202031267

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202031267 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：108140604　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 11 月 08 日

(51)Int. Cl.：　*A61K31/712* (2006.01)　*A61K31/7125* (2006.01)

C07H21/02 (2006.01)　*C07H21/04* (2006.01)

A61P1/16 (2006.01)　*A61P31/20* (2006.01)

(30)優先權：2018/11/08　美國　62/757,632

2019/05/31　美國　62/855,323

2019/09/30　美國　62/907,845

(71)申請人：美商艾利格斯醫療公司 (美國) ALIGOS THERAPEUTICS, INC.　(US)

美國

(72)發明人：畢戈曼　里歐尼德 BEIGELMAN, LEONID (US)；潘迪　瑞珍卓拉 PANDEY, RAJENDRA (US)；拉萬施　維韋克　庫瑪爾 RAJWANSHI, VIVEK KUMAR (US)；史密斯　大衛　伯納德 SMITH, DAVID BERNARD (US)；布雷特　勞倫斯 M BLATT, LAWRENCE M. (US)；洪　勁 HONG, JIN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：104 項　圖式數：23　共 219 頁

(54)名稱

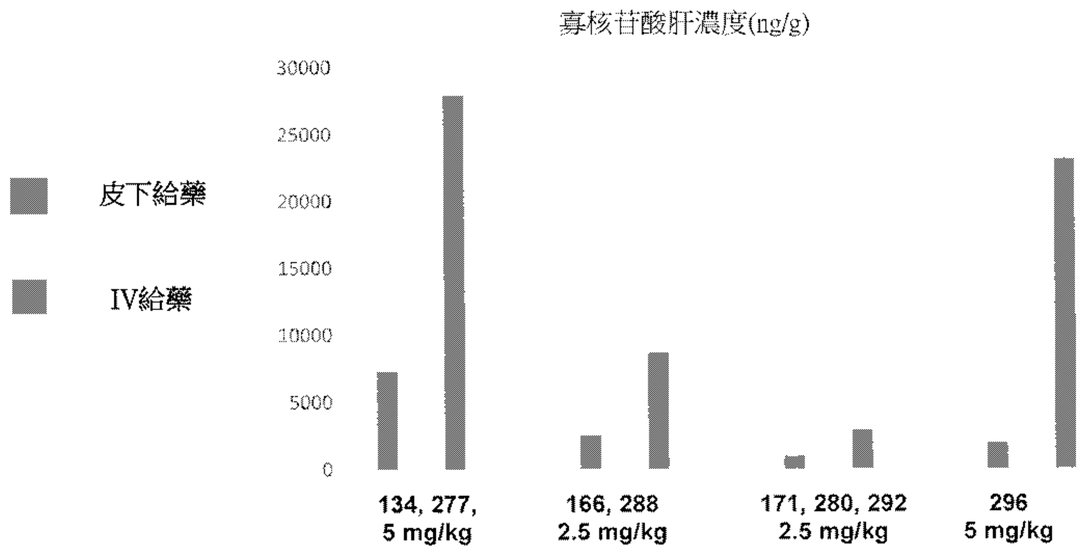
S-抗原運輸抑制寡核苷酸聚合物及方法

(57)摘要

各種實施例提供 STOPS™聚合物，其為 S-抗原運輸抑制寡核苷酸聚合物，其製造方法及使用其以治療疾病及病症之方法。在一些實施例中，該等 STOPS™修飾之寡核苷酸包括具有如本文所述修飾之交替 A 及 C 單元之至少部分硫代磷酸酯化序列。如藉由 HBsAg 分泌分析測定，STOPS™修飾之寡核苷酸之實施例對抗 B 型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係大於參考化合物之序列獨立性抗病毒活性。

Various embodiments provide STOPS™ polymers that are S-antigen transport inhibiting oligonucleotide polymers, processes for making them and methods of using them to treat diseases and conditions. In some embodiments the STOPS™ modified oligonucleotides include an at least partially phosphorothioated sequence of alternating A and C units having modifications as described herein. The sequence independent antiviral activity against hepatitis B of embodiments of STOPS™ modified oligonucleotides, as determined by HBsAg Secretion Assay, is greater than that of a reference compound.

指定代表圖：

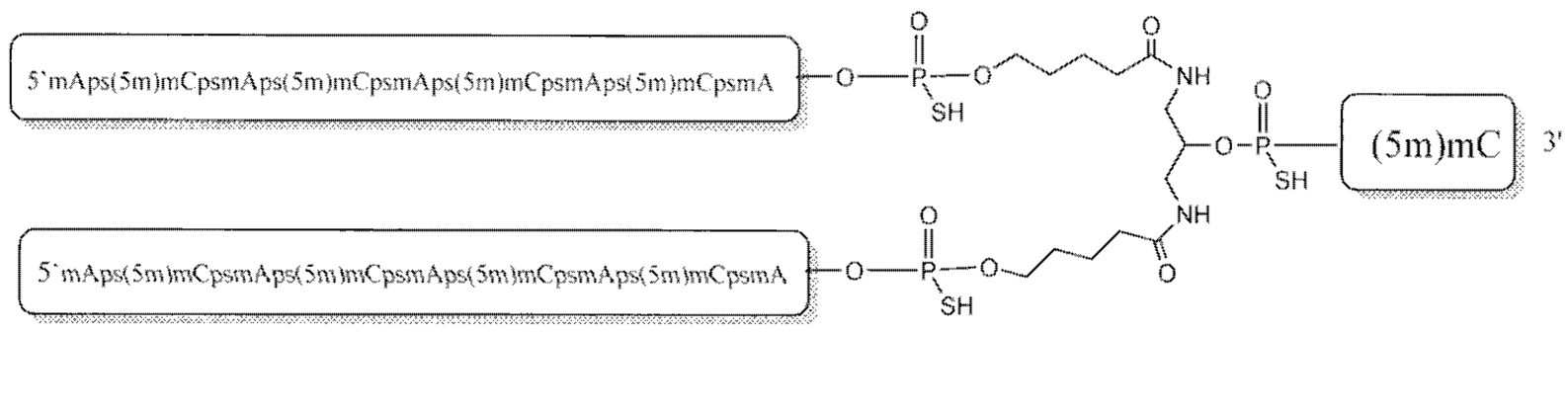


化合物編號及劑量

化合物編號(劑量)	134, 277, 284 (5 mg/kg)		166, 288 (2.5 mg/kg)		171, 280, 292 (2.5 mg/kg)		296 (5 mg/kg)	
途徑	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC
肝濃度(ng/g)	7350.5	27,942.5	2603	8711	1024.5	2938.5	1995.5	23,191.5

【圖12】

特徵化學式：



202031267

【發明摘要】

【中文發明名稱】

S-抗原運輸抑制寡核苷酸聚合物及方法

【英文發明名稱】

S-ANTIGEN TRANSPORT INHIBITING OLIGONUCLEOTIDE POLYMERS AND METHODS

【中文】

各種實施例提供STOPS™聚合物，其為S-抗原運輸抑制寡核苷酸聚合物，其製造方法及使用其以治療疾病及病症之方法。在一些實施例中，該等STOPS™修飾之寡核苷酸包括具有如本文所述修飾之交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列。如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™修飾之寡核苷酸之實施例對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係大於參考化合物之序列獨立性抗病毒活性。

【英文】

Various embodiments provide STOPS™ polymers that are S-antigen transport inhibiting oligonucleotide polymers, processes for making them and methods of using them to treat diseases and conditions. In some embodiments the STOPS™ modified oligonucleotides include an at least partially phosphorothioated sequence of alternating A and C units having modifications as described herein. The sequence independent antiviral activity against hepatitis B of embodiments of STOPS™ modified oligonucleotides, as determined by HBsAg Secretion Assay, is greater than that of a reference compound.

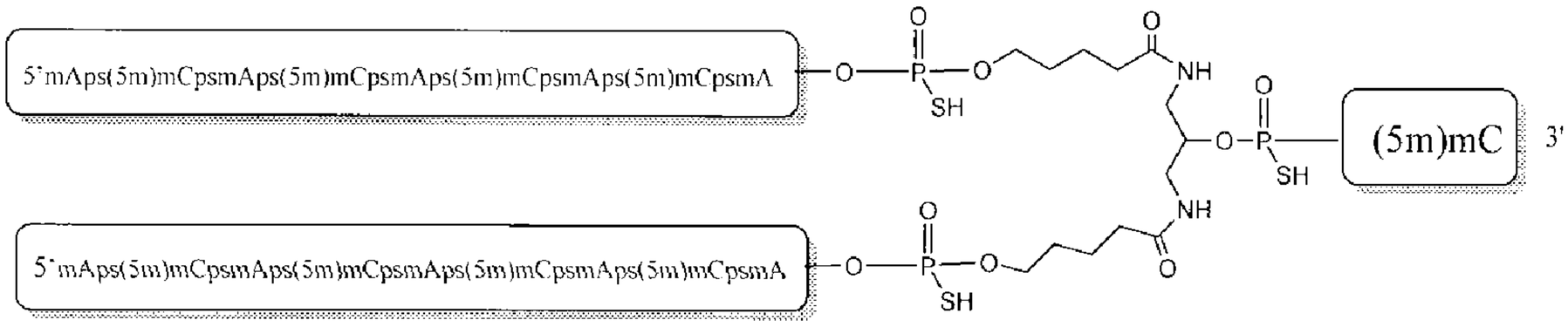
【指定代表圖】

圖12

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

S-抗原運輸抑制寡核苷酸聚合物及方法

【英文發明名稱】

S-ANTIGEN TRANSPORT INHIBITING OLIGONUCLEOTIDE POLYMERS AND METHODS

【技術領域】

【0001】 本申請案係關於STOPS™抗病毒化合物，其為S-抗原運輸抑制寡核苷酸聚合物，其製造方法及使用其以治療疾病及病症之方法。

【先前技術】

【0002】 本文描述之STOPS™化合物係抗病毒寡核苷酸，其可經至少部分硫代磷酸酯化並由非序列依賴性作用模式發揮其抗病毒活性。參見A. Vaillant, 「Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection」, Antiviral Research 133, 32-40 (2016)。儘管術語「核酸聚合物」 (NAP)不一定暗示抗病毒活性，但該術語已用於參考文獻中來係指等寡核苷酸。在21世紀初申請之許多專利申請案揭示某些特定化合物之結構並將各種結構選擇識別為用於進一步實驗之潛在區域。參見，例如，美國專利案第7,358,068；8,008,269；8,008,270及8,067,385號。此等努力導致將熟習此項技術者已知的化合物識別為REP 2139，具有所有胞嘧啶經5-甲基化及所有核糖經2'-O甲基修飾之重複之腺苷-胞苷(AC)單元之硫代磷酸酯化40-mer，連同該化合物被稱為其臨床起源，REP 2055。參見I. Roehl等人，「Nucleic Acid Polymers with

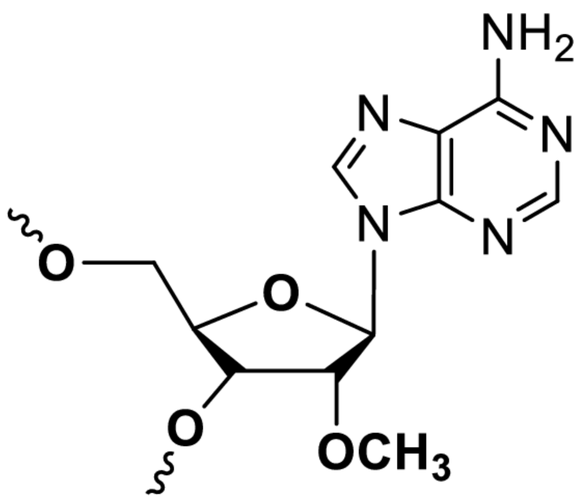
Accelerated Plasma and Tissue Clearance for Chronic Hepatitis B Therapy」, Molecular Therapy: Nucleic Acids，第8卷，1-12 (2017)。公開案之作者指示此等化合物之結構特徵已經最佳化用於治療B型肝炎(HBV)及D型肝炎 (HBD)。亦參見A. Vaillant, 「Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection」, Antiviral Research 133 (2016) 32-40。根據此等作者及相關參考文獻，此等化合物保留對抗HBV之抗病毒活性，同時防止藉由先天免疫反應識別以容許其與免疫療法(諸如聚乙二醇化干擾素)一起安全使用。然而，長期以來仍需在此類別中更有效之化合物。

【發明內容】

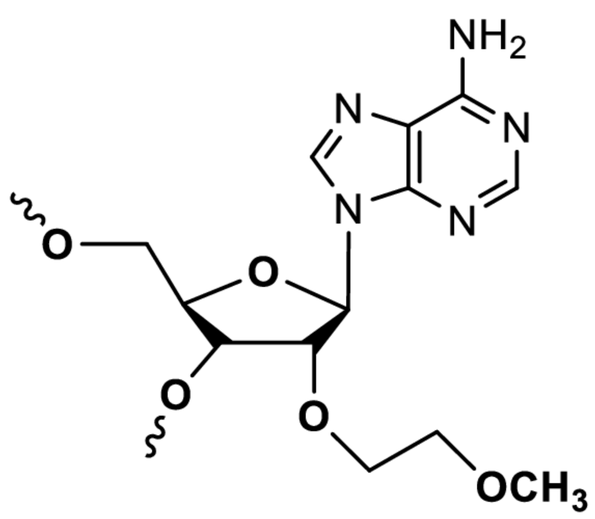
【0003】 現已發現，與在關於抗病毒化合物所需結構特徵之最佳組合之領域中之教示相反，經顯著改善之性質可藉由修飾其以提供如本文描述之STOPS™化合物獲得。例如，在一些實施例中，如藉由HBsAg分泌分析測定，新穎STOPS™化合物對抗HBV之序列獨立性抗病毒活性係大於參考化合物之序列獨立性抗病毒活性。鑒於多年來對以REP 2139之公認之最佳化結構告終之研究，熟習此項技術者幾乎已不期望本文描述之經修飾之STOPS™化合物之實施例將很可能顯示效價之此等改善。因此，新穎STOPS™化合物之結構及使用其以治療HBV及HBD之方法係意外且出乎意料的。

【0004】 本文描述之一些實施例係關於具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其可包括交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，其中：

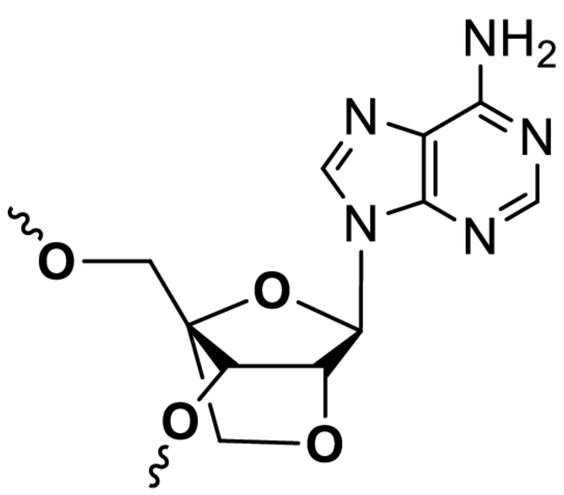
該等A單元包含一或多個選自以下：



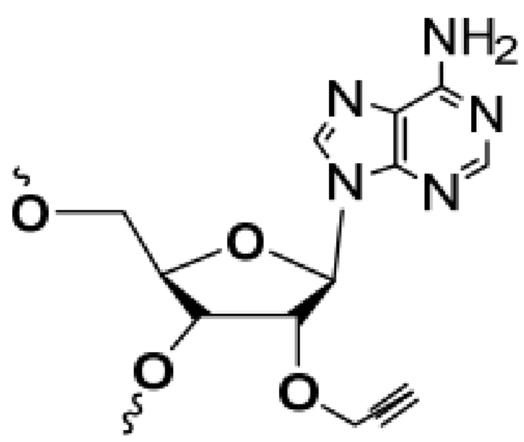
2'-OMe-A、



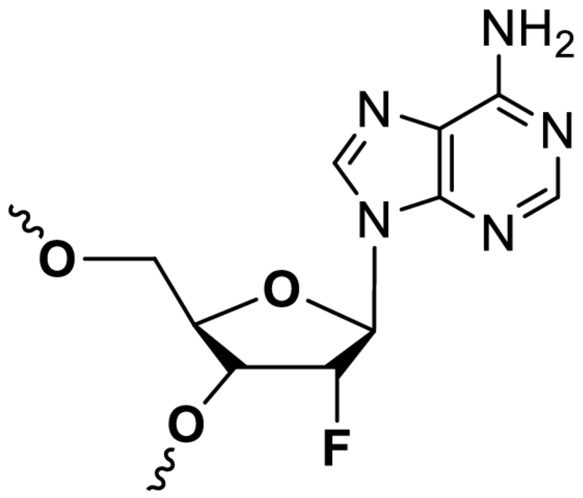
2'-O-MOE-A、



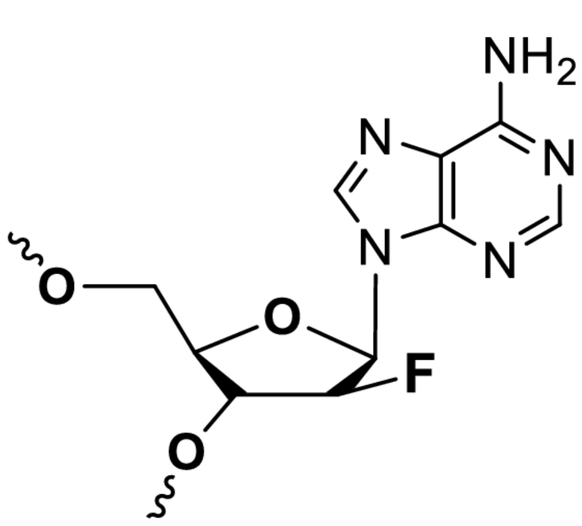
LNA-A、



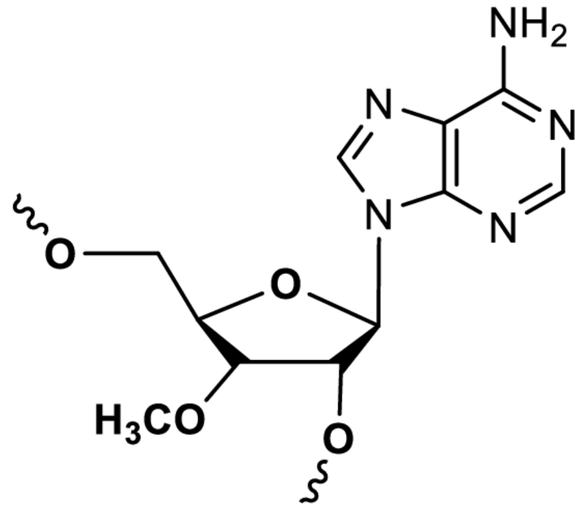
2'-O-丙炔基 -A、



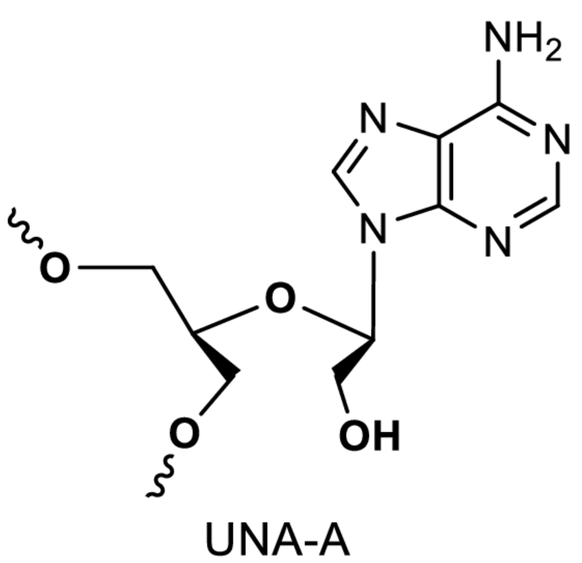
2'-F A、



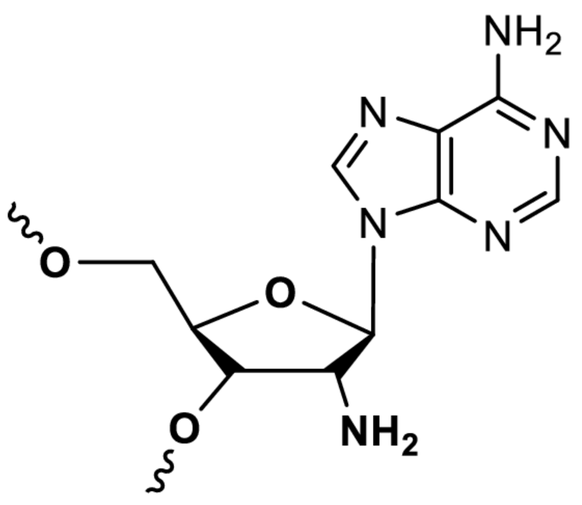
2'-araF A、



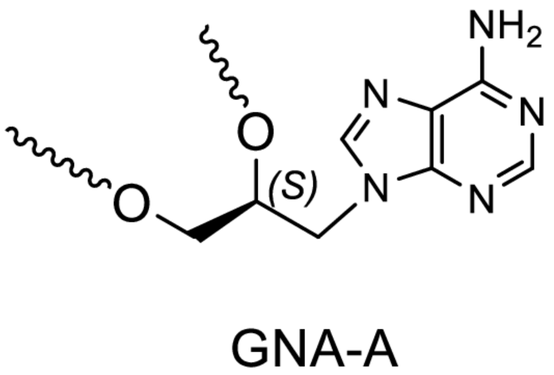
3'-OMe-A、



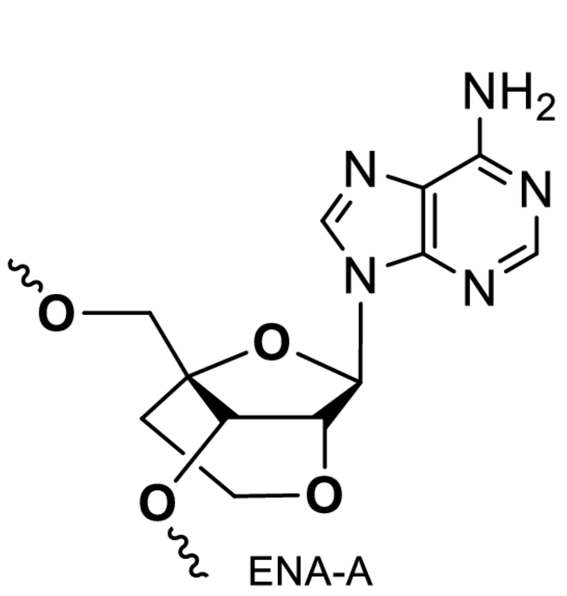
UNA-A、



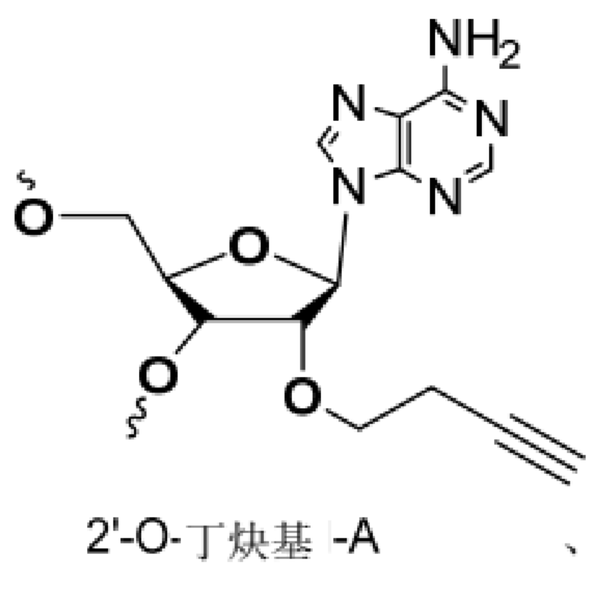
2'-NH_2-A、



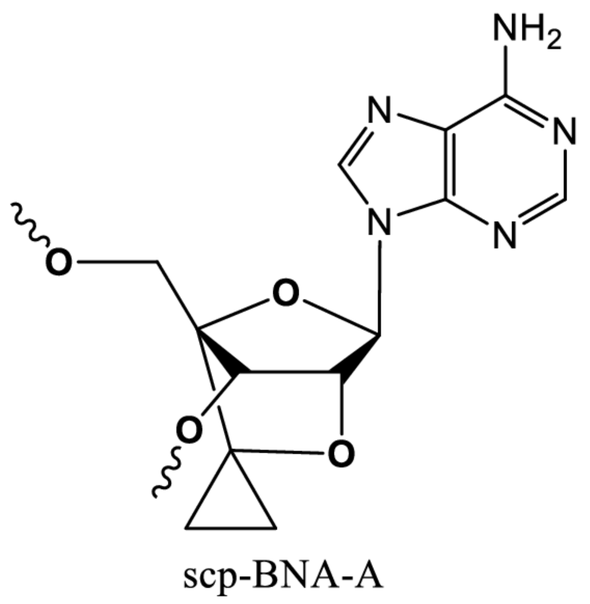
GNA-A、



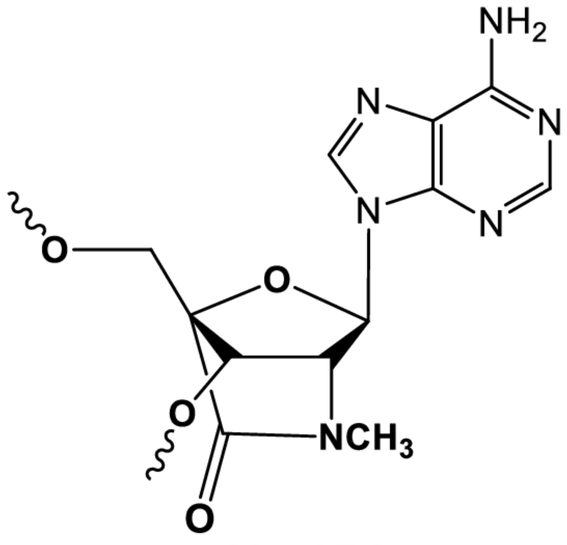
ENA-A、



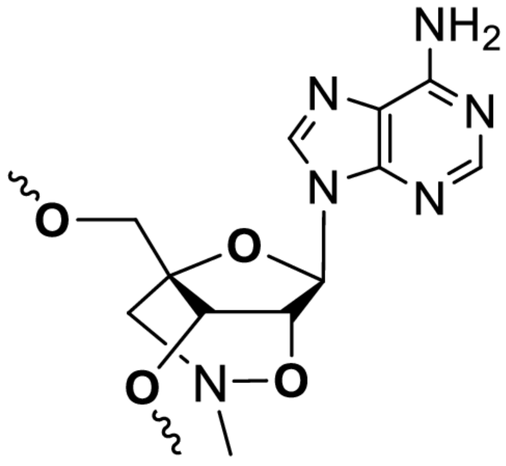
2'-O-丁炔基-A、



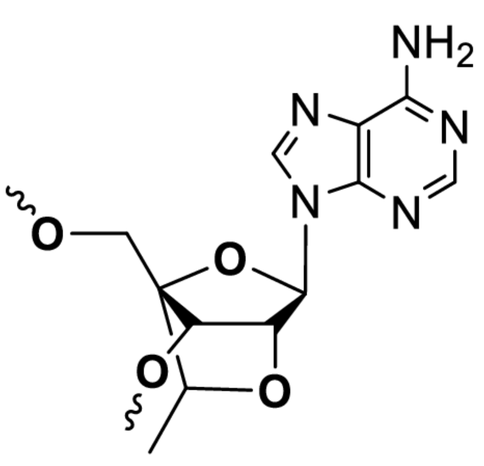
scp-BNA-A、



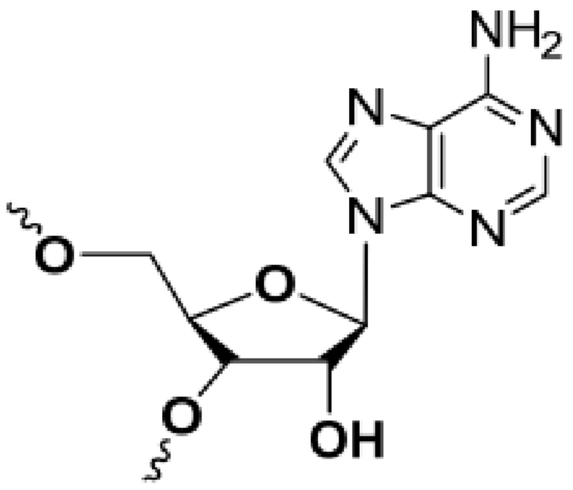
AmNA-(NMe)-A、



nmLNA-A、

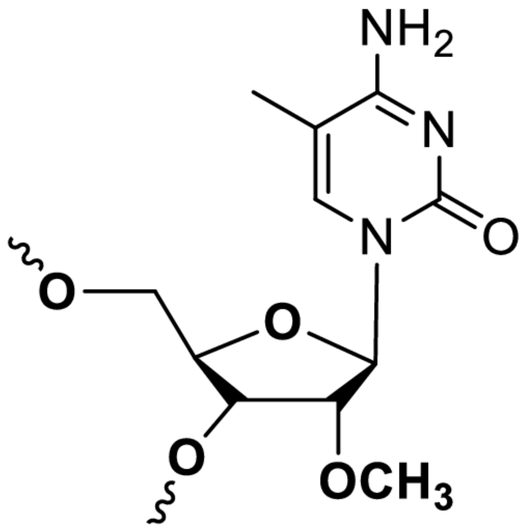


4etl-A及

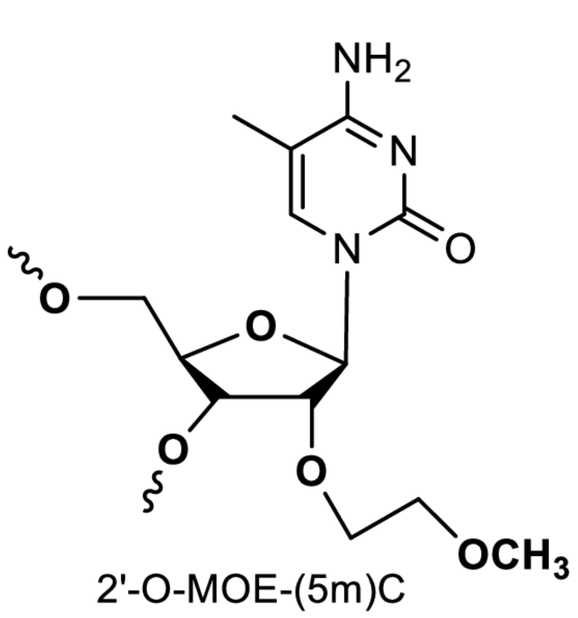


核糖-A；

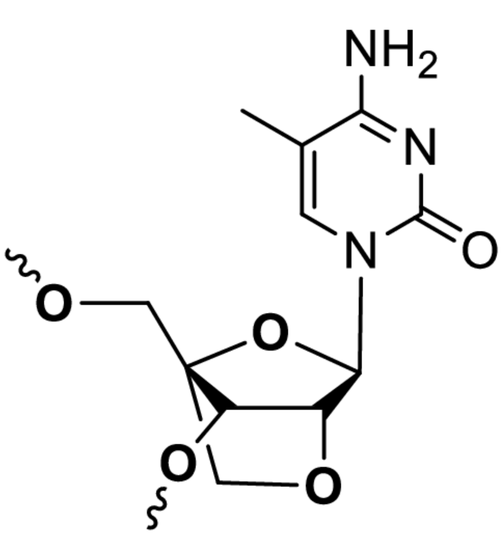
該等C單元包含一或多個選自以下：



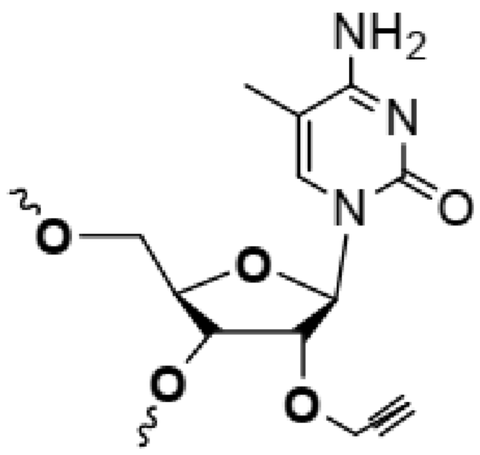
2'-OMe-(5m)C、



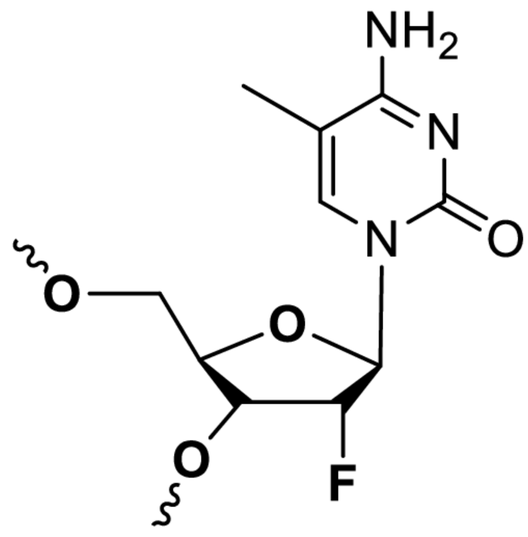
2'-O-MOE-(5m)C、



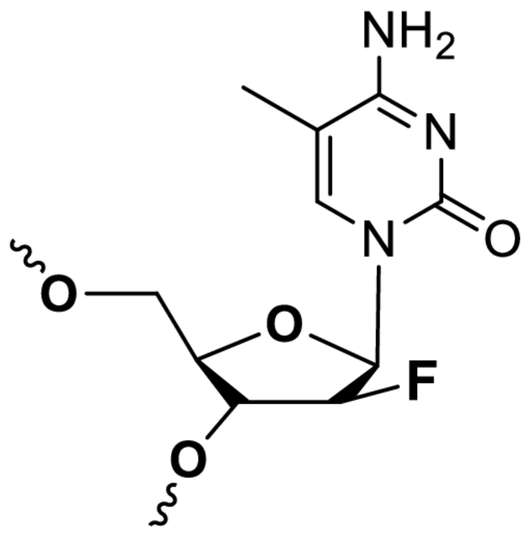
LNA-(5m)C、



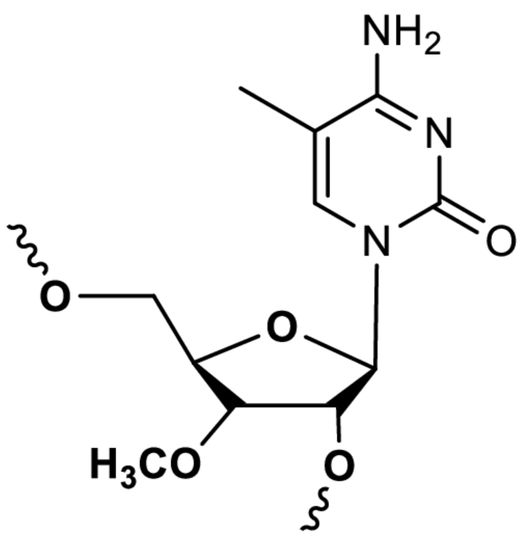
2'-O-丙炔基 - (5m)C 、



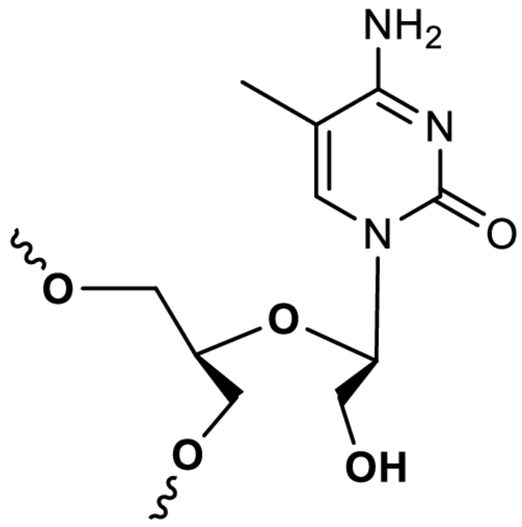
2'-F-(5m)C 、



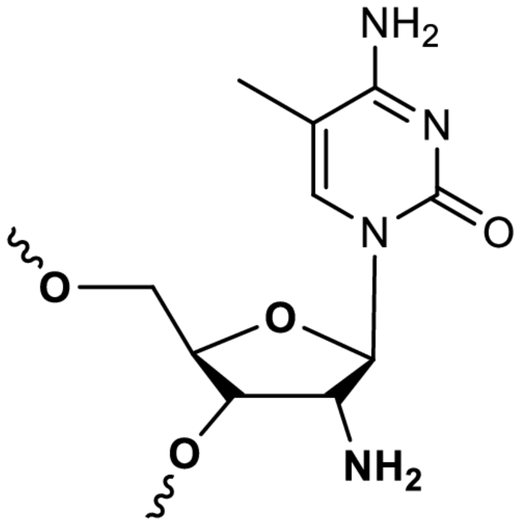
2'-araF-(5m)C 、



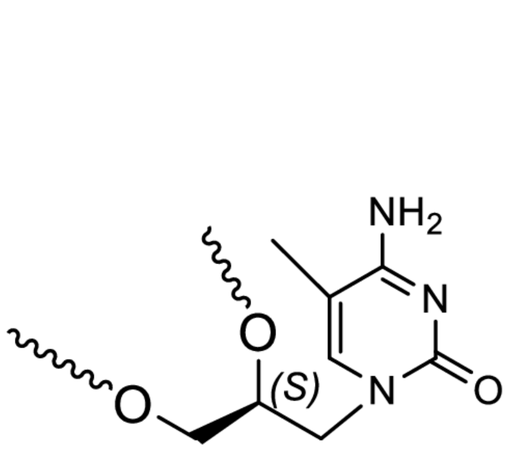
3'-OMe-(5m)C 、



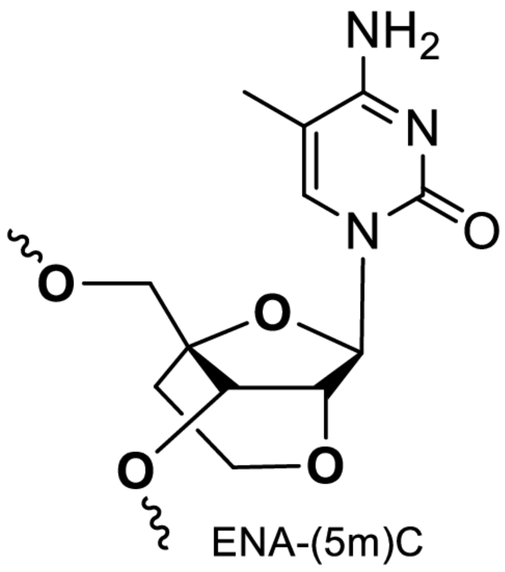
UNA-(5m)C 、



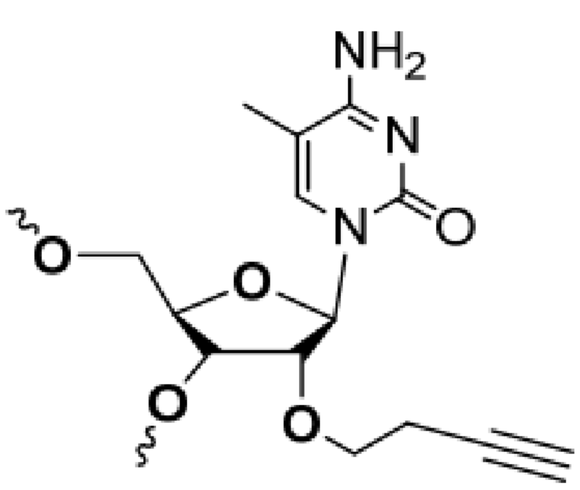
2'-NH_2- (5m)C 、



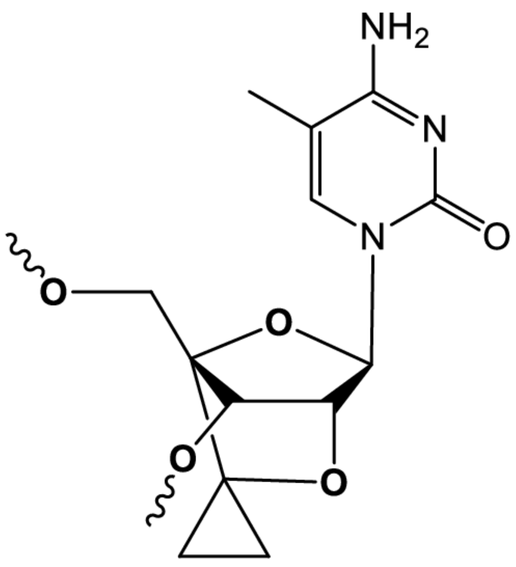
GNA-(5m)C 、



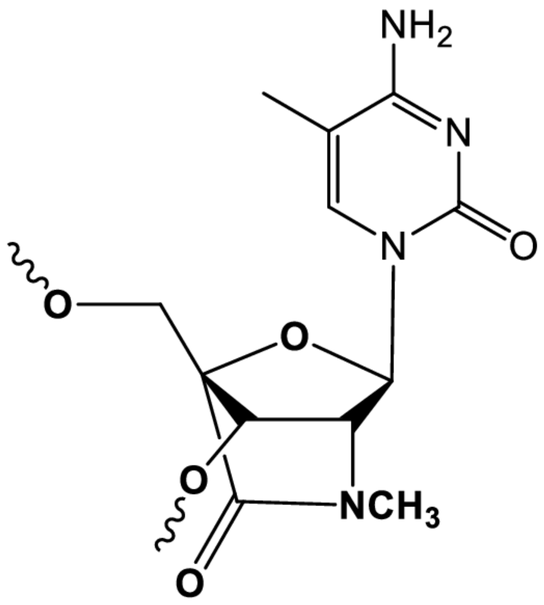
ENA-(5m)C 、



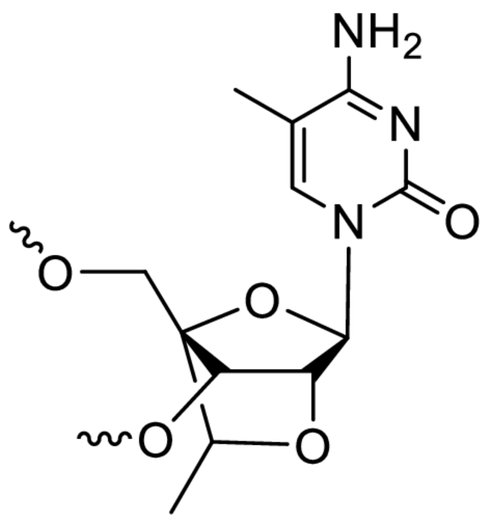
2'-O-丁炔基 - (5m)C 、



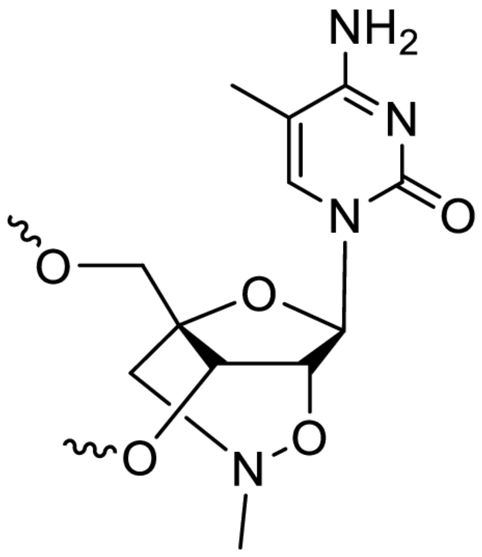
scp-BNA-(5m)C 、



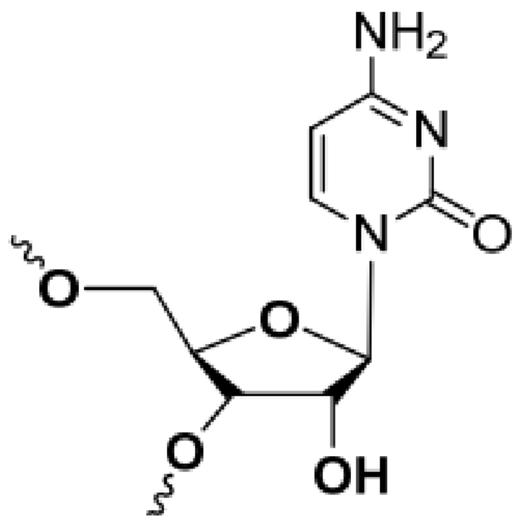
AmNA-(NMe)-(5m)C 、



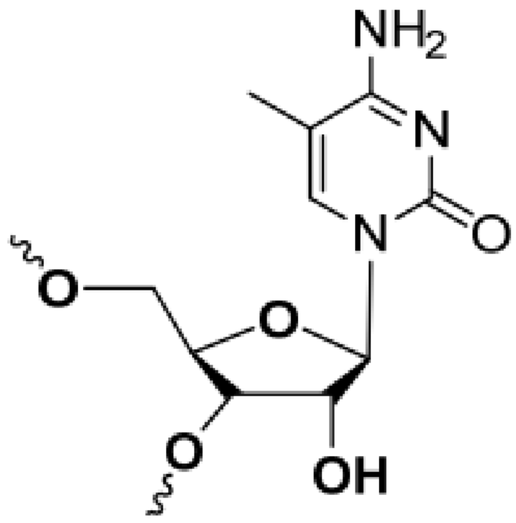
4etl-(5m)C 、



nmLNA-(5m)C 、



核糖-C 及



核糖-(5m)C ；

【0005】 各末端 ~~O 獨立地係羥基、硫代磷酸O,O-二氫酯、磷酸二氫酯、端帽或連接基；

【0006】 各內部 ~~O 係連接至鄰近A或C單元之含磷鍵聯，該含磷鍵聯為硫代磷酸酯鍵聯或選自磷酸二酯、硫代二磷酸酯、膦酸甲酯、硫代二磷酸酯、5’-磷醯胺酯、3’,5’-磷醯二胺酯、5’-硫代磷醯胺酯、3’,5’-硫代磷醯二胺酯或二磷酸二酯之經修飾鍵聯；及

【0007】 如藉由HBsAg分泌分析測定，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係大於參考化合物之序列獨立性抗病毒活性；

【0008】 條件為，當交替A及C單元之序列包含核糖-A單元時，該序列進一步包含至少一個A單元不為核糖-A單元；及

【0009】 條件為，當交替A及C單元之序列包含核糖-C單元時，該序列進一步包含至少一個C單元不為核糖-C單元。

【0010】 本文描述之一些實施例係關於治療HBV及/或HDV感染之方法，其可包括向經識別為罹患HBV及/或HDV感染之個體投與有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸之醫藥組合物。

【0011】 本文揭示之一些實施例係關於抑制HBV及/或HDV之複製之方法，其可包括使感染感染HBV及/或HDV之細胞與有效量之如本文描

述之經修飾之寡核苷酸，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸之醫藥組合物接觸。

【0012】 此等其他實施例係更詳細描述於下文中。

【圖式簡單說明】

【0013】 圖1闡述包含C_{2-6}伸烷基鍵聯之經修飾之寡核苷酸之實施例。

【0014】 圖2闡述包含環氧丙烷鍵聯之經修飾之寡核苷酸之實施例。

【0015】 圖3A闡述具有經由5’三縮四乙二醇(TEG)鍵聯結合之膽固醇之經修飾之寡核苷酸之實施例。

【0016】 圖3B闡述具有經由3’TEG鍵聯結合之膽固醇之經修飾之寡核苷酸之實施例。

【0017】 圖3C闡述具有經由5’TEG鍵聯結合之生育酚(維生素E)之經修飾之寡核苷酸之實施例。

【0018】 圖3D闡述具有經由3’TEG鍵聯結合之生育酚(維生素E)之經修飾之寡核苷酸之實施例。

【0019】 圖4A及4B闡述具有經由連接基結合之GalNac之經修飾之寡核苷酸之實施例。

【0020】 圖5闡述用於製備5’-EP建構組元之反應方案之實施例。

【0021】 圖6A闡述經修飾之寡核苷酸及對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性(如藉由HBsAg分泌分析測定)及細胞毒性之相應值之實施例。

【0022】 圖6B闡述經修飾之寡核苷酸及對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性(如藉由HBsAg分泌分析測定)及細胞毒性之相應值之實施例。

【0023】 圖7闡述用於製備化合物5’-VP之反應方案之實施例。

【0024】 圖8闡述用於製備8-5及8-6化合物之反應方案之實施例。

【0025】 圖9A闡述用於製備化合物9R之反應方案之實施例。

【0026】 圖9B闡述用於製備化合物9S之反應方案之實施例。

【0027】 圖10闡述用於製備化合物10-5及10-6之反應方案之實施例。

【0028】 圖11A闡述用於製備化合物11R之反應方案之實施例。

【0029】 圖11B闡述用於製備化合物11S之反應方案之實施例。

【0030】 圖12闡述在向非人類靈長類動物皮下投與經修飾之寡核苷酸化合物之實施例後之肝曝露結果。

【0031】 圖13闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0032】 圖14闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0033】 圖15闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0034】 圖16闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0035】 圖17闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0036】 圖18闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0037】 圖19闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸

化合物之實施例之免疫反應。

【0038】 圖20闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0039】 圖21闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0040】 圖22闡述PBMC分析結果，該結果闡述經修飾之寡核苷酸化合物之實施例之免疫反應。

【0041】 圖23闡述結合實例B3及B4中描述之HBsAg分泌分析使用之圖。

【實施方式】

相關申請案資訊

【0042】 本申請案主張對2018年11月8日申請之美國序列第62/757,632號；2019年5月31日申請之美國序列第62/855,323號；及2019年9月30日申請之美國序列第62/907,845號之優先權。前述中之各者係以全文引用之方式併入本文中。

定義

【0043】 除非另有定義，否則本文使用之所有技術及科學術語具有與由一般技術者通常瞭解之含義相同之含義。除非另有規定，否則本文參考之所有專利案、申請案、公開之申請案及其他公開案係以全文引用之方式併入本文中。除非本文另有規定，否則在本文術語具有複數個定義之情況下，以彼等於此部分中者為準。

【0044】 B型肝炎病毒(HBV)係DNA病毒及嗜肝病毒科(*Hepadnaviridae*)家族之成員。全球HBV感染超過3億且係肝癌及肝疾病(諸如慢性肝炎、肝硬化及肝細胞癌)之病原體。HBV可為急性及/或慢性

的。急性HBV感染可為無症狀性或呈症狀性急性肝炎。將HBV分類為八種基因型，A至H。

【0045】 HBV係約3.2千鹼基(kb)對之部分雙股環狀DNA。HBV複製途徑已經詳細研究。T.J. Liang, Heptaology (2009) 49(5 Suppl):S13-S21。複製之一部分包括共價閉合環(cccDNA)形式之形成。cccDNA之存在引起在宿主生物體整個生命週期內病毒再度出現之風險。HBV攜帶者可傳播疾病多年。估計2.57億人感染B型肝炎病毒感染生活，且估計全球每年超過750,000人死於B型肝炎。另外，經免疫抑制之個體或正經化學療法之個體係尤其在再活化HBV感染之風險下。

【0046】 HBV可由血液、精液及/或其他體液傳播。此可通過直接血液與血液接觸、無保護性行為、共用針頭及在分娩過程中自經感染之母親傳播至其嬰兒發生。HBV表面抗原(HBsAg)最常用於篩選此感染之存在。目前可用之藥物無法治癒HBV及/或HDV感染。當然，該等藥物抑制病毒之複製。

【0047】 D型肝炎病毒(HDV)係DNA病毒，亦於病毒之嗜肝病毒科家族中。HDV僅可在HBV之存在下傳播。HDV之傳播途徑係類似於HBV之傳播途徑。HDV之傳播可經由同時感染HBV (共感染)或除慢性B型肝炎或B型肝炎攜帶狀態(重複感染)外發生。相較於單獨感染HBV，重複感染及共感染HDV兩者均導致更嚴重之併發症。此等併發症包括在急性感染中經歷肝衰竭之更大可能性並迅速進展為肝硬化，及在慢性感染中發展肝癌之風險增加。與B型肝炎組合，D型肝炎具有所有肝炎感染之最高死亡率，為20%。目前尚無用於D型肝炎之治癒方法或疫苗。

【0048】 如本文在寡核苷酸或其他材料之內文中使用，術語「抗病

毒」具有如由熟習此項技術者瞭解之其通常含義且因此包括抑制病毒顆粒產生之寡核苷酸或其他材料之存在之效應，通常藉由減少在另外適用於針對至少一種病毒形成感染性病毒顆粒之系統中形成之感染性病毒顆粒之數量。在某些實施例中，該抗病毒寡核苷酸具有對抗多種不同病毒(例如，HBV及HDV兩者)之抗病毒活性。

【0049】 如本文使用，術語「寡核苷酸(oligonucleotide)」 (或「寡核苷酸(oligo)」)具有如由熟習此項技術者瞭解之其通常含義且因此係指包括寡脫氧核苷酸、寡脫氧核糖核苷酸及寡核糖核苷酸之一類化合物。因此，「寡核苷酸」係指核糖核酸(RNA)或脫氧核糖核酸(DNA)或其模擬物之寡聚物或聚合物，包括對寡核苷酸之參考，其由天然生成之核鹼基、糖及磷酸二酯(PO)核苷間(主鏈)鍵聯及具有功能類似之非天然生成之部分之「經修飾」或經取代之寡核苷酸構成。因此，術語「經修飾」 (或「經取代」)之寡核苷酸具有如由熟習此項技術者瞭解之其通常含義並包括具有各種修飾(例如，穩定修飾)中之一者或多者之寡核苷酸，且因此可包括在核苷間鍵聯中及/或在核糖上及/或在鹼基上之至少一種修飾。例如，經修飾之寡核苷酸可包括於核糖之2'-位置之修飾、無環核苷酸類似物、鹼基之甲基化、硫代磷酸酯化(PS)鍵聯、硫代二磷酸酯鍵聯、膦酸甲酯鍵聯、經由硫或氮連接至糖環之鍵聯，及/或如本文別處描述之其他修飾。因此，經修飾之寡核苷酸可包括一或多個硫代磷酸酯化(PS)鍵聯，而非PO鍵聯或除PO鍵聯外。如同未經修飾之寡核苷酸，包括此等PS鍵聯之經修飾之寡核苷酸被認為屬於相同類別化合物，因為即使該PS鍵聯含有磷-硫雙鍵而非PO鍵聯之磷-氧雙鍵，PS及PO鍵聯兩者經由氧原子連接至糖環。

【0050】 如本文在經修飾之寡核苷酸之內文中使用，術語「硫代磷酸酯化」寡核苷酸具有如由熟習此項技術者瞭解之其通常含義且因此係指經修飾之寡核苷酸，其中所有磷酸二酯核苷間鍵聯已經硫代磷酸酯鍵聯置換。因此，熟習此項技術者瞭解術語「硫代磷酸酯化」寡核苷酸係與「完全硫代磷酸酯化」寡核苷酸同義。硫代磷酸酯化寡核苷酸(或部分硫代磷酸酯化寡核苷酸內之硫代磷酸酯化寡核苷酸之序列)可經類似修飾，包括(例如)藉由由磷酸二酯鍵聯置換一或多個硫代磷酸酯化核苷間鍵聯。因此，術語「經修飾之硫代磷酸酯化」寡核苷酸係指硫代磷酸酯化寡核苷酸已以與本文關於寡核苷酸描述之方式類似之方式經修飾，例如，藉由用經修飾鍵聯(諸如磷酸二酯、硫代二磷酸酯、膦酸甲酯、硫代二磷酸酯、5’-磷醯胺酯、3’,5’-磷醯二胺酯、5’-硫代磷醯胺酯、3’,5’-硫代磷醯二胺酯或二磷酸二酯)置換硫代磷酸酯化鍵聯。經修飾之寡核苷酸之至少部分硫代磷酸酯化序列可經類似修飾，且因此，例如，可經修飾以含有非硫代磷酸酯化鍵聯(諸如磷酸二酯、硫代二磷酸酯、膦酸甲酯、硫代二磷酸酯、5’-磷醯胺酯、3’,5’-磷醯二胺酯、5’-硫代磷醯胺酯、3’,5’-硫代磷醯二胺酯或二磷酸二酯)。在描述對硫代磷酸酯化寡核苷酸，或對經修飾之寡核苷酸之至少部分硫代磷酸酯化序列之修飾之內文中，藉由包括磷酸二酯鍵聯之修飾可分別被認為導致經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸，或對經修飾之硫代磷酸酯化序列之修飾。類似地，在描述對寡核苷酸，或對經修飾之寡核苷酸之經至少部分磷酸二酯化之序列之修飾之內文中，包括硫代磷酸酯化鍵聯可分別被認為導致經修飾之寡核苷酸或經修飾之磷酸二酯化之序列。

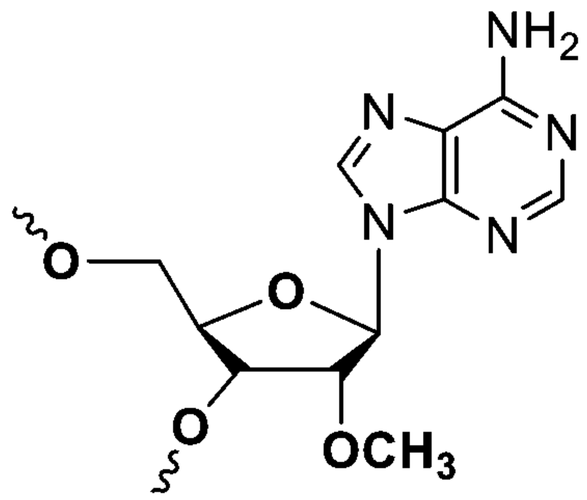
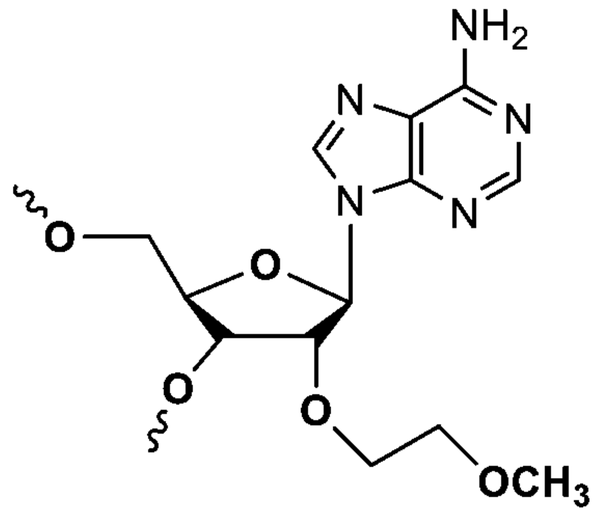
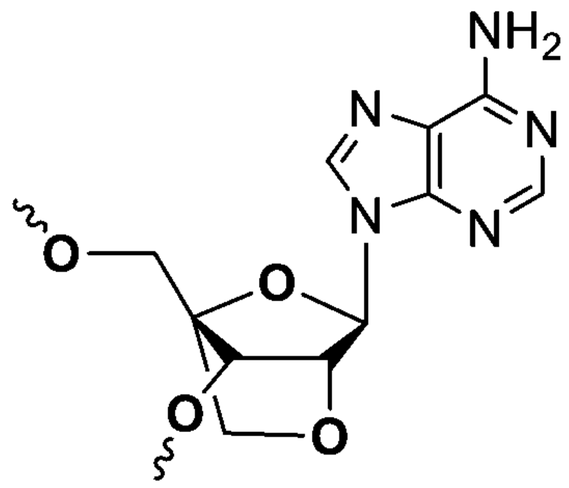
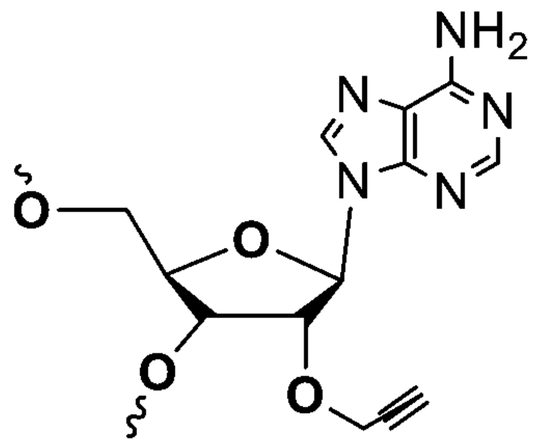
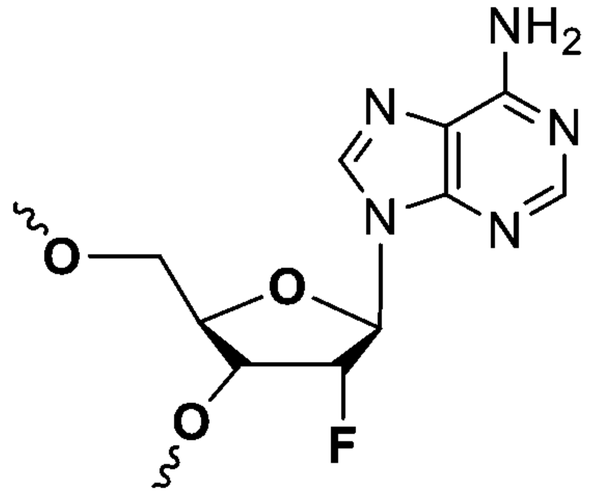
【0051】 如本文在二核苷酸或寡核苷酸之內文中使用，術語「立體

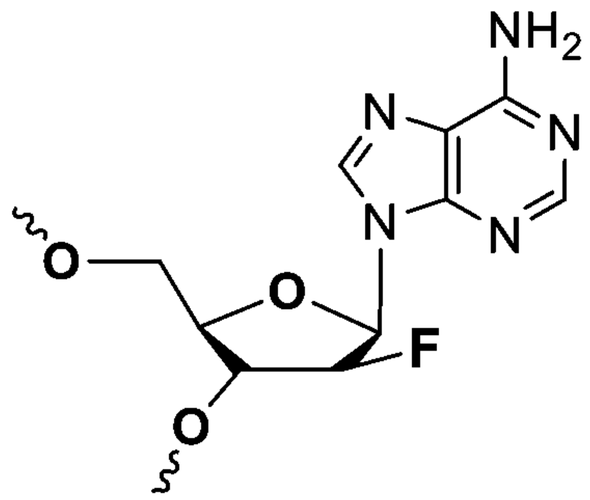
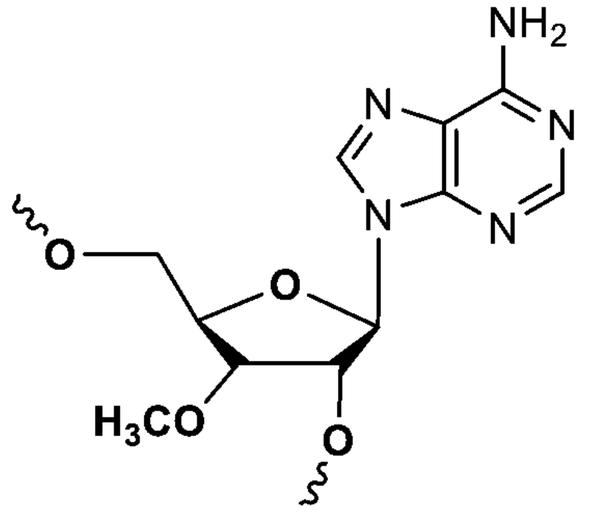
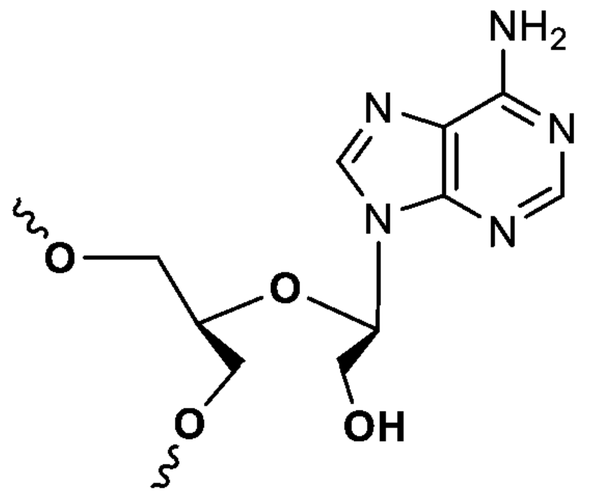
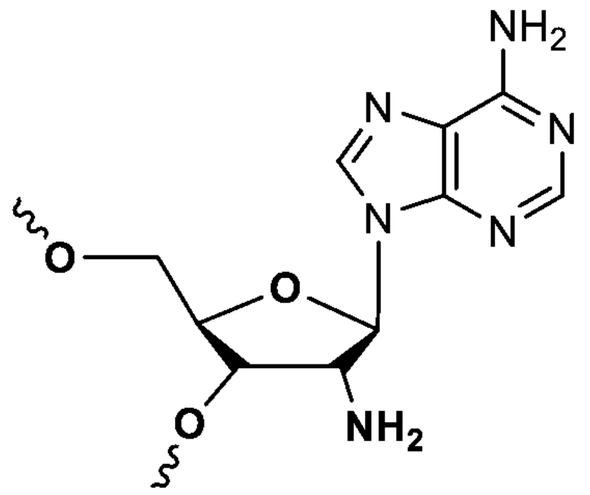
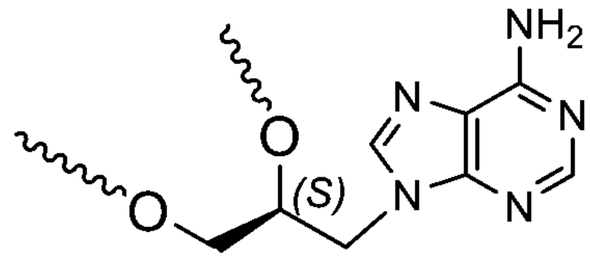
化學定義之硫代磷酸酯鍵聯」具有如由熟習此項技術者瞭解之其通常含義且因此係指具有具有所選對掌性(R或S構型)之磷立體中心之硫代磷酸酯鍵聯。可將含有此二核苷酸或寡核苷酸之組合物富集於具有所選對掌性之分子中。此組合物之立體純度可在廣泛範圍內變化，例如自約51%至約100%立體純。在各種實施例中，該立體純度係大於55%、65%、75%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%；或在經定義為具有前述立體純度值中之任何兩者作為端點之範圍內。

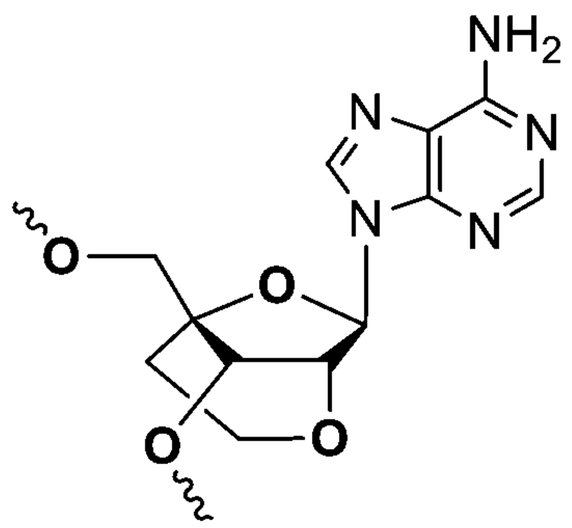
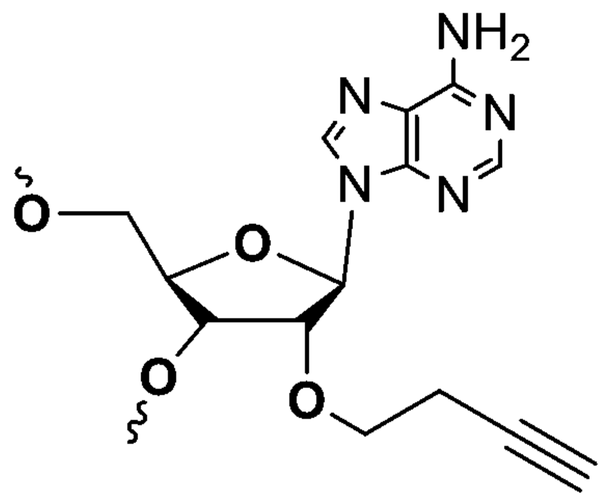
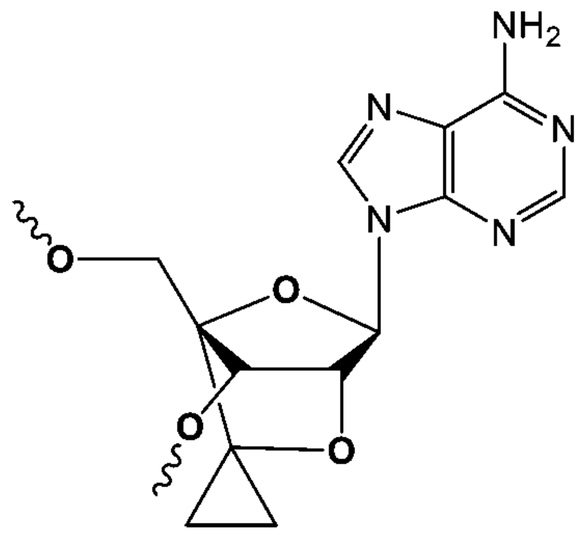
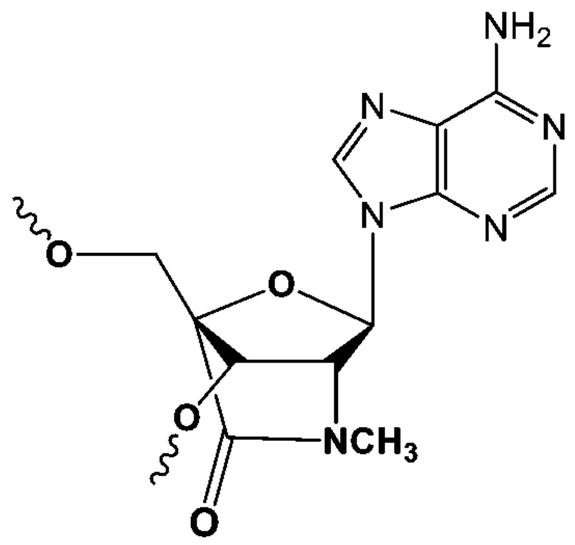
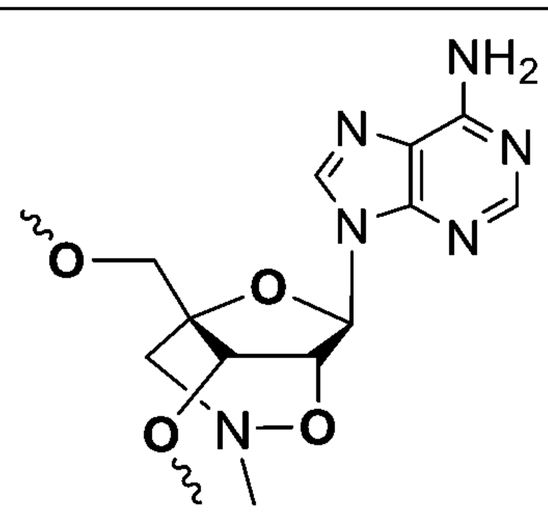
【0052】 術語「序列獨立性」抗病毒活性具有如由熟習此項技術者瞭解之其通常含義且因此係指獨立於寡核苷酸之序列之寡核苷酸(例如，經修飾之寡核苷酸)之抗病毒活性。用於確定寡核苷酸之抗病毒活性是否為序列獨立性之方法係為熟習此項技術者已知且包括用於確定寡核苷酸是否主要藉由如美國專利案第7,358,068；8,008,269；8,008,270及8,067,385號之實例10中揭示之非序列互補作用模式發揮作用之測試，該等美國專利案係以引用之方式併入本文中且尤其用於描述此等測試之目的。

【0053】 在描述具有序列獨立性抗病毒活性且包含A及C單元(例如，交替A及C單元，或AC單元)之序列(例如，至少部分硫代磷酸酯化序列)之經修飾之寡核苷酸之內文中，術語「A」及「C」係指下表1及2中分別闡述之經修飾之含有腺苷(A)之單元及經修飾之含有胞嘧啶(C)之單元。

表1：「A」單元

縮寫(A單元)	結構(A單元)
2'-OMe-A	
2'-O-MOE-A	
LNA-A	 LNA-A
2'-O-丙炔基-A	
2'-F-A	

縮寫(A單元)	結構(A單元)
2'-araF-A	
3'-OMe-A	
UNA-A	
2'-NH_2-A	
GNA-A	

縮寫(A單元)	結構(A單元)
ENA-A	
2'-O-丁炔基-A	
scp-BNA-A	
AmNA(NMe)-A	
nmLNA-A	

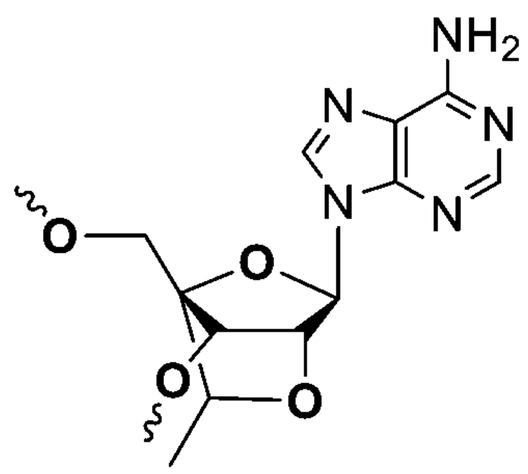
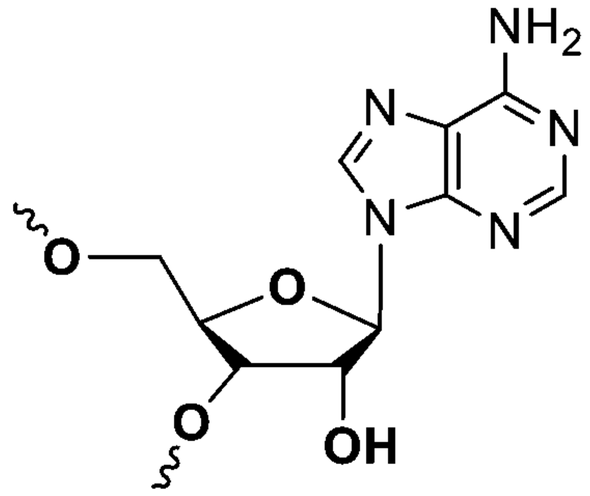
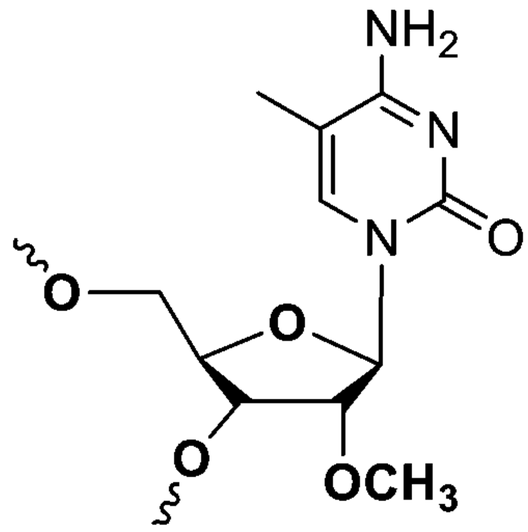
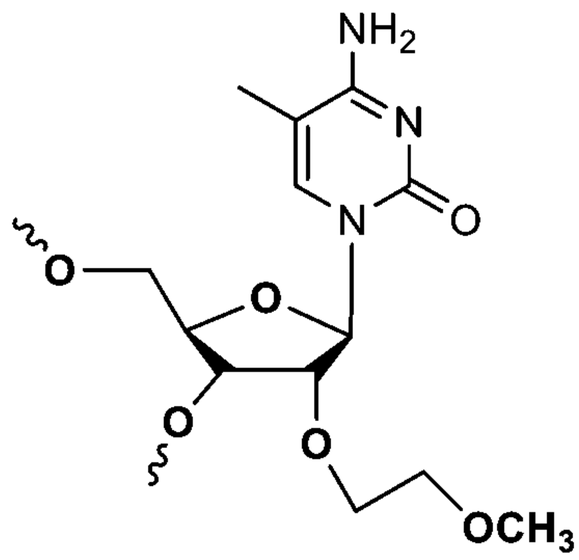
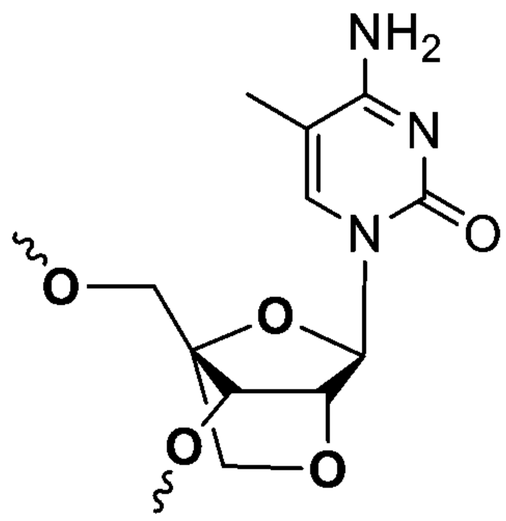
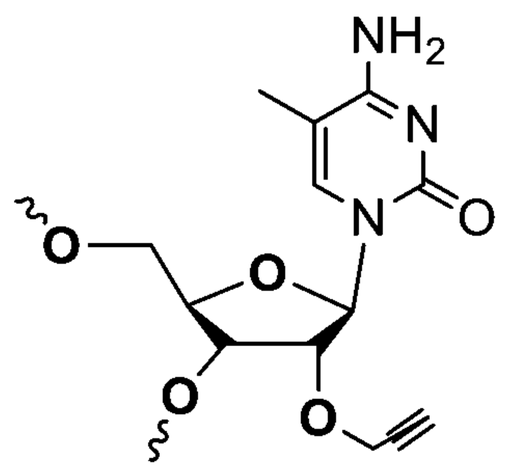
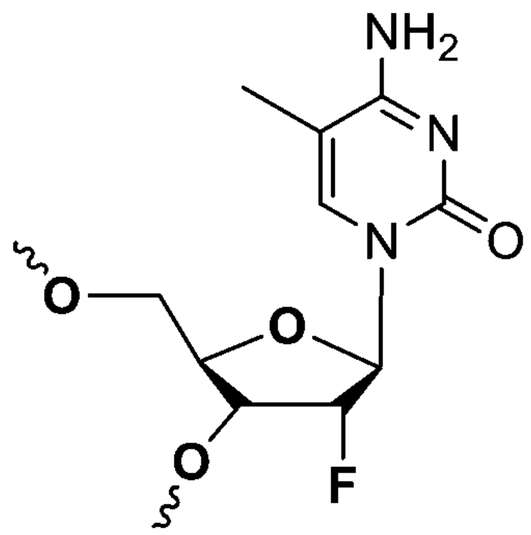
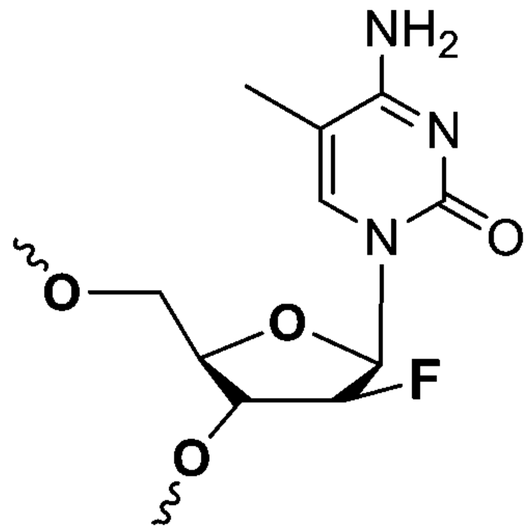
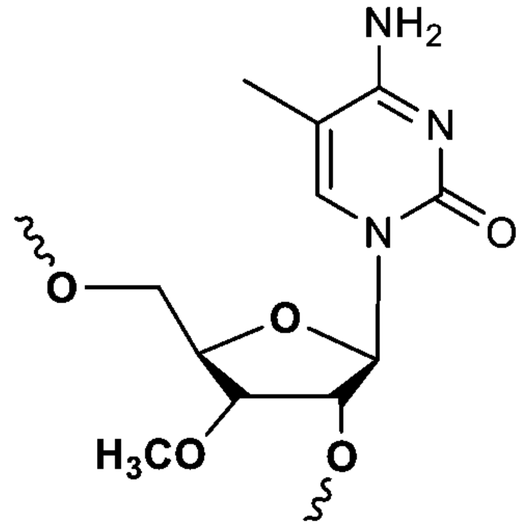
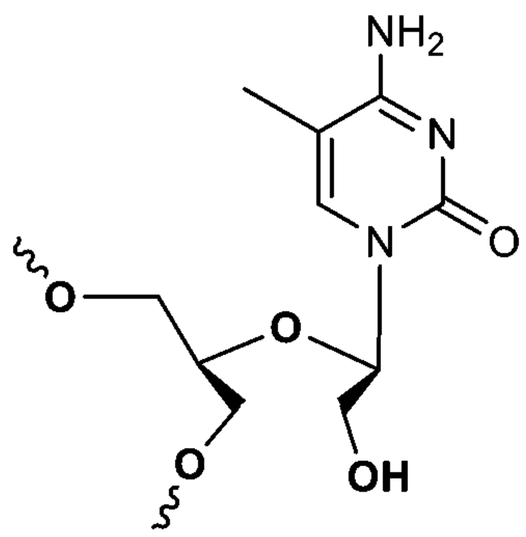
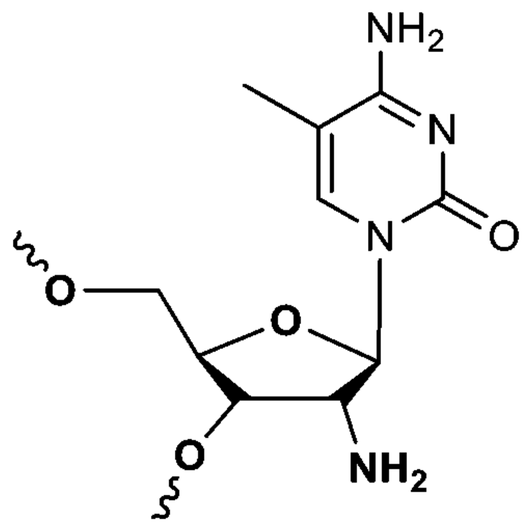
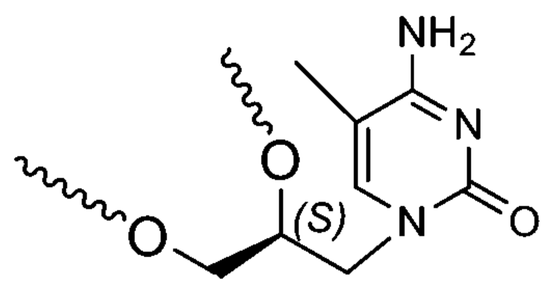
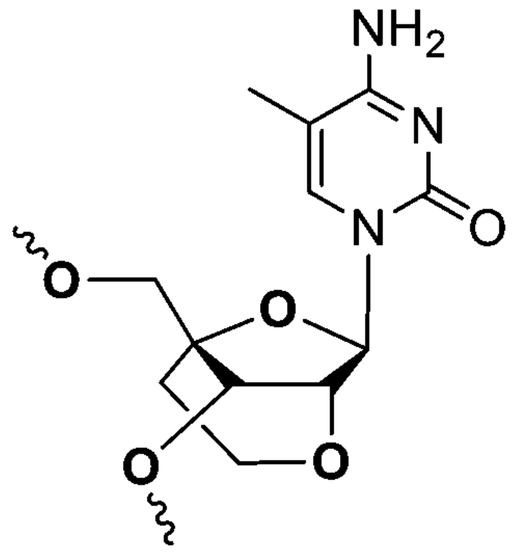
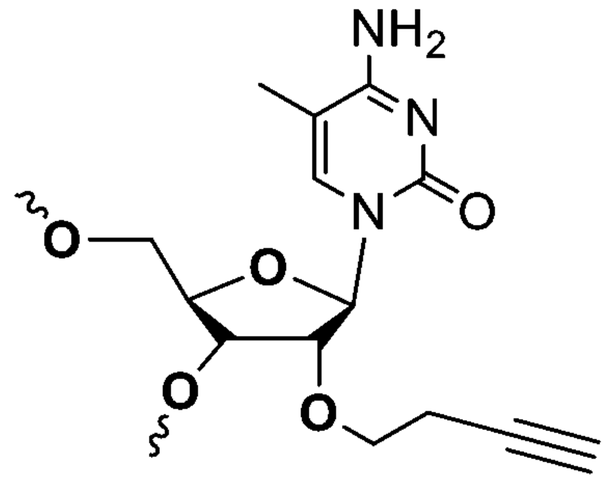
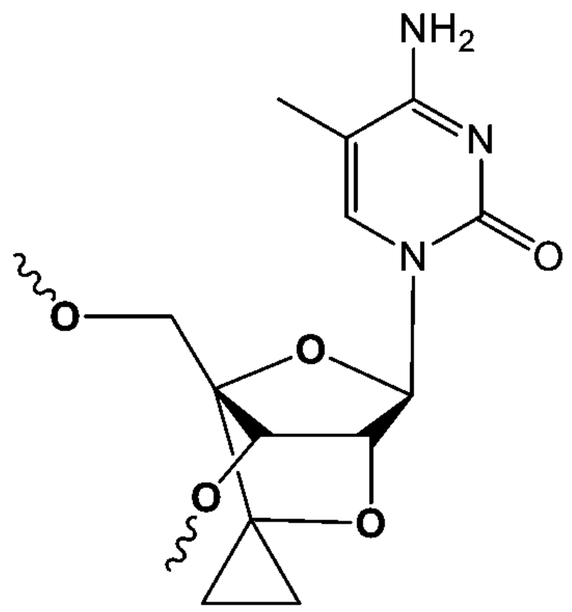
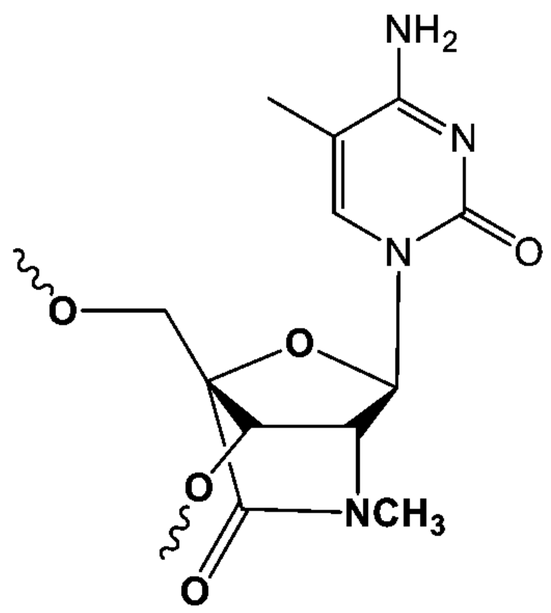
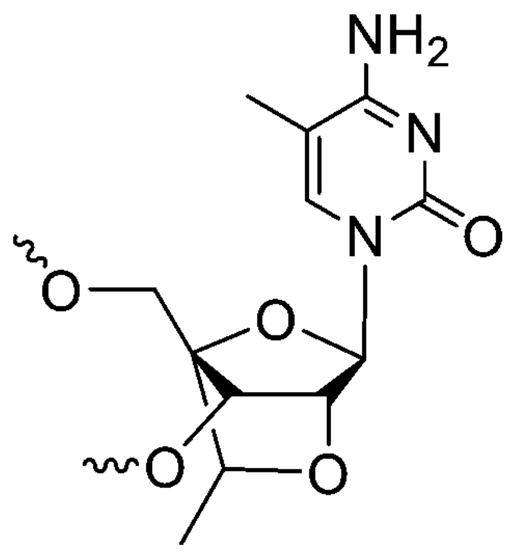
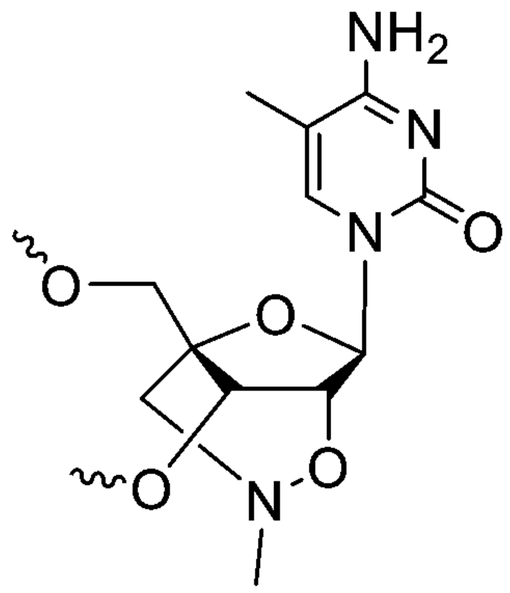
縮寫(A單元)	結構(A單元)
4etl-A	
核糖-A	

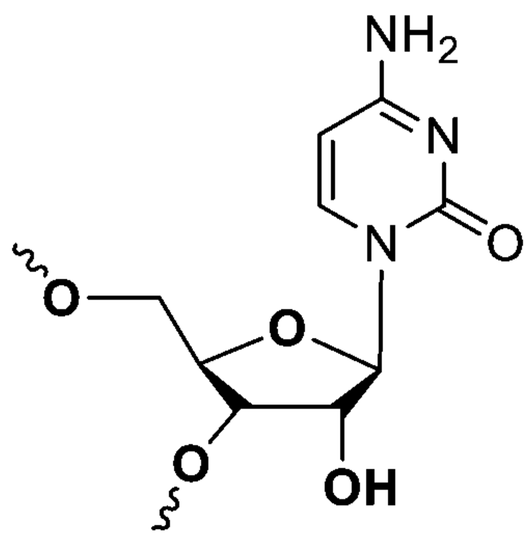
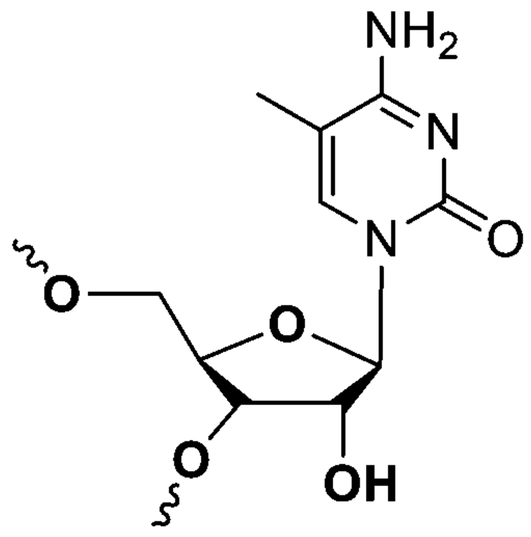
表2：「C」單元

縮寫(C單元)	結構(C單元)
2'-OMe-(5m)C	
2'-O-MOE-(5m)C	

縮寫(C單元)	結構(C單元)
LNA-(5m)C	 LNA-5mC
2'-O-丙炔基-(5m)C	
2'-F-(5m)C	
2'-araF-(5m)C	
3'-OMe-(5m)C	

縮寫(C單元)	結構(C單元)
UNA-(5m)C	
2'-NH_2-(5m)C	
GNA-(5m)C	
ENA-(5m)C	
2'-O-丁炔基-(5m)C	

縮寫(C單元)	結構(C單元)
scp-BNA-(5m)C	
AmNA-(NMe)-(5m)C	
4etl-(5m)C	
nmLNA-(5m)C	

縮寫(C單元)	結構(C單元)
核糖-C	
核糖-(5m)C	

經修飾之寡核苷酸化合物

【0054】一實施例提供具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之STOPS™修飾之寡核苷酸化合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，其中該等A單元係選自彼等表1中闡述者之任何一者或多者，及該等C單元係選自彼等表2中闡述者之任何一者或多者。A及C單元之各種組合可包括於經至少部分硫代磷酸酯化AC序列中，包括下表3中描述之組合。

表3：AC單元之實例

編號	A單元	C單元
1	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C
2	2'-OMe-A	2'-O-MOE-(5m)C
3	2'-OMe-A	LNA-(5m)C
4	2'-OMe-A	ENA-(5m)C
5	2'-OMe-A	scp-BNA-(5m)C
6	2'-OMe-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
7	2'-OMe-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
8	2'-OMe-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
9	2'-OMe-A	2'-F-(5m)C

編號	A單元	C單元
10	2'-OMe-A	2'-araF-(5m)C
11	2'-OMe-A	3'-OMe-(5m)C
12	2'-OMe-A	UNA-(5m)C
13	2'-OMe-A	2'-NH_2-(5m)C
14	2'-OMe-A	GNA-(5m)C
15	2'-OMe-A	4etl-(5m)C
16	2'-OMe-A	nmLNA-(5m)C
17	2'-O-MOE-A	2'-OMe-(5m)C
18	2'-O-MOE-A	2'-O-MOE-(5m)C
19	2'-O-MOE-A	LNA-(5m)C
20	2'-O-MOE-A	ENA-(5m)C
21	2'-O-MOE-A	scp-BNA-(5m)C
22	2'-O-MOE-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
23	2'-O-MOE-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
24	2'-O-MOE-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
25	2'-O-MOE-A	2'-F-(5m)C
26	2'-O-MOE-A	2'-araF-(5m)C
27	2'-O-MOE-A	3'-OMe-(5m)C
28	2'-O-MOE-A	UNA-(5m)C
29	2'-O-MOE-A	2'-NH_2-(5m)C
30	2'- O-MOE-A	GNA-(5m)C
31	2'-O-MOE-A	4etl-(5m)C
32	2'-O-MOE-A	nmLNA-(5m)C
33	LNA-A	2'-OMe-(5m)C
34	LNA-A	2'-O-MOE-(5m)C
35	LNA-A	LNA-(5m)C
36	LNA-A	ENA-(5m)C
37	LNA-A	scp-BNA-(5m)C
38	LNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
39	LNA-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
40	LNA-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
41	LNA-A	2'-F-(5m)C
42	LNA-A	2'-araF-(5m)C
43	LNA-A	3'-OMe-(5m)C
44	LNA-A	UNA-(5m)C
45	LNA-A	2'-NH_2-(5m)C
46	LNA-A	GNA-(5m)C

編號	A單元	C單元
47	LNA-A	4etl-(5m)C
48	LNA-A	nmLNA-(5m)C
49	ENA-A	2'-OMe-(5m)C
50	ENA-A	2'- O-MOE-(5m)C
51	ENA-A	LNA-(5m)C
52	ENA-A	ENA-(5m)C
53	ENA-A	scp-BNA-(5m)C
54	ENA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
55	ENA-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
56	ENA-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
57	ENA-A	2'-F-(5m)C
58	ENA-A	2'-araF-(5m)C
59	ENA-A	3'-OMe-(5m)C
60	ENA-A	UNA-(5m)C
61	ENA-A	2'-NH_2-(5m)C
62	ENA-A	GNA-(5m)C
63	ENA-A	4etl-(5m)C
64	ENA-A	nmLNA-(5m)C
65	scp-BNA-A	2'-OMe-(5m)C
66	scp-BNA-A	2'- O-MOE-(5m)C
67	scp-BNA-A	LNA-(5m)C
68	scp-BNA-A	ENA-(5m)C
69	scp-BNA-A	scp-BNA-(5m)C
70	scp-BNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
71	scp-BNA-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
72	scp-BNA-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
73	scp-BNA-A	2'-F-(5m)C
74	scp-BNA-A	2'-araF-(5m)C
75	scp-BNA-A	3'-OMe-(5m)C
76	scp-BNA-A	UNA-(5m)C
77	scp-BNA-A	2'-NH_2-(5m)C
78	scp-BNA-A	GNA-(5m)C
79	scp-BNA-A	4etl-(5m)C
80	scp-BNA-A	nmLNA-(5m)C
81	AmNA(N-Me)-A	2'-OMe-(5m)C
82	AmNA(N-Me)-A	2'- O-MOE-(5m)C
83	AmNA(N-Me)-A	LNA-(5m)C

編號	A單元	C單元
84	AmNA(N-Me)-A	ENA-(5m)C
85	AmNA(N-Me)-A	scp-BNA-(5m)C
86	AmNA(N-Me)-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
87	AmNA(N-Me)-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
88	AmNA(N-Me)-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
89	AmNA(N-Me)-A	2'-F-(5m)C
90	AmNA(N-Me)-A	2'-ara-F-(5m)C
91	AmNA(N-Me)-A	3'-OMe-(5m)C
92	AmNA(N-Me)-A	UNA-(5m)C
93	AmNA(N-Me)-A	2'-NH_2-(5m)C
94	AmNA(N-Me)-A	GNA-(5m)C
95	AmNA(N-Me)-A	4etl-(5m)C
96	AmNA(N-Me)-A	nmLNA-(5m)C
97	2'-O-丙炔基-A	2'-OMe-(5m)C
98	2'-O-丙炔基-A	2'- O-MOE-(5m)C
99	2'-O-丙炔基-A	LNA-(5m)C
100	2'-O-丙炔基-A	ENA-(5m)C
101	2'-O-丙炔基-A	scp-BNA-(5m)C
102	2'-O-丙炔基-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
103	2'-O-丙炔基-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
104	2'-O-丙炔基-A	2'-O-丁炔-(5m)C
105	2'-O-丙炔基-A	2'-F-(5m)C
106	2'-O-丙炔基-A	2'-araF-(5m)C
107	2'-O-丙炔基-A	3'-OMe-(5m)C
108	2'-O-丙炔基-A	UNA-(5m)C
109	2'-O-丙炔基-A	2'-NH_2-(5m)C
110	2'-O-丙炔基-A	GNA-(5m)C
111	2'-O-丙炔基-A	4etl-(5m)C
112	2'-O-丙炔基-A	nmLNA-(5m)C
113	2'-O-丁炔基-A	2'-OMe-(5m)C
114	2'-O-丁炔基-A	2'- O-MOE-(5m)C
115	2'-O-丁炔基-A	LNA-(5m)C
116	2'-O-丁炔基-A	ENA-(5m)C
117	2'-O-丁炔基-A	scp-BNA-(5m)C
118	2'-O-丁炔基-A	AmNA-(NMe)-(5m)C

編號	A單元	C單元
119	2'-O-丁炔基-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
120	2'-O-丁炔基-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
121	2'-O-丁炔基-A	2'-F-(5m)C
122	2'-O-丁炔基-A	2'-araF-(5m)C
123	2'-O-丁炔基-A	3'-OMe-(5m)C
124	2'-O-丁炔基-A	UNA-(5m)C
125	2'-O-丁炔基-A	2'-NH_2-(5m)C
126	2'-O-丁炔基-A	GNA-(5m)C
127	2'-O-丁炔基-A	4etl-(5m)C
128	2'-O-丁炔基-A	nmLNA-(5m)C
129	2'-F A	2'-OMe-(5m)C
130	2'-F A	2'- O-MOE-(5m)C
131	2'-F A	LNA-(5m)C
132	2'-F A	ENA-(5m)C
133	2'-F A	scp-BNA-(5m)C
134	2'-F A	AmNA-(NMe)-(5m)C
135	2'-F A	2'-O-丙炔基-(5m)C
136	2'-F A	2'-O-丁炔基-(5m)C
137	2'-F A	2'-F-(5m)C
138	2'-F A	2'-ara-F-(5m)C
139	2'-F A	3'-OMe-(5m)C
140	2'-F A	UNA-(5m)C
141	2'-F A	2'-NH_2-(5m)C
142	2'-F A	GNA-(5m)C
143	2'-F A	4etl-(5m)C
144	2'-F A	nmLNA-(5m)C
145	2'-araF A	2'-OMe-(5m)C
146	2'-araF A	2'- O-MOE-(5m)C
147	2'-araF A	LNA-(5m)C
148	2'-araF A	ENA-(5m)C
149	2'-araF A	scp-BNA-(5m)C
150	2'-araF A	AmNA-(NMe)-(5m)C
151	2'-araF A	2'-O-丙炔基-(5m)C
152	2'-araF A	2'-O-丁炔基-(5m)C
153	2'-araF A	2'-F-(5m)C
154	2'-araF A	2'-araF-(5m)C

編號	A單元	C單元
155	2'-araF A	3'-OMe-(5m)C
159	2'-araF A	UNA-(5m)C
157	2'-araF A	2'-NH_2-(5m)C
158	2'-araF A	GNA-(5m)C
159	2'-araF A	4etl-(5m)C
160	2'-araF A	nmLNA-(5m)C
161	3'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C
162	3'-OMe-A	2'- O-MOE-(5m)C
163	3'-OMe-A	LNA-(5m)C
164	3'-OMe-A	ENA-(5m)C
165	3'-OMe-A	scp-BNA-(5m)C
166	3'-OMe-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
167	3'-OMe-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
168	3'-OMe-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
169	3'-OMe-A	2'-F-(5m)C
170	3'-OMe-A	2'-ara-F-(5m)C
171	3'-OMe-A	3'-OMe-(5m)C
172	3'-OMe-A	UNA-(5m)C
173	3'-OMe-A	2'-NH_2-(5m)C
174	3'-OMe-A	GNA-(5m)C
175	3'-OMe-A	4etl-(5m)C
176	3'-OMe-A	nmLNA-(5m)C
177	UNA-A	2'-OMe-(5m)C
178	UNA-A	2'- O-MOE-(5m)C
179	UNA-A	LNA-(5m)C
180	UNA-A	ENA-(5m)C
181	UNA-A	scp-BNA-(5m)C
182	UNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
183	UNA-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
184	UNA-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
185	UNA-A	2'-F-(5m)C
186	UNA-A	2'-araF-(5m)C
187	UNA-A	3'-OMe-(5m)C
188	UNA-A	UNA-(5m)C
189	UNA-A	2'-NH_2-(5m)C
190	UNA-A	GNA-(5m)C
191	UNA-A	4etl-(5m)C

編號	A單元	C單元
192	UNA-A	nmLNA-(5m)C
193	2'-NH_2-A	2'-OMe-(5m)C
194	2'-NH_2-A	2'-O-MOE-(5m)C
195	2'-NH_2-A	LNA-(5m)C
196	2'-NH_2-A	ENA-(5m)C
197	2'-NH_2-A	scp-BNA-(5m)C
198	2'-NH_2-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
199	2'-NH_2-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
200	2'-NH_2-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
201	2'-NH_2-A	2'-F-(5m)C
202	2'-NH_2-A	2'-ara-F-(5m)C
203	2'-NH_2-A	3'-OMe-(5m)C
204	2'-NH_2-A	UNA-(5m)C
205	2'-NH_2-A	2'-NH_2-(5m)C
206	2'-NH_2-A	GNA-(5m)C
207	2'-NH_2-A	4etl-(5m)C
208	2'-NH_2-A	nmLNA-(5m)C
209	GNA-A	2'-OMe-(5m)C
210	GNA-A	2'-O-MOE-(5m)C
211	GNA-A	LNA-(5m)C
212	GNA-A	ENA-(5m)C
213	GNA-A	scp-BNA-(5m)C
214	GNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
215	GNA-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
216	GNA-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
217	GNA-A	2'-F-(5m)C
218	GNA-A	2'-ara-F-(5m)C
219	GNA-A	3'-OMe-(5m)C
220	GNA-A	UNA-(5m)C
221	GNA-A	2'-NH_2-(5m)C
222	GNA-A	GNA-(5m)C
223	GNA-A	4etl-(5m)C
224	GNA-A	nmLNA-(5m)C
225	nmLNA-A	2'-OMe-(5m)C
226	nmLNA-A	2'-O-MOE-(5m)C
227	nmLNA-A	LNA-(5m)C
228	nmLNA-A	ENA-(5m)C

編號	A單元	C單元
229	nmLNA-A	scp-BNA-(5m)C
230	nmLNA-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
231	nmLNA-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
232	nmLNA-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
233	nmLNA-A	2'-F-(5m)C
234	nmLNA-A	2'-ara-F-(5m)C
235	nmLNA-A	3'-OMe-(5m)C
236	nmLNA-A	UNA-(5m)C
237	nmLNA -A	2'-NH_2-(5m)C
238	nmLNA-A	GNA-(5m)C
239	nmLNA-A	4etl-(5m)C
240	nmLNA-A	nmLNA-(5m)C
241	4etl-A	2'-OMe-(5m)C
242	4etl-A	2'-O-MOE-(5m)C
243	4etl-A	LNA-(5m)C
244	4etl-A	ENA-(5m)C
245	4etl-A	scp-BNA-(5m)C
246	4etl-A	AmNA-(NMe)-(5m)C
247	4etl-A	2'-O-丙炔基-(5m)C
248	4etl-A	2'-O-丁炔基-(5m)C
249	4etl-A	2'-F-(5m)C
250	4etl-A	2'-ara-F-(5m)C
251	4etl-A	3'-OMe-(5m)C
252	4etl-A	UNA-(5m)C
253	4etl-A	2'-NH_2-(5m)C
254	4etl-A	GNA-(5m)C
255	4etl-A	4etl-(5m)C
256	4etl-A	nmLNA-(5m)C

【0055】如本文描述之經修飾之寡核苷酸之長度可在較寬範圍內變化。在各種實施例中，如本文描述之經修飾之寡核苷酸包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，其具有約8個單元、約10個單元、約12個單元、約14個單元、約16個單元、約18個單元、約20個單元、約24個單元、約30個單元、約34個單元、約36個單元、約38個單元、約40個單

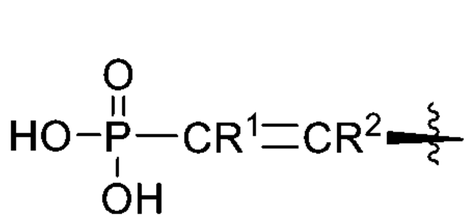
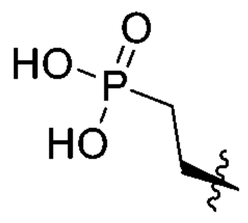
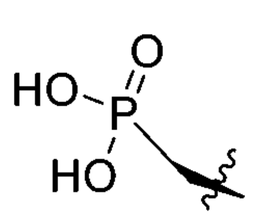
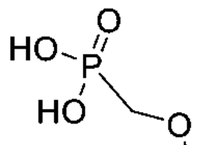
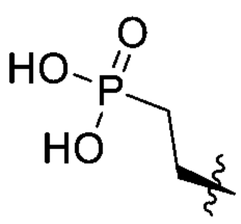
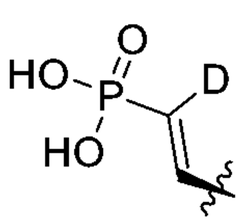
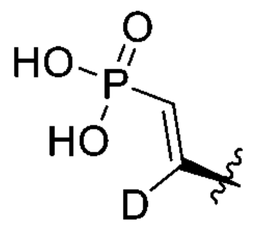
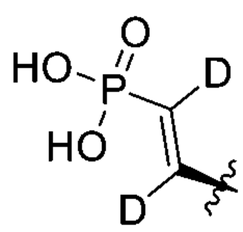
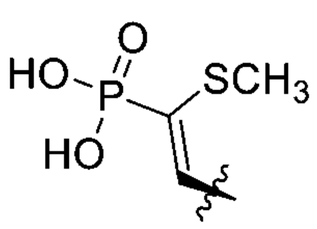
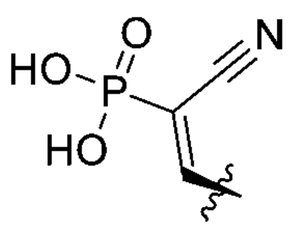
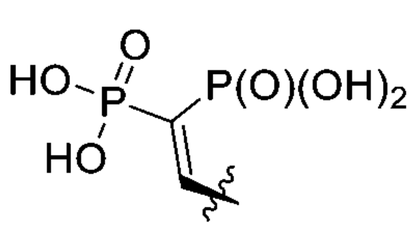
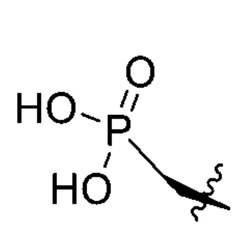
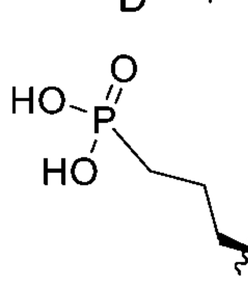
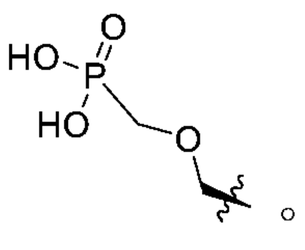
元、約44個單元、約50個單元、約60個單元、約76個單元、約100個單元、約122個單元、約124個單元、約150個單元、約172個單元、約200個單元序列長度，或在上述值之任何兩者之間之範圍內之序列長度。例如，在一實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在8個單元至200個單元範圍內之序列長度。在另一實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在下列範圍之任何一者或多者(如適用)中之序列長度：約8個單元至約36個單元；約16個單元至約36個單元；20個單元至36個單元；16個單元至30個單元；18個單元至60個單元；20個單元至30個單元；30個單元至50個單元；34個單元至46個單元；36個單元至44個單元；44個單元至200個單元；44個單元至150個單元；44個單元至120個單元；50個單元至200個單元；50個單元至150個單元；50個單元至120個單元；60個單元至200個單元；60個單元至150個單元；及/或60個單元至120個單元。

【0056】 如本文別處描述，經修飾之寡核苷酸可包含交替A及C單元之單一至少部分硫代磷酸酯化序列，在一些實施例中，或在其他實施例中，該經修飾之寡核苷酸可包含連接在一起之交替A及C單元之複數個至少部分硫代磷酸酯化序列。因此，含有交替A及C單元之單一至少部分硫代磷酸酯化序列之經修飾之寡核苷酸可具有與該序列相同之序列長度。此等序列長度之實例係描述於本文別處。同樣地，含有交替A及C單元之複數個至少部分硫代磷酸酯化序列之經修飾之寡核苷酸可具有作為連接如本文別處描述之彼等序列之結果之序列長度。含有交替A及C單元之複數個至少部分硫代磷酸酯化序列之經修飾之寡核苷酸之序列長度之實例係於本文別處根據個別序列之長度表示，且亦考慮連接基之長度。

【0057】 如本文描述之經修飾之寡核苷酸可包含交替A及C單元之複數個至少部分硫代磷酸酯化序列。在一實施例中，當交替A及C單元之序列包含核糖-A單元時，該序列進一步包含至少一個A單元不為核糖-A單元。同樣地，在一實施例中，當交替A及C單元之序列包含核糖-C單元時，該序列進一步包含至少一個C單元不為核糖-C單元。在一實施例中，該經修飾之寡核苷酸可含有各種核苷酸單元(熟習此項技術者已知，例如，胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤、鳥糞嘌呤及其經修飾之版本)中之任何一者或多者，其等非A或C單元，例如，在交替A及C單元之兩個或更多個至少部分硫代磷酸酯化序列之間作為端基及/或作為連接基。例如，在一實施例中，該經修飾之寡核苷酸包含將交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列中之至少兩者或更多者連接在一起之一或多個胞嘧啶單元。在一實施例中，由非A/非C連接基連接在一起之交替A及C單元之該等兩個或更多個至少部分硫代磷酸酯化序列係彼此相同的。此經修飾之寡核苷酸之實例係$(AC)_8$-胞嘧啶-$(AC)_8$。包含複數個相同序列之連接在一起之此經修飾之寡核苷酸在本文中可稱為多聯體。連接在一起之交替A及C單元之該等兩個或更多個至少部分硫代磷酸酯化序列亦可彼此不同。此經修飾之寡核苷酸之實例係$(AC)_8$-胞嘧啶-$(AC)_{16}$。

【0058】 經修飾之寡核苷酸可含有兩個或更多個不同之A基團及/或兩個或更多個不同之C基團。當A或C基團係經不同之A或C基團置換時，通常不認為此置換中斷A及C單元之交替序列。例如，在一實施例中，至少一些A單元在核糖環上未2’O-甲基化及/或至少一些C單元在核糖環上未2’O-甲基化。然而，在一些實施例中，連接交替A及C單元之兩個至少部分硫代磷酸酯化序列之基團其本身為中斷A及C單元之交替序列之A或C單

元。例如，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化16-mer可由A單元連接至另一此16-mer以形成$(AC)_8$-A-$(AC)_8$。同樣地，此16-mer可由C單元連接至另一此16-mer以形成$(AC)_8$-C-$(AC)_8$。如上文指示，當彼此相同之交替A及C單元之複數個至少部分硫代磷酸酯化序列係由連接基連接在一起時，該經修飾之寡核苷酸在本文中可稱為多聯體。如上文指示，連接在一起之交替A及C單元之兩個或更多個至少部分硫代磷酸酯化序列亦可彼此不同。此等經修飾之寡核苷酸之實例包括$(AC)_8$-A-$(AC)_{16}$及$(AC)_8$-C-$(AC)_{16}$。

【0059】在一實施例中，經修飾之寡核苷酸包含5'端帽。在各種實施例中，該5'端帽係選自 、、及。在一實施例中，R^1及R^2係各別地選自氫、氘、磷酸酯、硫代C_{1-6}烷基及氰基。例如，在一實施例中，R^1及R^2兩者均為氫及該經修飾之寡核苷酸包含乙烯基膦酸酯端帽。在其他實施例中，R^1及R^2非均為氫。在一些實施例中，該5'端帽係選自 、、、、、、、、及。

【0060】在其他實施例中，經修飾之寡核苷酸包含3'及/或5'連接基。例如，關於包含如本文描述之A及C單元(諸如，分別表1及2之A及C單元)之經修飾之寡核苷酸化合物，至少一個末端 可為連接基。可使

用熟習此項技術者已知的各種連接基用於將經修飾之寡核苷酸連接至另一部分(諸如一或多個第二寡核苷酸及/或靶向配體)。在一實施例中，該連接基包含非A/非C連接基或中斷如上文討論之A及C單元之交替序列之A或C單元，或該連接基包含C_{2-6}伸烷基鍵聯(圖1)、C_{2-6}環氧烷鍵聯，諸如環氧丙烷鍵聯(圖2)，或三縮四乙二醇(TEG)鍵聯(圖3A至D)。

【0061】 在各種實施例中，經修飾之寡核苷酸中之二、三、四或更多者可以各種方式彼此連接。例如，該等經修飾之寡核苷酸可經由3’及/或5’連接基端-至-端連接，及/或連接基可連接至多種經修飾之寡核苷酸之一個3’或5’端，例如，如圖1及2中闡述。

【0062】 在各種實施例中，經修飾之寡核苷酸進一步包含靶向配體經由連接基連接至經修飾之寡核苷酸。例如，在各種實施例中，該靶向配體係或包含N-乙醯半乳胺糖(GalNac) (例如，三觸角-GalNAc)、生育酚或膽固醇。圖3A及3B闡述具有分別經由5’ TEG連接基及3’TEG連接基結合之膽固醇之經修飾之寡核苷酸之實施例。圖3C及3D闡述具有分別經由5’ TEG連接基及3’TEG連接基結合之生育酚(維生素E)之經修飾之寡核苷酸之實施例。圖4A及4B闡述具有經由連接基結合之GalNac之經修飾之寡核苷酸之實施例。在一實施例中，該GalNac係三觸角GalNac。

【0063】 在各種實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列可包括對一或多種硫代磷酸酯化鍵聯之修飾。通常不認為包括此經修飾鍵聯中斷A及C單元之交替序列，因為熟習此項技術者瞭解此序列可僅經部分硫代磷酸酯化，且因此可包含對硫代磷酸酯鍵聯之一或多種修飾。在各種實施例中，對硫代磷酸酯鍵聯之修飾係選自磷酸二酯、硫代二磷酸酯、膦酸甲酯、硫代二磷酸酯及二磷酸二酯之經修飾鍵聯。例如，在

一實施例中，該經修飾鍵聯係磷酸二酯鍵聯。

【0064】 在各種實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列可具有各種程度之硫代磷酸酯化。例如，在一實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係經至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%硫代磷酸酯化。在一實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化。在一實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係完全硫代磷酸酯化。

【0065】 在各種實施例中，交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列可包括對一或多種硫代磷酸酯化鍵聯之立體化學修飾。在一實施例中，本文描述之經修飾之寡核苷酸可包含至少一個立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯。在各種實施例中，該立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯具有R構型。在各種實施例中，該立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯具有S構型。

【0066】 熟習此項技術者將知曉包含如本文描述之A及C單元(諸如分別表1及2之A及C單元)之經修飾之寡核苷酸化合物含有在A與C單元之間的內部鍵聯及於3’及5’端之末端基團。因此，關於本文描述之A及C單元，諸如分別表1及2之A及C單元，各 表示內部 或末端 。在各種實施例中，各末端 獨立地係羥基、硫代磷酸O,O-二氫酯、磷酸二氫酯、端帽或連接基。在各種實施例中，各內部 係連接至鄰近A或C單元之含磷鍵聯，該含磷鍵聯為硫代磷酸酯鍵聯或選自磷酸二酯、硫代二磷酸酯、膦酸甲酯、硫代二磷酸酯、5’-磷醯胺酯、3’,5’-磷醯二胺酯、5’-硫代磷醯胺酯、3’,5’-硫代磷醯二胺酯或二磷酸二酯之經修飾鍵聯。

【0067】 如上文指示，本文描述之STOPS™化合物係抗病毒寡核苷

酸。在各種實施例中，如藉由HBsAg分泌分析測定，包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列之如本文描述之經修飾之寡核苷酸具有大於參考化合物之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。例如，在一實施例中，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係比參考化合物大至少2倍。在另一實施例中，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係在自比參考化合物大2倍至比參考化合物大5倍之範圍內。在另一實施例中，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係比參考化合物大至少5倍。在另一實施例中，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係在自比參考化合物大5倍至比參考化合物大10倍之範圍內。在另一實施例中，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係比參考化合物大至少10倍。在另一實施例中，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係在自比參考化合物大10倍至比參考化合物大25倍之範圍內。在另一實施例中，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係比參考化合物大至少25倍。在此內文中，上述術語2倍、5倍、10倍及25倍係指如由EC_{50}值分別為參考化合物之EC_{50}值之二分之一、五分之一、十分之一或二十五分之一指示，在HBsAg分泌分析中，如本文描述之經修飾之寡核苷酸相較於另一化合物增加之效價。例如，在HBsAg分泌分析中，具有比參考化合物大兩倍之效價之經修飾之寡核苷酸具有為參考化合物之EC_{50}值之二分之一的EC_{50}值。同樣地，在HBsAg分泌分析中，具有比參考化合物大五倍之效價之經修飾之寡核苷酸具有為參考化合物之五分之一的EC_{50}值。同樣地，在HBsAg分泌分析中，具有比參考化合物大十倍之效價之經修飾之寡核苷酸具有為參考化合物之十分之一的EC_{50}值。同樣地，在HBsAg分泌分析中，具有比參考化合物大二十五倍之效價之經修飾之寡核苷酸具有為參考化合物之二十五分之一的EC_{50}值。

在一些實施例中，該參考化合物可為被稱為上文討論之REP 2139之硫代磷酸酯化AC 40-mer寡核苷酸。在一些實施例中，該參考化合物可為具有結構

5’mApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmA
psmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmC
psmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsm
ApsmC 3’ (2’-OMe-A，2’-OMe-C)之AC 40-mer寡核苷酸。

【0068】 在各種實施例中，如藉由HBsAg分泌分析測定，包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列之如本文描述之經修飾之寡核苷酸具有在小於30奈莫耳(nM)之「A」活性範圍內；在30 nM至小於100 nM之「B」活性範圍內；在100 nM至小於300 nM之「C」活性範圍內；或在大於300 nM之「D」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。在一些實施例中，如藉由HBsAg分泌分析測定，包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列之如本文描述之經修飾之寡核苷酸具有小於50 nM之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0069】 本文描述之經修飾之寡核苷酸可以各種複合物之形式製備。因此，一實施例提供如本文描述之經修飾之寡核苷酸之螯合複合物。例如，在一實施例中，此螯合複合物包含該經修飾之寡核苷酸之鈣、鎂或鋅螯合複合物。本文描述之經修飾之寡核苷酸亦可以各種單價相對離子複合物之形式製備。例如，在一實施例中，此相對離子複合物包含該經修飾之寡核苷酸之鋰、鈉或鉀複合物。

【0070】 一實施例提供具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含如本文描述之交替A及C單元之

至少部分硫代磷酸酯化序列，其中；

【0071】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化；

【0072】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

【0073】 該等A單元包含至少12個2’-OMe-A單元(例如，至少15個2’-OMe-A單元)及至少1個核糖-A單元(例如，至少2個核糖-A單元)；

【0074】 該等C單元包含至少15個LNA-5mC單元；及

【0075】 如藉由HBsAg分泌分析測定，經修飾之寡核苷酸具有小於100 nM (例如，小於50 nM或小於30 nM)之EC_{50}值。

【0076】 一個實施例提供一種具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含如本文描述之交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，其中；

【0077】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化；

【0078】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

【0079】 該等A單元包含至少15個2’-OMe-A單元；

【0080】 該等C單元包含至少7個LNA-5mC單元；及

【0081】 如藉由HBsAg分泌分析測定，經修飾之寡核苷酸具有小於100 nM (例如小於50 nM或小於30 nM)之EC_{50}值。

【0082】 一個實施例提供一種具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含如本文描述之交替A及C

單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，其中；

【0083】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化；

【0084】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

【0085】 該等A單元包含至少15個2’-OMe-A單元；

【0086】 該等C單元包含至少3個LNA-5mC單元；及

【0087】 如藉由HBsAg分泌分析測定，經修飾之寡核苷酸具有小於100 nM (例如小於50 nM或小於30 nM)之EC_{50}值。

【0088】 一個實施例提供一種具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含如本文描述之交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，其中；

【0089】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化；

【0090】 交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

【0091】 該等A單元包含至少18個2’-OMe-A單元；

【0092】 該等C單元包含至少15個LNA-5mC單元；及

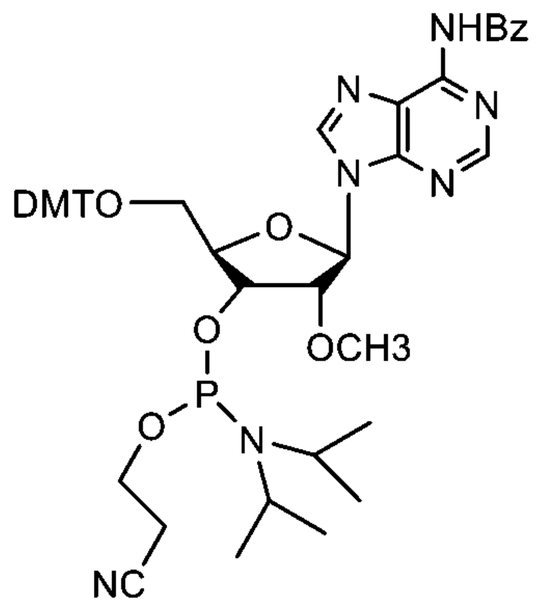
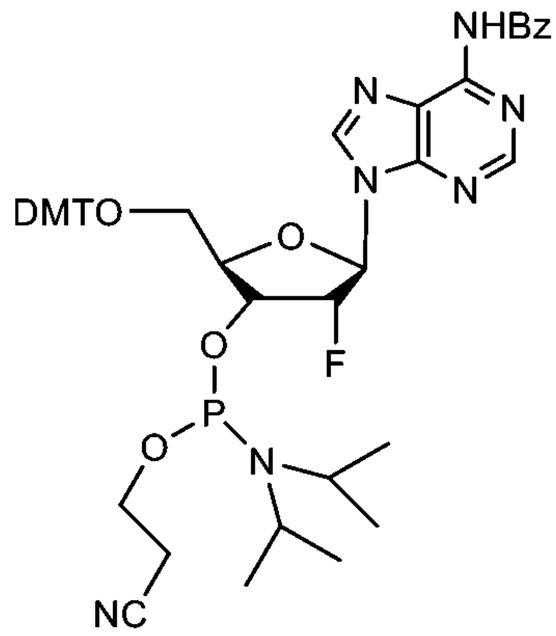
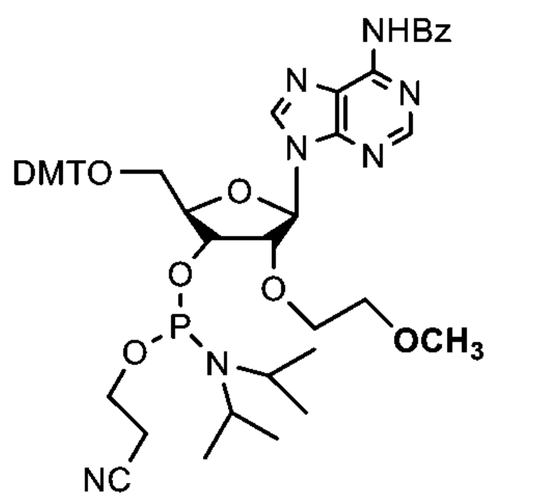
【0093】 如藉由HBsAg分泌分析測定，經修飾之寡核苷酸具有小於100 nM (例如小於50 nM或小於30 nM)之EC_{50}值。

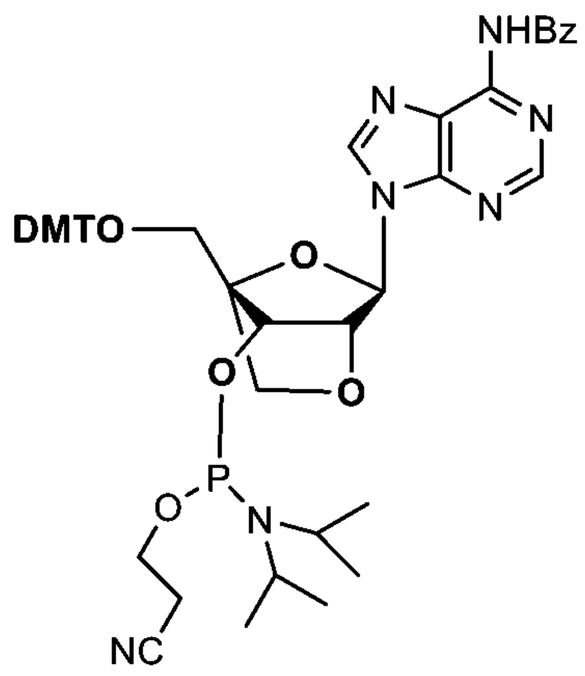
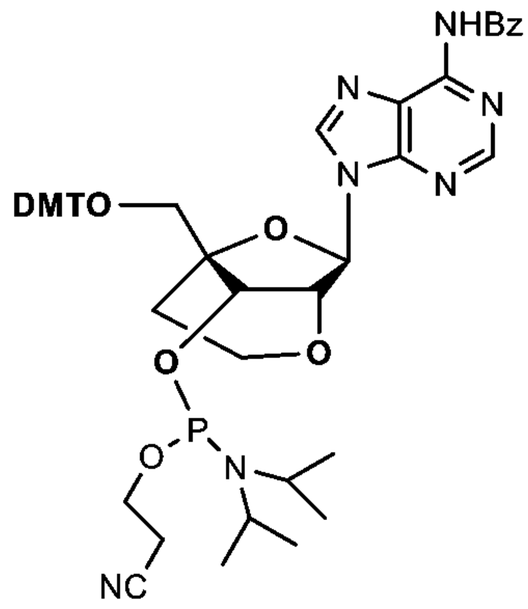
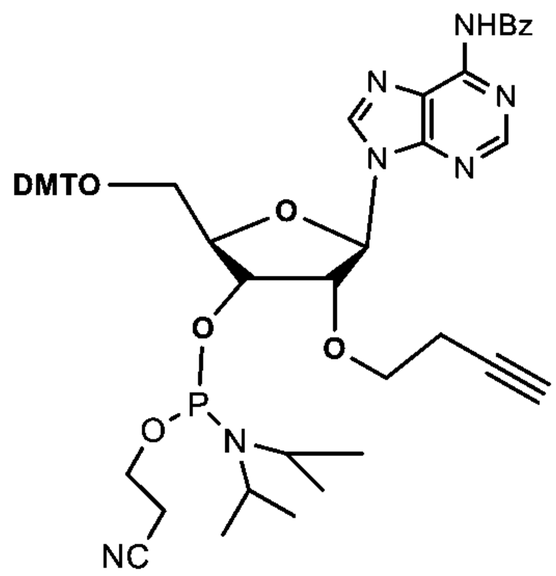
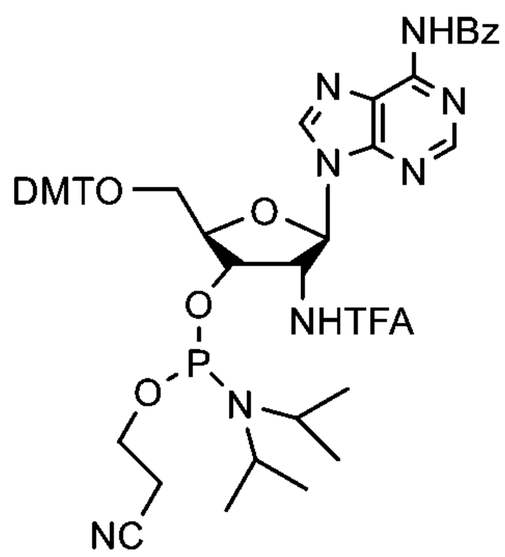
合成

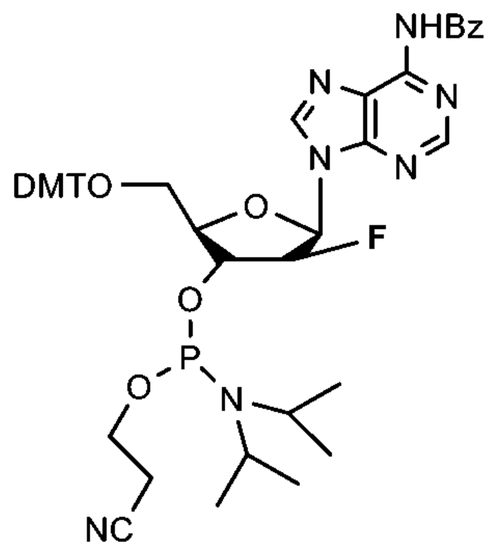
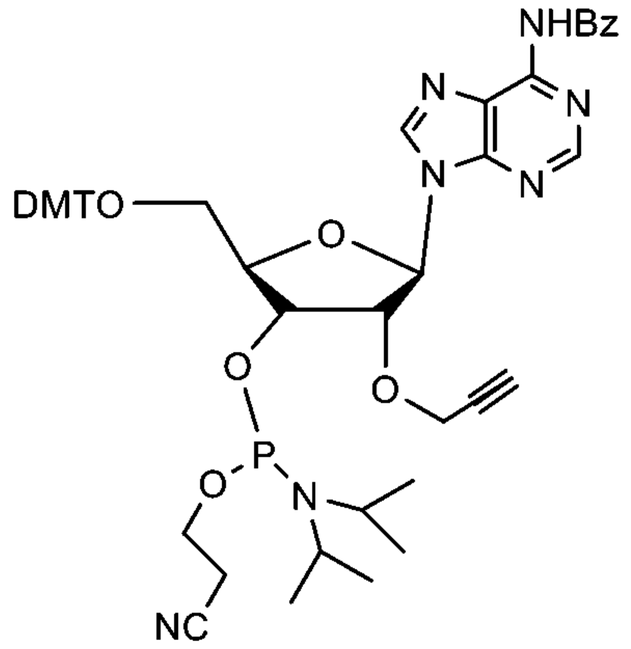
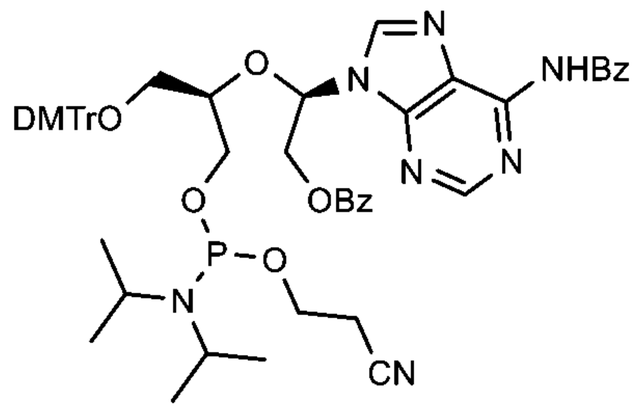
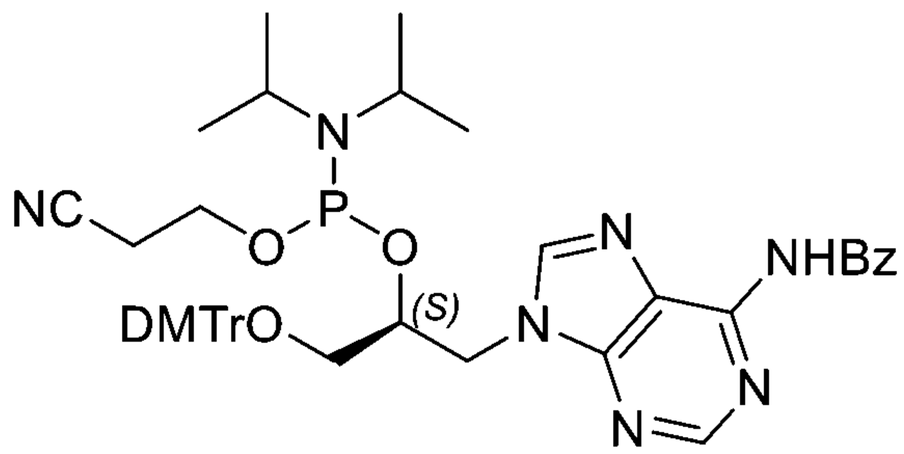
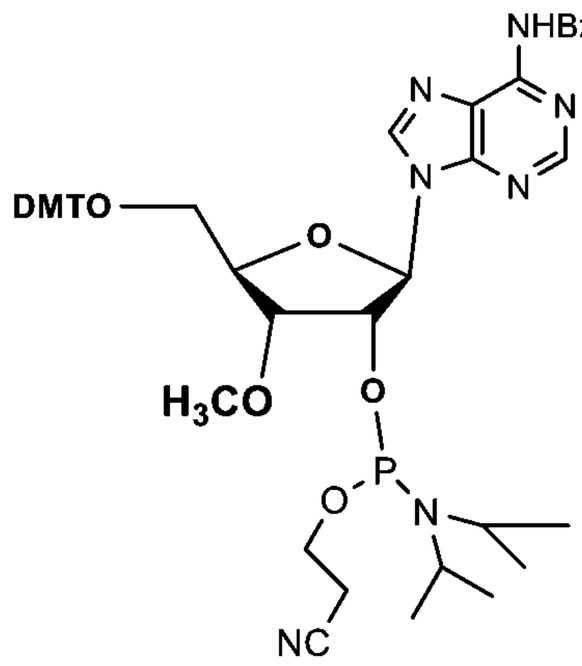
【0094】 本文描述之經修飾之寡核苷酸可以各種方法製備。在一實施例中，藉由應用標準亞磷醯胺化學，使用表4及5中描述之建構組元單體

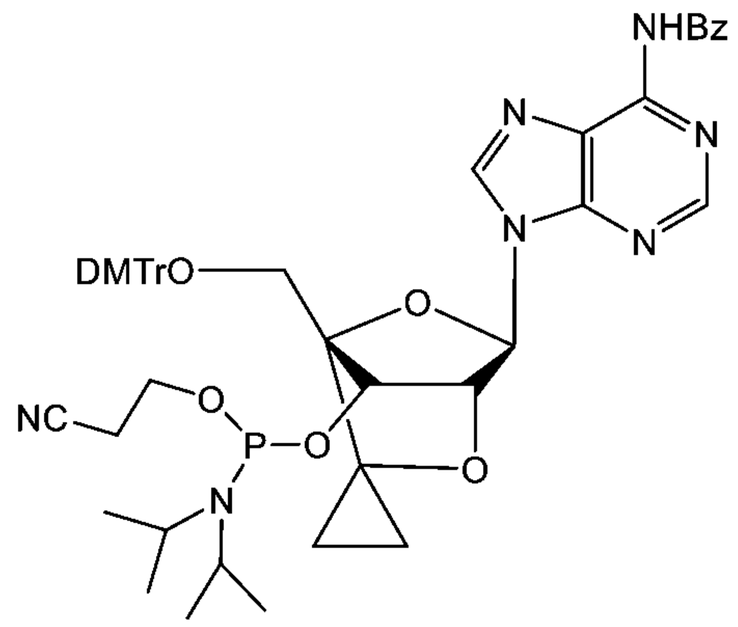
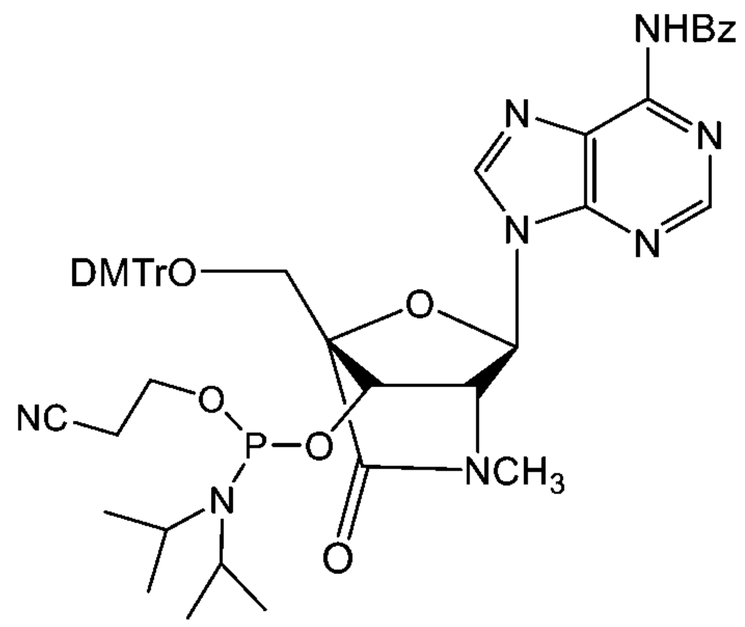
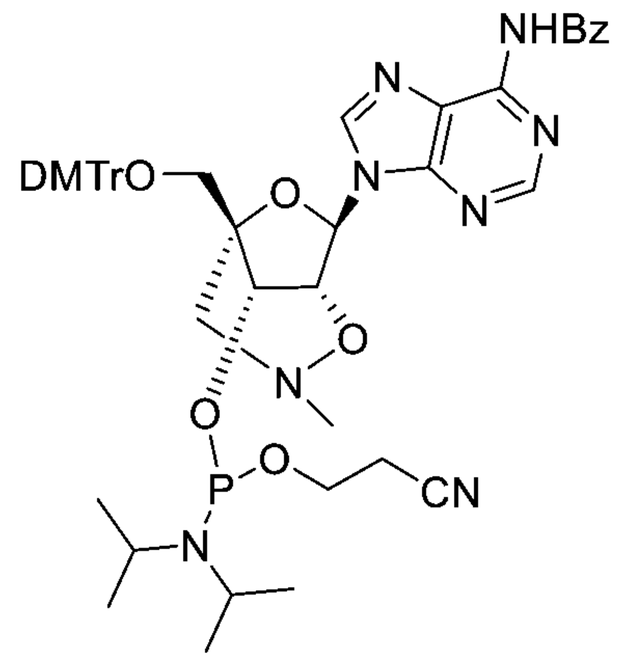
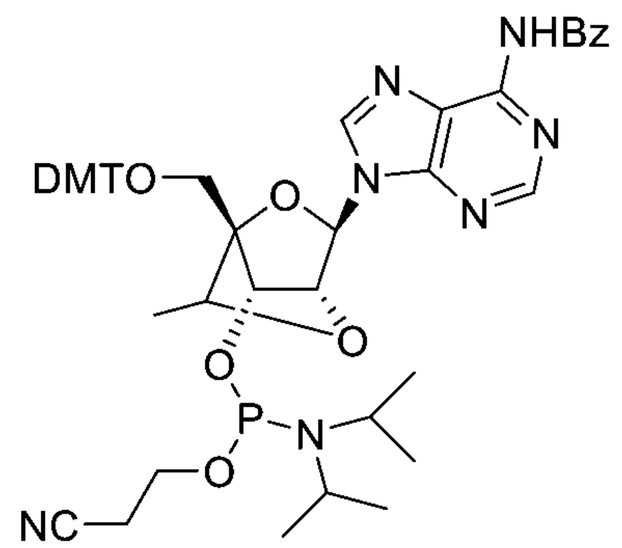
用於製造本文描述之經修飾之寡核苷酸。表4及5中描述之建構組元及其他建構組元亞磷醯胺單體可藉由已知方法製備或獲得自商業來源(Thermo Fischer Scientific US, Hongene Biotechnology USA Inc., Chemgenes公司)。用於製造經修飾之寡核苷酸之例示性程序係闡述於下文實例中。

表4：用於「A」單元之建構組元

縮寫	結構
2'-OMe-A亞磷醯胺	
2'-F-A亞磷醯胺	
2'-O-MOE-A亞磷醯胺	

縮寫	結構
LNA-A亞磷醯胺	
ENA-A亞磷醯胺	
2'-O-丁炔-A亞磷醯胺	
2'-NH_2-A亞磷醯胺	

縮寫	結構
2’-F-Ara-A亞磷醯胺	
2'-O-丙炔基-A亞磷醯胺	
UNA-A亞磷醯胺	
GNA-A亞磷醯胺	
3'-O-甲基-A亞磷醯胺	

縮寫	結構
scp-BNA-A亞磷醯胺	
AmNA-(N-Me)-A亞磷醯胺	
nmLNA-A亞磷醯胺	
4etl-A亞磷醯胺	

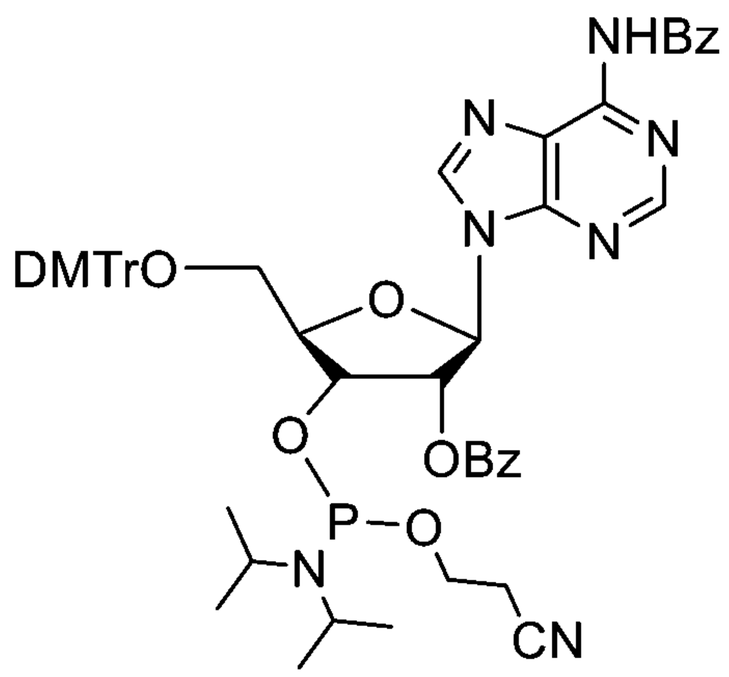
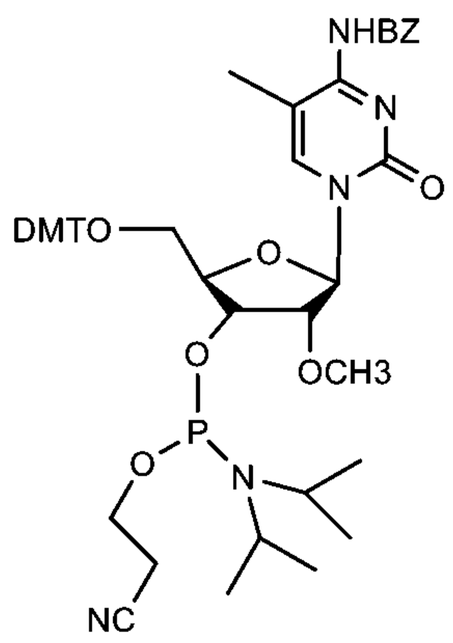
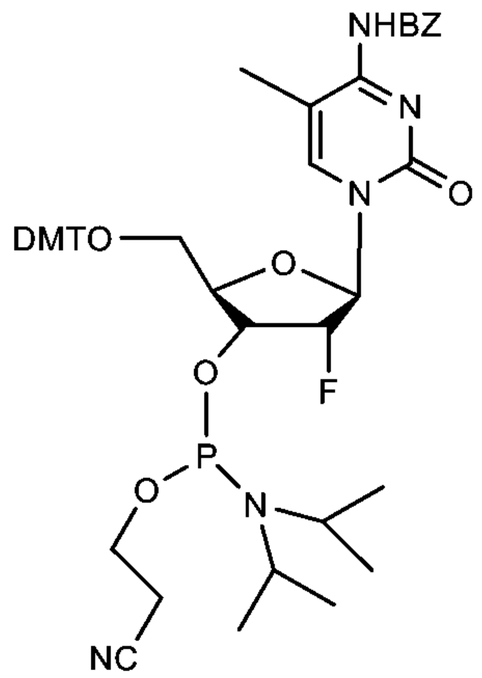
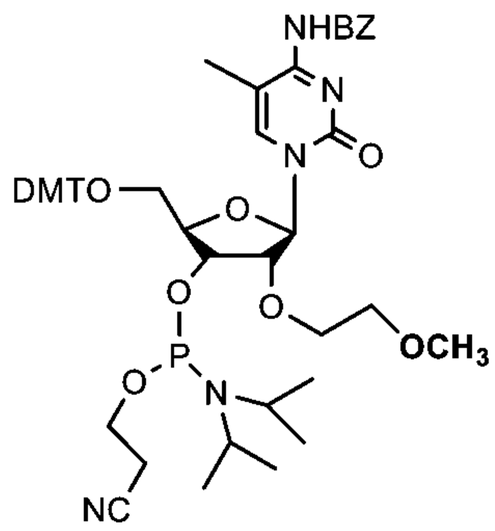
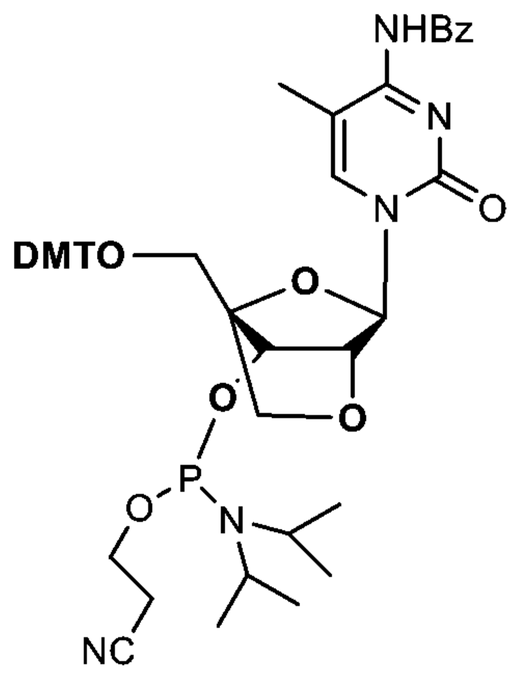
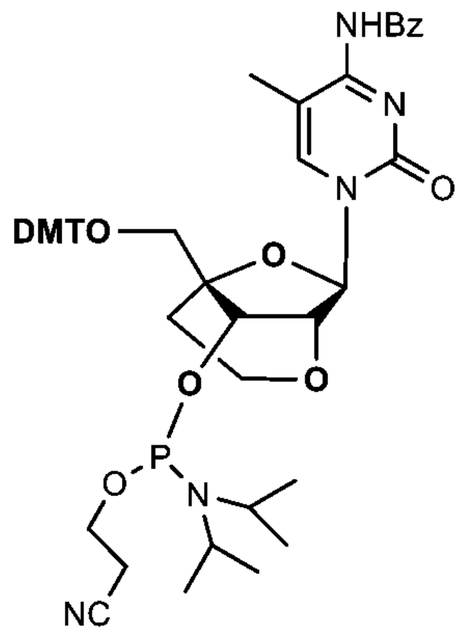
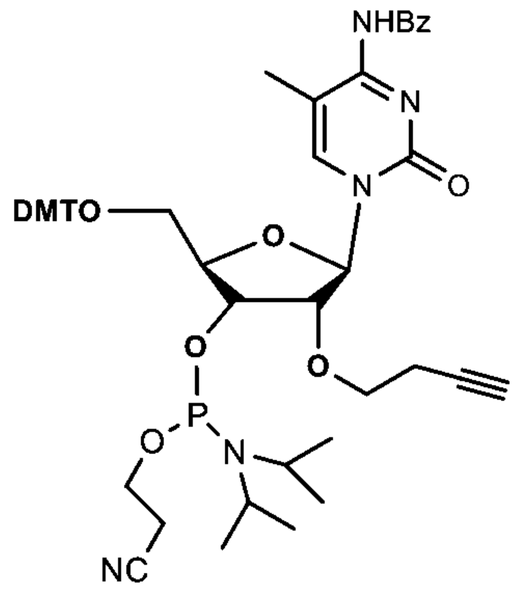
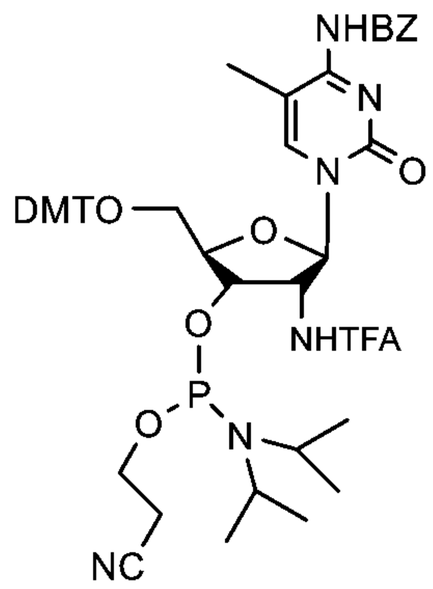
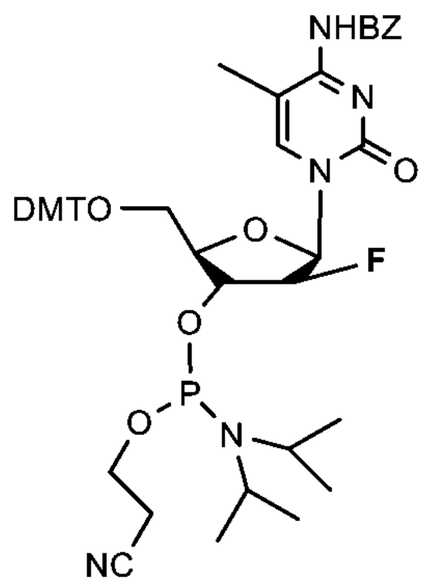
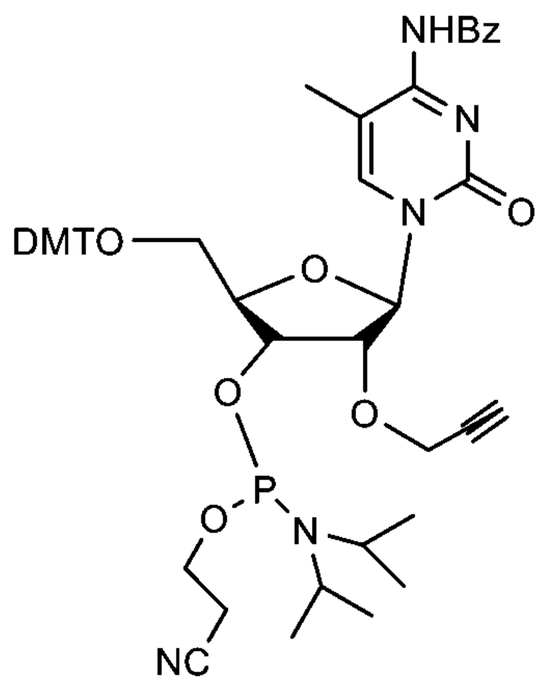
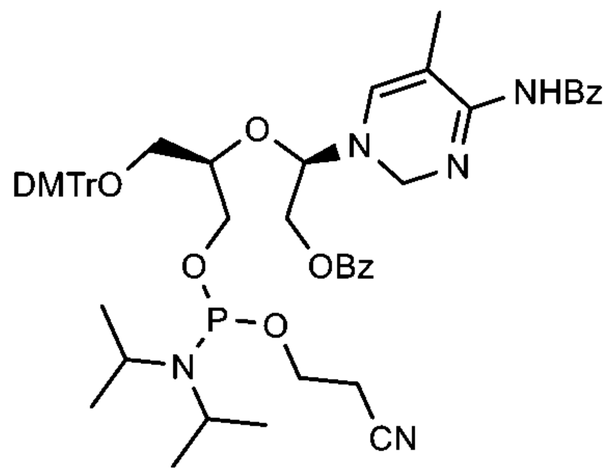
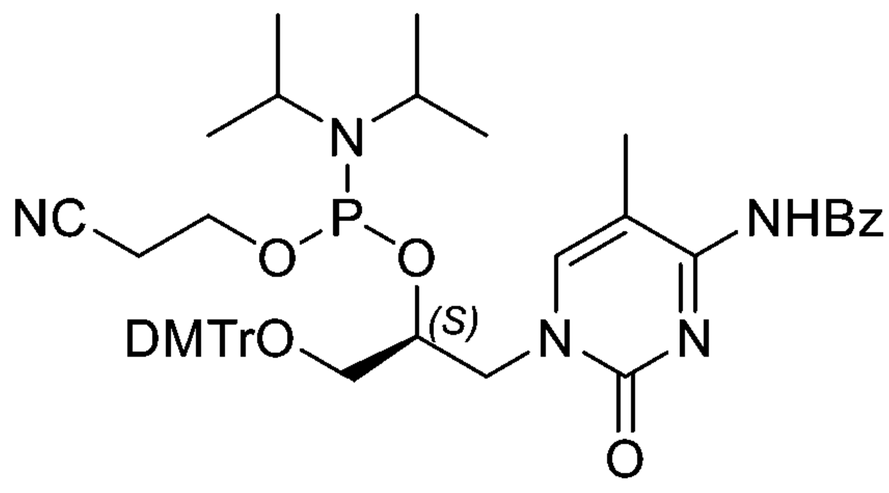
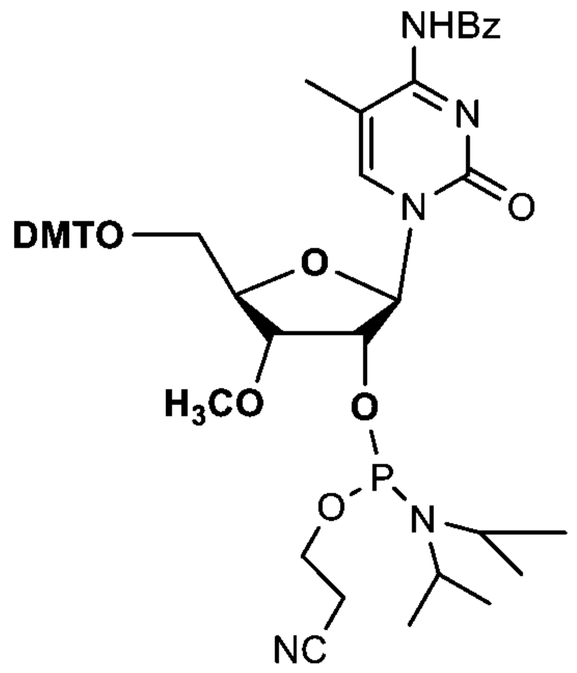
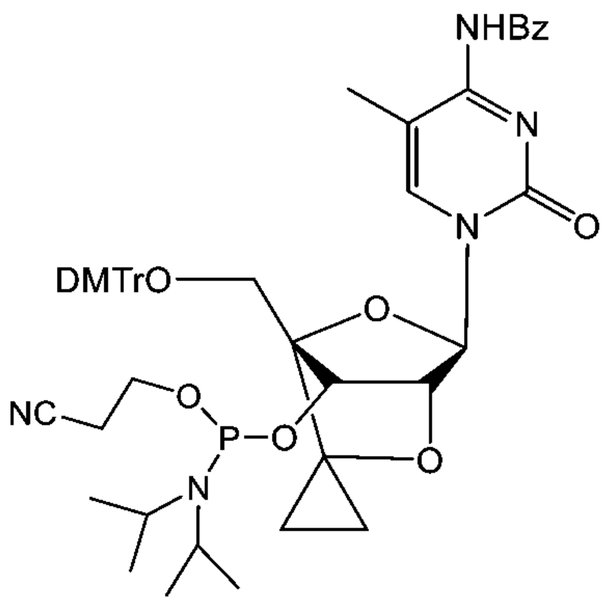
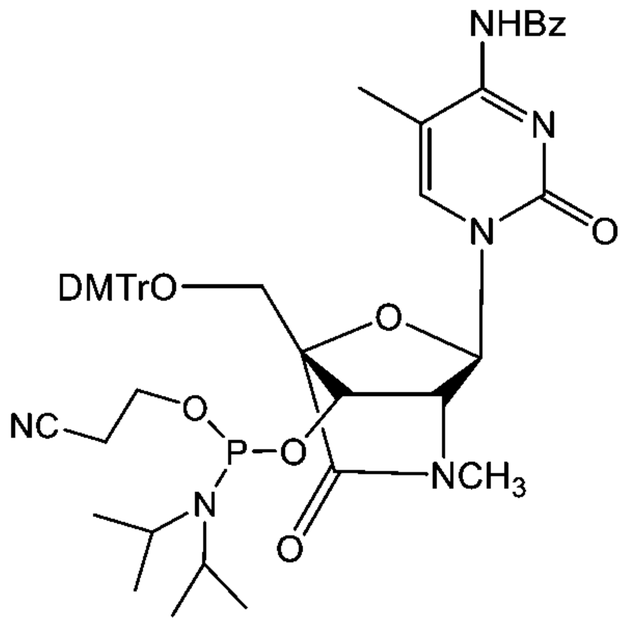
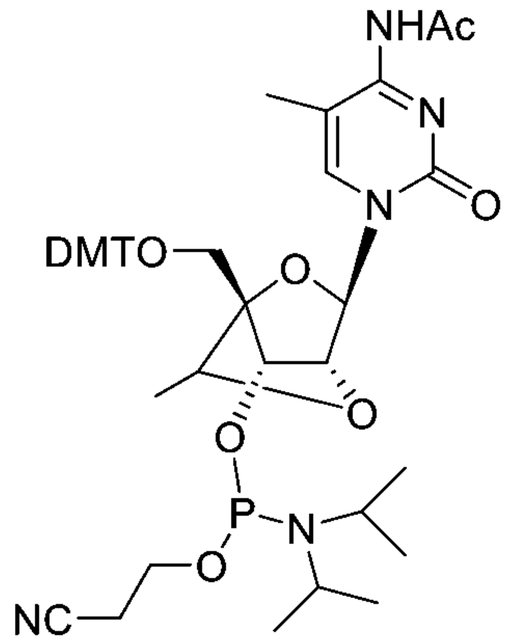
縮寫	結構
核糖-A亞磷醯胺	

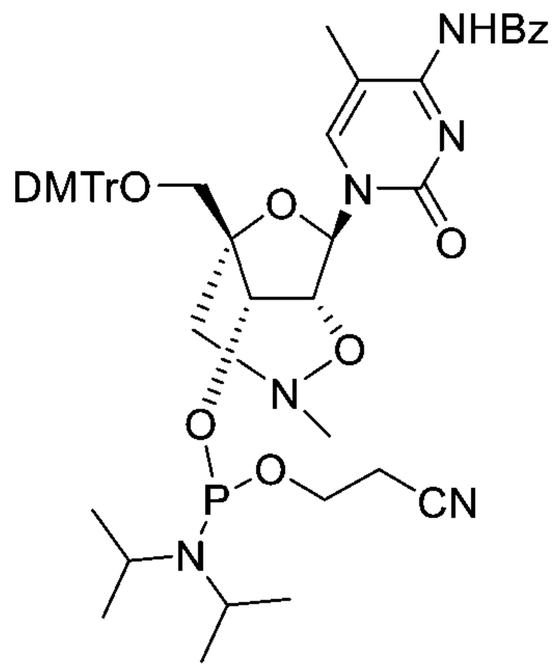
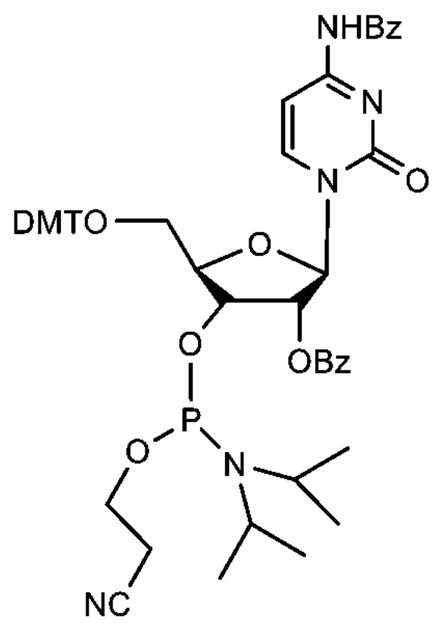
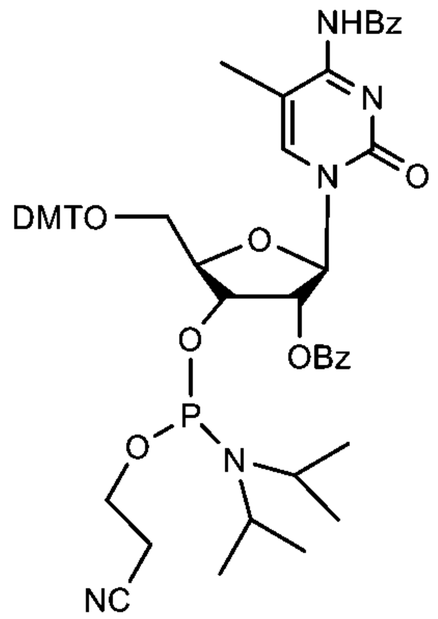
表5：用於「C」單元之建構組元

縮寫	結構
2'-OMe-(5m)C 亞磷醯胺	
2'-F-(5m)C亞磷醯胺	
2'-O-MOE-(5m)C 亞磷醯胺	

縮寫	結構
LNA-(5m)C 亞磷醯胺	
ENA-(5m)C 亞磷醯胺	
2'-O-丁炔-(5m)C 亞磷醯胺	
2'-NH_2-(5m)C 亞磷醯胺	

縮寫	結構
2'-F-Ara-(5m)C 亞磷醯胺	
2'-O-丙炔基-(5m)C 亞磷醯胺	
UNA-(5m)C 亞磷醯胺	
GNA-(5m)C 亞磷醯胺	

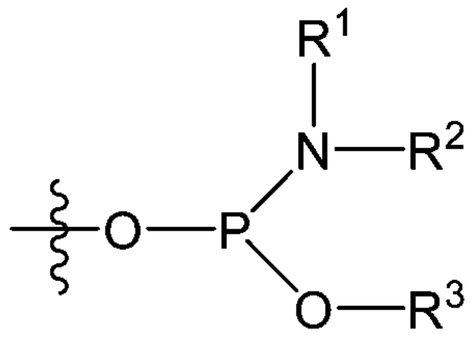
縮寫	結構
3'-O-甲基-(5m)C 亞磷醯胺	
scp-BNA-(5m)C 亞磷醯胺	
AmNA-(NMe)-(5m)C亞磷醯胺	
4etl-(5m)C 亞磷醯胺	

縮寫	結構
nmLNA-(5m)C 亞磷醯胺	
核糖-C 亞磷醯胺	
核糖-(5m)C 亞磷醯胺	

【0095】在各種實施例中，本文描述之STOPS™修飾之寡核苷酸亦可使用包含表4及5中描述之建構組元單體中之任何兩者或由表4及5中描述之建構組元單體中之任何兩者組成之二核苷酸製備。用於製造二核苷酸及相應之經修飾之寡核苷酸之例示性程序係闡述於下文實例中。

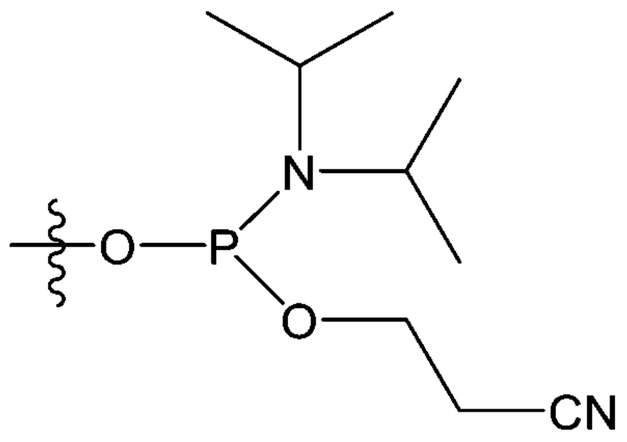
【0096】一實施例提供包含由立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯連接之A單元及C單元或由立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯連接之A單元及C單元組成之二核苷酸，其中該A單元係選自表4中描述之建構組元單體中之

任何一者及C單元係選自表5中描述之建構組元單體中之任何一者，且其中各 ~~O 獨立地係羥基、硫代磷酸O,O-二氫酯、磷酸O,O-二氫酯、亞磷醯胺、二甲氧基三苯甲基醚，或立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯。在一實施例中，該 ~~O 係下式(A)之亞磷醯胺：



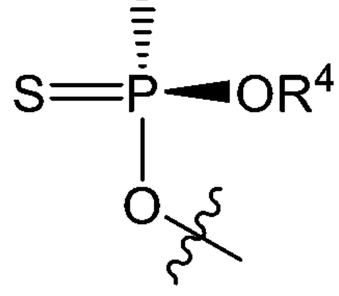
(A)

【0097】 在各種實施例中，式(A)之R^1及R^2各別地係C_{1-6}烷基，及R^3係C_{1-6}烷基或氰基C_{1-6}烷基。例如，在一實施例中，式(A)之亞磷醯胺係下式(A1)之亞磷醯胺：

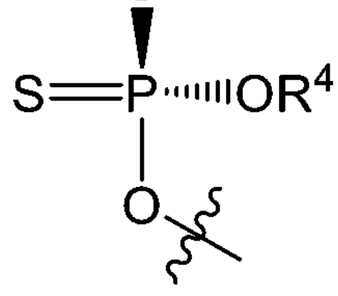


(A1)

【0098】 在另一實施例中， ~~O 係立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯，其係硫代磷酸酯。例如，在一實施例中，立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯係下式(B1)或(B2)之硫代磷酸酯：



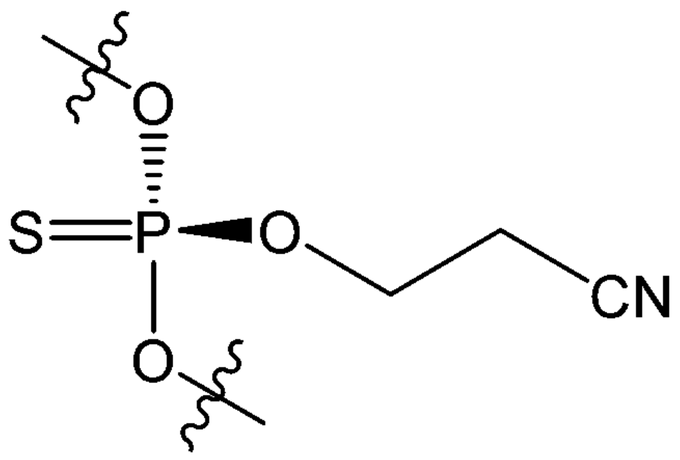
(B1)



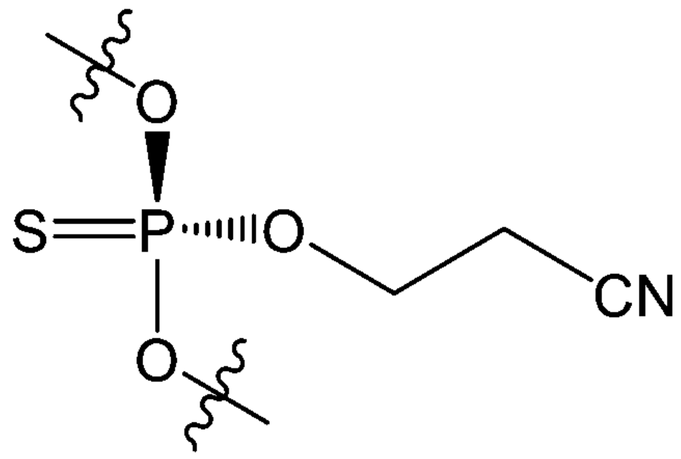
(B2)

【0099】 在各種實施例中，式(B1)及(B2)之R^4係C_{1-6}烷基或氰基C_{1-6}

烷基。例如，在一實施例中，式(B1)及(B2)之硫代磷酸酯分別係下式(B3)或(B4)之硫代磷酸酯：



(B3)



(B4)

【0100】 各種實施例提供製造如本文描述之經修飾之寡核苷酸之方法，其等包括偶合如本文描述之一或多個二核苷酸。進行此偶合之例示性方法係闡述於下文實例中。

醫藥組合物

【0101】 本文描述之一些實施例係關於醫藥組合物，其可包括有效量之本文描述之化合物(例如，如本文描述之STOPS™修飾之寡核苷酸化合物或其複合物)及醫藥上可接受之載劑、賦形劑或其組合。本文描述之醫藥組合物適用於人類及/或獸醫應用。

【0102】 如本文使用，「載劑」係指促進將化合物併入細胞或組織內之化合物。例如(但不限於)二甲亞碸(DMSO)係促進將許多有機化合物攝取至個體之細胞或組織內之常用載劑。

【0103】 如本文使用，「稀釋劑」係指醫藥組合物中缺乏藥理學活性但可為醫藥上必需或理想之成分。例如，稀釋劑可用於增加質量過小難以製造及/或投與之強效藥物之體積。稀釋劑亦可為用於溶解待藉由注射、攝取或吸入投與之藥物之液體。稀釋劑在此領域中之常見形式係緩衝水溶液，諸如(但不限於)模擬人類血液之組成之磷酸鹽緩衝鹽水。

【0104】 如本文使用，「賦形劑」係指添加至醫藥組合物以向組合

物提供(但不限於)體積、稠度、穩定性、結合能力、潤滑、崩解能力等之惰性物質。「稀釋劑」係賦形劑之一種類型。

【0105】 適當之調配係取決於所選之投與途徑。用於調配並投與本文描述之化合物之技術係為熟習此項技術者已知。此領域中現存之投與化合物之多種技術包括(但不限於)經口、經直腸、局部、氣霧劑、注射及非經腸遞送，包括肌內、皮下、靜脈內、髓內注射、囊內、直接心室內、腹膜內、鼻內及眼內注射。醫藥組合物將通常適用於特定之預期之投與途徑。

【0106】 吾人亦可以局部而非全身方式投與化合物，例如，經由將該化合物直接注射至經感染之區域內，視需要於藥效持久或持續釋放之調配物中。此外，吾人可在靶向藥物遞送系統中投與該化合物，例如，在經組織特異性抗體塗覆之脂質體中。該等脂質體亦可靶向器官並由器官選擇性吸收。

【0107】 本文揭示之醫藥組合物可以眾所周知之方式製造，例如，藉助於習知的混合、溶解、粒化、製造糖衣丸、磨細、乳化、囊封、包埋或製錠方法。如本文描述，醫藥組合物中使用之化合物可作為與醫藥上可相容之相對離子形成之鹽提供。

使用方法

【0108】 本文描述之一些實施例係關於治療HBV及/或HDV感染之方法，其可包括向經識別為罹患HBV及/或HDV感染之個體投與有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物。本文描述之其他實施例係關於使用如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物製造用於治療HBV

及/或HDV感染之藥物。本文描述之又其他實施例係關於如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物或包括如本文描述之經修飾之寡核苷酸之醫藥組合物用於治療HBV及/或HDV感染之用途。

【0109】 如本文別處指示，可使用各種途徑用於向有此需要之個體投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係藉由非經腸途徑投與個體。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係向個體靜脈內投與。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係向個體皮下投與。意外地，現已發現如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之實施例可以針對治療安全且有效之量向靈長類動物皮下投與。先前，向靈長類動物皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物(諸如REP 2139、REP 2055或彼等描述於美國專利案第7,358,068；8,008,269；8,008,270及8,067,385號中者)被認為不太可能係安全且有效的，因為據信達成效用需相對較高之劑量且伴隨安全性問題(諸如非所需之注射位點反應)之潛在風險增加。因此，例如，據信涉及向人類投與REP 2139之臨床前研究已利用僅靜脈內途徑。在據信效用必需之劑量程度下，據信安全性問題(諸如非所需之注射位點反應)將已排除皮下投與。

【0110】 意外地，如下文圖12及實例B5中闡述，現已發現向非人類靈長類動物皮下投與後之肝曝露係遠高於基於由另外類似靜脈內給藥產生之肝曝露程度預期之肝曝露。此發現意謂如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之實施例，及尤其如本文描述之高效STOPS™化合物或複合物之實施例可經由低於先前認為很可能有效之劑量之皮下投與向靈長類動物安全且有效地投與。此等較低劑量減小風險概況(例如，減小注射位點反應之風險)並因此針對人類用途提供臨床可接受之安全性概況。

【0111】本文揭示之一些實施例係關於治療HBV及/或HDV感染之方法，其可包括使感染感染HBV及/或HDV之細胞與有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物接觸。在一實施例中，治療HBV及/或HDV感染之此方法包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0112】本文描述之其他實施例係關於使用如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物製造用於治療HBV及/或HDV感染之藥物。本文描述之又其他實施例係關於如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物用於治療HBV及/或HDV感染之用途。在一實施例中，此等用途包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之

經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0113】本文揭示之一些實施例係關於抑制HBV及/或HDV之複製之方法，其可包括使感染感染HBV及/或HDV之細胞與有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物接觸。在一實施例中，抑制HBV及/或HDV之複製之此方法包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0114】本文描述之其他實施例係關於使用如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物製造用於抑制HBV及/或HDV之複製之藥物。本文描述之又其他實施例係關於如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物，於抑制HBV及/或HDV之複製之用途。在一實施例中，用於抑制HBV及/或HDV之複製之此等用途包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察

之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0115】 在一些實施例中，HBV感染可為急性HBV感染。在一些實施例中，HBV感染可為慢性HBV感染。

【0116】 本文揭示之一些實施例係關於治療因HBV及/或HDV感染而發展之肝硬化之方法，其可包括向罹患肝硬化之個體投與及/或使罹患肝硬化之個體中感染感染HBV及/或HDV之細胞與有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物接觸。在一實施例中，治療因HBV及/或HDV感染發展之肝硬化之此方法包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之

「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0117】本文描述之其他實施例係關於使用如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物製造用於以有效量之經修飾之寡核苷酸治療因HBV及/或HDV感染發展之肝硬化之藥物。本文描述之又其他實施例係關於如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物用於治療因HBV及/或HDV感染發展之肝硬化之用途。在一實施例中，用於治療肝硬化之此等用途包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0118】本文揭示之一些實施例係關於治療因HBV及/或HDV感染發展之肝癌(諸如肝細胞癌)之方法，其可包括向罹患肝癌之個體投與及/或使罹患肝癌之個體中感染HBV及/或HDV之細胞與有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物接觸。在一實施例中，治療因HBV及/或HDV感染發展之肝癌(諸如肝細胞癌)之此方法包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與

經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0119】 本文描述之其他實施例係關於使用如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物製造用於治療因HBV及/或HDV感染發展之肝癌(諸如肝細胞癌)之藥物。本文描述之又其他實施例係關於如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物用於治療因HBV及/或HDV感染發展之肝癌(諸如肝細胞癌)之用途。在一實施例中，用於治療肝癌(諸如肝細胞癌)之此等用途包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0120】 本文揭示之一些實施例係關於治療因HBV及/或HDV感染

發展之肝衰竭之方法，其可包括向罹患肝衰竭之個體投與及/或使罹患肝衰竭之個體中感染HBV及/或HDV之細胞與有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物接觸。在一實施例中，治療因HBV及/或HDV感染發展之肝衰竭之此方法包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0121】 本文描述之其他實施例係關於使用如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物製造用於治療因HBV及/或HDV感染發展之肝衰竭之藥物。本文描述之又其他實施例係關於如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或包括有效量之如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之醫藥組合物用於治療因HBV及/或HDV感染發展之肝衰竭之用途。在一實施例中，用於治療肝衰竭之此等用途包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向人類安全且有效地皮下投與經修飾之寡核苷酸或其複合物。例如，在一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物係REP-2139或其複合物。在另一實施例中，經修飾之寡核苷酸或其複合物包含如本文描述之高效STOPS™化合物或其複合物。例如，在一實施

例中，STOPS™化合物或其複合物係如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列，如藉由HBsAg分泌分析測定，STOPS™化合物或其複合物具有在小於30 nm之「A」活性範圍內之對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性。

【0122】 用於確定用於治療HBV及/或HDV感染之方法之效用之各種指標係亦為熟習此項技術者已知。合適之指標之實例包括(但不限於)由HBV DNA (或負載)、HBV表面抗原(HBsAg)及HBV e-抗原(HBeAg)之減小指示之病毒負載之減小、血漿病毒負載之減小、病毒複製之減少、血清轉化(病患血清中無法偵測之病毒)之時間減少、對療法之持續病毒反應之速率之增加、肝功能之改善及/或臨床結果中發病率或死亡率之下降。

【0123】 在一些實施例中，如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物之有效量係有效達成持續之病毒學反應(例如，在完成治療後持續之病毒反應12個月)之量。

【0124】 經臨床診斷患有HBV及/或HDV感染之個體包括「未接受過治療之」個體(例如，先前未針對HBV及/或HDV治療之個體)及針對HBV及/或HDV之先前治療已失敗之個體(「治療失敗」個體)。治療失敗個體包括「無反應者」 (ALT濃度未達成足夠降低之個體，例如，於開始抗HBV及/或抗HDV療法之6個月內無法達成自基線超過1 log10下降之個體)及「復發者」 (先前已針對HBV及/或HDV治療之ALT濃度已經增加之個體，例如，藉由雜化分析，ALT >正常上限兩倍及可偵測血清HBV DNA)。個體之其他實例包括無症狀性之患有HBV及/或HDV感染之個體。

【0125】 在一些實施例中，可向罹患HBV及/或HDV之治療失敗個

體提供如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物。在一些實施例中，可向罹患HBV及/或HDV之無反應者個體提供如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物。在一些實施例中，可向罹患HBV及/或HDV之復發者個體提供如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物。在一些實施例中，該個體可患有HBeAg陽性慢性B型肝炎。在一些實施例中，該個體可患有HBeAg陰性慢性B型肝炎。在一些實施例中，該個體可患有肝硬化。在一些實施例中，該個體可為無症狀性的，例如，該個體可經HBV及/或HDV感染但不顯示病毒感染之任何症狀。在一些實施例中，該個體可為免疫功能不全的。在一些實施例中，該個體可正經化學療法。

【0126】已用於治療HBV及/或HDV之藥劑之實例包括干擾素(諸如包括PEG-IFN-α-2a之IFN-α及聚乙二醇化干擾素)，及核苷/核苷酸(諸如拉米夫定(lamivudine)、替比夫定(telbivudine)、阿德福韋酯(adefovir dipivoxil)、克拉夫定(clevudine)、恩替卡韋(entecavir)、替諾福韋阿拉芬醯胺(tenofovir alafenamide)及替諾福韋酯(tenofovir disoproxil))。然而，與干擾素治療相關聯之缺點中之一些係不良副作用、需皮下投與及高成本。使用核苷/核苷酸治療之缺點可為耐藥性之發展。

【0127】耐藥性可為治療失敗之原因。如本文使用之術語「耐藥性」係指顯示對抗病毒藥劑之經延遲、減弱及/或無效之反應之病毒株。在一些實施例中，可向對一或多種抗HBV及/或抗HDV藥劑耐藥之感染HBV及/或HDV菌株之個體提供如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物。其中耐藥性可發展之抗病毒藥劑之實例包括拉夫米定、替比夫定、阿德福韋酯、克拉夫定、恩替卡韋、替諾福韋阿拉芬醯胺及替諾福韋酯。在一些實施例中，相較於對其他HBV及/或HDV抗病毒藥劑(諸如彼等本文描

述者)耐藥之HBV及/或HDV菌株之發展，當用如本文描述之經修飾之寡核苷酸治療個體時，耐藥性HBV及/或HDV菌株之發展係經延遲。

組合療法

【0128】 在一些實施例中，如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物可與一或多種額外藥劑組合用於治療及/或抑制HBV及/或HDV複製。額外藥劑包括(但不限於)干擾素、核苷/核苷酸類似物、衣殼組裝調節劑、序列特異性寡核苷酸(諸如反義寡核苷酸及/或siRNA)、進入抑制劑及/或小分子免疫調節劑。例如，在一實施例中，如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物可作為第一治療與針對HBV之一或多種第二治療組合使用，其中該第二治療包含具有抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之第二寡核苷酸、siRNA寡核苷酸(或核苷酸)、反義寡核苷酸、核苷、干擾素、免疫調節劑、衣殼組裝調節劑，或其組合。額外藥劑之實例包括重組干擾素α2b、IFN-α、PEG-IFN-α-2a、拉米夫定、替比夫定、阿德福韋酯、克拉夫定、恩替卡韋、替諾福韋阿拉芬醯胺、替諾福韋酯、JNJ-3989 (ARO-HBV)、RG6004、GSK3228836、AB-729、VIR-2218、DCR-HBVS、JNJ-6379、GLS4、ABI-HO731、JNJ-440、NZ-4、RG7907、AB-423、AB-506及ABI-H2158。在一實施例中，該額外藥劑係衣殼組裝調節劑(CAM)。在一實施例中，該額外藥劑係反義寡核苷酸(ASO)。

【0129】 在一些實施例中，如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物可在單一醫藥組合物中與一或多種額外藥劑一起投與。在一些實施例中，如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物可與一或多種額外藥劑作為兩個或更多個單獨之醫藥組合物投與。此外，如本文描述之經修飾之寡核苷酸或其複合物及一或多種額外藥劑之投與順序可變化。

實例

【0130】本文揭示之額外實施例進一步詳細描述於下列實例中，該等實例無意以任何方式限制申請專利範圍之範圍。

實例1至116

【0131】含有交替A及C單元之硫代磷酸酯化序列之一系列經修飾之寡核苷酸係在ABI 394合成器上使用標準亞磷醯胺化學合成。撐體係可控孔玻璃(CPG, 1000A, Glen Research, Sterling VA)及建構組元單體係描述於表4及5中。試劑(二甲胺基-亞甲基)胺基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮(DDTT)係用作用於合成寡核糖核苷酸硫代磷酸酯(PS鍵聯)之硫轉移劑。亞磷醯胺於CH_3CN中之0.1 M溶液在5-(乙硫基)-1H-四唑活化劑之存在下延長偶合至固體結合之寡核苷酸，接著標準加帽、氧化及去保護提供經修飾之寡核苷酸。所有經修飾之亞磷醯胺之逐步偶合效率係大於95%。亦製備含有交替A及C單元之序列但具有磷酸二酯(PO)鍵聯而非硫代磷酸酯(PS)鍵聯之數種經修飾之寡核苷酸。

去保護

【0132】在合成完成後，將可控孔玻璃(CPG)轉移至螺旋帽小瓶或螺旋帽無RNase微量離心管。寡核苷酸係以在55℃下用1.0 mL乙醇氨(氨:乙醇(3:1))之混合物同時去保護鹼基及磷酸酯基團5至15 hr裂解自該撐體。使小瓶在冰上短暫冷卻及然後將乙醇氨混合物轉移至新微量離心管。CPG用2 x 0.1 mL部分之去離子水清洗，放置於乾冰上10 min，然後在加速真空中乾燥。

粗寡聚物或原始分析之定量

【0133】將樣本溶解於去離子水(1.0 mL)中並如下定量：首先單獨

用水(1 mL)進行空白實驗。在微量離心管中充分混合20 ul樣本及980 uL水，轉移至比色皿並在260 nm下獲得吸光度讀數。將粗材料乾燥並儲存在-20℃下。

寡聚物之HPLC純化

【0134】 藉由HPLC (Dionex PA 100)分析及純化粗寡聚物。緩衝系統係A =水，B = 0.25 M Tris-HCl pH 8，C：0.375 M高氯酸鈉，流量5.0 mL/min，波長260 nm。首先注射少量材料(~5 OD)並藉由LC-MS分析。此材料之身份一經證實，則該粗寡聚物可然後使用較大量材料，例如，每次運行60 OD，流動速率5mL/min進行純化。然後將含有全長寡核苷酸之溶離份合併在一起，蒸發及最終如下文描述去鹽。

經純化之寡聚物之去鹽

【0135】 然後，經純化之無水寡聚物使用Sephadex G-25M (Amersham Biosciences)去鹽。用10 mL水調整匣。將完全溶解於2.5 mL無RNAse水中之經純化之寡聚物施加至該匣及非常緩慢之逐滴溶析。無鹽寡聚物用3.5 ml水直接溶析至螺旋帽小瓶內。

HPLC分析及電灑LC/Ms

【0136】 首先乾燥約0.2 OD寡聚物，重新溶解於水(50 µl)中及然後吸取至特定小瓶中用於HPLC及LC-MS分析。

【0137】 表6針對所得之例示性經修飾之寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元及主鏈是否為硫代磷酸酯(PS)或磷酸二酯(PO)。

表6

編號	長度	A修飾	C修飾	主鏈
1	(AC)20	2'-OMe	2'-OMe	PS
2	(AC)15	2'-OMe	2'-OMe	PS
3	(AC)25	2'-OMe	2'-OMe	PS

編號	長度	A修飾	C修飾	主鏈
4	(AC)30	2’-OMe	2’-OMe	PS
5	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-MOE	PS
6	(AC)20	LNA	LNA	PS
7	(AC)20	2'-F	2'-F	PS
8	(AC)20	2'-O-丙炔基	2'-O-丙炔基	PS
9	(AC)20	2'-O-丁炔	2'-O-丁炔	PS
10	(AC)20	2’-F-Ara	2'-F-Ara	PS
11	(AC)20	UNA	UNA	PS
12	(AC)20	ENA	ENA	PS
13	(AC)20	2’-OMe	2'-O-MOE	PS
14	(AC)20	2’-OMe	LNA	PS
15	(AC)20	2’-OMe	2'-F	PS
16	(AC)20	2’-OMe	2'-O-丙炔基	PS
17	(AC)20	2’-OMe	2'-O-丁炔	PS
18	(AC)20	2’-OMe	2'-F-Ara	PS
19	(AC)20	2’-OMe	UNA	PS
20	(AC)20	2’-OMe	ENA	PS
21	(AC)20	2’-OMe	2'-NH_2	PS
22	(AC)20	2'-O-MOE	2’-OMe	PS
23	(AC)20	2'-O-MOE	LNA	PS
24	(AC)20	2'-O-MOE	2'-F	PS
25	(AC)20	2'-O-MOE	2'-O-丙炔基	PS
26	(AC)20	2'-O-MOE	2’-O-丁炔	PS
27	(AC)20	2'-O-MOE	2’-F-Ara	PS
28	(AC)20	2'-O-MOE	UNA	PS
29	(AC)20	2'-O-MOE	ENA	PS
30	(AC)20	2'-O-MOE	2'-NH_2	PS
31	(AC)20	LNA	2’-OMe	PS
32	(AC)20	LNA	2'-O-MOE	PS
33	(AC)20	LNA	2'-F	PS
34	(AC)20	LNA	2’-O-丙炔基	PS
35	(AC)20	LNA	2’-O-丁炔	PS
36	(AC)20	LNA	2’-F-Ara	PS
37	(AC)20	LNA	UNA	PS
38	(AC)20	LNA	ENA	PS
39	(AC)20	LNA	2'-NH_2	PS

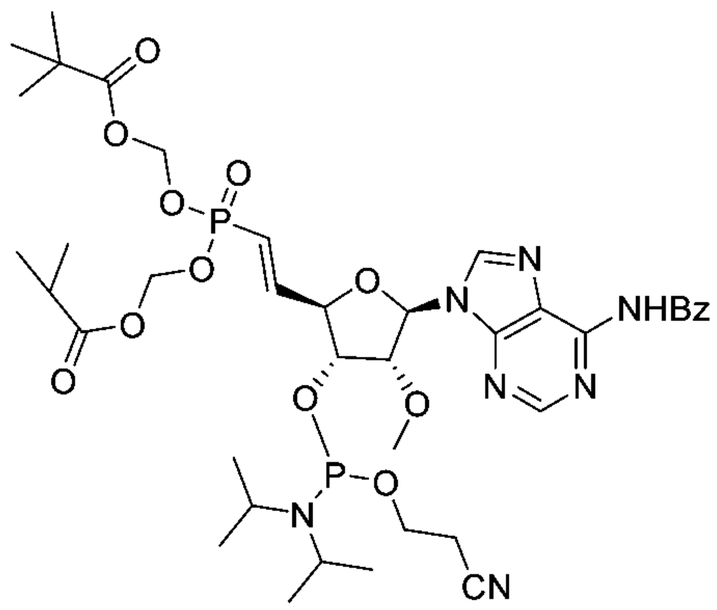
編號	長度	A修飾	C修飾	主鏈
40	(AC)20	2'-F	LNA	PS
41	(AC)20	2'-F	2’-OMe	PS
42	(AC)20	2'-F	2'-O-MOE	PS
43	(AC)20	2'-F	2’-O-丙炔基	PS
44	(AC)20	2'-F	2’-O-丁炔	PS
45	(AC)20	2'-F	2’-F-Ara	PS
46	(AC)20	2'-F	UNA	PS
47	(AC)20	2'-F	ENA	PS
48	(AC)20	2'-F	2'-NH_2	PS
49	(AC)20	2’-O-丙炔基	2’-OMe	PS
50	(AC)20	2’-O-丙炔基	2'-O-MOE	PS
51	(AC)20	2’-O-丙炔基	LNA	PS
52	(AC)20	2’-O-丙炔基	2'-F	PS
53	(AC)20	2’-O-丙炔基	2’-O-丁炔	PS
54	(AC)20	2’-O-丙炔基	2’-F-Ara	PS
55	(AC)20	2’-O-丙炔基	UNA	PS
56	(AC)20	2’-O-丙炔基	ENA	PS
57	(AC)20	2’-O-丙炔基	2'-NH_2	PS
58	(AC)20	2’-O-丁炔	2’-OMe	PS
59	(AC)20	2’-O-丁炔	2'-O-MOE	PS
60	(AC)20	2’-O-丁炔	LNA	PS
61	(AC)20	2’-O-丁炔	2'-F	PS
62	(AC)20	2’-O-丁炔	2’-O-丙炔基	PS
63	(AC)20	2’-O-丁炔	2’-F-Ara	PS
64	(AC)20	2’-O-丁炔	UNA	PS
65	(AC)20	2’-O-丁炔	ENA	PS
66	(AC)20	2’-O-丁炔	2'-NH_2	PS
67	(AC)20	2’-F-Ara	2’-OMe	PS
68	(AC)20	2’-F-Ara	2'-O-MOE	PS
69	(AC)20	2’-F-Ara	LNA	PS
70	(AC)20	2’-F-Ara	2'-F	PS
71	(AC)20	2’-F-Ara	2’-O-丙炔基	PS
72	(AC)20	2’-F-Ara	2’-O-丁炔	PS
73	(AC)20	2’-F-Ara	UNA	PS
74	(AC)20	2’-F-Ara	ENA	PS

編號	長度	A修飾	C修飾	主鏈
75	(AC)20	2’-F-Ara	2'-NH_2	PS
76	(AC)20	UNA	2’-OMe	PS
77	(AC)20	UNA	2'-O-MOE	PS
78	(AC)20	UNA	LNA	PS
79	(AC)20	UNA	2'-F	PS
80	(AC)20	UNA	2’-O-丙炔基	PS
81	(AC)20	UNA	2’-O-丁炔	PS
82	(AC)20	UNA	2’-F-Ara	PS
83	(AC)20	UNA	ENA	PS
84	(AC)20	UNA	2'-NH_2	PS
85	(AC)20	ENA	2’-OMe	PS
86	(AC)20	ENA	2'-O-MOE	PS
87	(AC)20	ENA	LNA	PS
88	(AC)20	ENA	2'-F	PS
89	(AC)20	ENA	2’-O-丙炔基	PS
90	(AC)20	ENA	2’-O-丁炔	PS
91	(AC)20	ENA	2’-F-Ara	PS
92	(AC)20	ENA	UNA	PS
93	(AC)20	ENA	2'-NH_2	PS
94	(AC)20	LNA	2’-O-MOE	PS
95	(AC)20	2’-F	LNA	PS
96	(AC)25	2’-OMe	2’-OMe	PO
97	(AC)25	2’-OMe	2’-OMe	PS
98	(AC)20	2’-F	2’-OMe	PS
99	(AC)20	LNA	2'-O-Me	PS
100	(AC)20	2’-OMe	2'-F	PS
101	(AC)20	2’-OMe	2'-OMe	PO
102	(AC)20	2'-F	2'-O-MOE	PS
103	(AC)30	2'-OMe	2'-OMe	PS
104	(AC)15	2'-OMe	2'-OMe	PS
105	(AC)20	2'-OMe	LNA	PS
106	(AC)20	LNA	LNA	PS
107	(AC)20	2’-OMe	2’-O’MOE	PS
108	(AC)20	2’-O-MOE	2’-OMe	PS
109	(AC)20	2’-OMe	2'-OMe	PS
110	(AC)30	2’-OMe	2’-O-丁炔	PO

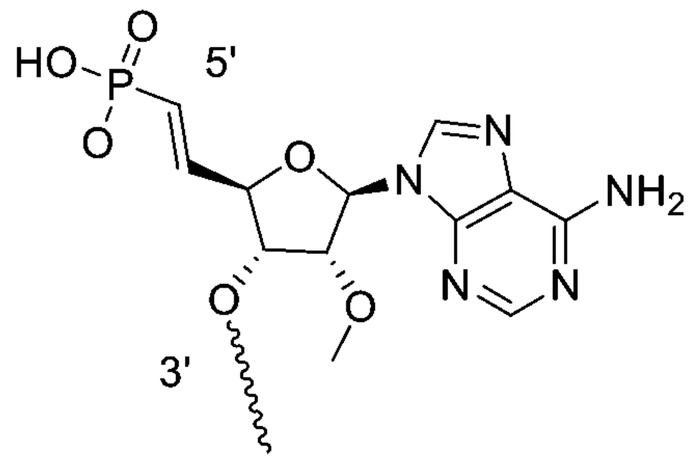
編號	長度	A修飾	C修飾	主鏈
111	(AC)20	2'-F	2'-F	PS
112	(AC)20	2’-OMe	2’-OMe	PS
113	(AC)15	2’-OMe	2’-OMe	PO
114	(AC)20	2’-O-MOE	2’-O-MOE	PS
115	(AC)20	2'-O-MOE	2’-F	PS
116	(AC)20	LNA	2'-F	PS

實例117至130

【0138】 5’修飾之效應係藉由根據上文於實例1至116中描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。端帽寡核苷酸係藉由使用5’-乙烯基膦酸酯建構組元以併入5’-乙烯基膦酸酯端帽製得：



5’-乙烯基膦酸酯建構組元(5’-VP)



具有5’-乙烯基膦酸酯端帽之經修飾之寡核苷酸

【0139】 參考圖7，5’-乙烯基膦酸酯建構組元(5’-VP)係如下製備：

【0140】 化合物7-2之製備：向7-1 (15.0 g，53.3 mmol)於無水吡啶(150 mL)中之溶液添加TBSCl (20.0 g，133.3 mmol)及咪唑(10.8 g，159.9 mmol)。在室溫下將混合物攪拌15 h。TLC顯示7-1經完全消耗。在真空中濃縮反應混合物以產生殘餘物。該殘餘物用DCM (500 mL)淬滅。

DCM層用H_2O (1 L*2)清洗2次並用鹽水清洗。在真空中濃縮DCM層以產生呈黃色油之粗7-2 (27.2 g，53.3 mmol)。該粗7-2係直接用於下一步驟中。ESI-LCMS m/z 510.5 $[M+H]^+$。

【0141】化合物7-3之製備：在5℃下向7-2 (26.2 g，51.3 mmol)於吡啶(183 mL)中之溶液滴加苯甲醯氯(15.8 g，113.0 mmol)。在室溫下將反應混合物攪拌2小時。TLC顯示該7-2經完全消耗。該反應混合物用H_2O (4 mL)淬滅。然後將$NH_3.H_2O$ (20 mL)添加至該反應混合物並在室溫下攪拌30 min。然後藉由在減壓下濃縮自該混合物移除吡啶。將殘餘物添加至H_2O (100 mL)並用EA (150 mL*3)萃取及組合EA層。該EA層用鹽水清洗並於Na_2SO_4上乾燥。過濾並濃縮以產生粗7-3 (45.0 g)。ESI-LCMS m/z = 614.5 $[M+H]^+$。

【0142】化合物7-4之製備：在0℃下向7-3 (44.0 g，粗)於THF (440 mL)中之混合物溶液添加H_2O (220 mL)及TFA (220 mL)。然後在0℃下將反應混合物攪拌1.5 h。TLC顯示該7-3經完全消耗。用$NH_3.H_2O$將反應混合物pH調整至7至8。然後該混合物用EA (300 mL*7)萃取。經組合之EA層用鹽水清洗並在真空中濃縮以產生粗產物。該粗產物係藉由管柱層析術(EA：PE = 1:5~1:1)純化以產生呈白色固體之化合物7-4 (15.8 g)。^{1}H-NMR (400 MHz,DMSO-d_6): δ = 11.24 (s, 1H，與D_2O交換), 8.77 (s, 2H), 8.04-8.06 (m, 2H), 7.64-7.66 (m, 2H), 7.54-7.58 (m, 2H), 6.14-6.16 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 5.20-5.23 (m, 1H),4.58-4.60 (m, 1H), 4.52-4.55 (m,1H), 3.99-4.01 (m, 1H), 3.69-3.75 (m, 1H), 3.57-3.61 (m, 1H), 3.34 (s, 4H), 0.93 (s, 9H), 0.14-0.15 (d, J = 1.44 Hz, 6H)。ESI-LCMS m/z = 500.3 $[M+H]^+$。

【0143】化合物7-5之製備：在室溫下向500 mL圓底燒瓶依次添加DMSO (132 mL)及7-4 (13.2 g，26.4 mmol)，EDCI (15.19 g，79.2 mmol)。然後將吡啶(2.09 g，26.4 mmol，2.1 mL)添加至反應混合物。在攪拌5 min後，將TFA (1.51 g，13.2 mmol)添加至該反應混合物。然後在室溫下將反應混合物攪拌3 hr。LC-MS顯示該7-4經完全消耗。將該反應混合物添加至冰水(500 mL)並用EA (300 mL*3)萃取3次。經組合之EA層用H_2O清洗2次並用鹽水清洗1次。於Na_2SO_4上乾燥並過濾。濃縮濾液以獲得呈白色固體之粗7-5 (14.6 g)。ESI-LCMS m/z = 516.3 $[M+H]^+$。

【0144】化合物7-6之製備：在0℃下將5A (24.4 g，38.5 mmol)添加至NaH (2.5 g，64.3 mmol，60%純度)於THF (50 mL)中之混合物溶液。在攪拌15 min後，將於THF (60 mL)中之7-5 (16.0 g，32.1 mmol)添加至反應混合物。然後在室溫下將該反應混合物攪拌1 hr。LC-MS顯示該7-5經完全消耗。然後該反應混合物用飽和NH_4Cl (500 mL)淬滅並用EA (400 mL*3)萃取3次。經組合之EA層用鹽水清洗，於Na_2SO_4上乾燥並過濾。在真空中濃縮濾液以獲得粗產物。該粗產物係藉由c.c (EA：PE = 1:5 ~ 1:1)純化以產生呈白色固體之7-6 (10.0 g，12.4 mmol，38.6%產率)。ESI-LCMS m/z = 804.4 $[M+H]^+$；^{31}P NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ 17.01。

【0145】化合物7-7之製備：向500 mL圓底燒瓶依次添加7-6 (9.0 g，11.2 mmol)及H_2O (225 mL)，HCOOH (225 mL)。在26℃下將反應混合物攪拌15 h。LC-MS顯示該7-6經完全消耗。用$NH_3.H_2O$將該反應混合物調整pH = 6至7。然後該混合物用EA (300 mL*3)萃取3次。經組合之EA層係於Na_2SO_4上乾燥，過濾並濃縮濾液以獲得粗產物。該粗產物係藉

由管柱層析術(DCM/ MeOH = 100:1 ~ 60:1)純化以產生產品7-7 (7.0 g，10.1 mmol，90.6%產率)。^{1}H-NMR (400 MHz,DMSO-d_6): δ = 11.11 (s, 1H，與D_2O交換),8.71-8.75 (d, J=14.4, 2H), 8.04-8.06 (m, 2H), 7.64-7.65 (m, 1H), 7.54-7.58 (m, 2H), 6.88-7.00 (m, 1H), 6.20-6.22 (d, J=5.4, 2H), 6.06-6.16 (m, 1H), 5.74-5.75 (d, J=5.72, 2H), 5.56-5.64 (m, 4H), 4.64-4.67 (m, 1H), 4.58-4.59(m, 1H), 4.49-4.52 (m, 1H), 3.37 (s, 3H), 1.09-1.10 (d, J=1.96, 18H)。^{31}P NMR (162 MHz, DMS O-d_6) δ 17.45。ESI-LCMS m/z = 690.4 $[M+H]^+$。

【0146】化合物5'-VP之製備：向7-7 (5.5 g，7.9 mmol)於DCM (55 mL)中之溶液添加DCI (750 mg，6.3 mmol)，然後添加CEP[$N(iPr)_2$]$_2$ (3.1 g，10.3 mmol)。在室溫下將混合物攪拌2 h。TLC顯示3.5%之7.7剩餘。反應混合物用H_2O (40 mL*2)及鹽水(50 mL*2)清洗，於Na_2SO_4上乾燥並濃縮以產生粗產物。殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/5於30 min內增加至CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 3/1收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。濃縮該產物並用EA (50 mL* 3)萃取。經組合之EA層用鹽水清洗並於Na_2SO_4上乾燥，過濾並濃縮濾液以獲得所得之呈白色固體之5'-VP (6.0 g，98%純度)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.27 (s, 1H，與D_2O交換), 8.72-8.75 (m, 2H), 8.04-8.06 (m, 2H), 7.54-7.68 (m, 3H), 6.85-7.05 (m, 1H),6.09-6.26 (m, 2H), 5.57-5.64 (m, 4H), 4.70-4.87 (m, 3H), 3.66-3.88 (m, 4H), 3.37-3.41 (m, 3H),2.82-2.86 (m, 2H), 1.20-1.21 (m, 12H), 1.08-1.09 (m, 18H)。^{31}PNMR (162 MHz, DMSO-d_6):149.99,

149.16, 17.05, 16.81。ESI-LCMS m/z = 890.8 $[M+H]^+$。

【0147】 表7針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元及5’修飾。

表7

編號	長度	A	C	5’-修飾
117	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	OH
118	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	OH
119	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	OH
120	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A
121	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A
122	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A
123	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A
124	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	OH
125	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	OH
126	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	OH
127	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A
128	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A
129	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A
130	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A

實例131至174

【0148】 序列長度、LNA併入及5’-修飾之效應係藉由根據上文於實例1至116中描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。表8針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元、5’修飾及LNA單元之長度及位置。

表8

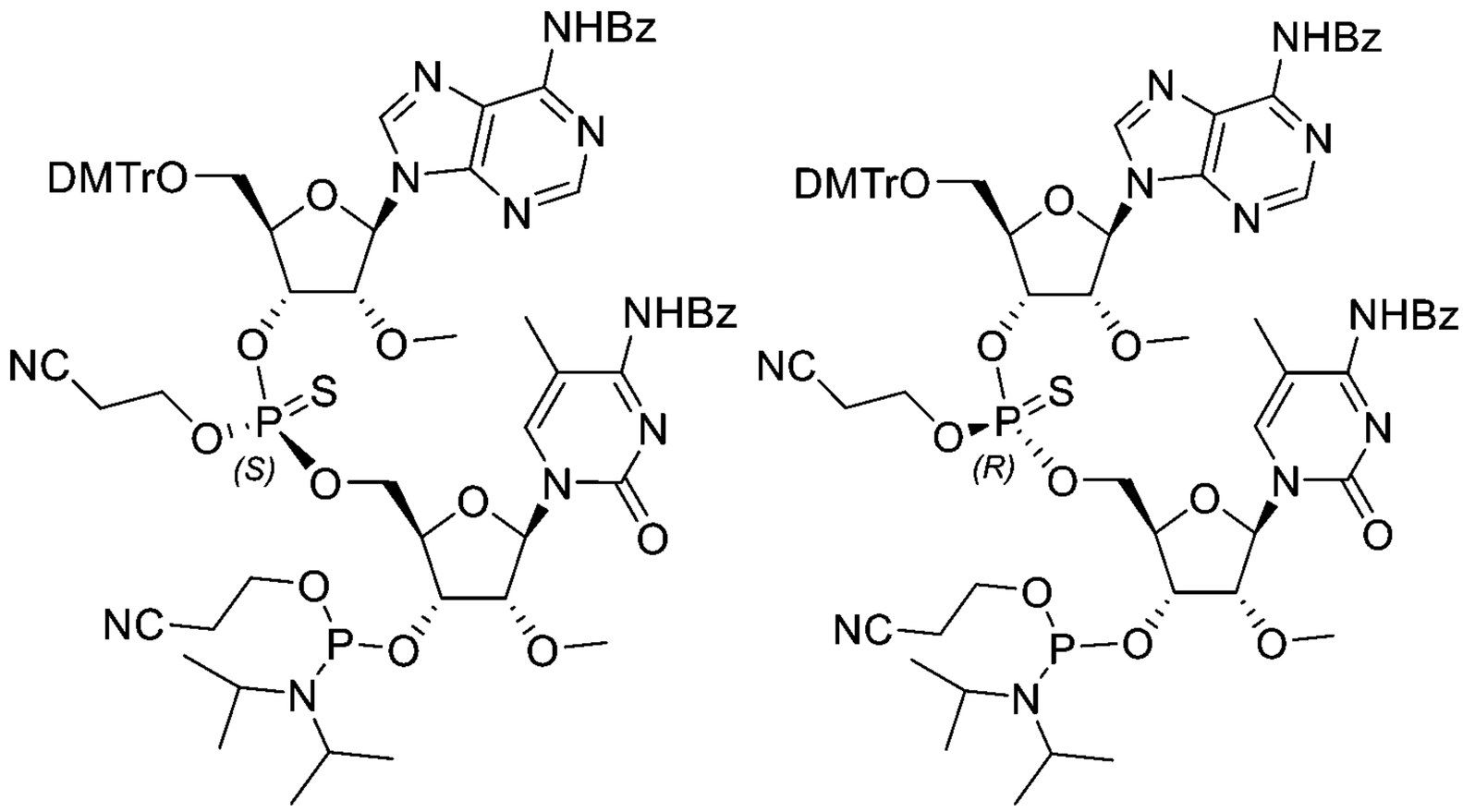
編號	長度	A	C	5’-修飾	LNA修飾
131	(AC)17	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
132	(AC)18	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
133	(AC)19	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
134	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	OH	
135	(AC)17	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	

編號	長度	A	C	5’-修飾	LNA修飾
136	(AC)18	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
137	(AC)19	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
138	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
139	(AC)17	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	OH	
140	(AC)18	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	OH	
141	(AC)19	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	OH	
142	(AC)20	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	OH	
143	(AC)17	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
144	(AC)18	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
145	(AC)19	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
146	(AC)20	LNA-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
147	(AC)17	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	
148	(AC)18	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	
149	(AC)19	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	
150	(AC)20	UNA-A	LNA-(5m)C	OH	
151	(AC)17	UNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
152	(AC)18	UNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
153	(AC)19	UNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
154	(AC)20	UNA-A	LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
155	(AC)17	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
156	(AC)18	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
157	(AC)19	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
158	(AC)20	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	
159	(AC)20	LNA-A	UNA-(5m)C	OH	4 LNA之組元
160	(AC)17	LNA-A	UNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
161	(AC)18	LNA-A	UNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
162	(AC)19	LNA-A	UNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
163	(AC)20	LNA-A	UNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	
164	(AC)20	2’-OMe-A LNA-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	OH	每第3個鹼基係LNA
165	(AC)20	2’-OMe-A LNA-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	每第3個鹼基係LNA
166	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	OH	每第4個鹼基係LNA
167	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	每第4個鹼基係LNA

編號	長度	A	C	5’-修飾	LNA修飾
168	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	5 (5m)lnC在中間
169	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	6 lnAps(5m)C在中間
170	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	6 lnAps(5m)C在中間
171	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA(5m)C	OH	5 (5m)lnC在中間
172	(AC)20	LNA-A 2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA(5m)C	OH	10 lnAps(5m)C在中間
173	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	5 (5m)lnC在中間
174	(AC)20	2’-OMe-A LNA-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	乙烯基-膦酸酯-A	10 lnAps(5m)C在中間

實例175至216

【0149】 序列長度、LNA併入、立體化學修飾及5’修飾之效應係藉由根據上文於實例1至116中描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估，只是該等寡核苷酸係藉由經修飾之方法使用由立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯如下連接之A單元及C單元構成之二核苷酸建構組元製備：



2’-OMeApsR(5m)mC亞磷醯胺(9R) 2’-OMeApsS(5m)mC亞磷醯胺(9S)

【0150】 參考圖8、9A及9B，二核苷酸建構組元9R及9S係如下製

備：

【0151】化合物8-2之製備：在室溫下向具有惰性氮氣氛之8-1 (300.0 g，445.1 mmol)於3000 mL無水二噁烷中之溶液滴加乙醯丙酸(309.3 g，2.67 mol)。然後在室溫下依次添加二環己亞胺甲烷(274.6 g，1.33 mol)及4-二甲胺基吡啶(27.1 g，222.0 mmol)。在室溫下將所得溶液攪拌5 h及用5000 mL二氯甲烷稀釋並過濾。有機相分別用2 x 3000 mL 2%碳酸氫鈉水溶液及1 x 3000 mL水清洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，過濾並在減壓下濃縮。獲得呈白色固體之345.0 g (粗) 8-2且無需進一步純化即可用於下一步驟中。ESI-LCMS: m/z 774 $[M+H]^+$。

【0152】化合物8-3之製備：在0℃下向具有惰性氮氣氛之溶解於3000 mL二氯甲烷中之8-2 (345 g，445.1 mmol)之溶液滴加對甲苯磺酸(84.6 g，445.1 mmol)。在0℃下將所得溶液攪拌0.5 h及用3000 mL二氯甲烷稀釋並分別用2 x 2000 mL飽和碳酸氫鈉水溶液及1 x 2000 mL飽和氯化鈉水溶液清洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，並在減壓下濃縮且殘餘物係藉由矽膠管柱層析術(SiO_2，二氯甲烷:甲醇= 30:1)純化以產生呈白色固體之8-3 (210.0 g，90%，經兩個步驟)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ =12.88 (s, 1H), 8.17-8.10 (m, 3H), 7.62-7.60 (m, 1H), 7.58-7.48 (m, , 2H), 5.97-5.91 (m, 1H), 5.42 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.21-4.08 (m, 2H), 3.78-3.59 (m, 2H), 2.75-2.74 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 2.13 (d, J = 2.3 Hz, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.81 (m, 1H), 1.77-1.56 (m, 1H), 1.33-0.98 (m, 1H)。ESI-LCMS: m/z 474 $[M+H]^+$。

【0153】化合物8-4之製備：在0℃下向具有惰性氮氣氛之8-3 (210.0 g，444.9 mmol)於2000 mL乙腈中之溶液依次添加8-3a (360.0 g，

405.4 mmol)及ETT (58.0 g，445.9 mmol)。在室溫下將所得溶液攪拌2 h。然後將混合物過濾且無需進一步純化即可用於下一步驟中。ESI-LCMS: m/z 1258 $[M+H]^+$。

【0154】 化合物8-5及8-6之製備：在室溫下向具有惰性氮氣氛之8-4 (509.9 g，405.4 mmol)於2000 mL乙腈中之溶液依次添加吡啶(128.0 g，1.62 mol)及5-胺基-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(121.8 g，810.9 mmol)。在室溫下將反應溶液攪拌30分鐘。將所得溶液過濾並在減壓下濃縮。殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此導致呈白色固體之8-5及8-6 (430.0 g，90%，經兩個步驟)之混合物。溶離份用3000 mL二氯甲烷稀釋。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，過濾並在減壓下濃縮。殘餘物係藉由具有下列條件之SFC純化：CHIRALPAK IB N-5(IB50CD-VD008)/SFC 0.46 cm I.D. × 25 cm L 10.0 μl流動相：(DCM/EtOAc=80/20(V/V))，偵測器，UV 254 nm。濃縮溶離份直至在減壓下無殘餘溶劑。獲得呈白色固體之105.0 g (35.0%) 8-5並用於製造如下文描述之9R。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 12.88 (s, 1H), 11.26 (s, 1H), 8.62 (d, J = 8.06 Hz, 2H), 8.18 (m, 2H), 8.05 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.67-7.48 (m, 6H), 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.28-7.18 (m, 7H), 6.86-6.83 (m, 4H), 6.21 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 5.91 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.44-5.41 (m, 1H), 5.28-5.26 (m, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.45-4.24 (m, 7H), 3.71 (s, 6H), 3.39 (s, 4H), 3.31 (s, 3H), 2.98 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 2.56 (m, 2H), 2.01 (s,

3H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 67.17。ESI-LCMS: m/z 1292 $[M+H]^+$；獲得呈白色固體之170.0 g (56.6%) 8-6並用於製造如下文描述之9S。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 12.86 (s, 1H), 11.25 (s, 1H), 8.62 (d, J = 16.6 Hz, 2H), 8.18 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.05 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.67-7.48 (m, 6H), 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.28-7.18 (m, 7H), 6.87-6.85 (m, 4H), 6.21 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.91 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.43-5.39 (m, 1H), 5.28-5.26 (m, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.48-4.21 (m, 7H), 3.72 (s, 6H), 3.36 (s, 4H), 3.26 (s, 3H), 2.95 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 2.55 (m, 2H), 2.04 (s, 3H); ^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 66.84；ESI-LCMS: m/z 1292 $[M+H]^+$。

【0155】化合物9-1之製備：在0℃下向具有惰性氮氣氛之8-5 (100.0 g，77.4 mmol)於700 mL乙腈中之溶液添加於吡啶/乙酸(3:2)中之0.5 M水合肼(20.0 g，0.4 mol)。在0℃下將所得溶液攪拌0.5 h。然後立刻向反應添加2,4-戊二酮，容許將混合物升溫至室溫並再攪拌15 min。該溶液用DCM (2000 mL)稀釋並用飽和NH_4Cl水溶液清洗兩次及用鹽水清洗且於Na_2SO_4上乾燥。然後在減壓下濃縮該溶液且殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此導致呈白色固體之9-1 (67.0 g，80%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 12.97 (s, 1H), 11.26 (s, 1H), 8.62 (d, J = 11.2 Hz, 2H), 8.19 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.05 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.67-7.48. (m, 6H), 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.28-7.18 (m, 7H),

6.85 (m, 4H), 6.21 (m, 1H), 5.90 (d, J= 3.2 Hz, 1H), 5.49-5.43 (m, 2H), 5.05 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.40-4.30 (m, 4H), 4.18-4.11 (m, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.40-3.32 (m, 8H), 2.98 (m, 2H), 2.04 (s, 3H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 67.30。ESI-LCMS: m/z 1194 $[M+H]^+$。

【0156】化合物9R之製備：在室溫下向具有惰性氮氣氛之9-1 (58.0 g，48.6 mmol)於600 mL二氯甲烷中之溶液依次添加CEP[$N(iPr)_2]_2$ (18.7 g，62.1 mmol)及DCI (5.1 g，43.7 mmol)。在室溫下將所得溶液攪拌1小時並用1000 mL二氯甲烷稀釋及分別用2 x 1000 mL飽和碳酸氫鈉水溶液及1 x 1000 mL飽和氯化鈉水溶液清洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，過濾並濃縮直至在減壓下無殘餘溶劑。殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此導致呈白色固體之9R (51.2 g，70%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ = 12.94 (m, 1H), 11.26 (s, 1H), 8.62 (m, 2H), 8.19 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.05 (m, 2H), 7.77 (m, 1H), 7.69-7.46 (m, 6H), 7.39 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.26-7.20 (m, 7H), 6.84 (m, 4H), 6.20 (m, 1H), 5.90 (m, 1H), 5.43 (m, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.46-4.17 (m, 7H), 4.12 (m, 1H), 3.82-3.80 (m, 2H), 3.73-3.66 (s, 6H), 3.64-3.58 (m, 2H), 3.48-3.29 (m, 8H), 2.98 (s, 2H), 2.82-2.77 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.24-1.15 (m, 12H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 149.87, 149.80, 67.43, 67.33。ESI-LCMS: m/z 1394 $[M+H]^+$。

【0157】化合物9-2之製備：在0℃下向具有惰性氮氣氛之8-6 (110.0 g，85.1 mmol)於700 mL乙腈中之溶液添加於吡啶/乙酸(3:2)中之0.5 M水合肼(21.1 g，423.6 mmol)。在0℃下將所得溶液攪拌0.5 h。然後立刻向反應添加2,4-戊二酮，容許將混合物升溫至室溫並再攪拌15 min，該溶液用DCM (2000 mL)稀釋並用飽和NH_4Cl水溶液清洗兩次及用鹽水清洗並於Na_2SO_4上乾燥。然後在減壓下濃縮該溶液且殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此導致呈白色固體之9-2 (72.0 g，80%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 12.94 (s, 1H), 11.24 (s, 1H), 8.61-8.57 (m, 2H), 8.18 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.66-7.47 (m, 6H), 7.40 (d, J= 7.1 Hz, 2H), 7.27-7.20 (m, 7H), 6.86 (m, 4H), 6.20 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 5.87 (d, J= 4.0 Hz, 1H), 5.42 (m, 2H), 5.05 (m, 1H), 4.45 (m, 2H), 4.40-4.24 (m, 1H), 4.22-4.06 (m, 4H), 3.92 (m, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.40-3.32 (m, 8H), 2.94 (m, 2H), 2.03 (m, 3H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 66.87。ESI-LCMS: m/z 1194 $[M+H]^+$。

【0158】化合物9S之製備：在室溫下向具有惰性氮氣氛之9-2 (62.0 g，51.9 mmol)於600 mL二氯甲烷中之溶液依次添加$CEP[N(iPr)_2]_2$ (19.0 g，63.1 mmol)及DCI (5.55 g，47.0 mmol)。在室溫下將所得溶液攪拌1小時並用1000 mL二氯甲烷稀釋及分別用2 x 1000 mL飽和碳酸氫鈉水溶液及1 x 1000 mL飽和氯化鈉水溶液清洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾

燥，過濾並濃縮直至在減壓下無殘餘溶劑。殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此導致呈白色固體之9S (51.5 g，70%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 12.90 (s, 1H), 11.25 (s, 1H), 8.60 (m, 2H), 8.19 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 8.04 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.67-7.48 (m, 6H), 7.41 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.29-7.19 (m, 7H), 6.85 (m, 4H), 6.21 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.91-5.87 (m, 1H), 5.41 (m, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.46-4.21 (m, 7H), 4.10 (m, 1H), 3.83-3.75 (m, 2H), 3.73-3.68 (s, 6H), 3.68-3.59 (m, 2H), 3.40-3.32 (m, 8H), 2.93 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.18-1.13 (m, 12H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 149.96, 149.73, 66.99, 66.86。ESI-LCMS: m/z 1394 $[M+H]^+$。

【0159】 經修飾之方法亦使用更長之偶合時間(8 min)及更大當量之醯胺化物(8當量)。表9針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元、立體化學定義之硫代磷酸酯(PS)鍵聯之數量及類型(R或S)及5’-修飾。

表9

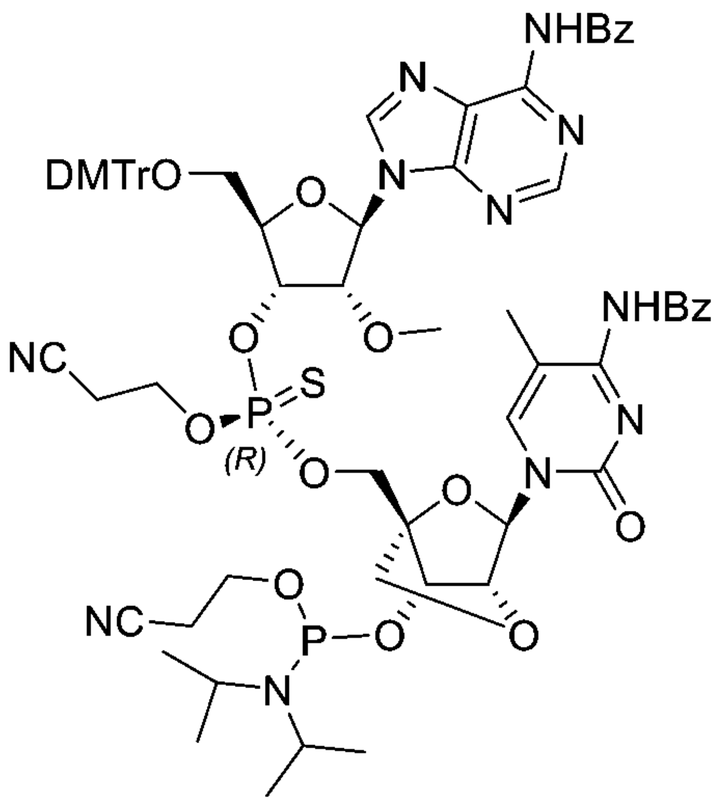
編號	長度	A	C	PS修飾	5’-修飾
175	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5 R異構體	OH
176	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6 R異構體	OH
177	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	4 R異構體	OH
178	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	4 R異構體	OH
179	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5 R異構體	OH
180	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6 R異構體	OH
181	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6 R異構體	乙烯基-膦酸酯-A

編號	長度	A	C	PS修飾	5’-修飾
182	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	7 R異構體	OH
183	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	13 R異構體	OH
184	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20 R異構體	OH
185	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20 R異構體	乙烯基-膦酸酯-A
186	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	19 R異構體	乙烯基-膦酸酯-A
187	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	5 R異構體	OH
188	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	6 R異構體	OH
189	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	6 R異構體	OH
190	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	4 R異構體	OH
191	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5 R異構體	OH
192	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	6 R異構體	OH
193	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	6 R異構體	乙烯基-膦酸酯-A
194	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	13 R異構體	OH
195	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	20 R異構體	OH
196	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	20 R異構體	乙烯基-膦酸酯-A
197	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5 S異構體	OH
198	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6 S異構體	OH
199	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6 S異構體	OH
200	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	4 S異構體	OH
201	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5 S異構體	OH
202	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6 S異構體	OH
203	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	7 S異構體	OH
204	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	13 S異構體	OH
205	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20 S異構體	OH
206	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20 S異構體	乙烯基-膦酸酯-A
207	(AC)17	LNA-A	LNA-(5m)C	5 S異構體	OH
208	(AC)18	LNA-A	LNA-(5m)C	6 S異構體	OH
209	(AC)19	LNA-A	LNA-(5m)C	6 S異構體	OH
210	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	4 S異構體	OH
211	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5 S異構體	OH
212	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	6 S異構體	OH
213	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	6 S異構體	乙烯基-膦酸酯-A
214	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	13 S異構體	OH

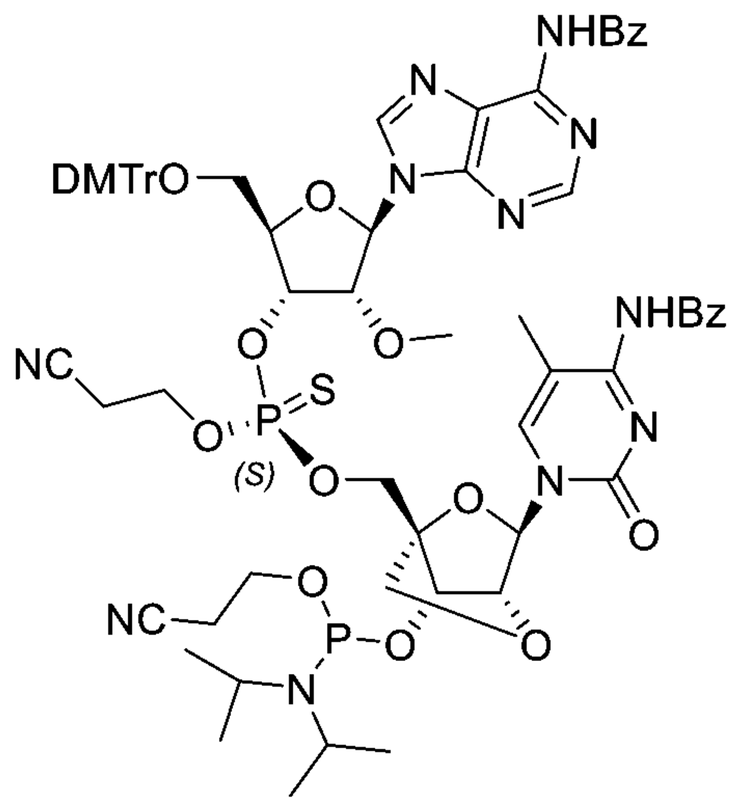
編號	長度	A	C	PS修飾	5’-修飾
215	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	20 S異構體	OH
216	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	20 S異構體	乙烯基-膦酸酯-A

實例217至234

【0160】 序列長度、LNA併入、立體化學修飾及5’修飾之效應係藉由根據上文於實例175至216中描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估，只是除該等寡核苷酸係藉由使用由立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯連接之A單元及C單元構成之二核苷酸建構組元之經修飾之方法製備：



2’-OMeApsR(5m)lnC亞磷醯胺(11R)



2’-OMeApsS(5m)lnC亞磷醯胺(11S)

【0161】 參考圖10、11A及11B，二核苷酸建構組元11R及11S係如下製備：

【0162】 化合物10-2之製備：在室溫下向具有惰性氮氣氛之10-1 (50.0 g，74.0 mmol)於500 mL無水二噁烷中之溶液滴加乙醯丙酸(51.5 g，44.4 mol)。然後在室溫下依次添加二環己亞胺甲烷(45.7 g，0.2 mol)及4-二甲胺基吡啶(4.6 g，37.0 mmol)。在室溫下將所得溶液攪拌5 h及用3000 mL二氯甲烷稀釋並過濾。有機相分別用2 x 1000 mL 2%碳酸氫鈉水

溶液及1 x 1000 mL水清洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，過濾並在減壓下濃縮。獲得呈白色固體之52.0 g (粗) 10-2且無需進一步純化即可用於下一步驟中。ESI-LCMS: m/z 774 $[M+H]^+$。

【0163】化合物10-3之製備：在0℃下向具有惰性氮氣氛之溶解於400 mL二氯甲烷中之10-2 (52.0 g，67.0 mmol)之溶液滴加對甲苯磺酸(51.5 g，0.4 mol)。在0℃下將所得溶液攪拌0.5 h並用2000 mL二氯甲烷稀釋及分別用2 x 1000 mL飽和碳酸氫鈉水溶液及1 x 1000 mL飽和氯化鈉水溶液清洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥並在減壓下濃縮且殘餘物係藉由矽膠管柱層析術(SiO_2，二氯甲烷:甲醇= 30:1)純化以產生呈白色固體之10-3 (32.0 g，80%，經兩個步驟)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.05 (s, 1H), 8.20-7.91 (m, 4H), 7.60-7.49 (m, 4H), 5.57 (m, 2H), 5.32 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.18 (s, 1H), 3.91-3.78 (m, 5H), 2.74-2.69 (m, 4H), 2.59-2.49 (m, 7H), 2.10 (s, 5H), 2.06 (s, 4H), 1.74-1.49 (m, 3H), 1.26-1.02 (m, 3H)。ESI-LCMS: m/z 472 $[M+H]^+$。

【0164】化合物10-4之製備：在0℃下向具有惰性氮氣氛之10-3 (28.0 g，59.4 mmol)於300 mL乙腈中之溶液依次添加8-3a (50.0 g，56.3 mmol)及ETT (7.9 g，59.4 mmol)。在室溫下將所得溶液攪拌2 h。然後將混合物過濾且無需進一步純化即可用於下一步驟中。ESI-LCMS: m/z 1258 $[M+H]^+$。

【0165】化合物10-5及10-6之製備：在室溫下向具有惰性氮氣氛之10-4 (70.9 g，56.3 mmol)於300 mL乙腈中之溶液依次添加吡啶(17.8 g，225.2 mmol)及5-胺基-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮(16.9 g，112.6 mmol)。在

室溫下將反應溶液攪拌30分鐘。將所得溶液過濾並在減壓下濃縮。殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此導致10-5及10-6之混合物。溶離份用3000 mL二氯甲烷稀釋。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，過濾並在減壓下濃縮。殘餘物係藉由具有下列條件之SFC純化：CHIRAL CEL OD-H/SFC 20 mm*250 mmL 5 μm (相A：CO_2；相B：50%乙醇-50%乙腈)，偵測器，UV 220 nm。濃縮溶離份直至在減壓下無殘餘溶劑。獲得呈白色固體之9.0 g (25.7%) 10-5並用於製造如下文描述之11R。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.06 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 8.63 (d, J = 20 Hz, 2H), 8.20 (m, 2H), 8.05 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.67-7.39 (m, 8H), 7.28-7.19 (m, 7H), 6.86-6.83 (m, 4H), 6.24 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 5.66 (s, 2H), 5.45-5.43(m, 1H), 5.10-5.03(m, 2H), 4.82-4.76(m, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.50-4.33 (m, 4H), 4.03-3.96 (m, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.41-3.35 (m, 7H), 3.03-3.00 (m, 2H), 2.75-2.72 (m, 2H), 2.56-2.53 (m, 2H),2.08-2.05 (m, 6H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 67.02。ESI-LCMS: m/z 1290 $[M+H]^+$。獲得呈白色固體之15.0 g (42.8%) 10-6並用於製造如下文描述之11S。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.05 (s, 1H), 11.26 (s, 1H), 8.63 (d, J = 24 Hz, 2H), 8.-7.96(m, 4H), 7.76 (s, 1H), 7.67-7.39 (m, 8H), 7.28-7.19 (m, 7H), 6.86 (d, J = 7.2 Hz, 4H), 6.24 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 5.43-5.41(m, 1H), 5.12(m, 1H), 4.97(s, 1H), 4.82-4.79(m, 1H), 4.57-4.49 (m, 3H), 4.27-

4.25 (m, 2H), 4.07-4.03 (m, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.44-3.36 (m, 6H), 2.96 (m, 2H), 2.74-2.71 (m, 2H), 2.55-2.53 (m, 2H),2.08 (s, 3H), 1.94 (s, 3H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 66.58。ESI-LCMS: m/z 1290 $[M+H]^+$。

【0166】化合物11-1之製備：在0℃下向具有惰性氮氣氛之10-5 (10.0 g，7.7 mmol)於100 mL乙腈中之溶液添加於吡啶/乙酸(3:2)中之0.5 M水合肼(1.8 g，37.5 mmol)。在0℃下將所得溶液攪拌0.5 h。然後立刻向反應添加2,4-戊二酮，容許將混合物升溫至室溫並再攪拌15 min。該溶液用DCM (500 mL)稀釋並用飽和NH_4Cl水溶液清洗兩次及用鹽水清洗並於Na_2SO_4上乾燥。然後在減壓下濃縮該溶液且殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此導致呈白色固體之11-1 (6.0 g，65%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.13 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 8.63 (d, J = 20 Hz, 2H), 8.21 (d, J = 8 Hz, 2H), 8.06-7.95 (m, 3H), 7.80 (s, 1H), 7.67-7.48. (m, 8H), 7.40 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.32-7.19 (m, 10H), 6.85 (m, 5H), 6.24 (d, J = 8 Hz, 1H), 6.04 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 5.44-5.42(m, 1H), 5.19-5.17(m, 2H), 5.10-5.08(m, 1H), 4.80-4.76(m, 2H), 4.50 (d, J= 5.6 Hz, 1H), 4.37-4.32 (m, 4H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.81 (m, 1H), 3.72 (s, 7H), 3.40-3.36 (m, 8H), 3.03-3.00 (m, 2H), 2.05 (m, 3H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 67.21。ESI-LCMS: m/z 1192 $[M+H]^+$。

【0167】化合物11R之製備：在室溫向具有惰性氮氣氛之11-1 (6.0 g，5.0 mmol)於60 mL二氯甲烷中之溶液依次添加$CEP[N(iPr)_2]_2$ (1.9 g，6.5 mmol)及DCI (0.6 g，5.0 mmol)。在室溫將所得溶液攪拌1小時並用1000 mL二氯甲烷稀釋及分別用2 x 250 mL飽和碳酸氫鈉水溶液及1 x 250 mL飽和氯化鈉水溶液洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，過濾並濃縮直至在減壓下無殘餘溶劑。殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此產生呈白色固體之11R (5.0 g，70%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ = 13.10 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 8.20 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.04 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.79 (d, J = 14 Hz, 2H), 7.67-7.48 (m, 6H), 7.39 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.27-7.18 (m, 7H), 6.85-6.82 (m, 4H), 6.23-6.20 (m, 1H), 5.64 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.44-5.41 (m, 1H), 5.08-5.07 (m, 1H), 4.82-4.77 (m, 1H), 4.56-4.46 (m, 3H), 4.36-4.30 (m, 2H), 4.22 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.71 (s, 7H), 3.59-3.55 (m, 2H), 3.40-3.34 (m, 10H), 3.02-2.98 (m, 2H), 2.77-2.72 (m, 2H), 2.08-2.05 (m, 3H), 1.13-1.08 (m, 12H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 148.71, 148.11, 67.51, 67.44。ESI-LCMS: m/z 1392 $[M+H]^+$。

【0168】化合物11-2之製備：在0℃向具有惰性氮氣氛之10-6 (10.0 g，7.7 mmol)於100 mL乙腈中之溶液添加於吡啶/乙酸(3:2)中之0.5 M水合肼(1.8 g，37.5 mmol)。在0℃將所得溶液攪拌0.5 h。然後立刻向反應添加2,4-戊二酮，使混合物升溫至室溫並再攪拌15 min。該溶液用DCM

(500 mL)稀釋，並用飽和NH_4Cl水溶液洗兩次及用鹽水洗，並於Na_2SO_4上乾燥。然後在減壓下濃縮該溶液，且殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV 254 nm。此產生呈白色固體之11-2 (7.5 g，80%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.11 (s, 1H), 11.26 (s, 1H), 8.63 (d, J = 20 Hz, 2H), 8.20 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.15 (m, 3H), 7.73 (s, 1H), 7.66-7.47. (m, 8H), 7.41 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.32-7.19 (m, 10H), 6.85 (m, 5H), 6.24 (m, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.54 (s, H), 5.41(m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.79-4.75(m, 1H), 4.57-4.49 (m, 3H), 4.30-4.24 (m, 4H), 4.02 (m, 2H), 3.85 (m, 1H), 3.72 (s, 7H), 3.38-3.35 (m, 7H), 2.95 (m, 2H), 1.98 (m, 3H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 66.79。ESI-LCMS: m/z 1192 $[M+H]^+$。

【0169】化合物11S之製備：在室溫下向具有惰性氮氣氛之11-2 (7.0 g，5.0 mmol)於70 mL二氯甲烷中之溶液依次添加$CEP[N(iPr)_2]_2$ (2.0 g，6.5 mmol)及DCI (0.6 g，5.0 mmol)。在室溫下將所得溶液攪拌1小時並用1000 mL二氯甲烷稀釋及分別用2 x 250 mL飽和碳酸氫鈉水溶液及1 x 250 mL飽和氯化鈉水溶液清洗。有機相係於無水硫酸鈉上乾燥，過濾並濃縮直至在減壓下無殘餘溶劑。殘餘物係藉由急驟製備型HPLC以下列條件(IntelFlash-1)純化：管柱，C18矽膠；流動相，CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/1於20 min內增加至CH_3CN/H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0，在CH_3CN/ H_2O (0.5% NH_4HCO_3) = 1/0收集溶析產物；偵測器，UV

254 nm。此導致呈白色固體之11S (6.3 g，70%)。^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 13.10 (s, 1H), 11.27 (s, 1H), 8.65(s, 1H), 8.61(s, 1H), 8.19 (m, 2H), 8.02 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.76-7.73 (m, 1H), 7.66-7.47 (m, 6H), 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.28-7.19 (m, 7H), 6.86-6.85 (m, 4H), 6.24 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.62 (m, 1H), 5.43-5.41 (m, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.84-4.78 (m, 1H), 4.66-4.49 (m, 3H), 4.30-4.18 (m, 3H), 4.04-3.95 (m, 2H), 3.83-3.77 (m, 1H), 3.72 (s, 7H), 3.62-3.54 (m, 2H), 3.44-3.32 (m, 6H), 2.96-2.92 (m, 2H), 2.77-2.72 (m, 2H), 1.98-1.97 (m, 3H), 1.12-1.11 (m, 12H)。^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ = 148.53, 148.09, 67.04。ESI-LCMS: m/z 1392 $[M+H]^+$。

【0170】 如在實例175至216中，經修飾之方法亦使用更長之偶合時間(8 min)及更大當量之醯胺化物(8當量)。表10針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元、立體化學定義之硫代磷酸酯(PS)鍵聯之數量及類型(R或S)及5’修飾。

表10

編號	長度	A	C	PS修飾	5’-修飾
217	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5；2’-OMeApsR(5m)lnC	OH
218	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsR(5m)lnC	OH
219	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsR(5m)lnC	OH
220	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsR(5m)lnC	OH
221	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20；2’-OMeApsR(5m)lnC	OH
222	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5；2’-OMeApsR(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A
223	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsR(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A
224	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsR(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A
225	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsR(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A
226	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20；2’-OMeApsR(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A

編號	長度	A	C	PS修飾	5’-修飾
227	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5；2’-OMeApsS(5m)lnC	OH
228	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsS(5m)lnC	OH
229	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsS(5m)lnC	OH
230	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsS(5m)lnC	OH
231	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20；2’-OMeApsS(5m)lnC	OH
232	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5；2’-OMeApsS(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A
233	(AC)18	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsS(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A
234	(AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	6；2’-OMeApsS(5m)lnC	乙烯基-膦酸酯-A

實例235至240

【0171】分支化之效應係藉由製備一系列具有分支倍增器設計之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估，其中該等寡核苷酸中之兩者係經由連接基彼此結合。具有倍增器設計之硫代磷酸酯化寡核苷酸之實例係闡述於圖1中。表11針對所得之例示性硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元及5’修飾。

表11

編號	長度	A	C	5’-修飾
235	(AC)9-(5m)lnC	LNA-A	LNA-(5m)C	5’ OH，19mer
236	(AC)15-(5m)lnC	LNA-A	LNA-(5m)C	5’ OH，31mer
237	(AC)20-(5m)lnC	LNA-A	LNA-(5m)C	5’ OH，41mer
238	(AC)9-(5m)mC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’ OH，19mer
239	(AC)15-(5m)mC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’ OH，31mer
240	(AC)20-(5m)mC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’ OH，41mer

實例241至246

【0172】分支化之效應係藉由製備一系列具有分支三倍倍增器設計之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估，其中三個硫代磷酸酯化寡核苷酸係經由連接基彼此結合。具有三倍倍增器設計之硫代磷酸酯化寡核苷酸之實例係闡述於圖2中。表12針對所得之例示性硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元及5’修飾。

表12

編號	長度	A	C	5’-修飾
241	(AC)10-TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5’ OH，31mer
242	(AC)13-TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5’ OH，40mer
243	(AC)15-TREB-(5m)mC	LNA-A	LNA-(5m)C	5’ OH，46mer
244	(AC)10-TREB-(5m)mC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’ OH，31mer
245	(AC)13-TREB-(5m)mC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’ OH，40mer
246	(AC)15-TREB-(5m)mC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’ OH，46mer

實例247至252

【0173】 醯胺基-橋核酸(AmNA-(N-Me))修飾及螺環丙烯-橋接核酸(scp-BNA)修飾之效應係藉由製備一系列經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。AmNA-N-Me 6-N-苯甲醯基腺苷(A^{Bz})、4-N-苯甲醯基-5-甲基胞苷係獲得自Luxna Biotech Co, Ltd及具有6-N-苯甲醯基腺苷(A^{Bz})、4-N-苯甲醯基-5-甲基胞苷之scp-BNA亞磷醯胺單體係藉由使用參考文獻Takao Yamaguchi、Masahiko Horiba及Satoshi Obika; Chem. Commun. 2015, 51, 9737-9740及Masahiko Horiba、Takao Yamaguchi及Satoshi Obika; Journal of Organic Chemistry, 2016, 81, 11000-11008中描述之程序合成。單體係在具有乾燥劑之真空乾燥器中乾燥(P_2O_5，在室溫下，歷時24小時)。就AmNA及scp-BNA修飾而言，合成係在1 μM規模上在3’至5’方向上以於無水CH_3CN中經稀釋至0.12 M之濃度之亞磷醯胺單體在0.3 M 5-(苯甲硫基)-1H-四唑活化劑之存在下(偶合時間16至20 min)進行至固體結合之寡核苷酸，接著經修飾之加帽、氧化及去保護以提供經修飾之寡核苷酸。所有經修飾之亞磷醯胺之逐步偶合效率係大於97%。DDTT (二甲胺基-亞甲基)胺基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮係用作用於合成寡核糖核苷酸硫代磷酸酯之硫轉移劑。攜載寡核苷酸之撐體用於乙腈中之20% DEA溶液清洗15 min，然後管柱用AcCN徹底清洗。該撐體在65℃下用二異丙胺:

水:甲醇(1:1:2)在加熱組元中加熱5 h以裂解自該撐體並去保護鹼不穩定之保護基。表13針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元及5’修飾。

表13

編號	長度	A	C	5’-修飾
247	(AmAps(5m)AmC)20	AmNA(NMe)-A	AmNA(NMe)-(5m)C	5’ OH，40mer，所有AmNA
248	(ScpAps(5m)scpC)20	Scp-BNA-A	Scp-BNA-(5m)C	5’ OH，40mer，所有Scp-BNA
249	AmAps(5m)mC (AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	一個AmNA於5’-端，40mer
250	(AC)19-mAps(5m)AmC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	一個AmNA於3’-端，40mer
251	ScpAps(5m)mC (AC)19	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	一個 ScpA 於 5’-端，40mer
252	(AC)19-mAps(5m)ScpC	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	一個 ScpC 於 3’-端，40mer

實例253至256

【0174】結合靶向配體之效應係藉由製備一系列經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。靶向配體、膽固醇及生育酚(維生素E)係經由環氧烷連接基(三縮四乙二醇，TEG)根據上文於實例1至116中描述之方法結合至硫代磷酸酯化寡核苷酸，只是固相合成係在以由TEG連接子針對3’-結合結合之膽固醇及生育酚撐體上進行而亞磷醯胺之最終偶合提供5’-結合之寡核苷酸。圖3A至D及表14針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸闡述結構並匯總序列長度、交替A及C單元及靶向配體。

表14

編號	長度	A	C	靶向配體
253	Chol-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-膽固醇，40mer
254	(AC)20- Chol	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	3’-膽固醇，40mer

編號	長度	A	C	靶向配體
255	Toco-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-生育酚，40mer
256	(AC)20-Toco	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	3’-生育酚，40mer

實例257至268

【0175】結合靶向配體之效應係藉由製備一系列經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。N-乙醯半乳胺糖(GalNac)係經由各種連接基藉由與如圖4A中闡述之GalNAc建構組元反應結合至硫代磷酸酯化寡核苷酸。GalNAc-3及GalNAc-5亞磷醯胺係分別購買自AM Chemicals LLC及Glen Research。GalNAc-4及GalNAc-6係獲得自AM Chemicals LLC。表15針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸闡述結構並匯總序列長度、交替A及C單元及靶向配體。

表15

編號	長度	A	C	靶向配體
257	GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3po-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-GalNAc-3 ; 40mer
258	(AC)20-po-GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	3’-GalNAc-3 ; 40mer
259	GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5’-GalNAc-3 ; 40mer
260	(AC)20-po-GalNAc3ps-GalNAc3ps-GalNAc3	LNA-A	LNA-(5m)C	3’-GalNAc-3 ; 40mer
261	GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4po-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-GalNAc-4 ; 40mer
262	(AC)20-po-GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	3’-GalNAc-4 ; 40mer
263	GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5’-GalNAc-4 ; 40mer
264	(AC)20-po-GalNAc4ps-GalNAc4ps-GalNAc4	LNA-A	LNA-(5m)C	3’-GalNAc-4 ; 40mer
265	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-GalNAc-5 ; 40mer
266	(AC)20-po-GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	3’-GalNAc-5 ; 40mer

編號	長度	A	C	靶向配體
267	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5’-GalNAc-5 ; 40mer
268	(AC)20-po-GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5	LNA-A	LNA-(5m)C	3’-GalNAc-5 ; 40mer

實例269至272

【0176】結合靶向配體之效應係藉由製備一系列經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。N-乙醯半乳胺糖(GalNAc)係經由連接基藉由製備初始寡核苷酸，藉由在5’-末端結合C_6-NH_2連接基形成前體，及然後使該前體與GalNAc酯反應結合至硫代磷酸酯化寡核苷酸。序列係在10 μmol規模下使用通用撐體(負載65 μmol/g)合成。C_6-NH_2連接子係藉由與於0.1 M乙腈中之6-(4-單甲氧基三苯甲基胺基)己基-(2-氰基乙基)-(N,N-二異丙基)-亞磷醯胺反應10 min之偶合時間結合至5’-末端以形成前體。攜載硫代磷酸酯化寡核苷酸之撐體係在室溫下用氨水/甲胺(1:1)溶液在搖動器中加熱3 h以裂解自該撐體並去保護鹼不穩定之保護基。

【0177】在IEX純化及去鹽後，將前體溶解於0.2 M碳酸氫鈉緩衝液，pH 8.5 (0.015 mM)中並添加溶解於DMSO中之5至7 mol當量之GalNAc酯。GalNAc酯之結構係闡述於圖4B中。在室溫下將反應混合物攪拌4 h。分析樣本以證實不存在前體。向此氨水(28重量%)添加(5×反應體積)並在室溫下攪拌2至3 h。在減壓下濃縮該反應混合物並將所得殘餘物溶解於水中及藉由HPLC在強陰離子交換管柱上純化。

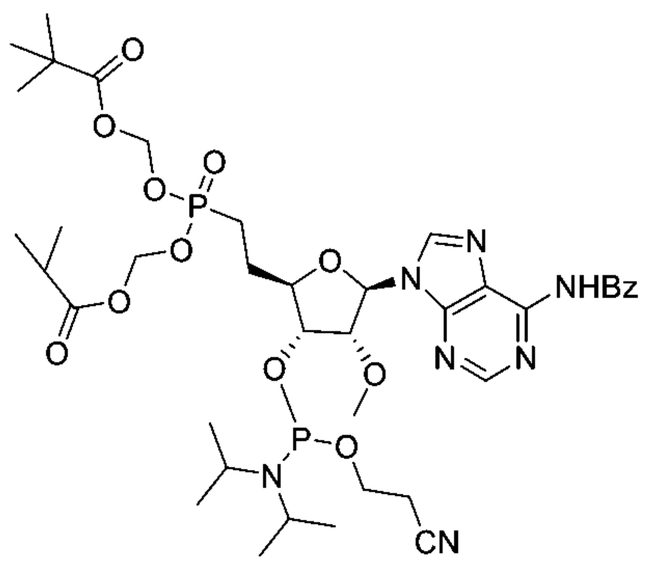
【0178】表16針對所得之例示性經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸闡述結構並匯總序列長度、交替A及C單元及靶向配體。GalNAc-1及GalNAc-2係分別根據J. Med. Chem. 2016 59(6) 2718-2733及WO 2017/021385A1中描述之程序製備。

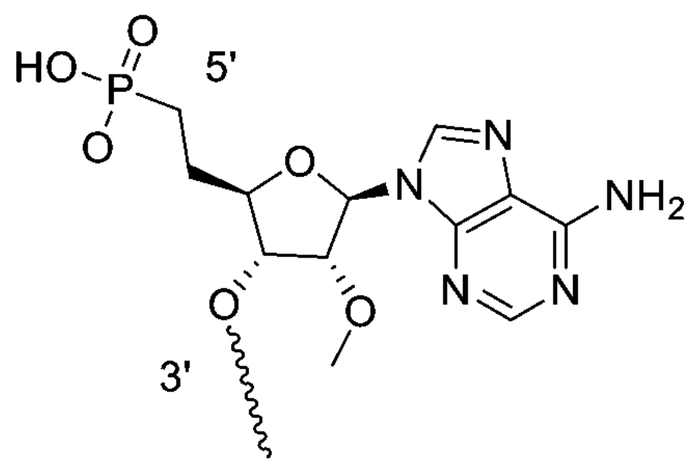
表16

編號	長度	A	C	靶向配體
269	GalNAc1-NH-C6-po-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-GalNAc-1；40mer
270	GalNAc1-NH-C6-po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5’-GalNAc-1；40mer
271	GalNAc2-NH-C6-po-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-GalNAc-2；40mer
272	GalNAc2-NH-C6-po-(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5’-GalNAc-2；40mer

實例273至281

【0179】 5’修飾之效應係藉由用於根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估，只是使用下列5’-膦酸乙酯(EP)建構組元以併入5’-膦酸乙酯端帽：





5’-膦酸乙酯(5’-EP)建構組元　　5’-膦酸乙酯端帽

【0180】 參考圖5，5’-膦酸乙酯建構組元係如下製備：

【0181】 在N_2下向5-1 (3.0 g，4.35 mmol，1當量)於MeOH (5 mL)中之混合物添加Pd/C (900 mg，72.50 umol，10%純度)。在真空下將懸浮液脫去並用H_2淨化數次。在H_2 (15 psi)下在20℃下將該混合物攪拌12 hr。^{1}H NMR及^{31}P NMR顯示5-1經完全消耗以形成所需產品。過濾並濃縮反應混合物以產生呈白色固體之2,2-二甲基丙酸[2-[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲醯胺基嘌呤-9-基)-3-羥基-4-甲氧基-四氫呋喃-2-基]乙基-(2,2-二甲基丙醯氧基甲氧基)磷醯基]氧基甲酯，化合物5-2，(2.8 g，4.05 mmol，93.06%產率)。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8.75 (s, 1H), 8.53 (s,

1H), 8.08 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.68 - 7.61 (m, 1H), 7.59 - 7.50 (m, 2H), 7.23 - 7.17 (m, 1H), 7.15 - 7.10 (m, 1H), 6.15 (d, J=4.2 Hz, 1H), 5.71 - 5.61 (m, 4H), 4.57 (t, J=4.7 Hz, 1H), 4.41 (t, J=5.3 Hz, 1H), 4.09 - 3.99 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 2.16 - 1.97 (m, 4H), 1.17 (d, J=3.5 Hz, 18 H) ; ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3CN) δ = 32.91 (s, 1P)。

【0182】 向5-2 (2.3 g，3.33 mmol，1當量)於DCM (30 mL)中之溶液添加1H-咪唑-4,5-二甲腈(589.06 mg，4.99 mmol，1.5當量)，接著添加3-雙(二異丙基胺基)膦醯氧基丙腈(2.00 g，6.65 mmol，2.11 mL，2.0當量)，並在25℃下將混合物攪拌2 hr。TLC指示大多數5-2經消耗並形成一個主要新點。反應混合物用H_2O (50 mL*2)及鹽水(50 mL*2)清洗，於Na_2SO_4上乾燥，並濃縮以產生殘餘物。殘餘物係藉由使用下列條件之Flash-C-18管柱純化：管柱，C18矽膠；流動相，水及乙腈(0%至70%乙腈)以產生呈淡黃色固體之2,2-二甲基丙酸[2-[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲醯胺基嘌呤-9-基)-3-[2-氰基乙氧基-(二異丙基胺基)膦醯基]氧基-4-甲氧基-四氫呋喃-2-基]乙基-(2,2-二甲基丙醯氧基甲氧基)磷醯基]氧基甲酯，(5'-EP建構組元)，(1.4 g，1.53 mmol，45.88%產率，97.2%純度)。LCMS (ESI): RT = 3.785 min，針對$C_{40}H_{60}N_7O_{12}P_2$，m/z計算值892.37 $[M+H]^+$，實測值892.0。HPLC：流動相：於水(溶劑C)及乙腈(溶劑D)中之10 mMol NH_4Ac，使用溶析梯度80%至100% (溶劑D)，歷時10分鐘並在100%下在1.0 mL/分鐘之流動速率下保持5分鐘；管柱30：Waters Xbridge C18 3.5 μm，150*4.6 mm；^{1}H NMR (400MHz, CD_3CN) δ = δ = 9.40 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.27 (d, J=1.8 Hz, 1H), 8.01 (d, J=7.5 Hz, 2H), 7.68 - 7.60 (m, 1H), 7.58 - 7.52 (m, 2H), 6.05 (dd, J=5.1, 8.4 Hz,

1H), 5.62 - 5.54 (m, 4H), 4.68 (t, J=1.8, 5.0 Hz, 1H), 4.64 - 4.55 (m, 1H), 4.25 - 4.11 (m, 1H), 3.93 - 3.66 (m, 4H), 3.40 (d, J=19.2 Hz, 3H), 2.75 - 2.67 (m, 2H), 2.14 - 1.95 (m, 4H), 1.25 - 1.20 (m, 12H), 1.15 - 1.11 (m, 18H) ; ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3CN) δ = 149.95, 149.27, 32.29, 32.05。

【0183】 表17針對所得之例示性5'-EP加端帽之經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸匯總序列長度、交替A及C單元、立體化學定義之硫代磷酸酯(PS)鍵聯之數量及類型(R或S)及LNA修飾。

表17

編號	長度	A	C	PS修飾	注釋
273	(AC)20	2'O-Me-A	2'-OMe-(5m)C	PS	40mer
274	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	PS	40mer
275	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	20；2'-OMeApsR(5m)lnC	20 R異構體，41mer
276	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	19；2'-OMeApsR(5m)lnC	19 R異構體，40mer
277	(AC)20	2'-OMe-A	LNA-(5m)C	PS	40mer 交替2'-OMe/LNA
278	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	PS	每第3個鹼基係LNA
279	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	PS	每第4個鹼基係LNA
280	(AC)20	2'-OMe-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	PS	5 LNA在中間
281	(AC)20	2'-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	PS	10 LNA在中間

實例282至298

【0184】 圖6A描述化合物編號282至295，其等係根據上文描述之方法製備。

實例296至304

【0185】 序列長度、LNA併入及RNA併入之效應係係藉由根據上文

描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表18中。

表18

編號	長度	A	C	RNA修飾
296	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	5 RNA
297	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	7 RNA
298	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	14 RNA
299	(AC)15	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5 RNA
300	(AC)15	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	10 RNA
301	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	7 RNA
302	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	14 RNA
303	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	5 RNA
304	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	10 RNA

實例305至313

【0186】 序列長度、LNA併入及主鏈之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表19中。

表19

編號	長度	A	C	主鏈
305	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer；20 PO；19 PS
306	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer；7 PO；32 PS
307	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer；14 PO；25 PS
308	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	30mer；5 PO；24 PS
309	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	30mer；10 PO；19 PS
310	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	40mer；7 PO；32 PS
311	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	40mer；14 PO；25 PS
312	(AC)15	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	30mer；5 PO；24 PS
313	(AC)15	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	30mer；10 PO；19 PS

實例314至322

【0187】 序列長度、LNA併入及膦酸乙酯端帽之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表20

中。

表20

編號	長度	A	C	修飾
314	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	乙基-膦酸酯-A
315	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	19 R二聚體組元； 乙基-膦酸酯-A
316	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5 LNA，乙基-膦酸酯-A
317	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；每第4個鹼基係LNA 乙基-膦酸酯-A
318	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；每第3個鹼基係LNA 乙基-膦酸酯-A
319	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	40mer；乙基-膦酸酯-A
320	(AC)18	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	36mer；交替2’-OMe及LNA
321	(AC)20	2’-OMe-A LNA-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	36mer；每第3個鹼基係LNA
322	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	36mer；每第4個鹼基係LNA

實例323至324

【0188】 LNA併入及磷酸酯端帽之效應係藉由根據上文描述之方法製備硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表21中。

表21

編號	長度	A	C	端帽
323	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	5’-磷酸酯
324	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	5’-磷酸酯

實例325至338

【0189】 LNA併入之水平之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表22中。

表22

編號	長度	A	C	修飾
325	(AC)20	2’-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；75% 2’-OMe， 25% LNA
326	(AC)20	2’-OMe-A	2'-OMe-(5m)C	40mer；67.5% 2’-OMe

編號	長度	A	C	修飾
		LNA-A	LNA-(5m)C	37.5% LNA
327	(AC)20	2’-O-MOE-A LNA-A	2’-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；75% 2’-O-MOE， 25% LNA
328	(AC)20	2’-O-MOE-A LNA-A	2’-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；67.5% 2’-O-MOE 37.5% LNA
329	(AC)20	2’-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；75% LNA， 25% 2’-OMe (10mer組元)
330	(AC)20	2’-OMe-A LNA-A	2'-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；50% LNA；50% 2’-OMe(20mer組元)
331	(AC)20	2’-O-MOE-A LNA-A	2’-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；75% LNA， 25% 2’-O-MOE (10mer組元)
332	(AC)20	2’-O-MOE-A LNA-A	2’-O-MOE-(5m)C LNA-(5m)C	40mer；50% LNA；50% 2’-O-MOE (20mer組元)
333	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer；7 DNA
334	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer；14 DNA
335	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	30mer；5 DNA
336	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	30mer；10 DNA
337	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer；50% LNA；50% DNA (10mer DNA組元)
338	(AC)20	LNA-A DNA-A	LNA-(5m)C DNA-(5m)C	40mer；50% LNA；50% DNA (20mer DNA組元)

實例339至340

【0190】 ScpA及AmNA併入之效應係藉由根據上文描述之方法製備硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表23中。

表23

編號	長度	A	C	修飾
339	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	一個ScpA於3’-端，40mer
340	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	一個AmNA於3’-端，40mer

實例341至346

【0191】 GNA及UNA併入之效應係藉由根據上文描述之方法製備

一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表24中。

表24

編號	長度	A	C
341	(AC)20	LNA-A	GNA-(5m)C
342	(AC)20	GNA-A	2’-OMe-(5m)C
343	(AC)20	2’-OMe-A	GNA-(5m)C
345	(AC)20	UNA-A	UNA-(5m)C
346	(AC)20	UNA-A	UNA-(5m)C

實例347至350

【0192】結合靶向配體之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表25中。

表25

編號	長度	A	C	修飾
347	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	40mer，交替2’-OMe-LNA；5’-GalNac
348	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA-(5m)C	40mer，每第4個鹼基係LNA；5’-GalNac
349	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C LNA-A	40mer，5個LNA；5’-GalNac
350	GalNAc5ps-GalNAc5ps-GalNAc5po-(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	40mer，交替2’-OMe-LNA 5個RNA；5’-GalNac

實例351至355

【0193】結合膽固醇或生育酚靶向配體之效應係係藉由根據上文描述之方法製備一系列經修飾之硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表26中。

表26

編號	長度	A	C	靶向配體
351	Chol-(AC)20	2’-OMe-A	(5m)-丙炔基-C	3’-膽固醇，40mer
352	(AC)20-Chol	2’-OMe-A	(5m)-丙炔基-C	3’-棕櫚醯基，40mer
353	(AC)20	3’-OMe-A	3’-OMe-(5m)C	3’-OMe，40mer

編號	長度	A	C	靶向配體
354	(AC)20-Chol	3’-OMe-A	3’-OMe-(5m)C	3’-膽固醇，40mer
355	(AC)20-Toco	3’-OMe-A	3’-OMe-(5m)C	3’-生育酚，40mer

實例356至358

【0194】 端帽結構(甲基、烯丙基、胞嘧啶)之效應係藉由根據上文描述之方法製備硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表27中。

表27

編號	長度	A	C	端帽
356	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C	40mer，4’-Me於5’端
357	(AC)20	2’-OMe-A 3’-C-烯丙基-A	LNA-A LNA-(5m)C	40mer，5 3’-C-烯丙基-A
358	(AC)20	LNA-A	LNA-(5m)C	40mer，Cy-5於3’-端

實例359至362

【0195】 包括G及U鹼基之效應係藉由根據上文描述之方法製備硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。化合物係匯總於表28中。

表28

編號	長度	鹼基1	鹼基2	修飾
359	(AG)20	2’-OMe-A	2’-OMe-G	AG重複
360	(GA)20	2’-OMe-G	2’-OMe-A	GA重複
361	(CA)20	2’-OMe-(5m)C	2’-OMe-A	CA重複
362	(AU)20	2’-OMe-A	2’-OMe-U	AU重複

實例363至376

【0196】 序列長度之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。化合物係匯總於表29中。

表29

編號	長度	A	C	修飾
363	(AC)14	2’-OMe-A	2’-OMe-C	28mer
364	(AC)15-A	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	31mer

編號	長度	A	C	修飾
365	(AC)17	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	34mer
366	(AC)18-A	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	37mer
367	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-C	20mer
368	(AC)9	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	18mer
369	(AC)9-A	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	19mer
370	(AC)10	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	20mer
371	(AC)9-A	LNA-A	LNA-(5m)C	19mer
372	(AC)9	LNA-A	LNA-(5m)C	18mer
373	(AC)15	LNA-A	LNA-(5m)C	30mer
374	(AC)12-A	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	25mer
375	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	40mer，5 S異構體
376	(AC)10	LNA-A	LNA-(5m)C	20mer

實例377至380及384

【0197】 RNA併入之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表30中。

表30

編號	長度	A	C	修飾
377	(AC)20	2’-OMe-A 核糖-A	LNA-(5m)C	40mer，4 RNA
378	(AC)20	2’-OMe-A 核糖-A	LNA-(5m)C	40mer，3 RNA
379	(AC)20	2’-OMe-A 核糖-A	LNA-(5m)C	40mer，2 RNA
380	(AC)20	2’-OMe-A UNA-A	2’-OMe-(5m)C UNA-(5m)C	40mer ， 2’-OMe 及 UNA 之4mer組元
384	(AC)20	2’-OMe-A 核糖-A	LNA-(5m)C	40mer，1 RNA

實例381至383

【0198】 4etl (4-乙基-LNA)併入之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表31中。

表31

編號	長度	A	C	修飾
381	(AC)20	4etl-A	4etl-(5m)C	40mer，100% 4etl
382	(AC)20	2’-OMe-A	4etl-(5m)C	40mer，50% 4etl
383	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C 4etl-(5m)C	40mer，25% 4etl

實例385至389

【0199】 nmLNA (N-甲基LNA) A及C併入之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表32中。

表32

編號	長度	A	C	修飾
385	(AC)20	2’-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C	40mer，1 nmLNA
386	(AC)20	2’-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C	40mer，3 nmLNA
387	(AC)20	2’-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C nmLNA (5m)-C	40mer，3 nmLNA
388	(AC)20	2’-OMe-A	LNA-(5m)C nmLNA (5m)-C	40mer，3 nmLNA
389	(AC)20	2’-OMe-A nmLNA-A	LNA-(5m)C nmLNA (5m)-C	40mer，4 nmLNA

實例390至392

【0200】 AmNA及Scp-BNA A及C併入之效應係藉由根據上文描述之方法製備一系列硫代磷酸酯化寡核苷酸評估。結果係匯總於表33中(亦參見表23)。

表33

編號	長度	A	C	修飾
390	(AC)20	2’-OMe-A	AmNA-(5m)C	40mer，20AmNA(50%)
391	(AC)20	2’-OMe-A	2’-OMe-(5m)C	40mer，10 scp-BNA (25%)

編號	長度	A	C	修飾
			Scp-(5m)C	
392	(AC)20	2’-OMe-A Scp-A	2’-OMe-(5m)C	40mer，5 scp-BNA (12.5%)

實例B1

HBSAG分泌分析及細胞毒性分析

【0201】 對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性(如藉由HBsAg分泌分析測定)及許多例示性經修飾之寡核苷酸化合物之細胞毒性係如下文描述測定並匯總於表34至35及圖6A及6B中。

HBsAg釋放分析方案

細胞培養

【0202】 將HepG2.2.15細胞維持在具有10%胎牛血清(FBS)及1%青黴素/鏈黴素、1%麩醯胺酸、1%非必需胺基酸、1%丙酮酸鈉及380 ug/ml G418之DMEM培養基中。將細胞維持在37℃及5% CO_2氣氛下。

HBsAg分泌分析

【0203】 使HepG2.2.15細胞在如上文描述之DMEM培養基中生長。將細胞以45,000個細胞/孔之濃度接種於經膠原蛋白I塗覆之96孔盤中。在添加細胞後，立即添加測試化合物。

【0204】 所選化合物亦可在Lipofectamine® RNAiMAX轉染後測試。Lipofectamine® RNAiMAX轉染試劑(Thermo Fisher)係遵循製造商之使用說明使用。

【0205】 50%抑制濃度(EC_{50})及50%細胞毒性濃度(CC_{50}；下文)係藉由在1 X PBS中增容至100 X所需之最終測試濃度評估。然後在具有10% FBS之DMEM培養基中將各化合物連續稀釋(1:3)多達8種不同之濃度至10X所需之最終測試濃度。使用10X化合物於細胞培養基中之10 μL樣

本用於以96孔模式處理HepG2.2.15細胞。細胞最初用化合物在37℃及5% CO_2氣氛下培養3天。

【0206】 化合物添加/轉染後三天，用具有RNAiMax之新鮮培養基/化合物置換培養基及化合物並再培養3天，歷時6天之總培養時間。收集細胞上清液及細胞裂解液兩者(參見下文)用於定量HBsAg。

【0207】 分泌之HBsAg係使用HBsAg ELISA套組(Autobio-CL0310)定量量測。

【0208】 EC_{50}(相對於未經處理之細胞對照值，減少HBsAg分泌50%所需之藥物之濃度)係使用Microsoft Excel (預測函數)，計算自HBsAg水平之減少百分率相對於藥物濃度之圖。

【0209】 設定平行組之盤，該等盤待用於測試誘導細胞毒性之化合物(參見下文)。

細胞毒性分析

【0210】 HepG2.2.15細胞係如上文培養及處理。在第6天，細胞毒性係使用細胞增殖分析(CellTiter-Glo發光細胞存活率分析；Promega)根據製造商之使用說明或合適之替代評估。

【0211】 CC_{50}(相對於未經處理之細胞對照值，減少細胞存活率50%所需之藥物之濃度)係使用Microsoft Excel (預測函數)，計算自活細胞之減少百分率相對於藥物濃度之圖。

表34：效價及細胞毒性

化合物編號	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
3	B	A
6	A	B
8	B	A
9	A	A
10	A	A

化合物編號	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
12	A	A
13	B	A
18	C	A
20	B	B
23	B	B
26	C	A
34	B	A
36	B	A
38	A	A
39	B	C
44	A	A
45	A	A
63	B	A
97	B	A
98	B	A
99	B	A
105	B	A
106	B	A
120	C	A
121	B	A
122	B	A
127	B	A
128	D	A
129	D	A
130	B	A
134	A	A
142	C	A
147	D	A
148	D	A
149	B	A
150	A	A
151	D	A
152	D	A
153	B	A
158	B	A
159	C	A
178	A	A

化合物編號	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
179	A	A
180	A	A
182	A	A
183	A	A
184	A	A
190	B	A
191	B	A
192	A	A
199	B	A
200	C	A
201	B	A
202	B	A
204	B	A
205	B	A
220	C	A
221	A	A
223	C	A
235	D	B
236	D	B
237	A	B
238	D	A
239	D	A
240	B	A
241	B	A
242	A	A
243	A	A
244	C	A
245	D	A

【0212】 效價：A：≥ 5倍高於(2’-OMe-A；2’-OMe-C)；B：≥ 2倍高於(2’-OMe-A；2’-OMe-C)及< 5倍高於(2’-OMe-A；2’-OMe-C)；C：高於或等於(2’-OMe-A；2’-OMe-C)及< 2倍高於(2’-OMe-A；2’-OMe-C)；D：低於(2’-OMe-A；2’-OMe-C)。

【0213】 細胞毒性：A：≥ 2 μM；B：< 2 μM

表35：效價及細胞毒性

化合物編號[1]	EC_{50}	CC_{50}
6、274、283	A	B
376	D	A
371	D	A
372	D	A
273、282	D	A
367	C	A
368	D	A
369	D	A
370	D	A
345	B	A
346	A	A
351	D	B
352	D	B
373	B	B
308	C	A
239	D	A
235	D	B
236	D	B
237	A	B
301	A	B
303	B	B
305	C	A
315	C	A
309	D	B
297	C	A
298	D	A
300	D	A
312	D	A
313	D	A
299	D	A
304	D	A
302	D	A
307	D	A
375	B	A
201	C	A

化合物編號[1]	EC_{50}	CC_{50}
202	C	A
203	B	A
204	D	A
205	D	A
353	B	A
351	D	A
352	D	A
178	A	A
179	A	A
180	C	A
182	A	A
183	D	A
184、290	A	A
177	B	A
374	D	A
363	D	A
364	D	A
365	D	A
366	D	A
238	D	A
240	B	A
241	B	A
242	A	A
243	A	A
130	A	A
380	D	A
310	D	A
311	D	A
254	D	A
325	D	A
326	D	A
327	D	A
328	D	A
158	B	A
150	A	A
159	C	A
341	D	A

化合物編號[1]	EC_{50}	CC_{50}
342	B	A
244	C	A
245	C	A
343	B	A
329	C	A
330	B	B
331	D	A
332	D	A
333	B	A
334	B	A
335	C	A
336	C	A
337	A	B
338	B	B
117	B	A
118	B	A
134、277、284	A	A
142	C	A
190	B	A
191	B	A
192	B	A
210	B	A
211	B	A
212	B	A
218	C	A
223	C	A
221	A	A
127	D	A
128	C	A
129	C	A
120	B	A
121	B	A
122	A	A
181	C	A
147	D	A
148	D	A
149	B	A

化合物編號[1]	EC_{50}	CC_{50}
151	D	A
152	D	A
153	B	A
294	B	A
276、291	A	A
275、295	A	B
173、293	A	A
165、287	B	A
167、289	B	A
164、286	C	A
166、288	A	A
171、280、292	B	A
314	A	B
281、316	A	A
296	A	A
285	A	B
251	A	A
356	A	A
320	A	A
321	A	B
322	B	A
317	A	B
318	B	B
319	A	B
357	A	A
339	A	A
252	A	A
340	A	A
250	A	A
359	D	A
360	D	A
361	D	A
362	D	A
12	A	A
20	B	A
38	A	A

化合物編號[1]	EC_{50}	CC_{50}
385	A	A
386	A	A
387	A	A
388	A	A
389	A	A
376	A	A
377	A	A
378	A	A
379	A	A
384	A	A
381	A	A
382	A	A
383	B	A
390	A	B
391	A	B
392	B	B

【0214】 [1]本文描述之許多化合物係由不止如本文及整個揭示內容別處指示之單一化合物編號援引。

【0215】 效價：A：EC_{50} < 30 nM；B：$EC_{50} \geq$ 30 nM及EC_{50} < 100 nM；C：$EC_{50} \geq$ 100 nM及EC_{50} < 300 nM；D：EC_{50} > 300 nM。

【0216】 細胞毒性：A：$CC_{50} \geq$ 1000 nM；B：CC_{50} < 1000 nM

實例B2

即時感染分析

【0217】 將HepG2-NTCP細胞維持在具有10%胎牛血清(FBS)及1%青黴素/鏈黴素、1%麩醯胺酸、1%非必需胺基酸、1%丙酮酸鈉之DMEM/F12培養基中。將細胞維持在37℃及5% CO_2氣氛下。

【0218】 HepG2-NTCP細胞係用上文提及之培養基重懸浮並以15,000個細胞/孔之濃度接種於經膠原蛋白I塗覆之96孔盤中。在第二天(第0天)，該等細胞係經HBV（來自HepAD38細胞之經純化之HBV)在200

moi (ge)下在4% PEG8000及2% DMSO之存在下感染並在37℃下培養整夜。將接種物抽真空及細胞用具有2% FBS之DMEM/F12清洗三次，然後用HepG2-NTCP培養基置換。

【0219】 在第5天處理細胞。在第5天，測試化合物用Opti-MEM I培養基稀釋3倍及與Lipofectamine® RNAiMAX轉染試劑遵循製造商之使用說明混合。在第8天培養基置換後，如本文描述轉染該等測試化合物。在再培養3天後，收穫上清液及HBsAg係藉由ELISA (Diasino)量測。細胞存活率係用CellTiter-Glo (Promega)量測。

【0220】 EC50(相對於未經處理之細胞對照值，減少HBsAg分泌50%所需之藥物之濃度)係使用Microsoft Excel預測函數或GraphPad Prism計算自HBsAg水平之減少百分率相對於藥物濃度之圖並匯總於表36中。

表36：效價及細胞毒性

化合物編號	EC_{50}	CC_{50}
6、274、283	A	A
273、282	C	A
315	D	A
290 184	A	A
134、277、284	A	A
192	A	A
221	A	A
294	C	A
291 276	A	A
295 275	B	A
173、293	B	A
165、287	A	A
167、289	B	A

化合物編號	EC_{50}	CC_{50}
164、286	B	A
166、288	B	A
171、280、292	B	A
314	A	A
281、316	C	A
296	A	A
285	A	A
251	B	A
356	A	A
320	A	A

【0221】 效價：A：EC_{50} < 30 nM；B：EC_{50} ≥ 30 nM及EC_{50} < 100 nM；C：EC_{50} ≥ 100 nM及EC_{50} < 300 nM；D：EC_{50} > 300 nM。

【0222】 細胞毒性：A：CC_{50} ≥ 1000 nM；B：CC_{50} < 1000 nM

實例B3

組合之HBSAG分泌分析

【0223】 例示性經修飾之寡核苷酸化合物與反義寡核苷酸(ASO)之組合對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性(如藉由HBsAg分泌分析測定)係如下文描述測定並匯總於表37中。

細胞培養

【0224】 將HepG2.2.15細胞維持在具有10%胎牛血清(FBS)及1%青黴素/鏈黴素、1%麩醯胺酸、1%非必需胺基酸、1%丙酮酸鈉之DMEM/F12培養基中。將細胞維持在37℃及5% CO_2氣氛下。

HBsAg分泌分析

【0225】 使HepG2.2.15細胞在如上文描述之DMEM/F12培養基中生長。將細胞以35,000個細胞/孔之濃度接種於經膠原蛋白I塗覆之96孔盤中。在添加細胞後，立即添加測試化合物。在第0及3天，進行雙重轉染。

轉染方法

【0226】 Lipofectamine® RNAiMAX 轉染。Lipofectamine® RNAiMAX轉染試劑(Thermo Fisher, cat#: 13778-150)係遵循製造商之使用說明使用。

【0227】 A：混合RNAiMAX (就96孔盤而言，0.3 ul/孔)及Opti-MEM I (製造20%額外)，在室溫下培養5 min。

【0228】 B：在Opti-MEM I中稀釋ASO及經修飾之寡核苷酸之組合以製造最終濃度之40x (8點，3倍稀釋，包括濃度0 nM)。最高濃度係EC_{50}值之約100至200倍。然後如圖23中顯示之圖中指示，在相反方向上混合來自化合物1及化合物2兩者之等體積稀釋液。

【0229】 等體積混合A及B (製造20%額外體積)，再培養5至10 min。然後將A及B之混合物以最終培養體積之1/10添加至各孔，用手將盤搖動10秒。針對該等盤，應至少一式三份。在37℃下培養3天，更新培養基，重複轉染過程。在治療之第6天，收穫上清液用於ELISA分析，用CellTiter-Glo (Promega)量測細胞存活率。

資料分析

【0230】 為分析協同，針對各孔計算HBsAg (或DNA)減少之百分率。減少百分率= (1個孔/無藥物對照之平均值)*100。將此等數值輸入MacSynergy II軟體中並遵循該軟體之使用說明獲得協同/拮抗體積。

【0231】 協同體積<25指示無協同/拮抗。

【0232】 協同體積25至50指示較小協同/拮抗。

【0233】 協同體積50至100指示中度協同/拮抗。

【0234】 協同體積>100指示強協同/拮抗。

【0235】 協同體積>1,000指示可能之錯誤，檢查資料。

【0236】 細胞存活率之百分率= (孔/無藥物對照之平均值)*100。如先前描述監測細胞毒性。

HBsAg定量

【0237】 分泌之HBsAg係使用HBsAg ELISA套組(Autobio-CL0310)定量量測。經修飾之寡核苷酸與ASO之組合之協同值係提供於表37中。

表37：組合之協同

化合物編號	ASO[1]	HBsAg 95%協同體積
166、288	ASO-1	335.08
134、277、284	ASO-2	52.98
296	ASO-2	43.05

[1]ASO-1係如Javanbakht, H.等人，Molecular Therapy: Nucleic Acids，第11卷，June 2018中揭示之未經結合之HBV ASO SSO-1，其具有下列結構：5-lnApslnGpsln(5m)CpsGpsApsApsGpsTpsGps(5m)CpsAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnGpslnG-3。ASO-2係具有如針對在美國申請案序列編號62/855,793中稱為之序列#9之ASO描述之結構之ASO，該美國申請案係以引用之方式併入本文中且尤其用於描述序列#9之結構之目的。

實例B4

組合之HBSAG分泌分析

【0238】 例示性經修飾之寡核苷酸化合物與ASO、衣殼組裝調節劑(CAM化合物1或CAM化合物2)或核苷類似物(Entecavir, ETV)之組合對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性(如藉由HBsAg分泌分析測定)係如下文描述測定並匯總於表38中。

細胞培養

【0239】下列分析程序描述HBV抗病毒分析。此分析使用HepG2.2.15細胞，該等細胞已經HBV基因體轉染，及細胞外HBV DNA定量作為端點。細胞存活率係藉由使用來自Promega之CellTiter-Glo®試劑量測細胞內ATP含量進行平行評估。

HBsAg分泌分析

【0240】使HepG2.2.15細胞在如上文描述之DMEM/F12培養基中生長。將細胞以35,000個細胞/孔之濃度接種於經膠原蛋白I塗覆之96孔盤中。在添加細胞後，立即添加測試化合物。在第0及3天進行雙重轉染。

HBV DNA定量分析

【0241】細胞外DNA係用QIAamp 96 DNA血液套組遵循製造商之手冊分離。然後，HBV DNA係藉由qPCR以如下文指定之HBV特異性引子及探針使用來自Roche之FastStart Universal MasterMix在ABI-7900HT上定量。PCR循環程序由95℃歷時10 min，接著在95℃下循環40次歷時15 sec及60℃歷時1 min組成。

項目	名稱	序列(5’ → 3’)
HBV引子	HBV-前移	GTGTCTGCGGCGTTTTATCA
	HBV-反向	GACAAACGGGCAACATACCTT
HBV探針	HBV探針	FAM-CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC-TAMRA

轉染方法

【0242】Lipofectamine® RNAiMAX轉染。Lipofectamine® RNAiMAX轉染試劑(Thermo Fisher, cat#: 13778-150)係遵循製造商之使用說明使用。

【0243】A：混合RNAiMAX (就96孔盤而言，0.3 ul/孔)及Opti-

MEM I (製造20%額外)，在室溫下培養5 min

【0244】 B：稀釋CAM、ASO或ETV及經修飾之寡核苷酸於Opti-MEM I中之組合以製造40x最終濃度(8點，3倍稀釋，包括濃度0 nM)。最高濃度係EC_{50}值之約100至200倍。然後如圖23中顯示之圖中指示，在相反方向上混合來自化合物1及化合物2兩者之等體積稀釋液。

【0245】 等體積混合A及B (製造20%額外體積)，再培養5至10 min。然後將A及B之混合物以最終培養體積之1/10添加至各孔，用手將盤搖動10秒。針對該等盤，應至少一式三份。在37℃下培養4 hr，然後添加ASO、ETV或CAM以使該等細胞恢復自轉染。在治療後第3天，收穫上清液用於ELISA分析，用CellTiter-Glo (Promega)量測細胞存活率。

資料分析

【0246】 協同資料係如上文於實例B3中描述分析。

HBsAg定量

【0247】 分泌之HBsAg係使用HBsAg ELISA套組(Autobio-CL0310)定量量測。經修飾之寡核苷酸與ASO之組合之協同值係提供於表38中。

表38：組合之協同

化合物編號	ASO、CAM或ETV[1]	HBV DNA	HBV DNA 95%協同體積
166、288	ASO-1	加成	23.99
134、277、284	ETV	協同	25.91
134、277、284	CAM化合物1	加成	1.35
134、277、284	CAM化合物2	協同	41.86

[1]CAM化合物1係具有如針對在WO2017/181141中稱為化合物3之CAM化合物描述之結構之CAM，WO2017/181141係以引用之方式併入本文中且尤其用於描述化合物3之結構之目的。CAM化合物2係具有如針對

在美國序列第62/805,725號中稱為之化合物1之CAM化合物描述之結構之CAM，美國序列第62/805,725號係以引用之方式併入本文中且尤其用於描述化合物1之結構之目的。ASO-1係如上文針對表37描述。

實例B5

非人類靈長類動物中之肝曝露

【0248】非人類靈長類動物中之終末肝曝露係藉由以靜脈內(IV)或皮下(SC)途徑向雌性食蟹猴給藥例示性經修飾之寡核苷酸化合物評估。就IV途徑而言，將化合物投與至無菌磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)媒劑中並歷時2 hr以1 mL/kg輸注。就皮下給藥而言，該媒劑亦可為無菌PBS且該化合物係以1 mL/kg之單次推注投與。每個劑量組中有兩隻動物，且顯示之資料係兩隻動物之平均值。肝濃度係在24小時時間點下測定。用於此研究之劑量及獲得之資料係顯示於圖12中。意外地，向非人類靈長類動物皮下投與後之肝曝露係遠高於基於由另外類似靜脈內給藥產生之肝曝露濃度預期之肝曝露。

實例B6

PBMC分析

【0249】例示性經修飾之寡核苷酸化合物對自外周血單核細胞(PBMC)釋放細胞介素之影響係如下文描述評估並匯總於表39及圖13至22中。

【0250】血塊黃層(N=3)係獲得自Stanford血液中心並遵循Aragen之標準方案使用Ficoll密度梯度離心進行處理以分離PBMC。將PBMC (1百萬個/mL)懸浮於完全培養基(用10%熱滅活低IgG FBS及PSG補充之RPMI)中並以100 μL/孔接種於96孔圓底盤中。PBMC用測試品(下一幻燈

片上所列) (濃度範圍：10 μM至0 μM至3倍稀釋)及PHA及聚IC (濃度範圍：10 μg/mL至0 μg/mL至3倍稀釋)處理。所有均一式三份設定。在37℃下/5%CO_2加濕標準細胞培養培養器中培養24小時後，收穫上清液並儲存在-80℃下直至針對細胞介素進行分析。細胞介素(GM-CSF、IL-1b、IL-2、IL-6、IL-10、IL-8、IL-12p70、IFNg、TNFa)係在Intellicyt iQue篩選器上測試並使用ForeCyt分析軟體分析。細胞介素(IFNa)係藉由標準ELISA測試。將結果表示為基於標準曲線計算之pg/ml。

表39

化合物編號	圖式編號	免疫反應[1]
PHA對照	13	強
REP-2139	14	弱
171、280、292	15	弱
296	16	無
134、277、284	17	弱
166、288	18	無
167、289	19	無
281、316	20	無
294	21	弱
276、291	22	弱

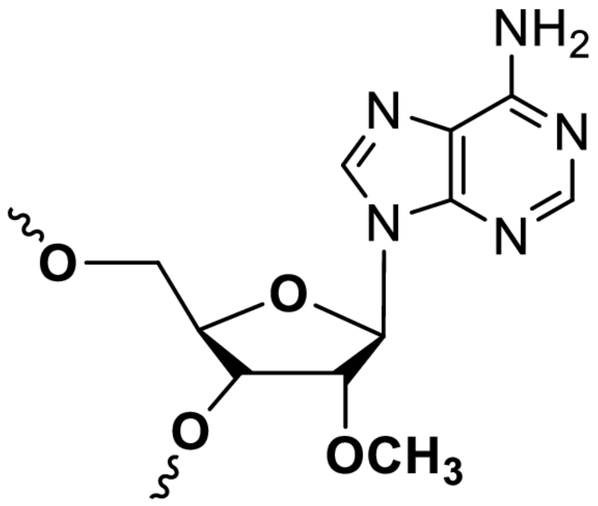
[1]強：在測試組中在超過兩種類型之細胞介素中觀察之顯著誘導；弱：在測試組中在一或兩種類型之細胞介素中觀察之誘導；無：在測試組中在任何細胞介素中均未見誘導。

【發明申請專利範圍】

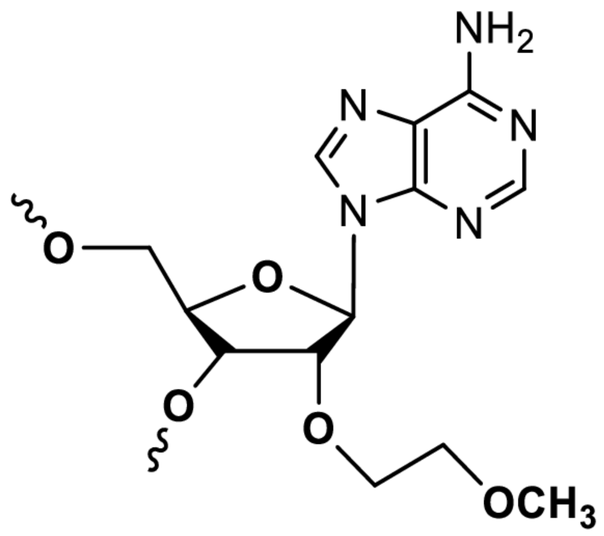
【第1項】

一種具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化(phosphoro-thioated)序列，其中：

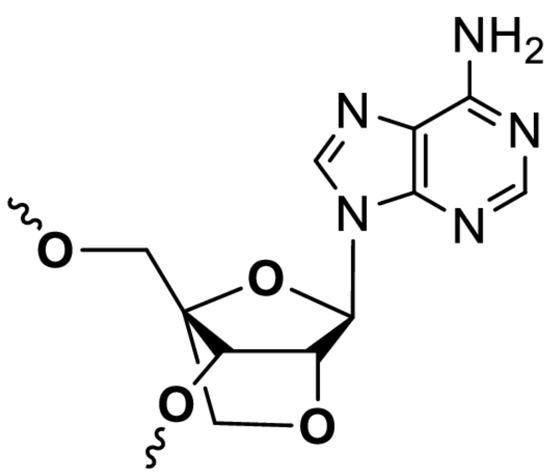
該等A單元包含一或多個選自以下：



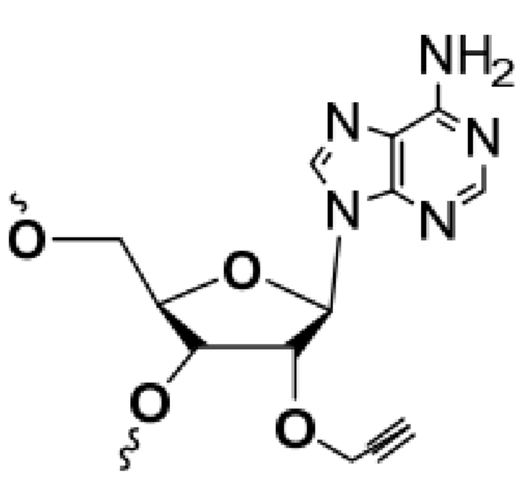
2'-OMe-A、



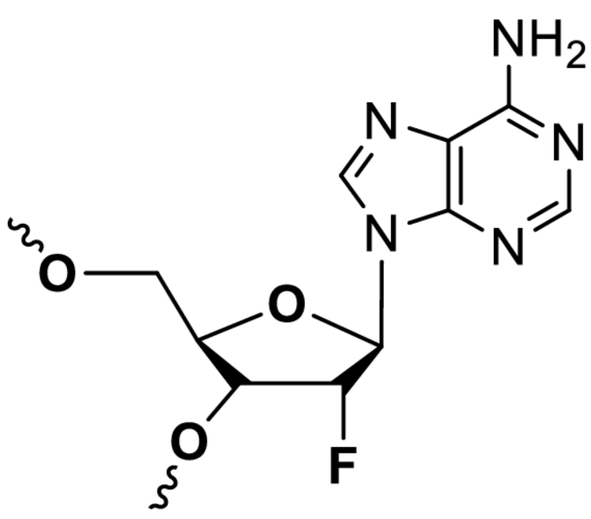
2'-MOE-A、



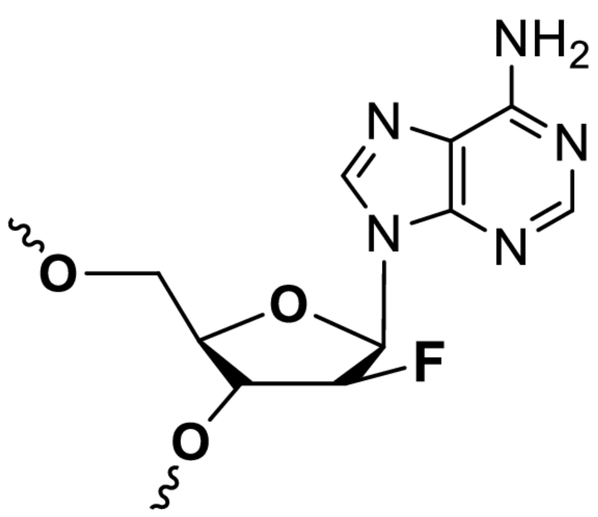
LNA-A、



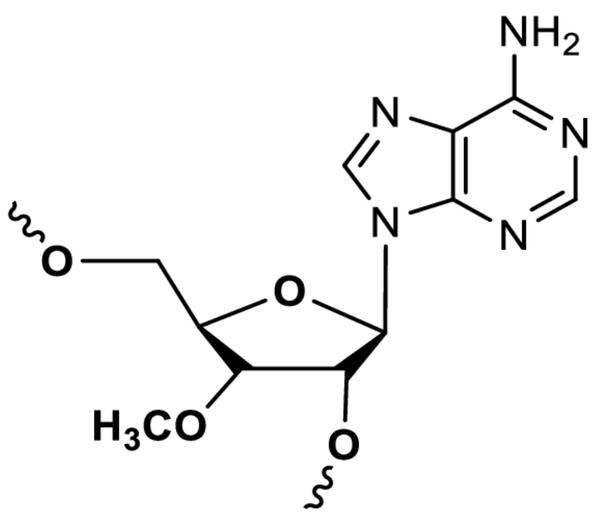
2'-O-丙炔基-A、



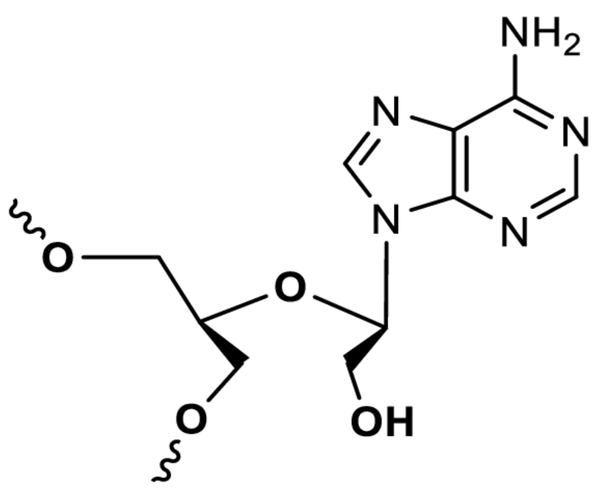
2'-F A、



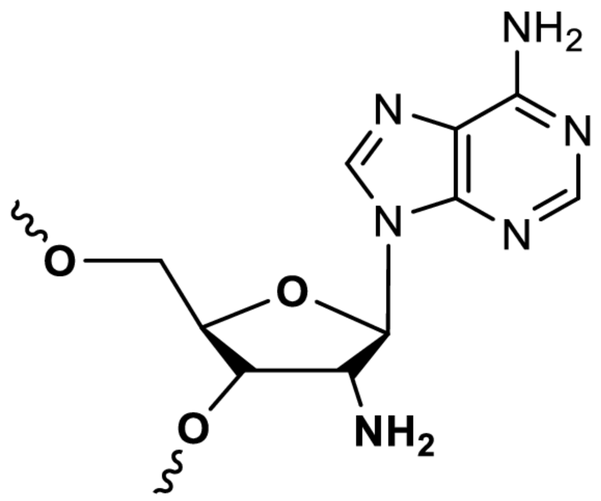
2'-araF A、



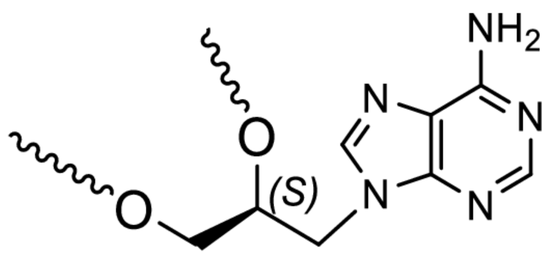
3'-OMe-A、



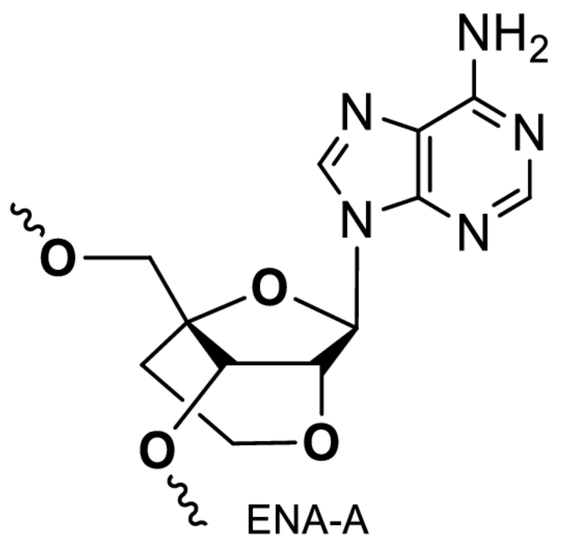
UNA-A、



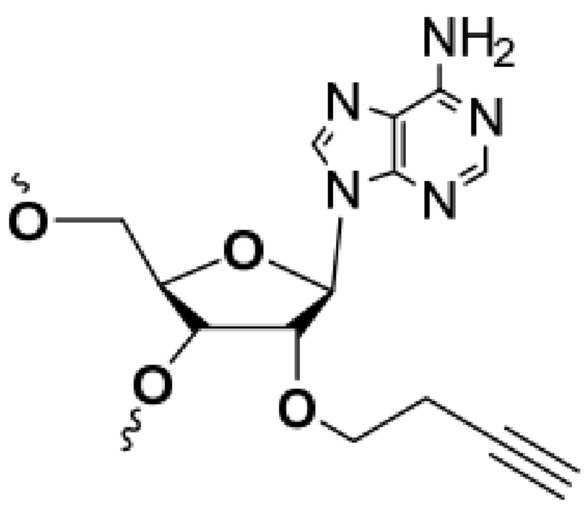
2'-NH_2-A、



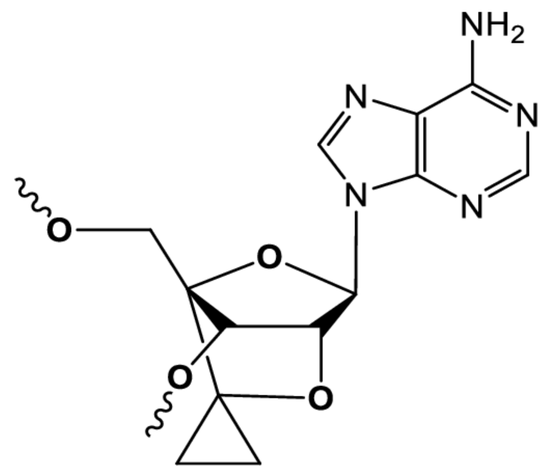
GNA-A、



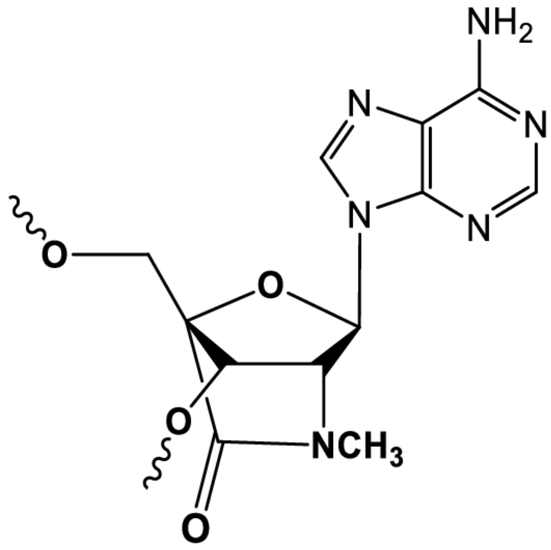
ENA-A、



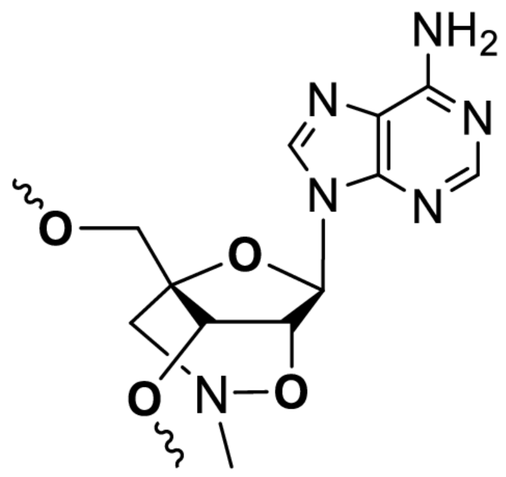
2'-O- 丁炔基 -A、



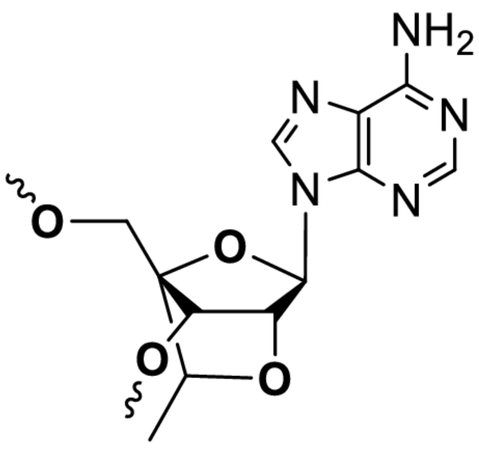
scp-BNA-A、



AmNA-(NMe)-A、

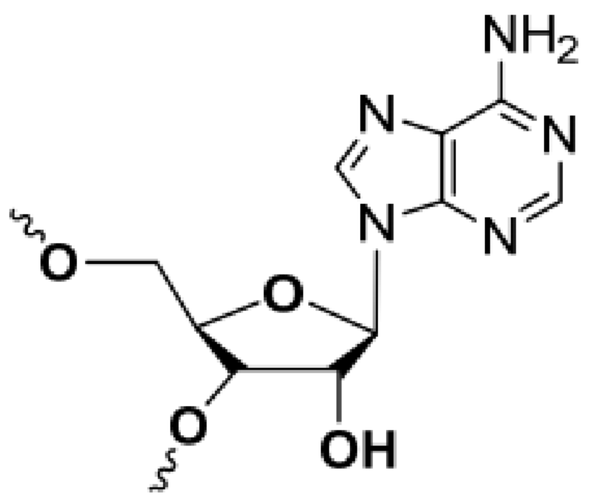


nmLNA-A、



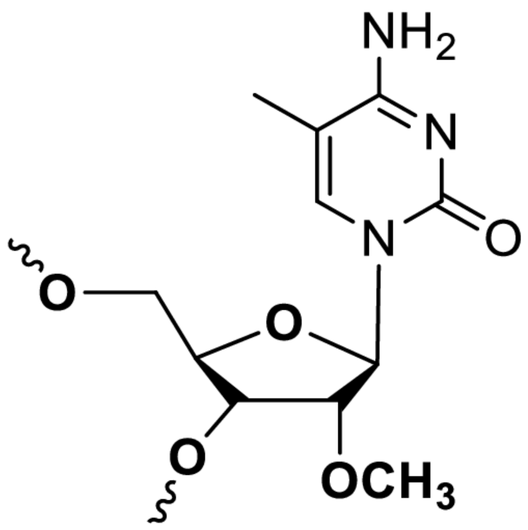
4etl-A

及

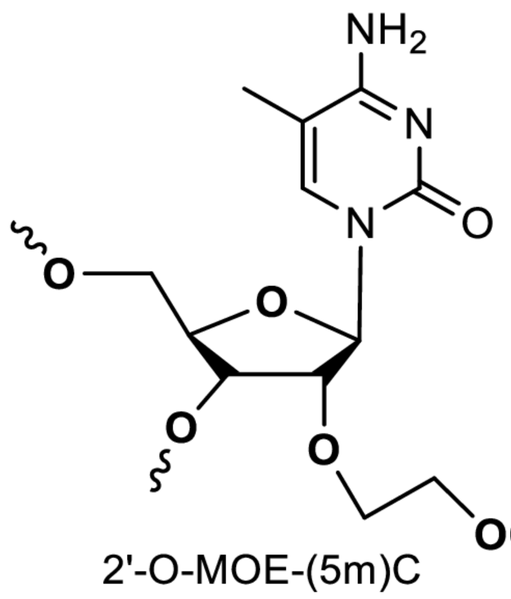


核糖-A;

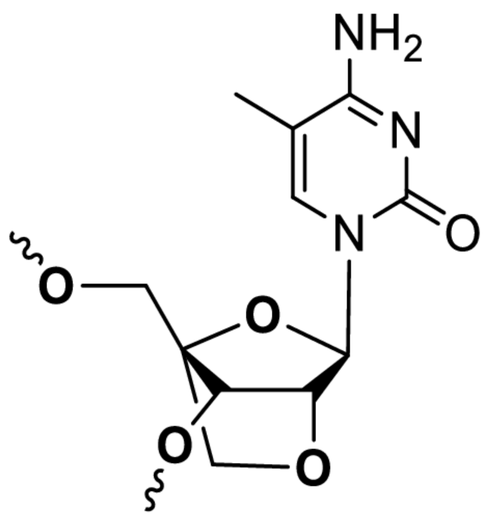
該等C單元包含一或多個選自以下：



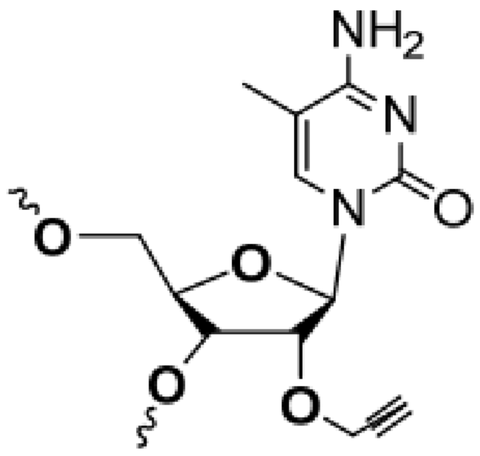
2'-OMe-(5m)C、



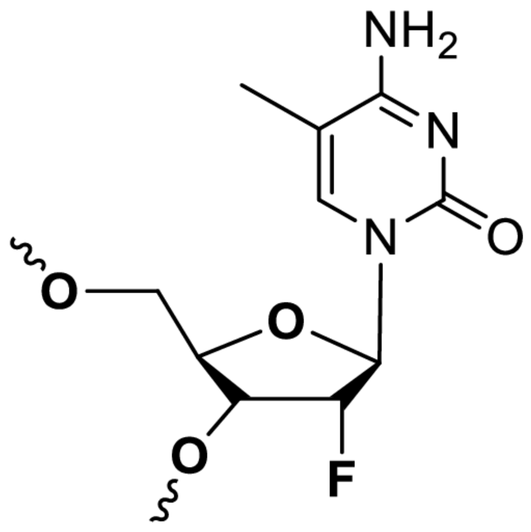
2'-O-MOE-(5m)C、



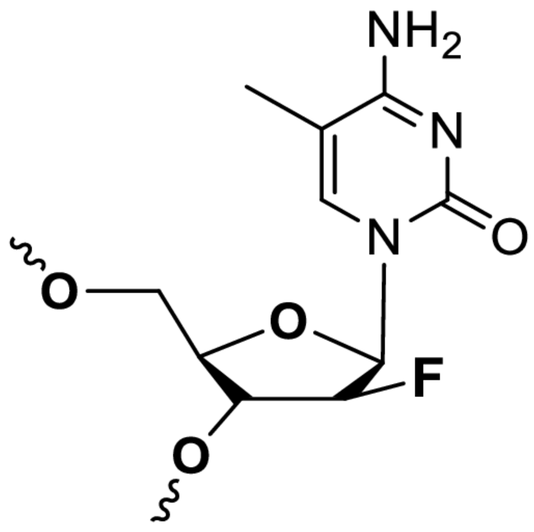
LNA-5mC、



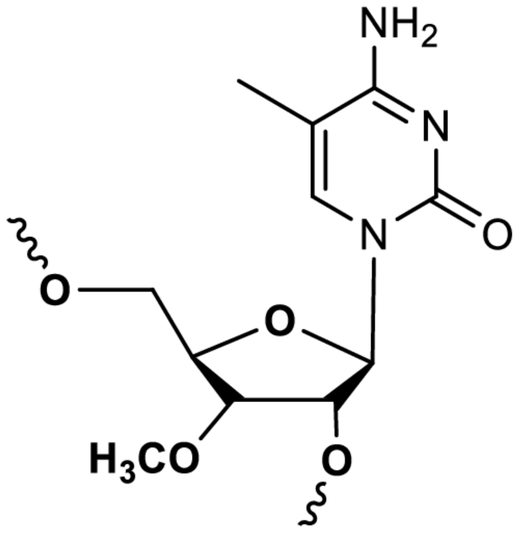
2'-O- 丙炔基 - (5m)C 、



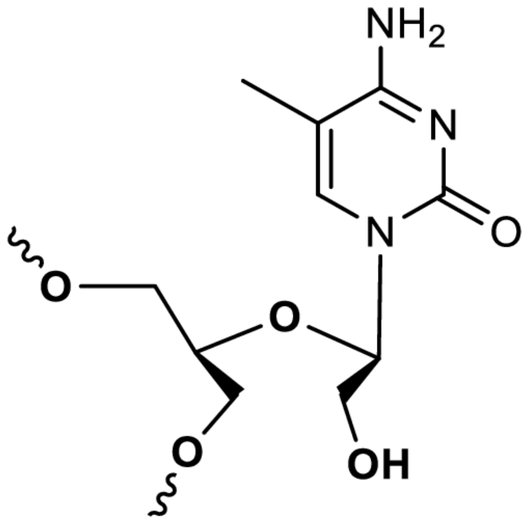
2'-F(5m)C 、



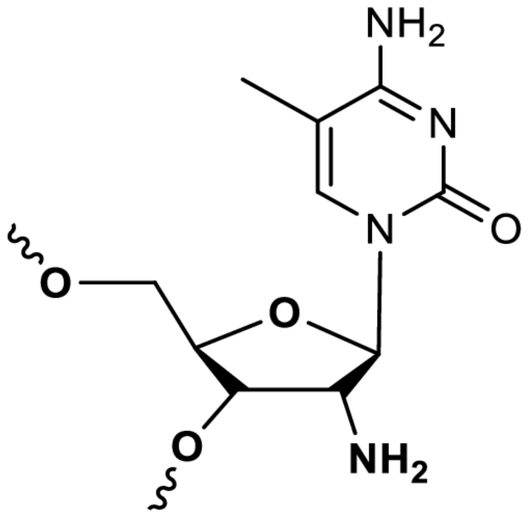
2'-araF(5m)C 、



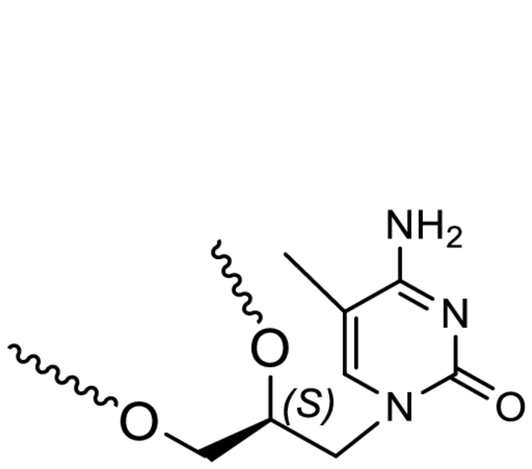
3'-OMe (5m)C 、



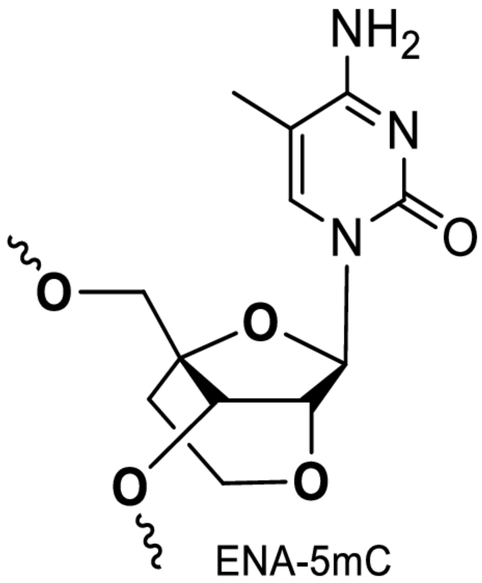
UNA-(5m)C 、



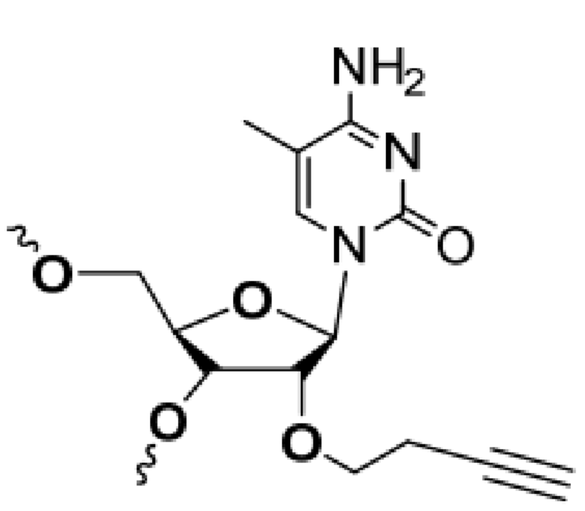
2'-NH_2 (5m)C 、



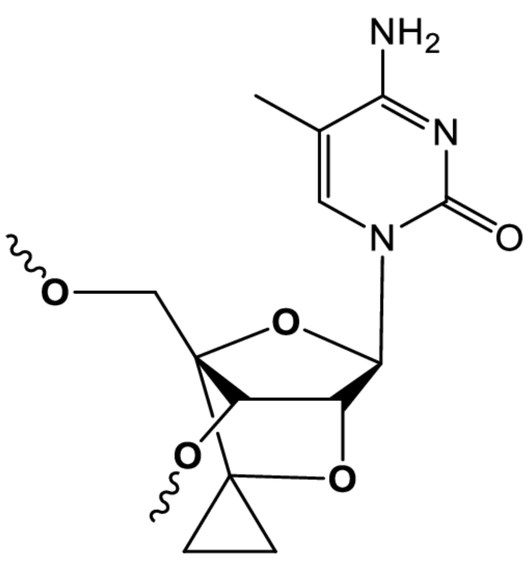
GNA-(5m)C 、



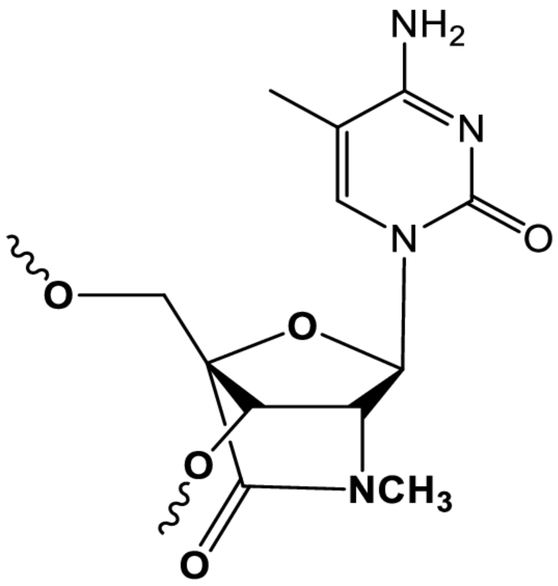
ENA-5mC 、



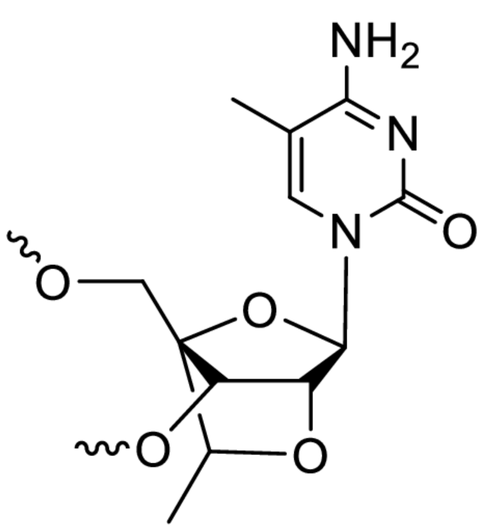
2'-O- 丁炔基 - (5m)C 、



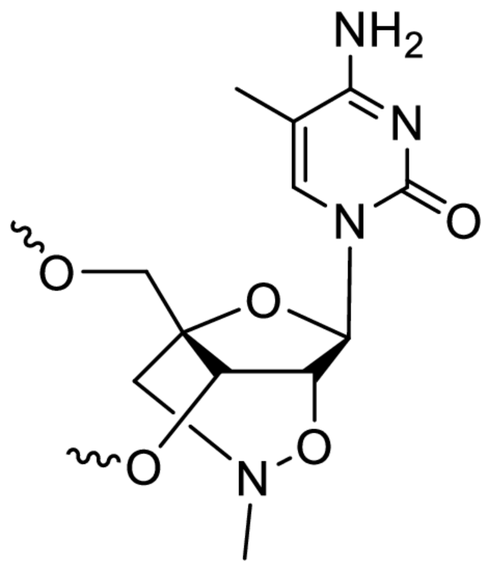
scp-BNA-(5m)C 、



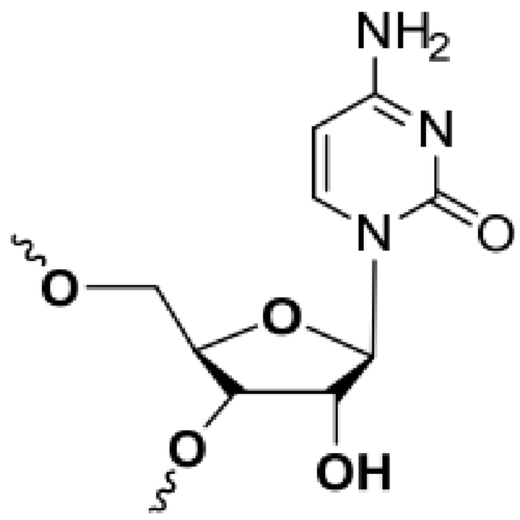
AmNA-(NMe)-(5m)C 、



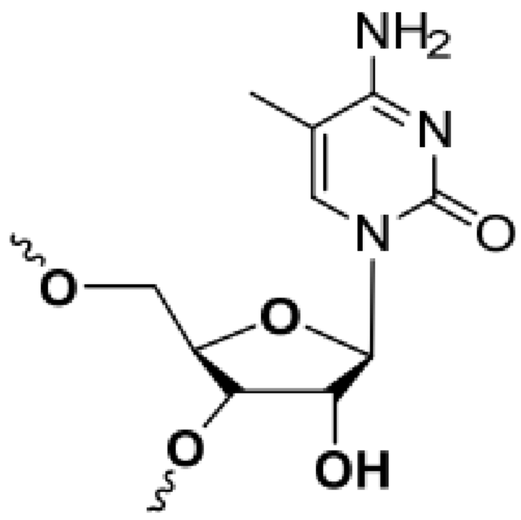
4etl-(5m)C 、



nmLNA-(5m)C 、



核糖-C 、



核糖-(5m)C ；

各末端 ~~O 獨立地係羥基、硫代磷酸O,O-二氫酯(O,O-dihydrogen phosphorothioate)、磷酸二氫酯、端帽(endcap)或連接基；

各內部 ~~O 係連接至鄰近A或C單元之含磷鍵聯，該含磷鍵聯為硫代磷酸酯鍵聯或選自磷酸二酯、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、膦酸甲酯、硫代二磷酸酯(diphosphorothioate)、5’-磷醯胺酯(phosphoramidate)、3’,5’-磷醯二胺酯(phosphordiamidate)、5’-硫代磷醯胺酯、3’,5’-硫代磷醯二胺酯或二磷酸二酯之經修飾鍵聯；及

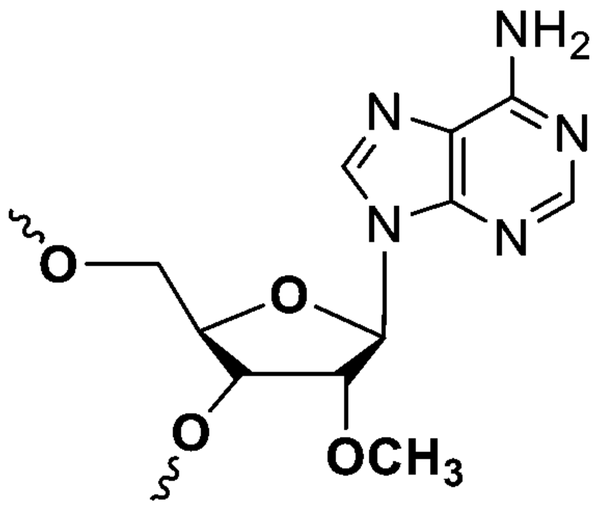
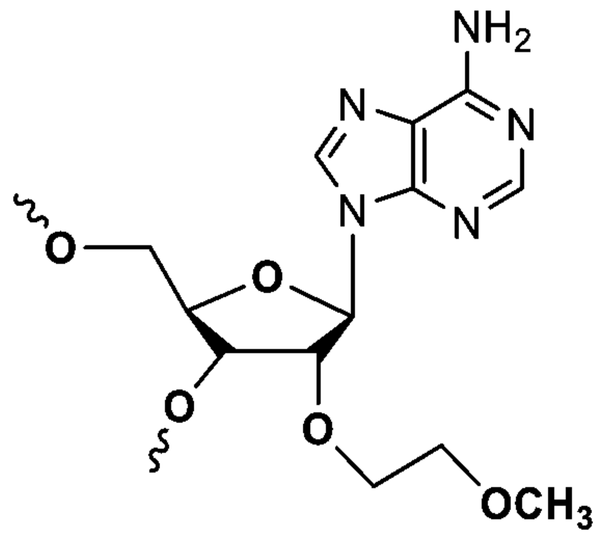
如藉由HBsAg分泌分析測定，對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係大於參考化合物之序列獨立性抗病毒活性；

條件為，當交替A及C單元之序列包含核糖-A單元時，該序列進一步包含至少一個A單元不為核糖-A單元；及

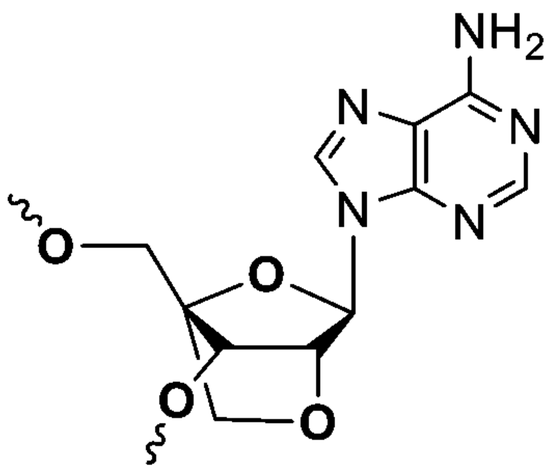
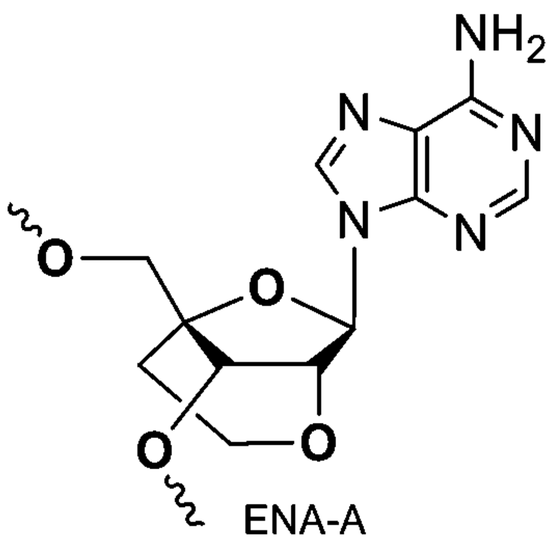
條件為，當交替A及C單元之序列包含核糖-C單元時，該序列進一步包含至少一個C單元不為核糖-C單元。

【第2項】

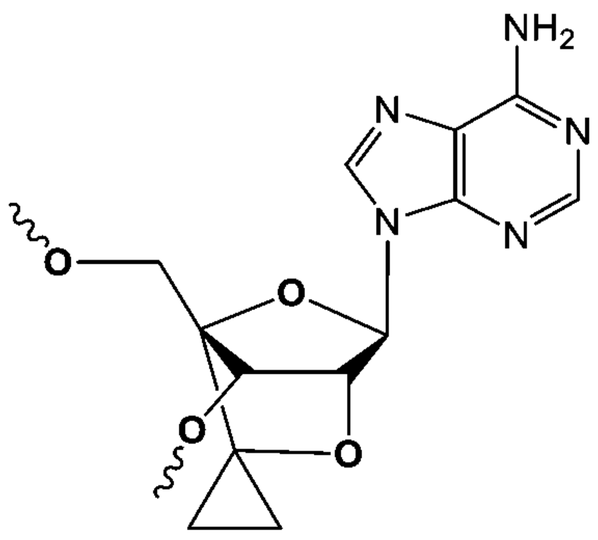
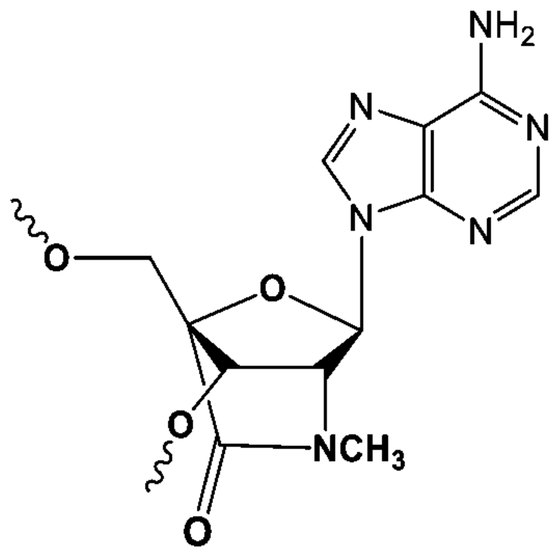
如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係一或多

個選自以下：
2'-OMe-A
及
2'-O-MOE-A
。

【第3項】

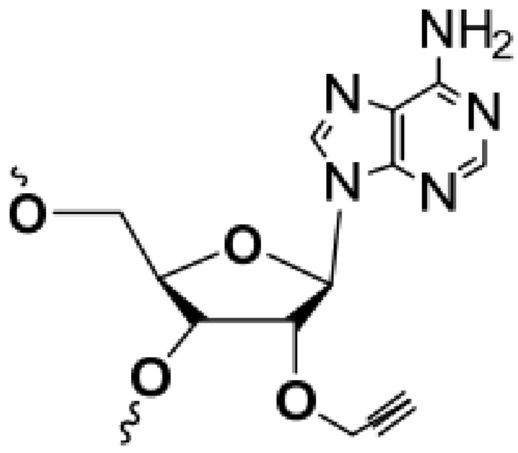
如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係一或多個選自以下：
LNA-A
及
ENA-A
。

【第4項】

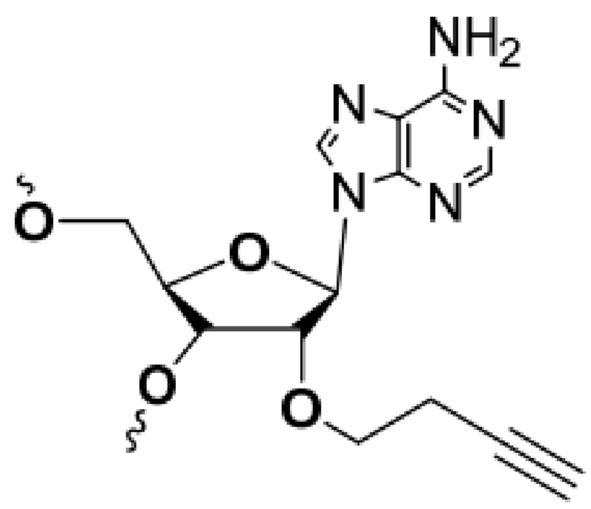
如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係一或多個選自以下：
scp-BNA-A
及
AmNA-(NMe)-A
。

【第5項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係一或多



2'-O- 丙炔基 -A

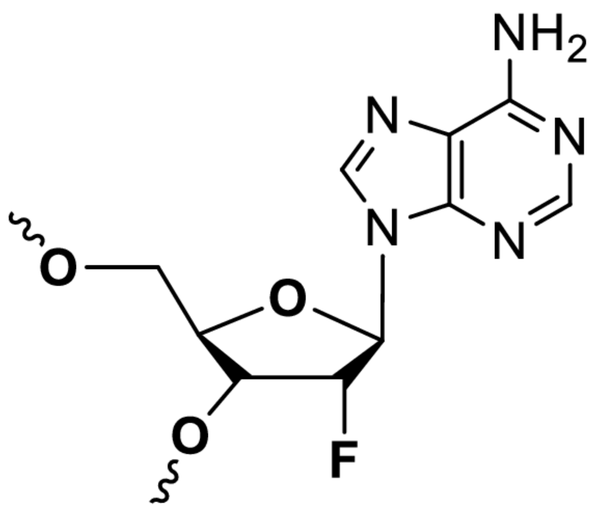


2'-O- 丁炔基 -A

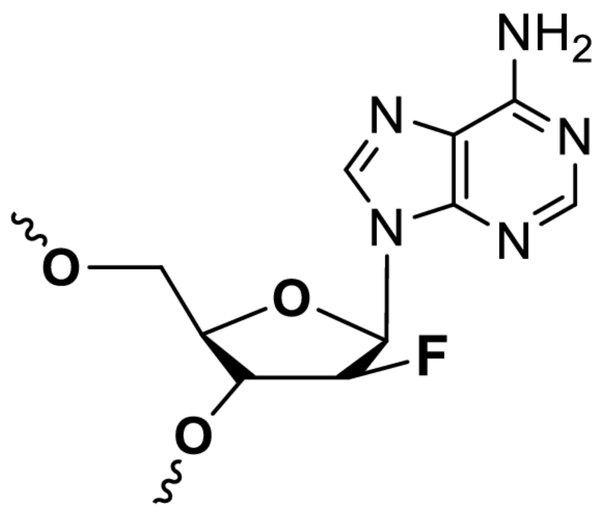
個選自以下： 及 。

【第6項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係一或多



2'-F A

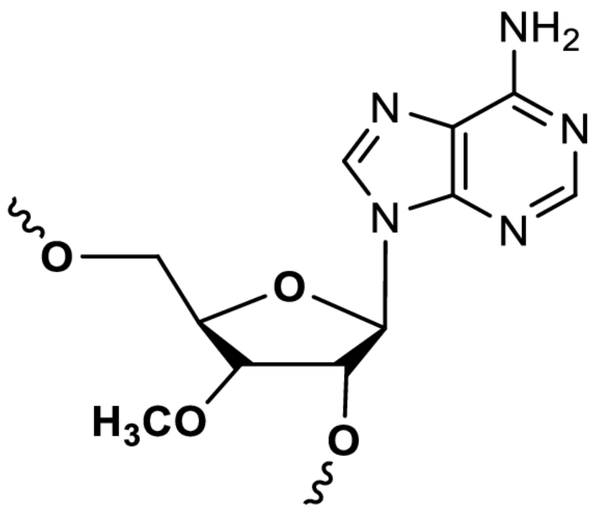


2'-araF A

個選自以下： 及 。

【第7項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係

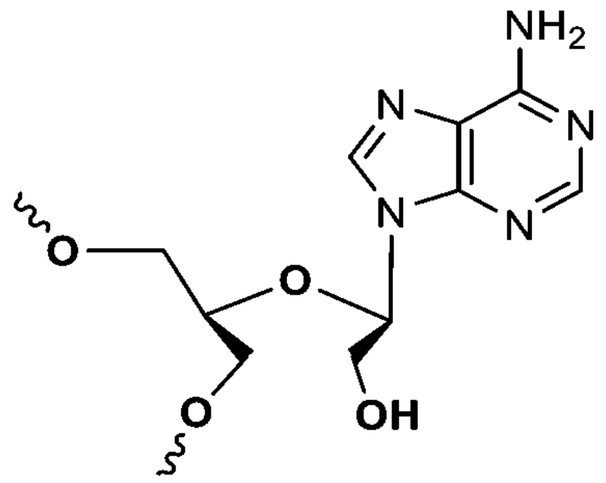


3'-OMe-A

。

【第8項】

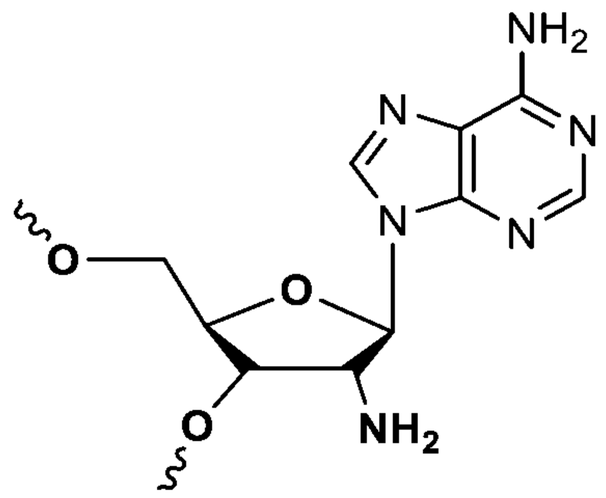
如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係



UNA-A

【第9項】

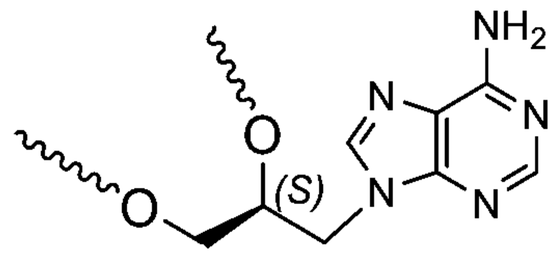
如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係



2'-NH_2-A

【第10項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係



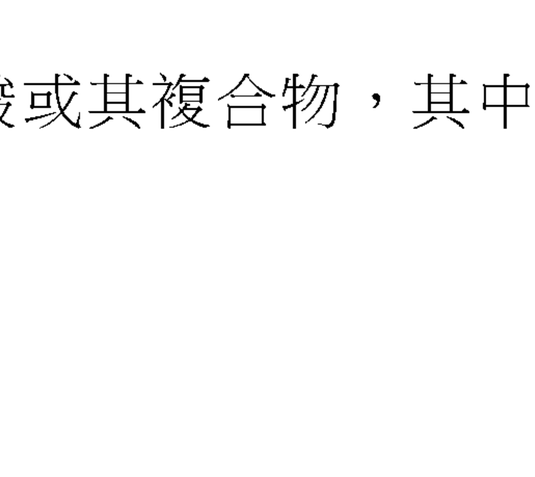
GNA-A

【第11項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該A單元係一或多個選自以下：

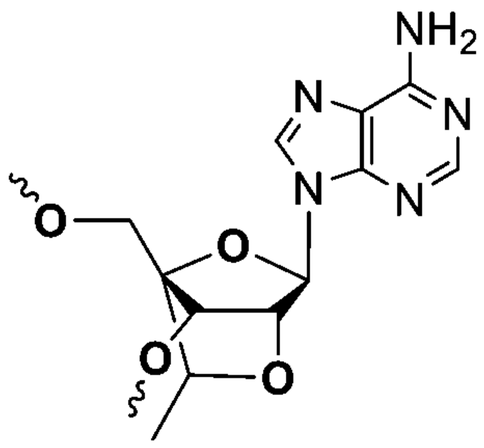
LNA-A

、



nmLNA-A

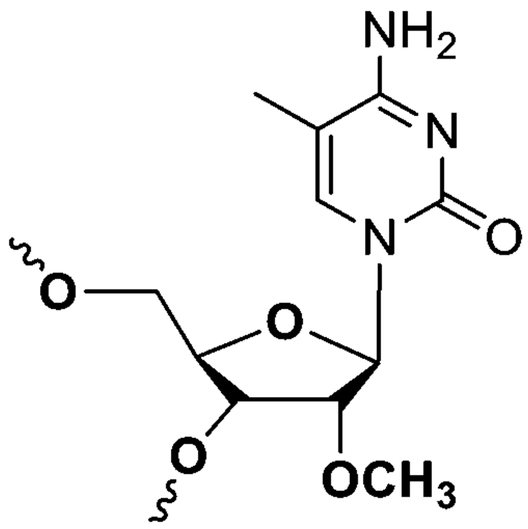
及



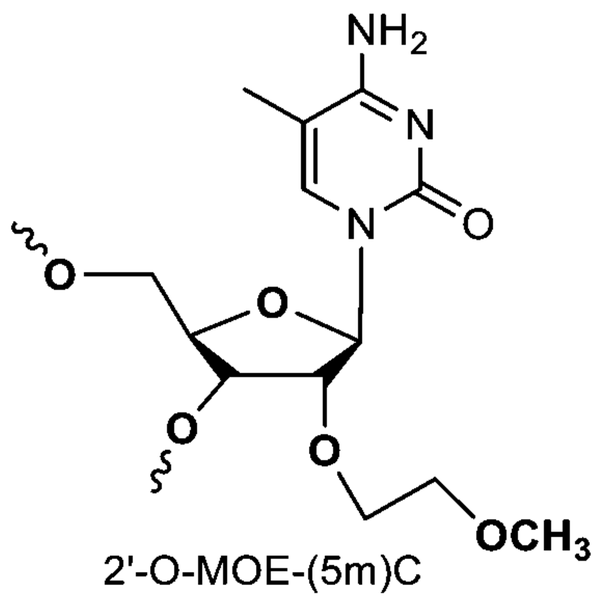
4etl-A

。

【第12項】

如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C單元係一或多個選自以下：

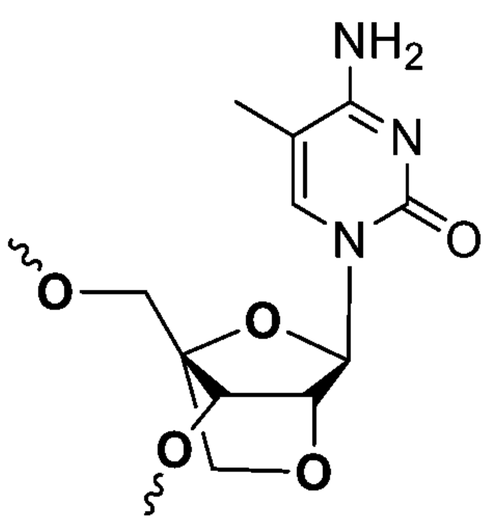
2'-OMe-(5m)C

及

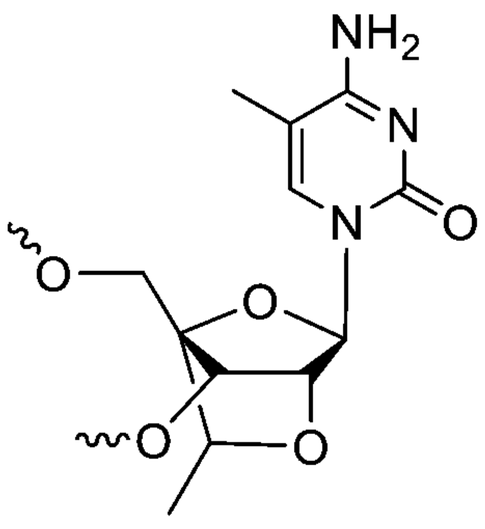
2'-O-MOE-(5m)C

。

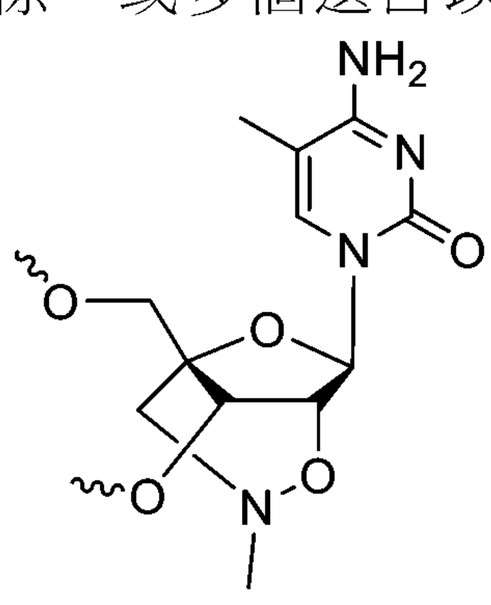
【第13項】

如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C單元係一或多個選自以下：

LNA-(5m)C

、

4etl-(5m)C

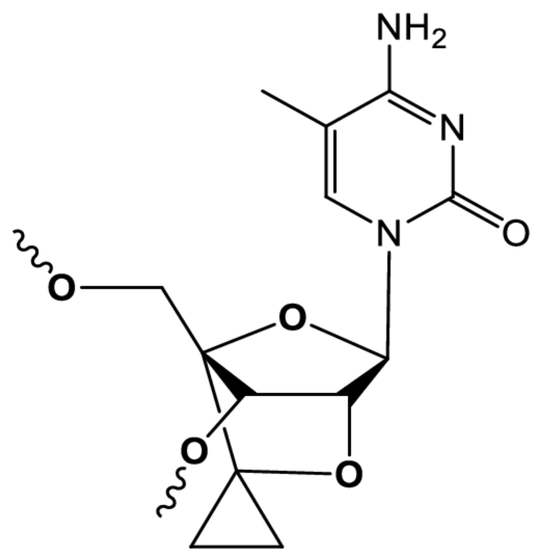
及

nmLNA-(5m)C

。

【第14項】

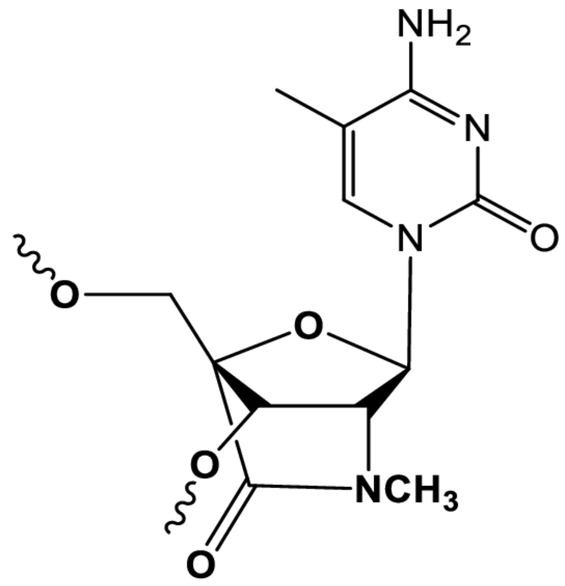
如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C



單元係 scp-BNA-(5m)C 。

【第15項】

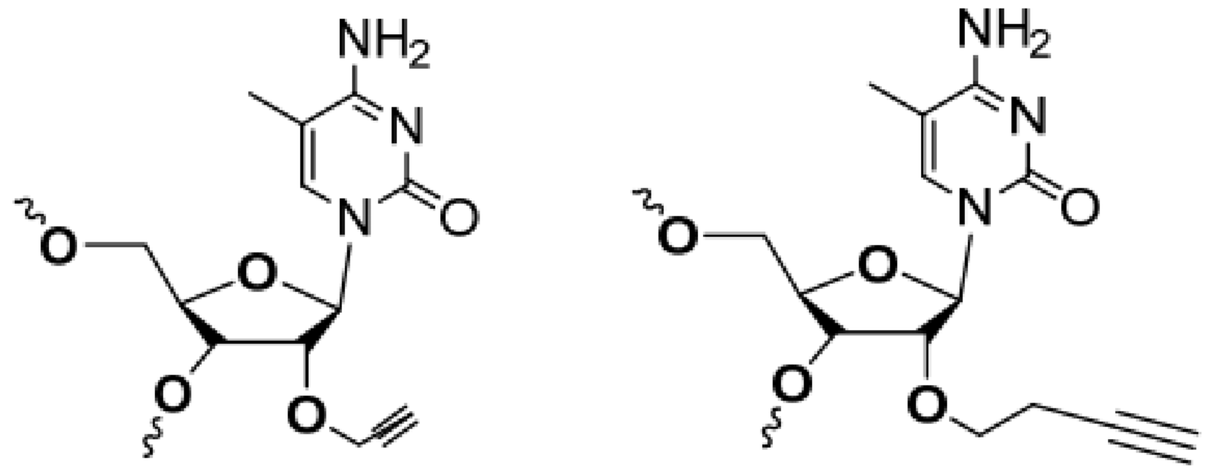
如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C



單元係 AmNA-(NMe)-(5m)C 。

【第16項】

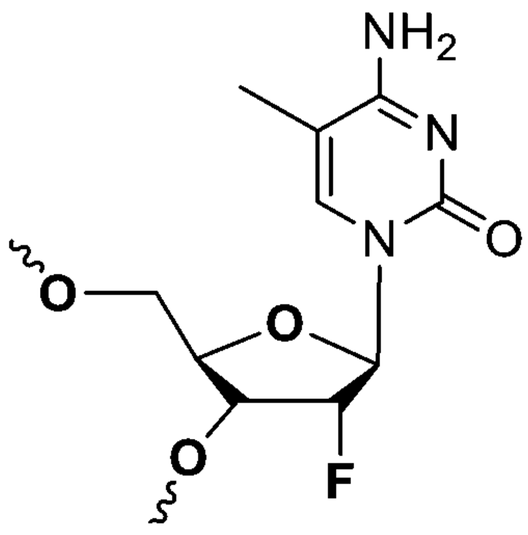
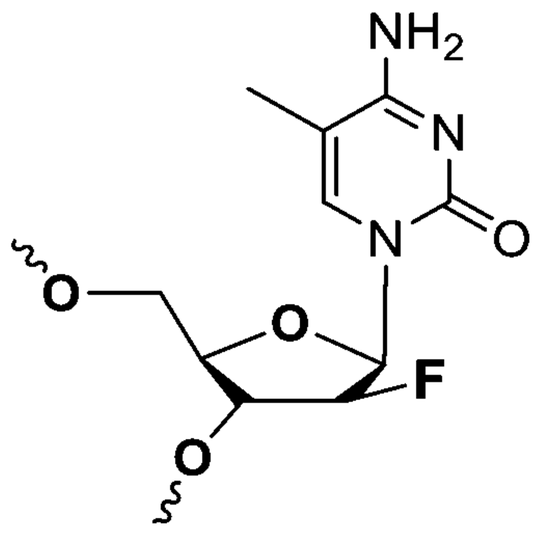
如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C



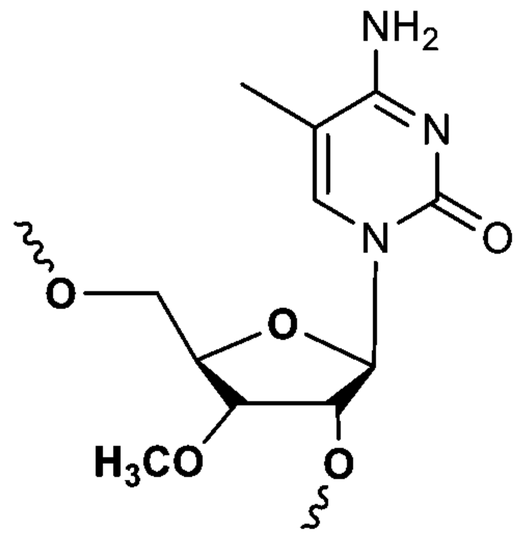
單元係一或多個選自以下： 2'-O- 丙炔基 - (5m)C 及 2'-O- 丁炔基 - (5m)C 。

【第17項】

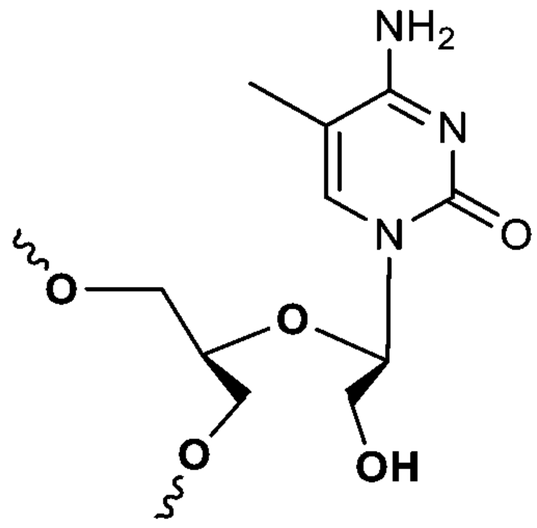
如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C

單元係一或多個選自以下：
2'-F(5m)C
及
2'-araF(5m)C
。

【第18項】

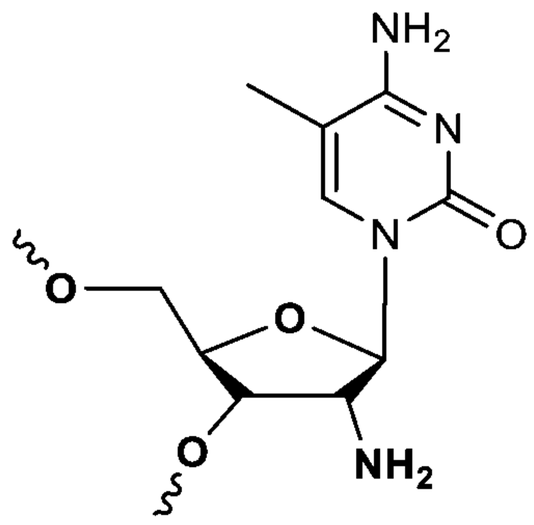
如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C單元係
3'-OMe- (5m)C
。

【第19項】

如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C單元係
UNA-(5m)C
。

【第20項】

如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C

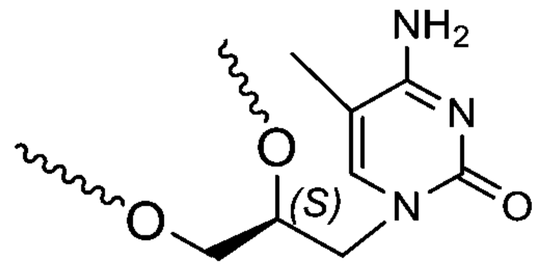


2'-NH_2 (5m)C

單元係　　。

【第21項】

如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C

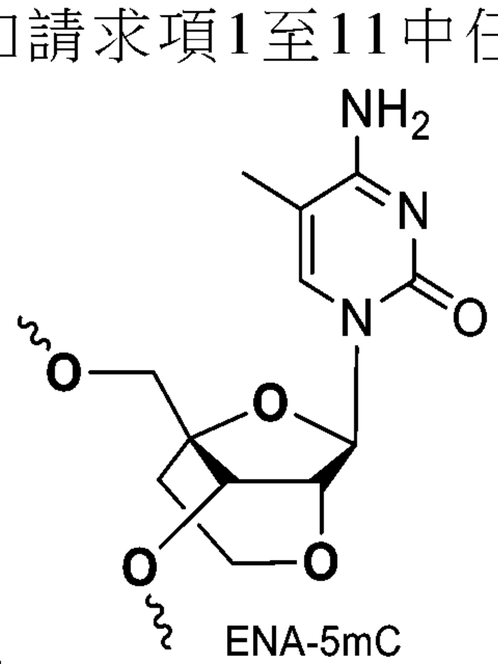


GNA-(5m)C

單元係　　。

【第22項】

如請求項1至11中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該C



ENA-5mC

單元係　　。

【第23項】

如請求項1至22中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其係部分硫代磷酸酯化。

【第24項】

如請求項23之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其係至少約85%硫代磷酸酯化。

【第25項】

如請求項1至22中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其係完全硫代磷酸酯化。

【第26項】

如請求項23至25中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含至少一個立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯。

【第27項】

如請求項26之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含至少6個立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯。

【第28項】

如請求項26或27之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該至少一個立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯具有R構型。

【第29項】

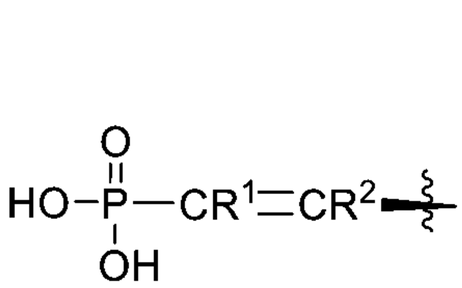
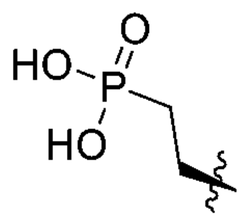
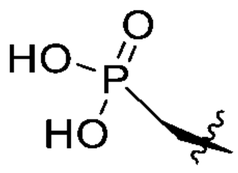
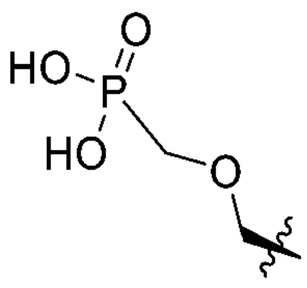
如請求項26或27之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該至少一個立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯具有S構型。

【第30項】

如請求項1至29中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其包含5’端帽。

【第31項】

如請求項30之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該5’端帽係選自


、

、

及

，其中R^1及R^2係各別地選自氫、氘、磷酸酯、硫代C_{1-6}烷基及氰基。

【第32項】

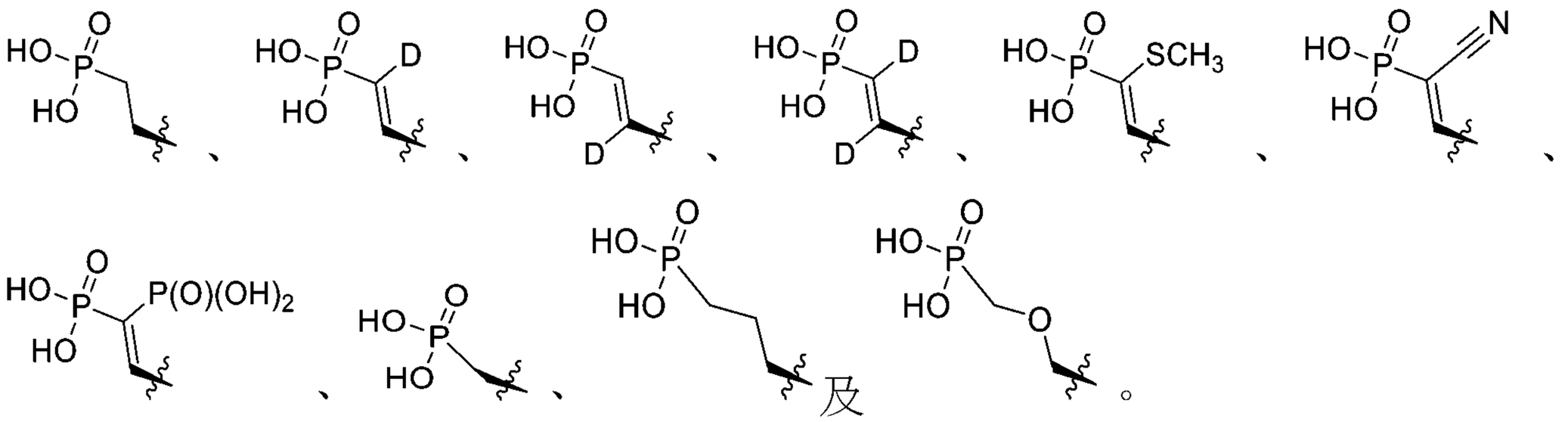
如請求項31之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中R^1及R^2均為氫。

【第33項】

如請求項31之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中R^1及R^2不均為氫。

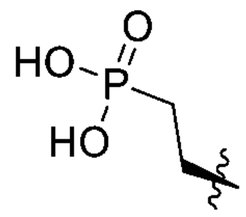
【第34項】

如請求項31之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該5’端帽係選自



【第35項】

如請求項31之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該5’端帽係



【第36項】

如請求項1至35中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在約8個單元至約200個單元範圍內之序列長度。

【第37項】

如請求項1至35中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在18個單元至60個單元範圍內之序列長度。

【第38項】

如請求項1至35中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在30個單元至50個單元範圍內之序列長度。

【第39項】

如請求項1至35中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在34個單元至46個單元範圍內之序列長度。

【第40項】

如請求項1至35中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度。

【第41項】

如請求項1至40中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中至少一個末端 係連接基。

【第42項】

如請求項41之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其進一步包含至少一個第二寡核苷酸經由連接基連接至經修飾之寡核苷酸。

【第43項】

如請求項41之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其進一步包含靶向配體經由連接基連接至經修飾之寡核苷酸。

【第44項】

如請求項43之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該靶向配體包含

N-乙醯半乳胺糖(GalNac)、三觸角-GalNAc、生育酚或膽固醇。

【第45項】

如請求項1至44中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中至少一些A單元在核糖環上未2’O-甲基化。

【第46項】

如請求項1至45中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中至少一些C單元在核糖環上未2’O-甲基化。

【第47項】

如請求項1至46中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列進一步包含對硫代磷酸酯鍵聯之一或多種修飾。

【第48項】

如請求項47之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中對硫代磷酸酯鍵聯之修飾係選自磷酸二酯、硫代二磷酸酯、膦酸甲酯、硫代二磷酸酯、5’-磷醯胺酯、3’,5’-磷醯二胺酯、5’-硫代磷醯胺酯、3’,5’-硫代磷醯二胺酯或二磷酸二酯之經修飾鍵聯。

【第49項】

如請求項48之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該經修飾鍵聯係磷酸二酯鍵聯。

【第50項】

如請求項1至46中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其進一步包含交替A及C單元之至少兩個部分硫代磷酸酯化序列連接在一起形成多聯體(concatemer)。

【第51項】

如請求項1至50中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係比參考化合物大至少2倍。

【第52項】

如請求項51之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性係比參考化合物大至少5倍。

【第53項】

如請求項1至52中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有小於30 nM之EC_{50}值。

【第54項】

如請求項1至52中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有在30 nM至小於100 nM之範圍內之EC_{50}值。

【第55項】

如請求項1至52中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有在100 nM至小於300 nM之範圍內之EC_{50}值。

【第56項】

如請求項1至52中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有大於300 nM之EC_{50}值。

【第57項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該至少部分硫代磷

酸酯化序列具有如表6至33及圖6A至6B中闡述之序列長度及交替A及C單元。

【第58項】

如請求項1至57中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該參考化合物係稱為REP 2139之硫代磷酸酯化AC 40-mer寡核苷酸。

【第59項】

如請求項1至57中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中該參考化合物係5’mApsmCpsmApsmC 3’ (2’-OMe-A；2’-OMe-C)。

【第60項】

如請求項1至59中任一項之經修飾之寡核苷酸之複合物，其中該複合物係螯合複合物。

【第61項】

如請求項60之複合物，其中該複合物係該經修飾之寡核苷酸之鈣、鎂或鋅螯合複合物。

【第62項】

如請求項1至59中任一項之經修飾之寡核苷酸之複合物，其中該複合物係單價相對離子複合物。

【第63項】

如請求項62之複合物，其中該複合物係該經修飾之寡核苷酸之鋰、鈉或鉀複合物。

【第64項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中：

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化；

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

該等A單元包含至少12個2’-OMe-A單元及至少1個核糖-A單元；

該等C單元包含至少15個LNA-5mC單元；及

如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有小於30 nM之EC_{50}值。

【第65項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中：

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化；

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

該等A單元包含至少15個2’-OMe-A單元；

該等C單元包含至少7個LNA-5mC單元；及

如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有小於50 nM之EC50值。

【第66項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中：

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯

化；

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

該等A單元包含至少15個2’-OMe-A單元；

該等C單元包含至少3個LNA-5mC單元；及

如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有小於100 nM之EC50值。

【第67項】

如請求項1之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其中：

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列係至少85%硫代磷酸酯化；

交替A及C單元之至少部分硫代磷酸酯化序列具有在36個單元至44個單元範圍內之序列長度；

該等A單元包含至少18個2’-OMe-A單元；

該等C單元包含至少15個LNA-5mC單元；及

如藉由HBsAg分泌分析測定，該經修飾之寡核苷酸具有小於30 nM之EC50值。

【第68項】

如請求項64至67中任一項之經修飾之寡核苷酸之複合物，其中該複合物係單價相對離子複合物，其包含該經修飾之寡核苷酸之鈉或鉀複合物。

【第69項】

一種醫藥組合物，其包含可有效治療感染B型肝炎個體之量之如請求

項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物；及醫藥上可接受之載劑。

【第70項】

一種醫藥組合物，其可有效治療感染D型肝炎個體之量之如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物；及醫藥上可接受之載劑。

【第71項】

一種用於B型肝炎、D型肝炎或兩者之治療，其包含有效量之如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或如請求項69或70之醫藥組合物。

【第72項】

一種治療B型肝炎之方法，其包括向有此需要之個體投與有效量之如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，如請求項69或70之醫藥組合物，或如請求項71之治療。

【第73項】

如請求項72之方法，其中該經修飾之寡核苷酸或其複合物係藉由非經腸途徑投與該個體。

【第74項】

如請求項72之方法，其中該經修飾之寡核苷酸或其複合物係經靜脈內投與該個體。

【第75項】

如請求項72之方法，其中該經修飾之寡核苷酸或其複合物係經皮下投與該個體。

【第76項】

如請求項72至75中任一項之方法，其進一步包括向該個體投與有效量之用於B型肝炎之第二治療。

【第77項】

如請求項76之方法，其中該用於B型肝炎之第二治療包含具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之第二寡核苷酸、siRNA寡核苷酸、反義寡核苷酸、核苷、干擾素、免疫調節劑、衣殼組裝調節劑，或其組合。

【第78項】

如請求項77之方法，其中該用於B型肝炎之第二治療包含反義寡核苷酸。

【第79項】

如請求項77之方法，其中該用於B型肝炎之第二治療包含衣殼組裝調節劑。

【第80項】

一種治療D型肝炎之方法，其包括向有此需要之個體投與有效量之如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，如請求項69或70之醫藥組合物，或如請求項71之治療。

【第81項】

如請求項80之方法，其中該經修飾之寡核苷酸或其複合物係藉由非經腸途徑投與該個體。

【第82項】

如請求項80之方法，其中該經修飾之寡核苷酸或其複合物係經靜脈內投與該個體。

【第83項】

如請求項80之方法，其中該經修飾之寡核苷酸或其複合物係經皮下投與該個體。

【第84項】

如請求項80至83中任一項之方法，其進一步包括向該個體投與有效量之用於D型肝炎之第二治療。

【第85項】

如請求項84之方法，其中該用於D型肝炎之第二治療包含具有對抗B型肝炎之序列獨立性抗病毒活性之第二寡核苷酸、反義寡核苷酸、核苷、干擾素、衣殼組裝調節劑，或其組合。

【第86項】

如請求項85之方法，其中該用於B型肝炎之第二治療包含反義寡核苷酸。

【第87項】

如請求項85之方法，其中該用於B型肝炎之第二治療包含衣殼組裝調節劑。

【第88項】

一種治療B型肝炎或D型肝炎之方法，其包括向有此需要之個體皮下投與有效量之抗病毒寡核苷酸或其複合物，其中該寡核苷酸之抗病毒活性主要藉由序列獨立性作用模式發生。

【第89項】

如請求項88之方法，其中該抗病毒寡核苷酸係REP 2139、REP 2055、REP 2165或其螯合複合物。

【第90項】

如請求項88之方法，其中該抗病毒寡核苷酸係如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物、如請求項69或70之醫藥組合物，或如請求項71之治療。

【第91項】

如請求項88至90中任一項之方法，其包括以比另外基於另外相當靜脈內投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向有此需要之人類個體皮下投與安全且有效量之抗病毒寡核苷酸或其複合物。

【第92項】

如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其用於治療B型肝炎。

【第93項】

如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物，其用於治療D型肝炎。

【第94項】

一種如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物之用途，其用於製備用於治療B型肝炎之藥劑。

【第95項】

一種如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸或其複合物之用途，其用於製備用於治療D型肝炎之藥劑。

【第96項】

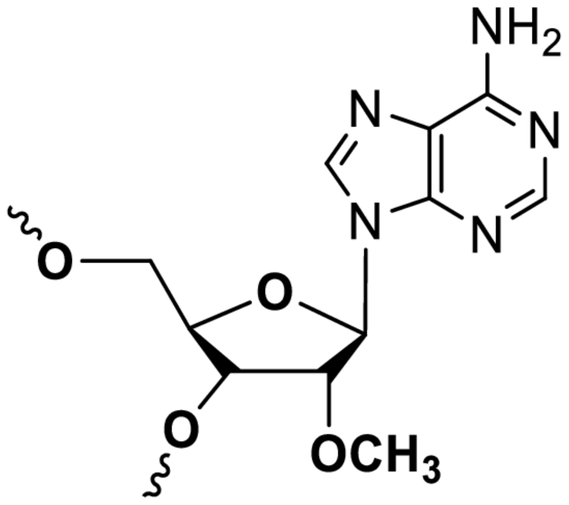
如請求項92或93之經修飾之寡核苷酸或其複合物，或如請求項94或95之用途，其中該用途包括以比另外基於另外相當靜脈投與後觀察之肝濃度預期更低劑量，向有此需要之人類個體皮下投與安全且有效量之抗病毒

寡核苷酸或其複合物。

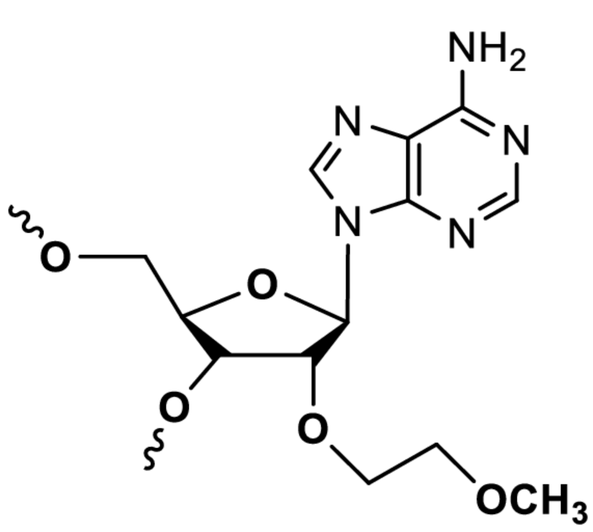
【第97項】

一種二核苷酸，其係由立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯連接之A單元及C單元構成，其中：

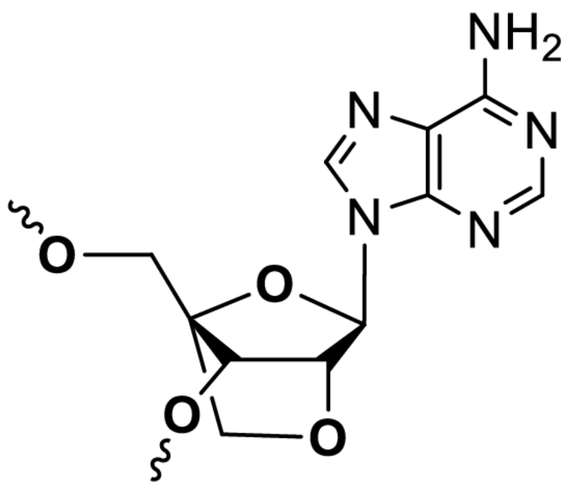
該等A單元包含一或多個選自以下：



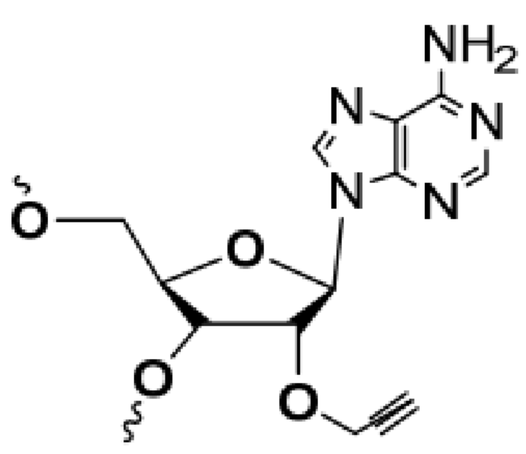
2'-OMe-A、



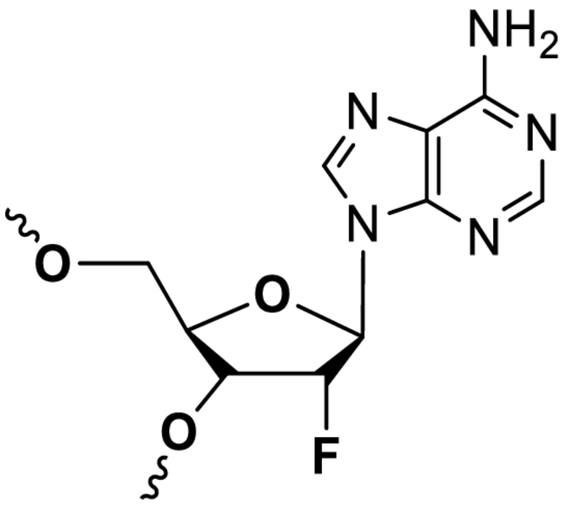
2'-O-MOE-A、



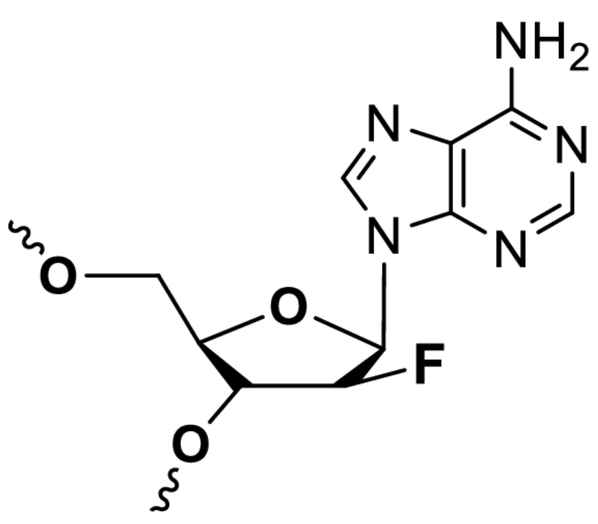
LNA-A、



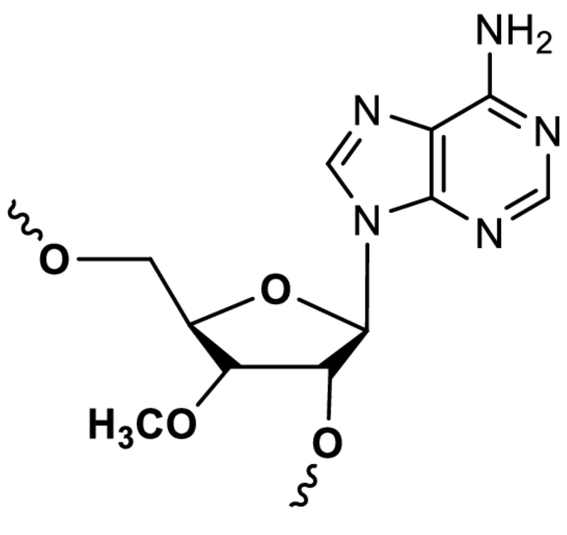
2'-O- 丙炔基 -A、



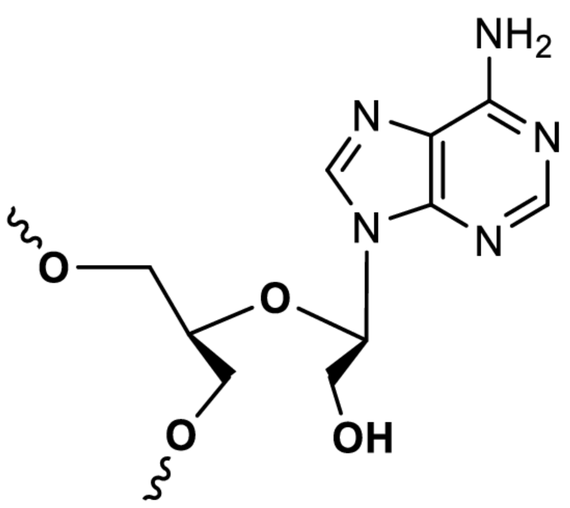
2'-F A、



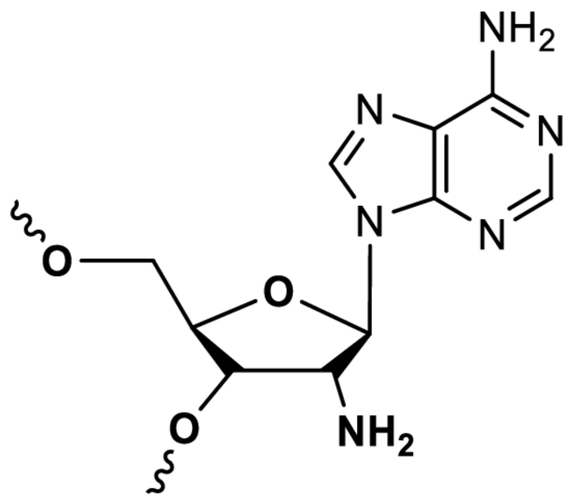
2'-araF A、



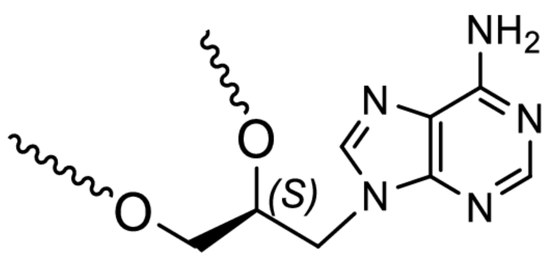
3'-OMe-A、



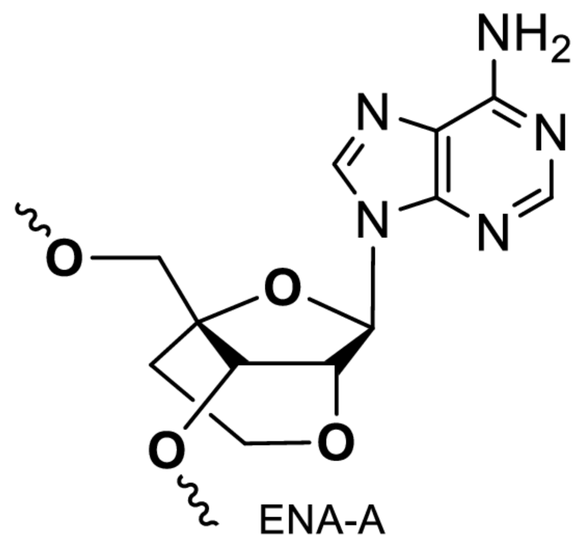
UNA-A、



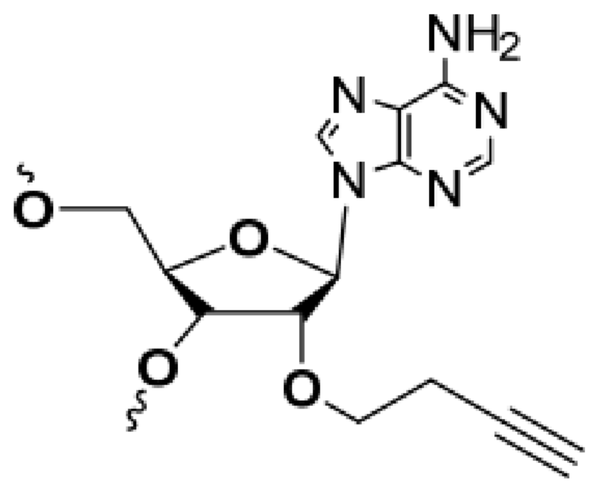
2'-NH_2-A、



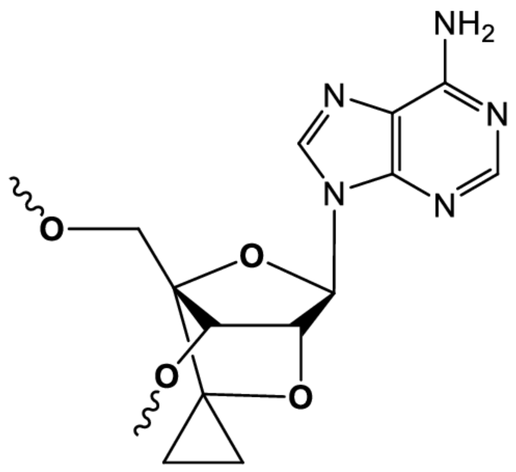
GNA-A、



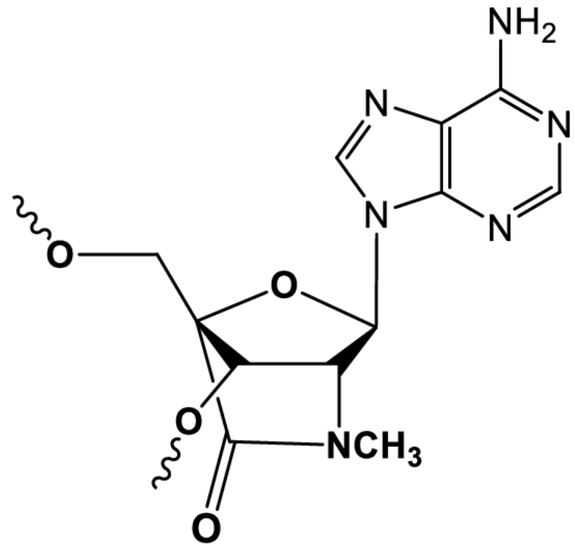
ENA-A、



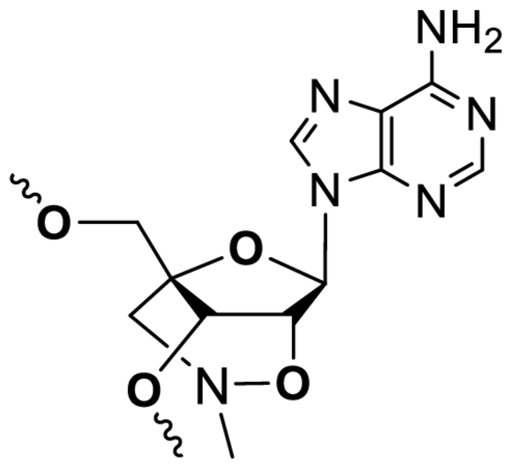
2'-O- 丁炔基 -A、



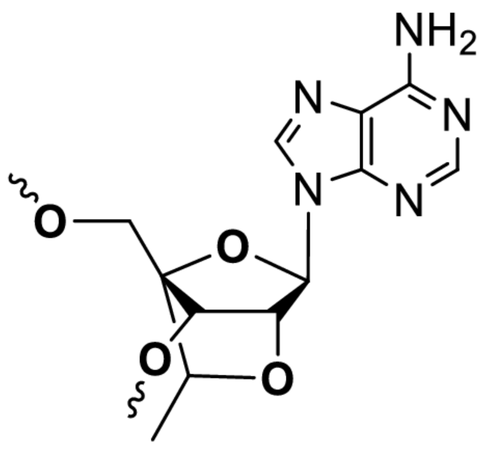
scp-BNA-A、



AmNA-(NMe)-A、

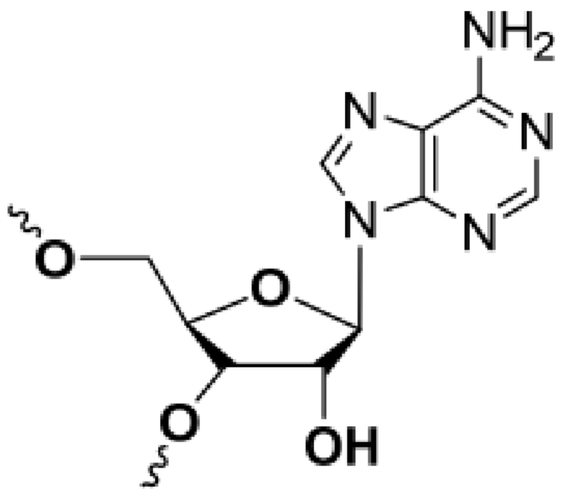


nmLNA-A、



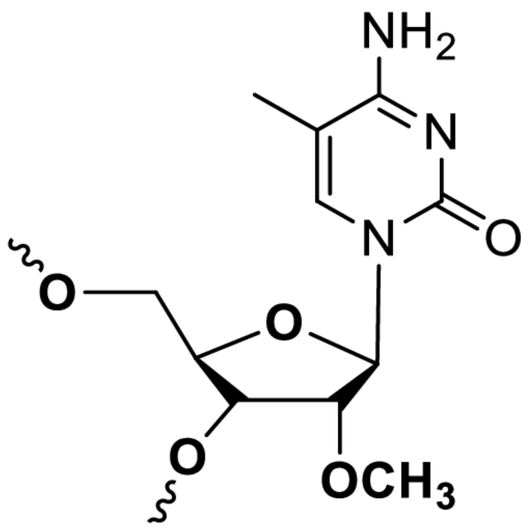
4etl-A

及

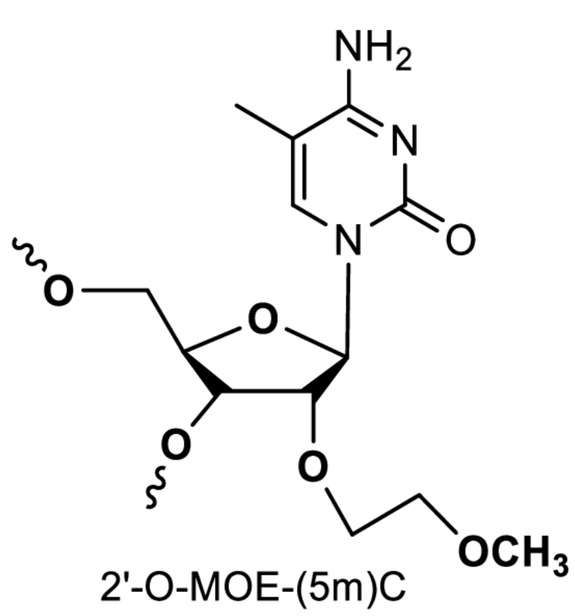


核糖-A；

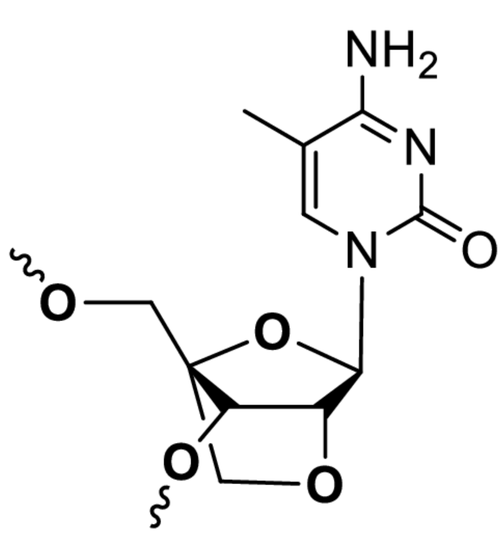
該等C單元包含一或多個選自以下：



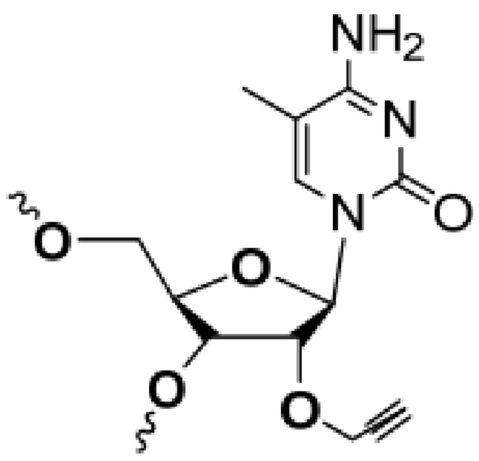
2'-OMe-(5m)C、



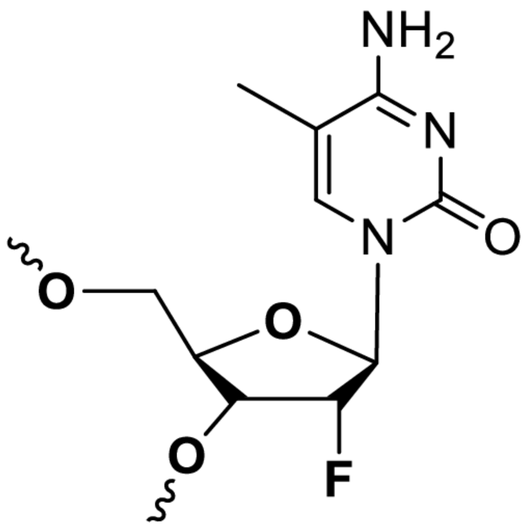
2'-O-MOE-(5m)C、



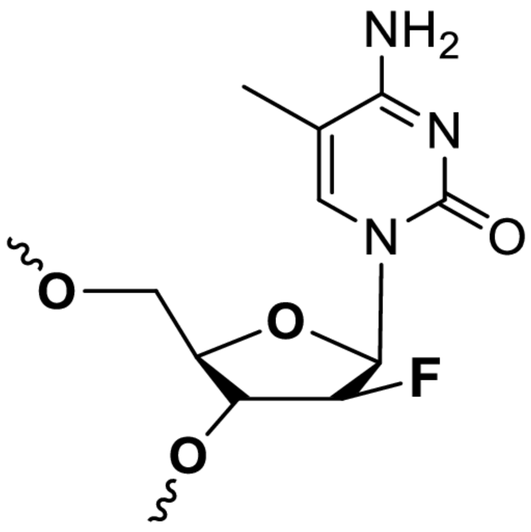
LNA-5mC、



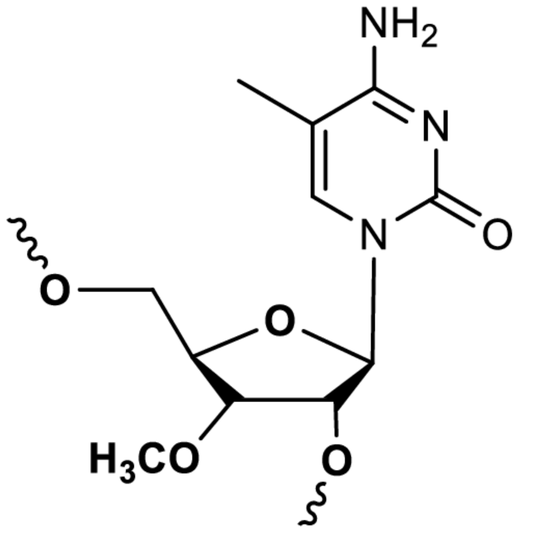
2'-O- 丙炔基 - (5m)C 、



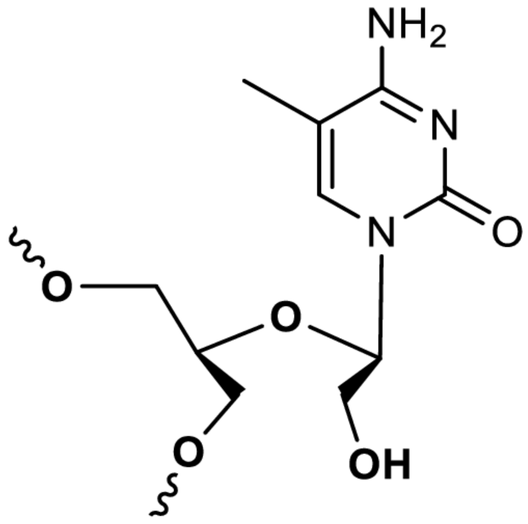
2'-F(5m)C 、



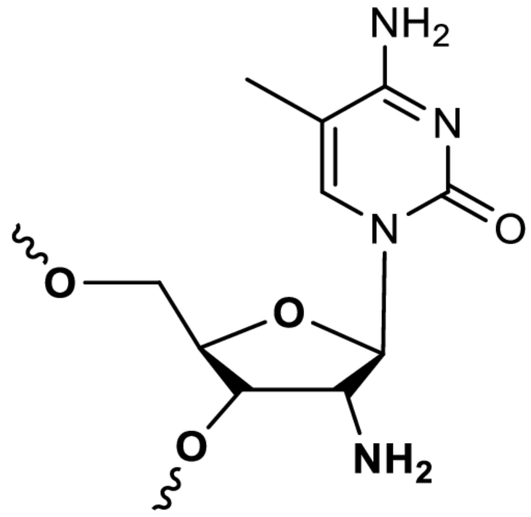
2'-araF(5m)C 、



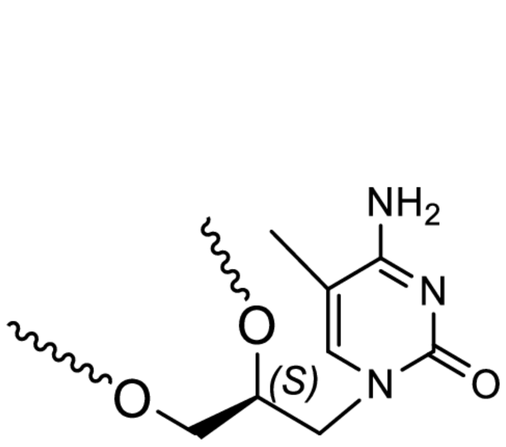
3'-OMe (5m)C 、



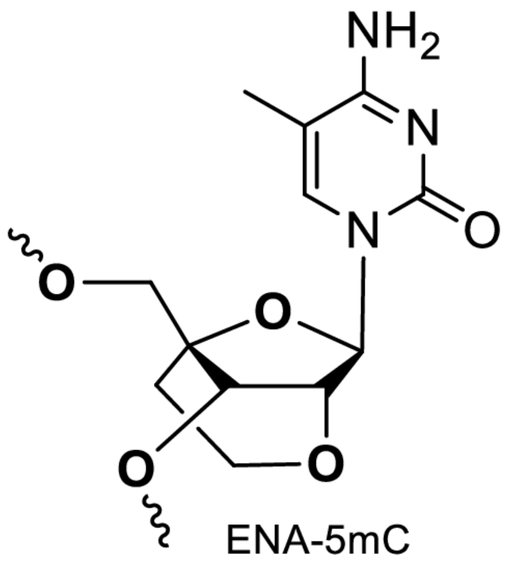
UNA-(5m)C 、



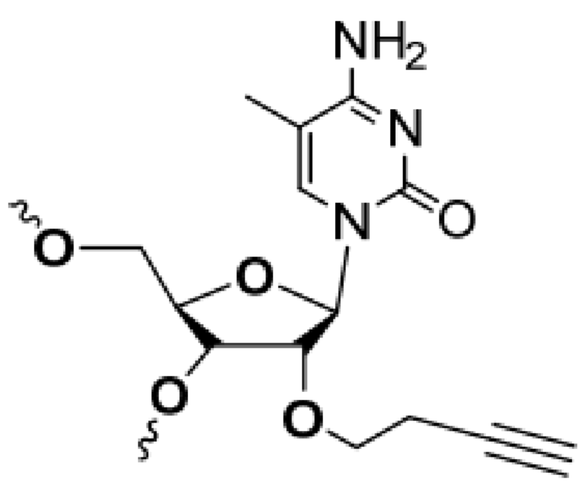
2'-NH_2 (5m)C 、



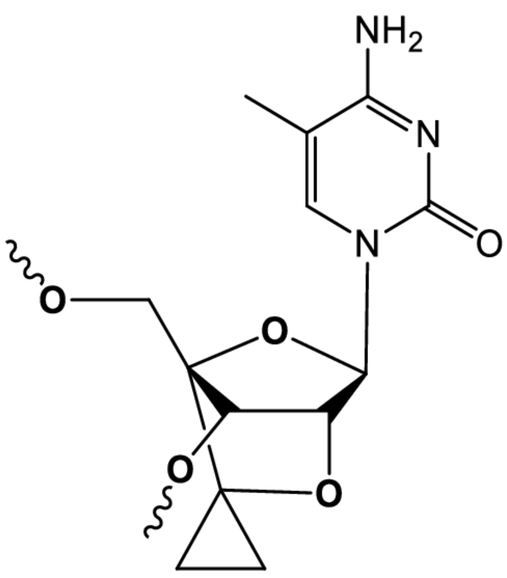
GNA-(5m)C 、



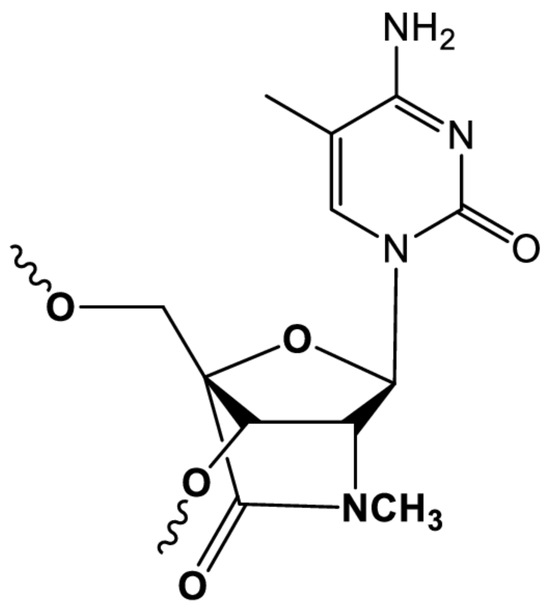
ENA-5mC 、



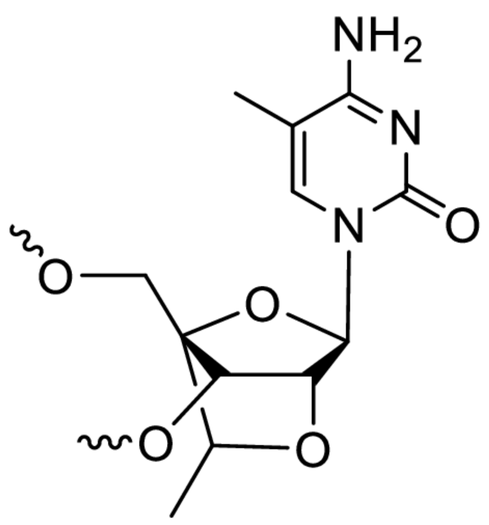
2'-O- 丁炔基 - (5m)C 、



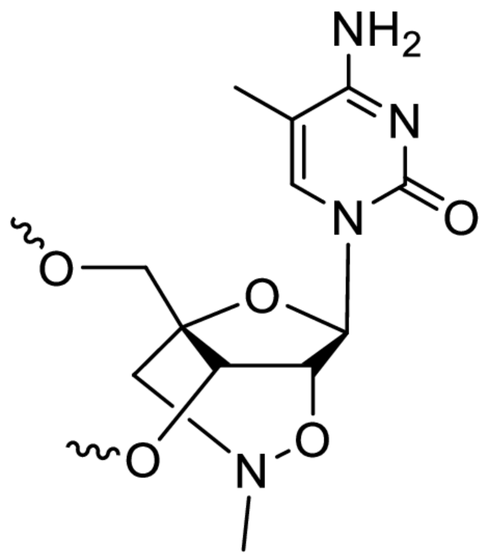
scp-BNA-(5m)C 、



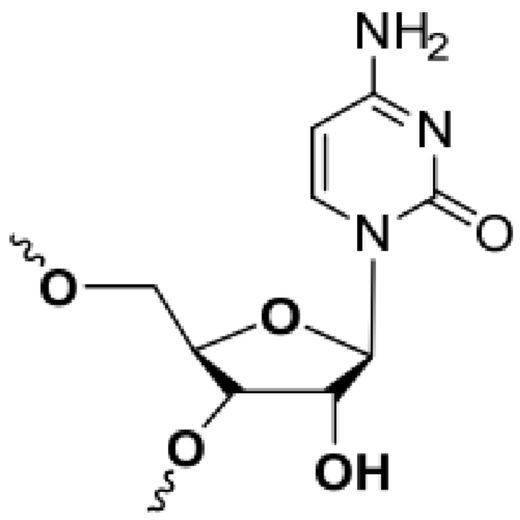
AmNA-(NMe)-(5m)C 、



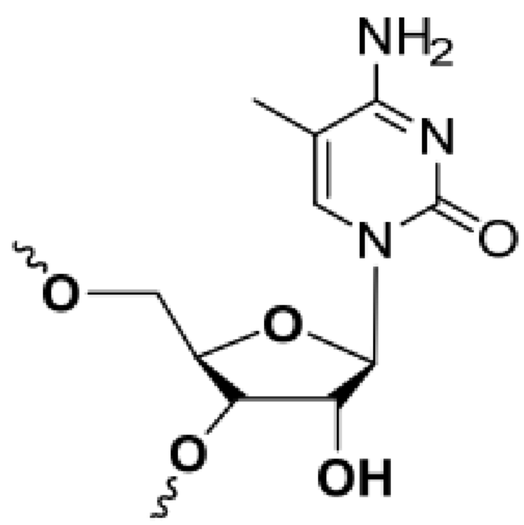
4etl-(5m)C 、



nmLNA-(5m)C、



核糖-C及



核糖-(5m)C；及

各 ~~O 獨立地係羥基、硫代磷酸O,O-二氫酯、亞磷醯胺(phosphoramidite)、二甲氧基三苯甲基醚，或立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯。

【第98項】

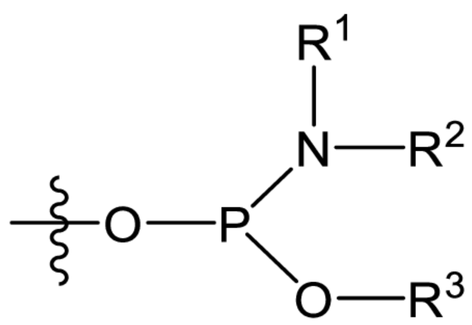
如請求項97之二核苷酸，其條件為該二核苷酸不均包含核糖-A單元及核糖-C單元。

【第99項】

如請求項97之二核苷酸，其選自包含表4及5中描述之建構組元單體中任兩者，或由表4及5中描述之建構組元單體中任兩者構成之二核苷酸。

【第100項】

如請求項97或98之二核苷酸，其中 ~~O 係下式(A)之亞磷醯胺(phosphoramidite)：



(A)

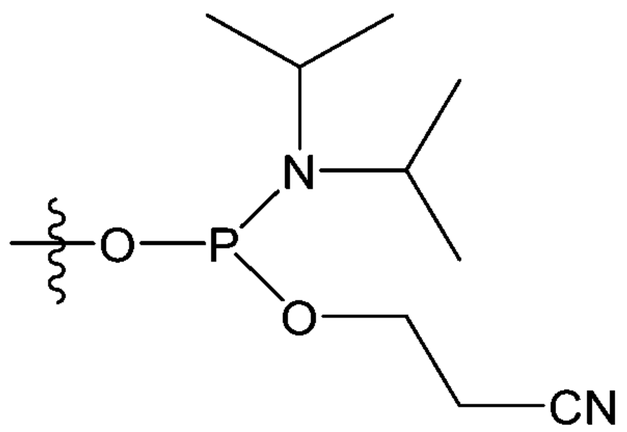
其中：

R^1及R^2各別地係C_{1-6}烷基；及

R^3係C_{1-6}烷基或氰基C_{1-6}烷基。

【第101項】

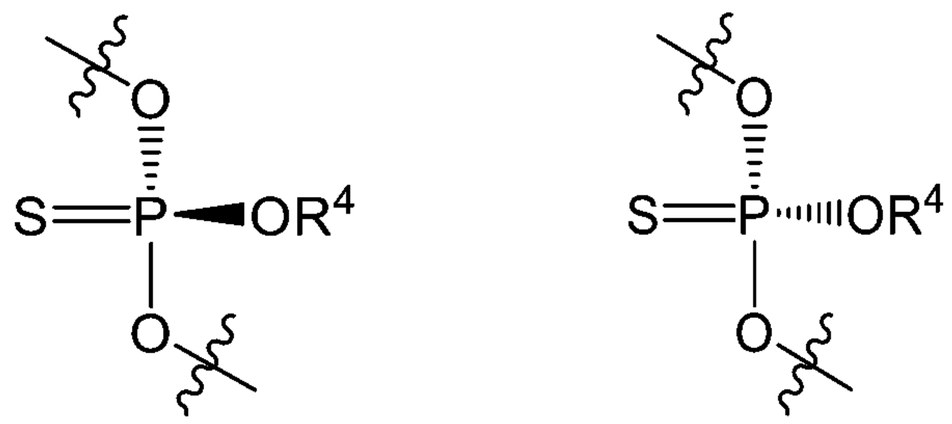
如請求項100之二核苷酸，其中式(A)之亞磷醯胺係下式(A1)之亞磷醯胺：



(A1)。

【第102項】

如請求項97至101中任一項之二核苷酸，其中該立體化學定義之硫代磷酸酯鍵聯係下式(B1)或(B2)之硫代磷酸酯：

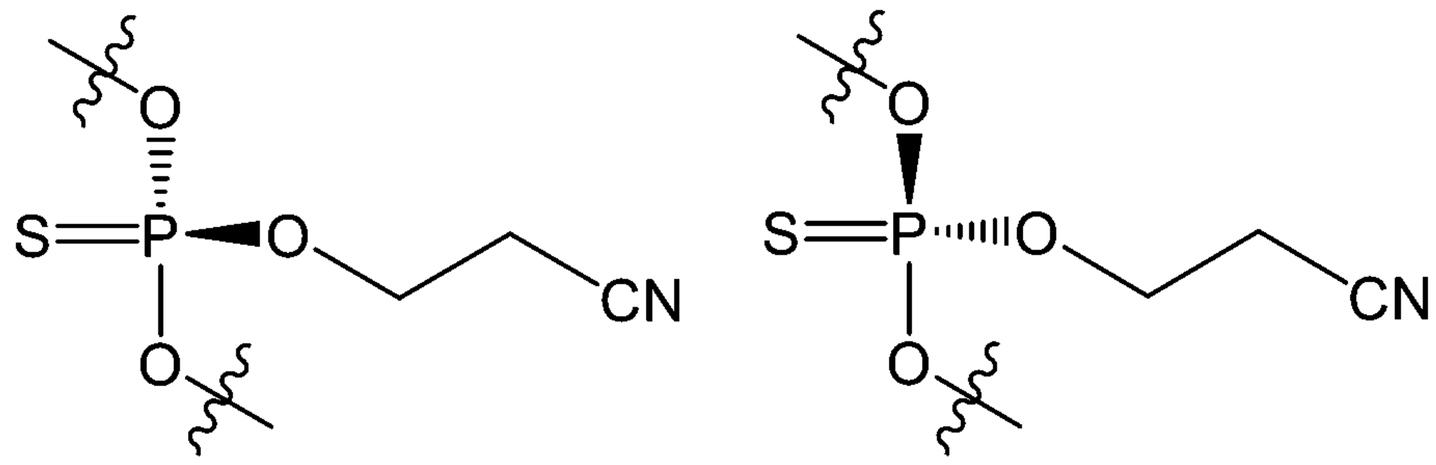


(B1)　　(B2)

其中R^4係C_{1-6}烷基或氰基C_{1-6}烷基。

【第103項】

如請求項102之二核苷酸，其中式(B1)之硫代磷酸酯係式(B3)之硫代磷酸酯，或式(B2)之硫代磷酸酯係式(B4)之硫代磷酸酯，如下：



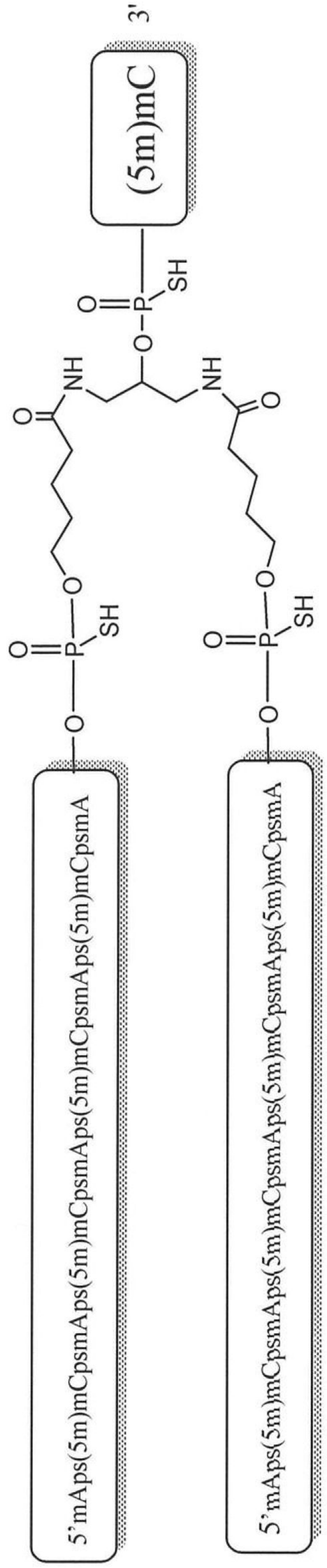
(B3)　　(B4)。

【第104項】

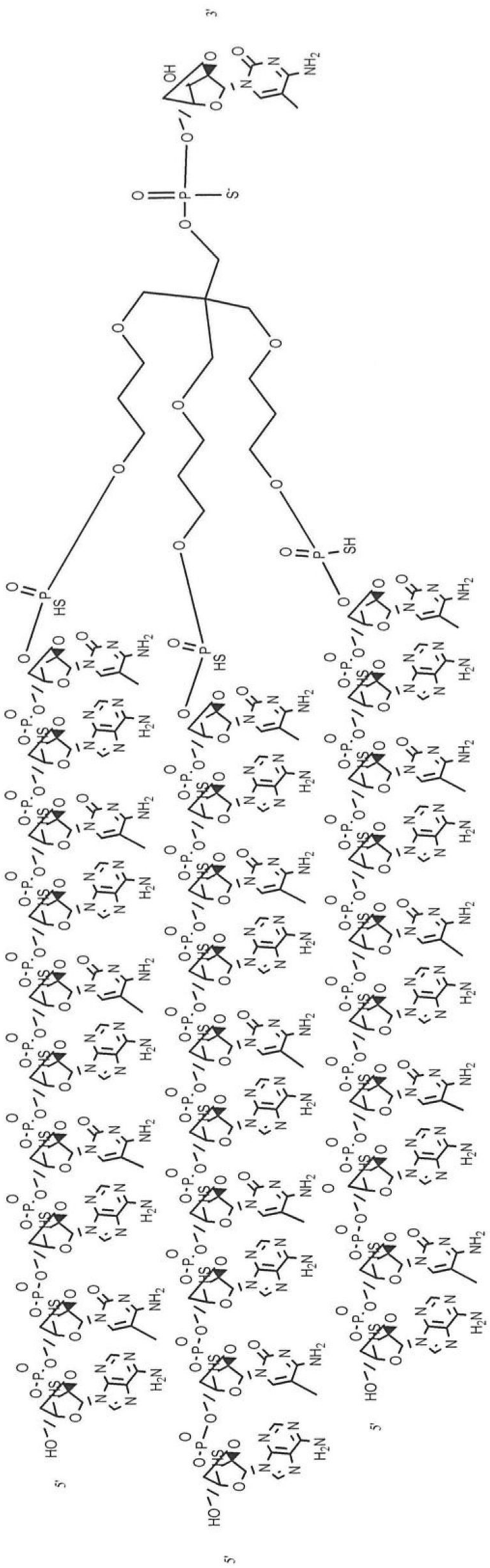
一種用於製造如請求項1至68中任一項之經修飾之寡核苷酸之方法，其包括偶合如請求項97至103中任一項之二核苷酸。

【發明圖式】

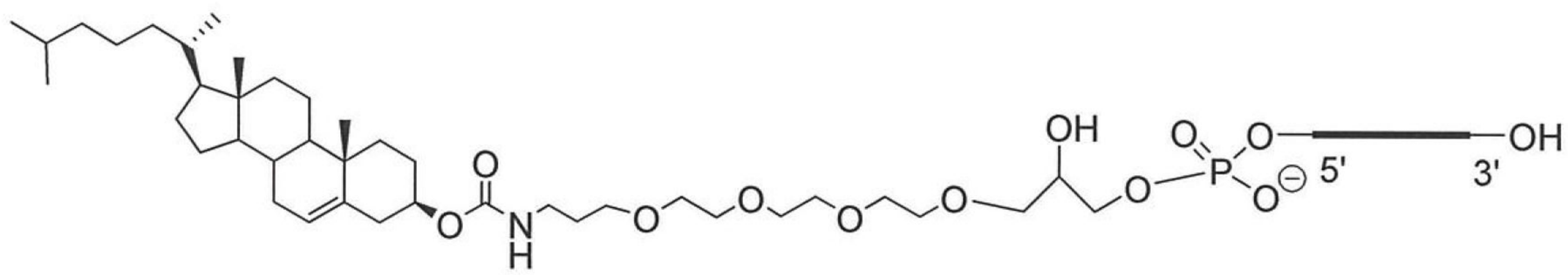
【圖1】


3'
(5m)mC
SH
O
P
NH
5'mAps(5m)mCpsmAps(5m)mCpsmAps(5m)mCpsmA
5'mAps(5m)mCpsmAps(5m)mCpsmAps(5m)mCpsmA

【圖2】

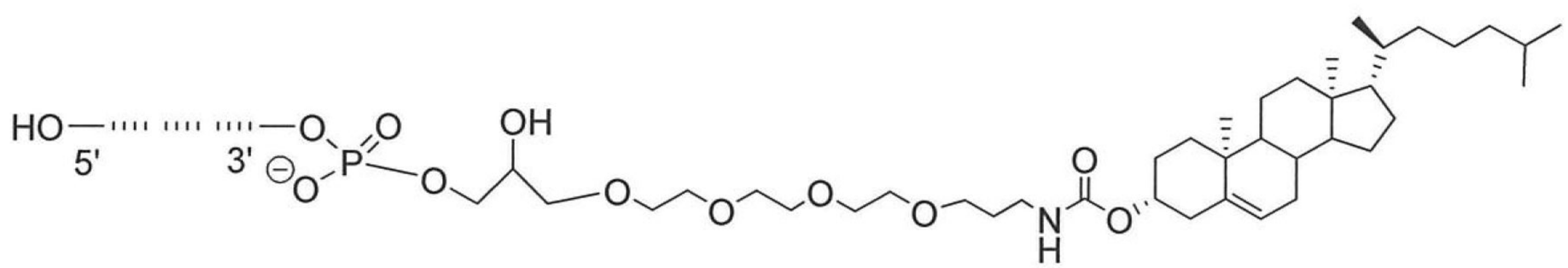


經由TEG連接子結合之5'-膽固醇



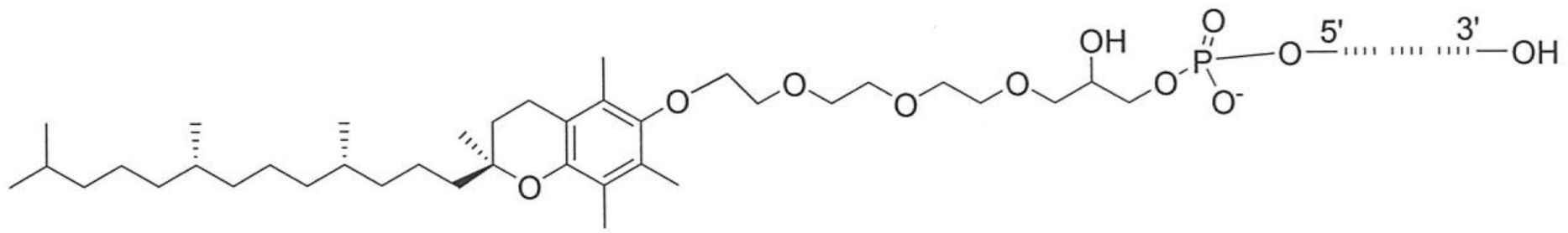
【圖3A】

經由TEG連接子結合之3'-膽固醇



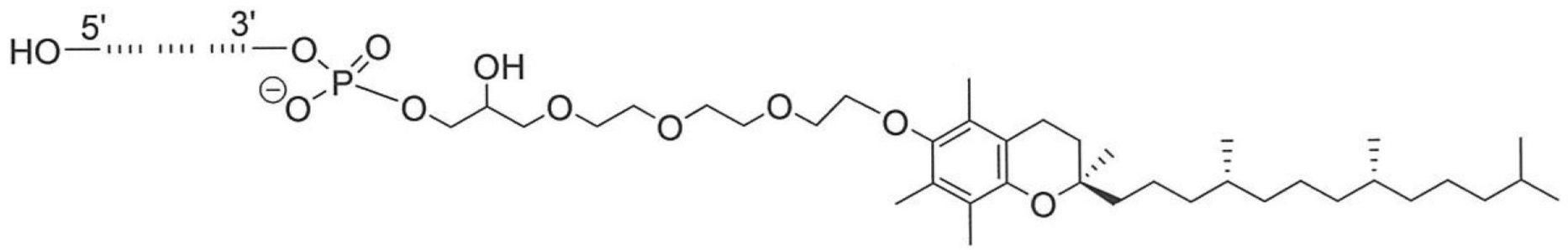
【圖3B】

經由TEG連接子結合之5'-維生素E



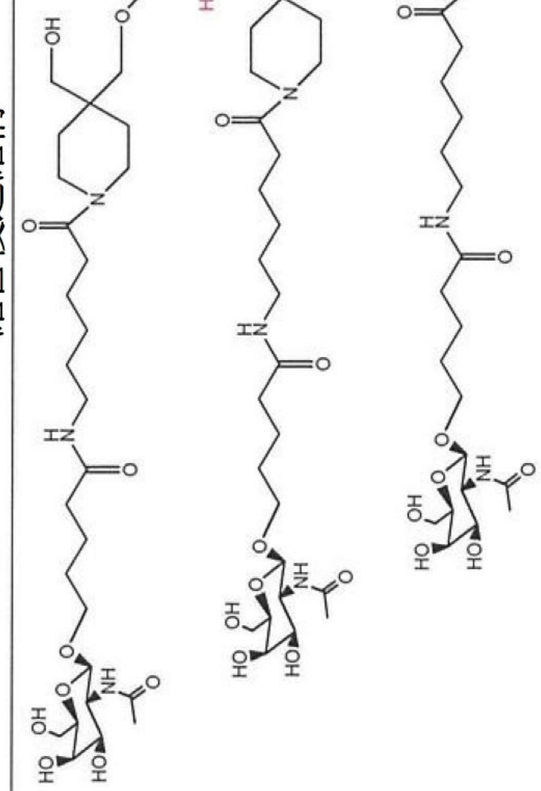
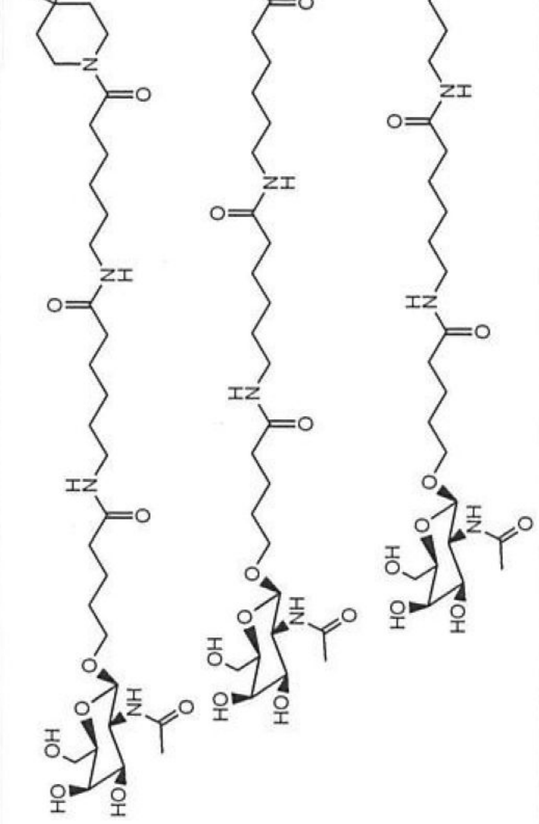
【圖3C】

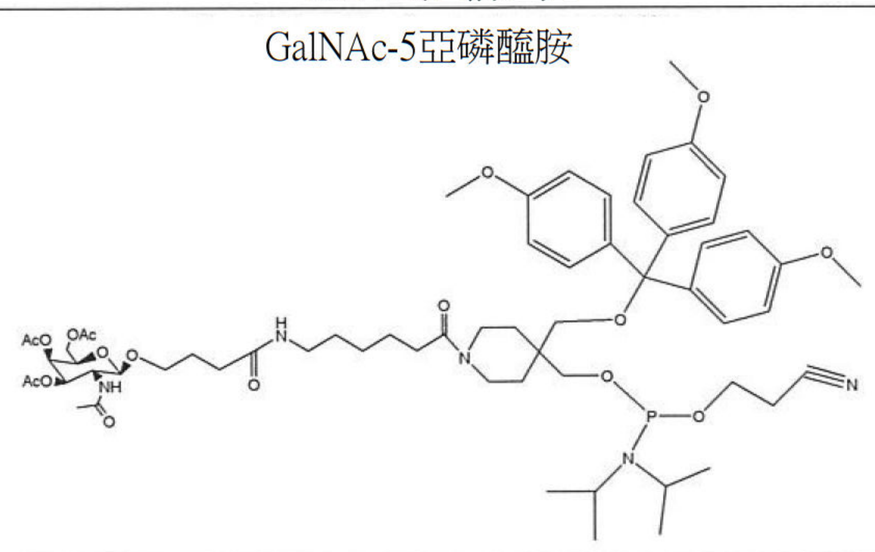
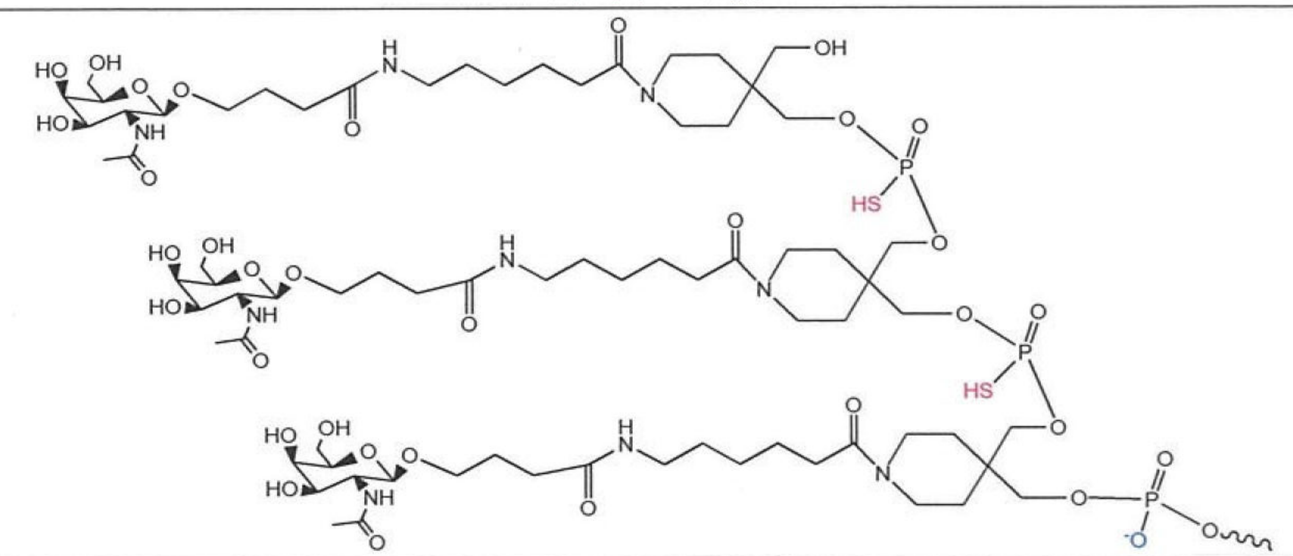
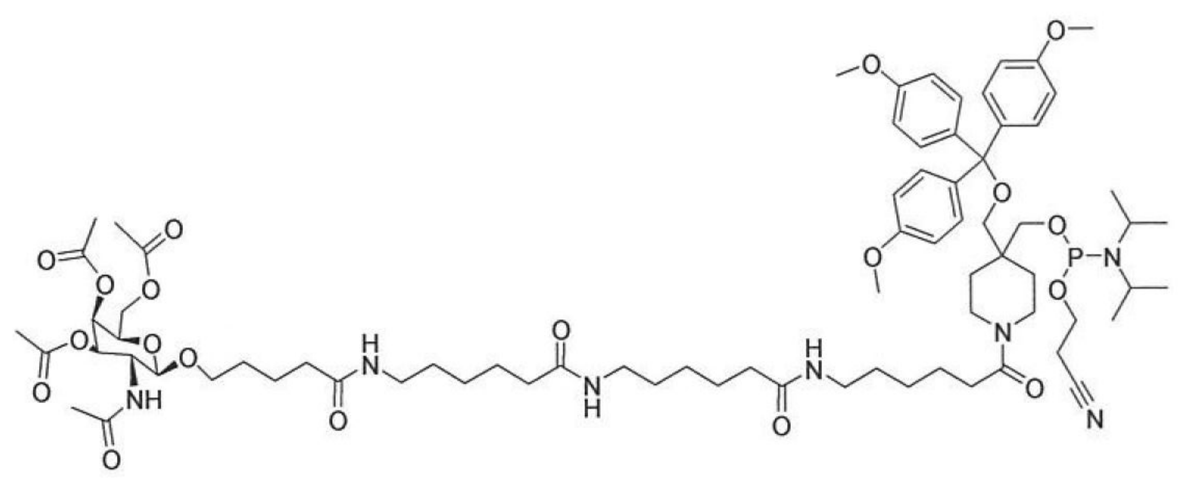
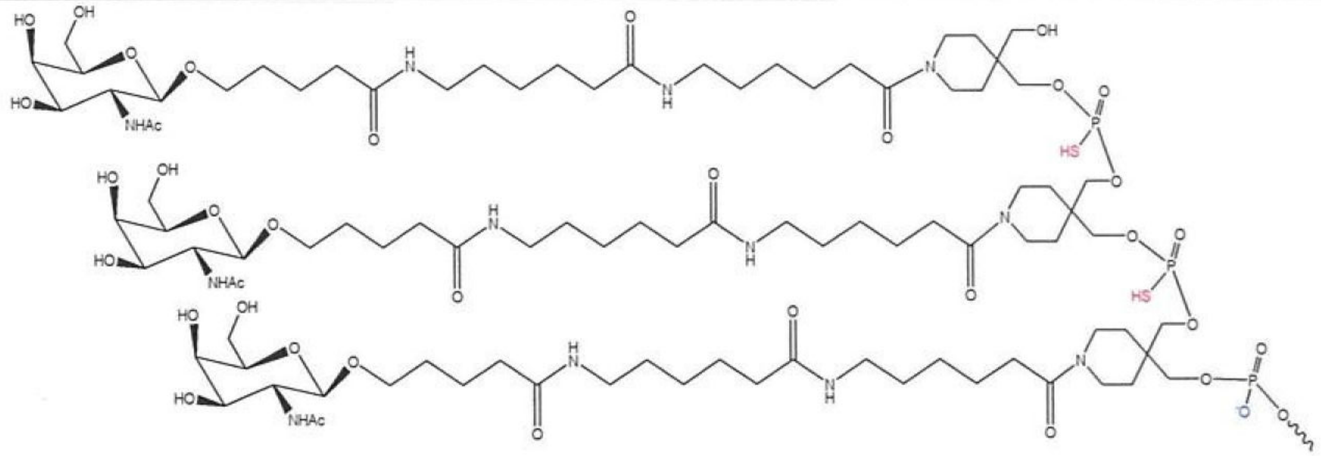
經由TEG連接子結合之3'-維生素E



【圖3D】

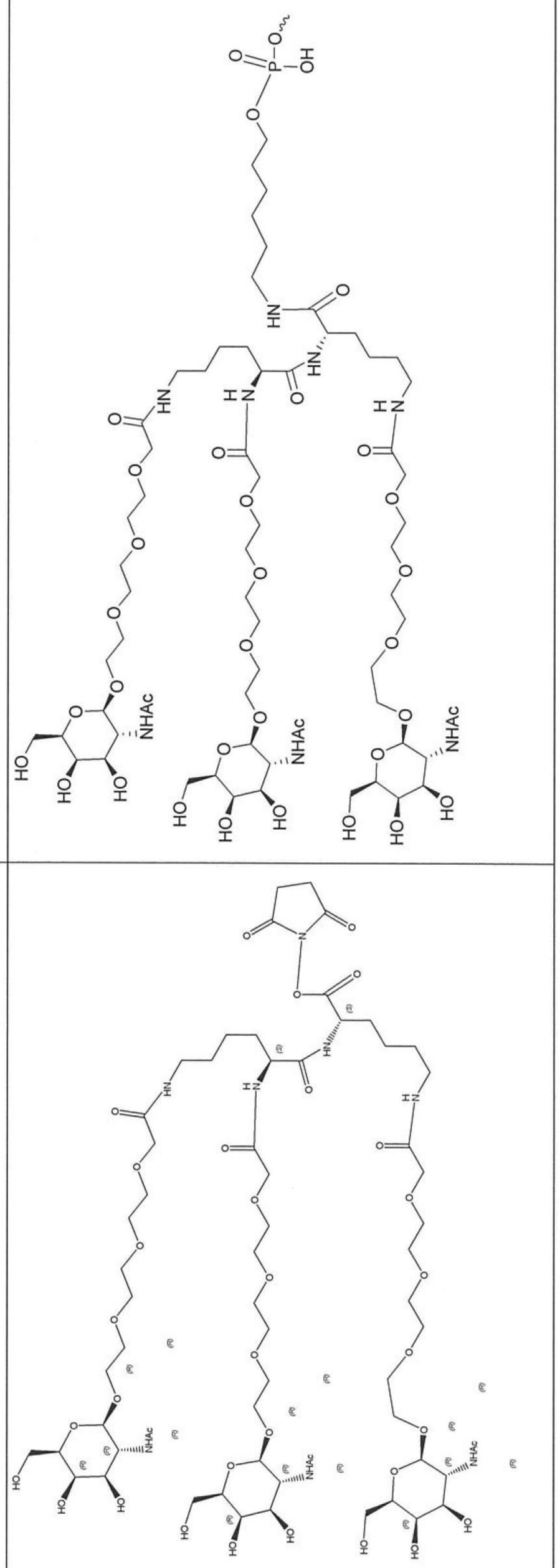
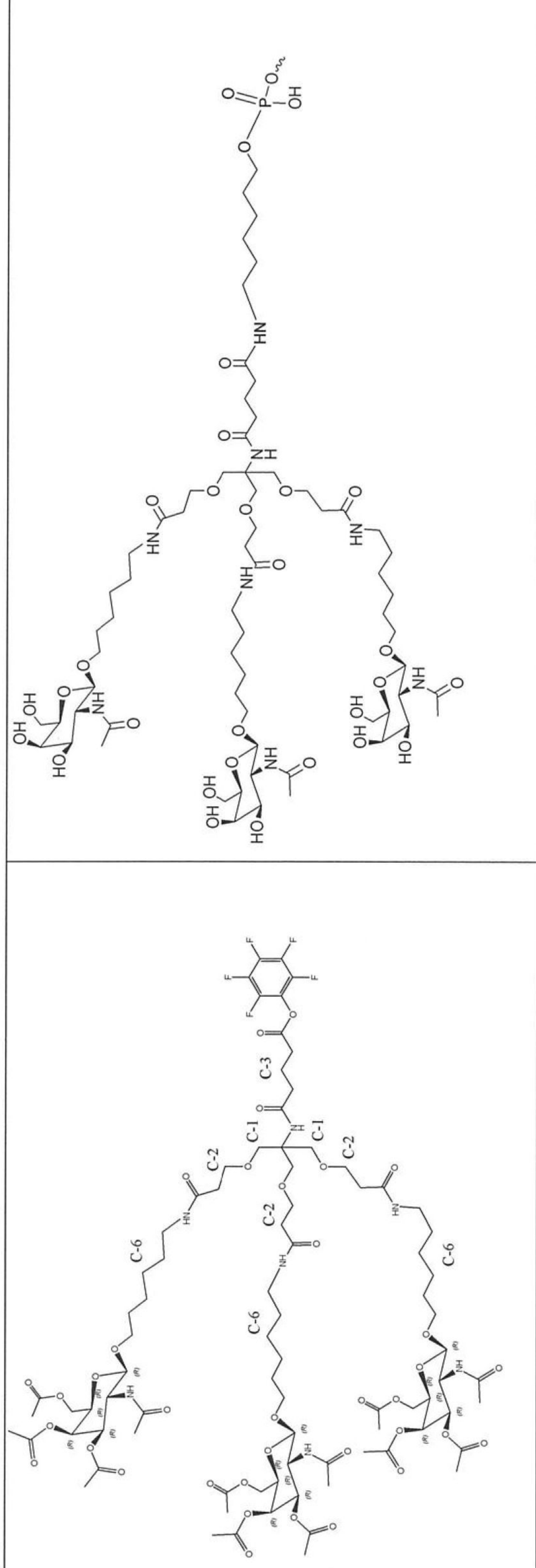
【圖4A】

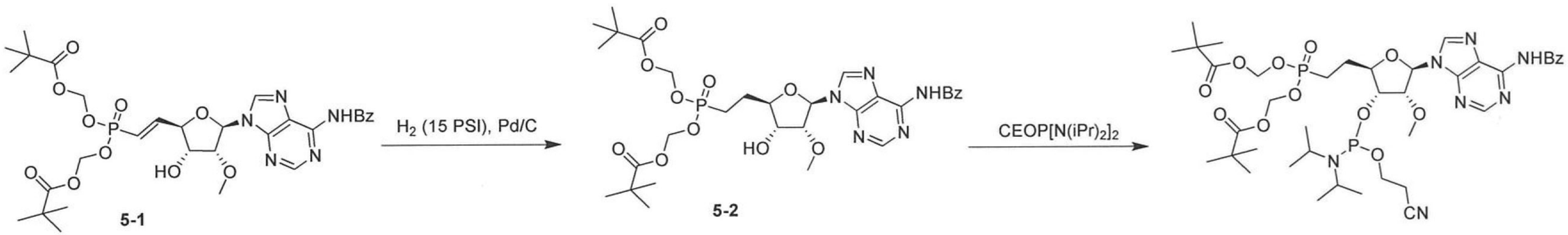
GalNAc建構組元	結合後之結構
GalNAc-3亞磷醯胺	
GalNAc-4亞磷醯胺	

GalNAc建構組元	結合後之結構
GalNAc-5亞磷醯胺 	
GalNAc-6亞磷醯胺 	

【圖4A】(續)

【圖4B】

GalNAc2酯	
GalNAc-1酯	



【圖5】

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	注釋
282	5’-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cps mApsm(5m)CsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	對照	A	PS 40mer 所有2'-OMe
283	5’lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer 所有LNA PS
284	5’mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer 交替 2'-OMe/LNA
285	5’VPmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	AAAA		PS 40mer 交替 2'-OMe/LNA 5'-VP端帽

【圖6A】

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	注釋
286	5’mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)Cps lnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)Cps lnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	AAA		PS 40mer 2’-OMe; 13 LNA (每第3個鹼基)
287	5’VPmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)Cps lnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)Cps lnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer 2’-OMe; 13 LNA (每第3個鹼基) 5'-VP端帽
288	5’mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer 2’-OMe; 10 LNA (每第4個鹼基)
289	5’-VP-mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer 2’-OMe; 10 LNA (每第4個鹼基) 5'-VP端帽

【圖6A】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	注釋
290	5’mApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3’	AA	A	PS 40mer **20 R** 異構體二聚體組元
291	5’VPmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer **19 R** 異構體二聚體組元；1 m(5m)C 5'-VP端帽
292	5’mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	AAA	A	PS 40mer 2’-OMe; 5 LNA
293	5’VPmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer 2’-OMe; 5 LNA 5'-VP端帽

【圖6A】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	注釋
294	5’VPmApsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3’	AAA	A	PS 41mer **20 R** 異構體 二聚體組元 5'-VP端帽
295	5’VPmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	AAA	B	PS 40mer 2’-OMe; 10 LNA 5'-VP端帽
314	5’EPmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	AAAA	A	PS 40mer 交替 2'-OMe/LNA 5'-EP端帽
315	5’EPmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3’	A	A	PS 40mer **19 R** 異構體 二聚體組元； 1 (5m)mC 5'-EP端帽

【圖6A】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	注釋
316, 281	5’EPmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	AAA	A	PS 40mer 5 LNA 5'-EP封端

效價：AAAA：比對照(參考化合物編號282)更有效≥ 25倍；AAA：比對照更有效≥ 10倍且比對照更有效< 25倍；AA：比對照更有效≥ 5倍且比對照更有效< 10倍；A：比對照更有效≥ 2倍且比對照更有效< 5倍

細胞毒性：A：≥ 2 μM；B：< 2 μM

【圖6A】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
6, 274, 283	5' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3'	A	B
376	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)C 3’	D	A
371	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnA 3’	D	A
372	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	D	A
273, 282	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C-3’	D	A
367	5’ mApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmA psmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmAps mCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmC-3’	C	A
368	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
369	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA 3’	D	A

【圖6B】

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
370	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
345	5’ unApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)C psunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)C 3’	B	A
346	5’ mApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmApsun(5m)CpsmAps un(5m)C 3’	A	A
351	5’ lnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr (5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)Cps lnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr (5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)Cps lnApspr(5m)CpslnApspr(5m)C-Cholesterol 3'	D	B
352	5’ lnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr (5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)Cps lnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr (5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)CpslnApspr(5m)Cps lnApspr(5m)CpslnApspr(5m)C-Palmitoyl 3’	D	B
373	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	B

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
308	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	C	A
239	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA 5'	D	A
235	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psln(5m)C 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnA 5'	D	B
236	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps 5’	D	B
237	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)Cps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3' 5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)C 5'	A	B
301	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)C 3’	A	B

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
303	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsrCps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)C 3’	B	B
305	5’ lnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C polnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C polnApsln(5m)CpolnApsln(5m)C 3’	C	A
309	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnApsln(5m)C pslnApsln(5m)CpolnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	D	B
297	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)C 3’	C	A
298	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsr(5m)CpsrApsm(5m) CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCpsrAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCporApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	D	A
300	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCpsrAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsrCpsrApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsrApsrCpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
312	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
313	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpomApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpomApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpomApsm(5m)C psmApsm(5m)CpomApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpomAps m(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
299	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsrCps mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsrApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)C 3’	D	A
304	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsrCpslnApsln(5m)CpslnApsrCpsrAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsrCpslnApsln(5m)CpslnApsrCpsrApsln(5m)CpslnApsl n(5m)CpsrApsrCpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	D	A
302	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsrCpslnApsln(5m)CpslnApsr(5m)CpsrApsln(5m) CpslnApsln(5m)CpsrApsrCpslnApsln(5m)CpslnApsrCpsrAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrApsrCpslnApsln(5m)CpslnApsrCpsrApsln(5m)CpslnApsl n(5m)CpsrApsrCpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	D	A
307	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnApsln(5m)C pslnApsln(5m)CpolnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpolnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpolnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)C poln Apsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	D	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
375	5’ mApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	B	A
201	5’ mApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A
202	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A
203	5’ mApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	B	A
204	5’ mApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsS m(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsS m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
205	5’ mApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsSm(5m)C 3’	D	A
353	5’ 3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps3mAps3m(5m)Cps

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
179	5’ mApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	A
180	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A
182	5’ mApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	A
183	5’ mApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
184, 290	5’ mApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmA psRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3’	A	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
177	5’ mApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsSm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)C 3’	B	A
374	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA 3’	D	A
363	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)C 3’	D	A
364	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA-3’	D	A
365	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
366	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmA 3’	D	A
13	5’ mApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)Cps mApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)Cps mApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)Cps mApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)Cps mApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)CpsmApsmoe(5m)Cp 3’	D	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
238	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-psm(5m)C 3'-5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 5'	D	A
240	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cps-DBLR-ps-c4-CONH-c2-ps(5m)mC 3'-5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 5'	B	A
241	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps-TREB-ps-c3-O-C3-ps(5m)mC 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)Cps 5'	B	A
242	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps-TREB-ps-c3-O-C3-psm(5m)C 3' lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps 5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps 5'	A	A
243	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnA-TREB-ps-c3-O-C3-psm(5m)C 3'-5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnA 5'	A	A

【圖6B】(續)

202031267

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
130	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	A
380	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsunApsun(5m)C 3’	D	A
310	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
311	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpomApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpomApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpomApom(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApom(5m)CpomApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
254	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cpo-CHOL 3’	D	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
324	5’ P-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
323	5’ P-lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C-3’	D	A
306	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApoln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	D	A
325	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
326	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
327	5’ moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)C 3’	D	A
328	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps moeApsmoe(5m)C 3’	D	A
158	5’ lnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnAps un(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnAps un(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnAps un(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnApsun(5m)CpslnAps un(5m)CpslnApsun(5m)C 3’	B	A
150	5’ unApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)CpsunApsln(5m)C 3’	A	A
159	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsl n(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsunApsun(5m)CpsunApsun(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsunAps un(5m)CpsunApsun(5m)C 3’	C	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
341	5’ lnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)CpslnApsgn(5m)C 3’	D	A
342	5’ gnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)CgnApsm(5m)C 3’	B	A
244	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cps-TREB-ps-c3-O-C3-psm(5m)C 3' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)Cps 5'	C	A
245	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps-TREB-ps-c3-O-C3-ps(5m)mC 3' mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps 5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps 5'	C	A
343	5’ mApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)CpsmApsgn(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
329	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A
330	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	B	B
331	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)Cps moeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5 m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)C 3’	D	A
332	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeApsmoe(5m)CpsmoeAps moe(5m)C 3’	D	A
333	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpslnApsl n(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps (5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
334	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsrAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	A
335	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps (5m)CpolnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	C	A
336	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps(5m)CpsApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	C	A
337	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsAps(5m)CpsA ps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)C 3’	A	B
338	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)CpsAps(5m)C 3’	B	B
117	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
118	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnA 3’	B	A
134, 277, 284	5’ mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
142	5’ lnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)Cps lnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)Cps lnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpslnA m(5m)C 3’	C	A
190	5’ mApsRm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSln(5m)CpsmApsRm(5m)CpslnApsln(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	B	A
191	5’ mApsRm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsRm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsR m(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSln(5m)CpsmApsRm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRm(5m)CpslnApsl n(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
192	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsRln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsR ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRln(5m)CpslnApsln(5m)C pslnApsln(5m)CpsmApsRln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsRln(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	B	A
210	5’ mApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	A
211	5’ mApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)C pslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	A
212	5’ lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsSm(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	A
218	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
223	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3'	C	A
221	5’ mApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)CpsmApsRln(5m)C 3’	A	A
127	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	D	A
128	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A
129	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A
120	5’ VP-mApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
121	5’ VP-mApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)C 3’	B	A
122	5’ VP-mApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnAps ln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)CpslnApsln(5m)Cps lnApsln(5m)C 3’	A	A
181	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsRm(5m)C psmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	C	A
147	5’ unApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)Cps 3’	D	A
148	5’ unApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)C 3’	D	A
149	5’ unApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunAps ln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsl n(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

202031267

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
151	5’ VP-mApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)Cps 3’	D	A
152	5’ VP-mApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)C 3’	D	A
153	5’ VP-mApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)CpsunApsln(5m)C 3’	B	A
168	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’		
169	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’		
170	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)C 3’		

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
294	5’ VP-mApsmApsRm(5m)C 3’	B	A
276, 291	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3'	A	A
275, 295	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	B
173, 293	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	A
165, 287	5’ VP-mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
167, 289	5’ VP-mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	B	A
164, 286	5’ mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	C	A
166, 288	5’ mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
171, 280, 292	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
172	5’ mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’		
314	5’ EP-mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	B
281, 316	5’ EP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	A
296	5’ mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
285	5’ VP-mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	B

【圖6B】(續)

202031267

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
251	5’ cpApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	A
356	5' 4’-Me-mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
320	5’ mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
357	5’ mApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	A	B
322	5’ mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	B	A
317	5’ EP-mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	B

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
318	5’ EP-mApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)C 3’	B	B
319	5’ EP-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	B
315	5’ EP-mApsm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m) CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsR m(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)CpsmApsRm(5m)C 3’	C	A
357	5' mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)Cps3calApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps3calAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps3calApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsl n(5m)Cps3calApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps3calA psln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
347	5’GalNAc5mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’		

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’ 至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
348	5’ GalNAc5mApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsln(5m)C 3’		
350	5’ GalNAc5mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)Cps mApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’		
349	5’ GalNAc5mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnAps m(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpslnApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C 3’		
339	5’ mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpscpApsln(5m)C 3’	A	A
252	5’ mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApscp(5m)C 3’	A	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
340	5’ mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsamApsln(5m)C 3’	A	A
250	5’ mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmAps ln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsm(5m)C 3’	A	A
359	5’ mApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsm ApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmAp smGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmG 3'	D	A
360	5' mGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsm GpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGp smApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmApsmGpsmA 3'	D	A
361	5' mCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmC psmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmApsmCps mApsmCpsmApsmCpsmApsmCpsmAps mCpsmApsmCpsmA 3'	D	A
362	5' mApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsm ApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmAp smUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmUpsmApsmU 3'	D	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
377	5’mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
378	5’mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
379	5’mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
381	5’4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)Cps4etlAps4etl(5m)C 3’	A	A
382	5’mAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmAps4etl(5m)C 3’	A	A
383	5’mApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)CpsmApsm(5m)CpsmAps4etl(5m)C 3’	B	A

【圖6B】(續)

202031267

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
384	5’mApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsrApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
385	5’nmlnApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
386	5’nmlnApsln(5m)CpsnmlnApsln(5m)CpsnmlnApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
387	5’nmlnApsnmln(5m)CpsnmlnApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A
388	5’mApsnmln(5m)CpsmApsnmln(5m)CpsmApsnmln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)	A	A
389	5’nmlnApsnmln(5m)CpsnmlnApsnmln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)CpsmApsln(5m)C 3’	A	A

【圖6B】(續)

編號	化合物結構(5’至3’)	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
390	5’mApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)CpsmApsam(5m)C-3’	A	B
391	5’-mApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApscp(5m)C-3’	A	B
392	5’-mApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpscpApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpscpApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpscpApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpscpApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpscpApsm(5m)CpsmApsm(5m)CpsmApsm(5m)C-3’	B	B

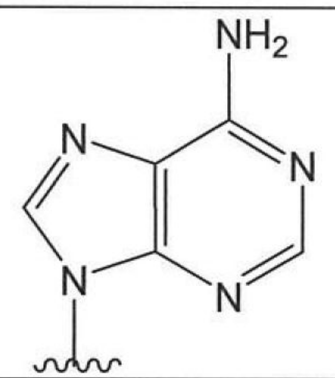
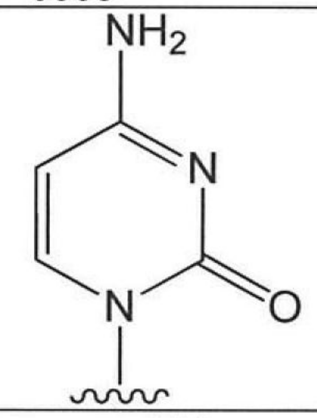
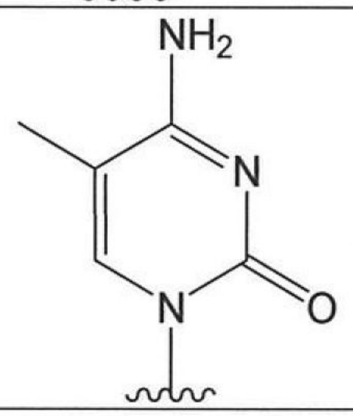
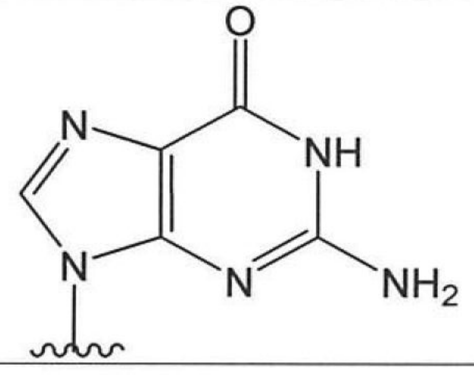
效價：A：EC_{50} < 30 nM；B：EC_{50} ≥ 30 nM且EC_{50} < 100 nM；C：EC_{50} ≥ 100 nM且EC_{50} < 300 nM；D：EC_{50} ≥ 300 nM

細胞毒性：A：CC_{50} > 1000 nM；B：CC_{50} ≤ 1000 nM

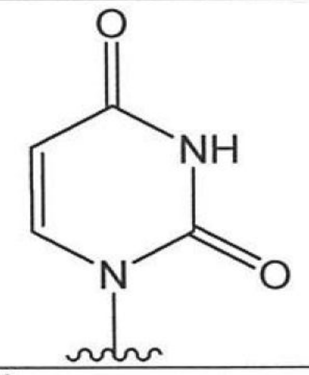
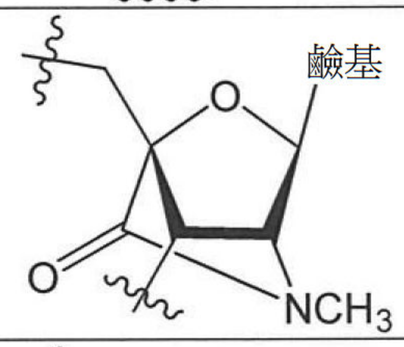
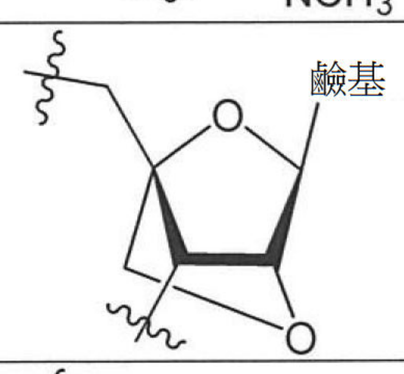
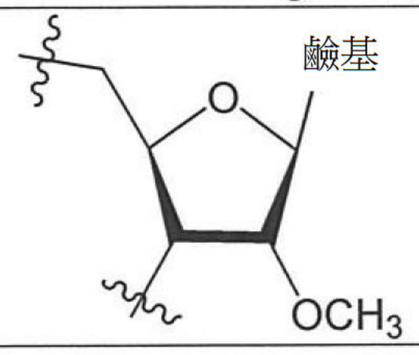
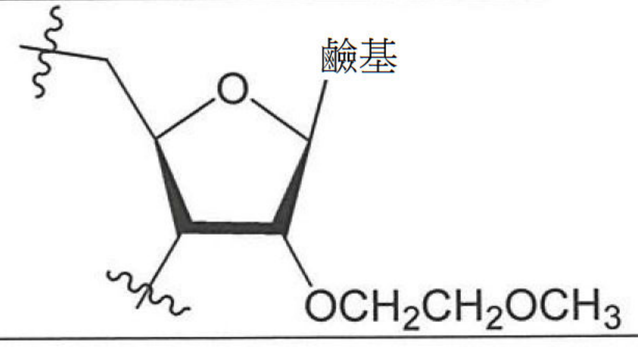
【圖6B】(續)

在圖6B中，使用下列縮寫，且各縮寫係描述於表A中。

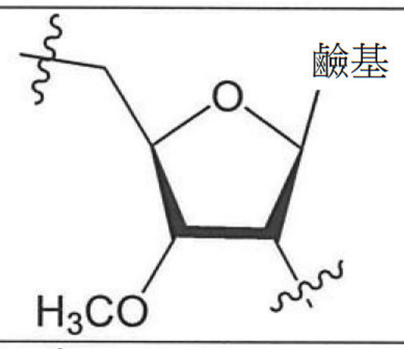
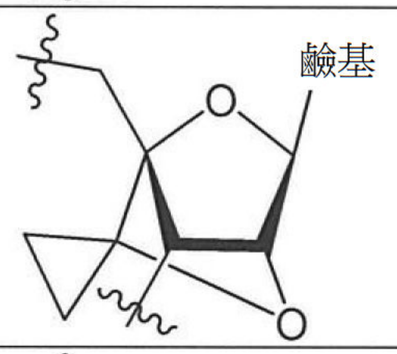
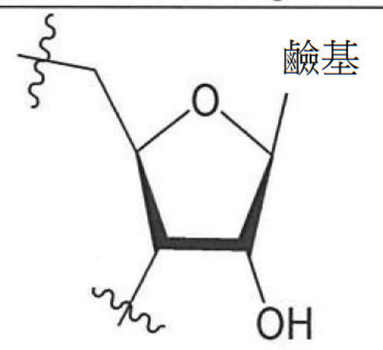
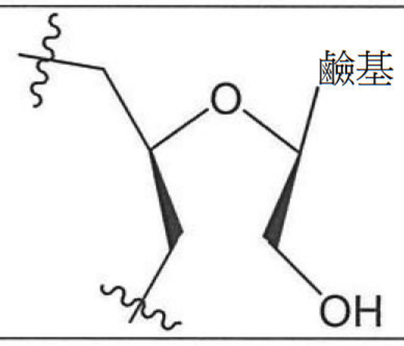
表A

縮寫	名稱	結構
A	腺嘌呤	
C	胞嘧啶	
(5m)C	5-甲基-胞嘧啶	
G	鳥嘌呤	

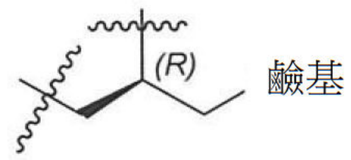
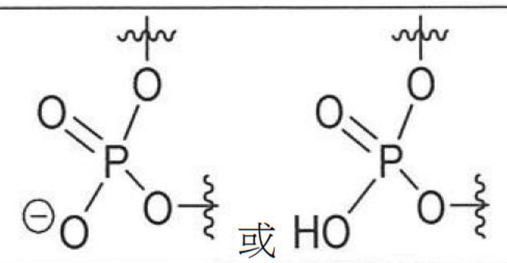
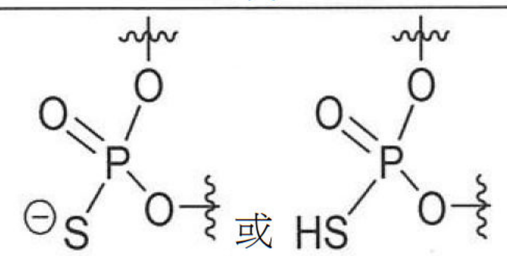
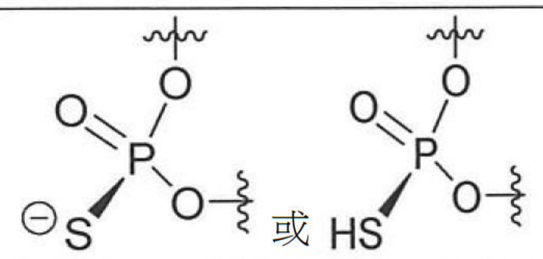
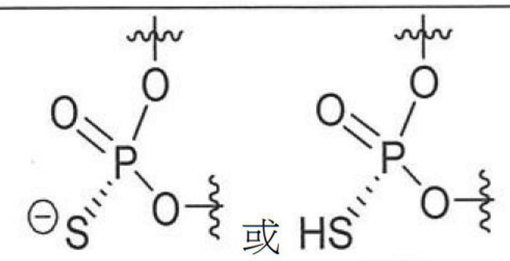
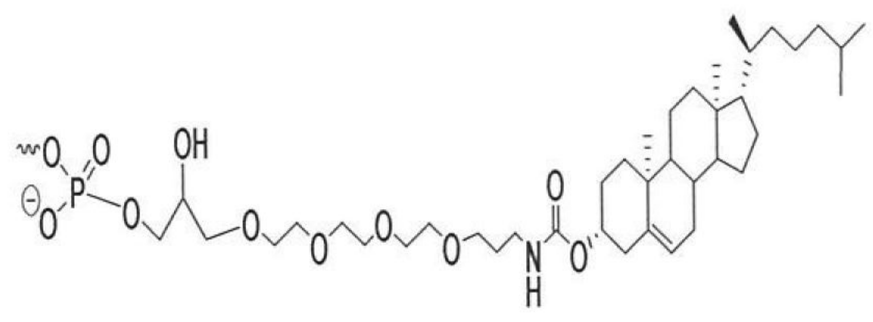
【圖6B】(續)

縮寫	名稱	結構
U	尿嘧啶	
am	AmNA	
In	LNA	
m	2’-OMe	
moe	2’-MOE	

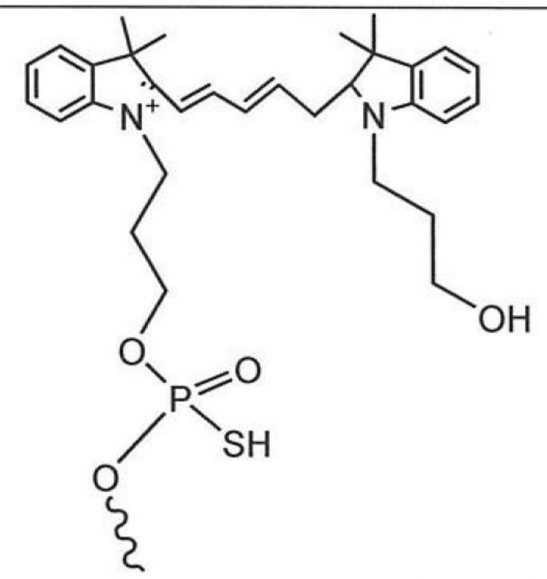
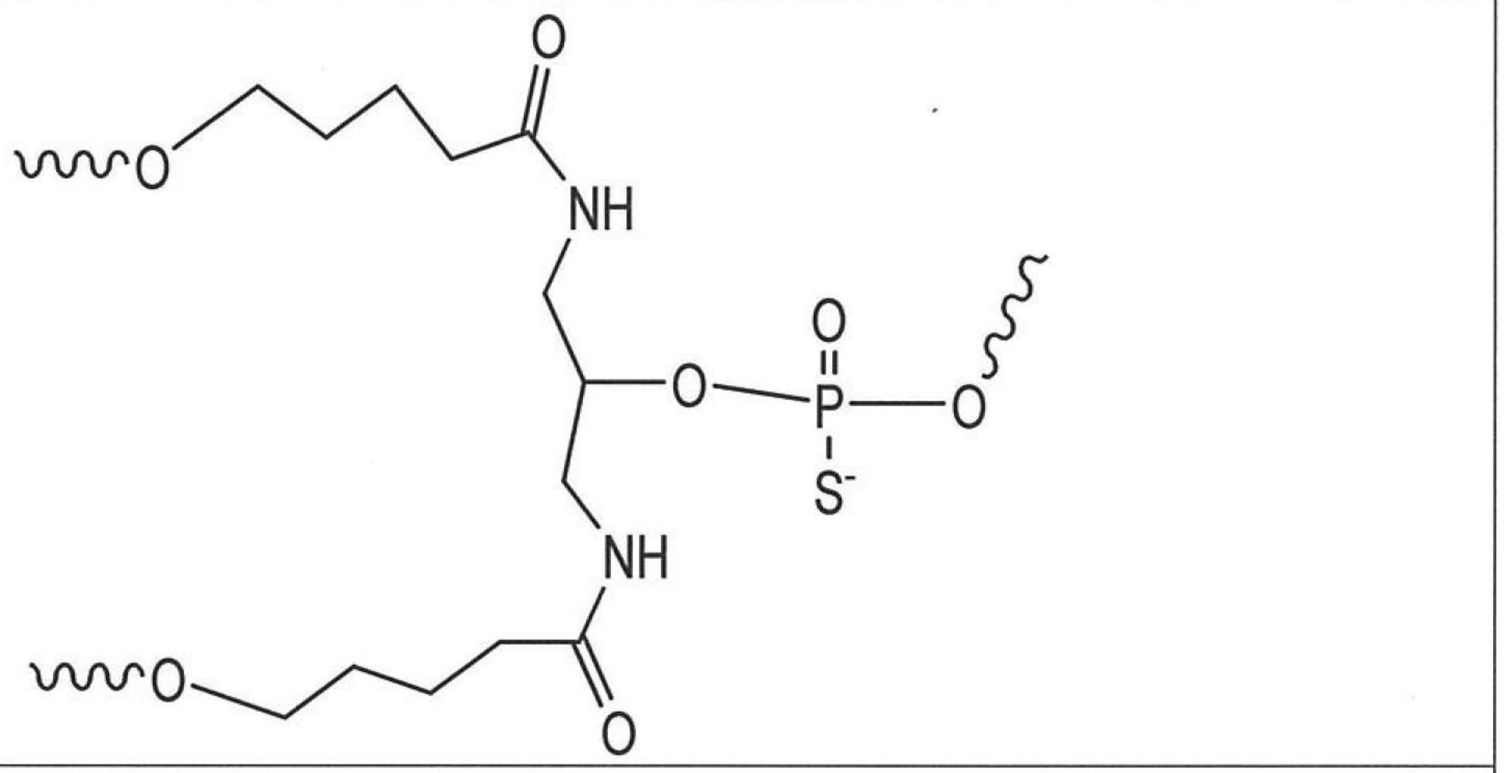
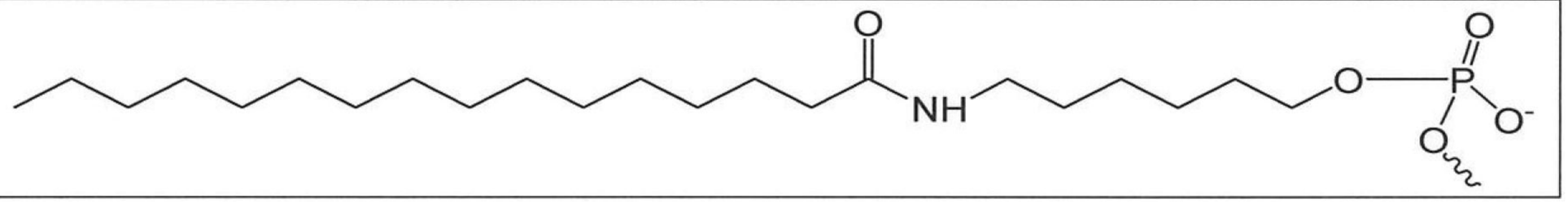
【圖6B】(續)

縮寫	名稱	結構
3m	3’-OMe	
cp	scp-BNA	
r	RNA	
un	無環	

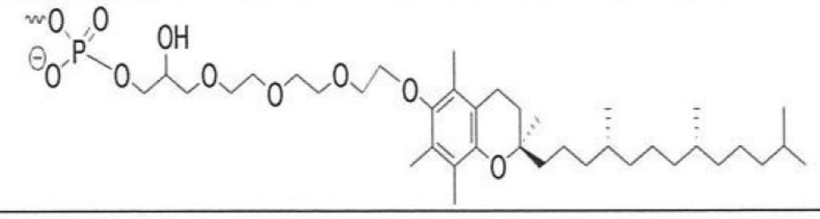
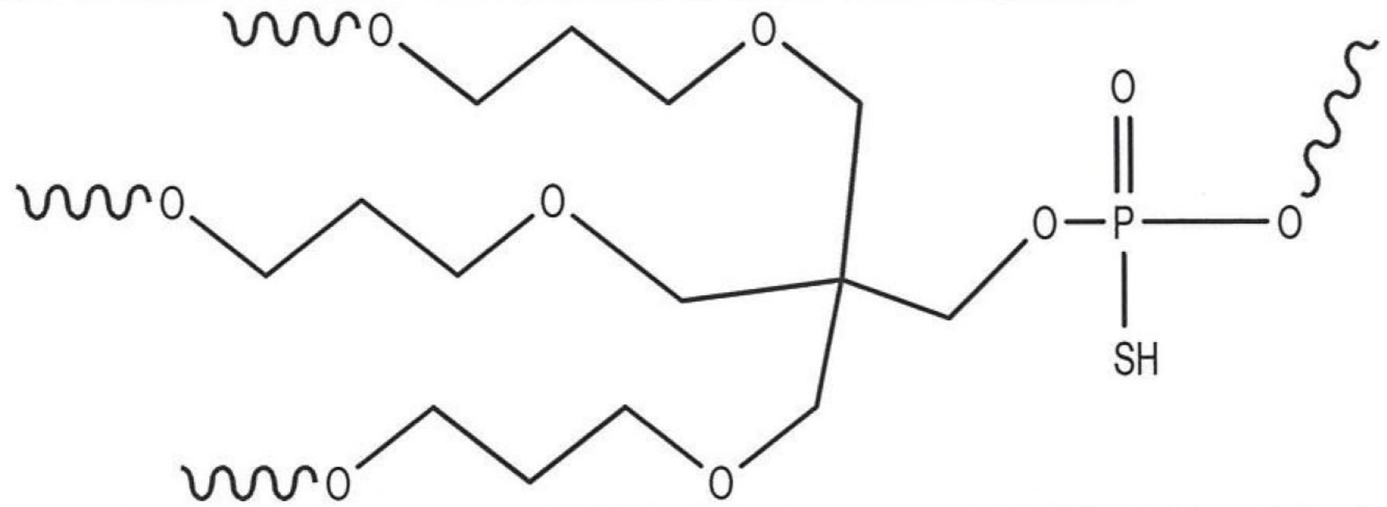
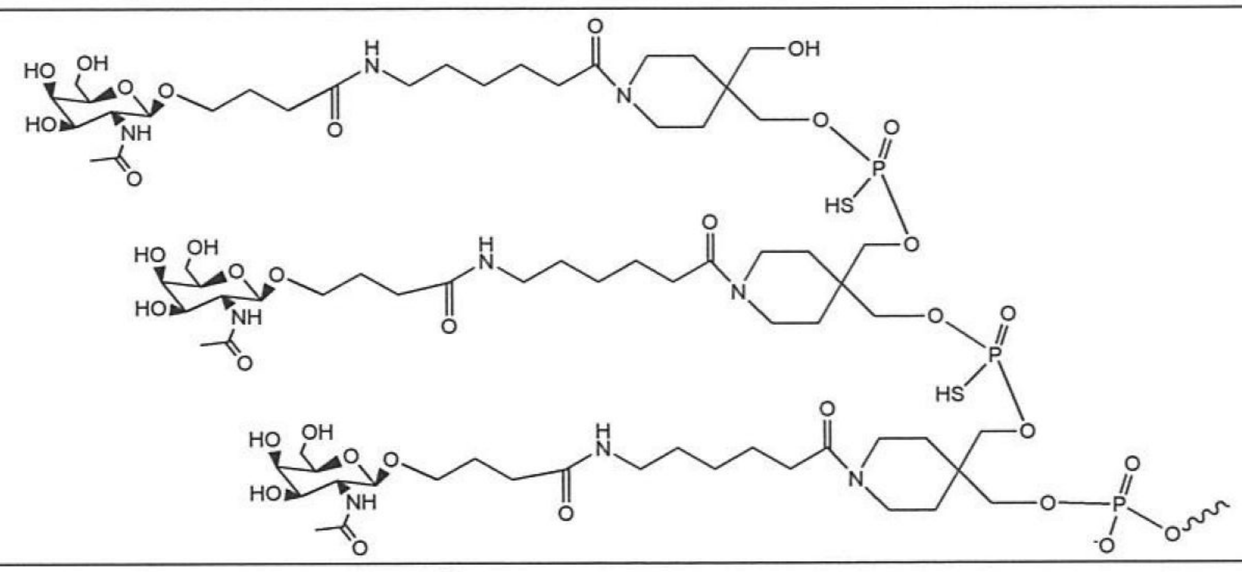
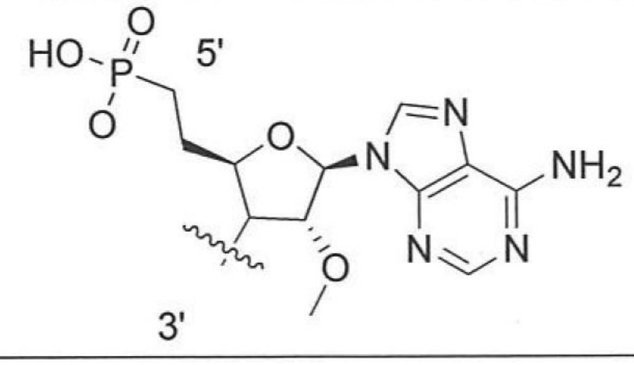
【圖6B】(續)

縮寫	名稱	結構
gn	GNA	 鹼基
po	磷酸酯	 或
ps	硫代磷酸酯	 或
psR	具有*(R)*-立體化學之硫代磷酸酯	 或
psS	具有*(S)*-立體化學之硫代磷酸酯	 或
3’-膽固醇(CHOL)		

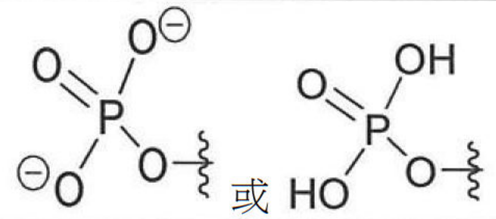
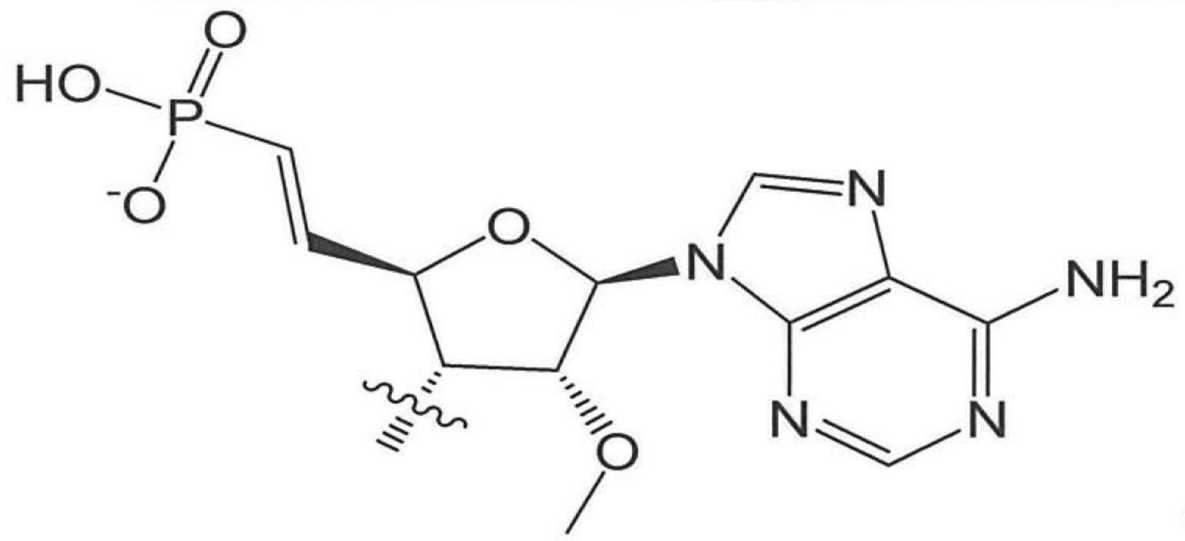
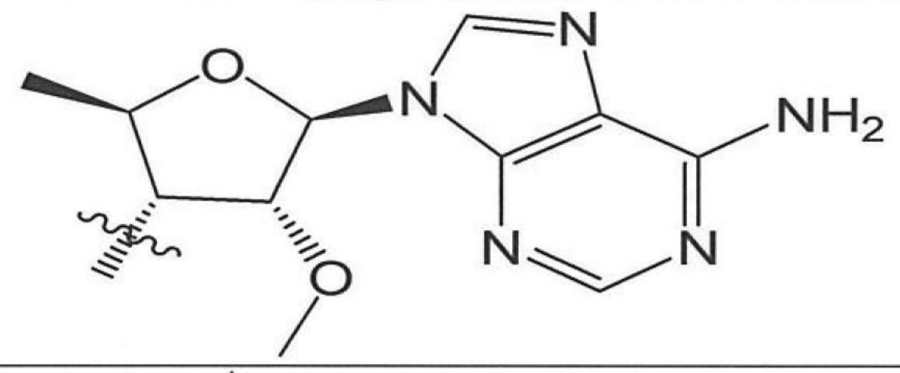
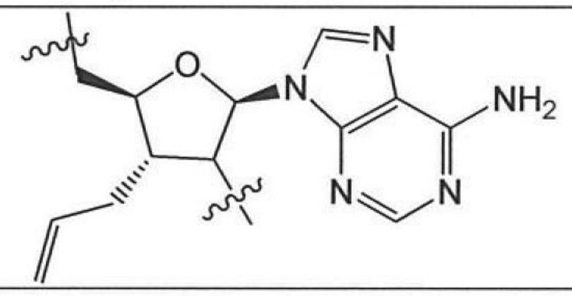
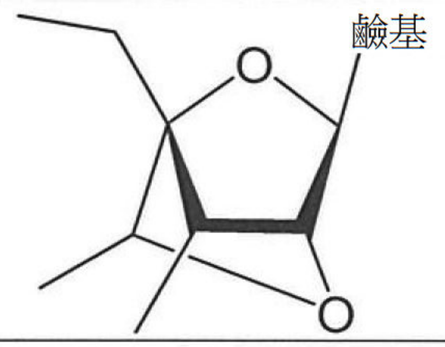
【圖6B】(續)

縮寫	名稱	結構
Cy5		
DBLR-ps-c4-CONH-c2		
棕櫚醯基		

【圖6B】(續)

縮寫	名稱	結構
生育酚		
TREB-ps-c3-O-C3		
GalNAc5		
EP	5'-膦酸乙酯端帽	

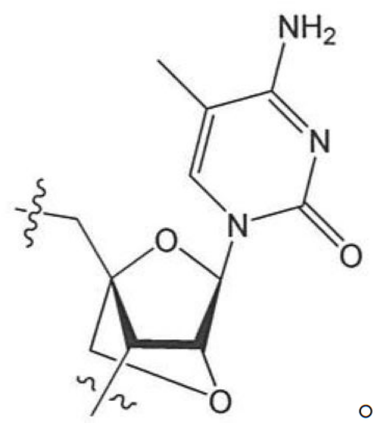
【圖6B】(續)

縮寫	名稱	結構
P		
VP		
4’-Me	4’-Me-2-OMe-A	
3cal	3’ -C-烯丙基-A	
4etl		

【圖6B】(續)

例如，使用來自表A之縮寫及結構，此項技術者瞭解

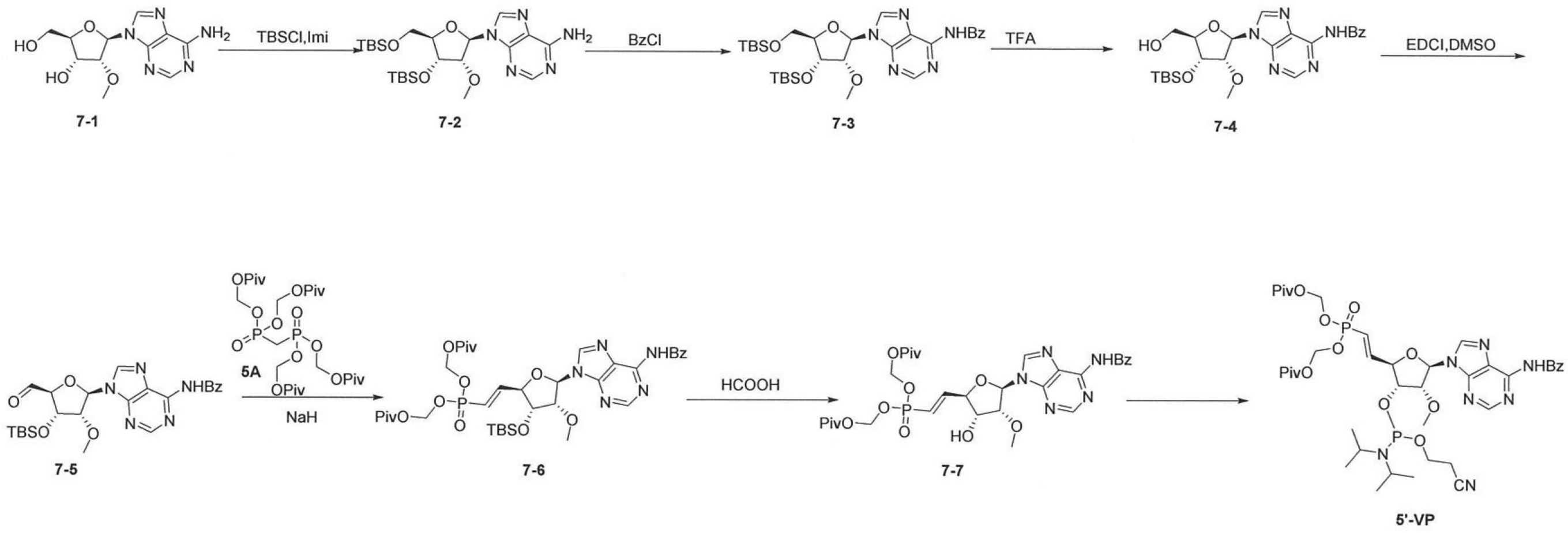
縮寫「ln(5m)C」表示下式：



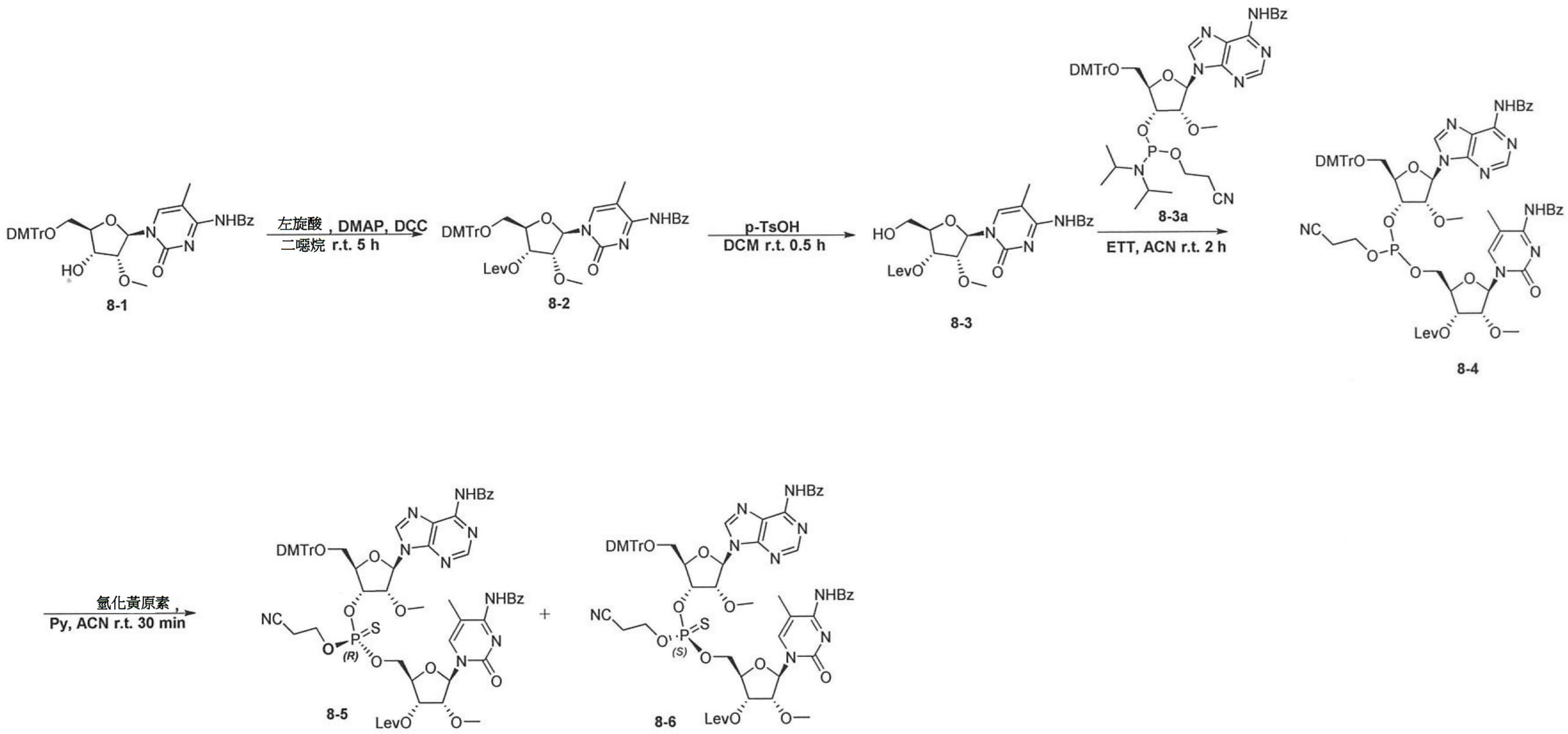
。

【圖6B】(續)

((((E)-2-((2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲醯胺基-9H-嘌呤-9-基)-3-(((2-氰基乙氧基)(二異丙基胺基)膦基)氧基)-4-甲氧基四氫呋喃-2-基)乙烯基)磷醯基)雙(氧基))雙(亞甲基)雙(2,2-二甲基丙酸酯)之製備(5VP)

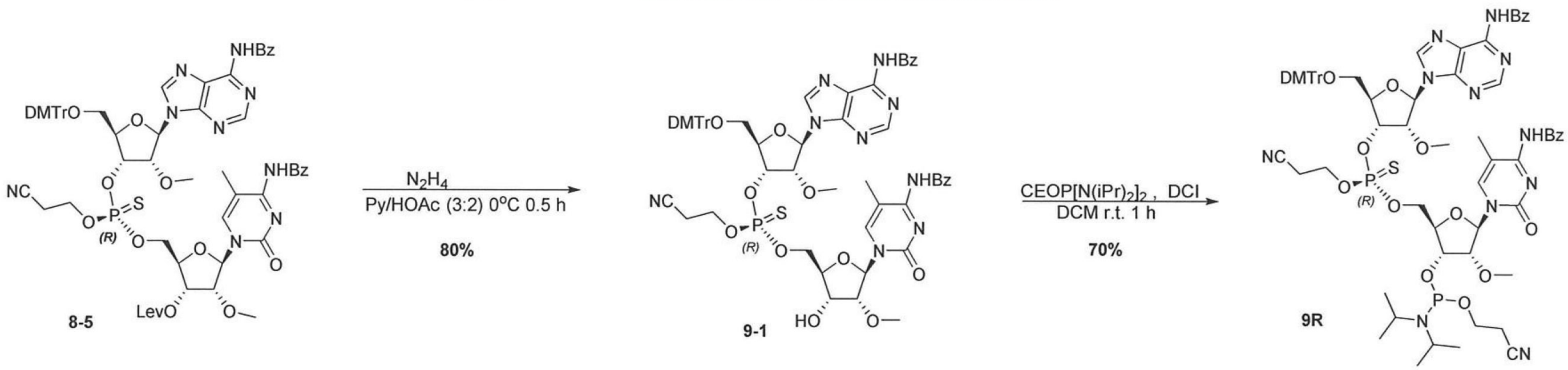


【圖7】


DMTrO
NHBz
HO
LevO
8-1
左旋酸，DMAP, DCC
二噁烷 r.t. 5 h
8-2
p-TsOH
DCM r.t. 0.5 h
8-3
8-3a
ETT, ACN r.t. 2 h
8-4
氫化黃原素，
Py, ACN r.t. 30 min
NC
(R)
(S)
8-5
8-6

【圖8】

(2R,3R,4R,5R)-5-(4-苯甲醯胺基-5-甲基-2-側氧基嘧啶-1(2H)-基)-2-((((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲醯胺基-9H-嘌呤-9-基)-2-((雙(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-甲氧基四氫呋喃-3-基)氧基)(2-氰基乙氧基)硫代磷醯基)氧基)甲基)-4-甲氧基四氫呋喃-3-基(2-氰基乙基)二異丙基亞磷醯胺(9R)之製備

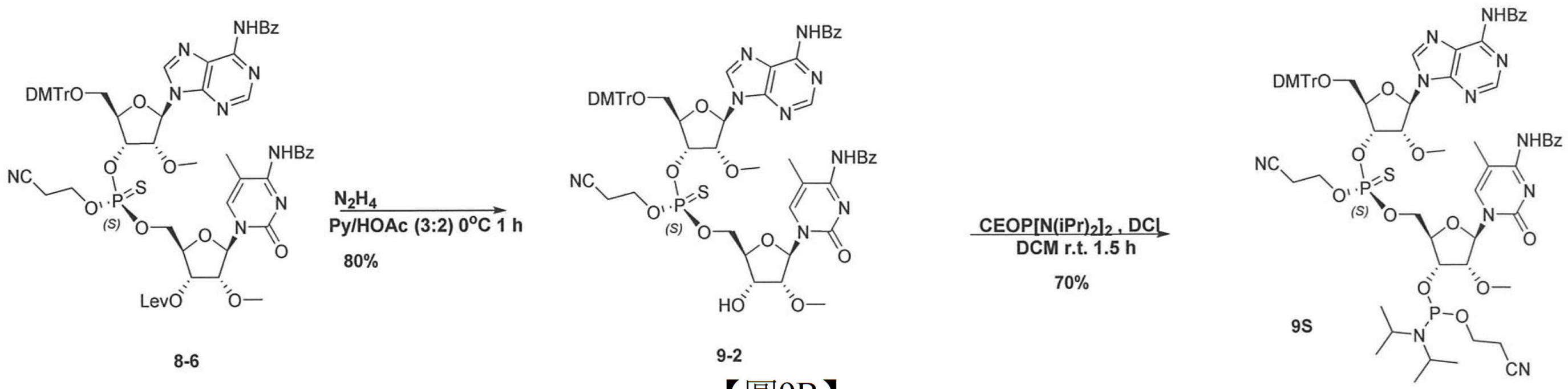


【圖9A】

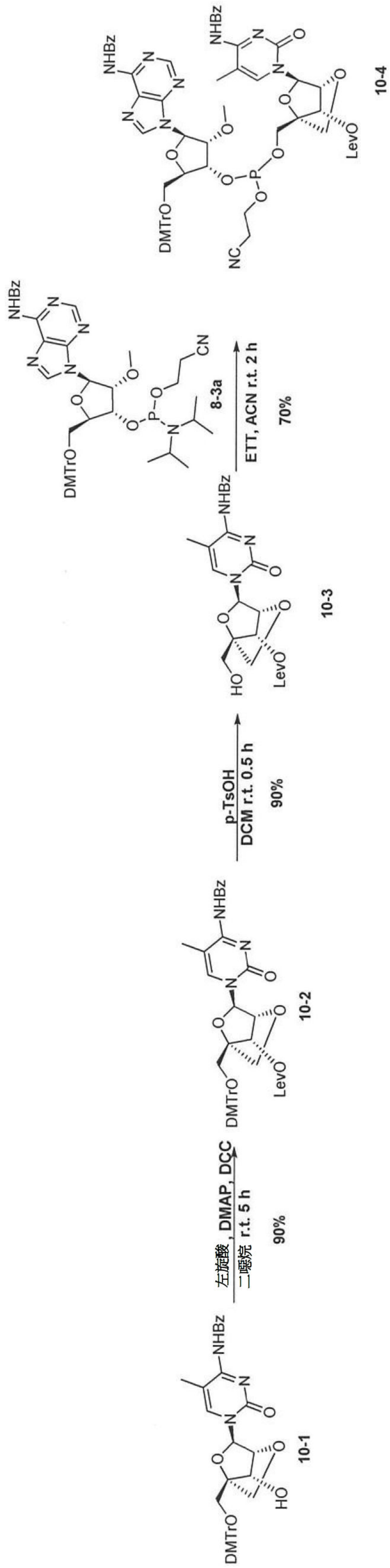
109062977-0

202031267

(2R,3R,4R,5R)-5-(4-苯甲醯胺基-5-甲基-2-側氧基嘧啶-1(2H)-基)-2-((((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲醯胺基-9H-嘌呤-9-基)-2-((雙(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-甲氧基四氫呋喃-3-基)氧基)(2-氰基乙氧基)硫代磷醯基)氧基)甲基)-4-甲氧基四氫呋喃-3-基(2-氰基乙基)二異丙基亞磷醯胺(9S)之製備

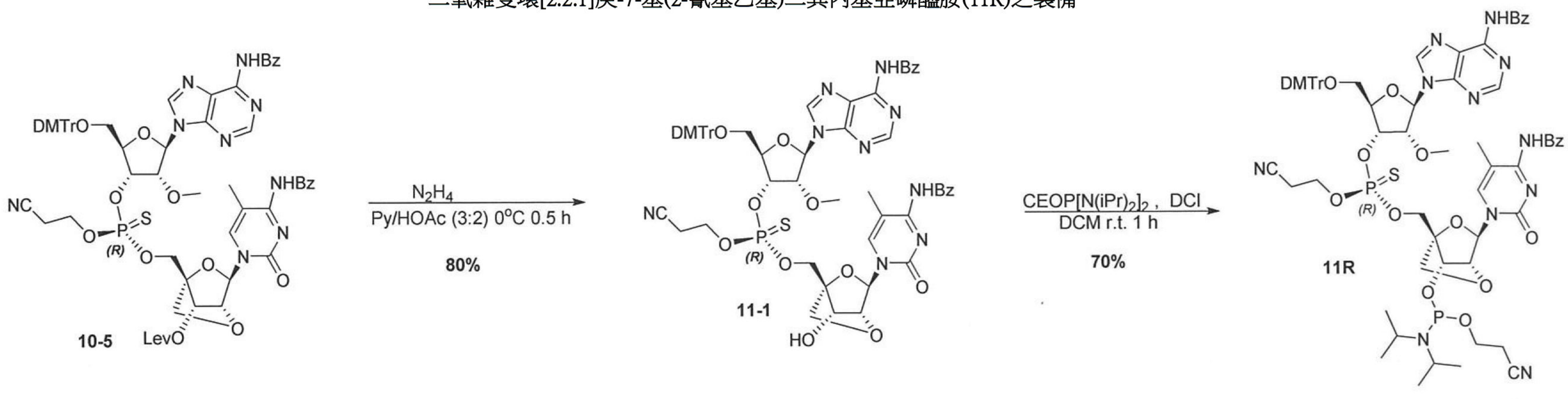


【圖9B】


NHBz
DMTrO
LevO
10-4
8-3a
ETT, ACN r.t. 2 h
70%
10-3
HO
p-TsOH
DCM r.t. 0.5 h
90%
10-2
左旋酸, DMAP, DCC
二噁烷 r.t. 5 h
90%
10-1
10-5
10-6
氫化黃原素,
Py, ACN r.t. 30 min

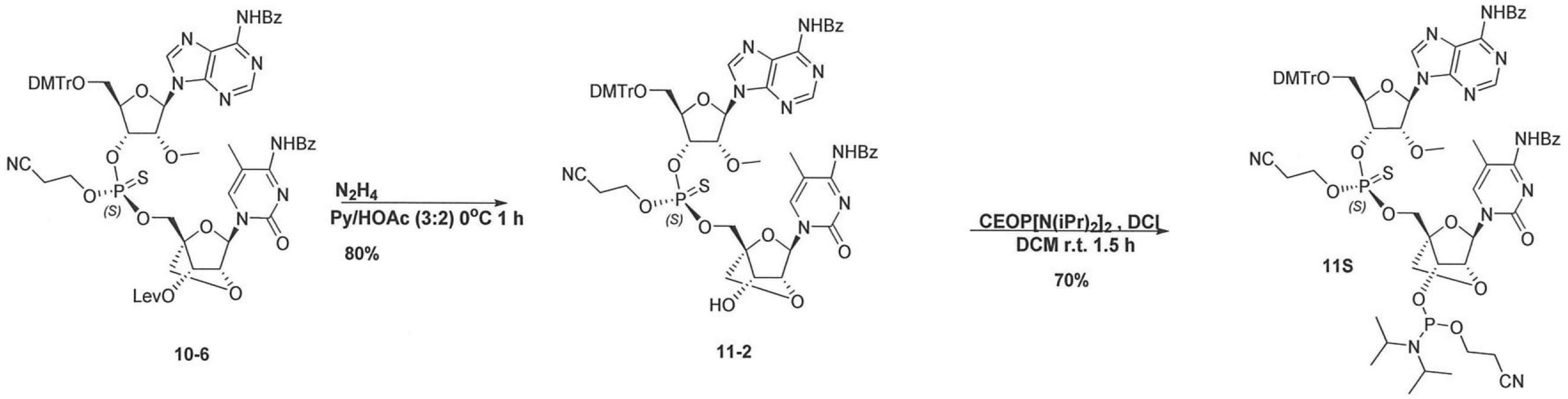
【圖10】

(1R,3R,4R,7S)-3-(4-苯甲醯胺基-5-甲基-2-側氧基嘧啶-1(2H)-基)-1-((((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲醯胺基-9H-嘌呤-9-基)-2-((雙(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-甲氧基四氫呋喃-3-基)氧基)(2-氰基乙氧基)硫代磷醯基)氧基)甲基)-2,5-二氧雜雙環[2.2.1]庚-7-基(2-氰基乙基)二異丙基亞磷醯胺(11R)之製備

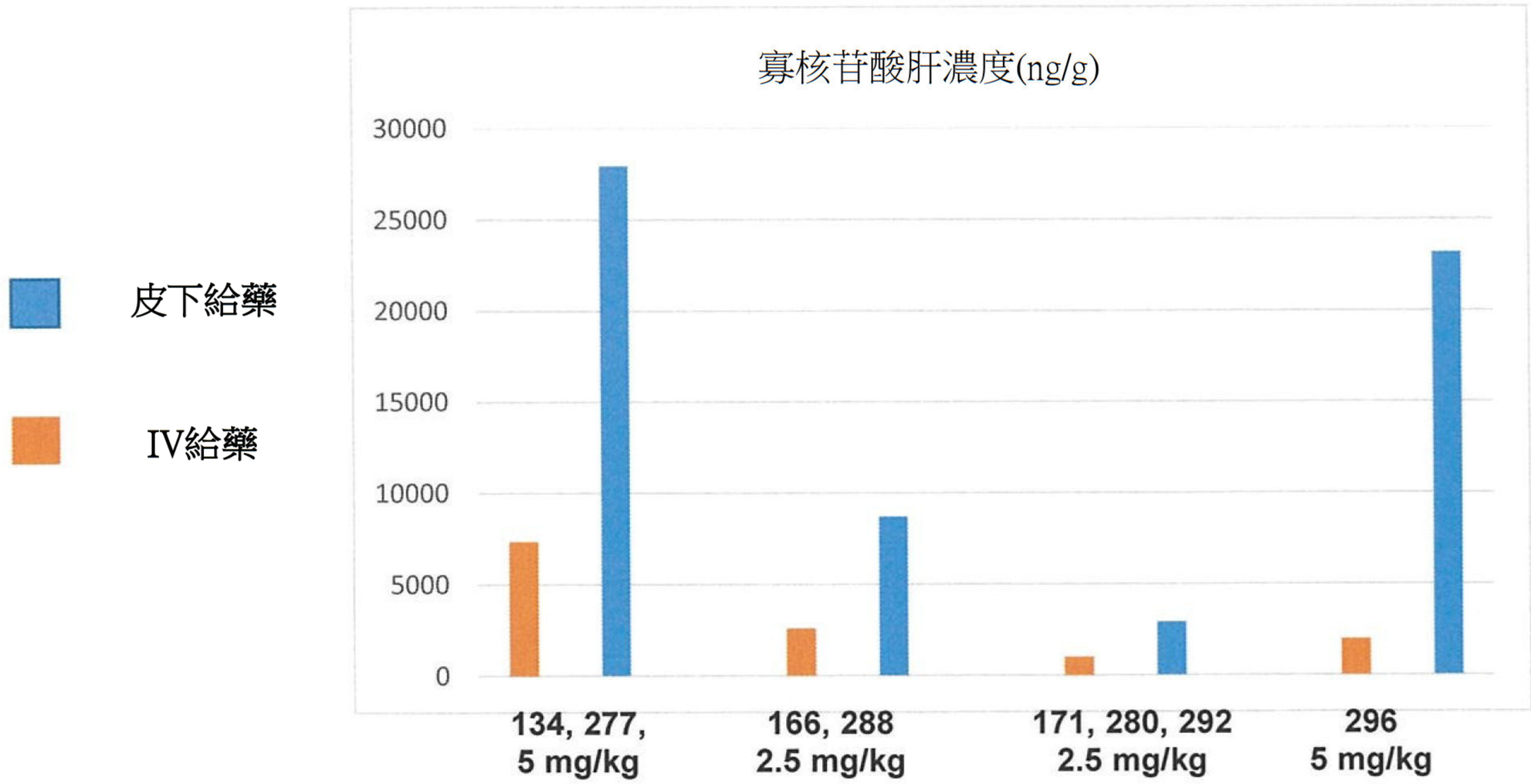


【圖11A】

(1R,3R,4R,7S)-3-(4-苯甲醯胺基-5-甲基-2-側氧基嘧啶-1(2H)-基)-1-((((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲醯胺基-9H-嘌呤-9-基)-2-((雙(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-甲氧基四氫呋喃-3-基)氧基)(2-氰基乙氧基)硫代磷醯基)氧基)甲基)-2,5-二氧雜雙環[2.2.1]庚-7-基(2-氰基乙基)二異丙基亞磷醯胺(11S)之製備

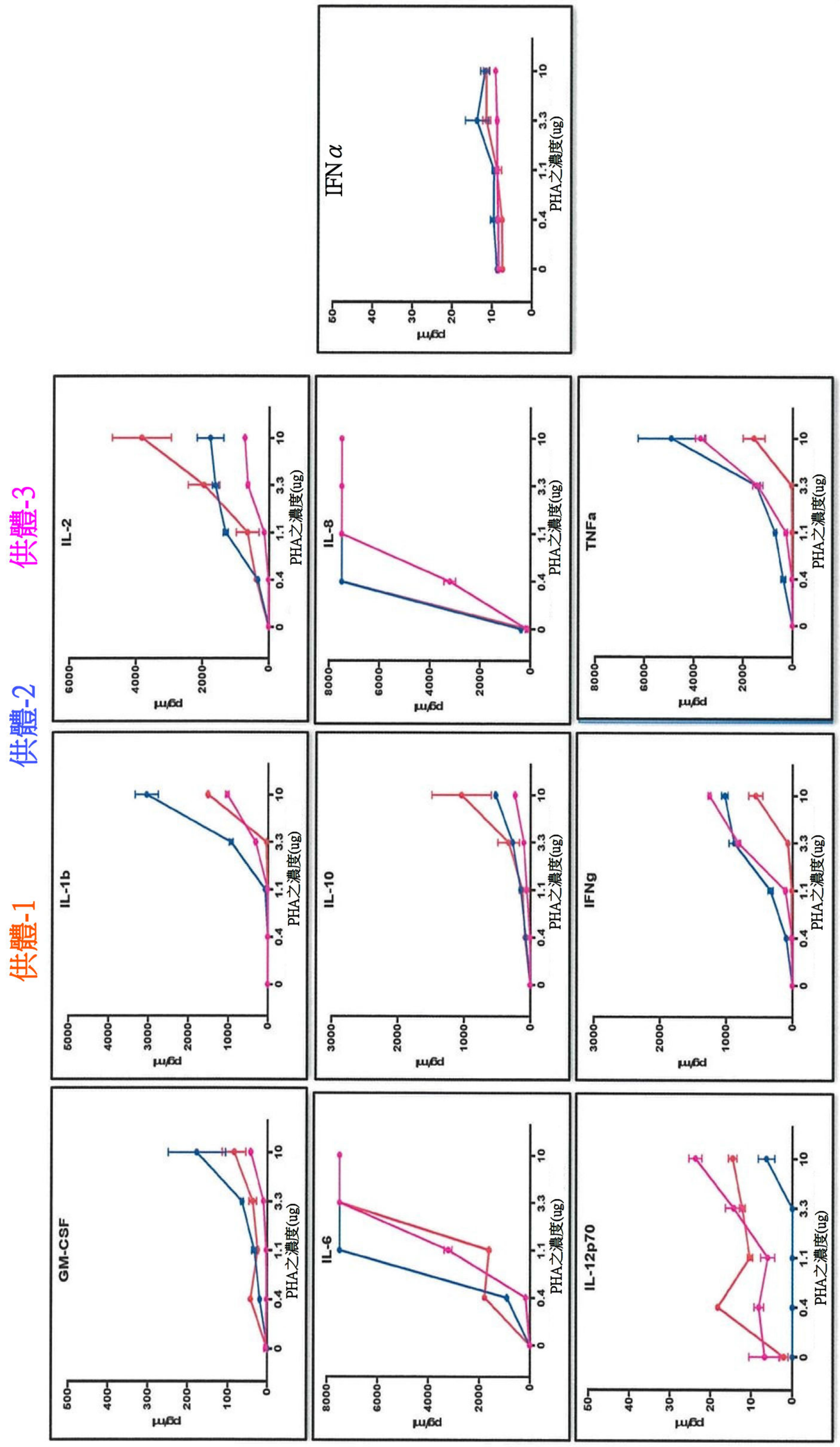


【圖11B】



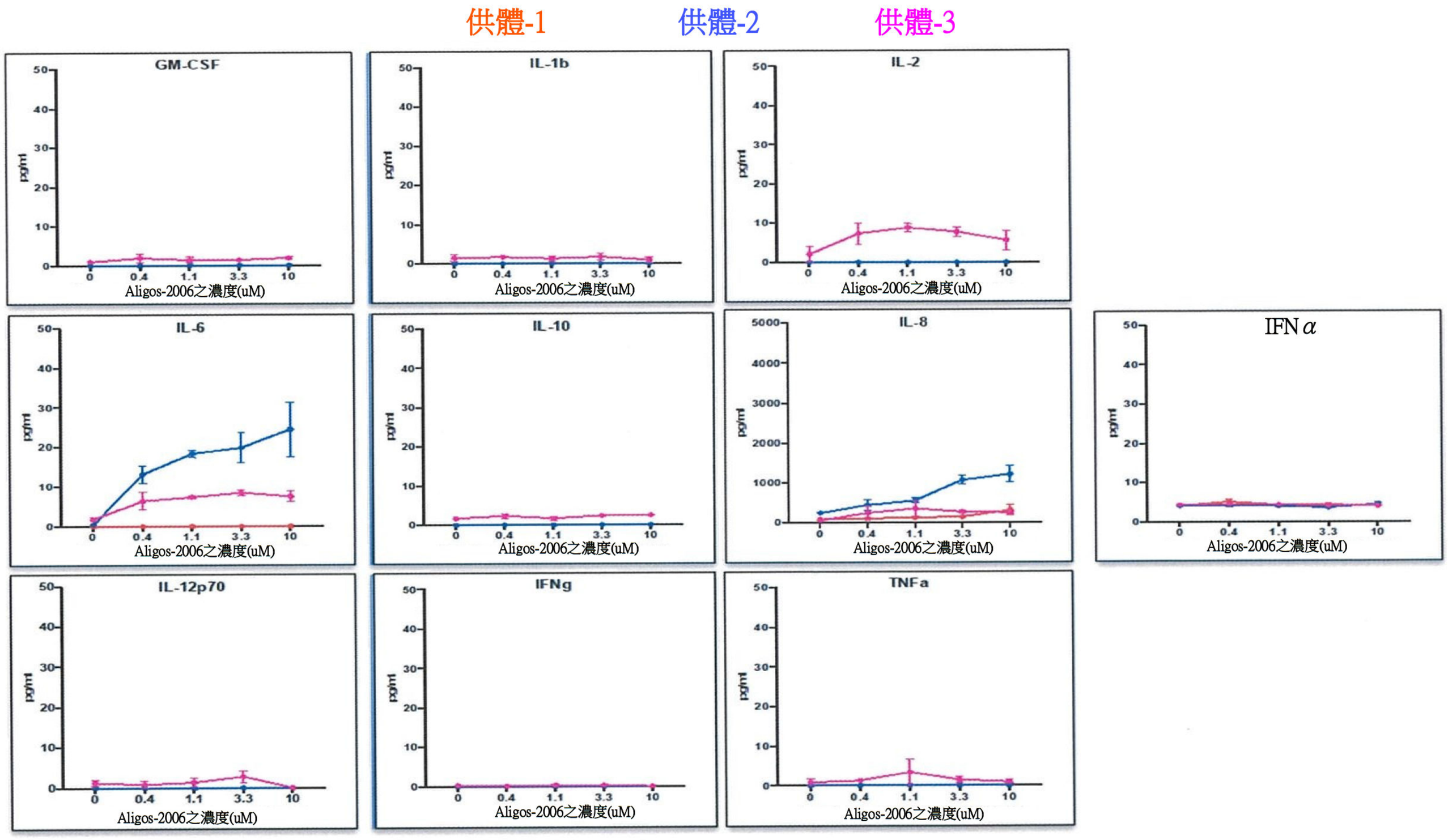
化合物編號(劑量)	134, 277, 284 (5 mg/kg)		166, 288 (2.5 mg/kg)		171, 280, 292 (2.5 mg/kg)		296 (5 mg/kg)	
途徑	IV	SC	IV	SC	IV	SC	IV	SC
肝濃度(ng/g)	7350.5	27,942.5	2603	8711	1024.5	2938.5	1995.5	23,191.5

【圖12】


供體-1
供體-2
供體-3
IL-1b
IL-2
IL-8
IL-10
TNFa
IFNg
GM-CSF
IL-6
IL-12p70
IFN α
pg/ml
PHA之濃度(ug)
0
0.4
1.1
3.3
10

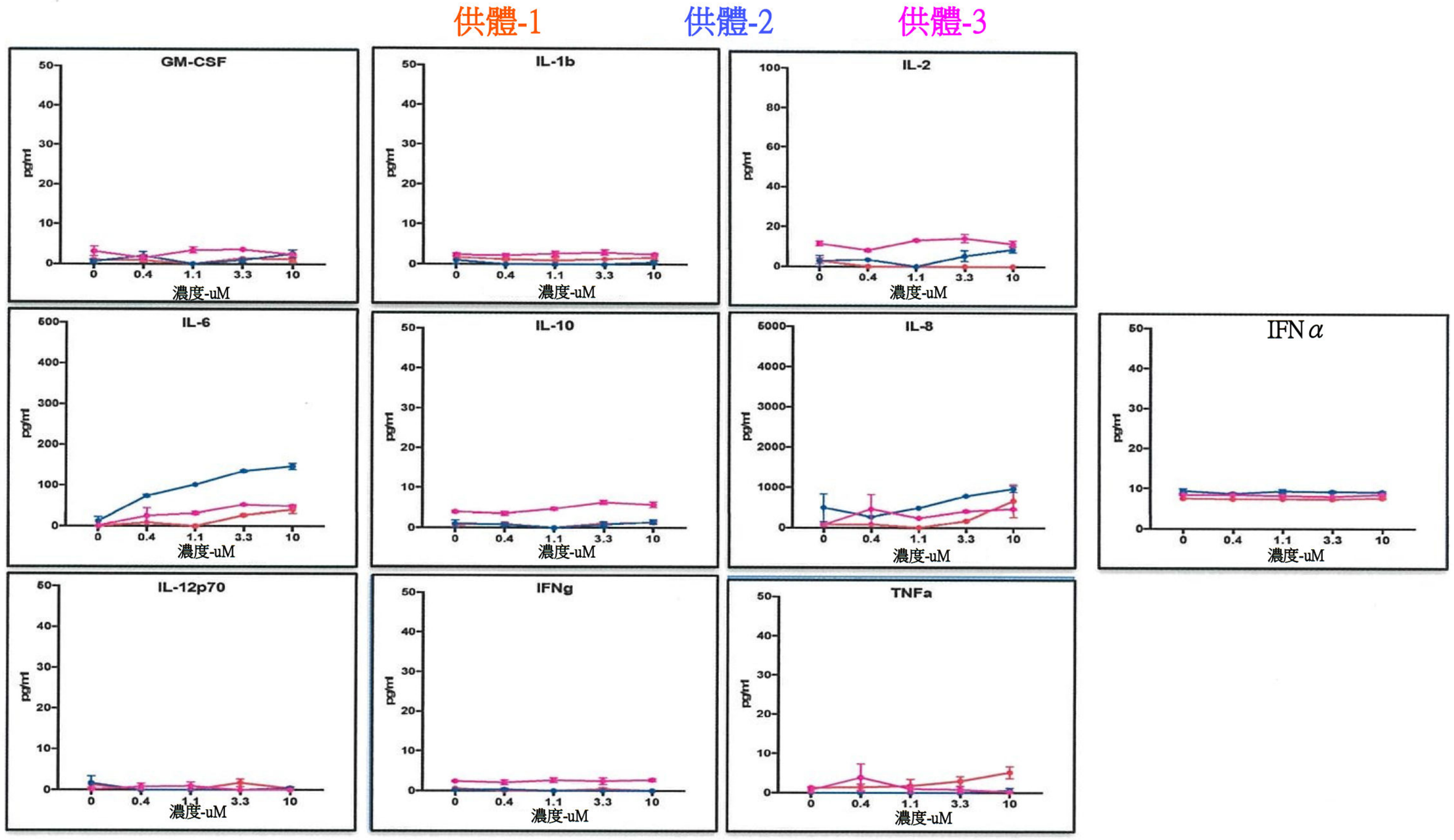
PHA對照

【圖13】



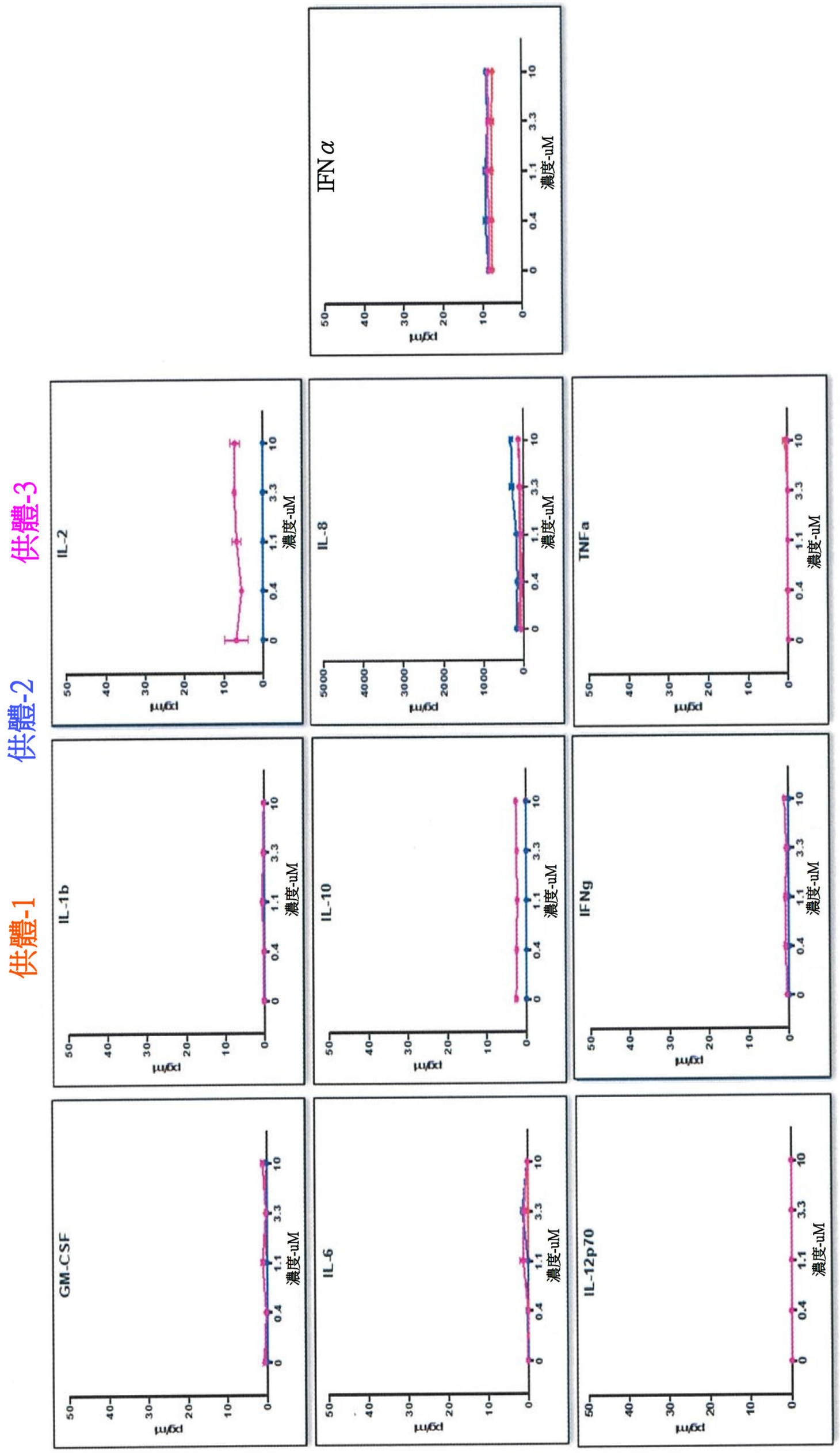
化合物編號1 (REP-2139)

【圖14】



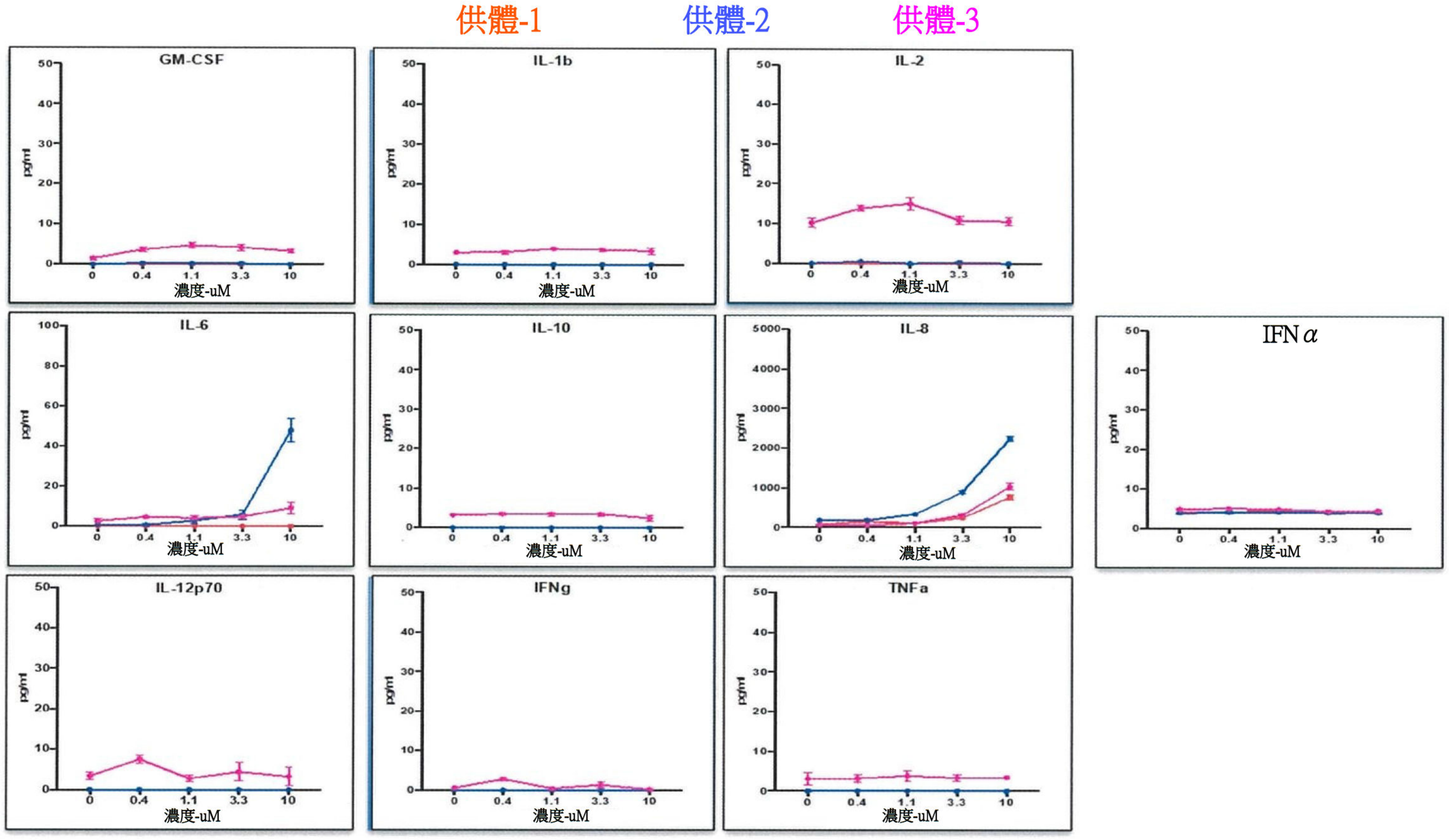
化合物編號171、280、292

【圖15】



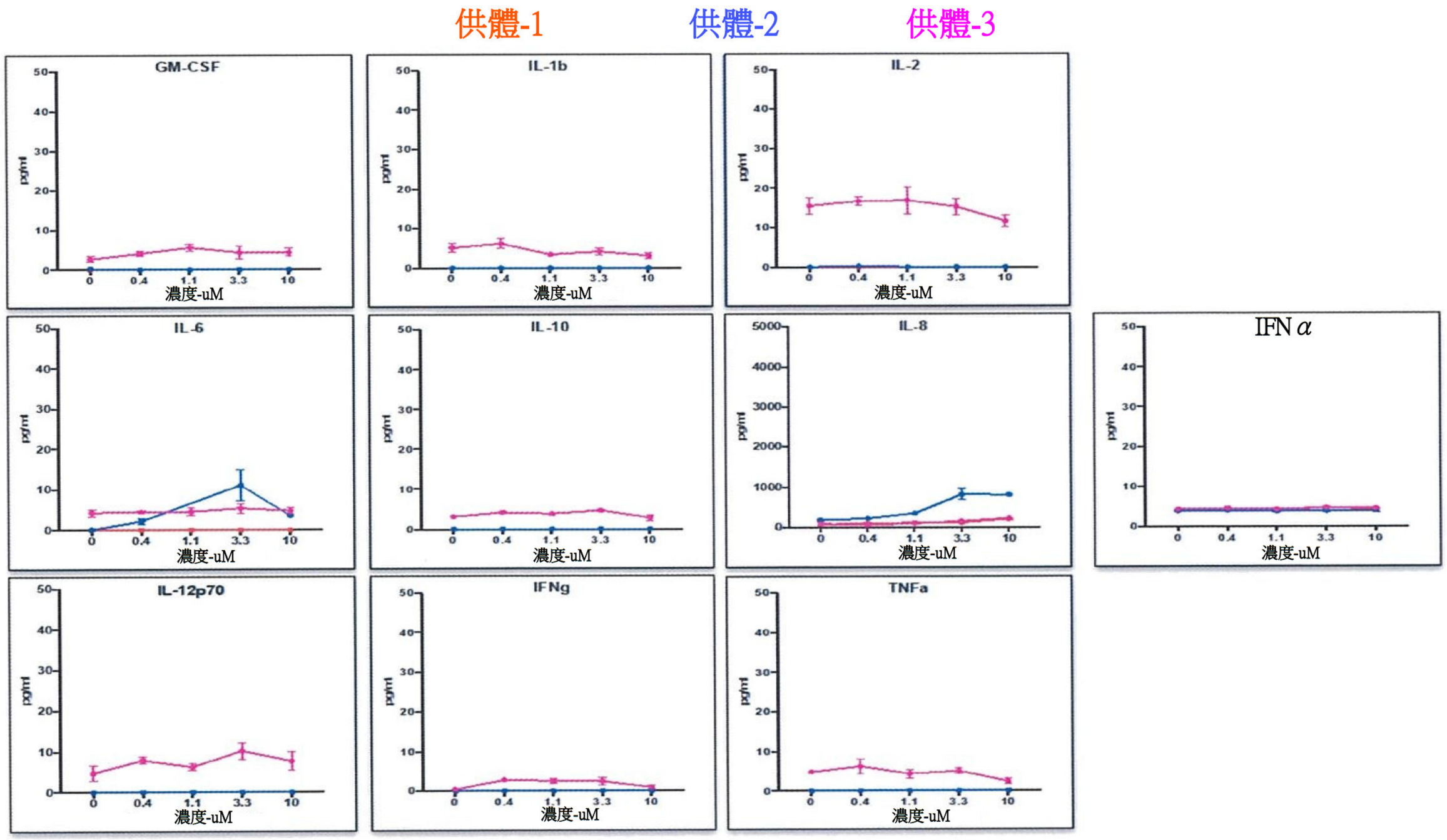
化合物編號296

【圖16】



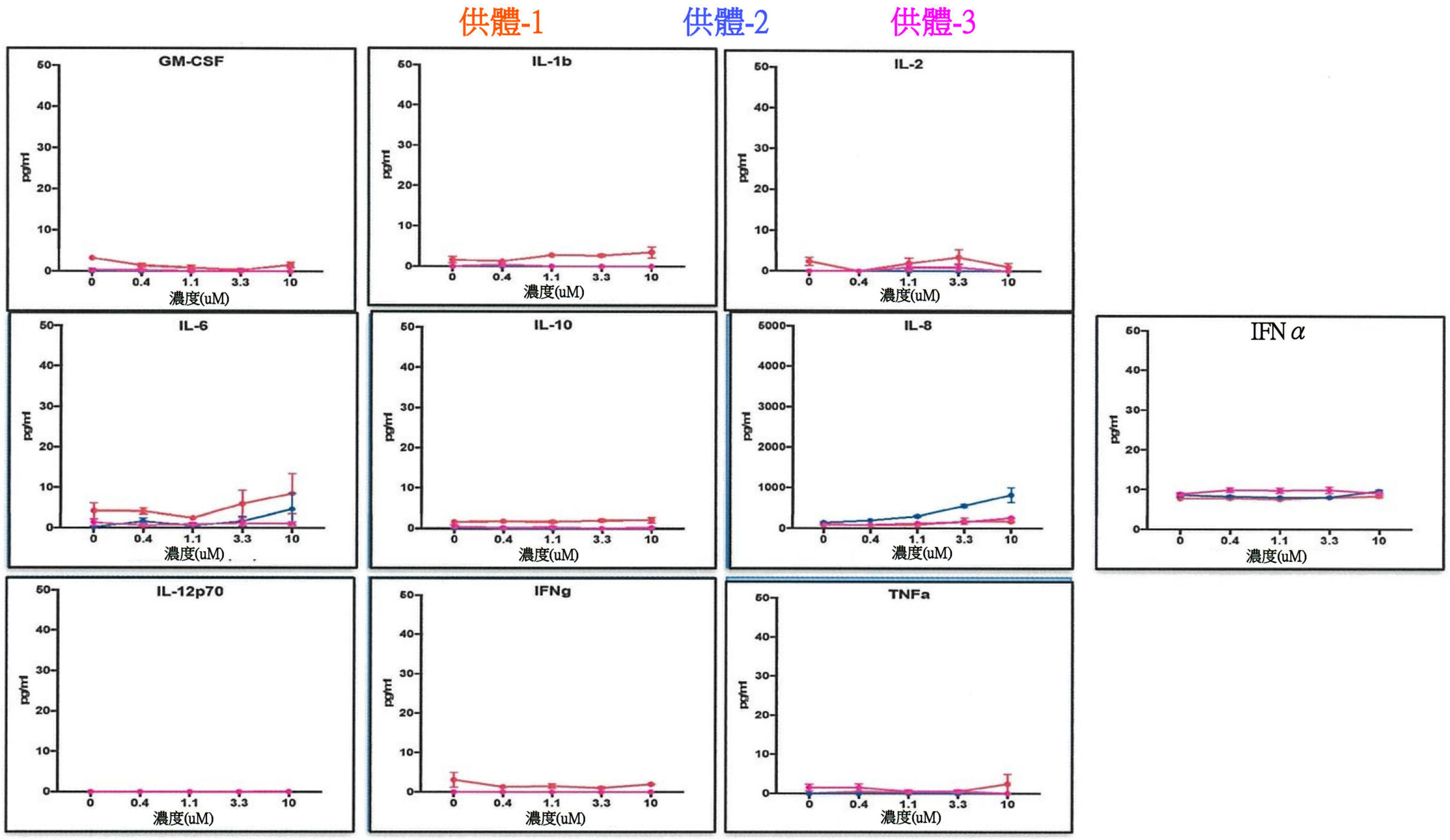
化合物編號134、277、284

【圖17】



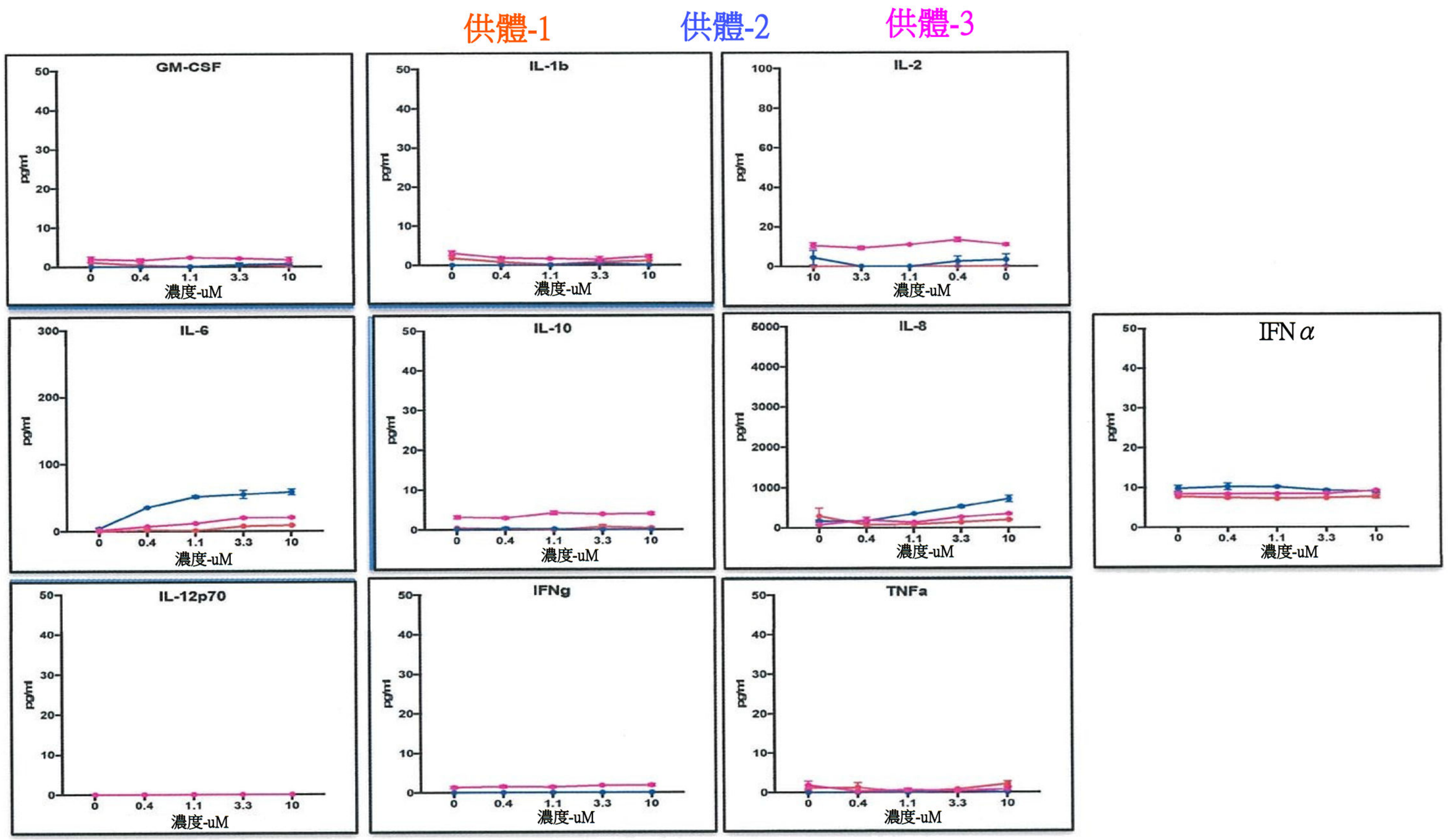
化合物編號166、288

【圖18】



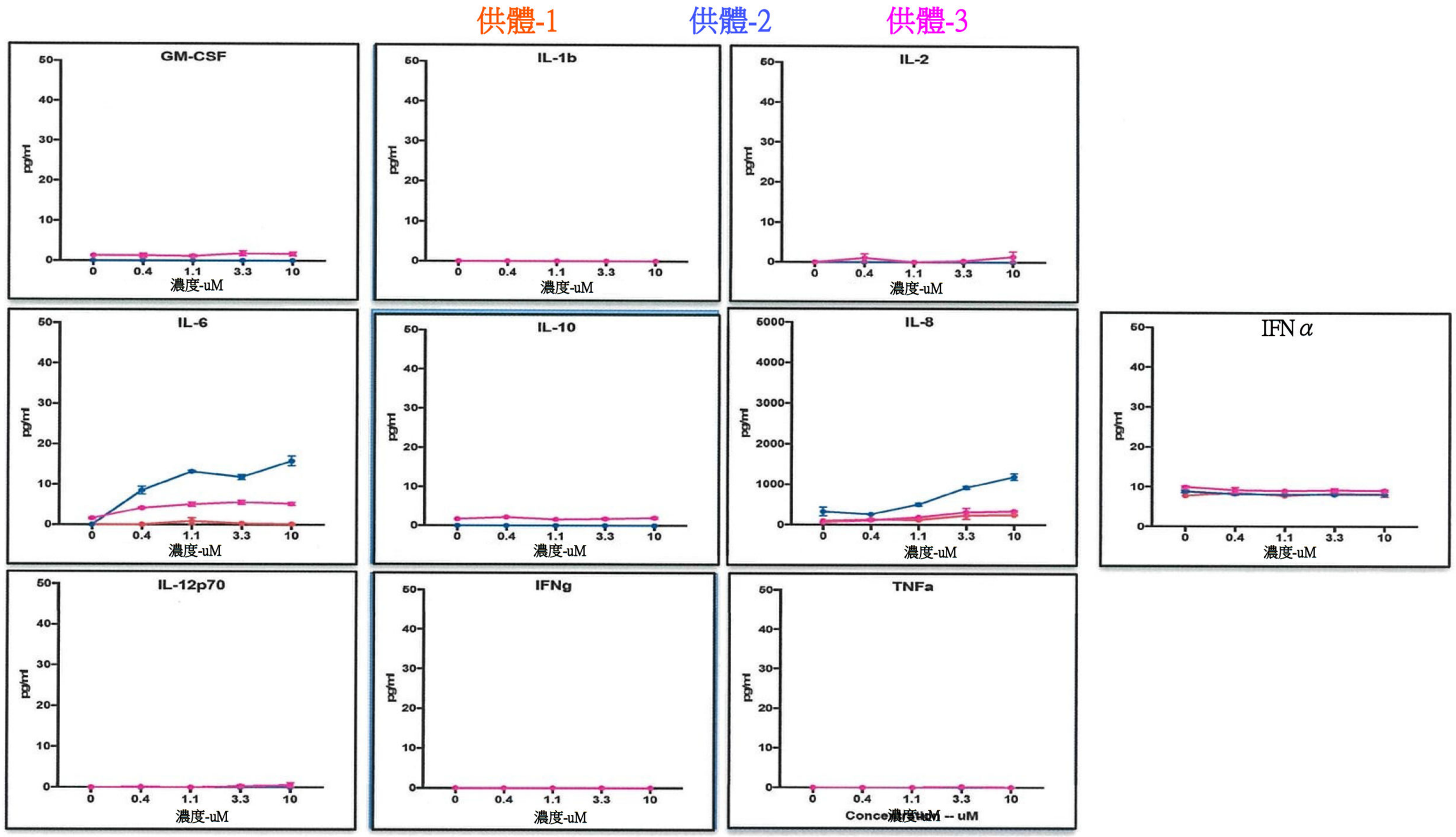
化合物編號167、289

【圖19】



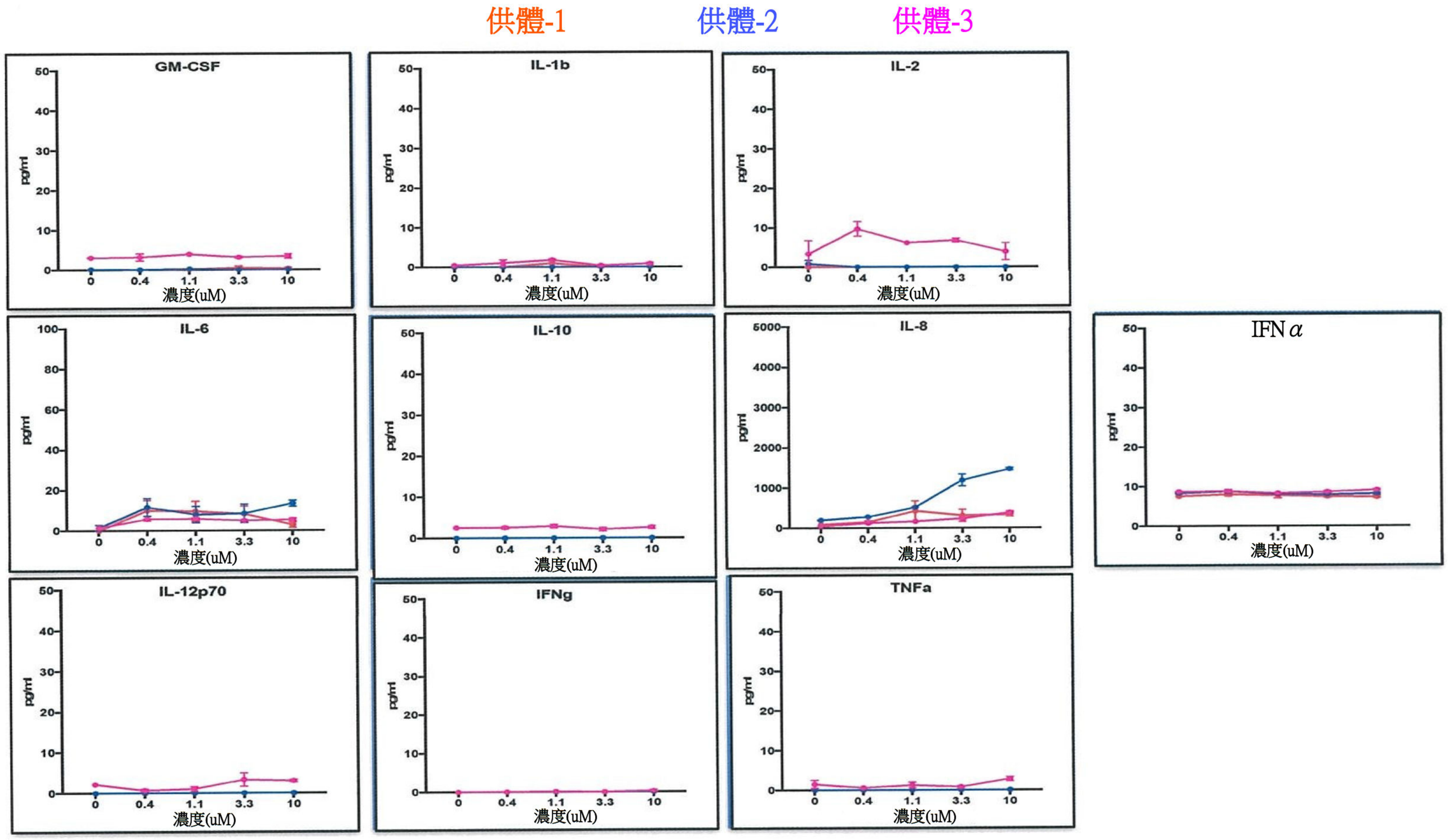
化合物編號281、316

【圖20】



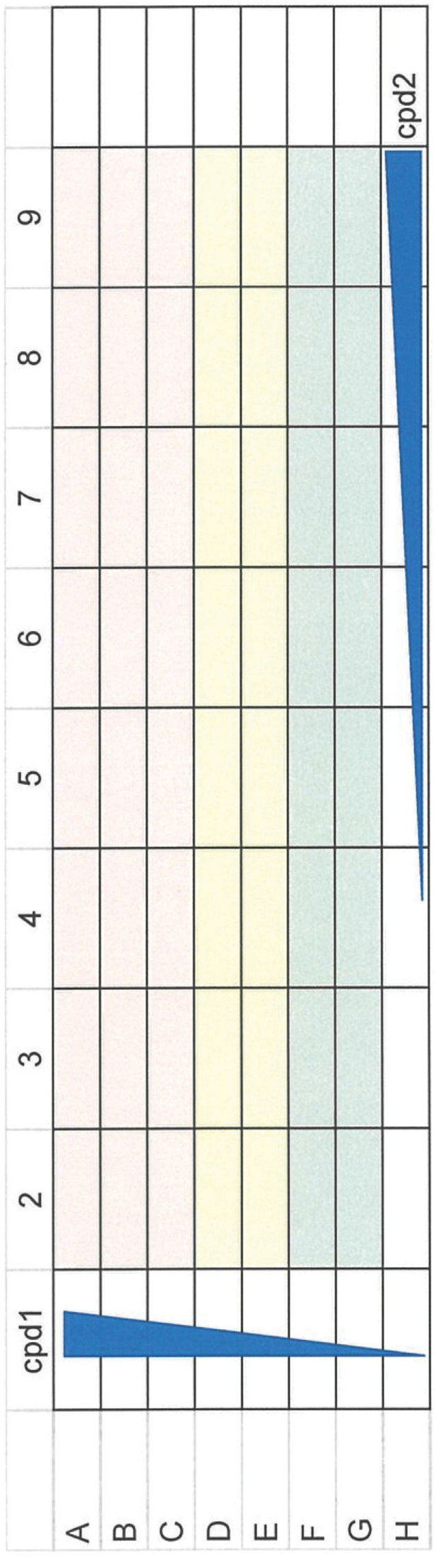
化合物編號294

【圖21】



化合物編號276、291

【圖22】



【圖23】