



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118345073 A

(43) 申请公布日 2024.07.16

(21) 申请号 202410391906.4

A61K 47/54 (2017.01)

(22) 申请日 2018.09.14

A61K 31/7125 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07H 21/02 (2006.01)

62/558773 2017.09.14 US

C07H 23/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 31/20 (2006.01)

201880073585.6 2018.09.14

A61P 1/16 (2006.01)

(71) 申请人 詹森生物制药有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·格里亚佐夫 J·洪

V·K·拉吉万施 R·K·潘迪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 黄登高 彭昶

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

权利要求书3页 说明书57页

序列表(电子公布)

(54) 发明名称

GalNAc衍生物

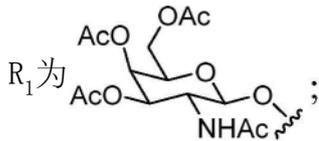
(57) 摘要

本发明公开了包含本公开的GalNAc部分的经修饰的寡核苷酸连同制备的方法和例如对抗HBV的用途。

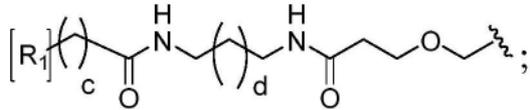
1. 包含寡核苷酸和药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物在制备用于治疗有需要的受试者的乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的药物中的用途, 包括向有需要的受试者施用所述药物组合物, 其中所述寡核苷酸具有式 (I) 或 (II) 的结构:



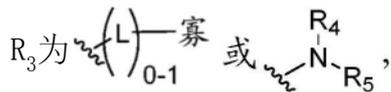
其中



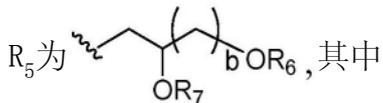
R_8 为 C_3 - C_{10} 烷基部分、具有 1-5 个氧原子的 C_3 - C_{10} 烷基氧化物部分或



R_2 为 C_3 - C_{10} 烷基部分或具有 1-5 个氧原子的 C_3 - C_{10} 烷基氧化物部分;



R_4 为 H;



R_6 为到寡核苷酸的键;

R_7 为 H、固体载体连接基或 $-\text{PH}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$;

L 为连接基部分;

a 为 1-3 的整数;

b 为 1-4 的整数;

c 为 3-7 的整数; 并且

d 为 0-4 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中在施用后, 在有需要的受试者中血清 HBV S 抗原 (HBsAg) 水平、血清 HBV E 抗原 (HBeAg) 水平或两者降低。

3. 根据权利要求 2 所述的用途, 其中在施用后, 血清 HBsAg 水平、血清 HBeAg 水平或两者降低 25% 至 99%。

4. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中在施用后, 在有需要的受试者中肝脏 HBV S 抗原 (HBsAg) 水平、肝脏 HBV E 抗原 (HBeAg) 水平或两者降低。

5. 根据权利要求 4 所述的用途, 其中在施用后, 肝脏 HBsAg 水平、肝脏 HBeAg 水平或两者降低 25% 至 99%。

6. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中在施用后在有需要的受试者中生物标记物的水平降低, 其中所述生物标记物选自由丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、 γ -谷氨酰

转肽酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP)、胆红素、类风湿因子 (RF) 及其任意组合。

7. 根据权利要求6所述的用途, 其中在施用后所述生物标记物的水平降低25%至99%。

8. 根据权利要求1所述的用途, 其中在施用后, 在有需要的受试者中抗HBV抗体的水平增加。

9. 根据权利要求8所述的用途, 其中在施用后抗HBV抗体的水平增加25%至99%。

10. 根据权利要求8所述的用途, 其中测量有需要的受试者的细胞、组织、血液或其他流体中的抗HBV抗体的水平。

11. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述寡核苷酸是稳定的。

12. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述施用是静脉内施用。

13. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述施用是皮下施用。

14. 根据权利要求1所述的用途, 其中有需要的受试者是成年人。

15. 根据权利要求1所述的用途, 其中 R_2 为 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 或 C_{10} 烷基部分。

16. 根据权利要求1所述的用途, 其中 R_7 包含琥珀酸酯部分。

17. 根据权利要求1所述的用途, 其中 R_8 为包含2-5个环氧乙烷部分的 C_3 - C_{10} 烷基氧化物部分。

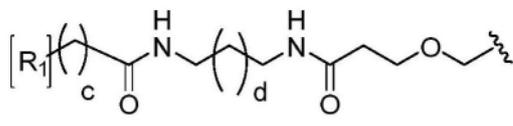
18. 根据权利要求1所述的用途, 其中L为 C_1 - C_8 氨基连接基。

19. 根据权利要求1所述的用途, 其中a为3。

20. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述化合物为式(I)的化合物。

21. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述化合物为式(II)的化合物。

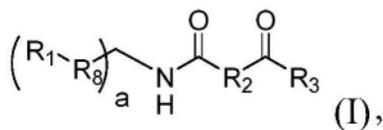
22. 根据权利要求1所述的用途, 其中 R_8 为:



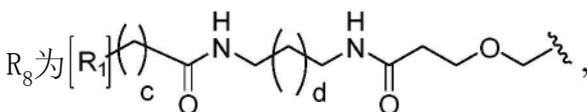
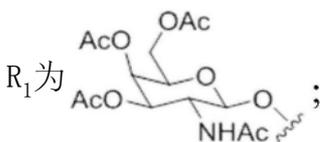
23. 根据权利要求1所述的用途, 其中 R_6 包括氨基磷酸酯部分。

24. 根据权利要求1所述的用途, 其中 R_6 包括磷酸二酯部分。

25. 具有式(I)结构的化合物:



其中



其中c为4, 并且d为1;

a为3;

R_2 为 C_2 - C_{10} 烷基部分; 和

GalNAc衍生物

[0001] 本申请是申请日为2018年9月14日,申请号为201880073585.6,发明名称为“GalNAc衍生物”的发明专利的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请是要求2017年9月14日提交的美国临时申请No.62/558,773的优先权的权益的美国申请,该申请的全部内容据此引用方式并入。

背景技术

[0004] 反义寡核苷酸疗法已被考虑用于治疗或预防各种疾病和病症,诸如病毒性疾病、神经疾病、神经退行性疾病、纤维化疾病、增殖性疾病。

[0005] 某些病毒性疾病,诸如乙型肝炎病毒(HBV),在持续感染估计2.40亿人(被定义为HBV表面抗原阳性至少6个月),并造成每年超过686,000人死亡的同时,从传统疗法仍然希望渺茫。常规疗法,包括口服抗病毒核苷酸类似物治疗,诸如替诺福韦或恩替卡韦,仅抑制病毒的复制并且不治疗HBV感染。因此,即使用目前HBV治疗方法治疗的那些患者也必须终身接受他们的治疗。

[0006] 寡核苷酸可结合互补的RNA或DNA序列。该特征使得寡核苷酸能够结合细胞过程的某些方面(诸如代谢、分化、增殖和复制)以及病毒复制(诸如HBV的复制)中涉及的特定核酸靶标。

[0007] N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)直接或经由连接基缀合至寡核苷酸,以有助于将寡核苷酸导向至其预期的细胞靶标并改善其在细胞中的摄取。

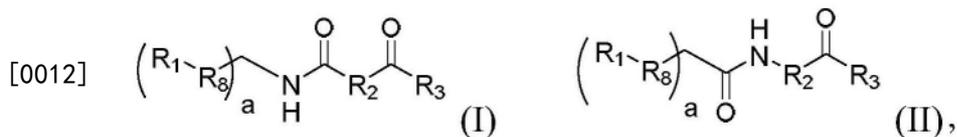
[0008] 本领域需要发现和开发在其施用中具有改善的特异性和效率的新疗法。

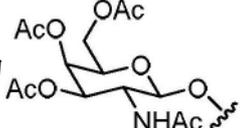
发明内容

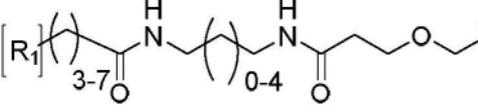
[0009] 本公开涉及GalNAc部分,其制备方法以及在靶向它们缀合至细胞(诸如肝细胞)的寡核苷酸中的使用方法。

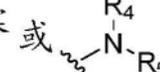
[0010] 本公开涉及一种构建体,所述构建体包含至少一个寡核苷酸链,该寡核苷酸链具有附接到所述链的至少一个GalNAc部分,其中每个GalNAc部分独立地选自GalNAc 1至GalNAc 13。在一些实施方案中,GalNAc部分为GalNAc-2。在一些实施方案中,GalNAc部分为GalNAc-6。在一些实施方案中,通过连接基将至少一个GalNAc部分缀合至寡核苷酸链中的至少一个。在一些实施方案中,连接基是C6-NH₂连接基。在一些实施方案中,寡核苷酸序列对HBV RNA转录物具有亲和力或与HBV RNA转录物基本上互补。在一些实施方案中,所述构建体包含单寡核苷酸链。在一些实施方案中,所述构建体包含双寡核苷酸链。在一些实施方案中,GalNAc部分化学附接到寡核苷酸链的3'端和5'端。

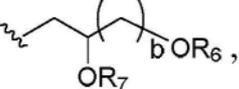
[0011] 本公开还涉及具有式(I)或(II)的结构的化合物:



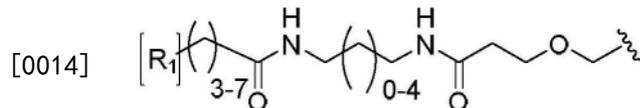
[0013] 其中 R_1 为 ; R_8 为 C_3 - C_{10} 烷基部分、具有1-5个氧原子的 C_3 - C_{10} 烷基氧化

化物部分或 ; R_2 为 C_3 - C_{10} 烷基部分或具有1-5个氧原子的

C_3 - C_{10} 烷基氧化物部分; R_3 为H、PG'、寡或 , 其中PG' 为保护基团; R_4 为H; R_5

为  OR_7 , 其中 R_6 为保护基团或通过任选连接基到寡核苷酸的键和/或氨基磷酸

酯或磷酸二酯键; R_7 为H、固体载体连接基(例如,琥珀酸酯)或 $-PH(O)CH_2CH_2CN$; 或者 R_4 和 R_5 一起形成5元环或6元环, 任选地被 CH_2OPG 取代; PG为醇保护基团; L为连接基部分; a为1-3的整数; 并且b为1-4的整数。在一些实施方案中, R_2 为 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 或 C_{10} 烷基。在一些实施方案中, R_8 为包含2-5个环氧乙烷部分的 C_3 - C_{10} 烷基氧化物部分。在一些实施方案中, 连接基是 C_6-NH_2 连接基。在一些实施方案中, a为1。在一些实施方案中, a为3。在一些实施方案中, b为2或3。在一些实施方案中, PG为DMTr。在一些实施方案中, 化合物为式(I)的化合物, 在一些实施方案中, 化合物为式(II)的化合物。在一些实施方案中, R_8 为:

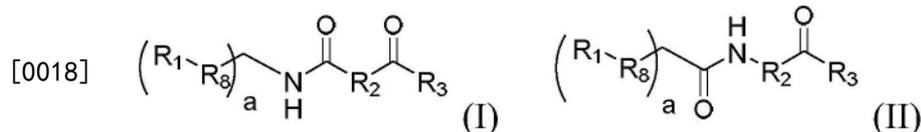


[0015] 在一些实施方案中, PG选自叔丁基二甲基甲硅烷基醚(TBMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)、三异丙基甲硅烷基醚(TIPS)、单甲氧基三苯甲基(MMTr)、4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr)或三甲苯基。在一些实施方案中, R_6 为通过连接基到寡核苷酸的键和/或氨基磷酸酯或磷酸二酯键。在一些实施方案中, R_6 包括氨基磷酸酯键。在一些实施方案中, R_6 包括磷酸二酯键。

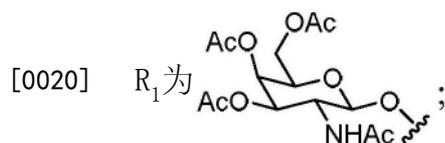
具体实施方式

[0016] 本公开涉及缀合至寡核苷酸的一个或多个GalNAc部分。本公开还涉及使用和制备GalNAc部分及其与寡核苷酸的缀合的方法。

[0017] GalNAc部分的一些实施方案包括式(I)或(II)的化合物:

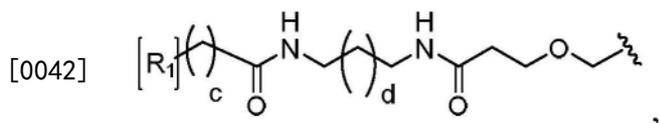


[0019] 其中



些实施方案中,a为3。在一些实施方案中,b为2或3。在一些实施方案中,e为1、2、3、4或5。

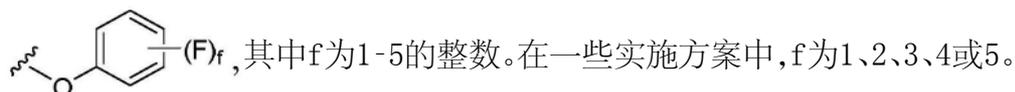
[0041] 在一些实施方案中, R_8 为:

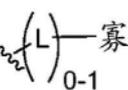


[0043] 其中亚烷基链含有以下数目的碳原子(c,d):(3,0)、(3,1)、(3,2)、(3,3)、(3,4)、(4,0)、(4,1)、(4,2)、(4,3)、(4,4)、(5,0)、(5,1)、(5,2)、(5,3)、(5,4)、(6,0)、(6,1)、(6,2)、(6,3)、(6,4)、(7,0)、(7,1)、(7,2)、(7,3)或(7,4)。

[0044] 在一些实施方案中,PG可包括醇保护基团,诸如甲硅烷基保护基团(例如,叔丁基二甲基甲硅烷基醚(TBMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)、三异丙基甲硅烷基醚(TIPS))或单甲氧基三苯甲基(MMTr)或4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr)或三甲苯基或任何其它合适的保护基团,诸如Wuts、Peter GM和Theodora W.Greene, Greene's protective groups in organic synthesis. John Wiley&Sons, 2006(有机合成中的Greene保护基团,约翰威立出版公司,2006年)中的那些。

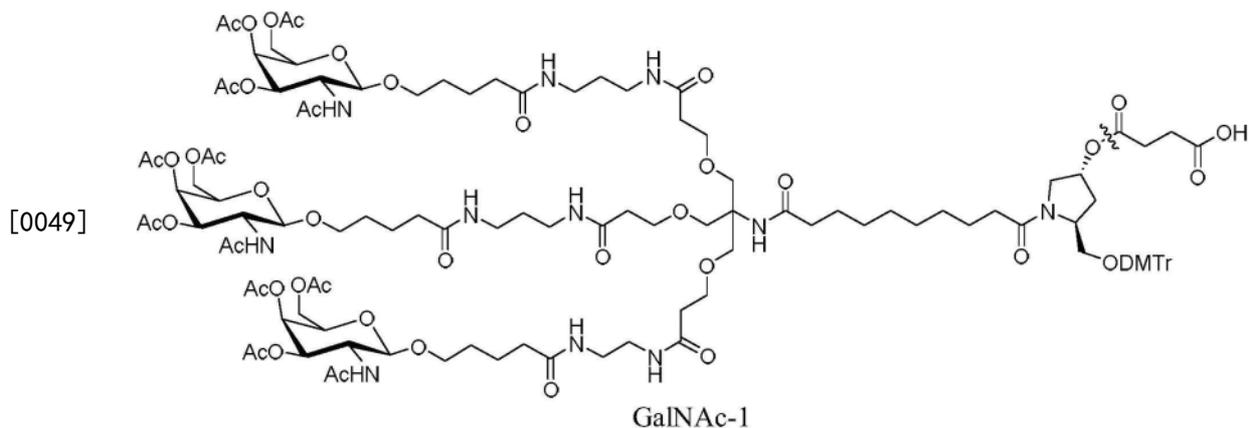
[0045] 在一些实施方案中,PG'为保护基团,例如在一些情况下,PG'可包括

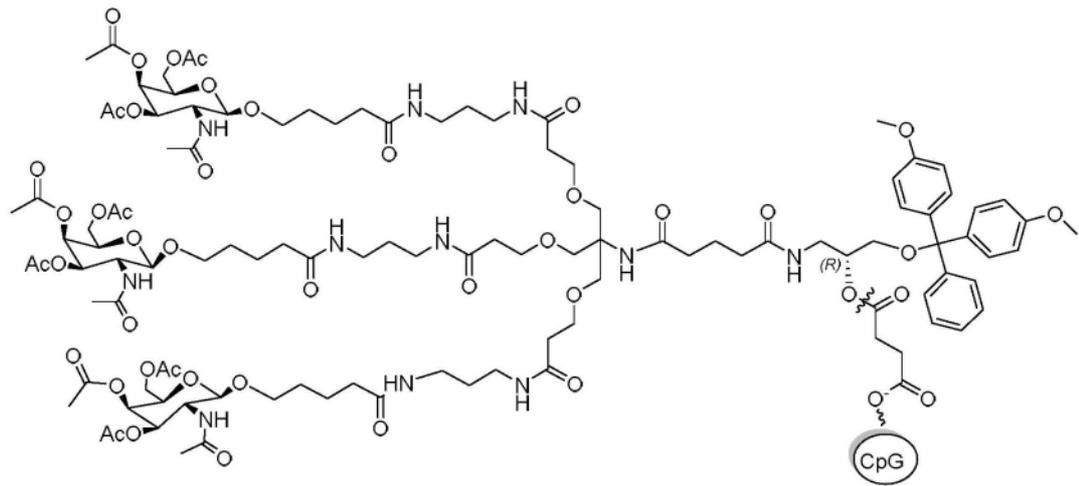


[0046] 在一些实施方案中, R_3 为 。寡核苷酸不受具体限制,并且可以是任何寡核苷酸,诸如反义寡核苷酸或siRNA寡核苷酸。在一些实施方案中,任选连接基是 $C_1-C_8-NH_2$ 连接基,例如 C_6-NH_2 连接基。

[0047] 在一些实施方案中, R_6 为通过连接基到寡核苷酸的键和/或氨基磷酸酯或磷酸二酯键。在一些实施方案中, R_6 包括氨基磷酸酯键。在一些实施方案中, R_6 包括磷酸二酯键。

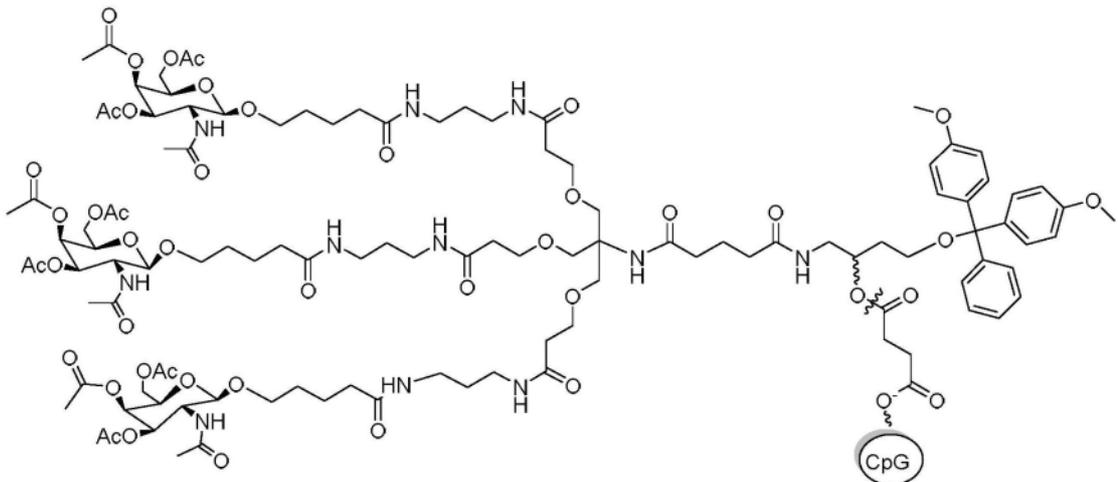
[0048] 在一些实施方案中,GalNAc部分是以下中的一者,如将理解的那样,波浪线表示与核苷酸或寡核苷酸偶合后的最终裂解点,并且因此化合物的剩余部分将不存在于最终GalNAc取代的寡核苷酸中。这在工作示例中示出:



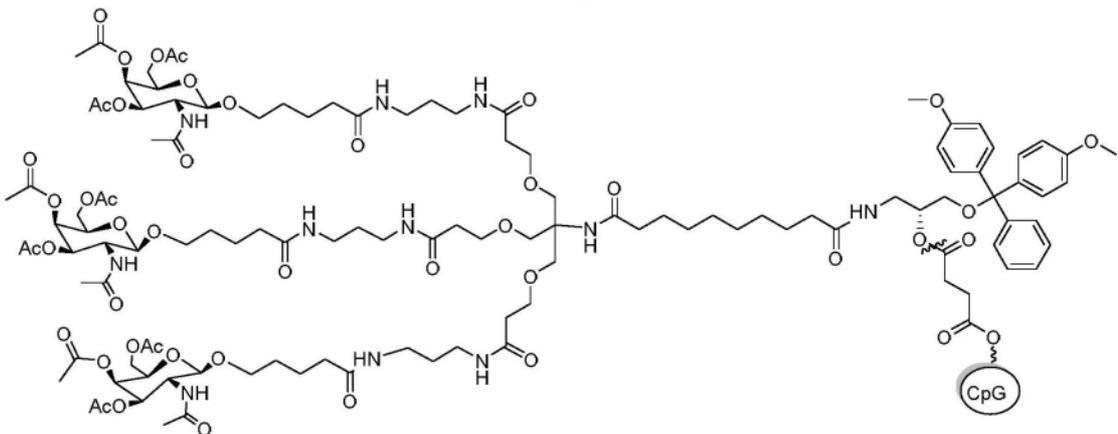


GalNAc-2-CPG

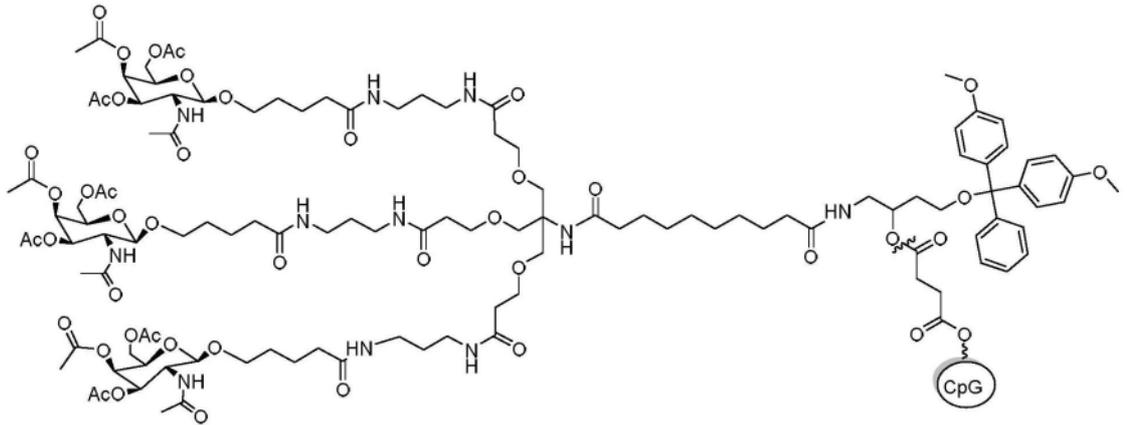
[0050]



GalNAc-3

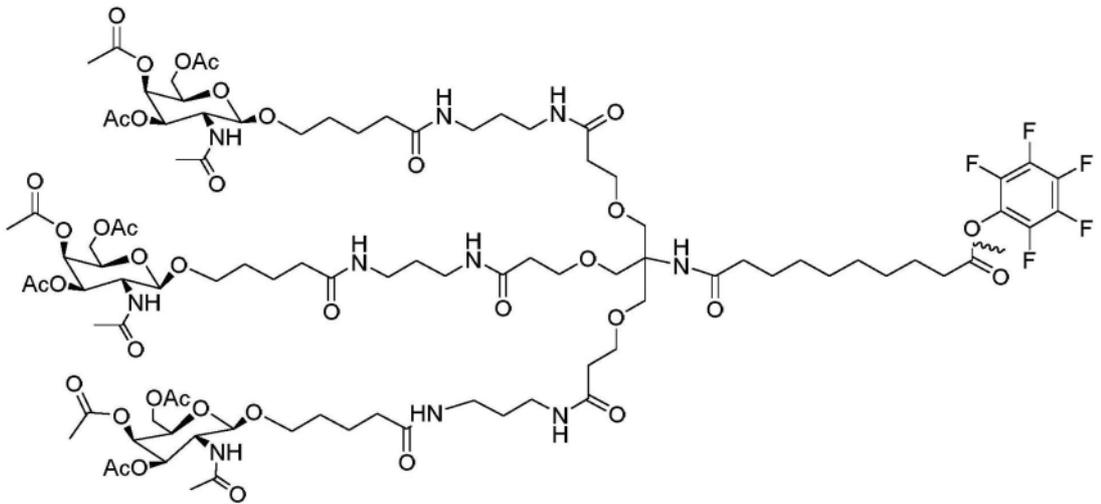


GalNAc-4

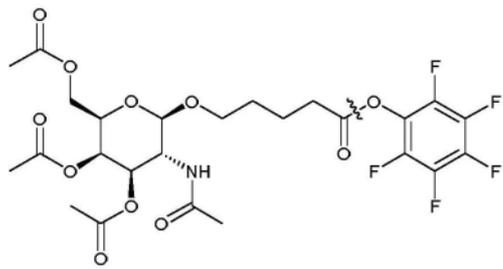


GalNAc-5

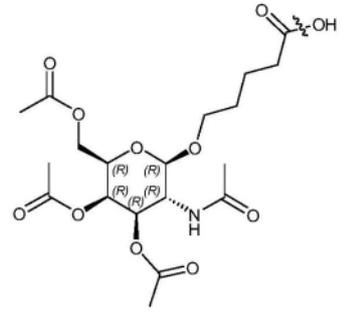
[0051]



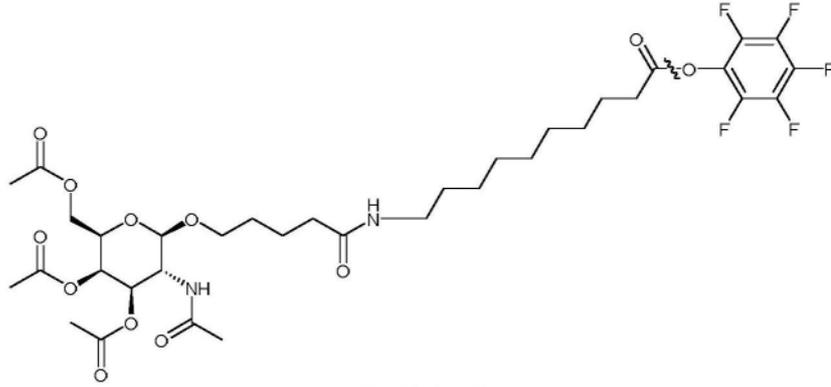
GalNAc-6



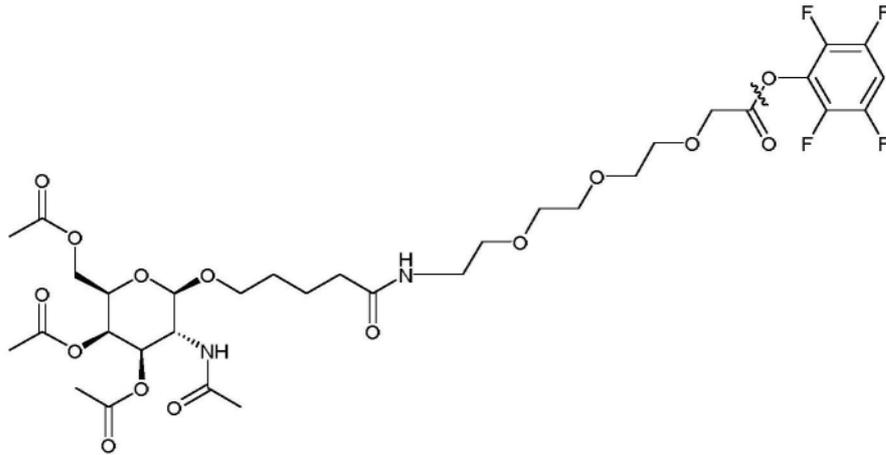
GalNAc-7



GalNAc-8

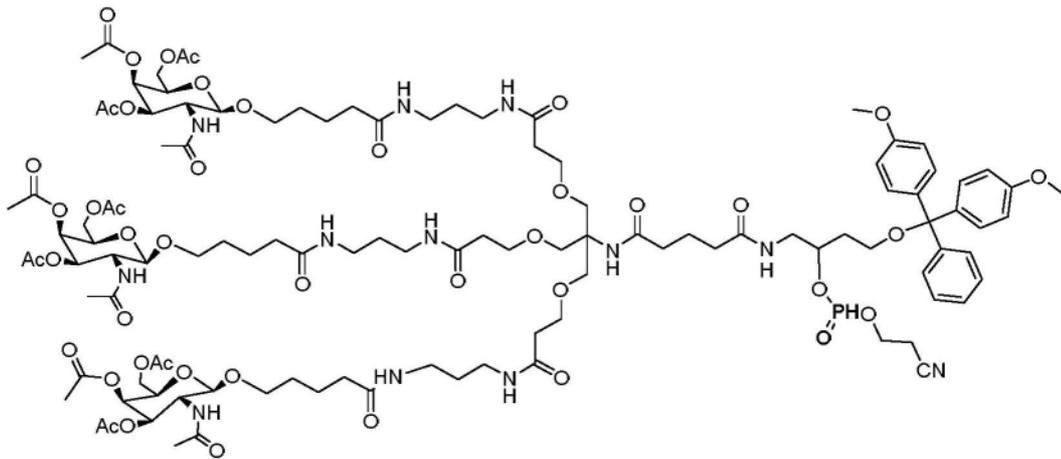


GalNAc-9

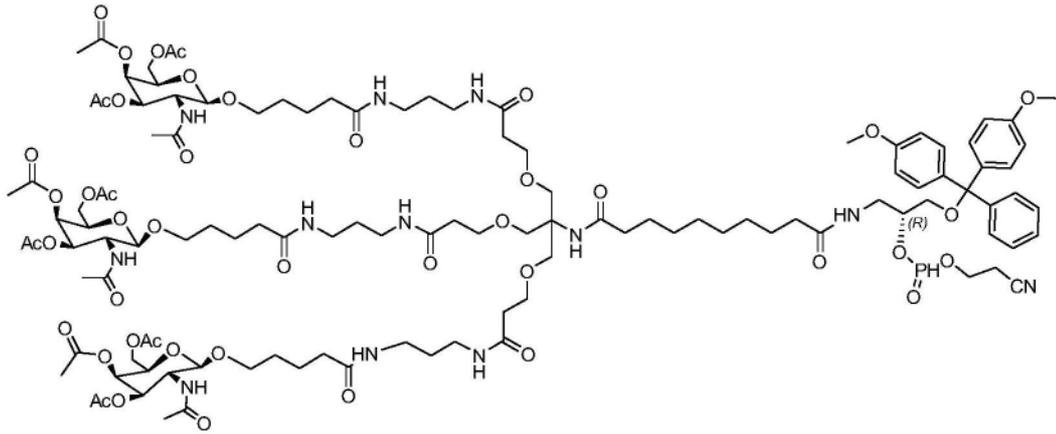


[0052]

GalNAc-10

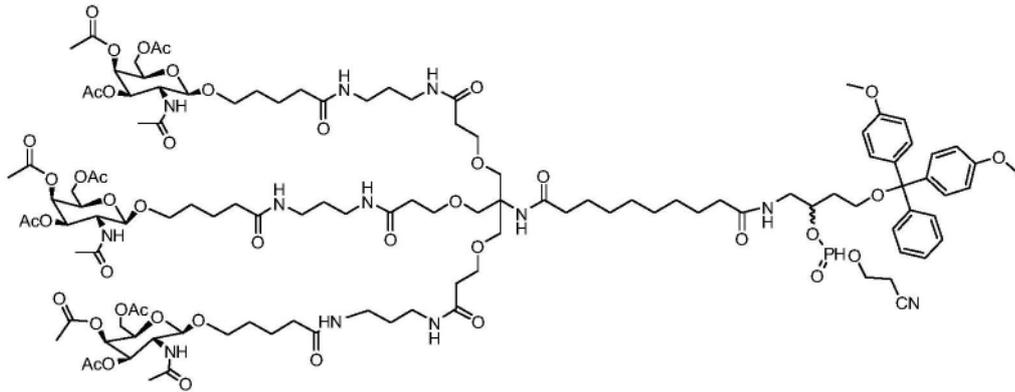


GalNAc-11



[0053]

GalNAc-12

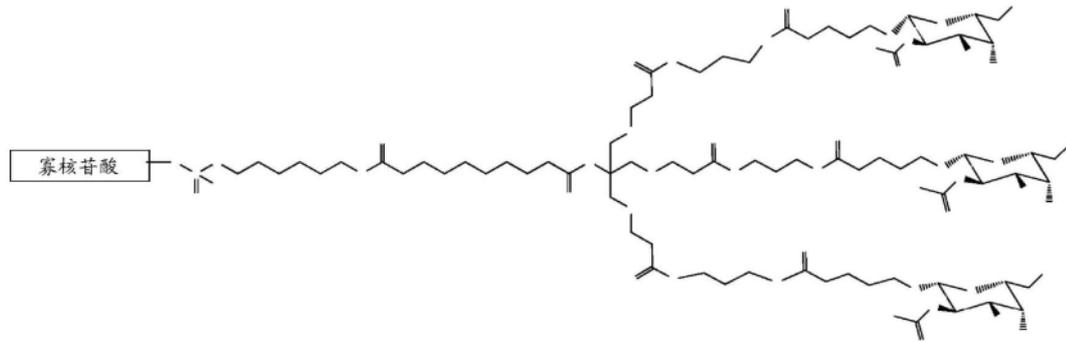


GalNAc-13

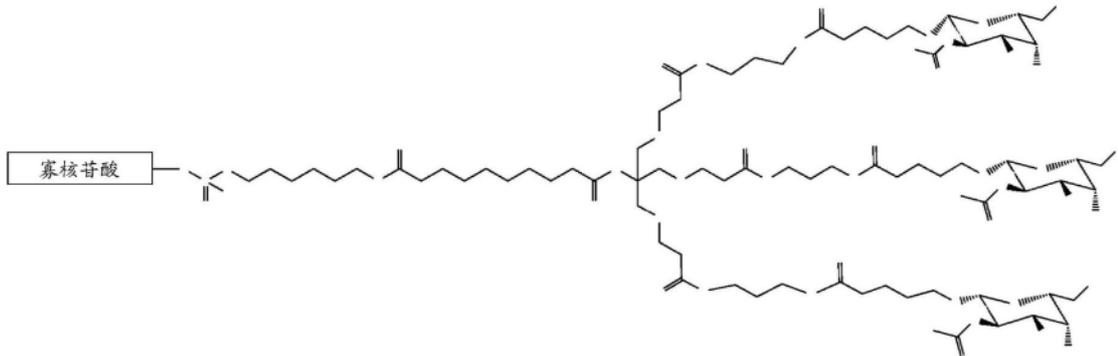
[0054] 在一些实施方案中, GalNAc部分包含琥珀酸酯部分或固体载体连接基。在一些实施方案中, GalNAc部分包含氟苯酯(例如, 五氟苯酯), 其中寡核苷酸的3'末端或5'末端可化学附接。在一些实施方案中, GalNAc部分包含H磷酸酯, 其中寡核苷酸的3'末端或5'末端可化学附接。关于这些部分的进一步详细说明可见于工作示例中。

[0055] 缀合GalNAc

[0056] 在实施方案中, 寡核苷酸通过连接基, 诸如氨基烷基连接基(例如, C₆-NH₂)连接至靶向部分。例如, GalNAc1-13或式(I)或(II)可通过该类型的连接基连接至寡核苷酸。例如, 在实施方案中, 寡核苷酸的3'端通过氨基磷酸酯或磷酸二酯键附接至进一步连接至GalNAc的C₆-氨基连接基, 诸如GalNAc-1-13或式(I)或(II), 如以下构建体中所列出:



[0057]



[0058] 包含本公开的GalNAc部分的寡核苷酸还可包括经修饰或未修饰的寡核苷酸序列，诸如WO 2018/053185中所述的那些，该文献全文以引用方式并入本文。

[0059] 包含本公开的GalNAc部分的示例性寡核苷酸包括示例中所列的那些。

[0060] 在本公开的一方面，本文所述的寡核苷酸序列在一端或两端由任选地通过连接基部分附接的本公开的GalNAc部分缀合或修饰。在一些实施方案中，寡核苷酸链包含通过任选的连接基在5'端和/或3'端处缀合的本公开的GalNAc部分。在一些实施方案中，本公开的GalNAc部分缀合在寡核苷酸链的3'端处。本公开的连接部分还可包括HEG连接基或C6氨基连接基。

[0061] 在一些实施方案中，GalNAc部分通过特定类型的细胞诸如肝细胞来增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取。

[0062] 在本发明的组合物和方法的某些实施方案中，配体是附接的一种或多种GalNAc衍生物，诸如分别通过二价或三价支化的连接基连接到寡核苷酸上的两种或三种GalNAc衍生物。

[0063] 组合物

[0064] 本公开还涵盖包含本公开的GalNAc取代的寡核苷酸的药物组合物。一个实施方案为包含本公开的寡核苷酸，以及药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物。

[0065] 在一些实施方案中，含有本公开的GalNAc取代的寡核苷酸的药物组合物配制用于通过肠胃外递送的全身性给药。非肠道给药包括静脉内的、动脉内的、皮下、腹膜内注射或肌肉注射或输液；另外皮下给药，例如，经由植入的装置。在一个优选的实施方案中，将含有本公开的寡核苷酸的药物组合物配制用于皮下 (SC) 或静脉内 (IV) 递送。用于非肠道给药的制剂可包括无菌水溶液，其也可含有缓冲剂、稀释剂和技术人员理解的其他药学上可接受的添加剂。对于静脉内使用，可控制溶质的总浓度以致使制备等渗的。

[0066] 含有本公开的GalNAc取代的寡核苷酸的该药物组合物可用于治疗疾病或病症,例如,与HBV基因表达或活性相关联的。

[0067] 使用方法

[0068] 本技术的一个方面包括用于治疗被诊断为患有、疑似患有HBV感染和/或HBV相关障碍或处于患有HBV感染和/或HBV相关障碍风险的受试者的方法。在治疗应用中,以足以治愈、或至少部分停止疾病的症状(包括该疾病发展中的其并发症和中间病理表型)的量,将包含本技术的GalNAc取代的寡聚核苷酸的组合物施用于疑似、或已经患有此类疾病的受试者(例如,在受试者的血清和/或肝脏中存在HBV抗原表面和包膜抗原(例如,HBsAg和/或HBeAg),或升高的HBV DNA或HBV病毒负载水平)。

[0069] 在一些实施方案中,本技术的GalNAc取代的寡核苷酸显示与以下区域或表A中的HBV RNA转录物中的至少一者的亲和力。

[0070] 表A

区域	靶向 HBV RNA 转录物	受影响的 HBV 蛋白	
[0071]	Pol/S	Pre-Core、Pg、Pre-S1、Pre-S2	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg
	Pol	Pre-Core、Pg、Pre-S1、	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中
[0072]		Pre-S2	HBsAg、小 HBsAg
	Pol/X	Pre-Core、Pg、Pre-S1、Pre-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg
	DR1	Pre-Core、Pg、Pre-S1、Pre-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg
	DR2	Pre-Core、Pg、Pre-S1、Pre-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg
	预聚物 A	Pre-Core、Pg、Pre-S1、Pre-S2、X	HBeAg、HBcAg、聚合酶、大 HBsAg、中 HBsAg、小 HBsAg、HBxAg

[0073] 患有HBV感染和/或HBV相关障碍的受试者可通过本领域已知的诊断或预后测定中的任一种或组合来鉴定。例如,HBV感染和/或HBV相关病症的典型症状包括但不限于血清和/或肝脏HBV抗原(例如HBsAg和/或HBeAg)的存在,升高的ALT、升高的AST、不存在或低含量的抗-HBV抗体、肝损伤、肝硬化、丁型肝炎、急性乙型肝炎、急性爆发性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝纤维化、晚期肝疾病、肝细胞癌、血清病样综合征、厌食症、恶心、呕吐、低烧、肌肉痛、易疲劳、味觉紊乱和嗅觉紊乱(厌恶食物和香烟)右上腹部和上腹部痛(间歇性,轻微至中度)、肝性脑病、嗜睡症、睡眠模式紊乱、精神错乱、昏迷、腹水、消化道出血、凝血病、黄疸、肝肿大(轻度增大、软肝)、脾肿大、手掌红斑、蜘蛛状痣、肌肉萎缩、蜘蛛痣、血管炎、静脉曲张出血、外周性水肿、男性乳腺增生、睾丸萎缩、腹部侧支静脉(脐周静脉曲张)、高水平的丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)(在1000-2000IU/mL范围内)、ALT水平高于AST水平、升高的 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)和/或碱性磷酸酶(ALP)水平、降低的白蛋白水平、升高的血清铁水平、白血球减少症(即,粒细胞减少)、淋巴球增多、增加的红细胞沉降率(ESR)、缩

短的红血球存活、溶血反应、血小板减少症、国际标准化比率的延长 (INR)、血清HBVDNA的存在、转氨酶的升高 (<5乘以所述ULN)、增加的胆红素水平、延长的前凝血酶时间 (PT)、血球蛋白过多、组织-非特异性抗体的存在, 诸如抗-平滑肌抗体 (ASMAs) 或抗细胞核抗体 (ANAs)、组织-特异性抗体的存在, 诸如对抗甲状腺的抗体、升高的类风湿因子的水平 (RF)、高胆红素血症、低血小板和白血球计数、AST水平高于ALT水平、伴有退行性变的小叶炎症和再生性肝细胞改变以及显著地小叶中心坏死。

[0074] 在一些实施方案中, 用本技术的寡核苷酸组合物治疗的受试者将表现出以下病症或症状中一种或多种的改善或消除: 存在血清和/或肝HBV抗原 (例如, HBsAg和/或HBeAg)、不存在抗HBV抗体或其水平偏低、肝损伤、肝硬化、丁型肝炎、急性乙型肝炎、急性暴发性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、肝纤维化、终末期肝病、肝细胞癌、血清病样综合征、厌食症、恶心、呕吐、低烧、肌肉痛、易疲劳、味觉紊乱和嗅觉紊乱 (厌恶食物和香烟)、右上腹部和上腹部痛 (间歇性, 轻微至中度)、肝性脑病、嗜睡症、睡眠模式紊乱、精神错乱、昏迷、腹水、消化道出血、凝血病、黄疸、肝肿大 (轻度增大、软肝)、脾肿大、手掌红斑、蜘蛛状痣、肌肉萎缩、蜘蛛痣、血管炎、静脉曲张出血、外周性水肿、男性乳房发育、睾丸萎缩、腹部侧支静脉 (脐周静脉曲张)、ALT水平高于AST水平、白血球减少症 (即, 粒细胞减少)、降低的白蛋白水平、升高的血清铁水平、淋巴球增多、增加的红细胞沉降率 (ESR)、缩短的红血球存活期、溶血反应、血小板减少症、国际标准化比率 (INR) 延长、存在血清HBVDNA、延长的前凝血酶时间 (PT)、血球蛋白过多、存在组织非特异性抗体诸如抗平滑肌抗体 (ASMA) 或抗细胞核抗体 (ANA)、存在组织特异性抗体诸如对抗甲状腺的抗体、高胆红素血症、低血小板和白血球计数、AST水平高于ALT水平、伴有退行性和再生性肝细胞改变的小叶炎症、以及主要在小叶中心的坏死。

[0075] 在一些实施方案中, 与患有HBV感染和/或HBV相关障碍的未治疗受试者相比, 用本技术的寡核苷酸组合物治疗的受试者将表现出一种或多种生物标记物的表达水平降低, 所述生物标记物选自: 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP)、胆红素和类风湿因子 (RF)。

[0076] 本公开提供了用于治疗被诊断为患有或疑似患有HBV感染和/或HBV相关障碍的受试者的方法, 所述方法包括向受试者施用有效量的本技术的寡核苷酸组合物。

[0077] 本公开的寡核苷酸和组合物可用于反义治疗。例如, 寡核苷酸可含有与已知病毒DNA或RNA序列, 例如在HBV中的靶核酸序列互补或杂交的核碱基序列。

[0078] 一些实施方案包括通过使靶核酸与包含本公开的寡核苷酸的反义化合物接触来调节靶的表达的方法。在一些实施方案中, 靶核酸为在细胞中, 例如, 在动物, 诸如人类中。

[0079] 一些实施方案包括在动物中抑制靶RNA的表达的方法, 包括向动物施用包含本公开的寡核苷酸的反义化合物。寡核苷酸可与靶RNA的一部分互补或杂交。

[0080] 一些实施方案包括用于减少感染病毒的受试者中的病毒的病毒负载的方法, 该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物, 从而降低受试者中的病毒的病毒负载。寡核苷酸可与病毒中的靶RNA的一部分互补或杂交。

[0081] 一些实施方案包括抑制细胞或受试者中的病毒基因表达的方法, 该方法包括使细胞与本公开的寡核苷酸或组合物接触, 或者向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物。寡核苷酸可与病毒中的靶RNA的一部分互补或杂交。

[0082] 其它实施方案包括用于减少感染病毒的受试者中的病毒抗原的水平的方法, 该方

法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物,从而降低受试者中的病毒抗原的水平。寡核苷酸可与病毒中的靶RNA的一部分互补或杂交。

[0083] 本公开的寡核苷酸和组合物可用于例如抑制或减少乙型肝炎病毒 (HBV) 基因表达或抑制HBV病毒的复制或者用于治疗患有HBV的受试者或用于降低感染HBV的受试者中乙型肝炎病毒 (HBV) 的病毒负载。在实施方案中,本发明所公开的嵌合寡核苷酸被用于在靶基因处诱导RNA酶H的活性。

[0084] 本公开的寡核苷酸和组合物可用于,例如,争夺对HCV RNA的微-RNA结合位点,从而抑制复制。

[0085] 本公开还涉及稳定用于递送至受试者的寡核苷酸的方法。在本文中,寡核苷酸的稳定的特征在于[定量]增加寡核苷酸的熔点或温度 T_m 。

[0086] 本发明所公开的寡核苷酸构建体可单独施用或与对于靶向疾病的一种或多种附加治疗组合施用。本发明所公开的寡核苷酸构建体可单独施用或与对于靶向疾病的一种或多种HBV感染组合施用。应当理解,在组合疗法中,用于HBV感染的寡核苷酸构建体和一种或多种附加治疗可同时在相同或分开的组合物中施用,或在相同的时间或顺序地施用。

[0087] 在一些实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV复制抑制剂或免疫调节剂组合给药,或在将抗-HBV寡核苷酸试剂与HBV复制抑制剂和免疫调节剂两者组合的方案中施用。在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV感染的标准护理治疗组合施用。对于HBV感染的标准护理治疗可包括病毒聚合酶的抑制剂,诸如核苷酸/核苷酸类似物(例如,拉米夫定、替比夫定、恩替卡韦、阿德福韦、泰诺福韦和克拉夫定、泰诺福韦艾拉酚胺(TAF)、CMX157和AGX-1009)和干扰素(例如,Peg-IFN-2a和IFN-a-2b干扰素 λ)。在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体在同时(共同施用)或顺序给药后与一种或多种寡核苷酸联合施用。寡核苷酸可包括siRNA,诸如ALN-HBV、ARB-1467、ARC-520和ARC-521,反义寡核苷酸,诸如RG6004(LNAHBV)、Ionis-HBV_{Rx}和Ionis-HBV-L_{Rx}、miRNA模拟物抑制剂、核酸配体、空间阻断剂、saRNA、shRNA、免疫调节和/或HBsAg释放抑制,诸如REP2139和REP2165寡核苷酸。在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体与一种或多种抗病毒剂,诸如病毒复制抑制剂联合施用。在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV衣壳抑制剂联合施用。HBV衣壳抑制剂可包括NVR 3-778、AB-423、GLS-4、Bayer41-4109、HAP-1和AT-1。在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体与一种或多种免疫调节剂,诸如TLR激动剂联合施用。TLR激动剂可包括GS-9620、ARB-1598、ANA975、RG7795(ANA773)、MEDI9197、PF-3512676和IMO-2055。在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体与HBV疫苗联合施用。HBV疫苗可包括Hepplisrav、ABX203和INO-1800。在实施方案中,本发明所公开的寡核苷酸构建体联合施用。

[0088] 一些实施方案包括抑制细胞或受试者中的HBV基因表达,包括使细胞与本公开的寡核苷酸或组合物接触,或者向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物。

[0089] 一些实施方案包括治疗与HBV基因的表达或活性相关联的疾病或障碍,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物。

[0090] 一些实施方案包括用于减少感染乙型肝炎病毒 (HBV) 的受试者中的HBV的病毒负载的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物,

从而降低受试者中的HBV的病毒负载。一些实施方案还提供降低感染丁型肝炎病毒 (HDV) 的受试者中HDV的病毒负载的方法。

[0091] 其它实施方案包括用于减少感染乙型肝炎病毒 (HBV) 的受试者中的HBV抗原的水平的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的寡核苷酸或组合物,从而降低受试者中的HBV抗原的水平。一些实施方案还提供降低感染丁型肝炎病毒 (HDV) 的受试者中HDV抗原的水平的方法。在一些实施方案中,HBV抗原为HBsAg或HBeAg。

[0092] 在一个实施方案中,将本公开的靶向HBV的寡核苷酸或组合物施用于患有HBV感染或HBV和HDV感染两者和/或HBV相关疾病的受试者,使得在将本公开的寡核苷酸或组合物施用于受试者之后,例如受试者的细胞、组织、血液或其它组织或流体中的一种或多种HBV基因、HBV ccc DNA水平、HBV抗原水平、HBV病毒负载水平、ALT和/或AST的表达降低至少约25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、62%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或至少约99%或更多,或介于这些数字中的两个之间的值。在一些实施方案中,HBV抗原水平降低了先前列举的量。在一些实施方案中,抗原为HBsAg或HBeAg。在一些实施方案中,HBV病毒载量水平降低了先前列举的量。

[0093] 在一个实施方案中,将本公开的靶向HBV的寡核苷酸或组合物施用于患有HBV感染或HBV和HDV感染两者和/或HBV相关疾病的受试者,使得当将本公开的寡核苷酸或组合物施用于受试者时,例如受试者的细胞、组织、血液或其它组织或流体中的抗HBV抗体的水平增加至少约25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、62%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%,或至少约99%或更多,或介于这些数字中的两个之间的值。

[0094] 根据本公开的方法和使用的本公开的寡核苷酸或组合物的施用可导致在被HBV感染或HBV和HDV感染两者,和/或HBV-相关疾病的患者中的此类疾病或病症的严重程度、迹象、症状和/或标记物的降低。在此上下文中,所谓“减少”意指此类水平的统计上的显著降低。减少可为例如至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或约100%,或介于两个这些数值之间的值。

[0095] 本公开的寡核苷酸或组合物的量可由医疗专业人员确定。产品的日剂量可以在每个成人每日0.001-1,000mg的宽范围内变化,或在其中的任何范围内变化。对于口服给药,组合物优选地以含有0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、150、200、250和500毫克的活性成分的片剂形式提供,用于根据待治疗患者的症状来调节剂量。有效量的药物通常是以每天每千克体重约0.01mg至约100mg或其中的任何范围的剂量水平提供。优选地,该范围是每天每千克体重约0.01至约50.0mg或其中的任何范围。更优选地,该范围是每天每千克体重约0.01至约10.0mg或其中的任何范围。更优选地,该范围是每天

每千克体重约0.01至约1.0mg或其中的任何范围。可以将寡核苷酸按每天1至4次的方案施用。例如,本公开的寡核苷酸可以约0.1mg/kg至约100mg/kg的一个或多个剂量施用。例如,本公开所公开的寡核苷酸可以约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、34.5、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或约100mg/kg的剂量施用。对所列举值的中间值和范围也旨在成为本公开的一部分。这些值可适用于静脉内输注和/或皮下递送。本文所述的其他递送形式也可以这些剂量施用。该剂量可因患者的需求、正在治疗的病症的严重性和所采用的寡核苷酸而异。可采用每日给药或周期后给药的使用方式。

[0096] 本公开的寡核苷酸可在一段时间内通过静脉内输注施用,诸如在5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或约25分钟的周期内施用。可例如定期重复施用,诸如每周、每两周(即每两个星期)持续一个月,两个月、三个月、四个月或更长时间。在初始治疗方案之后,可以较不频繁的规律施用所述治疗。例如,每周或每两周施用持续三个月后,可每月重复施用一次持续六个月或一年或更长时间。

[0097] 本公开的寡核苷酸也可通过皮下递送来施用。可例如定期重复施用,诸如每周、每两周(即每两个星期)持续一个月,两个月、三个月、四个月或更长时间。在初始治疗方案之后,可以较不频繁的规律施用所述治疗。例如,每周或每两周施用持续三个月后,可每月重复施用一次持续六个月或一年或更长时间。

[0098] 可例如通过测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减少、生活质量,维持治疗效果所需的药物剂量、疾病标记物的水平或适于治疗或靶向预防的给定疾病的任何其他可测量参数来评估治疗或预防疾病的功效。通过测量此类参数中的任一个或参数的任意组合,监测治疗或预防的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。例如,可通过定期监测病毒载量和转氨酶水平来评估CHB的治疗功效。比较较后读数与初始读数提供治疗是否有效的指示。

[0099] 定义

[0100] 应当了解,本文所用的术语只是为了描述具体实施方案之目的,并非旨在限制本发明的范畴。除非另外指明,否则下列定义将适用。

[0101] 如本文所用,关于多核苷酸(即核苷酸序列,诸如寡核苷酸或靶核酸)的术语“互补的”或“互补性”是指碱基配对规则。如本文所用,核酸序列的互补序列是指当与核酸序列比对使得一个序列的5'末端与另一个序列的3'端配对时,处于“反平行结合”的寡核苷酸。例如,序列“5'-A-G-T-3'”与序列“3'-T-C-A-5'”互补。在天然存在的核酸中不常见的某些碱基可包括在本文所述的核酸中。这些包括例如肌苷、7-脱氮鸟嘌呤、锁核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。互补性不必是完美的;稳定的双链可含有错配的碱基对、简并的或不匹配的碱基。核

酸技术领域的技术人员可鉴于许多变量,包括例如,寡核苷酸的长度、碱基组成和寡核苷酸序列、离子强度和不匹配碱基对的发生率,以经验的方式确定双链的稳定性。互补序列也可以是与DNA序列或其互补序列互补的RNA序列,并且也可为cDNA。

[0102] 如本文所用,术语“杂交”是指其中两条基本上互补的核酸链(在至少14至25个核苷酸的一段内至少约65%互补,至少约75%,或至少约90%互补)在适当严格条件下,通过在介于互补碱基对之间形成的氢键,彼此退火以形成双链或异源双链的方法。杂交通常并且优选地用探针长度核酸分子进行,优选地长度为15-100个核苷酸,更优选地长度为18-50个核苷酸。核酸杂交技术是本领域所熟知的。参见例如Sambrook等人的1989年,《分子克隆:实验室手册》,第二版,冷泉港出版社,纽约州,普莱恩维尤(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.*)。杂交和杂交的强度(即,核酸之间缔合的强度)受诸如核酸之间的互补性程度,所涉及的条件的严格性以及所形成的杂交体的热解链温度(T_m)因素的影响。本领域的技术人员理解如何估计和调节杂交条件的严格性,使得具有至少所期望的互补性水平的序列将稳定杂交,而具有较低互补性的那些不会稳定杂交。关于杂交条件和参数的示例,参见例如Sambrook等人的1989年,《分子克隆:实验室手册》,第二版,冷泉港出版社,纽约州,普莱恩维尤(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.*); Ausubel, F.M.等人的1994,《分子生物学实验室指南》,约翰·威利父子公司,新泽西州,斯考克斯市(1994, *Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Secaucus, N.J.*)。在一些实施方案中,特异性杂交在严格杂交条件下发生。对靶核酸具有特异性的寡核苷酸或多核苷酸(例如探针或引物)将在适宜的条件下与靶核酸“杂交”。

[0103] 如本文所用,术语“严格杂交条件”是指至少与以下一样严格的杂交条件:在50%甲酰胺、5xSSC、50mM NaH_2PO_4 、pH6.8、0.5% SDS、0.1mg/mL超声处理过的鲑鱼精DNA和5x Denhart's溶液,在42°C下杂交过夜;用2x SSC、0.1% SDS在45°C下洗涤;并用0.2x SSC、0.1% SDS在45°C下洗涤。在另一个实施方案中,严格杂交条件不应允许在涵盖20个连续核苷酸的一段上相差超过两个碱基的两个核酸的杂交。

[0104] 如本文所用,术语“基本上互补的”意指两个序列在严格杂交条件下杂交。技术人员将会理解,基本上互补的序列不需要沿着它们的整个长度杂交。具体地讲,基本上互补的序列可包含不与靶序列杂交的连续碱基序列,其定位在严格杂交条件下与靶序列杂交的连续碱基序列的3'或5'。

[0105] “药学上可接受的”是指非生物学或其他方面不可取的材料,即该材料可以掺入给予患者的药物组合物中,而不会引起任何不良的生物效应或以有害的方式与含有该材料的组合物中的任何其他成分相互作用。当术语“药学上可接受的”用于指药用载体或赋形剂时,其意味着该载体或赋形剂符合所需的毒理学和制造检验标准,或意味着它包括在美国和药物管理局编制的《非活性成分指南》(*Inactive Ingredient Guide*)内。

[0106] 寡核苷酸的“构建体”可以指本公开的寡核苷酸,以及例如(1)共轭部分,诸如本文所述的那些(诸如靶向部分)或(2)经修饰/未修饰的核苷酸的结构域,诸如在一些嵌合寡核苷酸中。

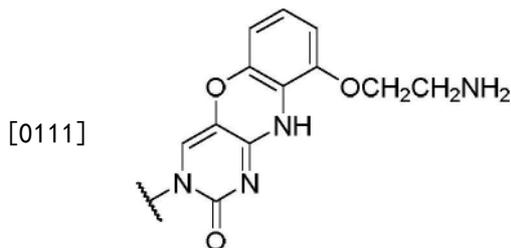
[0107] “嵌合寡核苷酸”是指具有超过一个上结构域的寡核苷酸,例如,如由式(VI)和

(VII) 所例示的。嵌合寡核苷酸可包括附加组分,例如配体靶向基团或药效团或附加的核苷酸,连接基等。

[0108] “经修饰核苷”是指独立地具有经修饰糖部分和/或经修饰核碱基的核苷。应当理解,核苷可通过亚基间的键连接,诸如磷酸二酯亚基间的键,硫代磷酸酯亚基间的键,氨基磷酸酯亚基间的键和硫代磷酸酰胺酯亚基间的键,“经修饰核苷”可以指一起的核苷和亚基间的键。

[0109] “未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。“经修饰核碱基”包括其它合成和天然的核碱基,诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(具体地5-溴)、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。另外的经修饰核碱基包括三环嘧啶诸如吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G形钳诸如取代的吩噻嗪胞苷(例如,9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、咪唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]咪唑-2-酮)、吡啶并咪唑胞苷(H-吡啶并[3,2,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。经修饰核碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环取代的那些,例如,7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。

[0110] 在一些实施方案中,经修饰核碱基选自5-甲基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、5-甲基尿嘧啶和g形钳。在一些实施方案中,g形钳为



[0112] “配体靶向基团”是指通过受体结合促进寡核苷酸向HBV感染的肝细胞递送的部分。这些基团包括在细胞表面分别靶向细胞表面受体ASGPR和LDL受体的“受体靶向配体”,诸如GalNAc。在细胞表面上靶向这些受体的其他受体靶向配体也在该术语的范围内。

[0113] “药效团”是指在HBV/HDV或HBV感染的细胞内与HBV DNA或RNA分子相互作用并触发抗病毒应答的寡核苷酸药物序列。

[0114] “构象受限的核苷”是指具有桥连或双环糖结构的核苷,其中核苷的构象可被固定在特定构型中。例如,构象受限的核苷包括具有固定的C_{3'}-内切糖折叠的那些。示例性实施方案包括桥联的核酸(BNAs),例如,2',4'-BNA核苷,诸如,-L-亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2') LNA、β-D-亚甲基氧基(4'-CH₂-O-2') LNA、乙烯氧基(4'-(CH₂)₂-O-2') ENA、2',4'-BNA^{NC}[NH]、

2', 4' -BNA^{NC}[NMe]、2', 4' -BNA^{NC}[NBn]、氨基氧基(4'-CH₂-O-N(R)-2')BNA和羟亚胺基(4'-CH₂-N(R)-O-2')BNA。其他示例性结构包括但不限于,在介于糖的4'和2'位置之间具有至少一个桥联的寡核苷酸,其中每个桥联独立地包含1或2至4个独立地选自-[C(R₁)(R₂)]_n-、-C(R₁)-C(R₂)-、-C(R₁)-N-、-C(=NR₁)-、-C(=O)-、-C(=S)-、-O-、-Si(R₁)₂-、-S(=O)_x-和-N(R₁)-的连接基;其中:x为0、1或2;n为1、2、3或4;每个R₁和R₂独立地为H、保护基团、羟基、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、杂环基、取代的杂环基、杂芳基、取代的杂芳基、C₅-C₇脂环族基团、取代的C₅-C₇脂环族基团、卤素、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、CN、磺酰基(S(=O)₂-J₁)或亚磺酰基(S(=O)-J₁);并且每个J₁和J₂独立地为H、C₁-C₁₂烷基、取代的C₁-C₁₂烷基、C₂-C₁₂烯基、取代的C₂-C₁₂烯基、C₂-C₁₂炔基、取代的C₂-C₁₂炔基、C₅-C₂₀芳基、取代的C₅-C₂₀芳基、酰基(C(=O)-H)、取代的酰基、杂环基、取代的杂环基、C₁-C₁₂氨基烷基、取代的C₁-C₁₂氨基烷基或保护基团。某些BNA已在专利文献以及科学文献中进行了制备和公开(参见例如:发布的美国专利No. 7, 053, 207; No. 6, 268, 490; No. 6, 770, 748; No. 6, 794, 499; No. 7, 034, 133; No. 6, 525, 191; No. 7, 696, 345; No. 7, 569, 575; No. 7, 314, 923; No. 7, 217, 805; 和No. 7, 084, 125, 这些专利全文以引用方式并入本文。“构象受限的核苷酸”是指通过亚基间的键连接的构象受限的核苷。

[0115] 在一些实施方案中,构象受限的核苷选自任选取代的LNA或任选取代的ENA。该任选取代的LNA或ENA可被烷基部分取代,例如在-CH₂-部分中的一个上的甲基或乙基。

[0116] “抑制表达”是指表达或活性的降低或阻断,并且不一定表示完全消除表达或活性。

[0117] “禁止病毒的复制”是指减少或阻断病毒的复制,并且不一定指示完全消除病毒的复制。

[0118] “受试者”是指哺乳动物并且包括人和非人类哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是人,诸如成年人。

[0119] “治疗(Treating)”或“治疗(treatment)”受试者的疾病是指(1)预防疾病在易感或尚未表现出疾病症状的受试者中发生;(2)抑制疾病或阻止其发展;或(3)改善或导致疾病的复原。

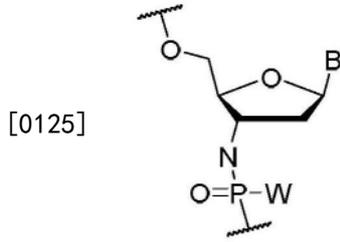
[0120] “治疗有效量”是指向受试者提供治疗益处的药物制剂的量。

[0121] “药学上可接受的盐”意指本公开的化合物的生理上和药学上可接受的盐,即保留亲本寡核苷酸/化合物的所需生物活性并且不另外赋予不期望的毒理作用的盐。

[0122] 以下缩写用于该公开中。2'-H(脱氧核糖)核苷用对应于核碱基的大写字母表示,例如A、C、G,并且T。2'-OH(核糖)核苷用小写r和对应于核碱基的大写字母,例如rA、rC、rG和rU来表示。2'-O-Me核苷用小写m和对应于核碱基的大写字母,例如mA、mC、mG和mU来表示。2'-MOE核苷用小写的“moe”和对应于核碱基的大写字母,例如moeA、moeC、oeG和moeU来表示。2'-ribo-F核苷用小写“f”和对应于核碱基的大写字母,例如fA、fC、fG和fU来表示。2'-阿拉伯糖-F核苷用小写的“af”和对应于核碱基的大写字母,例如afA、afC、afG和afU来表示。mA*为3'-氨基-2'-OMe-2,6-二氨基嘌呤。A*为3'-氨基-2'-脱氧-2,6-二氨基嘌呤。fA*为3'-氨基-2'-F-2,6-二氨基嘌呤。LNA核苷用“L”和对应于核碱基的大写字母,例如LA、LC、LG、LT来表示。

[0123] 对于核苷酸的主链或亚基间的键、磷酸二酯亚基间的键被称为“PO”，或通常不包括在序列细节中；硫代磷酸酯亚基间的键缩写为小写的“ps”；氨基磷酸酯亚基间的键缩写为小写的“np”；并且硫代氨基磷酸酯亚基间的键缩写为小写的“nps”。

[0124] N3' →P5' 是指具有亚基间的键的经修饰的核苷酸，其中3' 部分含有N(例如，NH)并且通过P连接。例如，以下结构具有N3' →P5' 键：



[0126] 值得注意的是，除非上下文清楚决定不是这样，否则本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个”和“所述”包括复数指代。还应当注意，权利要求书可制定为排除任何任选的元素。同样地，这一声明旨在当结合权利要求元素的表述“单独地”、“唯一地”等使用此类专用术语时，或使用“负”限制时充当先行基础。

[0127] 术语“约”应被本领域普通技术人员理解并根据使用其的上下文中有某种程度的变化。如果在给定的使用术语的上下文中，该术语的用途对于本领域的普通技术人员而言不清楚，则“约”将意指最多加上或减去特殊项的10%。本文所呈现的具有数值的某些范围，在前面有术语“约”。本文使用术语“约”用于为其在之前的精确数字提供文字支持，以及接近或近似该术语先于的数字的数字。在确定数字是否接近或近似具体列举的数字时，接近或近似未列举的数字可为数字，在呈现该数字的上下文中，该数字提供了具体列举的数量基本等同。

[0128] “连接基部分”可包括例如C₂-C₁₀烷基部分，或具有1-5个氧原子的C₃-C₁₀烷基氧化物部分。该连接基还可在连接基的末端或内部连接基处包括一个或多个胺部分，例如在C₂-C₁₀烷基部分或C₃-C₁₀烷基氧化物部分的内部。

[0129] 本领域的普通技术人员将会将“固体载体连接基”理解为将化合物连接到固体载体的化学部分，诸如树脂。固体载体连接基必须能够在合成结束时在特定条件下容易地裂解。常用的连接基为琥珀酰连接基，其可容易地通过用浓缩氢氧化铵处理而裂解。术语固体载体连接基包括其中化学物质附接到固体载体的实施方案，以及其中固体载体连接基不包括固体载体的实施方案。

[0130] 还应当理解，本文所述的疾病或病症的各种治疗或预防模式旨在意味着“大量”，其包括总的、而且少于总的治疗或预防，并且其中实现了一些生物学或医学相关的结果。治疗可为对于慢性疾病的连续长期治疗或用于治疗急性病症的一个或很少时间的施用。

[0131] 在提供数值范围的情况下，应当理解，除非上下文另外清楚地指明，否则介于那个范围上限和下限之间的，以及在那个规定的范围内的任何其他规定或介于中间的值的每一个介于中间的值，直至下限单位的十分之一，涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地被包括在较小范围内，并且也被涵盖在本发明内，但受到规定范围内的任何具体排除的限定的限制。在所述范围包括极限值之一或极限值两者的情况下，排除这些包括的极限值中的任一者或两者的范围也包括在本发明中。

[0132] 本公开不限于所述的具体实施例,因为此类实施例可以有差别。另外应当了解,本文所用的术语只是为了描述具体实施例的目的,并不旨在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书来限定。

[0133] 如本领域技术人员在阅读本公开之后所显而易见的,本文所述和所示的单独实施方案中的每个具有分立部件和特征,在不背离本发明的范围或精神的前提下,所述部件和特征可容易地与其他若干实施方案中任意方面的特征分离或组合。可按所述事件的顺序或按任何其他在逻辑上可能的顺序来执行任何所述方法。

[0134] 本说明书中引用的所有出版物和专利均以引用方式并入本文,如同每个单独的出版物或专利均明确且个别地表明以引用方式并入,并且以引用方式并入本文以公开并描述与所引用的出版物相关的所述方法和/或材料。对任何出版物的引用都是用于在提交日期之前将其公开,而不应将其理解为承认本公开无权享有对由于在先的发明的此类出版物优先权。另外,所提供的专利公开日期可能不同于实际公开日期,实际公开日期可能需要单独证实。

[0135] 实施例

[0136] 以下实施例示出了本公开的某些实施方案,以有助于技术人员实践本公开。因此,这些实施例决不被认为限制本公开的范围。

[0137] 制备方法

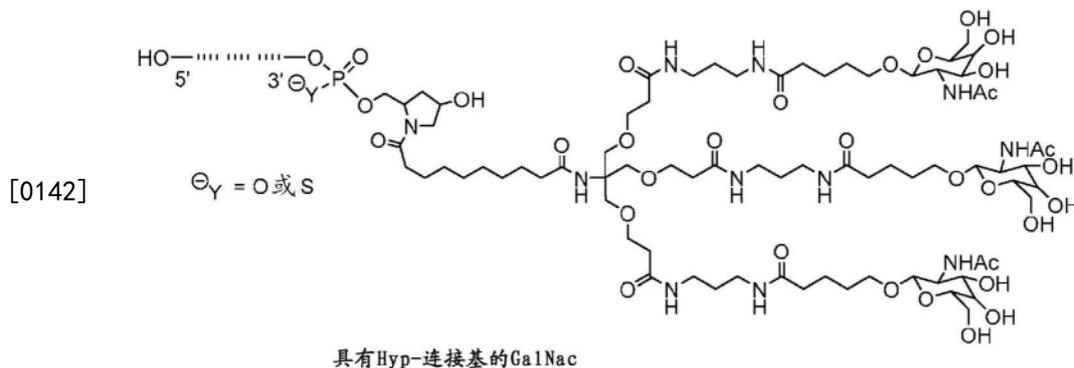
[0138] 将所有单体在具有干燥剂(KOH和 P_2O_5 , 室温, 24小时)的真空干燥器中干燥。附接到第一5'残基的合成固体载体(CPG)可购自商业来源。所有其他合成试剂和溶剂均可购自商业来源并原样使用。用于合成后工作流程的化学品和溶剂购自商业来源,并无需任何纯化或处理就使用了。在合成期间,将溶剂(乙腈)和溶液(单体(amidite)和活化剂)储存在分子筛上。

[0139] 用于本研究中的对照物,核酸酶稳定的3'-GalNAc缀合的反义寡核苷酸在例如表中示出。在ABI-394合成器上,使用由制造商所写的标准93-步循环合成反义寡核苷酸。固体载体为可控孔度的玻璃,并且单体含有标准保护基团。根据标准固相寡核苷酸合成规程,使用可商购获得的5'-O-(4,4'-二甲氧三苯甲基)-3'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基)DNA和或6-N-苯甲酰基腺苷(A^{Bz})、4-N-乙酰基胞嘧啶核苷(C^{Ac})、2-N-异丁酰基鸟嘌呤核苷(G^{iBu})和胸苷(T)的2'-O-Me亚磷酰胺单体,单独地合成每个寡核苷酸。该亚磷酰胺购自商业来源。该2'-O-Me-2,6,二氨基嘌呤亚磷酰胺购自商业来源。将DDTT((二甲基氨基亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮用作硫转移剂,以用于合成寡核糖核苷酸硫代磷酸酯。在5-(乙硫基)-1H-四唑活化剂的存在下,将亚磷酰胺在 CH_3CN 中的0.1M溶液延伸偶合至固体结合的寡核苷酸,然后进行标准封端、氧化和脱保护,从而获得经修饰寡核苷酸。所有经修饰亚磷酰胺的逐步偶合效率超过98%。将承载寡核苷酸的固体载体在55°C下用氨水/乙醇(3:1)溶液加热8小时,以脱保护碱基不稳定的保护基团。

[0140] 由羟脯氨酸-GalNAc固体载体合成GalNAc缀合的ASOs。通过6-氨基己酸酯键将GalNAc固定到反式-4-羟脯氨酸上,以获得羟脯氨酸-GalNAc部分,随后将其附接到官能化的控制孔度的玻璃(CPG)上,以获得固体载体。

[0141] 通过阴离子交换HPLC纯化未缀合的和GalNAc修饰的寡核苷酸。缓冲剂为20mM的10% CH_3CN 中的磷酸钠,pH8.5(缓冲剂A)和20mM的10% CH_3CN 中的磷酸钠,1.8M NaBr,pH 8.5

(缓冲剂B)。将含有全长寡核苷酸的级分合并、脱盐并冻干。



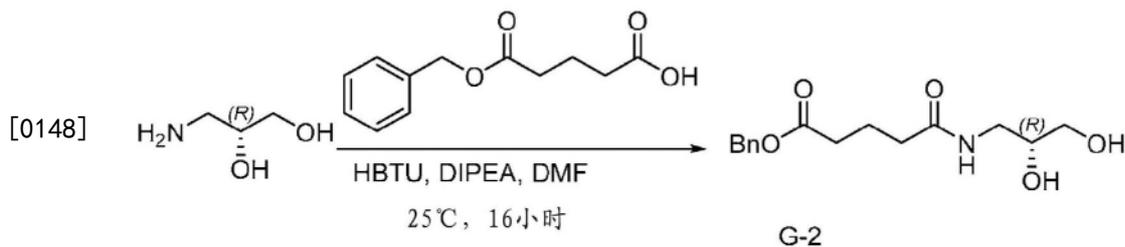
[0143] GalNAc合成

[0144] G-1的合成



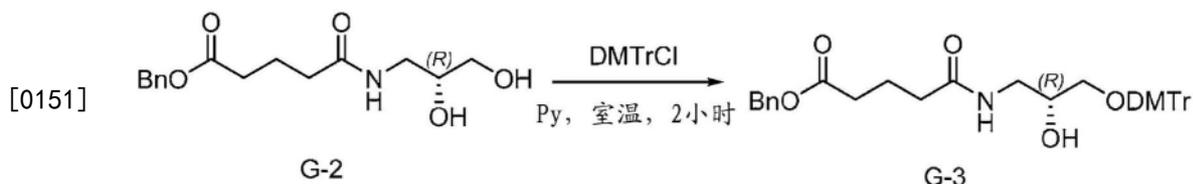
[0146] 具有氮惰性气氛下,在室温随着搅拌向环氧乙烷-2,6-二酮(1000g,8.76mol,1.00当量)、4-二甲氨基吡啶(53.5g,437.9mmol,0.05当量)于二氯甲烷(10000mL)中的溶液滴加苯甲醇(900g,8.32mol,0.95当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。用饱和碳酸氢钠溶液洗涤所得的混合物。用10%盐酸调节水层的pH值至1。使用3×2000mL乙酸乙酯萃取所得的溶液,并合并有机层。用2×3000mL饱和氯化钠洗涤所得混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。这获得1240g(64%)为无色油的G-1。MS m/z [M+H]⁺ (ESI): 223。

[0147] G-2的合成



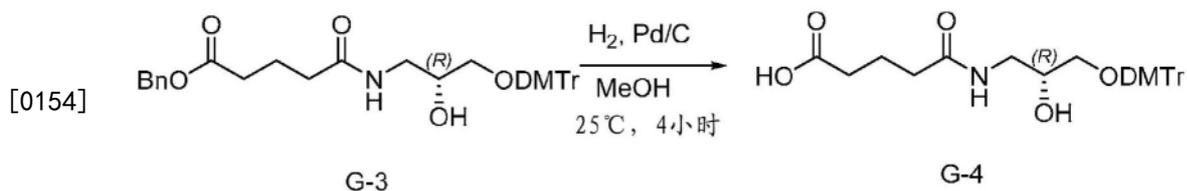
[0149] 具有氮惰性气氛下,在室温向G-1(58.5g,263.23mmol,1.20当量)、N,N-二异丙基乙胺(34g,263.57mmol,1.20当量)于N,N-二甲基甲酰胺(600mL)中的溶液添加0-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基六氟磷酸盐脲鎓(100g,263.69mmol,1.20当量)。在室温下将所得溶液搅拌1h。这随后在室温下添加(2R)-3-氨基丙烷-1,2-二醇(20g,219.52mmol,1.00当量)。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。用2000mL乙酸乙酯稀释所得溶液。用2×1000mL饱和碳酸氢钠溶液洗涤所得混合物。用无水硫酸钠干燥该混合物并减压浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得38.7g(60%)为浅黄色固体的G-2。MS m/z [M+H]⁺ (ESI): 296。

[0150] G-3的合成



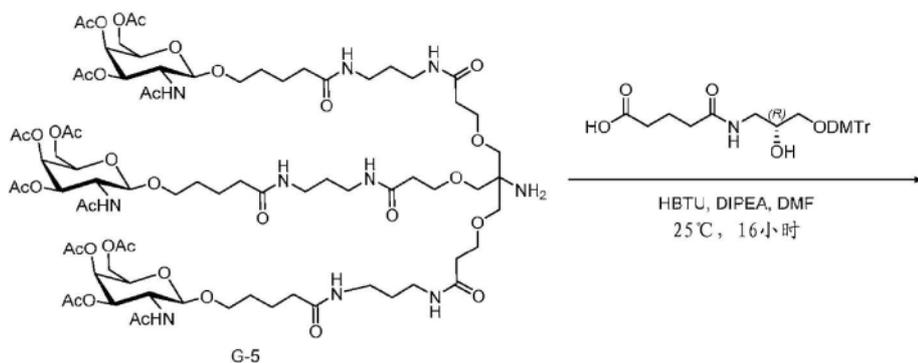
[0152] 具有氮惰性气氛下,在室温下向G-2(10g,33.86mmol,1.00当量)于吡啶(100mL)中的溶液添加1-[氯(4-甲氧基苯基)苄基]-4-甲氧基苯(12.63g,37.28mmol,1.10当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。随后通过添加甲醇(10mL)淬灭该反应。减压浓缩所得混合物。用1000L乙酸乙酯稀释所得溶液。用2×500mL饱和碳酸氢钠溶液洗涤所得混合物。用无水硫酸钠干燥该混合物并减压浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得10.2g(50%)为浅黄色油的G-3。MS m/z [M+Na]⁺(ESI):620。

[0153] G-4的合成

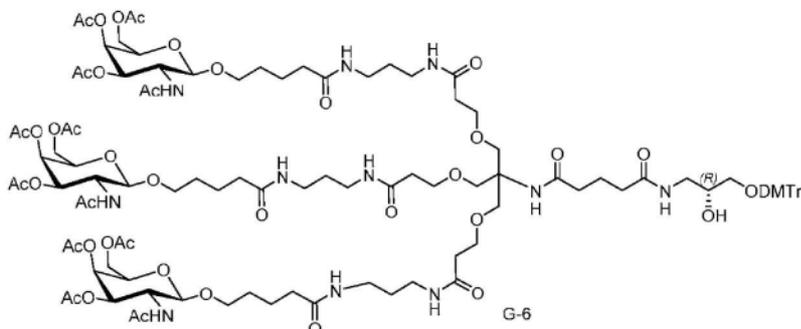


[0155] 在室温下,向G-3(10g,16.73mmol,1.00当量)于甲醇(100mL)中的溶液添加10%活性碳钯(1g)。抽空烧瓶并用氢吹扫五次。在室温下将所得溶液搅拌4小时。滤出固体。减压浓缩所得混合物。这获得7.6g(89%)为白色固体的G-4。MS m/z [M+Na]⁺(ESI):530。

[0156] G-5的合成



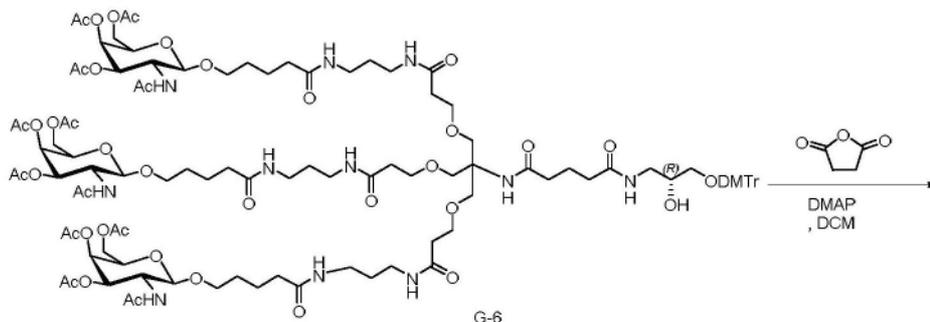
[0157]



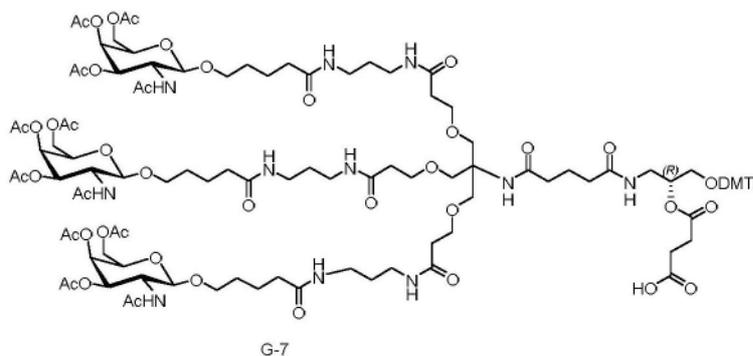
[0158] 具有氮惰性气氛下,在室温向G-4(8.90g,17.53mmol,1.05当量)于N,N-二甲基甲酰胺(300mL)中的溶液添加N,N-二异丙基乙胺(6.47g,50.16mmol,3.00当量)。在室温下,向这添加0-苯并三唑-N,N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓(7.10g,18.73mmol,1.12当量)。在室温下

持续搅拌所得的溶液15分钟。在室温下,向该混合物添加G-5 ReF(《核酸研究》,2014年,第42,(13)卷,8796-8807页(Nucleic Acids Research,2014,42,(13)8796-8807))(30g,16.72mmol,1.00当量)。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。这获得20.1g(53%)为白色固体的G-6。MS m/z $[M+H]^+$ (ESI):2283。

[0159] G-7的合成



[0160]



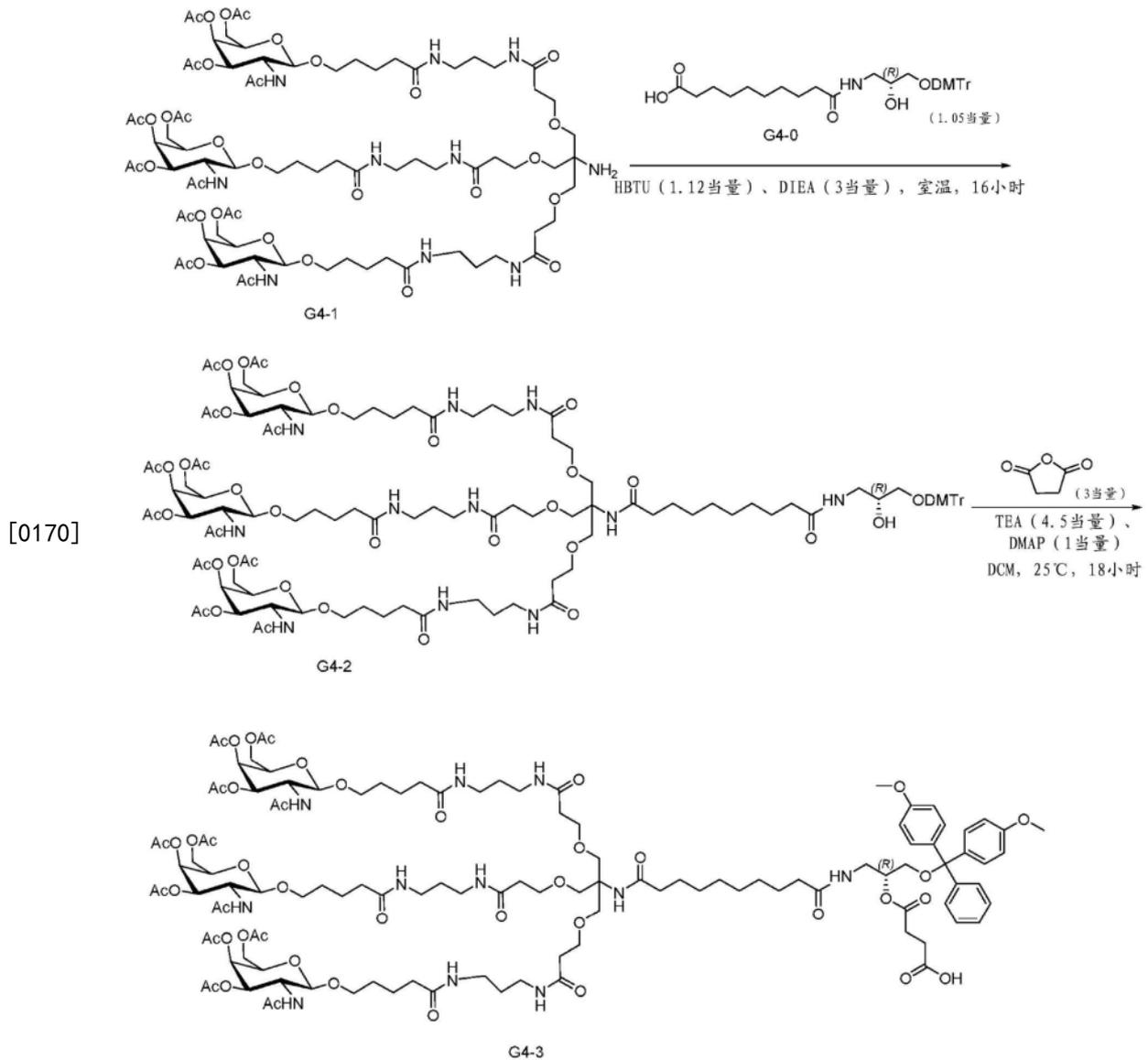
[0161] 具有氮惰性气氛下,在室温向G-6(25g,10.96mmol,1.00当量)于二氯甲烷(750mL)中的溶液添加三乙胺(4.98g,49.21mmol,4.49当量)。在室温下,向这添加4-二甲氨基吡啶(1.33g,10.89mmol,0.99当量)。在室温下,向该混合物添加氧杂环戊烷-2,5-二酮(3.29g,32.88mmol,3.00当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。这获得15.83g(61%)为铵盐的白色固体的G-7。MS m/z $[M/2+NH_4]^+$ (ESI):1210。

[0162] GalNAc-2-固体载体-GPG的合成

(9.9g, 27.03mmol, 1.10当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。然后添加G3-1 (44g, 24.57mmol, 1.00当量)。在室温下将所得溶液搅拌16小时。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。这获得22g (41%) 为浅黄色固体的G3-2。MS m/z $[M-H]^-$ (ESI) : 2295。H-NMR (DMSO, 400MHz) : 7.79-7.83 (m, 6H) , 7.70-7.73 (m, 4H) , 7.33-7.35 (m, 2H) , 7.26-7.30 (m, 2H) , 7.19-7.22 (m, 5H) , 7.01 (s, 1H) , 6.84-6.87 (m, 4H) , 5.19-5.20 (d, $J=4.0$ Hz, 3H) , 4.93-4.97 (m, 3H) , 4.58-4.59 (d, $J=4.0$ Hz, 1H) , 4.46-4.48 (d, $J=8.0$ Hz, 3H) , 3.95-4.04 (m, 9H) , 3.82-3.89 (m, 3H) , 3.67-3.71 (m, 9H) , 3.45-3.61 (m, 12H) , 3.36-3.41 (m, 3H) , 2.94-3.09 (m, 16H) , 2.24-2.27 (m, 6H) , 2.00-2.08 (m, 29H) , 1.87 (s, 9H) , 1.75 (s, 9H) , 1.63-1.69 (m, 3H) , 1.41-1.51 (m, 19H) 。

[0168] 在室温下向G3-2 (22g, 9.58mmol, 1.00当量)、TEA (4.4g, 4.50当量)、4-二甲基氨基吡啶 (1.15g, 1.00当量) 在二氯甲烷 (220mL) 中的溶液添加氧杂环戊烷-2,5-二酮 (2.87g, 28.68mmol, 3.00当量)。在室温下将所得溶液搅拌18小时。真空浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。这获得15.01g (65%) 为白色固体的G3-3。MS m/z $[M-H]^-$ (ESI) : 2395。H-NMR (DMSO, 400MHz) : 7.96-8.16 (m, 10H) , 7.28-7.36 (m, 4H) , 7.21-7.23 (m, 6H) , 6.86-6.89 (m, 4H) , 5.21-5.22 (d, $J=3.2$ Hz, 3H) , 4.97-5.03 (m, 4H) , 4.51-4.53 (d, $J=8$ Hz, 3H) , 4.03 (m, 9H) , 3.85-3.92 (m, 3H) , 3.69-3.74 (m, 9H) , 3.52-3.59 (m, 12H) , 3.38-3.44 (m, 4H) , 2.95-3.04 (m, 15H) , 2.23-2.29 (m, 10H) , 2.10 (s, 9H) , 2.04-2.07 (m, 9H) , 2.00 (s, 9H) , 1.89 (s, 9H) , 1.78 (s, 10H) , 1.63-1.68 (m, 3H) , 1.45-1.54 (m, 18H) 。

[0169] GalNAc-4的合成

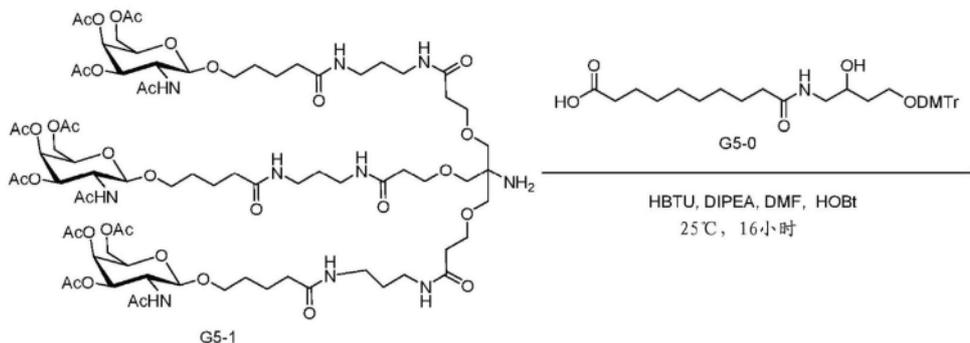


[0171] 在氮惰性气氛下,在室温下向G4-0(10.13g,17.53mmol,1.05当量)于N,N-二甲基甲酰胺(300mL)中的溶液添加N,N-二异丙基乙胺(6.47g,50.06mmol,2.99当量)。在室温下,向此添加0-苯并三唑-N,N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓(7.10g,18.72mmol,1.12当量)。在室温下持续搅拌所得的溶液15分钟。在室温下,向该混合物添加G4-1(30g,16.72mmol,1.00当量)。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物(30g)。这获得22.3g(57%)为白色固体的G4-2。

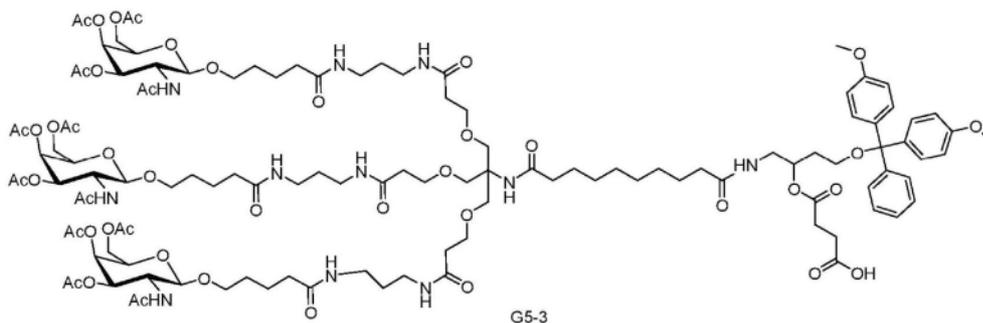
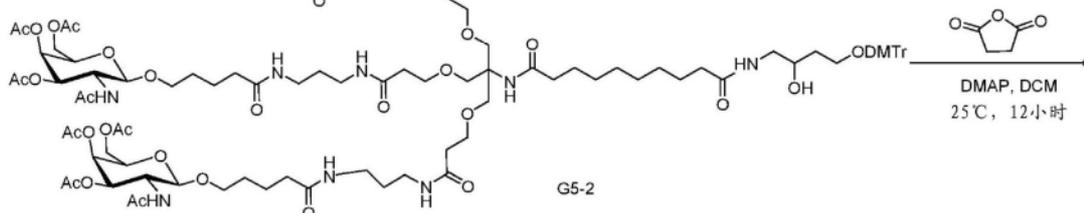
[0172] 在氮惰性气氛下,在室温下向G4-2(15g,6.38mmol,1.00当量)于二氯甲烷(450mL)中的溶液添加三乙胺(2.90g,28.66mmol,4.49当量)。在室温下,向此添加4-二甲氨基吡啶(777mg,6.36mmol,1.00当量)。在室温下,向该混合物添加氧杂环戊烷-2,5-二酮(1.91g,19.09mmol,2.99当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物(15g)。这获得10.8047g(69%)为浅黄色固体的G4-3。MS m/z [M+H]⁺ (ESI):2453。¹H NMR (DMSO-d₆,400Hz,ppm):8.10-7.92(m,10H),7.35-7.30(m,4H),7.24-7.22(m,5H),7.10-7.01(m,1H),6.89-6.87(m,4H),5.22-5.21(d,J=3.2Hz,3H),4.00-4.97(m,4H),4.53-4.51(m,3H),4.04-3.90(m,9H),3.87-3.3.80(m,3H),3.74-3.70(m,10H),

3.69-3.39 (m, 16H), 3.05-3.02 (m, 16H), 2.51-2.50 (m, 2H), 2.30-2.27 (m, 8H), 2.11-1.99 (m, 29H), 1.89 (s, 9H), 1.77 (s, 9H), 1.52-1.32 (m, 22H), 1.20 (s, 9H)。

[0173] GalNAc-5的合成



[0174]

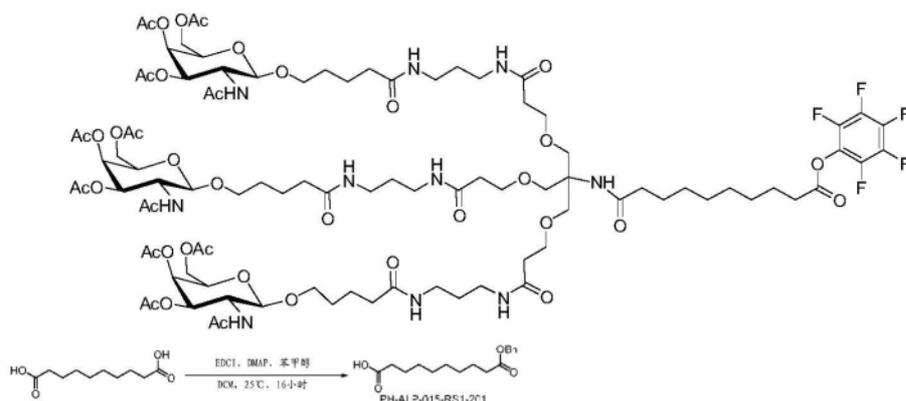


[0175] 在氮惰性气氛下,向N,N-二甲基甲酰胺 (300mL) 中的G5-0 (10g, 16.90mmol, 1.06当量) 的溶液添加N,N-二异丙基乙胺 (6.18g, 47.96mmol, 3.0当量)、0-苯并三唑-N,N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓 (6.84g, 18.04mmol, 1.13当量)。在室温下搅拌所得的溶液5分钟。然后添加G5-1 (28.68g, 15.99mmol, 1.00当量) 在N,N-二甲基甲酰胺 (300mL) 中的溶液。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物 (20g)。这获得20.44g (54%) 为白色固体的G5-2。

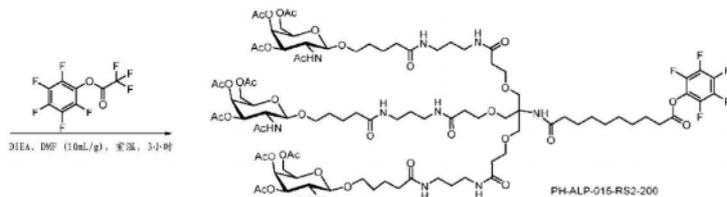
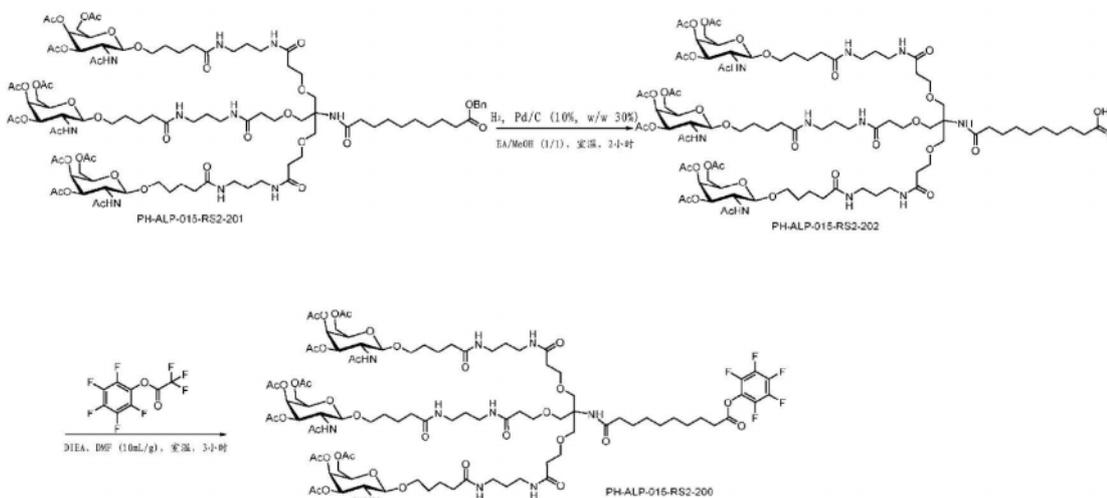
[0176] 在氮惰性气氛下,向G5-2 (12.5g, 5.28mmol, 1.00当量) 于二氯甲烷 (375mL) 中的溶液依次添加4-二甲基氨基吡啶 (650mg, 5.32mmol, 1.01当量)、三乙胺 (2.4g, 23.76mmol, 4.50当量) 和氧杂环戊烷-2,5-二酮 (1.59g, 15.89mmol, 3.01当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物 (15g)。这获得9.0g (73%) 为白色固体的G5-3。MS m/z [M-H]⁻ (ESI): 2465。¹H-NMR (DMSO-d₆, 300Hz): 8.10-7.90 (m, 10H), 7.36-7.20 (m, 9H), 7.10 (s, 1H), 6.88-6.85 (m, 4H), 5.22-5.20 (d, J=3.0Hz, 3H), 4.99-4.95 (m, 4H), 4.52-4.49 (m, 3H), 4.02-3.89 (s, 9H), 3.85-3.73 (m, 3H), 3.70-68 (m, 9H), 3.65-3.52 (m, 12H), 3.52-3.38 (m, 6H), 3.02-2.94 (m, 15H), 2.30-2.25 (m, 10H), 2.09-

1.99 (M, 29H), 1.88- (s, 9H), 1.77 (s, 11H), 1.52-1.45 (m, 22H), 1.23-1.19 (m, 9H)。

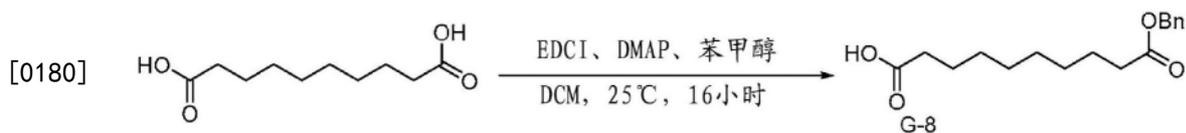
[0177] GalNAc-6的合成



[0178]

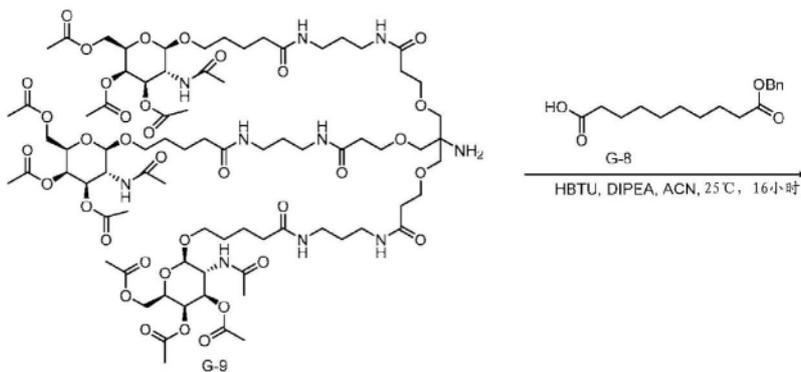


[0179] G-8的合成

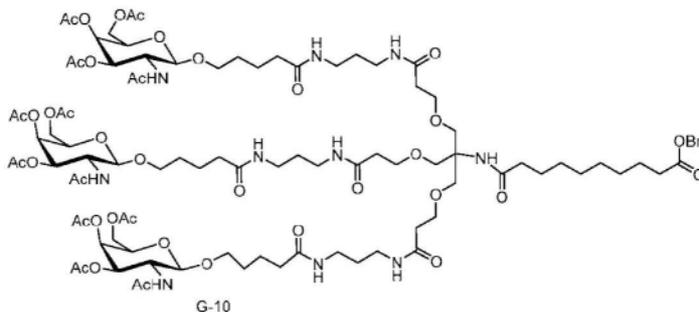


[0181] 在室温下,向癸二酸(100g,494.4mmol,1.00当量)于二氯甲烷(2000mL)中的溶液添加4-二甲氨基吡啶(18.1g,148.2mmol,0.30当量)。在室温下,向这添加N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(114g,594.7mmol,1.20当量)。在室温下将所得溶液搅拌1h。在0°C下,随着搅拌向该混合物滴加苄醇(64.1g)。在室温下,随着搅拌使所得的溶液反应过夜。用饱和氯化钠水溶液洗涤所得的混合物。用无水硫酸钠干燥该混合物并减压浓缩。通过快速制备型HPLC纯化粗产物(100g)。这获得60.7g(42%)为白色固体的G-8。MS m/z [M+H]⁺ (ESI):293。

[0182] G-10的合成

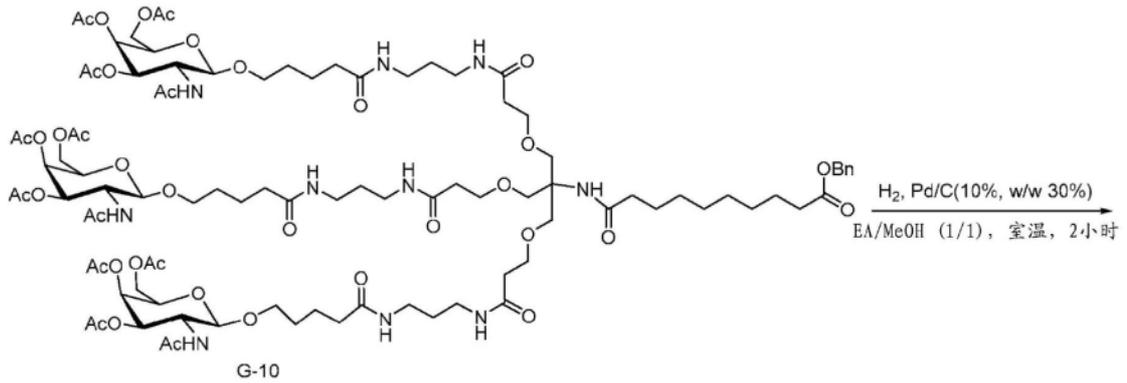


[0183]

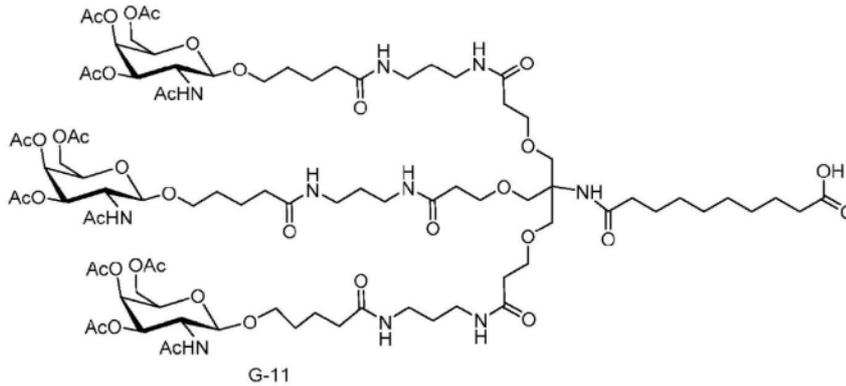


[0184] 向G-8(4.48g, 15.32mmol, 1.50当量)于乙腈(320mL)中的溶液添加0-苯并三唑-N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓(5.84g, 15.40mmol, 1.50当量)、N,N-二异丙基乙胺(3.96g, 30.64mmol, 3.00当量)。将所得溶液在25℃下搅拌1小时。这之后添加G-9(18.4g, 10.26mmol, 1.00当量)。在25℃下搅拌所得的溶液16小时,然后在真空下浓缩。通过闪蒸纯化粗产物。这获得12g(57%)为白色固体的G-10。¹H-NMR(DMSO, 400MHz, ppm): 7.74-7.83(m, 9H), 7.31-7.37(m, 5H), 6.97(s, 1H), 5.21(d, J=3.3Hz, 3H), 5.07(s, 2H), 4.98(dd, J=11.2Hz, 3.4Hz, 3H), 4.49(d, J=8.4Hz, 3H), 4.04(s, 9H), 3.83-3.99(m, 3H), 3.67-3.72(m, 3H), 3.52-3.55(m, 12H), 3.37-3.43(m, 3H), 2.99-3.05(m, 12H), 2.25-2.35(m, 8H), 2.12(s, 9H), 1.99-2.11(m, 17H), 1.92(s, 9H), 1.77(s, 9H), 1.40-1.53(m, 22H), 1.19-1.25(m, 8H)。

[0185] G-11的合成

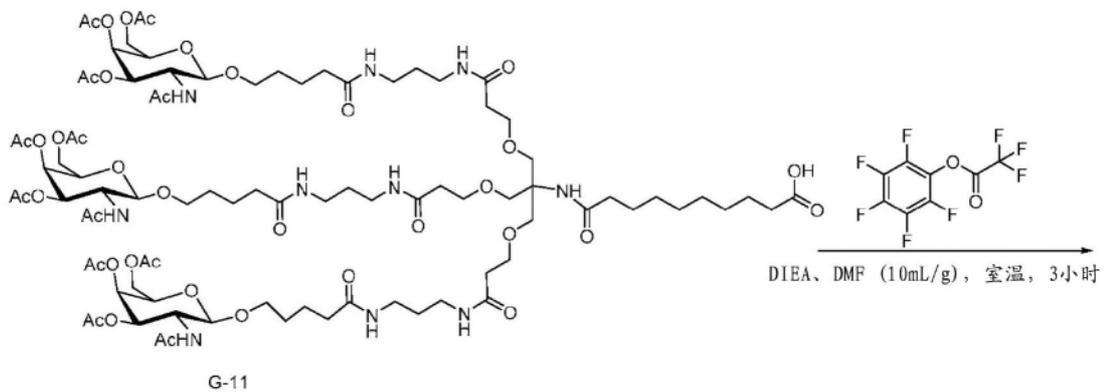


[0186]

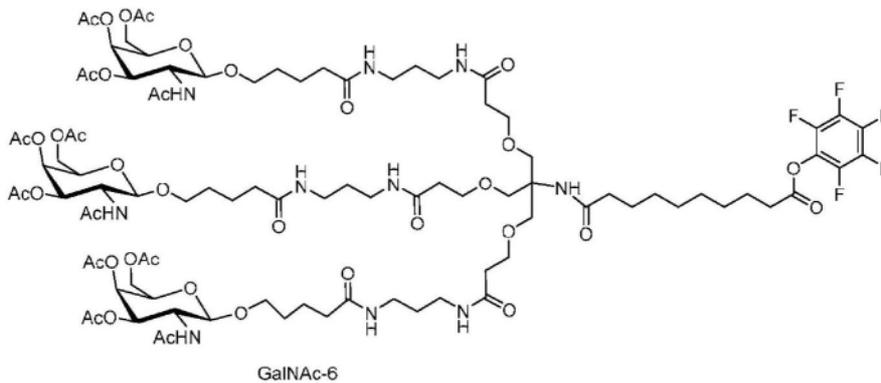


[0187] 向G-10 (5g, 2.45mmol, 1.00当量) 于甲醇/乙酸乙酯 (100mL, v/v=1:1) 中的溶液添加10% 钯碳 (1.5g, 10%)。抽空烧瓶并用氢吹扫五次。在室温下, 在氢气气氛中, 搅拌该混合物2小时。滤出固体。真空浓缩所得混合物。这获得4g (82%) 为白色固体的G-11。

[0188] GalNAc-6的合成

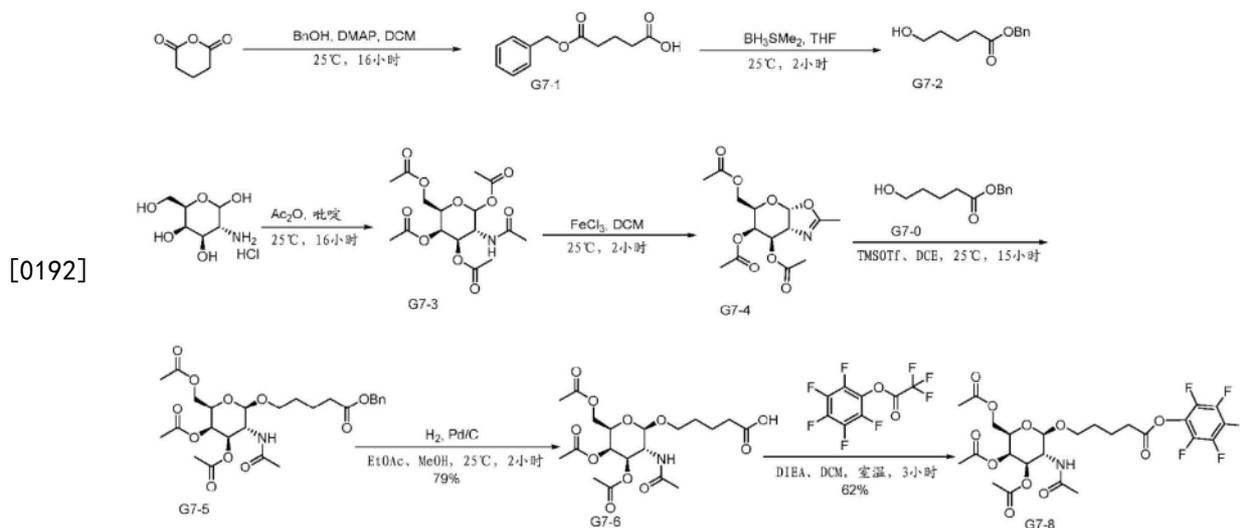


[0189]



[0190] 向G-11 (6.3g, 3.18mmol, 1.00当量) 于N,N-二甲基甲酰胺 (63mL) 中的溶液添加N,N-二异丙基乙胺 (1.0g, 7.95mmol, 2.50当量)。这之后在0℃下, 随着搅拌滴加2,2,2-三氟乙酸五氟苯酯 (1.33g, 4.77mmol, 1.50当量)。在25℃下搅拌所得的溶液3小时。真空浓缩所得混合物。通过快速色谱纯化粗产物, 具有下列条件: C18凝胶柱, 洗脱液A: 水, 洗脱液B: 乙腈; 梯度: 20% 最高至80%, 15分钟内, 100% 保持3分钟; 检测器, UV 210nm。这获得5g (73%) 为白色固体的GalNAc-6。MS m/z $[M/2+H]^+$ (ESI): 1073; H-NMR (DMSO, 300MHz, ppm): 7.71-7.80 (m, 9H), 6.98 (s, 1H), 5.22 (d, $J=3.3$ Hz, 3H), 4.99 (dd, $J=11.1$ Hz, 3.3Hz, 3H), 4.50 (d, $J=8.4$ Hz, 3H), 4.02 (s, 9H), 3.82-3.92 (m, 3H), 3.69-3.74 (m, 3H), 3.52-3.56 (m, 12H), 3.39-3.44 (m, 3H), 3.03 (s, 12H), 2.75-2.79 (m, 2H), 2.28 (t, $J=6.3$ Hz, 6H), 2.00-2.10 (m, 26H), 1.89 (s, 9H), 1.77 (s, 9H), 1.64-1.68 (m, 2H), 1.25-1.53 (m, 28H); F-NMR (DMSO, 162MHz, ppm): -153.60, -153.67, -153.68, -153.69, -158.05, -158.14, -158.22, -162.53, -162.60, -162.62, -162.69, -162.70。

[0191] GalNAc-7的合成



[0193] 向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的5000mL四颈圆底烧瓶中放入环氧乙烷-2,6-二酮 (250g, 2.19mol, 1.00当量) 在二氯甲烷 (2.5L)、4-二甲基氨基吡啶 (11.1g, 90.91, mmol, 0.05当量) 中的溶液。之后边搅拌边逐滴添加苯甲醇 (225g, 2.08mol, 0.95当量)。在25℃下搅拌所得的溶液16小时。用饱和碳酸氢钠水溶液萃取所得的溶液并将水层合并。用盐酸 (1mol/L) 将该溶液的pH值调节至1。用乙酸乙酯萃取所得溶液。合并有机层并在硫酸镁上干燥, 过滤并在真空下浓缩。这获得230g (47%) 的G7-1。

[0194] 向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的5L三颈圆底烧瓶中放入G7-1 (100g, 449.97mmol, 1.00当量) 在四氢呋喃 (2.0L) 中的溶液。之后边搅拌边逐滴添加苯甲醇 (二甲基-3-磺酰基) 硼烷 (41g, 539.69mmol, 1.20当量)。在25℃下搅拌所得的溶液3小时。然后通过添加200mL甲醇来淬灭反应, 并且在真空下浓缩。通过从己烷重结晶纯化该粗产物。这获得58g (62%) 的G7-2。

[0195] 向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的10000mL四颈圆底烧瓶中放入 (3R, 4R, 5R, 6R) -3-氨基-6-(羟甲基) 环氧乙烷-2,4,5-三醇盐酸盐 (350g, 1.62mol, 1.00当量) 在吡啶 (3500mL) 中的溶液。随后在25℃下逐滴添加乙酸酐 (1246g, 12.2mol, 7.52当量)。在25℃下搅拌所得的溶液16小时。真空浓缩所得混合物。通过从水/冰重结晶纯化该粗产物。通

过过滤收集固体。这获得507g (80%)的G7-3。

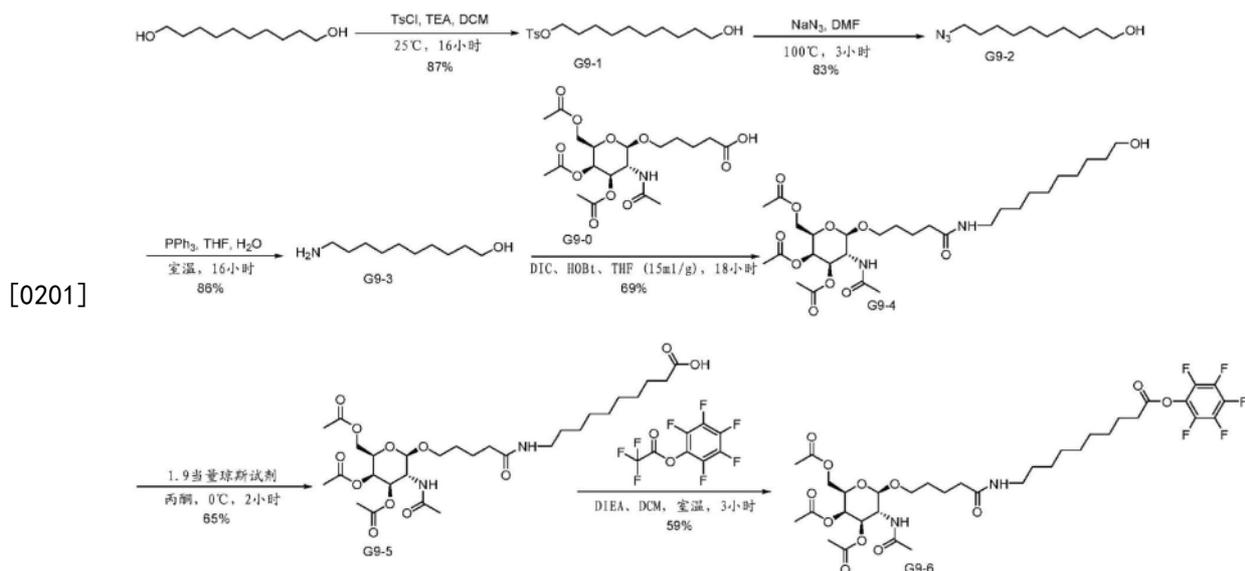
[0196] 向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的50L三颈圆底烧瓶中放入G7-3 (220g, 565mmol, 1.00当量) 在二氯甲烷 (22L) 中的溶液。随后在25℃下部分地添加氯化铁 (275g)。在25℃下搅拌所得的溶液2小时。然后通过添加17L水/冰来淬灭反应。用水和饱和氯化钠水溶液洗涤所得溶液。混合物用无水硫酸钠干燥、过滤并真空浓缩。这获得121g (65%)的G7-4。

[0197] 向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的2000mL圆底烧瓶中放入G7-4 (111g, 337.1mmol, 1.00当量) 和5-羟基戊酸苄酯 (70.2g, 438.2mmol, 1.3当量) 在1,2-二氯乙烷 (1100mL) 和22g分子筛型4A中的溶液。在25℃下搅拌所得的溶液30分钟。随后在搅拌下在10分钟内逐滴添加三甲基甲硅烷基三氟甲磺酸酯 (22.48g, 101.12mmol, 0.3当量)。将所得的溶液在25℃下搅拌15小时。将所得溶液用二氯甲烷稀释, 分别用水、饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。通过闪蒸纯化残余物。这获得110g (57%)的G7-5。

[0198] 向5000mL圆底烧瓶中放入G7-5 (330g, 614mmol, 1.00当量) 在乙酸乙酯 (3300mL)、10%无水钨碳 (100g) (30% w/w) 中的溶液。抽空烧瓶并用氢吹扫五次。在室温下, 在氢气气氛中, 搅拌该混合物3小时。滤出固体, 并将滤液在真空下浓缩。这获得184g (67%)的G7-6。MS m/z $[M+H]^+$ (ESI) : 448; H-NMR (CD_3Cl , 300Hz, ppm) : δ 5.99 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 5.36 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 5.29 (dd, $J=10.6, 3.0$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 3.91-4.21 (m, 5H), 3.51-3.56 (m, 1H), 2.31-2.52 (m, 2H), 1.91-2.21 (m, 12H), 1.71 (s, 4H)。

[0199] 向用氮气惰性气氛吹扫并维持氮气惰性气氛的100mL三颈圆底烧瓶中放入G7-6 (5g, 11.17mmol, 1.00当量)、二氯甲烷 (50mL)、DIEA (2.17g, 16.79mmol, 1.50当量) 的溶液。这之后在0℃下, 随着搅拌逐滴添加2,2,2-三氟乙酸五氟苯酯 (4.69g, 16.75mmol, 1.50当量)。在25℃下搅拌所得的溶液3小时。真空浓缩所得混合物。将残余物施加到硅胶柱上。这获得4g (58%)的G7-8。MS m/z $[M+H]^+$ (ESI) : 614; H-NMR (DMSO, 400Hz, ppm) : δ 7.85 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.23 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 4.99 (dd, $J=11.2, 3.2$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.87-3.94 (m, 1H), 3.74-3.79 (m, 1H), 3.45-3.51 (m, 1H), 2.78-2.81 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.66-1.77 (m, 4H); F-NMR (DMSO, 400Hz, ppm) : δ -153.61, -153.66, -158.04, -158.16, -162.58, -162.64, -162.71。

[0200] GalNAc-9的合成



[0202] 向癸烷-1,10-二醇 (125g, 717.23mmol, 5.00当量) 在二氯甲烷/N,N-二甲基甲酰胺 (250mL/250mL) 中的溶液添加三乙胺 (21.8g, 215.44mmol, 1.50当量)。这之后在25°C下添加4-甲苯磺酰氯 (27.3g, 143.19mmol, 1.00当量)。在25°C下搅拌所得的溶液16小时。在真空下浓缩所得混合物并用500mL二氯甲烷稀释其。滤出固体。用3×500mL水和3×500mL饱和氯化钠洗涤所得的溶液。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得41g (87%) 为无色油的G9-1。

[0203] 向G9-1 (32.8g, 99.86mmol, 1.00当量) 于N,N-二甲基甲酰胺 (150mL) 中的溶液添加叠氮化钠 (13.0g, 199.97mmol, 2.00当量)。将所得的溶液在90°C下在油浴中搅拌3小时。滤出固体。用500mL乙酸乙酯稀释所得的溶液, 并且用3×500mL的饱和碳酸氢钠和3×500mL的饱和氯化钠洗涤其。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得18g (83%) 为黄色油的G9-2。

[0204] 向G9-2 (10g, 50.18mmol, 1.00当量) 于四氢呋喃 (100mL) 中的溶液添加三苯基膦 (14.4g, 54.90mmol, 1.10当量)。在25°C下搅拌所得的溶液16小时。真空浓缩所得混合物。用50mL水稀释所得溶液并用3×50mL甲苯洗涤其。将水层在真空下浓缩并施加到硅胶柱上。这获得8g (86%) 为浅黄色固体的G9-3。

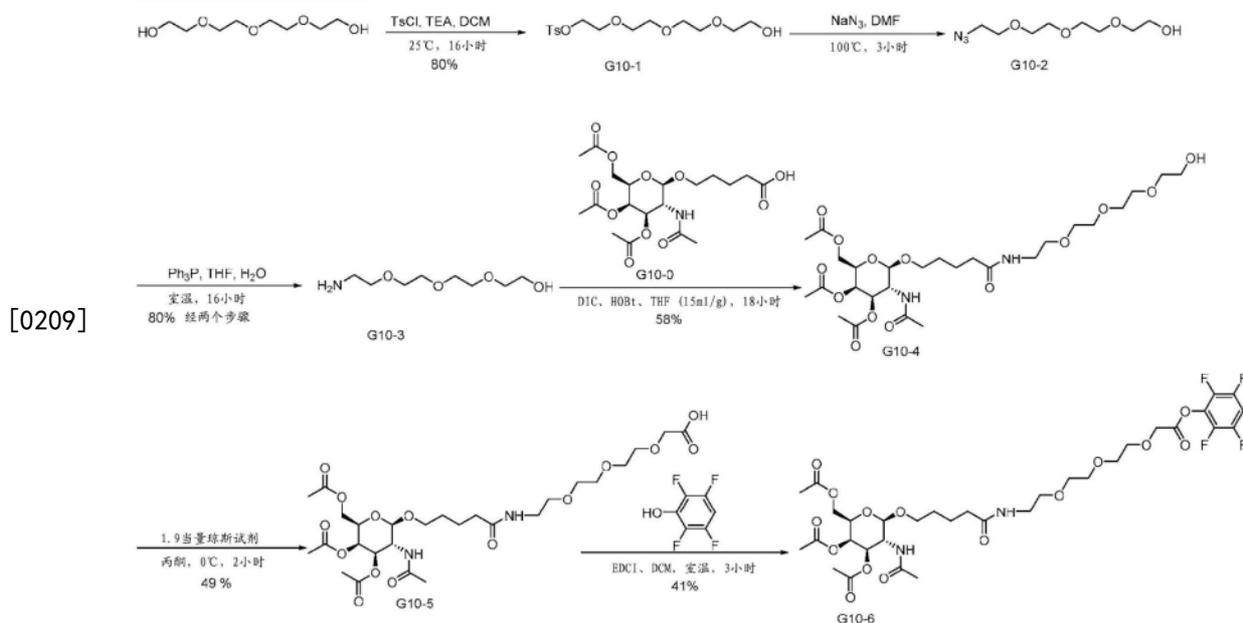
[0205] 向G9-3 (9.9g, 22.13mmol, 1.00当量) 于四氢呋喃 (100mL)、1-羟基苯并三唑 (3g, 22.20mmol, 1.00当量) 中的溶液添加N,N-二异丙基碳二亚胺 (5.6g, 44.37mmol, 2.00当量)。这之后在0°C下, 随着搅拌添加10-氨基癸-1-醇 (5g, 28.85mmol, 1.30当量)。在25°C下搅拌所得的溶液16小时。真空浓缩所得混合物。通过闪蒸纯化粗产物。这获得9.3g (69%) 为白色固体的G9-4。MS m/z $[M+H]^+$ (ESI): 603, 1H NMR (DMSO, 400Hz, ppm): δ 7.81 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.98 (dd, $J=11.2$ Hz, 3.2Hz, 1H), 4.49 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.33 (t, $J=5.2$ Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.86-3.88 (m, 1H), 3.69-3.72 (m, 1H), 3.34-3.41 (m, 3H), 2.97-3.02 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00-2.04 (m, 5H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.36-1.50 (m, 8H), 1.24 (s, 12H)。

[0206] 在0°C下随着搅拌向G9-4 (3g, 4.98mmol, 1.00当量) 于丙酮 (30mL) 中的溶液逐滴添加琼斯试剂 (3.6mL, 1.87当量)。在0°C下搅拌所得的溶液2小时。使用饱和碳酸氢钠水溶液将该溶液的pH值调节至6。滤出固体, 并且将滤液用3×500mL饱和氯化钠洗涤。将该有机层

置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。通过闪蒸纯化粗产物。这获得2g (65%) 为白色固体的G9-5。

[0207] 在0℃下随着搅拌向G9-5 (4g, 6.49mmol, 1.00当量) 于二氯甲烷 (40mL)、N,N-二异丙基乙胺 (2.1g, 16.25mmol, 2.00当量) 中的溶液逐滴添加五氟苯基2,2,2-三氟乙酸酯 (2.73g, 9.75mmol, 1.50当量)。在25℃下搅拌所得的溶液3小时。真空浓缩所得混合物。通过闪蒸纯化粗产物。这获得3g (59%) 为白色固体的G9-6。MS m/z $[M+H]^+$ (ESI): 783.1H NMR (DMSO, 400Hz, ppm) δ 7.81 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.68 (t, J=5.6Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.98 (dd, J=11.2Hz, 3.2Hz, 1H), 4.49 (d, J=8.8Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.83-3.90 (m, 1H), 3.67-3.73 (m, 1H), 3.37-3.43 (m, 1H), 2.97-3.02 (m, 2H), 2.75-2.79 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.99-2.04 (m, 5H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.62-1.69 (m, 2H), 1.25-1.50 (m, 16H); FNMR (DMSO, 400Hz, ppm): δ -153.65, -153.66, -153.71, -158.09, -158.15, -158.21, -162.58, -162.63, -162.64, -162.70, -162.71。

[0208] GalNAc-10的合成



[0210] 向2-[2-[2-(2-羟乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙烷-1-醇 (194g, 998.84mmol, 10.00当量) 在二氯甲烷 (120mL) 中的溶液添加三乙胺 (15.15g, 149.72mmol, 1.50当量)。这之后在25℃下添加4-甲苯磺酰氯 (19.1g, 100.18mmol, 1.00当量)。在16℃下将所得的溶液搅拌过夜。用100mL水稀释所得的溶液。使用3×200mL二氯甲烷萃取所得的溶液, 并合并有机层。用3×100mL的5%柠檬酸水溶液洗涤所得的混合物。将该有机层置于硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得35g (93%) 为白色固体的G10-1。

[0211] 向G10-1 (34.8g, 99.88mmol, 1.00当量) 于N,N-二甲基甲酰胺 (180mL) 中的溶液添加叠氮化钠 (13.0g, 199.97mmol, 2.00当量)。将所得的溶液在90℃下在油浴中搅拌3小时。滤出固体。用500mL乙酸乙酯稀释所得的溶液, 并且用3×500mL的饱和碳酸氢钠和3×500mL的饱和氯化钠洗涤其。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得17g (71%) 为浅黄色油的G10-2。

[0212] 向G10-2 (2.2g, 10.03mmol, 1.00当量) 于四氢呋喃 (20mL) 中的溶液添加三苯基膦 (2.88g, 10.98mmol, 1.10当量)。在25℃下搅拌所得的溶液12小时。用50mL水稀释所得溶液

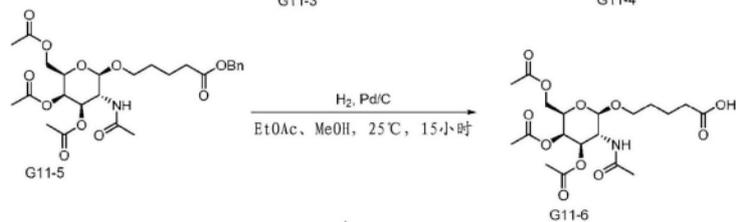
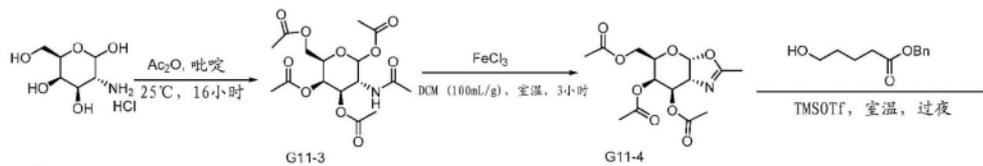
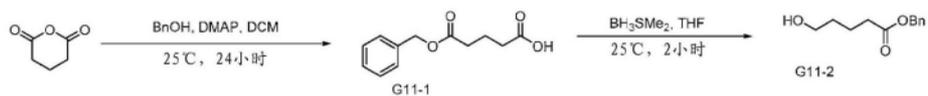
并用3×50mL甲苯洗涤其。将水在真空下浓缩。这获得1.7g (81%) 为浅黄色油的G10-3。

[0213] 向G10-3 (10g, 22.35mmol, 1.00当量) 于四氢呋喃 (100mL) 中的溶液添加1-羟基苯并三唑 (3g, 22.20mmol, 1.00当量) N,N-二异丙基碳二亚胺 (5.62g, 44.53mmol, 2.00当量)。这之后在0℃下, 随着搅拌添加2-[2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙烷-1-醇 (5.6g, 28.98mmol, 1.30当量)。在25℃下搅拌所得的溶液16小时。真空浓缩所得混合物。将残余物施加到硅胶柱上。通过闪蒸纯化粗产物。这获得8g (58%) 为浅黄色油的G10-4。MS m/z [M+H]⁺ (ESI): 623., 1H NMR (DMSO, 400Hz, ppm): δ 7.82 (d, J=4.4Hz, 2H), 5.22 (s, 1H), 4.98 (dd, J=11.2Hz, 3.6Hz, 1H), 4.58 (t, J=5.2Hz, 1H), 4.49 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.83-3.91 (m, 1H), 3.67-3.73 (m, 1H), 3.48-3.51 (m, 10H), 3.37-3.42 (m, 5H), 3.19-3.20 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.08-2.10 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.40-1.60 (m, 4H)。

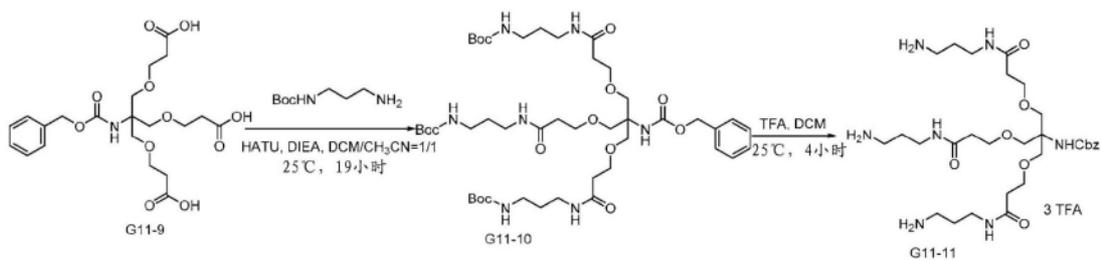
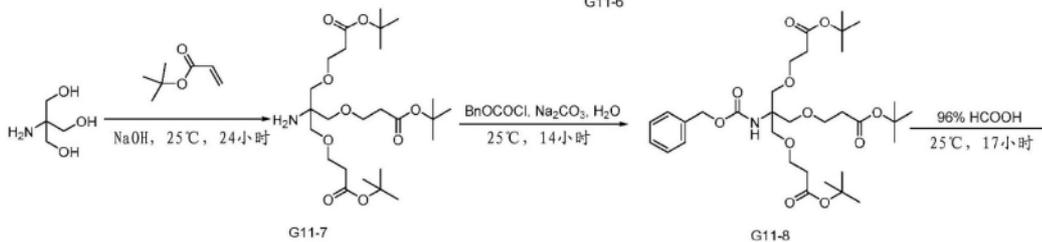
[0214] 在0℃下随着搅拌向G10-4 (6g, 9.64mmol, 1.00当量) 于丙酮 (60mL) 中的溶液逐滴添加琼斯试剂 (6.7mL)。在0℃下搅拌所得的溶液3小时。使用饱和碳酸氢钠水溶液将该溶液的pH值调节至5。滤出固体, 并且将滤液用3×500mL饱和氯化钠洗涤。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。通过闪蒸纯化粗产物。这获得3g (49%) 为固体的G10-5。

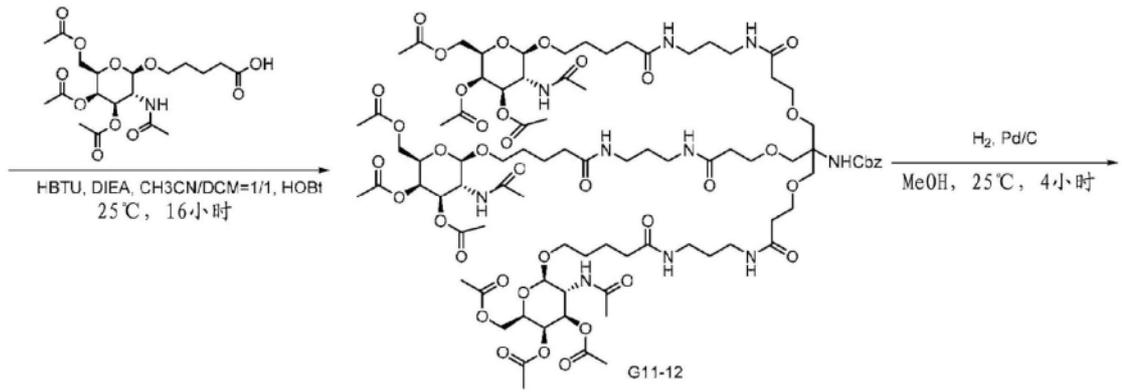
[0215] 向G10-5 (1g, 1.57mmol, 1.00当量) 于二氯甲烷 (10mL) 中的溶液添加1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (360mg, 1.88mmol, 1.20当量)、2,3,5,6-四氟苯酚 (310mg, 1.87mmol, 1.20当量)。在25℃下搅拌所得的溶液3小时。真空浓缩所得混合物。通过闪蒸纯化粗产物。使用氯仿萃取所得的溶液, 并合并有机层。将该有机层置于硫酸钠上方干燥、过滤并在真空下浓缩。这获得0.5g (41%) 为浅黄色油的G10-6, 并且将其它批产物合并以提供5.0422g的G10-6。MS m/z [M+H]⁺ (ESI): 785., 1H NMR (CD₃CN, 400Hz, ppm): δ 7.30-7.40 (m, 1H), 6.48-6.60 (m, 2H), 5.30 (s, 1H), 5.04 (dd, J=11.2Hz, 3.6Hz, 1H), 4.52-4.59 (m, 3H), 4.08-4.13 (m, 2H), 3.95-3.99 (m, 2H), 3.76-3.78 (m, 3H), 3.60-3.67 (m, 6H), 3.48-3.59 (m, 3H), 3.30-3.48 (m, 2H), 2.14-2.16 (m, 5H), 2.12 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.50-1.60 (m, 4H)。FNMR (CD₃CN, 400Hz, ppm): δ -140.76, -140.79, -140.82, -140.84, -154.52, -154.54, -154.57, -154.60。

[0216] GalNAc-11的合成

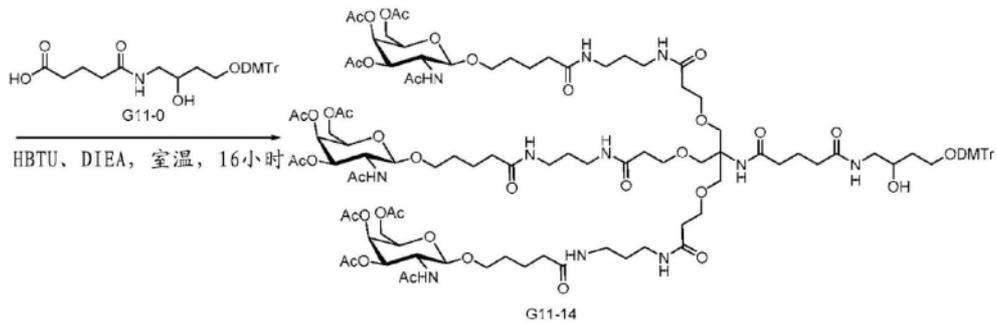
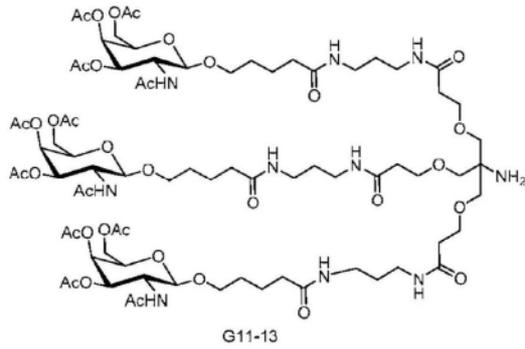


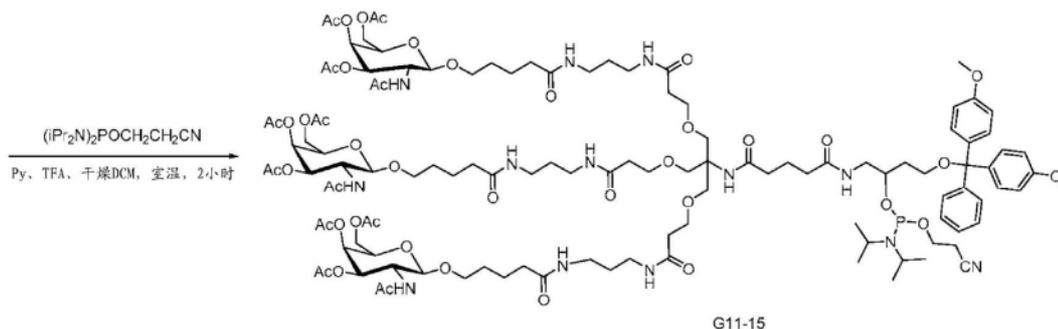
[0217]



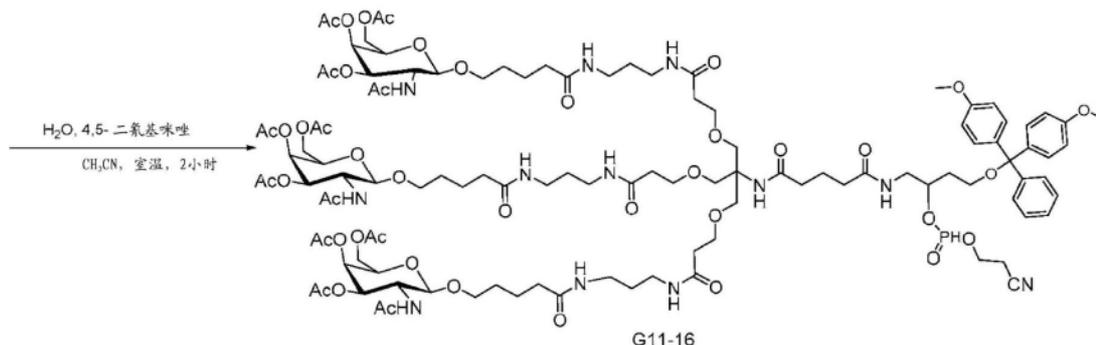


[0218]





[0219]



[0220] 在氮惰性气氛下,在室温下随着搅拌向环氧乙烷-2,6-二酮(1000g,8.76mol,1.00当量)、4-二甲氨基吡啶(53.5g,437.9mmol,0.05当量)于二氯甲烷(10000mL)中的溶液滴加苯甲醇(900g,8.32mol,0.95当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。用饱和碳酸氢钠溶液洗涤所得的混合物。用10%盐酸调节水层的pH值至1。使用乙酸乙酯萃取所得的溶液,并合并有机层。用饱和氯化钠洗涤所得的混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。这获得1240g(64%)为无色油的G11-1。MS m/z [M+H]⁺ (ESI):223。

[0221] 在0℃下随着搅拌向G11-1(500g,2.24mol,1.00当量)于四氢呋喃(4000mL)中的溶液逐滴添加硼烷-二甲基硫醚络合物(270mL,1.20当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。然后通过添加200mL甲醇来淬灭反应。减压浓缩所得混合物。将残余物施加到硅胶柱上。这获得312g(67%)为黄色油的G11-2。MS m/z [M+H]⁺ (ESI):209。

[0222] 向(3R,4R,5R,6R)-2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)环氧乙烷-3-氯化铵(1000g,4.63mol,1.00当量)在吡啶(10000mL)中的溶液添加乙酸酐(3560g,34.9mol,7.50当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。减压浓缩所得混合物。通过从冰/水重结晶纯化该粗产物。这获得1450g(80%)为白色固体的G11-3。MS m/z [M+H]⁺ (ESI):390。

[0223] 在氮惰性气氛下,在室温下向G11-3(100g,256.84mmol,1.00当量)于二氯甲烷(10L)中的溶液添加三氯化铁(125g,771.60mmol,3.00当量)。在室温下将所得溶液搅拌3小时。用水和饱和氯化钠洗涤所得混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。这获得52g(61%)为棕色油的G11-4。将产物直接用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0224] 在氮惰性气氛下,在0℃下随着搅拌向G11-4(52g,157.91mmol,1.00当量)、5-羟基戊酸苄酯(42.7g,205.04mmol,1.30当量)在2-二氯乙烷(500mL)中的溶液逐滴添加三甲基硅烷基三氟甲磺酸酯(10.5g,47.24mmol,0.30当量)。在室温下将所得溶液搅拌1h。通过添加冰/水来淬灭该反应。使用二氯甲烷萃取所得的溶液,并合并有机层。用水和饱和氯化钠洗涤所得混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。将残余物施

加到硅胶柱上。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。这获得46.4g (55%) 为浅黄色油的G11-5。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 538。

[0225] 向G11-5 (10g, 18.60mmol, 1.00当量) 于乙酸乙酯 (100mL) 中的溶液添加10% 活性炭 (1g)。抽空烧瓶并用氢吹扫五次。在室温下将所得溶液搅拌3小时。将固体滤出并用甲醇洗涤, 并且在高真空下干燥过夜。这获得6.82g (82%) 为白色固体的G11-6。

[0226] 在氮惰性气氛下, 在15°C下向2-氨基-2-(羟甲基) 丙烷-1,3-二醇 (300g, 2.48mol, 1.00当量) 在DMSO (500mL) 中的溶液添加5.0M 氢氧化钠 (49.5mL, 0.248mol, 0.1当量)。之后边搅拌边逐滴添加叔丁基丙烯酸酯 (1079g, 8.4mol, 3.4当量)。在25°C下搅拌所得的溶液24小时。用4×3000mL 乙酸乙酯萃取所得溶液, 并合并有机层。用水和饱和氯化钠洗涤所得混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得526g (42%) 为浅黄色油的G11-7。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 506.6。

[0227] 向G11-7 (50g, 99.0mmol, 1.00当量) 在CH₂Cl₂ (750mL) 中的溶液添加365mL的25% Na₂CO₃ 水溶液, 同时进行搅拌。之后在室温下边搅拌边逐滴添加氯甲酸苄酯 (50.5g, 0.297mol, 3.00当量)。在室温下将所得的溶液搅拌过夜。使用二氯甲烷萃取所得的溶液, 并合并有机层。用饱和氯化钠水溶液洗涤有机层, 置于无水硫酸钠上方干燥, 过滤, 并在减压下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得42.4g (67%) 为浅黄色油的G11-8。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 640.4。

[0228] 向G11-8 (300g, 468.9mmol, 1.00当量) 的溶液添加甲酸 (3L, 96%)。在25°C下搅拌所得的溶液16小时。减压浓缩反应混合物。用氢氧化钠 (1mol/L) 将该溶液的pH值调节至12。使用3×6L 乙醚萃取所得的溶液, 并合并水层。使用盐酸 (2mol/L) 将水层的pH调节至4。用4 乙酸乙酯萃取所得溶液。将有机层合并置于无水硫酸钠上方干燥, 过滤并在减压下浓缩。这获得198.96g (90%) 为黄色油的G11-9。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 472。

[0229] 向G11-9 (264g, 560.51mmol, 1.00当量) 在二氯甲烷/乙腈 (1400mL/1400mL) 中的溶液依次添加N,N-二异丙基乙胺 (578.4g, 4.484mol, 8当量)、O-苯并三唑-N,N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓 (848g, 2.231mol, 4.00当量)。在25°C下搅拌所得的溶液30分钟。这之后在25°C下添加N-(3-氨基丙基) 氨基甲酸叔丁酯 (390g, 2.238mol, 4.00当量)。在25°C下搅拌所得的溶液6小时。减压浓缩所得溶液。用3000mL 二氯甲烷稀释残余物。将有机层分别用饱和碳酸氢钠溶液、饱和氯化铵和饱和氯化钠洗涤。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。将残余物施加到硅胶柱上。这获得336g (70%) 为白色泡沫的G11-10。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 941。

[0230] 向G11-10 (350g, 372.3mmol, 1.00当量) 于二氯甲烷 (1.4L) 中的溶液添加三氟乙酸 (350mL)。在25°C下搅拌所得的溶液4小时。减压浓缩所得混合物。这获得470g (粗) 为红色油的G11-11。MS m/z [M+H]⁺ (ESI) : 641。

[0231] 在氮惰性气氛下, 在室温下向G11-6 (66g, 147.51mmol, 3.50当量)、和N,N-二异丙基乙胺 (37g, 286.29mmol, 6.78当量) 于二氯甲烷/乙腈 (200mL/200mL) 中的溶液添加1-羟基苯并三唑 (24.5g, 181.48mmol, 4.30当量) 和O-苯并三唑-N,N,N-四甲基六氟磷酸盐脲鎓 (56g, 147.66mmol, 3.50当量)。将所得的溶液在室温下搅拌30分钟。这之后在室温下添加苄基G11-11 (41.4g, 42.20mmol, 1.00当量)。在室温下, 随着搅拌使所得的溶液反应过夜。减压浓缩所得混合物。用二氯甲烷稀释所得的溶液。分别用饱和碳酸氢钠和饱和氯化钠洗涤所

得混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。这获得41.2g (51%) 为浅黄色固体的G11-12。MS m/z $[M/2+H]^+$ (ESI): 965。

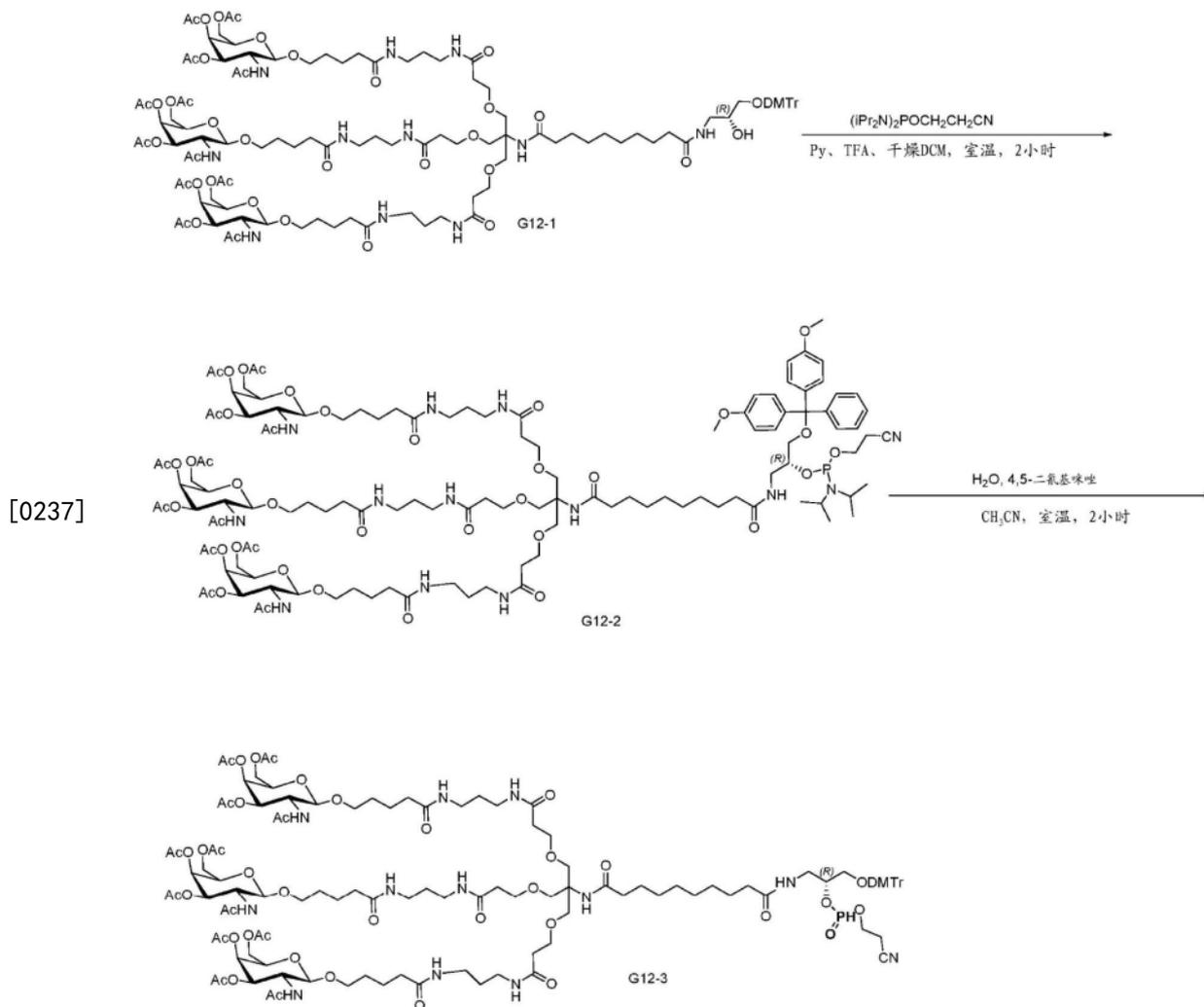
[0232] 在室温下,向G11-12 (20g, 10.37mmol, 1.00当量) 于甲醇 (200mL) 中的溶液添加10% 活性碳钡 (2g)。抽空烧瓶并用氢吹扫五次。在室温下将所得溶液搅拌4小时。滤出固体。减压浓缩所得混合物。这获得16.5g (89%) 为白色固体的G11-13。MS m/z $[M/2+H]^+$ (ESI): 898。

[0233] 向N,N-二甲基甲酰胺 (500mL) 中的G11-0 (12.8g, 24.57mmol, 1.00当量) 的溶液添加N,N-二异丙基乙胺 (9.0g, 69.64mmol, 3.00当量)、0-苯并三唑-N,N,N-四甲基六氟磷酸脲鎓 (9.9g, 27.03mmol, 1.10当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。然后添加G11-13 (44g, 24.57mmol, 1.00当量)。在室温下将所得溶液搅拌16小时。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。这获得22g (41%) 为浅黄色固体的G11-14。MS m/z $[M-H]^-$ (ESI): 2295。H-NMR (DMSO, 400MHz): 7.79-7.83 (m, 6H), 7.70-7.73 (m, 4H), 7.33-7.35 (m, 2H), 7.26-7.30 (m, 2H), 7.19-7.22 (m, 5H), 7.01 (s, 1H), 6.84-6.87 (m, 4H), 5.19-5.20 (d, $J=4.0$ Hz, 3H), 4.93-4.97 (m, 3H), 4.58-4.59 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 4.46-4.48 (d, $J=8.0$ Hz, 3H), 3.95-4.04 (m, 9H), 3.82-3.89 (m, 3H), 3.67-3.71 (m, 9H), 3.45-3.61 (m, 12H), 3.36-3.41 (m, 3H), 2.94-3.09 (m, 16H), 2.24-2.27 (m, 6H), 2.00-2.08 (m, 29H), 1.87 (s, 9H), 1.75 (s, 9H), 1.63-1.69 (m, 3H), 1.41-1.51 (m, 19H)。

[0234] 在氮惰性气氛下,在室温下向G11-14 (2g, 0.87mmol, 1.00当量) 于二氯甲烷 (20mL) 中的溶液添加双(二异丙氨基氨基)(2-氰基乙氧基)膦 (786.7mg, 1.62mmol, 3.00当量)。这之后在室温下添加三氟乙酸吡啶 (336.3mg, 1.74mmol, 2.00当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。减压浓缩所得混合物。这获得2.0g (粗) 为黄色油的G11-15。将产物直接用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0235] 在氮惰性气氛下,在室温下向G11-15 (2g, 0.80mmol, 1.00当量) 于乙腈 (20mL) 中的溶液添加水 (43mg, 2.4mmol, 3.00当量) 和4,5-二氰基咪唑 (113mg, 0.96mmol, 1.20当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物。用二氯甲烷萃取产物级分。用饱和氯化钠洗涤所得的混合物。将该有机层置于无水硫酸钠上方干燥、过滤并减压下浓缩。这获得1.025g (53%) 为白色固体的G11-16。MS m/z $[M-H]^-$ (ESI): 2412。H-NMR (DMSO- d_6 , 400Hz): 8.10-7.90 (m, 1H), 7.85-7.7.81 (m, 6H), 7.75-7.72 (m, 3H), 7.35-7.22 (m, 9H), 7.05-7.00 (m, 1H), 6.89-6.87 (m, 4H), 5.21-5.20 (d, $J=3.2$ Hz, 3H), 4.98-4.95 (m, 3H), 4.50 (s, 1H), 4.47-4.40 (m, 3H), 4.04-4.01 (s, 11H), 3.88-3.85 (m, 3H), 3.73-3.69 (m, 9H), 3.55-3.52 (m, 12H), 3.41-3.39 (m, 3H), 3.20 (s, 2H), 3.04-3.00 (m, 14H), 2.85-2.75 (m, 2H), 2.49-2.29 (m, 6H), 2.10-1.99 (m, 28H), 1.89-1.77 (m, 11H), 1.77-1.70 (m, 9H), 1.70-1.65 (m, 2H), 1.52-1.45 (m, 18H)。PNMR (CD_3OD , 400Hz): 7.957, 7.927。

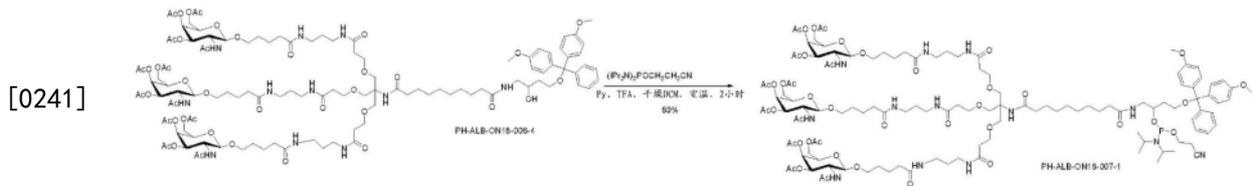
[0236] GalNAc-12的合成



[0238] 在氮惰性气氛下,在室温下向G12-1 (4.0g, 1.70mmol, 1.00当量)于二氯甲烷(40mL)中的溶液添加双(二异丙氨基氨基)(2-氰基乙氧基)膦(922.6mg, 3.06mmol, 1.80当量)。在室温下,向此添加三氟乙酸吡啶(525mg, 2.72mmol, 1.60当量)。在室温下将所得溶液搅拌1h。减压浓缩所得混合物。这获得3.0g(粗)为黄色油的G12-2。

[0239] 在氮惰性气氛下,在室温下向G12-2(3.0g, 1.18mmol, 1.00当量)于乙腈(30mL)中的溶液添加水(166mg, 9.22mmol, 7.85当量)。在室温下,向此添加4,5-二氰基咪唑(63.4mg, 0.54mmol, 0.46当量)。在室温下将所得溶液搅拌1h。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物(2.5g)。这获得2.0542g(71%)为白色固体的G12-3。MS m/z [M-H]⁻(ESI): 2468。¹H-NMR(DMSO- d_6 , 400Hz): 7.91-7.80(m, 7H), 7.74-7.71(m, 3H), 7.38-7.31(m, 4H), 7.29-7.23(m, 5H), 6.97(s, 1H), 6.87-6.81(m, 4H), 5.21(s, 3H), 4.98-4.94(m, 3H), 4.60(s, 1H), 4.49-4.47(d, J=8.4Hz, 3H), 4.25-4.10(m, 2H), 4.02(s, 9H), 3.88-3.85(m, 3H), 3.73-3.68(m, 9H), 3.55-3.52(m, 11H), 3.52-3.41(m, 3H), 3.20(s, 3H), 3.04-2.92(m, 13H), 2.90-2.89(m, 2H), 2.29-2.10(m, 6H), 2.09-1.99(m, 28H), 1.89-1.80(m, 9H), 1.77-1.71(m, 9H), 1.52-1.37(m, 23H), 1.19(s, 9H)。P-NMR(DMSO- d_6 , 400Hz): 8.456。

[0240] GalNAc-13的合成

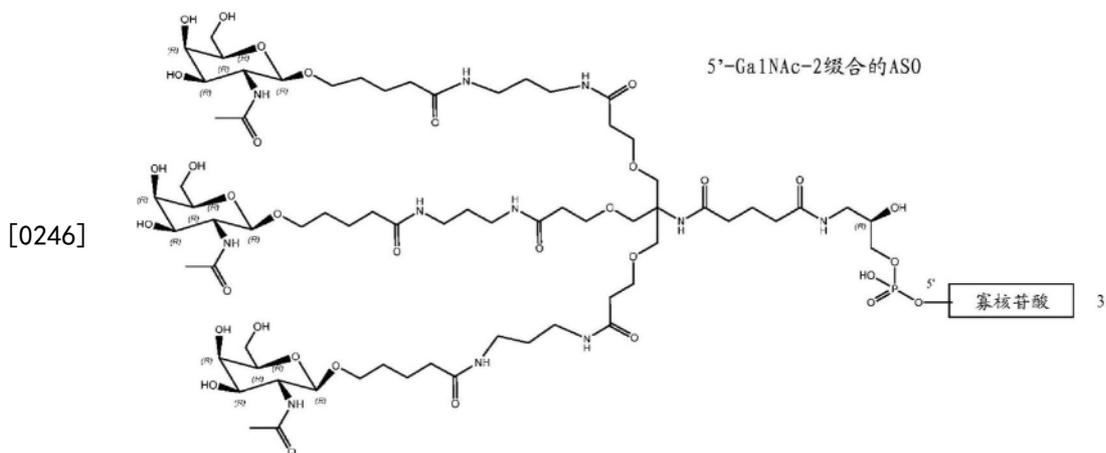


[0242] 在氮惰性气氛下,在室温下向G13-1 (4.0g, 1.70mmol, 1.00当量)于二氯甲烷(40mL)中的溶液添加双(二异丙氨基氨基)(2-氰基乙氧基)膦(690mg, 2.29mmol, 1.80当量)。在室温下,向此添加三氟乙酸吡啶(390mg, 2.02mmol, 1.60当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。减压浓缩所得混合物。这获得2.5g(粗)为黄色油的G13-2。

[0243] 在室温下向G13-2 (2.3g, 0.90mmol, 1.00当量)于乙腈(22mL)和水(50mg, 2.78mmol, 3.00当量)中的溶液添加4,5-二氰基咪唑(0.12g, 101.69mmol, 1.20当量)。在室温下将所得溶液搅拌2小时。减压浓缩所得混合物。通过快速制备型HPLC纯化粗产物(2.3g)。这获得2.076g(94%)为灰白色固体的G13-3。MS m/z [M+Na]⁺ (ESI): 2506。¹H-NMR (DMSO-d₆, 300Hz): 8.05-7.90 (m, 1H), 7.80-7.71 (m, 9H), 7.38-7.22 (m, 9H), 6.95 (s, 1H), 6.89-6.86 (m, 4H), 5.21 (s, 3H), 4.99-4.94 (m, 3H), 4.65-4.40 (m, 4H), 4.02 (s, 11H), 3.88-3.85 (m, 3H), 3.73-3.68 (m, 9H), 3.56-3.51 (m, 12H), 3.42-3.38 (m, 3H), 3.32 (s, 2H), 3.04 (s, 14H), 2.84-2.82 (m, 2H), 2.29-2.22 (m, 6H), 2.10-1.99 (m, 28H), 1.89 (s, 10H), 1.77 (s, 10H), 1.52-1.45 (m, 22H), 1.22 (s, 9H)。P-NMR (DMSO-d₆, 300Hz): 7.867。

[0244] GalNAc缀合

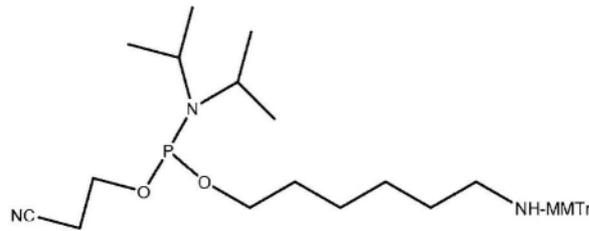
[0245] 对于制备所述5' GalNAc缀合的低聚物,具有下列修饰: 2'-F-NPS-PS-2'-F-NPS; 2'-F-NP-PS-2'-F-NP; 2'-OMe-NP-PS-2'-OMe-NP; 2'-OMe-NPS-DNA-PS-2'-OMe-NPS、2'-OEt-NPS-DNA-PS-2'-OEt-NPS和2'-MOE-NPS-DNA-PS-2'-MOE-NPS, 该合成以10至200 μ m规模,在5'至3'方向实施,具有5'-亚磷酰胺单体在无水CH₃CN中被稀释成0.1M的浓度,在5-(苄硫基)-1H-四唑活化剂的存在下(偶合时间2.0-4.0分钟),变成GalNAc2-CPG。与经修饰规程的偶合循环之后进行标准封端、氧化和脱保护,得到经修饰寡核苷酸。逐步偶合效率超过98%。将DDTT(二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮用作硫转移剂,以用于合成寡核糖核苷酸硫代磷酸酯。将二甲基吡啶:乙腈(1:1)中0.2M的苯乙酰二硫化物(PADS)用作大规模合成中的硫化剂(Akta0P-100)。在室温,在摇动器上将承载寡核苷酸的固体载体与氨水/甲胺(1:1)溶液一起加热3小时以从载体上裂解并脱保护所述碱基不稳定保护基团。



[0247] 3'-C6NH₂-NPS-PS-NPS- (前体) 合成

[0248] 对于制备所述3' Ga1NAc缀合的低聚物,具有下列修饰:2'-F-NPS-PS-2'-F-NPS; 2'-F-NP-PS-2'-F-NP; 2'-OMe-NP-PS-2'-OMe-NP; 2'-OMe-NPS-DNA-PS-2'-OMe-NPS、2'-OEt-NPS-DNA-PS-2'-OEt-NPS和2'-MOE-NPS-DNA-PS-2'-MOE-NPS ASOs以10 μ mol规模,使用通用的载体(负载量65 μ mol/g)合成。合成方法与上文所述相同。在3'-末端将引入C6-NH₂连接基,使用0.1M乙腈中的6-(4-甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酸胺具有10分钟的偶合时间。在摇动器上,将承载寡核苷酸的固体载体在室温下与氨水/甲胺(1:1)溶液一起加热3小时以从载体上裂解,并脱保护所述碱基不稳定保护基团。在IEX纯化以及脱盐之后,该C6-NH₂修饰的ASO可被用于执行后合成缀合。

[0249]



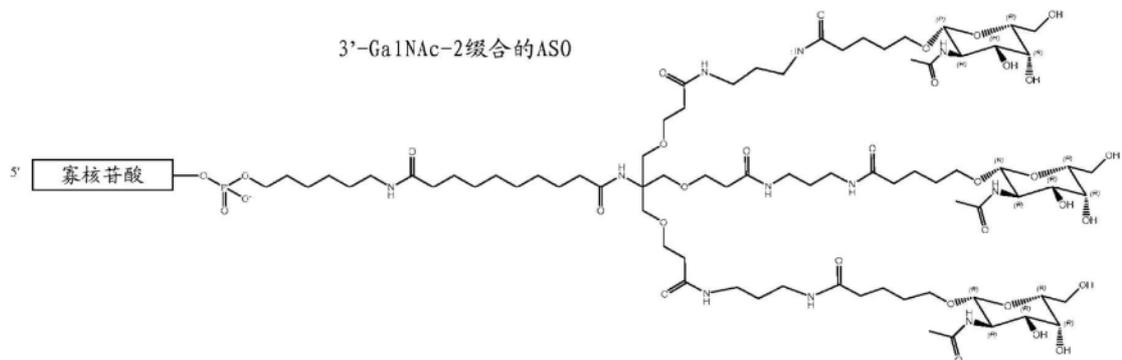
5'-氨基-调节剂C6

6-(4-甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酸胺

[0250] 3'-Ga1NAc NPS-PS-NPS-ASO合成(后合成缀合)

[0251] 将3'-C6-NH₂修饰的ASO溶解于0.2M碳酸氢钠缓冲液中,pH 8.5(0.015mM),并且添加溶解于DMSO中的5-7mol Ga1NAc-6酯的等同物。在室温下持续搅拌该反应混合物4小时。分析样品以确认是否任何未反应的氨基修饰的ASO的存在。向该氨水(28重量%)添加(5 \times 反应体积)并在室温下持续搅拌2-3小时。在减压下浓缩反应混合物,并且将残余物溶解于水中,并通过HPLC在强阴离子交换柱上纯化。

[0252]

[0253] 3'-Ga1NAc6缀合

寡核苷酸的浓度	GalNAc 6 PFP 酯的等同物	温度(°C)	到 3' Ga1NAc ASO 的转化率%
0.015mM	5	25	75
0.0076mM	7	25	80
0.0076mM	4	25	65

[0255] 粗低聚物的定量或原始分析

[0256] 将样品溶解于去离子水中(1.0mL),并如下定量:首先单独用水执行空白(1.0mL),将20 μ l的样品和980 μ L的水在微量离心管中充分混合,转移至比色管并在260nm处获得吸光

度读数。将粗料干燥冷却并储存于-20℃下。

[0257] 粗HPLC/LC Ms分析

[0258] 将粗制样品的0.10D提交用于粗MS分析。在确认粗LC-MS数据之后,执行纯化步骤。

[0259] HPLC纯化

[0260] 通过阴离子交换HPLC纯化具有和不具有GalNAc缀合物的氨基磷酸酯(NP)和硫代氨基磷酸酯(NPS)修饰的寡核苷酸。缓冲剂为20mM的10%CH₃CN中的磷酸钠,pH 8.5(缓冲剂A)和20mM的10%CH₃CN中的磷酸钠,1.8M NaBr,pH8.5(缓冲剂B)。将含有全长寡核苷酸的级分合并、脱盐并冻干。

[0261] 纯化的低聚物的脱盐

[0262] 然后使用Sephadex G-25 M(Amersham Biosciences)将纯化的干燥低聚物脱盐。用10mL的去离子水三次调理滤筒。最后,将纯化的低聚物彻底溶解于2.5mL的RNA酶游离水中,以非常缓慢的滴落方式洗脱将其施用至滤筒。用3.5mL去离子水洗脱不含盐的低聚物直接进入螺帽小瓶中。

[0263] 络合寡核苷酸的稳定性测试

[0264] 在实施方案中,与相同序列的未修饰的寡核苷酸相比,所公开的寡核苷酸对靶核酸序列显示出增加的亲和力。例如,在一些序列中,本发明所公开的寡核苷酸具有与靶核酸序列互补或杂交的核碱基序列,该核酸序列具有比相同序列的未修饰的寡核苷酸更高的亲和力。在实施方案中,与互补靶核酸序列络合的所公开的寡核苷酸具有>37℃的熔融温度T_m。络合物可在生理条件或几乎生理条件下形成,诸如在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。在实施方案中,络合物的T_m为>50℃。在实施方案中,络合物的T_m为50-100℃。在实施方案中,在生理条件或几乎生理条件下与靶核酸序列双联的本发明所公开的寡核苷酸的T_m为>50℃。

[0265] 在某些实施方案中,靶核酸序列可选自己知的病毒DNA或RNA序列,诸如HBV基因组的核酸序列。

[0266] 在实施方案中,所公开的寡核苷酸显示出对HBV基因组或其RNA等同物的下列六个序列中的至少一个亲和力,并且/或者显示出与HBV基因组的至少一个序列或其RNA等同物络合的稳定性。在实施方案中,与互补HBV基因组序列络合的寡核苷酸具有>37℃的熔融温度(T_m)。HBV基因组可为RNA序列,诸如DR-1和/或DR-2 RNA序列。络合物可在生理条件或几乎生理条件下形成,诸如在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。在实施方案中,络合物的T_m为>50℃。在实施方案中,络合物的T_m为50-100℃。在实施方案中,在生理条件或几乎生理条件下与HBV RNA双联的本发明所公开的寡核苷酸的T_m为>50℃。

[0267] 寡核苷酸的体外测试

[0268] 使用两条HBV细胞系评估寡核苷酸的体外效能:HepG2.2.15(2215)和HepG2.117(2117)。使用HepG2.2.15细胞测量在上清液(sup)中HBsAg减少以及细胞毒性。在HepG2.117细胞中测量了在上清液以及细胞内级分中的HBVDNA减少。

[0269] HepG2.2.15细胞系是具有四个完整的HBV基因组的稳定的细胞系。细胞在37℃下于5%CO₂的气氛中,在Dulbecco的修饰的Eagle的培养基中生长,所述培养基补充有10%FCS、100IU/mL青霉素、100μg/mL链霉素和2%谷氨酰胺。在给药前一天,将2.5×10⁴细胞/孔接种于胶原涂覆的96孔板中并温育过夜。在给药当天,遵循制造商的规程,用Lipofectamine RNAiMax(马萨诸塞州,沃尔瑟姆,赛默飞世尔(Thermo Fisher,Waltham,

MA)) 将连续稀释的低聚物转染到细胞中。针对每种药物浓度进行重复,并且将每种寡核苷酸设置用于EC50测量和CC50测量两者。转染后三天,收集上清液(sup)并用于HBsAg ELISA(中国,安图生物(AutoBio,China))用于EC50计算。对于CC50测量,遵循制造商的说明,将CellTiter-Glo[®](威斯康星州,麦迪逊,普洛麦格(Promega, Madison, WI))用于测定。

[0270] HepG2.117是在TetOFF(在不存在四环素或其同系物强力霉素下诱导转录)的规则下,拥有HBV基因组(ayw亚型)的完整1.05拷贝的稳定的肝癌细胞系。细胞在37°C下于5%CO₂的气氛中,在DMEM/F12培养基中生长,所述培养基补充有10%FCS、100IU/mL青霉素、100μg/mL链霉素、2%谷氨酰胺、250μg/mL G418和2μg/mL四环素。在给药前一天,移除细胞培养基中含有的四环素,将细胞洗涤以移除残余的四环素,并用处理培养基(DMEM/F12,含有2% Tet-系统核准的FBS 100IU/mL青霉素、100μg/mL链霉素和2%谷氨酰胺)以 2.5×10^4 细胞/孔接种于胶原涂覆的96孔板中。然后将细胞温育过夜。在实验当天,遵循制造商的规程,用Lipofectamine RNAiMax(马萨诸塞州,沃尔瑟姆,赛默飞世尔(Thermo Fisher, Waltham, MA))将连续稀释的低聚物转染到细胞中。针对每种药物浓度进行重复,并且将每种寡核苷酸设置用于EC50测量和CC50测量两者。转染后四天,收集上清液以直接用于HBV DNA qPCR。用MagMAX[™]总核酸分离试剂盒(赛默飞世尔)分离来自细胞的HBV DNA,然后作为模板施用到qPCR中。HBV的ayw亚型DNA(检索号V01460)序列被用于设计(赛默飞世尔,引物探针设计软件(primer Express, Thermo Fisher))正向引物(5'-TTG CCT TCT GAC TTC TTT CCT TCT-3')、反向引物(5'-TGC CTG AGT GCT GTA TGG TGA G-3')以及用FAM(6-羧基荧光素)在5'处和用TAMRA(6-羧基四甲基若丹明)3'处标记的荧光底物TaqMan[®]探针(5'-TCG GGA AGC CTT AGA GTC TCC TGA-3')。这些引物和探针用于通过AmpliTaq黄金DNA聚合酶(马萨诸塞州,沃尔瑟姆,珀金埃尔默生命科学(Perkin Elmer Life Science, Waltham, MA))进行定量实时PCR。该反应的条件如下:1循环,在95°C下热启动10分钟,之后进行50次变性循环(95°C, 15秒)和退火/聚合(59°C, 1分钟)。

[0271] 原发性人类肝细胞中感染HBV系统

[0272] 解冻冷藏保存的原发性人类肝细胞(PHH),并以200,000个细胞/孔接种于24孔板中。使细胞在37°C 5%CO₂中恢复过夜。以感染复数50-100,用HBV感染细胞0/N(37°C/5%CO₂)。在感染过夜后,移除病毒种菌,并用预热的洗涤培养基洗涤细胞三次。然后用新鲜的PHH培养的培养基再填充。用450μl新鲜培养基替换该培养基。添加50u1转染混合物。将在Opti-MEM I(生命技术(Life Technology), Cat#:31985-070)中的低聚物稀释至20x的最终浓度,与等体积的含有Lipofectamine RNAiMAX(英杰生命技术(Invitrogen), Cat#:13778-150)的Opti-MEM I混合,用移液管移3次,并在室温下温育10-20分钟。添加50u1寡核苷酸:RNAiMAX混合物至孔中,用手轻敲板几次。将板放回培养箱中。在测定日,对于HBsAg和HBeAg ELISA的上清液,收获用于细胞活力的细胞。HBsAg ELISA描述于上文部分中。对于HBeAg,使用来自安图生物诊断(Autobio Diagnostics)(CL0312-2)的方法。

[0273] 寡核苷酸的体内测试

[0274] AAV/HBV是携带可复制HBV基因组的重组AAV。利用基因型8AAV高度嗜肝的特征,HBV基因组可被有效地递送至递小鼠肝脏细胞。用AAV/HBV感染免疫活性小鼠可导致长期HBV病毒血,其模拟患者中慢性HBV感染。AAV/HBV模型可用于评估各种类型抗-HBV药剂的体

内活性。小鼠在研究的-28天用AAV-HBV感染。在第0、2和4天,以指定的剂量水平皮下剂量(除非另外指明)测试物或阴性对照(PBS)。或者,它们可在第0天以指定的剂量水平作为单剂量注射。对于HBV DNA,但不是对于HBV抗原,每天口服阳性对照恩替卡韦(ETV)。通过实时PCR,通过ELISA和HBV DNA测定血清HBVS抗原(HBsAg)和E抗原(HBeAg)。ELISA方法和qPCR方法已描述于上文体外测定部分中。

[0275] 以下陈述描述了如何生成表1-22中的数据。对于所述体外HBsAg细胞系EC50和CC50的数据,使用HepG2.2.15的方法,因此,在其中显示数据的列或行中标记“2215”。对于所述体外HBV DNA细胞系EC50和CC50的数据,使用HepG2.117的方法,因此,在其中显示数据的列或行中标记“2117”。对于在HBV/PHH传染性系统中测试的所有体外HBsAg以及HBeAg EC50数据,使用PHH方法,因此在其中显示数据的列或行中标记“PHH”。对于小鼠模型体内产生的AAV-HBV,应用上文体内部分的方法。最大HBsAg(或HBeAg)减少描述为最低点(单位对数减少),并且最低点被标记在显示数据的列或行中。两个ASO通常比较它们的最低点。如果比较非最低点的值,则在文本中指示它们。

[0276] 治疗方法

[0277] 患有HBV感染的成年人类静脉内注射本公开的治疗有效化合物,例如选自表1-22的化合物。继续治疗,直至改善HBV的一种或多种症状,或例如降低血清HBV S抗原(HBsAg)和/或E抗原(HBeAg)水平。

[0278] 患有HBV感染的成年人类皮下注射本公开的治疗有效化合物,例如选自表1-22的化合物。继续治疗,直至改善HBV的一种或多种症状,或例如降低血清HBV S抗原(HBsAg)和/或E抗原(HBeAg)水平。

[0279] 表1

序列	T _m (°C)	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg	最大 HBeAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg	
258	77.2	3.4 log	2.7 log	
[0280] 259	69.9	2.4 log	1.9 log	
改善	7.3	1 log	0.8 log	
#	序列(5'-3')			分子量
258	5'-mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGps			8862.97
[0281] 259*	TpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNAc6-3'			9008.93
	5'-moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5me)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5me)moeC-po-GalNAc2-3'			

[0282] *还测试了序列260和261并提供类似的结果。

[0283] 表2

序列	T _m (°C)	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×10mg/kg	最大 HBeAg 减少(最 低点) 3×10mg/kg
262	77.3	3.1 log	2.5 log
263	69.9	2.4 log	1.9 log
改善	7.4	0.7 log	0.6 log
[0284] #	序列(5'-3')		分子量
262*	5'-GalNAc 2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnps GpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeU npsmoeGnpsmoeCn 3'		8941.00
263	5'-moeGps(5me)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGps GpsTpsGpsApsApsGps(5me)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeT psmoeGps(5me)moeC-GalNAc2-3'		9008.93

[0285] *5' -GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m) CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'

[0286] 和

[0287] 5' -GalNAc1-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3' 也被测试并提供类似的结果。

[0288] 表3

序列	最大 HBsAg 减少(最 低点) 3×5mg/kg	最大 HBeAg 减少(最 低点) 3×5mg/kg	
266	2.3 log	2.1 log	
267	2.2 log	1.9 log	
改善	0.1 log	0.2 log	
[0289] #	序列(5'-3')		分子量
266*	5-GalNAc2- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3		8736.73
267	5'-GalNAc6- NH-C6- moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsA psApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC-3'		9105.14

[0290] *5' -GalNAc2-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m) CpsGps ApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3' 也被测试并提供类似的结果。

[0291] 如在上文中可见到的,MOE NPS低聚物在体内比MOE PS更有效,并且OMe NPS与MOE PS低聚物一样有效。

[0292] 体外和体内测试了两种寡核苷酸,第一个含有OEt NPS取代,并且第二个具有MOE NPS。下表4汇总了测试的结果。

[0293] 表4

序列	最大 HBsAg 减少 (最低点) 3×5mg/kg	最大 HBeAg 减少 (最低点) 3×5mg/kg
269	1.9 log	1.7 log
270	1.9 log	1.8
差值	0 log	-0.1 log
#	序列(5' -3')	

[0295]

269	5' -GalNAc2-etoGnps(5m)etoCnpsetoAnpsetoGnpsetoAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApssetoAnpsetoGnpsetoTnpsetoGnps(5m)etoCn-3'
270	5-GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnps GpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3

[0296] 如在上文中可见到的,MOE NPS低聚物具有与OEt NPS低聚物类似的活性。

[0297] 体外测试四个寡核苷酸,第一个含有MOE PS取代,第二个具有MOE NPS取代,第三个具有OME PS取代,第四个具有OME NPS。下表5汇总了测试的结果。

[0298] 表5

序列	2215 HBsAg EC50(nM)	T _m (°C)
271	5	69.9
272	0.7	77.3
273	5	70.7
274	0.9	75.5

[0299]

#	序列(5'-3')	MW
271	5'-moeGpsmoemCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTps GpsApsApsGps5mCpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGpsmo emC 3'	7344.19
272	5'moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsA psApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn 3'	7276.27
273	5'-mGps5mmCpsmApsmGpsmApsGpsGpsTpsGpsApsAps Gps5mCpsGpsApsmApsmGpsmUpsmGps5mmC-3'	6889.64
274	5'-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsAps GpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3'	6837.71

[0300] 在体内测试两个寡核苷酸,第一个含有5' Ga1NAc-2' -MOE NPS取代,第二个具有5' -Ga1NAc-6:MOE PS取代。下表6汇总了测试的结果。

[0301] 表6

#	序列(5'-3')	MW
275	5'-GalNAc2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCn-3'	8957.00
276	5'-GalNac6-NH-C6-moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsAps ApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moe C-3'	9105.14

[0302]

剂量	HBsAg 最大降低(最低点)的改善
3×5mg/kg	0.4 Log(2.5 倍)
1×5mg/kg	0.5 log(3.2 倍)

[0303] 在体内测试两个寡核苷酸,第一个含有3' GalNAc-2' -MOE NPS取代,第二个具有3' -GalNAc2' -MOE PS取代。下表7汇总了测试的结果。

[0304] 表7

#	序列(5'-3')	MW
277	5'moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsAps Gps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5me)moeC-GalNAc2-3'	9008.93
258	5'-mGnpsmoeCnpsmoeAnpsmGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsC psGpsApsmoeAnpsmGnpsmoeUnpsmGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNAc6 3'	8862.97

[0305]

序列	277	258	改善
T _m (°C)	69.9	77.2	7.3
2215 HBsAg 体外 EC50(nM)	5	0.7	7.1-折叠
最大 HBsAg 减少(最低	2.4 log	3.4 log	1 log(10 倍)

[0306]

点)3×10mg/kg			
最大 HBeAg 减少(最低点)3×10mg/kg	1.9 log	2.7 log	0.8 log(6.3 倍)

[0307] 在体内测试两个寡核苷酸,第一个含有OME NPS取代,第二个具有OME PS取代取代。

[0308] 表8

#	序列(5'-3')	MW	
278	5-GalNac2- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsA psmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3'	8502.45	
[0309] 279	5- mGps(5m)mCpsmApsmGpsmApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsG psApsmApsmGpsmUpsmGps(5m)mC-GalNac1-3'	8650.54	
OME NPS 优于 OME PS 的改善		最大 HBsAg 减少(最低点)改善	最大 HBeAg 减少(最低点)
3×10mg/kg		0.9 Log(8 倍)	0.5 Log(3.2 倍)

[0310] 在HBV小鼠模型中测试以下序列。在1×10mg/kg剂量下,3' GalNac MOE NPS维持与5' GalNac MOE PS相比高达0.8log (6倍)的功效,在21天研究的大部分时间维持优势。5' GalNac MOE NPS维持与5' GalNac MOE PS相比高达0.4log (2.5倍)的功效,在21天研究的大部分时间维持优势。在3×3.3mg/kg剂量下,3' GalNac MOE NPS和5' GalNac MOE NPS的表现相似,两者维持与5' GalNac MOE PS相比高达0.6log (4倍)的功效,在21天研究的大部分时间维持优势。

[0311] 表9

#	化学	序列(5' - 3')	MW
[0312] 276	MOE PS	5'-GalNac6-NH-C6- moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTps GpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTps moeGps(5m)moeC-3'	9105.14
[0313] 280	MOE NPS	5'-GalNac2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps (5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCn-3'	8957.00

[0314] 在HBV小鼠模型中测试以下序列。

[0315] 表10

#	化学	序列(5' - 3')	MW
276	MOE PS	5'-GalNac6-NH-C6-moeGps(5m)moeCpsmoeApsmoeGpsmoeApsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeApsmoeGpsmoeTpsmoeGps(5m)moeC-3'	9105.14
[0316] 281	MOE NPS	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCnp-C6-NH-GalNac6-3'	9053.85
282	MOE NPS	5'-GalNac2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)CpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'	8957.00

[0317] 在HBV小鼠模型中测试以下序列。右列中的值示出了在第0、2、4天以3×10mg/kg的LOG剂量最大HBsAg降低。

[0318] 表11

#	化学	序列 5'-3'	最大HBsAg减少(最低点)	MW
[0319] 283	脱氧 NPS	5'-GalNac1-GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsAnpsGnpsTnpsGnpsCn-3'	1.1	8312.38
265	MOE NPS	5'-GalNac1-moeGnpsmoeCnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeAn	3.1	9037.17
[0320]		psGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmoeAnpsmoeGnpsmoeUnpsmoeGnpsmoeCn-3'		

[0321] 在HBV小鼠模型中测试以下序列。右列中的值示出了在第0、2、4天以3×10mg/kg的LOG剂量最大HBsAg降低。

[0322] 表12

[0323]

号	靶向 HBV 区域	化学	序列 5'-3'	log 中的最大 HBsAg 减少(最低点)	MW
283	DR2 #1	脱氧 NPS	5'-GalNAc1-GnpsCnpsAnpsGnpsAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsAnpsGnpsTnpsGnpsCn-3'	1.1	8312.38
284	DR2 #1	OME NPS	5'-GalNAc1-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmCn-3'	2.1	8598.62
285	DR2 #1	F NPS	5'-GalNAc1-fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGnps-3nh2-fC-3'	2.5	8478.26
286	DR2 #1	Ara F NPS	5'-GalNAc1-afGnpsafCnpsafAnpsafGnpsafAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsafAnpsafGnpsafTnpsafGnpsafCn-3'	0.5	8492.29
287	DR2 #2	脱氧 NPS	5'-GalNAc1-dTnpsGnpsCnpsAnpsGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAnpsAnpsGnpsTnps-3nh2-G-3'	1.1	8327.29
288	DR2 #2	OME NPS	5'-GalNAc1-mUnpsmGnpsmCnpsmAnpsmGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsmAnpsmAnpsmGnpsmUnpsmGn-3'	2.1	8599.60
289	DR2 #2	F NPS	5'-GalNAc1-	2.4	8479.

[0324]

			fUnpsfGnpsfCnpsfAnpsfGnpsApsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsfAnpsfAnpsfGnpsfUnps-3nh2-fG-3'		24
290	预聚物 A	OME NPS	5'-GalNAc1-mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnpsApsApsApsTpsTps5MeCpsTpsTpsTpsApsmUnpsmAnpsmAnpsmGnpsmGnpsmGn-3'	1.1	8807.84
291	预聚物 A	MOE NPS	5'-GalNAc1-moeGnpsmoeCnpsmoeUnpsmoeCnpsmoeCnpsApsApsApsTpsTps5MeCpsTpsTpsTpsApsmoeUnpsmoeAnpsmoeAnpsmoeGnpsmoeGnpsmoeGn-3'	2.0	9292.42

[0325] 表14

号	化学	MW	序列
294	F NPS 具有 OPO 连接至 3'GalNac	8507.3	5'- fGnps(5m)fCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsC psGpsApsfAnpsfGnpsfTnpsfGnpsfC-C6-NH-GalNac6-3'
295	F NPS 具有 NPO 连接至 3'GalNac	8492.29	5'- fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGps(5m)Cp sGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGnpsfCnp-C6-NH-GalNac6-3'

[0327] 表15

号	化学	MW	序列
296	OME NPS 具有 NPO 键合至 3'GalNac	8614.39	5-mGnpsmCnpsmAnps mGnpsmAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps mGnpsmCnp-C6-NH- GalNac6-3
297	OME NPS 具有 OPO 键合至 3'GalNac	8614.43	5-mGnpsmCnpsmAnps mGnpsmAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps mAnpsmGnpsmUnps mGnpsmC-C6-NH- GalNac6-3

[0329] 表16

号	化学	MW	序列
298	OME NPS 具有 NPO 键合至 3'GalNac	9054.52	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCnp-C6-NH- GalNac6-3'
299	MOE NPS 具有 NPO 键合至 3'GalNac	9069.62	5'-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnps(5m)moeC-C6-NH- GalNac6-3'

[0331] 表17

号	化学	MW	序列
300	5' GalNac MOE NPS	8955.48	5-GalNac2-moeGnpsmoeCnpsmoeAnps moeGnpsmoeAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps moeAnpsmoeGnpsmoeUnps moeGnpsmoeCn-3
301	5' GalNac OEt NPS	8697.6	5-GalNac2-etoGnpseto(5m)CnpsetoAnps etoGnpsetoAnpsGps GpsTpsGps ApsApsGps (5m)CpsGpsAps etoAnpsetoGnpsetoTnps etoGnpseto(5m)Cn-3'

[0333] 表18

号	序列 5'-3'	修饰	MW	2215 HBsA g EC50(uM)	2215 HBsA g CC50 (uM)
[0334]					
302	5-mGnpsmCnps2-4- OCH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTps GpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps3- NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x2 3'-NH-LNA-A	6835.3	0.0008	0.0148
303	5-mGnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGp sTpsGpsApsApsGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps 3-NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x2 3'-NH-ENA-A	6862.0	0.0006 7	0.0256
304	5-mGnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnps2- 4OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTpsGpsAps ApsGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps 3-NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x3 3'-NH-ENA-A	6874.7	0.0009	0.0214
305	5-mGnpsmCnpsmAnpsmGnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsGpsGpsTpsGpsApsA psGpsCpsGpsAps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmUnpsmGnps 3-NH ₂ mC-3	抗-DR-1 具有 x2 3'-NH-ENA-A	6863.3	0.0002 9	0.0226
[0335]					
306	5- mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTp sTpsTps mAnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3- NH ₂ mG-3	预聚物 A 具有 x2 3'-NH-ENA-A	7116.0	0.0005	>1.00
307	5- mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTp sTpsTps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmGnps3- NH ₂ mG-3	预聚物 A 具有 x3 3'-NH-ENA-A	7128.6	0.0005 5	>1.00
308	5- mGnpsmCnpsmUnpsmCnpsmCnps2- 4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTp sTpsTps2-4-OCH ₂ CH ₂ AnpsmUnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmAnpsmGnpsmGnps 3-NH ₂ mG-3	预聚物 A 具有 x3 3'-NH-ENA-A	7127.9	0.0006	>1.00

[0336] 表19

号	寡核苷酸(5'-3')	修饰	2215 HBsAg EC50(uM)	2215 HBsAg CC50 (uM)
	5- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsG psTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnps mGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	对照	---	---
309	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnpsmGnpsmA npsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsA psmAnpsmGnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 具有 3'-NH-ENA- G(1+1)	0.0013	0.0553
310	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsAp sApsGpsCpsGpsApsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 具有 3'-NH-ENA-G 2+2 3'-NH-ENA-G	0.0006	0.0230
311	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTp sGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGn psmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	DR-1 具有 3'-ENA-G & 3'- ENA A (1+1) 非对称的	0.00078	0.0305
312	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmC nps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTp sTps mAnpsmUnpsmAnps2-4- OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsm2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	预聚物 A 具有 1+1/1+1 3'-NH-ENA- G+A	0.0015	>1.00
313	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnpsmUnpsmCnpsmC npsmAnpsApsApsTpsTpsCpsTpsTps mAnpsmUnpsmAnpsmAnpsmGnpsm2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	预聚物 A 具有 3'-NH-ENA-G 1+1	0.0017	>1.00

[0337] 表20

号	实测值 MW:	寡核苷酸(5'-3')	修饰	HPLC 纯度	2215 HBsAg EC50(uM)	2215 HBsAg CC50 (uM)
314	6838.8	5- mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAn psmGnpsmUnpsmGnps3-NH ₂ mC-3	对照	86%	---	---
315	6902.9	5-mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsA psApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps3- NH ₂ mC-3	DR-1 2+1	83%	0.0033	>1.00
[0339] 316	6914.8	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4 OCH ₂ CH ₂ AnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTp sGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmG nps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmGnps2- OCH ₂ CH ₂ 3-NH ₂ (5me)C-3	DR-1 2+2	94%	0.0043 0.0025	>1.00
317	7169.0	5-2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmCnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmCnpsmCnpsmAnpsAps ApsTpsTpsCpsTpsTpsTpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmAnpsmGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ Gnps3-NH ₂ mG-3	预聚物 A 2+2	84%	0.0025	>1.00
318	7182.2	5-mGnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmUnps2-4 OCH ₂ CH ₂ (5me)CnpsmCnpsmAnpsApsApsTpsTps CpsTpsTpsTpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ TnpsmAnpsmAnps2-4 OCH ₂ CH ₂ GnpsmGnps3-NH ₂ mG-3	预聚物 A 2+2	95%	0.0051	>1.00

[0340] 在体内测试含有FNPS化学物质的三种寡核苷酸。第一个在5'端处作为三GalNac部分,第二个具有两个三GalNac部分,一个在5'端处,并且另一个在3'端处。第三寡核苷酸具有在5'端处的三GalNac部分和3'端处的单GalNac。下表21总结了测试的结果。

[0341] 表21

号	靶向 HBV 区域	化学	序列 5'-3'	log 中的最大 HBsAg 减少 (最低点)	MW
[0342] 319	DR2 #1	F NPS	5'-GalNac-fGnpsfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsfAnpsfGnpsfUnpsfGnps-3nh2-fCn-3'	2.0	8478.26
[0342] 320	DR2 #1	F NPS	5'-GalNac2-fGnps5mfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsGsApsfAnpsfGnpsfTnpsfGnpsfC-C6NH--GalNac6-3'	2.6	10172.08
[0342] 321	DR2 #1	F NPS	5'-GalNac2-fGnps5mfCnpsfAnpsfGnpsfAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsGsApsfAnpsfGnpsfTnpsfGnpsfC-C6NH-GalNac7-3'	2.3	8893.59

[0343] 在3×5mkp下在5'端和3'端处,GalNac缀合明显优于仅在5'端处的缀合,其中体内活性在某些时间点更好0.61log。

[0344] 两种寡核苷酸,其中在体内以3×10mpk的剂量测试,一种含有在5'端处的三GalNac部分,并且第二种含有在5'处的三GalNac部分和在3'端处的生育酚部分。

[0345] 表22

号	靶向 HBV 区域	化学	序列 5'-3'	log 中的最大 HBsAg 减少 (最低点)	MW
[0346] 322	DR2 #1	OMe NPS	5'-GalNac2-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGps GpsTpsGpsApsApsGps CpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnps mGnps-3nh2-mC-3'	2.6	8502.47
[0347] 323	DR2 #1	OMe NPS	5'-GalNac1-mGnpsmCnpsmAnpsmGnpsmAnpsGpsGpsTpsGpsApsApsGpsCpsGpsApsmAnpsmGnpsmUnpsmGnpsmC-Toco-3'	2.2	9202.34

[0348] 在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸还包括选自表1-43中所列的核碱基序列的寡核苷酸,与表1-43中所列序列的修饰无关。本公开的寡核苷酸还包括寡核苷酸,该寡核苷酸包含与选自表1-43中所列序列的核碱基序列至少90%相同的序列,与表1-43中所列序列的修饰无关。在一些实施方案中,1、2、3、4、5个核碱基与表1-43中所列的序列不同,与表1-43中所列的序列的修饰无关。

[0349] 在一些实施方案中,本公开的寡核苷酸还包括选自表1-43中所列的核苷酸序列的寡核苷酸,与表1-43中所列的序列的核碱基无关。本公开的寡核苷酸还包括寡核苷酸,该寡

核苷酸包含与选自表1-43中所列序列的核苷酸序列至少90%相同的序列,与表1-43中所列序列的核碱基无关。在一些实施方案中,1、2、3、4、5个核碱基与表1-43中所列的序列不同,与表1-43中所列的序列的修饰无关。