



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107849567 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 23

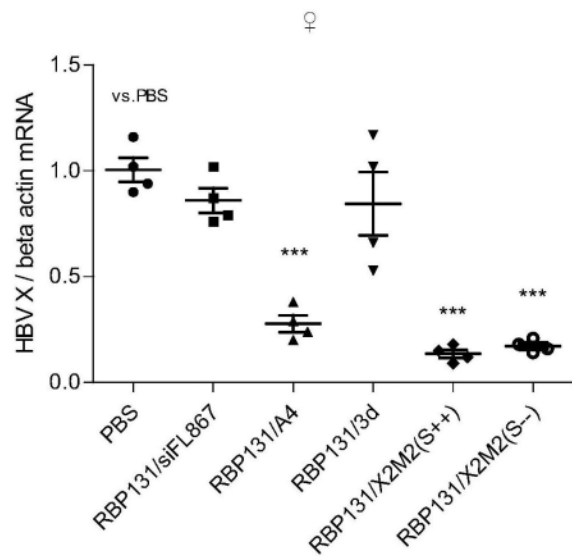
(21) 申请号 201680036513.5	(72) 发明人 张鸿雁 高山 黄渊余
(22) 申请日 2016.06.24	(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司 11290
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107849567 A	专利代理师 洪俊梅 张淑珍
(43) 申请公布日 2018.03.27	(51) Int.Cl.
(66) 本国优先权数据 201510364229.8 2015.06.26 CN	C12N 15/113 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2017.12.21	A61K 48/00 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/CN2016/087034 2016.06.24	A61P 31/20 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02016/206626 ZH 2016.12.29	(56) 对比文件
(73) 专利权人 苏州瑞博生物技术股份有限公司	CN 102140461 A,2011.08.03
地址 215300 江苏省苏州市昆山市玉山镇 元丰路168号	CN 103380113 A,2013.10.30
	WO 2014160129 A2,2014.10.02
	审查员 王娟
	权利要求书3页 说明书25页 序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

一种siRNA、含有该siRNA的药物组合物和缀合物及它们的应用

(57) 摘要

提供一种特异性抑制HBV基因表达的小干扰核酸、含有该小干扰核酸的可用于预防和/或治疗乙型肝炎的药物组合物和siRNA缀合物。还提供该小干扰核酸在制备用于预防和/或治疗乙型肝炎的药物中的应用。



1. 一种siRNA,所述siRNA的序列如下所示:

正义链5'-CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAA-dTdT-3';

反义链5'-UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAGG-dTdT-3',

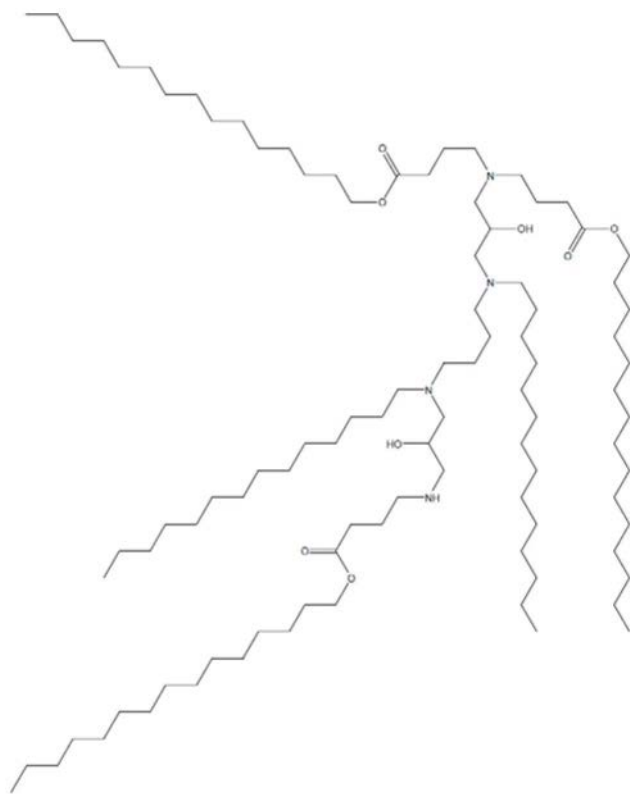
其中,所述siRNA的所述正义链和/或所述反义链的3'垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键被硫代磷酸二酯键替换,

其中,大写字母C、G、U、A和T表示核苷酸的碱基组成;小写字母d表示该字母d右侧的一个核苷酸为脱氧核糖核苷酸;小写字母m表示该字母m左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被甲氧基取代;小写字母f表示该字母f左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被氟取代。

2. 一种药物组合物,所述药物组合物含有权利要求1所述的siRNA和药学上可接受的载体。

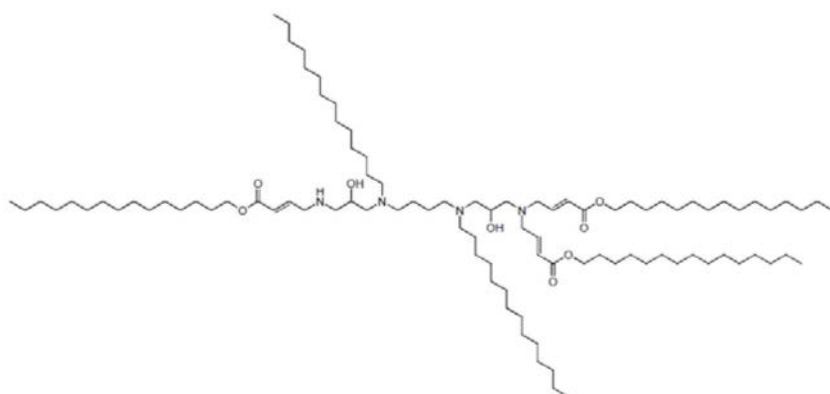
3. 根据权利要求2所述的药物组合物,其中,所述药学上可接受的载体为含胺化合物、胆固醇和聚乙二醇化脂质组成的脂质混合物,

所述含胺化合物为如下所示的含胺化合物72或含胺化合物87:



72

;



87

所述聚乙二醇化脂质为1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。

4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中,所述药学上可接受的载体中含胺化合物、胆固醇、聚乙二醇化脂质三者的摩尔百分比为:含胺化合物19.7%-80%,胆固醇19.7%-80%,聚乙二醇化脂质0.3%-50%。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物,其中,所述药学上可接受的载体中含胺化合物、胆固醇、聚乙二醇化脂质三者的摩尔百分比为:含胺化合物50%-70%,胆固醇20%-40%,聚乙二醇化脂质3%-20%。

6. 根据权利要求4所述的药物组合物,其中,所述药学上可接受的载体中含胺化合物87、胆固醇、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]三者的摩尔百分比为:含胺化合物87 19.7%-80%,胆固醇19.7%-80%,1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]0.3%-50%。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中,所述药学上可接受的载体中含胺化合物87、胆固醇、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]三者的摩尔百分比为:含胺化合物87 50%-70%,胆固醇20%-40%,1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]3%-20%。

8. 根据权利要求2-7中任一项所述的药物组合物,其中,所述siRNA与所述药学上可接受的载体的重量比为1:(1-50)。

9. 一种siRNA缀合物,所述siRNA缀合物由如权利要求1所述的siRNA与药学上可接受的缀合分子缀合而得,其中,所述缀合分子包含药学上可接受的靶向分子和任选的接头。

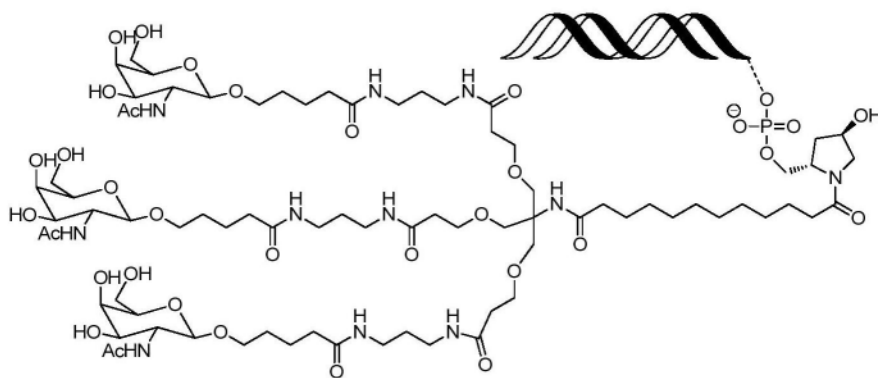
10. 根据权利要求9所述的siRNA缀合物,其中,所述药学上可接受的靶向分子为去唾液酸糖蛋白受体的配体。

11. 根据权利要求10所述的siRNA缀合物,其中,所述药学上可接受的靶向分子为半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

12. 根据权利要求11所述的siRNA缀合物,其中,所述半乳糖或所述N-乙酰半乳糖胺通过接头与所述siRNA共价缀合。

13. 根据权利要求12所述的siRNA缀合物,其中,所述半乳糖或所述N-乙酰半乳糖胺通过接头与所述siRNA的正义链3'末端共价缀合。

14. 根据权利要求11所述的siRNA缀合物,其中,所述siRNA缀合物的结构如下所示:



其中,所述缀合分子与所述siRNA的正义链3'末端共价缀合,  
所述siRNA与所述N-乙酰半乳糖胺的摩尔比为1:3。

15.一种试剂盒,所述试剂盒包含如权利要求1所述的siRNA和/或如权利要求2-8中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求9-14中任一项所述的siRNA缀合物。

16.如权利要求1所述的siRNA和/或如权利要求2-8中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求9-14中任一项所述的siRNA缀合物在制备用于治疗 and/或预防乙肝的药物中的应用。

17.一种用于非治疗目的的抑制感染慢性HBV的肝炎细胞中HBV基因表达的方法,该方法包括将如权利要求1所述的siRNA和/或如权利要求2-8中任一项所述的药物组合物和/或如权利要求9-14中任一项所述的siRNA缀合物导入所述感染慢性HBV的肝炎细胞。

## 一种siRNA、含有该siRNA的药物组合物和缀合物及它们的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种siRNA、含有该siRNA的药物组合物和缀合物及它们的应用。具体而言,本发明涉及一种用于抑制乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因表达的siRNA、含有该siRNA作为活性成分的药物组合物和缀合物以及所述siRNA、药物组合物和缀合物在制备用于预防和/或治疗乙型肝炎的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 乙型病毒性肝炎(又称乙型肝炎或乙肝)是严重威胁全球、特别是中国的一类传染病,而目前全球公认的干扰素和核苷类似物这两大类乙肝防治药物仍存在多种弊端。因此,若能从基因水平抑制HBV的生成和复制,由此从根本上降低病毒代谢和对肝细胞的侵染,无疑将是最为理想的乙肝治疗手段。就此而言,从理论上讲,小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)可基于RNA干扰(RNA interference, RNAi)这一机制,以序列特异性的方式抑制或阻断任何感兴趣的靶基因(例如引发如癌症等疾病的基因)的表达,从而达到治疗疾病的目的。

[0003] 遗憾的是,迄今为止真正进入临床应用的siRNA药物却并不多。其中一个主要原因在于,siRNA本身的稳定性较差,在体内容易被核酸酶降解(特别是,在体内系统给药后,siRNA首先会进入体内的血液循环系统,而血液中富含内源性核酸酶)。为克服这一障碍,其中一种手段便是对siRNA进行化学修饰,以提高siRNA在血液中的稳定性。然而,本领域对siRNA在血液中的降解过程和机制仍缺乏足够了解,对修饰位点的选择依然是一个经验主义的、必须通过反复实验来验证的过程。因此,为获得足够的稳定性,不得不向siRNA中引入大量(甚至可称之为盲目的、冗余的)化学修饰。其结果是,虽然通过修饰也许能够在一定程度上提高siRNA的稳定性,但由于引入了过量的修饰或不恰当的修饰,势必会带来增加成本、修饰后的siRNA产生潜在的细胞毒性、修饰后的siRNA的生物活性及特异性受到影响等弊端。

[0004] 因此,开发出一种在血液中稳定的、具有良好生物活性的、且细胞毒性较低的抑制HBV基因表达的siRNA成为迫切需要解决的问题。

[0005] 在申请人已授权的在先申请CN102140461B中,对特异性抑制HBV基因的siRNA CA1(正义链为5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAA-dTdT-3'(SEQ ID NO:1);反义链为5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGG-dTdT-3'(SEQ ID NO:2))的多种化学修饰策略进行了研究。该研究发现,不同修饰策略会对siRNA的稳定性、生物活性及细胞毒性等指标产生截然不同的影响,例如,相比未经修饰的裸siRNA CA1,携有多达20处化学修饰的siRNA CA2不仅显示出了较差的细胞水平活性、较高的细胞毒性,在血液中也未能达到稳定状态。在该研究中,证实了五种有效的修饰方式,与未经修饰的siRNA CA1相比,其中一种修饰方式所得的siRNA A4在提高血液稳定性的同时,还保持了与siRNA CA1基本相当的抑制活性。尽管如此,从合成成本和合成效率、合成工艺工艺便利性、siRNA稳定性、siRNA活性等各个方面考

量,仍需进一步对siRNA CA1的 修饰位点进行精简和优化,以期待得到更为优秀的siRNA。考虑到本领域的在先研究已经表明,对siRNA所进行的不同化学修饰很可能会“牵一发而动全身”,即,仅在1个位点处采取不同的修饰策略即会从根本上改变siRNA的稳定性,完成上述精简和优化并非易事。

[0006] 另一方面,除进行化学修饰外,还可以通过与合适的载体形成药物组合物 或与合适的缀合分子形成缀合物,来进一步改善siRNA的血液稳定性、提高 其靶向性、解决siRNA体内递送问题等。对于旨在防治乙肝的siRNA,能够 赋予或者提高肝靶向性的载体或缀合分子将是十分有利的,这会极大提高 siRNA抑制HBV基因表达的效率并降低潜在的副作用。进而,在引入肝靶向性的载体或缀合分子后,siRNA还需要能够在靶位点发挥作用,即,载体或缀 合分子的包裹/缀合不能影响siRNA本身的活性(例如不能影响siRNA装载入 细胞内的RNAi机器,即RISC复合物)。对于此类能够提高siRNA临床应用 潜能的药学上可接受的载体或缀合分子,及利用此类载体或缀合分子制备而成 的siRNA药物组合物或siRNA缀合物,本领域中同样存在迫切需求。

## 发明内容

[0007] 发明人通过对用于抑制HBV基因表达的siRNA及其修饰方式进行细致研 究,发现采用特定修饰方式的siRNA显示出优异的血液稳定性,且核苷酸修 饰量的减少降低了合成与生产的成本,拓展了合成完成后的脱保护试剂的选择 空间,缩短了反应时间,提高了合成效率,同时还维持了较低的细胞毒性。更 为重要的是,由本发明的新修饰方案得到的核苷酸修饰量减少的siRNA在体 外的血液(血浆)稳定性更优于在申请人已授权的在先申请 CN102140461B中 公开的siRNA A4、且在动物体内的生物活性也更优于siRNA A4,进一步提 升 了其临床应用潜能。

[0008] 进而,发明人研究了多种用于siRNA给药的药学上可接受的载体,对载 体分子的类型、配比(包括载体内部组分之间的配比以及载体与本发明的 siRNA之间的配比)、理化性质、载药效率、给药方式、给药剂量、药物处理 时间等进行了细致深入的研究。同时,发明人也研究了各种类型的siRNA缀 合物,包括药学上可接受的缀合分子的选择(含靶向分子的选择、靶向分子与 本发明的siRNA之间的接头(linker)的选择)、合成路线的开发与建立、体内 生物活性的研究等。经过上述系统全面的研究,发明人发现,本发明的siRNA 能够与多种药学上可接受的载体组合或与多种药学上可接受的缀合分子缀合, 实现优异的体内效果。特别地,通过将由含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质这三种组分形成的脂质混合物用作药学上可接受的载体与本发明的 siRNA形成药物组合物,还可将本发明的 siRNA特异性地递送至肝脏,并在 大大降低给药剂量的同时显示出更出色的HBV mRNA抑制作用。由此,发明 人完成了本发明。

[0009] 因此,在第一方面,本发明提供了一种能够特异性靶向作为HBV基因的4个开放读码框之一的X基因区的siRNA,该siRNA的靶mRNA序列如SEQ ID NO:3所示,其特征在于,所述 siRNA的序列如下所示:

[0010] 正义链5'-CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAA-dTdT-3';

[0011] 反义链5'-UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAGG-dTdT-3',

[0012] 其中,大写字母C、G、U、A和T表示核苷酸的碱基组成;小写字母d 表示该字母d右侧

的一个核苷酸为脱氧核糖核苷酸；小写字母m表示该字母m左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被甲氧基取代；小写字母f表示该字母f左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被氟取代。例如，由正义链5'端第1个大写字母C及其右侧的m组成的“Cm”表示所含碱基为胞嘧啶、核糖基团的2'-羟基被甲氧基取代的核苷酸；由反义链5'端第1个大写字母U及其右侧的f组成的“Uf”表示所含碱基为尿嘧啶、核糖基团的2'-羟基被氟取代的核苷酸。

[0013] 在第二方面，本发明提供了一种药物组合物，该药物组合物含有如第一方面所述的siRNA作为活性成分和药学上可接受的载体。

[0014] 在第三方面，本发明提供了一种siRNA缀合物，该siRNA缀合物由如第一方面所述的siRNA与药学上可接受的缀合分子缀合而得。

[0015] 在第四方面，本发明提供了一种试剂盒，该试剂盒含有如第一方面所述的siRNA和/或如第二方面所述的药物组合物和/或如第三方面所述的siRNA缀合物。

[0016] 在第五方面，本发明提供了如第一方面所述的siRNA和/或如第二方面所述的药物组合物和/或如第三方面所述的siRNA缀合物在制备用于预防和/或治疗乙肝的药物中的应用。

[0017] 在第六方面，本发明提供了一种治疗乙肝的方法，该方法包括将如第一方面所述的siRNA和/或如第二方面所述的药物组合物和/或如第三方面所述的siRNA缀合物给予有需要的患者。

[0018] 在第七方面，本发明提供了一种抑制感染慢性HBV的肝炎细胞中HBV基因表达的方法，该方法包括将如第一方面所述的siRNA和/或如第二方面所述的药物组合物和/或如第三方面所述的siRNA缀合物导入所述感染慢性HBV的肝炎细胞。

[0019] 有益效果

[0020] 相比CN102140461B中的siRNA A4，本发明的siRNA进一步减少了修饰核苷酸的个数，但仍能达到相似甚至更优的药效（细胞实验中的HBV mRNA表达抑制活性相似；动物实验中的HBV mRNA表达抑制活性、乙肝表面抗原HBsAg抑制作用更强）；更重要的是，在减少修饰核苷酸的个数后，还出人预料地提高了血液稳定性（体外实验中全长siRNA片段能够在血浆中长时间保持更高的稳定性）；同时，由于核苷酸修饰量的减少，本发明的siRNA在合成上比siRNA A4的成本更低、技术方案选择更广、生产效率更高，由此提供了一种更具临床应用潜能的siRNA。

[0021] 进而，由本发明的siRNA形成的药物组合物和siRNA缀合物在乙肝模型小鼠中表现出优异的HBV mRNA抑制效率，同时能够有效地降低表面抗原表达，显示出对慢性乙型肝炎良好的治疗作用。特别地，如上文所述，通过将由含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质这三种组分形成的脂质混合物用作药学上可接受的载体与本发明的siRNA形成药物组合物，可将本发明的siRNA特异性地递送至肝脏，并在大大降低给药剂量的同时显示出更出色的HBV mRNA抑制作用（在乙肝模型小鼠中，在给药剂量仅为由其它常规载体形成的药物组合物的1/5的情况下，该药物组合物的HBV mRNA抑制效率高达由其它常规载体形成的药物组合物的近2倍，甚至可达到10余倍）。

[0022] 本发明的其它特征和优点将在随后的具体实施方式中予以详细说明。

## 附图说明

[0023] 图1a-图1c分别显示了:图1a, (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2双链的超高效液相色谱 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 谱图结果 (解链后); 图 1b, (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 正义链的MS质谱结果; 以及图1c, (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 反义链的MS质谱结果。

[0024] 图2显示了表1中所列的测试siRNA与对照siRNA在HepG2.2.15细胞中 对HBV mRNA表达抑制活性的检测结果。

[0025] 图3显示了表1中所列的测试siRNA与对照siRNA在体外人血浆中的稳 定性检测结果。

[0026] 图4显示了包载了表1中所列的测试siRNA的RBP131/siRNA脂质体制剂 在C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J转基因小鼠中对HBV mRNA表达抑制活性的检测结果。

[0027] 图5显示了所测各组供试品在不同时间点对M-TgHBV转基因小鼠血清中 HBsAg表达抑制活性的检测结果。

[0028] 图6显示了所测各组供试品在第7、28天对pHBV小鼠 (基于高压注射的 HBV转染小鼠) 肝脏中HBsAg表达抑制活性的检测结果。

[0029] 图7显示了所测各组供试品对pHBV小鼠 (基于高压注射的HBV转染小 鼠) 肝脏中HBV mRNA表达抑制活性的检测结果。

[0030] 图8显示了所测各组供试品对pHBV小鼠 (基于高压注射的HBV转染小 鼠) 血清中HBsAg表达抑制活性的检测结果。

[0031] 图9显示了所测各组供试品在不同时间点对pHBV小鼠 (基于高压注射的 HBV转染小鼠) 血清中HBsAg表达抑制活性的检测结果。

## 具体实施方式

[0032] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是, 此处所描述 的具体实施方式仅用于说明和解释本发明, 并不用于限制本发明。

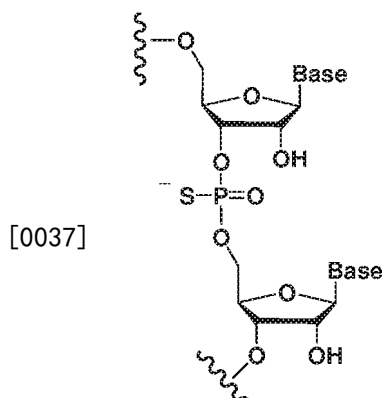
[0033] 下文中, 也可将本发明第一方面所述的siRNA称为X2M2。

[0034] 一. 本发明的siRNA

[0035] 本发明的siRNA含有核苷酸基团作为基本结构单元, 所述核苷酸基团含有 磷酸基团、核糖基团和碱基。本发明的siRNA含有修饰的核苷酸基团, 所述修 饰的核苷酸基团不会导致所述siRNA抑制HBV基因表达的功能明显削弱或丧 失。目前, 本领域存在多种可用于修饰siRNA的方式, 包括骨架修饰 (如磷酸 基团修饰)、核糖基团修饰及碱基修饰等 (Watts, J.K., G.F. Deleavey, and M.J. Damha, Chemically modified siRNA: tools and applications. Drug Discov Today, 2008.13 (19-20): p.842-55)。在本发明所述siRNA的一些实施方式中, 所述修饰 的核苷酸基团为核糖基团及任选的磷酸基团被修饰的核苷酸基团, 但不限于此。

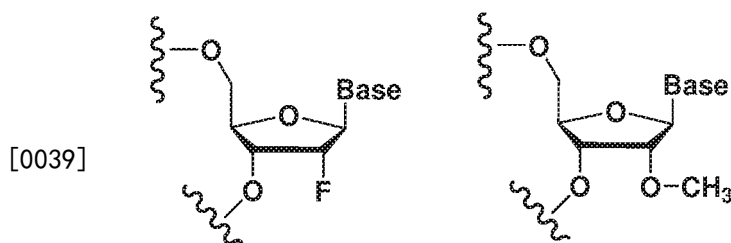
[0036] 在本发明所述siRNA的一些优选实施方式中, 磷酸基团修饰是指硫代磷 酸 (phosphorothioate) 修饰, 即, 用一个硫原子取代磷酸二酯键中的非桥氧原 子, 从而以硫代磷酸二酯键替换磷酸二酯键。该修饰能稳定siRNA的结构, 保持碱基配对的高特异性和高亲合力。





硫代磷酸修饰

[0038] 在本发明所述siRNA的一些优选实施方式中,核糖基团修饰是指核糖基团的2'-羟基被甲氧基或氟取代。在核糖基团的2'-羟基位置引入例如甲氧基或氟后,可使血液中的核糖核酸酶不易切割核酸,由此增加核酸的稳定性,使核酸具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。



2'-氟修饰

2'-甲氧基修饰

[0040] 在本发明的siRNA中,正义链和反义链的3'端均连接有垂悬末端(overhang)dTdT。根据本发明一个优选的实施方式,正义链和/或反义链的3'垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键进行了硫代磷酸修饰。在下文中,可将正义链与反义链3'垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键均进行了硫代磷酸修饰的siRNA称为X2M2(S++);可将正义链与反义链3'垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键均未进行硫代磷酸修饰的siRNA称为X2M2(S--);可将仅正义链3'垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键进行了硫代磷酸修饰的siRNA称为X2M2(S+-);并可将仅反义链3'垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键进行了硫代磷酸修饰的siRNA称为X2M2(S-+)。此外,如上下文无特殊说明,当提及siRNA X2M2时,意在涵盖此处列举的X2M2(S++)、X2M2(S--)、X2M2(S+-)及X2M2(S-+)。

[0041] 本领域技术人员清楚知晓的是,可以通过本领域常规的siRNA制备方法(例如固相合成和液相合成)得到本发明所述的siRNA,例如X2M2(S++)、X2M2(S--)、X2M2(S+-)及X2M2(S-+)。其中,固相合成已经有商业化订制服务,苏州瑞博生物技术有限公司也具有此类固相合成能力。可以通过使用具有相应修饰的核苷酸单体来将修饰的核苷酸基团引入本发明所述的siRNA中,制备具有相应修饰的核苷酸单体的方法及将修饰的核苷酸基团引入siRNA的方法也是本领域技术人员所熟知的。

[0042] 二.本发明的药物组合物

[0043] 在本发明的药物组合物中,含有本发明所述的siRNA和药学上可接受的载体。所述药学上可接受的载体可以是siRNA给药领域常规使用的载体,例如但不限于磁性纳米粒(magnetic nanoparticles,如 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )、碳纳米管(carbon nanotubes)、介孔硅

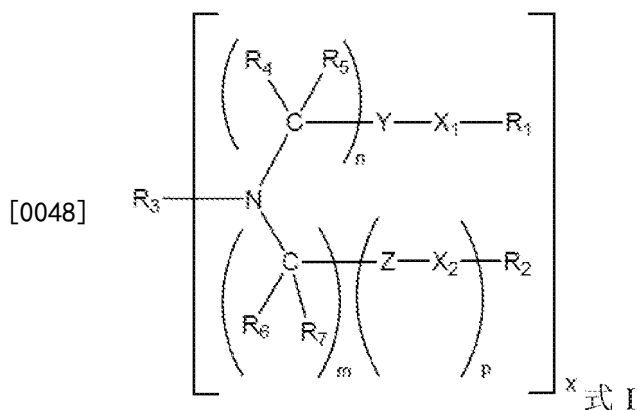
(mesoporous silicon)、磷酸钙纳米粒(calcium phosphate nanoparticles)、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚酰胺胺型 树形高分子(polyamidoamine (PAMAM) dendrimer)、聚L-赖氨酸 (poly(L-lysine), PLL)、壳聚糖(chitosan)、1,2-二油酰基-3-三甲铵丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)、聚D型或L型乳酸/羟 基乙酸共聚物(poly(D&L-lactic/glycolic acid) copolymer, PLGA)、聚(2-氨基乙 基乙撑磷酸酯)(poly(2-aminoethyl ethylene phosphate), PPEEA)和聚(甲基丙 烯酸-N,N-二甲氨基乙酯)(poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate), PDMAEMA)以及它们的衍生物等。在本发明的药物组合物中,对siRNA和 药学上可接受的载体的含量没有特别要求,一般地,siRNA与 药学上可接受的 载体的重量比为1:(1-50)。

[0044] 在本发明的药物组合物中,还可以包含药学上可接受的其它辅料,该辅料 可以为本领域常规采用的各种制剂或化合物的一种或多种。例如,所述药学上 可接受的其它辅料可以包括pH值缓冲液、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。所述pH值缓冲液可以为pH值7.5-8.5的三羟甲基胺基甲烷盐酸盐缓冲液 和/或pH值5.5-8.5的磷酸盐缓冲液,优选为pH值5.5-8.5的磷酸盐缓冲液。所述保护剂可以为肌醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖和葡 糖糖中的至少一种。以所述药物组合物的总重量为基准,所述保护剂的含量可 以为0.01-30重量%。所述渗透压调节剂可以为氯化钠和/或氯化钾。所述渗透 压调节剂的含量使所述药物组合物的渗透压为200-700毫渗摩尔/千克。根据所 需渗透压,本领域技术人员可以容易地确定所述渗透压调节剂的含量。

[0045] 根据本发明的一些实施方式,所述药物组合物可以为液体制剂,例如注射液;也可以为冻干粉针剂,实施给药时与液体辅料混合,配制成液体制剂。所述液体制剂可以但不限于用于皮下、肌肉或静脉注射给药,也可以但不限于通过喷雾给药到肺脏、或通过喷雾经肺脏给药到其它脏器组织(如肝脏)。优选地,所述药物组合物用于静脉注射给药。

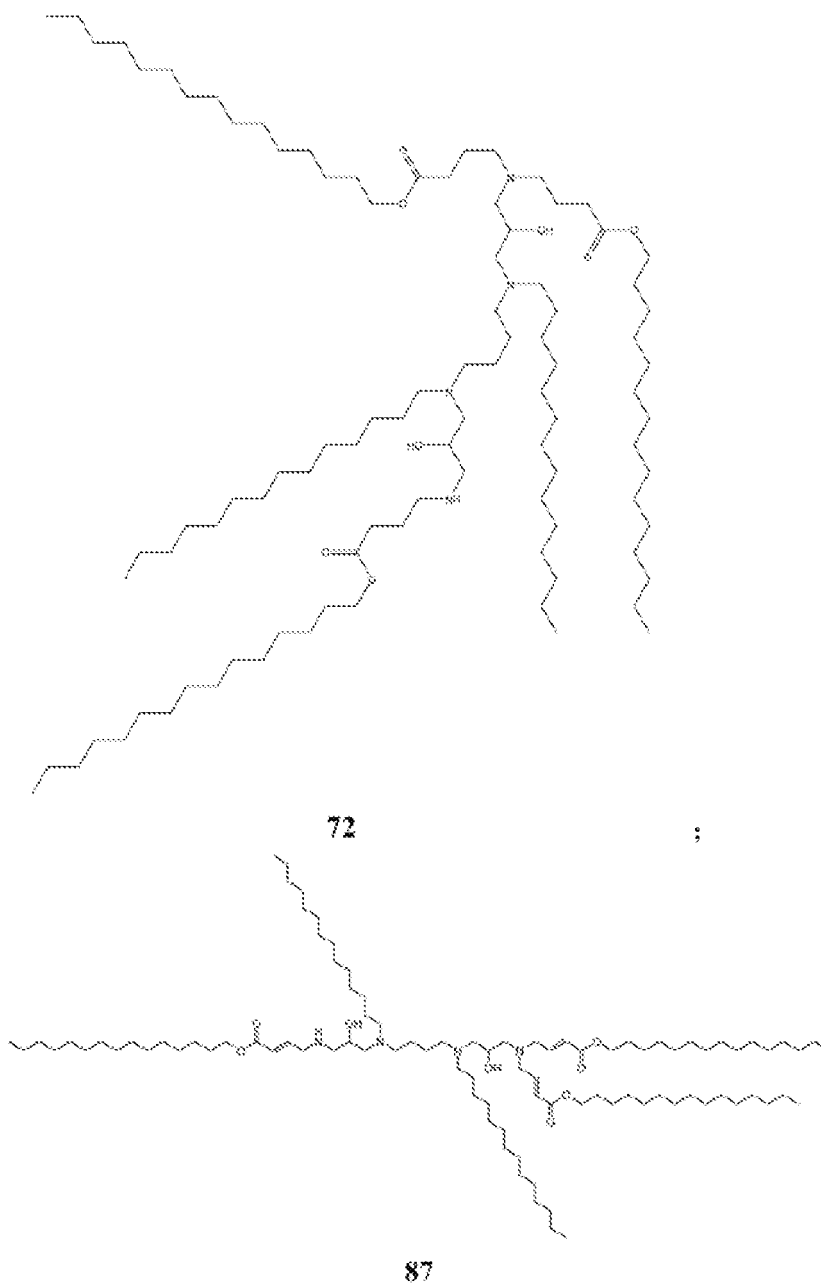
[0046] 在本发明的药物组合物的一个优选实施方式中,所述药物组合物可以为脂质体制剂的形式。在一个更优选的实施方式中,所述脂质体制剂中使用的药学上可接受的载体包含含胺的转染化合物(下文也可将其称为含胺化合物)、辅助脂质和/或聚乙二醇化脂质。其中,所述含胺化合物、辅助脂质和聚乙二醇化脂质可分别选自于CN201180060664.1(通过引用将其整体并入本文)中所描述的含胺的转染化合物或其药学上可接受的盐或衍生物、辅助脂质和聚乙二醇化脂质中的一种或多种。

[0047] 具体而言,所述含胺化合物可为CN201180060664.1中描述的如式I所示 的化合物或其药学上可接受的盐:





[0059]



[0060] 优选地,所述辅助脂质可以是胆固醇或其类似物、衍生物等。

[0061] 优选地,所述聚乙二醇化脂质可以是1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000],即 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethyleneglycol)-2000]。

[0062] 在本发明的药物组合物中的一个更优选的实施方式中,所使用的药学上可接受的载体同时包含上文所描述的含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质这三种组分,这三种组分形成脂质混合物。在该优选的实施方式中,所述药学上可接受的载体中含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质三者的摩尔百分比可以为:含胺化合物19.7%-80%,辅助脂质19.7%-80%,聚乙二醇化脂质0.3%-50%。更优选地,所述药学上可接受的载体中含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质三者的摩尔百分比可以为:含胺化合物50%-70%,辅助脂质20%-40%,聚乙二醇化脂质3%-20%。

[0063] 利用上述含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质及siRNA制备功能性脂质体制

剂形式的药物组合物的方法也可参见CN201180060664.1。对于该制备方法,可使得药物组合物中的药学上可接受的载体中含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质三者的摩尔百分比为:含胺化合物19.7%-80%,辅助脂质 19.7%-80%,聚乙二醇化脂质0.3%-50%。更优选地,可使得药物组合物中的药学上可接受的载体中含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质三者的摩尔百分比为:含胺化合物50%-70%,辅助脂质20%-40%,聚乙二醇化脂质3%-20%。

[0064] 由本发明的siRNA与上述脂质混合物形成的脂质体颗粒具有约30nm至约200nm的平均直径,通常为约40nm至约135nm,更通常地,该脂质体颗粒的平均直径是约50nm至约120nm、约50nm至约100nm、约60nm至约90nm或约70nm至约90nm,例如,该脂质体颗粒的平均直径是约30、40、50、60、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、150或160nm。

[0065] 在脂质体制剂形式的药物组合物中,本发明的siRNA与全部脂质(例如含胺化合物、辅助脂质和/或聚乙二醇化脂质)的重量比(重量/重量比)在从约1:1至约1:50、从约1:1至约1:30、从约1:3至约1:20、从约1:4至约1:18、从约1:5至约1:17、从约1:5至约1:15、从约1:5至约1:12、从约1:6至约1:12或从约1:6至约1:10的范围内,例如,本发明的siRNA与全部脂质的重量比为约1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17或1:18。

[0066] 三.本发明的siRNA缀合物

[0067] 本发明的siRNA缀合物由本发明的siRNA与药学上可接受的缀合分子缀合得到,所述缀合分子包含药学上可接受的靶向分子和任选的接头(linker)。在本发明的实施方式中,所述siRNA可以非共价缀合至所述缀合分子,但优选共价缀合至所述缀合分子。为降低缀合对siRNA活性的影响,siRNA与缀合分子的缀合位点可以在siRNA正义链的3'端或5'端,也可在反义链的5'端。在一些实施方式中,除3'端或5'端外,siRNA与缀合分子的缀合位点还可以在siRNA的内部序列中。

[0068] siRNA与缀合分子间可以通过酸不稳定的、或可还原的化学键相连,在细胞内环境的酸性环境下,这些化学键可降解,从而使siRNA成为自由状态。对于不可降解的缀合方式,缀合分子可连接在siRNA的正义链,从而尽量降低缀合对siRNA活性的影响。

[0069] 所述药学上可接受的靶向分子可以是siRNA给药领域常规使用的靶向分子,例如但不限于以下靶向分子或其衍生物中的一种或多种:亲脂分子,例如胆固醇、胆汁酸、维生素(例如维生素E)、不同链长的脂质分子;聚合物,例如聚乙二醇;多肽,例如透膜肽;适配体;抗体;量子点;糖类,例如乳糖、聚乳糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc);叶酸(folate);或肝实质细胞表达的受体配体,例如去唾液酸糖蛋白、去唾液酸糖残基、脂蛋白(如高密度脂蛋白、低密度脂蛋白等)、胰高血糖素、神经递质(如肾上腺素)、生长因子、转铁蛋白等。

[0070] 在本发明的siRNA缀合物的一些优选的实施方式中,所述药学上可接受的靶向分子可以选自于以下分子中的一种或多种:去唾液酸糖蛋白,例如去唾液酸血清类粘蛋白(asialoorosomuroid, ASOR);去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)的配体,例如乳糖、聚乳糖、甘露糖、半乳糖和N-乙酰半乳糖胺。

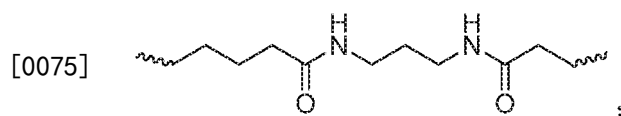
[0071] 在本发明的siRNA缀合物的一些更优选的实施方式中,所述药学上可接受的靶向分子可以是半乳糖或N-乙酰半乳糖胺,其中,半乳糖或N-乙酰半乳糖胺分子可以是一价、二

价、三价、四价。应当理解的是,这里所述的一价、二价、三价、四价分别指siRNA分子与含有作为靶向分子的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺分子的缀合分子形成siRNA缀合物后,该siRNA缀合物中siRNA分子与半乳糖或N-乙酰半乳糖胺分子的摩尔比为1:1、1:2、1:3和1:4。更优选地,所述药学上可接受的靶向分子是N-乙酰半乳糖胺。进一步更优选地,当本发明所述的siRNA与含有N-乙酰半乳糖胺的缀合分子缀合时,N-乙酰半乳糖胺分子是三价或四价。甚至更优选地,当本发明所述的siRNA与含有N-乙酰半乳糖胺的缀合分子缀合时,N-乙酰半乳糖胺分子是三价。

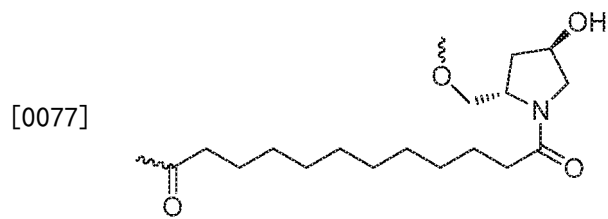
[0072] 当本发明所述的siRNA与缀合分子缀合时,缀合分子可经由合适的接头与siRNA分子相连,本领域技术人员可以根据靶向分子的具体类型选择合适 的接头。在一些实施方式中,当所述靶向分子为N-乙酰半乳糖胺时,合适的 接头可以为如下结构:  $-(L^A)_n L^C-L^B-$ , 其中,

[0073]  $n$ 为1-3的整数;

[0074]  $L^A$ 为包含酰胺键的链状部分,与N-乙酰半乳糖胺分子和 $L^C$ 部分通过醚键 相连接,其结构如下所示:

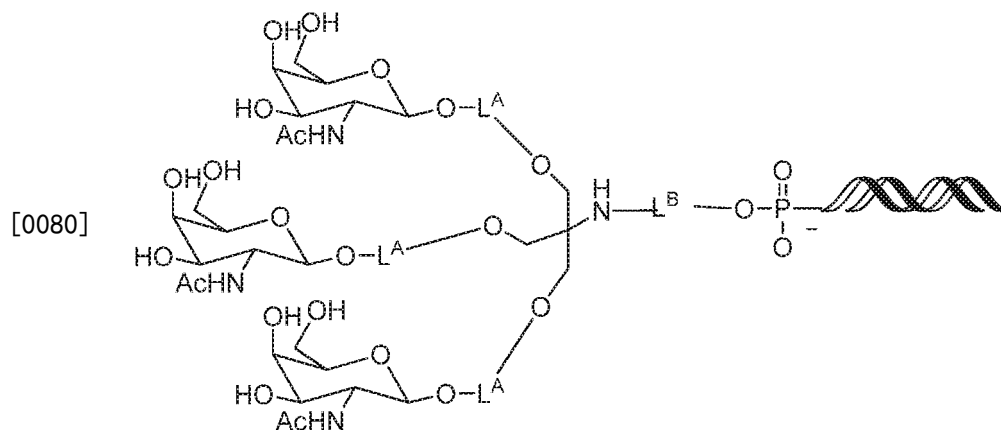


[0076]  $L^B$ 为包含酰胺键的链状部分,与 $L^C$ 部分通过酰胺键相连接,与siRNA部分通过磷酸酯键相连接,其结构如下所示:



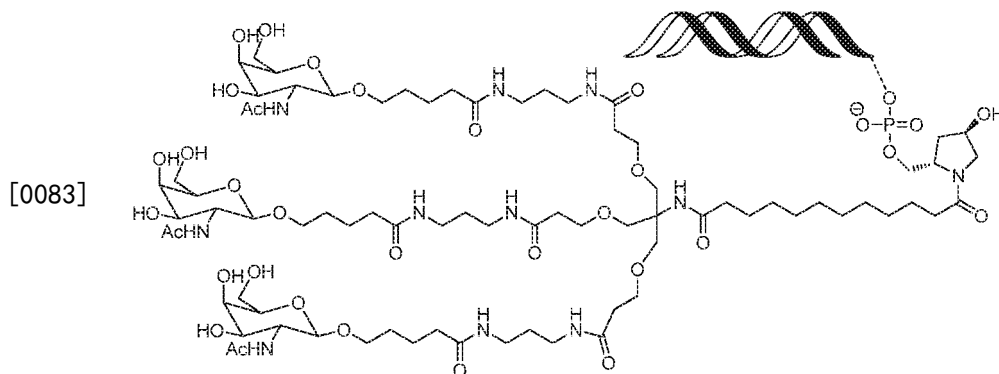
[0078]  $L^C$ 为基于羟甲基氨基甲烷、二羟甲基氨基甲烷或三羟甲基氨基甲烷的2-4 价连接基团, $L^C$ 一端可经由氧原子与1-3个 $L^A$ 部分通过醚键相连接,从而经由 $L^A$ 部分与1-3个N-乙酰半乳糖胺分子相连接; $L^C$ 另一端经由氮原子与 $L^B$ 部分通过酰胺键相连接。

[0079] 在一个优选的实施方式中,当 $n=3$ , $L^C$ 为基于三羟甲基氨基甲烷的4价连接基团时,由作为接头的  $-(L^A)_3 L^C-L^B-$  连接N-乙酰半乳糖胺分子和siRNA分子所形成的siRNA缀合物的结构如下所示:



[0081] 同样, siRNA与缀合分子的缀合位点可以在siRNA正义链的3'端或5'端, 也可在反义链的5'端, 还可以在siRNA的内部序列中。

[0082] 因而, 最优选地, 本发明所述siRNA的正义链3'末端通过接头-(L<sup>A</sup>)<sub>3</sub>三羟甲基氨基甲烷-L<sup>B</sup>-与三个N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)分子共价缀合, 得到siRNA分子与GalNAc分子的摩尔比为1:3的siRNA缀合物, 下文也可将其称为 (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2, 其结构如下所示:



[0084] 对于本发明的siRNA缀合物, 其也可以与药学上可接受的其它辅料联用, 该辅料可以为本领域常规采用的各种制剂或化合物的一种或多种, 详情可参见上文关于本发明的药物组合物的描述。

#### [0085] 四. 本发明的试剂盒

[0086] 在本发明的试剂盒的一些实施方式中, 可使一个容器用于提供siRNA、至少另一个容器用于提供药学上可接受的载体和/或辅料。除了siRNA和药学上可接受的载体和/或辅料以外, 所述试剂盒中还可包含其它成分, 如稳定剂或防腐剂等。所述其它成分可包含于所述试剂盒中, 但存在于与提供siRNA和药学上可接受的载体和/或辅料的容器均不同的容器中。在这些实施方式中, 所述试剂盒可包含用于将siRNA与药学上可接受的载体和/或辅料或其它成分进行混合的说明书。

[0087] 在本发明的试剂盒的另一些实施方式中, 可将siRNA缀合物保存于一个容器中; 可以有或没有至少另一个容器, 用于提供或不提供药学上可接受的辅料。除了siRNA缀合物和任选的药学上可接受的辅料外, 所述试剂盒中还可包含其它成分, 如稳定剂或防腐剂等。所述其它成分可包含于所述试剂盒中, 但存在于与提供siRNA缀合物和任选的药学上可接受的辅料的容器均不同的容器中。在这些实施方式中, 所述试剂盒可包含用于将siRNA缀合物与药学上可接受的辅料(对于有辅料而言)或其它成分进行混合的说明书。

[0088] 在本发明的试剂盒中, 所述siRNA和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述siRNA缀合物和任选的药学上可接受的辅料可以任何形式提供, 例如液体形式、干燥形式或冻干形式。优选所述siRNA和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述siRNA缀合物和任选的药学上可接受的辅料基本上纯净和/或无菌。可任选地在本发明的试剂盒中提供无菌水。

#### [0089] 五. 本发明的siRNA、药物组合物及siRNA缀合物的应用

[0090] 通过将本发明的siRNA和/或药物组合物和/或siRNA缀合物给予有需要的患者, 可以通过RNA干扰的机制达到治疗乙肝的目的。因此, 本发明的siRNA和/或药物组合物和/或siRNA缀合物可用于预防和/或治疗乙肝、或用于制备用于预防和/或治疗乙肝的药物。

[0091] 本文所使用的术语“给药/给予”是指通过使得至少部分地将siRNA或药物组合物

或siRNA缀合物定位于期望的位点以产生期望效果的方法或途径,将siRNA或药物组合物或siRNA缀合物放置入受试者体内。适于本发明方法的给药途径包括局部给药和全身给药。一般而言,局部给药导致与受试者整个身体相比将更多siRNA或药物组合物或siRNA缀合物递送至特定位点;而全身给药导致将所述siRNA或药物组合物或siRNA缀合物递送至受试者的基本整个身体。考虑到本发明旨在提供预防和/或治疗乙肝的手段,优选能够将药物递送至肝脏的给药方式。

[0092] 可通过本领域已知的任何合适途径向受试者给药,所述途径包括但不限于:口服或胃肠外途径,包括静脉内给药、肌肉内给药、皮下给药、经皮给药、气道给药(气雾剂)、肺部给药、鼻部给药、直肠给药和局部给药(包括口腔含化给药和舌下给药)。

[0093] 本发明所述的siRNA或药物组合物或siRNA缀合物的使用剂量可为本领域常规的剂量,所述剂量可以根据各种参数、尤其是受试者的年龄、体重和性别来确定。可在细胞培养或实验动物中通过标准药理学程序测定毒性和疗效,例如测定LD<sub>50</sub>(使50%的群体致死的剂量)和ED<sub>50</sub>(在量反应中指能引起50%最大反应强度的剂量,在质反应中指引起50%实验对象出现阳性反应时的剂量)。毒性和疗效之间的剂量比为治疗指数,可以用LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>的比值来表示。优选显示出高治疗指数的siRNA或药物组合物或siRNA缀合物。可基于由细胞培养分析和动物研究得到的数据得出人用剂量的范围。

[0094] 在给予本发明所述的药物组合物或siRNA缀合物时,例如,对于雄性或雌性、6-12周龄、体重18-25g的C57BL/6J或C3H/HeNCr1Vr小鼠,以所述药物组合物或siRNA缀合物中的siRNA的量计:(i)对于siRNA与药学上可接受的载体形成的药物组合物,其siRNA用量可以为0.001-50mg/kg体重,优选为0.01-10mg/kg体重,更优选为0.05-5mg/kg体重,最优选为0.1-3mg/kg体重;(ii)对于siRNA与药学上可接受的缀合分子形成的siRNA缀合物,其siRNA用量可以为0.001-100mg/kg体重,优选为0.01-50mg/kg体重,更优选为0.05-20mg/kg体重,最优选为0.1-10mg/kg体重。在给予本发明所述的siRNA时,可参考上述用量。

[0095] 通过将本发明的siRNA和/或药物组合物和/或siRNA缀合物导入感染慢性HBV的肝炎细胞,还可以通过RNA干扰的机制达到抑制感染慢性HBV的肝炎细胞中HBV基因的表达这一目的。在一个优选的实施方式中,所述细胞为HepG2.2.15细胞。

[0096] 实施例

[0097] 以下将通过实施例对本发明进行详细描述。除非特别说明,以下实施例中所用到的试剂、培养基均为市售商品,所用到的核酸电泳、real-time PCR等操作均按常规方案进行。例如,可按Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))所记载的进行。

[0098] HepG2.2.15细胞购自ATCC,用含有10%的胎牛血清(FBS,Gibco)、2mM L-谷氨酰胺(Gibco)和380μg/ml G418的DMEM完全培养基(Gibco)培养细胞,于37℃在含5%CO<sub>2</sub>/95%空气的培养箱中培养。

[0099] 用制备实施例1中合成的针对HBV的X基因区的siRNA或作为阴性对照的非特异性siRNA(均由苏州瑞博生物技术有限公司合成)转染细胞时,使用Lipofectamine™ 2000(Invitrogen)作为转染试剂,具体操作参照制造商提供的说明书。

[0100] 所有数据采用“平均值±标准差”表示。先采用Levene's检验进行方差齐性检验。方差齐的数据采用单因素方差分析,若结果显示有差异,再采用Dunnett检验;方差不齐的



数据经秩次转换后再进行Dunnett检验。统计软件为 SPSS 13.0版。P<0.05表示组间具有显著性差异。

[0101] 制备实施例1 siRNA的筛选及合成

[0102] 通过对多种修饰方式及修饰位点进行组合评价和分析,筛选出下表1中的 siRNA序列。其中,NC-pos、NC-bas及NC为对HBV基因无抑制作用的阴性对照,下文也将其称为对照siRNA;其余siRNA则为特异性靶向HBV的X基因区的siRNA,下文也将其称为测试siRNA。

[0103] 由苏州瑞博生物技术有限公司通过常规固相合成方法得到表1中所列的 siRNA。用退火盐溶液溶解等摩尔的正义链和反义链混合物,随后常规退火以形成siRNA双链。

[0104] 表1 siRNA的序列

siRNA	正义链 (5'→3')	反义链 (5'→3')
NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT (SEQ ID NO: 4)	ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT (SEQ ID NO: 5)
NC-pos	UmUmCmUmCCGAACmCGmUGmUmCmAmCGUdTdT	AfCmGfUGACAfCGfUUCGfGAGAA dTdT
NC-bas	UmUmCmUmCmCmGAACmGUmGUmCmACmGUmdTdT	ACmGUfGACfACfGUfUfCfGGAGA AdTdT
CA1	CCUUGAGGCAUACUCAAAdTdT	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGdTdT
CA2	CmCmUmUGmAGmGCmAUmACmUUmCmAAAdTdT	UmUUmGAmAGmUAmUGmCCmUCmAAmGGmdTdT
A4	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTdT	UfUmUfGAAGUfAUfGCCUfCAAGGdTdT
1d	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTdT	UUmUfGAAGUfAUfGCCUfCAAGGdTdT
2d	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTdT	UfUfGAAGUfAUfGCCUfCAAGGdTdT
3d	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTdT	UfUmUGAAGUfAUfGCCUfCAAGGdTdT
8d	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTdT	UfUmUfGAAGUAUfGCCUfCAAGGdTdT
14d	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTdT	UfUmUfGAAGUfAUfGCCUCAAGGdTdT
X2M2(S++)	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdT-s-dT	UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAGGdT-s-dT
X2M2(S--)	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTdT	UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAGGdTdT

[0106] 注:大写字母C、G、U、A和T表示核苷酸的碱基组成;小写字母d表示该字母d右侧的一个核苷酸为脱氧核糖核苷酸;小写字母m表示该字母m左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被甲氧基取代;小写字母f表示该字母f左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被氟取代;小写字母s表示3'垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键被硫代磷酸二酯键替换。

[0107] 制备实施例2 RBP131/siRNA脂质体制剂的合成

[0108] 将三种干粉脂质化合物(即,含胺化合物、辅助脂质、聚乙二醇化脂质)以59:29:12的摩尔比悬浮于乙醇中并混合,三种脂质化合物的总质量浓度约为8.85mg/ml。将表1所

列的已合成的siRNA溶解于200mM醋酸钠(pH 5.2)溶液中,使siRNA的浓度为0.2mg/ml。以1:3的体积比,非常迅速地混合所得到的脂质乙醇溶液和siRNA醋酸钠水溶液。在表2中描述了混合后得到的脂质体制剂的具体组成。

[0109] 表2 脂质体制剂的组成

[0110]	组成成分	含量
	含胺化合物(CN201180060664.1中的化合物87)	1.52mg/ml
	胆固醇	0.18mg/ml
	聚乙二醇化脂质(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000])	0.51mg/ml
	siRNA	0.15mg/ml
	缓冲盐	150mM 醋酸钠
	溶液	25%乙醇

[0111] 将混合后得到的脂质体制剂(即,含胺化合物、胆固醇、聚乙二醇化脂质与siRNA的组合物)在约50℃孵育10分钟。孵育后,使用KrosFlo®切相流系统,中空纤维柱100KDa超滤,超滤交换溶液为pH 7.4的PBS。超滤的同时可将制剂浓缩或稀释到期望的siRNA浓度。超滤后的制剂在0.22μm滤器上过滤除菌。将由含胺化合物87、胆固醇、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]组成的脂质混合物称为RBP131。所得RBP131/siRNA脂质体制剂在使用前储存在4℃,并检测相关理化性质,检测结果见表3。

[0112] 表3 RBP131/siRNA脂质体制剂的理化参数

[0113]	检测指征	结果
	pH	7.4
	包封率(%)	95.9
	siRNA浓度(mg/ml)	0.14
	粒径(nm)	69.25
	PDI	0.121
	渗透压(mOsm/kg)	300.5

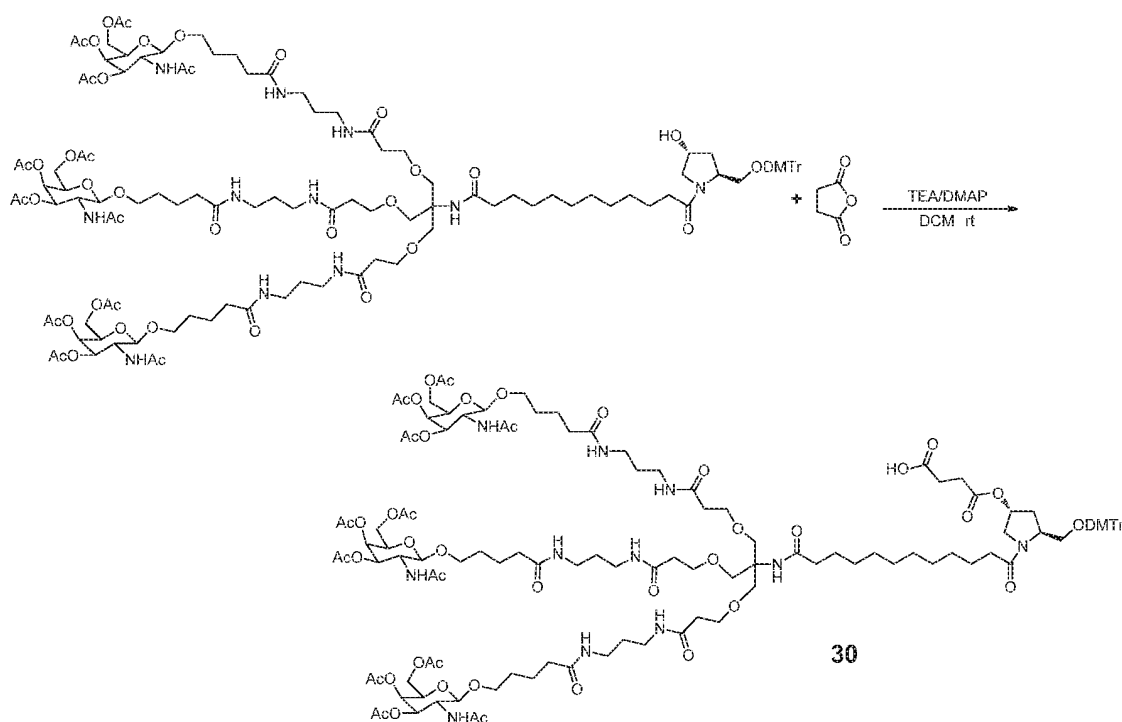
[0114] 另外,除将含胺化合物更换为CN201180060664.1中的化合物72之外,依据上文所述相同的方式制备脂质体制剂RBP130/siRNA。该脂质体制剂RBP130/siRNA的理化参数与表3中所示的参数类似。

[0115] 制备实施例3(GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2缀合物的合成

[0116] (1) (GalNAc)<sub>3</sub>缀合分子的合成

[0117] 按照W02014025805A1所述的制备方法合成化合物30,即,含有如上文所述的接头-(L<sup>A</sup>)<sub>3</sub>三羟甲基氨基甲烷-L<sup>B</sup>-以及作为靶向分子的N-乙酰半乳糖胺分子(其中,每个L<sup>A</sup>可连接一个N-乙酰半乳糖胺分子,因而一个接头可连接三个N-乙酰半乳糖胺分子)的缀合分子,本文中也可将其称为(GalNAc)<sub>3</sub>缀合分子,所述化合物30的结构如下式所示:

[0118]

[0119] (2) (GalNAc)<sub>3</sub>缀合分子连接到固相载体

[0120] 称取(GalNAc)<sub>3</sub>缀合分子(50mg, 0.020mmol)、HBTU(9.1mg, 0.024mmol)至反应瓶中,加入DMF 2ml、DIEA(10.8μl, 0.06mmol),室温下轻轻摇晃2-3min使其全部溶解,加入大孔氨基树脂(50mg,南开合成公司,货号 HC4025-1/HC4025-2)。将反应瓶放置于摇床上,在30℃下以250rpm/min的速度摇动过夜。反应结束后,过滤,所得固体用2ml甲醇/二氯甲烷(体积比=1:9)洗涤一次,再用2ml乙醚洗涤一次,抽干。得到固体粗产物约66mg。

[0121] 将所得固体粗产物加入1.5ml醋酸酐/吡啶(体积比=1:3)中,置于摇床上室温摇动30min。过滤,所得固体用2ml甲醇/二氯甲烷(体积比=1:9)洗涤一次,再用2ml乙醚洗涤一次,抽干。得到固体终产物,即连接(GalNAc)<sub>3</sub>缀合分子的固相载体,约56mg。

[0122] (3) 合成(GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2缀合物

[0123] 通过亚磷酰胺核酸固相合成的方法,利用上述步骤制备的连接(GalNAc)<sub>3</sub>缀合分子的固相载体,合成(GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2的正义链S;利用dT固相载体(GE Healthcare公司,货号:17-5253-83),合成(GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2的反义链AS。

[0124] 序列如下表4所示:

[0125] 表4(GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2的序列组成

序列名称		序列组成(5'-3')
(GalNAc) <sub>3</sub> -X2M2	S	5'-CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAA AdTdT-(GalNAc) <sub>3</sub> -3'
	AS	5'-UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAGGdTdT-3'

[0126] 备注:小写字母d表示该字母d右侧的一个核苷酸为脱氧核糖核苷酸;小写字母m表示该字母m左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被甲氧基取代;小写字母f表示该字母f左侧的一个核苷酸的核糖基团的2'-羟基被氟取代;(GalNAc)<sub>3</sub>表示(GalNAc)<sub>3</sub>缀合分子,即化合物30。

[0127] (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2的合成规模为1μmol,具体合成步骤如下:

[0128] 合成:使用核酸固相合成仪(美国ABI公司,型号:ABI394合成仪),自动循环完成

核酸从3'到5'序列的延伸,每个循环包括脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应。所有为合成 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 使用到的常规核苷单体、甲氧单体、氟代单体都配制成0.1M浓度的乙腈溶液,并使用固相合成中的标准脱保护、偶联、盖帽、氧化试剂。单体的偶联时间为12min。 $(\text{GalNAc})_3$ 缀合分子与siRNA通过磷酸二酯键连接,最终所得的 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 缀合物中siRNA分子与N-乙酰半乳糖胺分子的摩尔比为1:3。以连接 $(\text{GalNAc})_3$ 缀合分子的固相载体起始循环,可将 $(\text{GalNAc})_3$ 缀合分子通过共价连接的方式缀合在siRNA正义链的3'末端。

[0129] 切割与脱保护:将 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 的正义链S、反义链AS分别加入浓氨水中,55℃反应16h,以完成核酸链从固相载体上的切割,并脱除碱基上的保护基团和磷酸上的保护基团。将氨水上清吸出后,真空浓缩至干,用DMSO溶解后,加入三乙胺三氢氟酸盐,用于脱除核糖上的2' TBDMS保护。

[0130] 纯化与脱盐:利用制备型离子色谱纯化柱(Source 15Q),通过NaBr的梯度洗脱,完成核酸的纯化。纯度合格的产品收集后并管,采用反相色谱纯化柱进行脱盐。

[0131] 检测:纯度采用离子交换色谱(IEX-HPLC)进行检测;分子量采用液质联用(LC-MS)进行分析。

[0132] 退火:将S链与AS链以等摩尔比混合,加热至95℃,室温冷却后,使它们通过氢键形成双链结构。

[0133] 鉴定:利用液质联用仪(LC-MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 购于Waters公司,型号:LCT Premier)进行分子量检测,结果如图1a-图1c所示,发现实测值与理论值一致,确定所合成的 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 是目标设计的带有 $(\text{GalNAc})_3$ 缀合分子的双链核酸序列。

[0134] 测试实施例1本测试实施例用来测试本发明的siRNA X2M2的细胞水平毒性和动物水平毒性。

[0135] 利用本领域常规方法,在HepG2.2.15细胞和大鼠原代肝细胞上用MTT方法检测本发明的siRNA X2M2的细胞毒性,在500nM浓度(药效浓度的100倍)下未见有任何细胞毒性反应;在C57BL/6J小鼠上,RB131/X2M2静脉单次给药10mg/kg(起效剂量的33倍),连续观察14天,未出现动物死亡,也未观察到与药物不良反应相关的临床症状;在C57BL/6J小鼠上, $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 缀合物皮下单次给药10mg/kg,连续观察14天,未出现动物死亡,也未观察到与药物不良反应相关的临床症状,表明本发明的siRNA X2M2及其药物组合物或缀合物具有较低的细胞毒性和较高的安全性,具备临床应用的可能。

[0136] 实验实施例1 本实验实施例用来检测制备实施例1中得到的siRNA对HBV mRNA表达量的体外(in vitro)抑制效率。

[0137] 用制备实施例1中得到的siRNA体外转染HepG2.2.15细胞,每组3个平行,至少重复3次实验。siRNA终浓度分别为50nM、10nM、1nM。转染48小时后,采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescent qPCR)测定以上收获的细胞中HBV mRNA的表达水平,具体地:使用RNeasy Mini Kit(QIAGEN公司,货号Cat.74106)试剂盒,按其说明书进行总RNA的提取,并将提取的总RNA逆转录为cDNA,接着用荧光定量PCR法检测siRNA对HepG2.2.15细胞的HBV mRNA表达的抑制效率。

[0138] 在该荧光定量PCR法中,以GAPDH基因作为内参基因,使用针对HBV的引物和针对GAPDH的引物分别对HBV和GAPDH进行检测,引物序列如下表5所示:

[0139] 表5 检测引物的序列

	基因	上游引物	下游引物
[0140]	HBV	5'-CCGTCTGTGCCTTCTCATCT-3' (SEQ ID NO: 6)	5'-TAATCTCCTCCCCCAACTCC-3' (SEQ ID NO: 7)
	GAPDH	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3' (SEQ ID NO: 8)	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3' (SEQ ID NO: 9)

[0141] 在该荧光定量PCR法中, siRNA抑制活性用HBV基因表达剩余量表示, 按如下等式计算:

[0142]  $\text{HBV基因表达剩余量} = (\text{测试组HBV基因的拷贝数} / \text{测试组GAPDH的拷贝数}) / (\text{mock组HBV基因的拷贝数} / \text{mock组GAPDH的拷贝数}) \times 100\%$ 。

[0143] 其中, 各测试组为分别经表1中所列的siRNA处理的HepG2.2.15细胞, 所述siRNA包括特异性靶向HBV的X基因区的siRNA以及三种对照NCsiRNA; mock组为未经任何siRNA处理的HepG2.2.15细胞。

[0144] 图2显示了表1中所列的测试siRNA与对照siRNA在HepG2.2.15细胞中 对HBV mRNA表达抑制活性的检测结果。从图2的结果可以看出, 除siRNA 3d 和siRNA CA2外, 各测试siRNA的HBV mRNA抑制活性与裸序列siRNA CA1 相似。其中, 从表1可以看出, siRNA 3d为减少siRNA A4反义链5' 端第3位 核苷酸修饰的siRNA; siRNA CA2为对裸序列siRNA CA1进行核苷酸间隔修 饰的siRNA。

[0145] 该结果表明, 对siRNA进行的不同化学修饰确实会影响siRNA的活性, 并且, 本发明的siRNA X2M2在细胞水平显示出了优异活性。

[0146] 实验实施例2 本实验实施例用来检测制备实施例1中得到的siRNA在体外人血浆中的稳定性。

[0147] 用制备实施例1中得到的siRNA (20 $\mu$ M, 10 $\mu$ l) 与50%人血浆 (Human plasma, HP) 在37 $^{\circ}$ C下体外孵育一定时间后取样, 具体而言, 分别在0、2、4、6、8、24、48小时取出10 $\mu$ l样本, 并立即进行液氮速冻, 随后冻存于-80 $^{\circ}$ C备 用。配制20重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 将10 $\mu$ l 5倍稀释的上述样品 (稀释液1 $\times$ PBS, pH 7.4) 与4 $\mu$ l上样缓冲液 (20mM EDTA, 36重量%甘油, 0.06 重量%溴酚蓝) 混合, 然后上样, 在80mA恒流条件下电泳60分钟左右。电 泳结束后, 用1 $\times$ Sybr Gold染料 (Invitrogen, Cat. 11494) 染色15分钟后成相, 结果如图3所示。

[0148] 图3显示了表1中所列的测试siRNA与对照siRNA在体外人血浆中的稳 定性检测结果, 其中, 两端的Marker表示未经人血浆处理的等量siRNA, 用来指示经处理的siRNA的大小变化。通过定量读取灰度值, 计算出这些测试 siRNA和对照siRNA与人血浆孵育后残留的最长片段与未经人血浆处理的 siRNA (即图3中显示的Marker) 最长片段的比例 (ratio of the longest fragments, RL), 结果示于表6中。

[0149] 表6 siRNA血浆稳定性定量结果, 人血浆浓度为50%。

样本	RL						
	0h	2h	4h	6h	8h	24h	48h
NC	100.0%	83.9%	69.7%	58.4%	52.6%	36.2%	26.0%
NC-pos	100.0%	93.4%	95.9%	84.9%	88.6%	87.1%	90.0%
NC-bas	100.0%	95.1%	89.8%	86.8%	85.3%	91.1%	90.8%
CA1	100.0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CA2	100.0%	86.9%	76.5%	68.8%	67.7%	48.7%	52.0%
A4	100.0%	97.5%	93.7%	106.0%	91.7%	90.0%	81.2%
1d	100.0%	90.0%	97.2%	93.3%	87.5%	55.7%	65.1%
2d	100.0%	97.6%	88.2%	82.2%	84.5%	82.1%	78.4%
3d	100.0%	96.6%	99.6%	93.3%	87.1%	75.0%	41.6%
8d	100.0%	78.2%	72.7%	59.7%	48.3%	34.0%	25.9%
14d	100.0%	94.6%	90.0%	85.6%	86.0%	78.0%	84.6%
X2M2(S++)	100.0%	101.5%	98.2%	98.6%	93.0%	92.1%	90.9%
X2M2(S--)	100.0%	111.3%	97.5%	90.2%	96.1%	109.1%	93.9%

[0150] 结果显示,未经修饰的裸siRNA CA1一经加入人血浆即迅速降解,血浆 稳定性极差;经过修饰的siRNA则均能够从一定程度上改善血浆稳定性,其中,携有多达20处化学修饰的siRNA CA2的血浆稳定性尽管有所提升,但也并不让人满意。另一方面,无论3' 垂悬末端dTdT之间的磷酸二酯键是否被硫 代磷酸二酯键替换,本发明的siRNA X2M2均显示出比siRNA A4更为优异的血浆稳定性,在与入血浆孵育48h后仍能够保证RL为90%以上。考虑到本发明的siRNA X2M2在siRNA A4的基础上还减少了一个核苷酸的修饰,这一结果是非常令人惊喜的。进而,更令人惊喜的是,从图3中可以看出,尽管siRNA A4在与入血浆孵育48h后还能够保持81.2%的RL,但可以观察到其条带明显 逐渐下移(其它特异性靶向HBV的X基因区的测试siRNA也存在类似情况),即,仍然发生了一定程度的降解(这可能是由于其末端的碱基被RNase切割),而本发明的siRNA X2M2却能够始终保持全长状态。

[0152] 实验实施例3本实验实施例用来检测制备实施例2中得到的 RBP131/siRNA脂质体制剂在HBV转基因小鼠C57BL/6J-Tg (A1b1HBV) 44Bri/J (购自北京维通利华实验动物技术有限公司)中对HBV mRNA表达量的抑制 效率。

[0153] 其中,所用测试siRNA包括表1中所列出的siRNA X2M2(S++)、A4、3d、X2M2(S--),并使用特异性针对萤火虫萤光素酶(Firefly Luciferase)的无关 siRNA siFL867作为阴性对照,其序列如下:

[0154] 正义链:5' CCCUAUUCUCCUUCUUCGCdTdT-3' (SEQ ID NO:10);

[0155] 反义链:5' -GCGAAGAAGGAGAAUAGGGdTdT-3' (SEQ ID NO:11)。

[0156] 先将24只C57BL/6J-Tg (A1b1HBV) 44Bri/J小鼠按血清HBsAg含量随机分 成6组(每组4只,均为雌性),分别为PBS对照组、RBP131/siFL867组、RBP131/X2M2(S++)组、RBP131/A4组、RBP131/3d组和RBP131/X2M2(S--)组。所有动物根据体重计算药量,尾静脉单次给

药,给药剂量为1mg/kg,体积为10ml/kg。给药后第3天将动物处死,对动物进行大体解剖,观察体内脏 器是否有病变,对肉眼观察有病变的组织用10%福尔马林保存进一步进行病理观察,收集肝脏,用RNA later(Sigma Aldrich公司)保存;用组织匀浆仪匀 浆肝组织,再用Trizol根据总RNA提取的标准操作步骤提取得到总RNA。

[0157] 采用实时荧光定量PCR检测肝组织中HBV mRNA的表达水平,具体地:使用ImProm-II™反转录试剂盒(Promega公司)按其说明书将提取的总RNA 逆转录为cDNA,接着用荧光定量PCR试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公 司)检测siRNA对肝组织中的HBV mRNA表达的抑制效率。在该荧光定量 PCR法中,以 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)基因作为内参基因,使用针对HBV的引 物和针对 $\beta$ -肌动蛋白的引物分别对HBV和 $\beta$ -肌动蛋白进行检测。

[0158] 检测引物的序列参见表7。

[0159] 表7 检测引物的序列

	基因	上游引物	下游引物
[0160]	HBV	5'-CCGTCGTGCTTCTCATCT-3'	5'-TAATCTCCTCCCCAACTCC-3'
	$\beta$ -actin	5'-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT TG-3' (SEQ ID NO: 12)	5'-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3' (SEQ ID NO: 13)

[0161] 在该荧光定量PCR法中,siRNA抑制活性用HBV基因表达剩余量表示,按如下等式计算:

[0162]  $\text{HBV基因表达剩余量} = (\text{测试组HBV基因的拷贝数} / \text{测试组}\beta\text{-actin的拷贝数}) / (\text{对照组HBV基因的拷贝数} / \text{对照组}\beta\text{-actin的拷贝数}) \times 100\%$ 。

[0163] 其中,对照组为本实验中施以PBS的对照组小鼠,各测试组为分别施以 不同药物组合物的给药组小鼠。结果示于图4中。

[0164] 结果显示,RBP131/X2M2(S++)和RBP131/X2M2(S--)对乙肝小鼠肝组织 HBV基因X基因区mRNA的抑制活性相当且都十分令人满意,抑制率在90% 左右,阴性对照RBP131/siFL867和测试组中的RBP131/3d对乙肝小鼠肝组织 HBV X基因区mRNA无抑制作用,RBP131/A4对乙肝小鼠肝组织HBV X基 因区mRNA的抑制率则约为70%。此结果证明,在动物水平,在siRNA本身 的序列相同的情况下,不合理的修饰策略甚至会使得siRNA的活性完全丧失(例如RBP131/3d表现出的活性);与之不同,本发明所述的siRNA X2M2在 疾病模型小鼠体内的生物活性十分出色,且高于申请人已授权的在先申请 CN102140461B中的siRNA A4。

[0165] 此外,依据相同的方式,对制备实施例2中得到的RBP130/X2M2(S++)和 RBP130/X2M2(S--)脂质体制剂进行了测试,这些脂质体制剂显示出与 RBP131/X2M2(S++)和 RBP131/X2M2(S--)类似的效果。

[0166] 实验实施例4本实验实施例用来检测RBP131包载不同剂量的X2M2在不 同时间点 在HBV转基因小鼠中对血清HBsAg表达量的抑制效率。

[0167] 按照制备实施例2的方法,制备RBP131/siRNA脂质体制剂。将80只HBV 转基因小鼠(命名为M-TgHBV,购自上海市公共卫生中心动物部,转基因小 鼠的制备方法如Ren J., et al. J. Medical Virology. 2006, 78: 551-560所述)按血清HBsAg含量随机分成8组(每组10只,其中雄性4只,雌性6只),分别 为1×PBS对照组、RBP131/NC对照组(1mg/kg)、IFN干扰素对照组(25ng/g)、三个不同剂量的RBP131/X2M2(S++)样品组(剂量分别为0.1mg/kg、

0.3mg/kg、1mg/kg)、单一剂量的RBP131/X2M2(S<sup>- -</sup>)样品组(1mg/kg)及RBP131/A4样品组(1mg/kg)。所有动物根据体重计算药量,给药体积为10ml/kg。PBS组和各RBP131/siRNA组尾静脉单次给药,干扰素组皮下每周给药2次,即第0、4、7、11、14天给药,共计5次。在给药前与给药后第7、14、21、28天对小鼠眼眶静脉丛取血,在各时间点检测血清HBsAg水平。

[0168] 眼眶取血每次约0.5ml,离心后血清不少于200 $\mu$ l。利用HBsAg CLIA试剂盒(安图生物,CL0310)检测血清中HBsAg的表达水平。HBsAg表达剩余量按如下等式计算:

[0169]  $\text{HBsAg表达剩余量} = (\text{测试组HBsAg含量} / \text{PBS对照组HBsAg含量}) \times 100\%$ 。其中,HBsAg含量用每克肝组织蛋白含多少纳克HBsAg表示。

[0170] 结果如图5所示。可以看出,在给药后不同时间点,IFN干扰素对照组和RBP131/NC对照组对小鼠血清HBsAg表达均无抑制作用。RBP131/X2M2和RBP131/A4呈剂量依赖性地抑制血清中HBsAg的表达。其中,RBP131/X2M2(S<sup>++</sup>)低剂量(0.1mg/kg)在第7天的抑制率为68%,中剂量(0.3mg/kg)的抑制效果可以维持14天以上,高剂量(1mg/kg)的抑制效果可以维持28天以上;同等剂量下(1mg/kg),RBP131/X2M2(S<sup>++</sup>)和RBP131/X2M2(S<sup>- -</sup>)对血清中HBsAg的表达抑制效果始终高于RBP131/A4。由此可见,在动物体内,本发明的siRNA X2M2的生物活性更优于siRNA A4,进一步提升了其临床应用潜能。

[0171] 另一方面,此实验还表明,本发明的RBP131/X2M2相对于传统的抗乙肝药物干扰素而言,对HBsAg有明显的抑制作用,证实了siRNA对病毒性乙型肝炎功能性治愈的可能性。

[0172] 此外,依据相同的方式,对制备实施例2中得到的RBP130/X2M2(S<sup>++</sup>)和RBP130/X2M2(S<sup>- -</sup>)脂质体制剂进行了测试,这些脂质体制剂显示出与RBP131/X2M2(S<sup>++</sup>)和RBP131/X2M2(S<sup>- -</sup>)类似的效果。

[0173] 实验实施例5本实验实施例用来检测RBP131包载不同剂量的X2M2在不同时间点在基于高压注射的HBV转染小鼠中对肝脏HBsAg表达量的抑制效率。

[0174] 按照制备实施例2的方法,制备RBP131/X2M2复合物。将72只高压注射HBV质粒的C3H/HeN小鼠(命名为pHBV,购自上海市公共卫生中心动物部,高压注射小鼠的制备方法如Peng XH., et al. World J. Gastroenterol. 2015, 21(12):3527-3536所述)按血清HBsAg含量随机分成6组(每组12只,雌雄各半),分别为1 $\times$  PBS对照组、ETV恩替卡韦对照组(0.1mg/kg)、三个不同剂量的RBP131/X2M2(S<sup>++</sup>)样品组(剂量分别为0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg)及单一剂量的RBP131/X2M2(S<sup>- -</sup>)样品组(1mg/kg)。所有动物根据体重计算药量,给药体积为10ml/kg。PBS组和各RBP131/X2M2组尾静脉单次给药,恩替卡韦组每日灌胃,连续给药7天,即第0天至第6天,每日一次。第7、28天分批处死动物各半,检测肝组织HBsAg表达水平,HBsAg检测方法同前。

[0175] 结果如图6所示。可以看出,0.3mg/kg剂量的RBP131/X2M2(S<sup>++</sup>)显示出抑制肝脏中HBsAg表达水平的迹象,而1mg/kg和3mg/kg剂量的RBP131/X2M2(S<sup>++</sup>)可以显著抑制肝脏中HBsAg表达水平,给药后第7天,相对于PBS组,肝脏中HBsAg的抑制率高达90%以上,但目前主流的核苷类抗乙肝药物恩替卡韦对肝脏中HBsAg的表达抑制没有疗效;同时,RBP131/X2M2(S<sup>- -</sup>)在不同时间点在高压注射乙肝小鼠pHBV中对肝脏HBsAg表达量的抑制效率与RBP131/X2M2(S<sup>++</sup>)类似,提示RBP131/X2M2对病毒性乙型肝炎功能性治愈的潜在优势。

[0176] 此外,依据相同的方式,对制备实施例2中得到的RBP130/X2M2(S<sup>++</sup>)和RBP130/



X2M2 (S-- ) 脂质体制剂进行了测试,这些脂质体制剂显示出与 RBP131/X2M2 (S++) 和 RBP131/X2M2 (S-- ) 类似的效果。

[0177] 实验实施例6本实验实施例用来检测不同厂商生产的商业化siRNA体内 给药载体,包括Invivo fectamine 2.0 (购自Life technology)、invivo jetPEI (购 自PolyPlus-transfection (PT))、Entranster (购自Engreen Biosystem) 以及本发 明所述的RBP131,包 载携带siRNA X2M2后,在HBV转基因模型小鼠 C57BL/6J-Tg (A1b1HBV) 44Bri/J (购自北京维 通利华实验动物技术有限公司) 中对HBV mRNA表达量的抑制效率。

[0178] 根据生产商提供的标准操作流程,将本发明的siRNA X2M2 (S++) 包裹进上 述商业 化载体,制备相应的载体/siRNA组合物,分别标记为IVF2.0/X2M2、invivo jetPEI/X2M2、 Entranster/X2M2。同时。按照制备实施例2的方法,制 备RBP131/X2M2组合物。

[0179] 将30只C57BL/6J-Tg (A1b1HBV) 44Bri/J小鼠按血清HBsAg含量随机分成 5组 (每组 6只,雌雄各半),分别为PBS对照组、IVF2.0/X2M2、invivo jetPEI/X2M2、Entranster/X2M2、 RBP131/X2M2样品组。所有动物根据体重计 算药量,尾静脉单次给药,IVF2.0/X2M2、invivo jetPEI/X2M2、Entranster/X2M2 三组的给药剂量为2.5mg/kg (siRNA),RBP131/X2M2组的给 药剂量为0.5mg/kg (siRNA),所有5组的给药体积为10ml/kg。给药后第3天将动物处死,对 动物 进行大体解剖,观察体内脏器是否有病变,对肉眼观察有病变的组织用10%福 尔马 林保存进一步进行病理观察,收集肝脏,用RNA later (Sigma Aldrich公 司) 保存;用组织 匀浆仪匀浆肝组织,再用Trizol根据总RNA提取的标准操 作步骤提取得到总RNA。

[0180] 采用实时荧光定量PCR检测肝组织中HBV mRNA的表达水平。检测方法 同实验实施 例3所述,检测引物同表5所述。

[0181] 在该荧光定量PCR法中,siRNA抑制活性按如下等式计算:

[0182]  $\text{siRNA抑制活性} = [1 - (\text{测试组HBV基因的拷贝数} / \text{测试组GAPDH的拷贝数}) / (\text{对照 组HBV基因的拷贝数} / \text{对照组GAPDH的拷贝数})] \times 100\%$ 。

[0183] 其中,对照组为本实验中的施以PBS的对照组小鼠,各处理组为分别施 以不同药 物组合物的给药组小鼠。

[0184] 表8显示了所测各组供试品在C57BL/6J-Tg (A1b1HBV) 44Bri/J转基因小鼠 中对 HBV mRNA表达抑制活性的检测结果。

[0185] 表8 HBV mRNA表达抑制活性

[0186]

供试品	载体来源 (厂家)	siRNA 给 药剂量	给药 频率	处理 时间	实验动物 及数量	mRNA 抑 制效率
1×PBS	自配	0mg/kg	单次	72 小 时	Bri44, 22-27g, 3♀+3♂	0%
<i>In vivo</i> fectamine 2.0 (IVF2.0)/X2M2	Life Technologies	2.5mg/kg	单次	72 小 时	Bri44, 22-27g, 3♀+3♂	61%
<i>invivo</i> jetPEI/X2M2	PolyPlus-tran sfection(PT)	2.5mg/kg	单次	72 小 时	Bri44, 22-27g, 3♀+3♂	49%
Entranster/X2M2	Engreen Biosystem	2.5mg/kg	单次	72 小 时	Bri44, 22-27g, 3♀+3♂	10%
RBP131/X2M2	Suzhou Ribo	0.5mg/kg	单次	72 小 时	Bri44, 22-27g, 3♀+3♂	95%

[0187] 结果显示,即便与由其它商业化载体形成的药物组合中效果最好的 IVF2.0/X2M2组相比,RBP131/X2M2组对乙肝模型小鼠中HBV mRNA的抑制率也提高了34%;同时,RBP131/X2M2组的抑制活性是*invivo* jetPEI/X2M2组的近2倍、是Entranster/X2M2组的近10倍。进而,考虑到RBP131/X2M2组的给药剂量仅为其它三组的1/5,相较于由其它商业化载体形成的药物组合而言,RBP131/X2M2显示出极高的生物活性。

[0188] 实验实施例7本实验实施例用来检测不同文献来源的siRNA体内给药载体以及本发明所述的RBP131包载携带针对载脂蛋白B(ApoB)基因的siRNA (siApoB:正义链(5'→3') GUCAUCACACUGAAUACCAAUdTdT (SEQ ID NO: 16);反义链(5'→3') AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACACdTdT (SEQ ID NO: 17))形成脂质体制剂后,在正常C57BL/6J小鼠中对ApoB mRNA(或血脂)表达量的抑制效率。ApoB的主要功能是负责将肝脏中的脂质运输到血液循环系统中,当ApoB的表达受到抑制后,相应地,肝脏中的脂质就会累积,血液中的脂质水平就会下降。

[0189] 依据文献(Biomaterials.2012 Jun;33(18):4653-64与Biomaterials.2013 Apr;34(12):3120-31)描述,将载体与siRNA混合制备好相应的脂质体制剂。具体而言:(1)二元与三元复合物的制备:依据所需要的复合物电荷比(二元复合物、三元复合物的电荷比(N/P,N/P/C)中,N代表PCL-g-PDMAEMA分子中氨基的摩尔量,P代表siRNA分子磷酸基团的摩尔量,C代表PGA-g-PEG分子中羧基的摩尔量)。将siRNA(包含有所需要的siRNA量)与PCL-g-PDMAEMA纳米粒(包含有所需要的氨基基团量)混合,在室温下孵育15分钟,即得到二元复合物。向二元复合物中再加入一定量的PGA-g-PEG(含有所需的羧基基团量),继续在室温下孵育15分钟,即得到三元复合物。(2)PEA、PEAG复合物的制备:聚合物PEA、PEAG与siRNA的N/P比根据聚合物上的氨基/胍基(N)的摩尔数以及siRNA的磷酸基团(P)的摩尔数进行计算。制备复合物时,将一定量的聚合物(含有所需氨基/胍基量)与一定量的siRNA溶液(含有所需siRNA量)用移液枪混合,室温孵育20分钟,即形成最终的PEA/siRNA与PEAG/siRNA混合物。对RBP131而言,则按照制备实施例2的方法,制备RBP131/siApoB复合物。在进行给药前,可以根据需要再用1×PBS对这些复合物进行体积调整,以适用于相应实验的

需求。

[0190] 将36只正常C57BL/6J小鼠随机分成6组(每组6只,雌雄各半),分别为PBS对照组、Binary Complex 5:1(二元复合物)组、Ternary Complex 5:1:2(三元复合物)组、PEA/siApoB 10:1组、PEAG/siApoB 10:1组、RBP131/siApoB 组。所有动物根据体重计算药量,尾静脉单次给药,Binary Complex 5:1(二元复合物)组、Ternary Complex 5:1:2(三元复合物)组、PEA/siApoB 10:1组、PEAG/siApoB 10:1组的给药剂量为2.5mg/kg(siRNA),RBP131/siApoB组的剂量为0.5mg/kg(siRNA),所有6组的给药体积为10ml/kg。给药后第3天将动物处死,小鼠眼眶静脉丛取血,离心获得血清;对动物进行大体解剖,观察体内脏器是否有病变,对肉眼观察有病变的组织用10%福尔马林保存进一步进行病理观察,收集肝脏,用RNA later(Sigma Aldrich公司)保存;用组织匀浆仪匀浆肝组织,再用Trizol根据总RNA提取的标准操作步骤提取得到总RNA。

[0191] 采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescent qPCR)检测肝组织中ApoB mRNA的表达水平,具体地:使用ImProm-II<sup>TM</sup>反转录试剂盒(Promega公司)按其说明书将提取的总RNA逆转录为cDNA,接着用荧光定量PCR试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)检测siRNA对肝组织中的ApoB mRNA表达的抑制效率。

[0192] 表9检测引物的序列

[0193]	基因	上游引物	下游引物
	ApoB	5'-TTCCAGCCCATGGGCAACTTTA CCT-3' (SEQ ID NO: 14)	5'-TACTGCAGGGCGTCAGTGACAAA T-3' (SEQ ID NO: 15)
	$\beta$ -actin	5'-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT TG-3'	5'-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA -3'

[0194] 在该荧光定量PCR法中,siRNA抑制活性按如下等式计算:

[0195]  $\text{siRNA抑制活性} = [1 - (\text{测试组ApoB基因的拷贝数} / \text{测试组}\beta\text{-actin的拷贝数}) / (\text{对照组ApoB基因的拷贝数} / \text{对照组}\beta\text{-actin的拷贝数})] \times 100\%$ 。

[0196] 其中,对照组为本实验中的施以PBS的对照组小鼠,各测试组为分别施以不同药物组合物的给药组小鼠。

[0197] 血清中血脂的水平用PM4000/3血清生化仪(SABA,意大利)直接检测。

[0198] 表10显示了所测各组供试品在C57BL/6J正常小鼠中对ApoB mRNA表达抑制活性和血脂表达水平的检测结果。

[0199] 表10 ApoB mRNA表达抑制活性和血脂表达水平

[0200]

供试品	载体来源(厂家或文献出处)	siRNA 给药剂量	给药频率	处理时间	实验动物	mRNA 抑制率	血脂下调量
1×PBS	自配	0mg/kg	单次	72 小时	C57BL/6J, 18-22g, 3♀+3♂	0%	0%
Binary Complexc 5:1 (二元载体)	Biomaterials. 2012	2.5mg/kg	单次	72 小时	C57BL/6J, 18-22g, 3♀+3♂	38%	33%
Ternary Complex 5:1:2 (三元载体)	Jun;33(18):4653-64.	2.5mg/kg	单次	72 小时	C57BL/6J, 18-22g, 3♀+3♂	12%	8%
PEA/siApoB 10:1	Biomaterials. 2013	2.5mg/kg	单次	72 小时	C57BL/6J, 18-22g, 3♀+3♂	20%	16%
PEAG/siApoB 10:1	Apr;34(12):3120-31.	2.5mg/kg	单次	72 小时	C57BL/6J, 18-22g, 3♀+3♂	40%	34%
RBP131/siApoB	Suzhou Ribo	0.5mg/kg	单次	72 小时	C57BL/6J, 18-22g, 3♀+3♂	95%	93%

[0201] 结果显示,RBP131/siApoB组对ApoB mRNA与血脂的抑制效果显著优于 其它药物组合物,其中,RBP131/siApoB对血脂的抑制率是Binary Complexc 5:1 (二元复合物)组和PEAG/siApoB 10:1组的2.8倍,是Ternary Complex 5:1:2 (三元复合物)组的11.6倍;并且,RBP131/siApoB组的给药剂量仍然仅是其 它四组的1/5,所以,相较于由其它载体所形成的药物组合物而言, RBP131/siApoB显示了极高的生物活性。

[0202] 实验实施例8本实验实施例用来检测不同剂量的 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 缀合物 在基于高压注射的HBV转染小鼠中对肝脏中HBV mRNA和血清中HBsAg表达 量的抑制效率。

[0203] 按照制备实施例3的方法,制备 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 缀合物及 $(\text{GalNAc})_3\text{-NC}$  缀合物( $(\text{GalNAc})_3\text{-NC}$ 缀合物的制备方法与 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 缀合物相同,区别仅在于将siRNA的序列变为表1中所列出的NC)。将60只高压注射HBV质 粒的C3H/HeN小鼠(命名为pHBV,购自上海市公共卫生中心动物部,高压注射小鼠的制备方法如Peng XH.,et al.World J.Gastroenterol.2015,21(12): 3527-3536所述)按血清HBsAg含量随机分成6组(每组10只,雌雄各半),分别为1×PBS对照组、ETV恩替卡韦对照组(0.1mg/kg)、 $(\text{GalNAc})_3\text{-NC}$ 对照组(3mg/kg)及三个不同剂量的 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 样品组(剂量分别为0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg)。所有动物根据体重计算药量,给药体积为10ml/kg。PBS组、 $(\text{GalNAc})_3\text{-NC}$ 组和各 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 组皮下单次给药,恩替卡韦组每日灌胃,连续给药14天,即第0天至第13天,每日一次。第14天处死所有动物,检测 肝脏中HBV mRNA和血清中HBsAg表达水平,检测方法分别同实验实施例3 和实验实施例4。

[0204] 结果如图7和图8所示。可以看出,皮下单次给药后,ETV恩替卡韦对照组和 $(\text{GalNAc})_3\text{-NC}$ 对照组对小鼠肝脏中HBV mRNA和血清中HBsAg表达均无 抑制作用。 $(\text{GalNAc})_3\text{-X2M2}$ 呈剂量依赖性地降低HBV小鼠肝脏中HBV mRNA 和血清中HBsAg的含量,抑制率见如下表11。

[0205] 表11小鼠肝脏中HBV mRNA和血清中HBsAg表达的抑制

[0206]

组别		肝脏 HBV X mRNA 抑制率 (%)	血清 HBsAg 抑制率 (%)
ETV	0.1mg/kg	-5.0	2.8
(GalNAc) <sub>3</sub> -NC	3mg/kg	-5.8	-0.4
(GalNAc) <sub>3</sub> -X2M2	0.3mg/kg	45.8	43.6
	1mg/kg	90.6	87.0
	3mg/kg	96.9	95.6

[0207] 由此可见,在动物体内,本发明的 (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 缀合物可以发挥很好的生物活性,具有临床应用的潜能。此外,本发明的 (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 相对于临床一线的抗乙肝药物恩替卡韦而言,对 HBsAg 有明显的抑制作用,进一步凸显了 (GalNAc)<sub>3</sub>-siRNA 缀合物对病毒性乙型肝炎功能性治愈的可能性。

[0208] 实验实施例9本实验实施例用来检测不同剂量的 (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 缀合物在不同时间点在基于高压注射的HBV转染小鼠中对血清HBsAg表达量的抑制效率。

[0209] 按照制备实施例3的方法,制备 (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 缀合物。将40只高压注射HBV质粒的C3H/HeN小鼠(命名为pHBV,购自上海市公共卫生中心动物部,高压注射小鼠的制备方法如Peng XH., et al. World J. Gastroenterol. 2015, 21(12):3527-3536所述)按血清HBsAg含量随机分成4组(每组10只,雌雄各半),分别为1×PBS对照组及三个不同剂量的 (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 样品组(剂量分别为0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg)。所有动物根据体重计算药量,给药体积为10ml/kg。PBS组和各 (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 组皮下单次给药,每周检测动物血清中HBsAg含量。于给药后第56天处死所有动物,检测血清中HBsAg表达水平,方法同上。

[0210] 结果如图9所示。可以看出, (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 在给药后不同的时间点呈剂量依赖性地降低HBV小鼠血清中的HBsAg含量,0.3mg/kg (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 单次给药后对血清HBsAg的抑制作用可维持至42天,1mg/kg和3mg/kg (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 单次给药后对血清HBsAg的抑制作用可维持至49天。1mg/kg (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 单次给药后2周对HBsAg的抑制作用大于90%。由此可以看出, (GalNAc)<sub>3</sub>-X2M2 单次给药能有效、长期地抑制乙肝小鼠的血清HBsAg,提示它将对慢性乙型肝炎患者的功能性治愈及依从性改善提供潜在的可能。

[0211] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0212] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0213] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 苏州瑞博生物技术有限公司
- [0003] <120> 一种siRNA、含有该siRNA的药物组合物和缀合物及它们的应用
- [0004] <150> 2015103642298
- [0005] <151> 2015-06-26
- [0006] <160> 17
- [0007] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 21
- [0010] <212> RNA
- [0011] <213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA正义链)
- [0012] <400> 1
- [0013] ccuugaggca uacuuc aaat t 21
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 21
- [0016] <212> RNA
- [0017] <213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA反义链)
- [0018] <400> 2
- [0019] uuugaaguau gccucaaggt t 21
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 19
- [0022] <212> RNA
- [0023] <213> HBV mRNA(乙型肝炎病毒mRNA)
- [0024] <400> 3
- [0025] ccuugaggca uacuuc aaa 19
- [0026] <210> 4
- [0027] <211> 21
- [0028] <212> RNA
- [0029] <213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA正义链)
- [0030] <400> 4
- [0031] uucuccgaac gugucacgut t 21
- [0032] <210> 5
- [0033] <211> 21
- [0034] <212> RNA
- [0035] <213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA反义链)
- [0036] <400> 5
- [0037] acgugacacg uucggagaat t 21
- [0038] <210> 6

[0039]	<211> 20
[0040]	<212> DNA
[0041]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)
[0042]	<400> 6
[0043]	ccgtctgtgc cttctcatct 20
[0044]	<210> 7
[0045]	<211> 20
[0046]	<212> DNA
[0047]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)
[0048]	<400> 7
[0049]	taatctcctc ccccaactcc 20
[0050]	<210> 8
[0051]	<211> 20
[0052]	<212> DNA
[0053]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)
[0054]	<400> 8
[0055]	agaaggctgg ggctcatttg 20
[0056]	<210> 9
[0057]	<211> 20
[0058]	<212> DNA
[0059]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)
[0060]	<400> 9
[0061]	aggggccatc cacagtcttc 20
[0062]	<210> 10
[0063]	<211> 21
[0064]	<212> RNA
[0065]	<213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA正义链)
[0066]	<400> 10
[0067]	cccuauucuc cuucuugct t 21
[0068]	<210> 11
[0069]	<211> 21
[0070]	<212> RNA
[0071]	<213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA反义链)
[0072]	<400> 11
[0073]	gcgaagaagg agaauagggt t 21
[0074]	<210> 12
[0075]	<211> 24
[0076]	<212> DNA
[0077]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)

---

[0078]	<400> 12
[0079]	agcttccttg cagctccttc gttg 24
[0080]	<210> 13
[0081]	<211> 24
[0082]	<212> DNA
[0083]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)
[0084]	<400> 13
[0085]	ttctgaccca ttcccacat caca 24
[0086]	<210> 14
[0087]	<211> 24
[0088]	<212> DNA
[0089]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)
[0090]	<400> 14
[0091]	ttccagccat gggcaacttt acct 24
[0092]	<210> 15
[0093]	<211> 24
[0094]	<212> DNA
[0095]	<213> Artificial Sequence(人工序列:合成引物)
[0096]	<400> 15
[0097]	tactgcaggg cgtcagtgac aaat 24
[0098]	<210> 16
[0099]	<211> 23
[0100]	<212> RNA
[0101]	<213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA正义链)
[0102]	<400> 16
[0103]	gucaucacac ugaauaccaa utt 23
[0104]	<210> 17
[0105]	<211> 25
[0106]	<212> RNA
[0107]	<213> Artificial Sequence(人工序列:siRNA反义链)
[0108]	<400> 17
[0109]	auugguauuc agugugauga cactt 25



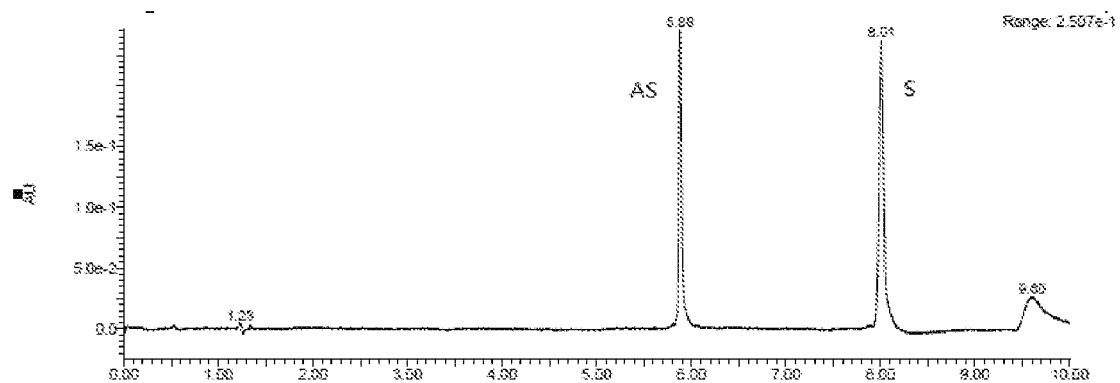


图1a

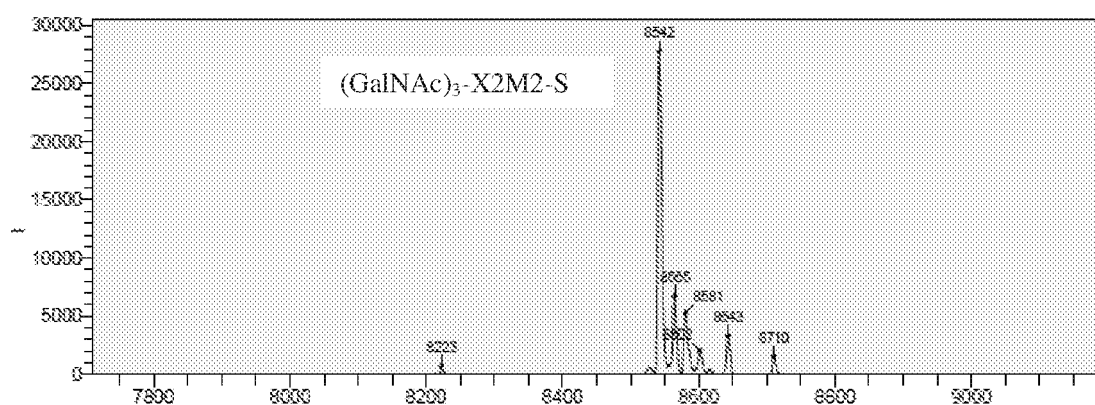


图1b

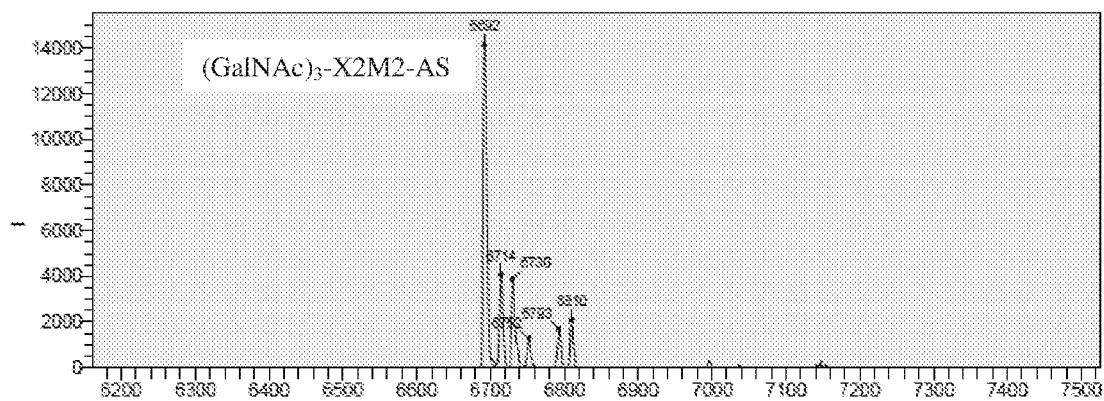


图1c

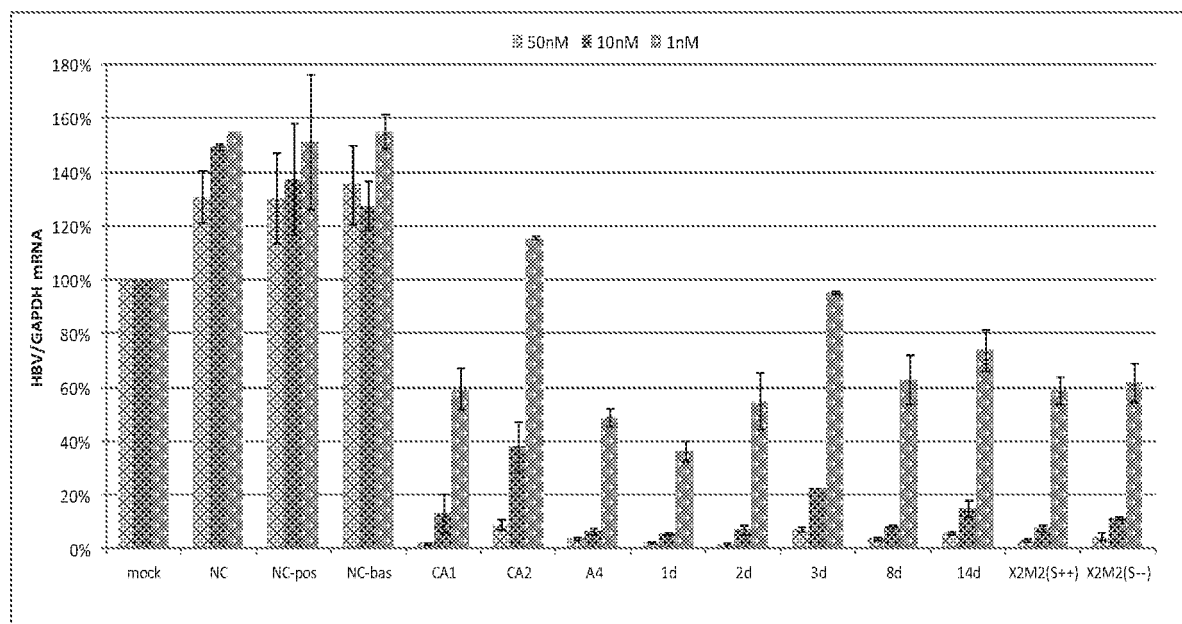


图2

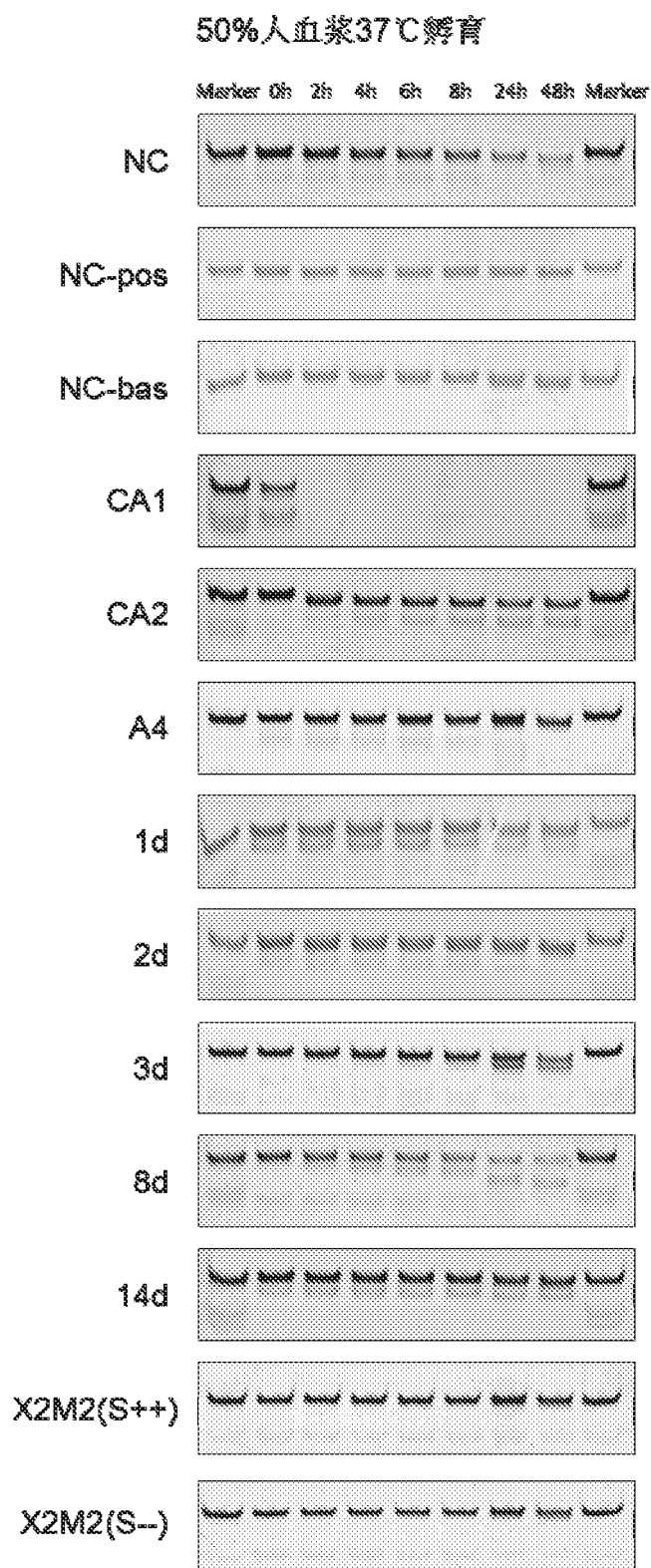


图3

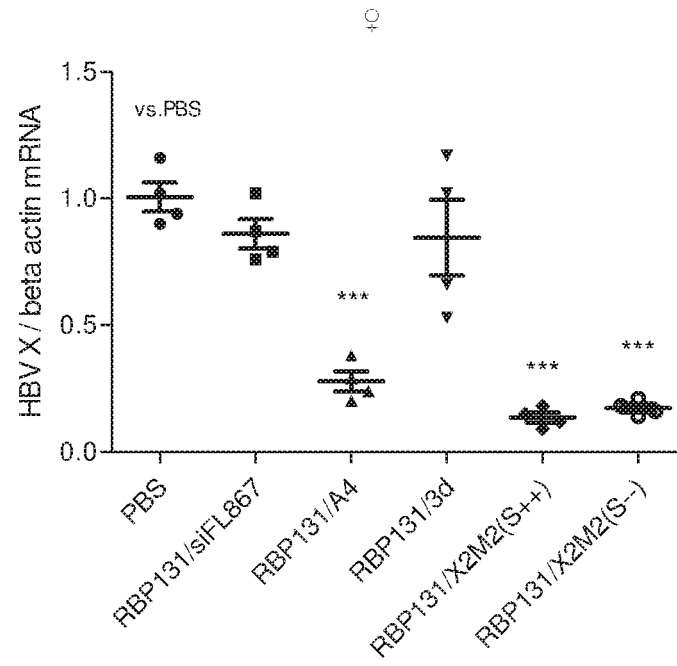


图4

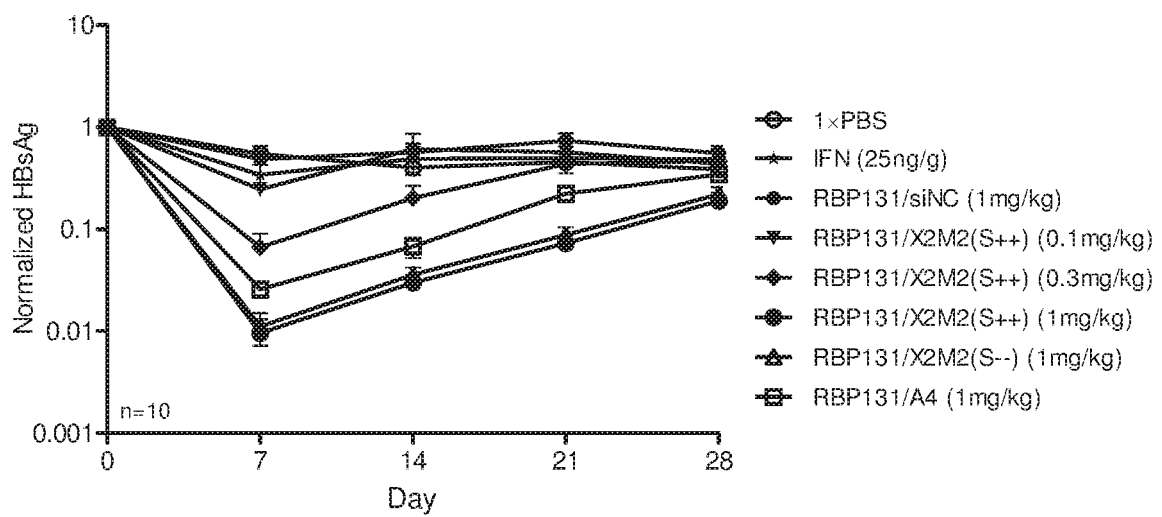


图5

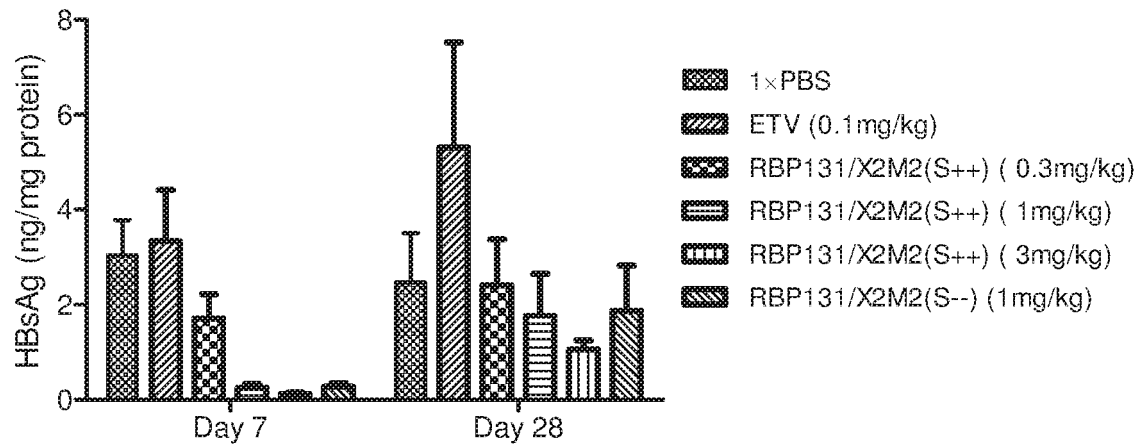


图6

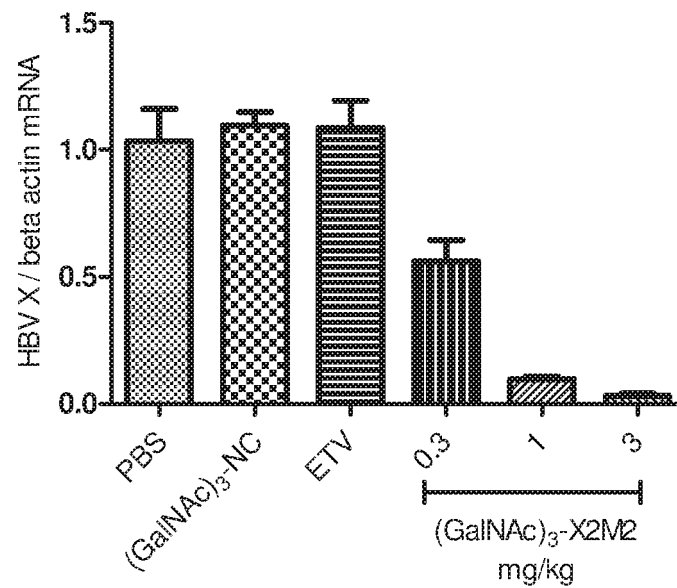


图7

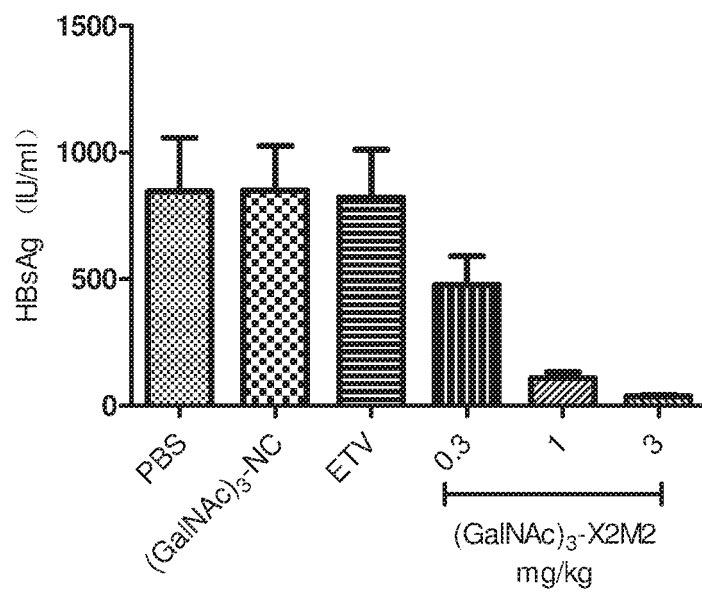


图8

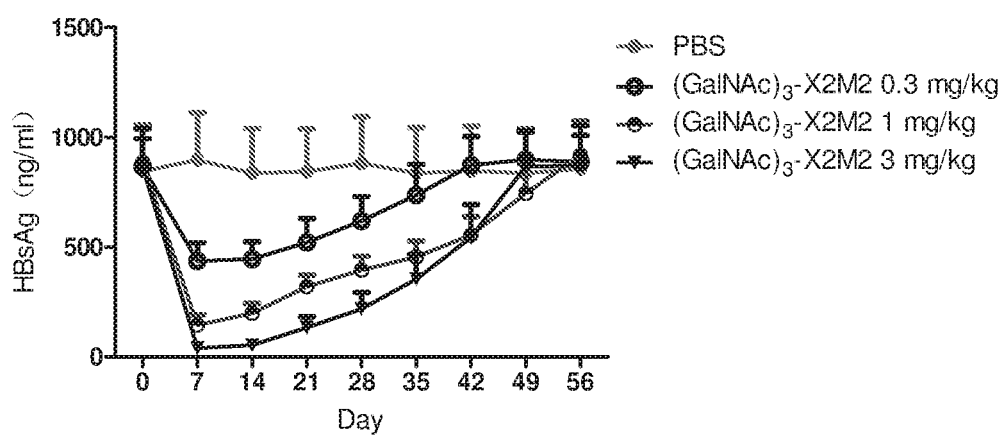


图9