

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2020年11月26日(26.11.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/233651 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C12N 15/113* (2010.01) *C07C 237/06* (2006.01)  
*C07D 211/58* (2006.01) *C07C 229/24* (2006.01)  
*C07C 229/16* (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)  
*C07D 211/28* (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)  
*C07C 229/26* (2006.01) *A61P 19/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/091485

(22) 国际申请日: 2020年5月21日(21.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201910430586.8 2019年5月22日(22.05.2019) CN

(71) 申请人: 苏州瑞博生物技术股份有限公司(SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。

(72) 发明人: 张鸿雁(ZHANG, Hongyan); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 高山(GAO, Shan); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 康代武(KANG, Daiwu); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 李海涛(LI, Haitao); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) Title: NUCLEIC ACID, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, CONJUGATE, PREPARATION METHOD, AND USE

(54) 发明名称: 核酸、药物组合物与缀合物及制备方法和用途

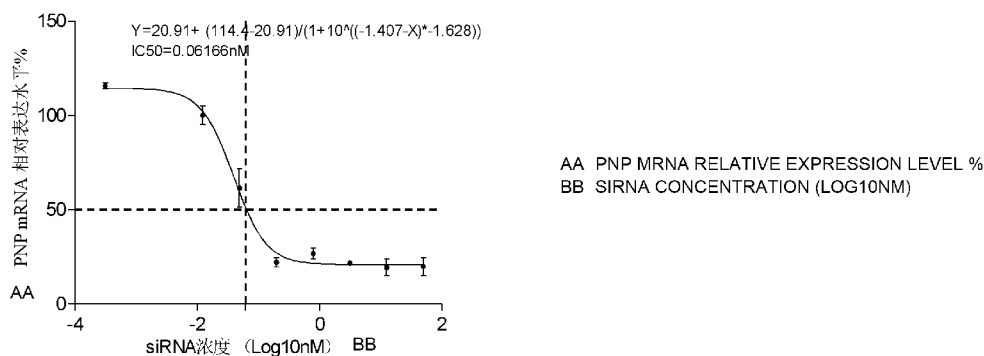


图 1D

(57) Abstract: Provided are an siRNA which inhibits purine nucleoside phosphorylase (PNP) gene expression, a pharmaceutical composition containing the siRNA, and an siRNA conjugate, capable of effectively treating and/or preventing abnormal uric acid metabolism, or diseases or physiological conditions caused by abnormal uric acid metabolism. Each nucleotide in the siRNA is independently a modified or unmodified nucleotide.

(57) 摘要: 提供了一种抑制嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)基因表达的siRNA, 含有siRNA的药物组合物和siRNA缀合物, 其可以有效治疗和/或预防尿酸代谢异常或者尿酸代谢异常引发的疾病或生理状况。所述siRNA中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。



WO 2020/233651 A1

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,  
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84)** 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**本国际公布:**

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

## 核酸、药物组合物与缀合物及制备方法和用途

## 技术领域

本公开涉及一种能够抑制嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 基因表达的核酸和含有核酸的药物组合物与 siRNA 缀合物。本公开还涉及该核酸、药物组合物与 siRNA 缀合物的制备方法和用途。

## 背景技术

痛风是一种与嘌呤代谢紊乱和/或尿酸排泄减少所致的高尿酸血症直接相关的疾病。痛风自古就是欧美等发达国家的常见病，第二次世界大战后，随着各国经济的发展，其患病率在全球呈逐年升高的趋势，且有年轻化的趋势。目前在中国痛风患者就有 1200 万。

嘌呤核苷磷酸化酶 (Purine Nucleotide Phosphorylase, PNP) 是治疗痛风的关键靶点之一。通过抑制 PNP 表达，能够有效抑制次黄嘌呤、鸟嘌呤的产生，进而减少尿酸产生，从而达到缓解痛风疾病进程并逆转病情的目的。通过抑制 PNP 基因的表达，能够在细胞水平上对尿酸代谢异常引发的疾病、特别是高尿酸血症以及痛风进行预防和治疗。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的表达，从而达到治疗疾病的目的。

开发抑制 PNP 基因表达和治疗尿酸代谢异常引发的疾病的 siRNA 药物的关键之一在于寻找合适的 siRNA 及其修饰以及有效的递送系统。

## 发明内容

本公开的发明人意外发现，具有本公开提供的如下 siRNA 及其修饰序列能够特异性地抑制 PNP 基因的表达，药物组合物或 siRNA 缀合物能够特异性地靶向肝脏，从而可以抑制肝脏中 PNP 基因的表达，实现尿酸代谢异常引发的疾病，特别是高尿酸血症与痛风的治疗或预防，从而完成了本发明。

在一些实施方案中，本公开提供了第一种能够抑制 PNP 基因表达的 siRNA，该 siRNA 含有正义链和反义链，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，所述反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区，其中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'-CCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>1</sub>-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-Z<sub>2</sub>UCUUAUAAUCUUCUAGG-3' (SEQ ID NO: 2),

其中，Z<sub>1</sub> 为 A，Z<sub>2</sub> 为 U，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>1</sub> 的核苷酸 Z<sub>3</sub>，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>2</sub> 的核苷酸 Z<sub>4</sub>，所述 Z<sub>4</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

在一些实施方案中，本公开提供了第二种能够抑制 PNP 基因表达的 siRNA，该 siRNA 含有正义链和反义链，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，所述反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区，其中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'-GUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>5</sub>-3' (SEQ ID NO: 61);

5'-Z<sub>6</sub>UAACUUCUGGUACUGUAC-3' (SEQ ID NO: 62),

其中，Z<sub>5</sub> 为 U，Z<sub>6</sub> 为 A，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>5</sub> 的核苷酸 Z<sub>7</sub>，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>6</sub> 的核苷酸 Z<sub>8</sub>，所述 Z<sub>8</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

在一些实施方案中，本公开提供了第三种能够抑制 PNP 基因表达的 siRNA，该 siRNA 含有正义链和反义链，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，所述反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区，其中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 121 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'-CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>9</sub>-3' (SEQ ID NO: 121);

5'-Z<sub>10</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 122),

其中，Z<sub>9</sub> 为 A，Z<sub>10</sub> 为 U，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>9</sub> 的核苷酸 Z<sub>11</sub>，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>10</sub> 的核苷酸 Z<sub>12</sub>，所述 Z<sub>12</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

在一些实施方案中，本公开提供了第四种能够抑制 PNP 基因表达的 siRNA，该 siRNA 含有正义链和反义链，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，所述反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核

核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区, 其中, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 181 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5'-CAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>13</sub>-3' (SEQ ID NO: 181);

5'-Z<sub>14</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 182),

其中, Z<sub>13</sub> 为 A, Z<sub>14</sub> 为 U, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>13</sub> 的核苷酸 Z<sub>15</sub>, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>14</sub> 的核苷酸 Z<sub>16</sub>, 所述 Z<sub>16</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

在一些实施方案中, 本公开提供了一种药物组合物, 所述药物组合物含有本公开的 siRNA 和药学上可接受的载体。

在一些实施方案中, 本公开提供了一种 siRNA 缀合物, 所述 siRNA 缀合物含有本公开提供的 siRNA 以及缀合连接至该 siRNA 的缀合基团。

在一些实施方案中, 本公开提供了本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物在制备用于治疗 and/或预防由尿酸代谢异常或者尿酸代谢异常引发的疾病或生理状况的药物中的用途。

在一些实施方案中, 本公开提供了一种治疗和/或预防尿酸代谢异常或者尿酸代谢异常引发的疾病或生理状况的方法, 所述方法包括将有效量的本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物给予有需要的受试者。

在一些实施方案中, 本公开提供了一种抑制肝细胞中 PNP 基因表达的方法, 该方法包括将有效量的本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物与所述肝细胞接触。

在一些实施方案中, 本公开提供了一种试剂盒, 所述试剂盒含有本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物。

有益效果

本公开提供的 siRNA、药物组合物和 siRNA 缀合物具有良好的稳定性, 较高的 PNP mRNA 抑制活性, 较低的脱靶效应, 和/或能显著治疗或缓解痛风症状。

在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在体外细胞实验中显示出优异的靶 mRNA 抑制活性。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在肝细胞中显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的靶 mRNA 抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 在 50 nM 浓度下在 SMMC-7721 细胞中显示出 61.43%-74.83% 的 PNP mRNA 抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 在 50 nM 浓度下在 Huh7 细胞中显示出高达 89.15% 的 PNP mRNA 抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 在 50 nM 浓度下在 HepG2 细胞中显示出 57.35%-65.37% 的 PNP mRNA 抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 在不同浓度下在 SMMC-7721 细胞中显示出较高的 PNP mRNA 抑制率, 在 50 nM 浓度下可高达 81.23%。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 在不同浓度下在 HepG2 细胞中显示出较高的 PNP mRNA 抑制率; 在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 缀合物在 SMMC-7721 细胞中显示出较高的 PNP mRNA 抑制率, IC<sub>50</sub> 值在 0.017-0.113nM 之间。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 缀合物在不同浓度下在 HepG2 细胞中显示出较高的 PNP mRNA 抑制率, 在 50 nM 浓度下可高达 68.0%。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 缀合物在 50 nM 浓度下在 SMMC-7721 细胞中显示出高达 88.93% 的 PNP mRNA 抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 缀合物在 50 nM 浓度下在 Huh7 细胞中显示出高达 77.89% 的 PNP mRNA 抑制率。

在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物可在体内具有更高的稳定性和/或更高的活性。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的靶基因表达抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的 PNP 基因表达抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的肝内 PNP 基因表达抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的动物模型中肝内 PNP 基因表达抑制率。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的人类受试者中肝内 PNP 基因表达抑制率。在一些实施方案中, 本公开的 siRNA 缀合物在急性高尿酸小鼠模型中显示出显著的抑制血尿酸水平的效果。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物未显示出明显脱靶效应。脱靶效应可以是例如抑制非靶基因的基因正常表达。据认为, 如果脱靶基因表达的结合/抑制与在靶基因效果相比低于 50%、40%、30%、20% 或 10% 时, 该脱靶效应就是不显著的。

由此说明, 本公开提供的 siRNA、药物组合物以及 siRNA 缀合物能够抑制 PNP 基因的表达, 有效治疗和/或预防尿酸代谢异常或者尿酸代谢异常引发的疾病或生理状况, 尤其是高尿酸血症和

/或痛风症状,具有良好的应用前景。

本公开的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

#### 附图说明

图 1A-图 1D 依次为转染了不同浓度的缀合物 4-7 后, SMMC-7721 细胞中 PNP mRNA 相对表达水平拟合的剂量-效应曲线和由此计算得到的 IC<sub>50</sub> 值。

图 2A 显示了转染了不同浓度的缀合物 2 后, 体外 SMMC-7721 细胞中的 PNP mRNA 相对表达水平拟合的剂量-效应曲线和由此计算得到的 IC<sub>50</sub> 值。

图 2B 显示了转染了不同浓度的缀合物 8 后, 体外 SMMC-7721 细胞中的 PNP mRNA 相对表达水平拟合的剂量-效应曲线和由此计算得到的 IC<sub>50</sub> 值。

图 3 显示了空白对照小鼠、急性高尿酸血症小鼠模型和给予缀合物 13 后的急性高尿酸小鼠模型中, 相对血清尿酸含量平均值的折线图。

#### 具体实施方式

以下对本公开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公开, 而非旨在在任何方面限制本公开。

在本公开中, PNP mRNA 是指具有 Genbank 注册号为 NM\_000270.3 所示序列的 mRNA。进一步地, 若无其它说明, 本公开中所使用的术语“靶基因”是指转录上述 PNP mRNA 的基因, 术语“靶 mRNA”是指上述 PNP mRNA。

#### 定义

在上文及下文中, 如无特别说明, 大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成; 小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸; 小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸; 小写字母 s 表示与该字母 s 左右相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接; P1 表示该 P1 右侧相邻的一个核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸, 大写字母 P 表示该字母 P 右侧相邻的一个核苷酸为 5'-磷酸核苷酸。

在上文及下文中, 所述“氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被氟取代形成的核苷酸, “非氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物。“核苷酸类似物”指能够在核酸中代替核苷酸, 但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的基团。如异核苷酸、桥联的核苷酸 (bridged nucleic acid, 简称 BNA) 或无环核苷酸。所述“甲氧基修饰的核苷酸”指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

在本文的上下文中, 表述“互补”和“反向互补”可互相替代使用, 并具有本领域技术人员周知的含义, 即, 在双链核酸分子中, 一条链的碱基各自与另一条链上的碱基以互补的方式相配对。在 DNA 中, 嘌呤碱基腺嘌呤 (A) 始终与嘧啶碱基胸腺嘧啶 (T) (或者在 RNA 中为尿嘧啶 (U)) 相配对; 嘌呤碱基鸟嘌呤 (C) 始终与嘧啶碱基胞嘧啶 (G) 相配对。每个碱基对都包括一个嘌呤和一个嘧啶。当一条链上的腺嘌呤始终与另一条链上的胸腺嘧啶 (或尿嘧啶) 配对, 以及鸟嘌呤始终与胞嘧啶配对时, 两条链被认为是彼此相互互补的, 以及从其互补链的序列中可以推断出该链的序列。与此相应地, “错配”在本领域中意指在双链核酸中, 对应位置上的碱基并未以互补的形式配对存在。

在上文及下文中, 如无特别说明, “基本上反向互补”是指所涉及的两段核苷酸序列之间存在不多于 3 个的碱基错配; “实质上反向互补”是指两段核苷酸序列之间存在不多于 1 个的碱基错配; “完全反向互补”是指两段核苷酸序列之间不存在碱基错配。

在上文及下文中, 一个核苷酸序列与另外一个核苷酸序列存在“核苷酸差异”, 是指前者与后者相比, 相同位置的核苷酸的碱基种类发生了改变, 例如, 在后者中一个核苷酸碱基为 A 时, 在前者的相同位置处的对应核苷酸碱基为 U、C、G 或者 T 的情况下, 认定为两个核苷酸序列之间在该位置处存在核苷酸差异。在一些实施方案中, 以无碱基核苷酸或其等同物代替原位置的核苷酸时, 也可认为在该位置处产生了核苷酸差异。

在上文及下文中, 特别是在描述本公开的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物的制备方法时, 除非特别说明, 所述核苷单体 (nucleoside monomer) 指, 根据欲制备的 siRNA 或 siRNA 缀合物中核苷酸的种类和顺序, 亚磷酸酰胺固相合成中使用的修饰或未修饰的核苷亚磷酸酰胺单体 (unmodified or modified RNA phosphoramidites, 有时 RNA phosphoramidites 也称为 Nucleoside phosphoramidites)。亚磷酸酰胺固相合成成为本领域技术人员所公知的 RNA 合成中所用的方法。本公开所用的核苷单体均可商购得到。

在本公开的上下文中, 除非另有说明, “缀合”是指两个或多个各自具有特定功能的化学部分之间以共价连接的方式彼此连接; 相应地, “缀合物”是指该各个化学部分之间通过共价连接而形成的化合物。进一步地, “siRNA 缀合物”表示一个或多个具有特定功能的化学部分共价连接至 siRNA 上而形成的化合物。在下文中, 有时也将本公开的 siRNA 缀合物简称为“缀合物”。siRNA 缀合物应根据上下文, 理解为多个 siRNA 缀合物的总称或者某个化学式所示的 siRNA 缀合物。

在本公开的上下文中，“缀合分子”应当理解为可通过反应缀合至 siRNA，最终形成本公开的 siRNA 缀合物的特定化合物。

如本文所使用的，“任选的”或“任选地”是指其后描述的事件或状况可以发生或不发生，并且该描述包括事件或状况发生的情况和不发生的情况。例如，“任选地取代”的“烷基”包括下文定义的“烷基”和“取代烷基”。本领域技术人员将理解的是，对于包含一个或多个取代基的任何基团，这些基团不打算引入空间上不切实际、合成上不可行和/或本身不稳定的任何取代或取代模式。

如本文所使用的，“烷基”是指具有指定数量的碳原子的直链和支链，所述数量通常为 1 至 20 个碳原子，例如 1 至 10 个碳原子，如 1 至 8 个或 1 至 6 个碳原子。例如，C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基包含 1 至 6 个碳原子的直链和支链烷基。当提及具有特定数量的碳的烷基残基时，旨在涵盖具有该数量的碳的所有支链和直链形式；因此，例如，“丁基”意味着包括正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基；“丙基”包括正丙基和异丙基。亚烷基是烷基的子集，指与烷基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“烯基”是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和支链或直链烷基，所述碳-碳双键是通过从母体烷基的相邻碳原子中除去一分子氢而获得的。该基团可以处于双键的顺式或反式构型。典型的烯基基团包括但不限于：乙烯基；丙烯基，如丙-1-烯-1-基、丙-1-烯-2-基、丙-2-烯-1-基（烯丙基）、丙-2-烯-2-基；丁烯基，例如丁-1-烯-1-基、丁-1-烯-2-基、2-甲基丙-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、丁-2-烯-2-基、丁-1,3-二烯-1-基、丁-1,3-二烯-2-基等等。在某些实施方案中，烯基基团具有 2 到 20 个碳原子，而在其他实施方案中，具有 2 至 10 个、2 至 8 个或 2 至 6 个碳原子。亚烯基是烯基的一个子集，指与烯基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“炔基”是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和支链或直链烷基，所述碳-碳三键是通过从母体烷基的相邻碳原子中除去两分子氢而获得的。典型的炔基基团包括但不限于：乙炔基；丙炔基，如丙-1-炔-1-基、丙-2-炔-1-基；丁炔基，例如丁-1-炔-1-基、丁-1-炔-3-基、丁-3-炔-1-基等。在某些实施方案中，炔基具有 2 到 20 个碳原子，而在其他实施方案中，具有 2 至 10、2 至 8 或 2 至 6 个碳原子。亚炔基是炔基的一个子集，指的是与炔基相同、但有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“烷氧基”是指通过氧桥连接的指定数量碳原子的烷基，例如，甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、2-戊氧基、异戊氧基、新戊氧基、己氧基、2-己氧基、3-己氧基、3-甲基戊氧基等。烷氧基通常具有 1 至 10 个、1 至 8 个、1 至 6 个或 1 至 4 个通过氧桥连接的碳原子。

如本文所使用的，“芳基”是指通过从环碳原子中除去氢原子而衍生自芳香族单环或多环烃环系统形成的基团。所述芳香族单环或多环烃环系统仅含有氢和 6 至 18 个碳原子的碳，其中所述环系统中的至少一个环是完全不饱和的，即，包含根据 Hückel 理论的环状、离域的(4n+2) $\pi$ -电子体系。芳基包括但不限于苯基、茚基和萘基等基团。亚芳基是芳基的子集，指与芳基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“卤素取代基”或“卤素”指氟代、氯代、溴代或碘代，术语“卤素”包括氟、氯、溴或碘。

如本文所使用的，“卤代烷基”是指指定数量的碳原子被一个或多个、直至最大允许数量的卤素原子取代的如上述所定义的烷基。卤代烷基的实例包括但不限于三氟甲基、二氟甲基、2-氟乙基或五氟乙基。

“杂环基”是指稳定的 3-至 18-元非芳香族环基，包含 2-12 个碳原子和 1-6 个杂原子，所述杂原子选自氮、氧或硫。除非说明书中另有说明，杂环基是单环、双环、三环或四环系统，可包括稠环或桥环系统。杂环基中的杂原子可以任选地被氧化。一个或多个氮原子（如果存在的话）任选地被季铵化。杂环基是部分饱和或完全饱和的。杂环基可以通过任何环原子连接至分子的其余部分。此类杂环基的实例包括但不限于：二噁烷基、噻吩基[1,3]二硫烷基(thienyl[1,3]dithianyl)、十氢异喹啉基、咪唑基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噻唑基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧杂哌嗪基、2-氧杂哌啶基、2-氧杂吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢吡喃基、三硫烷基(trithianyl)、四氢吡喃基、硫代吗啉基(thiomorpholinyl)、硫杂吗啉基(thiamorpholinyl)、1-氧代硫吗啉基(1-oxo-thiomorpholinyl)和 1,1-二氧代硫吗啉基(1,1-dioxo-thiomorpholinyl)。

“杂芳基”指由 3-至 18-元芳香环自由基衍生而成的基团，包含 2 个至 17 个碳原子和选自氮、氧和硫的 1 至 6 个杂原子。如本文所使用的，杂芳基可以是单环、双环、三环或四环系统，其中环系统中的至少一个环是完全不饱和的，即，包含根据 Hückel 理论的环状离域(4n+2) $\pi$ -电子体系。杂芳基包括稠环或桥环系统。杂芳基中的杂原子被任选地氧化。一个或多个氮原子（如果存在的话）任选地被季铵化。杂芳基通过任何环原子连接至分子的其余部分。杂芳基的实例包括但不限于：氮杂环庚三烯基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并吲哚基、1,3-苯并二噁唑基、苯并吡喃基、苯并噁唑基、苯并[d]噁唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二噁庚基(benzo[b][1,4]dioxepinyl)、苯并[b][1,4]噁嗪基(benzo[b][1,4]oxazinyl)、1,4-苯并二噁烷基(1,4-benzodioxanyl)、苯并萘并咪

喃基、苯并噁唑基、苯并间二氧杂环戊烯基(benzodioxolyl)、苯并二噁英基(benzodioxinyl)、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基、苯并噻吩并[3,2-d]嘧啶基、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、呋唑基、噌啉基(cinnolinyl)、环戊烷并[d]嘧啶基、6,7-二氢-5H-环戊烷并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6-二氢苯并[h]喹唑啉基(5,6-dihydrobenzo[h]quinazolinyl)、5,6-二氢苯并[h]噌啉基(5,6-dihydrobenzo[h]cinnolinyl)、6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚烷并[1,2-c]噻嗪基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、呋喃酮基、呋喃并[3,2-c]吡啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]嘧啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]噻嗪基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]吡啶基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基(indazolyl)、吲哚基、异吲哚基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、异喹啉基、吲哚嗪基(indoliziny)、异噁唑基、5,8-甲醇-5,6,7,8-四氢喹唑啉基(5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl)、萘啶基(naphthyridinyl)、1,6-萘啶酮基(1,6-naphthyridinonyl)、噁二唑基、2-氧杂吡庚因基(2-oxoazepinyl)、噁唑基、氧杂环丙烷基(oxiranyl)、5,6,6a,7,8,9,10,10a-八氢苯并[H]喹唑啉基、1-苯基-1H-吡咯基、吩嗪基、吩嗪基、吩噁嗪基、酞嗪基(phthalazinyl)、蝶啶基(pteridinyl)、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡唑并[3,4-d]嘧啶基、吡啶基、吡啶并[3,2-d]嘧啶基、吡啶并[3,4-d]嘧啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、喹唑啉基、喹啉基、喹啉基(quinoxaliny)、喹啉基、四氢喹啉基、5,6,7,8-四氢喹唑啉基、5,6,7,8-四氢苯并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、6,7,8,9-四氢-5H-环庚烷并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6,7,8-四氢吡啶并[4,5-c]噻嗪基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基、噻吩并[2,3-d]嘧啶基、噻吩并[3,2-d]嘧啶基、噻吩并[2,3-c]吡啶基(thieno[2,3-c]pridinyl)和噻吩基(thiophenyl/thienyl)。

在本公开中可以使用各种羟基保护基团。一般来说,保护基团使化学官能团对特定的反应条件不敏感,并且可以在分子中的该官能团上添加以及去除,而不实质上损害分子的其余部分。代表性的羟基保护基团公开于 Beaucage 等人, Tetrahedron 1992, 48, 2223-2311, 以及 Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991 中,以引用的方式将上述文献各自整体并入本文。在一些实施方案中,保护基团在碱性条件下稳定,但可以在酸性条件下脱除。在一些实施方案中,本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括二甲氧基三苯甲基(DMT)、单甲氧基三苯甲基、9-苯基氧杂蒽-9-基(Pixyl)或 9-(对甲氧基苯基)氧杂蒽-9-基(Mox)。在一些实施方案中,本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括 Tr(三苯甲基)、MMTr(4-甲氧基三苯甲基)、DMTr(4,4'-二甲氧基三苯甲基)或 TMTr(4,4',4'-三甲氧基三苯甲基)。

“受试者”一词,如本文所使用的,指任何动物,例如哺乳动物或有袋动物。本公开的受试者包括但不限于人类、非人灵长类(例如,恒河猴或其他类型的猕猴)、小鼠、猪、马、驴、牛、绵羊、大鼠或任何种类的家禽。

如本文所使用的,“治疗”是指获得有益的或期望的结果的方法,包括但不限于治疗益处。“治疗益处”意味着根除或改善被治疗的潜在障碍。此外,治疗益处通过根除或改善与潜在障碍相关的一个或多个生理症状,从而在受试者中观察到改善而获得,尽管受试者可能仍然受到潜在障碍的折磨。

如本文所使用的,“预防”是指获得有益或期望的结果的方法,包括但不限于预防性益处。为了获得“预防性益处”,可将 siRNA 缀合物或药物组合物给予有罹患特定疾病风险的受试者,或给予报告疾病的一种或多种生理症状的受试者,即便可能该疾病的诊断尚未作出。

在一方面,本公开提供了第一种至第四种能够抑制 PNP 基因表达的 siRNA。以下依次对其进行详细描述。

本公开的 siRNA 含有核苷酸基团作为基本结构单元,本领域技术人员公知,所述核苷酸基团含有磷酸基团、核糖基团和碱基,在此不再赘述。

#### 第一种 siRNA

按照本公开,所述 siRNA 可以是第一种 siRNA。

所述第一种 siRNA 含有正义链和反义链,所述第一种 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸,其中,所述正义链含有一段核苷酸序列 I,所述反义链含有一段核苷酸序列 II,所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区,其中,所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列长度相等,且不多于 3 个核苷酸差异,且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列长度相等,且不多于 3 个核苷酸差异:

5'-CCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>1</sub>-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-Z<sub>2</sub>UCUUAUAAUCUUCUAGG-3' (SEQ ID NO: 2),

其中, Z<sub>1</sub> 为 A, Z<sub>2</sub> 为 U;

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>1</sub> 的核苷酸 Z<sub>3</sub>,所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>2</sub> 的核苷酸 Z<sub>4</sub>,所述 Z<sub>4</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

在上文与下文中,“位置对应”是指从核苷酸序列相同端起算,处于核苷酸序列中相同的位置。例如,核苷酸序列 I 的 3' 端第 1 个核苷酸是位置对应于 SEQ ID NO:1 的 3' 端第 1 个核苷酸的核苷

酸。

在一些实施方案中，所述正义链仅包含核苷酸序列 I，所述反义链仅包含核苷酸序列 II。

在一些实施方案中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方案中，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>4</sub> 位置处的差异，且 Z<sub>4</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中，所述核苷酸差异为 Z<sub>4</sub> 位置处的差异，Z<sub>4</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中，Z<sub>3</sub> 是与 Z<sub>4</sub> 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高靶 mRNA 抑制能力，而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方案中，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补；所述基本上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 3 个的碱基错配；所述实质上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 1 个的碱基错配；完全反向互补是指两个核苷酸序列之间没有碱基错配。

在一些实施方案中，核苷酸序列 I 是 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，核苷酸序列 II 是 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列：

5'-CCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO: 3)；

5'-Z<sub>4</sub>UCUUAUAUAUCUUCUAGG-3' (SEQ ID NO: 4)，

其中，所述 Z<sub>4</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸，Z<sub>3</sub> 选自 A、U、G 或 C，并且 Z<sub>4</sub> 是与 Z<sub>3</sub> 互补的核苷酸；在一些实施方案中，Z<sub>3</sub> 为 A，Z<sub>4</sub> 为 U。

在一些实施方案中，所述正义链还含有核苷酸序列 III，所述反义链还含有核苷酸序列 IV，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度各自为 1-4 个核苷酸；所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或者完全反向互补；所述核苷酸序列 III 连接在所述核苷酸序列 I 的 5' 末端，所述核苷酸序列 IV 连接在所述核苷酸序列 II 的 3' 末端。在一些实施方案中，所述核苷酸序列 IV 与第二段核苷酸序列实质上反向互补或者完全反向互补，该第二段核苷酸序列是指和靶 mRNA 中与由 SEQ ID NO: 1 表示的核苷酸序列的 5' 末端相邻且长度与所述核苷酸序列 IV 相同的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度均为 1 个核苷酸，核苷酸序列 III 的碱基为 A，核苷酸序列 IV 的碱基为 U；此时，正义链和反义链的长度比为 20/20；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 CA，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UG；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 ACA，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UGU；此时，正义链和反义链的长度比为 22/22；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 UACA，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UGUA；此时，正义链和反义链的长度比为 23/23。在一些实施方案中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度为 2 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 CA，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UG；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21。

在一些实施方案中，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 完全反向互补，因此，给出了核苷酸序列 III 的碱基，核苷酸序列 IV 的碱基也就确定了。

### 第二种 siRNA

按照本公开，所述 siRNA 可以是第二种 siRNA。

所述第二种 siRNA 含有正义链和反义链，所述第二种 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，所述反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区，其中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'-GUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>5</sub>-3' (SEQ ID NO: 61)；

5'-Z<sub>6</sub>UAACUUCUGGUACUGUAC-3' (SEQ ID NO: 62)，

其中，Z<sub>5</sub> 为 A，Z<sub>6</sub> 为 U；

并且，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>5</sub> 的核苷酸 Z<sub>7</sub>，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>6</sub> 的核苷酸 Z<sub>8</sub>，所述 Z<sub>8</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

在一些实施方案中，所述正义链仅包含核苷酸序列 I，所述反义链仅包含核苷酸序列 II。

在一些实施方案中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方案中,所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>8</sub> 位置处的差异,且 Z<sub>8</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中,所述核苷酸差异为 Z<sub>8</sub> 位置处的差异,Z<sub>8</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中,Z<sub>7</sub> 是与 Z<sub>8</sub> 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高靶 mRNA 抑制能力,而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方案中,所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补。

在一些实施方案中,核苷酸序列 I 是 SEQ ID NO: 63 所示的核苷酸序列,核苷酸序列 II 是 SEQ ID NO: 64 所示的核苷酸序列:

5'-GUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO: 63);

5'-Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUAC-3' (SEQ ID NO: 64),

其中,所述 Z<sub>8</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸,Z<sub>7</sub> 选自 A、U、G 或 C,并且 Z<sub>8</sub> 是与 Z<sub>7</sub> 互补的核苷酸;在一些实施方案中,Z<sub>7</sub> 为 U,Z<sub>8</sub> 为 A。

在一些实施方案中,所述正义链还含有核苷酸序列 III,所述反义链还含有核苷酸序列 IV,核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度各自为 1-4 个核苷酸;所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或者完全反向互补;所述核苷酸序列 III 连接在所述核苷酸序列 I 的 5' 末端,所述核苷酸序列 IV 连接在所述核苷酸序列 II 的 3' 末端,所述核苷酸序列 IV 与第二段核苷酸序列实质上反向互补或者完全反向互补,该第二段核苷酸序列是指和靶 mRNA 中与由 SEQ ID NO: 61 表示的核苷酸序列的 5' 末端相邻且长度与所述核苷酸序列 IV 相同的核苷酸序列。

在一些实施方案中,所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度均为 1 个核苷酸,核苷酸序列 III 的碱基为 A,核苷酸序列 IV 的碱基为 U;此时,正义链和反义链的长度比为 20/20;或者,核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸,按照 5' 末端到 3' 末端的方向,核苷酸序列 III 的碱基组成为 GA,核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UC;此时,正义链和反义链的长度比为 21/21;或者,核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸,按照 5' 末端到 3' 末端的方向,核苷酸序列 III 的碱基组成为 UGA,核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UCA;此时,正义链和反义链的长度比为 22/22;或者,核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸,按照 5' 末端到 3' 末端的方向,核苷酸序列 III 的碱基组成为 AUGA,核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UCAU;此时,正义链和反义链的长度比为 23/23。在一些实施方案中,所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度为 2 个核苷酸,按照 5' 末端到 3' 末端的方向,核苷酸序列 III 的碱基组成为 GA,核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UC;此时,正义链和反义链的长度比为 21/21。

在一些实施方案中,核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 完全反向互补,因此,给出了核苷酸序列 III 的碱基,核苷酸序列 IV 的碱基也就确定了。

### 第三种 siRNA

按照本公开,所述 siRNA 可以是第三种 siRNA。

所述第三种 siRNA 含有正义链和反义链,所述第三种 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸,其中,所述正义链含有一段核苷酸序列 I,所述反义链含有一段核苷酸序列 II,所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区,其中,所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 121 所示的核苷酸序列长度相等,且不多于 3 个核苷酸差异,且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列长度相等,且不多于 3 个核苷酸差异:

5'-CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>9</sub>-3' (SEQ ID NO: 121);

5'-Z<sub>10</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 122),

其中,Z<sub>9</sub> 为 A,Z<sub>10</sub> 为 U;

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>9</sub> 的核苷酸 Z<sub>11</sub>,所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>10</sub> 的核苷酸 Z<sub>12</sub>,所述 Z<sub>12</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

在一些实施方案中,所述正义链仅包含核苷酸序列 I,所述反义链仅包含核苷酸序列 II。

在一些实施方案中,所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 121 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异,和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方案中,所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>12</sub> 位置处的差异,且 Z<sub>12</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中,所述核苷酸差异为 Z<sub>12</sub> 位置处的差异,Z<sub>12</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中,Z<sub>11</sub> 是与 Z<sub>12</sub> 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高靶 mRNA 抑制能力,而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方案中,所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补。

在一些实施方案中,核苷酸序列 I 是 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列,核苷酸序列 II 是

SEQ ID NO: 124 所示的核苷酸序列:

5'-CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 123);

5'-Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 124),

其中, 所述 Z<sub>12</sub> 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z<sub>11</sub> 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z<sub>12</sub> 是与 Z<sub>11</sub> 互补的核苷酸; 在一些实施方案中, Z<sub>11</sub> 为 A, Z<sub>12</sub> 为 U;

在一些实施方案中, 所述正义链还含有核苷酸序列 III, 所述反义链还含有核苷酸序列 IV, 核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度各自为 1-4 个核苷酸; 所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或者完全反向互补; 所述核苷酸序列 III 连接在所述核苷酸序列 I 的 5'末端, 所述核苷酸序列 IV 连接在所述核苷酸序列 II 的 3'末端, 所述核苷酸序列 IV 与第二段核苷酸序列实质上反向互补或者完全反向互补, 该第二段核苷酸序列是指和靶 mRNA 中与由 SEQ ID NO: 121 表示的核苷酸序列的 5'末端相邻且长度与所述核苷酸序列 IV 相同的核苷酸序列。

在一些实施方案中, 所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度均为 1 个核苷酸, 核苷酸序列 III 的碱基为 G, 核苷酸序列 IV 的碱基为 C; 此时, 正义链和反义链的长度比为 20/20; 或者, 核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 核苷酸序列 III 的碱基组成为 GG, 核苷酸序列 IV 的碱基组成为 CC; 此时, 正义链和反义链的长度比为 21/21; 或者, 核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 核苷酸序列 III 的碱基组成为 UGG, 核苷酸序列 IV 的碱基组成为 CCA; 此时, 正义链和反义链的长度比为 22/22; 或者, 核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 核苷酸序列 III 的碱基组成为 CUGG, 核苷酸序列 IV 的碱基组成为 CCAG; 此时, 正义链和反义链的长度比为 23/23。在一些实施方案中, 所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度为 2 个核苷酸, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 核苷酸序列 III 的碱基组成为 GG, 核苷酸序列 IV 的碱基组成为 CC; 此时, 正义链和反义链的长度比为 21/21。

在一些实施方案中, 核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 完全反向互补, 因此, 给出了核苷酸序列 III 的碱基, 核苷酸序列 IV 的碱基也就确定了。

在一些实施方案中, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 125 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 126 所示的核苷酸序列:

5'-CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 125);

5'-Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCC-3' (SEQ ID NO: 126),

或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 127 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 128 所示的核苷酸序列:

5'-GGCAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 127);

5'-Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCCAG-3' (SEQ ID NO: 128),

其中, 所述 Z<sub>12</sub> 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z<sub>11</sub> 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z<sub>12</sub> 是与 Z<sub>11</sub> 互补的核苷酸。

#### 第四种 siRNA

按照本公开, 所述 siRNA 可以是第四种 siRNA。

所述第四种 siRNA 含有正义链和反义链, 所述第四种 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸, 其中, 所述正义链含有一段核苷酸序列 I, 所述反义链含有一段核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区, 其中, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 181 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5'-CAAACAAGGACUAAUCCA Z<sub>13</sub>-3' (SEQ ID NO: 181);

5'-Z<sub>14</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 182),

其中, Z<sub>13</sub> 为 A, Z<sub>14</sub> 为 U;

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>13</sub> 的核苷酸 Z<sub>15</sub>, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>14</sub> 的核苷酸 Z<sub>16</sub>, 所述 Z<sub>16</sub> 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

在一些实施方案中, 所述正义链仅包含核苷酸序列 I, 所述反义链仅包含核苷酸序列 II。

在一些实施方案中, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 181 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异, 和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方案中, 所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>16</sub> 位置处的差异, 且 Z<sub>16</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中, 所述核苷酸差异为 Z<sub>16</sub> 位置处的差异, Z<sub>16</sub> 选自 A、C 或 G。在一些实施方案中, Z<sub>15</sub> 是与 Z<sub>16</sub> 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高靶 mRNA 抑制能力, 而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方案中, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 基本上反向互补、实质上反向互

补或完全反向互补。

在一些实施方案中，核苷酸序列 I 是 SEQ ID NO: 183 所示的核苷酸序列，核苷酸序列 II 是 SEQ ID NO: 184 所示的核苷酸序列：

5'-CAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO: 183);

5'-Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 184),

其中，所述 Z<sub>16</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸，Z<sub>15</sub> 选自 A、U、G 或 C，并且 Z<sub>16</sub> 是与 Z<sub>15</sub> 互补的核苷酸；在一些实施方案中，Z<sub>15</sub> 为 A，Z<sub>16</sub> 为 U；

在一些实施方案中，所述正义链还含有核苷酸序列 III，所述反义链还含有核苷酸序列 IV，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度各自为 1-4 个核苷酸；所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或者完全反向互补；所述核苷酸序列 III 连接在所述核苷酸序列 I 的 5' 末端，所述核苷酸序列 IV 连接在所述核苷酸序列 II 的 3' 末端，所述核苷酸序列 IV 与第二段核苷酸序列实质上反向互补或者完全反向互补，该第二段核苷酸序列是指和靶 mRNA 中与由 SEQ ID NO: 181 表示的核苷酸序列的 5' 末端相邻且长度与所述核苷酸序列 IV 相同的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度均为 1 个核苷酸，核苷酸序列 III 的碱基为 C，核苷酸序列 IV 的碱基为 G；此时，正义链和反义链的长度比为 20/20；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 AC，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 GU；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 GAC，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 GUC；此时，正义链和反义链的长度比为 22/22；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 AGAC，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 GUCU；此时，正义链和反义链的长度比为 23/23。在一些实施方案中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度为 2 个核苷酸，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 AC，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 GU；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21。

在一些实施方案中，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 完全反向互补，因此，给出了核苷酸序列 III 的碱基，核苷酸序列 IV 的碱基也就确定了。

以下，对核苷酸序列 V、核酸序列、siRNA 中的核苷酸修饰以及修饰序列的描述适用于上述第一种 siRNA 至第四种 siRNA 中的任意一种。即如果没有特指，下面对 siRNA 的描述应视为是对第一种 siRNA、第二种 siRNA、第三种 siRNA 和第四种 siRNA 逐一进行了描述。例如，如不特别指明具体的 siRNA，“所述 siRNA 还含有核苷酸序列 V”的意思是“第一种 siRNA、第二种 siRNA、第三种 siRNA 或第四种 siRNA 还含有核苷酸序列 V”。

在一些实施方案中，所述正义链和反义链长度不同，所述反义链还含有核苷酸序列 V，核苷酸序列 V 的长度为 1 至 3 个核苷酸，连接在所述反义链的 3' 末端，构成反义链的 3' 突出端。由此，本公开提供的 siRNA 正义链和反义链的长度比可以是 19/20、19/21、19/22、20/21、20/22、20/23、21/22、21/23、21/24、22/23、22/24、22/25、23/24、23/25 或 23/26。在一些实施方案中，所述核苷酸序列 V 的长度为 2 个核苷酸，由此，本公开提供的 siRNA 正义链和反义链的长度比可以是 19/21、21/23 或 23/25。

所述核苷酸序列 V 中的每一个核苷酸可以是任意的核苷酸，为了便于合成并节约合成成本，所述核苷酸序列 V 为连续的 2 个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸 (dTdT) 或连续的 2 个尿嘧啶核糖核苷酸 (UU)；或者，为了提高 siRNA 反义链与靶 mRNA 的亲和力，核苷酸序列 V 与靶 mRNA 的相应位置的核苷酸互补。因此，在一些实施方案中，本公开的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比为 19/21 或 21/23，此时，本公开的 siRNA 具有更好的靶 mRNA 沉默活性。

靶 mRNA 的相应位置的核苷酸是指与靶 mRNA 的第三段核苷酸序列在 5' 末端相邻的核苷酸或核苷酸序列，该第三段核苷酸序列是与核苷酸序列 II 实质上反向互补或完全反向互补，或者与核苷酸序列 II 和核苷酸序列 IV 构成的核苷酸序列实质上反向互补或完全反向互补的那段核苷酸序列。

在一些实施方案中，对于所述第一种 siRNA，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列：

5'-CCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO: 5);

5'-Z<sub>4</sub>UCUUAUAUAUCUUCUAGGUG-3' (SEQ ID NO: 6);

或者，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列：

5'-CACCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO: 7);

5'-Z<sub>4</sub>UCUUAUAUAUCUUCUAGGUGUA-3' (SEQ ID NO: 8);

其中，所述 Z<sub>4</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸，Z<sub>3</sub> 选自 A、U、G 或 C，并且 Z<sub>4</sub> 是与 Z<sub>3</sub> 互补的核苷酸。

在一些实施方案中，对于所述第二种 siRNA，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 65 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 66 所示的核苷酸序列：

5'- GUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO: 65)；

5'- Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUACUC-3' (SEQ ID NO: 66)，

或者，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 67 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 68 所示的核苷酸序列：

5'- GAGUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO: 67)；

5'- Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUACUCAU-3' (SEQ ID NO: 68)，

其中，所述 Z<sub>8</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸，Z<sub>7</sub> 选自 A、U、G 或 C，并且 Z<sub>8</sub> 是与 Z<sub>7</sub> 互补的核苷酸。

在一些实施方案中，对于第三种 siRNA，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 125 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 126 所示的核苷酸序列：

5'- CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 125)；

5'- Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCC-3' (SEQ ID NO: 126)，

或者，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 127 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 128 所示的核苷酸序列：

5'- GGCAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 127)；

5'- Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCCAG-3' (SEQ ID NO: 128)，

其中，所述 Z<sub>12</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸，Z<sub>11</sub> 选自 A、U、G 或 C，并且 Z<sub>12</sub> 是与 Z<sub>11</sub> 互补的核苷酸。在一些实施方案中，对于所述第四种 siRNA，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 185 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 186 所示的核苷酸序列：

5'- CAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO: 185)；

5'- Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUGGU-3' (SEQ ID NO: 186)，

或者，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 187 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 188 所示的核苷酸序列：

5'- ACCAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO: 187)；

5'- Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUGGUCU-3' (SEQ ID NO: 188)，

其中，所述 Z<sub>16</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸，Z<sub>15</sub> 选自 A、U、G 或 C，并且 Z<sub>16</sub> 是与 Z<sub>15</sub> 互补的核苷酸。

在一些实施方案中，本公开所述 siRNA 为表 1a-表 1d 中列出的 siPNa1、siPNa2、siPNb1、siPNb2、siPNc1、siPNc2、siPND1 或 siPND2。

如前所述，本公开的 siRNA 中的核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。在一些实施方案中，本公开的 siRNA 中的核苷酸为未经修饰的核苷酸；在一些实施方案中，本公开的 siRNA 中的部分或全部核苷酸为修饰的核苷酸，核苷酸基团上的这些修饰不会导致本公开的 siRNA 抑制 PNP 基因表达的功能明显削弱或丧失。

在一些实施方案中，本公开的 siRNA 至少含有 1 个修饰的核苷酸。在本公开的上下文中，所使用的术语“修饰的核苷酸”是指核苷酸的核糖基 2' 位羟基被其他基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物，或者具有经修饰的碱基的核苷酸。所述修饰的核苷酸不会导致 siRNA 抑制基因表达的功能明显削弱或丧失。例如，可以选择 J.K. Watts, G.F. Deleavey, and M.J. Damha, Chemically modified siRNA: tools and applications. Drug Discov Today, 2008, 13(19-20): 842-55 中公开的修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，本公开提供的 siRNA 的正义链或所述反义链中的至少一个核苷酸为修饰的核苷酸，和/或至少一个磷酸酯基为具有修饰基团的磷酸酯基；换句话说，所述正义链和所述反义链中至少一条单链的磷酸-糖骨架中的磷酸酯基和/或核糖基的至少一部分为具有修饰基团的磷酸酯基和/或具有修饰基团的核糖基。

在一些实施方案中，所述正义链和/或所述反义链中的全部核苷酸均为修饰的核苷酸。在一些实施方案中，本公开提供的 siRNA 的正义链和所述反义链中的每一个核苷酸独立地为氟代修饰的核苷酸或非氟代修饰的核苷酸。

本公开的发明人惊奇地发现，本公开所述的 siRNA 在动物实验中获得了血浆中稳定性和基因沉默效率的高度平衡。

在一些实施方案中，所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II 中，并且，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，所述核苷酸序列 I 的至少第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸；按照 5' 末端到 3' 末端的方向，所述核苷酸序列 II 的至少第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II 中，所述核苷酸序列 I 中氟代修饰的核苷酸不多于 5 个，并且，按照 5' 末端到 3' 末端的方向，所述核苷酸序列

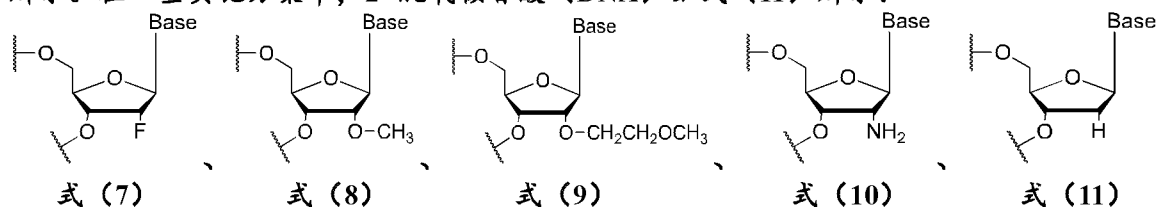
I的至少第7、8、9位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸；所述核苷酸序列II中氟代修饰的核苷酸不多于7个，并且，所述核苷酸序列II的至少第2、6、14、16位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照5'末端到3'末端的方向，在所述正义链中，所述核苷酸序列I的第7、8、9位或者5、7、8、9位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸；按照5'末端到3'末端的方向，在所述反义链中，所述核苷酸序列II的第2、6、14、16位或者2、6、8、9、14、16位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸。

在本公开的上下文中，“氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基2'位的羟基被氟取代形成的核苷酸，其具有以下式(7)所示的结构。“非氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物。在一些实施方案中，每一个非氟代修饰的核苷酸独立地选自核苷酸的核糖基2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物中的一种。

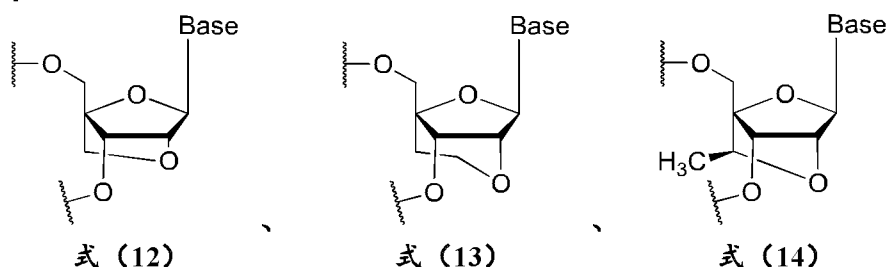
这些核糖基2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸是本领域技术人员所公知的，这些核苷酸可以选自2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸中的一种。

在一些实施方案中，2'-烷氧基修饰的核苷酸为2'-甲氧基(2'-OMe)修饰的核苷酸，如式(8)所示。在一些实施方案中，2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸，例如可以是2'-甲氧基乙基(2'-MOE)修饰的核苷酸，如式(9)所示。在一些实施方案中，2'-氨基(2'-NH<sub>2</sub>)修饰的核苷酸如式(10)所示。在一些实施方案中，2'-脱氧核苷酸(DNA)如式(11)所示：

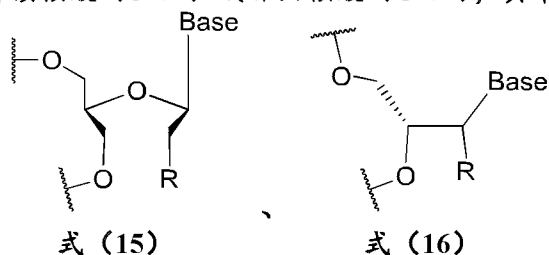


核苷酸类似物指能够在核酸中代替核苷酸，但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的基团。在一些实施方案中，核苷酸类似物可以是异核苷酸、桥联的核苷酸或无环核苷酸。

桥联的核苷酸(bridged nucleic acid, 简称BNA)是指受约束的或不能接近的核苷酸。BNA可以含有五元环、六元环或七元环的具有“固定的”C3'-内切糖缩拢的桥联结构。通常将该桥掺入到该核糖的2'-、4'-位处以提供一个2',4'-BNA核苷酸。在一些实施方案中，BNA可以是LNA、ENA、cET BNA等，其中，LNA如式(12)所示，ENA如式(13)所示，cET BNA如式(14)所示：

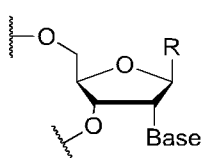


无环核苷酸是核苷酸的糖环被打开形成的一类核苷酸。在一些实施方案中，无环核苷酸可以是解锁核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)，其中，UNA如式(15)所示，GNA如式(16)所示：

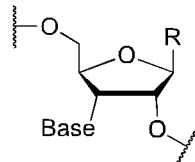


上述式(15)和式(16)中，R选自H、OH或烷氧基(O-烷基)。

异核苷酸是指核苷酸中碱基在核糖环上的位置发生改变而形成的化合物。在一些实施方案中，异核苷酸可以是碱基从核糖环的1'-位移动至2'-位或3'-位而形成的化合物，如式(17)或(18)所示。



式 (17)



式 (18)

上述式 (17) - 式 (18) 所示化合物中, Base 表示核酸碱基, 例如 A、U、G、C 或 T; R 选自 H、OH、F 或者如上所述的非氟基团。

5 在一些实施方案中, 核苷酸类似物选自异核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA 和 GNA 中的一种。在一些实施方案中, 每一个非氟代修饰的核苷酸均为甲氧基修饰的核苷酸, 在上文和下文, 所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

10 在上文及下文中, “氟代修饰的核苷酸”、“2'-氟修饰的核苷酸”、“核糖基团的 2'-羟基被氟取代的核苷酸”和“具有 2'-氟代核糖基的核苷酸”意义相同, 均指核苷酸的 2'-羟基被氟取代, 而形成的具有如式 (7) 所示结构的化合物; “甲氧基修饰的核苷酸”、“2'-甲氧基修饰的核苷酸”、“核糖基团的 2'-羟基被甲氧基取代的核苷酸”和“具有 2'-甲氧基核糖基的核苷酸”意义相同, 均指核苷酸核糖基团的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的具有如式 (8) 所示结构的化合物。

15 在一些实施方案中, 本公开的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA: 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 在所述正义链中, 所述核苷酸序列 I 的第 7、8、9 位或者第 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, 所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸; 在所述反义链中, 所述核苷酸序列 II 的第 2、6、14、16 位或者第 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, 所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸。

20 在一些实施方案中, 本公开的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA: 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、8、9、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸;

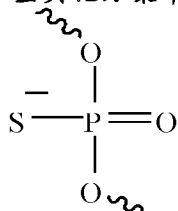
25 或者, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸;

30 或者, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸。

35 在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 为表 1a-表 1d 中列出的 siPNa1-M1、siPNa2-M1、siPNa1-M2、siPNa2-M2、siPNa1-M3、siPNa2-M3、siPNb1-M1、siPNb2-M1、siPNb1-M2、siPNb2-M2、siPNb1-M3、siPNb2-M3、siPnc1-M1、siPnc2-M1、siPnc1-M2、siPnc2-M2、siPnc1-M3、siPnc2-M3、siPnd1-M1、siPnd2-M1、siPnd1-M2、siPnd2-M2、siPnd1-M3、siPnd2-M3 中的任意一种。

具有上述修饰的 siRNA 不仅成本低, 而且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。同时, 上述修饰的 siRNA 具有较高的靶 mRNA 抑制活性。

40 在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 的正义链和反义链中至少一条单链的磷酸-糖骨架中的磷酸酯基中的至少一部分为具有修饰基团的磷酸酯基。在一些实施方案中, 具有修饰基团的磷酸酯基为磷酸酯基中的磷酸二酯键中的至少一个氧原子被硫原子取代而形成的硫代磷酸酯基; 在一些实施方案中, 所述具有修饰基团的磷酸酯基为具有如式 (1) 所示结构的硫代磷酸酯基:



式 (1)。

这种修饰能稳定 siRNA 的双链结构, 保持碱基配对的高特异性和高亲和力。

45 在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 中, 硫代磷酸酯基连接存在于由以下位置组成的组中的至少一处: 正义链或反义链任意一端的第一个和第二个核苷酸之间; 正义链或反义链任意一端的第二个和第三个核苷酸之间; 或上述的任意组合。在一些实施方案中, 硫代磷酸酯基连接存

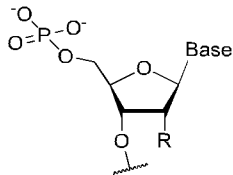
在于除正义链 5'末端以外的全部上述位置处。在一些实施方案中，硫代磷酸酯基连接存在于除正义链 3'末端以外的全部上述位置处。在一些实施方案中，硫代磷酸酯基连接存在于以下位置中的至少一处：

所述正义链的 5'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；  
 所述正义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；  
 所述正义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；  
 所述正义链的 3'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；  
 所述反义链的 5'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；  
 所述反义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；  
 所述反义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及  
 所述反义链的 3'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

在一些实施方案中，本公开提供的 siRNA 为表 1a-表 1d 中列出的 siPNa1-M1S、siPNa2-M1S、siPNa1-M2S、siPNa2-M2S、siPNa1-M3S、siPNa2-M3S、siPNb1-M1S、siPNb2-M1S、siPNb1-M2S、siPNb2-M2S、siPNb1-M3S、siPNb2-M3S、siPNc1-M1S、siPNc2-M1S、siPNc1-M2S、siPNc2-M2S、siPNc1-M3S、siPNc2-M3S、siPNd1-M1S、siPNd2-M1S、siPNd1-M2S、siPNd2-M2S、siPNd1-M3S、siPNd2-M3S 中的任意一种。

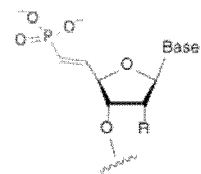
在一些实施方案中，所述 siRNA 反义链的 5'末端核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸。

常用的所述 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸是本领域技术人员所公知的，如 5'-磷酸核苷酸可具有如下结构：

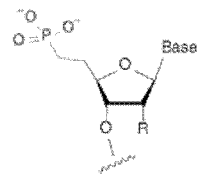


式 (2)；

再如，Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, *The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility*. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(3): 238-48 中公开了如下 4 种 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸：



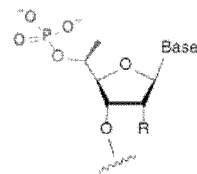
式 (3)



式 (4)



式 (5)



式 (6)

其中，R 选自 H、OH、甲氧基、氟；Base 表示核酸碱基，选自 A、U、C、G 或 T。

在一些实施方案中，5'-磷酸核苷酸为式 (2) 所示的含有 5'-磷酸修饰的核苷酸，5'-磷酸类似物修饰的核苷酸为含有乙烯基磷酸酯 (5'-(E)-vinylphosphonate, E-VP) 修饰的核苷酸，如式 (3) 所示，或者为硫代磷酸酯修饰的核苷酸，如式 (5) 所示。

在一些实施方案中，本公开提供的 siRNA 为 siPNa1-M1P1、siPNa2-M1P1、siPNa1-M2P1、siPNa2-M2P1、siPNa1-M3P1、siPNa2-M3P1、siPNa1-M1SP1、siPNa2-M1SP1、siPNa1-M2SP1、siPNa2-M2SP1、siPNa1-M3SP1、siPNa2-M3SP1、siPNb1-M1P1、siPNb2-M1P1、siPNb1-M2P1、siPNb2-M2P1、siPNb1-M3P1、siPNb2-M3P1、siPNb1-M1SP1、siPNb2-M1SP1、siPNb1-M2SP1、siPNb2-M2SP1、siPNb1-M3SP1、siPNb2-M3SP1、siPNc1-M1P1、siPNc2-M1P1、siPNc1-M2P1、siPNc2-M2P1、siPNc1-M3P1、siPNc2-M3P1、siPNc1-M1SP1、siPNc2-M1SP1、siPNc1-M2SP1、siPNc2-M2SP1、siPNc1-M3SP1、siPNc2-M3SP1、siPNd1-M1P1、siPNd2-M1P1、siPNd1-M2P1、siPNd2-M2P1、siPNd1-M3P1、siPNd2-M3P1、siPNd1-M1SP1、siPNd2-M1SP1、siPNd1-M2SP1、siPNd2-M2SP1、siPNd1-M3SP1、siPNd2-M3SP1 中的任意一种。

本公开的发明人意外发现，本公开提供的上述 siRNA 不仅具有显著增强的血浆和溶酶体稳定性，还显示出很高的靶 mRNA 抑制活性。

本公开提供的 siRNA 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的方法）得到。其中，固相合成已经有商业化订制服务。可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入本公开所述的 siRNA 中，制备具有相应修饰的核苷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。

#### 药物组合物

本公开提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有如上所述的 siRNA 作为活性成分和药学

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, 如基于  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  或  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  的纳米粒)、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)、聚酰胺型树形高分子 (polyamidoamine (PAMAM) dendrimer)、聚赖氨酸 (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(氨乙基乙撑磷酸酯) (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) 以及它们的衍生物中的一种或多种。

所述药物组合物中, 对 siRNA 和药学上可接受的载体的含量没有特别要求, 可以是各组分的含量。在一些实施方案中, siRNA 与药学上可接受的载体的重量比可以为 1:(1-500), 在一些实施方案中, 上述重量比为 1:(1-50)。

在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 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 缓冲液、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。

所述 pH 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, 例如可以为 pH 值 5.5-8.5 的磷酸盐缓冲液。

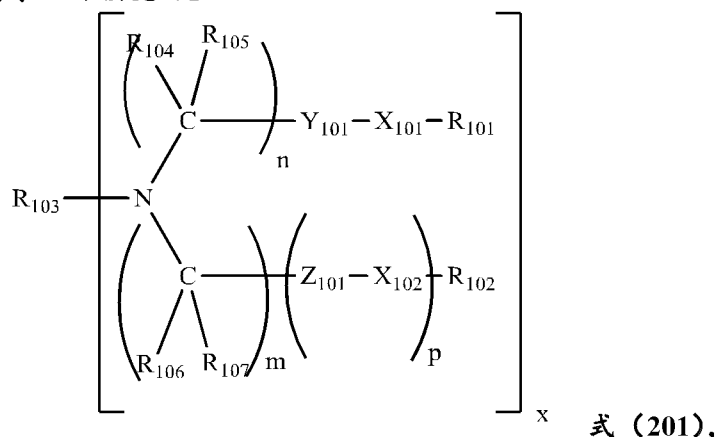
所述保护剂可以为肌醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖和葡萄糖中的至少一种。以所述药物组合物的总重量为基准, 所述保护剂的含量可以为 0.01-30 重量%。

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 (mOsm/kg)。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。

在一些实施方案中, 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)。在一些实施方案中, 所述药物组合物用于静脉注射给药。

在一些实施方案中, 所述药物组合物可以为脂质体制剂的形式。在一些实施方案中, 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 (下文也可将其称为有机胺)、辅助脂质和/或聚乙二醇化脂质。其中, 所述有机胺、辅助脂质和聚乙二醇化脂质可分别选自于 CN103380113A (通过引用的方式将其整体并入本文) 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。

在一些实施方案中, 所述有机胺可为 CN103380113A 中描述的如式 (201) 所示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中:

每个  $\text{X}_{101}$  或  $\text{X}_{102}$  各自独立地是 O、S、N-A 或 C-A, 其中 A 是氢或  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{20}$  烃链;

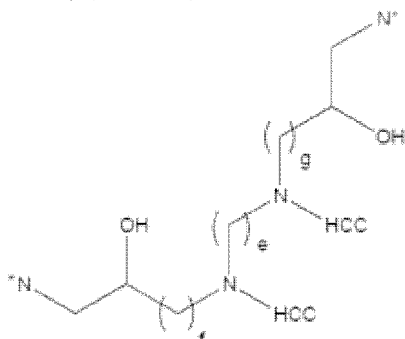
每个  $\text{Y}_{101}$  或  $\text{Z}_{101}$  各自独立地是 C=O、C=S、S=O、CH-OH 或  $\text{SO}_2$ ;

每个  $\text{R}_{101}$ 、 $\text{R}_{102}$ 、 $\text{R}_{103}$ 、 $\text{R}_{104}$ 、 $\text{R}_{105}$ 、 $\text{R}_{106}$  或  $\text{R}_{107}$  各自独立地是氢, 环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链脂族基团, 环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链杂脂族基团, 被取代的或未被取代的、支链或直链酰基, 被取代的或未被取代的、支链或直链芳基, 被取代的或未被取代的、支链或直链杂芳基;

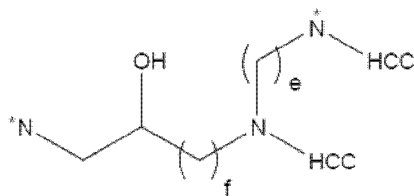
x 是 1-10 的整数;

n 是 1-3 的整数, m 是 0-20 的整数, p 是 0 或 1; 其中, 如果  $m=p=0$ , 则  $\text{R}_{102}$  是氢;

并且, 如果 n 或 m 中的至少一个是 2, 那么 R<sub>103</sub> 和在式 (201) 中的氮形成如式 (202) 或式 (203) 所示的结构:



式 (202),

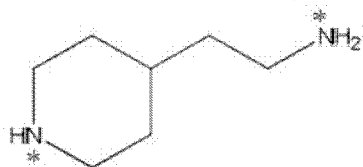


式 (203);

其中, g、e 或 f 各自独立地是 1-6 的整数, “HCC”代表烃链, 且每个 \*N 代表式 (201) 中的氮原子。

在一些实施方案中, R<sub>103</sub> 是多胺。在其它实施方案中, R<sub>103</sub> 是缩酮。在一些实施方案中, 在式 (201) 中的 R<sub>101</sub> 和 R<sub>102</sub> 中的每一个独立地是任意的被取代的或未被取代的、支链或直链烷基或烯基, 所述烷基或烯基具有 3 至约 20 个碳原子, 诸如 8 至约 18 个碳原子, 和 0 至 4 个双键, 诸如 0 至 2 个双键。

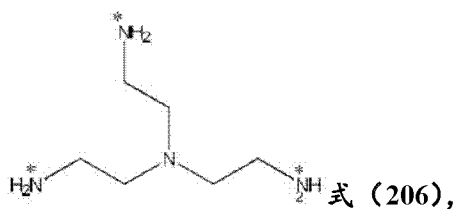
在一些实施方案中, 如果 n 和 m 中的每一个独立地具有 1 或 3 的值, 那么 R<sub>103</sub> 可以是下述式 (204) - 式 (213) 中的任一个:



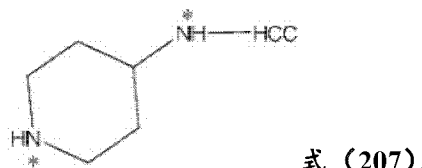
式 (204),



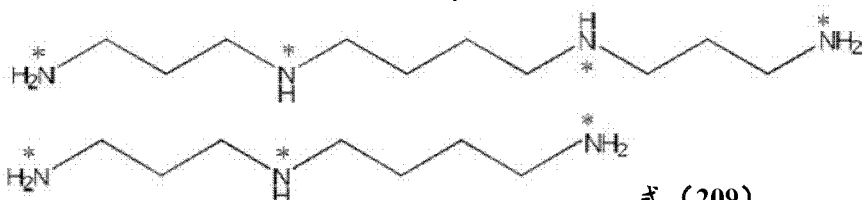
式 (205),



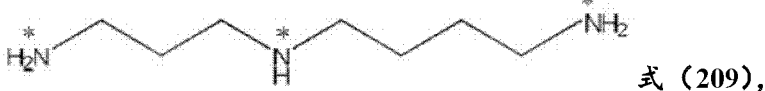
式 (206),



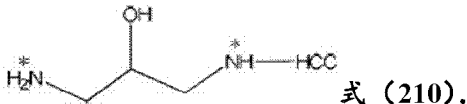
式 (207),



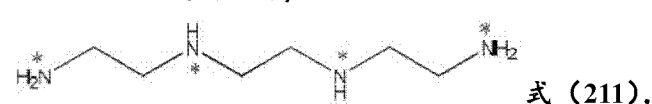
式 (208),



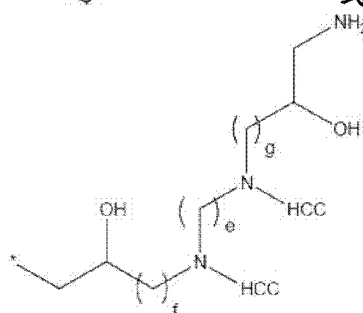
式 (209),



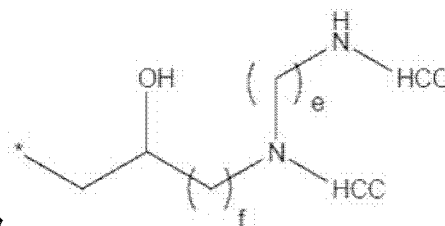
式 (210),



式 (211),



式 (212) 和

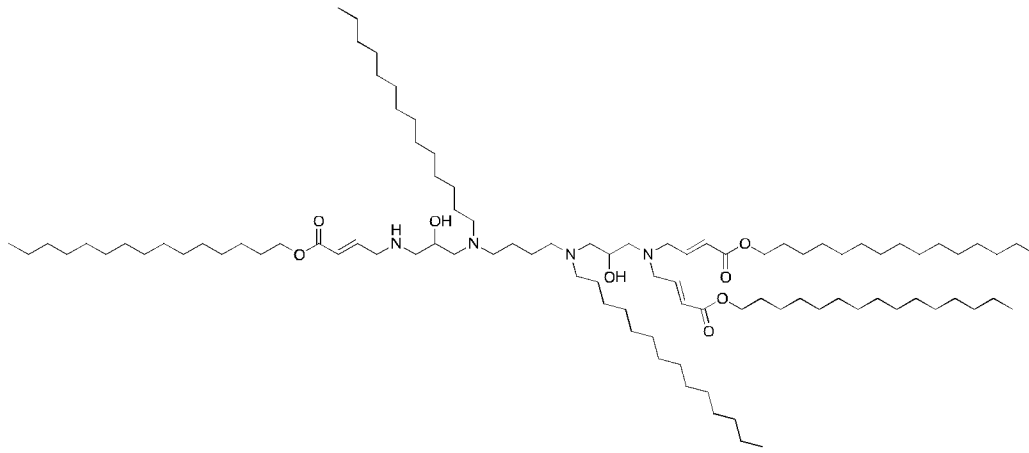


式 (213);

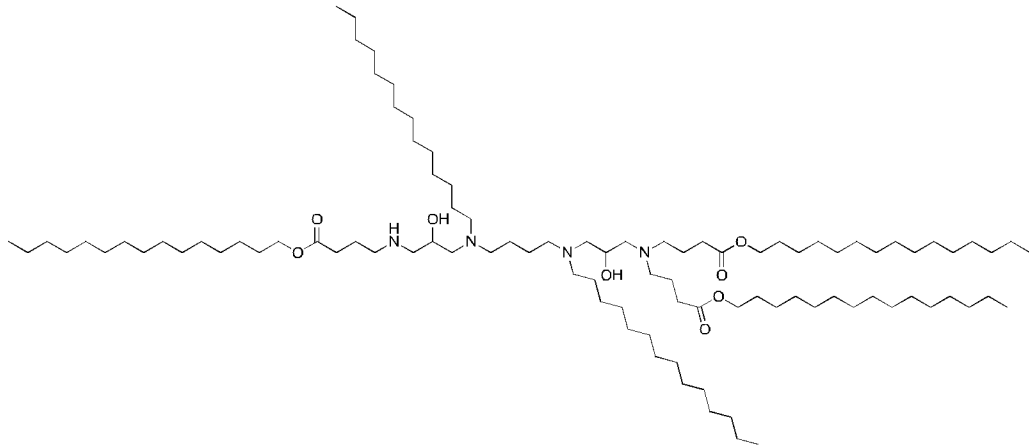
其中, 式 (204) - 式 (213) 中, g、e 和 f 各自独立地是 1-6 的整数, 每个“HCC”代表烃链, 且每个 \* 显示 R<sub>103</sub> 与在式 (201) 中的氮原子的可能连接点, 其中在任意 \* 位置上的每个 H 可以被替换以实现与在式 (201) 中的氮原子的连接。

其中, 式 (201) 所示化合物可以根据 CN103380113A 中的描述制备。

在一些实施方案中, 所述有机胺为如式 (214) 所示的有机胺和/或如式 (215) 所示的有机胺:



式 (214),



式 (215);

所述辅助脂质为胆固醇、胆固醇的类似物和/或胆固醇的衍生物;

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

5 在一些实施方案中, 所述药物组合物中, 所述有机胺、所述辅助脂质和所述聚乙二醇化脂质三者之间的摩尔比为 (19.7-80):(19.7-80):(0.3-50), 例如可以为 (50-70):(20-40):(3-20)。

10 在一些实施方案中, 由本公开的 siRNA 与上述含胺的转染试剂形成的药物组合物颗粒具有约 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。

15 在一些实施方案中, 由本公开的 siRNA 与上述含胺的转染试剂形成的药物组合物中, siRNA 与全部脂质 (例如有机胺、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, 本公开的 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。

20 在一些实施方案中, 所述药物组合物在销售时各组分可以独立存在, 在使用时可以液体制剂的形式存在。在一些实施方案中, 本公开提供的 siRNA 与上述药学上可接受的载体形成的药物组合物可以按照已知的各种方法制备, 只是用本公开提供的 siRNA 替代现有 siRNA 即可; 在一些实施方案中, 可以按照如下方法制备:

25 将有机胺、辅助脂质和聚乙二醇化脂质按照上述摩尔比悬浮于醇中并混匀得到脂质溶液; 醇的用量使得到的脂质溶液的总质量浓度为 2-25mg/mL, 例如可以为 8-18mg/mL。所述醇选自药学上可接受的醇, 诸如在室温附近为液体的醇, 例如, 乙醇、丙二醇、苯甲醇、甘油、聚乙二醇 200、聚乙二醇 300、聚乙二醇 400 中的一种或多种, 例如可以为乙醇。

30 将本公开提供的 siRNA 溶解于缓冲盐溶液中, 得到 siRNA 水溶液。缓冲盐溶液的浓度为 0.05-0.5M, 例如可以为 0.1-0.2M, 调节缓冲盐溶液的 pH 至 4.0-5.5, 例如可以为 5.0-5.2, 缓冲盐溶液的用量使 siRNA 的浓度不超过 0.6mg/mL, 例如可以为 0.2-0.4mg/mL。所述缓冲盐选自可溶性醋酸盐、可溶性柠檬酸盐中的一种或多种, 例如可以为醋酸钠和/或醋酸钾。

将脂质溶液和 siRNA 水溶液混合, 将混合后得到的产物在 40-60°C 孵育至少 2 分钟, 例如可以为 5-30 分钟, 得到孵育后的脂质体制剂。脂质溶液和 siRNA 水溶液的体积比为 1:(2-5)。

将孵育后的脂质体制剂浓缩或稀释，去除杂质，除菌，得到本公开提供的药物组合物，其理化参数为 pH 值为 6.5-8，包封率不低于 80%，粒径为 40-200nm，多分散指数不高于 0.30，渗透压为 250-400mOsm/kg；例如理化参数可以为 pH 值为 7.2-7.6，包封率不低于 90%，粒径为 60-100nm，多分散指数不高于 0.20，渗透压为 300-400mOsm/kg。

其中，浓缩或稀释可以在去除杂质之前、之后或同时进行。去除杂质的方法可以采用现有各种方法，例如可以使用切相流系统、中空纤维柱，在 100K Da 条件下超滤，超滤交换溶液为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS)。除菌的方法可以采用现有各种方法，例如可以在 0.22 $\mu$ m 过滤器上过滤除菌。

#### siRNA 缀合物

本公开提供了一种 siRNA 缀合物，所述 siRNA 缀合物含有上述 siRNA 以及缀合连接至该 siRNA 的缀合基团。

一般来说，所述缀合基团包含药学上可接受的至少一个靶向基团和任选的接头 (linker)，并且，所述 siRNA、所述接头和所述靶向基团依次连接。在一些实施方案中，所述靶向基团为 1-6 个。在一些实施方案中，所述靶向基团为 2-4 个。所述 siRNA 分子可以非共价或共价缀合至所述缀合基团，例如可以共价缀合至所述缀合基团。siRNA 与缀合基团的缀合位点可以在 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。在一些实施方案中，所述 siRNA 与缀合基团的缀合位点在 siRNA 正义链的 3'末端。

在一些实施方案中，所述缀合基团可以连接在核苷酸的磷酸基团、2'-位羟基或者碱基上。在一些实施方案中，所述缀合基团还可以连接在 3'-位羟基上，此时核苷酸之间采用 2'-5'磷酸二酯键连接。当缀合基团连接在 siRNA 链的末端时，所述缀合基团通常连接在核苷酸的磷酸基团上；当缀合基团连接在 siRNA 的内部序列时，所述缀合基团通常连接在核糖糖环或者碱基上。各种连接方式可以参考文献：Muthiah Manoharan *et.al.* siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10 (5): 1181-7.

在一些实施方案中，所述 siRNA 与缀合基团间可以通过酸不稳定的或可还原的化学键相连，在细胞内涵体的酸性环境下，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，缀合基团可连接在 siRNA 的正义链，从而尽量降低缀合对 siRNA 活性的影响。

在一些实施方案中，所述药学上可接受的靶向基团可以是 siRNA 给药领域常规使用的配体，例如 WO2009082607A2 中描述的各种配体，以引用的方式将其全部公开内容并入本文。

在一些实施方案中，所述药学上可接受的靶向基团可以选自以下靶向分子或其衍生物形成的配体中的一种或多种：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)；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。

在一些实施方案中，所述的每个配体独立地选自一个能够与细胞表面受体结合的配体。在一些实施方案中，至少一个配体是能够与肝细胞表面受体结合的配体。在一些实施方案中，至少一个配体是能够与哺乳动物细胞表面受体结合的配体。在一些实施方案中，至少一个配体是能够与人肝细胞表面受体结合的配体。在一些实施方案中，至少一个配体是能够与肝表面去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 结合的配体。这些配体的种类为本领域技术人员所公知，其作用一般是与靶细胞表面的特异性受体相结合，介导与配体连接的 siRNA 递送至靶细胞。

在一些实施方案中，所述药学上可接受的靶向基团可以是与哺乳动物肝细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 结合的任意一种配体。在一些实施方案中，每个配体独立地为去唾液酸糖蛋白，例如去唾液酸血清类粘蛋白 (asialoorosomucoid, ASOR) 或去唾液酸胎球蛋白 (asialofetuin, ASF)。在一些实施方案中，所述配体为糖或糖的衍生物。

在一些实施方案中，至少一个配体是糖。在一些实施方案中，每个配体均是糖。在一些实施方案中，至少一个配体是单糖、多糖、修饰的单糖、修饰的多糖或糖衍生物。在一些实施方案中，至少一个所述配体可以是单糖，双糖或三糖。在一些实施方案中，至少有一个配体是修饰的糖。在一些实施方案中，每一个配体均为修饰的糖。在一些实施方案中，每个配体均独立地选自多糖、修饰的多糖、单糖、修饰的单糖、多糖衍生物或单糖衍生物。在一些实施方案中，每一个或至少一个配体选自由以下糖所组成的组：葡萄糖及其衍生物、甘露聚糖及其衍生物、半乳糖及其衍生物、木糖及其衍生物、核糖及其衍生物、岩藻糖及其衍生物、乳糖及其衍生物、麦芽糖及其衍生物，阿拉伯糖及其衍生物、果糖及其衍生物和唾液酸。

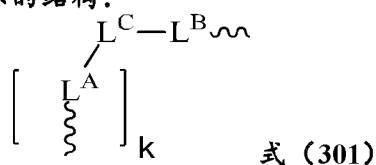
在一些实施方案中，每个所述配体可独立地选自 D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃甘露糖、 $\beta$ -D-呋喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃甘露糖、 $\beta$ -D-吡喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃

葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-三氟乙酰半乳糖胺、N-丙酰半乳糖胺、N-正丁酰半乳糖胺、N-异丁酰半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖或L-4-硫代核糖。所述配体的其它选择可参见例如 CN105378082A 的记载，以引用的方式将其全部公开内容并入本文。

在一些实施方案中，所述 siRNA 缀合物中药学上可接受的靶向基团可以是半乳糖或 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基团的半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺分子的缀合基团形成 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 或 1:4。在一些实施方案中，所述药学上可接受的靶向基团是 N-乙酰半乳糖胺。在一些实施方案中，当本公开所述的 siRNA 与含有 N-乙酰半乳糖胺的缀合基团缀合时，N-乙酰半乳糖胺分子是三价或四价。在一些实施方案中，当本公开所述的 siRNA 与含有 N-乙酰半乳糖胺的缀合基团缀合时，N-乙酰半乳糖胺分子是三价。

靶向基团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基团的具体类型选择合适的接头。这些接头、靶向基团的种类以及与 siRNA 的连接方式，可参见 WO2015006740A2 的公开内容，通过引用的方式将其整体内容并入本文。

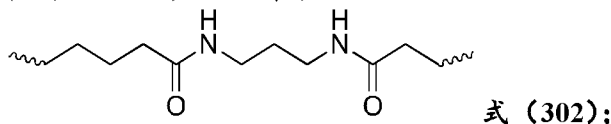
在一些实施方案中，当所述靶向基团为 N-乙酰半乳糖胺时，合适的接头可以为如式 (301) 所示的结构：



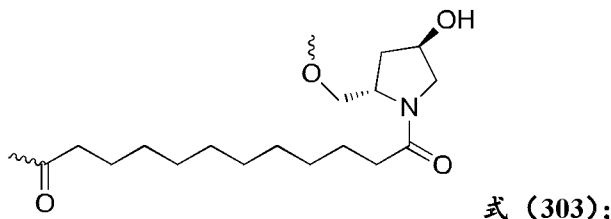
其中，

k 为 1-3 的整数；

L<sup>A</sup> 为具有如式 (302) 所示结构的包含酰胺键的链状部分，每个所述 L<sup>A</sup> 在其两端分别与一个所述靶向基团和所述 L<sup>C</sup> 部分通过醚键相连接：

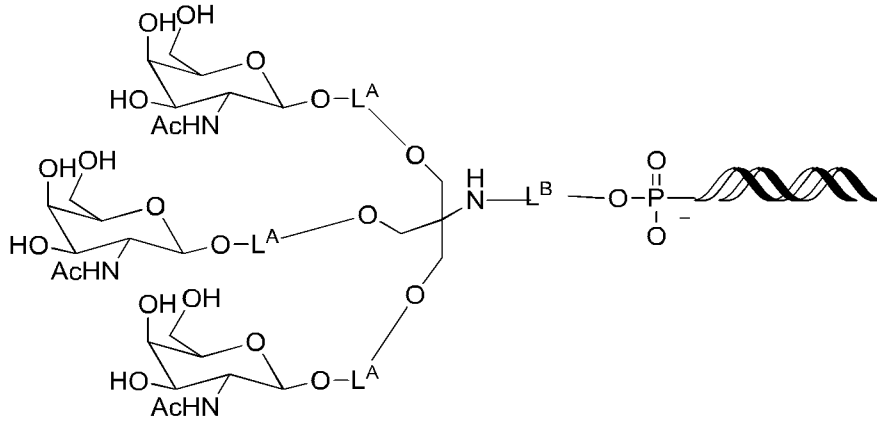


L<sup>B</sup> 为具有如式 (303) 所示结构的包含 N-酰基吡咯烷的链状部分，所述链状部分在其一端具有羰基并与所述 L<sup>C</sup> 部分通过酰胺键相连接，在另一端具有氧基并与所述 siRNA 通过磷酸酯键相连接：



L<sup>C</sup> 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，所述 L<sup>C</sup> 经由氧原子与各个所述 L<sup>A</sup> 部分通过醚键相连接，并且经由氮原子与所述 L<sup>B</sup> 部分通过酰胺键相连接。

在一些实施方案中，当 n=3，L<sup>C</sup> 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<sup>A</sup>)<sub>3</sub> 三羟甲基氨基甲烷-L<sup>B</sup>-连接 N-乙酰半乳糖胺分子和 siRNA 分子所形成的 siRNA 缀合物，其结构如下式 (304) 所示：

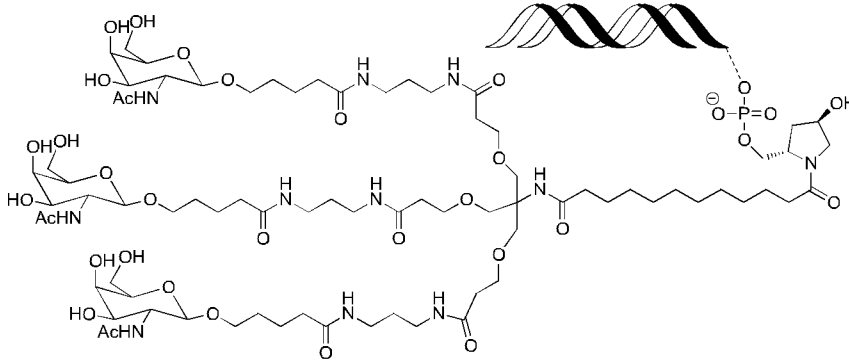


式 (304),

式中, 双螺旋结构表示 siRNA。

同样, siRNA 与缀合基团的缀合位点可以在 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。

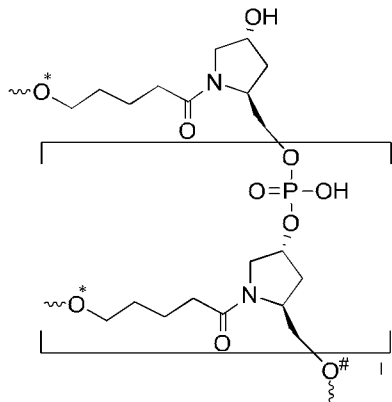
- 5 在一些实施方案中, 本公开所述 siRNA 的正义链 3'末端通过接头-(L<sup>A</sup>)<sub>3</sub>三羟甲基氨基甲烷-L<sup>B</sup>-与三个 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 分子共价缀合, 得到 siRNA 分子与 GalNAc 分子的摩尔比为 1:3 的 siRNA 缀合物, 下文也可将其称为 (GalNAc)<sub>3</sub>-siRNA, 其结构如下式 (305) 所示:



式 (305),

其中, 双螺旋结构表示所述 siRNA, 并且所述接头连接至所述 siRNA 的正义链 3'末端。

- 10 在一些实施方案中, 当所述靶向基因为 N-乙酰半乳糖胺时, 合适的接头可以为如式 (306) 所示的结构:



式 (306),

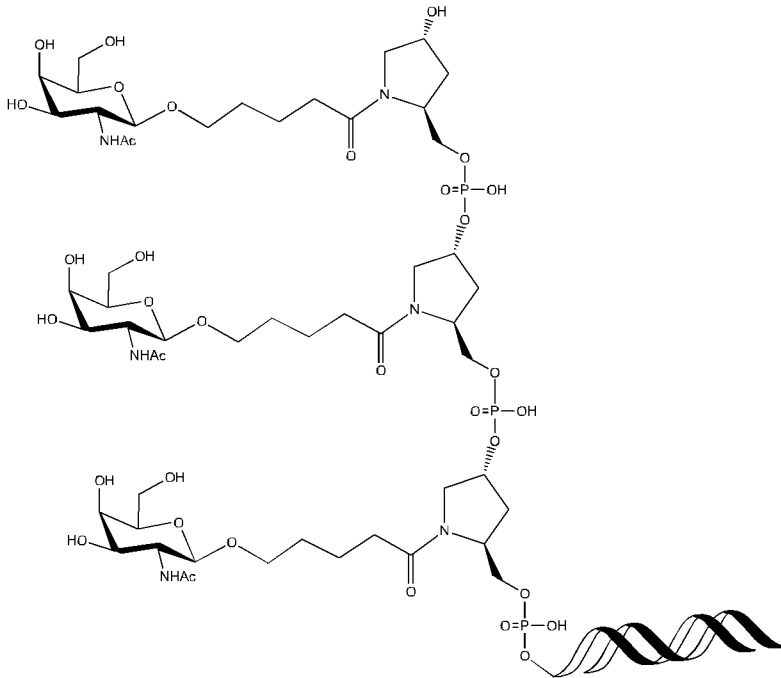
其中,

l 为 0-3 的整数;

- 15 \*表示接头上通过醚键与靶向基因连接的位点;

#表示接头上通过磷酸酯键与 siRNA 连接的位点。

在一些实施方案中, 当 l=2 时, 所述 siRNA 缀合物具有如式 (307) 所示的结构:

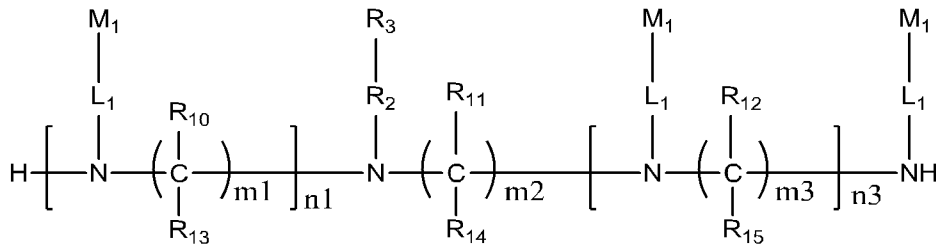


式 (307),

其中, 双螺旋结构表示所述 siRNA, 并且所述接头连接至所述 siRNA 的正义链 3' 末端。

上述缀合物可以通过现有技术中已经详细描述的方法进行合成。例如, WO2015006740A2 中详细描述了多种缀合物的制备方法。通过本领域技术人员熟知的方式, 获得本公开的 siRNA 缀合物。如 WO2014025805A1 中记载了式 (305) 所示结构的制备方法, Rajeev 等人在 ChemBioChem 2015, 16, 903-908 中描述了式 (307) 所示结构的制备方法。

在一些实施方案中, 所述 siRNA 缀合物具有如式 (308) 所示的结构:



式 (308),

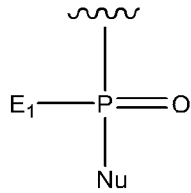
其中:

n1 为选自 1-3 的整数, n3 为选自 0-4 的整数;

每个 m1、m2 或 m3 各自独立地为选自 2-10 的整数;

每个 R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub> 或 R<sub>15</sub> 各自独立地为 H, 或选自于由以下基团所组成的组: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基以及 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷氧基;

R<sub>3</sub> 为式 A59 所示结构的基团:



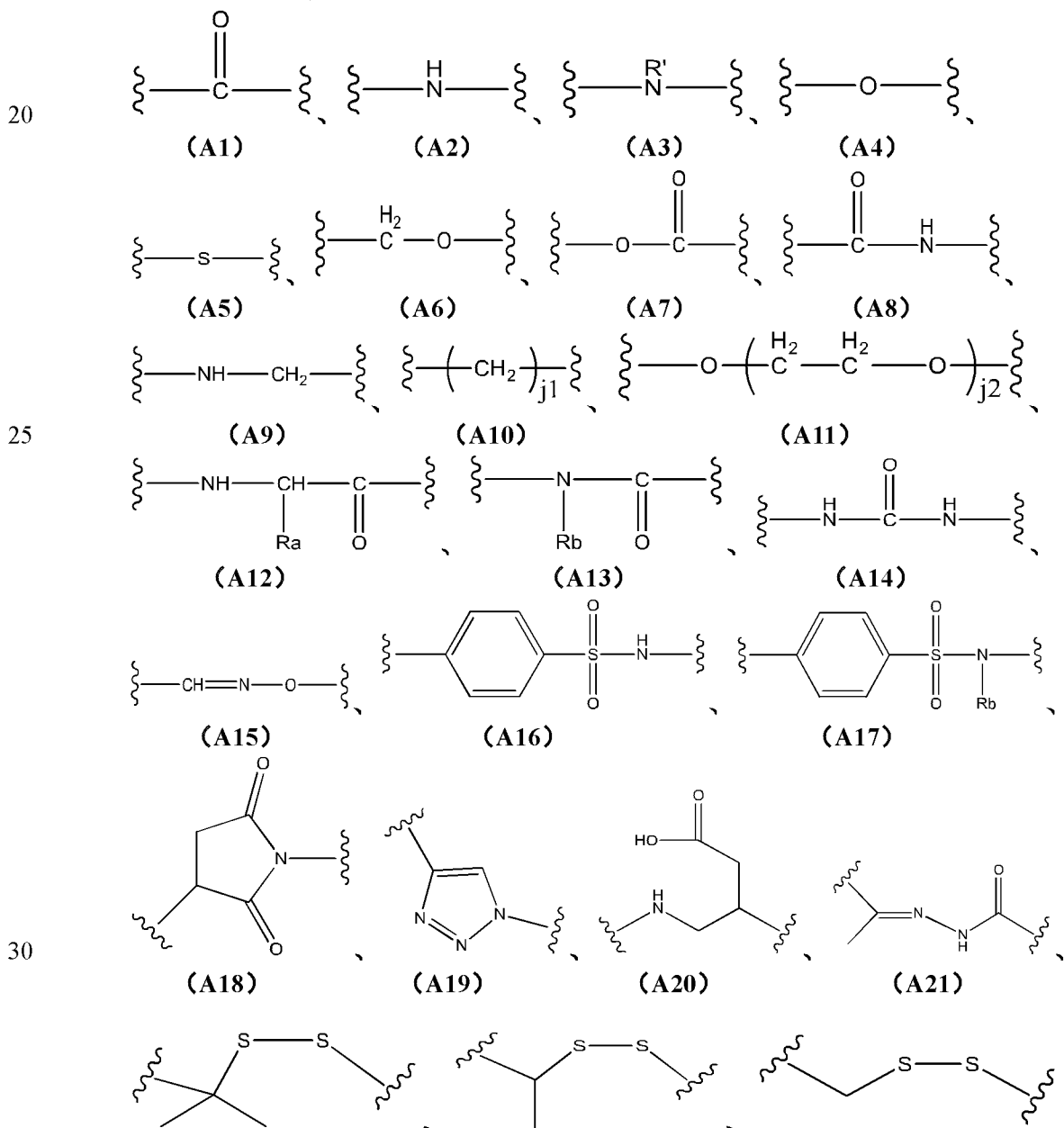
其中, E<sub>1</sub> 为 OH、SH 或 BH<sub>2</sub>, Nu 为本公开的 siRNA;

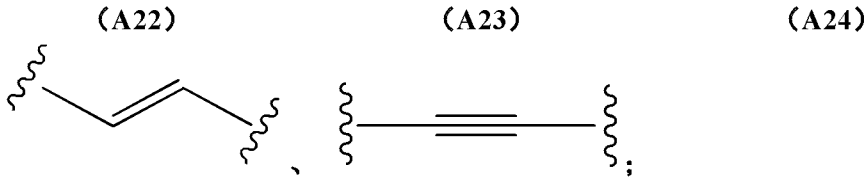
R<sub>2</sub> 是长度为 1-20 个碳原子的直链亚烷基, 其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换: C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基; 并且其中, R<sub>2</sub> 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>、-NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷

基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤烷基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHSO<sub>2</sub>(苯基)和-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)；

5 每个 L<sub>1</sub> 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基；并且其中，L<sub>1</sub> 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>、-NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤烷基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHSO<sub>2</sub>(苯基)和-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)。

15 在一些实施方案中，L<sub>1</sub> 可选自于由 A1-A26 基团或其任意连接组合所组成的组，其中 A1-A26 的结构和定义如下所示：

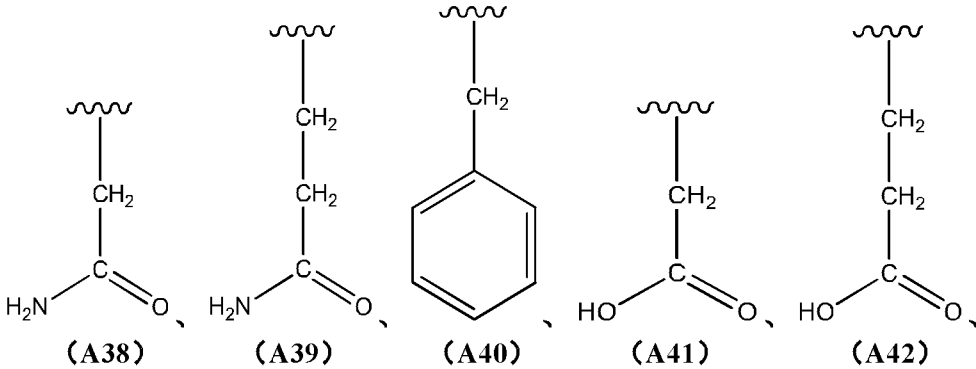
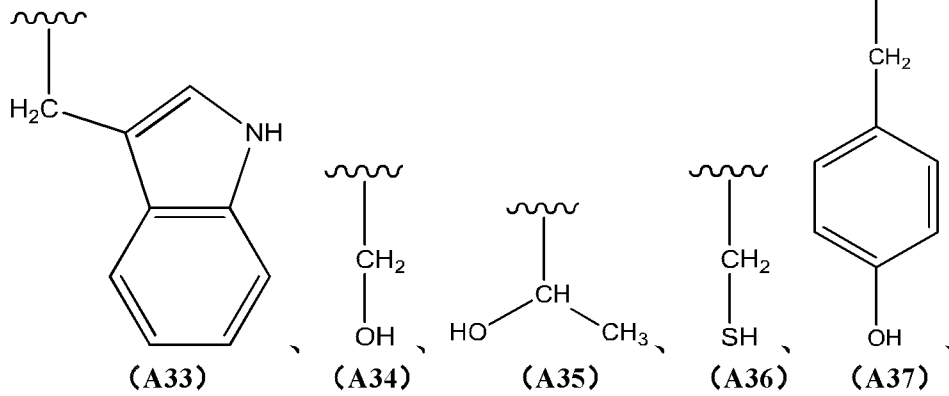
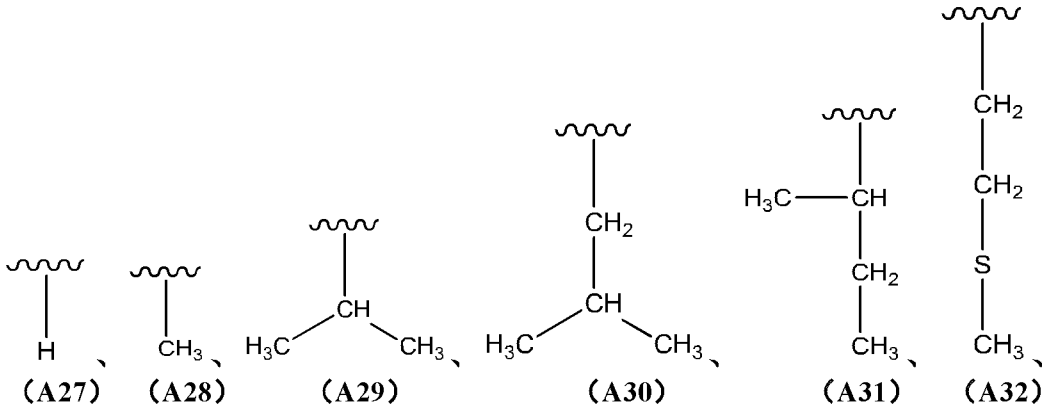




其中, j1 为 1-20 的整数; j2 为 1-20 的整数;

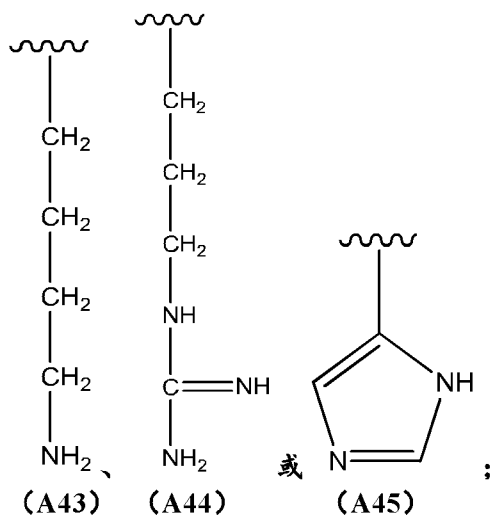
R' 为 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基;

Ra 选自式 A27-A45 基团或其任意连接组合所组成的组:



5

10



Rb 为  $C_1$ - $C_{10}$  烷基； $\sim$  表示基团共价连接的位点。

技术人员会理解的是，尽管为了方便起见， $L_1$  被定义为线性亚烷基，但是它可能不是线性基团或者名称不同，例如由于上述替换和/或取代而产生的胺或烯基。为了本公开内容的目的， $L_1$  的长度是连接两个连接点的链中的原子数。为此目的，将替换所述直链亚烷基的碳原子而得到的环（如亚杂环基或亚杂芳基）计为一个原子。

$M_1$  表示靶向基团，其定义和可选择的范围与上述靶向基团相同。在一些实施方案中，每个  $M_1$  独立地选自对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体中的一种。

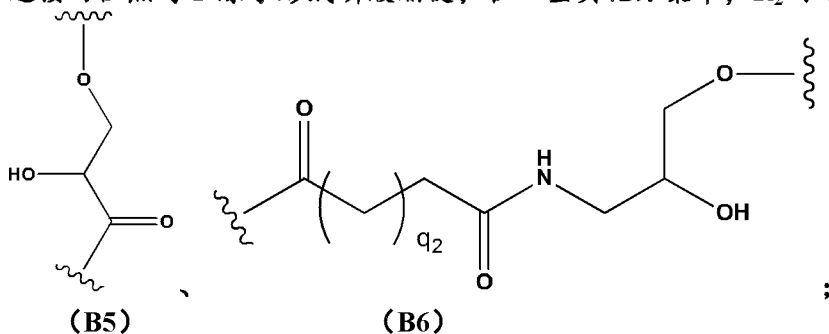
当  $M_1$  为对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体时，在一些实施方案中， $n_1$  可以是 1-3 的整数， $n_3$  可以是 0-4 的整数，保证所述缀合物中  $M_1$  靶向基团的个数至少为 2；在一些实施方案中， $n_1+n_3 \geq 2$ ，这样可以使得  $M_1$  靶向基团的个数至少为 3，从而使得  $M_1$  靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体更容易结合，进而促进所述缀合物通过内吞作用进入细胞。实验表明，当  $M_1$  靶向基团的个数大于 3 个时， $M_1$  靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体结合的容易程度增加并不明显，因此，从合成容易程度、结构/工艺成本和递送效率等多方面综合考虑，在一些实施方案中， $n_1$  为 1-2 的整数， $n_3$  为 0-1 的整数，且  $n_1+n_3=2-3$ 。

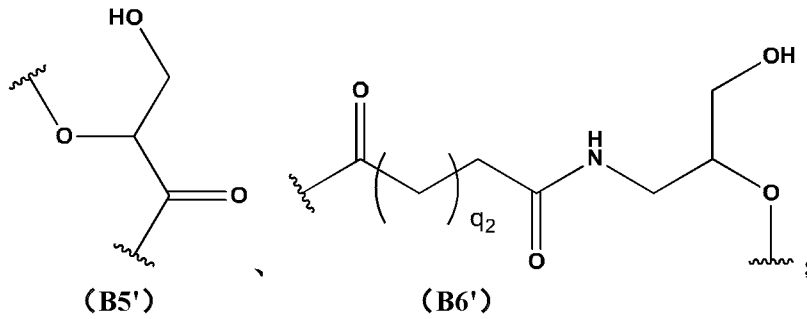
在一些实施方案中，每个  $m_1$ 、 $m_2$  或  $m_3$  各自独立地选自 2-10 的整数时，可以使多个  $M_1$  靶向基团之间的空间位置适合  $M_1$  靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体的结合，为了使本公开提供的 siRNA 缀合物更为简单，更容易合成和/或降低成本，在一些实施方案中，每个  $m_1$ 、 $m_2$  或  $m_3$  各自独立地为 2-5 的整数，在一些实施方案中， $m_1=m_2=m_3$ 。

本领域技术人员可以理解，当每个  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$  或  $R_{15}$  各自独立地选自 H、 $C_1$ - $C_{10}$  烷基、 $C_1$ - $C_{10}$  卤代烷基、以及  $C_1$ - $C_{10}$  烷氧基中的一种时，不会改变本公开的 siRNA 缀合物的性质，均可以实现本公开的目的。在一些实施方案中，每个  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$  或  $R_{15}$  各自独立地选自 H、甲基或乙基。在一些实施方案中，每个  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$  和  $R_{15}$  均为 H。

$R_3$  为式 A59 所示结构的基团，其中， $E_1$  为 OH、SH 或  $BH_2$ ，基于制备原料易获取性的考虑，在一些实施方案中， $E_1$  为 OH 或 SH。

$R_2$  的选择是为了实现与含氮骨架上的 N 原子与 A59 的连接。在本公开的上下文中，“含氮骨架”是指连接有  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$  和  $R_{15}$  的碳原子与 N 原子互相连接的链状结构。因此， $R_2$  可以是任何能够以适当方式将 A59 基团连接至含氮骨架上的 N 原子的连接基团。在一些实施方案中，在通过固相合成的工艺制备式 (308) 所示的 siRNA 缀合物的情况下， $R_2$  基团中需要同时含有与含氮骨架上的 N 原子连接的连接位点和与  $R_3$  中的 P 原子相连接的连接位点。在一些实施方案中， $R_2$  中所述与含氮骨架上的 N 原子连接的位点与 N 原子形成酰胺键，所述与  $R_3$  上的 P 原子连接的位点与 P 原子形成磷酸酯键；在一些实施方案中， $R_2$  可以是 B5、B6、B5' 或 B6'：





其中， 表示基团共价键连接的位点。

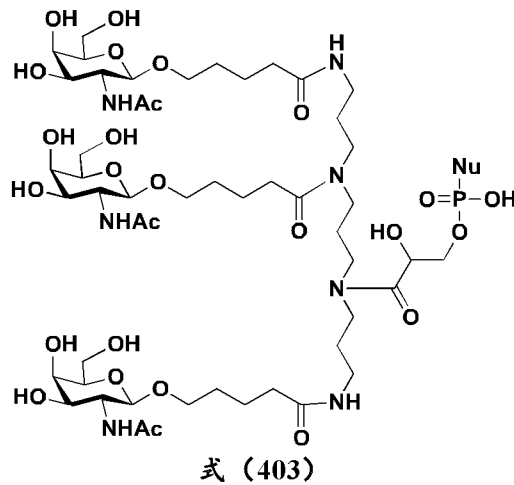
q<sub>2</sub> 的取值范围可以是 1-10 的整数，在一些实施方案中，q<sub>2</sub> 为 1-5 的整数。

5 L<sub>1</sub> 的作用是将 M<sub>1</sub> 靶向基团与含氮骨架上的 N 原子连接，为式 (308) 所示的 siRNA 缀合物提供肝靶向功能。在一些实施方案中，L<sub>1</sub> 选自式 A1-A26 基团中的一种或多种的连接组合。在一些实施方案中，L<sub>1</sub> 选自 A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11 和 A13 中的一种或多种的连接组合。在一些实施方案中，L<sub>1</sub> 选自 A1、A4、A8、A10 和 A11 中至少 2 个的连接组合。在一些实施方案中，L<sub>1</sub> 选自 A1、A8、A10 中至少 2 个的连接组合。

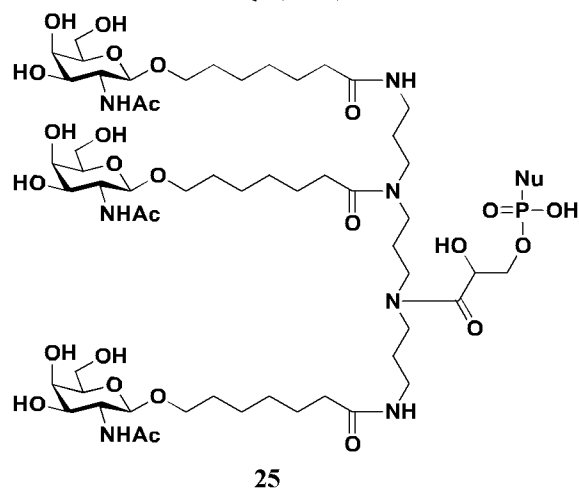
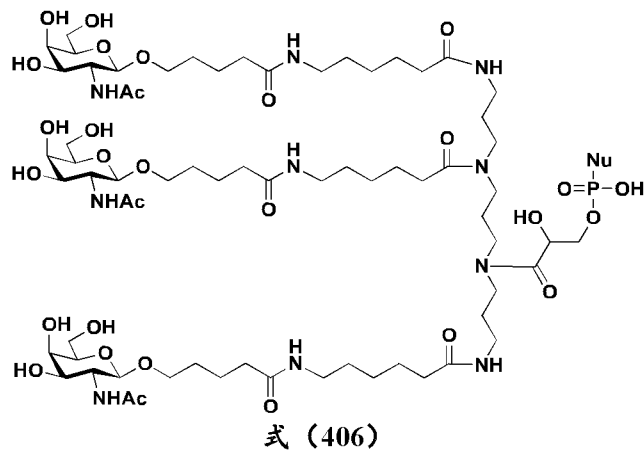
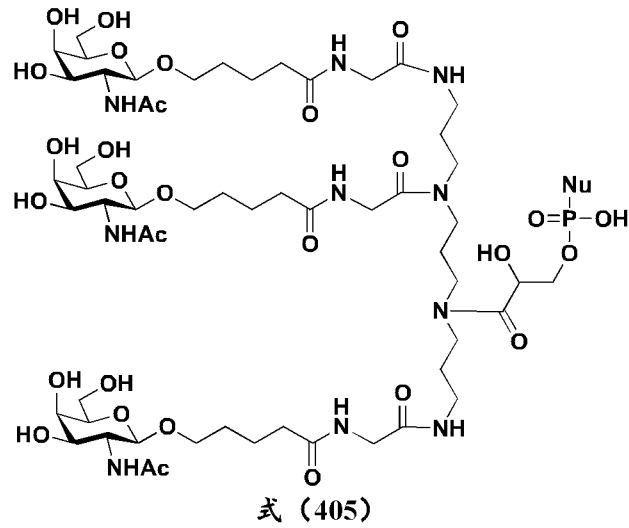
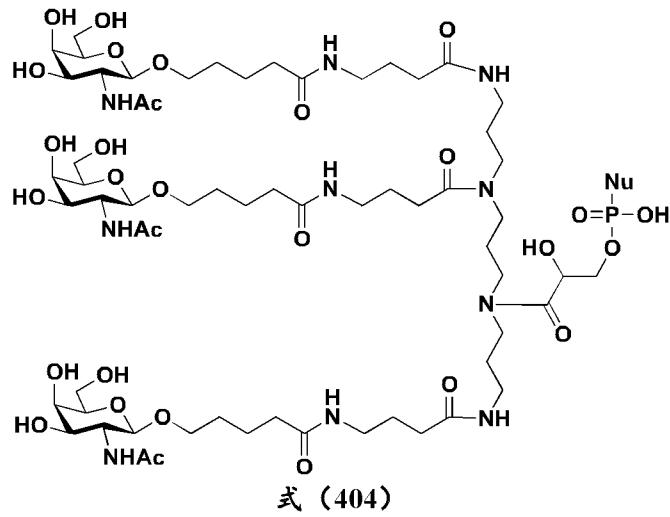
10 在一些实施方案中，L<sub>1</sub> 的长度可以为 3-25 个原子、3-20 个原子、4-15 个原子或 5-12 个原子。在一些实施方案中，L<sub>1</sub> 的长度为 3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个、23 个、24 个、25 个、30 个、35 个、40 个、45 个、50 个、55 个、60 个原子。

15 在一些实施方案中，j<sub>1</sub> 为 2-10 的整数，在一些实施方案中，j<sub>1</sub> 为 3-5 的整数。在一些实施方案中，j<sub>2</sub> 为 2-10 的整数，在一些实施方案中，j<sub>2</sub> 为 3-5 的整数。R' 为 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷基，在一些实施方案中，R' 为甲基、乙基和异丙基中的一种。Ra 为 A27、A28、A29、A30 和 A31 中的一种，在一些实施方案中，Ra 为 A27 或 A28。Rb 为 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基，在一些实施方案中，Rb 为甲基、乙基、异丙基和丁基中的一种。在一些实施方案中，在式 A1-A26 中各自对 j<sub>1</sub>、j<sub>2</sub>、R'、Ra、Rb 进行选择，以实现 M<sub>1</sub> 靶向基团与含氮骨架上的 N 原子连接，并使 M<sub>1</sub> 靶向基团之间的空间位置更适合

20 M<sub>1</sub> 靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体结合。  
 在一些实施方案中，该缀合物具有式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421) 或 (422) 所示的结构：

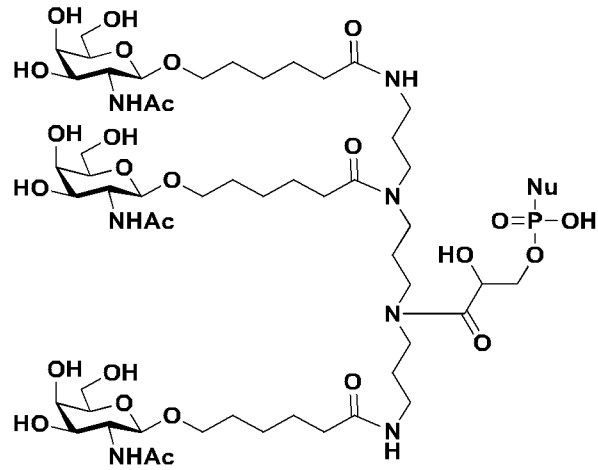


25

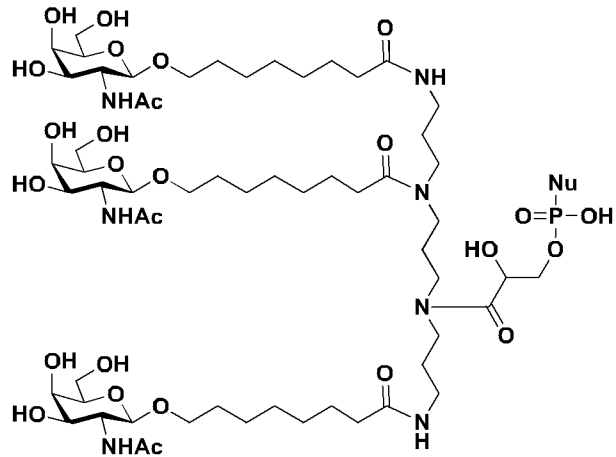


5

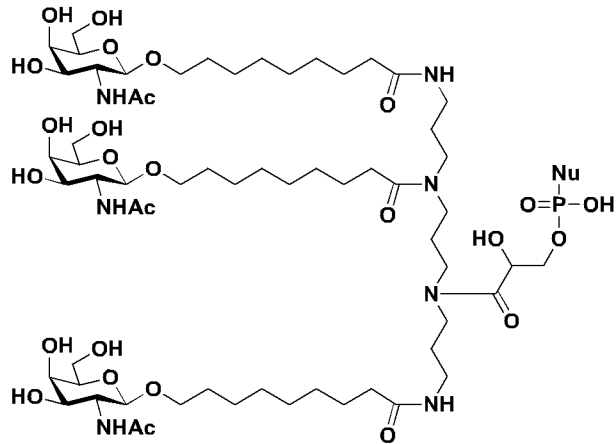
式 (407)



式 (408)

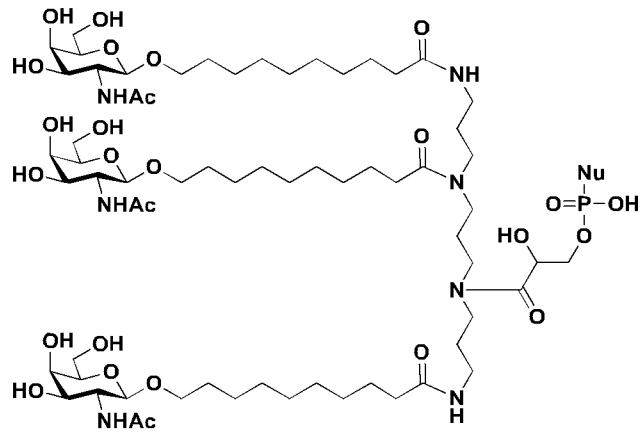


式 (409)

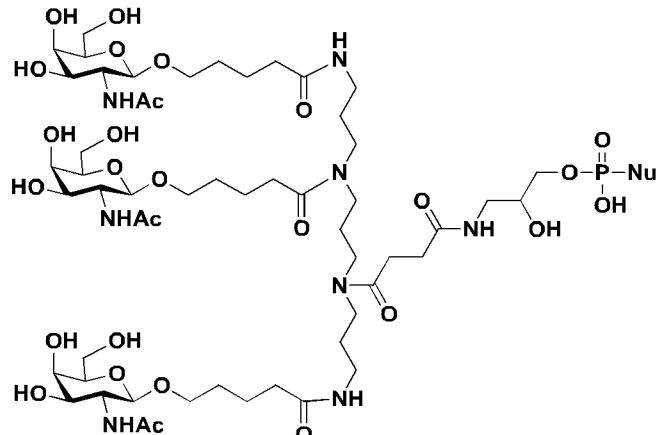


式 (410)

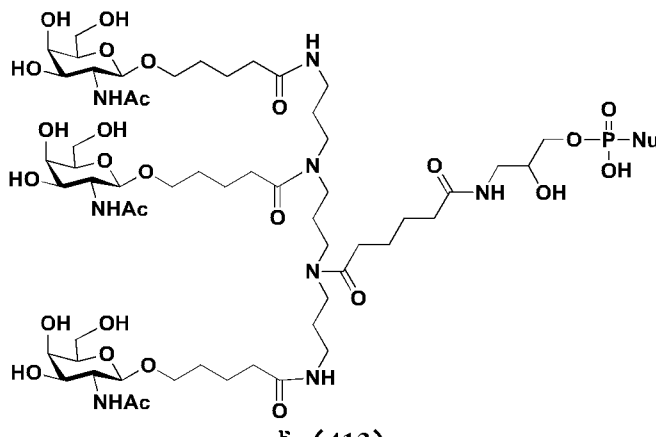
5



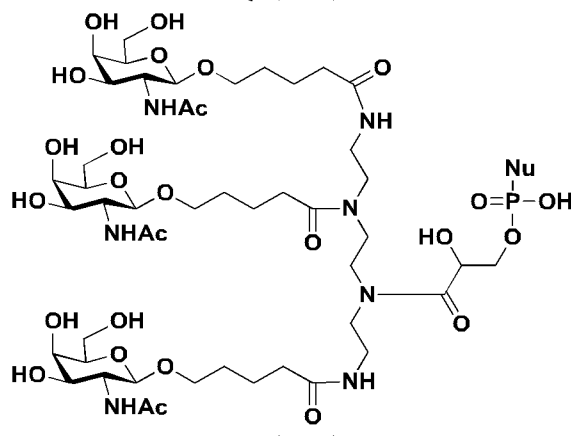
式 (411)



式 (412)

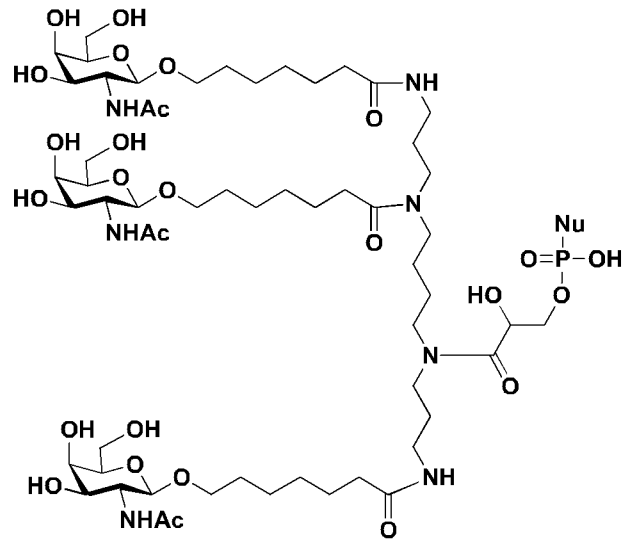


式 (413)

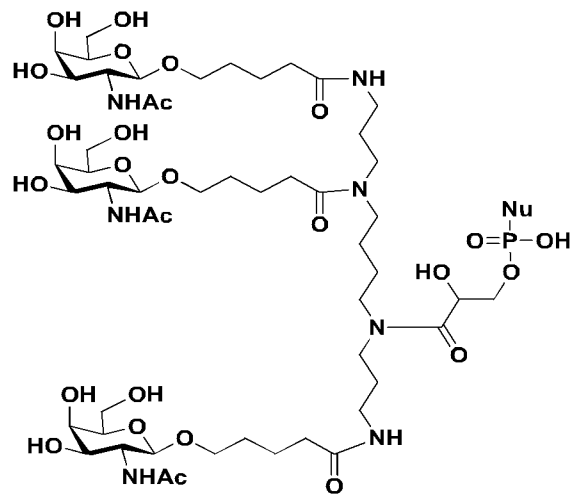


式 (414)

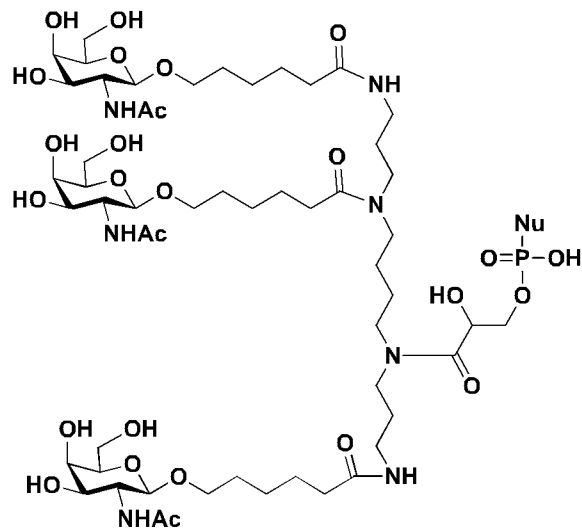
5



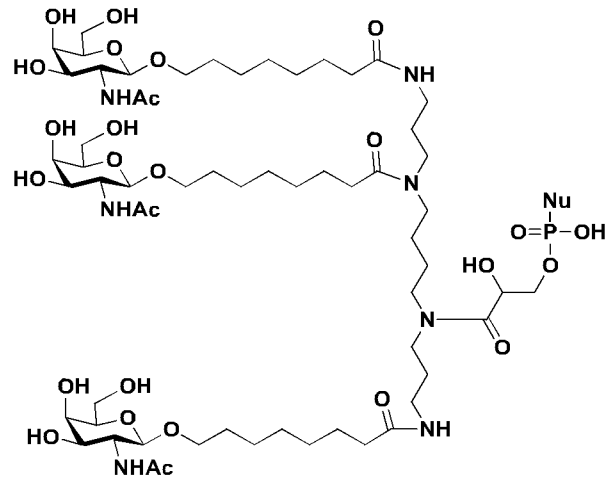
式 (415)



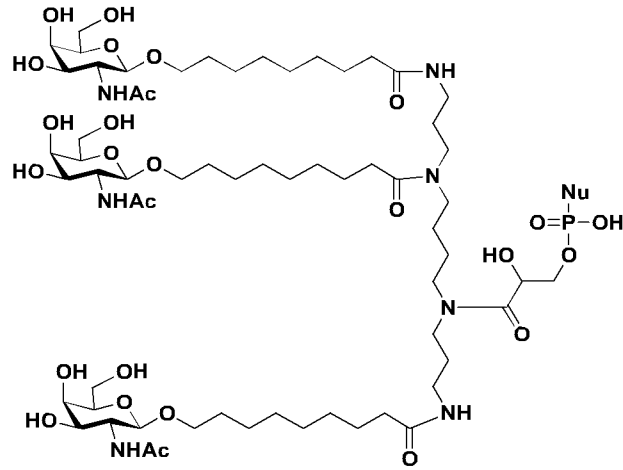
式 (416)



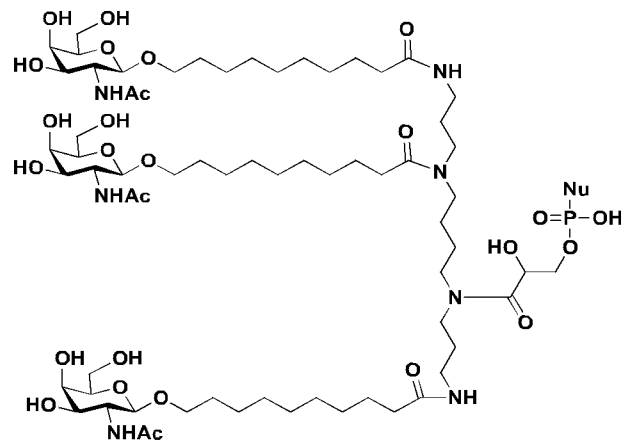
式 (417)



式 (418)

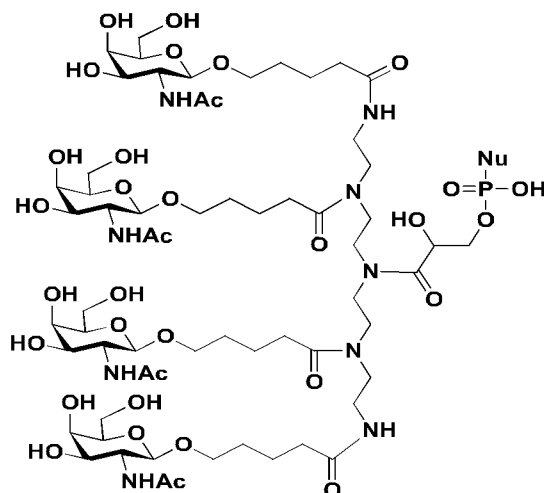


式 (419)

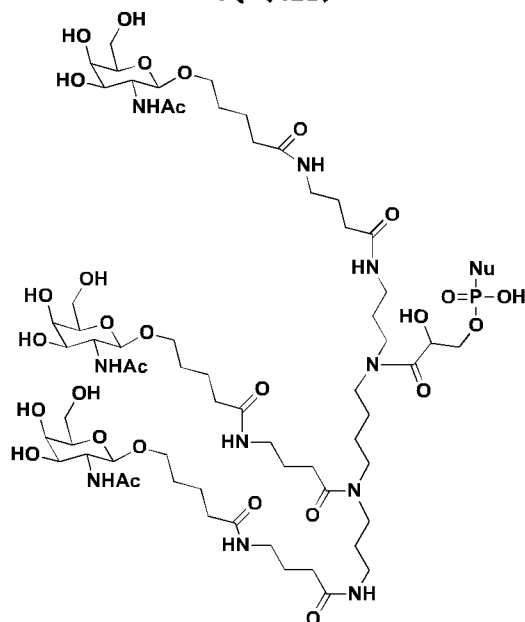


式 (420)

5



式 (421)



式 (422)

5 在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子可以连接到 siRNA 序列中任何可能的位置，例如，式 A59 中的 P 原子可以连接到 siRNA 正义链或反义链的任何一个核苷酸上；在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子连接到 siRNA 正义链的任何一个核苷酸上。在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子连接到 siRNA 正义链或反义链的端部；在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子连接到 siRNA 正义链的端部。所述端部指所述正义链或所述反义链中从其一端起算的前 4 个核苷酸。在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子连接到 siRNA 正义链或反义链的末端；在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子连接到 siRNA 正义链的 3' 末端。在连接至 siRNA 的正义链的上述位置的情况下，式 (308) 所示的 siRNA 缀合物进入细胞后，在解旋时，可以释放出单独的 siRNA 反义链，以阻断 PNP mRNA 翻译蛋白质的过程，抑制 PNP 基因表达。

15 在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子可以连接到 siRNA 中的核苷酸上任何可能的位置，例如，核苷酸的 5' 位、核苷酸的 2' 位、核苷酸的 3' 位或核苷酸的碱基上。在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子可通过形成磷酸二酯键连接至所述 siRNA 中的核苷酸的 2' 位、3' 位或 5' 位。在一些实施方案中，式 A59 中的 P 原子连接在 siRNA 正义链 3' 末端核苷酸的 3' 羟基脱氢后形成的氧原子上（此时，A59 中的 P 原子也可以看作是 siRNA 中含有的磷酸基团中的 P 原子），或者式 A59 中的 P 原子通过取代 siRNA 正义链中的一个核苷酸的 2'-羟基中的氢与核苷酸连接，或者式 A59 中的 P 原子通过取代 siRNA 正义链 5' 末端核苷酸的 5' 羟基中的氢与核苷酸连接。

20 本公开的发明人意外发现，本公开的 siRNA 缀合物在在具有显著提高的血浆中稳定性、低脱靶效应的同时，还表现出较高的 PNP mRNA 沉默活性，而且还具有较高的血尿酸浓度抑制作用。在一些实施方案中，本公开的 siRNA 可以为表 1a-1d 中示出的 siRNA 中的一种。含有这些 siRNA 的 siRNA 缀合物表现出更高的 PNP mRNA 沉默活性。

25 表 1a: 本公开的第一种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siPNa1	9	CCUAUGAAGAUUAUAAGAA
	10	UUCUUAUAAUCUUCAUAGGUG
siPNa2	11	CACCUAUGAAGAUUAUAAGAA
	12	UUCUUAUAAUCUUCAUAGGUGUA
siPNa1 -M1	13	CmCmUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	14	UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGm
siPNa2 -M1	15	CmAmCmCmUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	16	UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmUmGm
siPNa1 -M2	17	CmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	18	UmUfCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGm
siPNa2 -M2	19	CmAmCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	20	UmUfCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmUmGm
siPNa1 -M3	21	CmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	22	UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGm
siPNa2 -M3	23	CmAmCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	24	UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmUmGm
siPNa1 -M1S	25	CmsCmsUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	26	UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm
siPNa2 -M1S	27	CmsAmsCmCmUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	28	UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmsUmsGm
siPNa1 -M2S	29	CmsCmsUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	30	UmsUfsCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm
siPNa2 -M2S	31	CmsAmsCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	32	UmsUfsCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmsUmsGm
siPNa1 -M3S	33	CmsCmsUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	34	UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm
siPNa2 -M3S	35	CmsAmsCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	36	UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmsUmsGm
siPNa1 -M1P1	37	CmCmUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	38	P1UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGm
siPNa2 -M1P1	39	CmAmCmCmUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	40	P1UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmUmGm
siPNa1 -M2P1	41	CmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	42	P1UmUfCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGm
siPNa2 -M2P1	43	CmAmCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	44	P1UmUfCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmUmGm
siPNa1 -M3P1	45	CmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	46	P1UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGm
siPNa2 -M3P1	47	CmAmCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	48	P1UmUfCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmUmGm

siPNa1-M1SP1	49	CmsCmsUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	50	P1UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm
siPNa2-M1SP1	51	CmsAmsCmCmUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	52	P1UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmsUmsGm
siPNa1-M2SP1	53	CmsCmsUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	54	P1UmsUfsCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm
siPNa2-M2SP1	55	CmsAmsCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	56	P1UmsUfsCmUmUmAfUmAfAfUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmsUmsGm
siPNa1-M3SP1	57	CmsCmsUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	58	P1UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm
siPNa2-M3SP1	59	CmsAmsCmCmUmAmUfGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm
	60	P1UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmUmGmsUmsGm

表 1b: 本公开的第二种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siPNb1	69	GUACAGUACCAGAAGUUAU
	70	AUAACUUCUGGUACUGUACUC
siPNb2	71	GAGUACAGUACCAGAAGUUAU
	72	AUAACUUCUGGUACUGUACUCAU
siPNb1-M1	73	GmUmAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	74	AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCm
siPNb2-M1	75	GmAmGmUmAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	76	AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmAmUm
siPNb1-M2	77	GmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	78	AmUfAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCm
siPNb2-M2	79	GmAmGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	80	AmUfAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmAmUm
siPNb1-M3	81	GmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	82	AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCm
siPNb2-M3	83	GmAmGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	84	AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmAmUm
siPNb1-M1S	85	GmsUmsAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	86	AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm
siPNb2-M1S	87	GmsAmsGmUmAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	88	AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmsAmsUm
siPNb1-M2S	89	GmsUmsAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	90	AmsUfsAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm
siPNb2-M2S	91	GmsAmsGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	92	AmsUfsAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmsAmsUm
siPNb1-	93	GmsUmsAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm

M3S	94	AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm
siPNb2-M3S	95	GmsAmsGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	96	AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmsAmsUm
siPNb1-M1P1	97	GmUmAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	98	P1AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCm
siPNb2-M1P1	99	GmAmGmUmAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	100	P1AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmAmUm
siPNb1-M2P1	101	GmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	102	P1AmUfAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCm
siPNb2-M2P1	103	GmAmGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	104	P1AmUfAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmAmUm
siPNb1-M3P1	105	GmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	106	P1AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCm
siPNb2-M3P1	107	GmAmGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	108	P1AmUfAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmAmUm
siPNb1-M1SP1	109	GmsUmsAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	110	P1AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm
siPNb2-M1SP1	111	GmsAmsGmUmAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	112	P1AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmsAmsUm
siPNb1-M2SP1	113	GmsUmsAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	114	P1AmsUfsAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm
siPNb2-M2SP1	115	GmsAmsGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	116	P1AmsUfsAmAmCmUfUmCfUfGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmsAmsUm
siPNb1-M3SP1	117	GmsUmsAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	118	P1AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm
siPNb2-M3SP1	119	GmsAmsGmUmAmCmAfGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm
	120	P1AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmUmCmsAmsUm

表 1c: 本公开的第三种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siPNc1	129	CAAACAAGCUGCACAGAAA
	130	UUUCUGUGCAGCUUGUUUGCC
siPNc2	131	GGCAAACAAGCUGCACAGAAA
	132	UUUCUGUGCAGCUUGUUUGCCAG
siPNc1-M1	133	CmAmAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	134	UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCm
siPNc2-M1	135	GmGmCmAmAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	136	UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmAmGm
siPNc1-M2	137	CmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	138	UmUfUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCm

siPNc2 -M2	139	GmGmCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	140	UmUfUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmAmGm
siPNc1 -M3	141	CmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	142	UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCm
siPNc2 -M3	143	GmGmCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	144	UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmAmGm
siPNc1 -M1S	145	CmsAmsAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	146	UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm
siPNc2 -M1S	147	GmsGmsCmAmAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	148	UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmsAmsGm
siPNc1 -M2S	149	CmsAmsAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	150	UmsUfsUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm
siPNc2 -M2S	151	GmsGmsCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	152	UmsUfsUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmsAmsGm
siPNc1 -M3S	153	CmsAmsAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	154	UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm
siPNc2 -M3S	155	GmsGmsCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	156	UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmsAmsGm
siPNc1 -M1P1	157	CmAmAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	158	P1UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCm
siPNc2 -M1P1	159	GmGmCmAmAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	160	P1UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmAmGm
siPNc1 -M2P1	161	CmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	162	P1UmUfUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCm
siPNc2 -M2P1	163	GmGmCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	164	P1UmUfUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmAmGm
siPNc1 -M3P1	165	CmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	166	P1UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCm
siPNc2 -M3P1	167	GmGmCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	168	P1UmUfUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmAmGm
siPNc1 -M1SP 1	169	CmsAmsAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	170	P1UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm
siPNc2 -M1SP 1	171	GmsGmsCmAmAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	172	P1UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmsAmsGm
siPNc1 -M2SP 1	173	CmsAmsAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	174	P1UmsUfsUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm
siPNc2 -M2SP 1	175	GmsGmsCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
	176	P1UmsUfsUmCmUmGfUmGfCfAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmsAmsGm
siPNc1	177	CmsAmsAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm

-M3SP 1	178	P1UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm
siPNc2	179	GmsGmsCmAmAmAmCfAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm
-M3SP 1	180	P1UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmCmCmsAmsGm

表 1d: 本公开的第四种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siPNd1	189	CAAACAAGGACUAAUCCAA
	190	UUGGAUUAGUCCUUGUUUGGU
siPNd2	191	ACCAAACAAGGACUAAUCCAA
	192	UUGGAUUAGUCCUUGUUUGGUCU
siPNd1 -M1	193	CmAmAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	194	UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUm
siPNd2 -M1	195	AmCmCmAmAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	196	UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmCmUm
siPNd1 -M2	197	CmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	198	UmUfGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUm
siPNd2 -M2	199	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	200	UmUfGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmCmUm
siPNd1 -M3	201	CmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	202	UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUm
siPNd2 -M3	203	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	204	UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmCmUm
siPNd1 -M1S	205	CmsAmsAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	206	UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm
siPNd2 -M1S	207	AmCmCmAmAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	208	UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmsCmsUm
siPNd1 -M2S	209	CmsAmsAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	210	UmsUfsGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm
siPNd2 -M2S	211	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	212	UmsUfsGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmsCmsUm
siPNd1 -M3S	213	CmsAmsAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	214	UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm
siPNd2 -M3S	215	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	216	UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmsCmsUm
siPNd1 -M1P1	217	CmAmAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	218	P1UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUm
siPNd2 -M1P1	219	AmCmCmAmAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	220	P1UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmCmUm
siPNd1 -M2P1	221	CmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	222	P1UmUfGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUm

siPNd2 -M2P1	223	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	224	P1UmUfGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmCmUm
siPNd1 -M3P1	225	CmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	226	P1UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUm
siPNd2 -M3P1	227	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	228	P1UmUfGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmCmUm
siPNd1 -M1SP 1	229	CmsAmsAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	230	P1UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm
siPNd2 -M1SP 1	231	AmCmCmAmAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	232	P1UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmsCmsUm
siPNd1 -M2SP 1	233	CmsAmsAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	234	P1UmsUfsGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm
siPNd2 -M2SP 1	235	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	236	P1UmsUfsGmGmAmUfUmAfGfUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmsCmsUm
siPNd1 -M3SP 1	237	CmsAmsAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	238	P1UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm
siPNd2 -M3SP 1	239	AmCmCmAmAmAmCfAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm
	240	P1UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmGmUmsCmsUm

其中，大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸；小写字母 s 表示该字母左右两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接；P1 表示该 P1 右侧相邻的一个核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸。在一些实施方案中，P1 是表示具体修饰的 VP、Ps 或 P，其中，字母组合 VP 表示该字母组合 VP 右侧相邻的一个核苷酸为乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸，字母组合 Ps 表示该字母组合 Ps 右侧相邻的一个核苷酸为硫代磷酸酯修饰的核苷酸，大写字母 P 表示该字母 P 右侧相邻的一个核苷酸为 5'-磷酸核苷酸。

本公开所述 siRNA 或 siRNA 缀合物中，每个相邻核苷酸之间由磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键连接，磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子带有负电荷，它可以以羟基或巯基的形式存在，羟基或巯基中的氢离子也可以部分或全部被阳离子取代。所述阳离子可以是任意的阳离子，如金属阳离子、铵离子 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、有机铵阳离子中的一种。出于提高溶解性考虑，在一种实施方案中，所述阳离子选自碱金属离子、三级胺形成的铵阳离子和季铵阳离子中的一种或多种。碱金属离子可以是 K<sup>+</sup>和/或 Na<sup>+</sup>，三级胺形成的阳离子可以是三乙胺形成的铵离子和/或 N,N-二异丙基乙胺形成的铵离子。因此，本公开所述 siRNA 或 siRNA 缀合物可以至少部分以盐的形式存在。在一种方式中，磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子至少部分与钠离子结合，本公开所述 siRNA 或 siRNA 缀合物以钠盐或部分钠盐的形式存在。

本领域技术人员清楚知晓的是，可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入本公开所述的 siRNA 中。制备具有相应修饰的核苷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。所有修饰的核苷单体均可以商购得到或者采用已知方法制备得到。

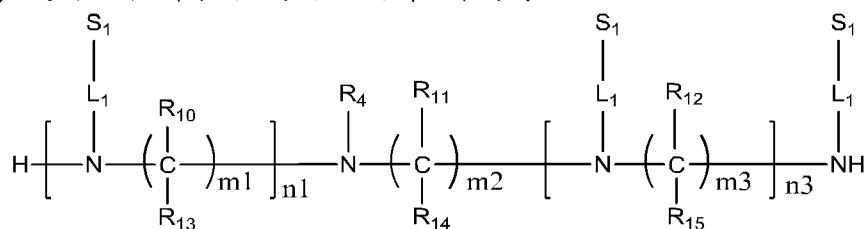
式 (308) 所示的 siRNA 缀合物的制备

可以采用任意合理的合成路线制备式 (308) 所示的 siRNA 缀合物。

在一些实施方案中，式 (308) 所示的 siRNA 缀合物可以采用如下方法制备，该方法包括在亚磷酰胺固相合成的条件下，分别按照 siRNA 正义链和反义链的核苷酸种类和顺序，按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接，每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应；分离出 siRNA 的正义链和反义链，退火，其中，所述 siRNA 为上述本公开的 siRNA；

并且，该方法还包括在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式 (321) 所示的化合物与核苷单体或连接在固相载体上的核苷酸序列接触，使式 (321) 所示的化合物经偶联反应连接至核苷

酸序列。下文中，式 (321) 所示的化合物也称作缀合分子。



式 (321)

其中：

$R_4$  为能够结合至式 (308) 所示的化合物中 Nu 代表的 siRNA 的基团。在一些实施方案中， $R_4$  为能够通过共价键结合至 Nu 代表的 siRNA 的基团。在一些实施方案中， $R_4$  为能够经反应而通过磷酸二酯键缀合至 Nu 代表的 siRNA 的任意官能团的基团；

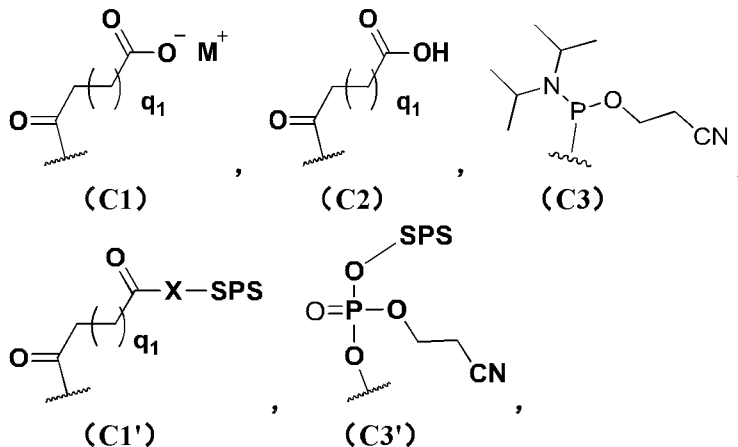
每个  $S_1$  独立地是  $M_1$  中全部活性羟基被 YCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个 Y 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种；在一些实施方案中，Y 为甲基。

$n_1$ 、 $n_3$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $M_1$  各自的定义和可选择的范围如前所述。

$R_4$  的选择是为了实现与含氮骨架上的 N 原子的连接，并且为合成式 (308) 所示的 siRNA 缀合物提供合适的反应位点。在一些实施方案中， $R_4$  中包括  $R_2$  连接基团或经保护的  $R_2$  连接基团，以及可通过反应与 siRNA 形成 A59 所示结构的官能团。

在一些实施方案中， $R_4$  包含可与 Nu 代表的 siRNA 或核苷单体上的基团形成亚磷酸酯的第 1 官能团以及可与羟基或氨基反应形成共价键的第 2 官能团或者含有由所述共价键连接的固相载体。在一些实施方案中，所述第 1 官能团为亚磷酸胺、羟基或被保护的羟基。在一些实施方案中，所述第 2 官能团为亚磷酸胺、羧基或羧酸盐。在一些实施方案中，所述第 2 官能团为经由共价键连接至分子其他部分的固相载体，所述共价键由羟基或氨基形成。在一些实施方案中，所述固相载体经由磷酸酯键、羧酸酯键或酰胺键连接。在一些实施方案中，所述固相载体为树脂。

在一些实施方案中，所述第 1 官能团含有羟基、 $-OR_k$  或式 (C3) 所示的基团；所述第 2 官能团含有式 (C1)、(C2)、(C3)、(C1') 或 (C3') 所示的结构：



式中， $q_1$  为 1-4 的整数，X 为 O 或 NH， $M^+$  为阳离子， $R_k$  为羟基保护基团，SPS 表示固相载体， $\sim$  表示基团共价连接的位点。

在一些实施方案中，所述第 1 官能团含有亚磷酸胺基团，如式 (C3) 所示，该亚磷酸胺基团可以与核苷酸上的任意位置的羟基，如 2' 位羟基或 3' 位羟基发生偶联反应形成亚磷酸酯，并经氧化或硫化形成式 A59 所示的磷酸二酯键或硫代磷酸酯键，将缀合分子缀合至 siRNA。此时，即使所述第 2 官能团并不存在，式 (321) 所示化合物也能够缀合至核苷酸，不影响式 (308) 所示的 siRNA 缀合物的获得。在此情况下，在经由亚磷酸胺固相合成等方法获得 siRNA 的正义链或反义链后，使式 (321) 所示化合物与核苷酸序列中末端核苷酸上的羟基反应，并在后续的氧化或硫化过程中形成磷酸二酯键连接或硫代磷酸酯连接，将式 (321) 所示化合物缀合至 siRNA。

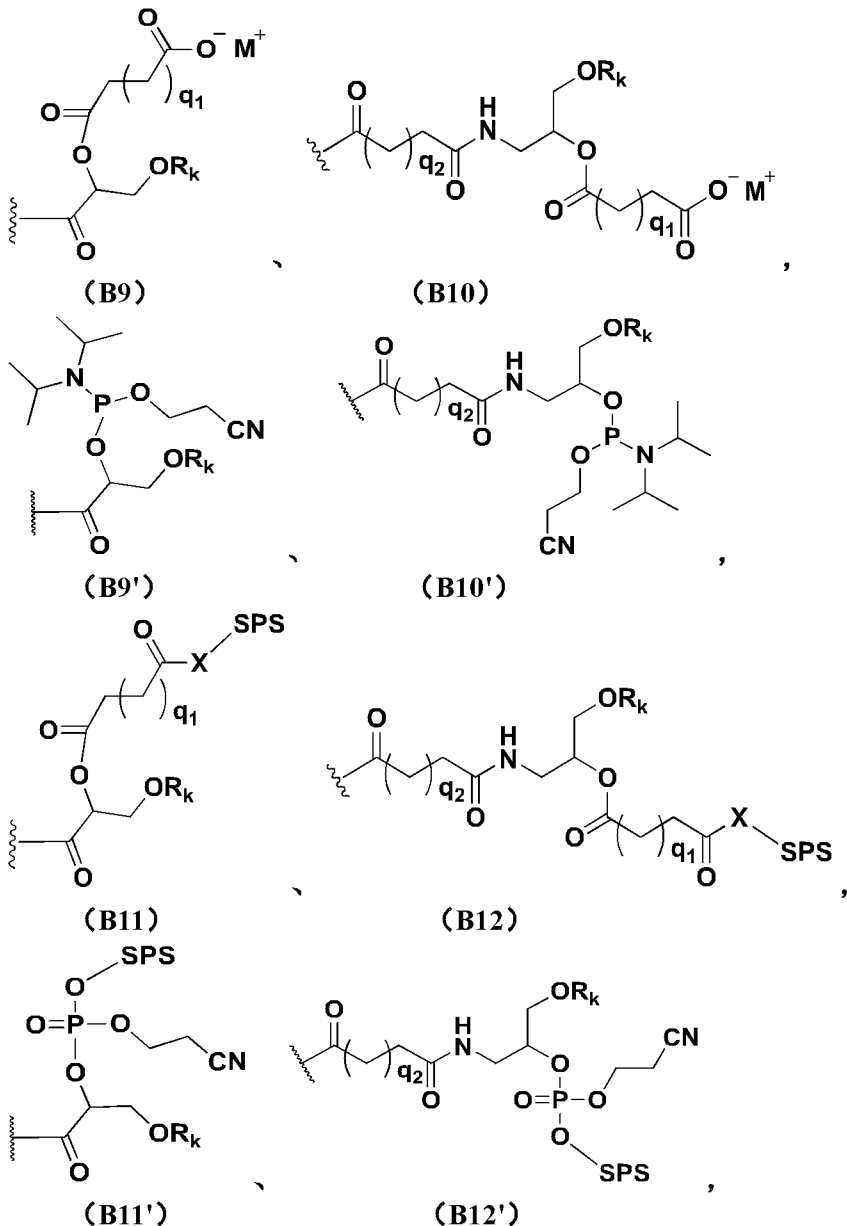
在一些实施方案中，所述第 1 官能团含有被保护的羟基。在一些实施方案中，所述第 2 官能团包含可与固相载体反应的基团，所述反应提供包含固相载体的缀合分子。在一些实施方案中，所述第 2 官能团含有羧基、羧酸盐或亚磷酸胺，如式 (C1)、(C2) 或 (C3) 所示，当所述第 2 官能团包含羧基或羧酸盐时，式 (321) 所示化合物与固相载体，例如树脂上的羟基或氨基进行酯化反应或酰胺化反应，形成经羧酸酯键连接的包含固相载体的缀合分子。当所述第 2 官能团包

含亚磷酸胺官能团时，式(321)所示化合物与通用固相载体，例如树脂上的羟基发生偶联反应，并经氧化形成经磷酸二酯键连接的包含固相载体的缀合分子。随后，以上述连接固相载体后的产物作为起始，按照亚磷酸胺固相合成方法依次连接核苷单体，获得连接有缀合基团的 siRNA 的正义链或反义链。在亚磷酸胺固相合成过程中，所述第 1 官能团发生脱保护，随后在偶联反应条件下与核苷单体上的亚磷酸胺基团发生偶联。

在一些实施方案中，所述第 1 官能团含有羟基或被保护的羟基；所述第 2 官能团含有经羧酸酯键连接的固相载体或经酰胺键连接的固相载体或经磷酸酯键连接的固相载体，如式(C1')或(C3')所示。此时，由式(321)所示化合物代替固相载体作为起始，按照亚磷酸胺固相合成方法依次连接核苷单体，获得连接有缀合基团的 siRNA 的正义链或反义链。

在一些实施方案中，羧酸盐可以表示为  $-COO^-M^+$ ，其中， $M^+$  是阳离子，例如选自金属阳离子，铵阳离子  $NH_4^+$ ，有机铵阳离子中的一种。在一种实施方案中，所述金属离子选自碱金属离子中的一种，如  $K^+$  或  $Na^+$ 。出于提高溶解性、使反应顺利进行的考虑，在一些实施方案中，有机铵离子为三级胺形成的铵阳离子或季铵阳离子，如，三乙胺形成的铵离子或 N,N-二异丙基乙胺形成的铵离子。在一些实施方案中，羧酸盐是三乙胺羧酸盐或 N,N-二异丙基乙胺羧酸盐。

在一些实施方案中， $R_4$  含有式(B9)、(B10)、(B9')、(B10')、(B11)、(B12)、(B11')或(B12')所示的结构：



其中， $q_1$  为 1-4 的整数， $q_2$  为 1-10 的整数，X 为 O 或 NH， $M^+$  为阳离子， $R_k$  为羟基保护基团，SPS 表示固相载体， $\sim$  表示基团共价连接的位点。在一些实施方案中， $q_1$  为 1 或 2。在一些实施方案中， $q_2$  为 1-5 的整数。在一些实施方案中， $R_4$  含有式(B9)或(B10)所示的结构。在一些实施方案中， $R_4$  含有式(B11)或(B12)所示的结构。

在一些实施方案中,  $R_k$  是 Tr (三苯甲基)、MMTr (4-甲氧基三苯甲基)、DMTr (4,4'-二甲氧基三苯甲基)、TMTr (4,4',4'-三甲氧基三苯甲基) 中的一种或多种。在一些实施方案中,  $R_k$  可以是 DMTr, 即 4,4'-二甲氧基三苯甲基 (4,4'-dimethoxytrityl)。

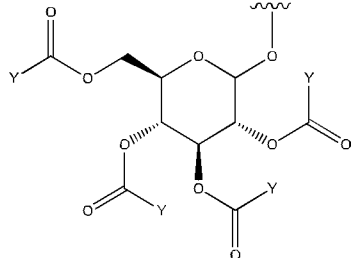
$L_1$  的定义如前所述。

5 在一些实施方案中,  $L_1$  被用于将  $M_1$  靶向基团连接至含氮骨架上的 N 原子, 从而为式 (308) 所示的 siRNA 缀合物提供肝靶向功能。在一些实施方案中,  $L_1$  包含 A1-A26 中的任一个或其组合。

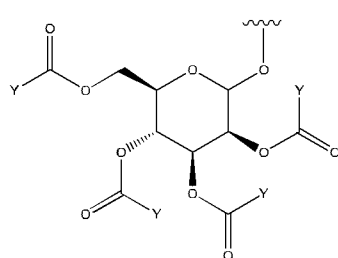
10 根据上述描述, 本领域技术人员容易理解的是, 相较于本领域公知的亚磷酰胺固相合成方法而言, 可通过上述第 1 官能团以及任选的第 2 官能团, 获得将缀合分子连接至核苷酸序列的任意可能的位置的式 (308) 所示的 siRNA 缀合物, 例如, 缀合分子连接至核苷酸序列的端部, 缀合分子连接至核苷酸序列的末端。相应地, 除非另有说明, 以下涉及缀合物和/或缀合分子的制备的描述中, 当提及“脱保护”、“偶联”、“盖帽”、“氧化”、“硫化”等反应时, 应当理解为本领域公知的亚磷酰胺核酸固相合成方法中所涉及的反应条件和试剂也同样适用于这些反应。示例性的反应条件和试剂将在后文详细描述。

15 在一些实施方案中, 每个  $S_1$  独立地是  $M_1$ 。在一些实施方案中, 每个  $S_1$  独立地是  $M_1$  中至少一个活性羟基被羟基保护基团保护而形成的基团。在一些实施方案中, 每个  $S_1$  独立地是  $M_1$  中任何存在的活性羟基全部被羟基保护基团保护而形成的基团。在一些实施方案中, 任何本领域技术人员已知的羟基保护基团均可被用于保护  $M_1$  中的活性羟基。在一些实施方案中, 被保护的羟基可以式 YCOO- 表示, 其中, 每个 Y 独立地选自于由  $C_1$ - $C_{10}$  烷基和  $C_6$ - $C_{10}$  芳基所组成的组, 所述  $C_1$ - $C_{10}$  烷基和  $C_6$ - $C_{10}$  芳基任选地被一个或多个取代基取代, 所述取代基选自于由卤素和  $C_1$ - $C_6$  烷基所组成的组。在一些实施方案中, 每个 Y 独立地选自于由以下基团所组成的组: 甲基、三氟甲基、二氟甲基、单氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤苯基, 以及  $C_1$ - $C_6$  烷基苯基。

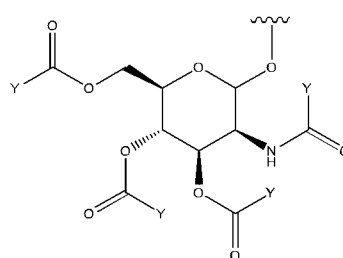
20 在一些实施方案中, 每个  $S_1$  各自独立地选自于由式 A46-A54 所组成的组:



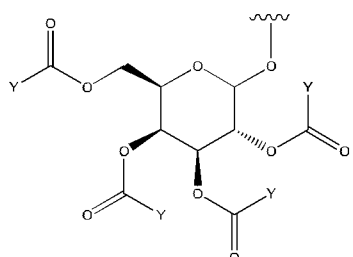
(A46)



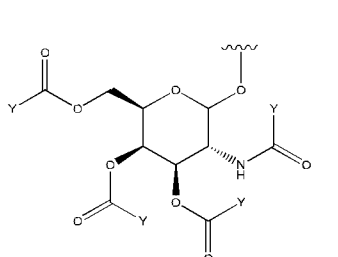
(A47)



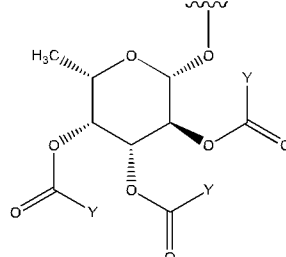
(A48)



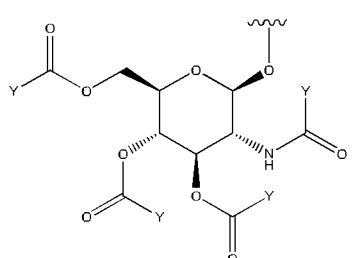
(A49)



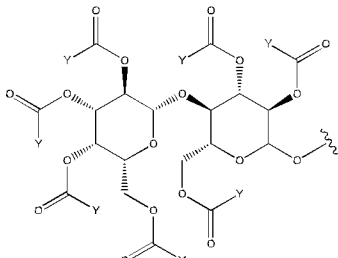
(A50)



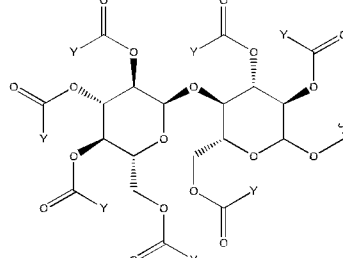
(A51)



(A52)



(A53)



(A54)

30 在一些实施方案中,  $S_1$  为式 A49 或 A50。

在一些实施方案中, 每个 Y 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种; 在一些实施方案中, Y 为甲基。

如前所述, 式 (308) 所示的 siRNA 缀合物的制备方法还包括以下步骤: 合成 siRNA 的另一

链(例如,当上述步骤合成了连接有缀合分子的 siRNA 正义链时,还包括按照固相合成方法合成 siRNA 的反义链,反之亦然),分离正义链和反义链,以及退火。具体地,在分离步骤中,连接至核苷酸序列和/或缀合分子的固相载体被切割下来,同时必要的保护基团被脱除(此时,式(321)所示化合物中的各  $S_1$  基团转化为对应的  $M_1$  靶向基团),获得连接有缀合分子的 siRNA 正义链(或反义链)以及对应的反义链(或正义链),正义链与反义链退火形成双链 RNA 结构,获得式(308)所示的 siRNA 缀合物。

在一些实施方案中,式(308)所示的 siRNA 缀合物的制备方法包含以下步骤:在偶联反应条件和偶联试剂存在下,将式(321)所示的化合物与正义链或反义链的 3'端的第一个核苷单体接触,使式(321)所示的化合物连接上序列中第一个核苷酸,在亚磷酸胺固相合成的条件下,按照期望的正义链或反义链核苷酸种类和顺序,按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接,合成 siRNA 的正义链或反义链;其中,式(321)所示化合物为  $R_4$  中含有第 1 官能团和第 2 官能团,第 1 官能团含有被保护的羟基,第 2 官能团具有如式(C1')或(C3')所示结构的化合物,与第一个核苷单体连接前,式(321)所示化合物经过脱保护;每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应;得到连接有缀合基团的核酸的正义链或反义链;在亚磷酸胺固相合成的条件下,按照反义链或正义链核苷酸种类和顺序,按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接,合成核酸的反义链或正义链;每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应;脱除保护基并与固相载体切割,分离纯化获得正义链和反义链,退火。

在一些实施方案中,式(308)所示的 siRNA 缀合物的制备方法包含以下步骤:按照该双链 siRNA 中正义链或反义链的核苷酸种类和顺序,按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接,合成正义链和反义链,每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应,得到连接在固相载体上的正义链和连接在固相载体上的反义链;在偶联反应条件和偶联试剂存在下,将式(321)所示的化合物与连接在固相载体上的正义链或连接在固相载体上的反义链接触,将式(321)所示化合物连接至正义链或反义链,其中,式(321)所示化合物是  $R_4$  中含有第 1 官能团,第 1 官能团为亚磷酸胺基团的式(321)所示化合物;脱除保护基并与固相载体切割,分别分离纯化,获得 siRNA 的正义链或反义链,退火,其中,所述 siRNA 的正义链或反义链上连接有缀合基团。

在一些实施方案中,式 A59 中的 P 原子连接至 siRNA 中的正义链的 3'末端,式(308)所示的 siRNA 缀合物的制备方法包括:

(1) 脱除上述式(321)所示化合物(其中,式(321)所示化合物为  $R_4$  中含有第 1 官能团和第 2 官能团,第 1 官能团含有被保护的羟基  $OR_k$ ,第 2 官能团具有如式(C1')或(C3')所示结构的化合物)中的羟基保护基团  $R_k$ ;在偶联反应条件和偶联试剂存在下,将脱保护得到的产物与核苷单体接触,得到通过缀合分子连接至固相载体的核苷单体;

(2) 以该通过缀合分子连接至固相载体的核苷单体起始,按照 3'-5'的方向通过亚磷酸胺固相合成方法合成 siRNA 的正义链;

(3) 通过亚磷酸胺固相合成方法,合成 siRNA 的反义链;

(4) 分离出 siRNA 的正义链和反义链并退火,获得式(308)所示的 siRNA 缀合物。

其中,在步骤(1)中,脱除式(321)所示化合物中的保护基团  $R_k$  的方法包括在脱保护条件下,将式(321)所示化合物与脱保护试剂接触。脱保护条件包括温度为 0-50℃,在一些实施方案中为 15-35℃,反应时间为 30-300 秒,在一些实施方案中为 50-150 秒,脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一种或多种,在一些实施方案中为二氯乙酸。脱保护试剂与式(321)所示化合物的摩尔比为 10:1-1000:1,在一些实施方案中为 50:1-500:1。

所述偶联反应条件和偶联试剂可使用任何适合于上述偶联反应的条件和试剂。在一些实施方案中,可使用与所采用的固相合成方法中的偶联反应相同的条件与试剂。

在一些实施方案中,所述偶联反应的条件包括反应温度为 0-50℃,在一些实施方案中为 15-35℃。式(321)所示化合物与核苷单体的摩尔比为 1:1-1:50,在一些实施方案中为 1:2-1:5;式(321)所示化合物和偶联试剂的摩尔比可以为 1:1-1:50,在一些实施方案中为 1:3-1:10,反应时间为 200-3000 秒,在一些实施方案中为 500-1500 秒。偶联试剂选自 1H-四氮唑、5-乙硫基 1H-四氮唑、5-苄硫基 1H-四氮唑中的一种或多种,在一些实施方案中为 5-乙硫基 1H-四氮唑。所述偶联反应可在有机溶剂中进行,所述有机溶剂选自无水乙腈、无水 DMF、无水二氯甲烷中的一种或多种,在一些实施方案中为无水乙腈。相对于式(321)所示化合物,所述有机溶剂的用量为 3-50L/mol,在一些实施方案中为 5-20L/mol。

在步骤(2)中,通过亚磷酸胺核酸固相合成的方法,利用上述步骤制备的通过缀合分子连接至固相载体的核苷单体起始,按照 3'-5'的方向合成 siRNA 缀合物的正义链 SS。此时,缀合基团连接至所得到的正义链的 3'末端。

步骤(2)和(3)中所述固相合成的其它条件,包括核苷单体脱保护条件、脱保护试剂种类和用量、偶联反应条件、偶联试剂的种类和用量、盖帽反应的条件、盖帽试剂的种类和用量、氧化反应条件、氧化试剂种类和用量、硫化反应条件、硫化试剂种类和用量采用本领域中常规使用

的各种试剂、用量和条件。

例如，在一些实施方案中，步骤（2）和（3）中所述固相合成可使用如下条件：

核苷单体脱保护条件包括温度为 0-50℃，在一些实施方案中为 15-35℃，反应时间为 30-300 秒，在一些实施方案中为 50-150 秒，脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸、中的一种或多种，在一些实施方案中为二氯乙酸。脱保护试剂与固相载体上 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基的的摩尔比可以为 2:1-100:1，在一些实施方案中为 3:1-50:1。

偶联反应条件包括温度为 0-50℃，在一些实施方案中为 15-35℃，固相载体上连接的核酸序列与核苷单体的摩尔比可以为 1:1-1:50，在一些实施方案中为 1:5-1:15；固相载体上连接的核酸序列和偶联试剂的摩尔比为 1:1-1:100，在一些实施方案中为 1:50-1:80，反应时间和偶联试剂的选择与前述相同。

盖帽反应条件包括温度为 0-50℃，在一些实施方案中为 15-35℃，反应时间为 5-500 秒，在一些实施方案中为 10-100 秒，盖帽试剂的选择与前述相同。盖帽试剂的总量与固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 1:100-100:1，在一些实施方案中为 1:10-10:1。在盖帽试剂使用等摩尔量的乙酸酐与 N-甲基咪唑的情况下，乙酸酐、N-甲基咪唑以及固相载体上连接的核酸序列的摩尔比可为 1:1:10-10:10:1，在一些实施方案中为 1:1:2-2:2:1。

氧化反应条件包括温度为 0-50℃，在一些实施方案中为 15-35℃，反应时间为 1-100 秒，在一些实施方案中为 5-50 秒，氧化试剂在一些实施方案中为碘（在一些实施方案中，以碘水的形式提供）。氧化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比可以为 1:1-100:1，在一些实施方案中为 5:1-50:1。在一些实施方案中，所述氧化反应在四氢呋喃:水:吡啶=3:1:1-1:1:3 的混合溶剂中进行。硫化反应条件包括温度为 0-50℃，在一些实施方案中为 15-35℃，反应时间为 50-2000 秒，在一些实施方案中为 100-1000 秒，硫化试剂在一些实施方案中为硫化黄原素。硫化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 10:1-1000:1，在一些实施方案中为 10:1-500:1。在一些实施方案中，所述硫化反应在乙腈:吡啶=1:3-3:1 的混合溶剂中进行。

在将所有核苷单体连接之后，退火之前，该方法还包括分离出 siRNA 的正义链和反义链。分离的方法为本领域技术人员所公知，一般包括将合成得到的核苷酸序列从固相载体上切割下来，脱除碱基上、磷酸基上和配体上的保护基团，纯化和脱盐。

将合成得到的核苷酸序列从固相载体上切割下来，并脱除碱基上、磷酸基上和配体上的保护基团可按照 siRNA 合成中常规的切割和脱保护方法进行。例如，将得到的连接有固相载体的核苷酸序列与浓氨水接触；在脱保护的过程中，A46-A54 基团的保护基团 YCOO- 转化为羟基，S<sub>1</sub> 基团转化为相应的 M<sub>1</sub> 基团，生成式（308）所示的 siRNA 缀合物。其中，所述浓氨水可以是 25-30 重量%的氨水，浓氨水的用量与目标 siRNA 序列相比可以为 0.2ml/μmol-0.8ml/μmol。

在所合成的核苷酸序列上存在至少一个 2'-TBDMS 保护时，所述方法还包括将脱除了固相载体的核苷酸序列与三乙胺三氢氟酸盐接触，以脱除该 2'-TBDMS 保护。此时，所得到的目标 siRNA 序列中的相应核苷酸具有游离的 2'-羟基。三乙胺三氢氟酸盐纯品的用量与目标 siRNA 序列相比可以为 0.4ml/μmol-1.0ml/μmol。这样即可得到式（308）所示的 siRNA 缀合物。

纯化和脱盐的方法是本领域技术人员熟知的。例如，可利用制备型离子色谱纯化柱，通过 NaBr 或 NaCl 的梯度洗脱，完成核酸的纯化；产品收集合并后，可采用反相色谱纯化柱进行脱盐。

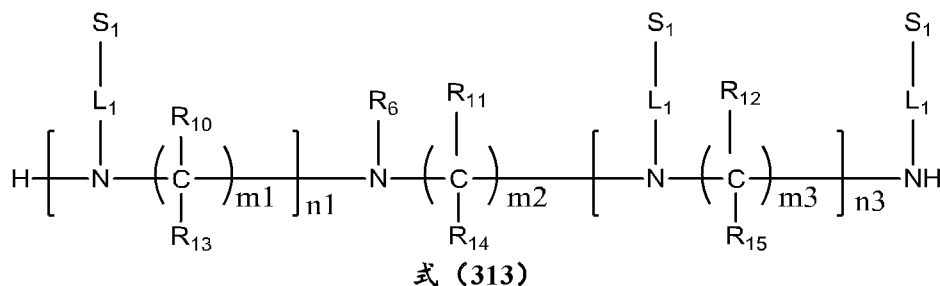
这样得到的式（308）所示的 siRNA 缀合物中，核苷酸之间的磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子基本与钠离子结合，式（308）所示的 siRNA 缀合物基本以钠盐形式存在。可以采用熟知的离子交换方法，用氢离子和/或其他阳离子取代所述钠离子，得到其他形式的式（308）所示的 siRNA 缀合物。所述阳离子如前所述。

在合成过程中，可随时对核酸序列的纯度和分子量进行检测，更好地把控合成质量，此类检测的方法为本领域技术人员所公知。例如，可通过离子交换色谱检测核酸纯度，并通过液质联用色谱（LC-MS）测定分子量。

退火的方法也是本领域技术人员熟知的。例如，可简单地将所合成的正义链（S 链）与反义链（AS 链）以等摩尔比混合在注射用水中加热至 70-95℃，随后室温冷却，使其通过氢键形成双链结构。这样即可得到式（308）所示的 siRNA 缀合物。

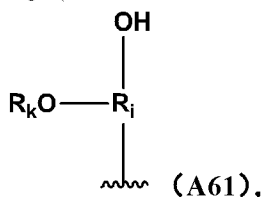
在获得所述缀合物后，在一些实施方案中，还可利用例如液质联用色谱等方法，通过分子量检测等方式对所合成的式（308）所示的 siRNA 缀合物进行表征，确定所合成的 siRNA 缀合物为目标设计的式（308）所示的 siRNA 缀合物，且所合成的 siRNA 的序列为期望的 siRNA 的序列，例如为表 1a-表 1d 中所列的序列之一。

式（321）所示化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括在有机溶剂中，在酯化反应条件下，以及在碱和酯化催化剂存在下，将式（313）所示化合物与环状酸酐接触，离子交换，分离得到式（321）所示化合物：



其中, n1、n3、m1、m2、m3、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>、R<sub>15</sub>、L<sub>1</sub>、S<sub>1</sub>各自的定义和可选择的范围如前所述;

5 R<sub>6</sub>为提供式(321)中R<sub>4</sub>的基团;在一些实施方案中,R<sub>6</sub>具有式(A61)所示的结构:



其中,R<sub>i</sub>为能够实现与含氮骨架上的N原子连接、与R<sub>k</sub>O连接并且连接有一个游离羟基的任意基团,R<sub>k</sub>为羟基保护基团。此时,所获得的是R<sub>4</sub>中含有作为羟基保护基团的第1官能团和第2官能团,所述第2官能团含有如式(C1)或(C2)所示结构的式(321)所示化合物。

10 所述酯化反应条件包括反应温度为0-100℃,反应时间为8-48小时,在一些实施方案中,所述酯化反应条件为反应温度为10-40℃,反应时间为20-30小时。

15 在一些实施方案中,所述有机溶剂包含环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。在一些实施方案中,所述环氧类溶剂为二氧六环和/或四氢呋喃,所述醚类溶剂为乙醚和/或甲基叔丁基醚,所述卤代烷类溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一种或多种。在一些实施方案中,所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于所述式(313)所示化合物,所述有机溶剂的用量为3-50L/mol,在一些实施方案中为5-20L/mol。

20 在一些实施方案中,所述环状酸酐为丁二酸酐、戊二酸酐、己二酸酐或庚二酸酐中的一种,在一些实施方案中为丁二酸酐。所述环状酸酐与所述式(313)所示化合物的摩尔比为1:1-10:1,在一些实施方案中为2:1-5:1。

所述酯化催化剂可以是任何对该酯化反应起到催化作用的催化剂,例如该催化剂可以是4-二甲氨基吡啶。所述催化剂与式(313)所示化合物的摩尔比为1:1-10:1,在一些实施方案中为2:1-5:1。

25 在一些实施方案中,所述碱可以是任意的无机碱,有机碱或者它们的结合。考虑溶解性和产物稳定性,所述碱可以是例如三级胺。在一些实施方案中,所述三级胺为三乙胺或N,N-二异丙基乙胺。所述三级胺与式(313)所示化合物的摩尔比为1:1-20:1,在一些实施方案中为3:1-10:1。

30 所述离子交换作用是将式(321)所示化合物转化为期望的羧酸或羧酸盐的形式,离子交换的方法为本领域技术人员所公知,可以使用合适的离子交换溶液和交换条件,得到具有M<sup>+</sup>阳离子的缀合分子,在此不做详述。在一些实施方案中,所述离子交换反应使用三乙胺磷酸盐溶液进行,所述三乙胺磷酸盐溶液的浓度为0.2-0.8M,在一些实施方案中,所述三乙胺磷酸盐溶液的浓度为0.4-0.6M,相对于式(313)所示化合物,所述三乙胺磷酸盐溶液的用量为3-6L/mol,在进一步的实施方案中为4-5L/mol。

35 可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式(321)所示化合物。在一些实施方案中,可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式(321)所示化合物,例如,可使用如下两种色谱条件进行分离:(1)正相纯化硅胶:200-300目硅胶填料,使用含1wt%三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20梯度洗脱;或者(2)反相纯化:C18、C8反相填料,使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度洗脱。在一些实施方案中,可以直接除去溶剂得到式(321)所示化合物粗产品,该粗产品可以直接用于后续反应。

40 在一些实施方案中,式(321)所示化合物的制备方法还进一步包括在缩合反应条件下,在有机溶剂中,在缩合剂、缩合催化剂和三级胺的存在下,将上述离子交换反应得到的产物进一步与含有氨基或羟基的固相载体进行接触。此时,所获得的是R<sub>4</sub>中含有第1官能团和第2官能团,第1官能团含有羟基保护基团,第2官能团含有如式(C1')所示结构的式(321)所示化合物。

45 所述固相载体为固相合成siRNA中所用的载体中的一种,其中的一些为本领域技术人员所公知。例如,所述固相载体可以选自含有活性羟基或氨基官能团的固相载体,在一些实施方案中,所述固相载体为氨基树脂或羟基树脂。在一些实施方案中,所述氨基或羟基树脂具有如下参数:粒径100-400目(mesh),表面氨基或羟基载量为0.2-0.5mmol/g。所述式(321)所示化合物与固相

载体的用量比为 10-400  $\mu\text{mol}$  化合物/每克固相载体 ( $\mu\text{mol/g}$ )。在一些实施方案中, 所述式 (321) 所示化合物与固相载体的用量比为 50-200 $\mu\text{mol/g}$ 。

所述有机溶剂可以是本领域技术人员已知的任何合适的溶剂或混合溶剂。在一些实施方案中, 所述有机溶剂为乙腈、环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。在一些实施方案中, 所述环氧类溶剂为二氧六环和/或四氢呋喃, 所述醚类溶剂为乙醚和/或甲基叔丁基醚, 所述卤代烷类溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷中的一种或多种。在一些实施方案中, 所述有机溶剂为乙腈。相对于式 (321) 所示化合物, 所述有机溶剂的用量为 20-200L/mol, 在一些实施方案中为 50-100L/mol。

在一些实施方案中, 所述缩合剂可以是苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸酯/盐 (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate, PyBop)、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮 (3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one, DEPBT) 和/或 O-苯并三唑-四甲基脲六氟磷酸酯/盐 (O-benzotriazol-1-yl-tetramethyluronium hexafluorophosphate), 在一些实施方案中, 所述缩合剂为 O-苯并三唑-四甲基脲六氟磷酸酯。所述缩合剂与式 (321) 所示化合物的摩尔比为 1:1-20:1, 在其它实施方案中为 1:1-5:1。

在一些实施方案中, 所述三级胺为三乙胺和/或 N,N-二异丙基乙胺, 在一些实施方案中为 N,N-二异丙基乙胺; 所述三级胺与式 (321) 所示化合物的摩尔比为 1:1-20:1, 在一些实施方案中为 1:1-5:1。

在一些实施方案中, 式 (321) 所示化合物的制备方法还可以包括在盖帽反应条件下, 在有机溶剂中, 将得到的缩合产物与盖帽试剂和酰化催化剂接触, 分离得到式 (321) 所示化合物。所述盖帽反应的作用在于除去任何尚未反应完全的活性反应官能团, 以避免在后续反应中产生不必要的副产物。所述盖帽反应的条件包括反应温度为 0-50 $^{\circ}\text{C}$ , 在一些实施方案中为 15-35 $^{\circ}\text{C}$ , 反应的时间为 1-10h, 在一些实施方案中为 3-6h。盖帽试剂可以使用 siRNA 固相合成中所使用的盖帽试剂, siRNA 固相合成中所使用的盖帽试剂为本领域技术人员所公知。

在一些实施方案中, 所述盖帽试剂由盖帽试剂 1 (cap1) 和盖帽试剂 2 (cap2) 组成, 其中, 盖帽试剂 1 为 N-甲基咪唑, 在一些实施方案中以 N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液形式提供, 其中, 吡啶与乙腈的体积比为 1:10-1:1, 在一些实施方案中为 1:3-1:1, 吡啶与乙腈的总体积与 N-甲基咪唑的体积比为 1:1-10:1, 在一些实施方案中为 3:1-7:1。所述盖帽试剂 2 为乙酸酐。在一些实施方案中, 所述盖帽试剂 2 以乙酸酐的乙腈溶液形式提供, 其中, 乙酸酐和乙腈的体积比为 1:1-1:10, 在进一步的实施方案中为 1:2-1:6。

在一些实施方案中, 所述 N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液的体积与式 (321) 所示化合物的质量之比为 5ml/g-50ml/g, 在一些实施方案中为 15ml/g-30ml/g。所述乙酸酐的乙腈溶液的体积与式 (321) 所示化合物的质量之比为 0.5ml/g-10ml/g, 在一些实施方案中为 1ml/g-5ml/g。

在一些实施方案中, 盖帽试剂使用等摩尔量的乙酸酐与 N-甲基咪唑。在一些实施方案中, 所述有机溶剂为乙腈、环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。在一些实施方案中, 所述有机溶剂为乙腈。相对于式 (321) 所示化合物, 所述有机溶剂的用量为 10-50L/mol, 在一些实施方案中为 5-30L/mol。

在一些实施方案中, 所述酰化催化剂可以选自任何可用于酯化缩合或酰胺化缩合的催化剂, 例如碱性杂环化合物。在一些实施方案中, 所述酰化催化剂为 4-二甲氨基吡啶。所述催化剂与式 (321) 所示化合物的质量之比为 0.001:1-1:1, 在一些实施方案中为 0.01:1-0.1:1。

在一些实施方案中, 可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式 (321) 所示化合物。在一些实施方案中, 可通过以有机溶剂充分洗涤, 并过滤, 去除未反应的反应物、过量的盖帽试剂及其它杂质, 得到式 (321) 所示化合物, 所述有机溶剂选自乙腈、二氯甲烷、甲醇, 在一些实施方案中为乙腈。

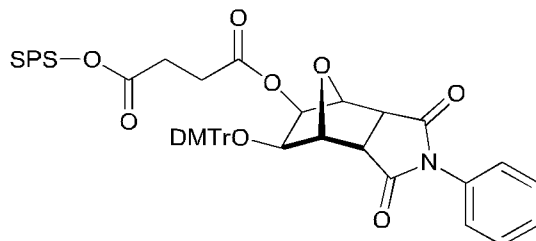
在一些实施方案中, 式 (321) 所示缀合分子的制备方法包括在有机溶剂中, 在偶联反应条件下, 以及在偶联试剂存在下, 将式 (313) 所示化合物与亚磷酰二胺接触, 分离得到式 (321) 所示化合物。此时, 所获得的是  $R_4$  中含有第 1 官能团和第 2 官能团, 第 1 官能团含有羟基保护基团, 第 2 官能团含有如式 (C3) 所示结构的式 (321) 所示化合物。

在一些实施方案中, 偶联反应条件包括温度可以为 0-50 $^{\circ}\text{C}$ , 例如为 15-35 $^{\circ}\text{C}$ , 式 (313) 所示化合物与亚磷酰二胺的摩尔比可以为 1:1-1:50, 例如为 1:5-1:15; 式 (313) 所示化合物和偶联试剂的摩尔比可以为 1:1-1:100, 例如为 1:50-1:80; 反应时间可以为 200-3000 秒, 例如为 500-1500 秒。所述亚磷酰二胺例如可使用双(二异丙基氨基)(2-氧基乙氧基)膦, 其可商购获得或按照本领域中公知的方法合成获得。偶联试剂选自 1H-四氮唑、5-乙硫基 1H-四氮唑、5-苄硫基 1H-四氮唑中的一种或多种, 例如为 5-乙硫基 1H-四氮唑。所述偶联反应可在有机溶剂中进行, 所述有机溶剂选自无水乙腈、无水 DMF、无水二氯甲烷中的一种或多种, 例如为无水乙腈。在一些实施方案中, 相对于式 (313) 所示化合物, 所述有机溶剂的用量为 3-50L/mol, 例如可以为 5-20L/mol。通过进行该偶联反应, 式 (313) 所示化合物中的羟基与亚磷酰二胺反应形成亚磷酰胺基团。在一些

实施方案中，可以直接除去溶剂得到式(321)所示化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方案中，式(321)所示化合物的制备方法还进一步包括以下步骤：在偶联反应条件下，在有机溶剂中，以及在偶联试剂存在下，将分离得到的产物进一步与含有羟基的固相载体进行接触。随后，经盖帽反应、氧化反应，分离得到式(321)所示化合物。此时，所获得的是R<sub>4</sub>中含有第1官能团和第2官能团，第1官能团含有羟基保护基团，第2官能团具有如式(C3')所示结构的式(321)所示化合物。

在一些实施方案中，所述固相载体为本领域中公知的可用于核酸固相合成的固相载体，例如，可以是经脱保护反应后的市售的通用固相载体(NittoPhase®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support, Kinovate Life Sciences 公司，结构如式 B80 所示)：



(B80)。

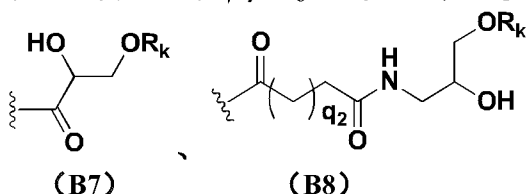
脱保护反应为本领域技术人员所公知。在一些实施方案中，脱保护条件包括温度为 0-50℃，例如为 15-35℃；反应时间为 30-300 秒，例如为 50-150 秒。脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氟乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一种或多种，在一些实施方案中，脱保护试剂为二氯乙酸。脱保护试剂与固定相上的-DMTr (4,4'-二甲氧基三苯甲基) 保护基的摩尔比为 2:1-100:1，例如为 3:1-50:1。通过进行所述脱保护，在所述固相载体表面上获得具有反应活性的游离羟基，便于进行后续的偶联反应。

偶联反应条件以及偶联试剂的选择可如上所述。通过进行该偶联反应，脱保护反应中形成的游离羟基与亚磷酸胺基团反应形成亚磷酸酯连接。

在一些实施方案中，盖帽反应条件包括温度为 0-50℃，例如为 15-35℃，反应时间为 5-500 秒，例如为 10-100 秒，所述盖帽反应在盖帽试剂存在下进行。盖帽试剂的选择和用量可如上所述。

氧化反应条件包括温度为 0-50℃，例如可以为 15-35℃，反应时间为 1-100 秒，例如可以为 5-50 秒，氧化试剂例如可以为碘(在一些实施方案中，以碘水的形式提供)。在一些实施方案中，氧化试剂与连接至固相载体的核酸序列的摩尔比为 1:1-100:1，例如可以为 5:1-50:1。在一些实施方案中，所述氧化反应在四氢呋喃:水:吡啶=3:1:1-1:1:3 的混合溶剂中进行。

在一些实施方案中，R<sub>6</sub>为式 B7 或 B8 基团中的一种，

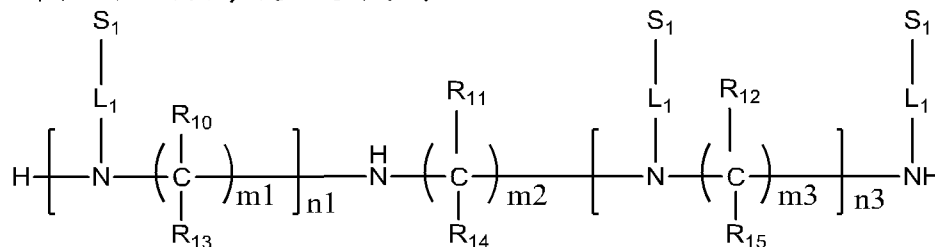


(B7)

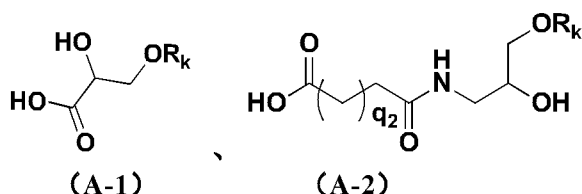
(B8)

其中 q<sub>2</sub> 的定义如前所述，

此时，式(313)所示化合物可以通过以下制备方法得到：在有机溶剂中，在酰胺化反应条件下，以及在酰胺化反应缩合剂和三级胺存在下，将式(314)所示化合物与式(A-1)所示化合物或式(A-2)所示化合物接触，随后进行分离：



式(314)



其中,  $n_1$ 、 $n_3$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $S_1$ 、 $q_2$  和  $R_k$  各自的定义和可选择的范围如前所述。

5 所述酰胺化反应条件可包括反应温度为 0-100℃, 反应时间为 1-48 小时, 在一些实施方案中, 所述酰胺化反应条件为反应温度为 10-40℃, 反应时间为 2-16 小时。

10 在一些实施方案中, 所述有机溶剂为醇类溶剂、环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、*N,N*-二甲基甲酰胺和 *N,N*-二异丙基乙胺中的一种或多种。所述醇类溶剂在一些实施方案中为甲醇、乙醇、丙醇中的一种或多种, 在一些实施方案中为乙醇。所述环氧类溶剂在一些实施方案中为二氧六环和/或四氢呋喃。所述醚类溶剂在一些实施方案中为乙醚和/或甲基叔丁基醚。所述卤代烷类溶剂在一些实施方案中为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷中的一种或多种。在一些实施方案中, 所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式 (314) 所示化合物, 有机溶剂用量为 3-50L/mol, 在进一步的实施方案中为 3-20L/mol。

15 在一些实施方案中, 所述酰胺化反应缩合剂为苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐、2-乙氧基-1-乙氧羰酰基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ) 或 *O*-苯并三唑-四甲基脲六氟磷酸盐/酯, 在进一步的实施方案中为 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮。所述酰胺化反应缩合剂与式 (314) 所示化合物的摩尔比可以为 1:1-10:1, 在一些实施方案中为 2.5:1-5:1。

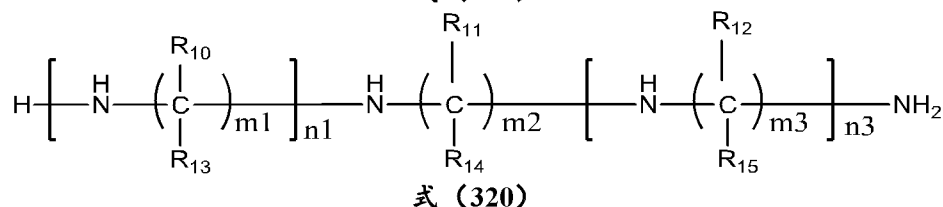
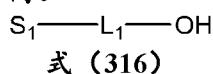
20 在一些实施方案中, 所述三级胺为三乙胺或 *N,N*-二异丙基乙胺, 在进一步的实施方案中为 *N,N*-二异丙基乙胺。所述三级胺与式 (314) 所示化合物的摩尔比为 3:1-20:1, 在一些实施方案中为 5:1-10:1。

25 在一些实施方案中, 式 (A-1) 和式 (A-2) 所示化合物可通过任何适当的方式制备。例如, 当  $R_k$  为 DMTr 基团时, 可通过甘油酸钙与 DMTrCl 反应制备式 (A-1) 所示化合物; 类似地, 可先将 3-氨基-1,2-丙二醇与环状酸酐接触, 然后再与 DMTrCl 反应制备式 (A-2) 所示化合物, 所述环状酸酐可以是碳原子数为 4-13、在一些实施方案中为 4-8 的环状酸酐。本领域技术人员容易理解的是, 所述环状酸酐的选择对应于 (A-2) 所示化合物中  $q_2$  的不同值, 例如, 当所述环状酸酐为丁二酸酐时,  $q_2=1$ , 当所述环状酸酐为戊二酸酐时,  $q_2=2$ , 以此类推。

30 在一些变型中, 也可通过使式 (314) 所示化合物依次与所述环状酸酐、3-氨基-1,2-丙二醇和 DMTrCl 反应, 制备式 (313) 所示化合物。本领域技术人员容易理解的是, 这些变型不会影响式 (313) 所示化合物的结构与功能, 并且这些变型是本领域技术人员在上述方法的基础上容易实现的。

35 与上述类似地, 可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式 (313) 所示化合物。在一些实施方案中, 可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式 (313) 所示化合物, 例如, 可使用如下两种色谱条件进行分离: (1) 正相纯化硅胶: 200-300 目硅胶填料, 使用石油醚: 乙酸乙酯: 二氯甲烷: *N,N*-二甲基甲酰胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6 梯度洗脱; 以及 (2) 反相纯化: C18、C8 反相填料, 使用甲醇: 乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方案中, 可以直接除去溶剂得到式 (313) 所示化合物粗产品, 该粗产品可以直接用于后续反应。

40 在一些实施方案中, 式 (314) 所示化合物可以通过以下制备方法得到: 该方法包括在有机溶剂中, 在酰胺化反应缩合剂和三级胺存在下, 在缩合反应条件下, 将式 (320) 所示化合物与式 (316) 所示化合物接触, 随后进行分离:



45 其中,  $n_1$ 、 $n_3$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$  各自的定义和可选择的范围如前所述。

式 (316) 所示化合物可使用例如 J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961 中所公开的化合物, 或者, 式 (316) 所示化合物可由本领域技术人员通过各种方法制备, 例如, 可参照美国专

利 US 8,106,022 B2 实施例 1 中所公开的方法制备某些式 (316) 所示化合物, 以引用的方式将以上文献的全部内容整体并入本文。

在一些实施方案中, 所述缩合反应条件包括反应温度为 0-100°C, 反应时间为 0.1-24 小时, 在一些实施方案中为反应温度为 10-40°C, 反应时间为 0.5-16 小时。

考虑到期望产物式 (314) 所示化合物的结构, 所述式 (316) 所示化合物与式 (320) 所示化合物的摩尔比应当基于与式 (320) 中  $n_1$  与  $n_3$  的和而确定。在一些实施方案中, 例如, 当  $n_1+n_3=3$  时, 为了保证反应完全而不过度, 式 (316) 所示化合物与式 (320) 所示化合物的摩尔比可以为 3:1-3.5:1, 在一些实施方案中为 3.01:1-3.15:1。

在一些实施方案中, 所述有机溶剂为乙腈、环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种, 所述环氧类溶剂在一些实施方案中为二氧六环和/或四氢呋喃, 所述醚类溶剂在一些实施方案中为乙醚和/或甲基叔丁基醚, 所述卤代烷类溶剂在一些实施方案中为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷中的一种或多种, 在一些实施方案中, 所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式 (320) 所示化合物, 所述有机溶剂的用量为 3-50L/mol, 在一些实施方案中为 5-20L/mol。

在一些实施方案中, 所述酰胺化反应缩合剂为苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮 (DEPBT)、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐/酯、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐或 1-羟基苯并三唑中的一种或多种, 在进一步的实施方案中为苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯和 1-羟基苯并三唑的混合物, 其中苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯和 1-羟基苯并三唑为等摩尔用量。所述总的酰胺化反应缩合剂与式 (316) 所示化合物的摩尔比可以为 1:1-3:1, 在一些实施方案中为 1.05:1-1.5:1。

所述三级胺可以为 N-甲基吗啉、三乙胺或 N,N-二异丙基乙胺, 在一些实施方案中为 N-甲基吗啉; 所述三级胺与式 (316) 所示化合物的摩尔比可以为 2:1-10:1, 在一些实施方案中为 2:1-5:1。

与上述类似地, 可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式 (314) 所示化合物。在一些实施方案中, 可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式 (314) 所示化合物例如, 可使用如下两种色谱条件进行分离: (1) 正相纯化硅胶: 200-300 目硅胶填料, 使用二氯甲烷: 甲醇 = 100:5-100:7 梯度洗脱; 以及 (2) 反相纯化: C18、C8 反相填料, 使用甲醇: 乙腈 = 0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方案中, 可以直接除去溶剂得到式 (314) 所示化合物粗产品, 该粗产品可以直接用于后续反应。

式 (320) 所示化合物可商购获得, 或者由本领域技术人员使用已知的方法获得。例如, 当  $m_1=m_2=m_3=3$ ,  $n_1=1$ ,  $n_3=2$ , 且每个  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$  均为 H 时, 式 (320) 所示化合物可自阿法埃莎公司商购获得。

本公开的 siRNA 缀合物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公开的药物组合物的描述。

#### 本公开的 siRNA、含该 siRNA 的药物组合物及缀合物的应用

在一些实施方案中, 本公开提供了本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物在制备用于治疗或/或预防尿酸代谢异常或尿酸代谢异常的引发的疾病或生理状况的药物中的用途。

在一些实施方案中, 本公开提供了一种预防和/或治疗尿酸代谢异常的或尿酸代谢异常的引发的疾病或生理状况的方法, 该方法包括将有效量的本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物给予有需要的受试者。

通过将本公开的 siRNA 活性成分给予有需要的受试者, 可以通过 RNA 干扰的机制达到预防和/或治疗尿酸代谢异常或尿酸代谢异常的引发的疾病或生理状况的目的。因此, 本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物可用于预防和/或治疗尿酸代谢异常或尿酸代谢异常的引发的疾病或生理状况, 或用于制备用于预防和/或治疗尿酸代谢异常或尿酸代谢异常的引发的疾病或生理状况的药物。

在一些实施方案中, 所述尿酸代谢异常引发的疾病或生理状况指高尿酸血症或痛风症, 通常表现为血液中尿酸的水平提高以及由该提高的血尿酸水平而直接导致的关节剧烈疼痛、活动不便等症状。

本文所使用的术语“给药/给予”是指通过使得至少部分地将本公开的 siRNA、药物组合物和/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, 将本公开的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物放置入受试者体内。适于本公开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体循环相比将更多 siRNA 缀合物递送至特定位点; 而全身给药导致将本公开的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物递送至受试者的体循环。考虑到本公开旨在提供预防和/或治疗痛风的手段, 在一些实施方案中采用能够将药物递送至肝脏的给药方式。

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, 如静脉内给药、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）。给药频率可以是每天、每周、每两周、每三周、每个月、每两个月、每三个月、每半年或每年一次或多次。

本公开所述的 siRNA、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% 的群体死亡的致死剂量）和 ED<sub>50</sub>（在量反应中指能引起 50% 最大反应强度的剂量，在质反应中指能引起 50% 实验对象出现阳性反应时的剂量）。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。

在给予本公开所述的 siRNA、药物组合物和/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 小鼠，以 siRNA 的量计：(i) 对于 siRNA 缀合物，其 siRNA 用量可以为 0.001-100mg/kg 体重，在一些实施方案中为 0.01-50mg/kg 体重，在一些实施方案中为 0.05-20mg/kg 体重，另一些实施方案中为 0.1-15mg/kg 体重，另一些实施方案中为 0.1-10mg/kg 体重；(ii) 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，在一些实施方案中为 0.01-10mg/kg 体重，在一些实施方案中为 0.05-5mg/kg 体重，在一些实施方案中为 0.1-3mg/kg 体重。

在一些实施方案中，本公开提供了一种抑制肝细胞中 PNP 基因表达的方法，该方法包括将有效量的本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物与所述肝细胞接触，将本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物导入所述肝细胞，通过 RNA 干扰的机制达到抑制肝细胞中 PNP 基因表达的目的。所述肝细胞可以选自 SMMC-7721、HepG2、Huh7 等肝癌细胞系或分离的肝原代细胞。在一些实施方案中，所述细胞为 SMMC-7721 肝癌细胞。

采用本公开提供的方法抑制 PNP 基因在细胞中表达，所提供的修饰的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物中的 siRNA 用量一般是这样的量：其足以减少靶基因的表达，并导致在靶细胞表面处 1pM 至 1μM、0.01nM 至 100nM、0.05nM 至 50nM 或 0.05nM 至约 5nM 的细胞外浓度。达到该局部浓度所需的量将随各种因素而变化，所述因素包括递送方法、递送部位、在递送部位和靶细胞或组织之间的细胞层的数目、递送途径（局部还是全身）等。在递送部位处的浓度可以显著高于在靶细胞或组织的表面处的浓度。

#### 试剂盒

本公开提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含有效量的本公开的修饰的 siRNA、药物组合物和 siRNA 缀合物的至少一种。

在一些实施方案中，本文所述的试剂盒可在一个容器中提供修饰的 siRNA。在一些实施方案中，本文所述的试剂盒可包含一个提供药学上可接受的赋形剂的容器。在一些实施方案中，所述试剂盒中还可包含其它成分，如稳定剂或防腐剂等。在一些实施方案中，本文所述的试剂盒可在不同于提供本文所述修饰的 siRNA 的容器以外的其它容器中包含至少一种其它治疗剂。在一些实施方案中，所述试剂盒可包含用于将修饰的 siRNA 与药学上可接受的载体和/或辅料或其它成分（若有的话）进行混合的说明书。

在本公开的试剂盒中，所述修饰的 siRNA 和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述修饰的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物和/或缀合物，和/或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。在一些实施方案中，所述修饰的 siRNA 和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述药物组合物和/或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。在一些实施方案中，可在本公开的试剂盒中提供无菌水。

下面将通过实施例来进一步说明本公开，但是本公开并不因此而受到任何限制。

#### 实施例

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 等操作均参照 Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)) 所记载的方法进行。

SMMC-7721 细胞（广州吉妮欧生物科技有限公司）用含有 10% 的胎牛血清（FBS，HyClone 公司）及 0.2% 体积的青霉素双抗（Penicillin-Streptomycin，HyClone）的 H-DMEM 完全培养基（HyClone 公司）于 37°C 下在含 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气的培养箱中培养。

HepG2 细胞（广州吉妮欧生物科技有限公司）用含有 20% 的胎牛血清（FBS，HyClone 公司）及 0.2 体积% 的青霉素双抗（Penicillin-Streptomycin，HyClone）的 H-DMEM 完全培养基（HyClone 公司）于 37°C 下在含 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气的培养箱中培养。

Huh7 细胞（广州吉妮欧生物科技有限公司）用含有 10% 的胎牛血清（FBS，Hyclone 公司）及 0.2 体积% 的青霉素双抗（Penicillin-Streptomycin，HyClone）的 H-DMEM 完全培养基（Hyclone 公司）于 37°C 下在含 5% CO<sub>2</sub>/95% 空气的培养箱中培养。

本公开合成的针对 PNP 基因的 siRNA、siRNA 缀合物或作为阴性对照的 siRNA、siRNA 缀合物转染细胞时，使用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen) 或 INTERFERin (Polyplus) 作为转染试剂，具体操作参照制造商提供的说明书。

若无其它说明，以下提供的试剂比例均按体积比 (v/v) 计算。

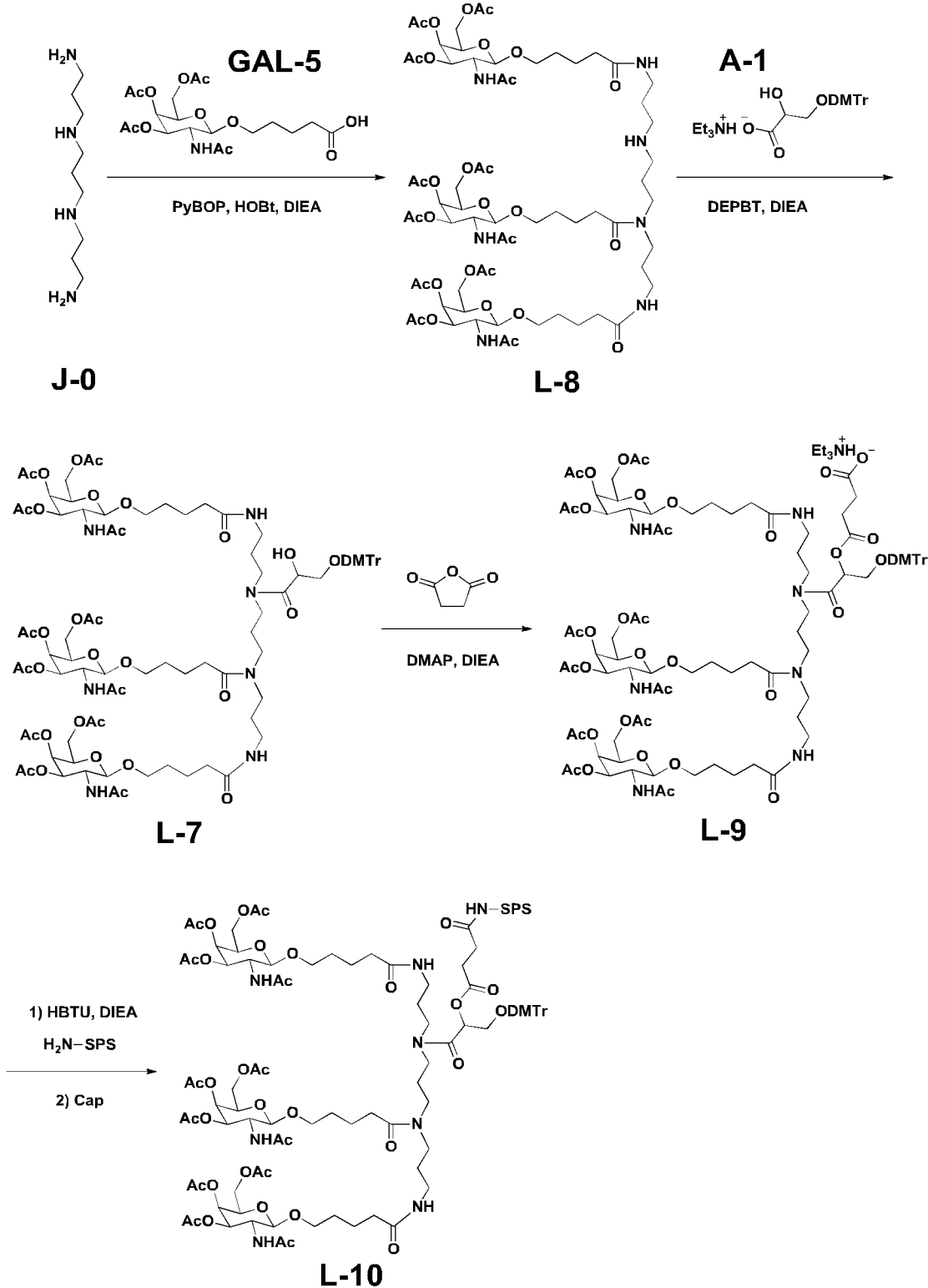
实验数据均以  $\bar{X} \pm SEM$  表示，数据分析采用 Graphpad prism5.0 统计分析软件。

制备例 1: 缀合物 1 的制备

本制备例合成了缀合物 1。缀合物 1 为 L-9 缀合分子与表 3 中编号为 siPNa1M1S 的 siRNA 缀合后形成的 siRNA 缀合物。

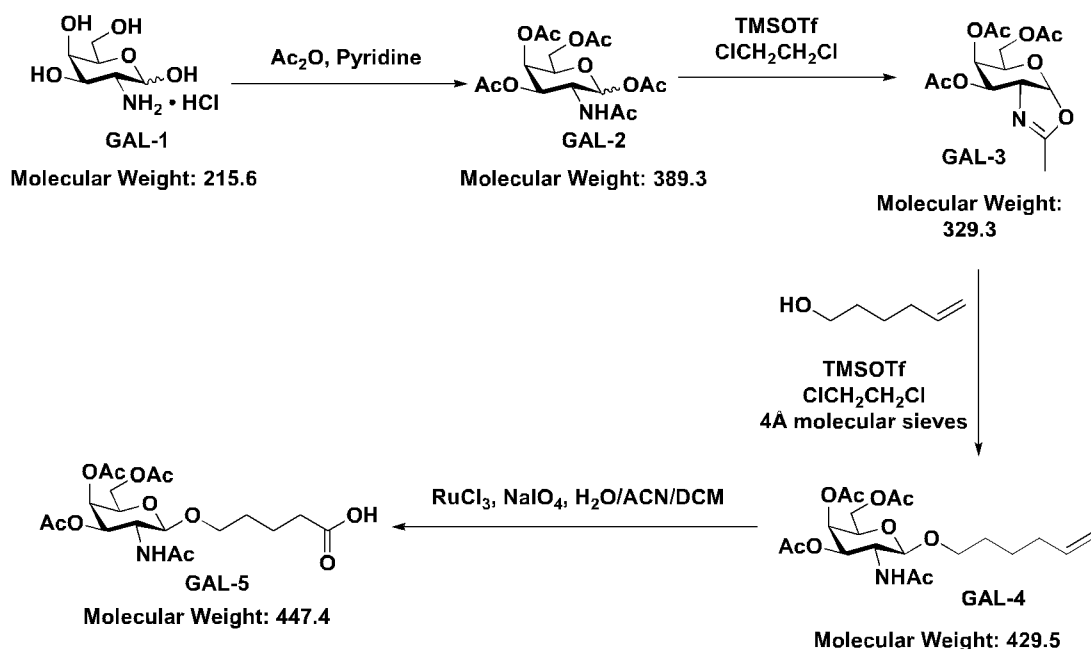
(1-1) L-10 化合物的合成

按照以下方法，合成了 L-10 化合物：



10

(1-1-1) 缀合末端段 GAL-5 的合成



## (1-1-1a) GAL-2 的合成

将 100.0g GAL-1 (N-乙酰-D-半乳糖胺盐酸盐, CAS 号: 1772-03-8, 购自宁波弘翔生化公司, 463.8 mmol) 溶于 1000ml 无水吡啶, 冰水浴下加入 540ml 乙酸酐(购自 Enox 公司, 5565.6mmol), 室温搅拌反应 1.5 小时。将反应液倒入 10L 冰水中, 减压抽滤, 滤饼用 2L 冰水洗涤后, 加乙腈/甲苯混合溶剂(体积比乙腈:甲苯=1:1)至完全溶解, 蒸干溶剂, 得到白色固体产品 GAL-2 130.0g。

## (1-1-1b) GAL-3 的合成

将步骤 (1-1-1a) 中获得的 GAL-2 (35.1g, 90.0mmol) 溶解于 213ml 无水 1,2-二氯乙烷中, 在冰水浴且氮气保护条件下, 加入 24.0g TMSOTf (CAS 号: 27607-77-8, 购自麦克林公司, 108.0mmol), 室温反应过夜。

在反应液中加入 400ml 二氯甲烷稀释, 以硅藻土过滤, 再加入 1L 饱和碳酸氢钠水溶液, 搅拌均匀, 分出有机相, 水相用二氯乙烷萃取两次, 每次 300ml, 合并有机相, 分别用 300ml 饱和碳酸氢钠水溶液和 300ml 饱和食盐水洗涤, 分出有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 得到浅黄色粘稠糖稀状产品 GAL-3 26.9g。

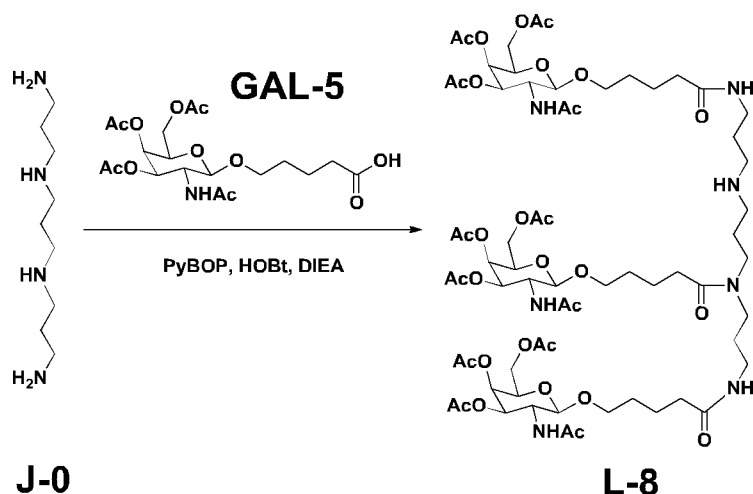
## (1-1-1c) GAL-4 的合成

将步骤 (1-1-1b) 中获得的 GAL-3 (26.9g, 81.7mmol) 溶于 136ml 无水 1,2-二氯乙烷中, 加入干燥的 4Å 分子筛粉末 30g, 再加入 9.0g 5-己烯-1-醇 (CAS 号: 821-41-0, 购自 Adamas-beta 公司, 89.9mmol), 室温下搅拌 30 分钟, 冰浴和氮气保护下加入 9.08g TMSOTf (40.9mmol), 室温下搅拌反应过夜。过滤除去 4 Å 分子筛粉末, 滤液中加入 300ml 二氯甲烷稀释, 以硅藻土过滤, 再加入 500ml 饱和碳酸氢钠水溶液搅拌 10 分钟洗涤, 分出有机相, 水相用 300ml 二氯乙烷萃取一次, 合并有机相并分别用 300ml 饱和碳酸氢钠水溶液和 300ml 饱和食盐水洗涤, 分出有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 得到黄色糖稀状产品 GAL-4 41.3g, 不进行纯化直接进行下一步氧化反应。

## (1-1-1d) GAL-5 的合成

将按照步骤 (1-1-1c) 中描述的方法得到的 GAL-4 (14.9g, 34.7mmol,) 溶于 77ml 二氯甲烷和 77ml 乙腈的混合溶剂中, 分别加入 103ml 去离子水和 29.7g 高碘酸钠 (CAS 号: 7790-28-5, 购自阿拉丁公司, 138.8mmol), 冰水浴下搅拌 10 分钟, 加入三氯化钨 (CAS 号: 14898-67-0, 购自安耐吉公司, 238mg, 1.145mmol), 室温反应过夜。反应液加入 300ml 水稀释搅拌, 加饱和碳酸氢钠调 pH 约为 7.5, 分出并弃去有机相, 水相用二氯甲烷萃取三次, 每次 200ml, 弃去有机相。水相用柠檬酸固体调节 pH 约为 3, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 200ml, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 得到白色泡沫状固体产品 GAL-5 6.85g。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.01 (br, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.21 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.96 (dd, *J* = 11.2, 3.2 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.07 – 3.95 (m, 3H), 3.92 – 3.85 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.48 – 3.39 (m, 1H), 2.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.55 – 1.45 (m, 4H)。

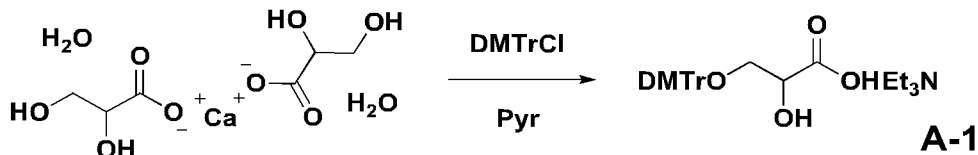
## (1-1-2) L-8 的合成



将 J-0 (9.886g, 52.5mmol, 商购自阿法埃沙公司) 和步骤 (1-1-1) 中得到的 GAL-5 (72.819g, 162.75mmol, 由多批次产物合并而得) 溶于 525ml 二氯甲烷, 加入二异丙基乙胺 (DIEA, 44.782g, 346.50mmol)、苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯 (PyBOP, 90.158g, 173.25mmol) 和羟基苯并三唑 (HOBT, 23.410g, 173.25mmol), 室温下反应 4h, 加入 20ml 饱和碳酸氢钠和 200ml 饱和食盐水进行洗涤, 水相用二氯甲烷萃取 2 次, 每次 100ml, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤后减压蒸干溶剂得粗品。纯化使用 200-300 目正相硅胶, 以 10wt% 三乙胺中和硅胶酸性, 1wt% 三乙胺平衡柱子, 以二氯甲烷: 甲醇=100:25-100:40 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂得到纯品 L-8 38.8g。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 3H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 7.13 – 7.18 (m, 1H), 5.22 (d, *J* = 3.1 Hz, 3H), 4.97 (dd, *J* = 11.3, 3.1 Hz, 3H), 4.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 4.09 – 3.98 (m, 9H), 3.88 (dd, *J* = 19.3, 9.3 Hz, 3H), 3.75 – 3.66 (m, 3H), 3.44 – 3.38 (m, 3H), 3.17 – 3.30 (m, 4H), 3.10 – 2.97 (m, 4H), 2.35 – 2.20 (m, 6H), 2.15 – 2.08 (m, 9H), 2.07 – 1.98 (m, 13H), 1.94 – 1.87 (m, 9H), 1.81 – 1.74 (m, 9H), 1.65 – 1.42 (m, 18H). MS *m/z*: C<sub>85</sub>H<sub>119</sub>N<sub>7</sub>O<sub>30</sub>, [M+H]<sup>+</sup>, 理论: 1477.59, 实测: 1477.23。

(1-1-3) L-7 的合成

(1-1-3a) A-1 的合成

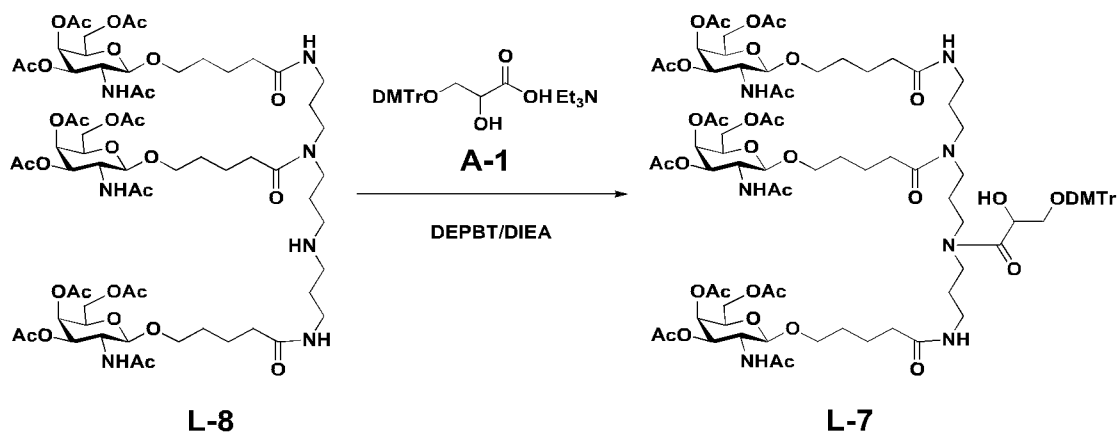


Molecular Weight: 286.25

Molecular Weight: 509.64

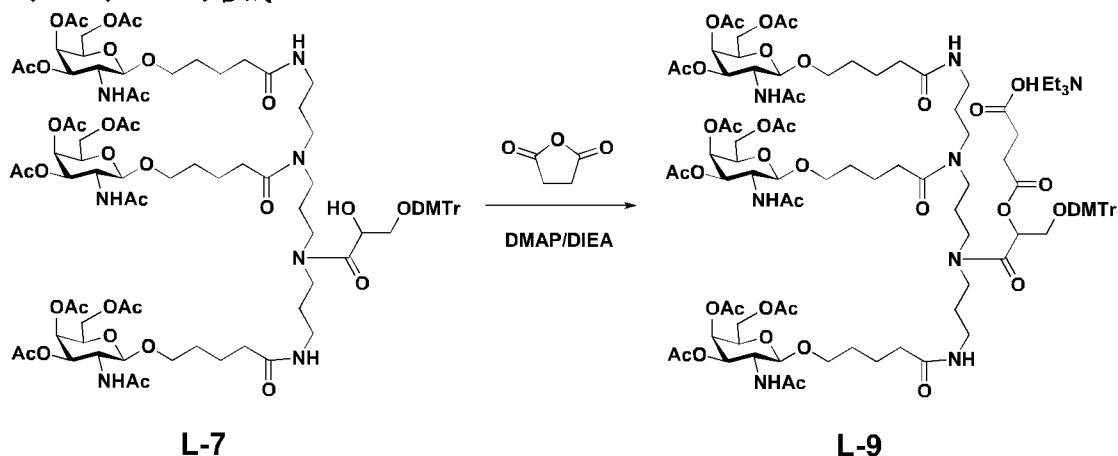
将 DMTrCl (4,4'-双甲氧基三苯甲基氯, 101.65g, 300mmol) 溶于 1000ml 无水吡啶中, 加入 DL-甘油酸钙水合物 (28.63g, 100mmol), 在 45°C 反应 20h, 将反应液过滤, 滤饼用 200ml DCM 淋洗, 滤液减压浓缩至干, 剩余物用 500ml 二氯甲烷重新溶解, 0.5M 三乙胺磷酸盐 (pH=7-8) 洗涤 2 次, 每次 200ml, 水相以二氯甲烷萃取 2 次, 每次 200ml, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸干溶剂, 200-300 目正相硅胶柱纯化, 以石油醚: 乙酸乙酯: 二氯甲烷: 甲醇=1:1:1:0.35-1:1:1:0.55 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂, 600ml 二氯甲烷重新溶解, 以 200ml 0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤 1 次, 水相用 200ml 二氯甲烷萃取 1 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸干溶剂, 真空油泵减压下过夜, 得到白色固体产品 A-1 50.7g。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.46 (ddd, *J* = 6.5, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 4.84 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.36 – 4.24 (m, 1H), 4.29 (s, 6H), 3.92 (dd, *J* = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.67 (dd, *J* = 12.3, 7.0 Hz, 1H), 2.52 (q, *J* = 6.3 Hz, 6H), 1.03 (t, *J* = 6.3 Hz, 9H). MS *m/z*: C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub>, [M-H]<sup>-</sup>, 理论: 407.15, 实测: 406.92。

(1-1-3b) L-7 的合成



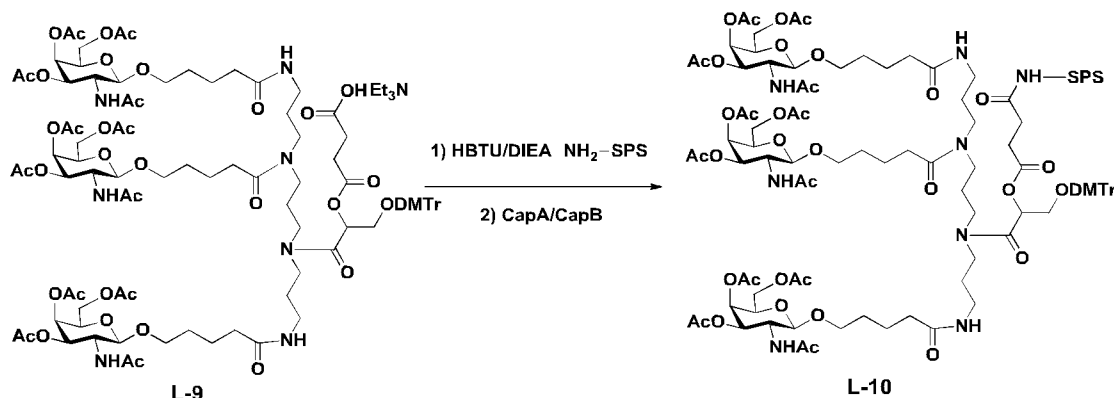
将步骤 (1-1-2) 中获得的 L-8 (40g, 27.09mmol, 由多批次产物合并而得) 和步骤 (1-1-3a) 中获得的 A-1 (41.418g, 81.27mmol) 混合, 溶于 271ml 二氯甲烷, 加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮 (DEPBT) (24.318g, 81.37mmol), 再加入二异丙基乙胺 (21.007g, 162.54mmol), 25°C 下搅拌反应 1.5h, 用 800ml 饱和碳酸氢钠洗涤有机相, 水相以二氯甲烷萃取 3 次, 每次 50ml, 以 150ml 饱和食盐水洗涤有机相, 水相以 50ml 二氯甲烷萃取 1 次, 合并有机相并以无水硫酸钠干燥, 过滤后减压蒸干溶剂, 真空油泵发泡干燥过夜, 得到粗品。柱纯化使用 2kg 200-300 目正相硅胶, 以 200ml 三乙胺中和硅胶酸性, 以含 1wt% 三乙胺的石油醚平衡柱子, 以石油醚: 乙酸乙酯: 二氯甲烷: N,N-二甲基甲酰胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂得到纯品 L-7 40.4g。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.90 – 7.78 (m, 4H), 7.75 – 7.64 (m, 1H), 7.38 – 7.18 (m, 9H), 6.91 – 6.83 (m, 4H), 5.25 – 5.10 (m, 4H), 4.97 (dd,  $J$  = 11.2, 3.2 Hz, 3H), 4.48 – 4.30 (m, 4H), 4.02 (s, 9H), 3.93 – 3.84 (m, 3H), 3.76 – 3.66 (m, 9H), 3.45 – 3.35 (m, 3H), 3.24 – 2.98 (m, 10H), 2.30 – 2.20 (m, 2H), 2.11 – 1.88 (m, 31H), 1.80 – 1.40 (m, 28H). MS  $m/z$ : C<sub>90</sub>H<sub>128</sub>N<sub>7</sub>O<sub>35</sub>, [M-DMTr]<sup>+</sup>, 理论: 1564.65, 实测: 1564.88。

#### (1-1-4) L-9 的合成



将步骤 (1-1-3b) 中获得的 L-7 (40g, 21.4247mmol)、丁二酸酐 (4.288g, 42.8494mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 5.235g, 42.8494mmol) 混合溶于 215ml 二氯甲烷, 再加入二异丙基乙胺 (DIEA, 13.845g, 107.1235mmol), 25°C 下搅拌 24h, 800ml 0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤反应液, 水相以二氯甲烷萃取 3 次, 每次 5ml, 合并有机相减压蒸干得到粗品。柱纯化使用 1kg 200-300 目正相硅胶, 以 1wt% 三乙胺中和硅胶酸性, 以二氯甲烷平衡柱子, 以含 1wt% 三乙胺的二氯甲烷: 甲醇=100:18-100:20 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂得到纯品 L-9 缀合分子 31.0g。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.58 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H), 7.94 – 7.82 (m, 3H), 7.41 – 7.29 (m, 5H), 7.22 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 5H), 6.89 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 4H), 5.49 – 5.37 (m, 1H), 5.21 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 3H), 4.97 (d,  $J$  = 11.1 Hz, 3H), 4.49 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 3H), 4.02 (s, 9H), 3.88 (dd,  $J$  = 19.4, 9.4 Hz, 3H), 3.77 – 3.65 (m, 9H), 3.50 – 3.39 (m, 6H), 3.11 – 2.90 (m, 5H), 2.61 – 2.54 (m, 4H), 2.47 – 2.41 (m, 2H), 2.26 – 2.17 (m, 2H), 2.15 – 1.95 (m, 22H), 1.92 – 1.84 (m, 9H), 1.80 – 1.70 (m, 10H), 1.65 – 1.35 (m, 17H), 1.31 – 1.19 (m, 4H), 0.96 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 9H). MS  $m/z$ : C<sub>94</sub>H<sub>132</sub>N<sub>7</sub>O<sub>38</sub>, [M-DMTr]<sup>+</sup>, 理论: 1664.72, 实测: 1665.03。

#### (1-1-5) L-10 化合物的合成



此步骤中，通过将 L-9 缀合分子连接至固相载体，制备了 L-10 化合物。

将步骤 (1-1-4) 中获得的 L-9 缀合分子 (22.751g, 11mmol)、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐/酯 (HBTU, 6.257g, 16.5mmol) 和二异丙基乙胺 (DIEA, 2.843g, 22mmol) 混合，溶于 900ml 乙腈，室温搅拌 5 分钟，向反应液中加入氨基树脂 (88g, 100-200 目，氨基载量 400 $\mu$ mol/g，购自南开和成公司)，25 $^{\circ}$ C 下进行摇床反应，转速 150 转/分钟，反应 18h 后过滤，滤饼以 DCM 淋洗 2 次，每次 300ml，乙腈淋洗 3 次，每次 300ml，真空油泵干燥 18h，随后再按照表 2 中示出的投料配比加入原料 (CapA、CapB、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 和乙腈) 进行盖帽反应。25 $^{\circ}$ C 下置于摇床上，转速 150 转/分钟，反应 5h，反应液过滤，滤饼用乙腈淋洗 3 次，每次 300ml，减压蒸发溶剂至干，真空油泵减压下干燥过夜，得到 L-10 化合物 (即，连接固相载体的 L-9 缀合分子) 102g，载量 90.8 $\mu$ mol/g。

表 2: 盖帽反应投料配比

原料	用量	规格	批号	生产厂家
CapA	1980ml	——	——	——
CapB	220ml	——	——	——
DMAP	1.100g	分析纯	I1422139	Aladdin
乙腈	220ml	光谱纯	O15161001	上海星可

其中，CapA 和 CapB 为盖帽试剂溶液，CapA 为 20 体积% N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液，吡啶与乙腈的体积比为 3:5；CapB 为 20 体积% 乙酸酐的乙腈溶液。

#### (1-2) 合成缀合物 1 的正义链

通过固相亚磷酸胺法，利用上述步骤制备的 L-10 化合物起始循环，按照表 3 中列出的 siRNA 缀合物 1 对应 siRNA 的正义链核苷酸排布顺序自 3'-5' 方向逐一连接核苷单体。每连接一个核苷单体都包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应。其中，两个核苷酸之间采用磷酸酯连接时，连接后一个核苷单体时，包括脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应。两个核苷酸之间采用硫代磷酸酯连接时，连接后一个核苷单体时，包括保护、偶联、盖帽、硫化四步反应。合成条件给定如下：

核苷单体以 0.1M 浓度的乙腈溶液提供，每一步的脱保护反应的条件相同，即温度为 25 $^{\circ}$ C，反应时间为 70 秒，脱保护试剂为二氯乙酸的二氯甲烷溶液 (3%v/v)，二氯乙酸与固相载体上 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基的摩尔比为 5:1。

每一步偶联反应条件均相同，包括温度为 25 $^{\circ}$ C，固相载体上连接的核酸序列与核苷单体的摩尔比为 1:10，固相载体上连接的核酸序列和偶联试剂的摩尔比为 1:65，反应时间为 600 秒，偶联试剂为 5-乙硫基-1H-四氮唑 (5-(Ethylthio)-1H-tetrazole, ETT) 的 0.5M 乙腈溶液。

每一步盖帽条件均相同，包括温度为 25 $^{\circ}$ C，反应时间为 15 秒。盖帽试剂溶液为摩尔比为 1:1 的 CapA 和 CapB 的混合溶液，盖帽试剂与固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为乙酸酐:N-甲基咪唑:固相载体上连接的核酸序列=1:1:1。

每一步氧化反应条件相同，包括温度为 25 $^{\circ}$ C，反应时间为 15 秒，氧化试剂为浓度为 0.05M 的碘水。碘与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 30:1。反应在四氢呋喃:水:吡啶=3:1:1 的混合溶剂中进行。

每一步硫化反应的条件相同，包括温度为 25 $^{\circ}$ C，反应时间为 300 秒，硫化试剂为氯化黄原素。硫化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 120:1。反应在乙腈:吡啶=1:1 的混合溶剂中进行。

待最后一个核苷单体连接完成后，依次对固相载体上连接的核酸序列进行切割、脱保护、纯化、脱盐，随后冻干获得正义链。其中，切割和脱保护条件如下：将合成的连接有载体的核苷酸序列加入浓度为 25wt% 的氨水中，氨水用量为 0.5ml/ $\mu$ mol，在 55 $^{\circ}$ C 反应 16h，过滤去除剩余载体，将上清液真空浓缩至干。

纯化与脱盐条件如下：利用制备型离子色谱纯化柱 (Source 15Q)，通过 NaCl 的梯度洗脱，实现核酸的纯化。具体而言为：洗脱剂 A：20mM 磷酸钠 (pH 8.1)，溶剂为水/乙腈=9:1 (体积比)；洗脱剂 B：1.5M 氯化钠，20mM 磷酸钠 (pH 8.1)，溶剂为水/乙腈=9:1 (体积比)；洗脱梯度：洗脱剂 A:洗脱剂 B=100:0-50:50 梯度洗脱。收集产品洗脱液后合并，采用反相色谱纯化柱进行脱盐，具体条件包括采用葡聚糖凝胶柱进行脱盐，填料为葡聚糖凝胶 G25 (Sephadex G25)，以去离子水洗脱。

检测方法如下：使用离子交换色谱 (IEX-HPLC) 检测上述正义链的纯度，使用液质联用 (LC-MS) 分析分子量。实测值与理论值相符，表明所合成的是 3'末端缀合了 L-9 缀合分子的正义链 SS。

(1-3) 合成缀合物 1 的反义链

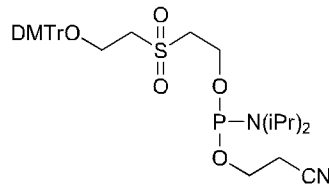
通过固相亚磷酸胺法，利用通用固相载体 (UnyLinker™ loaded NittoPhase® HL Solid Supports, Kinovate Life Sciences 公司) 起始循环，合成缀合物 1 的反义链 AS，其具有表 3 中列出的对应于缀合物 1 的 siRNA 的反义链序列。固相合成方法中的脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化反应条件，切割和脱保护，纯化与脱盐条件与合成正义链相同。随后冻干获得反义链。反义链的纯度采用离子交换色谱 (IEX-HPLC) 进行检测；分子量采用液质联用 (LC-MS) 进行分析。其结果，实测值与理论值相符，表明所合成的是具有目标序列的反义链 AS。

(1-4) 合成缀合物 1

对于缀合物 1，将正义链与反义链分别溶于注射用水中，得到 40mg/mL 的溶液，以等摩尔比混合，50°C 加热 15min，室温冷却后，得到退火后的产品，冻干，得到冻干粉。使用超纯水 (Milli-Q 超纯水仪，电阻率 18.2MΩ\*cm (25°C)) 将缀合物稀释至浓度为 0.2mg/mL 后，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。实测值与理论值一致，说明所合成的 siRNA 缀合物 1 是目标设计的带有 L-9 缀合分子的双链核酸序列。其结构如式 (403) 所示，并且该缀合物包含的 siRNA 具有表 3 中缀合物 1 所对应的 siRNA 序列。

制备例 2: 缀合物 2-13 的制备

采用与制备例 1 相同的方法，合成了缀合物 2-13，并进行分子量检测。不同的是：1) 所述 siRNA 分别为表 3 中所示的对应于缀合物 2-13 的序列；2) 当目标序列中在反义链 5'-末端第一个核苷酸处具有 5-磷酸时，按照固相亚磷酸胺法制备反义链的过程中，在连接反义链最后一个核苷单体后，再经脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应将 CPR-I 单体 (苏州吉玛，货号 Cat#13-2601-XX) 连接至反义链 5'末端，形成 5'-磷酸酯修饰。



(CPR-I)

该连接中，使用的脱保护、偶联、盖帽、氧化反应条件，切割和脱保护，纯化与脱盐条件与合成正义链相同。表 3 列出了缀合物编号和 siRNA 序列组成。

表 3: siRNA 缀合物

缀合物	编号	序列方向 5'-3'		SEQ ID NO
缀合物 1	L10-siPNa1 M1S	正义链	CmsCmsUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm	241
		反义链	UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm	242
缀合物 2	L10-siPNb1 M1S	正义链	GmsUmsAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm	243
		反义链	AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm	244
缀合物 3	L10-siPNc1 M1S	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm	245
		反义链	UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm	246

缓合物 4	L10-siPNa1 M1SP	正义链	CmsCmsUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm	247
		反义链	PUmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm	248
缓合物 5	L10-siPNb1 M1SP	正义链	GmsUmsAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm	249
		反义链	PAmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm	250
缓合物 6	L10-siPNc1 M1SP	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm	251
		反义链	PUmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsCmsCm	252
缓合物 7	L10-siPNd1 M1SP	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm	253
		反义链	PUmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm	254
缓合物 8	L10-siPNd1 M1S	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm	255
		反义链	UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsGmsUm	256
缓合物 9	L10-siPNb1 M1SU	正义链	GmsUmsAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmAm	257
		反义链	UmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsCm	258
缓合物 10	L10-siPNb1 M1SUU	正义链	GmsUmsAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmAm	259
		反义链	UmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAmCfUmGfUmAmCmsUmsUm	260
缓合物 11	L10-siPNc1 M1SU	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmCmAmGmAmAmAm	261
		反义链	UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUmUfGmUfUmUmGmsUmsUm	262
缓合物 12	L10-siPNd1 M1SU	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmAmUmCmCmAmAm	263
		反义链	UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUmUfGmUfUmUmGmsUmsUm	264
缓合物 13	L10-siPNe1 M1SP	正义链	GmsCmsAmCmAmGmUfCfCfCmAmGmAmAmGmUmUmAmUm	265
		反义链	PAmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmGmAmCfUmGfUmGmCmsUmsCm	266

其中，大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸；小写字母 s 表示该字母 s 左右两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接；大写字母 P 表示该字母 P 右侧相邻的一个核苷酸为 5'-磷酸核苷酸。

5

制备例 3：合成 siRNA 序列

通过固相合成方法分别合成表 4 中所列的 siRNA，使用 DEPC 水分别溶解等摩尔的表 4 中相互互补的正义链和反义链，随后退火得到本公开提供的 siRNA 1-4 和参比 siRNA NC。

表 4：siRNA 序列

siRNA	编号	序列方向 5'-3'		SEQ ID NO
siRNA 1	siPNa1 M1S	正义链	CmsCmsUmAmUmGmAfAfGfAmUmUmAmUmAmAmGmAmAm	267
		反义链	UmsUfsCmUmUmAfUmAmAmUmCmUmUmCfAmUfAmGmGmsUmsGm	268

siRNA 2	siPNb1M1S	正义链	GmsUmsAmCmAmGmUfAfCfCmAmGmAma mGmUmUmAmUm	269
		反义链	AmsUfsAmAmCmUfUmCmUmGmGmUmAm CfUmGfUmAmCmsUmsCm	270
siRNA 3	siPNc1M1S	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfCfUmGmCmAmC mAmGmAmAmAm	271
		反义链	UmsUfsUmCmUmGfUmGmCmAmGmCmUm UfGmUfUmUmGmsCmsCm	272
siRNA 4	siPNd1M1S	正义链	CmsAmsAmAmCmAmAfGfGfAmCmUmAmA mUmCmCmAmAm	273
		反义链	UmsUfsGmGmAmUfUmAmGmUmCmCmUm UfGmUfUmUmGmsGmsUm	274
NC	-	正义链	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT	275
		反义链	ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT	276

其中，大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸；小写字母 s 表示该字母 s 左右两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接；dT 表示胸腺嘧啶脱氧核苷酸。

5 上述序列的制备过程中，当目标序列中包含未修饰的核苷酸时，在切割与脱保护条件中，在氨水处理后，相对于单链核酸的量，用 0.4ml/ $\mu$ mol N-甲基吡咯烷酮溶解产品，随后加入 0.3ml/ $\mu$ mol 三乙胺和 0.6ml/ $\mu$ mol 三乙胺三氢氟酸盐，以脱除核糖上的 2'-TBDMS 保护。

在上述本公开的 siRNA 或缀合物制备完成后，使用标准手段冻干为固体粉末保存备用。在使用时，可使用例如注射用水、生理盐水 (NS)、磷酸缓冲液 (PB) 或者磷酸盐缓冲液 (PBS) 等  
10 将其重新溶解为所需浓度的溶液使用。

实验例 1: siRNA 在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

将 SMMC-7721 细胞以  $7.5 \times 10^4$  细胞/孔接种于 24 孔板中，16h 后细胞生长密度达到 70-80% 时，吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基，每孔加入 500 $\mu$ l Opti-MEM 培养基 (GIBCO 公司) 继续培养 1.5h。  
15

用 DEPC 化水将下面的 siRNA 中的每一个 siRNA 分别配制成 10  $\mu$ M 的 siRNA 工作液，所用 siRNA 分别为 siPNa1M1S、siPNb1M1S、siPNc1M1S 或 siPNd1M1S 和阴性对照 NC。

配制 1A 溶液，对于每一个 siRNA，分别配制 1A 溶液，每份 1A 溶液依次含有上述 10  $\mu$ M 浓度的 siRNA 工作液 3 $\mu$ l 和 Opti-MEM 培养基 50 $\mu$ l。  
20

配制 1B 溶液，每份 1B 溶液含有 1  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000 和 50 $\mu$ l Opti-MEM 培养基。

分别将一份 1B 溶液与得到的每个 siRNA 的 1A 溶液混合，分别室温下孵育 20min，得到每个 siRNA 的转染复合物 1X。  
25

将一份 1B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50 $\mu$ l 混合，室温下孵育 20min，得到转染复合物 1X'。

在培养孔中，分别加入每一个 siRNA 转染复合物 1X，均匀混合，加入量为 100 $\mu$ l/孔，得到每个 siRNA 终浓度分别约为 50 nM 转染复合物，每个 siRNA 的转染复合物 1X 分别转染 2 个培养孔，得到含 siRNA 的转染混合物，记为测试组。  
30

在另外 2 个培养孔中，分别加入转染复合物 1X'，加入量为 100 $\mu$ l/孔，得到不含 siRNA 的转染混合物，记为空白对照组。

将含 siRNA 的转染混合物和不含 siRNA 的转染混合物在培养孔中转染 4h 后，每孔补加 1ml 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 24h。  
35

随后，使用 RNAVzol (购自威格拉斯生物技术 (北京) 有限公司，货号 N002) 根据说明书记载的方法提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞，分别取 1 $\mu$ g 总 RNA，使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit (购自北京擎科新业生物技术有限公司，货号 TSK301M) 提供的试剂，其中选取 Goldenstar™ Oligo (dT)<sub>17</sub> 作为引物，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20 $\mu$ l，对各孔细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：对于每一反转录反应体系，将反转录反应体系置于 50 $^{\circ}$ C 孵育 50min，然后 85 $^{\circ}$ C 孵育 5min，最后 4 $^{\circ}$ C 孵育 30s，反应结束后，向反转录反应体系中加入 DEPC 水 80 $\mu$ l，得到含 cDNA 的溶液。  
40

对于每一反转录反应体系，分别取上述含 cDNA 的溶液 5 $\mu$ l 做模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒 (购自近岸蛋白质科技有限公司，货号 E096-01B) 提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20 $\mu$ l，其中，用于扩增目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列如表

7 所示, 每条引物的终浓度为 0.25 $\mu$ M。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上, 使用三步法进行扩增, 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后, 得到含有扩增了目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的产物 W。产物 W 随即依次经过 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 15s 的孵育, 实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W 中目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线, 得到目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

表 5: 引物信息

基因名称	引物类型	核苷酸序列 (5'→3')	SEQ ID NO
人 PNP	上游引物	ACTGGTGTTTGGGTTCTGA	277
	下游引物	TCCTGCTGCATTGGTACTA	278
人 GAPDH	上游引物	GGTCGGAGTCAACGGATTT	279
	下游引物	CCAGCATCGCCCCACTTGA	280

采用比较 Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) 法, 对各测试组中目标基因 PNP 进行相对定量计算, 计算方法如下:

$$\Delta\text{Ct}(\text{测试组}) = \text{Ct}(\text{测试组目标基因}) - \text{Ct}(\text{测试组内参基因})$$

$$\Delta\text{Ct}(\text{对照组}) = \text{Ct}(\text{对照组目标基因}) - \text{Ct}(\text{对照组内参基因})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct}(\text{测试组}) = \Delta\text{Ct}(\text{测试组}) - \Delta\text{Ct}(\text{对照组平均})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct}(\text{对照组}) = \Delta\text{Ct}(\text{对照组}) - \Delta\text{Ct}(\text{对照组平均})$$

其中,  $\Delta\text{Ct}(\text{对照组平均})$  是对照组三个培养孔各自的  $\Delta\text{Ct}(\text{对照组})$  的算术平均值。从而, 测试组和对照组的每一培养孔均对应一个  $\Delta\Delta\text{Ct}$  值。

以对照组为基准, 对测试组 PNP mRNA 的表达水平进行归一化, 定义空白对照组 PNP mRNA 表达水平为 100%,

$$\text{测试组 PNP mRNA 相对表达水平} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}(\text{测试组})} \times 100\%$$

$$\text{测试组 PNP mRNA 抑制率} = (1 - \text{测试组 PNP mRNA 相对表达水平}) \times 100\%$$

各 siRNA 对 PNP mRNA 的抑制率总结于表 6 中。对于同一测试组 siRNA, mRNA 抑制率是两个培养孔测定的测试组 PNP mRNA 抑制率的算术平均值。

表 6: SMMC-7721 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%
siRNA 1	siPNa1M1S	74.83
siRNA 2	siPNb1M1S	64.37
siRNA 3	siPNc1M1S	61.43
siRNA 4	siPNd1M1S	66.15
NC	-	-0.18

由表 6 的结果可见, 本公开提供的修饰的 siRNA 在 SMMC-7721 细胞系中有较高的抑制活性, 在 50nM 的 siRNA 浓度下, PNP mRNA 抑制率至少为 61.43%, 甚至可达 74.83%。

实验例 2: siRNA 在 Huh7 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

本实验例中, 检测了本公开的 siRNA 在 Huh7 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 的抑制率, 区别在于, 用 Huh7 细胞代替 SMMC-7721 细胞。各 siRNA 在体外 Huh7 细胞中的抑制活性如表 7 所示。

表 7: Huh7 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%
siRNA 1	siPNa1M1S	45.17
siRNA 2	siPNb1M1S	53.56
siRNA 3	siPNc1M1S	66.62
siRNA 4	siPNd1M1S	89.15
NC	-	-0.93

由表 7 的结果可见, 本公开提供的 siRNA 在 Huh7 细胞系中有较高的抑制活性, 特别是 50nM 的 siRNA4 对 PNP mRNA 表达量的抑制率可高达 89.15%。

实验例 3: siRNA 在 HepG2 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 的抑制率, 区别在于, 用 HepG2 细胞代替 SMMC-7721 细胞。各 siRNA 在体外 HepG2 细胞中的抑制活性如表 8 所示。

表 8: HepG2 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%
siRNA 1	siPNa1M1S	65.04
siRNA 2	siPNb1M1S	57.35

siRNA 3	siPNc1M1S	65.37
siRNA 4	siPNd1M1S	63.63
NC	-	-9.50

由表 8 的结果可见, 本公开提供的 siRNA 在 HepG2 细胞系中同样有较高的抑制活性, 抑制率为 57.35%-65.37%。

实验例 4: 不同剂量的 siRNA 在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 的抑制率, 区别在于, 对于所使用的每一 siRNA, 分别配制浓度为 10  $\mu$ M、1  $\mu$ M 和 0.1  $\mu$ M 的工作液, 即分别在 50nM、5nM 和 0.5nM 的 siRNA 终浓度下进行检测。所测得的各 siRNA 在体外 SMMC-7721 细胞中的抑制活性如表 9 所示。

表 9: 不同浓度 siRNA 对 SMMC-7721 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%		
		50 nM	5 nM	0.5 nM
siRNA 1	siPNa1M1S	68.37	67.55	43.75
siRNA 2	siPNb1M1S	80.25	76.24	64.08
siRNA 3	siPNc1M1S	74.89	72.90	70.14
siRNA 4	siPNd1M1S	81.23	70.22	52.15
NC	-	-0.06	-	-

由表 9 的结果可见, 在 SMMC-7721 细胞系中, 本公开提供的 siRNA 在各个浓度下均显示出较高的抑制活性。具体地, 在 0.5 nM 浓度下, 本公开的 siRNA 就显示出至少 43.75 %-70.14 % 的靶 mRNA 抑制率, 在 50 nM 浓度下更是显示出高达 81.23 % 的 PNP mRNA 抑制率。

实验例 5: 不同浓度的 siRNA 在 HepG2 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 的抑制率, 区别在于, 用 HepG2 细胞代替 SMMC-7721 细胞; 对于所使用的每一 siRNA, 分别配制浓度为 10  $\mu$ M 和 1  $\mu$ M 的工作液, 即分别在 50nM 和 5nM 的 siRNA 终浓度下进行检测。所测得的各 siRNA 在体外 HepG2 细胞中的抑制活性如表 10 所示。

表 10: 不同浓度 siRNA 对 HepG2 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%	
		50 nM	5 nM
siRNA 1	siPNa1M1S	59.5	34.0
siRNA 2	siPNb1M1S	64.5	46.5
siRNA 3	siPNc1M1S	64.5	29.0
siRNA 4	siPNd1M1S	68.0	36.0
NC	-	6.5	-

由表 10 的结果可见, 在 HepG2 细胞系中, 本公开提供的 siRNA 在各个浓度下也显示出较高的抑制活性。

实验例 6: siRNA 缀合物在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 的 IC<sub>50</sub> 测定。

本实验例通过实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-Time PCR) 的方法, 检测转染了不同浓度的 siRNA 缀合物 4、缀合物 5、缀合物 6 或缀合物 7 后, SMMC-7721 细胞中 PNP mRNA 相对表达水平, 测定各个 siRNA 缀合物对 PNP mRNA 的 IC<sub>50</sub> 值。

将 SMMC-7721 细胞以  $5 \times 10^4$  细胞/孔接种于 24 孔板中, 16h 后细胞生长密度达到 70-80% 时, 吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基, 每孔加入 500 $\mu$ l Opti-MEM 培养基 (GIBCO 公司) 继续培养 1.5h。

用 DEPC 化水将每一缀合物分别配制为 50  $\mu$ M、12.5  $\mu$ M、3.125  $\mu$ M、0.7813  $\mu$ M、0.1953  $\mu$ M、0.0488  $\mu$ M、0.0122  $\mu$ M 和 0.0031  $\mu$ M (以 siRNA 计算) 共 8 种不同浓度的 siRNA 缀合物工作液, 所用缀合物分别为上述缀合物 4-7。

对于每一缀合物, 分别配制 6A1-6A8 溶液, 每份 6A1-6A8 溶液依次含有上述 8 个浓度的 siRNA 缀合物工作液 3  $\mu$ L 和 Opti-MEM 培养基 50 $\mu$ l。

分别将一份 1B 溶液与得到的一份每个缀合物的 6A1-6A8 的溶液混合, 分别在室温下孵育 20min, 得到每个缀合物的转染复合物 6X1-6X8。

将一份 1B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50  $\mu$ L 混合, 室温下孵育 20min, 得到转染复合物 6X'。

在上述培养 SMMC-7721 细胞的培养孔中, 分别加入上述转染复合物 6X1-6X8 中的一种, 均匀混合, 加入量为 100  $\mu$ L/孔, 得到缀合物终浓度 (以 siRNA 计) 分别为 250nM、60nM、15.625nM、3.9065nM、0.9765nM、0.244nM、0.061nM 及 0.155nM 的转染混合物。每个缀合物的转染复合物分别转染 2 个培养孔。得到含本公开的 siRNA 缀合物的转染混合物, 记为测试组。

在另外两个培养孔中, 分别加入转染复合物 6X', 加入量为 100  $\mu$ L/孔, 得到不含缀合物的转

染混合物, 记为对照组。

将上述测试组和对照组的转染混合物在培养孔中转染 4h 后, 每孔补加 1ml 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 24h。

随后, 使用 RNAVzol (购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司, 货号 N002) 根据说明书描述的方法提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞, 分别取 1μg 总 RNA, 使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit (购自北京擎科新业生物技术有限公司, 货号 TSK301M) 提供的试剂, 其中选取 Goldenstar™ Oligo (dT)<sub>17</sub> 作为引物, 按试剂盒说明书中反转录操作步骤配制反转录反应体系 20μl, 对细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为: 将反转录反应体系置于 50℃ 孵育 50min, 然后 85℃ 孵育 5min, 最后 4℃ 孵育 30s, 反应结束后, 向各反转录反应体系加入 DEPC 水 80μl, 得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系, 分别取上述含 cDNA 的溶液 5μl 做模板, 使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒 (购自近岸蛋白质科技有限公司, 货号 E096-01B) 提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μl, 其中, 用于扩增目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列如表 5 所示, 每条引物的终浓度为 0.25μM。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上, 使用三步法进行扩增, 扩增程序为 95℃ 预变性 10min, 然后 95℃ 变性 30s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后, 得到含有扩增了目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的产物 W。产物 W 随即依次经过 95℃ 15s, 60℃ 1min, 95℃ 15s 的孵育, 实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W 中目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线, 得到目标基因 PNP 和内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

采用比较 Ct (ΔΔCt) 法, 对各测试组中目标基因 PNP 进行相对定量计算, 计算方法如下:

$$\Delta Ct(\text{测试组}) = Ct(\text{测试组目标基因}) - Ct(\text{测试组内参基因})$$

$$\Delta Ct(\text{对照组}) = Ct(\text{对照组目标基因}) - Ct(\text{对照组内参基因})$$

$$\Delta\Delta Ct(\text{测试组}) = \Delta Ct(\text{测试组}) - \Delta Ct(\text{对照组平均})$$

$$\Delta\Delta Ct(\text{对照组}) = \Delta Ct(\text{对照组}) - \Delta Ct(\text{对照组平均})$$

其中, ΔCt(对照组平均) 是对照组三个培养孔各自的 ΔCt(对照组) 的算术平均值。从而, 测试组和对照组的每一培养孔均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准, 对测试组 PNP mRNA 的表达水平进行归一化, 定义对照组 PNP mRNA 表达水平为 100%,

$$\text{测试组 PNP mRNA 相对表达水平} = 2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})} \times 100\%。$$

利用 Graphpad 5.0 软件 log(inhibitor) vs. response—Variable slope 功能来拟合所述剂量-效应曲线, 根据剂量-效应曲线计算各缀合物对 PNP mRNA 的 IC<sub>50</sub> 值。具体来说, 拟合获得的剂量-效应曲线符合以下计算公式:

$$Y = \text{Bot} + \frac{\text{Top} - \text{Bot}}{1 + 10^{(X' - X) \times \text{HillSlope}}}$$

式中:

Y 是各测试组 mRNA 相对表达水平,

X 为对应测试组所使用的 siRNA 终浓度的对数值,

Bot 是稳态期底部的 Y 值,

Top 是稳态期顶部的 Y 值,

X' 是拟合获得的当 Y 在底部到顶部之间一半时的 X 值, 而 HillSlope 则是拟合获得的曲线在 X' 处的斜率。

由该剂量-效应曲线和对应的计算公式, 确定当 Y=50% 时对应的 X<sub>50</sub> 值, 计算获得各 siRNA 的 IC<sub>50</sub> 值=10<sup>X<sub>50</sub></sup> (nM)。

图 1A-图 1D 依次为依据转染了不同浓度的 siRNA 缀合物 4-7 后, SMMC-7721 细胞中 PNP mRNA 相对表达水平拟合的剂量-效应曲线。其中以 siRNA 浓度的对数值 (lg nM) 为横坐标, 以 PNP mRNA 相对表达水平 (%) 为纵坐标, 每个圆点代表 2 个复孔中 PNP mRNA 相对表达水平的平均值。

各缀合物对 PNP mRNA 的 IC<sub>50</sub> 值总结于表 11 中。

表 11: siRNA 缀合物的 IC<sub>50</sub>

缀合物	编号	IC <sub>50</sub>
缀合物 4	L10-siPNa1M1SP	0.017 nM
缀合物 5	L10-siPNb1M1SP	0.045 nM
缀合物 6	L10-siPNc1M1SP	0.113 nM
缀合物 7	L10-siPNd1M1SP	0.062 nM

由图 1A-1D 以及表 11 的结果可知, 本公开提供的 siRNA 缀合物在体外 SMMC-7721 细胞中有很高的抑制 PNP mRNA 的活性,  $IC_{50}$  在 0.017-0.113 nM 之间。

实验例 7: 不同剂量的 siRNA 在 HepG2 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 的抑制率, 区别在于:(1)对于所使用的每一 siRNA, 分别在 50nM、5nM 和 0.5nM 的 siRNA 终浓度下进行检测;(2)转染试剂使用 INTERFERin;(3)所检测的 siRNA 为表 4 中的 siRNA 2-4, 并增加 NC 阴性对照组;(4)用 HepG2 细胞代替 SMMC-7721。所测得的各 siRNA 在体外 HepG2 细胞中的抑制活性如表 12 所示。

表 12: 不同浓度 siRNA 对 HepG2 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%		
		50 nM	5 nM	0.5 nM
siRNA 2	siPNb1M1S	64.5	46.5	25.5
siRNA 3	siPNc1M1S	64.5	29.0	15.5
siRNA 4	siPNd1M1S	68.0	36.0	18.5
NC	-	-	-	-

由表 12 的结果可见, 本公开提供的 siRNA 在 HepG2 细胞系中有较高的抑制活性, 特别是 50nM 的 siRNA4 对 PNP mRNA 表达量的抑制率可高达 68.0%。

实验例 8: siRNA 缀合物在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 缀合物的抑制率, 区别在于, 将待测 siRNA 替换为缀合物 2、3 和 8, 并增加 NC 阴性对照组, 所用浓度按照 siRNA 计算。所测得的各 siRNA 缀合物在体外 SMMC-7721 细胞中的抑制活性如表 13 所示。

表 13: siRNA 缀合物对 SMMC-7721 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%
缀合物 2	L10-siPNb1M1S	80.46
缀合物 3	L10-siPNc1M1S	80.88
缀合物 8	L10-siPNd1M1S	88.93
NC	-	-4.96

由表 13 的结果可见, 本公开提供的 siRNA 缀合物在 SMMC-7721 细胞系中有较高的抑制活性, 特别是缀合物 8 对 PNP mRNA 表达量的抑制率可到 88.93%。

实验例 9: siRNA 缀合物在 Huh7 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 缀合物的抑制率, 区别在于, 将 siRNA 替换为缀合物 2、3 和 8, 所用浓度以 siRNA 计算, 以及用 Huh7 细胞代替 SMMC-7721 细胞。所测得的各 siRNA 缀合物在体外 Huh7 细胞中的抑制活性如表 14 所示。

表 14: siRNA 缀合物对 Huh7 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%
缀合物 2	L10-siPNb1M1S	60.22
缀合物 3	L10-siPNc1M1S	62.58
缀合物 8	L10-siPNd1M1S	77.89
NC	-	2.00

由表 14 的结果可见, 本公开提供的 siRNA 缀合物在 Huh7 细胞系中有较高的抑制活性, 特别是缀合物 8 对 PNP mRNA 表达量的抑制率可达 77.89%。

实验例 10: siRNA 缀合物在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 缀合物的抑制率, 区别在于: 将 siRNA 替换为缀合物 2、9、10、3、11、8 和 12, 并增加阴性对照组 NC, 所用浓度按照 siRNA 终浓度计算。所测得的各 siRNA 缀合物在体外 SMMC-7721 细胞中的抑制活性如表 15 所示。

表 15: siRNA 缀合物对 SMMC-7721 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%
缀合物 2	L10-siPNb1M1S	78.28
缀合物 9	L10-siPNb1M1SU	81.4
缀合物 10	L10-siPNb1M1SUU	75.93
缀合物 3	L10-siPNc1M1S	75.96
缀合物 11	L10-siPNc1M1SU	82.21
缀合物 8	L10-siPNa1M1SP	86.96
缀合物 12	L10-siPNd1M1SU	82.07
NC	-	-5.04

由表 15 的结果可见, 本公开提供的 siRNA 缓合物在 SMMC-7721 细胞中均显示出较高的抑制活性, PNP mRNA 抑制率至少为 75.96%, 甚至可高达 86.96%。

实验例 11: siRNA 缓合物在 Huh7 细胞中对 PNP mRNA 表达量的抑制效率检测。

按照与实验例 1 相同的方法检测 siRNA 缓合物的抑制率, 区别在于: 将 siRNA 替换为缓合物 2、9、10、3、11、8 和 12, 所用浓度以 siRNA 计算, 并增加阴性对照组 NC, 以及将 SMMC-7721 细胞替换为 Huh7 细胞。所测得的各 siRNA 缓合物在体外 Huh7 细胞中的抑制活性如表 16 所示。

表 16: siRNA 缓合物对 Huh7 细胞中 PNP mRNA 的抑制

siRNA	编号	mRNA 抑制率%
缓合物 2	L10-siPNb1M1S	69.31
缓合物 9	L10-siPNb1M1SU	69.46
缓合物 10	L10-siPNb1M1SUU	62.80
缓合物 3	L10-siPNc1M1S	65.12
缓合物 11	L10-siPNc1M1SU	61.46
缓合物 8	L10-siPNa1M1S	74.46
缓合物 12	L10-siPNd1M1SU	64.45
NC	-	-4.30

由表 16 的结果可见, 本公开提供的 siRNA 缓合物在 Huh7 细胞中均显示出较高的抑制活性, PNP mRNA 抑制率约为 61.46%-74.46%。

实验例 12: siRNA 缓合物在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 的 IC<sub>50</sub> 测定。

按照与实验例 6 相同的方法测定缓合物 2 和缓合物 8 在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 的 IC<sub>50</sub> 值, 区别仅在于所测试的 siRNA 缓合物分别为缓合物 2 或缓合物 8。缓合物 2 或缓合物 8 在 SMMC-7721 细胞中对 PNP mRNA 的表达抑制以及相应拟合的剂量-效应曲线图见图 2A-2B 所示。同时, 根据剂量-效应曲线计算待测 siRNA 靶向 PNP mRNA 的 IC<sub>50</sub> 值, 缓合物 2 和缓合物 8 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.491nM 和 0.400nM, 显示出优异的抑制 PNP mRNA 的效果。

实验例 13: 本公开的 siRNA 缓合物在急性高尿酸血症小鼠模型中的抑制活性

以 8 mg/ml 的浓度将腺嘌呤溶于 0.5wt% 羧甲基纤维素钠溶液中, 获得腺嘌呤溶液。

以 40 mg/ml 的浓度将氧嗪酸钾溶于 0.5wt% 羧甲基纤维素钠溶液中, 获得氧嗪酸钾溶液。

将 6-8 周龄正常雌性小鼠 C57BL/6J 随机分组, 每组 5 只。第一组的 5 只小鼠不注射任何物质, 作为空白对照 (Blank); 第二组的 5 只小鼠先以上述腺嘌呤溶液灌胃, 剂量为 12.5 ml/kg 小鼠体重, 即腺嘌呤剂量为 100 mg/kg, 灌胃 30min 后, 向每只小鼠皮下注射 200 $\mu$ l 上述氧嗪酸钾溶液; 第三组的 5 只小鼠先皮下注射缓合物 13 (5 mg/kg 小鼠体重, 以 siRNA 计), 然后以上述腺嘌呤溶液灌胃, 剂量为 12.5 ml/kg 小鼠体重, 即腺嘌呤剂量为 100 mg/kg, 灌胃 30min 后, 向每只小鼠皮下注射 200 $\mu$ l 上述氧嗪酸钾溶液。分别在 0h、1h、2h、4h 时眼眶取血 200  $\mu$ L, 离心后取 100  $\mu$ L 血清, 在各时间点检测其中尿酸含量 (委托迪安检测公司检测)。其中, 0h 取血点为在给药前 2h 以内完成取血。检测结果如图 3 所示, 其中每组血清尿酸含量值以 0h 时以及各时间点的空白对照组的平均血清尿酸含量值的数据进行归一化, 以归一化后的相对血清尿酸含量作为纵坐标。

由图 3 可以看出, 相对于只注射了腺嘌呤和氧嗪酸钾的第二组小鼠, 注射了缓合物 13、腺嘌呤和氧嗪酸钾的第三组小鼠血清中的尿酸含量显示出明显降低, 说明本公开的 siRNA 缓合物可显著降低高尿酸模型小鼠中的血尿酸含量。

以上详细描述了本公开的一些实施方案, 但是, 本公开并不限于上述实施方案中的具体细节, 在本公开的技术构思范围内, 可以对本公开的技术方案进行多种简单变型, 这些简单变型均属于本公开的保护范围。

另外需要说明的是, 在上述一些实施方案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, 本公开对各种可能的组合方式不再另行说明。

此外, 本公开的各种不同的实施方案之间也可以进行任意组合, 只要其不违背本公开的思想, 其同样应当视为本公开所公开的内容。

以引用的方式并入

本说明书中提及的所有出版物、专利以及专利申请均以引用的方式并入本文, 其程度与每一单独的出版物、专利或专利申请均专门并且单独地以引用的方式并入本文的程度相同。

## 权 利 要 求 书

1. 一种 siRNA, 所述 siRNA 含有正义链和反义链, 所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸, 其中, 所述正义链含有一段核苷酸序列 I, 反义链含有一段核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区, 其中, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5' -CCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>1</sub>-3' (SEQ ID NO: 1);

5' -Z<sub>2</sub>UCUUAUAAUCUUCUAGG-3' (SEQ ID NO: 2),

其中, Z<sub>1</sub> 为 A, Z<sub>2</sub> 为 U, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>1</sub> 的核苷酸 Z<sub>3</sub>, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>2</sub> 的核苷酸 Z<sub>4</sub>, 所述 Z<sub>4</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸; 或者, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5' -GUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>5</sub>-3' (SEQ ID NO: 61);

5' -Z<sub>6</sub>UAACUUCUGGUACUGUAC-3' (SEQ ID NO: 62),

其中, Z<sub>5</sub> 为 U, Z<sub>6</sub> 为 A, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>5</sub> 的核苷酸 Z<sub>7</sub>, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>6</sub> 的核苷酸 Z<sub>8</sub>, 所述 Z<sub>8</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸; 或者, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 121 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5' -CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>9</sub>-3' (SEQ ID NO: 121);

5' -Z<sub>10</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 122),

其中, Z<sub>9</sub> 为 A, Z<sub>10</sub> 为 U;

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>9</sub> 的核苷酸 Z<sub>11</sub>, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>10</sub> 的核苷酸 Z<sub>12</sub>, 所述 Z<sub>12</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸; 或者,

所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 181 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5' -CAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>13</sub>-3' (SEQ ID NO: 181);

5' -Z<sub>14</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 182),

其中, Z<sub>13</sub> 为 A, Z<sub>14</sub> 为 U, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z<sub>13</sub> 的核苷酸 Z<sub>15</sub>, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z<sub>14</sub> 的核苷酸 Z<sub>16</sub>, 所述 Z<sub>16</sub> 是所述反义链 5' 末端的第一个核苷酸。

2. 如权利要求 1 所述的 siRNA, 其中, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异, 和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异;

或者, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异, 和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异;

或者, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 121 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异, 和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异;

或者, 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 181 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异, 和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 siRNA, 其中, 所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>4</sub> 位置处的差异, 且 Z<sub>4</sub> 选自 A、C 或 G;

或者, 所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>8</sub> 位置处的差异, 且 Z<sub>8</sub> 选自 U、C 或 G;

或者, 所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>12</sub> 位置处的差异, 且 Z<sub>12</sub> 选自 A、C 或 G;

或者, 所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z<sub>16</sub> 位置处的差异, 且 Z<sub>16</sub> 选自 A、C 或 G。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的 siRNA, 其中 Z<sub>3</sub> 是与 Z<sub>4</sub> 互补的核苷酸; 或者, Z<sub>7</sub> 是与 Z<sub>8</sub> 互补的核苷酸; 或者, Z<sub>11</sub> 是与 Z<sub>12</sub> 互补的核苷酸; 或者, Z<sub>15</sub> 是与 Z<sub>16</sub> 互补的核苷酸。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II

基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补；所述基本上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于3个的碱基错配；所述实质上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于1个的碱基错配；完全反向互补是指两个核苷酸序列之间没有错配。

5 6. 如权利要求1-5中任一项所述的siRNA, 其中, 所述核苷酸序列I是SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列, 所述核苷酸序列II是SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列:

5'-CCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO: 3);

5'-Z<sub>4</sub>UCUUAUAAUCUUCAUAGG-3' (SEQ ID NO: 4),

其中, Z<sub>3</sub>选自A、U、G或C, Z<sub>4</sub>是与Z<sub>3</sub>互补的核苷酸;

10 或者, 所述核苷酸序列I是SEQ ID NO: 63所示的核苷酸序列, 所述核苷酸序列II是SEQ ID NO: 64所示的核苷酸序列:

5'-GUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO: 63);

5'-Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUAC-3' (SEQ ID NO: 64),

其中, Z<sub>7</sub>选自A、U、G或C, Z<sub>8</sub>是与Z<sub>7</sub>互补的核苷酸;

15 或者, 所述核苷酸序列I是SEQ ID NO: 123所示的核苷酸序列, 核苷酸序列II是SEQ ID NO: 124所示的核苷酸序列:

5'-CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 123);

5'-Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 124),

其中, Z<sub>11</sub>选自A、U、G或C, Z<sub>12</sub>是与Z<sub>11</sub>互补的核苷酸;

20 或者, 所述核苷酸序列I是SEQ ID NO: 183所示的核苷酸序列, 核苷酸序列II是SEQ ID NO: 184所示的核苷酸序列:

5'-CAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO: 183);

5'-Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUG-3' (SEQ ID NO: 184),

其中, Z<sub>15</sub>选自A、U、G或C, Z<sub>16</sub>是与Z<sub>15</sub>互补的核苷酸。

25 7. 如权利要求6所述的siRNA, 其中Z<sub>3</sub>为A, Z<sub>4</sub>为U; 或者, Z<sub>7</sub>为U, Z<sub>8</sub>为A; 或者, Z<sub>11</sub>为A, Z<sub>12</sub>为U; 或者, Z<sub>15</sub>为A, Z<sub>16</sub>为U。

30 8. 如权利要求1-7中任一项所述的siRNA, 其中, 所述正义链还含有核苷酸序列III, 所述反义链还含有核苷酸序列IV, 核苷酸序列III和核苷酸序列IV的长度各自独立地为1-4个核苷酸, 所述核苷酸序列III连接在核苷酸序列I的5'末端, 核苷酸序列IV连接在核苷酸序列II的3'末端, 所述核苷酸序列III和所述核苷酸序列IV长度相等并且实质上反向互补或完全反向互补; 所述实质上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于1个的碱基错配; 完全反向互补是指两个核苷酸序列之间没有错配。

35 9. 如权利要求8所述的siRNA, 其中, 所述核苷酸序列I与SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异, 并且, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为1个核苷酸, 所述核苷酸序列III的碱基为A; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为2个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为CA; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为3个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为ACA; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为4个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为UACA; 或者,

40 所述核苷酸序列I与SEQ ID NO: 61所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异, 并且, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为1个核苷酸, 所述核苷酸序列III的碱基为A; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为2个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为GA; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为3个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为UGA; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为4个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为AUGA; 或者,

45 所述核苷酸序列I与SEQ ID NO: 121所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异, 并且, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为1个核苷酸, 所述核苷酸序列III的碱基为G; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为2个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为GG; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为3个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为UGG; 或者, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为4个核苷酸, 按照5'末端到3'末端的方向, 核苷酸序列III的碱基组成为CUGG;

50 或者, 所述核苷酸序列I与SEQ ID NO: 181所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异, 并且, 所述核苷酸序列III和IV的长度均为1个核苷酸, 所述核苷酸序列III的

碱基为 C; 或者, 所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 核苷酸序列 III 的碱基组成为 AC; 或者, 所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 核苷酸序列 III 的碱基组成为 GAC; 或者, 所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸, 按照 5' 末端到 3' 末端的方向, 核苷酸序列 III 的碱基组成为 AGAC。

5  
10  
10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述反义链还含有核苷酸序列 V, 核苷酸序列 V 的长度为 1 至 3 个核苷酸, 连接在所述反义链的 3' 末端, 构成反义链的 3' 突出端;  
或者所述核苷酸序列 V 的长度为 2 个核苷酸;  
或者所述核苷酸序列 V 为连续的两个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸或连续的两个尿嘧啶核糖核苷酸,  
或者所述核苷酸序列 V 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸互补。

15  
11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列, 所述反义链含有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列:  
5'-CCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO: 5);  
5'-Z<sub>4</sub>UCUUAUAAUCUUCUAGGUG-3' (SEQ ID NO: 6);  
或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列, 所述反义链含有如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列:  
20  
5'-CACCUAUGAAGAUUAUAAGAZ<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO: 7);  
5'-Z<sub>4</sub>UCUUAUAAUCUUCUAGGUGUA-3' (SEQ ID NO: 8);  
其中, 所述 Z<sub>4</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸, Z<sub>3</sub> 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z<sub>4</sub> 是与 Z<sub>3</sub> 互补的核苷酸;  
或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 65 所示的核苷酸序列, 所述反义链含有如 SEQ ID NO: 66 所示的核苷酸序列:  
25  
5'-GUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO: 65);  
5'-Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUACUC-3' (SEQ ID NO: 66),  
或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 67 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 68 所示的核苷酸序列:  
30  
5'-GAGUACAGUACCAGAAGUUAZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO: 67);  
5'-Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUACUCAU-3' (SEQ ID NO: 68),  
其中, 所述 Z<sub>8</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸, Z<sub>7</sub> 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z<sub>8</sub> 是与 Z<sub>7</sub> 互补的核苷酸;  
或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 125 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 126 所示的核苷酸序列:  
35  
5'-CAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 125);  
5'-Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCC-3' (SEQ ID NO: 126),  
或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 127 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 128 所示的核苷酸序列:  
40  
5'-GGCAAACAAGCUGCACAGAAZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO: 127);  
5'-Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCCAG-3' (SEQ ID NO: 128),  
其中, 所述 Z<sub>12</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸, Z<sub>11</sub> 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z<sub>12</sub> 是与 Z<sub>11</sub> 互补的核苷酸;  
或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 185 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 186 所示的核苷酸序列:  
45  
5'-CAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO: 185);  
5'-Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUGGU-3' (SEQ ID NO: 186),  
或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 187 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 188 所示的核苷酸序列:  
50  
5'-ACCAAACAAGGACUAAUCCAZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO: 187);  
5'-Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUGGUCU-3' (SEQ ID NO: 188),  
其中, 所述 Z<sub>16</sub> 是反义链 5' 末端的第一个核苷酸, Z<sub>15</sub> 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z<sub>16</sub> 是与 Z<sub>15</sub> 互补的核苷酸。

55  
12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 为 siPNa1、siPNa2、siPNb1、siPNb2、siPNc1、siPNc2、siPnd1 或 siPnd2 中的任意一种。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述正义链或所述反义链中的至少一个核苷酸为修饰的核苷酸, 和/或至少一个磷酸酯基为具有修饰基团的磷酸酯基。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述正义链和所述反义链中的每一个核苷酸独立地为氟代修饰的核苷酸或非氟代修饰的核苷酸。

15. 如权利要求 14 所述的 siRNA, 其中, 所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II 中, 并且, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述核苷酸序列 I 的至少第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸; 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述核苷酸序列 II 的至少第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸; 优选地, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 在所述正义链中, 所述核苷酸序列 I 的第 7、8、9 位或者 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, 所述正义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸; 按照 5'末端到 3'末端的方向, 在所述反义链中, 所述核苷酸序列 II 的第 2、6、14、16 位或者 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, 所述反义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸。

16. 如权利要求 14-15 中任一项所述的 siRNA, 其中, 每一个非氟代修饰的核苷酸独立地选自核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物中的一种。

17. 如权利要求 16 所述的 siRNA, 其中, 核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸选自 2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸中的一种; 核苷酸类似物选自异核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA 和 GNA 中的一种。

18. 如权利要求 14-15 中任一项所述的 siRNA, 其中, 每一个非氟代修饰的核苷酸均为甲氧基修饰的核苷酸, 所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

19. 如权利要求 18 所述的 siRNA, 其中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、8、9、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸;

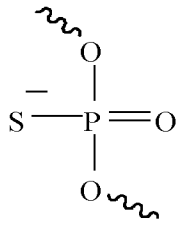
或者, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸;

或者, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 7、8 和 9 位的核苷酸为-氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸。

20. 如权利要求 1-19 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 为 siPNa1-M1、siPNa2-M1、siPNa1-M2、siPNa2-M2、siPNa1-M3、siPNa2-M3、siPNb1-M1、siPNb2-M1、siPNb1-M2、siPNb2-M2、siPNb1-M3、siPNb2-M3、siPNc1-M1、siPNc2-M1、siPNc1-M2、siPNc2-M2、siPNc1-M3、siPNc2-M3、siPNd1-M1、siPNd2-M1、siPNd1-M2、siPNd2-M2、siPNd1-M3、siPNd2-M3 中的任意一种。

21. 如权利要求 13 所述的 siRNA, 其中, 所述具有修饰基团的磷酸酯基为磷酸酯基中的磷酸二酯键中的至少一个氧原子被硫原子取代而形成的硫代磷酸酯基。

22. 如权利要求 13 或 21 所述的 siRNA, 其中, 所述具有修饰基团的磷酸酯基为具有如式(1)所示结构的硫代磷酸酯基:

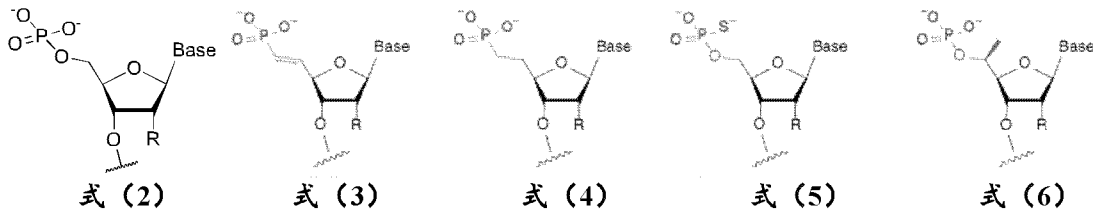


23. 如权利要求 21 或 22 所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 中, 硫代磷酸酯基连接存在于由以下位置组成的组中的至少一处:

- 5 所述正义链的 5' 末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间;
- 所述正义链的 5' 末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间;
- 所述正义链的 3' 末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间;
- 所述正义链的 3' 末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间;
- 10 所述反义链的 5' 末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间;
- 所述反义链的 5' 末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间;
- 所述反义链的 3' 末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间; 以及
- 所述反义链的 3' 末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

24. 如权利要求 1-23 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 为 siPNa1-M1S、siPNa2-M1S、siPNa1-M2S、siPNa2-M2S、siPNa1-M3S、siPNa2-M3S、siPNb1-M1S、siPNb2-M1S、siPNb1-M2S、siPNb2-M2S、siPNb1-M3S、siPNb2-M3S、siPNc1-M1S、siPNc2-M1S、siPNc1-M2S、siPNc2-M2S、siPNc1-M3S、siPNc2-M3S、siPNd1-M1S、siPNd2-M1S、siPNd1-M2S、siPNd2-M2S、siPNd1-M3S、siPNd2-M3S 中的任意一种。

25. 如权利要求 1-24 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述反义链的 5' 末端核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸; 优选地, 所述 5'-磷酸核苷酸为具有如式 (2) 所示结构的核苷酸, 所述 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸选自结构如式 (3) - 式 (6) 中任意一个所示的核苷酸,



25 其中, R 选自 H、OH、甲氧基或氟; Base 表示核酸碱基, 选自 A、U、C、G 或 T。

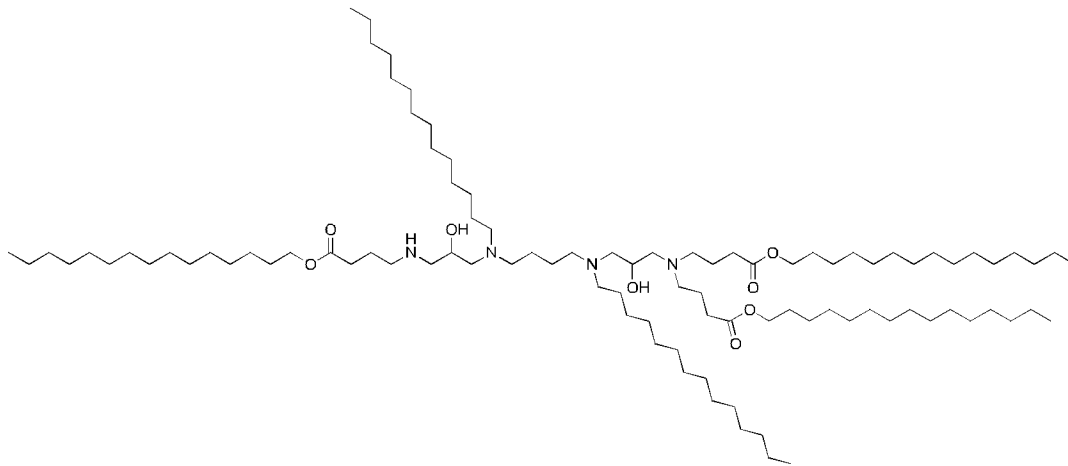
26. 如权利要求 1-25 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 为 siPNa1-M1P1、siPNa2-M1P1、siPNa1-M2P1、siPNa2-M2P1、siPNa1-M3P1、siPNa2-M3P1、siPNa1-M1SP1、siPNa2-M1SP1、siPNa1-M2SP1、siPNa2-M2SP1、siPNa1-M3SP1、siPNa2-M3SP1、siPNb1-M1P1、siPNb2-M1P1、siPNb1-M2P1、siPNb2-M2P1、siPNb1-M3P1、siPNb2-M3P1、siPNb1-M1SP1、siPNb2-M1SP1、siPNb1-M2SP1、siPNb2-M2SP1、siPNb1-M3SP1、siPNb2-M3SP1、siPNc1-M1P1、siPNc2-M1P1、siPNc1-M2P1、siPNc2-M2P1、siPNc1-M3P1、siPNc2-M3P1、siPNc1-M1SP1、siPNc2-M1SP1、siPNc1-M2SP1、siPNc2-M2SP1、siPNc1-M3SP1、siPNc2-M3SP1、siPNd1-M1P1、siPNd2-M1P1、siPNd1-M2P1、siPNd2-M2P1、siPNd1-M3P1、siPNd2-M3P1、siPNd1-M1SP1、siPNd2-M1SP1、siPNd1-M2SP1、siPNd2-M2SP1、siPNd1-M3SP1、siPNd2-M3SP1 中的任意一种。

27. 一种药物组合物, 其特征在于, 该药物组合物含有权利要求 1-26 中任意一项所述的 siRNA 和药学上可接受的载体。

28. 如权利要求 27 所述的药物组合物, 其中, 所述 siRNA 与药学上可接受的载体的重量比为 1 : (1-500); 优选地, 所述 siRNA 与药学上可接受的载体的重量比为 1 : (1-50)。

29. 如权利要求 27-28 中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药学上可接受的载体含有有机胺、辅助脂质和聚乙二醇化脂质; 其中, 所述有机胺为如式 (201) 所示的化合物和/或其药学上可接受的盐:





式 (215);

所述辅助脂质为胆固醇、胆固醇的类似物和/或胆固醇的衍生物;

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

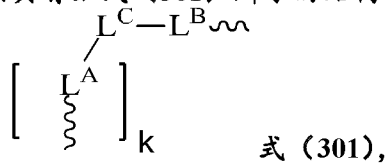
5

30. 如权利要求 28 或 29 所述的药物组合物, 其中, 所述有机胺、所述辅助脂质和所述聚乙二醇化脂质三者之间的摩尔比为(19.7-80) : (19.7-80) : (0.3-50); 优选地, 所述有机胺、所述辅助脂质和所述聚乙二醇化脂质三者之间的摩尔比为(50-70) : (20-40) : (3-20)。

31. 一种 siRNA 缀合物, 所述 siRNA 缀合物含有权利要求 1-26 中任意一项所述的 siRNA 以及缀合连接至该 siRNA 的缀合基团。

32. 如权利要求 31 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述缀合基团包含药学上可接受的靶向基团和接头, 并且, 所述 siRNA、所述接头和所述靶向基团依次共价或非共价连接; 优选地, 所述接头具有如式 (301) 所示的结构:

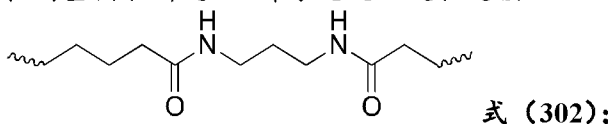
15



其中, k 为 1-3 的整数;

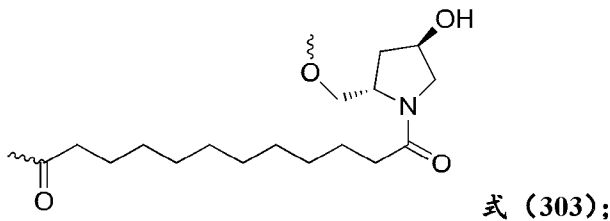
L<sup>A</sup> 为具有如式 (302) 所示结构的包含酰胺键的链状部分, 每个所述 L<sup>A</sup> 在其两端分别与一个所述靶向基团和所述 L<sup>C</sup> 部分通过醚键相连接:

20

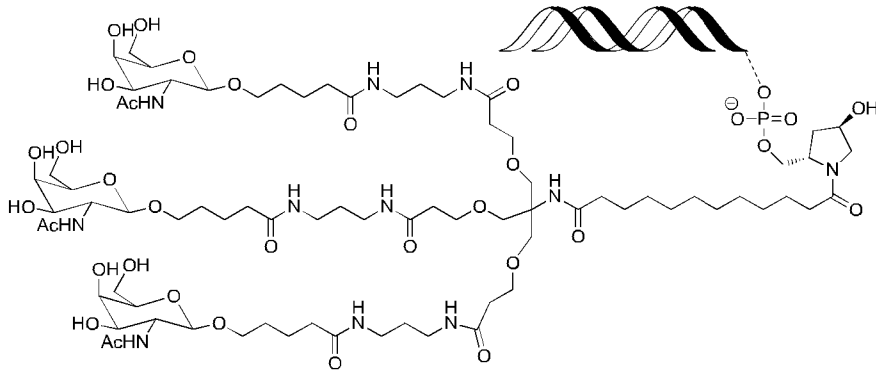


L<sup>B</sup> 为具有如式 (303) 所示结构的包含 N-酰基吡咯烷的链状部分, 所述链状部分在其一端具有羰基并与所述 L<sup>C</sup> 部分通过酰胺键相连接, 在另一端具有氧原子并与所述 siRNA 通过磷酸酯键相连接:

25



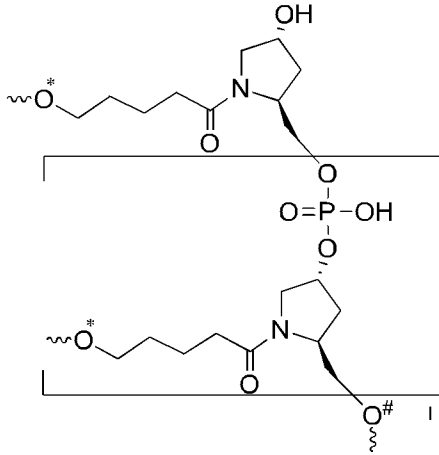
L<sup>C</sup> 为基于羟甲基氨基甲烷、二羟甲基氨基甲烷或三羟甲基氨基甲烷的 2-4 价连接基团, 所述 L<sup>C</sup> 经由氧原子与各个所述 L<sup>A</sup> 部分通过醚键相连接, 并且经由氮原子与所述 L<sup>B</sup> 部分通过酰胺键相连接; 优选地, 所述 siRNA 缀合物具有如式 (305) 所示的结构:



式 (305),

其中, 双螺旋结构表示所述 siRNA。

33. 如权利要求 32 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述接头具有式 (306) 所示的结构:



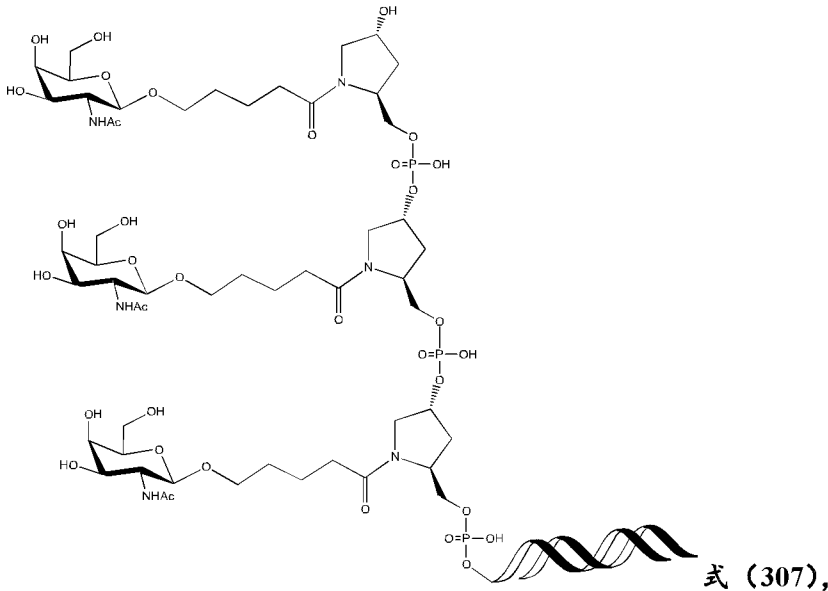
式 (306),

其中, 1 为 0-3 的整数;

\*表示所述接头上通过醚键与所述靶向基团连接的位点;

#表示所述接头上通过磷酸酯键与所述 siRNA 连接的位点。

34. 如权利要求 31-33 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述 siRNA 缀合物具有如式(307)所示的结构:

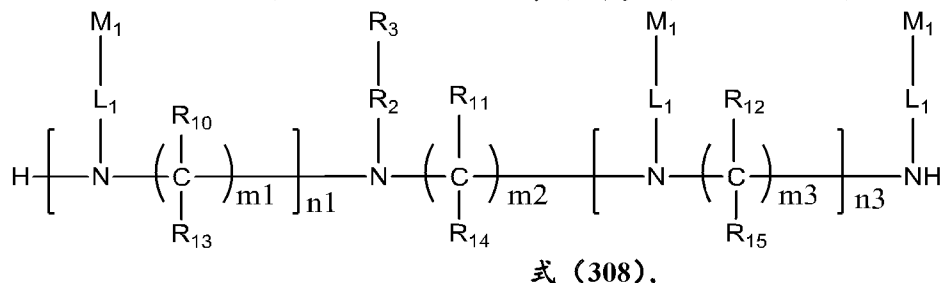


式 (307),

其中, 双螺旋结构表示所述 siRNA。

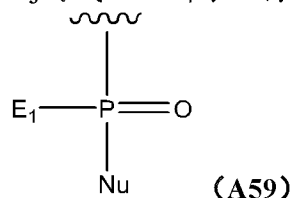
35. 如权利要求 31-34 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述接头连接至所述 siRNA 的正义链 3'末端。

36. 如权利要求 35 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述缀合物具有式 (308) 所示的结构:



其中,

- 5 n1 为选自 1-3 的整数, n3 为选自 0-4 的整数;  
 每个 m1、m2 或 m3 各自独立地为选自 2-10 的整数;  
 每个 R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub> 或 R<sub>15</sub> 各自独立地为 H, 或选自于由以下基团所组成的组: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基以及 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷氧基;  
 R<sub>3</sub> 为式 A59 所示结构的基团:



其中, E<sub>1</sub> 为 OH、SH 或 BH<sub>2</sub>, Nu 为权利要求 1-26 中任意一项所述的 siRNA;

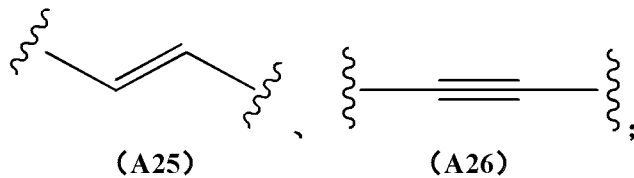
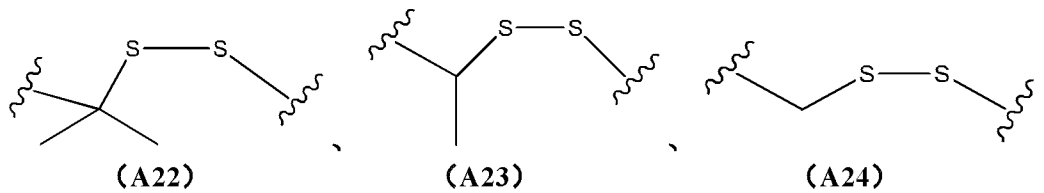
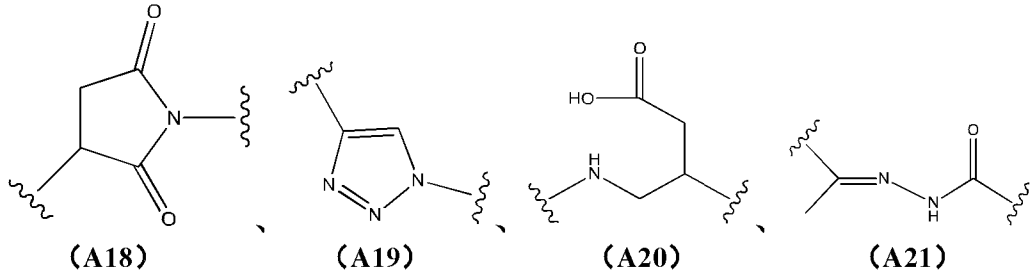
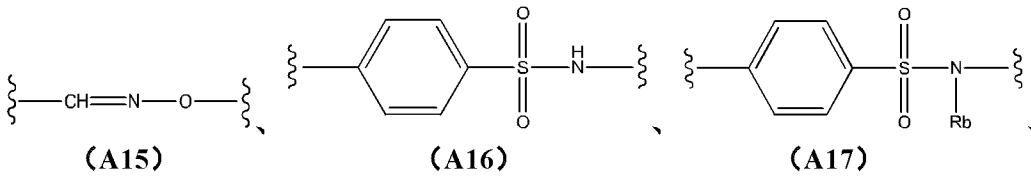
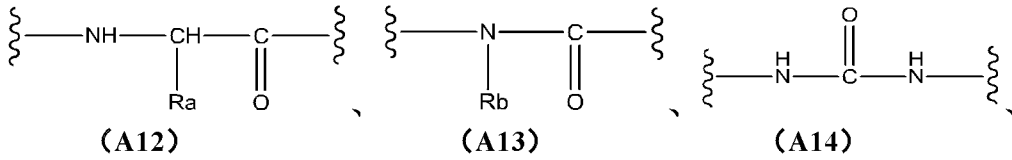
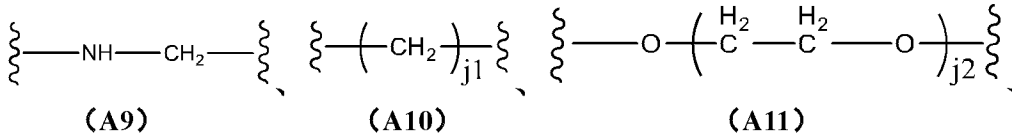
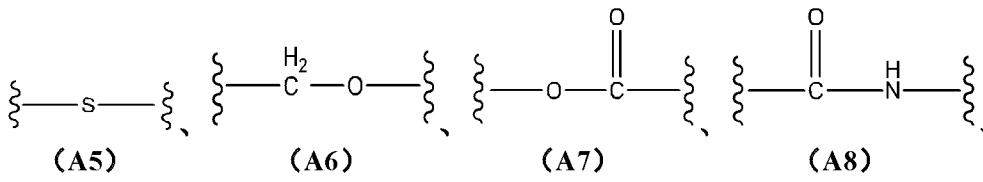
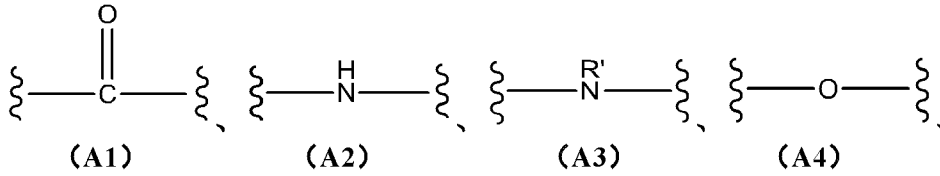
- R<sub>2</sub> 是长度为 1-20 个碳原子的直链亚烷基, 其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换: C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基; 并且其中 R<sub>2</sub> 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>、-NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHSO<sub>2</sub>(苯基)和 -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基);

- 25 每个 L<sub>1</sub> 独立地是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基, 其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换: C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基; 并且其中, L<sub>1</sub> 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>、-NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHSO<sub>2</sub>(苯基)和 -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基);

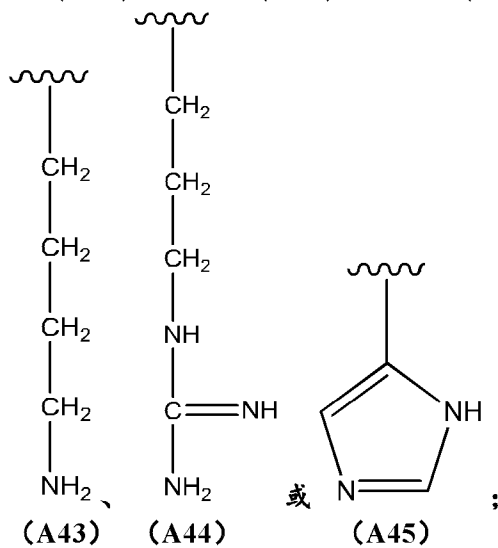
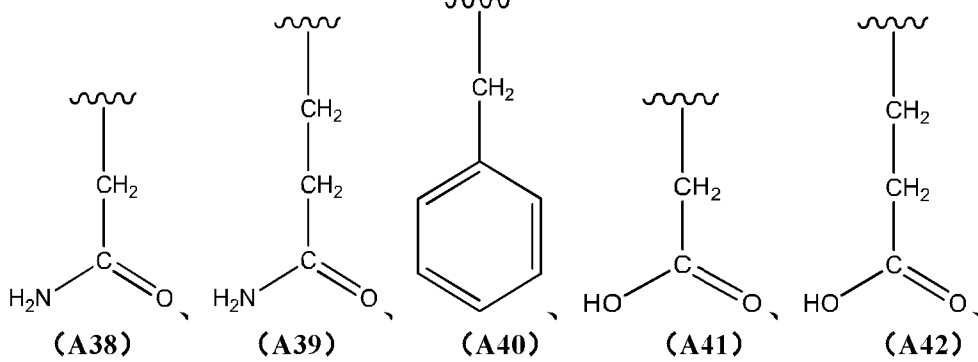
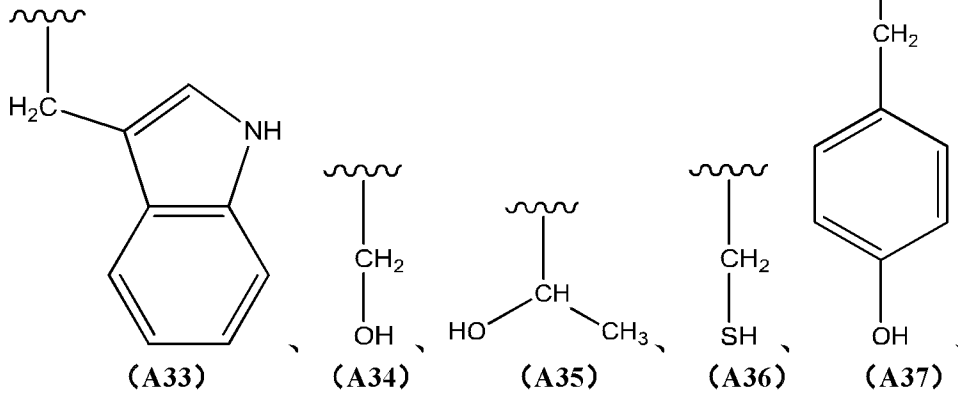
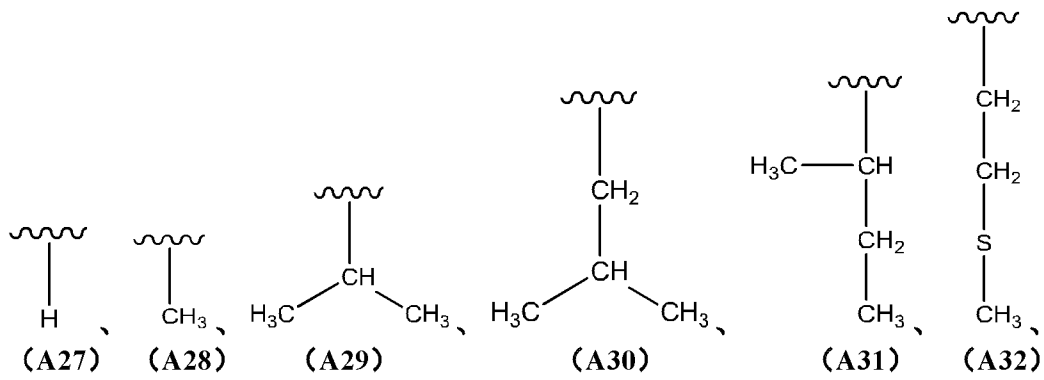
~ 表示基团共价连接的位点;

M<sub>1</sub> 表示靶向基团。

- 40 37. 如权利要求 36 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 每个 L<sub>1</sub> 独立地选自于由基团 A1-A26 基团及其任意组合所组成的组:



其中，每个 j1 独立地为 1-20 的整数；  
 每个 j2 独立地为 1-20 的整数；  
 每个 R' 独立地为 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基；  
 每个 Ra 选自于由 A27-A45 及其任意组合所组成的组；



每个 Rb 独立地为 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基；  
 ~~~~~ 表示基团共价连接的位点。

38. 如权利要求 39 所述的 siRNA 缀合物，其中，L<sub>1</sub> 选自自由基团 A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11、A13 及其连接组合所组成的组；优选地，L<sub>1</sub> 为基团 A1、A4、A8、A10 和 A11 中至

少 2 个的连接组合；优选地， $L_1$  为基团 A1、A8 和 A10 中至少 2 个的连接组合。

39. 如权利要求 31-38 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中， $L_1$  的长度为 3-25 个原子；优选地， $L_1$  的长度为 4-15 个原子。

40. 如权利要求 37-39 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中， $j_1$  为 2-10 的整数， $j_2$  为 2-10 的整数， $R'$  为  $C_1$ - $C_4$  烷基， $R_a$  为 A27、A28、A29、A30 和 A31 中的一种， $R_b$  为  $C_1$ - $C_5$  烷基；优选地， $j_1$  为 3-5 的整数， $j_2$  为 3-5 的整数， $R'$  为甲基、乙基和异丙基中的一种， $R_a$  为 A27 或 A28， $R_b$  为甲基、乙基、异丙基和丁基中的一种。

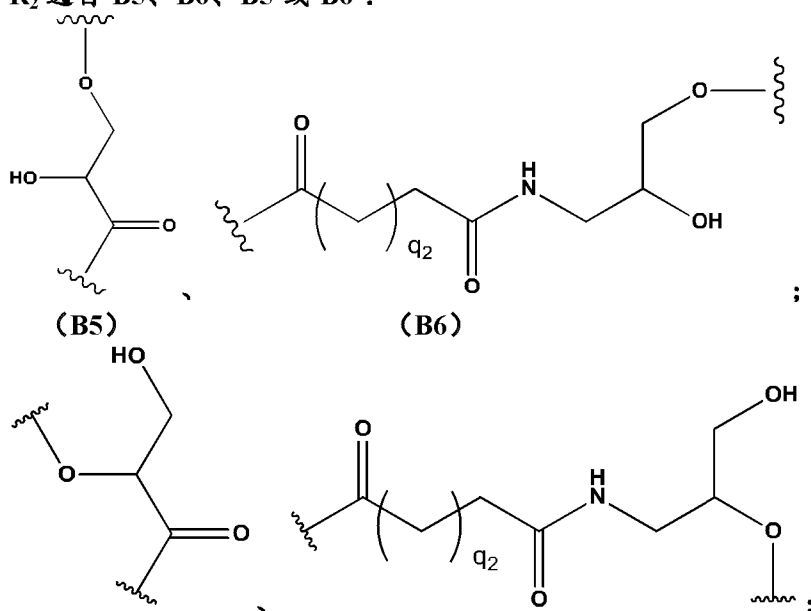
41. 如权利要求 38-40 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中， $n_1$  为 1-2 的整数， $n_3$  为 0-1 的整数，且  $n_1+n_3=2-3$ 。

42. 如权利要求 36-41 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每个  $m_1$ 、 $m_2$  和  $m_3$  各自独立地为 2-5 的整数；优选地， $m_1=m_2=m_3$ 。

43. 如权利要求 31-42 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每个所述靶向基团独立地为与哺乳动物肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体亲和的配体；优选地，每个所述靶向基团独立地为去唾液酸糖蛋白或糖；优选地，每个所述靶向基团独立地选自 D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃甘露糖、 $\beta$ -D-呋喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃甘露糖、 $\beta$ -D-吡喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃葡萄糖、 $\beta$ -D-呋喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃果糖、 $\alpha$ -D-吡喃果糖、 $\alpha$ -D-吡喃半乳糖、 $\beta$ -D-吡喃半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃半乳糖、 $\beta$ -D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-三氟乙酰半乳糖胺、N-丙酰半乳糖胺、N-正丁酰半乳糖胺、N-异丁酰半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基- $\alpha$ -神经氨酸、5-硫代- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代- $\beta$ -D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代- $\alpha$ -D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种；优选地，至少一个或每个所述靶向基团为半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺。

44. 如权利要求 31-43 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中， $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$  或  $R_{15}$  独立地为 H、甲基或乙基。

45. 如权利要求 31-44 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中， $R_2$  上同时含有与含氮骨架上的 N 原子连接的连接位点和与  $R_3$  中的 P 原子连接的连接位点；优选地， $R_2$  上所述与含氮骨架上的 N 原子连接的位点与 N 形成酰胺键，所述与  $R_3$  上的 P 原子连接的位点与 P 形成磷酸酯键；优选地， $R_2$  选自 B5、B6、B5' 或 B6'：



(B5')

(B6')

其中,  $\sim$  表示基因共价键连接的位点,  $q_2$  为 1-10 的整数; 优选地,  $q_2$  为 1-5 的整数。

5 46. 如权利要求 31-45 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, 该缀合物具有式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421) 或 (422) 所示的结构。

10 47. 如权利要求 31-46 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, 式 A59 中的 P 原子连接到 siRNA 正义链或反义链的端部, 所述端部指所述正义链或反义链中从其一端起算的前 4 个核苷酸; 优选地, 式 A59 中的 P 原子连接到所述 siRNA 正义链或反义链的末端; 优选地, 式 A59 中的 P 原子连接到所述 siRNA 正义链的 3' 末端; 优选地, 式 A59 中的 P 原子通过磷酸二酯键连接至所述 siRNA 中的核苷酸的 2' 位、3' 位或 5' 位。

15 48. 权利要求 1-26 中任一项所述的 siRNA、权利要求 27-30 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 31-47 中任一项所述的 siRNA 缀合物在制备用于治疗 and/或预防尿酸代谢异常或其引发的疾病或生理状况的药物中的用途。

20 49. 如权利要求 48 所述的用途, 其中, 所述尿酸代谢异常引发的疾病或生理状况为高尿酸血症或痛风症。

50. 一种治疗和/或预防尿酸代谢异常或其引发的疾病或生理状况的方法, 其中, 所述方法包括将有效量的权利要求 1-26 中任一项所述的 siRNA、权利要求 27-30 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 31-47 中任一项所述的 siRNA 缀合物给予患有尿酸代谢异常的受试者。

25 51. 如权利要求 50 所述的方法, 其中, 所述尿酸代谢异常引发的疾病或生理状况为高尿酸血症或痛风症。

30 52. 一种抑制肝细胞中 PNP 基因表达的方法, 该方法包括将有效量的权利要求 1-26 中任一项所述的 siRNA、权利要求 27-30 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 31-47 中任一项所述的 siRNA 缀合物与所述肝细胞接触。

53. 一种试剂盒, 其中, 该试剂盒含有权利要求 1-26 任一项所述的 siRNA、权利要求 27-30 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 31-47 中任一项所述的 siRNA 缀合物。

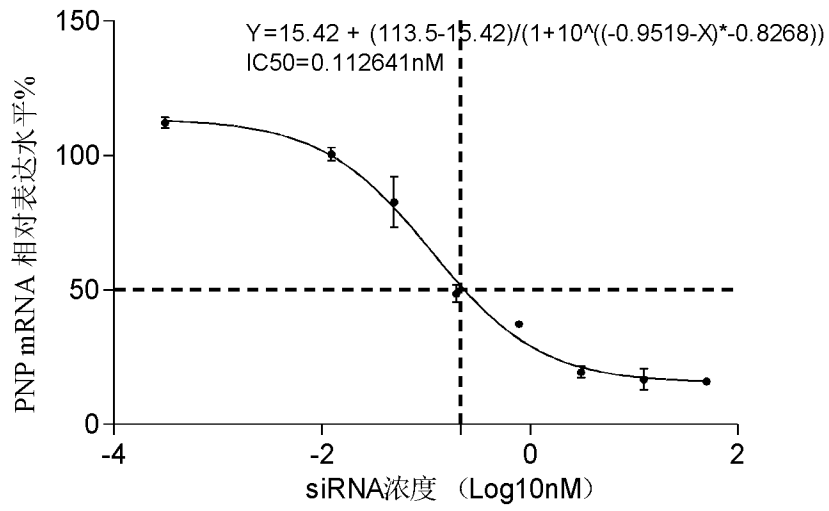


图 1A

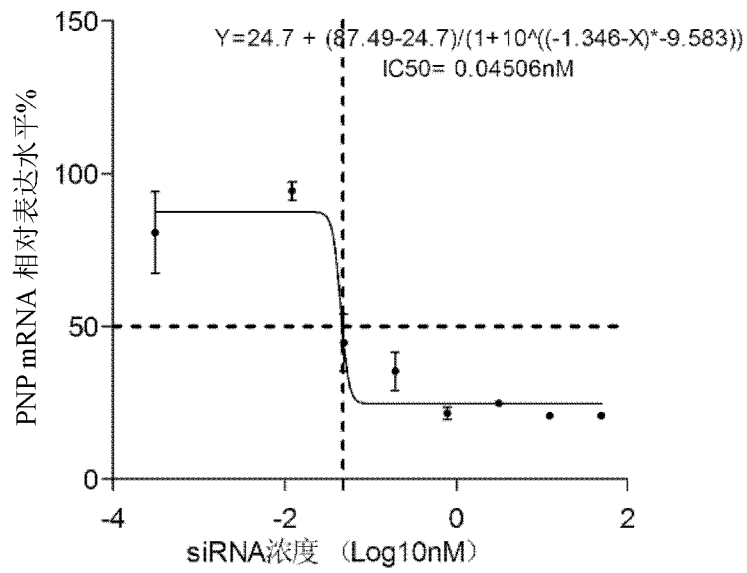


图 1B

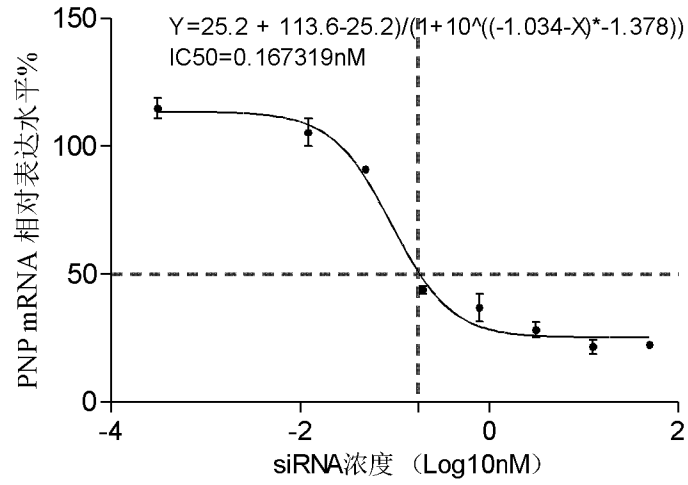


图 1C

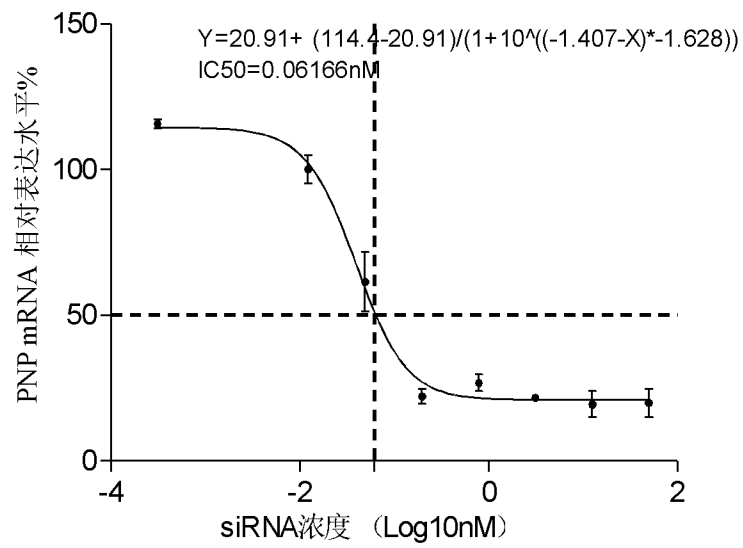


图 1D

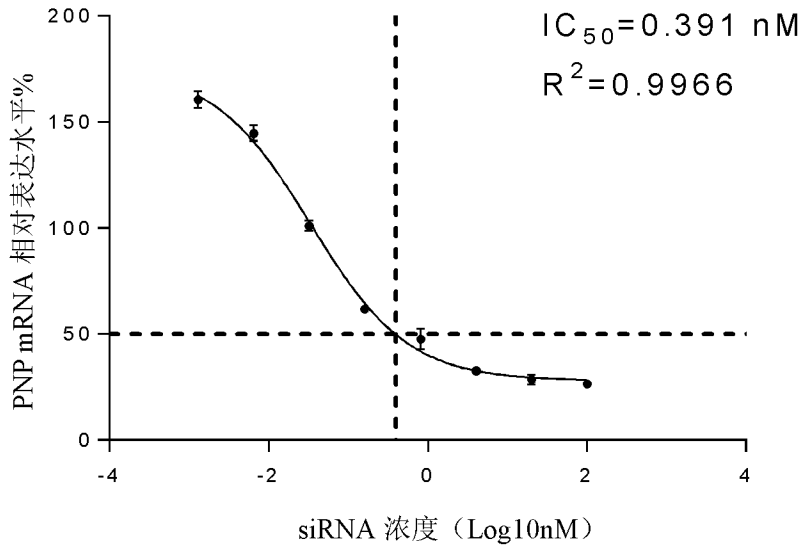


图 2A

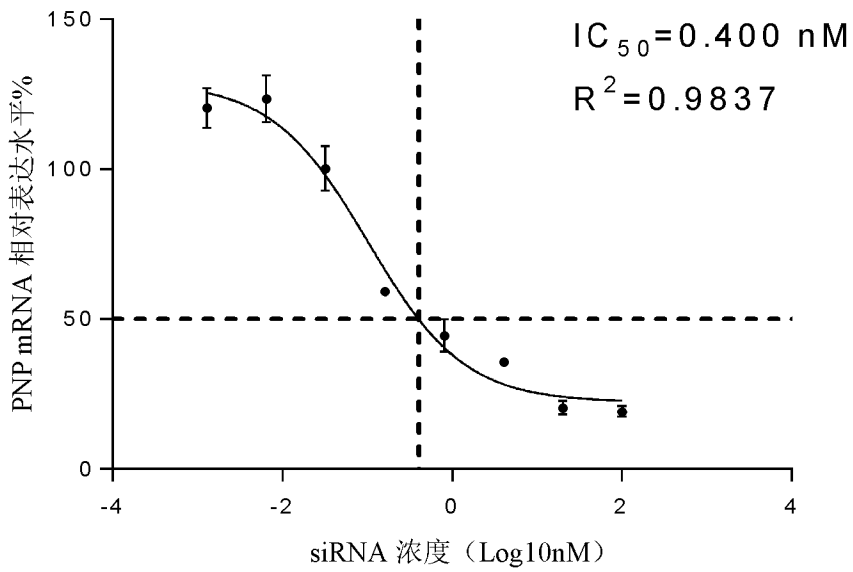


图 2B

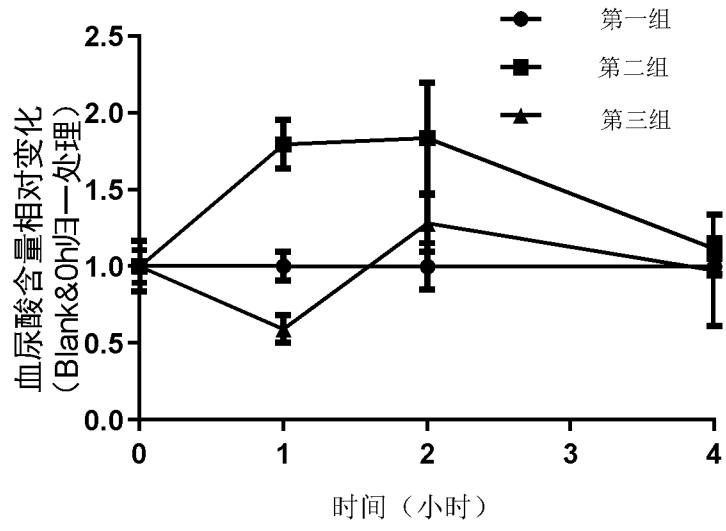


图 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2020/091485**

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| C12N 15/113(2010.01)i; C07D 211/58(2006.01)i; C07C 229/16(2006.01)i; C07D 211/28(2006.01)i; C07C 229/26(2006.01)i; C07C 237/06(2006.01)i; C07C 229/24(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61P 19/06(2006.01)i                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12N, C07D, C07C, A61K, A61P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>CNABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED: 嘌呤核苷磷酸化酶, 痛风, Purine Nucleoside Phosphorylase, pnpase, pnp, gout, sirna, shrna, dsrna, "ccuauagaagauuaaaga", "cctatgaagattataaga", "guacaguaccagaaguua", "gtacagtaccagaagta"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                         | Relevant to claim No.                                                       |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2015006498 A2 (HARVARD COLLEGE et al.) 15 January 2015 (2015-01-15)<br>see claims 93-95, SEQ ID NO: 2581, figure 11                                                                     | 1-49 and 53 (all in part)                                                   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 106232831 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES et al.) 14 December 2016 (2016-12-14)<br>see table 1, SEQ ID NO: 1549 | 1-49 and 53 (all in part)                                                   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 104717982 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 17 June 2015 (2015-06-17)<br>see claims 1-26                                                                                                | 1-49 and 53 (all in part)                                                   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC) 15 January 2015 (2015-01-15)<br>see entire document                                                                                         | 1-49 and 53 (all in part)                                                   |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CN 103380113 A (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 30 October 2013 (2013-10-30)<br>see claims 1-42                                                                                                    | 1-49 and 53 (all in part)                                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                            |                                                                             |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>11 August 2020</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                            | Date of mailing of the international search report<br><b>25 August 2020</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br><b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)<br/>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing<br/>100088<br/>China</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                            | Authorized officer                                                          |
| Facsimile No. <b>(86-10)62019451</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                            | Telephone No.                                                               |

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                           |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Category*                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No.     |
| A                                      | Jonathan K Watts et al. "Chemically modified siRNA: tools and applications"<br><i>Drug Discov Today</i> , Vol. 13, No. 19-20, 07 July 2008 (2008-07-07),<br>ISSN: 1359-6446,<br>pages 842-855, see figure 2                                                                                                                                                                          | 1-49 and 53 (all in part) |
| A                                      | Luis Emiliano Peña-Altamira et al. "Release of soluble and vesicular purine nucleoside phosphorylase from rat astrocytes and microglia induced by pro-inflammatory stimulation with extracellular ATP via P2X7 receptors"<br><i>Neurochemistry International</i> , Vol. 115, 31 May 2018 (2018-05-31),<br>ISSN: 0197-0186,<br>pages 37-49, see page 40 right-hand column paragraph 3 | 1-49 and 53 (all in part) |
| A                                      | Kallanthottathil G Rajeev et al. "Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo"<br><i>Chembiochem</i> , Vol. 16, No. 6, 13 April 2015 (2015-04-13),<br>ISSN: 1439-4227,<br>pages 903-908, see abstract, figure 1, page 905                                                       | 1-49 and 53 (all in part) |

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **50-52**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[1] Claims 50-52 relate to a method for treatment of the human or animal body.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention one: claims 1-49 and 53 (all in part) relate to subject matter related to SEQ ID NOs: 1-8, siPNa1 and siPNa2, and modified nucleotides thereof.
- [2] Invention two: claims 1-49 and 53 (all in part) relate to subject matter related to SEQ ID NOs: 61-68, siPNb1 and siPNb2, and modified nucleotides thereof.
- [3] Invention three: claims 1-49 and 53 (all in part) relate to subject matter related to SEQ ID NOs: 121-128, siPNc1 and siPNc2, and modified nucleotides thereof.
- [4] Invention four: claims 1-49 and 53 (all in part) relate to subject matter related to SEQ ID NOs: 181-188, siPNd1 and siPNd2, and modified nucleotides thereof.
- [5] The technical feature shared by inventions one to four described above is siRNAs having general structures. However, the general siRNA structures are well-known siRNA frameworks in the present field. Therefore, inventions one to four described above do not share a same or corresponding special technical feature, and thus do not satisfy the criteria of PCT Rule 13.1, 13.2 and 13.3.

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: **The subject matter in claims 1-49 and 53 (all in part) related to SEQ ID NOs: 1-8, siPNa1 and siPNa2, and SEQ ID NOs: 61-68, siPNb1 and siPNb2, and modified nucleotides thereof.**
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/091485**

| Patent document cited in search report |             |    | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) |            |    | Publication date (day/month/year) |
|----------------------------------------|-------------|----|-----------------------------------|-------------------------|------------|----|-----------------------------------|
| WO                                     | 2015006498  | A2 | 15 January 2015                   | WO                      | 2016057835 | A2 | 14 April 2016                     |
|                                        |             |    |                                   | WO                      | 2015006498 | A3 | 02 April 2015                     |
|                                        |             |    |                                   | US                      | 2015152436 | A1 | 04 June 2015                      |
|                                        |             |    |                                   | EP                      | 3019595    | A2 | 18 May 2016                       |
|                                        |             |    |                                   | EP                      | 3019595    | A4 | 30 November 2016                  |
|                                        |             |    |                                   | US                      | 2020048659 | A1 | 13 February 2020                  |
|                                        |             |    |                                   | US                      | 10208319   | B2 | 19 February 2019                  |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 2016528890 | A  | 23 September 2016                 |
|                                        |             |    |                                   | WO                      | 2016057835 | A3 | 25 August 2016                    |
|                                        |             |    |                                   | CN                      | 106232831  | A  | 14 December 2016                  |
| KR                                     | 20160127713 | A  | 04 November 2016                  |                         |            |    |                                   |
| WO                                     | 2015069790  | A9 | 02 June 2016                      |                         |            |    |                                   |
| AU                                     | 2014346788  | A1 | 26 May 2016                       |                         |            |    |                                   |
| EP                                     | 3066215     | B1 | 24 April 2019                     |                         |            |    |                                   |
| US                                     | 10607717    | B2 | 31 March 2020                     |                         |            |    |                                   |
| JP                                     | 2020078323  | A  | 28 May 2020                       |                         |            |    |                                   |
| WO                                     | 2015069790  | A1 | 14 May 2015                       |                         |            |    |                                   |
| US                                     | 2020143906  | A1 | 07 May 2020                       |                         |            |    |                                   |
| EP                                     | 3066215     | A1 | 14 September 2016                 |                         |            |    |                                   |
| AU                                     | 2014346788  | A8 | 16 June 2016                      |                         |            |    |                                   |
| JP                                     | 2017502686  | A  | 26 January 2017                   |                         |            |    |                                   |
| CA                                     | 2929826     | A1 | 14 May 2015                       |                         |            |    |                                   |
| EP                                     | 3594359     | A1 | 15 January 2020                   |                         |            |    |                                   |
| ES                                     | 2738289     | T3 | 21 January 2020                   |                         |            |    |                                   |
| JP                                     | 6657105     | B2 | 04 March 2020                     |                         |            |    |                                   |
| CN                                     | 104717982   | A  | 17 June 2015                      | AU                      | 2013299717 | B2 | 28 June 2018                      |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 2015525797 | A  | 07 September 2015                 |
|                                        |             |    |                                   | US                      | 10086081   | B2 | 02 October 2018                   |
|                                        |             |    |                                   | EP                      | 2879718    | A1 | 10 June 2015                      |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 2018062520 | A  | 19 April 2018                     |
|                                        |             |    |                                   | US                      | 2015196655 | A1 | 16 July 2015                      |
|                                        |             |    |                                   | WO                      | 2014025805 | A1 | 13 February 2014                  |
|                                        |             |    |                                   | HK                      | 1210952    | A1 | 13 May 2016                       |
|                                        |             |    |                                   | AU                      | 2013299717 | A1 | 26 February 2015                  |
|                                        |             |    |                                   | US                      | 2019134206 | A1 | 09 May 2019                       |
|                                        |             |    |                                   | CN                      | 104717982  | B  | 28 August 2018                    |
| CA                                     | 2879693     | A1 | 13 February 2014                  |                         |            |    |                                   |
| WO                                     | 2015006740  | A2 | 15 January 2015                   | US                      | 2016376585 | A1 | 29 December 2016                  |
|                                        |             |    |                                   | EP                      | 3019200    | A2 | 18 May 2016                       |
|                                        |             |    |                                   | AU                      | 2014287002 | A1 | 11 February 2016                  |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 2016529230 | A  | 23 September 2016                 |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 6702862    | B2 | 03 June 2020                      |
|                                        |             |    |                                   | CA                      | 2917161    | A1 | 15 January 2015                   |
|                                        |             |    |                                   | WO                      | 2015006740 | A3 | 07 May 2015                       |
|                                        |             |    |                                   | AU                      | 2020202093 | A1 | 09 April 2020                     |
| CN                                     | 103380113   | A  | 30 October 2013                   | US                      | 2018200374 | A1 | 19 July 2018                      |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 2018080187 | A  | 24 May 2018                       |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 6383480    | B2 | 29 August 2018                    |
|                                        |             |    |                                   | JP                      | 2017031186 | A  | 09 February 2017                  |
|                                        |             |    |                                   | WO                      | 2012068176 | A1 | 24 May 2012                       |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/091485**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|----------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
|                                        |                                   | EP 2640700 A1           | 25 September 2013                 |
|                                        |                                   | JP 2014508102 A         | 03 April 2014                     |
|                                        |                                   | US 2012136073 A1        | 31 May 2012                       |
|                                        |                                   | EP 3470395 A1           | 17 April 2019                     |
|                                        |                                   | US 2020061197 A1        | 27 February 2020                  |
|                                        |                                   | CN 103380113 B          | 30 March 2018                     |
|                                        |                                   | ES 2702428 T3           | 28 February 2019                  |
|                                        |                                   | JP 2018197255 A         | 13 December 2018                  |
|                                        |                                   | US 2015174260 A1        | 25 June 2015                      |
|                                        |                                   | DK 2640700 T3           | 14 January 2019                   |
|                                        |                                   | EP 2640700 B1           | 31 October 2018                   |
|                                        |                                   | US 10406237 B2          | 10 September 2019                 |
|                                        |                                   | CN 108358812 A          | 03 August 2018                    |
|                                        |                                   | US 9901642 B2           | 27 February 2018                  |

---

| <p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 15/113(2010.01)i; C07D 211/58(2006.01)i; C07C 229/16(2006.01)i; C07D 211/28(2006.01)i; C07C 229/26(2006.01)i; C07C 237/06(2006.01)i; C07C 229/24(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61P 19/06(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                         |                                             |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|-------------------|---------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---|--------------------------------------------------------------------------|----------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---|----------------------------------------------------------------------|----------------|
| <p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N, C07D, C07C, A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KR-TXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED:嘌呤核苷磷酸化酶, 痛风, Purine Nucleoside Phosphorylase, pnpase, pnpase, gout, sirna, shrna, dsrna, "ccuauagaagauuaaaga", "cctatgaagattataaga", "guacaguaccagaaguua", "gtacagtaccagaagtta"</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                         |                                             |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| <p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015006498 A2 (HARVARD COLLEGE等) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)<br/>参见权利要求93-95, SEQ ID NO: 2581, 附图11</td> <td>1-49和53 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106232831 A (美国卫生和人力服务部等) 2016年 12月 14日 (2016 - 12 - 14)<br/>参见表1, SEQ ID NO: 1549</td> <td>1-49和53 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104717982 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2015年 6月 17日 (2015 - 06 - 17)<br/>参见权利要求1-26</td> <td>1-49和53 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)<br/>参见全文</td> <td>1-49和53 (均为部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103380113 A (生命科技公司) 2013年 10月 30日 (2013 - 10 - 30)<br/>参见权利要求1-42</td> <td>1-49和53 (均为部分)</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                         |                                             | 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | A | WO 2015006498 A2 (HARVARD COLLEGE等) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)<br>参见权利要求93-95, SEQ ID NO: 2581, 附图11 | 1-49和53 (均为部分) | A | CN 106232831 A (美国卫生和人力服务部等) 2016年 12月 14日 (2016 - 12 - 14)<br>参见表1, SEQ ID NO: 1549 | 1-49和53 (均为部分) | A | CN 104717982 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2015年 6月 17日 (2015 - 06 - 17)<br>参见权利要求1-26 | 1-49和53 (均为部分) | A | WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)<br>参见全文 | 1-49和53 (均为部分) | A | CN 103380113 A (生命科技公司) 2013年 10月 30日 (2013 - 10 - 30)<br>参见权利要求1-42 | 1-49和53 (均为部分) |
| 类型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                       | 相关的权利要求                                     |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | WO 2015006498 A2 (HARVARD COLLEGE等) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)<br>参见权利要求93-95, SEQ ID NO: 2581, 附图11 | 1-49和53 (均为部分)                              |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | CN 106232831 A (美国卫生和人力服务部等) 2016年 12月 14日 (2016 - 12 - 14)<br>参见表1, SEQ ID NO: 1549                    | 1-49和53 (均为部分)                              |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | CN 104717982 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2015年 6月 17日 (2015 - 06 - 17)<br>参见权利要求1-26                                | 1-49和53 (均为部分)                              |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)<br>参见全文                    | 1-49和53 (均为部分)                              |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | CN 103380113 A (生命科技公司) 2013年 10月 30日 (2013 - 10 - 30)<br>参见权利要求1-42                                    | 1-49和53 (均为部分)                              |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                         |                                             |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                         |                                             |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| <p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 8月 11日</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                         | <p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 8月 25日</p>       |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |
| <p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br/>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                         | <p>授权官员</p> <p>潘俊宇</p> <p>电话号码 62411108</p> |     |                   |         |   |                                                                                                         |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                          |                |   |                                                                                      |                |   |                                                                      |                |

| C. 相关文件 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 类型*     | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 相关的权利要求        |
| A       | Jonathan K Watts等. "Chemically modified siRNA: tools and applications"<br>Drug Discov Today, 第13卷, 第19-20期, 2008年 7月 7日 (2008 - 07 - 07),<br>ISSN: 1359-6446,<br>第842-855页, 参见图2                                                                                                                                                        | 1-49和53 (均为部分) |
| A       | Luis Emiliano Peña-Altamira等. "Release of soluble and vesicular purine nucleoside phosphorylase from rat astrocytes and microglia induced by pro-inflammatory stimulation with extracellular ATP via P2X7 receptors"<br>Neurochemistry International, 第115卷, 2018年 5月 31日 (2018 - 05 - 31),<br>ISSN: 0197-0186,<br>第37-49页, 参见第40页右栏第3段 | 1-49和53 (均为部分) |
| A       | Kallanthottathil G Rajeev等. "Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo"<br>Chembiochem, 第16卷, 第6期, 2015年 4月 13日 (2015 - 04 - 13),<br>ISSN: 1439-4227,<br>第903-908页, 参见摘要, 图1, 第905页                                              | 1-49和53 (均为部分) |

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a),对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求: 50-52  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题,即:  
[1] 权利要求50-52涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法。
2.  权利要求:  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分,以致不能进行任何有意义的国际检索,具体地说:
3.  权利要求:  
因为它们是从属权利要求,并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

## 第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明,即:

- [1] 发明1: 权利要求1-49, 53(均为部分)中涉及SEQ ID NOs:1-8, SiPNa1、SiPNa2及其经修饰的核苷酸的相关主题;
- [2] 发明2: 权利要求1-49, 53(均为部分)中涉及SEQ ID NOs:61-68, SiPNb1、SiPNb2及其经修饰的核苷酸的相关主题;
- [3] 发明3: 权利要求1-49, 53(均为部分)中涉及SEQ ID NOs:121-128, SiPNc1、SiPNc2及其经修饰的核苷酸的相关主题;
- [4] 发明4: 权利要求1-49, 53(均为部分)中涉及SEQ ID NOs:181-188, SiPNd1、SiPNd2及其经修饰的核苷酸的相关主题。
- [5] 上述发明1-4共同的技术特征在于具有通用结构的siRNA,然而这些siRNA之间的通用结构属于本领域已知的siRNA框架,因此上述发明1-4之间并没有相同或相应的特定技术特征,因此不符合PCT细则13.1、13.2、13.3的规定。

## 第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1.  由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2.  由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3.  由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：1-49, 53(均为部分)中涉及SEQ ID NOs:1-8, SiPNa1、SiPNa2和SEQ ID NOs:61-68, SiPNb1、SiPNb2及其经修饰的核苷酸的相关主题
4.  申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

## 对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/091485

| 检索报告引用的专利文件 |             |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-------------|----|----------------|------|------------|----|----------------|
| WO          | 2015006498  | A2 | 2015年 1月 15日   | WO   | 2016057835 | A2 | 2016年 4月 14日   |
|             |             |    |                | WO   | 2015006498 | A3 | 2015年 4月 2日    |
|             |             |    |                | US   | 2015152436 | A1 | 2015年 6月 4日    |
|             |             |    |                | EP   | 3019595    | A2 | 2016年 5月 18日   |
|             |             |    |                | EP   | 3019595    | A4 | 2016年 11月 30日  |
|             |             |    |                | US   | 2020048659 | A1 | 2020年 2月 13日   |
|             |             |    |                | US   | 10208319   | B2 | 2019年 2月 19日   |
|             |             |    |                | JP   | 2016528890 | A  | 2016年 9月 23日   |
|             |             |    |                | WO   | 2016057835 | A3 | 2016年 8月 25日   |
|             |             |    |                | CN   | 106232831  | A  | 2016年 12月 14日  |
| KR          | 20160127713 | A  | 2016年 11月 4日   |      |            |    |                |
| WO          | 2015069790  | A9 | 2016年 6月 2日    |      |            |    |                |
| AU          | 2014346788  | A1 | 2016年 5月 26日   |      |            |    |                |
| EP          | 3066215     | B1 | 2019年 4月 24日   |      |            |    |                |
| US          | 10607717    | B2 | 2020年 3月 31日   |      |            |    |                |
| JP          | 2020078323  | A  | 2020年 5月 28日   |      |            |    |                |
| WO          | 2015069790  | A1 | 2015年 5月 14日   |      |            |    |                |
| US          | 2020143906  | A1 | 2020年 5月 7日    |      |            |    |                |
| EP          | 3066215     | A1 | 2016年 9月 14日   |      |            |    |                |
| AU          | 2014346788  | A8 | 2016年 6月 16日   |      |            |    |                |
| JP          | 2017502686  | A  | 2017年 1月 26日   |      |            |    |                |
| CA          | 2929826     | A1 | 2015年 5月 14日   |      |            |    |                |
| EP          | 3594359     | A1 | 2020年 1月 15日   |      |            |    |                |
| ES          | 2738289     | T3 | 2020年 1月 21日   |      |            |    |                |
| JP          | 6657105     | B2 | 2020年 3月 4日    |      |            |    |                |
| CN          | 104717982   | A  | 2015年 6月 17日   | AU   | 2013299717 | B2 | 2018年 6月 28日   |
|             |             |    |                | JP   | 2015525797 | A  | 2015年 9月 7日    |
|             |             |    |                | US   | 10086081   | B2 | 2018年 10月 2日   |
|             |             |    |                | EP   | 2879718    | A1 | 2015年 6月 10日   |
|             |             |    |                | JP   | 2018062520 | A  | 2018年 4月 19日   |
|             |             |    |                | US   | 2015196655 | A1 | 2015年 7月 16日   |
|             |             |    |                | WO   | 2014025805 | A1 | 2014年 2月 13日   |
|             |             |    |                | HK   | 1210952    | A1 | 2016年 5月 13日   |
|             |             |    |                | AU   | 2013299717 | A1 | 2015年 2月 26日   |
|             |             |    |                | US   | 2019134206 | A1 | 2019年 5月 9日    |
| WO          | 2015006740  | A2 | 2015年 1月 15日   | CN   | 104717982  | B  | 2018年 8月 28日   |
|             |             |    |                | CA   | 2879693    | A1 | 2014年 2月 13日   |
|             |             |    |                | US   | 2016376585 | A1 | 2016年 12月 29日  |
|             |             |    |                | EP   | 3019200    | A2 | 2016年 5月 18日   |
|             |             |    |                | AU   | 2014287002 | A1 | 2016年 2月 11日   |
|             |             |    |                | JP   | 2016529230 | A  | 2016年 9月 23日   |
|             |             |    |                | JP   | 6702862    | B2 | 2020年 6月 3日    |
|             |             |    |                | CA   | 2917161    | A1 | 2015年 1月 15日   |
|             |             |    |                | WO   | 2015006740 | A3 | 2015年 5月 7日    |
|             |             |    |                | AU   | 2020202093 | A1 | 2020年 4月 9日    |
| CN          | 103380113   | A  | 2013年 10月 30日  | US   | 2018200374 | A1 | 2018年 7月 19日   |
|             |             |    |                | JP   | 2018080187 | A  | 2018年 5月 24日   |
|             |             |    |                | JP   | 6383480    | B2 | 2018年 8月 29日   |
|             |             |    |                | JP   | 2017031186 | A  | 2017年 2月 9日    |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/091485

| 检索报告引用的专利文件 | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|----------------|------|------------|----|----------------|
|             |                | WO   | 2012068176 | A1 | 2012年 5月 24日   |
|             |                | EP   | 2640700    | A1 | 2013年 9月 25日   |
|             |                | JP   | 2014508102 | A  | 2014年 4月 3日    |
|             |                | US   | 2012136073 | A1 | 2012年 5月 31日   |
|             |                | EP   | 3470395    | A1 | 2019年 4月 17日   |
|             |                | US   | 2020061197 | A1 | 2020年 2月 27日   |
|             |                | CN   | 103380113  | B  | 2018年 3月 30日   |
|             |                | ES   | 2702428    | T3 | 2019年 2月 28日   |
|             |                | JP   | 2018197255 | A  | 2018年 12月 13日  |
|             |                | US   | 2015174260 | A1 | 2015年 6月 25日   |
|             |                | DK   | 2640700    | T3 | 2019年 1月 14日   |
|             |                | EP   | 2640700    | B1 | 2018年 10月 31日  |
|             |                | US   | 10406237   | B2 | 2019年 9月 10日   |
|             |                | CN   | 108358812  | A  | 2018年 8月 3日    |
|             |                | US   | 9901642    | B2 | 2018年 2月 27日   |