



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118252843 A

(43) 申请公布日 2024.06.28

(21) 申请号 202410300943.X

A61K 47/54 (2017.01)

(22) 申请日 2020.05.21

A61P 21/04 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61P 21/00 (2006.01)

201910430606.1 2019.05.22 CN

A61P 37/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

(62) 分案原申请数据

202080035486.6 2020.05.21

(71) 申请人 苏州瑞博生物技术股份有限公司

地址 215300 江苏省苏州市昆山市玉山镇  
元丰路168号

(72) 发明人 张鸿雁 高山 康代武

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理  
有限公司 11728

专利代理师 郝文婷 陈悦军

(51) Int. Cl.

A61K 31/713 (2006.01)

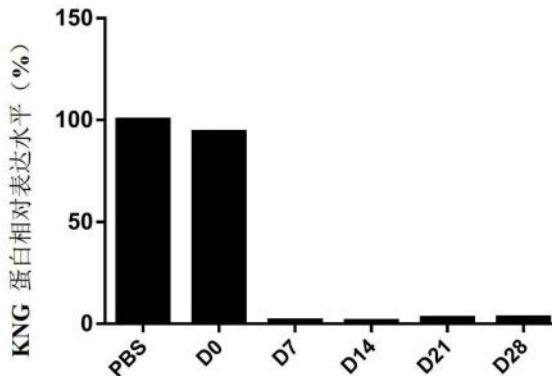
权利要求书22页 说明书102页  
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

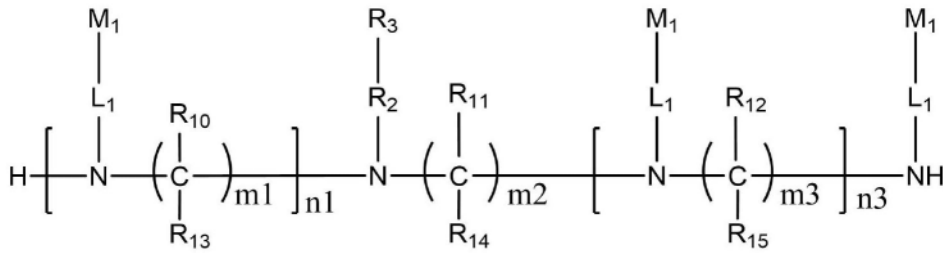
核酸、药物组合物与缀合物及制备方法和用途

(57) 摘要

一种抑制激肽原(KNG)基因表达的siRNA,含有该siRNA的药物组合物和siRNA缀合物。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,该siRNA含有正义链和反义链,所述正义链含有核苷酸序列I,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,所述反义链含有核苷酸序列II,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。所述siRNA及其药物组合物和siRNA缀合物,可以有效治疗和/或预防败血症。



1. 一种siRNA缀合物,其中,所述siRNA缀合物具有式(308)所示的结构:



式(308),

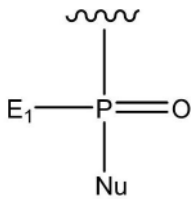
其中,

$n_1$ 为选自1-3的整数, $n_3$ 为选自0-4的整数;

每个 $m_1$ 、 $m_2$ 或 $m_3$ 各自独立地为选自2-10的整数;

$R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 或 $R_{15}$ 各自独立地为H,或选自于由以下基团所组成的组: $C_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $C_1$ - $C_{10}$ 卤代烷基以及 $C_1$ - $C_{10}$ 烷氧基;

$R_3$ 为式A59所示结构的基团:



(A59)

其中, $E_1$ 为OH、SH或 $BH_2$ ,Nu为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,所述核苷酸序列I和所述核苷酸序列II选自如下i)-vi)所示序列中的一组:

i) 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'-AAAGUAACAACCAGUUUG $Z_1$ -3' (SEQ ID NO:1);

5'- $Z_2$ CAAACUGGUUGUACUUU-3' (SEQ ID NO:2),

其中, $Z_1$ 为U, $Z_2$ 为A;

所述核苷酸序列I中包含位置对应于 $Z_1$ 的核苷酸 $Z_3$ ,所述核苷酸序列II中包含位置对应于 $Z_2$ 的核苷酸 $Z_4$ ,所述 $Z_4$ 是所述反义链5'末端的第一个核苷酸;

ii) 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'-AUUGAACUUUCGAAUUAC $Z_5$ -3' (SEQ ID NO:61);

5'- $Z_6$ GUAAUUCGAAAGUCAAU-3' (SEQ ID NO:62),

其中, $Z_5$ 为C, $Z_6$ 为G;

所述核苷酸序列I中包含位置对应于 $Z_5$ 的核苷酸 $Z_7$ ,所述核苷酸序列II中包含位置对应于 $Z_6$ 的核苷酸 $Z_8$ ,所述 $Z_8$ 是所述反义链5'末端的第一个核苷酸;

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

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

其中, $Z_9$ 为U, $Z_{10}$ 为A;

所述核苷酸序列I中包含位置对应于 $Z_9$ 的核苷酸 $Z_{11}$ ,所述核苷酸序列II中包含位置对应于 $Z_{10}$ 的核苷酸 $Z_{12}$ ,所述 $Z_{12}$ 是所述反义链5'末端的第一个核苷酸;

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

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

其中, $Z_{13}$ 为A, $Z_{14}$ 为U;

所述核苷酸序列I中包含位置对应于 $Z_{13}$ 的核苷酸 $Z_{15}$ ,所述核苷酸序列II中包含位置对应于 $Z_{14}$ 的核苷酸 $Z_{16}$ ,所述 $Z_{16}$ 是所述反义链5'末端的第一个核苷酸;

v)所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:241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:242所示的核苷酸序列长度相等,且不多于3个核苷酸差异:

5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>17</sub>-3' (SEQ ID NO:241);

5'-Z<sub>18</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO:242),

其中, $Z_{17}$ 为U, $Z_{18}$ 为A;

所述核苷酸序列I中包含位置对应于 $Z_{17}$ 的核苷酸 $Z_{19}$ ,所述核苷酸序列II中包含位置对应于 $Z_{18}$ 的核苷酸 $Z_{20}$ ,所述 $Z_{20}$ 是所述反义链5'末端的第一个核苷酸;

vi)所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:301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:302所示的核苷酸序列长度相等,且不多于3个核苷酸差异:

5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ<sub>21</sub>-3' (SEQ ID NO:301);

5'-Z<sub>22</sub>AUCUUGAAAUAGAAAGUU-3' (SEQ ID NO:302),

其中, $Z_{21}$ 为U, $Z_{22}$ 为A,

所述核苷酸序列I中包含位置对应于 $Z_{21}$ 的核苷酸 $Z_{23}$ ,所述核苷酸序列II中包含位置对应于 $Z_{22}$ 的核苷酸 $Z_{24}$ ,所述 $Z_{24}$ 是所述反义链5'末端的第一个核苷酸;

$R_2$ 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 $R_2$ 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>-

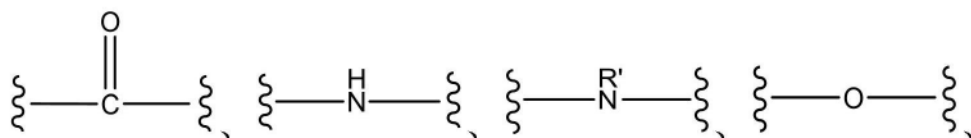
$C_{10}$ 烷基、 $-SC_1-C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1-C_{10}$ 烷基-SH、 $-SC_1-C_{10}$ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、- $NH_2$ 、 $-C_1-C_{10}$ 烷基- $NH_2$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-NH(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基苯基)$ 、 $-NH(C_1-C_{10}烷基苯基)$ 、氰基、硝基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-CON(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-CONH(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-NHC(O)(苯基)$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)C(O)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)C(O)(苯基)$ 、 $-C(O)C_1-C_{10}烷基$ 、 $-C(O)C_1-C_{10}烷基苯基$ 、 $-C(O)C_1-C_{10}卤代烷基$ 、 $-OC(O)C_1-C_{10}烷基$ 、 $-SO_2(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-SO_2(苯基)$ 、 $-SO_2(C_1-C_{10}卤代烷基)$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-SO_2NH(苯基)$ 、 $-NHSO_2(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-NHSO_2(苯基)$ 和 $-NHSO_2(C_1-C_{10}卤代烷基)$ ；

每个 $L_1$ 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： $C(O)$ 、 $NH$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $C_2-C_{10}$ 亚烯基、 $C_2-C_{10}$ 亚炔基、 $C_6-C_{10}$ 亚芳基、 $C_3-C_{18}$ 亚杂环基和 $C_5-C_{10}$ 亚杂芳基；并且其中， $L_1$ 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： $C_1-C_{10}$ 烷基、 $C_6-C_{10}$ 芳基、 $C_5-C_{10}$ 杂芳基、 $C_1-C_{10}$ 卤代烷基、 $-OC_1-C_{10}烷基$ 、 $-OC_1-C_{10}烷基苯基$ 、 $-C_1-C_{10}烷基-OH$ 、 $-OC_1-C_{10}卤代烷基$ 、 $-SC_1-C_{10}烷基$ 、 $-SC_1-C_{10}烷基苯基$ 、 $-C_1-C_{10}烷基-SH$ 、 $-SC_1-C_{10}卤代烷基$ 、卤素取代基、-OH、-SH、 $-NH_2$ 、 $-C_1-C_{10}烷基-NH_2$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-NH(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基苯基)$ 、 $-NH(C_1-C_{10}烷基苯基)$ 、氰基、硝基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-CON(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-CONH(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-NHC(O)(苯基)$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)C(O)(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-N(C_1-C_{10}烷基)C(O)(苯基)$ 、 $-C(O)C_1-C_{10}烷基$ 、 $-C(O)C_1-C_{10}烷基苯基$ 、 $-C(O)C_1-C_{10}卤代烷基$ 、 $-OC(O)C_1-C_{10}烷基$ 、 $-SO_2(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-SO_2(苯基)$ 、 $-SO_2(C_1-C_{10}卤代烷基)$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-SO_2NH(苯基)$ 、 $-NHSO_2(C_1-C_{10}烷基)$ 、 $-NHSO_2(苯基)$ 和 $-NHSO_2(C_1-C_{10}卤代烷基)$ ；

~~~~~表示基团共价连接的位点；

$M_1$ 表示靶向基团。

2. 如权利要求1所述的siRNA缀合物，其中，每个 $L_1$ 独立地选自于由基团A1-A26基团及其任意组合所组成的组：

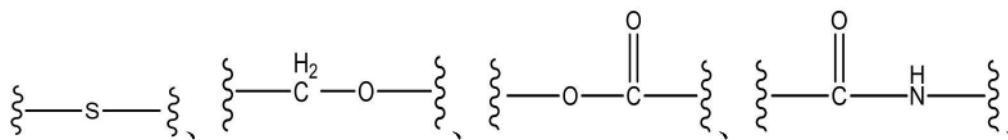


(A1)

(A2)

(A3)

(A4)

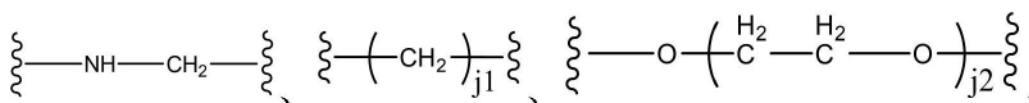


(A5)

(A6)

(A7)

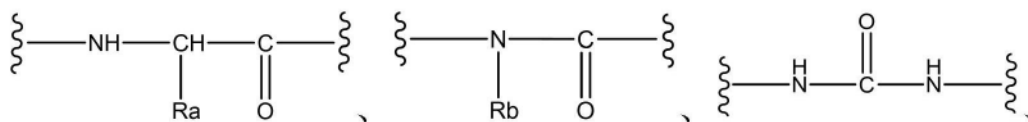
(A8)



(A9)

(A10)

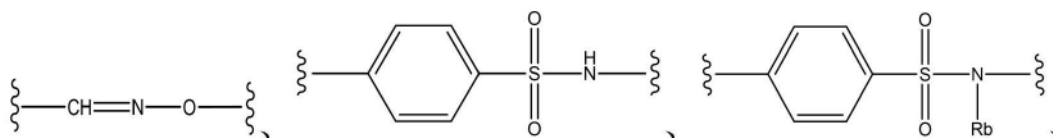
(A11)



(A12)

(A13)

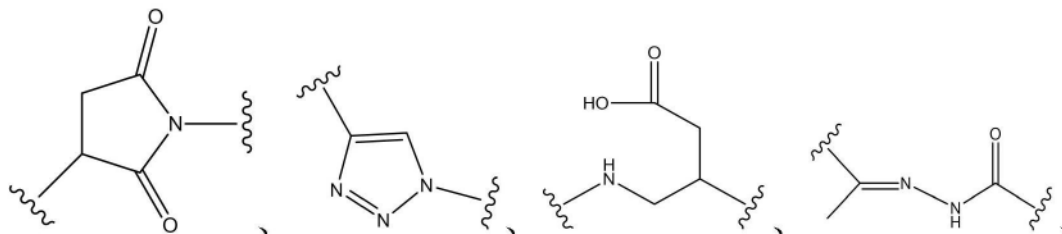
(A14)



(A15)

(A16)

(A17)

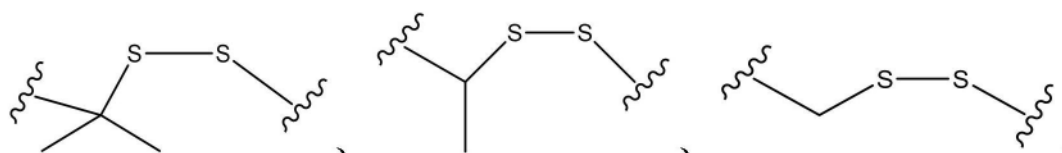


(A18)

(A19)

(A20)

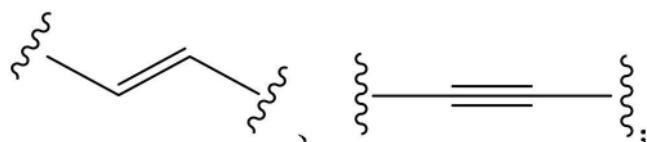
(A21)



(A22)

(A23)

(A24)



(A25)

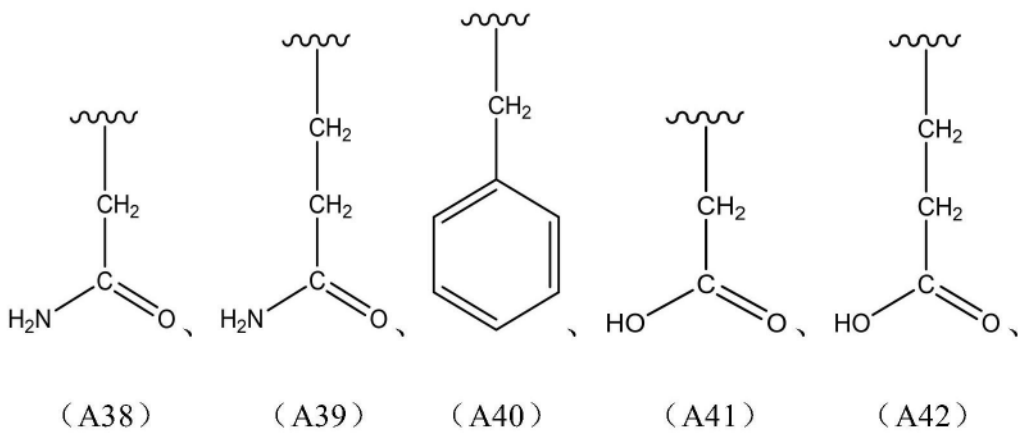
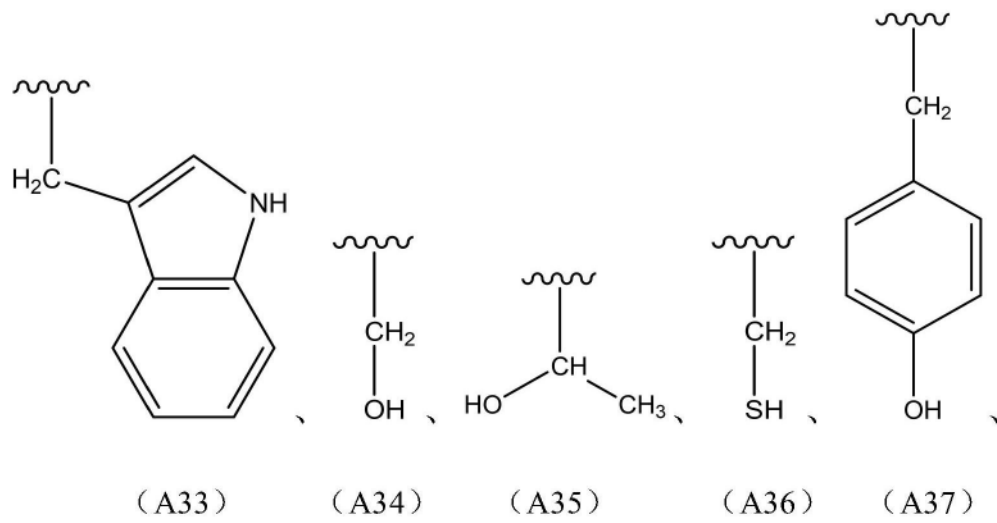
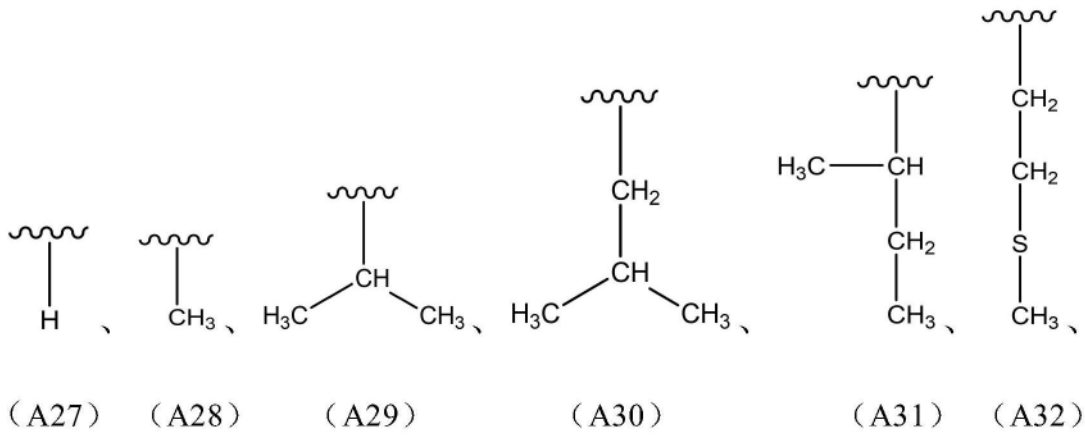
(A26)

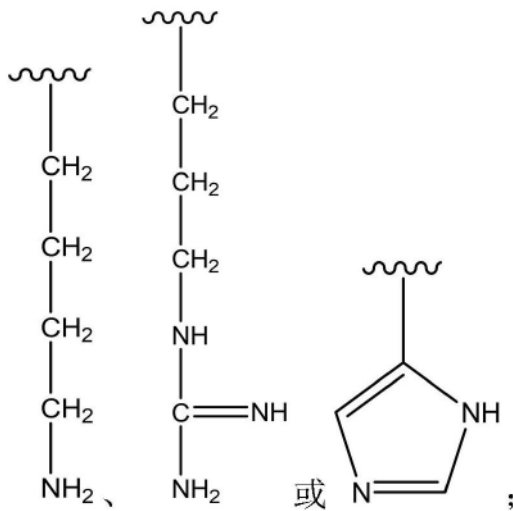
其中,每个 $j_1$ 独立地为1-20的整数;

每个 $j_2$ 独立地为1-20的整数;

每个 $R'$ 独立地为 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基;

每个 $R_a$ 独立地选自于由A27-A45基团及其任意组合所组成的组:





(A43) (A44) (A45)

每个R<sub>b</sub>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；或者，

L<sub>1</sub>选自于由基团A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11、A13及其连接组合所组成的组；或者，

L<sub>1</sub>为基团A1、A4、A8、A10和A11中至少2个的连接组合；或者，L<sub>1</sub>为基团A1、A8和A10中至少2个的连接组合；或者，L<sub>1</sub>的长度为3-25个原子；或者，L<sub>1</sub>的长度为4-15个原子；或者，

j<sub>1</sub>为2-10的整数，j<sub>2</sub>为2-10的整数，R'为C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基，R<sub>a</sub>为A27、A28、A29、A30和A31中的一种，R<sub>b</sub>为C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基；或者，j<sub>1</sub>为3-5的整数，j<sub>2</sub>为3-5的整数，R'为甲基、乙基和异丙基中的一种，R<sub>a</sub>为A27或A28，R<sub>b</sub>为甲基、乙基、异丙基和丁基中的一种；或者，

n<sub>1</sub>为1-2的整数，n<sub>3</sub>为0-1的整数，且n<sub>1</sub>+n<sub>3</sub>=2-3；或者，

每个m<sub>1</sub>、m<sub>2</sub>或m<sub>3</sub>各自独立地为2-5的整数；或者，m<sub>1</sub>=m<sub>2</sub>=m<sub>3</sub>。

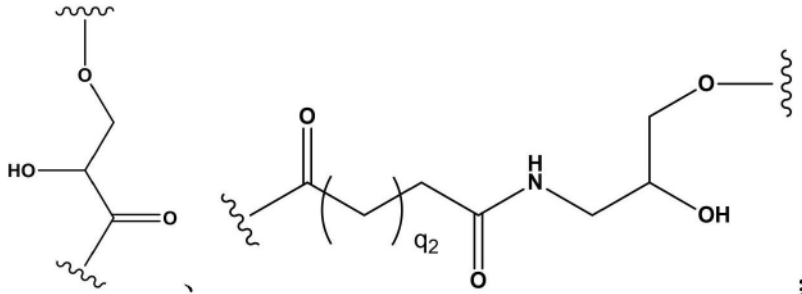
3. 如权利要求1或2所述的siRNA缀合物，其中，每个所述靶向基团独立地为与哺乳动物肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体具有亲和力的配体；或者，每个所述靶向基团独立地为去唾液酸糖蛋白或糖；或者，每个所述靶向基团独立地选自D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃甘露糖、 $\beta$ -D-呋喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃甘露糖、 $\beta$ -D-吡喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃葡萄糖、 $\beta$ -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、葡萄糖胺、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-阿洛糖脲、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种；或者，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。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的siRNA缀合物，其中，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>独立地

为H、甲基或乙基;或者,

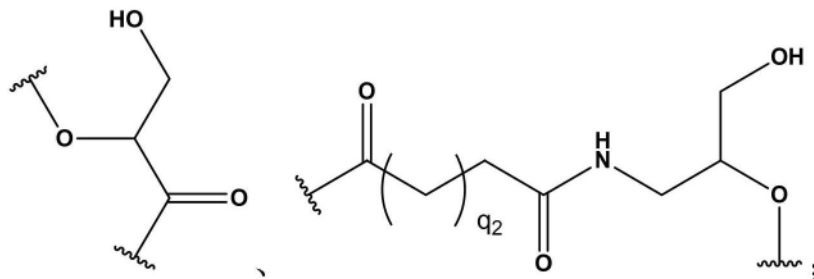
$R_2$ 上同时含有与含氮骨架上的N连接的连接位点和与 $R_3$ 中的P原子连接的连接位点;或者, $R_2$ 上所述与含氮骨架上的N连接的位点与N形成酰胺键,所述与 $R_3$ 上的P原子连接的位点与P形成磷酸酯键;或者,

$R_2$ 选自B5、B6、B5'或B6':



(B5)

(B6),

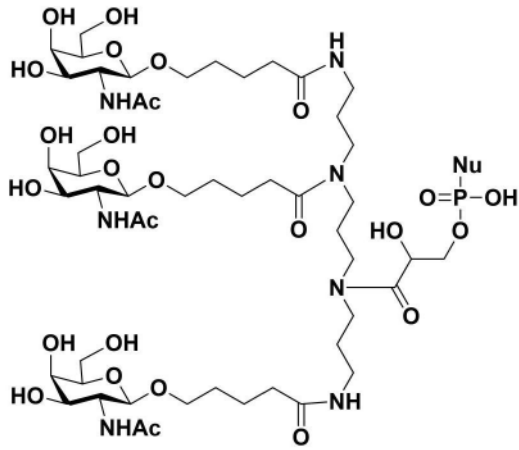


(B5')

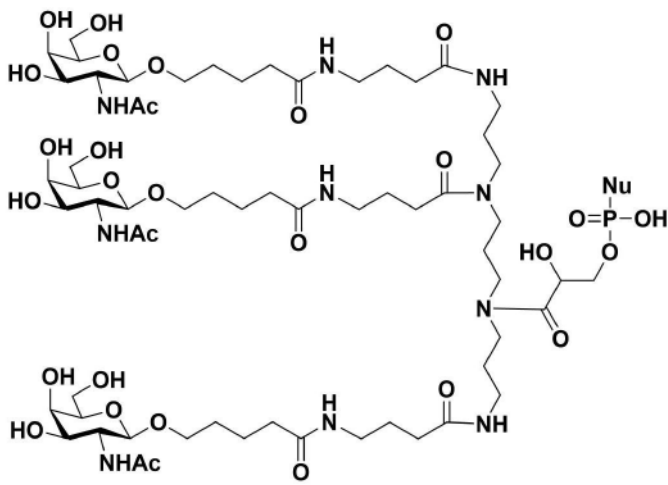
(B6'),

其中,  $\sim$  表示基团共价连接的位点,  $q_2$  为1-10的整数;或者,  $q_2$  为1-5的整数。

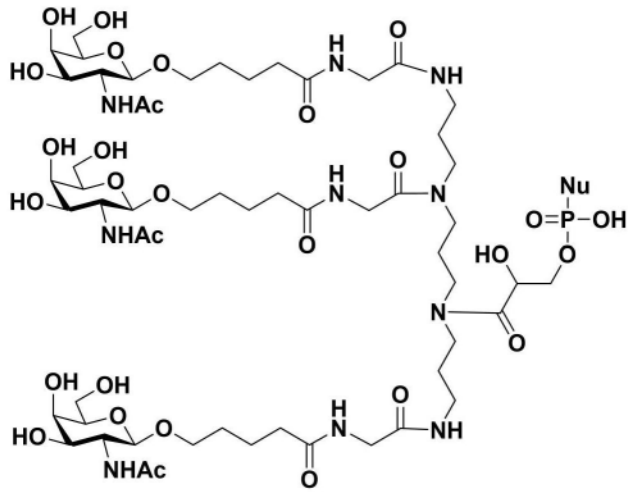
5. 如权利要求1-4中任一项所述的siRNA缀合物, 其中, 该siRNA缀合物具有式(403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421)或(422)所示的结构:



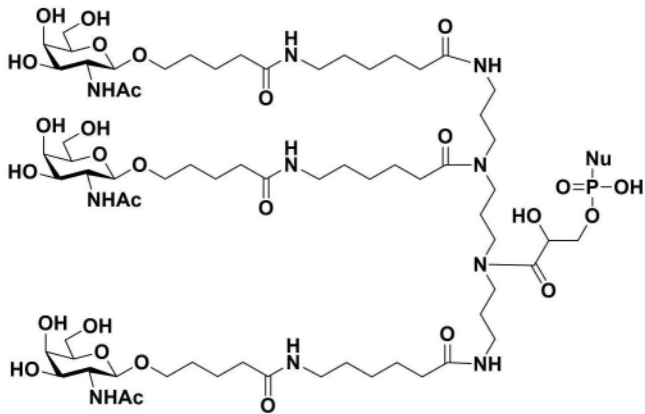
式 (403)



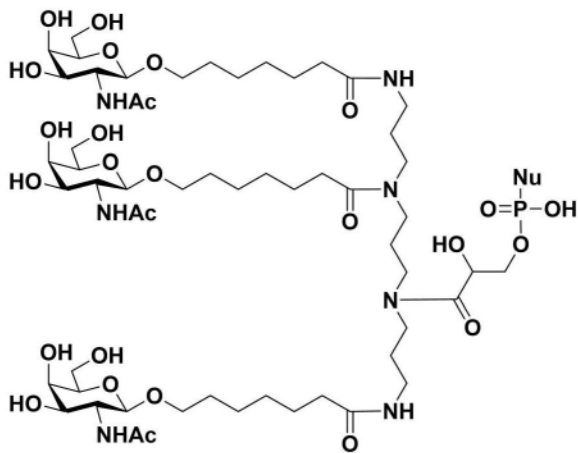
式 (404)



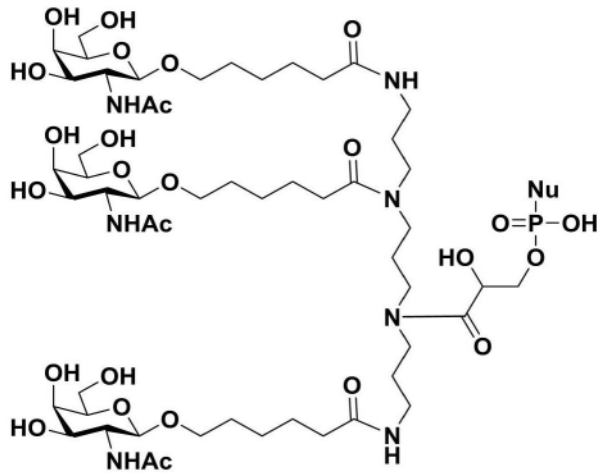
式 (405)



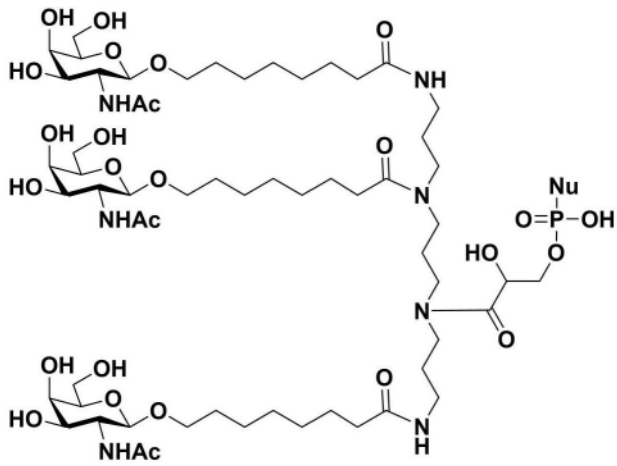
式 (406)



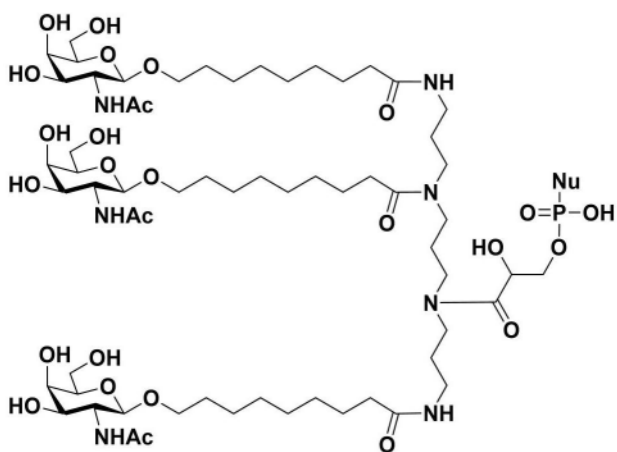
式 (407)



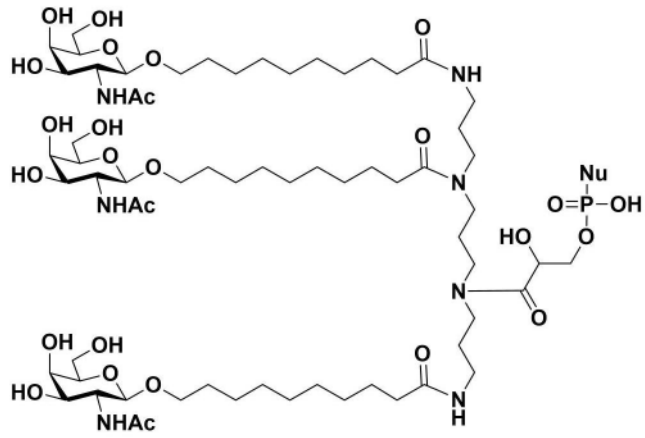
式 (408)



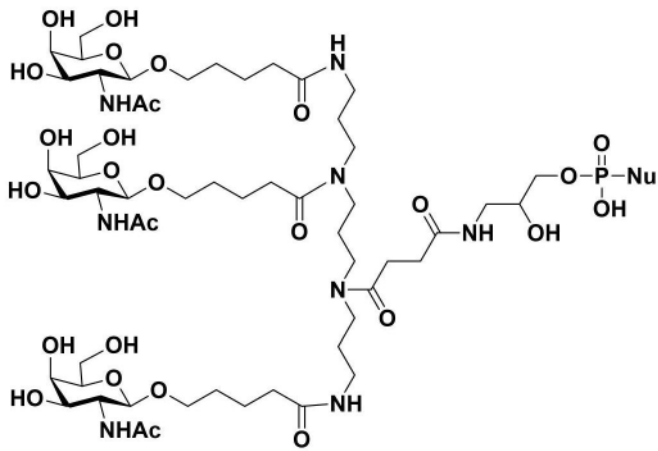
式 (409)



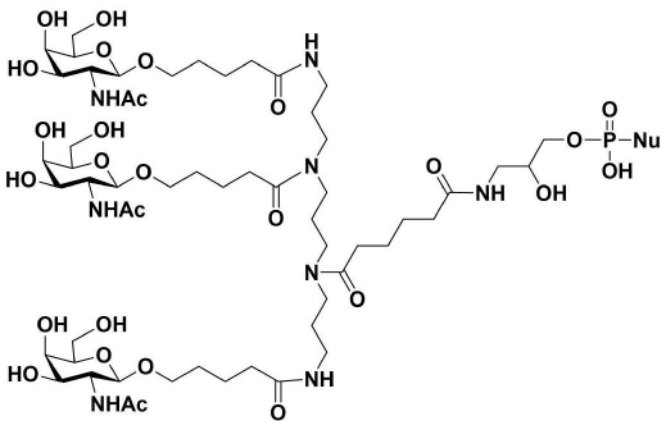
式 (410)



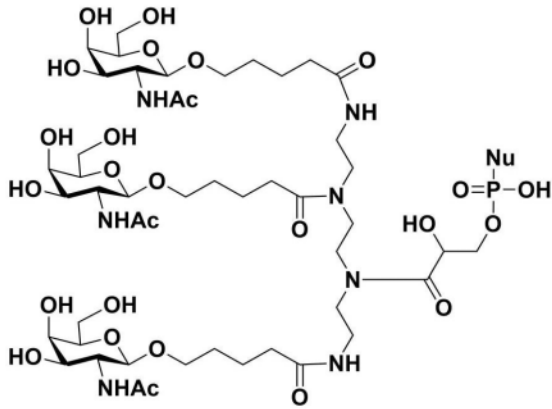
式 (411)



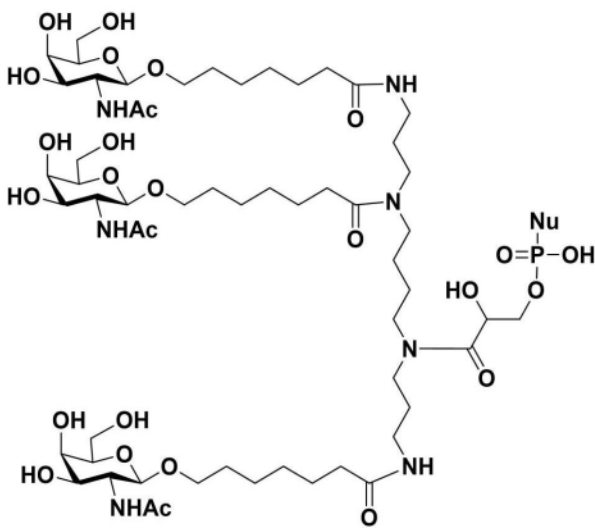
式 (412)



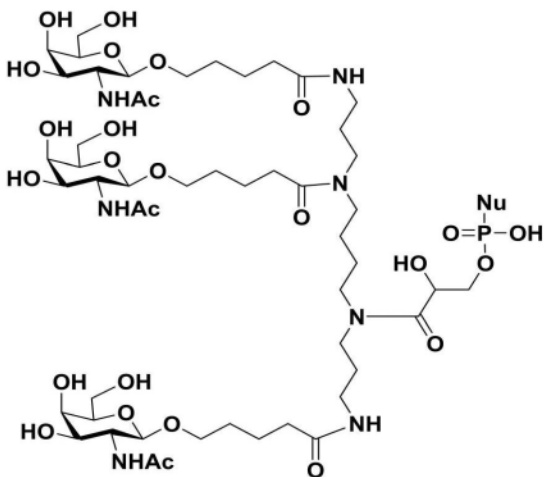
式 (413)



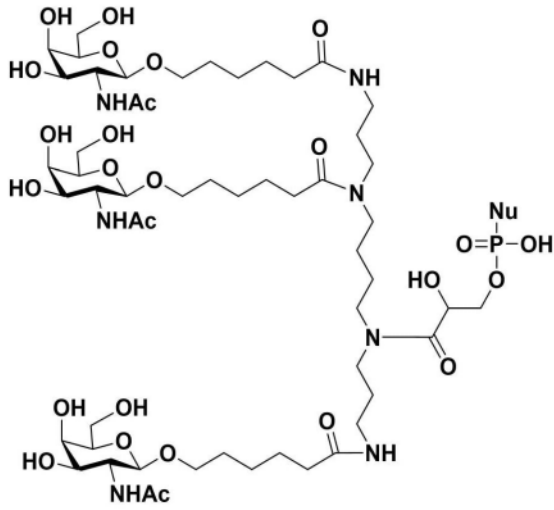
式 (414)



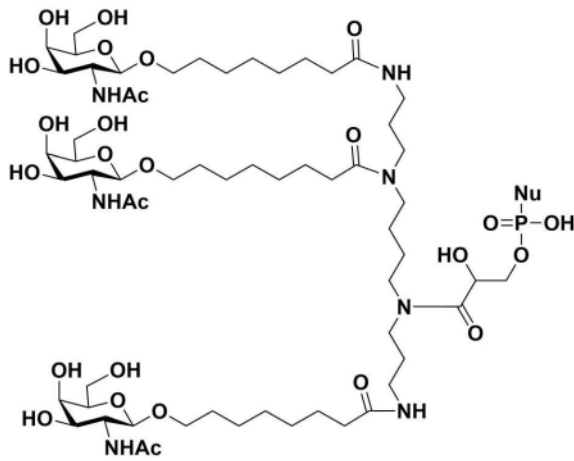
式 (415)



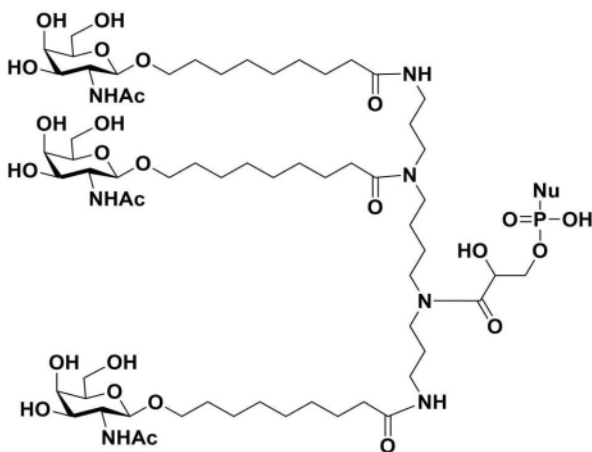
式 (416)



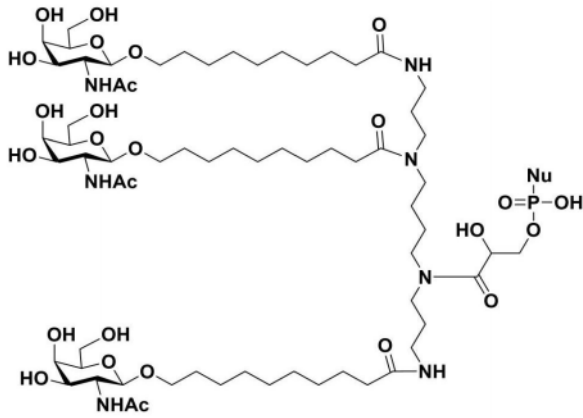
式 (417)



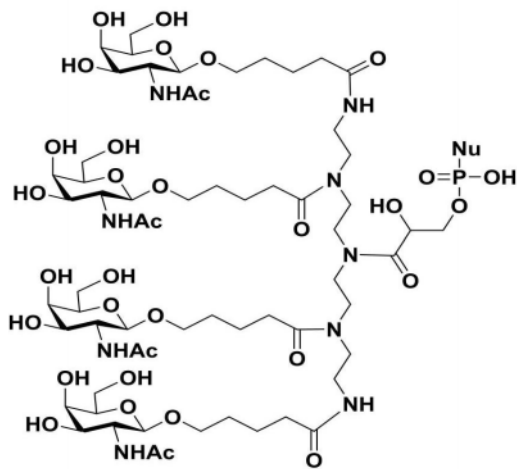
式 (418)



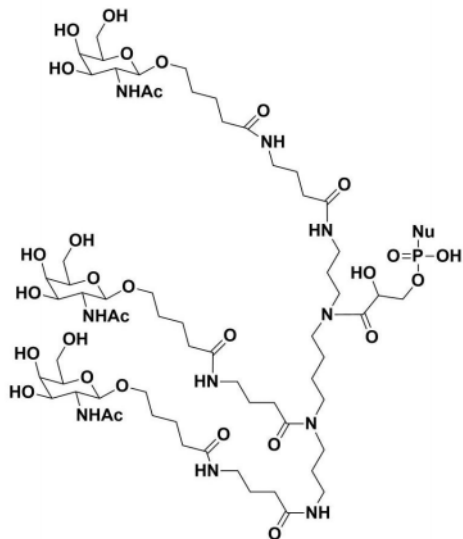
式 (419)



式 (420)



式 (421)



式 (422)。

6. 如权利要求1-5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;或

者,式A59中的P原子连接到所述siRNA正义链或反义链的末端;或者,式A59中的P原子连接到所述siRNA正义链的3'末端;或者,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。

7.如权利要求1-6中任一项所述的siRNA缀合物,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;

或者,所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:241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:242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:301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:302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 $Z_4$ 位置处的差异,且 $Z_4$ 选自U、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 $Z_8$ 位置处的差异,且 $Z_8$ 选自A、U或C;

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 $Z_{12}$ 位置处的差异,且 $Z_{12}$ 选自U、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 $Z_{16}$ 位置处的差异,且 $Z_{16}$ 选自A、C或G;

或者,所述核苷酸序列II与SEQ ID NO:242所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 $Z_{20}$ 位置处的差异,且 $Z_{20}$ 选自U、C或G;

或者,所述核苷酸序列II与SEQ ID NO:302所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 $Z_{24}$ 位置处的差异,且 $Z_{24}$ 选自U、C或G;或者,

$Z_3$ 是与 $Z_4$ 互补的核苷酸;或者, $Z_7$ 是与 $Z_8$ 互补的核苷酸;或者, $Z_{11}$ 是与 $Z_{12}$ 互补的核苷酸;或者, $Z_{15}$ 是与 $Z_{16}$ 互补的核苷酸;或者, $Z_{19}$ 是与 $Z_{20}$ 互补的核苷酸;或者, $Z_{23}$ 是与 $Z_{24}$ 互补的核苷酸。

8.如权利要求1-7中任一项所述的siRNA缀合物,其中,所述正义链和反义链长度相同或不同,所述正义链的长度为19-23个核苷酸,反义链的长度为19-26个核苷酸;并且,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

或者,所述核苷酸序列I是SEQ ID NO:243所示的核苷酸序列,所述核苷酸序列II是SEQ ID NO:244所示的核苷酸序列:

5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>19</sub>-3' (SEQ ID NO:243);

5'-Z<sub>20</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO:244),

其中,Z<sub>20</sub>选自A、U、G或C,Z<sub>19</sub>是与Z<sub>20</sub>互补的核苷酸;

或者,所述核苷酸序列I是SEQ ID NO:303所示的核苷酸序列,所述核苷酸序列II是SEQ ID NO:304所示的核苷酸序列:

5'-AACUUUCUAAUUCAGAUZ<sub>23</sub>-3' (SEQ ID NO:303);

5'-Z<sub>24</sub>AUCUUGAAAUAGAAAGUU-3' (SEQ ID NO:304)

其中,Z<sub>24</sub>选自A、U、G或C,Z<sub>23</sub>是与Z<sub>24</sub>互补的核苷酸;或者,

Z<sub>3</sub>为U,Z<sub>4</sub>为A;或者Z<sub>7</sub>为C,Z<sub>8</sub>为G;或者Z<sub>11</sub>为U,Z<sub>12</sub>为A;或者Z<sub>15</sub>为A,Z<sub>16</sub>为U;或者Z<sub>19</sub>为U,Z<sub>20</sub>为A;或者Z<sub>23</sub>为U,Z<sub>24</sub>为A。

9.如权利要求1-8中任一项所述的siRNA缀合物,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;或者,

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CC;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ACC;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AACC;

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,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;

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,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U;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UU;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CUU;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ACUU;

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,所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:241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AGA;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CAGA;

或者,所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:301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GC;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CGC;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ACGC。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的siRNA缀合物,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;或者,

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

5'-Z<sub>4</sub>CAAACUGGUUGUUACUUUGG-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:

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

5'-Z<sub>4</sub>CAAACUGGUUGUUACUUUGGUU-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siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:66所示的核苷酸序列:

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

5'-Z<sub>8</sub>GUAUUUCGAAAGUCAAUCC-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'-GGAUUGAACUUUCGAAUUACZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO:67);

5'-Z<sub>8</sub>GUAUUUCGAAAGUCAAUCCAG-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:

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

5'-Z<sub>12</sub>AUUGAGUAGGUAAUUCGAAA-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'-UUUCGAAUUACCUACUCAAUZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO:127);

5'-Z<sub>12</sub>AUUGAGUAGGUAAUUCGAAAGU-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:

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

5'-Z<sub>16</sub>AUCGAUGUAUGCAUUAUCUG-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'-CAGAUAAUGCAUACAUCGAUZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO:187);

5'-Z<sub>16</sub>AUCGAUGUAUGCAUUAUCUGUA-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；

或者，所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:245所示的核苷酸序列，所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:246所示的核苷酸序列：

5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>19</sub>-3' (SEQ ID NO:245)；

5'-Z<sub>20</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUCUC-3' (SEQ ID NO:246)，

或者，所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:247所示的核苷酸序列，所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:248所示的核苷酸序列：

5'-GAGAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>19</sub>-3' (SEQ ID NO:247)；

5'-Z<sub>20</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUCUCUG-3' (SEQ ID NO:248)，

其中，所述Z<sub>20</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸，Z<sub>19</sub>选自A、U、G或C，并且Z<sub>20</sub>是与Z<sub>19</sub>互补的核苷酸；

或者，所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:305所示的核苷酸序列，所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:306所示的核苷酸序列：

5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ<sub>23</sub>-3' (SEQ ID NO:305)；

5'-Z<sub>24</sub>AUCUUGAAAUAGAAAGUUGC-3' (SEQ ID NO:306)，

或者，所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:307所示的核苷酸序列，所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:308所示的核苷酸序列：

5'-GCAACUUUCUAUUUCAAGAUZ<sub>23</sub>-3' (SEQ ID NO:307)；

5'-Z<sub>24</sub>AUCUUGAAAUAGAAAGUUGCGU-3' (SEQ ID NO:308)，

其中，所述Z<sub>24</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸，Z<sub>23</sub>选自A、U、G或C，并且Z<sub>24</sub>是与Z<sub>23</sub>互补的核苷酸；或者，

所述siRNA为siKNa1、siKNa2、siKNb1、siKNb2、siKNc1、siKNc2、siKNd1、siKNd2、siKNe1、siKNe2、siKNf1和siKNf2。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的siRNA缀合物，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；或者，

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；或者，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；或者，

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；或者，

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；或者，

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；或者，

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；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、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；

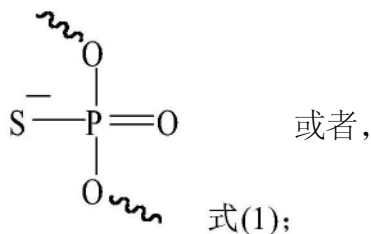
或者，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的正义链中核苷酸序列I的第5、7、8和9位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，siRNA的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸，并且，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的反义链中核苷酸序列II的第2、6、14和16位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，siRNA的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；

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；或者，

所述siRNA为siKNa1-M1、siKNa1-M2、siKNa1-M3、siKNa2-M1、siKNa2-M2、siKNa2-M3、siKNb1-M1、siKNb1-M2、siKNb1-M3、siKNb2-M1、siKNb2-M2、siKNb2-M3、siKNc1-M1、siKNc1-M2、siKNc1-M3、siKNc2-M1、siKNc2-M2、siKNc2-M3、siKNd1-M1、siKNd1-M2、siKNd1-M3、siKNd2-M1、siKNd2-M2、siKNd2-M3、siKNe1-M1、siKNe1-M2、siKNe1-M3、siKNe2-M1、siKNe2-M2、siKNe2-M3、siKNf1-M1、siKNf1-M2、siKNf1-M3、siKNf2-M1、siKNf2-M2和siKNf2-M3中的任意一种。

12. 如权利要求11所述的siRNA缀合物，其中，所述具有修饰基团的磷酸酯基为磷酸酯基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；或者，

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：



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：

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；

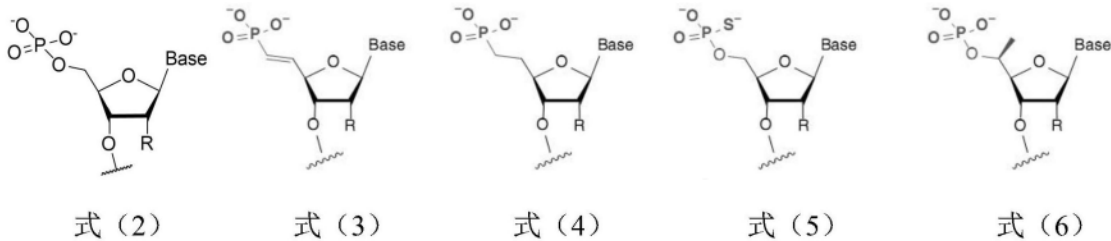
所述正义链的3'末端第2个核苷酸和第3个核苷酸之间；

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；或者，

所述siRNA为siKNa1-M1S、siKNa1-M2S、siKNa1-M3S、siKNa2-M1S、siKNa2-M2S、siKNa2-M3S、siKNb1-M1S、siKNb1-M2S、siKNb1-M3S、siKNb2-M1S、siKNb2-M2S、siKNb2-M3S、siKnc1-M1S、siKnc1-M2S、siKnc1-M3S、siKnc2-M1S、siKnc2-M2S、siKnc2-M3S、siKnd1-M1S、siKnd1-M2S、siKnd1-M3S、siKnd2-M1S、siKnd2-M2S、siKnd2-M3S、siKne1-M1 S、siKne1-M2S、siKne1-M3S、siKne2-M1 S、siKne2-M2S、siKne2-M3S、siKNf1-M1 S、siKNf1-M2S、siKNf1-M3S、siKNf2-M1S、siKNf2-M2S和siKNf2-M3S中的任意一种。

13. 如权利要求12所述的siRNA缀合物，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；或者，

其中，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，



其中，R选自H、OH、甲氧基或氟；Base表示碱基，选自A、U、C、G或T；或者，

所述siRNA为siKNa1-M1P1、siKNa1-M2P1、siKNa1-M3P1、siKNa2-M1P1、siKNa2-M2P1、siKNa2-M3P1、siKNa1-M1 SP1、siKNa1-M2SP1、siKNa1-M3SP1、siKNa2-M1 SP1、siKNa2-M2SP1、siKNa2-M3SP1、siKNb1-M1P1、siKNb1-M2P1、siKNb1-M3P1、siKNb2-M1P1、siKNb2-M2P1、siKNb2-M3P1、siKNb1-M1SP1、siKNb1-M2SP1、siKNb1-M3SP1、siKNb2-M1SP1、siKNb2-M2SP1、siKNb2-M3SP1、siKnc1-M1P1、siKnc1-M2P1、siKnc1-M3P1、siKnc2-M1P1、siKnc2-M2P1、siKnc2-M3P1、siKnc1-M1SP1、siKnc1-M2SP1、siKnc1-M3SP1、siKnc2-M1 SP1、siKnc2-M2SP1、siKnc2-M3SP1、siKnd1-M1P1、siKnd1-M2P1、siKnd1-M3P1、siKnd2-M1P1、siKnd2-M2P1、siKnd2-M3P1、siKnd1-M1SP1、siKnd1-M2SP1、siKnd1-M3SP1、siKnd2-M1SP1、siKnd2-M2SP1、siKnd2-M3SP1、siKne1-M1P1、siKne1-M2P1、siKne1-M3P1、siKne2-M1P1、siKne2-M2P1、siKne2-M3P1、siKne1-M1 SP1、siKne1-M2SP1、siKne1-M3SP1、siKne2-M1 SP1、siKne2-M2SP1、siKne2-M3SP1、siKNf1-M1P1、siKNf1-M2P1、siKNf1-M3P1、siKNf2-M1P1、siKNf2-M2P1、siKNf2-M3P1、siKNf1-M1SP1、siKNf1-M2SP1、siKNf1-M3SP1、siKNf2-M1SP1、siKNf2-M2SP1和siKNf2-M3SP1中的任意一种。

14. 权利要求1-13中任意一项所述的siRNA缀合物在制备用于治疗 and/或预防败血症的药物中的用途。

15. 一种在体外抑制KNG基因表达的方法，该方法包括将有效量的权利要求1-13中任意一项所述的siRNA缀合物与肝细胞接触。

16. 一种试剂盒，其中，该试剂盒含有权利要求1-13任意一项所述的siRNA缀合物。

## 核酸、药物组合物与缀合物及制备方法和用途

[0001] 本申请是申请日2020年5月21日、申请号202080035486.6、发明名称为“核酸、药物组合物与缀合物及制备方法和用途”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本公开涉及一种能够抑制激肽原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

[0003] 败血症(或称脓毒症,Sepsis)是指由感染引起的全身炎症反应综合征,临床上证实有细菌存在或有高度可疑感染灶。虽然败血症是由感染引起,但是一旦发生后,其发生发展遵循其自身的病理过程和规律,故从本质上讲败血症是机体对感染性因素的反应。

[0004] 激肽原(Kininogen,KNG)基因可表达产生活化高分子量激肽原(activated high molecular weight kininogen, HMWka),它可与革兰氏阴性菌细胞表面的脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)结合而延长其半寿期。通过抑制KNG表达,能够有效抑制病原体寿命,从而达到缓解败血症疾病进程并逆转病情的目的。因此,KNG与由病原体引发的败血症和其它炎症密切相关,因而是治疗败血症的关键靶点之一。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感兴趣的目的基因的表达,从而达到治疗疾病的目的。

[0005] 开发抑制KNG基因表达和治疗败血症的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

[0006] 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,以及含有该siRNA的药物组合物和siRNA缀合物能够特异性地抑制KNG基因的表达,并且所述siRNA缀合物能够特异性地靶向肝脏,从而可以抑制肝脏中KNG基因的表达,实现败血症的治疗或预防。

[0007] 在一些实施方式中,本公开提供了第一种能够抑制KNG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,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,所述核苷酸序列I和所述核苷酸序列II选自如下i)-vi)所示序列中的一组:

[0008] i) 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:

[0009] 5'-AAAGUAACAACCAGUUUGZ<sub>1</sub>-3'(SEQ ID NO:1);

[0010] 5'-Z<sub>2</sub>CAAACUGGUUGUUACUUU-3'(SEQ ID NO:2),

[0011] 其中,  $Z_1$  为U,  $Z_2$  为A, 所述核苷酸序列I中包含位置对应于  $Z_1$  的核苷酸  $Z_3$ , 所述核苷酸序列II中包含位置对应于  $Z_2$  的核苷酸  $Z_4$ , 所述  $Z_4$  是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0012] ii) 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:

[0013] 5'-AUUGAACUUUCGAAUUAC $Z_5$ -3' (SEQ ID NO:61);

[0014] 5'- $Z_6$  GUAAUUCGAAAGUCAAU-3' (SEQ ID NO:62),

[0015] 其中,  $Z_5$  为C,  $Z_6$  为G, 所述核苷酸序列I中包含位置对应于  $Z_5$  的核苷酸  $Z_7$ , 所述核苷酸序列II中包含位置对应于  $Z_6$  的核苷酸  $Z_8$ , 所述  $Z_8$  是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0016] iii) 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:

[0017] 5'-UCGAAUUACCUACUCAAU $Z_9$ -3' (SEQ ID NO:121);

[0018] 5'- $Z_{10}$  AUUGAGUAGGUAAUUCGA-3' (SEQ ID NO:122),

[0019] 其中,  $Z_9$  为U,  $Z_{10}$  为A, 所述核苷酸序列I中包含位置对应于  $Z_9$  的核苷酸  $Z_{11}$ , 所述核苷酸序列II中包含位置对应于  $Z_{10}$  的核苷酸  $Z_{12}$ , 所述  $Z_{12}$  是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0020] iv) 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:

[0021] 5'-GAUAAUGCAUACAUCGAU $Z_{13}$ -3' (SEQ ID NO:181);

[0022] 5'- $Z_{14}$  AUCGAUGUAUGCAUUAUC-3' (SEQ ID NO:182),

[0023] 其中,  $Z_{13}$  为A,  $Z_{14}$  为U, 所述核苷酸序列I中包含位置对应于  $Z_{13}$  的核苷酸  $Z_{15}$ , 所述核苷酸序列II中包含位置对应于  $Z_{14}$  的核苷酸  $Z_{16}$ , 所述  $Z_{16}$  是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0024] v) 所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:241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:242所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异:

[0025] 5'-GAAUAACGCAACUUUCUA $Z_{17}$ -3' (SEQ ID NO:241);

[0026] 5'- $Z_{18}$  UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO:242),

[0027] 其中,  $Z_{17}$  为U,  $Z_{18}$  为A, 所述核苷酸序列I中包含位置对应于  $Z_{17}$  的核苷酸  $Z_{19}$ , 所述核苷酸序列II中包含位置对应于  $Z_{18}$  的核苷酸  $Z_{20}$ , 所述  $Z_{20}$  是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0028] vi) 所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:301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:302所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异:

[0029] 5'-AACUUUCUAUUUCAAGA $Z_{21}$ -3' (SEQ ID NO:301);

[0030] 5'- $Z_{22}$  AUCUUGAAAUAGAAAGUU-3' (SEQ ID NO:302),

[0031] 其中,  $Z_{21}$  为U,  $Z_{22}$  为A, 所述核苷酸序列I中包含位置对应于  $Z_{21}$  的核苷酸  $Z_{23}$ , 所述核苷酸序列II中包含位置对应于  $Z_{22}$  的核苷酸  $Z_{24}$ , 所述  $Z_{24}$  是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

酸。

[0032] 在一些实施方式中,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。

[0033] 在一些实施方式中,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。

[0034] 在一些实施方式中,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/或预防由所述KNG基因异常表达引起的败血症的药物中的用途。

[0035] 在一些实施方式中,本公开提供了一种治疗和/或预防败血症的方法,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缀合物给予患有败血症的受试者。

[0036] 在一些实施方式中,本公开提供了一种抑制细胞中KNG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缀合物与所述细胞接触。

[0037] 在一些实施方式中,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。

[0038] 以引用的方式并入

[0039] 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。

[0040] 有益效果

[0041] 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KNG mRNA抑制活性,较低的脱靶效应,和/或能显著治疗或缓解败血症症状。

[0042] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA、药物组合物或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表达抑制率。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA缀合物在psiCHECK系统中显示出较高的抑制活性,IC<sub>50</sub>在0.0048-0.2328nM之间。

[0043] 本公开提供的siRNA在psiCHECK系统中对KNG mRNA显示出较高的抑制活性,在不同siRNA浓度下对KNG目标序列均显示出抑制效果,特别是在0.1nM浓度下,本公开提供的siRNA对KNG mRNA表达量抑制率均达到了75%以上。

[0044] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA、药物组合物或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。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA、药物组合物或siRNA缀合物在体内显示出至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的KNG基因表达抑制率。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA、药物组合物或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KNG基因表达抑制率。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA、药物组合物或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KNG基因表达抑制率。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA、药物组合物或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KNG基因表达抑制率。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA缀合物在人源化小鼠中对KNG mRNA显示出明显的抑制活性,siRNA缀合物对KNG mRNA的表达水平的抑制率可达到56%。在一些实施方式中,本公开提供的siRNA缀合物在人源小鼠中显示出很高的抑制活性,对KNG mRNA的表达水平的抑制率均达到了97%以上。

[0045] 在一些实施方式中,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。

[0046] 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KNG mRNA的表达,有效治疗和/或预防败血症症状,具有良好的应用前景。

[0047] 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

[0048] 图1是转染了多种浓度的不同siRNA后,体外HEK293A细胞中的Renilla的相对残留活性的柱状图。

[0049] 图2A-2F是依据转染了多种浓度的不同siRNA后,HEK293A细胞中Renilla的相对残留活性而拟合的剂量-效应曲线。

[0050] 图3是给予siRNA缀合物后,在不同时间点小鼠体内(in vivo)的KNG蛋白相对表达水平的柱状图。

### 具体实施方式

[0051] 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,并不用于限制本公开。

[0052] 在本公开中,KNG mRNA是指具有Genbank注册号为NM\_001102416.2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KNG mRNA的基因,术语“靶mRNA”是指上述KNG mRNA。

#### [0053] 定义

[0054] 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,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。

[0055] 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。

[0056] 在本文的上下文中,表述“互补”或“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。

[0057] 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。

[0058] 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。在一些实施方式中,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。

[0059] 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,亚磷酰胺固相合成中使用的修饰或未修饰的核苷亚磷酰胺单体(unmodified or modified RNA phosphoramidites,有时RNA phosphoramidites也称为Nucleoside phosphoramidites)。亚磷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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。在某些实施方式中,烯基基团具有2到20个碳原子,而在其他实施方式中,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。

[0064] 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。在某些实施方式中,炔基具有2到20个碳原子,而在其他实施方式中,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。

[0065] 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。

[0066] 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、苄基和萘基等基团。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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] “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:

[0070] 二噁烷基、噻吩基[1,3]二硫酰基(thienyl[1,3]dithianyl)、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、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、四氢呋喃基、三硫酰基(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1,1-二氧化硫吗啉基(1,1-dioxo-thiomorpholinyl)。

[0071] “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、苯并吡啶基、1,3-苯并二噁唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并[d]噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二噁庚英基(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)、苯并萘并呋喃基、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、咪唑基、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]quinazolinylyl)、5,6-二氢苯并[h]噌啉基(5,6dihydrobenzo[h]cinnolinyl)、6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚烷并[1,2-c]哒嗪基、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]哒嗪基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]吡啶基、异噻唑基、咪唑基、吡唑基(indazolyl)、吡啶基、异吡啶基、二氢吡啶基、异二氢吡啶基、异喹啉基、吡啶基(indolizinylyl)、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-tetrahydroquinazolinylyl)、萘啶基(naphthyridinylyl)、1,6-萘啶酮基(1,6-naphthyridinonylyl)、噁二唑基、2-氧杂吡庚因基(2-oxoazepinylyl)、噁唑基、氧杂环丙烷基(oxiranylyl)、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、吩噻嗪基、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(quinoxalinylyl)、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]哒嗪基、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)。

[0072] 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Greeneand 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。在一些实施方式中,保护基团在碱性条件下稳定,但可以在酸性条件下脱除。在一些实施方式

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)。在一些实施方式中,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TMTTr(4,4',4"-三甲氧基三苯甲基)。

[0073] “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。

[0074] 如本文所使用的,“治疗”是指的是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。

[0075] 如本文所使用的,“预防”是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、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。

[0076] 在一方面,本公开提供了第一种至第六种能够抑制KNG基因表达的siRNA。以下依次对其进行详细描述。

[0077] 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。

[0078] 本公开的siRNA含有正义链和反义链,所述正义链和反义链长度相同或不同,所述正义链的长度为19-23个核苷酸,反义链的长度为19-26个核苷酸。这样,本公开提供的siRNA正义链和反义链的长度比可以是19/19、19/20、19/21、19/22、19/23、19/24、19/25、19/26、20/20、20/21、20/22、20/23、20/24、20/25、20/26、21/20、21/21、21/22、21/23、21/24、21/25、21/26、22/20、22/21、22/22、22/23、22/24、22/25、22/26、23/20、23/21、23/22、23/23、23/24、23/25或23/26。在一些实施方式中,所述siRNA正义链和反义链的长度比为19/21、21/23或23/25。

[0079] 第一种siRNA

[0080] 按照本公开,所述siRNA可以是第一种siRNA。

[0081] 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:

[0082] 5'-AAAGUAACAACCAGUUUG<sub>1</sub>-3'(SEQ ID NO:1);

[0083] 5'-Z<sub>2</sub>CAAACUGGUUGUUACUUU-3'(SEQ ID NO:2),

[0084] 其中,Z<sub>1</sub>为U,Z<sub>2</sub>为A,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。

[0085] 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。

[0086] 在一些实施方式中,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。

[0087] 在一些实施方式中,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。

[0088] 在一些实施方式中,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 $Z_4$ 位置处的差异,且 $Z_4$ 选自U、C或G。在一些实施方式中,所述核苷酸差异为 $Z_4$ 位置处的差异, $Z_4$ 选自U、C或G。在一些实施方式中, $Z_3$ 是与 $Z_4$ 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的siRNA具有较高的靶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。

[0089] 在一些实施方式中,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。

[0090] 在一些实施方式中,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:

[0091] 5'-AAAGUAACAACCAGUUUG $Z_3$ -3'(SEQ ID NO:3);

[0092] 5'- $Z_4$ CAAACUGGUUGUACUUUGG-3'(SEQ ID NO:4),

[0093] 其中,所述 $Z_4$ 是反义链5'末端的第一个核苷酸, $Z_4$ 选自A、U、G或C,并且 $Z_3$ 是与 $Z_4$ 互补的核苷酸;在一些实施方式中, $Z_3$ 为U, $Z_4$ 为A。

[0094] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0095] 在一些实施方式中,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CC,核苷酸序列IV的碱基组成为GG;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ACC,核苷酸序列IV的碱基组成为GGU;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AACC,核苷酸序列IV的碱基组成为GGUU;此时,正义链和反义链的长度比为23/23。在一些实施方式中,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CC,核苷酸序列IV的碱基组成为GG;此时,正义链和反义链的长度比为21/21。

[0096] 在一些实施方式中,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。

[0097] 第二种siRNA

[0098] 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:

[0099] 5'-AUUGAACUUUCGAAUUACZ<sub>5</sub>-3' (SEQ ID NO:61);

[0100] 5'-Z<sub>6</sub>GUAAUUCGAAAGUCAAU-3' (SEQ ID NO:62),

[0101] 其中,Z<sub>5</sub>为C,Z<sub>6</sub>为G,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。

[0102] 在一些实施方式中,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。

[0103] 在一些实施方式中,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。

[0104] 在一些实施方式中,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、U或C。在一些实施方式中,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、U或C。在一些实施方式中,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具有较高的靶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。

[0105] 在一些实施方式中,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。

[0106] 在一些实施方式中,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:

[0107] 5'-AUUGAACUUUCGAAUUACZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO:63);

[0108] 5'-Z<sub>8</sub>GUAAUUCGAAAGUCAAU-3' (SEQ ID NO:64),

[0109] 其中,所述Z<sub>8</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>8</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>7</sub>是与Z<sub>8</sub>互补的核苷酸;在一些实施方式中,Z<sub>7</sub>为C,Z<sub>8</sub>为G。

[0110] 在一些实施方式中,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。

[0111] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0112] 在一些实施方式中,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。

### [0113] 第三种siRNA

[0114] 按照本公开,所述siRNA可以是第三种siRNA。

[0115] 所述第三种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:

[0116] 5'-UCGAAUACCUACUCAAUZ<sub>9</sub>-3' (SEQ ID NO:121);

[0117] 5'-Z<sub>10</sub>AUUGAGUAGGUAUUCGA-3' (SEQ ID NO:122),

[0118] 其中,Z<sub>9</sub>为U,Z<sub>10</sub>为A,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。

[0119] 在一些实施方式中,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。

[0120] 在一些实施方式中,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。

[0121] 在一些实施方式中,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U、C或G。在一些实施方式中,所述核苷酸差异为Z<sub>12</sub>位置处的差异,Z<sub>12</sub>选自U、C或G。在一些实施方式中,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具有较高的靶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。

[0122] 在一些实施方式中,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。

[0123] 在一些实施方式中,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:

[0124] 5'-UCGAAUACCUACUCAAUZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO:123);

[0125] 5'-Z<sub>12</sub>AUUGAGUAGGUAUUCGA-3' (SEQ ID NO:124),

[0126] 其中,所述 $Z_{12}$ 是反义链5'末端的第一个核苷酸, $Z_{12}$ 选自A、U、G或C,并且 $Z_{11}$ 是与 $Z_{12}$ 互补的核苷酸;在一些实施方式中, $Z_{11}$ 为U, $Z_{12}$ 为A。

[0127] 在一些实施方式中,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。

[0128] 在一些实施方式中,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U,核苷酸序列IV的碱基为A;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UU,核苷酸序列IV的碱基组成为AA;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CUU,核苷酸序列IV的碱基组成为AAG;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ACUU,核苷酸序列IV的碱基组成为AAGU;此时,正义链和反义链的长度比为23/23。在一些实施方式中,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UU,核苷酸序列IV的碱基组成为AA;此时,正义链和反义链的长度比为21/21。

[0129] 在一些实施方式中,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。

#### [0130] 第四种siRNA

[0131] 按照本公开,所述siRNA可以是第四种siRNA。

[0132] 所述第四种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: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:

[0133] 5'-GAUAAUGCAUACAUCGAUZ<sub>13</sub>-3'(SEQ ID NO:181);

[0134] 5'-Z<sub>14</sub>AUCGAUGUAUGCAUUAUC-3'(SEQ ID NO:182),

[0135] 其中, $Z_{13}$ 为A, $Z_{14}$ 为U,所述核苷酸序列I中包含位置对应于 $Z_{13}$ 的核苷酸 $Z_{15}$ ,所述核苷酸序列II中包含位置对应于 $Z_{14}$ 的核苷酸 $Z_{16}$ ,所述 $Z_{16}$ 是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0136] 在一些实施方式中,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。

[0137] 在一些实施方式中,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。

[0138] 在一些实施方式中,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 $Z_{16}$ 位置处的差异,且 $Z_{16}$ 选自A、C或G。在一些实施方式中,所述核苷酸差异为 $Z_{16}$ 位置处的差异, $Z_{16}$ 选自A、C或G。在一些实施方式中, $Z_{15}$ 是与 $Z_{16}$ 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的siRNA具有较高的靶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。

[0139] 在一些实施方式中,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。

[0140] 在一些实施方式中,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:

[0141] 5'-GAUAAUGCAUACAUCGAUZ<sub>15</sub>-3'(SEQ ID NO:183);

[0142] 5'-Z<sub>16</sub>AUCGAUGUAUGCAUUAUC-3'(SEQ ID NO:184),

[0143] 其中,所述 $Z_{16}$ 是反义链5'末端的第一个核苷酸, $Z_{16}$ 选自A、U、G或C,并且 $Z_{15}$ 是与 $Z_{16}$ 互补的核苷酸;在一些实施方式中, $Z_{15}$ 为A, $Z_{16}$ 为U。

[0144] 在一些实施方式中,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。

[0145] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0146] 在一些实施方式中,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。

[0147] 第五种siRNA

[0148] 按照本公开,所述siRNA可以是第五种siRNA。所述第五种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:241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:242所示的核苷酸序列长度相等,且不多于3个核苷酸差异:

[0149] 5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>17</sub>-3' (SEQ ID NO:241);

[0150] 5'-Z<sub>18</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO:242),

[0151] 其中,Z<sub>17</sub>为U,Z<sub>18</sub>为A,所述核苷酸序列I中包含位置对应于Z<sub>17</sub>的核苷酸Z<sub>19</sub>,所述核苷酸序列II中包含位置对应于Z<sub>18</sub>的核苷酸Z<sub>20</sub>,所述Z<sub>20</sub>是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0152] 在一些实施方式中,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。

[0153] 在一些实施方式中,所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:241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:242所示的核苷酸序列之间不多于1个核苷酸差异。

[0154] 在一些实施方式中,所述核苷酸序列II与SEQ ID NO:242所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括Z<sub>20</sub>位置处的差异,且Z<sub>20</sub>选自U、C或G。在一些实施方式中,所述核苷酸差异为Z<sub>20</sub>位置处的差异,Z<sub>20</sub>选自U、C或G。在一些实施方式中,Z<sub>19</sub>是与Z<sub>20</sub>互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的siRNA具有较高的靶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。

[0155] 在一些实施方式中,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。

[0156] 在一些实施方式中,核苷酸序列I是SEQ ID NO:243所示的核苷酸序列,核苷酸序列II是SEQ ID NO:244所示的核苷酸序列:

[0157] 5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>19</sub>-3' (SEQ ID NO:243);

[0158] 5'-Z<sub>20</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO:244),

[0159] 其中,所述Z<sub>20</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>20</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>19</sub>是与Z<sub>20</sub>互补的核苷酸;在一些实施方式中,Z<sub>19</sub>为U,Z<sub>20</sub>为A。

[0160] 在一些实施方式中,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:241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。

[0161] 在一些实施方式中,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AGA,核苷酸序列IV的碱基组成为UCU;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CAGA,核苷酸序列IV的碱基组成为UCUG;此时,正义链和反义链的长度比为23/23。在一些实施方式中,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。

[0162] 在一些实施方式中,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。

[0163] 第六种siRNA

[0164] 按照本公开,所述siRNA可以是第六种siRNA。

[0165] 所述第六种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:301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:302所示的核苷酸序列长度相等,且不多于3个核苷酸差异:

[0166] 5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ<sub>21</sub>-3'(SEQ ID NO:301);

[0167] 5'-Z<sub>22</sub>AUCUUGAAAUAGAAAGUU-3'(SEQ ID NO:302),

[0168] 其中,Z<sub>21</sub>为U,Z<sub>22</sub>为A,所述核苷酸序列I中包含位置对应于Z<sub>21</sub>的核苷酸Z<sub>23</sub>,所述核苷酸序列II中包含位置对应于Z<sub>22</sub>的核苷酸Z<sub>24</sub>,所述Z<sub>24</sub>是所述反义链5'末端的第一个核苷酸。

[0169] 在一些实施方式中,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。

[0170] 在一些实施方式中,所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:301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:302所示的核苷酸序列之间不多于1个核苷酸差异。

[0171] 在一些实施方式中,所述核苷酸序列II与SEQ ID NO:302所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括Z<sub>24</sub>位置处的差异,且Z<sub>24</sub>选自U、C或G。在一些实施方式中,所述核苷酸差异为Z<sub>24</sub>位置处的差异,Z<sub>24</sub>选自U、C或G。在一些实施方式中,Z<sub>23</sub>是与Z<sub>24</sub>互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的siRNA具有较高的靶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。

[0172] 在一些实施方式中,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。

[0173] 在一些实施方式中,核苷酸序列I是SEQ ID NO:303所示的核苷酸序列,核苷酸序列II是SEQ ID NO:304所示的核苷酸序列:

[0174] 5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ<sub>23</sub>-3'(SEQ ID NO:303);

[0175] 5'-Z<sub>24</sub>AUCUUGAAAUAGAAAGUU-3'(SEQ ID NO:304),

[0176] 其中,所述Z<sub>24</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>24</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>23</sub>是与Z<sub>24</sub>互补的核苷酸;在一些实施方式中,Z<sub>23</sub>为U,Z<sub>24</sub>为A。

[0177] 在一些实施方式中,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:301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。

[0178] 在一些实施方式中,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GC,核苷酸序列IV的碱基组成为GC;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CGC,核苷酸序列IV的碱基组成为GCG;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ACGC,核苷酸序列IV的碱基组成为GCGU;此时,正义链和反义链的长度比为23/23。在一些实施方式中,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GC,核苷酸序列IV的碱基组成为GC;此时,正义链和反义链的长度比为21/21。

[0179] 在一些实施方式中,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。

[0180] 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至第六种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、第四种siRNA、第五种siRNA或第六种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、第四种siRNA、第五种siRNA或第六种siRNA还含有核苷酸序列V”。

[0181] 在一些实施方式中,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。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。在一些实施方式中,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。

[0182] 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的亲合力,核苷酸序列V与靶mRNA的相应位置的核苷酸互补。因此,在一些实施方式中,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。

[0183] 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。

[0184] 在一些实施方式中,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:

[0185] 5'-AAAGUAACAACCAGUUUG<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO:5);

[0186] 5'-Z<sub>4</sub>CAAACUGGUUGUUACUUUGG-3' (SEQ ID NO:6);

[0187] 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:

[0188] 5'-CCAAAGUAACAACCAGUUUG Z<sub>3</sub>-3' (SEQ ID NO:7);

[0189] 5'-Z<sub>4</sub>CAAACUGGUUGUUACUUUGGU-3' (SEQ ID NO:8);

[0190] 其中,所述Z<sub>4</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>4</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>3</sub>是与Z<sub>4</sub>互补的核苷酸。

[0191] 在一些实施方式中,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:

[0192] 5'-AUUGAACUUUCGAAUUACZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO:65);

[0193] 5'-Z<sub>8</sub>GUAAUUCGAAAGUCAAUCC-3' (SEQ ID NO:66),

[0194] 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:

[0195] 5'-GGAUUGAACUUUCGAAUUACZ<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO:67);

[0196] 5'-Z<sub>8</sub>GUAAUUCGAAAGUCAAUCCAG-3' (SEQ ID NO:68),

[0197] 其中,所述Z<sub>8</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>8</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>7</sub>是与Z<sub>8</sub>互补的核苷酸。

[0198] 在一些实施方式中,对于所述第三种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:

[0199] 5'-UCGAAUUACCUACUCAAUZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO:125);

[0200] 5'-Z<sub>12</sub>AUUGAGUAGGUAAUUCGAAA-3' (SEQ ID NO:126),

[0201] 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:

[0202] 5'-UUUCGAAUUACCUACUCAAUZ<sub>11</sub>-3' (SEQ ID NO:127);

[0203] 5'-Z<sub>12</sub>AUUGAGUAGGUAAUUCGAAAGU-3' (SEQ ID NO:128),

[0204] 其中,所述Z<sub>12</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>12</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>11</sub>是与Z<sub>12</sub>互补的核苷酸。

[0205] 在一些实施方式中,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:

[0206] 5'-GAUAAUGCAUACAUCGAUZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO:185);

[0207] 5'-Z<sub>16</sub>AUCGAUGAUGCAUUAUCUG-3' (SEQ ID NO:186),

[0208] 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:

[0209] 5'-CAGAUAAUGCAUACAUCGAUZ<sub>15</sub>-3' (SEQ ID NO:187);

[0210] 5'-Z<sub>16</sub>AUCGAUGAUGCAUUAUCUGUA-3' (SEQ ID NO:188),

[0211] 其中,所述Z<sub>16</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>16</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>15</sub>是与Z<sub>16</sub>

互补的核苷酸。

[0212] 在一些实施方式中,对于所述第五种siRNA,所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:245所示的核苷酸序列,所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:246所示的核苷酸序列:

[0213] 5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>19</sub>-3' (SEQ ID NO:245);

[0214] 5'-Z<sub>20</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUCUC-3' (SEQ ID NO:246),

[0215] 或者,所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:247所示的核苷酸序列,所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:248所示的核苷酸序列:

[0216] 5'-GAGAAUAACGCAACUUUCUAZ<sub>19</sub>-3' (SEQ ID NO:247);

[0217] 5'-Z<sub>20</sub>UAGAAAGUUGCGUUAUUCUCUG-3' (SEQ ID NO:248),

[0218] 其中,所述Z<sub>20</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>20</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>19</sub>是与Z<sub>20</sub>互补的核苷酸。

[0219] 在一些实施方式中,对于所述第六种siRNA,所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:305所示的核苷酸序列,所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:306所示的核苷酸序列:

[0220] 5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ<sub>23</sub>-3' (SEQ ID NO:305);

[0221] 5'-Z<sub>24</sub>AUCUUGAAAUAAGAAAGUUGC-3' (SEQ ID NO:306),

[0222] 或者,所述siRNA的正义链含有如SEQ ID NO:307所示的核苷酸序列,所述siRNA的反义链含有如SEQ ID NO:308所示的核苷酸序列:

[0223] 5'-GCAACUUUCUAUUUCAAGAUZ<sub>23</sub>-3' (SEQ ID NO:307);

[0224] 5'-Z<sub>24</sub>AUCUUGAAAUAAGAAAGUUGCGU-3' (SEQ ID NO:308),

[0225] 其中,所述Z<sub>24</sub>是反义链5'末端的第一个核苷酸,Z<sub>24</sub>选自A、U、G或C,并且Z<sub>23</sub>是与Z<sub>24</sub>互补的核苷酸。

[0226] 在一些实施方式中,本公开所述siRNA为表1a-1f中列出的siKNa1、siKNa2、siKNb1、siKNb2、siKNc1、siKNc2、siKNd1、siKNd2、siKNe1、siKNe2、siKNf1和siKNf2。

[0227] 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。在一些实施方式中,本公开的siRNA中的每个核苷酸均为未经修饰的核苷酸。在一些实施方式中,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KNG基因表达的功能明显削弱或丧失。

[0228] 在一些实施方式中,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。

[0229] 在一些实施方式中,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。

[0230] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0231] 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。

[0232] 在一些实施方式中,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。

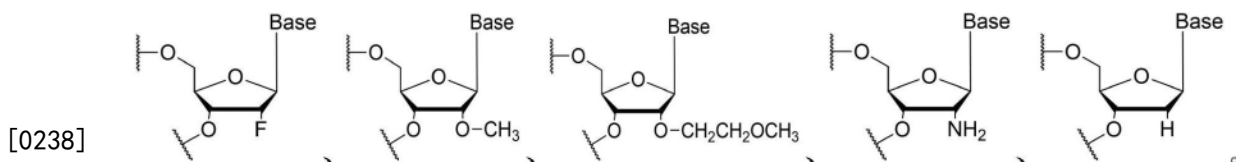
[0233] 在一些实施方式中,所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列I和核苷酸序列II中,所述核苷酸序列I中氟代修饰的核苷酸不多于5个,并且,按照5'末端到3'末端的方向,所述核苷酸序列I的至少第7、8、9位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸;所述核苷酸序列II中氟代修饰的核苷酸不多于7个,并且,所述核苷酸序列II的至少第2、6、14、16位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

[0234] 在一些实施方式中,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。

[0235] 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。在一些实施方式中,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。

[0236] 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。

[0237] 在一些实施方式中,2'-烷氧基修饰的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸(2'-OMe),如式(8)所示。在一些实施方式中,2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸,例如可以是2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸(2'-MOE),如式(9)所示。在一些实施方式中,2'-氨基修饰的核苷酸(2'-NH<sub>2</sub>)如式(10)所示。在一些实施方式中,2'-脱氧核苷酸(DNA)如式(11)所示:



式(7)

式(8)

式(9)

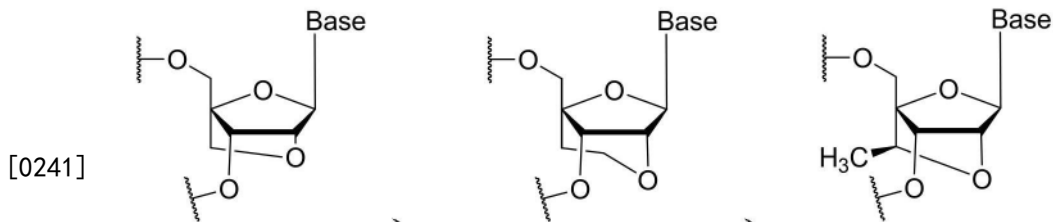
式(10)

式(11)

[0239] 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。在一些实施方式中,核苷酸类似物可以是异核苷酸、桥联的核苷酸(bridged nucleic

acid,简称BNA)或无环核苷酸。

[0240] 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。在一些实施方式中,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:

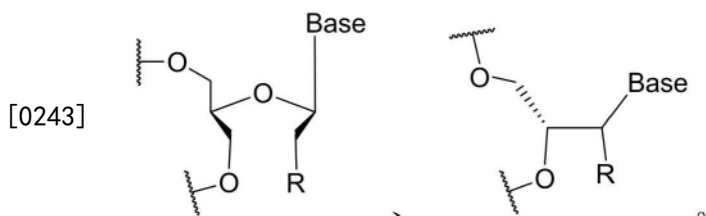


式(12)

式(13)

式(14)

[0242] 无环核苷酸是核苷酸的糖环被打开形成的一类核苷酸。在一些实施方式中,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:

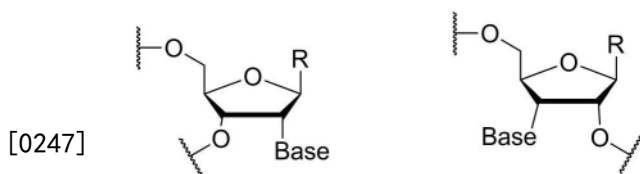


式(15)

式(16)

[0245] 上述式(15)和式(16)中,R选自H、OH或烷氧基(O-烷基)。

[0246] 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。在一些实施方式中,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)

[0248] 上述式(17)-式(18)所示的化合物中,Base表示碱基,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。

[0249] 在一些实施方式中,核苷酸类似物选自异核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA和GNA中的一种。在一些实施方式中,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。

[0250] 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。

[0251] 在一些实施方式中,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。

[0252] 在一些实施方式中,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;

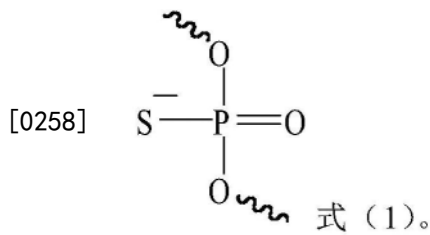
[0253] 或者,按照5'末端到3'末端的方向,所述siRNA的正义链中核苷酸序列I的第5、7、8和9位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸,siRNA的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸,并且,按照5'末端到3'末端的方向,所述siRNA的反义链中核苷酸序列II的第2、6、14和16位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸,siRNA的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸;

[0254] 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。

[0255] 在一些实施方式中,本公开提供的siRNA为表1a-1f中列出的siKNa1-M1、siKNa1-M2、siKNa1-M3、siKNa2-M1、siKNa2-M2、siKNa2-M3、siKNb1-M1、siKNb1-M2、siKNb1-M3、siKNb2-M1、siKNb2-M2、siKNb2-M3、siKNc1-M1、siKNc1-M2、siKNc1-M3、siKNc2-M1、siKNc2-M2、siKNc2-M3、siKNd1-M1、siKNd1-M2、siKNd1-M3、siKNd2-M1、siKNd2-M2、siKNd2-M3、siKNe1-M1、siKNe1-M2、siKNe1-M3、siKNe2-M1、siKNe2-M2、siKNe2-M3、siKNf1-M1、siKNf1-M2、siKNf1-M3、siKNf2-M1、siKNf2-M2和siKNf2-M3中的任意一种。

[0256] 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具有较高的抑制靶mRNA的活性。

[0257] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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;在一些实施方式中,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:



[0259] 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。

[0260] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,硫代磷酸酯基连接存在于以下位置中的至少一处:

[0261] 所述正义链的5'末端第1个核苷酸和第2个核苷酸之间;

[0262] 所述正义链的5'末端第2个核苷酸和第3个核苷酸之间;

[0263] 所述正义链的3'末端第1个核苷酸和第2个核苷酸之间;

[0264] 所述正义链的3'末端第2个核苷酸和第3个核苷酸之间;

[0265] 所述反义链的5'末端第1个核苷酸和第2个核苷酸之间;

[0266] 所述反义链的5'末端第2个核苷酸和第3个核苷酸之间;

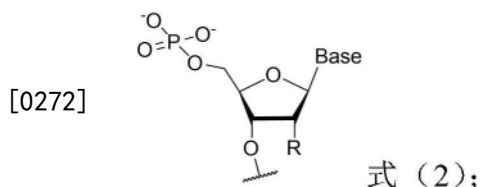
[0267] 所述反义链的3'末端第1个核苷酸和第2个核苷酸之间;以及

[0268] 所述反义链的3'末端第2个核苷酸和第3个核苷酸之间。

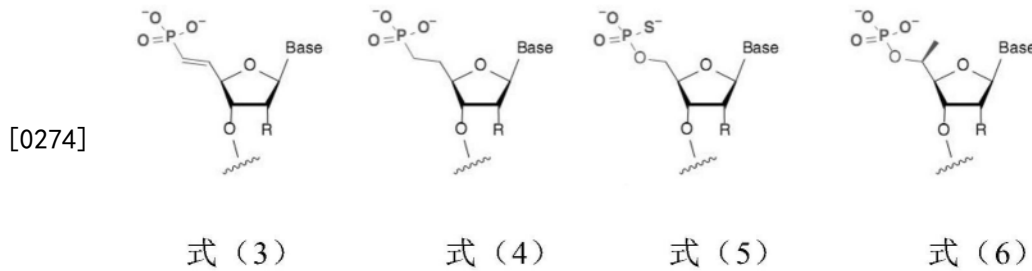
[0269] 在一些实施方式中,本公开提供的siRNA为表1a-1f中列出的siKNa1-M1S、siKNa1-M2S、siKNa1-M3S、siKNa2-M1S、siKNa2-M2S、siKNa2-M3S、siKNb1-M1S、siKNb1-M2S、siKNb1-M3S、siKNb2-M1S、siKNb2-M2S、siKNb2-M3S、siKNc1-M1S、siKNc1-M2S、siKNc1-M3S、siKNc2-M1S、siKNc2-M2S、siKNc2-M3S、siKNd1-M1S、siKNd1-M2S、siKNd1-M3S、siKNd2-M1S、siKNd2-M2S、siKNd2-M3S、siKNe1-M1S、siKNe1-M2S、siKNe1-M3S、siKNe2-M1S、siKNe2-M2S、siKNe2-M3S、siKNf1-M1S、siKNf1-M2S、siKNf1-M3S、siKNf2-M1S、siKNf2-M2S和siKNf2-M3S中的任意一种。

[0270] 在一些实施方式中,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。

[0271] 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:



[0273] 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:



[0275] 其中,R选自H、OH、甲氧基、氟;Base表示碱基,选自A、U、C、G或T。

[0276] 在一些实施方式中,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。

[0277] 在一些实施方式中,本公开提供的siRNA为表1a-1f中列出的siKNa1-M1P1、siKNa1-M2P1、siKNa1-M3P1、siKNa2-M1P1、siKNa2-M2P1、siKNa2-M3P1、siKNa1-M1SP1、siKNa1-M2SP1、siKNa1-M3SP1、siKNa2-M1SP1、siKNa2-M2SP1、siKNa2-M3SP1、siKNb1-M1P1、siKNb1-M2P1、siKNb1-M3P1、siKNb2-M1P1、siKNb2-M2P1、siKNb2-M3P1、siKNb1-M1SP1、siKNb1-M2SP1、siKNb1-M3SP1、siKNb2-M1SP1、siKNb2-M2SP1、siKNb2-M3SP1、siKNc1-M1P1、siKNc1-M2P1、siKNc1-M3P1、siKNc2-M1P1、siKNc2-M2P1、siKNc2-M3P1、siKNc1-M1SP1、siKNc1-M2SP1、siKNc1-M3SP1、siKNc2-M1SP1、siKNc2-M2SP1、siKNc2-M3SP1、siKNd1-M1P1、siKNd1-M2P1、siKNd1-M3P1、siKNd2-M1P1、siKNd2-M2P1、siKNd2-M3P1、siKNd1-M1SP1、siKNd1-M2SP1、siKNd1-M3SP1、siKNd2-M1SP1、siKNd2-M2SP1、siKNd2-M3SP1、siKNe1-M1P1、siKNe1-M2P1、siKNe1-M3P1、siKNe2-M1P1、siKNe2-M2P1、siKNe2-M3P1、siKNe1-M1SP1、siKNe1-M2SP1、siKNe1-M3SP1、siKNe2-M1SP1、siKNe2-M2SP1、siKNe2-M3SP1、siKNf1-M1P1、siKNf1-M2P1、siKNf1-M3P1、siKNf2-M1P1、siKNf2-M2P1、siKNf2-M3P1、siKNf1-M1SP1、siKNf1-M2SP1、siKNf1-M3SP1、siKNf2-M1SP1、siKNf2-M2SP1和siKNf2-M3SP1中的任意一种。

[0278] 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,还具有较高的靶mRNA抑制活性。

[0279] 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。

#### [0280] 药物组合物

[0281] 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。

[0282] 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。

[0283] 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,可以是各组分常规的含量。在一些实施方式中,siRNA与药学上可接受的载体的重量比可以为1:(1-500),在一些的实施方式中,上述重量比为1:(1-50)。

[0284] 在一些实施方式中,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。

[0285] 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。

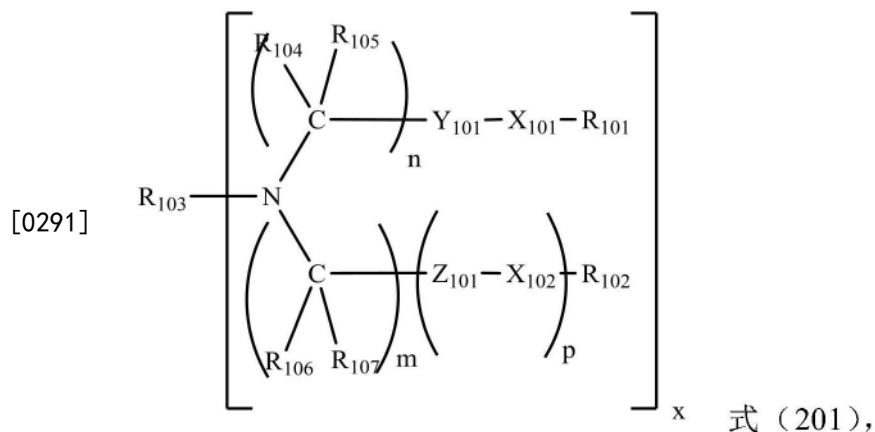
[0286] 所述保护剂可以为肌醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖和葡萄糖中的至少一种。以所述药物组合物的总重量为基准,所述保护剂的含量可以为0.01-30重量%。

[0287] 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。

[0288] 在一些实施方式中,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)。在一些实施方式中,所述药物组合物用于静脉注射给药。

[0289] 在一些实施方式中,所述药物组合物可以为脂质体制剂的形式。在一些实施方式中,所述脂质体制剂中使用的药学上可接受的载体包含含胺的转染化合物(下文也可将其称为有机胺)、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。

[0290] 在一些实施方式中,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:



[0292] 其中:

[0293]  $X_{101}$ 或 $X_{102}$ 各自独立地是O、S、N-A或C-A,其中A是氢或C1-C20烃链;

[0294]  $Y_{101}$ 或 $Z_{101}$ 各自独立地是C=O、C=S、S=O、CH-OH或 $SO_2$ ;

[0295]  $R_{101}$ 、 $R_{102}$ 、 $R_{103}$ 、 $R_{104}$ 、 $R_{105}$ 、 $R_{106}$ 或 $R_{107}$ 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;

[0296] x是1-10的整数;

[0297] 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 $R_{102}$ 是氢;

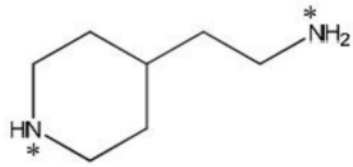
[0298] 并且,如果n或m中的至少一个是2,那么 $R_{103}$ 和在式(201)中的氮形成如式(202)或式(203)所示的结构:



[0300] 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。

[0301] 在一些实施方式中, $R_{103}$ 是多胺。在其它实施方式中, $R_{103}$ 是缩酮。在一些实施方式中,在式(201)中的 $R_{101}$ 和 $R_{102}$ 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。

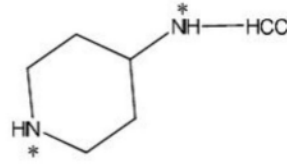
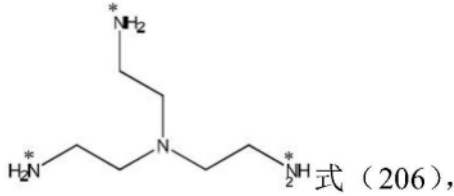
[0302] 在一些实施方式中,如果n和m中的每一个独立地具有1或3的值,那么 $R_{103}$ 可以是下述式(204)-式(213)中的任一个:



式 (204),

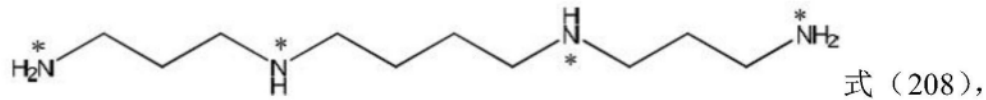


式 (205),

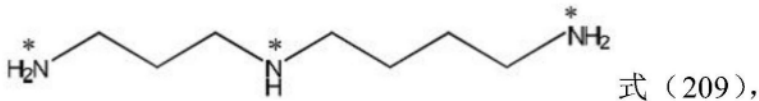


式 (207),

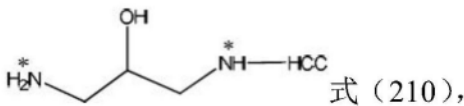
[0303]



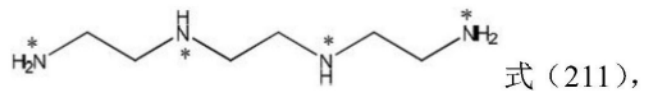
式 (208),



式 (209),

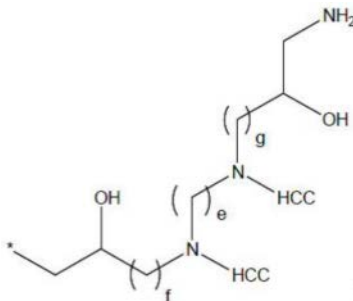


式 (210),

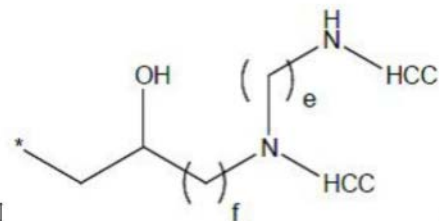


式 (211),

[0304]



式 (212) 和

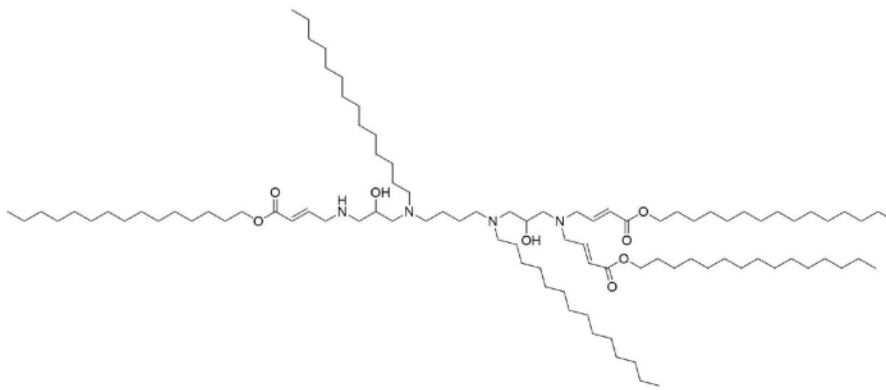


式 (213);

[0305] 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 $R_{103}$ 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。

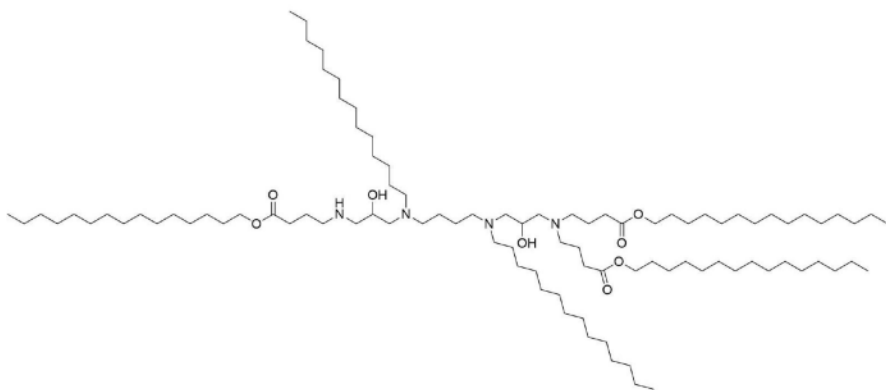
[0306] 其中,式(201)所示化合物可以根据CN103380113A中的描述制备。

[0307] 在一些实施方式中,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),

[0308]



式(215);

[0309] 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;

[0310] 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。

[0311] 在一些实施方式中,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)。

[0312] 在一些实施方式中,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。

[0313] 在一些实施方式中,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。

[0314] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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;在一些实施方式中,可以按照如下方法制备:

[0315] 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。

[0316] 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。

[0317] 将脂质溶液和siRNA水溶液混合,将混合后得到的产物在40-60℃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)。

[0318] 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。

[0319] 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0.22μm过滤器上过滤除菌。

#### [0320] siRNA缀合物

[0321] 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。

[0322] 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。在一些实施方式中,所述靶向基团为1-6个。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,所述siRNA与缀合基团的缀合位点在siRNA正义链的3'末端。

[0323] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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.

[0324] 在一些实施方式中,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。

[0325] 在一些实施方式中,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W02009082607A2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。

[0326] 在一些实施方式中,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。

[0327] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,至少一个配体是能够与肝细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,至少一个配体是能够与人肝细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中,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。

[0328] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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)。在一些实施方式中,所述配体为糖或糖的衍生物。

[0329] 在一些实施方式中,至少一个配体是糖。在一些实施方式中,每个配体均是糖。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,至少一个所述配体可以是单糖、双糖或三糖。在一些实施方式中,至少有一个配体是修饰的糖。在一些实施方式中,每一个配体均为修饰的糖。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

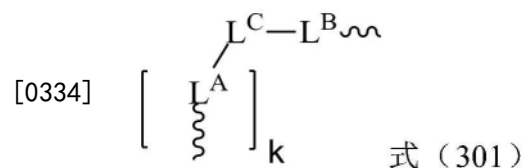
[0330] 在一些实施方式中,每个所述配体可独立地选自D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃甘露糖、 $\beta$ -D-呋喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃甘露糖、 $\beta$ -D-吡喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃葡萄糖、 $\beta$ -D-呋喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃果糖、 $\alpha$ -D-吡喃果糖、 $\alpha$ -D-吡喃半乳糖、 $\beta$ -D-吡喃半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃半乳糖、 $\beta$ -D-呋喃半乳糖、葡萄糖胺、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。

[0331] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,所述药学上可接受的靶向基团是N-乙酰半乳糖胺。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0332] 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W02015006740A2的公开内容,通过引用的方式将其整体内容并入本文。

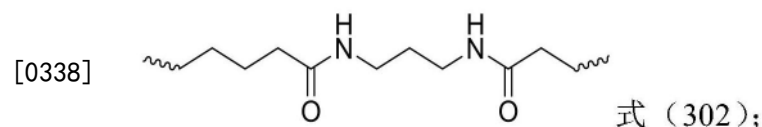
[0333] 在一些实施方式中,当所述靶向基团为N-乙酰半乳糖胺时,合适的接头可以为如式(301)所示的结构:



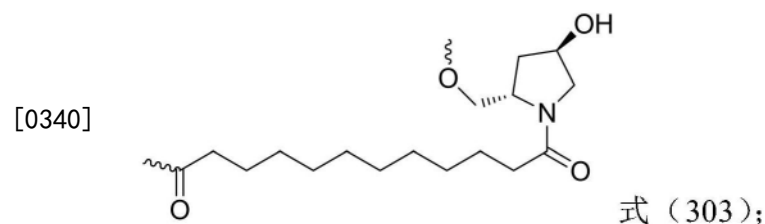
[0335] 其中,

[0336] k为1-3的整数;

[0337]  $L^A$ 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 $L^A$ 在其两端分别与一个所述靶向基团和所述 $L^C$ 部分通过醚键相连接:



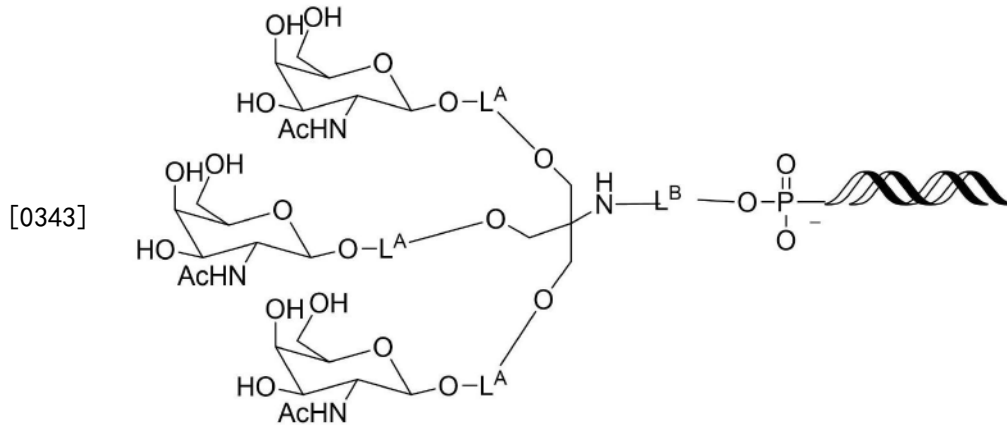
[0339]  $L^B$ 为具有如式(303)所示结构的包含N-酰基吡咯烷的链状部分,所述链状部分在其一端具有羰基并与所述 $L^C$ 部分通过酰胺键相连接,在另一端具有氧基并与所述siRNA通过磷酸酯键相连接:



[0341]  $L^C$ 为基于羟甲基氨基甲烷、二羟甲基氨基甲烷或三羟甲基氨基甲烷的2-4价连接

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

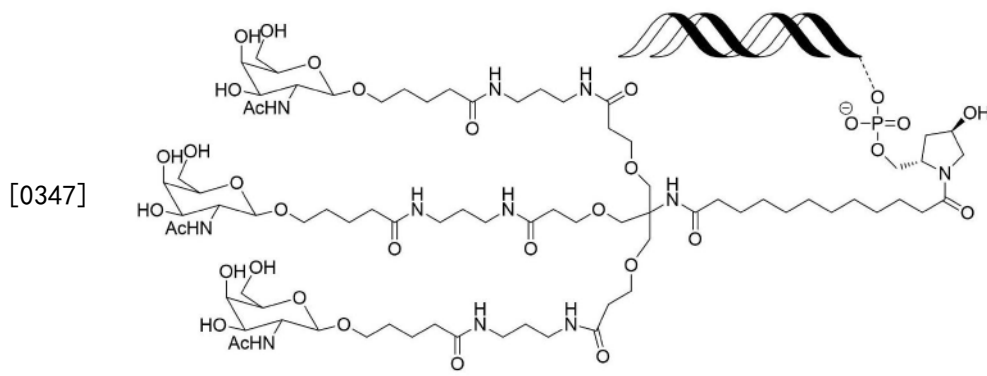
[0342] 在一些实施方式中,当 $n=3$ , $L^C$ 为基于三羟甲基氨基甲烷的4价连接基团时,由作为接头的 $-(L^A)_3$ 三羟甲基氨基甲烷- $L^B$ -连接N-乙酰半乳糖胺分子和siRNA分子所形成的siRNA缀合物,其结构如下式(304)所示:



[0344] 式中,双螺旋结构表示siRNA。

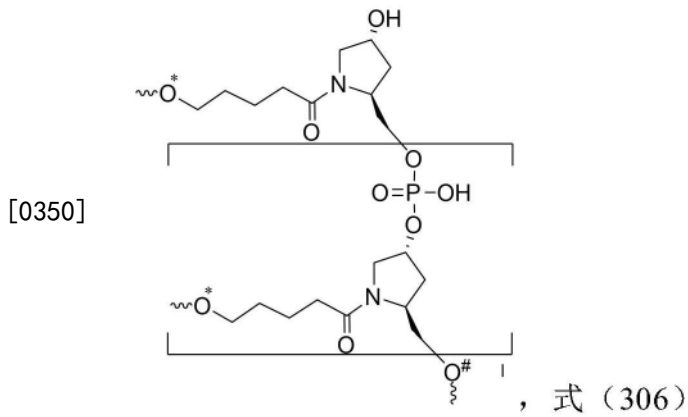
[0345] 同样,siRNA与缀合基团的缀合位点可以在siRNA正义链的3'端或5'端,也可在反义链的5'端,还可以在siRNA的内部序列中。

[0346] 在一些实施方式中,本公开所述siRNA的正义链3'末端通过接头 $-(L^A)_3$ 三羟甲基氨基甲烷- $L^B$ -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 $(\text{GalNAc})_3$ -siRNA,其结构如下式(305)所示:



[0348] 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。

[0349] 在一些实施方式中,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(306)所示的结构:



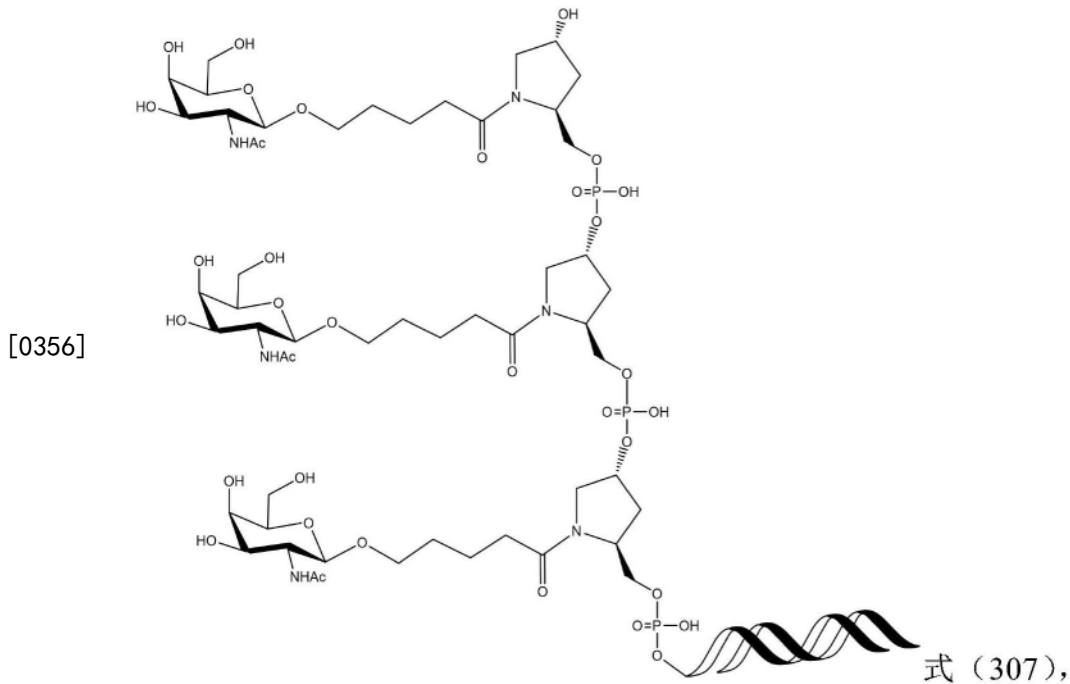
[0351] 其中，

[0352] 1为0-3的整数；

[0353] \*表示接头上通过醚键与靶向基团连接的位点；

[0354] #表示接头上通过磷酸酯键与siRNA连接的位点。

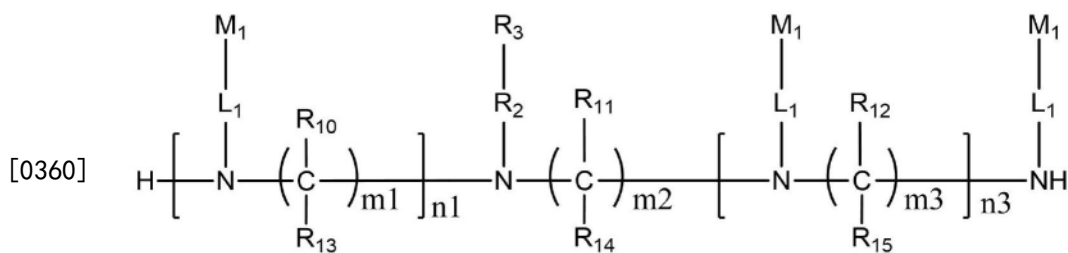
[0355] 在一些实施方式中，当1=2时，所述siRNA缀合物具有如式(307)所示的结构：



[0357] 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。

[0358] 上述siRNA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，W02015006740A2中详细描述了多种siRNA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W02014025805A1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。

[0359] 在一些实施方式中，所述siRNA缀合物具有如式(308)所示的结构：



式 (308),

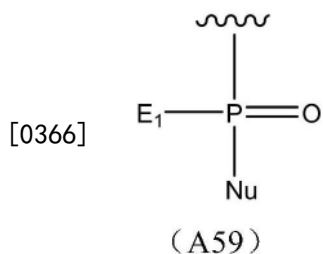
[0361] 其中:

[0362]  $n_1$ 为选自1-3的整数, $n_3$ 为选自0-4的整数;

[0363]  $m_1$ 、 $m_2$ 或 $m_3$ 独立地为选自2-10的整数;

[0364]  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 或 $R_{15}$ 各自独立地为H,或选自于由以下基团所组成的组: $C_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $C_1$ - $C_{10}$ 卤代烷基以及 $C_1$ - $C_{10}$ 烷氧基;

[0365]  $R_3$ 为式A59所示结构的基团:



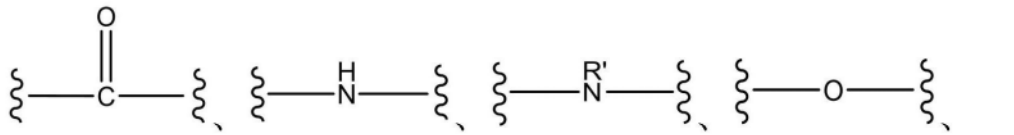
[0367] 其中, $E_1$ 为OH、SH或 $BH_2$ ,Nu为本公开的siRNA;

[0368]  $R_2$ 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、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $C_2$ - $C_{10}$ 亚烯基、 $C_2$ - $C_{10}$ 亚炔基、 $C_6$ - $C_{10}$ 亚芳基、 $C_3$ - $C_{18}$ 亚杂环基和 $C_5$ - $C_{10}$ 亚杂芳基;并且其中, $R_2$ 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: $C_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $C_6$ - $C_{10}$ 芳基、 $C_5$ - $C_{10}$ 杂芳基、 $C_1$ - $C_{10}$ 卤代烷基、 $-OC_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $-OC_1$ - $C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1$ - $C_{10}$ 烷基-OH、 $-OC_1$ - $C_{10}$ 卤代烷基、 $-SC_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $-SC_1$ - $C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1$ - $C_{10}$ 烷基-SH、 $-SC_1$ - $C_{10}$ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、 $-C_1$ - $C_{10}$ 烷基-NH<sub>2</sub>、 $-N(C_1-C_{10} \text{烷基})(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-NH(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-N(C_1-C_{10} \text{烷基})(C_1-C_{10} \text{烷基苯基})$ 、 $-NH(C_1-C_{10} \text{烷基苯基})$ 、氰基、硝基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-CON(C_1-C_{10} \text{烷基})(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-CONH(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-NHC(O)(\text{苯基})$ 、 $-N(C_1-C_{10} \text{烷基})C(O)(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-N(C_1-C_{10} \text{烷基})C(O)(\text{苯基})$ 、 $-C(O)C_1-C_{10} \text{烷基}$ 、 $-C(O)C_1-C_{10} \text{烷基苯基}$ 、 $-C(O)C_1-C_{10} \text{卤代烷基}$ 、 $-OC(O)C_1-C_{10} \text{烷基}$ 、 $-SO_2(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-SO_2(\text{苯基})$ 、 $-SO_2(C_1-C_{10} \text{卤代烷基})$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-SO_2NH(\text{苯基})$ 、 $-NHSO_2(C_1-C_{10} \text{烷基})$ 、 $-NHSO_2(\text{苯基})$ 和 $-NHSO_2(C_1-C_{10} \text{卤代烷基})$ ;

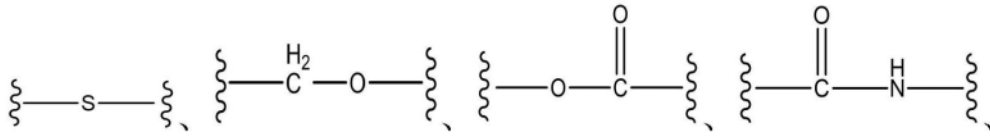
[0369] 每个 $L_1$ 独立地是长度为1-70个碳原子的直链亚烷基,其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换: $C(O)$ 、NH、O、S、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $C_2$ - $C_{10}$ 亚烯基、 $C_2$ - $C_{10}$ 亚炔基、 $C_6$ - $C_{10}$ 亚芳基、 $C_3$ - $C_{18}$ 亚杂环基和 $C_5$ - $C_{10}$ 亚杂芳基;并且其中, $L_1$ 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基: $C_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $C_6$ - $C_{10}$ 芳基、 $C_5$ - $C_{10}$ 杂芳基、 $C_1$ - $C_{10}$ 卤代烷基、 $-OC_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $-OC_1$ - $C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1$ - $C_{10}$ 烷基-OH、 $-OC_1$ - $C_{10}$ 卤代烷基、 $-SC_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $-SC_1$ - $C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1$ - $C_{10}$ 烷基-SH、 $-SC_1$ - $C_{10}$ 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)。

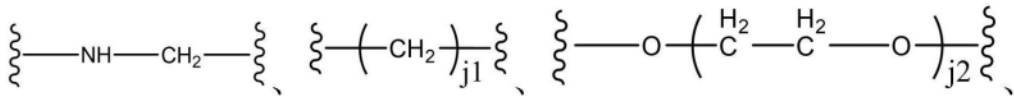
[0370] 在一些实施方式中，L<sub>1</sub>可选自于由A1-A26基团或其任意组合所组成的组，其中A1-A26的结构和定义如下所示：



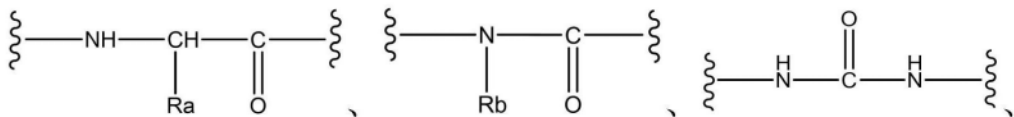
(A1)                      (A2)                      (A3)                      (A4)



(A5)                      (A6)                      (A7)                      (A8)

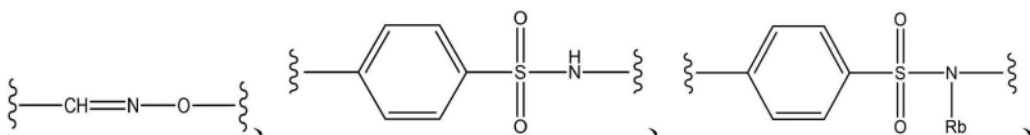


(A9)                      (A10)                      (A11)

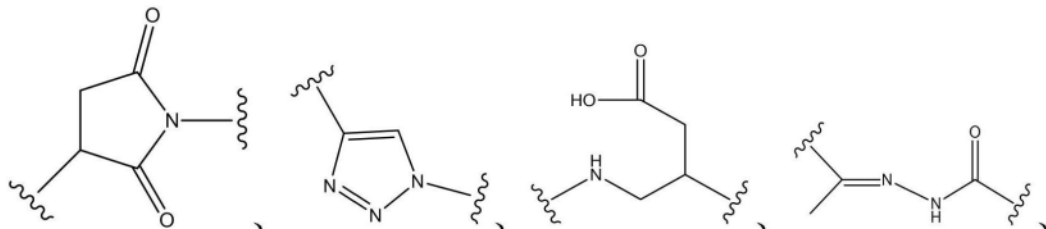


(A12)                      (A13)                      (A14)

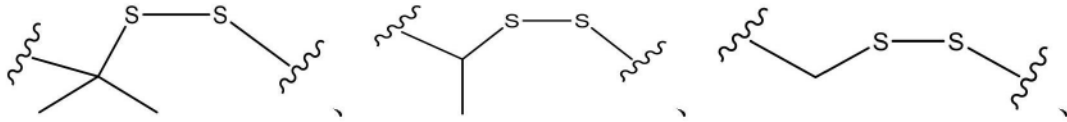
[0371]



(A15)                      (A16)                      (A17)



(A18)                      (A19)                      (A20)                      (A21)

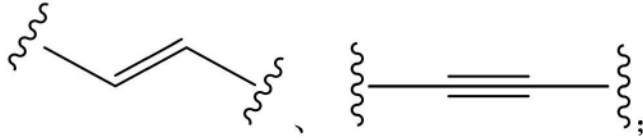


(A22)

(A23)

(A24)

[0372]



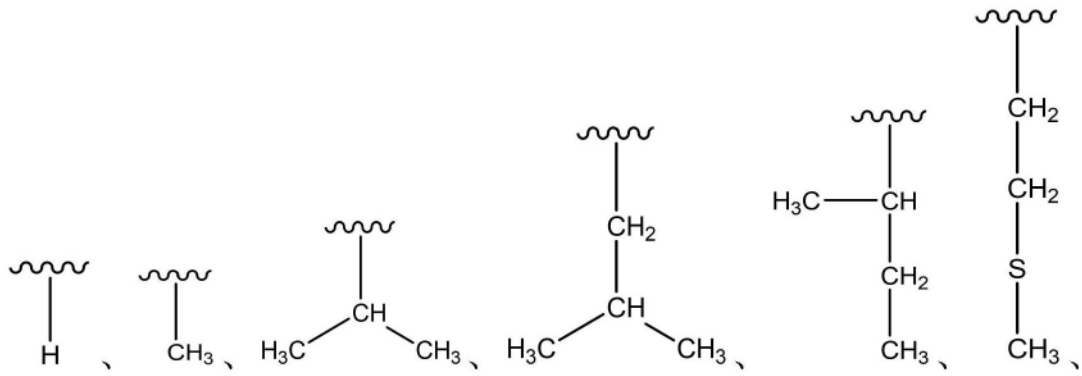
(A25)

(A26)

[0373] 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;

[0374] 每个R'独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基;

[0375] 每个Ra独立地选自于由式A27-A45基团及其任意组合所组成的组:



(A27)

(A28)

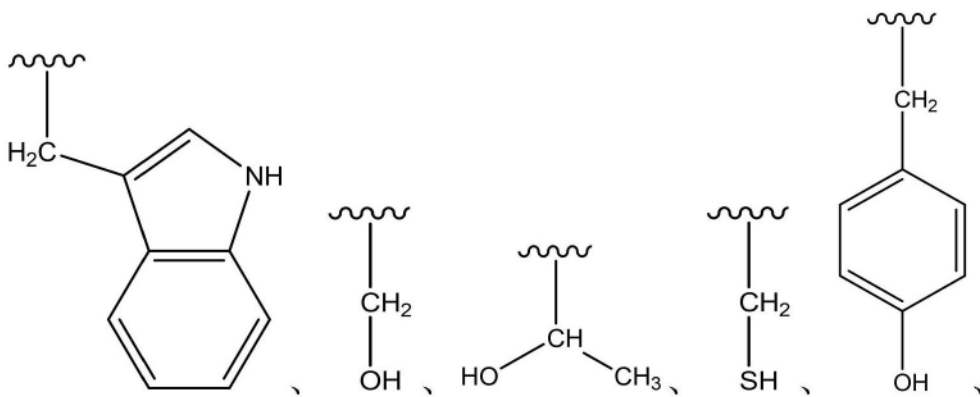
(A29)

(A30)

(A31)

(A32)

[0376]



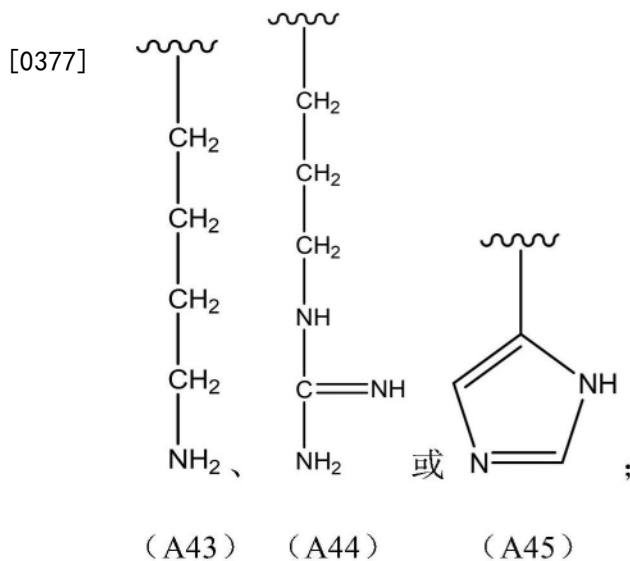
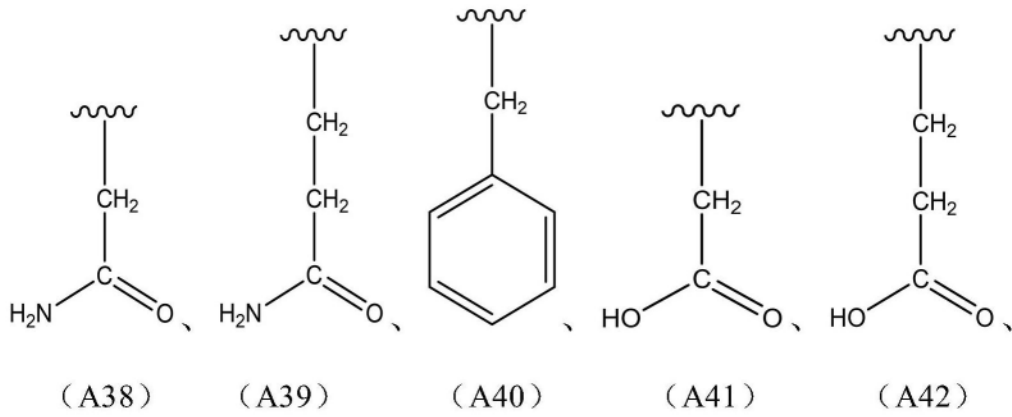
(A33)

(A34)

(A35)

(A36)

(A37)



[0378] 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。

[0379] 技术人员会理解的是，尽管为了方便起见，L<sub>1</sub>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<sub>1</sub>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。

[0380] M<sub>1</sub>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。在一些实施方式中，每个M<sub>1</sub>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和力的配体中的一种。

[0381] 当M<sub>1</sub>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和力的配体时，在一些实施方式中，n<sub>1</sub>可以是1-3的整数，n<sub>3</sub>可以是0-4的整数，保证所述siRNA缀合物中M<sub>1</sub>靶向基团的个数至少为2；在一些实施方式中，n<sub>1</sub>+n<sub>3</sub>≥2，这样可以使得M<sub>1</sub>靶向基团的个数至少为3，从而使得M<sub>1</sub>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siRNA缀合物通过内吞作用进入细胞。实验表明，当M<sub>1</sub>靶向基团的个数大于3个时，M<sub>1</sub>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，在一些实施方式中，n<sub>1</sub>为1-2的整数，n<sub>3</sub>为0-1的整数，且n<sub>1</sub>+n<sub>3</sub>=2-3。

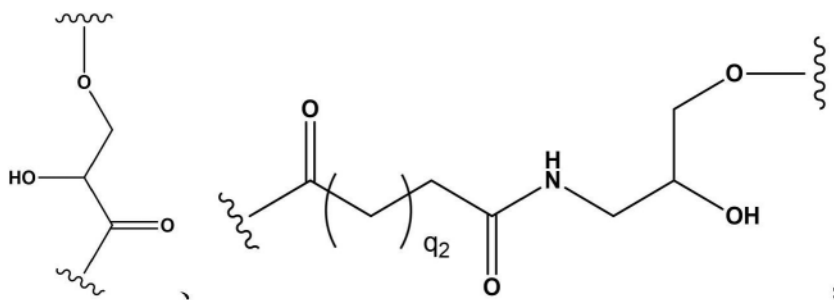
[0382] 在一些实施方式中，m<sub>1</sub>、m<sub>2</sub>或m<sub>3</sub>独立地选自2-10的整数时，可以使多个M<sub>1</sub>靶向基团

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,在一些实施方式中, $m_1$ 、 $m_2$ 或 $m_3$ 各自独立地为2-5的整数,在一些实施方式中, $m_1 = m_2 = m_3$ 。

[0383] 本领域技术人员可以理解,当 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 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。在一些实施方式中, $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 或 $R_{15}$ 各自独立地选自H、甲基或乙基。在一些实施方式中, $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 或 $R_{15}$ 均为H。

[0384]  $R_3$ 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,在一些实施方式中, $E_1$ 为OH或SH。

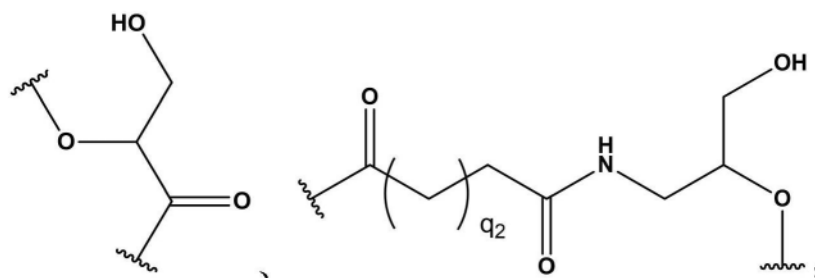
[0385]  $R_2$ 的选择是为了实现与含氮骨架上的N原子与A59的连接。在本公开的上下文中,“含氮骨架”是指连接有 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 和 $R_{15}$ 的碳原子与N原子互相连接的链状结构。因此, $R_2$ 可以是任何能够以适当方式将A59基团连接至含氮骨架上的N原子的连接基团。在一些实施方式中,在通过固相合成的工艺制备式(308)所示的siRNA缀合物的情况下, $R_2$ 基团中需要同时含有与含氮骨架上的N原子连接的连接位点和与 $R_3$ 中的P原子相连接的连接位点。在一些实施方式中, $R_2$ 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;在一些实施方式中, $R_2$ 可以是B5、B6、B5'或B6'：



(B5)

(B6),

[0386]



(B5')

(B6'),

[0387] 其中, 表示基团共价连接的位点。

[0388]  $q_2$ 的取值范围可以是1-10的整数,在一些实施方式中, $q_2$ 为1-5的整数。

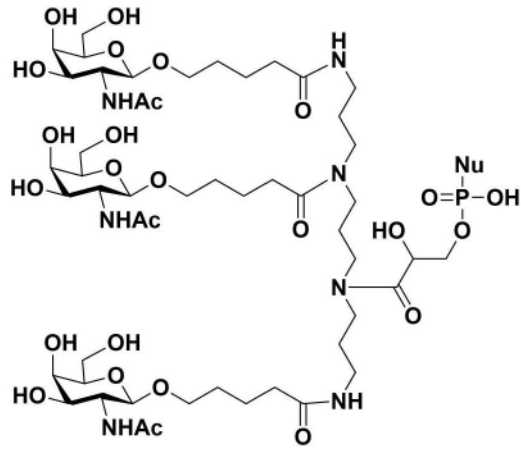
[0389]  $L_1$ 的作用是将 $M_1$ 靶向基团与含氮骨架上的N连接,为式(308)所示的siRNA缀合物提供肝靶向功能。在一些实施方式中, $L_1$ 选自式A1-A26基团中的一种或多种的连接组合。在一

些实施方式中,  $L_1$  选自A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11和A13中的一种或多种的连接组合。在一些实施方式中,  $L_1$  选自A1、A4、A8、A10和A11中至少2个的连接组合。在一些实施方式中,  $L_1$  选自A1、A8、A10中至少2个的连接组合。

[0390] 在一些实施方式中,  $L_1$  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。在一些实施方式中,  $L_1$  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。

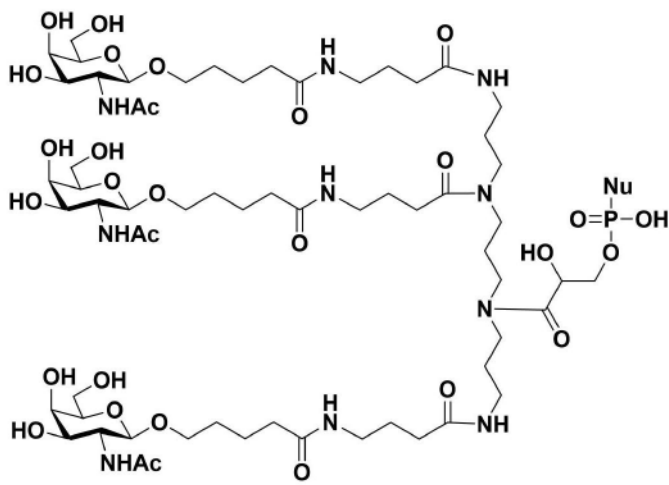
[0391] 在一些实施方式中,  $j_1$  为2-10的整数, 在一些实施方式中,  $j_1$  为3-5的整数。在一些实施方式中,  $j_2$  为2-10的整数, 在一些实施方式中,  $j_2$  为3-5的整数。 $R'$  为 $C_1$ - $C_4$ 烷基, 在一些实施方式中,  $R'$  为甲基、乙基和异丙基中的一种。 $R_a$  为A27、A28、A29、A30和A31中的一种, 在一些实施方式中,  $R_a$  为A27或A28。 $R_b$  为 $C_1$ - $C_5$ 烷基, 在一些实施方式中,  $R_b$  为甲基、乙基、异丙基和丁基中的一种。在一些实施方式中, 在式A1-A26中各自对  $j_1$ 、 $j_2$ 、 $R'$ 、 $R_a$ 、 $R_b$  进行选择, 以实现  $M_1$  靶向基团与含氮骨架上的N原子连接, 并使  $M_1$  靶向基团之间的空间位置更适合  $M_1$  靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体结合。

[0392] 在一些实施方式中, 该siRNA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:

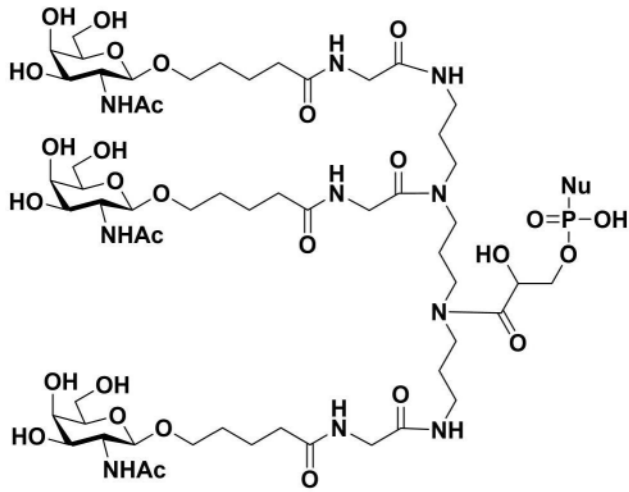


式 (403)

[0393]

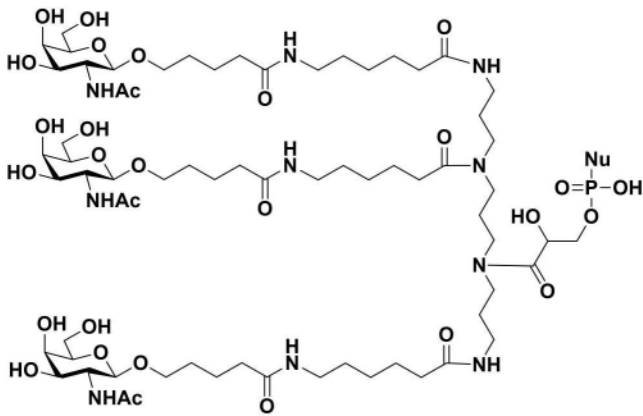


式 (404)

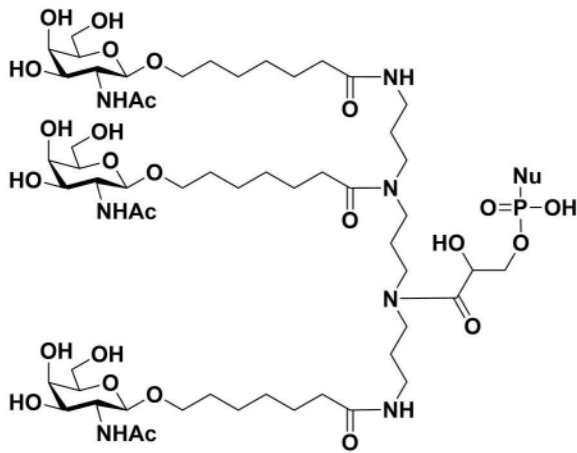


式 (405)

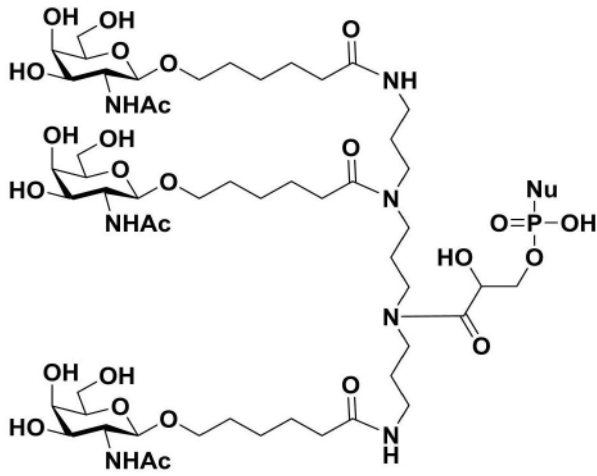
[0394]



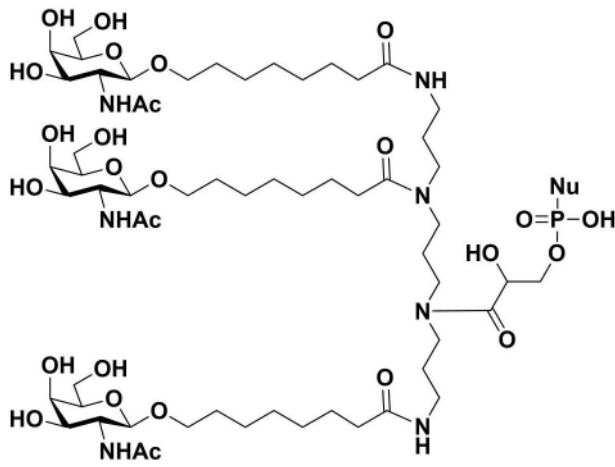
式 (406)



式 (407)

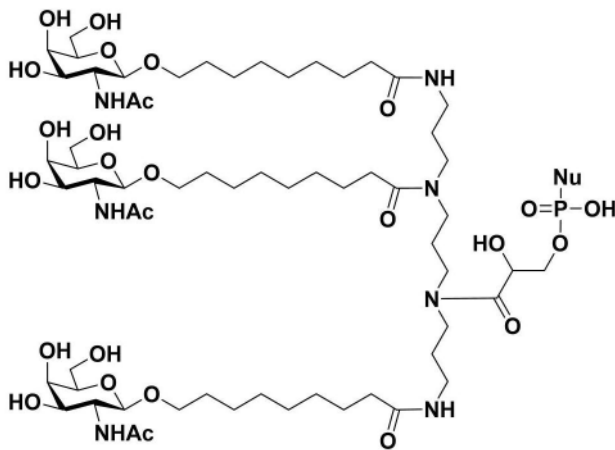


式 (408)

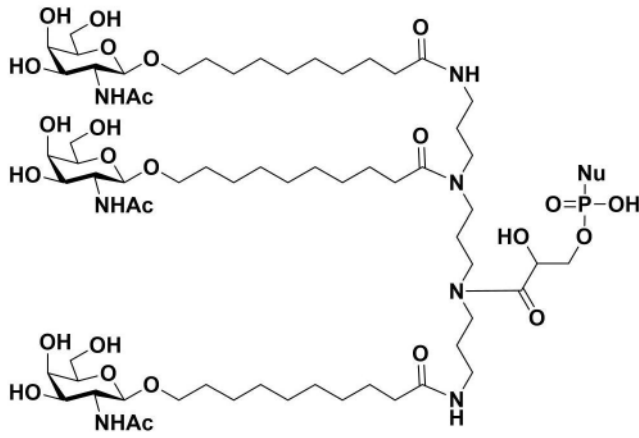


[0395]

式 (409)

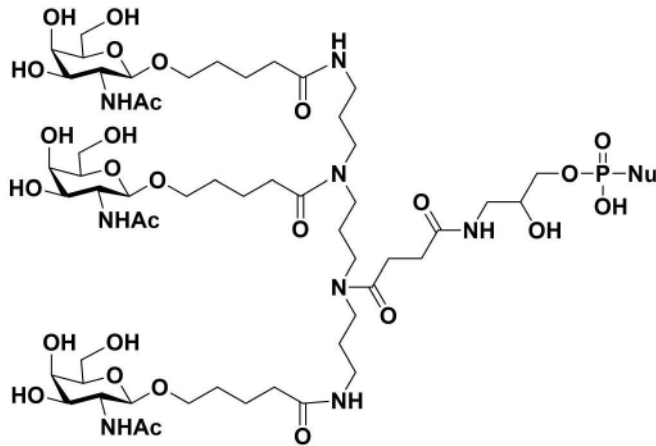


式 (410)

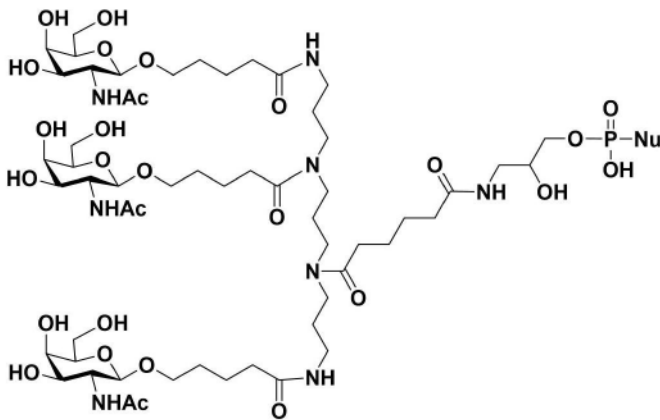


式 (411)

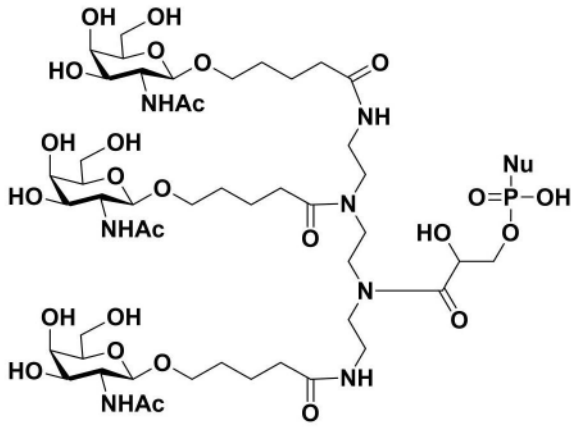
[0396]



式 (412)

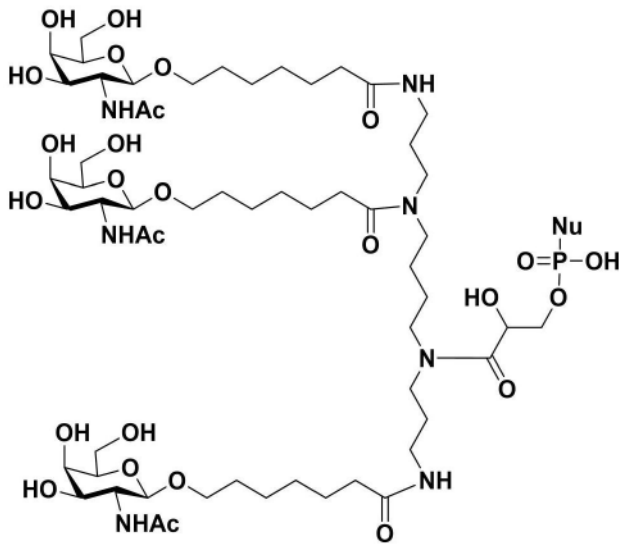


式 (413)

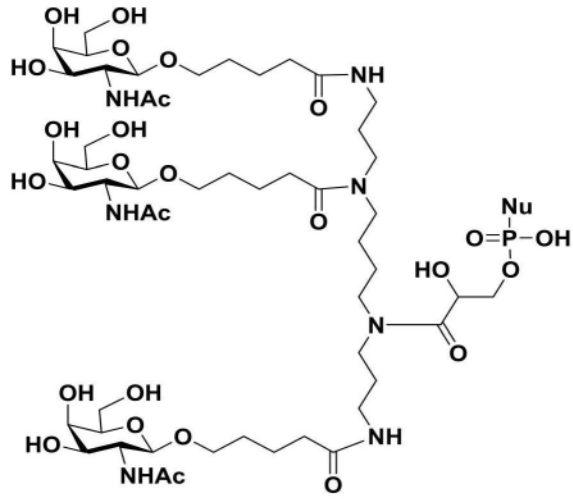


式 (414)

[0397]

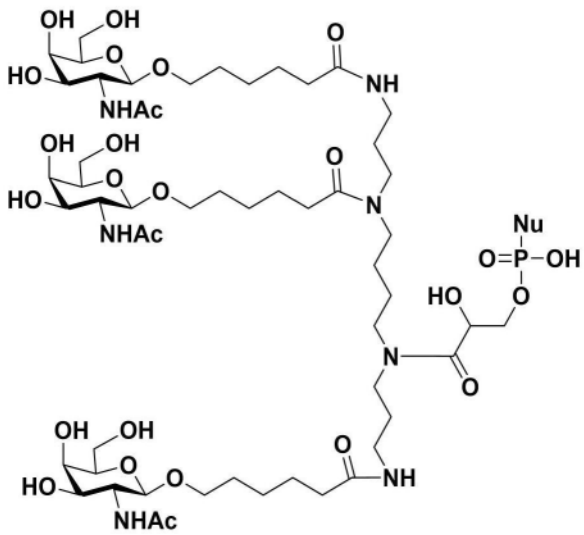


式 (415)

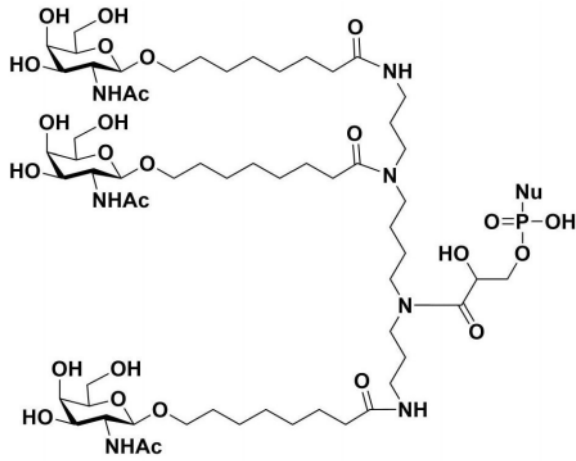


式 (416)

[0398]

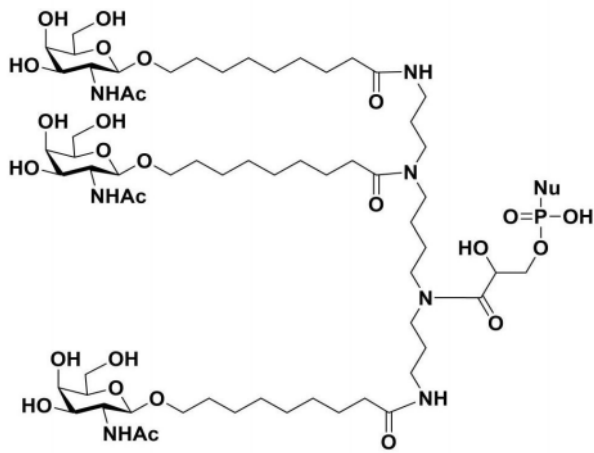


式 (417)

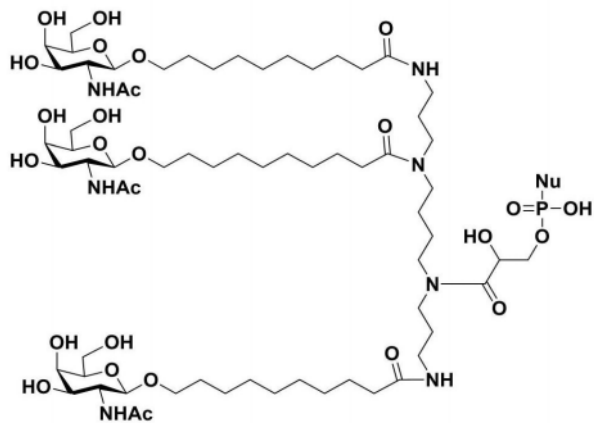


式 (418)

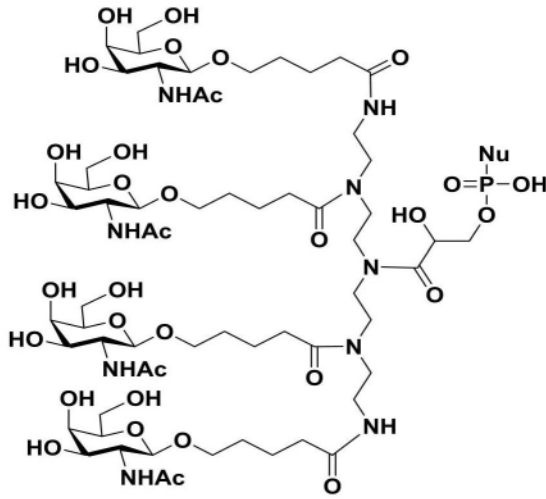
[0399]



式 (419)

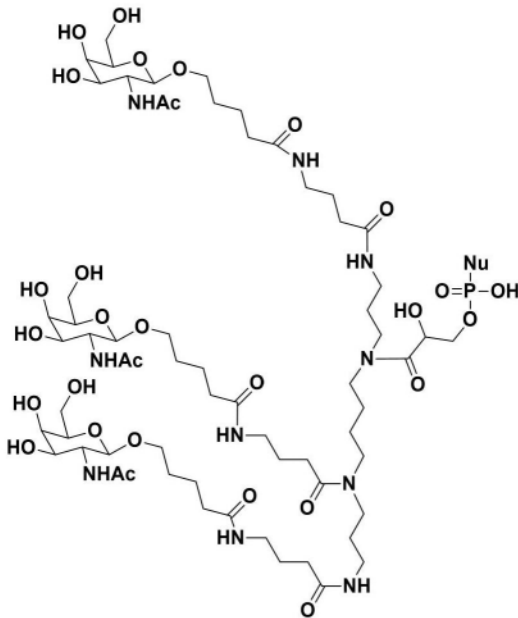


式 (420)



式 (421)

[0400]



式 (422)

[0401] 在一些实施方式中,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;在一些实施方式中,式A59中的P原子连接到siRNA正义链的任何一个核苷酸上。在一些实施方式中,式A59中的P原子连接到siRNA正义链或反义链的端部;在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,式A59中的P原子连接到siRNA正义链或反义链的末端;在一些实施方式中,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KNG mRNA翻译蛋白质的过程,抑制KNG基因表达。

[0402] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0403] 本公开的发明人意外发现,本公开的siRNA缀合物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KNG mRNA沉默活性。在一些实施方式中,本公开的siRNA可以为表1a-1f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KNG mRNA沉默活性。

[0404] 表1a本公开的第一种siRNA序列

| siRNA<br>编号 | SEQ<br>ID<br>NO: | 序列方向 5' - 3'                               |
|-------------|------------------|--|
| siKNa1      | 9                | AAAGUAACAACCAGUUUGU                        |
|             | 10               | ACAAACUGGUUGUUACUUUGG                      |
| siKNa2      | 11               | CCAAAGUAACAACCAGUUUGU                      |
|             | 12               | ACAAACUGGUUGUUACUUUGGUU                    |
| siKNa1-M1   | 13               | AmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm     |
|             | 14               | AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm |
| siKNa1-M2   | 15               | AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm     |
|             | 16               | AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm |
| siKNa1-M3   | 17               | AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm     |

[0405]

[0406]

|                |    |  |
|----------------|----|--|
|                | 18 | AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm             |
| siKNa2-M1      | 19 | CmCmAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm             |
|                | 20 | AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm         |
| siKNa2-M2      | 21 | CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm             |
|                | 22 | AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm         |
| siKNa2-M3      | 23 | CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm             |
|                | 24 | AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm         |
| siKNa1-M1<br>S | 25 | AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm               |
|                | 26 | AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm         |
| siKNa1-M2<br>S | 27 | AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm               |
|                | 28 | AmsCfsAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm         |
| siKNa1-M3<br>S | 29 | AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm               |
|                | 30 | AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm         |
| siKNa2-M1<br>S | 31 | CmsCmsAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm           |
|                | 32 | AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUms<br>Um |
| siKNa2-M2<br>S | 33 | CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm           |
|                | 34 | AmsCfsAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUmsUm     |
| siKNa2-M3<br>S | 35 | CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm           |
|                | 36 | AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUms<br>Um |
| siKNa1-M1      | 37 | AmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm                 |

[0407]

|           |    |  |
|-----------|----|--|
| P1        | 38 | P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm             |
| siKNa1-M2 | 39 | AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm                   |
| P1        | 40 | P1AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm             |
| siKNa1-M3 | 41 | AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm                   |
| P1        | 42 | P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm             |
| siKNa2-M1 | 43 | CmCmAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm               |
| P1        | 44 | P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmU<br>m     |
| siKNa2-M2 | 45 | CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm               |
| P1        | 46 | P1AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm         |
| siKNa2-M3 | 47 | CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm               |
| P1        | 48 | P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmU<br>m     |
| siKNa1-M1 | 49 | AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm                 |
| SP1       | 50 | P1AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm         |
| siKNa1-M2 | 51 | AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm                 |
| SP1       | 52 | P1AmsCfsAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm         |
| siKNa1-M3 | 53 | AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm                 |
| SP1       | 54 | P1AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm         |
| siKNa2-M1 | 55 | CmsCmsAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm             |
| SP1       | 56 | P1AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUm<br>sUm |

[0408]

|           |     |  |
|-----------|-----|--|
| siKNa2-M2 | 57  | CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm |
|           | SP1 | 58   |
| siKNa2-M3 | 59  | CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm |
|           | SP1 | 60   |

[0409] 表1b本公开的第二种siRNA序列

[0410]

| siRNA<br>编号   | SEQ<br>ID<br>NO: | 序列方向 5' - 3'                                   |
|---------------|------------------|--|
| siKNb1        | 69               | AUUGAACUUUCGAAUUACC                            |
|               | 70               | GGUAAUUCGAAAGUCAAUCC                           |
| siKNb2        | 71               | GGAUUGAACUUUCGAAUUACC                          |
|               | 72               | GGUAAUUCGAAAGUCAAUCCAG                         |
| siKNb1-M<br>1 | 73               | AmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm         |
|               | 74               | GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm     |
| siKNb1-M<br>2 | 75               | AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm         |
|               | 76               | GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm     |
| siKNb1-M<br>3 | 77               | AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm         |
|               | 78               | GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm     |
| siKNb2-M<br>1 | 79               | GmGmAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm     |
|               | 80               | GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm |

[0411]

|          |     |  |
|----------|-----|--|
| siKNb2-M | 81  | GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm             |
|          | 2   | GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm         |
| siKNb2-M | 83  | GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm             |
|          | 3   | GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm         |
| siKNb1-M | 85  | AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm               |
|          | 1S  | GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm         |
| siKNb1-M | 87  | AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm               |
|          | 2S  | GmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm         |
| siKNb1-M | 89  | AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm               |
|          | 3S  | GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm         |
| siKNb2-M | 91  | GmsGmsAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm           |
|          | 1S  | GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAmsG<br>m |
| siKNb2-M | 93  | AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm               |
|          | 2S  | GmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAmsGm     |
| siKNb2-M | 95  | GmsGmsAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm           |
|          | 3S  | GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAmsG<br>m |
| siKNb1-M | 97  | AmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm                 |
|          | 1P1 | P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm           |
| siKNb1-M | 99  | AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm                 |
|          | 2P1 | P1GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm           |

[0412]

|          |      |  |
|----------|------|--|
| siKNb1-M | 101  | AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm                   |
|          | 3P1  | P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm             |
| siKNb2-M | 103  | GmGmAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm               |
|          | 1P1  | P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmG<br>m     |
| siKNb2-M | 105  | GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm               |
|          | 2P1  | P1GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm         |
| siKNb2-M | 107  | GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm               |
|          | 3P1  | P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmG<br>m     |
| siKNb1-M | 109  | AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm                 |
|          | 1SP1 | P1GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm         |
| siKNb1-M | 111  | AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm                 |
|          | 2SP1 | P1GmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm         |
| siKNb1-M | 113  | AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm                 |
|          | 3SP1 | P1GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm         |
| siKNb2-M | 115  | GmsGmsAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm             |
|          | 1SP1 | P1GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAm<br>sGm |
| siKNb2-M | 117  | GmsGmsAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm             |
|          | 2SP1 | P1GmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAms<br>Gm |

[0413]

|                  |     |  |
|------------------|-----|--|
| siKNb2-M<br>3SP1 | 119 | GmsGmsAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm             |
|                  | 120 | P1GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAm<br>sGm |

[0414] 表1c本公开的第三种siRNA序列

[0415]

| siRNA<br>编号   | SEQ<br>ID<br>NO: | 序列方向 5' - 3'                                   |
|---------------|------------------|--|
| siKNc1        | 129              | UCGAAUUACCUACUCAAUU                            |
|               | 130              | AAUUGAGUAGGUAAUUCGAAA                          |
| siKNc2        | 131              | UUUCGAAUUACCUACUCAAUU                          |
|               | 132              | AAUUGAGUAGGUAAUUCGAAAGU                        |
| siKNc1-M<br>1 | 133              | UmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm         |
|               | 134              | AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm     |
| siKNc1-M<br>2 | 135              | UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm         |
|               | 136              | AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm     |
| siKNc1-M<br>3 | 137              | UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm         |
|               | 138              | AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm     |
| siKNc2-M<br>1 | 139              | UmUmUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm     |
|               | 140              | AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm |
| siKNc2-M<br>2 | 141              | UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm     |
|               | 142              | AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm |
| siKNc2-M      | 143              | UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm     |

[0416]

|          |     |  |
|----------|-----|--|
| 3        | 144 | AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm         |
| siKNc1-M | 145 | UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm               |
| 1S       | 146 | AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm         |
| siKNc1-M | 147 | UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm               |
| 2S       | 148 | AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm         |
| siKNc1-M | 149 | UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm               |
| 3S       | 150 | AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm         |
| siKNc2-M | 151 | UmsUmsUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm           |
| 1S       | 152 | AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGms<br>Um |
| siKNc2-M | 153 | UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm           |
| 2S       | 154 | AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGmsU<br>m |
| siKNc2-M | 155 | UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm           |
| 3S       | 156 | AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGms<br>Um |
| siKNc1-M | 157 | UmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm                 |
| 1P1      | 158 | P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm           |
| siKNc1-M | 159 | UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm                 |
| 2P1      | 160 | P1AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm           |
| siKNc1-M | 161 | UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm                 |
| 3P1      | 162 | P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm           |

[0417]

|                  |     |  |
|------------------|-----|--|
| siKNe2-M<br>1P1  | 163 | UmUmUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm           |
|                  | 164 | P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm     |
| siKNe2-M<br>2P1  | 165 | UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm           |
|                  | 166 | P1AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm     |
| siKNe2-M<br>3P1  | 167 | UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm           |
|                  | 168 | P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm     |
| siKNe1-M<br>1SP1 | 169 | UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm             |
|                  | 170 | P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm     |
| siKNe1-M<br>2SP1 | 171 | UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm             |
|                  | 172 | P1AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm     |
| siKNe1-M<br>3SP1 | 173 | UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm             |
|                  | 174 | P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm     |
| siKNe2-M<br>1SP1 | 175 | UmsUmsUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm         |
|                  | 176 | P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGmsUm |
| siKNe2-M<br>2SP1 | 177 | UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm         |
|                  | 178 | P1AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGmsUm |
| siKNe2-M<br>3SP1 | 179 | UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm         |
|                  | 180 | P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsG     |

[0418]

|  |  |      |
|--|--|------|
|  |  | msUm |
|--|--|------|

[0419]

表1d本公开的第四种siRNA序列

[0420]

| siRNA<br>编号 | SEQ<br>ID<br>NO: | 序列方向 5' - 3'                                   |
|-------------|------------------|--|
| siKNd1      | 189              | GAUAAUGCAUACAUCGAUA                            |
|             | 190              | UAUCGAUGUAUGCAUUAUCUG                          |
| siKNd2      | 191              | CAGAUAAUGCAUACAUCGAUA                          |
|             | 192              | UAUCGAUGUAUGCAUUAUCUGUA                        |
| siKNd1-M1   | 193              | GmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm         |
|             | 194              | UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm     |
| siKNd1-M2   | 195              | GmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm         |
|             | 196              | UmAfUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm     |
| siKNd1-M3   | 197              | GmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm         |
|             | 198              | UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm     |
| siKNd2-M1   | 199              | CmAmGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm     |
|             | 200              | UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm |
| siKNd2-M2   | 201              | CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm     |
|             | 202              | UmAfUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm |
| siKNd2-M3   | 203              | CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm     |
|             | 204              | UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm |
| siKNd1-M1   | 205              | GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm       |

[0421]

|           |     |  |
|-----------|-----|--|
| S         | 206 | UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm         |
| siKNd1-M2 | 207 | GmsAmsUmAmAfuGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                |
| S         | 208 | UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm         |
| siKNd1-M3 | 209 | GmsAmsUmAmAfuGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                |
| S         | 210 | UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm         |
| siKNd2-M1 | 211 | CmsAmsGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm           |
| S         | 212 | UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUms<br>Am |
| siKNd2-M2 | 213 | CmsAmsGmAmUmAmAfuGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm            |
| S         | 214 | UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUmsAm     |
| siKNd2-M3 | 215 | CmsAmsGmAmUmAmAfuGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm            |
| S         | 216 | UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUms<br>Am |
| siKNd1-M1 | 217 | GmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                 |
| P1        | 218 | P1UmAfuCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm            |
| siKNd1-M2 | 219 | GmAmUmAmAfuGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                  |
| P1        | 220 | P1UmAfuCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm            |
| siKNd1-M3 | 221 | GmAmUmAmAfuGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                  |
| P1        | 222 | P1UmAfuCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm            |
| siKNd2-M1 | 223 | CmAmGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm             |
| P1        | 224 | P1UmAfuCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmA<br>m    |

[0422]

|           |     |  |
|-----------|-----|--|
| siKNd2-M2 | 225 | CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                   |
|           | P1  | 226 P1UmAfUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm         |
| siKNd2-M3 | 227 | CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                   |
|           | P1  | 228 P1UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm         |
| siKNd1-M1 | 229 | GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                     |
|           | SP1 | 230 P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm         |
| siKNd1-M2 | 231 | GmsAmsUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                     |
|           | SP1 | 232 P1UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm         |
| siKNd1-M3 | 233 | GmsAmsUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                     |
|           | SP1 | 234 P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm         |
| siKNd2-M1 | 235 | CmsAmsGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                 |
|           | SP1 | 236 P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUm<br>sAm |
| siKNd2-M2 | 237 | CmsAmsGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                 |
|           | SP1 | 238 P1UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUms<br>Am |
| siKNd2-M3 | 239 | CmsAmsGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm                 |
|           | SP1 | 240 P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUm<br>sAm |

[0423] 表1e本公开的第五种siRNA序列

[0424]

| siRNA<br>编号    | SEQ<br>ID<br>NO: | 序列方向 5' - 3'                                   |
|----------------|------------------|--|
| siKNe1         | 249              | GAAUACGCAACUUUCUAU                             |
|                | 250              | AUAGAAAGUUGCGUUAUUCUC                          |
| siKNe2         | 251              | GAGAAUACGCAACUUUCUAU                           |
|                | 252              | AUAGAAAGUUGCGUUAUUCUCUG                        |
| siKNe1-M1      | 253              | GmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm         |
|                | 254              | AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm     |
| siKNe1-M2      | 255              | GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm         |
|                | 256              | AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm     |
| siKNe1-M3      | 257              | GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm         |
|                | 258              | AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm     |
| siKNe2-M1      | 259              | GmAmGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm     |
|                | 260              | AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm |
| siKNe2-M2      | 261              | GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm     |
|                | 262              | AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm |
| siKNe2-M3      | 263              | GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm     |
|                | 264              | AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm |
| siKNe1-M1<br>S | 265              | GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm       |
|                | 266              | AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm |
| siKNe1-M2      | 267              | GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm       |

[0425]

|           |     |  |
|-----------|-----|--|
| S         | 268 | AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm         |
| siKNe1-M3 | 269 | GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm               |
| S         | 270 | AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm         |
| siKNe2-M1 | 271 | GmsAmsGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm           |
| S         | 272 | AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUms<br>Gm |
| siKNe2-M2 | 273 | GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm           |
| S         | 274 | AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUmsGm     |
| siKNe2-M3 | 275 | GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm           |
| S         | 276 | AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUms<br>Gm |
| siKNe1-M1 | 277 | GmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm                 |
| P1        | 278 | P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm           |
| siKNe1-M2 | 279 | GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm                 |
| P1        | 280 | P1AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm           |
| siKNe1-M3 | 281 | GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm                 |
| P1        | 282 | P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm           |
| siKNe2-M1 | 283 | GmAmGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm             |
| P1        | 284 | P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmG<br>m   |
| siKNe2-M2 | 285 | GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm             |
| P1        | 286 | P1AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm       |

[0426]

|                  |     |  |
|------------------|-----|--|
| siKNe2-M3<br>P1  | 287 | GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm           |
|                  | 288 | P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm     |
| siKNe1-M1<br>SP1 | 289 | GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm             |
|                  | 290 | P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm     |
| siKNe1-M2<br>SP1 | 291 | GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm             |
|                  | 292 | P1AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm     |
| siKNe1-M3<br>SP1 | 293 | GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm             |
|                  | 294 | P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm     |
| siKNe2-M1<br>SP1 | 295 | GmsAmsGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm         |
|                  | 296 | P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUmsGm |
| siKNe2-M2<br>SP1 | 297 | GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm         |
|                  | 298 | P1AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUmsGm |
| siKNe2-M3<br>SP1 | 299 | GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm         |
|                  | 300 | P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUmsGm |

[0427] 表1f本公开的第六种siRNA序列

[0428]

| siRNA<br>编号 | SEQ<br>ID<br>NO: | 序列方向 5' - 3' |
|-------------|------------------|--------------|
|-------------|------------------|--------------|

[0429]

|                |     |  |
|----------------|-----|--|
| siKNf1         | 309 | AACUUUCUAUUUCAAGAUU                            |
|                | 310 | AAUCUUGAAAUAGAAAGUUGC                          |
| siKNf2         | 311 | GCAACUUUCUAUUUCAAGAUU                          |
|                | 312 | AAUCUUGAAAUAGAAAGUUGCGU                        |
| siKNf1-M1      | 313 | AmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm         |
|                | 314 | AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm     |
| siKNf1-M2      | 315 | AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm         |
|                | 316 | AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm     |
| siKNf1-M3      | 317 | AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm         |
|                | 318 | AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm     |
| siKNf2-M1      | 319 | GmCmAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm     |
|                | 320 | AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm |
| siKNf2-M2      | 321 | GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm     |
|                | 322 | AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm |
| siKNf2-M3      | 323 | GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm     |
|                | 324 | AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm |
| siKNf1-M1<br>S | 325 | AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm       |
|                | 326 | AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm |
| siKNf1-M2<br>S | 327 | AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm       |
|                | 328 | AmsAfsUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm |
| siKNf1-M3<br>S | 329 | AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm       |
|                | 330 | AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm |

[0430]

|           |     |  |
|-----------|-----|--|
| siKNf2-M1 | 331 | GmsCmsAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm               |
|           | S   | 332 AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGms<br>Um |
| siKNf2-M2 | 333 | GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm               |
|           | S   | 334 AmsAfsUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGmsUm     |
| siKNf2-M3 | 335 | GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm               |
|           | S   | 336 AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGms<br>Um |
| siKNf1-M1 | 337 | AmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm                     |
|           | P1  | 338 P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm           |
| siKNf1-M2 | 339 | AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm                     |
|           | P1  | 340 P1AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm           |
| siKNf1-M3 | 341 | AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm                     |
|           | P1  | 342 P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm           |
| siKNf2-M1 | 343 | GmCmAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm                 |
|           | P1  | 344 P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmU<br>m   |
| siKNf2-M2 | 345 | GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm                 |
|           | P1  | 346 P1AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm       |
| siKNf2-M3 | 347 | GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm                 |
|           | P1  | 348 P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmU<br>m   |

[0431]

|           |     |  |
|-----------|-----|--|
| siKNf1-M1 | 349 | AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm     |
|           | SP1 | 350  |
| siKNf1-M2 | 351 | AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm     |
|           | SP1 | 352  |
| siKNf1-M3 | 353 | AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm     |
|           | SP1 | 354  |
| siKNf2-M1 | 355 | GmsCmsAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm |
|           | SP1 | 356  |
| siKNf2-M2 | 357 | GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm |
|           | SP1 | 358  |
| siKNf2-M3 | 359 | GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm |
|           | SP1 | 360  |

[0432] 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。在一些实施方式中,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(5'-(E)-vinylphosphonate,E-VP)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。

[0433] 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 $\text{NH}_4^+$ ,有机铵阳离子中的一种。出于提高溶解性考虑,在一些实施方式中,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 $\text{K}^+$ 和/或 $\text{Na}^+$ ,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。在一些实施方式中,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。

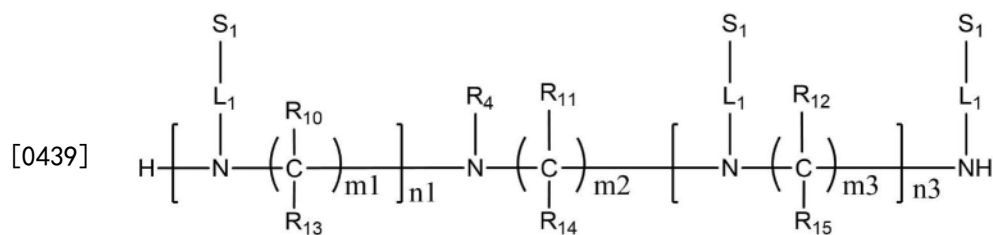
[0434] 本领域技术人员清楚知晓的是,可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入本公开所述的siRNA中。制备具有相应修饰的核苷单体的方法及将修饰的核苷酸基团引入siRNA的方法也是本领域技术人员所熟知的。所有修饰的核苷单体均可以商购得到或者采用已知方法制备得到。

[0435] 式(308)所示的siRNA缀合物的制备

[0436] 可以采用任意合理的合成路线制备式(308)所示的siRNA缀合物。

[0437] 在一些实施方式中,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;

[0438] 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)

[0440] 其中:

[0441]  $R_4$ 为能够结合至式(308)所示的化合物中Nu代表的siRNA的基团。在一些实施方式中, $R_4$ 为能够通过共价键结合至Nu代表的siRNA的基团。在一些实施方式中, $R_4$ 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;

[0442] 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;在一些实施方式中,Y为甲基。

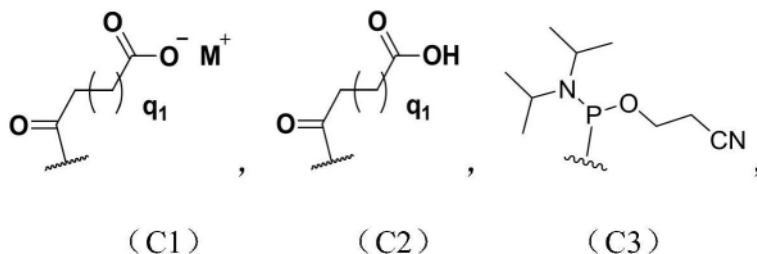
[0443]  $n1$ 、 $n3$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $M_1$ 各自的定义和可选择的范围如前所述。

[0444]  $R_4$ 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。在一些实施方式中, $R_4$ 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。

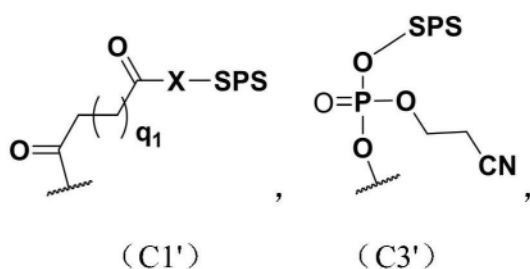
[0445] 在一些实施方式中, $R_4$ 包含可与Nu代表的siRNA或核苷单体上的基团形成亚磷酸酯的第1官能团以及可与羟基或氨基反应形成共价键的第2官能团或者含有由所述共价键连接的固相载体。在一些实施方式中,所述第1官能团为亚磷酰胺、羟基或被保护的羟基。在

一些实施方式中,所述第2官能团为亚磷酰胺、羧基或羧酸盐。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,所述固相载体经由磷酸酯键、羧酸酯键或酰胺键连接。在一些实施方式中,所述固相载体为树脂。

[0446] 在一些实施方式中,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:



[0447]



[0448] 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。

[0449] 在一些实施方式中,所述第1官能团含有亚磷酰胺基团,如式(C3)所示,该亚磷酰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)所示的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,在经由亚磷酰胺固相合成等方法获得siRNA的正义链或反义链后,使式(321)所示的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)所示的化合物缀合至siRNA。

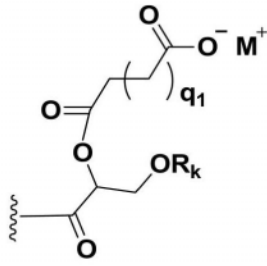
[0450] 在一些实施方式中,所述第1官能团含有被保护的羟基。在一些实施方式中,所述第2官能团包含可与固相载体反应的基团,所述反应提供包含固相载体的缀合分子。在一些实施方式中,所述第2官能团含有羧基、羧酸盐或亚磷酰胺,如式(C1)、(C2)或(C3)所示,当所述第2官能团包含羧基或羧酸盐时,式(321)所示的化合物与固相载体,例如树脂上的羟基或氨基进行酯化反应或酰胺化反应,形成经羧酸酯键连接的包含固相载体的缀合分子。当所述第2官能团包含亚磷酰胺官能团时,式(321)所示的化合物与通用固相载体,例如树脂上的羟基发生偶联反应,并经氧化形成经磷酸二酯键连接的包含固相载体的缀合分子。随后,以上述连接固相载体后的产物作为起始,按照亚磷酰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。在亚磷酰胺固相合成过程中,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酰胺基团发生偶联。

[0451] 在一些实施方式中,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

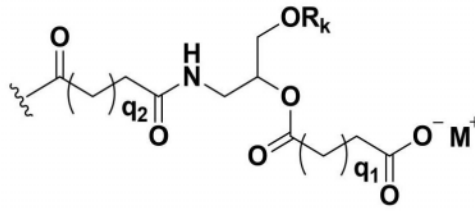
有经羧酸酯键连接的固相载体或经酰胺键连接的固相载体、或者经磷酸酯键连接的固相载体,如式(C1')或(C3')所示。此时,由式(321)所示的化合物代替固相载体作为起始,按照亚磷酰胺固相合成方法依次连接核苷单体,获得连接有缀合基团的siRNA的正义链或反义链。

[0452] 在一些实施方式中,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。在一种实施方式中,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,在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,羧酸盐是三乙胺羧酸盐或N,N-二异丙基乙胺羧酸盐。

[0453] 在一些实施方式中, $R_4$ 含有式(B9)、(B10)、(B9')、(B10')、(B11)、(B12)、(B11')或(B12')所示的结构:

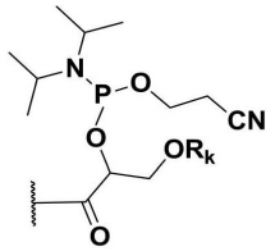


(B9)

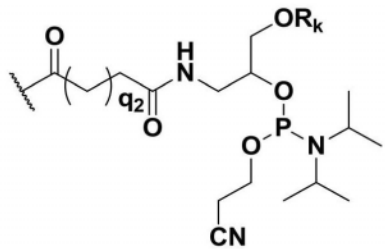


(B10)

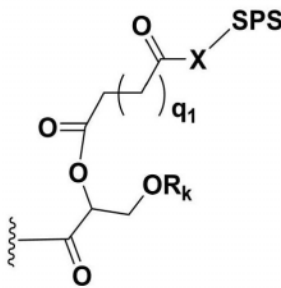
[0454]



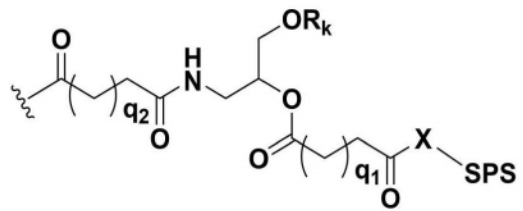
(B9')



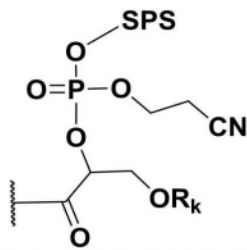
(B10')



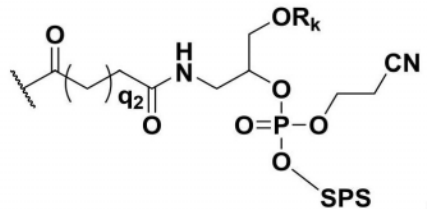
(B11)



(B12)



(B11')



(B12')

[0455] 其中,  $q_1$  为 1-4 的整数,  $q_2$  为 1-10 的整数, X 为 0 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。在一些实施方式中,  $q_1$  为 1 或 2。在

一些实施方式中,  $q_2$  为1-5的整数。在一些实施方式中,  $R_4$  含有式 (B9) 或 (B10) 所示的结构。在一些实施方式中,  $R_4$  含有式 (B11) 或 (B12) 所示的结构。

[0456] 在一些实施方式中,  $R_k$  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。在一些实施方式中,  $R_k$  可以是DMTr, 即4,4'-二甲氧基三苯甲基 (4,4'-dimethoxytrityl)。

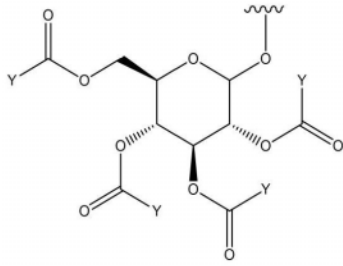
[0457]  $L_1$  的定义如前所述。

[0458] 在一些实施方式中,  $L_1$  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。在一些实施方式中,  $L_1$  包含A1-A26中的任一个或其组合。

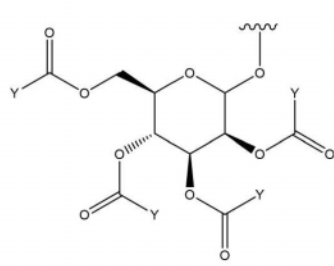
[0459] 根据上述描述, 本领域技术人员容易理解的是, 相较于本领域公知的亚磷酰胺固相合成方法而言, 可通过上述第1官能团以及任意的第2官能团, 获得将缀合分子连接至核苷酸序列的任意可能的位置的式 (308) 所示的siRNA缀合物, 例如, 缀合分子连接至核苷酸序列的端部, 缀合分子连接至核苷酸序列的末端。相应地, 除非另有说明, 以下涉及siRNA缀合物和/或缀合分子的制备的描述中, 当提及“脱保护”、“偶联”、“盖帽”、“氧化”、“硫化”等反应时, 应当理解为本领域公知的亚磷酰胺核酸固相合成方法中所涉及的反应条件和试剂也同样适用于这些反应。示例性的反应条件和试剂将在后文详细描述。

[0460] 在一些实施方式中, 每个  $S_1$  独立地是  $M_1$ 。在一些实施方式中, 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。在一些实施方式中, 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。在一些实施方式中, 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。在一些实施方式中, 被保护的羟基可以式  $YC(O)O-$  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。在一些实施方式中, 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。

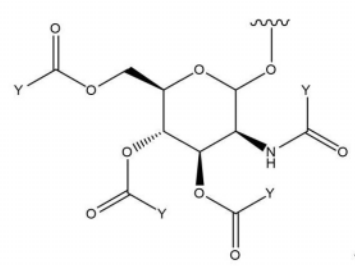
[0461] 在一些实施方式中, 每个  $S_1$  各自独立地选自于由式A46-A54所组成的组:



(A46)

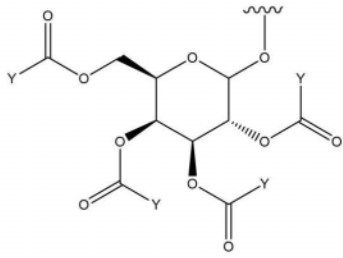


(A47)

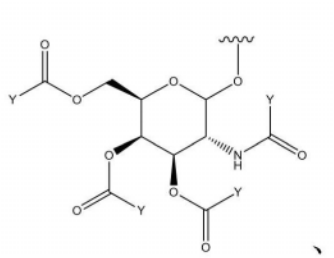


(A48)

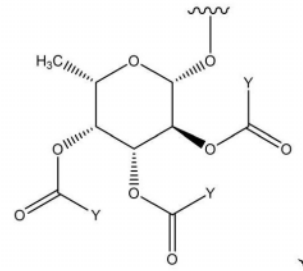
[0462]



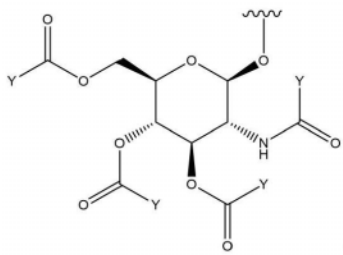
(A49)



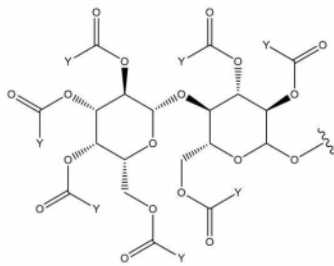
(A50)



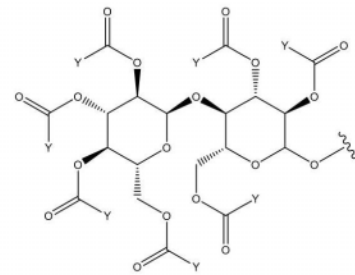
(A51)



(A52)



(A53)



(A54)

[0463] 在一些实施方式中,  $S_1$  为式A49或A50。

[0464] 在一些实施方式中, 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; 在一些实施方式中, Y为甲基。

[0465] 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)所示的化合物中的各 $S_1$ 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。

[0466] 在一些实施方式中, 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'端的第一个核苷酸接触, 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)所示的化合物为 $R_4$ 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)所示的化合物经过脱保护;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;在亚磷酰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。

[0467] 在一些实施方式中,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)所示的化合物连接至正义链或反义链,其中,式(321)所示的化合物是 $R_4$ 中含有第1官能团,第1官能团为亚磷酰胺基团的式(321)所示的化合物;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。

[0468] 在一些实施方式中,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:

[0469] (1) 脱除式(321)所示的化合物(其中,式(321)所示的化合物为 $R_4$ 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;

[0470] (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'的方向通过亚磷酰胺固相合成方法合成siRNA的正义链;

[0471] (3) 通过亚磷酰胺固相合成方法,合成siRNA的反义链;

[0472] (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。

[0473] 其中,在步骤(1)中,脱除上述式(321)所示的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)所示的化合物与脱保护试剂接触。脱保护条件包括温度为0-50℃,在一些实施方式中为15-35℃,反应时间为30-300秒,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为二氯乙酸。脱保护试剂与式(321)所示的化合物的摩尔比为10:1-1000:1,在一些实施方式中为50:1-500:1。

[0474] 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。在一些实施方式中,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。

[0475] 在一些实施方式中,所述偶联反应的条件包括反应温度为0-50℃,在一些实施方式中为15-35℃。式(321)所示的化合物与核苷单体的摩尔比为1:1-1:50,在一些实施方式中为1:2-1:5;式(321)所示的化合物和偶联试剂的摩尔比可以为1:1-1:50,在一些实施方式中

式中为1:3-1:10,反应时间为200-3000秒,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为无水乙腈。相对于式(321)所示的化合物,所述有机溶剂的用量为3-50L/mol,在一些实施方式中为5-20L/mol。

[0476] 在步骤(2)中,通过亚磷酰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'的方向合成第二种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。

[0477] 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。

[0478] 例如,在一些实施方式中,步骤(2)和(3)中所述固相合成可使用如下条件:

[0479] 核苷单体脱保护条件包括温度为0-50℃,在一些实施方式中为15-35℃,反应时间为30-300秒,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为二氯乙酸。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,在一些实施方式中为3:1-50:1。

[0480] 偶联反应条件包括温度为0-50℃,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为1:50-1:80,反应时间和偶联试剂的选择与前述相同。

[0481] 盖帽反应条件包括温度为0-50℃,在一些实施方式中为15-35℃,反应时间为5-500秒,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为1:1:2-2:2:1。

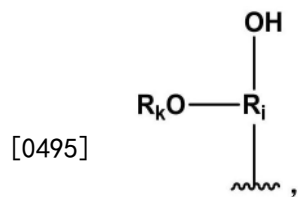
[0482] 氧化反应条件包括温度为0-50℃,在一些实施方式中为15-35℃,反应时间为1-100秒,在一些实施方式中为5-50秒,氧化试剂在一些实施方式中为碘(在一些实施方式中,以碘水的形式提供)。氧化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比可以为1:1-100:1,在一些实施方式中为5:1-50:1。在一些实施方式中,所述氧化反应在四氢呋喃:水:吡啶=3:1:1-1:1:3的混合溶剂中进行。硫化反应条件包括温度为0-50℃,在一些实施方式中为15-35℃,反应时间为50-2000秒,在一些实施方式中为100-1000秒,硫化试剂在一些实施方式中为氢化黄原素。硫化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为10:1-1000:1,在一些实施方式中为10:1-500:1。在一些实施方式中,所述硫化反应在乙腈:吡啶=1:3-3:1的混合溶剂中进行。

[0483] 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。



如前所述；

[0494]  $R_6$ 为提供式(321)中 $R_4$ 的基团；在一些实施方式中， $R_6$ 具有式(A61)所示的结构：



(A61)

[0496] 其中， $R_i$ 为能够实现与含氮骨架上的N原子连接、与 $R_k\text{O}$ 连接并且连接有一个游离羟基的任意基团， $R_k$ 为羟基保护基团。此时，所获得的是 $R_4$ 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)所示的化合物。

[0497] 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，在一些实施方式中，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。

[0498] 在一些实施方式中，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。在一些实施方式中，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。在一些实施方式中，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，在一些实施方式中为5-20L/mol。

[0499] 在一些实施方式中，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，在一些实施方式中为丁二酸酐。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，在一些实施方式中为2:1-5:1。

[0500] 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，在一些实施方式中为2:1-5:1。

[0501] 在一些实施方式中，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。在一些实施方式中，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，在一些实施方式中为3:1-10:1。

[0502] 所述离子交换作用是将式(321)所示的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 $M^+$ 阳离子的缀合分子，在此不做详述。在一些实施方式中，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，在一些实施方式中，所述三乙胺磷酸盐溶液的浓度为0.4-0.6M，相对于式(313)所示的化合物，所述三乙胺磷酸盐溶液的用量为3-6L/mol，在进一步的实施方式中为4-5L/mol。

[0503] 可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式(321)所示的化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式(321)所示的化合物，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。在一些实施方式中,可以直接除去溶剂得到式(321)所示的化合物粗产品,该粗产品可以直接用于后续反应。

[0504] 在一些实施方式中,式(321)所示的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 $R_4$ 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(C1')所示结构的式(321)所示的化合物。

[0505] 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,在一些实施方式中,所述固相载体为氨基树脂或羟基树脂。在一些实施方式中,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 $\mu$ mol化合物/每克固相载体( $\mu$ mol/g)。在一些实施方式中,所述式(321)所示化合物与固相载体的用量比为50-200 $\mu$ mol/g。

[0506] 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。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,所述有机溶剂为乙腈。相对于式(321)所示的化合物,所述有机溶剂的用量为20-200L/mol,在一些实施方式中为50-100L/mol。

[0507] 在一些实施方式中,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(3H)-酮(3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one, DEPBT)和/或0-苯并三唑-四甲基脲六氟磷酸酯/盐(0-benzotriazol-1-yl-tetramethyluronium hexafluorophosphate),在一些实施方式中,所述缩合剂为0-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐/酯。所述缩合剂与式(321)所示化合物的摩尔比为1:1-20:1,在其它实施方式中为1:1-5:1。

[0508] 在一些实施方式中,所述三级胺为三乙胺和/或N,N-二异丙基乙胺,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为1:1-5:1。

[0509] 在一些实施方式中,式(321)所示的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 $^{\circ}$ C,在一些实施方式中为15-35 $^{\circ}$ C,反应的时间为1-10h,在一些实施方式中为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。

[0510] 在一些实施方式中,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,在一些实施方式中以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,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为3:1-7:1。所述盖帽试剂2为乙酸酐。在一些实施方式中,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,在进一步的实施方式中为1:2-1:6。

[0511] 在一些实施方式中,所述N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液的体积与式(321)所示的化合物的质量之比为5ml/g-50ml/g,在一些实施方式中为15ml/g-30ml/g。所述乙酸酐的乙腈溶液的体积与式(321)所示的化合物的质量之比为0.5ml/g-10ml/g,在一些实施方式中为1ml/g-5ml/g。

[0512] 在一些实施方式中,盖帽试剂使用等摩尔量的乙酸酐与N-甲基咪唑。在一些实施方式中,所述有机溶剂为乙腈、环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砷、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。在一些实施方式中,所述有机溶剂为乙腈。相对于式(321)所示的化合物,所述有机溶剂的用量为10-50L/mol,在一些实施方式中为5-30L/mol。

[0513] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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,在一些实施方式中为0.01:1-0.1:1。

[0514] 在一些实施方式中,可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式(321)所示的化合物。在一些实施方式中,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)所示的化合物,所述有机溶剂选自乙腈、二氯甲烷、甲醇,在一些实施方式中为乙腈。

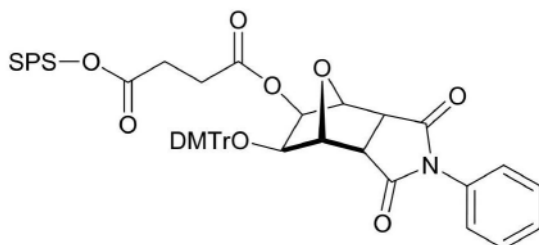
[0515] 在一些实施方式中,式(321)所示缀合分子的制备方法包括在有机溶剂中,在偶联反应条件下,以及在偶联试剂存在下,将式(313)所示化合物与亚磷酰二胺接触,分离得到式(321)所示化合物。此时,所获得的是 $R_4$ 中含有第1官能团和第2官能团,第1官能团含有羟基保护基团,第2官能团含有如式(C3)所示结构的式(321)所示的化合物。

[0516] 在一些实施方式中,偶联反应条件包括温度可以为0-50°C,例如为15-35°C,式(313)所示的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)所示的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-氰基乙氧基)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。在一些实施方式中,相对于式(313)所示的化合物,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)所示的化合物中的羟基与亚磷酰二胺反应形成亚磷酰胺基团。在一些实施方式中,可以直接除去溶剂得到式(321)所示的化合物粗产品,该粗产品可以直接用于后续反应。

[0517] 在一些实施方式中,式(321)所示的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)所示的化合物。

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官能团具有如式(C3')所示结构的式(321)所示的化合物。

[0518] 在一些实施方式中,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® HLUnyLinker™300 Oligonucleotide Synthesis Support, Kinovate Life Sciences公司,结构如式B80所示):



[0519]

(B80)。

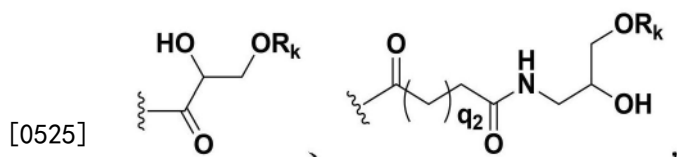
[0520] 脱保护反应为本领域技术人员所公知。在一些实施方式中,脱保护条件包括温度为0-50℃,例如为15-35℃;反应时间为30-300秒,例如为50-150秒。脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一种或多种,在一些实施方式中,脱保护试剂为二氯乙酸。脱保护试剂与固定相上的-DMTr(4,4'-二甲氧基三苯甲基)保护基的摩尔比为2:1-100:1,例如为3:1-50:1。通过进行所述脱保护,在所述固相载体表面上获得具有反应活性的游离羟基,便于进行后续的偶联反应。

[0521] 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酰胺基团反应形成亚磷酸酯连接。

[0522] 在一些实施方式中,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。

[0523] 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(在一些实施方式中,以碘水的形式提供)。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0524] 在一些实施方式中, $R_6$ 为式B7或B8基团中的一种,



[0525]

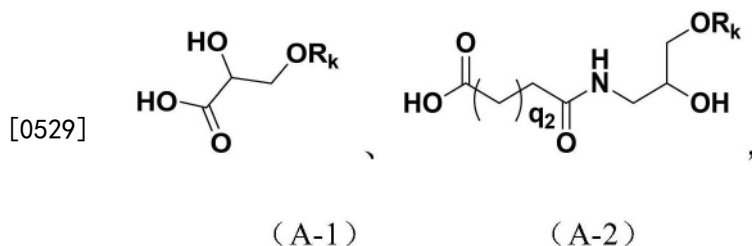
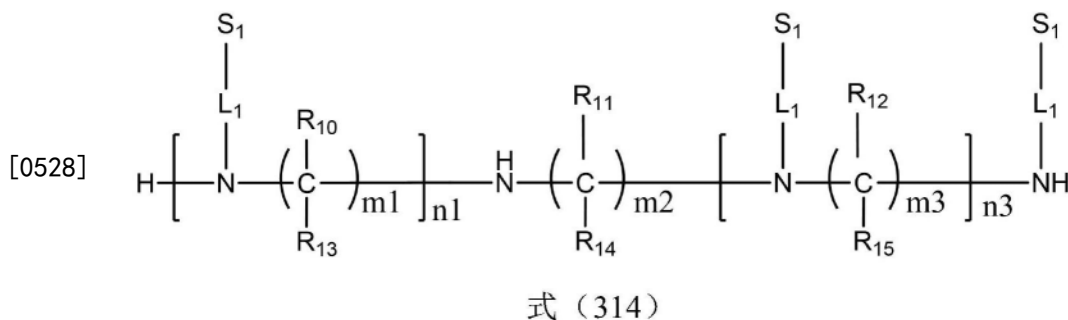
(B7)

(B8)

[0526] 其中 $q_2$ 、 $R_k$ 的定义如前所述,

[0527] 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)所示的化合物接触,随后进行分离:



[0530] 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。

[0531] 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,在一些实施方式中,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。

[0532] 在一些实施方式中,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式中为甲醇、乙醇、丙醇中的一种或多种,在一些实施方式中为乙醇。所述环氧类溶剂在一些实施方式中为二氧六环和/或四氢呋喃。所述醚类溶剂在一些实施方式中为乙醚和/或甲基叔丁基醚。所述卤代烷类溶剂在一些实施方式中为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一种或多种。在一些实施方式中,所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式(314)所示的化合物,有机溶剂用量为3-50L/mol,在进一步的实施方式中为3-20L/mol。

[0533] 在一些实施方式中,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-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)或0-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐/酯,在进一步的实施方式中为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,在一些实施方式中为2.5:1-5:1。

[0534] 在一些实施方式中,所述三级胺为三乙胺或N,N-二异丙基乙胺,在进一步的实施方式中为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,在一些实施方式中为5:1-10:1。

[0535] 在一些实施方式中,式(A-1)和式(A-2)所示的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DMTrC1反应制备式(A-1)所示的化合物;类似地,可先将3-氨基-1,2-丙二醇与环状酸酐接触,随后再与DMTrC1反应制备式(A-2)所示的化合物,所述环状酸酐可以是碳原子数为4-13、在一些实施方式中为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)所示的化合物中 $q_2$ 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。

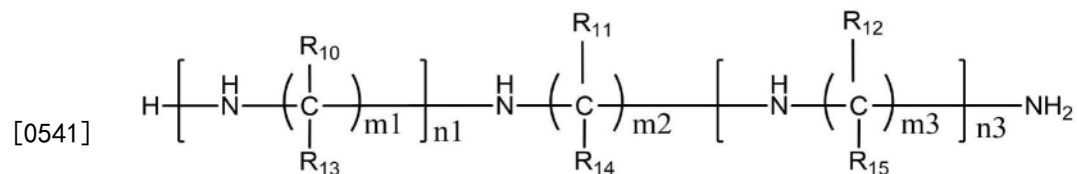
[0536] 在一些变型中,也可通过使式(314)所示化合物依次与所述环状酸酐、3-氨基-1,2-丙二醇和DMTrCl反应,制备式(313)所示的化合物。本领域技术人员容易理解的是,这些变型不会影响式(313)所示的化合物的结构与功能,并且这些变型是本领域技术人员在上述方法的基础上容易实现的。

[0537] 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)所示的化合物。在一些实施方式中,可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式(313)所示的化合物,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。在一些实施方式中,可以直接除去溶剂得到式(313)所示的化合物粗产品,该粗产品可以直接用于后续反应。

[0538] 在一些实施方式中,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:

[0539]  $S_1-L_1-OH$

[0540] 式(316)



式(320)

[0542] 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。

[0543] 式(316)所示的化合物可使用例如J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961中所公开的化合物,或者,式(316)所示的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US8,106,022B2实施例1中所公开的方法制备某些式(316)所示的化合物,以引用的方式将以上文献的全部内容整体并入本文。

[0544] 在一些实施方式中,所述缩合反应条件包括反应温度为0-100℃,反应时间为0.1-24小时,在一些实施方式中为反应温度为10-40℃,反应时间为0.5-16小时。

[0545] 考虑到期望产物式(314)所示的化合物的结构,所述式(316)所示化合物与所述式(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。在一些实施方式中,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,在一些实施方式中为3.01:1-3.15:1。

[0546] 在一些实施方式中,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

一些实施方式中为二氧六环和/或四氢呋喃,所述醚类溶剂在一些实施方式中为乙醚和/或甲基叔丁基醚,所述卤代烷类溶剂在一些实施方式中为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一种或多种,在一些实施方式中,所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式(320)所示的化合物,所述有机溶剂的用量为3-50L/mol,在一些实施方式中为5-20L/mol。

[0547] 在一些实施方式中,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)、0-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,在进一步的实施方式中为苯并三唑-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酯/盐和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,在一些实施方式中为1.05:1-1.5:1。

[0548] 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,在一些实施方式中为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,在一些实施方式中为2:1-5:1。

[0549] 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)所示的化合物。在一些实施方式中,可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式(314)所示的化合物例如,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。在一些实施方式中,可以直接除去溶剂得到式(314)所示的化合物粗产品,该粗产品可以直接用于后续反应。

[0550] 式(320)所示的化合物可商购获得,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)所示的化合物可自阿法埃莎公司商购获得。

[0551] 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。

[0552] 本公开的siRNA、药物组合物及siRNA缀合物的应用

[0553] 在一些实施方式中,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/或预防败血症的药物中的用途。

[0554] 在一些实施方式中,本公开提供了一种预防和/或治疗败血症的方法,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。

[0555] 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/或治疗败血症的目的。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/或治疗败血症,或用于制备用于预防和/或治疗败血症的药物。

[0556] 在一些实施方式中,所述败血症通常表现为指由感染引起的全身炎症反应综合征,本质上讲是机体对感染因素的反应。在一些实施方式中,败血症常常发生在有严重疾病的患者中,如严重烧伤、多发伤、外科手术后等患者。在一些实施方式中,败血症也常见于有慢性疾病的患者如糖尿病、慢性阻塞性支气管、白血病、再生障碍性贫血和尿路结石。

[0557] 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基本体循环。考虑到本公开可以提供预防和/或治疗败血症疾病的手段,在一些实施方式中采用能够将药物递送至肝脏的给药方式。

[0558] 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1次或多次。

[0559] 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。

[0560] 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或30-45g的ob/ob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,在一些实施方式中为0.01-50mg/kg体重,在一些实施方式中为0.05-20mg/kg体重,另一些实施方式中为0.1-15mg/kg体重,另一些实施方式中为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,在一些实施方式中为0.01-10mg/kg体重,在一些实施方式中为0.05-5mg/kg体重,在一些实施方式中为0.1-3mg/kg体重。

[0561] 在一些实施方式中,本公开提供了一种抑制肝细胞中KNG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KNG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。

[0562] 采用本公开提供的方法抑制KNG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mRNA的表达,并导致在靶细胞表面处1pM至1 $\mu$ M、或0.01nM至100nM、或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。

#### [0563] 试剂盒

[0564] 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siRNA、药物组合物和siRNA缀合物的至少一种。

[0565] 在一些实施方式中,本文所述的试剂盒可在一个容器中提供修饰的siRNA。在一些实施方式中,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

施方式中,所述试剂盒中还可包含其它成分,如稳定剂或防腐剂等。在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,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。

[0566] 在本公开的试剂盒中,所述siRNA和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述siRNA、药物组合物和/或siRNA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。在一些实施方式中,所述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siRNA缀合物和任选的药学上可接受的辅料基本上纯净和/或无菌。在一些实施方式中,可在本公开的试剂盒中提供无菌水。

[0567] 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。

[0568] 实施例

[0569] 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。

[0570] 本公开合成的针对KNG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)作为转染试剂,具体操作参照制造商提供的说明书。

[0571] 若无其它说明,以下提供的试剂比例均按体积比(v/v)计算。

[0572] 若无特别说明,以下体内/体外效果实验数据均以 $\bar{X} \pm \text{SEM}$ 表示,数据分析采用Graphpadprism5.0统计分析软件。

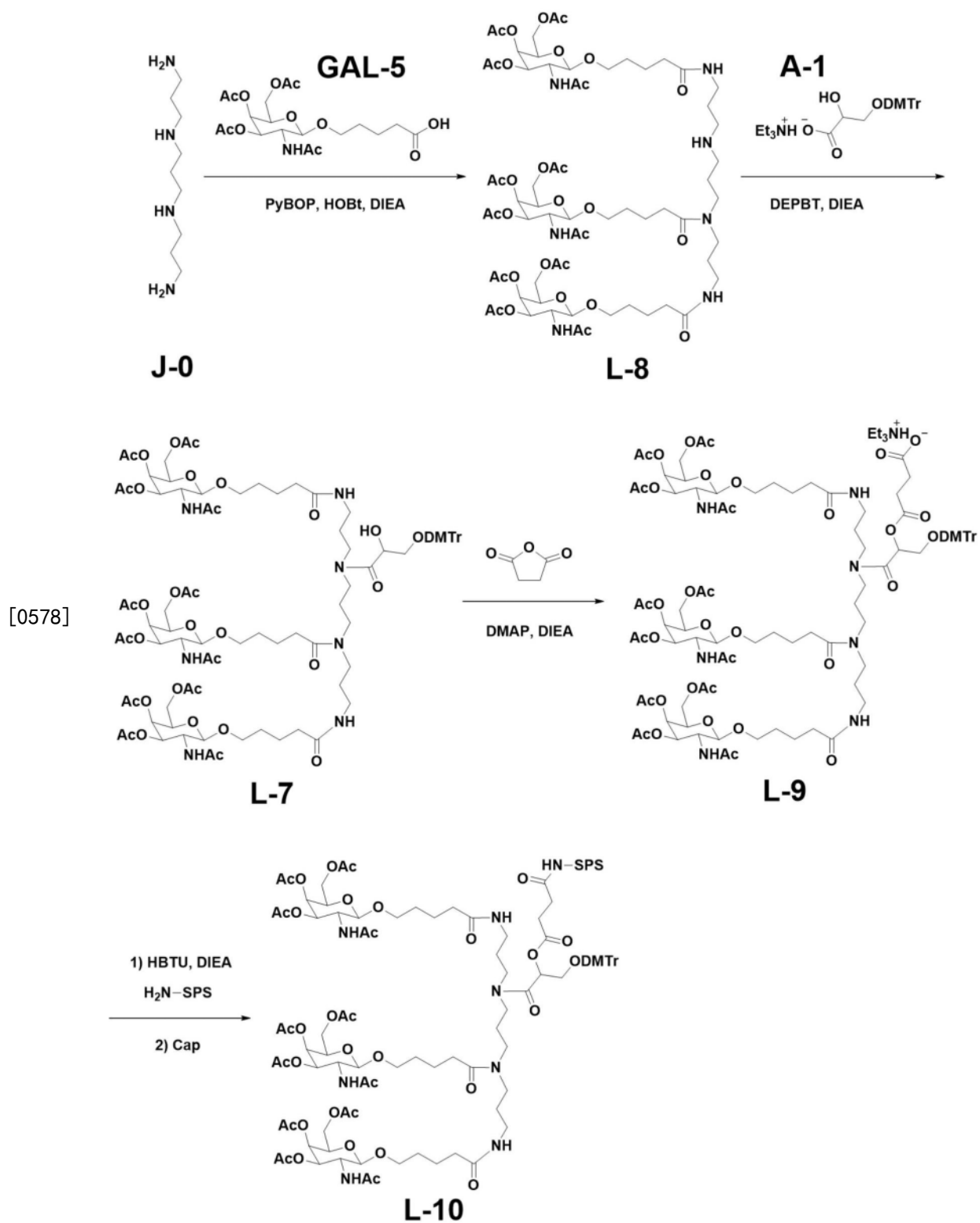
[0573] 制备例1

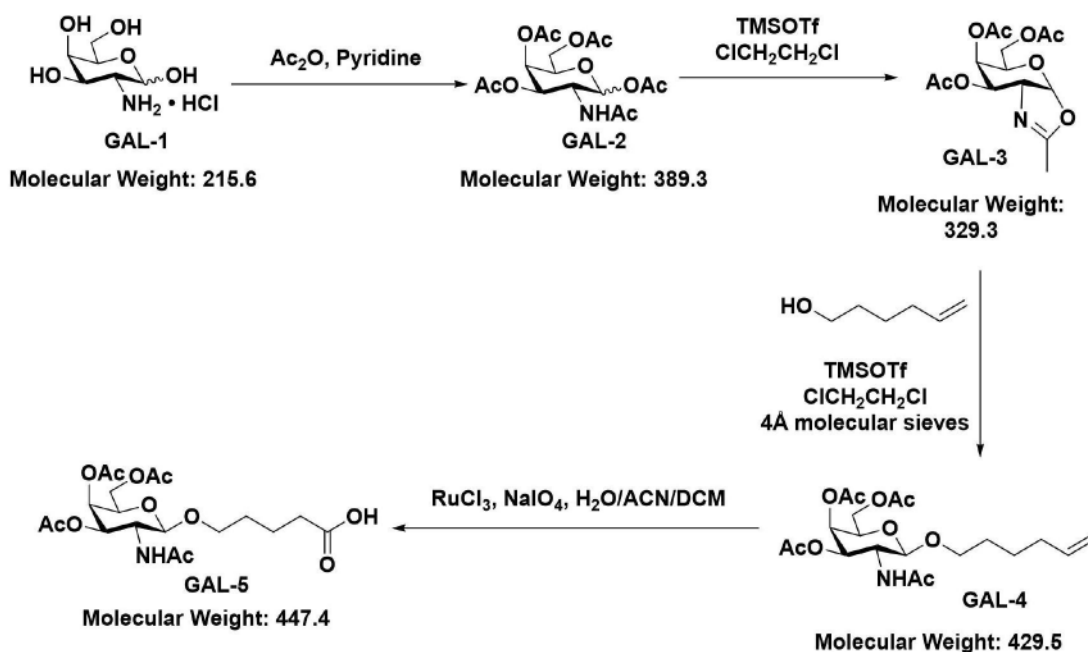
[0574] siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP的制备

[0575] 本制备例合成了siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP。该siRNA缀合物中所缀合的siRNA具有表3中对应于siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP的正义链和反义链序列。

[0576] (1-1)L-10化合物的合成

[0577] 按照以下方法,合成了L-10化合物:





[0580] (1-1-1a) GAL-2的合成

[0581] 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, 463.8mmol) 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-2130.0g。

[0582] (1-1-1b) GAL-3的合成

[0583] 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。

[0584] 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-326.9g。

[0585] (1-1-1c) GAL-4的合成

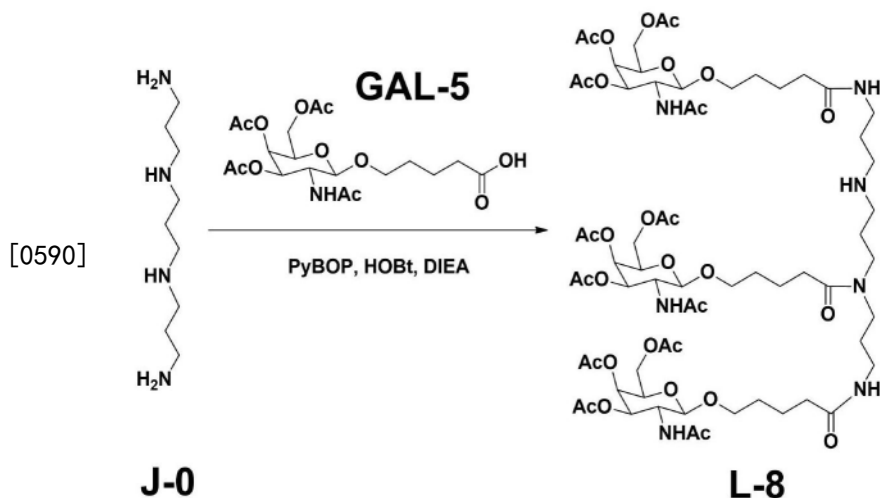
[0586] 将步骤(1-1-1b)中获得的GAL-3(26.9g, 81.7mmol) 溶于136ml无水1,2-二氯乙烷中, 加入干燥的4Å分子筛粉末30g, 再加入9.0g 5-己烯-1-醇 (CAS号:821-41-0, 购自Adamas-beta公司, 89.9mmol), 室温下搅拌30分钟, 冰浴和氮气保护下加入9.08g TMSOTf (40.9mmol), 室温下搅拌反应过夜。过滤除去4Å分子筛粉末, 滤液中加入300ml二氯甲烷稀释, 以硅藻土过滤, 再加入500ml饱和碳酸氢钠水溶液搅拌10分钟洗涤, 分出有机相, 水相用300ml二氯乙烷萃取一次, 合并有机相并分别用300ml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-441.3g, 不进行纯化直接进行下一步氧化反应。

[0587] (1-1-1d) GAL-5的合成

[0588] 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

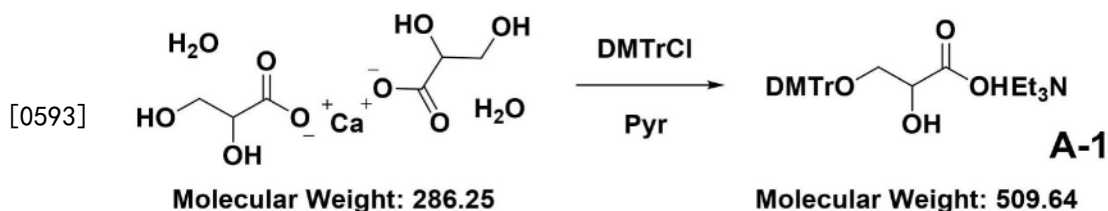
氯甲烷和77ml乙腈的混合溶剂中,分别加入103ml去离子水和29.7g高碘酸钠(CAS号:7790-28-5,购自阿拉丁公司,138.8mmol),冰水浴下搅拌10分钟,加入三氯化钨(CAS号:14898-67-0,购自安耐吉公司,238mg,1.145mmol),室温反应过夜。反应液加入300ml水稀释搅拌,加饱和碳酸氢钠调pH约为7.5,分出并弃去有机相,水相用二氯甲烷萃取三次,每次200ml,弃去有机相。水相用柠檬酸固体调节pH约为3,用二氯甲烷萃取三次,每次200ml,合并有机相,无水硫酸钠干燥,减压蒸干溶剂,得到白色泡沫状固体产品GAL-56.85g。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, DMSO)  $\delta$ 12.01(br, 1H), 7.83(d, J=9.2Hz, 1H), 5.21(d, J=3.2Hz, 1H), 4.96(dd, J=11.2, 3.2Hz, 1H), 4.49(d, J=8.4Hz, 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=6.8Hz, 2H), 2.11(s, 3H), 2.00(s, 3H), 1.90(s, 3H), 1.77(s, 3H), 1.55-1.45(m, 4H)。

[0589] (1-1-2)L-8的合成:



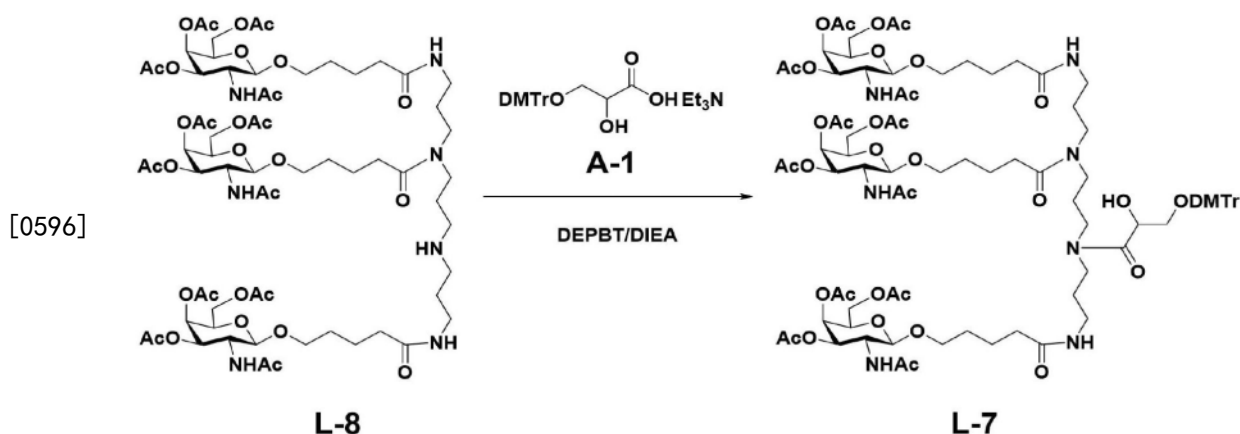
[0591] 将J-0(9.886g, 52.5mmol, 商购自阿法埃沙公司)和步骤(1-1-1)中得到的GAL-5(72.819g, 162.75mmol, 由多批次产物合并而得)溶于525ml二氯甲烷,加入二异丙基乙胺(DIEA, 44.782g, 346.50mmol)、苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯(PyBOP, 90.158g, 173.25mmol)和羟基苯并三唑(HOBt, 23.410g, 173.25mmol),室温下反应4h,加入20ml饱和碳酸氢钠和200ml饱和食盐水进行洗涤,水相用二氯甲烷萃取2次,每次100ml,合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤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-838.8g。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, DMSO)  $\delta$ 7.84(d, J=9.0Hz, 3H), 7.27-7.23(m, 1H), 7.13-7.18(m, 1H), 5.22(d, J=3.1Hz, 3H), 4.97(dd, J=11.3, 3.1Hz, 3H), 4.48(d, J=8.4Hz, 3H), 4.09-3.98(m, 9H), 3.88(dd, J=19.3, 9.3Hz, 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)。MSm/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。

[0592] (1-1-3a)A-1的合成



[0594] 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℃反应20h, 将反应液过滤, 滤饼用200mlDCM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200ml0.5M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-150.7g。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.46 (ddd, J=6.5, 2.3, 1.1Hz, 1H), 7.40-7.28 (m, 7H), 6.89-6.81 (m, 4H), 4.84 (d, J=5.0Hz, 1H), 4.36-4.24 (m, 1H), 4.29 (s, 6H), 3.92 (dd, J=12.4, 7.0Hz, 1H), 3.67 (dd, J=12.3, 7.0Hz, 1H), 2.52 (q, J=6.3Hz, 6H), 1.03 (t, J=6.3Hz, 9H)。MSm/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。

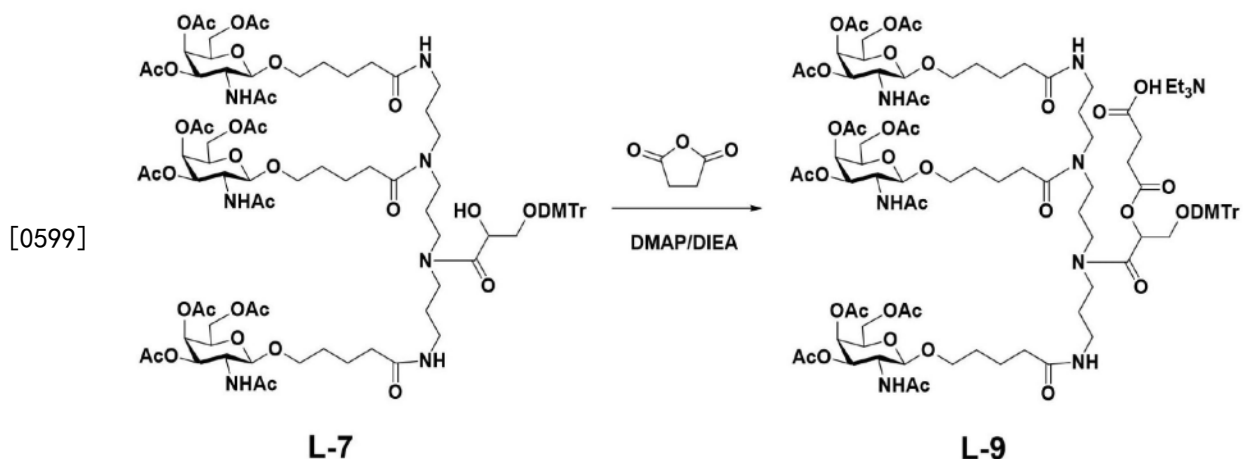
[0595] (1-1-3b)L-7的合成:



[0597] 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℃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-740.4g。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) δ7.90-7.78 (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, 3.2Hz, 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-

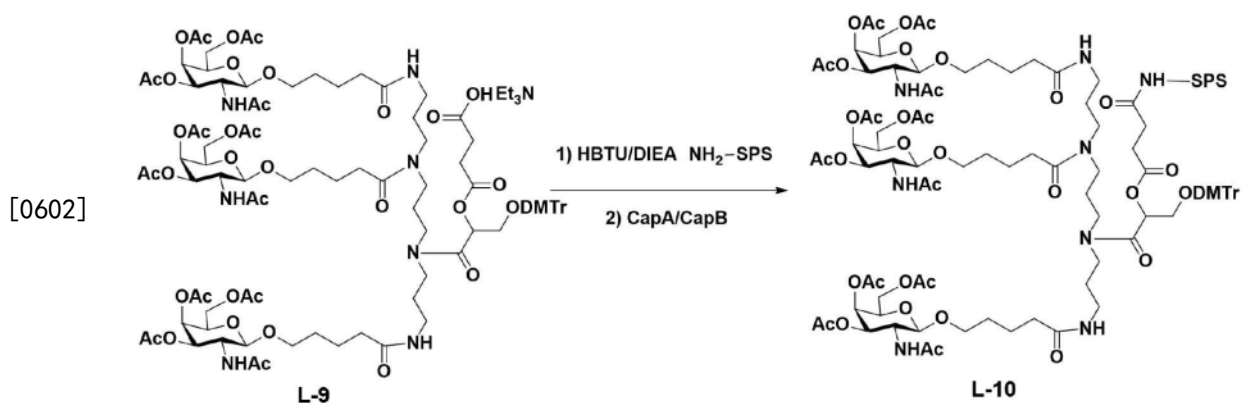
1.40 (m, 28H) .MS m/z:  $C_{90}H_{128}N_7O_{35}$ ,  $[M-DMTr]^+$ , 理论: 1564.65, 实测: 1564.88。

[0598] (1-1-4)L-9的合成:



[0600] 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℃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。 $^1H$  NMR (400MHz, 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:  $C_{94}H_{132}N_7O_{38}$ ,  $[M-DMTr]^+$ , 理论: 1664.72, 实测: 1665.03。

[0601] (1-1-5)L-10化合物的合成:



[0603] 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。

[0604] 将步骤(1-1-4)中获得的L-9缀合分子(22.751g, 11mmol)、0-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。

[0605] 表2盖帽反应投料配比

[0606]

| 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 | 015161001 | 上海星可    |

[0607] 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。

[0608] (1-2)合成siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP的正义链

[0609] 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L10-siKNa1M1SP对应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,包括脱保护、偶联、盖帽、硫化四步反应。合成条件给定如下:

[0610] 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。

[0611] 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。

[0612] 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。

[0613] 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。

[0614] 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,

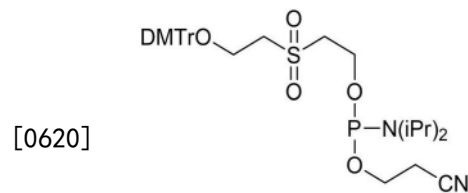
[0615] 切割和脱保护条件如下:将合成的连接有载体的核苷酸序列加入浓度为25wt%的氨水中,氨水用量为0.5ml/ $\mu$ mol,在55 $^{\circ}$ C反应16h,过滤去除剩余载体,将上清液真空浓缩至干。

[0616] 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。

[0617] 检测方法如下:使用离子交换色谱(IEX-HPLC)检测正义链纯度,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。

[0618] (1-3)合成siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP的反义链

[0619] 通过固相亚磷酰胺法,利用通用固相载体(UnyLinker<sup>TM</sup> loaded NittoPhase<sup>®</sup> HL Solid Supports, Kinovate Life Sciences公司)起始循环,表3中L10-siKNa1M1SP对应的反义链核苷酸顺序合成siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP的反义链。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。不同的是:对于反义链,其在5'-末端第一个核苷酸处具有5'-磷酸核苷酸,因此,在按照固相亚磷酰胺法制备反义链的过程中,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'-磷酸核苷酸修饰。



(CPR-I)

[0621] 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。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。

[0622] (1-4)合成siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP

[0623] 将(1-2)和(1-3)得到的正义链与反义链分别溶于注射用水中,得到40mg/mL的溶液,将得到的溶液以等摩尔的正义链和反义链混合,50℃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℃))将siRNA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。所述siRNA具有表3中所示的对应于siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP的正义链和反义链序列。

[0624] 表3 siRNA缀合物

| 制备例编号 | siRNA<br>缀合物编<br>号 | 序列方向 5'-3' |   | SEQ<br>ID<br>NO |
|-------|--------------------|------------|---|-----------------|
|       |                    | 正义链        | 反义链   |                 |
| 制备例 1 | L10-siKNa<br>1M1SP | 正义链        | AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmA<br>mGmUmUmUmGmUm                          | 361             |
|       |                    | 反义链        | PAmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmG<br>mUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm                   | 362             |
| 制备例 2 | L10-siKNb<br>1M1SP | 正义链        | AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmA<br>mAmUmUmAmCmCm                          | 363             |
|       |                    | 反义链        | PGmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmA<br>mGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm                   | 364             |
| 制备例 3 | L10-siKNc<br>1M1SP | 正义链        | UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmC<br>mUmCmAmAmUmUm                          | 365             |
|       |                    | 反义链        | PAmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmU<br>mAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm                   | 366             |
| 制备例 4 | L10-siKNd<br>1M1SP | 正义链        | GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmA<br>mUmCmGmAmUmAm                          | 367             |
|       |                    | 反义链        | PUmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmG<br>mCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm                   | 368             |
| 制备例 5 | L10-siKNe<br>1M1SP | 正义链        | GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmU<br>mUmUmCmUmAmUm                          | 369             |
|       |                    | 反义链        | PAmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmC  | 370             |
| 制备例 6 | L10-siKNf1<br>M1SP | 正义链        | mGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm<br>AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmC<br>mAmAmGmAmUmUm | 371             |
|       |                    | 反义链        | PAmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmA<br>mGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm                   | 372             |

[0627] 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。

[0628] 制备例2-6

[0629] 本公开的siRNA缀合物的合成

[0630] 按照制备例1的方法,合成了表3中所示的本公开的siRNA缀合物:L10-siKNb1M1SP、L10-siKNc1M1SP、L10-siKNd1M1SP、L10-siKNe1M1SP和L10-siKNf1M1SP。这些

siRNA缀合物包含的siRNA分别具有表3中各siRNA缀合物对应的正义链和反义链序列。制备方法的区别仅在于,分别按照表3中各siRNA缀合物所对应的siRNA正义链和反义链序列合成正义链和反义链。

[0631] 制备完成后,按照制备例1的方法对所制备得到的各siRNA缀合物的分子量分别进行检测,实测值与理论值一致,说明所合成的siRNA缀合物是目标设计的带有L-9缀合分子的双链核酸序列。其结构均如式(403)所示。这些siRNA缀合物所包含的siRNA分别具有表3中所示的对应于siRNA缀合物L10-siKNb1M1SP、L10-siKNc1M1SP、L10-siKNd1M1SP、L10-siKNe1M1SP和L10-siKNf1M1SP的序列。

[0632] 制备例7-14和对比制备例15和16

[0633] 合成siRNA序列

[0634] 通过固相合成方法分别合成表4中所列的siRNA序列的正义链或反义链,使用DEPC水溶解等摩尔的正义链和反义链混合物,随后退火以形成siRNA双链,得到以下siRNA: siKNa1M1S、siKNb1M1S、siKNc1M1S、siKNd1M1S、siKNe1M1S、siKNf1M1S、siKNa0、siKNc0、siKNa0-com、NC。

[0635] 表4 siRNA序列

| 制备例编号    | siRNA 编号   | 序列方向 5'-3' |  | SEQ ID NO |
|----------|------------|------------|--|-----------|
| 制备例 7    | siKNa1M1S  | 正义链        | AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm     | 373       |
|          |            | 反义链        | AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm | 374       |
| 制备例 8    | siKNb1M1S  | 正义链        | AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm     | 375       |
|          |            | 反义链        | GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm | 376       |
| 制备例 9    | siKNc1M1S  | 正义链        | UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm     | 377       |
|          |            | 反义链        | AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm | 378       |
| 制备例 10   | siKNd1M1S  | 正义链        | GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm     | 379       |
|          |            | 反义链        | UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm | 380       |
| 制备例 11   | siKNe1M1S  | 正义链        | GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm     | 381       |
|          |            | 反义链        | AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm | 382       |
| 制备例 12   | siKNf1M1S  | 正义链        | AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmmUmUm    | 383       |
|          |            | 反义链        | AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm | 384       |
| 制备例 13   | siKNa0     | 正义链        | AAAGUAACAACCAGUUUGU                          | 385       |
|          |            | 反义链        | ACAAACUGGUUGUUACUUU                          | 386       |
| 制备例 14   | siKNc0     | 正义链        | UCGAAUUACCUACUCAAUU                          | 387       |
|          |            | 反义链        | AAUUGAGUAGGUAUUUCGA                          | 388       |
| 对比制备例 15 | siKNa0-com | 正义链        | CCAAAGUAACAACCAGUUU                          | 389       |
|          |            | 反义链        | AAACUGGUUGUUACUUUGG                          | 390       |
| 对比       | NC         | 正义链        | UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT                      | 391       |
| 制备例 16   |            | 反义链        | ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT                      | 392       |

[0638] 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。

[0639] 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/ $\mu\text{mol}$  N-甲基吡咯烷酮溶解产品,随后加入0.3ml/ $\mu\text{mol}$ 三乙胺和0.6ml/ $\mu\text{mol}$ 三乙胺三氢氟酸盐,以脱除核糖上的2'-TBDMS保护。按照制备例1的方法分别对上述siRNA的分子量进行检测,实测值与理论值一致,确认所获得的siRNA分别具有对应于表4中所示的各个siRNA的序列。

[0640] 在上述本公开的siRNA或siRNA缀合物制备完成后,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)等将其重新溶解为所需浓度的溶液使用。

[0641] 实验例1

[0642] 本公开的siRNA体外(in vitro)的抑制活性

[0643] 用含有10%的胎牛血清(FBS, Hyclone公司)及0.2体积%的青链霉素双抗(Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen公司)的H-DMEM完全培养基(Hyclone公司)于37°C在含5%CO<sub>2</sub>/95%空气的培养箱中培养HEK293A细胞(购自南京科佰生物科技有限公司)。

[0644] 根据Kumico Ui-Tei et.al., Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Nucleic Acids Research, 2008. 36(7), 2136-2151描述的方法, 构建检测质粒, 与待评价的siRNA共转染至HEK293A细胞中, 通过双萤光素酶报告基因的表达水平, 来反应siRNA的抑制活性。具体步骤如下:

[0645] [1] 构建检测质粒

[0646] 采用psiCHECK<sup>TM</sup>-2 (Promega<sup>TM</sup>) 质粒构建检测质粒, 每一个检测质粒含有一个目标序列, 即siRNA靶序列。对于每一待测siRNA, 目标序列如下所示:

[0647] siKNa0的目标序列为:

[0648] AAAGTAACAACCAGTTTGT (SEQ ID NO:393)

[0649] siKNc0的目标序列为:

[0650] TCGAATTACCTACTCAATT (SEQ ID NO:394)

[0651] 将目标序列克隆到psiCHECK<sup>TM</sup>-2质粒的Xho I/Not I位点。

[0652] [2] 转染

[0653] 将HEK293A细胞以 $8 \times 10^3$ 细胞/孔接种于96孔板中, 16小时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80 $\mu\text{l}$  Opti-MEM培养基(GIBCO公司)继续培养1.5小时。

[0654] 对于每一siRNA, 用DEPC化水将对应的检测质粒稀释成200ng/ $\mu\text{l}$ 的检测质粒工作液。对于每一siRNA, 用DEPC化水将siRNA配制成浓度分别为10nM、3nM和1nM(以siRNA的量计)的siRNA工作液。

[0655] 配制1A1溶液, 每份1A1溶液含有浓度为10nM的siRNA工作液1 $\mu\text{l}$ 、检测质粒工作液0.05 $\mu\text{l}$ (含检测质粒10ng)和10 $\mu\text{l}$ 的Opti-MEM培养基。

[0656] 配制1A2溶液, 每份1A2溶液含有浓度为3nM的siRNA工作液1 $\mu\text{l}$ 、检测质粒工作液0.05 $\mu\text{l}$ (含检测质粒10ng)和10 $\mu\text{l}$ 的Opti-MEM培养基。

[0657] 配制1A3溶液,每份1A3溶液含有浓度为1nM的siRNA工作液1 $\mu$ l、检测质粒工作液0.05 $\mu$ l(含检测质粒10ng)和10 $\mu$ l的Opti-MEM培养基。

[0658] 配制1B溶液,每份1B溶液含有0.2 $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup>2000和10 $\mu$ l Opti-MEM培养基。

[0659] 配制1C溶液,每份1C溶液含有检测质粒工作液0.05 $\mu$ l(含检测质粒10ng)和10 $\mu$ l的Opti-MEM培养基。

[0660] 对于每一siRNA,分别将一份1B溶液与一份1A1溶液、一份1A2溶液、一份1A3溶液,室温下孵育20min,分别得到转染复合物1X1、1X2、1X3。将一份1B溶液与一份1C溶液混合,室温下孵育20min得到转染复合物1X4。

[0661] 对于每一siRNA,在三个培养孔中,分别加入转染复合物1X1,均匀混合,加入量为20 $\mu$ l/孔,得到siRNA终浓度约为0.1nM的共转染混合物,记为测试组1。

[0662] 对于每一siRNA,在另外三个培养孔中,分别加入转染复合物1X2,均匀混合,加入量为20 $\mu$ l/孔,得到siRNA终浓度约为0.03nM的共转染混合物,记为测试组2。

[0663] 对于每一siRNA,在另外三个培养孔中,分别加入转染复合物1X3,均匀混合,加入量为20 $\mu$ l/孔,得到siRNA终浓度约为0.01nM的共转染混合物,记为测试组3。

[0664] 在另外三个培养孔中,分别加入转染复合物1X4,得到不含siRNA的转染混合物,加入量为20 $\mu$ l/孔,记为对照组。

[0665] 将含siRNA的共转染混合物和不含siRNA的转染混合物在培养孔中共转染4小时后,每孔补加100 $\mu$ l含20%FBS的H-DMEM完全培养基。将96孔板置于CO<sub>2</sub>培养箱继续培养24小时。

[0666] [3]检测

[0667] 吸去培养孔中的培养基,每孔加入150 $\mu$ l的Dual-Glo<sup>®</sup>Luciferase试剂与H-DMEM混合溶液(体积比1:1),充分混匀,室温孵育10min后,转移120 $\mu$ l混合液到96孔酶标板上,使用Synergy II多功能酶标仪(BioTek公司)读取Firefly化学发光值(Fir);再向每孔加入60 $\mu$ l Dual-Glo<sup>®</sup>Stop&Glo<sup>®</sup>试剂,充分混匀,室温孵育10min后,按照读取Fir的排布方式,使用酶标仪读取每个培养孔中Renilla的化学发光值(Ren)。

[0668] 计算每孔发光比值Ratio=Ren/Fir,各测试组或对照组的发光比值Ratio(测试)或Ratio(对照)为三个培养孔Ratio的平均值;以对照组的发光比值为基准,对各测试组的发光比值进行归一化,获得Ratio(测试)/Ratio(对照)的比值R,以此表示Renilla报告基因的表达水平,即残留活性。siRNA的抑制率=(1-R)×100%。

[0669] 图1示出了分别转染了siKNa0、siKNc0后的HEK293A细胞中Renilla报告基因的残留活性。

[0670] 对比实验例1

[0671] 参比siRNA体外(in vitro)的抑制活性。

[0672] 按照实验例2的方法同时考察了参比siRNA NC和siKNa0-com在psiCHECK系统中的残留活性,区别仅在于,所测试的siRNA分别为参比siRNA NC和siKNa0-com。

[0673] siKNa0-com的目标序列为:

[0674] CCAAAGTAACAACCAGTTT (SEQ ID NO:395)

[0675] NC的目标序列与siKNa0的目标序列相同。

[0676] 结果如图1所示。

[0677] 图1的结果表明,本公开的siRNA在HEK293A细胞中对目标序列均显示出良好的抑制作用,且抑制率呈现出浓度依赖性。特别是,在0.1nM的siRNA浓度下,siKNa0和siKNc0抑制率均达到了75%以上,显示出良好的抑制KNG基因表达的效果。与此形成鲜明对照的是,尽管序列与siKNa0非常相似,然而参比siKNa0-com即使在0.1nM的siRNA浓度下,对目标序列的抑制率也不足50%,表明本公开的siRNA出人意料地显示出良好的抑制KNG基因表达的效果。

[0678] 实验例2

[0679] siRNA在psiCHECK系统中的目标序列IC<sub>50</sub>测定

[0680] 用含有10%的胎牛血清(FBS, Hyclone公司)及0.2体积%的青链霉素双抗(Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen公司)的H-DMEM完全培养基(Hyclone公司)于37°C在含5%CO<sub>2</sub>/95%空气的培养箱中培养HEK293A细胞(购自南京科佰生物科技有限公司)。

[0681] 根据Kumico Ui-Tei et.al., Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Nucleic Acids Research, 2008. 36(7), 2136-2151描述的方法, 构建检测质粒, 将所述检测质粒与待测siRNA共转染至HEK293A细胞中, 通过双荧光素酶报告基因的表达水平, 来反映siRNA的目标序列抑制活性。具体步骤如下:

[0682] [1] 构建检测质粒

[0683] 采用psiCHECK™-2 (Promega™) 质粒构建了检测质粒, 所述质粒中含有一个目标序列, 即siRNA靶序列。对于待测siRNA, 目标序列如下所示:

[0684] siKNa1M1S目标序列为:

[0685] CATGGCCACGGAAAACATAAAAATAAAGGCCAAAAGAATGGAAAGCACAATGGTTGGAAAACAGAGCA  
TTTGGCAAGCTCTTCTGAAGACAGTACTACACCTTCTGCACAGACACAAGAGAAGACAGAAGGGCCAACACCCATC  
CCTTCCCTAGCCAAGCCAGGTGTAACAGTTACCTTTTCTGACTTTCAGGACTCTGATCTCATTGCAACTATGATGC  
CTCCTATATCACCAGCTCCCATACAGAGTGATGACGATTGGATCCCTGATATCCAGATAGACCCAAATGGCCTTTC  
ATTTAACCCAATATCAGATTTTCCAGACACGACCTCCCCAAAATGTCTGGACGCCCTGGAAGTCAGTTAGTGAA  
ATTAATCCAACCACACAAATGAAAGAATCTTATTATTTGATCTCACTGATGGCCTTCTTAATTTAAGTGGCTAT  
GGGTATTTCTTTCATACTTTATTAAGTATCAATATCCCTCTCTCCATTGTCCAGATGAAAATATCCTGATATAAT  
GCACCAAAAACCATGCAGCTTCGGAACAGTCTAAAGAGAAGTGGTGAGACTCCCAGTGGAGACACC (SEQ ID NO:  
396)

[0686] siKNb1M1S、siKNc1M1S、siKNd1M1S、siKNe1M1S和siKNf1M1S的目标序列为:

[0687] CATGGCCACGGAAAACATAAAAATAAAGGCCAAAAGAATGGAAAGCACAATGGTTGGAAAACAGAGCA  
TTTGGCAAGCTCTTCTGAAGACAGTACTACACCTTCTGCACAGACACAAGAGAAGACAGAAGGGCCAACACCCATC  
CCTTCCCTAGCCAAGCCAGGTGTAACAGTTACCTTTTCTGACTTTCAGGACTCTGATCTCATTGCAACTATGATGC  
CTCCTATATCACCAGCTCCCATACAGAGTGATGACGATTGGATCCCTGATATCCAGATAGACCCAAATGGCCTTTC  
ATTTAACCCAATATCAGATTTTCCAGACACGACCTCCCCAAAATGTCTGGACGCCCTGGAAGTCAGTTAGTGAA  
ATTAATCCAACCACACAAATGAAAGAATCTTATTATTTGATCTCACTGATGGCCTTCTTAATTTAAGTGGCTAT

GGGTATTTCTTTCATACTTTATTAAGTATCAATATCCCTCTCTCCATTGTCCAGATGAAAATATCCTGATATAAT  
GCACCAAAAACCATGCAGCTTCGGAACAGTCTAAAGAGAAGTGGTGAGACTCCCAGTGGAGACACC (SEQ ID NO:  
397)

[0688] 上述目标序列均是编码人KNG mRNA的基因的基因片段。

[0689] 将目标序列克隆到psiCHECK™-2质粒的Xho I/Not I位点。

[0690] [2]转染

[0691] 将HEK293A细胞以 $8 \times 10^3$ 细胞/孔接种于96孔板中,16小时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80 $\mu$ l Opti-MEM培养基(GIBCO公司)继续培养1.5小时。

[0692] 用DEPC化水将上述检测质粒稀释成200ng/ $\mu$ l的检测质粒工作液;用DEPC化水将下面的siRNA中的每一个siRNA分别配制成100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.5625nM、0.7813nM和0.3906nM共9种不同浓度的siRNA工作液,所用siRNA分别为siKNa1M1S、siKNb1M1S、siKNc1M1S、siKNd1M1S、siKNe1M1S和siKNf1M1S。

[0693] 对于每一siRNA,分别配制2A1-2A9溶液,每份2A1-2A9溶液依次含有上述9个浓度的siRNA工作液1 $\mu$ l、检测质粒工作液0.05 $\mu$ l(含检测质粒10ng)和10 $\mu$ l的Opti-MEM培养基。

[0694] 分别将一份1B溶液与得到的一份每个siRNA的2A1-2A9的溶液混合,分别室温下孵育20min,得到每个siRNA的转染复合物2X1-2X9。

[0695] 在培养孔中,分别加入每一siRNA的转染复合物2X1-2X9,均匀混合,加入量为20 $\mu$ l/孔,得到每个siRNA终浓度分别约为1nM、0.5nM、0.25nM、0.125nM、0.0625nM、0.03125nM、0.015625nM、0.007813nM和0.003906nM的转染复合物,每个siRNA的转染复合物2X1-2X9分别转染3个培养孔,得到含siRNA的共转染混合物,记为测试组。

[0696] 在另外3个培养孔中,分别加入转染复合物1X3,加入量为20 $\mu$ l/孔,得到不含siRNA的共转染混合物,记为对照组。

[0697] 分别将含siRNA的共转染混合物和不含siRNA的共转染混合物在培养孔中转染4小时后,每孔补加100 $\mu$ l含20%FBS的H-DMEM完全培养基。将96孔板置于CO<sub>2</sub>培养箱继续培养24小时。

[0698] [3]检测

[0699] 吸去培养孔中的培养基,每孔加入150 $\mu$ l的Dual-Glo® Luciferase试剂与H-DMEM混合溶液(体积比1:1),充分混匀,室温孵育10min后,转移120 $\mu$ l混合液到96孔酶标板上,使用SynergyII多功能酶标仪(BioTek公司)读取96孔酶标板上各培养孔中Firefly的化学发光值(Fir);再向96孔酶标板上每孔加入60 $\mu$ l Dual-Glo® Stop&Glo® 试剂,充分混匀,室温孵育10min后,按照读取Fir的排布方式,使用酶标仪读取96孔酶标板上各培养孔中Renilla的化学发光值(Ren)。

[0700] 计算96孔酶标板上每孔发光比值 $\text{Ratio} = \text{Ren}/\text{Fir}$ ,各测试组或对照组的发光比值Ratio(测试)或Ratio(对照)为三个培养孔Ratio的平均值;以对照组的发光比值为基准,对各测试组的发光比值进行归一化,获得Ratio(测试)/Ratio(对照)的比值R,以此表示Renilla报告基因的相对表达水平,即残留活性。siRNA对目标序列的抑制率 $= (1 - R) \times 100\%$ 。

[0701] 依据转染了不同浓度的待测siRNA后,HEK293A细胞中Renilla的相对残留活性,利

用Graphpad5.0软件的非线性回归分析功能拟合log (inhibitor) vs. response—Variableslope (fourparameters) 剂量-效应曲线,图2A-2F依次示出了siKNa1M1S、siKNb1M1S、siKNc1M1S、siKNd1M1S、siKNe1M1S和siKNf1M1S的剂量-效应曲线。其中以siRNA终浓度的常用对数值 (lgnM) 为横坐标,以Renilla的相对残留活性(%)为纵坐标,每个圆点代表相对于对照组而言,测试组3个培养孔中Renilla的相对残留活性的平均值。

[0702] 根据拟合的剂量-效应曲线对应的函数,计算待测siRNA靶向目标序列的IC<sub>50</sub>值,所述函数如下,

$$[0703] \quad Y = Bot + \frac{Top - Bot}{1 + 10^{(X' - X) \times HillSlope}}$$

[0704] 式中:

[0705] Y是比值R,即Renilla的相对残留活性,

[0706] X为转染siRNA浓度的对数值,

[0707] Bot是稳态期底部的Y值,

[0708] Top是稳态期顶部的Y值,

[0709] X' 是当Y在底部到顶部之间一半时对应的X值,而HillSlope则是曲线在X'处的斜率。

[0710] 由该剂量-效应曲线和对应的函数,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),IC<sub>50</sub>值总结于表5中。

[0711] 表5 siRNA缀合物的IC<sub>50</sub>

| 制备例编号        | 编号             | IC50      |
|--------------|----------------|-----------|
| 制备例 1        | L10-siKNa1M1SP | 0.1054 nM |
| 制备例 2        | L10-siKNb1M1SP | 0.1914 nM |
| [0712] 制备例 3 | L10-siKNc1M1SP | 0.2328 nM |
| 制备例 4        | L10-siKNd1M1SP | 0.1096 nM |
| 制备例 5        | L10-siKNe1M1SP | 0.0048 nM |
| 制备例 6        | L10-siKNf1M1SP | 0.0186 nM |

[0713] 由图2A-2F以及上述表5的结果可知,本公开提供的siRNA缀合物在体外HEK293A细胞中有较高的目标序列抑制活性,IC<sub>50</sub>在0.0048-0.2328nM之间。

[0714] 实验例3

[0715] 本公开提供的siRNA缀合物在人源化小鼠体内 (in vivo) 活性的测定

[0716] 本试验例中使用的人源化小鼠委托苏州大学唐仲英血液学研究中心构建,将6-8周人源化小鼠随机分为5组,每组4只(2雄2雌),采用皮下注射方式单次给药,对每组小鼠分别以6mg/kg (以siRNA计) 给予siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP、L10-siKNc1M1SP、L10-siKNe1M1SP和L10-siKNf1M1SP和生理盐水 (saline) 对照。各siRNA缀合物以0.6mg/mL (以

siRNA计)的0.9%氯化钠水溶液形式给予,给药体积均为10mL/kg。

[0717] 然后于第28天处死动物,分别收集每只小鼠的肝脏组织,取肝脏左大叶约100mg/鼠,用RNA later (SigmaAldrich公司)保存;随后对于每只小鼠的肝脏组织,分别用组织匀浆仪匀浆肝组织,再用Trizol (Thermo Fisher公司)根据说明书描述的操作步骤提取得到每只小鼠的肝组织总RNA。

[0718] 按照实验例2的方法进行荧光定量PCR检测和计算KNG mRNA的相对表达水平及抑制率,区别仅在于:使用ImProm-II™反转录试剂盒(Promega公司)按其说明书将提取的总RNA逆转录为cDNA,得到含cDNA的溶液,接着用荧光定量PCR试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)检测肝组织中的KNG mRNA的表达量。在该荧光定量PCR法中,以 $\beta$ -actin基因作为内参基因,使用针对KNG的引物和针对 $\beta$ -actin基因的引物分别对KNG和 $\beta$ -actin基因进行检测。检测引物的序列参见表6所示。在KNG mRNA表达量及抑制率的计算中,对照组为本实验中施以PBS的对照组小鼠,各测试组为分别施以不同siRNA缀合物的给药组小鼠。对照组的KNG mRNA表达量记为100%,相应地,KNG mRNA表达量抑制率记为0%,测试结果以对照组的KNG mRNA表达量进行标准化,结果示于表6中。

[0719] 表6检测引物的序列

| 基因名称           | 引物类型 | 核苷酸序列 (5'→3')            | SEQ ID NO. |
|----------------|------|--------------------------|------------|
| 人 KNG          | 上游引物 | CTACCCAGACCTGCCAGATTACTC | 398        |
|                | 下游引物 | GATATAGGATGCACACAGCCGAG  | 399        |
| $\beta$ -actin | 上游引物 | GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG  | 400        |
|                | 下游引物 | ATGCCACAGGATTCCATACC     | 401        |

[0721] 采用比较Ct ( $\Delta \Delta$ Ct)法,对各测试组和对照组中目标基因KNG的表达量进行相对定量计算,计算方法如下:

[0722]  $\Delta$  Ct (测试组) = Ct (测试组目标基因) - Ct (测试组内参基因)

[0723]  $\Delta$  Ct (对照组) = Ct (对照组目标基因) - Ct (对照组内参基因)

[0724]  $\Delta \Delta$  Ct (测试组) =  $\Delta$  Ct (测试组) -  $\Delta$  Ct (对照组平均)

[0725]  $\Delta \Delta$  Ct (对照组) =  $\Delta$  Ct (对照组) -  $\Delta$  Ct (对照组平均)

[0726] 其中, $\Delta$  Ct (对照组平均)是对照组每只小鼠各自的 $\Delta$  Ct (对照组)的算术平均值。从而,测试组和对照组的每一小鼠均对应一个 $\Delta \Delta$  Ct值。

[0727] 以对照组为基准,对测试组KNG mRNA的表达水平进行归一化,定义对照组KNG mRNA表达水平为100%,

[0728] 测试组KNG mRNA相对表达水平 =  $2^{-\Delta \Delta \text{Ct (测试组)}} \times 100\%$ 。

[0729] 对于同一测试组siRNA,测试组KNG mRNA相对表达水平平均值为该浓度每组小鼠的相对表达水平的算术平均值。

[0730] 测试结果以对照组的KNG mRNA表达量进行标准化,结果示于表7中。表7中,人KNG mRNA抑制率为给与相对应的siRNA缀合物的一组小鼠人KNG mRNA抑制率的平均值及其标准偏差。

[0731] 表7本公开的siRNA缀合物在人源化小鼠体内对人KNG mRNA的抑制率

| 制备例编号        | siRNA<br>缀合物编号 | 人 KNG mRNA 抑制率%<br>(±标准差) |
|--------------|----------------|---------------------------|
| [0732] 制备例 1 | L10-siKNa1M1SP | 52.75±29.52               |
| 制备例 3        | L10-siKNc1M1SP | 56.29±14.47               |
| 制备例 5        | L10-siKNe1M1SP | 54.13±16.22               |
| 制备例 6        | L10-siKNf1M1SP | 48.35±6.49                |

[0733] 由表7的结果可见,本公开的siRNA缀合物在人源化小鼠肝中对人KNG mRNA均显示出较好的抑制效果,对KNG mRNA的抑制率为48.35% -56.29%。

[0734] 实验例4

[0735] 本公开提供的siRNA缀合物在人源化小鼠体内(in vivo)对KNG蛋白浓度影响的测定

[0736] 本实验例中使用的人源化小鼠与实验例3相同。测试组使用2只6-8周人源化小鼠,采用皮下注射方式单次给药,对每只小鼠分别给予6mg/kg (以siRNA计)的siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP。siRNA缀合物L10-siKNa1M1SP以0.6mg/mL (以siRNA计)的0.9%氯化钠水溶液形式提供,给药体积均为10mL/kg小鼠体重。向另外1只人源化小鼠给予1×PBS,给药体积为10mL/kg小鼠体重,作为对照组。

[0737] 分别于给药当天以及给药后第7天、第14天、第21天和第28天对小鼠分别采血(将上述各时间点依次记为D0、D7、D14、D21、D28),获得全血样品。向每只小鼠的全血样品中以抗凝剂与全血的体积比1:9(v/v)的比例加入3.8wt%枸橼酸钠水溶液抗凝剂,离心分离,得到上清液,即待测血浆样品,在-80℃下保存。

[0738] 将6×蛋白上样缓冲液(含DTT,购于北京拜尔迪生物技术有限公司,货号DE0105-1mL)用无菌水稀释为2×蛋白上样缓冲液。分别取测试组和对照组的共3只小鼠中的每一只的待测血浆样品5μL加入到不同的1.5mL离心管中,再向各个离心管中分别加入5μL无菌水和15μL 2×蛋白上样缓冲液,混匀后,在金属浴100℃温度下变性10分钟,得到蛋白样品液。

[0739] 配置10%分离胶和4%浓缩胶。取200mL 5×SDS-PAGE电泳缓冲液(购自北京拜尔迪生物技术有限公司,货号DE0100-500),加水至800mL混匀,得到稀释缓冲液。向电泳槽内倒入稀释缓冲液。将制备好的每一种蛋白样品液各取出10μL,分别加入SDS-PAGE胶的不同的胶孔中,在另1个胶孔内加入蛋白marker(Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder,Thermo Scientific公司,货号26634)在120V恒压下电泳80分钟,终止电泳。

[0740] 取100mL的10×蛋白电泳转移缓冲液(北京拜尔迪生物技术有限公司,货号DE0181-500 mL),加水至800mL,再加入200mL的无水甲醇,混匀,得到稀释转移缓冲液。用甲醇浸泡聚二氟乙烯膜(以下称为,PVDF膜)2分钟后,以稀释转移缓冲液浸泡海绵,滤纸及PVDF膜。取出胶板中的凝胶,按照负极板(黑)—海绵—滤纸—凝胶—PVDF膜—滤纸—海绵—正极板(白),由下向上的顺序制好夹板,放入转膜槽中。将转膜槽置于冰盒中,100V恒压

转膜1小时。

[0741] 取出转模结束的PVDF膜,剪切对应于蛋白marker 80-150KD区间的PVDF膜,将剪切下的PVDF膜浸泡在5wt%脱脂牛奶(脱脂奶粉购自北京索莱宝科技有限公司,货号D8340)中,在摇床中封闭2小时。用5wt%脱脂牛奶按1:1500的体积比稀释一抗(anti-h-KNG(购自苏州大学唐仲英血液学研究中心)),在4℃温度下过夜孵育,得到孵育后的PVDF膜。

[0742] 取50mL 20×TBS缓冲液(购自北京拜尔迪生物技术有限公司,货号DE0190-500),加水稀释至1L,再加入1000μL Tween-20(购自北京索莱宝科技有限公司,货号T8220)混匀后制成TBST缓冲液。

[0743] 用过量TBST缓冲液对前述孵育后的PVDF膜洗脱3次,每次5分钟,然后用5wt%脱脂牛奶按1:2000的体积比稀释二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(购自北京中杉金桥生物技术有限公司,货号ZB-2301)),在室温下摇床孵育1小时后,用过量TBST缓冲液对PVDF膜洗脱3次,每次5分钟。得到清洗后的PVDF膜。

[0744] 使用Western发光检测试剂盒(购自威哥拉斯生物技术(北京)有限公司,货号P004)按照说明书描述步骤拍摄蛋白质印迹,具体步骤为:以1:1(v/v)的比例混合A液和B液(包含于Western发光检测试剂盒中),得到辣根过氧化物酶反应底物液(HRP反应底物),向清洗后的PVDF膜涂布HRP反应底物。

[0745] 将涂布HRP反应底物的PVDF膜置于成像仪中,按照说明书描述的方法在明场模式下拍摄蛋白marker;在化学发光模式下拍摄蛋白发光条带,曝光时间为10min。

[0746] 由蛋白标记拍摄结果可知,对照组和不同时间点的各测试组均显示出清晰的蛋白标记;然后,通过ImageJ软件分析蛋白标记,分别获得对照组和不同时间点的各测试组的蛋白印迹条带的光强度值,分析可知,与对照组和D0的数据相比,各测试组在给药后的不同时间点蛋白印迹条带的光强度值均显著降低。

[0747] 进一步地,以对照组的蛋白印迹条带的光强度值为基准,对测试组各时间点下的KNG蛋白印迹条带的光强度值进行标准化,将对照组的蛋白表达水平定义为100%,测试组KNG蛋白的相对表达水平如下等式进行计算:

[0748]  $\text{KNG蛋白相对表达水平} = (\text{测试组KNG蛋白印迹条带的光强度值} / \text{对照组KNG蛋白印迹条带的光强度值}) \times 100\%$

[0749]  $\text{对KNG蛋白表达的抑制率} = (1 - \text{KNG蛋白相对表达水平}) \times 100\%$

[0750] 对于测试组,相对表达水平和抑制率是2只小鼠的测试结果的算术平均值

[0751] 图3示出了对照组和不同取血时间点的测试组样品的KNG蛋白的相对表达水平。

[0752] 由图3的结果表明,本公开提供的siRNA缀合物在小鼠体内待测血浆样品中对KNG蛋白显示出优异的抑制作用。本公开提供的siRNA缀合物在长达28天的时间,待测血浆样品中的KNG蛋白抑制率均达到了97%以上,甚至高达约99%,抑制效果显著。可见,本公开的siRNA缀合物能够有效抑制KNG蛋白的表达,因此显示出优异的治疗KNG相关疾病、特别是败血症的应用前景。

[0753] 以上详细描述了本公开的一些实施方式,但是,本公开并不限于上述实施方式中的具体细节,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。

[0754] 另外需要说明的是,在上述一些实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛

盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本公开对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0755] 此外,本公开的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本公开的思想,其同样应当视为本公开所公开的内容。

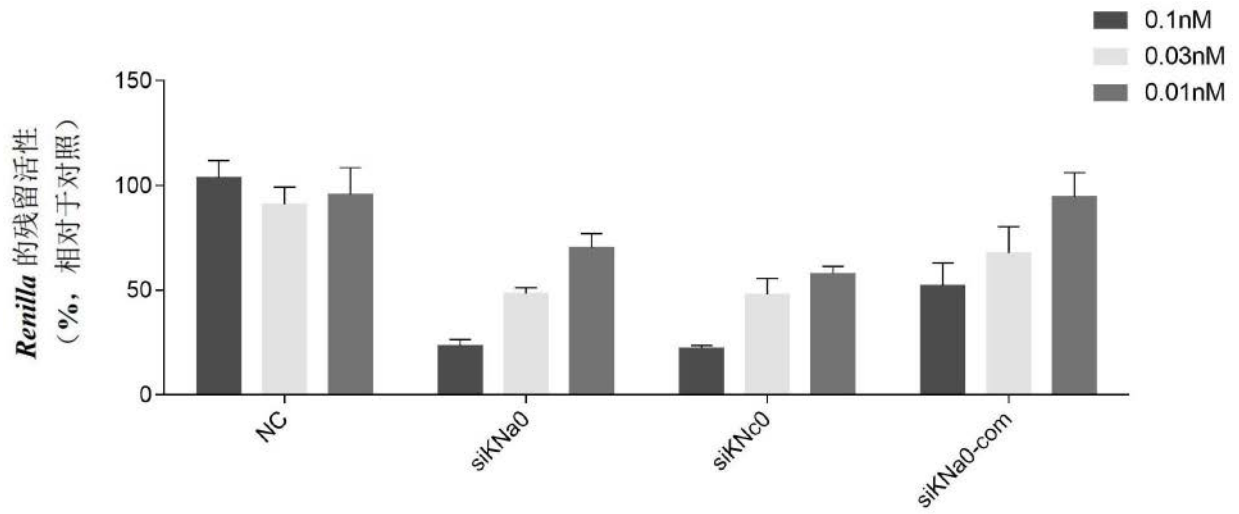


图1

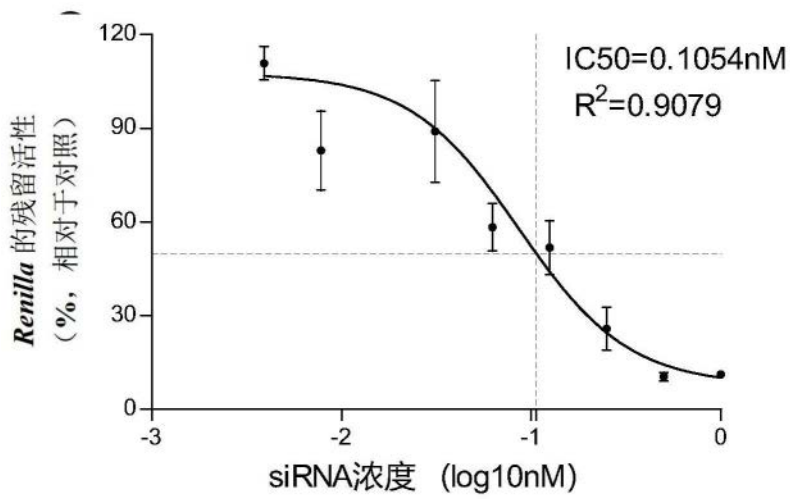


图2A

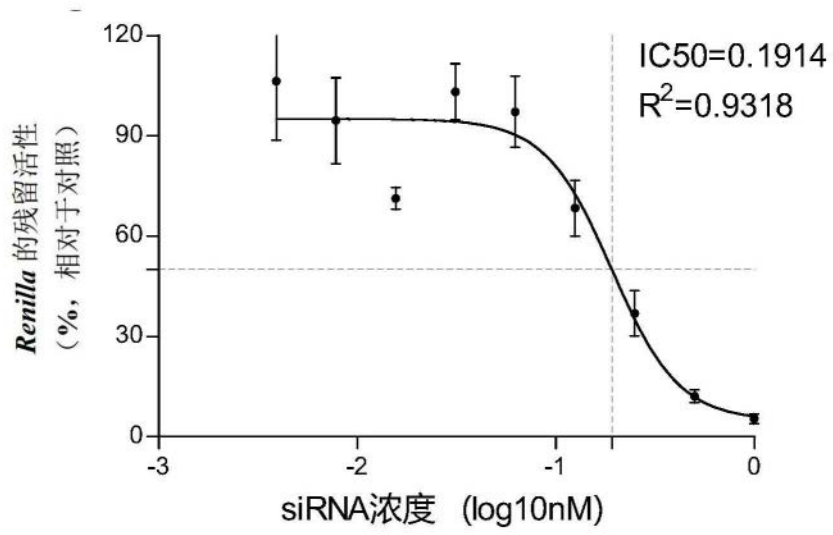


图2B

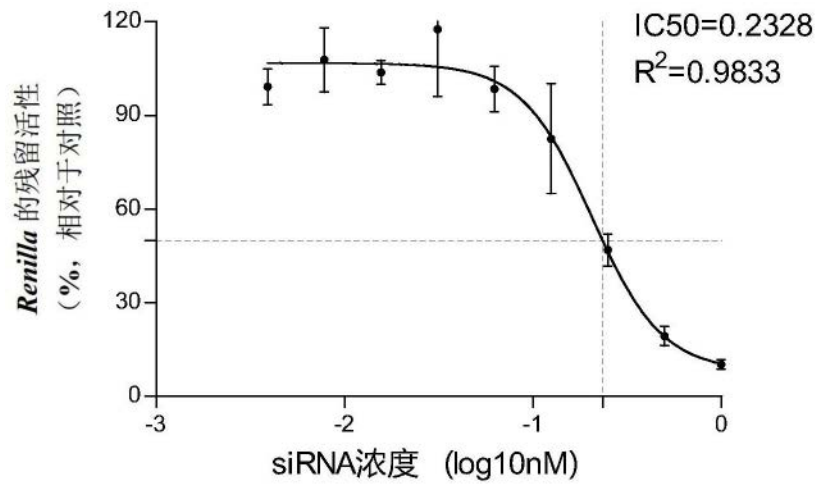


图2C

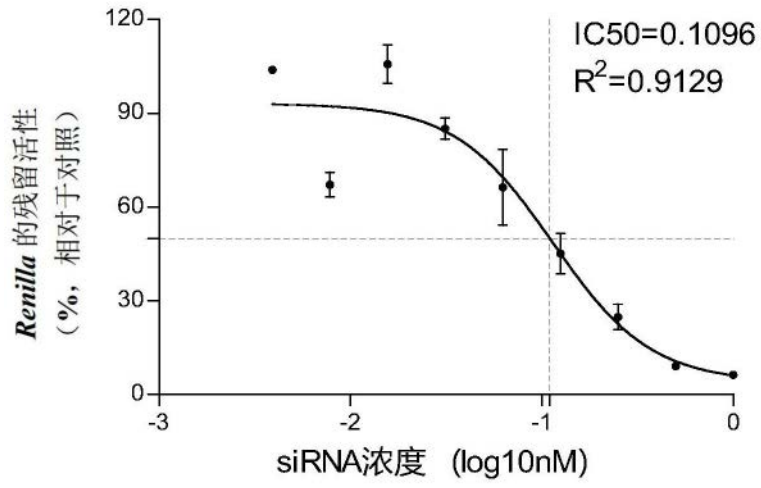


图2D

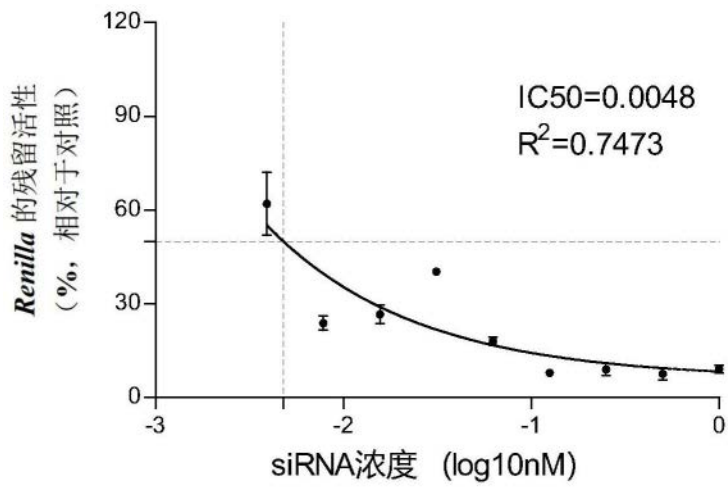


图2E

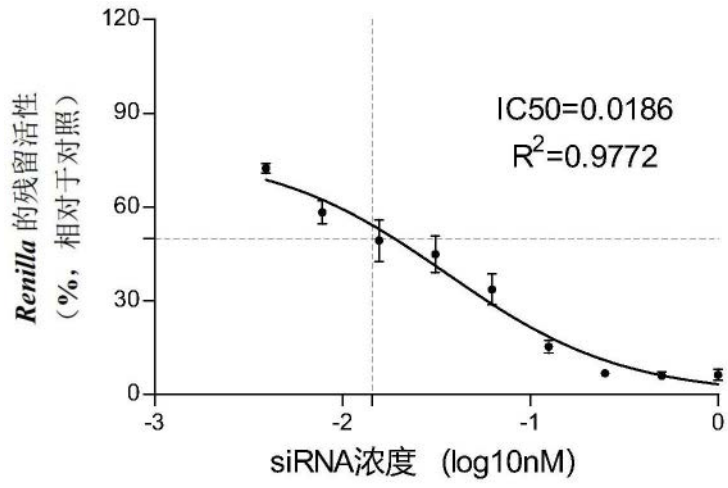


图2F

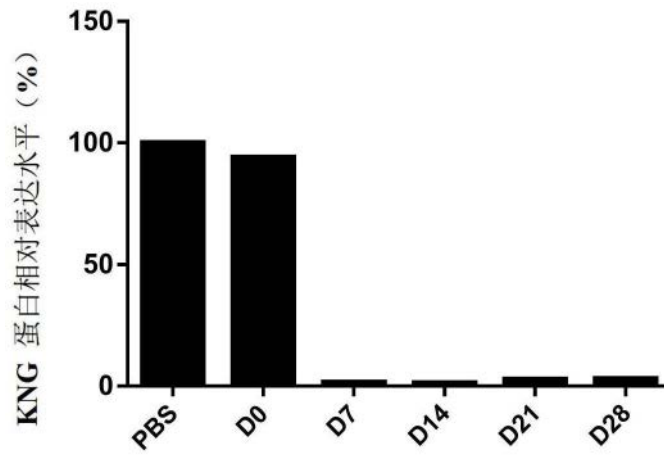


图3