(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 6 月 6 日 (06.06.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/105419 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 47/28* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61K 47/36* (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/118232

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 29 日 (29.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201711249345.0 2017年12月1日 (01.12.2017) CN
201711486999.5 2017年12月29日 (29.12.2017) CN

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

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

(74) 代理人: 北京柏杉松知识产权代理事务所 (普通合伙) (PATENTSINO IP FIRM); 中国北京市西城区北三环中路27号商房大厦413室, Beijing 100029 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) **Title:** NUCLEIC ACID, COMPOSITION AND CONJUGATE CONTAINING SAME, PREPARATION METHOD, AND USE

(54) 发明名称: 一种核酸、含有该核酸的组合物与缀合物及制备方法和用途

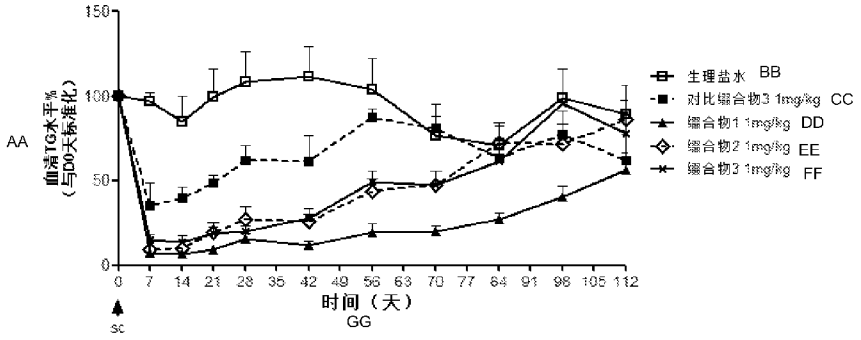


图 5C

AA Serum TG level % (normalized with day D0)
BB Normal saline
CC Comparative conjugate 3 1mg/kg
DD Conjugate 1 1mg/kg
EE Conjugate 2 1mg/kg
FF Conjugate 3 1mg/kg
GG Time (day(s))

(57) **Abstract:** The present invention provides an siRNA for inhibiting apolipoprotein C3 (ApoC3) gene expression, and a pharmaceutical composition and conjugate containing the siRNA. Each nucleotide in the siRNA is a modified nucleotide. The siRNA contains a sense strand and an antisense strand; the sense strand contains a nucleotide sequence A, the nucleotide sequence A having a length that is equal to that of a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:1 and having no more than three nucleotide differences; the antisense strand contains a nucleotide sequence B, the nucleotide sequence B having a length that is equal to that a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 and having no more than three nucleotide differences. The siRNA and the pharmaceutical composition and conjugate thereof provided in the present invention can effectively treat and/or prevent dyslipidemia.

WO 2019/105419 A1

[见续页]

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要：本公开提供了一种抑制载脂蛋白C3(ApoC3)基因表达的siRNA，含有该siRNA的药物组合物和缀合物。所述siRNA中的每个核苷酸均为修饰的核苷酸，该siRNA含有正义链和反义链，所述正义链含有核苷酸序列A，所述核苷酸序列A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B，所述核苷酸序列B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。本公开提供的siRNA及其药物组合物和缀合物，可以有效治疗和/或预防血脂异常。

一种核酸、含有该核酸的组合物与缀合物及制备方法和用途

背景技术

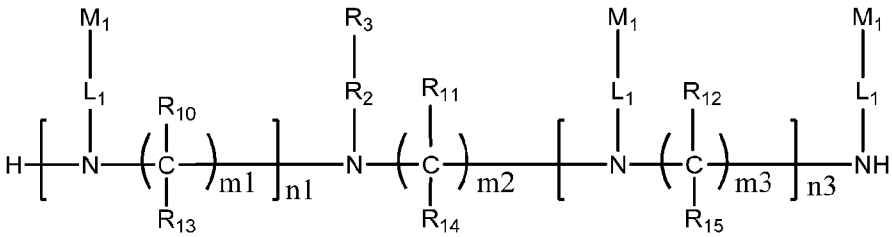
血脂异常，又名高脂血症，是脂肪代谢或运转异常，使血浆脂质高于正常值的一种全身性疾病，正严重威胁着全球患者的健康。现有的治疗血脂异常的药物主要有他汀类、胆固醇吸收抑制剂、树脂类、普罗步考、贝特类和烟酸及其衍生物。

载脂蛋白 C3（APOC3）在脂质代谢中具有重要作用，携带有 APOC3 突变基因的人血液循环中 APOC3 的表达量下降 46%，血浆内甘油三酯水平较普通人下降 39%，同时较低的血脂水平可使 APOC3 突变基因携带者患心脏病的风险比非携带者降低 35.1%。因此，若能从基因水平沉默基因表达，阻断 APOC3 的生成，无疑将是最为理想的治疗手段。小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）可基于 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）这一机制，以序列特异性的方式抑制或阻断任何感兴趣的目的基因的表达，从而达到治疗疾病的目的。

siRNA 稳定化修饰及其递送系统是小 RNA 药物开发中的两个关键技术。

发明内容

在一些实施方式中，本公开提供了一种 siRNA 缀合物，该缀合物具有式（1）所示的结构：



式（1）

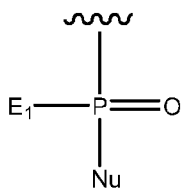
其中：

n1 为选自 1-3 的整数，n3 为选自 0-4 的整数；

m1、m2 和 m3 独立地为选自 2-10 的整数；

R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14} 和 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 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，所述 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列1和所述核苷酸序列2至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列1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 2 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'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ -3'（SEQ ID NO: 1）；

5'- Z'UCUUGUCCAGCUUUAUUG -3'（SEQ ID NO: 2）；

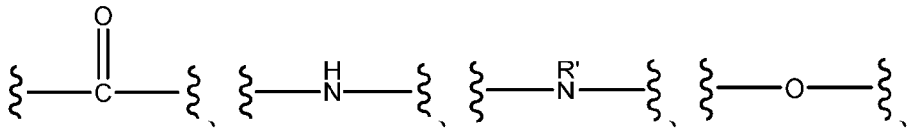
其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 1 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 2 中包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

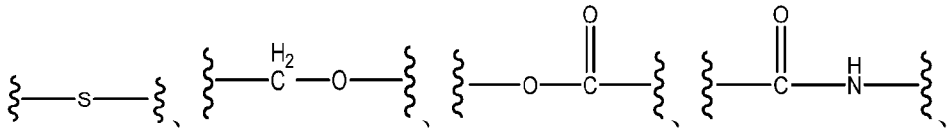
R_2 是长度为 1-20 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、C_2-C_{10} 亚烯基、C_2-C_{10} 亚炔基、C_6-C_{10} 亚芳基、C_3-C_{18} 亚杂环基和 C_5-C_{10} 亚杂芳基；并且其中，R_2 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C_1-C_{10} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、C_5-C_{10} 杂芳基、C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC_1-C_{10} 烷基、-OC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10}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_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)、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 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、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)、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)。

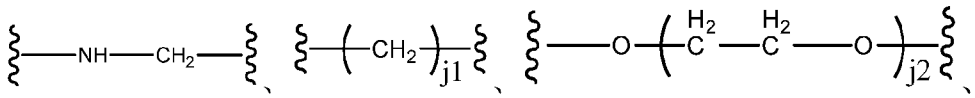
在一些实施方式中，每个 L_1 独立地选自式 A1-A26 基团中的一种或多种的连接组合：



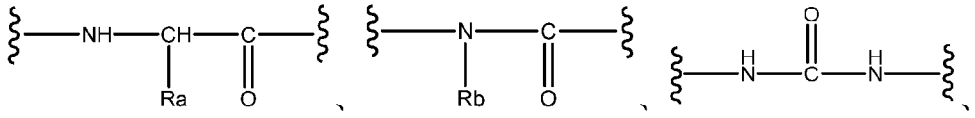
（A1） （A2） （A3） （A4）



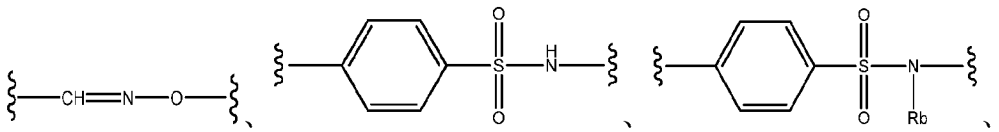
（A5） （A6） （A7） （A8）



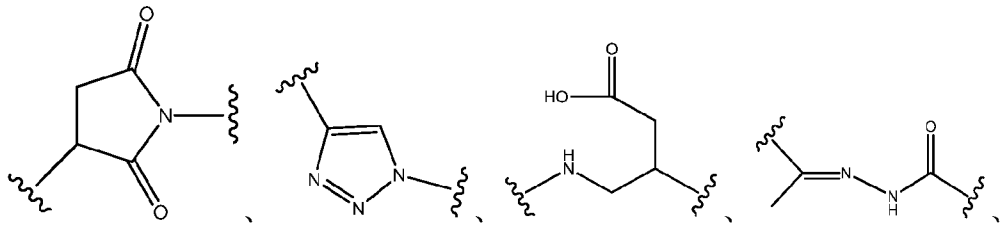
（A9） （A10） （A11）



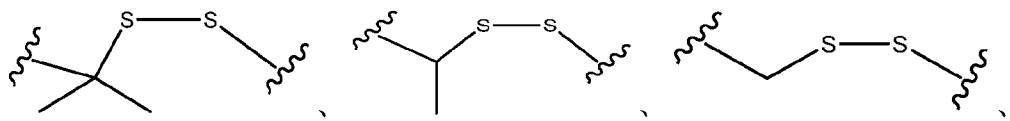
（A12） （A13） （A14）



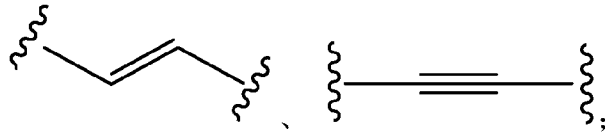
（A15） （A16） （A17）



（A18） （A19） （A20） （A21）



（A22） （A23） （A24）

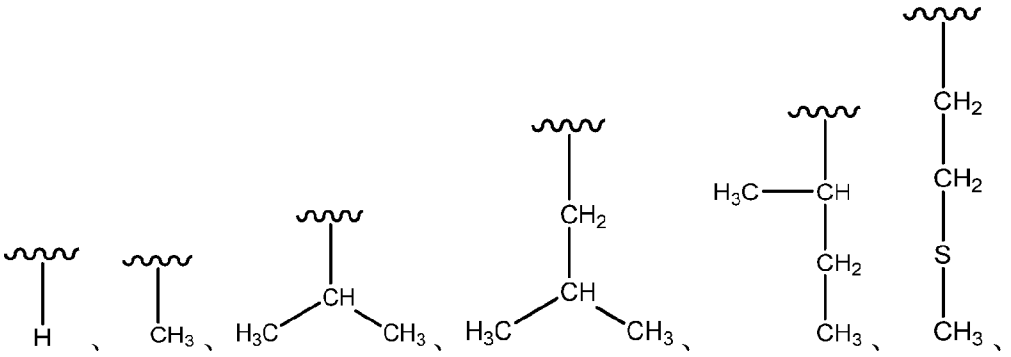


（A25） （A26）

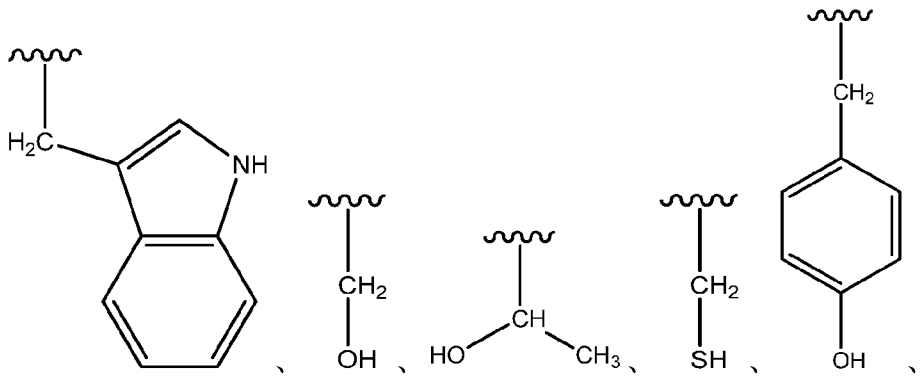
其中，j1 为 1-20 的整数；j2 为 1-20 的整数；

R’为 C_1-C_{10} 的烷基；

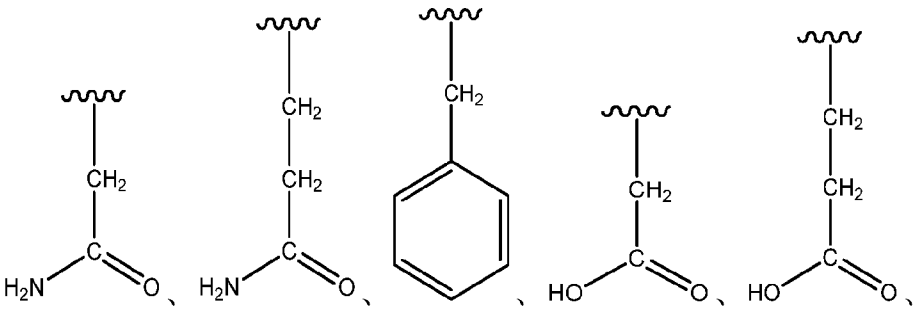
Ra 选自式 A27-A45 基团或其任意组合所组成的组：



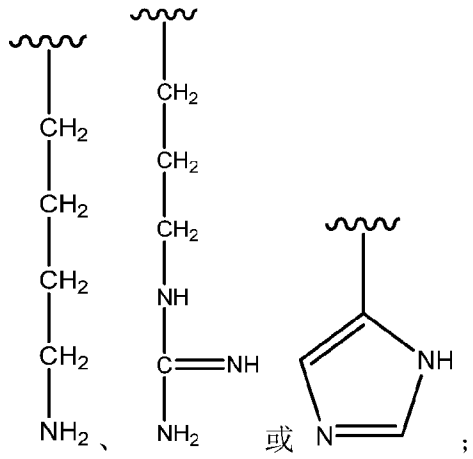
（A27） （A28） （A29） （A30） （A31） （A32）



（A33） （A34） （A35） （A36） （A37）



（A38） （A39） （A40） （A41） （A42）



（A43） （A44） （A45）

Rb 为 C_1-C_{10} 的烷基；

表示基团连接至分子其余部分的位点；

M_1 表示靶向基团。

在一些实施方式中，本公开提供了一种缀合物的制备方法，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 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，所述 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 1 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 2 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：

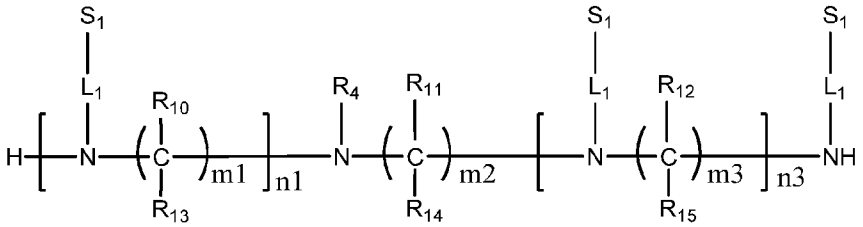
5'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ-3'（SEQ ID NO: 1）；

5'- Z'UCUUGUCCAGCUUUAUUG -3'（SEQ ID NO: 2）；

其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 1 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 2 中包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

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，从而使式（321）所示的化合物经偶联反应连接至核苷酸序列。下文中，式（321）所示的化合物也称作缀合分子。



式（321）

其中：

R_4为能够结合至 Nu 代表的 siRNA 的部分。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 的部分。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 的任意官能团的部分；

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；

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。

在一些实施方式中，本公开提供了一种能够抑制 APOC3 基因表达的修饰的 siRNA，该 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链和反义链的每一个核苷酸均为修饰的核苷酸，其中，所述正义链和反义链均包含氟代修饰的核苷酸和非氟代修饰的核苷酸；所述正义链包含核苷酸序列Ⅰ，所述反义链包含核苷酸序列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含有核苷酸序列 A，所述核苷酸序列 A 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含有核苷酸序列 B，所述核苷酸序列 B 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’- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ-3’ （SEQ ID NO: 1）；

5’- Z’UCUUGUCCAGCUUUAUUG-3’ （SEQ ID NO: 2），

其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 A 中包含位置对应于 Z 的核苷酸Z_A，所述核苷酸序列 B 中包含位置对应于 Z'的核苷酸Z'_B，所述Z'_B是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 A 和核苷酸序列 B 中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 A 的第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸；并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 B 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方式中，本公开提供了本公开的修饰的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物在制备用于治疗和/或预防由载脂蛋白 C3（ApoC3）的过量表达引起的血脂异常的药物中的用途。

在一些实施方式中，本公开提供了一种治疗血脂异常的方法，所述方法包括向患有血脂异常的受试者给予有效量的本公开的修饰的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物。

在一些实施方式中，本公开提供了一种抑制肝细胞 APOC3 基因表达的方法，该方法包括将有效量的本公开的修饰的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物与所述肝细胞进行接触。

在一些实施方式中，本公开提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含本公开的修饰的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物。

以引用的方式并入

本说明书中提及的所有出版物、专利以及专利申请均以引用的方式并入本文，其程度与每一单独的出版物、专利以及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。

有益效果

在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、含该 siRNA 的组合物或 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、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的靶基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的 APOC3 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的肝内 APOC3 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的动物模型中肝内 APOC3 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的人类受试者中肝内 APOC3 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、含该 siRNA 的组合物或 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。

在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA 缀合物表现出优异的抑制 APOC3 基因表达的特性：在 1mg/kg 的剂量下抑制高脂模型小鼠肝脏中至少 88%的 APOC3 基因表达。特别地，与现有技术提供的缀合分子形成的缀合物相比，本公开提供的修饰的 siRNA 和 siRNA 缀合物显示出优异的基因抑制率，及低的脱靶效应；并且，本公开提供的 siRNA 缀合物能够在低给药剂量、低给药频率的情况下，在长达 189 天的实验时间内持续显示出优异的血脂抑制作用。

上述情况表明，本文提供的 siRNA、药物组合物和 siRNA 缀合物能够有效降低靶细胞基因表达，并且显示出优异的递送潜力。

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

为了更清楚地说明本发明实施例和现有技术的技术方案，下面对实施例和现有技术中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 显示了缀合物 F1-F5 在体外 psiCHECK 系统中的抑制活性。

图 2 显示了 D14 天缀合物 1 在人 APOC3 转基因小鼠肝组织中对 APCO3 mRNA 表

达量的抑制率。

图 3A 和 3B 显示不同剂量缀合物 1 对血脂的抑制率，以血清总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）表示。

图 4A 和 4B 显示以血清总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）为指标，不同剂量的缀合物 2 对血脂的抑制率。

图 5A、5B、5C 和 5D 显示了以血清中的总胆固醇(CHO)和甘油三酯(TG)为指标，不同剂量的缀合物 1-3 对血脂的抑制率。

具体实施方式

以下对本公开的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本公开，并不用于限制本公开。

在本公开中，APOC3 基因是指 mRNA 序列如 Genbank 注册号 NM_000040.1 所示的基因。所述靶 mRNA 序列如 NM_000040.1 所示。

定义

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

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

在本文的上下文中，“互补”或“反向互补”一词可互相替代使用，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。

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；“完全互补”是指两段核苷酸序列之间不存在碱基错配。

在上文及下文中，一个核苷酸序列与另外一个核苷酸序列存在“核苷酸差异”，是指前者与后者相比，相同位置的核苷酸的碱基种类发生了改变，例如，在后者中一个核苷酸碱基为A时，在前者的相同位置处的对应核苷酸碱基为U、C、G或者T的情况下，认定为两个核苷酸序列之间在该位置处存在核苷酸差异。在一些实施方式中，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。

在上文及下文中，特别是在描述本公开的siRNA、含siRNA的组合物或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）。亚磷酰胺固相合成为本领域技术人员所公知的RNA合成中所用的方法。本公开所用的核苷单体均可商购得到。

在本公开的上下文中，除非另有说明，“缀合”是指两个或多个各自具有特定功能的化学部分之间以共价连接的方式彼此连接；相应地，“缀合物”是指该各个化学部分之间通过共价连接而形成的化合物。进一步地，“siRNA缀合物”表示一个或多个具有特定功能的化学部分共价连接至siRNA上而形成的化合物。在下文中，有时也将本公开的siRNA缀合物简称为“缀合物”。siRNA缀合物应根据上下文，理解为siRNA缀合物的总称、第一种siRNA缀合物或第二种siRNA缀合物。在本公开的上下文中，“缀合分子”应当理解为可通过反应缀合至siRNA，最终形成本公开的siRNA缀合物的特定化合物。

如本文所使用的，不介于两个字母之间或两个符号之间的短横（“-”）是用于指示取代基附着点的位置。例如：-C_1-C_{10}烷基-NH_2通过C_1-C_{10}烷基而附着。

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，并且所述描述包括事件或状况发生的情况和其中不发生的情况。例如，“任选的取代的烷基”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/或内在不稳定的任何取代或取代型式。

如本文所使用的，“烷基”是指具有指定数量的碳原子的直链和支链，所述数量通常为1到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，C1-C6烷基包含1至6个碳原子的直链和支链烷基。当对具有特定数量的碳的烷基残基进行命名时，旨在涵盖所有具有该数量的碳的支链和直链形式；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、但具有两个附着点的残基。

如本文所使用的，“烯基”是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和支链或直链烷基，所述碳-碳双键是通过从母体烷基的相邻碳原子中除去一个氢分子而获得的。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、但具有两个附着点的残基。

如本文所使用的，“炔基”是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和支链或直链烷基，所述碳-碳三键是通过从母体烷基的相邻碳原子中除去两个氢分子而获得的。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、但有两个附着点的残基。

如本文所使用的，“烷氧基”是指通过氧桥附着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 个通过氧桥附着的碳原子。

如本文所使用的，“芳基”是指衍生自芳香族单环或多环烃环系统、通过从环碳原子中除去氢原子而形成的基团。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，其根据 Hückel 理论包含环状、离域的(4n+2)π-电子系统。芳基包括但不限于苯基、芴基和萘基等基团。亚芳基是芳基的一个子集，指与芳基相同、但具有两个附着点的残基。

如本文所使用的，“环烷基”是指非芳香碳环，通常具有 3 至 7 个环状碳原子。环可以是饱和的，或具有一个或多个碳-碳双键。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基和环己烯基，以及桥联和笼状环基团，如降冰片烷（norbornane）。

如本文所使用的，“卤素取代基”或“卤”指氟代、氯代、溴代和碘代，术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

如本文所使用的，“卤代烷基”是指指定数量的碳原子被一个或多个、直至最大允许数量的卤素原子取代的如上述所定义的烷基。卤代烷基的实例包括但不限于三氟甲基、二氟甲基、2-氟乙基和五氟乙基。

“杂环基”是指一个稳定的 3-到 18-元非芳香环基，包含 2-12 个碳原子和 1-6 个杂原子，所述杂原子选自氮、氧和硫。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。杂环自由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。杂环基可以通过环的任何原子附着至分子的其余部分。此类杂环基的实例包括但不限于：二噁烷基、噻吩基[1,3]二硫酰基、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异恶唑烷基、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-氧杂嘧啶基、恶唑烷基、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、四氢吡喃基、硫吗啉基、硫杂吗啉基、1-氧杂硫吗啉基和1,1-二氧杂硫吗啉基。

“杂芳基”指由 3-至 18-元芳香环自由基衍生而成的基团，其包含 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，根据 Hückel 理论，包含环状离域(4n+2)π-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。杂芳基通过环中的任何原子附着至分子的其余部分。杂芳基的实例包括但不限于：氮杂环庚三烯基、吖啶基、苯并咪唑基、苯并吲哚基、1,3-苯并二恶唑基、苯并呋喃基、苯并恶唑基、苯并[d]噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二恶唑基、苯并[b][1,4]恶唑基、1,4-苯并二恶唑基、苯并萘并呋喃基、苯并二唑基、苯并二氧杂苯基、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[3,2-d]嘧啶基、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑[1,2-a]吡啶基、咔唑基、噌啉基、环戊基[d]嘧啶基、6,7-二氢-5H-环戊基[4,5]噻吩[2,3-d]嘧啶基、5,6-二氢苯并[h]喹唑啉基、5,6-二氢苯并[h]辛诺林基、6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚[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[3,2-c]吡啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环庚烷[d]嘧啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛酸[d]哒嗪基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛酸[d]吡啶基、异噻唑基、吲唑基、咪唑基、吲哚基、异吲哚基、二氢吲哚基、异二氢氮茚基、异喹啉基、吲哚嗪基、异恶唑基、5,8-甲基-5,6,7,8-四氢喹唑啉基、萘啶酮基、1,6-萘啶酮基、恶二唑基、2-氧氮杂庚基、恶唑基、恶草酰基、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、吩恶嗪基、邻苯二甲酰基、蝶啶基、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、吡咯基、喹唑啉基、喹喔啉基、喹啉基、异喹啉基、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[2,3-d]嘧啶基、6,7,8,9四氢-5H-环庚烷[4,5]噻吩[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[2,3-d]嘧啶基、噻吩[3,2-d]嘧啶基、噻吩[2,3-c]普萘基和噻吩基。

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度对特定的反应条件不敏感，并且可以在分子中的该官能度上附加以及去除，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-苯基黄嘌呤-9-基（Pixyl）和 9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-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）和 TMTr（4,4’,4’’-三甲氧基三苯甲基）。

“受试者”一词，如本文所使用的，指任何动物，例如哺乳动物或有袋动物。本公开的主题包括但不限于人类、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、大鼠和任何种类的家禽。

如本文所使用的，“治疗方法”、“治疗”、“减轻”、或“改善”可在此处互换使用。这些术语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。

如本文所使用的，“防止”和“预防”可互换使用。这些术语指获得有益或期望的结果的方法，包括但不限于预防性益处。为了获得“预防性益处”，可将缀合物或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病理症状的受试者，即便可能该疾病的诊断尚未作出。

修饰的 siRNA

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。

本公开提供了一种能够抑制 APOC3 基因表达的修饰的 siRNA，所述修饰的 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链和反义链的每一个核苷酸均为修饰的核苷酸，其中，所述正义链和反义链均包含氟代修饰的核苷酸和非氟代修饰的核苷酸；所述正义链包含核苷酸序列Ⅰ，所述反义链包含核苷酸序列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含有核苷酸序列 A，所述核苷酸序列 A 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含有核苷酸序列 B，所述核苷酸序列 B 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'-CAAUAAAGCUGGACAAGAZ-3'（SEQ ID NO: 1）；

5'-Z'UCUUGUCCAGCUUUAUUG-3'（SEQ ID NO: 2），

其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 A 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 B 中包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；并且，所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 A 和核苷酸序列 B 中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 A 的第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸；并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 B 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 A 中氟代修饰的核苷酸不多于 5 个；所述核苷酸序列 B 中氟代修饰的核苷酸不多于 7 个。

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 A 的 3'端第 1 个核苷酸是位置对应于 SEQ ID NO:1 的 3'端第 1 个核苷酸的核苷酸。

在一些实施方式中，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。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 A 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 B 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 B 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核

苷酸差异包括 Z'_B 位置处的差异，且 Z'_B 选自 A、C 或 G。在一些实施方式中，所述核苷酸差异为 Z'_B 位置处的差异，Z'_B 选自 A、C 或 G。在一些实施方式中，Z_A 是与 Z'_B 互补的核苷酸。这些核苷酸差异并不会显著降低 siRNA 缀合物的靶基因抑制能力，而这些包含核苷酸差异的 siRNA 缀合物也在本公开的保护范围之内。

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

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 A 是 SEQ ID NO: 60 所示的核苷酸序列，核苷酸序列 B 是 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列：

5'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$-3'（SEQ ID NO: 60）；

5'- Z'$_B$UCUUGUCCAGCUUUAUUG-3'（SEQ ID NO: 61），

其中，所述 Z'_B 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z_A 选自 A、U、G 或 C，并且 Z'_B 是与 Z_A 互补的核苷酸；并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 A 的第 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 B 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方式中，该 siRNA 含有正义链和反义链，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，核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II 反向互补形成双链区，核苷酸序列 I 含有如 SEQ ID NO: 60 所示的核苷酸序列，核苷酸序列 II 含有如 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列：

5'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$-3'（SEQ ID NO: 60）；

5'- Z'$_B$UCUUGUCCAGCUUUAUUG-3'（SEQ ID NO: 61），

其中，所述 Z'_B 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z_A 选自 A、U、G 或 C，并且 Z'_B 是与 Z_A 互补的核苷酸；在一些实施方式中，Z_A 为 A，Z'_B 为 U；

并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的正义链中 SEQ ID NO: 60 的第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，siRNA 的正义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸；并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的反义链中 SEQ ID NO: 61 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，siRNA 的反义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸。

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。

在一些实施方式中，所述正义链和反义链长度相同，所述核苷酸序列 I 还含有核苷酸序列 III，所述核苷酸序列 II 还含有核苷酸序列 IV，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度

各自独立地为 1-4 个核苷酸；所述核苷酸序列 III 连接核苷酸序列 A 的 5’末端，所述核苷酸序列 IV 连接在核苷酸序列 B 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。

所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 可以互补或不互补，为了增加 siRNA 的稳定性，在一些实施方式中，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 至少部分互补；在一些实施方式中，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 80%以上的碱基互补，或者 90%以上的碱基互补；在一些实施方式中，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 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；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。由此，所述 siRNA 正义链和反义链等长，其长度比为 20/20、21/21、22/22 或 23/23。在一些实施方式中，所述 siRNA 正义链和反义链的长度比为 21/21 或 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 的碱基依次为 C、C，核苷酸序列 IV 的碱基依次为 G、G；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 的碱基依次为 U、C、C，核苷酸序列 IV 的碱基依次为 G、G、A；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 的碱基依次为 C、U、C、C，核苷酸序列 IV 的碱基依次为 G、G、A、G；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 的碱基依次为 C、C，核苷酸序列 IV 的碱基依次为 G、G；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21。

在一些实施方式中，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度相同，并且完全反向互补，因此，给出了核苷酸序列 III 的碱基，核苷酸序列 IV 的碱基也就确定了。

在一些实施方式中，所述正义链和反义链长度不同，所述核苷酸序列 II 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，连接在反义链的 3’末端，构成反义链的 3’ 悬垂末端。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。

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（TT）或连续的 2 个尿嘧啶核糖核苷酸（UU）；为了提高 siRNA 反义链与靶 mRNA 的亲和力，核苷酸序列 V 与靶 mRNA 的相应位置的核苷酸互补。

在一些实施方式中，所述正义链含有如 SEQ ID No: 60 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列：

5’-CAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$-3’（SEQ ID No: 60）

5’-Z'_BUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG-3’（SEQ ID No: 3）

或者所述正义链含有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列：

5’-CCCAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$-3’（SEQ ID No: 4）

5’-Z'_BUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG-3’（SEQ ID No: 5）。

其中，所述 Z'_B 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z_A 选自 A、U、G 或 C，并且 Z'_B 是与 Z_A 互补的核苷酸。

在一些实施方式中，本公开所述的 siRNA 为 siAP1 或 siAP2：

siAP1

正义链：5’-CAAUAAAGCUGGACAAGAA-3’（SEQ ID No: 6）

反义链：5’-UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG-3’（SEQ ID No: 7）

siAP2

正义链：5’-CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA-3’（SEQ ID No: 8）

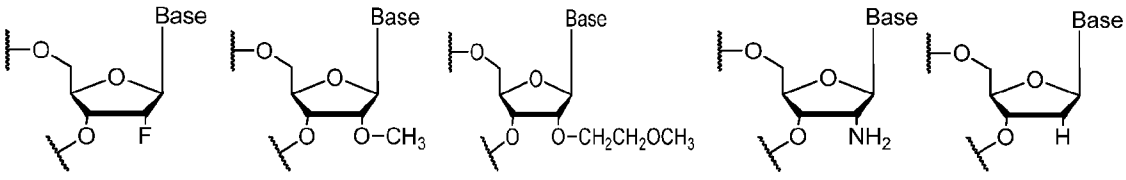
反义链：5’-UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG-3’（SEQ ID No: 9）。

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 A 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；在所述反义链中，所述核苷酸序列 B 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。

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（107）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。

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

在一些实施方式中，2'-烷氧基修饰的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸（2'-OMe），如式（108）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（109）所示。在一些实施方式中，2'-氨基修饰的核苷酸（2'-NH_2）如式（110）所示。在一些实施方式中，2'-脱氧核苷酸（DNA）如式（111）所示。

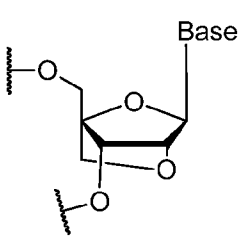


式（107） 式（108） 式（109） 式（110） 式（111）

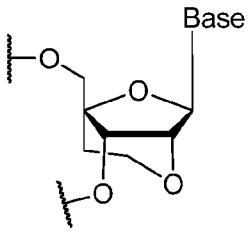
核苷酸类似物指能够在核酸中代替核苷酸，但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤

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。

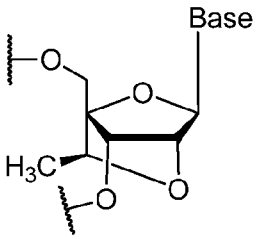
BNA 是指受约束的或不能接近的核苷酸。BNA 可以含有五元环、六元环、或七元环的具有“固定的”C3'-内切糖缩拢的桥联结构。通常将该桥掺入到该核糖的 2'-、4'-位处以提供一个 2', 4'-BNA 核苷酸。在一些实施方式中，BNA 可以是 LNA、ENA、cET BNA 等，其中，LNA 如式（112）所示，ENA 如式（113）所示，cET BNA 如式（114）所示。



式（112）

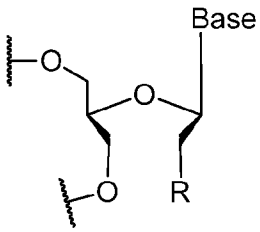


式（113）

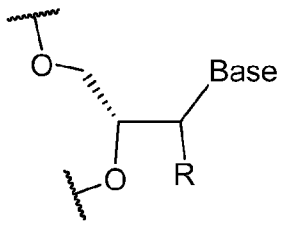


式（114）

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（115）所示，GNA 如式（116）所示。



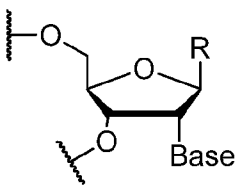
式（115）



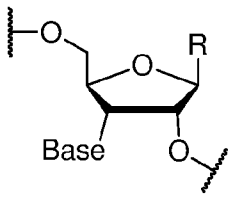
式（116）

上述式（115）和式（116）中，R 选自 H、OH 或烷氧基（O-烷基）。

异核苷酸是指核苷酸中碱基在核糖环上的位置发生改变而形成的化合物。在一些实施方式中，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（117）或（118）所示。



式（117）



式（118）

上述式（117）-式（118）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。

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，在上文和下文中，所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷

酸。

在上文及下文中，“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“2'-氟代核糖基”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（107）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“2'-甲氧基核糖基”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（108）所示结构的化合物。

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 A 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 B 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。

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 A 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 B 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 A 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 B 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。

换句话说，该 siRNA 的磷酸-糖骨架中的核糖基分别具有如下修饰基团：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 A 的第 5、7、8 和 9 位的糖基为 2’-氟代核糖基，siRNA 的正义链的其余位置核苷酸的糖基为 2’-甲氧基核糖基，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 B 的第 2、6、8、9、14 和 16 位的糖基为 2’-氟代核糖基，siRNA 的反义链其余位置核苷酸的糖基为 2’-甲氧基核糖基；

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 A 的第 7、8 和 9 位的糖基为 2’-氟代核糖基，siRNA 的正义链的其余位置核苷酸的糖基为 2’-甲氧基核糖基，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 B 的第 2、6、14 和 16 位的糖基为 2’-氟代核糖基，siRNA 的反义链其余位置核苷酸的糖基为 2’-甲氧基核糖基。

在一些实施方式中，所述 siRNA 分子为 siAP1-M1、siAP2-M1、siAP1-M2、siAP2-M2 中的任意一种：

siAP1-M1

正义链：5’- CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 10）

反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’ （SEQ ID NO: 11）

siAP2-M1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’ （SEQ ID NO: 12）

反义链： 5’-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm-3’（SEQ ID NO: 13）

siAP1-M2

正义链：5’- CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’ （SEQ ID NO: 14）

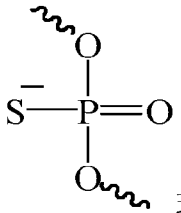
反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’（SEQ ID NO: 15）

siAP2-M2

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 16）

反义链：5’-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm-3’(SEQ ID NO: 17）

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（101）所示结构的硫代磷酸酯基：



式（101）。

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。

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：

所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及

所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

在一些实施方式中，所述 siRNA 为 siAP1-M1S、siAP2-M1S、siAP1-M2S、siAP2-M2S 中的任意一种：

siAP1-M1S

正义链：5’- CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 18）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’（SEQ ID NO: 19）

siAP2-M1S

正义链：5’- CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 20）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm-3’（SEQ ID NO: 21）

siAP1-M2S

正义链：5’- CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’ （SEQ ID NO: 22）

反义链：5’-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm-3’（SEQ ID NO: 23）

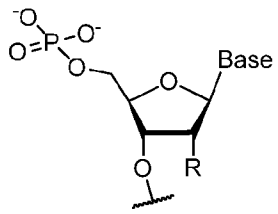
siAP2-M2S

正义链：5’-CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 24）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’ （SEQ ID NO: 25）

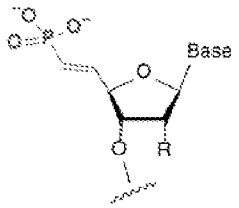
在一些实施方式中，所述 siRNA 反义链的 5’末端核苷酸为 5’-磷酸核苷酸或 5’-磷酸类似物修饰的核苷酸。

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

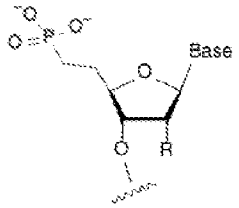


式（102）；

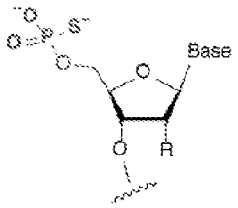
再如，Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48 中公开了如下 4 种 5’-磷酸类似物修饰的核苷酸：



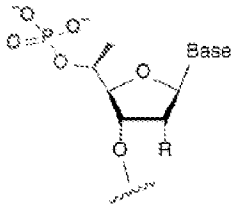
式（103）



式（104）



式（105）



式（106）

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。

在一些实施方式中，5'-磷酸核苷酸为式（102）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（103）所示，或者为硫代磷酸酯修饰的核苷酸，如式（105）所示。

在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA 可以为 siAP1-M1P1、siAP2-M1P1、siAP1-M2P1、siAP2-M2P1、siAP1-M1SP1、siAP2-M1SP1、siAP1-M2SP1、siAP2-M2SP1 中的任意一种：

siAP1-M1P1

正义链：5’- CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’ （SEQ ID NO: 10）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’ SEQ ID NO: 26）

siAP2-M1P1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’ （SEQ ID NO: 12）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’ （SEQ ID NO: 27）

siAP1-M2P1

正义链：5’- CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’ （SEQ ID NO: 14）

反义链：5’-P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm-3’（SEQ ID NO: 28）

siAP2-M2P1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 16）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’ （SEQ ID NO: 29）

siAP1-M1SP1

正义链：5’- CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’ （SEQ ID NO: 18）

反义链：5’-P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm-3’（SEQ ID NO: 30）

siAP2-M1SP1

正义链：5’- CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 20）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’ （SEQ ID NO: 31）

siAP1-M2SP1

正义链：5’- CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’ （SEQ ID NO: 22）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’ （SEQ ID NO: 32）

siAP2-M2SP1

正义链：5’-CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 24）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’ （SEQ ID NO: 33）

本公开的发明人发现，本公开提供的 siRNA 不仅具有显著增强的血浆和溶酶体稳定性，减少了脱靶效应，还保留很高的基因抑制活性。

本公开提供的 siRNA 可以通过本领域常规的核酸制备方法（例如固相合成和液相合成的方法）得到。其中，固相合成已经有商业化订制服务。可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入本公开所述的 siRNA 中，制备具有相应修饰的核苷单体的方法及将修饰的核苷酸基团引入 siRNA 的方法也是本领域技术人员所熟知的。

药物组合物

本公开提供了一种药物组合物，该药物组合物含有如上所述的修饰的 siRNA 和药学上可接受的载体。

所述药学上可接受的载体可以是 siRNA 给药领域常规使用的载体，例如但不限于磁性纳米粒（magnetic nanoparticles，如基于 Fe_3O_4 或 Fe_2O_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。

在一些实施方式中，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，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，上述重量比为为 1:（1-50）。

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。

所述 pH 缓冲液可以为 pH 值 7.5-8.5 的三羟甲基胺基甲烷盐酸盐缓冲液和/或 pH 值 5.5-8.5 的磷酸盐缓冲液，例如可以为 pH 值 5.5-8.5 的磷酸盐缓冲液。

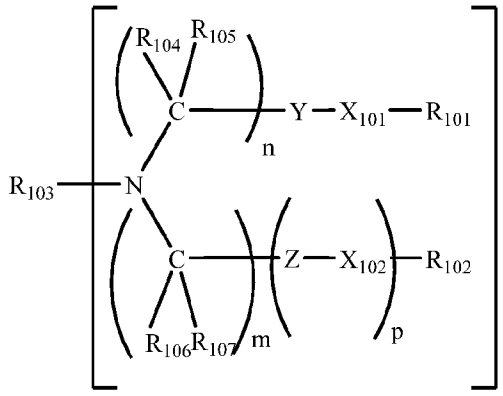
所述保护剂可以为肌醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖和葡萄糖中的至少一种。以所述药物组合物的总重量为基准，所述保护剂的含量可以为 0.01-30 重量%。

所述渗透压调节剂可以为氯化钠和/或氯化钾。所述渗透压调节剂的含量使所述药物组合物的渗透压为 200-700 毫渗摩尔/千克（mOsm/kg）。根据所需渗透压，本领域技术人员可以容易地确定所述渗透压调节剂的含量。

在一些实施方式中，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。

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。

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：



式（201），

其中：

X_{101} 和 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；

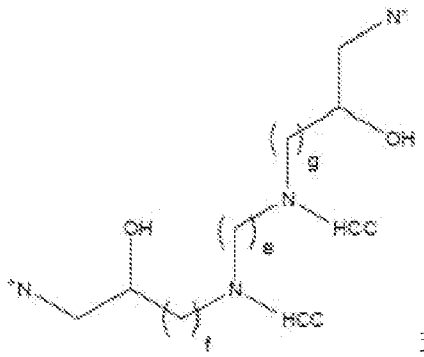
Y 和 Z 各自独立地是 C=O、C=S、S=O、CH-OH 或 SO_2；

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

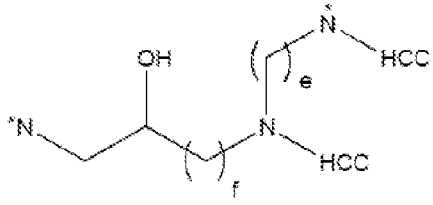
x 是 1-10 的整数；

n 是 1-3 的整数，m 是 0-20 的整数，p 是 0 或 1；其中，如果 m=p=0，则 R_{102} 是氢；

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：



式（202），

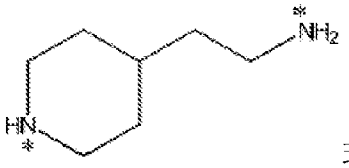


式（203）；

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

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。

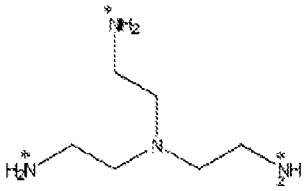
在一些实施方式中，如果 n 和 m 中的每一个独立地具有 1 或 3 的值，那么 R_{103} 可以是下述式（204）-式（213）中的任一个：



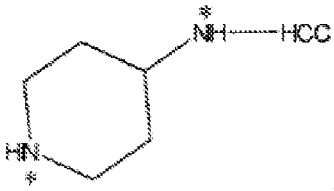
式（204），



式（205），



式（206），



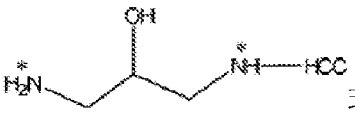
式（207），



式（208），



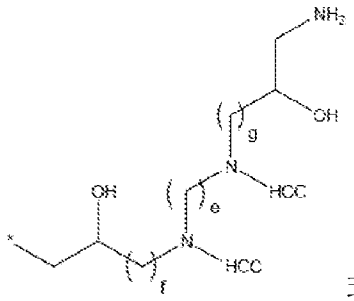
式（209），



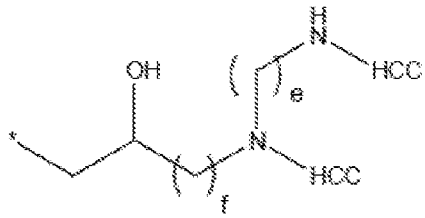
式（210），



式（211），



式（212）和

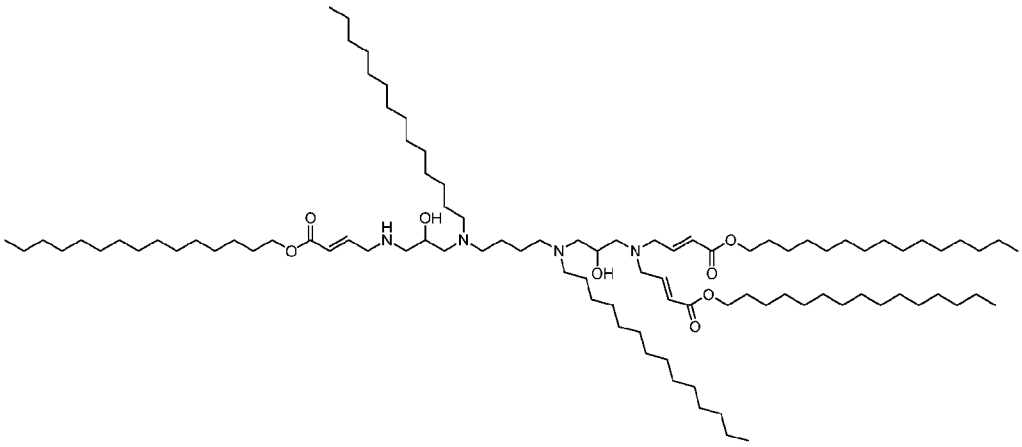


式（213）；

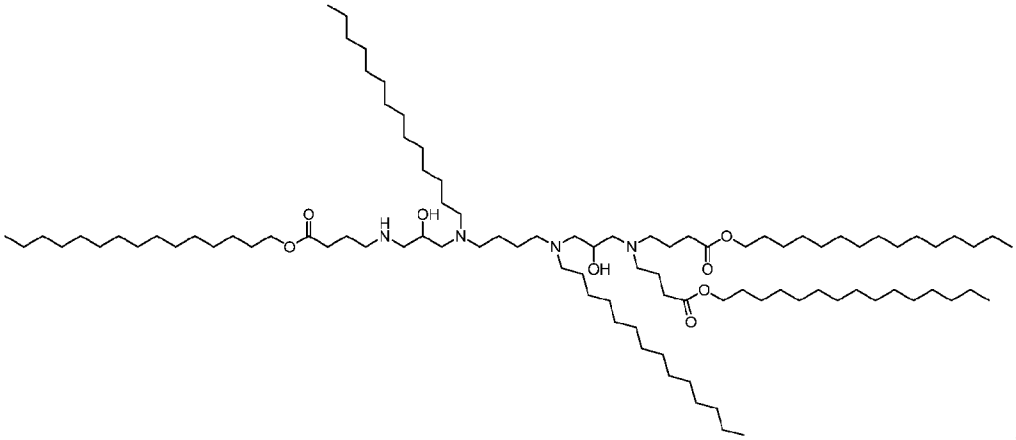
其中，式（204）-式（213）中，g、e 和 f 各自独立地是 1-6 的整数，每个“HCC”代表烃链，且每个*显示 R_{103} 与在式（201）中的氮原子的可能连接点，其中在任意*位置上的每个 H 可以被替换以实现与在式（201）中的氮原子的连接。

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

在一些实施方式中，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），



式（215）；

所述辅助脂质为胆固醇、胆固醇的类似物和/或胆固醇的衍生物；

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

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）。

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。

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。

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：

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。

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

将脂质溶液和 siRNA 水溶液混合，将混合后得到的产物在 40-60℃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)，例如可以为 1:4。

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

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

第一种 siRNA 缀合物

本公开提供了一种 siRNA 缀合物，所述第一种 siRNA 缀合物含有上述 siRNA 以及缀合连接至该 siRNA 的缀合基团。

一般来说，所述缀合基团包含药学上可接受的至少一个靶向基团和任选的接头（linker），并且，所述 siRNA、所述接头和所述靶向基团依次连接。在一些实施方式中，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。

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 Muthiah Manoharan *et.al.* siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10 (5): 1181-7。

在一些实施方式中，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。

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 WO2009082607A2 中描述的各种配体，以引用的方式将其全部公开内容并入本文。

在一些实施方式中，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。

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。

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。

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葡萄糖及其衍生物组、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

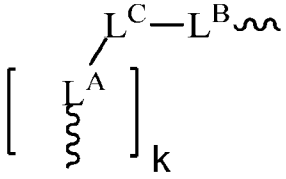
藻糖及其衍生物、乳糖及其衍生物、麦芽糖及其衍生物，阿拉伯糖及其衍生物、果糖及其衍生物和唾液酸组成的组中。

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

在一些实施方式中，所述第一种 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。

靶向基团可经由合适的接头与 siRNA 分子相连，本领域技术人员可以根据靶向基团的具体类型选择合适的接头。这些接头、靶向基团的种类以及与 siRNA 的连接方式，可参见 WO2015006740A2 的公开内容，通过引用的方式将其整体内容并入本文。

在一些实施方式中，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：

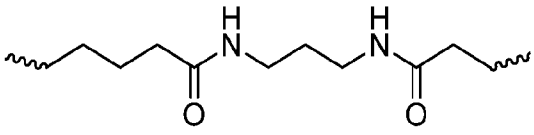


式（301）

其中，

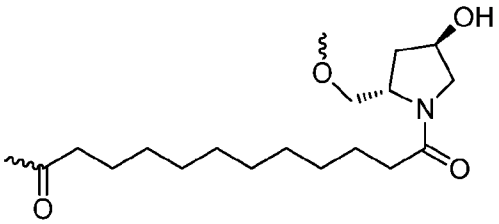
k 为 1-3 的整数；

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：



式（302）；

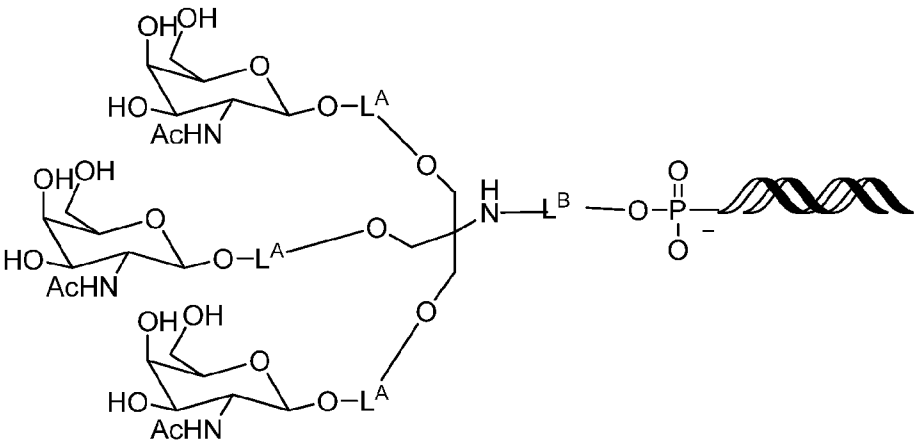
L^B 为具有如式（303）所示结构的包含 N-酰基吡咯烷的链状部分，所述链状部分在其一端具有羰基并与所述 L^C 部分通过酰胺键相连接，在另一端具有氧基并与所述 siRNA 通过磷酸酯键相连接：



式（303）；

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。

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 分子所形成的第一种 siRNA 缀合物，其结构如下式（304）所示：

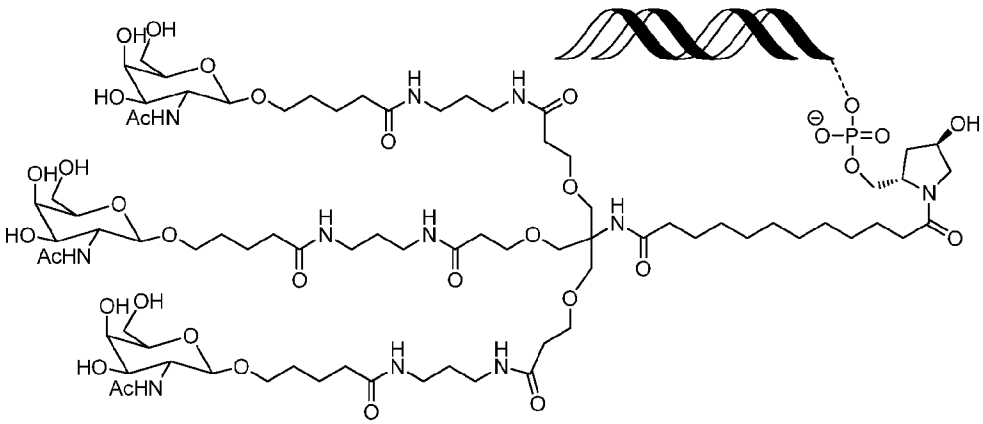


式（304），

式中，双螺旋结构表示 siRNA。

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

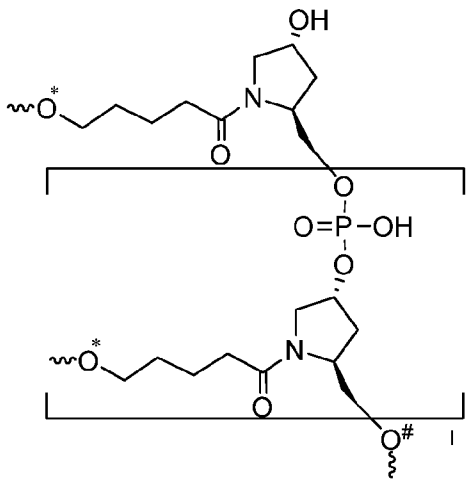
在一些实施方式中，本公开所述 siRNA 的正义链 3'末端通过接头-$(L^A)_3$ 三羟甲基氨基甲烷-L^B-与三个 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）分子共价缀合，得到 siRNA 分子与 GalNAc 分子的摩尔比为 1:3 的第一种 siRNA 缀合物，下文也可将其称为$(GalNAc)_3$-siRNA，其结构如下式（305）所示：



式（305），

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

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：



，式（306）

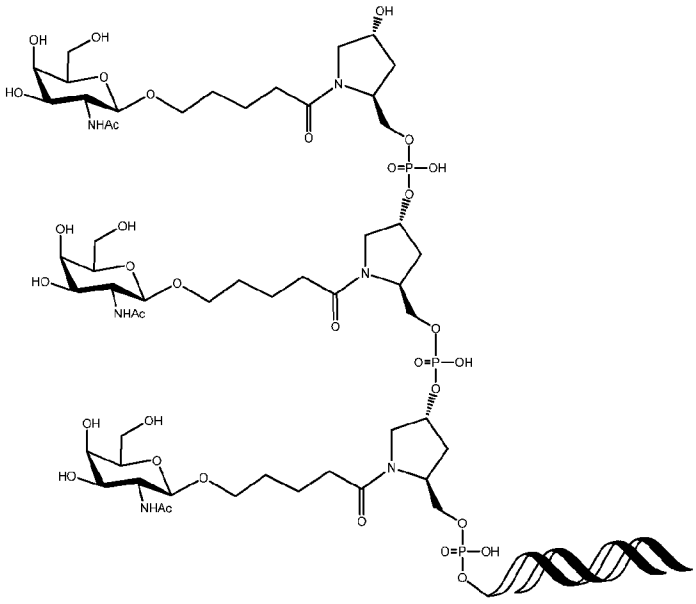
其中，

l 为 0-3 的整数；

*表示接头上通过醚键与靶向基团连接的位点；

#表示接头上通过磷酸酯键与 siRNA 连接的位点。

在一些实施方式中，当 l=2 时，所述第一种 siRNA 缀合物具有如式（307）所示的结构：



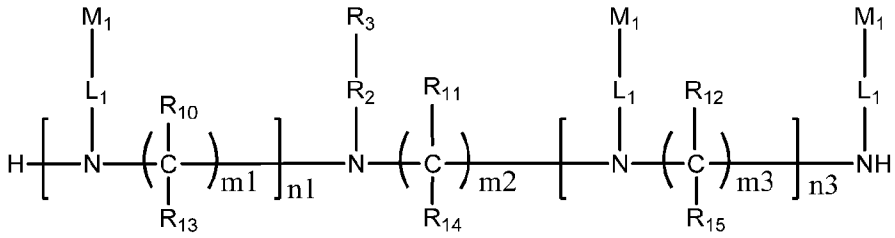
式（307），

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

上述缀合物可以通过现有技术中已经详细描述的方法进行合成。例如，WO2015006740A2 中详细描述了多种缀合物的制备方法。通过本领域技术人员熟知的方式，获得本公开的第一种 siRNA 缀合物。如 WO2014025805A1 中记载了式（305）所示结构的制备方法，Rajeev 等人在 ChemBioChem 2015, 16, 903-908 中描述了式（307）所示结构的制备方法。

第二种 siRNA 缀合物

在一些实施方式中，本公开提供了第二种 siRNA 缀合物，该第二种 siRNA 缀合物具有如式（1）所示的结构：



式（1），

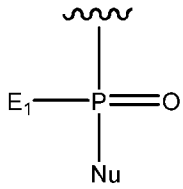
其中：

n1 为选自 1-3 的整数，n3 为选自 0-4 的整数；

m1、m2 和 m3 独立地为选自 2-10 的整数；

R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14} 和 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；

Nu 代表的 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，Nu 代表的 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 1 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 2 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'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ -3'（SEQ ID NO: 1），

5'- Z'UCUUGUCCAGCUUUAUUG -3'（SEQ ID NO: 2）；

其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 1 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 2 中包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

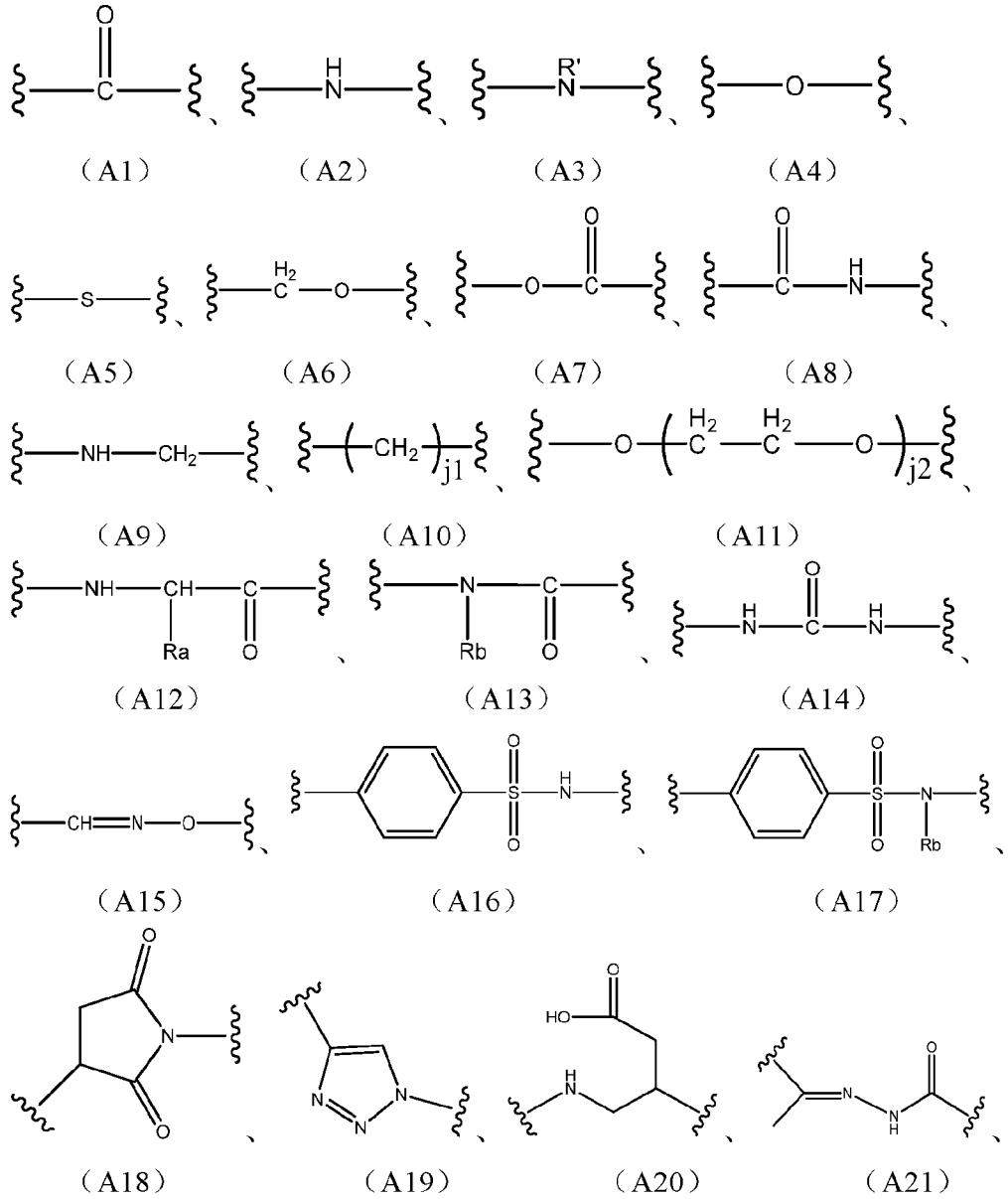
在上文与下文中，“位置对应”是指从核苷酸序列相同端起算，处于核苷酸序列中相同的位置。例如，核苷酸序列 1 的 3'端第 1 个核苷酸是位置对应于 SEQ ID NO:1 的 3'端第 1 个核苷酸的核苷酸。

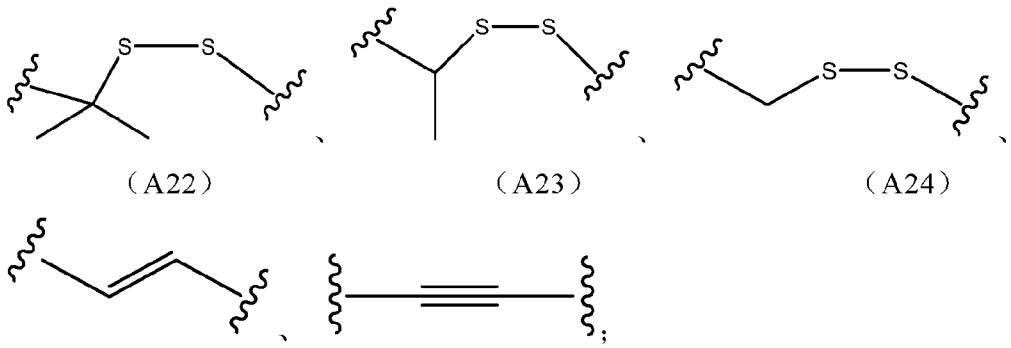
R_2 是长度为 1-20 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、C_2-C_{10} 亚烯基、C_2-C_{10} 亚炔基、C_6-C_{10} 亚芳基、C_3-C_{18} 亚杂环基和 C_5-C_{10} 亚杂芳基；并且其中，R_2 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C_1-C_{10} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、C_5-C_{10} 杂芳基、C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC_1-C_{10} 烷基、-OC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 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_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)、氰基、硝基、-CO2H、-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 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、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)、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)。

在一些实施方式中，L_1 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：





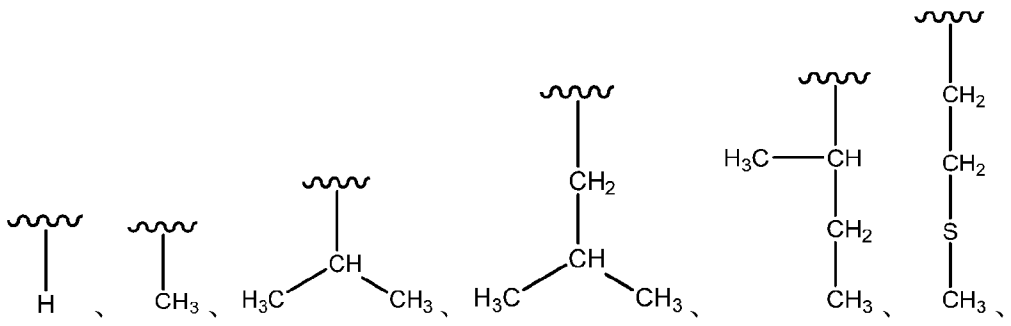
（A22） （A23） （A24）

（A25） （A26）

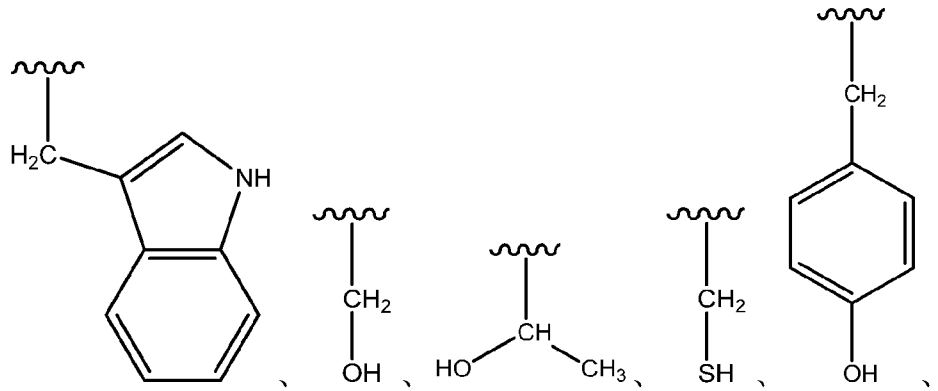
其中，j1 为 1-20 的整数；j2 为 1-20 的整数；

R’为 C_1-C_{10} 的烷基；

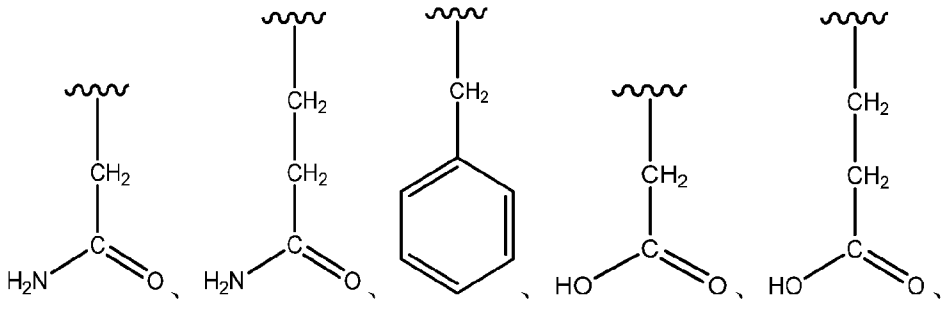
Ra 选自式 A27-A45 基团或其任意组合所组成的组：



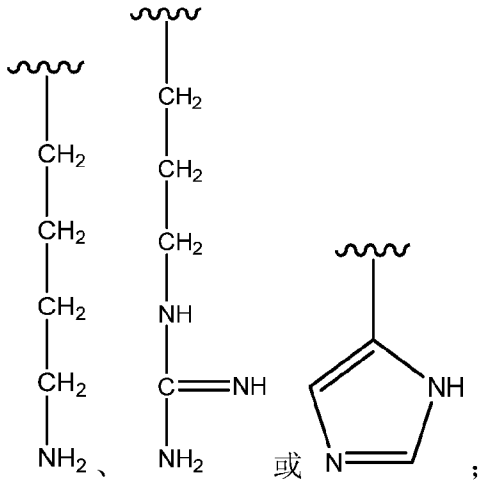
（A27） （A28） （A29） （A30） （A31） （A32）



（A33） （A34） （A35） （A36） （A37）



（A38） （A39） （A40） （A41） （A42）



（A43） （A44） （A45）

Rb 为 C_1-C_{10} 的烷基； 表示基团连接至分子其余部分的位点。

技术人员会理解的是，尽管为了方便起见，L_1 被定义为线性烷基，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/或置换而产生的胺或烯基。为了本公开内容的目的，L_1 的长度是连接两个附着点的链中的原子数。为此目的，将替换所述直链亚烷基的碳原子而得到的环（如亚杂环基或亚杂芳基）计为一个原子。

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

当 M_1 为对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体时，在一些实施方式中，n1 可以是 1-3 的整数，n3 可以是 0-4 的整数，保证所述缀合物中 M_1 靶向基团的个数至少为 2；在一些实施方式中，n1+n3≥2，这样可以使得 M_1 靶向基团的个数至少为 3，从而使得 M_1 靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体更容易结合，进而促进所述缀合物通过内吞作用进入细胞。实验表明，当 M_1 靶向基团的个数大于 3 个时，M_1 靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体结合的容易程度增加并不明显，因此，从合成容易程度、结构/工艺成本和递送效率等多方面综合考虑，在一些实施方式中，n1 为 1-2 的整数，n3 为 0-1 的整数，且 n1+n3=2-3。

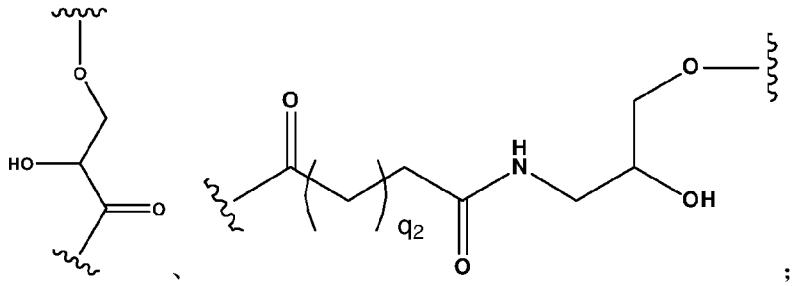
在一些实施方式中，m1、m2 和 m3 独立地选自 2-10 的整数时，可以使多个 M_1 靶向基团之间的空间位置适合 M_1 靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体的结合，为了使本公开提供的缀合物更为简单，更容易合成和/或降低成本，在一些实施方式中，m1、m2 和 m3 各自独立地为 2-5 的整数，在一些实施方式中，m1=m2=m3。

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

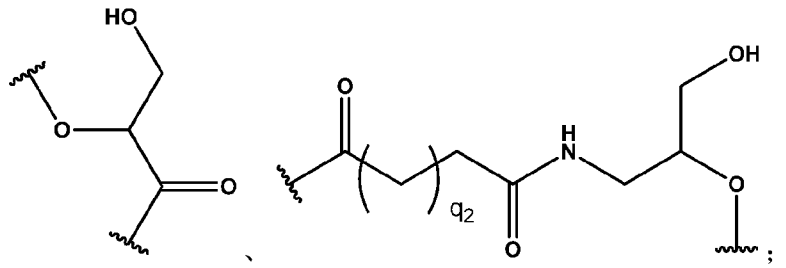
R_3 为式 A59 所示结构的基团，其中，E_1 为 OH、SH 或 BH_2，基于制备原料易获取性

的考虑，在一些实施方式中，E_1 为 OH 或 SH。

R_2 的选择是为了实现与含氮骨架上的 N 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 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 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第二种 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 连接的连接位点和与 R_3 中的 P 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 连接的位点与 N 形成酰胺键，所述与 R_3 上的 P 连接的位点与 P 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），



（B5’）、（B6’），

其中，～～～表示基团共价键连接的位点。

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。

L_1 的作用是将 M_1 靶向基团与含氮骨架上的 N 连接，为第二种 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。

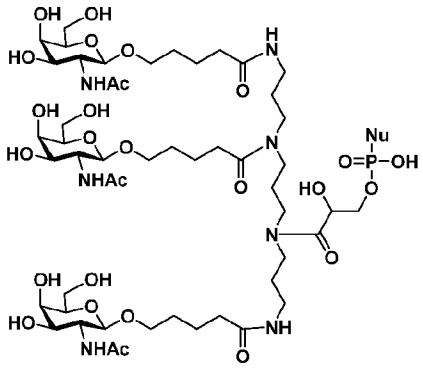
在一些实施方式中，L_1 的长度可以为 3-25 个原子，3-20 个原子、4-15 个原子或 5-12 个原子。在一些实施方式中，L_1 的长度为 3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个、23 个、24 个、25 个、30 个、35 个、40 个、45 个、50 个、55 个、60 个原子。

技术人员会理解，尽管为了方便起见，L_1 被定义为线性烷基，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/或置换而产生的胺或烯基。为了本公开内容的目的，L_1 的长度是连接两个附着点的链中的原子数。为此目的，将替换所述直链亚烷基

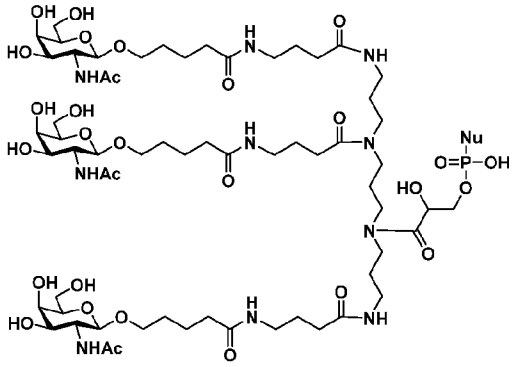
的碳原子而得到的环(如亚杂环基或亚杂芳基)计为一个原子。

在一些实施方式中，j1 为 2-10 的整数，在一些实施方式中，j1 为 3-5 的整数。在一些实施方式中，j2 为 2-10 的整数，在一些实施方式中，j2 为 3-5 的整数。R'为 C1-C4 的烷基，在一些实施方式中，R'为甲基、乙基和异丙基中的一种。Ra 为 A27、A28、A29、A30 和 A31 中的一种，在一些实施方式中，Ra 为 A27 或 A28。Rb 为 C1-C5 的烷基，在一些实施方式中，Rb 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 j1、j2、R'、Ra、Rb 进行选择，以实现 M_1 靶向基团与含氮骨架上的 N 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。

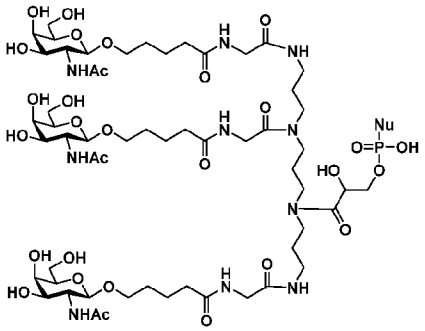
在一些实施方式中，该缀合物具有式（3）、（4）、（5）、（6）、（7）、（8）、（9）、（10）、（11）、（12）、（13）、（14）、（15）、（16）、（17）、（18）、（19）、（20）、（21）或（22）所示的结构：



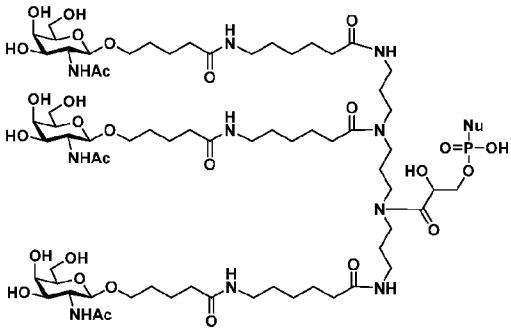
式（3）



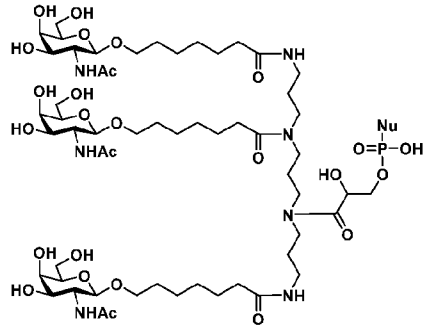
式（4）



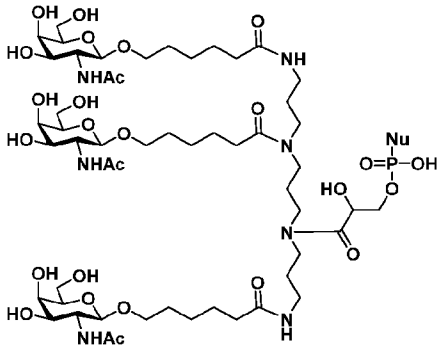
式（5）



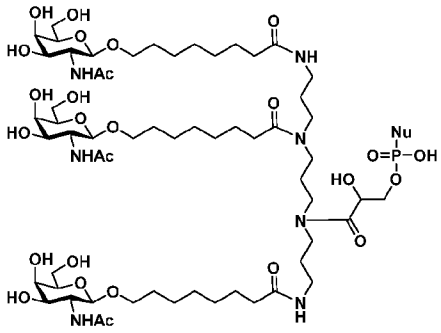
式（6）



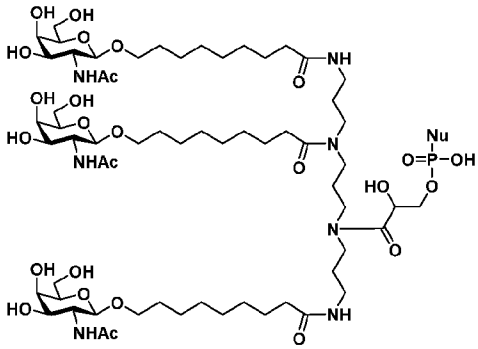
式（7）



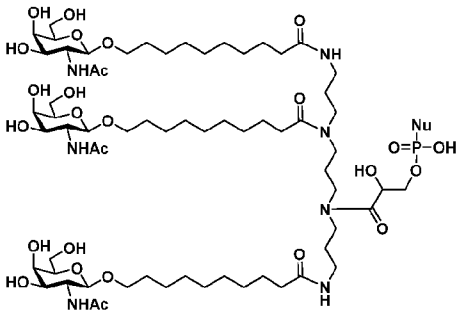
式（8）



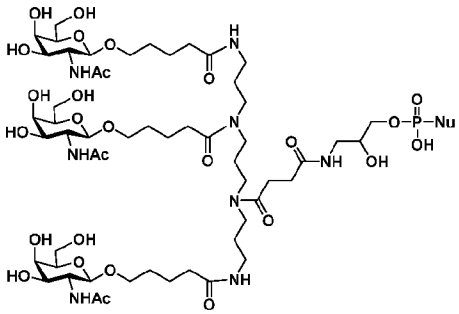
式（9）



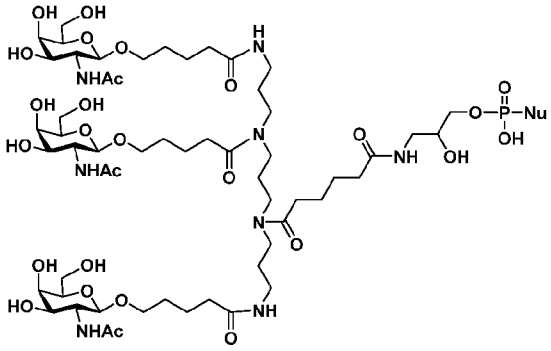
式（10）



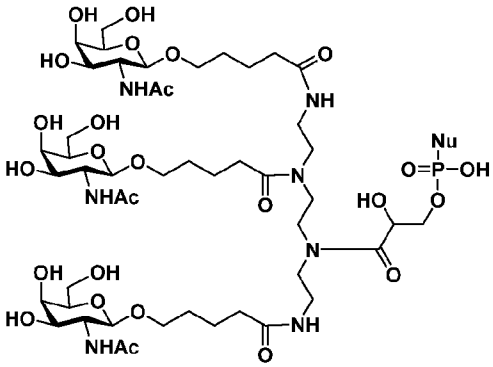
式（11）



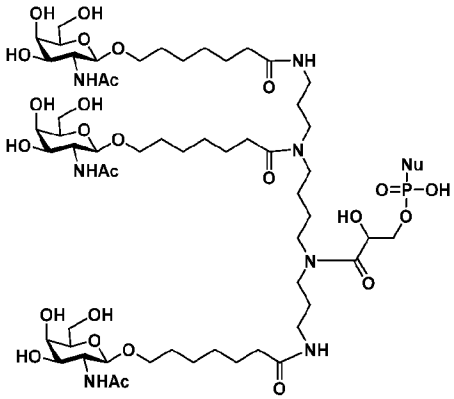
式（12）



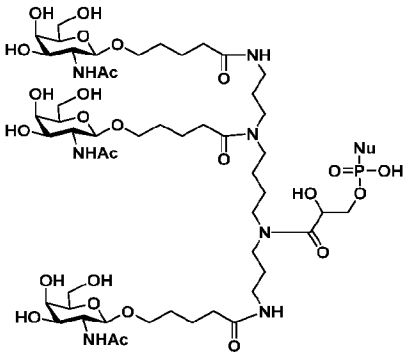
式（13）



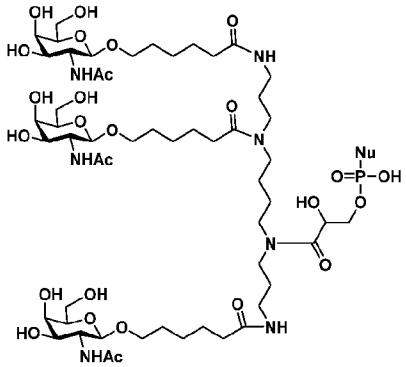
式（14）



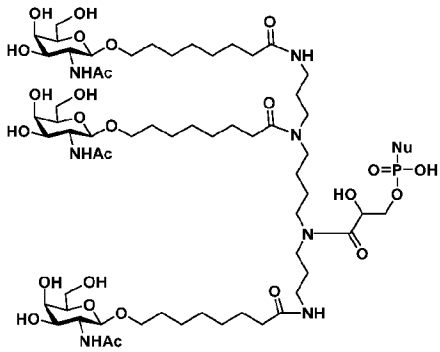
式（15）



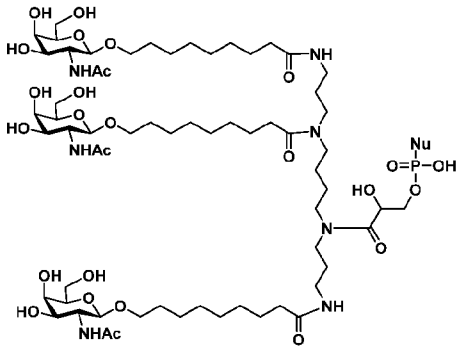
式（16）



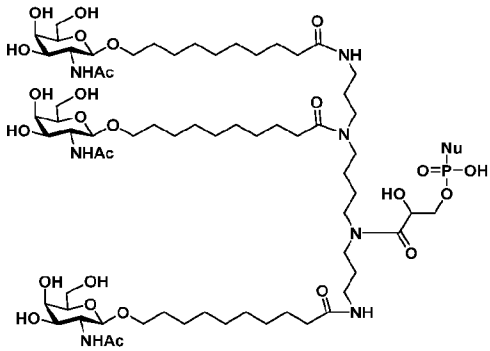
式（17）



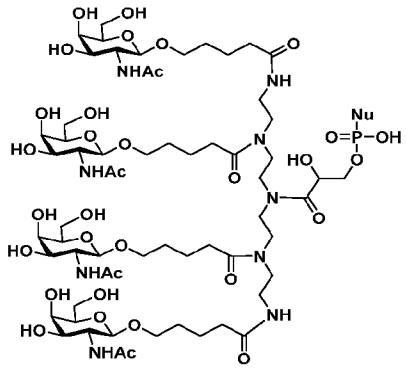
式（18）



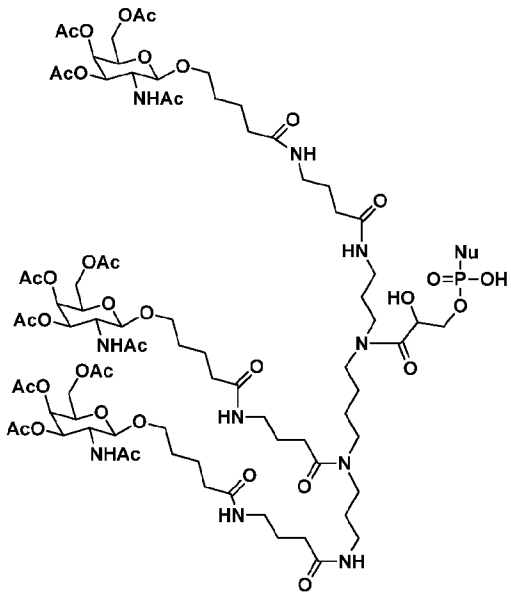
式（19）



式（20）



式（21）



式（22）。

在一些实施方式中，式 A59 中的 P 可以连接到 Nu 代表的 siRNA 序列中任何可能的位置，例如，式 A59 中的 P 可以连接到 Nu 代表的 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 可以连接到 Nu 代表的 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 连接到 Nu 代表的 siRNA 正义链或反义链的端部；在一些实施方式中，式 A59 中的 P 连接到 Nu 代表的 siRNA 正义链的端部。Nu 代表的 siRNA 的端部指 Nu 代表的 siRNA 正义链或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 连接到 Nu 代表的 siRNA 正义链或反义链的末端；在一些实施方式中，式 A59 中的 P 连接到 Nu 代表的 siRNA 中的正义链的 3'末端。在连接至 Nu 代表的 siRNA 的正义链的上述位置的情况下，第二种 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 APOC3 mRNA 翻译蛋白质的过程，抑制载脂蛋白 C3（ApoC3）基因表达。

在一些实施方式中，式 A59 中的 P 可以连接到 Nu 代表的 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 可通过形成磷酸二酯键而连接至 Nu 代表的 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 连接在 Nu 代表的 siRNA 正义链 3'末端核苷酸的 3'羟基脱氢后形成的氧原子上，或者式 A59 中的 P 通过取代 Nu 代表的 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 通过取代 Nu 代表的 siRNA 正义链 5'末端核苷酸的 5'羟基中的氢与核苷酸连接。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 2 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 2 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z'_B 位置处的差异，且 Z'_B 选自 A、C 或 G；在一些实施方式中，所述核苷酸差异为 Z'_B 位置处的差异，Z'_B 选自 A、C 或 G；在一些实施方式中，Z_A 是与 Z'_B 互补的核苷酸。这些核苷酸差异并不会显著降低第二种 siRNA 缀合物的靶基因抑制能力，而这些包含特定核苷酸差异的第二种 siRNA 缀合物也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补。所述基本上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 3 个的碱基错配；所述实质上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 1 个的碱基错配；完全反向互补是指两个核苷酸序列之间没有错配。

在一些实施方式中，所述正义链还含有核苷酸序列 3，所述反义链还含有核苷酸序列 4，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度各自独立地为 1-4 个核苷酸，并且所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的位置相对应。在一些实施方式中，核苷酸序列 4 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸至少部分互补，在一些实施方式中，核苷酸序列 4 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸完全互补。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 连接在所述核苷酸序列 1 的 5'末端，并且所述核苷酸序列 4 连接在所述核苷酸序列 2 的 3'末端。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 长度相等并且反向互补。因此，所述正义链和反义链的长度可以是 19-23 个核苷酸。

一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 1 个核苷酸，所述核苷酸序列 3 的碱基为 C，此时，所述双链区的长度可以是 20 个核苷酸，即所述正义链和反义链的长度之比可以是 20/20；或者，

所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 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 3 的碱基依次为 C 和 C，此时，所述双链区的长度可以是 21 个核苷酸，即所述正义链和反义链的长度之比可以是 21/21；或者，

所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 U、C 和 C，此时，所述双链区的长度可以是 22 个核苷酸，即所述正义链和反义链的长度之比可以是 22/22；或者，

所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 C、U、C 和 C，此时，所述双链区的长度可以是 23 个核苷酸，即所述正义链和反义链的长度之比可以是 23/23。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 的长度为 2 个核苷酸，并且按照 5'末端到 3'末

端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 C 和 C。

应当理解的是，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度相同，并且互补，因此，给出了核苷酸序列 3 的碱基，核苷酸序列 4 的碱基也就确定了。

在一些实施方式中，式（1）中 Nu 代表的 siRNA 中还含有核苷酸序列 5，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 至 3 个核苷酸，连接在所述反义链的 3'末端，从而构成所述反义链的 3'突出端。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 或 2 个核苷酸。这样，Nu 代表的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比可以是 19/20、19/21、20/21、20/22、21/22、21/23、22/23、22/24、23/24 或 23/25。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 2 个核苷酸，并且按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 5 为连续的 2 个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸、连续的 2 个尿嘧啶核糖核苷酸、或者与靶 mRNA 互补的两个核苷酸。因此，在一些实施方式中，Nu 代表的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比为 19/21 或 21/23，此时，含有该 siRNA 的缀合物具有更好的 APOC3 mRNA 沉默活性。

在一些的实施方式中，所述正义链含有如 SEQ ID NO: 60 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列：

5’- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$ -3’（SEQ ID NO: 60）；

5’- Z'$_B$UCUUGUCCAGCUUUAUUGGG-3’（SEQ ID NO: 3）；

或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列：

5’- CCCAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$ -3’（SEQ ID NO: 4）；

5’- Z'$_B$UCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG -3’（SEQ ID NO: 5）；

其中，所述 Z'$_B$ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z$_A$ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z'$_B$ 是与 Z$_A$ 互补的核苷酸。

在一些实施方式中，Nu 代表的 siRNA 为 siAP1 或 siAP2：

siAP1

正义链：5’- CAAUAAAGCUGGACAAGAA -3’ （SEQ ID NO: 6）；

反义链：5’- UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG -3’ （SEQ ID NO: 7）；

siAP2

正义链：5’- CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA -3’ （SEQ ID NO: 8）；

反义链：5’- UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG -3’ （SEQ ID NO: 9）。

如前所述，式（1）中 Nu 代表的 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，Nu 代表的 siRNA 中的核苷酸为未经修饰的核苷酸；在一些实施方式中，Nu 代表的 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第二种 siRNA 缀合物抑制 APOC3 基因表达的功能明显削弱或丧失。

在一些实施方式中，缀合物中的 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，或者核苷酸上的碱基是经修饰的碱基的核苷酸。所述修饰的核

苷酸不会导致 siRNA 缀合物抑制基因表达的功能明显削弱或丧失。例如，可以选择 J.K. Watts, G.F. Deleavey, and M.J. Damha, Chemically modified siRNA: tools and applications. Drug Discov Today, 2008, 13(19-20): 842-55 中公开的修饰的核苷酸。

在一些实施方式中，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，换句话说，所述正义链和所述反义链中至少一条单链的磷酸-糖骨架中的磷酸酯基和/或核糖基的至少一部分为具有修饰基团的磷酸酯基和/或具有修饰基团的核糖基。

在一些实施方式中，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，正义链和所述反义链中的每一个核苷酸独立地为氟代修饰的核苷酸或非氟代修饰的核苷酸。

本公开的发明人惊奇地发现，当第二种 siRNA 缀合物中 Nu 代表的 siRNA 是如下 siRNA 时，在动物实验中获得了血浆中稳定性和基因沉默效率的高度平衡：

在一些实施方式中，所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 1 和核苷酸序列 2 中，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 的第 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 2 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 中氟代修饰的核苷酸不多于 5 个；在一些实施方式中，所述核苷酸序列 2 中氟代修饰的核苷酸不多于 7 个。

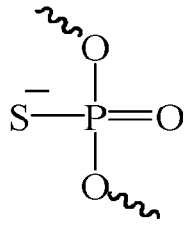
在一些实施方式中，按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述正义链中，所述核苷酸序列 1 的第 7、8、9 位或者 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸；按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14、16 位或者 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸。

氟代修饰的核苷酸及非氟代修饰的核苷酸各自的定义和可选择的范围如前所述。

在一些实施方式中，按照 5’末端到 3’末端的方向，Nu 代表的 siRNA 的正义链中核苷酸序列 1 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，Nu 代表的 siRNA 的反义链中核苷酸序列 2 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，Nu 代表的 siRNA 的正义链中核苷酸序列 1 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，Nu 代表的 siRNA 的反义链中核苷酸序列 2 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。

在一些实施方式中，所述核苷酸具有磷酸基团修饰。在一些实施方式中，磷酸基团修饰为如下式（101）所示的硫代磷酸（phosphorthioate）修饰，即，用一个硫原子取代磷酸二酯键中的非桥氧原子，从而以硫代磷酸二酯键替换磷酸二酯键。该修饰能稳定 siRNA 的结构，保持碱基配对的高特异性和高亲和力。



式（101）

在一些实施方式中，Nu 代表的 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：

所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

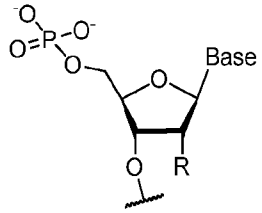
所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及

所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

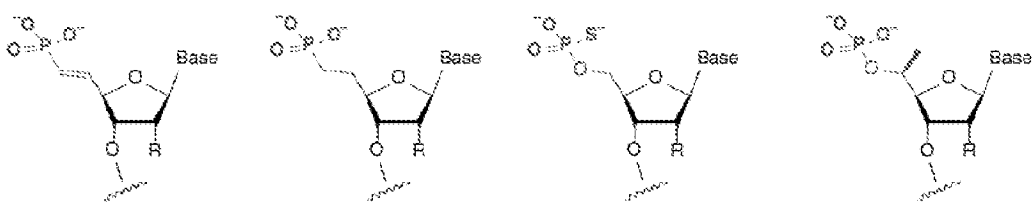
在一些实施方式中，Nu 代表的 siRNA 分子的反义链序列 5'末端核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸。

如本领域技术人员所熟知的，5'-磷酸核苷酸可具有以下结构：



式（102）；

同时，常用的所述 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸的种类是本领域技术人员公知的，例如，Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48 中公开的如下 4 种核苷酸：



式（103） 式（104） 式（105） 式（106），

其中，R 表示选自于由 H、OH、F 和甲氧基所组成的组的基团；

Base 表示选自 A、U、C、G 或 T 的碱基。

在一些实施方式中，5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸为式（102）所示的含有 5'-磷酸修饰的核苷酸、式(103)所示的含有乙烯基磷酸酯(E-vinylphosphonate，E-VP）的核苷酸或式（105）所示的含有 5'-硫代磷酸修饰的核苷酸。

本公开的发明人意外发现，本公开的第二种 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，还表现出并未明显降低的 APOC3 mRNA 沉默活性，而且还具有较高的血脂抑制作用。因此，在一些实施方式中，本公开的第二种 siRNA 缀合物中 Nu 代表的 siRNA 可以为 siAP1、siAP2、siAP1-M1、siAP2-M1、siAP1-M2、siAP2-M2、siAP1-M1S、siAP2-M1S、siAP1-M2S、siAP2-M2S、siAP1-M1P1、siAP2-M1P1、siAP1-M2P1、siAP2-M2P1、siAP1-M1SP1、siAP2-M1SP1、siAP1-M2SP1、siAP2-M2SP1 中的一种，如表 1 示出。

表 1 本公开缀合物中的 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5’ - 3’
siAP1	6	CAAUAAAGCUGGACAAGAA
	7	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG
siAP2	8	CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA
	9	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG
siAP1-M1	10	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	11	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm
siAP2-M1	12	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	13	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm
siAP1-M2	14	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	15	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm
siAP2-M2	16	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	17	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm
siAP1-M1S	18	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	19	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm
siAP2-M1S	20	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	21	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm
siAP1-M2S	22	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	23	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm
siAP2-M2S	24	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	25	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm
siAP1-M1P1	10	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	26	P1-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm
siAP2-M1P1	12	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	27	P1-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm
siAP1-M2P1	14	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	28	P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm
siAP2-M2P1	16	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm

	29	P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm
siAP1-M1SP1	18	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	30	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm
siAP2-M1SP1	20	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	31	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm
siAP1-M2SP1	22	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	32	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm
siAP2-M2SP1	24	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm
	33	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm

本公开所述 siRNA 或 siRNA 缀合物中，每个相邻核苷酸之间由磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键连接，磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子带有负电荷，它可以以羟基或巯基的形式存在，羟基或巯基中的氢离子也可以部分或全部被阳离子取代。所述阳离子可以是任意的阳离子，如金属阳离子，铵离子 NH_4^+，有机铵阳离子中的一种。出于提高溶解性考虑，在一种实施方式中，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 K^+和/或 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 或第一种或第二种 siRNA 缀合物可以至少部分以盐的形式存在。在一种方式中，磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子至少部分与钠离子结合，本公开所述 siRNA 或第一种或第二种 siRNA 缀合物以钠盐或部分钠盐的形式存在。

本领域技术人员清楚知晓的是，可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入所述的 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。

第二种 siRNA 缀合物的制备

可以采用任意合理的合成路线制备第二种 siRNA 缀合物。

在一些实施方式中，第二种 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，Nu 代表的 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，Nu 代表的 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 1 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 2 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：

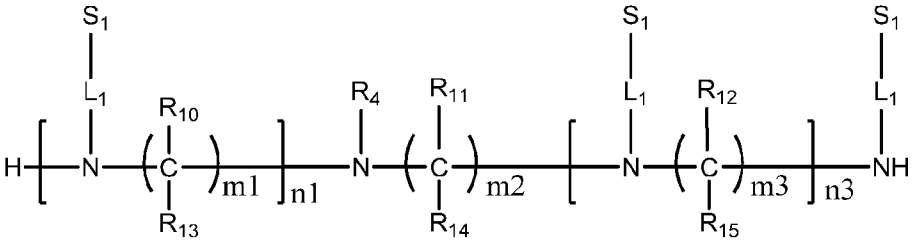
5'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ -3'（SEQ ID NO: 1），

5'- Z'UCUUGUCCAGCUUUAUUG -3'（SEQ ID NO: 2）；

其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 1 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 2 中包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

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，从而使式（321）所示的化合物经偶联反应连接至核苷酸序列。下文中，式（321）所示的化合物也称作缀合分子。



式（321）

其中：

R_4 为能够结合至 Nu 代表的 siRNA 的部分。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 的部分。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 的任意官能团的部分；

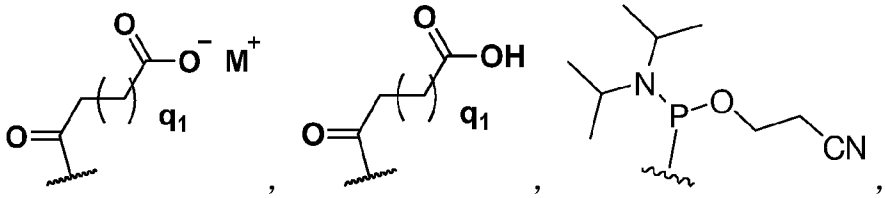
每个 S_1 独立地是 M_1 中全部活性羟基被 YCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个 Y 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种；在一些实施方式中，Y 为甲基。

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。

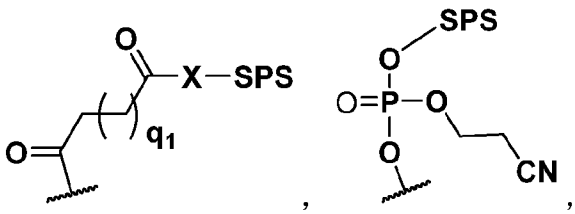
R_4 的选择是为了实现与含氮骨架上的 N 的连接，并且为合成第二种 siRNA 缀合物提供合适的反应位点。在一些实施方式中，R_4 中包括 R_2 连接基团或经保护的 R_2 连接基团，以及可通过反应与 siRNA 形成 A59 所示结构的官能团。

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、羧酸或羧酸盐。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。

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：



（C1） （C2） （C3）



（C1’） （C3’）

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，～～～表示基团连接至分子其余部分的位点。

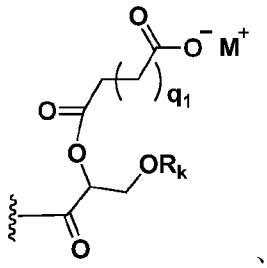
在一些实施方式中，所述第 1 官能团含有亚磷酰胺基团，如式（C3）所示，该亚磷酰胺基团可以与核苷酸上的任意位置的羟基，如 2'位羟基或 3'位羟基发生偶联反应形成亚磷酸酯，并经氧化或硫化形成式 A59 所示的磷酸二酯键或硫代磷酸酯键，将缀合分子缀合至 siRNA。此时，即使所述第 2 官能团并不存在，式（321）化合物也能够缀合至核苷酸，不影响第二种 siRNA 缀合物的获得。在此情况下，在经由亚磷酰胺固相合成等方法获得 siRNA 的正义链或反义链后，使式（321）化合物与核苷酸序列中末端核苷酸上的羟基反应，并在后续的氧化或硫化过程中形成磷酸二酯键连接或硫代磷酸酯连接，将式（321）化合物缀合至 siRNA。

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）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）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。

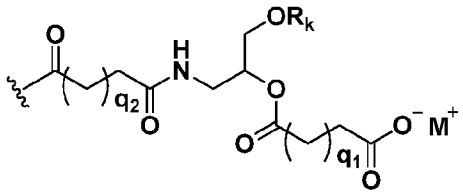
在一些实施方式中，所述第 1 官能团含有羟基或被保护的羟基；所述第 2 官能团含有经羧酸酯键连接的固相载体或经酰胺键连接的固相载体、或者经磷酸酯键连接的固相载体，如式（C1’）或（C3’）所示。此时，由式（321）化合物代替固相载体作为起始，按照亚磷酰胺固相合成方法依次连接核苷单体，获得连接有缀合基团的 siRNA 的正义链或反义链。

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。

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：

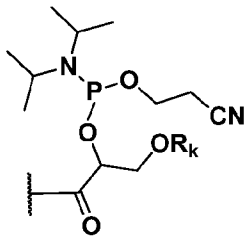


、

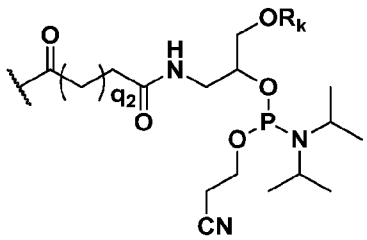


，

（B9） （B10）

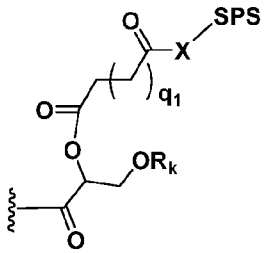


、

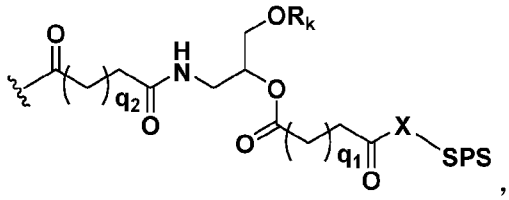


，

（B9’） （B10’）

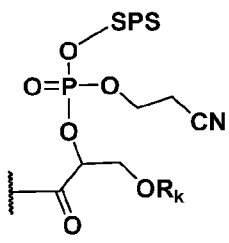


、

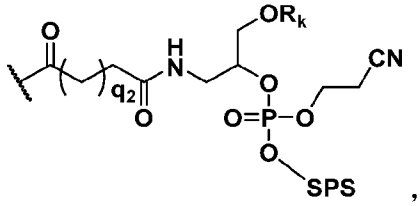


，

（B11） （B12）



、



，

（B11’） （B12’）

其中，q_1 为 1-4 的整数，q_2 为 1-10 的整数，X 为 O 或 NH，M^+为阳离子，R_k 为羟基保护基团，SPS 表示固相载体，〰表示基团连接至分子其余部分的位点。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。

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'-双甲氧基三苯甲基）、TMTr（4,4',4'-三甲氧基苯甲基）中的一种或多种。在一些实施方式中，R_k 可以是 DMTr，即 4,4'-双甲氧基三苯甲基（4,4'-dimethoxytrityl）。

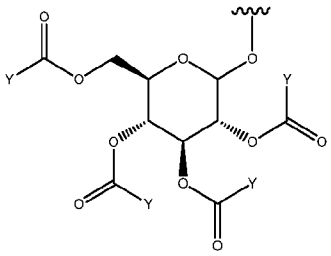
L_1 的定义如前所述。

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，从而为第二种 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。

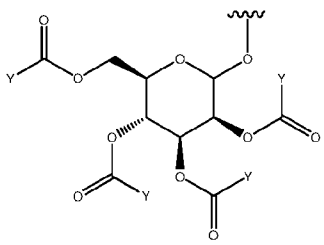
根据上述描述，本领域技术人员容易理解的是，相较于本领域公知的亚磷酰胺固相合成方法而言，可通过上述第 1 官能团以及任选的第 2 官能团，获得将缀合分子连接至核苷酸序列的任意可能的位置的第二种 siRNA 缀合物，例如，缀合分子连接至核苷酸序列的端部，缀合分子连接至核苷酸序列的末端。相应地，除非另有说明，以下涉及缀合制备的描述中，当提及"脱保护"、"偶联"、"盖帽"、"氧化"、"硫化"等反应时，应当理解为本领域公知的亚磷酰胺核酸固相合成方法中所涉及的反应条件和试剂也同样适用于这些反应。示例性的反应条件和试剂将在后文详细描述。

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 YCOO-表示，其中，每个 Y 独立地选自于由 C_1-C_{10} 烷基和 C_6-C_{10} 芳基所组成的组，所述 C_1-C_{10} 烷基和 C_6-C_{10} 芳基任选地被一个或多个取代基取代，所述取代基选自于由卤素和 C_1-C6 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。

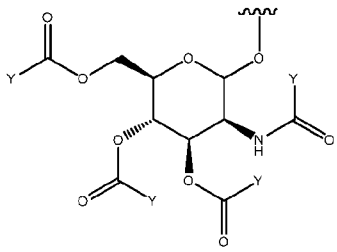
在一些实施方式中，每个 S_1 各自独立地选自于由式 A46-A54 所组成的组：



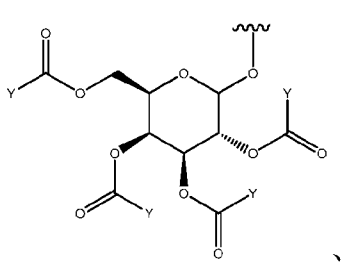
（A46）、



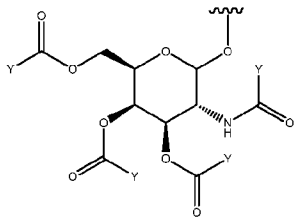
（A47）、



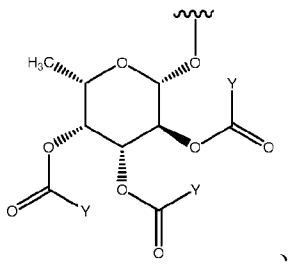
（A48）、



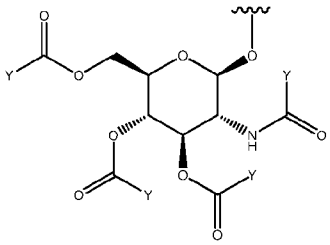
（A49）、



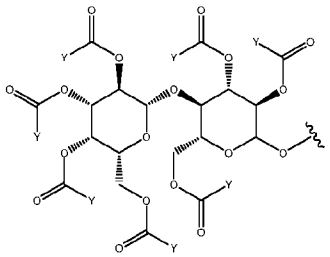
（A50）、



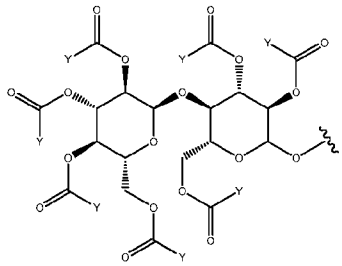
（A51）、



（A52）、



（A53）、



（A54）。

在一些实施方式中，S_1 为式 A49 或 A50。

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。

如前所述，第二种 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基团的 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）化合物中的各 S_1 基团转化为对应的 M_1 靶向基团），获得连接有缀合基团的 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，获得第二种 siRNA 缀合物。

在一些实施方式中，第二种 siRNA 缀合物的制备方法包含以下步骤：在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式（321）所示的化合物与正义链或反义链的 3'端的第一个核苷单体接触，使式（321）所示的化合物连接上序列中第一个核苷酸，在亚磷酰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，（321）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'）所示结构的式（321）所示的化合物，与第一个核苷单体连接前，式（321）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，分离纯化获得核酸的正义链和反义链，退火。

在一些实施方式中，第二种 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）化合物连接至正义链或反义链，其中，式（321）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）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，Nu 代表的 siRNA 的正义链或反义链上连接有缀合基团。

在一些实施方式中，式 A59 中的 P 连接至 siRNA 中的正义链的 3'末端，第二种 siRNA 缀合物的制备方法包括：

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

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

（3）通过亚磷酰胺固相合成方法，合成 siRNA 的反义链；

（4）分离出 siRNA 的正义链和反义链并退火，获得第二种 siRNA 缀合物。

其中，在步骤（1）中，脱除式（321）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）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）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。

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。

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）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）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）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。

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 S。此时，缀合基团连接至所得到的正义链的 3'末端。

步骤（2）和（3）中所述固相合成的其它条件，包括核苷单体脱保护条件，脱保护试

剂种类和用量，偶联反应条件，偶联试剂的种类和用量，盖帽反应的条件，盖帽试剂的种类和用量，氧化反应条件，氧化试剂种类和用量，硫化反应条件，硫化试剂和用量采用本领域中常规使用的各种试剂、用量和条件。

例如，在一些实施方式中，步骤（2）和（3）中所述固相合成可使用如下条件：

核苷单体脱保护条件包括温度为 0-50℃，在一些实施方式中为 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。

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。

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为 1:1:10-10:10:1，在一些实施方式中为 1:1:2-2:2:1。

氧化反应条件包括温度为 0-50℃，在一些实施方式中为 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。

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

将合成得到的核苷酸序列从固相载体上切割下来，并脱除碱基上、磷酸基上和配体上的保护基团可按照 siRNA 合成中常规的切割和脱保护方法进行。例如，将得到的连接有固相载体的核苷酸序列与浓氨水接触；在脱保护的过程中，A46-A54 基团的保护基团 YCOO-转化为羟基，S_1 基团转化为相应的 M_1 基团，生成式（1）所示的缀合物。其中，所述浓氨水可以是 25-30 重量%的氨水，浓氨水的用量与目标 siRNA 序列相比可以为 0.2ml/μmol-0.8ml/μmol。

在所合成的核苷酸序列上存在至少一个 2'-TBDMS 保护时，所述方法还包括将脱除了固相载体的核苷酸序列与三乙胺三氢氟酸盐接触，以脱除该 2'-TBDMS 保护。此时，所得

到的目标 siRNA 序列中具有游离的 2'-羟基的相应核苷。三乙胺三氢氟酸盐纯品的用量与目标siRNA序列相比可以为0.4ml/μmol-1.0ml/μmol。这样即可得到第二种siRNA缀合物。

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

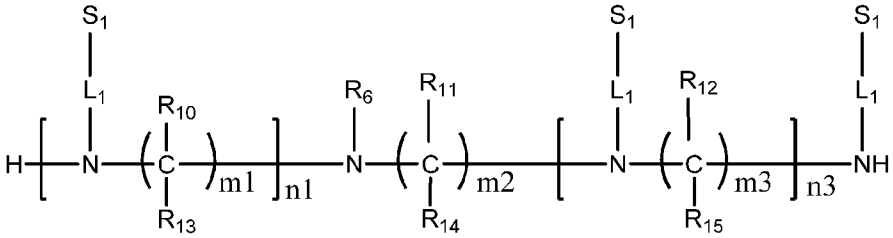
这样得到的第二种 siRNA 缀合物中，核苷酸之间的磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子基本与钠离子结合，第二种 siRNA 缀合物基本以钠盐形式存在。可以采用熟知的离子交换方法，用氢离子和/或其他阳离子取代所述钠离子，得到其他形式的第二种 siRNA 缀合物。所述阳离子如前所述。

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

退火的方法也是本领域技术人员熟知的。例如，可简单地将所合成的正义链（S 链）与反义链（AS 链）以等摩尔比混合在注射用水中加热至 70-95℃，随后室温冷却，使其通过氢键形成双链结构。这样即可得到第二种 siRNA 缀合物。

在获得所述缀合物后，在一些实施方式中，还可利用例如液质联用色谱等方法，通过分子量检测等方式对所合成的第二种 siRNA 缀合物进行表征，确定所合成的 siRNA 缀合物为目标设计的第二种 siRNA 缀合物，且所合成的 siRNA 的序列为期望的 siRNA 的序列，例如为表 1 中所列的序列之一。

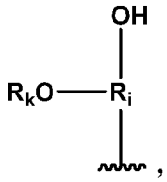
式（321）所示化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括在有机溶剂中，在酯化反应条件下，以及在碱和成酯催化剂存在下，将式（313）所示化合物与环状酸酐接触，离子交换，分离得到式（321）所示化合物：



式（313）

其中，n1、n3、m1、m2、m3、R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14}、R_{15}、L_1、S_1 各自的定义和可选择的范围如前所述；

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）

其中，R_i 为能够实现与含氮骨架上的N连接、与R_kO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）化合物。

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。

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。

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。

所述成酯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。

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类有机碱。在一些实施方式中，所述三级胺类有机碱为三乙胺或 N,N-二异丙基乙胺。所述三级胺类有机碱与式（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。

所述离子交换作用是将式（321）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，得到前述阳离子为 M^+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）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。

可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（321）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）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 1 重量‰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)化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（321）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，在缩合剂和三级胺类有机碱的存在下，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）化合物。

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 μmol 化合物/每克固相载体（μmol/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 50-200μmol/g。

所述有机溶剂可以是本领域技术人员已知的任何合适的溶剂或混合溶剂。在一些实施方式中，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）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。

在一些实施方式中，所述缩合剂可以是六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮和/或 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯，在一些实施方式中，所述缩合剂为 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯。所述缩合剂与式（321）所示化合物的摩尔比为 1:1-20:1，在进一步的实施方式中为 1:1-5:1。

在一些实施方式中，所述三级胺类有机碱为三乙胺和/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；所述三级胺类有机碱与式（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。

在一些实施方式中，式（321）化合物的制备方法还可以包括将得到的缩合产物在盖帽反应条件下，在有机溶剂中，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℃，在一些实施方式中为 15-35℃，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。

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-基甲基咪唑，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为 1:1-1:10，在进一步的实施方式中为 1:2-1:6。

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）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）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。

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，所述有机溶剂为乙腈。相对于式（321）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。

在一些实施方式中，所述酰化催化剂可以选自任何可用于成酯缩合或成酰胺缩合的催化剂，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。

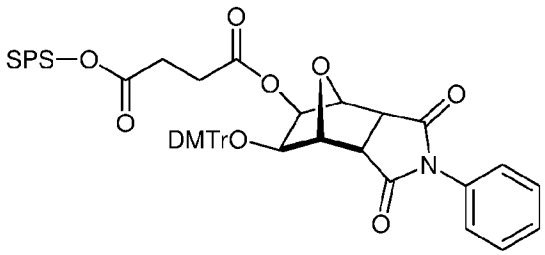
在一些实施方式中，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（321）化合物。在一些实施方式中，可通过以有机溶剂充分洗涤，并过滤，去除未反应的反应物、过量的盖帽试剂及其它杂质，得到式（321）化合物，所述有机溶剂选自乙腈、二氯甲烷、甲醇，在一些实施方式中为乙腈。

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）化合物。

在一些实施方式中，偶联反应条件包括温度可以为0-50℃，例如为15-35℃，式（313）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）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）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）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）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（321）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）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）化合物。

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®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support，Kinovate Life Sciences 公司，结构如式 B80 所示）：



（B80）。

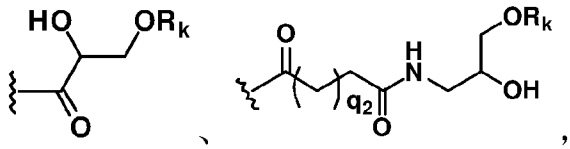
脱保护反应为本领域技术人员所公知。在一些实施方式中，脱保护条件包括温度为0-50℃，例如为15-35℃；反应时间为30-300秒，例如为50-150秒。脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一种或多种，在一些实施方式中，脱保护试剂为二氯乙酸。脱保护试剂与固定相上的-DMTr（4,4'-二甲氧基三苯甲基）保护基的摩尔比为2:1-100:1，例如为3:1-50:1。通过进行所述脱保护，在所述固相载体表面上获得具有反应活性的游离羟基，便于进行下一步的偶联反应。

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

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。

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，氧化试剂与亚磷酸酯基团的摩尔比为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。

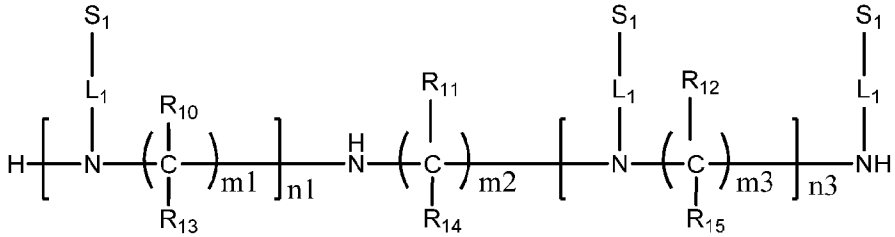
在一些实施方式中，R_6为式B7或B8基团中的一种，



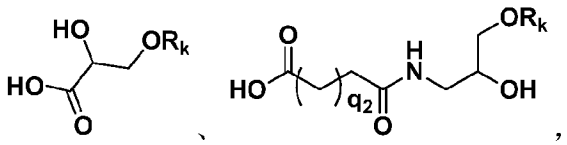
（B7） （B8）

其中q_2的定义如前所述，

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



式（314）



（A-1） （A-2）

其中，n1、n3、m1、m2、m3、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。

所述成酰胺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，所述成酰胺反应条件为反应温度为 10-40℃，反应时间为 2-16 小时。

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）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。

在一些实施方式中，所述成酰胺反应缩合剂为六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、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 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯，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。所述成酰胺反应缩合剂与式（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。

在一些实施方式中，所述三级胺类有机碱为三乙胺或 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。所述三级胺类有机碱与式（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。

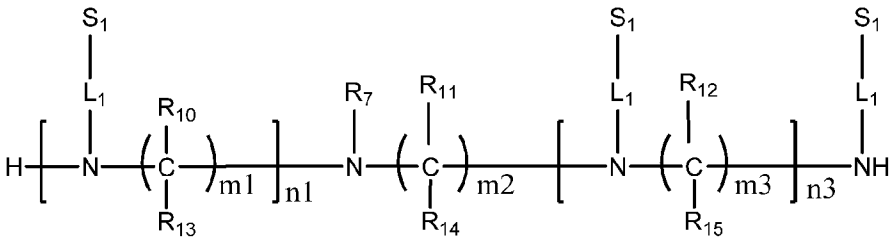
在一些实施方式中，式（A-1）和式（A-2）化合物可通过任何适当的方式制备。例如，当R_k为 DMTr 基团时，可通过甘油酸钙与 DMTrCl 反应制备式（A-1）化合物；类似地，可先将 3-氨基-1,2-丙二醇与环状酸酐接触，随后再与 DMTrCl 反应制备式（A-2）化合物，所述环状酸酐可以是碳原子数为 4-13、在一些实施方式中为 4-8 的环状酸酐。本领域技术人员容易理解的是，所述环状酸酐的选择对应于（A-2）化合物中 q_2 的不同值，例如，当所述环状酸酐为丁二酸酐时，q_2=1，当所述环状酸酐为戊二酸酐时，q_2=2，以此类推。

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）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）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。

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）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）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

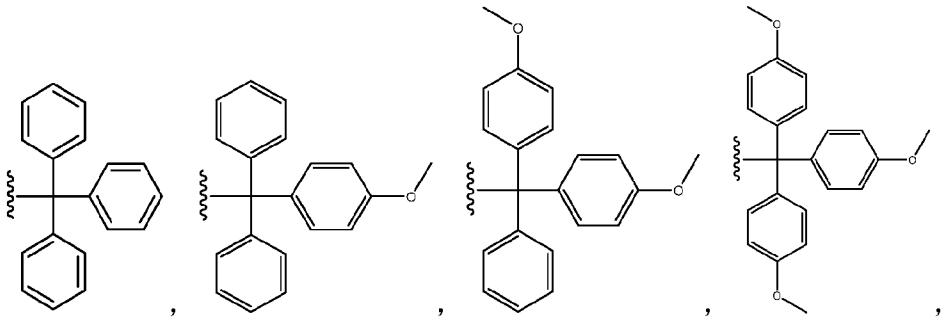
相纯化：C18、C8 反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（313）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，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，在脱保护反应条件下，将式（315）所示化合物与卤代乙酸接触，随后进行分离：



式（315）

其中，R_7选自式（330）、（331）、（332）或（333）所示的基团，在一些实施方式中，R_7的结构如式（330）所示：



式（330） 式（331） 式（332） 式（333）

n1、n3、m1、m2、m3、R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14}、R_{15}、L_1、S_1 各自的定义和可选择的范围如前所述。

所述卤代乙酸选自二氯乙酸、三氯乙酸、一氯乙酸和三氟乙酸中的一种或多种，在一些实施方式中为二氯乙酸。

所述脱保护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。

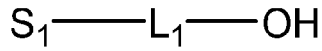
在一些实施方式中，所述有机溶剂为环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。所述环氧类溶剂在一些实施方式中为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂在一些实施方式中为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂在一些实施方式中为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷中的一种或多种，在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式（315）化合物，有机溶剂用量为 3-50L/mol，在进一步的实施方式中为 5-20L/mol。

所述卤代乙酸与所述式（315）所示化合物的摩尔比为 5:1-100:1，在一些实施方式中为 10:1-50:1。

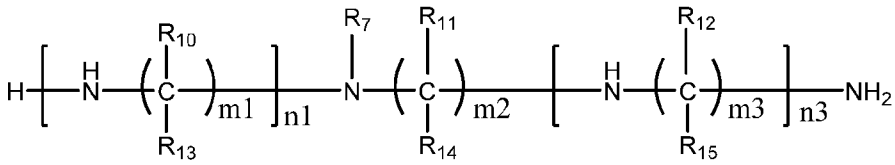
与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（314）化合物。

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）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=100:30-100:40 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）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

式（315）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，在成酰胺反应缩合剂和三级胺类有机碱存在下，在缩合反应条件下，将式（317）所示化合物与式（316）所示化合物接触，随后进行分离：



式（316）



式（317）

其中，n1、n3、m1、m2、m3、R_7、R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14}、R_{15}、L_1、S_1 各自的定义和可选择的范围如前所述。

式（316）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）化合物可由本领域技术人员通过各种方法制备，例如，可参照美国专利 US 8,106,022 B2 实施例 1 中所公开的方法制备某些式（316）化合物，以引用的方式将以上文献的全部内容整体并入本文。

在一些实施方式中，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。

所述式（316）所示化合物与所述式（317）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 2.5:1-5:1。

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，所述有机溶剂为乙腈。相对于式（317）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。

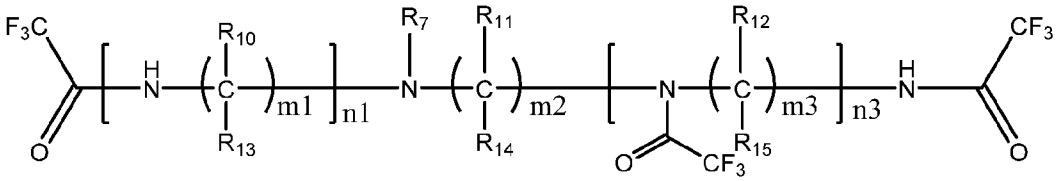
在一些实施方式中，所述成酰胺反应缩合剂为六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT）、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯或 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐，在进一步的实施方式中为 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐。所述成酰胺反应缩合剂与式（317）所示化合物的摩尔比可以为 2:1-10:1，在一些实施方式中为 2.5:1-5:1。

所述三级胺类有机碱可以为 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；所述三级胺类有机碱与式（317）所示化合物的摩尔比可以为 3:1-20:1，在一些实施方式中为 5:1-10:1。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（315）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（315）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（315）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（317）化合物与足量的一种式（316）化合物一次反应即生成期望的式（315）化合物，此时，各个 S_1-L_1 部分彼此相同。在一些实施方式中，可根据需要，通过使式（317）化合物分批与不同的式（316）化合物，即 L_1 和/或 S_1 不同的式（316）化合物发生反应，使得生成的式（315）化合物中含有两种以上的 S_1 和/或 L_1。例如，对于 1 eq 的式（317）化合物，可先使其与 2 eq 的第一式（316）化合物接触，在式（317）化合物中的两个末端伯胺基团上连接第一 S_1-L_1 部分，随后，使其继续与（n3+n1-1） eq 的第二式（316）化合物接触（n3 和 n1 的定义和取值范围如前所述），在式（317）化合物中的（n3+n1-1）个仲胺基团上连接第二 S_1-L_1 部分。

在一些实施方式中，式（317）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存在下，在脱保护反应条件下，将式（318）所示化合物与甲胺水溶液接触，随后进行分离：



式（318）

其中，n1、n3、m1、m2、m3、R_7、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。

所述脱保护反应条件包括反应温度为 0-150℃，反应时间为 5-72 小时，在一些实施方式中为反应温度为 20-80℃，反应时间为 10-30 小时。

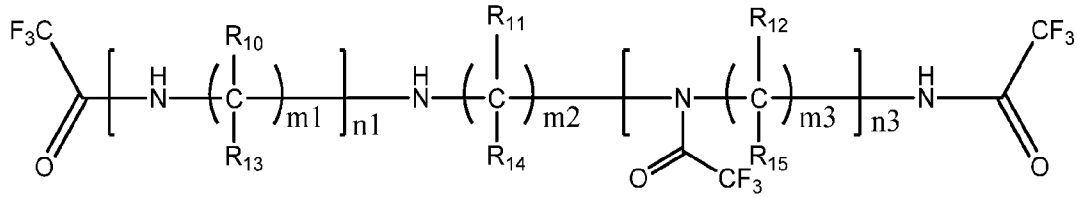
所述有机溶剂可选自醇，在一些实施方式中为甲醇、乙醇和异丙醇中的一种，在一些实施方式中为甲醇；相对于式（318）化合物，所述有机溶剂的用量为 1-20L/mol，在一些实施方式中为 1.5-10L/mol。

所述甲胺水溶液的浓度可以为 30-40 质量%，甲胺与式（318）所示化合物的摩尔比可以为 10:1-500:1，在一些实施方式中为 50:1-200:1。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（317）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（317）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:氨水（25 重量%）=1:1:0.05-1:1:0.25 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（317）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（318）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存在下，在取代反应条件下，将式（319）所示化合物与三苯基氯甲烷（TrCl）、二苯基乙苯基氯甲烷、苯基二乙苯基氯甲烷或三乙苯基氯甲烷，在一些实施方式中为三苯基氯甲烷（TrCl）接触，随后进行分离：



式（319）

其中，n1、n3、m1、m2、m3、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。

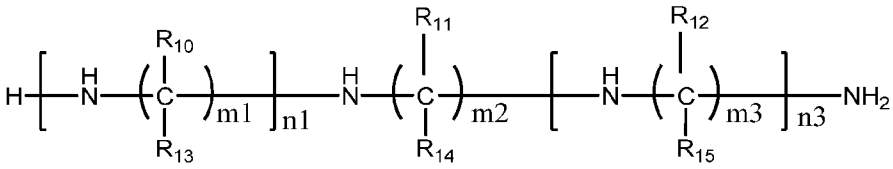
所述取代反应条件可包含反应温度为 0-100℃，反应时间为 5-72 小时，在一些实施方式中，反应条件包含反应温度为 10-40℃，反应时间为 10-30 小时。

三苯基氯甲烷（TrCl）、二苯基乙苯基氯甲烷、苯基二乙苯基氯甲烷或三乙苯基氯甲烷可商购得到，三苯基氯甲烷（TrCl）、二苯基乙苯基氯甲烷、苯基二乙苯基氯甲烷或三乙苯基氯甲烷与式（319）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 1:1-3:1。

所述有机溶剂可以为环氧类溶剂、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可以为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂在一些实施方式中可以为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂在一些实施方式中可以为二氯甲烷、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（319）化合物，所述有机溶剂的用量可以为 3-50L/mol，在一些实施方式中为 5-20L/mol。

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（318）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（318）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，使用甲醇:二氯甲烷=0.01:1-0.5:1 梯度洗脱；或者使用甲醇:二氯甲烷:乙酸乙酯:石油醚=0.1:1:1:1-1:1:1:1 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（318）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（319）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，在取代反应条件下，将式（320）所示化合物与三氟乙酸乙酯接触，随后进行分离：



式（320）

其中，n1、n3、m1、m2、m3、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。

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，在一些实施方式中，所述醚类溶剂为乙醚和/或甲基叔丁基醚，在一些实施方式中，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（320）化合物，所述有机溶剂的用量可以为 1-50L/mol，在一些实施方式中为 1-20L/mol。

所述取代反应条件可包括反应温度为 0-100℃，反应时间为 5-72 小时，在一些实施方式中，所述取代反应条件包括反应温度为 10-40℃，反应时间为 10-30 小时。

式（320）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 m1=m2=m3=3，n1=1，n3=2，且 R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14}、R_{15}均为 H 时，式（320）化合物可自阿法埃莎公司商购获得。

所述三氟乙酸乙酯与式（320）所示化合物的摩尔比为 2:1-10:1，在一些实施方式中为 3:1-5:1。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（319）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（319）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，使用甲醇:二氯甲烷=0.01:1-0.5:1 梯度洗脱；或者使用甲醇:二氯甲烷:乙酸乙酯:石油醚=0.1:1:1:1-1:1:1:1 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（319）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

本公开的第一种或第二种 siRNA 缀合物也可以与药学上可接受的其它辅料联用，该辅料可以为本领域常规采用的各种制剂或化合物的一种或多种，详情可参见上文关于本公开的药物组合物的描述。

本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物以及第二种 siRNA 缀合物的应用

在一些实施方式中，本公开提供了修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物在制备用于治疗和/或预防由所述载脂蛋白 C3（ApoC3）的过量表达引起的血脂异常的药物中的用途。

在一些实施方式中，本公开提供了一种治疗载脂蛋白 C3（ApoC3）的过量表达引起的血脂异常的方法，该方法包括向受试者给予有效量的本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物。

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 干扰的机制达到治疗血脂异常的目的。因此，本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物可用于预防和/或治疗血脂异常、或用于制备用于预防和/或治疗血脂异常的药物。

所述血脂异常指肝细胞中 APOC3 基因过度表达引起的血脂异常，通常表现为血液中甘油三酯、胆固醇等脂质和/或脂蛋白中的任一种或全部的水平提高，高水平的血脂与高血压、心血管疾病、糖尿病以及其他病理学病症高度相关。高甘油三酯血症与动脉粥样硬化相关，还会导致胰腺炎。本公开所述的血脂异常包括但不限于高胆固醇血症、高甘油三酯血症或动脉粥样硬化。

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修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 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，将本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 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整个身体相比将更多本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物递送至特定位点；而全身给药导致将本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物递送至受试者的基本整个身体。考虑到本公开旨在提供预防和/或治疗血脂异常的手段，在一些实施方式中为能够将药物递送至肝脏的给药方式。

可通过本领域已知的任何合适途径向受试者给药，所述途径包括但不仅限于：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、每个月或每年 1 次或多次。

本公开所述的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 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学程序测定毒性和疗效，例如测定 LD50（使 50%的群体致死的剂量）和 ED50（在量反应中指能引起 50%最大反应强度的剂量，在质反应中指引起 50%实验对象出现阳性反应时的剂量）。可基于由细胞培养分析和动物研究得到的数据得出人用剂量的范围。

在给予本公开所述的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 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)对于第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物，其 siRNA 用量可以为 0.001-100mg/kg 体重，在进一步的实施方式中为 0.01-50mg/kg 体重，在更进一步的实施方式中为 0.05-20mg/kg 体重，在又进一步的实施方式中为 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，在进一步的实施方式中为 0.01-10mg/kg 体重，在更进一步的实施方式中为 0.05-5mg/kg 体重，在又进一步的实施方式中为 0.1-3mg/kg 体重。

在一些实施方式中，本公开提供了一种抑制肝细胞中载脂蛋白 C3（ApoC3）基因表达的方法，该方法包括将有效量的本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物与所述肝细胞接触。将本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物导入肝细胞，通过 RNA 干扰机制达到抑制肝细胞中 APOC3 基因表达的目的。所述肝细胞可以选自 Hep3B、HepG2、Huh7 等肝癌细胞系或分离的肝原代细胞。在一些实施方式中，所述细胞为 Huh7 肝癌细胞。

采用本公开提供的方法抑制 APOC3 基因在细胞中表达，所提供的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物中的 siRNA 用量一般是这样的量：其足以减少靶基因的表达，并导致在靶细胞表面处 1pM 至 1μM、或 0.01nM 至 100nM、或 0.05nM 至 50nM 或至约 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、递送是局部还是全身等。在递送部位处的浓度可以显著高于在靶细胞或组织的表面处的浓度。

试剂盒

本公开提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含有效量的本公开的修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和第二种 siRNA 缀合物的至少一种。

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。

在本公开的试剂盒中，所述修饰的 siRNA 和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述修饰的 siRNA、药物组合物、第一种 siRNA 缀合物和/或第二种 siRNA 缀合物和/或缀合物，和/或药学上可接受的辅料可以任何形式提供，例如液体形式、干燥形式或冻干形式。在一

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

下面通过制备例和实施例来进一步说明本公开，但是本公开并不因此而受任何限制。

实施例

以下将通过实施例对本公开进行详细描述。除非特别说明，以下实施例中所用到的试剂、培养基均为市售商品，所用到的核酸电泳、real-time PCR 等操作均参照 *Molecular Cloning*（Cold Spring Harbor LBboratory Press(1989)）所记载的方法进行。

HEK293A 细胞由北京大学分子医学研究所核酸技术实验室提供，用含有 20%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 DMEM 完全培养基(Hyclone 公司)培养细胞，于 37°C 在含 5% CO_2/95%空气的培养箱中培养。

Huh7 细胞购自中国科学院干细胞库，用含有 10%的胎牛血清（FBS，Hyclone 公司）、1%非必须氨基酸（NEAA，Corning 公司）的 DMEM 完全培养基（Hyclone 公司）培养细胞，于 37℃在含 5% CO_2/95%空气的培养箱中培养。

本公开合成的针对 APOC3 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^{TM}2000（Invitrogen）作为转染试剂，具体操作参照制造商提供的说明书。

若无其它说明，以下提供的试剂比例均按体积比（v/v）计算。

所使用的动物模型如下：

人 APOC3 转基因小鼠：B6;CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J，购于美国 Jackson 实验室；

食蟹猴：由苏州华测生物技术有限公司提供。

实验数据均以 $\overline{X}$±SEM 表示，数据分析采用 Graphpad prism5.0 统计分析软件。首先对数据进行正态分布及方差齐性检验。符合正态分布（$p>0.20$）及方差齐（$p>0.10$）：多组间比较采用单因素方差分析的 LSD 法进行多重比较，$p<0.05$ 认为有统计学意义；不符合正态分布或方差不齐：多组间比较采用非参数检验的 Kruskal-Wallis H 方法，如果 Kruskal-wallis H 检验结果显著（$p<0.05$），再将数据进行秩转换后，进行多组间两两比较，$p<0.05$ 认为有统计学意义。

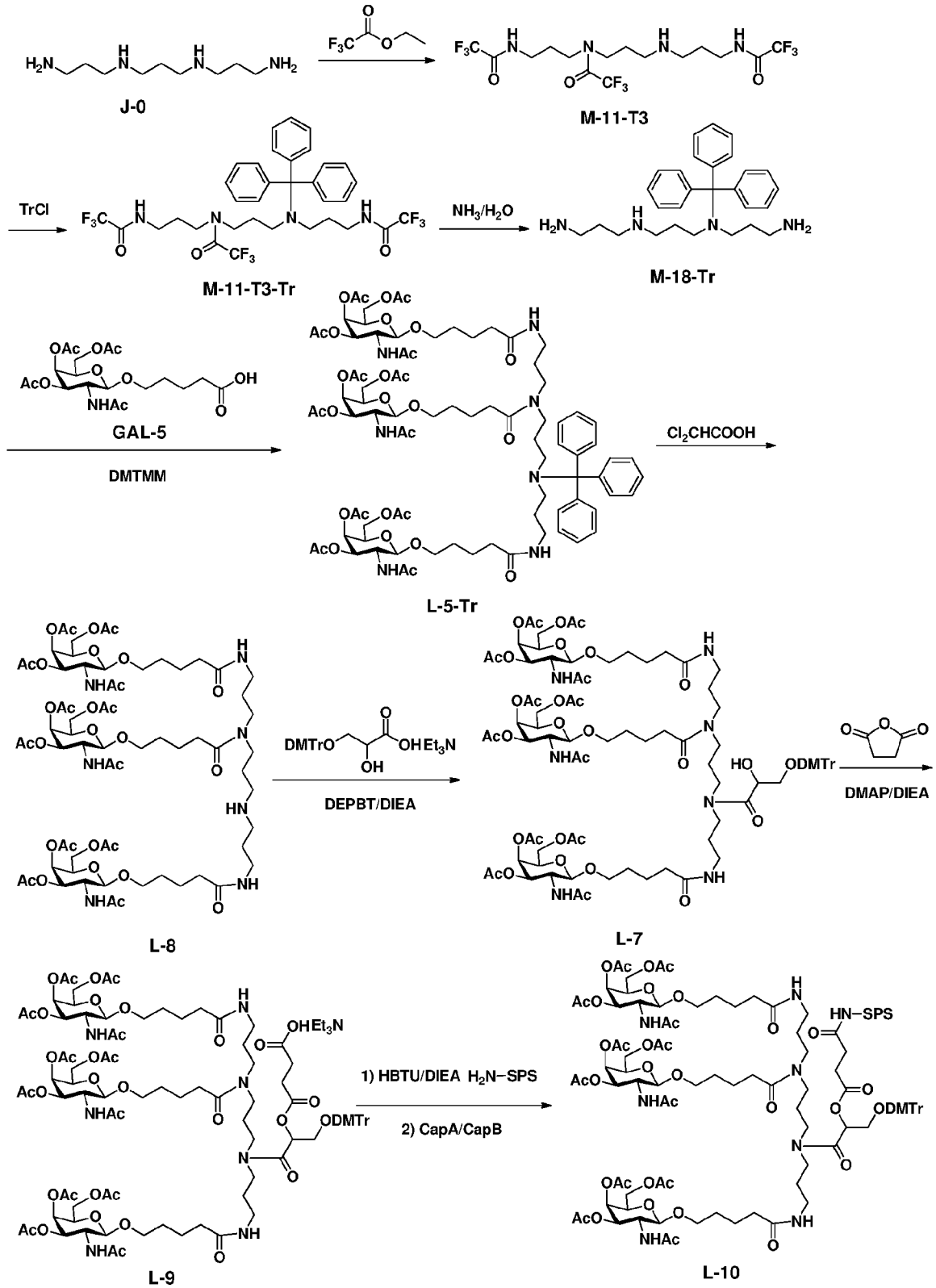
制备例 1 缀合物 1-3 的制备

本制备例合成了缀合物 1-3（以下，也分别称为 L10-siAP1M2SVP 缀合物、L10-siAP1M2SP 缀合物和 L10-siAP1M2SPs 缀合物）。所述缀合物为 L-9 缀合分子分别与编号为 siAP1M2SVP、siAP1M2SP 或 siAP1M2SPs 的 siRNA 缀合后形成的缀合物。该缀合物

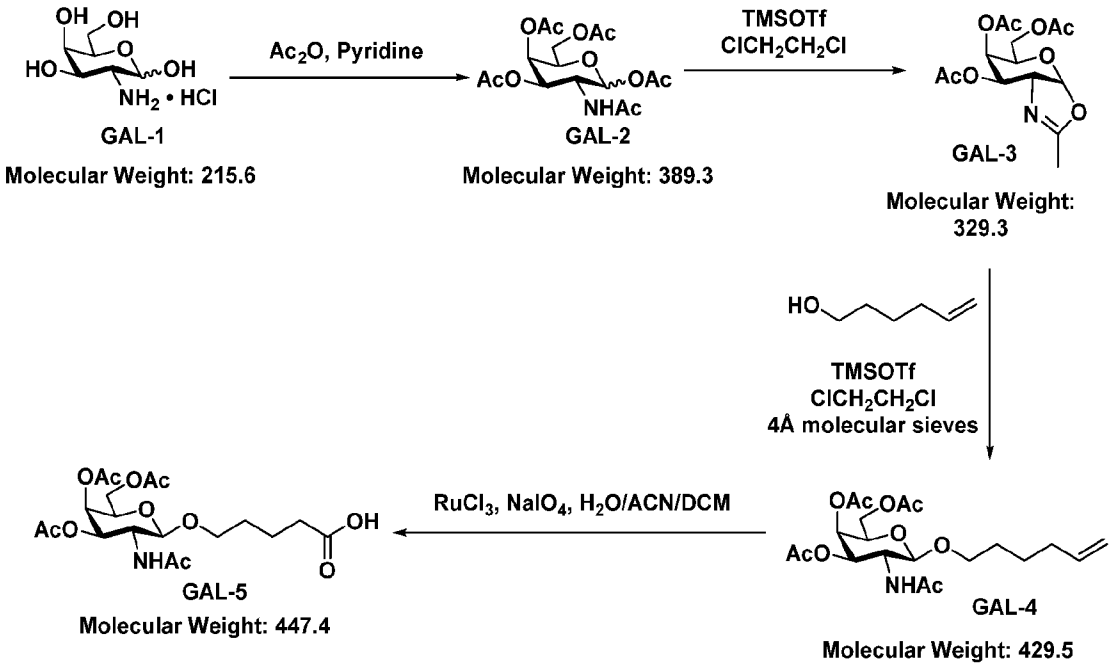
中所缀合的 siRNA 的序列参见表 3。

（1-1）L-10 化合物的合成

按照以下方法，合成了 L-10 化合物：



（1-1-1）缀合末端段 GAL-5 的合成



（1-1-1a）GAL-2 的合成

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

（1-1-1b）GAL-3 的合成

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

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

（1-1-1c）GAL-4 的合成

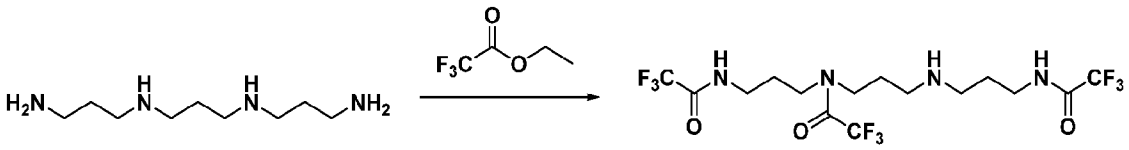
将步骤（1-1-1b）中获得的 **GAL-3**（26.9g，81.7mmol）溶于 136ml 无水 1,2-二氯乙烷中，加入干燥的 4Å 分子筛粉末 30g，再加入 9.0g 5-己烯-1-醇（CAS 号：821-41-0，购自 Adamas-beta 公司，89.9mmol），室温下搅拌 30 分钟，冰浴和氮气保护下加入 9.08g TMSOTf（40.9mmol），室温下搅拌反应过夜。过滤除去 4 Å 分子筛粉末，滤液中加入 300ml 二氯甲烷稀释，以硅藻土过滤，再加入 500ml 饱和碳酸氢钠水溶液搅拌 10 分钟洗涤，分出有

机相，水相用 300ml 二氯乙烷萃取一次，合并有机相并分别用 300ml 饱和碳酸氢钠水溶液和 300ml 饱和食盐水洗涤，分出有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸干溶剂，得到黄色糖稀状产品 **GAL-4** 41.3g，不进行纯化直接进行下一步氧化反应。

（1-1-1d）GAL-5 的合成

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

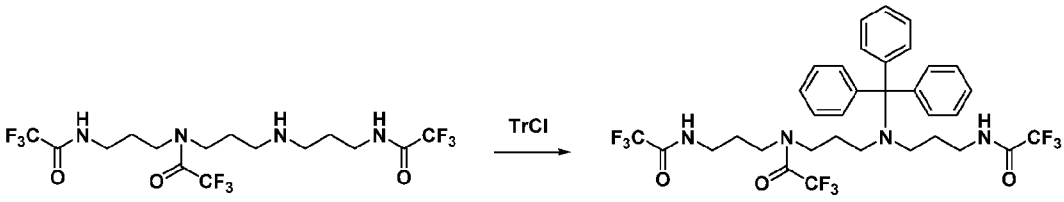
（1-1-2）M-11-T3 的合成：



J-0 **M-11-T3**

将 J-0（1.883g，10mmol，商购自阿法埃莎公司）溶于 25ml 乙腈中，加入三乙胺（4.048g，40mmol）冰水浴冷却至 0℃，加入三氟乙酸乙酯（5.683g，40mmol），室温下反应 22h，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥 18h，得到 5.342g 粗品固体 M-11-T3，不经进一步纯化地直接用于后续反应。MS m/z：$C_{15}H_{22}F_9N_4O_3$，$[M+H]^+$，理论：477.35，实测：477.65。

（1-1-3）M-11-T3-Tr 的合成：

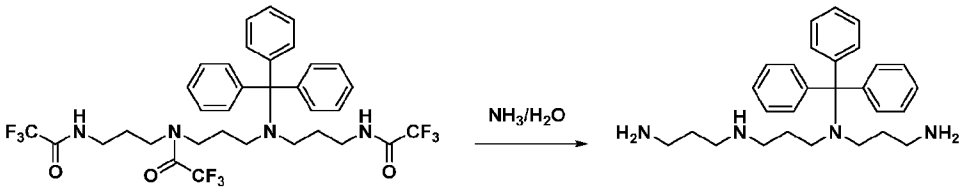


M-11-T3 **M-11-T3-Tr**

将 M-11-T3 粗品（5.342g，10mmol）溶于 50ml 二氯甲烷，向反应液中加入 TrCl（3.345g，12mmol）和三乙胺（1.518g，15mmol），室温下搅拌反应 20h，用饱和碳酸氢钠洗涤反应

液 2 次，每次 20ml，20ml 饱和食盐水洗涤 1 次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干有机溶剂，真空油泵发泡干燥过夜，得到粗品固体 M-11-T3-Tr 7.763g。MS m/z：$C_{34}H_{36}F_9N_4O_3$，$[M+Na]^+$，理论：741.25，实测：741.53。粗品固体 M-11-T3-Tr 不经纯化地继续用于下一步 M-18-Tr 的合成。

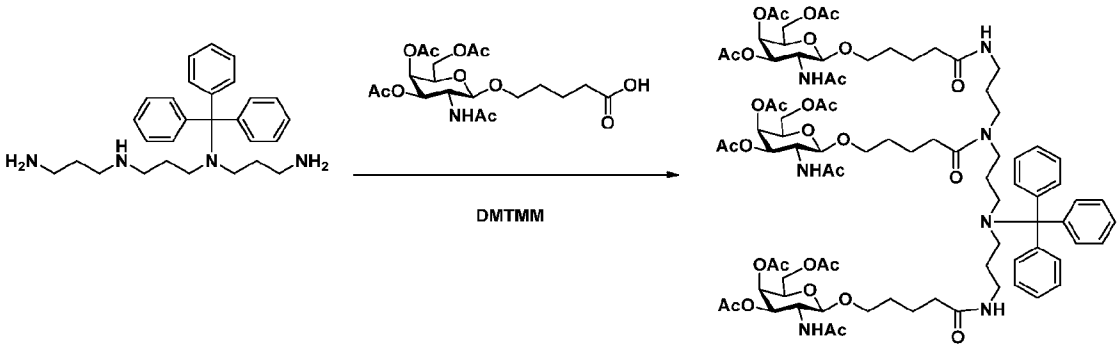
（1-1-4）M-18-Tr 的合成：



M-11-T3-Tr **M-18-Tr**

将步骤（1-1-3）中获得的 M-11-T3-Tr 粗品（7.763g，10mmol）溶于 100ml 甲醇，再加入 100ml 甲胺水溶液（40 质量%），在 50℃搅拌反应 23h，过滤除去不溶颗粒物，减压蒸干溶剂，加入 200ml 体积比为 1:1 的二氯甲烷:甲醇混合溶剂，用 50ml 饱和碳酸氢钠洗涤，水相再用二氯甲烷（DCM）萃取 3 次，每次 50ml，合并有机相，用无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥过夜，用 200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷:甲醇:氨水（25 重量%）=1:1:0.05-1:1:0.25 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 M-18-Tr 2.887g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ7.47 – 7.39 (m, 6H), 7.32 –7.24 (m, 6H), 7.19 – 7.12 (m, 3H), 2.60 – 2.47 (m, 4H), 2.46 – 2.19 (m, 13H), 1.70 – 1.55 (m, 4H), 1.40 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H). MS m/z：$C_{28}H_{39}N_4$，$[M+H]^+$，理论：431.65，实测：432.61。

（1-1-5）L-5-Tr 的合成：

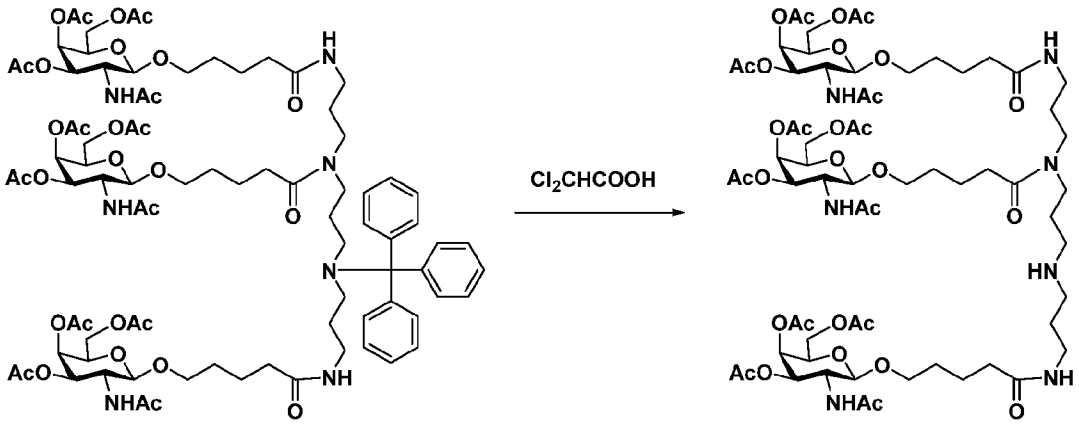


M-18-Tr **L-5-Tr**

将步骤（1-1-4）中获得的 M-18-Tr（2.02g，4.69mmol）与步骤（1-1-1）中获得的 GAL-5（6.93g，15.48mmol）混合溶于 47ml 乙腈，加入 N-甲基吗啉（3.13g，30.96mmol）和 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐（DMTMM，4.28g，15.48mmol），室温搅拌反应 2h。以 200ml 二氯甲烷稀释反应液，100ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤有机相，100ml 饱和食盐水洗涤有机相，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干溶剂得粗品。200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7

梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干得到纯品 L-5-Tr 7.49g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ7.83 – 7.10 (m, 4H), 7.67 – 7.60 (m, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 6H), 7.33 – 7.24 (m, 6H), 7.20 – 7.15 (m, 3H), 5.22 (s, 3H), 4.97 (d, *J* = 11.3 Hz, 3H), 4.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 4.06 – 3.07 (m, 9H),3.95 – 3.83 (m, 3H), 3.77 – 3.64 (m, 3H), 3.45 – 3.35 (m, 3H), 3.12 – 2.87 (m, 8H), 2.30 – 2.15 (m, 3H), 2.11 – 1.98 (m, 22H), 1.95 – 1.84 (m, 11H), 1.81 – 1.61 (m, 14H), 1.54 – 1.36 (m, 14H). MS m/z：$C_{85}H_{119}N_7O_{30}$，$[M+H]^+$，理论：1718.81，实测：1718.03。

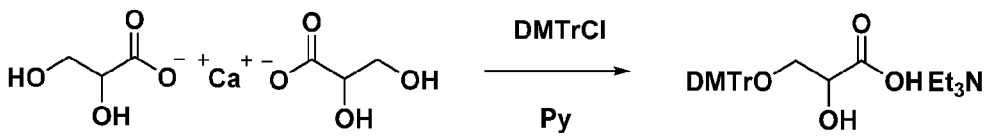
（1-1-6）L-8 的合成：



L-5-Tr **L-8**

将步骤（1-1-5）中得到的 L-5-Tr（5.94g，3.456mmol）溶于 69ml 二氯甲烷，再加入二氯乙酸（13.367g，103.67mmol），室温下反应 2h，加入 100ml 二氯甲烷稀释反应液，再加饱和碳酸氢钠溶液洗涤调节 pH=7-8 之间，水相以二氯甲烷萃取 6 次，每次 30ml，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 10 重量%三乙胺中和硅胶酸性，1 重量‰三乙胺平衡柱子，以二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到纯品 L-8 4.26g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 3H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 7.13 – 7.18 (m, 1H), 5.22 (d, *J* = 3.1 Hz, 3H), 4.97 (dd, *J* = 11.3, 3.1 Hz, 3H), 4.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 4.09 – 3.98 (m, 9H), 3.88 (dd, *J* = 19.3, 9.3 Hz, 3H), 3.75 – 3.66 (m, 3H), 3.44 – 3.38 (m, 3H), 3.17 – 3.30 (m, 4H), 3.10 – 2.97 (m, 4H), 2.35 – 2.20 (m, 6H), 2.15 – 2.08 (m, 9H), 2.07 – 1.98 (m, 13H), 1.94 – 1.87 (m, 9H), 1.81 – 1.74 (m, 9H), 1.65 – 1.42 (m, 18H). MS m/z：$C_{85}H_{119}N_7O_{30}$，$[M+H]^+$，理论：1477.59，实测：1477.23。

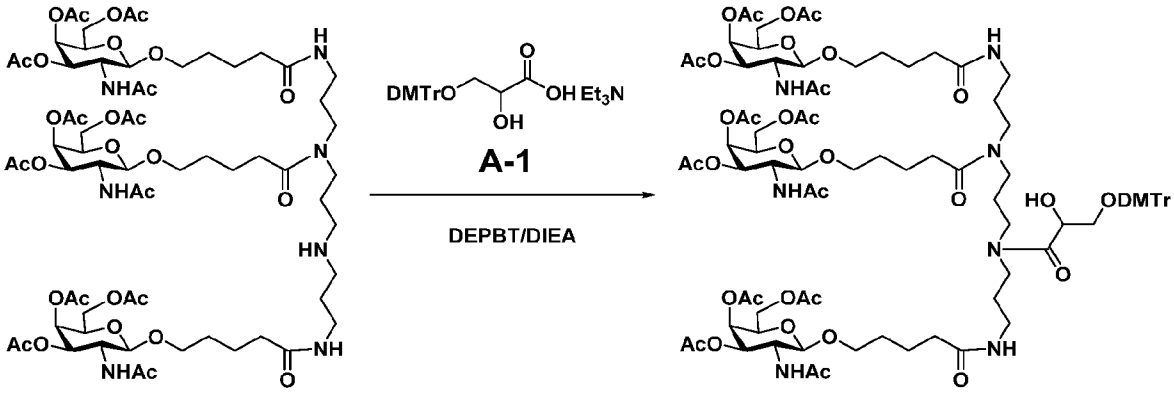
（1-1-7a）A-1 的合成



将 DMTrCl（4,4'-双甲氧基三苯甲基氯，38.12g，112.5mmol）溶于 450ml 无水吡啶中，加入 DL-甘油酸钙水合物（12.88g，45.0mmol），在 45℃反应 22h，将反应液过滤，滤饼用

200ml DCM 淋洗，滤液减压浓缩至干，剩余物用 500ml 二氯甲烷重新溶解，0.5M 三乙胺磷酸盐（pH=7-8）洗涤 2 次，每次 200ml，水相以二氯甲烷萃取 2 次，每次 200ml，合并有机相，用无水硫酸钠干燥，过滤，减压蒸干溶剂，200-300 目正相硅胶柱纯化，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.35-1:1:1:0.55 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，500ml 二氯甲烷重新溶解，以 200ml 0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤 1 次，水相用二氯甲烷萃取 2 次，每次 200ml，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，减压蒸干溶剂，真空油泵减压下过夜，得到白色固体产品 A-1 20.7g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.46 (ddd, J = 6.5, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 4.84 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.36 – 4.24 (m, 1H), 4.29 (s, 6H), 3.92 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 12.3, 7.0 Hz, 1H), 2.52 (q, J = 6.3 Hz, 6H), 1.03 (t, J = 6.3 Hz, 9H). MS m/z：$C_{24}H_{23}O_6$，[M-H]$^-$，理论：407.15，实测：406.92。

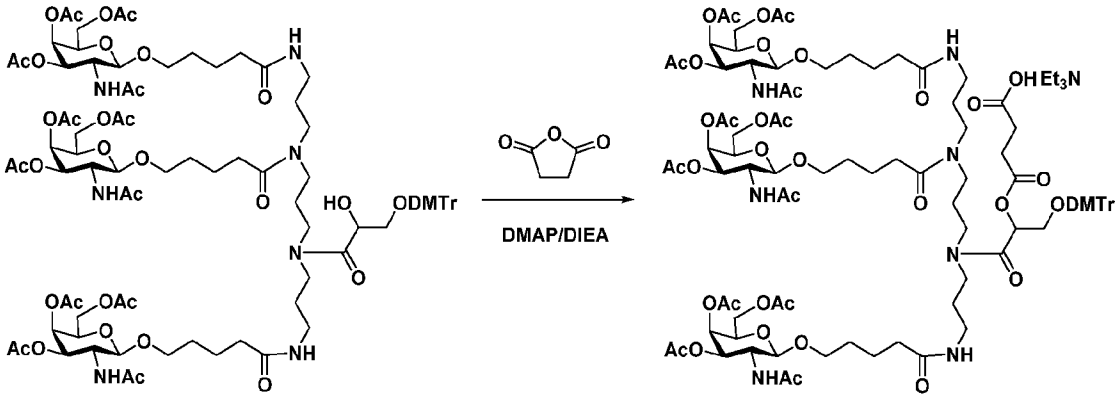
（1-1-7b）L-7 的合成：



L-8 **L-7**

将步骤（1-1-6）中获得的 L-8（2.262g，1.532mmol）和步骤（1-1-7a）中获得的 A-1（2.342g，4.596mmol）混合，溶于 16ml 二氯甲烷，加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT）（1.375g，4.596mmol），再加入二异丙基乙胺（1.188g，9.191mmol），25℃下搅拌反应 2h，用 10ml 饱和碳酸氢钠洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 3 次，每次 10ml，以 10ml 饱和食盐水洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 2 次，每次 10ml，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 4.900g。柱纯化使用 120g 200-300 目正相硅胶，以 20ml 三乙胺中和硅胶酸性，以含 1 重量%三乙胺的石油醚平衡柱子，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:N,N-二甲基甲酰胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到纯品 L-7 2.336g。^{1}H NMR (400 MHz, 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, 3.2 Hz, 3H), 4.48 – 4.30 (m, 4H), 4.02 (s, 9H), 3.93 – 3.84 (m, 3H), 3.76 – 3.66 (m, 9H), 3.45 – 3.35 (m, 3H), 3.24 – 2.98 (m, 10H), 2.30 – 2.20 (m, 2H), 2.11 – 1.88 (m, 31H), 1.80 – 1.40 (m, 28H). MS m/z：$C_{90}H_{128}N_7O_{35}$，[M-DMTr]$^+$，理论：1564.65，实测：1564.88。

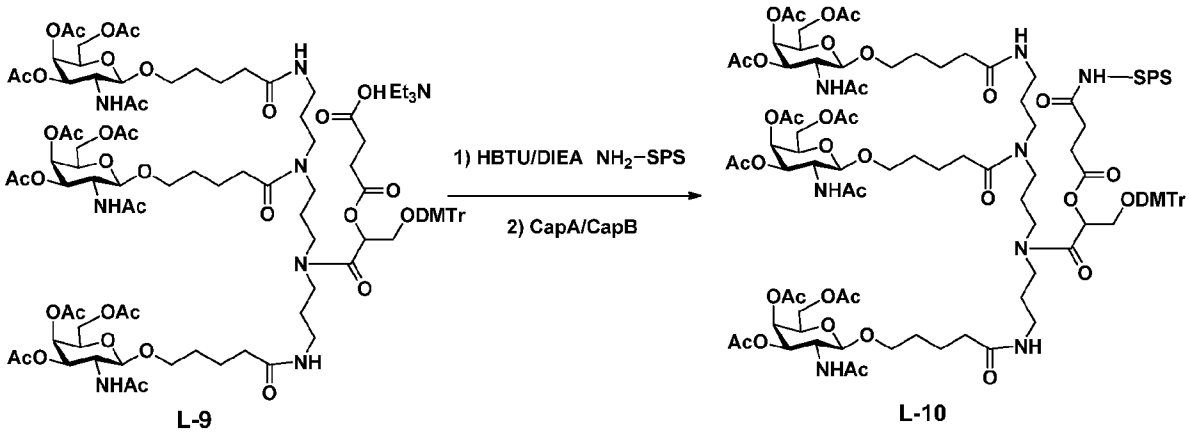
（1-1-8）L-9 的合成：



L-7 L-9

将步骤（1-1-7b）中获得的 L-7（2.300g，1.26mmol）、丁二酸酐（0.378g，3.78mmol）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP，0.462g，3.78mmol）混合溶于 13ml 二氯甲烷，再加入二异丙基乙胺（DIEA，0.814g，6.30mmol），25℃下搅拌 24h，5ml 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 2.774g 粗品。柱纯化使用 60g 200-300 目正相硅胶，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷平衡柱子，以含 1 重量‰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 1.874g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 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：$C_{94}H_{132}N_7O_{38}$，$[M\text{-}DMTr]^+$，理论：1664.72，实测：1665.03。

（1-1-9）L-10 化合物的合成：



L-9 L-10

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

将步骤（1-1-8）中获得的 L-9 缀合分子（0.233g，0.1126mmol）、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯（HBTU，0.064g，0.1689mmol）和二异丙基乙胺（DIEA，0.029g，0.2252mmol）混合，溶于 19ml 乙腈，室温搅拌 5 分钟，向反应液中加入氨甲基树脂（0.901g，100-200 目，氨基载量 400μmol/g，购自南开和成公司），25℃下进行摇床反应，转速 220 转/分钟，反应 15h 后过滤，滤饼以 DCM 淋洗 2 次，每次 30ml，乙腈淋洗 3 次，每次 30ml，30ml 乙醚淋洗 1 次，真空油泵干燥 2h，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℃下置于摇床上，转速 200 转/分钟，反应 5h，反应液过滤，滤饼用乙腈淋洗 3 次，每次 30ml，抽滤至干，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）1.100g，载量 90.8μmol/g。

表 2 盖帽反应投料配比

原料	用量	规格	批号	生产厂家
CapA	20ml	——	——	——
CapB	2.3ml	——	——	——
DMAP	0.01g	分析纯	I1422139	Aladdin
乙腈	2.3ml	光谱纯	O15161001	上海星可

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

（1-2）合成缀合物 1-3 的正义链

缀合物 1-3 的正义链序列相同，故其制备方法也相同。

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

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

每一步偶联反应条件均相同，包括温度为 25℃，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-四氮唑的 0.5M 乙腈溶液。

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

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

每一步硫化反应的条件相同，包括温度为 25℃，反应时间为 300 秒，硫化试剂为氢化

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 120:1。反应在乙腈:吡啶=1:1 的混合溶剂中进行。

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 25 重量%的氨水中，氨水用量为 0.5ml/μmol，在 55°C 反应 16h，除去液体，真空浓缩至干。

纯化与脱盐：利用制备型离子色谱纯化柱（Source 15Q），通过 NaCl 的梯度洗脱，完成核酸的纯化。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，以去离子水洗脱。

检测：使用离子交换色谱（IEX-HPLC）检测纯度，使用液质联用（LC-MS）分析分子量。正义链分子量的理论值为 7649.55，对于缀合物 1 的正义链批次，实测值为 7649.1；对于缀合物 2 和 3 的正义链批次，实测值为 7648.8。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 S。

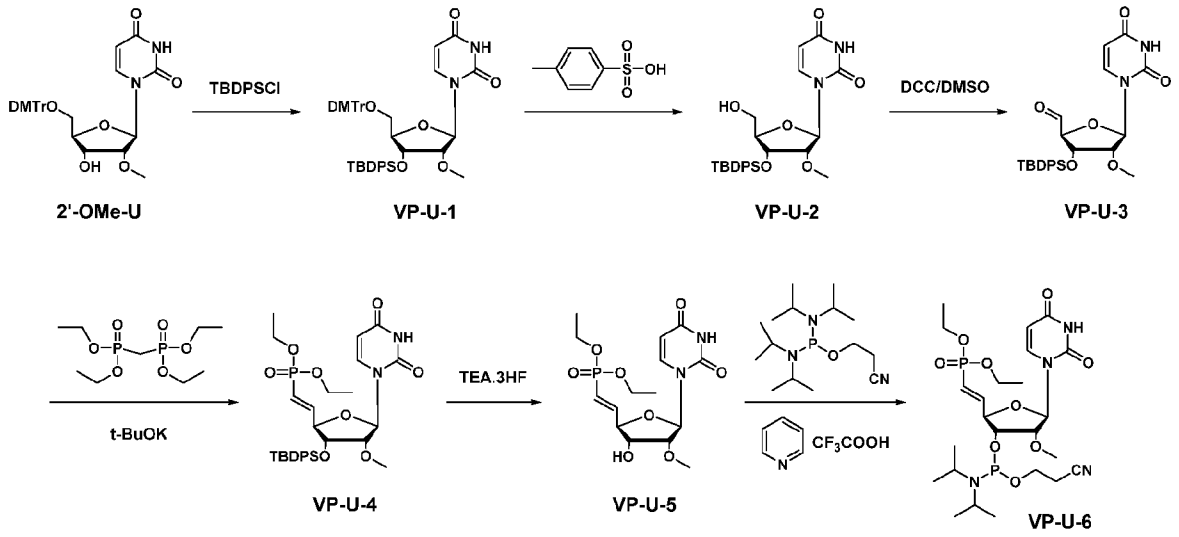
（1-3）合成反义链

（1-3A）缀合物 1 反义链的制备

通过固相亚磷酰胺法，利用通用固相载体（UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports，Kinovate Life Sciences 公司）起始循环，合成缀合物 1 的反义链 AS。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。

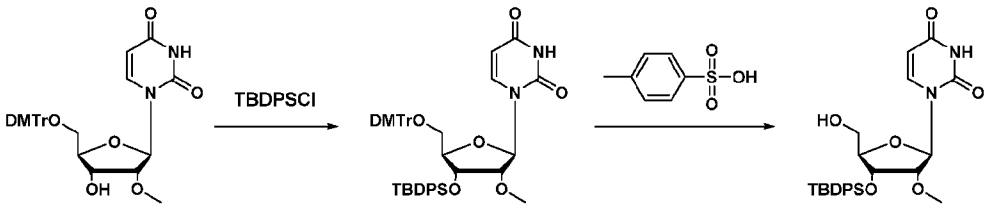
检测：纯度采用离子交换色谱（IEX-HPLC）进行检测；分子量采用液质联用（LC-MS）进行分析。理论值 6991.46，实测值 6991.0。实测值与理论值相符，表明所合成的是具有目标序列的反义链 AS。

其中，乙烯基磷酸酯修饰的 2'-甲氧基修饰尿嘧啶核苷单体（VP-Um）按照以下方法合成：



（1-3-1）VP-U-2 的合成

按照以下方法，合成了 VP-U-2 分子：

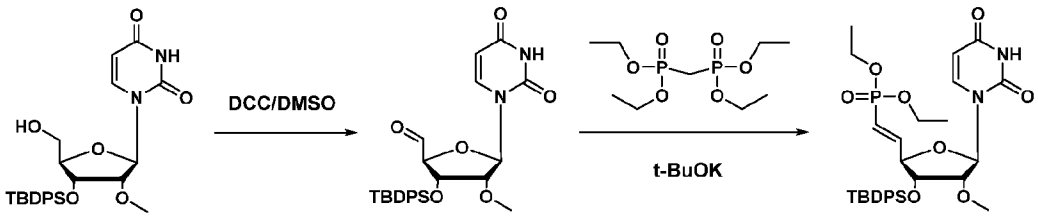


2'-OMe-U VP-U-1 VP-U-2

将 2'-甲氧基修饰的尿嘧啶核苷（2'-OMe-U，51.30g，91.6mmol），叔丁基二苯基氯硅烷（TBDPSCl，50.35g，183.2mmol），咪唑（12.47g，183.2mmol）混合溶于 450ml N,N-二甲基甲酰胺（DMF），室温下搅拌反应 20h。蒸除 DMF，用 600ml 二氯甲烷溶解后加 300ml 饱和碳酸氢钠洗涤，水相再用二氯甲烷（DCM）萃取 3 次，每次 300ml，合并有机相，用 5%草酸洗涤至水相 pH<5，蒸发溶剂至干后获得 VP-U-1 粗品直接用于随后 VP-U-2 的合成。

将 VP-U-1 粗品用 100ml 二氯甲烷溶解后，外加冰浴搅拌 10 分钟，再加入预先在 4℃冰箱冷藏好的 450ml 2%对甲苯磺酸溶液（溶剂为体积比 3:7 的甲醇-二氯甲烷混合溶剂），反应 10 分钟。再加入 200ml 饱和碳酸氢钠淬灭反应，有机相加入饱和碳酸氢钠水溶液洗涤至 pH=8。合并水相，用二氯甲烷萃取 2 次，每次 200ml，合并有机相，再用 200ml 饱和食盐水洗涤一次，蒸发溶剂至干。200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.25 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 VP-U-2 共 40.00g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41–7.30 (m, 6H), 6.79 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.94 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.12 (td, J = 4.6, 3.9 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 4.8, 4.0 Hz, 1H), 3.96 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 3.68 (ddd, J = 11.8, 7.0, 4.6 Hz, 1H), 3.57 – 3.46 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.05 (s, 8H). MS m/z：$C_{26}H_{33}N_2O_6Si$，$[M+H]^+$，理论：497.21，实测：497.45。

（1-3-2）VP-U-4 的合成：

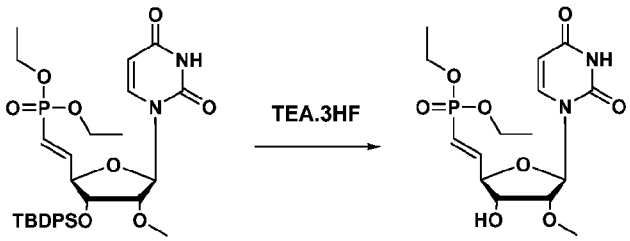


VP-U-2 VP-U-3 VP-U-4

将 VP-U-2（19.84g，40.0mmol），二环己基碳二亚胺（DCC，16.48g，80.0mmol），吡啶（4.20g，53.2mmol），三氟乙酸（6.61g，53.2mmol）混合溶于 200ml 二甲基亚砜（DMSO），室温下搅拌反应 20h。另取亚甲基二磷酸四乙酯（21.44g，74.4mmol）溶于 120ml THF，冰浴降温，在冰浴温度下加入 t-BuOK（11.36g，101.2mmol），先在冰浴温度下反应 10min，再升至室温反应 0.5h，然后加入至前述反应液中，约 1h 加完，冰浴温度下反应 1h，再升至室温反应 18h。加水淬灭反应，水相以二氯甲烷提取 3 次，每次 200ml。合并有机相，用 200ml 饱和食盐水水洗一次后蒸发溶剂至干。用 200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装

柱，以石油醚:乙酸乙酯=1:1-1:4 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 VP-U-4 共 14.00g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41 – 7.30 (m, 6H), 6.82 – 6.71 (m, 2H), 5.90 (ddd, J = 25.9, 15.0, 1.0 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.36 – 4.21 (m, 3H), 4.18 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.05 (ddq, J = 9.7, 8.5, 6.9 Hz, 2H), 3.87 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.32 (td, J = 6.9, 0.7 Hz, 6H), 1.05 (s, 8H). MS m/z：$C_{31}H_{42}N_2O_8PSi$，$[M+H]^+$，理论：629.24，实测：629.51。

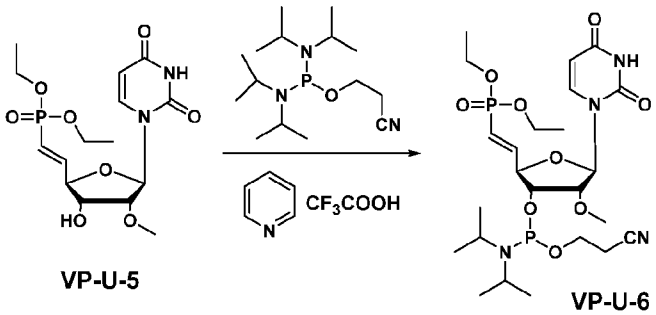
（1-3-3）VP-U-5 的合成：



VP-U-4 VP-U-5

将 VP-U-4（14.00g，22.29mmol）溶于 100ml 四氢呋喃，加入三乙胺三氢氟酸（17.96g，111.45mmol），室温搅拌 20h 反应完全。直接蒸发溶剂至干，再用二氯甲烷溶解随后蒸干 2 次，每次使用 50ml 二氯甲烷，得到粗品。用 200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.25 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 VP-U-5 共 6.70g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 15.0, 6.2 Hz, 1H), 5.99 – 5.82 (m, 2H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.10 (dd, J = 5.3, 4.7 Hz, 1H), 4.29 (ddq, J = 9.8, 8.6, 7.0 Hz, 2H), 4.17 (ddd, J = 6.2, 5.2, 1.0 Hz, 1H), 4.12 – 3.98 (m, 3H), 3.39 (s, 2H), 1.32 (td, J = 6.9, 0.6 Hz, 6H). MS m/z：$C_{15}H_{24}N_2O_8P$，$[M+H]^+$，理论：391.13，实测：391.38。

（1-3-4）VP-U-6 的合成：

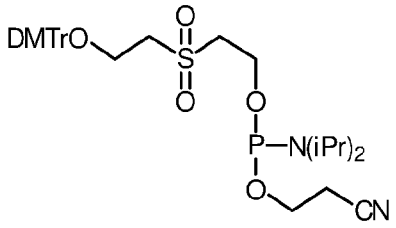


VP-U-5 VP-U-6

在氩气保护条件下向 10ml 无水二氯甲烷中加入 VP-U-5（391mg，1.0mmol）、三氟乙酸吡啶盐（0.232g，1.2mmol）、N-甲基咪唑（0.099g，1.2mmol），双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦（0.452g，1.5mmol），室温搅拌反应 5 小时。蒸除溶剂至干，柱层析纯化（200-300 目正相硅胶，二氯甲烷:乙腈（含 0.5 重量%三乙胺）=3:1-1:3 梯度洗脱），收集产物洗脱液，浓缩除去溶剂，得到目标产物 VP-U-6 共 508mg。^{31}P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 150.34, 150.29, 17.07, 15.50. MS m/z：$C_{24}H_{41}N_4O_9P_2$，$[M+H]^+$，理论：591.23，实测：591.55。表明 VP-U-6 是目标产物 VP-Um，作为核苷单体参与 RNA 链合成。

（1-3B）缀合物 2 反义链的制备

缀合物 2 的反义链与缀合物 1 的反义链的区别仅在于 5'-末端第一个核苷酸修饰不同。按照固相亚磷酰胺法制备反义链时，最后连接的核苷单体为 2'-甲氧基修饰尿嘧啶核苷单体（Um），再经脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应将 CPR-I 单体（苏州吉玛，货号 Cat#13-2601-XX）连接至反义链 5'末端，形成 5'-磷酸酯修饰。



（CPR-I）

合成中，使用的通用固相载体，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。

采用离子交换色谱（IEX-HPLC）检测纯度；采用液质联用（LC-MS）分析分子量，理论值 6995.47，实测值 6994.8。实测值与理论值相符，表明所合成的是具有目标序列的反义链 AS。

（1-3C）缀合物 3 反义链的制备

采用与缀合物 2 反义链相同的合成工艺，区别在于连接 CPR-I 单体时，以硫化反应条件代替上述氧化反应条件，制得具有 5'-硫代磷酸酯修饰的缀合物 3 反义链。

采用离子交换色谱（IEX-HPLC）检测纯度；采用液质联用（LC-MS）分析分子量，理论值 7011.53，实测值 7010.9。实测值与理论值相符，表明所合成的是具有目标序列的反义链 AS。

（1-4）合成缀合物 1-3

对于缀合物 1，将 S 链与 AS 链分别溶于注射用水中，得到 40mg/mL 的溶液，以等摩尔比混合，50°C 加热 15min，室温冷却后，使它们通过氢键形成双链结构。使用超纯水（Milli-Q 超纯水仪自制，电阻率 18.2MΩ*cm（25℃））将缀合物稀释至浓度为 0.2mg/mL 后，利用液质联用仪（LC-MS，Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，购于 Waters 公司，型号：LCT Premier）进行分子量检测。实测值与理论值一致，说明所合成的缀合物 1 是目标设计的带有 L-9 缀合分子的双链核酸序列。

对于缀合物 2-3，采用相同的方法制备并检测分子量，实测值与理论值一致，说明所合成的缀合物是目标设计的带有 L-9 缀合分子的双链核酸序列。缀合物 1-4 的结构如式（3）所示。

制备例 2 缀合物 4-21 以及对比缀合物 1-2 的制备

采用与制备例 1 相同的方法，合成了对比缀合物 1-2，预期能够制得缀合物 4-21，不同的是：1) 所述 siRNA 分别为表 3 中所示的对应于对比缀合物 1-2 以及缀合物 4-21 的序列；2) 当目标序列中含有未修饰的核苷酸时，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/μmol N-甲基吡咯烷酮溶解产品，随后加入 0.3ml/μmol 三乙胺和 0.6ml/μmol 三乙胺三氢氟酸盐，以脱除核糖上的 2'-TBDMS 保护。

表 3 siRNA 缀合物

siRNA 缀合物	编号	序列方向 5'-3'		SEQ ID NO
缀合物 1	L10-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 2	L10-siAP1M2SP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	P-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	42
缀合物 3	L10-siAP1M2SPs	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	Ps-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	43
缀合物 4	L10-siAP1	正义链	CAAUAAAGCUGGACAAGAA	6
		反义链	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG	7
缀合物 5	L10-siAP2	正义链	CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA	8
		反义链	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG	9
缀合物 6	L10-siAP1M1	正义链	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	10
		反义链	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	11
缀合物 7	L10-siAP2M1	正义链	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	12
		反义链	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	13
缀合物 8	L10-siAP1M2	正义链	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	14
		反义链	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	15
缀合物 9	L10-siAP2M2	正义链	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	16

		反义链	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	17
缀合物 10	L10-siAP1M1VP	正义链	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	10
		反义链	VP-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	34
缀合物 11	L10-siAP2M1VP	正义链	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	12
		反义链	VP-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	35
缀合物 12	L10-siAP1M2VP	正义链	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	14
		反义链	VP-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	36
缀合物 13	L10-siAP2M2VP	正义链	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	16
		反义链	VP-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	37
缀合物 14	L10-siAP1M1S	正义链	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	18
		反义链	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	19
缀合物 15	L10-siAP2M1S	正义链	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	20
		反义链	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	21
缀合物 16	L10-siAP1M2S	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	23
缀合物 17	L10-siAP2M2S	正义链	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	24
		反义链	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	25
缀合物 18	L10-siAP1M1SVP	正义链	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	18
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	38
缀合物 19	L10-siAP2M1SVP	正义链	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	20
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	39
缀合物 20	L10-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmC	22

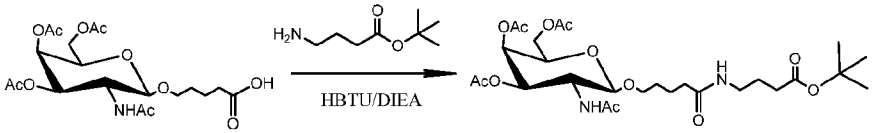
			mAmAmGmAmAm	
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 21	L10-siAP2M2SVP	正义链	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	24
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	41
缀合物 22	P10-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 23	R5-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 24	LA5-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 25	LB5-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 26	V8-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 27	W8-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 28	X8-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 29	Z5-siAP1M2SVP	正义链	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	22
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	40
缀合物 F1	FIN-siAP1M1SVP	正义链	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	18
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	38

缀合物 F2	FIN-siAP1M1S	正义链	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	18
		反义链	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	19
缀合物 F3	FIN-siAP2M1SVP	正义链	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	20
		反义链	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	39
缀合物 F4	FIN-siAP2M1S	正义链	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	20
		反义链	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	21
缀合物 F5	FIN-siAP2M2S	正义链	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	24
		反义链	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	25
对比缀合物 1	L10-siHBX1M1SVP	正义链	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	44
		反义链	VPUmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	45
对比缀合物 2	L10-siNCM2S	正义链	UmsUmsCmUmCmCmGfAfAfCmGmUmGmUmCmAmCmGmUm	46
		反义链	AmsCfsGmUmGmAfCmAmCmGmUmUmCmGfGmAfGmAmAmsCmsUm	47
对比缀合物 3	$(GalNAc)_3$-69535	正义链	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGmGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmAm	48
		反义链	UmsGfsAmAmUmAmCmUmGmUmCmCfCmUfUmUmUmAmAmGmCmsAmsAm	49

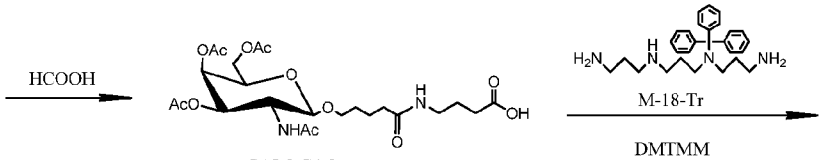
制备例 3 P10-siAP1M2SP 缀合物（缀合物 22）的制备

（3-1）P-10 化合物的合成

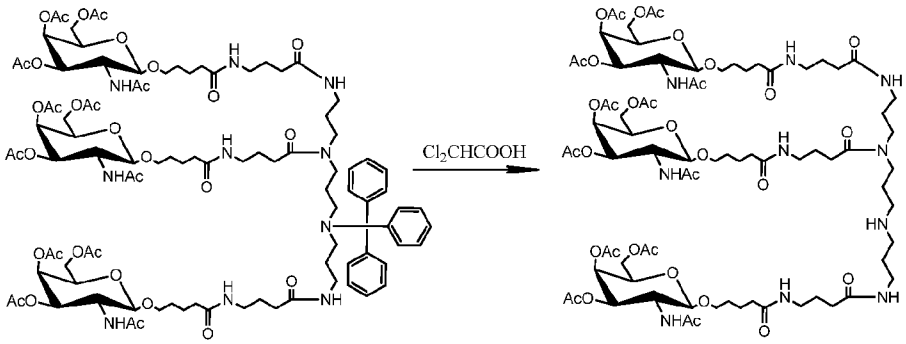
按照以下方法，合成了 P-10 化合物：



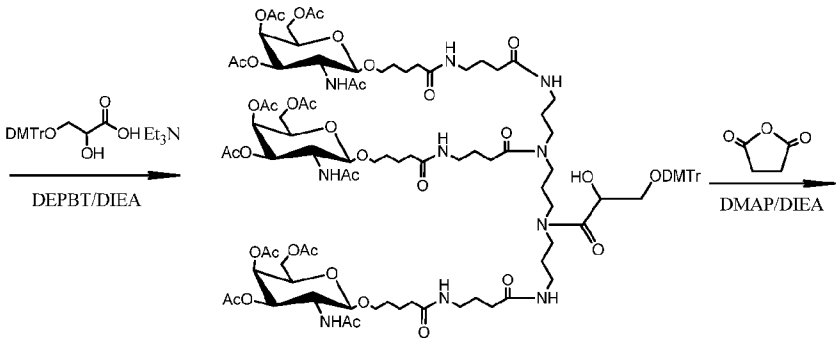
GAL-5 GAL5-C4-1



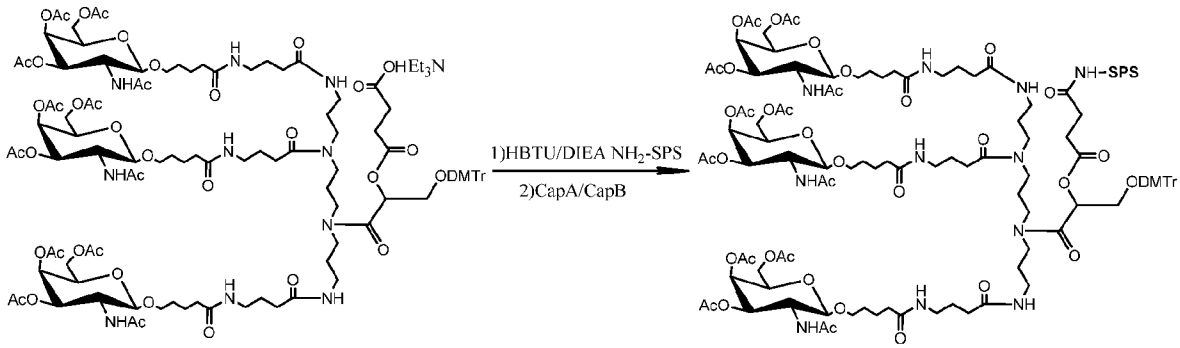
GAL5-C4-2



P-6 P-7



P-8



P-9 P-10

（3-1-1）GAL5-C4-1 的合成

向 40ml N,N-二甲基甲酰胺中加入按照上述（1-1-1）中描述的方法得到的 GAL-5

（13.43g，30.0mmol）、4-氨基酸叔丁酯盐酸盐（5.87g，30.0mmol）、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯（13.65g，36.0mmol）和二异丙基乙胺（11.63g，90.0mmol），溶解均一后室温搅拌反应 5 小时。向反应液中加入 300ml 饱和碳酸氢钠水溶液，用乙酸乙酯萃取 3 次，每次 200ml，合并有机相，用 200ml 饱和食盐水洗涤一次，分出有机相，再用无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂至干得到 30.3g 油状物粗品 GAL5-C4-1，直接进行下一步反应。

（3-1-2）GAL5-C4-2 的合成

将步骤（3-1-1）中获得的 GAL5-C4-1 粗品（30.3g，30mmol）溶于 180ml 甲酸中，室温搅拌反应 16 小时。蒸发溶剂至干，柱层析纯化（200-300 目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20 梯度洗脱），收集反应洗脱液，浓缩除去溶剂，得到目标产物 GAL5-C4-2 共 14.84g。

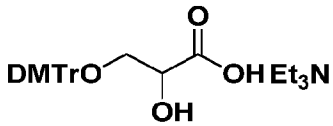
（3-1-3）P-6 的合成：

将按照步骤（1-1-4）中描述的方法得到的 M-18-Tr（2.02g，4.69mmol）与将步骤（3-1-2）中获得的 GAL5-C4-2（8.24g，15.48mmol，由两批产物合并获得）混合溶于 47ml 乙腈，再加入 N-甲基吗啉（3.13g，30.96mmol），最后加入 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐（DMTMM，4.28g，15.48mmol），室温搅拌反应 2h。以 20ml 二氯甲烷稀释反应液，10ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤有机相，10ml 饱和食盐水洗涤有机相，合并有机相并以无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干溶剂得粗品，200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干得到纯品 P-6 共 8.27g。

（3-1-4）P-7 的合成：

将按照上述（3-1-3）中得到的 P-6（6.82g，3.456mmol）溶于 69ml 二氯甲烷，再加入二氯乙酸（13.367g，103.67mmol），室温下反应 2h。加入 100ml 二氯甲烷稀释反应液，再加入饱和碳酸氢钠溶液洗涤调节 pH=7-8 之间，水相以二氯甲烷萃取 6 次，每次 30ml，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干溶剂得粗品。用 200-300 目正相硅胶纯化，以 10 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以 1 重量‰三乙胺平衡柱子，二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到 P-7 共 4.82g。MS m/z：$C_{78}H_{127}N_{10}O_{33}$，$[M+H]^+$，理论：1732.91，实测：1735.73。

（3-1-5）P-8 的合成：



（A-1）

将 P-7（2.653g，1.532mmol）和 A-1（2.342g，4.596mmol）混合溶于 16ml 二氯甲烷，加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT）（1.375g，4.596mmol），再加入二异

丙基乙胺（1.188g，9.191mmol），25℃下搅拌反应 2h。用 10ml 饱和碳酸氢钠洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 3 次，每次 10ml，10ml 饱和食盐水洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 2 次，每次 10ml，合并有机相，用无水硫酸钠干燥，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 120g 200-300 目正相硅胶，以 20ml 三乙胺中和硅胶酸性，以含 1 重量%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 P-8 共 2.793g。

（3-1-6）P-9 的合成：

将 P-8（490mg，0.231mmol）、丁二酸酐（69mg，0.693mmol）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP，68mg，0.554mmol）混合溶于 2.3ml 二氯甲烷，再加入二异丙基乙胺（DIEA，149mg，1.155mmol），25℃下搅拌反应 21h。50ml 二氯甲烷稀释反应液，再加入 100ml 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 10ml，合并有机相，减压蒸干得到粗品。柱纯化使用 80g 200-300 目正相硅胶，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷平衡柱子，以含 1 重量‰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 P-9 缀合分子共 200mg。MS m/z：$C_{106}H_{153}N_{10}O_{41}$，$[M\text{-}DMTr]^+$，理论：1921.05，实测：1920.97。

（3-1-7）P-10 的合成：

通过与制备例 1 中步骤（1-1-9）相同的方法，制备 P-10。不同的是以 P-9 缀合分子代替 L-9 缀合分子，得到连接固相载体的 P-9 缀合分子。

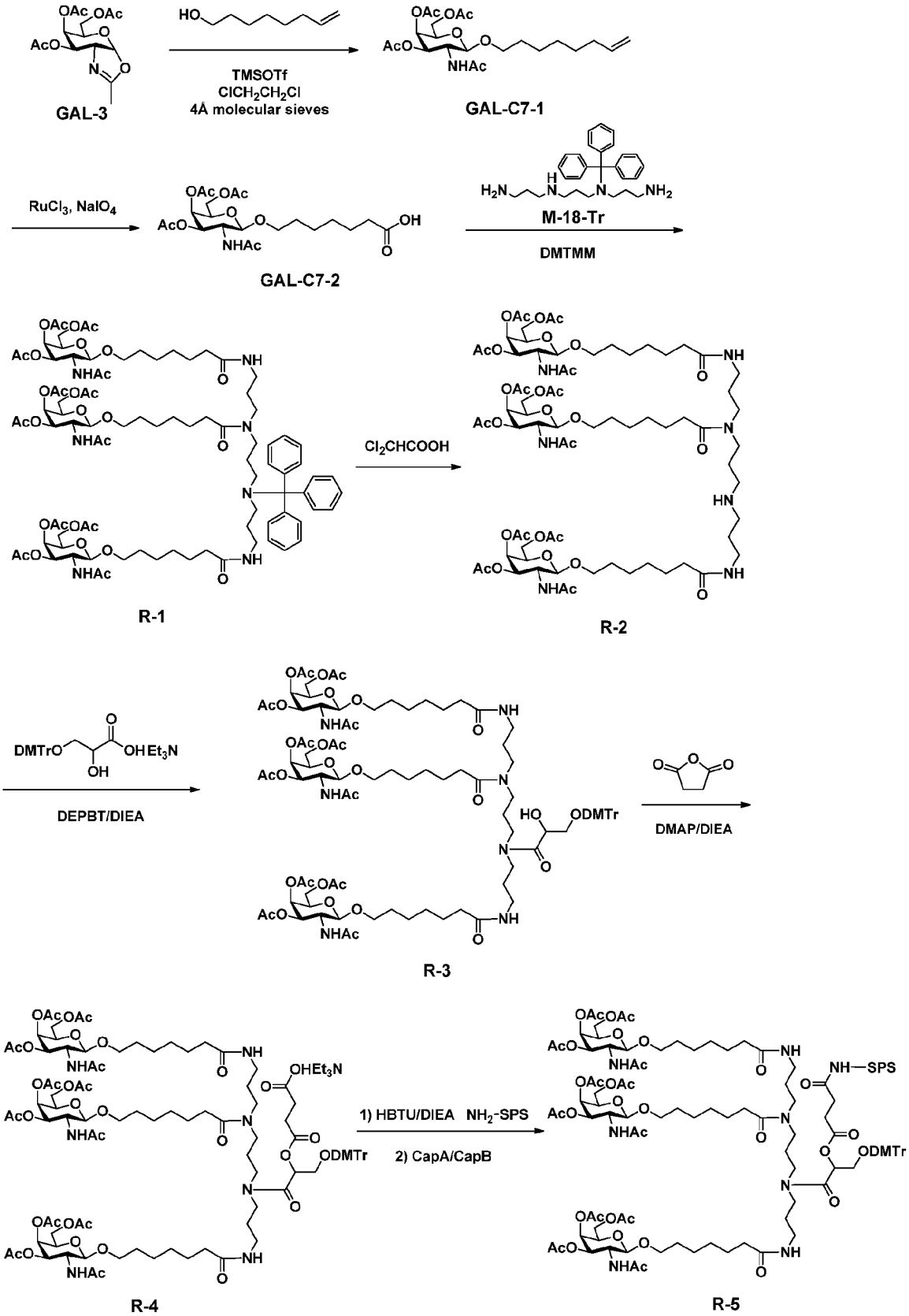
（3-2）合成 P10-siAP1M2SVP 缀合物

通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 22，不同的是以 P-10 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 P10-siAP1M2SVP 缀合物，其结构如式（4）所示。

制备例 4 R5-siAP1M2SVP 缀合物（缀合物 23）的制备

（4-1）R-5 化合物的合成

按照以下方法，合成了 R-5 化合物：



（4-1-1）GAL-C7-1 的合成

将按照步骤（1-1-1b）中描述的方法得到的 GAL-3（26.4g，80.2mmol）溶于 134ml 无水 1,2-二氯乙烷中，加入 4Å 分子筛粉末 60g，再加入 7-辛烯-1-醇（11.3g，88.2mmol），室温下搅拌反应 10 分钟，冰浴和氮气保护下加入三氟甲基磺酸三甲基硅酯（8.9g，40.1mmol），室温搅拌反应 24 小时。过滤除去 4Å 分子筛粉末，滤液中加入 500ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤，分出有机相，水相用 100ml 二氯甲烷萃取一次，合并有机相并用 250ml 饱和食盐水洗涤一次，分出有机相，用无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂至干得到黄色糖稀状产品 GAL-C7-1 33.3g，不进行纯化直接进行下一步氧化反应。

（4-1-2）GAL-C7-2 的合成

将按照步骤（4-1-1）中得到的 GAL-C7-1（33.3g，72.8mmol）溶于 160ml 二氯甲烷和 160ml 乙腈的混合溶剂中，分别加入 216ml 水和高碘酸钠固体（62.3g，291.2mmol），冰水浴下搅拌 10 分钟，加入催化剂三氯化钌（498mg，2.4mmol）自然升至室温搅拌反应 23 小时。反应液加入 200ml 水稀释搅拌，加饱和碳酸氢钠调节 pH 值为 7.5，分掉有机相，水相再用二氯甲烷萃取三次，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，减压蒸除溶剂后柱层析（200-300 目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20 梯度洗脱）纯化得到白色泡沫状固体产品 GAL-C7-2 22.4g。MS m/z：$C_{21}H_{32}NO_{11}$，$[M+H]^+$，理论：476.50，实测：475.94。

（4-1-3）R-1 的合成：

将按照步骤（1-1-4）中描述的方法得到的 M-18-Tr（2.02g，4.69mmol）与 GAL-C7-2（7.36g，15.48mmol）混合溶于 47ml 乙腈，再加入 N-甲基吗啉（3.13g，30.96mmol），最后加入 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐（DMTMM，4.28g，15.48mmol），室温搅拌反应 2h。以 200ml 二氯甲烷稀释反应液，100ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤有机相，100ml 饱和食盐水洗涤有机相，合并有机相并以无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干溶剂得粗品，200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干得到纯品 R-1 7.82g。

（4-1-4）R-2 的合成：

将 R-1（6.23g，3.456mmol）溶于 69ml 二氯甲烷，再加入二氯乙酸（13.367g，103.67mmol），室温下反应 2h。加入 100ml 二氯甲烷稀释反应液，再加饱和碳酸氢钠溶液洗涤调节 pH=7-8 之间，水相以二氯甲烷萃取 6 次，每次 30ml，合并有机相并以无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干溶剂得粗品。200-300 目正相硅胶，以 10 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以 1 重量‰三乙胺平衡柱子，二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40 梯度洗脱，减压蒸干溶剂得到纯品 R-2 4.49g。

（4-1-5）R-3 的合成：

将 R-2（2.391g，1.532mmol）和 A-1（2.342g，4.596mmol）混合溶于 16ml 二氯甲烷，加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT）（1.375g，4.596mmol），再加入二异

丙基乙胺（1.188g，9.191mmol），25℃下搅拌反应 2h。用 10ml 饱和碳酸氢钠洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 3 次，每次 10ml，以 10ml 饱和食盐水洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 2 次，每次 10ml，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 120g 200-300 目正相硅胶，以 20ml 三乙胺中和硅胶酸性，以含 1 重量%三乙胺的石油醚平衡柱子，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，减压蒸干溶剂得到纯品 R-3 2.642g。

（4-1-6）R-4 的合成：

将 R-3（795mg，0.4074mmol）、丁二酸酐（82mg，0.8148mmol）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP，100mg，0.8148mmol）混合溶于 4ml 二氯甲烷，再加入二异丙基乙胺（DIEA，100mg，0.8148mmol），25℃下搅拌反应 18h。5ml 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 30g 200-300 目正相硅胶，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷平衡柱子，含 1 重量‰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 R-4 缀合分子 505mg。

（4-1-7）R-5 缀合分子的合成：

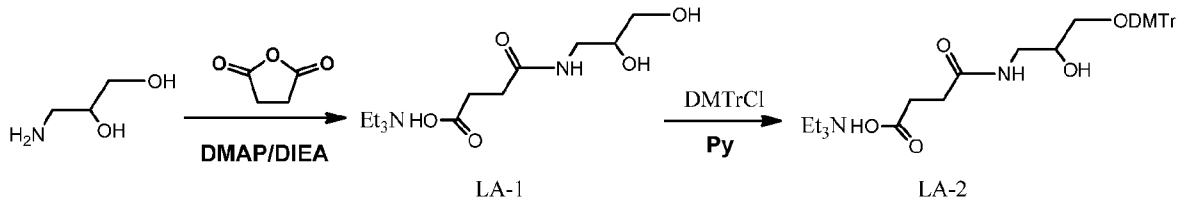
通过与制备例 1 中步骤（1-1-9）相同的方法，制备 R-5。不同的是以 R-4 缀合分子代替 L-9 缀合分子，得到连接固相载体的 R-4 缀合分子。

（4-2）合成 R5-siAP1M2SVP 缀合物

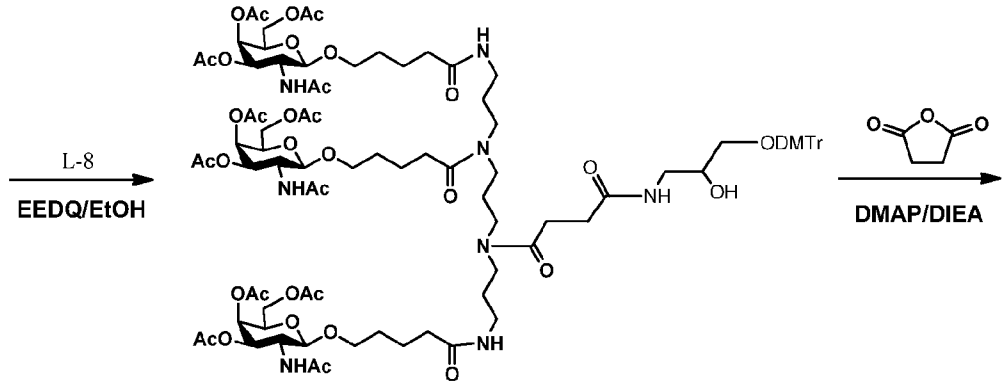
通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 23，不同的是以 R-5 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 R5-siAP1M2SVP 缀合物，其结构如式（7）所示。

制备例 5　LA5-siAP1M2SVP 缀合物（缀合物 24）的制备

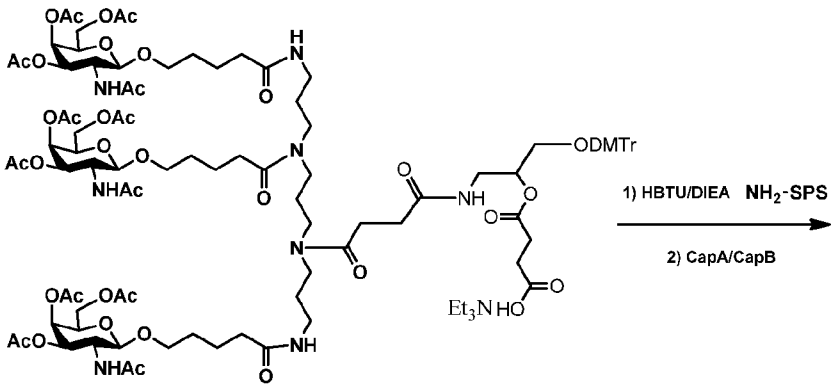
按照以下工艺路线，预期能够合成 LA-5 化合物：



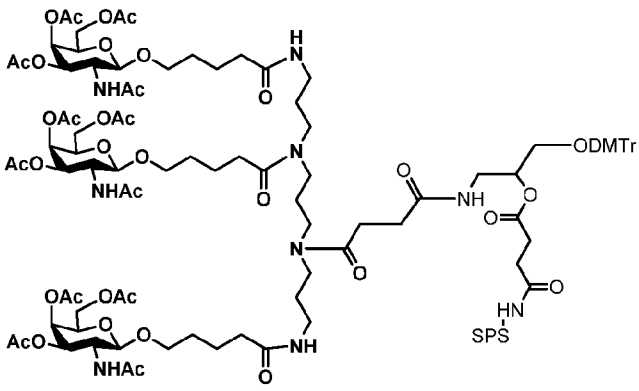
LA-1 LA-2



LA-3



LA-4



LA-5

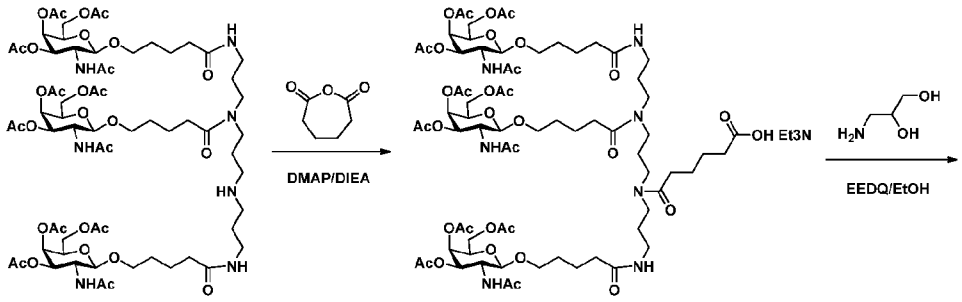
通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 24，不同的是以 LA-5 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 LA5-siAP1M2SVP 缀合

物，其结构如式（12）所示。

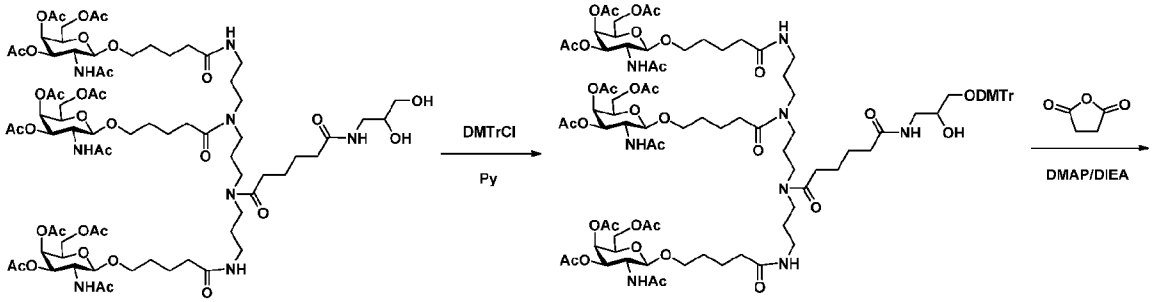
制备例 6 LB5-siAP1M2SVP 缀合物（缀合物 25）的制备

（6-1）LB-5 化合物的合成

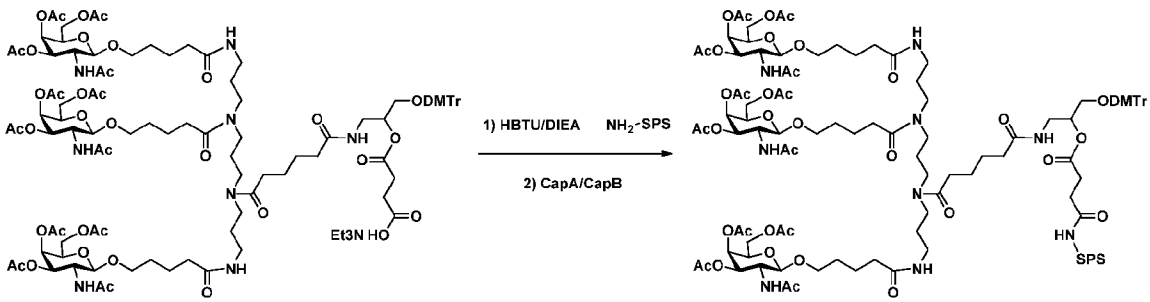
按照以下方法，合成了 LB-5 化合物：



L-8 LB-1



LB-2 LB-3



LB-4 LB-5

（6-1-1）LB-1 的合成：

将按照步骤（1-1-6）中描述的方法得到的 L-8（5.0g，3.386mmol）、己二酸酐（870mg，6.772mmol）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP，827mg，6.772mmol）混合溶于 130ml 二氯甲烷，再加入二异丙基乙胺（DIEA，2.2g，16.931mmol ），25℃下搅拌反应 4h。加入 70ml 二氯甲烷稀释反应液，以 0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤反应液，水相以二氯甲烷萃取 4 次，每次 10ml，合并有机相减压蒸干得到粗品。柱纯化使用 120g 200-300 目正相硅胶，以 1 重量%三乙胺

中和硅胶酸性，以二氯甲烷平衡柱子，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.2-1:1:1:1梯度洗脱，减压蒸干溶剂得到纯品 LB-1 4.267g。

（6-1-2）LB-2 的合成：

将按照步骤（6-1-1）中描述的方法得到的 LB-1（4.697g，2.753mmol，由两批次产物合并而得）、3-氨基-1,2-丙二醇（313mg，3.442mmol）、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐（DMTMM，953mg，3.442mmol）和 N-甲基吗啉（700mg，6.884mmol）先后加入 30ml 乙腈和 3ml 甲醇的混合液中，室温搅拌反应过夜。蒸发溶剂至干，柱层析（200-300目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=1:0.07-1:0.5 梯度洗脱）纯化，收集产物洗脱液，浓缩除去溶剂，得到目标产物 LB-2 3.27g。

（6-1-3）LB-3 的合成：

将 LB-2（2.27g，1.353mmol）用 14ml 无水吡啶溶解。再加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯（688mg，2.03mmol）室温下搅拌反应过夜。加 150ml 甲醇淬灭，蒸发溶剂至干。柱层析（200-300 目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=1:0.05-1:0.2 梯度洗脱）纯化，收集产物洗脱液，浓缩除去溶剂，得到目标产物 LB-3 1.647g。

（6-1-4）LB-4 的合成：

将 LB-3（822mg，0.415mmol）、丁二酸酐（83g，0.83mmol）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP，102mg，0.83mmol）混合溶于 4ml 二氯甲烷，再加入 DIEA（270mg，2.075mmol），25℃下搅拌反应过夜。0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤反应液 3 次，水相以二氯甲烷萃取 3 次，每次 2ml，合并有机相减压蒸干得到粗品。柱纯化使用 200-300 目正相硅胶，以 5 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以石油醚平衡柱子，用含 1 重量‰三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:5-100:20 梯度洗脱，减压蒸干溶剂得到纯品 LB-4 缀合分子 787mg。

（6-1-5）LB-5 的合成：

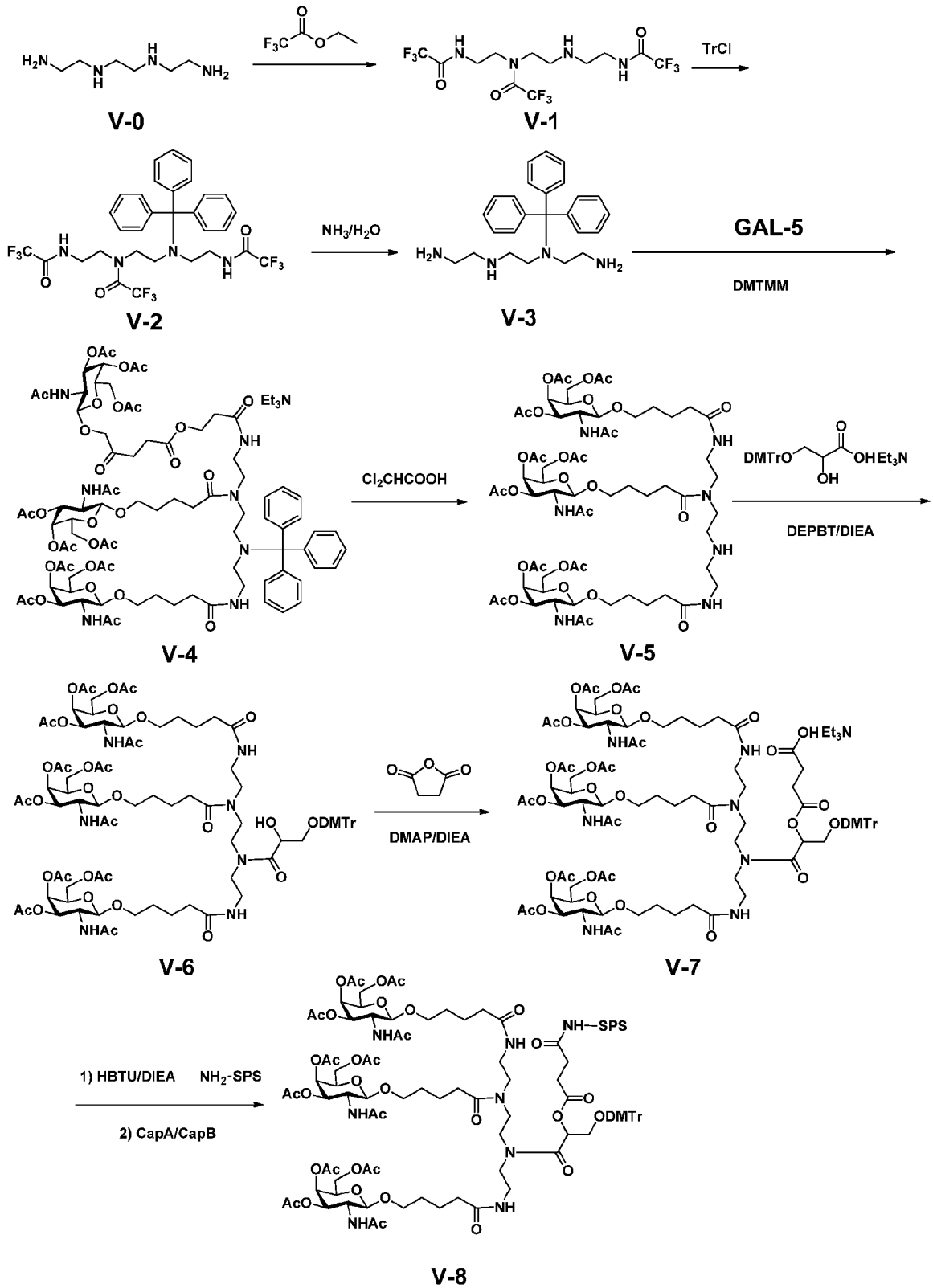
通过与制备例 1 中步骤（1-1-9）相同的方法，制备 LB-5。不同的是以 LB-4 缀合分子代替 L-9 缀合分子，得到连接固相载体的 LB-4 缀合分子。

（6-2）合成 LB5-siAP1M2SVP 缀合物

通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 25，不同的是以 LB-5 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 LB5-siAP1M2SVP，其结构如式（13）所示。

制备例 7 V8-siAP1M2SVP 缀合物（缀合物 26）的合成

按照以下工艺路线，预期能够合成 V-8 化合物：



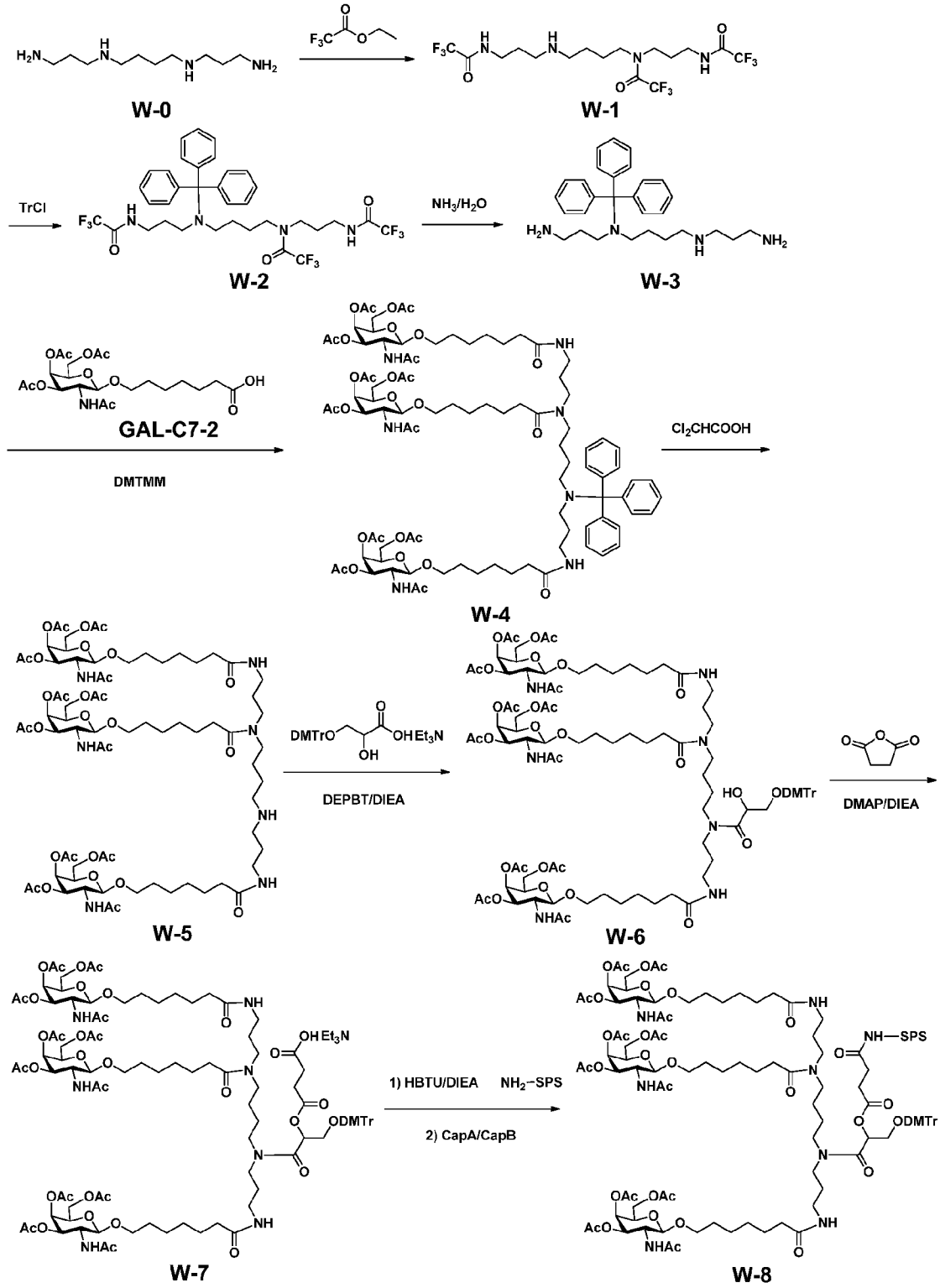
通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 26，不同的是以 V-8 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 V8-siAP1M2SVP，其结

构如式（14）所示。

制备例 8 W8-siAP1M2SVP 缀合物（缀合物 27）的制备

（8-1）W-8 化合物的合成

按照以下方法，合成了 W-8 化合物：



（8-1-1）W-1 的合成：

将 W-0（2.024g，10mmol）溶于 25ml 乙腈中，再加三乙胺（4.048g，40mmol），冰水浴冷却至 0℃左右，加入三氟乙酸乙酯（5.683g，40mmol），室温下反应 22h。减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥 18h，得到 5.835g 粗品固体 W-1。

（8-1-2）W-2 的合成：

将 W-1 粗品（5.835g，10mmol）溶于 50ml 二氯甲烷，向反应液中加入 TrCl（3.345g，12mmol）和三乙胺（1.518g，15mmol），室温下搅拌反应 20h。用 20ml 饱和碳酸氢钠洗涤反应液 2 次，用 20ml 饱和食盐水洗涤 1 次，合并有机相并以无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干有机溶剂，真空油泵发泡干燥过夜，得到粗品固体 W-2 8.012g。不经处理，进行下一步脱保护反应。

（8-1-3）W-3 的合成：

将 W-2 粗品（8.012g，10mmol）溶于 100ml 甲醇，再加入 100ml 甲胺水溶液（40 重量%），在 50℃下搅拌反应 23h。过滤除去不溶颗粒物，减压蒸干溶剂，加入 200ml 体积比为 1:1 的 DCM-甲醇混合溶剂，以 50ml 饱和碳酸氢钠洗涤有机相，水相再用二氯甲烷萃取 3 次，每次 50ml，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，200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷:甲醇:氨水（25 重量%）=1:1:0.05-1:1:0.25 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 W-3 3.062g。

（8-1-4）W-4 的合成：

将 W-3（0.675g，1.517mmol）与 GAL-C7-2（2.60g，5.46mmol）混合溶于 47ml 乙腈，再加二异丙基乙胺（1.57g，12.14mmol），最后加入 3 -二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT，1.816g，6.04mmol），室温搅拌反应 2.5h。以 100ml 二氯甲烷稀释反应液，80ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤有机相，80ml 饱和食盐水洗涤有机相，合并有机相并以无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸干溶剂得粗品，200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干得到纯品 W-4 1.610g。

（8-1-5）W-5 的合成：

将 W-4（1.61g，0.886mmol）溶于 125ml 二氯甲烷，再加入二氯乙酸（3.5ml，42.43mmol），室温下反应 1h。加入 150ml 吡啶中和反应液，减压蒸干溶剂得粗品。200-300 目正相硅胶，10 重量%三乙胺中和硅胶酸性，1 重量‰三乙胺平衡柱子，二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到纯品 W-5 1.26g。

（8-1-6）W-6 的合成：

将 W-5（1.25g，0.793mmol）和按照步骤（1-1-7a）中描述的方法得到的 A-1（1.21g，2.38mmol）混合溶于 12ml 二氯甲烷，加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT，

0.712g，2.38mmol），再加入二异丙基乙胺（0.615g，4.76mmol），25℃下搅拌反应 3h。用 80ml 饱和碳酸氢钠洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 3 次，每次 10ml，合并有机相并以 10ml 饱和食盐水洗涤，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 185g 200-300 目正相硅胶，20ml 三乙胺中和硅胶酸性，以含 1 重量%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=1:1:1:0.1-1:1:0.7 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到纯品 W-6 1.57g。

（8-1-7）W-7 的合成：

将 W-6（1.238g，0.63mmol）、丁二酸酐（0.189g，1.89mmol）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP，0.231g，1.89mmol）混合溶于 7ml 二氯甲烷，再加入 DIEA（0.407g，3.15mmol），25℃下搅拌反应 24h。以 5ml 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 30g 200-300 目正相硅胶，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，二氯甲烷平衡柱子，以含 1 重量‰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 W-7 缀合分子 1.033g。MS m/z：C101H146N7O38，[M-DMTr]+，理论：1763.92，实测：1763.21。

（8-1-8）W-8 的合成：

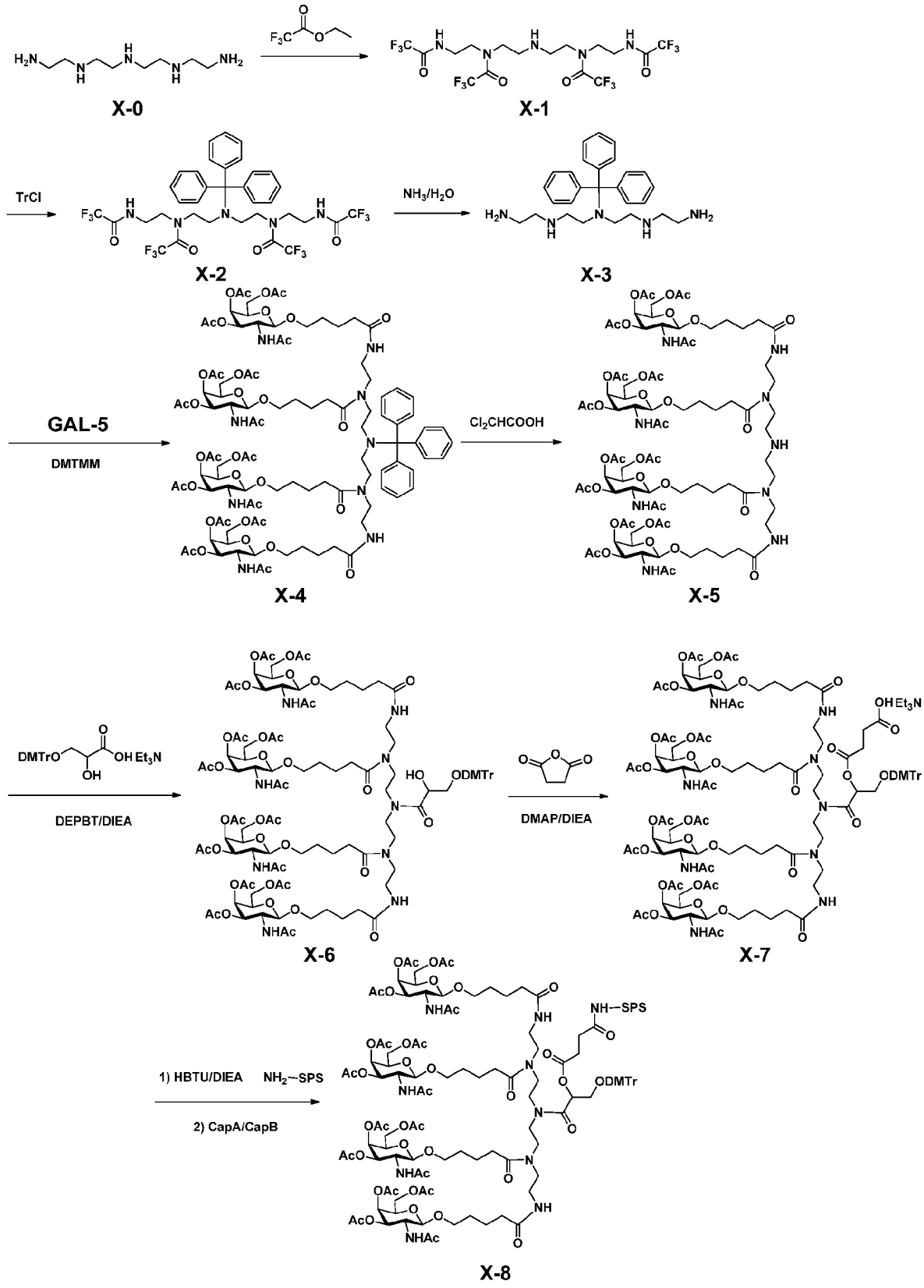
通过与制备例 1 中步骤（1-1-9）相同的方法，制备 W-8。不同的是以 W-7 缀合分子代替 L-9 缀合分子，得到连接固相载体的 W-7 缀合分子。

（8-2）合成 W8-siAP1M2SVP 缀合物

通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 27，不同的是以 W-8 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 W8-siAP1M2SVP，其结构如式（15）所示。

制备例 9 X8-siAP1M2SVP 缀合物（缀合物 28）的制备

按照以下工艺路线，预期能够合成 X-8 化合物：



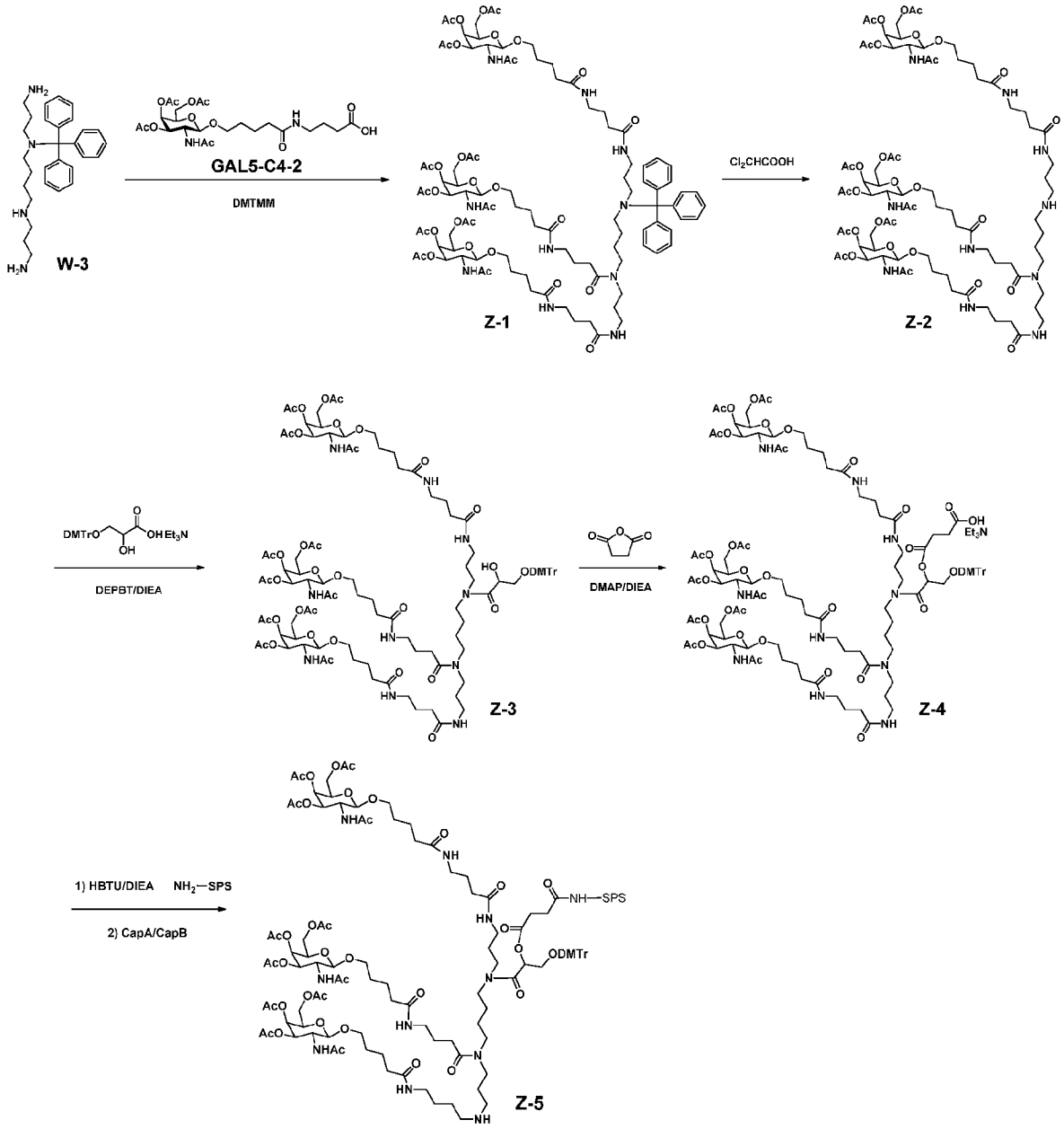
通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 28，不同的是以 X-8 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 X8-siAP1M2SVP，其结

构如式（21）所示。

制备例 10 Z5-siAP1M2SVP 缀合物（缀合物 29）的制备

（10-1）Z-5 化合物的合成

按照以下方法，合成了 Z-5 化合物：



（10-1-1）Z-1 的合成：

将按照步骤（8-1-3）中描述的方法得到的 W-3（1.50g，3.37mmol）与按照步骤（3-1-2）中描述的方法得到的 GAL5-C4-2（7.18g，13.48mmol）混合溶于 34ml 二氯甲烷，再加入二异丙基乙胺（3.48g，26.96mmol），最后加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT，4.04g，13.48mmol），室温搅拌反应 4.5h。以 100ml 二氯甲烷稀释反应液，80ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤有机相，80ml 饱和食盐水洗涤有机相，合并有机相并以无水硫酸钠

干燥，过滤后减压蒸干溶剂得粗品，200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，以二氯甲烷:甲醇=30:1-15:1 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干得到纯品 Z-1 3.97g。MS m/z：$C_{98}H_{143}N_{10}O_{33}$，$[M+H]^+$，理论：1987.98，实测：1987.90。

（10-1-2）Z-2 的合成：

将 Z-1（3.97g，2.00mmol）溶于 250ml 二氯甲烷，再加入二氯乙酸（10.941g，84.85mmol），室温下反应 1h。加入吡啶中和反应液至中性，减压蒸干溶剂得粗品。220g 200-300 目正相硅胶装柱，10%吡啶中和硅胶酸性，1‰吡啶平衡柱子，二氯甲烷:甲醇=10:1-2:1 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到纯品 Z-2 3.49g。MS m/z：$C_{79}H_{129}N_{10}O_{33}$，$[M+H]^+$，理论：1746.94，实测：1746.90。

（10-1-3）Z-3 的合成：

将 Z-2（3.49g，2.0mmol）和按照步骤（1-1-7a）中描述的方法得到的 A-1（3.06g，6.0mmol）混合溶于 30ml 二氯甲烷，加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT，1.80g，6.0mmol），再加入二异丙基乙胺（1.55g，12.0mmol），25℃下搅拌反应 3h。100ml 二氯甲烷稀释反应液，用饱和碳酸氢钠洗涤有机相 2 次，每次 30ml，水相以 10 二氯甲烷萃取，合并有机相并以 50ml 饱和食盐水洗涤，合并有机相无水硫酸钠干燥，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 200g 200-300 目正相硅胶，20ml 三乙胺中和硅胶酸性，以含 1 重量%三乙胺的石油醚平衡柱子，二氯甲烷:甲醇=25:1-15:1 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到纯品 Z-3 2.2g。MS m/z：$C_{103}H_{151}N_{10}O_{38}$，$[M+H]^+$，理论：2136.02，实测：2136.20。

（10-1-4）Z-4 的合成：

将 Z-3（2.10g，0.983mmol）溶解在含有 DIEA（0.635g，4.915mmol）的 14.8ml 二氯甲烷中，加入 4-二甲氨基吡啶（DMAP，240mg，1.966mmol）搅拌澄清后，加入丁二酸酐（197mg，1.966mmol），25℃下搅拌反应 18h。加入 50ml 二氯甲烷稀释反应液，以 80ml 0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤有机相，水相以二氯甲烷萃取 2 次，每次 50ml，合并有机相减压蒸干得到粗品。柱纯化使用 188g 200-300 目正相硅胶，以 1 重量%三乙胺中和硅胶酸性，二氯甲烷平衡柱子，以含 1 重量‰三乙胺的二氯甲烷:甲醇=10:1-3:1 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到纯品 Z-4 缀合分子 1.95g。MS m/z：$C_{107}H_{155}N_{10}O_{41}$，$[M+H]^+$，理论：1935.07，实测：1935.29。

（10-1-5）Z-5 的合成

通过与制备例 1 中步骤（1-1-9）相同的方法，制备 Z-5。不同的是以 Z-4 缀合分子代替 L-9 缀合分子，得到连接固相载体的 Z-4 缀合分子。

（10-2）合成 Z5-siAP1M2SVP 缀合物

通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3A）、（1-4）相同的方法，制备缀合物 29，不同的是以 Z-5 化合物代替 L-10 化合物起始正义链合成。预期可以得到 Z5-siAP1M2SVP 缀合物，其结构如式（22）所示。

制备例 11 缀合物 F1-F5 的制备

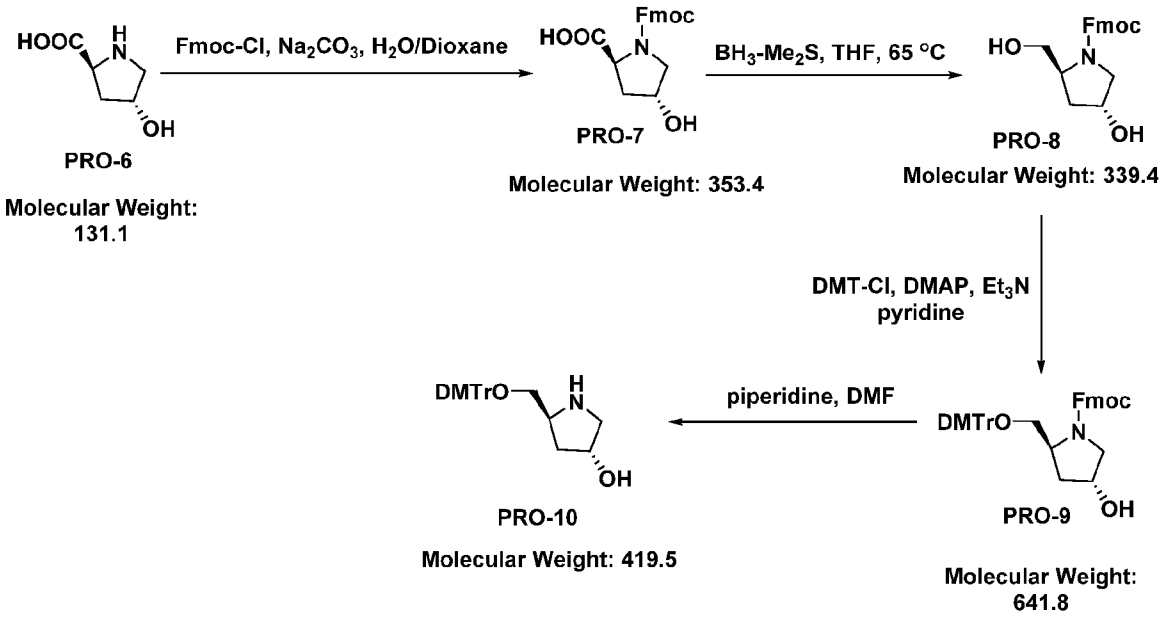
本制备例合成了缀合物 F1-F5（以下，也分别称为 FIN-siAP1M1SVP、FIN-siAP1M1S、

FIN-siAP2M1SVP、FIN-siAP2M1S 和 FIN-siAP2M2S 缀合物）。该缀合物中所缀合的 siRNA 的序列参见表 3。

（11-1）FIN-2 缀合分子的合成

参照 Rajeev 等人，ChemBioChem 2015,16,903-908 中描述的制备方法，按照以下工艺路线，合成了 FIN-2 缀合分子：

（11-1-1）PRO-10 的合成



（11-1-1a）PRO-7 的合成

将 2.93g **PRO-6**（L-羟基脯氨酸，CAS 号：51-35-4，购自安耐吉公司，22.4mmol）溶于 22.5ml 1,4-dioxane（1,4-二氧六环，CAS 号：123-91-1）中，加入 34ml 10%（w/w）Na_2CO_3 的水溶液，呈悬浊液状态，将 6.95g Fmoc-Cl（氯甲酸-9-芴基甲酯，CAS 号：28920-43-6，购自安耐吉公司，26.8mmol）溶于 34ml 1,4-dioxane，冰浴下加入到上述悬浊液中，自然升至室温反应过夜。将反应液倒入 150ml 冰水中，用甲基叔丁基醚萃取三次，每次 100ml，弃去有机相，水相用浓 HCl 调节至 pH≤5，用 100ml 乙酸乙酯萃取两次，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 **PRO-7** 7.83g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.91 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.48 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.27 (m, 2H), 5.17 (s, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.23 – 4.11 (m, 2H), 3.55 – 3.41 (m, 3H), 2.31 – 2.10 (m, 1H), 2.08 – 1.88 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z 理论 $C_{20}H_{19}NO_5$ $[M-H]^-$ 352.1190, 实测 352.1033.

（11-1-1b）PRO-8 的合成

将 7.83g **PRO-7**（22.2mmol）溶于 80ml THF（CAS 号：109-99-9）中，油浴加热到 65°C，回流状态下加入 36.6ml 2mol/L 的 BH_3-Me_2S 的 THF 溶液（CAS 号 13292-87-0，购自百灵威公司，73.2mmol），继续回流反应 3 小时。倒出反应液，用甲醇溶解剩余固体，搅拌下加入甲醇至反应液无气体放出并继续搅拌 30 分钟，减压蒸除溶剂后用石油醚提纯三次后得白色固体产物 **PRO-8** 7.1g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.91 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 7.67

(d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.49 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.26 (m, 2H), 5.18 (dd, *J* = 6.1, 3.8 Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.23 – 4.13 (m, 2H), 3.55 – 3.38 (m, 2H), 2.32 – 2.11 (m, 1H), 2.08 – 1.89 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z 理论 $C_{20}H_{21}NO_4$ $[M+Na]^+$ 362.1368, 实测 362.1012.

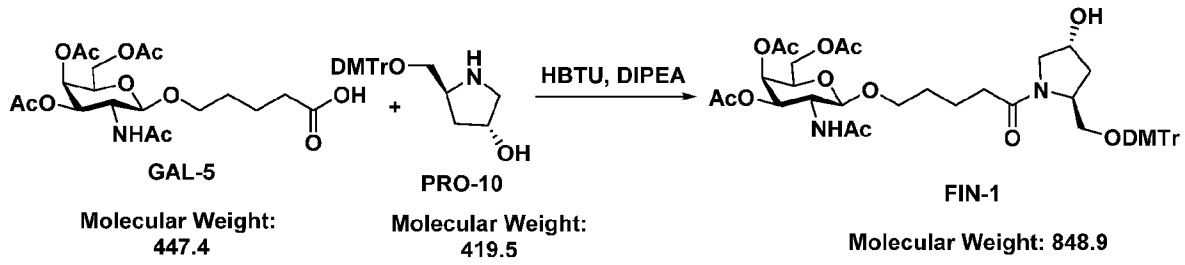
（11-1-1c）PRO-9 的合成

将 7.1g **PRO-8**（21mmol）溶于 100ml 吡啶中，加入 14.2g DMTr-Cl（4,4'-双甲氧基三苯甲基氯，42mmol），室温下搅拌反应 5 小时。减压蒸除溶剂，粗品用乙酸乙酯溶解后过滤除去盐类杂质，减压蒸除溶剂后硅胶柱纯化，硅胶柱预先用吡啶碱化后 DCM 溶解粗品上样，先用含 1%（v/v）吡啶的 DCM 洗脱 DMTr-Cl，随后用乙酸乙酯洗脱产物，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，得白色固体产物 **PRO-9** 8.2g；HRMS (ESI) m/z 理论 $C_{41}H_{39}NO_6$ $[M+Na]^+$ 664.2675, 实测 664.2348；C18 RP-HPLC（批号 JJS160324-1）纯度 94.20%。

（11-1-1d）PRO-10 的合成

将 8.2g **PRO-9**（12.8mmol）溶于 64ml DMF（N,N-二甲基甲酰胺）中，加入 40ml 哌啶（384mmol），室温下搅拌反应 30 分钟。反应液倒入 300ml 冰水中，乙酸乙酯萃取三次，每次 150ml，合并有机相，用 200ml 饱和食盐水洗涤后，有机相以无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂后硅胶柱纯化，硅胶柱预先用吡啶碱化后 DCM 溶解粗品上样，先用含 1%（v/v）吡啶的 DCM 洗脱 Fmoc，随后用乙酸乙酯洗脱产物，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，得白色固体产物 **PRO-10** 4.65g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.35 – 7.18 (m, 7H), 6.93 – 6.84 (m, 4H), 4.56 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.46 – 3.37 (m, 1H), 2.88 (ddd, *J* = 18.5, 10.0, 5.5 Hz, 2H), 2.75 (dd, *J* = 8.7, 5.8 Hz, 1H), 2.62 (dd, *J* = 11.0, 2.7 Hz, 1H), 1.74 – 1.65 (m, 1H), 1.40 (ddd, *J* = 12.9, 8.5, 5.9 Hz, 1H)； HRMS (ESI) m/z 理论 $C_{26}H_{29}NO_4$ $[M+Na]^+$ 442.1994, 实测 442.1999；C18 RP-HPLC（批号 JJS160329-1）纯度 97.07%。

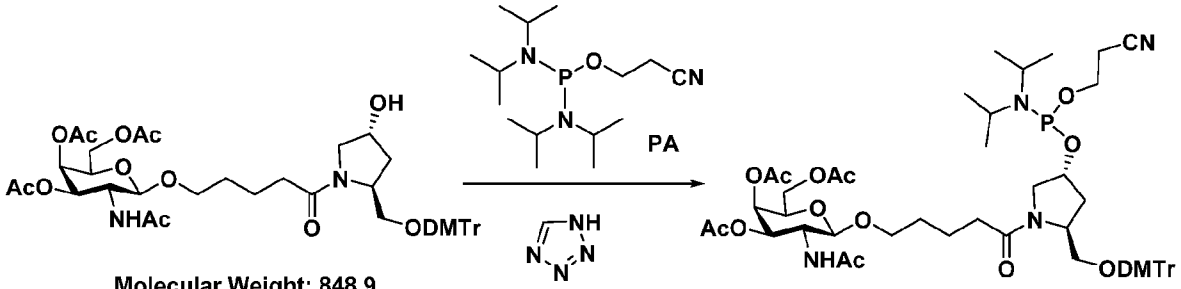
（11-1-2）FIN-1 的合成



将按照（1-1-1）中描述的方法得到的 **GAL-5**（4.5g，10mmol）溶于 40ml DMF 中，依次加入 3.9g DIEA（N,N-二异丙基乙胺，CAS 号：7087-68-5，购自阿拉丁公司，30mmol）和 3.8g HBTU（苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐，CAS 号：94790-37-2，商购自阿拉丁公司，11mmol），室温下搅拌 10 分钟，将步骤（11-1-1d）中获得的 **PRO-10**（4.2g，10mmol）溶于 40mlDMF 中，随后加入到上述反应液中，反应液中加入无水硫酸钠干燥，室温搅拌 2 小时。将反应液倒入 120ml 冰水中，用乙酸乙酯萃取三次，每次 60ml，合并有机相，分别用 20ml 水、20ml 饱和食盐水洗涤，分出有机相并以无水硫酸钠干燥，减压蒸除溶剂，硅胶柱纯化，硅胶柱预先用吡啶碱化后上样，用含 1 体积%三乙胺和 1 体积%甲

醇的二氯甲烷（DCM）溶液洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，得到浅黄色泡沫状固体产品 **FIN-1** 6.5g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.83 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 7.20 (td, J = 8.9, 3.5 Hz, 5H), 6.93 – 6.84 (m, 4H), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.04 – 4.90 (m, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.40 (d, J = 4.4 Hz, 0.8H), 4.31 (d, J = 5.0 Hz, 0.2H), 4.15 (s, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.93 (s, 1H), 3.74 (s, 7H), 3.59 (dt, J = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.50 – 3.40 (m, 1H), 3.39 – 3.25 (m, 3H), 3.13 (dd, J = 8.9, 5.2 Hz, 1H), 3.00 (dq, J = 9.3, 5.3, 4.3 Hz, 1H), 2.22 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.90 (s, 4H), 1.74 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.36 (s, 1H)。C18 RP-HPLC（批号 LJ160422）纯度 95.45%。

（11-1-3）FIN-2 的合成



将步骤（11-1-2）中获得的 **FIN-1**（3.0g，3.53mmol）与乙腈共沸除水，减压抽干，溶于 10ml DMF，氮气保护下加入 2.13g PA（双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦，购自 Adamas 公司，商品编号 11356B，7.06mmol）、346mg 四唑（CAS 号：288-94-8，购自阿拉丁公司，4.94mmol），室温下搅拌反应，补加 10ml DMF，继续搅拌反应 1 小时。减压蒸除溶剂后以硅胶柱色谱纯化，硅胶柱预先用吡啶碱化后 DCM 溶解粗品上样，乙酸乙酯洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸除溶剂，得无色糖浆状粗品 4.5g。粗品用 50 体积%乙腈水溶液溶解至完全溶解，用 C-18，330g，300Å 中压纯化柱纯化样品，柱子先用 1 体积%吡啶的乙腈溶液碱化，梯度洗脱收集产品峰，减压蒸除溶剂得白色粉末产品 **FIN-2** 缀合分子 2.2g。^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 148.04, 147.94, 147.62, 147.19，磷谱纯度 92%；C18 RP-HPLC 纯度 90.54%。

（11-2）FIN-2 缀合分子连接到固相载体

采用核酸固相合成方法，将步骤（11-1-3）中得到的 FIN-2 缀合分子，通过三次循环，连接到通用固相载体（UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports）上，从而实现缀合基团（FIN_FIN_FIN）连接在 RNA 正义链的 3'末端。

参照 Rajeev 等人，ChemBioChem 2015,16,903-908 中描述的制备方法进行上述连接，具体而言，首先，由上述通用固相载体开始，脱除固相载体上的羟基保护基团，在偶联反应条件和偶联试剂存在下与 FIN-2 缀合分子接触发生偶联，经盖帽反应和氧化反应后，获得连接至固相载体的 FIN 缀合分子；脱除该连接至固相载体的 FIN 缀合分子上的羟基保护基团 DMTr，与 FIN-2 缀合分子接触发生偶联，进行盖帽反应和氧化反应，并再重复一次上述脱保护-偶联-盖帽-氧化步骤，连接第三个 FIN-2 缀合分子，获得连接在固相载体上的的缀合基团（FIN_FIN_FIN）。

上述反应中，所述的脱保护、偶联、盖帽、氧化的反应条件、溶剂和试剂用量与前述步骤（1-2）中描述的核酸固相合成方法相同。

（11-3）缀合物 F1-F5 的合成

通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3）、（1-4）相同的方法，制备题述缀合物，不同的是：1）以步骤（11-2）得到的化合物起始合成正义链；2）缀合的 siRNA 具有表 3 中所示的对应于缀合物 F1-F5 的序列。

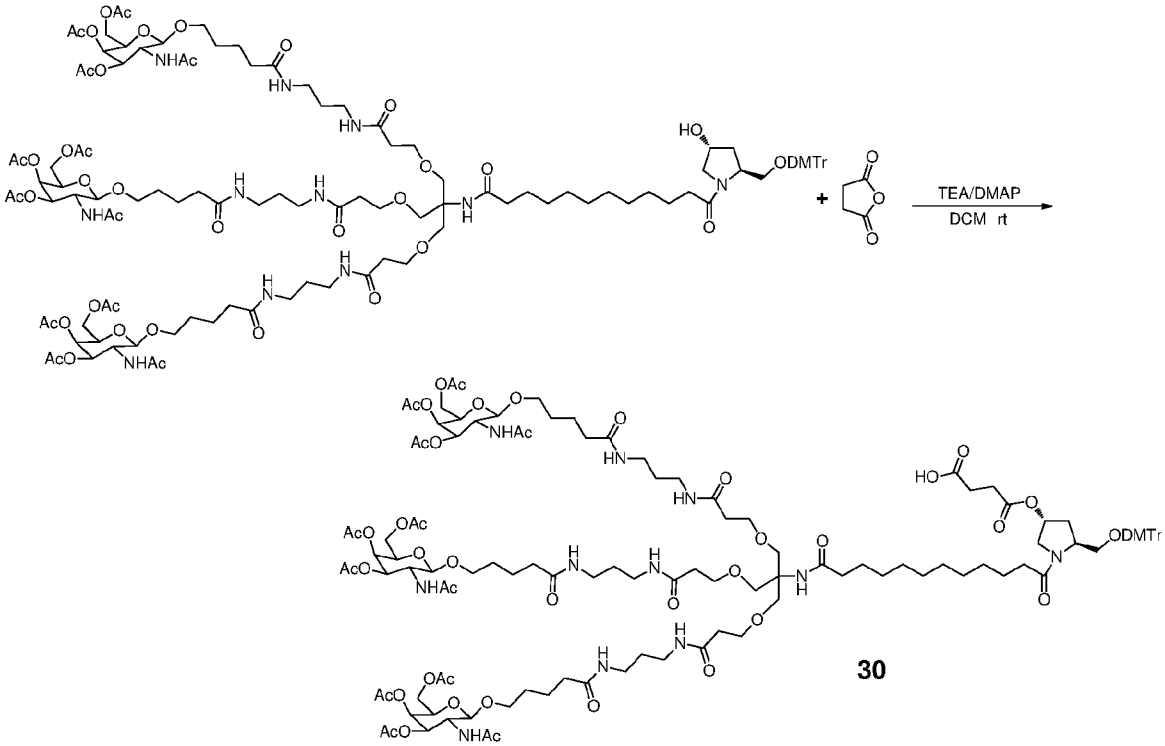
利用液质联用仪（LC-MS，Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，购于 Waters 公司，型号：LCT Premier）进行分子量检测。其结果，实测值与理论值相符，从而确定所合成的缀合物是目标设计的化合物，其结构如式（307）所示。

制备例 12 对比缀合物 3 的制备

本制备例合成了对比缀合物 3，该缀合物中所缀合的 siRNA 的序列参见表 3。该缀合物与美国申请 15/597,225 中化合物 AD-69535 的结构相同。

（12-1）$(GalNAc)_3$ 缀合分子的合成

按照 WO2014025805A1 所述的制备方法合成化合物 30，即，含有如上文所述的接头 $-(L^A)_3$ 三羟甲基氨基甲烷-L^B-以及作为靶向基团的 N-乙酰半乳糖胺分子（其中，每个 L^A 可连接一个 N-乙酰半乳糖胺分子，因而一个接头可连接三个 N-乙酰半乳糖胺分子）的缀合分子，也称$(GalNAc)_3$ 缀合分子，所述化合物 30 的结构如下式所示：



30

（12-2）$(GalNAc)_3$ 缀合分子连接到固相载体

通过与制备例 1 中步骤（1-1-9）相同的方法，将$(GalNAc)_3$ 缀合分子连接到固相载体，得到连接固相载体的$(GalNAc)_3$ 缀合分子。

（12-3）对比缀合物 1 的合成

通过与制备例 1 中步骤（1-2）、（1-3）、（1-4）相同的方法，制备对比缀合物 1，不同的是：1）以步骤（12-2）得到的化合物起始正义链合成；2）缀合的 siRNA 具有表 3 中编号为$(GalNAc)_3$-69535 所示的序列。

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。其结果，实测值与理论值相符，从而确定所合成的缀合物是目标设计的化合物，其结构如式（305）所示。

在上述本公开的缀合物制备完成后，使用标准手段冻干为固体粉末保存备用。在使用时，可使用例如注射用水将其重新溶解为所需浓度的溶液使用。

实验例 1 本实验考察本公开的 siRNA 缀合物在体外（*in vitro*）的抑制活性

实验例 1-1 体外 psiCHECK 系统中的在靶活性

本实验例考察了缀合物 F1-F5 在体外 psiCHECK 系统中的在靶活性（on-target activity），即测定了缀合物 F1-F5 靶向完全匹配目标序列（其核苷酸序列与所述缀合物反义链的全长核苷酸序列完全互补）的活性。

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 缀合物共转染至 HEK293A 细胞中，通过双萤光素酶报告基因的表达水平，来反应 siRNA 缀合物的在靶活性。

具体步骤如下：

[1] 构建检测质粒

采用 psiCHECK™-2（Promega™）质粒构建在靶质粒，该质粒含有一个目标序列，该目标序列与待测缀合物中的反义链的所有 21 个核苷酸序列完全互补。将目标序列克隆到 psiCHECK™-2 质粒的 Xho I/Not I 位点。

[2] 转染

在 96 孔板中，根据 Lipofectamine™ 2000（Invitrogen 公司）的使用说明，分别共转染 siRNA 缀合物和上述质粒，其中每孔转染质粒 10ng，使用 Lipofectamine™ 2000 0.2μL，缀合物的终浓度（以 siRNA 的浓度计算）依次为 0.5nM、0.1nM 和 0.02nM。各组以无缀合物处理为对照。每组 3 个复孔。

NC 为吉玛公司与目的基因序列无同源性的通用阴性对照 B01001。

[3] 检测

共转染 24 小时后，使用双萤光素酶报告基因检测试剂盒（Dual luciferase reporter gene assay kit，Promega 公司，cat.E2940），根据使用说明书裂解 HEK293A 细胞，检测双萤光素酶报告基因的表达水平。以海肾萤光素酶蛋白水平相对于萤火虫萤光素酶蛋白水平进行标准化。结果如图 1 所示。

结果表明，缀合物 F1-F5 都具有较好的体外抑制活性，高浓度下，各缀合物的抑制率为 87%-97%。

实验例 1-2 体外 psiCHECK 系统中 IC_{50} 的测定

本实验例考察了缀合物 1 在体外 psiCHECK 系统中的 IC_{50}。

采用与实验例 1-1 相同的方法构建缀合物 1 的在靶质粒，缀合物 1 的终浓度（以 siRNA 的浓度计算）自 1nM 起始，倍比稀释 11 个浓度，至 0.001nM。根据采用不同缀合物浓度所测得的活性结果，利用 Graphpad 5.0 软件 log(inhibitor) vs. response—Variable slope 功能来拟合剂量-效应曲线，根据剂量-效应曲线计算缀合物 1 的 IC_{50} 值。

$$Y = \mathrm{Bot} + \frac{\mathrm{Top} - \mathrm{Bot}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \times \mathrm{HillSlope}}}$$

式中：

Y 是残留 mRNA 的表达水平，

X 为转染 siRNA 浓度的对数值，

Bot 是稳态期底部的 Y 值，

Top 是稳态期顶部的 Y 值，

$LogIC_{50}$ 是当 Y 在底部到顶部之间一半时的 X 值，而 HillSlope 则是曲线的斜率。

检测可得，缀合物 1 在体外 psiCHECK 系统中的 IC_{50} 为 0.0174nM，说明本公开的 siRNA 缀合物在体外具有较高活性。

实验例 1-3 体外细胞系中 IC_{50} 的测定

本实验例考察了缀合物 2 在体外 Huh7 细胞中对 APOC3 mRNA 表达量的抑制效率。

使用 Lipofectamine™ 2000 将缀合物 2 转染至人类肝癌细胞株 Huh7 中，siRNA 缀合物终浓度（以 siRNA 的量计）自 3nM 起始，3 倍稀释 7 个浓度，至 0.004nM。每个浓度 2 个复孔。

通过实时荧光定量 PCR（Quantitative Real-Time PCR）分别检测转染了各浓度的缀合物 2 的 Huh7 细胞中 APOC3 mRNA 的表达量。具体步骤为：培养转染的细胞 24 小时后，使用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据总 RNA 提取的标准操作步骤提取细胞中的总 RNA；分别取 1μg 总 RNA，使用反转录试剂盒（Promega 公司，货号 A3500）按其说明书的操作方法反转录得到 cDNA。使用 2×Ultra SYBR Mixture(with ROX)（北京康为世纪生物科技有限公司，货号 CW0956）试剂盒，以 cDNA 为模板按照说明书的步骤进行 APOC3 mRNA 表达量的检测。其中，用于扩增 APOC3 和作为内参基因的 β-actin 的 PCR 引物如表 4 所示。

表 4 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
人 APOC3	5'- GTGACCGATGGCTTCAGTTC -3'（SEQ ID NO: 50）	5'- ATGGATAGGCAGGTGGACTT -3'（SEQ ID NO: 51）
人 β-actin	5'- CCAACCGCGAGAAGATGA - 3'（SEQ ID NO: 52）	5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'（SEQ ID NO: 53）

APOC3 mRNA 表达量按如下等式计算：APOC3 mRNA 表达量=[(测试组 APOC3 mRNA 的表达量/测试组 β-Actin mRNA 的表达量)/(对照组 APOC3 mRNA 的表达量/对照组 β-Actin mRNA 的表达量)]×100%。

缀合物对 APOC3 mRNA 表达量的抑制率按如下等式计算：抑制率＝(1- APOC3 mRNA 表达量)×100%。其中，各测试组为分别经各浓度缀合物 2 处理的 Huh7 细胞，对照组为未经缀合物 2 处理的 Huh7 细胞。

根据采用不同浓度缀合物 2 所测得的对 APOC3 mRNA 表达量的抑制率，采用与实验例 1-2 相同的方法计算 IC_{50}，可得缀合物 2 在体外 Huh7 细胞中的 IC_{50} 为 0.0085nM，说明本公开的 siRNA 缀合物在体外具有较高活性。

实验例 2 本实验考察本公开的 siRNA 缀合物在体内（*in vivo*）对 APOC3 mRNA 表达量的抑制效率

实验例 2-1 本实验例考察缀合物 1 在人 APOC3 转基因小鼠体内对肝脏组织中 APOC3 mRNA 表达量的抑制率。

将人 APOC3 转基因小鼠（B6;CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J）按照甘油三酯含量大于 2mmol/L 随机分组，每组 5 只，分别向每组小鼠给予缀合物 1、对比缀合物 1 以及生理盐水 NS。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，siRNA 缀合物给药剂量（以 siRNA 的量计）为 1mg/kg 和 0.1mg/kg 两个剂量组，缀合物分别以 0.2mg/ml 和 0.02mg/ml 浓度的 0.9%氯化钠水溶液提供，给药体积为 5mL/kg。给药后 14 天处死小鼠，收集肝脏，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；随后用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到肝组织总 RNA。

采用与实验例 1-3 相同的实时荧光定量 PCR 方法检测肝组织中 APOC3 mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 APOC3 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别检测 APOC3 和 β-肌动蛋白的表达量。

检测引物的序列参见表 5。

表 5 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
人 APOC3	5'- GTGACCGATGGCTTCAGTTC -3'（SEQ ID NO: 50）	5'- ATGGATAGGCAGGTGGACTT -3'（SEQ ID NO: 51）
小鼠 β-actin	5’-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG-3’（SEQ ID NO: 54）	5’-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3’（SEQ ID NO: 55）

肝中 APOC3 mRNA 的表达量以及缀合物对 APOC3 mRNA 的抑制率计算同实验例 1-3。其中，对照组为本实验中施以生理盐水的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同 siRNA 缀合物的给药组小鼠。结果示于图 2 中。

结果显示，缀合物 1 对转基因鼠中的人 APOC3 基因具有显著的抑制作用。

实验例 2-2 本实验例考察缀合物 1 在食蟹猴体内对肝脏组织中 APOC3 mRNA 表达量的抑制率，以及对血脂水平的影响。

该实验例委托苏州华测生物技术有限公司进行。将 2-4 kg 年龄为 3-5 岁的食蟹猴随机分为 2 组，每组一雄一雌，分别给予缀合物 1 以及对比缀合物 2。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，siRNA 缀合物给药剂量（以 siRNA 的量计）为 3mg/kg，缀合物分别以 3mg/ml 浓度的氯化钠注射液（山东科伦药业有限公司）的形式提供，给药

体积为 1mL/kg。首次给药当天定义为试验第 1 天（D1）、给药前 1 天为第 0 天（D0）。

给药前与给药后第 7、14、21、28 天对动物进行静脉采血，在各时间点检测血清待测物含量，待测物指血脂（总胆固醇 CHO、甘油三酯 TG）和转氨酶（谷草转氨酶 AST、谷丙转氨酶 ALT）。待测物进行标准化处理，各待测物的抑制率按如下等式计算：抑制率＝（1-给药后测试组待测物含量/给药前测试组待测物含量）×100%。其中，对甘油三酯的抑制率见表 6。

表 6 TG 含量及其抑制率

缀合物		TG 含量 (mmol/L)					TG 抑制率(%)			
	时间点	D0	D7	D14	D21	D28	D7	D14	D21	D28
缀合物 1	雄性 M	0.88	0.32	0.35	0.42	0.3	63.6	60.2	52.3	65.9
	雌性 F	0.75	0.31	0.4	0.52	0.23	58.7	46.7	30.7	69.3

通过检测给药后各检测点转氨酶含量，未发现肝功能异常。

给药后第 28 天处死动物，摘取肝脏。大体观察，未发现显著异常。采用与实验例 2-1 相同的方法提取肝组织 RNA，检测肝中 APOC3 mRNA 的表达量。检测引物的序列参见表 7。

表 7 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
猴 APOC3	5'- TTGAACCCTGAGGCCAAACC -3'（SEQ ID NO: 56）	5'- CGGTAGGAGGGCACTGAGAA -3'（SEQ ID NO: 57）
猴 GAPDH	5’- GGGAGCCAAAAGGGTCATCA-3’（SEQ ID NO: 58）	5’- CGTGGACTGTGGTCATGAGT-3’（SEQ ID NO: 59）

实时荧光定量 PCR 检测可得，相对于对比缀合物 2，缀合物 1 对雌性动物的 APOC3 mRNA 的抑制率为 55.3%；对雄性动物的 APOC3 mRNA 的抑制率为 78.5%。

该实验显示，缀合物 1 对非人灵长类中的 APOC3 基因同样具有显著的抑制作用，并对血清 TG 也有显著的抑制作用，同时并未检测到肝功异常。

实验例 3 本实验考察本公开的 siRNA 缀合物在体内（*in vivo*）对血脂含量的影响

实验例 3-1 本实验例考察缀合物 1 在人 APOC3 转基因小鼠体内对血清中总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）含量的影响。

将人 APOC3 转基因小鼠（B6;CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J）按照 TG 含量>2mmol/L 进行随机分组，每组 7 只，分组如下：（1）生理盐水对照组；（2）缀合物 1 3mg/kg 组；（3）缀合物 1 1mg/kg 组。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，siRNA 缀合物分别以 0.6mg/ml 和 0.2mg/ml 浓度的 0.9%氯化钠水溶液提供，给药体积为 5mL/kg。

分别于给药前（记为第 0 天），及给药后第 7、14、21、28、35、42、49、63、77、91、112、133、147、154、161、175、189 天对小鼠眼眶静脉丛取血，在各时间点检测血清 CHO 和 TG 水平。

眼眶取血每次约 100 μL，离心后血清不少于 20μL，进一步使用 PM1P000/3 全自动血清生化仪（SABA，意大利）检测血清中总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）的含量。

标准化的血脂水平=(给药后测试组血脂含量/给药前测试组血脂含量)×100%。

血脂水平的抑制率＝（1-给药后测试组血脂含量/给药前测试组血脂含量）×100%。血脂指总胆固醇或甘油三酯。

检测结果示于图 3A 和 3B 中。

由图 3A 和 3B 可以看出，在给药后不同时间点，缀合物 1 显示出明显的降低小鼠血清中 TG 和 CHO 的效果，效果能长达 189 天；表明其能够在长时间内稳定高效地抑制 APOC3 基因的表达。

实验例 3-2 本实验例考察了缀合物 2 在人 APOC3 转基因小鼠体内对血清中总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）含量的影响。

按照与实验例 3-1 相同的方法进行检测，区别在于，每组小鼠 8 只，所给予的缀合物为缀合物 2；以 0.1、0.3、1、3、9mg/kg 五个剂量组分别给药，给药体积不变，相应调整缀合物溶液浓度；测试持续至给药后第 112 天。结果示于图 4A 和 4B 中。

由图 4A 和 4B 的结果可知，缀合物 2 能够在长达 112 天的时间内显著降低转基因小鼠中的 TG 和 CHO 水平，并且该降低效果存在明显的剂量依赖效应。

实验例 3-3 本实验例比较了缀合物 1-3 在人 APOC3 转基因小鼠体内对血清中总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）含量的影响。

采用与实验例 3-1 相同的方法对小鼠血清总胆固醇（CHO）和总血脂（TG）进行测量，区别在于：每组小鼠 6 只，分别给予缀合物 1、2 和 3 以及对比缀合物 3，每一种缀合物按 1mg/kg 和 3mg/kg 两个剂量组给药，给药体积不变，相应调整缀合物溶液浓度；测试时间直至给药后第 112 天。结果参见图 5A-图 5D。

由图 5A-图 5D 的结果可知，在长达 112 天的时间内，本公开的缀合物 1-3 在不同剂量下均显示出对转基因小鼠中血脂的持续降低作用，该降低的持续效果总体上优于对比缀合物 3。

上述结果表明，本公开提供的缀合物能够有效降低肝脏中 APOC3 mRNA 的表达，降低血液中总胆固醇、甘油三酯含量，可预防和/或治疗血脂异常，具有良好的临床应用前景。

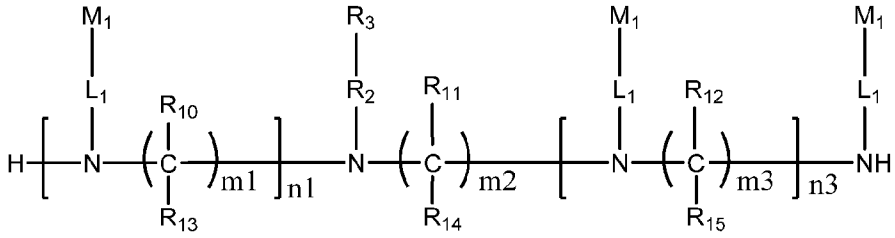
以上详细描述了本公开的一些实施方式，但是，本公开并不限于上述实施方式中的具体细节，在本公开的技术构思范围内，可以对本公开的技术方案进行多种简单变型，这些简单变型均属于本公开的保护范围。

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。

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。

权 利 要 求

1、一种 siRNA 缀合物，该缀合物具有式（1）所示的结构：



式（1），

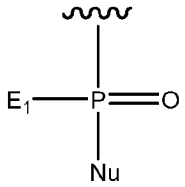
其中，

n1 为选自 1-3 的整数，n3 为选自 0-4 的整数；

m1、m2 和 m3 独立地为选自 2-10 的整数；

R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14} 和 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 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，所述 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 1 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 2 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'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ -3'（SEQ ID NO: 1），

5'- Z'UCUUGUCCAGCUUUAUUG -3'（SEQ ID NO: 2）；

其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 1 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 2 中包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 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_2、-C_1-C_{10} 烷基-NH_2、

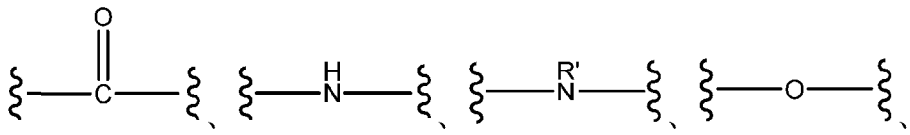
-N(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基)、-NH(C_1-C_{10}烷基)、氰基、硝基、-CO_2H、-C(O)O(C_1-C_{10}烷基)、-CON(C_1-C_{10}烷基)(C_1-C_{10}烷基)、-CONH(C_1-C_{10}烷基)、-$CONH_2$，-NHC(O)(C_1-C_{10}烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C_1-C_{10}烷基)C(O)(C_1-C_{10}烷基)、-N(C_1-C_{10}烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C_1-C_{10}烷基、-C(O)C_1-C_{10}烷基苯基、-C(O)C_1-C_{10}卤烷基、-OC(O)C_1-C_{10}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 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、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)、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)；

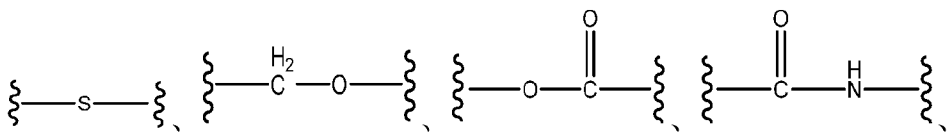
~~~表示基团连接至分子其余部分的位点；

M_1表示靶向基团。

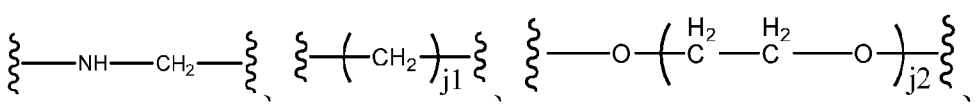
2、根据权利要求 1 所述的 siRNA 缀合物，其中，每个 L_1 独立地选自式 A1-A26 基团中的一种或多种的连接组合：



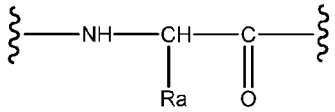
（A1） （A2） （A3） （A4）



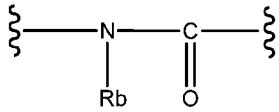
（A5） （A6） （A7） （A8）



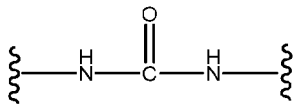
（A9） （A10） （A11）
~~~



、

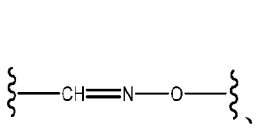


、

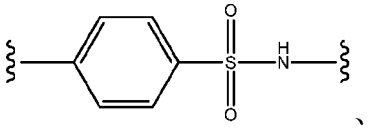


、

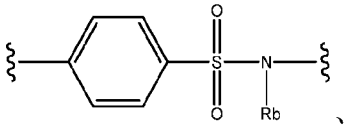
（A12） （A13） （A14）



、

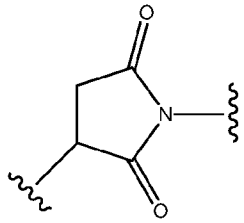


、

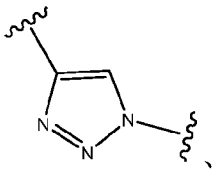


、

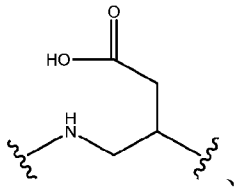
（A15） （A16） （A17）



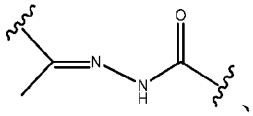
、



、

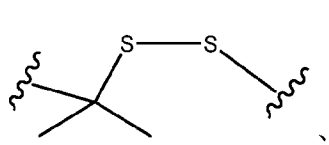


、

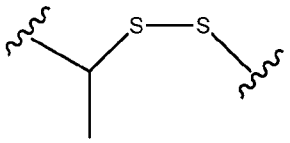


、

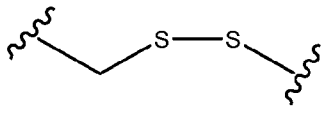
（A18） （A19） （A20） （A21）



、

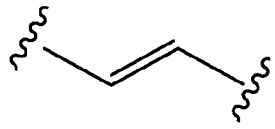


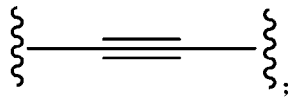
、



、

（A22） （A23） （A24）


、

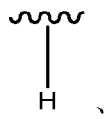

；

（A25） （A26）

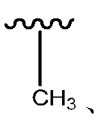
其中，j1 为 1-20 的整数；j2 为 1-20 的整数；

R’为 C_1-C_{10} 的烷基；

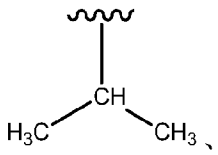
Ra 选自式 A27-A45 基团或其任意组合所组成的组：



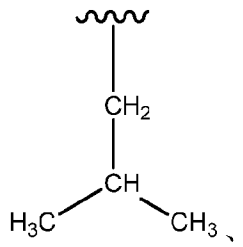
、



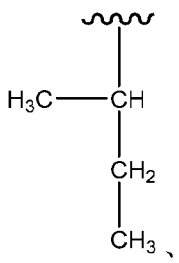
、



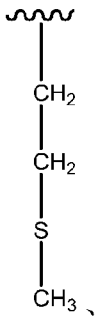
、



、

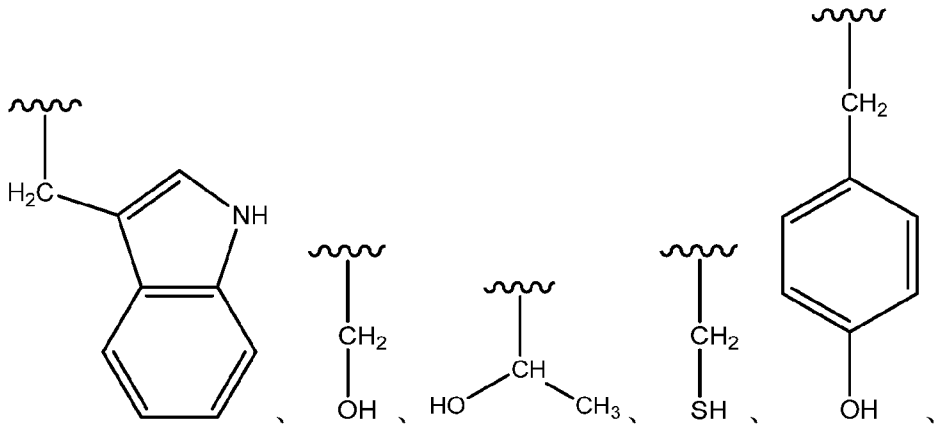


、

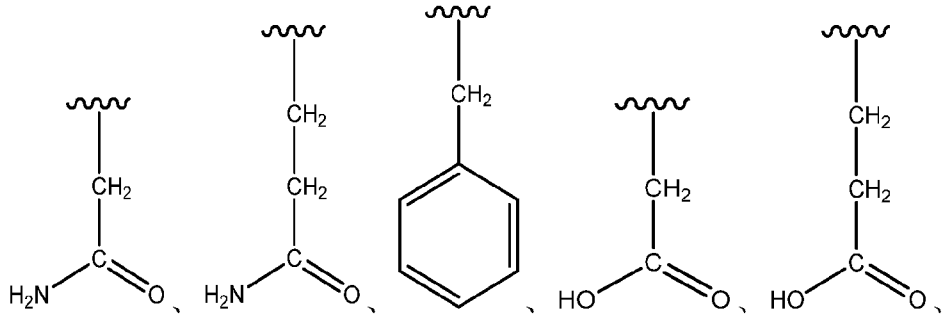


、

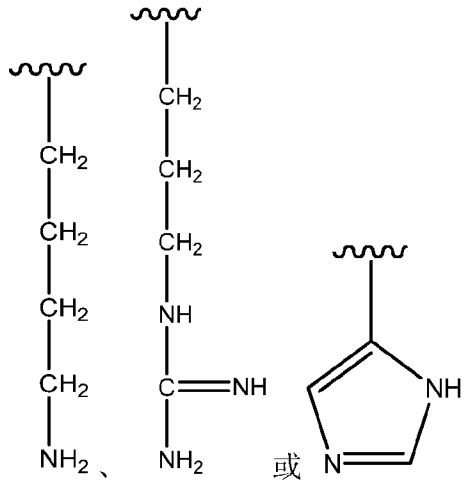
（A27） （A28） （A29） （A30） （A31） （A32）



（A33） （A34） （A35） （A36） （A37）



（A38） （A39） （A40） （A41） （A42）



（A43） （A44） （A45）

Rb 为 C_1-C_{10} 的烷基。

3、根据权利要求 2 所述的 siRNA 缀合物，其中，L_1 选自 A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11、A13 中的一种或多种的连接组合。

4、根据权利要求 2 或 3 中所述的 siRNA 缀合物，其中，L_1 选自 A1、A4、A8、A10 和 A11 中至少 2 个的连接组合。

5、根据权利要求 2-4 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，L_1 选自 A1、A8、A10

中至少 2 个的连接组合。

6、根据权利要求 1-5 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，L_1 的长度为 3-25 个原子。

7、根据权利要求 1-6 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，L_1 的长度为 4-15 个原子。

8、根据权利要求 2-7 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，j1 为 2-10 的整数，j2 为 2-10 的整数，R'为 C_1-C_4 的烷基，Ra 为 A27、A28、A29、A30 和 A31 中的一种，Rb 为 C_1-C_5 的烷基。

9、根据权利要求 2-8 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，j1 为 3-5 的整数，j2 为 3-5 的整数，R'为甲基、乙基和异丙基中的一种，Ra 为 A27 或 A28，Rb 为甲基、乙基、异丙基和丁基中的一种。

10、根据权利要求 1-9 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，n1 为 1-2 的整数，n3 为 0-1 的整数，且 n1+n3=2-3。

11、根据权利要求 1-10 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，m1、m2 和 m3 各自独立地为 2-5 的整数。

12、根据权利要求 1-11 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，m1=m2=m3。

13、根据权利要求 1-12 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每个所述靶向基团独立地为与哺乳动物肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体亲和的配体。

14、根据权利要求 1-13 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每个所述靶向基团独立地为去唾液酸糖蛋白或糖。

15、根据权利要求 1-14 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，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、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种。

16、根据权利要求 1-15 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，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。

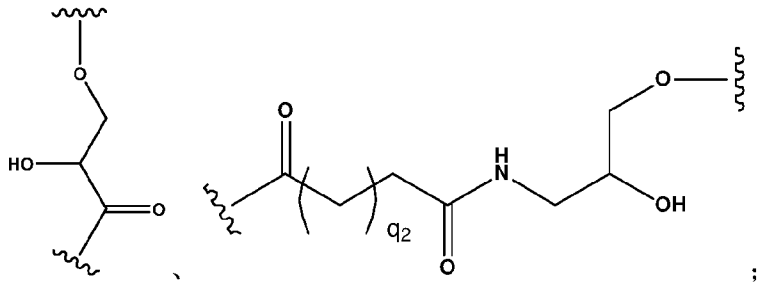
17、根据权利要求 1-16 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14} 和 R_{15} 独立地为 H、甲基或乙基。

18、根据权利要求 1-17 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，R_2 上同时含有与含氮

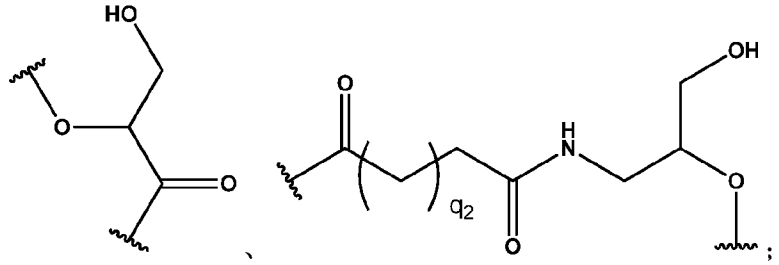
骨架上的 N 连接的位点和与 R_3 中的 P 连接的位点。

19、根据权利要求 18 所述的 siRNA 缀合物，其中，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 中的 P 连接的位点与 P 形成磷酸酯键。

20、根据权利要求 1-19 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，R_2 选自 B5、B6、B5’或 B6’：



（B5） （B6），

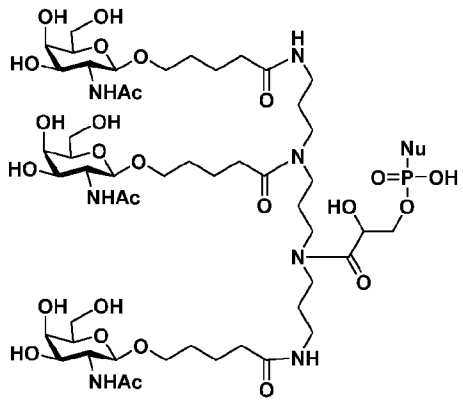


（B5’） （B6’），

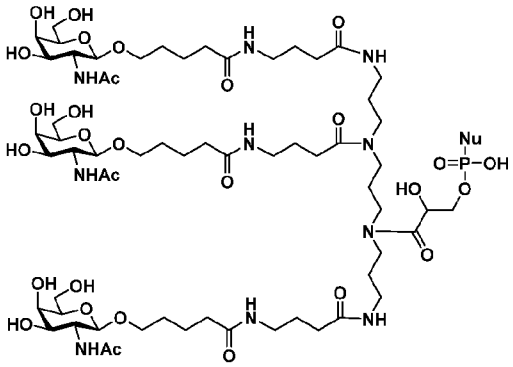
其中，～～表示基团共价键连接的位点，q_2 为 1-10 的整数。

21、根据权利要求 20 所述的 siRNA 缀合物，其中，q_2 为 1-5 的整数。

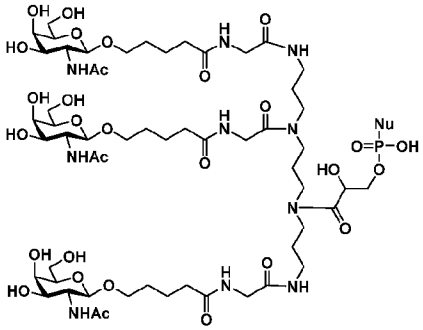
22、根据权利要求 1-21 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，该缀合物具有式(3)、（4）、（5）、（6）、（7）、（8）、（9）、（10）、（11）、（12）、（13）、（14）、（15）、（16）、（17）、（18）、（19）、（20）、（21）或（22）所示的结构：



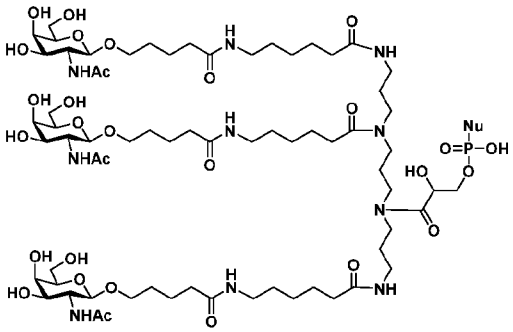
式（3）



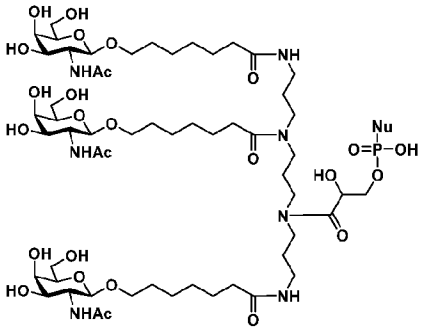
式（4）



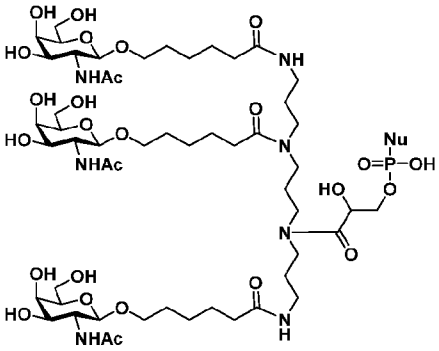
式（5）



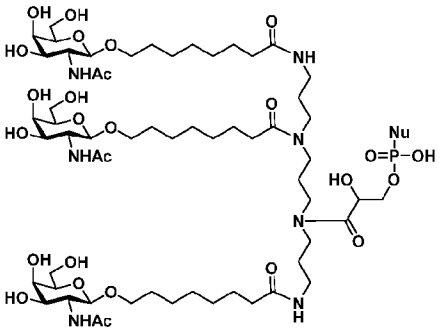
式（6）



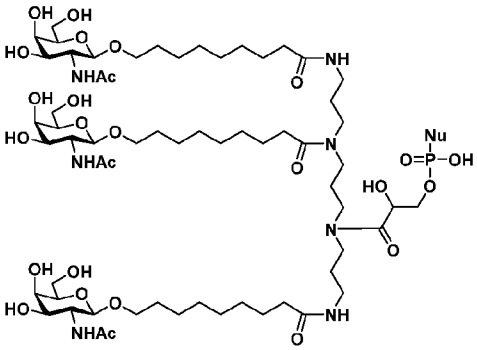
式（7）



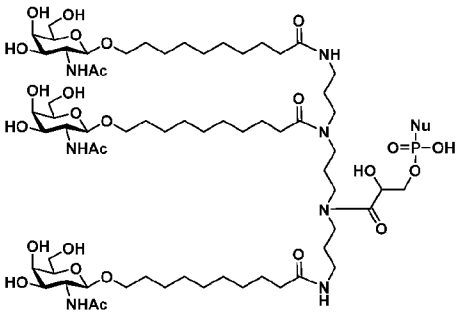
式（8）



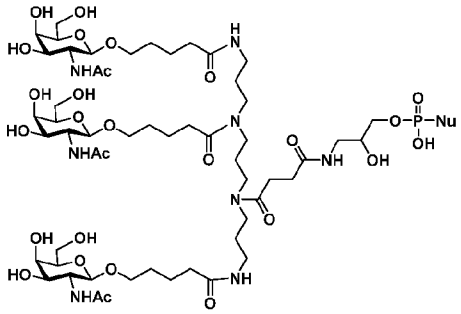
式（9）



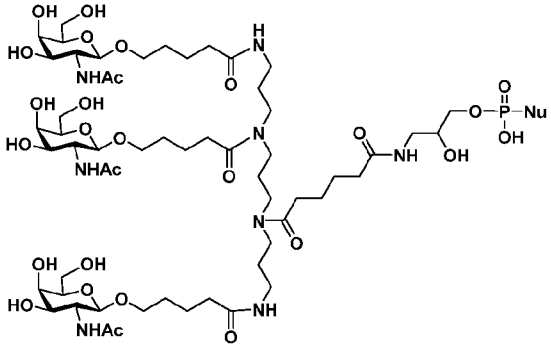
式（10）



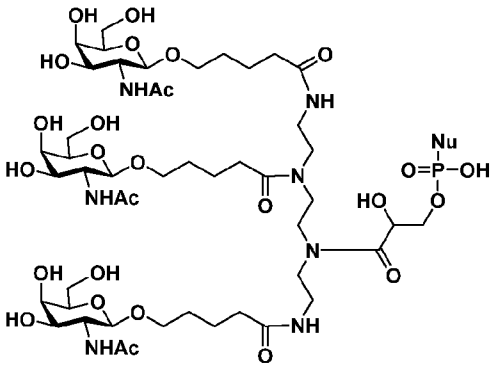
式（11）



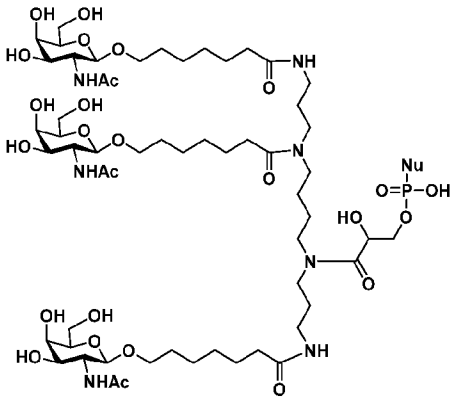
式（12）



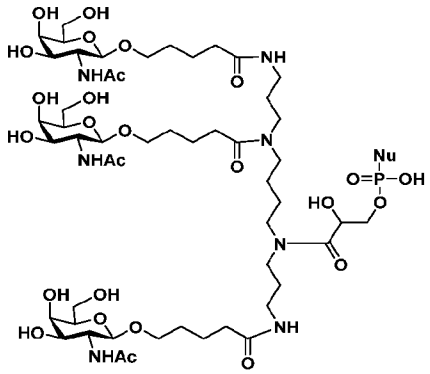
式（13）



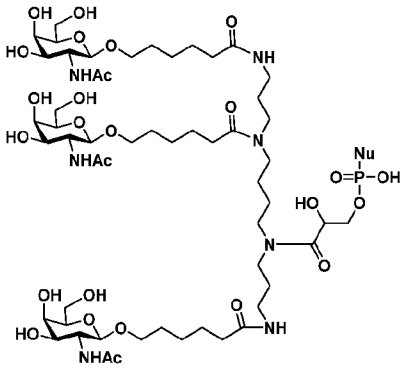
式（14）



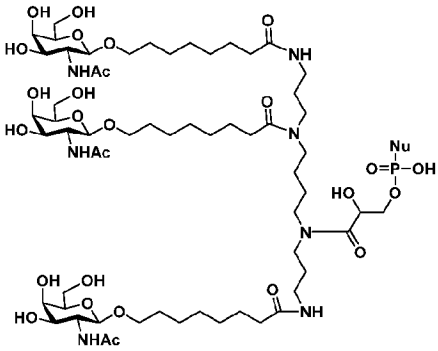
式（15）



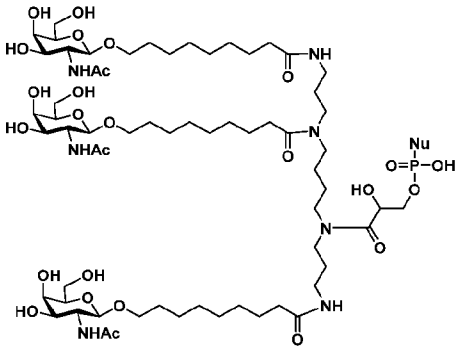
式（16）



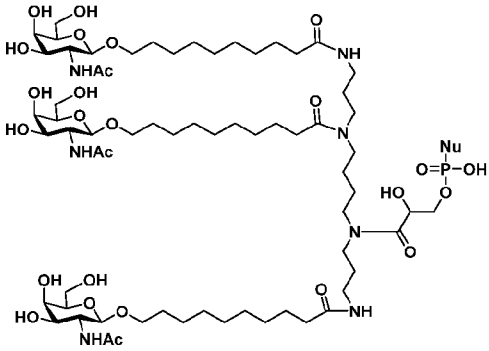
式（17）



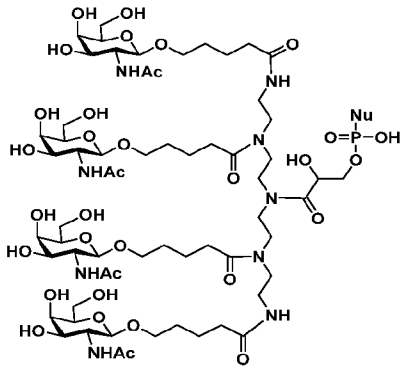
式（18）



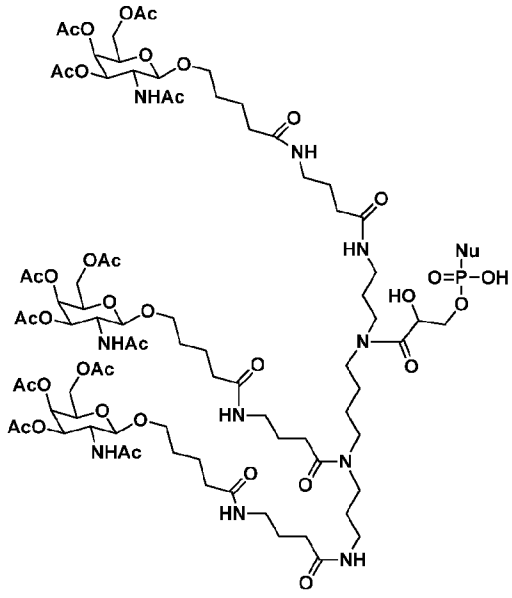
式（19）



式（20）



式（21）



式（22）。

23、根据权利要求 1-22 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，式 A59 中的 P 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。

24、根据权利要求 1-23 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，式 A59 中的 P 连接到所述 siRNA 正义链或反义链的末端。

25、根据权利要求 1-24 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，式 A59 中的 P 连接到所述 siRNA 正义链的 3'末端。

26、根据权利要求 1-25 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，式 A59 中的 P 通过形成磷酸二酯键而连接至所述 siRNA 中的核苷酸的 2'位、3'位或 5'位。

27、根据权利要求 1-26 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述核苷酸序列 1 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 2 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异。

28、根据权利要求 1-27 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述核苷酸序列 2 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z'_B 位置处的差异，且 Z'_B 选自 A、C 或 G。

29、根据权利要求 1-28 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，Z_A 是与 Z'_B 互补的核苷酸。

30、根据权利要求 1-29 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补；所述基本上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 3 个的碱基错配；所述实质上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 1 个的碱基错配；完全反向互补是指两个核苷酸序列之间没有错配。

31、根据权利要求 1-30 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述正义链还含有核苷酸序列 3，所述反义链还含有核苷酸序列 4，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度各自为 1-4 个核苷酸，所述核苷酸序列 3 连接在所述核苷酸序列 1 的 5'末端，并且所述核苷酸序列 4 连接在所述核苷酸序列 2 的 3'末端，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 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。

32、根据权利要求 31 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 1 个核苷酸，所述核苷酸序列 3 的碱基为 C；或者，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 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 3 的碱基依次为 C 和 C；或者，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 U、C 和 C；或者，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 C、U、C 和 C。

33、根据权利要求 1-32 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 还含有核苷酸序列 5，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 至 3 个核苷酸，连接在所述反义链的 3'末端，从而构成所述反义链的 3'突出端。

34、根据权利要求 33 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述核苷酸序列 5 的长度为 2 个核苷酸，并且按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 5 为连续的 2 个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸、连续的 2 个尿嘧啶核糖核苷酸、或者与靶 mRNA 互补的两个核苷酸。

35、根据权利要求 1-34 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述正义链含有如 SEQ ID NO: 60 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列：

5'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$ -3'（SEQ ID NO: 60）；

5’- Z'_BUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG -3’（SEQ ID NO: 3）；

或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列：

5’- CCCAAUAAAGCUGGACAAGAZ_A -3’（SEQ ID NO: 4）；

5’- Z'_BUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG -3’（SEQ ID NO: 5）；

其中，所述 Z'_B 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z_A 选自 A、U、G 或 C，并且 Z'_B 是与 Z_A 互补的核苷酸。

36、根据权利要求 1-35 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 为 siAP1 或 siAP2：

siAP1

正义链：5’- CAAUAAAGCUGGACAAGAA -3’ （SEQ ID NO: 6）；

反义链：5’- UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG -3’ （SEQ ID NO: 7）；

siAP2

正义链：5’- CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA -3’ （SEQ ID NO: 8）；

反义链：5’- UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG -3’ （SEQ ID NO: 9）。

37、根据权利要求 1-36 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。

38、根据权利要求 1-37 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述正义链和所述反义链中的每一个核苷酸独立地为氟代修饰的核苷酸或非氟代修饰的核苷酸，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。

39、根据权利要求 38 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 1 和核苷酸序列 2 中，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 的第 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 2 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

40、根据权利要求 1-39 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，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 1 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；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 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。

41、根据权利要求 38-40 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每一个非氟代修饰的核苷酸独立地选自核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物中的一种。

42、根据权利要求 41 所述的 siRNA 缀合物，其中，核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸选自 2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸中的一种；核苷酸类似物选自异核苷酸、

LNA、ENA、cET、UNA 和 GNA 中的一种。

43、根据权利要求 38-42 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每一个非氟代修饰的核苷酸均为甲氧基修饰的核苷酸，所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

44、根据权利要求 1-43 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，按照 5’末端到 3’末端的方向，所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 1 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 2 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 1 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 2 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。

45、根据权利要求 1-44 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 为 siAP1-M1、siAP2-M1、siAP1-M2、siAP2-M2 中的任意一种：

siAP1-M1

正义链：5’- CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 10）

反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’（SEQ ID NO: 11）

siAP2-M1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 12）

反义链： 5’- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 13）

siAP1-M2

正义链：5’- CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 14）

反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’（SEQ ID NO: 15）

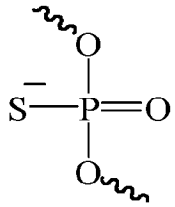
siAP2-M2

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 16）

反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 17）

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。

46、根据权利要求 37-45 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述具有修饰基团的磷酸酯基为具有如式（101）所示结构的硫代磷酸酯基：



式（101）。

47、根据权利要求 46 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 中，硫代磷酸酯基连接存在于由以下位置组成的组中的至少一处：

所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及

所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

48、根据权利要求 1-47 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 为 siAP1-M1S、siAP2-M1S、siAP1-M2S、siAP2-M2S 中的任意一种：

siAP1-M1S

正义链：5’- CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 18）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’（SEQ ID NO: 19）

siAP2-M1S

正义链：5’- CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 20）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 21）

siAP1-M2S

正义链：5’- CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 22）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’（SEQ ID NO: 23）

siAP2-M2S

正义链：5’-CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 24）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 25）

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 表示与该字母 s 左右相邻的两个核苷酸之间的连接为硫代磷酸酯基连接。

49、根据权利要求 1-48 中任一项所述的 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。

50、根据权利要求 1-49 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 为

siAP1-M1P1、siAP2-M1P1、siAP1-M2P1、siAP2-M2P1、siAP1-M1SP1、siAP2-M1SP1、siAP1-M2SP1、siAP2-M2SP1 中的任意一种：

siAP1-M1P1

正义链：5’- CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 10）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm-3’（SEQ ID NO: 26）

siAP2-M1P1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 12）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 27）

siAP1-M2P1

正义链：5’- CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 14）

反义链：5’-P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm-3’（SEQ ID NO: 28）

siAP2-M2P1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 16）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 29）

siAP1-M1SP1

正义链：5’- CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 18）

反义链：5’-P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm-3’（SEQ ID NO: 30）

siAP2-M1SP1

正义链：5’-CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 20）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 31）

siAP1-M2SP1

正义链：5’- CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 22）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’（SEQ ID NO: 32）

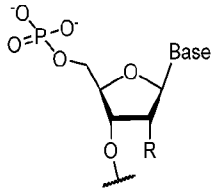
siAP2-M2SP1

正义链：5’-CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 24）

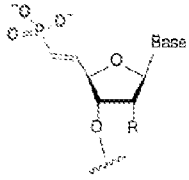
反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 33）

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；P1 表示该字母 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。

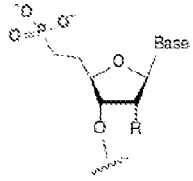
51、根据权利要求 49 或 50 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸为具有由以下式（102）-式（106）中的一个表示的核苷酸：



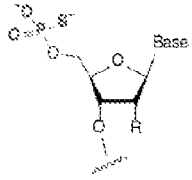
式（102）



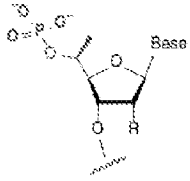
式（103）



式（104）



式（105）



式（106）

其中，R 表示选自于由 H、OH、F 和甲氧基所组成的组的基团；

Base 表示选自 A、U、C、G 或 T 的碱基。

52、一种修饰的 siRNA，所述 siRNA 含有正义链和反义链，所述正义链和反义链的每一个核苷酸均为修饰的核苷酸，其中，所述正义链和反义链均包含氟代修饰的核苷酸和非氟代修饰的核苷酸；所述正义链包含核苷酸序列Ⅰ，所述反义链包含核苷酸序列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含有核苷酸序列 A，所述核苷酸序列 A 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含有核苷酸序列 B，所述核苷酸序列 B 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'-CAAUAAAGCUGGACAAGAZ-3'（SEQ ID NO: 1）；

5'-Z'UCUUGUCCAGCUUUAUUG-3'（SEQ ID NO: 2），

其中，Z 为 A，Z'为 U，

所述核苷酸序列 A 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 B 中包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 A 和核苷酸序列 B 中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 A 的第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸；并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 B 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

53、根据权利要求 52 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 A 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 B 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。

54、根据权利要求 52 或 53 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 B 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z'_B 位置处的差异，且 Z'_B 选自 A、C 或 G。

55、根据权利要求 52-54 中任一项所述的 siRNA，其中 Z_A 是与 Z'_B 互补的核苷酸。

56、根据权利要求 52-55 中任一项所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 A 和所述核苷酸序列 B 基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补；所述基本上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 3 个的碱基错配；所述实质上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 1 个的碱基错配；完全反向互补是指两个核苷酸序列之间没有错配。

57、根据权利要求 52-56 中任一项所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 A 是 SEQ ID NO: 60 所示的核苷酸序列，核苷酸序列 B 是 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列：

5'- CAAUAAAGCUGGACAAGAZ_A-3'（SEQ ID NO: 60）；

5'- Z'_BUCUUGUCCAGCUUUAUUG-3'（SEQ ID NO: 61），

其中，Z_A选自 A、U、G 或 C，并且 Z'_B是与 Z_A互补的核苷酸。

58、根据权利要求 57 所述的 siRNA，其中，Z_A为 A，Z'_B为 U。

59、根据权利要求 52-58 中任一项所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 I 还含有核苷酸序列 III，所述核苷酸序列 II 还含有核苷酸序列 IV，所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 的长度各自为 1-4 个核苷酸，所述核苷酸序列 III 连接在核苷酸序列 A 的 5’末端，并且所述核苷酸序列 IV 连接在核苷酸序列 B 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。

60、根据权利要求 59 所述 siRNA，其中，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 的碱基依次为 C、C；

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 的碱基依次为 U、C、C；

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 的碱基依次为 C、U、C、C。

61、根据权利要求 52-60 中任一项所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 II 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’垂悬末端。

62、根据权利要求 61 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 V 的长度为 2 个核苷酸。

63、根据权利要求 61 或 62 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 V 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸互补，或者所述核苷酸序列 V 为连续的 2 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。

64、根据权利要求 52-63 中任一项所述的 siRNA，其中，所述正义链含有如 SEQ ID No: 60 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID No: 3 所示的核苷酸序列：

5’-CAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$-3’（SEQ ID No: 60）

5’-Z'$_B$UCUUGUCCAGCUUUAUUGGG-3’ （SEQ ID No: 3）

或者所述正义链含有如 SEQ ID No: 4 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID No: 5 所示的核苷酸序列：

5’-CCCAAUAAAGCUGGACAAGAZ$_A$-3’ （SEQ ID No: 4）

5’-Z'$_B$UCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG-3’ （SEQ ID No: 5）；

其中，所述 Z'_B是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z_A选自 A、U、G 或 C，并且 Z'_B是与 Z_A互补的核苷酸。

65、根据权利要求 52-64 中任一项所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 为 siAP1 或 siAP2：

siAP1

5’-CAAUAAAGCUGGACAAGAA-3’（SEQ ID No: 6）

5’-UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG-3’ （SEQ ID No: 7）

siAP2

5’-CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA-3’（SEQ ID No: 8）

5’-UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG-3’（SEQ ID No: 9）。

66、根据权利要求 52-65 中任一项所述的 siRNA，其中，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 A 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；在所述反义链中，所述核苷酸序列 B 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。

67、根据权利要求 52-66 中任一项所述的 siRNA，其中，每一个非氟代修饰的核苷酸独立地选自核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物中的一种。

68、根据权利要求67所述的siRNA，其中，核苷酸的核糖基2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸选自 2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸中的一种；核苷酸类似物选自异核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA 和 GNA 中的一种。

69、根据权利要求 52-68 中任一项所述的 siRNA，其中，每一个非氟代修饰的核苷酸均为甲氧基修饰的核苷酸，所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

70、根据权利要求 52-69 中任一项所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 为 siAP1-M1、siAP2-M1、siAP1-M2、siAP2-M2 中的任意一种：

siAP1-M1

正义链：5’- CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 10）

反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’（SEQ ID NO: 11）

siAP2-M1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 12）

反义链： 5’- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 13）

siAP1-M2

正义链：5’- CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 14）

反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’（SEQ ID NO: 15）

siAP2-M2

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 16）

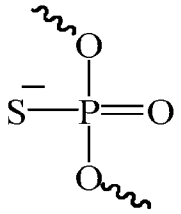
反义链：5’- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 17）

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。

71、根据权利要求 52-70 中任意一项所述的 siRNA，其中，所述 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。

72、根据权利要求 71 所述的 siRNA，其中，所述具有修饰基团的磷酸酯基为磷酸酯基中的磷酸二酯键中的至少一个氧原子被硫原子取代而形成的硫代磷酸酯基。

73、根据权利要求 71 或 72 所述的 siRNA，其中，所述具有修饰基团的磷酸酯基为具有如式（101）所示结构的硫代磷酸酯基：



式（101）。

74、根据权利要求 72 或 73 所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 中，硫代磷酸酯基连接存在于由以下位置组成的组中的至少一处：

所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及

所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

75、根据权利要求 52-74 中任一项所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 为 siAP1-M1S、siAP2-M1S、siAP1-M2S、siAP2-M2S 中的任意一种：

siAP1-M1S

正义链：5’- CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 18）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’（SEQ ID NO: 19）

siAP2-M1S

正义链：5’- CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 20）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 21）

siAP1-M2S

正义链：5’- CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 22）

反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’（SEQ ID NO: 23）

siAP2-M2S

正义链：5’-CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 24）

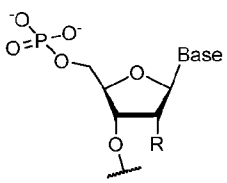
反义链：5’- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 25）

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

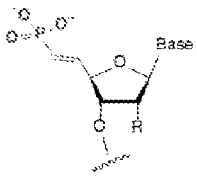
接。

76、根据权利要求 52-75 中任意一项所述的 siRNA，其中，所述反义链的 5’末端核苷酸为 5’-磷酸核苷酸或 5’-磷酸类似物修饰的核苷酸。

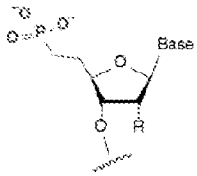
77、根据权利要求 76 所述的 siRNA，其中，所述 5’-磷酸核苷酸为具有如式（102）所示结构的核苷酸，所述 5’-磷酸类似物修饰的核苷酸选自结构如式（103）-式（106）中任意一个所示的核苷酸，



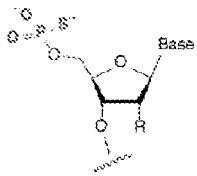
式（102）



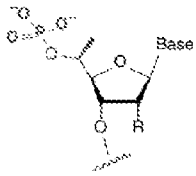
式（103）



式（104）



式（105）



式（106）

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。

78、根据权利要求 52-77 中任一项所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 为 siAP1-M1P1、siAP2-M1P1、siAP1-M2P1、siAP2-M2P1、siAP1-M1SP1、siAP2-M1SP1、siAP1-M2SP1、siAP2-M2SP1 中的任意一种：

siAP1-M1P1

正义链：5’- CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 10）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm-3’（SEQ ID NO: 26）

siAP2-M1P1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 12）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 27）

siAP1-M2P1

正义链：5’- CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 14）

反义链：5’-P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm -3’（SEQ ID NO: 28）

siAP2-M2P1

正义链：5’- CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 16）

反义链：5’-P1- UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm -3’（SEQ ID NO: 29）

siAP1-M1SP1

正义链：5’- CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 18）

反义链：5’-P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm-3’（SEQ ID NO: 30）

siAP2-M1SP1

正义链：5’- CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 20）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 31）

siAP1-M2SP1

正义链：5’- CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm -3’（SEQ ID NO: 22）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm -3’（SEQ ID

NO: 32）

siAP2-M2SP1

正义链：5’-CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm-3’（SEQ ID NO: 24）

反义链：5’-P1- UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm -3’（SEQ ID NO: 33）

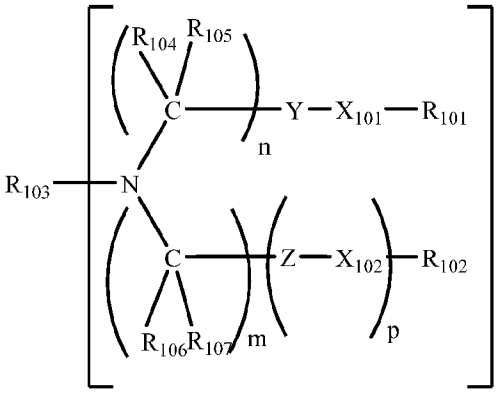
其中，大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸；小写字母 s 表示该字母左右两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接；P1 表示该字母 P1 右侧相邻的一个核苷酸为 5’-磷酸核苷酸或 5’-磷酸类似物修饰的核苷酸。

79、一种药物组合物，其特征在于，该药物组合物含有权利要求 52-78 中任意一项所述的 siRNA 和药学上可接受的载体。

80、根据权利要求 79 所述的药物组合物，其中，所述 siRNA 与药学上可接受的载体的重量比为 1 : (1-500)。

81、根据权利要求 80 所述的药物组合物，其中，所述 siRNA 与药学上可接受的载体的重量比为 1 : (1-50)。

82、根据权利要求 79-81 中任一项所述的药物组合物，其中，所述药学上可接受的载体含有有机胺、辅助脂质和聚乙二醇化脂质；其中，所述有机胺为如式（201）所示的化合物和/或其药学上可接受的盐：



式（201），

其中：

X_{101} 和 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；

Y 和 Z 各自独立地是 C=O、C=S、S=O、CH-OH 或 SO_2；

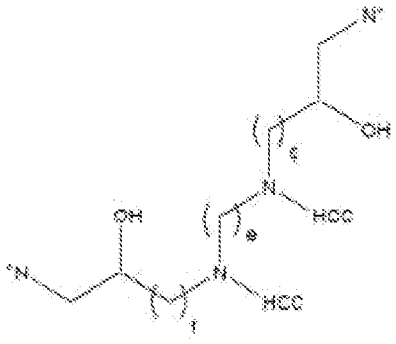
R_{101}、R_{102}、R_{103}、R_{104}、R_{105}、R_{106}和R_{107}各自独立地是氢，环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链脂族基团，环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链杂脂族基团，被取代的或未被取代的、支链或直链酰基，被取代的或未被取代的、支链或直链芳基，被取代的或未被取代的、支链或直链杂芳基；

x 是 1-10 的整数；

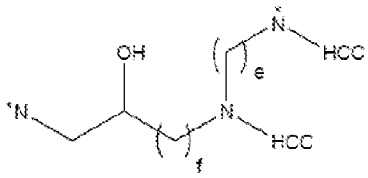
n 是 1-3 的整数，m 是 0-20 的整数，p 是 0 或 1；其中，如果 m=p=0，则 R_{102} 是氢；

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：



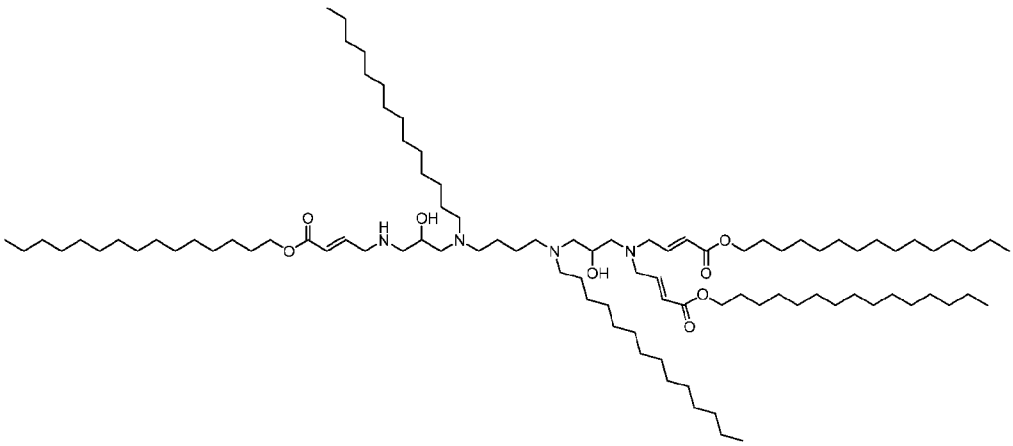
式（202），



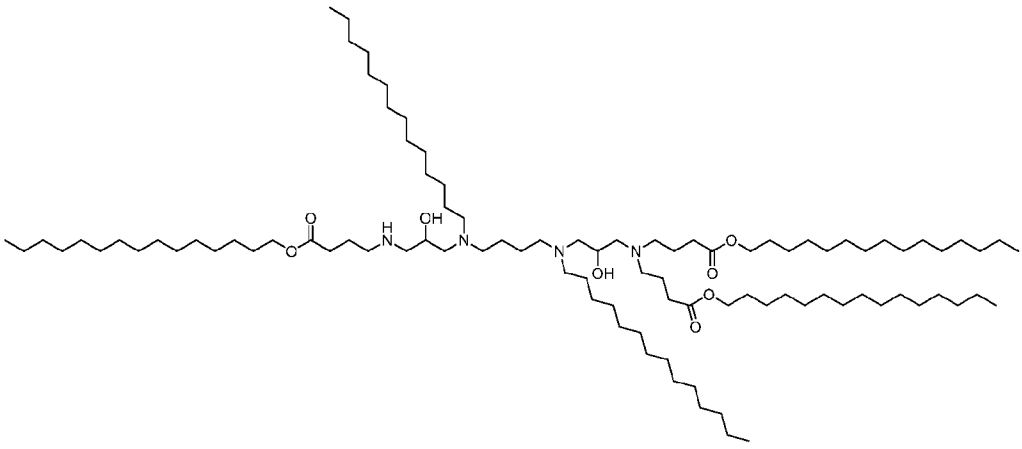
式（203）；

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

83、根据权利要求 82 所述的药物组合物，其中，所述有机胺为如式（214）所示的有机胺和/或如式（215）所示的有机胺：



式（214）；



式（215）；

所述辅助脂质为胆固醇、胆固醇的类似物和/或胆固醇的衍生物；

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

84、根据权利要求 82 或 83 所述的药物组合物，其中，所述有机胺、所述辅助脂质和

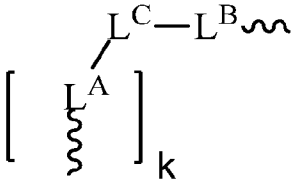
所述聚乙二醇化脂质三者之间的摩尔比为（19.7-80）：（19.7-80）：（0.3-50）。

85、根据权利要求 84 所述的药物组合物，其中，所述有机胺、所述辅助脂质和所述聚乙二醇化脂质三者之间的摩尔比为（50-70）：（20-40）：（3-20）。

86、一种 siRNA 缀合物，所述 siRNA 缀合物含有权利要求 52-78 中任意一项所述的 siRNA 以及缀合连接至该 siRNA 的缀合基团。

87、根据权利要求 86 所述 siRNA 缀合物，其中，所述缀合基团包含药学上可接受的靶向基团和接头，并且，所述 siRNA、所述接头和所述靶向基团依次共价或非共价连接。

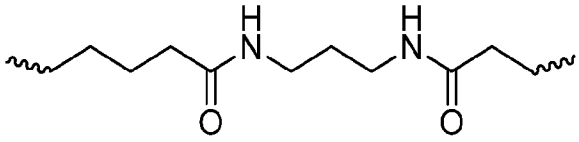
88、根据权利要求 87 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述接头具有如式（301）所示的结构：



式（301），

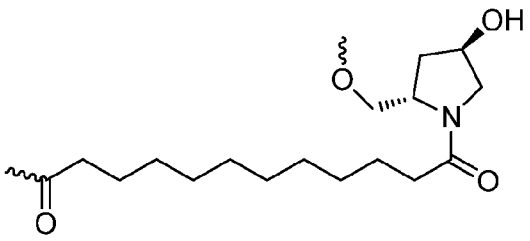
其中，k 为 1-3 的整数；

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：



式（302）；

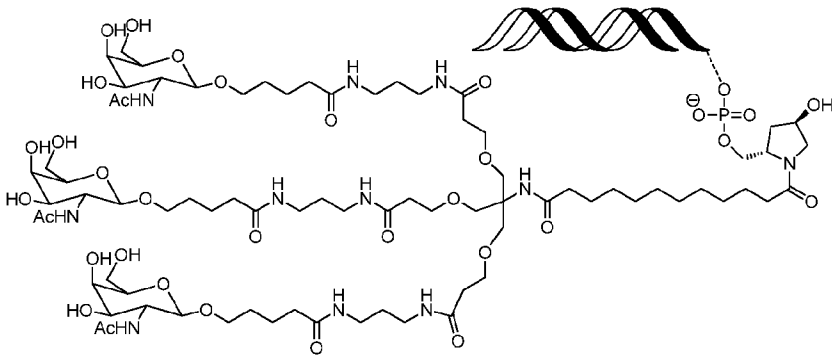
L^B 为具有如式（303）所示结构的包含 N-酰基吡咯烷的链状部分，所述链状部分在其一端具有羰基并与所述 L^C 部分通过酰胺键相连接，在另一端具有氧原子并与所述 siRNA 通过磷酸酯键相连接：



式（303）；

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。

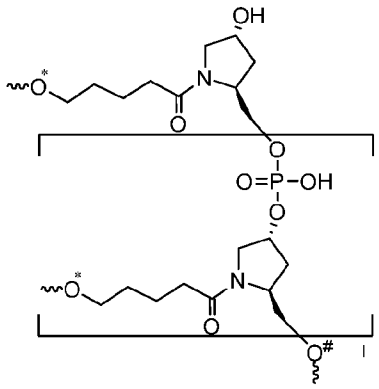
89、根据权利要求 86-88 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 缀合物具有如式（305）所示的结构：



式（305），

其中，双螺旋结构表示所述 siRNA。

90、根据权利要求 87 所述的 siRNA 缀合物，其中，所述接头具有式（306）所示的结构：



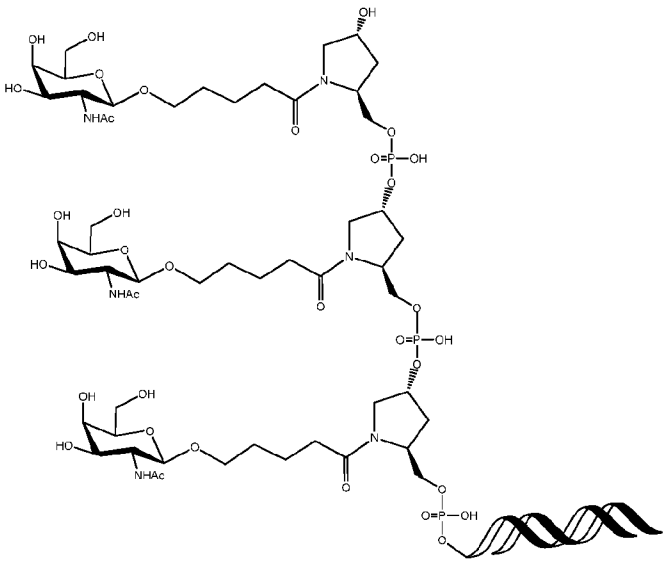
式（306），

其中，1 为 0-3 的整数；

*表示所述接头上通过醚键与所述靶向基团连接的位点；

#表示所述接头上通过磷酸酯键与所述 siRNA 连接的位点。

91、根据权利要求 86、87 和 90 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述 siRNA 缀合物具有如式（307）所示的结构：



式（307），

其中，双螺旋结构表示所述 siRNA。

92、根据权利要求 87-91 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，所述接头连接至所述 siRNA 的正义链 3’末端。

93、根据权利要求 87、88、90 和 92 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每个所述靶向基团独立地为与哺乳动物肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体亲和的配体。

94、根据权利要求 93 所述的 siRNA 缀合物，其中，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、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种。

95、根据权利要求 93 或 94 所述的 siRNA 缀合物，其中，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。

96、权利要求 1-51 中任意一项所述的 siRNA 缀合物、权利要求 52-78 中任一项所述 siRNA、权利要求 79-85 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 86-95 中任一项所述的 siRNA 缀合物在制备用于治疗和/或预防由载脂蛋白 C3（ApoC3）的过量表达引起的血脂异常的药物中的用途。

97、根据权利要求 96 所述的用途，其中，所述血脂异常为高胆固醇血症、高甘油三酯血症或动脉粥样硬化。

98、一种治疗血脂异常的方法，其中，所述方法包括向患有血脂异常的受试者给予有效量的权利要求 1-51 中任意一项所述的 siRNA 缀合物、权利要求 52-78 中任一项所述 siRNA、权利要求 79-85 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 86-95 中任一项所述的 siRNA 缀合物。

99、一种抑制肝细胞 APOC3 基因表达的方法，其中，该方法包括将有效量的权利要求 1-51 中任意一项所述的 siRNA 缀合物、权利要求 52-78 中任一项所述 siRNA、权利要求 79-85 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 86-95 中任一项所述的 siRNA 缀合物与所述肝细胞进行接触。

100、一种试剂盒，其中，该试剂盒包含权利要求 1-51 中任意一项所述的 siRNA 缀合物、权利要求 52-78 中任一项所述 siRNA、权利要求 79-85 中任一项所述的药物组合物和/或权利要求 86-95 中任一项所述的 siRNA 缀合物。

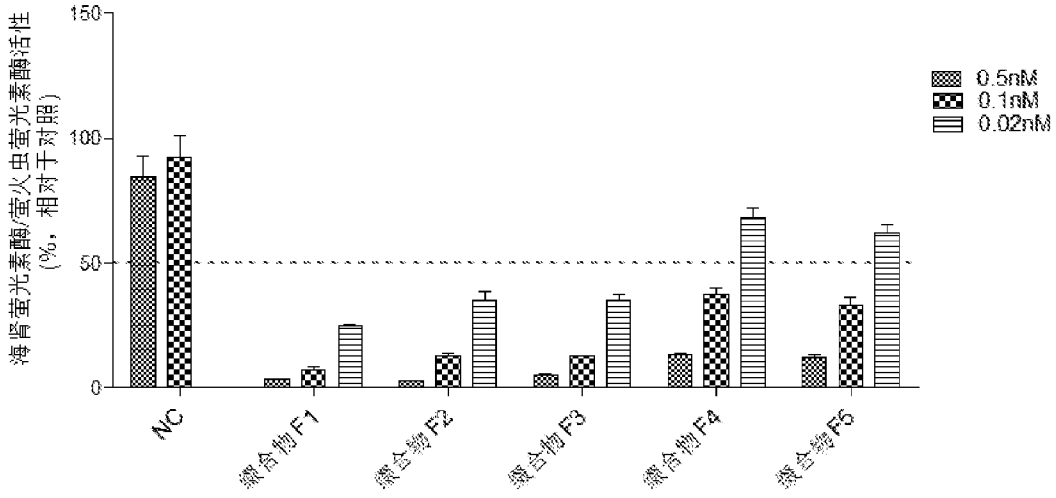

海肾萤光素酶/萤火虫萤光素酶活性
(%，相对于对照)
150
100
50
0
0.5nM
0.1nM
0.02nM
NC
缀合物F1
缀合物F2
缀合物F3
缀合物F4
缀合物F5

图 1

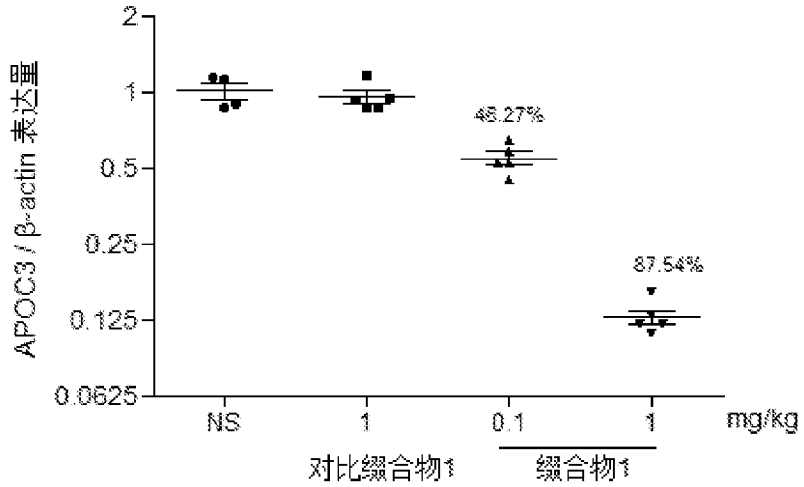

APOC3 / β-actin 表达量
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
46.27%
87.54%
NS
1
0.1
1
mg/kg
对比缀合物1
缀合物1

图 2

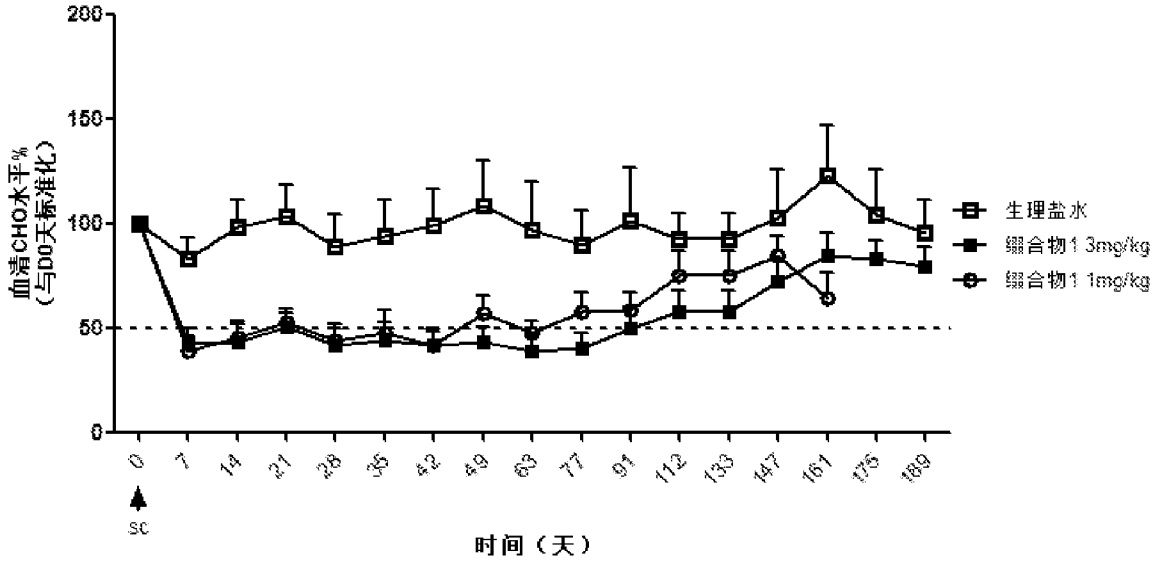

血清CHO水平%
（与D0天标准化）
200
150
100
50
0
0
7
14
21
28
35
42
49
63
77
91
112
133
147
161
175
189
SC
时间（天）
生理盐水
缀合物1 3mg/kg
缀合物1 1mg/kg

图 3A

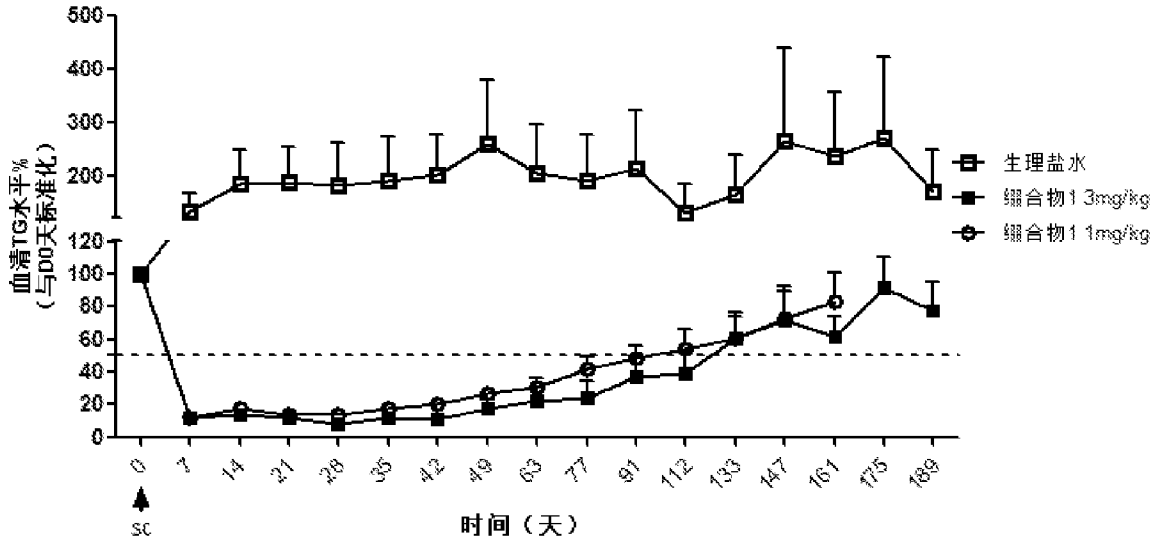

血清TG水平%
（与D0天标准化）
500
400
300
200
120
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
42
49
63
77
91
112
133
147
161
175
189
SC
时间（天）
生理盐水
缀合物1 3mg/kg
缀合物1 1mg/kg

图 3B

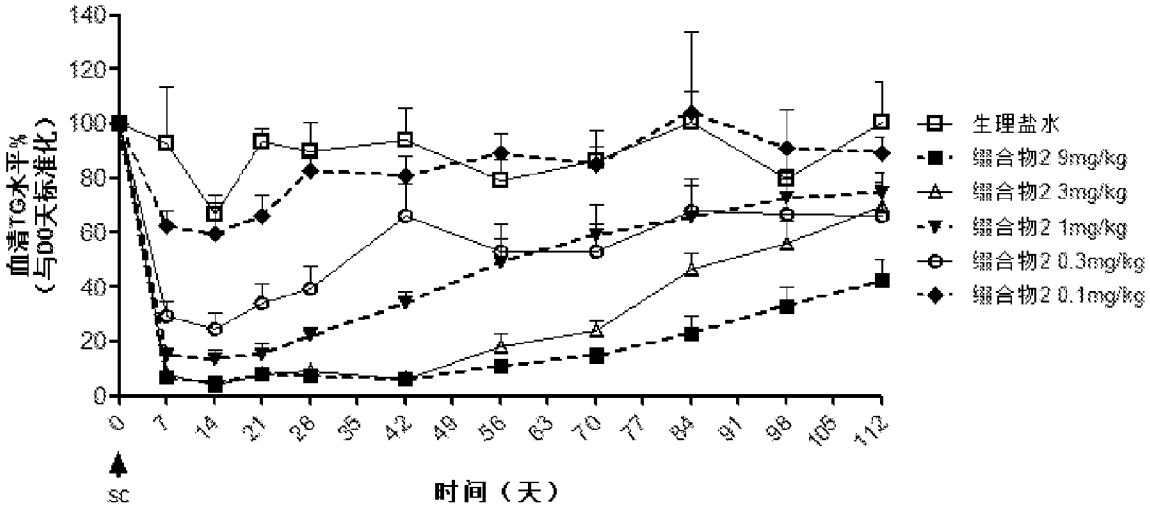

血清TG水平%
（与D0天标准化）
140
120
100
80
60
40
20
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112
SC
时间（天）
生理盐水
缀合物2 9mg/kg
缀合物2 3mg/kg
缀合物2 1mg/kg
缀合物2 0.3mg/kg
缀合物2 0.1mg/kg

图 4A

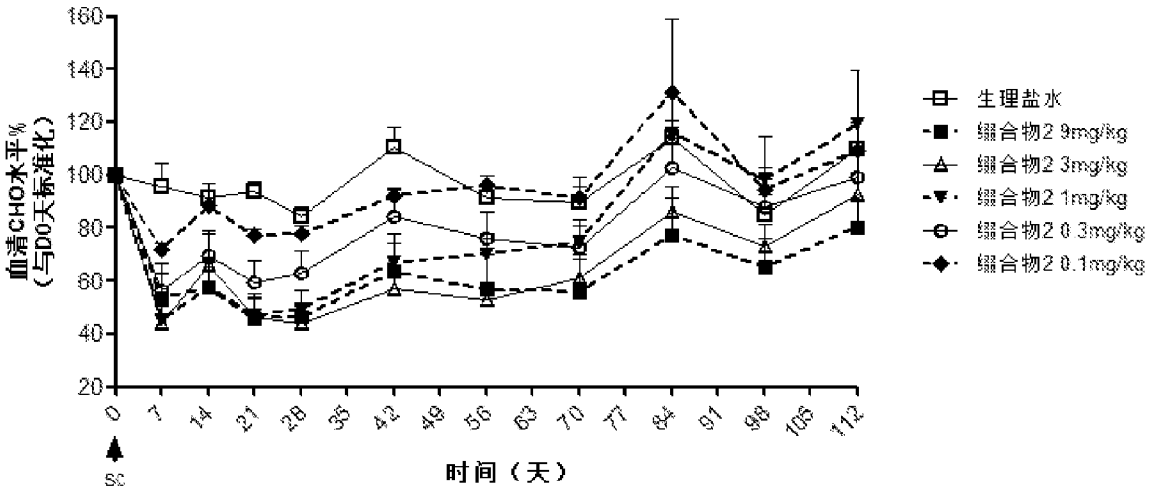

血清CHO水平%
（与D0天标准化）
160
140
120
100
80
60
40
20
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112
SC
时间（天）
生理盐水
缀合物2 9mg/kg
缀合物2 3mg/kg
缀合物2 1mg/kg
缀合物2 0.3mg/kg
缀合物2 0.1mg/kg

图 4B

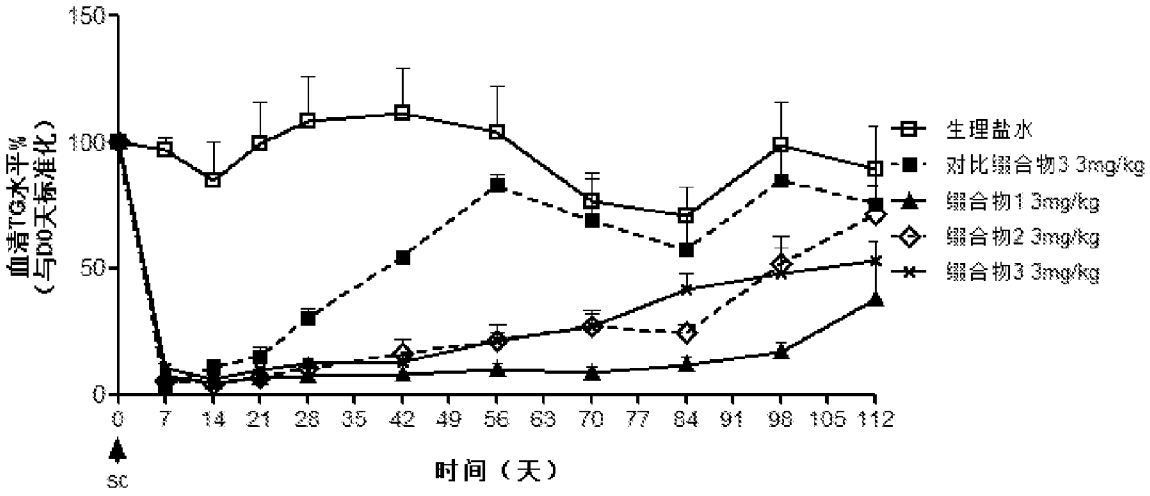

血清TG水平%
（与D0天标准化）
150
100
50
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112
sc
时间（天）
生理盐水
对比缀合物3 3mg/kg
缀合物1 3mg/kg
缀合物2 3mg/kg
缀合物3 3mg/kg

图 5A

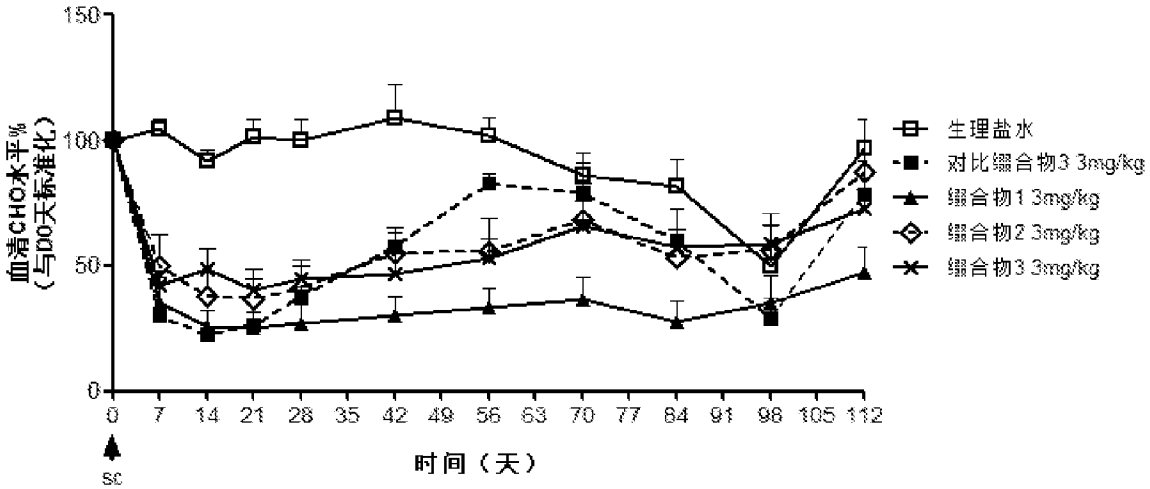

血清CHO水平%
（与D0天标准化）
150
100
50
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112
sc
时间（天）
生理盐水
对比缀合物3 3mg/kg
缀合物1 3mg/kg
缀合物2 3mg/kg
缀合物3 3mg/kg

图 5B

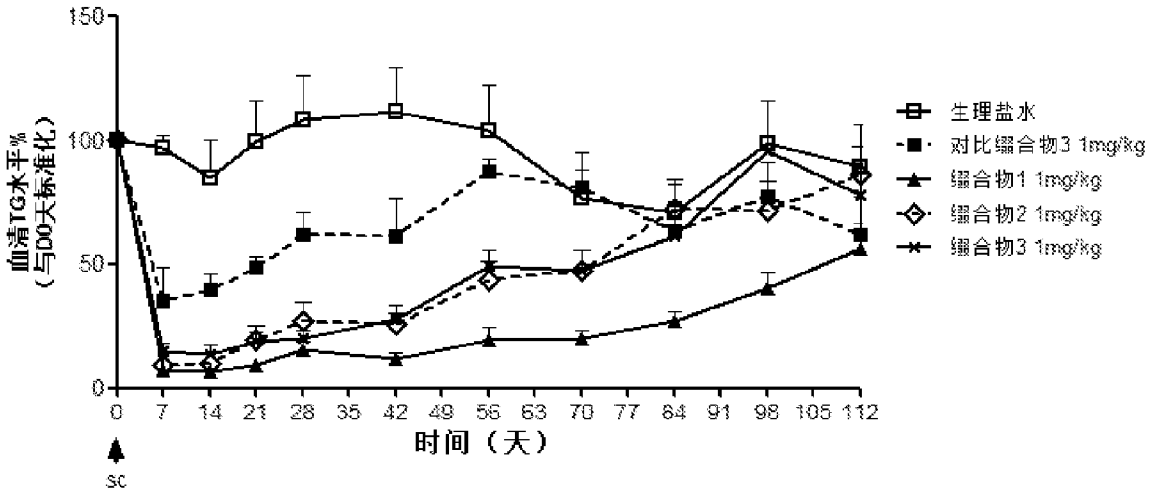

血清TG水平%
（与D0天标准化）
150
100
50
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112
时间（天）
sc
生理盐水
对比缀合物3 1mg/kg
缀合物1 1mg/kg
缀合物2 1mg/kg
缀合物3 1mg/kg

图 5C

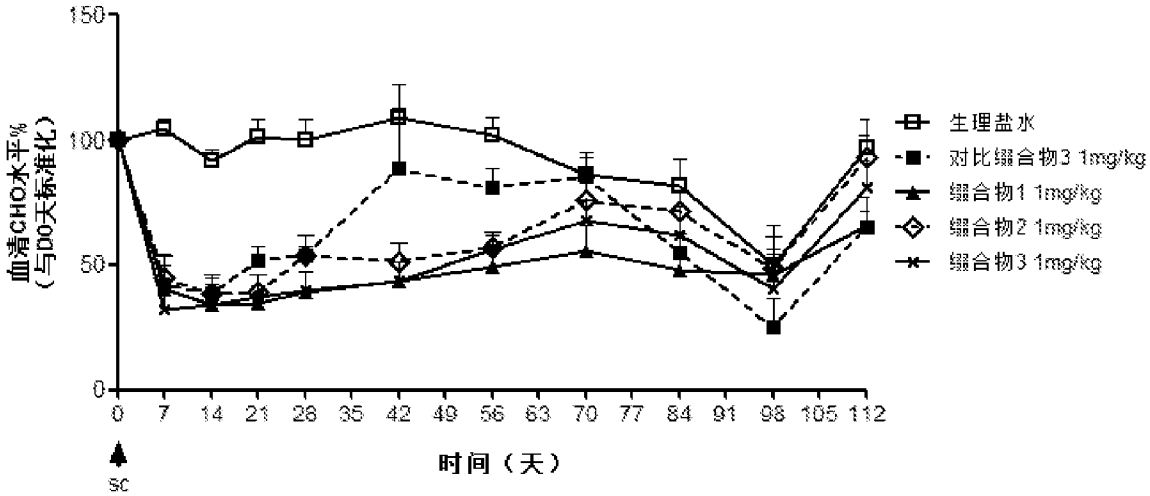

血清CHO水平%
（与D0天标准化）
150
100
50
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112
时间（天）
sc
生理盐水
对比缀合物3 1mg/kg
缀合物1 1mg/kg
缀合物2 1mg/kg
缀合物3 1mg/kg

图 5D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/118232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 47/18(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

TWABS; CPRSABS; MOABS; HKABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; 万方数据库, Wanfang Database; WEB OF SCIENCE: 载脂蛋白C3, 载脂蛋白CIII, 抑制, 修饰, 反义RNA, 干扰RNA, APOC3, siRNA, dsRNA, RNAi, inhibit, modify; 中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL, National Bio-Sequence Retrieval System Database of Chinese Patent+GenBank+EMBL: search for SEQ ID NOs: 1-2.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108239644 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 03 July 2018 (2018-07-03) see claims 1-13	52-97, 100
A	CN 105392488 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 09 March 2016 (2016-03-09) see entire document	1-97, 100
A	CN 107250362 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 13 October 2017 (2017-10-13) see entire document	1-97, 100
A	CN 107854478 A (IONIS PHARMACEUTICALS, INC.) 30 March 2018 (2018-03-30) see entire document	1-97, 100
A	CN 106460025 A (ARCTURUS THERAPEUTICS, INC.) 22 February 2017 (2017-02-22) see entire document	1-97, 100
A	WO 2016154127 A2 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC.) 29 September 2016 (2016-09-29) see entire document	1-97, 100

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 February 2019	**07 March 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing** **100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/118232

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **98-99**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 98-99 relate to a method for the treatment of a living human or animal body, which falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which a search is not required.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/118232

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 108239644 A	03 July 2018	None	
CN 105392488 A	09 March 2016	RU 2015151200 A3	14 January 2019
		RU 2018136140 A	17 December 2018
		US 2018273953 A1	27 September 2018
		AU 2017200365 A1	23 February 2017
		US 2016090596 A1	31 March 2016
		CN 105378082 A	02 March 2016
		EP 2992097 A2	09 March 2016
		MX 2015015264 A	12 August 2016
		PE 14302016 A1	06 January 2017
		RU 2015151199 A	05 June 2017
		NZ 631537 A	26 May 2017
		CA 2921518 A1	06 November 2014
		JP 2018027091 A	22 February 2018
		AU 2018267625 A1	13 December 2018
		RU 2015151199 A3	27 March 2018
		US 2018273952 A1	27 September 2018
		HK 1221475 A1	02 June 2017
		CR 20150612 A	03 March 2016
		US 9181550 B2	10 November 2015
		US 2016076030 A1	17 March 2016
		AU 2014259750 A1	22 October 2015
		WO 2014179627 A9	26 February 2015
		JP 6456362 B2	23 January 2019
		AU 2017200950 B2	17 January 2019
		KR 20180051678 A	16 May 2018
		AU 2014259755 B2	30 August 2018
		SG 11201508870V A	27 November 2015
		PH 12015502493 A1	22 February 2016
		AU 2017203436 A1	08 June 2017
		EP 2992009 A1	09 March 2016
		EP 2991661 A4	15 February 2017
		WO 2014179629 A8	02 June 2016
		RU 2670614 C9	23 November 2018
		BR 112015027322 A2	26 September 2017
		BR 112015027319 A2	26 September 2017
		EA 201592093 A1	30 June 2016
		AU 2014259756 B2	23 February 2017
		HK 1221404 A1	02 June 2017
		WO 2014179625 A1	06 November 2014
		NZ 631552 A	24 February 2017
		US 9145558 B2	29 September 2015
		US 9932581 B2	03 April 2018
		US 9181549 B2	10 November 2015
		KR 20160002976 A	08 January 2016
		BR 112015027369 A2	26 September 2017
		BR 112015027321 A2	26 September 2017
		CN 108064162 A	22 May 2018
		CA 2921514 A1	06 November 2014
		MX 2015015220 A	12 January 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/118232

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				US	2018044676	A1	15 February 2018
CN	107250362	A	13 October 2017	JP	2017535552	A	30 November 2017
				EP	3221451	A1	27 September 2017
				WO	2016081444	A9	21 July 2016
				CA	2968114	A1	26 May 2016
				US	2017260527	A1	14 September 2017
				WO	2016081444	A1	26 May 2016
				AU	2015350120	A1	18 May 2017
CN	107854478	A	30 March 2018	ES	2663635	T3	16 April 2018
				EP	2701713	A1	05 March 2014
				AU	2017200025	B2	15 November 2018
				NZ	710192	A	24 February 2017
				RU	2603076	C9	03 February 2017
				AU	2012249324	B2	06 October 2016
				US	9157082	B2	13 October 2015
				EP	2701713	A4	24 December 2014
				MY	162715	A	14 July 2017
				KR	101800333	B1	22 November 2017
				IL	229010	D0	31 December 2013
				RU	2016138742	A	12 December 2018
				JP	2018168184	A	01 November 2018
				CN	103547271	A	29 January 2014
				US	2016060625	A1	03 March 2016
				CA	2834232	A1	01 November 2012
				EP	3357497	A1	08 August 2018
				DK	2701713	T3	16 April 2018
				SG	10201606174R	A	29 September 2016
				AU	2017200025	A1	02 February 2017
				AU	2012249324	A1	31 October 2013
				UA	115309	C2	25 October 2017
				US	2017268004	A1	21 September 2017
				BR	112013027479	A2	13 June 2017
				US	2014128453	A1	08 May 2014
				EP	2701713	B1	07 February 2018
				RU	2603076	C2	20 November 2016
				SG	194671	A1	30 December 2013
				CN	107714715	A	23 February 2018
				JP	6203707	B2	27 September 2017
				RU	2013153147	A	10 June 2015
				KR	20140038425	A	28 March 2014
				JP	2014516516	A	17 July 2014
				JP	2017008059	A	12 January 2017
				WO	2012149495	A1	01 November 2012
				KR	20170129964	A	27 November 2017
				NZ	616779	A	28 August 2015
CN	106460025	A	22 February 2017	WO	2015148580	A9	24 March 2016
				JP	2017516461	A	22 June 2017
				CA	2946719	A1	01 October 2015
				AU	2015236215	A1	10 November 2016
				EP	3122889	A4	01 November 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/118232

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2015148580 A2	01 October 2015
		EP 3122889 A2	01 February 2017
		US 2015307881 A1	29 October 2015
		WO 2015148580 A3	25 February 2016
		US 2018362985 A1	20 December 2018
WO 2016154127 A2	29 September 2016	US 2018245077 A1	30 August 2018
		CA 2979998 A1	29 September 2016
		WO 2016154127 A3	10 November 2016

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2018/118232

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 47/18(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)i; A61K 47/28(2006.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

TWABS;CPRSABS;MOABS;HKABS;CNABS;DWPI;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;EPTXT;USTXT;CNKI;万方数据库;WEB OF SCIENCE:载脂蛋白C3，载脂蛋白CIII，抑制，修饰，反义RNA，干扰RNA，APOC3，siRNA，dsRNA，RNAi，inhibit，modify；中国专利生物序列检索系统+GenBank+EMBL；关于SEQ ID NOs:1-2的序列检索。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 108239644 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2018年 7月 3日 (2018-07-03) 参见权利要求1-13	52-97，100
A	CN 105392488 A (ISIS制药公司) 2016年 3月 9日 (2016-03-09) 参见全文	1-97，100
A	CN 107250362 A (阿尔尼拉姆医药品有限公司) 2017年 10月 13日 (2017-10-13) 参见全文	1-97，100
A	CN 107854478 A (IONIS制药公司) 2018年 3月 30日 (2018-03-30) 参见全文	1-97，100
A	CN 106460025 A (阿克丘勒斯治疗公司) 2017年 2月 22日 (2017-02-22) 参见全文	1-97，100
A	WO 2016154127 A2 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC) 2016年 9月 29日 (2016-09-29) 参见全文	1-97，100

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 2月 28日	2019年 3月 7日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	王慧梅
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62416241

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/118232

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 98-99
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求98-99涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1（iv）规定的无须检索的情况。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/118232

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	108239644	A	2018年 7月 3日	无			
CN	105392488	A	2016年 3月 9日	RU	2015151200	A3	2019年 1月 14日
				RU	2018136140	A	2018年 12月 17日
				US	2018273953	A1	2018年 9月 27日
				AU	2017200365	A1	2017年 2月 23日
				US	2016090596	A1	2016年 3月 31日
				CN	105378082	A	2016年 3月 2日
				EP	2992097	A2	2016年 3月 9日
				MX	2015015264	A	2016年 8月 12日
				PE	14302016	A1	2017年 1月 6日
				RU	2015151199	A	2017年 6月 5日
				NZ	631537	A	2017年 5月 26日
				CA	2921518	A1	2014年 11月 6日
				JP	2018027091	A	2018年 2月 22日
				AU	2018267625	A1	2018年 12月 13日
				RU	2015151199	A3	2018年 3月 27日
				US	2018273952	A1	2018年 9月 27日
				HK	1221475	A1	2017年 6月 2日
				CR	20150612	A	2016年 3月 3日
				US	9181550	B2	2015年 11月 10日
				US	2016076030	A1	2016年 3月 17日
				AU	2014259750	A1	2015年 10月 22日
				WO	2014179627	A9	2015年 2月 26日
				JP	6456362	B2	2019年 1月 23日
				AU	2017200950	B2	2019年 1月 17日
				KR	20180051678	A	2018年 5月 16日
				AU	2014259755	B2	2018年 8月 30日
				SG	11201508870V	A	2015年 11月 27日
				PH	12015502493	A1	2016年 2月 22日
				AU	2017203436	A1	2017年 6月 8日
				EP	2992009	A1	2016年 3月 9日
				EP	2991661	A4	2017年 2月 15日
				WO	2014179629	A8	2016年 6月 2日
				RU	2670614	C9	2018年 11月 23日
				BR	112015027322	A2	2017年 9月 26日
				BR	112015027319	A2	2017年 9月 26日
				EA	201592093	A1	2016年 6月 30日
				AU	2014259756	B2	2017年 2月 23日
				HK	1221404	A1	2017年 6月 2日
				WO	2014179625	A1	2014年 11月 6日
				NZ	631552	A	2017年 2月 24日
				US	9145558	B2	2015年 9月 29日
				US	9932581	B2	2018年 4月 3日
				US	9181549	B2	2015年 11月 10日
				KR	20160002976	A	2016年 1月 8日
				BR	112015027369	A2	2017年 9月 26日
				BR	112015027321	A2	2017年 9月 26日
				CN	108064162	A	2018年 5月 22日
				CA	2921514	A1	2014年 11月 6日
				MX	2015015220	A	2016年 1月 12日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/118232

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
				US	2018044676	A1	2018年 2月 15日
CN	107250362	A	2017年 10月 13日	JP	2017535552	A	2017年 11月 30日
				EP	3221451	A1	2017年 9月 27日
				WO	2016081444	A9	2016年 7月 21日
				CA	2968114	A1	2016年 5月 26日
				US	2017260527	A1	2017年 9月 14日
				WO	2016081444	A1	2016年 5月 26日
				AU	2015350120	A1	2017年 5月 18日
CN	107854478	A	2018年 3月 30日	ES	2663635	T3	2018年 4月 16日
				EP	2701713	A1	2014年 3月 5日
				AU	2017200025	B2	2018年 11月 15日
				NZ	710192	A	2017年 2月 24日
				RU	2603076	C9	2017年 2月 3日
				AU	2012249324	B2	2016年 10月 6日
				US	9157082	B2	2015年 10月 13日
				EP	2701713	A4	2014年 12月 24日
				MY	162715	A	2017年 7月 14日
				KR	101800333	B1	2017年 11月 22日
				IL	229010	D0	2013年 12月 31日
				RU	2016138742	A	2018年 12月 12日
				JP	2018168184	A	2018年 11月 1日
				CN	103547271	A	2014年 1月 29日
				US	2016060625	A1	2016年 3月 3日
				CA	2834232	A1	2012年 11月 1日
				EP	3357497	A1	2018年 8月 8日
				DK	2701713	T3	2018年 4月 16日
				SG	10201606174R	A	2016年 9月 29日
				AU	2017200025	A1	2017年 2月 2日
				AU	2012249324	A1	2013年 10月 31日
				UA	115309	C2	2017年 10月 25日
				US	2017268004	A1	2017年 9月 21日
				BR	112013027479	A2	2017年 6月 13日
				US	2014128453	A1	2014年 5月 8日
				EP	2701713	B1	2018年 2月 7日
				RU	2603076	C2	2016年 11月 20日
				SG	194671	A1	2013年 12月 30日
				CN	107714715	A	2018年 2月 23日
				JP	6203707	B2	2017年 9月 27日
				RU	2013153147	A	2015年 6月 10日
				KR	20140038425	A	2014年 3月 28日
				JP	2014516516	A	2014年 7月 17日
				JP	2017008059	A	2017年 1月 12日
				WO	2012149495	A1	2012年 11月 1日
				KR	20170129964	A	2017年 11月 27日
				NZ	616779	A	2015年 8月 28日
CN	106460025	A	2017年 2月 22日	WO	2015148580	A9	2016年 3月 24日
				JP	2017516461	A	2017年 6月 22日
				CA	2946719	A1	2015年 10月 1日
				AU	2015236215	A1	2016年 11月 10日
				EP	3122889	A4	2017年 11月 1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/118232

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				WO	2015148580	A2	2015年 10月 1日
				EP	3122889	A2	2017年 2月 1日
				US	2015307881	A1	2015年 10月 29日
				WO	2015148580	A3	2016年 2月 25日
				US	2018362985	A1	2018年 12月 20日
WO	2016154127	A2	2016年 9月 29日	US	2018245077	A1	2018年 8月 30日
				CA	2979998	A1	2016年 9月 29日
				WO	2016154127	A3	2016年 11月 10日