

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年11月26日(26.11.2020)

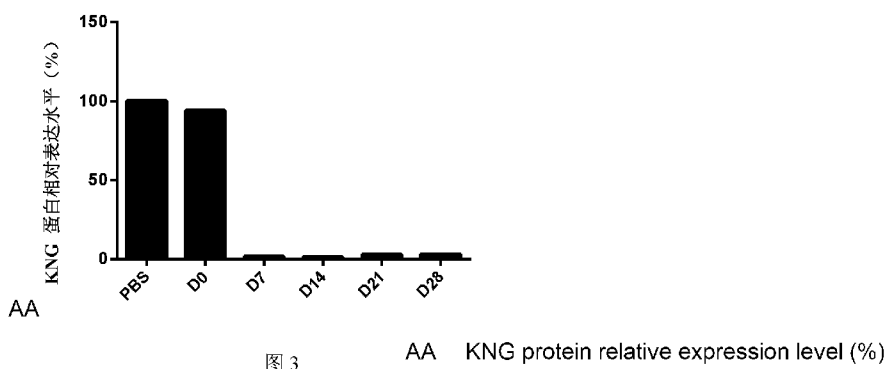


(10) 国际公布号
WO 2020/233680 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/713* (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/091614
- (22) 国际申请日: 2020年5月21日(21.05.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910430606.1 2019年5月22日(22.05.2019) CN
- (71) 申请人: 苏州瑞博生物技术股份有限公司(SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省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: 北京信诺创成知识产权代理有限公司(SINO-CREATIVITY INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 中国北京市朝阳区光华路7号汉威大厦东区25A3-1室, Beijing 100020 (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,

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

(54) 发明名称: 核酸、药物组合物与缀合物及制备方法和用途



(57) Abstract: An siRNA which inhibits kininogen (KNG) gene expression, a pharmaceutical composition containing the siRNA, and an siRNA conjugate. Each nucleotide in the siRNA is independently a modified or unmodified nucleotide. The siRNA contains a sense strand and an antisense strand. The sense strand contains nucleotide sequence I, nucleotide sequence I having the same length as the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1, with no more than three nucleotide differences. The antisense strand contains nucleotide sequence II, nucleotide sequence II having the same length as the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 2, with no more than three nucleotide differences. The siRNA, the pharmaceutical composition thereof and the siRNA conjugate can effectively treat and/or prevent septicemia.

(57) 摘要: 一种抑制激肽原(KNG)基因表达的siRNA, 含有该siRNA的药物组合物和siRNA缀合物。所述siRNA中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸, 该siRNA含有正义链和反义链, 所述正义链含有核苷酸序列I, 所述核苷酸序列I与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异, 所述反义链含有核苷酸序列II, 所述核苷酸序列II与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于3个核苷酸差异。所述siRNA及其药物组合物和siRNA缀合物, 可以有效治疗和/或预防败血症。

WO 2020/233680 A1

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

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

本国际公布:

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

核酸、药物组合物与缀合物及制备方法和用途

技术领域

本公开涉及一种能够抑制激肽原基因表达的核酸和含有核酸的药物组合物与 siRNA 缀合物。本公开还涉及该核酸、药物组合物与 siRNA 缀合物的制备方法和用途。

背景技术

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

激肽原（Kininogen, KNG）基因可表达产生活化高分子量激肽原（activated high molecular weight kininogen, HMWKa），它可与革兰氏阴性菌细胞表面的脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）结合而延长其半寿期。通过抑制 KNG 表达，能够有效抑制病原体寿命，从而达到缓解败血症疾病进程并逆转病情的目的。因此，KNG 与由病原体引发的败血症和其它炎症密切相关，因而是治疗败血症的关键靶点之一。小干扰 RNA（small interfering RNA, siRNA）可基于 RNA 干扰（RNA interference, RNAi）这一机制，以序列特异性的方式抑制或阻断感兴趣的目的基因的表达，从而达到治疗疾病的目的。

开发抑制 KNG 基因表达和治疗败血症的 siRNA 药物的关键之一在于寻找合适的 siRNA 及其修饰，以及有效的递送系统。

发明内容

本公开的发明人意外发现具有本公开提供的如下 siRNA 及其修饰序列，以及含有该 siRNA 的药物组合物和 siRNA 缀合物能够特异性地抑制 KNG 基因的表达，并且所述 siRNA 缀合物能够特异性地靶向肝脏，从而可以抑制肝脏中 KNG 基因的表达，实现败血症的治疗或预防。

在一些实施方式中，本公开提供了第一种能够抑制 KNG 基因表达的 siRNA，该 siRNA 含有正义链和反义链，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 选自如下 i) - vi) 所示序列中的一组：

i) 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'- AAAGUAACAACCAGUUUGZ₁-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-Z₂CAAACUGGUUGUUACUUU-3' (SEQ ID NO: 2),

其中, Z₁ 为 U, Z₂ 为 A, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁ 的核苷酸 Z₃, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₂ 的核苷酸 Z₄, 所述 Z₄ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

ii) 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5'- AUUGAACUUUCGAAUUACZ₅-3' (SEQ ID NO: 61);

5'-Z₆ GUAAUUCGAAAGUUCAAU-3' (SEQ ID NO: 62),

其中, Z₅ 为 C, Z₆ 为 G, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₅ 的核苷酸 Z₇, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₆ 的核苷酸 Z₈, 所述 Z₈ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

iii) 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 121 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异, 且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列长度相等, 且不多于 3 个核苷酸差异:

5'- UCGAAUUACCUACUCAAUZ₉-3' (SEQ ID NO: 121);

5'-Z₁₀AUUGAGUAGGUAAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 122),

其中, Z₉ 为 U, Z₁₀ 为 A, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₉ 的核苷酸 Z₁₁, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₀ 的核苷酸 Z₁₂, 所述 Z₁₂ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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

5'- GAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₃-3' (SEQ ID NO: 181);

5'-Z₁₄AUCGAUGUAUGCAUUAUC-3' (SEQ ID NO: 182),

其中, Z₁₃ 为 A, Z₁₄ 为 U, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁₃ 的核苷酸 Z₁₅, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₄ 的核苷酸 Z₁₆, 所述 Z₁₆ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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

5'- GAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₇-3' (SEQ ID NO: 241);

5'-Z₁₈UAGAAAGUUGCGUUAUUC -3' (SEQ ID NO: 242),

其中, Z₁₇ 为 U, Z₁₈ 为 A, 所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁₇ 的核苷酸 Z₁₉, 所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₈ 的核苷酸 Z₂₀, 所述 Z₂₀ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

vi) 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 301 所示的核苷酸序列长度相等, 且

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

5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₁-3' (SEQ ID NO: 301)；

5'-Z₂₂AUCUUGAAAUAGAAAGUU-3' (SEQ ID NO: 302)，

其中，Z₂₁ 为 U，Z₂₂ 为 A，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₂₁ 的核苷酸 Z₂₃，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₂₂ 的核苷酸 Z₂₄，所述 Z₂₄ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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

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

在一些实施方式中，本公开提供了本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物在制备用于治疗 and/或预防由所述 KNG 基因异常表达引起的败血症的药物中的用途。

在一些实施方式中，本公开提供了一种治疗和/或预防败血症的方法，所述方法包括将有效量的本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物给予患有败血症的受试者。

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

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

以引用的方式并入

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

有益效果

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

在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在体外细胞实验中显示出优异的靶 mRNA 抑制活性。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在肝细胞中显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%的靶 mRNA 表达抑制率。在一些实

施方式中，本公开提供的 siRNA 缀合物在 psiCHECK 系统中显示出较高的抑制活性，IC₅₀ 在 0.0048-0.2328nM 之间。

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

在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物可在体内具有更高的稳定性和/或更高的活性。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%的靶基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%的 KNG 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%的肝内 KNG 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%的动物模型中肝内 KNG 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物在体内显示出至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%的人类受试者中肝内 KNG 基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA 缀合物在人源化小鼠中对 KNG mRNA 显示出明显的抑制活性，siRNA 缀合物对 KNG mRNA 的表达水平的抑制率可达到 56%。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA 缀合物在人源小鼠中显示出很高的抑制活性，对 KNG mRNA 的表达水平的抑制率均达到了 97%以上。

在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物未显示出明显脱靶效应。脱靶效应可以是例如抑制非靶基因的基因正常表达。据认为，如果脱靶基因表达的结合/抑制与在靶基因效果相比低于 50%、40%、30%、20%或 10%时，该脱靶效应就是不显著的。

由此说明，本公开提供的 siRNA、药物组合物以及 siRNA 缀合物能够抑制 KNG mRNA 的表达，有效治疗和/或预防败血症症状，具有良好的应用前景。

本公开的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

附图说明

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

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

图 3 是给予 siRNA 缀合物后，在不同时间点小鼠体内 (*in vivo*) 的 KNG 蛋

白相对表达水平的柱状图。

具体实施方式

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，KNG mRNA 是指具有 Genbank 注册号为 NM_001102416.2 所示序列的 mRNA。进一步地，若无其它说明，本公开中所使用的术语“靶基因”是指转录上述 KNG mRNA 的基因，术语“靶 mRNA”是指上述 KNG mRNA。

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

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

在上文及下文中，一个核苷酸序列与另外一个核苷酸序列存在“核苷酸差异”，是指前者与后者相比，相同位置的核苷酸的碱基种类发生了改变，例如，在后者中一个核苷酸碱基为 A 时，在前者的相同位置处的对应核苷酸碱基为 U、C、G 或者 T 的情况下，认定为两个核苷酸序列之间在该位置处存在核苷酸差异。在一些实施方式中，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、药物组合物或 siRNA 缀合物的制备方法时，除非特别说明，所述核苷单体 (nucleoside monomer) 指，根据欲制备的 siRNA 或 siRNA 缀合物中核苷酸的种类和顺序，亚磷酰胺固相合成中使用的修饰或未修饰的核苷亚磷酰胺单体 (unmodified or modified RNA phosphoramidites，有时 RNA phosphoramidites 也称为 Nucleoside phosphoramidites)。亚磷酰胺固相合成成为本领域技术人员所公知的 RNA 合成中所用的方法。本公开所用的核苷单体均可商购得到。

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

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

如本文所使用的，“烷基”是指具有指定数量的碳原子的直链和支链，所述数量通常为 1 至 20 个碳原子，例如 1 至 10 个碳原子，如 1 至 8 个或 1 至 6 个碳原子。例如，C₁-C₆ 烷基包含 1 至 6 个碳原子的直链和支链烷基。当提及具有特定数量的碳的烷基残基时，旨在涵盖具有该数量的碳的所有支链和直链形式；因此，例如，“丁基”意味着包括正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基；“丙基”包括正丙基和异丙基。亚烷基是烷基的子集，指与烷基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“烯基”是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和支链或直链烷基，所述碳-碳双键是通过从母体烷基的相邻碳原子中除去一分子氢而获得的。该基团可以处于双键的顺式或反式构型。典型的烯基基团包括但不限于：乙烯基；丙烯基，如丙-1-烯-1-基、丙-1-烯-2-基、丙-2-烯-1-基（烯丙基）、丙-2-烯-

2-基；丁烯基，例如丁-1-烯-1-基、丁-1-烯-2-基、2-甲基丙-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、丁-2-烯-2-基、丁-1,3-二烯-1-基、丁-1,3-二烯-2-基等等。在某些实施方式中，烯基基团具有 2 到 20 个碳原子，而在其他实施方式中，具有 2 至 10 个、2 至 8 个或 2 至 6 个碳原子。亚烯基是烯基的一个子集，指与烯基相同、但具有两个连接点的残基。

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

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

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

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

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

“杂环基”是指稳定的 3-至 18-元非芳香族环基，包含 2-12 个碳原子和 1-6 个杂原子，所述杂原子选自氮、氧或硫。除非说明书中另有说明，杂环基是单环、双环、三环或四环系统，可包括稠环或桥环系统。杂环基中的杂原子可以任选地被氧化。一个或多个氮原子（如果存在的话）任选地被季铵化。杂环基是部分饱和或完全饱和的。杂环基可以通过任何环原子连接至分子的其余部分。此类杂环基的实例包括但不限于：

二噁烷基、噻吩基[1,3]二硫酰基(thienyl[1,3]dithianyl)、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚

基、2-氧杂哌嗪基、2-氧杂哌啶基、2-氧杂吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三硫酰基(trithianyl)、四氢吡喃基、硫代吗啉基(thiomorpholinyl)、硫杂吗啉基(thiamorpholinyl)、1-氧代硫吗啉基(1-oxo-thiomorpholinyl)和1,1-二氧代硫吗啉基(1,1-dioxo-thiomorpholinyl)。

“杂芳基”指由3-至18-元芳香环自由基衍生而成的基团，包含2个至17个碳原子和选自氮、氧和硫的1至6个杂原子。如本文所使用的，杂芳基可以是单环、双环、三环或四环系统，其中环系统中的至少一个环是完全不饱和的，即，包含根据Hückel理论的环状离域 $(4n+2)\pi$ -电子体系。杂芳基包括稠环或桥环系统。杂芳基中的杂原子被任选地氧化。一个或多个氮原子(如果存在的话)任选地被季铵化。杂芳基通过任何环原子连接至分子的其余部分。杂芳基的实例包括但不限于：氮杂环庚三烯基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并吡啶基、1,3-苯并二噁唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并[d]噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二噁庚英基(benzo[b][1,4]dioxepinyl)、苯并[b][1,4]噁嗪基(benzo[b][1,4]oxazinyl)、1,4-苯并二噁烷基(1,4-benzodioxanyl)、苯并萘并呋喃基、苯并噁唑基、苯并间二氧杂环戊烯基(benzodioxolyl)、苯并二噁英基(benzodioxinyl)、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基、苯并噻吩并[3,2-d]嘧啶基、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、喹啉基、噌啉基(cinnolinyl)、环戊烷并[d]嘧啶基、6,7-二氢-5H-环戊烷并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6-二氢苯并[h]喹唑啉基(5,6-dihydrobenzo[h]quinazolinyl)、5,6-二氢苯并[h]噌啉基(5,6-dihydrobenzo[h]cinnolinyl)、6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚烷并[1,2-c]哒嗪基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、呋喃酮基、呋喃并[3,2-c]吡啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]嘧啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]哒嗪基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]吡啶基、异噻唑基、咪唑基、吡唑基(indazolyl)、吡啶基、异吡啶基、二氢吡啶基、异二氢吡啶基、异喹啉基、吡啶基(indoliziny)、异噁唑基、5,8-甲醇-5,6,7,8-四氢喹唑啉基(5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl)、萘啶基(naphthyridinyl)、1,6-萘啶酮基(1,6-naphthyridinonyl)、噁二唑基、2-氧杂吡啶基(2-oxoazepinyl)、噁唑基、氧杂环丙烷基(oxiranyl)、5,6,6a,7,8,9,10,10a-八氢苯并[H]喹唑啉基、1-苯基-1H-吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、酞嗪基(phthalazinyl)、蝶啶基(pteridinyl)、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡唑并[3,4-d]嘧啶基、吡啶基、吡啶并[3,2-d]嘧啶基、吡啶并[3,4-d]嘧啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、喹唑啉基、喹啉基(quinoxaliny)、喹啉基、四氢喹啉基、5,6,7,8-四氢喹唑啉基、5,6,7,8-四氢苯并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、6,7,8,9-四氢-5H-环庚烷并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6,7,8-四氢吡啶并[4,5-c]哒嗪基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基、噻吩并[2,3-d]嘧啶基、噻吩并[3,2-d]嘧啶基、噻吩并[2,3-c]吡啶基(thieno[2,3-c]pridinyl)和噻吩基(thiophenyl/thienyl)。

在本公开中可以使用各种羟基保护基团。一般来说，保护基团使化学官能团对特定的反应条件不敏感，并且可以在分子中的该官能团上添加以及去除，

而不实质上损害分子的其余部分。代表性的羟基保护基团公开于 Beaucage 等人, Tetrahedron 1992, 48, 2223-2311, 以及 Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991 中, 以引用的方式将上述文献各自整体并入本文。在一些实施方式中, 保护基团在碱性条件下稳定, 但可以在酸性条件下脱除。在一些实施方式中, 本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括二甲氧基三苯甲基 (DMT)、单甲氧基三苯甲基、9-苯基氧杂蒽-9-基 (Pixyl) 或 9-(对甲氧基苯基) 氧杂蒽-9-基 (Mox)。在一些实施方式中, 本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括 Tr(三苯甲基)、MMTr (4-甲氧基三苯甲基)、DMTr (4,4'-二甲氧基三苯甲基) 或 TMTTr (4,4',4''-三甲氧基三苯甲基)。

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

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

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

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。

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

第一种 siRNA

按照本公开, 所述 siRNA 可以是第一种 siRNA。

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

5'-AAAGUAACAACCAGUUUGZ₁-3' (SEQ ID NO: 1)；

5'-Z₂CAAACUGGUUGUUACUUU-3' (SEQ ID NO: 2)，

其中，Z₁ 为 U，Z₂ 为 A，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁ 的核苷酸 Z₃，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₂ 的核苷酸 Z₄，所述 Z₄ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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

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

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₄ 位置处的差异，且 Z₄ 选自 U、C 或 G。在一些实施方式中，所述核苷酸差异为 Z₄ 位置处的差异，Z₄ 选自 U、C 或 G。在一些实施方式中，Z₃ 是与 Z₄ 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高的靶 mRNA 抑制能力，而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

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

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

5'-AAAGUAACAACCAGUUUGZ₃-3' (SEQ ID NO: 3)；

5'-Z₄CAAACUGGUUGUUACUUUGG-3' (SEQ ID NO: 4)，

其中，所述 Z₄ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₄ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₃ 是与 Z₄ 互补的核苷酸；在一些实施方式中，Z₃ 为 U，Z₄ 为 A。

在一些实施方式中，所述正义链还含有核苷酸序列 III，所述反义链还含有核苷酸序列 IV，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度各自为 1-4 个核苷酸；所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或者完全

反向互补；所述核苷酸序列 III 连接在所述核苷酸序列 I 的 5'末端，所述核苷酸序列 IV 连接在所述核苷酸序列 II 的 3'末端。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 IV 与第二段核苷酸序列实质上反向互补或者完全反向互补，该第二段核苷酸序列是指和靶 mRNA 中与由 SEQ ID NO: 1 表示的核苷酸序列的 5'末端相邻、且长度与所述核苷酸序列 IV 相同的核苷酸序列。

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

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

第二种 siRNA

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

5'- AUUGAACUUUCGAAUUACZ₅-3' (SEQ ID NO: 61)；

5'-Z₆GUAAUUCGAAAGUUCAAU-3' (SEQ ID NO: 62)，

其中，Z₅ 为 C，Z₆ 为 G，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₅ 的核苷酸 Z₇，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₆ 的核苷酸 Z₈，所述 Z₈ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序

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

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₈ 位置处的差异，且 Z₈ 选自 A、U 或 C。在一些实施方式中，所述核苷酸差异为 Z₈ 位置处的差异，Z₈ 选自 A、U 或 C。在一些实施方式中，Z₇ 是与 Z₈ 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高的靶 mRNA 抑制能力，而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

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

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

5'- AUUGAACUUUCGAAUUAACZ₇ -3' (SEQ ID NO: 63)；

5'- Z₈GUAAUUCGAAAGUUCAAU -3' (SEQ ID NO: 64)，

其中，所述 Z₈ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₈ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₇ 是与 Z₈ 互补的核苷酸；在一些实施方式中，Z₇ 为 C，Z₈ 为 G。

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

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

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

第三种 siRNA

按照本公开,所述 siRNA 可以是第三种 siRNA。

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

5'-UCGAAUUACCUACUCAAUZ₉-3' (SEQ ID NO: 121);

5'-Z₁₀AUUGAGUAGGUAAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 122),

其中,Z₉为U,Z₁₀为A,所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₉的核苷酸 Z₁₁,所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₀的核苷酸 Z₁₂,所述 Z₁₂是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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

在一些实施方式中,所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₁₂位置处的差异,且 Z₁₂选自 U、C 或 G。在一些实施方式中,所述核苷酸差异为 Z₁₂位置处的差异,Z₁₂选自 U、C 或 G。在一些实施方式中,Z₁₁是与 Z₁₂互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高的靶 mRNA 抑制能力,而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

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

在一些实施方式中,核苷酸序列 I 是 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列,核苷酸序列 II 是 SEQ ID NO: 124 所示的核苷酸序列:

5'-UCGAAUUACCUACUCAAUZ₁₁-3' (SEQ ID NO: 123);

5'-Z₁₂AUUGAGUAGGUAAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 124),

其中,所述 Z₁₂是反义链 5'末端的第一个核苷酸,Z₁₂选自 A、U、G 或 C,并且 Z₁₁是与 Z₁₂互补的核苷酸;在一些实施方式中,Z₁₁为 U,Z₁₂为 A。

在一些实施方式中,所述正义链还含有核苷酸序列 III,所述反义链还含有

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

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度均为 1 个核苷酸，核苷酸序列 III 的碱基为 U，核苷酸序列 IV 的碱基为 A；此时，正义链和反义链的长度比为 20/20；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 UU，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 AA；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 CUU，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 AAG；此时，正义链和反义链的长度比为 22/22；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 ACUU，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 AAGU；此时，正义链和反义链的长度比为 23/23。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 UU，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 AA；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21。

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

第四种 siRNA

按照本公开，所述 siRNA 可以是第四种 siRNA。

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

5'- GAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₃-3' (SEQ ID NO: 181)；

5'-Z₁₄AUCGAUGUAUGCAUUAUC-3' (SEQ ID NO: 182)，

其中，Z₁₃ 为 A，Z₁₄ 为 U，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁₃ 的核苷酸 Z₁₅，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₄ 的核苷酸 Z₁₆，所述 Z₁₆ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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

核苷酸序列 II。

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

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₁₆ 位置处的差异，且 Z₁₆ 选自 A、C 或 G。在一些实施方式中，所述核苷酸差异为 Z₁₆ 位置处的差异，Z₁₆ 选自 A、C 或 G。在一些实施方式中，Z₁₅ 是与 Z₁₆ 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高的靶 mRNA 抑制能力，而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

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

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

5'- GAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₅ -3' (SEQ ID NO: 183)；

5'- Z₁₆AUCGAUGUAUGCAUUAUC -3' (SEQ ID NO: 184)，

其中，所述 Z₁₆ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₁₆ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₁₅ 是与 Z₁₆ 互补的核苷酸；在一些实施方式中，Z₁₅ 为 A，Z₁₆ 为 U。

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

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

照 5'末端到 3'末端的方向,核苷酸序列 III 的碱基组成为 CA,核苷酸序列 IV 的碱基组成为 UG;此时,正义链和反义链的长度比为 21/21。

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

第五种 siRNA

按照本公开,所述 siRNA 可以是第五种 siRNA。所述第五种 siRNA 含有正义链和反义链,所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸,其中,所述正义链含有一段核苷酸序列 I,所述反义链含有一段核苷酸序列 II,所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区,其中,所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 241 所示的核苷酸序列长度相等,且不多于 3 个核苷酸差异,且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列长度相等,且不多于 3 个核苷酸差异:

5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₇-3' (SEQ ID NO: 241);

5'-Z₁₈UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO: 242),

其中,Z₁₇为U,Z₁₈为A,所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁₇的核苷酸 Z₁₉,所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₈的核苷酸 Z₂₀,所述 Z₂₀是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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 I 与 SEQ ID NO: 241 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异,和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方式中,所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₂₀位置处的差异,且 Z₂₀选自 U、C 或 G。在一些实施方式中,所述核苷酸差异为 Z₂₀位置处的差异,Z₂₀选自 U、C 或 G。在一些实施方式中,Z₁₉是与 Z₂₀互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高的靶 mRNA 抑制能力,而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

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

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

5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₉-3' (SEQ ID NO: 243);

5'-Z₂₀UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO: 244),

其中,所述 Z₂₀是反义链 5'末端的第一个核苷酸,Z₂₀选自 A、U、G 或 C,

并且 Z₁₉ 是与 Z₂₀ 互补的核苷酸；在一些实施方式中，Z₁₉ 为 U，Z₂₀ 为 A。

在一些实施方式中，所述正义链还含有核苷酸序列 III，所述反义链还含有核苷酸序列 IV，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度各自为 1-4 个核苷酸；所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或者完全反向互补；所述核苷酸序列 III 连接在所述核苷酸序列 I 的 5'末端，所述核苷酸序列 IV 连接在所述核苷酸序列 II 的 3'末端，所述核苷酸序列 IV 与第二段核苷酸序列实质上反向互补或者完全反向互补，该第二段核苷酸序列是指和靶 mRNA 中与由 SEQ ID NO: 241 表示的核苷酸序列的 5'末端相邻、且长度与所述核苷酸序列 IV 相同的核苷酸序列。

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

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

第六种 siRNA

按照本公开，所述 siRNA 可以是第六种 siRNA。

所述第六种 siRNA 含有正义链和反义链，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，所述反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区，其中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 301 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 302 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'- AACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₁ -3' (SEQ ID NO: 301)；

5'-Z₂₂AUCUUGAAAUAGAAAGUU -3' (SEQ ID NO: 302)，

其中，Z₂₁ 为 U，Z₂₂ 为 A，所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₂₁ 的核苷酸 Z₂₃，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₂₂ 的核苷酸 Z₂₄，所述 Z₂₄ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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 I 与 SEQ ID NO: 301 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 302 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 302 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₂₄ 位置处的差异，且 Z₂₄ 选自 U、C 或 G。在一些实施方式中，所述核苷酸差异为 Z₂₄ 位置处的差异，Z₂₄ 选自 U、C 或 G。在一些实施方式中，Z₂₃ 是与 Z₂₄ 互补的核苷酸。具有上述核苷酸差异的 siRNA 具有较高的靶 mRNA 抑制能力，而这些包含核苷酸差异的 siRNA 也在本公开的保护范围之内。

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

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

5'- AACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₃ -3' (SEQ ID NO: 303)；

5'- Z₂₄AUCUUGAAAUAGAAAGUU -3' (SEQ ID NO: 304)，

其中，所述 Z₂₄ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₂₄ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₂₃ 是与 Z₂₄ 互补的核苷酸；在一些实施方式中，Z₂₃ 为 U，Z₂₄ 为 A。

在一些实施方式中，所述正义链还含有核苷酸序列 III，所述反义链还含有核苷酸序列 IV，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 长度各自为 1-4 个核苷酸；所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或者完全反向互补；所述核苷酸序列 III 连接在所述核苷酸序列 I 的 5'末端，所述核苷酸序列 IV 连接在所述核苷酸序列 II 的 3'末端，所述核苷酸序列 IV 与第二段核苷酸序列实质上反向互补或者完全反向互补，该第二段核苷酸序列是指和靶 mRNA 中与由 SEQ ID NO: 301 表示的核苷酸序列的 5'末端相邻、且长度与所述核苷酸序列 IV 相同的核苷酸序列。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度均为 1 个核苷酸，核苷酸序列 III 的碱基为 C，核苷酸序列 IV 的碱基为 G；此时，正义链和反义链的长度比为 20/20；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 GC，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 GC；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 CGC，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 GCG；此时，正义链和反义链的长度比为 22/22；或者，核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 ACGC，核苷酸

序列 IV 的碱基组成为 GCGU；此时，正义链和反义链的长度比为 23/23。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 GC，核苷酸序列 IV 的碱基组成为 GC；此时，正义链和反义链的长度比为 21/21。

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

以下，对核苷酸序列 V、核酸序列、siRNA 中的核苷酸修饰以及修饰序列的描述适用于上述第一种 siRNA 至第六种 siRNA 中的任意一种。即如果没有特指，下面对 siRNA 的描述应视为是对第一种 siRNA、第二种 siRNA、第三种 siRNA、第四种 siRNA、第五种 siRNA 或第六种 siRNA 逐一进行了描述。例如，如不特别指明具体的 siRNA，“所述 siRNA 还含有核苷酸序列 V”的意思是“第一种 siRNA、第二种 siRNA、第三种 siRNA、第四种 siRNA、第五种 siRNA 或第六种 siRNA 还含有核苷酸序列 V”。

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

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

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

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

5'- AAAGUAACAACCCAGUUUGZ₃ -3' (SEQ ID NO: 5)；

5'- Z₄CAAACUGGUUGUUACUUUGG -3' (SEQ ID NO: 6)；

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

5'- CCAAAGUAACAACCAGUUUG Z₃-3' (SEQ ID NO: 7);

5'- Z₄ CAAACUGGUUGUUACUUUGGUU -3' (SEQ ID NO: 8);

其中, 所述 Z₄ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₄ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₃ 是与 Z₄ 互补的核苷酸。

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

5'- AUUGAACUUUCGAAUUCZ₇-3' (SEQ ID NO: 65);

5'- Z₈ GUAAUUCGAAAGUUCAAUCC -3' (SEQ ID NO: 66),

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

5'- GGAUUGAACUUUCGAAUUCZ₇-3' (SEQ ID NO: 67);

5'- Z₈ GUAAUUCGAAAGUUCAAUCCAG -3' (SEQ ID NO: 68),

其中, 所述 Z₈ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₈ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₇ 是与 Z₈ 互补的核苷酸。

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

5'- UCGAAUUACCUACUCAAUZ₁₁-3' (SEQ ID NO: 125);

5'- Z₁₂ AUUGAGUAGGUAAUUCGAAA -3' (SEQ ID NO: 126),

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

5'- UUUCGAAUUACCUACUCAAUZ₁₁-3' (SEQ ID NO: 127);

5'- Z₁₂ AUUGAGUAGGUAAUUCGAAAGU -3' (SEQ ID NO: 128),

其中, 所述 Z₁₂ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₁₂ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₁₁ 是与 Z₁₂ 互补的核苷酸。

在一些实施方式中, 对于所述第四种 siRNA, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 185 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 186 所示的核苷酸序列:

5'- GAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₅-3' (SEQ ID NO: 185);

5'- Z₁₆ AUCGAUGUAUGCAUUAUCUG -3' (SEQ ID NO: 186),

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

5'- CAGAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₅-3' (SEQ ID NO: 187);

5'- Z₁₆ AUCGAUGUAUGCAUUAUCUGUA -3' (SEQ ID NO: 188),

其中，所述 Z₁₆ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₁₆ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₁₅ 是与 Z₁₆ 互补的核苷酸。

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

5'- GAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₉-3' (SEQ ID NO: 245);
5'- Z₂₀UAGAAAGUUGCGUUAUUCUC-3' (SEQ ID NO: 246)，

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

5'- GAGAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₉-3' (SEQ ID NO: 247);
5'- Z₂₀ UAGAAAGUUGCGUUAUUCUCUG-3' (SEQ ID NO: 248)，

其中，所述 Z₂₀ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₂₀ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₁₉ 是与 Z₂₀ 互补的核苷酸。

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

5'- AACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₃-3' (SEQ ID NO: 305);
5'- Z₂₄ AUCUUGAAAUAGAAAGUUGC -3' (SEQ ID NO: 306)，

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

5'- GCAACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₃-3' (SEQ ID NO: 307);
5'- Z₂₄ AUCUUGAAAUAGAAAGUUGCGU -3' (SEQ ID NO: 308)，

其中，所述 Z₂₄ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₂₄ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₂₃ 是与 Z₂₄ 互补的核苷酸。

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

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

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 至少含有 1 个修饰的核苷酸。在本公开的上下文中，所使用的术语“修饰的核苷酸”是指核苷酸的核糖基 2'位羟基被其他基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物，或者具有经修饰的碱基的核苷

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

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

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

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

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

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

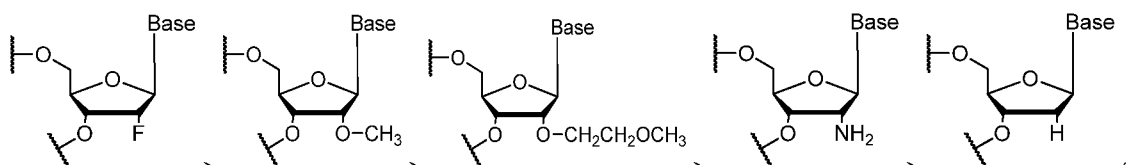
在一些实施方式中，按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述正义链中，所述核苷酸序列 I 的第 7、8、9 位或者 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸；按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述反义链中，所述核苷酸序列 II 的第 2、6、14、16 位或者 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸。

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

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（8）所示。在一些实施方式中，2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸，例如可以是2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸（2'-MOE），如式（9）所示。在一些实施方式中，2'-氨基修饰的核苷酸（2'-NH₂）如式（10）所示。在一些实施方式中，2'-脱氧核苷酸（DNA）如式（11）所示：



式（7）

式（8）

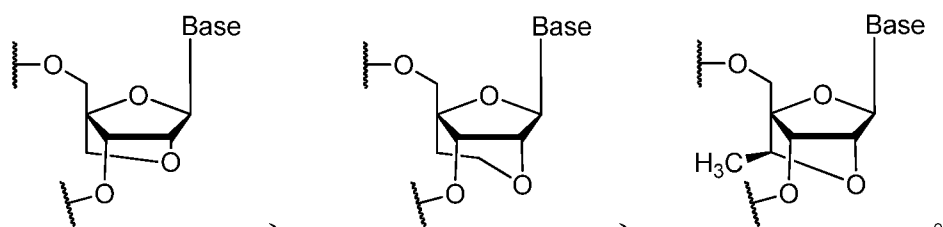
式（9）

式（10）

式（11）

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（12）所示，ENA 如式（13）所示，cET BNA 如式（14）所示：

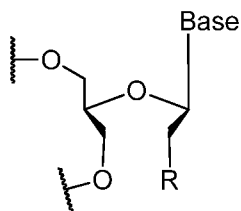


式（12）

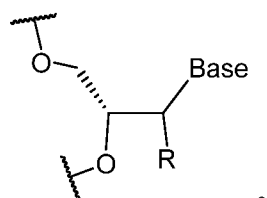
式（13）

式（14）

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



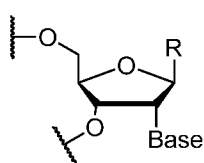
式 (15)



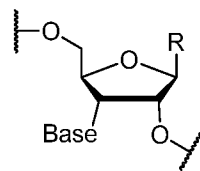
式 (16)

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

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



式 (17)



式 (18)

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

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

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

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

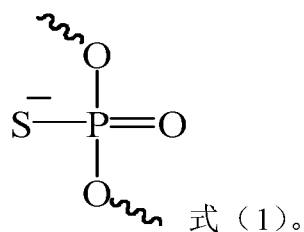
或者，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；

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

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

具有上述修饰的 siRNA 不仅成本低，而且可使血液中的核糖核酸酶不易切割核酸，由此增加核酸的稳定性，使核酸具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。同时，上述修饰的 siRNA 具有较高的抑制靶 mRNA 的活性。

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



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。

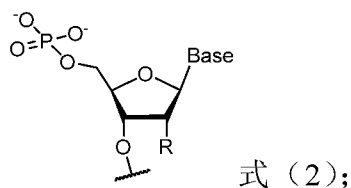
在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA 中，硫代磷酸酯基连接存在于由以下位置组成的组中的至少一处：正义链或反义链任意一端的第一个和第二个核苷酸之间；正义链或反义链任意一端的第二个和第三个核苷酸之间；或上述的任意组合。在一些实施方式中，硫代磷酸酯基连接存在于除正义链 5'末端以外的全部上述位置处。在一些实施方式中，硫代磷酸酯基连接存在于除正义链 3'末端以外的全部上述位置处。在一些实施方式中，硫代磷酸酯基连接存在于以下位置中的至少一处：

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

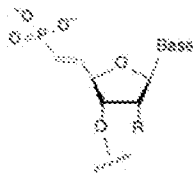
在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA 为表 1a-1f 中列出的 siKNa1-M1S、siKNa1-M2S、siKNa1-M3S、siKNa2-M1S、siKNa2-M2S、siKNa2-M3S、siKNb1-M1S、siKNb1-M2S、siKNb1-M3S、siKNb2-M1S、siKNb2-M2S、siKNb2-M3S、siKNc1-M1S、siKNc1-M2S、siKNc1-M3S、siKNc2-M1S、siKNc2-M2S、siKNc2-M3S、siKNd1-M1S、siKNd1-M2S、siKNd1-M3S、siKNd2-M1S、siKNd2-M2S、siKNd2-M3S、siKNe1-M1S、siKNe1-M2S、siKNe1-M3S、siKNe2-M1S、siKNe2-M2S、siKNe2-M3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

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。

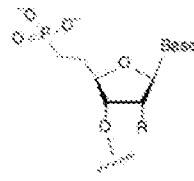
常用的所述 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸是本领域技术人员所公知的，如 5'-磷酸核苷酸可具有如下结构：



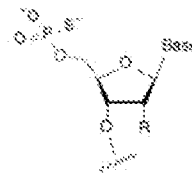
再如，Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, *The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility*. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(3): 238-48 中公开了如下 4 种 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸：



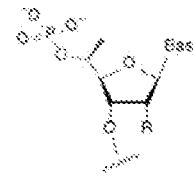
式 (3)



式 (4)



式 (5)



式 (6)

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

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

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

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

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

本公开提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有如上所述的 siRNA 作为活性成分和药学上可接受的载体。

所述药学上可接受的载体可以是 siRNA 给药领域常规使用的载体，例如但不限于磁性纳米粒（magnetic nanoparticles，如基于 Fe₃O₄ 或 Fe₂O₃ 的纳米粒）、碳纳米管（carbon nanotubes）、介孔硅（mesoporous silicon）、磷酸钙纳米粒（calcium phosphate nanoparticles）、聚乙烯亚胺（polyethylenimine, PEI）、聚酰胺型树形高分子（polyamidoamine (PAMAM) dendrimer）、聚赖氨酸（poly(L-lysine), PLL）、壳聚糖（chitosan）、1,2-二油酰基-3-三甲铵丙烷（1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP）、聚 D 型或 L 型乳酸/羟基乙酸共聚物（poly(D&L-lactic/glycolic acid)copolymer, PLGA）、聚（氨乙基乙撑磷酸酯）（poly(2-aminoethyl ethylene phosphate), PPEEA）和聚（甲基丙烯酸-N,N-二甲氨基乙酯）（poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate), PDMAEMA）以及它们的衍生物中的一种或多种。

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

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%。

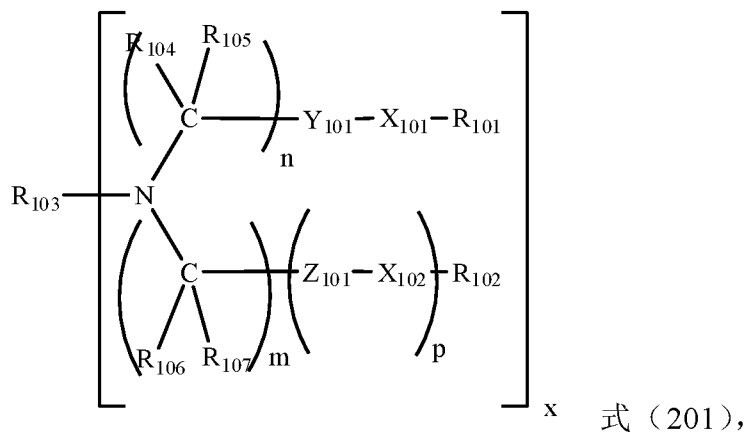
所述渗透压调节剂可以为氯化钠和/或氯化钾。所述渗透压调节剂的含量使所述药物组合物的渗透压为 200-700 毫渗摩尔/千克（mOsm/kg）。根据所需渗透压，本领域技术人员可以容易地确定所述渗透压调节剂的含量。

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:



其中:

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

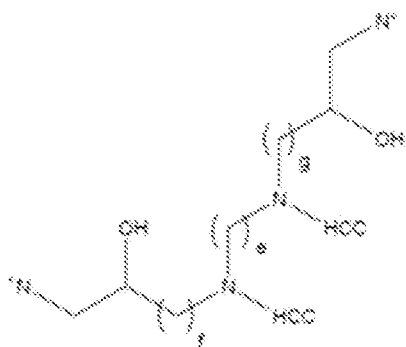
Y_{101} 或 Z_{101} 各自独立地是 C=O、C=S、S=O、CH-OH 或 SO_2 ;

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

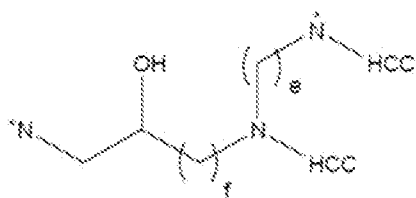
x 是 1-10 的整数;

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),



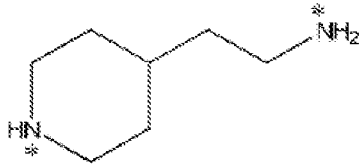
式(203);

其中, g、e 或 f 各自独立地是 1-6 的整数, “HCC” 代表烃链, 且每个 *N 代表

式 (201) 中的氮原子。

在一些实施方式中，R₁₀₃ 是多胺。在其它实施方式中，R₁₀₃ 是缩酮。在一些实施方式中，在式 (201) 中的 R₁₀₁ 和 R₁₀₂ 中的每一个独立地是任意的被取代的或未取代的、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。

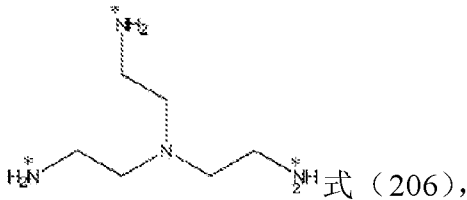
在一些实施方式中，如果 n 和 m 中的每一个独立地具有 1 或 3 的值，那么 R₁₀₃ 可以是下述式 (204) - 式 (213) 中的任一个：



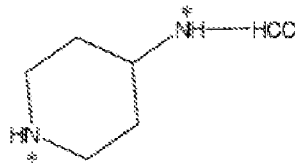
式 (204),



式 (205),



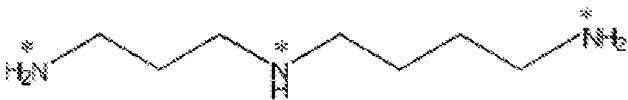
式 (206),



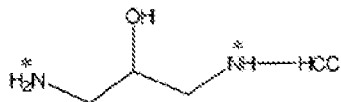
式 (207),



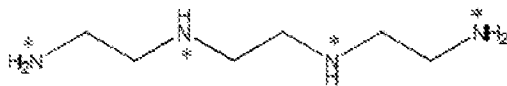
式 (208),



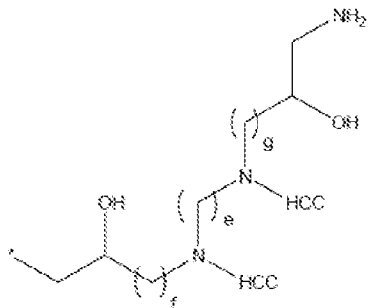
式 (209),



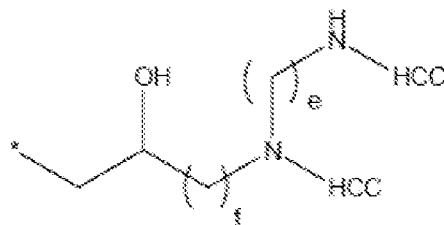
式 (210),



式 (211),



式 (212) 和



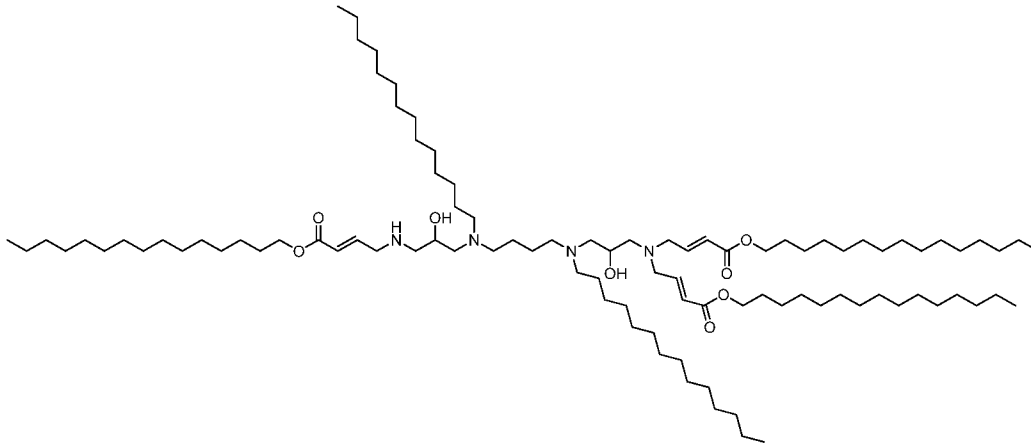
式 (213);

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 R₁₀₃ 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。

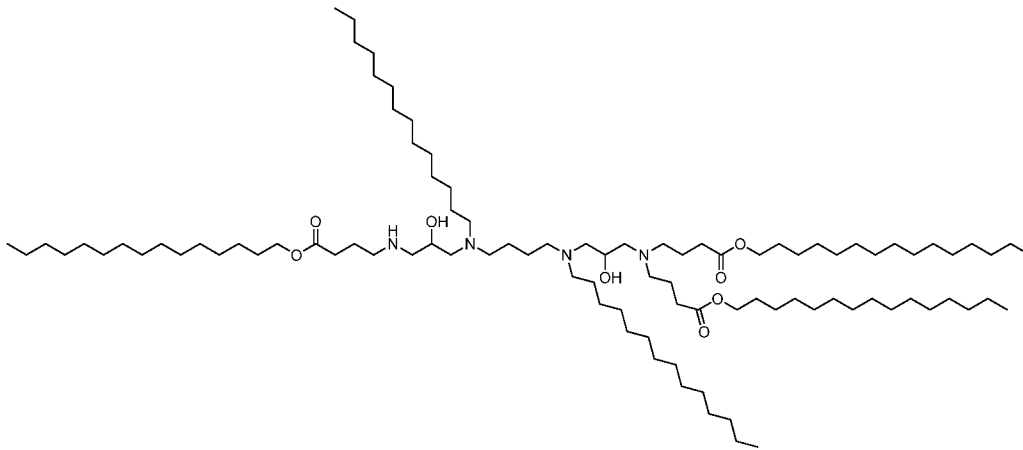
其中，式 (201) 所示化合物可以根据 CN103380113A 中的描述制备。

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°C 孵育至少 2 分钟，例如可以为 5-30 分钟，得到孵育后的脂质体制剂。脂质溶液和 siRNA 水溶液的体积比为 1: (2-5)。

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

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

siRNA 缀合物

本公开提供了一种 siRNA 缀合物，所述 siRNA 缀合物含有上述 siRNA 以

及缀合连接至该 siRNA 的缀合基团。

一般来说，所述缀合基团包含药学上可接受的至少一个靶向基团和任选的接头 (linker)，并且，所述 siRNA、所述接头和所述靶向基团依次连接。在一些实施方式中，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文献：Muthiah Manoharan *et.al.* siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10 (5): 1181-7.

在一些实施方式中，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于由以下糖所组成的组：葡萄糖及其衍生物、甘露聚糖及其衍生物、半乳糖及其衍生物、木糖及其衍生物、核糖及其衍生物、岩藻糖及其衍生物、乳糖及其衍生物、麦芽糖及其衍生物，阿拉伯糖及其衍生物、果糖及其衍生物和唾液酸。

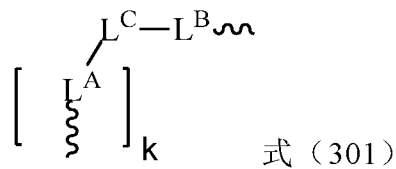
在一些实施方式中，每个所述配体可独立地选自 D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 α -D-呋喃甘露糖、 β -D-呋喃甘露糖、 α -D-吡喃甘露糖、 β -D-吡喃甘露糖、 α -D-吡喃葡萄糖、 β -D-吡喃葡萄糖、 α -D-呋喃葡萄糖、 β -D-呋喃葡萄糖、 α -D-呋喃果糖、 α -D-吡喃果糖、 α -D-吡喃半乳糖、 β -D-吡喃半乳糖、 α -D-呋喃半乳糖、 β -D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-三氟乙酰半乳糖胺、N-丙酰半乳糖胺、N-正丁酰半乳糖胺、N-异丁酰半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基- α -神经氨酸、5-硫代- β -D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代- β -D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代- α -D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖脎、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 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。

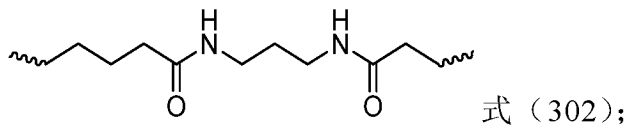
在一些实施方式中，当所述靶向基团为 N-乙酰半乳糖胺时，合适的接头可以为如式 (301) 所示的结构：



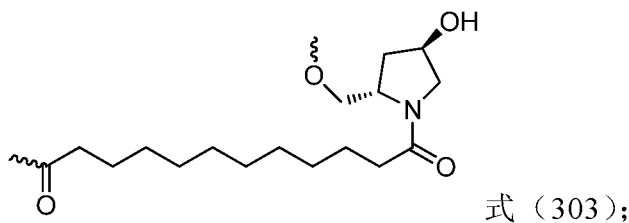
其中，

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：

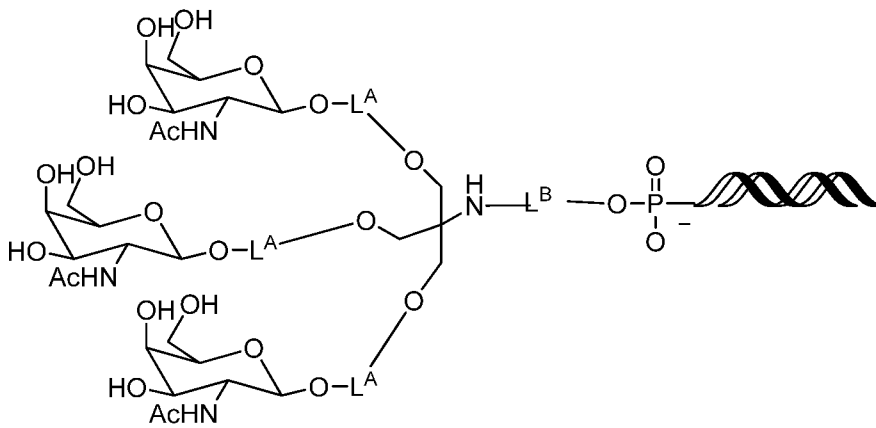


L^B 为具有如式 (303) 所示结构的包含 N-乙酰基吡咯烷的链状部分，所述链状部分在其一端具有羰基并与所述 L^C 部分通过酰胺键相连接，在另一端具有氧基并与所述 siRNA 通过磷酸酯键相连接：



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 siRNA 缀合物，其结构如下式 (304) 所示：

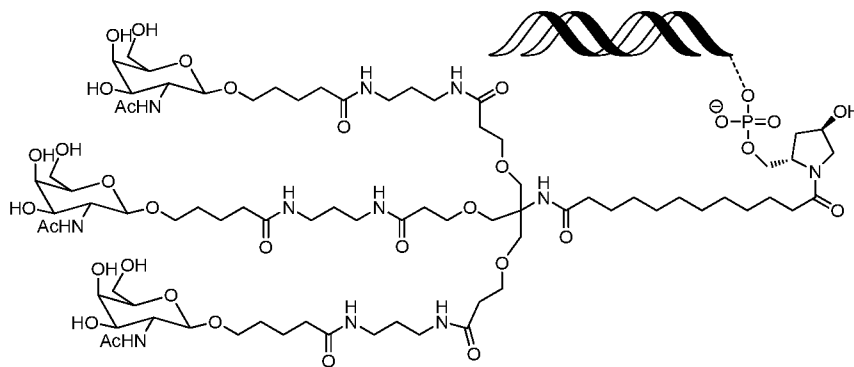


式 (304),

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。

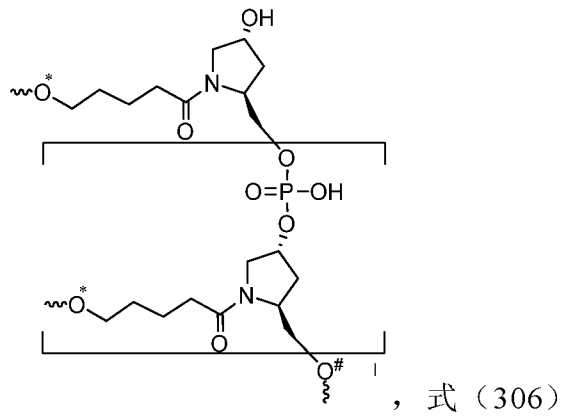
在一些实施方式中, 本公开所述 siRNA 的正义链 3'末端通过接头-(L^A)₃ 三羟甲基氨基甲烷-L^B-与三个 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 分子共价缀合, 得到 siRNA 分子与 GalNAc 分子的摩尔比为 1:3 的 siRNA 缀合物, 下文也可将其称为(GalNAc)₃-siRNA, 其结构如下式 (305) 所示:



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:



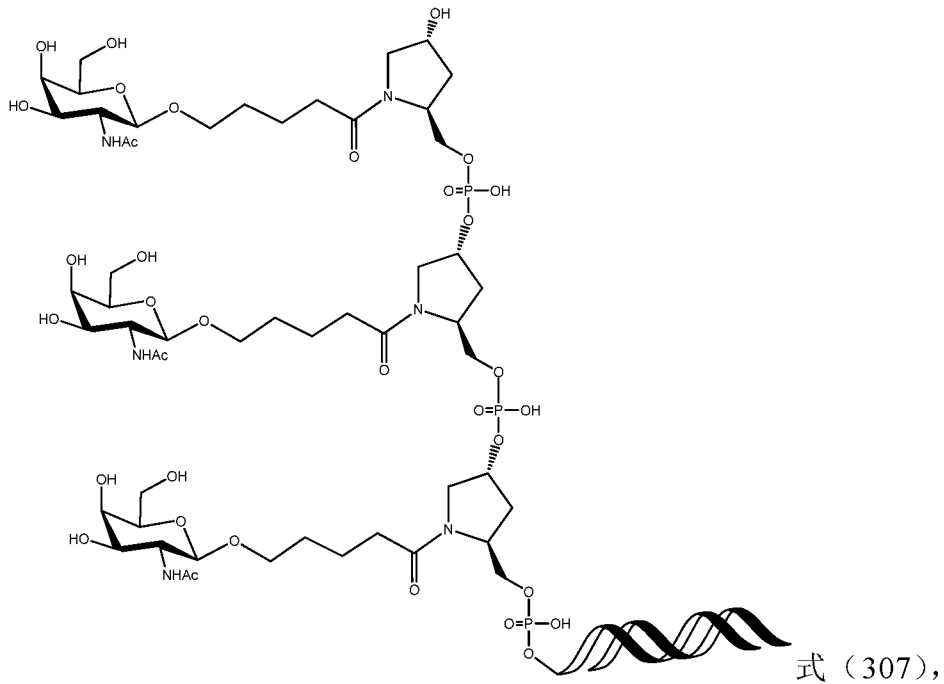
其中,

1 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 siRNA 缀合物具有如式 (307) 所示的结构:

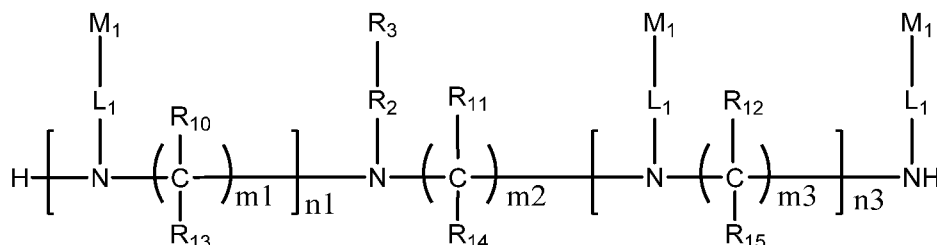


其中, 双螺旋结构表示所述 siRNA, 并且所述接头连接至所述 siRNA 的正义链 3'末端。

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

903-908 中描述了式 (307) 所示结构的制备方法。

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



式 (308),

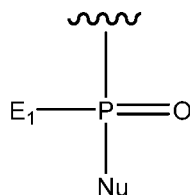
其中:

n_1 为选自 1-3 的整数, n_3 为选自 0-4 的整数;

m_1 、 m_2 或 m_3 独立地为选自 2-10 的整数;

R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 或 R_{15} 各自独立地为 H, 或选自于由以下基团所组成的组: C₁-C₁₀ 烷基、C₁-C₁₀ 卤代烷基以及 C₁-C₁₀ 烷氧基;

R_3 为式 A59 所示结构的基团:



(A59)

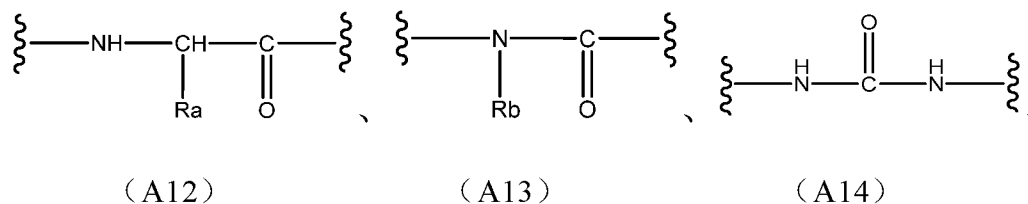
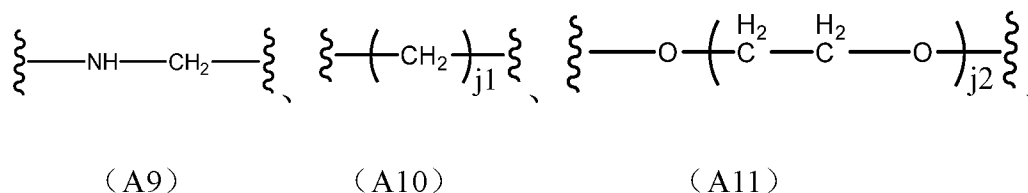
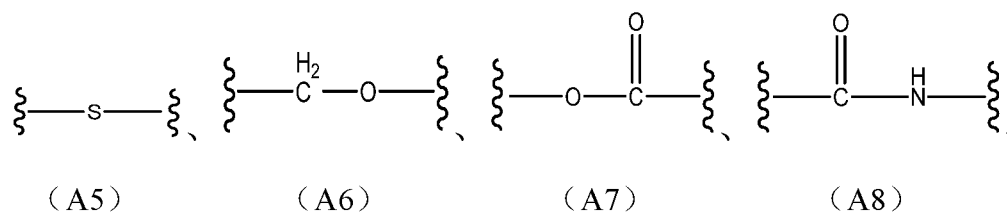
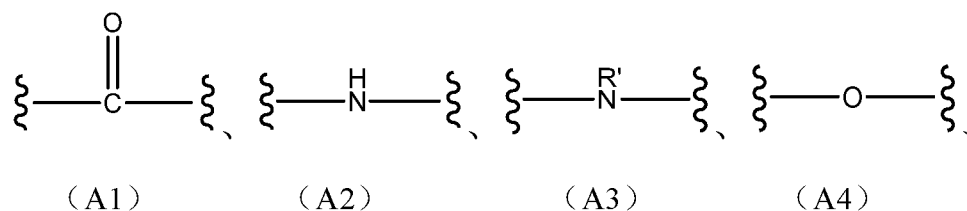
其中, E_1 为 OH、SH 或 BH₂, Nu 为本公开的 siRNA;

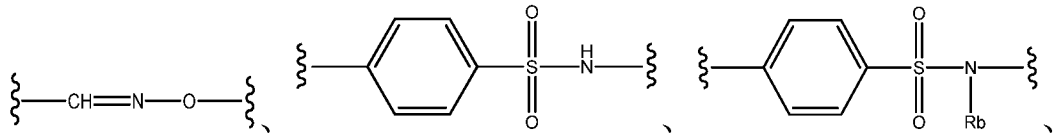
R_2 是长度为 1-20 个碳原子的直链亚烷基, 其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换: C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、C₂-C₁₀ 亚烯基、C₂-C₁₀ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₁₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基; 并且其中, R_2 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基: C₁-C₁₀ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-OH、-OC₁-C₁₀ 卤代烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-SH、-SC₁-C₁₀ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO₂H、-C(O)O(C₁-C₁₀ 烷基)、-CON(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基苯基、-C(O)C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC(O)C₁-C₁₀ 烷基、-SO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基);

每个 L_1 独立地是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基, 其中一个或多个碳

原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、C₂-C₁₀亚烯基、C₂-C₁₀亚炔基、C₆-C₁₀亚芳基、C₃-C₁₈亚杂环基和 C₅-C₁₀亚杂芳基；并且其中，L₁ 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：C₁-C₁₀烷基、C₆-C₁₀芳基、C₅-C₁₀杂芳基、C₁-C₁₀卤代烷基、-OC₁-C₁₀烷基、-OC₁-C₁₀烷基苯基、-C₁-C₁₀烷基-OH、-OC₁-C₁₀卤代烷基、-SC₁-C₁₀烷基、-SC₁-C₁₀烷基苯基、-C₁-C₁₀烷基-SH、-SC₁-C₁₀卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀烷基)(C₁-C₁₀烷基)、-NH(C₁-C₁₀烷基)、-N(C₁-C₁₀烷基)(C₁-C₁₀烷基苯基)、-NH(C₁-C₁₀烷基苯基)、氰基、硝基、-CO₂H、-C(O)O(C₁-C₁₀烷基)、-CON(C₁-C₁₀烷基)(C₁-C₁₀烷基)、-CONH(C₁-C₁₀烷基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁-C₁₀烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₁₀烷基)C(O)(C₁-C₁₀烷基)、-N(C₁-C₁₀烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₁₀烷基、-C(O)C₁-C₁₀烷基苯基、-C(O)C₁-C₁₀卤代烷基、-OC(O)C₁-C₁₀烷基、-SO₂(C₁-C₁₀烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀卤代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀卤代烷基)。

在一些实施方式中，L₁ 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：

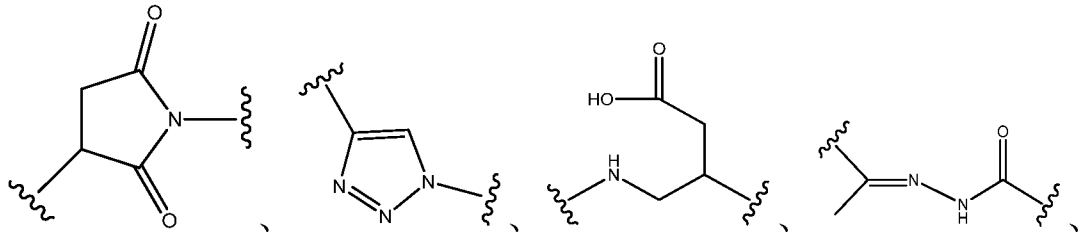




(A15)

(A16)

(A17)

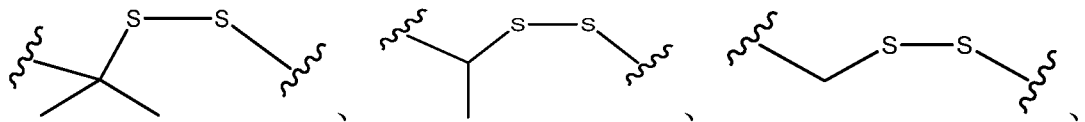


(A18)

(A19)

(A20)

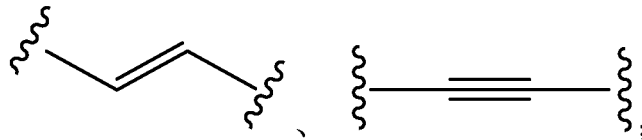
(A21)



(A22)

(A23)

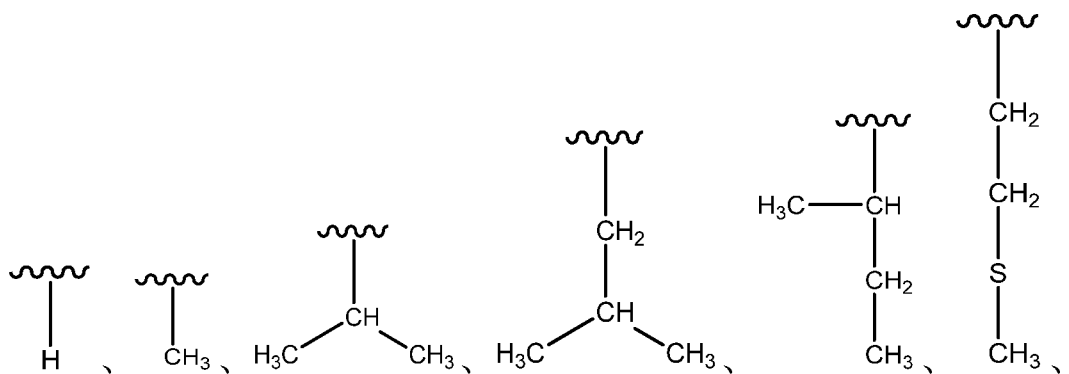
(A24)



(A25)

(A26)

其中，每个 j_1 独立地为 1-20 的整数；每个 j_2 独立地为 1-20 的整数；
 每个 R' 独立地为 C₁-C₁₀ 烷基；
 每个 Ra 独立地选自由式 A27-A45 基团及其任意组合所组成的组：



(A27)

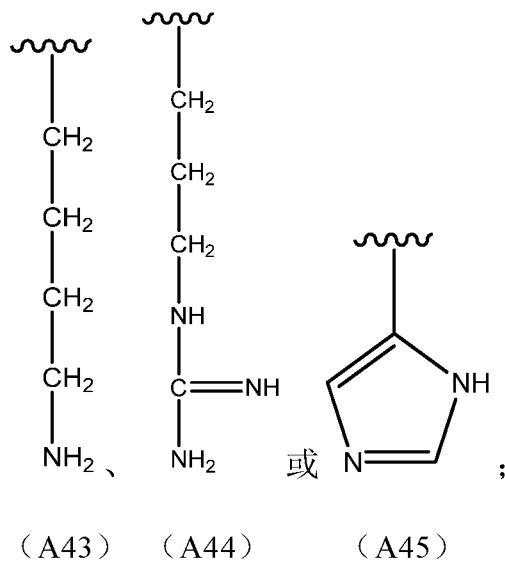
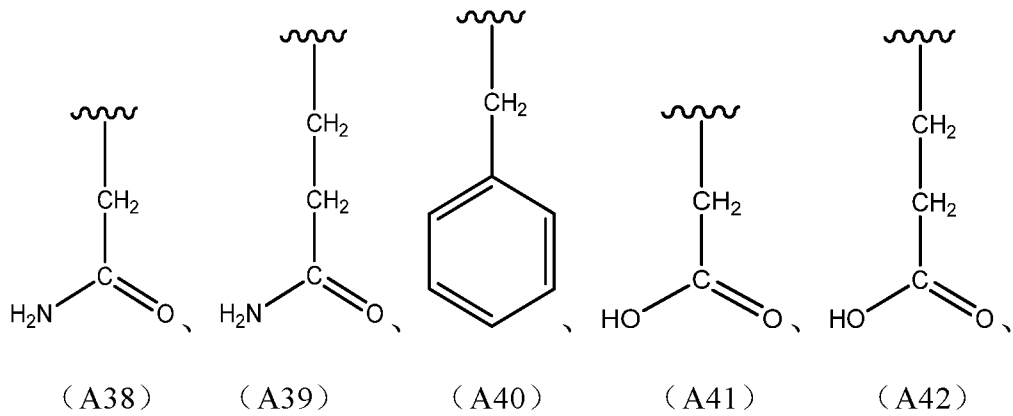
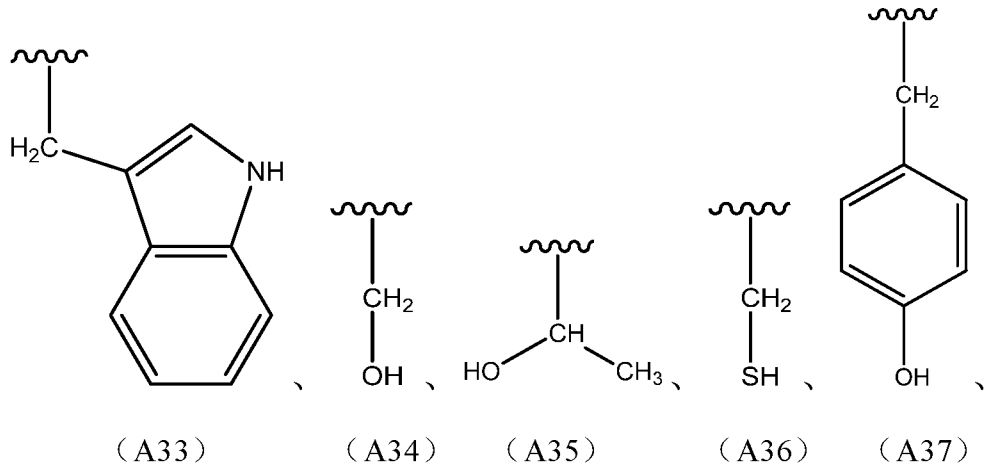
(A28)

(A29)

(A30)

(A31)

(A32)



每个 Rb 独立地为 C₁-C₁₀ 烷基； 表示基团共价连接的位点。

技术人员会理解的是，尽管为了方便起见，L₁ 被定义为线性亚烷基，但是它可能不是线性基团或者名称不同，例如由于上述替换和/或取代而产生的胺或烯基。为了本公开内容的目的，L₁ 的长度是连接两个连接点的链中的原子数。为此目的，将替换所述直链亚烷基的碳原子而得到的环（如亚杂环基或亚杂芳基）计为一个原子。

M₁ 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和力的配体中的一种。

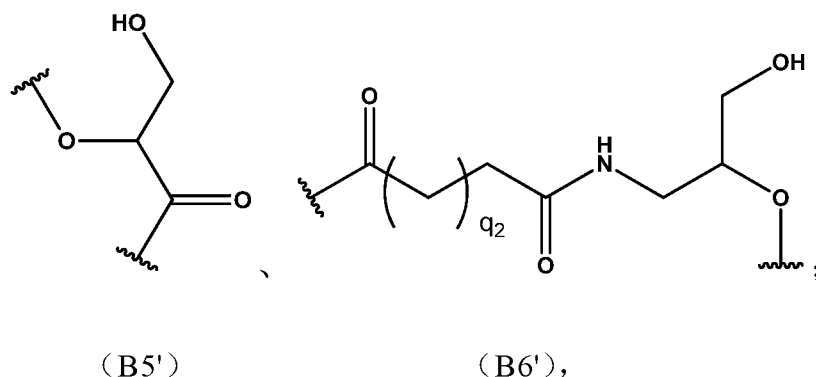
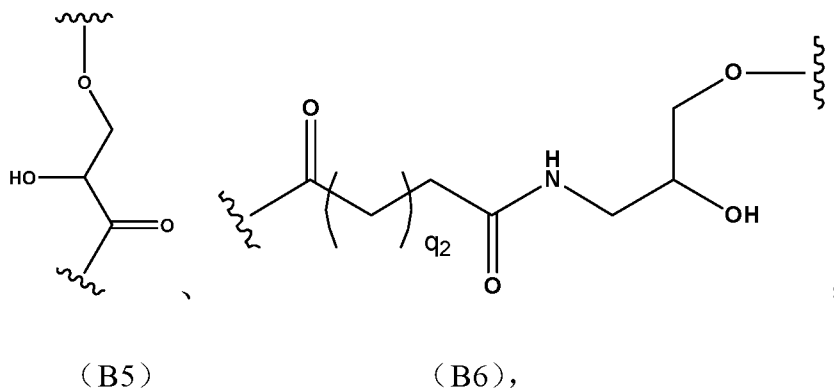
当 M_1 为对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲和力的配体时,在一些实施方式中, n_1 可以是 1-3 的整数, n_3 可以是 0-4 的整数,保证所述 siRNA 缀合物中 M_1 靶向基团的个数至少为 2; 在一些实施方式中, $n_1+n_3 \geq 2$, 这样可以使得 M_1 靶向基团的个数至少为 3, 从而使得 M_1 靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体更容易结合, 进而促进所述 siRNA 缀合物通过内吞作用进入细胞。实验表明, 当 M_1 靶向基团的个数大于 3 个时, M_1 靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体结合的容易程度增加并不明显, 因此, 从合成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

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

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

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



其中，表示基团共价连接的位点。

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。

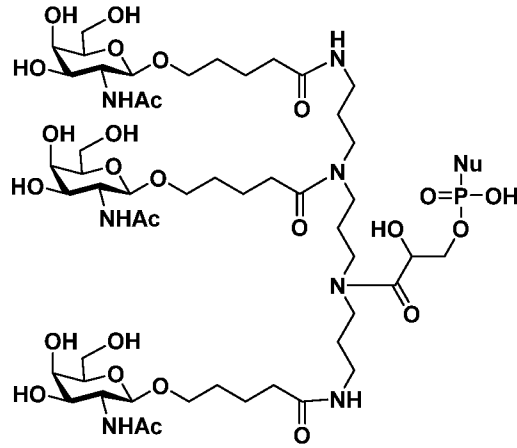
L_1 的作用是将 M_1 靶向基团与含氮骨架上的 N 连接，为式 (308) 所示的 siRNA 缀合物提供肝靶向功能。在一些实施方式中， L_1 选自式 A1-A26 基团中的一种或多种的连接组合。在一些实施方式中， L_1 选自 A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11 和 A13 中的一种或多种的连接组合。在一些实施方式中， L_1 选自 A1、A4、A8、A10 和 A11 中至少 2 个的连接组合。在一些实施方式中， L_1 选自 A1、A8、A10 中至少 2 个的连接组合。

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。

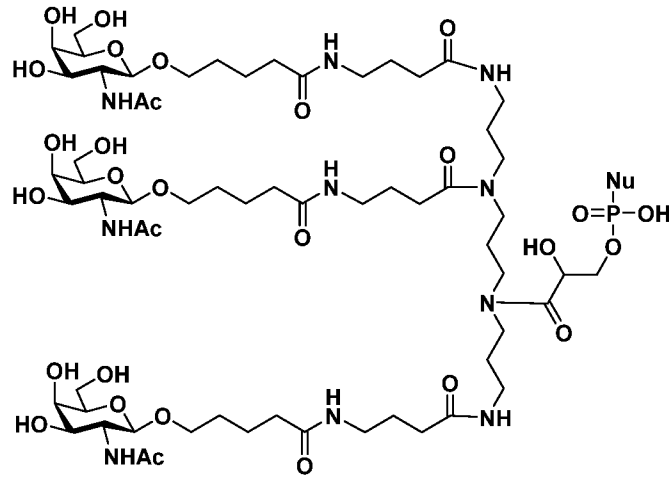
在一些实施方式中， j_1 为 2-10 的整数，在一些实施方式中， j_1 为 3-5 的整数。在一些实施方式中， j_2 为 2-10 的整数，在一些实施方式中， j_2 为 3-5 的整数。 R' 为 C_1 - C_4 烷基，在一些实施方式中， R' 为甲基、乙基和异丙基中的一种。 R_a 为 A27、A28、A29、A30 和 A31 中的一种，在一些实施方式中， R_a 为 A27 或 A28。 R_b 为 C_1 - C_5 烷基，在一些实施方式中， R_b 为甲基、乙基、异丙基和丁基中的一种。在一些实施方式中，在式 A1-A26 中各自对 j_1 、 j_2 、 R' 、 R_a 、 R_b 进

行选择，以实现 M₁ 靶向基团与含氮骨架上的 N 原子连接，并使 M₁ 靶向基团之间的空间位置更适合 M₁ 靶向基团与肝表面去唾液酸糖蛋白受体结合。

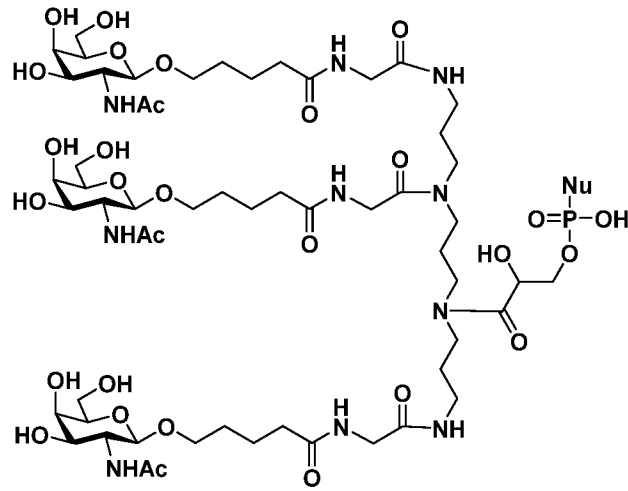
在一些实施方式中，该 siRNA 缀合物具有式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421) 或 (422) 所示的结构：



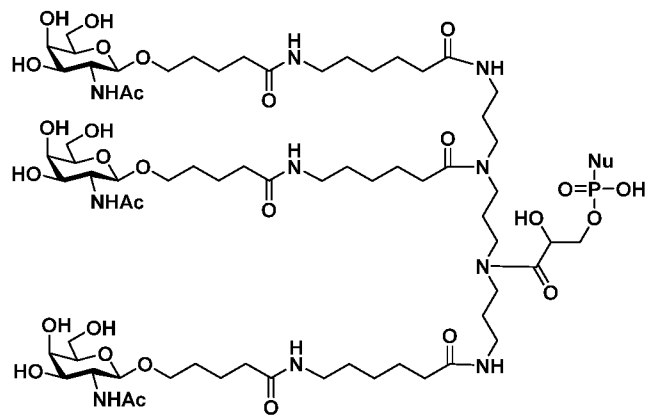
式 (403)



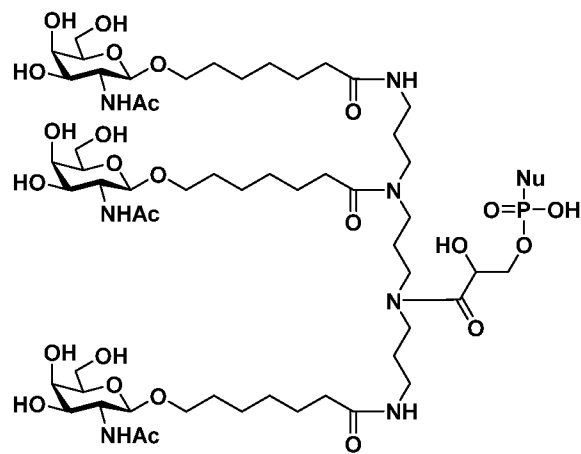
式 (404)



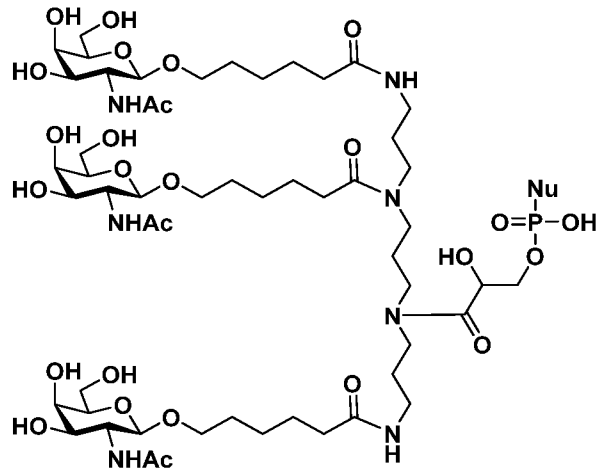
式 (405)



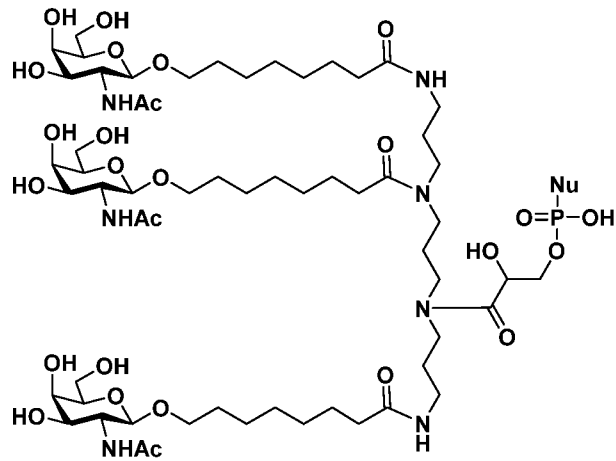
式 (406)



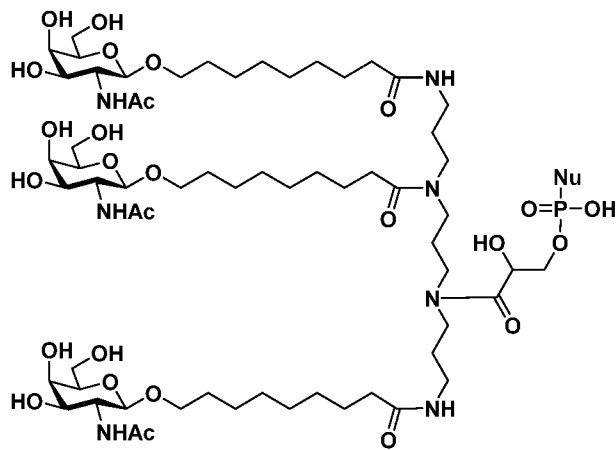
式 (407)



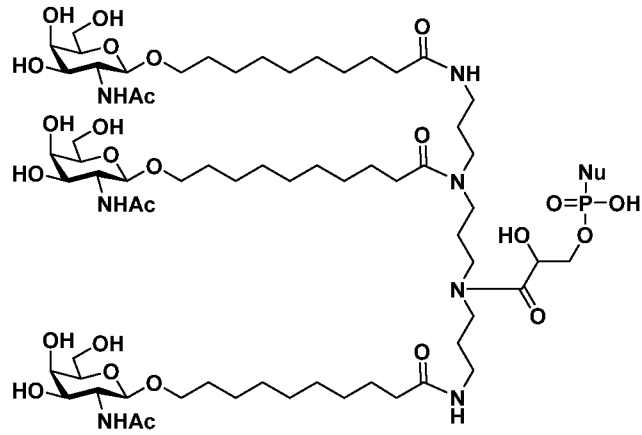
式 (408)



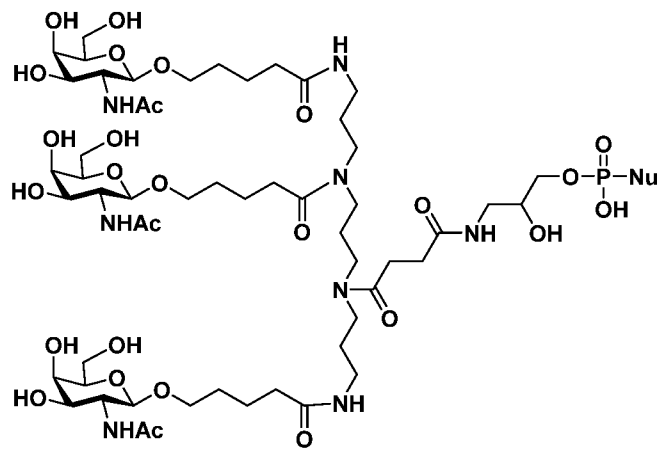
式 (409)



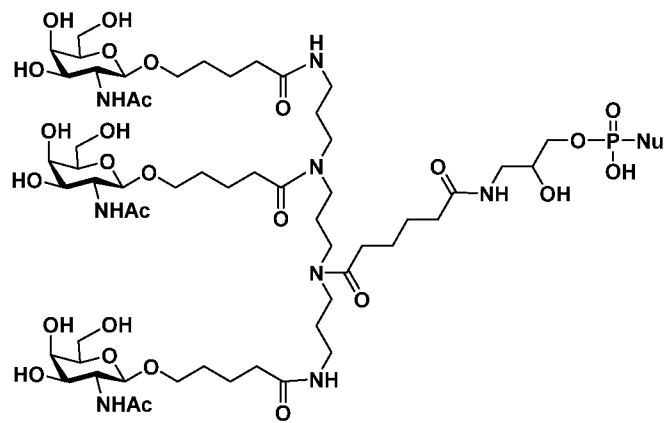
式 (410)



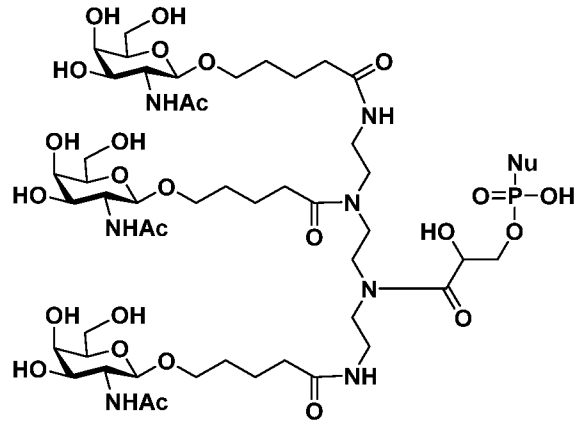
式 (411)



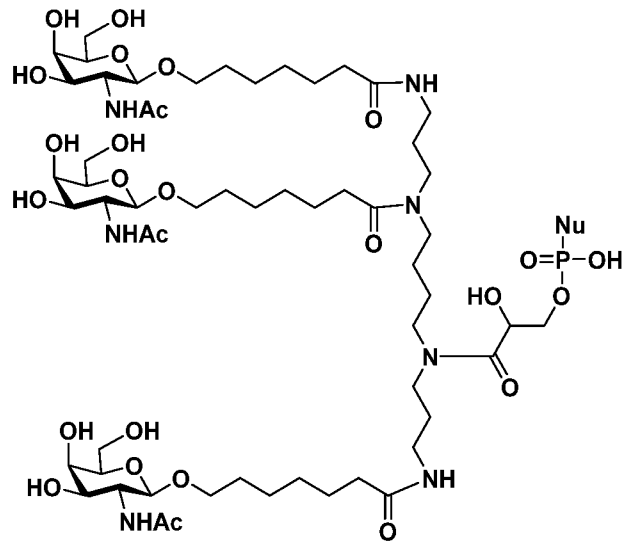
式 (412)



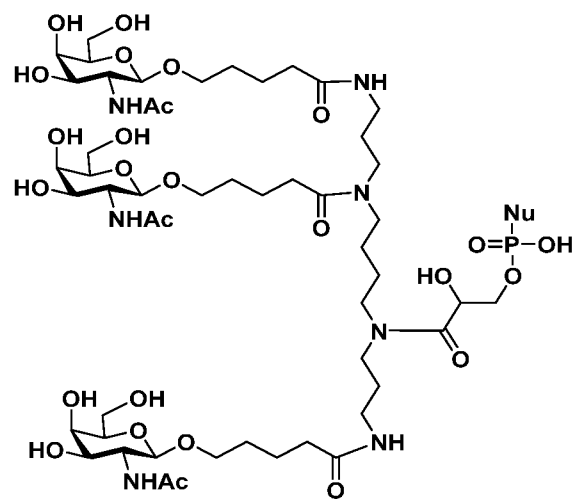
式 (413)



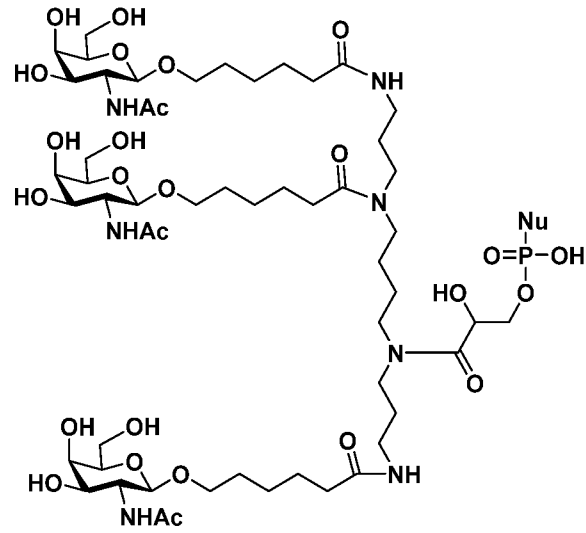
式 (414)



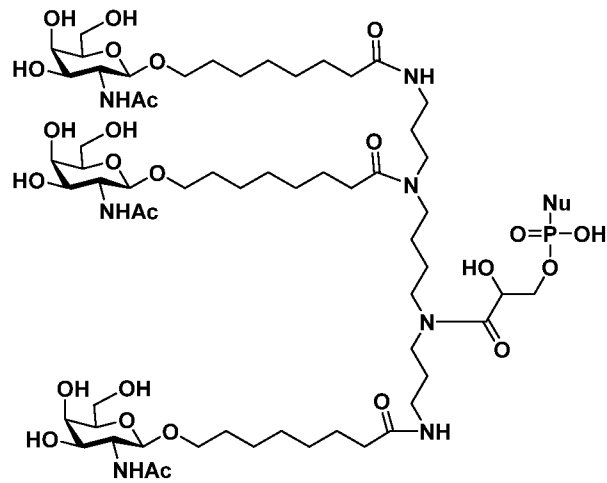
式 (415)



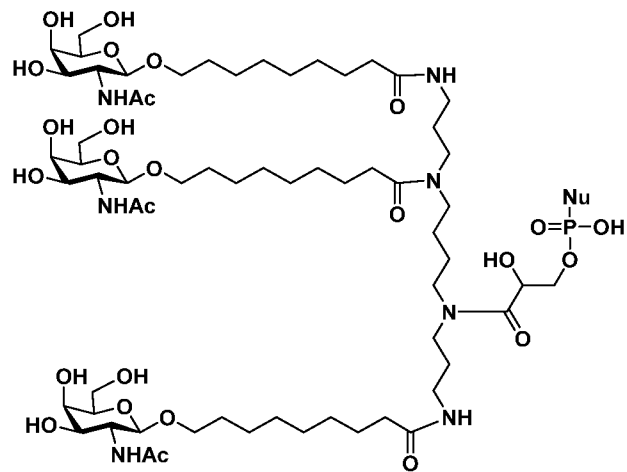
式 (416)



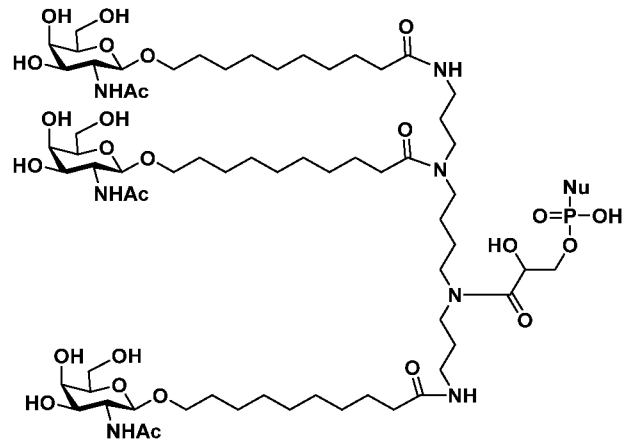
式 (417)



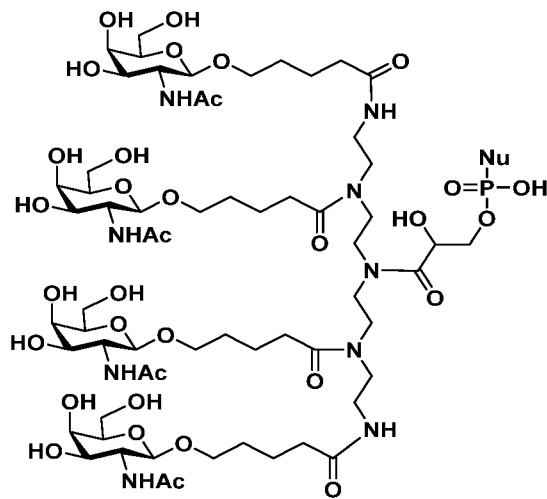
式 (418)



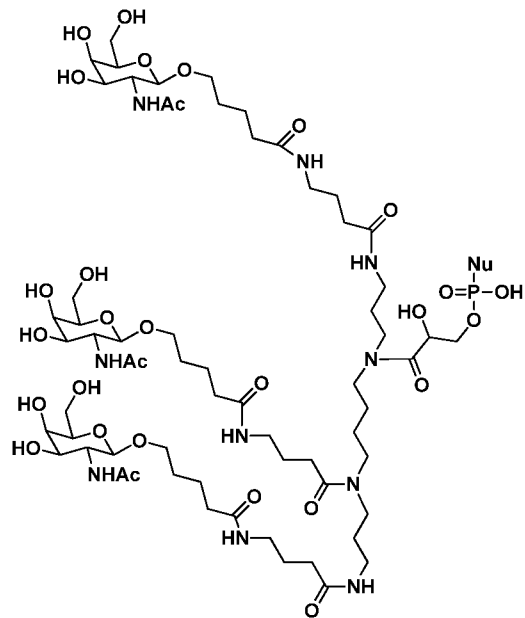
式 (419)



式 (420)



式 (421)



式 (422)

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

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

本公开的发明人意外发现，本公开的 siRNA 缀合物在具有显著提高的血浆中稳定性、低脱靶效应的同时，还表现出较高的 KNG mRNA 沉默活性。在一些实施方式中，本公开的 siRNA 可以为表 1a-1f 中示出的 siRNA 中的一种。含有这些 siRNA 的 siRNA 缀合物表现出更高的 KNG mRNA 沉默活性。

表 1a 本公开的第一种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siKNa1	9	AAAGUAACAACCAGUUUGU
	10	ACAAACUGGUUGUUACUUUGG
siKNa2	11	CCAAAGUAACAACCAGUUUGU
	12	ACAAACUGGUUGUUACUUUGGU

siKNa1-M1	13	AmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	14	AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm
siKNa1-M2	15	AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	16	AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm
siKNa1-M3	17	AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	18	AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm
siKNa2-M1	19	CmCmAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	20	AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm
siKNa2-M2	21	CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	22	AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm
siKNa2-M3	23	CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	24	AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm
siKNa1-M1S	25	AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	26	AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm
siKNa1-M2S	27	AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	28	AmsCfsAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm
siKNa1-M3S	29	AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	30	AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm
siKNa2-M1S	31	CmsCmsAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	32	AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUms Um
siKNa2-M2S	33	CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
	34	AmsCfsAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUmsU

		m
siKNa2-	35	CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M3S	36	AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUms Um
siKNa1-	37	AmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M1P1	38	P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm
siKNa1-	39	AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M2P1	40	P1AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm
siKNa1-	41	AmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M3P1	42	P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGm
siKNa2-	43	CmCmAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M1P1	44	P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmU m
siKNa2-	45	CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M2P1	46	P1AmCfAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmUm
siKNa2-	47	CmCmAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M3P1	48	P1AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmUmU m
siKNa1-	49	AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M1SP1	50	P1AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm
siKNa1-	51	AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M2SP1	52	P1AmsCfsAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm
siKNa1-	53	AmsAmsAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm

M3SP1	54	P1AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm
siKNa2-	55	CmsCmsAmAmAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M1SP1	56	P1AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUmsUm
siKNa2-	57	CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M2SP1	58	P1AmsCfsAmAmAmCfUmGfGfUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUmsUm
siKNa2-	59	CmsCmsAmAmAmGmUfAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm
M3SP1	60	P1AmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmGmGmsUmsUm

表 1b 本公开的第二种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siKNb1	69	AUUGAACUUUCGAAUUACC
	70	GGUAAUUCGAAAGUCAAUCC
siKNb2	71	GGAUUGAACUUUCGAAUUACC
	72	GGUAAUUCGAAAGUCAAUCCAG
siKNb1-M1	73	AmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
	74	GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm
siKNb1-M2	75	AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
	76	GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm
siKNb1-	77	AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm

M3	78	GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm
siKNb2-	79	GmGmAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M1	80	GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm
siKNb2-	81	GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M2	82	GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm
siKNb2-	83	GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M3	84	GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm
siKNb1-	85	AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M1S	86	GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm
siKNb1-	87	AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M2S	88	GmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm
siKNb1-	89	AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M3S	90	GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm
siKNb2-	91	GmsGmsAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M1S	92	GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAms Gm
siKNb2-	93	AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M2S	94	GmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAmsG m
siKNb2-	95	GmsGmsAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M3S	96	GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAms Gm
siKNb1-	97	AmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm

M1P1	98	P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm
siKNb1-	99	AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M2P1	100	P1GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm
siKNb1-	101	AmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M3P1	102	P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCm
siKNb2-	103	GmGmAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M1P1	104	P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmG m
siKNb2-	105	GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M2P1	106	P1GmGfUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmGm
siKNb2-	107	GmGmAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M3P1	108	P1GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmAmG m
siKNb1-	109	AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M1SP1	110	P1GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm
siKNb1-	111	AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M2SP1	112	P1GmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm
siKNb1-	113	AmsUmsUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M3SP1	114	P1GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm
siKNb2-	115	GmsGmsAmUmUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
M1SP1	116	P1GmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsA msGm
siKNb2-	117	GmsGmsAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm

M2SP1	118	PIGmsGfsUmAmAmUfUmCfGfAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsAms Gm
siKNb2- M3SP1	119	GmsGmsAmUmUmGmAfAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm
	120	PIGmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmCmCmsA msGm

表 1c 本公开的第三种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siKNc1	129	UCGAAUUACCUACUCAAUU
	130	AAUUGAGUAGGUAUUUCGAAA
siKNc2	131	UUUCGAAUUACCUACUCAAUU
	132	AAUUGAGUAGGUAUUUCGAAAGU
siKNc1- M1	133	UmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	134	AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm
siKNc1- M2	135	UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	136	AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm
siKNc1- M3	137	UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	138	AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm
siKNc2- M1	139	UmUmUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	140	AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm
siKNc2- M2	141	UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	142	AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm

siKNc2- M3	143	UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	144	AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm
siKNc1- M1S	145	UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	146	AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm
siKNc1- M2S	147	UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	148	AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm
siKNc1- M3S	149	UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	150	AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm
siKNc2- M1S	151	UmsUmsUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	152	AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGms Um
siKNc2- M2S	153	UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	154	AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGmsU m
siKNc2- M3S	155	UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	156	AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGms Um
siKNc1- M1P1	157	UmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	158	P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm
siKNc1- M2P1	159	UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	160	P1AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm
siKNc1- M3P1	161	UmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	162	P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAm

siKNc2- M1P1	163	UmUmUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	164	P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm
siKNc2- M2P1	165	UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	166	P1AmAfUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm
siKNc2- M3P1	167	UmUmUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	168	P1AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmGmUm
siKNc1- M1SP1	169	UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	170	P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm
siKNc1- M2SP1	171	UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	172	P1AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm
siKNc1- M3SP1	173	UmsCmsGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	174	P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm
siKNc2- M1SP1	175	UmsUmsUmCmGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	176	P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGmsUm
siKNc2- M2SP1	177	UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	178	P1AmsAfsUmUmGmAfGmUfAfGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGmsUm
siKNc2- M3SP1	179	UmsUmsUmCmGmAmAfUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm
	180	P1AmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmAmAmsGmsUm

表 1d 本公开的第四种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siKNd1	189	GAUAAUGCAUACAUCGAUA
	190	UAUCGAUGUAUGCAUUAUCUG
siKNd2	191	CAGAUAAUGCAUACAUCGAUA
	192	UAUCGAUGUAUGCAUUAUCUGUA
siKNd1-M1	193	GmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
	194	UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm
siKNd1-M2	195	GmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
	196	UmAfUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm
siKNd1-M3	197	GmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
	198	UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm
siKNd2-M1	199	CmAmGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
	200	UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm
siKNd2-M2	201	CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
	202	UmAfUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm
siKNd2-M3	203	CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
	204	UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm
siKNd1- M1S	205	GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
	206	UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm
siKNd1-	207	GmsAmsUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm

M2S	208	UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm
siKNd1-	209	GmsAmsUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M3S	210	UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm
siKNd2-	211	CmsAmsGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M1S	212	UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUms Am
siKNd2-	213	CmsAmsGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M2S	214	UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUmsA m
siKNd2-	215	CmsAmsGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M3S	216	UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUms Am
siKNd1-	217	GmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M1P1	218	P1UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm
siKNd1-	219	GmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M2P1	220	P1UmAfUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm
siKNd1-	221	GmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M3P1	222	P1UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGm
siKNd2-	223	CmAmGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M1P1	224	P1UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmA m
siKNd2-	225	CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M2P1	226	P1UmAfUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm

siKNd2-	227	CmAmGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M3P1	228	P1UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmUmAm
siKNd1-	229	GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M1SP1	230	P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm
siKNd1-	231	GmsAmsUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M2SP1	232	P1UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm
siKNd1-	233	GmsAmsUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M3SP1	234	P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm
siKNd2-	235	CmsAmsGmAmUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M1SP1	236	P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUmsAm
siKNd2-	237	CmsAmsGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M2SP1	238	P1UmsAfsUmCmGmAfUmGfUfAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUmsAm
siKNd2-	239	CmsAmsGmAmUmAmAfUmGfCfAfUmAmCmAmUmCmGmAmUmAm
M3SP1	240	P1UmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmUfAmUmCmUmGmsUmsAm

表 1e 本公开的第五种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
-------------	------------------	--------------

siKNe1	249	GAAUAACGCAACUUUCUAU
	250	AUAGAAAGUUGCGUUAUUCUC
siKNe2	251	GAGAAUAACGCAACUUUCUAU
	252	AUAGAAAGUUGCGUUAUUCUCUG
siKNe1-M1	253	GmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	254	AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm
siKNe1-M2	255	GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	256	AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm
siKNe1-M3	257	GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	258	AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm
siKNe2-M1	259	GmAmGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	260	AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm
siKNe2-M2	261	GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	262	AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm
siKNe2-M3	263	GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	264	AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm
siKNe1-M1S	265	GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	266	AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm
siKNe1-M2S	267	GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	268	AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm
siKNe1-M3S	269	GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
	270	AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm
siKNe2-	271	GmsAmsGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm

M1S	272	AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUms Gm
siKNe2-	273	GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M2S	274	AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUmsG m
siKNe2-	275	GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M3S	276	AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUms Gm
siKNe1-	277	GmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M1P1	278	P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm
siKNe1-	279	GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M2P1	280	P1AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm
siKNe1-	281	GmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M3P1	282	P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCm
siKNe2-	283	GmAmGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M1P1	284	P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmG m
siKNe2-	285	GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M2P1	286	P1AmUfAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmGm
siKNe2-	287	GmAmGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M3P1	288	P1AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmUmG m
siKNe1-	289	GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm

M1SP1	290	P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm
siKNe1-	291	GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M2SP1	292	P1AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm
siKNe1-	293	GmsAmsAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M3SP1	294	P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm
siKNe2-	295	GmsAmsGmAmAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M1SP1	296	P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsU msGm
siKNe2-	297	GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M2SP1	298	P1AmsUfsAmGmAmAfAmGfUfUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsUms Gm
siKNe2-	299	GmsAmsGmAmAmUmAfAmCfGfCfAmAmCmUmUmUmCmUmAmUm
M3SP1	300	P1AmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmAfUmUmCmUmCmsU msGm

表 1f 本公开的第六种 siRNA 序列

siRNA 编号	SEQ ID NO:	序列方向 5' - 3'
siKNf1	309	AACUUUCUAUUUCAAGAUU
	310	AAUCUUGAAAUAGAAAGUUGC
siKNf2	311	GCAACUUUCUAUUUCAAGAUU
	312	AAUCUUGAAAUAGAAAGUUGCGU
siKNf1-M1	313	AmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm

	314	AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm
siKNf1-M2	315	AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	316	AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm
siKNf1-M3	317	AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	318	AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm
siKNf2-M1	319	GmCmAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	320	AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm
siKNf2-M2	321	GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	322	AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm
siKNf2-M3	323	GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	324	AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm
siKNf1-M1S	325	AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	326	AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm
siKNf1-M2S	327	AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	328	AmsAfsUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm
siKNf1-M3S	329	AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	330	AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm
siKNf2-M1S	331	GmsCmsAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	332	AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGmsUm
siKNf2-M2S	333	GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
	334	AmsAfsUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGmsUm

siKNf2-	335	GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M3S	336	AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGms Um
siKNf1-	337	AmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M1P1	338	P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm
siKNf1-	339	AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M2P1	340	P1AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm
siKNf1-	341	AmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M3P1	342	P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCm
siKNf2-	343	GmCmAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M1P1	344	P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGm Um
siKNf2-	345	GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M2P1	346	P1AmAfUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGmUm
siKNf2-	347	GmCmAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M3P1	348	P1AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmGm Um
siKNf1-	349	AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M1SP1	350	P1AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm
siKNf1-	351	AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M2SP1	352	P1AmsAfsUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm
siKNf1-	353	AmsAmsCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M3SP1	354	P1AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm

siKNf2-	355	GmsCmsAmAmCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M1SP1	356	P1AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGmsUm
siKNf2-	357	GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M2SP1	358	P1AmsAfsUmCmUmUfGmAfAfAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGmsUm
siKNf2-	359	GmsCmsAmAmCmUmUfUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmAmUmUm
M3SP1	360	P1AmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGmUmUmGmCmsGmsUm

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

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，在一些实施方式中，所述阳离子选自碱金属离子、三级胺形成的铵阳离子和季铵阳离子中的一种或多种。碱金属离子可以是 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 siRNA 缀合物可以至少部分以盐的形式存在。在一些实施方式中，磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子至少部分与钠离子结合，本公开所述 siRNA 或 siRNA 缀合物以钠盐或部分钠盐的形式存在。

本领域技术人员清楚知晓的是，可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入本公开所述的 siRNA 中。制备具有相应修饰的核苷单体的方法及将修饰的核苷酸基团引入 siRNA 的方法也是本领域技术人员所熟知

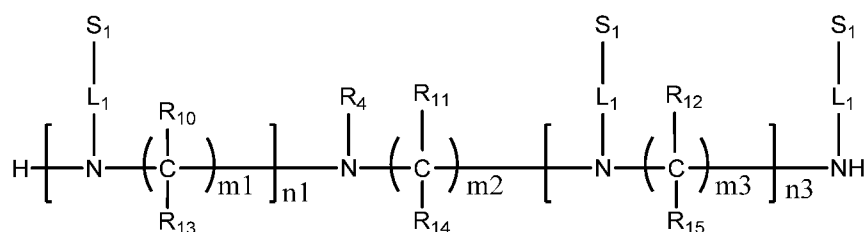
的。所有修饰的核苷单体均可以商购得到或者采用已知方法制备得到。

式(308)所示的 siRNA 缀合物的制备

可以采用任意合理的合成路线制备式(308)所示的 siRNA 缀合物。

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

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



式(321)

其中:

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

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。

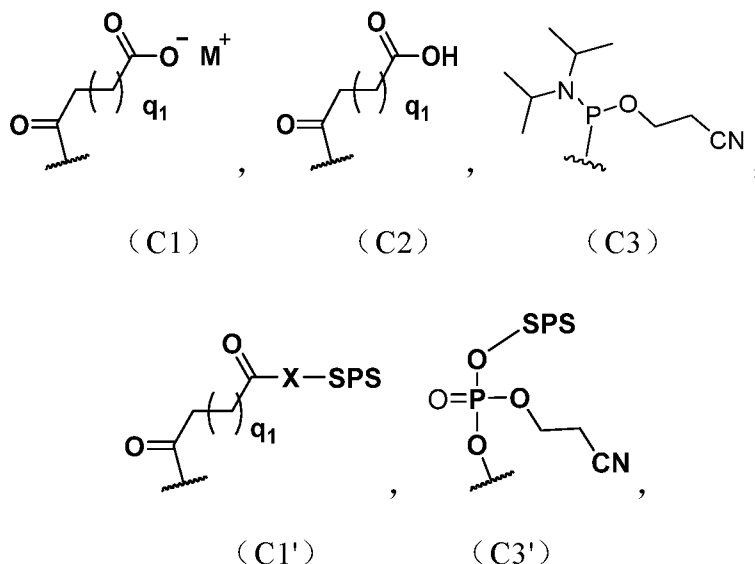
n_1 、 n_3 、 m_1 、 m_2 、 m_3 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 L_1 、 M_1 各自的定义和可选择的范围如前所述。

R_4 的选择是为了实现与含氮骨架上的 N 原子的连接,并且为合成式(308)所示的 siRNA 缀合物提供合适的反应位点。在一些实施方式中, 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、羧基或羧酸盐。在一些实施方式中，所述第 2 官能团为经由共价键连接至分子其他部分的固相载体，所述共价键由羟基或氨基形成。在一些实施方式中，所述固相载体经由磷酸酯键、羧酸酯键或酰胺键连接。在一些实施方式中，所述固相载体为树脂。

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：



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

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

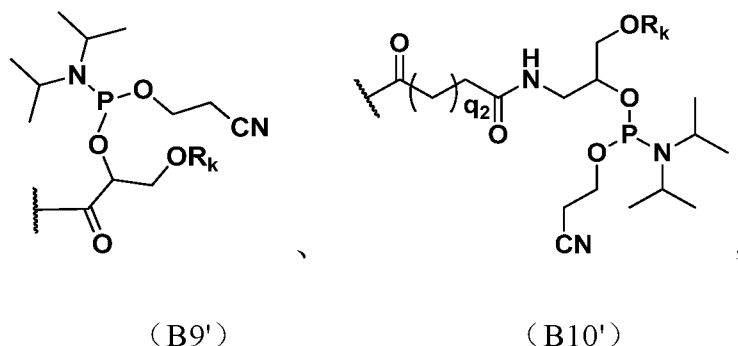
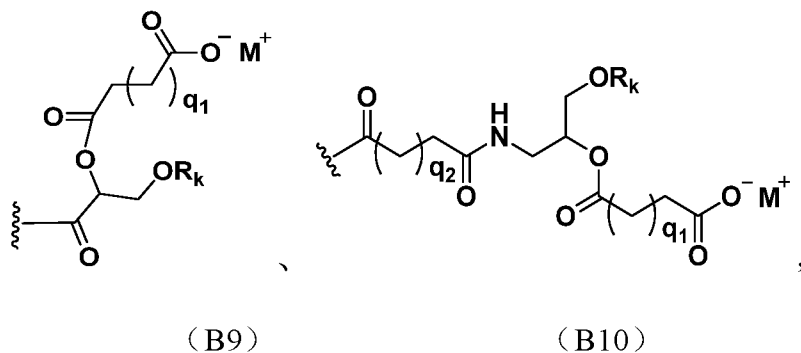
在一些实施方式中，所述第 1 官能团含有被保护的羟基。在一些实施方式中，所述第 2 官能团包含可与固相载体反应的基团，所述反应提供包含固相载体的缀合分子。在一些实施方式中，所述第 2 官能团含有羧基、羧酸盐或亚磷酰胺，如式 (C1)、(C2) 或 (C3) 所示，当所述第 2 官能团包含羧基或羧酸盐时，式 (321) 所示的化合物与固相载体，例如树脂上的羟基或氨基进行酯化反应或酰胺化反应，形成经羧酸酯键连接的包含固相载体的缀合分子。当所述第 2 官能团包含亚磷酰胺官能团时，式 (321) 所示的化合物与通用固相载体，例

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

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

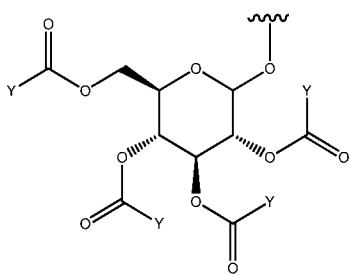
在一些实施方式中，羧酸盐可以表示为 $-\text{COO}^- \text{M}^+$ ，其中， M^+ 是阳离子，例如选自金属阳离子，铵阳离子 NH_4^+ ，有机铵阳离子中的一种。在一种实施方式中，所述金属离子选自碱金属离子中的一种，如 K^+ 或 Na^+ 。出于提高溶解性、使反应顺利进行的考虑，在一些实施方式中，有机铵离子为三级胺形成的铵阳离子或季铵阳离子，如，三乙胺形成的铵离子或 N,N-二异丙基乙胺形成的铵离子。在一些实施方式中，羧酸盐是三乙胺羧酸盐或 N,N-二异丙基乙胺羧酸盐。

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：

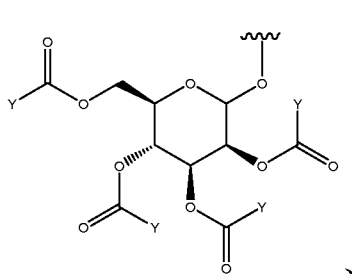


在一些实施方式中，每个 S₁ 独立地是 M₁。在一些实施方式中，每个 S₁ 独立地是 M₁ 中至少一个活性羟基被羟基保护基团保护而形成的基团。在一些实施方式中，每个 S₁ 独立地是 M₁ 中任何存在的活性羟基全部被羟基保护基团保护而形成的基团。在一些实施方式中，任何本领域技术人员已知的羟基保护基团均可被用于保护 M₁ 中的活性羟基。在一些实施方式中，被保护的羟基可以式 YCOO-表示，其中，每个 Y 独立地选自于由 C₁-C₁₀ 烷基和 C₆-C₁₀ 芳基所组成的组，所述 C₁-C₁₀ 烷基和 C₆-C₁₀ 芳基任选地被一个或多个取代基取代，所述取代基选自于由卤素和 C₁-C₆ 烷基所组成的组。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 C₁-C₆ 烷基苯基。

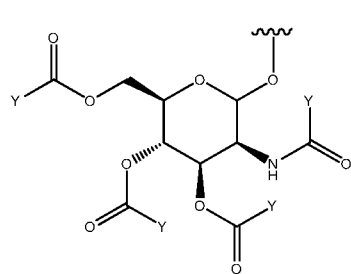
在一些实施方式中，每个 S₁ 各自独立地选自于由式 A46-A54 所组成的组：



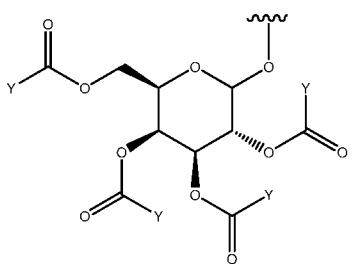
(A46)



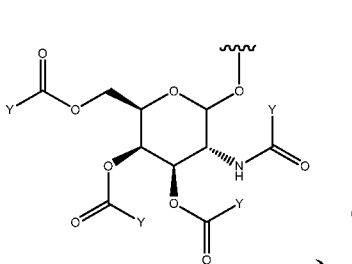
(A47)



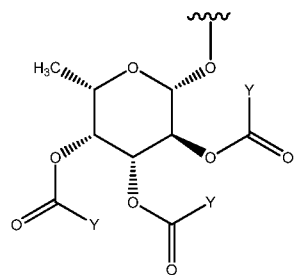
(A48)



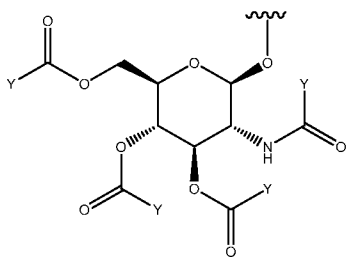
(A49)



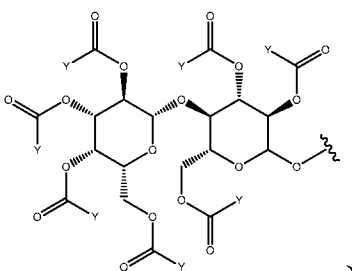
(A50)



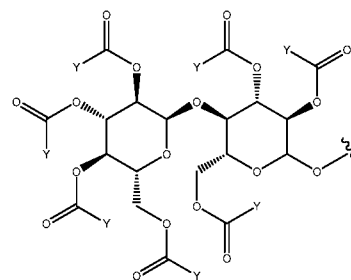
(A51)



(A52)



(A53)



(A54)

在一些实施方式中，S₁ 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，式 (308) 所示的 siRNA 缀合物的制备方法还包括以下步骤：合成 siRNA 的另一链（例如，当上述步骤合成了连接有缀合分子的 siRNA 正义链时，还包括按照固相合成方法合成 siRNA 的反义链，反之亦然），分离正义链和反义链，以及退火。具体地，在分离步骤中，连接至核苷酸序列和/或缀合分子的固相载体被切割下来，同时必要的保护基团被脱除（此时，式 (321) 所示的化合物中的各 S_i 基团转化为对应的 M_i 靶向基团），获得连接有缀合分子的 siRNA 正义链（或反义链）以及对应的反义链（或正义链），正义链与反义链退火形成双链 RNA 结构，获得式 (308) 所示的 siRNA 缀合物。

在一些实施方式中，式 (308) 所示的 siRNA 缀合物的制备方法包含以下步骤：在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式 (321) 所示的化合物与正义链或反义链的 3'端的第一个核苷单体接触，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，式 (321) 所示的化合物为 R₄ 中含有第 1 官能团和第 2 官能团，第 1 官能团含有被保护的羟基，第 2 官能团具有如式 (C1') 或 (C3') 所示结构的化合物，与第一个核苷单体连接前，式 (321) 所示的化合物经过脱保护；每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应；得到连接有缀合基团的核酸的正义链或反义链；在亚磷酰胺固相合成的条件下，按照反义链或正义链核苷酸种类和顺序，按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接，合成核酸的反义链或正义链；每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应；脱除保护基并与固相载体切割，分离纯化获得正义链和反义链，退火。

在一些实施方式中，式 (308) 所示的 siRNA 缀合物的制备方法包含以下步骤：按照该双链 siRNA 中正义链或反义链的核苷酸种类和顺序，按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接，合成正义链和反义链，每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应，得到连接在固相载体上的正义链和连接在固相载体上的反义链；在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式 (321) 所示的化合物与连接在固相载体上的正义链或连接在固相载体上的反义链接触，将式 (321) 所示的化合物连接至正义链或反义链，其中，式 (321) 所示的化合物是 R₄ 中含有第 1 官能团，第 1 官能团为亚磷酰胺基团的式 (321) 所示的化合物；脱除保护基并与固相载体切割，分别分离纯化，获得 siRNA 的正义链或反义链，退火，其中，所述 siRNA 的正义链或反义链上连接有缀合基团。

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

- (1) 脱除式 (321) 所示的化合物（其中，式 (321) 所示的化合物为 R₄ 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，获得式 (308) 所示的 siRNA 缀合物。

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

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

在步骤 (2) 中，通过亚磷酰胺核酸固相合成的方法，利用上述步骤制备的通过缀合分子连接至固相载体的核苷单体起始，按照 3'-5' 的方向合成第二种 siRNA 缀合物的正义链 SS。此时，缀合基团连接至所得到的正义链的 3' 末端。

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

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

氧化反应条件包括温度为 0-50°C，在一些实施方式中为 15-35°C，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°C，在一些实施方式中为 15-35°C，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，S₁ 基团转化为相应的 M₁ 基团，生成式（308）所示的 siRNA 缀合物。其中，所述浓氨水可以是 25-30 重量%的氨水，浓氨水的用量与目标 siRNA 序列相比可以为 0.2ml/μmol-0.8ml/μmol。

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

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

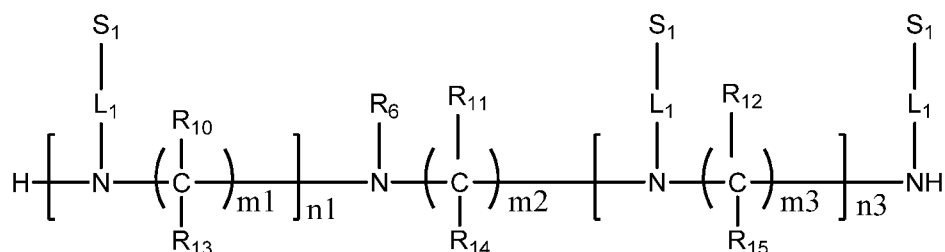
这样得到的式(308)所示的 siRNA 缀合物中,核苷酸之间的磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键中的非桥接氧原子或硫原子基本与钠离子结合,式(308)所示的 siRNA 缀合物基本以钠盐形式存在。可以采用熟知的离子交换方法,用氢离子和/或其他阳离子取代所述钠离子,得到其他形式的式(308)所示的 siRNA 缀合物。所述阳离子如前所述。

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

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

在获得所述 siRNA 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式(308)所示的 siRNA 缀合物进行表征,确定所合成的 siRNA 缀合物为目标设计的式(308)所示的 siRNA 缀合物,且所合成的 siRNA 的序列为期望的 siRNA 的序列,例如为表 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,以及在碱和酯化催化剂存在下,将式(313)所示化合物与环状酸酐接触,离子交换,分离得到式(321)所示化合物:

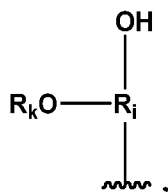


式(313)

其中, n1、n3、m1、m2、m3、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅、L₁、S₁ 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 原子连接、与 $R_k\text{O}$ 连接并且连接有一个游离羟基的任意基团， R_k 为羟基保护基团。此时，所获得的是 R_4 中含有作为羟基保护基团的第 1 官能团和第 2 官能团，所述第 2 官能团含有如式 (C1) 或 (C2) 所示结构的式 (321) 所示的化合物。

所述酯化反应条件包括反应温度为 0-100°C，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°C，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、二甲基亚砷、N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。在一些实施方式中，所述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。

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

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

所述离子交换作用是将式 (321) 所示的化合物转化为期望的羧酸或羧酸盐的形式，离子交换的方法为本领域技术人员所公知，可以使用合适的离子交换溶液和交换条件，得到具有 M^+ 阳离子的缀合分子，在此不做详述。在一些实施

方式中, 所述离子交换反应使用三乙胺磷酸盐溶液进行, 所述三乙胺磷酸盐溶液的浓度为 0.2-0.8M, 在一些实施方式中, 所述三乙胺磷酸盐溶液的浓度为 0.4-0.6M, 相对于式(313)所示的化合物, 所述三乙胺磷酸盐溶液的用量为 3-6L/mol, 在进一步的实施方式中为 4-5L/mol。

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

在一些实施方式中, 式(321)所示的化合物的制备方法还进一步包括在缩合反应条件下, 在有机溶剂中, 在缩合剂、缩合催化剂和三级胺的存在下, 将上述离子交换反应得到的产物进一步与含有氨基或羟基的固相载体进行接触。此时, 所获得的是 R₄ 中含有第 1 官能团和第 2 官能团, 第 1 官能团含有羟基保护基团, 第 2 官能团含有如式 (C1') 所示结构的式(321)所示的化合物。

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)所示的化合物, 所述有机溶剂的用量为 20-200L/mol, 在一些实施方式中为 50-100L/mol。

在一些实施方式中, 所述缩合剂可以是苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸酯 / 盐 (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate, PyBop)、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮 (3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one, DEPBT) 和/或 O-苯并三唑-四甲基脲六氟磷酸酯 / 盐 (O-benzotriazol-1-yl-tetramethyluronium hexafluorophosphate), 在一些实施方式中, 所述缩合剂为 O-苯并三氮唑-四甲基

腺六氟磷酸盐/酯。所述缩合剂与式(321)所示化合物的摩尔比为1:1-20:1,在其它实施方式中为1:1-5:1。

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

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

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

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

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)所示的化合物,所述有机溶剂的用量为10-50L/mol,在一些实施方式中为5-30L/mol。

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

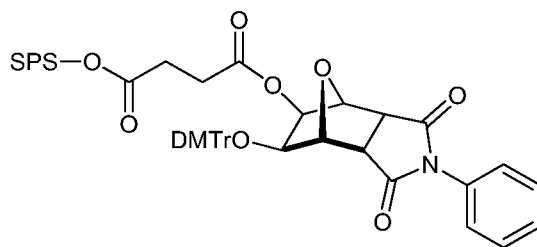
在一些实施方式中,可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式(321)所示的化合物。在一些实施方式中,可通过以有机溶剂充分洗涤,并过滤,去除未反应的反应物、过量的盖帽试剂及其它杂质,得到式(321)所示的化合物,所述有机溶剂选自乙腈、二氯甲烷、甲醇,在一些实施方式中为乙腈。

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R₄中含有第1官能团和第2官能团，第1官能团含有羟基保护基团，第2官能团含有如式(C3)所示结构的式(321)所示的化合物。

在一些实施方式中，偶联反应条件包括温度可以为0-50°C，例如为15-35°C，式(313)所示的化合物与亚磷酰二胺的摩尔比可以为1:1-1:50，例如为1:5-1:15；式(313)所示的化合物和偶联试剂的摩尔比可以为1:1-1:100，例如为1:50-1:80；反应时间可以为200-3000秒，例如为500-1500秒。所述亚磷酰二胺例如可使用双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦，其可商购获得或按照本领域中公知的方法合成获得。偶联试剂选自1H-四氮唑、5-乙硫基1H-四氮唑、5-苄硫基1H-四氮唑中的一种或多种，例如为5-乙硫基1H-四氮唑。所述偶联反应可在有机溶剂中进行，所述有机溶剂选自无水乙腈、无水DMF、无水二氯甲烷中的一种或多种，例如为无水乙腈。在一些实施方式中，相对于式(313)所示的化合物，所述有机溶剂的用量为3-50L/mol，例如可以为5-20L/mol。通过进行该偶联反应，式(313)所示的化合物中的羟基与亚磷酰二胺反应形成亚磷酰胺基团。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式(321)所示的化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式(321)所示的化合物的制备方法还进一步包括以下步骤：在偶联反应条件下，在有机溶剂中，以及在偶联试剂存在下，将分离得到的产物进一步与含有羟基的固相载体进行接触。随后，经盖帽反应、氧化反应，分离得到式(321)所示的化合物。此时，所获得的是R₄中含有第1官能团和第2官能团，第1官能团含有羟基保护基团，第2官能团具有如式(C3')所示结构的式(321)所示的化合物。

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

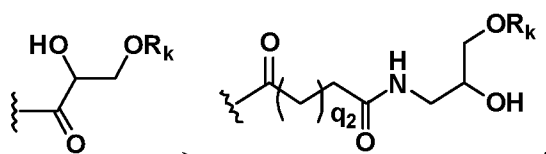
括温度为 0-50°C，例如为 15-35°C；反应时间为 30-300 秒，例如为 50-150 秒。脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一种或多种，在一些实施方式中，脱保护试剂为二氯乙酸。脱保护试剂与固定相上的-DMTr(4,4'-二甲氧基三苯甲基)保护基的摩尔比为 2:1-100:1，例如为 3:1-50:1。通过进行所述脱保护，在所述固相载体表面上获得具有反应活性的游离羟基，便于进行后续的偶联反应。

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

在一些实施方式中，R₆ 为式 B7 或 B8 基团中的一种，

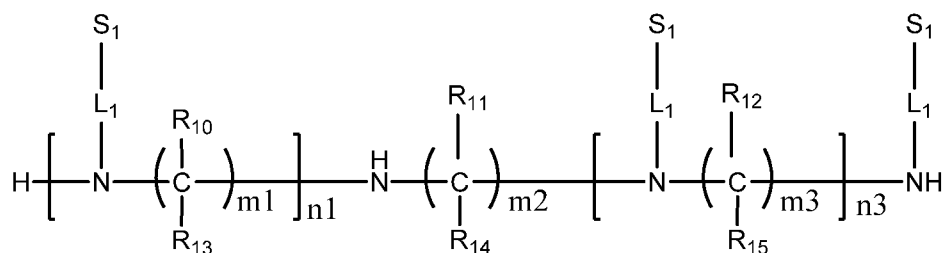


(B7)

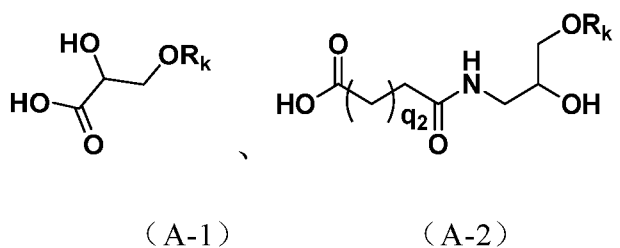
(B8)

其中 q₂、R_k 的定义如前所述，

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



式 (314)



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

所述酰胺化反应条件可包括反应温度为 0-100°C，反应时间为 1-48 小时，在一些实施方式中，所述酰胺化反应条件为反应温度为 10-40°C，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二氧六环和/或四氢呋喃。所述醚类溶剂在一些实施方式中为乙醚和/或甲基叔丁基醚。所述卤代烷类溶剂在一些实施方式中为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷中的一种或多种。在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式 (314) 所示的化合物，有机溶剂用量为 3-50L/mol，在进一步的实施方式中为 3-20L/mol。

在一些实施方式中，所述酰胺化反应缩合剂为苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐、2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ) 或 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐/酯，在进一步的实施方式中为 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮。所述酰胺化反应缩合剂与式 (314) 所示化合物的摩尔比可以为 1:1-10:1，在一些实施方式中为 2.5:1-5:1。

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

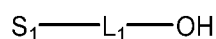
在一些实施方式中，式 (A-1) 和式 (A-2) 所示的化合物可通过任何适当的方式制备。例如，当 R_k 为 DMTr 基团时，可通过甘油酸钙与 DMTrCl 反应制备式 (A-1) 所示的化合物；类似地，可先将 3-氨基-1,2-丙二醇与环状酸酐接触，随后再与 DMTrCl 反应制备式 (A-2) 所示的化合物，所述环状酸酐可以是碳原子数为 4-13、在一些实施方式中为 4-8 的环状酸酐。本领域技术人员容易理解的是，所述环状酸酐的选择对应于 (A-2) 所示的化合物中 q_2 的不同值，例如，当所述环状酸酐为丁二酸酐时， $q_2=1$ ，当所述环状酸酐为戊二酸酐时， $q_2=2$ ，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

在一些变型中，也可通过使式 (314) 所示化合物依次与所述环状酸酐、3-

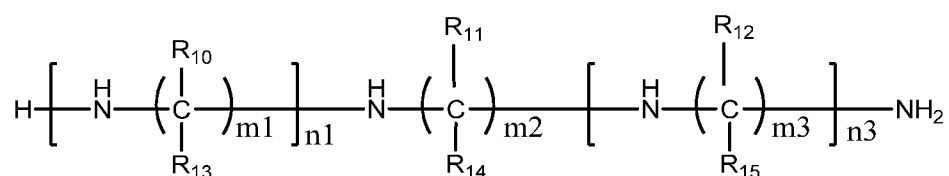
氨基-1,2-丙二醇和 DMTrCl 反应, 制备式 (313) 所示的化合物。本领域技术人员容易理解的是, 这些变型不会影响式 (313) 所示的化合物的结构与功能, 并且这些变型是本领域技术人员在上述方法的基础上容易实现的。

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

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



式 (316)



式 (320)

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

式 (316) 所示的化合物可使用例如 J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961 中所公开的化合物, 或者, 式 (316) 所示的化合物可由本领域技术人员通过各种方法制备, 例如, 可参照美国专利 US 8,106,022 B2 实施例 1 中所公开的方法制备某些式 (316) 所示的化合物, 以引用的方式将以上文献的全部内容整体并入本文。

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°C, 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°C, 反应时间为 0.5-16 小时。

考虑到期望产物式 (314) 所示的化合物的结构, 所述式 (316) 所示化合物与式 (320) 所示化合物的摩尔比应当基于与式 (320) 中 n_1 与 n_3 的和而确定。在一些实施方式中, 例如, 当 $n_1+n_3=3$ 时, 为了保证反应完全而不过度,

式(316)所示化合物与式(320)所示化合物的摩尔比可以为3:1-3.5:1, 在一些实施方式中为3.01:1-3.15:1。

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

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

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

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

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

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

本公开的siRNA、药物组合物及siRNA缀合物的应用

在一些实施方式中, 本公开提供了本公开的siRNA和/或药物组合物和/或

siRNA 缀合物在制备用于治疗 and/或预防败血症的药物中的用途。

在一些实施方式中，本公开提供了一种预防和/或治疗败血症的方法，该方法包括将有效量的本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物给予有需要的受试者。

通过将本公开的 siRNA 活性成分给予有需要的受试者，可以通过 RNA 干扰的机制达到预防和/或治疗败血症的目的。因此，本公开的 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物可用于预防和/或治疗败血症，或用于制备用于预防和/或治疗败血症的药物。

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

本文所使用的术语“给药/给予”是指通过使得至少部分地将本公开的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物定位于期望的位点以产生期望效果的方法或途径，将本公开的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物放置入受试者体内。适于本公开方法的给药途径包括局部给药和全身给药。一般而言，局部给药导致与受试者体循环相比将更多 siRNA 缀合物递送至特定位点；而全身给药导致将本公开的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物递送至受试者的基本体循环。考虑到本公开可以提供预防和/或治疗败血症疾病的手段，在一些实施方式中采用能够将药物递送至肝脏的给药方式。

可通过本领域已知的任何合适途径向受试者给药，所述途径包括但不限于：口服或胃肠外途径，如静脉内给药、肌肉内给药、皮下给药、经皮给药、气道给药（气雾剂）、肺部给药、鼻部给药、直肠给药和局部给药（包括口腔含化给药和舌下给药）。给药频率可以是每天、每周、每两周、每三周、每个月、每两个月、每三个月、每半年或每年 1 次或多次。

本公开所述的 siRNA、药物组合物或 siRNA 缀合物的使用剂量可为本领域常规的剂量，所述剂量可以根据各种参数、尤其是受试者的年龄、体重和性别来确定。可在细胞培养或实验动物中通过标准药理学程序测定毒性和疗效，例如测定 LD₅₀（使 50% 的群体死亡的致死剂量）和 ED₅₀（在量反应中指能引起 50% 最大反应强度的剂量，在质反应中指能引起 50% 实验对象出现阳性反应时的剂量）。可基于由细胞培养分析和动物研究得到的数据得出人用剂量的范围。

在给予本公开所述的 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物时，例如，对于雄性或雌性、6-12 周龄、体重 18-25g 的 C57BL/6J 或 30-45g 的 ob/ob 小鼠，以 siRNA 的量计：(i) 对于 siRNA 缀合物，其 siRNA 用量可以为 0.001-100mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.01-50mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.05-

20mg/kg 体重，另一些实施方式中为 0.1-15mg/kg 体重，另一些实施方式中为 0.1-10mg/kg 体重；(ii) 对于 siRNA 与药学上可接受的载体形成的药物组合物，其 siRNA 用量可以为 0.001-50mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.01-10mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.05-5mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.1-3mg/kg 体重。

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

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

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 siRNA、药物组合物和 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 siRNA 和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述 siRNA、药物组合物和/或 siRNA 缀合物，和/或药学上可接受的辅料可以任何形式提供，例如液体形式、干燥形式或冻干形式。在一些实施方式中，所述 siRNA 和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述药物组合物和/或 siRNA 缀合物和任选的药学上可接受的辅料基本上纯净和/或无菌。在一些实施方式中，可在本公开的试剂盒中提供无菌水。

下面将通过实施例来进一步说明本公开，但是本公开并不因此而受到任何限制。

实施例

除非特别说明，以下实施例中所用到的试剂、培养基均为市售商品，所用到的核酸电泳、real-time PCR 等操作均参照 Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)) 所记载的方法进行。

本公开合成的针对 KNG 基因的 siRNA、siRNA 缀合物或作为阴性对照的 siRNA、siRNA 缀合物转染细胞时，使用 Lipofectamine™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。

若无特别说明，以下体内/体外效果实验数据均以 $\bar{X} \pm \text{SEM}$ 表示，数据分析采用 Graphpad prism5.0 统计分析软件。

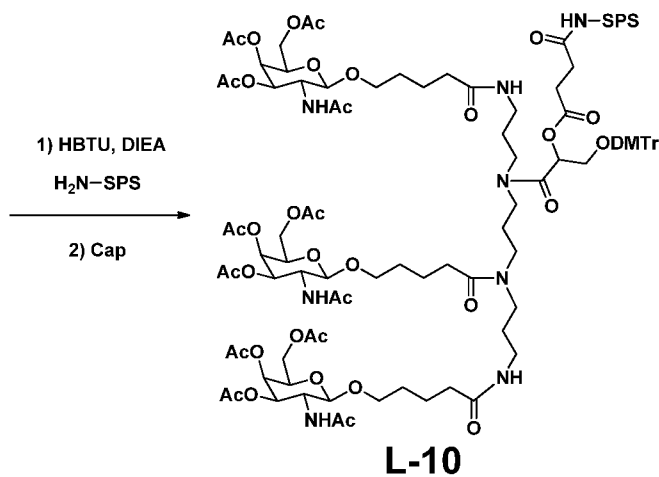
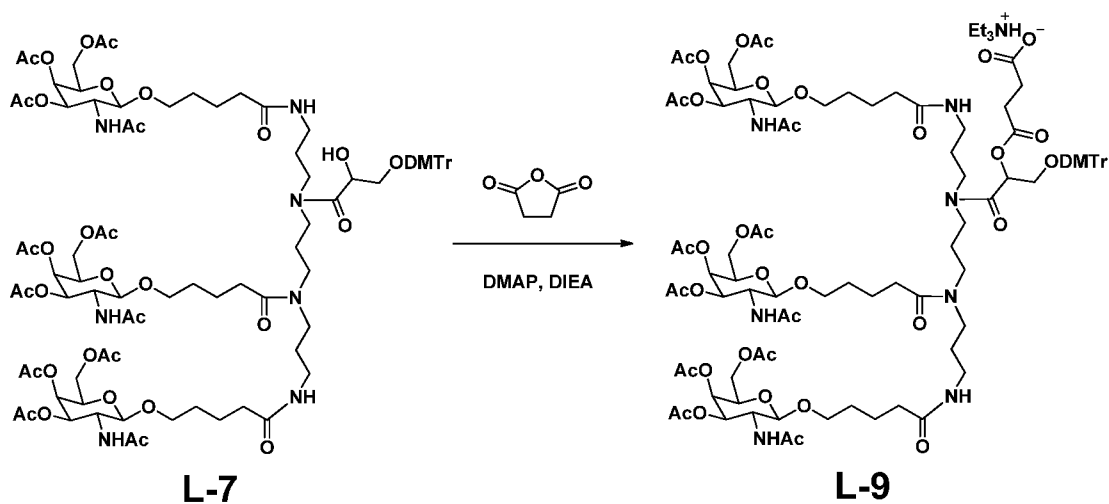
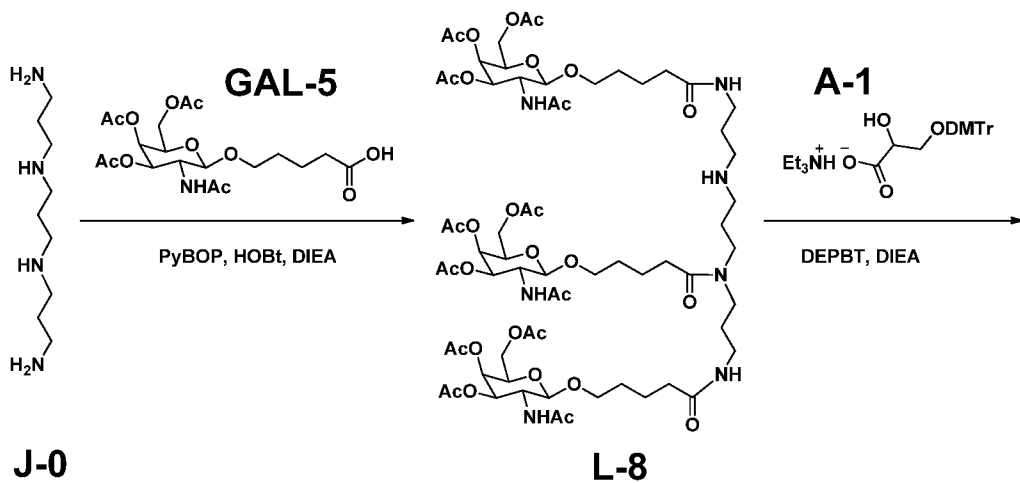
制备例 1

siRNA 缀合物 L10-siKNa1M1SP 的制备

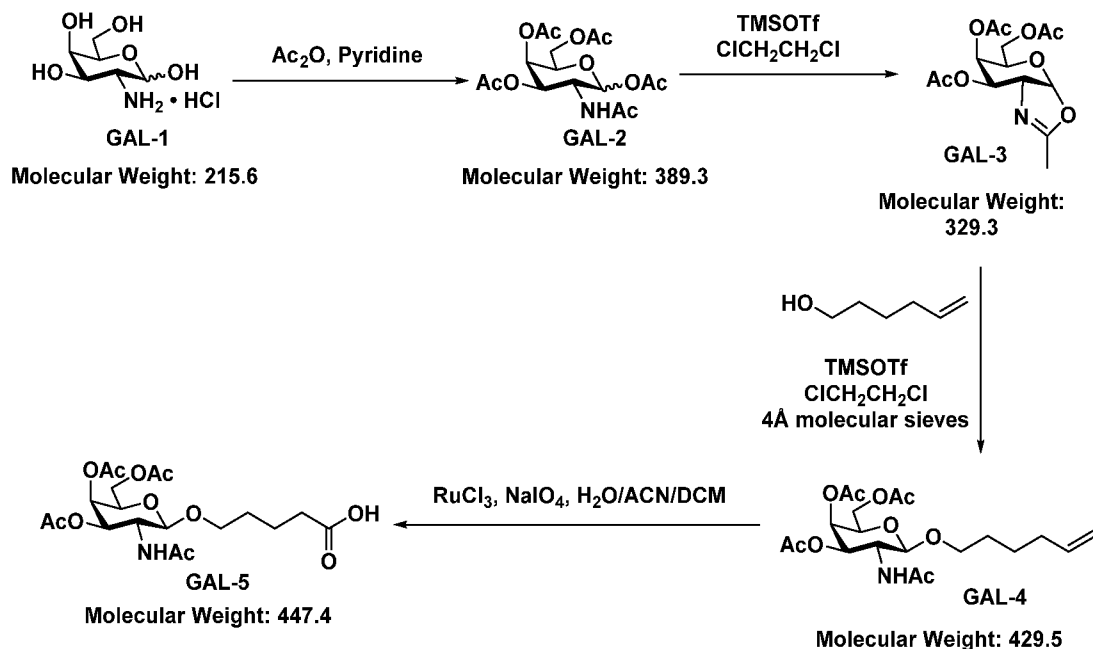
本制备例合成了 siRNA 缀合物 L10-siKNa1M1SP。该 siRNA 缀合物中所缀合的 siRNA 具有表 3 中对应于 siRNA 缀合物 L10-siKNa1M1SP 的正义链和反义链序列。

(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

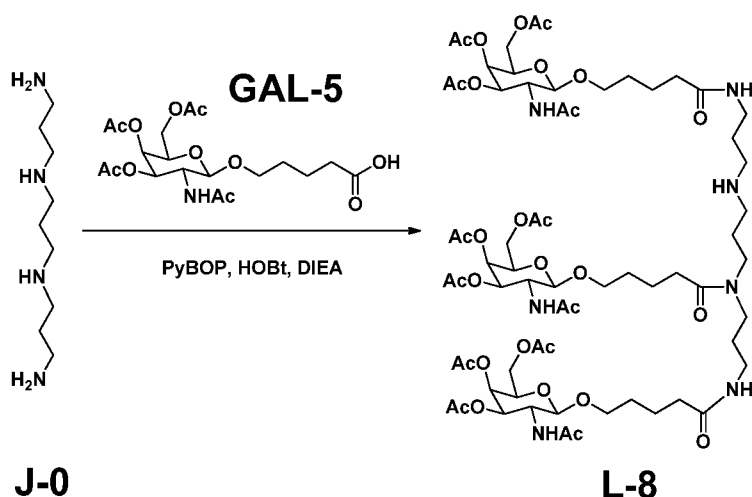
将步骤 (1-1-1b) 中获得的 **GAL-3** (26.9g, 81.7mmol) 溶于 136ml 无水 1,2-二氯乙烷中, 加入干燥的 4Å 分子筛粉末 30g, 再加入 9.0g 5-己烯-1-醇 (CAS 号: 821-41-0, 购自 Adamas-beta 公司, 89.9mmol), 室温下搅拌 30 分钟, 冰浴和氮气保护下加入 9.08g TMSOTf (40.9mmol), 室温下搅拌反应过夜。过滤除去 4 Å 分子筛粉末, 滤液中加入 300ml 二氯甲烷稀释, 以硅藻土过滤, 再加入 500ml 饱和碳酸氢钠水溶液搅拌 10 分钟洗涤, 分出有机相, 水相用 300ml 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, 加入三氯化钨 (CAS 号: 14898-67-0, 购自安耐吉公司, 238mg, 1.145mmol), 室温反应过夜。反应液加入 300ml 水稀释搅拌, 加饱和碳酸氢钠调 pH 约为 7.5, 分出并弃去有机相, 水相用二氯甲烷萃取三次, 每次 200ml, 弃去有机相。水相用柠檬酸固体调节 pH 约为 3, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 200ml, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 得到白色泡沫状固体产品 **GAL-5** 6.85g。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.01 (br, 1H), 7.83 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 5.21 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.96 (dd, $J = 11.2, 3.2$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.07 – 3.95 (m, 3H), 3.92 – 3.85 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.48 – 3.39 (m, 1H), 2.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.55 – 1.45 (m, 4H).

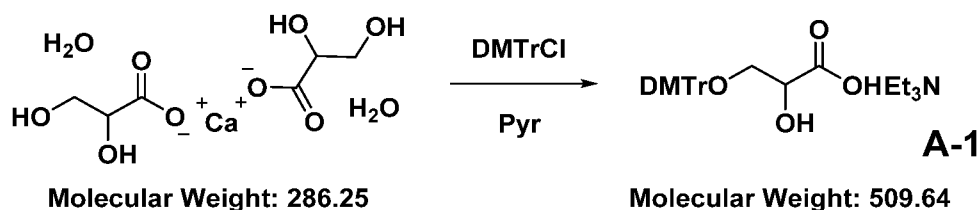
(1-1-2) L-8 的合成:



将 **J-0** (9.886g, 52.5mmol, 商购自阿法埃沙公司) 和步骤 (1-1-1) 中得到的 **GAL-5** (72.819g, 162.75mmol, 由多批次产物合并而得) 溶于 525ml 二氯甲烷, 加入二异丙基乙胺 (**DIEA**, 44.782g, 346.50mmol)、苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐/酯 (**PyBOP**, 90.158g, 173.25mmol) 和羟基苯并三唑 (**HOBt**, 23.410g, 173.25mmol), 室温下反应 4h, 加入 20ml 饱和碳酸氢钠和 200ml 饱和食盐水进行洗涤, 水相用二氯甲烷萃取 2 次, 每次 100ml, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤后减压蒸干溶剂得粗品。纯化使用 200-300 目正相硅胶, 以 10wt% 三乙胺中和硅胶酸性, 1wt% 三乙胺平衡柱子, 以二氯甲烷: 甲醇 = 100:25-100:40 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂得到纯品 **L-8** 38.8g。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 3H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 7.13 –

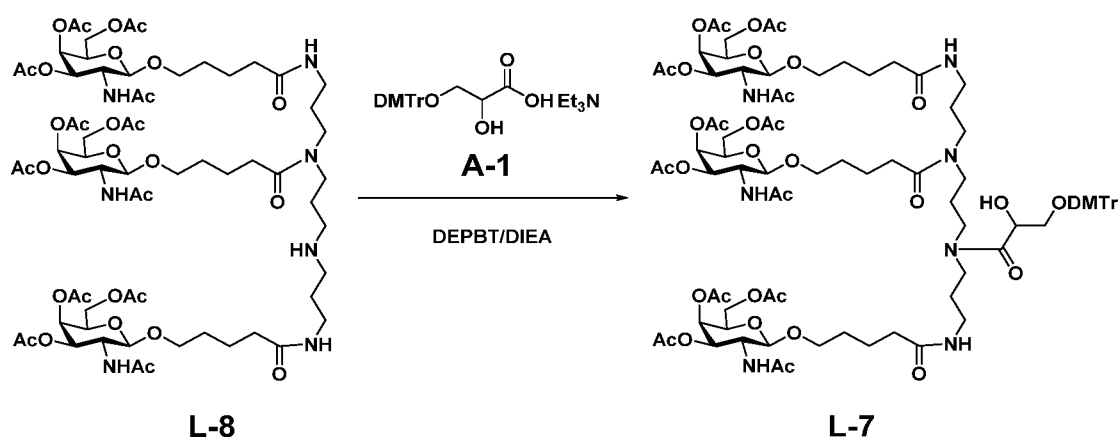
7.18 (m, 1H), 5.22 (d, $J = 3.1$ Hz, 3H), 4.97 (dd, $J = 11.3, 3.1$ Hz, 3H), 4.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H), 4.09 – 3.98 (m, 9H), 3.88 (dd, $J = 19.3, 9.3$ Hz, 3H), 3.75 – 3.66 (m, 3H), 3.44 – 3.38 (m, 3H), 3.17 – 3.30 (m, 4H), 3.10 – 2.97 (m, 4H), 2.35 – 2.20 (m, 6H), 2.15 – 2.08 (m, 9H), 2.07 – 1.98 (m, 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。

(1-1-3a) A-1 的合成



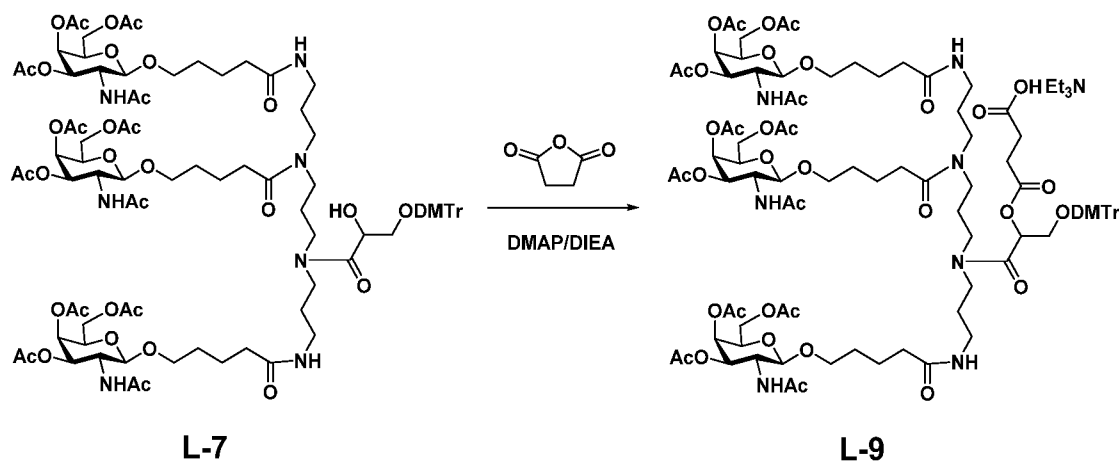
将 DMTrCl (4,4'-双甲氧基三苯甲基氯, 101.65g, 300mmol) 溶于 1000ml 无水吡啶中, 加入 DL-甘油酸钙水合物 (28.63g, 100mmol), 在 45°C 反应 20h, 将反应液过滤, 滤饼用 200ml DCM 淋洗, 滤液减压浓缩至干, 剩余物用 500ml 二氯甲烷重新溶解, 0.5M 三乙胺磷酸盐 (pH=7-8) 洗涤 2 次, 每次 200ml, 水相以二氯甲烷萃取 2 次, 每次 200ml, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸干溶剂, 200-300 目正相硅胶柱纯化, 以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇 = 1:1:1:0.35-1:1:1:0.55 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂, 600ml 二氯甲烷重新溶解, 以 200ml 0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤 1 次, 水相用 200ml 二氯甲烷萃取 1 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸干溶剂, 真空油泵减压下过夜, 得到白色固体产品 A-1 50.7g。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 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。

(1-1-3b) L-7 的合成:



将步骤(1-1-2)中获得的 L-8 (40g, 27.09mmol, 由多批次产物合并而得) 和步骤(1-1-3a)中获得的 A-1 (41.418g, 81.27mmol) 混合, 溶于 271ml 二氯甲烷, 加入 3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮 (DEPBT) (24.318g, 81.37mmol), 再加入二异丙基乙胺 (21.007g, 162.54mmol), 25°C 下搅拌反应 1.5h, 用 800ml 饱和碳酸氢钠洗涤有机相, 水相以二氯甲烷萃取 3 次, 每次 50ml, 以 150ml 饱和食盐水洗涤有机相, 水相以 50ml 二氯甲烷萃取 1 次, 合并有机相并以无水硫酸钠干燥, 过滤后减压蒸干溶剂, 真空油泵发泡干燥过夜, 得到粗品。柱纯化使用 2kg 200-300 目正相硅胶, 以 200ml 三乙胺中和硅胶酸性, 以含 1wt% 三乙胺的石油醚平衡柱子, 以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:N,N-二甲基甲酰胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂得到纯品 L-7 40.4g。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.90 – 7.78 (m, 4H), 7.75 – 7.64 (m, 1H), 7.38 – 7.18 (m, 9H), 6.91 – 6.83 (m, 4H), 5.25 – 5.10 (m, 4H), 4.97 (dd, $J = 11.2, 3.2$ Hz, 3H), 4.48 – 4.30 (m, 4H), 4.02 (s, 9H), 3.93 – 3.84 (m, 3H), 3.76 – 3.66 (m, 9H), 3.45 – 3.35 (m, 3H), 3.24 – 2.98 (m, 10H), 2.30 – 2.20 (m, 2H), 2.11 – 1.88 (m, 31H), 1.80 – 1.40 (m, 28H)。MS m/z: C₉₀H₁₂₈N₇O₃₅, [M-DMTr]⁺, 理论: 1564.65, 实测: 1564.88。

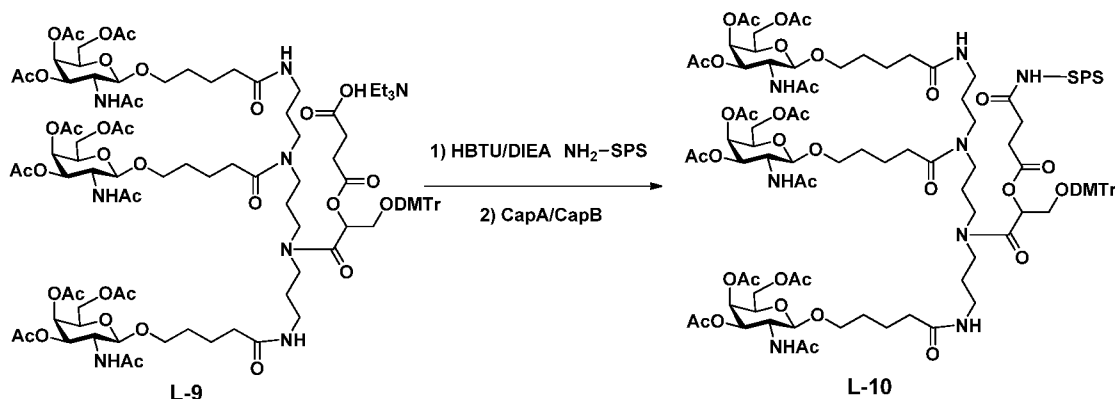
(1-1-4) L-9 的合成:



将步骤(1-1-3b)中获得的 L-7 (40g, 21.4247mmol)、丁二酸酐 (4.288g, 42.8494mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 5.235g, 42.8494mmol) 混合溶于 215ml 二氯甲烷, 再加入二异丙基乙胺 (DIEA, 13.845g, 107.1235mmol), 25°C 下搅拌 24h, 800ml 0.5M 三乙胺磷酸盐洗涤反应液, 水相以二氯甲烷萃取 3 次, 每次 5ml, 合并有机相减压蒸干得到粗品。柱纯化使用 1kg 200-300 目正相硅胶, 以 1wt% 三乙胺中和硅胶酸性, 以二氯甲烷平衡柱子, 以含 1wt% 三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20 梯度洗脱, 收集产物洗脱液, 减压蒸干溶剂得到纯品 L-9 缀合分子 31.0g。¹H 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 : $C_{94}H_{132}N_7O_{38}$, $[M-DMTr]^+$, 理论: 1664.72, 实测: 1665.03。

(1-1-5) L-10 化合物的合成:



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

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

表 2 盖帽反应投料配比

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

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

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

通过固相亚磷酸胺法，利用上述步骤制备的 L-10 化合物起始循环，按照表 3 中 L10-siKNa1M1SP 对应的正义链核苷酸排布顺序自 3'-5'方向逐一连接核苷单体。每连接一个核苷单体都包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应。其中，两个核苷酸之间采用磷酸酯连接时，连接后一个核苷单体时，包括脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应。两个核苷酸之间采用硫代磷酸酯连接时，连接后一个核苷单体时，包括脱保护、偶联、盖帽、硫化四步反应。合成条件给定如下：

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°C，反应时间为 70 秒，脱保护试剂为二氯乙酸的二氯甲烷溶液（3% v/v），二氯乙酸与固相载体上 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基的摩尔比为 5:1。

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

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

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

待最后一个核苷单体连接完成后，依次对固相载体上连接的核酸序列进行切割、脱保护、纯化、脱盐，随后冻干获得正义链，其中，

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

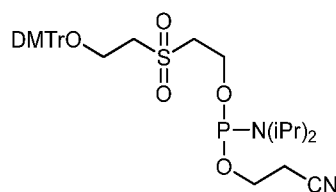
纯化与脱盐条件如下：利用制备型离子色谱纯化柱（Source 15Q），通过 NaCl 的梯度洗脱，实现核酸的纯化。具体而言为：洗脱剂 A：20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱剂 B：1.5M 氯化钠，20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱梯度：洗脱剂 A:洗脱剂 B=100:0-50:50 梯度洗脱。收集产品洗脱液后合并，采用反相色谱纯化柱进行脱盐，具体条件包括采用葡聚糖凝胶柱进行脱盐，填料为葡聚糖凝胶 G25（Sephadex G25），以去离子水洗脱。

检测方法如下：使用离子交换色谱（IEX-HPLC）检测正义链纯度，使用液质联用（LC-MS）分析分子量。实测值与理论值相符，表明所合成的是 3'末端

缀合了 L-9 缀合分子的正义链 SS。

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

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，表 3 中 L10-siKNa1M1SP 对应的反义链核苷酸顺序合成 siRNA 缀合物 L10-siKNa1M1SP 的反义链。固相合成方法中的脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化反应条件，切割和脱保护，纯化与脱盐条件与合成正义链相同。不同的是：对于反义链，其在 5'-末端第一个核苷酸处具有 5'-磷酸核苷酸，因此，在按照固相亚磷酰胺法制备反义链的过程中，连接反义链最后一个核苷单体后，再经脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应将 CPR-I 单体（苏州吉玛，货号 Cat#13-2601-XX）连接至反义链 5'末端，形成 5'-磷酸核苷酸修饰。



(CPR-I)

该连接中，使用的脱保护、偶联、盖帽、氧化反应条件，切割和脱保护，纯化与脱盐条件与合成正义链相同。随后冻干获得反义链。反义链的纯度采用离子交换色谱（IEX-HPLC）进行检测，分子量采用液质联用（LC-MS）进行分析。其结果，实测值与理论值相符，表明所合成的是具有目标序列的反义链 AS。

(1-4) 合成 siRNA 缀合物 L10-siKNa1M1SP

将 (1-2) 和 (1-3) 得到的正义链与反义链分别溶于注射用水中，得到 40mg/mL 的溶液，将得到的溶液以等摩尔的正义链和反义链混合，50°C 加热 15min，室温冷却后，得到退火后的产品，冻干，得到冻干粉。使用超纯水（Milli-Q 超纯水仪，电阻率 18.2MΩ*cm (25°C)）将 siRNA 缀合物稀释至浓度为 0.2mg/mL 后，利用液质联用仪（LC-MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 购于 Waters 公司，型号：LCT Premier）进行分子量检测。实测值与理论值一致，说明所合成的 siRNA 缀合物是目标设计的带有 L-9 缀合分子的双链核酸序列。其结构如式 (403) 所示。所述 siRNA 具有表 3 中所示的对应于 siRNA 缀合物 L10-siKNa1M1SP 的正义链和反义链序列。

表 3 siRNA 缀合物

制备例编号	siRNA 缀合物编 号	序列方向 5'-3'	SEQ ID NO

制备例 1	L10-siKNa 1M1SP	正义链	AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmA mGmUmUmUmGmUm	361
		反义链	PAmsCfsAmAmAmCfUmGmGmUmUmG mUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm	362
制备例 2	L10-siKNb 1M1SP	正义链	AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmA mAmUmUmAmCmCm	363
		反义链	PGmsGfsUmAmAmUfUmCmGmAmAmA mGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm	364
制备例 3	L10-siKNc 1M1SP	正义链	UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmC mUmCmAmAmUmUm	365
		反义链	PAmsAfsUmUmGmAfGmUmAmGmGmU mAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm	366
制备例 4	L10-siKNd 1M1SP	正义链	GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmA mUmCmGmAmUmAm	367
		反义链	PUmsAfsUmCmGmAfUmGmUmAmUmG mCmAfUmUfAmUmCmsUmsGm	368
制备例 5	L10-siKNe 1M1SP	正义链	GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmU mUmUmCmUmAmUm	369
		反义链	PAmsUfsAmGmAmAfAmGmUmUmGmC mGmUfUmAfUmUmCmsUmsCm	370
制备例 6	L10-siKNf1 M1SP	正义链	AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmC mAmAmGmAmUmUm	371
		反义链	PAmsAfsUmCmUmUfGmAmAmAmUmA mGmAfAmAfGmUmUmsGmsCm	372

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

制备例 2-6

本公开的 siRNA 缀合物的合成

按照制备例 1 的方法，合成了表 3 中所示的本公开的 siRNA 缀合物：L10-siKNb1M1SP、L10-siKNc1M1SP、L10-siKNd1M1SP、L10-siKNe1M1SP 和 L10-siKNf1M1SP。这些 siRNA 缀合物包含的 siRNA 分别具有表 3 中各 siRNA 缀合物对应的正义链和反义链序列。制备方法的区别仅在于，分别按照表 3 中各 siRNA 缀合物所对应的 siRNA 正义链和反义链序列合成正义链和反义链。

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

制备例 7-14 和对比制备例 15 和 16

合成 siRNA 序列

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

表 4 siRNA 序列

制备例编号	siRNA 编号	序列方向 5'-3'		SEQ ID NO
制备例 7	siKNa1M1S	正义链	AmsAmsAmGmUmAmAfCfAfAmCmCmAmGmUmUmUmGmUm	373
		反义链	AmCfAmAmAmCfUmGmGmUmUmGmUmUfAmCfUmUmUmsGmsGm	374
制备例 8	siKNb1M1S	正义链	AmsUmsUmGmAmAmCfUfUfUmCmGmAmAmUmUmAmCmCm	375
		反义链	GmGfUmAmAmUfUmCmGmAmAmAmGmUfUmCfAmAmUmsCmsCm	376
制备例 9	siKNc1M1S	正义链	UmsCmsGmAmAmUmUfAfCfCmUmAmCmUmCmAmAmUmUm	377
		反义链	AmAfUmUmGmAfGmUmAmGmGmUmAmAfUmUfCmGmAmsAmsAm	378

制备例 10	siKNd1M1S	正义链	GmsAmsUmAmAmUmGfCfAfUmAmCmAmUmCm GmAmUmAm	379
		反义链	UmAfUmCmGmAfUmGmUmAmUmGmCmAfUmU fAmUmCmsUmsGm	380
制备例 11	siKNe1M1S	正义链	GmsAmsAmUmAmAmCfGfCfAmAmCmUmUmUm CmUmAmUm	381
		反义链	AmUfAmGmAmAfAmGmUmUmGmCmGmUfUmA fUmUmCmsUmsCm	382
制备例 12	siKNf1M1S	正义链	AmsAmsCmUmUmUmCfUfAfUmUmUmCmAmAmGmA mUmUm	383
		反义链	AmAfUmCmUmUfGmAmAmAmUmAmGmAfAmAfGm UmUmsGmsCm	384
制备例 13	siKNa0	正义链	AAAGUAACAACCAGUUUGU	385
		反义链	ACAAACUGGUUGUUACUUU	386
制备例 14	siKNc0	正义链	UCGAAUUACCUACUCAAUU	387
		反义链	AAUUGAGUAGGUAAUUCGA	388
对比 制备例 15	siKNa0-com	正义链	CCAAAGUAACAACCAGUUU	389
		反义链	AAACUGGUUGUUACUUUGG	390
对比 制备例 16	NC	正义链	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT	391
		反义链	ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT	392

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

上述序列的制备过程中，当目标序列中包含未修饰的核苷酸时，在切割与脱保护条件中，在氨水处理后，相对于单链核酸的量，用 0.4ml/ μ mol N-甲基吡咯烷酮溶解产品，随后加入 0.3ml/ μ mol 三乙胺和 0.6ml/ μ mol 三乙胺三氢氟酸盐，以脱除核糖上的 2'-TBDMS 保护。按照制备例 1 的方法分别对上述 siRNA 的分子量进行检测，实测值与理论值一致，确认所获得的 siRNA 分别具有对应于表 4 中所示的各个 siRNA 的序列。

在上述本公开的 siRNA 或 siRNA 缀合物制备完成后，冻干为固体粉末保存备用。在使用时，可使用例如注射用水、生理盐水 (NS)、磷酸缓冲液 (PB) 或

者磷酸盐缓冲液 (PBS) 等将其重新溶解为所需浓度的溶液使用。

实验例 1

本公开的 siRNA 体外 (in vitro) 的抑制活性

用含有 10% 的胎牛血清 (FBS, Hyclone 公司) 及 0.2 体积% 的青链霉素双抗 (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen 公司) 的 H-DMEM 完全培养基 (Hyclone 公司) 于 37°C 在含 5% CO₂/95% 空气的培养箱中培养 HEK293A 细胞 (购自南京科佰生物科技有限公司)。

根据 Kumico Ui-Tei et.al., Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Nucleic Acids Research, 2008.36(7), 2136-2151 描述的方法, 构建检测质粒, 与待评价的 siRNA 共转染至 HEK293A 细胞中, 通过双萤光素酶报告基因的表达水平, 来反应 siRNA 的抑制活性。具体步骤如下:

[1] 构建检测质粒

采用 psiCHECKTM-2 (PromegaTM) 质粒构建检测质粒, 每一个检测质粒含有一个目标序列, 即 siRNA 靶序列。对于每一待测 siRNA, 目标序列如下所示:

siKNa0 的目标序列为:

AAAGTAACAACCAGTTTGT (SEQ ID NO: 393)

siKNc0 的目标序列为:

TCGAATTACCTACTCAATT (SEQ ID NO: 394)

将目标序列克隆到 psiCHECKTM-2 质粒的 Xho I/Not I 位点。

[2] 转染

将 HEK293A 细胞以 8×10^3 细胞/孔接种于 96 孔板中, 16 小时后细胞生长密度达到 70-80% 时, 吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基, 每孔加入 80 μ l Opti-MEM 培养基 (GIBCO 公司) 继续培养 1.5 小时。

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

配制 1A1 溶液, 每份 1A1 溶液含有浓度为 10 nM 的 siRNA 工作液 1 μ l、检测质粒工作液 0.05 μ l (含检测质粒 10 ng) 和 10 μ l 的 Opti-MEM 培养基。

配制 1A2 溶液, 每份 1A2 溶液含有浓度为 3 nM 的 siRNA 工作液 1 μ l、检测质粒工作液 0.05 μ l (含检测质粒 10 ng) 和 10 μ l 的 Opti-MEM 培养基。

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

配制 1B 溶液，每份 1B 溶液含有 0.2 μ l Lipofectamine™ 2000 和 10 μ l Opti-MEM 培养基。

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

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

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

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

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

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

将含 siRNA 的共转染混合物和不含 siRNA 的转染混合物在培养孔中共转染 4 小时后，每孔补加 100 μ l 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 96 孔板置于 CO₂ 培养箱继续培养 24 小时。

[3] 检测

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

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

率 = (1-R) × 100%。

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

对比实验例 1

参比 siRNA 体外 (in vitro) 的抑制活性。

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

siKNa0-com 的目标序列为:

CCAAAGTAACAACCAGTTT (SEQ ID NO: 395)

NC 的目标序列与 siKNa0 的目标序列相同。

结果如图 1 所示。

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

实验例 2

siRNA 在 psiCHECK 系统中的目标序列 IC₅₀ 测定

用含有 10% 的胎牛血清 (FBS, Hyclone 公司) 及 0.2 体积% 的青链霉素双抗 (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen 公司) 的 H-DMEM 完全培养基 (Hyclone 公司) 于 37°C 在含 5% CO₂/95% 空气的培养箱中培养 HEK293A 细胞 (购自南京科佰生物科技有限公司)。

根据 Kumico Ui-Tei et.al., Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Research*, 2008.36(7), 2136-2151 描述的方法, 构建检测质粒, 将所述检测质粒与待测 siRNA 共转染至 HEK293A 细胞中, 通过双萤光素酶报告基因的表达水平, 来反映 siRNA 的目标序列抑制活性。具体步骤如下:

[1] 构建检测质粒

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

siKNa1M1S 目标序列为:

CATGGCCACGGAAAACATAAAAATAAAGGC AAAAAGAATGGAAAGCA
CAATGGTTGGAAAACAGAGCATTGGCAAGCTCTTCTGAAGACAGTACTAC
ACCTTCTGCACAGACACAAGAGAAGACAGAAGGGCCAACACCCATCCCTT
CCCTAGCCAAGCCAGGTGTAACAGTTACCTTTTCTGACTTTCAGGACTCTG
ATCTCATTGCAACTATGATGCCTCCTATATCACCAGCTCCCATACAGAGTGAT
GACGATTGGATCCCTGATATCCAGATAGACCCAAATGGCCTTTCATTTAACC
CAATATCAGATTTTCCAGACACGACCTCCCCAAAATGTCCTGGACGCCCCT
GGAAGTCAGTTAGTGAAATTAATCCAACCACACAAATGAAAGAATCTTATT
ATTTTCGATCTCACTGATGGCCTTTCTTAATTTAAGTGGCTATGGGTATTTCTT
TCATACTTTATTAAAGTATCAATATCCCTCTCTCCATTGTCCAGATGAAAATA
TCCTGATATAATGCACCAAAAACCATGCAGCTTCGGAACAGTCTAAAGAGA
AGTGGTGAGACTCCAGTGGAGACACC (SEQ ID NO:396)

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

CATGGCCACGGAAAACATAAAAATAAAGGC AAAAAGAATGGAAAGCA
CAATGGTTGGAAAACAGAGCATTGGCAAGCTCTTCTGAAGACAGTACTAC
ACCTTCTGCACAGACACAAGAGAAGACAGAAGGGCCAACACCCATCCCTT
CCCTAGCCAAGCCAGGTGTAACAGTTACCTTTTCTGACTTTCAGGACTCTG
ATCTCATTGCAACTATGATGCCTCCTATATCACCAGCTCCCATACAGAGTGAT
GACGATTGGATCCCTGATATCCAGATAGACCCAAATGGCCTTTCATTTAACC
CAATATCAGATTTTCCAGACACGACCTCCCCAAAATGTCCTGGACGCCCCT
GGAAGTCAGTTAGTGAAATTAATCCAACCACACAAATGAAAGAATCTTATT
ATTTTCGATCTCACTGATGGCCTTTCTTAATTTAAGTGGCTATGGGTATTTCTT
TCATACTTTATTAAAGTATCAATATCCCTCTCTCCATTGTCCAGATGAAAATA
TCCTGATATAATGCACCAAAAACCATGCAGCTTCGGAACAGTCTAAAGAGA
AGTGGTGAGACTCCAGTGGAGACACC (SEQ ID NO:397)

上述目标序列均是编码人 KNG mRNA 的基因的基因片段。

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

[2] 转染

将 HEK293A 细胞以 8×10^3 细胞/孔接种于 96 孔板中, 16 小时后细胞生长密度达到 70-80% 时, 吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基, 每孔加入 80 μ l Opti-MEM 培养基 (GIBCO 公司) 继续培养 1.5 小时。

用 DEPC 化水将上述检测质粒稀释成 200 ng/ μ l 的检测质粒工作液; 用 DEPC 化水将下面的 siRNA 中的每一个 siRNA 分别配制成 100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM、1.5625 nM、0.7813 nM 和 0.3906nM 共 9 种不同

浓度的 siRNA 工作液, 所用 siRNA 分别为 siKNa1M1S、siKNb1M1S、siKNc1M1S、siKNd1M1S、siKNe1M1S 和 siKNf1M1S。

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

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

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

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

分别将含 siRNA 的共转染混合物和不含 siRNA 的共转染混合物在培养孔中转染 4 小时后, 每孔补加 100 μ l 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 96 孔板置于 CO₂ 培养箱继续培养 24 小时。

[3] 检测

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

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

依据转染了不同浓度的待测 siRNA 后, HEK293A 细胞中 *Renilla* 的相对残留活性, 利用 Graphpad 5.0 软件的非线性回归分析功能拟合 $\log(\text{inhibitor})$ vs. response—Variable slope (four parameters) 剂量-效应曲线, 图 2A-2F 依次示出了 siKNa1M1S、siKNb1M1S、siKNc1M1S、siKNd1M1S、siKNe1M1S 和 siKNf1M1S 的剂量-效应曲线。其中以 siRNA 终浓度的常用对数值 (\lg nM) 为横坐标, 以 *Renilla* 的相对残留活性 (%) 为纵坐标, 每个圆点代表相对于对照组而言, 测试组 3 个培养孔中 *Renilla* 的相对残留活性的平均值。

根据拟合的剂量-效应曲线对应的函数，计算待测 siRNA 靶向目标序列的 IC₅₀ 值，所述函数如下，

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

式中：

Y 是比值 R，即 *Renilla* 的相对残留活性，

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，

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

由该剂量-效应曲线和对应的函数，确定当 Y=50% 时对应的 X₅₀ 值，计算获得各 siRNA 的 IC₅₀ 值 = 10^{X₅₀} (nM)，IC₅₀ 值总结于表 5 中。

表 5 siRNA 缀合物的 IC₅₀

制备例编号	编号	IC ₅₀
制备例 1	L10-siKNa1M1SP	0.1054 nM
制备例 2	L10-siKNb1M1SP	0.1914 nM
制备例 3	L10-siKNc1M1SP	0.2328 nM
制备例 4	L10-siKNd1M1SP	0.1096 nM
制备例 5	L10-siKNe1M1SP	0.0048 nM
制备例 6	L10-siKNf1M1SP	0.0186 nM

由图 2A-2F 以及上述表 5 的结果可知，本公开提供的 siRNA 缀合物在体外 HEK293A 细胞中有较高的目标序列抑制活性，IC₅₀ 在 0.0048-0.2328nM 之间。

实验例 3

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

本试验例中使用的人源化小鼠委托苏州大学唐仲英血液学研究中心构建，将 6-8 周人源化小鼠随机分为 5 组，每组 4 只 (2 雄 2 雌)，采用皮下注射方式单次给药，对每组小鼠分别以 6 mg/kg (以 siRNA 计) 给予 siRNA 缀合物 L10-siKNa1M1SP、L10-siKNc1M1SP、L10-siKNe1M1SP 和 L10-siKNf1M1SP 和生理盐水 (saline) 对照。各 siRNA 缀合物以 0.6 mg/mL (以 siRNA 计) 的 0.9% 氯

化钠水溶液形式给予，给药体积均为 10 mL/kg。

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

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

表 6 检测引物的序列

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

实验例 4

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

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

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

将 6×蛋白上样缓冲液(含 DTT，购于北京拜尔迪生物技术有限公司，货

号 DE0105-1 mL) 用无菌水稀释为 2×蛋白上样缓冲液。分别取测试组和对照组的共 3 只小鼠中的每一只的待测血浆样品 5 μ L 加入到不同的 1.5 mL 离心管中, 再向各个离心管中分别加入 5 μ L 无菌水和 15 μ L 2×蛋白上样缓冲液, 混匀后, 在金属浴 100 °C 温度下变性 10 分钟, 得到蛋白样品液。

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

取 100 mL 的 10×蛋白电泳转移缓冲液 (北京拜尔迪生物技术有限公司, 货号 DE0181-500 mL), 加水至 800 mL, 再加入 200 mL 的无水甲醇, 混匀, 得到稀释转移缓冲液。用甲醇浸泡聚二氟乙烯膜 (以下称为, PVDF 膜) 2 分钟后, 以稀释转移缓冲液浸泡海绵, 滤纸及 PVDF 膜。取出胶板中的凝胶, 按照负极板 (黑) —海绵—滤纸—凝胶—PVDF 膜—滤纸—海绵—正极板 (白), 由下向上的顺序制好夹板, 放入转膜槽中。将转膜槽置于冰盒中, 100 V 恒压转膜 1 小时。

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

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

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

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

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

由蛋白标记拍摄结果可知, 对照组和不同时间点的各测试组均显示出清晰的蛋白标记; 然后, 通过 ImageJ 软件分析蛋白标记, 分别获得对照组和不同时间点的各

测试组的蛋白印迹条带的光强度值，分析可知，与对照组和 D0 的数据相比，各测试组在给药后的不同时间点蛋白印迹条带的光强度值均显著降低。

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

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

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

对于测试组，相对表达水平和抑制率是 2 只小鼠的测试结果的算术平均值

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

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

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。

权利要求书

1. 一种 siRNA，所述 siRNA 含有正义链和反义链，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，其中，所述正义链含有一段核苷酸序列 I，反义链含有一段核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 选自如下 i) - vi) 所示序列中的一组：

i) 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'- AAAGUAACAACCAGUUUGZ₁-3' (SEQ ID NO: 1)；

5'-Z₂CAAACUGGUUGUACUUU-3' (SEQ ID NO: 2)，

其中，Z₁ 为 U，Z₂ 为 A；

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁ 的核苷酸 Z₃，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₂ 的核苷酸 Z₄，所述 Z₄ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

ii) 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 61 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'- AUUGAACUUUCGAAUUACZ₅-3' (SEQ ID NO: 61)；

5'- Z₆GUAAUUCGAAAGUUCAAU-3' (SEQ ID NO: 62)，

其中，Z₅ 为 C，Z₆ 为 G；

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₅ 的核苷酸 Z₇，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₆ 的核苷酸 Z₈，所述 Z₈ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

iii) 所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 121 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'- UCGAAUUACCUACUCAAUZ₉-3' (SEQ ID NO: 121)；

5'-Z₁₀AUUGAGUAGGUAAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 122)，

其中，Z₉ 为 U，Z₁₀ 为 A；

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₉ 的核苷酸 Z₁₁，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₀ 的核苷酸 Z₁₂，所述 Z₁₂ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

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

5'- GAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₃-3' (SEQ ID NO: 181)；

5'-Z₁₄AUCGAUGUAUGCAUUAUC-3' (SEQ ID NO: 182)，

其中，Z₁₃ 为 A，Z₁₄ 为 U；

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁₃ 的核苷酸 Z₁₅，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₄ 的核苷酸 Z₁₆，所述 Z₁₆ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

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

5'-GAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₇-3' (SEQ ID NO: 241)；

5'-Z₁₈UAGAAAGUUGCGUUAUUC -3' (SEQ ID NO: 242)，

其中，Z₁₇ 为 U，Z₁₈ 为 A；

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₁₇ 的核苷酸 Z₁₉，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₁₈ 的核苷酸 Z₂₀，所述 Z₂₀ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸；

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

5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₁-3' (SEQ ID NO: 301)；

5'-Z₂₂AUCUUGAAAUAGAAAGUU -3' (SEQ ID NO: 302)，

其中，Z₂₁ 为 U，Z₂₂ 为 A，

所述核苷酸序列 I 中包含位置对应于 Z₂₁ 的核苷酸 Z₂₃，所述核苷酸序列 II 中包含位置对应于 Z₂₂ 的核苷酸 Z₂₄，所述 Z₂₄ 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

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

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

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

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

或者，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 241 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异；

或者，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 301 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 302 所示的核苷酸序列之间不多于 1 个核苷酸差异。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₄ 位置处的差异，且 Z₄ 选自 U、C 或 G；

或者，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 62 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₈ 位置处的差异，且 Z₈ 选自 A、U 或 C；

或者，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 122 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₁₂ 位置处的差异，且 Z₁₂ 选自 U、C 或 G；

或者，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 182 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₁₆ 位置处的差异，且 Z₁₆ 选自 A、C 或 G；

或者，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 242 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₂₀ 位置处的差异，且 Z₂₀ 选自 U、C 或 G；

或者，所述核苷酸序列 II 与 SEQ ID NO: 302 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z₂₄ 位置处的差异，且 Z₂₄ 选自 U、C 或 G。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的 siRNA，其中 Z₃ 是与 Z₄ 互补的核苷酸；或者，Z₇ 是与 Z₈ 互补的核苷酸；或者，Z₁₁ 是与 Z₁₂ 互补的核苷酸；或者，Z₁₅ 是与 Z₁₆ 互补的核苷酸；或者，Z₁₉ 是与 Z₂₀ 互补的核苷酸；或者，Z₂₃ 是与 Z₂₄ 互补的核苷酸。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的 siRNA，其中，所述正义链和反义链长度相同或不同，所述正义链的长度为 19-23 个核苷酸，反义链的长度为 19-26 个核苷酸；并且，

所述核苷酸序列 I 是 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，所述核苷酸序列 II 是 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列：

5'- AAAGUAACAACCCAGUUUGZ₃ -3' (SEQ ID NO: 3)；

5'- Z₄CAAACUGGUUGUACUUU -3' (SEQ ID NO: 4)，

其中，Z₄ 选自 A、U、G 或 C，Z₃ 是与 Z₄ 互补的核苷酸；

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

5'- AUUGAACUUUCGAAUACZ₇ -3' (SEQ ID NO: 63)；

5'- Z₈GUAAUUCGAAAGUCAAU -3' (SEQ ID NO: 64)，

其中，Z₈ 选自 A、U、G 或 C，Z₇ 是与 Z₈ 互补的核苷酸；

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

5'- UCGAAUUACCUACUCAAUZ₁₁-3' (SEQ ID NO: 123)；

5'-Z₁₂AUUGAGUAGGUAAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 124)，

其中，Z₁₂ 选自 A、U、G 或 C，Z₁₁ 是与 Z₁₂ 互补的核苷酸；

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

5'- GAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₅-3' (SEQ ID NO: 183)；

5'- Z₁₆AUCGAUGUAUGCAUUAUC-3' (SEQ ID NO: 184)，

其中，Z₁₆ 选自 A、U、G 或 C，Z₁₅ 是与 Z₁₆ 互补的核苷酸；

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

5'- GAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₉-3' (SEQ ID NO: 243)；

5'-Z₂₀UAGAAAGUUGCGUUAUUC-3' (SEQ ID NO: 244)，

其中，Z₂₀ 选自 A、U、G 或 C，Z₁₉ 是与 Z₂₀ 互补的核苷酸；

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

5'- AACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₃-3' (SEQ ID NO: 303)；

5'-Z₂₄AUCUUGAAAUAGAAAGUU -3' (SEQ ID NO: 304)

其中，Z₂₄ 选自 A、U、G 或 C，Z₂₃ 是与 Z₂₄ 互补的核苷酸。

6. 如权利要求 5 所述的 siRNA，其中，Z₃ 为 U，Z₄ 为 A；或者 Z₇ 为 C，Z₈ 为 G；或者 Z₁₁ 为 U，Z₁₂ 为 A；或者 Z₁₅ 为 A，Z₁₆ 为 U；或者 Z₁₉ 为 U，Z₂₀ 为 A；或者 Z₂₃ 为 U，Z₂₄ 为 A。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的 siRNA，其中，所述正义链还含有核苷酸序列 III，所述反义链还含有核苷酸序列 IV，核苷酸序列 III 和核苷酸序列 IV 的长度各自独立地为 1-4 个核苷酸，所述核苷酸序列 III 连接在核苷酸序列 I 的 5'末端，核苷酸序列 IV 连接在核苷酸序列 II 的 3'末端，所述核苷酸序列 III 和所述核苷酸序列 IV 长度相等并且实质上反向互补或完全反向互补；所述实质上反向互补是指两个核苷酸序列之间存在不多于 1 个的碱基错配；完全反向互补是指两个核苷酸序列之间没有错配。

8. 如权利要求 7 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，并且，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 1 个核苷酸，所述核苷酸序列 III 的碱基为 C；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，

核苷酸序列 III 的碱基组成为 CC；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 ACC；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 AACC；

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

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

或者，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 181 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，并且，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 1 个核苷酸，所述核苷酸序列 III 的碱基为 A；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 CA；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 ACA；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 UACA；

或者，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 241 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，并且，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 1 个核苷酸，所述核苷酸序列 III 的碱基为 A；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 GA；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 AGA；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 CAGA；

或者，所述核苷酸序列 I 与 SEQ ID NO: 301 所示的核苷酸序列长度相等，

且不多于 3 个核苷酸差异，并且，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 1 个核苷酸，所述核苷酸序列 III 的碱基为 C；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 GC；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 CGC；或者，所述核苷酸序列 III 和 IV 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 III 的碱基组成为 ACGC。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的 siRNA，其中，所述反义链还含有核苷酸序列 V，核苷酸序列 V 的长度为 1 至 3 个核苷酸，连接在所述反义链的 3'末端，构成反义链的 3'突出端。

10. 如权利要求 9 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 V 的长度为 2 个核苷酸。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的 siRNA，其中，所述核苷酸序列 V 为连续的两个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸或连续的两个尿嘧啶核糖核苷酸，或者所述核苷酸序列 V 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸互补。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列：

5'- AAAGUAACAACCAGUUUGZ₃ -3' (SEQ ID NO: 5)；

5'- Z₄CAAACUGGUUGUUACUUUGG -3' (SEQ ID NO: 6)，

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

5'- CCAAAGUAACAACCAGUUUGZ₃ -3' (SEQ ID NO: 7)；

5'- Z₄CAAACUGGUUGUUACUUUGGUU -3' (SEQ ID NO: 8)，

其中，所述 Z₄ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸，Z₃ 选自 A、U、G 或 C，并且 Z₄ 是与 Z₃ 互补的核苷酸；

或者，所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 65 所示的核苷酸序列，所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 66 所示的核苷酸序列：

5'- AUUGAACUUUCGAAUUACZ₇ -3' (SEQ ID NO: 65)；

5'- Z₈GUAAUUCGAAAGUUCAUCC-3' (SEQ ID NO: 66)，

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

5'- GGAUUGAACUUUCGAAUUACZ₇ -3' (SEQ ID NO: 67)；

5'- Z₈GUAAUUCGAAAGUUCAUCCAG -3' (SEQ ID NO: 68)，

其中, 所述 Z₈ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₇ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₈ 是与 Z₇ 互补的核苷酸;

或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 125 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 126 所示的核苷酸序列:

5'- UCGAAUUACCUACUCAAUZ₁₁-3' (SEQ ID NO: 125);

5'- Z₁₂AUUGAGUAGGUAAUUCGAAA -3' (SEQ ID NO: 126),

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

5'- UUUCGAAUUACCUACUCAAUZ₁₁-3' (SEQ ID NO: 127);

5'- Z₁₂AUUGAGUAGGUAAUUCGAAAGU -3' (SEQ ID NO: 128),

其中, 所述 Z₁₂ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₁₁ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₁₂ 是与 Z₁₁ 互补的核苷酸;

或者, 所述 siRNA 的正义链含有如 SEQ ID NO: 185 所示的核苷酸序列, 所述 siRNA 的反义链含有如 SEQ ID NO: 186 所示的核苷酸序列:

5'- GAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₅-3' (SEQ ID NO: 185);

5'- Z₁₆AUCGAUGUAUGCAUUAUCUG -3' (SEQ ID NO: 186),

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

5'- CAGAUAAUGCAUACAUCGAUZ₁₅-3' (SEQ ID NO: 187);

5'- Z₁₆AUCGAUGUAUGCAUUAUCUGUA -3' (SEQ ID NO: 188),

其中, 所述 Z₁₆ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₁₅ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₁₆ 是与 Z₁₅ 互补的核苷酸;

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

5'- GAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₉-3' (SEQ ID NO: 245);

5'- Z₂₀UAGAAAGUUGCGUUAUUCUC-3' (SEQ ID NO: 246),

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

5'- GAGAAUAACGCAACUUUCUAZ₁₉-3' (SEQ ID NO: 247);

5'-Z₂₀UAGAAAGUUGCGUUAUUCUCUG-3' (SEQ ID NO: 248),

其中, 所述 Z₂₀ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₁₉ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₂₀ 是与 Z₁₉ 互补的核苷酸;

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

5'-AACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₃-3' (SEQ ID NO: 305);

5'-Z₂₄AUCUUGAAAUAGAAAGUUGC-3' (SEQ ID NO: 306),

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

5'-GCAACUUUCUAUUUCAAGAUZ₂₃-3' (SEQ ID NO: 307);

5'-Z₂₄AUCUUGAAAUAGAAAGUUGCGU-3' (SEQ ID NO: 308),

其中, 所述 Z₂₄ 是反义链 5'末端的第一个核苷酸, Z₂₃ 选自 A、U、G 或 C, 并且 Z₂₄ 是与 Z₂₃ 互补的核苷酸。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 为 siKNa1、siKNa2、siKNb1、siKNb2、siKNc1、siKNc2、siKNd1、siKNd2、siKNe1、siKNe2、siKNf1 和 siKNf2。

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

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

16. 如权利要求 15 所述的 siRNA, 其中, 所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II 中, 并且, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述核苷酸序列 I 的至少第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸; 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述核苷酸序列 II 的至少第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

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

18. 如权利要求 15-17 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。

19. 如权利要求 18 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。

20. 如权利要求 15-19 中任意一项所述的 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。

21. 如权利要求 17 所述的 siRNA, 其中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、8、9、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸;

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

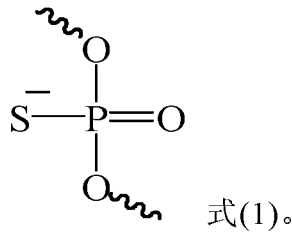
或者, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的正义链中核苷酸序列 I 的第 7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的正义链的其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸, 并且, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述 siRNA 的反义链中核苷酸序列 II 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸, siRNA 的反义链其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸。

22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的 siRNA, 其中, 所述 siRNA 为 siKNa1-M1、siKNa1-M2、siKNa1-M3、siKNa2-M1、siKNa2-M2、siKNa2-M3、siKNb1-M1、siKNb1-M2、siKNb1-M3、siKNb2-M1、siKNb2-M2、siKNb2-M3、siKNc1-M1、siKNc1-M2、siKNc1-M3、siKNc2-M1、siKNc2-M2、siKNc2-M3、siKNd1-M1、siKNd1-M2、siKNd1-M3、siKNd2-M1、siKNd2-M2、siKNd2-M3、siKNe1-M1、siKNe1-M2、siKNe1-M3、siKNe2-M1、siKNe2-M2、siKNe2-M3、siKNf1-M1、siKNf1-M2、siKNf1-M3、siKNf2-M1、siKNf2-M2 和 siKNf2-M3 中的任意一种。

23. 如权利要求 14 所述的 siRNA, 其中, 所述具有修饰基团的磷酸酯基为磷酸酯基的磷酸二酯键中的至少一个氧原子被硫原子取代而形成的硫代磷酸酯

基。

24. 如权利要求 14 或 23 所述的 siRNA，其中，所述具有修饰基团的磷酸酯基为具有如式(1)所示结构的硫代磷酸酯基：



25. 如权利要求 23 或 24 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'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；
- 所述正义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；
- 所述正义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；
- 所述正义链的 3'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；
- 所述反义链的 5'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；
- 所述反义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；
- 所述反义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及
- 所述反义链的 3'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

26. 如权利要求 1-25 中任一项所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 为 siKNa1-M1S、siKNa1-M2S、siKNa1-M3S、siKNa2-M1S、siKNa2-M2S、siKNa2-M3S、siKNb1-M1S、siKNb1-M2S、siKNb1-M3S、siKNb2-M1S、siKNb2-M2S、siKNb2-M3S、siKNc1-M1S、siKNc1-M2S、siKNc1-M3S、siKNc2-M1S、siKNc2-M2S、siKNc2-M3S、siKNd1-M1S、siKNd1-M2S、siKNd1-M3S、siKNd2-M1S、siKNd2-M2S、siKNd2-M3S、siKNe1-M1S、siKNe1-M2S、siKNe1-M3S、siKNe2-M1S、siKNe2-M2S、siKNe2-M3S、siKNf1-M1S、siKNf1-M2S、siKNf1-M3S、siKNf2-M1S、siKNf2-M2S 和 siKNf2-M3S 中的任意一种。

27. 如权利要求 1-26 中任一项所述的 siRNA，其中，所述 siRNA 为 siKNa1-M1P1、siKNa1-M2P1、siKNa1-M3P1、siKNa2-M1P1、siKNa2-M2P1、siKNa2-M3P1、siKNa1-M1SP1、siKNa1-M2SP1、siKNa1-M3SP1、siKNa2-M1SP1、siKNa2-M2SP1、siKNa2-M3SP1、siKNb1-M1P1、siKNb1-M2P1、siKNb1-M3P1、siKNb2-M1P1、siKNb2-M2P1、siKNb2-M3P1、siKNb1-M1SP1、siKNb1-M2SP1、siKNb1-M3SP1、siKNb2-M1SP1、siKNb2-M2SP1、siKNb2-M3SP1、siKNc1-M1P1、siKNc1-M2P1、siKNc1-M3P1、siKNc2-M1P1、siKNc2-M2P1、siKNc2-M3P1、siKNc1-

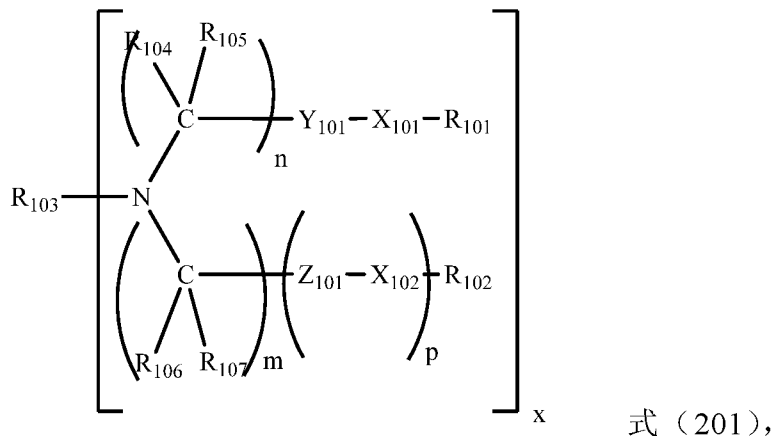
M1SP1、siKNc1-M2SP1、siKNc1-M3SP1、siKNc2-M1SP1、siKNc2-M2SP1、siKNc2-M3SP1、siKNd1-M1P1、siKNd1-M2P1、siKNd1-M3P1、siKNd2-M1P1、siKNd2-M2P1、siKNd2-M3P1、siKNd1-M1SP1、siKNd1-M2SP1、siKNd1-M3SP1、siKNd2-M1SP1、siKNd2-M2SP1、siKNd2-M3SP1、siKNe1-M1P1、siKNe1-M2P1、siKNe1-M3P1、siKNe2-M1P1、siKNe2-M2P1、siKNe2-M3P1、siKNe1-M1SP1、siKNe1-M2SP1、siKNe1-M3SP1、siKNe2-M1SP1、siKNe2-M2SP1、siKNe2-M3SP1、siKNf1-M1P1、siKNf1-M2P1、siKNf1-M3P1、siKNf2-M1P1、siKNf2-M2P1、siKNf2-M3P1、siKNf1-M1SP1、siKNf1-M2SP1、siKNf1-M3SP1、siKNf2-M1SP1、siKNf2-M2SP1 和 siKNf2-M3SP1 中的任意一种。

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

29. 如权利要求 28 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)。

30 如权利要求 29 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)。

31. 如权利要求 28-30 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：



其中：

每个 X₁₀₁ 或 X₁₀₂ 各自独立地是 O、S、N-A 或 C-A，其中 A 是氢或 C1-C20 烃链；

每个 Y₁₀₁ 或 Z₁₀₁ 各自独立地是 C=O、C=S、S=O、CH-OH 或 SO₂；

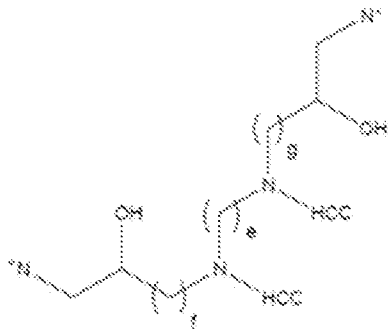
每个 R₁₀₁、R₁₀₂、R₁₀₃、R₁₀₄、R₁₀₅、R₁₀₆ 或 R₁₀₇ 各自独立地是氢，环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链脂族基团，环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链杂脂族基团，被取代的或未被取代的、支链或直链酰基，被取代的或未被取代的、支链或直链芳基，被取代的或未被取代的、

支链或直链杂芳基；

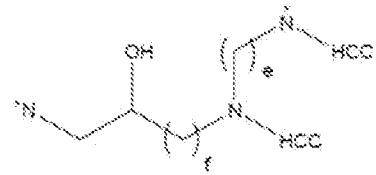
x 是 1-10 的整数；

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 R₁₀₂ 是氢；

并且，如果 n 或 m 中的至少一个是 2，那么 R₁₀₃ 和在式 (201) 中的氮形成如式 (202) 或式 (203) 所示的结构：



式 (202)，

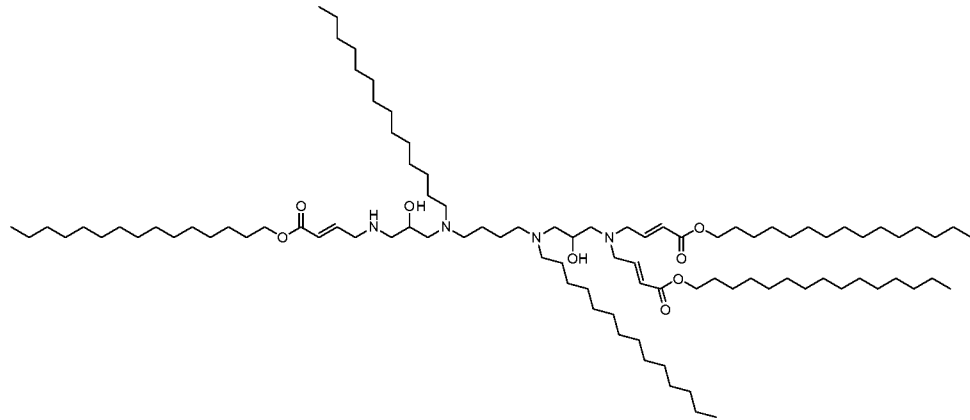


式

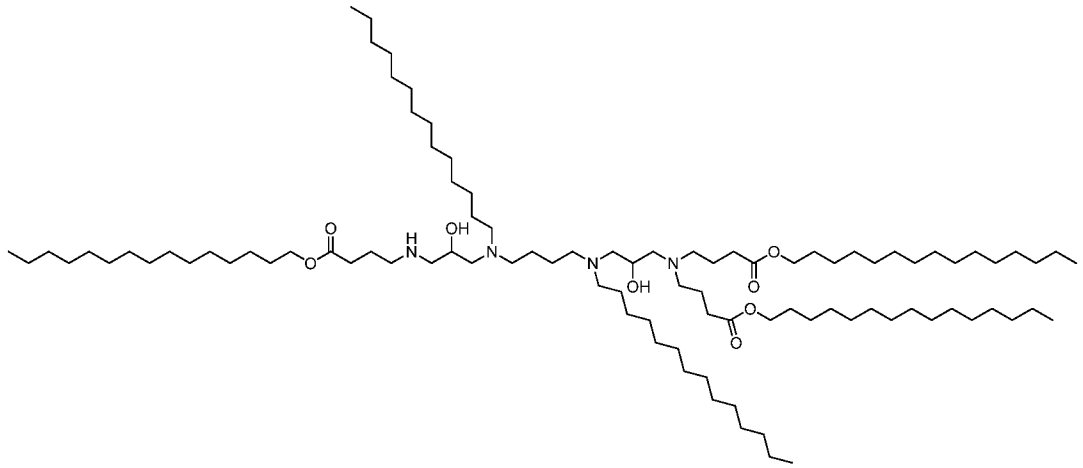
(203)；

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

32. 如权利要求 31 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。

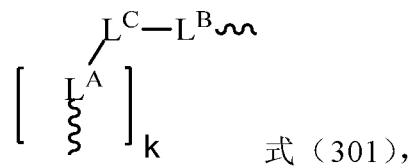
33. 如权利要求 31 或 32 所述的药物组合物, 其中, 所述有机胺、所述辅助脂质和所述聚乙二醇化脂质三者之间的摩尔比为(19.7-80) : (19.7-80) : (0.3-50)。

34. 如权利要求 33 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)。

35. 一种 siRNA 缀合物, 所述 siRNA 缀合物含有权利要求 1-27 中任意一项所述的 siRNA 以及缀合连接至该 siRNA 的缀合基团。

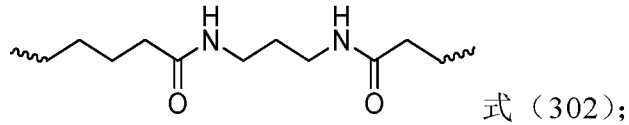
36. 如权利要求 35 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述缀合基团包含药学上可接受的靶向基团和接头, 并且, 所述 siRNA、所述接头和所述靶向基团依次共价或非共价连接。

37. 如权利要求 36 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述接头具有如式(301)所示的结构:

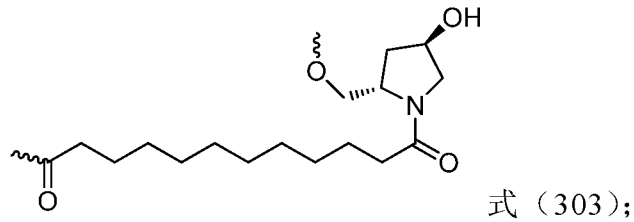


其中, k 为 1-3 的整数;

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:

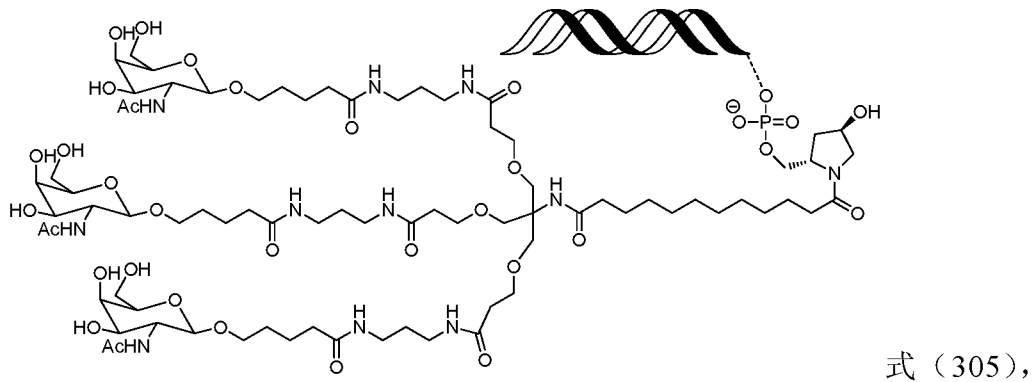


L^B 为具有如式 (303) 所示结构的包含 N-酰基吡咯烷的链状部分, 所述链状部分在其一端具有羰基并与所述 L^C 部分通过酰胺键相连接, 在另一端具有氧原子并与所述 siRNA 通过磷酸酯键相连接:



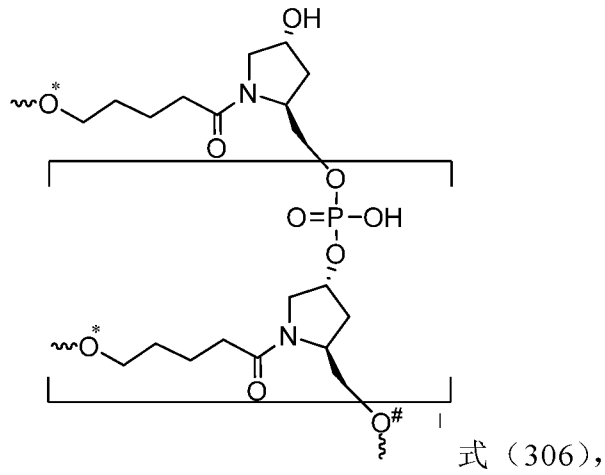
L^C 为基于羟甲基氨基甲烷、二羟甲基氨基甲烷或三羟甲基氨基甲烷的 2-4 价连接基团, 所述 L^C 经由氧原子与各个所述 L^A 部分通过醚键相连接, 并且经由氮原子与所述 L^B 部分通过酰胺键相连接。

38. 如权利要求 35-37 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:



其中, 双螺旋结构表示所述 siRNA。

39. 如权利要求 38 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述接头具有式 (306) 所示的结构:

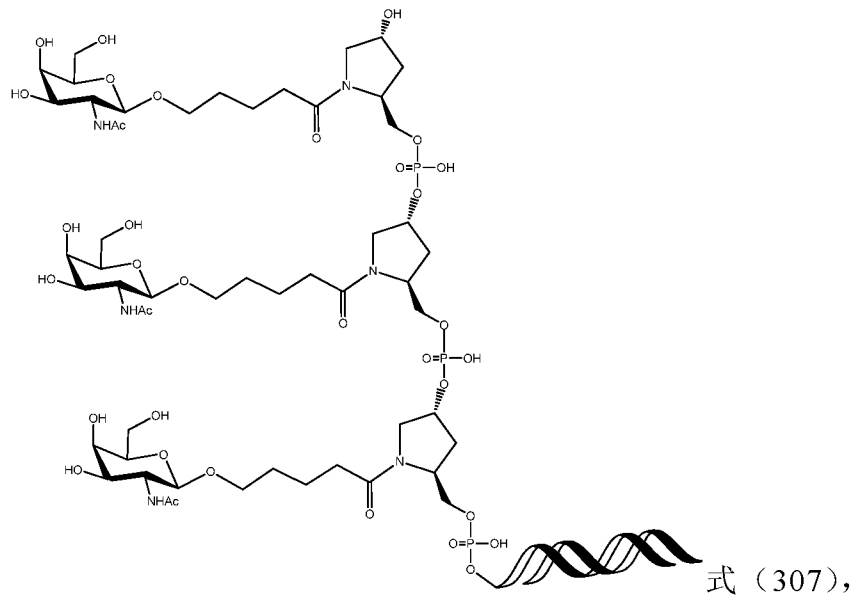


其中, 1 为 0-3 的整数;

*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。

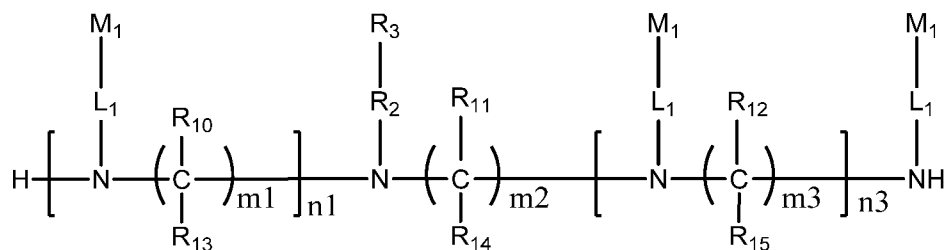
40. 如权利要求 35、36 和 39 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, 所述 siRNA 缀合物具有如式 (307) 所示的结构:



其中, 双螺旋结构表示所述 siRNA。

41. 如权利要求 36-40 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。

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



式 (308),

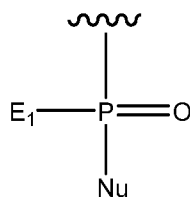
其中,

n_1 为选自 1-3 的整数, n_3 为选自 0-4 的整数;

每个 m_1 、 m_2 或 m_3 各自独立地为选自 2-10 的整数;

R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 或 R_{15} 各自独立地为 H, 或选自于由以下基团所组成的组: C₁-C₁₀ 烷基、C₁-C₁₀ 卤代烷基以及 C₁-C₁₀ 烷氧基;

R_3 为式 A59 所示结构的基团:



(A59)

其中, E_1 为 OH、SH 或 BH₂, Nu 为权利要求 1-26 中任意一项所述的 siRNA;

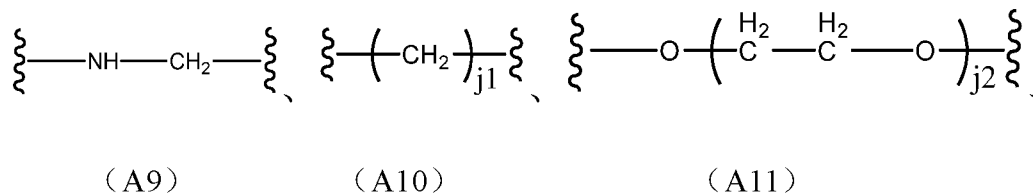
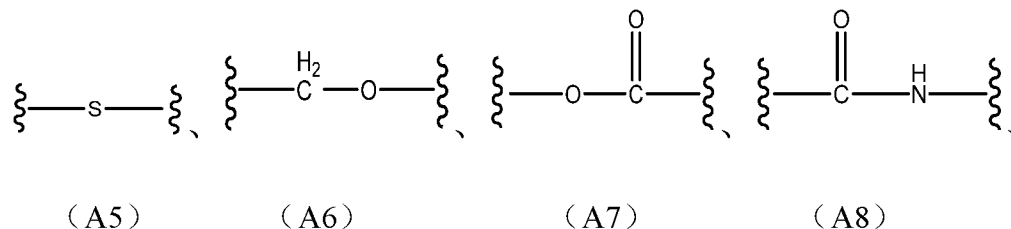
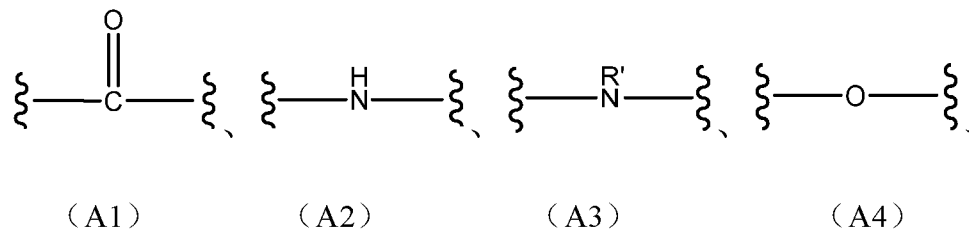
R_2 是长度为 1-20 个碳原子的直链亚烷基, 其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换: C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、C₂-C₁₀ 亚烯基、C₂-C₁₀ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₁₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基; 并且其中 R_2 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基: C₁-C₁₀ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-OH、-OC₁-C₁₀ 卤代烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-SH、-SC₁-C₁₀ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO₂H、-C(O)O(C₁-C₁₀ 烷基)、-CON(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基苯基、-C(O)C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC(O)C₁-C₁₀ 烷基、-SO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基);

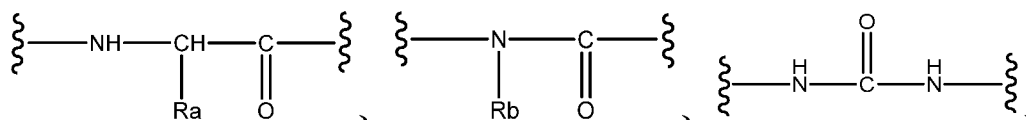
每个 L₁ 独立地是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、C₂-C₁₀ 亚烯基、C₂-C₁₀ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₁₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基；并且其中，L₁ 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C₁-C₁₀ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-OH、-OC₁-C₁₀ 卤代烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-SH、-SC₁-C₁₀ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO₂H、-C(O)O(C₁-C₁₀ 烷基)、-CON(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基苯基、-C(O)C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC(O)C₁-C₁₀ 烷基、-SO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)；

~~~~~表示基团共价连接的位点；

M<sub>1</sub> 表示靶向基团。

43. 如权利要求 42 所述的 siRNA 缀合物，其中，每个 L<sub>1</sub> 独立地选自于由基团 A1-A26 基团及其任意组合所组成的组：

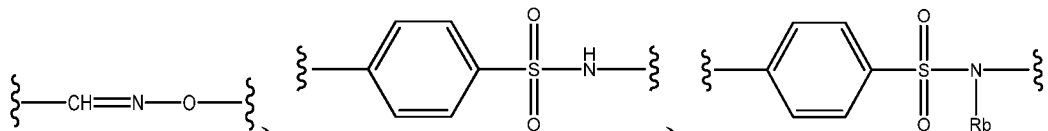




(A12)

(A13)

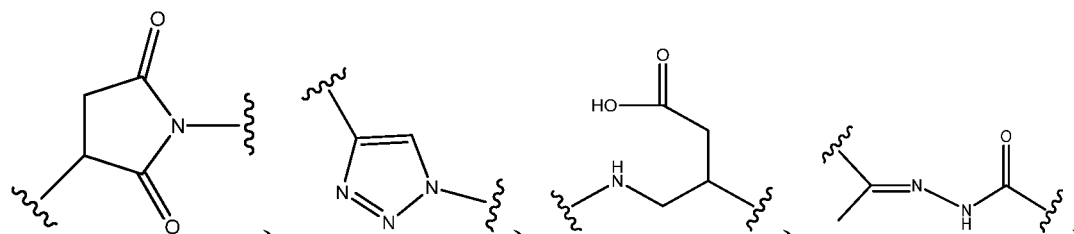
(A14)



(A15)

(A16)

(A17)

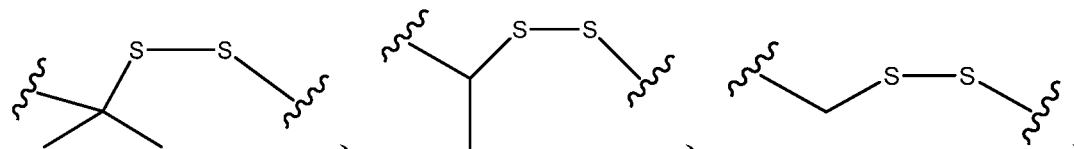


(A18)

(A19)

(A20)

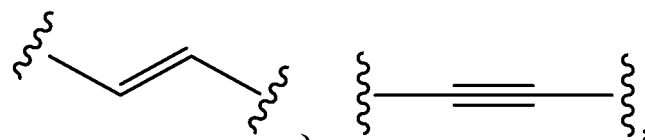
(A21)



(A22)

(A23)

(A24)



(A25)

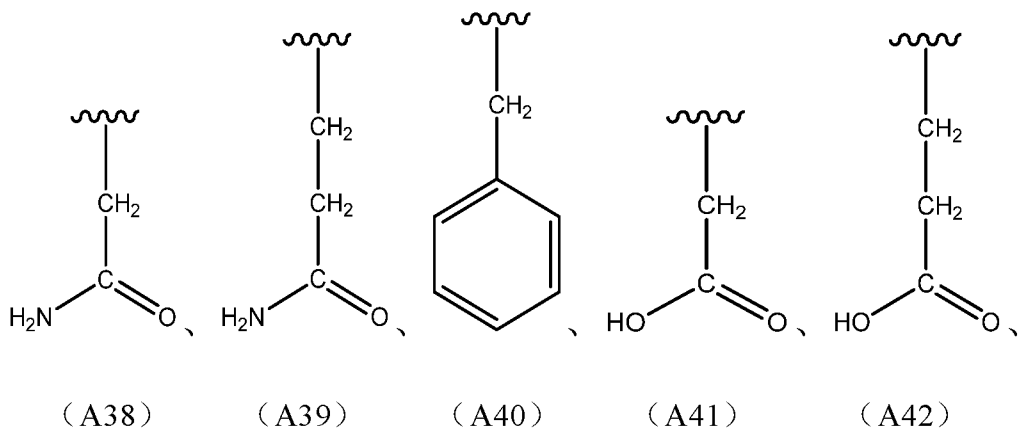
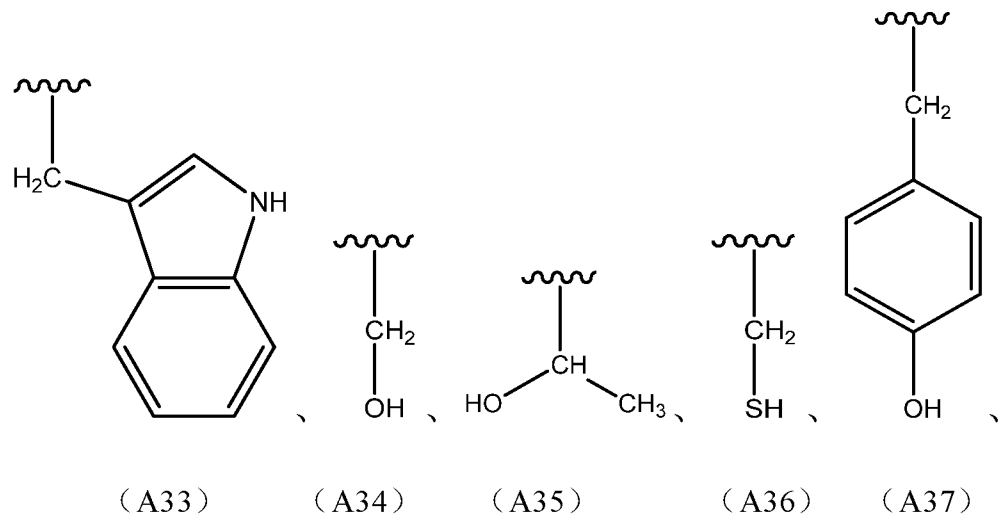
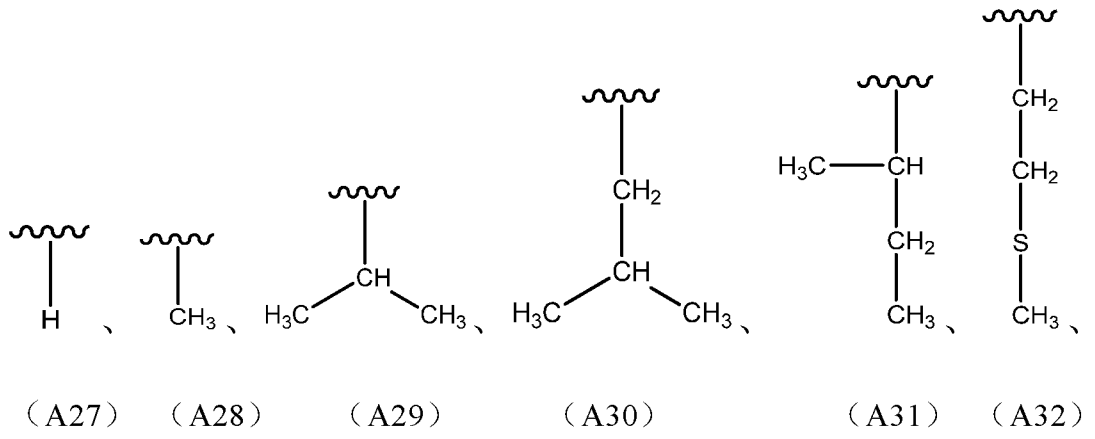
(A26)

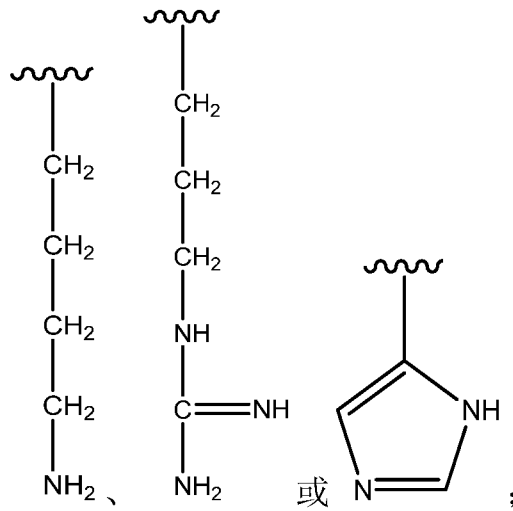
其中，每个  $j_1$  独立地为 1-20 的整数；

每个  $j_2$  独立地为 1-20 的整数；

每个  $R'$  独立地为  $C_1$ - $C_{10}$  烷基；

每个  $R_a$  独立地选自由 A27-A45 基团及其任意组合所组成的组；





(A43) (A44) (A45)

每个 Rb 独立地为 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基；

~~~~~表示基团共价连接的位点。

44. 如权利要求 43 所述的 siRNA 缀合物，其中，L₁ 选自于由基团 A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11、A13 及其连接组合所组成的组。

45. 如权利要求 44 所述的 siRNA 缀合物，其中，L₁ 为基团 A1、A4、A8、A10 和 A11 中至少 2 个的连接组合。

46. 如权利要求 45 所述的 siRNA 缀合物，其中，L₁ 为基团 A1、A8 和 A10 中至少 2 个的连接组合。

47. 如权利要求 42-46 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，L₁ 的长度为 3-25 个原子。

48. 如权利要求 47 所述的 siRNA 缀合物，其中，L₁ 的长度为 4-15 个原子。

49. 如权利要求 43-48 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 C₁-C₄ 烷基，Ra 为 A27、A28、A29、A30 和 A31 中的一种，Rb 为 C₁-C₅ 烷基。

50. 如权利要求 49 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。

51. 如权利要求 42-50 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。

52. 如权利要求 42-51 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，每个 m₁、m₂ 或 m₃ 各自独立地为 2-5 的整数。

53. 如权利要求 42-52 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, $m_1=m_2=m_3$ 。

54. 如权利要求 35-53 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具有亲和力的配体。

55. 如权利要求 54 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。

56. 如权利要求 55 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-呋喃葡萄糖、 β -D-呋喃葡萄糖、 α -D-呋喃葡萄糖、 β -D-呋喃葡萄糖、 α -D-吡喃果糖、 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、葡萄糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-三氟乙酰半乳糖胺、N-丙酰半乳糖胺、N-正丁酰半乳糖胺、N-异丁酰半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧- 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-吡喃葡萄糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖脎、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种。

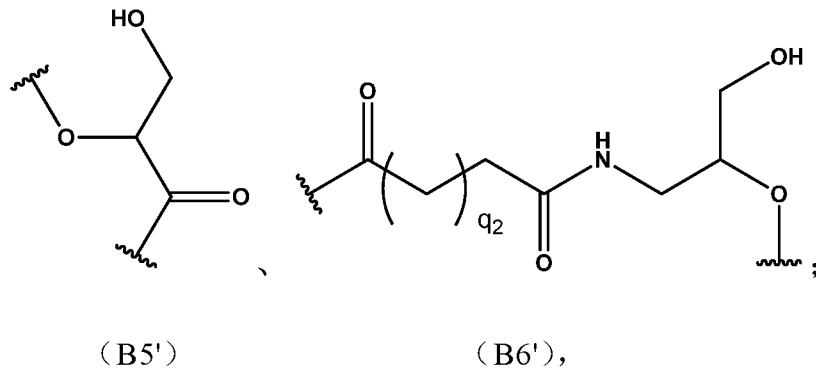
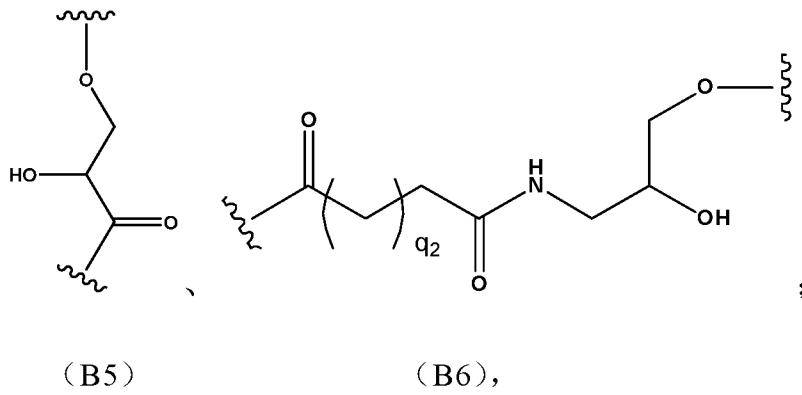
57. 如权利要求 56 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 至少一个或每个所述靶向基团为半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺。

58. 如权利要求 42-57 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 或 R_{15} 独立地为 H、甲基或乙基。

59. 如权利要求 43-58 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 连接的连接位点和与 R_3 中的 P 原子连接的连接位点。

60. 如权利要求 42-59 中任一项所述的 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 上的 P 原子连接的位点与 P 形成磷酸酯键。

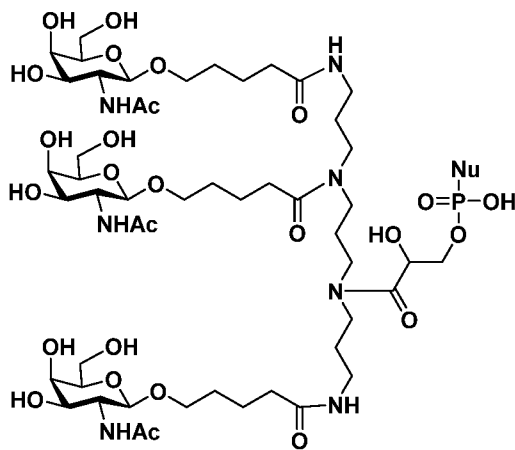
61. 如权利要求 42-60 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, R_2 选自 B5、B6、B5'或 B6'。



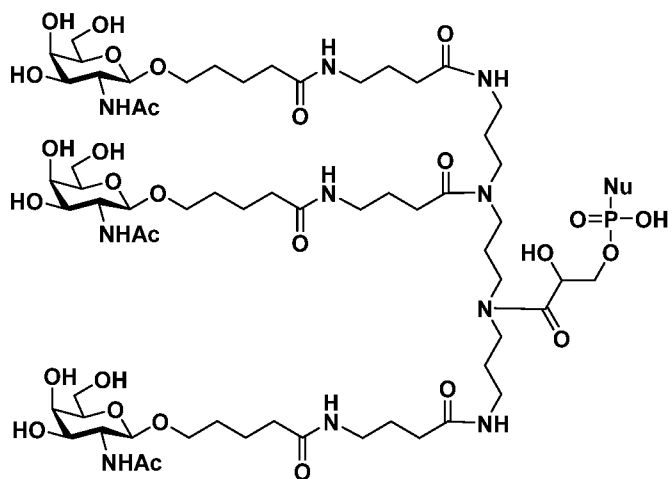
其中，表示基团共价连接的位点， q_2 为 1-10 的整数。

62. 如权利要求 61 所述的 siRNA 缀合物，其中， q_2 为 1-5 的整数。

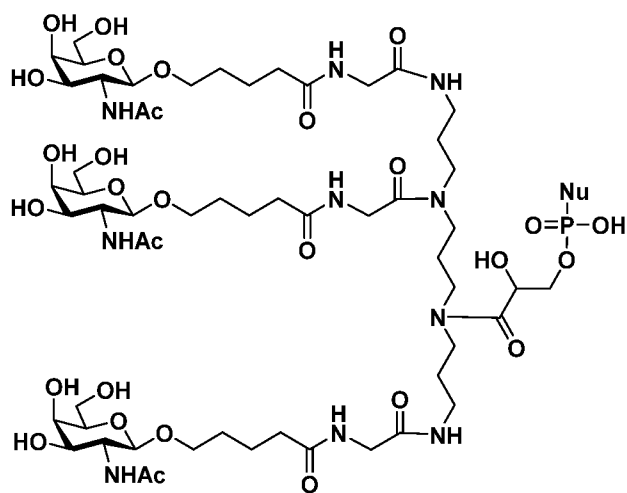
63. 如权利要求 35、42-62 中任一项所述的 siRNA 缀合物，其中，该 siRNA 缀合物具有式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421) 或 (422) 所示的结构：



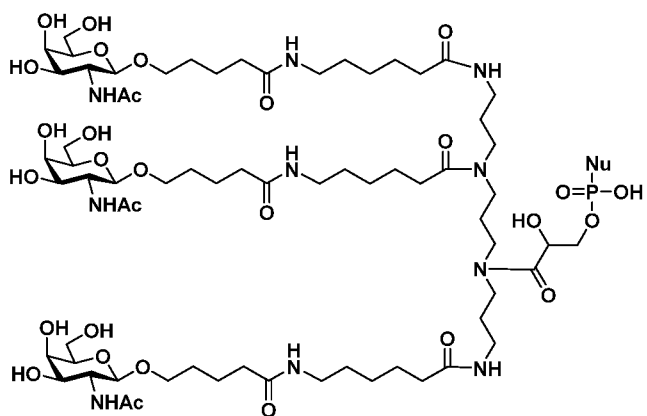
式 (403)



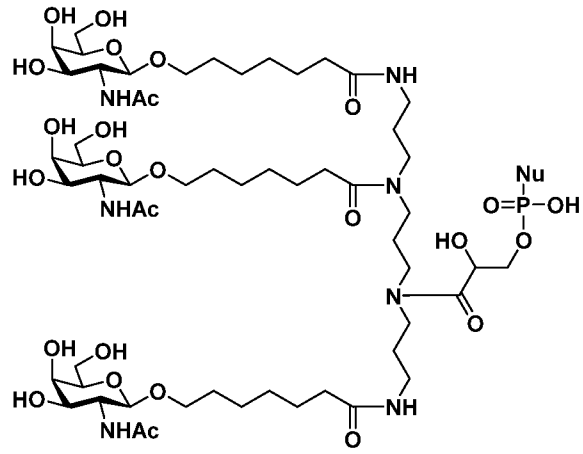
式 (404)



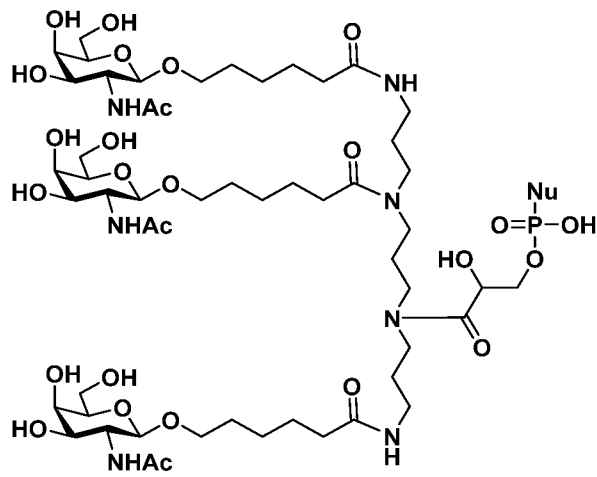
式 (405)



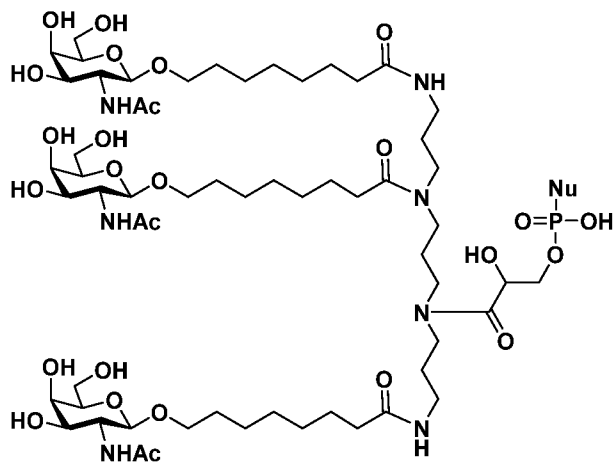
式 (406)



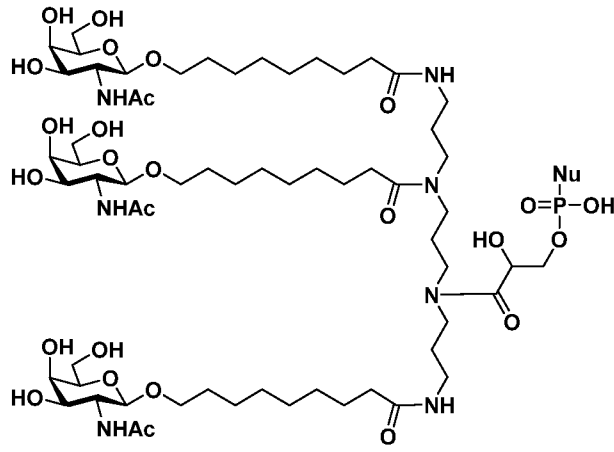
式 (407)



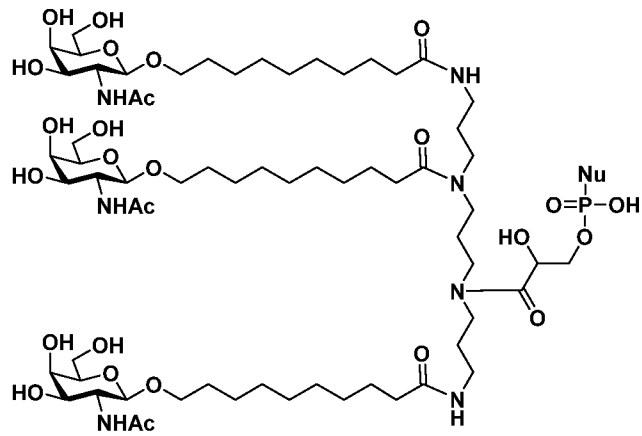
式 (408)



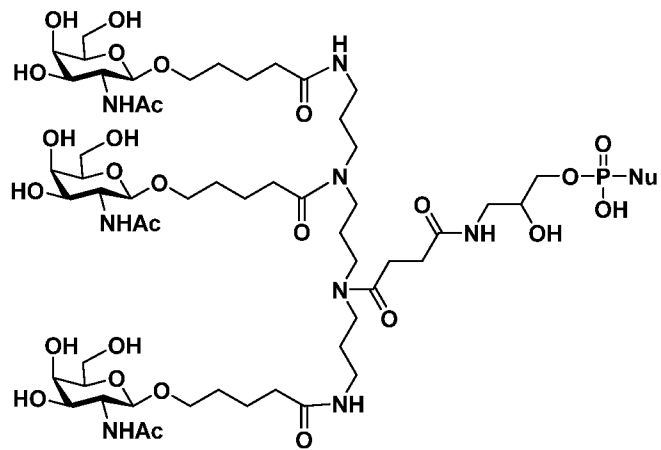
式 (409)



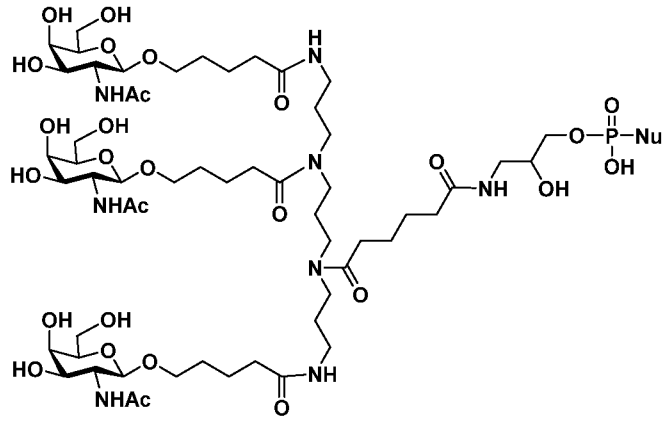
式 (410)



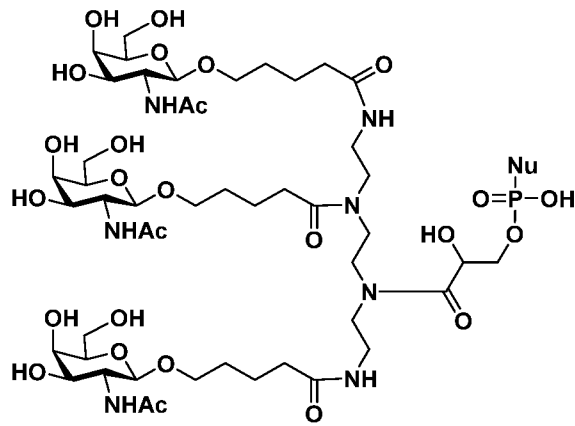
式 (411)



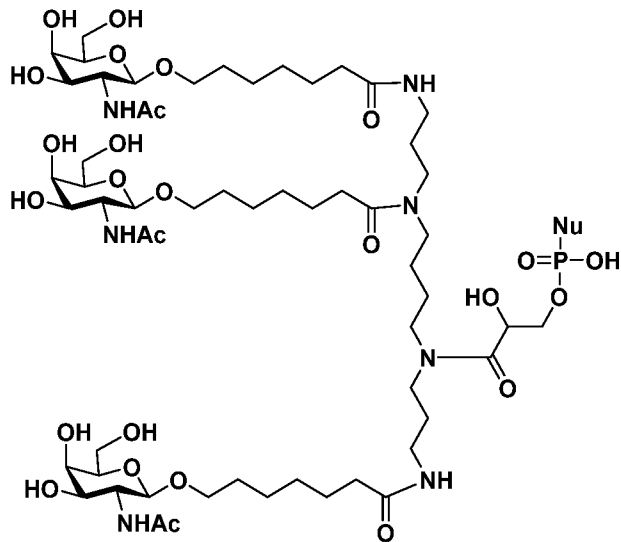
式 (412)



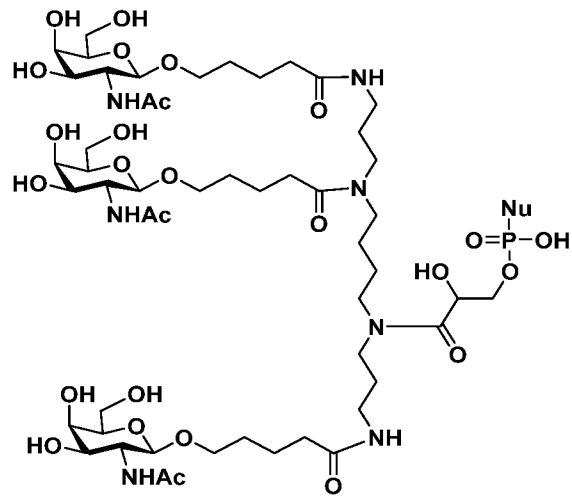
式 (413)



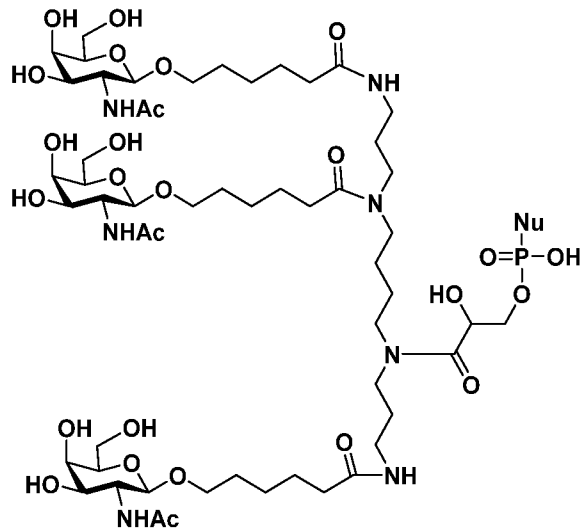
式 (414)



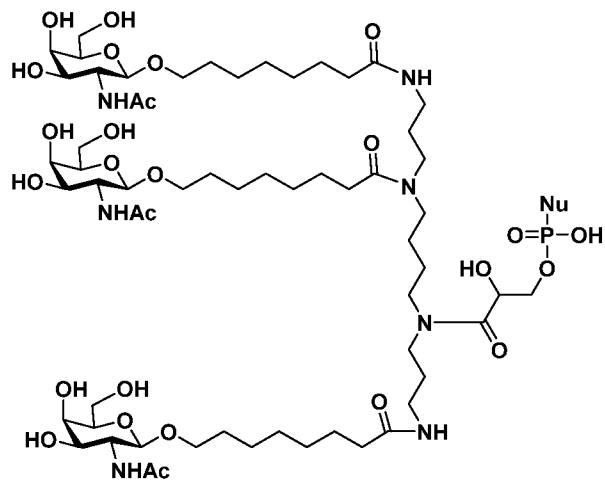
式 (415)



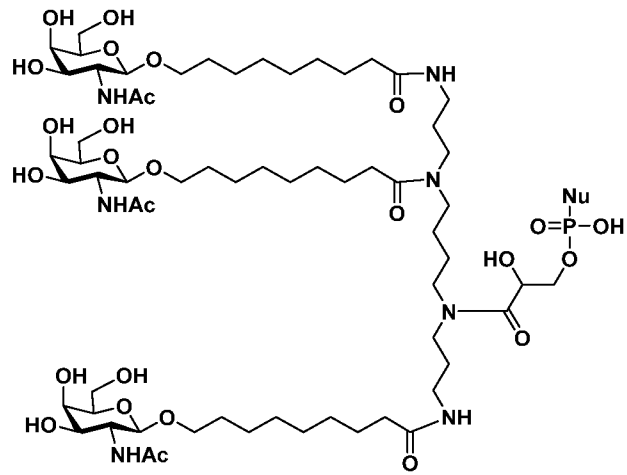
式 (416)



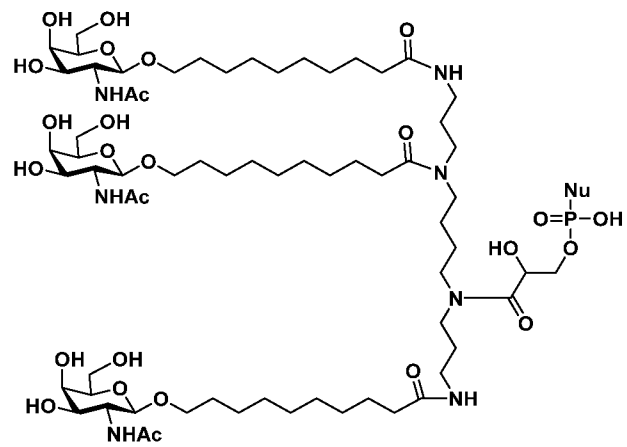
式 (417)



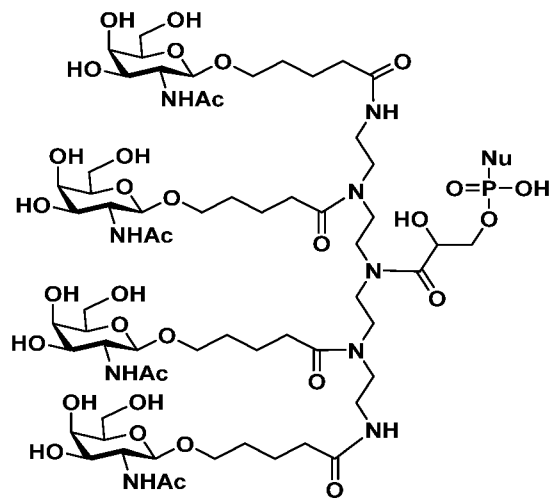
式 (418)



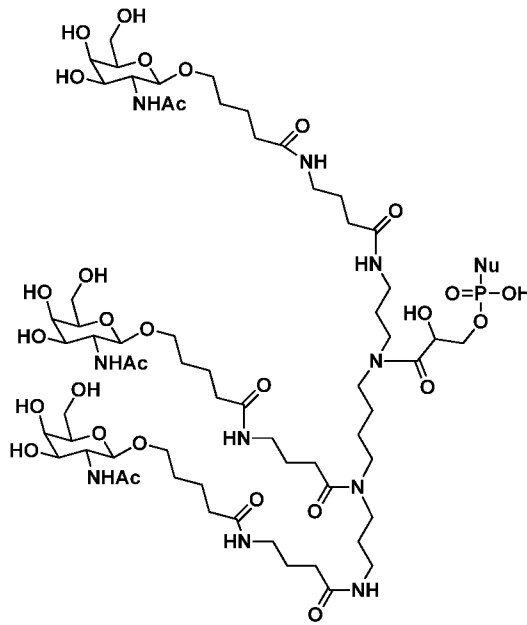
式 (419)



式 (420)



式 (421)



式 (422)。

64. 如权利要求 42-63 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, 式 A59 中的 P 原子连接到 siRNA 正义链或反义链的端部, 所述端部指所述正义链或反义链中从其一端起算的前 4 个核苷酸。

65. 如权利要求 64 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 式 A59 中的 P 原子连接到所述 siRNA 正义链或反义链的末端。

66. 如权利要求 65 所述的 siRNA 缀合物, 其中, 式 A59 中的 P 原子连接到所述 siRNA 正义链的 3' 末端。

67. 如权利要求 42-66 中任一项所述的 siRNA 缀合物, 其中, 式 A59 中的 P 原子通过磷酸二酯键连接至所述 siRNA 中的核苷酸的 2' 位、3' 位或 5' 位。

68. 权利要求 1-27 中任意一项所述的 siRNA、权利要求 28-34 中任意一项所述的药物组合物和/或权利要求 35-67 中任意一项所述的 siRNA 缀合物在制备用于治疗 and/或预防败血症的药物中的用途。

69. 一种治疗和/或预防败血症的方法, 其中, 所述方法包括将有效量的权利要求 1-27 中任意一项所述的 siRNA、权利要求 28-34 中任意一项所述的药物组合物和/或权利要求 35-67 中任意一项所述的 siRNA 缀合物给予患有败血症的受试者。

70. 一种抑制 KNG 基因表达的方法, 该方法包括将有效量的权利要求 1-27 中任意一项所述的 siRNA、权利要求 28-34 中任意一项所述的药物组合物和/或权利要求 35-67 中任意一项所述的 siRNA 缀合物与所述肝细胞接触。

71. 一种试剂盒,其中,该试剂盒含有权利要求 1-27 任意一项所述的 siRNA、权利要求 28-34 中任意一项所述的药物组合物和/或权利要求 35-67 中任意一项所述的 siRNA 缀合物。

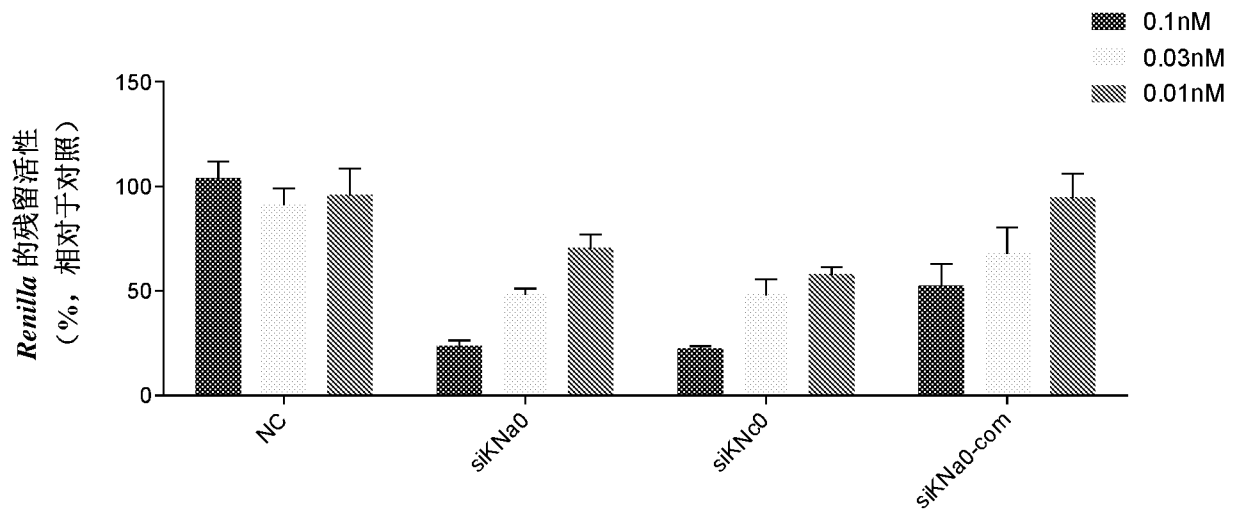


图 1

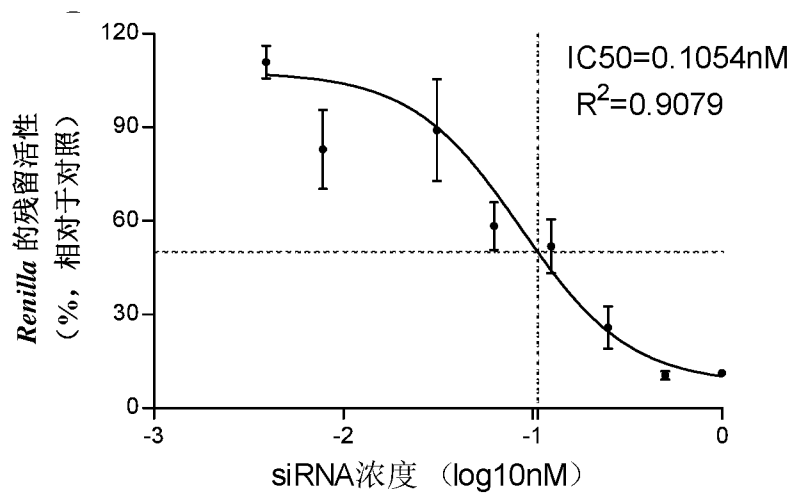


图 2A

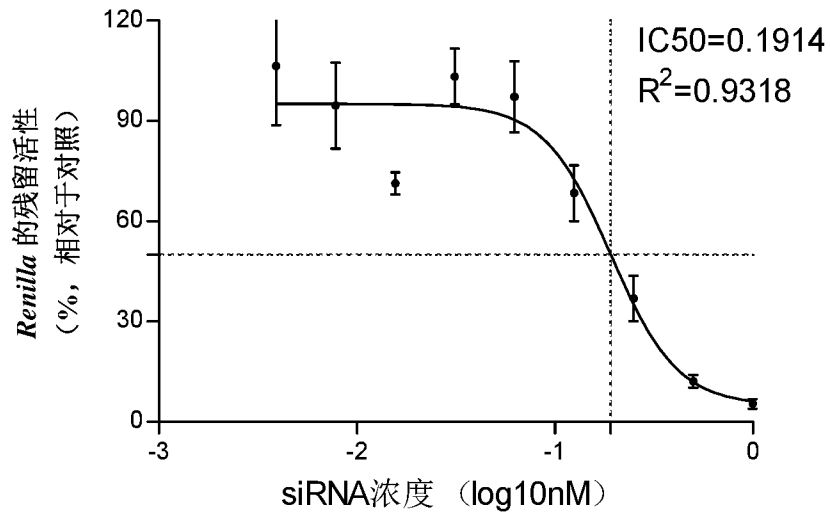


图 2B

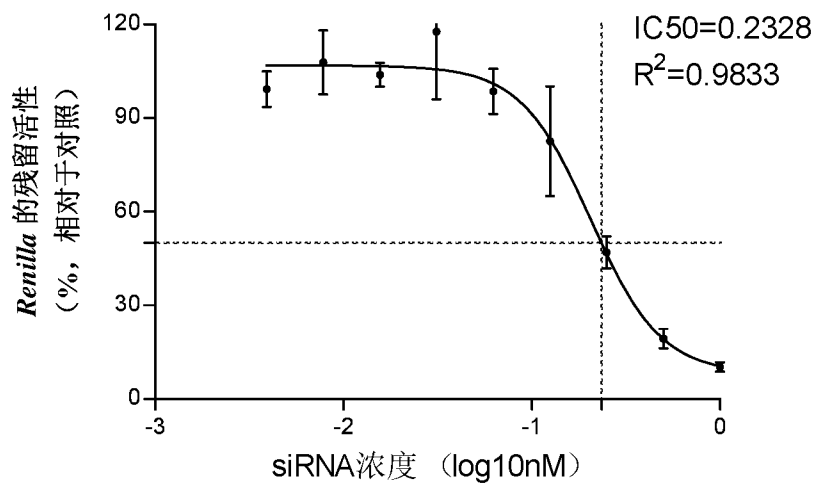


图 2C

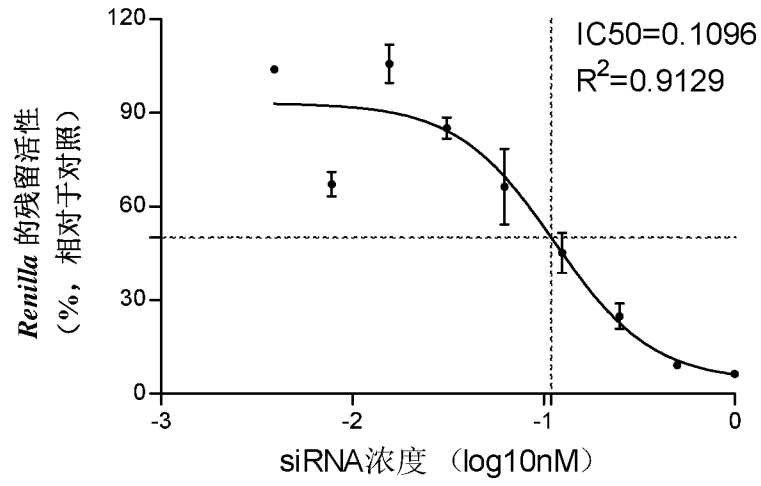


图 2D

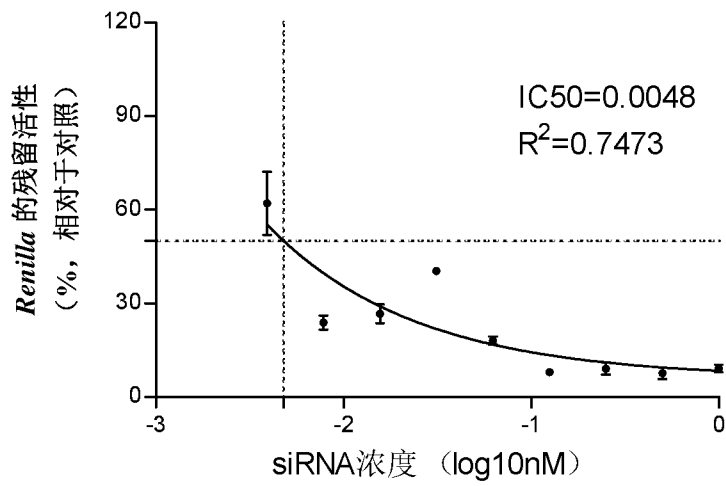


图 2E

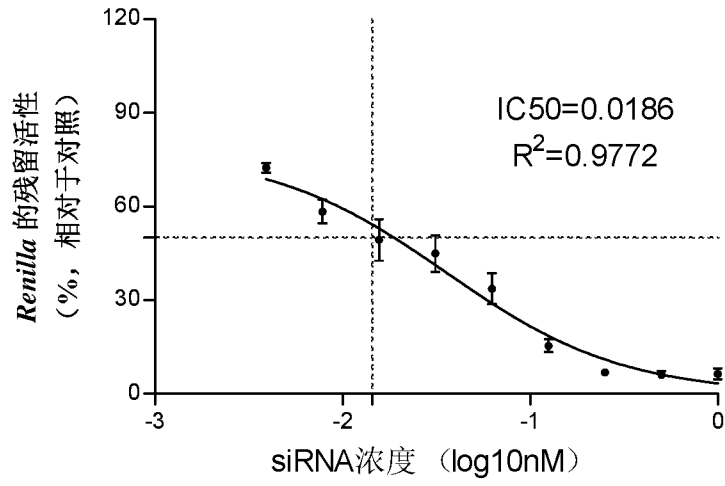


图 2F

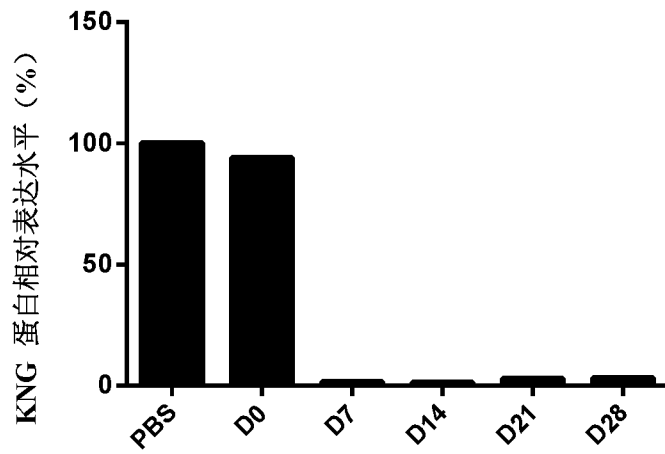


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/091614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; C07H 15/04(2006.01)i; A61K 31/713(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; C07H

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)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, 万方, WANFANG, PubMed, ISI web of knowledge: SIRNA, RNAI, IRNA, INTERFER+, KNG, KININOGEN, 激肽原, 缀合, 偶联, conjugat+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | CN 108271386 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.) 10 July 2018 (2018-07-10)
claims 1-96, and description, table 15 | 1-71 |
| Y | SENNBLAD, B. et al. "Homo Sapiens Kininogen 1 (KNG1), Transcript Variant 1, mRNA"
<i>GenBank</i> , 02 May 2018 (2018-05-02),
NM_001102416.2 | 1-71 |
| Y | CN 103380113 A (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 30 October 2013 (2013-10-30)
claims 1-46 | 28-34, 68-71 |
| Y | WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 15 January 2015
(2015-01-15)
claims 1-14, and description, schemes 7 and 23 and embodiments 14 and 17 | 35-41, 68-71 |
| Y | CN 108220293 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 29 June 2018 (2018-06-29)
claims 1-13 | 28-34, 68-71 |
| Y | CN 108064294 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 22 May 2018 (2018-05-22)
claims 1-220 | 35-41, 68-71 |
| PY | CN 110959011 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 03 April 2020 (2020-04-03)
claims 1-114 | 42-71 |

 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

03 August 2020

Date of mailing of the international search report

21 August 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/091614

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/091614

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.: **69**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Since claim 69 relates to a method of treatment of the living human or animal body, in the report, a search is made on the basis of the pharmaceutical use of the compound of claim 69.
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/CN2020/091614

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) | | |
|--|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------|------------------|
| CN 108271386 A | 10 July 2018 | CA 2984636 A1 | 10 November 2016 | | |
| | | US 2020131513 A1 | 30 April 2020 | | |
| | | BR 112017021967 A2 | 31 July 2018 | | |
| | | EP 3292201 A2 | 14 March 2018 | | |
| | | EA 201792444 A1 | 29 June 2018 | | |
| | | WO 2016179342 A9 | 08 December 2016 | | |
| | | JP 6695902 B2 | 20 May 2020 | | |
| | | AU 2016257996 A1 | 26 October 2017 | | |
| | | UY 36671 A | 30 December 2016 | | |
| | | TW 201704472 A | 01 February 2017 | | |
| | | JP 2018519797 A | 26 July 2018 | | |
| | | US 2018100150 A1 | 12 April 2018 | | |
| | | WO 2016179342 A2 | 10 November 2016 | | |
| | | WO 2016179342 A3 | 12 January 2017 | | |
| | | KR 20180002688 A | 08 January 2018 | | |
| | | CN 103380113 A | 30 October 2013 | CN 108358812 A | 03 August 2018 |
| | | | | US 9901642 B2 | 27 February 2018 |
| US 2018200374 A1 | 19 July 2018 | | | | |
| JP 2018080187 A | 24 May 2018 | | | | |
| JP 6383480 B2 | 29 August 2018 | | | | |
| JP 2017031186 A | 09 February 2017 | | | | |
| WO 2012068176 A1 | 24 May 2012 | | | | |
| EP 2640700 A1 | 25 September 2013 | | | | |
| JP 2014508102 A | 03 April 2014 | | | | |
| US 2012136073 A1 | 31 May 2012 | | | | |
| EP 3470395 A1 | 17 April 2019 | | | | |
| US 2020061197 A1 | 27 February 2020 | | | | |
| CN 103380113 B | 30 March 2018 | | | | |
| ES 2702428 T3 | 28 February 2019 | | | | |
| JP 2018197255 A | 13 December 2018 | | | | |
| US 2015174260 A1 | 25 June 2015 | | | | |
| DK 2640700 T3 | 14 January 2019 | | | | |
| EP 2640700 B1 | 31 October 2018 | | | | |
| US 10406237 B2 | 10 September 2019 | | | | |
| WO 2015006740 A2 | 15 January 2015 | US 2016376585 A1 | 29 December 2016 | | |
| | | EP 3019200 A2 | 18 May 2016 | | |
| | | AU 2014287002 A1 | 11 February 2016 | | |
| | | JP 6702862 B2 | 03 June 2020 | | |
| | | CA 2917161 A1 | 15 January 2015 | | |
| | | JP 2016529230 A | 23 September 2016 | | |
| | | WO 2015006740 A3 | 07 May 2015 | | |
| | | AU 2020202093 A1 | 09 April 2020 | | |
| CN 108220293 A | 29 June 2018 | None | | | |
| CN 108064294 A | 22 May 2018 | HR P20192177 T1 | 21 February 2020 | | |
| | | EP 3218489 A1 | 20 September 2017 | | |
| | | US 2017349901 A1 | 07 December 2017 | | |
| | | EA 201791014 A1 | 31 October 2017 | | |
| | | SG 11201703569 X A | 30 May 2017 | | |
| | | CA 2967408 A1 | 19 May 2016 | | |
| | | PL 3218489 T3 | 18 May 2020 | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/091614

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| | | EP 3218487 A1 | 20 September 2017 |
| | | KR 20170077251 A | 05 July 2017 |
| | | ES 2761912 T3 | 21 May 2020 |
| | | TW 201628659 A | 16 August 2016 |
| | | US 10513703 B2 | 24 December 2019 |
| | | AU 2015346513 A1 | 08 June 2017 |
| | | EP 3647424 A1 | 06 May 2020 |
| | | JP 2017538679 A | 28 December 2017 |
| | | EP 3218489 B1 | 09 October 2019 |
| | | AU 2015346566 A1 | 08 June 2017 |
| | | WO 2016077349 A1 | 19 May 2016 |
| | | MX 2017005958 A | 15 September 2017 |
| | | KR 20170077250 A | 05 July 2017 |
| | | TW 201631156 A | 01 September 2016 |
| | | JP 2017534290 A | 24 November 2017 |
| | | BR 112017008868 A2 | 16 January 2018 |
| | | WO 2016077321 A1 | 19 May 2016 |
| | | PT 3218489 T | 18 December 2019 |
| | | HU E047535 T2 | 28 April 2020 |
| | | SI 3218489 T1 | 31 January 2020 |
| | | DK 3218489 T3 | 16 December 2019 |
| | | SG 11201703638 X A | 29 June 2017 |
| | | US 2017349900 A1 | 07 December 2017 |
| | | CN 108064293 A | 22 May 2018 |
| | | US 10640770 B2 | 05 May 2020 |
| | | US 2020140864 A1 | 07 May 2020 |
| CN 110959011 A | 03 April 2020 | WO 2019128611 A1 | 04 July 2019 |
| | | AU 2018394875 A1 | 09 April 2020 |
| | | TW 201929905 A | 01 August 2019 |

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/091614

| <p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/113(2010.01)i; C07H 15/04(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--------------|-----|-------------------|---------|---|--|------|---|--|------|---|--|--------------|---|---|--------------|---|---|--------------|---|---|--------------|----|---|-------|--|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| <p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; A61K; C07H</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, 万方, PubMed, ISI web of knowledge: SIRNA, RNAI, IRNA, INTERFER+, KNG, KININOGEN, 激肽原, 缀合, 偶联, conjugat+</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108271386 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10)
权利要求1-96, 说明书表15</td> <td>1-71</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SENNBLAD, B.等. "Homo sapiens kininogen 1 (KNG1), transcript variant 1, mRNA"
GenBank, 2018年 5月 2日 (2018 - 05 - 02),
NM_001102416.2</td> <td>1-71</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103380113 A (生命科技公司) 2013年 10月 30日 (2013 - 10 - 30)
权利要求1-46</td> <td>28-34, 68-71</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)
权利要求1-14, 说明书scheme7和23, 实施例14和17</td> <td>35-41, 68-71</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108220293 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29)
权利要求1-13</td> <td>28-34, 68-71</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108064294 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2018年 5月 22日 (2018 - 05 - 22)
权利要求1-220</td> <td>35-41, 68-71</td> </tr> <tr> <td>PY</td> <td>CN 110959011 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2020年 4月 3日 (2020 - 04 - 03)
权利要求1-114</td> <td>42-71</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="1"> <tr> <td> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> </td> <td> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p> </td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <td> <p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 8月 3日</p> </td> <td> <p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 8月 21日</p> </td> </tr> <tr> <td> <p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p> </td> <td> <p>授权官员</p> <p>王慧</p> <p>电话号码 86-(10)-53962103</p> </td> </tr> </table> | | | 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | Y | CN 108271386 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10)
权利要求1-96, 说明书表15 | 1-71 | Y | SENNBLAD, B.等. "Homo sapiens kininogen 1 (KNG1), transcript variant 1, mRNA"
GenBank, 2018年 5月 2日 (2018 - 05 - 02),
NM_001102416.2 | 1-71 | Y | CN 103380113 A (生命科技公司) 2013年 10月 30日 (2013 - 10 - 30)
权利要求1-46 | 28-34, 68-71 | Y | WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)
权利要求1-14, 说明书scheme7和23, 实施例14和17 | 35-41, 68-71 | Y | CN 108220293 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29)
权利要求1-13 | 28-34, 68-71 | Y | CN 108064294 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2018年 5月 22日 (2018 - 05 - 22)
权利要求1-220 | 35-41, 68-71 | PY | CN 110959011 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2020年 4月 3日 (2020 - 04 - 03)
权利要求1-114 | 42-71 | <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> | <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p> | <p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 8月 3日</p> | <p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 8月 21日</p> | <p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p> | <p>授权官员</p> <p>王慧</p> <p>电话号码 86-(10)-53962103</p> |
| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | CN 108271386 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2018年 7月 10日 (2018 - 07 - 10)
权利要求1-96, 说明书表15 | 1-71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | SENNBLAD, B.等. "Homo sapiens kininogen 1 (KNG1), transcript variant 1, mRNA"
GenBank, 2018年 5月 2日 (2018 - 05 - 02),
NM_001102416.2 | 1-71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | CN 103380113 A (生命科技公司) 2013年 10月 30日 (2013 - 10 - 30)
权利要求1-46 | 28-34, 68-71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | WO 2015006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15)
权利要求1-14, 说明书scheme7和23, 实施例14和17 | 35-41, 68-71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | CN 108220293 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29)
权利要求1-13 | 28-34, 68-71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | CN 108064294 A (阿尔尼拉姆医药有限公司) 2018年 5月 22日 (2018 - 05 - 22)
权利要求1-220 | 35-41, 68-71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PY | CN 110959011 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2020年 4月 3日 (2020 - 04 - 03)
权利要求1-114 | 42-71 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> | <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 8月 3日</p> | <p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 8月 21日</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p> | <p>授权官员</p> <p>王慧</p> <p>电话号码 86-(10)-53962103</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

- a. 作为国际申请的一部分提交的:
 附件C/ST. 25文本文件形式
 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

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： 69
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 由于权利要求69包括了对有生命的人体或动物体实施的治疗方法，本报告基于权利要求69的化合物的制药用途进行检索。
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/CN2020/091614

| 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 | 108271386 | A | 2018年 7月 10日 | CA | 2984636 | A1 | 2016年 11月 10日 | | | | |
| | | | | US | 2020131513 | A1 | 2020年 4月 30日 | | | | |
| | | | | BR | 112017021967 | A2 | 2018年 7月 31日 | | | | |
| | | | | EP | 3292201 | A2 | 2018年 3月 14日 | | | | |
| | | | | EA | 201792444 | A1 | 2018年 6月 29日 | | | | |
| | | | | WO | 2016179342 | A9 | 2016年 12月 8日 | | | | |
| | | | | JP | 6695902 | B2 | 2020年 5月 20日 | | | | |
| | | | | AU | 2016257996 | A1 | 2017年 10月 26日 | | | | |
| | | | | UY | 36671 | A | 2016年 12月 30日 | | | | |
| | | | | TW | 201704472 | A | 2017年 2月 1日 | | | | |
| | | | | JP | 2018519797 | A | 2018年 7月 26日 | | | | |
| | | | | US | 2018100150 | A1 | 2018年 4月 12日 | | | | |
| | | | | WO | 2016179342 | A2 | 2016年 11月 10日 | | | | |
| | | | | WO | 2016179342 | A3 | 2017年 1月 12日 | | | | |
| | | | | KR | 20180002688 | A | 2018年 1月 8日 | | | | |
| | | | | CN | 103380113 | A | 2013年 10月 30日 | CN | 108358812 | A | 2018年 8月 3日 |
| | | | | | | | | US | 9901642 | B2 | 2018年 2月 27日 |
| US | 2018200374 | A1 | 2018年 7月 19日 | | | | | | | | |
| JP | 2018080187 | A | 2018年 5月 24日 | | | | | | | | |
| JP | 6383480 | B2 | 2018年 8月 29日 | | | | | | | | |
| JP | 2017031186 | A | 2017年 2月 9日 | | | | | | | | |
| WO | 2012068176 | A1 | 2012年 5月 24日 | | | | | | | | |
| EP | 2640700 | A1 | 2013年 9月 25日 | | | | | | | | |
| JP | 2014508102 | A | 2014年 4月 3日 | | | | | | | | |
| US | 2012136073 | A1 | 2012年 5月 31日 | | | | | | | | |
| EP | 3470395 | A1 | 2019年 4月 17日 | | | | | | | | |
| US | 2020061197 | A1 | 2020年 2月 27日 | | | | | | | | |
| CN | 103380113 | B | 2018年 3月 30日 | | | | | | | | |
| ES | 2702428 | T3 | 2019年 2月 28日 | | | | | | | | |
| JP | 2018197255 | A | 2018年 12月 13日 | | | | | | | | |
| US | 2015174260 | A1 | 2015年 6月 25日 | | | | | | | | |
| DK | 2640700 | T3 | 2019年 1月 14日 | | | | | | | | |
| EP | 2640700 | B1 | 2018年 10月 31日 | | | | | | | | |
| US | 10406237 | B2 | 2019年 9月 10日 | | | | | | | | |
| WO | 2015006740 | A2 | 2015年 1月 15日 | US | 2016376585 | A1 | 2016年 12月 29日 | | | | |
| | | | | EP | 3019200 | A2 | 2016年 5月 18日 | | | | |
| | | | | AU | 2014287002 | A1 | 2016年 2月 11日 | | | | |
| | | | | JP | 6702862 | B2 | 2020年 6月 3日 | | | | |
| | | | | CA | 2917161 | A1 | 2015年 1月 15日 | | | | |
| | | | | JP | 2016529230 | A | 2016年 9月 23日 | | | | |
| | | | | WO | 2015006740 | A3 | 2015年 5月 7日 | | | | |
| | | | | AU | 2020202093 | A1 | 2020年 4月 9日 | | | | |
| CN | 108220293 | A | 2018年 6月 29日 | 无 | | | | | | | |
| CN | 108064294 | A | 2018年 5月 22日 | HR | P20192177 | T1 | 2020年 2月 21日 | | | | |
| | | | | EP | 3218489 | A1 | 2017年 9月 20日 | | | | |
| | | | | US | 2017349901 | A1 | 2017年 12月 7日 | | | | |
| | | | | EA | 201791014 | A1 | 2017年 10月 31日 | | | | |
| | | | | SG | 11201703569X | A | 2017年 5月 30日 | | | | |
| | | | | CA | 2967408 | A1 | 2016年 5月 19日 | | | | |

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/091614

| 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) |
|----------------|----------------|--------------------|----------------|
| | | PL 3218489 T3 | 2020年 5月 18日 |
| | | EP 3218487 A1 | 2017年 9月 20日 |
| | | KR 20170077251 A | 2017年 7月 5日 |
| | | ES 2761912 T3 | 2020年 5月 21日 |
| | | TW 201628659 A | 2016年 8月 16日 |
| | | US 10513703 B2 | 2019年 12月 24日 |
| | | AU 2015346513 A1 | 2017年 6月 8日 |
| | | EP 3647424 A1 | 2020年 5月 6日 |
| | | JP 2017538679 A | 2017年 12月 28日 |
| | | EP 3218489 B1 | 2019年 10月 9日 |
| | | AU 2015346566 A1 | 2017年 6月 8日 |
| | | WO 2016077349 A1 | 2016年 5月 19日 |
| | | MX 2017005958 A | 2017年 9月 15日 |
| | | KR 20170077250 A | 2017年 7月 5日 |
| | | TW 201631156 A | 2016年 9月 1日 |
| | | JP 2017534290 A | 2017年 11月 24日 |
| | | BR 112017008868 A2 | 2018年 1月 16日 |
| | | WO 2016077321 A1 | 2016年 5月 19日 |
| | | PT 3218489 T | 2019年 12月 18日 |
| | | HU E047535 T2 | 2020年 4月 28日 |
| | | SI 3218489 T1 | 2020年 1月 31日 |
| | | DK 3218489 T3 | 2019年 12月 16日 |
| | | SG 11201703638X A | 2017年 6月 29日 |
| | | US 2017349900 A1 | 2017年 12月 7日 |
| | | CN 108064293 A | 2018年 5月 22日 |
| | | US 10640770 B2 | 2020年 5月 5日 |
| | | US 2020140864 A1 | 2020年 5月 7日 |
| CN 110959011 A | 2020年 4月 3日 | WO 2019128611 A1 | 2019年 7月 4日 |
| | | AU 2018394875 A1 | 2020年 4月 9日 |
| | | TW 201929905 A | 2019年 8月 1日 |