



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I856002 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：107142921 (22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 30 日

(51)Int. Cl. : C12N15/113 (2010.01) A61K31/713 (2006.01)
A61K47/60 (2017.01) A61P31/20 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/01 中國大陸 201711249378.5
2017/12/29 中國大陸 201711478933.1

(71)申請人：大陸商蘇州瑞博生物技術股份有限公司 (中國大陸) SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：張 鴻雁 ZHANG, HONGYAN (SE) ； 高山 GAO, SHAN (CN) ； 康 代武 KANG, DAIWU (SE)

(74)代理人：楊長峯

(56)參考文獻：
US 2003/0206887A1 WO 2004/078181A1

審查人員：官速貞

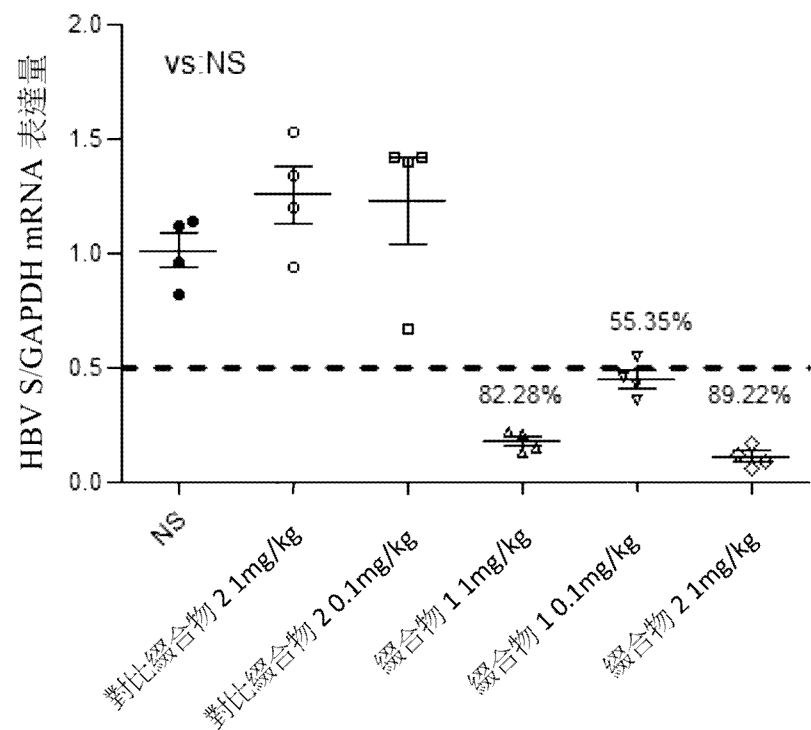
申請專利範圍項數：26 項 圖式數：11 共 185 頁

(54)名稱
核酸、含有該核酸的藥物組合物與綴合物及其用途與試劑盒

(57)摘要

本發明提供了一種抑制 B 型肝炎病毒基因表達的 siRNA，含有該 siRNA 的藥物組合物和綴合物。所述 siRNA 中的每個核苷酸各自獨立地為修飾或未修飾的核苷酸，該 siRNA 含有正義鏈和反義鏈，所述正義鏈含有核苷酸序列 A，所述核苷酸序列 A 與 SEQ ID NO：1 所示的核苷酸序列長度相等，且不多於 3 個核苷酸差異，所述反義鏈含有核苷酸序列 B，所述核苷酸序列 B 與 SEQ ID NO：2 所示的核苷酸序列長度相等，且不多於 3 個核苷酸差異。本發明提供的 siRNA 及其藥物組合物和綴合物具有良好的抑制 HBV 基因的表達的活性。

指定代表圖：



第 8 圖



I856002

【發明摘要】

【中文發明名稱】核酸、含有該核酸的藥物組合物與綴合物及其用途與試劑盒

【中文】

本發明提供了一種抑制 B 型肝炎病毒基因表達的 siRNA，含有該 siRNA 的藥物組合物和綴合物。所述 siRNA 中的每個核苷酸各自獨立地為修飾或未修飾的核苷酸，該 siRNA 含有正義鏈和反義鏈，所述正義鏈含有核苷酸序列 A，所述核苷酸序列 A 與 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列長度相等，且不多於 3 個核苷酸差異，所述反義鏈含有核苷酸序列 B，所述核苷酸序列 B 與 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列長度相等，且不多於 3 個核苷酸差異。本發明提供的 siRNA 及其藥物組合物和綴合物具有良好的抑制 HBV 基因的表達的活性。

【指定代表圖】第8圖

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】核酸、含有該核酸的藥物組合物與綴合物及其用途與試劑盒

【技術領域】

【0001】 本申請屬於核酸藥物領域，具體涉及一種核酸、含有該核酸的組合物與綴合物及其製備方法和用途。

【先前技術】

【0002】 B型病毒性肝炎(又稱B型肝炎或B肝)是嚴重威脅全球、特別是中國的一類傳染病，目前全球公認的兩大類B肝防止藥物為干擾素和核苷類似物，但是這兩類藥物存在使用後容易產生耐藥性或使用受限等多種弊端，如干擾素容易產生不良反應、核苷類藥物存在耐藥性和停藥後復發問題。因此，若能從基因水平沉默病毒的基因表達，阻斷HBV的生成和複製，由此從根本上降低病毒代謝和對肝細胞的侵染，無疑將是最為理想的B肝治療手段。小干擾RNA(small interfering RNA，siRNA)可基於RNA干擾(RNA interference，RNAi)這一機制，以序列特異性的方式抑制或阻斷任何感興趣的目的基因(例如引發如癌症等疾病的基因)的表達，從而達到治療疾病的目的。

【0003】 siRNA穩定化修飾及其遞送系統是小RNA藥物開發中的兩個關鍵技術。

【發明內容】

【0004】 在一些實施方式中，本發明提供了一種能夠抑制HBV基因表達的siRNA，該siRNA含有正義鏈和反義鏈，所述siRNA中的每個核苷酸各自獨立地為修飾或未修飾的核苷酸，其中，所述正義鏈含有一段核苷酸序列I，所述反義鏈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至少部分地反向互補形成雙鏈區，其中，所述核苷酸序列I含有核苷酸序列A，所述核苷酸序列A與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列長度相等，且不多於3個核苷酸差異，且所述核苷酸序列II含有核苷酸序列B，所述核苷酸序列B與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列長度相等，且不多於3個核苷酸差異：

【0005】 5'- UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ -3'(SEQ ID NO: 1)；

【0006】 5'- Z'AGAAGAUGAGGCAUAGCA -3'(SEQ ID NO: 2)，

【0007】 其中，Z為A，Z'為U；

【0008】 並且，所述核苷酸序列A中包含位置對應於Z的核苷酸Z_A，所述核苷酸序列B中包含位置對應於Z'的核苷酸Z'_B，所述Z'_B是所述反義鏈5'末端的第一個核苷酸。

【0009】 在一些實施方式中，本發明提供了一種藥物組合物，所述藥物組合物含有本發明的siRNA和藥學上可接受的載體。

【0010】 在一些實施方式中，本發明提供了一種siRNA綴合物，所述siRNA綴合物含有本發明提供的siRNA以及綴合連接至該siRNA的綴合基團。

【0011】 在一些實施方式中，本發明提供了本發明的siRNA和/或藥物組合物和/或siRNA綴合物在製備用於治療和/或預防由B型肝炎病毒的感染引起的病理狀況或疾病的藥物中的用途。

【0012】 在一些實施方式中，本發明提供了一種治療和/或預防由B型肝炎病毒的感染引起的病理狀況或疾病的方法，所述方法包括將有效量的本發明的siRNA和/或藥物組合物和/或siRNA綴合物給予有需要的受試者。

【0013】 在一些實施方式中，本發明提供了一種試劑盒，所述試劑盒含有本發明的siRNA和/或藥物組合物和/或siRNA綴合物。

【0014】 以引用的方式併入

【0015】 本說明書中提及的所有出版物、專利以及專利申請均以引用的方式併入本文，其程度與每一單獨的出版物、專利以及專利申請均明確地並且單獨地以引用的方式併入本文的程度相同。

【圖式簡單說明】

【0016】 第1圖表示綴合物25和綴合物26在體外的抑制活性結果。

【0017】 第2圖表示綴合物2在體外psiCHECK系統中IC50及脫靶效應的檢測結果。

【0018】 第3圖表示所測試siRNA綴合物在體外Tritosome中的穩定性半定量檢測結果。

【0019】 第4圖表示所測試siRNA綴合物在體外人血漿中的穩定性半定量檢測結果。

【0020】 第5圖表示所測試siRNA綴合物在體外猴血漿中的穩定性半定量檢測結果。

【0021】 第6圖表示綴合物1在小鼠中對HBV mRNA表達的抑制結果。

【0022】 第7圖表示綴合物2在小鼠中對HBV mRNA表達的抑制結果。

【0023】 第8圖表示綴合物1、綴合物2和對比綴合物2在小鼠中HBV mRNA表達的抑制結果。

【0024】 第9圖表示所述測試siRNA綴合物在HBV轉基因小鼠中siRNA對血清HBsAg表達量的時間相關性測試結果。

【0025】 第10圖表示綴合物2在1.28copy小鼠中對血清HBsAg表達量的時間相關性測試結果。

【0026】 第11圖表示綴合物2在1.28copy小鼠中對HBV DNA的抑制效率的時間相關性測試結果。

【實施方式】

【0027】 以下對本發明的具體實施方式進行詳細說明。應當理解的是，此處所描述的具體實施方式僅用於說明和解釋本發明，並不用於限制本發明。

【0028】 定義

【0029】 在本發明中，HBV基因是指DNA序列如Genbank註冊號NC_003977.1所示的基因。

【0030】 在上文及下文中，如無特別說明，大寫字母C、G、U、A、T表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母d表示該字母d右側相鄰的一個核苷酸為脫氧核糖核苷酸；小寫字母m表示該字母m左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母f表示該字母f左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸；小寫字母s表示與該字母s左右相鄰的兩個核苷酸之間為硫代磷酸酯基連接；P1表示該P1右側相鄰的一個核苷酸為5'-磷酸核苷酸或5'-磷酸類似物修飾的核苷酸，尤指乙烯基磷酸酯修飾的核苷酸(以下實施例中以VP表示)、5'-磷酸核苷酸(以下實施例中以P表示)或5'-硫代磷酸酯修飾的核苷酸(以下實施例中以Ps表示)。

【0031】 在上文及下文中，所述氟代修飾的核苷酸指核苷酸的核糖基2'位的羥基被氟取代形成的核苷酸，非氟代修飾的核苷酸指核苷酸的核糖基2'位的羥基被非氟基團取代形成的核苷酸或核苷酸類似物，核苷酸類似物指能夠在核酸中代替核苷酸，但結構不同於腺嘌呤核糖核苷酸、鳥嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶

核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶脫氧核糖核苷酸的基團。如異核苷酸、橋聯的核苷酸(bridged nucleic acid, 簡稱BNA)或無環核苷酸。所述甲氧基修飾的核苷酸指核糖基的2'-羥基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

【0032】 在本文的上下文中,“互補”或“反向互補”一詞可互相替代使用,並具有所屬技術領域具有通常知識者周知的含義,即,在雙鏈核酸分子中,一條鏈的鹼基與另一條鏈上的鹼基以互補的方式相配對。在DNA中,嘌呤鹼基腺嘌呤(A)始終與嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)(或者在RNA中為尿嘧啶(U))相配對;嘌呤鹼基鳥嘌呤(C)始終與嘧啶鹼基胞嘧啶(G)相配對。每個鹼基對都包括一個嘌呤和一個嘧啶。當一條鏈上的腺嘌呤始終與另一條鏈上的胸腺嘧啶(或尿嘧啶)配對,以及鳥嘌呤始終與胞嘧啶配對時,兩條鏈被認為是彼此相互補的,以及從其互補鏈的序列中可以推斷出該鏈的序列。與此相應地,“錯配”在本領域中意指在雙鏈核酸中,對應位置上的鹼基並未以互補的形式配對存在。

【0033】 在上文及下文中,如無特別說明,基本上反向互補是指所涉及的兩段核苷酸序列之間存在不多於3個的鹼基錯配;實質上完全反向互補是指兩段核苷酸序列之間存在不多於1個的鹼基錯配;完全互補是指兩段核苷酸序列之間不存在鹼基錯配。

【0034】 在上文及下文中,一個核苷酸序列與另外一個核苷酸序列存在“核苷酸差異”,是指前者與後者相比,相同位置的核苷酸的鹼基種類發生了改變,例如,在後者中一個核苷酸鹼基為A時,在前者的相同位置處的對應核苷酸鹼基為U、C、G或者T的情況下,認定為兩個核苷酸序列之間在該位置處存在核苷酸差異。在一些實施方式中,以無鹼基核苷酸或其均等物代替原位置的核苷酸時,也可認為在該位置處產生了核苷酸差異。

【0035】 在上文及下文中,特別是在描述本發明的綴合分子的製備方法或siRNA綴合物的製備方法時,除非特別說明,所述核苷單體(nucleoside monomer)

指，根據欲製備的siRNA或siRNA綴合物中核苷酸的種類和順序，亞磷醯胺固相合成中使用的修飾或未修飾的核苷亞磷醯胺單體(unmodified or modified RNA phosphoramidites，有時 RNA phosphoramidites 也稱為 Nucleoside phosphoramidites)。亞磷醯胺固相合成為所屬技術領域具有通常知識者所習知的 RNA 合成中所用的方法。本發明所用的核苷單體均可商購得到。

【0036】如本文所使用的，不介於兩個字母之間或兩個符號之間的短橫(“-”)是用於指示取代基附著點的位置。例如：-C₁-C₁₀烷基-NH₂藉由C₁-C₁₀烷基而附著。

【0037】如本文所使用的，“任選的”或“任選地”是指其後描述的事件或狀況可以發生或不發生，並且所述描述包括事件或狀況發生的情況和其中不發生的情況。例如，“任選的取代的烷基”包括下面定義的“烷基”和“取代烷基”。所屬技術領域具有通常知識者將理解的是，對於包含一個或多個取代基的任何基團，這些基團不打算引入空間上不切實際、合成上不可行和/或內在不穩定的任何取代或取代型式。

【0038】如本文所使用的，“烷基”是指具有指定數量的碳原子的直鏈和支鏈，所述數量通常為1到20個碳原子，例如1至10個碳原子，如1至8個或1至6個碳原子。例如，C₁-C₆烷基包含1至6個碳原子的直鏈和支鏈烷基。當對具有特定數量的碳的烷基殘基進行命名時，旨在涵蓋所有具有該數量的碳的支鏈和直鏈形式；因此，例如，“丁基”意味著包括正丁基、仲丁基、異丁基和叔丁基；“丙基”包括正丙基和異丙基。亞烷基是烷基的子集，指與烷基相同、但具有兩個附著點的殘基。

【0039】如本文所使用的，“烯基”是指具有至少一個碳-碳雙鍵的不飽和支鏈或直鏈烷基，所述碳-碳雙鍵是藉由從母體烷基的相鄰碳原子中除去一個氫分子而獲得的。該基團可以處於雙鍵的順式或反式構型。典型的烯基基團包括但

不限於：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。在某些實施方式中，烯基基團具有2到20個碳原子，而在其他實施方式中，具有2至10個、2至8個或2至6個碳原子。亞烯基是烯基的一個子集，指與烯基相同、但具有兩個附著點的殘基。

【0040】如本文所使用的，“炔基”是指具有至少一個碳-碳三鍵的不飽和支鏈或直鏈烷基，所述碳-碳三鍵是藉由從母體烷基的相鄰碳原子中除去兩個氫分子而獲得的。典型的炔基基團包括但不限於：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。在某些實施方式中，炔基具有2到20個碳原子，而在其他實施方式中，具有2至10、2至8或2至6個碳原子。亞炔基是炔基的一個子集，指的是與炔基相同、但有兩個附著點的殘基。

【0041】如本文所使用的，“烷氧基”是指藉由氧橋附著的指定數量碳原子的烷基，例如，甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、2-戊氧基、異戊氧基、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個、1至8個、1至6個，或1至4個藉由氧橋附著的碳原子。

【0042】如本文所使用的，“芳基”是指衍生自芳香族單環或多環烴環系統、藉由從環碳原子中除去氫原子而形成的自由基。所述芳香族單環或多環烴環系統僅含有氫和6至18個碳原子的碳，其中所述環系統中的至少一個環是完全不飽和的，即，其根據Hückel理論包含環狀、非定域的 $(4n+2)\pi$ -電子系統。芳基包括但不限於苯基、苄基和萘基等基團。亞芳基是芳基的一個子集，指與芳基相同、但具有兩個附著點的殘基。

【0043】如本文所使用的，“環烷基”是指非芳香碳環，通常具有3至7個環碳原子。環可以是飽和的，或具有一個或多個碳-碳雙鍵。環烷基的實例包括環丙基、環丁基、環戊基、環戊烯基、環己基和環己烯基，以及橋聯和籠狀環基團，如降冰片烷(norbornane)。

【0044】如本文所使用的，“鹵代”或“鹵”指氟代、氯代、溴代和碘代，術語“鹵素”包括氟、氯、溴和碘。

【0045】如本文所使用的，“鹵代烷基”是指指定數量的碳原子被一個或多個、直至最大允許數量的鹵素原子取代的如上述所定義的烷基。鹵代烷基的實例包括但不限於三氟甲基、二氟甲基、2-氟乙基和五氟乙基。

【0046】“雜環基”是指一個穩定的3-到18-員非芳香環基，包含2-12個碳原子和1-6個雜原子，所述雜原子選自氮、氧和硫。除非說明書中另有說明，雜環基是單環、雙環、三環或四環系統，可包括稠環或橋環系統。雜環自由基中的雜原子可以任選地被氧化。一個或多個氮原子(如果存在的話)任選地被季銨化。雜環基是部分飽和或完全飽和的。雜環基可以藉由環的任何原子附著至分子的其餘部分。此類雜環基的實例包括但不限於：二噁烷基、噻吩基[1,3]二硫醯基、十氫異喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、異噻唑烷基、異噁唑烷基、嗎啉基、八氫吡啶基、八氫異吡啶基、2-氧雜呋喃基、2-氧雜呋啶基、2-氧雜嘧啶基、噁唑烷基、呋啶基、呋喃基、4-呋啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎寧環基、噻唑烷基、四氫呋喃基、三硫醯基、四氫吡喃基、硫嗎啉基、硫雜嗎啉基、1-氧雜硫嗎啉基和1,1-二氧雜硫嗎啉基。

【0047】“雜芳基”指由3-至18-員芳香環自由基衍生而成的基團，其包含2個至17個碳原子和選自氮、氧和硫的1至6個雜原子。如本文所使用的，雜芳基可以是單環、雙環、三環或四環系統，其中環系統中的至少一個環是完全不飽和的，即，根據Hückel理論，包含環狀非定域 $(4n+2)\pi$ -電子體系。雜芳基包括稠

【0048】 在本發明中可以使用各種羥基保護基團。一般來說，保護基團使

第9頁，共148頁(發明說明書)

及去除，而不實質上損害分子的其餘部分。代表性的羥基保護基團揭露於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，以引用的方式將上述文獻整體併入本文。在一些實施方式中，保護基團在鹼性條件下穩定，但可以在酸性條件下脫除。在一些實施方式中，本文可使用的羥基保護基的非排他性實例包括二甲氧基三苯甲基(DMT)、單甲氧基三苯甲基、9-苯基黃嘌呤-9-基(Pixyl)和9-(對甲氧基苯基)黃嘌呤-9-基(Mox)。在一些實施方式中，本文可使用的羥基保護基的非排他性實例包括Tr(三苯甲基)、MMTr(4-甲氧基三苯甲基)、DMTr(4,4'-二甲氧基三苯甲基)和TMTr(4,4',4''-三甲氧基三苯甲基)。

【0049】“受試者”一詞，如本文所使用的，指任何動物，例如哺乳動物或有袋動物。本發明的主題包括但不限於人類、非人靈長類(例如，恆河猴或其他類型的獼猴)、小鼠、豬、馬、驢、牛、綿羊、大鼠和任何種類的家禽。

【0050】如本文所使用的，“治療”、“姑息治療”或“改善”可在此處互換使用。這些術語指的是獲得有益的或期望的結果的方法，包括但不限於治療益處。“治療益處”意味著根除或改善被治療的潛在障礙。此外，治療益處藉由根除或改善與潛在障礙相關的一個或多個生理症狀，從而在受試者中觀察到改善而獲得，儘管受試者可能仍然受到潛在障礙的折磨。

【0051】如本文所使用的，“預防”和“預防”可互換使用。這些術語指獲得有益或期望的結果的方法，包括但不限於預防性益處。為了獲得“預防性益處”，可將綴合物或組合物給予有罹患特定疾病風險的受試者，或給予報告疾病的一種或多種病理症狀的受試者，即便可能該疾病的診斷尚未作出。

【0052】 siRNA

【0053】 本發明提供了一種能夠抑制B型肝炎病毒基因表達的siRNA。

第 10 頁，共 148 頁(發明說明書)

【0054】 本發明的siRNA含有核苷酸基團作為基本結構單元，所屬技術領域具有通常知識者習知，所述核苷酸基團含有磷酸基團、核糖基團和鹼基，在此不再贅述。

【0055】 CN102140458B揭露一種特異性抑制HBV基因的siRNA，並對該siRNA的多種化學修飾策略進行了研究。該研究發現，不同修飾策略會對siRNA的穩定性、生物活性及細胞毒性等指標產生截然不同的影響。在該研究中，證實了7種有效的修飾方式，與未經修飾的siRNA相比，其中一種修飾方式所得的siRNA在提高血液穩定性的同時，還保持了與未經修飾的siRNA基本相當的抑制活性。

【0056】 本發明的siRNA含有正義鏈和反義鏈，所述siRNA中的每個核苷酸各自獨立地為修飾或未修飾的核苷酸，其中，所述正義鏈含有一段核苷酸序列I，所述反義鏈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至少部分地反向互補形成雙鏈區，其中，所述核苷酸序列I含有核苷酸序列A，所述核苷酸序列A與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列長度相等，且不多於3個核苷酸差異，且所述核苷酸序列II含有核苷酸序列B，所述核苷酸序列B與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列長度相等，且不多於3個核苷酸差異：

【0057】 5'- UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ -3'(SEQ ID NO: 1)；

【0058】 5'- Z'AGAAGAUGAGGCAUAGCA -3'(SEQ ID NO: 2)，

【0059】 其中，Z為A，Z'為U；

【0060】 並且，所述核苷酸序列A中包含位置對應於Z的核苷酸Z_A，所述核苷酸序列B中包含位置對應於Z'的核苷酸Z'_B，所述Z'_B是所述反義鏈5'末端的第一個核苷酸。

【0061】 在上文與下文中，“位置對應”是指從核苷酸序列相同端起算，處於核苷酸序列中相同的位置。例如，核苷酸序列A的3'末端第1個核苷酸是位置對應於SEQ ID NO:1的3'末端第1個核苷酸的核苷酸。

【0062】 在一些實施方式中，所述正義鏈僅包含核苷酸序列I，所述反義鏈僅包含核苷酸序列II。

【0063】 在一些實施方式中，所述核苷酸序列A與SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列之間不多於1個核苷酸差異，和/或所述核苷酸序列B與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列之間不多於1個核苷酸差異。

【0064】 在一些實施方式中，所述核苷酸序列B與SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列之間的核苷酸差異包括Z'_B位置處的差異，且Z'_B選自A、C或G。在一些實施方式中，所述核苷酸差異為Z'_B位置處的差異，Z'_B選自A、C或G，並且Z_A是與Z'_B互補的核苷酸。這些核苷酸差異並不會顯著降低siRNA綴合物的靶基因抑制能力，而這些包含核苷酸差異的siRNA綴合物也在本發明的保護範圍之內。

【0065】 在一些實施方式中，所述核苷酸序列A和所述核苷酸序列B基本上反向互補、實質上反向互補或完全反向互補；所述基本上反向互補是指兩個核苷酸序列之間存在不多於3個的鹼基錯配；所述實質上完全反向互補是指兩個核苷酸序列之間存在不多於1個的鹼基錯配；完全反向互補是指兩個核苷酸序列之間沒有錯配。

【0066】 在一些實施方式中，核苷酸序列A是SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列，核苷酸序列B是SEQ ID NO: 4所示的核苷酸序列：

【0067】 5'-UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ_A-3'(SEQ ID NO: 3)；

【0068】 5'-Z'_BAGAAGAUGAGGCAUAGCA-3'(SEQ ID NO: 4)，

【0069】 其中，所述Z'_B是反義鏈5'末端的第一個核苷酸，Z_A選自A、U、G或C，並且Z'_B是與Z_A互補的核苷酸；在一些實施方式中，Z_A為A，Z'_B為U；

【0070】 並且，所述正義鏈和反義鏈長度相同或不同，所述正義鏈的長度為19-23個核苷酸，反義鏈的長度為20-26個核苷酸。這樣，本發明提供的siRNA正義鏈和反義鏈的長度比可以是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。在一些實施方式中，所述siRNA正義鏈和反義鏈的長度比為19/21、21/23或23/25。

【0071】 根據本發明的一個實施方式，所述正義鏈和反義鏈長度相同，所述核苷酸序列I還含有核苷酸序列III，所述核苷酸序列II還含有核苷酸序列IV，核苷酸序列III和核苷酸序列IV長度各自獨立地為1-4個核苷酸；所述核苷酸序列III連接在核苷酸序列A的5'末端，所述核苷酸序列IV連接在核苷酸序列B的3'末端，所述核苷酸序列III和所述核苷酸序列IV長度相等。

【0072】 所述核苷酸序列III和核苷酸序列IV可以互補或不互補，為了增加siRNA的穩定性，在一些實施方式中，核苷酸序列III和核苷酸序列IV至少部分互補；在一些實施方式中，核苷酸序列III和核苷酸序列IV 80%以上的鹼基互補，或者90%以上的鹼基互補；在一些實施方式中，核苷酸序列III和核苷酸序列IV實質上完全反向互補或完全反向互補；所述實質上完全反向互補是指兩個核苷酸序列之間存在不多於1個的鹼基錯配；完全反向互補是指兩個核苷酸序列之間沒有錯配；在一些實施方式中，核苷酸序列III和核苷酸序列IV完全反向互補。由此，所述siRNA正義鏈和反義鏈等長，其長度比為20/20、21/21、22/22或23/23。在一些實施方式中，所述siRNA正義鏈和反義鏈的長度比為21/21或23/23。

【0073】 在一些實施方式中，所述核苷酸序列III和核苷酸序列IV的長度均為1個核苷酸，核苷酸序列III的鹼基為G，核苷酸序列IV的鹼基為C；此時，正義鏈和反義鏈的長度比為20/20；或者，核苷酸序列III和IV的長度均為2個核苷

酸，按照5'末端到3'末端的方向，核苷酸序列III的鹼基組成為AG，核苷酸序列IV的鹼基組成為CU；此時，正義鏈和反義鏈的長度比為21/21；或者，核苷酸序列III和IV的長度均為3個核苷酸，按照5'末端到3'末端的方向，核苷酸序列III的鹼基組成為AAG，核苷酸序列IV的鹼基組成為CUU；此時，正義鏈和反義鏈的長度比為22/22；或者，核苷酸序列III和IV的長度均為4個核苷酸，按照5'末端到3'末端的方向，核苷酸序列III的鹼基組成為CAAG，核苷酸序列IV的鹼基組成為CUUG；此時，正義鏈和反義鏈的長度比為23/23。在一些實施方式中，所述核苷酸序列III和核苷酸序列IV的長度為2個核苷酸，按照5'末端到3'末端的方向，核苷酸序列III的鹼基組成為AG，核苷酸序列IV的鹼基組成為CU；此時，正義鏈和反義鏈的長度比為21/21。

【0074】 在一些實施方式中，核苷酸序列III和核苷酸序列IV的長度相同，並且完全反向互補，因此，給出了核苷酸序列III的鹼基，核苷酸序列IV的鹼基也就確定了。

【0075】 在一些實施方式中，所述正義鏈和反義鏈長度不同，所述核苷酸序列II還含有核苷酸序列V，核苷酸序列V的長度為1至3個核苷酸，連接在所述反義鏈的3'末端，構成反義鏈的3'懸垂末端。由此，本發明提供的siRNA正義鏈和反義鏈的長度比可以是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。在一些實施方式中，所述核苷酸序列V的長度為2個核苷酸，由此，本發明提供的siRNA正義鏈和反義鏈的長度比可以是19/21、21/23或23/25。

【0076】 所述核苷酸序列V中的每一個核苷酸可以是任意的核苷酸，為了便於合成並節約合成成本，所述核苷酸序列V為連續的2個胸腺嘧啶脫氧核糖核苷酸(TT)或連續的2個尿嘧啶核糖核苷酸(UU)；為了提高siRNA反義鏈與靶mRNA的親和力，核苷酸序列V與靶mRNA的相應位置的核苷酸互補。因此，在

一些實施方式中，本發明的siRNA的正義鏈和反義鏈的長度之比為19/21或21/23，此時，本發明的siRNA具有更好的mRNA沉默活性。

【0077】 在一些實施方式中，所述siRNA的正義鏈含有如SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列，所述siRNA的反義鏈含有如SEQ ID NO: 5所示的核苷酸序列：

【0078】 5'-UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ_A-3'(SEQ ID NO: 3)；

【0079】 5'-Z'_BAGAAGAUGAGGCAUAGCAGC-3'(SEQ ID NO: 5)；

【0080】 或者，所述siRNA的正義鏈含有如SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列，所述siRNA的反義鏈含有如SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列：

【0081】 5'-UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ_A-3'(SEQ ID NO: 3)；

【0082】 5'-Z'_BAGAAGAUGAGGCAUAGCAUU-3'(SEQ ID NO: 6)；

【0083】 其中，所述Z'_B是反義鏈5'末端的第一個核苷酸，Z_A選自A、U、G或C，並且Z'_B是與Z_A互補的核苷酸。

【0084】 根據本發明一些具體的實施例，本發明所述siRNA為siHBVS1或siHBVS2：

siHBVS1

正義鏈：5'- UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ -3'(SEQ ID NO: 1)，

反義鏈：5'- Z'AGAAGAUGAGGCAUAGCAGC -3'(SEQ ID NO: 7)

siHBVS2

正義鏈：5'- UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ -3'(SEQ ID NO: 1)，

反義鏈：5'- Z'AGAAGAUGAGGCAUAGCAUU -3'(SEQ ID NO: 8)。

【0085】 如前所述，本發明的siRNA中的核苷酸各自獨立地為修飾或未修飾的核苷酸。在一些實施方式中，本發明的siRNA中的核苷酸為未經修飾的核苷酸；在一些實施方式中，本發明的siRNA中的部分或全部核苷酸為修飾的核苷酸。

酸，核苷酸基團上的這些修飾不會導致本發明的siRNA綴合物抑制B肝病毒基因表達的功能明顯削弱或喪失。

【0086】 在一些實施方式中，本發明的siRNA至少含有1個修飾的核苷酸。在本發明的上下文中，所使用的術語“修飾的核苷酸”是指核苷酸的核糖基2'位羥基被其他基團取代形成的核苷酸或核苷酸類似物，或者核苷酸上的鹼基是經修飾的鹼基的核苷酸。所述修飾的核苷酸不會導致siRNA抑制基因表達的功能明顯削弱或喪失。例如，可以選擇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 中公開的修飾的核苷酸。

【0087】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA的正義鏈或所述反義鏈中的至少一個核苷酸為修飾的核苷酸，和/或至少一個磷酸酯基為具有修飾基團的磷酸酯基；換句話說，所述正義鏈和所述反義鏈中至少一條單鏈的磷酸-糖骨架中的磷酸酯基和/或核糖基的至少一部分為具有修飾基團的磷酸酯基和/或具有修飾基團的核糖基。

【0088】 在一些實施方式中，所述正義鏈和/或所述反義鏈中的全部核苷酸均為修飾的核苷酸。在一些實施方式中，本發明提供的siRNA的正義鏈和所述反義鏈中的每一個核苷酸獨立地為氟代修飾的核苷酸或非氟代修飾的核苷酸。

【0089】 本發明的發明人驚奇地發現，本發明所述的siRNA在動物實驗中獲得了血漿中穩定性和基因沉默效率的高度平衡。

【0090】 在一些實施方式中，所述氟代修飾的核苷酸位於核苷酸序列A和核苷酸序列B中，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述核苷酸序列A的第7、8、9位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸；按照5'末端到3'末端的方向，所述核苷酸序列B的第2、6、14、16位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸。

【0091】 在一些實施方式中，所述氟代修飾的核苷酸位於核苷酸序列A和核苷酸序列B中，所述核苷酸序列A中氟代修飾的核苷酸不多於5個，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述核苷酸序列A的第7、8、9位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸；所述核苷酸序列B中氟代修飾的核苷酸不多於7個，並且，所述核苷酸序列B的第2、6、14、16位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸。

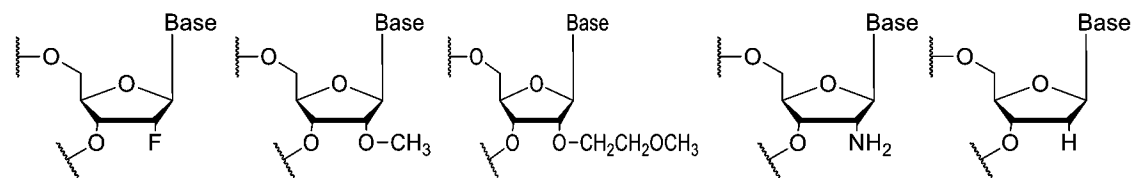
【0092】 在一些實施方式中，按照5'末端到3'末端的方向，在所述正義鏈中，所述核苷酸序列A的第7、8、9位或者5、7、8、9位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，所述正義鏈中其餘位置的核苷酸為非氟代修飾的核苷酸；按照5'末端到3'末端的方向，在所述反義鏈中，所述核苷酸序列B的第2、6、14、16位或者2、6、8、9、14、16位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，所述反義鏈中其餘位置的核苷酸為非氟代修飾的核苷酸。

【0093】 在本發明的上下文中，“氟代修飾的核苷酸”指核苷酸的核糖基2'位的羥基被氟取代形成的核苷酸，其具有以下式(101)所示的結構。“非氟代修飾的核苷酸”指核苷酸的核糖基2'位的羥基被非氟基團取代形成的核苷酸或核苷酸類似物。在一些實施方式中，每一個非氟代修飾的核苷酸獨立地選自核苷酸的核糖基2'位的羥基被非氟基團取代形成的核苷酸或核苷酸類似物中的一種。

【0094】 這些核糖基2'位的羥基被非氟基團取代形成的核苷酸是所屬技術領域具有通常知識者所習知的，這些核苷酸可以選自2'-烷氧基修飾的核苷酸、2'-經取代的烷氧基修飾的核苷酸、2'-烷基修飾的核苷酸、2'-經取代的烷基修飾的核苷酸、2'-氨基修飾的核苷酸、2'-經取代的氨基修飾的核苷酸、2'-脫氧核苷酸中的一種。

【0095】 在一些實施方式中，2'-烷氧基修飾的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸(2'-OMe)，如式(102)所示。2'-經取代的烷氧基修飾的核苷酸，例如可以是2'-O-

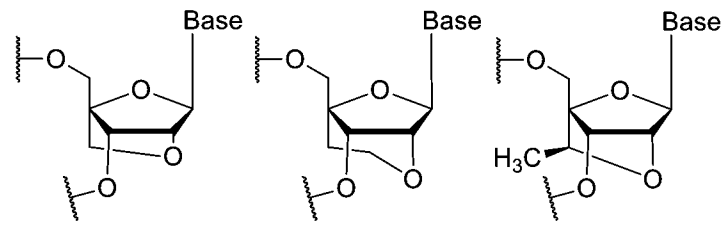
甲氧基乙基修飾的核苷酸(2'-MOE)，如式(103)所示。2'-氨基修飾的核苷酸(2'-NH₂)如式(104)所示。2'-脫氧核苷酸(DNA)如式(105)所示。



式(101) 式(102) 式(103) 式(104) 式(105)

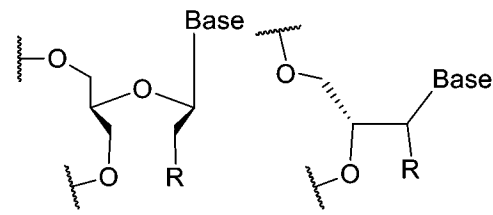
【0096】 核苷酸類似物指能夠在核酸中代替核苷酸，但結構不同於腺嘌呤核糖核苷酸、鳥嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶脫氧核糖核苷酸的基團。在一些實施方式中，核苷酸類似物可以是如異核苷酸、橋聯的核苷酸(bridged nucleic acid，簡稱BNA)或無環核苷酸。

【0097】 BNA是指受約束的或不能接近的核苷酸。BNA可以含有五員環、六員環、或七員環的具有“固定的”C3'-內切糖縮攏的橋聯結構。通常將該橋摻入到該核糖的2'-、4'-位處以提供一個2', 4'-BNA核苷酸，如LNA、ENA、cET BNA等，其中，LNA如式(106)所示，ENA如式(107)所示，cET BNA如式(108)所示。



式(106) 式(107) 式(108)

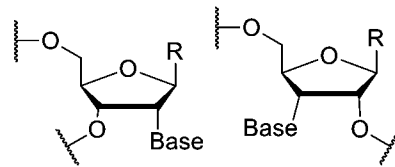
【0098】 無環核苷酸是核苷酸的糖環被打開形成的一類核苷酸，如解鎖核酸(UNA)或甘油核酸(GNA)，其中，UNA如式(109)所示，GNA如式(110)所示。



式(109) 式(110)

【0099】 上述式(109)和式(110)中，R選自H、OH或烷氧基(O-烷基)。

【0100】 異核苷酸是指核苷酸中鹼基在核糖環上的位置發生改變而形成的化合物，例如，鹼基從核糖環的1'-位移動至2'-位或3'-位而形成的化合物，如式(111)或(112)所示。



式(111) 式(112)

【0101】 上述式(111)和式(112)化合物中，Base表示鹼基，例如A、U、G、C或T；R選自H、OH、F或者如上所述的非氟基團。

【0102】 在一些實施方式中，核苷酸類似物選自異核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA和GNA中的一種。在一些實施方式中，每一個非氟代修飾的核苷酸均為甲氧基修飾的核苷酸，在上文和下文中，所述甲氧基修飾的核苷酸指核糖基的2'-羥基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

【0103】 在上文及下文中，“氟代修飾的核苷酸”、“2'-氟修飾的核苷酸”、“核糖基團的2'-羥基被氟取代的核苷酸”和“2'-氟代核糖基”意義相同，均指核苷酸的2'-羥基被氟取代，而形成的具有如式(207)所示結構的化合物；“甲氧基修飾的核苷酸”、“2'-甲氧基修飾的核苷酸”、“核糖基團的2'-羥基被甲氧基取代的核苷酸”和“2'-甲氧基核糖基”意義相同，均指核苷酸核糖基團的2'-羥基被甲氧基取代而形成的具有如式(208)所示結構的化合物。

【0104】 在一些實施方式中，本發明的siRNA是具有以下修飾的siRNA：按照5'末端到3'末端的方向，在所述正義鏈中，所述核苷酸序列A的第7、8、9位或者第5、7、8、9位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，所述正義鏈中其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；在所述反義鏈中，所述核苷酸序列B的第2、6、

14、16位或者第2、6、8、9、14、16位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，所述反義鏈中其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸。

【0105】 在一些實施方式中，本發明的siRNA是具有以下修飾的siRNA：按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的正義鏈中核苷酸序列A的第5、7、8和9位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，siRNA的正義鏈的其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的反義鏈中核苷酸序列B的第2、6、8、9、14和16位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，siRNA的反義鏈其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；

【0106】 或者，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的正義鏈中核苷酸序列A的第5、7、8和9位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，siRNA的正義鏈的其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的反義鏈中核苷酸序列B的第2、6、14和16位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，siRNA的反義鏈其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；

【0107】 或者，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的正義鏈中核苷酸序列A的第7、8和9位的核苷酸為-氟代修飾的核苷酸，siRNA的正義鏈的其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的反義鏈中核苷酸序列B的第2、6、14和16位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，siRNA的反義鏈其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸。

【0108】 換句話說，該siRNA的磷酸-糖骨架中的核糖基分別具有如下修飾基團：按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的正義鏈中核苷酸序列A的第5、7、8和9位的糖基為2'-氟代核糖基，siRNA的正義鏈的其餘位置核苷酸的糖基為2'-甲氧基核糖基，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的反義鏈中核苷酸序列B的第2、6、8、9、14和16位的糖基為2'-氟代核糖基，siRNA的反義鏈其餘位置核苷酸的糖基為2'-甲氧基核糖基；

【0109】或者，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的正義鏈中核苷酸序列A的第5、7、8和9位的糖基為2'-氟代核糖基，siRNA的正義鏈的其餘位置核苷酸的糖基為2'-甲氧基核糖基，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的反義鏈中核苷酸序列B的第2、6、14和16位的糖基為2'-氟代核糖基，siRNA的反義鏈其餘位置核苷酸的糖基為2'-甲氧基核糖基；

【0110】或者，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的正義鏈中核苷酸序列A的第7、8和9位的糖基為2'-氟代核糖基，siRNA的正義鏈的其餘位置核苷酸的糖基為2'-甲氧基核糖基，並且，按照5'末端到3'末端的方向，所述siRNA的反義鏈中核苷酸序列B的第2、6、14和16位的糖基為2'-氟代核糖基，siRNA的反義鏈其餘位置核苷酸的糖基為2'-甲氧基核糖基。

【0111】在一些實施方式中，本發明提供的siRNA為siHBVS3、siHBVS4、siHBVS5或siHBVS6：

siHBVS3

正義鏈：5'- UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 9)，

反義鏈：

5'- UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm -3'

(SEQ ID NO: 10)，

siHBVS4

正義鏈：5'- UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 9)，

反義鏈：

5'- UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm -3'

(SEQ ID NO: 11)，

siHBVS5

正義鏈：5'- UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 12) ,

反義鏈：

5'- UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm -3'

(SEQ ID NO: 13) ,

siHBVS6

正義鏈：5'- UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 12) ,

反義鏈：

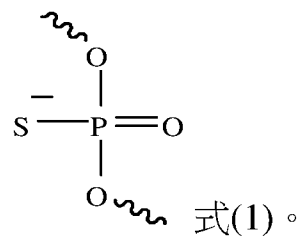
5'-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm -3'

(SEQ ID NO: 14) ,

【0112】 其中，大寫字母C、G、U、A表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母m表示該字母m左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母f表示該字母f左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸。

【0113】 具有上述修飾的siRNA不僅成本低，而且可使血液中的核糖核酸酶不易切割核酸，由此增加核酸的穩定性，使核酸具有更強的抵抗核酸酶水解的性能。

【0114】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA的正義鏈和反義鏈中至少一條單鏈的磷酸-糖骨架中的磷酸酯基中的至少一部分為具有修飾基團的磷酸酯基。在一些實施方式中，具有修飾基團的磷酸酯基為磷酸酯基中的磷酸二酯鍵中的至少一個氧原子被硫原子取代而形成的硫代磷酸酯基；在一些實施方式中，所述具有修飾基團的磷酸酯基為具有如式(1)所示結構的硫代磷酸酯基：



【0115】 這種修飾能穩定siRNA的雙鏈結構，保持鹼基配對的高特異性和高親和力。

【0116】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA中，硫代磷酸酯基連接存在於以下位置中的至少一處：正義鏈或反義鏈任意一端的第一個和第二個核苷酸之間；正義鏈或反義鏈任意一端的第二個和第三個核苷酸之間；或上述的任意組合。在一些實施方式中，硫代磷酸酯基連接存在於除正義鏈5'末端以外的全部上述位置處。在一些實施方式中，硫代磷酸酯基連接存在於除正義鏈3'末端以外的全部上述位置處。在一些實施方式中，硫代磷酸酯基連接存在於以下位置中的至少一處：

【0117】 所述正義鏈的5'末端端部第1個核苷酸和第2個核苷酸之間；

【0118】 所述正義鏈的5'末端端部第2個核苷酸和第3個核苷酸之間；

【0119】 所述正義鏈的3'末端端部第1個核苷酸和第2個核苷酸之間；

【0120】 所述正義鏈的3'末端端部第2個核苷酸和第3個核苷酸之間；

【0121】 所述反義鏈的5'末端端部第1個核苷酸和第2個核苷酸之間；

【0122】 所述反義鏈的5'末端端部第2個核苷酸和第3個核苷酸之間；

【0123】 所述反義鏈的3'末端端部第1個核苷酸和第2個核苷酸之間；以及

【0124】 所述反義鏈的3'末端端部第2個核苷酸和第3個核苷酸之間。

【0125】 在一些實施方式中，該siRNA正義鏈的5'末端端部第一個核苷酸和第二個核苷酸之間、該siRNA正義鏈的5'末端端部第二個核苷酸和第三個核苷酸之間、該siRNA反義鏈的5'末端端部第一個核苷酸和第二個核苷酸之間、該

siRNA反義鏈的5'末端端部第二個核苷酸和第三個核苷酸之間、該siRNA反義鏈的3'末端端部第一個核苷酸和第二個核苷酸之間和該siRNA反義鏈的3'末端端部第二個核苷酸和第三個核苷酸之間均為硫代磷酸酯基連接。

【0126】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA為siHBVS7、siHBVS8、siHBVS9或siHBVS10：

siHBVS7

正義鏈：

5'- UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 15) ，

反義鏈：

5'- UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm -3'

(SEQ ID NO: 16) ，

siHBVS8

正義鏈：

5'- UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 15) ，

反義鏈：

5'- UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm -3'

(SEQ ID NO: 17) ，

siHBVS9

正義鏈： 5'- UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 18) ，

反義鏈：

5'- UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm -3'

(SEQ ID NO: 19) ,

siHBVS10

正義鏈：5'- UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 18) ,

反義鏈：

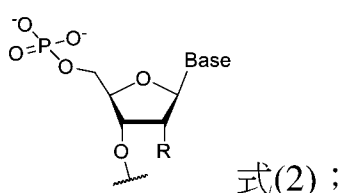
5'- UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm -3'

(SEQ ID NO: 20) ,

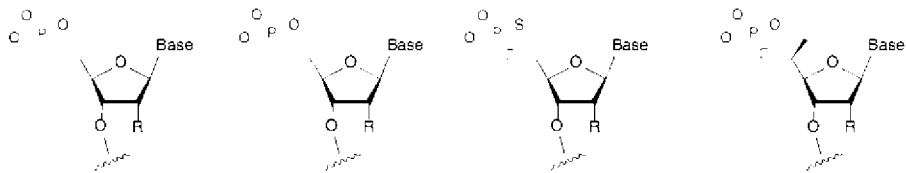
【0127】 其中，大寫字母C、G、U、A表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母m表示該字母m左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母f表示該字母f左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸；小寫字母s表示該字母左右兩個核苷酸之間為硫代磷酸酯基連接。

【0128】 在一些實施方式中，所述siRNA反義鏈的5'末端核苷酸為5'-磷酸核苷酸或5'-磷酸類似物修飾的核苷酸。

【0129】 常用的所述5'-磷酸核苷酸或5'-磷酸類似物修飾的核苷酸是所屬技術領域具有通常知識者所習知的，如5'-磷酸核苷酸可具有如下結構：



【0130】 再如，Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48中揭露如下4種5'-磷酸類似物修飾的核苷酸：



式(3) 式(4) 式(5) 式(6)

【0131】 其中，R選自H、OH、甲氧基、氟；Base表示鹼基，選自A、U、C、G或T。

【0132】 在一些實施方式中，5'-磷酸核苷酸為式(2)所示的含有5'-磷酸修飾的核苷酸，5'-磷酸類似物修飾的核苷酸為含有乙烯基磷酸酯(5'-(E)-vinylphosphonate，E-VP)修飾的核苷酸，如式(3)所示，或者為硫代磷酸酯修飾的核苷酸，如式(5)所示。

【0133】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA為siHBVS11、siHBVS12、siHBVS13、siHBVS14、siHBVS15、siHBVS16、siHBVS17或siHBVS18：

siHBVS11

正義鏈：5'- UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'
(SEQ ID NO: 9)，

反義鏈：

5'- P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm -3'
(SEQ ID NO: 21)，

siHBVS12

正義鏈：5'- UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'
(SEQ ID NO: 9)，

反義鏈：

5'- P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm -3'

(SEQ ID NO: 22) ,

siHBVS13

正義鏈： 5'- UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 12) ,

反義鏈：

5'- P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm -3'

(SEQ ID NO: 23) ,

siHBVS14

正義鏈： 5'- UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 12) ,

反義鏈：

5'- P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm -3'

(SEQ ID NO: 24) ,

siHBVS15

正義鏈：

5'- UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 15) ,

反義鏈：

5'- P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm -3'(SEQ ID NO: 25) ,

siHBVS16

正義鏈：

5'- UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 15) ,

反義鏈：

5'- P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm

-3'(SEQ ID NO: 26) ,

siHBVS17

正義鏈：5'- UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 18) ,

反義鏈：

5'- P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm -3'

(SEQ ID NO: 27) ,

siHBVS18

正義鏈：5'- UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm -3'

(SEQ ID NO: 18) ,

反義鏈：

5'- P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm -3'(SEQ ID NO: 28) ;

【0134】 其中，大寫字母C、G、U、A表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母m表示該字母m左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母f表示該字母f左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸；小寫字母s表示該字母左右兩個核苷酸之間為硫代磷酸酯基連接；大寫字母P1表示該字母右側相鄰的一個核苷酸為5'-磷酸核苷酸或5'-磷酸類似物修飾的核苷酸。

【0135】 本發明的發明人意外發現，本發明提供的siRNA 不僅具有顯著增強的血漿和溶酶體穩定性，還保留很高的基因抑制活性。

【0136】 本發明提供的siRNA可以藉由本領域常規的siRNA製備方法(例如固相合成和液相合成的方法)得到。其中，固相合成已經有商業化訂制服務。可以藉由使用具有相應修飾的核苷單體來將修飾的核苷酸基團引入本發明所述的siRNA中，製備具有相應修飾的核苷單體的方法及將修飾的核苷酸基團引入siRNA的方法也是所屬技術領域具有通常知識者所熟知的。

【0137】 藥物組合物

【0138】 本發明提供了一種藥物組合物，所述藥物組合物含有如上所述的siRNA作為活性成分和藥學上可接受的載體。

【0139】 所述藥學上可接受的載體可以是siRNA給藥領域常規使用的載體，例如但不限於磁性奈米粒(magnetic nanoparticles，如基於 Fe_3O_4 或 Fe_2O_3 的奈米粒)、碳奈米管(carbon nanotubes)、介孔矽(mesoporous silicon)、磷酸鈣奈米粒(calcium phosphate nanoparticles)、聚乙烯亞胺(polyethylenimine，PEI)、聚醯胺型樹形高分子(polyamidoamine (PAMAM) dendrimer)、聚賴氨酸(poly(L-lysine)，PLL)、殼聚糖(chitosan)、1,2-二油醯基-3-三甲銨丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane，DOTAP)、聚D型或L型乳酸/羥基乙酸共聚物(poly(D&L-lactic/glycolic acid)copolymer，PLGA)、聚(氨乙基乙撐磷酸酯)(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)以及它們的衍生物中的一種或多種。

【0140】 在一些實施方式中，所述藥物組合物中，對siRNA和藥學上可接受的載體的含量沒有特別要求，在一些實施方式中，siRNA與藥學上可接受的載體的重量比可以為1:(1-500)，在一些的實施方式中，上述重量比為1：(1-50)。

【0141】 在一些實施方式中，所述藥物組合物中，還可以包含藥學上可接受的其它輔劑，該輔劑可以為本領域常規採用的各種製劑或化合物的一種或多

種。例如，所述藥學上可接受的其它輔劑可以包括pH值緩衝液、保護劑和滲透壓調節劑中的至少一種。

【0142】 所述pH值緩衝液可以為pH值7.5-8.5的三羥甲基胺基甲烷鹽酸鹽緩衝液和/或pH值5.5-8.5的磷酸鹽緩衝液，例如可以為pH值5.5-8.5的磷酸鹽緩衝液。

【0143】 所述保護劑可以為肌醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麥芽糖、乳糖和葡萄糖中的至少一種。以所述藥物組合物的總重量為基準，所述保護劑的含量可以為0.01-30重量%。

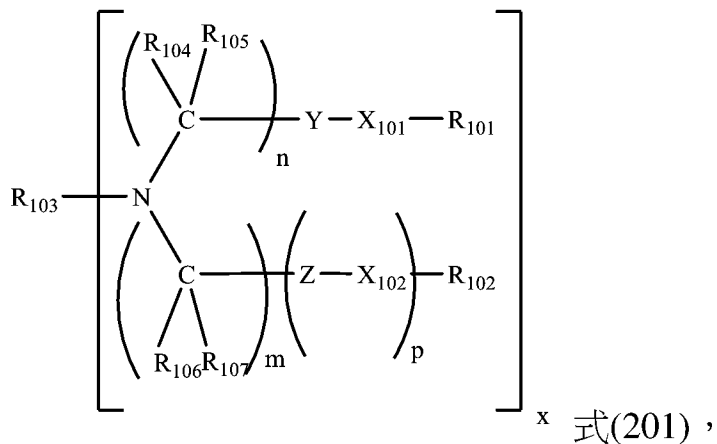
【0144】 所述滲透壓調節劑可以為氯化鈉和/或氯化鉀。所述滲透壓調節劑的含量使所述藥物組合物的滲透壓為200-700毫滲莫耳/千克。根據所需滲透壓，所屬技術領域具有通常知識者可以容易地確定所述滲透壓調節劑的含量。

【0145】 在一些實施方式中，所述藥物組合物可以為液體製劑，例如注射液；也可以為凍乾粉針劑，實施給藥時與液體輔劑混合，配製成液體製劑。所述液體製劑可以但不限於用於皮下、肌肉或靜脈注射給藥，也可以但不限於藉由噴霧給藥到肺臟、或藉由噴霧經肺臟給藥到其它臟器組織(如肝臟)。在一些實施方式中，所述藥物組合物用於靜脈注射給藥。

【0146】 在一些實施方式中，所述藥物組合物可以為脂質體製劑的形式。在一些實施方式中，所述脂質體製劑中使用的藥學上可接受的載體包含含胺的轉染化合物(下文也可將其稱為有機胺)、輔助脂質和/或聚乙二醇化脂質。其中，所述有機胺、輔助脂質和聚乙二醇化脂質可分別選自於CN103380113A(藉由引用的方式將其整體併入本文)中所描述的含胺的轉染化合物或其藥學上可接受的鹽或衍生物、輔助脂質和聚乙二醇化脂質中的一種或多種。

【0147】 在一些實施方式中，所述有機胺可為CN103380113A中描述的如式(201)所示的化合物或其藥學上可接受的鹽：

第 30 頁，共 148 頁(發明說明書)



【0148】 其中：

【0149】 X_{101} 和 X_{102} 各自獨立地是O、S、N-A或C-A，其中A是氫或C1-C20
烴鏈；

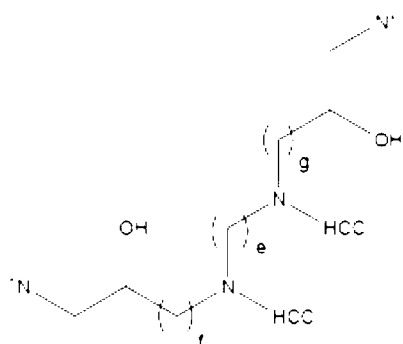
【0150】 Y和Z各自獨立地是C=O、C=S、S=O、CH-OH或SO₂；

【0151】 R_{101} 、 R_{102} 、 R_{103} 、 R_{104} 、 R_{105} 、 R_{106} 和 R_{107} 各自獨立地是氫，環狀或
無環的、被取代的或未被取代的、支鏈或直鏈脂族基團，環狀或無環的、被取
代的或未被取代的、支鏈或直鏈雜脂族基團，被取代的或未被取代的、支鏈或
直鏈鹽基，被取代的或未被取代的、支鏈或直鏈芳基，被取代的或未被取代的、
支鏈或直鏈雜芳基；

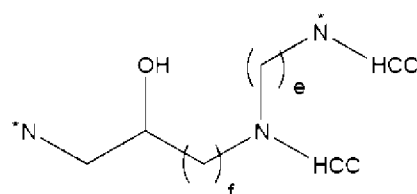
【0152】 x是1-10的整數；

【0153】 n是1-3的整數，m是0-20的整數，p是0或1；其中，如果m=p=0，
則 R_{102} 是氫；

【0154】 並且，如果n或m中的至少一個是2，那麼 R_{103} 和在式(201)中的氮
形成如式(202)或式(203)所示的結構：



式(202),

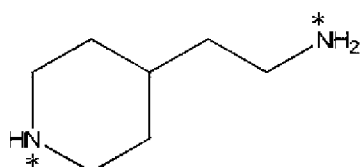


式(203);

【0155】 其中， g 、 e 和 f 各自獨立地是1-6的整數，“HCC”代表烴鏈，且每個 $*N$ 代表式(201)中的氮原子。

【0156】 在一些實施方式中， R_{103} 是多胺。在其它實施方式中， R_{103} 是縮酮。在一些實施方式中，在式(201)中的 R_{101} 和 R_{102} 中的每一個獨立地是任意的被取代的或未被取代的、支鏈或直鏈烷基或烯基，所述烷基或烯基具有3至約20個碳原子，諸如8至約18個碳原子，和0至4個雙鍵，諸如0至2個雙鍵。

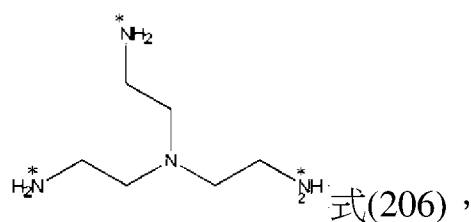
【0157】 在一些實施方式中，如果 n 和 m 中的每一個獨立地具有1或3的值，那麼 R_{103} 可以是下述式(204)至式(213)中的任一個：



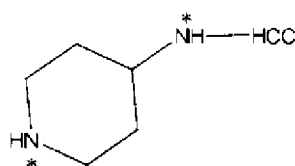
式(204),



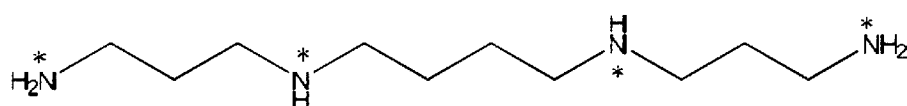
式(205),



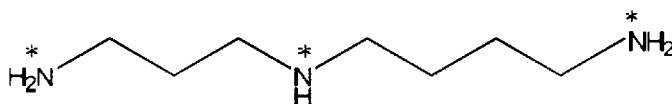
式(206),



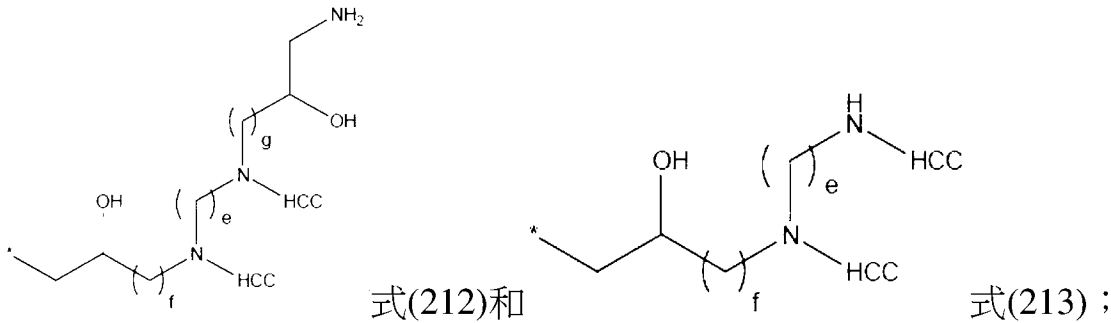
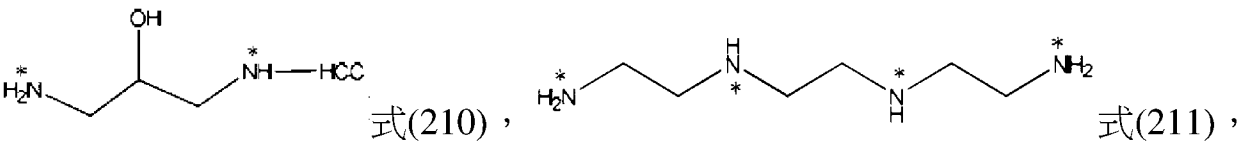
式(207),



式(208),



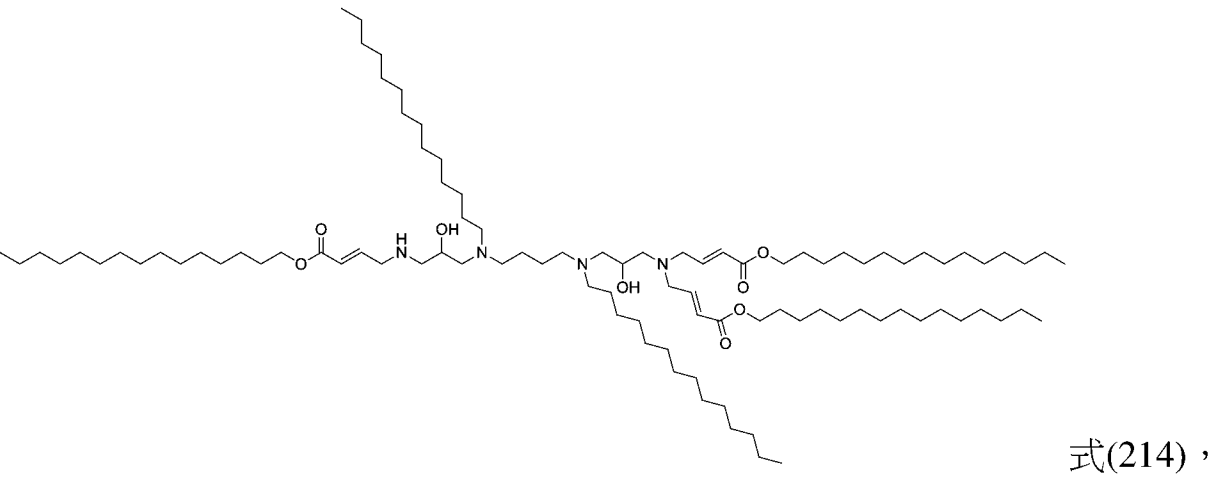
式(209),

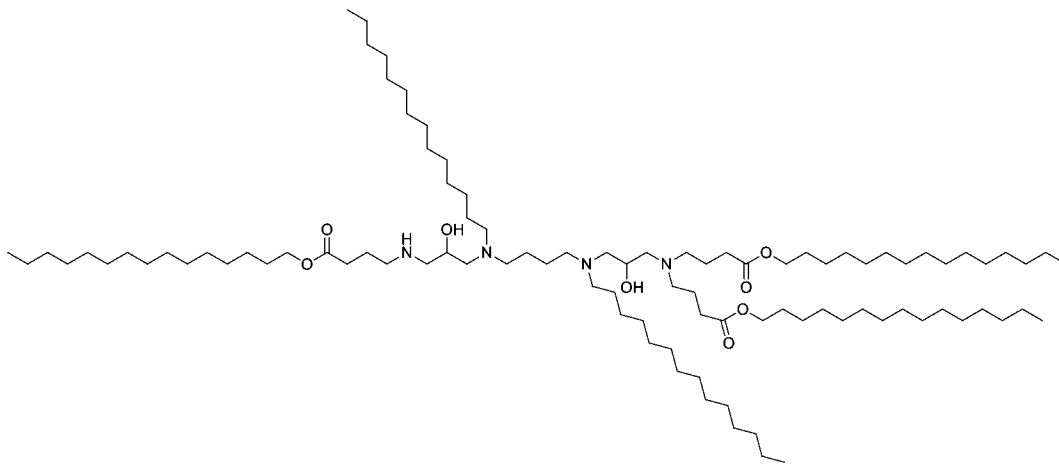


【0158】 其中，式(204)-式(213)中，g、e和f各自獨立地是1-6的整數，每個“HCC”代表烴鏈，且每個*顯示R₁₀₃與在式(201)中的氮原子的可能連接點，其中在任意*位置上的每個H可以被替換以實現與在式(201)中的氮原子的連接。

【0159】 其中，式(201)所示化合物可以根據CN103380113A中的描述製備。

【0160】 在一些實施方式中，所述有機胺為如式(214)所示的有機胺和/或如式(215)所示的有機胺：





式(215)；

【0161】 所述輔助脂質為膽固醇、膽固醇的類似物和/或膽固醇的衍生物；

【0162】 所述聚乙二醇化脂質為1,2-二棕櫚醯胺-sn-甘油-3-磷脂醯乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]-2000。

【0163】 在一些實施方式中，所述藥物組合物中，所述有機胺、所述輔助脂質和所述聚乙二醇化脂質三者之間的莫耳比為(19.7-80)：(19.7-80)：(0.3-50)，例如可以為(50-70)：(20-40)：(3-20)。

【0164】 在一些實施方式中，由本發明的siRNA與上述含胺的轉染試劑形成的藥物組合物顆粒具有約30nm至約200nm的平均直徑，通常為約40nm至約135nm，更通常地，該脂質體顆粒的平均直徑是約50nm至約120nm、約50nm至約100nm、約60nm至約90nm或約70nm至約90nm，例如，該脂質體顆粒的平均直徑是約30、40、50、60、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、150或160nm。

【0165】 在一些實施方式中，由本發明的siRNA與上述含胺的轉染試劑形成的藥物組合物中，siRNA與全部脂質(例如有機胺、輔助脂質和/或聚乙二醇化脂質)的重量比(重量/重量比)在從約1:1至約1:50、從約1:1至約1:30、從約1:3至約1:20、從約1:4至約1:18、從約1:5至約1:17、從約1:5至約1:15、從約1:5至約1:12、從約1:6至約1:12或從約1:6至約1:10的範圍內，例如，本發明的siRNA與全部脂質

的重量比為約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。

【0166】 在一些實施方式中，所述藥物組合物在銷售時各組分可以獨立存在，在使用時可以液體製劑的形式存在。在一些實施方式中，本發明提供的siRNA與上述藥學上可接受的載體形成的藥物組合物可以按照已知的各種方法製備，只是用本發明提供的siRNA替代習知siRNA即可；在一些實施方式中，可以按照如下方法製備：

【0167】 將有機胺、輔助脂質和聚乙二醇化脂質按照上述莫耳比懸浮於醇中並混勻得到脂質溶液；醇的用量使得到的脂質溶液的總質量濃度為2-25mg/mL，例如可以為8-18mg/mL。所述醇選自藥學上可接受的醇，諸如在室溫附近為液體的醇，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中的一種或多種，例如可以為乙醇。

【0168】 將本發明提供的siRNA溶解於緩衝鹽溶液中，得到siRNA水溶液。緩衝鹽溶液的濃度為0.05-0.5M，例如可以為0.1-0.2M，調節緩衝鹽溶液的pH至4.0-5.5，例如可以為5.0-5.2，緩衝鹽溶液的用量使siRNA的濃度不超過0.6mg/mL，例如可以為0.2-0.4mg/mL。所述緩衝鹽選自可溶性醋酸鹽、可溶性檸檬酸鹽中的一種或多種，例如可以為醋酸鈉和/或醋酸鉀。

【0169】 將脂質溶液和siRNA水溶液混合，將混合後得到的產物在40-60°C孵育至少2分鐘，例如可以為5-30分鐘，得到孵育後的脂質體製劑。脂質溶液和siRNA水溶液的體積比為1：(2-5)，例如可以為1:4。

【0170】 將孵育後的脂質體製劑濃縮或稀釋，去除雜質，除菌，得到本發明提供的藥物組合物，其理化參數為pH值為6.5-8，包覆率不低於80%，粒徑為40-200nm，多分散指數不高於0.30，滲透壓為250-400mOsm/kg；例如理化參數

可以為pH值為7.2-7.6，包覆率不低於90%，粒徑為60-100nm，多分散指數不高於0.20，滲透壓為300-400mOsm/kg。

【0171】其中，濃縮或稀釋可以在去除雜質之前、之後或同時進行。去除雜質的方法可以採用習知各種方法，例如可以使用切相流系統、中空纖維柱，在100K Da條件下超濾，超濾交換溶液為pH7.4的磷酸鹽緩衝液(PBS)。除菌的方法可以採用習知各種方法，例如可以在0.22 μ m過濾器上過濾除菌。

【0172】第一種siRNA綴合物

【0173】在一個方面，本發明提供了第一種siRNA綴合物，所述siRNA綴合物包含上述的siRNA以及連接至該siRNA的綴合基團。

【0174】在本發明的上下文中，除非另有說明，“綴合”是指兩個或多個各自具有特定功能的化學部分之間以共價連接的方式彼此連接；相應地，“綴合物”是指該各個化學部分之間藉由共價連接而形成的化合物。進一步地，“siRNA綴合物”表示一個或多個具有特定功能的化學部分共價連接至siRNA上而形成的化合物。在下文中，有時也將本發明的siRNA綴合物簡稱為“綴合物”。siRNA綴合物應根據上下文，理解為siRNA綴合物的總稱，第一種siRNA綴合物或第二種siRNA綴合物。在本發明的上下文中，“綴合分子”應當理解為可藉由反應綴合至siRNA、最終形成本發明的siRNA綴合物的化合物。

【0175】本發明提供了第一種siRNA綴合物，所述siRNA綴合物包含上述的siRNA以及連接至該siRNA的綴合基團。一般來說，對於第一種siRNA綴合物，所述綴合基團包含藥學上可接受的至少一個標靶基團和任選的连接子(linker)，並且，所述siRNA、所述连接子和所述標靶基團依次連接。在一種實施方式中，所述標靶基團為1-6個。在一種實施方式中，所述標靶基團為2-4個。所述siRNA分子可以非共價或共價綴合至所述綴合基團，例如可以共價綴合至所述綴合基團。siRNA與綴合基團的綴合位點可以在siRNA正義鏈的3'末端或5'末端，也可

在反義鏈的5'末端，還可以在siRNA的內部序列中。在一些實施方式中，所述siRNA與綴合基團的綴合位點在siRNA正義鏈的3'末端。在一些實施方式中，所述綴合基團可以連接在核苷酸的磷酸基團、2'-位羥基或者鹼基上。在一些實施方式中，所述綴合基團可以連接在3'-位羥基上，此時核苷酸之間採用2'-5'磷酸二酯鍵連接。當綴合基團連接在siRNA鏈的末端時，所述綴合基團通常連接在核苷酸的磷酸基團上；當綴合基團連接在siRNA的內部序列時，所述綴合基團通常連接在核糖糖環或者鹼基上。各種連接方式可參考：Muthiah Manoharan *et.al.* siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10 (5): 1181-7.

【0176】 在一些實施方式中，所述siRNA與綴合基團間可以藉由酸不穩定的、或可還原的化學鍵相連，在細胞胞內體(endosome)的酸性環境下，這些化學鍵可降解，從而使siRNA成為自由狀態。對於不可降解的綴合方式，綴合基團可連接在siRNA的正義鏈，從而儘量降低綴合對siRNA活性的影響。

【0177】 在一些實施方式中，所述藥學上可接受的標靶基團指可以是siRNA給藥領域常規使用的配體，例如WO2009082607A2中描述的各種配體，以引用的方式將其全部公開內容併入本文。

【0178】 在一些實施方式中，所述藥學上可接受的標靶基團可以選自以下標靶分子或其衍生物形成的配體中的一種或多種：親脂分子，例如膽固醇、膽汁酸、維生素(例如維生素E)、不同鏈長的脂質分子；聚合物，例如聚乙二醇；多肽，例如細胞穿透肽；適配體；抗體；量子點；糖類，例如乳糖、聚乳糖、甘露糖、半乳糖、N-乙醯半乳糖胺(GalNAc)；葉酸(folate)；肝實質細胞表達的受體配體，例如去唾液酸糖蛋白、去唾液酸糖殘基、脂蛋白(如高密度脂蛋白、

低密度脂蛋白等)、胰高血糖素、神經傳導物質(如腎上腺素)、生長因子、轉鐵蛋白等。

【0179】 在一些實施方式中，所述的每個配體獨立地選自一個能夠與細胞表面受體結合的配體。在一些實施方式中，至少一個配體是能夠與肝細胞表面受體結合的配體。在一些實施方式中，至少一個配體是能夠與哺乳動物肝細胞表面受體結合的配體。在一些實施方式中，至少一個配體是能夠與人肝細胞表面受體結合的配體。在一些實施方式中，至少一個配體是能夠與肝表面去唾液酸糖蛋白受體(ASGPR)結合的配體。這些配體的種類為所屬技術領域具有通常知識者所習知，其作用一般是與靶細胞表面的特異性受體相結合，介導與配體連接的siRNA遞送至靶細胞。

【0180】 在一些實施方式中，所述藥學上可接受的標靶基團可以是與哺乳動物肝細胞表面上的去唾液酸糖蛋白受體(ASGPR)結合的任意一種配體。在一種實施方式中，每個配體獨立地為去唾液酸糖蛋白，例如去唾液酸血清類黏蛋白(asialoorosomucoid，ASOR)或去唾液酸胎球蛋白(asialofetuin，ASF)。在一種實施方式所述配體為糖或糖的衍生物。

【0181】 在一些實施方式中，至少一個配體是糖。在一些實施方式中，每個配體均是糖。在一些實施方式中，至少一個配體是單糖、多糖、修飾的單糖、修飾的多糖或糖衍生物。在一些實施方式中，至少一個所述配體可以是單糖，雙糖或三糖。在一些實施方式中，至少有一個配體是修飾的糖。在一些實施方式中，每一個配體均為修飾的糖。在一些實施方式中，每個配體均獨立地選自多糖、修飾的多糖、單糖、修飾的單糖、多糖衍生物或單糖衍生物。在一些實施方式中，每一個或至少一個配體選自由葡萄糖及其衍生物組、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、麥芽糖及其衍生物，阿拉伯糖及其衍生物、果糖及其衍生物和唾液酸組成的群組。

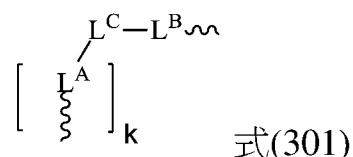
【0182】 在一些實施方式中，每個所述配體可獨立地選自D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 α -D-呋喃甘露糖、 β -D-呋喃甘露糖、 α -D-吡喃甘露糖、 β -D-吡喃甘露糖、 α -D-吡喃葡萄糖、 β -D-吡喃葡萄糖、 α -D-呋喃葡萄糖、 β -D-呋喃葡萄糖、 α -D-呋喃果糖、 α -D-吡喃果糖、 α -D-吡喃半乳糖、 β -D-吡喃半乳糖、 α -D-呋喃半乳糖、 β -D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙醯基半乳糖胺、N-三氟乙醯基半乳糖胺、N-丙醯基半乳糖胺、N-正丁醯基半乳糖胺、N-異丁醯基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脫氧- β -D-吡喃葡萄糖、2-脫氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脫氧-4-甲醯胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脫氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇醯基- α -神經氨酸、5-硫代- β -D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙醯基-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-乙醯基-2-脫氧-1,5-二硫代- α -D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脫水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖或L-4-硫代核糖。所述配體的其它選擇可參見例如CN105378082A的記載，以引用的方式將其全部公開內容併入本文。

【0183】 在一些實施方式中，所述第一種siRNA綴合物中藥學上可接受的標靶基團可以是半乳糖或N-乙醯半乳糖胺，其中，半乳糖或N-乙醯半乳糖胺分子可以是一價、二價、三價、四價。應當理解的是，這裡所述的一價、二價、三價、四價分別指siRNA分子與含有作為標靶基團的半乳糖或N-乙醯半乳糖胺分子的綴合基團形成寡核苷酸綴合物後，該寡核苷酸綴合物中siRNA分子與半乳糖或N-乙醯半乳糖胺分子的莫耳比為1:1、1:2、1:3或1:4。在一些實施方式中，所述藥學上可接受的標靶基團是N-乙醯半乳糖胺。在一些實施方式中，當本發明

所述的siRNA與含有N-乙醯半乳糖胺的綴合基團綴合時，N-乙醯半乳糖胺分子是三價或四價。在一些實施方式中，當本發明所述的siRNA與含有N-乙醯半乳糖胺的綴合基團綴合時，N-乙醯半乳糖胺分子是三價。

【0184】 當本發明所述的siRNA與綴合分子綴合時，綴合分子可經由合適的连接子與siRNA分子相連，所屬技術領域具有通常知識者可以根據標靶基團的具體類型選擇合適的连接子。這些綴合基團、连接子、標靶基團的種類以及與siRNA的连接方式，可參見WO2015006740A2的公開內容，藉由引用的方式將其整體內容併入本文。

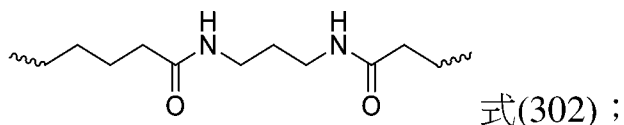
【0185】 在一些實施方式中，當所述標靶基團為N-乙醯半乳糖胺時，合適的连接子可以為如式(301)所示的結構：



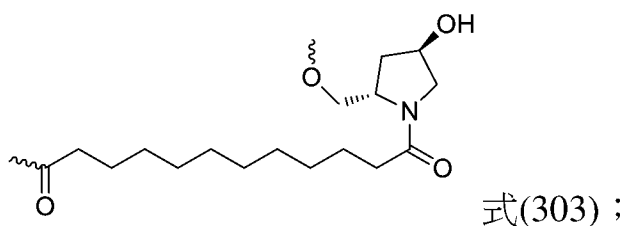
【0186】 其中，

【0187】 k為1-3的整數；

【0188】 L^A 為具有如式(302)所示結構的包含醯胺鍵的鏈狀部分，每個所述 L^A 在其兩端分別與一個所述標靶基團和所述 L^C 部分藉由醯鍵相連接：

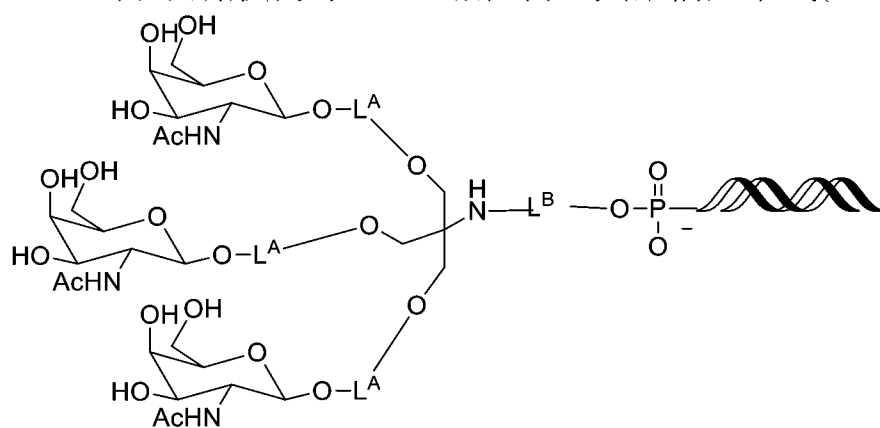


【0189】 L^B 為具有如式(303)所示結構的包含N-醯基吡咯烷的鏈狀部分，所述鏈狀部分在其一端具有羰基並與所述 L^C 部分藉由醯胺鍵相連接，在另一端具有氧基並與所述siRNA藉由磷酸酯鍵相連接：



【0190】 L^C 為基於羥甲基氨基甲烷、二羥甲基氨基甲烷或三羥甲基氨基甲烷的2-4價連接基團，所述 L^C 經由氧原子與各個所述 L^A 部分藉由醚鍵相連接，並且經由氮原子與所述 L^B 部分藉由醯胺鍵相連接。

【0191】 在一些實施方式中，當 $n=3$ ， L^C 為基於三羥甲基氨基甲烷的4價連接基團時，由作為連接子的 $-(L^A)_3$ 三羥甲基氨基甲烷- L^B -連接N-乙醯半乳糖胺分子和siRNA分子所形成的siRNA綴合物，其結構如下式(304)所示：

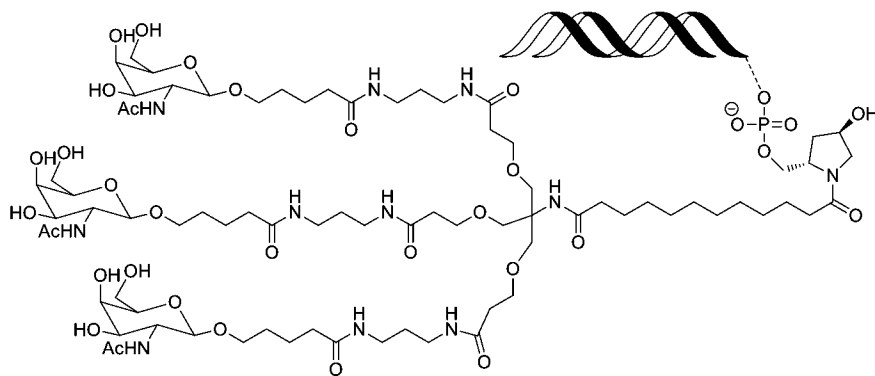


式(304)，

【0192】 式中，雙螺旋結構表示siRNA。

【0193】 同樣，siRNA與綴合分子的綴合位點可以在siRNA正義鏈的3'末端或5'末端，也可在反義鏈的5'末端，還可以在siRNA的內部序列中。

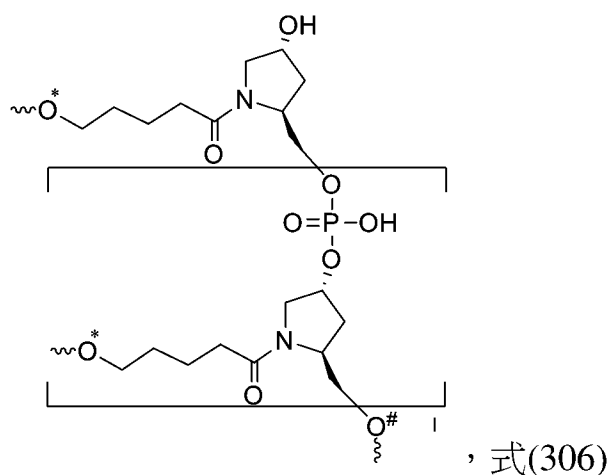
【0194】 在一些實施方式中，本發明所述siRNA的正義鏈3'末端藉由連接子 $-(L^A)_3$ 三羥甲基氨基甲烷- L^B -與三個N-乙醯半乳糖胺(GalNAc)分子共價綴合，得到siRNA分子與GalNAc分子的莫耳比為1:3的siRNA綴合物，下文也可將其稱為(GalNAc)₃-1-siRNA，其結構如下式(305)所示：



式(305)，

【0195】 其中，雙螺旋結構表示所述siRNA，並且所述連接子連接至所述siRNA的正義鏈3'末端。

【0196】 在一些實施方式中，當所述標靶基團為N-乙醯半乳糖胺時，合適的連接子可以為如式(306)所示的結構：



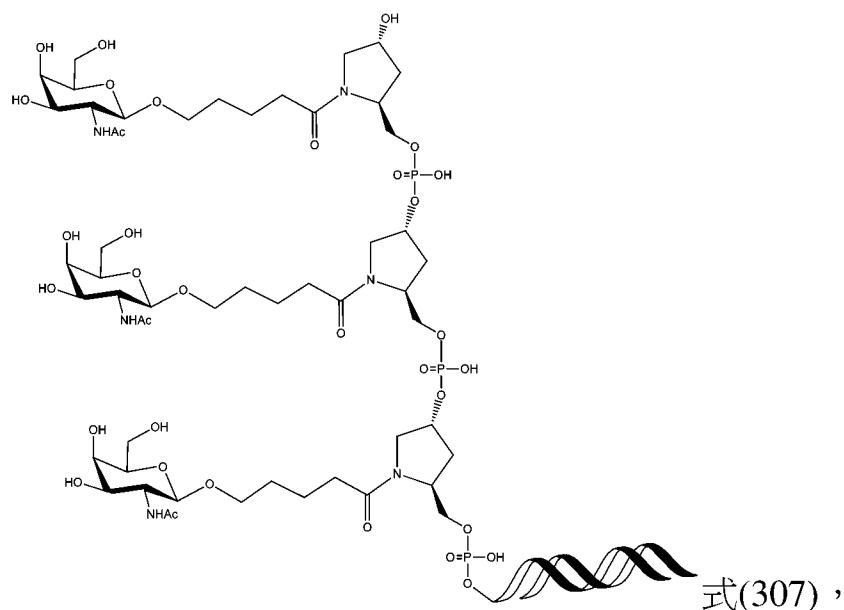
【0197】 其中，

【0198】 1為0-3的整數；

【0199】 *表示連接子上藉由醚鍵與標靶基團連接的位點；

【0200】 #表示連接子上藉由磷酸酯鍵與siRNA連接的位點。

【0201】 在一些實施方式中，當l=2時，所述siRNA綴合物具有如式(307)所示的結構：

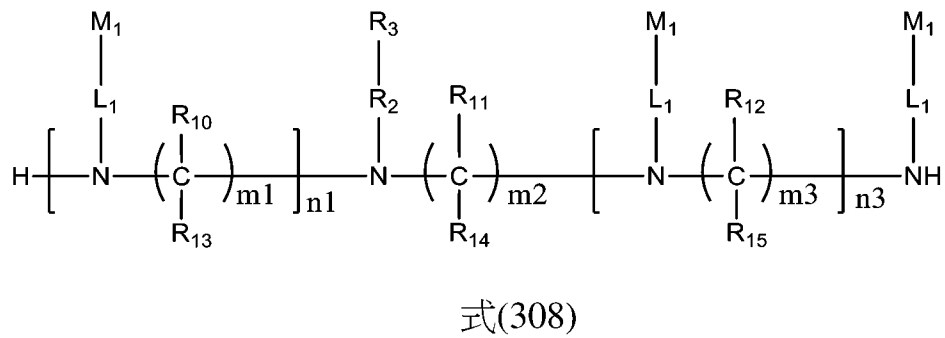


【0202】 其中，雙螺旋結構表示所述siRNA，並且所述連接子連接至所述siRNA的正義鏈3'末端。

【0203】 上述綴合物可以藉由習知技術中已經詳細描述的方法進行合成。例如，WO2015006740A2中詳細描述了多種綴合物的製備方法。藉由所屬技術領域具有通常知識者熟知的方式，獲得本發明的第一種siRNA綴合物。如WO2014025805A1中記載了式(305)所示結構的製備方法，Rajeev等人在ChemBioChem 2015, 16, 903-908中描述了式(307)所示結構的製備方法。

【0204】 第二種siRNA綴合物

【0205】 在一些實施方式中，所述siRNA綴合物為具有如式(308)所示結構第二種siRNA綴合物：



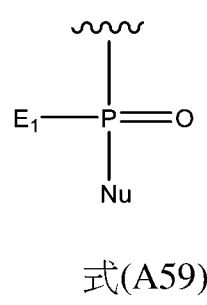
【0206】 其中：

【0207】 n1為選自1-3的整數，n3為選自0-4的整數；

【0208】 m1、m2和m3獨立地為選自2-10的整數；

【0209】 R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄和R₁₅各自獨立地為H，或選自於由以下基團所組成的群組：C₁-C₁₀烷基、C₁-C₁₀鹵代烷基以及C₁-C₁₀烷氧基；

【0210】 R₃為式(A59)所示結構的基團：

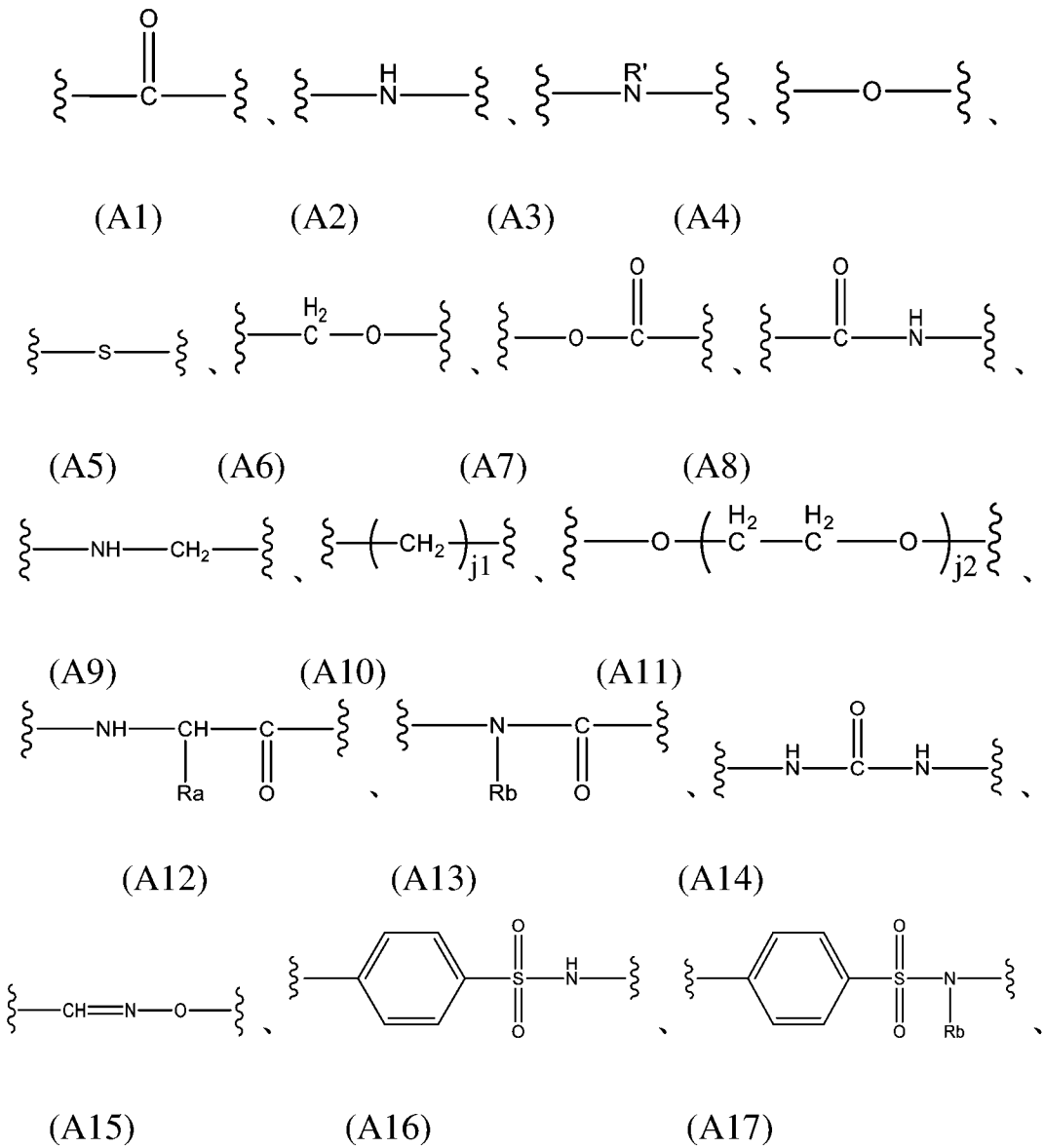


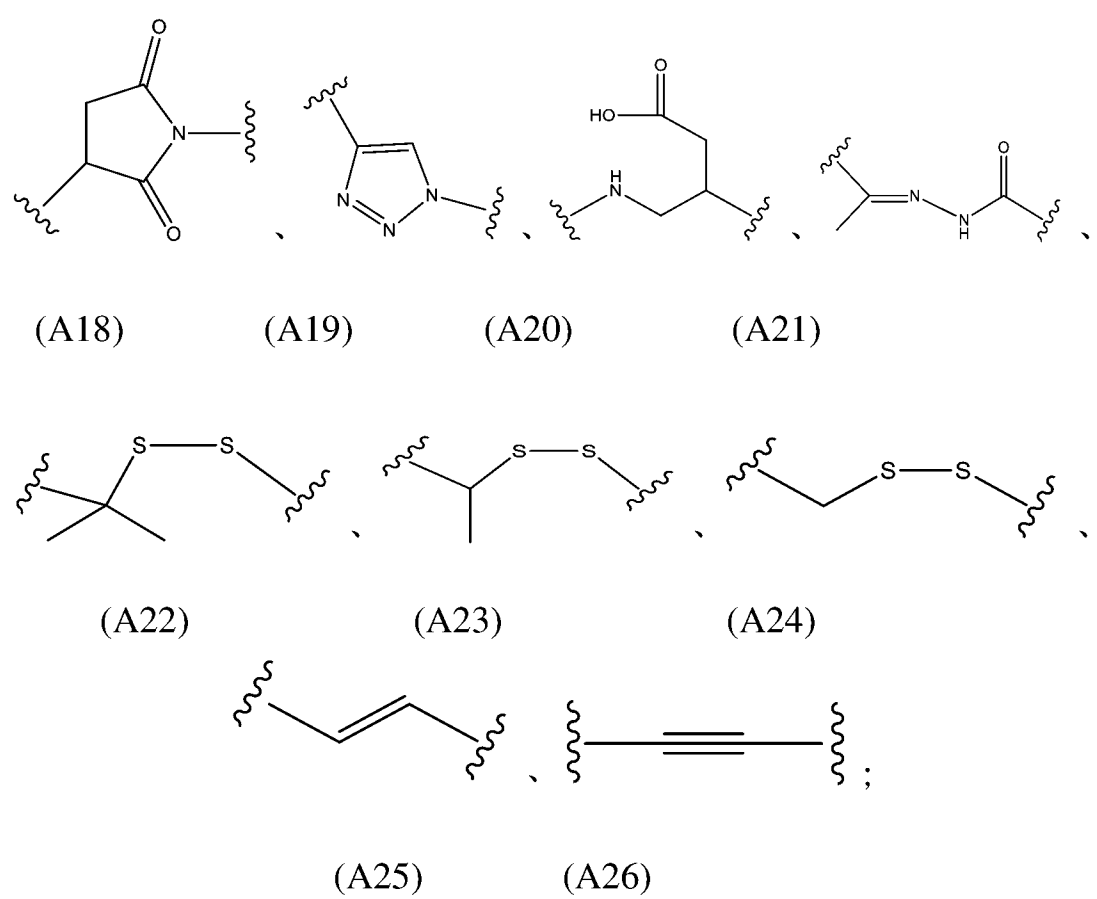
【0211】 其中， E_1 為OH、SH或 BH_2 ，Nu為本發明的siRNA；

【0212】 R_2 是長度為1-20個碳原子的直鏈亞烷基，其中一個或多個碳原子任選地被選自於以下基團所組成的群組中的一個或多個所替換： $C(O)$ 、NH、O、S、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 C_2-C_{10} 亞烯基、 C_2-C_{10} 亞炔基、 C_6-C_{10} 亞芳基、 C_3-C_{18} 亞雜環基和 C_5-C_{10} 亞雜芳基組成的群組中任意一個或多個替換，並且其中， R_2 可任選地具有由以下基團所組成的群組中的任何一個或多個的取代基： C_1-C_{10} 烷基、 C_6-C_{10} 芳基、 C_5-C_{10} 雜芳基、 C_1-C_{10} 鹵代烷基、 $-OC_1-C_{10}$ 烷基、 $-OC_1-C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1-C_{10}$ 烷基-OH、 $-OC_1-C_{10}$ 鹵代烷基、 $-SC_1-C_{10}$ 烷基、 $-SC_1-C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1-C_{10}$ 烷基-SH、 $-SC_1-C_{10}$ 鹵代烷基、鹵素取代基、-OH、-SH、- NH_2 、 $-C_1-C_{10}$ 烷基- NH_2 、 $-N(C_1-C_{10})$ 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、 $-NH(C_1-C_{10})$ 烷基)、氰基、硝基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10})$ 烷基)、 $-CON(C_1-C_{10})$ 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、 $-CONH(C_1-C_{10})$ 烷基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10})$ 烷基)、 $-NHC(O)$ (苯基)、 $-N(C_1-C_{10})$ 烷基) $C(O)(C_1-C_{10})$ 烷基)、 $-N(C_1-C_{10})$ 烷基) $C(O)$ (苯基)、 $-C(O)C_1-C_{10}$ 烷基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ 烷基苯基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ 鹵烷基、 $-OC(O)C_1-C_{10}$ 烷基、 $-SO_2(C_1-C_{10})$ 烷基)、 $-SO_2$ (苯基)、 $-SO_2(C_1-C_{10})$ 鹵代烷基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_{10})$ 烷基)、 $-SO_2NH$ (苯基)、 $-NHSO_2(C_1-C_{10})$ 烷基)、 $-NHSO_2$ (苯基)和 $-NHSO_2(C_1-C_{10})$ 鹵代烷基)；

【0213】 每個 L_1 是長度為1-70個碳原子的直鏈亞烷基，其中一個或多個碳原子任選地被選自於以下基團所組成的群組中的一個或多個所替換： $C(O)$ 、NH、O、S、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 C_2-C_{10} 亞烯基、 C_2-C_{10} 亞炔基、 C_6-C_{10} 亞芳基、 C_3-C_{18} 亞雜環基和 C_5-C_{10} 亞雜芳基組成的群組中任意一個或多個替換，並且其中， L_1 可任選地具有由以下基團所組成的群組中的任何一個或多個的取代基： C_1-C_{10} 烷基、 C_6-C_{10} 芳基、 C_5-C_{10} 雜芳基、 C_1-C_{10} 鹵代烷基、 $-OC_1-C_{10}$ 烷基、 $-OC_1-C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1-C_{10}$ 烷基-OH、 $-OC_1-C_{10}$ 鹵代烷基、 $-SC_1-C_{10}$ 烷基、 $-SC_1-C_{10}$ 烷基苯基、 $-C_1-C_{10}$ 烷基-SH、 $-SC_1-C_{10}$ 鹵代烷基、鹵代、-OH、-SH、- NH_2 、 $-C_1-C_{10}$ 烷基- NH_2 、

-N(C₁-C₁₀烷基)(C₁-C₁₀烷基)、-NH(C₁-C₁₀烷基)、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鹵烷基、-OC(O)C₁-C₁₀烷基、-SO₂(C₁-C₁₀烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀鹵代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀鹵代烷基)，並且，在一些實施方式中，L₁可選自於由A1-A26基團或其任意組合所組成的群組，其中A1-A26的結構和定義如下所示：

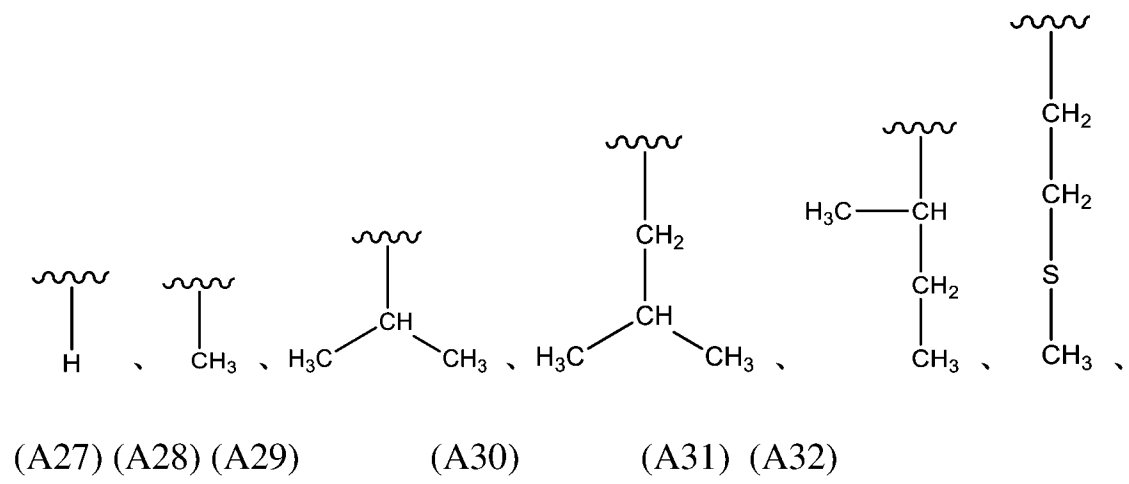




【0214】 其中，j1為1-20的整數；j2為1-20的整數；

【0215】 R'為C1-C10的烷基；

【0216】 Ra選自式A27-A45基團中的一種：



個附著點的鏈中的原子數。為此目的，將替換所述直鏈亞烷基的碳原子而得到的環(如亞雜環基或仲雜芳基)計為一個原子。

【0219】 M_1 表示標靶基團，其定義和可選擇的範圍與上述標靶基團相同。在一些實施方式中，每個 M_1 獨立地選自對哺乳動物肝臟細胞表面上的去唾液酸糖蛋白受體具有親合力的配體中的一種。

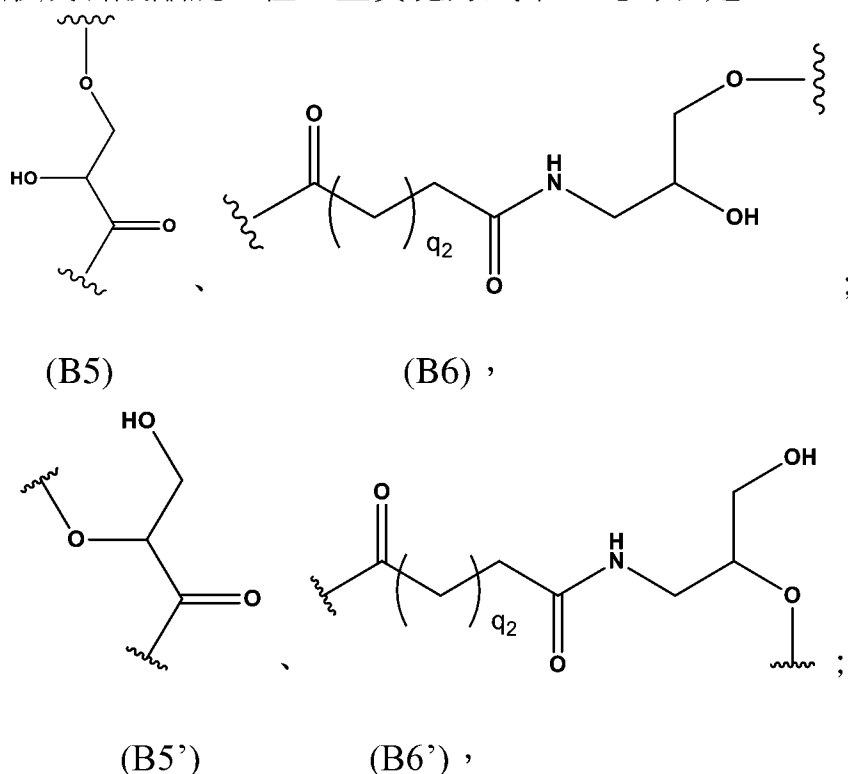
【0220】 當 M_1 為對哺乳動物肝臟細胞表面上的去唾液酸糖蛋白受體具有親和力的配體時，在一些實施方式中， n_1 可以是1-3的整數， n_3 可以是0-4的整數，保證所述綴合物中 M_1 配體的個數至少為2；在一些實施方式中， $n_1+n_3 \geq 2$ ，這樣可以使得 M_1 配體的個數至少為3，使得 M_1 配體與肝表面去唾液酸糖蛋白受體更容易結合，進而促進所述綴合物藉由內吞作用進入細胞。實驗表明，當 M_1 配體的個數大於3個時， M_1 配體與肝表面去唾液酸糖蛋白受體結合的容易程度增加並不明顯，因此，從合成容易程度、結構/製程成本和遞送效率等多方面綜合考慮，在一些實施方式中， n_1 為1-2的整數， n_3 為0-1的整數，且 $n_1+n_3=2-3$ 。

【0221】 在一些實施方式中， m_1 、 m_2 和 m_3 獨立地選自2-10的整數時，可以使多個 M_1 配體之間的空間位置適合 M_1 配體與肝表面去唾液酸糖蛋白受體的結合，為了使本發明提供的綴合物更為簡單，更容易合成和/或降低成本，在一些實施方式中， m_1 、 m_2 和 m_3 各自獨立地為2-5的整數，在一些實施方式中， $m_1=m_2=m_3$ 。

【0222】 所屬技術領域具有通常知識者可以理解，當 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 和 R_{15} 各自獨立地為H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_1 - C_{10} 鹵代烷基、以及 C_1 - C_{10} 烷氧基中的一種時，不會改變本文公開的綴合物的性質，均可以實現本發明的目的。在一些實施方式中， R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 和 R_{15} 各自獨立地選自H、甲基和乙基。在一些實施方式中， R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 和 R_{15} 均為H。

【0223】 根據本發明提供的第二種siRNA綴合物， R_3 為式A59所示結構的基團，其中， E_1 為OH、SH或 BH_2 ，基於製備原料易獲取性的考慮，在一些實施方式中， E_1 為OH或SH。

【0224】 在一些實施方式中， R_2 的選擇是為了實現與含氮骨架上的N與A59的连接。在本發明的上下文中，“含氮骨架”是指连接有 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 和 R_{15} 的碳原子與N互相連接的鏈狀結構。因此， R_2 可以是任何能夠以適當方式將A59基團連接至含氮骨架上的N的连接基團。在一些實施方式中，在藉由固相合成的製程製備本發明的siRNA綴合物的情況下， R_2 基團中需要同時含有與含氮骨架上的N連接的连接位點和與 R_3 中的P相連接的连接位點。在一些實施方式中， R_2 中所述與含氮骨架上的N連接的位點與N形成醯胺鍵，所述與 R_3 上的P連接的位點與P形成磷酸酯鍵。在一些實施方式中， R_2 可以是B5、B6、B5'或B6'：



【0225】 其中， $\sim$ 表示基團共價鍵連接的位點。

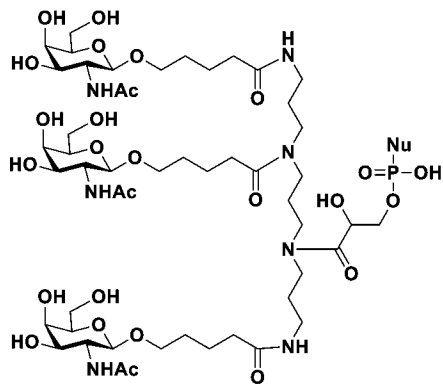
【0226】 q_2 的取值範圍可以是1-10的整數，在一些實施方式中， q_2 為1-5的整數。

【0227】 L_1 的作用是將 M_1 配體與含氮骨架上的N連接，為本發明的第二種siRNA綴合物提供肝標靶功能。在一些實施方式中， L_1 選自式A1-A26基團中的一種或多種的連接組合；在一些實施方式中， L_1 選自A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11和A13中的一種或多種的連接組合；在一些實施方式中， L_1 選自A1、A4、A8、A10和A11中至少2個的連接組合；在一些實施方式中， L_1 選自A1、A8、A10中至少2個的連接組合。

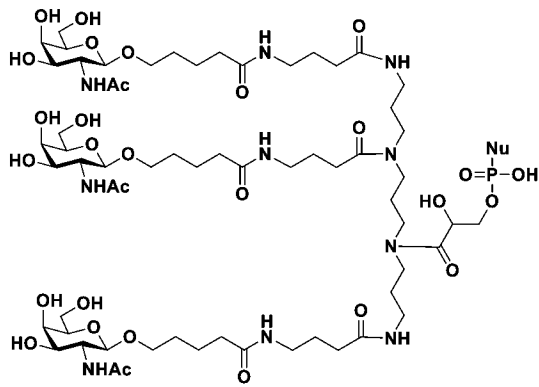
【0228】 在一些實施方式中， L_1 的長度可以為3-25個原子，3-20個原子、4-15個原子或5-12個原子。在一些實施方式中， L_1 的長度為3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個原子。

【0229】 在一些實施方式中， j_1 為2-10的整數，在一些實施方式中， j_1 為3-5的整數。 j_2 為2-10的整數，在一些實施方式中， j_2 為3-5的整數。 R' 為C1-C4的烷基，在一些實施方式中， R' 為甲基、乙基和異丙基中的一種。 R_a 為A27、A28、A29、A30和A31中的一種，在一些實施方式中， R_a 為A27或A28。 R_b 為C1-C5的烷基，在一些實施方式中， R_b 為甲基、乙基、異丙基和丁基中的一種。在一些實施方式中，在式A1-A26中各自對 j_1 、 j_2 、 R' 、 R_a 、 R_b 進行選擇，以實現 M_1 配體與含氮骨架上的N連接，並使 M_1 配體之間的空間位置更適合 M_1 配體與肝表面去唾液酸糖蛋白受體結合。

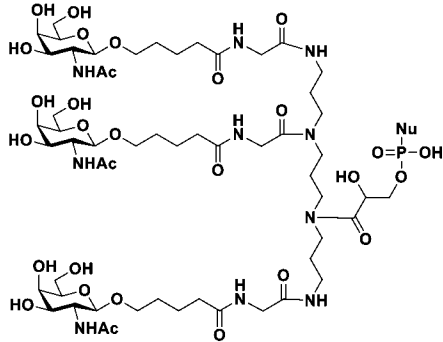
【0230】 在一些實施方式中，本發明的siRNA綴合物具有式(403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421)或(422)所示的結構：



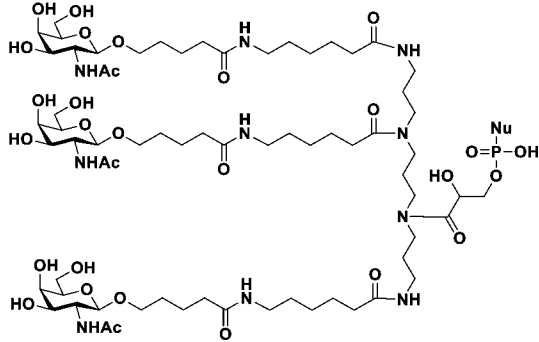
式(403)



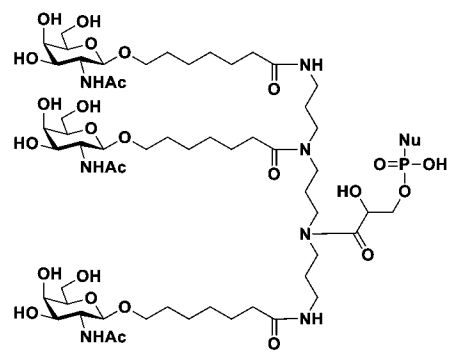
式(404)



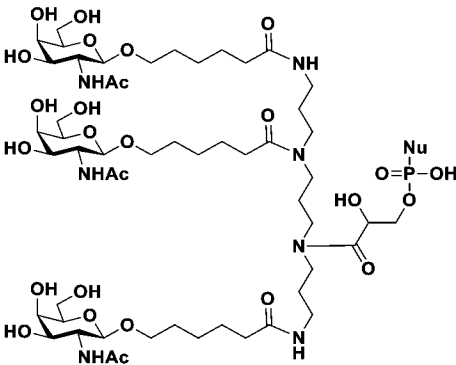
式(405)



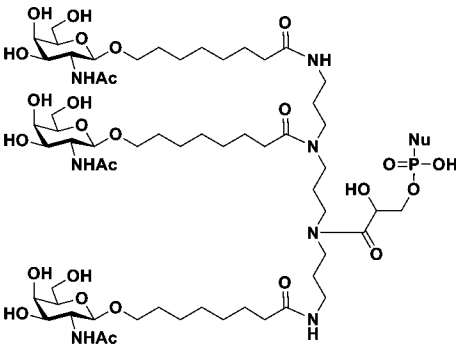
式(406)



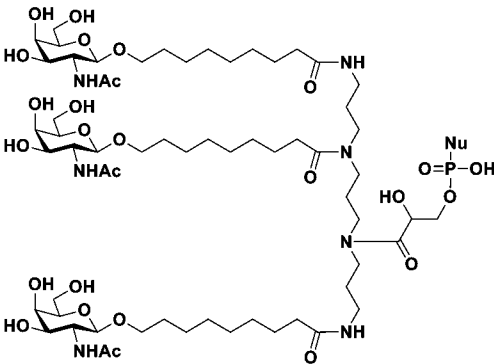
式(407)



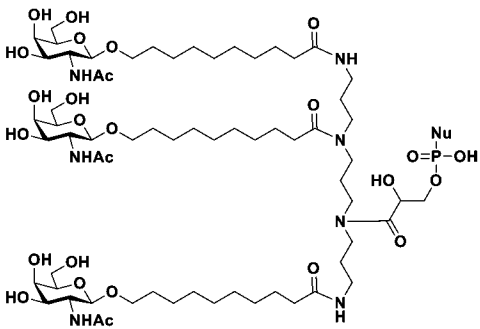
式(408)



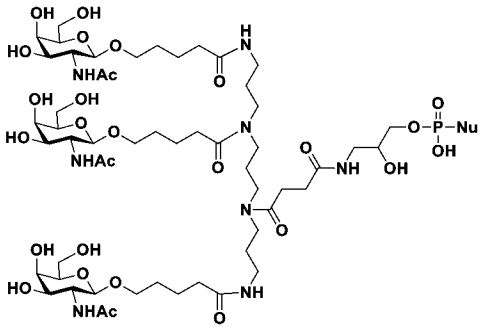
式(409)



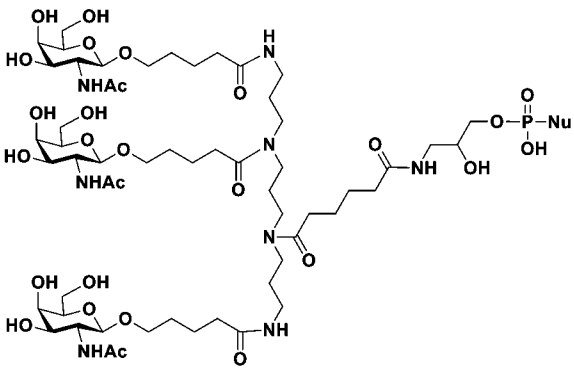
式(410)



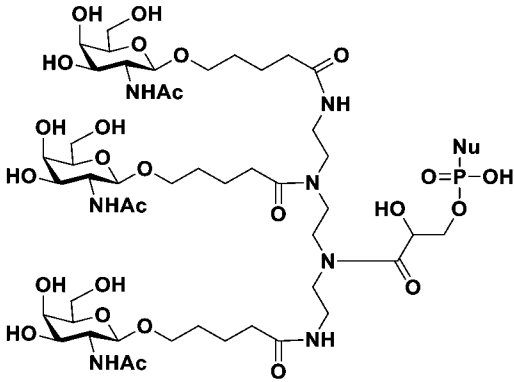
式(411)



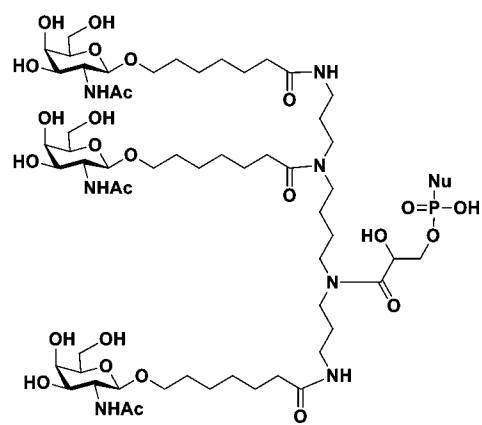
式(412)



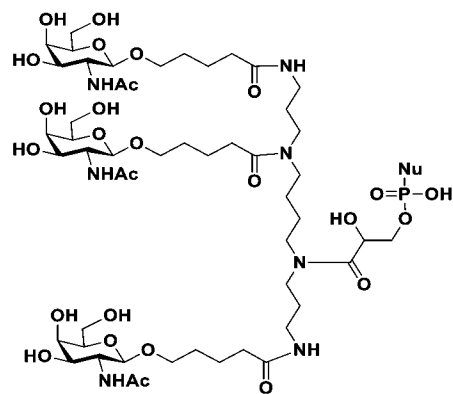
式(413)



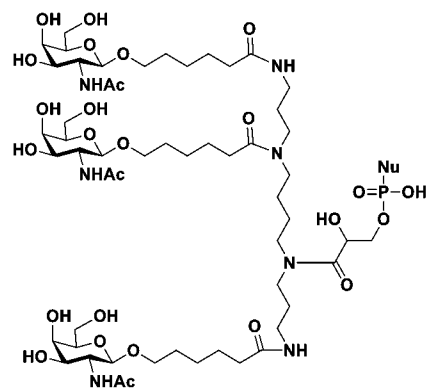
式(414)



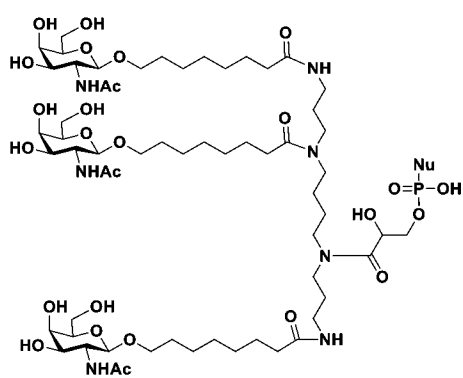
式(415)



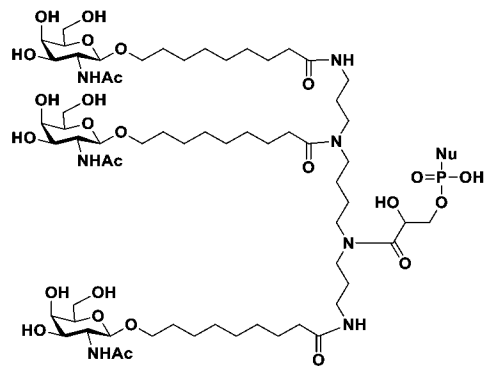
式(416)



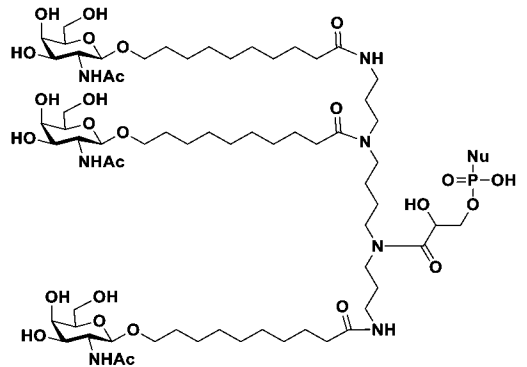
式(417)



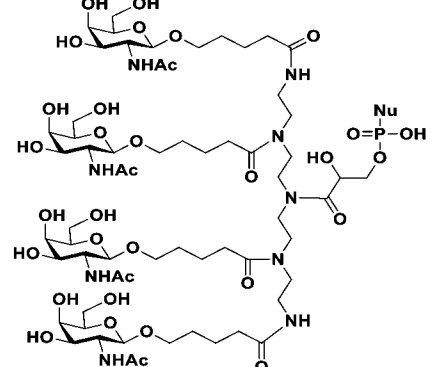
式(418)



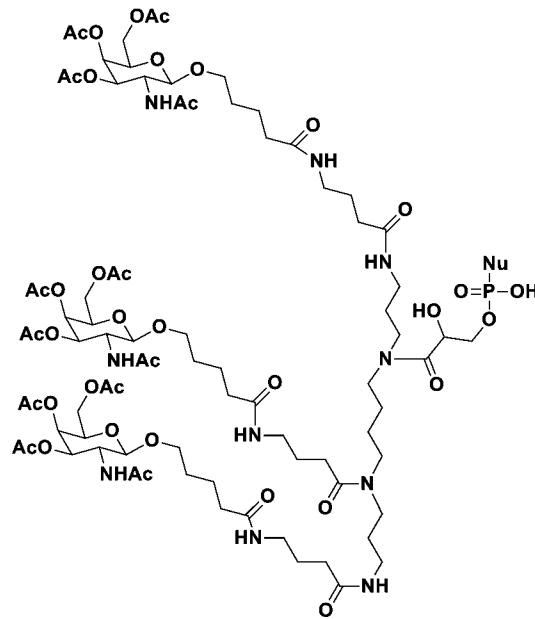
式(419)



式(420)



式(421)



式(422)。

【0231】 在一些實施方式中，式A59中的P可以連接到Nu代表的siRNA序列中任何可能的位置，例如，式A59中的P可以連接到Nu代表的siRNA正義鏈或反義鏈的任何一個核苷酸上；在一些實施方式中，式A59中的P連接到Nu代表的siRNA正義鏈的任何一個核苷酸上。在一些實施方式中，式A59中的P連接到Nu代表的siRNA正義鏈或反義鏈的端部；在一些實施方式中，式A59中的P連接到Nu代表的siRNA正義鏈的端部。Nu代表的siRNA的端部指Nu代表的siRNA正義鏈或所述反義鏈中從其一端起算的前4個核苷酸。在一些實施方式中，式A59中的P連接到Nu代表的siRNA正義鏈或反義鏈的末端；在一些實施方式中，式A59中的P連接到Nu代表的siRNA正義鏈的3'末端。在連接至Nu代表的siRNA的正義鏈的上述位置的情況下，第二種siRNA綴合物進入細胞後，在解旋時，可以釋放出單獨的siRNA反義鏈，以阻斷HBV的mRNA轉譯蛋白質的過程，抑制B型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因表達。

【0232】 式A59中的P可以連接到Nu代表的siRNA中的核苷酸上任何可能的位置，例如，核苷酸的5'位、核苷酸的2'位、核苷酸的3'位或核苷酸的鹼基上。

在一些實施方式中，式A59中的P可藉由形成磷酸二酯鍵連接至Nu代表的siRNA中的核苷酸的2'位、3'位或5'位。在一些實施方式中，式A59中的P連接在Nu代表的siRNA正義鏈3'末端核苷酸的3'羥基脫氫後形成的氧原子上，或者式A59中的P藉由取代Nu代表的siRNA正義鏈中的一個核苷酸的2'-羥基中的氫與核苷酸連接，或者式A59中的P藉由取代Nu代表的siRNA正義鏈5'末端核苷酸的5'羥基中的氫與核苷酸連接。

【0233】 本發明所述siRNA或siRNA綴合物中，每個相鄰核苷酸之間由磷酸二酯鍵或硫代磷酸二酯鍵連接，磷酸二酯鍵或硫代磷酸二酯鍵中的非橋接氧原子或硫原子帶有負電荷，它可以以羥基或巯基的形式存在，羥基或巯基中的氫離子也可以部分或全部被陽離子取代。所述陽離子可以是任意的陽離子，如金屬陽離子，銨離子 NH_4^+ ，有機銨陽離子中的一種。出於提高溶解性考慮，在一種實施方式中，所述陽離子選自鹼金屬離子、三級胺形成的銨陽離子和季銨陽離子中的一種或多種。鹼金屬離子可以是 K^+ 和/或 Na^+ ，三級胺形成的陽離子可以是三乙胺形成的銨離子和/或N,N-二異丙基乙胺形成的銨離子。因此，本發明所述siRNA或第一種或第二種siRNA綴合物可以至少部分以鹽的形式存在。在一種方式中，磷酸二酯鍵或硫代磷酸二酯鍵中的非橋接氧原子或硫原子至少部分與鈉離子結合，本發明所述siRNA或第一種或第二種siRNA綴合物以鈉鹽或部分鈉鹽的形式存在。

【0234】 所屬技術領域具有通常知識者清楚知曉的是，可以藉由使用具有相應修飾的核苷單體來將修飾的核苷酸基團引入本發明所述的siRNA中。製備具有相應修飾的核苷單體的方法及將修飾的核苷酸基團引入siRNA的方法也是所屬技術領域具有通常知識者所熟知的。所有修飾的核苷單體均可以商購得到或者採用已知方法製備得到。

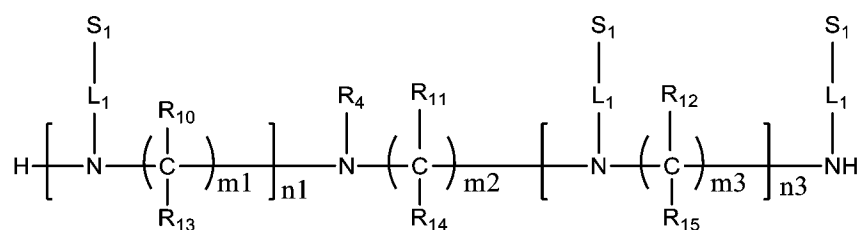
【0235】 第二種siRNA綴合物的製備

第 57 頁，共 148 頁(發明說明書)

【0236】 可以採用任意合理的合成途徑製備本發明的第二種siRNA綴合物。

【0237】 在一些實施方式中，第二種siRNA綴合物可以採用如下方法製備，該方法包括在亞磷醯胺固相合成的條件下，分別按照siRNA正義鏈和反義鏈的核苷酸種類和順序，按照3'到5'的方向將核苷單體依次連接，每個核苷單體的連接包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化四步反應；分離出siRNA的正義鏈和反義鏈，退火，其中，Nu代表的siRNA為上述本發明的siRNA；

【0238】 並且，該方法還包括在偶聯反應條件和偶聯試劑存在下，將式(321)所示的化合物與核苷單體或連接在固相載體上的核苷酸序列接觸，使式(321)所示的化合物經偶聯反應連接至核苷酸序列。下文中，式(321)所示的化合物也稱作綴合分子。



式(321)

【0239】 其中：

【0240】 R_4 為能夠結合至Nu代表的siRNA的部分。在一些實施方式中， R_4 為能夠藉由共價鍵結合至Nu代表的siRNA的部分。在一些實施方式中， R_4 為能夠經反應而藉由磷酸二酯鍵綴合至Nu代表的siRNA的任意官能團的部分；

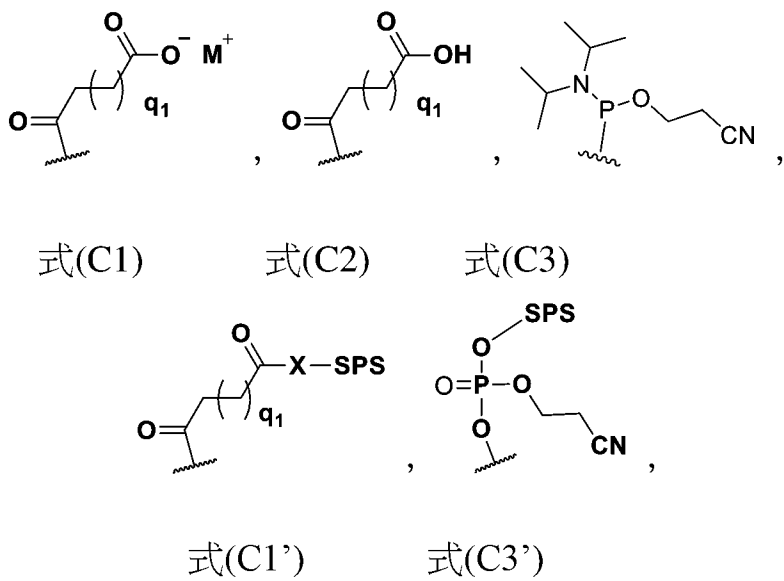
【0241】 每個 S_1 獨立地是 M_1 中全部活性羥基被 YCOO- 基團取代而形成的基團，其中，每個Y獨立地選自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、異丙基、苯基、鹵代苯基以及烷基苯基中的一種；

【0242】 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 各自的定義和可選擇的範圍如前所述。

【0243】 R_4 的選擇是為了實現與含氮骨架上的N的連接，並且為合成式(308)的siRNA綴合物提供合適的反應位點。在一些實施方式中， R_4 中包括 R_2 連接基團或經保護的 R_2 連接基團，以及可藉由反應與siRNA形成A59所示結構的官能團。

【0244】 在一些實施方式中， R_4 含包含可與Nu代表的siRNA或核苷單體上的基團形成亞磷酸酯的第1官能團以及可與羥基或氨基反應形成共價鍵的第2官能團或者含有由所述共價鍵連接的固相載體。在一些實施方式中，所述第1官能團為亞磷醯胺、羥基或被保護的羥基。在一些實施方式中，所述第2官能團為亞磷醯胺、羧酸或羧酸鹽。在一些實施方式中，所述第2官能團為經由共價鍵連接至分子其他部分的固相載體，所述共價鍵由羥基或氨基形成。在一些實施方式中，所述固相載體經由磷酸酯鍵、羧酸酯鍵或醯胺鍵連接。在一些實施方式中，所述固相載體為樹脂。

【0245】 在一些實施方式中，所述第1官能團含有羥基、 $-OR_k$ 或式(C3)所示的基團；所述第2官能團含有式(C1)、(C2)、(C3)、(C1')或(C3')所示的結構：



【0246】 式中， q_l 為1-4的整數，X為O或NH， M^+ 為陽離子， R_k 為羥基保護基團，SPS表示固相載體， $\sim$ 表示基團共價連接的位點。

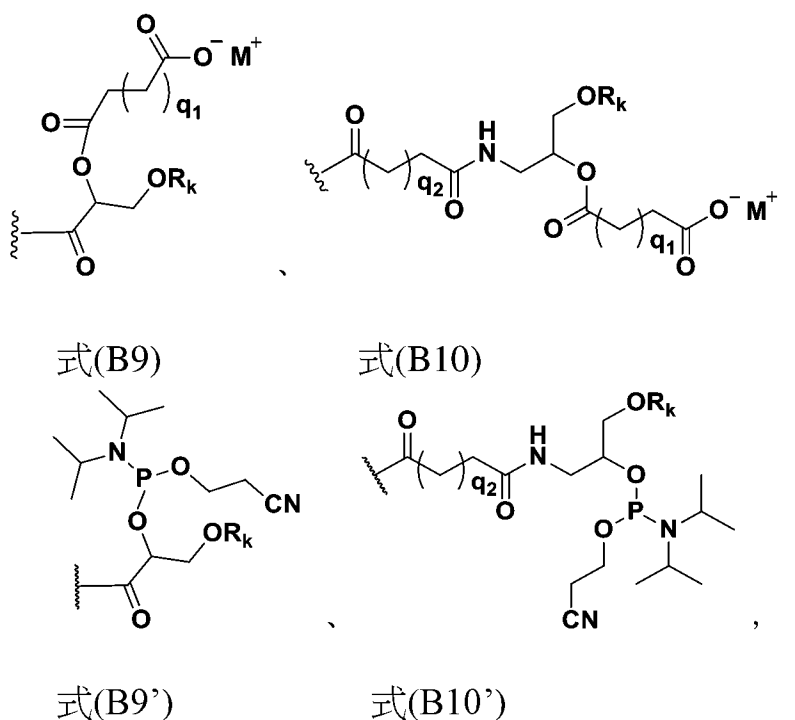
【0247】 在一些實施方式中，所述第1官能團含有亞磷醯胺官能團，如式(C3)所示，該亞磷醯胺基團可以與核苷酸上的任意位置的羥基，如2'位羥基或3'位羥基發生偶聯反應形成亞磷酸酯，並經氧化或硫化形成式A59所示的磷酸二酯鍵或硫代磷酸酯鍵，將綴合分子綴合至siRNA。此時，即使所述第2官能團並不存在，式(321)化合物也能夠綴合至核苷酸，不影響式(308)所示siRNA綴合物的獲得。在此情況下，在經由亞磷醯胺固相合成等方法獲得siRNA的正義鏈或反義鏈後，使式(321)化合物與核苷酸序列中末端核苷酸上的羥基反應，並在後續的氧化或硫化過程中形成磷酸二酯鍵連接或硫代磷酸酯連接，將式(321)化合物綴合至siRNA。

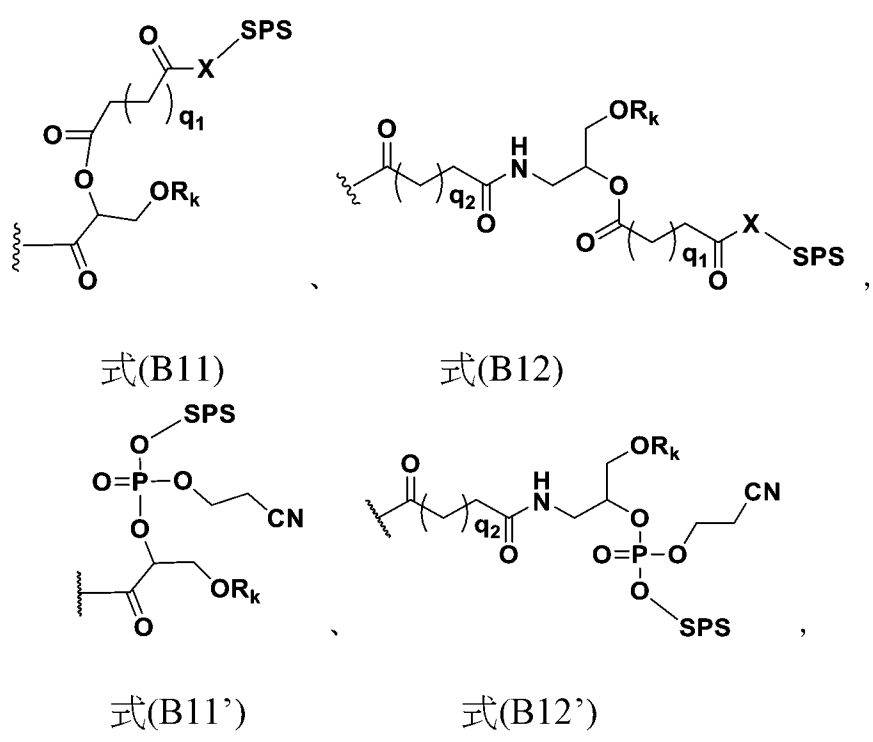
【0248】 在一些實施方式中，所述第1官能團含有被保護的羥基。在一些實施方式中，所述第2官能團包含可與固相載體反應的基團，所述反應提供包含固相載體的綴合分子。在一些實施方式中，所述第2官能團含有羧基、羧酸鹽或亞磷醯胺，如式(C1)、(C2)或(C3)所示，當所述第2官能團包含羧基或羧酸鹽時，式(321)化合物與固相載體，例如樹脂上的羥基或氨基進行酯化反應或醯胺化反應，形成經羧酸酯鍵連接或經醯胺鍵連接的包含固相載體的綴合分子。當所述第2官能團包含亞磷醯胺官能團時，式(321)化合物與通用固相載體，例如樹脂上的羥基發生偶聯反應，並經氧化形成經磷酸二酯鍵連接的包含固相載體的綴合分子。隨後，以上述連接固相載體後的產物作為起始，按照亞磷醯胺固相合成方法依次連接核苷單體，獲得連接有綴合基團的siRNA的正義鏈或反義鏈。在亞磷醯胺固相合成過程中，所述第1官能團發生脫保護，隨後在偶聯反應條件下與核苷單體上的亞磷醯胺基團發生偶聯。

【0249】 在一些實施方式中，所述第1官能團含有羥基或被保護的羥基；所述第2官能團含有經羧酸酯鍵連接的固相載體或經醯胺鍵連接的固相載體、或者經磷酸酯鍵連接的固相載體，如式(C1')或(C3')所示。此時，由式(321)化合物代替固相載體作為起始，按照亞磷醯胺固相合成方法依次連接核苷單體，獲得連接有綴合基團的siRNA的正義鏈或反義鏈。

【0250】 在一些實施方式中，羧酸鹽可以表示為 $\text{—COO}^-\text{M}^+$ ，其中， M^+ 是陽離子，例如選自金屬陽離子，銨陽離子 NH_4^+ ，有機銨陽離子中的一種。在一種實施方式中，所述金屬離子選自鹼金屬離子中的一種，如 K^+ 或 Na^+ 。出於提高溶解性、使反應順利進行的考慮，在一些實施方式中，有機銨離子為三級胺形成的銨陽離子或季銨陽離子，如，三乙胺形成的銨離子或N,N-二異丙基乙胺形成的銨離子。在一些實施方式中，羧酸鹽是三乙胺羧酸鹽或N,N-二異丙基乙胺羧酸鹽。

【0251】 在一些實施方式中， R_4 含有式(B9)、(B10)、(B9')、(B10')、(B11)、(B12)、(B11')或(B12')所示的結構：





【0252】 其中， q_1 為1-4的整數， q_2 為1-10的整數，X為O或NH， M^+ 為陽離子， R_k 為羥基保護基團，SPS表示固相載體， $\sim$ 表示基團共價鍵連接的位點。在一些實施方式中， q_1 為1或2。在一些實施方式中， q_2 為1-5的整數。在一些實施方式中， R_4 含有式(B9)或(B10)所示的結構。在一些實施方式中， R_4 含有式(B11)或(B12)所示的結構。

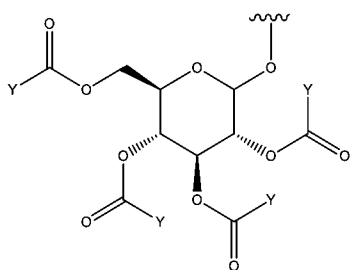
【0253】 在一些實施方式中， R_k 是Tr(三苯甲基)、MMTr(4-甲氧基三苯甲基)、DMTr(4,4'-雙甲氧基三苯甲基)、TMTr(4,4',4'-三甲氧基苯甲基)中的一種或多種。在一些實施方式中， R_k 可以是DMTr，即4,4'-雙甲氧基三苯甲基(4,4'-dimethoxytrityl)。

【0254】 L_1 的定義如前所述。在一些實施方式中， L_1 被用於將 M_1 配體連接至含氮骨架上的N原子，從而為寡核苷酸綴合物提供肝標靶功能。在一些實施方式中， L_1 包含A1-A26中的任一個或其組合。

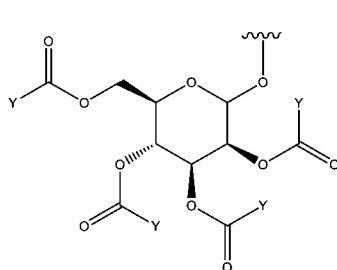
【0255】 根據上述描述，所屬技術領域具有通常知識者容易理解的是，相較於本領域習知的亞磷醯胺固相合成方法而言，可藉由上述第1官能團以及任選

的第2官能團，獲得將綴合分子連接至核苷酸序列的任意可能的位置的siRNA綴合物，例如，綴合分子連接至核苷酸序列的端部，綴合分子連接至核苷酸序列的末端。相應地，除非另有說明，以下涉及綴合製備的描述中，當提及“脫保護”、“偶聯”、“蓋帽”、“氧化”、“硫化”等反應時，應當理解為本領域習知的亞磷醯胺核酸固相合成方法中所涉及的反應條件和試劑也同樣適用於這些反應。示例性的反應條件和試劑將在後文詳細描述。在一些實施方式中，每個 S_1 獨立地是 M_1 。在一些實施方式中，每個 S_1 獨立地是 M_1 中至少一個活性羥基被羥基保護基團保護而形成的基團。在一些實施方式中，每個 S_1 獨立地是 M_1 中任何存在的活性羥基全部被羥基保護基團保護而形成的基團。在一些實施方式中，任何所屬技術領域具有通常知識者已知的羥基保護基團均可被用於保護 M_1 中的活性羥基。在一些實施方式中，被保護的羥基可以式 $YCOO-$ 表示，其中，每個 Y 獨立地選自於由 C_1-C_{10} 烷基和 C_6-C_{10} 芳基所組成的群組，所述 C_1-C_{10} 烷基和 C_6-C_{10} 芳基任選地被一個或多個取代基取代，所述取代基選自於由鹵素和 C_1-C_6 烷基所組成的群組。在一些實施方式中，每個 Y 獨立地選自於由以下基團所組成的群組：甲基、三氟甲基、二氟甲基、單氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、異丙基、苯基、鹵苯基，以及 C_1-C_6 烷基苯基。

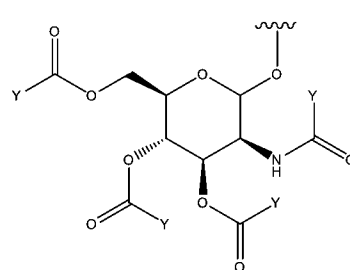
【0256】 在一些實施方式中，每個 S_1 各自獨立地選自於由式A46-A54所組成的群組：



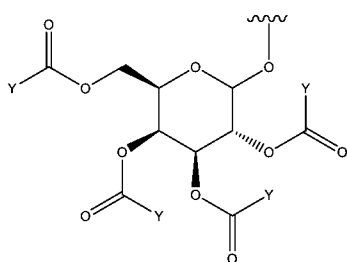
式(A46)



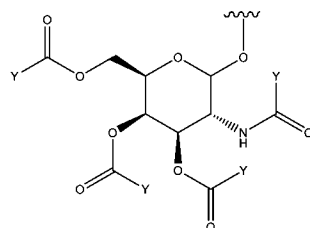
式(A47)



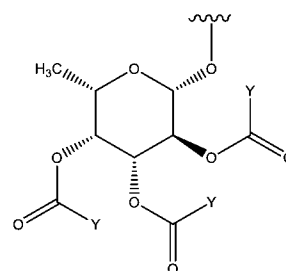
式(A48)



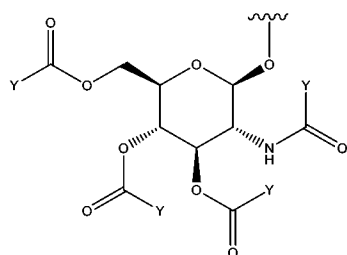
式(A49)



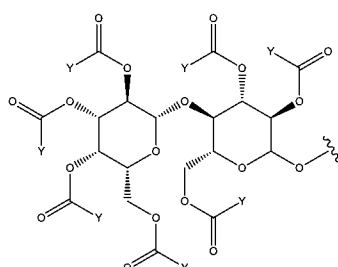
式(A50)



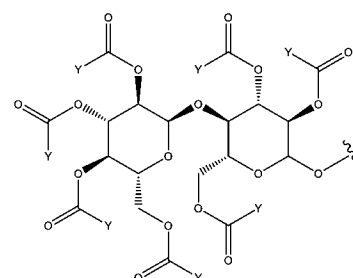
式(A51)



式(A52)



式(A53)



式(A54)

【0257】 在一些實施方式中， S_1 為式A49或A50。

【0258】 在一些實施方式中，每個Y獨立地選自甲基、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、異丙基、苯基、鹵代苯基以及烷基苯基中的一種；出於簡化本發明的綴合分子的目的，在一些實施方式中，Y為甲基。

【0259】 如前所述，本發明的siRNA綴合物的製備方法還包括以下步驟：合成siRNA的另一鏈(例如，當上述步驟合成了連接有綴合分子的siRNA正義鏈時，還包括按照固相合成方法合成siRNA的反義鏈，反之亦然)，分離正義鏈和反義鏈，以及退火。具體地，在分離步驟中，連接至核苷酸序列和/或綴合分子的固相載體被切割下來，同時必要的保護基團被脫除(此時，式(321)化合物中的各 S_1 基團轉化為對應的 M_1 配體)，獲得連接有綴合分子的siRNA正義鏈(或反義鏈)以及對應的反義鏈(或正義鏈)，正義鏈與反義鏈退火形成雙鏈RNA結構，獲得式(308)所示的siRNA綴合物。

【0260】 在一些實施方式中，所述siRNA綴合物的製備方法包含以下步驟：在偶聯反應條件和偶聯試劑存在下，將式(321)所示的化合物與正義鏈或反義鏈的3'末端的第一個核苷單體接觸，使式(321)所示的化合物連接上序列中第一個核苷酸，在亞磷醯胺固相合成的條件下，按照期望的正義鏈或反義鏈核苷酸種類和順序，按照3'到5'的方向將核苷單體依次連接，合成siRNA的正義鏈或反義鏈；其中，(321)化合物為 R_4 中含有第1官能團和第2官能團，第1官能團含有被保護的羥基，第2官能團具有如式(C1')或(C3')所示結構的式(321)所示的化合物，與第一個核苷單體連接前，式(321)化合物經過脫保護；每個核苷單體的連接包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化四步反應；得到連接有綴合分子的核酸的正義鏈或反義鏈；在亞磷醯胺固相合成的條件下，按照反義鏈或正義鏈核苷酸種類和順序，按照3'到5'的方向將核苷單體依次連接，合成核酸的反義鏈或正義鏈；每個核苷單體的連接包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化四步反應；脫除保護基並與固相載體切割，分離純化獲得核酸的正義鏈和反義鏈，退火。

【0261】 在一些實施方式中，第二種siRNA綴合物的製備方法包含以下步驟：按照該雙鏈siRNA中正義鏈或反義鏈的核苷酸種類和順序，按照3'到5'的方向將核苷單體依次連接，合成正義鏈和反義鏈，每個核苷單體的連接包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化四步反應，得到連接在固相載體上的正義鏈和連接在固相載體上的反義鏈；在偶聯反應條件和偶聯試劑存在下，將式(321)所示的化合物與連接在固相載體上的正義鏈或連接在固相載體上的反義鏈接觸，將式(321)化合物連接至正義鏈或反義鏈，其中，式(321)化合物是 R_4 中含有第1官能團，第1官能團為亞磷醯胺基團的式(321)化合物；脫除保護基並與固相載體切割，分別分離純化，獲得siRNA的正義鏈或反義鏈，退火，其中，所述siRNA的正義鏈或反義鏈上連接有綴合分子。

【0262】 在一些實施方式中，式A59中的P連接至siRNA中的正義鏈的3'末端，本發明的siRNA綴合物的製備方法包括：

【0263】 (1)脫除式(321)化合物(其中，式(321)化合物為 R_4 中含有第1官能團和第2官能團，第1官能團含有被保護的羥基 OR_k ，第2官能團具有如式(C1')或(C3')所示結構的化合物)中的羥基保護基團 R_k ；在偶聯反應條件和偶聯試劑存在下，將脫保護得到的產物與核苷單體接觸，得到藉由綴合分子連接至固相載體的核苷單體；

【0264】 (2)以該藉由綴合分子連接至固相載體的核苷單體起始，按照3'-5'的方向藉由亞磷醯胺固相合成方法合成siRNA的正義鏈；

【0265】 (3)藉由亞磷醯胺固相合成方法，合成siRNA的反義鏈；

【0266】 (4)分離出siRNA的正義鏈和反義鏈並退火，獲得本發明的siRNA綴合物。

【0267】 其中，在步驟(1)中，脫除式(321)化合物中的保護基團 R_k 的方法包括在脫保護條件下，將式(321)化合物與脫保護試劑接觸。脫保護條件包括溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C，反應時間為30-300秒，在一些實施方式中為50-150秒，脫保護試劑可以選自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一種或多種，在一些實施方式中為二氯乙酸。脫保護試劑與式(321)化合物的莫耳比為10:1-1000:1，在一個實施方式中為50:1-500:1。

【0268】 所述偶聯反應條件和偶聯試劑可使用任何適合於上述偶聯反應的條件和試劑。在一些實施方式中，可使用與所採用的固相合成方法中的偶聯反應相同的條件與試劑。

【0269】 在一些實施方式中，所述偶聯反應的條件包括反應溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C。式(321)化合物與核苷單體的莫耳比為1:1-1:50，在一些實施方式中為1:2-1:5；式(321)化合物和偶聯試劑的莫耳比可以

1:1-1:50，在一些實施方式中為1:3-1:10，反應時間為200-3000秒，在一些實施方式中為500-1500秒。偶聯試劑選自1H-四氮唑、5-乙硫基1H-四氮唑、5-苄硫基1H-四氮唑中的一種或多種，在一些實施方式中為5-乙硫基1H-四氮唑。所述偶聯反應可在有機溶劑中進行，所述有機溶劑選自無水乙腈、無水DMF、無水二氯甲烷中的一種或多種，在一些實施方式中為無水乙腈。相對於式(321)化合物，所述有機溶劑的用量為3-50L/mol，在一些實施方式中為5-20L/mol。

【0270】 在步驟(2)中，藉由亞磷醯胺核酸固相合成的方法，利用上述步驟製備的藉由綴合分子連接至固相載體的核苷單體起始，按照3'-5'的方向合成siRNA綴合物的正義鏈S。此時，綴合分子連接至所得到的正義鏈的3'末端。

【0271】 步驟(2)和(3)中所述固相合成的其它條件，包括核苷單體脫保護條件，脫保護試劑種類和用量，偶聯反應條件，偶聯試劑的種類和用量，蓋帽反應的條件，蓋帽試劑的種類和用量，氧化反應條件，氧化試劑種類和用量，硫化反應條件，硫化試劑和用量採用本領域中常規使用的各種試劑、用量和條件。

【0272】 例如，在一些實施方式中，步驟(2)和(3)中所述固相合成可使用如下條件：

【0273】 核苷單體脫保護條件包括溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C，反應時間為30-300秒，在一些實施方式中為50-150秒，脫保護試劑可以選自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸、中的一種或多種，在一些實施方式中為二氯乙酸。脫保護試劑與固相載體上4,4'-二甲氧基三苯甲基保護基的的莫耳比為2:1-100:1，在一些實施方式中為3:1-50:1。

【0274】 偶聯反應條件包括溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C，固相載體上連接的核酸序列與核苷單體的莫耳比為1:1-1:50，在一些實施方式中為1:5-1:15；固相載體上連接的核酸序列和偶聯試劑的莫耳比為1:1-1:100，在一些實施方式中為1:50-1:80，反應時間和偶聯試劑的選擇與前述相同。

【0275】 蓋帽反應條件包括溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C，反應時間為5-500秒，在一些實施方式中為10-100秒，蓋帽試劑的選擇與前述相同。蓋帽試劑的總量與固相載體上連接的核酸序列的莫耳比為1:100-100:1，在一些實施方式中為1:10-10:1。在蓋帽試劑使用等莫耳量的乙酸酐與N-甲基咪唑的情況下，乙酸酐、N-甲基咪唑以及固相載體上連接的核酸序列的莫耳比為1:1:10-10:10:1，在一些實施方式中為1:1:2-2:2:1。

【0276】 氧化反應條件包括溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C，反應時間為1-100秒，在一些實施方式中為5-50秒，氧化試劑在一些實施方式中為碘(在一些實施方式中，以碘水的形式提供)。氧化試劑與偶聯步驟中固相載體上連接的核酸序列的莫耳比可以為1:1-100:1，在一些實施方式中為5:1-50:1。在一些實施方式中，所述氧化反應在四氫呋喃:水:吡啶=3:1:1-1:1:3的混合溶劑中進行。硫化反應條件包括溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C，反應時間為50-2000秒，在一些實施方式中為100-1000秒，硫化試劑在一些實施方式中為氫化黃原素。硫化試劑與偶聯步驟中固相載體上連接的核酸序列的莫耳比可以為10:1-1000:1，在一些實施方式中為10:1-500:1。在一些實施方式中，所述硫化反應在乙腈:吡啶=1:3-3:1的混合溶劑中進行。

【0277】 在將所有核苷單體連接之後，退火之前，該方法還包括分離出siRNA的正義鏈和反義鏈。分離的方法為所屬技術領域具有通常知識者所習知，一般包括將合成得到的核苷酸序列從固相載體上切割下來，脫除鹼基上、磷酸基上和配體上的保護基團，純化和脫鹽。

【0278】 將合成得到的核苷酸序列從固相載體上切割下來，並脫除鹼基上、磷酸基上和配體上的保護基團可按照siRNA合成中常規的切割和脫保護方法進行。例如，將得到的連接有固相載體的核苷酸序列與濃氨水接觸；在脫保護的過程中，A46-A54基團的保護基團YCOO-轉化為羥基，S₁基團轉化為相應的

M₁基團，生成式(308)所示的綴合物。其中，所述濃氨水可以是25-30重量%的氨水，濃氨水的用量與目標siRNA序列相比可以為0.2ml/μmol-0.8ml/μmol。

【0279】在所合成的核苷酸序列上存在至少一個2'-TBDMS保護時，所述方法還包括將脫除了固相載體的核苷酸序列與三乙胺三氫氟酸鹽接觸，以脫除該2'-TBDMS保護。此時，所得到的目標siRNA序列中具有游離的2'-羥基的相應核苷。三乙胺三氫氟酸鹽純品的用量與目標siRNA序列相比為0.4ml/μmol-1.0ml/μmol。這樣即可得到式(308)的siRNA綴合物。

【0280】純化和脫鹽的方法是所屬技術領域具有通常知識者熟知的。例如，可利用製備型離子層析純化柱，藉由NaBr或NaCl的梯度沖提，完成核酸的純化；產品收集合併後，可採用反相層析純化柱進行脫鹽。

【0281】這樣得到的siRNA綴合物中，核苷酸之間的磷酸二酯鍵或硫代磷酸二酯鍵中的非橋接氧原子或硫原子基本與鈉離子結合，siRNA綴合物基本以鈉鹽形式存在。可以採用熟知的離子交換方法，用氫離子和/或其他陽離子取代所述鈉離子，得到其他形式的siRNA綴合物。所述陽離子如前所述。

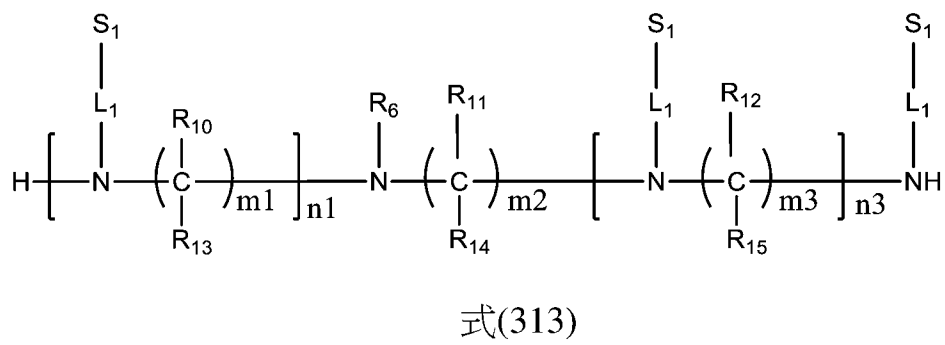
【0282】在合成過程中，可隨時對核酸序列的純度和分子量進行檢測，更好地把控合成質量，此類檢測方法為所屬技術領域具有通常知識者所習知。例如，可藉由離子交換層析檢測核酸純度，並藉由液質聯用層析測定分子量。

【0283】退火的方法也是所屬技術領域具有通常知識者熟知的。例如，可簡單地將所合成的正義鏈(S鏈)與反義鏈(AS鏈)以等莫耳比混合在注射用水中加熱至70-95°C，隨後室溫冷卻，使其藉由氫鍵形成雙鏈結構。這樣即可得到本發明的siRNA綴合物。

【0284】在獲得本發明的綴合物後，在一些實施方式中，還可利用例如液質聯用層析等方法，藉由分子量檢測等方式對所合成的siRNA綴合物進行表徵，

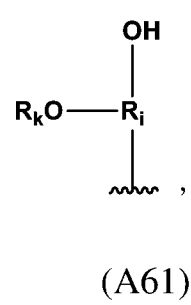
確定所合成的siRNA綴合物為目標設計的siRNA綴合物，且所合成的siRNA的序列與欲合成的siRNA的序列相符，例如為表1中所列的序列之一。

【0285】 式(321)所示化合物可以藉由以下製備方法得到：該方法包括在有機溶劑中，在酯化反應條件下，以及在鹼和酯化催化劑存在下，將式(313)所示化合物與環狀酸酐接觸，離子交換，分離得到式(321)所示化合物：



【0286】 其中，n1、n3、m1、m2、m3、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅、L₁、S₁各自的定義和可選擇的範圍如前所述；

【0287】 R₆為提供式(321)中R₄的基團。在一些實施方式中，R₆具有式(A61)所示的結構：



【0288】 其中，R_i為能夠實現與含氮骨架上的N連接、與R_kO連接並且連接有一個游離羟基的任意基團，R_k為羟基保護基團。此時，所獲得的是R₄中含有作為羟基保護基團的第1官能團和第2官能團，所述第2官能團含有如式(C1)或(C2)所示結構的式(321)化合物。

【0289】 所述酯化反應條件包括反應溫度為0-100℃，反應時間為8-48小時，在一些實施方式中，所述酯化反應條件為反應溫度為10-40℃，反應時間為20-30小時。

【0290】 在一些實施方式中，所述有機溶劑包含環氧類溶劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砷、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種。在一些實施方式中，所述環氧類溶劑為二氧六環和/或四氫呋喃，所述醚類溶劑為乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述鹵代烷類溶劑為二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一種或多種。在一些實施方式中，所述有機溶劑為二氯甲烷。相對於所述式(313)所示化合物，所述有機溶劑的用量為3-50L/mol，在一些實施方式中為5-20L/mol。

【0291】 在一些實施方式中，所述環狀酸酐為丁二酸酐、戊二酸酐、己二酸酐或庚二酸酐中的一種，在一些實施方式中為丁二酸酐。所述環狀酸酐與所述式(313)所示化合物的莫耳比為1:1-10:1，在一些實施方式中為2:1-5:1。

【0292】 所述酯化催化劑可以是任何對該酯化反應起到催化作用的催化劑，例如該催化劑可以是4-二甲氨基吡啶。所述催化劑與式(313)所示化合物的莫耳比為1:1-10:1，在一些實施方式中為2:1-5:1。

【0293】 在一些實施方式中，所述鹼可以是任意的無機鹼，有機鹼或者它們的結合。考慮溶解性和產物穩定性，所述鹼可以是例如三級胺類有機鹼。在一些實施方式中，所述三級胺類有機鹼為三乙胺或N,N-二異丙基乙胺。所述三級胺類有機鹼與式(313)所示化合物的莫耳比為1:1-20:1，在一些實施方式中為3:1-10:1。

【0294】 所述離子交換作用是將式(321)化合物轉化為期望的羧酸或羧酸鹽的形式，離子交換的方法為所屬技術領域具有通常知識者所習知，可以使用合適的離子交換溶液和交換條件，得到前述陽離子為 M^+ 的綴合分子，在此不做詳述。在一些實施方式中，所述離子交換反應使用三乙胺磷酸鹽溶液進行，所述三乙胺磷酸鹽溶液的濃度為0.2-0.8M，在一些實施方式中為0.4-0.6M，相對於

式(313)化合物，所述三乙胺磷酸鹽溶液的用量為3-6L/mol，在一些實施方式中為4-5L/mol。

【0295】可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(321)化合物。在一些實施方式中，可藉由蒸發除去溶劑、隨後藉由層析方法分離式(321)化合物，例如，可使用如下層析條件進行分離：(1)正相純化矽膠：200-300目矽膠填料，使用含1wt%三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20梯度沖提；或者(2)反相純化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度沖提。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(321)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0296】在一些實施方式中，式(321)化合物的製備方法還進一步包括在縮合反應條件下，在有機溶劑中，在縮合劑和三級胺類有機鹼的存在下，將上述離子交換反應得到的產物進一步與含有氨基或羥基的固相載體進行接觸。此時，所獲得的是R₄中含有第1官能團和第2官能團，第1官能團含有羥基保護基團，第2官能團含有如式(C1')所示結構的式(321)化合物。

【0297】所述固相載體為固相合成siRNA中所用的載體中的一種，其中的一些為所屬技術領域具有通常知識者所習知。例如，所述固相載體可以選自含有活性羥基或氨基官能團的固相載體，在一些實施方式中，所述固相載體為氨基樹脂或羥基樹脂。為了便於後續進行核酸固相合成，所述氨基或羥基樹脂在一些實施方式中具有如下參數：粒徑100-400目(mesh)，表面氨基或羥基載量為0.2-0.5mmol/g。所述式(321)所示化合物與固相載體的用量比為10-400μmol化合物/每克固相載體(μmol/g)。在一些實施方式中，所述式(321)所示化合物與固相載體的用量比為50-200μmol/g。

【0298】所述有機溶劑可以是所屬技術領域具有通常知識者已知的任何合適的溶劑或混合溶劑。在一些實施方式中，所述有機溶劑為乙腈、環氧類溶

劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砷、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種。在一些實施方式中，所述環氧類溶劑為二氧六環和/或四氫呋喃，所述醚類溶劑為乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述鹵代烷類溶劑為二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一種或多種。在一些實施方式中，所述有機溶劑為乙腈。相對於式(321)化合物，所述有機溶劑的用量為20-200L/mol，在一些實施方式中為50-100L/mol。

【0299】 所述縮合劑可以是六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮和/或O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯，在一些實施方式中為O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯。所述縮合劑與式(321)所示化合物的莫耳比為1:1-20:1，在一些實施方式中為1:1-5:1。

【0300】 在一些實施方式中，所述三級胺類有機鹼為三乙胺和/或N,N-二異丙基乙胺，在一些實施方式中為N,N-二異丙基乙胺；所述三級胺類有機鹼與式(321)所示化合物的莫耳比為1:1-20:1，在一些實施方式中為1:1-5:1。

【0301】 在一些實施方式中，式(321)化合物的製備方法還可以包括將得到的縮合產物在蓋帽反應條件下，在有機溶劑中，與蓋帽試劑和醯化催化劑接觸，分離得到式(321)所示化合物。所述蓋帽反應的作用在於除去任何尚未反應完全的活性反應官能團，以避免在後續反應中產生不必要的副產物。所述蓋帽反應的條件包括反應溫度為0-50°C，在一些實施方式中為15-35°C，反應的時間為1-10h，在一些實施方式中為3-6h。蓋帽試劑可以使用siRNA固相合成中所使用的蓋帽試劑，siRNA固相合成中所使用的蓋帽試劑為所屬技術領域具有通常知識者所習知。

【0302】 在一些實施方式中，所述蓋帽試劑由蓋帽試劑1(cap1)和蓋帽試劑2(cap2)組成，其中，蓋帽試劑1為N-基甲基咪唑，在一些實施方式中以N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液形式提供，其中，吡啶與乙腈的體積比為1:10-1:1，在一

些實施方式中為1:3-1:1，吡啶與乙腈的總體積與N-甲基咪唑的體積比為1:1-10:1，在一些實施方式中為3:1-7:1。所述蓋帽試劑2為乙酸酐，在一些實施方式中以乙酸酐的乙腈溶液形式提供，其中，乙酸酐和乙腈的體積比為1:1-1:10，在一些實施方式中為1:2-1:6。

【0303】 在一些實施方式中，所述N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液的體積與式(321)化合物的質量之比為5ml/g-50ml/g，在一些實施方式中為15ml/g-30ml/g。所述乙酸酐的乙腈溶液的體積與式(321)化合物的質量之比為0.5ml/g-10ml/g，在一些實施方式中為1ml/g-5ml/g。

【0304】 在一些實施方式中，蓋帽試劑使用等莫耳量的乙酸酐與N-甲基咪唑。所述有機溶劑為乙腈、環氧類溶劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種。在一些實施方式中，所述有機溶劑為乙腈。相對於式(321)化合物，所述有機溶劑的用量為10-50L/mol，在一些實施方式中為5-30L/mol。

【0305】 所述醯化催化劑可以選自任何可用於成酯縮合或成醯胺縮合的催化劑，例如鹼性雜環化合物。在一些實施方式中，所述醯化催化劑為4-二甲氨基吡啶。所述催化劑與式(321)所示化合物的質量之比為0.001:1-1:1，在一些實施方式中為0.01:1-0.1:1。

【0306】 可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(321)化合物。在一些實施方式中，可藉由以有機溶劑充分洗滌，並過濾，去除未反應的反應物、過量的蓋帽試劑及其它雜質，得到式(321)化合物，所述有機溶劑選自乙腈、二氯甲烷、甲醇，在一些實施方式中為乙腈。

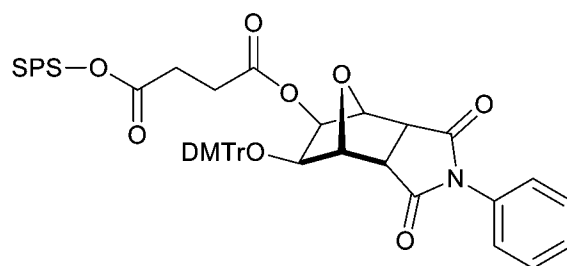
【0307】 在一些實施方式中，式(321)所示綴合分子的製備方法包括在有機溶劑中，在偶聯反應條件下，以及在偶聯試劑存在下，將式(313)所示化合物與亞磷醯二胺接觸，分離得到式(321)所示化合物。此時，所獲得的是R₄中含有第1

官能團和第2官能團，第1官能團含有羥基保護基團，第2官能團含有如式(C3)所示結構的式(321)化合物。

【0308】 在一些實施方式中，偶聯反應條件包括溫度為0-50°C，例如為15-35°C，式(313)化合物與亞磷醯二胺的莫耳比可以為1:1-1:50，例如為1:5-1:15；式(313)化合物和偶聯試劑的莫耳比可以為1:1-1:100，例如為1:50-1:80；反應時間可以為200-3000秒，例如為500-1500秒。所述亞磷醯二胺例如可使用雙(二異丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦，其可商購獲得或按照本領域中習知的方法合成獲得。偶聯試劑選自1H-四氮唑、5-乙硫基1H-四氮唑、5-苄硫基1H-四氮唑中的一種或多種，例如為5-乙硫基1H-四氮唑。所述偶聯反應可在有機溶劑中進行，所述有機溶劑選自無水乙腈、無水DMF、無水二氯甲烷中的一種或多種，例如為無水乙腈。在一些實施方式中，相對於式(313)化合物，所述有機溶劑的用量為3-50L/mol，例如可以為5-20L/mol。藉由進行該偶聯反應，式(313)化合物中的羥基與亞磷醯二胺反應形成亞磷醯胺基團。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(321)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0309】 在一些實施方式中，式(321)化合物的製備方法還進一步包括以下步驟：在偶聯反應條件下，在有機溶劑中，以及在偶聯試劑存在下，將分離得到的產物進一步與含有羥基的固相載體進行接觸。隨後，經蓋帽反應、氧化反應，分離得到式(321)化合物。此時，所獲得的是R₄中含有第1官能團和第2官能團，第1官能團含有羥基保護基團，第2官能團具有如式(C3')所示結構的式(321)化合物。

【0310】 在一些實施方式中，所述固相載體為本領域中習知的可用於核酸固相合成的固相載體，例如，可以是經脫保護反應後的市售的通用固相載體(NittoPhase®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support, Kinovate Life Sciences公司，結構如式B80所示)：



(B80)。

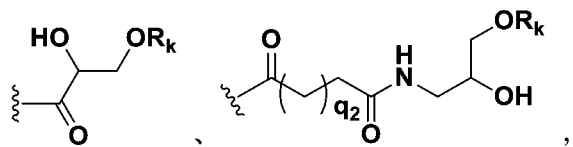
【0311】 脫保護反應為所屬技術領域具有通常知識者所習知。在一些實施方式中，脫保護條件包括溫度為0-50°C，例如為15-35°C；反應時間為30-300秒，例如為50-150秒。脫保護試劑可以選自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一種或多種，在一些實施方式中，脫保護試劑為二氯乙酸。脫保護試劑與固定相上的-DMTr(4,4'-二甲氧基三苯甲基)保護基的莫耳比為2:1-100:1，例如為3:1-50:1。藉由進行所述脫保護，在所述固相載體表面上獲得具有反應活性的游離羥基，便於進行下一步的偶聯反應。

【0312】 偶聯反應條件以及偶聯試劑的選擇可如上所述。藉由進行該偶聯反應，脫保護反應中形成的游離羥基與亞磷醯胺基團反應形成亞磷酸酯連接。

【0313】 在一些實施方式中，蓋帽反應條件包括溫度為0-50°C，例如為15-35°C，反應時間為5-500秒，例如為10-100秒，所述蓋帽反應在蓋帽試劑存在下進行。蓋帽試劑的選擇和用量可如上所述。

【0314】 氧化反應條件包括溫度為0-50°C，例如可以為15-35°C，反應時間為1-100秒，例如可以為5-50秒，氧化試劑例如可以為碘(在一些實施方式中，以碘水的形式提供)。在一些實施方式中，氧化試劑與亞磷酸酯基團的莫耳比為1:1-100:1，例如可以為5:1-50:1。在一些實施方式中，所述氧化反應在四氫呋喃:水:吡啶=3:1:1-1:1:3的混合溶劑中進行。

【0315】 在一些實施方式中，R₆為式B7或B8基團中的一種，

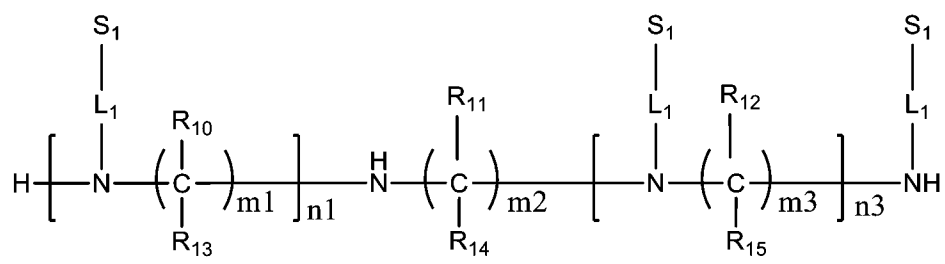


式(B7)

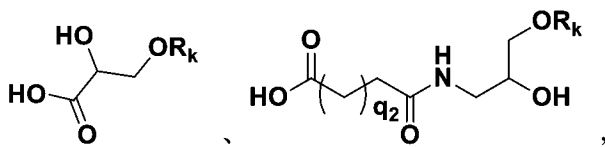
式(B8)

【0316】 其中 q_2 的定義如前所述，

【0317】 此時，式(313)所示化合物可以藉由以下製備方法得到：在有機溶劑中，在成醯胺反應條件下，以及在成醯胺反應縮合劑和三級胺類有機鹼存在下，將式(314)所示化合物與式(A-1)所示化合物或式(A-2)化合物接觸，隨後進行分離：



式(314)



式(A-1)

式(A-2)

【0318】 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 各自的定義和可選擇的範圍如前所述。

【0319】 所述成醯胺反應條件可包括反應溫度為0-100℃，反應時間為1-48小時，在一些實施方式中，所述成醯胺反應條件為反應溫度為10-40℃，反應時間為2-16小時。

【0320】 在一些實施方式中，所述有機溶劑為醇類溶劑、環氧類溶劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種。所述醇類溶劑在一些實施方式中為甲醇、乙醇、丙醇中的一種或多種。

種或多種，在一些實施方式中為乙醇。所述環氧類溶劑在一些實施方式中為二氧六環和/或四氫呋喃。所述醚類溶劑在一些實施方式中為乙醚和/或甲基叔丁基醚。所述鹵代烷類溶劑在一些實施方式中為二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一種或多種。在一些實施方式中，所述有機溶劑為二氯甲烷。相對於式(314)化合物，有機溶劑用量為3-50L/mol，在一些實施方式中為3-20L/mol。

【0321】 在一些實施方式中，所述成醯胺反應縮合劑為六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽、2-乙氧基-1-乙氧碳醯基-1,2-二氫喹啉(EEDQ)或O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯，在進一步的實施方式中為3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮。所述成醯胺反應縮合劑與式(314)所示化合物的莫耳比可以為1:1-10:1，在一些實施方式中為2.5:1-5:1。

【0322】 在一些實施方式中，所述三級胺類有機鹼為三乙胺或N,N-二異丙基乙胺，在一些實施方式中為N,N-二異丙基乙胺。所述三級胺類有機鹼與式(314)所示化合物的莫耳比為3:1-20:1，在一些實施方式中為5:1-10:1。

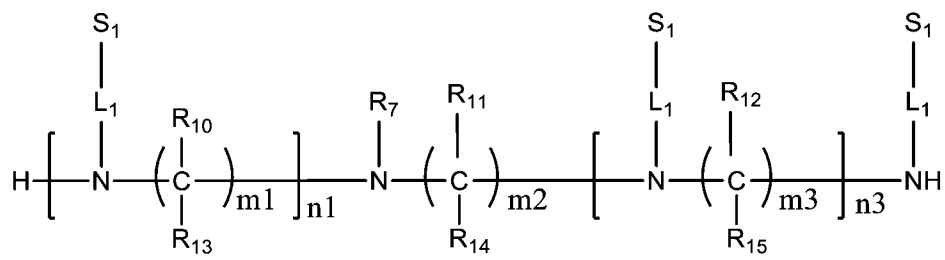
【0323】 式(A-1)和式(A-2)化合物可藉由任何適當的方式製備。例如，當 R_k 為DMTr基團時，可藉由甘油酸鈣與DMTrCl反應製備式(A-1)化合物；類似地，可先將3-氨基-1,2-丙二醇與環狀酸酐接觸，隨後再與DMTrCl反應製備式(A-2)化合物，所述環狀酸酐可以是碳原子數為4-13、在一些實施方式中為4-8的環狀酸酐。所屬技術領域具有通常知識者容易理解的是，所述環狀酸酐的選擇對應於(A-2)化合物中 q_2 的不同值，例如，當所述環狀酸酐為丁二酸酐時， $q_2=1$ ，當所述環狀酸酐為戊二酸酐時， $q_2=2$ ，以此類推。

【0324】 在一些變型中，也可藉由使式(314)所示化合物依次與所述環狀酸酐、3-氨基-1,2-丙二醇和DMTrCl反應，製備式(313)化合物。所屬技術領域具有

通常知識者容易理解的是，這些變型不會影響式(313)化合物的結構與功能，並且這些變型是所屬技術領域具有通常知識者在上述方法的基礎上容易實現的。

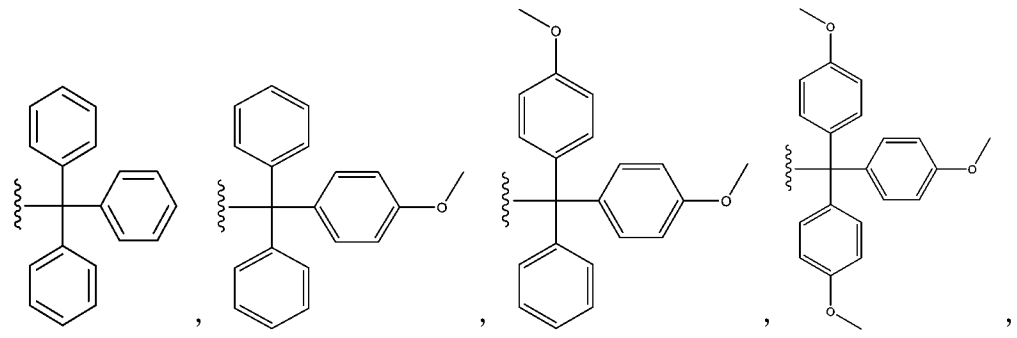
【0325】 與上述類似地，可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(313)化合物。在一些實施方式中，可藉由蒸發除去溶劑、隨後藉由層析方法分離式(313)化合物，例如，可使用如下兩種層析條件進行分離：(1)正相純化矽膠：200-300目矽膠填料，使用石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:N,N-二甲基甲醯胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6梯度沖提；以及(2)反相純化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度沖提。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(313)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0326】 在一些實施方式中，式(314)所示化合物可以藉由以下製備方法得到：該方法包括在有機溶劑中，在脫保護反應條件下，將式(315)所示化合物與鹵代乙酸接觸，隨後進行分離：



式(315)

【0327】 其中，R₇選自式(330)、(331)、(332)或(333)所示的基團，在一些實施方式中，R₇的結構如式(330)所示：



式(330) 式(331) 式(332) 式(333)

【0328】 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 各自的定義和可選擇的範圍如前所述。

【0329】 所述鹵代乙酸可選自二氯乙酸、三氯乙酸、一氯乙酸和三氟乙酸中的一種或多種，在一些實施方式中為二氯乙酸。

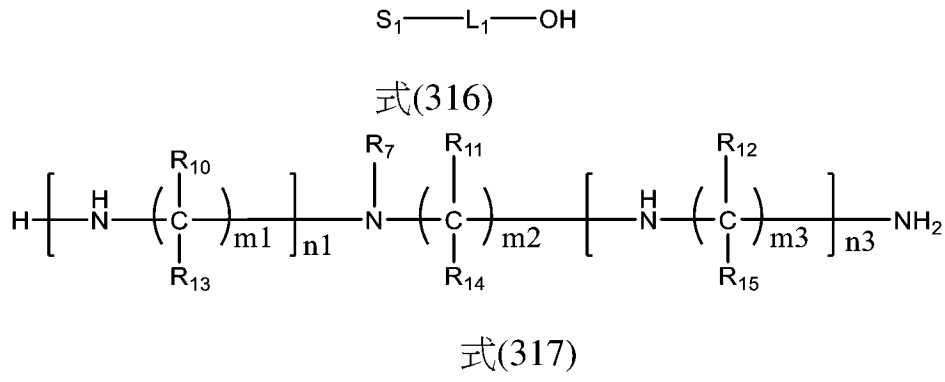
【0330】 所述脫保護反應條件包括反應溫度為0-100°C，反應時間為0.1-24小時，在一些實施方式中為反應溫度為10-40°C，反應時間為0.5-16小時。

【0331】 在一些實施方式中，所述有機溶劑為環氧類溶劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種。所述環氧類溶劑在一些實施方式中為二氧六環和/或四氫呋喃，所述醚類溶劑在一些實施方式中為乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述鹵代烷類溶劑在一些實施方式中為二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一種或多種，在一些實施方式中，所述有機溶劑為二氯甲烷。相對於式(315)化合物，有機溶劑用量為3-50L/mol，在一些實施方式中為5-20L/mol。

【0332】 所述鹵代乙酸與所述式(315)所示化合物的莫耳比為5:1-100:1，在一些實施方式中為10:1-50:1。

【0333】 與上述類似地，可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(314)化合物。在一些實施方式中，可藉由蒸發除去溶劑、隨後藉由層析方法分離式(314)化合物，例如，可使用如下兩種層析條件進行分離：(1)正相純化矽膠：200-300目矽膠填料，使用二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40梯度沖提；以及(2)反相純化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度沖提。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(314)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0334】 式(315)所示化合物可以藉由以下製備方法得到：該方法包括在有機溶劑中，在成醯胺反應縮合劑和三級胺類有機鹼存在下，在縮合反應條件下，將式(317)所示化合物與式(316)所示化合物接觸，隨後進行分離：



【0335】 其中，n1、n3、m1、m2、m3、R7、R10、R11、R12、R13、R14、R15、L1、S1各自的定義和可選擇的範圍如前所述。

【0336】 式(316)化合物可使用例如 J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961中所公開的化合物，或者，式(316)化合物可由所屬技術領域具有通常知識者藉由各種方法製備，例如，可參照美國專利US8106022B2實施例1中所公開的方法製備某些式(316)化合物，以引用的方式將以上文獻的全部內容整體併入本文。

【0337】 在一些實施方式中，所述縮合反應條件包括反應溫度為0-100℃，反應時間為0.1-24小時，在一些實施方式中為反應溫度為10-40℃，反應時間為0.5-16小時。

【0338】 所述式(316)所示化合物與所述式(317)所示化合物的莫耳比可以為2:1-10:1，在一些實施方式中為2.5:1-5:1。

【0339】 在一些實施方式中，所述有機溶劑為乙腈、環氧類溶劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種，所述環氧類溶劑在一些實施方式中為二氧六環和/或四氫呋喃，所述醚類溶劑在一些實施方式中為乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述鹵代烷類溶劑在

一些實施方式中為二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一種或多種，在一些實施方式中，所述有機溶劑為乙腈。相對於式(317)化合物，所述有機溶劑的用量為3-50L/mol，在一些實施方式中為5-20L/mol。

【0340】 所述成醯胺反應縮合劑為六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮(DEPBT)、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯或4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽，在一些實施方式中為4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽。所述成醯胺反應縮合劑與式(317)所示化合物的莫耳比為2:1-10:1，在一些實施方式中為2.5:1-5:1。

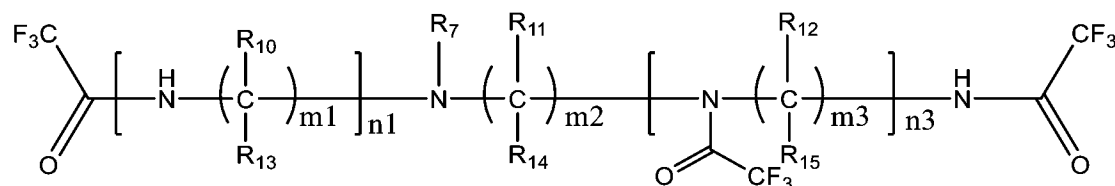
【0341】 所述三級胺類有機鹼為N-甲基嗎啉、三乙胺或N,N-二異丙基乙胺，在一些實施方式中為N-甲基嗎啉；所述三級胺類有機鹼與式(317)所示化合物的莫耳比為3:1-20:1，在一些實施方式中為5:1-10:1。

【0342】 與上述類似地，可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(315)化合物。在一些實施方式中，可藉由蒸發除去溶劑、隨後藉由層析方法分離式(315)化合物例如，可使用如下兩種層析條件進行分離：(1)正相純化矽膠：200-300目矽膠填料，使用二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7梯度沖提；以及(2)反相純化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度沖提。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(315)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0343】 在一些實施方式中，式(317)化合物與足量的一種式(316)化合物一次反應即生成期望的式(315)化合物，此時，各個 S_1 - L_1 部分彼此相同。在一些實施方式中，可根據需要，藉由使式(317)化合物分批與不同的式(316)化合物，即 L_1 和/或 S_1 不同的式(316)化合物發生反應，使得生成的式(315)化合物中含有兩種以上的 S_1 和/或 L_1 。例如，對於1 eq的式(317)化合物，可先使其與2 eq的第一式(316)化合物接觸，在式(317)化合物中的兩個末端伯胺基團上連接第一 S_1 - L_1 部分，隨

後，使其繼續與 (n_3+n_1-1) eq的第二式(316)化合物接觸(n_3 和 n_1 的定義和取值範圍如前所述)，在式(317)化合物中的 (n_3+n_1-1) 個仲胺基團上連接第二 S_1-L_1 部分。

【0344】 在一些實施方式中，式(317)所示化合物可以藉由以下製備方法得到：該方法包括在有機溶劑存在下，在脫保護反應條件下，將式(318)所示化合物與甲胺水溶液接觸，隨後進行分離：



式(318)

【0345】 其中， n_1 、 n_3 、 m_1 、 m_2 、 m_3 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 各自的定義和可選擇的範圍如前所述。

【0346】 所述脫保護反應條件包括反應溫度為 $0-150^{\circ}\text{C}$ ，反應時間為 $5-72$ 小時，在一些實施方式中為反應溫度為 $20-80^{\circ}\text{C}$ ，反應時間為 $10-30$ 小時。

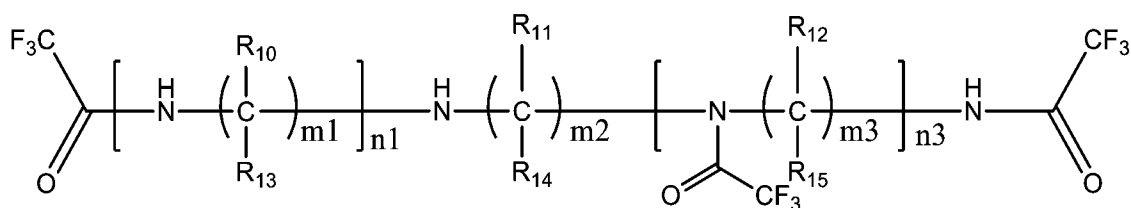
【0347】 所述有機溶劑選自醇，在一些實施方式中為甲醇、乙醇和異丙醇中的一種，在一些實施方式中為甲醇；相對於式(318)化合物，所述有機溶劑的用量為 $1-20\text{L/mol}$ ，在一些實施方式中為 $1.5-10\text{L/mol}$ 。

【0348】 所述甲胺水溶液的濃度可以為 $30-40\%$ 質量%，甲胺與式(318)所示化合物的莫耳比可以為 $10:1-500:1$ ，在一些實施方式中為 $50:1-200:1$ 。

【0349】 與上述類似地，可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(317)化合物。在一些實施方式中，可藉由蒸發除去溶劑、隨後藉由層析方法分離式(317)化合物例如，可使用如下兩種層析條件進行分離：正相純化矽膠：(1)200-300目矽膠填料，使用二氯甲烷:甲醇:氨水(25wt%)=1:1:0.05-1:1:0.25梯度沖提；以及(2)反相純化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度沖

提。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(317)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0350】 在一些實施方式中，式(318)所示化合物可以藉由以下製備方法得到：該方法包括在有機溶劑存在下，在取代反應條件下，將式(319)所示化合物與三苯基氯甲烷(TrCl)、二苯基乙苯基氯甲烷、苯基二乙苯基氯甲烷或三乙苯基氯甲烷、在一些實施方式中為三苯基氯甲烷(TrCl)接觸，隨後進行分離：



式(319)

【0351】 其中， $n1$ 、 $n3$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 各自的定義和可選擇的範圍如前所述。

【0352】 所述取代反應條件可包含反應溫度為0-100°C，反應時間為5-72小時，在一些實施方式中，反應條件包含反應溫度為10-40°C，反應時間為10-30小時。

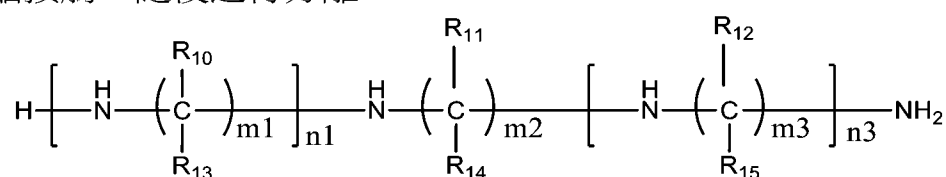
【0353】 三苯基氯甲烷(TrCl)、二苯基乙苯基氯甲烷、苯基二乙苯基氯甲烷或三乙苯基氯甲烷可商購得到，三苯基氯甲烷(TrCl)、二苯基乙苯基氯甲烷、苯基二乙苯基氯甲烷或三乙苯基氯甲烷與式(319)所示化合物的莫耳比可以為1:1-10:1，在一些實施方式中為1:1-3:1。

【0354】 所述有機溶劑可以為環氧類溶劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種。所述環氧類溶劑在一些實施方式中為二氧六環和/或四氫呋喃，所述醚類溶劑在一些實施方式中為乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述鹵代烷類溶劑在一些實施方式中為二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一種或多種；在一些實施方式中，所述有機

溶劑為二氯甲烷。相對於式(319)化合物，所述有機溶劑的用量可以為3-50L/mol，在一些實施方式中為5-20L/mol。

【0355】與上述類似地，可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(318)化合物。在一些實施方式中，可藉由蒸發除去溶劑、隨後藉由層析方法分離式(318)化合物例如，可使用如下兩種層析條件進行分離：(1)正相純化矽膠：200-300目矽膠填料，使用甲醇:二氯甲烷=0.01:1-0.5:1梯度沖提；或者使用甲醇:二氯甲烷:乙酸乙酯:石油醚=0.1:1:1:1-1:1:1:1梯度沖提。以及(2)反相純化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度沖提。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(318)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0356】在一些實施方式中，式(319)所示化合物可以藉由以下製備方法得到：該方法包括在有機溶劑中，在取代反應條件下，將式(320)所示化合物與三氟乙酸乙酯接觸，隨後進行分離：



式(320)

【0357】其中， $n1$ 、 $n3$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 各自的定義和可選擇的範圍如前所述。

【0358】在一些實施方式中，所述有機溶劑為乙腈、環氧類溶劑、醚類溶劑、鹵代烷類溶劑、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺和N,N-二異丙基乙胺中的一種或多種。在一些實施方式中，所述環氧類溶劑為二氧六環和/或四氫呋喃，在一些實施方式中，所述醚類溶劑為乙醚和/或甲基叔丁基醚，在一些實施方式中，所述鹵代烷類溶劑為二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一種或多種，

在一些實施方式中，所述有機溶劑為乙腈。相對於式(320)化合物，所述有機溶劑的用量為1-50L/mol，在一些實施方式中為1-20L/mol。

【0359】 所述取代反應條件可包括反應溫度為0-100°C，反應時間為5-72小時，在一些實施方式中，所述取代反應條件包括為反應溫度為10-40°C，反應時間為10-30小時。

【0360】 式(320)化合物可商購獲得，或者由所屬技術領域具有通常知識者使用已知的方法獲得。例如，當 $m_1=m_2=m_3=3$ ， $n_1=1$ ， $n_3=2$ ，且 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 均為H時，式(320)化合物可自阿法埃莎公司商購獲得。

【0361】 所述三氟乙酸乙酯與式(320)所示化合物的莫耳比為2:1-10:1，在一些實施方式中為3:1-5:1。

【0362】 與上述類似地，可使用任何合適的分離方法從反應混合物中分離式(319)化合物。在一些實施方式中，可藉由蒸發除去溶劑、隨後藉由層析方法分離式(319)化合物例如，可使用如下兩種層析條件進行分離：(1)正相純化矽膠：200-300目矽膠填料，使用甲醇:二氯甲烷=0.01:1-0.5:1梯度沖提；或者使用甲醇:二氯甲烷:乙酸乙酯:石油醚=0.1:1:1:1-1:1:1:1梯度沖提，以及(2)反相純化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度沖提。在一些實施方式中，可以直接除去溶劑得到式(319)化合物粗產品，該粗產品可以直接用於後續反應。

【0363】 本發明的第一種或第二種siRNA綴合物也可以與藥學上可接受的其它輔劑聯用，該輔劑可以為本領域常規採用的各種製劑或化合物的一種或多種，詳情可參見上文關於本發明的藥物組合物的描述。

【0364】 本發明的siRNA、含該siRNA的藥物組合物及綴合物的應用

【0365】 本發明的siRNA、含該siRNA的藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物的應用

【0366】 在一些實施方式中，本發明提供了siRNA、含該siRNA的藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物在製備用於治療和/或預防由所述B型肝炎病毒的感染引起的病理狀況或疾病的藥物中的用途。

【0367】 按照本發明的一種實施方式，本發明提供了一種治療B型肝炎病毒的感染引起的病理狀況或疾病的方法，該方法包括向受試者給予本發明提供的siRNA、藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物。

【0368】 按照本發明另外一種實施方式，本發明提供了一種抑制感染慢性B型肝炎病毒的肝炎細胞中B型肝炎病毒基因表達的方法，該方法包括將本發明提供的siRNA、藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物與所述感染慢性B型肝炎病毒的肝炎細胞接觸。

【0369】 所述由B型肝炎病毒的感染引起的病理狀況或疾病選自慢性肝病、肝炎、肝纖維化疾病和肝增生性疾病。

【0370】 藉由將本發明的siRNA和/或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物給予有需要的受試者，可以藉由RNA干擾的機制達到治療B肝的目的。因此，本發明的siRNA和/或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物可用於預防和/或治療B肝、或用於製備用於預防和/或治療B肝的藥物。

【0371】 本文所使用的術語“給藥/給予”是指藉由使得至少部分地將siRNA或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物定位於期望的位點以產生期望效果的方法或途徑，將siRNA或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物放置入受試者體內。適於本發明方法的給藥途徑包括局部給藥和全身給藥。一般而言，局部給藥導致與受試者整個身體相比將更多siRNA或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物遞送至特定位點；而全身給藥導致將所述siRNA或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及

第二種siRNA綴合物遞送至受試者的基本整個身體。考慮到本發明旨在提供預防和/或治療B肝的手段，較佳為能夠將藥物遞送至肝臟的給藥方式。

【0372】可藉由本領域已知的任何合適途徑向受試者給藥，所述途徑包括但不僅限於：口服或胃腸外途徑，包括靜脈內給藥、肌肉內給藥、皮下給藥、經皮給藥、氣道給藥(氣霧劑)、肺部給藥、鼻部給藥、直腸給藥和局部給藥(包括口腔含化給藥和舌下給藥)。給藥頻率可以是每天、每週、每兩周、每三周、每個月或每年1次或多次。

【0373】本發明所述的siRNA或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物的使用劑量可為本領域常規的劑量，所述劑量可以根據各種參數、尤其是受試者的年齡、體重和性別來確定。可在細胞培養或實驗動物中藉由標準藥學程序測定毒性和療效，例如測定LD50(使50%的群體致死的劑量)和ED50(在量反應中指能引起50%最大反應強度的劑量，在質反應中指引起50%實驗對象出現陽性反應時的劑量)。毒性和療效之間的劑量比為治療指數，可以用LD50/ED50的比值來表示。較佳顯示出高治療指數的siRNA或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物。可基於由細胞培養分析和動物研究得到的數據得出人用劑量的範圍。

【0374】在給予本發明所述的藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物時，例如，對於雄性或雌性、6-12周齡、體重18-25g的C57BL/6J或C3H/HeNCrIVr小鼠，以所述藥物組合物或siRNA綴合物中的siRNA的量計：(i)對於siRNA與藥學上可接受的載體形成的藥物組合物，其siRNA用量可以為0.001-50mg/kg體重，在進一步的實施方式中為0.01-10mg/kg體重，在更進一步的實施方式中為0.05-5mg/kg體重，在又進一步的實施方式中為0.1-3mg/kg體重；(ii)對於siRNA與藥學上可接受的綴合分子形成的第一種和/或第二種siRNA綴合物，其siRNA用量可以為0.001-100mg/kg體重，在進一步的實施方式中為

0.01-50mg/kg體重，在更進一步的實施方式中為0.05-20mg/kg體重，在又進一步的實施方式中為0.1-10mg/kg體重。在給予本發明所述的siRNA時，較佳可為上述用量。

【0375】 另外，藉由將本發明的siRNA和/或藥物組合物、第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物導入感染慢性HBV的肝炎細胞，還可以藉由RNA干擾的機制達到抑制感染慢性HBV的肝炎細胞中HBV基因的表達這一目的。在一些較佳的實施方式中，所述細胞為HepG2.2.15細胞。

【0376】 採用本發明提供的方法抑制HBV基因在細胞中表達，無論使用提供的siRNA還是藥物組合物還是第一種siRNA綴合物以及第二種siRNA綴合物，siRNA用量一般是這樣的量：其足以減少靶基因的表達，並導致在靶細胞表面處1pM至1μM、或0.01nM至100nM、或0.05nM至50nM或至約5nM的細胞外濃度。達到該局部濃度所需的量將隨各種因素而變化，所述因素包括遞送方法、遞送部位、在遞送部位和靶細胞或組織之間的細胞層的數目、遞送是局部還是全身等。在遞送部位處的濃度可以顯著高於在靶細胞或組織的表面處的濃度。

【0377】 試劑盒

【0378】 本發明提供了一種試劑盒，該試劑盒含有有效量的本發明的siRNA、藥物組合物、第一種siRNA綴合物和第二種siRNA綴合物中的至少一種。

【0379】 在一些實施方式中，本文所述的試劑盒可在一個容器中提供修飾的siRNA。在一些實施方式中，本文所述的試劑盒可包含一個提供藥學上可接受的賦形劑的容器。在一些實施方式中，所述試劑盒中還可包含其它成分，如穩定劑或防腐劑等。在一些實施方式中，本文所述的試劑盒可在不同於提供本文所述修飾的siRNA的容器以外的其它容器中包含至少一種其它治療劑。在一些實施方式中，所述試劑盒可包含用於將修飾的siRNA與藥學上可接受的載體和/或輔劑或其它成分(若有的話)進行混合的說明書。

【0380】 在本發明的試劑盒中，所述修飾的siRNA和藥學上可接受的載體和/或輔劑以及所述修飾的siRNA、藥物組合物、第一種siRNA綴合物和/或第二種siRNA綴合物和/或綴合物，和/或藥學上可接受的輔劑可以任何形式提供，例如液體形式、乾燥形式或凍乾形式。在一些實施方式中，所述修飾的siRNA和藥學上可接受的載體和/或輔劑以及所述藥物組合物和/或綴合物和任選的藥學上可接受的輔劑基本上純淨和/或無菌。在一些實施方式中，可在本發明的試劑盒中提供無菌水。

【0381】 下面將藉由實施例來進一步說明本發明，但是本發明並不因此而受到任何限制。

【0382】 有益效果

【0383】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA、組合物或siRNA綴合物可在體內具有更高的穩定性、更低的毒性和/或更高的活性。在一些實施方式中，本發明提供的siRNA、siRNA組合物或siRNA綴合物在體內顯示出至少20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或95%的HBV基因表達抑制率。在一些實施方式中，本發明提供的siRNA、siRNA組合物或siRNA綴合物在體內顯示出至少20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或95%的肝內HBV基因表達抑制率。在一些實施方式中，本發明提供的siRNA、siRNA組合物或siRNA綴合物在體內顯示出至少20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或95%的動物模型中肝內HBV基因表達抑制率。在一些實施方式中，本發明提供的siRNA、siRNA組合物或siRNA綴合物在體內顯示出至少20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或95%的HBV表面抗原表達抑制率。在一些實施方式中，本發明提供的siRNA、組合物或siRNA綴合物未顯示出明顯脫靶效應。脫靶效應可以是例如抑制非靶基因的基因正常表達。據認為，如果脫靶基因表達的結合/

抑制與在靶基因效果相比低於50%、40%、30%、20%或10%時，該脫靶效應就是不顯著的。

【0384】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA綴合物具有較好的體外抑制活性。

【0385】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA綴合物在具有優異的靶mRNA抑制效果的同時，還顯示出低的脫靶效應。

【0386】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA綴合物在Tritosome中可維持長時間不降解，顯示出很好的穩定性。

【0387】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA綴合物在人血漿中直至72h時仍未降解，顯示出優異的在人血漿中的穩定性。

【0388】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA綴合物在食蟹猴血漿中直至72h仍未降解，顯示出優異的在猴血漿中的穩定性。

【0389】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA綴合物對靶mRNA顯示出良好的抑制效果，1mg/kg下，抑制效率為81.73%-89.22%，並且對於不同HBV mRNA的抑制效果基本一致。

【0390】 在一些實施方式中，本發明提供的siRNA綴合物在85天的時間內持續顯示出對HBsAg以及HBV DNA的高效抑制。

【0391】 本發明的其他特徵和優點將在隨後的具體實施方式部分予以詳細說明

【0392】 實施例

【0393】 以下將藉由實施例對本發明進行詳細描述。除非特別說明，以下實施例中所用到的試劑、培養基均為市售商品，所用到的核酸電泳、real-time PCR等操作均參照*Molecular Cloning*(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))所記載的進行。

【0394】 若無其它說明，以下提供的試劑比例均按體積比(v/v)計算。

【0395】 所使用的動物模型如下：

【0396】 HBV轉基因小鼠C57BL/6-HBV：品系名：B6-Tg HBV/Vst (1.28 copy, genotype A)，購自北京維通達生物技術有限公司。於實驗前選擇COI $>10^4$ 的小鼠，以下有時也簡稱為1.28copy小鼠；

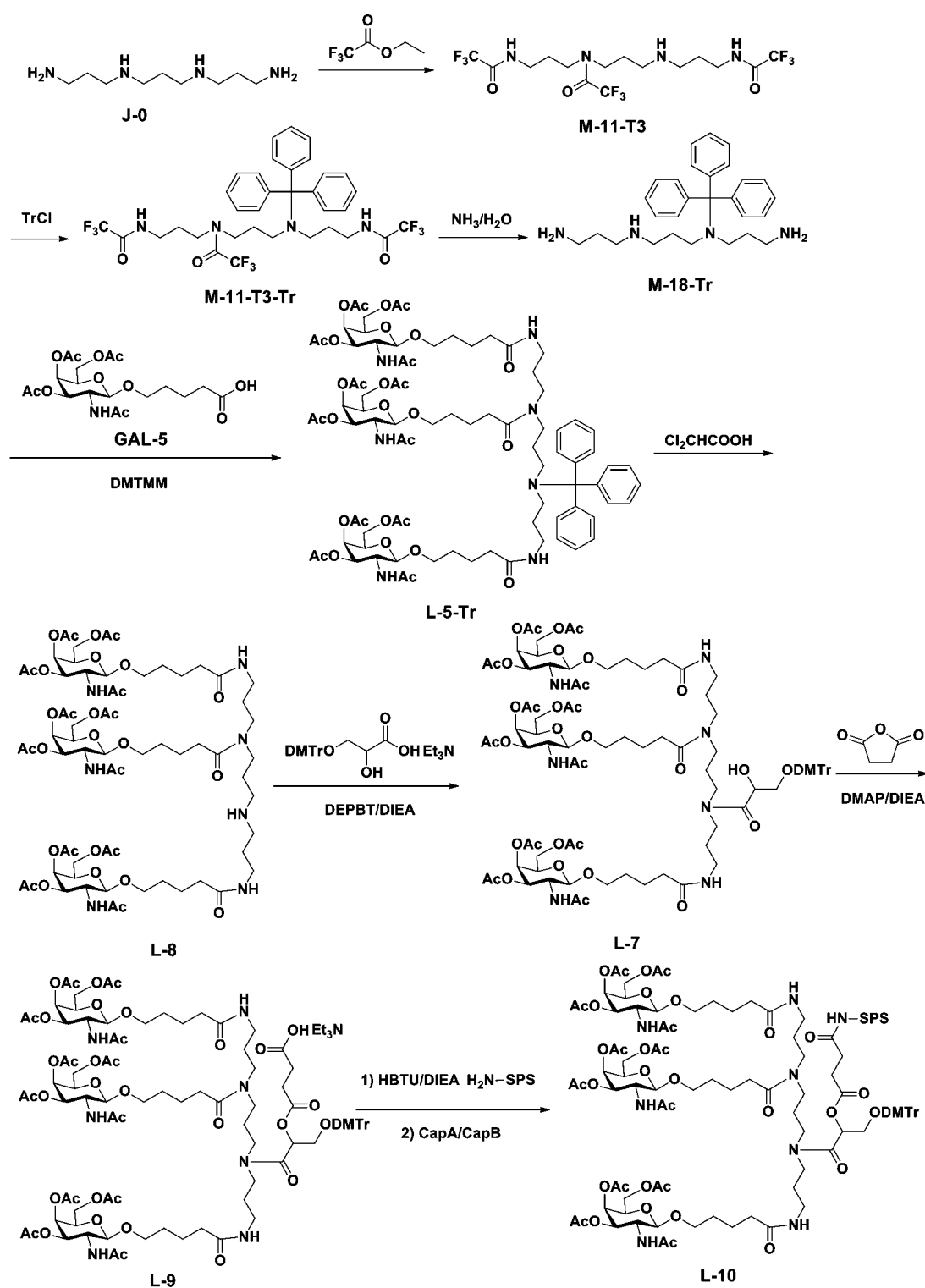
【0397】 AAV-HBV低濃度轉基因小鼠：按照文獻方法(董小岩等，Chin J Biotech 2010, May 25; 26(5): 679–686)製備AAV-HBV模型。將rAAV8-1.3HBV，D型(ayw)病毒(購於北京五加和分子醫學研究所有限公司， 1×10^{12} viral genome (v.g.)/mL，批號2016123011)用無菌PBS稀釋至 1×10^{11} v.g./mL，每隻小鼠注射100 μ L稀釋後的rAAV8-1.3HBV，(即每隻小鼠注射 1×10^{10} v.g.)，以下有時也稱為AAV-HBV低濃度模型小鼠，或簡稱為AAV-HBV。

【0398】 製備例1 綴合物1-2、15-16的製備

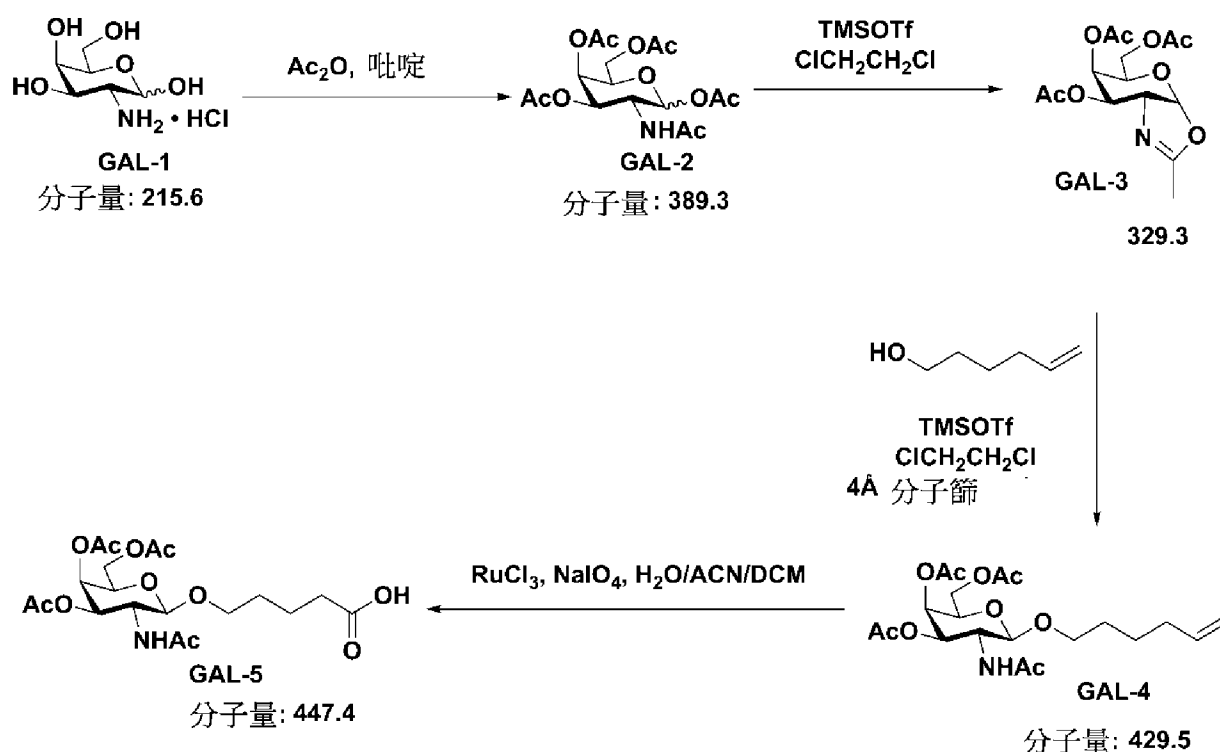
【0399】 本製備例中，合成了綴合物1(以下，也稱為L10-siHB1M1SVP綴合物)和綴合物2(以下，也稱為L10-siHB2M1SVP綴合物)，計劃合成綴合物15(以下，也稱為L10-siHB1M1SP)和綴合物16(以下，也稱為L10-siHB1M1SPs)。所述綴合物為L-9綴合分子分別與編號為siHB1M1SVP、siHB2M1SVP、siHB1M1SP或siHB1M1SPs的siRNA綴合後形成的綴合物。該綴合物中所綴合的siRNA的序列參見表1。

【0400】 (1-1)L-10化合物的合成

【0401】 按照以下方法，合成了L-10化合物：



【0402】 (1-1-1)綴合末端段GAL-5的合成



【0403】 (1-1-1a)GAL-2的合成

【0404】 將100.0g **GAL-1**(N-乙醯-D-半乳糖胺鹽酸鹽，CAS號：1772-03-8，購自寧波弘翔生化公司，463.8 mmol)溶於1000ml無水吡啶，冰水浴下加入540ml 乙酸酐(購自Enox公司，5565.6mmol)，室溫攪拌反應1.5小時。將反應液倒入10L 冰水中，減壓抽濾，濾餅用2L冰水洗滌後，加乙腈/甲苯混合溶劑(體積比乙腈: 甲苯=1:1)至完全溶解，蒸乾溶劑，得到白色固體產品**GAL-2** 130.0g。

【0405】 (1-1-1b)GAL-3的合成

【0406】 將步驟(1-1-1a)中獲得的**GAL-2**(35.1g，90.0mmol)溶解於213ml無水1,2-二氯乙烷中，在冰水浴且氮氣保護條件下，加入24.0g TMSOTf(CAS號：27607-77-8，購自麥克林公司，108.0mmol)，室溫反應過夜。

【0407】 在反應液中加入400ml二氯甲烷稀釋，以矽藻土過濾，再加入1L 飽和碳酸氫鈉水溶液，攪拌均勻，分出有機相，水相用二氯乙烷萃取兩次，每次300ml，合併有機相，分別用300ml飽和碳酸氫鈉水溶液和300ml飽和食鹽水洗

滌，分出有機相，無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸乾溶劑，得到淺黃色黏稠糖稀狀產品**GAL-3** 26.9g。

【0408】 (1-1-1c)**GAL-4**的合成

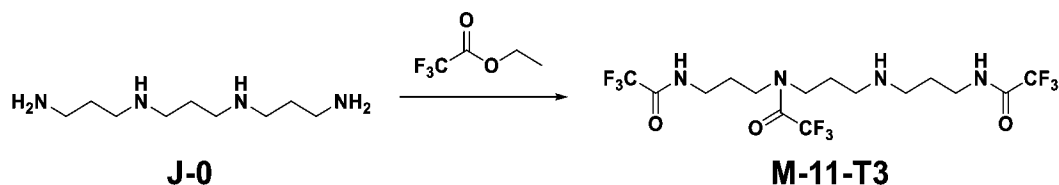
【0409】 將步驟(1-1-1b)中獲得的**GAL-3**(26.9g, 81.7mmol)溶於136ml無水1,2-二氯乙烷中，加入乾燥的4Å分子篩粉末30g，再加入9.0g 5-己烯-1-醇(CAS號：821-41-0，購自Adamas-beta公司，89.9mmol)，室溫下攪拌30分鐘，冰浴和氮氣保護下加入9.08g TMSOTf(40.9mmol)，室溫下攪拌反應過夜。過濾除去4 Å分子篩粉末，濾液中加入300ml二氯甲烷稀釋，以矽藻土過濾，再加入500ml飽和碳酸氫鈉水溶液攪拌10分鐘洗滌，分出有機相，水相用300ml二氯乙烷萃取一次，合併有機相並分別用300ml飽和碳酸氫鈉水溶液和300ml飽和食鹽水洗滌，分出有機相，無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸乾溶劑，得到黃色糖稀狀產品**GAL-4** 41.3g，不進行純化直接進行下一步氧化反應。

【0410】 (1-1-1d)**GAL-5**的合成

【0411】 將按照步驟(1-1-1c)中描述的方法得到的**GAL-4**(14.9g, 34.7mmol)溶於77ml二氯甲烷和77ml乙腈的混合溶劑中，分別加入103ml去離子水和29.7g高碘酸鈉(CAS號：7790-28-5，購自阿拉丁公司，138.8mmol)，冰水浴下攪拌10分鐘，加入三氯化釕(CAS號：14898-67-0，購自安耐吉公司，238mg, 1.145mmol)，室溫反應過夜。反應液加入300ml水稀釋攪拌，加飽和碳酸氫鈉調pH約為7.5，分出並棄去有機相，水相用二氯甲烷萃取三次，每次200ml，棄去有機相。水相用檸檬酸固體調節pH約為3，用二氯甲烷萃取三次，每次200ml，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸乾溶劑，得到白色泡沫狀固體產品**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

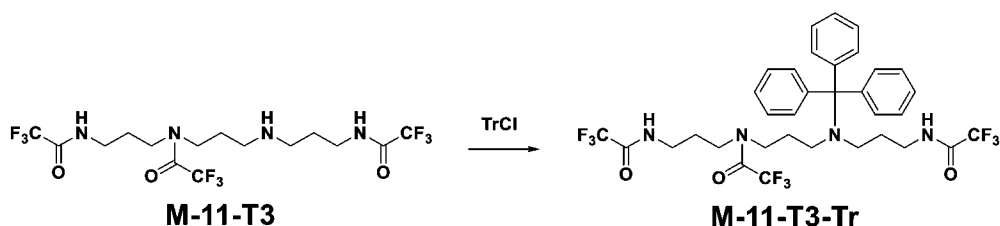
– 3.85 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.48 – 3.39 (m, 1H), 2.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.55 – 1.45 (m, 4H).

【0412】 (1-1-2)M-11-T3的合成：



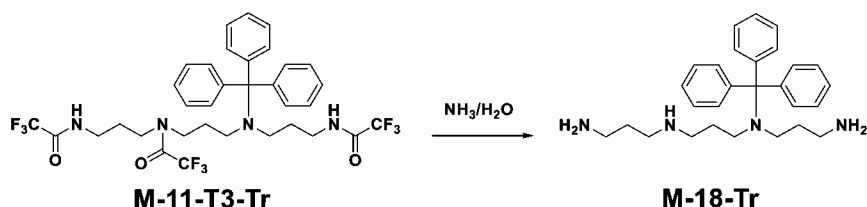
【0413】 將J-0(1.883g，10mmol，商購自阿法埃莎公司)溶於25ml乙腈中，加入三乙胺(4.048g，40mmol)冰水浴冷卻至0°C，加入三氟乙酸乙酯(5.683g，40mmol)，室溫下反應22h，減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥18h，得到5.342g粗品固體M-11-T3，不經進一步純化地直接用於後續反應。MS m/z ： $C_{15}H_{22}F_9N_4O_3$ ， $[M+H]^+$ ，理論：477.35，實測：477.65。

【0414】 (1-1-3)M-11-T3-Tr的合成：



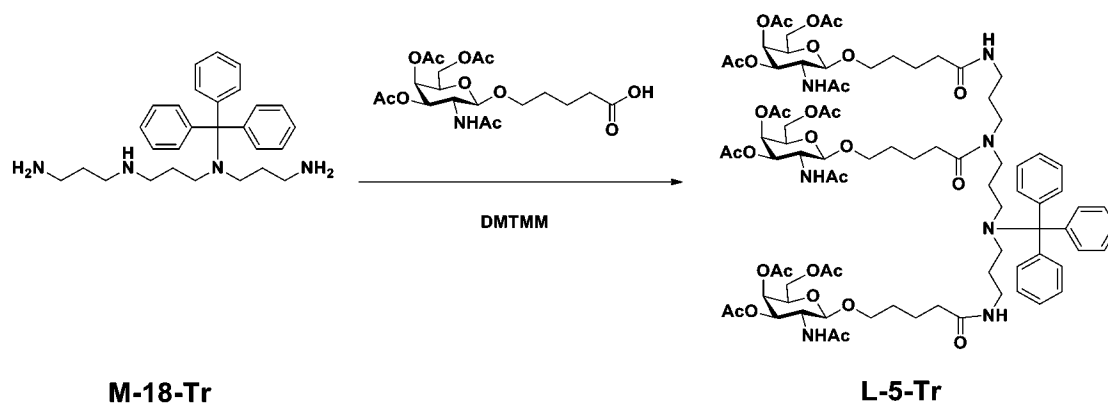
【0415】 將M-11-T3粗品(5.342g，10mmol)溶於50ml二氯甲烷，向反應液中加入TrCl(3.345g，12mmol)和三乙胺(1.518g，15mmol)，室溫下攪拌反應20h，用飽和碳酸氫鈉洗滌反應液2次，每次20ml，20ml飽和食鹽水洗滌1次，有機相用無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾有機溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜，得到粗品固體M-11-T3-Tr 7.763g。MS m/z ： $C_{34}H_{36}F_9N_4O_3$ ， $[M+Na]^+$ ，理論：741.25，實測：741.53。粗品固體M-11-T3-Tr不經純化地繼續用於下一步M-18-Tr的合成。

【0416】 (1-1-4)M-18-Tr的合成：



【0417】 將步驟(1-1-3)中獲得的M-11-T3-Tr粗品(7.763g, 10mmol)溶於100ml甲醇，再加入100ml甲胺水溶液(40質量%)，在50°C攪拌反應23h，過濾除去不溶顆粒物，減壓蒸乾溶劑，加入200ml體積比為1:1的二氯甲烷:甲醇混合溶劑，用50ml飽和碳酸氫鈉洗滌，水相再用二氯甲烷(DCM)萃取3次，每次50ml，合併有機相，用無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜，用200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷:甲醇:氨水(25wt%)=1:1:0.05-1:1:0.25梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥得到純品M-18-Tr 2.887g。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.47 – 7.39 (m, 6H), 7.32 – 7.24 (m, 6H), 7.19 – 7.12 (m, 3H), 2.60 – 2.47 (m, 4H), 2.46 – 2.19 (m, 13H), 1.70 – 1.55 (m, 4H), 1.40 (p, $J = 6.8$ Hz, 2H). MS m/z : $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_4$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, 理論: 431.65, 實測: 432.61。

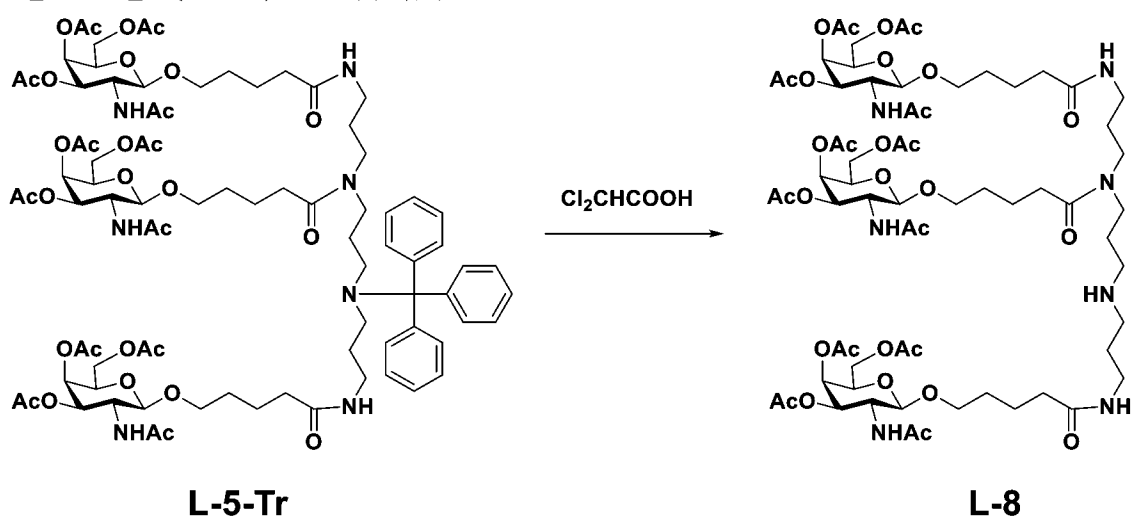
【0418】 (1-1-5)L-5-Tr的合成：



【0419】 將步驟(1-1-4)中獲得的M-18-Tr(2.02g, 4.69mmol)與步驟(1-1-1)中獲得的GAL-5(6.93g, 15.48mmol)混合溶於47ml乙腈，加入N-甲基嗎啉(3.13g, 30.96mmol)和4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽(DMTMM, 4.28g,

15.48mmol)，室溫攪拌反應2h。以200ml二氯甲烷稀釋反應液，100ml飽和碳酸氫鈉溶液洗滌有機相，100ml飽和食鹽水洗滌有機相，有機相用無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品。200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾得到純品L-5-Tr 7.49g。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.83 – 7.10 (m, 4H), 7.67 – 7.60 (m, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 6H), 7.33 – 7.24 (m, 6H), 7.20 – 7.15 (m, 3H), 5.22 (s, 3H), 4.97 (d, J = 11.3 Hz, 3H), 4.49 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.06 – 3.07 (m, 9H), 3.95 – 3.83 (m, 3H), 3.77 – 3.64 (m, 3H), 3.45 – 3.35 (m, 3H), 3.12 – 2.87 (m, 8H), 2.30 – 2.15 (m, 3H), 2.11 – 1.98 (m, 22H), 1.95 – 1.84 (m, 11H), 1.81 – 1.61 (m, 14H), 1.54 – 1.36 (m, 14H). MS m/z : $C_{85}H_{119}N_7O_{30}$, $[M+H]^+$, 理論: 1718.81, 實測: 1718.03。

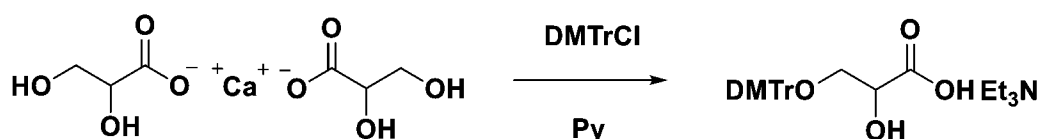
【0420】(1-1-6)L-8的合成：



【0421】將步驟(1-1-5)中得到的L-5-Tr(5.94g, 3.456mmol)溶於69ml二氯甲烷，再加入二氯乙酸(13.367g, 103.67mmol)，室溫下反應2h，加入100ml二氯甲烷稀釋反應液，再加飽和碳酸氫鈉溶液洗滌調節pH=7-8之間，水相以二氯甲烷萃取6次，每次30ml，合併有機相，用無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品。純化使用200-300目正相矽膠，以10wt%三乙胺中和矽膠酸性，1wt%三乙

胺平衡管柱，以二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品L-8 4.26g。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 : C₈₅H₁₁₉N₇O₃₀, [M+H]⁺, 理論：1477.59，實測：1477.23。

【0422】 (1-1-7a)A-1的合成

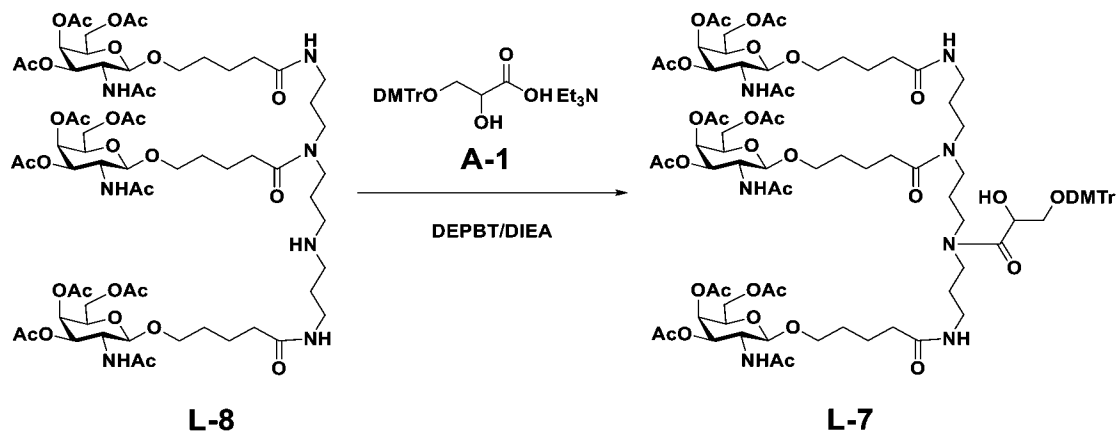


A-1

【0423】 將DMTrCl(4,4'-雙甲氧基三苯甲基氯，38.12g，112.5mmol)溶於450ml無水吡啶中，加入DL-甘油酸鈣水合物(12.88g，45.0mmol)，在45°C反應22h，將反應液過濾，濾餅用200ml DCM淋洗，濾液減壓濃縮至乾，剩餘物用500ml二氯甲烷重新溶解，0.5M三乙胺磷酸鹽(pH=7-8)洗滌2次，每次200ml，水相以二氯甲烷萃取2次，每次200ml，合併有機相，用無水硫酸鈉乾燥，過濾，減壓蒸乾溶劑，200-300目正相矽膠柱純化，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.35-1:1:1:0.55梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，500ml二氯甲烷重新溶解，以200ml 0.5M三乙胺磷酸鹽洗滌1次，水相用二氯甲烷萃取2次，每次200ml，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，過濾，減壓蒸乾溶劑，真空油泵減壓下過夜，得到白色固體產品A-1 20.7g。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.46 (ddd, J = 6.5, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 4.84 (d, J = 5.0

Hz, 1H), 4.36 – 4.24 (m, 1H), 4.29 (s, 6H), 3.92 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 12.3, 7.0 Hz, 1H), 2.52 (q, J = 6.3 Hz, 6H), 1.03 (t, J = 6.3 Hz, 9H). MS m/z : C₂₄H₂₃O₆, [M-H]⁻, 理論：407.15，實測：406.92。

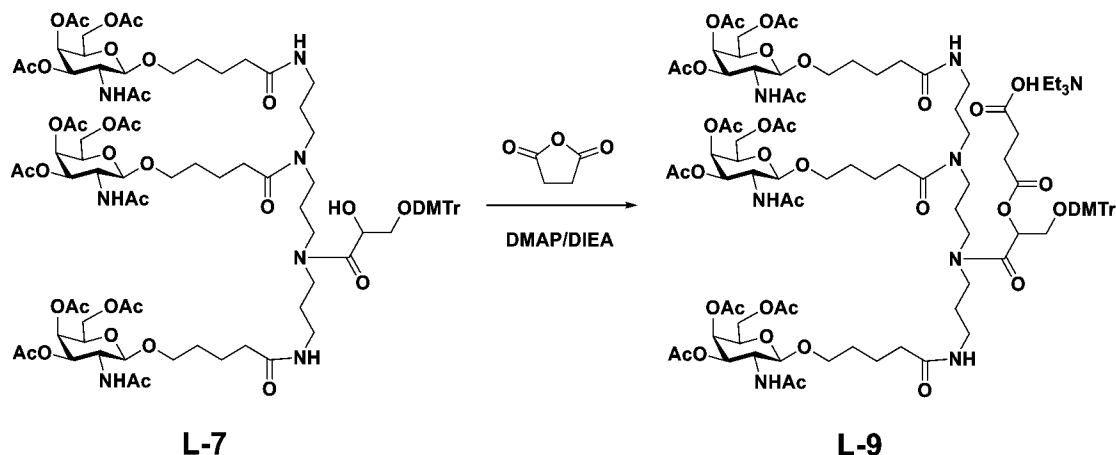
【0424】 (1-1-7b)L-7的合成：



【0425】 將步驟(1-1-6)中獲得的L-8(2.262g，1.532mmol)和步驟(1-1-7a)中獲得的A-1(2.342g，4.596mmol)混合，溶於16ml二氯甲烷，加入3-二乙氧基磷鹽基-1,2,3- 苯唑 4(3H)- 酮(DEPBT)(1.375g，4.596mmol)，再加入二異丙基乙胺(1.188g，9.191mmol)，25℃下攪拌反應2h，用10ml飽和碳酸氫鈉洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取3次，每次10ml，以10ml飽和食鹽水洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取2次，每次10ml，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜，得到粗品4.900g。柱純化使用120g 200-300目正相矽膠，以20ml三乙胺中和矽膠酸性，以含1wt%三乙胺的石油醚平衡管柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:N,N-二甲基甲醯胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品L-7 2.336g。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ7.90 – 7.78 (m, 4H), 7.75 – 7.64 (m, 1H), 7.38 – 7.18 (m, 9H), 6.91 – 6.83 (m, 4H), 5.25 – 5.10 (m, 4H), 4.97 (dd, J = 11.2, 3.2 Hz, 3H), 4.48 – 4.30 (m, 4H), 4.02 (s, 9H), 3.93 – 3.84 (m, 3H), 3.76 – 3.66 (m, 9H), 3.45 – 3.35 (m, 3H), 3.24 – 2.98 (m, 10H),

【0426】

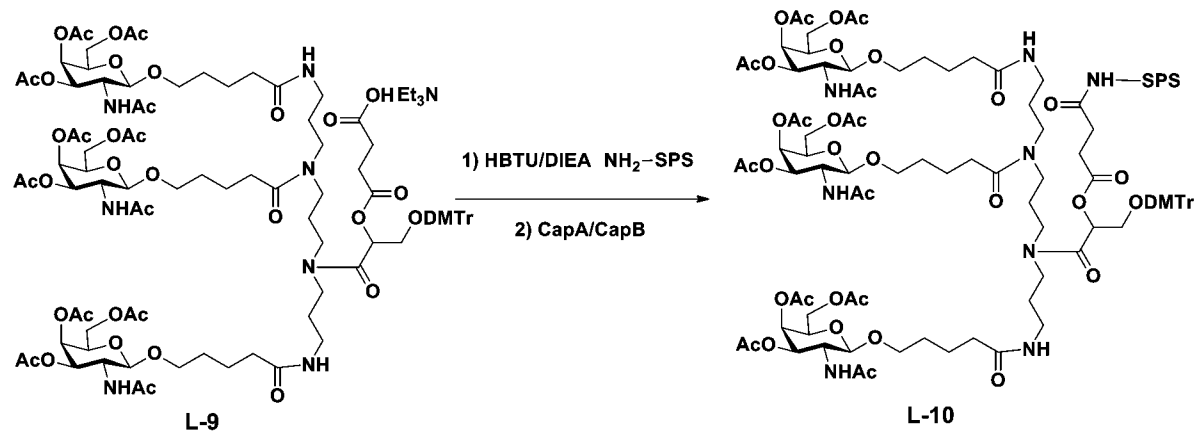
【0427】 (1-1-8)L-9綴合分子的合成：



第 101 頁，共 148 頁(發明說明書)

1.19 (m, 4H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 9H). MS *m/z* : C₉₄H₁₃₂N₇O₃₈ , [M-DMTr]⁺ , 理論 : 1664.72 , 實測 : 1665.03 。

【0429】 (1-1-9)L-10化合物的合成：



【0430】 此步驟中，藉由將L-9綴合分子連接至固相載體，製備了L-10化合物。

【0431】 將步驟(1-1-8)中獲得的L-9綴合分子(0.233g，0.1126mmol)、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU，0.064g，0.1689mmol)和二異丙基乙胺(DIEA，0.029g，0.2252mmol)混合，溶於19ml乙腈，室溫攪拌5分鐘，向反應液中加入氨甲基樹脂(0.901g，100-200目，氨基載量400μmol/g，購自南開和成公司)，25℃下進行振盪反應，轉速220轉/分鐘，反應15h後過濾，濾餅以DCM淋洗2次，每次30ml，乙腈淋洗3次，每次30ml，30ml乙醚淋洗1次，真空油泵乾燥2h，隨後再按照表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)進行蓋帽反應。25℃下置於振盪機上，轉速200轉/分鐘，反應5h，反應液過濾，濾餅用乙腈淋洗3次，每次30ml，抽濾至乾，真空油泵減壓下乾燥過夜，得到L-10化合物(即，連接固相載體的L-9綴合分子)1.100g，載量90.8μmol/g。

【0432】 表2 蓋帽反應投料配比

原料	用量	規格	批號	生產廠家
CapA	20ml	——	——	——
CapB	2.3ml	——	——	——

DMAP	0.01g	分析純	I1422139	Aladdin
乙腈	2.3ml	光譜純	O15161001	上海星可

【0433】 其中，CapA和CapB為蓋帽試劑溶液，CapA為20體積% N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液，吡啶與乙腈的體積比為3:5；CapB為20體積%乙酸酐的乙腈溶液。

【0434】 (1-2)合成綴合物1-2、15-16的正義鏈

【0435】 綴合物1-2、15-16的正義鏈序列相同，故其製備方法也相同。

【0436】 藉由固相亞磷醯胺法，利用上述步驟製備的L-10化合物起始循環，按照正義鏈核苷酸排布順序自3'-5'方向逐一連接核苷單體。每連接一個核苷單體都包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化四步反應。其中，兩個核苷酸之間採用磷酸酯連接時，連接後一個核苷單體時，包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化四步反應。兩個核苷酸之間採用硫代磷酸酯連接時，連接後一個核苷單體時，包括脫保護、偶聯、蓋帽、硫化四步反應。合成條件給定如下：

【0437】 核苷單體以0.1M濃度的乙腈溶液提供，每一步的脫保護反應的條件相同，即溫度為25℃，反應時間為70秒，脫保護試劑為二氯乙酸的二氯甲烷溶液(3%v/v)，二氯乙酸與固相載體上4,4'-二甲氧基三苯甲基保護基的莫耳比為5:1。

【0438】 每一步偶聯反應條件均相同，包括溫度為25℃，固相載體上連接的核酸序列與核苷單體的莫耳比為1:10，固相載體上連接的核酸序列和偶聯試劑的莫耳比為1:65，反應時間為600秒，偶聯試劑為5-乙硫基-1H-四氮唑的0.5M乙腈溶液。

【0439】 每一步蓋帽條件均相同，包括溫度為25℃，反應時間為15秒。蓋帽試劑溶液為莫耳比為1:1的CapA和CapB的混合溶液，蓋帽試劑與固相載體上連

接的核酸序列的莫耳比為乙酸酐:N-甲基咪唑:固相載體上連接的核酸序列=1:1:1。

【0440】 每一步氧化反應條件相同，包括溫度為25°C，反應時間為15秒，氧化試劑為濃度為0.05M的碘水。碘與偶聯步驟中固相載體上連接的核酸序列的莫耳比為30:1。反應在四氫呋喃:水:吡啶=3:1:1的混合溶劑中進行。

【0441】 每一步硫化反應的條件相同，包括溫度為25°C，反應時間為300秒，硫化試劑為氫化黃原素。硫化試劑與偶聯步驟中固相載體上連接的核酸序列的莫耳比為120:1。反應在乙腈:吡啶=1:1的混合溶劑中進行。

【0442】 切割和脫保護條件如下：將合成的連接有載體的核苷酸序列加入濃度為25wt%的氨水中，氨水用量為0.5ml/ μ mol，在55°C反應16h，除去液體，真空濃縮至乾。

【0443】 純化與脫鹽：利用製備型離子層析純化柱(Source 15Q)，藉由NaCl的梯度沖提，完成核酸的純化。具體而言為：沖提劑A：20mM磷酸鈉(pH 8.1)，溶劑為水/乙腈=9:1(體積比)；沖提劑B：1.5M氯化鈉，20mM磷酸鈉(pH 8.1)，溶劑為水/乙腈=9:1(體積比)；沖提梯度：沖提劑A:沖提劑B=100:0-50:50梯度沖提。收集產品沖提液後合併，採用反相層析純化柱進行脫鹽，具體條件包括採用葡聚糖凝膠柱進行脫鹽，填料為葡聚糖凝膠G25，以去離子水沖提。

【0444】 檢測：使用離子交換層析(IEX-HPLC)檢測純度，使用液質聯用(LC-MS)分析分子量。

【0445】 對於綴合物1的正義鏈分子量，理論值7407.22，實測值7406.4。對於綴合物2的正義鏈分子量，理論值7407.22，實測值7406.5。實測值與理論值相符，表明所合成的是3'末端綴合了L-9綴合分子的正義鏈S。

【0446】 (1-3)合成綴合物1-2的反義鏈

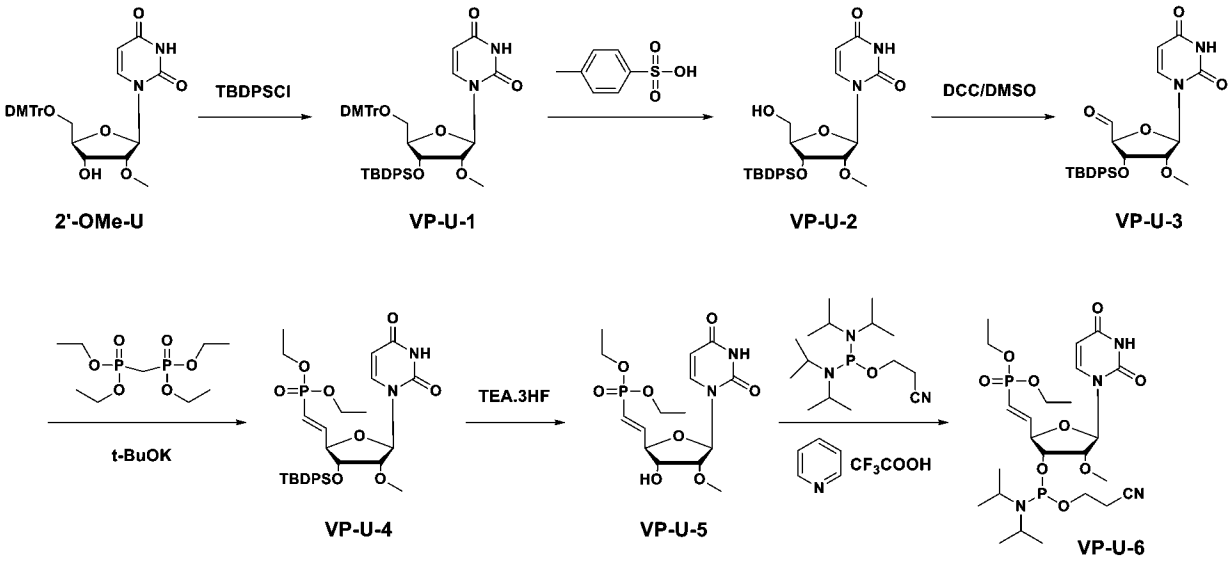
【0447】 (1-3A)綴合物1-2反義鏈的製備

第 104 頁，共 148 頁(發明說明書)

【0448】藉由固相亞磷醯胺法，利用通用固相載體(UnyLinker™ loaded NittoPhase® HL Solid Supports，Kinovate Life Sciences公司)起始循環，合成綴合物1和綴合物2的反義鏈AS。固相合成方法中的脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化反應條件，切割和脫保護，純化與脫鹽條件與合成正義鏈相同。

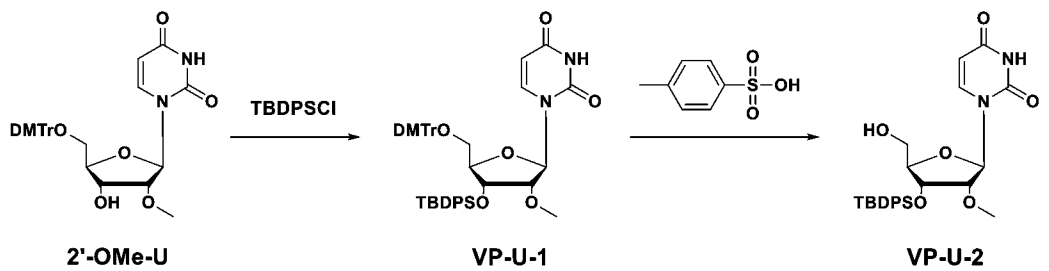
【0449】檢測：純度採用離子交換層析(IEX-HPLC)進行檢測，分子量採用液質聯用(LC-MS)進行分析。對於綴合物1，理論值7208.77，實測值7208.1。對於綴合物2，理論值7170.72，實測值7170.1。實測值與理論值相符，表明所合成的是具有目標序列的反義鏈AS。

【0450】其中，乙烯基磷酸酯修飾的2'-甲氧基修飾尿嘧啶核苷單體 (VP-Um)按照以下方法合成：



【0451】 (1-3-1)VP-U-2的合成

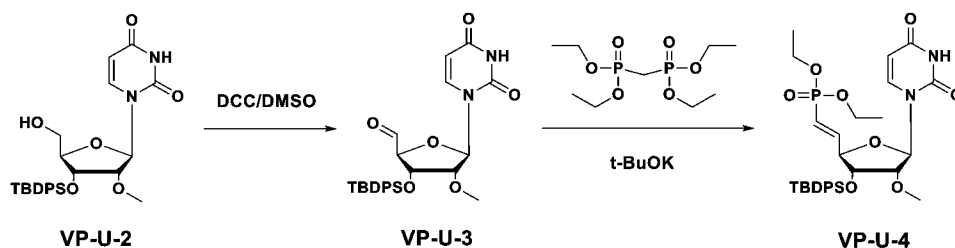
【0452】 按照以下方法，合成了VP-U-2分子：



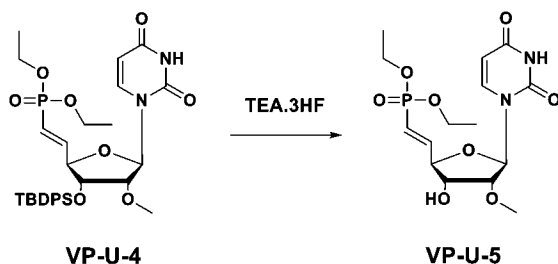
【0453】 將2'-甲氧基修飾的尿嘧啶核苷(2'-OMe-U，51.30g，91.6mmol)，叔丁基二苯基氯矽烷(TBDPSCl，50.35g，183.2mmol)，咪唑(12.47g，183.2mmol)混合溶於450ml N,N-二甲基甲醯胺(DMF)，室溫下攪拌反應20h。蒸除DMF，用600ml二氯甲烷溶解後加300ml飽和碳酸氫鈉洗滌，水相再用二氯甲烷(DCM)萃取3次，每次300ml，合併有機相，用5%草酸洗滌至水相pH<5，蒸發溶劑至乾後獲得VP-U-1粗品直接用於隨後VP-U-2的合成。

【0454】 將VP-U-1粗品用100ml二氯甲烷溶解後，外加冰浴攪拌10分鐘，再加入預先在4°C冰箱冷藏好的450ml 2%對甲苯磺酸溶液(溶劑為體積比3:7的甲醇-二氯甲烷混合溶劑)，反應10分鐘。再加入200ml飽和碳酸氫鈉淬滅反應，有機相加入飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌至pH=8。合併水相，用二氯甲烷萃取2次，每次200ml，合併有機相，再用200ml飽和食鹽水洗滌一次，蒸發溶劑至乾。200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.25梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥得到純品VP-U-2共40.00g。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41–7.30 (m, 6H), 6.79 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.94 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.12 (td, J = 4.6, 3.9 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 4.8, 4.0 Hz, 1H), 3.96 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 3.68 (ddd, J = 11.8, 7.0, 4.6 Hz, 1H), 3.57 – 3.46 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.05 (s, 8H). MS m/z : C₂₆H₃₃N₂O₆Si, [M+H]⁺, 理論: 497.21, 實測: 497.45。

【0455】 (1-3-2)VP-U-4的合成：



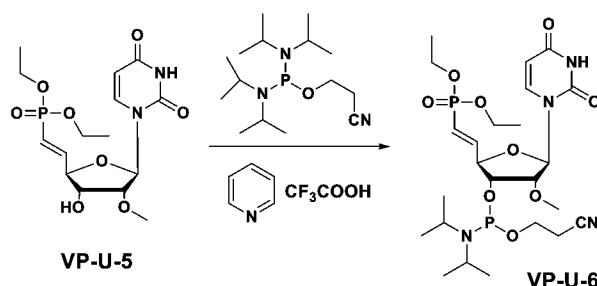
【0457】 (1-3-3)VP-U-5的合成：



第 107 頁，共 148 頁(發明說明書)

=1:1:1:0.05-1:1:1:0.25梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥得到純品VP-U-5共6.70g。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 15.0, 6.2 Hz, 1H), 5.99 – 5.82 (m, 2H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.10 (dd, J = 5.3, 4.7 Hz, 1H), 4.29 (ddq, J = 9.8, 8.6, 7.0 Hz, 2H), 4.17 (ddd, J = 6.2, 5.2, 1.0 Hz, 1H), 4.12 – 3.98 (m, 3H), 3.39 (s, 2H), 1.32 (td, J = 6.9, 0.6 Hz, 6H). MS m/z : C₁₅H₂₄N₂O₈P, [M+H]⁺, 理論：391.13，實測：391.38。

【0459】 (1-3-4)VP-U-6的合成：

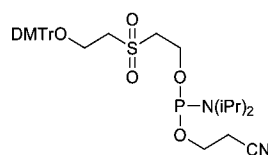


【0460】 在氬氣保護條件下向10ml無水二氯甲烷中加入VP-U-5(391mg，1.0mmol)、三氟乙酸吡啶鹽(0.232g，1.2mmol)、N-甲基咪唑(0.099g，1.2mmol)，雙(二異丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦(0.452g，1.5mmol)，室溫攪拌反應5小時。蒸除溶劑至乾，柱層析純化(200-300目正相矽膠，二氯甲烷:乙腈(含0.5wt%三乙胺)=3:1-1:3梯度沖提)，收集產物沖提液，濃縮除去溶劑，得到目標產物VP-U-6共508mg。³¹P NMR (161 MHz, DMSO-d₆) δ 150.34, 150.29, 17.07, 15.50. MS m/z : C₂₄H₄₁N₄O₉P₂, [M+H]⁺, 理論：591.23，實測：591.55。表明VP-U-6是目標產物VP-U_m，作為核苷單體參與RNA鏈合成。

【0461】 (1-3B)綴合物15的反義鏈的製備

【0462】 綴合物15的反義鏈與綴合物1的反義鏈的區別僅在於5'-末端第一個核苷酸修飾不同。按照固相亞磷醯胺法製備反義鏈時，最後連接的核苷單體為2'-甲氧基修飾尿嘧啶核苷單體(U_m)，再經脫保護、偶聯、蓋帽、氧化四步反

應將CPR-I單體(蘇州吉瑪，貨號Cat#13-2601-XX)連接至反義鏈5'末端，形成5'-磷酸酯修飾。



(CPR-I)

【0463】 合成中，使用的通用固相載體，脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化反應條件，切割和脫保護，純化與脫鹽條件與合成正義鏈相同。

【0464】 (1-3C)綴合物16的反義鏈的製備

【0465】 採用與綴合物15反義鏈相同的合成製程，區別在於連接CPR-I單體時，以硫化反應條件代替上述氧化反應條件，預期能夠制得具有5'-硫代磷酸酯修飾的綴合物16反義鏈。

【0466】 (1-4)合成綴合物1-2和15-16

【0467】 對於綴合物1，將S鏈與AS鏈分別溶於注射用水中，得到40mg/mL的溶液，以等莫耳比混合，50°C加熱15min，室溫冷卻後，使它們藉由氫鍵形成雙鏈結構。使用超純水(Milli-Q超純水儀自製，電阻率18.2MΩ*cm(25°C))將綴合物稀釋至濃度為0.2mg/mL後，利用液質聯用儀(LC-MS，Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，購於Waters公司，型號：LCT Premier)進行分子量檢測。實測值與理論值一致，說明所合成的綴合物1是目標設計的帶有L-9綴合分子的雙鏈核酸序列。

【0468】 對於綴合物2，採用相同的方法製備並檢測分子量，實測值與理論值一致，說明所合成的綴合物2是目標設計的帶有L-9綴合分子的雙鏈核酸序列。

【0469】對於綴合物15、16，採用相同的方法退火，預期能夠製得目標綴合物。

【0470】綴合物1和綴合物2，以及綴合物15、綴合物16的結構如式(403)所示。

【0471】製備例2 綴合物3-14與對比綴合物2的製備

【0472】採用與製備例1相同的方法，預期能夠制得題述綴合物，不同的是：1)所述siRNA分別為表1中所示的對應於綴合物3-14及對比綴合物2的序列；2)當目標序列中含有未修飾的核苷酸時，切割與脫保護條件中，在氨水處理後，相對於單鏈核酸的量，用0.4ml/μmol N-甲基吡咯烷酮溶解產品，隨後加入0.3ml/μmol三乙胺和0.6ml/μmol三乙胺三氫氟酸鹽，以脫除核糖上的2'-TBDMS保護。

【0473】題述綴合物中所綴合的siRNA的序列參見表1。

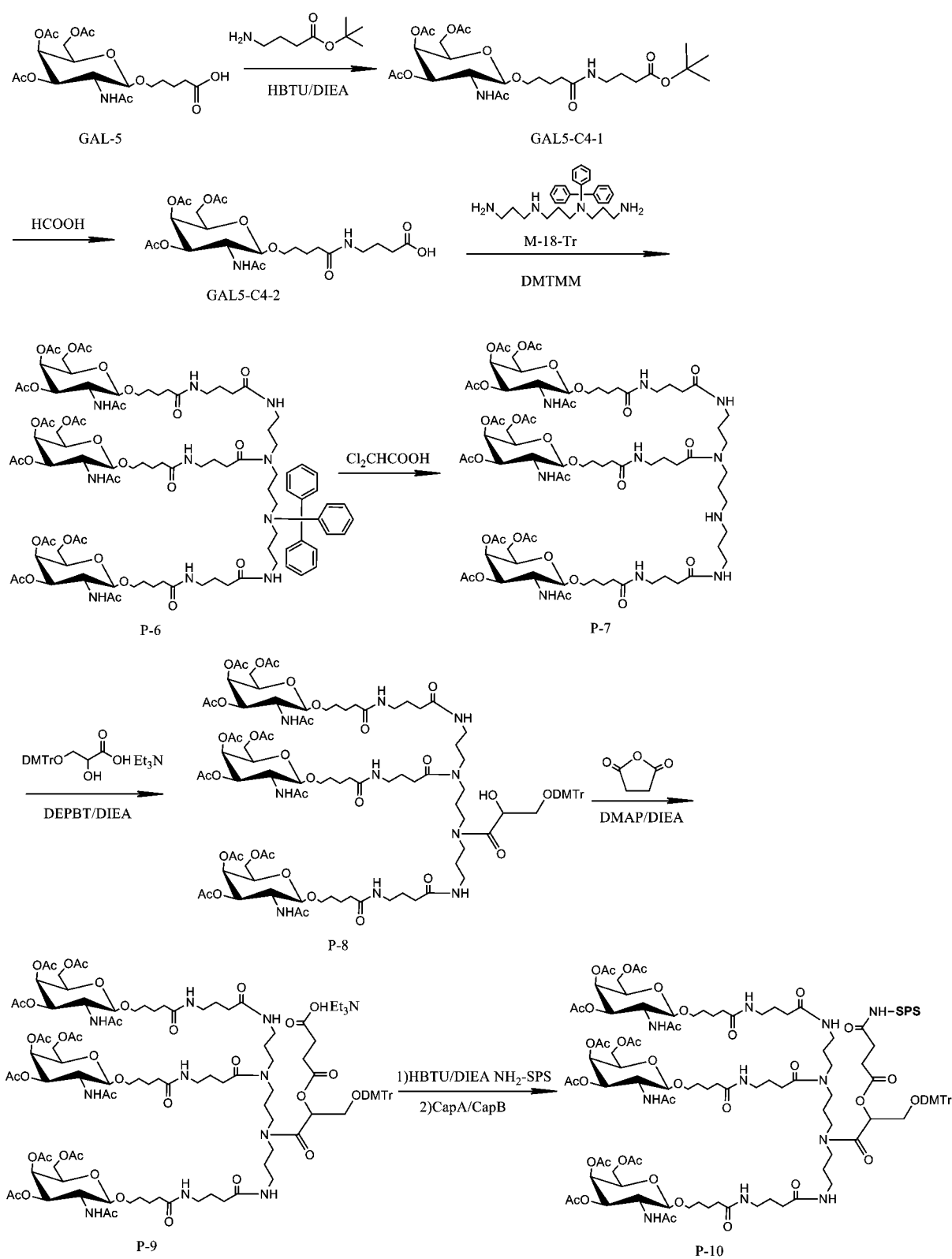
【0474】表1 siRNA綴合物

實施利	編號	序列方向 5'-3'		SEQ ID NO
綴合物 1	L10-siHB1M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	29
綴合物 2	L10-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 3	L10-siHB1M1S	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	16
綴合物 4	L10-siHB2M1S	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	17
綴合物 5	L10-siHB1M2	正義鏈	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	12
		反義鏈	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	13
綴合物 6	L10-siHB2M2	正義鏈	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	12
		反義鏈	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm	14

綴合物 7	L10-siHB1M2SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	18
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	31
綴合物 8	L10-siHB2M2SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	18
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	32
綴合物 9	L10-siHB1M5SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	18
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	29
綴合物 10	L10-siHB1M3SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAfUmGfCmCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	30
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	29
綴合物 11	L10-siHB1M4SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	33
綴合物 12	L10-siHB4M1SVP	正義鏈	GmsCmsUmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	34
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCmsGmsCm	35
綴合物 13	L10-siHB1	正義鏈	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	36
		反義鏈	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAGC	37
綴合物 14	L10-siHB2	正義鏈	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	38
		反義鏈	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAUU	39
綴合物 15	L10-siHB1M1SP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	P-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	40
綴合物 16	L10-siHB1M1SPs	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	Ps-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	41
綴合物 17	P10-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 18	R5-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 19	LA5-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 20	LB5-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 21	V8-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15

		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 22	W8-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 23	X8-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 24	Z5-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
綴合物 25	FIN-siHB1M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	29
綴合物 26	FIN-siHB2M1SVP	正義鏈	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	15
		反義鏈	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	30
對比綴合物 1	FIN-NC	正義鏈	UUCUCCGAACGUGUCACGU	42
		反義鏈	ACGUGACACGUUCGGAGAAUU	43
對比綴合物 2	L10-siHB3M1SVP	正義鏈	GmsCmsUmGmCmUmAfUfGfCmCmUmCmAmUmCmUmUmAm	44
		反義鏈	VP-UmsAfsAmGmAmUfGmAmGmGmCmA mUmAfGmCfAmGmCmsAmsGm	45
對比綴合物 3	FIN-siHB3M1SVP	正義鏈	GmsCmsUmGmCmUmAfUfGfCmCmUmCmAmUmCmUmUmAm	44
		反義鏈	VP-UmsAfsAmGmAmUfGmAmGmGmCmA mUmAfGmCfAmGmCmsAmsGm	45

- 【0475】 製備例3 P10-siHB2M1SVP(綴合物17)的製備
- 【0476】 (3-1)P-10化合物的合成
- 【0477】 按照以下方法，合成了P-10化合物：



【0478】 (3-1-1)GAL5-C4-1的合成

【0479】 向40ml N,N-二甲基甲醯胺中加入按照上述(1-1-1)中描述的方法得到的GAL-5(13.43g，30.0mmol)、4-氨基酸叔丁酯鹽酸鹽(5.87g，30.0mmol)、

O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯(13.65g, 36.0mmol)和二異丙基乙胺(11.63g, 90.0mmol)，溶解均一後室溫攪拌反應5小時。向反應液中加入300ml飽和碳酸氫鈉水溶液，用乙酸乙酯萃取3次，每次200ml，合併有機相，用200ml飽和食鹽水洗滌一次，分出有機相，再用無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸除溶劑至乾得到30.3g油狀物粗品GAL5-C4-1，直接進行下一步反應。

【0480】 (3-1-2)GAL5-C4-2的合成

【0481】 將步驟(3-1-1)中獲得的GAL5-C4-1粗品(30.3g, 30mmol)溶於180ml甲酸中，室溫攪拌反應16小時。蒸發溶劑至乾，管柱層析純化(200-300目正相矽膠，二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20梯度沖提)，收集反應沖提液，濃縮除去溶劑，得到目標產物GAL5-C4-2共14.84g。

【0482】 (3-1-3)P-6的合成：

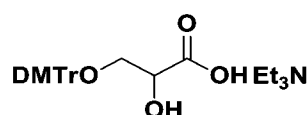
【0483】 將按照步驟(1-1-4)中描述的方法得到的M-18-Tr(2.02g, 4.69mmol)與將步驟(3-1-2)中獲得的GAL5-C4-2(8.24g, 15.48mmol，由兩批產物合併獲得)混合溶於47ml乙腈，再加入N-甲基嗎啉(3.13g, 30.96mmol)，最後加入4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽(DMTMM, 4.28g, 15.48mmol)，室溫攪拌反應2h。以20ml二氯甲烷稀釋反應液，10ml飽和碳酸氫鈉溶液洗滌有機相，10ml飽和食鹽水洗滌有機相，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品，200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾得到純品P-6共8.27g。

【0484】 (3-1-4)P-7的合成：

【0485】 將按照上述(3-1-3)中得到的P-6(6.82g, 3.456mmol)溶於69ml二氯甲烷，再加入二氯乙酸(13.367g, 103.67mmol)，室溫下反應2h。加入100ml二氯甲烷稀釋反應液，再加入飽和碳酸氫鈉溶液洗滌調節pH=7-8之間，水相以二氯

甲烷萃取6次，每次30ml，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品。用200-300目正相矽膠純化，以10wt%三乙胺中和矽膠酸性，以1wt%三乙胺平衡管柱，二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到P-7共4.82g。MS m/z: $C_{78}H_{127}N_{10}O_{33}$ ，[M+H]⁺，理論：1732.91，實測：1735.73。

【0486】 (3-1-5)P-8的合成：



(A-1)

【0487】 將P-7(2.653g，1.532mmol)和A-1(2.342g，4.596mmol)混合溶於16ml二氯甲烷，加入3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮(DEPBT)(1.375g，4.596mmol)，再加入二異丙基乙胺(1.188g，9.191mmol)，25°C下攪拌反應2h。用10ml飽和碳酸氫鈉洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取3次，每次10ml，10ml飽和食鹽水洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取2次，每次10ml，合併有機相，用無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜得到粗品。管柱純化使用120g 200-300目正相矽膠，以20ml三乙胺中和矽膠酸性，以含1wt%三乙胺的石油醚平衡管柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:N,N-二甲基甲醯胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品P-8共2.793g。

【0488】 (3-1-6)P-9的合成：

【0489】 將P-8(490mg，0.231mmol)、丁二酸酐(69mg，0.693mmol)和4-二甲氨基吡啶(DMAP，68mg，0.554mmol)混合溶於2.3ml二氯甲烷，再加入二異丙基乙胺(DIPEA，149mg，1.155mmol)，25°C下攪拌反應21h。50ml二氯甲烷稀釋反應液，再加入100ml 0.5M三乙胺磷酸鹽洗滌反應液，水相以二氯甲烷萃取3次，

每次10ml，合併有機相，減壓蒸乾得到粗品。柱純化使用80g 200-300目正相矽膠，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷平衡管柱，以含1wt%三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品P-9綴合分子共200mg。MS m/z： $C_{106}H_{153}N_{10}O_{41}$ ，[M-DMTr]⁺，理論：1921.05，實測：1920.97。

【0490】 (3-1-7)P-10的合成

【0491】 藉由與製備例1中步驟(1-1-9)相同的方法，製備P-10。不同的是以P-9綴合分子代替L-9綴合分子，得到連接固相載體的P-9綴合分子。

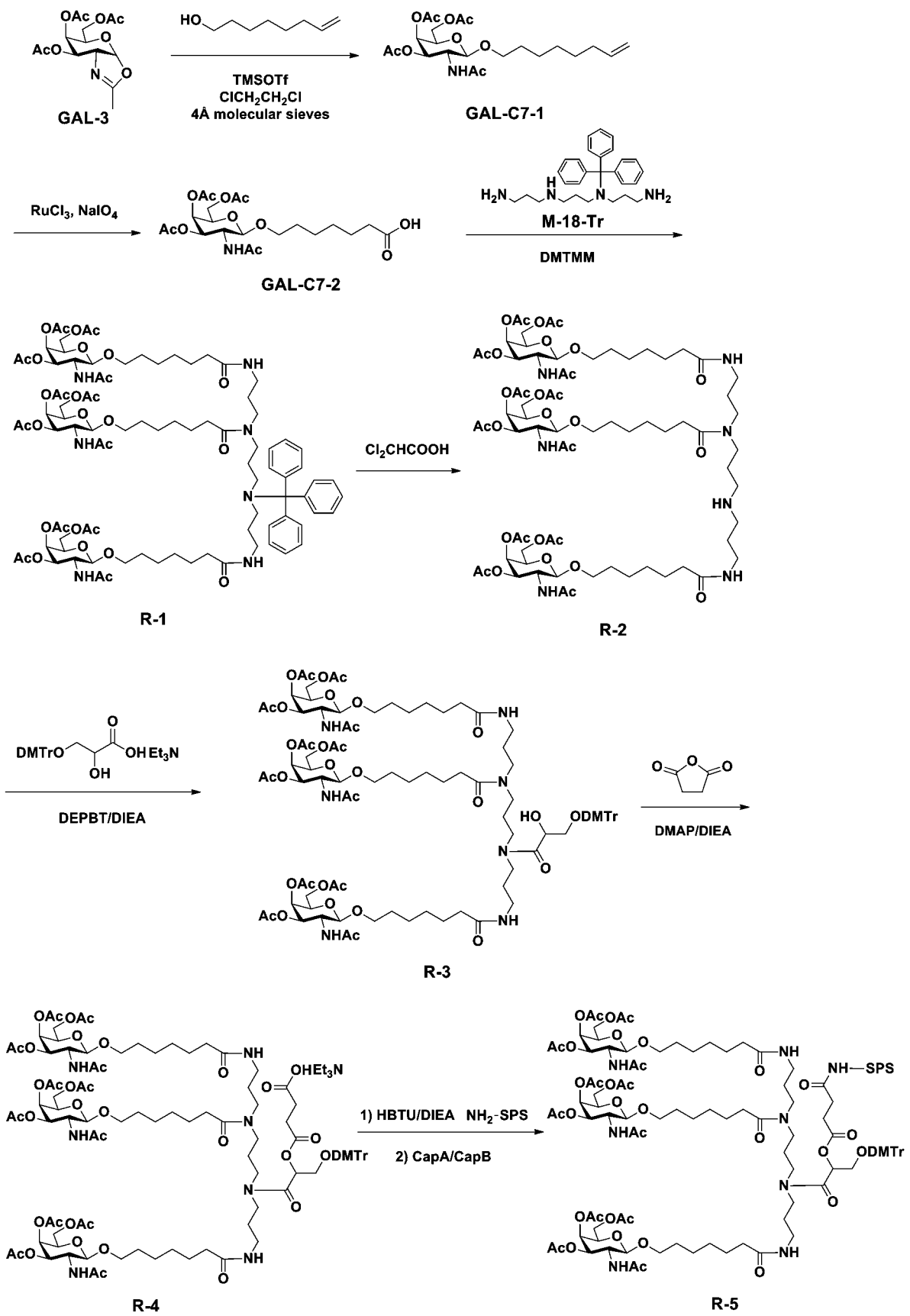
【0492】 (3-2)合成P10-siHB2M1SVP綴合物

【0493】 藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物17，不同的是以P-10化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到P10-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(404)所示。

【0494】 製備例4 R5-siHB2M1SVP綴合物(綴合物18)的製備

【0495】 (4-1)R-5化合物的合成

【0496】 按照以下方法，合成了R-5化合物：



【0497】 (4-1-1)GAL-C7-1的合成

【0498】 將按照步驟(1-1-1b)中描述的方法得到的GAL-3(26.4g, 80.2mmol)溶於134ml無水1,2-二氯乙烷中，加入4Å分子篩粉末60g，再加入7-辛烯-1-醇(11.3g, 88.2mmol)，室溫下攪拌反應10分鐘，冰浴和氮氣保護下加入三氟甲基磺酸三甲基矽酯(8.9g, 40.1mmol)，室溫攪拌反應24小時。過濾除去4Å分子篩粉末，濾液中加入500ml飽和碳酸氫鈉水溶液洗滌，分出有機相，水相用100ml二氯甲烷萃取一次，合併有機相並用250ml飽和食鹽水洗滌一次，分出有機相，用無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸除溶劑至乾得到黃色糖稀狀產品GAL-C7-1 33.3g，不進行純化直接進行下一步氧化反應。

【0499】 (4-1-2)GAL-C7-2的合成

【0500】 將按照步驟(4-1-1)中得到的GAL-C7-1(33.3g, 72.8mmol)溶於160ml二氯甲烷和160ml乙腈的混合溶劑中，分別加入216ml水和高碘酸鈉固體(62.3g, 291.2mmol)，冰水浴下攪拌10分鐘，加入催化劑三氯化釕(498mg, 2.4mmol)自然升至室溫攪拌反應23小時。反應液加入200ml水稀釋攪拌，加飽和碳酸氫鈉調節pH值為7.5，分掉有機相，水相再用二氯甲烷萃取三次，棄去有機相，水相用檸檬酸固體調節pH約為3，用二氯甲烷萃取三次，每次200ml，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸除溶劑後柱層析(200-300目正相矽膠，二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20梯度沖提)純化得到白色泡沫狀固體產品GAL-C7-2 22.4g。MS m/z: $C_{21}H_{32}NO_{11}$, $[M+H]^+$ ，理論：476.50，實測：475.94。

【0501】 (4-1-3)R-1的合成：

【0502】 將按照步驟(1-1-4)中描述的方法得到的M-18-Tr(2.02g, 4.69mmol)與GAL-C7-2(7.36g, 15.48mmol)混合溶於47ml乙腈，再加入N-甲基嗎啉(3.13g, 30.96mmol)，最後加入4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽(DMTMM, 4.28g, 15.48mmol)，室溫攪拌反應2h。以200ml二氯甲烷稀釋反應液，100ml飽和碳酸氫鈉溶液洗滌有機相，100ml飽和食鹽水洗滌有機相，合併有機相並以無

第 118 頁，共 148 頁(發明說明書)

水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品，200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾得到純品R-1 7.82g。

【0503】 (4-1-4)R-2的合成：

【0504】 將R-1(6.23g，3.456mmol)溶於69ml二氯甲烷，再加入二氯乙酸(13.367g，103.67mmol)，室溫下反應2h。加入100ml二氯甲烷稀釋反應液，再加飽和碳酸氫鈉溶液洗滌調節pH=7-8之間，水相以二氯甲烷萃取6次，每次30ml，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品。200-300目正相矽膠，以10wt%三乙胺中和矽膠酸性，以1wt%三乙胺平衡管柱，二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40梯度沖提，減壓蒸乾溶劑得到純品R-2 4.49g。

【0505】 (4-1-5)R-3的合成：

【0506】 將R-2(2.391g，1.532mmol)和A-1(2.342g，4.596mmol)混合溶於16ml二氯甲烷，加入3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮(DEPBT)(1.375g，4.596mmol)，再加入二異丙基乙胺(1.188g，9.191mmol)，25°C下攪拌反應2h。用10ml飽和碳酸氫鈉洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取3次，每次10ml，以10ml飽和食鹽水洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取2次，每次10ml，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜得到粗品。管柱純化使用120g 200-300目正相矽膠，以20ml三乙胺中和矽膠酸性，以含1wt%三乙胺的石油醚平衡管柱，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:N,N-二甲基甲醯胺=1:1:1:0.5-1:1:1:0.6梯度沖提，減壓蒸乾溶劑得到純品R-3 2.642g。

【0507】 (4-1-6)R-4的合成：

【0508】 將R-3(795mg，0.4074mmol)、丁二酸酐(82mg，0.8148mmol)和4-二甲氨基吡啶(DMAP，100mg，0.8148mmol)混合溶於4ml二氯甲烷，再加入二異丙基乙胺(DIPEA，100mg，0.8148mmol)，25°C下攪拌反應18h。5ml 0.5M三

乙胺磷酸鹽洗滌反應液，水相以二氯甲烷萃取3次，每次5ml，合併有機相減壓蒸乾得到粗品。管柱純化使用30g 200-300目正相矽膠，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷平衡管柱，含1wt%三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品R-4綴合分子505mg。

【0509】 (4-1-7)R-5的合成：

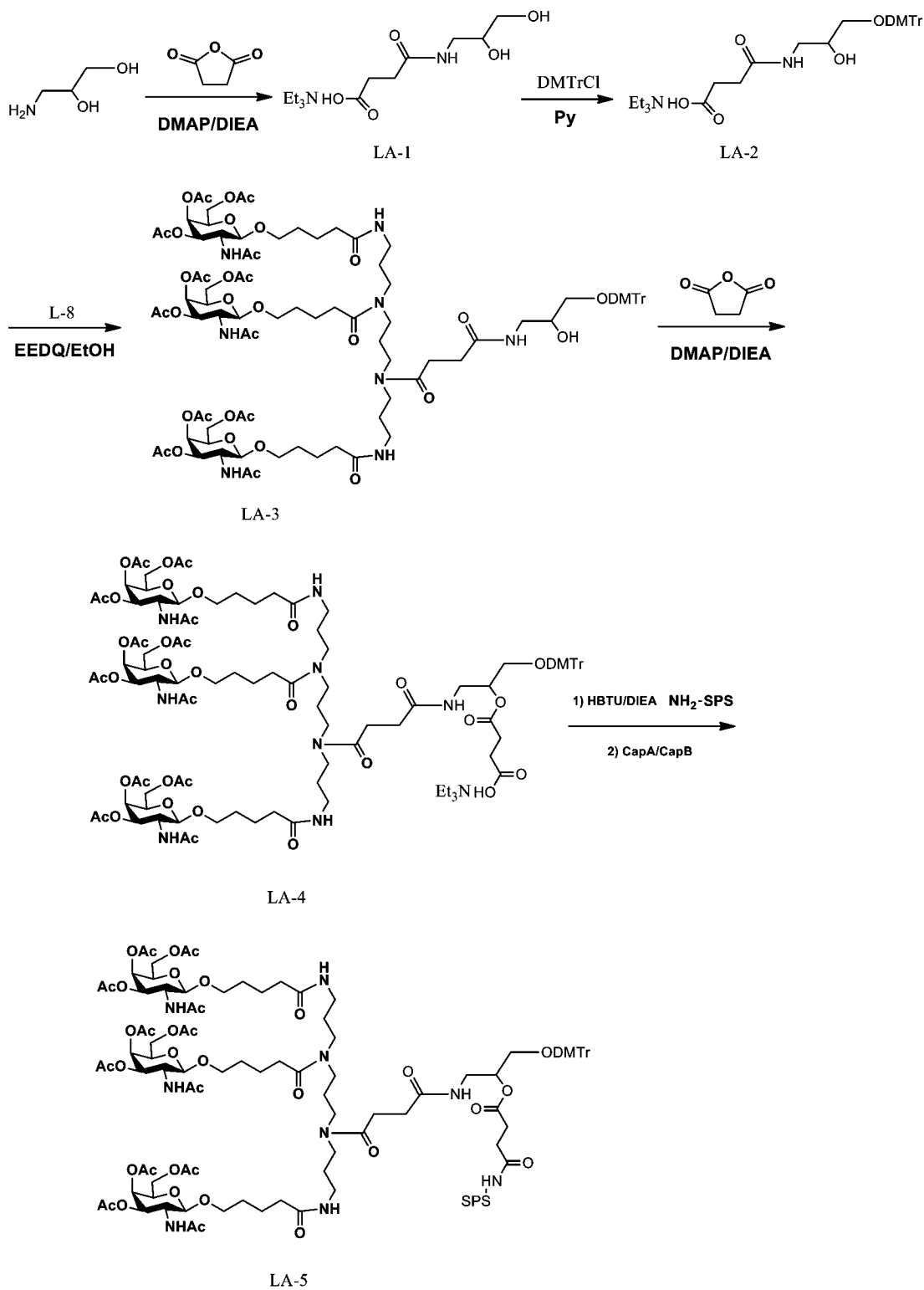
【0510】 藉由與製備例1中步驟(1-1-9)相同的方法，製備R-5。不同的是以R-4綴合分子代替L-9綴合分子，得到連接固相載體的R-4綴合分子。

【0511】 (4-2)合成R5-siHB2M1SVP綴合物

【0512】 藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物18，不同的是以R-5化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到R5-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(407)所示。

【0513】 製備例5 LA5-siHB2M1SVP綴合物(綴合物19)的製備

【0514】 按照以下製程途徑，預期能夠合成LA-5化合物：

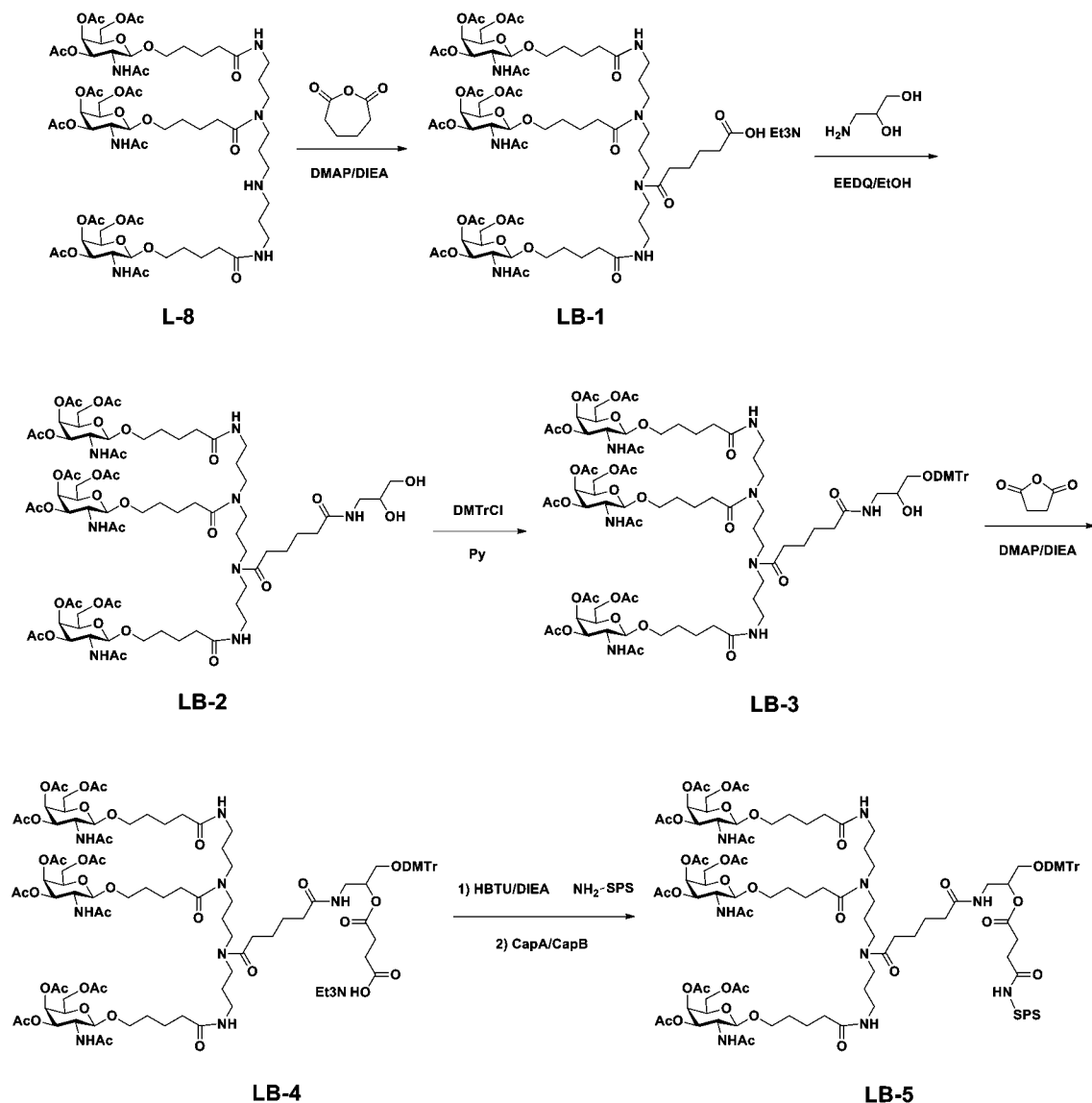


【0515】 藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物19，不同的是以LA-5化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到LA5-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(412)所示。

【0516】 製備例6 LB5-siHB2M1SVP綴合物(綴合物20)的製備

【0517】 (6-1)LB-5化合物的合成

【0518】 按照以下方法，合成了LB-5化合物：



【0519】 (6-1-1)LB-1的合成：

【0520】 將按照步驟(1-1-6)中描述的方法得到的L-8(5.0g, 3.386mmol)、己二酸酐(870mg, 6.772mmol)和4-二甲氨基吡啶(DMAP, 827mg, 6.772mmol)混合溶於130ml二氯甲烷，再加入二異丙基乙胺(DIPEA, 2.2g, 16.931mmol)，25℃下攪拌反應4h。加入70ml二氯甲烷稀釋反應液，以0.5M三乙胺磷酸鹽洗滌反應液，水相以二氯甲烷萃取4次，每次10ml，合併有機相減壓蒸乾得到粗品。管柱純化使用120g 200-300目正相矽膠，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷平

衡管柱，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.2-1:1:1:1梯度沖提，減壓蒸乾溶劑得到純品LB-1 4.267g。

【0521】 (6-1-2)LB-2的合成：

【0522】 將按照步驟 (6-1-1) 中描述的方法得到的 LB-1(4.697g，2.753mmol，由兩批次產物合併而得)、3-氨基-1,2-丙二醇(313mg，3.442mmol)、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽(DMTMM，953mg，3.442mmol)和N-甲基嗎啉(700mg，6.884mmol)先後加入30ml乙腈和3ml甲醇的混合液中，室溫攪拌反應過夜。蒸發溶劑至乾，管柱層析(200-300目正相矽膠，二氯甲烷:甲醇=1:0.07-1:0.5梯度沖提)純化，收集產物沖提液，濃縮除去溶劑，得到目標產物LB-2 3.27g。

【0523】 (6-1-3)LB-3的合成：

【0524】 將LB-2(2.27g，1.353mmol)用14ml無水吡啶溶解。再加入4,4'-雙甲氧基三苯甲基氯(688mg，2.03mmol)室溫下攪拌反應過夜。加150ml甲醇淬滅，蒸發溶劑至乾。管柱層析(200-300目正相矽膠，二氯甲烷:甲醇=1:0.05-1:0.2梯度沖提)純化，收集產物沖提液，濃縮除去溶劑，得到目標產物LB-3 1.647g。

【0525】 (6-1-4)LB-4的合成：

【0526】 將LB-3(822mg，0.415mmol)、丁二酸酐(83g，0.83mmol)和4-二甲氨基吡啶(DMAP，102mg，0.83mmol)混合溶於4ml二氯甲烷，再加入DIPEA(270mg，2.075mmol)，25°C下攪拌反應過夜。0.5M三乙胺磷酸鹽洗滌反應液3次，水相以二氯甲烷萃取3次，每次2ml，合併有機相減壓蒸乾得到粗品。柱純化使用200-300目正相矽膠，以5wt%三乙胺中和矽膠酸性，以石油醚平衡管柱，用含1wt%三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:5-100:20梯度沖提，減壓蒸乾溶劑得到純品LB-4綴合分子787mg。

【0527】 (6-1-5)LB-5的合成：

第 123 頁，共 148 頁(發明說明書)

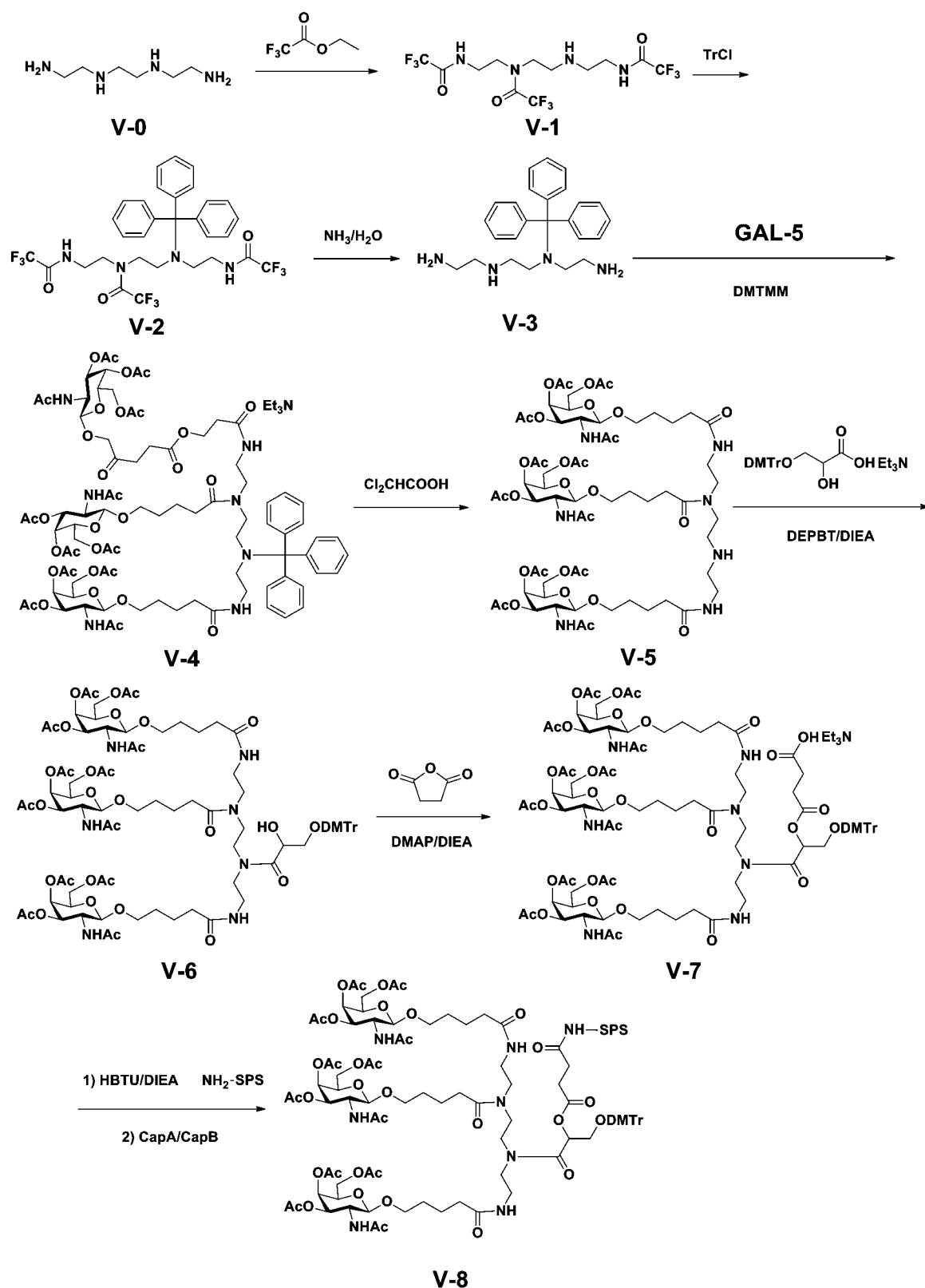
【0528】藉由與製備例1中步驟(1-1-9)相同的方法，製備LB-5。不同的是以LB-4綴合分子代替L-9綴合分子，得到連接固相載體的LB-4綴合分子。

【0529】(6-2)合成LB5-siHB2M1SVP綴合物

【0530】藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物20，不同的是以LB-5化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到LB5-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(413)所示。

【0531】製備例7 V8-siHB2M1SVP綴合物(綴合物21)的合成

【0532】按照以下製程途徑，預期能夠合成V-8化合物：

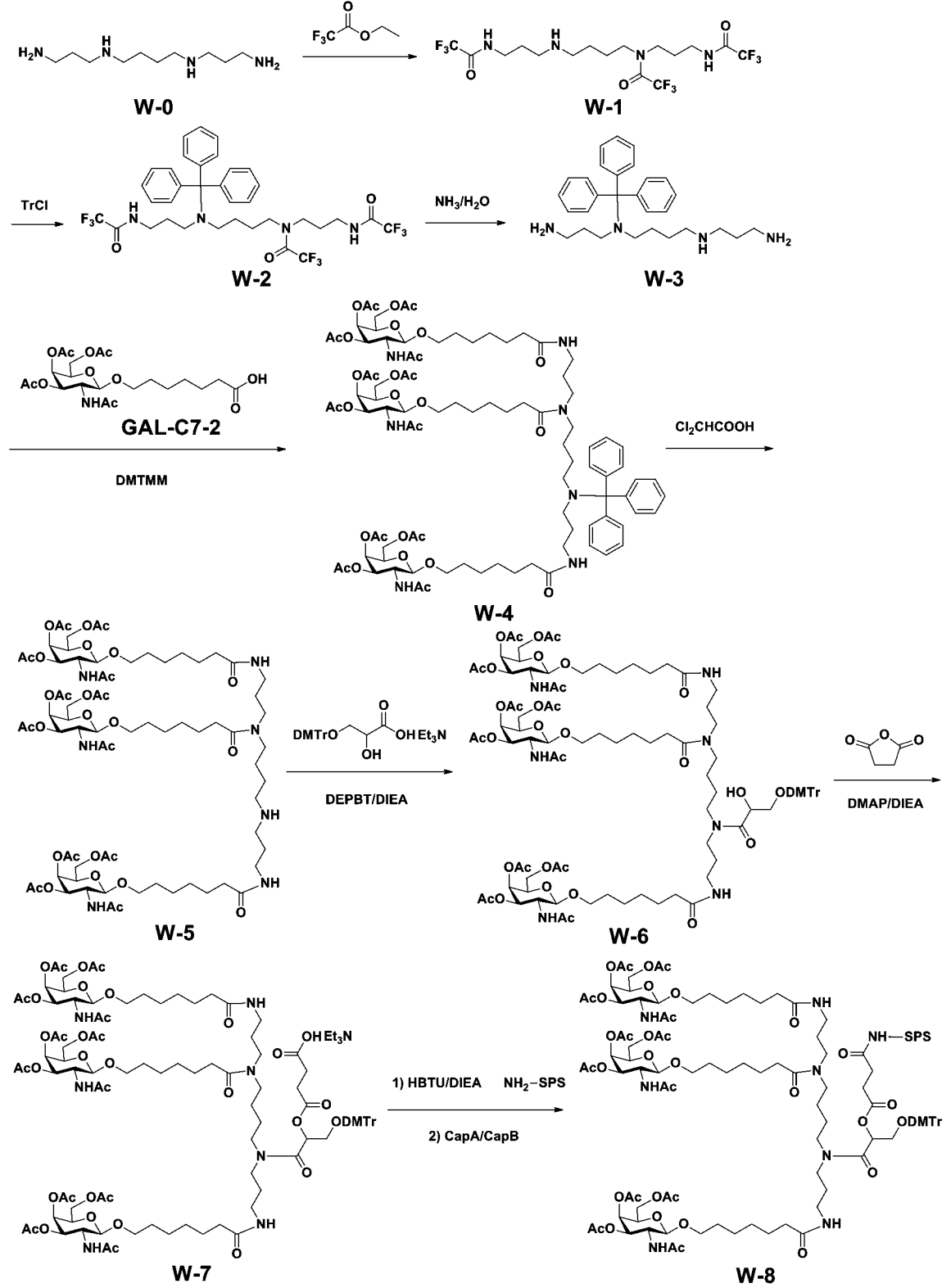


【0533】 藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物21，不同的是以V-8化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到V8-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(414)所示。

【0534】 製備例8 W8-siHB2M1SVP綴合物(綴合物22)的製備

【0535】 (8-1)W-8化合物的合成

【0536】 按照以下方法，合成了W-8化合物：



【0537】 (8-1-1)W-1的合成：

【0538】 將W-0(2.024g, 10mmol)溶於25ml乙腈中，再加三乙胺(4.048g, 40mmol)，冰水浴冷卻至0°C左右，加入三氟乙酸乙酯(5.683g, 40mmol)，室溫下反應22h。減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥18h，得到5.835g粗品固體W-1。

【0539】 (8-1-2)W-2的合成：

【0540】 將W-1粗品(5.835g, 10mmol)溶於50ml二氯甲烷，向反應液中加入TrCl(3.345g, 12mmol)和三乙胺(1.518g, 15mmol)，室溫下攪拌反應20h。用20ml飽和碳酸氫鈉洗滌反應液2次，用20ml飽和食鹽水洗滌1次，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾有機溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜，得到粗品固體W-2 8.012g。不經處理，進行下一步脫保護反應。

【0541】 (8-1-3)W-3的合成：

【0542】 將W-2粗品(8.012g, 10mmol)溶於100ml甲醇，再加入100ml甲胺水溶液(40wt%)，在50°C下攪拌反應23h。過濾除去不溶顆粒物，減壓蒸乾溶劑，加入200ml體積比為1:1的DCM-甲醇混合溶劑，以50ml飽和碳酸氫鈉洗滌有機相，水相再用二氯甲烷萃取3次，每次50ml，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜，200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷:甲醇:氨水(25wt%)=1:1:0.05-1:1:0.25梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥得到純品W-3 3.062g。

【0543】 (8-1-4)W-4的合成：

【0544】 將W-3(0.675g, 1.517mmol)與GAL-C7-2(2.60g, 5.46mmol)混合溶於47ml乙腈，再加二異丙基乙胺(1.57g, 12.14mmol)，最後加入3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮(DEPBT, 1.816g, 6.04mmol)，室溫攪拌反應2.5h。以100ml二氯甲烷稀釋反應液，80ml飽和碳酸氫鈉溶液洗滌有機相，80ml飽和食鹽水洗滌有機相，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品，

200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷:甲醇=100:5-100:7梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾得到純品W-4 1.610g。

【0545】 (8-1-5)W-5的合成：

【0546】 將W-4(1.61g，0.886mmol)溶於125ml二氯甲烷，再加入二氯乙酸(3.5ml，42.43mmol)，室溫下反應1h。加入150ml吡啶中和反應液，減壓蒸乾溶劑得粗品。200-300目正相矽膠，10wt%三乙胺中和矽膠酸性，1wt%三乙胺平衡管柱，二氯甲烷:甲醇=100:30-100:40梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品W-5 1.26g。

【0547】 (8-1-6)W-6的合成：

【0548】 將W-5(1.25g，0.793mmol)和按照步驟(1-1-7a)中描述的方法得到的A-1(1.21g，2.38mmol)混合溶於12ml二氯甲烷，加入3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮(DEPBT，0.712g，2.38mmol)，再加入二異丙基乙胺(0.615g，4.76mmol)，25°C下攪拌反應3h。用80ml飽和碳酸氫鈉洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取3次，每次10ml，合併有機相並以10ml飽和食鹽水洗滌，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜得到粗品。管柱純化使用185g 200-300目正相矽膠，20ml三乙胺中和矽膠酸性，以含1wt%三乙胺的石油醚平衡管柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:N,N-二甲基甲醯胺=1:1:1:0.1-1:1:0.7梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品W-6 1.57g。

【0549】 (8-1-7)W-7的合成：

【0550】 將W-6(1.238g，0.63mmol)、丁二酸酐(0.189g，1.89mmol)和4-二甲氨基吡啶(DMAP，0.231g，1.89mmol)混合溶於7ml二氯甲烷，再加入DIEA(0.407g，3.15mmol)，25°C下攪拌反應24h。以5ml 0.5M三乙胺磷酸鹽洗滌反應液，水相以二氯甲烷萃取3次，每次5ml，合併有機相減壓蒸乾得到粗品。

第 128 頁，共 148 頁(發明說明書)

管柱純化使用30g 200-300目正相矽膠，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，二氯甲烷平衡管柱，以含1wt%三乙胺的二氯甲烷:甲醇=100:18-100:20梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品W-7綴合分子1.033g。MS m/z: $C_{101}H_{146}N_7O_{38}$ ，[M-DMTr]⁺，理論：1763.92，實測：1763.21。

【0551】 (8-1-8)W-8的合成：

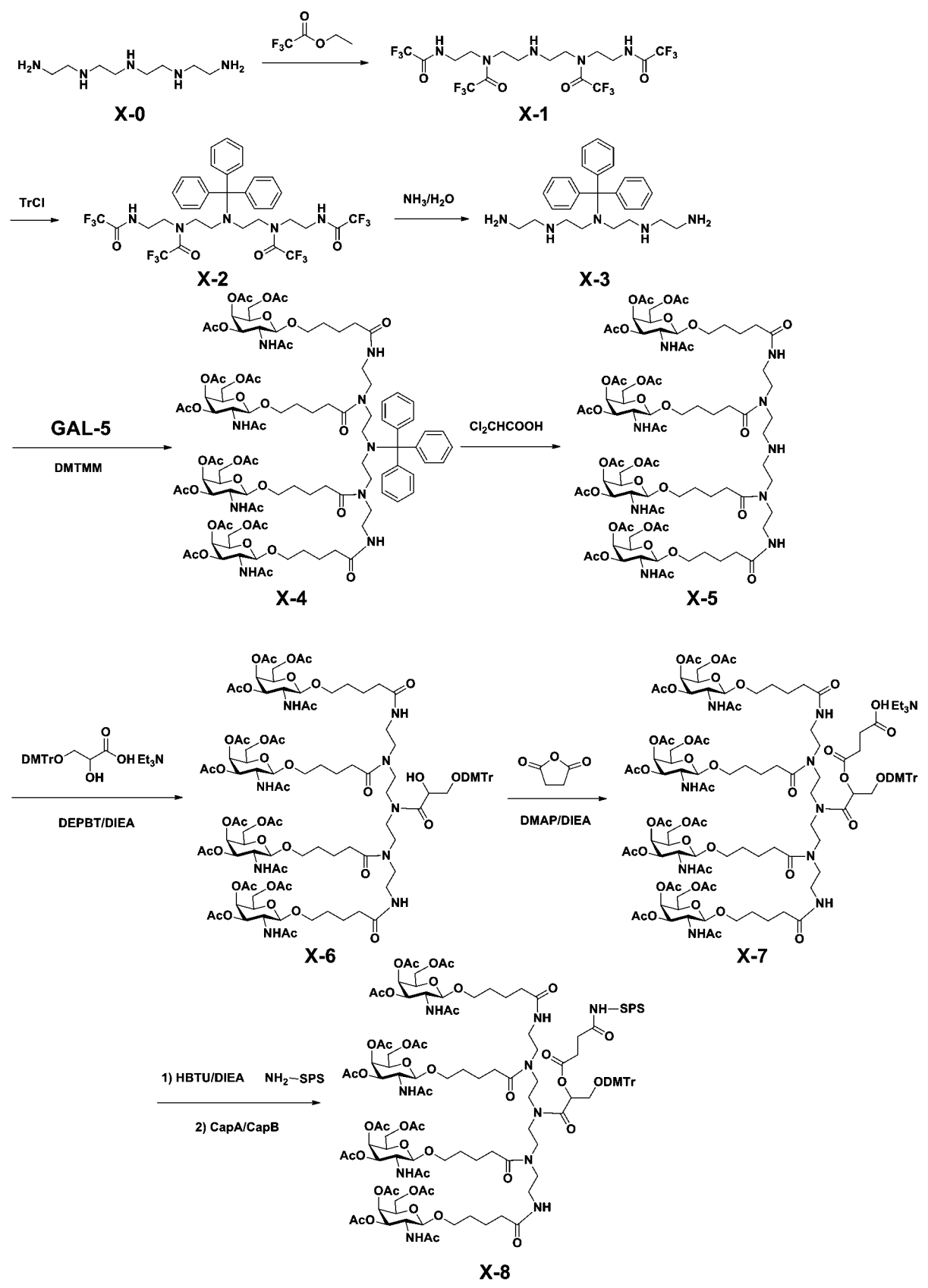
【0552】 藉由與製備例1中步驟(1-1-9)相同的方法，製備W-8。不同的是以W-7綴合分子代替L-9綴合分子，得到連接固相載體的W-7綴合分子。

【0553】 (8-2)合成W8-siHB2M1SVP綴合物

【0554】 藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物22，不同的是以W-8化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到W8-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(415)所示。

【0555】 製備例9 X8-siHB2M1SVP綴合物(綴合物23)的製備

【0556】 按照以下製程途徑，預期能夠合成X-8化合物：

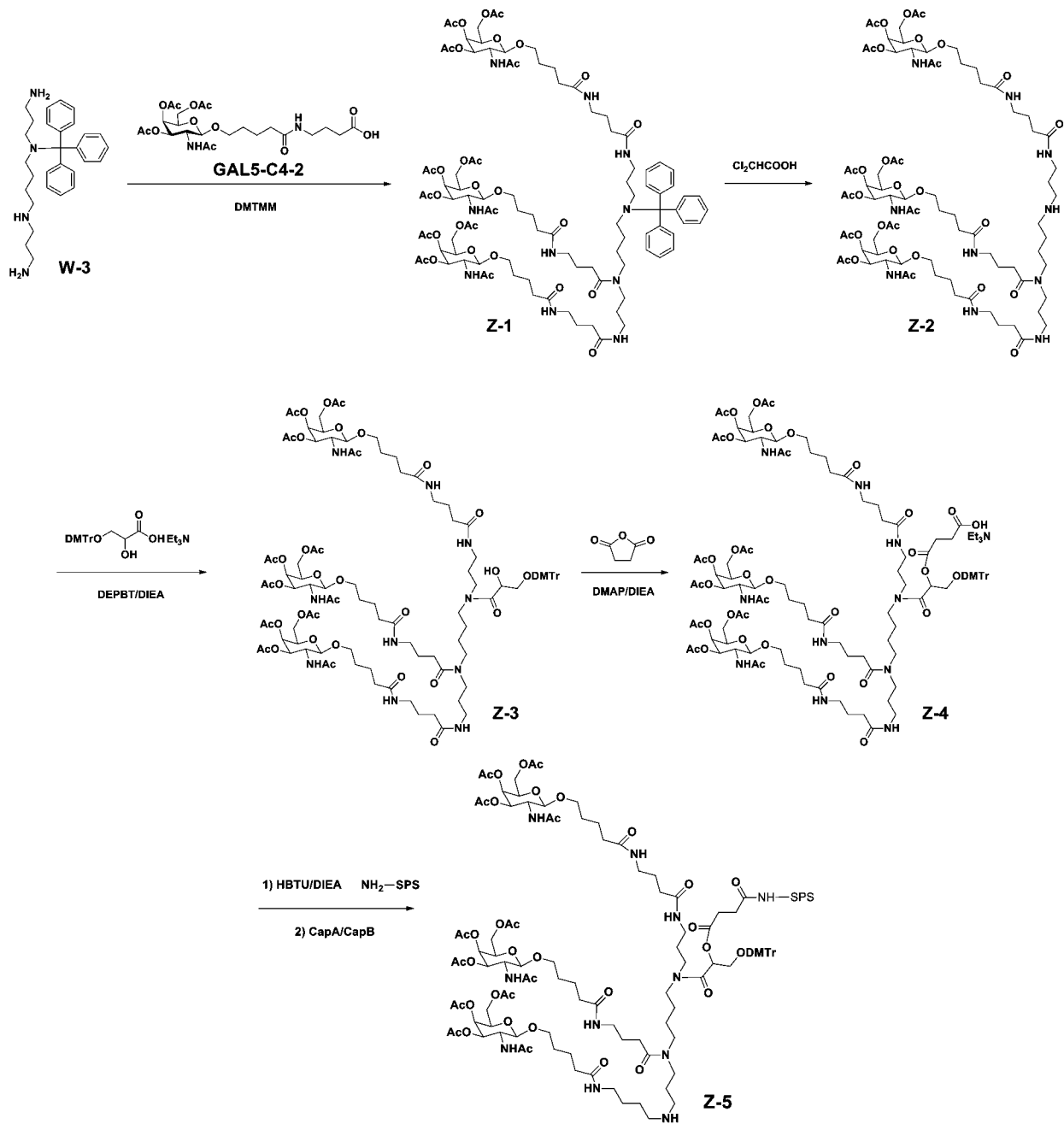


【0557】藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物23，不同的是以X-8化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到X8-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(421)所示。

【0558】製備例10 Z5-siHB2M1SVP綴合物(綴合物24)的製備

【0559】(10-1)Z-5化合物的合成

【0560】按照以下方法，合成了Z-5化合物：



【0561】(10-1-1)Z-1的合成：

【0562】 將按照步驟(8-1-3)中描述的方法得到的W-3(1.50g, 3.37mmol)與按照步驟(3-1-2)中描述的方法得到的GAL5-C4-2(7.18g, 13.48mmol)混合溶於34ml二氯甲烷，再加入二異丙基乙胺(3.48g, 26.96mmol)，最後加入3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮(DEPBT, 4.04g, 13.48mmol)，室溫攪拌反應4.5h。以100ml二氯甲烷稀釋反應液，80ml飽和碳酸氫鈉溶液洗滌有機相，80ml飽和食鹽水洗滌有機相，合併有機相並以無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑得粗品，200-300目正相矽膠柱純化，石油醚裝柱，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，以二氯甲烷:甲醇=30:1-15:1梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾得到純品Z-1 3.97g。MS m/z: $C_{98}H_{143}N_{10}O_{33}$, [M+H]⁺, 理論: 1987.98, 實測: 1987.90。

【0563】 (10-1-2)Z-2的合成:

【0564】 將Z-1(3.97g, 2.00mmol)溶於250ml二氯甲烷，再加入二氯乙酸(10.941g, 84.85mmol)，室溫下反應1h。加入吡啶中和反應液至中性，減壓蒸乾溶劑得粗品。220g 200-300目正相矽膠裝柱，10%吡啶中和矽膠酸性，1%吡啶平衡管柱，二氯甲烷:甲醇=10:1-2:1梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品Z-2 3.49g。MS m/z: $C_{79}H_{129}N_{10}O_{33}$, [M+H]⁺, 理論: 1746.94, 實測: 1746.90。

【0565】 (10-1-3)Z-3的合成:

【0566】 將Z-2(3.49g, 2.0mmol)和按照步驟(1-1-7a)中描述的方法得到的A-1(3.06g, 6.0mmol)混合溶於30ml二氯甲烷，加入3-二乙氧基磷醯基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮(DEPBT, 1.80g, 6.0mmol)，再加入二異丙基乙胺(1.55g, 12.0mmol)，25°C下攪拌反應3h。100ml二氯甲烷稀釋反應液，用飽和碳酸氫鈉洗滌有機相2次，每次30ml，水相以10二氯甲烷萃取，合併有機相並以50ml飽和食鹽水洗滌，合併有機相無水硫酸鈉乾燥，過濾後減壓蒸乾溶劑，真空油泵發泡乾燥過夜得到粗品。管柱純化使用200g 200-300目正相矽膠，20ml三乙胺中和矽膠酸性，以含1wt%三乙胺的石油醚平衡管柱，二氯甲烷:甲醇=25:1-15:1梯度沖提，收集產

物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品Z-3 2.2g。MS m/z: $C_{103}H_{151}N_{10}O_{38}$, $[M+H]^+$, 理論: 2136.02, 實測: 2136.20。

【0567】 (10-1-4)Z-4的合成:

【0568】 將Z-3(2.10g, 0.983mmol)溶解在含有DIEA(0.635g, 4.915mmol)的14.8ml二氯甲烷中，加入4-二甲氨基吡啶(DMAP, 240mg, 1.966mmol)攪拌澄清後，加入丁二酸酐(197mg, 1.966mmol), 25°C下攪拌反應18h。加入50ml二氯甲烷稀釋反應液，以80ml 0.5M三乙胺磷酸鹽洗滌有機相，水相以二氯甲烷萃取2次，每次50ml，合併有機相減壓蒸乾得到粗品。柱純化使用188g 200-300目正相矽膠，以1wt%三乙胺中和矽膠酸性，二氯甲烷平衡管柱，以含1wt%三乙胺的二氯甲烷:甲醇=10:1-3:1梯度沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑得到純品Z-4 綴合分子1.95g。MS m/z: $C_{107}H_{155}N_{10}O_{41}$, $[M+H]^+$, 理論: 1935.07, 實測: 1935.29。

【0569】 (10-1-5)Z-5的合成

【0570】 藉由與製備例1中步驟(1-1-9)相同的方法，製備Z-5。不同的是以Z-4綴合分子代替L-9綴合分子，得到連接固相載體的Z-4綴合分子。

【0571】 (10-2)合成Z5-siHB2M1SVP綴合物

【0572】 藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備綴合物24，不同的是以Z-5化合物代替L-10化合物起始正義鏈合成。預期可以得到Z5-siHB2M1SVP綴合物，其結構如式(422)所示。

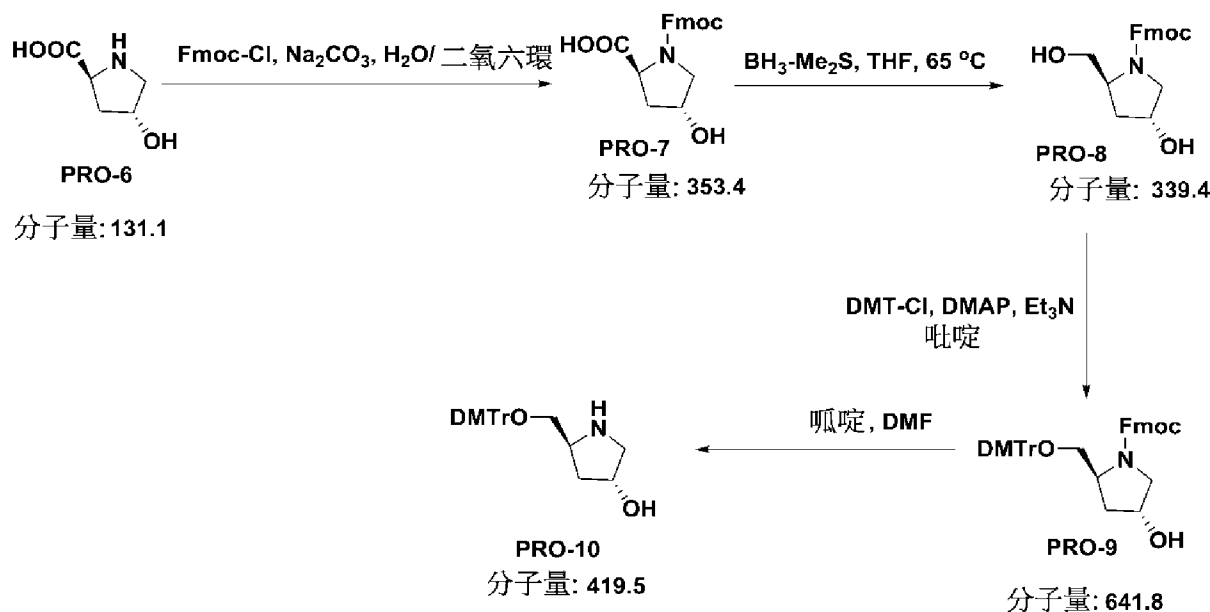
【0573】 製備例11 綴合物25、26及對比綴合物1、3的製備

【0574】 本製備例合成了綴合物25、26及對比綴合物1、3(以下，也分別稱為FIN-siHB1M1SVP、FIN-siHB2M1SVP和FIN-NC、FIN-siHB3M1SVP綴合物)。該綴合物中所綴合的siRNA的序列參見表1。

【0575】 (11-1)FIN-2綴合分子的合成

【0576】 參照Rajeev等人，ChemBioChem 2015,16,903-908中描述的製備方法，按照以下製程途徑，合成了FIN-2綴合分子：

【0577】 (11-1-1)PRO-10的合成



【0578】 (11-1-1a)PRO-7的合成

【0579】 將2.93g PRO-6(L-羥基脯氨酸，CAS號：51-35-4，購自安耐吉公司，22.4mmol)溶於22.5ml 1,4-dioxane(1,4-二氧六環，CAS號：123-91-1)中，加入34ml 10%(w/w)Na₂CO₃的水溶液，呈懸濁液狀態，將6.95g Fmoc-Cl(氯甲酸-9-芴基甲酯，CAS號：28920-43-6，購自安耐吉公司，26.8mmol)溶於34ml 1,4-dioxane，冰浴下加入到上述懸濁液中，自然升至室溫反應過夜。將反應液倒入150ml冰水中，用甲基叔丁基醚萃取三次，每次100ml，棄去有機相，水相用濃HCl調節至pH≤5，用100ml乙酸乙酯萃取兩次，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸乾溶劑得到白色泡沫狀固體產品**PRO-7** 7.83g。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.48 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.27 (m, 2H), 5.17 (s, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.23 – 4.11 (m, 2H), 3.55 – 3.41 (m, 3H),

2.31 – 2.10 (m, 1H), 2.08 – 1.88 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z : $C_{20}H_{19}NO_5$, $[M-H]^-$, 理論：352.1190，實測：352.1033.

【0580】 (11-1-1b)PRO-8的合成

【0581】 將7.83g **PRO-7**(22.2mmol)溶於80ml THF(CAS號：109-99-9)中，油浴加熱到65°C，回流狀態下加入36.6ml 2mol/L的 BH_3-Me_2S 的THF溶液(CAS號13292-87-0，購自百靈威公司，73.2mmol)，繼續回流反應3小時。倒出反應液，用甲醇溶解剩餘固體，攪拌下加入甲醇至反應液無氣體放出並繼續攪拌30分鐘，減壓蒸除溶劑後用石油醚提純三次後得白色固體產物**PRO-8** 7.1g。 ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.91 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.49 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.26 (m, 2H), 5.18 (dd, $J = 6.1, 3.8$ Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.23 – 4.13 (m, 2H), 3.55 – 3.38 (m, 2H), 2.32 – 2.11 (m, 1H), 2.08 – 1.89 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z : $C_{20}H_{21}NO_4$, $[M+Na]^+$, 理論：362.1368，實測：362.1012.

【0582】 (11-1-1c)PRO-9的合成

【0583】 將 7.1g **PRO-8**(21mmol) 溶 於 100ml 吡 啶 中 ， 加 入 14.2g DMTr-Cl(4,4'-雙甲氧基三苯甲基氯，42mmol)，室溫下攪拌反應5小時。減壓蒸除溶劑，粗品用乙酸乙酯溶解後過濾除去鹽類雜質，減壓蒸除溶劑後矽膠柱純化，矽膠柱預先用吡啶鹼化後DCM溶解粗品上樣，先用含1%(v/v)吡啶的DCM沖提DMTr-Cl，隨後用乙酸乙酯沖提產物，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，得白色固體產物**PRO-9** 8.2g；HRMS (ESI) m/z : $C_{41}H_{39}NO_6$, $[M+Na]^+$, 理論：664.2675，實測：664.2348；C18 RP-HPLC(批號JJS160324-1)純度94.20%。

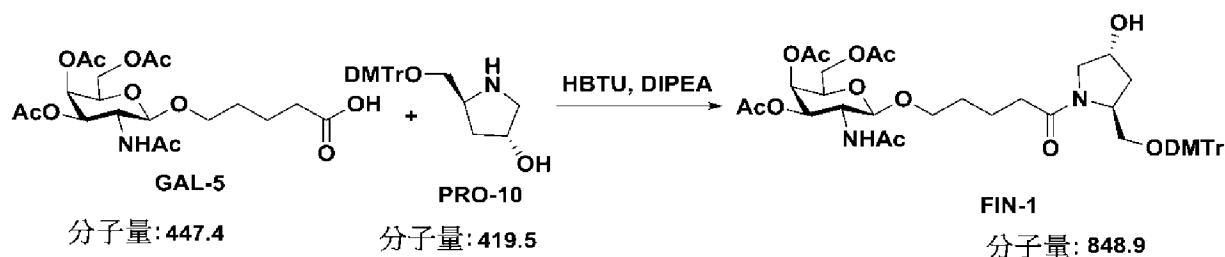
【0584】 (11-1-1d)PRO-10的合成

【0585】 將8.2g **PRO-9**(12.8mmol)溶於64ml DMF(N,N-二甲基甲醯胺)中，加入40ml 呱啶(384mmol)，室溫下攪拌反應30分鐘。反應液倒入300ml冰水中，乙酸乙酯萃取三次，每次150ml，合併有機相，用200ml飽和食鹽水洗滌後，有

第 135 頁，共 148 頁(發明說明書)

機相以無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸除溶劑後矽膠柱純化，矽膠柱預先用吡啶鹼化後DCM溶解粗品上樣，先用含1%(v/v)吡啶的DCM沖提Fmoc，隨後用乙酸乙酯沖提產物，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，得白色固體產物**PRO-10** 4.65g。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.35 – 7.18 (m, 7H), 6.93 – 6.84 (m, 4H), 4.56 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.46 – 3.37 (m, 1H), 2.88 (ddd, *J* = 18.5, 10.0, 5.5 Hz, 2H), 2.75 (dd, *J* = 8.7, 5.8 Hz, 1H), 2.62 (dd, *J* = 11.0, 2.7 Hz, 1H), 1.74 – 1.65 (m, 1H), 1.40 (ddd, *J* = 12.9, 8.5, 5.9 Hz, 1H); HRMS (ESI) *m/z*: C₂₆H₂₉NO₄, [M+Na]⁺, 理論: 442.1994, 實測: 442.1999; C18 RP-HPLC(批號JJS160329-1)純度97.07%。

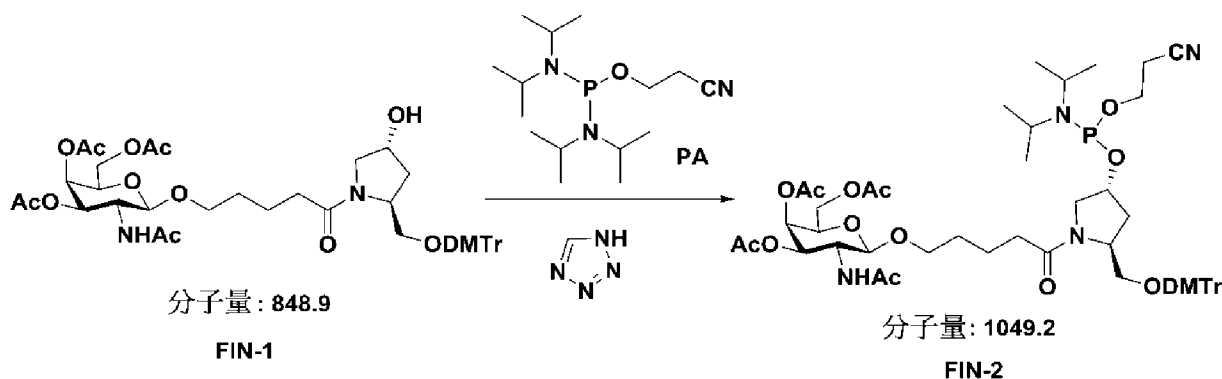
【0586】 (11-1-2)FIN-1的合成



【0587】 將按照(1-1-1)中描述的方法得到的**GAL-5**(4.5g, 10mmol)溶於40ml DMF中，依次加入3.9g DIPEA(N,N-二異丙基乙胺，CAS號: 7087-68-5，購自阿拉丁公司，30mmol)和3.8g HBTU(苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽，CAS號: 94790-37-2，商購自阿拉丁公司，11mmol)，室溫下攪拌10分鐘，將步驟(11-1-1d)中獲得的**PRO-10**(4.2g, 10mmol)溶於40mlDMF中，隨後加入到上述反應液中，反應液中加入無水硫酸鈉乾燥，室溫攪拌2小時。將反應液倒入120ml冰水中，用乙酸乙酯萃取三次，每次60ml，合併有機相，分別用20ml水、20ml飽和食鹽水洗滌，分出有機相並以無水硫酸鈉乾燥，減壓蒸除溶劑，矽膠柱純化，矽膠柱預先用吡啶鹼化後上樣，用含1體積%三乙胺和1體積%甲醇的二氯甲烷(DCM)溶液沖提，收集產物沖提液，減壓蒸乾溶劑，得到淺黃色泡沫狀

固體產品**FIN-1** 6.5g。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.83 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H), 7.20 (td, $J = 8.9, 3.5$ Hz, 5H), 6.93 – 6.84 (m, 4H), 5.21 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.04 – 4.90 (m, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.40 (d, $J = 4.4$ Hz, 0.8H), 4.31 (d, $J = 5.0$ Hz, 0.2H), 4.15 (s, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.93 (s, 1H), 3.74 (s, 7H), 3.59 (dt, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.50 – 3.40 (m, 1H), 3.39 – 3.25 (m, 3H), 3.13 (dd, $J = 8.9, 5.2$ Hz, 1H), 3.00 (dq, $J = 9.3, 5.3, 4.3$ Hz, 1H), 2.22 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.90 (s, 4H), 1.74 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.36 (s, 1H)。C18 RP-HPLC(批號LJ160422)純度95.45%。

【0588】 (11-1-3)FIN-2的合成



【0589】 將步驟(11-1-2)中獲得的**FIN-1**(3.0g, 3.53mmol)與乙腈共沸除水，減壓抽乾，溶於10ml DMF，氮氣保護下加入2.13g PA(雙(二異丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦，購自Adamas公司，商品編號11356B，7.06mmol)、346mg四唑(CAS號：288-94-8，購自阿拉丁公司，4.94mmol)，室溫下攪拌反應，補加10ml DMF，繼續攪拌反應1小時。減壓蒸除溶劑後以矽膠柱層析純化，矽膠柱預先用吡啶鹼化後DCM溶解粗品上樣，乙酸乙酯沖提，收集產物沖提液，減壓蒸除溶劑，得無色糖漿狀粗品4.5g。粗品用50體積%乙腈水溶液溶解至完全溶解，用C-18，330g，300Å中壓純化柱純化樣品，管柱先用1體積%吡啶的乙腈溶液鹼化，梯度沖提收集產品峰，減壓蒸除溶劑得白色粉末產品**FIN-2**綴合分子2.2g。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 148.04, 147.94, 147.62, 147.19，磷譜純度92%；C18 RP-HPLC純度90.54%。

【0590】 (11-2)FIN-2綴合分子連接到固相載體

【0591】 採用核酸固相合成方法，將步驟(11-1-3)中得到的FIN-2綴合分子，藉由三次循環，連接到通用固相載體(UnyLinker™ loaded NittoPhase® HL Solid Supports)上，從而實現綴合基團(FIN_FIN_FIN)連接在RNA正義鏈的3'末端。

【0592】 參照Rajeev等人，ChemBioChem 2015,16,903-908中描述的製備方法進行上述連接，具體而言，首先，由上述通用固相載體開始，脫除固相載體上的羥基保護基團，在偶聯反應條件和偶聯試劑存在下與FIN-2綴合分子接觸發生偶聯，經蓋帽反應和氧化反應後，獲得連接至固相載體的FIN綴合分子；脫除該連接至固相載體的FIN綴合分子上的羥基保護基團DMTr，與FIN-2綴合分子接觸發生偶聯，進行蓋帽反應和氧化反應，並再重複一次上述脫保護-偶聯-蓋帽-氧化步驟，連接第三個FIN-2綴合分子，獲得連接在固相載體上的的綴合基團(FIN_FIN_FIN)。

【0593】 上述反應中，所述的脫保護、偶聯、蓋帽、氧化的反應條件、溶劑和試劑用量與前述步驟(1-2)中描述的核酸固相合成方法相同。

【0594】 (11-3)綴合物25、26及對比綴合物1、3的合成

【0595】 藉由與製備例1中步驟(1-2)、(1-3A)、(1-4)相同的方法，製備題述綴合物，不同的是：1)以步驟(11-2)得到的化合物起始正義鏈合成；2)綴合的siRNA具有表1中所示的對應於綴合物25、26及對比綴合物1、3的序列；3)對於對比綴合物1，因目標序列含有未修飾的核苷酸，切割與脫保護條件中，在氨水處理後，相對於單鏈核酸的量，用0.4ml/μmol N-甲基吡咯烷酮溶解產品，隨後加入0.3ml/μmol 三乙胺和0.6ml/μmol 三乙胺三氫氟酸鹽，以脫除核糖上的2'-TBDMS保護。

【0596】 利用液質聯用儀(LC-MS，Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，購於Waters公司，型號：LCT Premier)進行分子量檢測。其結果，

第 138 頁，共 148 頁(發明說明書)

實測值與理論值相符，從而確定所合成的綴合物是目標設計的化合物，其結構如式(307)所示。

【0597】 在上述本發明的綴合物製備完成後，使用標準手段凍乾為固體粉末保存備用。在使用時，可使用例如注射用水將其重新溶解為所需濃度的溶液使用。

【0598】 實驗例1 本實驗說明本發明的siRNA綴合物在體外(in vitro)的抑制活性

【0599】 實驗例1-1 體外psiCHECK系統中的在靶活性

【0600】 本實驗例中所使用的HEK293A細胞由北京大學分子醫學研究所核酸技術實驗室提供，用含有20%的胎牛血清(FBS，Hyclone公司)及0.2體積%的青黴素雙抗(Penicillin-Streptomycin，Gibco，Invitrogen公司)的DMEM完全培養基(Hyclone公司)培養細胞，於37°C在含5% CO₂/95%空氣的培養箱中培養。

【0601】 本實驗例考察了綴合物25和綴合物26在體外psiCHECK系統中的在靶活性(on-target activity)，即測定了綴合物25和綴合物26標靶完全匹配目標序列(其核苷酸序列與所述綴合物反義鏈的全長核苷酸序列完全互補)的活性。

【0602】 根據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，構建檢測質粒，與待評價的siRNA綴合物共轉染至HEK293A細胞中，藉由雙螢光素酶報告基因的表達水平，來反應siRNA綴合物的在靶活性及脫靶效應。具體步驟如下：

【0603】 [1] 構建檢測質粒

【0604】 採用psiCHECK™-2(Promega™)質粒構建在靶質粒，該質粒含有一個目標序列，該目標序列與待測綴合物中的反義鏈的所有21個核苷酸序列完全互補。將目標序列選殖(clone)到psiCHECK™-2質粒的Xho I/Not I位點。

【0605】 [2] 轉染

【0606】 在96孔板中，根據Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司)的使用說明，分別共轉染siRNA綴合物和上述質粒，其中每孔轉染質粒10ng，使用Lipofectamine™ 2000 0.2μL。綴合物的終濃度(以siRNA的濃度計算)依次為0.1nM、0.05nM和0.01nM。各組以無綴合物處理為對照。每組3個複孔。

【0607】 [3] 檢測

【0608】 共轉染24小時後，使用雙螢光素酶報告基因檢測試劑盒(Dual luciferase reporter gene assay kit，Promega公司，cat.E2940)，根據使用說明書裂解HEK293A細胞，檢測雙螢光素酶報告基因的表達水平。以海腎螢光素酶蛋白水平相對於螢火蟲螢光素酶蛋白水平進行標準化。結果如第1圖所示。

【0609】 結果表明，綴合物25和綴合物26都具有較好的體外抑制活性。

【0610】 實驗例1-2 體外psiCHECK系統中IC50的測定及脫靶檢測

【0611】 本實驗例考察了綴合物2在體外psiCHECK系統中的IC50及脫靶效應。

【0612】 根據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，構建檢測質粒，與待測綴合物共轉染至HEK293A細胞中，藉由雙螢光素酶報告基因的表達水平，來反應綴合物的在靶活性及脫靶效應。具體步驟如下：

【0613】 [1] 構建檢測質粒

第 140 頁，共 148 頁(發明說明書)

【0614】 採用psiCHECK™-2(Promega™)質粒構建了4種重組質粒，其中GSCM表示在靶質粒，PSCM、GSSM、PSSM表示脫靶質粒：

【0615】 (1)GSCM，含有一個目標序列，該目標序列與綴合物2中的反義鏈的所有21個核苷酸序列完全互補；

【0616】 (2)PSCM，含有一個目標序列，該目標序列與綴合物2中的反義鏈的所有21個核苷酸序列完全一致；

【0617】 (3)GSSM，含有一個目標序列，該目標序列與待測siRNA中反義鏈的5'末端起1-8位核苷酸序列完全互補，該目標序列的剩餘部分與待測siRNA中反義鏈5'末端起9-21位的核苷酸序列相對應，其序列完全不互補，即待測siRNA中反義鏈5'末端起9-21位中任一位置的核苷酸為G，C，A或U時，目標序列相應位置的核苷酸分別為T，A，C或G。

【0618】 (4)PSSM，含有一個目標序列，該目標序列與待測siRNA中正義鏈的5'末端起1-8位核苷酸序列完全互補，該目標序列的剩餘部分與待測siRNA中正義鏈5'末端起9-19位的核苷酸序列相對應，其序列完全不互補，即待測siRNA中正義鏈5'末端起9-19位中任一位置的核苷酸為G，C，A或U時，目標序列相應位置的核苷酸分別為T，A，C或G。為了與GSSM靶序列等長，目標序列的3'末端依次加入核苷酸C、C。

【0619】 將目標序列選殖(clone)到psiCHECK™-2質粒的Xho I/Not I位點。

【0620】 [2] 轉染

【0621】 在96孔板中，根據Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司)的使用說明，分別共轉染綴合物和上述每一種質粒，其中每孔轉染質粒10ng，使用Lipofectamine™ 2000 0.2μL，siRNA綴合物終濃度(以siRNA的量計)自0.1nM起始，倍比稀釋至0.0001nM，一種質粒對應11組siRNA濃度，每組3個複孔。

【0622】 [3] 檢測

【0623】 將HEK293A細胞培養24小時後，使用雙螢光報告基因檢測試劑盒 (Dual luciferase reporter gene assay kit，Promega公司，cat.E2940)，根據使用說明書裂解細胞，檢測雙螢光報告基因的表達水平。每一特定濃度的綴合物測試組以無綴合物處理組為對照。以海腎螢光素酶蛋白水平(Ren)相對於螢火蟲螢光素酶蛋白水平(Fir)進行標準化。根據採用不同siRNA濃度所測得的活性結果，利用Graphpad 5.0軟體log(inhibitor) vs. response—Variable slope功能來擬合劑量-效應曲線，根據劑量-效應曲線計算待測siRNA標靶GSCM的IC50值，計算方法如下

$$Y = \text{Bot} - \frac{\text{Top} - \text{Bot}}{1 + 10^{(\text{LogIC50} - X) \times \text{HillSlope}}}$$

【0624】 式中：

【0625】 Y是殘留mRNA的表達水平，

【0626】 X為轉染siRNA濃度的對數值，

【0627】 Bot是穩態期底部的Y值，

【0628】 Top是穩態期頂部的Y值，

【0629】 LogIC50是當Y在底部到頂部之間一半時的X值，而HillSlope則是曲線的斜率。結果如第2圖所示。

【0630】 由第2圖可知，綴合物2在具有優異靶mRNA抑制效果的同時，還顯示出低的脫靶效應。

【0631】 實驗例2 本實驗說明本發明的siRNA綴合物的穩定性

【0632】 (實驗例2-1)siRNA綴合物在體外溶酶體裂解液中的穩定性

【0633】 經溶酶體裂解液處理的測試樣品製備：將綴合物1和綴合物2(分別以siRNA濃度為20μM的0.9%氯化鈉水溶液形式提供，每組6μl)分別與27.2 μL檸檬酸鈉水溶液(pH5.0)、4.08μL去離子水和2.72 μL Tritosomes(商購自Xenotech公司，貨號R0610LT，批號1610069，終濃度為0.2 mU/μL)混勻。37°C恆溫孵育。分別在0 h、5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8h取出5μl樣本，分別加入

到15 μ L 9 M的尿素中變性，隨後加入4 μ L 6 $\times$ 上樣緩衝液(索萊寶公司，貨號20160830)，立即冷凍於-80 $^{\circ}$ C冰箱終止反應。0小時表示，將待測樣品與溶酶體裂解液混勻後，立即取出的時刻。

【0634】 未經溶酶體裂解液處理的參比樣品製備：取等莫耳量的綴合物4(20 μ M)1.5 μ L與7.5 μ L檸檬酸鈉水溶液(pH5.0)、1 μ L去離子水混勻，加入30 μ L 9M的尿素溶液變性，隨後加入8 μ L 6 $\times$ 上樣緩衝液混勻，立即冷凍於-80 $^{\circ}$ C冰箱終止反應。參比樣品在電泳圖中標記為Con。

【0635】 配製16重量%的非變性聚丙烯醯胺凝膠，上述測試樣品及參比樣品各取20 μ L上樣至凝膠，在20mA恆流條件下電泳10min後，繼續在40mA恆流條件下電泳30min。電泳結束後，將凝膠置於振盪機上，用Gelred染料(BioTium公司，貨號13G1203)染色10min。凝膠成像觀察並拍照，結果如第3圖所示。

【0636】 第3圖顯示了所測試siRNA綴合物在體外溶酶體中的穩定性半定量檢測結果。結果顯示，本發明的綴合物在溶酶體中可維持長時間不降解，顯示出很好的穩定性。

【0637】 (實驗例2-2)siRNA綴合物在人血漿中的穩定性

【0638】 將綴合物1、綴合物2(分別以siRNA濃度為20 μ M的0.9%氯化鈉水溶液形式提供，每組12 μ L)及對比序列1(20 μ M，12 μ L)分別與108 μ L 90%人血漿(Human plasma，PBS稀釋)混勻。37 $^{\circ}$ C恆溫孵育。分別在0、2、4、6、8、24、48、72小時取出10 μ L樣本，立即進行液氮速凍，於-80 $^{\circ}$ C冰箱中凍存。待各時間點取樣完畢後，將上述凍存樣品分別以1 $\times$ PBS(pH7.4)稀釋5倍後每一樣品取10 μ L備用。同時，取等莫耳量的siRNA(2 μ M，2 μ L)或siRNA綴合物(siRNA濃度為2 μ M，2 μ L)，與8 μ L 1 $\times$ PBS(pH7.4)混勻，製備成10 μ L未經人血漿處理的樣品，記為Con。

【0639】 配製20重量%的非變性聚丙烯醯胺凝膠，將上述備用樣品中每一組的全部樣品與4 μ L上樣緩衝液(20mM EDTA，36重量%甘油，0.06重量%溴酚

藍的水溶液)混合，然後上樣至前述凝膠，在80mA恆流條件下電泳60分鐘。電泳結束後，用1×Sybr Gold染料(Invitrogen，Cat.11494)染色15分鐘後成相，結果如圖4所示。

【0640】 對比序列1：

【0641】 正義鏈：CCUUGAGGCAUACUUCAAA(SEQ ID NO: 46)

【0642】 反義鏈：UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU(SEQ ID NO: 47)

【0643】 第4圖示出了所測試綴合物在體外人血漿中的穩定性半定量檢測結果。

【0644】 由第4圖的結果可以看出，本發明的綴合物在人血漿中直至72h時仍未降解，顯示出優異的在人血漿中的穩定性。

【0645】 (實驗例2-3)siRNA綴合物在猴血漿中的穩定性

【0646】 在另外的實驗中，採用與實驗例2-2相同的方法檢測綴合物1、綴合物2和對比序列1在猴血漿(Monkey plasma，購自鴻泉生物，HQ70082，PBS稀釋)中的穩定性，結果如第5圖所示。

【0647】 第5圖示出了所測試siRNA綴合物在體外猴血漿中的穩定性半定量檢測結果。

【0648】 由第5圖的結果可以看出，本發明的siRNA綴合物在食蟹猴血漿中直至72h仍未降解，顯示出優異的在猴血漿中的穩定性。

【0649】 實驗例3本實驗例說明本發明的綴合物在小鼠中對HBV mRNA表達的抑制

【0650】 在本實驗例中，對綴合物1和對比綴合物2在HBV轉基因小鼠C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J中對HBV mRNA表達量的抑制效率進行了考察。

【0651】 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J小鼠購自北京大學醫學部實驗動物科學部，使用B型肝炎病毒表面抗原診斷試劑盒(酵素免疫分析法)(上海科華生

物)檢測小鼠血清HBsAg含量，選取S/COV >10的小鼠，隨機分組(均為雌性)，每組4隻小鼠，分別進行編號，並增加生理鹽水NS對照組。所有動物根據體重計算藥量，採用皮下注射方式單次給藥，分別以1mg/kg以及0.1ml/kg的不同劑量給予綴合物1(以0.2mg/ml以及0.02mg/ml的0.9%氯化鈉水溶液形式提供)，給藥體積為5ml/kg。給藥後第7天將動物處死，收集肝臟，用RNA later(Sigma Aldrich公司)保存；用組織勻漿儀勻漿肝組織，再用Trizol根據總RNA提取的標準操作步驟提取得到總RNA。

【0652】 採用實時螢光定量PCR檢測肝組織中HBV mRNA的表達量，具體地：使用ImProm-II™反轉錄試劑盒(Promega公司)按其說明書將提取的總RNA逆轉錄為cDNA，接著用螢光定量PCR試劑盒(北京康為世紀生物科技有限公司)檢測siRNA對肝組織中的HBV mRNA表達量的抑制效率。在該螢光定量PCR法中，以GAPDH基因作為內參基因，使用針對HBV X的引子(primer)和針對GAPDH的引子分別對HBV和GAPDH進行檢測。

【0653】 檢測引子的序列參見表3。

【0654】 表3 檢測引子的序列

基因	上游引子	下游引子
HBV X	5'- CCGTCTGTGCCTTCTCATCT -3' (SEQ ID NO: 48)	5'- TAATCTCCTCCCCCAACTCC -3' (SEQ ID NO: 49)
GAPDH	5'- AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC -3' (SEQ ID NO: 50)	5'- TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA -3' (SEQ ID NO: 51)

【0655】 在該螢光定量PCR法中，HBV mRNA的表達量用HBV X基因表達剩餘量表示，按如下等式計算：

【0656】 $\text{HBV X基因表達剩餘量} = (\text{測試組HBV X基因的拷貝數}(\text{copy number}) / \text{測試組}\beta\text{-actin的拷貝數}) / (\text{對照組HBV X基因的拷貝數} / \text{對照組}\beta\text{-actin的拷貝數}) \times 100\%$ ，圖中標識為HBV X / β -actin mRNA表達量。

【0657】 隨後根據下式計算綴合物對mRNA抑制率：

【0658】 綴合物對mRNA的抑制率=(1- HBV X基因表達剩餘量)×100% ，

【0659】 其中，對照組為本實驗中施以NS的對照組小鼠，各測試組為分別施以不同siRNA綴合物的給藥組小鼠。結果示於第6圖中。

【0660】 由第6圖的結果可見，上述本發明的綴合物1在1mg/kg的給藥量下，對於靶mRNA的抑制率達81.73%，顯示出良好的抑制效果。

【0661】 在另外的實驗中，採用與上述相同的方法，對小鼠HBV mRNA表達量進行檢測，不同之處在於：給予的siRNA綴合物更換為綴合物2進行試驗，在第7天收集檢測數據，結果示於第7圖；

【0662】 在另外的實驗中，採用與上述相同的方法，對小鼠HBV mRNA表達量進行檢測，不同之處在於：給予的siRNA綴合物更換為綴合物1、綴合物2及對比綴合物2進行試驗，對於綴合物1和對比綴合物2，分別以1mg/kg和0.1mg/kg兩個劑量給藥，綴合物2以1mg/kg劑量給藥，且檢測序列更換為表4所示的序列，結果示於第8圖。

【0663】 表4 檢測引子的序列

基因	上游引子	下游引子
HBV S	5'- CGTTTCTCCTGGCTCAGTTTA -3' (SEQ ID NO: 52)	5'- CAGCGGTAAAAAGGGACTCAA -3' (SEQ ID NO: 53)
GAPDH	5'- AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC -3' (SEQ ID NO: 50)	5'- TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA -3' (SEQ ID NO: 51)

【0664】 由第7圖和第8圖的結果可見，上述本發明的綴合物對於靶mRNA均顯示出良好的抑制效果，並且對於不同HBV mRNA的抑制效果基本一致。

【0665】 實驗例4 本實驗說明本發明的siRNA綴合物在HBV轉基因小鼠中siRNA對血清HBsAg表達量和HBV DNA的抑制效率的時間相關性測試

【0666】 對於AAV-HBV低濃度模型小鼠，按血清HBsAg含量隨機分組(每組5隻)，分別給予綴合物2，以及NS空白對照。所有動物根據體重計算藥量，皮

下單次給藥，給藥劑量為3mg/kg以及1mg/kg兩個組別，藥物以0.6mg/ml以及0.2mg/ml的0.9%氯化鈉水溶液的形式提供，給藥體積為5ml/kg。在給藥前(記為D0)與給藥後第7、14、21、28、56、84、98、112、126、140天對小鼠眼眶靜脈叢取血，在各時間點檢測血清HBsAg水平。

【0667】眼眶取血每次約100 μ l，離心後血清不少於20 μ l。利用HBsAg CLIA試劑盒(安圖生物，CL0310)檢測血清中HBsAg的含量。

【0668】標準化的血清HBsAg水平=(給藥後測試組HBsAg含量/給藥前測試組HBsAg含量) $\times$ 100%。

【0669】HBsAg抑制率=(1-給藥後測試組HBsAg含量/給藥前測試組HBsAg含量) $\times$ 100%。其中，HBsAg含量用每毫升(ml)血清含多少當量(UI)HBsAg表示。

【0670】結果如第9圖所示。

【0671】由第9圖的結果可以看出，在給藥後不同時間點，NS陰性對照組未顯示出任何抑制作用；與之相比，綴合物2在給藥後不同時間點對HBsAg均體現出了優異的HBsAg抑制效果，在長達100天左右的時間內持續顯示出高的血清HBsAg抑制率，表明其能夠在較長時間內穩定高效地抑制HBV基因的表達。

【0672】在進一步的實驗中，按照上述方法，在1.28copy小鼠中，使用綴合物2，按照3mg/kg和1mg/kg兩個劑量組給藥，給藥時間持續至85天，並按照上述的方法對HBsAg的抑制效果進行檢測，結果參見第10圖。

【0673】參照QIAamp 96 DNA Blood Kit說明書提取血清中DNA，進行定量PCR，檢測HBV DNA的表達水平，結果參見第11圖。

【0674】標準化的血清HBV DNA水平=(給藥後測試組HBV DNA含量/給藥前測試組HBV DNA含量) $\times$ 100%。

【0675】 HBV DNA抑制率 $= (1 - \text{給藥後測試組HBV DNA含量} / \text{給藥前測試組HBV DNA含量}) \times 100\%$ 。

【0676】 其中，HBV DNA含量用每毫升(ml)血清含多少拷貝HBV DNA表示。

【0677】 由第10圖和第11圖的結果可知，在1.28copy小鼠中，本發明的綴合物2在85天的時間內持續顯示出對HBV基因表達以及HBV DNA的高效抑制。

【0678】 以上詳細描述了本發明的實施方式，但是，本發明並不限於上述實施方式中的具體細節，在本發明的技術構思範圍內，可以對本發明的技術方案進行多種簡單變型，這些簡單變型均屬本發明的保護範圍。

【0679】 另外需要說明的是，在上述具體實施方式中所描述各個具體技術特徵，在不矛盾的情況下，可以藉由任何合適的方式進行組合。為了避免不必要的重複，本發明對各種可能的組合方式不再另行說明。

【0680】 此外，本發明的各種不同的實施方式之間也可以進行任意組合，只要其不違背本發明的思想，其同樣應當視為本發明所公開的內容。

【符號說明】

【0681】 無

序列表

<110> 大陸商蘇州瑞博生物技術股份有限公司 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.)

<120> 核酸、含有該核酸的藥物組合物與綴合物及其用途與試劑盒

<130> EP1F182410ZX/CNSZRB/GG-TW

<140> 107142921

<141> 2018/11/30

<150> 201711249378.5 (CN)

<151> 2017-12-01

<150> 201711478933.1 (CN)

<151> 2017-12-29

<160> 53

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_ feature

<222> (19)..(19)

<223> n爲A

<400> 1

ugcuaugccu caucuucun 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_ feature

<222> (1)..(1)

<223> n爲U

<400> 2

nagaagauga ggcauagca 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n選自A、U、G或C

<400> 3
ugcuaugccu caucuucun 19

<210> 4
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n選自A、U、G或C

<400> 4
nagaagauga ggcauagca 19

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n選自A、U、G或C

<400> 5
nagaagauga ggcauagcag c 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n選自A、U、G或C

<400> 6
nagaagauga ggcauagcau u 21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n選自A、U、G或C

<400> 7

nagaagauga ggcauagcag c21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n選自A、U、G或C

<400> 8

nagaagauga ggcauagcau u21

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

ugcuaugccu caucuucua19

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

uagaagauga ggcauagcag c21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11
uagaagauga ggcauagcau u

21

<210> 12
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12
ugcuaugccu caucuucua

19

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13
uagaagauga ggcauagcag c

21

<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14
uagaagauga ggcauagcau u

21

<210> 15
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15
ugcuaugccu caucuucua

19

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16
uagaagauga ggcauagcag c

21

<210> 17
<211> 21

<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	17	
uagaagauga	ggc <u>au</u> agcau u	21
<210>	18	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	18	
ugc <u>ua</u> ugccu	caucuucua	19
<210>	19	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	19	
uagaagauga	ggc <u>au</u> agcag c	21
<210>	20	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	20	
uagaagauga	ggc <u>au</u> agcau u	21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	21	
uagaagauga	ggc <u>au</u> agcag c	21
<210>	22	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	22	
uagaagauga	ggc <u>au</u> agcau u	21

<210>	23	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	23	
uagaauga	ggcauagcag c	21
<210>	24	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	24	
uagaauga	ggcauagcau u	21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	25	
uagaauga	ggcauagcag c	21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	26	
uagaauga	ggcauagcau u	21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	27	
uagaauga	ggcauagcag c	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	RNA	

<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	28	
uagaagauga	ggcauagcau u	21
<210>	29	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	29	
uagaagauga	ggcauagcag c	21
<210>	30	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	30	
uagaagauga	ggcauagcau u	21
<210>	31	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	31	
uagaagauga	ggcauagcag c	21
<210>	32	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	32	
uagaagauga	ggcauagcau u	21
<210>	33	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	33	
uagaagauga	ggcauagcag c	21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 34

gcugcuauhc cucaucuucu a

21

<210> 35

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 35

uagaagauga ggcauagcag cgc

23

<210> 36

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 36

ugcuauGCCU caucuucua

19

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 37

uagaagauga ggcauagcag c

21

<210> 38

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 38

ugcuauGCCU caucuucua

19

<210> 39

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 39	
uagaagauga ggcauagcau u	21
<210> 40	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 40	
uagaagauga ggcauagcag c	21
<210> 41	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 41	
uagaagauga ggcauagcag c	21
<210> 42	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 42	
uucuccgaac gugucacgu	19
<210> 43	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 43	
acgugacacg uucggagaau u	21
<210> 44	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 44	
gcugcuaugc cucaucuua	19

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 45

uaagaugagg cauagcagca g21

<210> 46

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 46

ccuugaggca uacuucaaa19

<210> 47

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 47

uuugaaguau gccucaaggu u21

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 48

ccgtctgtgc cttctcatct20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 49

taatctctc ccccaactcc20

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 50
aactttggca ttgtggaagg gctc

24

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 51
tggaagagtg ggagttgctg ttga

24

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 52
cgtttctcct ggctcagttt a

21

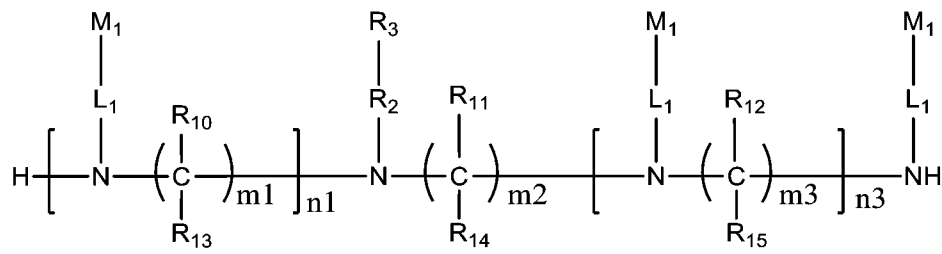
<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 53
cagcggtaaa aagggactca a

21

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種 siRNA 綴合物，其中，該綴合物具有式(308)所示的結構：



式(308)，

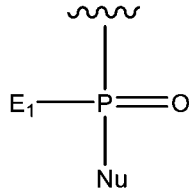
其中，

n1 為選自 1-3 的整數，n3 為選自 0-4 的整數；

m1、m2 和 m3 獨立地為選自 2-10 的整數；

R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄ 和 R₁₅ 各自獨立地為 H，或選自於由以下基團所組成的群組：C₁-C₁₀ 烷基、C₁-C₁₀ 鹵代烷基以及 C₁-C₁₀ 烷氧基；

R₃ 為式(A59)所示結構的基團：



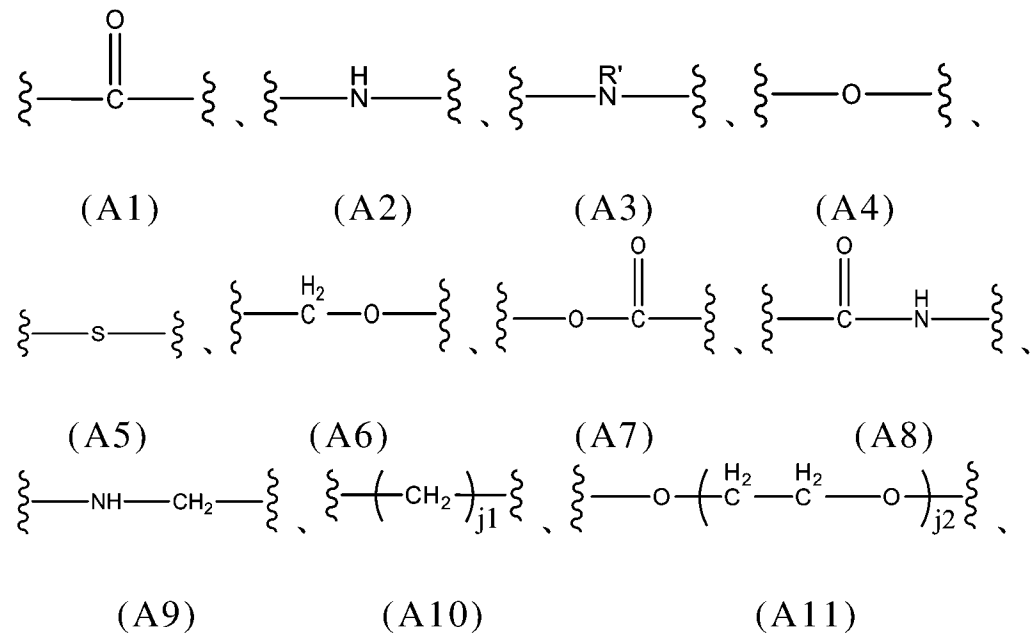
(A59)

其中，E₁ 為 OH、SH 或 BH₂，Nu 為 siRNA；

R₂ 是長度為 1-20 個碳原子的直鏈亞烷基，其中一個或多個碳原子任選地被選自於以下基團所組成的組中的一個或多個所替換：C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、C₂-C₁₀ 亞烯基、C₂-C₁₀ 亞炔基、C₆-C₁₀ 亞芳基、C₃-C₁₈ 亞雜環基和 C₅-C₁₀ 亞雜芳基組成的群組中任意一個或多個替換，並且其中，R₂ 可任選地具有由以下基團所組成中的任何一個或多個的取代基：C₁-C₁₀ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 雜芳基、C₁-C₁₀ 鹵代烷基、-OC₁-C₁₀

烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-OH、-OC₁-C₁₀ 鹵代烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-SH、-SC₁-C₁₀ 鹵代烷基、鹵素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基)、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 鹵烷基、-OC(O)C₁-C₁₀ 烷基、-SO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀ 鹵代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀ 鹵代烷基)；

每個 L₁ 獨立地選自式 A1-A11 基團中的一種或多種的連接組合：



其中，j1 為 1-20 的整數；j2 為 1-20 的整數；

R' 為 C1-C10 的烷基；

~~~~~表示基團連接至分子其餘部分的位點；

M<sub>1</sub> 表示標靶基團，每個所述靶向基團為 N-乙醯基半乳糖胺；

其中，該 siRNA 含有正義鏈和反義鏈，所述正義鏈和反義鏈長度相同或不同，正義鏈的長度為 19-23 個核苷酸，反義鏈的長度為 20-26 個核苷酸；該 siRNA 中的每個核苷酸各自獨立地為修飾或未修飾的核苷酸，其中，該正義鏈含有一段核苷酸序列 I，該反義鏈含有一段核苷酸序列 II，該核苷酸序列 I 和該核苷酸序列 II 完全反向互補形成雙鏈區，所述完全反向互補是指序列 I 和序列 II 之間沒有錯配；

其中，該核苷酸序列 I 含有核苷酸序列 A，該核苷酸序列 A 為 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，且該核苷酸序列 II 含有核苷酸序列 B，該核苷酸序列 B 為 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列：

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

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

其中，Z 為 A，Z'為 U；

該核苷酸序列 A 中包含位置對應於 Z 的核苷酸 Z<sub>A</sub>，該核苷酸序列 B 中包含位置對應於 Z'的核苷酸 Z'<sub>B</sub>，該 Z'<sub>B</sub> 是該反義鏈 5'末端的第一個核苷酸。

【請求項2】 如請求項 1 所述的 siRNA 綴合物，其中，L<sub>1</sub> 選自 A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11 中的一種或多種的連接組合。

【請求項3】 如請求項 2 所述的 siRNA 綴合物，其中 L<sub>1</sub> 選自 A1、A4、A8、A10 和 A11 中至少 2 個的連接組合。

【請求項4】 如請求項 1 所述的 siRNA 綴合物，其中，L<sub>1</sub> 的長度為 3-25 個原子。

【請求項5】 如請求項 4 所述的 siRNA 綴合物，其中 L<sub>1</sub> 的長度為 4-15 個原子。

【請求項6】 如請求項 1 所述的 siRNA 綴合物，其中，m1、m2 和

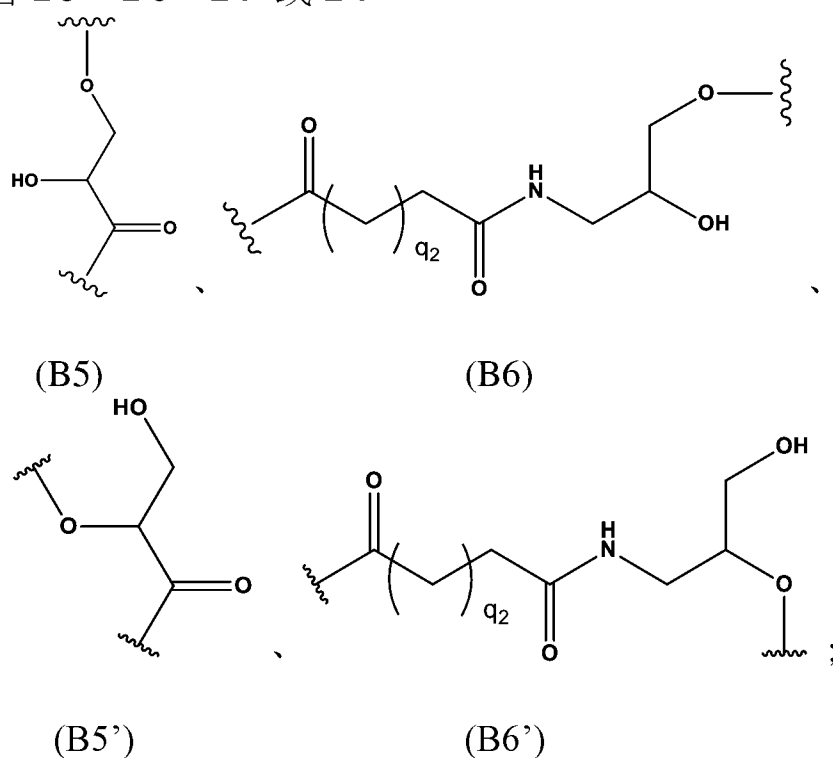
$m_3$  各自獨立地為 2-5 的整數。

【請求項7】 如請求項 1 或 6 所述的 siRNA 綴合物，其中  $m_1=m_2=m_3$ 。

【請求項8】 如請求項 1 所述的 siRNA 綴合物，其中， $R_2$  上同時含有與含氮骨架上的 N 連接的连接位點和與  $R_3$  中的 P 連接的连接位點。

【請求項9】 如請求項 8 所述的 siRNA 綴合物，其中所述  $R_2$  與含氮骨架上的 N 連接的位點與 N 形成醯胺鍵，所述  $R_3$  上的 P 連接的位點與 P 形成磷酸酯鍵。

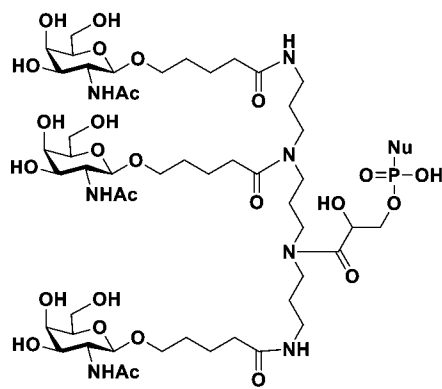
【請求項10】 如請求項 8 或 9 所述的 siRNA 綴合物，其中， $R_2$  選自 B5、B6、B5'或 B6'：



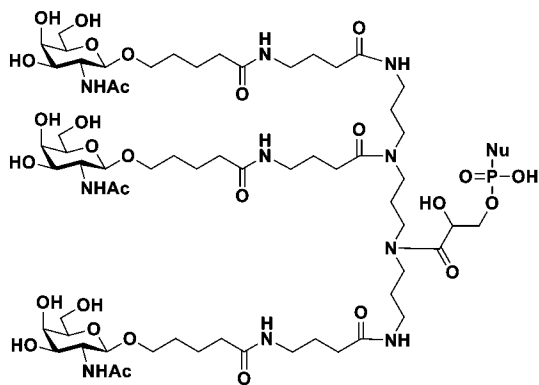
其中， $\sim$  表示基團連接至分子其餘部分的位點， $q_2$  為 1-10 的整數。

【請求項11】 如請求項 1 所述的 siRNA 綴合物，其中，該綴合物具有式(403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421)

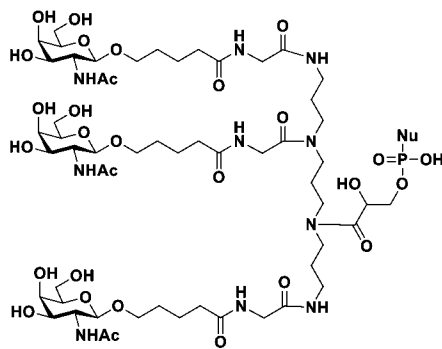
或(422)所示的結構：



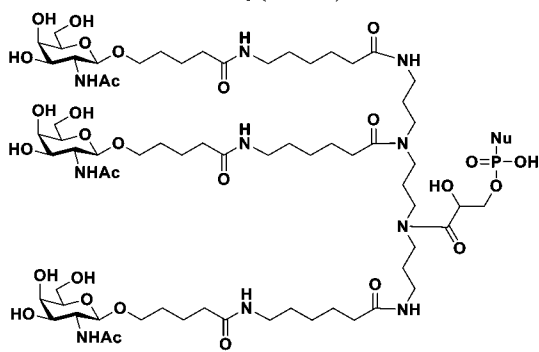
式(403)



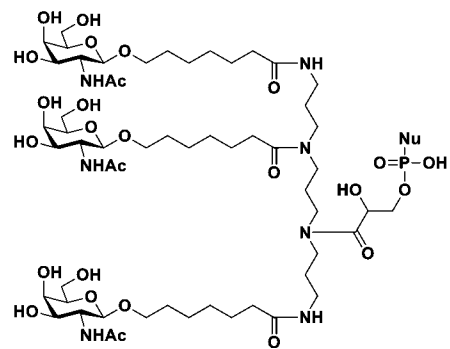
式(404)



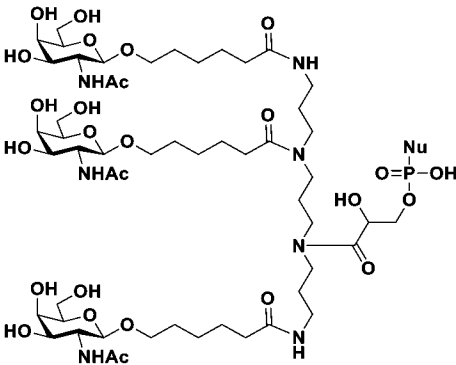
式(405)



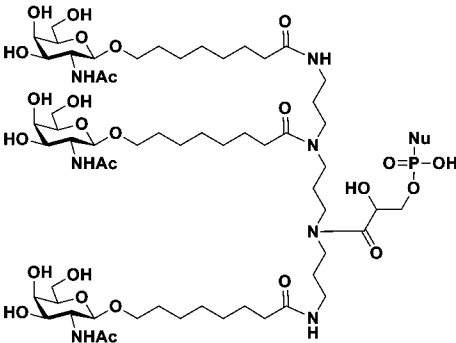
式(406)



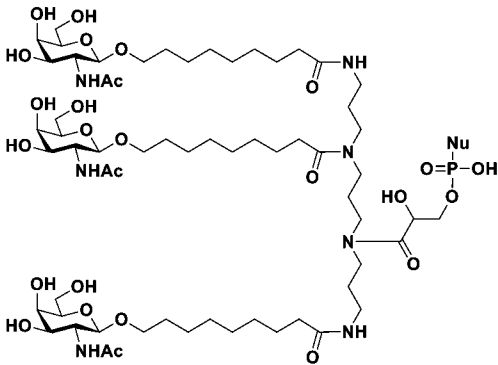
式(407)



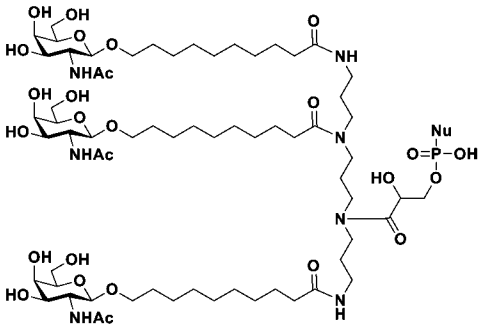
式(408)



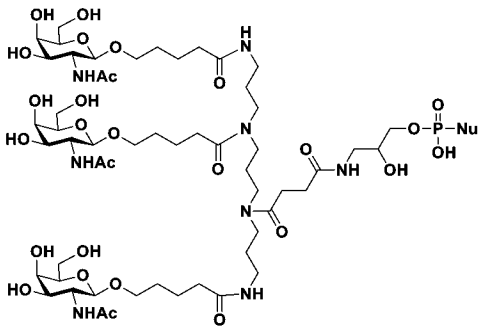
式(409)



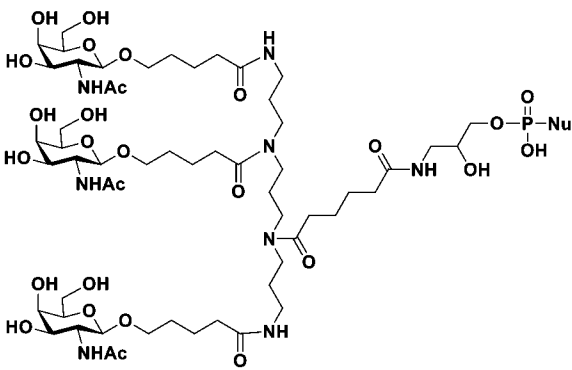
式(410)



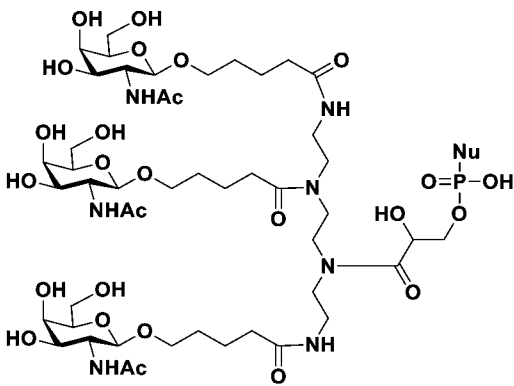
式(411)



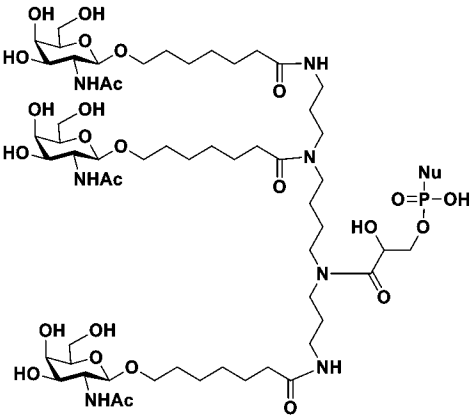
式(412)



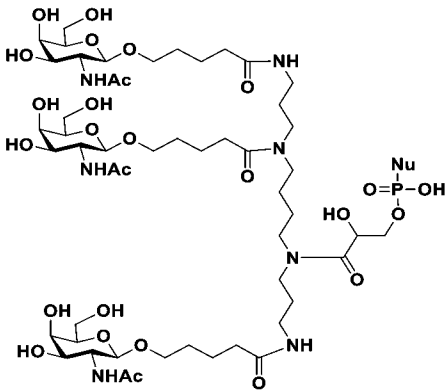
式(413)



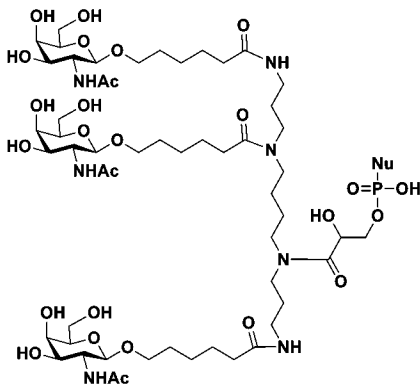
式(414)



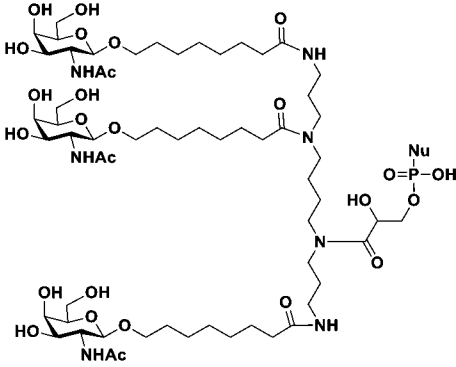
式(415)



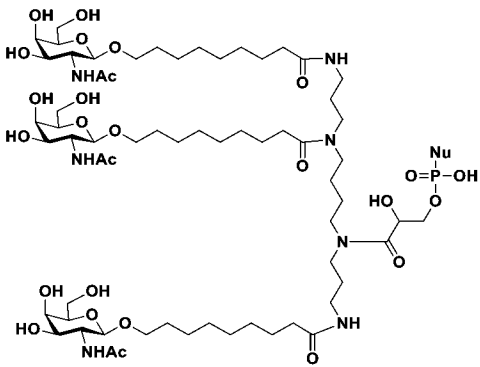
式(416)



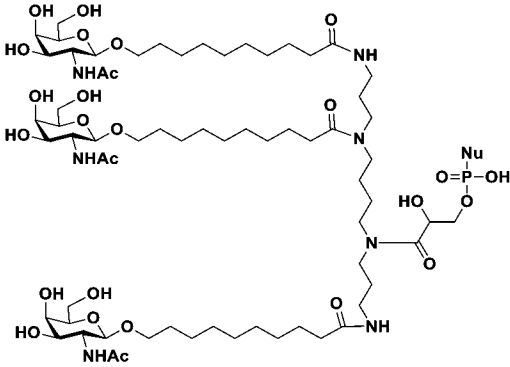
式(417)



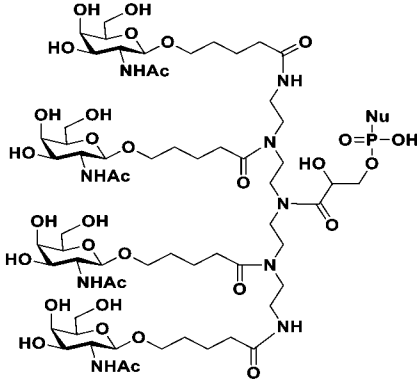
式(418)



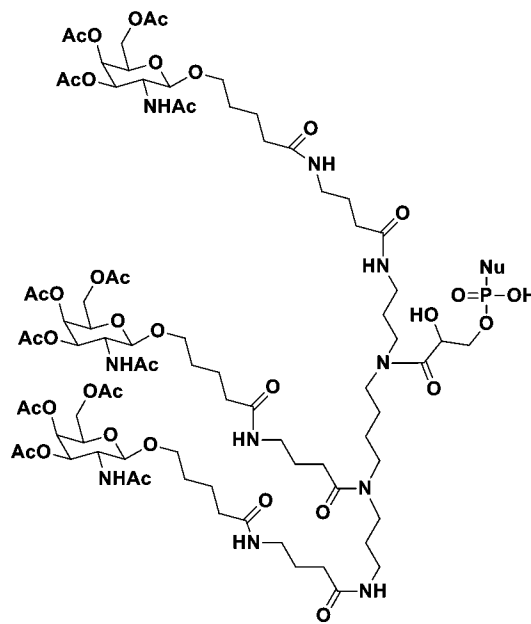
式(419)



式(420)



式(421)



式(422)。

【請求項12】 如請求項 1 所述的 siRNA 綴合物，其中，式(A59) 中的 P 原子連接到該 siRNA 正義鏈的 3'末端。

【請求項13】 如請求項 1 所述之 siRNA 綴合物，其中，該核苷酸序列 I 進一步含有核苷酸序列 III，該核苷酸序列 II 進一步含有核苷酸序列 IV，該核苷酸序列 III 和該核苷酸序列 IV 的長度各自獨立地為 1-4 個核苷酸，該核苷酸序列 III 連接在該核苷酸序列 A 的 5'末端，該核苷酸序列 IV 連接在該核苷酸序列 B 的 3'末端，該核苷酸序列 III 和該核苷酸序列 IV 長度相等並且實質上反向互補或完全反向互補；該實質上反向互補是指兩個核苷酸序列之間存在不多於 1 個的鹼基錯配；該完全反向互補是指兩個核苷酸序列之間沒有錯配。

【請求項14】 如請求項 13 所述之 siRNA 綴合物，其中，該核苷酸序列 III 和 IV 的長度均為 1 個核苷酸，該核苷酸序列 III 的鹼基為 G；或者，

該核苷酸序列 III 和 IV 的長度均為 2 個核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，該核苷酸序列 III 的鹼基組成為 AG；或者，

該核苷酸序列 III 和 IV 的長度均為 3 個核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，該核苷酸序列 III 的鹼基組成為 AAG；或者

該核苷酸序列 III 和 IV 的長度均為 4 個核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，該核苷酸序列 III 的鹼基組成為 CAAG。

**【請求項15】** 如請求項 1 或 13 所述之 siRNA 綴合物，其中，該核苷酸序列 II 還含有核苷酸序列 V，該核苷酸序列 V 的長度為 1 至 3 個核苷酸，連接在該反義鏈的 3'末端，構成反義鏈的 3'垂懸末端。

**【請求項16】** 如請求項 1 所述之 siRNA 綴合物，其中，該 siRNA 的正義鏈含有如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，該反義鏈含有如 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列：

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

5'-Z'<sub>B</sub>AGAAGAUGAGGCAUAGCAGC-3' (SEQ ID NO: 5)；或者

該 siRNA 的正義鏈含有如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列，該反義鏈含有如 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列：

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

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

其中，該 Z'<sub>B</sub> 是反義鏈 5'末端的第一個核苷酸，該 Z<sub>A</sub> 為 A，Z'<sub>B</sub> 為 U。

**【請求項17】** 如請求項 1 所述之 siRNA 綴合物，其中，所述正義鏈和所述反義鏈中的每一個核苷酸獨立地為氟代修飾的核苷酸或非氟代修飾的核苷酸；

其中，所述氟代修飾的核苷酸位於所述 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列和所述 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列中，並且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列的第 7、8、9 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸；按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 SEQ ID NO:

2 所示的核苷酸序列的第 2、6、14、16 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸。

【請求項18】 如請求項 17 所述之 siRNA 綴合物，其中，每一個非氟代修飾的核苷酸均為甲氧基修飾的核苷酸，該甲氧基修飾的核苷酸指核糖基的 2'-羥基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

【請求項19】 如請求項 18 所述之 siRNA 綴合物，其中，按照 5'末端到 3'末端的方向，該 siRNA 的正義鏈中核苷酸序列 A 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，該 siRNA 的正義鏈的其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸，並且，按照 5'末端到 3'末端的方向，該 siRNA 的反義鏈中核苷酸序列 B 的第 2、6、8、9、14 和 16 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，該 siRNA 的反義鏈其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；或者

按照 5'末端到 3'末端的方向，該 siRNA 的正義鏈中核苷酸序列 A 的第 5、7、8 和 9 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，該 siRNA 的正義鏈的其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸，並且，按照 5'末端到 3'末端的方向，該 siRNA 的反義鏈中核苷酸序列 B 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，該 siRNA 的反義鏈其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；或者

按照 5'末端到 3'末端的方向，該 siRNA 的正義鏈中核苷酸序列 A 的第 7、8 和 9 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，該 siRNA 的正義鏈的其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸，並且，按照 5'末端到 3'末端的方向，該 siRNA 的反義鏈中核苷酸序列 B 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸為氟代修飾的核苷酸，該 siRNA 的反義鏈其餘位置的核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸。

【請求項20】 如請求項 19 記載之 siRNA 綴合物，其中，所述  
第 12 頁，共 19 頁(發明申請專利範圍)

siRNA 為 siHBVS3、siHBVS4、siHBVS5 或 siHBVS6：

siHBVS3

正義鏈：

5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'  
' (SEQ ID NO: 9) ，

反義鏈：

5'-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmG  
mCm-3' (SEQ ID NO: 10) ，

siHBVS4

正義鏈：

5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm  
-3' (SEQ ID NO: 9) ，

反義鏈：

5'-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmU  
mUm-3' (SEQ ID NO: 11) ，

siHBVS5

正義鏈：

5'-UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'  
(SEQ ID NO: 12) ，

反義鏈：

5'-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGm  
Cm-3' (SEQ ID NO: 13) ，

siHBVS6

正義鏈：

5'-UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'

(SEQ ID NO: 12) ,

反義鏈：

5'-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUm

Um-3' (SEQ ID NO: 14) ,

其中，大寫字母 C、G、U、A 表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母 m 表示該字母 m 左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母 f 表示該字母 f 左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸。

【請求項21】 如請求項 1 記載之 siRNA 綴合物，其中，該 siRNA 中，至少一個磷酸酯基為硫代磷酸酯基，並且該硫代磷酸酯基連接存在於由以下位置所組成的組中的至少一處：

該正義鏈的 5'末端端部第 1 個核苷酸和第 2 個核苷酸之間；

該正義鏈的 5'末端端部第 2 個核苷酸和第 3 個核苷酸之間；

該正義鏈的 3'末端端部第 1 個核苷酸和第 2 個核苷酸之間；

該正義鏈的 3'末端端部第 2 個核苷酸和第 3 個核苷酸之間；

該反義鏈的 5'末端端部第 1 個核苷酸和第 2 個核苷酸之間；

該反義鏈的 5'末端端部第 2 個核苷酸和第 3 個核苷酸之間；

該反義鏈的 3'末端端部第 1 個核苷酸和第 2 個核苷酸之間；以及

該反義鏈的 3'末端端部第 2 個核苷酸和第 3 個核苷酸之間。

【請求項22】 如請求項 21 記載之 siRNA 綴合物，其中，該 siRNA 為 siHBVS7、siHBVS8、siHBVS9 或 siHBVS10：

siHBVS7

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm

-3' (SEQ ID NO: 15) ,

反義鏈：

5'-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAms

GmsCm-3' (SEQ ID NO: 16) ,

siHBVS8

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm

-3' (SEQ ID NO: 15) ,

反義鏈：

5'-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAms

UmsUm-3' (SEQ ID NO: 17) ,

siHBVS9

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-

3' (SEQ ID NO: 18) ,

反義鏈：

5'-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsG

msCm-3' (SEQ ID NO: 19) ,

siHBVS10

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-

3' (SEQ ID NO: 18) ,

反義鏈：

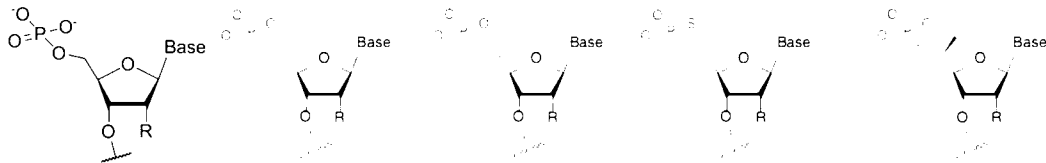
5'-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsU

msUm-3'(SEQ ID NO: 20) ,

其中，大寫字母 C、G、U、A 表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母 m 表示該字母 m 左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母 f 表示該字母 f 左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸；小寫字母 s 表示該字母左右兩個核苷酸之間為硫代磷酸酯基連接。

【請求項23】 如請求項 1 記載之 siRNA 綴合物，其中，該反義鏈的 5'末端核苷酸為 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸類似物修飾的核苷酸；

其中，該 5'-磷酸核苷酸為具有如式(2)所示結構的核苷酸，該 5'-磷酸類似物修飾的核苷酸選自結構如式(3)-式(6)中任意一個所示的核苷酸：



式(2)

式(3)

式(4)

式(5)

式(6)

其中，R 選自 H、OH、甲氧基或氟；

Base 表示鹼基，選自 A、U、C、G 或 T。

【請求項24】 如請求項 23 記載之 siRNA 綴合物，其中，該 siRNA 為 siHBVS11、siHBVS12、siHBVS13、siHBVS14、siHBVS15、siHBVS16、siHBVS17 或 siHBVS18：

siHBVS11

正義鏈：

5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'  
(SEQ ID NO: 9) ,

反義鏈：

5'-P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmA

mGmCm-3'(SEQ ID NO: 21) ,

siHBVS12

正義鏈：

5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'

(SEQ ID NO: 9) ,

反義鏈：

5'-P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmA

mUmUm-3'(SEQ ID NO: 22) ,

siHBVS13

正義鏈：

5'- UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'

(SEQ ID NO: 12) ,

反義鏈：

5'-P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAm

GmCm-3' (SEQ ID NO: 23) ,

siHBVS14

正義鏈：

5'-UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'

(SEQ ID NO: 12) ,

反義鏈：

5'-P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAm

UmUm-3'(SEQ ID NO: 24) ,

siHBVS15

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm  
-3' (SEQ ID NO: 15) ,

反義鏈：

5'-P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCm  
AmsGmsCm-3' (SEQ ID NO: 25) ,

siHBVS16

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm  
-3' (SEQ ID NO: 15) ,

反義鏈：

5'-P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCm  
AmsUmsUm-3' (SEQ ID NO: 26) ,

siHBVS17

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-  
3' (SEQ ID NO: 18) ,

反義鏈：

5'-P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmA  
msGmsCm-3' (SEQ ID NO: 27) ,

siHBVS18

正義鏈：

5'-UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-  
3' (SEQ ID NO: 18) ,

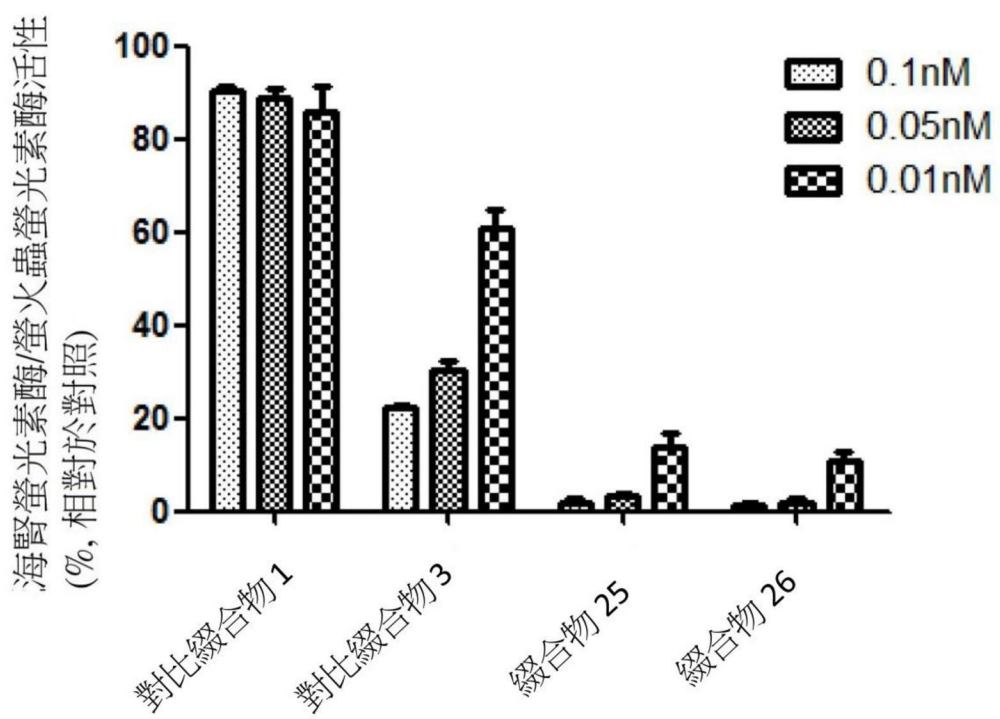
反義鏈：

5'-P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmA  
msUmsUm-3'(SEQ ID NO: 28)

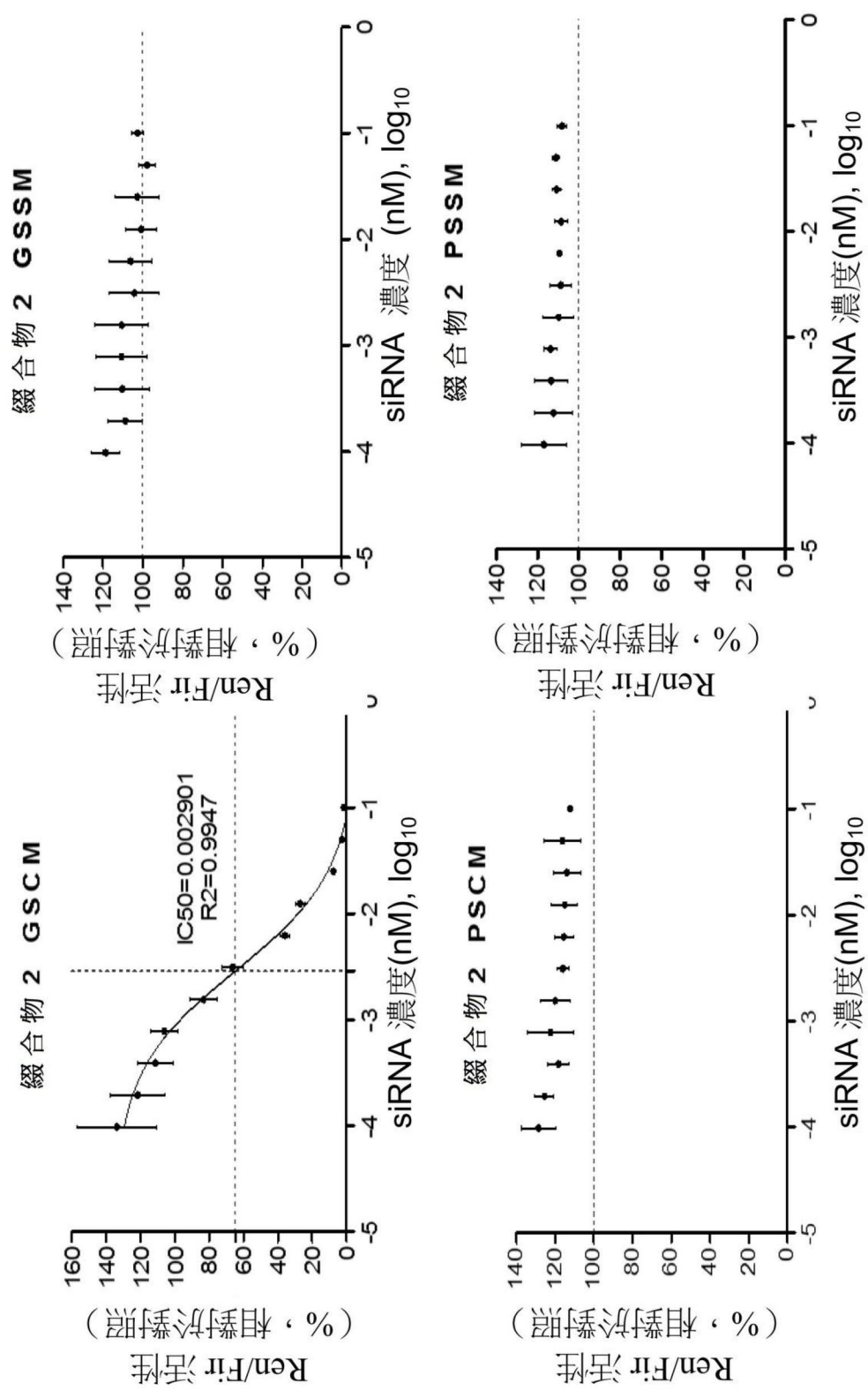
其中，大寫字母 C、G、U、A 表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母 m 表示該字母 m 左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母 f 表示該字母 f 左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸；小寫字母 s 表示該字母左右兩個核苷酸之間為硫代磷酸酯基連接；大寫字母 P1 表示該字母右側相鄰的一個核苷酸為 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸類似物修飾的核苷酸。

**【請求項25】** 一種如請求項 1-24 任一項所述的 siRNA 綴合物在製備用於治療由 B 型肝炎病毒的感染引起的病理狀況或疾病的藥物中的用途。

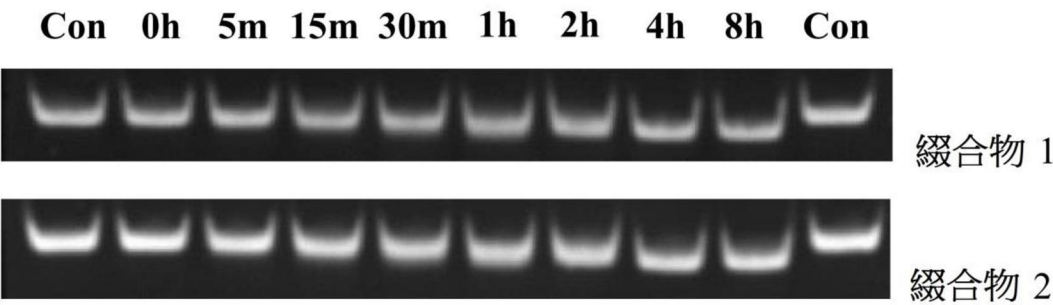
**【請求項26】** 如請求項 25 所述的 siRNA 的用途，其中，該由 B 型肝炎病毒的感染引起的病理狀況或疾病選自慢性肝病、炎症、纖維化疾病和增生性疾病。



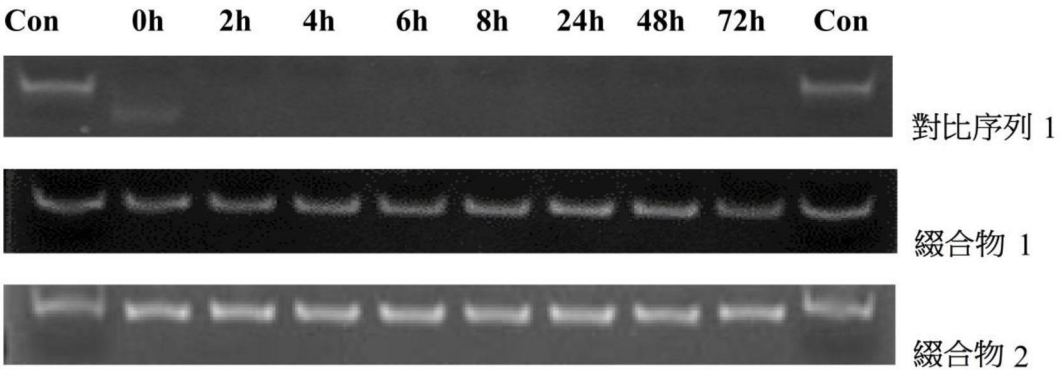
第 1 圖



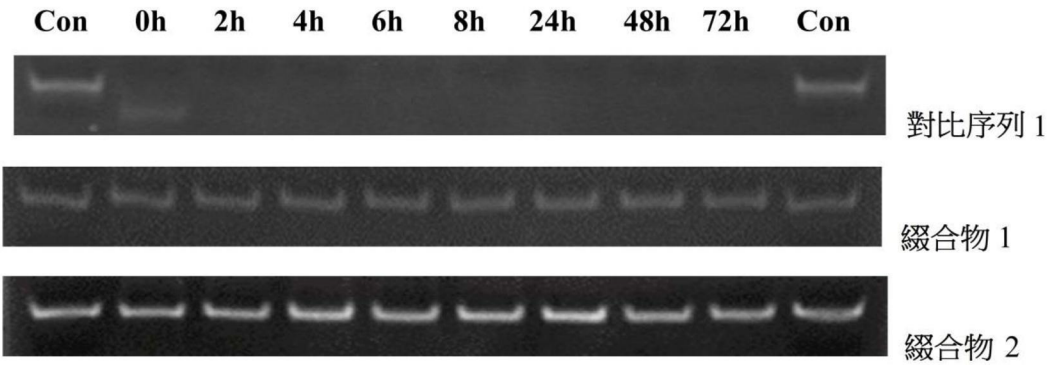
第 2 圖



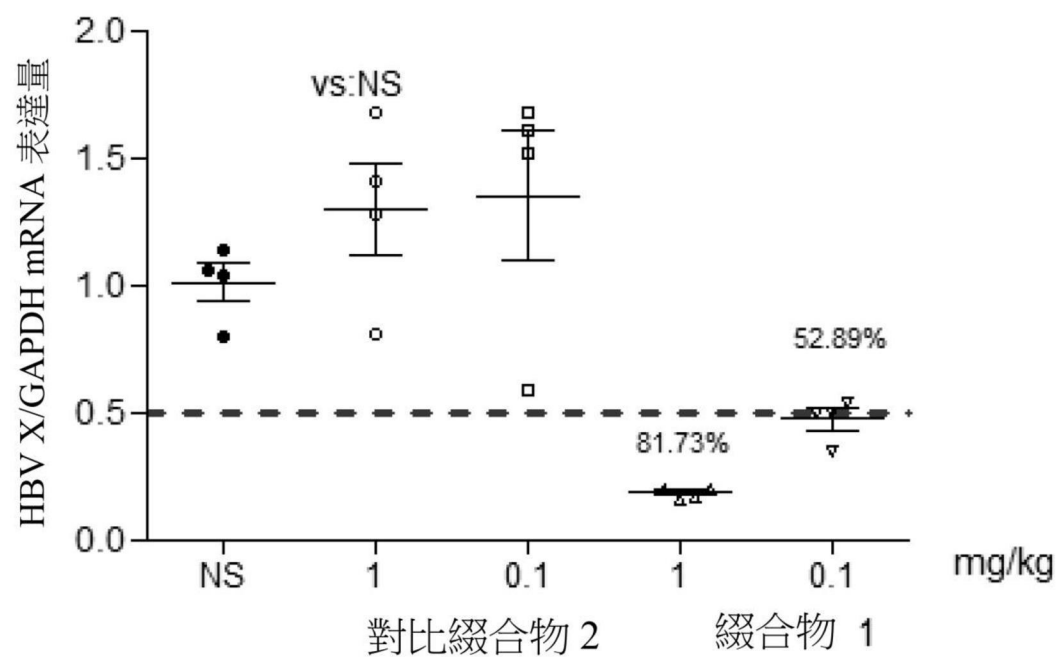
第 3 圖



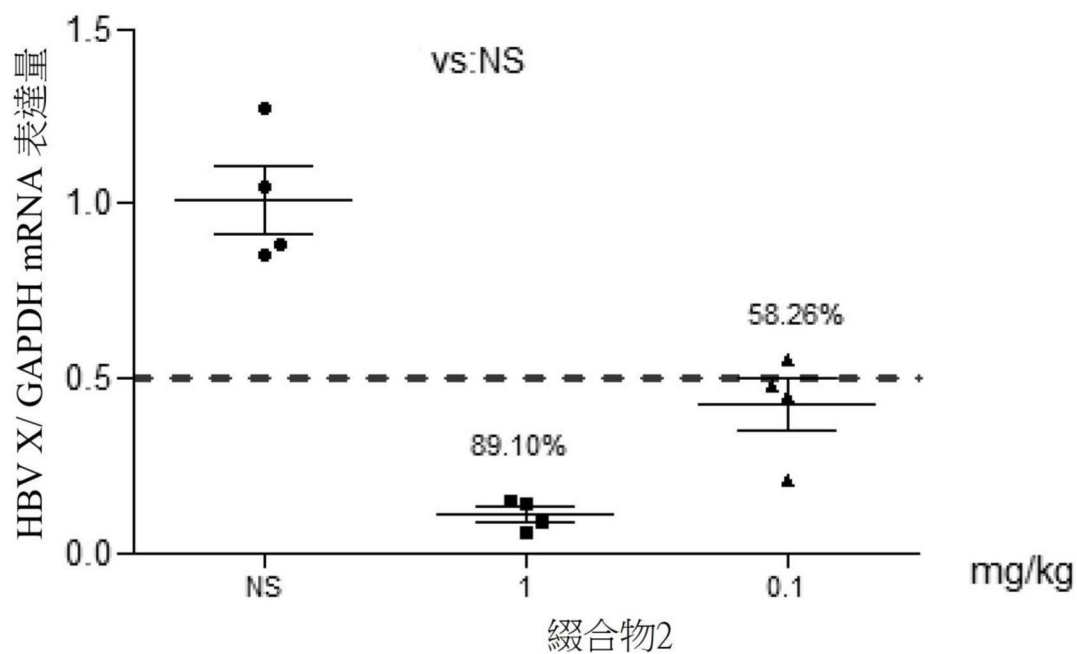
第 4 圖



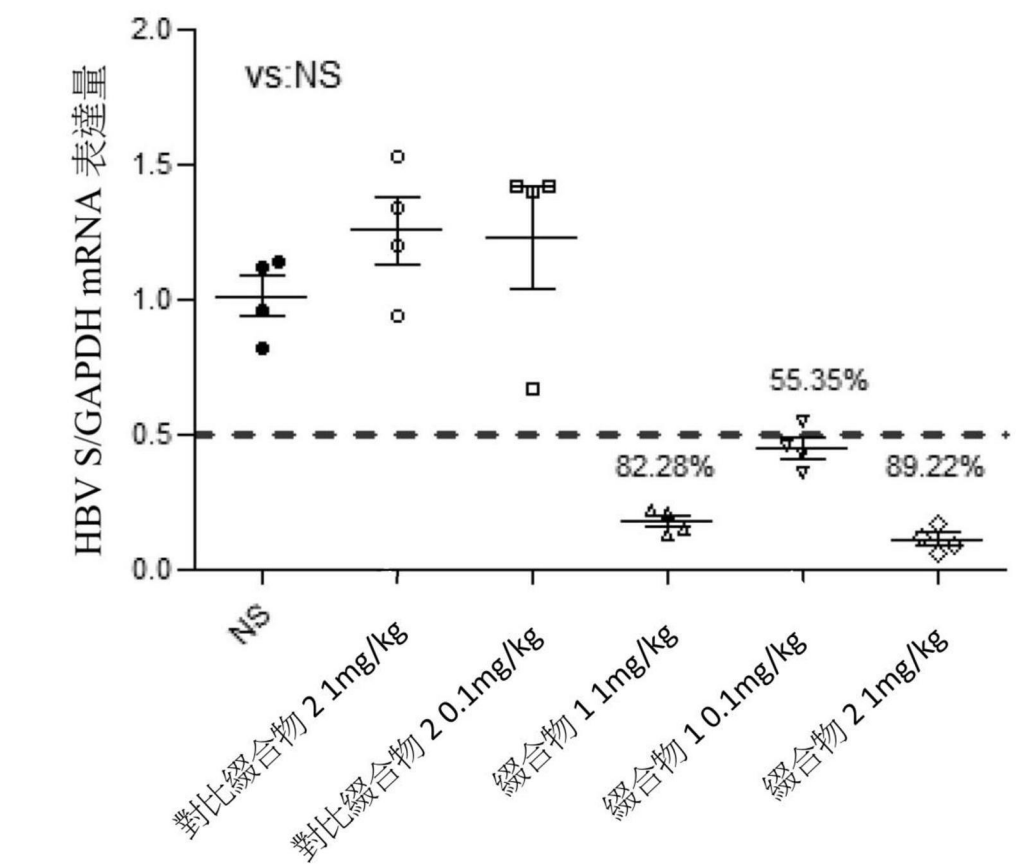
第 5 圖



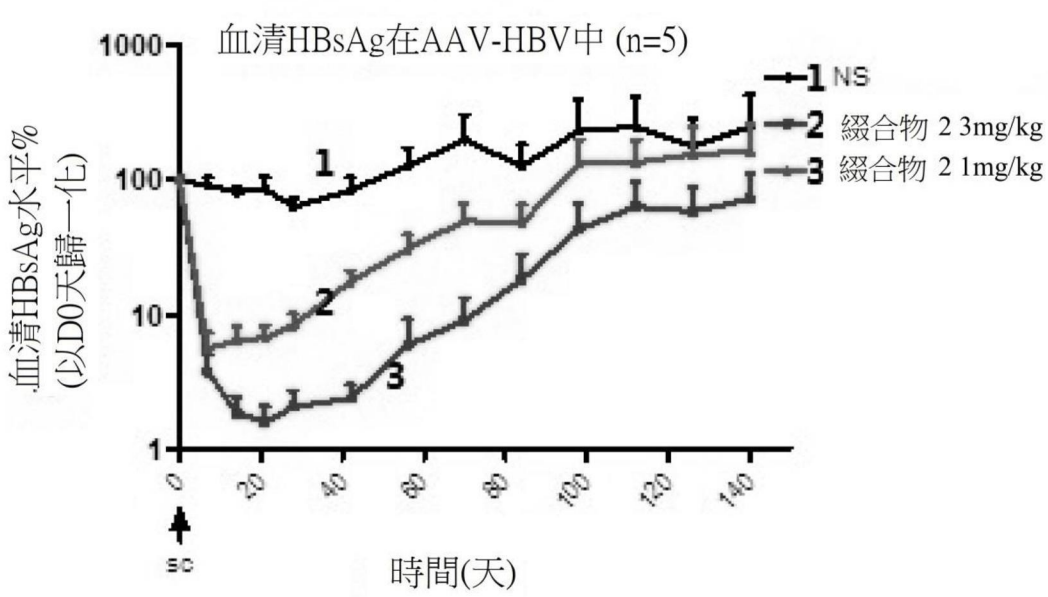
第 6 圖



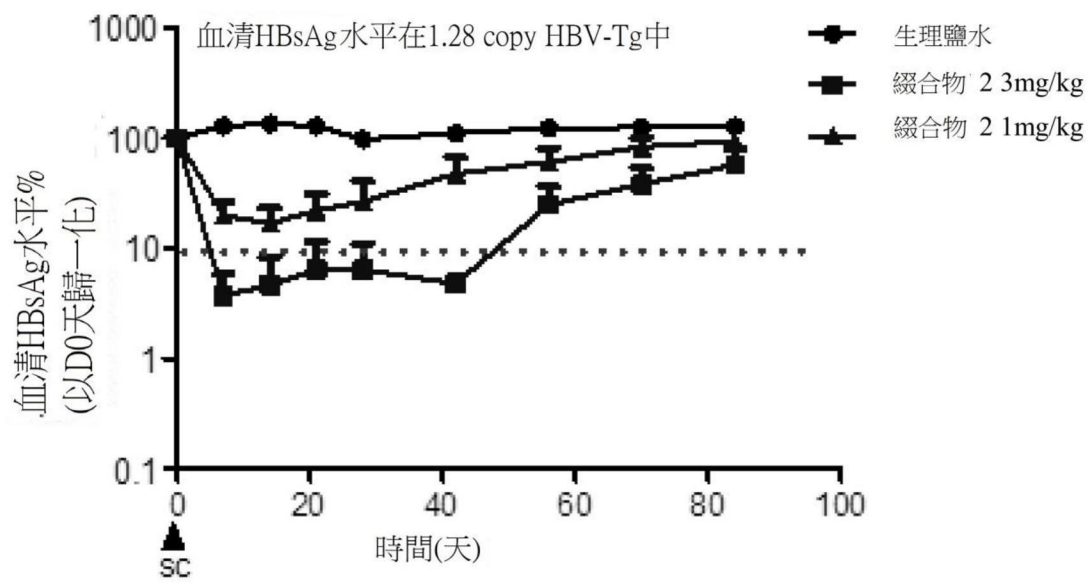
第 7 圖



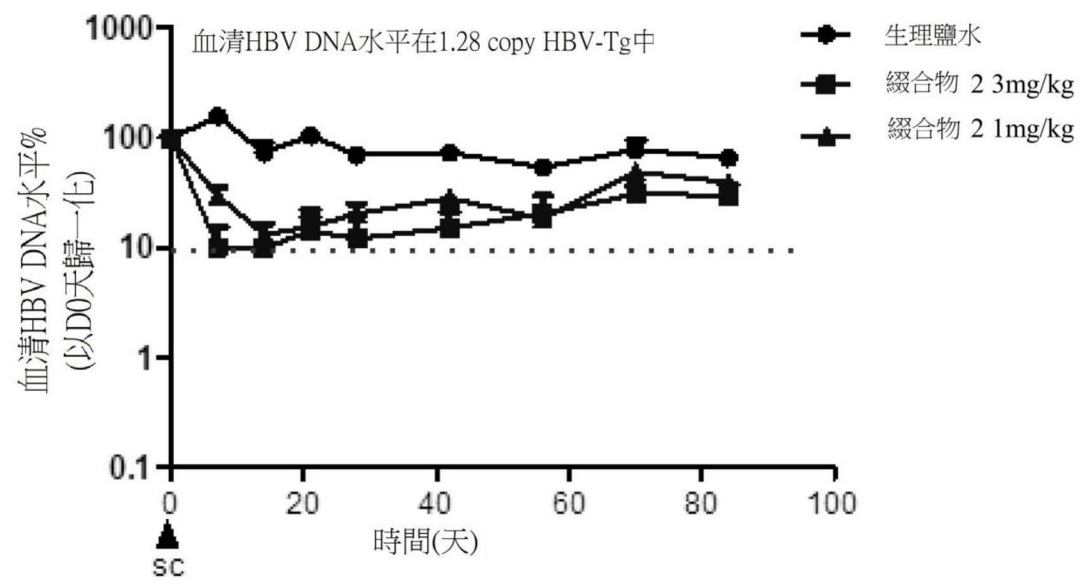
第 8 圖



第 9 圖



第 10 圖



第 11 圖