

一种用于抑制细胞程序性死亡-配体 1 基因表达的 siRNA、其缀合物和药物组合物及用途

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种用于抑制细胞程序性死亡-配体 1 基因表达的 siRNA、其缀合物和药物组合物及用途。

背景技术

细胞程序性死亡配体 1 (Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 也称为表面抗原分化簇 274 (cluster of differentiation 274, CD274) 或 B7 同源体 (B7 homolog 1, B7-H1)，是大小为 40kDa 的 I 型跨膜蛋白，由 CD274 基因编码。PD-L1 在 T 细胞、上皮细胞、内皮细胞等不同组织细胞上均有表达，并且其在包括在许多肿瘤中表达上调。

PD-L1 是 PD-1 的主要配体，配体 PD-L1 与受体 PD1 的相互作用可以诱导细胞内免疫受体酪氨酸转换基序 (ITSM) 和受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 磷酸化，从而抑制 T 细胞的活化和细胞因子的产生。在正常组织感染或炎症期间，这种相互作用对于通过维持免疫反应稳态来预防自身免疫很重要。在肿瘤微环境中，这种相互作用可以促使效应 T 细胞失活，从而为肿瘤细胞提供免疫逃逸。

此外有文章报道 (Sun Y 等人, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2020 Jan 1;318(1):G162-G173.) 病毒调节 PD-1/PD-L1 途径以改善感染性。在乙型肝炎病毒 (HBV) 感染过程中，HBV 可以通过 PTEN/ β -catenin/c-Myc 信号通路增加 PD-L1 的表达，从而抑制 T 细胞反应，最终促进 HBV 免疫逃逸。靶向该信号通路是治疗慢性乙型肝炎的潜在策略。

目前靶向 PD-L1 的上市或临床药物类型大多数是抗体类或小分子类，如恩沃利单抗、舒格利单抗、度伐利尤单抗、APL-502、CA-170 等。此类药物在研适应症多为肿瘤领域，为全身性用药，临床上不良反应率较高，安全性较差，较少有乙型肝炎治疗领域应用，目前上市药物中仅恩沃利单抗 (ASC22) 针对乙型肝炎适应症在美国开展临床试验，临床前研究表明在感染乙型肝炎病毒的土拨鼠模型中，ASC22 与恩替卡韦联用可以降低表面抗原水平 (Balsitis S 等人, PLoS One. 2018 Feb 14;13(2):e0190058.)，IIa 期临床数据显单次给药 0.3、1.0 或 2.5mg/kg ASC22 后剂量依赖性 HBsAg 减少。

目前在核酸领域，在乙型肝炎治疗领域临床阶段仅罗氏一款针对 PD-L1 的寡核苷酸类 (ASO) RO-9191863 药物，通常 ASO 在有效性和长效性表现上稍逊于 siRNA 药物，具有全身分布的特性，肝部特异性递送不如肝靶向分子缀合的 siRNA 药物形式。siRNA 药物可以通过肝靶向分子缀合的方式，特异地将靶向 PD-L1 的 siRNA 药物递送至肝脏，可以特异地下调肝部 PD-L1 分子的水平，降低小分子、抗体、ASO 药物形式的全身副作用。

截至目前，虽有一些靶向 PD-L1 的 siRNA 的专利，但尚未有靶向 PD-L1 的 siRNA 药物上市，甚至未有 siRNA 药物处于临床研究阶段。因此，仍需持续开发能够抑制 PD-L1 基因表达的 siRNA 药物。

发明内容

本发明的目的在于提供如下能够特异地抑制细胞中 PD-L1 基因的表达的 siRNA 及其修饰序列，包含本公开的 siRNA 的药物组合物和 siRNA 缀合物能够有效地将本公开的 siRNA 递送至目标组织和/或细胞，从而在治疗或预防与 PD-L1 表达相关的疾病中显示出高的成药潜力。

为达到上述目的，本发明采用的技术方案是：

本发明第一方面提供一种用于抑制细胞程序性死亡-配体 1 基因表达的 siRNA，其包括正义链和反义链，所述正义链包括选自 SEQ ID NO.1 至 12 所示核苷酸序列中的一种或上述序列不超过 3 个碱基突变的核苷酸序列，所述反义链包括选自 SEQ ID NO.13 至 24 所示核苷酸序列中的一种或上述序列不超过 5 个碱基突变的核苷酸序列。

根据某些实施方式，所述正义链包括与 SEQ ID NO.1 至 12 所示核苷酸序列中的任一条不超过 2 个碱基突变的核苷酸序列，不超过 1 个碱基突变的核苷酸序列。

根据某些实施方式,所述正义链的碱基突变可以在核苷酸序列的任意位置,例如第一位、第二位、第三位、第四位、第五位、第六位、第七位、第八位、第九位、第十位、第十一位、第十二位、第十三位、第十四位、第十五位、第十六位、第十七位、第十八位、第十九位中的任意一位、两位或三位。

根据某些实施方式,所述反义链包括与 SEQ ID NO.13 至 24 所示核苷酸序列中的任一条不超过 5 个碱基突变的核苷酸序列,不超过 4 个碱基突变的核苷酸序列,不超过 3 个碱基突变的核苷酸序列,不超过 2 个碱基突变的核苷酸序列,不超过 1 个碱基突变的核苷酸序列。

根据某些实施方式,所述反义链的碱基突变可以在核苷酸序列的任意位置,例如第一位、第二位、第三位、第四位、第五位、第六位、第七位、第八位、第九位、第十位、第十一位、第十二位、第十三位、第十四位、第十五位、第十六位、第十七位、第十八位、第十九位、第二十位、第二十一位中的任意一位、两位、三位、四位或五位。

根据某些实施方式,按照 5' 到 3' 的方向,所述正义链的碱基突变在其核苷酸序列的 3' 末端,所述反义链的碱基突变在其核苷酸序列的 5' 末端、第 2-8 位、3' 端最后两位中的任意一位或多位。

根据某些实施方式,所述碱基突变包括碱基的替换、插入或者缺失。

在某些实施方案中,所述修饰的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₃ 修饰的核苷酸、2'-O-CH₂-CH=CH₂ 修饰的核苷酸、2'-CH₂-CH₂-CH=CH₂ 修饰的核苷酸、2'-脱氧基核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、硫代磷酸酯键修饰的核苷酸、VP 修饰的核苷酸、LNA、ENA、cETBNA、UNA、GNA 和 SAFE-01 中的一种或多种的组合,其中 SAFE-01 所示结构式中的 R1 为 H、OH 或 CH₃, Base 为天然核碱基、修饰的核碱基、通用碱基或 H 原子。

进一步地,R1 为 CH₃。

在某些实施方案中,所述正义链中的修饰核苷酸的个数为一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个或十九个。

在某些实施方案中,所述反义链中的修饰核苷酸的个数为一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或二十一个。

在某些实施方案中,所述正义链和所述反义链中的全部的核苷酸为修饰的核苷酸。

在某些实施方案中,按照 5' 到 3' 的方向,所述正义链的第 7、8 和 9 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸,所述反义链的第 2、14 和 16 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸。

在某些进一步地实施方案中,所述正义链的其他位置的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸。

在某些进一步地实施方案中,按照 5' 到 3' 的方向,所述反义链的第 6 位为 2'-氟代修饰的核苷酸或 SAFE-01,所述反义链的第 7 位为 2'-甲氧基修饰的核苷酸或 SAFE-01。

优选地,SAFE-01 为 Ago、Ggo、Cgo 或 Ugo。

在某些进一步地实施方案中,所述反义链的其他位置的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸,其中,所述其他位置是指第 2、6、7、14 和 16 位以外的位置。

在某些进一步地实施方案中,所述 siRNA 中以下核苷酸之间的连接中至少一个为硫代磷酸酯基连接:

所述正义链的 5' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接;

所述正义链的 5' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接;

所述正义链的 3' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接;

所述正义链的 3' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接;

所述反义链的 5' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接;

所述反义链的 5' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接;

所述反义链的 3' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接;

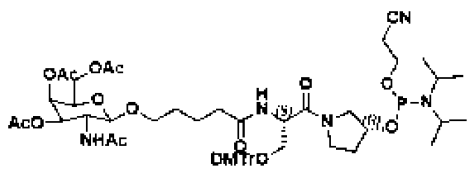
所述反义链的 3' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接。

在某些进一步地实施方案中，所述正义链的 3' 末端为硫代磷酸酯基，所述反义链的 5' 末端为 VP 修饰的核苷酸。

在某些实施方案中，所述 siRNA 选自表 2 或表 3 中的任意序列，其中一个双链编号的一条正义链和一条反义链组成一条 siRNA。

本发明第二方面提供一种 siRNA 缀合物，其包括上述 siRNA 中的一条或多条，以及缀合至所述 siRNA 的缀合基团。

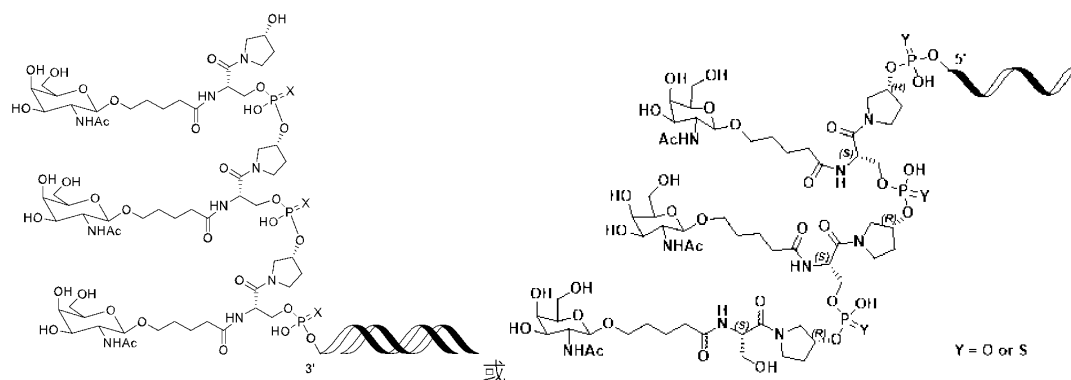
在某些实施方案中，所述缀合基团来自化合物 SA51，所述化合物 SA51 的结构式为：



进一步地，所述缀合基团中的化合物 SA51 的个数为 2~4 个，2~4 个所述化合物 SA51 通过化学键依次连接。

在某些实施方案中，所述缀合基团连接在所述正义链的 3' 末端和/或 5' 末端。

在某些实施方案中，所述 siRNA 缀合物的结构式如下：



其中， 表示本公开的 siRNA 形成的双链体，X 为 O 或 S。

本发明第三方面提供一种药物组合物，其包括上述 siRNA 或上述 siRNA 缀合物，以及药学上可接受的载体或辅料。

在某些实施方案中，所述药物组合物用于抑制细胞程序性死亡-配体 1 基因表达。

本发明第四方面提供上述 siRNA，或上述 siRNA 缀合物，或上述药物组合物用于制备治疗和/或预防 PD-L1 基因表达相关的疾病的药剂的用途。

在某些实施方案中，所述疾病为病毒性肝炎或癌症。

进一步地，所述病毒性肝炎为乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒感染所导致的。

在某些实施方案中，上述 siRNA，或上述 siRNA 缀合物，或上述药物组合物按照所需剂量被配制施用用于受试者。

在某些实施方案中，上述 siRNA，或上述 siRNA 缀合物，或上述药物组合物通过皮下注射、静脉注射、鞘内注射或肌肉注射等形式施用。

由于上述技术方案运用，本发明与现有技术相比具有下列优点：

本发明公开的 siRNA 为人源 PD-L1 siRNA 序列，其缀合物和药物组合物具有良好的稳定性，较高的

PD-L1 mRNA 抑制活性。该 siRNA 药物具有肝靶向特异性，相比于小分子药物和抗体药物具有更好的安全性，同时具有长效性，可在临床中实现更长给药间隔，患者的依从性更佳。

附图说明

图 1 为实施例 5 的 siRNA 在 SNU-387 细胞中的 IC₅₀ 测试结果图；

图 2 为实施例 7 的 siRNA 在 HDI 小鼠体内第 7 天和第 28 天的活性结果图。

具体实施方式

需要说明的是，除非另外定义，本申请使用的技术术语或者科学术语应当为所属领域的技术人员所理解的通常意义。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售产品。

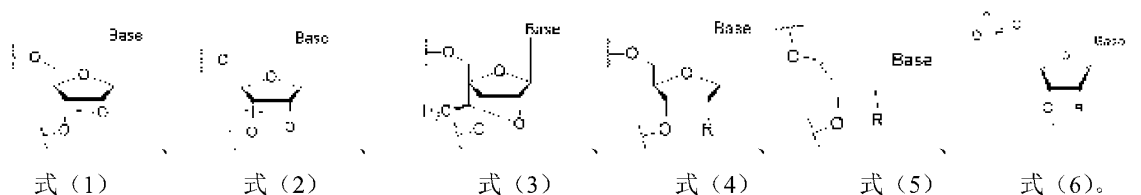
定义

在上文及下文中，2'-甲氧基修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被甲氧基取代形成的核苷酸；同理，2'-氟代修饰的核苷酸、2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₃ 修饰的核苷酸、2'-O-CH₂-CH=CH₂ 修饰的核苷酸、2'-CH₂-CH₂-CH=CH₂ 修饰的核苷酸、2'-脱氧基核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸分别是指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被相应基团取代所形成的核苷酸。

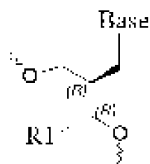
硫代磷酸酯键修饰的核苷酸指核苷酸的磷酸酯基中的磷酸二酯键中的一个氧原子被硫原子取代。

VP 修饰的核苷酸是指核苷酸的磷酸基团被乙烯基磷酸酯基取代形成的核苷酸，在一些实施方式中，反义链的 5'末端磷酸基团被 VP 取代。

LNA 如式 (1) 所示，ENA 如式 (2) 所示，cET BNA 如式 (3) 所示，UNA 如式 (4) 所示，GNA 如式 (5) 所示，VP 如式 (6) 所示：



上述式 (1) 至式 (6) 中，Base 表示天然核碱基、修饰的核碱基、通用碱基，例如 A、U、G 或 C。上述式 (4) 至式 (6) 中，R 选自 H、OH 或烷氧基 (O-烷基)。



SAFE-01 的结构式为

，其中，R1 为 H、OH 或 CH₃，Base 为天然核碱基、修饰的

核碱基、通用碱基或 H 原子。根据一些实施方式，R1 为 H。根据一些实施方式，R1 为 OH。根据一些实施方式，R1 为 CH₃。

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

在本公开的上下文中，除非另有说明，“缀合”是指两个或多个各自具有特定功能的化学部分之间以共价连接的方式彼此连接；相应地，“缀合物”是指该各个化学部分之间通过共价连接而形成的化合物。进一步地，“siRNA 缀合物”表示一个或多个具有特定功能的化学部分共价连接至 siRNA 上而形成的化合

物。siRNA 缀合物应根据上下文，理解为多个 siRNA 缀合物的总称或者某个化学式所示的 siRNA 缀合物。在本公开的上下文中，“缀合分子”应当理解为可通过反应缀合至 siRNA，最终形成本公开的 siRNA 缀合物的特定化合物。

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

本公开中所述的药学上可接受的载体可以是 siRNA 给药领域常规使用的载体，例如但不限于磁性纳米粒 (magnetic nanoparticles, 如基于 Fe₃O₄ 或 Fe₂O₃ 的纳米粒)、碳纳米管 (carbon nanotubes)、介孔硅 (mesoporous silicon)、磷酸钙纳米粒 (calcium phosphate nanoparticles)、聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI)、聚酰胺型树形高分子 (polyamidoamine (PAMAM) dendrimer)、聚赖氨酸 (poly(L-lysine), PLL)、壳聚糖 (chitosan)、1,2-二油酰基-3-三甲铵丙烷 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)、聚 D 型或 L 型乳酸/羟基乙酸共聚物 (poly(D&L-lactic/glycolic acid) copolymer, PLGA)、聚 (氨基乙基乙撑磷酸酯) (poly(2-aminoethyl ethylene phosphate), PPEEA) 和聚 (甲基丙烯酸-N,N-二甲氨基乙酯) (poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate), PDMAEMA) 以及它们的衍生物中的一种或多种。辅料可以为本领域常规采用的各种制剂或化合物的一种或多种。例如，所述药学上可接受的其它辅料可以包括 pH 缓冲液、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。

如本说明书所使用的，“任选的”或“任选地”是指其后描述的事件或状况可以发生或不发生，并且所述描述包括事件或状况发生的情况和其中不发生的情况。

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

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

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

下面结合具体的实施例对本发明提供的技术方案做进一步的描述。下述实施例仅用于对本发明进行说明，并不会对本发明的保护范围进行限制。

实施例 1 siRNA 的合成

本文中，若未给出实际的试剂来源，则该类试剂可以自任意分子生物学试剂的供应商获得；且具备满足用于分子生物学应用的质量/纯度标准。

使用固体支撑物介导的亚磷酰胺化学于 Dr.Oligo48 合成器(Biolytic)上以 200 纳摩尔(nmol)规格合成 PD-L1 siRNA 序列。该固体支撑物是通用固体支撑物(深圳逗点生物)。核苷单体原料 2'-F RNA、2'-O-甲基 RNA 等核苷亚磷酰胺单体购自上海兆维或苏州吉玛。全部亚磷酰胺(50mM 乙腈溶液)的偶合时间是 6 分钟(min)，采用 5-乙基硫-1H-四唑(ETT)作为活化剂(0.6M 乙腈溶液)，使用 0.22 M 的 PADS 溶于 1:1 体积比的乙腈和三甲基吡啶 (苏州柯乐玛) 溶液作为硫化试剂，硫化反应时间是 3 分钟 (min)，使用碘吡啶/

水溶液（柯乐玛）作为氧化剂，氧化反应时间 2 分钟（min）。

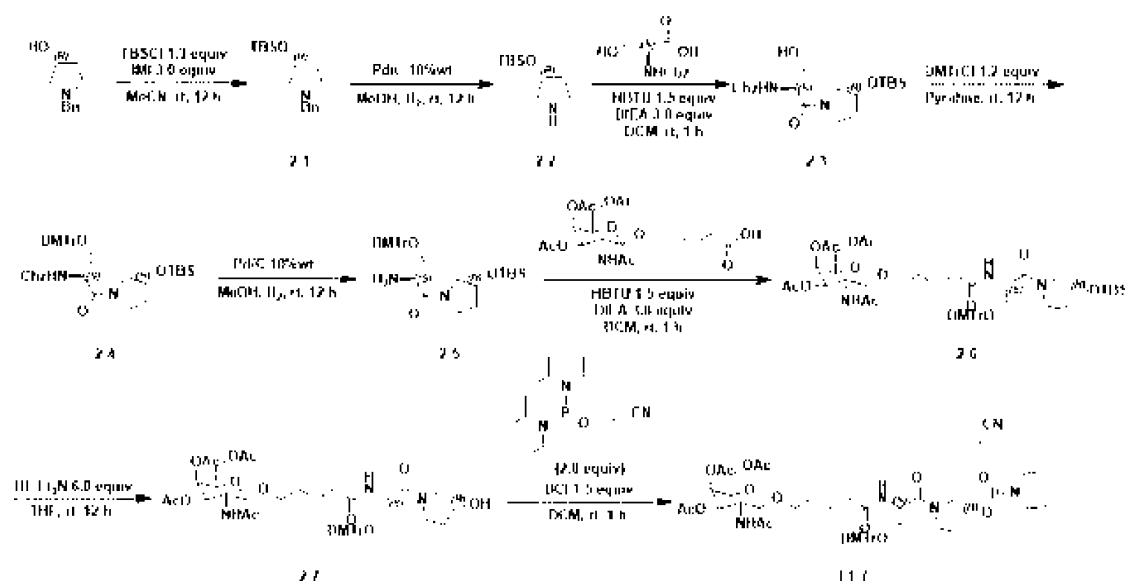
固相合成完成后，寡核糖核苷酸自该固体支撑物裂解，采用 3:1 的 28%氨水和乙醇溶液在 50℃条件下浸泡 16 小时。然后高速离心，将上清液转移到另一个离心管中，浓缩蒸发干后，使用 C18 反向色谱纯化，流动相为 0.1MTEAA 和乙腈，并使用 3%三氟乙酸溶液脱出 DMTr。目标寡核苷酸收集后冻干，并经 LC-MS 鉴定为目标产物，再经过 UV（260nm）定量。

所得到的单链寡核苷酸，根据等摩尔比，按照互补配对的两条序列，进行退火，最后所得到的双链 siRNA 溶于 1X PBS 中，并调整至实验所需浓度。这些单体通过 5' -3' -磷酸二酯键相互连接成寡核苷酸中。

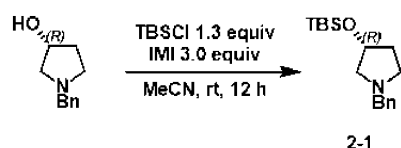
实施例 2 siRNA 缀合物的制备

一、Galnac 靶头制备

本实施例中，化合物 SA51 (I-1-7) 的合成路线如下所示：

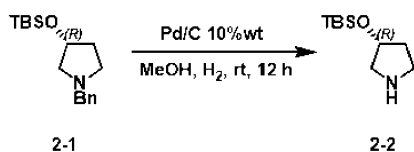


1、中间体 2-1 的制备



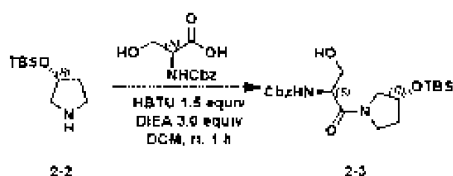
将化合物(R)-(+)-N-苄基-3-羟基吡咯烷（市售，购买于上海泰坦科技股份有限公司）(16.9 mmol, 3.0 g) 和咪唑（3.0 equiv, 50.7 mmol, 3.45 g）置于洁净干燥反应瓶中，加入 50 mL 乙腈，室温下缓慢加入叔丁基二甲基氯硅烷（1.3 equiv, 21.9 mmol, 3.31 g），随后室温继续搅拌 12 小时。反应后向反应液中加入 100 mL 乙酸乙酯，并用 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 100 mL 饱和食盐水洗涤，干燥有机相，过滤并浓缩，所得粗产品硅胶柱层析分离纯化（石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 - 5/1），得到无色油状物化合物 2-1 (4.9 g, 16.8 mmol, 99% 收率)。化合物 2-1 分子式：C₁₇H₂₉ONSi，分子量：291.2，LC-MS 实测：292.4 (M+H)。

2.2 中间体 2-2 的制备



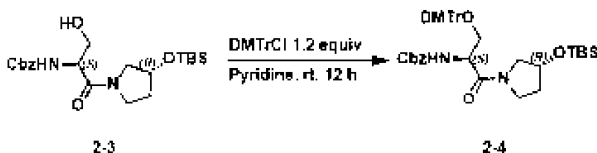
将化合物 2-1 (16.8 mmol, 4.9 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 甲醇, 室温氢气下加入钯碳 (湿基, 10% Pd/C) (10%wt, 490.0 mg), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后过滤除去钯碳, 滤液浓缩, 得到粗产品白色固体化合物 2-2 (3.31 g, 16.5 mmol, 98%收率), 未纯化直接投入下一步反应。化合物 2-2 分子式: $C_{10}H_{23}ONSi$, 分子量: 201.1, LC-MS 实测: 202.3 (M+H).

2.3 中间体 2-3 的制备



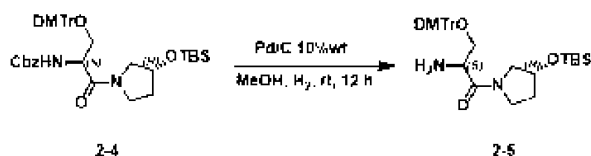
将化合物 N-苄氧羰基-L-丝氨酸 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) (15.0 mmol, 3.58 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷, 室温下加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.5 equiv, 22.5 mmol, 8.53 g)、化合物 2-2 (1.1 equiv, 16.5 mmol, 3.31 g) 和 N,N-二异丙基乙胺 (3.0 equiv, 45.0 mmol, 5.78 g), 随后室温搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 二氯甲烷, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 10/1 - 1/3), 得到白色固体化合物 2-3 (4.5 g, 10.65 mmol, 63%两步收率)。化合物 2-3 分子式: $C_{21}H_{34}O_5N_2Si$, 分子量: 422.2, LC-MS 实测: 423.3 (M+H). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.35 - 7.29 (m, 5H), 5.96 (dd, J = 14.3, 8.3 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.61 - 4.40 (m, 2H), 3.85 - 3.68 (m, 2H), 3.65 - 3.49 (m, 2H), 3.41 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.31 (s, 1H), 1.95 (qdd, J = 15.0, 11.8, 5.3 Hz, 2H), 1.77 (s, 1H), 0.86 (s, 9H), 0.06 (d, J = 3.1 Hz, 6H).

2.4 中间体 2-4 的制备



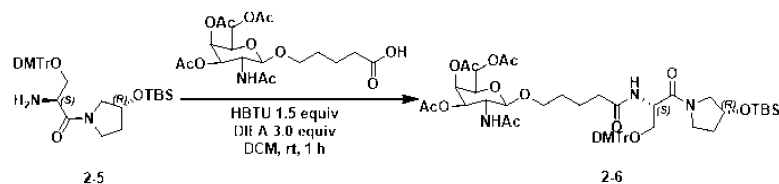
将化合物 2-3 (10.65 mmol, 4.5 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 吡啶, 室温下加入 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (1.2 equiv, 12.78 mmol, 4.32 g), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 乙酸乙酯, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 - 1/1), 得到淡黄色油状物化合物 2-4 (7.56 g, 10.43 mmol, 98%收率)。化合物 2-4 分子式: $C_{42}H_{52}O_7N_2Si$, 分子量: 724.3, LC-MS 实测: 747.4 (M+Na). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.35 - 7.31 (m, 1H), 7.28 (d, J = 4.7 Hz, 4H), 7.27 - 7.23 (m, 2H), 7.23 - 7.14 (m, 5H), 7.13 - 7.11 (m, 2H), 6.80 - 6.78 (m, 1H), 6.76 (dd, J = 7.7, 5.4 Hz, 4H), 5.72 (dd, J = 22.7, 8.3 Hz, 1H), 5.08 - 4.99 (m, 2H), 4.69 - 4.59 (m, 1H), 4.35 - 4.30 (m, 1H), 3.73 (dd, J = 4.5, 3.7 Hz, 6H), 3.65 - 3.44 (m, 2H), 3.36 - 3.20 (m, 3H), 1.86 - 1.81 (m, 1H), 1.70 (s, 1H), 0.80 (d, J = 13.1 Hz, 9H), -0.02 (dd, J = 14.9, 4.2 Hz, 6H).

2.5 中间体 2-5 的制备



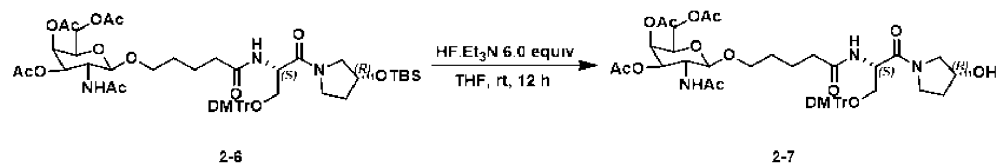
将化合物 2-4 (10.43 mmol, 7.56 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 甲醇, 室温氢气下加入钯碳(湿基, 10% Pd/C) (10%wt, 750.0 mg), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后过滤除去钯碳, 滤液浓缩, 得到粗产品白色固体化合物 2-5 (6.0 g, 10.22 mmol, 98%收率), 未纯化直接投入下一步反应。化合物 2-5 分子式: $C_{34}H_{46}O_5N_2Si$, 分子量: 590.3, LC-MS 实测: 591.6 (M+H).

2.6 中间体 2-6 的制备



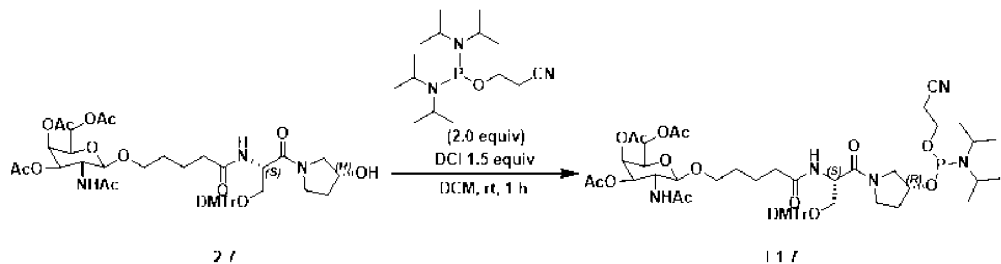
将化合物 5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰氨基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸 (市售, 购买于诺甘林生物医药科技(苏州)有限公司) (2.06 g, 4.62 mmol) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷, 室温下加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐 (1.5 equiv, 6.93 mmol, 2.63 g), 搅拌十分钟, 随后向反应体系中加入化合物 2-5 (1.1 equiv, 5.08 mmol, 3.0 g) 和 N,N-二异丙基乙胺 (3.0 equiv, 13.86 mmol, 17.91 g), 随后室温继续搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 二氯甲烷, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 50/1 - 10/1), 得到白色固体化合物 2-6 (3.58 g, 3.51 mmol, 76%收率)。化合物 2-6 分子式: $C_{53}H_{73}O_{15}N_3Si$, 分子量: 1019.3, LC-MS 实测: 1018.3 (M-H).

2.7 中间体 2-7 的制备



将化合物 2-6 (3.51 mmol, 3.58 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 吡啶, 室温下加入三乙胺氟化氢 (5.0 equiv, 17.55 mmol, 2.97 g), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后向反应液中加入 100 mL 乙酸乙酯, 并用 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 100 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 50/1 - 10/1), 得到淡黄色油状物化合物 2-7 (2.4 g, 2.65 mmol, 76%收率)。化合物 2-7 分子式: $C_{47}H_{59}O_{15}N_3$, 分子量: 905.3, LC-MS 实测: 904.4 (M-H). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.30 (dd, $J = 4.2, 1.9$ Hz, 1H), 7.29 - 7.25 (m, 5H), 7.19 - 7.15 (m, 4H), 6.85 - 6.81 (m, 4H), 5.40 - 5.34 (m, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.26 - 5.19 (m, 1H), 5.13 (ddd, $J = 14.5, 10.9, 3.3$ Hz, 1H), 4.85 - 4.78 (m, 1H), 4.75 - 4.71 (m, 1H), 4.68 - 4.61 (m, 1H), 4.50 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.18 - 4.11 (m, 2H), 4.06 - 3.97 (m, 1H), 3.90 (dt, $J = 10.6, 6.8$ Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.67 - 3.46 (m, 4H), 3.25 - 3.19 (m, 2H), 2.34 - 2.23 (m, 1H), 2.17 - 2.15 (m, 3H), 2.10 - 2.03 (m, 5H), 1.98 (dt, $J = 12.9, 2.4$ Hz, 4H), 1.76 - 1.61 (m, 4H), 1.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

2.8 化合物 1-1-7 的制备



将化合物 2-7 (2.65 mmol, 2.4 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 无水二氯甲烷 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司)。室温氩气保护下加入化合物 2-氰乙基 N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺 (2.0 equiv, 5.3 mmol, 1.6 g) 和 4,5-二氰咪唑 (1.5 equiv, 3.97 mmol, 470.0 mg), 室温下继续搅拌一小时。反应后向反应液中加入 50 mL 二氯甲烷, 并用 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品经 C18 反相柱 (规格: 30 μ m; 100 $\text{\AA}$, 市售, 购买于上海博蕴生物科技有限公司) (MeCN:H₂O = 75%:25%) 制备得到白色固体 I-1-7 (2.03 g, 1.84 mmol, 70% 收率)。化合物 I-1-7 分子式: C₅₆H₇₆O₁₅N₆P, 分子量: 1105.5, LC-MS 实测: 1128.4 (M+Na). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.12 – 8.06 (m, 1H), 7.78 (dd, J = 9.1, 2.0 Hz, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 4H), 7.23 – 7.17 (m, 5H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 5.21 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.97 (dd, J = 11.2, 3.0 Hz, 1H), 4.86 – 4.75 (m, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.47 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.04 – 3.98 (m, 3H), 3.91 – 3.83 (m, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.70 – 3.60 (m, 3H), 3.58 – 3.47 (m, 3H), 3.39 (t, J = 11.7 Hz, 2H), 3.31 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 3.19 (qd, J = 8.7, 3.8 Hz, 1H), 3.02 (dt, J = 19.9, 6.8 Hz, 1H), 2.78 – 2.70 (m, 1H), 2.60 (td, J = 5.8, 1.8 Hz, 1H), 2.09 (s, 5H), 1.98 (s, 4H), 1.89 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.44 (s, 4H), 1.20 – 0.88 (m, 14H). ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-d₆): δ 148.22 (s), 146.82 (t, J = 35.8 Hz).

二、siRNA 缀合物制备

通过固相亚磷酰胺法, 利用上述步骤制备的化合物 SA51 起始循环, 按照核苷酸排布顺序自 3' -5' 方向逐一连接核苷单体。每连接一个核苷单体都包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应。正义链和反义链采用相同的合成条件。

仪器设备型号: Biolytic Dr. Oligo 48 固相合成仪, 逗点生物 Embed CPG Frits 通用合成柱 DS0200, 逗点生物 96 孔板脱盐柱 DC189650 (80mg)。表 1 为合成 siRNA 缀合物使用的试剂。

表 1

试剂名称	试剂组成	规格	用途	厂家
ACT	0.6M ETT in ACN	4L	活化剂	柯乐玛
Cap A	乙酸酐:乙腈 2:8	4L	盖帽试剂	柯乐玛
Cap B	N-甲基咪唑:吡啶:乙腈 20:30:50	4L		柯乐玛
OXD	50 nM 碘的吡啶溶液:水 90:10	4L	氧化剂	柯乐玛
DCA	二氯乙酸的甲苯溶液 (3% v/v)	1kg	脱 DMT 保护试剂	柯乐玛
乙腈	水含量小于 20ppm (实际 10ppm 左右)	4L	溶剂	柯乐玛
PADS (二硫化二苯乙酰)	将 3-甲基吡啶和乙腈等体积混合后, 配置 0.2M PADS 溶液		硫化试剂	柯乐玛
3-甲基吡啶				柯乐玛

合成条件如下:

核苷单体以 0.05M 浓度的乙腈溶液提供, 每一步的脱保护反应的条件相同, 即温度为 25℃, 反应时间为 3 分钟, 脱保护试剂为 DCA, 进样体积 180 μ L。

每一步偶联反应条件均相同, 包括温度为 25℃, 反应时间为 3 分钟。核苷单体进样体积 90 μ L, 催化剂 ACT 进样体积 110 μ L。

每一步盖帽条件均相同,包括温度为 25℃,反应时间为 2 分钟。盖帽试剂溶液的摩尔比为 1:1 的 CapA 和 CapB (CapB1: CapB2=1:1) 的混合溶液。盖帽试剂进样体积 180 μ L。

每一步氧化反应条件均相同,包括温度为 25℃,反应时间为 3 分钟,氧化试剂 OXD 进样体积为 180 μ L。

每一步硫化反应条件均相同,包括温度为 25℃,反应时间为 4 分钟,硫化试剂为 0.05 M PADS 的吡啶乙腈溶液。硫化试剂进样体积 180 μ L。

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

切割和脱保护条件如下:将合成的连接有载体的核苷酸序列加入氨水:乙醇=3:1 的混合溶液至体积为 0.8 mL。在 50℃ 反应 15h,过滤除去剩余载体,将上清液真空浓缩至干。

纯化和脱盐条件如下:利用 C18 反相色谱柱进行脱盐。具体条件包括:

(1) 样品的准备

向寡核苷酸样品中加入 0.1M 的 TEAA (三乙胺醋酸盐) 至体积为 0.8 mL。

(2) 96 孔板的活化

活化: 0.8 mL 乙腈通过 96 孔板的每个孔中进行活化;

平衡: 用 0.8 mL TEAA (pH 7.0) 溶液进行 96 孔板的平衡。

(3) 纯化过程依次按照如下操作:

将 0.8 mL 包含寡核苷酸的溶液通过脱盐柱;

用 0.8 mL 6.5% 氨水洗涤 96 孔板 2 次, 去除失败的序列;

用 0.8 mL 去离子水冲洗 96 孔板 2 次, 去除盐分;

用 0.8 mL 3% 三氟乙酸冲洗 96 孔板 3 次, 去除 DMT, 观察到吸附层变橙红色;

用 0.8 mL 0.1 M TEAA 冲洗 96 孔板;

用 0.8 mL 去离子水冲洗 96 孔板 2 次, 去除三氟乙酸和残余的盐分;

用 0.6 mL 20% 乙腈进行洗脱, 并收集冻干。

检测方法如下: 使用 Waters Acquity UPLC-LTQ LCMS (column: ACQUITY UPLC BEH C18) 检测上述正义链和反义链纯度并分析分子量。实测值与理论值相符, 表明所合成的是 3' 端和/或 5' 端缀合了基团的正义链以及反义链。

退火操作如下: 将步骤 2 合成获得的正义链和反义链分别溶于注射用水中, 配制 0.1mg/mL-40mg/mL 的溶液, 用浓度仪标定等摩尔比混合, 90℃ 加热 5 分钟, 再缓慢自然降温, 使它们通过氢键形成双链结构, 取样送检测产品的 SEC 纯度。将双链样品冻干。

实施例 3 Ago 单体、Cgo 单体、Ugo 单体的合成及含该单体修饰的 siRNA 的制备

3.1. Ago 单体的合成路线参见本申请人的专利申请号 202310436173.7 的实施例 2, 具体合成方法如下:



(2) 将化合物 2 (14.7 g, 61.7 mmol, 1.0 equiv) 溶于 150 mL 二氯甲烷中, 氮气保护, 室温下加入咪唑 (16.8 g, 247.0 mmol, 4.0 equiv) 与叔丁基二甲基氯硅烷 (27.9 g, 185.0 mmol, 22.7 mL, 3.0 equiv)。反应液在室温下搅拌一小时, TLC 与 LCMS 检测显示化合物 2 消失。反应液中加入 100 mL 二氯甲烷, 400 mL 饱和食盐水洗涤反应液两次, 干燥有机相, 过滤后浓缩有机相, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯=100/1 到 10/1), 得到淡黄色油状物化合物 3 (12.0 g, 34.0mmol, 55%收率)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.25 (m, 5H), 4.52 (d, J = 2.4Hz, 2H), 4.10 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 3.75-3.65 (m, 4H), 3.59 (dd, J = 9.2, 5.3 Hz, 1H), 2.79 (dt, J = 8.4, 5.9 Hz, 1H), 1.17 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.86(s, 9H), 0.04 (d, J = 8.6 Hz, 6H)。

LC-MS: $C_{16}H_{32}O_4Si$, 分子量 352.1, 353.2 (M+H).

(3) 将化合物 3 (11.1 g, 31.5 mmol, 1.0 equiv) 溶于四氢呋喃中, 降温至零下 70℃ 到零下 60℃ 之间, 氮气保护下滴加二异丁基氢化铝 (1.0 M, 69.3 mL, 2.2 equiv)。在此温度下继续搅拌两小时。LCMS 检测显示化合物 3 消失, 升温至 0℃, 加入 20 mL 乙酸乙酯, 再用 100 mL 酒石酸钾钠溶液淬灭反应, 继续搅拌半小时。此混合物用 100 mL 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后过滤浓缩, 得到淡黄色油状物化合物 4 (9.75 g, 30.0 mmol, 95% 收率)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.40-7.27 (m, 5H), 4.59-4.45 (m, 2H), 4.19 (dd, J = 6.2, 3.7 Hz, 1H), 4.01 (dd, J = 11.3, 4.0 Hz, 1H), 3.78-3.60 (m, 3H), 1.78-1.68 (m, 1H), 1.29-1.21 (m, 3H), 0.95-0.87 (m, 9H), 0.12-0.02 (m, 6H)。LC-MS: $C_{18}H_{32}O_3Si$, 分子量 324.1, 325.2 (M+H)。

(4) 将化合物 4 (9.75 g, 30.0 mmol, 1.0 equiv) 溶于四氢呋喃中, 降温至 0℃, 氮气保护下滴加对甲苯磺酰氯 (11.5 g, 60.1 mmol, 2.0 equiv) 与甲基咪唑 (6.17 g, 75.1 mmol, 2.5 equiv), 滴加完毕升温至室温继续搅拌 16 小时。LCMS 检测显示化合物 4 消失。反应液中加入 20 mL 乙酸乙酯, 冰浴下用 100 mL 酒石酸钾钠溶液淬灭反应, 继续搅拌半小时。此混合物用 100 mL 饱和食盐水洗涤后, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得到淡黄色油状物化合物 5 (13.7 g, 28.6 mmol, 95% 收率) 粗产品。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.89-7.68 (m, 2H), 7.42-7.17 (m, 10H), 4.47-4.33 (m, 2H), 4.23 (dd, J = 9.6, 5.1 Hz, 1H), 4.13-4.06 (m, 1H), 4.01-3.94 (m, 1H), 3.52-3.34 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.02-1.89 (m, 1H), 1.10 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.81 (s, 8H), 0.04-0.05 (m, 6H)。LC-MS: $C_{25}H_{38}O_5SSi$, 分子量 478.1, 479.2 (M+H)。

(5) 氮气保护下, 向干燥的反应瓶中加入化合物 5 (13.7 g, 28.6 mmol, 1.0 equiv) 与 35 mL 乙腈, 35-40℃ 下蒸除乙腈, 除去化合物 5 中水分。在氮气保护下, 另一洁净干燥的反应瓶中加入 80 mL N,N-二甲基甲酰胺, 化合物 5-1 (9H-嘌呤-6-胺) (4.25 g, 31.5 mmol, 1.1 equiv) 与碳酸钾 (3.96 g, 28.6 mmol, 1.0 equiv), 升温至 95-100℃ 继续搅拌半小时。此温度下向反应液中滴加化合物 5 (13.7 g, 28.6 mmol, 1.0 equiv) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (60 mL) 溶液, 继续搅拌 12 小时。LCMS 检测显示化合物 5 消失, 反应液降至室温, 加入 200 mL 乙酸乙酯, 此混合溶液依次用 200 mL 碳酸氢钠溶液, 100 mL 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩滤液, 得到的粗产品硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=20/1 到 10/1) 分离纯化, 得到淡黄色油状物化合物 6 (6.2 g, 14.0 mmol, 49% 收率)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.37 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.39-7.24 (m, 6H), 5.66 (br, s, 2H), 4.47-4.34 (m, 3H), 4.21 (dd, J = 14.1, 8.8 Hz, 1H), 4.07 (dd, J = 6.2, 4.9 Hz, 1H), 3.42-3.34 (m, 2H), 2.10-1.96 (m, 1H), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (d, J = 6.0 Hz, 6H)。LC-MS: $C_{23}H_{35}N_5O_2Si$, 分子量 441.1, 442.3 (M+H)。

(6) 室温下将钨碳 (3.0 g, 10% 纯度) 溶于 25 mL 甲醇中, 加入 25 mL 化合物 6 (5.2 g, 11.8 mmol, 1.0 equiv) 甲醇溶液和三氟乙酸 (134.0 mg, 1.18 mmol, 87.2 μ L)。此反应液在 50 psi 氢气压力下搅拌 48 小时。LCMS 检测显示化合物 6 消失。将反应液过滤浓缩得到粗产物淡黄色油状物化合物 7 (3.9 g, 11.1 mmol)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.21 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 4.50-4.36 (m, 1H), 4.33-4.22 (m, 1H), 4.15-4.02 (m, 1H), 3.53 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 2.21-2.09 (m, 1H), 1.25 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (d, J = 3.1 Hz, 6H)。LC-MS: $C_{16}H_{29}N_5O_2Si$, 分子量 351.1, 352.2 (M+1)。

(7) 将化合物 7 (3.9 g, 11.1 mmol, 1.0 equiv) 置于洁净干燥反应瓶中, 氮气保护下加入 10 mL 吡啶, 升温至蒸除吡啶, 重复一次此操作, 以除去化合物 7 中水分。加入 28 mL 吡啶, 冰浴下加入三甲基氯硅烷 (4.8 g, 44.4 mmol, 5.63 mL, 4.0 equiv), 升温至室温, 继续搅拌两小时, TLC 检测显示化合物 7 消失, 冰浴下加入苯甲酰氯 (6.2 g, 44.4 mmol, 5.15 mL, 4.0 equiv), 继续搅拌 2 小时, TLC 检测显示原料反应消失, 滴加 60 mL 水与 90 mL 浓氨水继续搅拌半小时。用 250 mL 乙酸乙酯萃取反应液, 有机相用饱和食盐水洗涤, 干燥后抽滤浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (洗脱体系: 二氯甲烷/甲醇=50/1 到 10/1), 得到淡黄色油状物化合物 8 (4.0 g, 8.78 mmol, 79% 收率)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 9.22-8.90 (m, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.07-8.04 (m, 2H), 8.03 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.57-7.50 (m, 2H), 4.62-4.50 (m, 1H), 4.42 (dd, J = 14.3, 8.6 Hz, 1H), 4.24-4.09 (m, 1H), 4.05 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 3.59-3.48 (m, 1H), 3.47-3.35 (m, 1H), 2.04-1.98 (m, 1H), 1.31 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.98-0.84 (m, 9H), 0.11 (d, J = 10.1 Hz, 5H)。LC-MS:

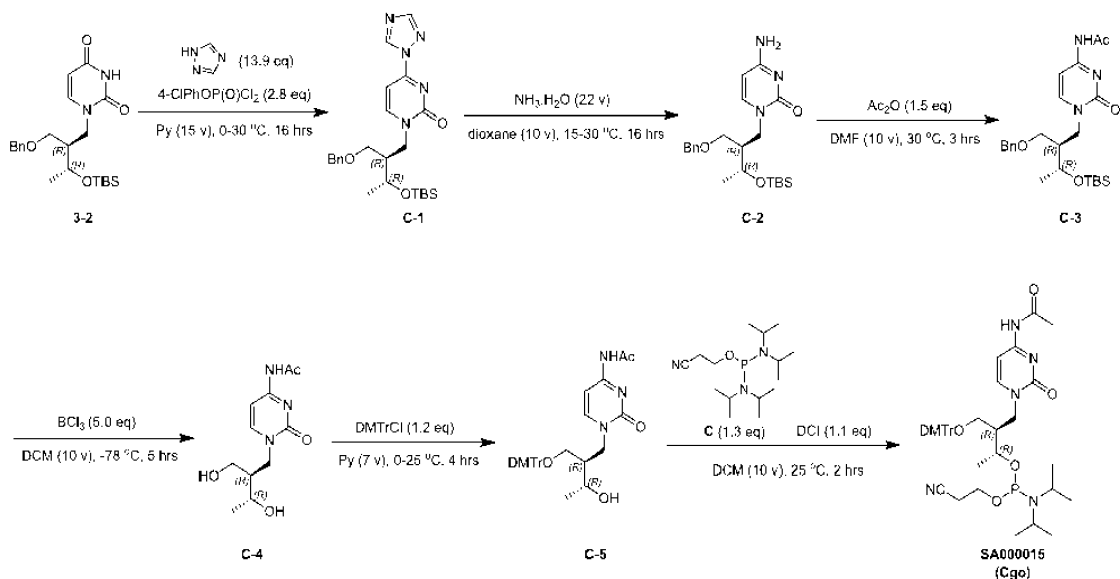
$C_{23}H_{33}N_5O_3Si$, 分子量 455.2, 456.3 (M+H).

(8) 将化合物 8 (4.0 g, 8.78 mmol, 1.0 equiv) 置于洁净干燥反应瓶中, 氮气保护下加入 10 mL 吡啶, 升温蒸除吡啶, 重复一次此操作, 以除去化合物 8 中水分。加入 28 mL 吡啶, 冰浴下加入 4,4'-双(甲氧基三苯甲基)氯 (3.27 g, 9.66 mmol, 1.1 equiv), 升至室温继续搅拌 1 小时, TLC 检测显示化合物 8 消失, 反应混合物中加入 150 mL 乙酸乙酯, 并用 200 mL 碳酸氢钠溶液, 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤有机相并浓缩滤液, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (梯度洗脱: 石油醚/乙酸乙酯=10/1 到 0/1), 得到淡黄色油状物化合物 9 (5.91 g, 7.8 mmol, 88% 收率)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 9.07 (br s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.04 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.65-7.58 (m, 1H), 7.57-7.50 (m, 2H), 7.28-7.13 (m, 9H), 6.81-6.69 (m, 4H), 4.52-4.43 (m, 1H), 4.25 (dd, J = 14.2, 8.6 Hz, 1H), 4.07 (dd, J = 6.3, 4.2 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 4.5 Hz, 6H), 3.22 (dd, J = 9.8, 5.4 Hz, 1H), 3.04 (dd, J = 9.8, 6.1 Hz, 1H), 2.34 (dd, J = 8.1, 4.5 Hz, 1H), 1.19 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.90-0.77 (m, 9H), 0.07-0.09 (m, 6H). LC-MS: $C_{44}H_{51}N_5O_3Si$, 分子量 757.3, 758.4 (M+H).

(9) 将化合物 9 (3.00 g, 3.96 mmol, 1.0 equiv) 溶于四氢呋喃中, 氮气保护、冰浴下加入氢氟酸吡啶盐 (2.26 g, 79.2 mmol, 2.1 mL, 20.0 equiv) 和咪唑 (10.8 g, 158.0 mmol, 40.0 equiv)。升温至室温, 继续搅拌 2 小时。LCMS 检测显示化合物 9 消失。加入 50 mL 乙酸乙酯, 并用 100 mL 碳酸氢钠溶液, 50 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥后过滤, 浓缩滤液, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (梯度洗脱: 石油醚/乙酸乙酯=10/1 到 0/1), 得到淡黄色油状物化合物 10 (2.44 g, 3.79 mmol, 96% 收率)。 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 11.16 (br s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.05 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.69-7.61 (m, 1H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.25-7.12 (m, 5H), 7.05 (t, J = 8.9 Hz, 4H), 6.78 (dd, J = 8.9, 3.1 Hz, 4H), 4.79 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.51-4.28 (m, 2H), 3.81 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 3.70 (s, 6H), 3.10 (dd, J = 9.8, 4.9 Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 9.7, 5.1 Hz, 1H), 2.37-2.23 (m, 1H), 1.03 (d, J = 6.3 Hz, 3H). LC-MS: $C_{38}H_{37}N_5O_3$, 分子量 643.2, 644.2 (M+H).

(10) 将化合物 10 (1.5 g, 2.33 mmol, 1.0 equiv) 置于洁净干燥反应瓶中, 氮气保护下加入 4 mL 乙腈, 升温至 35-40°C 蒸除乙腈, 重复一次此操作, 以除去化合物 10 中水分。室温下向上述反应瓶中加入 15 mL 无水二氯甲烷。再加入化合物 11-1 (1.05 g, 3.5 mmol, 1.1 mL, 1.5 equiv) 与 4,5-二氰咪唑 (358 mg, 3.03 mmol, 1.3 equiv), 室温下继续搅拌一小时。TLC 检测显示化合物 10 消失。加入 30 mL 二氯甲烷, 用碳酸氢钠溶液 (50 mL $\times$ 2), 饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩滤液, 所得粗产品溶于 50 mL 甲基叔丁基醚中, 加入 100 mL 1% 的氢氧化钠水溶液, 搅拌半小时。静置分层收集有机相, 有机相用饱和食盐水洗涤, 干燥后过滤浓缩, 粗产品经 C18 反相柱制备得到淡黄色产物 SA000001 (1.1 g, 1.3 mmol, 56% 收率)。 1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ 9.33 (br s, 1H), 8.61 (br s, 1H), 7.99 (d, J = 11.0 Hz, 3H), 7.67-7.60 (m, 1H), 7.59-7.49 (m, 2H), 7.32-6.99 (m, 9H), 6.75 (td, J = 9.2, 6.5 Hz, 4H), 4.50-4.38 (m, 1H), 4.36-4.13 (m, 2H), 3.72 (dd, J = 4.8, 1.5 Hz, 6H), 3.66-3.45 (m, 3H), 3.25 (td, J = 9.6, 5.4 Hz, 1H), 3.01 (ddd, J = 17.9, 10.0, 5.8 Hz, 1H), 2.62 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 2.53 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 1.32-1.22 (m, 4H), 1.17-1.05 (m, 12H). ^{31}P NMR ($DMSO-d_6$, 162 MHz): δ ppm 147.7, 146.8. LCMS: $C_{47}H_{54}N_7O_6P$, 分子量 843.3, 844.5 (M+H).

3.2. Cgo 单体的合成路线参见本申请人的专利申请号 202310436173.7 的实施例 4, 具体合成方法如下:



(1) 在室温条件下将化合物 3-2 (8.5 g, 20.3 mmol, 由实施例 5 制备) 和 1,2,4-三氮唑 (19.5 g, 282.0 mmol, 13.9 equiv) 溶解于吡啶 (128.0 mL) 中, 随后在冰水浴条件下向反应体系中滴加 4-氯苯基二氯磷酸酯 (56.9 mmol, 9.25 mL, 2.8 equiv)。将反应液在 30 °C 条件下搅拌 16 小时。反应完毕减压蒸馏除去溶剂吡啶, 剩余体系用水和乙酸乙酯萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干得到黄色油状的粗产品化合物 C-1 (9.5 g), 直接用于下一步反应。化合物 C-1 的质谱鉴定 ($C_{24}H_{35}N_3O_3Si$, 分子量 469.1, $[M+H]^+ = 470.3$)。

(2) 在室温条件下将化合物 C-1 (9.5 g, 20.2 mmol) 溶解于 1,4-二氧六环 (95.0 mL) 中, 随后向反应体系中加入氨水 (1.38 mol, 212.1 mL, 25% purity, 68.0 equiv)。将反应液在 30 °C 条件下搅拌 16 小时。反应完毕减压蒸馏除去溶剂, 剩余体系用水和二氯甲烷萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干得到黄色固体的粗产品化合物 C-2 (8.5 g), 直接用于下一步反应。化合物 C-2 的质谱鉴定 ($C_{22}H_{35}N_3O_3Si$, 分子量 417.1, $[M+H]^+ = 418.2$)。

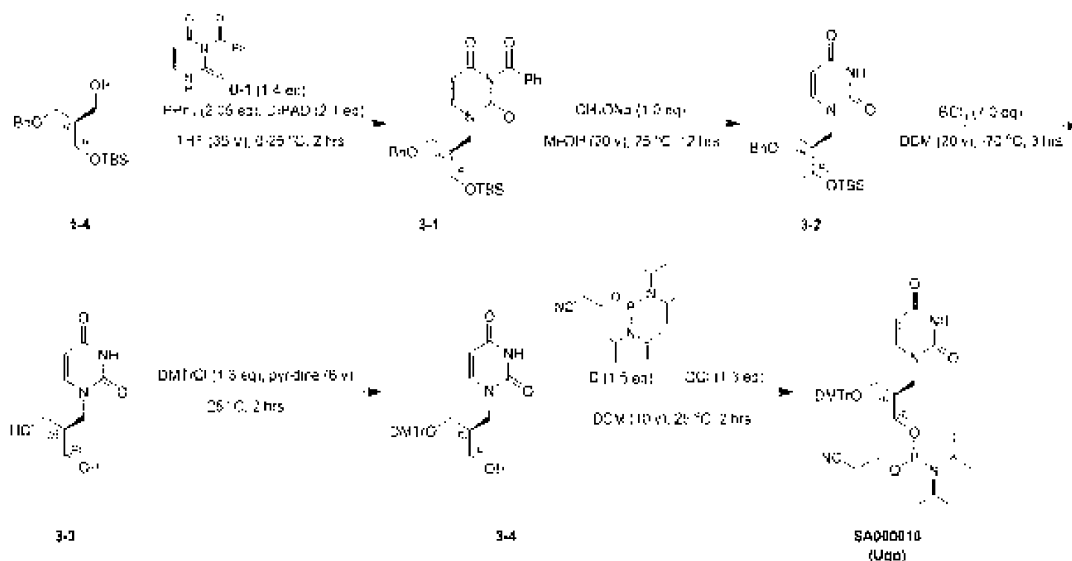
(3) 在室温条件下将化合物 C-2 (8.5 g, 20.2 mmol) 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺 (85.0 mL) 中, 随后向反应体系中缓慢加入醋酸酐 (3.1 g, 30.4 mmol, 2.85 mL, 1.5 equiv)。将反应液在 30 °C 条件下搅拌 3 小时。反应完毕减压蒸馏除去溶剂, 剩余体系用饱和碳酸氢钠溶液和乙酸乙酯萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇 1:0 至 100:1) 进行分离纯化, 得到黄色固体化合物 C-3 (4.2 g, 反应收率 43%)。化合物 C-3 的 1H NMR 数据: (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.7 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.29 (m, 5H), 7.08 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 1.2$ Hz, 2H), 4.05-3.99 (m, 2H), 3.72-3.67 (m, 1H), 3.39 (dd, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.15-2.08 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.15 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.85 (s, 9H), 0.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。化合物 C-3 的质谱鉴定 ($C_{24}H_{37}N_3O_4Si$, 分子量 459.1, $[M+H]^+ = 460.2$)。

(4) 在 -78 °C 条件下将化合物 C-3 (4.3 g, 9.35 mmol) 溶解于二氯甲烷 (46.0 mL) 中, 随后向反应体系中缓慢加入三氯化硼 (1.0 M in DCM, 46.8 mL, 5.0 equiv)。随后将反应液在 -78 °C 条件下搅拌 4 小时。反应完毕用三乙胺 (40.0 mL) 和甲醇 (88.0 mL) 淬灭反应, 剩余体系用水和二氯甲烷萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用 C18 反相柱制备得到白色固体化合物 C-4 (0.96 g, 反应收率 40%)。化合物 C-4 的 1H NMR 数据: (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.7 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.53-4.50 (m, 1H), 4.00-3.99 (m, 1H), 3.75-3.70 (m, 2H), 3.37-3.32 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.81-1.77 (m, 1H), 1.01 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H)。化合物 C-4 的质谱鉴定 ($C_{11}H_{17}N_3O_4$, 分子量 255.1, $[M+H]^+ = 256.2$)。

(5) 在室温条件下将化合物 C-4 (1.5 g, 5.88 mmol) 溶解于吡啶 (10.0 mL) 中, 冰水浴条件下向反应体系中加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯 (2.4 g, 7.05 mmol, 1.2 equiv)。随后将反应液在室温条件下搅拌 4 小时。反应完毕减压蒸馏除去溶剂吡啶, 剩余体系用饱和碳酸氢钠溶液和乙酸乙酯萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯 4:1 至 0:1) 进行分离纯化, 得到白色固体化合物 C-5 (0.7 g, 反应收率 70%)。化合物 C-5 的 ^1H NMR 数据: (400 MHz, CDCl_3) δ 9.71 (s, 1H), 7.39 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 7.35-7.21 (m, 7H), 7.06 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 4.71 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.43 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H), 4.23-3.99 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.50-3.38 (m, 1H), 3.31 (dd, $J = 10.0, 4.1$ Hz, 1H), 2.69 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 1.08 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H)。化合物 C-5 的质谱鉴定 ($\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$, 分子量 557.1, $[\text{M}+\text{H}] = 558.4$)。

(6) 在室温氮气条件下将化合物 C-5 (2.0 g, 3.59 mmol) 溶解于二氯甲烷 (20.0 mL) 中, 分别向反应体系中加入 4,5-二氰基咪唑 (466.0 mg, 3.95 mmol, 1.1 equiv) 和双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦 (1.4 g, 4.66 mmol, 1.48 mL, 1.3 equiv)。随后将反应液在室温条件下搅拌 2 小时。反应完毕将反应液溶解于甲基叔丁基醚 (10.0 mL) 和 1% 氢氧化钠溶液 (10.0 mL), 室温条件下继续搅拌 0.5 小时。剩余体系用饱和碳酸氢钠溶液和二氯甲烷萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用 C18 反相柱制备得到白色固体化合物 SA000015 (1.5 g, 反应收率 55%)。化合物 SA000015 的 ^1H NMR 数据: (400 MHz, CD_3CN) δ 9.15 (s, 1H), 7.50-7.18 (m, 11H), 6.84-6.80 (m, 4H), 4.22-4.08 (m, 2H), 3.75-3.22 (m, 11H), 3.23-3.22 (m, 2H), 2.62-2.51 (m, 2H), 2.38-2.35 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.022-1.07 (m, 15H)。 ^{31}P NMR 数据: (400 MHz, CD_3CN) δ 147.5, 146.7。化合物 SA000015 的质谱鉴定 ($\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$, 分子量 757.1, $[\text{M}+\text{H}] = 758.5$)。

3.3. Ugo 单体的合成路线参见本申请人的专利申请号 202310436173.7 的实施例 5, 具体合成方法如下:



(1) 在冰水浴条件下分别将化合物 1-4 (9.99 g, 30.8 mmol)、化合物 U-1 (市售, 购买于上海皓鸿生物医药科技有限公司) (9.33 g, 43.1 mmol, 1.4 equiv) 和三苯基膦 (16.6 g, 63.2 mmol, 2.0 equiv) 溶解于干燥的四氢呋喃 (350.0 mL) 中, 随后向反应体系中滴加偶氮二甲酸二异丙酯 (13.1 g, 64.7 mmol, 12.6 mL, 2.1 equiv)。随后将反应液在室温条件下搅拌 2 小时。反应完毕用饱和碳酸氢钠溶液和乙酸乙酯萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯 10:1 至 8:1) 进行分离纯化, 得到白色固体化合物 3-1 (16.1 g, 反应收率 99%)。化合物 3-1 的 ^1H NMR 数据: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.89-7.74 (m, 4H), 7.56-7.53 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 5H), 5.80-5.73 (m, 1H), 4.46-4.38 (m, 2H), 4.00-3.91 (m, 2H), 3.60-3.50 (m, 1H), 3.49-3.43 (m, 2H), 2.17-1.98 (m, 1H), 1.13 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (d, $J = 6.0$ Hz, 6H)。化合

物 3-1 的质谱鉴定 ($C_{29}H_{38}N_2O_5Si$, 分子量 522.1, $[M+H]=523.2$).

(2) 室温条件下将化合物 3-1 (8.05 g, 15.4 mmol) 溶解于甲醇 (160.0 mL) 中, 随后向反应体系中缓慢加入甲醇钠 (2.77 g, 15.4 mmol, 30% purity, 1.0 equiv)。随后将反应液在室温条件下搅拌 12 小时。反应完毕减压蒸馏除去溶剂甲醇, 剩余体系用 1M 盐酸溶液和乙酸乙酯萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯 10:1 至 0:1) 进行分离纯化, 得到白色固体化合物 3-2 (6.1 g, 反应收率 94%)。化合物 3-2 的 1H NMR 数据: (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.1 (s, 1H), 7.48 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.30-7.24 (m, 5H), 5.47-5.44 (m, 1H), 4.45-4.35 (m, 2H), 3.98-3.94 (m, 1H), 3.79-3.78 (m, 1H), 3.63-3.57 (m, 1H), 3.38-3.35 (m, 2H), 2.04-1.95 (m, 1H), 1.10 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (d, $J=6.0$ Hz, 6H)。化合物 3-2 的质谱鉴定 ($C_{22}H_{34}N_2O_4Si$, 分子量 418.1, $[M+H]=418.2$).

(3) 在 $-70^\circ C$ 条件下将化合物 3-2 (4.0 g, 9.56 mmol) 溶解于二氯甲烷 (30.0 mL) 中, 随后向反应体系中缓慢加入三氯化硼 (1.0 M in DCM, 66.9 mL, 7.0 equiv)。随后将反应液在 $-70^\circ C$ 条件下搅拌 3 小时。反应完毕用三乙胺 (5.0 mL) 和甲醇 (30.0 mL) 淬灭反应, 剩余体系用水和二氯甲烷萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用 C18 反相柱制备得到白色固体化合物 3-3 (0.7 g, 反应收率 33%)。化合物 3-3 的 1H NMR 数据: (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.54 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.51 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 3.88-3.84 (m, 1H), 3.72-3.70 (m, 1H), 3.61-3.59 (m, 2H), 1.75-1.68 (m, 1H), 1.09 (d, $J=6.4$ Hz, 3H)。化合物 3-3 的质谱鉴定 ($C_9H_{14}N_2O_4$, 分子量 214.1, $[M+H]=215.2$).

(4) 在室温条件下将化合物 3-1 (0.4 g, 1.87 mmol) 溶解于吡啶 (4.0 mL) 中, 冰水浴条件下向反应体系中加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯 (949.0 mg, 2.8 mmol, 1.5 equiv)。随后将反应液在室温条件下搅拌 2 小时。反应完毕减压蒸馏除去溶剂吡啶, 剩余体系用饱和碳酸氢钠溶液和乙酸乙酯萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯 4:1 至 0:1) 进行分离纯化, 得到白色固体化合物 3-4 (0.7 g, 反应收率 70%)。化合物 3-4 的 1H NMR 数据: (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.3 (s, 1H), 7.37 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.33-7.29 (m, 4H), 7.20-7.17 (m, 5H), 6.86-6.83 (m, 4H), 5.40 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J=4.8$ Hz, 2H), 3.83-3.79 (m, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.71-3.68 (m, 1H), 3.08-2.90 (m, 2H), 1.90 (s, 1H), 1.01 (d, $J=6.4$ Hz, 3H)。化合物 3-4 的质谱鉴定 ($C_{30}H_{32}N_2O_6$, 分子量 516.1, $[M+H]=517.4$).

(5) 在室温氮气条件下将化合物 3-4 (1.2 g, 2.32 mmol) 溶解于二氯甲烷 (12.0 mL) 中, 分别向反应体系中加入 4,5-二氧基咪唑 (357.0 mg, 3.02 mmol, 1.3 equiv) 和双(二异丙基氨基)(2-氧基乙氧基)膦 (1.05 g, 3.48 mmol, 1.5 equiv)。随后将反应液在室温条件下搅拌 2 小时。反应完毕将反应液溶解于甲基叔丁基醚 (10.0 mL) 和 1% 氢氧化钠溶液 (10.0 mL), 室温条件下继续搅拌 0.5 小时。剩余体系用乙酸乙酯萃取反应液 3 次, 将有机相合并旋干, 得到的粗产品用 C18 反相柱制备得到白色固体化合物 SA000016 (1.2 g, 反应收率 71%)。化合物 SA000016 的 1H NMR 数据: (400 MHz, CD_3CN) δ 9.39 (s, 1H), 7.39-7.24 (m, 10H), 6.85-6.81 (m, 4H), 5.43-5.39 (m, 1H), 4.21-4.18 (m, 1H), 3.86-3.77 (m, 1H), 3.75 (s, 6H), 3.56-3.53 (m, 5H), 3.28-3.05 (m, 2H), 2.62-2.61 (m, 2H), 2.22-2.19 (m, 2H), 1.22-1.07 (m, 15H)。 ^{31}P NMR 数据: (400 MHz, CD_3CN) δ 147.6, 146.5。化合物 SA000016 的质谱鉴定 ($C_{39}H_{49}N_4O_7P$, 分子量 716.1, $[M+H]=717.5$).

3.4 修饰 siRNA 的制备

反义链的 5' 区域的第 6 或 7 位中的核苷酸位置处包含 Ago、Cgo、Ugo 所示的化学修饰, 该修饰的 siRNA 参照实施例 2 的固相合成获得。

发明人通过前期设计和合成了大量 PD-L1 siRNA, 并经过细胞活性验证, 排除了一些效果不佳的 PD-L1 siRNA, 保留部分活性较好的 PD-L1 siRNA 进行进一步实验, 具体序列参见下表 2 至 4。

下表 2 为 PD-L1 siRNA 的未修饰的正义链及反义链, 下表 3 为 PD-L1 siRNA 的经过修饰的正义链和反义链 (该表从上至下分别为表 1 中各 siRNA 对应的修饰序列), 下表 4 为 siRNA 缀合物序列。其中, 大写字母 A、C、G、U 分别表示腺苷-3'-磷酸、胞苷-3'-磷酸、鸟苷-3'-磷酸、尿苷-3'-磷酸; 小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸; 小写字母 f 表示左侧相邻的一个核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸; 小写字母 s 在大写字母中间表示 s 左右相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基链接;

s 在 3' 端第一个时表示与该字母 s 左侧相邻的一个核苷酸末端为硫代磷酸酯基。SA51 的合成与缀合物合成见实施例 2。

表 2

双链编号	正义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:
SA012-00029	UAUUUGCUGUCUUUAUAUU	1	AAUAUAAAGACAGCAAAUAUC	13
SA012-00031	UUUGCUGUCUUUAUAUUA	2	UGAAUAUAAAGACAGCAAAUA	14
SA012-00102	AGAUGAGGAUAUUUGCUGU	3	ACAGCAAAUAUCCUCAUCU	15
SA012-00138	AAGAUGAGGAUAUUUGCUA	4	UAGCAAAUAUCCUCAUCUU	16
SA012-00104	AUGAGGAUAUUUGCUGUCU	5	AGACAGCAAAUAUCCUCAUCU	17
SA012-00150	GAUAUUUGCUGUCUUUAUA	6	UAUAAAGACAGCAAAUAUC	18
SA012-00227	CCAGAAAGAUGAGGAUAUU	7	AAUAUCCUCAUCUUUCUGGAA	19
SA012-00229	GAGGAUAUUUGCUGUCUUU	8	AAAGACAGCAAAUAUCCUCAU	20
SA012-00272	CUCAAUGCCUCAAUUUGUU	9	AACAAAUUGAGGCAUUGAGUG	21
SA012-00354	UAUUUGCUGUCUUUAUAUA	10	UAUAUAAAGACAGCAAAUAUC	22
SA012-00355	AGAUGAGGAUAUUUGCUGUGA	11	UCAGCAAAUAUCCUCAUCUU	23
SA012-00356	GAGGAUAUUUGCUGUCUUA	12	UAAGACAGCAAAUAUCCUCAU	24
SA012-00340	GUUUUCUGCUUUCUGUCAA	25	UUGACAGAAAGCAGAAAACAA	26
SA012-00183	GAGAUUAGAUCUGAGGAA	27	UUCCUCAGGAUCUAAUCUCU	28

表 3

双链编号	正义链序列 5'-3'	反义链序列 5'-3'
SD003141	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUmUmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmAfAmAmGmAmCmAmGmCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD004135	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUmUmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmAgoAmAmGmAmCmAmGmCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD004136	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUmUmUmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmAfAgoAmGmAmCmAmGmCfAmAfAmUmAmsUmsCm

SD003 143	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmUmAm UmAmUmUmCmAm	UmsGfsAmAmUmAfUmAmAmAmGmAmCmAfG mCfAmAmAmsUmsAm
SD004 137	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmUmAm UmAmUmUmCmAm	UmsGfsAmAmUmAgoUmAmAmAmGmAmCmAfG mCfAmAmAmsUmsAm
SD004 138	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmUmAm UmAmUmUmCmAm	UmsGfsAmAmUmAfUgoUmAmAmAmGmAmCmAfG mCfAmAmAmsUmsAm
SD003 187	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUm UmGmCmUmGmUm	AmsCfsAmGmCmAfAmAmUmAmUmCmCmUfCm AfUmCmUmsUmsUm
SD004 139	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUm UmGmCmUmGmUm	AmsCfsAmGmCmAgoAmAmUmAmUmCmCmUfC mAfUmCmUmsUmsUm
SD004 140	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUm UmGmCmUmGmUm	AmsCfsAmGmCmAfAgoAmAmUmAmUmCmCmUfC mAfUmCmUmsUmsUm
SD003 223	AmsAmsGmAmUmGmAfGfGfAmUmAmUm UmUmGmCmUmAm	UmsAfsGmCmAfAmUmAmUmCmCmUmCfAm UfCmUmUmsUmsCm
SD004 143	AmsAmsGmAmUmGmAfGfGfAmUmAmUm UmUmGmCmUmAm	UmsAfsGmCmAgoAmAmUmAmUmCmCmUmCfA mUfCmUmUmsUmsCm
SD004 144	AmsAmsGmAmUmGmAfGfGfAmUmAmUm UmUmGmCmUmAm	UmsAfsGmCmAfAgoUmAmUmCmCmUmCfA mUfCmUmUmsUmsCm
SD003 189	AmsUmsGmAmGmGmAfUfAfUmUmUmGm CmUmGmUmCmUm	AmsGfsAmCmAfGfCmAfAmAmUmAmUmCfCm UfCmAmsUmsCmsUm
SD004 142	AmsUmsGmAmGmGmAfUfAfUmUmUmGm CmUmGmUmCmUm	AmsGfsAmCmAfGfCgoAmAmUmAmUmCfC mUfCmAmsUmsCmsUm
SD003 765	GmsAmsUmAmUmUmUfGfCfUmGmUmCm UmUmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmAmAfGmAfCmAfAmGmCmAfA mUfAmUmCmsCmsUm
SD004 145	GmsAmsUmAmUmUmUfGfCfUmGmUmCm UmUmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmAmAgoGmAfCmAfAmGmCmAfA mUfAmUmCmsCmsUm
SD003 842	CmsCmsAmGmAmAmAfGfAfUmGmAmGm GmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmCfCmAfCmAfAmUmCmUmUfUm CfUmGmGmsAmsAm
SD004 129	CmsCmsAmGmAmAmAfGfAfUmGmAmGm GmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmCgoCmAfCmAfAmUmCmUmUfU mCfUmGmGmsAmsAm
SD004 130	CmsCmsAmGmAmAmAfGfAfUmGmAmGm GmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmCfCgoCmAfCmAfAmUmCmUmUfU mCfUmGmGmsAmsAm
SD003 844	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmCmUm GmUmCmUmUmUm	AmsAfsAmGmAfCmAfCmAfAmAmAmUmAfU mCfCmAmsUmsAm
SD004 131	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmCmUm GmUmCmUmUmUm	AmsAfsAmGmAfCgoCmAfCmAfAmAmAmUmAfU mCfCmAmsUmsAm
SD004 132	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmCmUm GmUmCmUmUmUm	AmsAfsAmGmAfCgoCmAfCmAfAmAmAmUmAfU mCfCmAmsUmsAm
SD003 887	CmsUmsCmAfAmUmGfCfCfUmCmAfAm UmUmUmGmUmUm	AmsAfsCmAfAmAfUmUmGmAfCmAfAmGmCmAfU mUfGmAmsUmsGm
SD004 133	CmsUmsCmAfAmUmGfCfCfUmCmAfAm UmUmUmGmUmUm	AmsAfsCmAfAmAgoUmUmGmAfCmAfAmGmCmAfU mUfGmAmsUmsGm

SD004 134	CmsUmsCmAmAmUmGfCfCfUmCmAmAm UmUmUmGmUmUm	AmsAfsCmAmAmAfUgoUmGmAmGmGmCmAfU mUfGmAmGmsUmsGm
SD004 740	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUm UmAmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmUmAfAmAmGmAmCmAmGmCfA mAfAmUmAmsUmsCm
SD004 741	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUm UmAmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmUmAgoAmAmGmAmCmAmGmCfA mAfAmUmAmsUmsCm
SD004 742	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUm UmAmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmUmAfAgoAmGmAmCmAmGmCfA mAfAmUmAmsUmsCm
SD004 743	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUm UmGmCmUmGmAm	UmsCfsAmGmCmAfAmAmUmAmUmCmCmUfCm AfUmCmUmsUmsUm
SD004 744	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUm UmGmCmUmGmAm	UmsCfsAmGmCmAgoAmAmUmAmUmCmCmUfC mAfUmCmUmsUmsUm
SD004 745	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUm UmGmCmUmGmAm	UmsCfsAmGmCmAfAgoAmAmUmAmUmCmCmUfC mAfUmCmUmsUmsUm
SD004 746	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmCmUm GmUmCmUmUmAm	UmsAfsAmGmAmCfAmGmCmAmAmAmUmAfU mCfCmUmCmsAmsUm
SD003 955	GmsUmsUmUmUmCmUfGfCfUmUmUmCm UmGmUmCmAmAm	UmsUfsGmAmCmAfGmAmAmAmGmCmAmGfA mAfAmAmCmsAmsAm
SD003 798	GmsAmsGmAmUmUmAfGfAfUmCmCmUm GmAmGmGmAmAm	UmsUfsCmCmUmCfAmGmGmAmUmCmUmAfAm UfCmUmCmsCmsUm

表 4

缀合双 链编号	正义链序列 5'-3'	反义链序列 5'-3'
SD0041 77	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUmUm AmUmAmUmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsAfsUmAmUmAfAmAmGmAmCmAm GmCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD0042 38	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUmUm AmUmAmUmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsAfsUmAmUmAgoAmAmGmAmCmA mGmCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD0042 39	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUmUmUm AmUmAmUmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsAfsUmAmUmAfAgoAmGmAmCmA mGmCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD0041 78	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmUmAmUm AmUmUmCmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsGfsAmAmUmAfUmAmAmAmGmAm CmAfGmCfAmAmAmsUmsAm
SD0041 79	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmUmAmUm AmUmUmCmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsGfsAmAmUmAgoUmAmAmAmGmA mCmAfGmCfAmAmAmsUmsAm
SD0042 40	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmUmAmUm AmUmUmCmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsGfsAmAmUmAfUgoAmAmAmGmA mCmAfGmCfAmAmAmsUmsAm
SD0041 80	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUmUm GmCmUmGmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsCfsAmGmCmAfAmAmUmAmUmCm CmUfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD0042 41	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUmUm GmCmUmGmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsCfsAmGmCmAgoAmAmUmAmUmC mCmUfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD0042 42	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmUmUmUm GmCmUmGmAms-SA51-SA51-SA51	VPumsCfsAmGmCmAfAgoAmAmUmAmUmCm CmUfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD0041	GmsAmsUmAmUmUmUfGfCfUmGmUmCmUm	VPumsAfsUmAmAmAfGmAmCmAmGmCm

81	UmUmAmUmAms-SA51-SA51-SA51	AmAfAmUfAmUmCmsCmsUm
SD0042	GmsAmsUmAmUmUmUfGfCfUmGmUmCmUm	VPumsAfsUmAmAmAgoGmAmCmAmGmC
43	UmUmAmUmAms-SA51-SA51-SA51	mAmAfAmUfAmUmCmsCmsUm
SD0041	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmCmUmGm	VPumsAfsAmGmAmCfAmGmCmAmAmAm
82	UmCmUmUmAms-SA51-SA51-SA51	UmAfUmCfCmUmCmsAmsUm

实施例 4 IC50 体外筛选：Dual-Glo®双萤光素酶测定法

在体外利用 Dual-Glo®双萤光素酶测定法测试靶向 PD-L1 的 siRNA 的活性。siRNA 初步转染的终浓度为 10nM，对 10nM 浓度下活性剩余百分比小于 35%的化合物进行两浓度 1 nM 和 0.2 nM 活性筛选，从经过两浓度筛选出的优选化合物进行 IC50 筛选。

1) 细胞培养和质粒/siRNA 共转染

HEK293 细胞培养于 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 (Gibco, C11995500BT) 中，在 37℃，5% CO₂ 条件下，生长至汇合度 90%左右，然后通过胰蛋白酶 (Thermo, 25200072) 消化，将细胞重悬。将完整的人 PD-L1 参考序列(NM_014143.4)克隆到双萤光素酶 psiCHECK2TM 载体多克隆位点 XhoI 和 NotI 之中，构建 hs-psiCHECK 质粒。使用 Lipofectamine™2000 Transfection Reagent(Thermo, 11668500)将双萤光素酶质粒与 siRNA 共转染进 1x10⁴ 个细胞中。采用 96 孔板，每孔将 0.3 μL 的 Lipofectamine™2000 加入到含有 20 ng 质粒载体和 siRNA 的 19.7 μL Opti-MEM (Gibco, 31985070) 中，并使其在室温下孵育 15 分钟，将混合物加入 96 板中。然后加入重悬于 80 μL 新鲜含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 (Gibco, C11995500BT) 的细胞。将细胞孵育 24 小时，检测萤光素酶 (翊圣生物, 11405ES80)。

2) Dual-Glo®双萤光素酶测定

在 siRNA 转染 24 小时后，测量双萤光素酶即萤火虫萤光素酶(内参对照)和海肾萤光素酶(PolyA 后插入 PD-L1 靶序列，融合成一条 mRNA)。参照产品说明手册 (翊圣生物, 11405ES80)，首先在多功能酶标仪 (Biotek, Synergy LX) 上检测萤火虫萤光素酶发光信号，然后检测海肾萤光素酶发光信号。海肾萤光素酶在微孔板上的检测顺序应与萤火虫萤光素酶的检测顺序相同。

将各孔的海肾萤光素酶信号读值对萤火虫萤光素酶(对照)信号进行比值均一化，然后与转染有相同质粒但未经 siRNA 处理的细胞比较，评估各 siRNA 的活性。所有转染设置复孔。

结果以相对于未加 siRNA 的对照组 (对照组为 100%) 的剩余百分比表示，数据见表 5。从表 5 可见，除了 SD003798 和 SD003955 以外，其他各组的实验结果较佳，对效果较好的 siRNA 进行进一步研究。

表 5

化合物编号	Hs-psiCHECK IC50 (nM)
SD003141	0.0168
SD003143	0.0338
SD003187	0.0174
SD003189	0.0524
SD003223	0.0263
SD003765	0.0164
SD003798	0.2531
SD003842	0.0342
SD003844	0.0286
SD003887	0.0151
SD003955	0.2154

实施例 5 siRNA 在 SNU-387 细胞中的活性，IC50 体外筛选

在 SNU-387 细胞中采用 8 个浓度 (10 nM 开始 3 倍稀释，共 8 个浓度点) 开展 IC50 体外筛选。

SNU-387 细胞培养于 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (Thermo, 11875119) 中, 培养条件 37℃, 5% CO₂, 然后通过胰蛋白酶消化, 将细胞重悬。使用 RNAiMAX (Thermo, 13778150) 将 siRNA 共转染进 2x10⁴ 个细胞中。采用 96 孔板, 每孔将 0.3 μL 的 RNAiMAX 加入到含有不同浓度的 siRNA 的 19.7 μL Opti-MEM (Gibco, 31985070) 中, 并使其在室温下孵育 15 分钟, 将混合物加入 96 孔板中, 然后加入重悬于 80 μL 新鲜含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (Thermo, 11875119) 中的细胞。将细胞孵育 24 小时, 利用组织细胞提取试剂盒 (志昂生物, MNTR/FX96) 提取 RNA, 进行反转录 cDNA (Takara, 6210B), 通过 SYBR Green qPCR (Vazyme, Q711) 测量 PD-L1 基因的表达水平, 具体操作方法见相应说明书。

目的基因 PD-L1 引物和探针:

正向引物: TGCAGGGCATTCCAGAAAGAT (SEQ ID NO.29);

反向引物: CCTTGGGAACCGTGACAGTA (SEQ ID NO.30);

内参基因 β-Actin 引物:

正向引物: TGCACCACCAACTGCTTAGC (SEQ ID NO.31);

反向引物: ACTGTGGTCATGAGTCCTTCCA (SEQ ID NO.32);

与未经 siRNA 处理的细胞比较计算不同浓度下的相对水平, 并计算 IC₅₀ 值, 结果见表 6 和图 1。结果显示, SD003141、SD003143、SD003187、SD003842、SD003844、SD003887 活性相对较好。

表 6

化合物编号	IC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)
SD003141	0.32	68.17
SD003143	0.53	72.72
SD003187	0.34	65.89
SD003189	3.66	57.75
SD003223	12.76	55.34
SD003765	19.35	52.04
SD003842	0.78	63.95
SD003844	0.94	57.36
SD003887	0.83	52.52

实施例 6 包含不同化学修饰的 siRNA 体外在靶和脱靶评估

利用双荧光素酶报告基因检测不同化学修饰的 siRNA 在靶活性和脱靶活性。

HEK293 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。参照产品说明手册, 利用 Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, 11668019) 将报告基因质粒和不同浓度 (终浓度 90 nM 开始, 3 倍稀释, 共 11 个浓度) 的 siRNA 共同转染至细胞中。转染 24 小时后利用双荧光素酶检测试剂盒 (翊圣生物, 11405ES80) 进行检测。在报告子质粒的海肾荧光素酶的 3' 非翻译区分别插入与反义链互补配对的序列 (为在靶报告质粒) 和含有与正义链 5' 端 12-19 位点一致的五个串联的序列 (为脱靶报告质粒)。报告子质粒中都含有萤火虫荧光素酶, 作为内参。只转染质粒的组作为对照组。将各孔的海肾荧光素酶信号读值对萤火虫荧光素酶(对照)信号进行比值均一化, 然后与转染有相同质粒但未经 siRNA 处理的细胞比较计算不同浓度下的相对水平, 并计算 IC₅₀ 值, 结果见表 7。结果显示, 部分序列在反义链的 5' 区域的第 6 或 7 位中的核苷酸进行修饰不影响活性的同时改善脱靶作用, 提高了 siRNA 的安全性。

表 7

化合物编号	在靶		脱靶	
	IC ₅₀ (nM)	E _{max}	IC ₅₀ (nM)	E _{max}
SD003141	0.016	86.05%	>90	27.60%
SD004135	0.034	86.25%	>90	13.80%

SD004136	0.022	80.20%	>90	18.40%
SD003143	0.021	81.35%	0.429	83.85%
SD004137	0.025	85.50%	0.996	73.25%
SD004138	0.051	80.00%	>90	44.60%
SD003187	0.013	85.95%	>90	8.50%
SD004139	0.032	85.50%	>90	12.15%
SD004140	0.034	84.50%	>90	16.85%
SD003223	0.114	79.10%	4.577	67.55%
SD004143	0.098	82.80%	>90	45.25%
SD004144	0.312	80.75%	>90	10.05%
SD003189	0.092	78.90%	0.358	89.90%
SD004142	0.054	73.60%	6.663	55.70%
SD003765	0.029	74.85%	3.795	57.30%
SD004145	0.055	79.10%	>90	43.25%
SD003842	0.019	78.25%	0.037	88.10%
SD004129	0.032	81.95%	>90	53.90%
SD004130	0.029	80.75%	>90	51.80%
SD003844	0.064	75.75%	>90	52.85%
SD004131	0.063	77.70%	>90	48.75%
SD004132	0.127	68.55%	>90	45.60%
SD003887	0.071	70.65%	1.865	61.45%
SD004133	>10	50.50%	>90	22.90%
SD004134	>10	46.80%	>90	25.75%
SD004740	0.006	90.10%	>90	27.95%
SD004741	0.015	88.95%	>90	22.85%
SD004742	0.013	86.95%	>90	29.10%
SD004743	0.016	89.55%	>90	20.30%
SD004744	0.011	93.50%	>90	15.00%
SD004745	0.024	90.35%	>90	19.75%
SD004746	0.001	88.70%	>90	25.50%

实施例7 包含不同化学修饰的 siRNA 在 HDI 小鼠体内活性

在本实施例中，综合体外在靶和脱靶评估结果，选取 siRNA 进行缀合合成，在 HDI 小鼠模型中测评体内活性。siRNA 缀合物合成为实施例2通过固相合成获得。

在缀合物给药前至少 14 天，对六至八周龄雌性 Balb/C 小鼠（浙江维通利华）通过高压尾静脉注射构建人源化表达 PD-L1 的小鼠，在 5-7 秒内通过尾静脉将 2 μ g 含有 PD-L1 mRNA 序列的质粒注射至小鼠中，以产生 PD-L1-SEAP 模型小鼠(Zhang G 等人, “High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injection of naked plasmid DNA.” Human Gene Therapy 1999 Vol. 10, p1735-1737.)。PD-L1 siRNA 缀合物对 PD-L1 表达的抑制导致分泌型碱性磷酸酶（SEAP）表达的抑制。在给药前 1 天，通过眼眶采血，收集血清，根据产品说明书，用 Phospha-Light SEAP 报导基因分析系统(Invitrogen)来测量血清中的 SEAP 表达水平，且根据平均 SEAP 水平对小鼠进行分组。其中实验组小鼠给予缀合物，溶媒组小鼠给予磷酸盐

缓冲盐水（PBS），按照每只小鼠给予 3 mg/kg 缀合物的剂量进行皮下给药。给药后 7 天、28 天再次采血，收集血清，并根据产品说明书，用 Phospha-Light SEAP 报导基因分析系统(Invitrogen)来测量血清中的 SEAP 表达水平。将各动物给药后的 SEAP 水平除以该动物给药前的 SEAP 水平，以确定“针对处理前归一化”的表达比率。

结果以各组给药前后血清 SEAP 的剩余表达水平表示（溶媒组为 100%），相对剩余表达水平结果如表 8 和图 2 所示，在给药后 7 天缀合物 SD004177、SD004178、SD004179、SD004240、SD004180、SD004241、SD004242、SD004181、SD004182 活性较好，抑制率大于 80%，给药后 28 天，SD004178 和 SD004180 化合物仍然保持大于 80%的活性，体现了长效性。

表 8

化合物	第 7 天 SEAP 表达剩余水平%		第 28 天 SEAP 表达剩余水平%	
	AVG	SD	AVG	SD
PBS	105.53	15.05	107.52	26.10
SD004177	13.23	2.78	54.51	15.79
SD004238	36.22	8.97	110.70	64.21
SD004239	55.65	9.61	110.45	21.50
SD004178	5.77	0.73	15.81	2.55
SD004179	11.04	3.24	31.85	11.20
SD004240	17.91	4.65	61.86	15.78
SD004180	5.71	1.58	16.05	8.32
SD004241	11.88	3.12	18.08	8.19
SD004242	13.51	3.02	58.12	6.28
SD004181	18.42	2.41	30.49	11.83
SD004243	45.14	16.00	98.98	29.76
SD004182	10.12	3.69	25.23	23.31

本实施例利用 HDI 模型，可在体内检测基于人 PD-L1 基因水平，从而能够更好的预测人源 PD-L1 mRNA 体内活性，为药物的临床试验以及药物上市提供更多且更可靠的实验数据。

实施例 8 siRNA 在 hPD-1/PD-L1 人源化小鼠 AAV-HBV（乙型肝炎病毒）模型中体内药效

在本实例中，评估 siRNA 在 hPD-1/PD-L1 人源化小鼠 AAV-HBV 模型中的体内药效，测试抗乙肝病毒活性。siRNA 缀合物合成为实施例 2 通过固相合成获得。

缀合物给药前 6 周，构建 hPD-1/PD-L1 人源化小鼠 AAV-HBV 模型。通过向 6-8 周龄 B6- hPD-1/PD-L1 雌性小鼠尾部静脉注射 rAAV8-1.3HBV，制备持续性 HBV 感染的小鼠动物模型。AAV 病毒注射剂量为 1E+11vg/只，注射病毒 6 周后对动物进行下颌下取血，取血后离心，离心条件为 5000 rpm，4℃，离心 10 分钟。用 PBS 稀释血清，需按照实际情况确定稀释倍数。然后将稀释后的样品送至北京迪安医学检验实验室有限公司进行检测 HBsAg（乙型肝炎表面抗原），其测定结果按照稀释倍数进行回算。HBsAg 定量方法为直接电化学发光法。根据 HBsAg 水平分组，在第 0 天对动物分别皮下注射，注射剂量为 7.5 mg/kg 体重，每周给药 1 次，在实验进展至第 49 天取血检测 HBsAg 水平，评估 siRNA 抗乙肝病毒的活性。

给药后 49 天 HBsAg 降低见表 9，结果表明 SD004178 和 SD004180 均能显著降低 HBsAg 水平。

表 9

化合物编号	给药后 49 天 HBsAg 降低 log10	
	AVG	SD
PBS	-0.25	0.49
SD004180	-1.66	0.07

SD004178	-1.62	0.08
----------	-------	------

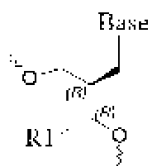
以上对本发明做了详尽的描述，其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本发明的内容并加以实施，并不能以此限制本发明的保护范围，凡根据本发明的精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围内。

权 利 要 求 书

1、一种 siRNA，其包括正义链和反义链，其特征在于：所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，所述正义链包括选自 SEQ ID NO.1 至 12 所示核苷酸序列中的一种或上述序列不超过 3 个碱基突变的核苷酸序列，所述反义链包括选自 SEQ ID NO.13 至 24 所示核苷酸序列中的一种或上述序列不超过 5 个碱基突变的核苷酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的 siRNA，其特征在于：按照 5' 到 3' 的方向，所述正义链的碱基突变在其核苷酸序列的 3' 末端，所述反义链的碱基突变在其核苷酸序列的 5' 末端、第 2~8 位、3' 端最后两位中的任意一位或多位。

3、根据权利要求 1 所述的 siRNA，其特征在于：所述修饰的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₃ 修饰的核苷酸、2'-O-CH₂-CH=CH₂ 修饰的核苷酸、2'-CH₂-CH₂-CH=CH₂ 修饰的核苷酸、2'-脱氧基核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、硫代磷酸酯键修饰的核苷酸、VP 修饰的



核苷酸、LNA、ENA、cETBNA、UNA、GNA 和

中的一种或多种的组合，其中，R1

为 H、OH 或 CH₃，Base 为天然核碱基、修饰的核碱基、通用碱基或 H 原子。

4、根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的 siRNA，其特征在于：所述正义链或所述反义链中的一个及以上的核苷酸为修饰的核苷酸。

5、根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的 siRNA，其特征在于：按照 5' 到 3' 的方向，所述正义链的第 7、8 和 9 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，所述正义链的其他位置的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸；按照 5' 到 3' 的方向，所述反义链的第 2、14 和 16 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，所述反义链的除第 2、6、7、14 和 16 位以外的位置的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸；所述 siRNA 中以下核苷酸之间的连接中至少一个为硫代磷酸酯基连接：

所述正义链的 5' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；

所述正义链的 5' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；

所述正义链的 3' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；

所述正义链的 3' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；

所述反义链的 5' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；

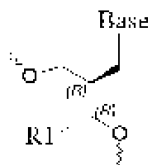
所述反义链的 5' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；

所述反义链的 3' 端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；

所述反义链的 3' 端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；

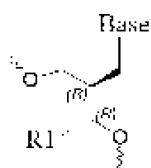
所述正义链的 3' 末端为硫代磷酸酯基，所述反义链的 5' 末端为 VP 修饰的核苷酸。

6、根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的 siRNA，其特征在于：按照 5' 到 3' 的方向，所述反义链的第 6 位



为 2'-氟代修饰的核苷酸或

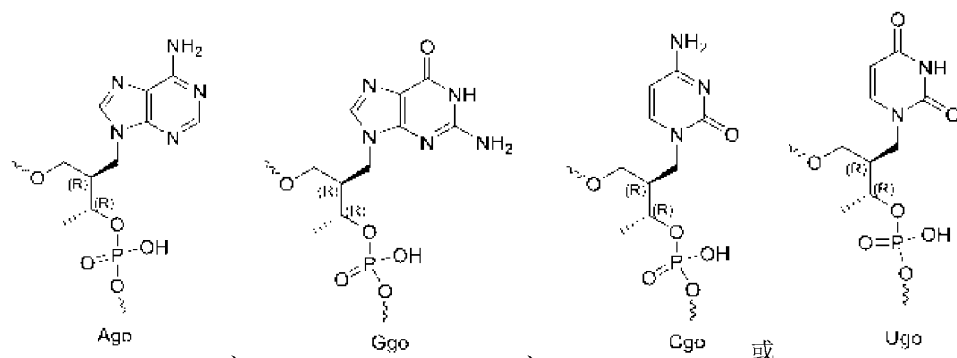
，所述反义链的第 7 位为 2'-甲氧基修饰的核苷酸或



，其中，R1 为 H、OH 或 CH₃，Base 为天然核碱基、修饰的核碱基、通用碱基或 H

原子。

7、根据权利要求 6 所述的 siRNA，其特征在于：所述反义链的第 6 位或第 7 位的核苷酸为



8、根据权利要求 1 所述的 siRNA，其特征在于：所述 siRNA 为如下表所示序列中的任一条：

双链编号	正义链序列 5'-3'	反义链序列 5'-3'
SA012-00029	UAUUUGCUGUCUUUAUAUU	AAUAUAAAAGACAGCAAAUAUC
SA012-00031	UUUGCUGUCUUUAUAUUCA	UGAAUAUAAAAGACAGCAAAUA
SD003141	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmUm UmUmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmAfAmAmGmAmCmAmGmC fAmAfAmUmAmsUmsCm
SD003143	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmUm AmUmAmUmUmCmAm	UmsGfsAmAmUmAfUmAmAmAmGmAmCmA fGmCfAmAmAmsUmsAm

9、根据权利要求 1 所述的 siRNA，其特征在于：所述 siRNA 为如下表所示序列中的任一条：

双链编号	正义链序列 5'-3'	反义链序列 5'-3'
SA012-00102	AGAUGAGGAUAUUUGCUGU	ACAGCAAAUAUCCUCAUCUUU
SA012-00138	AAGAUGAGGAUAUUUGCUGA	UAGCAAAUAUCCUCAUCUUUC
SA012-00104	AUGAGGAUAUUUGCUGUCU	AGACAGCAAAUAUCCUCAUCU
SA012-00150	GAUAUUUGCUGUCUUUAUA	UAUAAAAGACAGCAAAUAUCCU
SA012-00227	CCAGAAAGAUGAGGAUAUU	AAUAUCCUCAUCUUUCUGGAA
SA012-00229	GAGGAUAUUUGCUGUCUUU	AAAGACAGCAAAUAUCCUCAU
SA012-00272	CUCAAUGCCUCAAUUUGUU	AACAAAUUGAGGCAUUGAGUG
SD003187	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmU mUmUmGmCmUmGmUm	AmsCfsAmGmCmAfAmAmUmAmUmCmCm UfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD003223	AmsAmsGmAmUmGmAfGfGfAmUmA mUmUmUmGmCmUmAm	UmsAfsGmCmAmAfAmUmAmUmCmCmUm CfAmUfCmUmUmsUmsCm
SD003189	AmsUmsGmAmGmGmAfUfAfUmUmU mGmCmUmGmUmCmUm	AmsGfsAmCmAmGfCmAmAmAmUmAmUm CfCmUfCmAmUmsCmsUm
SD003765	GmsAmsUmAmUmUmUfGfCfUmGmU	UmsAfsUmAmAmAfGmAmCmAmGmCmAm

	mCmUmUmUmAmUmAm	AfAmUfAmUmCmsCmsUm
SD003842	CmsCmsAmGmAmAmAfGfAfUmGmA mGmGmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmCfCmUmCmAmUmCmUm UfUmCfUmGmGmsAmsAm
SD003844	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmC mUmGmUmCmUmUmUm	AmsAfsAmGmAmCfAmGmCmAmAmAmUm AfUmCfCmUmCmsAmsUm
SD003887	CmsUmsCmAmAmUmGfCfCfUmCmAm AmUmUmUmGmUmUm	AmsAfsCmAmAmAfUmUmGmAmGmGmCm AfUmUfGmAmGmsUmsGm

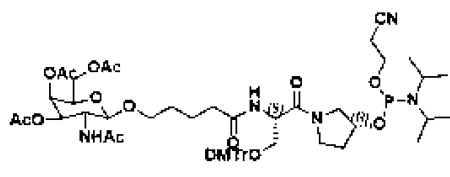
10、根据权利要求1所述的 siRNA，其特征在于：所述 siRNA 为如下表所示序列中的任一条：

双链编号	正义链序列 5'-3'	反义链序列 5'-3'
SA012-00354	UAUUUGCUGUCUUUAUAUA	UAUAUAAAGACAGCAAUAUC
SA012-00355	AGAUGAGGAUAUUUGCUGA	UCAGCAAUAUCCUCAUCUUU
SA012-00356	GAGGAUAUUUGCUGUCUUA	UAAGACAGCAAUAUCCUCAU
SD004135	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmU mUmUmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmAgoAmAmGmAmCmAmG mCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD004136	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmU mUmUmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmAfAgoAmGmAmCmAmG mCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD004137	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmU mAmUmAmUmUmCmAm	UmsGfsAmAmUmAgoUmAmAmAmGmAmC mAfGmCfAmAmAmsUmsAm
SD004138	UmsUmsUmGmCmUmGfUfCfUmUmU mAmUmAmUmUmCmAm	UmsGfsAmAmUmAfUgoAmAmAmGmAmC mAfGmCfAmAmAmsUmsAm
SD004139	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmU mUmUmGmCmUmGmUm	AmsCfsAmGmCmAgoAmAmUmAmUmCmC mUfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD004140	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmU mUmUmGmCmUmGmUm	AmsCfsAmGmCmAfAgoAmUmAmUmCmCm UfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD004143	AmsAmsGmAmUmGmAfGfGfAmUmA mUmUmUmGmCmUmAm	UmsAfsGmCmAmAgoAmUmAmUmCmCmU mCfAmUfCmUmUmsUmsCm
SD004144	AmsAmsGmAmUmGmAfGfGfAmUmA mUmUmUmGmCmUmAm	UmsAfsGmCmAmAfAgoAmUmAmUmCmCmU mCfAmUfCmUmUmsUmsCm
SD004142	AmsUmsGmAmGmGmAfUfAfUmUmU mGmCmUmGmUmCmUm	AmsGfsAmCmAmGfCgoAmAmAmUmAmU mCfCmUfCmAmUmsCmsUm
SD004145	GmsAmsUmAmUmUmUfGfCfUmGmU mCmUmUmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmAmAgoGmAmCmAmGmCmA mAfAmUfAmUmCmsCmsUm
SD004129	CmsCmsAmGmAmAmAfGfAfUmGmA mGmGmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmCgoCmUmCmAmUmCmU mUfUmCfUmGmGmsAmsAm
SD004130	CmsCmsAmGmAmAmAfGfAfUmGmA mGmGmAmUmAmUmUm	AmsAfsUmAmUmCfCgoUmCmAmUmCmUm UfUmCfUmGmGmsAmsAm
SD004131	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmC mUmGmUmCmUmUmUm	AmsAfsAmGmAmCgoAmGmCmAmAmAmU mAfUmCfCmUmCmsAmsUm
SD004132	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmC mUmGmUmCmUmUmUm	AmsAfsAmGmAmCfAgoGmCmAmAmAmU mAfUmCfCmUmCmsAmsUm
SD004133	CmsUmsCmAmAmUmGfCfCfUmCmA mAmUmUmUmGmUmUm	AmsAfsCmAmAmAgoUmUmGmAmGmGmC mAfUmUfGmAmGmsUmsGm

SD004134	CmsUmsCmAmAmUmGfCfCfUmCmA mAmUmUmUmGmUmUm	AmsAfsCmAmAmAfUgoUmGmAmGmGmC mAfUmUfGmAmGmsUmsGm
SD004740	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmU mUmUmAmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmUmAfAmAmGmAmCmAmGm CfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD004741	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmU mUmUmAmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmUmAgoAmAmGmAmCmAmG mCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD004742	UmsAmsUmUmUmGmCfUfGfUmCmU mUmUmAmUmAmUmAm	UmsAfsUmAmUmAfAgoAmGmAmCmAmG mCfAmAfAmUmAmsUmsCm
SD004743	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmU mUmUmGmCmUmGmAm	UmsCfsAmGmCmAfAmAmUmAmUmCmCm UfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD004744	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmU mUmUmGmCmUmGmAm	UmsCfsAmGmCmAgoAmAmUmAmUmCmC mUfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD004745	AmsGmsAmUmGmAmGfGfAfUmAmU mUmUmGmCmUmGmAm	UmsCfsAmGmCmAfAgoAmUmAmUmCmCm UfCmAfUmCmUmsUmsUm
SD004746	GmsAmsGmGmAmUmAfUfUfUmGmC mUmGmUmCmUmUmAm	UmsAfsAmGmAmCfAmGmCmAmAmAmUm AfUmCfCmUmCmsAmsUm

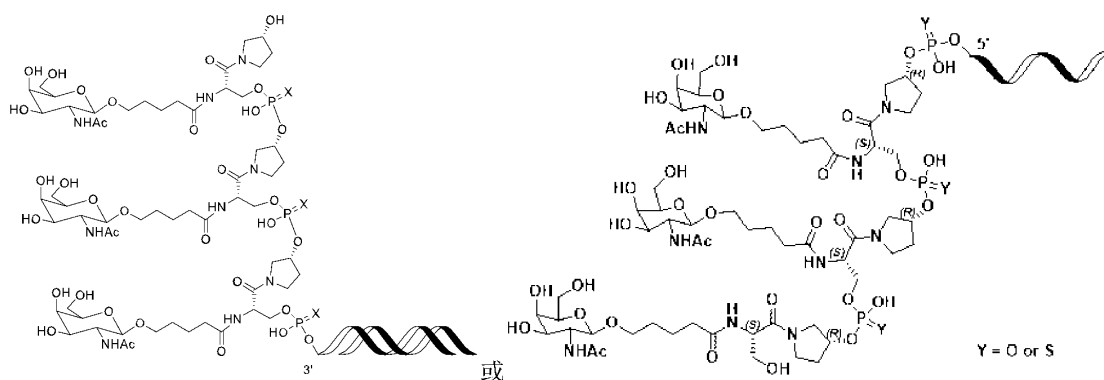
11、一种 siRNA 缀合物，其特征在于：其包括权利要求 1 至 10 中任一项所述的 siRNA 中的一条或多条，以及缀合至所述 siRNA 的缀合基团。

12、根据权利要求 11 所述的 siRNA 缀合物，其特征在于：所述缀合基团来自化合物 SA51，所述缀合基团中的化合物 SA51 的个数为 2~4 个，2~4 个所述化合物 SA51 通过化学键依次连接；所述化合物 SA51 的结构式为：



13、根据权利要求 11 或 12 所述的 siRNA 缀合物，其特征在于：所述缀合基团连接在所述正义链的 3' 末端和/或 5' 末端。

14、根据权利要求 11 所述的 siRNA 缀合物，其特征在于：所述 siRNA 缀合物的结构式如下：



其中， 表示本公开的 siRNA 形成的双链体，X 为 O 或 S。

- 15、一种药物组合物，其特征在于：其包括权利要求 1 至 10 中任一项所述的 siRNA 或权利要求 11 至 14 中任一项所述的 siRNA 缀合物，以及药学上可接受的载体或辅料。
- 16、根据权利要求 15 所述的药物组合物，其特征在于：所述药物组合物用于抑制细胞程序性死亡-配体 1 基因表达。
- 17、如权利要求 1 至 10 中任一项所述的 siRNA，或权利要求 11 至 14 中任一项所述的 siRNA 缀合物，或权利要求 15 或 16 所述的药物组合物用于制备治疗和/或预防 PD-L1 基因表达相关的疾病的药剂的用途。
- 18、根据权利要求 17 所述的用途，其特征在于：所述疾病为病毒性肝炎或癌症。
- 19、根据权利要求 18 所述的用途，其特征在于：所述病毒性肝炎为乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒感染所导致的。