

双链寡核苷酸及其缀合物和用途

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2023 年 5 月 19 日提交中国国家知识产权局的申请号为 202310574400.2、发明名称为“双链寡核苷酸及其缀合物和用途”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本公开涉及寡核苷酸领域，具体涉及修饰的双链寡核苷酸、寡核苷酸缀合物或组合物的制备方法和用途。

背景技术

双链寡核苷酸 (dsRNA) 具有指导基因特异性的转录后沉默已为本领域公知，并且已经作为有效的药物活性成分。

众所周知，基于 RNA 干扰(RNAi)的药物开发需要具有良好基因沉默特性或抑制活性的双链寡核苷酸分子，且其通常是需要经过修饰的。例如，使用包含替代性修饰的 siRNA 双链体，常见的是通过 2'-OMe、2'-F 和硫代磷酸酯修饰的不同组合以稳定血清中的 siRNA；但是不同的修饰通常会导致双链寡核苷酸的活性存在差异甚至活性丧失。例如，Tai, W. ("Chemical modulation of siRNA lipophilicity for efficient delivery." J Control Release **307**: 98-107.)提出，一个或多个 MOE 修饰削弱了 siRNA 活性。

在双链寡核苷酸的成药中，具有良好药理学活性的双链寡核苷酸修饰策略开发一直是本领域努力探索的方向。

发明内容

本公开旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。

为此，在一个方面，本公开提供了一种用于抑制靶基因表达的双链寡核苷酸(dsRNA)，所述双链寡核苷酸包含正义链和反义链，每条链具有 17 至 35 个核苷酸，其中每一个核苷酸为修饰或未修饰的核苷酸；所述正义链和反义链至少部分地反向互补形成双链区，且所述双链区具有大空间体积修饰的核苷酸和/或双取代基修饰的核苷酸；其中，所述双链区的组成如下式 (I) 所示：

SS: 5'-(N)a'-(X)p'-(N)b'-(X)q'-(N)c'-(X)r'-(N)d'-3'

AS: 3'-(N)a-(X)p-(N)b-(X)q-(N)c-5' (I)，

其中，SS 代表正义链，AS 代表反义链。

式 (I) 中，所述 X 各自独立地表示核糖中 2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸或 2'位被双取代基取代（即 2'羟基和氢均被取代）的核苷酸，所述 2'位大空间体积基团选自空间体积大于 2'-甲氧基的基团；所述双取代基中的每个取代基各自独立地选自 C₁-C₆ 烷基或卤素。

在一些实施方式中，X 表示核糖中 2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸时，其独立地选自下列 2'位修饰的核苷酸：2'-(O)_{m1}(CH₂)_n(O)_{m2}R₁，其中，m₁ 或 m₂ 各自独立的为 0 或 1，n 选自 0 至 6 的整数；R₁ 选自取代或未取代的 C₁-C₆ 烷基，或-Si(R₂)₃；其中 R₂ 各自独立地选自：取代的或未取代的 C₁-C₆ 烷基，取代的或未取代的 C₁-C₆ 烷氧基；其中，所述取代包括选自下列取代基的一种或多种：卤素、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、羟基、氨基、碳原子数不超过 6 的环烷基、碳原子数不超过 12 的芳基，或碳原子数不超过 12 的杂芳基。

在一些实施方式中，m₁=0，n=0，m₂=1，R₁=Si(R₂)₃。

在一些实施方式中，m₁=1，m₂=0，n 为正整数。

在一些实施方式中，所述 X 各自独立地选自下列修饰的核苷酸：2'-O(CH₂)_nOR₁ 或 2'-R₃-2'-R₄。其中，n 为 1 或 2，取代基 R₁，R₂ 定义同上。其中，R₃ 和 R₄ 各自独立地选自 C₁-C₆ 烷基或卤素。任选地，所述卤素为氟。任选地，所述 C₁-C₆ 烷基选自甲基或乙基。

式 (I) 中，所述 N 各自独立地表示未修饰核苷酸，或核糖中 2'位置被修饰的核苷酸且不为 X（即不为 X 中的上述 2'修饰）；任选地，所述修饰的核苷酸选自下组：2'-O-烷基、2'-烷基、2'-取代的烷基、2'-卤代、2'-脱氧（即 2'-H 修饰），或者类核苷酸，其中，所述烷基的碳原子数为 1-6；所述类核苷酸选自 ENA、BNA、LNA、GNA 或 UNA；任选地，所述 2'-取代的烷基中总的碳原子数为 1-6。本公开中，所述烷基包括支链或直链的烷基。

优选地，N 各自独立地选自 2'-OMe 修饰，2'-F 修饰或 2'-脱氧修饰的核苷酸。

式 I 中, 所述双链区结构通式中的 a 、 a' 、 p 、 p' 、 b 、 b' 、 q 、 q' 、 c 、 c' 、 r 、 d' 各自独立地表示核苷酸数目, 其中:
 a' 选自 3-8 的整数; p' 选自 0-3 的整数; b' 选自 4-13 的整数; q' 选自 0-4 的整数; c' 选自 3-9 的整数; r' 选自 0-3 的整数; d' 选自 0-9 的整数; a 选自 4-7 的整数; p 选自 0-1 的整数; b 选自 4-8 的整数; q 选自 0-4 的整数; c 选自 6-10 的整数; 且, p' 、 q' 、 r' 、 p 、 q 不同时为 0, 且任选地 $0 \leq q' + r' \leq 4$ 。

在本公开的一些实施方案中, 含有本公开上述式 (I) 所示双链区的双链寡核苷酸分子中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述正义链和/或反义链的核苷酸序列特定位置中具有至少 1 个修饰的核苷酸 X, 即大空间体积修饰的核苷酸或双取代基修饰的核苷酸。

在本公开的一些实施方案中, 按照 5'末端到 3'末端方向, 所述大空间体积修饰和/或双取代基修饰的核苷酸位于式 I 所示双链区中反义链中的特定位置, 所述特定位置为第 10、15 位中的至少之一。

在本公开的一些实施方案中, 所述特定位置进一步包括 8-10 位中的至少之一。

在本公开的一些实施方案中, 所述大空间体积修饰和/或双取代基修饰的核苷酸位于式 I 所示双链区中正义链的特定位置中, 所述特定位置为相对于反义链 2, 8, 12 或 15 位 (按照 5'末端到 3'末端方向) 中至少之一的对位 (即相对位点处)。

在本公开的一些实施方案中, 所述正义链上修饰的核苷酸 X 位于与其互补的反义链第 2、8、15 位中任一位置的相对位点处。

在本公开的一些实施方案中, 任选地, 以 5'-端起始计, X 位于反义链 15 位, 且: 反义链 9 位或 12 位至少存在一个氟代修饰, 和/或, 与反义链 10 位相对位点处的该正义链位置为氟代修饰。

在本公开的一些实施方案中, (N)a 中至少存在一个氟代修饰的核苷酸。

在本公开的一些实施方案中, (N)c 中至少存在两个氟代修饰的核苷酸。

在本公开的一些实施方案中, 当 $q' + c' + r' + d' = 9$ 时, $0 \leq q' + r' \leq 4$ 。

在本公开的一些实施方案中, 按 5'末端到 3'末端的方向, 正义链上(N)b'的前 4 个核苷酸中至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸。

在本公开的一些实施方案中, X 各自独立地选自下列修饰的核苷酸: 2'-O-甲氧基乙基 (MOE)、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-R₅; 其中, R₅ 为取代或未取代的 C₁-C₃ 烷基; 任选地, 所述取代基各自独立地选自下列取代基中的一种或多种: 卤素, C₁-C₃ 烷基, C₁-C₃ 烷氧基, 氨基; 任选地, 所述卤素为氟。其中, MOE 为甲氧基乙基, TBDMS 为叔丁基二甲基氯硅烷基, TOM 为三异丙基甲氧基硅烷基。

在本公开的一些实施方案中, 2'位被双取代基取代的核苷酸选自[2'-卤素-2'-卤素]或[2'-卤素-2'-烷基]或[2'-烷基-2'-烷基]修饰的核苷酸; 示例性地, 选自[2'-F-2'-F]双氟取代修饰。所述烷基为 C₁-C₃ 烷基。

在本公开的一些实施方案中, 所述反义链还含有一个或两个硫代磷酸酯键修饰。

在本公开的一些实施方案中, 双链寡核苷酸由双链区和突出端区组成, 即双链寡核苷酸还可以在一条链的 3'-端或 5'-端或两端处包含一个或多个突出端区, 突出端区长度可以是 1-6 个核苷酸。

在本公开的一些实施方案中, 含有突出端区的双链寡核苷酸分子可由下式 (II) 表示:

SS: 5'-(T)t1-(N)a'-(X)p'-(N)b'-(X)q'-(N)c'-(X)r'-(N)d'-(T)t2-3'

AS: 3'-(T)t1-(N)a-(X)p-(N)b-(X)q-(N)c-(T)t2-5' (II),

其中, SS 代表正义链, AS 代表反义链; T 代表突出端核苷酸; t1, t2 分别独立地选自 0-6 的整数, 且不能同时为 0; 其余取代基的定义同上式 I。其中, 所述突出端核苷酸 T 各自独立地表示修饰或未修饰的核苷酸, 所述修饰的核苷酸选自下组: 2'-O-烷基 (2'-烷氧基)、2'-烷基、2'-经取代的烷基、2'-卤代、2'-脱氧, 无碱基核苷酸, 或者反向核苷酸; 任选地, 所述烷基的碳原子数为 1-6, 优选碳原子数为 1-3。所述取代选自下列取代基的一种或多种: C₁-C₆ 烷基, C₁-C₆ 烷氧基, 卤素, 氨基。

在本公开的一些实施方案中, 双链寡核苷酸的反义链在 3'端处具有一个核苷酸突出端, 5'端是平的; 并且, 该突出端包括 1-3 个核苷酸。此时, 双链寡核苷酸分子可由下式 (IIa) 所示:

SS: 5'-(N)a'-(X)p'-(N)b'-(X)q'-(N)c'-(X)r'-(N)d'-3'

AS: 3'-(T)t1-(N)a-(X)p-(N)b-(X)q-(N)c-5' (IIa),

其中, t1 选自 1-3 的整数, 其余取代基的定义同上式 II。

在本公开的一些实施方案中, 该突出端区(T)t1 的核苷酸之间具有硫代磷酸酯基。在一个实施例中, 本公开的双链寡核苷酸在其双链体的两端处还可以具有两个平端。

在本公开的一些实施方案中, 本公开的双链寡核苷酸具有 19-21 个核苷酸 (nt) 长度的双链区。

在本公开的一些实施方案中, 所述双链寡核苷酸的每条链包括 17-35 个核苷酸。

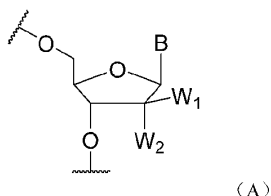
在本公开的一些实施方案中，所述双链寡核苷酸的每条链包括 17-25 个核苷酸。

在本公开的一些实施方案中，所述双链寡核苷酸的每条链包括 17-21 个核苷酸。

在本公开的一些实施方案中，所述双链寡核苷酸的每条链包括 19-23 个核苷酸。

在本公开的一些实施方案中，所述双链寡核苷酸的每条链包括 19-21 个核苷酸。

在本公开的一些实施方案中，所述式 I 和式 II 中修饰的核苷酸 X 如下式 (A) 所示，或为式 (A) 的互变异构体：



其中，B 选自核苷酸碱基，包括：尿嘧啶或其衍生物、胸腺嘧啶或其衍生物、胞嘧啶或其衍生物、5-甲基胞嘧啶或其衍生物、腺嘌呤或其衍生物、鸟嘌呤或其衍生物。

在本公开的一些实施方案中，修饰的核苷酸 X 为 2' 大空间体积基团修饰的核苷酸时，W₁ 和 W₂ 分别独立地选自 H、-O-MOE、-O-TBDMS、-O-TOM、-O-CH₂-O-R 基团，其中 R 为取代或未取代的 C₁-C₃ 烷基；且，W₁ 和 W₂ 有一个为 H 且 W₁ 和 W₂ 不同。

在本公开的一些实施方案中，修饰的核苷酸 X 为 2' 双取代基团修饰的核苷酸时，W₁ 和 W₂ 均为卤素，或者：W₁ 和 W₂ 其中之一为卤素，另一个为 C₁-C₆ 烷基。

在本公开的一些实施方案中，所述卤素为氟 (F)。

在本公开的一些实施方案中，W₁ 和 W₂ 均为 F。

在本公开的一些实施方案中，W₁ 和 W₂ 其中之一为 F，另一个为 C₁-C₃ 烷基。

在本公开的一些实施方案中，所述 AS 链的突出端(T)tl 包括至少一个 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸。

在本公开的一些实施方案中，所述双链寡核苷酸进一步包括至少一个配体。

在本公开的一些实施方案中，所述配体包括肝脏靶向配体和非肝靶向配体。

在本公开的一些实施方案中，所述配体为肝脏靶向的 ASGPR 配体，所述 ASGPR 配体包括通过支链接头而附接的 GalNAc 或其衍生物。

在另一个方面中，本公开还提供了一种双链寡核苷酸，包含正义链和反义链，每条链具有 17 至 35 个核苷酸，其中每个核苷酸为修饰或未修饰的核苷酸，所述正义链和反义链至少部分地反向互补形成双链区；其特征在于，所述双链寡核苷酸包含至少一个 2'-双取代基修饰的核苷酸，且所述 2'-双取代基中的每个取代基各自独立地选自甲基或氟；

其中，当所述双链寡核苷酸的双链区包含 2'-双取代基修饰的核苷酸时，所述 2'-双取代基修饰的核苷酸选自 2'-双 F 取代的核苷酸；或，当所述双链寡核苷酸双链区之外的位置包含 2'-双取代基修饰的核苷酸时，所述 2'-双取代基修饰的核苷酸选自 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸。

在本公开的一些实施方案中，所述双链寡核苷酸具有以下特征的一个或多个：

(1) 所述双链寡核苷酸包含 2'-双 F 取代的核苷酸时，所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从正义链的 5' 端起始计的位置 7、8、9 或 10 处中的至少一个；

(2) 所述双链寡核苷酸包含 2'-双 F 取代的核苷酸时，所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从反义链的 5' 端起始计的位置 2、4、6、8、9、10、12、14 或 16 处中的至少一个；

(3) 所述双链寡核苷酸包含 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸时，所述 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸位于寡核苷酸双链区之外的位置。

(4) 所述双链寡核苷酸包含 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸时，所述 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸位于反义链的 3' 末端位置的突出端。

在本公开的一些实施方案中，特征(1)中，所述双链寡核苷酸包含 2'-双 F 取代的核苷酸时，所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从正义链的 5' 端起始计的位置 7、8、9 或 10 处中的至少 2 个或至少 3 个。

在本公开的一些实施方案中，特征(2)中，所述双链寡核苷酸包含 2'-双 F 取代的核苷酸时，所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从反义链的 5' 端起始计的位置 2、4、6、8、9、10、12、14 或 16 处中的至少 2 个。

在另一个方面中，本公开还提供了一种寡核苷酸缀合物，所述寡核苷酸缀合物含有本公开提供的双链寡核苷酸以及缀合连接至该双链寡核苷酸的缀合基团；所述缀合基团包含接头和药学上可接受的靶向基团和/或递送辅助基团，并且所

述靶向基因选自能够和细胞表面受体结合的配体，所述递送辅助基因选自能够增加所述寡核苷酸缀合物在递送目标器官或组织中的生物相容性的基因。

在另一个方面中，本公开还提供了一种药物组合物，该药物组合物含有本公开提供的双链寡核苷酸或其缀合物，以及药学上可接受的载体。

在另一个方面中，本公开还提供了本公开所述双链寡核苷酸、药物组合物和/或寡核苷酸缀合物在制备用于治疗/或预防与目标基因表达的 mRNA 水平相关的疾病或症状的药物中的用途。

在另一个方面中，本公开还提供了一种治疗和/或预防与目标基因表达的 mRNA 水平相关的疾病或症状的方法，所述方法包括向有需要的受试者给予本公开的双链寡核苷酸、药物组合物和/或寡核苷酸缀合物。

在另一个方面中，本公开进一步提供了一种向受试者的特定靶标递送本公开的双链寡核苷酸的方法，包括通过皮下或静脉内给予。

在另一个方面中，本公开还提供了一种调节细胞中目标基因表达水平的方法，所述方法包括将有效量的本公开的双链寡核苷酸、药物组合物和/或寡核苷酸缀合物与所述细胞接触。

另外，本公开还提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含本公开的双链寡核苷酸、药物组合物和/或寡核苷酸缀合物。

本公开的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本公开的实践了解到。

有益效果

本公开的双链寡核苷酸和/或寡核苷酸缀合物在正义链和/或反义链上进行单个或多个位点的特定修饰具有良好的耐受性，可以很好的维持寡核苷酸的药学活性，具有较高的目标基因表达调节活性。

附图说明

为了更清楚地说明本申请实施例的技术方案，下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍，应当理解，以下附图仅示出了本申请的某些实施例，因此不应被看作是对范围的限定，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

图 1 显示了本公开实施例 2 中 HepG2 转染了正义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平；

图 2 显示了本公开实施例 2 中 HepG2 转染了反义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平；

图 3 显示了本公开实施例 3 中给药 siRNA 缀合物后，小鼠体内血清 CC3 蛋白的表达水平；

图 4 显示了本公开实施例 4 中小鼠原代肝细胞自由摄取正义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 ANGPTL3 mRNA 的相对表达水平；

图 5 显示了本公开实施例 4 中小鼠原代肝细胞自由摄取反义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 ANGPTL3 mRNA 的相对表达水平；

图 6 显示了本公开实施例 5 中给药 siRNA 缀合物后，小鼠体内 ANGPTL3mRNA 的表达水平；

图 7 显示了本公开实施例 6 中小鼠原代肝细胞自由摄取正义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 FXI mRNA 的相对表达水平；

图 8 显示了本公开实施例 6 中小鼠原代肝细胞自由摄取反义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 FXI mRNA 的相对表达水平；

图 9 显示了本公开实施例 7 中给药 siRNA 缀合物后，小鼠体内 CC3 mRNA 的表达水平；

图 10 显示了本公开实施例 8 中 HepG2 转染了正义链不同位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平；

图 11 显示了本公开实施例 8 中 HepG2 转染了反义链不同位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平；

图 12 显示了本公开实施例 9 中 HepG2 转染了正义链多位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平；

图 13 显示了本公开实施例 9 中 HepG2 转染了反义链多位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平；

图 14 显示了本公开实施例 9 中 HepG2 转染了正义链和反义链多位点 MOE 修饰的 siRNA 后,靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平;

图 15 显示了本公开实施例 10 中给予了 siRNA 缀合物(RZ502031、RZ502033、RZ502034、RZ502035、RZ502039)后,小鼠体内 CC3 mRNA 的表达水平;

图 16 显示了本公开实施例 10 中给予了 siRNA 缀合物(RZ502031、RZ502036、RZ502049、RZ502087)后,小鼠体内 CC3 mRNA 的表达水平;

图 17 显示了本公开实施例 11 中给予了 siRNA 缀合物后,小鼠体内 SOD1 mRNA 的表达水平;

图 18a-d 显示了本公开实施例 12 中 HepG2 转染了 siRNA 缀合物(RZ002003、RZ002006、RZ002011 和 RZ002031 转换不同修饰方案)后,靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平。

图 19 显示了本公开实施例 13 中 Huh7 转染了 siRNA 缀合物(RZ003017 和 RZ003020 转换不同修饰方案)后,靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平。

图 20 显示了本公开实施例 14 中给予了 siRNA 缀合物(RZ003021、RZ003065、RZ003066)后,hREN×hAGT 高血压小鼠血清中的 AGT 蛋白表达水平。

图 21 显示了本公开实施例 15 中给予了 siRNA 缀合物(RZ001032、RZ001034、RZ001037、RZ001039)后,在 LPA 靶点的 HDI 小鼠模型中靶基因 mRNA 的相对表达水平。

图 22 显示了本公开实施例 16 中给予了 siRNA 缀合物(RZ001032、RZ001034)后,在 hApo(a)转基因小鼠中 LPA 蛋白表达水平。

图 23 显示了本公开实施例 17 中给予了反义链不同位点 NM062 和 NM063 修饰 siRNA 缀合物后,小鼠体内 SOD1 mRNA 的相对表达水平。

图 24 显示了本公开实施例 18 中小鼠原代肝细胞自由摄取反义链 NM096、NM097、NM098 和 NM099 修饰 siRNA 缀合物后,靶基因 SOD1 mRNA 的相对表达水平。

图 25 显示了本公开实施例 19 中小鼠原代肝细胞自由摄取正义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物(RZ599051)后,靶基因 SOD1 mRNA 的相对表达水平。

图 26 显示了本公开实施例 20 中小鼠原代肝细胞自由摄取正义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物(RZ599055、RZ599056)后,靶基因 SOD1 mRNA 的相对表达水平。

图 27 显示了本公开实施例 21 中小鼠原代肝细胞自由摄取正义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物后,靶基因 ANGPTL3 mRNA 的相对表达水平。

图 28 显示了本公开实施例 22 中小鼠原代肝细胞自由摄取正义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物后,靶基因 CFB mRNA 的相对表达水平。

图 29 显示了本公开实施例 23 中给予了正义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物后,小鼠体内靶基因 CFB mRNA 的相对表达水平。

图 30 显示了本公开实施例 24 中小鼠原代肝细胞自由摄取反义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物后,靶基因 ANGPTL3 mRNA 的相对表达水平。

图 31 显示了本公开实施例 25 中小鼠原代肝细胞自由摄取反义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物(RZM11504、RZM11505)后,靶基因 CFB mRNA 的相对表达水平。

图 32 显示了本公开实施例 26 中小鼠原代肝细胞自由摄取反义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物(RZM11507)后,靶基因 CFB mRNA 的相对表达水平。

图 33 显示了本公开实施例 27 中给予了反义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物后,小鼠体内靶基因 CFB mRNA 的相对表达水平。

图 34 显示了本公开实施例 28 中给予了反义链 2'位双 F 修饰 siRNA 缀合物后,小鼠体内靶基因 C4B mRNA 的相对表达水平。

图 35 显示了本公开实施例 29 中给予了反义链包含 NM054 修饰 siRNA 缀合物后,小鼠体内靶基因 SOD1 mRNA 的相对表达水平。

图 36 显示了本公开实施例 30 中给予了反义链包含 NM054 修饰 siRNA 缀合物后,小鼠体内靶基因 ANGPTL3 mRNA 的相对表达水平。

图 37 显示了本公开实施例 31 中给予了 siRNA 缀合物(RZ002099、RZ002101、RZ002106、RZ002113)后,食蟹猴血清中 CC3 蛋白表达水平。

图 38 显示了本公开实施例 32 中给予了 siRNA 缀合物(RZ003069)后,食蟹猴血清中 AGT 蛋白表达水平。

具体实施方式

下面详细描述本公开的实施例。下面描述的实施例是示例性的，仅用于解释本公开，而不能理解为对本公开的限制。

需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本公开的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值，这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说，各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间，以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围，这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义，否则本文中使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

在本文中，术语“包含”或“包括”为开放式表达，即包括本公开所指明的内容，但并不排除其他方面的内容。

在本文中，术语“任选地”、“任选的”或“任选”通常是指随后所述的事件或状况可以但未必发生，并且该描述包括其中发生该事件或状况的情况，以及其中未发生该事件或状况的情况。

在本文中，术语“补体成分 3” (complement component 3, CC3)，指参与 3 条补体活化途径的固有成分，为血浆含量最高的补体成分。补体活化时，C3 可被 C3 转化酶裂解为小片段 C3a 和大片段 C3b：C3a 游离于液相，具有过敏毒素活性；C3b 是 3 条激活途径 C5 转化酶和旁路途径 C3 转化酶的关键组分，并可与免疫复合物、微生物、高分子物质或细胞膜结合，从而介导调理作用和免疫黏附作用。

在本文中，术语“血管生成素样蛋白 3” (angiopoietin-like 3, ANGPTL3)，是参与调节血脂代谢的血管生成素样蛋白家族的成员之一，其家族还包括 ANGPTL4 和 ANGPTL8。ANGPTL3 基因编码的蛋白仅在肝脏中产生，进而分泌至循环系统中。在肝脏中，ANGPTL3 完全由肝细胞产生，其表达受羟甲基戊二酰辅酶 A 受体 (HMGCR) 调控。

在本文中，术语“凝血因子 XI” (Factor XI, FXI)，是凝血因子 XI (factor XI, FXI) 是一种参与凝血过程接触阶段 (内源性凝血途径) 的血浆糖蛋白，FXI 对体内正常止血非常重要。

在本文中，术语“寡核苷酸” (Oligonucleotide)，是指一个例如具有少于 100、200 或 300 个核苷酸长度的核酸分子 (RNA 或 DNA)。

在本文中，术语“LNA”是指锁核酸，LNA 是一种修饰的 RNA 核苷酸。LNA 核苷酸的核糖部分是用额外的桥 (例如，亚甲基桥或乙烯桥) 连接相同核糖的 2' 羟基至 4' 碳来修饰的。术语“ENA”是指乙烯桥联核酸，并且通常是指受约束的或不能接近的 RNA。术语“BNA”是指桥联的核酸，BNA 可以含有 5-元、6-元、或甚至 7-元的具有“固定的”C3'-内切糖缩合的桥联结构，通常将该桥掺入到该核糖的 2'-、4'-位处以提供一个 2'-、4'-BNA 核苷酸 (例如，LNA 或 ENA)。术语 GNA 是指甘油核酸，UNA 是指开环核苷酸。

在本文中，如无特别说明，大写字母 C、G、U、A、T 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸；小写字母 s 表示与该字母 s 左右相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接。

在本文中，所述“氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被氟取代形成的核苷酸，如无特殊说明，氟代修饰均是指单氟代修饰，“类核苷酸”或“核苷酸类似物”指能够在核酸中代替核苷酸，但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶、脱氧核糖核苷酸的基团。如异核苷酸、桥联的核苷酸 (bridged nucleic acid, 简称 BNA) 或无环核苷酸。所述“甲氧基修饰的核苷酸”指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。本文中 2-甲氧基也可以由 2'-OMe 表示，2-甲氧基和 2'-OMe 在本文中可以相互代替使用。如无特殊说明，在上文及下文中，所述“修饰的核苷酸”均指核苷酸的核糖基 2' 位修饰的核苷酸。

本文中的核苷酸，可指代独立的核苷酸，也可指代在寡核苷酸中的核苷酸残基；本文中的核苷酸可为单数或复数，为复数时，可以指代一类核苷酸。本文中，双链寡核苷酸也可以由 dsRNA、siRNA 或双链寡聚核苷酸表示，双链寡核苷酸、双链寡聚核苷酸、dsRNA 和 siRNA 在本文中 can 相互代替使用。

在本文中，“烷基”是指具有指定数量的碳原子的直链和支链，所述数量通常为 1 至 20 个碳原子，例如，C₁-C₆ 烷基，其包含 1 至 6 个碳原子的直链和支链烷基。

在本文中，所述 siRNA 分子由两条链组成，其中同靶 mRNA 结合的链称为反义链或引导链，另一条链称为正义链或过客链。术语“反义链”是指 siRNA 的这样一条链，所述链包括与靶序列完全或基本互补的区域。术语“正义链”是指 siRNA 的这样一条链，所述链包括与作为在此定义的术语反义链的区域基本互补的区域。术语“互补区域”是指反义链上与靶

mRNA 序列完全或基本互补的区域。在互补区域与靶序列不完全互补的情况下，错配可以位于分子的内部或末端区域中。如此处所使用，术语“互补”是指第一多核苷酸在某些条件例如严格条件下与第二多核苷酸杂交的能力。

在本文的上下文中，表述“双链体”，“双链体区”和“双链区”可互相替代使用，并具有本领域技术人员周知的含义，即，在双链核酸分子中，正义链与反义链以互补的方式相配对形成的双链结构。

在本文中，表述“互补”和“反向互补”可互相替代使用，并具有本领域技术人员周知的含义，即，在双链核酸分子中，一条链的碱基各自与另一条链上的碱基以互补的方式相配对。

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

在本文中，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，“寡核苷酸缀合物”表示一个或多个具有特定功能的化学部分共价连接至寡核苷酸上而形成的化合物。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寡核苷酸，最终形成本公开的寡核苷酸缀合物的特定化合物。

发明人经过反复研究和实验发现，在双链寡核苷酸的正义链和/或反义链特定位点上进行单个或多个位点的特定修饰可以具有良好的耐受性，以及可以很好的维持甚至进一步提升双链寡核苷酸分子的活性。

第一个方面，本公开提供了具有不降低抑制活性甚至增加抑制活性的修饰的双链寡核苷酸分子及其试剂，以及适于治疗性用途的药物组合物。

在一个具体的实施方案中，本公开提供了一种用于抑制靶基因表达的双链寡核苷酸(dsRNA)，所述双链寡核苷酸包含正义链和反义链，每条链具有 17 至 35 个核苷酸，其中每一个核苷酸为修饰或未修饰的核苷酸；所述正义链和反义链至少部分地反向互补形成双链区；按照 5'末端到 3'末端的方向，所述正义链和/或反义链的核苷酸序列特定位置中具有大空间体积修饰的核苷酸和/或双取代基修饰的核苷酸，其中，所述大空间体积修饰的核苷酸指核苷酸的核糖 2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸，并且所述 2'位大空间体积基团选自空间体积大于 2'-O-甲基的基团；所述双取代基修饰的核苷酸是指核苷酸的核糖 2'位的羟基和氢同时被取代的核苷酸。可选地，所述双取代基中的每个取代基各自独立地选自 C₁-C₆烷基或卤素。

在一些实施方式中，本公开所述双链寡核苷酸中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述反义链的第 8,9,10 或 15 位核苷酸中的至少一个为大空间体积修饰的核苷酸或双取代基修饰的核苷酸；和/或，所述正义链存在或不存在修饰的核苷酸 X；当该正义链存在修饰的核苷酸 X 时，至少一个核苷酸 X 位于与该反义链第 2, 8 或 15 位（按照 5'末端到 3'末端的方向）中任意位置的相对位点处。

在一些实施方式中，该双链寡核苷酸的反义链与正义链互补形成双链区，双链区结构如下式(I)表示：

SS: 5'-(N)a'-(X)p'-(N)b'-(X)q'-(N)c'-(X)r'-(N)d'-3'

AS: 3'-(N)a-(X)p-(N)b-(X)q-(N)c-5' (I)，

其中，SS 代表正义链，AS 代表反义链。

式 (I) 中，所述 X 各自独立地表示核糖中 2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸或 2'位羟基和氢被双取代基取代的核苷酸；所述 2'位大空间体积基团选自空间体积大于 2'-O-甲基的基团；所述双取代基中的每个取代基各自独立地选自 C₁-C₆烷基或卤素。

在一些实施方式中，X 表示核糖中 2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸时，其独立地选自下列 2'位修饰的核苷酸：2'-(O)_{m1}(CH₂)_n(O)_{m2}R₁，其中，m₁ 或 m₂ 各自独立的为 0 或 1，n 选自 0 至 6 的整数；R₁ 选自取代基取代或未取代的 C₁-C₆烷基，或-Si(R₂)₃；其中 R₂ 各自独立地选自：取代的或未取代的 C₁-C₆烷基，取代的或未取代的 C₁-C₆烷氧基；其中，所述取代或取代基选自下列中的一种或多种：卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、羟基、氨基、碳原子数不超过 6 的环烷基、碳原子数不超过 12 的芳基或碳原子数不超过 12 的杂芳基。

在一些实施方式中，所述 X 各自独立地选自下列修饰的核苷酸：2'-O(CH₂)_nOR₁ 或 2'-R₃-2'-R₄。其中，n 为 1 或 2，R₁ 选自取代基取代的或未取代的 C₁-C₆烷基，或-Si(R₂)₃；其中 R₂ 各自独立地选自：取代的或未取代的 C₁-C₆烷基，取代的或未取代的 C₁-C₆烷氧基；其中，所述取代基选自卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、羟基、氨基、碳原子数不超过 6 的环烷基、碳原子数不超过 12 的芳基或碳原子数不超过 12 的杂芳基。

其中，R₃ 和 R₄ 各自独立地选自 C₁-C₆烷基或卤素。任选地，所述卤素为氟。任选地，所述 C₁-C₆烷基选自甲基或乙基。

式 I 中，所述 N 各自独立地表示未修饰核苷酸，或不同于 X 且核糖中 2'位置被修饰的核苷酸，所述修饰的核苷酸选自下组：2'-O-烷基、2'-烷基、2'-经取代的烷基、2'-卤代、2'-脱氧，或者类核苷酸；所述类核苷酸选自 ENA、BNA、

LNA、GNA 或 UNA；任选地，所述烷基、烷氧基的碳原子数为 1-6。

在一些实施方式中，N 各自独立地选自 2'-OMe 修饰、2'-F 修饰或 2'-H 修饰的核苷酸；其中，2'-H 或 2'-脱氧修饰的核苷酸具有相同的含义，即 2'-羟基被 H 取代。在另一些实施方式中，N 各自独立地选自 2'-OMe 修饰或 2'-F 修饰。

在一些实施方式中，2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸 X 各自独立地选自下列修饰的核苷酸：2'-O-甲氧基乙基 (MOE)、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-R 基团，R 为取代或未取代的 C₁-C₃ 烷基；任选地，所述取代基各自独立地选自下列取代基中的一种或多种：卤素，C₁-C₃ 烷基，C₁-C₃ 烷氧基，氨基。

在一些实施方式中，X 各自独立地选自下列修饰的核苷酸：2'-O-甲氧基乙基 (MOE)、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃，2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃。

在一些实施方式中，2'位被双取代基取代的核苷酸选自[2'-卤素-2'-卤素]或[2'-卤素-2'-烷基]或[2'-烷基-2'-烷基]修饰的核苷酸；任选地，选自[2'-F-2'-F]或[2'-氟-2'-烷基]修饰。可选地，所述烷基为 C₁-C₃ 烷基。

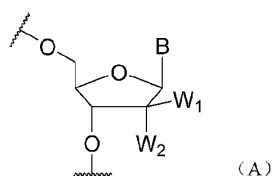
式 I 中，所述 a、a'、p、p'、b、b'、q、q'、c、c'、r'、d' 各自独立地表示核苷酸数目，例如，(N)a 中当 a 为 3 时，表示连续 3 个修饰的核苷酸 N-N-N，其中每个 N 可以相同，也可以不同。其中：a' 为 3-8 的整数；p' 为 0-3 的整数；b' 为 4-13 的整数；q' 为 0-4 的整数；c' 为 3-9 的整数；r' 为 0-3 的整数；d' 为 0-9 的整数；a 为 4-7 的整数；p 为 0-1 的整数；b 为 4-8 的整数；q 为 0-4 的整数；c 为 6-10 的整数；且，p'、q'、r'、p、q 不同时为 0。

可选地，q' 和 r' 不同时为 0。

可选地，q'+c'+r'+d'=9，且 0≤q'+r'≤4。

可选地，(N)a 和 (N)b 中均至少存在一个氟代修饰的核苷酸，(N)c 至少存在两个氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方式中，本公开中所述的核苷酸 X 结构可以如下式 (A) 所示，或为式(A)的互变异构体：



其中，B 选自核苷酸碱基，包括：尿嘧啶或其衍生物、胸腺嘧啶或其衍生物、胞嘧啶或其衍生物、5-甲基胞嘧啶或其衍生物、腺嘌呤或其衍生物、鸟嘌呤或其衍生物。

在本公开的一些实施方案中，修饰的核苷酸 X 为 2'大空间体积基团修饰的核苷酸时，W₁ 和 W₂ 分别独立地选自 H、-O-MOE、-O-TBDMS、-O-TOM、-O-CH₂-O-R 基团，其中 R 为取代或未取代的 C₁-C₃ 烷基；且，W₁ 和 W₂ 有一个为 H 且 W₁ 和 W₂ 不同。

在本公开的一些实施方案中，修饰的核苷酸 X 为 2'双取代基团修饰的核苷酸时，W₁ 和 W₂ 均为卤素，或者：W₁ 和 W₂ 其中之一为卤素，另一个为 C₁-C₆ 烷基。

在本公开的一些实施方案中，所述卤素为氟 (F)。

在本公开的一些实施方案中，W₁ 和 W₂ 均为 F。

在本公开的一些实施方案中，W₁ 和 W₂ 其中之一为 F，另一个为甲基或乙基。

其中，波浪线为核苷酸之间的连接键。

在一些实施方式中，本公开的双链寡核苷酸除了包含上述双链区，还包含一个或多个突出端区，突出端区长度可以是 1-6 个核苷酸。这些突出端可以使得一个链比另一个链更长，或两个链具有相同长度。该突出端可以与该靶标 mRNA 形成一个错配，或它可以与靶向的基因序列互补，或可以是其他序列，例如：正义链和反义链可以通过另外的碱基连接形成一个发夹，或通过其他非碱基接头连接。在一个实例中，所述突出端基团中的核苷酸可以各自独立地是经修饰的或未经修饰的核苷酸。

在一个实例中，该突出端存在于正义链、反义链或两条链的 3'端处。任选地，本公开的双链寡核苷酸仅含一个突出端。在另一个实例中，这个 3'-突出端存在于反义链中。在另一个实例中，这个 3'-突出端存在于正义链中。

在本公开的一些实施方案中，所述包含突出端区的双链寡核苷酸分子可由下式 II 表示：

SS: 5'-(T)t₁-(N)a'-(X)p'-(N)b'-(X)q'-(N)c'-(X)r'-(N)d'-(T)t₂-3'

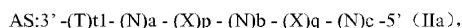
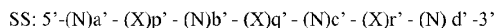
AS: 3'-(T)t₁-(N)a-(X)p-(N)b-(X)q-(N)c-(T)t₂-5' (II)，

其中，SS 代表正义链，AS 代表反义链；T 代表突出端核苷酸；t₁, t₂ 分别独立地选自 0-6 的整数，且不能同时为 0；

其余取代基的定义同上式 (I)。

其中, 所述突出端核苷酸 T 各自独立地表示修饰或未修饰的核苷酸, 所述修饰的核苷酸选自下组: 2'-烷氧基、2'-经 C₁-C₆ 取代的烷氧基、2'-烷基、2'-经 C₁-C₆ 取代的烷基、2'-卤代、2'-脱氧, 无碱基核苷酸, 或者反向核苷酸; 任选地, 所述烷基、烷氧基的碳原子数为 1-6, 优选碳原子数为 1-3。

在本公开的一些实施方案中, 双链寡核苷酸的反义链在 3' 端处具有一个核苷酸突出端; 并且, 该突出端包括 1-3 个核苷酸。此时, 双链寡核苷酸分子可由下式 (IIa) 所示:



其中, tl 选自 1-3 的整数, 其余取代基的定义同上式 (II)。

在一些实例中, 该突出端基团(T)tl 的两个核苷酸之间具有硫代磷酸酯基。在一个实施例中, 本公开的双链寡核苷酸在其双链体的两端处还可以具有两个平端。

在一些实施方式中, 本公开双链寡核苷酸的双链区具有 17-30 个核苷酸对的长度。例如, 该双链区具有 17-25 个核苷酸对、17-21 个核苷酸对、17-19 个核苷酸对, 或 19-25 个核苷酸对、19-23 个核苷酸对、19-21 个核苷酸对, 或 21-25 个核苷酸对、21-23 个核苷酸对。

在一些实施方式中, 该双链区的长度选自 17、18、19、20、21、22、23 个核苷酸对。

在一个实施方式中, 该双链体区的长度为 19 个或 21 个核苷酸对。

在一些实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸中, 式(I)所示双链区中的反义链与正义链互补, 所述互补包括: 基本上反向互补、实质上反向互补或完全反向互补。在一个实施方式中, 式(I)所示双链区中的反义链与正义链完全反向互补。在另一个实施方式中, 式(I)所示双链区中的反义链与正义链存在 1-3 个的碱基错配, 从而实现基本上反向互补或实质上反向互补。

在一些实施方式中, 本公开提供的式(II)所示的双链寡核苷酸的每条链可以具有 17-35 核苷酸的长度。例如, 双链寡核苷酸的每条链可以具有 17-23 个核苷酸、17-21 个核苷酸、17-19 个核苷酸, 或 19-25 个核苷酸、19-23 个核苷酸、19-21 个核苷酸、21-23 个核苷酸。

在一些实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸分子中, 核苷酸 X 为大空间体积基团修饰的核苷酸, 且: 存在一个或多个核苷酸 X 且仅位于所述反义链中。在一些实施方式中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 当反义链中仅含有一个 X 时, X 可以位于反义链 8-10 位或 15 位中的任意一个位置。任选地, X 可以位于反义链第 10 或 15 位。

在一些实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸分子中, 核苷酸 X 为大空间体积基团修饰的核苷酸, 且: 存在一个或多个 X 且仅位于所述正义链中。任选地, 所述正义链中可含有一个或两个 X。任选地, 正义链中 X 可以位于与反义链第 2、8 或 15 位 (以 5'-端计) 中任意位置的对位。其中, 所述的对位指的是双链体区中一条链上的核苷酸与另一条链上相应的互补核苷酸的位置 (即相对位点处)。

在一些实施方式中, 核苷酸 X 为大空间体积基团修饰的核苷酸; 含有本公开上述式 (I) 所述双链区结构的双链寡核苷酸分子中, 当双链体为 19 个核苷酸对 (或双链寡核苷酸分子为 19/21 核苷酸) 时, 至少存在一个核苷酸 X 位于所述正义链的 7-9 位中 (以 5'-3'方向计), 该正义链的 7-9 位与反义链的 11-13 位 (以 5'-3'方向计) 核苷酸为对位。

在一些实施方式中, 核苷酸 X 为大空间体积基团修饰的核苷酸; 含有本公开上述式 (I) 所述双链体结构的双链寡核苷酸分子中, 存在两个或多个核苷酸 X 且分别位于所述反义链和正义链两条链中。在一些实施方式中, 反义链中仅含有一个 X 时, 正义链可含有一个或两个 X。在一些实施方式中, X 可以位于反义链 8-10 位或 15 位 (以 5'-端起始计) 中的任意位置; 同时, 正义链中 X 可以位于相对于反义链 2、8、12 或 15 位 (以 5'-端计) 中任意位置的对位。

在一些实施方式中, 核苷酸 X 为大空间体积基团修饰的核苷酸; 所述双链寡核苷酸分子中, 至少存在一个 X 且位于反义链的 15 位 (以 5'-端起始计)。

在一些实施方式中, 所述 2'大空间体积基团为 2'-O-甲氧基乙基 (MOE)。在另一些实施方式中, 所述 2'大空间体积基团为 2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃, 或 2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃。

在一些实施方式中, 本公开式 (II) 所示双链寡核苷酸或包含式(I)所示双链区结构的双链寡核苷酸中, 其中: N 各自独立地选自 2'-OMe 修饰, 2'-F 修饰或 2'-脱氧修饰的核苷酸; X 各自独立地选自 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃ 修饰的核苷酸; 其中, a, a', p, p', b, b', q, q', c, c', r', d'各自独立地表示的核苷酸数目定义如下: a'为 3-8 的整数; p'为 0-3 的整数; b'为 4-13 的整数; q'为 0-4 的整数; c'为 3-9 的整数; r'为 0-3 的整数; d'为 0-9 的整数; a 为 4-7 的整数; p 为 0-1 的整数; b 为 4-8 的整数; q 为 0-4 的整数; c 为 6-10 的整数; 且, p', q', r', p, q 不同时为 0。

任选地, q'和 r'不同时为 0。

任选地, $q'+c'+r'+d'=9$, 且 $0 \leq q'+r' \leq 4$ 。

任选地, (N)a 和 (N)b 中均至少存在一个氟代修饰的核苷酸, 且 (N)c 至少存在两个氟代修饰的核苷酸。

在一个实施方式中, $p'=0$ 即当 (X)p' 不存在时, $a'=6$ 。在另一个实施方式中, 当双链寡核苷酸为 SS/AS=21/23nt 时, $a'=8$ 。

在一个实施方式中, 当 $p'=1$ 时, X 位于正义链上, 且位于与该反义链 14-16 位的对位任一位置处 (以 5'-端起始计)。

在一个实施方式中, (X)p' 中存在至少一个 X 且有一个 X 位于反义链 15 位 (以 5'-端起始计) 的对位; 任选地, 当 $p'=1$ 时, X 位于反义链 15 位 (以 5'-端起始计) 的对位。

在一个实施方式中, 当 (X)q' 和 (X)r' 均不存在时 (即 q', r' 均为 0), 则该正义链仅含有 (X)p', 则双链区的正义链 SS 为: 5'-(N)a'-(X)p'-(N)b'-3'; 其中, $k'=7-22$ 。

在一个实施方式中, 正义链上 (N)b' 的前 4 个核苷酸 (以 5'-端起始计) 位于相对于反义链 10-13 位 (以 5'-端起始计) 的对位, 且该前 4 个核苷酸中至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸。

在一个实施方式中, q' 优选为 0-2; 进一步优选 0-1。

在一个实施方式中, 当 r' 与 q' 均不为 0 时, d' 不为 0。例如, $r'=1$ 且 $q'=1$ 时, b' 和 c' 可以为 5, d' 为 1 (此时正义链上一个 X 位于 12 位, 另一个 X 位于 18 位, 以 5'-端起始计)。

在一个实施方式中, q' 和 r' 不同时为 0。进一步地, 当 q' 和 r' 不同时为 0 时, 其中正义链上至少一个 X 位于反义链的种子区 (1-8 位, 以 5'-端起始计) 对位。在另一个实施方式中, 正义链上至少存在一个 X 位于相对于反义链种子区 2-8 位 (以 5'-端起始计) 的对位。

在一个实施方式中, $d'=1-9$ 。

在一个实施方式中, $q'+c'+r'+d'=9$, 且 $0 \leq q'+r' \leq 4$ 。

在一个实施方式中, 当 (X)p 不存在时, $a=5-7$, 例如: 当 dsRNA 为 SS/AS=21/23nt 时, $a=7$ 。

在一个实施方式中: (N)a 中至少存在一个氟代修饰的核苷酸; 优选位于反义链的 16 位 (以 5'-端起始计)。

在一个实施方式中, 当 $p \neq 0$ 时 (即 $p=1$), X 位于反义链的 15 位 (以 5'-端起始计)。

在一个实施方式中, 当 (X)q 不存在时 b 为 8 (即 $q=0$ 时 $b=8$)。

在一个实施方式中, 当 (X)q 不存在时 $b+c=14$ 。

在一个优选实施方式中, (N)b 中至少存在一个氟代修饰的核苷酸, 优选位于反义链的 14 位 (以 5'-端计)。

在一个实施方式中, 当 (X)q 不存在时 c 为 10。

在一个优选实施方式中, (N)c 中至少存在两个氟代修饰的核苷酸; 进一步优选地, 至少存在两个氟代修饰的核苷酸且分别位于反义链的 2 和 6 位 (以 5'-端起始计)。

在一些实施方式中, 本公开式 (II) 所示双链寡核苷酸或包含上述式 (I) 所示双链区的双链寡核苷酸中, 所述反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成 17-23 个碱基对的双链区; 其中, N 各自独立地分别 2'-OMe 修饰, 2'-F 修饰或 2'-脱氧修饰的核苷酸; X 各自独立地选自 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃ 修饰的核苷酸; a' 、 p 、 p' 、 b 、 b' 、 q 、 q' 、 c 、 c' 、 r' 、 d' 各自独立地表示的核苷酸数目, 进一步定义如下:

a' 为 3-8 的整数; p' 为 0-2 的整数; b' 为 4-12 的整数; q' 为 0-2 的整数; c' 为 3-8 的整数; r' 为 0-2 的整数; d' 为 1-9 的整数; a 为 4-7 的整数; p 为 0 或 1; b 为 4-8 的整数; q 为 0-2 的整数; c 为 6-10 的整数; 并且:

1) (N)a 和 (N)b 中均至少存在一个氟代修饰的核苷酸, (N)c 中至少存在两个氟代修饰的核苷酸; $q'+c'+r'+d'=9$, 且 $0 \leq q'+r' \leq 4$;

2) (N)b' 的前 4 个核苷酸 (以 5'-端起始计) 中至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方式中, 本公开式 (II) 所示双链寡核苷酸或包含上述式 (I) 所示双链区的双链寡核苷酸中, 所述反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成 19-21 个碱基对的双链体区; 其中, N 各自独立地选自 2'-OMe 修饰, 2'-F 修饰或 2'-脱氧修饰的核苷酸; X 各自独立地选自 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃ 修饰的核苷酸; a' 、 p 、 p' 、 b 、 b' 、 q 、 q' 、 c 、 c' 、 r' 、 d' 各自独立地表示的核苷酸数目: a' 为 3-8 的整数; p' 为 0 或 1; b' 为 4-13 的整数; q' 为 0 或 1; c' 为 3-9 的整数; r' 为 0 或 1; d' 为 1-8 的整数; a 为 4-7 的整数; p 为 1; b 为 4-8 的整数; q 为 0 或 1; c 为 6-10 的整数; 并且:

1) (N)a 中至少存在一个氟代修饰的核苷酸, 且反义链 16 位 (以 5'-端起始计) 为氟代修饰的核苷酸;

2) (N)b 中至少存在一个氟代修饰的核苷酸, 且反义链 14 位 (以 5'-端起始计) 为氟代修饰的核苷酸;

3) (N)c 中至少存在两个氟代修饰的核苷酸, 且反义链的 2 和 6 位 (以 5'-端起始计) 均为氟代修饰的核苷酸;

4) $q'+c'+r'+d'=9$, $0 \leq q'+r' \leq 2$; 可选地, q' 和 r' 不同时为 0;

5) 正义链上至少存在一个 X 位于反义链种子区 (1-8 位, 以 5'-端起始计) 的对位;

6) (N)b' 的前 4 个核苷酸 (基于 5'-3' 方向) 位于与该反义链 10-13 位 (以 5'-端起始计) 的对位 (相对的位点处), 且

该前 4 个核苷酸中至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸, 以及: 任选地, 含有一个或至少一个非氟代修饰的核苷酸。所述非氟代修饰的核苷酸可以选自下列的一种或多种: 2'-大体积修饰的核苷酸 X, 2'-脱氧修饰核苷酸, 2'-甲基修饰核苷酸。

可选地, 非氟代修饰的核苷酸为 2'-大体积修饰的核苷酸 X, 且 X 位于(N)b'的前 3 个核苷酸中; 进一步可选地, X 位于(N)b'的前 2 个核苷酸中。

在一个实施方式中, (N)b'的前 4 个核苷酸(以 5'-端起始计)中, 含有 2 个或 3 个氟代修饰的核苷酸, 以及一个本公开所述的 2'-大体积修饰的核苷酸 X 或双取代修饰的核苷酸。

在另一个实施方式中, (N)b'的前 3 个核苷酸(以 5'-端起始计)中, 含有 2 个氟代修饰的核苷酸, 以及 1 个双取代修饰的核苷酸或者 2'-脱氧修饰核苷酸。

在一个实施方式中, 式(I)表示的双链寡核苷酸双链体区为 19 个核苷酸对, 其中正义链上(N)b'区域的前 4 个核苷酸(以 5'-端起始计)位于 7-10 位; 此时, 非氟代修饰的核苷酸可位于 7 位, 8 位, 9 位或者 10 位中的任意一位。示例性地, 双取代修饰的核苷酸 X 或者 2'-脱氧修饰核苷酸(DNA)位于正义链的 7 位, 8 位, 9 位中的任意一位。可选地, 双取代修饰的核苷酸 X 位于正义链的 8 位。

在一个实施方式中, $q=0$ 时, $b+c=14$ 。在另一个实施方式中, $q=0$ 时, $b=8$, $c=6$; 在另一个实施方式中, $q=0$ 时, $b=4$, $c=10$ 。

在一些实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸分子中, 存在一个或多个 X 且仅位于所述反义链中。在一些实施方式中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 当反义链中仅含有一个 X 时, X 位于反义链 8-10 位或 15 位中的任意一个位置。任选地, X 位于反义链 15 位。

在一些实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸分子中, 存在一个或多个 X 且仅位于所述正义链中。可选地, 所述正义链中可含有一个或两个 X。示例性地, 正义链中 X 可以位于相对于反义链 2, 8 或 15 位(以 5'-端起始计)中任意位置的对位。其中, 所述的对位指的是双链体区中一条链上的核苷酸与另一条链上相应的互补核苷酸的位置。示例性地, 以 5'-3'方向计, 在 19/21 核苷酸对组成结构中, 与 AS 链 15 位核苷酸对位的 SS 链位置为 5 位, 与 AS 链 8 位核苷酸对位的 SS 链位置为 12 位。这是本领域熟知的。

在一些实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸分子中, 存在两个或多个 X 且分别位于所述反义链和正义链两条链中。在一些实施方式中, X 可以位于反义链 8-10 位或 15 位(以 5'-端起始计)中的任意位置; 同时, 正义链中 X 可以位于相对于反义链 2, 8 或 15 位(以 5'-端起始计)中任意位置的对位。

在一些实施方式中, 本公开式(II)所示双链寡核苷酸或包含上述式(I)所示双链区的双链寡核苷酸中, 所述正义链具有以下特征的一个或多个或全部:

- 1) 所述正义链上存在至少一个 X, 且存在一个 X 位于反义链 15 位(以 5'-端起始计)的对位;
- 2) 所述正义链上位于反义链 10-13 位(以 5'-端起始计)对位的 4 个核苷酸中, 至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸;
- 3) 任选地, 所述正义链上存在至少一个 X 位于反义链种子区(1-8 位, 以 5'-端-计)的对位; 和/或, 该双链寡核苷酸的所述反义链具有以下特征的一个或多个或全部:
 - 1) 所述反义链的 2 位, 6 位, 14 位和 16 位(以 5'-端-计)均为氟代修饰的核苷酸;
 - 2) 所述反义链的其他位置核苷酸均为非氟代修饰的核苷酸;
 - 3) 所述反义链不存在 X 或至少存在一个 X; 且当反义链上存在 X 时, 该 X 任选地位于反义链的 8, 9, 10 或 15 位中的任意一个位置。

选地, 反义链含有一个 X 核苷酸且位于 15 位。

可选地, 该双链寡核苷酸的双链区包含由反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成 19-23 个碱基对(示例性地, 例如 19 个或 20 个或 21 个碱基对)。

在另一些实施方式中, 本公开式(II)所示双链寡核苷酸或包含上述式(I)所示双链区的双链寡核苷酸中, 具有以下特征的至少两个或至少三个或全部:

- 1) 所述正义链上存在至少一个 X 核苷酸; 且至少一个 X 位于反义链 15 位或 8 位或 2 位(以 5'-端起始计)任意一个位置的对位;
- 2) 所述正义链上位于与该反义链 10-13 位(以 5'-端起始计)相对位点处的 4 个核苷酸中, 至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸;
- 3) 所述反义链的 2 位, 6 位, 14 位和 16 位(以 5'-端起始计)均为氟代修饰的核苷酸, 其他位置核苷酸均为非氟代修饰的核苷酸;
- 4) 所述反义链的 8 位, 9 位, 10 位, 15 位中的至少一个位置为 X 核苷酸;
- 5) 任选地, 所述正义链上存在至少一个 X 位于反义链种子区(1-8 位, 以 5'-端起始计)的对位。

可选地,上述双链体区包含由反义链和正义链的序列彼此充分互补以形成 19-21 个碱基对(示例性地,例如 19 个或 20 个或 21 个碱基对)。示例性地,该双链寡核苷酸可以包含长度为 19-21 个核苷酸的正义链和长度为 19-23 个核苷酸的反义链。

在另一个实施方式中,本公开式(II)所示双链寡核苷酸或包含上述式(I)所示双链区的双链寡核苷酸中,具有以下特征的全部:

- 1) 所述正义链上存在一个或两个 X 核苷酸,且:任选地,至少一个 X 位于反义链 15 位或 8 位或 2 位(以 5'-端起始计)任意位置的对位;
- 2) 所述正义链上的位于反义链 10-13 位(以 5'-端起始计)对位的 4 个核苷酸中,至少存在 2 个氟代修饰的核苷酸;
- 3) 所述反义链的 2 位,6 位,14 位和 16 位(以 5'-端起始计)均为氟代修饰的核苷酸,其他位置核苷酸均为非氟代修饰的核苷酸;
- 4) 所述反义链的 8 位,9 位,10 位,15 位中的至少一个位置为核苷酸 X。

可选地,所述正义链上存在一个核苷酸 X,且位于反义链 15 位或 8 位或 2 位(以 5'-端-计)任意一个位置的对位。

可选地,所述反义链的 15 位为核苷酸 X。

在另一个实施方式中,本公开式(II)所示双链寡核苷酸或包含上述式(I)所示双链区的双链寡核苷酸中,具有以下特征的全部:

- 1) 所述正义链上存在一个 X,且位于反义链 15 位或 8 位或 2 位(以 5'-端-计)任意一个位置的对位;
- 2) 所述正义链上位于反义链 10-13 位(以 5'-端起始计)对位的 4 个核苷酸中,至少存在 2 个氟代修饰的核苷酸;
- 3) 所述反义链的 2 位,6 位,14 位和 16 位(以 5'-端起始计)均为氟代修饰的核苷酸,其他位置核苷酸均为非氟代修饰的核苷酸;
- 4) 所述反义链的 10 位,15 位中的至少一个位置为 X 核苷酸;和/或,所述反义链仅含有一个 X 核苷酸且位于 15 位(以 5'-端起始计);
- 5) 可选地,双链体区包含 19-23 个碱基对。

在一个实施方式中,本公开的双链寡核苷酸分子中,按照 5'末端到 3'末端的方向,所述双链体区中反义链的第 15 个核苷酸为 X 核苷酸,且正义链上位于反义链 2、8 位(以 5'-端起始计)对位的核苷酸也均为 X 核苷酸。

在一个实施方式中,本公开所述的双链寡核苷酸分子中,还具有硫代磷酸酯键修饰,示例性地:具有在正义链的位置 1-5(以 5'-端起始计)核苷酸中一个或两个硫代磷酸酯键修饰,和/或在反义链的位置 18-23(从该反义链的 5'端计数)中的 1 个或两个硫代磷酸酯键修饰。

在一些实施方式中,本公开的双链寡核苷酸如式(II)所示,其中双链体区的每个核苷酸均为修饰的核苷酸。

在另一些实施方式中,本公开的双链寡核苷酸如式(IIa)所示,其中双链体区的每个核苷酸均为修饰的核苷酸,且所述突出端位于所述反义链的 3'端,所述突出端核苷酸序列的长度为 1 至 3 个核苷酸。示例性地,本公开提供的双链寡核苷酸的正义链和反义链的长度之比可以是 19/19、19/21、19/22、20/20、21/21、21/22、21/23、22/22、22/24、22/25、23/25 等。在一些实施方式中,本公开的双链寡核苷酸的正义链和反义链各自具有 19/21 个核苷酸或 21/23 个核苷酸长度。

在一些实施方式中,所述突出端为 2 个核苷酸。示例性地,所述突出端为 dTdT(连续的胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸)、UU。

在一些实施方式中,本公开上述式(II)表示的双链寡核苷酸,包含长度为 19-21 个核苷酸的正义链和长度为 19-23 个核苷酸的反义链,其中该反义链和正义链的序列彼此互补形成 17-21 个碱基对的双链体区;并且该双链寡核苷酸在反义链的 3'端处具有核苷酸突出端,以及任选地:所述反义链或正义链均独立地包含 1-4 个硫代磷酸酯核苷酸间键,例如可以为但不限于为 1、2、3 或 4 个;和/或,该双链寡核苷酸的正义链与配体缀合。

对于所述的核苷酸突出端,示例性地,在反义链的 3'端具有 2-4 个核苷酸的突出端并且在反义链的 5'端具有平端。

在一些实施方式中,本公开上述式(II)表示的双链寡核苷酸中,按照 5'末端到 3'末端的方向,具有:1) 所述反义链的第 8,9,10 或 15 位核苷酸中的至少一个为 X 核苷酸;和所述反义链的 2 位,6 位,14 位和 16 位(以 5'-端-计)均为氟代修饰的核苷酸;2) 所述正义链上存在一个或两个 X 核苷酸,且所述正义链上至少一个 X 核苷酸位于反义链第 2, 8, 12, 或 15 位(以 5'-端-计)任一位置的对位;以及,正义链上的位于反义链 10-13 位(以 5'-端起始计)对位的 4 个核苷酸中,至少存在 2 个氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方式中,本公开提供的双链寡核苷酸的正义链和反义链中磷酸-糖骨架中的磷酸酯基中至少 1 个为硫代修饰的磷酸酯基(即硫代磷酸酯基)。本文所述硫代磷酸酯基为磷酸酯基中的磷酸二酯键中的至少一个氧原子被硫原子取代而形成的硫代磷酸酯基;在一些实施方式中,所述具有修饰基团的磷酸酯基为磷酸二酯键中的一个氧原子被硫原子取代而形成的硫代磷酸酯基。

在一些实施方式中, 本公开所述双链寡核苷酸中, 所述硫代磷酸酯基存在于所述正义链的末端和/或反义链的末端区域, 所述末端区域包括 5'末端和 3'末端的连续 3 个或 4 个或 5 个核苷酸。在另一些实施方式中, 基于单链末端核苷酸为第 1 个核苷酸计, 所述硫代磷酸酯基存在于第 1 至 3 个核苷酸序列的任意连续两个核苷酸之间。

示例性地, 基于单链末端核苷酸为第 1 个核苷酸计, 所述硫代磷酸酯基可以存在于所述正义链和/或反义链的末端区域的任意下列位置的一个或多个: 5'末端的第 1-2 个核苷酸之间、5'末端的第 2-3 个核苷酸之间、3'末端的第 1-2 个核苷酸之间、3'末端的第 2-3 个核苷酸之间。

在一些实施方式中, 所述反义链的 5'末端核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸。在一个实施方式中, 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸为含有乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸(例如, 5'-VP), 或者为硫代磷酸酯修饰的核苷酸。可选地, 所述 5'-VP 可以是 5'-E-VP、5'-Z-VP、或其组合物。

本公开的双链寡核苷酸可以是各种调节基因表达的双链寡核苷酸。在一些实施方式中, 可以是抑制或下调基因表达的双链寡核苷酸, 例如 siRNA; 在一些实施方式中, 可以是激活或上调基因表达的双链寡核苷酸, 例如, saRNA。

在一个实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸中:

- 1) 所述反义链按照 5'-3'方向计, 所述反义链的第 10 或 15 位核苷酸中的至少一个为选自下列修饰的核苷酸: 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃; 且所述反义链的 2 位, 6 位, 14 位和 16 位均为氟代修饰的核苷酸; 反义链的其余位置为甲氧基修饰的核苷酸;
- 2) 在所述正义链上, 位于与该反义链第 2, 8 或 15 位(以 5'-端起始计)任一位置的对位为选自下列修饰的核苷酸: 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃; 且, 正义链上的位于与该反义链 10-13 位(以反义链 5'-端起始计)对位的 4 个核苷酸中, 至少存在 2 个氟代修饰的核苷酸; 正义链的其余位置为甲氧基修饰的核苷酸;
- 3) 正义链和反义链上均至少含有一个硫代磷酸酯基, 且硫代磷酸酯基位于每条单链的末端区域。其中, 所述末端区域包含 3-5 个核苷酸长度区间。

在一个实施方式中, 该双链寡核苷酸还包括一个 5'-VP 修饰核苷酸。

在一个实施方式中, 本公开所述双链寡核苷酸的每个正义链和反义链具有 17-30 个核苷酸。在一个实例中, 该正义链具有 19-21 个核苷酸, 并且该反义链具有 19-25 个核苷酸。在一个实例中, 该正义链具有 19 或 21 个核苷酸, 并且该反义链具有 21 或 23 个核苷酸。

在一个实施方式中, 在该双链寡核苷酸双链体中的反义链的 5'-端的位置 1 处的核苷酸选自: A、dA、dU、U 或 dT。

在一个实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸(dsRNA)的反义链与靶 RNA 是 100%互补的, 并可以通过 RNA 干扰抑制其表达。在另一个实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸的反义链与靶 RNA 存在至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%碱基对比率的互补。

在本公开中描述的双链寡核苷酸 dsRNA 可以由式(II)表示, 或包含由式(I)表示的双链体区。

在一个实施方式中, 本公开的双链寡核苷酸包括正义链和反义链, 其中:

- (a) 其中的正义链, 具有:
 - (i) 19-21 个核苷酸的长度;
 - (ii) 衔接至 3'端的 ASGPR 配体, 其中所述的 ASGPR 配体为 GalNAc 或其衍生物;
 - (iii) 位于相对于反义链第 2, 8, 15 位(从 5'端计数)对位的至少一个位置处为 2'-大体积基团修饰的核苷酸;
 - (iv) 位于与该反义链 10-13 位(从 5'端计数)对位的 4 个核苷酸中, 至少存在 2 个 2'-氟代修饰的核苷酸; 以及任选地, 其余位置独立地选自 2'-OMe 修饰的核苷酸, 2'-脱氧修饰的核苷酸或 2'-大体积基团修饰的核苷酸中的一个或至少一个; 其中 2'-大体积基团修饰选自下列修饰的核苷酸中的一个或多个: 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃;
- 和
- (b) 其中的反义链, 其具有:
 - (i) 21-23 个核苷酸的长度;
 - (ii) 所述反义链的第 10 或 15 位核苷酸中的至少一个为 2'-大体积基团修饰的核苷酸;
 - (iii) 所述反义链的 2 位, 6 位, 14 位和 16 位均为 2'-氟代修饰的核苷酸; 以及任选地, 反义链的其余位置选自 2'-OMe 修饰的核苷酸, 2'-脱氧修饰的核苷酸或 2'-大体积基团修饰的核苷酸中的一个或至少一个; 其中 2'-大体积基团修饰选自下列修饰的核苷酸中的一个或多个: 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃;
 - (iv) 末端区域的核苷酸之间至少具有一个硫代磷酸酯基键联;
 - (v) 任选地, 在该反义链的 3'-端具有 2-3 个核苷酸组成的突出端, 和在该反义链的 5'-端的一个平端。

在一个实施方式中,本公开上述双链寡核苷酸在反义链的核苷酸位置1和2之间、核苷酸位置2和3之间、核苷酸位置19和20之间、和核苷酸位置20和21之间存在硫代磷酸酯基键联(从5'端计数)。在一个实施例中,在该反义链的3'端具有两个核苷酸组成的突出端,该反义链的5'端为平端。

在一个实施例中,本公开的双链寡核苷酸包括:以5'端计数,反义链的15位处具有2'-大体积基团修饰的核苷酸;在正义链上位于反义链第2,8,15位对位的任一位置处为2'-大体积基团修饰的核苷酸;且所述的2'-大体积基团为该所在核苷酸提供大于2'-OMe修饰的空间体积。

在一个实施方式中,反义链的15位处具有2'-大体积基团修饰的核苷酸;在正义链上位于反义链第15位对位的位置为2'-大体积基团修饰的核苷酸。

在一个实施方式中,反义链的15位处具有2'-大体积基团修饰的核苷酸;在正义链上位于反义链第8位对位的位置处为2'-大体积基团修饰的核苷酸。

在一个实施方式中,反义链的15位处具有2'-大体积基团修饰的核苷酸;在正义链上位于反义链第2位对位的位置处为2'-大体积基团修饰的核苷酸。

在一个实施方式中,反义链的15位处具有2'-大体积基团修饰的核苷酸;在正义链上位于反义链第2位和第8位对位的位置处为2'-大体积基团修饰的核苷酸。

在可选的实施方式中,所述正义链上存在一个位于该反义链种子区相对位点处的2'-大体积基团修饰核苷酸(其中,反义链的种子区在位置1-8处,以5'端计)。

任选地,上述的2'-大体积基团选自下列的一个或多个:2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃。

示例性地,当正义链的长度是21个核苷酸时,该2'-大体积基团修饰的核苷酸在以5'端计的位置7,14,20处(分别对应反义链第15,8,2位的对位)。

示例性地,当正义链的长度是19个核苷酸时,该2'-大体积基团修饰的核苷酸在以5'端计的位置5,12,18处(分别对应反义链第15,8,2位的对位)。

本公开提供的双链寡核苷酸可以单独使用,或者与药学上可接受的载体形成药物组合物,或者与缀合分子结合形成寡核苷酸缀合物,或者其他的形式。使用时,可以将有效量的所述双链寡核苷酸、所述药物组合物或寡核苷酸缀合物与细胞接触,以调节目标基因的表达,或者将所述双链寡核苷酸、所述药物组合物或缀合物给与受试者,调节目标基因的表达,达到治疗与目标基因表达水平相关的病理状况或疾病的目的。

另一方面,本公开提供了一种双链寡核苷酸,包含正义链和反义链,每条链具有17至35个核苷酸,其中每个核苷酸为修饰或未修饰的核苷酸,所述正义链和反义链至少部分地反向互补形成双链区;其特征在于,所述双链寡核苷酸包含至少一个2'-双取代基修饰的核苷酸,且所述2'-双取代基中的每个取代基各自独立地选自甲基或氟;

其中,当所述双链寡核苷酸的双链区包含2'-双取代基修饰的核苷酸时,所述2'-双取代基修饰的核苷酸选自2'-双F取代的核苷酸;或,当所述双链寡核苷酸双链区之外的位置包含2'-双取代基修饰的核苷酸时,所述2'-双取代基修饰的核苷酸选自2'-F-2'-Me取代的核苷酸。

在一些实施方案中,所述双链寡核苷酸具有以下特征的一个或多个:

(1)所述双链寡核苷酸包含2'-双F取代的核苷酸时,所述2'-双F取代的核苷酸位于从正义链的5'端起始计的位置7、8、9或10处中的至少一个;

(2)所述双链寡核苷酸包含2'-双F取代的核苷酸时,所述2'-双F取代的核苷酸位于从反义链的5'端起始计的位置2、4、6、8、9、10、12、14或16处中的至少一个;

(3)所述双链寡核苷酸包含2'-F-2'-Me取代的核苷酸时,所述2'-F-2'-Me取代的核苷酸位于寡核苷酸双链区之外的位置。

(4)所述双链寡核苷酸包含2'-F-2'-Me取代的核苷酸时,所述2'-F-2'-Me取代的核苷酸位于反义链的3'末端位置的突出端。

在一些实施方案中,特征(1)中,所述双链寡核苷酸包含2'-双F取代的核苷酸时,所述2'-双F取代的核苷酸位于从正义链的5'端起始计的位置7、8、9或10处中的至少2个或至少3个。

在一些实施方案中,特征(2)中,所述双链寡核苷酸包含2'-双F取代的核苷酸时,所述2'-双F取代的核苷酸位于从反义链的5'端起始计的位置2、4、6、8、9、10、12、14或16处中的至少2个。另一方面,本公开提供了一种双链寡核苷酸缀合物,该寡核苷酸缀合物含有本公开提供的双链寡核苷酸或根据本公开的方法获得的双链寡核苷酸,以及缀合连接至该双链寡核苷酸的缀合基团。本公开可通过与合适的载体形成药物组合物或与合适的缀合分子形成寡核苷酸缀合

物,来进一步改善本公开的双链寡核苷酸的血液稳定性、提高其靶向性。所述缀合分子可以是靶向肝脏、肺脏、肾脏等组织的缀合分子。

在一些实施方式中,所述缀合基团包含接头和药学上可接受的靶向基团,并且,所述双链寡核苷酸、所述接头和所述靶向基团或者所述递送辅助基团依次共价或非共价连接,每个所述靶向基团选自能够和细胞表面受体结合的配体。一般来说,所述靶向基团为1-6个。在一种实施方式中,所述靶向基团为2-4个。双链寡核苷酸与缀合基团的缀合位点可以在双链寡核苷酸正义链的3'端或5'端,也可在反义链的5'端,还可以在双链寡核苷酸的内部序列中。在一些具体的实施方式中,所述双链寡核苷酸与缀合基团的缀合位点在双链寡核苷酸正义链的3'末端。

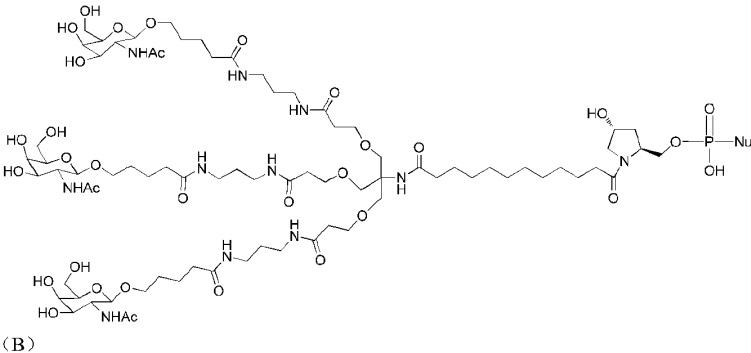
上述寡核苷酸缀合物可以通过现有技术中已经详细描述的方法进行合成。例如,WO2015006740A2中详细描述了多种 siRNA 缀合物的制备方法。

在又一个方面,本公开提供了一种双链寡核苷酸的缀合物或偶联物,所述缀合物包含本文所述的双链寡核苷酸和靶向基团,以提供组织特异性靶向。

在一些实施方式中,本公开的缀合物特异性地靶向至肝细胞表面受体,从而特异性地靶向至肝组织。在一些实施方式中,本公开所述靶向基团为与去唾液酸糖蛋白受体亲和的配体,以特异性地靶向至肝细胞表面的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)。示例性地,靶向基团为含有来自 N-乙酰基-半乳糖胺(GalNAc)或其衍生物的配体基团。

在一个实施方式中,本公开提供的双链寡核苷酸与至少一个 ASGPR 配体相连接。示例性,该 ASGPR 配体是通过二价或三价支链接头附接的 GalNAc 或其衍生物。

在一些实施方式中,该 ASGPR 配体通过 linker 被附接至所述双链寡核苷酸正义链或反义链的 5'-端或 3'-端形成缀合物;示例性地,所述缀合物具有如下结构式(B):



其中, Nu 代表本公开所述的双链寡核苷酸或其他核酸类药物活性分子(例如单链寡核苷酸)。

在一个实施方式中,配体可以缀合在双链寡核苷酸的正义链的3'-端或5'-端。

本公开还提供所述双链寡核苷酸及其试剂的用途。在一个实施例中,所述用途为用于抑制受试者中的靶基因表达。该受试者可以是任何动物,优选地是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、绵羊、牛、狗、猫、或人。

在一些实施方式中,本公开还提供了一种药物组合物,该药物组合物含有本公开所述的双链寡核苷酸和药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可以是任何可用的载体。

在一些实施方式中,所述药物组合物中,对双链寡核苷酸和药学上可接受的载体的含量没有特别要求。所述药物组合物中,还可以包含药学上可接受的其它辅料,该辅料可以为本领域常规采用的各种制剂或化合物的一种或多种。例如,所述药学上可接受的其它辅料可以包括 pH 缓冲液、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。

在一些实施方式中,本公开提供了一种治疗和/或预防与目标基因表达的 mRNA 水平相关的疾病或症状的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予有效量的本公开提供的双链寡核苷酸、药物组合物和/或寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中,所述与目标基因表达的 mRNA 水平相关的疾病或症状是肝炎、肝纤维化疾病、肝增生性疾病和/或血脂异常。在一些实施方式中,所述血脂异常为高胆固醇血症、高甘油三酯血症或动脉粥样硬化。

在一些实施方式中，本公开提供了一种该双链寡核苷酸、上述含有双链寡核苷酸的药物组合物或上述寡核苷酸缀合物在制备用于治疗/或预防与目标基因表达的 mRNA 水平相关的引起的病理状况或疾病（例如基因过量表达）的药物中的用途。

在一些实施方式中，所述目标基因是肝细胞中异常表达的基因。在一些实施方式中，所述目标基因是肝脏中表达的内源性基因。在肝脏中表达的内源性基因包括但不限于 ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV 等基因。

在一些实施方式中，所述疾病选自慢性肝病、肝炎、肝纤维化疾病、肝增生性疾病和血脂异常。

在一些实施方式中，所述血脂异常为高胆固醇血症、高甘油三酯血症或动脉粥样硬化。

在一些实施方式中，本公开提供了一种调节基因表达的方法，其中，所述方法包括将有效量的上述双链寡核苷酸、上述药物组合物或上述寡核苷酸缀合物与所述表达该基因的细胞进行接触。

在一些实施方式中，本公开提供了一种治疗由基因异常表达引起的病理状况或疾病的方法，所述方法包括向受试者给予有效量的上述双链寡核苷酸、上述药物组合物或上述寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中，所述异常表达为过量表达，相应地，所述调节为对所述过量表达进行抑制。在一些实施方式中，所述调节是指抑制肝细胞中目标基因表达，所述目标基因表达的 mRNA 选自乙型肝炎病毒基因(HBV)表达的 mRNA、血管生成素样蛋白 3(ANGPTL3)基因表达的 mRNA 或者载脂蛋白 C3(ApoC3)基因表达的 mRNA。

在一些实施方式中，本公开上述双链寡核苷酸、上述药物组合物或上述寡核苷酸缀合物也可以用于治疗其他肝脏疾病，包括癌症、肝细胞癌(HCC)、肝转移或肝母细胞瘤。

在一些实施方式中，可通过本领域已知的任何合适途径向受试者给药，所述途径包括但不限于：口服或胃肠外途径，如静脉内给药、肌肉内给药、皮下给药、经皮给药、气道给药(气雾剂)、肺部给药、鼻部给药、直肠给药和局部给药(包括口腔含化给药和舌下给药)。给药频率可以是每周、每月或每年 1 次或多次。

在一些实施方式中，本公开进一步提供了一种用于通过皮下或静脉内给予向受试者的特定靶标递送上述双链寡核苷酸、上述药物组合物或上述寡核苷酸缀合物的方法。

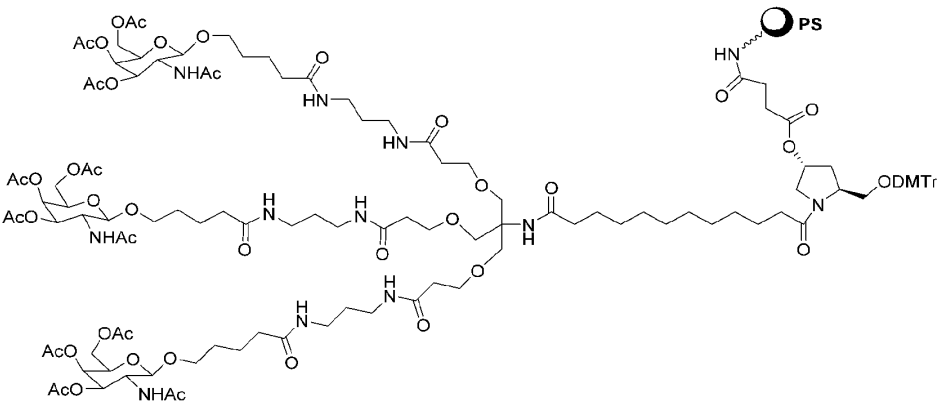
本公开提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含如上所述的双链寡核苷酸、如上所述的药物组合物和/或如上所述的寡核苷酸缀合物。

在一些实施方式中，本文所述的试剂盒可在一个容器中提供双链寡核苷酸。在一些实施方式中，本文所述的试剂盒可包含一个提供药学上可接受的赋形剂的容器。在一些实施方式中，所述试剂盒中还可包含其它的成分例如稳定剂或防腐剂等成分。在一些实施方式中，本文所述的试剂盒可在不同于提供本文所述双链寡核苷酸的容器以外的其它容器中包含至少一种其它治疗剂。

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

除非另有说明，本公开各实施例所述的碱基组成及修饰含义如下：大写字母 A、U、G、C、T 表示核苷酸的碱基组成，小写字母 m 表示其之前一位字母表示的核苷酸为 2'-甲氧基修饰核苷酸；小写字母 f 表示其之前一位字母表示的核苷酸为 2'-氟代修饰核苷酸；小写字母 d 表示其之前一位字母表示的核苷酸为 2'-脱氧核糖核苷酸；括号加大写字母 TBDMS，即(TBDMS)，表示其前一位字母表示的核苷酸为 2'-O-叔丁基二甲基硅基修饰核苷酸；括号加大写字母 TOM，即(TOM)，表示其前一位字母表示的核苷酸为 2'-O-三异丙基甲基硅烷修饰核苷酸；括号加大写字母 MOE，即(MOE)，表示其前一位字母表示的核苷酸为 2'-O-甲氧基乙基修饰核苷酸；小写字母 s 表示其前后两位字母表示的核苷酸之间为硫代磷酸酯键连接。

本公开中，化合物 L96-PS 的结构式如式(C)所示：



(C)

其中，PS 代表聚苯乙烯（Polystyrene）树脂固相载体，化合物 L96-PS 购自凯莱英医药集团（天津）股份有限公司，载量为 120±12μmol/g（检测方法为：UV/HPLC）。

除非另有说明，本公开使用的试剂耗材（表 1）及仪器设备（表 2）均来源于下述厂家的市售产品。

表 1

名称	厂家
HepG2 细胞	武汉普诺赛生命科技有限公司
DMEM 培养基	中科迈晨（北京）科技有限公司
Opti-MEM 培养基	GIBCO
胎牛血清（FBS）	Merck Ltd
Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific
瀚维 RNA 提取试剂盒	浙江瀚维科技有限责任公司
Reverse Transcription System	Promega Corporation
SYBR Select Master Mix	ABI
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	SIGMA
Collagenase from Clostridium histolyticum	SIGMA
RNA Later	Thermo Fisher Scientific

表 2

名称	生产厂家
全自动核酸提取仪	浙江瀚维科技有限责任公司
高速冷冻离心机	Eppendorf
NANODROP OneC	Thermo Fisher Scientific
梯度 PCR 扩增仪	Eppendorf
荧光定量 PCR 仪	ABI StepOne Plus
凝胶成像仪	上海天能生命科学有限公司
电泳仪	北京六一仪器厂
CO ₂ 恒温培养箱	Thermo Fisher Scientific
生物安全柜	Esco Lifesciences
TissueLyser II 型全自动组织匀浆仪	上海净信实业发展有限公司

除非另有说明，本公开使用的 dsRNA(实施例中用 siRNA 指代)序列均委托苏州贝信生物技术有限公司合成；PCR 引物合成均委托北京擎科生物科技有限公司完成；实验动物 C57BL/6J 小鼠、ICR 小鼠均购自斯贝福（北京）生物技术有限公司；血生化指标检测均委托北京希诺因生物科技有限公司完成。

除非另有说明，本公开各实施例中涉及体内/体外 siRNA 活性实验的 Real-time PCR 检测数据均采用 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算，计算方法概述如下：

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

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

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

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

以对照组为基准，对测试组目标基因的 mRNA 表达水平进行归一化，定义对照组目标基因 mRNA 剩余表达水平为 100%

$$\text{测试组目标基因 mRNA 相对剩余表达水平} = 2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})} \times 100\%$$

$$\text{测试组目标基因 mRNA 抑制率} = 100\% - \text{测试组目标基因 mRNA 相对表达水平}$$

体内/体外活性实验数据均以 $\bar{X} \pm SD$ （或 $\bar{X} \pm STDEV$ ）表示，实验数据均采用 GraphPad prism 8.0 软件进行制图和分析。其中， $\pm SD$ 值和 $\pm STDEV$ 值均表示标准差。

除非另有说明，本公开各实施例中所述试剂比例均按体积比（v/v）计算。

下面将结合实施例对本公开的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本公开，而不应视为限定本公开的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

大空间体积修饰的核苷单类似物的制备

本公开制备例中用到的试剂和试剂来源如表 3 所示：

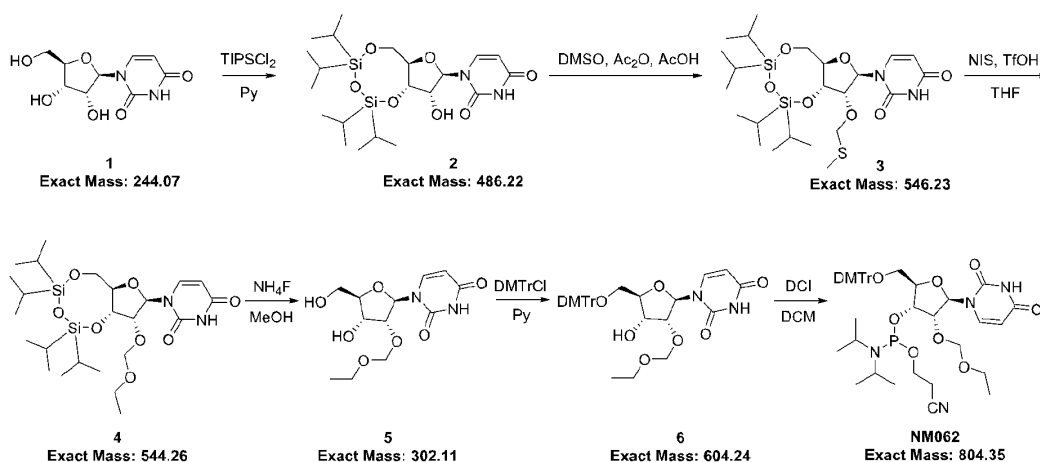
表 3

试剂名称	缩写	CAS 号
尿苷	Uridine	58-96-8

1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷	—	69304-37-6
N-碘代丁二酰亚胺	NIS	516-12-1
三氟甲磺酸	TfOH	1493-13-6
氟化铵	NH ₄ F	—
4,4'-二甲氧基三苯甲基氯/4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷	DMTrCl	40615-36-9
吡啶	Py	110-86-1
双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦	—	102691-36-1
4,5-二氰基咪唑	DCI	1122-28-7
三氟乙醇	-	75-89-8

制备例 1：化合物 NM062 的合成

化合物 NM062 的合成路线如下：

**(1-1) 化合物 2 的合成**

将化合物 1 (10g, 40.97mmol, 尿苷)溶于 100ml 吡啶中,加入 1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷(14.22g, 45.07mmol),在 25℃下搅拌 16 小时。反应完成后,将反应液浓缩除去溶剂,加入 300ml 二氯甲烷稀释,先用 100ml 饱和氯化铵水溶液洗涤两次 (2×100ml)、再用 100ml 饱和氯化钠水溶液洗涤两次 (2×100ml),有机相用无水硫酸钠干燥并过滤,浓缩,柱色谱正相纯化(洗脱梯度:石油醚/乙酸乙酯=3/1, 体积比 v/v),得到化合物 2 (11.5g, 收率 57.7%)。MS ESI (m/z) = 487.27 [M+H]⁺。

(1-2) 化合物 3 的合成

25℃下将化合物 2 (11g, 22.62mmol)溶于 77ml 二甲基亚砜中,加入 77ml 乙酸、38ml 乙酸酐,在 25℃下搅拌 16 小时。反应完成后,加入 500ml 乙酸乙酯稀释,用 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤两次 (2×100ml),用 100ml 饱和氯化钠水溶液洗涤两次 (2×100ml),有机相用无水硫酸钠干燥并过滤,浓缩,柱色谱正相纯化(洗脱梯度:石油醚/乙酸乙酯=3/1, v/v),得到化合物 3 (11.22g, 收率 90.81%)。MS ESI (m/z) = 546.23 [M+H]⁺。

(1-3) 化合物 4 的合成

25℃下将化合物 3 (5g, 9.15mmol)溶于 50ml 四氢呋喃中,加入乙醇 (4.21g, 91.5mmol),氮气置换三次,用干冰/乙腈浴将反应体系降温至-40℃,在-40℃下滴加 N-碘代丁二酰亚胺 (2.47g, 10.98mmol) 的四氢呋喃 (5ml) 溶液、三氟甲磺酸 (2.75g, 18.3mmol) 的四氢呋喃 (5ml) 溶液,氮气氛围下,反应液在-40℃搅拌 1 小时。反应完成后,加入 8ml 三乙胺淬灭,加入 10 质量%硫代硫酸钠的水溶液,用 150ml 二氯甲烷萃取四次 (4×150ml),有机相合并,有机相用 80ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤两次 (2×80ml)、用 100ml 饱和食盐水洗涤一次 (1×100ml),无水硫酸钠干燥并过滤,浓缩,柱色谱正相纯化(洗脱梯度:石油醚/乙酸乙酯=4/1, v/v),得到化合物 4 (4.78g, 收率 95.96%)。MS ESI (m/z) = 544.26 [M+H]⁺。

(1-4) 化合物 5 的合成

25℃下将化合物 4 (4g, 7.35mmol) 溶于 32ml 甲醇中, 加入氟化铵 (1.36g, 36.75mmol), 在 60℃ 搅拌 16 小时。反应完成后, 旋干除去溶剂, 柱色谱正相纯化 (洗脱梯度: 二氯甲烷/甲醇=20/1, v/v), 得到化合物 5 (2.05g, 收率 92.34%)。MS ESI (m/z) = 303.2 $[M+H]^+$ 。

(1-5) 化合物 6 的合成

冰浴下将化合物 5 (2g, 6.62mmol) 溶于 20ml 吡啶中, 冰浴降至 0℃, 分批加入 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (2.77g, 7.94mmol), 反应液在 0℃ 搅拌 1 小时。反应完成后, 加入 2ml 甲醇进行淬灭, 旋干除去溶剂, 加入 50ml 饱和氯化铵水溶液, 50ml 乙酸乙酯萃取三次 (3×50ml), 有机相合并, 100ml 饱和食盐水洗涤一次 (1×100ml), 无水硫酸钠干燥并过滤, 浓缩, 柱色谱正相纯化 (洗脱梯度: 石油醚/乙酸乙酯=1/1, v/v), 得到化合物 6 (2.28g, 收率 55.67%)。MS ESI (m/z) = 604.3 $[M+H]^+$ 。

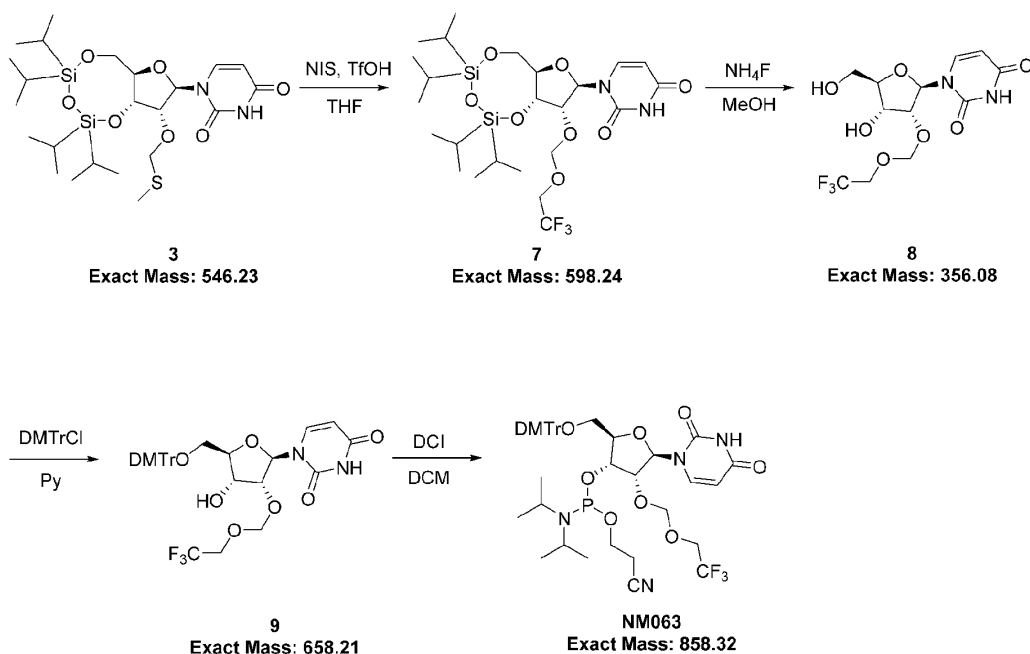
(1-6) 化合物 NM062 的合成

将化合物 6 (1.5g, 2.48mmol) 用 10ml 乙腈反复带干三次 (3×10ml) 后, 溶于 15ml 二氯甲烷中, 先加入 3-{[双(2-异丙基氨基)磷酰基]氧基}丙腈 (899.6mg, 2.98mmol, 用 10ml 乙腈反复带干三次 (3×10ml)) 的二氯甲烷 (15ml) 溶液, 再加入 1H-咪唑-4,5-二腈 (374.8mg, 1.984mmol), 氮气置换三次, 在氮气氛围中 25℃ 下搅拌 1 小时。反应完成后, 向反应液中加入 30ml 饱和碳酸氢钠水溶液稀释, 用 20ml 二氯甲烷萃取三次 (3×20ml), 有机相合并, 有机相 30ml 饱和食盐水洗涤两次 (2×30ml), 无水硫酸钠干燥并过滤, 浓缩, 柱色谱反相纯化 (洗脱梯度: 水/乙腈=1/9, v/v), 得到化合物 NM062 (1.7g, 收率 85.14%)。MS ESI (m/z) = 604.3 $[M+H]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 11.41 (s, 1H), 7.75 (dd, J = 8.2, 10.6 Hz, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 2H), 7.35 - 7.29 (m, 2H), 7.29 - 7.21 (m, 5H), 6.90 (dd, J = 6.1, 7.8 Hz, 4H), 5.88 (dd, J = 2.3, 4.2 Hz, 1H), 5.35 (dd, J = 8.5, 9.6 Hz, 1H), 4.81 - 4.68 (m, 2H), 4.48 - 4.33 (m, 2H), 4.19 - 4.04 (m, 1H), 3.74 (d, J = 2.0 Hz, 7H), 3.58 - 3.44 (m, 4H), 3.39 - 3.31 (m, 2H), 3.30 (br s, 1H), 2.78 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 2.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 1.16 - 1.03 (m, 12H), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 3H)。

制备例 2: 化合物 NM063 的合成

化合物 NM063 的合成路线如下:



(2-1) 化合物 7 的合成

25℃下, 将化合物 3 (5g, 9.15mmol) 溶于 50ml 四氢呋喃中, 加入三氟乙醇 (9.15g, 91.5mmol), 氮气置换三次, 干冰/乙腈浴降至 -40℃, 在 -40℃ 下滴加入 N-碘代丁二酰亚胺 (2.47g, 10.98mmol) 的四氢呋喃 (5ml) 溶液、

三氟甲烷磺酸 (2.75g, 18.3mmol) 的四氢呋喃 (5ml) 溶液, 在氮气氛围中在 -40°C 下搅拌 1 小时。反应完成后, 向反应液中加入 80ml 三乙胺淬灭, 加入 10 质量% 硫代硫酸钠的水溶液, 用 150ml 二氯甲烷萃取四次 (4×150ml), 有机相合并, 有机相用 80ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤两次 (2×80ml)、100ml 饱和食盐水洗涤一次 (1×100ml), 无水硫酸钠干燥并过滤, 浓缩, 柱色谱正相纯化 (洗脱梯度: 石油醚/乙酸乙酯=4/1, v/v), 得到化合物 7 (3.04g, 收率 55.51%)。MS ESI (m/z) = 599.23 [M+H]⁺。

(2-2) 化合物 8 的合成

25°C 下, 将化合物 7 (3 g, 5.01 mmol) 溶于甲醇 (32 mL) 中, 加入氟化铵 (926.85 mg, 25.05 mmol), 反应液在 60°C 搅拌 16 小时。反应完成后, 旋干除去溶剂, 柱色谱正相纯化 (洗脱梯度: 二氯甲烷/甲醇=20/1, v/v), 得到化合物 8 (1.51g, 收率 83.43%)。MS ESI (m/z) = 356.26 [M+H]⁺。

(2-3) 化合物 9 的合成

冰浴下将化合物 8 (1.51 g, 4.24 mmol) 溶于吡啶 (15 mL) 中, 冰浴降至 0°C, 分批加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯 (1.73 g, 5.09 mmol), 反应液在 0°C 搅拌 1 小时。反应完成后, 加入甲醇 (2 mL) 进行淬灭, 旋干除去溶剂, 加入饱和氯化铵水溶液 (50 mL), 乙酸乙酯 (3×50 mL) 萃取, 有机相合并, 饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 并过滤、浓缩, 进行柱色谱正相纯化 (洗脱梯度: 石油醚/乙酸乙酯=1/1, v/v), 得到化合物 9 (2.08 g, 收率 74.53%)。MS ESI (m/z) = 681.32 [M+Na]⁺。

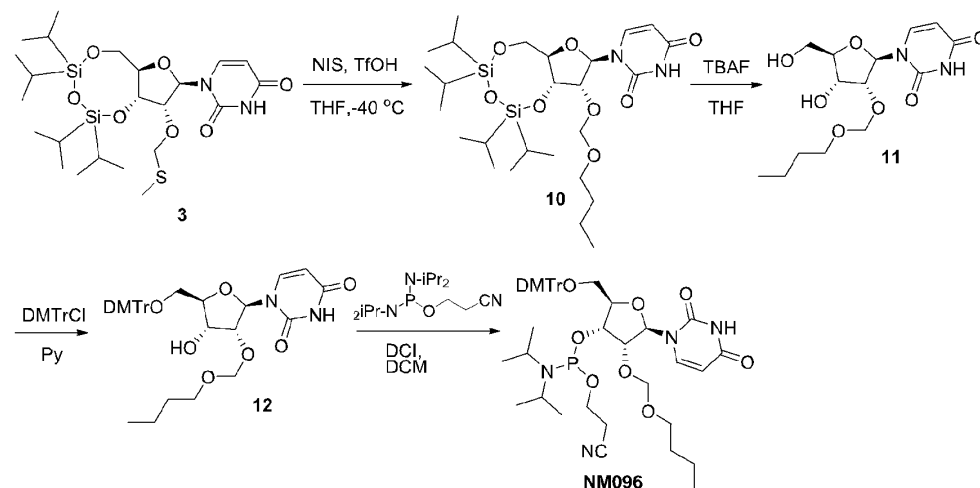
(2-4) 化合物 NM063 的合成

将化合物 9 (1.9 g, 2.89 mmol) 用乙腈 (3×10 mL) 反复带干, 溶于二氯甲烷 (15 mL), 加入以乙腈 (3×10 mL) 带干的 3-{[双(二异丙基氨基)磷酸基]氧基}丙腈 (1.307 g, 3.46 mmol) 的二氯甲烷 (15 mL) 溶液, 加入 1H-咪唑-4,5-二腈 (272.5 mg, 2.312 mmol), 氮气置换三次, 在氮气氛围下, 反应液在 25°C 搅拌 1 小时。反应完成后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液 (30 mL) 进行稀释, 二氯甲烷 (3×20 mL) 萃取, 有机相合并, 饱和食盐水 (2×30 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 并过滤、浓缩, 柱色谱反相纯化 (C18 色谱柱, 洗脱梯度: 水/乙腈=1/9, v/v), 得到化合物 NM063 (2.07g, 收率 83.55%)。MS ESI (m/z) = 859.43 [M+H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 11.41 (s, 1H), 7.77 (dd, J = 6.0, 7.9 Hz, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 2H), 7.35 - 7.18 (m, 7H), 6.95 - 6.85 (m, 4H), 5.90 - 5.83 (m, 1H), 5.28 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.99 - 4.86 (m, 2H), 4.53 - 4.40 (m, 2H), 4.26 - 4.02 (m, 3H), 3.85 - 3.59 (m, 8H), 3.52 (qd, J = 6.7, 10.4 Hz, 2H), 3.43 - 3.32 (m, 2H), 2.81 - 2.75 (m, 1H), 2.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 1.16 - 1.04 (m, 9H), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 3H)。

制备例 3: 化合物 NM096 的合成

本制备例中, 化合物 NM096 的合成路线如下:



(3-1) 化合物 10 的合成

25°C 下, 将化合物 3 (3 g, 5.49 mmol, 1 eq) 溶于四氢呋喃 (30 mL) 中, 加入正丁醇 (4.06 g, 54.92 mmol, 10 eq, CAS 号为 71-36-3), 氮气置换三次, 用干冰将反应体系降温至 -40°C, 滴加入 N-碘代丁二酰亚胺 (1.48 g, 6.59 mmol, 1.2 eq, 简称为 NIS, CAS 号为 516-12-1) 的四氢呋喃 (5 mL) 溶液、三氟甲磺酸 (1.64 g, 10.98 mmol, 2 eq, 简称为 TfOH, CAS

号为 1493-13-6)的四氢呋喃(5 mL)溶液,反应体系在-40℃搅拌 1 小时,加入三乙胺(6 mL)淬灭。反应结束后,浓缩反应液,加入二氯甲烷(2×50 mL)萃取,饱和碳酸氢钠水溶液(2×50 mL)、饱和氯化钠水溶液(30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=3/1,体积比 v/v),得到白色固体状的化合物 **10** (3.05 g, 收率 96.95%)。MS ESI (m/z) = 573.3 [M + H]⁺。

(3-2) 化合物 11 的合成

25℃下,将化合物 **10** (3.05 g, 5.33 mmol, 1 eq)溶于四氢呋喃(30 mL)中,加入四丁基氟化铵(CAS 号为 429-41-4)的四氢呋喃溶液(10.66 mL, 1 M, 10.66 mmol, 2 eq),反应液在 25℃搅拌 3 小时。反应完成后,浓缩反应液,柱色谱纯化(洗脱液:二氯甲烷/甲醇=10/1, v/v),得到白色固体状的化合物 **11** (1.7 g, 收率 98.27%)。MS ESI (m/z) = 353.4 [M + Na]⁺。

(3-3) 化合物 12 的合成

25℃下,将化合物 **11** (1.7 g, 5.15 mmol, 1 eq)溶于吡啶(17 mL)中,冰浴降至 0℃,分批加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯(2.27 g, 6.69 mmol, 1.3 eq, 简称为 DMTrCl, CAS 号为 40615-36-9),反应液在 25℃搅拌 1 小时,加入甲醇淬灭。反应结束后,浓缩反应液,加入乙酸乙酯(50 mL)稀释,饱和氯化铵水溶液(2×30 mL)、饱和食盐水(30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=1/1, v/v)得到黄色固体化合物 **12** (2.44 g, 收率 74.89%)。MS ESI (m/z) = 633.3 [M + H]⁺。

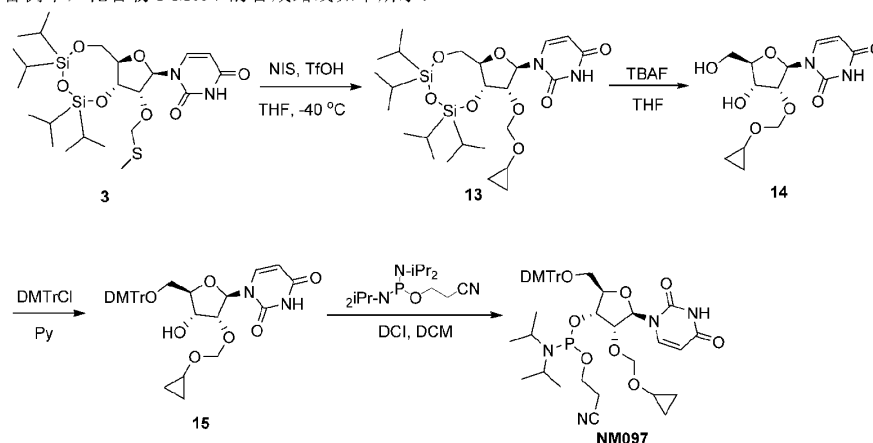
(3-3) 化合物 NM096 的合成

将化合物 **12** (2.44 g, 3.85 mmol, 1 eq)经乙腈(3 × 30 mL)反复带干后溶于二氯甲烷(25 mL)中,加入经乙腈(3 × 10 mL)带干的双(二异丙基氨基)(2-氧基乙氧基)膦(1.63 g, 5.78 mmol, 1.5 eq, CAS 号为 102691-36-1)的二氯甲烷(25 mL)溶液,加入 1H-咪唑-4,5-二腈(364.2 mg, 3.08 mmol, 0.8 eq, CAS 号为 1122-28-7),氮气置换三次,反应体系在氮气氛围中 25℃下搅拌 1 小时。反应完成后,向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)进行稀释,二氯甲烷(3×30 mL)萃取,有机相合并,有机相用饱和氯化钠水溶液(2×30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=2/1, v/v),得到白色固体状的化合物 **NM096** (2.7 g, 收率 84.11%)。MS ESI (m/z) = 833.4 [M + H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.36 (s, 1H), 7.72 (dd, J = 11.8, 8.1 Hz, 1H), 7.42 – 7.29 (m, 4H), 7.29 – 7.20 (m, 5H), 6.89 (dd, J = 8.6, 5.8 Hz, 4H), 5.89 (dd, J = 5.3, 3.1 Hz, 1H), 5.37 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 4.79 – 4.66 (m, 2H), 4.40 (dp, J = 19.0, 4.8 Hz, 2H), 4.12 (dq, J = 20.3, 3.8 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 2.1 Hz, 7H), 3.71 – 3.58 (m, 1H), 3.53 (dq, J = 9.8, 6.9 Hz, 2H), 3.49 – 3.40 (m, 2H), 3.39 – 3.32 (m, 1H), 2.78 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 2.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 1.42 (dq, J = 10.1, 6.8 Hz, 2H), 1.26 (dq, J = 14.3, 7.3 Hz, 2H), 1.20 – 1.06 (m, 10H), 0.99 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.83 (td, J = 7.4, 3.5 Hz, 3H)。

制备例 4: 化合物 NM097 的合成

本制备例中,化合物 NM097 的合成路线如下所示:



(4-1) 化合物 13 的合成

25℃下,将化合物 **3** (3 g, 5.49 mmol, 1 eq)溶于四氢呋喃(30 mL)中,加入环丙醇(3.18 g, 54.92 mmol, 10 eq),氮气置换三次,反应体系用干冰降温至-40℃,滴加入 NIS (1.48 g, 6.59 mmol, 1.2 eq)的四氢呋喃(5 mL)溶液、TfOH (1.64 g, 10.98

mmol, 2 eq)的四氢呋喃(5 mL)溶液,反应体系在-40℃搅拌1小时,加入三乙胺(6 mL)淬灭。反应完成后,浓缩反应液,加入二氯甲烷(2×50 mL)萃取,合并有机相,有机相用饱和碳酸氢钠水溶液(2×50 mL)、饱和氯化钠水溶液(30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=3/1, v/v),得到白色固体状的化合物 **13** (2.59 g, 收率 84.78%)。MS ESI (m/z) = 557.3 [$M + H$]⁺。

(4-2) 化合物 14 的合成

25℃下,将化合物 **13** (2.59 g, 4.66 mmol, 1 eq)溶于四氢呋喃(30 mL)中,加入四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(9.32 mL, 1 M, 9.32 mmol, 2 eq),反应液在 25℃搅拌 3 小时。反应完成后,浓缩反应液,柱色谱纯化(洗脱液:二氯甲烷/甲醇=20/1, v/v),得到白色固体状的化合物 **14** (1.45 g, 收率 99.3%)。MS ESI (m/z) = 337.1 [$M + Na$]⁺。

(4-3) 化合物 15 的合成

25℃下,将化合物 **14** (1.45 g, 4.62 mmol, 1 eq)溶于吡啶(15 mL)中,冰浴降温至 0℃,分批加入 DMTriCl (2.05 g, 6.00 mmol, 1.3 eq),反应液在 25℃搅拌 1 小时,加入甲醇淬灭。反应完成后,浓缩反应液,加入乙酸乙酯(50 mL)稀释,饱和氯化铵水溶液(2×30 mL)、饱和氯化钠水溶液(30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=1/1, v/v),得到黄色固体状的化合物 **15** (1.69 g, 收率 59.5%)。MS ESI (m/z) = 617.2 [$M + H$]⁺。

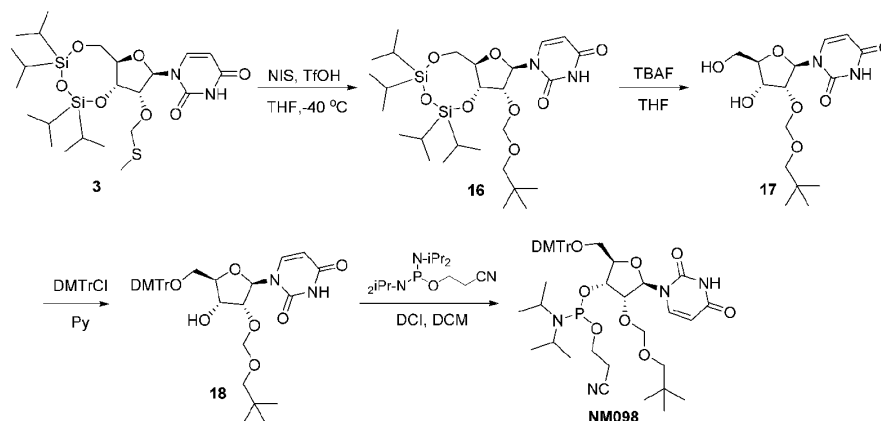
(4-4) 化合物 NM097 的合成

将化合物 **15** (1.69 g, 2.74 mmol, 1 eq)用乙腈(3 × 10 mL)反复带干后,溶于二氯甲烷(20 mL)中,加入用乙腈(3 × 10 mL)带干的双(二异丙基氨基)(2-氧基乙氧基)膦(1.24 g, 4.11 mmol, 1.5 eq)的二氯甲烷(25 mL)溶液,加入 1H-咪唑-4,5-二腈(258.9 mg, 2.19 mmol, 0.8 eq),氮气置换三次,反应体系在氮气氛围中 25℃下搅拌 1 小时。反应完成后,向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)进行稀释,二氯甲烷(3×30 mL)萃取,有机相合并,饱和氯化钠水溶液(2×30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=1/1, v/v),得到白色固体状的化合物 **NM097** (1.7 g, 收率 75.96%)。MS ESI (m/z) = 817.2 [$M + H$]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.40 (s, 1H), 7.76 (dd, J = 10.9, 8.1 Hz, 1H), 7.42 – 7.29 (m, 4H), 7.29 – 7.21 (m, 5H), 6.89 (td, J = 6.6, 3.2 Hz, 4H), 5.90 (dt, J = 7.1, 3.6 Hz, 1H), 5.40 – 5.24 (m, 1H), 4.94 – 4.68 (m, 2H), 4.56 – 4.37 (m, 2H), 4.13 (dt, J = 22.0, 4.1 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 2.1 Hz, 7H), 3.71 – 3.44 (m, 4H), 3.35 (t, J = 3.6 Hz, 1H), 3.30 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.78 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 2.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 1.15 – 1.08 (m, 9H), 0.98 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.56 – 0.36 (m, 4H)。

制备例 5: 化合物 NM098 的制备

本制备例中,化合物 NM098 的合成路线如下所示:



(5-1) 化合物 16 的合成

25℃下,将化合物 **3** (3 g, 5.49 mmol, 1 eq)溶于四氢呋喃(30 mL),加入新戊醇(4.83 g, 54.92 mmol, 10 eq, CAS 号为 75-84-3),氮气置换三次,用干冰将反应体系降温至-40℃,滴加入 NIS (1.48 g, 6.59 mmol, 1.2 eq)的四氢呋喃(5 mL)溶液、TfOH (1.64 g, 10.98 mmol, 2 eq)的四氢呋喃(5 mL)溶液,反应液在-40℃搅拌 1 小时,加入三乙胺(6 mL)淬灭。反应完成后,浓缩反应液,加入二氯甲烷(2×50 mL)萃取,有机相合并,饱和碳酸氢钠水溶液(2×50 mL)、饱和氯化钠水溶液(30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=3/1, v/v),得到白色固体状的化合物 **16** (3.06 g, 收率 95.03%)。MS ESI (m/z) = 587.3 [$M + H$]⁺。

(5-2) 化合物 17 的合成

25℃下,将化合物 16 (3.06 g, 5.22 mmol, 1 eq)溶于四氢呋喃(30 mL)中,加入四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(10.44 mL, 1 M, 10.44 mmol, 2 eq), 反应液在 25℃搅拌 3 小时。反应完成后, 浓缩反应液, 柱色谱纯化(洗脱液: 二氯甲烷/甲醇=10/1, v/v), 得到白色固体状的化合物 17 (1.78 g, 收率 99.1%)。MS ESI (m/z) = 367.1 $[M + Na]^+$ 。

(5-3) 化合物 18 的合成

25℃下,将化合物 17 (1.78 g, 5.17 mmol, 1 eq)溶于吡啶 (15 mL), 冰浴降温至 0℃, 分批加入 DMTrCl (2.28 g, 6.72 mmol, 1.3 eq), 反应液在 25℃搅拌 1 小时, 加入甲醇淬灭。反应完成后, 浓缩反应液, 加入乙酸乙酯(50 mL)稀释, 饱和氯化铵水溶液(2×30 mL)、饱和氯化钠水溶液(30 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 并过滤、浓缩, 柱色谱纯化(洗脱液: 石油醚/乙酸乙酯=1/1, v/v), 得到黄色固体状的化合物 18 (2.50 g, 收率 74.85%)。MS ESI (m/z) = 647.3 $[M + H]^+$ 。

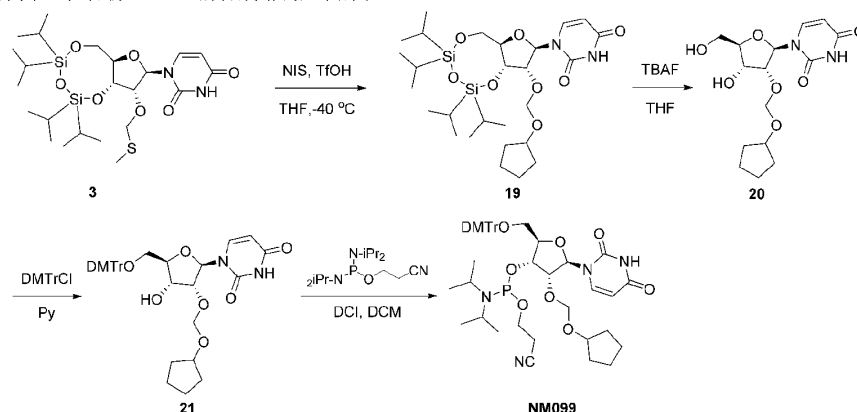
(5-4) 化合物 NM098 的合成

将化合物 18 (2.50 g, 3.87 mmol, 1 eq)用乙腈(3 × 10 mL)反复带干后溶于二氯甲烷(30 mL), 加入用乙腈(3 × 10 mL)带干的双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦(1.75 g, 5.80 mmol, 1.5 eq)的二氯甲烷(25 mL)溶液, 加入 1H-咪唑-4,5-二腈(364.9 mg, 3.10 mmol, 0.8 eq), 氮气置换三次, 反应体系在氮气氛围中 25℃下搅拌 1 小时。反应完成后, 向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)进行稀释, 二氯甲烷(3×30 mL)萃取, 有机相合并, 有机相用饱和氯化钠水溶液(2×30 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 并过滤、浓缩, 柱色谱纯化(洗脱液: 石油醚/乙酸乙酯=1/1, v/v), 得到白色固体状的化合物 NM098 (2.84 g, 收率 86.87%)。MS ESI (m/z) = 847.4 $[M + H]^+$ 。

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.41 (s, 1H), 7.72 (dd, J = 9.6, 8.1 Hz, 1H), 7.43 – 7.30 (m, 4H), 7.30 – 7.20 (m, 5H), 6.89 (td, J = 6.8, 3.3 Hz, 4H), 5.89 (dd, J = 4.6, 2.4 Hz, 1H), 5.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.85 – 4.66 (m, 2H), 4.38 (dp, J = 15.0, 4.9, 4.4 Hz, 2H), 4.12 (dd, J = 20.1, 3.7 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 2.2 Hz, 7H), 3.70 – 3.46 (m, 3H), 3.42 – 3.32 (m, 1H), 3.28 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.19 – 3.08 (m, 2H), 2.78 (td, J = 5.9, 2.1 Hz, 1H), 2.62 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 1.15 – 1.08 (m, 9H), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 5.9 Hz, 9H)。

制备例 6: 化合物 NM099 的制备

本制备例中, 化合物 NM099 的合成路线如下所示:



(6-1) 化合物 19 的合成

25℃下,将化合物 3 (3 g, 5.49 mmol, 1 eq)溶于四氢呋喃(30 mL), 加入环戊醇(4.74 g, 54.92 mmol, 10 eq), 氮气置换三次, 用干冰将反应体系降温至-40℃, 滴加入 NIS(1.48 g, 6.59 mmol, 1.2 eq)的四氢呋喃(5 mL)溶液、TfOH (1.64 g, 10.98 mmol, 2 eq)的四氢呋喃(5 mL)溶液, 反应体系在-40℃搅拌 1 小时, 加入三乙胺(6 mL)淬灭。反应完成后, 浓缩反应液, 加入二氯甲烷(2×50 mL)萃取, 饱和碳酸氢钠水溶液(2×50 mL)、饱和氯化钠水溶液(30 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 并过滤、浓缩, 柱色谱纯化(洗脱液: 石油醚/乙酸乙酯=4/1, v/v), 得到白色固体化合物 19 (3.20 g, 收率 99.6%)。MS ESI (m/z) = 585.3 $[M + H]^+$ 。

(6-2) 化合物 20 的合成

25℃下,将化合物 19 (3.20 g, 5.48 mmol, 1 eq)溶于四氢呋喃(30 mL), 加入四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(10.95 mL, 1 M, 10.95 mmol, 2 eq), 反应液在 25℃搅拌 3 小时。反应完成后, 浓缩反应液, 柱色谱纯化(洗脱液: 二氯甲烷/甲醇=20/1, v/v), 得到白色固体状的化合物 20 (1.87 g, 收率 99.3%)。MS ESI (m/z) = 365.1 $[M + Na]^+$ 。

(6-3) 化合物 21 的合成

25℃下,将化合物 20 (1.87 g, 5.47 mmol, 1 eq)溶于吡啶(20 mL),冰浴降至 0℃,分批加入 DMTrCl (2.41 g, 7.11 mmol, 1.3 eq),反应液在 25℃搅拌 1 小时,加入甲醇淬灭。反应完成后,浓缩反应液,加入乙酸乙酯(50 mL)稀释,饱和氯化铵水溶液(2×30 mL)、饱和氯化钠水溶液(30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=1/1),得到黄色固体状的化合物 21 (2.18 g, 收率 61.93%)。MS ESI (m/z) = 645.3 [M + H]⁺。

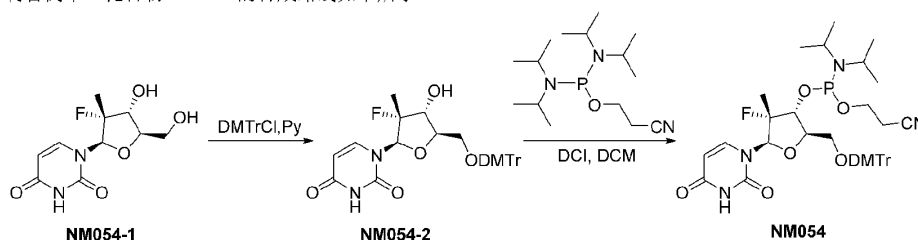
(6-4) 化合物 NM099 的合成

将化合物 21 (2.18 g, 3.38 mmol, 1 eq)用乙腈带干三次(每次用 10ml)后溶于二氯甲烷(20 mL),加入用乙腈(3 × 10 mL)带干的双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦(1.53 g, 5.08 mmol, 1.5 eq)的二氯甲烷(25 mL)溶液,加入 1H-咪唑-4,5-二腈(319.7 mg, 2.71 mmol, 0.8 eq),氮气置换三次,反应体系在氮气氛围中 25℃下搅拌 1 小时。反应完成后,向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)进行稀释,二氯甲烷(3×30 mL)萃取,有机相合并,有机相饱和氯化钠水溶液(2×30 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱色谱纯化(洗脱液:石油醚/乙酸乙酯=2/1),得到白色固体状的化合物 NM099 (2.28 g, 收率 79.80%)。MS ESI (m/z) = 845.3 [M + H]⁺。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.40 (s, 1H), 7.72 (dd, J = 12.3, 8.1 Hz, 1H), 7.35 (dt, J = 21.9, 6.3 Hz, 4H), 7.26 (t, J = 8.9 Hz, 5H), 6.89 (dd, J = 8.6, 5.7 Hz, 4H), 5.90 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.47 – 5.34 (m, 1H), 4.72 (dq, J = 14.7, 7.1 Hz, 2H), 4.49 – 4.31 (m, 2H), 4.18 – 4.07 (m, 2H), 3.74 (d, J = 2.0 Hz, 7H), 3.70 – 3.46 (m, 3H), 3.35 (q, J = 7.5, 4.9 Hz, 1H), 3.29 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 2.78 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 2.63 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 1.72 – 1.35 (m, 8H), 1.12 (td, J = 6.7, 4.4 Hz, 9H), 0.99 (d, J = 6.7 Hz, 3H)。

制备例 7: 化合物 NM054 的制备

本制备例中,化合物 NM054 的合成路线如下所示:



(7-1) 化合物 NM054-2 的合成

向 500ml 反应釜中加入化合物 NM054-1 (3g, 11.54mmol, 1.0eq, (2'R)-2'-脱氧-2'-氟-2'-甲基腺苷, CAS 号为 863329-66-2)和吡啶(30ml),降至 0℃,分批加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯(4.29g, 12.7mmol, 1.1eq),氮气置换 3 次,反应体系在氮气气氛中 25℃下搅拌 3 小时,HPLC 显示无原料。反应完毕后,浓缩反应液,加入纯化水(50ml)和乙酸乙酯(50ml)萃取,分出有机相,有机相用无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,柱层析纯化,得到化合物 NM054-2 (2.7g, 收率 41.7%)。MS ESI (m/z) = 563.0 [M + H]⁺。

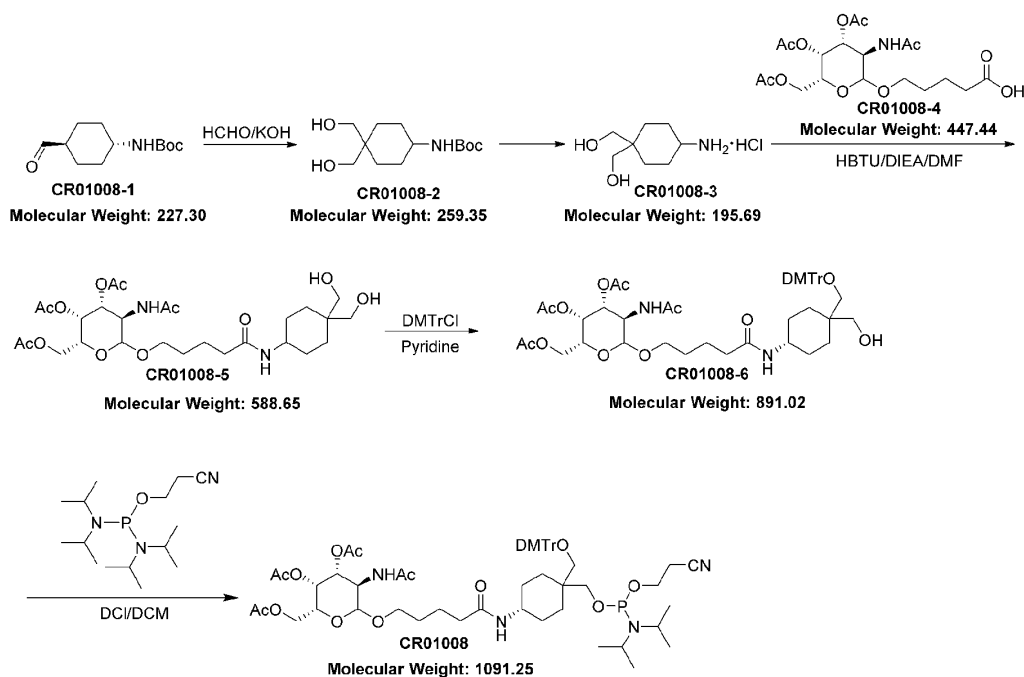
(7-2) 化合物 NM054 的合成

向 100ml 反应釜中加入化合物 NM054-2 (2.7g, 4.8mmol, 1.0eq),分批加入双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦(1.74g, 5.76mmol, 1.2eq),再加入 4,5-二氰基咪唑(0.45g, 3.8mmol, 0.8eq, CAS 号为 1122-28-7)和二氯甲烷(27ml),氮气置换 3 次,反应体系在氮气气氛中 25℃下搅拌 3 小时。反应完毕后,向反应液中加入碳酸氢钠水溶液(20ml),分出有机相,有机相用无水硫酸钠干燥,并过滤、浓缩,反相柱层析纯化(洗脱液:乙腈/水=90/10, v/v),得到化合物 NM054 (3.0g)。MS ESI (m/z) = 763 [M + H]⁺。

制备例 8: 化合物 CR01008 和化合物 CR01008Z 的制备

(8-1) 化合物 CR01008 的合成

本制备例中,化合物 CR01008 的合成路线如下:



(8-1-1) 化合物 CR01008-2 的合成

将化合物 CR01008-1 (10.0g, 1.0eq, 反式-4-(Boc-氨基)环己基甲醛, CAS 号 181308-57-6) 和甲醛水溶液 (8.9g, 37 质量%, 2.4eq) 溶于 33ml 甲醇中, 滴加 13ml 浓度为 45.3 质量%的 KOH 水溶液, 滴加完毕后在 25℃下搅拌反应 30 分钟, 升温至 60℃并在 60℃下回流反应 2 小时。反应结束后, 待反应液冷却至室温后减压蒸干反应液, 得到白色固体状的粗品。向粗品中加入少量水打浆, 过滤, 得到白色固体状的化合物 CR01008-2 (9g, 收率 78.9%)。MS-ESI (m/z) = 260 $[M + H]^+$ 。

(8-1-2) 化合物 CR01008-3 的合成

将化合物 CR01008-2 (9g, 1eq) 溶于 70ml 的 1,4-二氧六环中, 加入氯化氢的 1,4-二氧六环溶液 (45ml, 4M), 在 25℃下搅拌反应 1 小时。反应结束后, 减压蒸干反应液, 得到白色固体状的化合物 CR01008-3 (6.8g, 收率 100%)。

(8-1-3) 化合物 CR01008-5 的合成

将化合物 CR01008-3 (1.8g, 2.0eq)、化合物 CR01008-4 (2.1g, 1.0eq, 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)-2-四氢吡喃基]氧基]戊酸) 和 N,N'-二异丙基乙胺 (3.5g, 6.0eq, 简称 DIEA) 溶于 15ml 的 DMF 中, 加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.9g, 1.1eq, 简称 HBTU, CAS 号 94790-37-1), 在氮气气氛中在 25℃下搅拌反应 3 小时。反应结束后, 减压蒸干反应液, 反相纯化 (洗脱液: 22 体积%乙腈水溶液), 得到白色固体状的化合物 CR01008-5 (1.78g, 收率 64.4%)。MS-ESI (m/z) = 589 $[M + H]^+$ 。

(8-1-4) 化合物 CR01008-6 的合成

将化合物 CR01008-5 (1.54g, 1.0eq) 溶于 15ml 吡啶中, 用冰水浴将反应体系降温至 0℃并在 0℃下加入 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (1.32g, 1.5eq, 简称 DMTrCl, CAS 号 40615-36-9), 在 25℃下反应 3 小时, 向反应液中加入 15ml 甲醇淬灭反应。反应结束后, 减压蒸干反应液, 反相纯化 (洗脱液: 60 体积%乙腈的水溶液), 得到黄色固体状的化合物 CR01008-6 (1g, 收率 42.7%)。MS-ESI (m/z) = 891 $[M + H]^+$ 。

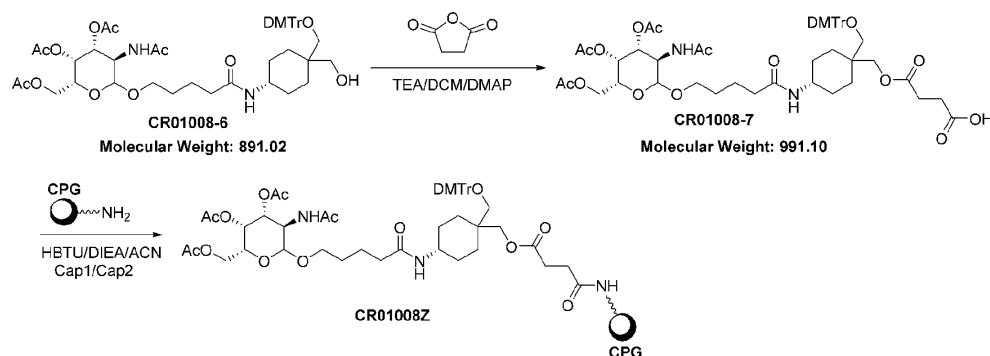
(8-1-5) 化合物 CR01008 的合成

将化合物 CR01008-6 (1.08g, 1.0eq) 溶于 20ml 无水二氯甲烷中, 分别加入 4,5-二氟基咪唑 (115mg, 0.8eq, 简称 DCI, CAS 号 1122-28-7) 和双(二异丙基氨基)(2-氧基乙氧基)膦 (732mg, 2.1eq, CAS 号 102691-36-1), 氮气置换 3 次, 在 25℃下搅拌反应 2 小时。反应结束后, 向反应液中加入 20ml 饱和碳酸氢钠水溶液, 用 20ml 二氯甲烷萃取 3 次 (3×20ml), 合并有机相, 减压蒸干有机相, 反相纯化 (洗脱液: 72 体积%乙腈水溶液) 后真空干燥 12 小时, 得到白色粉末状的化合物 CR01008 (1g, 收率 76.0%)。MS-ESI (m/z) = 1091 $[M + Na]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1.05 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.14 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H), 1.37 - 1.17 (m, 5H), 1.60 - 1.40 (m, 6H), 1.68 - 1.62 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 2.02 (s, 5H), 2.13 (s, 3H), 2.71 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.36 (s, 1H), 3.58 - 3.39 (m, 3H), 3.69 - 3.60 (m, 2H), 3.75 (s, 7H), 3.90 (dt, $J = 11.2$, 8.8 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H), 4.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.99 (dd, $J = 11.3$, 3.4 Hz, 1H), 5.24 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.78 (s, 1H), 6.93 - 6.87 (m, 4H), 7.35 - 7.21 (m, 7H), 7.44 - 7.37 (m, 2H), 7.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H).

(8-2) 化合物 CR01008Z 的合成

在本制备例中, 化合物 CR01008Z 的合成路线如下:



(8-2-1) 化合物 CR01008-7 的合成

将化合物 CR01008-6 (500mg) 溶于 10ml 二氯甲烷中, 加入化合物 8 (丁二酸酐, 112mg)、4-二甲氨基吡啶 (6.8mg, 简称 DMAP, CAS 号 1122-58-3) 和三乙胺 (226.2mg), 氮气置换 3 次, 在 25°C 下搅拌反应 16 小时, flash 纯化, 得到化合物 CR01008-7 (300mg, 收率 53.6%)。MS-ESI (m/z) = 1013 [$M + \text{Na}$] $^+$ 。

(1.2.2) 化合物 CR01008Z 的合成

向 20ml 样品瓶中加入化合物 CR01008-7 (50mg、氨基 CPG (1.25g, 80 $\mu\text{mol/g}$, 0.1mmol)、HBTU (27mg)、DIEA (12mg), 摇床反应 16 小时。反应结束后, 过滤反应液得到滤饼, 滤饼先用 10ml 乙腈洗涤一次 (1 $\times$ 10ml)、再经过真空干燥。向 20ml 样品瓶中加入干燥后的滤饼、DMAP (3mg)、Cap1 (10ml) 和 Cap2 (1ml), 摇床反应 6 小时。反应结束后, 过滤反应液得到滤饼, 滤饼先用 10ml 乙腈洗涤一次 (1 $\times$ 10ml)、再经过真空干燥, 得到化合物 CR01008Z (1.03g, 载量 20-30 $\mu\text{mol/g}$)。

其中, Cap1 和 Cap2 为盖帽试剂, Cap1 为 20 体积%N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液, 吡啶与乙腈的体积比为 3:5; Cap2 为 20 体积%乙酸酐的乙腈溶液。

实施例 1 siRNA 的合成

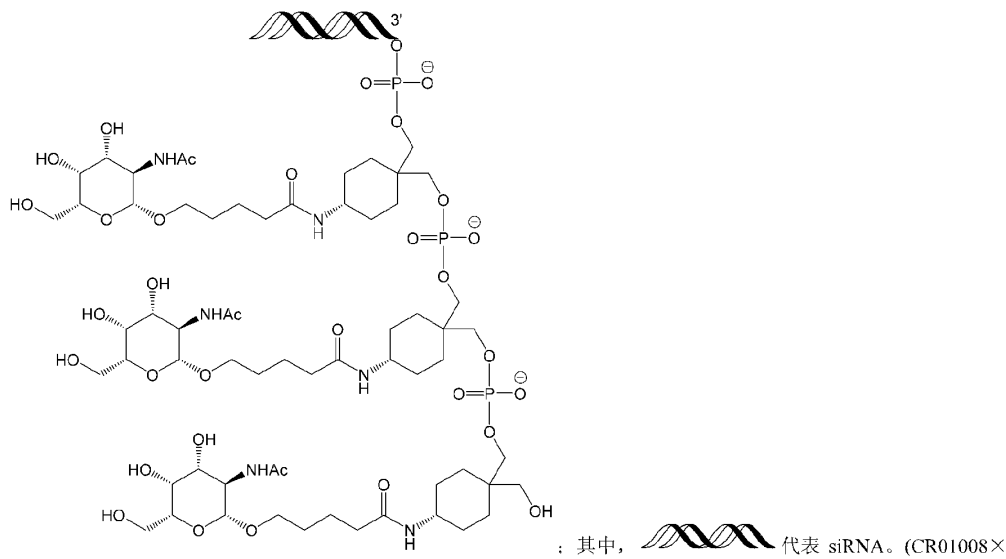
siRNA 合成与通常的亚磷酸酰胺固相合成方法无异, 当合成含 TBDMS、TOM、MOE 等大空间体积基团结构的正、反义链, 在需要引入大空间体积基团修饰的核苷酸时, 将上述亚磷酸酰胺单体替换原母序列相应位点的核苷酸单体。

在 ABI394 合成仪上导入需要合成的 siRNA 序列 (siRNA 单链), 以 Universal CPG/PS 或化合物 CR01008Z 为载体, 根据设定的合成程序进行合成, 在合成过程中, 化合物 CR01008 看作一个核苷单体。

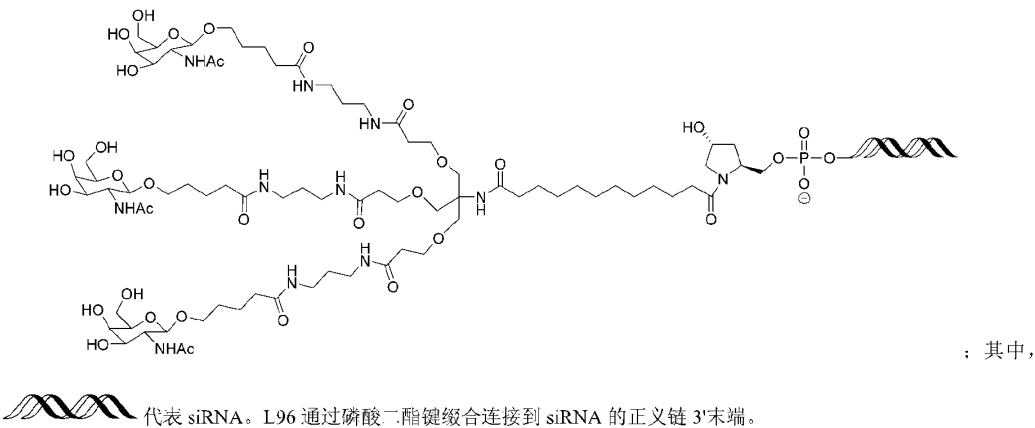
每个碱基的引入均需经过脱 DMTr、偶联、氧化及盖帽四步反应。2'-OMe、2'-F、2'-TOM、2'-TBDMS、2'-MOE 修饰的核苷亚磷酸酰胺单体均购自上海兆维科技发展有限公司, 化合物 NM062 通过制备例 1 所示方法合成, 化合物 NM063 通过制备例 2 所示方法合成。采用 5-乙硫基-1H-四氮唑(ETT)作为活化剂(0.6M 的乙腈溶液), 使用 0.2M 的氢化黄原素溶于 1:1 体积比的乙腈和吡啶(苏州柯乐玛)溶液作为硫代试剂, 使用 0.05M 碘溶于 9:1 体积比的吡啶和水溶液(苏州柯乐玛)作为氧化剂。

合成结束后卸下载体吹干, 使用浓氨水进行脱保护 (50°C, 16h), 反应结束后放入 -20°C 冰箱冷却 10min。离心后将上清液转移到另一个离心管中, 浓缩干后, 采用 RP-HPLC 的方法进行纯化, 流动相 A 为 0.1M TEAA, 流动相 B 为乙腈。对纯化收集的馏分进行 HPLC、MS 及 UV 检测, 合格的馏分收集后进行冻干, 得到 siRNA 单链。所得到的 siRNA 单链, 进行退火最后得到 siRNA 双链。

其中, 以 (CR01008)(CR01008)(CR01008Z) (也作 (CR01008 $\times$ 3)) 为递送载体的 siRNA 缀合物的结构式如下所示:



3)通过磷酸二酯键缀合连接到 siRNA 的正义链 3'末端。
以 L96 为递送载体的 siRNA 缀合物的结构式如下所示：



本公开所述各实施例所涉及的 siRNA 化合物序列及修饰信息见表 4。

表 4

化 合 物 编 号	正义链序列及修饰（5'-3'）	SEQ ID NOs	反义链序列及修饰（5'-3'）	SEQ ID NOs
RX5020 01	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	1	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	2
RX5020 23	C(TBDMS)sAmsGmAmCmAmGfAdCfAm AmGmAmCmCmAmUmCmUm	3	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	4
RX5020 24	CmsA(TBDMS)sGmAmCmAmGfAdCfAm AmGmAmCmCmAmUmCmUm	5	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	6
RX5020 25	CmsAmsG(TBDMS)AmCmAmGfAdCfAm AmGmAmCmCmAmUmCmUm	7	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	8
RX5020	CmsAmsGmA(TBDMS)CmAmGfAdCfAm	9	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC	10

26	AmGmAmCmCmAmUmCmUm		mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	
RX5020 27	CmsAmsGmAmC(TBDMS)AmGfAdCfAm AmGmAmCmCmAmUmCmUm	11	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	12
RX5020 28	CmsAmsGmAmCmA(TBDMS)GfAdCfAm AmGmAmCmCmAmUmCmUm	13	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	14
RX5020 29	CmsAmsGmAmCmAmG(TBDMS)AdCfA mAmGmAmCmCmAmUmCmUm	15	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	16
RX5020 30	CmsAmsGmAmCmAmGfA(TBDMS)CfA mAmGmAmCmCmAmUmCmUm	17	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	18
RX5020 31	CmsAmsGmAmCmAmGfAdC(TBDMS)A mAmGmAmCmCmAmUmCmUm	19	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	20
RX5020 32	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfA(TBDMS) AmGmAmCmCmAmUmCmUm	21	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	22
RX5020 33	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmA(TBD MS)GmAmCmCmAmUmCmUm	23	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	24
RX5020 34	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmG(T BDMS)AmCmCmAmUmCmUm	25	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	26
RX5020 35	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm A(TBDMS)CmCmAmUmCmUm	27	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	28
RX5020 36	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmC(TBDMS)CmAmUmCmUm	29	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	30
RX5020 37	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmC(TBDMS)AmUmCmUm	31	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	32
RX5020 38	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmA(TBDMS)UmCmUm	33	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	34
RX5020 39	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmU(TBDMS)CmUm	35	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	36
RX5020 40	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmC(TBDMS)Um	37	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	38
RX5020 41	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmU(TBDMS)	39	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	40
RX5020 02	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	41	A(TBDMS)sGfsAmUmGmGfUmCmUmUm GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	42
RX5020 03	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	43	AmsG(TBDMS)sAmUmGmGfUmCmUmU mGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	44
RX5020 04	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	45	AmsGfsA(TBDMS)UmGmGfUmCmUmUm GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	46
RX5020 05	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	47	AmsGfsAmU(TBDMS)GmGfUmCmUmUm GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	48
RX5020 06	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	49	AmsGfsAmUmG(TBDMS)GfUmCmUmUm GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	50
RX5020 07	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	51	AmsGfsAmUmGmG(TBDMS)UmCmUmU mGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	52
RX5020 08	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	53	AmsGfsAmUmGmGfU(TBDMS)CmUmUm GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	54
RX5020	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm	55	AmsGfsAmUmGmGfUmC(TBDMS)UmUm	56

09	AmCmCmAmUmCmUm		GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	
RX5020 10	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	57	AmsGfsAmUmGmGfUmCmU(TBDMS)Um GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	58
RX5020 11	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	59	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmU(TBDMS) GmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	60
RX5020 12	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	61	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmG(TBD MS)UmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	62
RX5020 13	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	63	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmU(T BDMS)CmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	64
RX5020 14	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	65	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC (TBDMS)UfGmUfCmUmGmsGmsAm	66
RX5020 15	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	67	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mU(TBDMS)GmUfCmUmGmsGmsAm	68
RX5020 16	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	69	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfG(TBDMS)UfCmUmGmsGmsAm	70
RX5020 17	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	71	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmU(TBDMS)CmUmGmsGmsAm	72
RX5020 18	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	73	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfC(TBDMS)UmGmsGmsAm	74
RX5020 19	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	75	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmU(TBDMS)GmsGmsAm	76
RX5020 20	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	77	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmG(TBDMS)sGmsAm	78
RX5020 21	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	79	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsG(TBDMS)sAm	80
RX5020 22	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	81	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsA(TBDMS)	82
RX5021 65	CmsAmsGmAmC(MOE)AmGfAdCfAmA mGmAmCmCmAmUmCmUm	83	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	84
RX5021 66	CmsAmsGmAmCmAmG(MOE)AdCfAmA mGmAmCmCmAmUmCmUm	85	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	86
RX5021 67	CmsAmsGmAmCmAmGfA(MOE)CfAmA mGmAmCmCmAmUmCmUm	87	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	88
RX5021 68	CmsAmsGmAmCmAmGfAdC(MOE)AmA mGmAmCmCmAmUmCmUm	89	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	90
RX5021 69	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfA(MOE)A mGmAmCmCmAmUmCmUm	91	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	92
RX5021 15	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmG(M OE)AmCmCmAmUmCmUm	93	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	94
RX5021 16	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmC(MOE)Um	95	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	96
RX5021 17	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmT(MOE)	97	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	98
RX5021 72	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	99	AmsG(MOE)sAmUmGmGfUmCmUmUmG mUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	100
RX5021	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm	101	AmsGfsA(MOE)UmGmGfUmCmUmUmGm	102

73	AmCmCmAmUmCmUm		UmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	
RX5021 18	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	103	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGm UmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	104
RX5021 19	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	105	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmT(MOE)Gm UmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	106
RX5021 77	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	107	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mT(MOE)GmUfCmUmGmsGmsAm	108
RX5021 20	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	109	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	110
RX5021 78	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	111	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmT(MOE)CmUmGmsGmsAm	112
RX5021 23	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmA mG(MOE)AmCmCmAmUmCmUm	113	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	114
RX5021 24	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmC(MOE)T(MOE)	115	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	116
RX5021 25	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmA mGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um	117	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	118
RX5021 26	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	119	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	120
RX5021 27	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmA mG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	121	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	122
RX5021 28	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmA mG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)T(M OE)	123	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	124
RX5021 30	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	125	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGm UmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	126
RX5021 31	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	127	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGm UmCmUfGmUfCmUmGmsG(MOE)sAm	128
RX5021 32	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	129	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGm UmCmUfGmUfCmUmGmsGmsA(MOE)	130
RX5021 34	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	131	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmT(MOE)Gm UmCmUfGmUfCmUmGmsG(MOE)sAm	132
RX5021 35	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	133	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmT(MOE)Gm UmCmUfGmUfCmUmGmsGmsA(MOE)	134
RX5021 36	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	135	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfG(MOE)UfCmUmGmsG(MOE)sAm	136
RX5021 38	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	137	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmT(MO E)GmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGms Am	138
RX5021 39	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	139	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmT(MOE)Gm UmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsG(MOE)sA m	140
RX5021 40	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm	141	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmT(MO E)GmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsG(M OE)sA(MOE)	142
RX5021	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmG(MOE)	143	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGm	144

46	MOE)AmCmCmAmUmCmUm		UmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	
RX5021 47	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmCmUm	145	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	146
RX5021 50	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um	147	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	148
RX5021 51	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um	149	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	150
RX5021 52	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um	151	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsA(MOE)	152
RX5021 53	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um	153	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmCmUfGmUfCmUmGmsG(MOE)sA(MOE)	154
RX5021 54	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmCmUm	155	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	156
RX5021 55	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmCmUm	157	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsA(MOE)	158
RX5021 56	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um	159	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	160
RX5021 57	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um	161	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsA(MOE)	162
RX5021 58	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	163	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	164
RX5021 59	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	165	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsA(MOE)	166
RX5021 60	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	167	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	168
RX5021 62	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	169	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmT(MOE)GmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	170
RX5021 63	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	171	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmT(MOE)GmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsG(MOE)sAm	172
RX5021 64	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAdCfAmAmG(MOE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um	173	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmT(MOE)GmUmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsG(MOE)sA(MOE)	174
RZ0000 02	UmsUmsCmUmCmCmGfAdAfCmGmUmGmUmCmAmCmGmUm_L96	175	AmsCfsGmUmGmAfCmAmCmGmUmUmCmGfGmAfGmAmAmsCmsUm	176
RZM02 001	AmsGmsAmAmGmAmAfGfAfUfAmUmUmAmUmCmUmCmUm_L96	177	AmsGfsAmGmAmUfAmAmUmAmUmCmUmUfCmUfUmCmUmsGmsGm	178
RZM02 004	AmsGmsAmAmGmAmAfGfAfUfAmUmUmAmUmCmUmC(tbdms)Um_L96	179	AmsGfsAmGmAmUfAmAmUmAmUmCmUmUfCmUfUmCmUmsGmsGm	180
RZM02 005	AmsGmsAmAmGmAmAfGfAfUfAmUmUmAmUmCmUmCmUm_L96	181	AmsGfsAmGmAmUfAmAmUmAmUmCmUmUfC(tbdms)UfUmCmUmsGmsGm	182
RXM02 006	AmsGmsAmAmGmAmAfGfAfUfAmUmUmAmUmCmUmCmUm_L96	183	AmsGfsAmGmAmUfAmAmUmAmUmCmUmUfCmUfUmCmUmsGmsG(tbdms)	184
RZ0020 01	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGmAmCmCmAmUmCmUm_L96	185	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	186

RZ5020 13	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmU(tom)_L96	187	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	188
RZ5020 16	CmsAmsGmAmCmAmGfAdCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm_L96	189	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmU(tom)GmU mCmUfGmUfCmUmGmsGmsAm	190
RZ5020 31	CmsAmsGmAmCmAmGfAfCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm_L96	191	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	192
RZ5020 33	CmsAmsGmAmCmAmGfAfCfAmAmG(M OE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um_L96	193	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfGmUfCmUmGmsGmsAm	194
RZ5020 34	CmsAmsGmAmCmAmGfAfCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm_L96	195	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGm UmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	196
RZ5020 35	CmsAmsGmAmCmAmGfAfCfAmAmG(M OE)AmCmCmAmUmCmUm_L96	197	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	198
RZ5020 36	CmsAmsGmAmCmAmGfAfCfAmAmG(M OE)AmCmCmAmUmC(MOE)Um_L96	199	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	200
RZ5020 39	CmsAmsGmAmCmA(MOE)GfAfCfAmA mGmAmCmCmAmUmC(MOE)Um_L96	201	AmsGfsAmUmGmGfUmC(MOE)UmUmGm UmCmUfG(MOE)UfCmUmGmsGmsAm	202
RZ5020 49	CmsAmsGmAmC(MOE)AmGfAfCfAmA mGmAmCmCmAmUmCmUm_L96	203	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mUfG(MOE)UfCmUmGmsG(MOE)sAm	204
RZ5020 87	CmsAmsGmAmCmAmGfAfCfAmAmGm AmCmCmAmUmCmUm_L96	205	AmsGfsAmUmGmGfUmCmUmUmGmUmC mT(MOE)GmUfCmUmGmsGmsAm	206
RZ5970 24	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	207	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	208
RZ5970 65	C(TBDMS)sCmsAmAmGmAmGfCdAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	209	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	210
RZ5970 66	CmsC(TBDMS)sAmAmGmAmGfCdAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	211	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	212
RZ5970 67	CmsCmsA(TBDMS)AmGmAmGfCdAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	213	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	214
RZ5970 68	CmsCmsAmA(TBDMS)GmAmGfCdAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	215	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	216
RZ5970 69	CmsCmsAmAmG(TBDMS)AmGfCdAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	217	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	218
RZ5970 70	CmsCmsAmAmGmA(TBDMS)GfCdAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	219	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	220
RZ5970 71	CmsCmsAmAmGmAmG(TBDMS)CdAfC mCmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	221	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	222
RZ5970 72	CmsCmsAmAmGmAmGfC(TBDMS)AfC mCmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	223	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	224
RZ5970 73	CmsCmsAmAmGmAmGfCdA(TBDMS)C mCmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	225	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	226
RZ5970 74	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfC(TBDMS) CmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	227	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	228
RZ5970 75	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmC(TBD MS)AmAmGmAmAmCmUmAm_L96	229	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	230
RZ5970 76	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmA(T BDMS)AmGmAmAmCmUmAm_L96	231	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	232

RZ5970 77	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm A(TBDMS)GmAmAmCmUmAm_L96	233	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	234
RZ5970 78	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmG(TBDMS)AmAmCmUmAm_L96	235	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	236
RZ5970 79	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmA(TBDMS)AmCmUmAm_L96	237	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	238
RZ5970 80	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmA(TBDMS)CmUmAm_L96	239	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	240
RZ5970 81	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmC(TBDMS)UmAm_L96	241	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	242
RZ5970 82	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmU(TBDMS)Am_L96	243	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	244
RZ5970 83	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmA(TBDMS)_L96	245	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsUm	246
RZ5970 84	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	247	U(TBDMS)sAfsGmUmUmCfUmUmGmGm UmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	248
RZ5970 85	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	249	UmsA(TBDMS)sGmUmUmCfUmUmGmG mUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	250
RZ5970 25	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	251	UmsAfsG(TBDMS)UmUmCfUmUmGmGm UmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	252
RZ5970 26	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	253	UmsAfsGmU(tbdms)UmCfUmUmGmGmU mGmCmUfCmUfUmGmGmsUmsUm	254
RZ5970 27	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	255	UmsAfsGmUmU(TBDMS)CfUmUmGmGm UmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	256
RZ5970 28	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	257	UmsAfsGmUmUmC(TBDMS)UmUmGmG mUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	258
RZ5970 29	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	259	UmsAfsGmUmUmCfU(tbdms)UmGmGmU mGmCmUfCmUfUmGmGmsUmsUm	260
RZ5970 30	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	261	UmsAfsGmUmUmCfUmU(tbdms)GmGmU mGmCmUfCmUfUmGmGmsUmsUm	262
RZ5970 31	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	263	UmsAfsGmUmUmCfUmUmG(TBDMS)Gm UmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	264
RZ5970 86	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	265	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmG(TBDMS) UmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	266
RZ5970 87	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	267	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmU(TBD MS)GmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	268
RZ5970 88	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	269	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmG(T BDMS)CmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	270
RZ5970 89	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	271	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC (TBDMS)UfCmUfUmGmGmsCmsUm	272
RZ5970 90	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	273	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mU(TBDMS)CmUfUmGmGmsCmsUm	274
RZ5970 91	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	275	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfC(TBDMS)UfUmGmGmsCmsUm	276
RZ5970 92	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	277	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmU(TBDMS)UmGmGmsCmsUm	278

RZ5970 93	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	279	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfU(TBDMS)GmGmsCmsUm	280
RZ5970 94	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	281	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmG(TBDMS)GmsCmsUm	282
RZ5970 95	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	283	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmG(TBDMS)sCmsUm	284
RZ5970 96	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	285	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsC(TBDMS)sUm	286
RZ5970 97	CmsCmsAmAmGmAmGfCdAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	287	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsCmsU(TBDMS)	288
RZ5940 01	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	289	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	290
RZ5940 07	G(TOM)sUmsAmCmGmUmGfGdAfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	291	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	292
RZ5940 08	GmsU(TOM)sAmCmGmUmGfGdAfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	293	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	294
RZ5940 09	GmsUmsA(TOM)CmGmUmGfGdAfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	295	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	296
RZ5940 10	GmsUmsAmC(TOM)GmUmGfGdAfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	297	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	298
RZ5940 11	GmsUmsAmCmG(TOM)UmGfGdAfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	299	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	300
RZ5940 12	GmsUmsAmCmGmU(TOM)GfGdAfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	301	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	302
RZ5940 13	GmsUmsAmCmGmUmG(TOM)GdAfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	303	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	304
RZ5940 14	GmsUmsAmCmGmUmGfG(TOM)AfCmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	305	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	306
RZ5940 15	GmsUmsAmCmGmUmGfGdA(TOM)CmU mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	307	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	308
RZ5940 16	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfC(TOM)U mGmGmAmUmUmCmUmGm_L96	309	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	310
RZ5940 17	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmU(TOM))GmGmAmUmUmCmUmGm_L96	311	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	312
RZ5940 18	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmG(T OM)GmAmUmUmCmUmGm_L96	313	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	314
RZ5940 19	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm G(TOM)AmUmUmCmUmGm_L96	315	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	316
RZ5940 20	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmA(TOM)UmUmCmUmGm_L96	317	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	318
RZ5940 21	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmU(TOM)UmCmUmGm_L96	319	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	320
RZ5940 22	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmU(TOM)CmUmGm_L96	321	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	322
RZ5940 23	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmC(TOM)UmGm_L96	323	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	324

RZ5940 24	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmU(TOM)Gm_L96	325	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	326
RZ5940 25	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmG(TOM)_L96	327	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsUm	328
RZ5940 26	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	329	C(TOM)sAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUm CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	330
RZ5940 27	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	331	CmsA(TOM)sGmAmAmUfCmCmAmGmU mCmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	332
RZ5940 28	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	333	CmsAfsG(TOM)AmAmUfCmCmAmGmUm CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	334
RZ5940 29	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	335	CmsAfsGmA(TOM)AmUfCmCmAmGmUm CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	336
RZ5940 02	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	337	CmsAfsGmAmA(TOM)UfCmCmAmGmUm CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	338
RZ5940 03	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	339	CmsAfsGmAmAmU(TOM)CmCmAmGmU mCmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	340
RZ5940 04	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	341	CmsAfsGmAmAmUfC(TOM)CmAmGmUm CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	342
RZ5940 05	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	343	CmsAfsGmAmAmUfCmC(TOM)AmGmUm CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	344
RZ5940 06	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	345	CmsAfsGmAmAmUfCmCmA(TOM)GmUm CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	346
RZ5940 30	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	347	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmG(TOM)Um CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	348
RZ5940 31	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	349	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmU(TOM) CmCmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	350
RZ5940 32	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	351	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmC(T OM)CmAfCmGfUmAmCmsUmsUm	352
RZ5940 33	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	353	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC (TOM)AfCmGfUmAmCmsUmsUm	354
RZ5940 34	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	355	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mA(TOM)CmGfUmAmCmsUmsUm	356
RZ5940 35	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	357	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfC(TOM)GfUmAmCmsUmsUm	358
RZ5940 36	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	359	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmG(TOM)UmAmCmsUmsUm	360
RZ5940 37	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	361	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfU(TOM)AmCmsUmsUm	362
RZ5940 38	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	363	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmA(TOM)CmsUmsUm	364
RZ5940 39	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	365	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmC(TOM)sUmsUm	366
RZ5940 40	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	367	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsU(TOM)sUm	368
RZ5940 41	GmsUmsAmCmGmUmGfGdAfCmUmGm GmAmUmUmCmUmGm_L96	369	CmsAfsGmAmAmUfCmCmAmGmUmCmC mAfCmGfUmAmCmsUmsU(TOM)	370

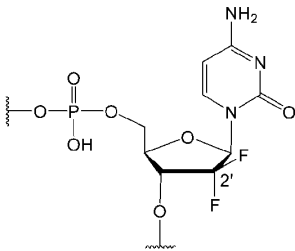
RZ5990 01	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmAm CmUmCmUmAmAmAm_L96	371	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGm AmUfUmAfAmAmAmsUmsGm	372
RZ5990 15	UmsUmsUmUmA(MOE)AmUfCfCfUmC mAmCmUmCmUmAmAmAm_L96	373	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGm AmUfU(MOE)AfAmAmAmsUmsGm	374
RZ5990 16	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmA(M OE)CmUmCmUmAmA(MOE)Am_L96	375	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGm AmUfU(MOE)AfAmAmAmsUmsGm	376
RZ5990 17	UmsUmsUmUmA(MOE)AmUfCfCfUmC mA(MOE)CmUmCmUmAmA(MOE)Am_ L96	377	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGm AmUfU(MOE)AfAmAmAmsUmsGm	378
RZ5990 18	UmsUmsUmUmA(MOE)AmUfCfCfUmC mAmCmUmCmUmAmAmAm_L96	379	UmsUfsUmAmGmAfGmU(MOE)GmAmGm GmAmUfU(MOE)AfAmAmAmsUmsGm	380
RZ5990 19	UmsUmsUmUmA(MOE)AmUfCfCfUmC mAmCmUmCmUmAmAmAm_L96	381	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGm AmUfU(MOE)AfAmAmAmsU(MOE)sGm	382
RZ5990 20	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmA(M OE)CmUmCmUmAmA(MOE)Am_L96	383	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGm AmUfU(MOE)AfAmAmAmsU(MOE)sGm	384
RZ5990 26	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmAmC mUmCmUmAmAmAm_L96	385	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUfUmAfAmAmAmsUmsGm	386
RZ5990 27	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmAmC mUmCmUmAmAmAm_L96	387	UmsUfsUmAmGmAfGm(NM062)GfAmGm GmAmUfUmAfAmAmAmsUmsGm	388
RZ5990 28	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmAmC mUmCmUmAmAmAm_L96	389	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUf(NM062)AfAmAmAmsUmsGm	390
RZ5990 29	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmAmC mUmCmUmAmAmAm_L96	391	UmsUfsUmAmGmAfGm(NM063)GfAmGm GmAmUfUmAfAmAmAmsUmsGm	392
RZ5990 30	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUmCmAmC mUmCmUmAmAmAm_L96	393	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUf(NM063)AfAmAmAmsUmsGm	394
RZ0020 03	CmsAmsGmAmGmAmAfAdUfUmCmUm AmCmUmAmCmAmUm_L96	407	AmsUfsGmUmAmGfUmAmGmAmAmUm UmUfCmUfCmUmGmsUmsAm	408
RZ0020 50	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfUfCmUmA mCmUmAmCmAmUm_L96	409	AmsUfsGmUmAmGfUmAmGfAmAmUmU mUfC(moe)UfCmUmGmsUmsAm	410
RZ0020 51	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfUfCmUmA mCmUmAmCmAmUm_L96	411	AmsUfsGmUmAmGfUmAmGmAfAmUmU mUfC(moe)UfCmUmGmsUmsAm	412
RZ0020 52	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfUfCmUmA mCmUmAmCmAmUm_L96	413	AmsUfsGmUmAmGfUmAmGmAmAfUmU mUfC(moe)UfCmUmGmsUmsAm	414
RZ0020 53	CmsAmsGmAmG(moe)AmAfAfUfUfCmU mAmCmUmAmCmAmUm_L96	415	AmsUfsGmUmAmGfUmAmGmAfAmUmU mUfC(moe)UfCmUmGmsUmsAm	416
416RZ0 02055	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfUfCmUmA (moe)CmUmAmCmAmUm_L96	417	AmsUfsGmUmAmGfUmAmGmAfAmUmU mUfC(moe)UfCmUmGmsUmsAm	418
RZ0020 58	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfUfCmT(mo e)AmCmUmAmCmAmUm_L96	419	AmsUfsGmUmAmGfUmA(moe)GmAfAmU mUmUfCmUfCmUmGmsUmsAm	420
RZ0020 59	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfUfCmUmA (moe)CmUmAmCmAmUm_L96	421	AmsUfsGmUmAmGfUmA(moe)GmAfAmU mUmUfCmUfCmUmGmsUmsAm	422
RZ0020 60	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfUfCmUmA mCmUmAmCmA(moe)Um_L96	423	AmsUfsGmUmAmGfUmA(moe)GmAfAmU mUmUfCmUfCmUmGmsUmsAm	424
RZ0020 06	CmsGmsAmAmGmCmUfCdAfUmGmAm AmUmAmUmAmUmUm_L96	425	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAmUmGm AmGfCmUfUmCmGmsUmsAm	426
RZ0020	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA	427	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCfAmUmGmA	428

33	mUmAmUmAmUmUm_L96		mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	
RZ0020 34	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA mUmAmUmAmUmUm_L96	429	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAfUmGmA mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	430
RZ0020 35	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA mUmAmUmAmUmUm_L96	431	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAfUmGmA mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	432
RZ0020 36	CmsGmsAmAmG(moe)CmUfCfAfUfGmA mAmUmAmUmAmUmUm_L96	433	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAfUmGmA mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	434
RZ0020 37	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmA(mo e)AmUmAmUmAmUmUm_L96	435	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAfUmGmA mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	436
RZ0020 38	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA (moe)UmAmUmAmUmUm_L96	437	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAfUmGmA mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	438
RZ0020 41	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmA(mo e)AmUmAmUmAmUmUm_L96	439	AmsAfsUmAmUmAfUmT(moe)CmAfUmG mAmGfCmUfUmCmGmsUmsAm	440
RZ0020 42	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA (moe)UmAmUmAmUmUm_L96	441	AmsAfsUmAmUmAfUmT(moe)CmAfUmG mAmGfCmUfUmCmGmsUmsAm	442
RZ0020 43	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA mUmAmUmAmT(moe)Um_L96	443	AmsAfsUmAmUmAfUmT(moe)CmAfUmG mAmGfCmUfUmCmGmsUmsAm	444
RZ0020 31	GmsAmsGmAmAmUmUfGdCfUmUmCm AmUmAmCmAmAmAm_L96	445	UmsUfsUmGmUmAfUmGmAmAmGmCm AmAfUmUfCmUmCmsCmsUm	446
RZ0020 67	GmsAmsGmAmAmUmUfGfCfUfUmCmA mUmAmCmAmAmAm_L96	447	UmsUfsUmGmUmAfUmGmAmAfGmCmA mAfT(moe)UfCmUmCmsCmsUm	448
RZ0020 68	GmsAmsGmAmAmUmUfGfCfUfUmCmA mUmAmCmAmAmAm_L96	449	UmsUfsUmGmUmAfUmGmAmAmGfCmA mAfT(moe)UfCmUmCmsCmsUm	450
RZ0020 69	GmsAmsGmAmA(moe)UmUfGfCfUfUmC mAmUmAmCmAmAmAm_L96	451	UmsUfsUmGmUmAfUmGmAmAfGmCmA mAfT(moe)UfCmUmCmsCmsUm	452
RZ0020 70	GmsAmsGmAmAmUmUfGfCfUfUmC(mo e)AmUmAmCmAmAmAm_L96	453	UmsUfsUmGmUmAfUmGmAmAfGmCmA mAfT(moe)UfCmUmCmsCmsUm	454
RZ0020 71	GmsAmsGmAmAmUmUfGfCfUfUmCmA (moe)UmAmCmAmAmAm_L96	455	UmsUfsUmGmUmAfUmGmAmAfGmCmA mAfT(moe)UfCmUmCmsCmsUm	456
RZ0020 11	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUm AmAmUmAmAmAmUm_L96	457	AmsUfsUmUmAmUfUmAmCmAfGmGm UmGfAmGfUmUmGmsAmsUm	458
RZ0020 82	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUmA mAmUmAmAmAmUm_L96	459	AmsUfsUmUmAmUfUmAmCmAfGmGmU mGfA(moe)GfUmUmGmsAmsUm	460
RZ0020 83	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUmA mAmUmAmAmAmUm_L96	461	AmsUfsUmUmAmUfUmAmCmAfGmGmU mGfA(moe)GfUmUmGmsAmsUm	462
RZ0020 84	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUmA mAmUmAmAmAmUm_L96	463	AmsUfsUmUmAmUfUmAmCmAfGmGmU mGfA(moe)GfUmUmGmsAmsUm	464
RZ0020 85	CmsAmsAmCmT(moe)CmAfCfCfUfGmU mAmAmUmAmAmAmUm_L96	465	AmsUfsUmUmAmUfUmAmCmAfGmGmU mGfA(moe)GfUmUmGmsAmsUm	466
RZ0020 86	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmT(mo e)AmAmUmAmAmAmUm_L96	467	AmsUfsUmUmAmUfUmAmCmAfGmGmU mGfA(moe)GfUmUmGmsAmsUm	468
RZ0020 87	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUmA(moe)AmUmAmAmAmUm_L96	469	AmsUfsUmUmAmUfUmAmCmAfGmGmU mGfA(moe)GfUmUmGmsAmsUm	470
RZ0020 91	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUmA(moe)AmUmAmAmAmUm_L96	471	AmsUfsUmUmAmUfUmA(moe)CmAfGmG mUmGfAmGfUmUmGmsAmsUm	472
RZ0020	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUmA	473	AmsUfsUmUmAmUfUmA(moe)CmAfGmG	474

92	mAmUmAmAmA(moe)Um_L96		mUmGfAmGfUmUmGmsAmsUm	
RZ0020 99	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA mUmAmUmAmUmUm_(CR01008×3)	475	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAmUfGmA mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	476
RZ0021 01	CmsGmsAmAmGmCmUfCfAfUfGmAmA (moe)UmAmUmAmUmUm_(CR01008×3)	477	AmsAfsUmAmUmAfUmUmCmAmUfGmA mGfC(moe)UfUmCmGmsUmsAm	478
RZ0021 06	CmsAmsGmAmGmAmAfAfUfCmUmA mCmUmAmCmAmUm_(CR01008×3)	479	AmsUfsGmUmAmGfUmAmGmAmAfUmU mUfC(moe)UfCmUmGmsUmsAm	480
RZ0021 13	CmsAmsAmCmUmCmAfCfCfUfGmUmA mAmUmAmAmA(moe)Um_(CR01008×3)	481	AmsUfsUmUmAmUfUmA(moe)CmAmGfG mUmGfAmGfUmUmGmsAmsUm	482
RZ0030 17	CmsAmsAmGmUmUmGfAdGfAmAmCm AmAmAmAmAmUmUm_L96	483	AmsAfsUmUmUmUfUmGmUmUmCmUmC mAfAmCfUmUmGmsAmsAm	484
RZ0030 28	CmsAmsAmGmUmUmGfAfGfAfAmC(mo e)AmAmAmAmAmUmUm_L96	485	AmsAfsUmUmUmUfUmGmUmUfCmUmC mAfA(moe)CfUmUmGmsAmsAm	486
RZ0030 29	CmsAmsAmGmUmUmGfAfGfAfAmC(mo e)AmAmAmAmAmUmUm_L96	487	AmsAfsUmUmUmUfUmGmUmUmCfUmC mAfA(moe)CfUmUmGmsAmsAm	488
RZ0030 31	CmsAmsAmGmUmUmGfAfGfAfAmC(mo e)AmAmAmAmAmT(moe)Um_L96	489	AmsAfsUmUmUmUfUmGmUmUfCmUmC mAfA(moe)CfUmUmGmsAmsAm	490
RZ0030 32	CmsAmsAmGmUmUmGfAfGfAfAmCmA mAmAmAmAmT(moe)Um_L96	491	AmsAfsUmUmUmUfUmG(moe)UmUfCmU mCmAfAmCfUmUmGmsAmsAm	492
RZ0030 20	GmsUmsUmUmUmAmAfAdAfUmUmAm AmAmGmUmAmUmAm_L96	493	UmsAfsUmAmCmUfUmUmAmAmUmUm UmUfAmAfAmAmCmsCmsCm	494
RZ0030 41	GmsUmsUmUmUmAmAfAfAfUfUmA(mo e)AmAmGmUmAmUmAm_L96	495	UmsAfsUmAmCmUfUmUmAmAfUmUmU mUfA(moe)AfAmAmCmsCmsCm	496
RZ0030 42	GmsUmsUmUmUmAmAfAfAfUfUmA(mo e)AmAmGmUmAmUmAm_L96	497	UmsAfsUmAmCmUfUmUmAmAmUfUmU mUfA(moe)AfAmAmCmsCmsCm	498
RZ0030 21	AmsAmsGmUmAmUmAfCdAfUmUmUm UmUmGmCmAmUmUm_L96	499	AmsAfsUmGmCmAfAmAmAmUmGm UmAfUmAfCmUmUmsUmsAm	500
RZ0030 65	AmsAmsGmUmAmUmAfCfAfUfUmUmU mUmGmCmAmUmUm_(CR01008×3)	501	AmsAfsUmGmCmAfAmAmAmAfUmGmU mAfUmAfCmUmUmsUmsAm	502
RZ0030 66	AmsAmsGmUmAmUmAfCfAfUfUmUmU mUmGmCmAmUmUm_(CR01008×3)	503	AmsAfsUmGmCmAfAmAmAmAfUmGmU mAfT(moe)AfCmUmUmsUmsAm	504
RZ0030 69	GmsUmsUmUmUmAmAfAfAfUfUmAmA mAmGmUmAmUmAm_(CR01008×3)	505	UmsAfsUmAmCmUfUmUmAfAmUmUmU mUfA(moe)AfAmAmCmsCmsCm	506
RZ0010 03	GmsGmsCmUmUmGmAfdUCfAmUmGm AmAmCmUmAmCmUm_L96	507	AmsGfsUmAmGmUfUmCmAmUmGmAm UmCfAmAfGmCmCmsAmsGm	508
RZ0010 05	GmsCmsAmGmCmUmCfdCUfUmAmUm UmGmUmUmAmUmAm_L96	509	UmsAfsUmAmAmCfAmAmUmAmAmGm GmAfGmCfUmGmCmsCmsAm	510
RZ0010 08	CmsGmsGmUmAmAmUfdGGfAmCmAm GmAmGmUmUmAmUm_L96	511	AmsUfsAmAmCmUfCmUmGmUmCmCmA mUfUmAfCmCmGmsUmsGm	512
RZ0010 12	CmsUmsGmGmCmUmUfdGAfUmCmAm AmGmAmAmCmUmAm_L96	513	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmAmUmCmA mAfGmCfCmAmGmsCmsAm	514
RZ0010 26	CmsUmsGmAmCmAmCfdAAfUmGmCm UmCmAmGmAmAmAm_L96	515	UmsUfsUmCmUmGfAmGmCmAmUmUmG mUfGmUfCmAmGmsAmsUm	516
RZ0010 32	GmsGmsCmUmUmGmAfUfCfAfUmGmA mAmCmUmAmCmUm_(CR01008×3)	517	AmsGfsUmAmGmUfUmCmAmUmGfAmU mCfA(moe)AfGmCmCmsAmsGm	518
RZ0010	GmsCmsAmGmCmUmCfCfUfUfAmUmU	519	UmsAfsUmAmAmCfAmAmUmAmAfGmG	520

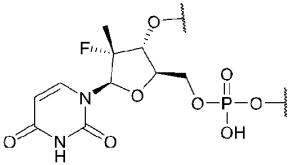
34	mGmUmUmAmUmAm_ (CR01008×3)		mAfG(moe)CfUmGmCmsCmsAm	
RZ0010 37	CmsGmsGmUmAmAmUfGfAfCmAmGmAmGmUmUmAmUm_ (CR01008×3)	521	AmsUfsAmAmCmUfCmUmGmUmCfCmA mUfT(moe)AfCmCmGmsUmsGm	522
RZ0010 39	CmsUmsGmGmCmUmUfGfAfUfCmAmAmGmAmAmCmUmAm_ (CR01008×3)	523	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmAmUfCmA mAfG(moe)CfCmAmGmsCmsAm	524
RZ0010 44	CmsUmsGmAmCmAmCfAfUfGmCmUmCmAmGmAmAmAm_ (CR01008×3)	525	UmsUfsUmCmUmGfAmGmCmAmUfUmG mUfG(moe)UfCmAmGmsAmsUm	526
RZ5990 62	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	527	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUfU(moe)AfAmAmAmsUmsGm	528
RZ5991 36	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	529	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUf(NM096)AfAmAmAmsUmsGm	530
RZ5991 37	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	531	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUf(NM097)AfAmAmAmsUmsGm	532
RZ5991 38	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	533	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUf(NM098)AfAmAmAmsUmsGm	534
RZ5991 39	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	535	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGfAmGmGmA mUf(NM099)AfAmAmAmsUmsGm	536
RZ5990 51	UmsUmsUmUmAmAmUf(Gemcitabine)CfUmCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	537	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGm AmUfUmAfAmAmAmsUmsGm	538
RZ5990 55	UmsUmsUmUmAmAmUf(Gemcitabine)CfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	539	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGfA mUfUmAfAmAmAmsUmsGm	540
RZ5990 56	UmsUmsUmUmAmAmUfCf(Gemcitabine)UfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_ L96	541	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGfA mUfUmAfAmAmAmsUmsGm	542
RZ5970 02	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm_ L96	543	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmC mUfCmUfUmGmGmsUmsUm	544
RZ5970 60	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm_ L96	545	UmsAfsGmUmUm(Gemcitabine)UmUmGm GmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsUmsUm	546
RZ5971 01	CmsCmsAmAmGmAmGf(Gemcitabine)AfCfCmAmAmGmAmAmCmUmAm_ L96	547	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGfC mUfC(moe)UfUmGmGmsCmsUm	548
RZM11 015	GmsCmsUmCmAmAmCfCfAfAmAmUmCmAmGmUmUmAmUm_ L96	649	AmsUfsAmAmCmUfGmAmUmUmUmGm GmUfUmGfAmGmCmsUmsUm	550
RZM11 508	GmsCmsUmCmAmAmCfCfAfAfAmUmCmAmGmUmUmAmUm_ L96	551	AmsUfsAmAmCmUfGmAmUmUmUmGfG mUfUmGfAmGmCmsUmsUm	552
RZM11 509	GmsCmsUmCmAmAmCfCfAfAfAmUmCmAmGmUmUmAmUm_ L96	553	AmsUfsAmAmCmUfGmAmUmUmUmGfG mUfT(moe)GfAmGmCmsUmsUm	554
RZM11 510	GmsCmsUmCmAmAm(Gemcitabine)CfAfAfAmUmCmAmGmUmUmAmUm_ L96	555	AmsUfsAmAmCmUfGmAmUmUmUmGfG mUfT(moe)GfAmGmCmsUmsUm	556
RZM11 001	GmsGmsAmGmGmGmAfGfUfAmGmAmGmAmUmCmAmAmAm_ L96	557	UmsUfsUmGmAmUfCmUmCmUmAmCmU mCfCmCfUmCmCmsAmsGm	558
RZM11 502	GmsGmsAmGmGmGmAfGfUfAfGmAmGmAmUmCmAmAmAm_ L96	559	UmsUfsUmGmAmUfCmUmCmUmAmCfU mCfC(moe)CfUmCmCmsAmsGm	560
RZM11 504	GmsGmsAmGmGmGmAfGfUfAfGmAmGmAmUmCmAmAmAm_ L96	561	UmsUfsUmGmAmUfCmUmCmUmAmCfU m(Gemcitabine)CmCfUmCmCmsAmsGm	562
RZM11 505	GmsGmsAmGmGmGmAfGfUfAfGmAmGmAmUmCmAmAmAm_ L96	563	UmsUfsUmGmAmUfCmUmCmUmAmCfU mCfCm(Gemcitabine)UmCmCmsAmsGm	564
RZM11	GmsGmsAmGmGmGmAfGfUfAfGmAmG	565	UmsUfsUmGmAmUfCmUmCmUmAmCfU	566

507	mAmUmCmAmAmAm_L96		m(Gemcitabine)C(moe)CfUmCmCmsAmsGm	
RZM12501	CmsAmsAmCmAmGmUfGfAfUfGmAmAmAmUmCmCmAmAm_(CR01008)(CR01008)(CR01008Z)	567	UmsUfsGmGmAmUfUmUmCfAmUmCmA mCfU(moe)GfUmUmGmsCmsUm	568
RZM12503	CmsAmsAmCmAmGmUfGfAfUfGmAmAmAmUmCmCmAmAm_(CR01008)(CR01008)(CR01008Z)	569	UmsUfsGmGmAmUfUmUm(Gemcitabine)A mUmCmAmCfU(moe)GfUmUmGmsCmsU m	570
RZ597114	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCfCmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	571	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGfGmUmGmC mUfC(moe)UfUmGmGmsUmsUm	572
RZ597115	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCfCmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	573	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGfGmUmGmC mUfC(moe)UfUmGmGms(NM054)sUm	574
RZ597116	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCfCmAmAmGmAmAmCmUmAm_L96	575	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGfGmUmGmC mUfC(moe)UfUmGmGms(NM054)s(NM054))	576
RZ599060	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_L96	577	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGfA mUfUmAfAmAmAms(NM054)sGm	578
RZ599061	UmsUmsUmUmAmAmUfCfCfUfCmAmCmUmCmUmAmAmAm_L96	579	UmsUfsUmAmGmAfGmUmGmAmGmGfA mUfUmAfAmAmAms(NM054)s(NM054)	580



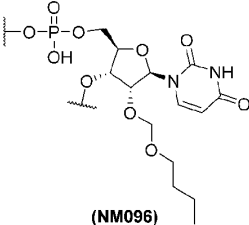
(Gemcitabine)表示 siRNA 中的一个核苷酸，其结构式为

(Gemcitabine)



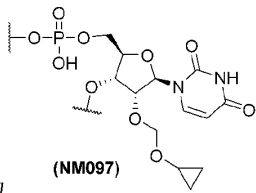
(NM054)表示 siRNA 中的一个核苷酸，其结构式为

(NM054)

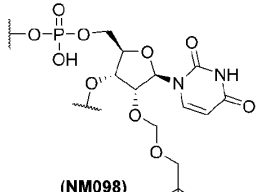


(NM096)表示 siRNA 中的一个核苷酸，其结构式为

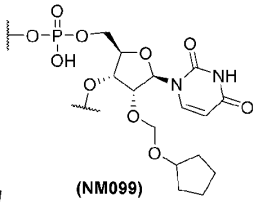
(NM096)



(NM097)表示 siRNA 中的一个核苷酸，其结构式为



(NM098)表示 siRNA 中的一个核苷酸，其结构式为



(NM099)表示一个核苷酸，其结构式为

实施例 2 不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 对补体成分 3(CC3)的 mRNA 的体外抑制活性

本实施例采用体外细胞筛选方法评价了正义链和反义链不同位点 TBDMS 修饰化合物 RX502002-RX502041，无 TBDMS 修饰的参比化合物 RX502001 在 HepG2 细胞中对目标靶基因 CC3 的抑制活性。

1.供试品配制

将上述每一个 siRNA 供试品离心后按照每管的规格加适量 1×PBS 溶解，配制成 20 μM 母液，再进一步用 1×PBS 稀释至 5 μM 工作液。

2.细胞培养与铺板

将 HepG2 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中，37℃，5%CO₂ 培养箱中培养增殖。铺板前弃去培养基，0.25% 胰酶漂洗，胰酶消化细胞后培养基终止消化，重悬细胞，800 rpm 离心 5 min，用新鲜的含 10%FBS 的 DMEM 培养基重悬，计数，稀释细胞密度至 1×10⁵ cells/mL，充分混匀后，24 孔板铺板，500 μL/孔；培养 24 h 后进行转染操作。

3.细胞转染

1)配制溶液 1——siRNA 混合液：

按每细胞孔 49.4μL Opti-MEM 培养基与 0.6μL siRNA 受试物工作液（5μM）混合均匀。每个 siRNA 供试品配制 3 个细胞复孔。

2)配制溶液 2——Lipofectamine 3000 混合液：

轻轻颠倒混匀转染试剂，按照每个细胞孔 48 μL Opti-MEM 培养基稀释 2 μL Lipo3000 试剂，轻轻吹吸 3~5 次，混匀，静置 5 min；每个 siRNA 供试品配制 3 个细胞复孔。

3)配制溶液 3——溶液 1 与溶液 2 混合物：

将一份（50μL）溶液 1 与一份（50μL）溶液 2 轻柔混合，配制成溶液 3（100μL）转染复合物，室温下孵育 20 min。

取出待转染的细胞培养板，弃去原培养基，加入 500μL Opti-MEM 培养基。加入孵育完成的溶液 3（100μL）逐滴加入细胞培养孔中，得到每个细胞转染孔 siRNA 受试物浓度约为 5nM。将细胞培养板置于 37℃，5%CO₂ 培养箱继续培养 4 小时，每孔补加 1mL 含 20% FBS 的 DMEM 培养基。继续置于 37℃，5%CO₂ 培养箱培养 24 小时。

Blank 对照组为正常培养 HepG2 细胞，不经任何转染操作；Mock 对照组为转染复合物中不加入任何 siRNA，仅加入 Lipofectamine 3000 转染试剂的对照组。

4.检测

RNA 提取：使用浙江瀚维科技有限责任公司全自动核酸提取仪及核酸提取试剂盒，按照说明书记载的方法提取各孔细胞中的总 RNA。

逆转录反应：将每孔细胞提取的总 RNA 分别取 1μg，使用 Promega 公司反转录试剂盒（Reverse Transcription System，A3500）并选取 Oligo (dT)₁₅ 逆转录引物，按照试剂盒说明书记载的方法配制 20μL 逆转录体系并完成逆转录反应。反应结束后，向逆转录体系中加入 80μL RNase-Free 水，得到用于 Real-time PCR 检测的 cDNA 溶液。

Real-time PCR 检测：使用 ABI 公司 SYBR™ Select Master Mix（Catalog number: 4472908）试剂，按照试剂盒说明书记载的方法配制每 PCR 检测孔 20μL Real-time PCR 反应体系，每个检测体系中含有 5μL 上述逆转录反应得到的 cDNA 模板、10μL SYBR™ Select Master Mix、0.5μL 10μM 上游引物、0.5μL 10μM 下游引物（引物信息见表 5）、4μL RNase-Free H₂O。将配制好的反应体系置于 ABI StepOnePlus PCR 仪上，使用三步法进行 Real-time PCR 扩增，扩增程序为 95℃ 预变性 10min，然后 95℃ 变性 30s，60℃ 退火 30s，72℃ 延伸 30s，重复变性、退火、延伸的过程 40 个循环。程序完成后通过上述 ΔΔCt 法计算基因表达差异。

表 5

靶点	引物类型	引物序列（5'-3'）	SEQ ID NO:
CC3	上游引物	AAGCGCATTCCGATTGAGGA	395
	下游引物	CCTGAGTGCAAGATGACGGT	396
GAPDH	上游引物	GGTCGGAGTCAACGGATT	397
	下游引物	CCAGCATCGCCCCACTGA	398

分别统计 HepG2 转染了正义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平（图 1）及靶基因 CC3 mRNA 的剩余活性（表 6），结果显示与无 TBDMS 修饰的参比序列（RX502001）相比，正义链 5 位（RX502027）、6 位（RX502028）、12 位（RX502034）、13 位（RX502035）、18 位（RX502040）TBDMS 修饰的 siRNA 序列体外活性有所提升；正义链 7 位（RX502029）、8 位（RX502030）、9 位（RX502031）、10 位（RX502032）TBDMS 修饰对 siRNA 序列体外活性的削弱作用较为明显。

表 6

组别	剩余活性%	±STDEV 值
Blank	95.12%	4.13
Mock	100.00%	23.29
RX502001	37.87%	8.02
RX502023	46.85%	5.43
RX502024	41.97%	1.77
RX502025	42.35%	6.33
RX502026	36.67%	0.35
RX502027	32.59%	5.10
RX502028	34.93%	0.24
RX502029	60.14%	7.73
RX502030	68.75%	3.51
RX502031	59.94%	8.31
RX502032	51.88%	5.43
RX502033	40.68%	6.38
RX502034	31.97%	0.45
RX502035	28.28%	9.63
RX502036	42.11%	6.72
RX502037	41.44%	9.96
RX502038	39.42%	1.68
RX502039	34.18%	5.43
RX502040	30.57%	6.01
RX502041	35.45%	4.59

分别统计 HepG2 转染了反义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平（图 2）及靶基因 CC3 mRNA 的剩余活性（表 7）与无 TBDMS 修饰的参比序列（RX502001）相比，反义链 8 位（RX502009）、15 位（RX502016）TBDMS 修饰对 siRNA 序列体外活性有进一步增强。

表 7

组别	剩余活性%	±STDEV 值
Blank	84.73%	21.89
Mock	100.00%	2.00
RX502001	31.03%	0.30
RX502002	46.41%	5.90
RX502003	59.23%	3.38
RX502004	52.15%	4.46
RX502005	64.90%	5.35
RX502006	59.99%	3.59
RX502007	49.94%	0.78
RX502008	41.48%	3.09
RX502009	29.52%	2.44
RX502010	33.34%	2.50
RX502011	33.05%	0.70
RX502012	73.19%	1.73
RX502013	47.10%	7.03
RX502014	75.17%	1.13
RX502015	63.59%	6.45
RX502016	23.91%	10.26
RX502017	70.65%	7.34
RX502018	39.76%	11.36
RX502019	31.94%	0.36
RX502020	34.41%	5.13
RX502021	37.34%	1.72
RX502022	41.58%	4.38

上述结果表明，TBDMS 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的 TBDMS 大基团修饰不影响 siRNA 活性，甚至可以进一步提高活性。

实施例 3.不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 缀合物对小鼠血清 CC3 蛋白的抑制活性

本实施例基于 Elisa 检测方法和原理评价了反义链不同位点 TBDMS 修饰化合物 RZM02004、RZM02005、RZM02006，无 TBDMS 修饰的参比化合物 RZM02001 在小鼠体内对血清 CC3 蛋白水平的抑制活性。

1.动物分组、给药及采血

将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组，每组 5 只，共 5 组。每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，每只给药剂量 3 mg/kg，给药体积 5 mL/kg。PBS 对照组给予同样体积的无 siRNA 缀合物 PBS 溶液。给药前取血记为 pre-dose，当天记为第一天（D0），给药后分别于 D14、D28、D42、D56、D70 和 D91 对每只小鼠采用促凝管（购自康诗菲，220518）进行眼底静脉丛取血，取血量约 0.1mL/只/次。使用促凝管（购自康诗菲，220518）采血，血样 4℃过夜，4℃ 1800g 离心 10min，分离血清-80℃保存。

2.血清 CC3 蛋白检测

采用 10 倍梯度稀释方式将血清样本 1:10000 稀释，采用小鼠 Complement C3 ELISA 试剂盒（购自 abcam，ab157711）检测每只小鼠血清中 CC3 蛋白含量。按照试剂盒说明书记载的方法配制标准品工作液及后续加样等操作，最终将 Elisa 板置于多功能微孔板检测仪（购自 Biotek，Biotek Synergy H1）中检测 450 nm 吸光值。利用 Graphpad prism 8.0 进行四参

数拟合（公式： $Y = \text{Bottom} + (X^{\text{HillSlope}} * (\text{Top} - \text{Bottom})) / (X^{\text{HillSlope}} + \text{EC50}^{\text{HillSlope}})$ ）绘制标曲及计算 R 平方，将 OD450 值代入标曲并乘以相应稀释倍数计算每个样本蛋白含量，并已 Pre-dose 检测值进行归一化处理。

3.结果分析

统计给药后小鼠体内血清 CC3 蛋白的表达水平（图 3）及靶基因 CC3 mRNA 的剩余活性（表 8），结果显示，正义链 18 位（RZM02004）、反义链 15 位（RZM02005）、反义链 21 位（RXM02006）TBDMS 的 siRNA 与无 TBDMS 修饰的参比序列（RZM02001）活性相当，均能够对血清 CC3 蛋白含量产生高效持续的抑制作用。至 D91 时，TBDMS 修饰的 RZM02004（剩余水平 61.69%）RZM02005（剩余水平 45.29%）RXM02006（剩余水平 56.75%）对血清 CC3 蛋白水平的抑制作用明显高于参比序列 RZM02001（剩余水平 72.75%），提示在 siRNA 特定位点上 TBDMS 大基团修饰不影响序列活性，甚至有可能进一步提升序列活性。

表 8

	PBS		RZM02001		RZM02004		RZM02005		RZM02006	
取材时间	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
pre-dose	100.00%	0.00	100.00%	0.00	100.00%	0.00	100.00%	0.00	100.00%	0.00
D14	79.34%	9.75	14.02%	2.15	11.37%	6.27	15.25%	2.21	15.12%	1.52
D28	70.79%	10.18	14.43%	0.38	13.88%	7.12	16.94%	3.96	14.18%	1.59
D42	75.15%	11.76	18.76%	4.43	15.82%	3.37	27.84%	14.33	18.77%	3.53
D56	79.89%	14.34	20.65%	4.89	23.84%	5.41	26.89%	10.88	24.27%	2.60
D70	68.66%	8.32	22.56%	4.79	34.40%	5.78	25.63%	6.09	30.97%	6.26
D91	86.35%	28.75	72.75%	25.57	61.69%	9.05	45.29%	9.90	56.75%	12.21

实施例 4. 不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠原代肝细胞中对血管生成素样蛋白 3（ANGPTL3）的 mRNA 的体外抑制活性

本实施例采用体外小鼠原代肝细胞筛选方法评价了 RZ597065 等正义链不同位点 TBDMS 修饰、及 RZ597084 等反义链不同位点 TBDMS 修饰，与无 TBDMS 修饰的参比化合物 RZ597024、无任何已知基因靶向性的阴性对照化合物 RZ000002 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 ANGPTL3 的抑制活性。

1.供试品配制

将上述每一个 siRNA 缀合物供试品离心后按照每管的规格加适量 1×PBS 溶解，配制成 20 μM 母液，再进一步用 1×PBS 稀释至 5 μM 工作液。

2.小鼠原代肝细胞分离

（1）麻醉：将 C57BL/6j 小鼠腹腔注射 0.04mL/10g 的 10%水合氯醛溶液。

（2）灌流：固定动物并用 75%乙醇消毒其腹部和胸部，打开腹腔找到肝门静脉和下腔静脉。将留置针由下腔静脉靠下端进针，开始以 120 滴/min 的速率灌注 HBSS 溶液，剪开肝门静脉，确认灌流液从被剪断的肝门静脉流出，固定好输液器，继续灌注 4 分钟。

（3）消化肝细胞：更换含 0.08%IV 型胶原酶(Collagenase from Clostridium histolyticum, Sigma)的 HBSS 以 120 滴/min 的速度继续灌注 8 分钟。

（4）分离原代肝细胞：从动物体内取出灌注后的肝脏，置于含 10 mL DMEM 的无菌培养皿中撕碎。用细胞筛（75μm）过滤除去未消化的肝组织及结缔组织。离心，用 DMEM 重悬清洗细胞两次。加入 10 mL 含 10%FBS 的 DMEM 培养基重悬、计数，待进行药物自由摄取操作。

3.siRNA 缀合物的自由摄取：

将新鲜分离的小鼠原代肝细胞铺板至 I 型胶原包被的 12 孔细胞培养板（Corning 公司）中，每孔含 5×10^5 活细胞、2mL 含 10%FBS 的 DMEM 培养基。

每个细胞孔分别加入上述 5 μ M siRNA 缀合物工作液 2 μ L，轻柔混合。得到每个细胞孔中 siRNA 缀合物的终浓度为 5nM。Blank 对照组为未进行任何 siRNA 缀合物自由摄取操作的原始小鼠原代肝细胞。将自由摄取处理后的小鼠原代肝细胞置于 37℃，5% CO₂ 培养箱继续培养 24 h。

4.检测

RNA 提取：使用浙江瀚维科技有限责任公司全自动核酸提取仪及核酸提取试剂盒，按照说明书记载的方法提取各孔细胞中的总 RNA。

逆转录反应：将每孔细胞提取的总 RNA 分别取 1 μ g，使用 Promega 公司反转录试剂盒（Reverse Transcription System, A3500）选取 Oligo (dT)₁₅ 逆转录引物，按照试剂盒说明书记载的方法配制 20 μ L 逆转录体系并完成逆转录反应。反应结束后，向逆转录体系中加入 80 μ L RNase-Free 水，得到用于 Real-time PCR 检测的 cDNA 溶液。

Real-time PCR 检测：使用 ABI 公司 SYBR™ Select Master Mix（Catalog number: 4472908）按照试剂盒说明书记载的方法配制每 PCR 检测孔 20 μ L Real-time PCR 反应体系，每个检测体系中含有 5 μ L 上述逆转录反应得到的 cDNA 模板、10 μ L SYBR™ Select Master Mix、0.5 μ L 10 μ M 上游引物、0.5 μ L 10 μ M 下游引物（引物信息见表 9）、4 μ L RNase-Free H₂O。将配制好的反应体系置于 ABI StepOnePlus PCR 仪上，使用三步法进行 Real-time PCR 扩增，扩增程序为 95℃ 预变性 10min，然后 95℃ 变性 30s，60℃ 退火 30s，72℃ 延伸 30s，重复变性、退火、延伸的过程 40 个循环。程序完成后通过上述 $\Delta\Delta C_t$ 法计算基因表达差异。

表 9

靶点	引物类型	引物序列（5'-3'）	SEQ ID NO:
ANGPTL3	上游引物	GAGGAGCAGCTAACCAACTTAAT	399
	下游引物	TCTGCATGTGCTGTTGACTTAAT	400
GAPDH	上游引物	TGCACCACCAACTGCTTAG	401
	下游引物	GGATGCAGGGATGATGTTC	402

5.结果分析

分别统计小鼠原代肝细胞自由摄取正义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 ANGPTL3 mRNA 的相对表达水平（图 4）及剩余活性（表 10），结果显示，与无 TBDMS 修饰的参比序列（RZ597024）相比，正义链 5 位（RZ597069）、6 位（RZ597070）、12 位（RZ597076）、13 位（RZ597077）、18 位（RZ597082）TBDMS 修饰有助于 siRNA 序列体外活性的提升；正义链 2 位（RZ597066）、3 位（RZ597067）、7 位（RZ597071）、8 位（RZ597072）、9 位（RZ597073）、10 位（RZ597074）TBDMS 修饰对 siRNA 序列体外活性的削弱作用较为明显。

表 10

组别	剩余活性	±STDEV 值
Blank	100.00%	8.83
RZ000002	104.09%	14.13
RZ597024	18.26%	4.41
RZ597065	22.05%	2.97
RZ597066	37.16%	9.95
RZ597067	36.97%	2.21
RZ597068	20.50%	2.85
RZ597069	12.93%	2.56
RZ597070	16.55%	5.90
RZ597071	68.28%	13.33

RZ597072	45.95%	9.77
RZ597073	72.55%	28.40
RZ597074	52.65%	7.89
RZ597075	19.44%	0.53
RZ597076	15.12%	0.68
RZ597077	12.81%	1.88
RZ597078	23.03%	3.75
RZ597079	27.89%	11.77
RZ597080	24.63%	14.70
RZ597081	21.84%	0.99
RZ597082	12.96%	1.60
RZ597083	11.53%	2.93

分别统计小鼠原代肝细胞自由摄取反义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 后，靶基因 ANGPTL3 mRNA 的相对表达水平（图 5）及剩余活性（表 11），结果显示，与无 TBDMS 修饰的参比序列（RZ597024）相比，反义链 8 位（RZ597030）、9 位（RZ597031）、10 位（RZ597086）、15 位（RZ597091）、20 位（RZ597096）、21 位（RZ597097）有助于 siRNA 序列体外活性的提升。

表 11

组别	剩余活性	±STDEV 值
Blank	100.00%	33.38
RZ000002	95.70%	34.93
RZ597024	28.92%	4.17
RZ597084	44.74%	14.86
RZ597085	74.01%	31.38
RZ597025	57.95%	1.85
RZ597026	61.39%	0.84
RZ597027	34.93%	14.14
RZ597028	36.04%	7.30
RZ597029	28.29%	10.81
RZ597030	17.00%	0.94
RZ597031	17.00%	0.52
RZ597086	17.30%	5.41
RZ597087	30.07%	9.39
RZ597088	42.58%	7.60
RZ597089	49.49%	4.79
RZ597090	50.68%	11.91
RZ597091	22.68%	3.81
RZ597092	34.85%	7.27
RZ597093	36.96%	10.01
RZ597094	29.13%	1.22
RZ597095	33.20%	14.25
RZ597096	23.81%	6.40
RZ597097	23.80%	9.93

实施例 4 实验结果提示的实验结论与实施例 2 具有高度相似性，均表明 TBDMS 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的 TBDMS 大基团修饰不影响 siRNA 活性，甚至可以进一步提高活性。

实施例 5. 不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠体内对 ANGPTL3 mRNA 的抑制活性

本实施例采用小鼠体内靶基因抑制活性评估方法评价了反义链不同位点 TBDMS 修饰的 siRNA 缀合物 RZ597026、RZ597030，及无 TBDMS 修饰的参比缀合物 RZ597024 在小鼠体内对目标靶基因 ANGPTL3 的抑制活性

将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组，每组 25 只，共 4 组。每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，每只给药剂量 3 mg/kg，给药体积 5 mL/kg。PBS 对照组给予同样体积的无 siRNA 缀合物 PBS 溶液。给药当天记为第一天（D0），给药后分别于 D7、D14、D28 和 D56 每组处死 5 只小鼠。对动物进行大体解剖，收集肝组织，切割成数个 2 mm³ 小块用 RNAlater 保存。从 RNAlater 中取出适量肝组织样本在 TissueLyser II 型全自动组织匀浆仪中破碎 60s，按照实施例 4 中记载的检测方法完成 RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测，并根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。

分别统计给药后小鼠体内 ANGPTL3mRNA 的表达水平（图 6）及 ANGPTL3mRNA 的剩余活性（表 12），与实施例 4 的体外原代肝细胞实验结论相似，反义链 8 位（RZ597030）对 TBDMS 修饰耐受性良好，RZ597030 体内活性和药效持续作用时间均优于无 TBDMS 修饰的参比序列（RZ597024），但反义链 4 位（RZ597026）TBDMS 修饰则对序列体内活性影响相对较大。

表 12

取材时间	PBS		RZ597024		RZ597026		RZ597030	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
D0	100.00%	0.00	100.00%	0.00	100.00%	0.00	100.00%	0.00
D7	99.29%	22.56	17.73%	10.91	55.68%	27.88	2.98%	1.30
D14	97.35%	14.70	18.08%	9.52	63.15%	24.32	3.11%	1.20
D28	115.32%	25.16	17.54%	9.43	63.42%	31.54	4.44%	0.82
D56	117.02%	64.52	103.98%	26.72	77.70%	43.25	32.97%	6.13

实施例 5 的体内实验结果再次验证，TBDMS 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的 TBDMS 大基团修饰不影响 siRNA 活性，甚至可以进一步提高活性。

实施例 6. 不同位点 TOM 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠原代肝细胞中对凝血因子 XI（Factor XI, FXI）mRNA 的体外抑制活性

采用与实施例 4 相同的实验方法，评价了反义链不同位点 TOM 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 FXI 的抑制活性。区别在于，本实施例使用了反义链不同位点 TOM 修饰的 siRNA 缀合物替换了实施例 4 中使用的 siRNA 缀合物；区别在于，本实施例使用了表 13 所示的靶基因 FXI 检测引物替换了实施例 4 中使用的靶基因检测引物。根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。

表 13

靶点	引物类型	引物序列（5'-3'）	SEQ ID NO:
FXI	上游引物	GCCCTGTAAAACTGGAATCAGC	403
	下游引物	GCCCTGTAAAACTGGAATCAGC	404
GAPDH	上游引物	TGCACCACCAACTGCTTAG	405
	下游引物	GGATGCAGGGATGATGTTC	406

分别统计鼠原代肝细胞自由摄取正义链不同位点 TOM 修饰的 siRNA 后，靶基因 FXI mRNA 的相对表达水平（图 7）及 FXI mRNA 的剩余活性（表 14），结果显示，与无 TOM 修饰的参比序列（RZ594001）相比，正义链 5 位（RZ594011）、6 位（RZ594012）、12 位（RZ594018）、13 位（RZ594019）、18 位（RZ594024）、19 位（RZ594025）TOM 修饰有助于 siRNA 序列体外活性的提升；正义链 2 位（RZ594008）、3 位（RZ594009）、7 位（RZ594013）、8 位（RZ594014）、9 位（RZ594015）、10 位（RZ594016）TBDMS 修饰对 siRNA 序列体外活性的削弱作用较为明显）。

表 14

组别	剩余活性	±STDEV 值
Blank	98.20%	0.05
RZ000002	100.00%	0.11
RZ594001	45.06%	0.10
RZ594007	58.21%	0.11
RZ594008	67.51%	0.00
RZ594009	74.34%	0.40
RZ594010	49.30%	0.21
RZ594011	38.92%	0.06
RZ594012	19.02%	0.07
RZ594013	72.04%	0.11
RZ594014	88.06%	0.05
RZ594015	91.68%	0.19
RZ594016	95.24%	0.13
RZ594017	46.44%	0.03
RZ594018	29.60%	0.03
RZ594019	35.99%	0.06
RZ594020	58.41%	0.07
RZ594021	50.19%	0.03
RZ594022	77.93%	0.14
RZ594023	66.24%	0.22
RZ594024	31.93%	0.07
RZ594025	40.17%	0.14

分别统计鼠原代肝细胞自由摄取反义链不同位点 TOM 修饰的 siRNA 后，靶基因 FXI mRNA 的相对表达水平（图 8）及 FXI mRNA 的剩余活性（表 15）与无 TOM 修饰的参比序列（RZ594001）相比，反义链 7 位（RZ594004）、8 位（RZ594005）、9 位（RZ594006）、10 位（RZ594030）、15 位（RZ594035）、20 位（RZ594040）、21 位（RZ594041）有助于 siRNA 序列体外活性的提升。

表 15

组别	剩余活性	±STDEV 值
Blank	112.17%	0.15
RZ000002	100.00%	0.16
RZ594001	44.17%	0.08
RZ594026	57.92%	0.04
RZ594027	73.82%	0.17
RZ594028	57.92%	0.04
RZ594029	73.82%	0.17
RZ594002	62.97%	0.08
RZ594003	65.46%	0.09
RZ594004	37.32%	0.01
RZ594005	31.60%	0.07
RZ594006	41.14%	0.05
RZ594030	35.51%	0.06
RZ594031	59.62%	0.01
RZ594032	59.37%	0.07
RZ594033	74.85%	0.18

RZ594034	83.68%	0.09
RZ594035	31.89%	0.02
RZ594036	73.49%	0.07
RZ594037	62.44%	0.12
RZ594038	61.86%	0.09
RZ594039	43.47%	0.02
RZ594040	39.27%	0.02
RZ594041	37.18%	0.03

实施例6的结果表明，TOM修饰对siRNA序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的TOM大基团修饰不影响siRNA活性，甚至可以进一步提高活性，其影响模式与TOM修饰具有高度相似性。

实施例7. 不同位点TOM修饰的siRNA缀合物在小鼠体内对CC3 mRNA的抑制活性

本实施例采用小鼠体内靶基因抑制活性评估方法评价了正义链19位TOM修饰缀合物RZ502013、反义链10位TOM修饰缀合物RZ502016，及无TOM修饰的参比缀合物RZ002001在小鼠体内对目标靶基因CC3的抑制活性。

将6-8周龄C57BL/6j小鼠按体重随机分组，每组5只，共4组。每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述siRNA缀合物，每只给药剂量3 mg/kg，给药体积5 mL/kg。PBS对照组给予同样体积的无siRNA缀合物PBS溶液。给药当天记为第一天(D0)，给药后于D7处死小鼠。对动物进行大体解剖，收集肝组织，切割成数个2 mm³小块用RNAlater保存。从RNAlater中取出适量肝组织样本在Tissuelyser II型全自动组织匀浆仪中破碎60s，按照实施例2中记载的检测方法完成RNA提取、逆转录反应和Real-time PCR检测，并根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因mRNA进行相对定量计算。区别在于，本实施例使用了TOM修饰的siRNA缀合物替换了实施例4中使用的siRNA缀合物；根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因mRNA进行相对定量计算。

分别统计给药后小鼠体内CC3 mRNA的表达水平(图9)及CC3 mRNA的剩余活性(表16)，结果显示siRNA正义链19位TOM修饰的siRNA缀合物RZ502013体内活性(D7)高于参比缀合物RZ002001，反义链10位TOM修饰RZ502016体内活性与参比缀合物RZ002001相当。

表 16

组别	剩余活性	±STDEV 值
PBS	100.00%	20.66
RZ002001	27.97%	4.37
RZ502013	17.28%	5.63
RZ502016	27.05%	2.54

实施例7的体内结果表明，特定位点的TOM大基团修饰不影响siRNA活性，甚至可以进一步提高活性。

实施例8. 不同位点MOE修饰的siRNA缀合物在HepG2细胞上对CC3 mRNA的抑制活性

采用与实施例2相同的实验方法，评价了RX502165等正义链不同位点和RX502172等反义链不同位点MOE修饰的siRNA化合物、以及无MOE修饰的参比化合物RX502001在HepG2细胞上的体外活性。区别在于，本实施例使用了正反义链不同位点MOE修饰的siRNA化合物替换了实施例2中使用的siRNA化合物；根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因mRNA进行相对定量计算。

实施例8的结果表明，MOE修饰对siRNA序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的MOE基团修饰不影响siRNA活性，甚至可以进一步提高活性，其影响模式与TBDMS修饰、TOM修饰均具有高度相似性。

分别统计HepG2转染了正义链不同位点MOE修饰的siRNA后，靶基因CC3 mRNA的相对表达水平(图10)及CC3 mRNA的剩余活性(表17)，结果显示与无MOE修饰的参比序列(RX502001)相比，正义链5位(RZ594011)、12位(RX502115)、18位(RX502116)、19位(RX502117)MOE修饰有助于siRNA序列体外活性的提升；正义链7位(RX502166)、8位(RX502167)、9位(RX502168)、10位(RX502169)MOE修饰对siRNA序列体外活性的削弱作用较为明显。

表 17

组别	剩余活性	±STDEV 值
----	------	----------

BLANK	123.72%	27.50
MOCK	100.00%	3.26
RX502001	32.73%	10.04
RX502165	28.12%	0.16
RX502166	56.98%	1.16
RX502167	71.83%	14.09
RX502168	50.68%	17.54
RX502169	38.27%	0.70
RX502115	30.07%	1.56
RX502116	27.65%	0.90
RX502117	27.81%	0.86

分别统计 HepG2 转染了反义链不同位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平（图 11）及 CC3 mRNA 的剩余活性（表 18），结果显示，与无 MOE 修饰的参比序列（RX502001）相比，反义链 8 位（RX502118）、10 位（RX502119）、15 位（RX502120）有助于 siRNA 序列体外活性的提升。

表 18

组别	剩余活性	±STDEV 值
BLANK	123.72%	27.50
MOCK	100.00%	3.26
RX502001	37.72%	2.97
RX502172	80.25%	6.90
RX502173	50.83%	26.06
RX502118	28.05%	1.96
RX502119	31.74%	2.80
RX502177	72.15%	2.17
RX502120	27.73%	2.84
RX502178	42.07%	5.89

实施例 8 的结果表明，MOE 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的 MOE 基团修饰不影响 siRNA 活性，甚至可以进一步提高活性，其影响模式与 TBDMS 修饰、TOM 修饰均具有高度相似性。

实施例 9. 多位点 MOE 修饰缀合物在 HepG2 细胞上对 CC3 mRNA 的抑制活性

采用与实施例 2 相同的实验方法，评价了 RX502123 等正义链多个位点 MOE 修饰的 siRNA 化合物、RX502130 等反义链多个位点 MOE 修饰的 siRNA 化合物、RX502146 等正义链和反义链同时 MOE 修饰的化合物、以及无 MOE 修饰的参比化合物 RX502001、不靶向任何已知靶点的阴性对照化合物 RZ000002 在 HepG2 细胞上的体外活性。区别在于，本实施例使用了上述正义链和/或反义链 MOE 修饰的 siRNA 化合物替换了实施例 2 中使用的 siRNA 化合物；根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。

分别统计 HepG2 转染了正义链多位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平（图 12）及 CC3 mRNA 的剩余活性（表 19），结果显示，正义链 6 位、12 位、18 位、19 位多位点组合 MOE 修饰与无 MOE 修饰的 siRNA 参比序列（RX502001）的体外活性相当，其中正义链 12 位和 18 位同时 MOE 修饰的化合物 RX502126 体外活性甚至略高于参比序列 RX502001。

表 19

组别	剩余活性	±STDEV 值
Blank	109.24%	14.81
Mock	100.00%	4.74
RZ000002	101.95%	7.63
RX502001	50.48%	0.58
RX502123	49.14%	3.34

RX502124	48.82%	1.50
RX502125	49.56%	5.91
RX502126	39.57%	3.84
RX502127	51.46%	3.02
RX502128	47.60%	2.17

分别统计 HepG2 转染了反义链多位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平（图 13）及 CC3 mRNA 的剩余活性（表 20）反义链 8 位、10 位、15 位、20 位、21 位多位点组合 MOE 修饰与无 MOE 修饰的 siRNA 参比序列（RX502001）的体外活性相当，其中正义链 8 位和 15 位同时 MOE 修饰的化合物 RX502130 等多条修饰序列体外活性甚至略高于参比序列 RX502001。

表 20

组别	剩余活性	±STDEV 值
Blank	110.50%	10.43
Mock	100.00%	6.61
RZ000002	107.76%	1.18
RX502001	42.58%	3.88
RX502130	36.09%	5.96
RX502131	38.52%	0.38
RX502132	46.57%	2.73
RX502134	41.29%	3.98
RX502135	46.41%	5.68
RX502136	36.99%	6.09
RX502138	40.82%	0.30
RX502139	39.03%	5.04
RX502140	42.50%	11.02

分别统计 HepG2 转染了正义链和反义链多位点 MOE 修饰的 siRNA 后，靶基因 CC3 mRNA 的相对表达水平（图 14）及 CC3 mRNA 的剩余活性（表 21），结果显示，正义链 6 位、12 位、18 位与反义链 8 位、10 位、15 位、20 位、21 位组合 MOE 修饰的化合物与无 MOE 修饰的 siRNA 参比序列（RX502001）的体外活性相当，其中正义链 18 位、反义链 15 位同时 MOE 修饰的化合物 RX502151，正义链 6 位、12 位、反义链 8 位、15 位同时 MOE 修饰的化合物 RX502154，正义链 6 位、18 位、反义链 8 位、15 位同时 MOE 修饰的化合物 RX502156，正义链 12 位、18 位、反义链 8 位、15 位同时 MOE 修饰的化合物 RX502158 等多条修饰序列的体外活性均略高于参比序列 RX502001。甚至在正义链 6 位、12 位、18 位和反义链 8 位、10 位、15 位、20 位、21 位同时进行 8 个位点的 MOE 修饰（RX502164）仍然能够很好的保持序列体外活性。

表 21

组别	剩余活性	±STDEV 值
Blank	116.68%	22.21
Mock	100.00%	8.37
RZ000002	101.23%	0.18
RX502001	52.76%	3.37
RX502146	55.37%	2.44
RX502147	49.71%	9.00
RX502150	46.92%	8.12
RX502151	44.70%	0.10
RX502152	53.10%	2.55
RX502153	60.77%	2.75

RX502154	42.19%	1.00
RX502155	58.49%	5.70
RX502156	39.78%	0.68
RX502157	58.00%	3.86
RX502158	43.32%	0.36
RX502159	54.69%	2.06
RX502160	48.33%	1.47
RX502162	52.14%	4.40
RX502163	49.89%	4.75
RX502164	54.06%	0.41

实施例 9 的结果表明，MOE 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，在正义链和/或反义链特定位点上进行单个或多个位点的 MOE 修饰可以具有良好的耐受性，仍然可以很好的维持甚至进一步提升 siRNA 序列活性。

实施例 10. 正义链和/或反义链不同位点 MOE 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠体内对 CC3 mRNA 的抑制活性

采用与实施例 7 相同的实验方法，评价了正义链和/或反义链不同位点 MOE 修饰的 siRNA 缀合物，及无 MOE 修饰的参比缀合物 RZ502031 在小鼠体内对目标靶基因 CC3 的抑制活性。区别在于，本实施例使用了上述正义链和/或反义链 MOE 修饰的 siRNA 化合物替换了实施例 7 中使用的 siRNA 化合物；根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。按照实施例 2 中记载的检测方法完成 RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测，并根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。

分别统计给药（本实施例所述 siRNA 缀合物）后，小鼠体内 CC3 mRNA 的表达水平（图 15，16）及 CC3 mRNA 的剩余活性（表 22，23），结果显示，在正义链和/或反义链特定位点上进行多位点 MOE 修饰仍然可以很好的维持甚至进一步提升 siRNA 序列的体内活性。siRNA 正义链 6 位、18 位，反义链 8 位、15 位同时 MOE 修饰的 siRNA 缀合物 RZ502039，正义链 12 位、18 位，反义链 15 位同时 MOE 修饰的 siRNA 缀合物 RZ502036 体内活性（D21 天）均高于参比缀合物 RZ502031。但在反义链 14 位进行 MOE 修饰（RZ502087）则显著影响 siRNA 的体内活性。

表 22

组别	剩余活性	$\pm$ STDEV 值
PBS	100.00%	38.33
RZ502031	37.42%	11.14
RZ502033	32.38%	9.28
RZ502034	33.83%	5.89
RZ502035	34.73%	2.74
RZ502039	30.36%	13.58

表 23

组别	剩余活性	$\pm$ STDEV 值
PBS	100.00%	18.16
RZ502031	50.99%	9.23
RZ502036	37.73%	5.66
RZ502049	59.94%	6.06
RZ502087	127.94%	25.65

实施例 10 的结果表明，MOE 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，在正义链和/或反义链特定位点上进行单个或多个位点的 MOE 修饰可以具有良好的耐受性，仍然可以很好的维持甚至进一步提升 siRNA 序列活性，但在另外一些位点上即使进行单一位点的 MOE 修饰也会显著影响 siRNA 序列活性。

实施例 11. 正义链和/或反义链不同位点 MOE 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠体内对 SOD1 mRNA 的抑制活性

采用与实施例 7 相同的实验方法,评价了正义链和/或反义链不同位点 MOE 修饰的 siRNA 缀合物,及无 MOE 修饰的参比缀合物 RZ599001 在小鼠体内对目标靶基因 SOD1 的抑制活性。区别在于,本实施例使用了上述正义链和/或反义链 MOE 修饰的 siRNA 化合物替换了实施例 7 中使用的 siRNA 化合物;根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。按照实施例 2 中记载的检测方法完成 RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测,并根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。

分别统计给药后第 7 天及第 21 天,小鼠体内 SOD1 mRNA 的表达水平(图 17)及剩余活性(表 24),结果表明,MOE 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关,在正义链和/或反义链特定位点上进行单个或多个位点的 MOE 修饰可以具有良好的耐受性,仍然可以很好的维持甚至进一步提升 siRNA 序列活性。

表 24

组别	D7		D21	
	剩余活性	±STDEV 值	剩余活性	±STDEV 值
PBS	100.00%	13.67	100.00%	10.42
RZ599001	30.51%	11.31	36.61%	7.30
RZ599015	23.39%	4.39	27.50%	1.98
RZ599016	26.46%	6.31	38.86%	9.78
RZ599017	23.49%	3.28	25.19%	7.93
RZ599018	16.60%	4.29	30.27%	4.74
RZ599019	32.79%	9.07	47.61%	10.13
RZ599020	32.00%	6.06	37.10%	5.48

实施例 12. 不同修饰方案的 siRNA 缀合物在 HepG2 细胞中对靶基因 C3 的体外活性评价

本实施例采用人肝癌细胞系 HepG2 对比评价了 RZ002003、RZ002006、RZ002011 和 RZ002031 转换不同修饰方案形成的各 siRNA 缀合物在细胞中对目标靶基因 C3 mRNA 的抑制活性。

供试品配制:

将上述每个 siRNA 供试品离心后,按照每管的规格加适量 PBS 溶解,配置成 20 μ M 母液,再进一步用 PBS 将母液进行梯度稀释,稀释成 0.5 μ M 和 0.05 μ M 工作液。以 5 nM 和 0.5 nM 最终双链体浓度进行剂量试验。

96 孔转染及检测:

使用胰蛋白酶消化生长至接近汇合状态的 HepG2 细胞,将细胞洗涤制备细胞悬液,96 孔板中每孔加入 100 μ L 细胞悬液,每孔细胞数为 12000 个细胞,置于 37℃,5%CO₂ 培养箱培养。待细胞贴壁 24 h 时,吸弃 96 孔板中的 DMEM 培养基,每孔加入 80 μ L Opti-MEM™培养基,随后将 96 孔板放入培养箱中继续培养。将 1 μ L 0.1 μ M 和 0.01 μ M 工作液分散在 9 μ L Opti-MEM 中,形成 siRNA 混合物,0.3 μ L RNAiMAX 分散在 9.7 μ L Opti-MEM 中,与每种 siRNA 混合物混匀,形成转染复合物。将转染复合物在室温下孵育 10 分钟,然后将转染复合物加入 96 孔平板中,20 μ L/孔。培养 4 h 后,每孔补 100 μ L 含 20%FBS 的 DMEM 培养基,96 孔板放入培养箱中继续培养 24 h。其中,Mock 对照组:0.3 μ L RNAiMAX 分散在 9.7 μ L Opti-MEM 中,再加入 10 μ L Opti-MEM,在室温下孵育 10 分钟;然后将其加入 96 孔平板中,20 μ L/孔。培养 4 h 后,每孔补 100 μ L 含 20%FBS 的 DMEM 培养基,96 孔板放入培养箱中继续培养 24 h。

取出 96 孔板,使用全自动核酸提取仪(购自浙江瀚维科技有限责任公司)及核酸提取试剂盒(购自浙江瀚维科技有限责任公司,GO-MNTR-100)按照总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到总 RNA。

使用反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, K1622)并选取 Oligo (dT)18 逆转录引物,按照反转录试剂盒说明书记载的方法配置 20 μ L 逆转录体系并完成逆转录反应。接着使用实时荧光定量 PCR 试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,TaqMan Fast Advanced Master Mix, 4444557)在荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,CFX Opus 384)上检测 HepG2 细胞中目标基因 mRNA 的表达量。在该实时荧光定量 PCR 法中,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因作为内参基因,使用针对目标基因的引物和针对 GAPDH 内参基因的引物分别对目标基因和 GAPDH 内参基因进行检测。检测引物的序列参见表 25。

表 25

基因		引物类型	引物序列	荧光基团	SEQ ID NO:
目标	C3	上游引物	5'-AGTCTCCTGCTTTAGTGATGC-3'	/	581

基因		下游引物	5'-GCCTTTGTTCTCATCTCGCT-3'	/	582
		探针引物	5'-CTGTTGACCTGCTCCTCGCAAATATCT-3'	5'FAM; 3'MGB	583
内参基因	GAPDH	上游引物	5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'	/	584
		下游引物	5'-CAAAGTGGTCGTTGAGGG-3'	/	585
		探针引物	5'-CAACAGCGACACCCACTC-3'	5'VIC; 3'MGB	586

按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书记载的方法配置每个 PCR 检测孔 10 μ L Real-time PCR 反应体系，每个反应体系中含有 4 μ L 上述逆转录反应得到的 cDNA 溶液、5 μ L TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (2 $\times$)、0.15 μ L 10 μ M 上游引物、0.15 μ L 10 μ M 下游引物、0.15 μ L 10 μ M 探针引物、0.55 μ L RNase-Free H₂O。将配置好的反应体系置于实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad 公司，CFX Opus 384）上，使用两步法进行 Real-time PCR 扩增，扩增程序为 50℃ 2 min，然后 95℃ 预变性 20 s，95℃ 变性 3 s，60℃ 退火和延伸 30 s，重复变性、退火和延伸的过程 40 个循环。在该实时荧光定量 PCR 法中，按照前述 $\Delta\Delta$ Ct 法对各测试组中目标基因 C3 mRNA 的表达水平和抑制率进行相对定量计算。

实施例 12 的结果表明，5 nM 和 0.5 nM 剂量下，RZ002003、RZ002006、RZ002011 和 RZ002031 转换了不同修饰方案的 siRNA 均能明显抑制 HepG2 细胞中 C3 基因 mRNA 表达且相较于原序列 RZ002003、RZ002006、RZ002011 和 RZ002031 具有更高的体外活性（图 18a、18b、18c、18d；表 26a、26b、26c、26d）。

表 26a

组别	5nM		0.5nM	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
Mock	100.08	5.72	N/A	N/A
RZ002003	17.22	2.77	54.38	3.56
RZ002050	17.66	2.29	36.57	2.38
RZ002051	16.28	2.17	27.45	6.33
RZ002052	13.93	1.18	30.06	0.72
RZ002053	14.89	4.02	26.02	0.90
RZ002055	15.59	2.72	24.55	2.19
RZ002058	14.76	0.11	31.74	1.35
RZ002059	11.29	1.47	26.65	4.85
RZ002060	10.29	1.48	25.95	0.70

表 26b

组别	5nM		0.5nM	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
biaoMock	100.02	3.12	N/A	N/A
RZ002006	12.47	0.29	44.20	7.28
RZ002033	9.16	0.94	31.05	0.71
RZ002034	8.80	0.76	24.49	6.22
RZ002035	7.65	1.92	32.11	1.97
RZ002036	11.99	0.18	24.01	1.03
RZ002037	11.26	0.61	27.13	0.60
RZ002038	9.04	1.21	30.72	0.51
RZ002041	10.48	1.47	27.69	6.13
RZ002042	9.07	0.71	26.13	1.61
RZ002043	8.04	0.71	30.69	0.16

表 26c

组别	5nM		0.5nM	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
Mock	100.08	5.65	N/A	N/A

RZ002011	27.09	1.06	47.46	6.82
RZ002082	21.94	5.23	28.47	2.52
RZ002083	19.50	8.69	25.41	1.19
RZ002084	15.72	8.18	27.87	2.26
RZ002085	23.29	5.75	33.23	2.55
RZ002086	21.13	8.66	34.13	6.23
RZ002087	21.79	0.85	36.56	3.15
RZ002091	11.74	0.65	36.05	0.00
RZ002092	11.68	1.28	37.75	0.36

表 26d

组别	5nM		0.5nM	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
Mock	100.02	2.98	N/A	N/A
RZ002031	28.18	0.90	54.75	6.16
RZ002067	16.90	4.88	27.45	1.50
RZ002068	15.99	9.04	38.28	2.66
RZ002069	18.45	5.73	31.23	2.43
RZ002070	16.78	8.11	34.34	1.93
RZ002071	16.24	5.09	32.75	1.91

实施例 13.不同修饰方案的 siRNA 缀合物在 Huh7 细胞中对靶基因血管紧张肽原（angiotensinogen,AGT）的体外活性评价

本实施例采用人肝癌细胞系 Huh7 对比评价了 RZ003017 和 RZ003020 转换不同修饰方案形成的各 siRNA 缀合物在细胞中对目标靶基因 AGT mRNA 的抑制活性。

供试品配制：

将上述每个 siRNA 供试品离心后，按照每管的规格加适量 PBS 溶解，配置成 20 μM 母液，再进一步用 PBS 将母液进行梯度稀释，稀释成 0.1 μM 和 0.01 μM 工作液。以 1 nM 和 0.1 nM 最终双链体浓度进行剂量试验。

96 孔转染及检测：

使用胰蛋白酶消化生长至接近汇合状态的 Huh7 细胞，将细胞洗涤制备细胞悬液，96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液，每孔细胞数为 12000 个细胞，置于 37℃，5%CO₂ 培养箱培养。待细胞贴壁 24h 时，吸弃 96 孔板中的 DMEM 培养基，每孔加入 80 μL Opti-MEM™培养基，随后将 96 孔板放入培养箱中继续培养；将 1 μL 0.1 μM 和 0.01 μM 工作液分散在 9 μL Opti-MEM 中，形成 siRNA 混合物，0.3 μL RNAiMAX 分散在 9.7 μL Opti-MEM 中，与每种 siRNA 混合物混匀，形成转染复合物。将转染复合物在室温下孵育 10 分钟，然后将转染复合物加入 96 孔平板中，20 μL/孔。培养 4 h 后，每孔补 100 μL 含 20%FBS 的 DMEM 培养基，96 孔板放入培养箱中继续培养 24 h。其中，Mock 对照组：0.3 μL RNAiMAX 分散在 9.7 μL Opti-MEM 中，再加入 10 μL Opti-MEM，在室温下孵育 10 分钟；然后将其加入 96 孔平板中，20 μL/孔。培养 4 h 后，每孔补 100 μL 含 20%FBS 的 DMEM 培养基，96 孔板放入培养箱中继续培养 24 h。RNA 提取、逆转录反应、荧光定量 PCR 操作如实施例 12 所述。在该实时荧光定量 PCR 法中，按照前述 ΔΔCt 法对各测试组中目标基因 mRNA 的表达水平和抑制率进行相对定量计算。检测引物的序列参见表 27。

表 27

基因		引物类型	引物序列	荧光基团	SEQ ID NO:
目标基因	AGT	上游引物	5'-GTATGTACACCCGGTCACC-3'	/	587
		下游引物	5'-GTTGTTCTGGGTACTACAGCA-3'	/	588
		探针引物	5'-CATCCTCTGCCTCCTGGCCTG-3'	5'FAM; 3'MGB	589
内参基因	GAPDH	上游引物	5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'	/	590
		下游引物	5'-CAAAGTGGTCGTTGAGGG-3'	/	591
		探针引物	5'-CAACAGCGACACCCACTC-3'	5'VIC; 3'MGB	592

实施例 13 的结果表明，1nM 和 0.1nM 剂量下，RZ003017、RZ003020 转换了不同修饰方案的 siRNA 均能明显抑制 HepG2 细胞中 AGT 基因 mRNA 表达且相较于原序列 RZ003017、RZ003020 具有相当或更高的体外活性（图 19；表 28）。

表 28

组别	1 nM		0.1 nM	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
Mock	100.07	4.01		
RZ003017	3.52	1.39	18.74	4.23
RZ003028	4.17	1.35	9.08	0.69
RZ003029	3.98	0.27	15.75	0.34
RZ003031	3.19	0.21	17.32	0.18
RZ003032	4.17	1.15	15.35	1.91
RZ003020	6.55	0.77	31.73	5.79
RZ003041	4.77	0.27	20.14	1.25
RZ003042	3.92	0.84	20.76	0.43

实施例 14. 不同修饰方案的 siRNA 缀合物在 hREN×hAGT 高血压小鼠体内降蛋白效果评估

本实施例采用酶联免疫吸附剂测定法（ELISA）测定参比 siRNA 缀合物 RZ003021，与 RZ003065、RZ003066 在单次给药后，对 hREN×hAGT 高血压小鼠不同时间点血清中的 AGT 蛋白表达的影响。

动物分组、给药及组织样本收集：

将 9-11 周龄 hREN×hAGT 高血压小鼠（购自赛业（苏州）生物科技有限公司）按收缩压水平进行分组（均为雄性）。每个测试组给予预定剂量的药物缀合物并增加 PBS 对照组。所有小鼠根据体重计算药剂量，采用腹部皮下注射方式单次给药，各药物缀合物以 0.3 mg/mL（以 siRNA 计算）的 PBS 溶液形式给药，给药体积为给药体积 10 mL/kg 小鼠体重，即，每一药物缀合物的给药剂量为 3 mg/kg 小鼠体重（以 siRNA 计算）。PBS 对照组给予同样体积的 PBS 溶液（不含药物缀合物）。于给药前（记为 pre-dose，药前值），给药当天记为第 0 天（记为 D0），于给药后的第 7 天（记为 D7）、第 14 天（记为 D14）、第 21 天（记为 D21）、第 28 天（记为 D28）、第 56 天（记为 D56）采集所有组小鼠血清，使用人血管紧张素原试剂盒（IBL，27412）进行 AGT 蛋白表达测定。

实施例 14 的结果表明，单次给药 3mg/kg 剂量下，RZ003021，与 RZ003065、RZ003066 均能有效降低 hREN×hAGT 高血压小鼠中的 AGT 蛋白水平，其中 RZ003066 的活性和药效持续时间优于 RZ003021 和 RZ003065（图 20，表 29）。

表 29

组别	药前值		第 7 天		第 14 天		第 21 天	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
PBS	100.00	0.00	85.92	31.19	102.09	32.50	99.64	21.27
RZ003021	100.00	0.00	10.85	1.92	10.02	1.34	14.22	2.68
RZ003065	100.00	0.00	9.94	1.79	10.35	1.46	18.01	2.87
RZ003066	100.00	0.00	9.94	0.68	10.46	1.06	9.01	0.97
组别	第 28 天		第 42 天		第 56 天			
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值		
PBS	102.10	20.61	87.40	6.38	80.16	7.82		

RZ003021	21.05	4.70	44.95	4.53	78.19	7.97		
RZ003065	25.15	6.48	38.05	7.26	55.51	10.75		
RZ003066	11.96	1.11	21.75	2.95	32.93	1.76		

实施例 15. siRNA 缀合物在 HDI 小鼠模型中对脂蛋白(A) (lipoprotein(a) ， LPA) mRNA 体内活性的影响

本实施例采用 BALB/c 小鼠水力注射模型对比评价了 LPA 靶点 siRNA 在采用不同修饰方案和 GalNAc 缀合结构时的体内活性。

质粒构建：

委托生工生物工程（上海）股份有限公司将 LPA 基因序列（NM_005577.4）构建到 pcDNA-CMV 载体质粒中，形成 pcDNA-CMV-RG001 表达质粒。

小鼠模型构建：

BALB/c 小鼠水力注射模型是将 pcDNA-CMV-RG001 质粒溶液通过小鼠尾静脉高压快速注射进小鼠体内所建立的模型。于试验第 3 天，小鼠通过尾静脉流体动力学 5 秒内注射 10 μg pcDNA-CMV-RG001，注射体积为小鼠体重的 8%。注射用质粒 DNA 用生理盐水稀释，溶液在注射前制备，4℃ 保存。

动物分组、给药及组织样本收集：

将 6-8 周龄 BALB/c 小鼠按体重随机分组（均为雌性），每组 5 只小鼠。每个测试组给予预定药剂量的药物缀合物并增加 PBS 对照组。所有小鼠根据体重计算药剂剂量，采用腹部皮下注射方式单次给药，各药物缀合物以 0.1 mg/mL（以 siRNA 计算）的 PBS 溶液形式给药，给药体积为给药体积 10 mL/kg 小鼠体重，即，每一药物缀合物的给药剂量为 1 mg/kg 小鼠体重（以 siRNA 计算）。PBS 对照组给予同样体积的 PBS 溶液（不含药物缀合物）。给药当天记为第 0 天（记为 D0），给药后的第 3 天（记为 D3）进行质粒注射，第 4 天（记为 D4）处死所有组的 5 只小鼠。分别对处死小鼠进行大体解剖并收集每只处死小鼠的肝脏组织，将肝脏组织切割成约 2 mm³ 小块，用 RNA later 保存。

对于每只小鼠，从 RNA later 中取出适量肝脏组织样本，将肝脏组织样本在 TissueLyser II 型全自动组织匀浆仪中破碎 60s，再用全自动核酸提取仪（购自浙江瀚维科技有限责任公司）及核酸提取试剂盒（购自浙江瀚维科技有限责任公司，GO-MNTR-100）按照总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到总 RNA。逆转录反应、荧光定量 PCR 如实施例 12 所述。在该实时荧光定量 PCR 法中，以质粒骨架上 Nero 基因作为内参基因，使用针对目标基因的引物和针对 Nero 内参基因的引物分别对目标基因和 Nero 内参基因进行检测。检测引物的序列参见表 30。

表 30

基因		引物类型	引物序列	荧光基团	SEQ ID NO:
目标基因	LPA	上游引物	5'-GACACGATGCTCAGATGC-3'	/	593
		下游引物	5'-GGGGTTTCCTCAGTCAGT-3'	/	594
		探针引物	5'-CGTCCCTCCGAATGTTA-3'	5'FAM; 3'MGB	595
内参基因	Nero	上游引物	5'-CGTTGGCTACCCGTGATATT-3'	/	596
		下游引物	5'-CTCGTCAAGAAGGCGATAGAAG-3'	/	597
		探针引物	5'-CCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTAT-3'	5'VIC; 3'MGB	598

按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书记载的方法配置每个 PCR 检测孔 10 μL Real-time PCR 反应体系，每个反应体系中含有 4 μL 上述逆转录反应得到的 cDNA 溶液、5 μL TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (2×)、0.15 μL 10μM 上游引物、0.15 μL 10μM 下游引物（引物信息见表 11）、0.15 μL 10μM 探针引物、0.55 μL RNase-Free H₂O。将配置好的反应体系置于实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad 公司，CFX Opus 384）上，使用两步法进行 Real-time PCR 扩增，扩增程序为 50℃ 2min，然后 95℃ 预变性 20s，95℃ 变性 3s，60℃ 退火和延伸 30s，重复变性、退火和延伸的过程 40 个循环。在该实时荧光定量 PCR 法中，按照实施方式中所述的技术方法采用 ΔΔCt 法对各测试组中目标基因 mRNA 的表达水平和抑制率进行相对定量计算。

实施例 15 的结果表明，1 mg/kg 给药剂量下，RZ001032 活性优于 RZ001003，RZ001034 活性优于 RZ001005，RZ001037 活性优于 RZ001008，RZ001039 活性优于 RZ001012，RZ001044 活性优于 RZ001026（图 21，表 31）。

表 31

组别	剩余活性%	±STDEV 值
PBS	100.00	10.71
RZ001003	26.75	4.97
RZ001032	19.61	5.91
RZ001005	28.18	5.83
RZ001034	18.39	1.92
RZ001008	58.28	23.49
RZ001037	52.72	14.26
RZ001012	31.77	9.31
RZ001039	30.85	5.25
RZ001026	41.66	9.10
RZ001044	28.08	14.91

实施例 16 siRNA 缀合物在 hApo(a)转基因小鼠中对靶基因 LPA 的抑制活性评价

hApo(a)转基因小鼠是由赛业（苏州）生物科技有限公司基于其特有的 TurboKnockout®平台构建的条件性敲入人源 Apo(a)转基因小鼠。构建流程包括：

- （1）打靶载体设计和构建：将人源 LPA 基因构建到载体中，形成 CAG promoter-loxP-PGK-Neo-6*SV40 pA-loxP-Kozak-Human LPA CDS-rBG pA 打靶载体，该载体能够在体内将人源 LPA 基因（NM_005577.4）插入到小鼠 11 号染色体 Hipp11 位点 Eif4enifl 和 Drg1 基因之间的基因间隔区。打靶载体经酶切、PCR 及测序对打靶载体进行验证，打靶载体验证无误后进行质粒提取及线性化。
- （2）打靶载体电转至胚胎干细胞、筛选阳性克隆：将打靶载体电转染至小鼠胚胎干细胞（ES）中，采用 Neo 进行阳性选择，采用 DTA 进行阴性选择。挑选抗药克隆，采用 PCR、核型分析和 Southern blot 验证 ES 细胞。
- （3）TurboKnockout®小鼠制备：将阳性 ES 细胞进行显微注射，并将注射后的囊胚移植到假孕母鼠。小鼠出生后进行鉴定，获得具有生殖传递能力的 TurboKnockout 小鼠。
- （4）hApo(a)转基因小鼠获得：将肝脏特异性表达 Cre 的小鼠与 TurboKnockout 小鼠进行杂交，将 loxP 位点中间的抗性基因去除，激活人源 LPA 基因表达，获得 hApo(a)转基因小鼠。

实施例本实施例采用酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)测定 siRNA 缀合物 RZ001032 和 RZ001034 单次给药后 hApo(a)转基因小鼠不同时间点血清中的 Apo(a)蛋白表达水平。

动物分组、给药及组织样本收集：

将 Apo(a)转基因小鼠（委托赛业（苏州）生物科技有限公司进行构建）按血清中 Apo(a)水平进行分组。每个测试组给予预定药剂量的药物缀合物并增加 PBS 对照组。所有小鼠根据体重计算药剂剂量，采用腹部皮下注射方式单次给药，各药物缀合物以 0.1 mg/mL（以 siRNA 计算）的 PBS 溶液形式给药，给药体积为给药体积 10 mL/kg 小鼠体重，即，每一药物缀合物的给药剂量为 1 mg/kg 小鼠体重（以 siRNA 计算）。PBS 对照组给予同样体积的 PB11）、第 28 天（记为 D28）、第 35 天（记为 D35）、第 42 天（记为 D42）、第 49 天（记为 D49）、第 56 天（记为 D56）采集所有组小鼠血清，使用人 Lipoprotein A ELISA 试剂盒（Abcam，ab212165）进行 Apo(a)蛋白表达测定。

实施例 16 的结果表明,单次给药 1mg/kg 剂量下,RZ001032 和 RZ001034 均能显著降低 Apo(a)转基因小鼠中的 Apo(a)蛋白水平（图 22，表 32）。

表 32

组别	PBS		RZ001032		RZ001034	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
D0	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
D7	132.20	13.61	12.13	10.64	16.02	3.49
D14	88.66	7.47	10.11	10.34	15.28	3.50
D21	152.29	70.19	11.57	8.02	35.24	6.30
D28	150.80	66.65	18.70	12.82	36.14	5.41

D35	112.43	46.49	25.73	19.46	60.75	10.34
D42	129.76	53.86	34.36	20.33	68.89	14.37
D49	93.20	37.30	44.10	17.83	90.20	39.00
D56	104.02	44.87	51.24	15.28	103.90	36.74

实施例 17.反义链不同位点 NM062 和 NM063 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠体内对 SOD1 mRNA 的抑制活性

本实施例采用如实施例 7 所示的小鼠体内评估方法，评价了反义链不同位点 NM062 和 NM063 修饰的 siRNA 缀合物，及无 NM062 和 NM063 修饰的参比缀合物 RZ599001 和 RZ599015 在小鼠体内对目标靶基因 SOD1 的抑制活性。

将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组 6 组，每组 15 只，每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，其中 PBS 对照组中的每只小鼠给予剂量为给药体积 5 mL/kg，siRNA 缀合物实验组每只给药剂量 3 mg/kg（以 siRNA 计），给药体积 5 mL/kg。给药当天记为第 0 天（D0），给药后分别于第 7 天（D7）、第 28 天（D28）、第 56 天（D56）各组处死 5 只小鼠，对动物进行大体解剖，收集肝组织，切割成数个 2 mm³ 小块用 RNAlater 保存。RNA 提取、逆转录反应、荧光定量 PCR 操作如上述描述，通过 $\Delta\Delta Ct$ 法计算基因表达差异。引物如表 33 所示。

表 33

靶点		引物类型	引物序列(5'-3')
目标基因	SOD1	上游引物	GGGTTCCACGTCCATCAGTA（SEQ ID NO.599）
		下游引物	ACACCGTCCTTTCCAGCAGT（SEQ ID NO.600）
内参基因	GAPDH	上游引物	TGCACCACCAACTGCTTAG（SEQ ID NO.601）
		下游引物	GGATGCAGGGATGATGTTC（SEQ ID NO.602）

统计给药后 D7、D28 及 D56，小鼠体内 SOD1 mRNA 的表达水平（图 23）及剩余活性（表 34），结果表明，在 siRNA 反义链特定位点采用 NM062 和 NM063 修饰可以具有良好的耐受性，反义链 8 位和 15 位 NM062 和 NM063 修饰可以进一步提升 siRNA 序列活性。

表 34

组别	D7		D28		D56	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
PBS	100.00	7.86	100.00	9.66	100.00	13.29
RZ599026	5.84	2.05	15.75	9.46	67.77	4.77
RZ599027	5.09	1.38	8.43	0.65	50.57	6.49
RZ599028	3.56	1.49	8.27	2.29	46.79	7.06
RZ599029	6.80	3.19	7.88	2.21	62.49	9.51
RZ599030	4.72	1.05	10.77	1.21	63.93	6.51

实施例 18.反义链 NM096、NM098 和 NM099 修饰的 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对 SOD1 mRNA 的抑制活性

采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了反义链 15 位 NM096 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599136、NM098 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599138 和 NM099 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599139 及对照 RZ599062 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 SOD1 的抑制活性。

鼠原代肝细胞分离、细胞培养等操作如前所示。从 C56BL/6j 小鼠新鲜肝组织中提取得到小鼠原代肝细胞，以细胞量为 2×10⁵ 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 10μM 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 1 μL/孔，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 10nM（以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 1 μL/孔的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。摇晃培养板均匀混合。37℃、5%CO₂ 细胞培养箱继续培养 24 h。根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。本实施例使用的引物如表 33 所示。根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因

mRNA 进行相对定量计算。

实施例 18 的结果表明，在小鼠肝原代细胞上，反义链 15 位 NM096、NM098 和 NM099 修饰 siRNA 缀合物与对照 RZ599062 相比，具有相当的抑制活性。（图 24，表 35）。

表 35		
组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	3.70
RZ599062	96.47	0.09
RZ599136	96.28	0.06
RZ599138	96.04	0.39
RZ599139	96.30	0.14

实施例 19. 正义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对靶基因 SOD1 的抑制活性评估

实施例 19 采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了正义链 8 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599051 及 8 位 F 修饰的 siRNA 参比缀合物 RZ599001 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 SOD1 的抑制活性。鼠原代肝细胞分离、细胞培养等操作如前所示。从 C56BL/6j 小鼠新鲜肝组织中提取得到小鼠原代肝细胞，以细胞量为 2×10^5 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 5 μ M 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 1 μ L/孔，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 5 nM（以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 1 μ L/孔的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。摇晃培养板均匀混合。37℃、5%CO₂ 细胞培养箱继续培养 24 h。根据前述 $\Delta \Delta$ Ct 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。本实施例使用的引物如表 34 所示。

实施例 19 的结果 9 表明正义链 8 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599051 具有与参比缀合物 RZ599001 相当的抑制活性。（图 25，表 36）

表 36		
组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	1.37
RZ599001	86.53	2.06
RZ599051	87.41	1.27

实施例 20. 正义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对靶基因 SOD1 的抑制活性评估

实施例 20 采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了正义链 8 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599055、正义链 9 位 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599056 及参比缀合物 RZ599001 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 SOD1 的抑制活性。RZ599055 与实施例 19 中 RZ599051 的区别在于正义链 10 位及反义链 12 位的核苷酸修饰由甲氧基修饰替换为 F 代修饰。

小鼠原代肝细胞以细胞量为 2×10^5 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 5 μ M 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 1 μ L/孔，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 5 nM（以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 1 μ L/孔的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。本实施例引物如表 34 所示。

实施例 20 的结果表明，正义链 8 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599055、正义链 9 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ599056 具有与参比缀合物 RZ599001 相当或更优的抑制活性。（图 26，表 37）

表 37		
组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	47.92
RZ599001	91.25	1.10
RZ599055	93.13	0.83
RZ599056	92.83	1.08

实施例 21. 正义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对靶基因 ANGPTL3 的抑制活性评估

实施例 21 采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了正义链 8 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ597101 及参比缀合物 RZ597002 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 ANGPTL3 的抑制活性。RZ597101 与参比 RZ597002 的区别还在于正义链 10 位及反义链 12 位的核苷酸修饰由甲氧基修饰替换为 F 代修饰，反义链 15 位核苷酸修饰由 2'位甲氧基替换为 moc 修饰。

小鼠原代肝细胞以细胞量为 2×10^5 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 $10 \mu\text{M}$ 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 $1 \mu\text{L}$ /孔，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 10 nM （以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 $1 \mu\text{L}$ /孔的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。本实施例引物如表 9 所示。

实施例 21 的结果表明， siRNA 缀合物 RZ597101 具有与参比缀合物 RZ597002 更优的抑制活性。（图 27，表 38）

表 38

组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	49.64
RZ597002	79.61	3.00
RZ597101	82.64	3.59

实施例 22. 正义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对靶基因补体因子 B（complement factor B, CFB）的抑制活性评估

实施例 22 采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了 siRNA 缀合物 RZM11508、RZM11509、RZM11510 与参比缀合物 RZM11015 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 CFB 的抑制活性。区别在于与参比缀合物 RZM11015 相比，RZM11508 正义链 10 位及反义链 12 位的核苷酸修饰由甲氧基修饰替换为 F 代修饰；RZM11509 在 RZM11508 修饰模式的基础上将反义链 15 位核苷酸修饰由 2'位甲氧基替换为 moc 修饰；RZM11510 与 RZM11509 区别在于正义链 7 位核苷酸替换为 2'位双 F 修饰核苷酸。

小鼠原代肝细胞以细胞量为 2×10^5 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 $10 \mu\text{M}$ 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 $1 \mu\text{L}$ /孔，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 10 nM （以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 $1 \mu\text{L}$ /孔的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。

表 39

靶点		引物类型	引物序列(5'-3')
目标基因	CFB	探针	CGGCATCGCTACTCCTCTCATCAGA（SEQ ID NO.603）
		上游引物	GCCACGATATGGTCTCCTGA（SEQ ID NO.604）
		下游引物	GAGCTTCTCTGTGACCCAGT（SEQ ID NO.605）
内参基因	GAPDH	探针	TCTCGGCCTTGACTGTGCCGT（SEQ ID NO.606）
		上游引物	TATGACTCCACTCACGGCAA（SEQ ID NO.607）
		下游引物	TGGAAGATGGTGATGGGCTT（SEQ ID NO.608）

实施例 22 的结果表明， siRNA 缀合物 RZM11508、 siRNA 缀合物 RZM11509、siRNA 缀合物 RZM11510 具有与参比缀合物 RZ011015 更优的抑制活性。（图 28，表 40）

表 40

组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	5.01
RZM11015	73.36	1.13
RZM11508	79.68	2.23
RZM11509	82.52	1.16
RZM11510	82.65	2.21

实施例 23. 正义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠体内对靶基因 CFB 的抑制活性评估

本实施例采用小鼠体内靶基因抑制活性评估方法评价了在 CFB 靶点 siRNA 缀合物 RZM11509、RZM11510 与参比缀合物 RZM11015 在小鼠体内对目标靶基因 CFB 的抑制活性。

将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组 4 组，每组 10 只。每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，其中 PBS 对照组中的每只小鼠给予剂量为给药体积 5ml/kg，siRNA 缀合物实验组每只给药剂量 3mg/kg（以 siRNA 计），给药体积 5ml/kg。给药当天记为 D0，给药后分别于第 7 天（D7）、第 28 天（D28）处死各组 5 只小鼠，对动物进行大体解剖，收集肝组织，切割成数个 2 mm³ 小块用 RNeasy 保存。RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测方法如前所示，并根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。引物如表 39 所示。

实施例 23 的结果表明，siRNA 缀合物 RZM11509、siRNA 缀合物 RZM11510 与参比缀合物 RZM11015 相比，在 D7 对靶基因的抑制活性基本相当；D28 具有比参比缀合物更优的抑制活性。（图 29，表 41）

表 41

组别	D7		D28	
	%抑制率平均值	±STDEV 值	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	11.63	0.00	4.85
RZM11015	83.63	4.03	59.92	7.98
RZM11509	84.39	3.44	65.11	6.63
RZM11510	83.22	3.93	67.39	7.63

实施例 24.反义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对靶基因 ANGPTL3 的抑制活性评估

实施例 24 采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了反义链 6 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ597060 及参比缀合物 RZ597002 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 ANGPTL3 的抑制活性。小鼠原代肝细胞以细胞量为 2×10^5 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 10 μ M 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 1 μ L/孔，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 10 nM（以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 1 μ L/孔的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测方法如前所示，并根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。引物如表 9 所示。

实施例 24 的结果表明，反义链 6 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZ597060 具有与参比缀合物 RZ597002 相当的抑制活性。（图 30，表 42）

表 42

组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	30.17
RZ597002	87.36	2.52
RZ597060	88.53	1.65

实施例 25.反义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对靶基因 CFB 的抑制活性评估

实施例 25 采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了反义链 14 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZM11504、反义链 16 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZM11505 及参比缀合物 RZM11001 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 CFB 的抑制活性。小鼠原代肝细胞以细胞量为 2×10^5 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 10 μ M 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 1 μ L/孔，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 10 nM（以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 1 μ L/孔的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测方法如前所示，并根据前述 $\Delta\Delta Ct$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。引物如表 39 所示。

实施例 25 的结果表明，反义链 14 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZM11504、反义链 16 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZM11505 具有比参比缀合物 RZM11001 更优的抑制活性。（图 31，表 43）

表 43

组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	5.01
RZM11001	85.97	0.13
RZM11504	88.21	0.35
RZM11505	88.50	0.12

实施例 26.反义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠肝原代细胞对靶基因 CFB 的抑制活性评估

实施例 26 采用上述小鼠肝原代对靶基因抑制活性评估实验方法，评价了反义链 14 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZM11507 及参比缀合物 RZM11502 在小鼠原代肝细胞中对目标靶基因 CFB 的抑制活性。与实施例 25 的区别在于序列反义链 15 位核苷酸修饰由 2'位甲氧基替换为 moe 修饰。

小鼠原代肝细胞以细胞量为 2×10^5 细胞/孔接种于 12 孔培养板，将各组双链 siRNA 缀合物用 PBS 梯度稀释至 $10 \mu\text{M}$ 的工作液（以 siRNA 计）。在上述 12 孔培养板中分别加入各个浓度 siRNA 缀合物工作液 $1 \mu\text{L}/\text{孔}$ ，相当于 siRNA 缀合物转染终浓度为 10 nM （以 siRNA 计），每一个浓度 siRNA 设置 2 个培养孔。另外 2 个培养孔加入 $1 \mu\text{L}/\text{孔}$ 的 PBS 作为空白对照孔（BLANK）。RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测方法如前所示，并根据前述 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。引物如表 39 所示。

实施例 26 的结果表明，反义链 14 位核苷酸 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZM11507 与参比缀合物 RZM11502 相比具有更优的抑制活性。（图 32，表 44）

表 44

组别	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	5.01
RZM11502	81.51	0.32
RZM11507	90.44	1.24

实施例 27. 反义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠体内对靶基因 CFB 的抑制活性评估

本实施例采用小鼠体内靶基因抑制活性评估方法评价了在 CFB 靶点 siRNA 缀合物 RZM11502、RZM11507 与参比缀合物 RZM11001 在小鼠体内对目标靶基因 CFB 的抑制活性。区别在于与参比缀合物 RZM11001 相比，RZM11502 正义链 10 位及反义链 12 位的核苷酸修饰由甲氧基修饰替换为 F 代修饰，反义链 15 位核苷酸修饰由 2'位甲氧基替换为 moe 修饰；RZM11507 与 RZM11502 区别在于反义链 14 位核苷酸为 2'位双 F 修饰的核苷酸。

将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组 4 组，每组 15 只。每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，其中 PBS 对照组中的每只小鼠给予剂量为给药体积 $5 \text{ ml}/\text{kg}$ ，siRNA 缀合物实验组每只给药剂量 $3 \text{ mg}/\text{kg}$ （以 siRNA 计），给药体积 $5 \text{ ml}/\text{kg}$ 。给药当天记为 D0，给药后分别于 D7、D28、D56 处死各组 5 只小鼠，对动物进行大体解剖，收集肝组织，切割成数个 2 mm^3 小块用 RNAlater 保存。RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测方法如前所示，并根据前述 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。引物如表 39 所示。

实施例 27 的结果表明，siRNA 缀合物 RZM11502 的抑制活性在 D7 及 D28 与参比缀合物 RZM11001 相比更优；siRNA 缀合物 RZM11507 与参比缀合物 RZM11001 相比，在 D7、D28 及 D56 具有更高的抑制效果及更长的药效作用时间。（图 33，表 45）

表 45

组别	D7		D28		D56	
	%抑制率平均值	±STDEV 值	%抑制率平均值	±STDEV 值	%抑制率平均值	±STDEV 值
PBS	0.00	11.63	0.00	4.85	0.00	9.54
RZM11001	83.25	6.31	63.17	10.22	13.34	16.52
RZM11502	91.27	2.02	76.37	3.80	10.14	14.72
RZM11507	90.68	4.18	91.84	1.00	44.46	6.84

实施例 28. 反义链特定位点 2'位双 F 取代 siRNA 缀合物在小鼠体内对靶基因补体成分 C4B(Complement C4B, C4B) 的抑制活性评估

本实施例采用小鼠体内靶基因抑制活性评估方法评价了在了 C4B 靶点反义链 9 位 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物

RZM12503 与参比缀合物 RZM12501 在小鼠体内对目标靶基因 C4B 的抑制活性。将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组 3 组，每组 10 只。每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，其中 PBS 对照组中的每只小鼠给予剂量为给药体积 5ml/kg，siRNA 缀合物实验组每只给药剂量 3mg/kg(以 siRNA 计)，给药体积 5ml/kg。给药当天记为 D0，给药后分别于 D7、D28 处死各组 5 只小鼠，对动物进行大体解剖，收集肝组织，切割成数个 2 mm³ 小块用 RNAlater 保存。RNA 提取、逆转录反应和 Real-time PCR 检测方法如前所示，并根据前述 $\Delta\Delta C_t$ 法对各测试组中目标基因 mRNA 进行相对定量计算。

表 46

靶点		引物类型	引物序列(5'-3')
目标基因	C4B	探针	TGGCAGAGCTGCCTTCCGTCT (SEQ ID NO.609)
		上游引物	TGGAGTATGGCTTCACGGTT (SEQ ID NO.610)
		下游引物	TGCAGGACTTGGGTGATCTT (SEQ ID NO.611)
内参基因	GAPDH	探针	TCTCGGCCTTGACTGTGCCGT (SEQ ID NO.612)
		上游引物	TATGACTCCACTCACGGCAA (SEQ ID NO.613)
		下游引物	TGGAAGATGGTGATGGGCTT (SEQ ID NO.614)

实施例 28 的结果表明，反义链 9 位 2'位双 F 修饰的 siRNA 缀合物 RZM12503 与参比缀合物 RZM12501 相比具有相当的抑制效果及药效作用时间。(图 34，表 47)

表 47

组别	D7		D28	
	%抑制率平均值	±STDEV 值	%抑制率平均值	±STDEV 值
BLANK	0.00	16.71	0.00	19.34
RZM12501	80.75	1.73	81.30	2.10
RZM12503	81.88	1.05	82.62	1.25

实施例 29.反义链包含 NM054 基团的 siRNA 缀合物在小鼠体内对靶基因 SOD1 的抑制活性评估

本实施例采用小鼠体内靶基因抑制活性评估方法评价了在 SOD1 靶点 siRNA 反义链 20 位包含 NM054 基团的缀合物 RZ599060 和 20、21 位包含 NM054 的缀合物 RZ599061、以及不包含该基团的缀合物 RZ599001 在小鼠体内对目标靶基因 SOD1 的抑制活性。

将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组 4 组，每组 15 只，每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，其中 PBS 对照组中的每只小鼠给予剂量为给药体积 5 mL/kg，siRNA 缀合物实验组每只给药剂量 3 mg/kg (以 siRNA 计)，给药体积 5 mL/kg。给药当天记为第 0 天 (D0)，给药后分别于第 7 天 (D7)、第 28 天 (D28)、第 49 天 (D49) 各组处死 5 只小鼠，对动物进行大体解剖，收集肝组织，切割成数个 2 mm³ 小块用 RNAlater 保存。RNA 提取、逆转录反应、荧光定量 PCR 操作如上述描述，通过 $\Delta\Delta C_t$ 法计算基因表达差异。引物如表 34 所示。

实施例 29 的结果表明，与不包含 NM054 基团的对照缀合物 RZ599001 相比，包含 NM054 基团的缀合物 RZ599060 和 RZ599061 均在 D7、D28 和 D49 具有跟更高的抑制活性，D49，RZ599060 和 RZ599061 抑制活性均比对照缀合物 RZ599001 高 15%左右。(图 35，表 48)。

表 48

组别	D7		D28		D49	
	抑制率平均值	±SD 值	抑制率平均值	±SD 值	抑制率平均值	±SD 值
PBS	0.00	18.73	0.00	9.79	0.00	24.49
RZ599001	95.08	1.18	88.01	1.97	49.68	16.94
RZ599060	96.29	1.82	88.42	8.87	66.12	10.66

RZ599061	96.76	0.53	93.00	1.11	64.98	7.23
----------	-------	------	-------	------	-------	------

实施例 30. 反义链包含 NM054 基团的 siRNA 缀合物在小鼠体内对靶基因 ANGPTL3 的抑制活性评估

本实施例采用小鼠体内靶基因抑制活性评估方法评价了在 ANGPTL3 靶点 siRNA 反义链 20 位包含 NM054 基团的缀合物 RZ597115 和 20、21 位包含 NM054 的缀合物 RZ597116、以及不包含该基团的缀合物 RZ597114 在小鼠体内对目标靶基因 ANGPTL3 的抑制活性。

将 6-8 周龄 C57BL/6j 小鼠按体重随机分组 4 组，每组 15 只，每组小鼠分别采用腹部皮下给药方式给予上述 siRNA 缀合物，其中 PBS 对照组中的每只小鼠给予剂量为给药体积 5 mL/kg，siRNA 缀合物实验组每只给药剂量 3 mg/kg（以 siRNA 计），给药体积 5 mL/kg。给药当天记为 D0，给药后分别于 D7、D28、D56 各组处死 5 只小鼠，对动物进行大体解剖，收集肝组织，切成数个 2 mm³ 小块用 RNAlater 保存。RNA 提取、逆转录反应、Real-time PCR 检测如上述所述，通过 $\Delta\Delta C_t$ 法计算基因表达差异。引物如表 9 所示。

实施例 30 的结果表明，与不包含 NM054 基团的对照缀合物 RZ597114 相比，包含 NM054 基团的缀合物 RZ597115 和 RZ597116 在 D7、D28 和 D56 的具有更高的抑制活性。D56，反义链 20 位包含 NM054 基团的缀合物 RZ597115 的抑制活性比对照缀合物 RZ597114 高约 25%；反义链 20、21 位包含 NM054 的缀合物 RZ597116 的抑制活性比对照缀合物 RZ597114 高约 35%。（图 36，表 49）

表 49

组别	D7		D28		D56	
	抑制率平均值	±SD	抑制率平均值	±SD 值	抑制率平均值	±SD 值
PBS	0.00	10.67	0.00	16.36	0.00	30.50
RZ597114	86.86	4.31	47.55	7.59	3.55	24.81
RZ597115	90.55	2.96	60.37	16.05	29.12	20.77
RZ597116	92.30	3.23	60.63	13.28	38.44	14.64

实施例 31. siRNA 缀合物在食蟹猴体内降 C3 蛋白效果评估

本实施例采用 ELISA 法测定(CR01008)×3 载体缀合物 RZ002099、RZ002101、RZ002106 和 RZ002113 单次给药后不同时间点食蟹猴血清中 C3 蛋白的表达。

动物分组、给药及组织样本收集：

将体重 3-5kg 的健康食蟹猴按照血清 C3 蛋白水平进行分组，每组 4 只，雌雄各半。每个测试组给予预定剂量的药物缀合物并增加 PBS 对照组。所有动物根据体重计算给药剂量，采用腹部皮下注射方式单次给药，各药物缀合物以 9 mg/mL 的 PBS 溶液形式给药，给药体积为给药体积 1 mL/kg（食蟹猴体重），即每一药物缀合物的给药剂量为 9 mg（以 siRNA 计算）/kg（食蟹猴体重）。PBS 对照组给予不含 siRNA 缀合物的 PBS 溶液 1 mL/kg（小鼠体重）。于给药前（记为药前值，pre-dose）、给药当天记为第 0 天（记为 D0）、给药后的第 7 天（记为 D7）、第 14 天（记为 D14）、第 21 天（记为 D21）、第 28 天（记为 D28）、第 35 天（记为 D35）、第 42 天（记为 D42）、第 49 天（记为 D49）、第 56 天（记为 D56）采集食蟹猴血清，使用人补体 C3 ELISA 试剂盒（Hycult Biotech，HK366-01）进行 C3 蛋白表达测定。

实施例 31 的结果表明，单次给药 9mg/kg 剂量下，RZ002099、RZ002101、RZ002106 和 RZ002113 均能明显降低食蟹猴血清中 C3 蛋白水平。其中 RZ002106 降 C3 蛋白效果可达 90%以上（图 37，表 50）。

表 50

组别	pre-dose		D7		D14		D21		D28	
	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
PBS	100.00	0.00	100.20	6.80	95.70	14.00	104.10	18.10	82.90	10.00
RZ002099	100.00	0.00	48.57	12.93	27.63	11.82	30.95	14.81	24.25	11.70
RZ002101	100.00	0.00	47.87	15.67	26.08	8.71	22.75	10.48	19.11	6.12
RZ002106	100.00	0.00	44.31	6.21	21.03	5.24	11.88	3.48	13.34	6.63
RZ002113	100.00	0.00	41.55	13.82	21.54	9.85	17.12	8.27	16.91	5.24

组别	D35		D42		D49		D56			
	剩余活性%	±STDEV值	剩余活性%	±STDEV值	剩余活性%	±STDEV值	剩余活性%	±STDEV值		
PBS	79.30	7.90	80.60	4.50	88.10	8.40	79.41	7.84		
RZ002099	26.75	8.80	30.29	15.16	37.84	24.22	34.34	26.33		
RZ002101	20.99	4.49	23.77	6.44	21.76	4.33	25.18	3.66		
RZ002106	12.15	4.03	11.87	4.67	9.01	1.95	9.51	2.59		
RZ002113	15.70	5.49	15.73	5.48	14.45	5.65	19.25	8.15		

实施例 32. siRNA 缀合物在食蟹猴体内降 AGT 蛋白效果评估

本实施例采用 ELISA 法测定(CR01008)×3 载体缀合物 RZ003069 单次给药后不同时间点食蟹猴血清中 AGT 蛋白的表达。

动物分组、给药及组织样本收集：

将体重 3-5kg 的健康食蟹猴按照血清 AGT 蛋白水平进行分组，每组 4 只，雌雄各半。每个测试组给予预定剂量的药物缀合物并增加 PBS 对照组。所有动物根据体重计算给药剂量，采用腹部皮下注射方式单次给药，各药物缀合物以 3 mg/mL 的 PBS 溶液形式给药，给药体积为给药体积 1 mL/kg（食蟹猴体重），即每一药物缀合物的给药剂量为 3mg/kg（食蟹猴体重）。PBS 对照组给予不含 siRNA 缀合物的 PBS 溶液 1 mL/kg。于给药当天记为第 0 天（记为 D0）、给药后的第 7 天（记为 D7）、第 14 天（记为 D14）、第 21 天（记为 D21）采集食蟹猴血清，使用人血管紧张素原 Elisa 检测试剂盒(Immuno-Biological, 27412)进行 AGT 蛋白表达测定。

实施例 32 的结果表明，单次给药 3mg/kg 剂量下，RZ003069 能明显降低食蟹猴血清中 AGT 蛋白水平（图 38，表 51）。

表 51

组别	D0		D7		D14		D21	
	剩 余 活 性%	± STDEV 值	剩 余 活 性%	± STDEV 值	剩 余 活 性%	±STDEV 值	剩余活性%	±STDEV 值
0.9%生理盐水	100.00	0.00	111.29	9.08	108.39	19.07	120.02	29.31
RZ003069	100.00	0.00	51.03	11.86	33.68	11.86	30.01	12.18

发明人经过反复研究和实验发现，在寡核苷酸的正义链和/或反义链特定位点上进行单个或多个位点的特定修饰可以使得被修饰的寡核苷酸具有良好的耐受性，甚至进一步提升寡核苷酸分子的活性，在 RNA 干扰(RNAi)的药物开发中具有很高的应用前景。

（1）本公开表明 TBDMS 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的 TBDMS 基团修饰不影响 siRNA 活性，甚至可以进一步提高活性。

（2）本公开实验结果验证，MOE 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，特定位点的 MOE 基团修饰不影响 siRNA 活性，其影响模式与 TBDMS 修饰、TOM 修饰均具有高度相似性。

以双链区具有 19 个核苷酸 (nt) 长度的寡核苷酸为例：与无 MOE 修饰的参比序列相比，正义链 5 位、12 位、18 位、19 位一个或多个位点 MOE 修饰有助于 siRNA 序列体外活性的提升。与无 MOE 修饰的参比序列相比，反义链 8 位、10 位、15 位一个或多个位点 MOE 修饰有助于 siRNA 序列体外活性的提升。

（3）本公开表明，MOE 修饰对 siRNA 序列活性的影响与修饰位点有关，在正义链和/或反义链特定位点进行单个或多个位点的 MOE 修饰可以具有良好的耐受性，仍然可以很好的维持甚至进一步提升 siRNA 序列活性。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、“一些实施方案”或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本公开的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本公开的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本公开的限制，本领域的普通技术人员在本公开的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

工业实用性

本公开提供了一种修饰的双链寡核苷酸与寡核苷酸缀合物，本公开的双链寡核苷酸和/或寡核苷酸缀合物在正义链和/或反义链上进行单个或多个位点的特定修饰具有良好的耐受性，可以很好的维持寡核苷酸的药学活性，具有较高的目标基因表达调节活性。

权利要求书

1.一种双链寡核苷酸，其特征在于，包含正义链和反义链，每条链具有17至35个核苷酸，其中每一个核苷酸为修饰或未修饰的核苷酸；所述正义链和反义链至少部分地反向互补形成双链区，且所述双链区包含大空间体积修饰的核苷酸和/或双取代基修饰的核苷酸；

其中，所述双链区如下式(I)所示：

SS: 5'- (N)a' - (X)p' - (N)b' - (X)q' - (N)c' - (X)r' - (N)d' - 3'

AS: 3' - (N)a - (X)p - (N)b - (X)q - (N)c - 5' (I),

其中，SS代表正义链，AS代表反义链；

所述X各自独立地表示核糖中2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸，或2'位被双取代基取代的核苷酸；

其中，核糖中2'位羟基被大空间体积基团取代的核苷酸独立地选自下列2'位修饰的核苷酸：2'-(O)_{m1}(CH₂)_n(O)_{m2}R₁；

其中，m₁或m₂各自独立的为0或1，n选自0至6的整数；

其中，R₁选自取代或未取代的C₁-C₆烷基或-Si(R₂)₃；其中R₂各自独立地选自：取代的或未取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基；其中，所述取代包括选自下列取代基的一种或多种：卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、羟基、氨基、碳原子数不超过6的环烷基、碳原子数不超过12的芳基，或碳原子数不超过12的杂芳基；

其中，所述双取代基中的每个取代基各自独立地选自C₁-C₆烷基或卤素；

所述N各自独立地表示修饰或未修饰的核苷酸；其中当N表示修饰的核苷酸时，其核糖中2'位置被修饰且不为X，且所述N各自独立地选自下列修饰中的一种或多种：2'-O-烷基、2'-烷基、2'-取代的烷基、2'-卤代、2'-脱氧，或者类核苷酸，其中，所述烷基的碳原子数为1-6；所述类核苷酸选自ENA、BNA、LNA、GNA或UNA中的一种或多种；

所述a、a'、p、p'、b、b'、q、q'、c、c'、r'、d'各自独立地表示核苷酸数目，其中：a'选自3-8的整数；p'选自0-3的整数；b'选自4-13的整数；q'选自0-4的整数；c'选自3-9的整数；r'选自0-3的整数；d'选自0-9的整数；a选自4-7的整数；p选自0-1的整数；b选自4-8的整数；q选自0-4的整数；c选自6-10的整数；

并且，p'、q'、r'、p、q不同时为0，且0≤q'+r'≤4。

2.根据权利要求1所述的双链寡核苷酸，其特征在于，所述X各自独立地选自下列修饰的核苷酸：2'-O(CH₂)_nOR₁或2'-R₃-2'-R₄；其中，n为1或2，R₁选自取代或未取代的C₁-C₆烷基，或-Si(R₂)₃；

其中，R₃和R₄各自独立地选自C₁-C₆烷基或卤素。

3.根据权利要求1或2所述的双链寡核苷酸，其特征在于，N各自独立地选自：2'-OMe修饰，2'-F修饰，2'-H修饰的核苷酸，或未修饰的核苷酸；

任选地，X各自独立地选自下列修饰的核苷酸：2'-O-甲氧基乙基、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-R₅；其中，R₅为未取代或取代基取代的C₁-C₃烷基；任选地，所述取代基独立地选自下列取代基中的一种或多种：卤素，C₁-C₃烷基，C₁-C₃烷氧基，氨基；

任选地，所述卤素为氟。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的双链寡核苷酸，其特征在于，按照5'末端到3'末端的方向，所述式(I)中反义链的第8，9，10或15位核苷酸中的至少一个为修饰的核苷酸X，和/或，所述正义链存在或不存在修饰的核苷酸X；

任选地，当所述正义链存在修饰的核苷酸X时，至少一个核苷酸X位于对应所述反义链第2，8或15位中任意位置的相对位点处；

任选地，修饰的核苷酸X位于反义链的第10或15位核苷酸中的至少一个；

任选地，X各自独立地选自下列修饰的核苷酸：2'-O-甲氧基乙基、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃，2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的双链寡核苷酸，其特征在于：

q'+c'+r'+d'=9，且0≤q'+r'≤4；

任选地，当p=0时，a=5-7；

任选地，当p=1时，按5'末端到3'末端方向，X位于所述反义链的15位；

任选地，当q=0时，b+c=14；

任选地，按5'末端到3'末端方向，(X)p'中至少一个X位于所述正义链上与反义链第15位相对的位点处；

任选地，当p'=1时，按5'末端到3'末端方向，(X)p'中的X位于与反义链第15位相对的位点处；

任选地，按5'末端到3'末端的方向，正义链上(N)b'的前4个核苷酸中至少含有2个氟代修饰的核苷酸；

任选地，q'为0-2；

任选地, q' 为 0 或 1;

任选地, $r'=1$ 且 $q'=1$ 时, b' 和 c' 为 5, d' 为 1;

任选地, $p'=0$ 时, $a'=6$;

任选地, $p'=0$ 时, $a'=8$;

任选地, 当 q' 和 r' 不同时为 0 时, 按 5'末端到 3'末端的方向, 正义链上至少一个 X 位于相对于所述反义链 1-8 位的对位;

任选地, $d'=1-9$ 。

6.根据权利要求 1-5 中任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于:

a' 选自 3-8 的整数; p' 选自 0-2 的整数; b' 选自 4-12 的整数; q' 选自 0-2 的整数; c' 选自 3-8 的整数; r' 选自 0-2 的整数; d' 选自 1-9 的整数; a 选自 4-7 的整数; p 选自 0 或 1; b 选自 4-8 的整数; q 选自 0-2 的整数; c 选自 6-10 的整数;

任选地, (N)a 和 (N)b 中均至少存在一个氟代修饰的核苷酸, (N)c 中至少存在两个氟代修饰的核苷酸;

任选地, $q'+c'+r'+d'=9$ 且 $0 \leq q'+r' \leq 4$;

任选地, 以 5'-端起始计, (N)b' 的前 4 个核苷酸中至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸。

7.根据权利要求 1-6 中任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于:

a' 选自 3-8 的整数; p' 选自 0 或 1; b' 选自 4-13 的整数; q' 选自 0 或 1; c' 选自 3-9 的整数; r' 选自 0 或 1; d' 选自 1-8 的整数; a 选自 4-7 的整数; p 选自 1; b 选自 4-8 的整数; q 选自 0 或 1; c 选自 6-10 的整数;

任选地, (N)a 中至少存在一个氟代修饰的核苷酸, 且: 以 5'-端起始计, 反义链 16 位为氟代修饰的核苷酸;

任选地, (N)b 中至少存在一个氟代修饰的核苷酸, 且: 以 5'-端起始计, 反义链 14 位为氟代修饰的核苷酸;

任选地, (N)c 中至少存在两个氟代修饰的核苷酸, 且: 以 5'-端起始计, 反义链的 2 和 6 位均为氟代修饰的核苷酸;

任选地, $q'+c'+r'+d'=9$, $0 \leq q'+r' \leq 2$;

任选地, 正义链上至少存在一个 X 位于相对于反义链种子区的对位, 所述反义链种子区为 1-8 位, 以 5'-端起始计;

任选地, 以 5'-端起始计, (N)b' 的前 4 个核苷酸位于与所述反义链 10-13 位相对的位点处, 且所述前 4 个核苷酸中至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸。

8.根据权利要求 1-7 中任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 以 5'-端起始计, 式 (I) 中 X 位于反义链 8-10 位或 15 位中的任意位置;

任选地, 正义链中 X 位于与所述反义链 2, 8 或 15 位中任意位置的对位;

任选地, 以 5'-端起始计, X 位于反义链第 15 位, 且: 所述反义链 9 位或 12 位至少存在一个氟代修饰, 和/或, 与所述反义链 10 位相对位点处的正义链位置为氟代修饰。

9.根据权利要求 1-8 中任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述双链寡核苷酸除了包含所述双链区, 还包含一个或多个突出端区; 所述突出端区长度是 1-6 个核苷酸。

10.根据权利要求 9 所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 包含突出端区的所述双链寡核苷酸由下式 (II) 表示:

SS: 5'-(T)t1-(N)a'- (X)p'- (N)b'- (X)q'- (N)c'- (X)r'- (N) d' -(T)t2-3'

AS: 3'-(T)t1-(N)a-(X)p-(N)b-(X)q-(N)c-(T)t2-5' (II),

其中, T 代表突出端的核苷酸; t1, t2 分别独立地选自 0-6 的整数, 且不能同时为 0; 其余取代基的定义同式 (I)。

11.根据权利要求 10 所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述突出端核苷酸 T 各自独立地选自修饰或未修饰的核苷酸, 所述修饰的核苷酸选自下组中的一种或多种: 2'-O-烷基、2'-烷基、2'-取代的烷基、2'-卤代、2'-脱氧, 无碱基核苷酸, 或者反向核苷酸。

12.根据权利要求 1-8 中任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 双链寡核苷酸的反义链在 3'端处具有一个核苷酸突出端, 并且所述突出端包括 1-3 个核苷酸; 所述双链寡核苷酸分子由下式 (IIa) 所示:

SS: 5'-(N)a'- (X)p'- (N)b'- (X)q'- (N)c'- (X)r'- (N) d' -3'

AS: 3'-(T)t1-(N)a-(X)p-(N)b-(X)q-(N)c-5' (IIa),

其中, t1 选自 1-3 的整数。

13.根据权利要求 9-12 中任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述突出端区还具有硫代磷酸酯修饰。

14.根据权利要求 1-13 中任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述双链寡核苷酸的每条链包括 17-35 个核苷酸;

任选地, 每条链包括 17-23 个核苷酸;

任选地, 每条链包括 17-21 个核苷酸;

任选地, 每条链包括 17-19 个核苷酸;

任选地, 每条链包括 19-25 个核苷酸;

任选地, 每条链包括 19-23 个核苷酸;

任选地, 每条链包括 19-21 个核苷酸;

任选地, 每条链包括 21-23 个核苷酸。

15. 根据权利要求 1-12 任一项所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述双链寡核苷酸具有以下特征的至少一个:

任选地, 所述正义链上存在至少一个核苷酸 X; 且以 5'-端起始计, 至少一个 X 位于与所述反义链 15 位或 8 位或 2 位任意位置的对位;

任选地, 以 5'-端起始计, 所述正义链上对应于所述反义链 10-13 位对位处的 4 个核苷酸中, 至少含有 2 个氟代修饰的核苷酸;

任选地, 以 5'-端起始计, 所述反义链的 2 位, 6 位, 14 位和 16 位均为氟代修饰的核苷酸;

任选地, 以 5'-端起始计, 所述反义链的 8 位, 9 位, 10 位, 15 位中的至少一个位置为核苷酸 X;

任选地, 以 5'-端起始计, 所述正义链上存在至少一个 X 位于对应于反义链 1-8 位的对位;

任选地, 以 5'-端起始计, 反义链上 15 位为核苷酸 X。

16. 根据权利要求 15 所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述核苷酸 X 独立地选自下列修饰的核苷酸: 2'-O-MOE、2'-O-TBDMS、2'-O-TOM、2'-O-CH₂-O-CH₂-CH₃、2'-O-CH₂-O-CH₂-CF₃;

任选地, 正义链和反义链上均至少含有一个硫代磷酸酯基, 且硫代磷酸酯基位于每条单链的末端区域。

17. 根据权利要求 12 所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述 AS 链的突出端(T)_n 包括至少一个 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸。

18. 根据权利要求 1 或 2 所述的双链寡核苷酸, 其特征在于: 所述双链寡核苷酸进一步包括至少一个配体;

任选地, 所述配体包括肝脏靶向配体和非肝脏靶向配体;

任选地, 所述配体为 ASGPR 配体;

任选地, 所述 ASGPR 配体包括通过支链接头而附接的 GalNAc 或其衍生物。

19. 一种双链寡核苷酸, 包含正义链和反义链, 每条链具有 17 至 35 个核苷酸, 其中每个核苷酸为修饰或未修饰的核苷酸, 所述正义链和反义链至少部分地反向互补形成双链区; 其特征在于, 所述双链寡核苷酸包含至少一个 2'-双取代基修饰的核苷酸, 且所述 2'-双取代基中的每个取代基各自独立地选自甲基或氟;

其中, 当所述双链寡核苷酸的双链区包含 2'-双取代基修饰的核苷酸时, 所述 2'-双取代基修饰的核苷酸选自 2'-双 F 取代的核苷酸; 或, 当所述双链寡核苷酸双链区之外的位置包含 2'-双取代基修饰的核苷酸时, 所述 2'-双取代基修饰的核苷酸选自 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸。

20. 根据权利要求 1-19 任一项所述的双链寡核苷酸, 特征在于, 其具有以下特征的一个或多个:

(1) 所述双链寡核苷酸包含 2'-双 F 取代的核苷酸时, 所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从正义链的 5'端起始计的位置 7、8、9 或 10 处中的至少一个;

任选地, 所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从正义链的 5'端起始计的位置 7、8、9 或 10 处中的至少 2 个或至少 3 个;

(2) 所述双链寡核苷酸包含 2'-双 F 取代的核苷酸时, 所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从反义链的 5'端起始计的位置 2、4、6、8、9、10、12、14 或 16 处中的至少一个;

任选地, 所述 2'-双 F 取代的核苷酸位于从反义链的 5' 端开始计的位置 2、4、6、8、9、10、12、14 或 16 处中的至少 2 个;

(3) 所述双链寡核苷酸包含 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸时, 所述 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸位于寡核苷酸双链区之外的位置;

(4) 所述双链寡核苷酸包含 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸时, 所述 2'-F-2'-Me 取代的核苷酸位于反义链的 3'末端位置的突出端。

21. 一种寡核苷酸缀合物, 其特征在于, 所述寡核苷酸缀合物含有权利要求 1-20 中任一项所述的双链寡核苷酸, 以及缀合连接至双链寡核苷酸的缀合基团;

任选地, 所述缀合基团包含药学上可接受的靶向基团和/或递送辅助基团。

22. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物含有权利要求 1-20 中任一项所述的双链寡核苷酸或权利要求 21 所述的寡核苷酸缀合物。

23. 权利要求 1-20 中任一项所述的双链寡核苷酸、权利要求 21 所述的寡核苷酸缀合物、权利要求 22 所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防与目标基因表达的 mRNA 水平相关的疾病或症状的药物中的用途。

24. 一种治疗和/或预防与目标基因表达的 mRNA 水平相关的疾病或症状的方法, 所述方法包括向有需要的受试者给予权利要求 1-20 中任一项所述的双链寡核苷酸、权利要求 21 所述的寡核苷酸缀合物、权利要求 22 所述的药物组合物中

至少之一。

25.一种调节细胞中目标基因表达水平的方法，所述方法包括将有效量的权利要求 1-20 中任一项所述的双链寡核苷酸、权利要求 21 所述的寡核苷酸缀合物、权利要求 22 所述的药物组合物中的至少之一与所述细胞接触。

26.一种试剂盒，所述试剂盒包括权利要求 1-20 中任一项所述的双链寡核苷酸、权利要求 21 所述的寡核苷酸缀合物、权利要求 22 所述的药物组合物中至少之一。