

# 靶向血管紧张素原的核酸及其用途

## 相关申请的交叉引用

5            本发明要求 2023 年 06 月 16 日提交的申请号为 202310718430.6 的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引入并入本文。

## 技术领域

             本发明属于生物技术领域，具体地，涉及靶向血管紧张素原的核酸及其  
10    用途。

## 背景技术

             肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 是一种由多种蛋白酶和短肽组成的复杂网络调节系统，是心血管和  
15    肾功能的一种重要调节因素，该系统的过度激活是很多常见病理状况的中心环节，包括高血压、心力衰竭和肾脏疾病 (Lu H et al. Hypertension Res. 39:492-500, 2016)。RAAS 途径始于肾素使其底物血管紧张素原 (Angiotensinogen) 分解，产生无活性肽血管紧张素 I (Angiotensin I, Ang I)，随后内皮细胞中的血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE)  
20    将 Ang I 转化为血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II)，Ang II 的 ACE 活化在肺部最为广泛，Ang II 介导血管收缩以及肾上腺释放醛固酮，从而导致钠潴留和血压升高。

             RAAS 抑制剂包括 ACE 抑制剂、Ang II 受体拮抗剂 (angiotensin II receptor blockers, ARBs)、醛固酮拮抗剂和直接肾素抑制剂等，RAAS 抑制  
25    剂是目前高血压治疗、心力衰竭预防和治疗的重要药物，临床上应用广泛

( Schmieder RE et al. Lancet. 369 (9568):1208-1219; Antonaccio MJ. J Pharmacol.14:29-45, 1983; Ruiz-Ortega M et al. Trends Cardiovasc Med. 17(1): 19-25, 2007; Matsubara H. Cric Res.83(12):1182-1191, 1998) 。ACE 抑制剂及 Ang II 受体拮抗剂能够激活代偿通路从而导致血管紧张素再度活化和醛固酮突围造成血液 Ang II 及醛固酮浓度回到治疗前甚至更高的水平 ( Nobakht N et al.Nat Rev Nephrol. 7:356-359, 2011; Bomback AS and Klemmer PJ. Nat Clin Pract Nephrol. 3:486-492,2007) 。这可能是顽固性高血压和心衰病人对 RAAS 抑制药物反应不佳的重要因素(Narayan H and Webb DJ. Curr Hypertens Rep. 18:34, 2016, Roig E et al. Eur Heart J. 21: 53-57, 2000) , 10 所以, 更为有效的治疗策略应该是靶向 RAAS 酶和受体的上游, 避免限制治疗效果的代偿机制和胞内分泌通路 ( Mullick AE et al. Hypertension. 70(3):566-576, 2017) 。

血管紧张素原(Angiotensinogen, AGT, 又为 SERPINA8, ANHU, hFLT1) 是所有血管紧张素的共同前体 (Wu C et al. Am J Med Sci. 4:183-190, 2011; 15 Lu H et al. Hypertens Res 39: 492-500, 2016), 肝脏是血液 AGT 的主要来源 (Yiannilouris G et al. Hypertension. 66:836-842, 2015; Matsusaka T et al. J Am Soc Nephrol. 23:1181-1189, 2012) 。多项研究证实, 血液 AGT 浓度升高和高血压呈显著正相关 (Fasola AF et al. J Appl Physiol. 21:1709-1712, 1966) , 降低血液 AGT 浓度能够抑制 RAAS 通路的活性并导致血压下降 20 (Olearczyk J et al. Hypertension Res. 37:405-412, 2014) , 静脉输注 AGT 给大鼠能增高血压, 并可通过采用抗 AGT 抗体治疗逆转 (Menard J et al. Hypertension. 18:705-707, 1991) , AGT-基因敲除小鼠血压降低, 而 AGT-过度表达导致血压上升 (Kim HS et al. Proc Natl Acad Sci USA92:2735-2739, 1995; Kimura S et al. Embo J. 11:821-827, 1982) 。通过调控 AGT 的水平治 25 疗高血压是很有希望的研发靶点, 然而采用传统手段靶向 AGT 遇到诸多困难 (Morgan L et al. Int J Biochem Cell Biol.28:1211-1222, 1996) 。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 指在进化过程中高度保守的、由

双链小干扰核糖核酸（small interference RNA，siRNA）诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的现象。因此，研究开发靶向 AGT 的 siRNA 具有重要的意义。

## 5 发明内容

本发明的目的是为了克服现有技术存在的问题，提供一种新的靶向 AGT 的核酸及其用途。

本发明第一方面提供了一种核酸，该核酸包括正义链和反义链，其中，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 1-26 任意一项所示序列具有 80% 以上的序列同一性的序列，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 27-52 任意一项所示序列具有 80% 以上的序列同一性的序列。

本发明第二方面提供了一种靶向药物递送系统，该靶向药物递送系统包括靶向基团、连接基团和通过连接基团与靶向基团连接的如上所述的核酸。

本发明第三方面提供了一种药物组合物，该药物组合物含有如上所述的核酸或靶向药物递送系统和药学上可接受的载体。

本发明第四方面提供了一种抑制细胞中血管紧张素基因的表达的方法，该方法包括：使所述细胞与如上所述的核酸、靶向药物递送系统或药物组合物接触，以抑制所述细胞中的血管紧张素基因的表达。

本发明第五方面提供了如上所述的核酸、靶向药物递送系统或药物组合物在以下任一方面的用途：1) 治疗和/或预防与血管紧张素相关的疾病；2) 制备用于治疗 and/或预防与血管紧张素相关的疾病的药物。

本发明的发明人发现，肾素-血管紧张素-醛固酮系统中，AGT 是 RNAi 最适合的靶点，因此，本发明提供了一种新的靶向 AGT 的核酸及其用途。本发明的核酸能够有效抑制 AGT 的表达，且能有效降低 RAAS 激活程度，

从而能够用于治疗 and/或预防高血压等与 AGT 相关的疾病。

## 附图说明

5 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施方式，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

10 图 1 为本发明实施例中 SN-682160, SN-682172, SN-682173, SN-682175 和 SN-682176 在人源 AGT 转基因小鼠中的药效。

图 2 为本发明实施例中 SN-682726 与 SN-682728 在人源 AGT 转基因小鼠中的药效。

图 3 为本发明实施例中 SN-682726 与 SN-2073 在人源 AGT 转基因小鼠中的药效。

15

## 具体实施方式

以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明，并不用于限制本发明，本领域技术人员可以对本发明进行多种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。  
20 例如，作为一个实施方式的部分而说明或描述的特征可以用于另一实施方式中，来产生更进一步的实施方式。

### 术语解释

除非另有说明，用于披露本发明的所有术语(包括技术和科学术语)的意义与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的相同。通过进一步的指导，

随后的定义用于更好地理解本发明的教导。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在限制本发明。

本文所使用的术语“和/或”、“或/和”、“及/或”的选择范围包括两个或两个以上相关所列项目中任一个项目，也包括相关所列项目的任意的和所有的组合，所述任意的和所有的组合包括任意的两个相关所列项目、任意的更多个相关所列项目、或者全部相关所列项目的组合。需要说明的是，当用至少两个选自“和/或”、“或/和”、“及/或”的连词组合连接至少三个项目时，应当理解，在本申请中，该技术方案毫无疑问地包括均用“逻辑与”连接的技术方案，还毫无疑问地包括均用“逻辑或”连接的技术方案。比如，“A 及/或 B”  
10 包括 A、B 和 A+B 三种并列方案。又比如，“A，及/或，B，及/或，C，及/或，D”的技术方案，包括 A、B、C、D 中任一项（也即均用“逻辑或”连接的技术方案），也包括 A、B、C、D 的任意的和所有的组合，也即包括 A、B、C、D 中任两项或任三项的组合，还包括 A、B、C、D 的四项组合（也即均用“逻辑与”连接的技术方案）。

15 本发明中所使用的术语“含有”、“包含”和“包括”是同义词，其是包容性或开放式的，不排除额外的、未被引述的成员、元素或方法步骤。

本发明中用端点表示的数值范围包括该范围内所包含的所有数值及分数，以及所引述的端点。

本发明中涉及浓度数值，其含义包括在一定范围内的波动。比如，可以在相应的精度范围内波动。比如 2%，可以允许 $\pm 0.1\%$ 范围内波动。对于数值较大或无需过于精细控制的数值，还允许其含义包括更大波动。比如 100mM，可以允许 $\pm 1\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 5\%$ 等范围内的波动。涉及分子量，允许其含义包括 $\pm 10\%$ 的波动。

25 本发明中，涉及“多个”、“多种”等描述，如无特别限定，指在数量上指大于等于 2。

本发明中，以开放式描述的技术特征中，包括所列举特征组成的封闭式

技术方案，也包括包含所列举特征的开放式技术方案。

本发明中，“优选”、“更好”、“更佳”、“为宜”仅为描述效果更好的实施方式或实施例，应当理解，并不构成对本发明保护范围的限制。

本发明中，“任选地”、“任选的”、“任选”、“可选地”、“可选的”、“可选”，指可有可无，也即指选自“有”或“无”两种并列方案中的任一种。如果一个技术方案中出现多处“任选”或“可选”，如无特别说明，且无矛盾之处或相互制约关系，则每项“任选”或“可选”各自独立。

本发明中，术语“核酸”是指含有 RNA 或 RNA 样(例如化学修饰的 RNA)寡核苷酸分子的组合物，所述寡核苷酸分子能够以序列特异性方式降解或抑制(例如，在适当的条件下降解或抑制)靶 mRNA 的信使 RNA(mRNA)转录物的翻译。所述的核酸可以通过 RNA 干扰机制(即，通过与哺乳动物细胞的 RNA 干扰途径机制(RNA 诱导沉默复合物或 RISC)的相互作用而诱导 RNA 干扰)、或通过任何替代机制或途径来起作用。本文公开的包括正义链和反义链的核酸的下的限定范围包括但不限于：短(或小)干扰 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微小 RNA(miRNA)、短发夹 RNA(shRNA)和切丁酶(dicer)底物。

本发明中，当提及给定基因的表达时，术语“沉默”、“降低”、“抑制”、“下调”或“敲减”，意指如通过基因在其中转录的细胞、细胞群、组织、器官或受试者中，由基因转录的 RNA 水平或者由 mRNA 翻译的多肽、蛋白质或蛋白质亚基的水平测量的，与未如此治疗的第二细胞、细胞群、组织、器官或受试者相比，当细胞、细胞群、组织、器官或受试者用本文所述的核酸进行治疗时，所述基因的表达是降低的。

本发明中，“完全互补的”意指在核碱基或核苷酸序列分子的杂交对中，第一寡核苷酸的邻接序列中的所有(100%)碱基，与第二寡核苷酸的邻接序列中的相同数目的碱基杂交。邻接序列可以包含第一核苷酸序列或第二核苷酸序列的全部或部分。

本发明中，“部分互补的”意指在核碱基或核苷酸序列分子的杂交对中，第一寡核苷酸的邻接序列中的至少 70%但并非全部碱基，与第二寡核苷酸的邻接序列中的相同数目的碱基杂交。邻接序列可以包含第一核苷酸序列或第二核苷酸序列的全部或部分。

5 本发明中，“基本上互补的”意指在核碱基或核苷酸序列分子的杂交对中，第一寡核苷酸的邻接序列中的至少 85%但并非全部碱基，与第二寡核苷酸的邻接序列中的相同数目的碱基杂交。邻接序列可以包含第一核苷酸序列或第二核苷酸序列的全部或部分。

本发明中，当提及“至少部分互补的”，意指在核碱基或核苷酸序列分子  
10 的杂交对中，第一寡核苷酸与第二寡核苷酸为部分互补的、基本上互补的或完全互补的。

本发明中，术语“治疗”意指为了提供受试者中的一种或多种疾病症状的数目、严重性和/或频率的缓解或减轻而采取的方法或步骤。所述的治疗可以包括受试者中的一种或多种疾病症状的数目、严重性和/或频率的预防、  
15 管理、预防性治疗、和/或抑制或降低。

本发明中，术语“连接”意指两种化合物或分子通过共价键进行接合。。除非另有说明，否则如本文使用的，术语“连接”可以指具有或不具有任何中间原子或原子群的第一化合物和第二化合物之间的连接。

## 核酸

20 本发明提供了一种（被修饰或未被修饰的）核酸，该核酸包括正义链和反义链，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 1~26 任意一项所示序列具有 80%（如 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）以上的序列同一性的序列，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 27~52 任意一项所示序列具有  
25 80%（如 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）以上的序

列同一性的序列。

在一些实施方式中，所述反义链具有 15~30（如 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30）个核苷酸（碱基）。

在一些实施方式中，所述正义链具有 15~30（如 15、16、17、18、19、  
5 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30）个核苷酸（碱基）。

在具体实施时，本领域人员可以结合正义链和反义链的互补性考虑而对本发明中所提供的序列而进行组合，从而得到组合后的核酸（siRNA）。

在本发明的优选实施方式中，如表 1 所示，所述核酸选自正义链序列为 SEQ ID NO: 1 且反义链序列为 SEQ ID NO: 27 的 siRNA-1、正义链  
10 序列为 SEQ ID NO: 2 且反义链序列为 SEQ ID NO: 28 的 siRNA-2、正义链序列为 SEQ ID NO: 3 且反义链序列为 SEQ ID NO: 29 的 siRNA-3、正义链序列为 SEQ ID NO: 4 且反义链序列为 SEQ ID NO: 30 的 siRNA-4、正义链序列为 SEQ ID NO: 5 且反义链序列为 SEQ ID NO: 31 的 siRNA-5……、siRNA-24、siRNA-25、siRNA-26 中的至少一种。

15 在一些优选的实施方式中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 27~52 任意一项所示序列相差不超过 0 个、1 个、2 个或 3 个核苷酸的至少 15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 个连续核苷酸，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的（如部分互补的、基本上互补的或完全互补的）核苷酸序列。

20 在一些优选的实施方式中，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 1~26 任意一项所示序列相差不超过 0 个、1 个、2 个或 3 个核苷酸的至少 15、16、17、18、19、20 或 21 个连续核苷酸。

本发明中，所述正义链和反义链可以具有相同的长度，也可以具有不同的长度。

25 上述核酸中所有核苷酸基团可以是未经化学修饰的，也可以含有至少一个修饰的核苷酸基团，且修饰可以在任意位置的核苷酸上。

在一些实施方式中，所述正义链和反义链可以是彼此部分互补、基本上互补或完全互补的。

在一些优选的实施方式中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 29、32、38、40、41、42、43、44 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的（如部分互补的、基本上互补的或完全互补的）核苷酸序列。当反义链具有上述序列时，双链 RNA 对 AGT 具有显著更优的抑制效果。

在一些优选的实施方式中，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 3、6、12、14、15、16、17、18 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列。

在一些更优选的实施方式中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 29、40、41、43、44 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列。

在一些优选的实施方式中，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 3、14、15、17、18 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列。

在一些进一步优选的实施方式中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 40 所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的（如部分互补的、基本上互补的或完全互补的）核苷酸序列。当反义链具有该序列时，经过不同修饰的双链 RNA 对 AGT 的均具有较优的抑制效果。

在一些优选的实施方式中，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 14 所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列。

在一些优选的实施方式中，所述核酸中的 GC 含量为 20~45%，更优选为 20~35%。

在一些实施方式中，所述核酸中的正义链或反义链与本发明所提及的对应序列的序列同一性低于 100%或相差 1 个以上核苷酸时，仍然具有与所

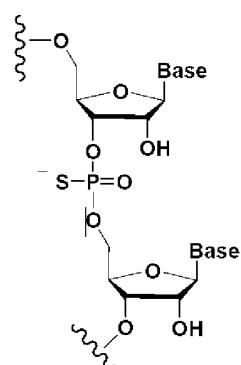
述对应序列相近或相当的对 AGT 的抑制效果。例如，在所述核酸的反义链的 3'端所连接的 UU 替换为 AA, CC, GG 或 UG 等，或任何两个核酸的组合。这样的核酸序列也属于本发明的保护范围。

本发明中所提到的上述关于裸序列（即未经修饰的序列）的技术方案，其效果优势并不依赖于修饰方法或靶向载体的选择。以下对其可以适用的修饰方案及进一步优选的修饰方案进行展开介绍：

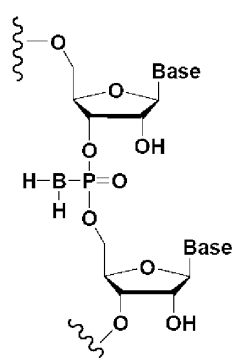
根据本发明所述的核酸，其中，所述核酸含有核苷酸基团作为基本结构单元，所述核苷酸基团含有磷酸基团、核糖基团和碱基，优选情况下，所述核酸含有至少一个修饰的核苷酸基团。修饰后的核酸对 AGT 的抑制效率不  
10 低于 50%（如 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%）。

15 根据本发明所述的核酸，其中，所述修饰的核苷酸基团为磷酸基团和/或核糖基团被修饰的核苷酸基团。带修饰的位点可以在正义链和/或反义链的第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 位核苷酸中的至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、  
20 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 位上。

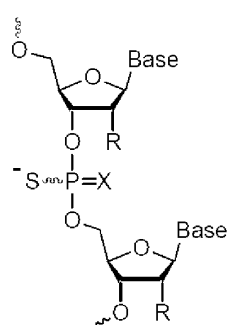
例如，磷酸基团的修饰是指对磷酸基团中的氧进行修饰，包括硫代磷酸修饰（Phosphorothioate）和硼烷化磷酸盐修饰（Boranophosphate）等。如下式所示分别用硫、硼烷、胺基、烷基或烷氧基置换磷酸基团中的氧。这几种修饰都能稳定核酸的结构，保持碱基配对的高特异性和高亲和力。



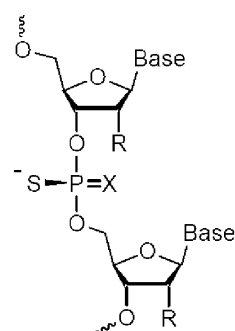
硫代磷酸修饰



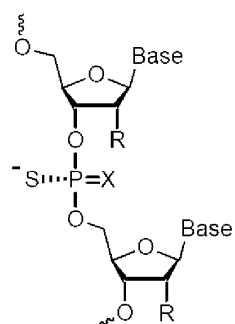
硼烷化磷酸盐修饰



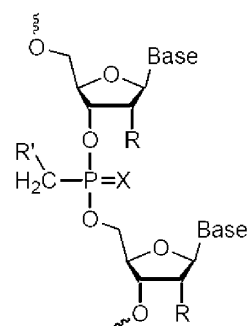
非立体专一硫代磷酸修饰



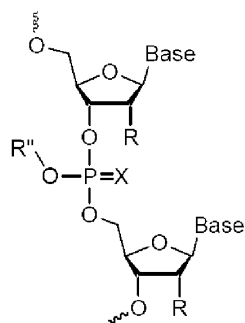
立体专一 (Sp) 硫代磷酸修饰



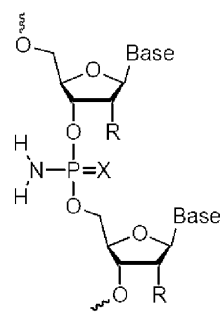
立体专一 (Rp) 硫代磷酸修饰



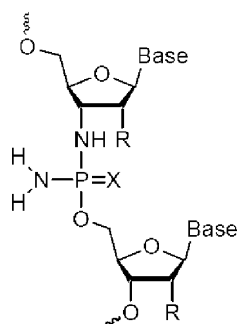
烷基磷酸酯修饰



烷氧基磷酸酯修饰



胺基磷酸酯修饰



二胺基磷酸酯修饰

以上结构式中，BASE 表示碱基 A、U、C、G 或 T。X 可以是氧(O)或硫(S)。R 在以上结构中可以是相同的，也可以是不同的，比如：氢(H)、氟(F)、甲氧基(OME)或甲氧乙基(MOE)、羟基、烯丙基、乙基胺基、炔丙基、氨基、氰基乙基、乙酰基等，R'和 R''可以各自独立地是氢(H)、甲基(CH<sub>3</sub>)、乙基(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、丙基(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、异丙基(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、烯丙基、炔丙基、酰氧基苄基、酰氧乙基。

核糖基团的修饰是指对核糖基团中 2'-羟基(2'-OH)的修饰。在核糖基团的 2'-羟基位置引入某些取代基如甲氧基或氟后，使核酸不易被核糖核酸酶切割，由此增加了核酸的稳定性，使核酸具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。对核苷酸戊糖中 2'-羟基的修饰包括 2'-氟修饰(2'-fluoromodification, 如 2'-arabino-fluoro modification)、2'-甲氧基修饰(2'-OME)、2'-甲氧乙基修饰(2'-MOE)、2'-2,4-二硝基苯酚修饰(2'-DNP modification)、环锁乙基修饰(2',4'-constrained ethylmodification)、

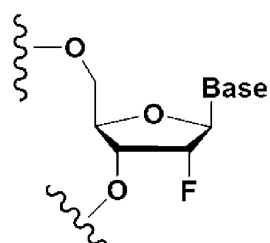
2'-氨基修饰 (2'-Amino modification)、2'-脱氧修饰 (2'-Deoxy modification)、BNA、无环核酸修饰、错位核酸修饰、L 型核酸修饰等。

BNA (内环桥接核苷酸) 是指受约束的或不能接近的核苷酸。BNA 可以含有五元环、六元环、或七元环的具有“固定的”C 3'-内切糖缩拢的桥联结构。

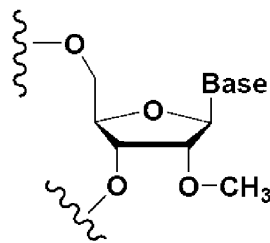
5 通常将该桥并入该核糖环的 2'-、4'-位处以提供 2',4'-BNA 核苷酸, 如锁乙基修饰 (LNA)、环锁乙基修饰 (ENA) 和乙基锁核酸修饰 (cET BNA)。

无环核酸是核苷酸的糖环被打开形成的核苷酸, 如解锁核酸(UNA)核苷酸和甘油核酸(GNA)核苷酸。错位核酸修饰是指 3',5'-磷酸键链接被 2',5'-磷酸键链所代替。L 型核酸修饰是指天然存在的 D 型核酸被替换为其镜像立体对应体 L 型核酸。

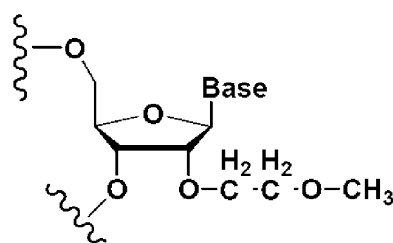
10



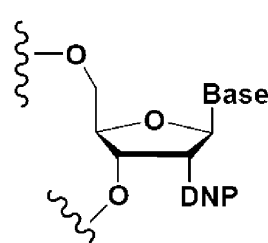
2'-氟修饰



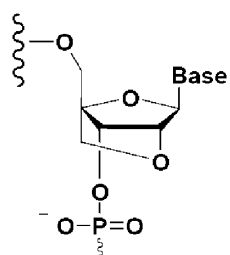
2'-甲氧基修饰



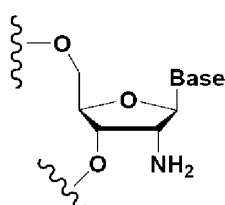
2'-甲氧乙基修饰



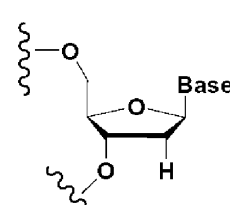
2'-2,4-二硝基苯酚修饰



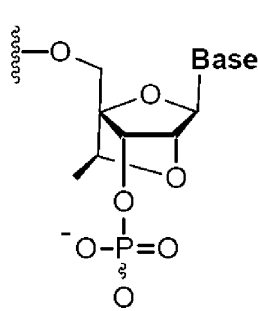
锁核酸修饰



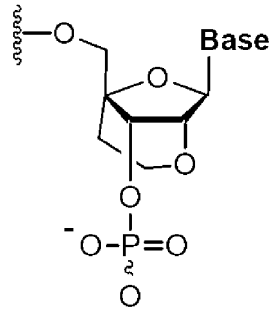
2'-氨基修饰



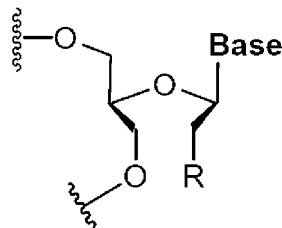
2'-脱氧修饰



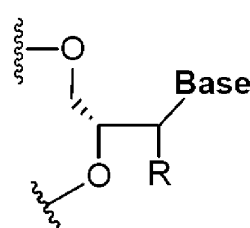
环锁乙基修饰



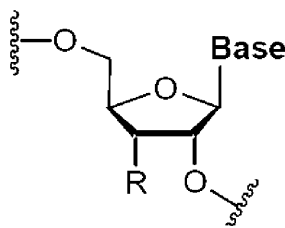
乙基锁核酸修饰



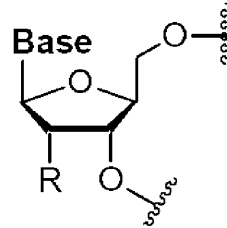
解锁核酸修饰



甘油核酸修饰



错位核酸修饰



L型核酸修饰

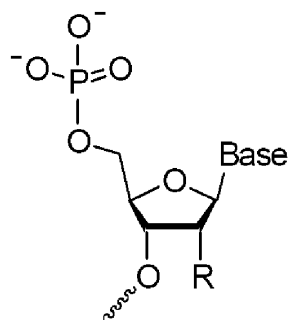
其中，BASE 表示碱基 A、U、C、G 或 T。R 在以上结构中可以是相同的，也可以是不同的，比如：氢（H）、氟（F）、甲氧基（OME）或甲  
 5 氧乙基（MOE）、羟基、烯丙基、乙基胺基、炔丙基、氰基乙基、乙酰基  
 等。

根据本发明所述的核酸，其中，优选情况下，核糖基团被修饰的核苷酸  
 基团为核糖基团的 2'-OH 被甲氧基或氟取代的核苷酸基团。

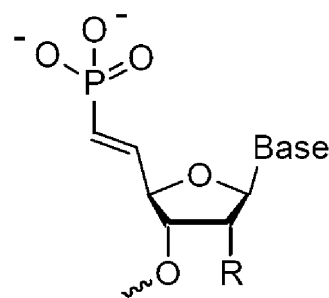
根据本发明的一种特别优选的实施方式，其中，所述核酸的正义链中含  
 10 有尿嘧啶碱基或胞嘧啶碱基的核苷酸基团为所述核糖基团被修饰的核苷酸  
 基团，即，所述核酸的正义链中含有尿嘧啶碱基或胞嘧啶碱基的核苷酸基团

中的核糖基团的 2'-OH 被甲氧基或氟取代。更优选地，所述核酸的正义链和反义链的 3'端均可以连接有 dTdT；或者，所述核酸的反义链的 3'端可以连接有 AA 或 UU 或任何两个核酸的组合（可以是但不局限于 CC, GG 或 UG），使序列具有特异性对 mRNA 降解的诱因。具有以上修饰的核酸表现  
 5 出更为优异的体内抑制效果，且上述修饰能够进一步降低本发明的核酸在体内的免疫原性。

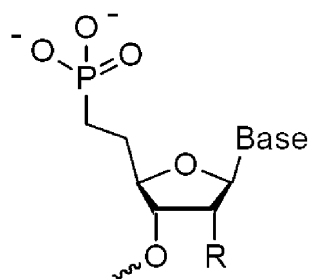
本发明的核酸还可以包括在反义链 5' 端连接一单磷酸核苷的修饰。由于 siRNA 导链终端的 5' -单磷酸对于 RISC 识别是重要的。其中 5' -羟基的磷酸化对 siRNA 能否有效地装载到细胞内部的 Ago2 上起了一定程度的作用。在 siRNA 中的导链 5' 端单磷酸盐与 Argonaute-2 (Ago2) 有 H 键的相互作用，从而确保对 mRNA 的靶标有准确定位和精确切割。常用的 5' -单磷酸核苷的衍生物有如下几种，此类磷酸核苷的衍生物已被证实在生物  
 10 代谢介质中具有一定稳定性，对促进 siRNA 导链装载到细胞内部的 Ago2 有一定作用(Nucleic Acids Research, 2015, 43, 2993 - 3011)。根据本发明所述的核酸，其中，优选情况下，反式-乙烯基磷酸酯(VP)作为首选，也可以包  
 15 括上面所述以外的单磷酸核苷的衍生物。



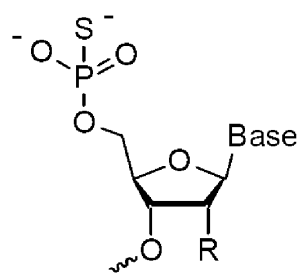
5' -单磷酸修饰



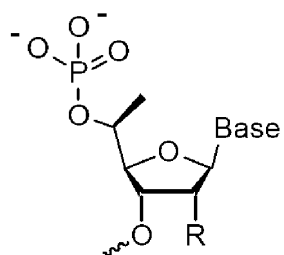
5' -反式乙烯基磷酸酯修饰



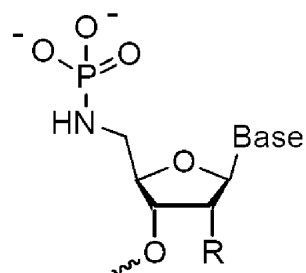
5'-乙基磷酸酯修饰



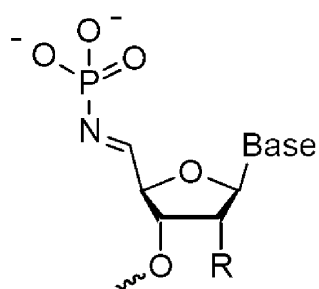
5'-硫代磷酸修饰



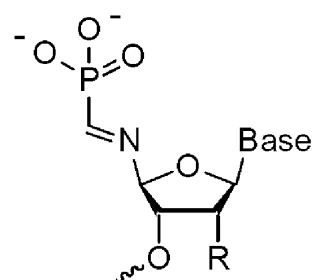
5'-甲氧基甲基磷酸修饰



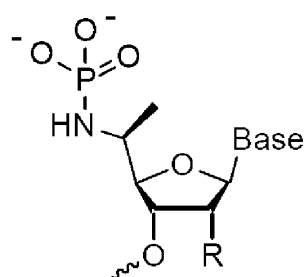
5'-氮磷酰胺修饰



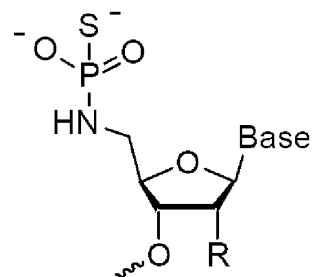
5'-反式-磷酰亚胺修饰



5'-反式-甲酰基磷酸酯亚胺修饰



5'-甲基氮磷酰胺修饰



5'-硫代氮磷酰胺修饰

- 5 以上结构中，BASE 表示碱基 A、U、C、G 或 T。R 在以上结构中可以是相同的，也可以是不同的，比如：氢（H）、氟（F）、甲氧基（OME）

或甲氧乙基（MOE）、羟基、烯丙基、乙基氨基、炔丙基、氰基乙基、氨基、乙酰基等。

在一些实施方式中，所述核酸中的至少一个核苷酸是修饰的核苷酸或包括修饰的间键。

5 在一些优选的实施方式中，所述修饰的核苷酸选自 2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2',3'-开环核苷酸模拟物、锁定的核苷酸、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向 2'-O-甲基核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、含有乙烯基磷酸酯的核苷酸、  
10 含有环丙基磷酸酯的核苷酸和 3'-O-甲基核苷酸中的一种或多种；所述修饰的核苷酸进一步优选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸中的一种或多种。

在一些优选的实施方式中，所述修饰的间键优选自硫代磷酸酯核苷酸间键和甲基磷酸酯核苷酸间键中的一种或多种；所述修饰的间键进一步优选自硫代磷酸酯单酯核苷酸间键、硫代磷酸二酯核苷酸间键中的一种或多  
15 种。

在一些实施方式中，所述反义链从 5'端计数的第 5 和 6 处核苷酸为 2'-O-甲基核苷酸，第 7 处核苷酸为 2'-氟核苷酸。在本发明所提及的任一序列的基础上，通过对反义链进行上述修饰，能够进一步明显改善 siRNA 对 AGT 的抑制效果。

20 在一些优选的实施方式中，所述反义链的 5'末端和 3'末端处分别含有 2 个硫代磷酸酯核苷酸间键，且在从 5'端计数的第 1、2、7、9、14 和 16 处核苷酸为 2'-氟核苷酸，其余核苷酸均为 2'-O-甲基核苷酸。

在一些实施方式中，所述正义链从 5'端计数的第 2 处核苷酸为 2'-O-甲基核苷酸或 2'-氟核苷酸，优选为 2'-O-甲基核苷酸。通过对正义链进行如  
25 上修饰，能够进一步改善 siRNA 对 AGT 的抑制效果。

在一些优选的实施方式中，所述正义链的 5'末端含有 2 个硫代磷酸酯

核苷酸间键，且在从 5'端计数的第 4、7、9、10 和 11 处核苷酸为 2'-氟核苷酸，其余核苷酸均为 2'-O-甲基核苷酸。

在一些实施方式中，所述反义链具有如表 3 或表 8 中任意一种所示的反义链序列相差不超过 0 个、1 个、2 个或 3 个核苷酸的至少 15、16、17、  
5 18、19、20、21、22 或 23 个连续核苷酸，所述正义链具有如表 3 或表 8 中任意一种所示的正义链序列相差不超过 0 个、1 个、2 个或 3 个核苷酸的至少 15、16、17、18、19、20 或 21 个连续核苷酸。

在一些实施方式中，所述正义链和反义链形成具有表 4 或表 8 中任意一种所示的 siRNA。

10 在一些实施方式中，所述反义链从 5'端到 3'端含有与以下核苷酸序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列：

AfsCfsacuuUfuUfuguUfcAfcaaacsasa;

所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列。

在一些实施方式中，所述正义链从 5'端到 3'端含有如以下任意一项核苷酸序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列：  
15

gsusuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu;

gsUfsuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu;

在本发明的各序列中，以小写字母表示的核苷酸代表该核苷酸为 2'-O-甲基核苷酸；f 表示其左侧相邻的一个核苷酸为 2'-氟修饰的核苷酸；s 代表左右相邻的两个核苷酸之间通过硫代磷酸二酯键连接。  
20

根据本发明所述的核酸，可以通过本领域常规的方法获得，例如通过固相合成和液相合成得到，所述固相合成已经有商业的订制服务，因此可以通过商购获得。所述修饰的核苷酸基团可以通过具有相应修饰的核苷酸单体引入。

25 基于如上合成的核酸（siRNA），本发明可以进一步构建与上述 siRNA

具有相同或相似功能的 shRNA 表达质粒，构建该表达质粒的方法为本领域技术人员所公知，在此不再赘述。

本发明还提供了如上所述的核酸的靶向基因位点。在一些实施方式中，所述靶向基因位点如表 1 第 1 列中的任意一项所标注。

5

表 1

| 靶向基因位点 | SEQ ID NO. | 正义链 (5'-3')            | SEQ ID NO. | 反义链 (5'-3')              |
|--------|------------|------------------------|------------|--------------------------|
| 778    | 1          | CCACGCUCUCUGGACUUCACA  | 27         | UGUGAAGUCCAGAGAGCGUGGGA  |
| 977    | 2          | UGGACAACAGCACCUCAGUGU  | 28         | ACACUGAGGUGCUGUUGUCCAUU  |
| 1145   | 3          | GUCUCACUUUCCAGCAAAACU  | 29         | AGUUUUGCUGGAAAGUGAGACUU  |
| 1167   | 4          | CCUCAACUGGAUGAAGAAACU  | 30         | AGUUUCUUAUCCAGUUGAGGGA   |
| 1450   | 5          | UUCCUGUUUGCUGUGUAUGAU  | 31         | AUCAUACACAGCAACAGGAAUG   |
| 1763   | 6          | GCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU  | 32         | AUUCUCUAAAAUAAACCCAGCUU  |
| 1764   | 7          | CUGGGUUUAUUUUAGAGAAUG  | 33         | CAUUCUCUAAAAUAAACCCAGUU  |
| 1843   | 8          | CCAACCGACCAGCUUGUUUGU  | 34         | ACAAACAAGCUGGUCGGUUGGAA  |
| 1847   | 9          | CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA  | 35         | UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU  |
| 1849   | 10         | GACCAGCUUGUUUGUGAAACA  | 36         | UGUUUCACAAACAAGCUGGUCGG  |
| 1849   | 11         | GACCAGCUUGUUUGUGAAACA  | 37         | UGUUUCACAAACAAGCUGGUCUU  |
| 1851   | 12         | CCAGCUUGUUUGUGAAACAAA  | 38         | UUUGUUUCACAAACAAGCUGGUC  |
| 1854   | 13         | GCUUGUUUGUGAAACAAAAAA  | 39         | UUUUUUUGUUUCACAAACAAGCUG |
| 1858   | 14         | GUUUUGUGAAACAAAAAAGUGU | 40         | ACACUUUUUUGUUUCACAAACAA  |
| 1868   | 15         | CAAAAAAGUGUCCCUUUUCA   | 41         | UGAAAAGGGAACACUUUUUUGUU  |
| 1880   | 16         | CCCUUUUCAAGUUGAGAACAA  | 42         | UUGUUCUCAACUUGAAAAGGGUU  |
| 1893   | 17         | GAGAACAAAAUUGGGUUUUUA  | 43         | UAAAACCCAAUUUUUUGUUCUAA  |
| 1895   | 18         | GAACAAAAUUGGGUUUUUAAA  | 44         | UUUAAAACCCAAUUUUUUGUUCUC |
| 1934   | 19         | GCAUUGCCUUCGGUUUGUAUU  | 45         | AAUACAAACCGAAGGCAAUGCAA  |
| 1935   | 20         | CAUUGCCUUCGGUUUGUAUUU  | 46         | AAAUACAAACCGAAGGCAAUGCA  |
| 1940   | 21         | CCUUCGGUUUGUAUUUAGUGU  | 47         | ACACUAAAUACAAACCGAAGGCA  |
| 1945   | 22         | GGUUUGUAUUUAGUGUCUUGA  | 48         | UCAAGACACUAAAUACAAACCGA  |
| 1950   | 23         | GUAUUUAGUGUCUUGAAUGUA  | 49         | UACAUUCAAGACACUAAAUACUU  |
| 1959   | 24         | GUGUCUUGAAUGUAAGAACAU  | 50         | AUGUUCUUACAUUCAAGACACUU  |
| 1961   | 25         | GUCUUGAAUGUAAGAACAUGA  | 51         | UCAUGUUCUUACAUUCAAGACAC  |
| 2085   | 26         | CCAUAGCUGGUUAUUUCUCCU  | 52         | AGGAGAAUAACCAGCUAUGGUU   |

注：第 1 列指靶向基因的首个碱基在 AGT 基因序列中的位置，以此类推；第 2、4 列中数字表示序列编号，例如，“1”表示 SEQ ID NO: 1。

人 AGT 的编码序列（NM\_001382817.3，SEQ ID NO: 53）：

10 1 agaaagtaga cctcaccag gcatggaatc tgccagtgcc ttgatcttgg acttccagct  
61 tccagaactg gtatgcggaa gcgagcacc cagtctgaga tggctcctgc cgggtgagc  
121 ctgagggcca ccctcctctg cctcctggcc tgggtggcc tggctgcagg tgacggggtg

181 tacatacacc ccttccacct cgtcatccac aatgagagta cctgtgagca gctggcaaag  
241 gccaatgccg ggaagcccaa agaccccacc ttcatacctg ctccaattca ggccaagaca  
301 tccccctgtgg atgaaaaggc cctacaggac cagctggtgc tagtcgctgc aaaacttgac  
361 accgaagaca agttgagggc cgcaatggtc gggatgctgg ccaacttctt gggcttccgt  
5 421 atatattggca tgcacagtga gctatggggc gtgggtccatg gggccaccgt cctctcccca  
481 acggctgtct ttggcacctt ggctctctct tatctgggag ccttggaacca cacagctgac  
541 aggctacagg caatcctggg tgttccttgg aaggacaaga actgcacctc cgggctggat  
601 gcgcacaagg tcctgtctgc cctgcaggct gtacagggcc tgctagtggc ccagggcagg  
661 gctgatatgc aggccagct gctgctgtcc acgggtggtg gcgtgttcac agccccaggc  
10 721 ctgcacctga agcagccgtt tgtgcagggc ctggctctct ataccctgtt ggtcctccca  
781 cgctctctgg acttcacaga actggatggt gctgctgaga agattgacag gttcatgcag  
841 gctgtgacag gatggaagac tggctgtctc ctgatgggag ccagtgtgga cagcacctg  
901 gctttcaaca cctacgtcca ctccaaggg aagatgaagg gcttctccct gctggccgag  
961 cccagggagt tctgggtgga caacagcacc tcagtgtctg ttcccatgct ctctggcatg  
15 1021 ggcaccttcc agcactggag tgacatccag gacaacttct cggtgactca agtgcccttc  
1081 actgagagcg cctgcctgct gctgateccag cctcactatg cctctgacct ggacaagggtg  
1141 gagggtctca ctttccagca aaactccctc aactggatga agaaactatc tccccggacc  
1201 atccacctga ccatgcccc aactgggtctg caaggatctt atgacctgca ggacctgctc  
1261 gccagggctg agctgcccgc cattctgcac accgagctga acctgcaaaa attgagcaat  
20 1321 gaccgcatca ggggtgggga ggtgctgaac agcatttttt ttgagcttga agcggatgag  
1381 agagagccca cagagtctac ccaacagctt aacaagcctg aggtcttgga ggtgaccctg  
1441 aaccgcccct tcctgttttg tgtgtatgat caaagcgcca ctgccctgca cttcctgggc  
1501 cgcgtggcca acccgctgag cacagcatga ggcagggcc ccagaacaca gtgcctggca  
1561 aggcctctgc ccctggcctt tgaggcaaa ggcagcagca gataacaacc ccggacaaat  
25 1621 cagcgatgtg tcacccccag tctcccacct tttcttctaa tgagtgcact ttgagctgga  
1681 aagcagccgt ttctccttgg tctaagtgtg ctgcatggag tgagcagtag aagcctgcag  
1741 cggcacaaat gcacctccca gtttgcctgg tttatttttag agaatggggg ttggggaggca  
1801 agaaccagtg tttagcgcgg gaactactgt ccaaaaagaa ttccaaccga ccagcttgtt  
1861 tgtgaaacaa aaaagtgttc ccttttcaag ttgagaacaa aaattggggt ttaaaattaa  
30 1921 agtatacatt tttgcattgc cttcgggttg tatttagtgt cttgaatgta agaacatgac  
1981 ctccgtgtag tgtctgtaat accttagttt tttccacaga tgcttgtgat ttttgaacaa  
2041 tacgtgaaag atgcaagcac ctgaatttct gtttgaatgc ggaaccatag ctggttatatt  
2101 ctcccttgtg ttagtaataa acgtcttgc acaataagcc tccaaaaa

### 靶向药物递送系统

35 本发明还提供了一种靶向药物递送系统，其特征在于，该靶向药物递送系统包括靶向基团、连接基团和通过连接基团与靶向基团连接的如上所述的核酸。

其中，所述靶向基团能够进一步提高小核酸的靶向性，可以由单糖（例如葡萄糖、甘露糖、阿洛糖、阿卓糖、半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺、  
40 他洛糖、果糖、艾杜糖等）和/或多肽（例如蛋白质、单克隆抗体、纳米体）提供。所述连接基团可以选自 -O-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>- 、-[CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>-CONH-[CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>O- 、-O-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>m</sub>-CONH-[CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>O- 、-O-[CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>-CONH-[CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>O-。其中，m 和 n 可以各自独立地为 1 到 10 的整数。

结合本领域常识而将本发明的核酸（siRNA）在应用于不同的靶向药物  
45 递送系统时，均具有较优的抑制效果。换言之，本发明中想要保护的裸序列

以及修饰后的序列，其效果并不依赖于靶向载体的选择。为了进一步提高 siRNA 的生物利用度和治疗效果，本发明还对靶向药物递送系统进行了优化，并得到了如下的技术方案。

5 在一些实施方式中，所述连接基团与所述核酸的正义链或反义链的 3' 端或 5'端连接。

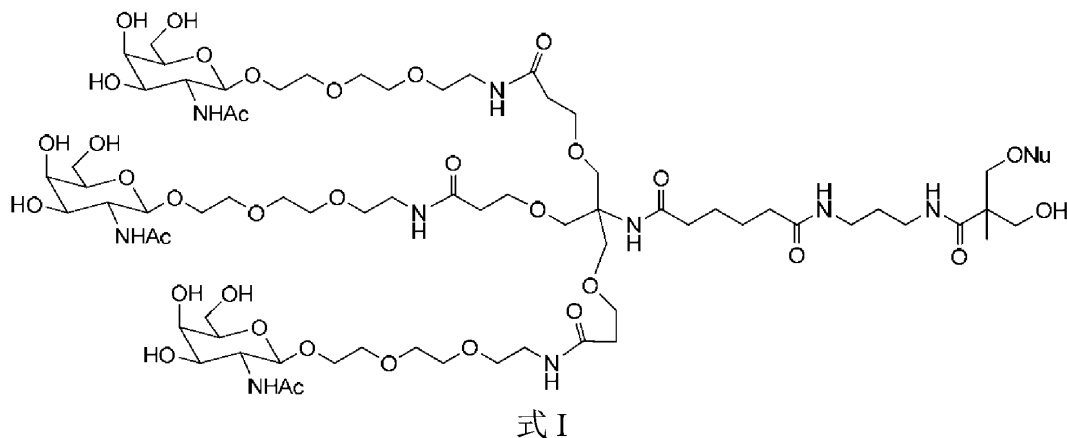
在一些具体的实施方式中，所述连接基团与所述核酸的正义链的 3'端连接。

在一些实施方式中，该靶向药物递送系统包括配体和与所述配体连接的所述的核酸。

10 在一些实施方式中，所述配体为是 GalNAc 衍生物。

在一些实施方式中，所述配体是通过单链、双链或三链支链接头连接的一种或多种 GalNAc 衍生物。

在一些优选的实施方式中，该靶向药物递送系统的结构如下式 I 所示：



15

式 I 中，Nu 代表所述核酸（siRNA）。在一些实施方式中，该系统中的化合物部分可以通过磷酸二酯键与 siRNA 的正义链的 5'端或 3'端相连，也可以通过磷酸二酯键与 siRNA 的反义链的 5'端或 3'端相连。该靶向药物递送系统利用其左侧的结构特性能提高核酸药物（Nu）的细胞穿透能力，增强其在细胞内的稳定性，且制备工艺简单，实用性强。

20

## 药物组合物

本发明还提供了一种药物组合物，该药物组合物含有如上所述的核酸或靶向药物递送系统以及药学上可接受的载体。

可以通过常规的方法由所述核酸和所述药学上可接受的载体制备得到  
5 所述药物组合物。例如，所述药物组合物可以为注射液。所述注射液可以用于皮下、肌肉或静脉的注射。

根据本发明所述的药物组合物，其中，对核酸或靶向药物递送系统以及药学上可接受的载体的量没有特别的要求，一般地，相对于 1 重量份的所述核酸（或 1 重量份的以核酸计的靶向药物递送系统），所述药学上可接  
10 受的载体的含量可以为 1-100000 重量份（如 1 重量份、5 重量份、10 重量份、50 重量份、100 重量份、500 重量份、1000 重量份、5000 重量份、10000 重量份、50000 重量份、100000 重量份或以上任意两个数值之间的任意值）。

根据本发明所述的药物组合物，其中，所述药学上可接受的载体可以为  
15 本领域常规采用的各种载体，例如，可以包括 pH 值缓冲液、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。所述 pH 值缓冲液可以为 pH 值为 7.5-8.5 的三羟甲基胺基甲烷盐酸盐缓冲液和/或 pH 为 5.5-8.5 的磷酸盐缓冲液，优选为 pH 为 5.5-8.5 的磷酸盐缓冲液。所述保护剂可以为肌醇、山梨醇和蔗糖中的至少一种。以所述药物组合物的总重量为基准，所述保护剂的含量可以为  
20 0.01-30 重量%（如 0.01 重量%、0.05 重量%、0.1 重量%、0.5 重量%、1 重量%、5 重量%、10 重量%、15 重量%、20 重量%、25 重量%、30 重量%或以上任意两个数值之间的任意值）。所述渗透压调节剂可以为氯化钠和/或氯化钾。所述渗透压调节剂的含量使所述药物组合物的渗透压为 200-700 毫渗摩尔/千克。根据所需渗透压，本领域技术人员可以确定所述渗透  
25 压调节剂的含量。

根据本发明一种优选的实施方式，所述药学上可接受的载体为脂质体。

脂质体可以为任何一种能包裹核酸的脂质体，其直径可以是 25-1000nm，可以包括但不限于胆固醇及其类似物或衍生物。

本发明所述药物组合物的使用剂量可以为本领域常规的剂量，所述剂量可以根据各种参数、尤其根据受试者的年龄、体重和性别来确定。例如，  
5 对于雌性，3-4 月龄，体重 25-30g 的小鼠，以所述药物组合物中的所述核酸的量计，所述药物组合物的用量可以为 0.01-100mg/kg 体重，优选为 1-10mg/kg 体重。

### 方法及用途

本发明还提供一种抑制细胞中血管紧张素基因的表达的方法，该方法  
10 包括：使所述细胞与如上所述的核酸、如上所述的靶向药物递送系统或如上所述的药物组合物接触，以抑制所述细胞中的血管紧张素基因的表达。

在一些实施方式中，所述细胞在受试者体内，例如，人类受试者，例如，患有血管紧张素原(AGT)相关疾病的受试者。

在一些实施方式中，所述细胞位于体外。所述方法基于研究目的、或用于  
15 构建动物模型。

在一些实施方式中，使所述细胞与所述核酸接触抑制 AGT 的表达的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%(例如，与所述细胞首次与所述核酸接触之前的 AGT 的表达水平相比；例如，在向所述受试者施用第一剂量的所述核酸之前)。在某些实施例中，抑制 AGT 的表达使受试者血清样品中的  
20 的 AGT 蛋白水平降低至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%，例如，与所述细胞首次与所述核酸接触之前的 AGT 的表达水平相比。

本发明还提供如上所述的核酸、如上所述的靶向药物递送系统或如上所述的药物组合物在以下任一方面的用途：1) 治疗和/或预防与血管紧张素相关的疾病；2) 制备用于治疗 and/或预防与血管紧张素相关的疾病的药物。

25 在一些实施方式中，所述疾病为：(i) 与血管紧张素活性水平增强或升高相关的疾病；或(ii) 将受益于血管紧张素原表达减少的疾病。

在一些实施方式中,所述疾病为肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)过度激活相关疾病。在一些具体实施方式中,“RAAS 系统过度激活相关疾病”可以包括高血压、心力衰竭、肾脏疾病、早老性痴呆、眼科疾病等。

在一些实施方式中,所述疾病选自高血压、高血压症、临界性高血压症、原发性高血压症、继发性高血压症、单纯收缩期或舒张期高血压症、妊娠相关高血压症、糖尿病性高血压症、顽固性高血压症、难治性高血压症、阵发性高血压症、肾血管性高血压症、戈德布拉特氏高血压症(Goldblatt hypertension)、与低血浆肾素活性或血浆肾素浓度相关的高血压症、高眼压、青光眼、肺动脉高血压症、门静脉高血压症、全身静脉高血压症、收缩期高血压症、不稳定性高血压症;高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病变、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、心力衰竭、心肌梗塞、心绞痛、中风、肾病、肾衰竭、系统性硬化症、宫内生长受限(IUGR)、胎儿生长受限、肥胖、肝脂肪变性/脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精脂肪性肝病(NAFLD)、葡萄糖不耐症、2 型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病)和代谢综合征中的一种或几种。

本发明中,所述受试者可以为哺乳动物,包含灵长类动物(如人、非人灵长类动物,例如猴子和黑猩猩)、非灵长类动物(如牛、猪、马、山羊、兔子、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠或小鼠)或鸟类。在一些实施方式中,所述受试者优选为灵长类动物,更优选为人。可以通过多种途径给药,取决于需要局部治疗还是全身治疗。给药的方式可以为但不限于静脉内给药、动脉内给药、皮下给药、腹膜内给药、经皮给药(如通过植入器械)和软组织内给药。给药量可以参照前述,在此不再赘述。

在一些实施方式中,所述核酸、所述的靶向药物递送系统或所述的药物组合物通过皮下给药、静脉内给药和/或肌肉内给药而施用于受试者。

## 实施例

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，优先参考本发明中给出的指引，还可以按照本领域的实验手册或常规条件，还可以参考本领域已知的其它实验方法，或者按照制

5 造厂商所建议的条件。

下述的具体实施例中，涉及原料组分的量度参数，如无特别说明，可能存在称量精度范围内的细微偏差。涉及温度和时间参数，允许仪器测试精度或操作精度导致的可接受的偏差。

实施例 1 siRNA 的序列筛选

10 双链 siRNA 可以进入细胞并被纳入 RISC 复合体。在 RISC 复合体中，双链 siRNA 被内切核酸酶 Ago2 解开，只留下反义链用于识别目标 mRNA。一般认为 35-55%的 GC 含量是 siRNA 的最佳选择。GC 含量还与 siRNA 的熔解温度相关。然而，较低 GC 含量的 siRNA 可能由于其热稳定性，可以更快或更高效地解开双链 siRNA。本发明设计的 siRNA 序列(如表 2 所示)

15 包括了那些 GC 含量较低的 siRNA 序列，以便更好地选择 siRNA。

表 2

| 靶向基因位点 | 序列 (5'-3')            | GC%    |
|--------|-----------------------|--------|
| 778    | CCACGCUCUCUGGACUUCACA | 57.10% |
| 977    | UGGACAACAGCACCUCAGUGU | 52.40% |
| 1145   | GUCUCACUUUCCAGCAAAACU | 42.90% |
| 1167   | CCUCAACUGGAUGAAGAAACU | 42.90% |
| 1450   | UUCCUGUUUGCUGUGUAUGAU | 38.10% |
| 1763   | GCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU | 33.30% |
| 1764   | CUGGGUUUAUUUUAGAGAAUG | 33.30% |
| 1843   | CCAACCGACCAGCUUGUUUGU | 52.40% |
| 1847   | CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA | 47.60% |
| 1849   | GACCAGCUUGUUUGUGAAACA | 42.90% |
| 1849A  | GACCAGCUUGUUUGUGAAACA | 42.90% |
| 1851   | CCAGCUUGUUUGUGAAACAAA | 38.10% |
| 1854   | GCUUGUUUGUGAAACAAAAAA | 28.60% |
| 1858   | GUUUGUGAAACAAAAAAGUGU | 28.60% |
| 1868   | CAAAAAAGUGUCCCUUUUCA  | 33.30% |
| 1880   | CCCUUUUCAAGUUGAGAACAA | 38.10% |

|      |                       |        |
|------|-----------------------|--------|
| 1893 | GAGAACAAAAAUUGGGUUUUA | 28.60% |
| 1895 | GAACAAAAAUUGGGUUUAAA  | 23.80% |
| 1934 | GCAUUGCCUUCGGUUUGUAUU | 42.90% |
| 1935 | CAUUGCCUUCGGUUUGUAUUU | 38.10% |
| 1940 | CCUUCGGUUUGUAUUUAGUGU | 38.10% |
| 1945 | GGUUUGUAUUUAGUGUCUUGA | 33.30% |
| 1950 | GUUUUAGUGUCUUGAAUGUA  | 28.60% |
| 1959 | GUGUCUUGAAUGUAAGAACAU | 33.30% |
| 1961 | GUCUUGAAUGUAAGAACAUGA | 33.30% |
| 2085 | CCAUAGCUGGUUAUUUCUCCU | 42.90% |

其中，优选的序列 GUUUGUGAAACAAAAAAGUGU，其 GC 含量是 28.6 %。

上述序列对应的正义链和反义链序列如表 1 所示。

本实施例进一步对各正义链和反义链进行修饰，修饰后的序列如表 3 所示。

表 3

| 编号       | 正义链 (5'-3')                 | 编号       | 反义链 (5'-3')                      |
|----------|-----------------------------|----------|----------------------------------|
| SN-22158 | cscsacgcUfcUfCfUfggacuucaca | SN-52158 | usGfsuGfaAfguccaGfaGfagcguggsgsa |
| SN-22159 | usgsgacaAfcAfGfCfaccucagugu | SN-52159 | asCfsaCfuGfaggugcuGfuUfguccasusu |
| SN-22160 | gsuscucaCfuUfUfCfcagcaaaacu | SN-52160 | asGfsuUfuUfgcuggaaAfgUfgagacsusu |
| SN-22161 | cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacu | SN-52161 | asGfsuUfuCfuucauccAfgUfugaggsgsa |
| SN-22163 | ususccugUfuUfGfCfuguguaugau | SN-52163 | asUfscAfuAfcacagcaAfaCfaggaasusg |
| SN-22164 | gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaaU | SN-52164 | asUfsuCfuCfuaaaaaAfaCfccagcsusu  |
| SN-22165 | csusggguUfuUfUfUfuagagaaug  | SN-52165 | csAfsuUfcUfuaaaaAfaAfccagcsusu   |
| SN-22166 | cscsaaccGfaCfCfAfgcuuguuugu | SN-52166 | asCfsaAfaCfaagcuggUfcGfguugsasa  |
| SN-22167 | cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaa | SN-52167 | usUfsuCfaCfaaacaagCfuGfgucggsusu |
| SN-22168 | gsasccagCfuUfGfUfuugugaaaca | SN-52168 | usGfsuUfuCfacaacaAfgCfuggucsgsg  |
| SN-22169 | gsasccagCfuUfGfUfuugugaaaca | SN-52169 | usGfsuUfuCfacaacaAfgCfuggucssusu |
| SN-22170 | cscsagcuUfgUfUfUfgugaaaca   | SN-52170 | usUfsuGfuUfucacaaaCfaAfgcuggsusc |
| SN-22171 | gscsuuguUfuGfUfGfaaaca      | SN-52171 | usUfsuUfuUfguuucacAfaAfcaagcsusg |
| SN-22172 | gsusuuguGfaAfAfCfaaaaaagugu | SN-52172 | asCfsaCfuUfuuuuguUfcAfcaacsasa   |
| SN-22173 | csasaaaaAfgUfGfUfuccuuuua   | SN-52173 | usGfsaAfaAfgggaacaCfuUfuuuugsusu |
| SN-22174 | cscscuuUfcAfAfGfuugagaaca   | SN-52174 | usUfsgUfuCfucaacuGfaAfaagggsusu  |
| SN-22175 | gsasgaacAfaAfAfAfuuggguuuua | SN-52175 | usAfsaAfaCfcaauuuUfuGfuucucsasa  |
| SN-22176 | gsasacaaAfaUfUfUfgguuuuaa   | SN-52176 | usUfsuAfaAfacccaauUfuUfuguucsusc |
| SN-22177 | gscsauugCfcUfUfCfUfgguuuua  | SN-52177 | asAfsuAfaAfaaccgaaGfgCfaaugcsasa |
| SN-22178 | csasuugCfuUfCfGfguuuguauuu  | SN-52178 | asAfsaUfaCfaaaccgaAfgGfcaaugscsa |
| SN-22179 | cscsuucGfuUfUfGfuauuuagugu  | SN-52179 | asCfsaCfuAfaauacaAfcCfagaaggscsa |
| SN-22180 | gsgsuuugUfaUfUfUfagugucuuga | SN-52180 | usCfsaAfgAfcacuaaUfaCfaaaccsgsa  |
| SN-22181 | gsusauuuAfgUfGfUfcuugaaugua | SN-52181 | usAfsaCfuUfcaagacaCfuAfaauacsusu |
| SN-22182 | gsusgucuUfgAfAfUfguaagaacau | SN-52182 | asUfsgUfuCfuuaacauCfaAfgacacsusu |

|          |                              |          |                                   |
|----------|------------------------------|----------|-----------------------------------|
| SN-22183 | gsuscuugAfaUfGfUfaagaacauga  | SN-52183 | usCfsaUfgUfucuuacaUfuCfaagacsasc  |
| SN-22184 | cscsauagCfuGfGfUfuauuuccuccu | SN-52184 | asGfsgAfgAfaauaaccAfgCfuauuggsusu |

表中，a/c/g/u=2'-OMe 核苷酸; Af/Cf/Gf/Uf=2'-F 核苷酸; s=硫代磷酸二酯键。

通过固相合成法，将表 2 中的正义链和反义链形成表 4 中修饰后的双链 siRNA。

5

表 4

| 编号        | 正义链 (5'-3')                  | 反义链 (5'-3')                       |
|-----------|------------------------------|-----------------------------------|
| SN-252158 | cscsacgcUfcUfCfUfggacuucaca  | usGfsuGfaAfguccaGfaGfagcguggsgsa  |
| SN-252159 | usgsgacaAfcAfGfCfaccucagugu  | asCfsaCfuGfaggugcuGfuUfguccasusu  |
| SN-252160 | gsuscucaCfuUfUfCfcagcaaaacu  | asGfsuUfuUfgcuggaaAfgUfgagacsusu  |
| SN-252161 | cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacu  | asGfsuUfuCfuucauccAfgUfugaggsgsa  |
| SN-252163 | ususccugUfuUfGfCfuguguaugau  | asUfscAfuAfcacagcaAfaCfaggaasusg  |
| SN-252164 | gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaau  | asUfsuCfuCfuaaaauaAfaCfccagcsusu  |
| SN-252165 | csusggguUfuUfUfUfuuagagaug   | csAfsuUfcUfcuaaaaauAfaAfccagsusu  |
| SN-252166 | cscsaaccGfaCfCfAfgcuuguuuugu | asCfsaAfaCfaagcuggUfcGfguuggsasa  |
| SN-252167 | cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaa  | usUfsuCfaCfaaacaagCfuGfgucggsusu  |
| SN-252168 | gsasccagCfuUfGfUfuugugaaaca  | usGfsuUfuCfacaacaAfgCfuggucsgsg   |
| SN-252169 | gsasccagCfuUfGfUfuugugaaaca  | usGfsuUfuCfacaacaAfgCfuggucsusu   |
| SN-252170 | cscsagcuUfgUfUfUfgugaaacaaa  | usUfsuGfuUfucacaaaCfaAfgcuggsusc  |
| SN-252171 | gscsuuguUfuUfUfGfaaacaacaaaa | usUfsuUfuUfguuucacAfaAfaagcsusg   |
| SN-252172 | gsusuuguGfaAfAfCfaaaaaagugu  | asCfsaCfuUfuuuuguuUfcAfaaacsasa   |
| SN-252173 | csasaaaaAfgUfGfUfuccuuuuuca  | usGfsaAfaAfgggaacaCfuUfuuuugsusu  |
| SN-252174 | cscscuuUfcAfAfGfuugagaacaa   | usUfsgUfuCfucaacuGfaAfaaggsusu    |
| SN-252175 | gsasgaacAfaAfAfAfuuggguuuua  | usAfsaAfaCfcauuuuUfuGfuucucsasa   |
| SN-252176 | gsasacaaAfaAfUfUfggguuuuaaa  | usUfsuAfaAfacccaauUfuUfuguucsusc  |
| SN-252177 | gscsauugCfcUfUfCfgguuuguauu  | asAfsuAfcAfaaccgaaGfgCfaaugcsasa  |
| SN-252178 | csasuugcCfuUfCfGfguuuguauuu  | asAfsaUfaCfaaaccgaAfgGfcaaugscsa  |
| SN-252179 | cscsuucgGfuUfUfGfuauuuagugu  | asCfsaCfuAfaauacaaAfcCfgaaggscsa  |
| SN-252180 | gsgsuuugUfaUfUfUfagugucuuga  | usCfsaAfgAfcacuaaaaUfaCfaaaccsgsa |
| SN-252181 | gsusauuuAfgUfGfUfcuugaugua   | usAfsaAfuUfcaagacaCfuAfaauacsusu  |
| SN-252182 | gsusgucuUfgAfAfUfguaagaacau  | asUfsgUfuCfuuaacuuCfaAfgacacsusu  |
| SN-252183 | gsuscuugAfaUfGfUfaagaacauga  | usCfsaUfgUfucuuacaUfuCfaagacsasc  |
| SN-252184 | cscsauagCfuGfGfUfuauuuccuccu | asGfsgAfgAfaauaaccAfgCfuauuggsusu |

表中，a/c/g/u=2'-OMe 核苷酸; Af/Cf/Gf/Uf=2'-F 核苷酸; s=硫代磷酸二酯键。

在 96 孔细胞培养皿内加入 0.5 毫升细胞培养液(DMEM, 10%小牛血清, 1% 青霉素+链霉素溶液)含 10<sup>4</sup> Hep3B (Procell, Cat# CL-0102)细胞，在 37℃,

5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养器内过夜培养。在 Opti-MEM 培养液内加入 RNAiMAX（1.5 微升/孔）和表 3 中的小干扰核酸（siRNA），加入细胞培养孔使最后每孔浓度为 1 nM 或 10 nM，继续在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养期内培养 48 小时。为提取 RNA，将细胞培养上清液吸净，用 PBS 冲洗，吸净后，加入 50 μL 配制好的裂解液（按 Cells-to-CT 试剂盒（ThermoFisher Scientific, Cat#4391851c）建议）混匀，静置 10 min 后，加入 2.5 μL Stop solution 终止 2 min。根据 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits（Thermo Fisher, 货号：4368814）的建议做 RT-PCR, 每个反应内含 10 ml 裂解后液体。用实时荧光 PCR 法测基因表达定量, 人 AGT 的 TaqMan 探针为 Hs00174854\_m1, 内参基因(人 HPRT1 )的探针为 Hs02800695\_m1（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）。PCR 条件为 95°C 20 秒 1 个循环, 95°C 1 秒和 60°C 20 秒 40 个循环, 实时荧光 PCR 仪为 QuantStudio™ 6 Pro 实时荧光定量 PCR 系统 (Thermo Fisher)。AGT 基因表达是以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算, 人 HPRT1 基因表达作为内参。AGT 基因表达量以和仅有 RNAiMAX 的细胞组为对照的相对值表达。结果见表 5。

表 5

| 样品编号      | 1nM  | 标准差  | 10nM | 标准差  |
|-----------|------|------|------|------|
| SN-252158 | 1.82 | 0.09 | 0.22 | 0.09 |
| SN-252159 | 2.67 | 0.07 | 0.78 | 0.21 |
| SN-252160 | 0.41 | 0.06 | 0.29 | 0.09 |
| SN-252161 | 0.90 | 0.04 | 0.22 | 0.02 |
| SN-252163 | 0.90 | 0.03 | 0.15 | 0.07 |
| SN-252164 | 0.35 | 0.02 | 0.19 | 0.05 |
| SN-252165 | 0.89 | 0.06 | 0.15 | 0.07 |
| SN-252166 | 1.63 | 0.01 | 0.14 | 0.01 |
| SN-252167 | 0.91 | 0.12 | 0.18 | 0.03 |
| SN-252168 | 0.90 | 0.25 | 0.61 | 0.06 |
| SN-252169 | 0.92 | 0.06 | 0.60 | 0.01 |
| SN-252170 | 0.31 | 0.02 | 0.22 | 0.02 |
| SN-252171 | 2.43 | 0.46 | 0.49 | 0.01 |
| SN-252172 | 0.25 | 0.00 | 0.12 | 0.03 |
| SN-252173 | 0.40 | 0.03 | 0.16 | 0.02 |
| SN-252174 | 0.31 | 0.12 | 0.08 | 0.01 |
| SN-252175 | 0.38 | 0.09 | 0.23 | 0.03 |
| SN-252176 | 0.26 | 0.14 | 0.29 | 0.01 |
| SN-252177 | 1.67 | 0.84 | 1.11 | 0.07 |

|           |      |      |      |      |
|-----------|------|------|------|------|
| SN-252178 | 1.22 | 0.39 | 1.05 | 0.01 |
| SN-252179 | 1.49 | 0.44 | 1.53 | 0.07 |
| SN-252180 | 1.48 | 0.55 | 1.27 | 0.03 |
| SN-252181 | 1.11 | 0.05 | 0.69 | 0.12 |
| SN-252182 | 1.26 | 0.12 | 0.35 | 0.10 |
| SN-252183 | 1.68 | 0.05 | 0.94 | 0.24 |
| SN-252184 | 0.97 | 0.00 | 0.49 | 0.11 |

为了进一步确定 siRNA 的活性，将表 5 中效果较好的 siRNA 与 Tri-GalNAc 偶联(其具体结构见前述式 I，偶联后的序列见表 6)后在人原代肝细胞中进行了剂量反应实验，siRNA-GalNAc 样品分别用 100  $\mu$ L 无酶无菌水溶解成 100  $\mu$ M 溶液，将 30  $\mu$ L 100  $\mu$ M 受试物溶液加入 70  $\mu$ L inVitroGRO

5 Plating Medium 稀释为 30  $\mu$ M 溶液作为 30 nM 终浓度组工作液备用；再用 inVitroGRO Plating Medium 对 30  $\mu$ M 受试物溶液进行 8 个浓度点的 3 倍稀释，使最后工作液浓度为 4.6、13.7、41.2、123.4、370.4、1111.1、3333.3、10000nM。将人原代肝细胞从液氮中取出，在 37°C 下解冻复苏，用含血清 inVitroGRO Plating Medium 冲洗计数并离心，去除上清液后用新含血清

10 inVitroGRO Plating Medium 将细胞稀释至 300k/mL，再将 90  $\mu$ L 稀释好的细胞液铺至 96 孔细胞培养板上，使得每孔细胞数为 30k，在细胞液中加入配制好的样品工作液使最终浓度为 0.46、1.37、4.12、12.34、37.04、111.11、333.33、1000nM，后放于 5 %二氧化碳培养箱中，37 °C 恒温培养 48 小时。48 小时后吸去 96 孔培养板中所有培养基，用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤，加入 50

15  $\mu$ L 配制好的 Cells to CT 裂解液（按厂商建议）混匀，静置 10 min 后，加入 2.5  $\mu$ L 终止液终止 2 min。根据 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits （Thermo Fisher, 货号：4368814）的建议做 RT-PCR，每个反应内含 10 ml 裂解后液体。用实时荧光 PCR 法测基因表达定量，人 AGT 的 TaqMan 探针为 Hs00174854\_m1，内参基因（人 HPRT1 ）的探针为 Hs02800695\_m1

20 （Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）。PCR 条件为 95°C 20 秒 1 个循环, 95°C 1 秒和 60°C 20 秒 40 个循环, 实时荧光 PCR 仪为 QuantStudio<sup>™</sup> 6 Pro 实时荧光定量 PCR 系统 (Thermo Fisher)。AGT 基因表达是以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 计算，人 HPRT1 基因表达作为内参。AGT 基因表达量以和仅有培养

液的细胞组为对照的百分比表达并计算 IC50 值，见表 7。

表 6

| 编号        | 正义链 (5'-3')                           | 反义链 (5'-3')                      |
|-----------|---------------------------------------|----------------------------------|
| SN-682160 | gsuscucaCfuUfUfCfcagcaaaacu-TriGalNAc | asGfsuUfuUfgcuggaaAfgUfgagacsusu |
| SN-682161 | cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacu-TriGalNAc | asGfsuUfuCfuucauccAfgUfugaggsgsa |
| SN-682163 | ususcugUfuUfGfCfuguguaugau-TriGalNAc  | asUfscAfuAfcacagcaAfaCfaggaasusg |
| SN-682164 | gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaau-TriGalNAc | asUfsuCfuCfuaaaauaAfaCfccagcsusu |
| SN-682165 | csusggguUfuAfUfUfuuagagaug-TriGalNAc  | csAfsuUfcUfcuaaaaAfaAfccagcsusu  |
| SN-682170 | cscsagcuUfgUfUfUfgugaaacaaa-TriGalNAc | usUfsuGfuUfucacaaaCfaAfgcuggsusc |
| SN-682172 | gsusuuguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TriGalNAc | asCfsaCfuUfuuuuguUfcAfcaaacsasa  |
| SN-682173 | csasaaaaAfgUfGfUfucuuuuuca-TriGalNAc  | usGfsaAfaAfgggaacaCfuUfuuuugsusu |
| SN-682174 | cscscuuUfcAfAfGfuugagaacaa-TriGalNAc  | usUfsgUfuCfucaacuGfaAfaaggsusu   |
| SN-682175 | gsasgaacAfaAfAfAfuuggguuuua-TriGalNAc | usAfsaAfaCfcaauuuUfuGfuucucsasa  |
| SN-682176 | gsasacaaAfaAfUfUfggguuuuaa-TriGalNAc  | usUfsuAfaAfaccaauUfuUfuguucsusc  |

表中，a/c/g/u=2'-OMe 核苷酸; Af/Cf/Gf/Uf=2'-F 核苷酸; s=硫代磷酸二酯键。

5

表 7

| 编号        | IC50, nM |
|-----------|----------|
| SN-682160 | 296.8    |
| SN-682161 | 380.3    |
| SN-682163 | 505.8    |
| SN-682164 | 467.2    |
| SN-682165 | 701.0    |
| SN-682170 | 345.9    |
| SN-682172 | 253.4    |
| SN-682173 | 79.4     |
| SN-682174 | 344.5    |
| SN-682175 | 8.7      |
| SN-682176 | 72.2     |

为了进一步验证 siRNA 的药效，将 SN-682160，SN-682172，SN-682173，SN-682175 和 SN-682176 分别以 10mg/kg 剂量皮下注射到人源 AGT 转基因小鼠中，并于第 10 天取血检测血浆中剩余 AGT 蛋白水平，结果如图 1。从图 1 中可以看到在第 10 天 SN-682172 能将 AGT 蛋白水平敲低至 90%以下。

实施例 2 siRNA 修饰方式的优化

为了更进一步增加 siRNA 的活性，按表 8 又对 siRNA 进行了新的修饰。

10

表 8

| siRNA 编号  | 正义链                                     | 反义链                               |
|-----------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| SN-682725 | gsusuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TrigalNac  | AfsCfsacuUfuuUfuguuUfcAfcaaacsasa |
| SN-682726 | gsusuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TrigalNac  | AfsCfsacuuUfuUfuguuUfcAfcaaacsasa |
| SN-682727 | gsUfsuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TrigalNac | AfsCfsacuUfuuUfuguuUfcAfcaaacsasa |
| SN-682728 | gsUfsuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TrigalNac | AfsCfsacuuUfuUfuguuUfcAfcaaacsasa |
| SN-682172 | gsusuuguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TrigalNac   | asCfsaCfuUfuuuuguuUfcAfcaaacsasa  |

表中，a/c/g/u=2'-OMe 核苷酸; Af/Cf/Gf/Uf=2'-F 核苷酸；s=硫代磷酸二酯键。

为了进一步确定 siRNA 的活性，将表 8 中的 siRNA 在人原代肝细胞中进行了剂量反应实验，方法与前相同。降低 AGT 表达的绝对 IC50 值见表 9。

表 9

| 样品号       | IC50, nM |
|-----------|----------|
| SN-682725 | 70.20    |
| SN-682726 | 8.60     |
| SN-682727 | 44.10    |
| SN-682728 | 21.80    |

SN-682172     375.40

实施例 3 siRNA 的体外效果验证

为了进一步验证药效,将优选 siRNA 药物在人原代肝细胞中与 SN-2073 进行对比,所涉及的 siRNA 如表 10。其中,作为对比的 SN-2073 根据 US11015201B2 的公开内容制备得到。在人原代肝细胞中的实验步骤与前面  
5 实验方法类似。AGT 基因表达量以和仅有溶媒的细胞组为对照的百分比表达结果见表 11。

表 10

| siRNA 编号  | 正义链                                     | 反义链                               |
|-----------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| SN-682726 | gsusuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TrigalNac  | AfsCfsacuuUfuUfuguuUfcAfcaaacsasa |
| SN-682728 | gsUfsuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu-TrigalNac | AfsCfsacuuUfuUfuguuUfcAfcaaacsasa |
| SN-2073   | gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca- TrigalNac   | usGfsuacTgncucauugUfgGfaugacsgsa  |

表中, a/c/g/u=2'-OMe 核苷酸; Af/Cf/Gf/Uf=2'-F 核苷酸; Tgn=胸苷乙二醇; s=硫代磷酸二酯键, SN-682726 和 SN-682728 所使用的为式 I 所示的结  
10 构, SN-2073 所使用的 Tri-galNac 为 Alnylam Tri-GalNac (L96)。式 I 所示的结构和 L96 在分类上均属于三触角 N-乙酰半乳糖胺 (Triantennary N-Acetylgalactosamine), 因此, 基于以下效果数据也能够确认本发明修饰后的序列所具有的优势。

表 11

| 样品号       | 1000 nM<br>平均值 | 标准差  | 100 nM | 标准差  |
|-----------|----------------|------|--------|------|
| SN-682726 | 16.25          | 0.99 | 25.27  | 2.77 |
| SN-682728 | 21.80          | 0.74 | 33.30  | 4.61 |
| SN-2073   | 36.00          | 0.62 | 33.63  | 3.07 |

15 从人原代肝细胞自由摄取实验中可以发现,本发明的 SN-682726 和 SN-682728 较 SN-2073 有更好的活性。

实施例 4 siRNA 的体内效果验证

为了进一步验证 siRNA 的活性,将人源 AGT 转基因小鼠在第 0 天分别皮下注射了 1, 3, 10 mg/kg 的 SN-682726 或 SN-682728, 且以 PBS 作为

空白对照组，而后对血液中的人 AGT 蛋白进行了追踪观察，结果如图 2。

由图 2 可知，SN-682726 和 SN-682728 均能够明显降低 AGT 蛋白水平，且具有较为长久的药效，其中，SN-682726 的药效更优。

为了进一步验证修饰对药效的影响，将 SN-682726 与作为对比的 SN-2073 在人源 AGT 转基因小鼠上进行了比较，小鼠在第 0 天分别皮下注射了 1, 3, 10 mg/kg 的 SN-682726 或 SN-2073 化合物，且以 PBS 作为空白对照组，而后对血液中的人 AGT 蛋白进行了追踪观察，结果如图 3 所示。

从图 3 中可以看到 SN-682726 在所有剂量组中都较对标 SN-2073 化合物能维持更长久的药效，在注射后第 130 天仍有 40%的敲低效应，而作为对比的 SN-2073 组的 AGT 蛋白水平在注射后 110 天已经恢复到基点，显示出 SN-682726 的优效性。

此外，需要说明的是，本发明中 siRNA 药物的药效优势并不依赖于靶向载体的选择，在其中 TriGalNAc 更换为其他可用载体（如前述的 L96）后，将所得到的 siRNA 药物与 SN-2073 相比，在体外细胞试验及体内实验中仍然具有上述所提及的显著效果优势。例如，将 SN-682726 的 TriGalNAc 替换成 L96 后，在猴原代肝细胞中仍能取得比 SN-2073 更好的 AGT 表达沉默效应，见表 12。

表 12

| siRNA         | 1000 nM | 标准差  | 250 nM | 标准差  |
|---------------|---------|------|--------|------|
| SN-682726-L96 | 74.5%   | 0.5% | 74.7%  | 4.0% |
| SN-2073-L96   | 66.2%   | 6.0% | 69.8%  | 4.4% |

将 SN-682726 的修饰也用于 SN-2073 如表 13 中的 SN-683015,可以发现，SN-683015 在猴原代肝细胞中比 SN-2073 有更好的药效，结果见表 14。

表 13

| 编号        | 正义链                              | 反义链                               |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| SN-683015 | gsuscAfucCfaCfAfAfugagaguaca-L96 | UfsGfsuacuCfuCfauugUfgGfaugacsgsa |

|         |                                |                                  |
|---------|--------------------------------|----------------------------------|
| SN-2073 | gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca-L96 | usGfsuacTgncucauugUfgGfaugacsgsa |
|---------|--------------------------------|----------------------------------|

表 14

| siRNA     | 1000 nM | 标准差  | 250 nM | 标准差  |
|-----------|---------|------|--------|------|
| SN-683015 | 82.2%   | 3.6% | 83.0%  | 2.8% |
| SN-2073   | 66.2%   | 6.0% | 69.8%  | 4.4% |

另外，将 SN-682726 的未经修饰的序列 (SN-122726)和 SN-2073 的未经修饰序列 (SN-122073, 表 15) 在 Hep3B 细胞中也进行了 3 个浓度 (0.1, 1 和 10 nM) 的比对，结果如表 16。可见，本发明中未经修饰的 SN-122726 能更有效地降低 AGT 表达水平。

表 15

| 编号        | 正义链                   | 反义链                     |
|-----------|-----------------------|-------------------------|
| SN-122726 | GUUUGUGAAACAAAAAGUGU  | ACACUUUUUUGUUUCACAAACAA |
| SN-122073 | GUCAUCCACAAUGAGAGUACA | UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA |

表 16

| siRNA     | 0.1nM | 标准差  | 1nM   | 标准差  | 10nM  | 标准差  |
|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|
| SN-122726 | 92.7% | 4.3% | 97.3% | 0.1% | 98.5% | 0.2% |
| SN-122073 | 82.8% | 0.5% | 91.6% | 1.1% | 96.5% | 0.6% |

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种核酸，该核酸包括正义链和反义链，其特征在于，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 1~26 任意一项所示序列具有 80%以上的序列同一性的序列，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 27~52 任意一项所示序列具有 80%  
5 以上的序列同一性的序列。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 27~52 任意一项所示序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列；任选地，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 1~26 任意一项所示序列相差不超过 3 个核苷酸的  
10 至少 15 个连续核苷酸。

3. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 29、32、38、40、41、42、43、44 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列；任选地，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 3、6、12、14、15、  
15 16、17、18 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列。

4. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 29、40、41、43、44 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列；任选  
20 地，所述正义链含有与 SEQ ID NO: 3、14、15、17、18 中任意一项所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列。

5. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述反义链含有与 SEQ ID NO: 40 所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列，所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列；任选地，所述正义链含有与 SEQ  
25 ID NO: 14 所示序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列。

6. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述核酸中的 GC 含量为 20~45%，

更优选为 20~35%。

7. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述核酸中的至少一个核苷酸是修饰的核苷酸或包括修饰的间键；

所述修饰的核苷酸优选自 2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2',3'-开环核苷酸模拟物、锁定的核苷酸、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、脱碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向 2'-O-甲基核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、含有乙烯基磷酸酯的核苷酸、含有环丙基磷酸酯的核苷酸和 3'-O-甲基核苷酸中的一种或多种；所述修饰的核苷酸进一步优选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸中的一种或多种；

所述修饰的间键优选自硫代磷酸酯核苷酸间键和甲基磷酸酯核苷酸间键中的一种或多种；所述修饰的间键进一步优选自硫代磷酸酯单酯核苷酸间键、硫代磷酸二酯核苷酸间键中的一种或多种。

8. 根据权利要求 7 所述的核酸，其中，所述反义链从 5'端计数的第 5 和 6 处核苷酸为 2'-O-甲基核苷酸，第 7 处核苷酸为 2'-氟核苷酸；

优选所述反义链的 5'末端和 3'末端处分别含有 2 个硫代磷酸酯核苷酸间键，且在从 5'端计数的第 1、2、7、9、14 和 16 处核苷酸为 2'-氟核苷酸，其余核苷酸均为 2'-O-甲基核苷酸。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的核酸，其中，所述正义链从 5'端计数的第 2 处核苷酸为 2'-O-甲基核苷酸或 2'-氟核苷酸，优选为 2'-O-甲基核苷酸；

优选所述正义链的 5'末端含有 2 个硫代磷酸酯核苷酸间键，且在从 5'端计数的第 4、7、9、10 和 11 处核苷酸为 2'-氟核苷酸，其余核苷酸均为 2'-O-甲基核苷酸。

10. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述反义链具有如表 3 或表 8 中任意一种所示的反义链序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核

核苷酸，所述正义链具有如表 3 或表 8 中任意一种所示的正义链序列相差不超过 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸；优选地，所述正义链和反义链形成具有表 4 或表 8 中任意一种所示的 siRNA。

11. 根据权利要求 1 所述的核酸，其中，所述反义链从 5'端到 3'端含有与以下核苷酸序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列：

AfsCfsacuuUfuUfuguUfcAfcaaacsasa；

所述正义链含有与所述反义链至少部分互补的核苷酸序列；

优选地，所述正义链从 5'端到 3'端含有如以下任意一项核苷酸序列相差 0 个、1 个或 2 个核苷酸的核苷酸序列：

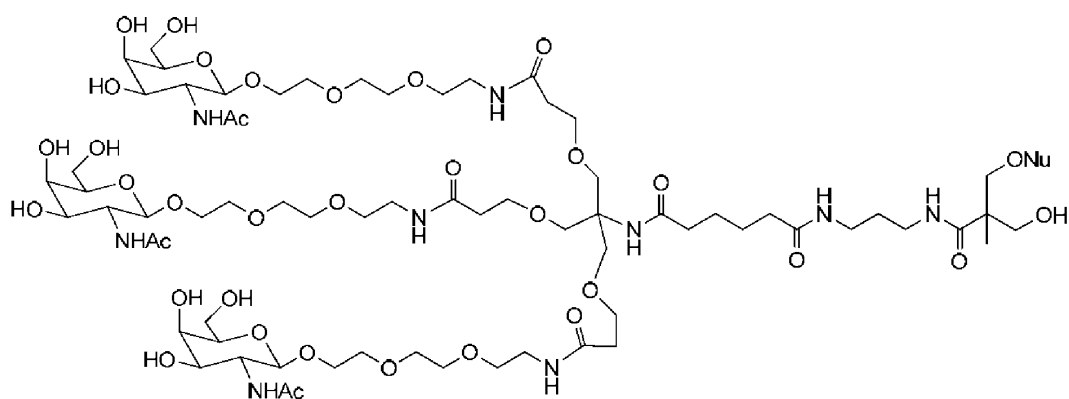
10 gsusuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu；

gsUfsuUfguGfaAfAfCfaaaaaagugu；

在各序列中，以小写字母表示的核苷酸代表该核苷酸为 2'-O-甲基核苷酸；f 表示其左侧相邻的一个核苷酸为 2'-氟修饰的核苷酸；s 代表左右相邻的两个核苷酸之间通过硫代磷酸二酯键连接。

12. 一种靶向药物递送系统，其特征在于，该靶向药物递送系统包括靶向基团、连接基团和通过连接基团与靶向基团连接的权利要求 1~11 中任一项所述的核酸。

13. 根据权利要求 12 所述的靶向药物递送系统，其中，该靶向药物递送系统包括配体和与所述配体连接的所述的核酸；优选所述配体为是 GalNAc 衍生物；更优选所述配体是通过单链、双链或三链支链接头连接的一种或多种 GalNAc 衍生物；进一步优选该靶向药物递送系统的结构如下式所示：



式中，Nu 代表所述核酸。

14. 一种药物组合物，其特征在于，该药物组合物含有权利要求 1~11 中任一项所述的核酸或权利要求 12~13 中任一项所述的靶向药物递送系统  
5 和药学上可接受的载体。

15. 一种抑制细胞中血管紧张素基因的表达的方法，该方法包括：使所述细胞与权利要求 1~11 中任一项所述的核酸、权利要求 12~13 中任一项所述的靶向药物递送系统或权利要求 14 所述的药物组合物接触，以抑制所述细胞中的血管紧张素基因的表达。

- 10 16. 权利要求 1~11 中任一项所述的核酸、权利要求 12~13 中任一项所述的靶向药物递送系统或权利要求 14 所述的药物组合物在以下任一方面的用途：

- 1) 治疗和/或预防与血管紧张素相关的疾病；
- 2) 制备用于治疗和/或预防与血管紧张素相关的疾病的药物。

- 15 17. 根据权利要求 16 所述的用途，其中，所述疾病为：

- (i) 与血管紧张素活性水平增强或升高相关的疾病；或
- (ii) 将受益于血管紧张素原表达减少的疾病。

18. 根据权利要求 16 所述的用途，其中，所述疾病为肾素-血管紧张素-醛固酮系统过度激活相关疾病。

19. 根据权利要求 16 所述的用途，其中，所述疾病选自高血压、高血压症、临界性高血压症、原发性高血压症、继发性高血压症、单纯收缩期或舒张期高血压症、妊娠相关高血压症、糖尿病性高血压症、顽固性高血压症、难治性高血压症、阵发性高血压症、肾血管性高血压症、戈德布拉特氏高血压症、与低血浆肾素活性或血浆肾素浓度相关的高血压症、高眼压、青光眼、肺动脉高血压症、门静脉高血压症、全身静脉高血压症、收缩期高血压症、不稳定性高血压症；高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病变、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、心力衰竭、心肌梗塞、心绞痛、中风、肾病、肾衰竭、系统性硬化症、宫内生长受限、胎儿生长受限、肥胖、肝脂肪变性/脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精脂肪性肝病、葡萄糖不耐症、2 型糖尿病和代谢综合征中的一种或几种。

20. 根据权利要求 16 所述的用途，其中，所述核酸、所述的靶向药物递送系统或所述的药物组合物通过皮下给药、静脉内给药和/或肌肉内给药而施用于受试者。