靶向第 13 型 17β-羟基类固醇脱氢酶的 siRNA 和 siRNA 缀合物

本公开要求申请日为 2021 年 04 月 22 日的中国专利申请 CN202110435243.8 的优先权，本公开引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本公开涉及靶向第 13 型 17β-羟基类固醇脱氢酶（HSD17B13）的 siRNA、siRNA 缀合物及应用。

背景技术

HSD17B13 是一类固醇类脱氢酶，属于 17β-羟基类固醇脱氢酶（17β-HSDs）家族的一员。目前在哺乳动物中，17β-HSDs 家族已报道有 14 名成员。这 14 个成员有着不同的组织分布、亚细胞定位和功能，作为与类固醇激素、前列腺素、脂质、异生物素和类维生素 A 代谢有关的酶，主要参与机体的生殖、发育、肥胖等一系列生理与病生理过程。

研究发现，在患有简单脂肪变性的人类受试者中，HSD17B13 蛋白表达在脂肪肝脂质液滴（LDs）中明显上调，并确定其主要位于 LDs 的表面。当 HSD17B13 蛋白过表达时，会导致肝细胞中 LDs 数量和大小的增加，并且会显著增加肝脏的脂肪生成和甘油三酯（TG）含量（Su W，Wang Y，Jia X，et al. Comparative proteomic study reveals 17β-HSD13 as a pathogenic protein in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111（31）:11437）。

最新研究进一步表明，HSD17B13 基因表达在非酒精性脂肪肝疾病（NAFLD）与非酒精性脂肪肝炎（NASH）的发病机制中起着重要作用。HSD17B13（rs72613567:TA）功能缺失型突变体降低了谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）的水平，同时减少了脂肪肝患者的炎症和肝损伤（Abul-Husn N S，Cheng X，Li A H，et al. A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease.[J]. N Engl J Med, 2018, 378（12）:1096-1106）。

NAFLD 是与肥胖，胰岛素抵抗，2 型糖尿病，高血压，高脂血症和代谢综合征相关的肝病。在美国，NAFLD 患者约占总人口的 25%，其中又有近四分之一的人会进展为以肝脏炎症、肝细胞损伤和肝脏纤维化为特征的 NASH。在 HSD17B13（rs72613567:TA）突变体携带者中发现，几种关键炎症因子表达水平减少，尤其白细胞介素（IL-6）血浆浓度显著低于非携带者，同时发现患者血清 ALT 和小儿 NAFLD 纤维化指数均降低，这揭示了 HSD17B13 功能缺失的变异体可降低 NASH 和进行性肝损伤的风险（Luukkonen P K，Tukiainen T，Juuti A，et al. Hydroxysteroid 17-β dehydrogenase 13 variant increases phospholipids and protects against fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. JCI Insight, 2020, 5（5））。

目前，临床上针对 NASH 尚无有效的治疗方法。因此，HSD17B13 的研究结果为治疗 NAFLD 及相关肝病提供了预警和新的治疗策略。

RNA 干扰（siRNA）是一种有效的沉默基因表达的方式，通过转录后调控机制，可以特异性降解靶基因 mRNA。

据统计，在人体内的疾病相关蛋白中，大约超过 80%的蛋白质不能被目前常规的小分子药物以及生物大分子制剂所靶向，属于不可成药蛋白。HSD17B13 在 NAFLD 进程中的过表达诱导了脂肪变性，增加了脂肪在肝脏中蓄积以及肝 TG 水平的升高。针对 HSD17B13 转录出的 mRNA 产物设计 siRNA，可以模仿 HSD17B13 自然发生导致功能丧失的遗传变异，防止 NAFLD 进一步进展为 NASH，以及防止 NASH 患者进一步出现肝硬化和肝癌，进而达到治疗的目的。

发明内容

本公开提供一种靶向 HSD17B13 的 siRNA。

一些实施方案中，提供靶向 HSD17B13 靶基因（Genbank 登录号 NM_178135.5）的 siRNA。

一些实施方案中，本公开提供了一种 siRNA，其包含形成双链区的正义链与反义链；所述正义链包含至少 15 个连续核苷酸，与 NM_178135.5 的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸；所述反义链包含至少 15 个连续核苷酸序列，与 NM_178135.5 互补的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸。

一些实施方案中，本公开提供了一种 siRNA，其包含形成双链区的正义链与反义链；所述正义链包含至少 15 个连续核苷酸，与 SEQ ID NO：1 的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸；所述反义链包含至少 15 个连续核苷酸序列，与 SEQ ID NO：2 的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸。

一些实施方案中，本公开 siRNA 正义链包含至少 15 个连续核苷酸（例如 16、17、18、19、20、21、22），且与 SEQ ID NO：3 至 SEQ ID NO：24 任一的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸。

一些实施方案中，本公开 siRNA 反义链包含至少 15 个连续核苷酸序列（例如 16、17、18、19、20、21、22、23、24），且与 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸。

一些实施方案中，本公开 siRNA 正义链包含或为 19 个连续核苷酸，且与 SEQ ID NO：3 至 SEQ ID NO：24 任一的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸；一些实施方案中，相差不超过 1 个核苷酸；一些实施方案中，正义链核苷酸序列 3’端第 1 位相同或不同。

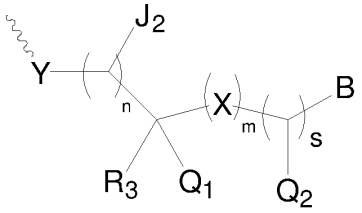
一些实施方案中，本公开 siRNA 反义链包含或为 21 个连续核苷酸，且与 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 任一的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸；一些实施方案中，相差不超过 1 个核苷酸；一些实施方案中，反义链核苷酸序列 5’端第 1

位相同或不同。

一些实施方案中，本公开 siRNA 正义链包含或为 SEQ ID NO：3 至 SEQ ID NO：24 任一的核苷酸序列。

一些实施方案中，本公开 siRNA 反义链包含或为 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 任一的核苷酸序列。

一些实施方案中，所述反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）中的至少一个核苷酸位置处包含式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（I）

其中：Y 选自 O、NH 和 S；

每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

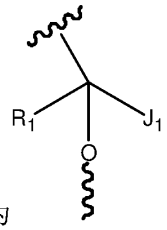
J_2 为 H 或 C_1-C_6 烷基；

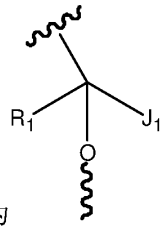
n=0、1 或 2；

m=0、1 或 2；

s=0 或 1；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，p=1、2 或 3；

Q_1 为 

，Q_2 为 R_2；或者 Q_1 为 R_2，Q_2 为 

；

其中：

R_1 选自 H、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，q=1、2 或 3；

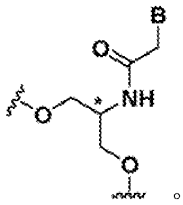
J_1 为 H 或 C_1-C_6 烷基；

R_2 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选

自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，r=1、2 或 3；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

B 是碱基；



其中：所述式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰不是 。

在一些实施方案中，当 X 为 NH-CO 时，R_1 不是 H。

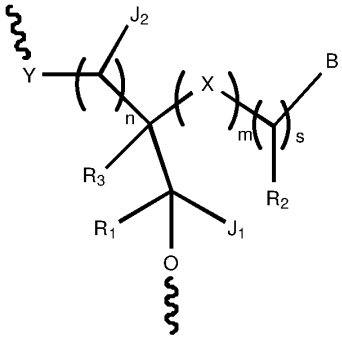
一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。

在一些实施方案中，反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）中的至少一个核苷酸位置处包含式（I-1）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（式 I-1）

其中：Y 选自 O、NH 和 S；

每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，p=1、2 或 3；

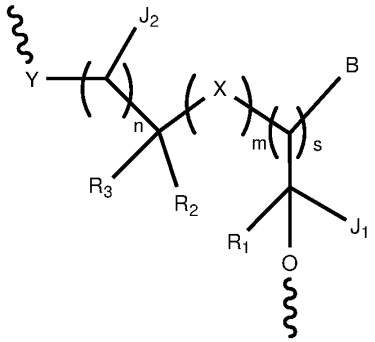
R_1 选自 H、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，q=1、2 或 3；

R_2 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，r=1、2 或 3；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

B 如式（I）中所定义。

在一些实施方案中，反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）中的至少一个核苷酸位置处包含式（I-2）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（I-2）

其中 Y 选自 O、NH 和 S；

每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，p=1、2 或 3；

R_1 选自 H、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，q=1、2 或 3；

R_2 选自 H、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、

-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中R_8选自OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6烯基和C_2-C_6炔基；r=1、2或3；

任选地，R_1和R_2直接相连成环；

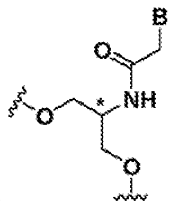
B如式（I）中所定义。

一些实施方案中，B是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B各自独立地选自所述反义链5’区域的第2位至第8位（如第2位、第3位、第4位、第5位、第6位、第7位、第8位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。一些具体的实施方案中，B各自独立地选自所述反义链5’区域的第2位至第8位（如第2位、第3位、第4位、第5位、第6位、第7位、第8位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，上述化学修饰或其互变异构体修饰不是



。

在一些实施方案中，每个 X 独立地选自$CR_4(R_4')$、S、NR_5和NH-CO，其中R_4、R_4'、R_5分别独立地为H或C_1-C_3烷基；

n=0、1或2；m=0、1或2；s=0或1；

每个J_1、J_2分别独立地为H或C_1-C_3烷基；

R_3选自H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_3烷基、C_1-C_3烷氧基、C_2-C_4烯基、C_2-C_4炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中R_6选自OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6烯基和C_2-C_6炔基，p=1、2或3；

R_1选自H、C_1-C_3烷基、C_1-C_3烷氧基、C_2-C_4烯基、C_2-C_4炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中R_7选自OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_4烯基和C_2-C_4炔基，q=1、2或3；

R_2选自H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_3烷基、C_1-C_3烷氧基、C_2-C_4烯基、C_2-C_4炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中R_8选自OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_4烯基和C_2-C_4炔基，r=1、2或3；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环。

B 如式（I）中所定义。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H、甲基、乙基、正丙基或异丙基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H 或甲基；

R_3 选自 H、OH、F、Cl、NH_2、甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、乙烯基、烯丙基、乙炔基、炔丙基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-甲基氨基、-O-乙基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、F、Cl、甲氧基、乙氧基、N_3、乙烯基、烯丙基、乙炔基和炔丙基，p=1 或 2；

R_1 选自 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、乙烯基、烯丙基、乙炔基、炔丙基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、F、Cl、甲氧基、乙氧基、N_3、乙烯基、烯丙基、乙炔基和炔丙基，q=1 或 2；

R_2 选自 H、OH、F、Cl、NH_2、甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、乙烯基、烯丙基、乙炔基、炔丙基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-甲基氨基、-O-乙基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选自 OH、F、Cl、甲氧基、乙氧基、N_3、乙烯基、烯丙基、乙炔基和炔丙基，r=1 或 2；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环。

B 如式（I）中所定义。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些涉及式（I-1）的实施方案中，Y 为 O 或 NH；每个 X 独立地选自 NH-CO、CH_2 和 NH；

n=0 或 1；m=0 或 1；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H；

R_1 选自 H、甲基和 CH_2OH；

R_2 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

R_3 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

B 如式（I）中所定义。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些涉及式（I-2）的实

施方案中，Y 为 O 或 NH；每个 X 独立地选自 NH-CO、CH_2 和 NH；

n=0 或 1；m=0 或 1；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H；

R_1 选自 H、甲基和 CH_2OH；

R_2 选自 H、甲基和 CH_2OH；

R_3 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

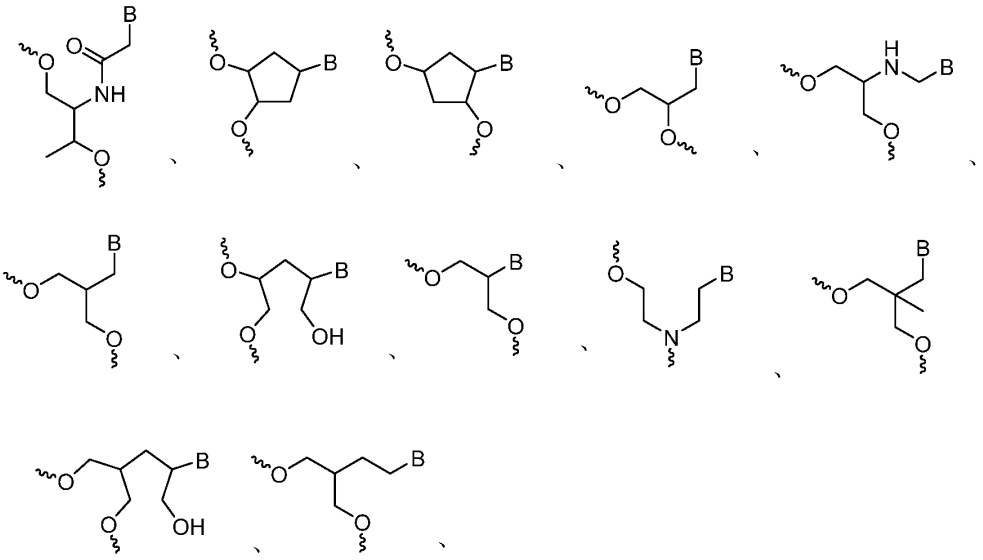
一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

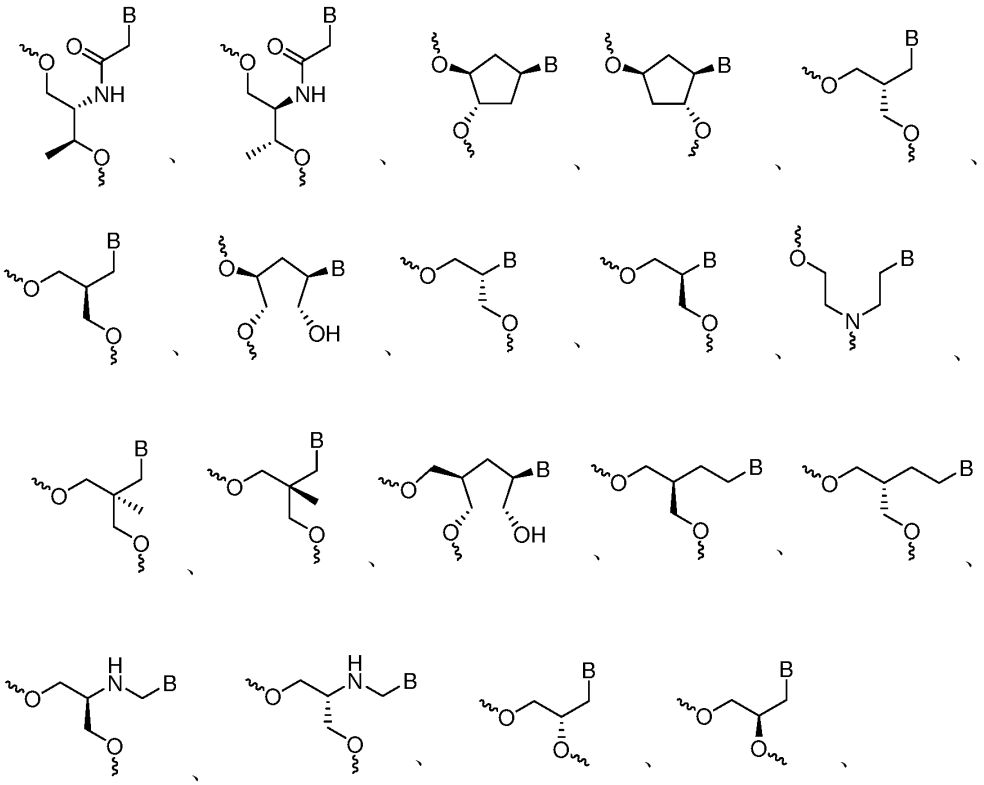
一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中 B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，在一些实施方案中，所述式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰选自：





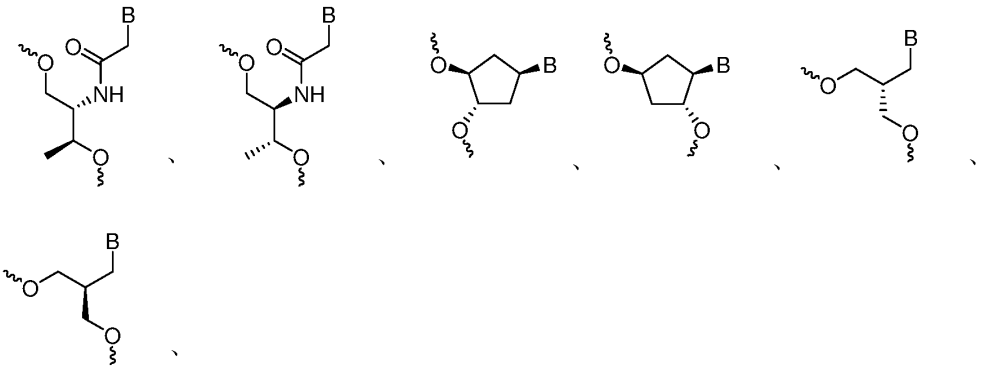
其中：B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，所述式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰选自：



其中：B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

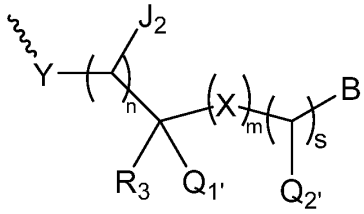
一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。本公开提供了一种 siRNA，其包含形成双链区的正义链与反义链；所述正义链包含至少 15 个连续核苷酸，与 SEQ ID NO：1 的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸；所述反义链包含至少 15 个连续核苷酸序列，与 SEQ ID NO：2 的核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸；其中，大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成。

一些实施方案中，反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）中的至少一个核苷酸位置处包含式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（I’）

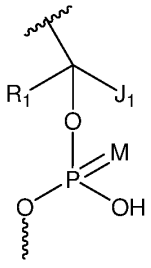
其中：Y 选自 O、NH 和 S；

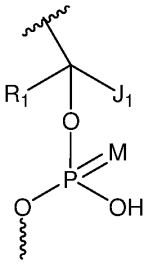
每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

J_2 为 H 或 C_1-C_6 烷基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，p=1、2 或 3；

Q_1'为 

，Q_2'为 R_2；或者 Q_1'为 R_2，Q_2'为 

；

其中：

R_1 选自 H、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，q=1、2 或 3；

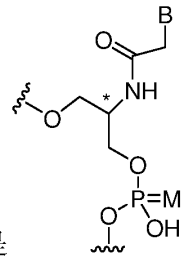
J_1 为 H 或 C_1-C_6 烷基；

R_2 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，r=1、2 或 3；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

B 是碱基；

M 为 O 或 S；



其中：所述式（I'）所示的化学修饰或其互变异构体修饰不是 。

在一些实施方案中，当 X 为 NH-CO 时，R_1 不是 H。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

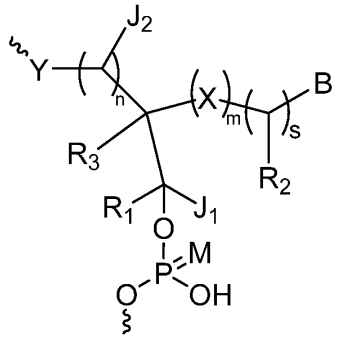
一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞

嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5'区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5'区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，反义链在其 5'区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）中的至少一个核苷酸位置处包含式（I'-1）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（I'-1）

其中：Y 选自 O、NH 和 S；

每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，p=1、2 或 3；

R_1 选自 H、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，q=1、2 或 3；

R_2 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，r=1、2 或 3；

M 为 O 或 S；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

B 如式（I’）中所定义。

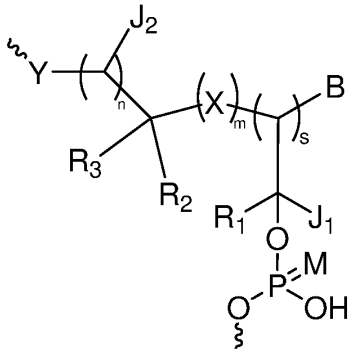
一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）中的至少一个核苷酸位置处包含式（I’-2）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（I’-2）

其中 Y 选自 O、NH 和 S；

每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6

炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中R_6选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6烯基和C_2-C_6炔基，p=1、2 或 3；

R_1选自 H、C_1-C_6烷基、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中R_7选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6烯基和C_2-C_6炔基，q=1、2 或 3；

R_2选自 H、C_1-C_6烷基、C_1-C_6烷氧基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中R_8选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6烯基和C_2-C_6炔基；r=1、2 或 3；

任选地，R_1和R_2直接相连成环；

M 为 O 或 S；

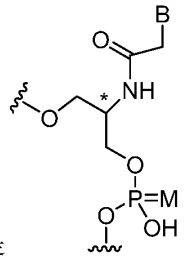
B 如式（I’）中所定义。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，上述化学修饰或其互变异构体修饰不是 

。

在一些实施方案中，当 X 为 NH-CO 时，R_1不是 H。

在一些实施方案中，每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5和 NH-CO，其中R_4、R_4'、R_5分别独立地为 H 或C_1-C_3烷基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H 或 C_1-C_3 烷基；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_3 烷基、C_1-C_3 烷氧基、C_2-C_4 烯基、C_2-C_4 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，p=1、2 或 3；

R_1 选自 H、C_1-C_3 烷基、C_1-C_3 烷氧基、C_2-C_4 烯基、C_2-C_4 炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_4 烯基和 C_2-C_4 炔基，q=1、2 或 3；

R_2 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_3 烷基、C_1-C_3 烷氧基、C_2-C_4 烯基、C_2-C_4 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_4 烯基和 C_2-C_4 炔基，r=1、2 或 3；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环。

在一些实施方案中，每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H、甲基、乙基、正丙基或异丙基；

n=0、1 或 2；m=0、1 或 2；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H 或甲基；

R_3 选自 H、OH、F、Cl、NH_2、甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、乙烯基、烯丙基、乙炔基、炔丙基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-甲基氨基、-O-乙基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、F、Cl、甲氧基、乙氧基、N_3、乙烯基、烯丙基、乙炔基和炔丙基，p=1 或 2；

R_1 选自 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、乙烯基、烯丙基、乙炔基、炔丙基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、F、Cl、甲氧基、乙氧基、N_3、乙烯基、烯丙基、乙炔基和炔丙基，q=1 或 2；

R_2 选自 H、OH、F、Cl、NH_2、甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、乙烯基、烯丙基、乙炔基、炔丙基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-甲基氨基、-O-乙基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选自 OH、F、Cl、甲氧基、乙氧基、N_3、乙烯基、烯丙基、乙炔基和炔丙基，r=1 或 2；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些涉及式（I’-1）的实施方案中，Y 为 O 或 NH；每个 X 独立地选自 NH-CO、CH_2 和 NH；

n=0 或 1；m=0 或 1；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H；

R_1 选自 H、甲基和 CH_2OH；

R_2 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

R_3 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些涉及式（I’-2）的实施方案中，Y 为 O 或 NH；每个 X 独立地选自 NH-CO、CH_2 和 NH；

n=0 或 1；m=0 或 1；s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H；

R_1 选自 H、甲基和 CH_2OH；

R_2 选自 H、甲基和 CH_2OH；

R_3 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲

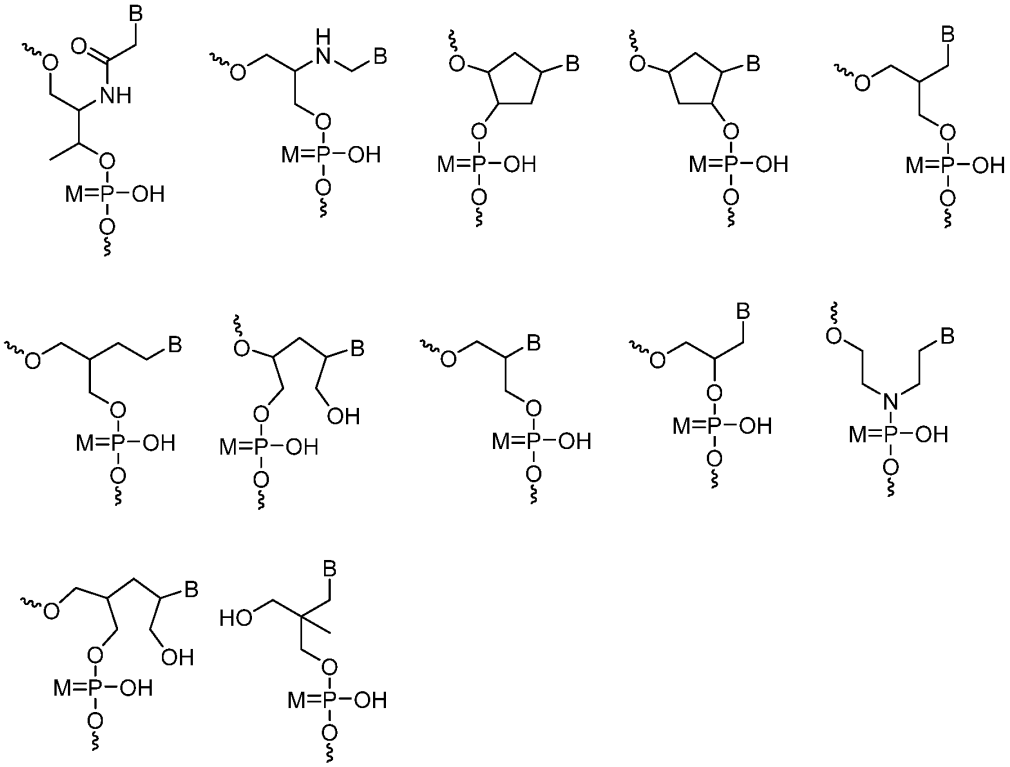
嗪和 3-硝基吡咯中的那些。

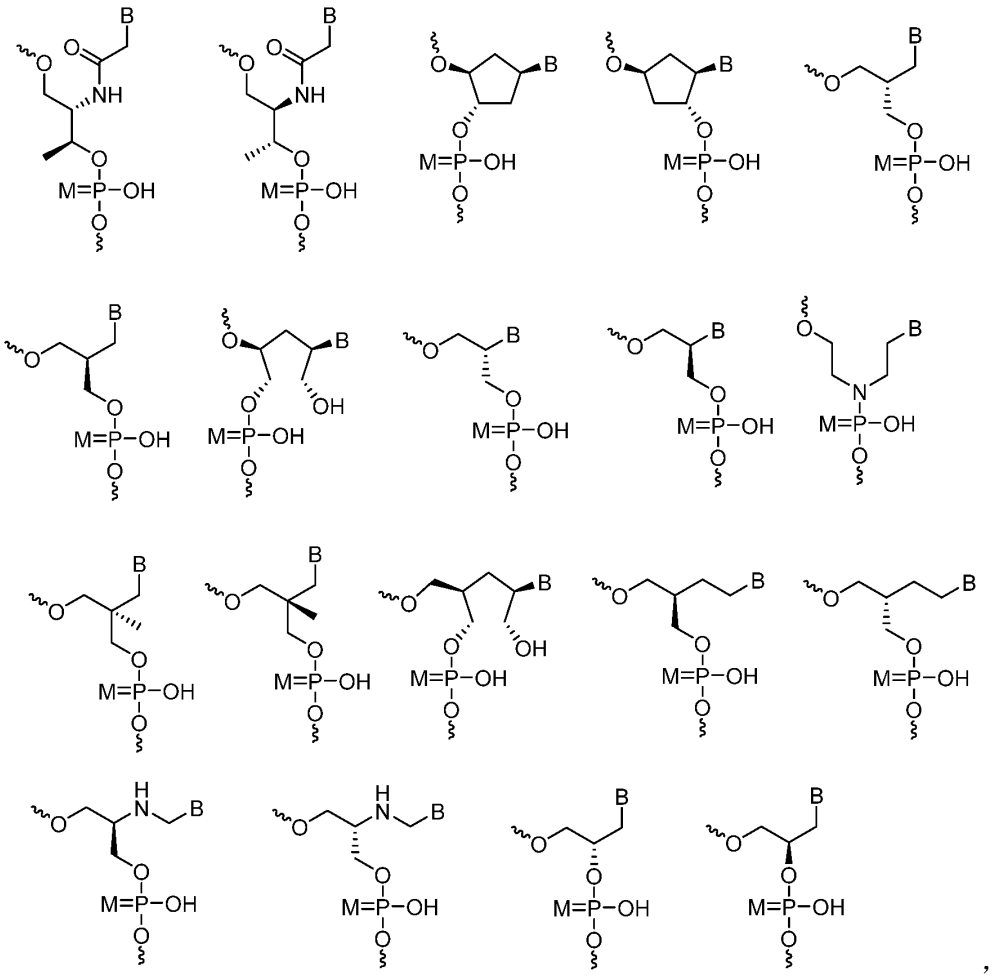
一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，所述式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰选自：





其中，M 为 O 或 S；

B 如式（I’）中所定义。

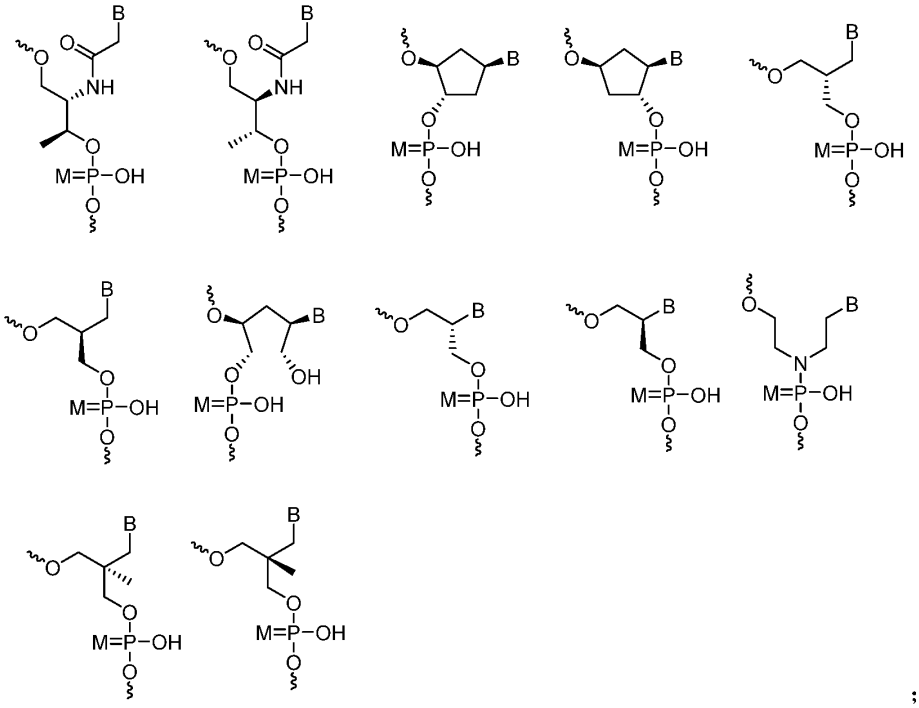
一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，所述式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰选自：



；

其中：M 为 O 或 S；

B 如式（I’）中所定义。

一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

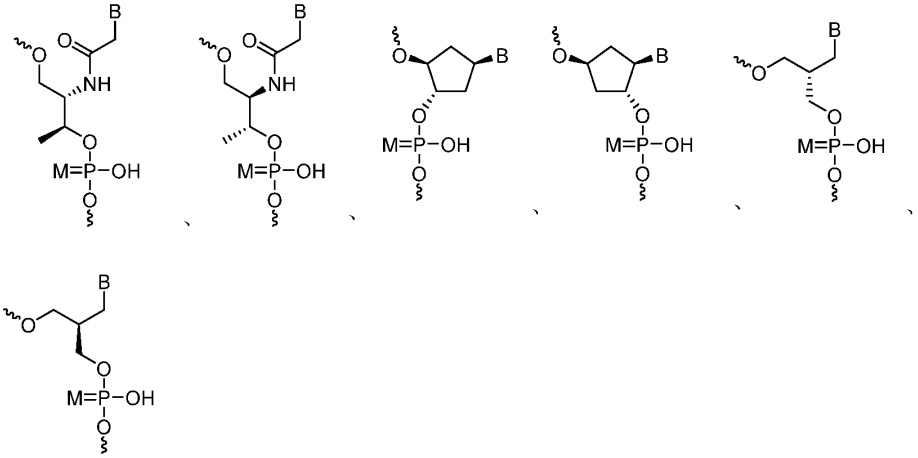
一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所

述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。

在一些实施方案中，所述式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰选自：



其中：M 为 O 或 S；

B 如式（I’）中所定义。

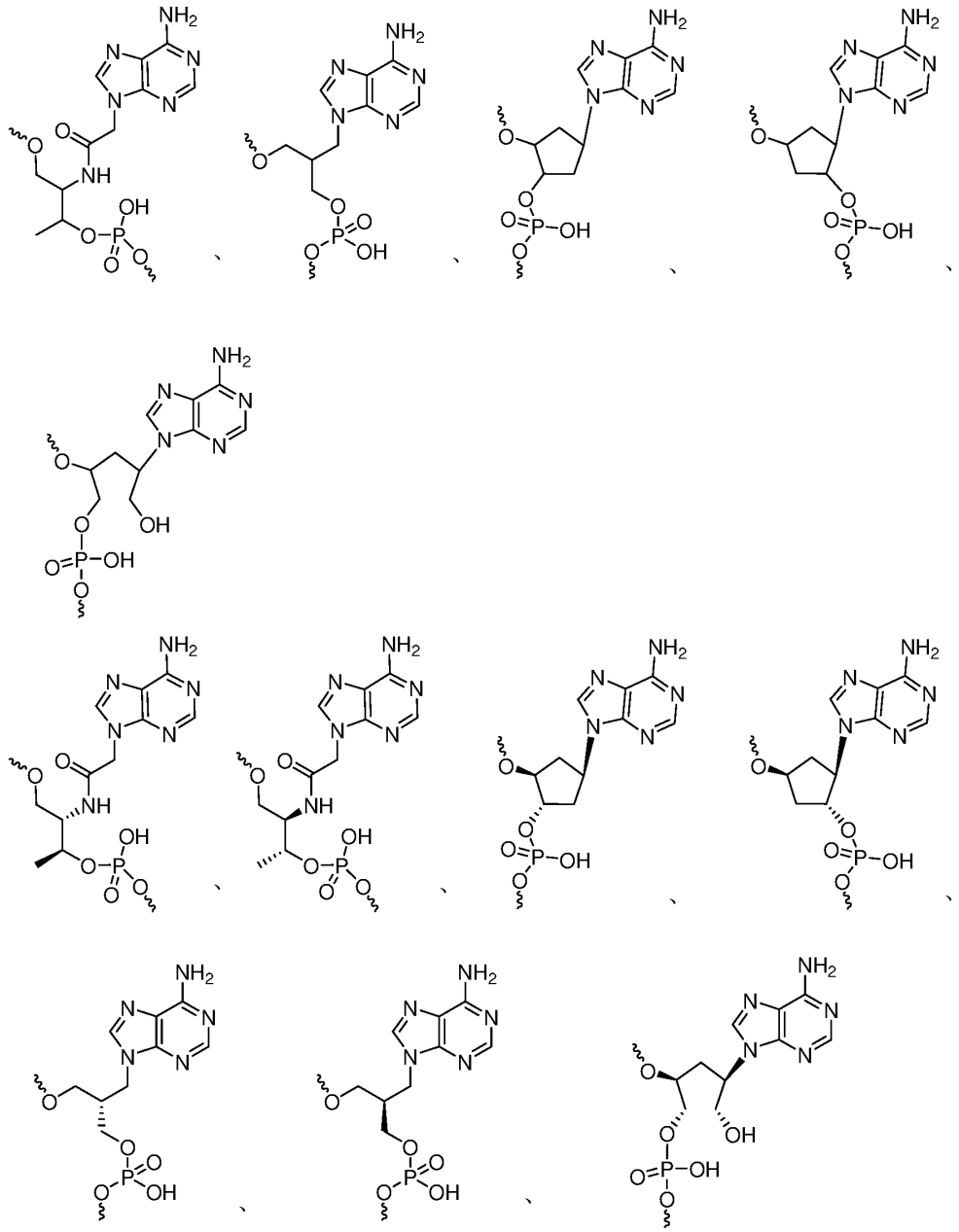
一些实施方案中，B 是碱基；例如选自嘌呤碱基、嘧啶碱基、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯中的那些。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、异鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、C2 修饰的嘌呤、N8 修饰的嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、N6-烷基腺嘌呤、O6-烷基鸟嘌呤、7-脱氮嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假胞嘧啶、尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、C5 修饰的嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯。

一些实施方案中，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；

一些实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

一些具体的实施方案中，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位（如第 2 位、第 3 位、第 4 位、第 5 位、第 6 位、第 7 位、第 8 位）的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的天然碱基。在一些实施方案中，所述式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰包括但不限于：



以及它们结构中的腺嘌呤被置换为鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶的那些。

在一些实施方案中，反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位、第 3 位至第 8 位、第 4 位至第 8 位、第 5 位至第 8 位、第 5 位至第 7 位中的至少一个核苷酸位置处包含上述式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰。

在一些实施方案中，本公开的 siRNA，反义链在其 5’区域的第 5 位、第 6 位或第 7 位包含上述式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰。

一些具体的实施方案中，式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰在其 5’区域的第 5 位，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨

基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；在一些实施方案中选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶。

一些具体的实施方案中，式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰在其 5’区域的第 6 位，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；在一些实施方案中选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶。

一些具体的实施方案中，式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰在其 5’区域的第 7 位，B 选自腺嘌呤、鸟嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、6-二甲基氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、吲哚、5-硝基吲哚和 3-硝基吡咯；在一些实施方案中选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶。

在一些实施方案中，正义链和反义链各自独立地具有 16 至 35 个、16 至 34 个、17 至 34 个、17 至 33 个、18 至 33 个、18 至 32 个、18 至 31 个、18 至 30 个、18 至 29 个、18 至 28 个、18 至 27 个、18 至 26 个、18 至 25 个、18 至 24 个、18 至 23 个、19 至 25 个、19 至 24 个、或 19 至 23 个核苷酸。

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

在一些实施方案中，反义链与靶序列至少部分地反向互补以介导 RNA 干扰。在一些实施方案中，反义链与靶序列之间存在不多于 5 个、不多于 4 个、不多于 3 个、不多于 2 个、不多于 1 个错配。在一些实施方案中，反义链与靶序列完全反向互补。

在一些实施方案中，正义链与反义链至少部分地反向互补以形成双链区。在一些实施方案中，正义链与反义链之间存在不多于 5 个、不多于 4 个、不多于 3 个、不多于 2 个、不多于 1 个错配。在一些实施方案中，正义链与反义链完全反向互补。

在一些实施方案中，本公开 siRNA 包含一个或两个平端。

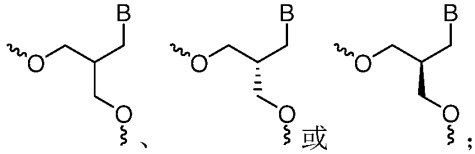
一些具体的实施方案中，siRNA 包含具有 1 至 4 个未配对核苷酸的突出端，例如 1 个、2 个、3 个、4 个。

在一些实施方案中，本公开 siRNA 包含位于所述 siRNA 反义链 3’端的突出端。

一些实施方案中，本公开 siRNA 反义链核苷酸序列包含或为 SEQ ID NO：47 至 SEQ ID NO：68 任一的核苷酸序列，其中，W’表示含有本公开所定义的式（I）

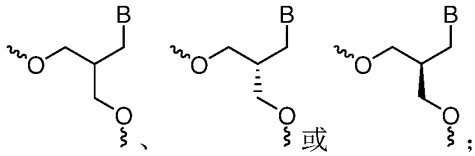
或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸。

一些具体的实施方案中，W’选自：



；其中：B 选自鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶。

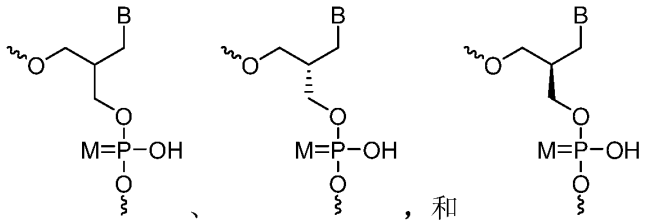
一些具体的实施方案中，W’选自：



；其中：B 选自表 12 中 SEQ ID NO：47 至 SEQ ID NO：68 与 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 的 5’区域的第 7 位的碱基，例如 SEQ ID NO：47 与 SEQ ID NO：25 对应、SEQ ID NO：68 与 SEQ ID NO：46 对应、SEQ ID NO：52 与 SEQ ID NO：30 对应。

一些具体的实施方案中，本公开 siRNA 反义链核苷酸序列包含或为 SEQ ID NO：47 至 SEQ ID NO：68 任一的核苷酸序列，其中，W’表示含有本公开所定义的式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸。

一些具体的实施方案中，W’选自：

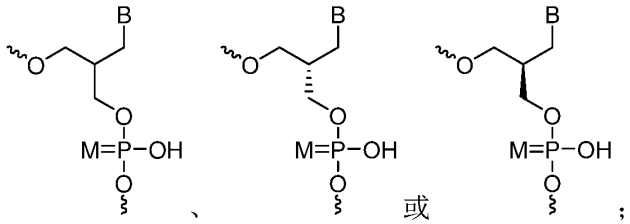


；

其中：M 为 O 或 S；其中：B 选自鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶。

一些具体的实施方案中，M 为 S。一些具体的实施方案中，M 为 O。

一些具体的实施方案中，W’选自：



；

其中：M 为 O 或 S；其中：B 选自表 12 中 SEQ ID NO：47 至 SEQ ID NO：68 与 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 的 5’区域的第 7 位的碱基，例如 SEQ ID NO：47 与 SEQ ID NO：25 对应、SEQ ID NO：68 与 SEQ ID NO：46 对应、SEQ ID NO：52 与 SEQ ID NO：30 对应。

一些具体的实施方案中，M 为 S。一些具体的实施方案中，M 为 O。

本公开还提供了一种 siRNA，其为经修饰的上述 siRNA，除含有上述式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰外，正义链和/或反义链中至少一个另外的核苷酸为修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，除含有上述式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰外，全部另外的核苷酸为修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，修饰的核苷酸相互独立地选自脱氧-核苷酸、3’-末端脱氧-胸腺嘧啶（dT）核苷酸、2’-O-甲基修饰的核苷酸、2’-氟修饰的核苷酸、2’-脱氧-修饰的核苷酸、锁核苷酸、非锁核苷酸、构象限制性核苷酸、限制性乙基核苷酸、无碱基核苷酸、2’-氨基-修饰的核苷酸、2’-O-烯丙基-修饰的核苷酸、2’-C-烷基-修饰的核苷酸、2’-羟基-修饰的核苷酸、2’-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2’-O-烷基-修饰的核苷酸、吗啉基核苷酸、氨基磷酸酯、包含非天然碱基的核苷酸、四氢吡喃修饰的核苷酸、1,5-脱水己糖醇修饰的核苷酸、环己烯基修饰的核苷酸、包含硫代磷酸酯基的核苷酸、包含甲基膦酸酯基的核苷酸、包含 5’-磷酸酯的核苷酸及包含 5’-磷酸酯模拟物的核苷酸。

在一些实施方案中，修饰的核苷酸相互独立地选自：2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-脱氧-2'-氟代修饰的核苷酸、3'-脱氧-胸腺嘧啶（dT）核苷酸、异核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA 和 GNA；

在一些实施方案中，修饰的核苷酸相互独立地选自：2'-甲氧基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸和 2'-脱氧-修饰的核苷酸。

在本公开的上下文中，2’-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。在一些实施方案中，2'-烷氧基修饰的核苷酸为 2’-甲氧基修饰的核苷酸（2'-OMe）。在一些实施方案中，2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸，例如可以是 2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸（2'-MOE）。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、6、14 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、6、9、12 和 14 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、6、10、12 和 14 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、9、12、14 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、10、12、14 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、9、12、14、16 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、10、12、14、16 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、9、10、12、14、16 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-脱氧核苷酸或 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、6 和 14 的核苷酸各自独立地为 2'-氟代修饰的核苷酸；

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸各自独立地为 2'-氟代修饰的核苷酸；

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、6、12 和 14 位的核苷酸各自独立地为 2'-氟代修饰的核苷酸；

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、12、14、16 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-氟代修饰的核苷酸；

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、9、12、14、16 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-氟代修饰的核苷酸；

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，反义链的第 2、4、6、10、12、14、16 和 18 位的核苷酸各自独立地为 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，本公开所述的 siRNA 正义链具有如下式所示的核苷酸序列：

5’-$N_aN_aN_aN_aXN_aN_bN_bN_bN_aN_aN_aN_aN_aN_aN_aN_aN_aN_a$-3’

其中，每个 N_a 和 N_b 各自独立地表示修饰的核苷酸或者未修饰的核苷酸，且 N_a 和 N_b 是不同的修饰；每个 X 独立地为 N_a 或 N_b。

在一些实施方案中，本公开所述的 siRNA 反义链具有如下式所示的核苷酸序列：

5’-N_a’N_b’N_a’X’N_a’N_b’W’N_a’X’Y’N_a’X’N_a’N_b’N_a’X’N_a’X’N_a’N_a’N_a’-3’；

其中，每个 N_a’和 N_b’独立地表示修饰的核苷酸或者未修饰的核苷酸，其中 N_a’和 N_b’上的修饰不同；每个 X’独立地为 N_a’或 N_b’，Y’为 N_a’或 N_b’，W’表示含有本公开任一式（I）或式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，X’和 Y’上的修饰不同。

在一些实施方案中，N_a 为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b 为 2'-氟代修饰的核苷酸或 2'-脱氧-修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，N_a’为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b’为 2'-氟代修饰的核苷

酸或 2'-脱氧-修饰的核苷酸；

在一些具体的实施方案中，N_a 为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b 为 2'-氟代修饰的核苷酸；

在一些具体的实施方案中，N_a'为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b'为 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，本公开所述的 siRNA 反义链具有如下式所示的核苷酸序列：

5'-N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'W'N_a'X'Y'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_a'N_a'-3'；

其中，每个 X'独立地为 N_a'或 N_b'，Y'为 N_a'或 N_b'，且 X'和 Y'上的修饰不同；N_a'为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b'为 2'-氟代修饰的核苷酸；W'表示含有本公开任一式（I）或式（I'）所示的化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，本公开所述的 siRNA 正义链具有如下式所示的核苷酸序列：

5'-$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_b$$N_b$$N_b$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$-3'；或，

5'-$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_b$$N_a$$N_b$$N_b$$N_b$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$$N_a$-3'；

其中，N_a 为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b 为 2'-氟代修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，本公开所述的 siRNA 反义链具有如下式所示的核苷酸序列：

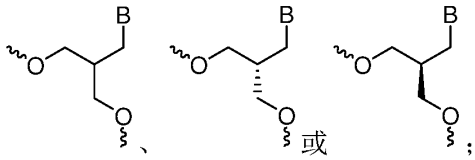
5'-N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'W'N_a'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_a'N_a'-3'；或，

5'-N_a'N_b'N_a' N_b'N_a'N_b'W'N_a'N_b'N_a'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_b'N_a'N_a'N_a'-3'；

其中，N_a 为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b 为 2'-氟代修饰的核苷酸；和/或 N_a'为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，N_b'为 2'-氟代修饰的核苷酸。

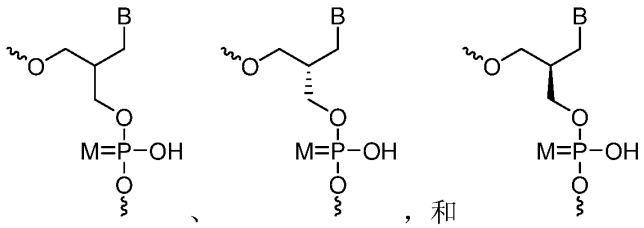
W'表示含有本公开任一式（I）或式（I'）所示的化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸。

在一些具体的实施方案中，W'表示含有化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸；所述化学修饰或其互变异构体修饰选自：



、 或 ；其中：B 选自鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶；在一些具体的实施方案中，B 选自反义链在其 5'区域的第 7 位的碱基。

在一些具体的实施方案中，W'表示含有化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸；所述化学修饰或其互变异构体修饰选自：



、 ，和 ；其中：M 为 O 或 S；其中：B 选自鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶；在一些具体的实施方案中，B 选自反义链在其 5’区域的第 7 位的碱基。

一些具体的实施方案中，M 为 S。一些具体的实施方案中，M 为 O。

在一些实施方案中，正义链和/或反义链中至少一个磷酸酯基为修饰的磷酸酯基，所述修饰使得所述 siRNA 在生物样品或环境中具有增加的稳定性。在一些实施方案中，所述修饰的磷酸酯基为硫代磷酸酯基。具体地，硫代磷酸酯基是指一个非桥接氧原子被硫原子替代而修饰的磷酸二酯基。

在一些实施方案中，硫代磷酸酯基存在于选自以下的位置中的至少一处：

所述正义链的 5'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端第 1 个核苷酸末端；

所述正义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 3'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端第 1 个核苷酸末端；

所述反义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；以及

所述反义链的 3'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间。

在一些实施方案中，正义链和/或反义链中包括多个硫代磷酸酯基，所述硫代磷酸酯基存在于：

所述正义链的 5'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述正义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 5'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间；

所述反义链的 3'末端第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间；

以及可选的，所述正义链的 3'末端第 1 个核苷酸末端，和/或，

可选的，所述正义链的 3'末端第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间。

在一些实施方案中，正义链选自如下式所示的核苷酸序列：

5’-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNm-3’，或，

5’-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNm-3’，或，

5’-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNms-3’，或，

5’-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNms-3’，或，

5’-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNm-3’，或，

5’-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNm-3’，或，

5’-NmsNmsNmNmNfNmNfNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNms-3’，或，

5’-NmsNmsNmNmNmNmNfNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmsNms-3’，

其中，Nm 表示 2'-甲氧基修饰的任意核苷酸，例如 2'-甲氧基修饰的 C、G、U、A、T；Nf 表示 2'-氟代修饰的任意核苷酸，例如 2'-氟代修饰的 C、G、U、A、T；

小写字母 s 表示与该字母 s 两侧相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接；小写字母 s 在 3’端第一个时表示与该字母 s 上游相邻的一个核苷酸末端为硫代磷酸酯基。

在一些实施方案中，反义链具有如下式所示的核苷酸序列：

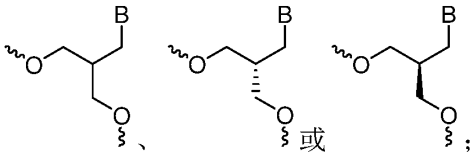
5’-Nm’sNf’sNm’Nf’Nm’Nf’W’Nm’Nm’Nf’Nm’Nf’Nm’Nf’Nm’Nf’Nm’Nf’Nm’s Nm’sNm’-3’ 或，

5’-Nm’sNf’sNm’Nf’Nm’Nf’W’Nm’Nf’Nm’Nm’Nf’Nm’Nf’Nm’Nf’Nm’Nf’Nm’s Nm’sNm’-3’

其中，Nm’表示 2'-甲氧基修饰的任意核苷酸，例如 2'-甲氧基修饰的 C、G、U、A、T；Nf’表示 2'-氟代修饰的任意核苷酸，例如 2'-氟代修饰的 C、G、U、A、T；

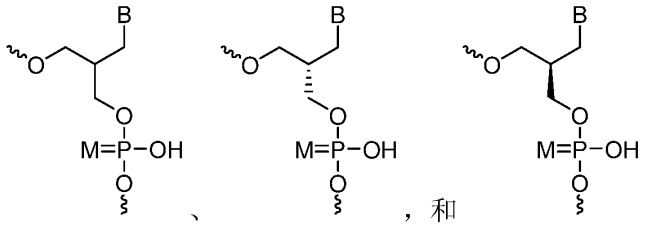
小写字母 s 表示与该字母 s 两侧相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接，小写字母 s 在 3’端第一个时表示与该字母 s 上游相邻的一个核苷酸末端为硫代磷酸酯基；

W’表示化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸；所述化学修饰或其互变异构体修饰选自：



、 或 ；其中：B 选自鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶，在一些实施方案中选自反义链在其 5’区域的第 7 位的碱基。

在一些具体的实施方案中，W’表示含有化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸；所述化学修饰或其互变异构体修饰选自：



、 ，和 ；其中：M 为 O 或 S；其中：B 选自鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶；在一些具体的实施方案中，B 选自反义链在其 5’区域的第 7 位的碱基。

一些具体的实施方案中，M 为 S。一些具体的实施方案中，M 为 O。

一些实施方案中，本公开 siRNA 正义链包含或为 SEQ ID NO：69 至 SEQ ID NO：110 任一。

一些实施方案中，本公开 siRNA 反义链包含或为 SEQ ID NO：111 至 SEQ ID NO：172 任一。

本公开还提供了一种 siRNA 缀合物，其包含上述 siRNA 中的任意一种和连接至所述 siRNA 的靶向配体。

在一些实施方案中，siRNA 和所述靶向配体共价或非共价连接。

在一些实施方案中，所述靶向配体连接至所述 siRNA 的正义链 3’末端。

在一些实施方案中，为了促进 siRNA 进入细胞，可以在 siRNA 正义链的末端引入胆固醇等亲脂性的基团，亲脂性的基团包括以共价键与小干扰核酸结合，如末端引入胆固醇、脂蛋白、维生素 E 等，以利于通过由脂质双分子层构成的细胞膜与细胞内的 mRNA 发生作用。同时，siRNA 也可以进行非共价键修饰，如通过疏水键或离子键结合磷脂分子、多肽、阳离子聚合物等增加稳定性和生物学活性。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团与 siRNA 末端连接。

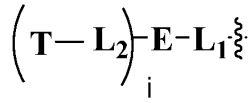
在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团与 siRNA 末端间接连接。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团与 siRNA 末端直接连接。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团或硫代磷酸酯基团与 siRNA 末端直接连接。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团或硫代磷酸酯基团与 siRNA 正义链 3’末端直接连接。

在一些实施方案中，靶向配体结构如下式（II）所示，



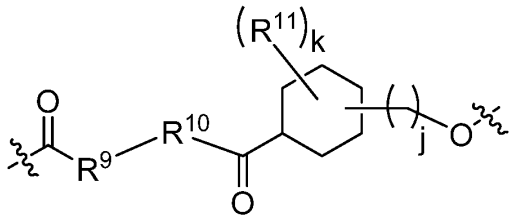
(II)

其中 T 为靶向部分，E 为分支基团，L_1 为接头部分，L_2 为靶向部分与分支基团间的栓系部分，其中 i 选自 1 到 10 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。

在一些实施方案中，i 选自 2 到 8 的整数。

在一些实施方案中，i 选自 3 到 5 的整数。

在一些实施方案中，L_1 为



(C-1)

，

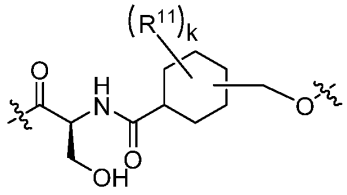
R^9及R^{10}各自独立的选自-S-，-NH-，-O-，-C(O)-，-OC(O)-，-C(O)O-，-NHC(O)-，-C(O)NH-，-CH_2-，-CH_2NH-，-CH_2O-，-NH-C(O)-CH_2-，-C(O)-CH_2-NH-，-NH（CO）NH-，3-12元杂环基，所述-CH_2-任选被选自卤素，烷基，烷氧基，烷氨基的取代基取代，所述烷基任选进一步被选自羟基、氨基、卤素的取代基取代；

R^{11}选自氘，卤素，烷基，氨基，氰基，硝基，烯基，炔基，羧基，羟基，巯基，烷巯基，烷氧基，烷氨基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，-CONH $_2$，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，-S(O)ONH_2，-S(O)ONH-烷基，所述的烷基，烯基、炔基、烷基巯基，烷基氧基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，-S(O)ONH-烷基，任选进一步被选自卤素，羟基，氨基，巯基的取代基取代；

所述k选自0，1，2，3，4；

所述j选自1到20的整数（例如0，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20）。

在一些实施方案中，L_1为

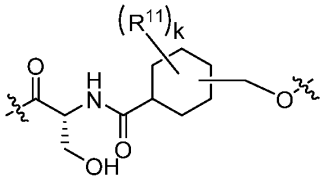


(C-2)

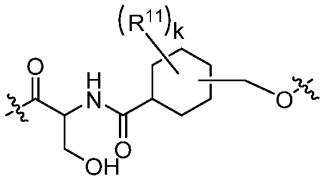
，其中R^{11}选自氘，卤素，烷基，氨基，氰基，硝基，烯基，炔基，羧基，羟基，巯基，烷巯基，烷氧基，烷氨基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，-CONH $_2$，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，-S(O)ONH_2，-S(O)ONH-烷基，所述的烷基，烯基、炔基、羧基、烷基巯基，烷基氧基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，-S(O)ONH-烷基，选进一步被选自卤素，羟基，氨基，巯基的取代基取代；

所述的k选自0，1，2，3，4。

在一些实施方案中，L_1为

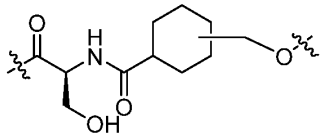

(C-2')

或


(C-2")

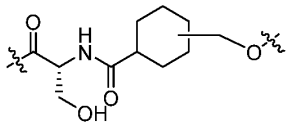
，其中 R^{11} 选自氘，卤素，烷基，氨基，氰基，硝基，烯基，炔基，羧基，羟基，巯基，烷巯基，烷氧基，烷氨基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，$-CONH_2$，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，$-S(O)ONH_2$，-S(O)ONH-烷基，所述的烷基，烯基、炔基、羧基、烷基巯基，烷基氧基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，-S(O)ONH-烷基，选进一步被选自卤素，羟基，氨基，巯基的取代基取代；所述的 k 选自 0，1，2，3，4。

在一些实施方案中，L_1 为

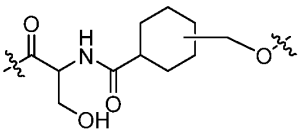

(C-3)

。

在一些实施方案中，L_1 为

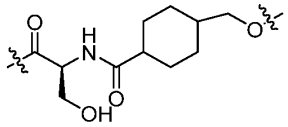

(C-3')

或


(C-3")

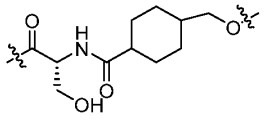
。

在一些实施方案中，L_1 为

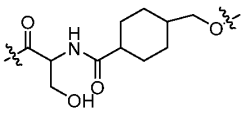

(C-4)

。

在一些实施方案中，L_1 为

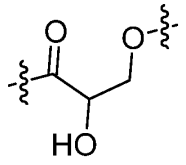

(C-4')

或


(C-4")

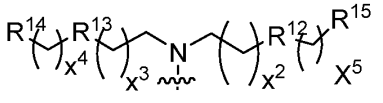
。

在一些实施方案中，L_1 为


(C-5)

。

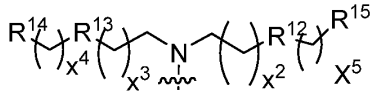
在一些实施方案中，靶向配体中 E 为


(E-1)

，

所述 R^{12}、R^{13}、R^{14} 及 R^{15} 各自独立的选自-C(O)NH-，-C(O)-，所述的羰基任选进一步被烷基取代，所述的烷基任选进一步被选自烷基，羟基，-C(O)O-，-C(O)O-烷基-，-C(O)NH-取代；

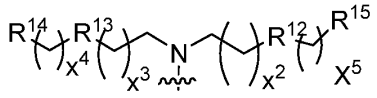
所述 X^2、X^3、X^4 及 X^5 各自独立的选自 0 到 10 的整数（例如 0，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10）。



在一些实施方案中，靶向配体中 E 为 (E-1) ，

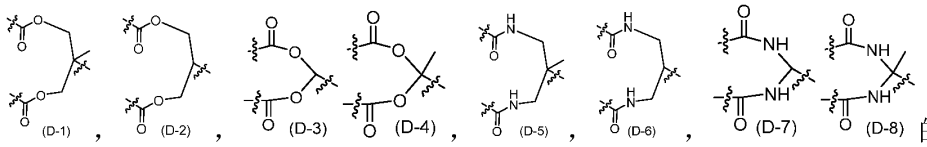
所述 R^{12}、R^{13}、R^{14} 及 R^{15} 各自独立的选自-C(O)NH-，-C(O)-，所述的-C(O)NH-，-C(O)-任选进一步被烷基取代，所述的烷基任选进一步被选自烷基，羟基，-C(O)O-，-C(O)O-烷基-，-C(O)NH-取代；

所述 X^2、X^3、X^4 及 X^5 各自独立的选自 0 到 10 的整数（例如 0，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10）。

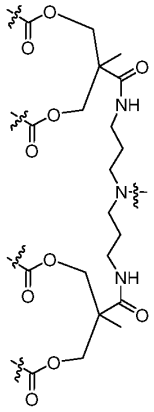


在一些实施方案中，靶向配体中 E 为 (E-1) ，

所述 R^{12}、R^{13}、R^{14} 及 R^{15} 各自独立的选自-C(O)NH-，-C(O)-，所述的-C(O)NH-，-C(O)-进一步被选自

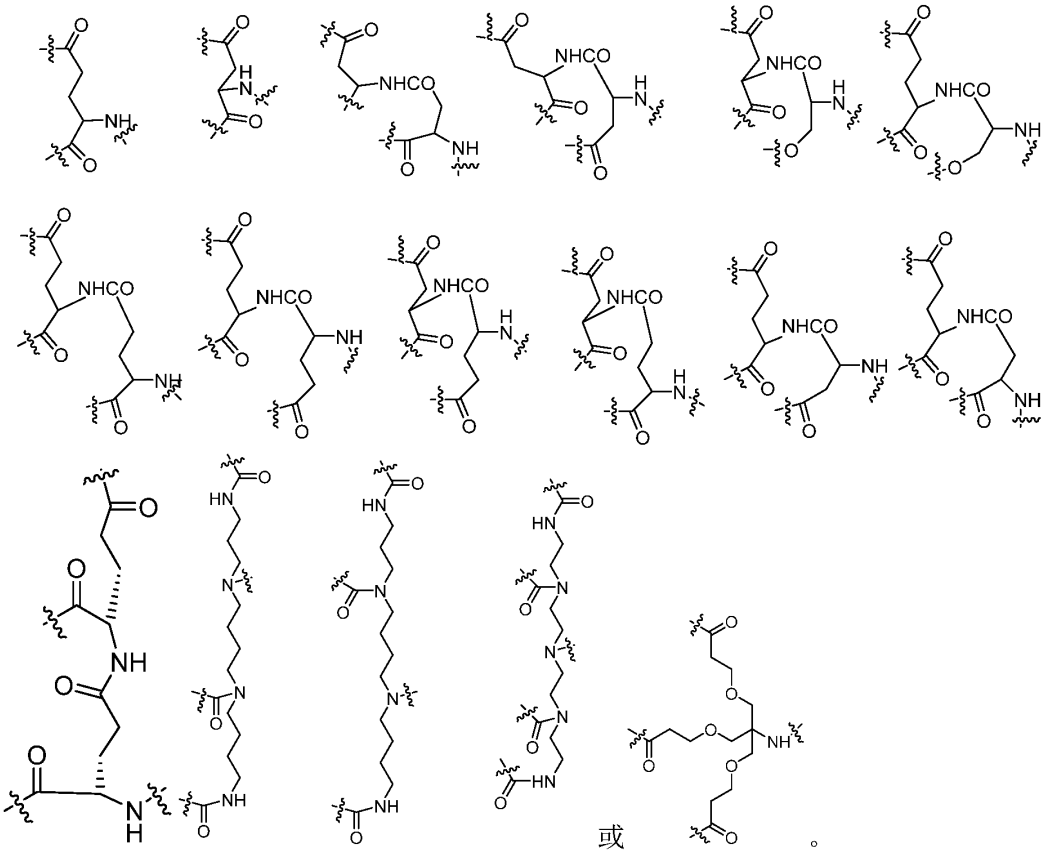


的取代基取代，所述 X^2、X^3、X^4 及 X^5 各自独立的选自 0 到 10 的整数（例如 0，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10）。

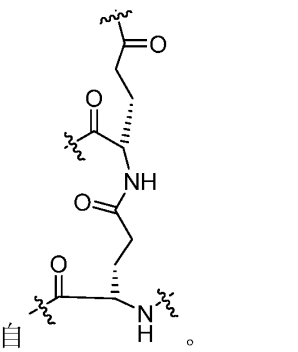


在一些实施方案中，靶向配体中 E 为 (E-2) 。

在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自：



或

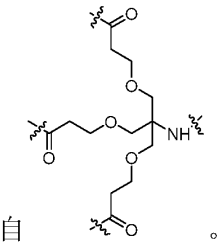


。

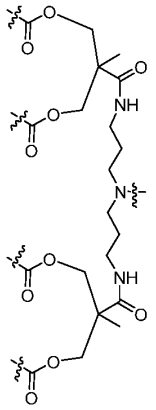
在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自

。

在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自

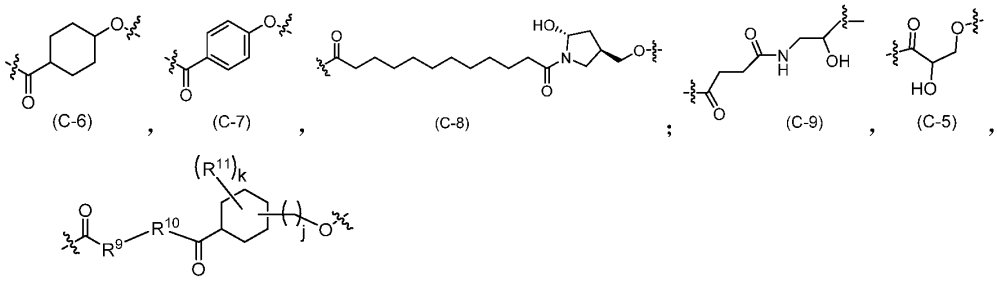


。



(E-2)

在一些实施方案中，靶向配体中 E 为 ，L_1 选自如下结构：



(C-6) ， (C-7) ， (C-8) ； (C-9) ， (C-5) ，

(C-1) ，

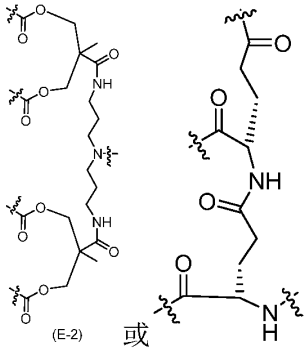
或者

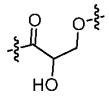
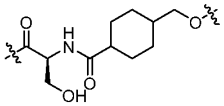
R^9 及 R^{10} 各自独立的选自-S-，-NH-，-O-，-S-，-C(O)-，-OC(O)-，-C(O)O-，-NHC(O)-，-C(O)NH-，$-CH_2-$，$-CH_2NH-$，$-CH_2O-$，-NH-C(O)-CH_2-，-C(O)-CH_2-NH-，-NH（CO）NH-，3-12 元杂环基，所述-CH_2-任选被选自卤素，烷基，烷氧基，烷氨基的取代基取代，所述烷基任选进一步被选自羟基、氨基、卤素的取代基取代；

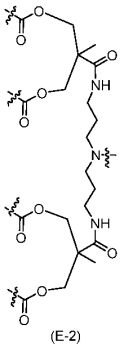
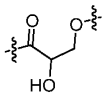
R^{11} 选自氘，卤素，烷基，氨基，氰基，硝基，烯基，炔基，羧基，羟基，巯基，烷巯基，烷氧基，烷氨基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，$-CONH_2$，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，$-S(O)ONH_2$，-S(O)ONH-烷基，所述的烷基，烯基、炔基、烷基巯基，烷基氧基，-C(O)-烷基，-C(O)-O-烷基，-CONH-烷基，-OC(O)-烷基，-NH-C(O)-烷基，-S(O)O-烷基，-S(O)ONH-烷基，任选进一步被选自卤素，羟基，氨基，巯基的取代基取代；

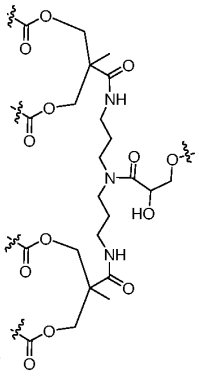
所述的 k 选自 0，1，2，3，4；

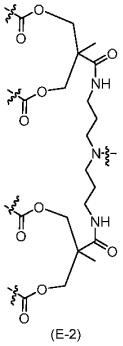
所述的 j 选自 0，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20。

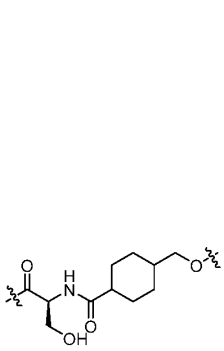
在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自： (E-2) 或 ，L_1 选自：

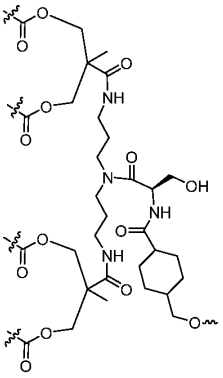
 (C-5) ，或  (C-4) 。

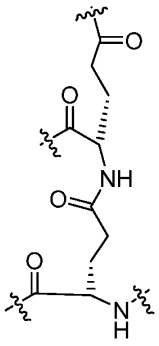
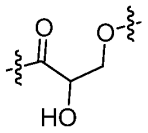
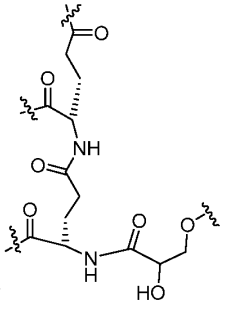
在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自： (E-2) ，L_1 选自： (C-5) ，即

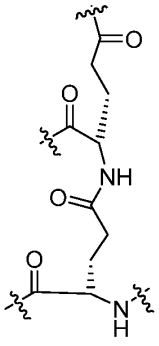
E-L_1 为  。

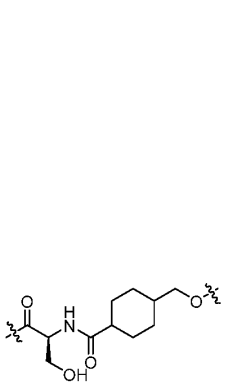
在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自： (E-2) ，L_1 选自：


(C-4)

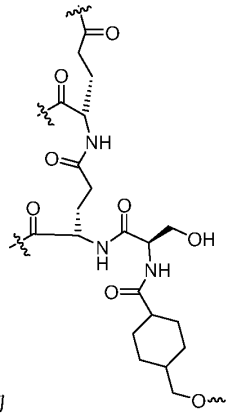
，即 E-L_1 为 。

在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自 ，L_1 选自 
(C-5)
，即 E-L_1 为 。

在一些实施方案中，靶向配体中 E 选自 ，L_1 选自


(C-4)

，即 E-L_1 为


。

本公开中 L_2 为靶向部分与分支基团间的栓系部分，L_2 在分支基团和各靶向部分之间发挥连接、间隔作用。

在一些实施方案中，L_2 的一端直接连接至靶向配体，而另一端直接连接至分支基团 E。

在一些实施方案中，L_2 的一端直接连接至靶向配体，而另一端间接地连接至分支基团 E。

在一些实施方案中，L_2 的一端间接连接至靶向配体，而另一端间接地连接至分支基团 E。

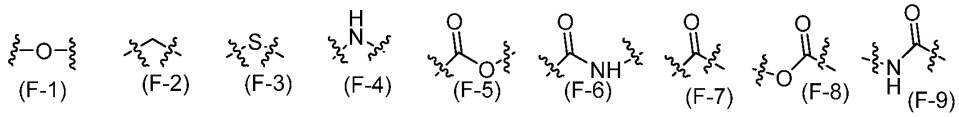
在一些实施方案中，本文公开的靶向配体包括 2 个 L_2 和 2 个靶向部分。

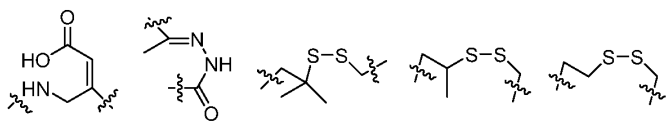
在一些实施方案中，本文公开的靶向配体包括 3 个 L_2 和 3 个靶向部分。

在一些实施方案中，本文公开的靶向配体包括 4 个 L_2 和 4 个靶向部分。

在一些实施方案中，本文公开的靶向配体包括多个 L_2 和多个靶向部分。

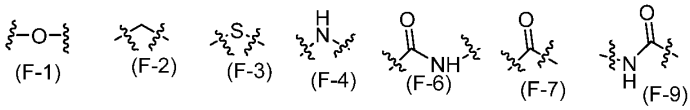
在一些实施方案中，本公开中 L_2 为任选自 1 到 20（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20）个任选自


(F-1) (F-2) (F-3) (F-4) (F-5) (F-6) (F-7) (F-8) (F-9)


(F-10) (F-11) (F-12) (F-13) (F-14)

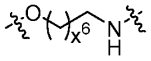
，取代的或未取代的环烷基（例如环己基，环丙基，环丁基，环戊基，环庚基，环辛基等），取代的或未取代的环烯基（例如环己烯基，环丁烯基，环戊烯基，环庚烯基，环辛烯基，环己二烯基，环戊二烯基，环庚二烯基，环辛二烯基等），取代的或未取代的芳基（例如苯基，萘基，联萘基，蒽基等），取代的或未取代的杂芳基（例如吡啶基，嘧啶基，吡咯，咪唑，呋喃，苯并呋喃，吲哚等）和取代的或未取代的杂环基（例如四氢呋喃，四氢吡喃，哌啶，吡咯烷等）的基团的共价组合。

在一些实施方案中，本公开中 L_2 由 1 到 20 个（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20）任选自



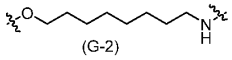
的基团的共价组合。

在一些实施方案中，靶向配体包括具有如下所示结构的 L_2，



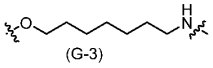
，其中 x^6 是从 1 至 20 的整数（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20）。

在一些实施方案中，靶向配体包括具有如下所示结构的 L_2，



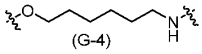
。

在一些实施方案中，靶向配体包括具有如下所示结构的 L_2，



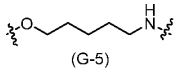
。

在一些实施方案中，靶向配体包括具有如下所示结构的 L_2，



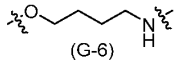
。

在一些实施方案中，靶向配体包括具有如下所示结构的 L_2，



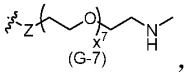
。

在一些实施方案中，靶向配体包括具有如下所示结构的 L_2，

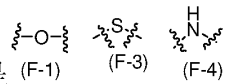


。

在一些实施方案中，靶向配体包括具有如下所示结构的 L_2，

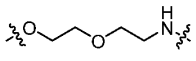


，其中，x^7 是从 1 至 20 的整数（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20），并且 Z 是



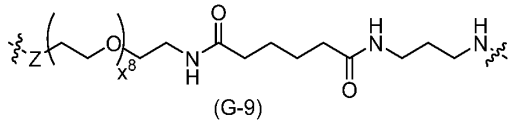
。

在一些实施方案中，靶向配体具有如下所示结构的 L_2，



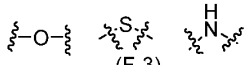
。

在一些实施方案中，靶向配体具有如下所示结构的 L_2，

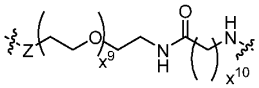


，

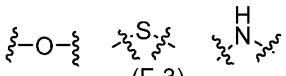
其中，x^8 是从 1 至 20 的整数（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

12、13、14、15、16、17、18、19 或 20），并且 Z 是  (F-1) (F-3) (F-4)。

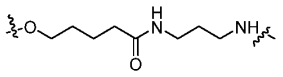
在一些实施方案中，靶向配体具有如下所示结构的 L_2，



(G-10)

，其中 x^9 和 X^{10} 各自独立选自从 1 至 20 的整数（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20），并且 Z 是  (F-1) (F-3) (F-4)。

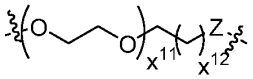
在一些实施方案中，靶向配体具有如下所示结构的 L_2，



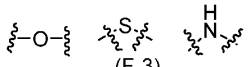
(G-11)

。

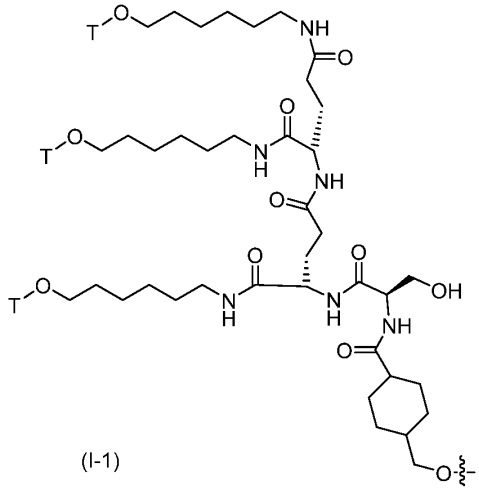
在一些实施方案中，靶向配体具有如下所示结构的 L_2，



(G-12)

其中，x^7 和 X^8 各自独立选自从 1 至 20 的整数（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20），并且 Z 是  (F-1) (F-3) (F-4)。

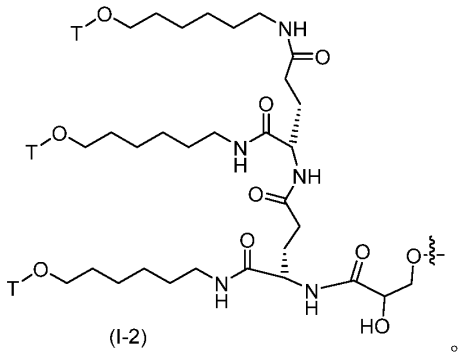
在一些具体的实施方案中，靶向配体具有以下结构：



(I-1)

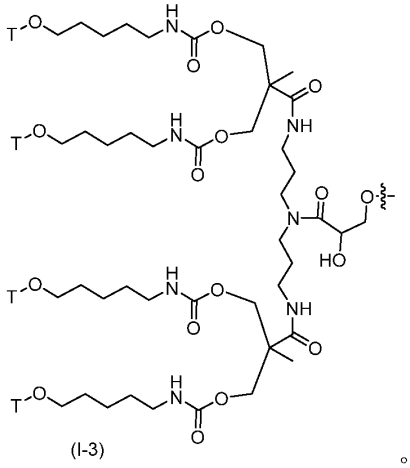
。

在一些具体的实施方案中，靶向配体具有以下结构：



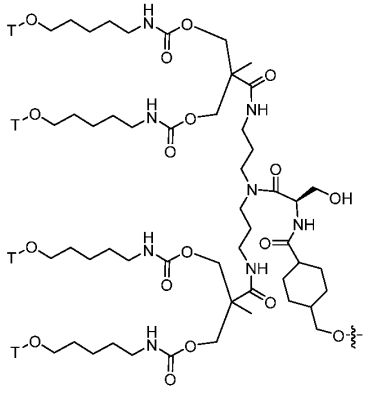
(I-2)

在一些具体的实施方案中，靶向配体具有以下结构：



(I-3)

在一些具体的实施方案中，靶向配体具有以下结构：



(I-4)

一些实施方案中，靶向配体的靶向部分 T 是由一个或多个靶向部分组成，靶向配体协助引导将与其连接的治疗性试剂递送至所需靶位置。在一些情况中，靶向部分可以结合细胞或细胞受体，并且启动内吞作用以促进治疗性试剂进入细胞。靶向部分可以包括对细胞受体或细胞表面分子或抗体具有亲和性的化合物。含有靶向部分的各种靶向配体可以与治疗性试剂和其它化合物连接以将试剂靶向细胞和特定细胞受体。

一些实施方案中，靶向部分 T 的类型包括碳水化合物、胆固醇和胆甾醇基团或类固醇。可以结合细胞受体的靶向部分包括糖类，诸如半乳糖、半乳糖衍生物（如 N-乙酰基-半乳糖胺，N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺）、甘露糖和甘露糖衍生物）。

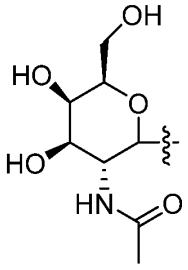
已知结合脱唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）的靶向部分可特别用于引导递送寡聚化合物（例如 siRNA）至肝脏。脱唾液酸糖蛋白受体在肝脏细胞（肝细胞）上大量表达。靶向 ASGPR 的细胞受体靶向部分包括半乳糖和半乳糖衍生物。具体而言，半乳糖衍生物的簇，包括由 2、3、4 或超过 4 个 N-乙酰基-半乳糖胺（GalNAc 或 NAG）组成的簇可以促进肝细胞中某些化合物的摄取。偶联寡聚化合物的 GalNAc 簇用于引导组合物至肝脏，在这里 N-乙酰基-半乳糖胺糖能够结合肝脏细胞表面的脱唾液酸糖蛋白受体。脱唾液酸糖蛋白受体的结合被认为将启动受体介导的内吞作用，从而促进化合物进入细胞内部。

一些实施方案中，靶向配体可以包括 2、3、4 或超过 4 个靶向部分。在一些实施方案中，本文所公开的靶向配体可以包括 1、2、3、4 或超过 4 个通过 L_2 连接至分支基团的靶向部分。

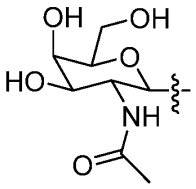
在一些实施方案中，靶向配体是半乳糖簇的形式。

在一些实施方案中，各靶向部分包括半乳糖胺衍生物，其为 N-乙酰基-半乳糖胺。可用作靶向部分且对脱唾液酸糖蛋白受体具有亲和性的其他糖可选自半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基-半乳糖胺和 N-异丁酰基-半乳糖胺等。

在一些实施方案中，本公开中的靶向配体包括 N-乙酰半乳糖胺作为靶向部分，



(H-2)



(H-2)

。

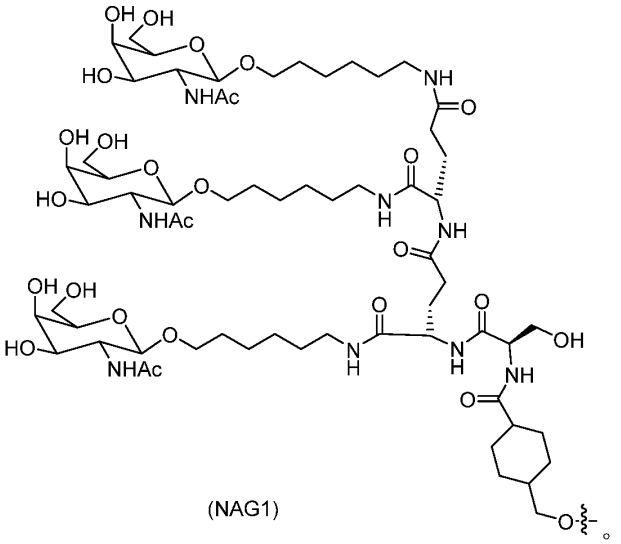
在一些实施方案中，靶向配体包括三个末端半乳糖胺或半乳糖胺衍生物（诸如 N-乙酰基-半乳糖胺），其各自对唾液酸糖蛋白受体均具有亲和性。在一些实施方案中，靶向配体包括三个末端 N-乙酰基-半乳糖胺（GalNAc 或 NAG）作为靶向部分。

在一些实施方案中，靶向配体包括四个末端半乳糖胺或半乳糖胺衍生物（诸如 N-乙酰基-半乳糖胺），其各自对脱唾液酸糖蛋白受体均具有亲和性。在一些实施方案中，靶向配体包括四个末端 N-乙酰基-半乳糖胺（GalNAc 或 NAG）作为靶向部分。

当述及三个末端 N-乙酰基-半乳糖胺时本领域常用的术语包括三触角（tri-antennary）、三价物（tri-valent）和三聚体。

当述及四个末端 N-乙酰基-半乳糖胺时本领域常用的术语包括四触角（tetra-antennary）、四价物（tetra-valent）和四聚体。

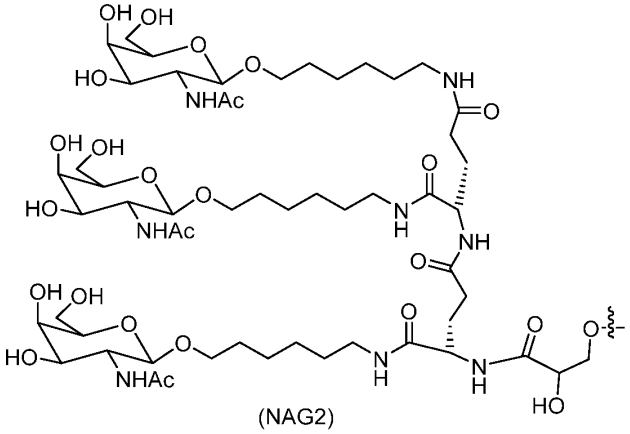
一些具体实施方案中，本公开提供的靶向配体具有如下结构，



(NAG1)

。

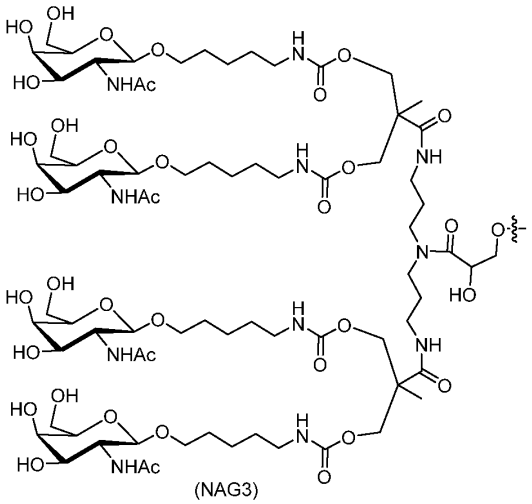
一些具体实施方案中，本公开提供的靶向配体具有如下结构，



(NAG2)

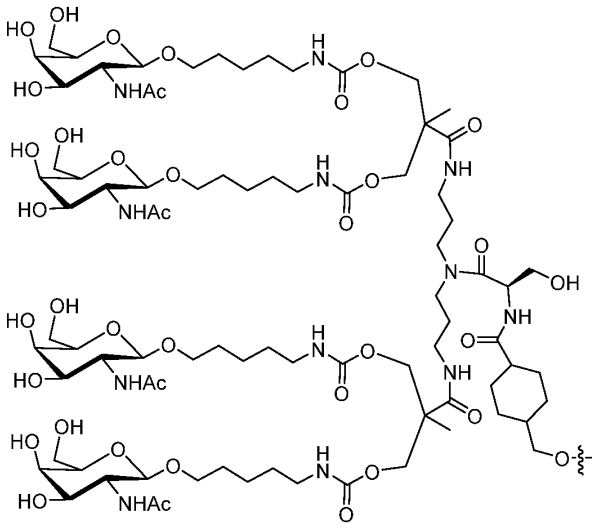
。

一些具体实施方案中，本公开提供的靶向配体具有如下结构，



(NAG3)

一些具体实施方案中，本公开提供的靶向配体具有如下结构，



(NAG4)

在一些实施方案中，本公开 siRNA 连接至本公开靶向配体，形成具有如下所示的 siRNA 缀合物，

$$\left(T-L_2\right)_i-E-L_1-D$$

其中 T 为靶向部分，E 为分支基团，L_1 为接头部分，L2 为靶向部分与分支基团间的栓系部分，其中 x 选自 1 到 10 的整数，D 为靶向 HSD17B13 的 siRNA。

在一些实施方案中，D 为靶向 HSD17B13 的 siRNA。

在一些实施方案中，D 为本公开任一 siRNA。在一些实施方案中，所述 L1 连接至所述 siRNA 的正义链 3’末端。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团与 siRNA 末端连接。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团与 siRNA 末端间接连接。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团与 siRNA 末端直接连接。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团与 siRNA 末端直接连接。

在一些实施方案中，靶向配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团与 siRNA 正义链 3’末端直接连接。

一些实施方案中，本公开 siRNA 正义链包含或为 SEQ ID NO：194 至 SEQ ID NO：212 任一。

一些实施方案中，本公开 siRNA 反义链包含或为 SEQ ID NO：111 至 SEQ ID NO：172 任一。

本公开另一方面提供一种组合物，其包含上述缀合物，和一种或多种药学上可接受的赋形剂，例如载剂、运载体、稀释剂、和/或递送聚合物。

本公开另一方面提供一种上述缀合物或含有缀合物的组合物在制备治疗受试者疾病的药物中的用途，在一些实施方案中选自肝源性疾病。

本公开另一方面提供一种治疗受试者疾病的法，包括向受试者给予上述缀合物，或组合物。

本公开另一方面提供一种抑制受试者体内 mRNA 表达的方法，该方法包括给予受试者上述缀合物，或组合物。

本公开另一方面提供一种体内递送 siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物肝脏的方法，给与受试者上述缀合物，或组合物。

本文所公开的缀合物、组合物和方法可以在细胞、细胞群、组织或受试者中降低靶 mRNA 的水平，包括：向受试者给予治疗有效量的本文所述的 siRNA，siRNA 缀合物或药物组合物，所述 siRNA，siRNA 缀合物或药物组合物与靶向配体连接，从而抑制靶 mRNA 在受试者中的表达。

在一些实施方案中，所述受试者已被鉴定为在靶向的细胞或组织中具有靶基因的病理性上调。

本公开中所述的受试者是指患有将受益于减少或抑制靶 mRNA 的疾病或病症的受试者。

递送可以是通过局部给药（例如，直接注射、植入、或局部给予），全身给药，或皮下，静脉内，腹膜内，或胃肠外途径，包括颅内（例如，心室内，实质内和鞘内），肌肉内，透皮，气道（气溶胶），鼻，口服，直肠，或局部（包括口颊和舌下）给药。

可选的实施方案中，本公开提供的 siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物可以通过注射给予，例如，静脉内、肌内、皮内、皮下、十二指肠内或腹膜内注射。

各种递药系统是已知的并且可以用于本公开的 siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物，例如封装在脂质体中、微粒、微囊、能够表达该化合物的重组细胞、受体介导的细胞内吞作用、构建核酸作为逆转录病毒或其他载体的一部分。

可选的实施方案中，当靶向配体与 siRNA 连接成缀合物后，所述缀合物可被包装在试剂盒中。

本公开还提供了一种药物组合物，其包含本公开的 siRNA 或 siRNA 缀合物。

在一些实施方案中，所述药物组合物中还可以包含药学上可接受的辅料和/或佐剂，该辅料可以为一种或多种本领域常规采用的各种制剂或化合物。例如，所述药学上可接受的辅料可以包括 pH 缓冲剂、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。

在一些实施方案中，上述 siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法，上述 siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物会抑制靶基因的表达至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%。

在一些实施方案中，上述 siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法，上述 siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物引起的靶基因 mRNA 剩余表达百分比为不高于 99%、不高于 95%、不高于 90%、不高于 85%、不高于 80%、不高于 75%、不高于 70%、不高于 65%、不高于 60%、不高于 55%、不高于 50%、不高于 45%、不高于 40%、不高于 35%、不高于 30%、不高于 25%、不高于 20%、不高于 15%、或不高于 10%。

在一些实施方案中，siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法，siRNA、siRNA 缀合物在保持在靶（on-target）活性的同时，将脱靶（off-target）活性减少了至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%或至少 75%。

在一些实施方案中，siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法，siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物使在靶活性降低至多 20%、至多 19%、至多 15%、至多 10%、至多 5%或超过 1%的同时，将脱靶活性减少了至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少

45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%或至少 75%。

在一些实施方案中，siRNA、siRNA 缀合物或药物组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA（bDNA）的方法，siRNA、siRNA 缀合物使在靶活性提高至少 1%、至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%或至少 80%的同时，将脱靶活性减少了至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%或至少 75%。

本公开还提供了一种细胞，其包含本公开的 siRNA 或 siRNA 缀合物。所述细胞不能发育成完整动植物个体。

本公开还提供了一种试剂盒，其包含本公开的 siRNA 或 siRNA 缀合物。

本公开还提供了一种用于沉默细胞中靶基因或靶基因的 mRNA 的方法，该方法包括将根据本公开的 siRNA、siRNA 缀合物和/或药物组合物引入该细胞中的步骤。

本公开还提供了一种用于在体内或在体外沉默细胞中靶基因或靶基因的 mRNA 的方法，该方法包括将根据本公开的 siRNA、siRNA 缀合物和/或药物组合物引入该细胞中的步骤。

本公开还提供了一种用于抑制靶基因或靶基因的 mRNA 表达的方法，该方法包括向有其需要的受试者施用有效量或有效剂量的根据本公开的 siRNA、siRNA 缀合物和/或药物组合物。

在一些实施方案中，施用通过包括肌肉内、支气管内、胸膜内、腹膜内、动脉内、淋巴、静脉内、皮下、脑脊髓、或其组合的给药方式进行。

在一些实施方案中，siRNA、siRNA 缀合物和/或药物组合物的有效量或有效剂量为约 0.001mg/kg 体重至约 200mg/kg 体重、约 0.01mg/kg 体重至约 100mg/kg 体重或约 0.5mg/kg 体重至约 50mg/kg 体重。

在一些实施方案中，靶基因是 HSD17B13 基因。

本公开提供了前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物, 用于治疗和/或预防受试者与 HSD17B13 基因表达相关的疾病。在一些实施方案中，所述与 HSD17B13 基因表达相关的疾病为慢性纤维炎性肝病。在一些实施方案中，所述慢性纤维炎性肝病与脂质液滴在肝脏中的蓄积及/或扩张有关。

本公开提供了前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物，用于治疗和/或预防疾病，所述疾病选自肝炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）、非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎（ASH）、酒精性脂肪肝病（ALD）、HCV-相关的硬化、药物引起的肝损伤、或肝细胞坏死。在一些实施方案中，所述疾病与 HSD17B13 基因表达相关。

本公开提供了前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物，用于降低具有脂肪变性的个体中发展慢性肝病的风险，和/或用于抑制脂肪变性的个体中脂肪变性至脂肪肝炎的进展，和/或用于抑制肝脏内脂质液滴蓄积。

本公开提供了前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物在制备用于治疗和/或预防受试者与 HSD17B13 基因表达相关的疾病的药物中的用途。在一些实施方案中，所述与 HSD17B13 基因表达相关的疾病为慢性纤维炎性肝病。在一些实施方案中，所述慢性纤维炎性肝病与脂质液滴在肝脏中的蓄积及/或扩张有关。

本公开提供了前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物在制备用于治疗和/或预防疾病的药物中的用途，所述疾病选自肝炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）、非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎（ASH）、酒精性脂肪肝病（ALD）、HCV-相关的硬化、药物引起的肝损伤、及肝细胞坏死的药物中的用途。在一些实施方案中，所述疾病与 HSD17B13 基因表达相关。

本公开提供了前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物在制备用于降低具有脂肪变性的个体中发展慢性肝病的风险，和/或用于抑制脂肪变性的个体中脂肪变性至脂肪肝炎的进展，和/或用于抑制肝脏内脂质液滴蓄积的药物中的用途。

本公开提供了一种抑制第 13 型 17β-羟基类固醇脱氢酶（HSD17B13）基因表达的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物。

本公开提供了一种治疗和/或预防受试者与 HSD17B13 基因表达相关的疾病的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物。在一些实施方案中，所述与 HSD17B13 基因表达相关的疾病为慢性纤维炎性肝病。在一些实施方案中，所述慢性纤维炎性肝病与脂质液滴在肝脏中的蓄积及/或扩张有关。

本公开提供了一种治疗和/或预防疾病的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物，所述疾病选自肝炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）、非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎（ASH）、酒精性脂肪肝病（ALD）、HCV-相关的硬化、药物引起的肝损伤、或肝细胞坏死。在一些实施方案中，所述疾病与 HSD17B13 基因表达相关。

本公开提供了一种用于降低具有脂肪变性的个体中发展慢性肝病的风险，和/或用于抑制脂肪变性的个体中脂肪变性至脂肪肝炎的进展，和/或用于抑制肝脏内脂质液滴蓄积的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的前述 siRNA 和/或药物组合物和/或 siRNA 缀合物。

本公开提供了一种体内递送抑制 HSD17B13 基因表达和/或复制的 siRNA 至肝脏的方法，包括给与受试者有效量或有效剂量的前述药物组合物和/或 siRNA 缀合

物。

本公开还提供了一种 siRNA 或 siRNA 缀合物，其特征在于以 2'-甲氧基修饰，替换本公开任一 siRNA 或 siRNA 缀合物的反义链式（I）或（I'）所示的化学修饰或其互变异构体修饰。

本公开还提供了一种 siRNA 或 siRNA 缀合物，其特征在于本公开任一 siRNA 或 siRNA 缀合物的反义链式（I）或（I'）所示的化学修饰为 2'-甲氧基修饰。

本公开还提供了一种 siRNA 或 siRNA 缀合物，其特征在于以碱基 T，替换本公开任一 siRNA 或 siRNA 缀合物的一个或多个碱基 U，例如 1 个、2 个、3 个、3 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个。

本公开中所述化合物的可药用盐选自无机盐或有机盐，本公开所述化合物可与酸性或碱性物质反应成相应盐。

如无特殊说明，本公开的"siRNA"、""siRNA 缀合物、"化学修饰"和"靶向配体"均可独立地以盐、混合盐或非盐（例如游离酸或游离碱）的形式存在。当以盐或混合盐的形式存在时，其可为可药用盐。

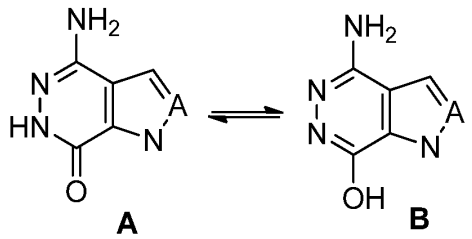
本公开中所述化合物可药用盐选自无机盐或有机盐，本公开所述化合物可与酸性或碱性物质反应成相应盐。

"与酸性物质反应成相应盐"是指能够保留游离碱的生物有效性而无其它副作用的，与无机酸或有机酸所形成的盐。无机酸盐包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等；有机酸盐包括但不限于甲酸盐、乙酸盐、2,2-二氯乙酸盐、三氟乙酸盐、丙酸盐、己酸盐、辛酸盐、癸酸盐、十一碳烯酸盐、乙醇酸盐、葡糖酸盐、乳酸盐、癸二酸盐、己二酸盐、戊二酸盐、丙二酸盐、草酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、油酸盐、肉桂酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、谷氨酸盐、焦谷氨酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、水杨酸盐、4-氨基水杨酸盐、萘二磺酸盐等。这些盐可通过本领域已知的方法制备。

"与碱性物质反应成相应盐"是指能够保持游离酸的生物有效性而无其它副作用的、与无机碱或有机碱所形成的盐。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。优选的无机盐为铵盐、钠盐、钾盐、钙盐及镁盐，优选钠盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下的盐：伯胺类、仲胺类及叔胺类，被取代的胺类，包括天然的被取代胺类、环状胺类及碱性离子交换树脂，例如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二甲基乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。优选的有机碱包括异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己基胺、胆碱及咖啡因。这些盐可通过本领域已知的方法制备。

另一方面，本公开化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本公开涵盖所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-)-和(+)-对对映体、(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、（D）-异构体、（L）-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本公开的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本公开的范围之内。

另外，本公开的化合物和中间体还可以以不同的互变异构体形式存在，并且所有这样的形式包含于本公开的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能垒互变的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体（也称为质子转移互变异构体）包括经由质子迁移的互变，如酮-烯醇及亚胺-烯胺、内酰胺-内酰亚胺异构化。内酰胺-内酰亚胺平衡实例是在如下所示的 A 和 B 之间。



A B

本公开中的所有化合物可以被画成 A 型或 B 型。所有的互变异构形式在本公开的范围内。化合物的命名不排除任何互变异构体。

本公开化合物可以是不对称的，例如，具有一个或多个立体异构体。除非另有说明，所有立体异构体都包括，如对映异构体和非对映异构体。本公开的含有不对称碳原子的化合物可以以光学活性纯的形式或外消旋形式被分离出来。光学活性纯的形式可以从外消旋混合物分离，或通过使用手性原料或手性试剂合成。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(R)-和(S)-异构体以及 D 和 L 异构体。如果想得到本公开某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体分离，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。

本公开还包括一些与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本公开化合物。可结合到本公开化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^{2}H、^{3}H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{13}N、^{15}N、^{15}O、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F、^{123}I、^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

除另有说明，当一个位置被特别地指定为氘（D）时，该位置应理解为具有大于氘的天然丰度（其为0.015%）至少1000倍的丰度的氘（即，至少10%的氘掺入）。示例中化合物的具有大于氘的天然丰度可以是至少1000倍的丰度的氘、至少2000倍的丰度的氘、至少3000倍的丰度的氘、至少4000倍的丰度的氘、至少5000倍的丰度的氘、至少6000倍的丰度的氘或更高丰度的氘。本公开还包括各种氘化形式的式I和式II化合物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式I和式II化合物。在制备氘代形式的式I和式II化合物时可使用市售的氘代起始物质，或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成，氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

“任选地”或“任选”是指意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如“任选的被卤素或者氰基取代的C_{1-6}烷基”是指卤素或者氰基可以但不必须存在，该说明包括烷基被卤素或者氰基取代的情形和烷基不被卤素和氰基取代的情形。

本公开所述化合物的化学结构中，键“ ”表示未指定构型，即如果化学结构中存在手性异构体，键“”可以为“ ”或“”，或者同时包含“”和“”两种构型。虽然为简便起见将全部上述结构式画成某些异构体形式，但是本公开可以包括所有的异构体，如互变异构体、旋转异构体、几何异构体、非对映异构体、外消旋体和对映异构体。本公开所述化合物的化学结构中，键“ ”并未指定构型，即键“”的构型可以为E型或Z型，或者同时包含E和Z两种构型。

本公开中，靶基因HSD17B13参考序列NM_178135.5，SEQ ID NO：1序列为（5’-3’）：

ACACAAGGACUGAACCAGAAGGAAGAGGACAGAGCAAAGCCAUGAACAU
CAUCCUAGAAAUCCUUCUGCUUCUGAUCACCAUCAUCUACUCCUACUUGG
AGUCGUUGGUGAAGUUUUUCAUUCCUCAGAGGAGAAAAUCUGUGGCUGG
GGAGAUUGUUCUCAUUACUGGAGCUGGGCAUGGAAUAGGCAGGCAGACU
ACUUAUGAAUUUGCAAAACGACAGAGCAUAUUGGUUCUGUGGGAUAUUA
AUAAGCGCGGUGUGGAGGAAACUGCAGCUGAGUGCCGAAAACUAGGCGU
CACUGCGCAUGCGUAUGUGGUAGACUGCAGCAACAGAGAAGAGAUCUAU
CGCUCUCUAAAUCAGGUGAAGAAAGAAGUGGGUGAUGUAACAAUCGUGG
UGAAUAAUGCUGGGACAGUAUAUCCAGCCGAUCUUCUCAGCACCAAGGA
UGAAGAGAUUACCAAGACAUUUGAGGUCAACAUCCUAGGACAUUUUUGG
AUCACAAAAGCACUUCUUCCAUCGAUGAUGGAGAGAAAUCAUGGCCACA
UCGUCACAGUGGCUUCAGUGUGCGGCCACGAAGGGAUUCCUUACCUCAUC
CCAUAUUGUUCCAGCAAAUUUGCCGCUGUUGGCUUUCACAGAGGUCUGAC
AUCAGAACUUCAGGCCUUGGGAAAAACUGGUAUCAAAACCUCAUGUCUC
UGCCCAGUUUUUGUGAAUACUGGGUUCACCAAAAAUCCAAGCACAAGAU
UAUGGCCUGUAUUGGAGACAGAUGAAGUCGUAAGAAGUCUGAUAGAUGG
AAUACUUACCAAUAAGAAAAUGAUUUUUGUUCCAUCGUAUAUCAAUAUC
UUUCUGAGACUACAGAAGUUUCUUCCUGAACGCGCCUCAGCGAUUUUAA
AUCGUAUGCAGAAUAUUCAAUUUGAAGCAGUGGUUGGCCACAAAAUCAA

AAUGAAAUGAAUAAAUAAGCUCCAGCCAGAGAUGUAUGCAUGAUAAUGA
UAUGAAUAGUUUCGAAUCAAUGCUGCAAAGCUUUAUUUCACAUUUUUUC
AGUCCUGAUAAUAUUAAAAACAUUGGUUUGGCACUAGCAGCAGUCAAAC
GAACAAGAUUAAUUACCUGUCUUCCUGUUUCUCAAGAAUAUUUACGUAG
UUUUUCAUAGGUCUGUUUUUCCUUUCAUGCCUCUUAAAAACUUCUGUGC
UUACAUAAACAUACUUAAAAGGUUUUCUUUAAGAUAUUUUAUUUUUCCA
UUUAAAGGUGGACAAAAGCUACCUCCCUAAAAGUAAAUACAAAGAGAAC
UUAUUUACACAGGGAAGGUUUAAGACUGUUCAAGUAGCAUUCCAAUCUG
UAGCCAUGCCACAGAAUAUCAACAAGAACACAGAAUGAGUGCACAGCUA
AGAGAUCAAGUUUCAGCAGGCAGCUUUAUCUCAACCUGGACAUAUUUUA
AGAUUCAGCAUUUGAAAGAUUUCCCUAGCCUCUUCCUUUUUCAUUAGCCC
AAAACGGUGCAACUCUAUUCUGGACUUUAUUACUUGAUUCUGUCUUCUG
UAUAACUCUGAAGUCCACCAAAAGUGGACCCUCUAUAUUUCCUCCCUUUU
UAUAGUCUUAUAAGAUACAUUAUGAAAGGUGACCGACUCUAUUUUAAAU
CUCAGAAUUUUAAGUUCUAGCCCCAUGAUAACCUUUUUCUUUGUAAUUU
AUGCUUUCAUAUAUCCUUGGUCCCAGAGAUGUUUAGACAAUUUUAGGCU
CAAAAAUUAAAGCUAACACAGGAAAAGGAACUGUACUGGCUAUUACAUA
AGAAACAAUGGACCCAAGAGAAGAAAAGGAAGAAAGAAAGGUUUUUUGG
UUUUUGUUUUGUUUUGUUUUGUUUUUUGUUUUUUUUGAGAUGGAGUCUCA
CUCUUUCGCCCAGGCUGGAGUGCAGUGGUAUGAUCUCAGCUCACUGCAAG
CUCCACCUCCCGGGUUCACGCCAUUCUCCUGCCUCAGCCUCCUGAGUAGC
UGGGACUACAGGCGCCCGCCACCACACCCGGCUAAUUUUUUGUAUUUUUU
GUAGAGACGGGGUUUCACCAUGUUAGCCAAGAUGGUCUCGAUCUCCUGA
CCUCGUGAUCCACCUGCCUCGGCCUCCCAAAGUGCUGGGAUUACGGGUGU
GAGCCACCGUGCCCAGCCUUUUUUUUUUUAAUAGAAAAAAUAAUCCGAC
UCCCACUACAUCAAGACUAAUCUUGUUUUGUGUGUUUUUCACAUGUAUU
AUAGAAUGCUUUUGCAUGGACUAUCCUCUUGUUUUUAUUAAAAACAAAU
GAUUUUUUUAAAAGUCACAAAAACAAUUCACUAAAAAUAAAUAUGUCAU
UGUGCUUUAAAAAAAUAACCUCUUGUAGUUAUAAAAUAAAACGUUUGAC
UUCUAAA;

本公开中，SEQ ID NO：2 序列为（5’-3’）：

UUUAGAAGUCAAACGUUUUAUUUUAUAACUACAAGAGGUUAUUUUUUUA
AAGCACAAUGACAUAUUUAUUUUUAGUGAAUUGUUUUUGUGACUUUUAA
AAAAAUCAUUUGUUUUUAAUAAAAACAAGAGGAUAGUCCAUGCAAAAGC
AUUCUAUAAUACAUGUGAAAAACACACAAAACAAGAUUAGUCUUGAUGU
AGUGGGAGUCGGAUUAUUUUUUCUAUUAAAAAAAAAAAGGCUGGGCACG
GUGGCUCACACCCGUAAUCCCAGCACUUUGGGAGGCCGAGGCAGGUGGAU
CACGAGGUCAGGAGAUCGAGACCAUCUUGGCUAACAUGGUGAAACCCCGU
CUCUACAAAAAAUACAAAAAAUUAGCCGGGUGUGGUGGCGGGCGCCUGU
AGUCCCAGCUACUCAGGAGGCUGAGGCAGGAGAAUGGCGUGAACCCGGG
AGGUGGAGCUUGCAGUGAGCUGAGAUCAUACCACUGCACUCCAGCCUGGG
CGAAAGAGUGAGACUCCAUCUCAAAAAAACAAAAAACAAAACAAAACAA
AACAAAAACCAAAAAACCUUUCUUUCUUCCUUUUCUUCUCUUGGGUCCAU
UGUUUCUUAUGUAAUAGCCAGUACAGUUCCUUUUCCUGUGUUAGCUUUA
AUUUUUGAGCCUAAAAUUGUCUAAACAUCUCUGGGACCAAGGAUAUAUG
AAAGCAUAAAUUACAAAGAAAAAGGUUAUCAUGGGGCUAGAACUUAAAA
UUCUGAGAUUUAAAAUAGAGUCGGUCACCUUUCAUAAUGUAUCUUAUAA
GACUAUAAAAAGGGAGGAAAUAUAGAGGGUCCACUUUUGGUGGACUUCA
GAGUUAUACAGAAGACAGAAUCAAGUAAUAAAGUCCAGAAUAGAGUUGC
ACCGUUUUGGGCUAAUGAAAAAGGAAGAGGCUAGGGAAAUCUUUCAAAU

GCUGAAUCUUAAAAUAUGUCCAGGUUGAGAUAAAGCUGCCUGCUGAAAC
UUGAUCUCUUAGCUGUGCACUCAUUCUGUGUUCUUGUUGAUAUUCUGUG
GCAUGGCUACAGAUUGGAAUGCUACUUGAACAGUCUUAAACCUUCCCUG
UGUAAAUAAGUUCUCUUUGUAUUUACUUUUAGGGAGGUAGCUUUUGUCC
ACCUUUAAAUGGAAAAAUAAAAUAUCUUAAAGAAAACCUUUUAAGUAUG
UUUAUGUAAGCACAGAAGUUUUUAAGAGGCAUGAAAGGAAAAACAGACC
UAUGAAAAACUACGUAAAUAUUCUUGAGAAACAGGAAGACAGGUAAUUA
AUCUUGUUCGUUUGACUGCUGCUAGUGCCAAACCAAUGUUUUUAAUAUU
AUCAGGACUGAAAAAAUGUGAAAUAAAGCUUUGCAGCAUUGAUUCGAAA
CUAUUCAUAUCAUUAUCAUGCAUACAUCUCUGGCUGGAGCUUAUUUAUU
CAUUUCAUUUUGAUUUUGUGGCCAACCACUGCUUCAAAUUGAAUAUUCU
GCAUACGAUUUAAAAUCGCUGAGGCGCGUUCAGGAAGAAACUUCUGUAG
UCUCAGAAAGAUAUUGAUAUACGAUGGAACAAAAAUCAUUUUCUUAUUG
GUAAGUAUUCCAUCUAUCAGACUUCUUACGACUUCAUCUGUCUCCAAUAC
AGGCCAUAAUCUUGUGCUUGGAUUUUUGGUGAACCCAGUAUUCACAAAA
ACUGGGCAGAGACAUGAGGUUUUGAUACCAGUUUUUCCCAAGGCCUGAA
GUUCUGAUGUCAGACCUCUGUGAAAGCCAACAGCGGCAAAUUUGCUGGA
ACAAUAUGGGAUGAGGUAAGGAAUCCCUUCGUGGCCGCACACUGAAGCC
ACUGUGACGAUGUGGCCAUGAUUUCUCUCCAUCAUCGAUGGAAGAAGUG
CUUUUGUGAUCCAAAAAUGUCCUAGGAUGUUGACCUCAAAUGUCUUGGU
AAUCUCUUCAUCCUUGGUGCUGAGAAGAUCGGCUGGAUAUACUGUCCCA
GCAUUAUUCACCACGAUUGUUACAUCACCCACUUCUUUCUUCACCUGAUU
UAGAGAGCGAUAGAUCUCUUCUCUGUUGCUGCAGUCUACCACAUACGCAU
GCGCAGUGACGCCUAGUUUUCGGCACUCAGCUGCAGUUUCCUCCACACCG
CGCUUAUUAAUAUCCCACAGAACCAAUAUGCUCUGUCGUUUUGCAAAUUC
AUAAGUAGUCUGCCUGCCUAUUCCAUGCCCAGCUCCAGUAAUGAGAACAA
UCUCCCCAGCCACAGAUUUUCUCCUCUGAGGAAUGAAAAACUUCACCAAC
GACUCCAAGUAGGAGUAGAUGAUGGUGAUCAGAAGCAGAAGGAUUUCUA
GGAUGAUGUUCAUGGCUUUGCUCUGUCCUCUUCCUUCUGGUUCAGUCCUU
GUGU。

附图说明

图 1. GalNAc 缀合 siRNA 对于鼠原代肝细胞 mTTR 基因抑制活性。

图 2. GalNAc 缀合 siRNA 对于小鼠 mTTR 基因的体内抑制活性。

具体实施方式

为了更容易理解本公开，以下具体定义了一些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文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。

如本文所使用的，在 RNA 介导的基因沉默的情形中，siRNA 的正义链（又称 SS、SS 链或有义链）是指包含与靶 mRNA 序列相同或基本上相同的序列的链；siRNA 的反义链（又称 AS 或 AS 链）是指具有与靶 mRNA 序列互补的序列的链。

术语“互补”或“反向互补”一词可互相替代使用，并具有本领域技术人员周知的含义，即，在双链核酸分子中，一条链的碱基与另一条链上的碱基以互补的方式相配对。在 DNA 中，嘌呤碱基腺嘌呤（A）与嘧啶碱基胸腺嘧啶（T）（或者在

RNA 中为尿嘧啶（U））相配对；嘌呤碱基鸟嘌呤（C）与嘧啶碱基胞嘧啶（G）相配对。每个碱基对都包括一个嘌呤和一个嘧啶。当一条链上的腺嘌呤与另一条链上的胸腺嘧啶（或尿嘧啶）配对，以及鸟嘌呤始终与胞嘧啶配对时，两条链被认为是彼此相互补的，以及从其互补链的序列中可以推断出该链的序列。与此相应地，“错配”在本领域中意指在双链核酸中，对应位置上的碱基并未以互补的形式配对存在。

术语“碱基”包含任何已知的 DNA 和 RNA 碱基、碱基类似物，例如嘌呤或嘧啶，其还包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、次黄苷和天然类似物。

术语“碱基类似物”是指位于可并入核酸双链体中的经过修饰的核苷酸中核苷酸糖部分的 1’位（或可并入核酸双链体中的核苷酸糖部分取代物的等效位置）的杂环部分。在本公开中，碱基类似物一般为嘌呤或嘧啶碱基，不包括常见碱基：鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）、腺嘌呤（A）、胸腺嘧啶（T）和尿嘧啶（U）。碱基的非限制性实例包括次黄嘌呤（I）、黄嘌呤（X）、3β-D-呋喃核糖基-（2,6-二氨基嘧啶）（K）、3-β-D-呋喃核糖基-（1-甲基-吡唑并[4,3-d]嘧啶-5,7（4H,6H）-二酮）（P）、异胞嘧啶（iso-C）、异鸟嘌呤（iso-G）、1-β-D-呋喃核糖基-（5-硝基吲哚）、1-β-D-呋喃核糖基-（3-硝基吡咯）、5-溴尿嘧啶、2-氨基嘌呤、4-硫代-dT、7-（2-噻吩基）-咪唑并[4，5-b]吡啶（Ds）和吡咯-2-甲醛（Pa）、2-氨基-6-（2-噻吩基）嘌呤（S）、2-氧代吡啶（Y）、二氟甲苯基、4-氟-6-甲基苯并咪唑、4-甲基苯并咪唑、3-甲基羟基异喹啉基、5-甲基羟基异喹啉基和 3-甲基-7-丙炔基羟基异喹啉基、7-氮杂吲哚基、6-甲基-7-氮杂吲哚基、咪唑并吡啶基、9-甲基-咪唑并吡啶基、吡咯并吡嗪基、羟基异喹啉基、7-丙炔基羟基异喹啉基、丙炔基-7-氮杂吲哚基、2,4,5-三甲基苯基、4-甲基吲哚基、4,6-二甲基吲哚基、苯基、萘基、蒽基、菲基、芘基、芪基（stilbenzyl）、并四苯基、并五苯基和其结构衍生物。碱基类似物还可以是通用碱基。

术语“通用碱基”是指位于经过修饰的核苷酸中核苷酸糖部分的 1′位或核苷酸糖部分取代物中等效位置的杂环部分，该杂环部分当存在于核酸双链体中时，可与一种以上碱基配对，同时不改变双螺旋结构（例如，磷酸骨架的结构）。此外，通用碱基不会破坏其所驻留的单链核酸与靶核酸形成双链体的能力。含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成双链体的能力可通过本领域技术人员显而易见的方法测定（例如，UV 吸光度、圆二色性、凝胶迁移法、单链核酸酶敏感性等）。另外，可以改变能观察到双链体形成的条件，以确定双链体稳定性或形成，例如，温度，如解链温度（Tm），与核酸双链体稳定性相关。相较于与靶核酸精确互补的参考单链核酸，含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成的双链体的 Tm 低于与互补核酸形成的双链体。然而，与其中通用碱基被碱基置换而产生单一错配的参考单链核酸相比较，含有通用碱基的单链核酸与靶核酸形成的双链体的 Tm 高于用具有错配碱基的核酸形成的双链体。

一些通用碱基能够通过在通用碱基与所有碱基鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）、腺嘌呤（A）、胸腺嘧啶（T）和尿嘧啶（U）在碱基配对条件下形成氢键，来实现碱基配对。通用碱基不是只与单一互补碱基形成碱基对的碱基。在双链体中，通用碱基可与双链体相对链上与之相对的 G、C、A、T 和 U 中每一者不形成氢键、形成一个氢键或形成一个以上氢键。在一些实施方案中，通用碱基不与双链体相对链上与之相对的碱基相互作用。在双链体中，与通用碱基之间发生的碱基配对不会改变磷酸骨架的双螺旋结构。通用碱基也可以借助堆叠相互作用与相同核酸链上的相邻核苷酸中的碱基相互作用。这种堆叠相互作用可使双链体稳定，尤其是在通用碱基不与双链体相对链上与之相对的碱基形成任何氢键的情形中。通用结合核苷酸的非限制性实例包括肌苷、1-β-D-呋喃核糖基-5-硝基吲哚和/或 1-β-D-呋喃核糖基-3-硝基吡咯。

术语“平端”或“平末端”可互换使用，是指在 siRNA 的给定的末端没有未配对的核苷酸或核苷酸类似物，即，没有核苷酸突出。大多数情况下，两个末端都是平末端的 siRNA 将在其整个长度范围内是双链的。

本公开中，正义链或反义链的“5’区域”也即“5’端”、“5’末端”，可替换使用。例如反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位的核苷酸，也可替换为反义链 5’端的第 2 位至第 8 位的核苷酸。同理，正义链或反义链的“3’区域”、“3’末端”和“3’端”也可替换使用。

本公开上下文中，术语“化学修饰”或“修饰”包括经化学手段的所有改变，例如化学部分的添加或去除、或以一个化学部分取代另一个化学部分。

术语“2’-氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被氟取代形成的核苷酸。“非氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物。“核苷酸类似物”指能够在核酸中代替核苷酸，但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的基团。如异核苷酸、桥联的核苷酸（bridged nucleic acid，简称 BNA）或无环核苷酸。所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。异核苷酸是指核苷酸中碱基在核糖环上的位置发生改变而形成的化合物。在一些实施方案中，异核苷酸可以是碱基从核糖环的 1'-位移动至 2'-位或 3'-位而形成的化合物。BNA 是指受约束的或不能接近的核苷酸。BNA 可以含有五元环、六元环、或七元环的具有“固定的”C3'-内切糖缩拢的桥联结构。通常将该桥掺入到该核糖的 2'-、4'-位处以提供一个 2',4'-BNA 核苷酸。在一些实施方案中，BNA 可以是 LNA、ENA、cET BNA 等。无环核苷酸是核苷酸的糖环被打开形成的一类核苷酸。在一些实施方案中，无环核苷酸可以是解锁核酸（UNA）或甘油核酸（GNA）。

术语“抑制”，可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“阻抑”和其他类似术语交替使用，并且包括任何水平的抑制。抑制可通过这些变量中的一个或多个与对照水平

相比的绝对或相对水平的减少来评估。该对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平，例如给药前基线水平、或从未经处理或经对照（例如仅缓冲液对照或惰性剂对照）处理的受试者、细胞、或样品确定的水平。例如，可以采用 mRNA 剩余表达量来表征 siRNA 对靶基因表达的抑制程度，如 mRNA 剩余表达量为不高于 99%、不高于 95%、不高于 90%、不高于 85%、不高于 80%、不高于 75%、不高于 70%、不高于 65%、不高于 60%、不高于 55%、不高于 50%、不高于 45%、不高于 40%、不高于 35%、不高于 30%、不高于 25%、不高于 20%、不高于 15%、或不高于 10%。靶基因表达的抑制率可以采用 Dual-Glo® Luciferase Assay System 检测，分别读取萤火虫化学发光值（Fir）和海肾化学发光值（Ren），计算相对值 Ratio= Ren/Fir，抑制率（%）=1-（Ratio+siRNA/Ratio 仅报告基因）×100%；本公开中，剩余 mRNA 表达量比例（或剩余活性%）=100%-抑制率（%）。

术语“有效量”或“有效剂量”指指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途，有益的或所需的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作，包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用，有益的或所需的结果包括临床结果，诸如减少各种本公开靶基因、靶 mRNA 或靶蛋白相关病症的发病率或改善所述病症的一个或更多个症状，减少治疗病症所需的其它药剂的剂量，增强另一种药剂的疗效，和/或延缓受试者的本公开靶基因、靶 mRNA 或靶蛋白相关病症的进展。

术语 “患者”、“受试者”或“个体”可互换使用，包括人类或者非人类动物，例如哺乳动物，例如人或猴。

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

术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“可药用赋形剂”或“药学上可接受的赋形剂”包括但不限于任何已经被美国食品和药物管理局批准对于人类或家畜动物使用可接受的任何助剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增香剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。

术语“有效量”或“有效治疗量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的

有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含 1 至 20 个碳原子的直链或支链基团。在一些实施方案中选自含有 1 至 12 个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。在一些实施方案中选自的是含有 1 至 6 个碳原子的烷基，非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基在一些实施方案中选自一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基、羧基或羧酸酯基。

术语“烷氧基”指-O-（烷基）和-O-（非取代的环烷基），其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基在一些实施方案中选自一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基，所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。同理，“炔氧基”、“烯氧基”、“环烷氧基”、“杂环烷氧基”、“环烯氧基”的定义如上述“烷氧基”定义。

术语“烯基”指直链或支链的非芳香族烃基，其含有至少一个碳-碳双键，并且具有 2-10 个碳原子。在这样的基团中可以存在多达 5 个碳-碳双键。例如，“C_2-C_6”烯基被定义为具有 2-6 个碳原子的烯基。烯基的示例包括但不限于：乙烯基、丙烯基、丁烯基和环己烯基。烯基的直链、支链或环状部分可以含有双键，并且在正常化合价所允许的任何位置任选地被单-、二-、三-、四-或五-取代。

术语“环烯基”表示具有特定数量的碳原子和至少一个碳-碳双键的单环烃基。

术语“炔基”指直链或支链的烃基，其含有 2-10 个碳原子并且含有至少一个碳-碳三键。可以存在多达 5 个碳-碳三键。因此，“C_2-C_6 炔基”表示具有 2-6 个碳原子的烯基。炔基的示例包括但不限于：乙炔基、2-丙炔基和 2-丁炔基。炔基的直链、支链部分可以含有正常化合价所允许的三键，并且在正常化合价所允许的任何位置任选地被单-、二-、三-、四-或五-取代。

术语“酮”指代本文所述通过羰基桥连接的任何烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环基、杂芳基或芳基。酮基的示例包括但不限于：烷酰基（例如，乙酰基，丙酰基，丁酰基，戊酰基，己酰基），烯酰基（例如，丙烯酰基），炔酰基（例如，乙炔酰基，丙炔酰基，丁炔酰基，戊炔酰基，己炔酰基），芳酰基（例如，苯甲酰基），杂芳酰基（例如，吡咯酰基，咪唑酰基，喹啉酰基，吡啶酰基）。

术语“烷氧基羰基”指通过羰基桥连接的上述定义的任何烷氧基（即，-C(O)O-烷基）。烷氧基羰基的示例包括但不限于：甲氧基羰基，乙氧基羰基，异丙氧基羰基，正丙氧基羰基，叔丁氧基羰基，苄氧基羰基或正戊氧基羰基。

术语“芳氧基羰基”指通过氧羰基桥连接的上述定义的任何芳基（即，-C(O)O-芳基）。芳氧基羰基的例子包括但不限于：苯氧基羰基和萘氧基羰基。

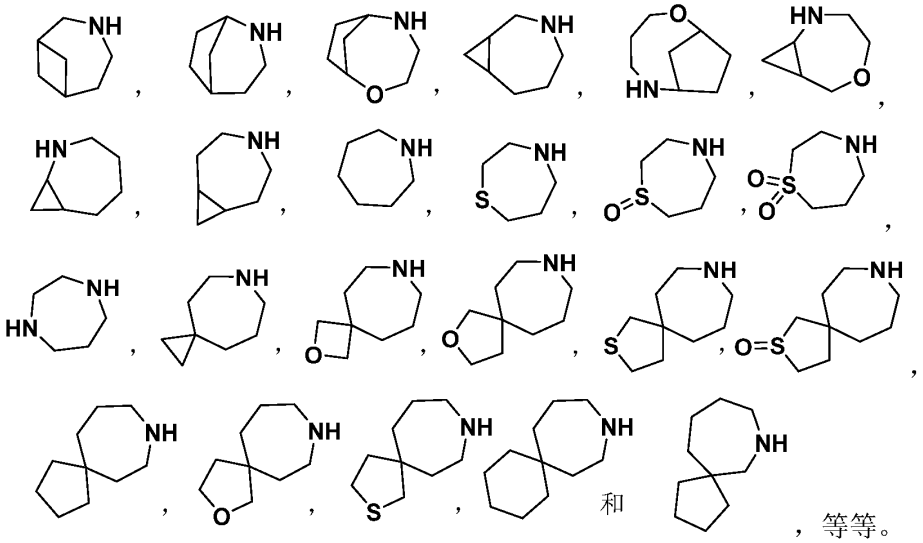
术语“杂芳氧基羰基”指通过氧基羰基桥连接的上述定义的任何杂芳基（即，-C(O)O-杂芳基）。杂芳基氧基羰基的示例包括但不限于：2-吡啶氧基羰基，2-噁唑基氧基羰基，4-噻唑基氧基羰基或嘧啶基氧基羰基。

术语“环烷基”或“碳环”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子。在一些实施方案中选自包含 3 至 7 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基等。多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。环烷基可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，在一些实施方案中选自一个或多个以下基团，独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 烷氧基、C_{2-6} 烯氧基、C_{2-6} 炔氧基、C_{3-6} 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C_{3-8} 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基，所述 C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 烷氧基、C_{2-6} 烯氧基、C_{2-6} 炔氧基、C_{3-6} 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C_{3-8} 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

所述环烷基环可以稠合于芳基或杂芳基环上，其中与母体结构连接在一起的

环为环烷基，非限制性实例包括茚满基、四氢萘基、苯并环庚烷基等。环烷基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基在一些实施方案中选自一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基，所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

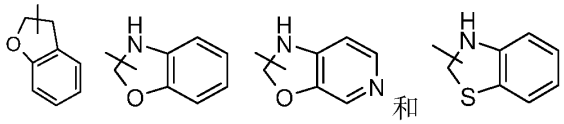
术语“杂环烷基”或“杂环”或“杂环基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含3至20个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或$S(O)_m$（其中m是整数0至2）的杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。在一些实施方案中选自包含3至12个环原子，其中1至4个是杂原子。在一些实施方案中选自包含3至7个环原子。单环杂环烷基的非限制性实例包括吡咯烷基、咪唑烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、二氢咪唑基、二氢呋喃基、二氢吡唑基、二氢吡咯基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环烷基包括螺环、稠环和桥环的杂环烷基。“杂环烷基”非限制性实例包括：



和

，等等。

所述杂环烷基环可以稠合于芳基或杂芳基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环烷基，其非限制性实例包括：



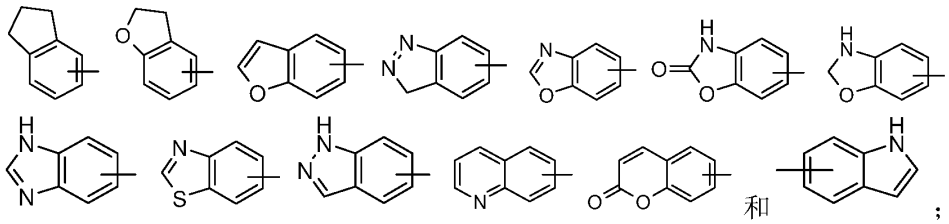
和

等。

杂环烷基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基在一些实施方案中选自一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基，所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、

C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

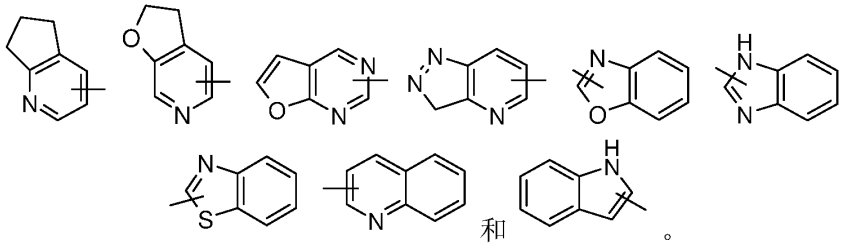
术语“芳基”指具有共轭的π电子体系的6至14元全碳单环或稠合多环（也就是共享毗邻碳原子对的环）基团。在一些实施方案中选自6至12元，例如苯基和萘基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环烷基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：


和
；

芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基在一些实施方案中选自一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基，所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子、5至14个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基在一些实施方案中选自6至12元，更在一些实施方案中选自5元或6元。例如。其非限制性实例包括：咪唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡唑基、噁唑基（oxazolyl）、异噁唑基（isoxazolyl）、吡咯基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、噻二唑、吡嗪基、三唑基、吲唑基、苯并咪唑基、 ， 、 等。

所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环烷基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：


和
。

杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基在一些实施方案

中选自一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基，所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯氧基、C_{2-6}炔氧基、C_{3-6}环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C_{3-8}环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

术语“羟基”指-OH基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“卤代烷基”指被卤素取代的烷基，其中烷基如上所定义。

术语“氰基”指-CN。

术语“硝基”指-NO_2。

术语“氧代”指 =O基团，例如，碳原子与氧原子通过双键连接，其中形成酮或醛基。

术语“氨基”指-NH_2。

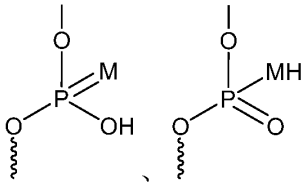
术语“羧基”指-C(O)OH。

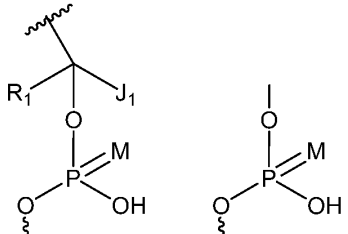
术语“醛基”指-CHO。

在本公开的化学结构式中，“ ”或 其可以根据本文所述发明范围连接一个或多个任何基团；星号“*”表示手性中心。

本公开中，术语“包含”可替换为“由……组成”。

本公开中，“磷酸酯基团”、“磷酸酯基”、“磷酸酯键”可互换使用，包括磷酸一酯基、磷酸二酯基或磷酸三酯基。若无特别说明，天然核苷酸间键磷酸酯基为磷酸二酯基。

本公开中，硫代磷酸酯基是指一个非桥接氧原子被硫原子替代而修饰的磷酸二酯基，可用（M为S原子）互换使用。

本公开上下文中，基团中的部分可以替换为能够与相邻核苷酸实现连接的任意基团。

术语“连接”，当表示两个分子之间的联系时，指两个分子通过共价键连接或者两个分子经由非共价键（例如，氢键或离子键）关联。

术语“直接连接”指第一化合物或基团与第二化合物或基团在没有任何间插原子或原子基团的情况下连接。

术语“间接连接”指第一化合物或基团与第二化合物或基团通过中间基团、化合物或分子（例如，连接基团）连接。

术语“取代的”表示指定原子（通常是碳、氧和氮原子）上的任何一个或多个氢原子被本文所限定的任何基团所替代，条件是不超过所述指定原子的正常化合价并且取代生成稳定化合物。取代基的非限制性示例包括 C1-C6 烷基、C2-C6 烯基、C2-C6 炔基、氰基、羟基、氧代基、羧基、环烷基、环烯基、杂环基、杂芳基、芳基、酮、烷氧基羰基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基或卤素（例如，F、Cl、Br、I）。当取代基是酮或氧代（即，=O）时，则原子上有两个（2 个）氢被替代。

“被一个或多个……取代”是指可以被单个或多个取代基取代。当被多个取代基取代时，可以是复数个相同取代基，也可以是一个或复数个不同取代基的组合。

本公开中的一些缩略语定义如下：

DCE：二氯乙烷；

Sc（OTf）$_3$：三氟甲烷磺酸钪；

TFH：四氢呋喃；

Pd/C：钯-碳；

TFA：三氟乙酸；

DMF：二甲基甲酰胺；

DIPEA ：N-乙基二异丙基胺；

HoBt：1-羟基苯并三唑；

EDCI：1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺盐酸盐；

DMTrCl：4,4'-双甲氧基三苯甲基氯；

DIEA ：N,N-二异丙基乙胺；

HATU：2-（7-氮杂苯并三氮唑）-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯；

LiOH：氢氧化锂；

DMAP：4-二甲氨基吡啶；

HBTU：苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐；

DMTrCl：1-[氯（4-甲氧基苯基）苄基]-4-甲氧基苯；

CF_3SO_3H：三氟甲磺酸；

BnBr：溴化苄；

DEPBT：3-（二乙氧基磷酰氧基）-1,2,3-苯并三嗪-4-酮；

Bz：苯甲酰基保护基；

MMTr：甲氧基苯基二苯甲基；

DMTr：二甲氧三苯甲基保护基。

实施例

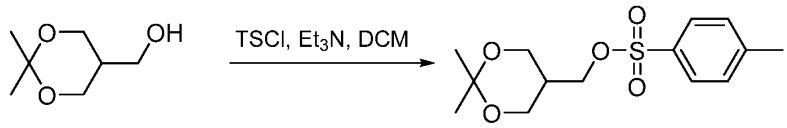
以下结合实施例进一步描述本公开，但这些实施例并非限制着本公开的范围。

本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

I. 式（I）化学修饰的制备和活性评价

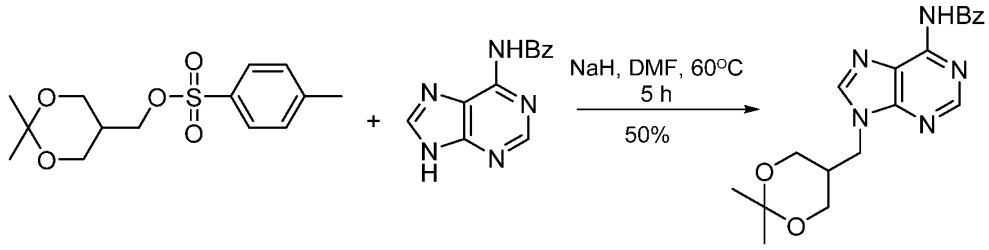
实施例 1 化学修饰的制备

1.1 合成化合物 1-1a 和化合物 1-1b



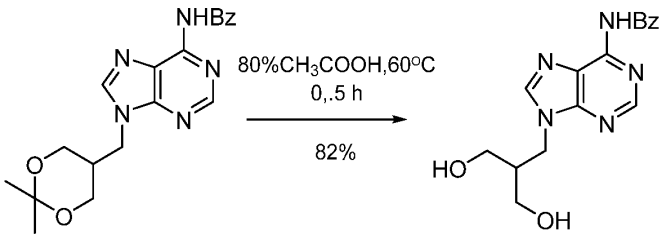
1 2

将化合物 1（500 mg，3.42 mmol）和三乙胺（Et_3N，692 mg，6.84 mmol，0.95 mL）溶于二氯甲烷（DCM，10 mL）中，冰浴下滴加 4-甲苯磺酰氯（TsCl, 717 mg，3.76 mmol）的二氯甲烷（10 mL）溶液，滴加完毕后反应在室温下搅拌过夜，待反应完毕后，用水淬灭，水相用二氯甲烷（15 mL）提取三次，合并的有机相先用饱和碳酸氢钠水溶液（10 mL）洗涤，再用饱和食盐水（20 mL）洗涤，随后减压蒸干溶剂得到粗品 **2**（820 mg，80%），直接用于下一步反应。MS m/z：$C_{14}H_{21}O_5S$，$[M+H]^+$ 理论：301.10 实测：301.2。



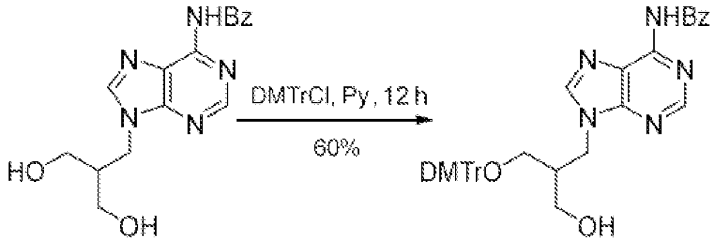
2 3 4

将化合物 **3**（239 mg，1.22 mmol）溶解于二甲基甲酰胺（DMF，10 mL）中，冰浴下加入 NaH（60%溶解在矿物油中, 93 mg，2.33 mmol）溶液，该反应下搅拌 30 分钟，然后滴加化合物 **2**（350 mg，1.16 mmol），滴加完毕后反应在 60℃下搅拌 5 小时，反应完毕后，加水淬灭，水相用乙酸乙酯（15 mL）提取三次，合并的有机相先用水（10 mL）洗涤三次，再用饱和食盐水（10 mL）洗涤，随后减压蒸干溶剂，经反相制备 HPLC（C^{18}，条件：5-50%（A：H_2O，B：CH_3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 220 mg 化合物 **4**。MS m/z：$C_{19}H_{21}N_5O_3Na$，$[M+Na]^+$ 理论：390.16，实测：390.3。



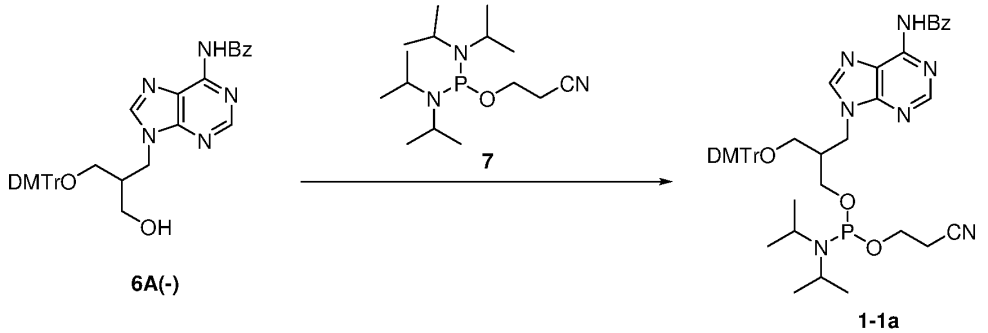
4 **5**

室温下将化合物 **4**（1.50 g，4.08 mmol）溶解于 20 mL 的醋酸和水（4:1）的混合溶液中，60℃下搅拌 30 分钟，待反应完毕后减压蒸干溶剂，经反相制备 HPLC（C^{18}，条件：5-25%（A：H_2O，B：CH_3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 1.10 g 化合物 **5**。MS m/z：$C_{16}H_{18}N_5O_3$，$[M+H]^+$ 理论：328.13，实测：328.4。



5 **6**

将化合物 **5**（1.00 g，3.05 mmol）溶于吡啶（Py，10 mL）中，冰浴下滴 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯（DMTrCl, 1.50 g，4.58 mmol）的吡啶（5 mL）溶液，滴加完毕后反应在室温下搅拌过夜，待反应完毕后，用水淬灭，减压蒸干溶剂，经反相制备 HPLC（C^{18}，条件：5-80%（A：H_2O，B：CH_3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 1.00 g 化合物 **6**。MS m/z：$C_{37}H_{36}N_5O_5$，$[M-H]^+$ 理论：630.26，实测：630.5。消旋体化合物 **6** 经手性柱（Daicel CHIRALPAK® IE 250×4.6 mm, 5μm, A：正己烷, B：乙醇）分离得 410 mg 6A(-)和 435 mg 6B(+)。

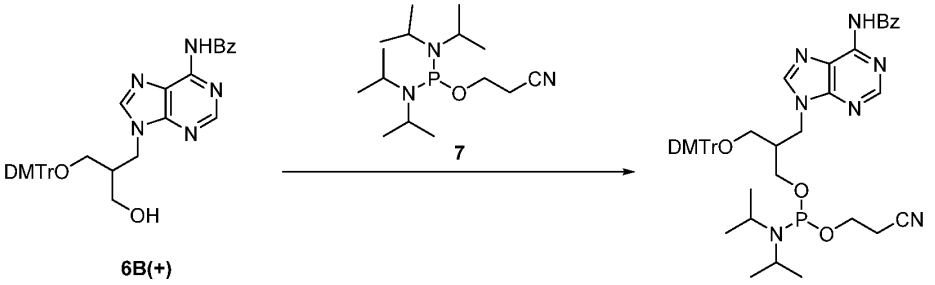


6A(-)

将化合物 **6A(-)**（200 mg，0.32 mmol），四氮唑（11 mg，0.16 mmol），N-甲基咪唑（5 mg，0.06 mmol），3A 分子筛（500 mg）溶于 10 mL 的乙腈中，室温下加入化合物 **7**（144 mg，0.48 mmol），在室温下搅拌过夜。反应完毕后，将分子筛过滤掉，加入二氯甲烷（30 mL），饱和碳酸氢钠水溶液（10 mL）洗涤三

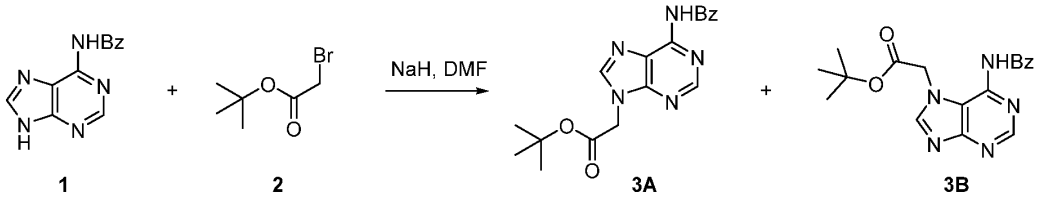
次，再用饱和食盐水（20 mL）洗涤，滤液旋干并经反相制备 HPLC（C^{18}，条件：5-100%（A：水，B：CH_3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 200 mg 化合物 **1-1a**。MS m/z：$C_{40}H_{39}N_6O_7P$，[M-二异丙基+OH]$^+$ 理论：747.26，实测：747.6。

1H NMR（400 MHz，乙腈-d_3）δ 7.56, 7.54（2s，1H），7.36-7.27（m，2H），7.24-7.21（m，7H），6.83-6.80（m，4H），4.12-4.10（m，2H），3.75-3.68（m，10H），3.20-2.80（m，2H），2.68-2.54（m，4H），1.22-1.04（m，18H）。

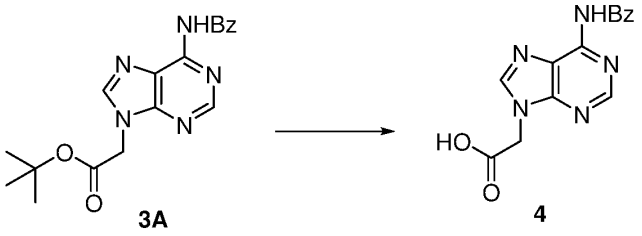


将化合物 **6B(+)**（200 mg，0.32 mmol），四氮唑（11 mg，0.16 mmol），N-甲基咪唑（5 mg，0.06 mmol），3A 分子筛（500 mg）溶于 10 mL 的乙腈中，室温下加入化合物 **7**（144 mg，0.48 mmol），在室温下搅拌过夜。反应完毕后，将分子筛过滤掉，加入二氯甲烷（30 mL），饱和碳酸氢钠水溶液（10 mL）洗涤三次，再用饱和食盐水（20 mL）洗涤，滤液旋干并经反相制备 HPLC（C^{18}，条件：5-100%（A：水，B：CH_3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 200 mg 化合物 **1-1b**。MS m/z：$C_{40}H_{39}N6O_7P$，[M-二异丙基+OH]$^+$ 理论：747.26，实测：747.5。

1.2 合成化合物 1-2

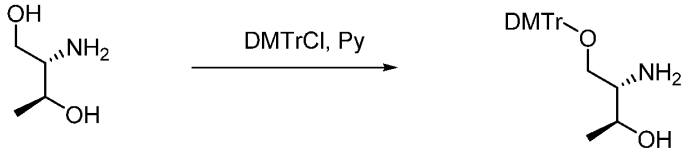


将化合物 **1**（2 g，8.36 mmol）溶解在 DMF（20 mL）中，室温条件下，氩气保护下缓慢加入 NaH（0.37 g，9.2 mmol，60%溶解在矿物油中）。室温搅拌 2 个小时后，将化合物 **2**（3.3 g，16.72 mmol）加入到反应液中。室温搅拌 12 h 后，将反应液浓缩后，残留物用乙醇（EtOH，50 mL）重结晶得到目标产物 **3A**（1.3 g，收率 44.0%）（二氯甲烷:乙酸乙酯 = 2：1，Rf = 0.2）和目标产物 **3B**（0.6 g，化合物 1 的混合物）（二氯甲烷:乙酸乙酯 = 2：1，Rf = 0.18）。



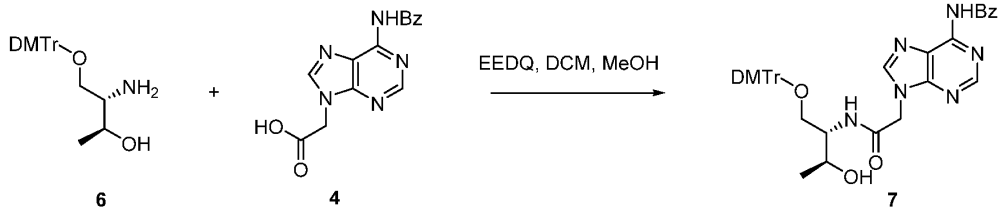
3A 4

将化合物 **3A**（1.3 g，3.68 mmol）溶解在混合液三氟乙酸（TFA，4 mL）和 DCM（20 mL）后，室温搅拌 12 h，将反应液浓缩，得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O + 乙腈）得到目标产物 **4**（1 g，收率 91.44%）。MS m/z：$C_{39}H_{38}N_6O_6$，$[M+H]^+$：687.5。



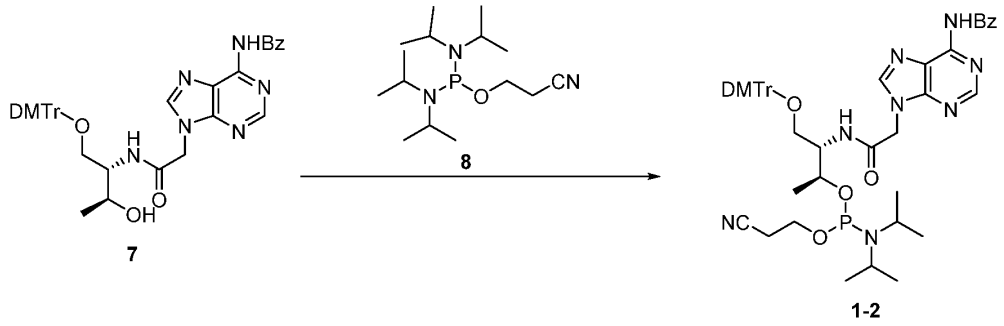
5 6

将化合物（D-Threoninol **5**，1.2 g，11.4 mmol）溶解在吡啶（10 mL）然后缓慢加入 DMTrCl（4.64 g，13.70 mmol）的吡啶（15 mL）溶液。室温下搅拌 16 h 后，将反应液用 H_2O（10 mL）淬灭并浓缩。将反应液浓缩，得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O + 乙腈）得到目标产物 **6**（4.0 g，收率 86.0%）。MS m/z：$C_{25}H_{29}NO_4$，$[M+Na]^+$：430.4。



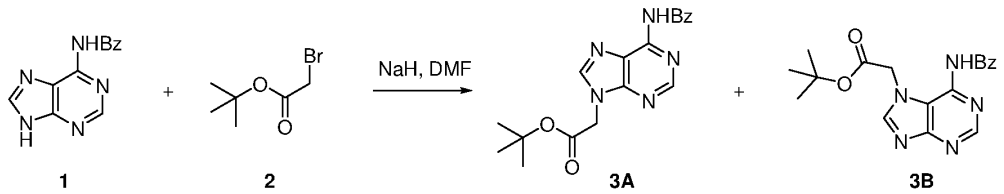
6 4 7

将化合物 **6**（600 mg，2.02 mmol）、化合物 **4**（822.5 mg，2.02 mmol）和二氢喹啉（EEDQ，998.2 mg，4.04 mmol）溶解在 DCM（10 mL）和甲醇（MeOH，5 mL）中。该混合液室温搅拌 16 h 后，将固体滤掉，滤液用 DCM（100 mL）稀释。有机相用 H_2O（30 mL）洗涤三次，用无水 Na_2SO_4 干燥，过滤再浓缩。得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O + 乙腈）得到目标产物 **7**（780 mg，收率 56.3%）。MS m/z：$C_{39}H_{38}N_6O_6$，$[M+H]^+$：687.5。

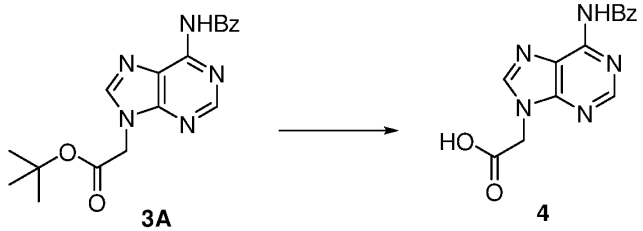


将化合物 **7**（780 mg，1.13 mmol），四氮唑（39.8 mg，0.57 mmol），N-甲基咪唑（18.7 mg，0.23 mmol）溶解在 CH_3CN（10 mL）中，加入 3A 分子筛（700 mg）。氩气保护下室温搅拌 5min 后，加入化合物 **8**（513.5 mg，1.70 mmol）。室温搅拌 1 h 后，将分子筛过滤掉，固体用 DCM（30 mL）淋洗三次。滤液分别用饱和的 $NaHCO_3$ 水溶液（30 mL×4）和 H_2O（30 mL×4）洗涤；有机相在 30 ℃下浓缩。得到残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O +乙腈, 乙腈 90%），冻干后得到目标化合物 **1-2**（700 mg，收率 69.5%）。MS m/z：$C_{48}H_{55}N_8O_7P$，[M-氰乙基-二异丙基+OH]$^-$：749.3。

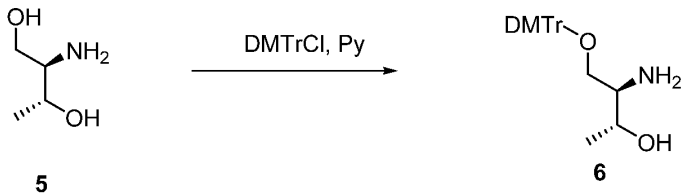
1.3 合成化合物 1-3



将化合物 **1**（2 g，8.36 mmol）溶解在 DMF（20 mL）中，室温条件下，氩气保护下缓慢加入 NaH（0.37 g，9.2 mmol，60%溶解在矿物油中）。室温搅拌 2 个小时后，将化合物 **2**（3.3 g，16.72 mmol）加入到反应液中。室温搅拌 12 h 后，将反应也浓缩后，残留物用 EtOH（50 mL）重结晶得到目标产物 **3A**（1.3 g，收率 44.0%）（二氯甲烷:乙酸乙酯 = 2：1, Rf = 0.2）和目标产物 **3B**（0.6 g，化合物 1 的混合物）（二氯甲烷:乙酸乙酯 = 2：1, Rf = 0.18）。

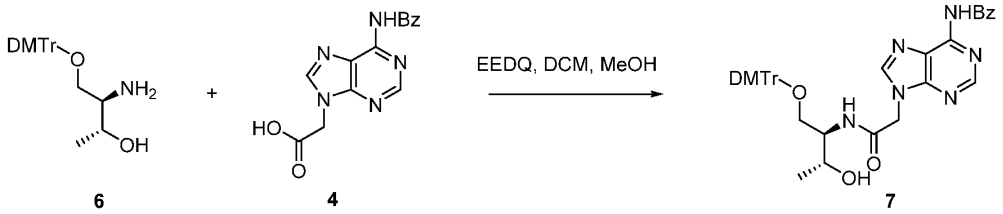


将化合物 **3A**（1.3 g，3.68 mmol）溶解在混合液 TFA（4 mL）和 DCM（20 mL）后，室温搅拌 12 h，将反应液浓缩，得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O + 乙腈）得到目标产物 **4**（1 g，收率 91.44%）。MS m/z：$C_{39}H_{38}N_6O_6$，[M+H]$^+$：687.5。



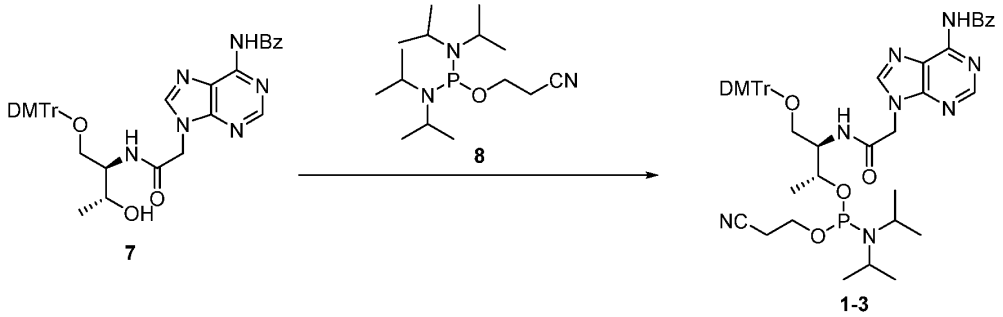
5 6

将化合物 L-苏氨醇（L-Threoninol **5**，1.2 g，11.4 mmol）溶解在吡啶（10 mL），然后缓慢加入 DMTrCl（4.64 g，13.70 mmol）的吡啶（15 mL）溶液。室温下搅拌 16 h 后，将反应液用 H_2O（10 mL）淬灭并浓缩。将反应液浓缩，得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O+乙腈）得到目标产物 **6**（4.0 g，收率 86.0%）。MS m/z：$C_{25}H_{29}NO_4$，$[M+Na]^+$：430.4。



6 4 7

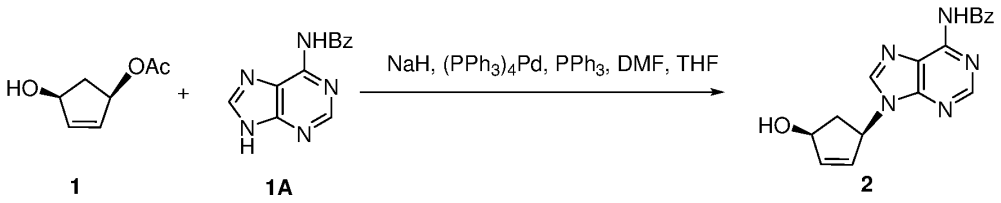
将化合物 **6**（600 mg，2.02 mmol），化合物 **4**（822.5 mg，2.02 mmol），四甲基脲六氟磷酸酯（HATU，1.15 g，3.03mmol）和二异丙基乙胺（DIEA，1 mL，6.05 mmol）溶解在 DMF（10 mL）中。室温搅拌 16 h 后，反应液过滤，滤液用 DCM（100 mL）稀释。有机相用 H_2O（30 mL）洗三次，用无水 Na_2SO_4 干燥，过滤，浓缩。得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O +乙腈, 乙腈 60%），冻干后得到目标化合物 **7**（1.0 g，收率 72.1%）。MS m/z：$C_{39}H_{38}N_6O_6$，$[M+H]^+$：687.5。



7 1-3

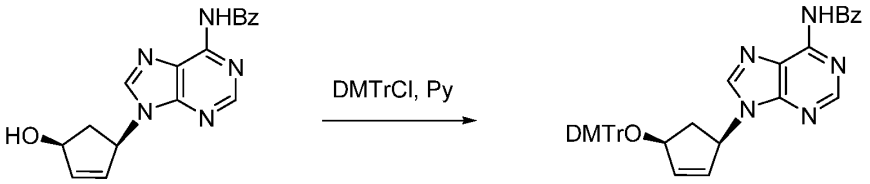
将化合物 **7**（1.2 g，1.75 mmol），四氮唑（61.2 mg，0.87 mmol），N-甲基咪唑（28.7 mg，0.35 mmol）溶解在 CH_3CN（10 mL）中，加入 3A 分子筛（700 mg）。氩气保护下室温搅拌 5min 后，加入化合物 **8**（0.79 g，2.62 mmol）。室温搅拌 1 h 后, 将分子筛过滤掉，固体用 DCM（30 mL）淋洗三次。滤液分别用饱和的 $NaHCO_3$ 水溶液（30 mL×4）和 H_2O（30 mL×4）洗。有机相在 30 ℃下浓缩。得到残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O +乙腈, 乙腈 90%），冻干后得到目标化合物 **1-3**（1.2 g，收率 77.4%）。MS m/z：$C_{48}H_{55}N_8O_7P$，$[M-氰乙基-二异丙基+OH]^-$：749.3。

1.4 合成化合物 1-4a 和化合物 1-4b



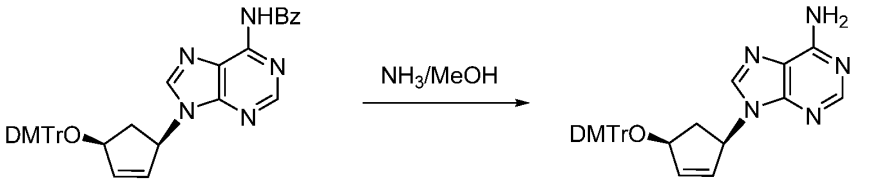
1 1A 2

将化合物 **1A**（6.73 g，28.14 mmol）溶解在干燥的 DMF（80 mL）中，氩气保护下缓慢加入 NaH（60%，1.24 g，30.95 mmol）。该混合液室温搅拌 30min 后，将该反应液加到溶有四（三苯基膦）钯（$Pd(PPh_3)_4$，1.95 g，1.69 mmol），三苯基膦（PPh_3，0.74 g，2.81 mmol）和化合物 **1**（4.0 g，28.14 mmol）的 四氢呋喃（THF，60 mL）溶液中。该反应液在 55℃搅拌 16 h 后，将固体滤掉并用 DCM（60 mL）洗涤三次。将滤液浓缩，得到的残留物用正向柱纯化（先用乙酸乙酯, 再用乙酸乙酯:甲醇（12：1 冲洗柱子）得目标产物 **2**（7 g，粗品）。



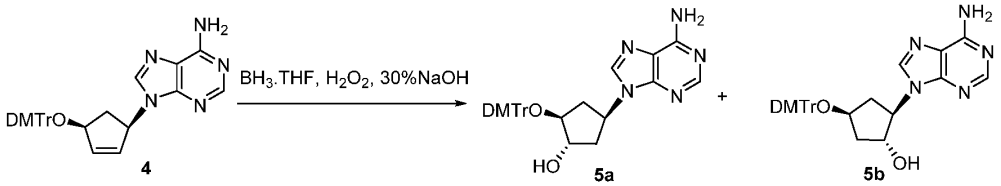
2 3

将化合物 **2**（8 g，粗品）和 DMTrCl（12.65 g，37.34 mmol）溶解在吡啶（10 mL）。该混合物室温搅拌 16 h 后，用水（80 mL）淬灭并浓缩。得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, 水+乙腈）冻干后，得到目标化合物 **3**（13 g，收率 83.7%）。



3 4

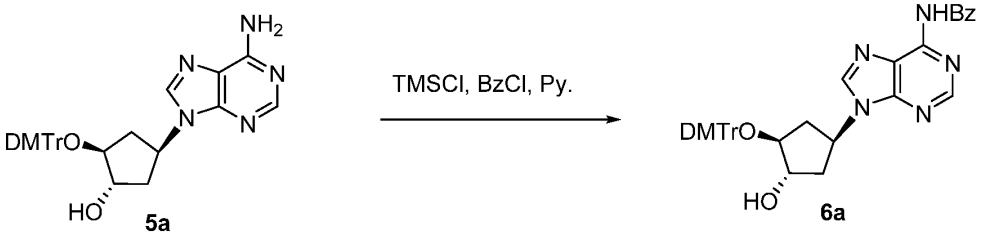
将化合物 **3**（5 g，8.02 mmol）溶解在甲醇（MeOH，20 mL）和氨水（6 mL）中，该混合液室温搅拌 16 h 后，将反应液浓缩。得到的残留物用正向柱（DCM：MeOH = 20：1）纯化得到目标化合物 **4**（4 g，收率 96.0%）。



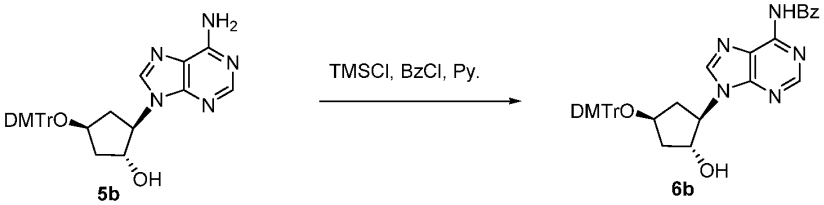
4 5a 5b

氩气保护下，0℃下将硼烷（BH_3）四氢呋喃溶液（1.0 M 溶解于 THF 中, 38.54 mL，38.54 mmol）逐滴滴加到溶有化合物 **4**（4.00 g，7.71 mmol）的 THF（12 mL）溶液中。该化合物在氩气保护下 0℃搅拌 6 h 后，逐滴滴加 H_2O（27 mL）。然后，将 3 M 的 NaOH 水溶液（52 mL，156 mmol）0℃下逐滴加入反应液中后，再将

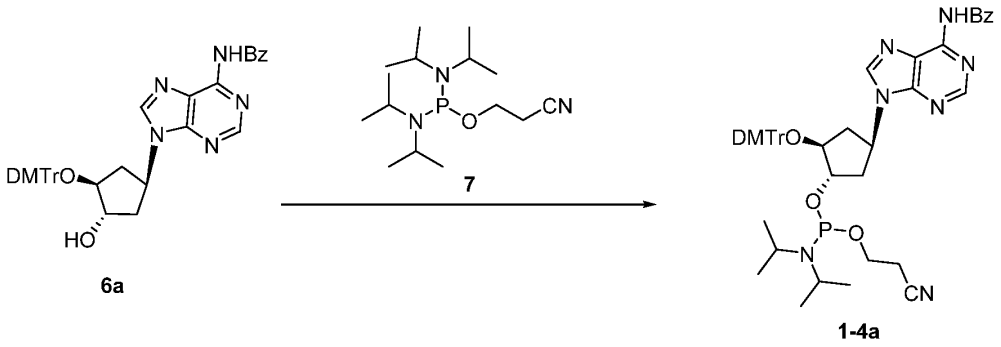
30 % 的 H_2O_2（106 mL）的水溶液逐滴滴加反应液中，再加入 EtOH（10 mL）。该反应液室温搅拌 48 h 后，0℃下用饱和的 $Na_2S_2O_3$ 缓慢加入，直到无气泡产生。将 H_2O（300 mL）加到反应液中，用 DCM（4×200 mL）萃取。有机相用无水 Na_2SO_4 干燥，过滤并浓缩。得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, 乙腈 + H2O, 50%），冻干后得到目标产物 **5a**（730 mg，收率 17.6%）和目标产物 **5b**（1.1 g，26.6%）。



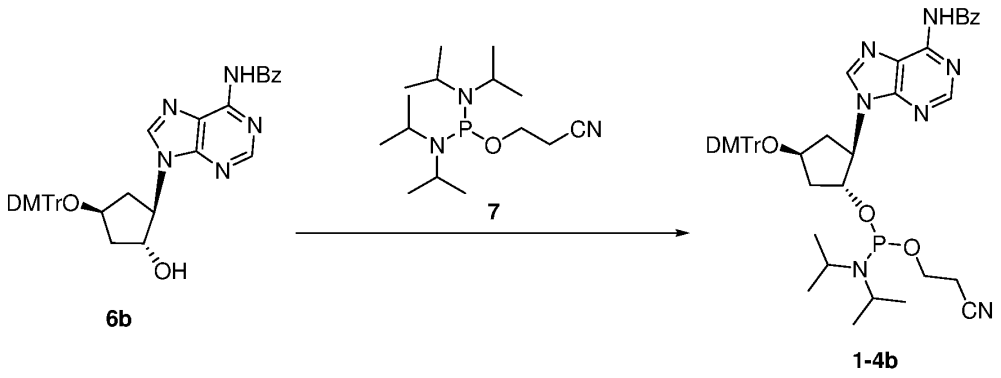
将化合物 **5a**（730 mg，1.36 mmol）溶解在吡啶（8 mL）中，氩气保护和室温下加入 TMSCl（0.67 g，6.14 mmol）。室温搅拌 1 h 后, BzCl（0.29 mL，2.46 mmol）加到反应液中。室温搅拌 16 h 后，反应液用 H_2O（10 mL）淬灭并浓缩。得到的残留物溶解在 THF（30 mL）中，加入四丁基氟化铵（TBAF，1 mL）。室温搅拌 1 h 后, 将氨水（0.5 mL）加入，室温搅拌 5 h 后。反应液用乙醇（EA，100 mL）稀释并用饱和食盐水（30 mL）洗五次。将有机相浓缩，得到残留物用反相柱纯化（C18, H_2O +乙腈, 乙腈 60%）冻干得到目标产物 **6a**（480 mg，收率 74.8%）。MS m/z：$C_{38}H_{35}N_5O_5$，$[M+H]^+$：642.6。



将化合物 **5b**（1.1 g，2.05 mmol）溶解在吡啶（20 mL）中，氩气保护和室温下加入 TMSCl（1.34 g，1.28 mmol）。室温搅拌 1 h 后, 苯甲酰氯（BzCl，0.59 mL，5.92 mmol）加到反应液中。室温搅拌 16 h 后，反应液用 H_2O（10 mL）淬灭并浓缩。得到的残留物溶解在 THF（30 mL）中，加入 TBAF（2 mL）。室温搅拌 1 h 后, 将氨水（0.5 mL）加入，室温搅拌 5 h 后。反应液用 EA（100 mL）稀释并用饱和食盐水（30 mL）洗五次。将有机相浓缩，得到残留物用反相柱纯化（C18, H_2O +乙腈, 乙腈 60%）冻干得到目标产物 **6b**（1.4 g，收率 82.1%）。MS m/z：$C_{38}H_{35}N_5O_5$，$[M+H]^+$：642.5。

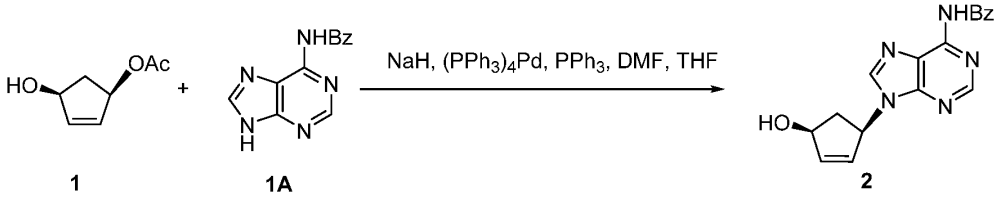


将化合物 **6a**（700mg，1.04 mmol），四氮唑（26.2 mg，0.37 mmol），N-甲基咪唑溶解在 CH_3CN（10 mL）中，加入 3A 分子筛（500 mg）。氩气保护，室温搅拌 5min 后，加入化合物 **7**（470.4 mg，1.56 mmol）。室温搅拌 1 h 后, 将分子筛过滤掉，固体用 DCM（50 mL）淋洗三次。滤液分别用饱和的 $NaHCO_3$ 水溶液（50 mL×4）和 H_2O（50 mL×4）洗。有机相在 30℃下浓缩。得到残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O +乙腈, 乙腈 90%），冻干后得到目标化合物 **1-4a**（600 mg，收率 66.1%）。MS m/z：$C_{47}H_{52}N_7O_6P$，[M-氰乙基-二异丙基+OH]$^-$：704.3。

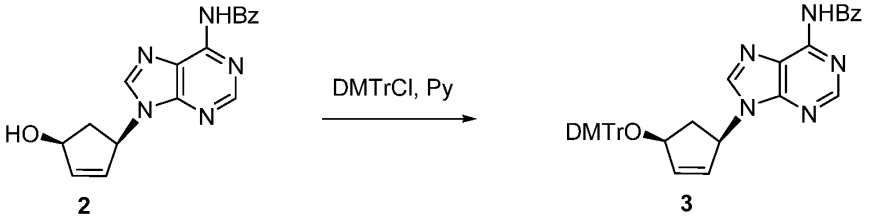


将化合物 **6b**（1.3 g，2.03 mmol），四氮唑（71.0 mg，1.01 mmol），N-甲基咪唑（33.3 mg，0.41 mmol）溶解在 CH_3CN（20 mL）中，加入 3A 分子筛（700 mg）。氩气保护，室温搅拌 5min 后，加入化合物 **7**（0.92 g，3.04 mmol）。室温搅拌 1 h 后, 将分子筛过滤掉，固体用 DCM（50 mL）淋洗三次。滤液分别用饱和的 $NaHCO_3$ 水溶液（50 mL×4）和 H_2O（50 mL×4）洗。有机相在 30 ℃下浓缩。得到残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O +乙腈, 乙腈 90%），冻干后得到目标化合物 **1-4b**（1.4g, 收率 82.1%）。MS m/z：$C_{47}H_{52}N_7O_6P$，[M-氰乙基-二异丙基]$^-$：704.3。

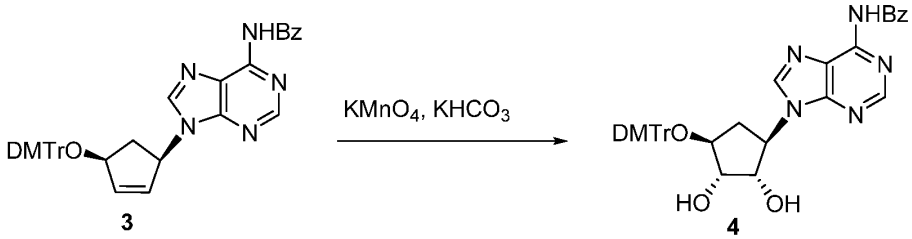
1.5 合成化合物 1-5



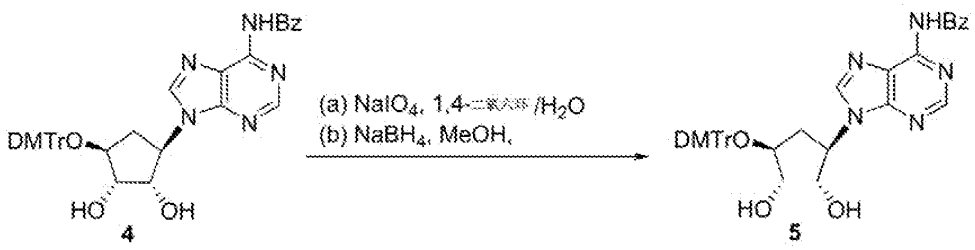
将化合物 **1A**（6.73 g，28.14 mmol）溶解在干燥的 DMF（80 mL）中，氩气保护下缓慢加入 NaH（60%，1.24 g，30.95 mmol）。该混合液室温搅拌 30min 后，将该反应液加到溶有 $Pd(PPh_3)_4$（1.95 g，1.69 mmol），PPh_3（0.74 g，2.81 mmol）和化合物 **1**（4.0 g，28.14 mmol）的 THF（60 mL）溶液中。该反应液在 55℃搅拌 16 h 后，将固体滤掉并用 DCM（60 mL）洗涤三次。将滤液浓缩，得到的残留物用正向柱纯化（先用乙酸乙酯, 再用乙酸乙酯:甲醇（12：1 冲洗柱子）得目标固体 **2**（7 g，粗品）。



将化合物 **2**（8 g，粗品）和 DMTrCl（12.65 g，37.34 mmol）溶解在吡啶（10 mL）。该混合物室温搅拌 16 h 后，用水（80 mL）淬灭并浓缩。得到的残留物用反向柱纯化（C^{18}, 水 + 乙腈）冻干后，得到目标化合物 **3**（13 g，收率 83.7%）。

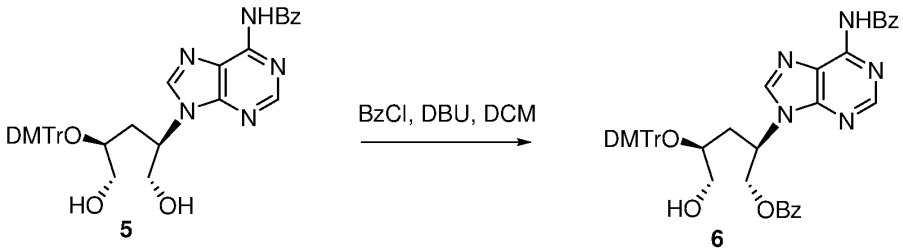


将化合物 **3**（1 g，1.60 mmol），$KHCO_3$（0.48 g，4.81 mmol）和乙二醇（0.40 g，6.41 mmol）溶解在丙酮（50 mL）中，-30℃下缓慢加入 $KMnO_4$（40%溶解于水中, 0.67 g，1.68 mmol）。-30℃下搅 1 h 后，用饱和的硫代硫酸钠水溶液（30 mL）将反应淬灭。该混合液用 DCM（30 mL）萃取四次。有机相用无水 Na_2SO_4 干燥，过滤并浓缩。残留物用反向柱纯化（C18, H_2O +乙腈, 乙腈 60%）冻干得到目标产物 **4**（600 mg，收率 56.9%）。MS m/z：$C_{38}H_{35}N_5O_6$，$[M+H]^+$：658.5。



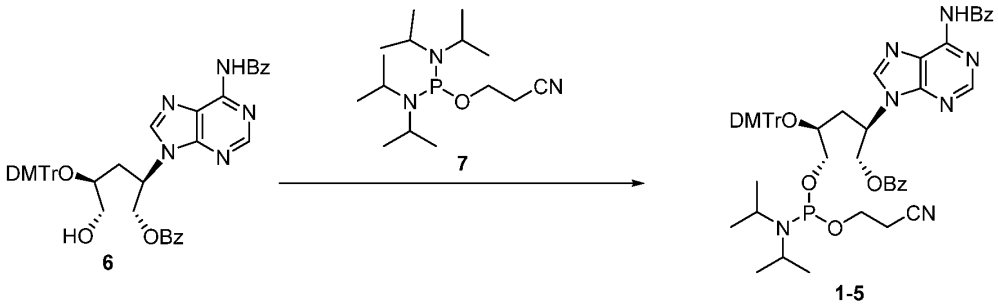
在 250 mL 圆底瓶中加入反应物 **4**（5.0 g，7.601 mmol），$NaIO_4$ 和 1,4-二氧六环/水（50 mL/5 mL），室温反应 2 小时后，减压除去溶剂，得到白色固体（6.0 g），然后溶于甲醇（50 mL），加入硼氢化钠（1.62 g，38 mmol），室温搅拌 2

小时后，加入 10%氯化铵溶液（10 mL），减压除去溶剂后，C18 柱层析（水/乙腈：5%-95%）得到产品 P1，无色油状物 **5**（2.0 g，3.0315 mmol，39%），LCMS, MS+, [M+H]+：660。



5 6

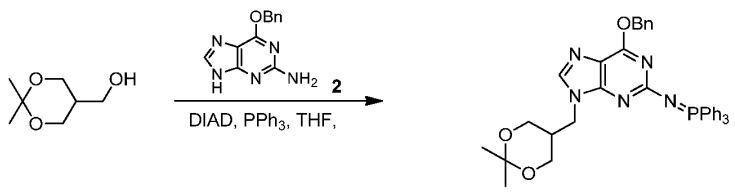
将化合物 **5**（1.7 g，2.58 mmol）和 DBU（0.77 mL，5.15 mmol）溶解在 DCM（20 mL），氩气保护-70 ℃下将 BzCl（0.5 M in DCM, 0.8 mL）逐滴滴加到反应中。该反应液置于-70 ℃下 1 h，该反应液用乙醇（5 mL）淬灭。淬灭的反应液用 DCM（100 mL）稀释并用水（30 mL）洗涤三次，有机相用无水 Na_2SO_4 干燥，过滤并浓缩。得到的残留物用正向柱纯化（DCM ：EA = 1 ：1）得到白色固体 **6**（80 mg，收率 4.14%）。MS m/z：$C_{45}H_{41}N_5O_7$，$[M+H]^+$：764.5。



6

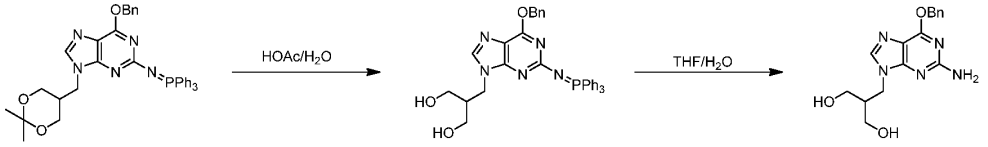
将化合物 **6**（380 mg，0.50 mmol），四氮唑（17.43 mg，0.25 mmol），N-甲基咪唑（8.17 mg，0.10 mmol）溶解在 CH_3CN（10 mL）中，加入 3A 分子筛（500 mg）。氩气保护，室温搅拌 5min 后，加入化合物 7（224.95 mg，0.75mmol）。室温搅拌 1 h 后, 将分子筛过滤掉，固体用 DCM（50 mL）淋洗三次。滤液分别用饱和的 $NaHCO_3$ 水溶液（50 mL×4）和 H_2O（50 mL×4）洗。有机相在 30 ℃下浓缩。得到残留物用反向柱纯化（C^{18}, H_2O +乙腈, 乙腈 90%），冻干后得到目标产物 **1-5**（330 mg，收率 68.8%）。MS m/z：$C_{54}H_{58}N_7O_8P$，[M-氰乙基-二异丙基]$^-$：826.3。

1.6 合成化合物 1-6a



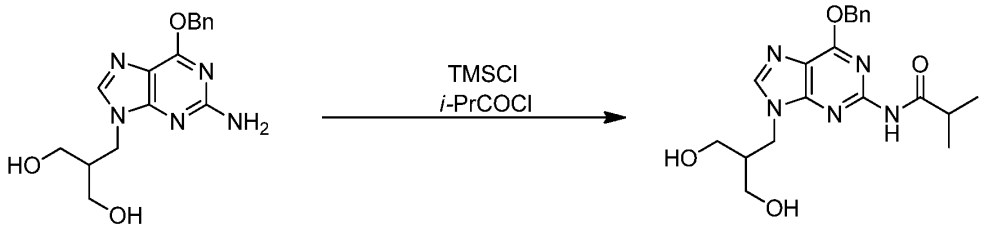
1 3

将化合物 1（10 g，68.404 mmol），化合物 2（15 g，62.186 mmol）和 三苯基膦（32.62 g，124.371 mmol）溶于无水 THF（30 mL），于 0 °C 下缓慢滴加 DIAD（24.656 mL，124.371 mmol）。该反应液在 25 度下反应 12 h. LCMS 显示反应完成。将该反应液用乙酸乙酯（200 mL）和水（200 mL）萃取，有机相干燥将滤液浓缩，得到的残留物用正向柱纯化（DCM/ MeOH = 10/ 1）得目标产物 3（20 g）。



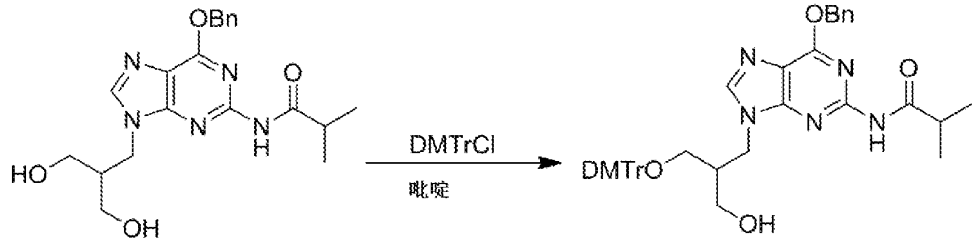
3 4 5

将化合物 **3**（20 g，28.585 mmol）溶于醋酸（24 mL，426.016 mmol）和 H2O（12 mL）中，60 °C 搅拌 1 小时。之后将反应液旋干加入 THF（12 mL）和 H2O（12 mL），80 °C 搅拌 7 小时。LCMS 显示反应完成。将反应液加入乙酸乙酯（200 mL）和水（100 mL）萃取，水相加入碳酸钠固体直到水相有大量固体析出。将固体过滤，用水洗涤，将滤饼用油泵拉干，得到目标化合物 **5**（9 g）。



5 **6**

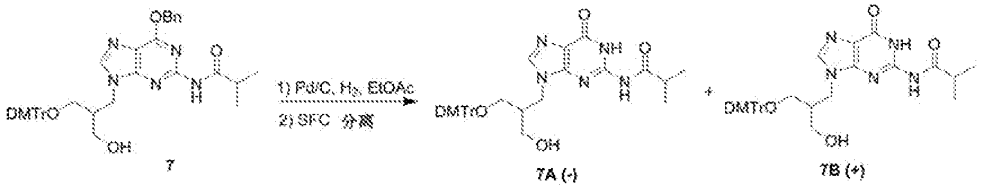
在氮气保护下，将化合物 5（6.8 g，18.581 mmol）溶于吡啶（80 mL）中，于 0 度下缓慢加入 TMSCl（14.250 mL，111.489 mmol），搅拌 2 h。之后在 0 度下加入 Isobutyryl chloride（2.044 mL，19.511 mmol），于 25 度下搅拌 1h. LCMS 显示反应完成。用二氯甲烷（200 mL）和水（200 mL）萃取，有机相干燥旋干后拌样，用正向柱纯化（DCM：MeOH=10：1）过柱，在 4.8% 处出峰），得到目标产物 6（12 g）。



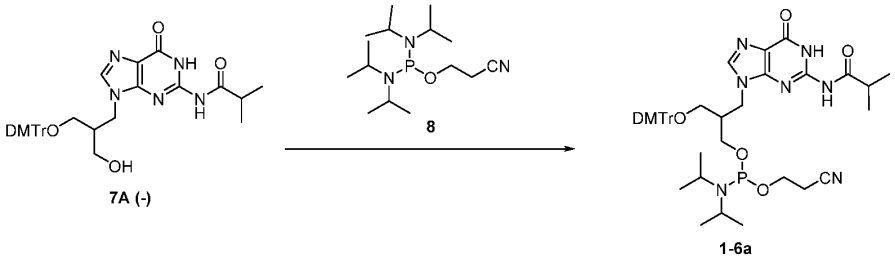
6 **7**

在氮气保护下，将化合物 6（5.5 g，12.392 mmol）溶于吡啶（30 mL），加入

MOLECULAR SIEVE 4A 1/16（7 g，12.392 mmol），然后在 0 °C 下分批加入 DMTrCl（5.04 g，14.870 mmol）固体，25 °C 反应 2h. TLC（PE：EtOAc= 1：1, Rf = 0.69）显示反应已经完成。该反应液和 TJN200879-040-P1 合并一起处理。将反应液用乙酸乙酯（200 mL）和水（200 mL）萃取，有机相干燥旋干后拌样用正向柱纯化（PE：EtOAc 过柱，在 84% 处出峰），得到目标产物 7（12 g）。

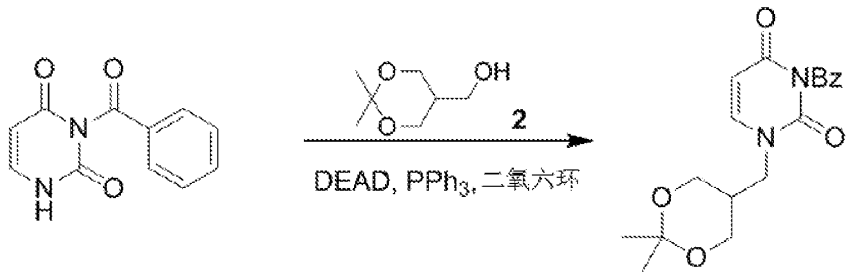


将化合物 7（12 g，15.389 mmol）溶于 EtOAc（140 mL），加入湿钯碳 Pd/C（7 g，15.389 mmol）该反应液在 25 度，氢气（15 Psi）下反应 2 小时。TLC（PE：EtOAc = 0：1, Rf = 0.09）显示反应已经完成。将反应液过滤，滤饼用乙酸乙酯（30 mL）冲洗三遍后，收集滤液。滤液旋干后加入 50 mL 二氯甲烷和 2 mL 三乙胺拌样用正向柱纯化（DCM：MeOH=10：1 过柱，在 0.5% 处出峰），得到 9 g（黄色泡沫状固体）。将所得消旋化合物 SFC 分离，得到产品目标化合物 7A(-)（3.9 g）和目标化合物 7B(+)（3.8 g）。



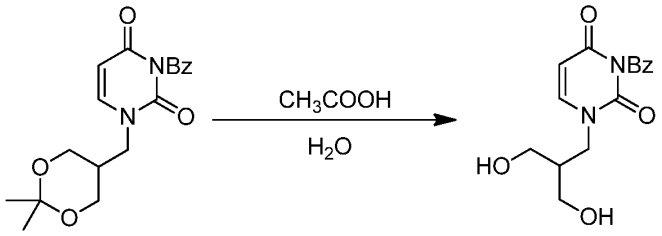
将化合物 7A(-)（3.30 g，5.40 mmol），四氮唑（190 mg，2.70 mmol），1-甲基咪唑（90 mg，1.10 mmol），3A 分子筛（500 mg）溶于 30 mL 的乙腈中，室温下加入化合物 8（2.50 g，8.10 mmol），在室温下搅拌 2 h。反应完毕后，将分子筛过滤掉，加入 DCM（150 mL），饱和碳酸氢钠水溶液洗涤（30 mL×3），再用饱和食盐水（30 mL）洗涤，滤液旋干并经反相制备 HPLC（C18，条件：5-100%（A：水，B：CH3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 **1-6a**（2.9 g，66%）。MS m/z：C43H55N7O7P [M+H]+，理论：812.38，实测：812.5。1H NMR（400 MHz，Acetonitrile-d3）δ 7.56, 7.54（2s，1H），7.36-7.27（m，2H），7.24-7.21（m，7H），6.83-6.80（m，4H），4.12-4.10（m，2H），3.75-3.68（m，10H），3.20-2.80（m，2H），2.68-2.54（m，4H），1.22-1.04（m，18H）。

1.7 合成化合物 1-7a



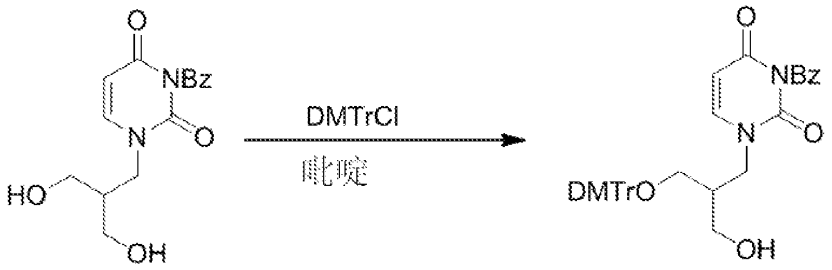
1 3

在氮气保护下，将化合物 1（5 g，23.1272 mmol），化合物 2（6.76 g，46.254 mmol）和三苯基磷（7.28 g，27.753 mmol）溶于 30 mL 二氧六环中，于 0 °C 缓慢滴加入 DEAD（5.502 mL，27.753 mmol）。滴加完成后，反应缓慢升温至 25 °C 继续反应 1 h. 在反应液里加入 100 mL H2O 和 100 mL EtOAc 萃取，有机相合并干燥过滤浓缩后拌样过柱，用正向柱纯化（PE:EtOAc=1:1 过柱得目标产物（4 g）。



3 4

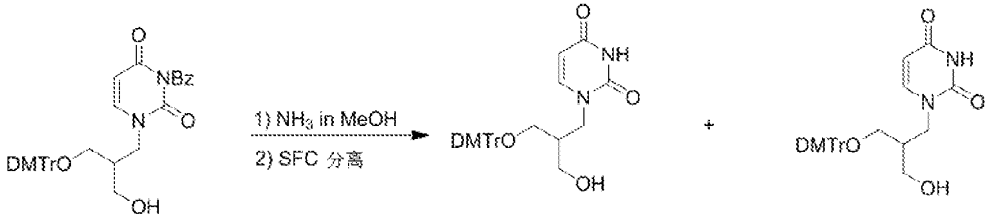
将化合物 3（3.3 g）溶于 HOAc（16 mL）和 H2O（4 mL），油浴 60 °C 加热 0.5 h. 将反应液旋干得到的残留物用正向柱纯化（PE:EtOAc=0:1 过柱），得到目标产物 4（3 g）。



4 5

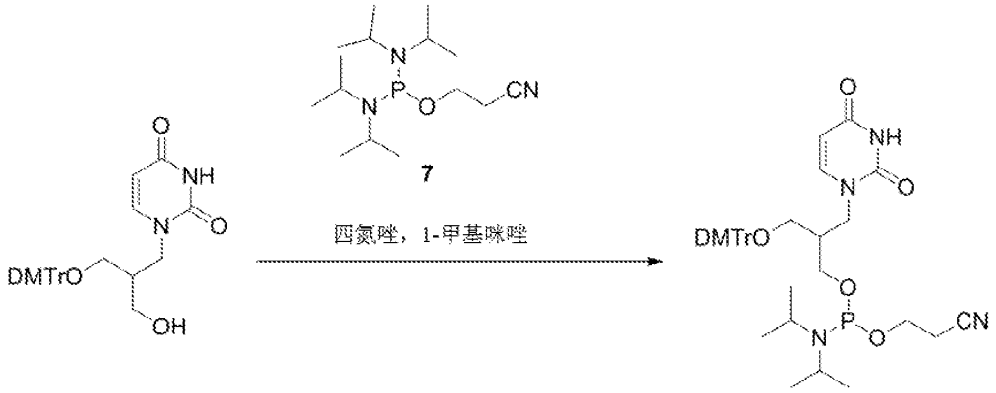
将化合物 4（3 g，8.873 mmol）溶于 5 mL 吡啶中，在氮气保护下于 0 °C 缓慢滴加 DMTrCl（3.91 g，11.535 mmol）的 10 mL 吡啶的溶液。滴加完毕后反应升温至 25 °C 并继续反应 1 h。在反应液中加入 50 mL 水和 100mL 乙酸乙酯萃取。水相再用 100 mL 乙酸乙酯萃取三次，有机相合并干燥过滤浓缩用正向柱纯化（用

PE:EtOAc=2:1）。得到目标产物 5（4 g）。



5 6A (-) 6B (+)

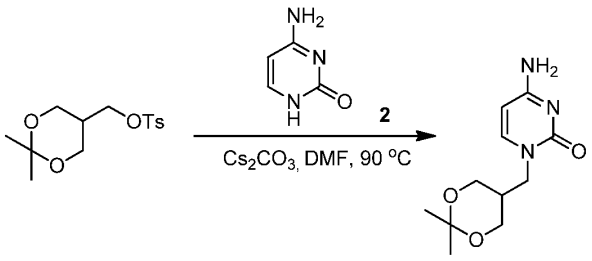
将化合物 5（4 g，5.769 mmol）溶于甲醇（10 mL），加入饱和的 NH3 甲醇溶液（40 mL），0 oC 反应 6 h. 将反应液旋干用正向柱纯化（用 PE:EtOAc =0:1）得消旋化合物 2.4 g SFC 分离，得到目标产物 6A（750 mg，100%纯度）和目标产物 6B（400 mg，99.16%纯度）。



6A (-) 1-7a

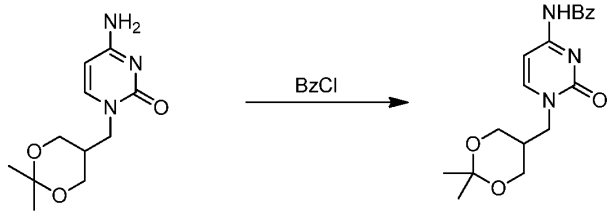
将化合物 6A(-)（700 mg，1.40 mmol），四氮唑（50 mg，0.70 mmol），1-甲基咪唑（23 mg，0.28 mmol），3A 分子筛（500 mg）溶于 10 mL 的乙腈中，室温下加入化合物 7（630 mg，2.10 mmol），在室温下搅拌 2 h。反应完毕后，将分子筛过滤掉，加入 DCM（50 mL），饱和碳酸氢钠水溶液洗涤（10 mL×3），再用饱和食盐水（20 mL）洗涤，滤液旋干并经反相制备 HPLC（C18，条件：5-100%（A：水，B：CH3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 **1-7a**（700 mg，72%）。MS m/z：C38H47N4O7PNa[M+Na]+，理论：725.32，实测：725.5。

1.8 合成化合物 1-8a



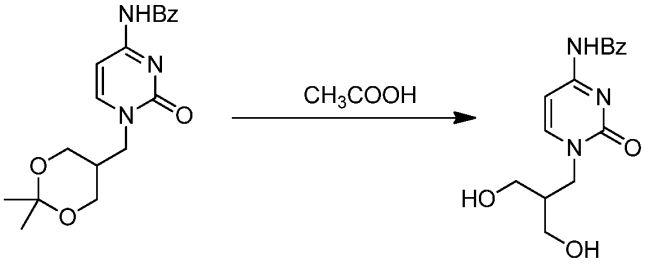
1 3

将化合物 1（8.5 g，76.508 mmol），化合物 2（30.64 g，91.809 mmol）溶于 DMF（150 mL），加入 CS2CO3（29.91 g，91.809 mmol），反应于氮气保护下，90 ℃反应 12 h。LCMS 检测反应完成。将反应液过滤，油泵旋干，正向柱分离纯化（80g, DCM/ MeOH = 10/ 1 至 5/ 1）得到目标产物 3（13.5 g，80%纯度）。



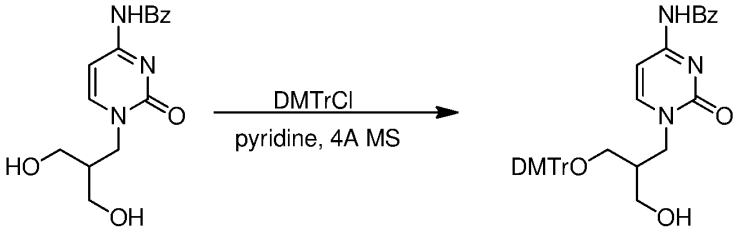
3 4

将化合物 3（10.5 g，35.105 mmol）溶于吡啶（65 mL）和 CH3CN（65 mL），向溶液中滴加 BzCl（4.894 mL，42.126 mmol），于 25 ℃反应 2h。LCMS 检测大部分原料反应完成，加 H2O（100 mL）淬灭，EtOAc（100 mL X 3）萃取，干燥旋干，柱分离（合并 TJN200872-101）纯化（80 g，PE/ EtOAc =10/ 1 至 0/ 1, DCM/ MeOH=10/ 1）得到目标产物 **4**（14 g，90%纯度）。



4 5

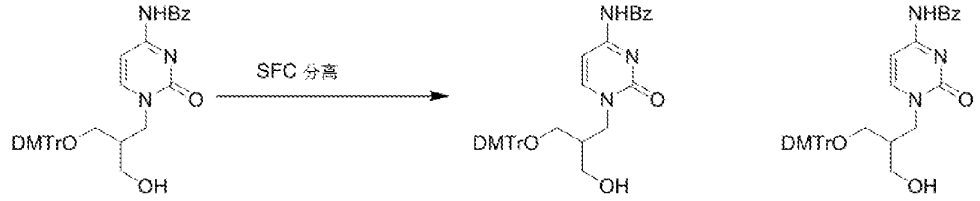
将化合物 4（14 g，36.694 mmol）溶于 HOAc（56 mL，314.796 mmol）和 H2O（14 mL），于 60 ℃反应 2h, LCMS 显示反应完成。油泵浓缩，正向柱分离（40 g，DCM/ MeOH = 1/ 0 至 5/ 1）得到目标产物 **5**（8.4 g，90%纯度& 2.4 g，80%纯度）。



5 6

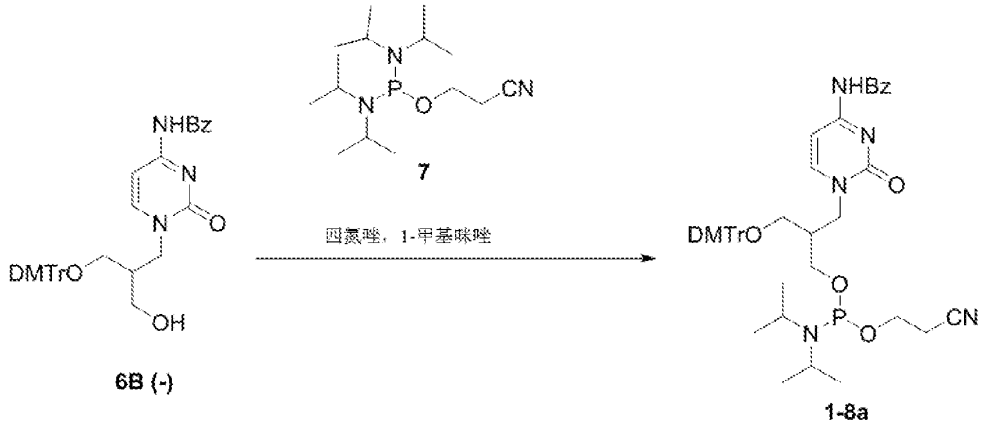
将化合物 5（7.4 g，21.957 mmol），DMAP（0.54 g，4.391 mmol），MOLECULAR SIEVE 4A（11.1 g，2.967 mmol）溶于吡啶（60 mL），冰浴下搅拌 10 min，然后加入 DMTrCl（8.93 g，26.348 mmol），反应搅拌 1.8 h. LCMS 检测约 19% 原料剩余，约 60% 目标 MS。合并（TJN200872-105&106）一起纯化。向反应液中加入 H2O

（50 mL），经 DCM（50 mL X 3）萃取，干燥，旋干，柱分离（120 g，PE/（EA：DCM：TEA = 1：1：0.05）= 1/ 0 至 0/ 1 至 DCM/ MeOH = 10/ 1）得到目标产物 6（11 g，89%纯度, TJN200872-105&106&107），回收原料（3.0 g，70%纯度）。



6　　6A (+)　　6B (-)

化合物 6（15 g，22.041 mmol）经 SFC（DAICEL CHIRALPAK AD（250mm×50mm,10um）；0.1% NH3H2O EtOH，B：45%-45%；200ml/ min）分离得到目标产物 6A（5.33 g，94.29%纯度），目标产物 6B（6.14 g，97.91%纯度），化合物 6 回收 1.0 g。



将化合物 6B(-)（5.4 g，8.92 mmol），四氮唑（312 mg，4.46 mmol），1-甲基咪唑（146 mg，1.78mmol），3A 分子筛（500 mg）溶于 40 mL 的乙腈中，室温下加入化合物 7（4 g，13.4 mmol），在室温下搅拌 2 h。反应完毕后，将分子筛过滤掉，加入 DCM（200 mL），饱和碳酸氢钠水溶液洗涤（30 mL×3），再用饱和食盐水（50 mL）洗涤，滤液旋干并经反相制备 HPLC（C18，条件：5-100%（A：水，B：CH3CN），流速：70 mL/min），冻干后得到 **1-8a**（5.8 g，80%）。MS m/z：C45H51N5O7P，[M+H]+，理论：804.36，实测：804.4。

实施例 2 siRNA 的合成

siRNA 的合成与通常的亚磷酰胺固相合成法无异，在合成 AS 链 5’第 7 位修饰的核苷酸时，使用上述合成的亚磷酰胺单体替换母序列原核苷酸。

合成过程简要描述如下：于 Dr.Oligo48 合成器（Biolytic）上，以 Universal CPG

载体为起始，根据合成程序逐个连接核苷亚磷酰胺单体。除上述描述的 AS 链 5’第 7 位的核苷亚磷酰胺单体外，其余核苷单体原料 2’-F RNA、2’-O-甲基 RNA 等核苷亚磷酰胺单体购自上海兆维或苏州吉玛。采用 5-乙基硫-1H-四唑（ETT）作为活化剂（0.6M 乙腈溶液），使用 0.22M 的 PADS 溶于 1:1 体积比的乙腈和三甲基吡啶（苏州柯乐玛）溶液作为硫化试剂，使用碘吡啶/水溶液（柯乐玛）作为氧化剂。

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

所得到的单链寡核苷酸，根据等摩尔比，按照互补配对，退火，最后所得到的双链 siRNA 溶于 1×PBS 中，并调整至实验所需浓度备用。

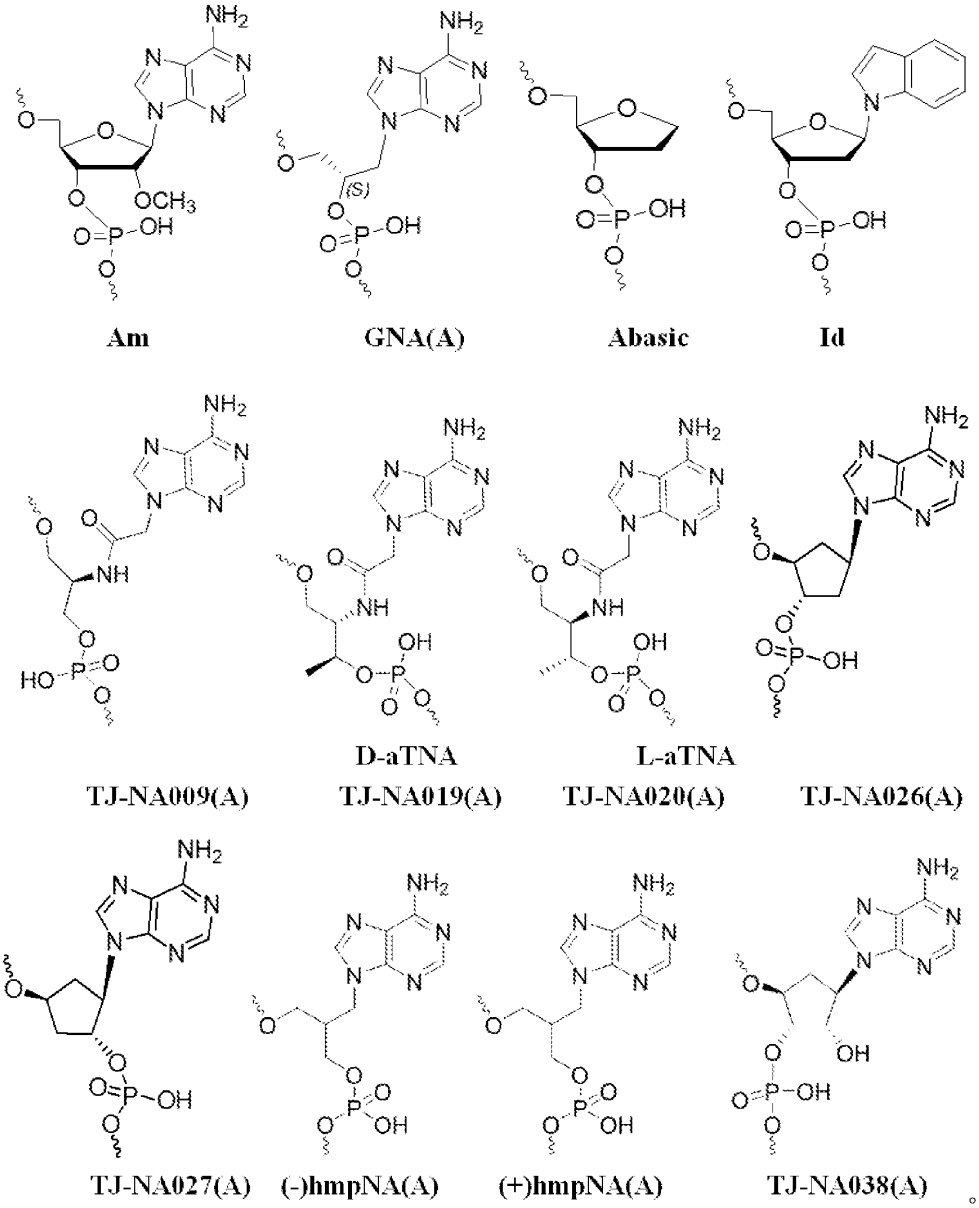
实施例 3 psiCHECK 活性筛选实验

Huh7 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 18h，将 Huh7 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 1 万个细胞，每孔 100μL 培养基。

转染前将孔中的含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基吸弃，换成 80 μL Opti-MEM，饥饿处理 1.5 h。然后按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染 siRNA 及对应质粒。在 96 孔板的每孔中添加含有 0.2μL Lipofectamine2000，20ng 质粒，以及 2.2μL siRNA（最高浓度 40nM，3 倍梯度稀释，共设置 11 个浓度点，每个浓度设双复孔）的 20μL Opti-MEM。37℃培养箱温育 4h 后，补充含 20% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。继续培养 24h 后，按照 Dual-Glo® Luciferase Assay System（Promega Cat.# E2940）检测试剂盒的实验操作方案进行荧光素酶活性检测。根据检测信号计算相对值 Ratio=Ren/Fir（海肾/萤火虫比值），以及抑制率 1-（Ratio+siRNA/Ratio 仅报告基因）×100%=抑制率（%）。本公开中，剩余活性%（也称为 mRNA 剩余表达量%或 mRNA 剩余表达比例）=100%-抑制率（%）。应用 Graphpad Prism 软件分析（four parameter logistic equations）计算 IC_{50} 值。

实施例 4 包含不同化学修饰的 siRNA 的在靶活性和脱靶活性实验

利用实施例 1 的化合物、采用实施例 2 的方法合成表 1 的 siRNA，并通过实施例 3 的方法验证各 siRNA 的在靶活性和脱靶活性，其中各 siRNA 采用相同的正义链，且反义链 5’端第 7 位分别为以下修饰核苷酸/化学修饰，



。

其中：我们将由 2-羟甲基-1,3-丙二醇为起始原料合成的核苷酸定义 hmpNA；

TJ-NA019(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-2 通过固相合成获得；

TJ-NA020(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-3 通过固相合成获得；

TJ-NA026(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-4a 通过固相合成获得；

TJ-NA027(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-4b 通过固相合成获得；

(+)hmpNA(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-1b 通过固相合成获得；

(-)hmpNA(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-1a 通过固相合成获得；

TJ-NA038(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-5 通过固相合成获得。

(+)hmpNA(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-1b 通过固相合成获得，绝

对构型为(S)-hmpNA(A)；

(-)hmpNA(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-1a 通过固相合成获得，绝对构型为(R)-hmpNA(A)；

类似的，替换 hmpNA 的碱基种类，通过固相合成获得以下结构并确认绝对构型：

(+)hmpNA(G)，绝对构型为(S)-hmpNA(G)；

(-)hmpNA(G)，绝对构型为(R)-hmpNA(G)；

(+)hmpNA(C)，绝对构型为(S)-hmpNA(C)；

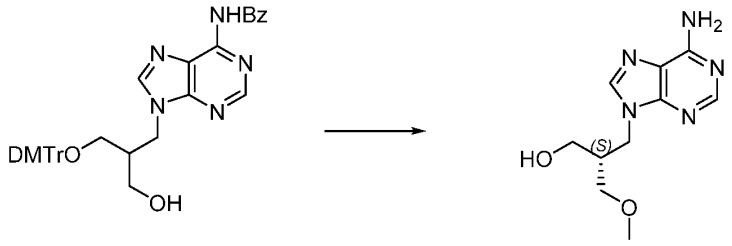
(-)hmpNA(C)，绝对构型为(R)-hmpNA(C)；

(+)hmpNA(U)，绝对构型为(R)-hmpNA(U)；

(-)hmpNA(U)，绝对构型为(S)-hmpNA(U)。

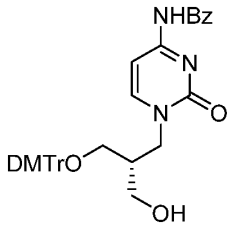
(S)-hmpNA(G)，(R)-hmpNA(G)，(S)-hmpNA(C)，(R)-hmpNA(C)，(S)-hmpNA(U)和(R)-hmpNA(U)的绝对构型由其中间体或衍生物经 X-Ray 衍射而确认。

中间体或衍生物的结构为：



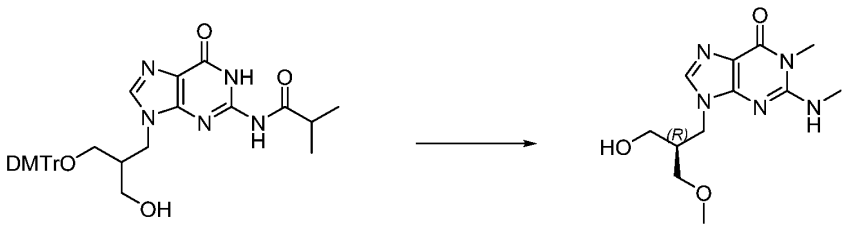
15.1 6B(+) TJ-NA067

TJ-NA067：检测晶体为无色块状（0.30 × 0.10 × 0.04mm3），属于单斜晶系 P21 空间群。晶胞参数 a = 16.0496（5）Å，b = 4.86260（10）Å，c = 16.4686（5）Å，α = 90°，β = 118.015（4）°，γ = 90°，V = 1134.65（7）Å3，Z = 4。计算密度 Dc = 1.389g/cm3，单胞中电子数 F（000）= 504.0，单胞的线性吸收系数 μ（Cu Kα）= 0.840mm–1，衍射实验温度 T = 150.00（11）K。



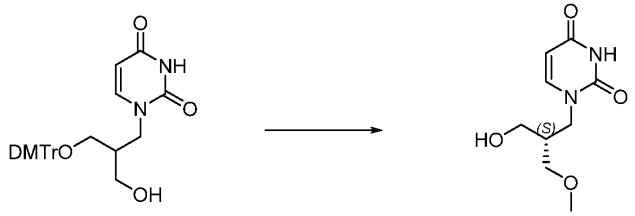
15.8 6A (+)

6A(+)：检测晶体为无色块状（0.30 × 0.20 × 0.10 mm3），属于单斜晶系 P21 空间群。晶胞参数 a = 22.6688（7）Å，b = 8.5595（2）Å，c = 23.3578（5）Å，α = 90°，β = 113.876（3）°，γ = 90°，V = 4144.3（2）Å3，Z = 2。计算密度 Dc = 0.999 g/cm3，单胞中电子数 F（000）= 1318.0，单胞的线性吸收系数 μ（Cu Kα）= 0.570 mm–1，衍射实验温度 T = 100.01（18）K。



15.6 7A (-) TJ-NA068

TJ-NA048：检测晶体为无色针状（0.30 × 0.04 × 0.04mm3），属于单斜晶系 P1 空间群。晶胞参数 a = 7.6165（4）Å，b = 11.3423（5）Å，c = 17.3991（8）Å，α = 85.007（4）°，β = 88.052（4）°，γ = 70.532（4）°，V = 1411.75（12）Å3，Z = 2。计算密度 Dc = 1.366g/cm3，单胞中电子数 F（000）= 620.0，单胞的线性吸收系数 μ（Cu Kα）= 0.856mm–1，衍射实验温度 T = 150.00（13）K。



15.7 6A (-) TJ-NA092

TJ-NA092：检测晶体为无色棱柱状（0.30 × 0.10 × 0.10 mm3），属于三斜晶系 P1 空间群。晶胞参数 a = 5.17960（10）Å，b = 8.0667（2）Å，c = 12.4077（2）Å，α = 93.146（2）°，β = 101.266（2）°，γ = 96.134（2）°，V = 503.993（18）Å3，Z = 2。计算密度 Dc = 1.412 g/cm3，单胞中电子数 F（000）= 228.0，单胞的线性吸收系数 μ（Cu Kα）= 0.945 mm–1，衍射实验温度 T = 100.00（10）K。

表 1. 靶向 HBV-S 的 siRNA 序列和修饰信息

	SEQ ID NO:	SS 链 5’-3’
	213	UmsGmsAmCmAfAmGfAfAfUmCmCmUmCmAmCmAmAmUm
双链代码		AS 链 5’-3’
TRD4389 母序列	214	AmsUfsUmGmUmGfAmGmGmAmUmUmCmUfUmGfUmCmAmsAmsCm
TRD5252	215	AmsUfsUmGmUmGf**GNA(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmGfUmCmAmsAmsCm
TRD5812	216	AmsUfsUmGmUmGf**Abasic**GmGmAmUmUmCmUfUmGfUmCmAmsAmsCm
TRD5813	217	AmsUfsUmGmUmGf**Id**GmGmAmUmUmCmUfUmGfUmCmAmsAmsCm
TRD5816	218	AmsUfsUmGmUmGf**TJ-NA009(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmGfUmCmAmsAmsCm
TRD5817	219	AmsUfsUmGmUmGf**TJ-NA019(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmGfUmCmAmsAmsCm
TRD5818	220	AmsUfsUmGmUmGf**TJ-NA020(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmGf

		UmCmAmsAmsCm
TRD5821	221	AmsUfsUmGmUmGf**TJ-NA027(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmGf UmCmAmsAmsCm
TRD5822	222	AmsUfsUmGmUmGf**(+)hmpNA(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmG fUmCmAmsAmsCm
TRD5823	223	AmsUfsUmGmUmGf**(-)hmpNA(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmGf UmCmAmsAmsCm
TRD5825	224	AmsUfsUmGmUmGf**TJ-NA038(A)**GmGmAmUmUmCmUfUmGf UmCmAmsAmsCm

在靶活性实验结果参见表 2，脱靶活性实验结果参见表 3。目前实验的化合物，在测试序列上均显示了与母序列相当或略优的活性，说明修饰没有影响在靶活性，其中活性最优的是分别包含 GNA/Abasic/Id、TJ-NA019(A)、TJ-NA020(A)、(+)hmpNA(A)和(-)hmpNA(A)的 siRNA。另外，母序列具有明显的脱靶活性，所有修饰均显示了明显的抑制脱靶活性的效果，特别是对于分别包含 TJ-NA027(A)、(+)hmpNA(A)和(-)hmpNA(A)的 siRNA，并未观察到脱靶活性。

表 2. 靶向 HBV-S 的 siRNA 的在靶活性结果

双链代码	靶基因 mRNA（在靶活性）表达剩余百分比（平均值）											
	40nM	13.3 nM	4.44 nM	1.48 nM	0.493 nM	0.16 4nM	0.05 4nM	0.018 2nM	0.006 09nM	0.002 03nM	0.000 67nM	IC50（nM）
TRD 4389	5.4%	4.1%	4.8%	4.8%	8.4%	21.7 %	53.0 %	82.5 %	104.9 %	99.4 %	95.2 %	0.0589
TRD 5252	3.4%	3.1%	3.1%	3.6%	5.7%	11.1 %	22.1 %	44.7 %	72.8 %	92.2 %	86.6 %	0.0162
TRD 5812	3.8%	3.0%	3.4%	3.6%	7.3%	9.8%	23.5 %	44.8 %	63.9 %	90.4 %	81.4 %	0.0158
TRD 5813	5.1%	3.8%	4.4%	4.3%	6.1%	13.2 %	33.5 %	53.8 %	74.5 %	80.8 %	96.4 %	0.0214
TRD 5816	3.9%	3.8%	3.4%	4.9%	6.9%	16.1 %	39.8 %	71.8 %	96.3 %	92.9 %	108.1 %	0.0389
TRD 5817	4.8%	4.2%	4.5%	3.7%	6.6%	13.7 %	31.0 %	61.0 %	81.8 %	92.9 %	103.7 %	0.0251
TRD 5818	3.7%	3.3%	3.1%	3.7%	6.1%	10.9 %	26.3 %	55.8 %	69.1 %	87.4 %	88.8 %	0.0195
TRD 5821	6.8%	5.2%	5.7%	6.1%	8.7%	19.7 %	39.3 %	69.9 %	102.8 %	92.9 %	97.9 %	0.0398
TRD 5822	4.4%	4.5%	4.1%	3.7%	5.3%	13.2 %	24.6 %	51.2 %	82.3 %	84.9 %	101.9 %	0.0200
TRD 5823	3.6%	3.8%	3.4%	3.4%	5.2%	11.0 %	29.7 %	58.3 %	71.4 %	84.7 %	100.7 %	0.0200
TRD 5825	4.3%	3.6%	3.4%	4.2%	7.1%	18.0 %	32.7 %	66.0 %	88.7 %	93.8 %	103.2 %	0.0302

表 3. 靶向 HBV-S 的 siRNA 的脱靶活性结果

双链代码	靶基因 mRNA（脱靶活性）表达剩余百分比（平均值）										
	40nM	13.3 nM	4.44 nM	1.48 nM	0.493 nM	0.164 nM	0.054 nM	0.0182 nM	0.006 09nM	0.002 03nM	0.000 67nM
TRD 4389	57.4%	55.9%	65.5%	73.3%	89.2%	92.8%	105.3%	102.4%	107.6%	96.0%	101.2%
TRD 5252	97.3%	100.4%	104.0%	108.1%	107.3%	102.9%	108.7%	94.9%	101.2%	101.8%	97.7%
TRD 5812	98.2%	107.0%	99.1%	100.7%	110.1%	125.2%	113.7%	105.3%	105.5%	99.5%	93.8%
TRD 5813	100.5%	105.2%	95.9%	112.1%	102.3%	104.3%	101.5%	97.2%	110.7%	100.6%	93.6%
TRD 5816	108.3%	101.5%	97.2%	109.5%	116.7%	122.8%	108.5%	113.2%	121.6%	112.9%	106.8%
TRD 5817	104.5%	106.7%	110.0%	109.3%	119.4%	120.9%	127.3%	113.6%	117.7%	112.2%	105.0%
TRD 5818	83.7%	89.7%	83.0%	91.0%	117.5%	79.4%	99.1%	103.4%	89.2%	92.9%	98.7%
TRD 5821	102.9%	99.3%	98.3%	99.6%	106.8%	106.4%	108.7%	108.1%	104.5%	95.4%	107.8%
TRD 5822	106.1%	93.8%	81.6%	100.4%	100.4%	96.9%	105.3%	101.9%	94.6%	101.4%	94.0%
TRD 5823	91.8%	89.1%	92.9%	99.8%	97.8%	101.1%	90.7%	92.6%	97.9%	95.9%	87.1%
TRD 5825	84.9%	89.7%	97.7%	106.7%	103.9%	104.7%	100.0%	100.9%	90.2%	112.7%	98.3%

实施例 5 包含不同化学修饰的 siRNA 的序列依赖性实验

已知 Abasic 修饰具有 siRNA 序列依赖性，因此发明人在多条不同序列上测试了本公开的实验化合物。使用了靶向不同基因（HBV-S、HBV-X）mRNA 的 siRNA（序列如表 4 所示），使用实施例 1 的化合物 TJ-NA020(A)、TJ-NA027(A)、(+)hmpNA(A)、(-)hmpNA(A)和作为对照的 GNA(A)、Id 化合物修饰 AS 链 5’端第 7 位（序列如表 5 所示），再与母序列比较在靶活性和脱靶活性。

表 4. 靶向不同基因的 siRNA 序列

siRNA 靶基因	SS 链 5’-3’	AS 链 5’-3’
HBV-S（siRNA2）	CmsCmsAmUmUfUmGfUfUfCmAmGmUmGmGmUmUmCmsGm（SEQ ID NO：225）	UmsGfsAmAmCmCfAmCmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：226）
HBV-X（siRNA3）	CmsAmsCmCmUfCmUfGfCfAmCmGmUmCmGmCmAmUmsGm（SEQ ID NO：227）	UmsAfsUmGfCmGfAmCmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：228）

表 5. 靶向不同基因的包含化学修饰的 siRNA 序列

靶 mRNA	siRNA	AS 链修饰
HBV-S	TRD5847	UmsGfsAmAmCmCfAmCmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：229）
	TRD5848	UmsGfsAmAmCmCfGNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：230）
	TRD5849	UmsGfsAmAmCmCfIdCmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：231）
	TRD5850	UmsGfsAmAmCmCfTJ-020(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：232）
	TRD5851	UmsGfsAmAmCmCfTJ-027(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：233）
	TRD5852	UmsGfsAmAmCmCf(+)hmpNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：234）
	TRD5853	UmsGfsAmAmCmCf(-)hmpNA(A)CmUmGmAmAmCmAfAmAfUmGmGmsCmsAm（SEQ ID NO：235）
HBV-X	TRD5854	UmsAfsUmGfCmGfAmCmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：236）
	TRD5855	UmsAfsUmGfCmGfGNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：237）
	TRD5856	UmsAfsUmGfCmGfIdCmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：238）
	TRD5857	UmsAfsUmGfCmGfTJ-020(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：239）
	TRD5858	UmsAfsUmGfCmGfTJ-027(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：240）
	TRD5859	UmsAfsUmGfCmGf(+)hmpNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：241）
	TRD5860	UmsAfsUmGfCmGf(-)hmpNA(A)CmGfUmGmCfAmGfAmGfGmUfGmsAmsAm（SEQ ID NO：242）

在靶活性实验结果参见表 6，GNA**(A)**显现出明显的序列依赖性，不同序列的在靶活性差异明显。本公开的实验化合物没有显示出明显的序列依赖性，普遍适用性更强。

表 6. 针对不同靶序列的 siRNA 的在靶活性结果

双链代码	靶基因 mRNA（在靶活性）表达剩余百分比（平均值）											
	40nM	13.3 nM	4.44 nM	1.48 nM	0.493 nM	0.164 nM	0.054 nM	0.0182 nM	0.006 09nM	0.002 03nM	0.000 67nM	IC50 值（nM）
TRD 5847	9.3%	7.2%	6.3%	8.5%	17.9%	47.2%	80.6%	94.7%	100.5%	106.1%	110.6%	0.1380
TRD 5848	46.5%	35.1%	26.6%	36.0%	67.3%	76.3%	88.4%	104.1%	91.6%	95.1%	98.1%	0.7943
TRD 5849	24.8%	16.7%	13.7%	20.9%	41.0%	71.6%	95.5%	98.2%	93.1%	104.3%	113.3%	0.3311

TRD 5850	19.7%	14.2%	12.8%	15.5%	29.3%	54.3%	84.2%	87.6%	86.6%	90.0%	95.2%	0.2042
TRD 5851	22.9%	15.5%	12.6%	20.2%	38.6%	70.0%	88.4%	102.3%	106.6%	101.0%	101.9%	0.3020
TRD 5852	24.7%	17.5%	13.1%	21.1%	40.5%	64.1%	84.3%	94.5%	88.4%	100.2%	95.1%	0.2951
TRD 5853	17.5%	11.5%	9.9%	13.5%	30.3%	54.5%	74.6%	86.3%	90.3%	91.0%	84.1%	0.1905
TRD 5854	37.9%	32.4%	35.3%	50.3%	70.6%	89.7%	98.8%	101.1%	106.1%	99.6%	114.7%	1.3804
TRD 5855	41.3%	40.7%	36.9%	73.6%	71.7%	87.0%	89.0%	85.8%	94.9%	104.4%	101.6%	4.2658
TRD 5856	38.6%	37.8%	35.8%	59.5%	72.7%	92.3%	92.5%	85.2%	102.1%	93.1%	102.1%	2.0417
TRD 5857	38.5%	34.4%	35.6%	45.6%	66.8%	81.4%	82.7%	84.7%	85.6%	95.0%	103.3%	1.1749
TRD 5858	25.0%	24.3%	26.0%	38.1%	59.3%	75.4%	86.5%	104.8%	93.8%	92.4%	94.7%	0.7244
TRD 5860	43.5%	37.1%	34.1%	50.8%	77.6%	88.5%	86.6%	100.0%	95.1%	97.8%	110.8%	1.5488

siRNA2 和 siRNA3 的脱靶活性实验结果参见表 7，可以看出，相对于母序列，本公开的实验化合物明显降低了 siRNA 的脱靶活性。

表 7. 针对不同靶序列的 siRNA 的脱靶活性结果

双链代码	靶基因 mRNA（脱靶活性）表达剩余百分比（平均值）										
	40nM	13.3 nM	4.44 nM	1.48 nM	0.493 nM	0.164 nM	0.054 nM	0.0182 nM	0.006 09nM	0.002 03nM	0.000 67nM
TRD 5847	51.2%	47.6%	47.5%	66.7%	77.8%	81.8%	93.2%	93.3%	93.1%	96.5%	85.7%
TRD 5848	99.9%	96.7%	101.6%	100.6%	91.6%	107.0%	96.7%	100.7%	95.4%	101.9%	113.0%
TRD 5849	77.3%	77.6%	69.3%	87.2%	90.7%	83.1%	85.4%	95.2%	94.1%	94.0%	108.0%
TRD 5850	86.3%	90.2%	92.1%	92.9%	89.8%	99.3%	98.6%	96.0%	95.8%	98.0%	103.5%
TRD 5851	84.9%	85.0%	87.7%	84.8%	86.8%	88.7%	92.1%	83.2%	91.5%	84.8%	104.1%
TRD 5852	81.8%	83.1%	79.0%	89.9%	91.3%	98.2%	99.3%	96.7%	109.6%	94.0%	99.8%
TRD 5853	86.4%	87.2%	91.4%	92.9%	91.9%	99.7%	87.0%	81.0%	89.0%	86.8%	91.3%
TRD 5854	36.9%	32.7%	36.1%	39.8%	62.9%	81.3%	87.6%	87.0%	95.8%	93.6%	99.8%
TRD 5855	71.1%	78.2%	81.6%	92.0%	91.0%	94.1%	87.3%	93.6%	99.4%	119.9%	96.6%
TRD 5856	89.7%	100.1%	96.5%	106.1%	112.7%	124.4%	117.5%	122.3%	117.5%	120.1%	112.6%
TRD 5857	84.9%	69.5%	86.0%	79.6%	87.1%	91.1%	96.1%	87.8%	104.8%	95.1%	95.2%
TRD 5858	73.9%	82.8%	92.5%	95.4%	107.5%	97.5%	99.1%	96.1%	94.1%	101.8%	99.8%

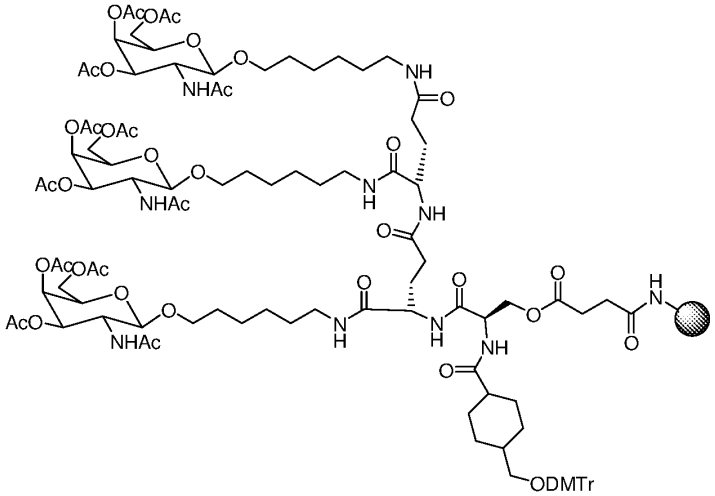
TRD 5859	79.8%	81.0%	86.0%	96.4%	101.9%	98.8%	99.8%	118.4%	101.3%	93.3%	103.2%
TRD 5860	78.4%	75.6%	80.6%	86.1%	83.2%	95.9%	91.6%	91.5%	95.6%	97.3%	98.6%

II. 靶向配体的制备和活性评价

表 8. 制备靶向配体的主要的仪器设备型号及原料来源

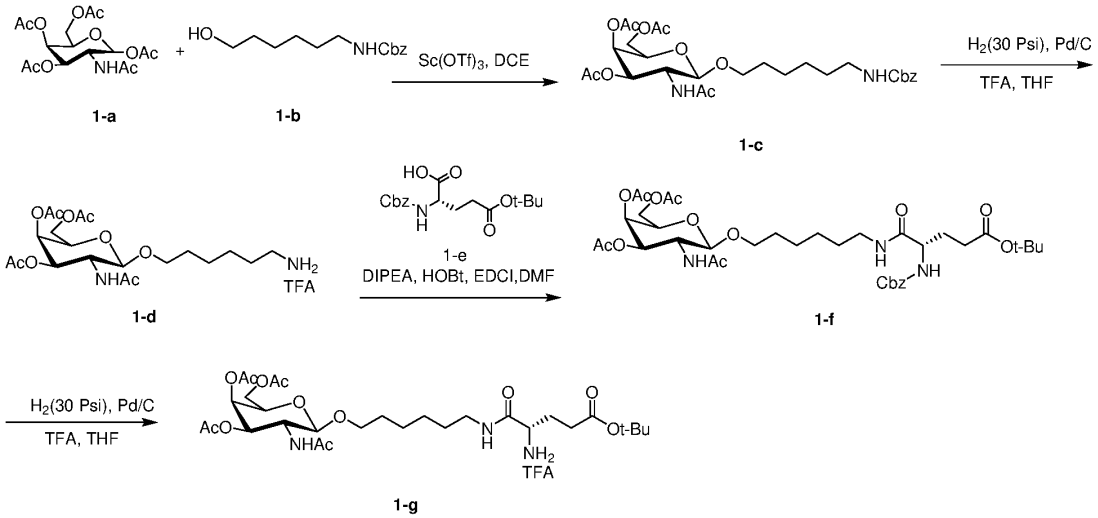
主要的仪器设备型号及原料来源		
名称	公司	货号/型号
固相合成仪	Dr.Oligo 48	Biolytic
HPLC	Agilent 1260 Infinity II	Agilent
质谱仪	Waters Acquity UPLC	Waters
核苷亚磷酰胺单体原料		Hongene Biotech

实施例 6 连接到固相载体上的氨基半乳糖化合物 1-t

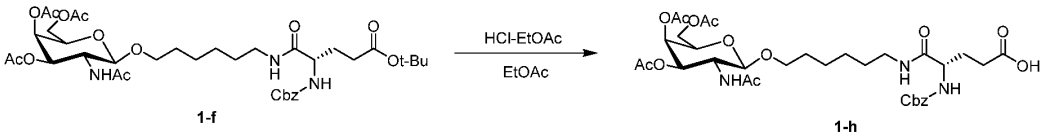


合成路线如下：

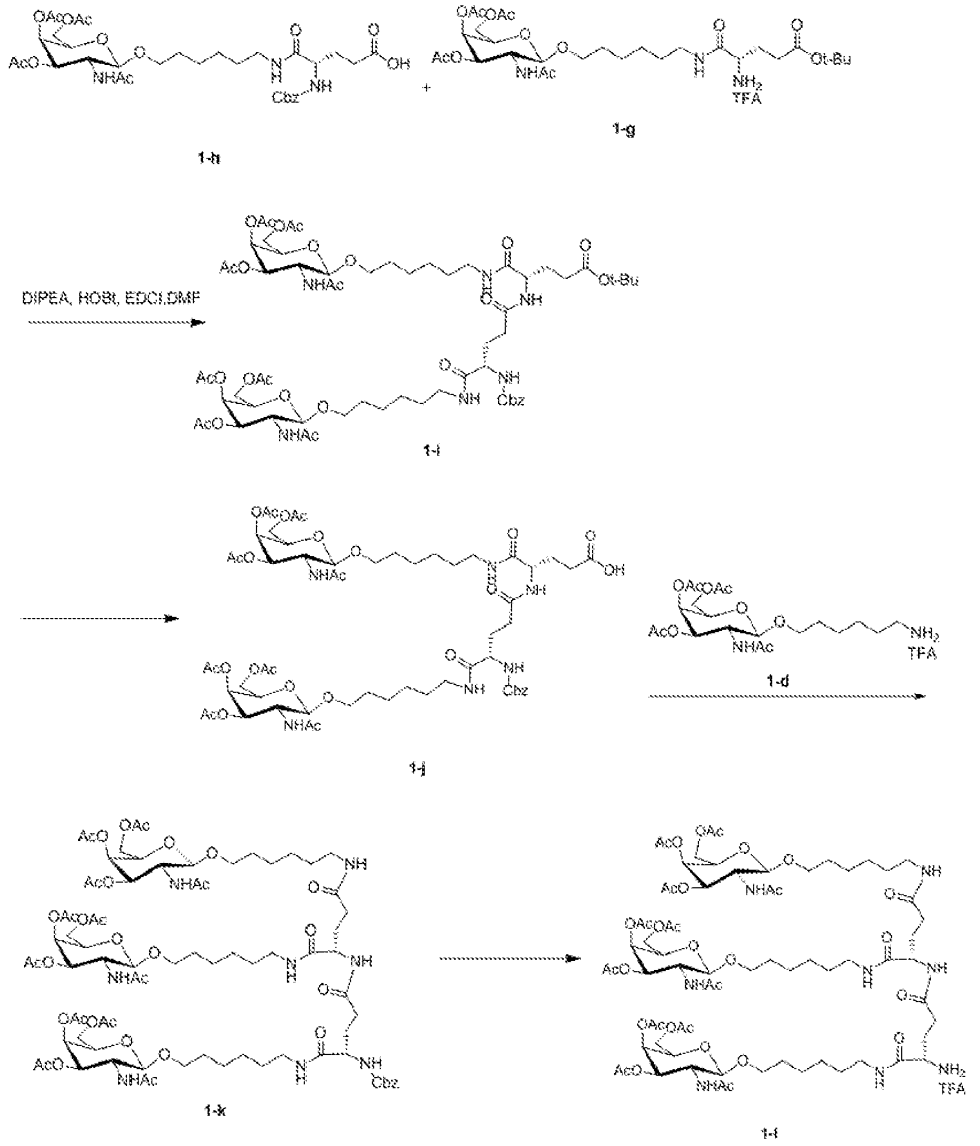
1）化合物 **1-g** 的合成路线



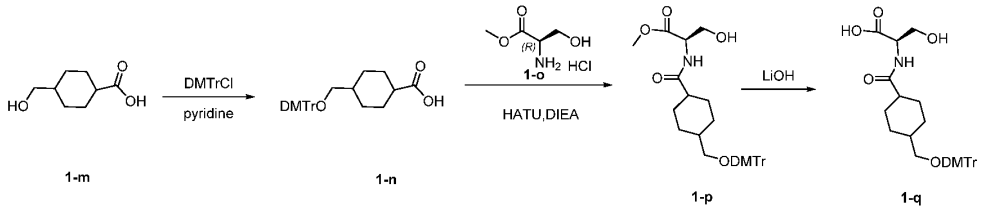
2）化合物 **1-h** 的合成路线



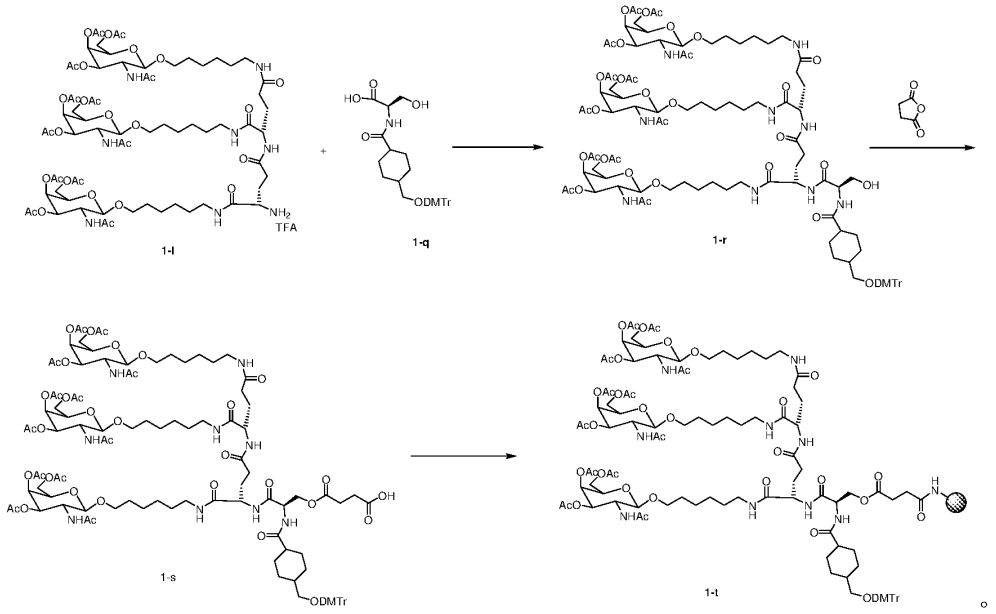
3）化合物 **1-l** 的合成路线



4）化合物 **1-q** 的合成



5）连接到固相载体上的氨基半乳糖化合物 **1-t** 的合成



步骤一

将原料 **1-a**（297 g，763 mmol）和原料 **1-b**（160 g，636 mmol）溶解于 960mlDCE，在 15℃条件下，加入 Sc（OTf）$_3$（15.6 g，31.8 mmol），然后升高反应温度到 85℃，搅拌反应 2h，反应结束后加入 1.5L 饱和 $NaHCO_3$ 中止反应，分出有机相，并再用 1.5 升饱和食盐水洗涤，有机相无水 Na_2SO_4 干燥，过滤后的溶液减压蒸馏后硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯 5:1-0:1），的到淡黄色油状产物 **1-c**（328 g，544 mmol，收率为 85.5%，纯度为 96.4%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，$CDCl_3$）δ 7.44-7.29（m，5H），5.83（d，J = 8.8 Hz，1H），5.40-5.23（m，2H），5.18-5.06（m，2H），4.86（s，1H），4.66（d，J = 8.4 Hz，1H），4.21-4.07（m，2H），4.04-3.77（m，3H），3.51-3.45（m，1H），3.31-3.11（m，2H），2.18（d，J = 2.0 Hz，1H），2.14（s，3H），2.06（s，3H），2.03-1.99（m，3H），1.95（s，3H），1.64-1.46（m，4H），1.43-1.29（m，4H）。

MS，$C_{28}H_{40}N_2O^{11}$，实测 M^+ 581.3。

步骤二

将步骤一所得化合物平行分成两份进行：每个反应包含化合物**1-c**（72.0 g，124 mmol）加入432mL THF中，在氩气保护下加入Pd/C（20.0 g，10% 纯度），再加入TFA（14.1 g，124 mmol，9.18 mL），在反应溶液中通入氢气，保持气体压力在30Psi，加热至30℃并搅拌反应16h。反应完成后，合并两个平行进行的反应，过滤，并减压浓缩滤液。残余物使用二氯甲烷稀释并重复减压浓缩，重复三次。减压抽干后得到目标化合物**1-d**（139 g）。

^{1}HNMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ 7.85（d，J = 9.2 Hz，1H），7.74（s，3H），5.21（d，J = 3.6 Hz，1H），4.97（dd，J = 2.8, 10.8 Hz，1H），4.48（d，J = 8.8 Hz，

1H），4.06-3.98（m，3H），3.93-3.82（m，1H），3.73-3.68（m，1H），3.63-3.56（m，1H），3.43-3.38（m，1H），2.82-2.71（m，2H），2.13-2.09（m，3H），2.01-1.97（m，3H），1.91-1.87（m，3H），1.77（s，3H），1.76-1.73（m，1H），1.52-1.44（m，4H），1.28（s，4H）。

步骤三

将化合物**1-d**（139 g，247 mmol）和化合物**1-e**（75.3 g，223 mmol）加入DMF溶液（834mL），在0℃下再加入DIPEA（41.6 g，322 mmol，56.1 mL）、HOBt（36.8 g，272 mmol）和EDCI（52.2 g，272 mmol），保持15℃搅拌反应16h，反应完成后将，反应液用二氯甲烷（（400 mL）稀释，然后用饱和氯化铵溶液（1L）、饱和$NaHCO_3$（1.00 L）、饱和食盐水依次洗涤，分出有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后减压蒸馏除去溶剂，残余物硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯=5:1-0:1），得到目标化合物**1-f**（108g，收率为56.8%）。

^{1}HNMR（40（400 MHz，DMSO-d_6）δ 7.89-7.78（m，2H），7.41-7.27（m，6H），5.21（d，J = 3.2 Hz，1H），5.08-4.92（m，3H），4.48（d，J = 8.4 Hz，1H），4.07-3.99（m，3H），3.97-3.81（m，2H），3.75-3.64（m，1H），3.42-3.37（m，1H），3.13-2.93（m，2H），2.20（t, J = 8.0 Hz，2H），2.10（s，3H），1.99（s，3H），1.89（s，3H），1.87-1.79（m，1H），1.76（s，3H），1.74-1.64（m，1H），1.48-1.41（m，2H），1.38（s，12H），1.29-1.20（m，4H），1.19-1.14（m，1H）。

MS，$C_{37}H_{55}N_3O_{14}$，实测值 M^+766.4。

步骤四

将上述所得化合物 **1-f** 平行分成两份进行：每个反应包含化合物 6（47.0 g，61.3 mmol）加入 280mL THF 中，在氩气保护下加入 Pd/C（15.0 g，10%纯度），再加入 TFA（7.00 g，61.3 mmol，4.54 mL），在反应溶液中通入氢气，保持气体压力在 30Psi，加热至 30℃并搅拌反应 16h。反应完成后，合并两个平行进行的反应，过滤，并减压浓缩滤液。残余物使用二氯甲烷稀释并重复减压浓缩，重复三次。减压抽干后得到目标化合物 **1-g**（94.0 g，粗品）。

^{1}HNMR（400 MHz，DMSO-d6）δ 8.38（s，1H），8.10（s，3H），7.83（d，J = 9.2 Hz，1H），5.21（d，J = 3.2 Hz，1H），4.96（dd，J = 3.6, 11.2 Hz，1H），4.47（d，J = 8.4 Hz，1H），4.06-3.98（m，3H），3.92-3.82（m，1H），3.75-3.67（m，2H），3.60（s，1H），3.43-3.37（m，1H），3.18-3.04（m，2H），2.30-2.24（m，2H），2.10（s，3H），2.00（s，3H），1.95-1.90（m，2H），1.89（s，3H），1.78-1.75（m，3H），1.49-1.41（m，3H），1.40（s，9H），1.26（s，4H）。

步骤五

将上述所得化合物**1-f**平行分成两份进行：每个反应包含化合物**1-f**（46.0 g，60 mmol）加入HCl-EtOAc（2.00 M, 276 mL）中，在15℃条件下搅拌反应16h。反应完成后合并两个反应溶液，减压蒸馏浓缩，残余物使用二氯甲烷稀释并重复减压

浓缩，重复三次。减压抽干后得到淡红色化合物**1-h**（91.0g，粗品）。

^{1}HNMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ 7.91-7.80（m，2H），7.42-7.26（m，6H），5.21（d，J = 3.2 Hz，1H），5.07-4.92（m，4H），4.48（d，J = 8.4 Hz，1H），4.06-3.98（m，3H），3.98-3.82（m，3H），3.73-3.65（m，1H），3.44-3.35（m，1H），3.12-2.94（m，2H），2.22（t, J = 8.0 Hz，2H），2.10（s，3H），2.01-1.97（m，4H），1.94-1.90（m，1H），1.89（s，3H），1.87-1.79（m，2H），1.76（s，3H），1.74-1.67（m，1H），1.49-1.40（m，2H），1.40-1.32（m，2H），1.24（d，J = 4.0 Hz，4H），1.19-1.13（m，1H）。

MS，$C_{33}H_{47}N_3O_{14}$，实测M^+710.3。

步骤六

平行进行两个反应：每个反应包含化合物 **1-g**（45.0 g，60.3 mmol）和化合物 **1-h**（38.5 g，54.3 mmol）加入到 270mL DMF，在 0℃下再加入 DIPEA（10.1 g，78.4 mmol，13.6 mL），再加入 HOBt（8.97 g，66.3 mmol）和 EDCI（12.7 g，66.3 mmol）。在 15℃条件下搅拌反应 16h。反应完成后合并两个反应溶液，并加入 300mL DCM 稀释，依次使用饱和氯化铵（800mL）、饱和 $NaHCO_3$（800 mL）和饱和食盐水（800mL）洗涤，有机相用无水 Na_2SO_4 干燥。过滤后，加压蒸发浓缩，残余物使用硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯=5:1-0:1），得到白色化合物 **1-i**（66.0 g，47.4 mmol，收率为 39.3%，纯度为 95.1%）。

^{1}HNMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ 7.96-7.78（m，5H），7.41-7.25（m，6H），5.21（d，J = 3.6 Hz，2H），5.05-4.92（m，4H），4.48（d，J = 8.8 Hz，2H），4.22-4.12（m，1H），4.02（s，6H），3.94-3.80（m，3H），3.74-3.64（m，2H），3.45-3.35（m，2H），3.11-2.92（m，4H），2.20-2.12（m，4H），2.10（s，6H），1.99（s，6H），1.89（s，6H），1.82-1.79（m，2H），1.76（s，6H），1.74-1.63（m，2H），1.44（d，J = 6.0 Hz，4H），1.37（s，12H），1.24（s，9H）。

MS：$C_{62}H_{94}N_6O_{25}$，实测值 m/z 1323.8。

步骤七

分成11个反应进行：在每个反应中加入化合物**1-i**（5.00 g，3.78 mmol）和甲苯（300 mL），加入硅胶（45.0 g）。在100℃下搅拌反应40h，反应完成后合并11个反应混合物。减压蒸馏除去溶剂后，残余物加入异丙醇和二氯甲烷，并搅拌20min。过滤除去不溶物，并使用异丙醇洗涤滤饼至无产物溶出，得到的溶液除去溶剂并抽干后得到淡黄色化合物**1-j**（43.2 g，34.0 mmol，收率为82.0%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，DMSO-d6）δ 8.01（d，J = 7.6 Hz，1H），7.93-7.79（m，2H），7.39-7.27（m，3H），5.21（d，J = 3.2 Hz，1H），5.06-4.91（m，2H），4.48（d，J = 8.0 Hz，1H），4.07-3.97（m，3H），3.94-3.82（m，2H），3.73-3.65（m，1H），3.45-3.36（m，2H），3.10-2.94（m，2H），2.15（d，J = 7.6 Hz，2H），2.10（s，3H），1.99（s，3H），1.89（s，3H），1.86-1.79（m，1H），1.77（s，3H），

1.74-1.65（m，1H），1.44（s，2H），1.37（d，J = 5.2 Hz，2H），1.24（s，4H）。

MS：$C_{58}H_{86}N_6O_{25}$，实测m/z=1267.8。

步骤八

此步平行分成两个反应进行：每个反应包含化合物 **1-d**（11.8 g，21.0 mmol）和化合物 **1-j**（21.3 g，16.8 mmol）加入到 70mL DMF，在 0℃下再加入 DIPEA（3.54 g，27.3 mmol，4.77 mL），再加入 HOBt（3.13 g，23.1 mmol）和 EDCI（4.44 g，23.1 mmol）。在 15℃条件下搅拌反应 16h。反应完成后合并两个反应溶液，并加入 500mL DCM 稀释，依次使用饱和氯化铵（1.5L）、饱和 $NaHCO_3$（1.5 mL）和饱和食盐水（1.5mL）洗涤，有机相用无水 Na_2SO_4 干燥。过滤后，加压蒸发浓缩，残余物使用硅胶柱层析纯化（二氯甲烷：甲醇=50:1-10:1），得到淡黄色化合物 **1-k**（54.0 g，31.8 mmol，收率为 75.6%）。

^{1}HNMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ 7.91（d，J = 7.6 Hz，1H），7.87-7.78（m，5H），7.73（t, J = 5.2 Hz，1H），7.42-7.24（m，6H），5.21（d，J = 3.6 Hz，3H），5.06-4.92（m，5H），4.48（d，J = 8.4 Hz，3H），4.19-4.09（m，2H），4.07-3.97（m，10H），3.94-3.80（m，4H），3.76-3.64（m，3H），3.42-3.37（m，4H），3.08-2.94（m，6H），2.20-2.12（m，2H），2.10（s，9H），2.08-2.01（m，2H），1.99（s，9H），1.89（s，9H），1.87-1.79（m，2H），1.77（s，9H），1.74-1.63（m，2H），1.44（d，J = 5.6 Hz，6H），1.40-1.31（m，6H），1.24（s，13H）。

MS：$C_{78}H_{118}N_8O_{33}$，实测值 m/z=1696.1。

步骤九

此步平行分成3个反应进行：在每个反应中加入化合物**1-k**（17.0 g，10.0 mmol）和THF（100 mL），在氩气保护下加入Pd/C（5.0 g，10%纯度），再加入TFA（1.14 g，10.0 mmol，742 μL），在反应溶液中通入氢气，保持气体压力在15Psi，加热至30℃并搅拌反应4h。反应完成后，合并3个平行进行的反应，过滤，并减压浓缩滤液。残余物使用二氯甲烷稀释并重复减压浓缩，重复三次。残余物使用制备液相色谱（C18，流动相A 0.1%TFA-水，流动相B：10-40% ACN，20min）纯化得到白色化合物**1-l**（17.3 g，10.2 mmol，收率为34.0%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，DMSO-d_6）δ 8.45（t, J = 5.2 Hz，1H），8.14（d，J = 5.2 Hz，3H），7.97（t, J = 5.2 Hz，1H），7.90-7.77（m，4H），5.21（d，J = 2.8 Hz，3H），4.96（dd，J = 3.2, 11.6 Hz，3H），4.47（d，J = 8.4 Hz，3H），4.20-4.10（m，1H），4.02（s，8H），3.87（q, J = 9.6 Hz，3H），3.75-3.61（m，4H），3.46-3.34（m，3H），3.21-2.93（m，6H），2.21（s，2H），2.14-2.02（m，11H），1.99（s，9H），1.96-1.82（m，12H），1.80-1.65（m，10H），1.44（d，J = 5.6 Hz，8H），1.36（d，J = 6.4 Hz，4H），1.30-1.17（m，12H）。

MS：$C_{70}H_{112}N_8O_{31}$，实测值m/2z=781.8。

步骤十

将化合物 **1-m**（2 g，12.64 mmol）溶于吡啶（10 mL）中，室温下滴加 DMTrCl（4.71 g，13.90 mmol）的吡啶（10 mL）溶液，反应在室温下搅拌 5 小时，待反应完毕后，用甲醇淬灭，减压浓缩得到粗品，用硅胶纯化（石油醚：乙酸乙酯=10：1 洗脱），收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂得到 4 g 的化合物 **1-n**。

MS m/z：$C_{29}H_{32}O_5$，$[M+H]^+$实测：461.3。

步骤十一

将化合物 **1-n**（2 g，4.34 mmol），N,N-二异丙基乙胺（DIEA，1.43 mL，8.68 mmol）和 HATU（2.47 g，6.51 mmol）溶解于 DMF（10 mL）中，室温下加入化合物 **1-o** 的 DMF（5 mL）溶液，该反应在室温下搅拌 8 小时。反应完毕后，加水淬灭，水相用乙酸乙酯提取，合并的有机相先用水洗涤，再用饱和食盐水（20 mL）洗涤，随后减压蒸干溶剂，经反相制备 HPLC（Column：Boston Green ODS 150×30 mm×5 um，条件：25-80%（A：水 0.075% $NH_3{\cdot}H_2O$，B：CH_3CN），流速：55 mL/min），冻干后得到 2.4 g 化合物 **1-p**。

MS m/z：$C_{33}H_{39}NO_7$，$[M+H]^+$实测：562.4。

步骤十二

将化合物 **1-p**（2.4 g，4.27 mmol）溶解于 15 mL 的甲醇和水（2：1）的混合溶液中，室温下加入 LiOH（0.36 g，8.54 mmol）并搅拌过夜。待反应完毕后减压蒸干溶剂，经反相制备 HPLC（Column：Boston Green ODS 150×30 mm×5 um，条件：25-75%（A：水 0.075% $NH_3{\cdot}H_2O$，B：CH_3CN），流速：55 mL/min），冻干后得到 2 g 化合物 **1-q**。

MS m/z：$C_{32}H_{37}NO_7$，$[M+H]^+$实测：548.6。

步骤十三

将化合物 **1-q**（0.37 g，0.69 mmol），DIEA（0.19 mL，1.15 mmol）和 HATU（0.32 g，0.86 mmol）溶于 2 mL 的 DMF 中，室温下加入化合物 **1-l**（0.9g, 0.69 mmol）的 DMF（2 mL）溶液，在室温下搅拌过夜。反应完毕后，经二氯甲烷（10mL）稀释反应液，并依次用饱和 $NaHCO_3$（20 mL）和饱和食盐水（20mL）洗涤，有机相无水 Na_2SO_4 干燥，过滤后减压浓缩。经反相制备 HPLC（Column：Boston Green ODS 150×30 mm×5 um，条件：25-65%（A：水 0.075% $NH_3{\cdot}H_2O$，B：CH_3CN），流速：45 mL/min）纯化，冻干后得到 0.5 g 化合物 **1-r**。

MS m/z：$C_{102}H_{147}N_9O_{37}$，$[M-H]^+$实测：2088.5。

步骤十四

将化合物 **1-r**（300 mg，0.14 mmol）和丁二酸酐（28.70mg，0.28 mmol）溶解于四氢呋喃中，向反应液中加入 DMAP（3.50 mg，0.028 mmol）并在 40 °C 下搅拌过夜。待反应完毕后，待反应完毕后，加入甲醇（18.8mg），并搅拌反应 10min，然后将反应液用二氯甲烷（3mL）稀释反应液，并用饱和 NaHCO3（5 mL）洗涤 2 次。将有机相减压浓缩至干，经反相制备 HPLC（Column：Boston Green ODS 150×30

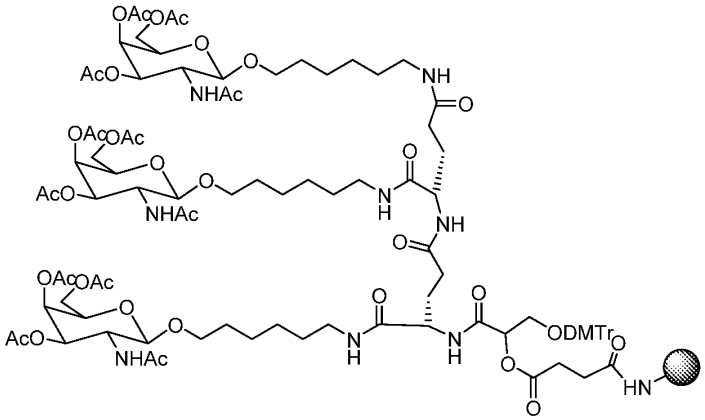
mm×5 um，条件：25-65%（A：水 0.075% $NH_3·H_2O$，B：CH_3CN），流速：35 mL/min）纯化，冻干后得到 140 mg 化合物 **1-s**。

MS m/z：$C_{106}H_{151}N_9O_{40}$，$[M-H]^+$实测：2189.4。

步骤十五

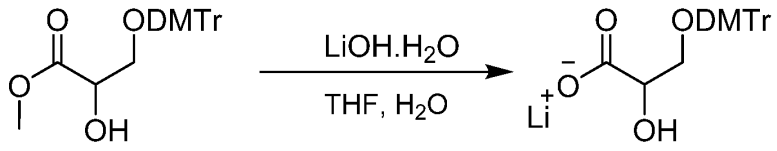
将上步得到的化合物 **1-r**（140mg，64μmol 加入乙腈（5mL），再加入 HBTU（48.7mg，128μmol），加入表面氨基修饰的固相支撑物（CPG-NH2，2.3g），加入 DIEA（41.5 mg，320 μmol, 55 μL），保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇（8mL×4）、二氯甲烷（8mL×4）洗涤。固体继续加入吡啶：乙酸酐（v：v = 4：1, 10.0 mL）中，继续保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇（8mL×4）、二氯甲烷（8mL×4）洗涤。得到连接在固相载体上的化合物 **1-t** 2.1g。

实施例 7 连接到固相载体上的氨基半乳糖化合物 2-e



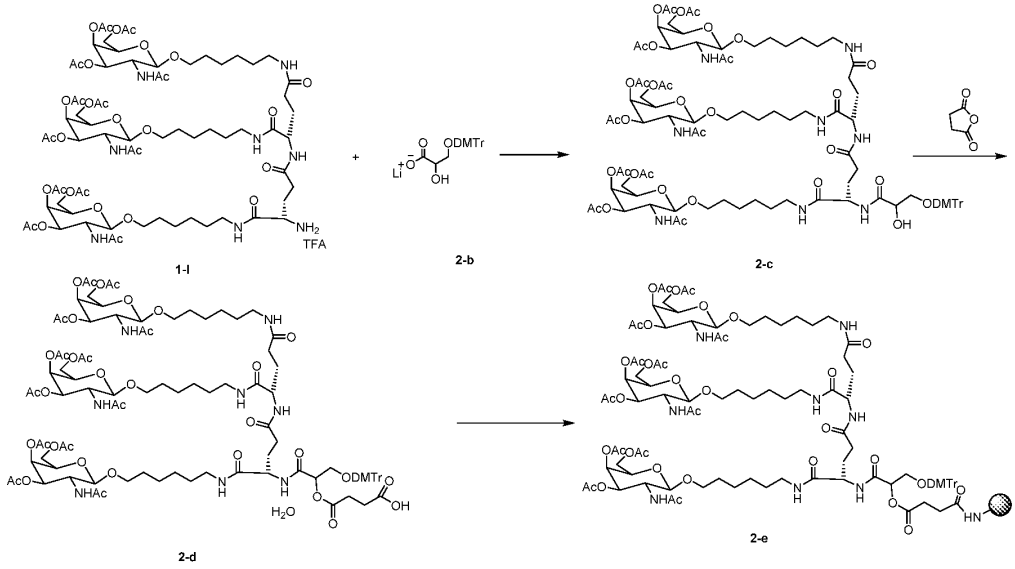
合成路线如下：

1）化合物 **2-b** 的合成



2-a **2-b**

2）化合物 **2-e** 的合成



步骤一

将化合物 **2-a**（1.00 g，2.37 mmol）加入 THF（7.5mL）和 H_2O（7.5mL）中，再加入 $LiOH.H_2O$（109 mg，2.60 mmol），保持 16℃搅拌反应 16h。反应完成后，减压蒸发除去溶剂，残余物继续冷冻干燥，得到目标化合物 **2-b**（960 mg，2.32 mmol，收率为 97.8%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，DMSO-d6）δ 7.44（d，J = 8.4 Hz，2H），7.34-7.23（m，6H），7.22-7.15（m，1H），6.86（d，J = 8.0 Hz，4H），3.73（s，6H），3.66（d，J = 6.4 Hz，1H），3.32（d，J = 12.0 Hz，1H），3.11（dd，J = 2.0, 9.2 Hz，1H），2.85（t, J = 8.8 Hz，1H）。

MS m/z：$C_{24}H_{24}O_6$，实测 m/z：407.2。

步骤二

将化合物 **1-l**（500 mg，0.30 mmol）加入二氯甲烷（3mL）中,15℃下，再将化合物 **2-b**（0.14 g，0.34 mmol）加入反应中，在 0℃下再加入 HBTU（142 mg，375 μmol）和 DIEA（（115 mg，895 μmol），保持 15℃反应 16h。反应完毕后，经二氯甲烷（10mL）稀释反应液，并依次用饱和 $NaHCO_3$（20 mL）和饱和食盐水（20mL）洗涤，有机相无水 Na_2SO_4 干燥，过滤后减压浓缩，残余物经过制备液相纯化（柱：Welch Xtimate C18 250×70mm#10um；流动相：[水-ACN]；B%：40%-66%，18min），得到化合物 **2-c**。

MS m/z：$C_{94}H_{134}N_8O_{36}$，[M-H]+实测：1952.1。

步骤三

将化合物 **2-c**（230 mg，0.12 mmol）和丁二酸酐（23.5mg，0.26 mmol）溶解于二氯甲烷溶液（2 mL）中，向反应液中加入 DMAP（43.1 mg，0.35 mmol），保持在 15 oC 下搅拌 16h。待反应完毕后，加入甲醇（18.8mg），并搅拌反应 10min，

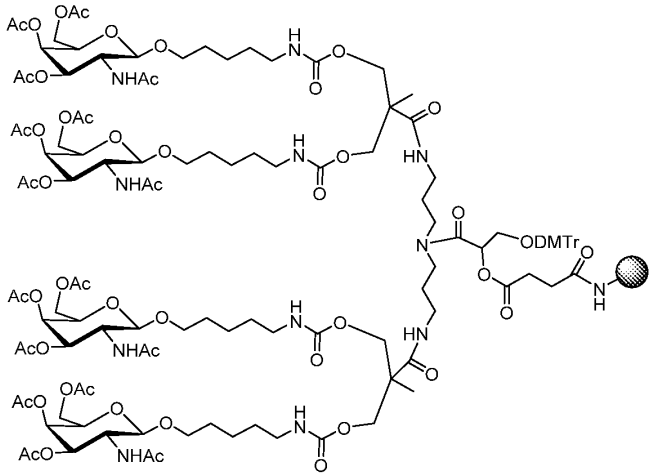
然后将反应液用二氯甲烷（3mL）稀释反应液，并用饱和 $NaHCO_3$ 洗涤 2 次。将反应液减压浓缩抽干得到化合物 **2-d**（240mg，粗品）。

MS m/z：C106H151N9O40，[M-H]+实测：m/2z:2070.2。

步骤四

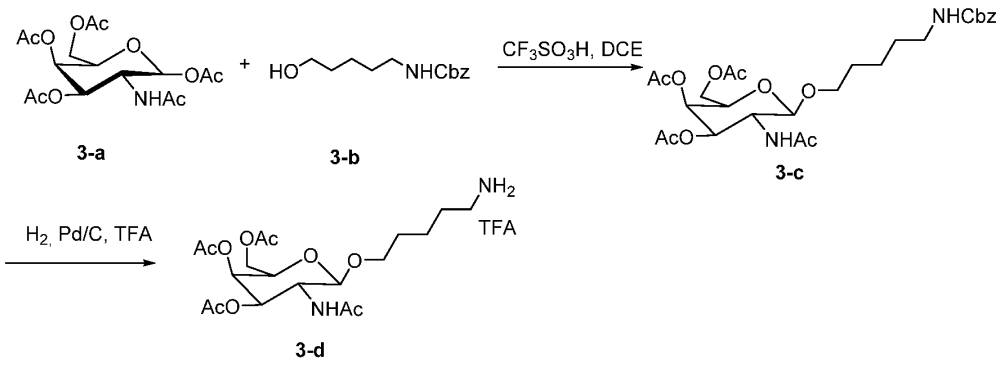
将上步得到的化合物 **2-d**（240mg，116μmol）加入乙腈（8mL），再加入 HBTU（88.7mg，233μmol），加入表面氨基修饰的固相支撑物（CPG-NH2，4g），加入 DIEA（75.5 mg，584 μmol, 101 μL），保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇（8mL×4）、二氯甲烷（8mL×4）洗涤。固体继续加入吡啶：乙酸酐（v：v = 4：1, 10.0 mL）中，继续保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇（8mL×4）、二氯甲烷（8mL×4）洗涤。得到目标产物连接在固相载体上的化合物 **2-e** 3.7g。

实施例 8 连接到固相载体上的氨基半乳糖化合物 3-n



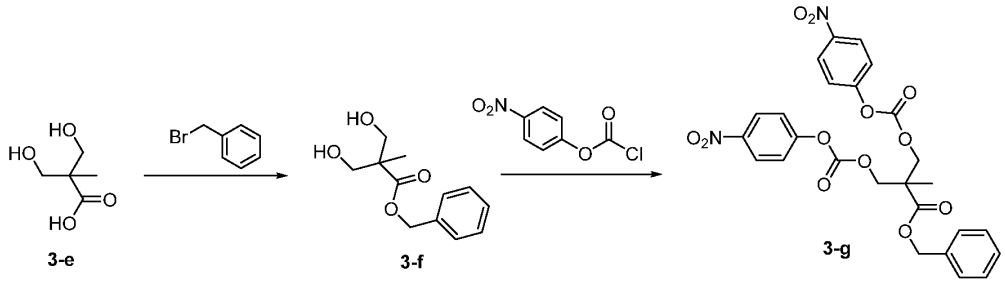
合成路线如下：

1）化合物 **3-d** 的合成

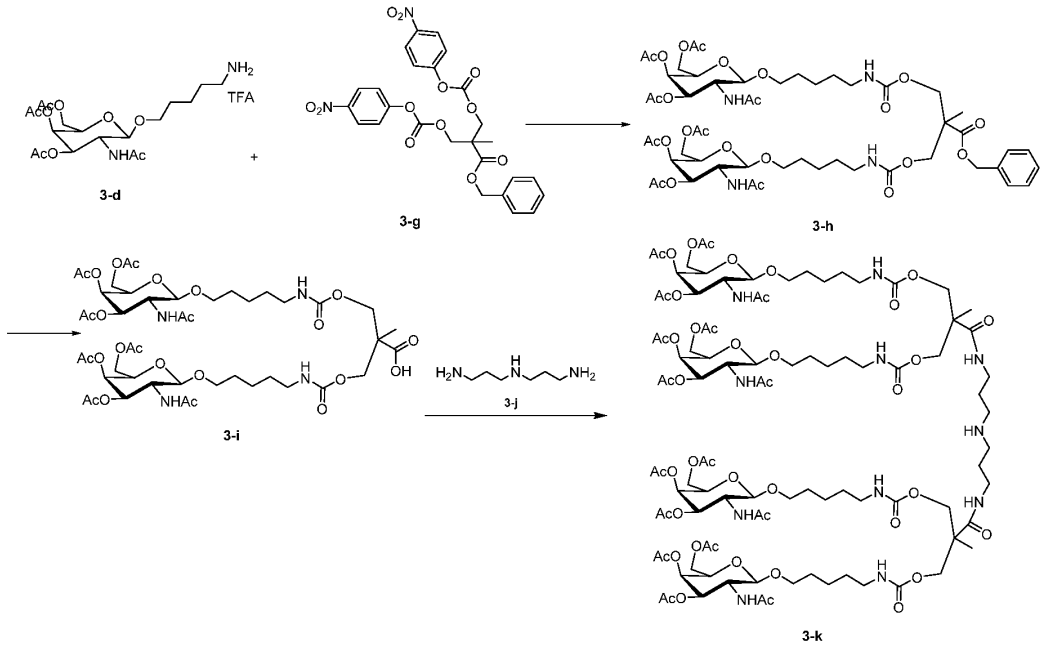


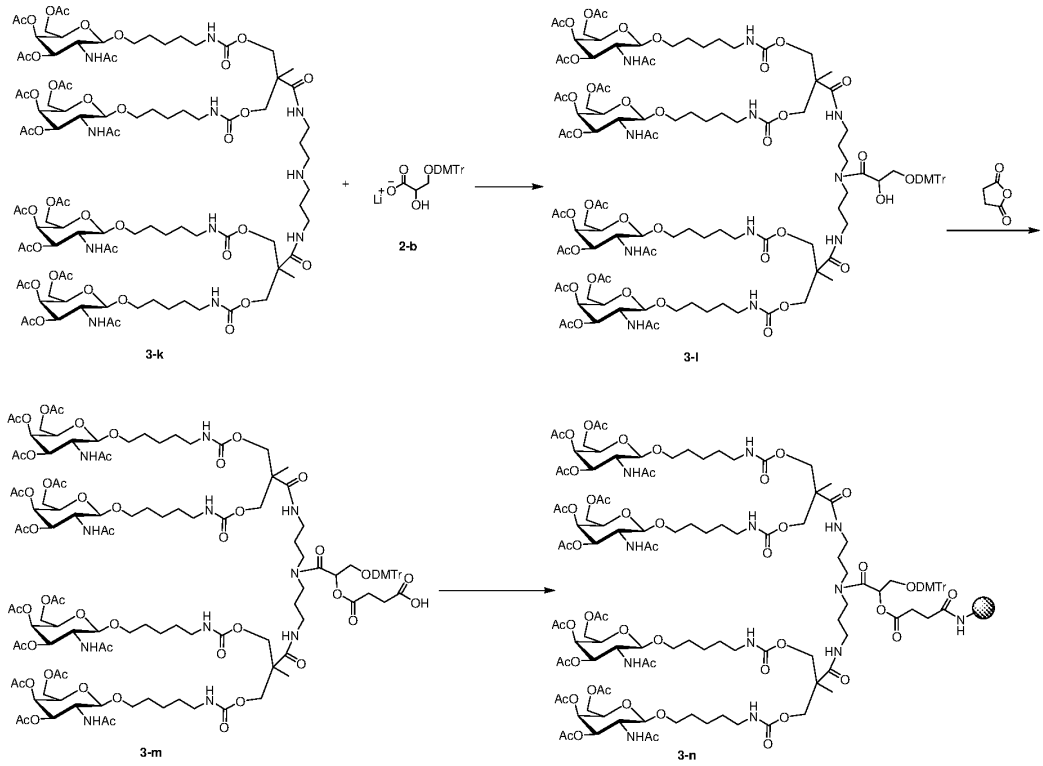
3-a 3-b 3-c 3-d

2）化合物 **3-g** 的合成


HO
HO
HO
O
3-e
Br
HO
HO
O
O
3-f
O2N
O
O
Cl
O2N
O2N
O
O
O
O
O
O
O
O
3-g

3）化合物**3-n**的合成


NH2
TFA
AcO
AcO
AcO
NHAc
+
3-d
O2N
O2N
O
O
O
O
O
O
3-g
AcO
OAc
AcO
NHAc
H
N
O
O
O
O
3-h
OH
3-i
H2N
H
N
NH2
3-j
HN
HN
HN
O
3-k



步骤一

将原料**3-a**（78.8 g，202 mmol）和原料**3-b**（40 g，168 mmol）溶解于DCE（250 mL），在15℃条件下，加入CF_3SO_3H（4.15 g，8.43 mmol），然后升高反应温度到75℃，搅拌反应2h，反应结束后加入1 L饱和$NaHCO_3$中止反应，分出有机相，并再用1 L饱和食盐水洗涤，有机相无水Na_2SO_4干燥，过滤后的溶液减压蒸馏后硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯5:1-0:1），的到目标产物**3-c**（63.2 g，107 mmol，收率为63.5%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，$CDCl_3$）δ 7.35-7.26（m，5H），5.88（s，1H），5.34-5.25（m，2H），4.65（d，J = 8.4 Hz，1H），4.16-4.13（m，2H），3.92-3.87（m，3H），3.18-3.17（m，1H），3.15-3.14（m，2H），2.16-1.91（m，15H），1.58-1.50（m，5H），1.49-1.36（m，2H）。

MS m/z：$C_{24}H_{40}N_2O_{11}$，实测m/z：567.4。

步骤二

将上述所得化合物 **3-c**（60.0 g，106 mmol）加入 360mL THF 中，在氩气保护下加入 Pd/C（15.0 g，10%纯度），再加入 TFA（12.1 g，106 mmol，7.84 mL），在反应溶液中通入氢气，保持气体压力在 30Psi，加热至 30℃并搅拌反应 16h。反应完成后，过滤，并减压浓缩滤液。残余物使用二氯甲烷稀释并重复减压浓缩，重复三次（500 mL×3）。减压抽干后得到目标化合物 **3-d**（44 g，102 mmol，收率为96.1%）。

步骤三

将化合物 **3-e**（60.0g，447mmol）溶解于 DMF（300mL），加入 K_2CO_3（92.7g，671mmol），在 0℃条件下滴加入 BnBr（115g，671mmol，79.7mL）。保持 25℃搅拌反应 6h。将反应液倒入碎冰中，然后使用乙酸乙酯（100mL×6）萃取，有机相再依次用水洗涤（100ml×2），饱和食盐水洗涤（100ml×3）。有机相无水硫酸钠干燥后减压蒸馏除去溶剂，残余物使用硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯=2:1-0:1），得到目标化合物 **3-f**（60.3g，269mmol，收率 60.1%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，$CDCl_3$）δ 7.37-7.26（m，5H），5.18（d，J = 4.4 Hz，2H），3.95-3.90（m，2H），3.75-3.71（m，2H），1.08（s，1H）。

MS m/z：$C_{12}H_{16}O_4$，实测 m/z：223.5。

步骤四

将化合物 **3-f**（50.0g，223mmol）溶解在二氯甲烷中（300mL），加入吡啶（73.5g，929mmol，75mL）和溶解于二氯甲烷（50mL）的对硝基苯基氯甲酸酯（180g，892mmol），氮气保护下保持 25℃搅拌反应 24h。反应完成后，加入二氯甲烷（250mL）稀释，然后依次使用 $NaHSO_4$ 溶液（30mL×3）和饱和食盐水（30mL×2）洗涤，有机相使用 $MgSO_4$ 干燥后，过滤，减压蒸发掉溶剂。所得到的粗品使用硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯=3:1），得到目标化合物 **3-g**（37.0g，66.7mmol，收率为 29.9%）。

MS m/z：$C_{26}H_{22}N_2O_{12}$，实测 m/z：553.4。

步骤五

将化合物 **3-g**（22.0g，39.7mmol）加入乙腈（120mL）中，在氮气保护条件下，再加入三乙胺（24.1g，238mmol，33,1mL），将反应液冷却到 0℃，滴加入溶解在乙腈（120mL）中的化合物 **3-d**（42.1g，40mmol），升高温度到 25℃，并搅拌反应 1h。反应完成后，减压浓缩除去溶剂，然后使用硅胶柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯=2:1）得到目标化合物 **3-h**（37.0g，12.0mmol,收率为 30.2%）。

MS m/z：$C_{52}H_{76}N_4O_{24}$，实测 m/z：1141.8。

步骤六

将化合物 **3-h**（11.0g，9.64mmol）溶解于乙酸乙酯（60mL）中，加入 Pd/C（2.00 g，10%纯度），反应溶液中通入氢气，保持气体压力在 40Psi，温度 25℃搅拌反应 8h。反应完成后，过滤，并减压蒸发至干燥，得到目标化合物 **3-i**（10.0 g，9.42 mmol，收率为 97.7%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，DMSO-d_6）δ 7.79（d，J = 9.2 Hz，2H），7.10（s，2H），5.74（t, J = 1.6 Hz，2H），5.21（d，J = 3.6 Hz，2H），4.98-4.95（m，2H），4.48（d，J = 8.4 Hz，2H），4.02（d，J = 4.8 Hz，11H），3.87-3.84（m，2H），3.69-3.67（m，2H），3.41-3.39（m，2H），2.94-2.90（m，4H），2.10（s，5H），1.99（s，7H），1.89（s，6H），1.77（s，6H），1.47-1.35（m，8H），1.26-1.24（m，4H），1.23-1.08

（m，3H）。

MS m/z：$C_{45}H_{70}N_4O_{24}$，实测 m/z：1051.4。

步骤七

将化合物 **3-i**（5.00 g，4.76 mmol）加入到二氯甲烷（30mL）和 DMF（30mL）的混合溶剂中，再加入化合物 33（312 mg，2.38 mmol），加入 HBTU（1.80 g，4.76 mmol）和 DIEA（615 mg，4.76 mmol），保持 25℃搅拌反应 12h。反应完成后，将反应液倒入到乙酸乙酯（100mL）中，然后使用饱和食盐水洗涤，无水 Na_2SO_4 干燥后，过滤并减压蒸发除去溶剂，残余物使用制备 HPLC 纯化得到目标化合物 **3-k**（2.1 g，956 μmol, 收率为 20.1%）。

^{1}HNMR：（400 MHz，DMSO-d_6）δ 7.84-7.81（m，5H），7.12-7.07（m，3H），5.21（d，J = 3.6 Hz，4H），4.99-4.96（m，4H），4.49（d，J = 8.4 Hz，4H），4.06-4.00（m，24H），3.88-3.86（m，4H），3.55-3.52（m，4H），3.49-3.43（m，4H），3.25-3.05（m，4H），2.94-2.93（m，8H），2.11（s，12H），2.00（s，16H），1.90（s，12H），1.78（s，12H），1.46-1.44（m，8H），1.38-1.35（m，8H），1.26-1.24（m，8H），1.18-1.16（m，6H），1.09-0.99（m，2H）。

MS m/z：$C_{96}H_{153}N_{11}O_{46}$，实测 m/z：2197.5。

步骤八

将化合物 **3-k**（100 mg,45.5μmol）加入 DMF（1mL）中，再将化合物 **2-b**（21.1mg，54μmol）加入反应中，再加入 HBTU（21.8 mg，57.3 μmol）和 DIEA（（17.7 mg，136 μmol），保持 15℃反应 16h。反应完毕后，经二氯甲烷（10mL）稀释反应液，并依次用饱和 $NaHCO_3$ 和饱和食盐水洗涤，有机相无水 Na_2SO_4 干燥，过滤后减压浓缩，残余物经过制备液相纯化（柱：Phenomenex Gemini-NX 150×30mm×5um；流动相：[水-ACN]；B%：35%-75%,12min），得到化合物 **3-l**。

MS m/z：$C_{120}H_{175}N_{11}O_{51}$，实测：2586.9。

步骤九

将化合物 **3-l**（14 mg，5.4μmol）和丁二酸酐（1.08mg,10.8μmol）溶解于二氯甲烷溶液（1 mL）中，向反应液中加入 DMAP（2.0 mg，16μmol）和 TEA（1.1mg,10.8μmol,1.5μL），保持在 15 ℃ 下搅拌 16h。待反应完毕后，加入甲醇（0.9mg），并搅拌反应 10min，然后将反应液用二氯甲烷稀释反应液，并用饱和 $NaHCO_3$ 洗涤 2 次。将反应液减压浓缩抽干得到化合物 **3-m**（18mg）。

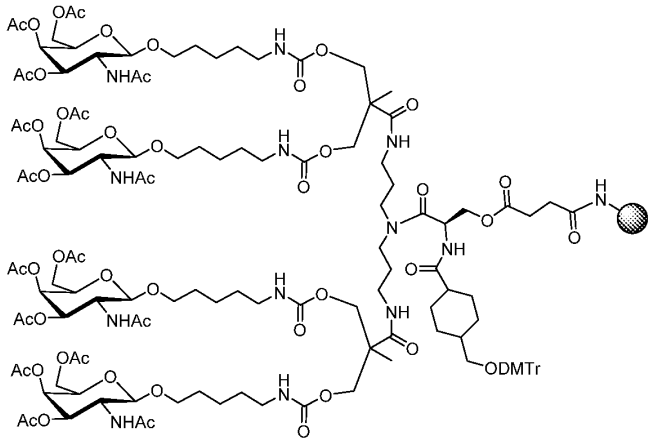
MS m/z：$C_{124}H_{179}N_{11}O^{54}$，实测：2687.2。

步骤十

将上步得到的化合物 3-m（18mg，6.7μmol）加入乙腈（3mL），再加入 HBTU（5.1mg，13.4μmol），加入表面氨基修饰的固相支撑物（CPG-NH2，200mg），加入 DIEA（4.3 mg，33.5 μmol, 5.8 μL），保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇（2mL×4）、二氯甲烷（2mL×4）洗涤。固体继续加入吡啶：乙

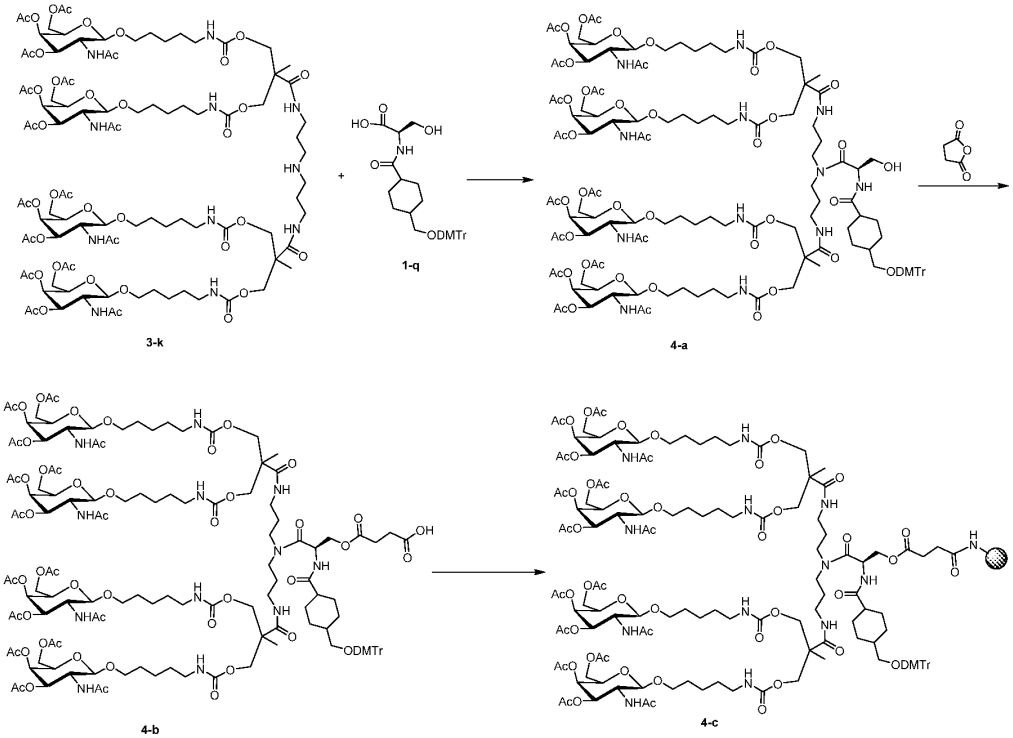
酸酐（v：v = 4：1, 2 mL）中，继续保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇、二氯甲烷洗涤。得到目标产物连接在固相载体上的化合物 **3-n** 200mg。

实施例 9 连接到固相载体上的氨基半乳糖化合物 4-c



合成路线如下：

化合物 **4-c** 的合成



步骤一

将化合物 **3-k**（149.5 mg，68μmol），DIEA（141.0 mg，1.09 mmol），3A 分子筛（500 mg）和 DEPBT（163.4 mg，0.55mmol）溶于 5 mL 的 DCM 中，室温下加

入化合物 **1-q**（400 mg，0.18 mmol），在室温下搅拌过夜。反应完毕后，将分子筛过滤掉，滤液旋干并经反相制备 HPLC（柱：Boston Green ODS 150×30 mm×5 um，条件：5-50%（A：水，B：CH3CN），流速：45 mL/min），冻干后得到化合 **4-a**（118 mg，32μmol，收率为 62.6%）。

MS m/z：$C_{128}H_{188}N_{12}O_{52}$，实测[M+HCOO$^-$]=2770.6。

步骤二

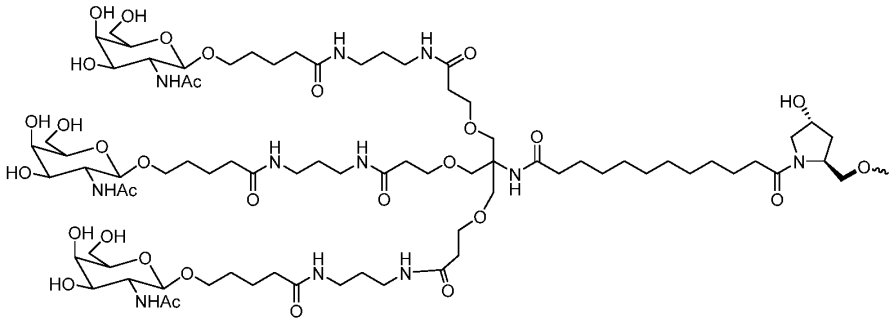
将化合物 **4-a**（110 mg，4.0μmol），DMAP（7.4 mg，40μmol），3A 分子筛（100 mg）和丁二酸酐（11.9 mg，120μmol）溶于 5 mL 的 THF 中，氩气保护，40 °C 下搅拌 4h。反应完毕后，将分子筛过滤掉，滤液旋干并经反相制备 HPLC 纯化（Column：Boston Green ODS 150×30 mm×5 um，条件：5-50%（A：水，B：CH_3CN），流速：45 mL/min），冻干后得到化合物 **4-b**（80 mg，28.3μmol，收率为 70.8%）。

MS m/z：$C_{132}H_{192}N_{12}O_{55}$，[M-H]$^+$实测：2824.6。

步骤三

将上步得到的化合物 **4-b**（71mg，25μmol）加入乙腈（5mL），再加入 HBTU（19.0mg，50μmol），加入表面氨基修饰的固相支撑物（CPG-NH2，0.86g），加入 DIEA（16.2 mg，125 μmol, 21.6μL），保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇（5mL×4）、二氯甲烷（5mL×4）洗涤。固体继续加入吡啶：乙酸酐（v：v = 4：1, 6.0 mL）中，继续保持 30℃震荡反应 16h。反应完成后，过滤，并依次用甲醇、二氯甲烷洗涤。得到连接在固相载体上的化合物 **4-c** 0.74g。

实施例 10 对照化合物 L96 的制备



按照专利 WO2014025805A1 所述的方法制备了对照化合物。按照上述的连接固相载体同样的方法，连接到 CPG 固相载体上，得到化合物 L96。

实施例 11 合成氨基半乳糖分子簇缀合的 siRNA

用于测试的 siRNA，靶向小鼠 TTR 基因 mRNA 的 siRNA（Molecular Therapy Vol. 26 No 3 March 2018）如下，在 SS 链的 3’末端通过共价键连接氨基半乳糖分子簇，

SS 链（5'-3'）：CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-

氨基半乳糖分子簇（SEQ ID NO：243）

AS 链（5'-3'）：UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm（SEQ ID NO：244）。

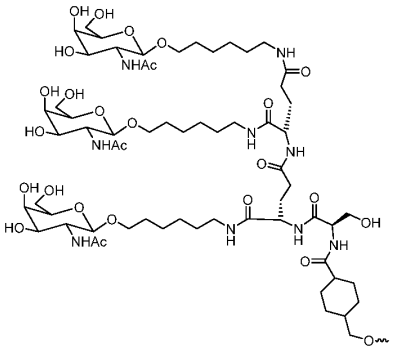
siRNA 的合成与通常的亚磷酰胺固相合成法无异，所不同的是在合成 siRNA 的 SS 链时，使用上述所合成的连接有氨基半乳糖簇的 CPG 载体代替通常的 Universal-CPG 载体。简要描述如下：于 Dr.Oligo48 合成器（Biolytic）上，以上述合成的氨基半乳糖连接的 CPG 载体为起始，根据合成程序逐个连接核苷亚磷酰胺单体。核苷单体原料 2'-F RNA、2'-O-甲基 RNA 等核苷亚磷酰胺单体购自上海兆维或苏州吉玛。采用 5-乙基硫-1H-四唑（ETT）作为活化剂（0 .6M 乙腈溶液），使用 0.22M 的 PADS 溶于 1:1 体积比的乙腈和三甲基吡啶（苏州柯乐玛）溶液作为硫化试剂，使用碘吡啶/水溶液（柯乐玛）作为氧化剂。

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

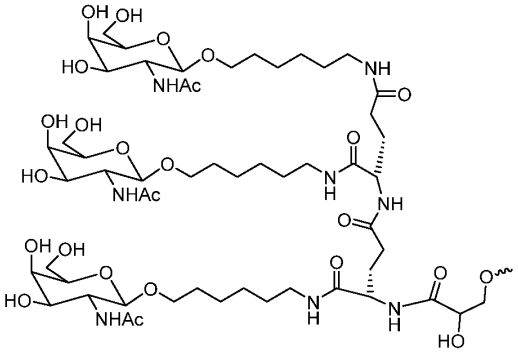
所得到的单链寡核苷酸，根据等摩尔比，按照互补配对，与 AS 链退火，最后所得到的双链 siRNA 溶于 1X PBS 中，并调整至实验所需浓度。

合成氨基半乳糖簇缀合的 siRNA，实验所用 siRNA 靶向小鼠 TTR mRNA。

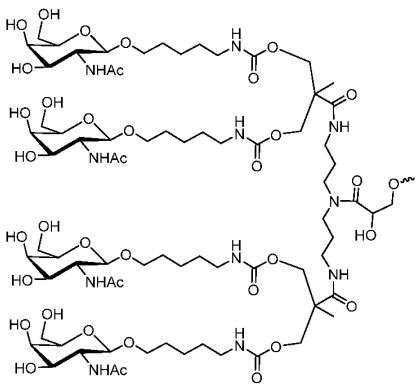
氨基半乳糖分子簇选自：



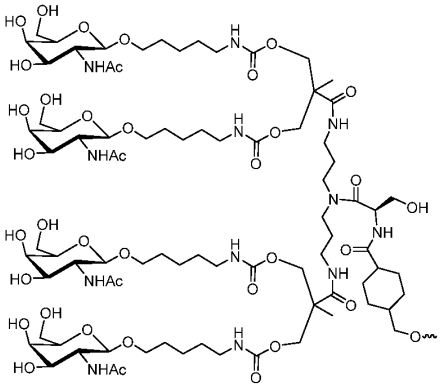
NAG1



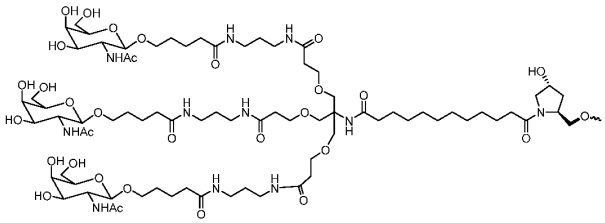
NAG2



NAG3



NAG4



L96（对照化合物）。

表 9. 靶向配体活性评价 siRNA 编号和序列

siRNA 编号	SS 链（5'-3‘）	AS 链（5'-3’）
S-1	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmAm Am –NAG1（SEQ ID NO：245）	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCm AmAmGmAmAfCmAfCmUm GmsUmsUm（SEQ ID NO：250）
S-2	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmAm Am –NAG2（SEQ ID NO：246）	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCm AmAmGmAmAfCmAfCmUm GmsUmsUm（SEQ ID NO：250）
S-3	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmAm Am –NAG3（SEQ ID NO：247）	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCm AmAmGmAmAfCmAfCmUm GmsUmsUm（SEQ ID NO：250）
S-4	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmAm Am –NAG4（SEQ ID NO：248）	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCm AmAmGmAmAfCmAfCmUm GmsUmsUm（SEQ ID NO：250）
S-L96	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf UmGmCmUmCmUmAmUmAm Am -L96（SEQ ID NO：249）	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCm AmAmGmAmAfCmAfCmUm GmsUmsUm（SEQ ID NO：250）

实施例 12 氨基半乳糖分子簇缀合的 siRNA 在肝原代细胞对 mRNA 表达的抑制

参照 Severgini 等报道的方法（Cytotechnology. 2012；64（2）:187–195）分离获得新鲜小鼠原代肝细胞。

原代肝细胞分离后，按照 10 万每孔接种于 24 孔板中，按照终浓度为 50nM，10nM，2nM，0.4nM，0.08nM，0.016nM，0.0032nM，0.00064nM 分别加入待测缀合的 siRNA。随后，将原代肝细胞置于 37℃，5% CO_2 的环境中培养 24h。24h 后，采用 qPCR 方法检测 mTTR 的 mRNA 表达水平。

如图 1 所示，S-1、S-2、S-3、S-4 均表现了优秀的 mTTR 基因表达抑制效率。S-1 及 S-4 的 IC50 值低于其他两组，与对照组 S-L96 的 IC50 值 0.280nM 相比，S-1 的 IC50 值为 0.131nM，S-4 的 IC50 值为 0.135nM，表明 S-1 及 S-4 体外被原代肝细胞自由摄取的效率优于对照组，S-1 及 S-4 化合物能更高效介导 siRNA 进入原代肝细胞。

实施例 13 氨基半乳糖分子簇缀合的 siRNA 在体内对 mRNA 表达的抑制

使用 8 周龄的 C57BL/6 小鼠（昭衍生物、SPF 级，雌性），采用上述缀合的 siRNA 经皮下注射递送。在第 1 天，在小鼠肩颈部的松弛皮肤上，给予 100μl 溶液的皮下注射，其含有 PBS 或 PBS 配置的 1mg/kg（mpk），0.2mpk 剂量的对应的缀合的 siRNA（S-L96，S-3，S-2，S-4 或 S-1）。各个组别注射 6 只小鼠。

在给药 3 天后，短颈处死小鼠，使用 qPCR 检测小鼠肝组织 mTTR 的 mRNA 表达水平。

如图 2 所示，S-1、S-2、S-3、S-4 均表现了优秀的 mTTR 基因表达抑制效率。其中，S-2、S-3、S-4 与对照组 S-L96 相比，在 1mpk 及 0.2mpk 的活性相近。S-1 在 1mpk 及 0.2mpk 的活性水平优于对照组 S-L96。

表 10. 氨基半乳糖分子簇化合物编号

氨基半乳糖分子簇化合物编号	对应的缀合 siRNA 编号
NAG1	S-1
NAG2	S-2
NAG4	S-4
NAG3	S-3
L96	S-L96

III. 靶向 HSD17B13 的 siRNA、siRNA 缀合物筛选和活性验证

实施例 14 人 HSD17B13 siRNA 的设计和合成

siRNA 设计

以人 HSD17B13 基因（NM_178135.5）作为靶基因，以满足活性 siRNA 的一般规则设计 19/21nt 的 siRNA。未经修饰的正义链及反义链序列详见表 11，其中未修饰 siRNA 为 SS 链、AS 链均未修饰。

表 11. 人 HSD siRNA 的未修饰的正义链和反义链

SEQ ID NO：	正义链（5'-3‘）	SEQ ID NO：	反义链（5'-3’）

3	GCACCAAGGAUGAAGAGAU	25	AUCUCUUCAUCCUUGGUGCUG
4	CACCAAGGAUGAAGAGAUU	26	AAUCUCUUCAUCCUUGGUGCU
5	ACCAAGGAUGAAGAGAUUA	27	UAAUCUCUUCAUCCUUGGUGC
6	CCAAGGAUGAAGAGAUUAU	28	AUAAUCUCUUCAUCCUUGGUG
7	AGGAUGAAGAGAUUACCAA	29	UUGGUAAUCUCUUCAUCCUUG
8	GGGUUCACCAAAAAUCCAA	30	UUGGAUUUUUGGUGAACCCAG
9	GGUUCACCAAAAAUCCAAA	31	UUUGGAUUUUUGGUGAACCCA
10	CACCAAAAAUCCAAGCACA	32	UGUGCUUGGAUUUUUGGUGAA
11	CAAAAAUCCAAGCACAAGA	33	UCUUGUGCUUGGAUUUUUGGU
12	AAAUCCAAGCACAAGAUUA	34	UAAUCUUGUGCUUGGAUUUUU
13	AAUCCAAGCACAAGAUUAU	35	AUAAUCUUGUGCUUGGAUUUU
14	GCACAAGAUUAUGGCCUGU	36	ACAGGCCAUAAUCUUGUGCUU
15	CACAAGAUUAUGGCCUGUA	37	UACAGGCCAUAAUCUUGUGCU
16	ACAAGAUUAUGGCCUGUAU	38	AUACAGGCCAUAAUCUUGUGC
17	CAAGAUUAUGGCCUGUAUU	39	AAUACAGGCCAUAAUCUUGUG
18	CACAAAAUCAAAAUGAAAU	40	AUUUCAUUUUGAUUUUGUGGC
19	CAAAAUCAAAAUGAAAUGA	41	UCAUUUCAUUUUGAUUUUGUG
20	AAAUCAAAAUGAAAUGAAU	42	AUUCAUUUCAUUUUGAUUUUG
21	AUCAAAAUGAAAUGAAUAA	43	UUAUUCAUUUCAUUUUGAUUU
22	UCAAAAUGAAAUGAAUAAA	44	UUUAUUCAUUUCAUUUUGAUU
23	CAAAAUGAAAUGAAUAAAU	45	AUUUAUUCAUUUCAUUUUGAU
24	AAAUGAAAUGAAUAAAUAA	46	UUAUUUAUUCAUUUCAUUUUG

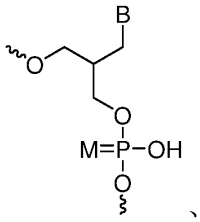
在合成 AS 链 5’第 7 位修饰的核苷酸时，使用实施例 1 合成的亚磷酰胺单体替换母序列原核苷酸。经过 AS 链 5’第 7 位修饰的反义链序列详见表 12。

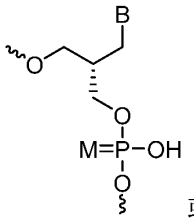
HSD17B13 siRNA 经过 2’-氟代、2’-甲氧基等修饰的正义链和反义链序列详见表 13，反义链 7 位修饰旋光变化详见表 14，HSD17B13 siRNA 缀合物正义链和反义链序列详见表 15。

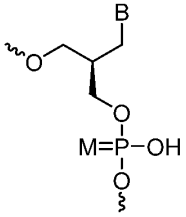
表 12. 人 HSD siRNA 的未修饰的反义链和 7 位化学修饰反义链对应

SEQ ID NO：	未修饰反义链（5'-3’）	SEQ ID NO：	7 位修饰反义链（5'-3’）
25	AUCUCUUCAUCCUUGGUGCUG	47	AUCUCUW'CAUCCUUGGUGCUG
26	AAUCUCUUCAUCCUUGGUGCU	48	AAUCUCW'UCAUCCUUGGUGCU
27	UAAUCUCUUCAUCCUUGGUGC	49	UAAUCUW'UUCAUCCUUGGUGC
28	AUAAUCUCUUCAUCCUUGGUG	50	AUAAUCW'CUUCAUCCUUGGUG
29	UUGGUAAUCUCUUCAUCCUUG	51	UUGGUAW'UCUCUUCAUCCUUG
30	UUGGAUUUUUGGUGAACCCAG	52	UUGGAUW'UUUGGUGAACCCAG
31	UUUGGAUUUUUGGUGAACCCA	53	UUUGGAW'UUUUGGUGAACCCA
32	UGUGCUUGGAUUUUUGGUGAA	54	UGUGCUW'GGAUUUUUGGUGAA
33	UCUUGUGCUUGGAUUUUUGGU	55	UCUUGUW'CUUGGAUUUUUGGU
34	UAAUCUUGUGCUUGGAUUUUU	56	UAAUCUW'GUGCUUGGAUUUUU
35	AUAAUCUUGUGCUUGGAUUUU	57	AUAAUCW'UGUGCUUGGAUUUU
36	ACAGGCCAUAAUCUUGUGCUU	58	ACAGGCW'AUAAUCUUGUGCUU
37	UACAGGCCAUAAUCUUGUGCU	59	UACAGGW'CAUAAUCUUGUGCU

38	AUACAGGCCAUAAUCUUGUGC	60	AUACAGW'CCAUAAUCUUGUGC
39	AAUACAGGCCAUAAUCUUGUG	61	AAUACAW'GCCAUAAUCUUGUG
40	AUUUCAUUUUGAUUUUGUGGC	62	AUUUCAW'UUUGAUUUUGUGGC
41	UCAUUUCAUUUUGAUUUUGUG	63	UCAUUUW'AUUUUGAUUUUGUG
42	AUUCAUUUCAUUUUGAUUUUG	64	AUUCAUW'UCAUUUUGAUUUUG
43	UUAUUCAUUUCAUUUUGAUUU	65	UUAUUCW'UUUCAUUUUGAUUU
44	UUUAUUCAUUUCAUUUUGAUU	66	UUUAUUW'AUUUCAUUUUGAUU
45	AUUUAUUCAUUUCAUUUUGAU	67	AUUUAUW'CAUUUCAUUUUGAU
46	UUAUUUAUUCAUUUCAUUUUG	68	UUAUUUW'UUCAUUUCAUUUUG

表 12 中，W’表示含有本公开式（I）式（I’）所示的化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸。在一些实施方案中，W’选自：

、

或

；其中：M 为 O 或 S；其中：B 选自表 16 中 SEQ ID NO：47 至 SEQ ID NO：68 与 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 的 5’区域的第 7 位的碱基，例如 SEQ ID NO：47 与 SEQ ID NO：25 对应、SEQ ID NO：68 与 SEQ ID NO：46 对应、SEQ ID NO：52 与 SEQ ID NO：30 对应。

表 13. 人 HSD17B13 siRNA 经过修饰的正义链和反义链

双链代码	SEQ ID NO：	正义链（5'-3‘）	SEQ ID NO：	反义链（5'-3’）
TRD005305	69	GmsCmsAm CmCfAm AfGfGf AmUmGm AmAmGm AmGmAm Um	111	AmsUfsCm UfCmUf UmCmAf UmCmCf UmUfGm GfUmGf CmsUmsGm
TRD005306	70	CmsAmsCm CmAfAm GfGfAf UmGmAm AmGmAm GmAmUm Um	112	AmsAfsUm CfUmCf UmUmCf AmUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm
TRD005307	71	AmsCmsCm AmAfGm GfAfUf GmAmAm GmAmGm AmUmUm Am	113	UmsAfsAm UfCmUf CmUmUf CmAmUf CmCfUm UfGmGf UmsGmsCm
TRD005308	72	CmsCmsAm AmGfGm AfUfGf AmAmGm AmGmAm UmUmAm Um	114	AmsUfsAm AfUmCf UmCmUf UmCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm
TRD005309	73	AmsGmsGm AmUfGm AfAfGf AmGmAm UmUmAm CmCmAm Am	115	UmsUfsGm GfUmAf AmUmCf UmCmUf UmCfAm UfCmCf UmsUmsGm

TRD005352	74	GmsGmsGm UmUfCm AfCfCf AmAmAm AmAmUm CmCmAm Am	116	UmsUfsGm GfAmUf UmUmUf UmGmGf UmGfAm AfCmCf CmsAmsGm
TRD005353	75	GmsGmsUm UmCfAm CfCfAf AmAmAm AmUmCm CmAmAm Am	117	UmsUfsUm GfGmAf UmUmUf UmUmGf GmUfGm AfAmCf CmsCmsAm
TRD005354	76	CmsAmsCm CmAfAm AfAfAf UmCmCm AmAmGm CmAmCm Am	118	UmsGfsUm GfCmUf UmGmGf AmUmUf UmUfUm GfGmUf GmsAmsAm
TRD005355	77	CmsAmsAm AmAfAm UfCfCf AmAmGm CmAmCm AmAmGm Am	119	UmsCfsUm UfGmUf GmCmUf UmGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm
TRD005356	78	AmsAmsAm UmCfCm AfAfGf CmAmCm AmAmGm AmUmUm Am	120	UmsAfsAm UfCmUf UmGmUf GmCmUf UmGfGm AfUmUf UmsUmsUm
TRD005357	79	AmsAmsUm CmCfAm AfGfCf AmCmAm AmGmAm UmUmAm Um	121	AmsUfsAm AfUmCf UmUmGf UmGmCf UmUfGm GfAmUf UmsUmsUm
TRD005358	80	GmsCmsAm CmAfAm GfAfUf UmAmUm GmGmCm CmUmGm Um	122	AmsCfsAm GfGmCf CmAmUf AmAmUf CmUfUm GfUmGf CmsUmsUm
TRD005359	81	CmsAmsCm AmAfGm AfUfUf AmUmGm GmCmCm UmGmUm Am	123	UmsAfsCm AfGmGf CmCmAf UmAmAf UmCfUm UfGmUf GmsCmsUm
TRD005360	82	AmsCmsAm AmGfAm UfUfAf UmGmGm CmCmUm GmUmAm Um	124	AmsUfsAm CfAmGf GmCmCf AmUmAf AmUfCm UfUmGf UmsGmsCm
TRD005361	83	CmsAmsAm GmAfUm UfAfUf GmGmCm CmUmGm UmAmUm Um	125	AmsAfsUm AfCmAf GmGmCf CmAmUf AmAfUm CfUmUf GmsUmsGm
TRD005397	84	CmsAmsCm AmAfAm AfUfCf AmAmAm AmUmGm AmAmAm Um	126	AmsUfsUm UfCmAf UmUmUf UmGmAf UmUfUm UfGmUf GmsGmsCm
TRD005398	85	CmsAmsAm AmAfUm CfAfAf AmAmUm GmAmAm AmUmGm Am	127	UmsCfsAm UfUmUf CmAmUf UmUmUf GmAfUm UfUmUf GmsUmsGm
TRD005399	86	AmsAmsAm UmCfAm AfAfAf UmGmAm AmAmUm GmAmAm Um	128	AmsUfsUm CfAmUf UmUmCf AmUmUf UmUfGm AfUmUf UmsUmsGm
TRD005400	87	AmsUmsCm AmAfAm AfUfGf AmAmAm UmGmAm AmUmAm Am	129	UmsUfsAm UfUmCf AmUmUf UmCmAf UmUfUm UfGmAf UmsUmsUm
TRD005401	88	UmsCmsAm AmAfAm UfGfAf AmAmUm GmAmAm UmAmAm Am	130	UmsUfsUm AfUmUf CmAmUf UmUmCf AmUfUm UfUmGf AmsUmsUm
TRD005402	89	CmsAmsAm AmAfUm GfAfAf AmUmGm AmAmUm AmAmAm Um	131	AmsUfsUm UfAmUf UmCmAf UmUmUf CmAfUm UfUmUf GmsAmsUm

TRD005403	90	AmsAmsAm UmGfAm AfAfUf GmAmAm UmAmAm AmUmAm Am	132	UmsUfsAm UfUmUf AmUmUf CmAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm
	91	CmsAmsCm CmAfAm GfGfAf UmGmAm AmGmAm GmAmUms Um	133	AmsAfsUm CfUmCf(-)hmpNA(U)UmCm AfUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm
	92	CmsCmsAm AmGfGm AfUfGf AmAmGm AmGmAm UmUmAms Um	134	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)CmUm UfCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm
	93	CmsAmsAm AmAfAm UfCfCf AmAmGm CmAmCm AmAmGms Am	135	UmsCfsUm UfGmUf(-)hmpNA(G)CmUm UfGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm
	94	AmsAmsAm UmGfAm AfAfUf GmAmAm UmAmAm AmUmAms Am	136	UmsUfsAm UfUmUf(-)hmpNA(A)UmUm CfAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm
	95	GmsCmsAm CmCfAm AfGfGf AmUmGm AmAmGm AmGmAm Um	137	AmsUfsCm UfCmUf(-)hmpNA(U)CmAf UmCmCf UmUfGm GfUmGf CmsUmsGm
	96	CmsAmsCm CmAfAm GfGfAf UmGmAm AmGmAm GmAmUm Um	138	AmsAfsUm CfUmCf(-)hmpNA(U)UmCf AmUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm
	97	AmsCmsCm AmAfGm GfAfUf GmAmAm GmAmGm AmUmUm Am	139	UmsAfsAm UfCmUf(-)hmpNA(C)UmUf CmAmUf CmCfUm UfGmGf UmsGmsCm
	98	CmsCmsAm AmGfGm AfUfGf AmAmGm AmGmAm UmUmAm Um	140	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)CmUf UmCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm
	99	AmsGmsGm AmUfGm AfAfGf AmGmAm UmUmAm CmCmAm Am	141	UmsUfsGm GfUmAf(-)hmpNA(A)UmCf UmCmUf UmCfAm UfCmCf UmsUmsGm
	100	GmsGmsUm UmCfAm CfCfAf AmAmAm AmUmCm CmAmAm Am	142	UmsUfsUm GfGmAf(-)hmpNA(U)UmUf UmUmGf GmUfGm AfAmCf CmsCmsAm
	101	CmsAmsAm AmAfAm UfCfCf AmAmGm CmAmCm AmAmGm Am	143	UmsCfsUm UfGmUf(-)hmpNA(G)CmUf UmGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm

	102	AmsAmsUm CmCfAm AfGfCf AmCmAm AmGmAm UmUmAm Um	144	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)UmGf UmGmCf UmUfGm GfAmUf UmsUmsUm
	103	GmsCmsAm CmAfAm GfAfUf UmAmUm GmGmCm CmUmGm Um	145	AmsCfsAm GfGmCf(-)hmpNA(C)AmUf AmAmUf CmUfUm GfUmGf CmsUmsUm
	104	CmsAmsCm AmAfAm AfUfCf AmAmAm AmUmGm AmAmAm Um	146	AmsUfsUm UfCmAf(-)hmpNA(U)UmUf UmGmAf UmUfUm UfGmUf GmsGmsCm
	105	CmsAmsAm AmAfUm CfAfAf AmAmUm GmAmAm AmUmGm Am	147	UmsCfsAm UfUmUf(-)hmpNA(C)AmUf UmUmUf GmAfUm UfUmUf GmsUmsGm
	106	AmsAmsAm UmCfAm AfAfAf UmGmAm AmAmUm GmAmAm Um	148	AmsUfsUm CfAmUf(-)hmpNA(U)UmCf AmUmUf UmUfGm AfUmUf UmsUmsGm
	107	AmsUmsCm AmAfAm AfUfGf AmAmAm UmGmAm AmUmAm Am	149	UmsUfsAm UfUmCf(-)hmpNA(A)UmUf UmCmAf UmUfUm UfGmAf UmsUmsUm
	108	UmsCmsAm AmAfAm UfGfAf AmAmUm GmAmAm UmAmAm Am	150	UmsUfsUm AfUmUf(-)hmpNA(C)AmUf UmUmCf AmUfUm UfUmGf AmsUmsUm
	109	CmsAmsAm AmAfUm GfAfAf AmUmGm AmAmUm AmAmAm Um	151	AmsUfsUm UfAmUf(-)hmpNA(U)CmAf UmUmUf CmAfUm UfUmUf GmsAmsUm
	110	AmsAmsAm UmGfAm AfAfUf GmAmAm UmAmAm AmUmAm Am	152	UmsUfsAm UfUmUf(-)hmpNA(A)UmUf CmAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm

表 14. AS 链 7 位不同旋光化学修饰

SEQ ID NO	反义链（5'-3’）	SEQ ID NO	反义链（5'-3’）
133	AmsAfsUm CfUmCf(-)hmpNA(U)UmCm AfUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm	163	UmsCfsUm UfGmUf(+)hmpNA(G)CmUf UmGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm
134	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)CmUmUfCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm	164	AmsUfsAm AfUmCf(+)hmpNA(U)UmGf UmGmCf UmUfGm GfAmUf UmsUmsUm

135	UmsCfsUm UfGmUf(-)hmpNA(G)CmUmUfGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm	165	AmsCfsAm GfGmCf(+)hmpNA(C)AmUf AmAmUf CmUfUm GfUmGf CmsUmsUm
136	UmsUfsAm UfUmUf(-)hmpNA(A)UmUm CfAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm	166	AmsUfsUm UfCmAf(+)hmpNA(U)UmUf UmGmAf UmUfUm UfGmUf GmsGmsCm
137	AmsUfsCm UfCmUf(-)hmpNA(U)CmAf UmCmCf UmUfGm GfUmGf CmsUmsGm	167	UmsCfsAm UfUmUf(+)hmpNA(C)AmUf UmUmUf GmAfUm UfUmUf GmsUmsGm
138	AmsAfsUm CfUmCf(-)hmpNA(U)UmCf AmUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm	168	AmsUfsUm CfAmUf(+)hmpNA(U)UmCf AmUmUf UmUfGm AfUmUf UmsUmsGm
139	UmsAfsAm UfCmUf(-)hmpNA(C)UmUf CmAmUf CmCfUm UfGmGf UmsGmsCm	169	UmsUfsAm UfUmCf(+)hmpNA(A)UmUf UmCmAf UmUfUm UfGmAf UmsUmsUm
140	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)CmUf UmCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm	170	UmsUfsUm AfUmUf(+)hmpNA(C)AmUf UmUmCf AmUfUm UfUmGf AmsUmsUm
141	UmsUfsGm GfUmAf(-)hmpNA(A)UmCf UmCmUf UmCfAm UfCmCf UmsUmsGm	171	AmsUfsUm UfAmUf(+)hmpNA(U)CmAf UmUmUf CmAfUm UfUmUf GmsAmsUm
142	UmsUfsUm GfGmAf(-)hmpNA(U)UmUf UmUmGf GmUfGm AfAmCf CmsCmsAm	172	UmsUfsAm UfUmUf(+)hmpNA(A)UmUf CmAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm
143	UmsCfsUm UfGmUf(-)hmpNA(G)CmUf UmGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm	173	AmsAfsUm CfUmCf hmpNA(U)UmCm AfUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm
144	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)UmGf UmGmCf UmUfGm GfAmUf UmsUmsUm	174	AmsUfsAm AfUmCf hmpNA(U)CmUmUfCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm
145	AmsCfsAm GfGmCf(-)hmpNA(C)AmUf AmAmUf CmUfUm GfUmGf CmsUmsUm	175	UmsCfsUm UfGmUf hmpNA(G)CmUmUfGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm
146	AmsUfsUm UfCmAf(-)hmpNA(U)UmUf UmGmAf UmUfUm UfGmUf GmsGmsCm	176	UmsUfsAm UfUmUf hmpNA(A)UmUm CfAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm
147	UmsCfsAm UfUmUf(-)hmpNA(C)AmUf UmUmUf GmAfUm UfUmUf GmsUmsGm	177	AmsUfsCm UfCmUf hmpNA(U)CmAf UmCmCf UmUfGm GfUmGf CmsUmsGm

148	AmsUfsUm CfAmUf(-)hmpNA(U)UmCf AmUmUf UmUfGm AfUmUf UmsUmsGm	178	AmsAfsUm CfUmCf hmpNA(U)UmCf AmUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm
149	UmsUfsAm UfUmCf(-)hmpNA(A)UmUf UmCmAf UmUfUm UfGmAf UmsUmsUm	179	UmsAfsAm UfCmUf hmpNA(C)UmUf CmAmUf CmCfUm UfGmGf UmsGmsCm
150	UmsUfsUm AfUmUf(-)hmpNA(C)AmUf UmUmCf AmUfUm UfUmGf AmsUmsUm	180	AmsUfsAm AfUmCf hmpNA(U)CmUf UmCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm
151	AmsUfsUm UfAmUf(-)hmpNA(U)CmAf UmUmUf CmAfUm UfUmUf GmsAmsUm	181	UmsUfsGm GfUmAf hmpNA(A)UmCf UmCmUf UmCfAm UfCmCf UmsUmsGm
152	UmsUfsAm UfUmUf(-)hmpNA(A)UmUf CmAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm	182	UmsUfsUm GfGmAf hmpNA(U)UmUf UmUmGf GmUfGm AfAmCf CmsCmsAm
153	AmsAfsUm CfUmCf(+)hmpNA(U)UmCm AfUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm	183	UmsCfsUm UfGmUf hmpNA(G)CmUf UmGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm
154	AmsUfsAm AfUmCf(+)hmpNA(U)CmUmUfCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm	184	AmsUfsAm AfUmCf hmpNA(U)UmGf UmGmCf UmUfGm GfAmUf UmsUmsUm
155	UmsCfsUm UfGmUf(+)hmpNA(G)CmUmUfGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm	185	AmsCfsAm GfGmCf hmpNA(C)AmUf AmAmUf CmUfUm GfUmGf CmsUmsUm
156	UmsUfsAm UfUmUf(+)hmpNA(A)UmUm CfAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm	186	AmsUfsUm UfCmAf hmpNA(U)UmUf UmGmAf UmUfUm UfGmUf GmsGmsCm
157	AmsUfsCm UfCmUf(+)hmpNA(U)CmAf UmCmCf UmUfGm GfUmGf CmsUmsGm	187	UmsCfsAm UfUmUf hmpNA(C)AmUf UmUmUf GmAfUm UfUmUf GmsUmsGm
158	AmsAfsUm CfUmCf(+)hmpNA(U)UmCf AmUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm	188	AmsUfsUm CfAmUf hmpNA(U)UmCf AmUmUf UmUfGm AfUmUf UmsUmsGm
159	UmsAfsAm UfCmUf(+)hmpNA(C)UmUf CmAmUf CmCfUm UfGmGf UmsGmsCm	189	UmsUfsAm UfUmCf hmpNA(A)UmUf UmCmAf UmUfUm UfGmAf UmsUmsUm
160	AmsUfsAm AfUmCf(+)hmpNA(U)CmUf UmCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm	190	UmsUfsUm AfUmUf hmpNA(C)AmUf UmUmCf AmUfUm UfUmGf AmsUmsUm

161	UmsUfsGm GfUmAf(+)hmpNA(A)UmCf UmCmUf UmCfAm UfCmCf UmsUmsGm	191	AmsUfsUm UfAmUf hmpNA(U)CmAf UmUmUf CmAfUm UfUmUf GmsAmsUm
162	UmsUfsUm GfGmAf(+)hmpNA(U)UmUf UmUmGf GmUfGm AfAmCf CmsCmsAm	192	UmsUfsAm UfUmUf hmpNA(A)UmUf CmAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm

表 15. 人 HSD17B13 siRNA 缀合物经过修饰的正义链和反义链

双链代码	SEQ ID NO：	正义链（5'-3‘）	SEQ ID NO：	反义链（5'-3’）
TRD006019	193	GmsCmsAm CmCfAm AfGfGf AmUmGm AmAmGm AmGmAm Um-NAG1	137	AmsUfsCm UfCmUf(-)hmpNA(U)CmAf UmCmCf UmUfGm GfUmGf CmsUmsGm
TRD006020	194	CmsAmsCm CmAfAm GfGfAf UmGmAm AmGmAm GmAmUm Um-NAG1	138	AmsAfsUm CfUmCf(-)hmpNA(U)UmCf AmUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm
TRD006021	195	AmsCmsCm AmAfGm GfAfUf GmAmAm GmAmGm AmUmUm Am-NAG1	139	UmsAfsAm UfCmUf(-)hmpNA(C)UmUf CmAmUf CmCfUm UfGmGf UmsGmsCm
TRD006022	196	CmsCmsAm AmGfGm AfUfGf AmAmGm AmGmAm UmUmAm Um-NAG1	140	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)CmUf UmCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm
TRD006023	197	AmsGmsGm AmUfGm AfAfGf AmGmAm UmUmAm CmCmAm Am-NAG1	141	UmsUfsGm GfUmAf(-)hmpNA(A)UmCf UmCmUf UmCfAm UfCmCf UmsUmsGm
TRD006030	198	GmsGmsUm UmCfAm CfCfAf AmAmAm AmUmCm CmAmAm Am-NAG1	142	UmsUfsUm GfGmAf(-)hmpNA(U)UmUf UmUmGf GmUfGm AfAmCf CmsCmsAm
TRD006031	199	CmsAmsAm AmAfAm UfCfCf AmAmGm CmAmCm AmAmGm Am-NAG1	143	UmsCfsUm UfGmUf(-)hmpNA(G)CmUf UmGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm
TRD006032	200	AmsAmsUm CmCfAm AfGfCf AmCmAm AmGmAm UmUmAm Um-NAG1	144	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)UmGf UmGmCf UmUfGm GfAmUf UmsUmsUm
TRD006033	201	GmsCmsAm CmAfAm GfAfUf UmAmUm GmGmCm CmUmGm Um-NAG1	145	AmsCfsAm GfGmCf(-)hmpNA(C)AmUf AmAmUf CmUfUm GfUmGf CmsUmsUm

TRD006051	202	CmsAmsCm AmAfAm AfUfCf AmAmAm AmUmGm AmAmAm Um-NAG1	146	AmsUfsUm UfCmAf(-)hmpNA(U)UmUf UmGmAf UmUfUm UfGmUf GmsGmsCm
TRD006052	203	CmsAmsAm AmAfUm CfAfAf AmAmUm GmAmAm AmUmGm Am-NAG1	147	UmsCfsAm UfUmUf(-)hmpNA(C)AmUf UmUmUf GmAfUm UfUmUf GmsUmsGm
TRD006053	204	AmsAmsAm UmCfAm AfAfAf UmGmAm AmAmUm GmAmAm Um-NAG1	148	AmsUfsUm CfAmUf(-)hmpNA(U)UmCf AmUmUf UmUfGm AfUmUf UmsUmsGm
TRD006054	205	AmsUmsCm AmAfAm AfUfGf AmAmAm UmGmAm AmUmAm Am-NAG1	149	UmsUfsAm UfUmCf(-)hmpNA(A)UmUf UmCmAf UmUfUm UfGmAf UmsUmsUm
TRD006055	206	UmsCmsAm AmAfAm UfGfAf AmAmUm GmAmAm UmAmAm Am-NAG1	150	UmsUfsUm AfUmUf(-)hmpNA(C)AmUf UmUmCf AmUfUm UfUmGf AmsUmsUm
TRD006056	207	CmsAmsAm AmAfUm GfAfAf AmUmGm AmAmUm AmAmAm Um-NAG1	151	AmsUfsUm UfAmUf(-)hmpNA(U)CmAf UmUmUf CmAfUm UfUmUf GmsAmsUm
TRD006057	208	AmsAmsAm UmGfAm AfAfUf GmAmAm UmAmAm AmUmAm Am-NAG1	152	UmsUfsAm UfUmUf(-)hmpNA(A)UmUf CmAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm
TRD006941	209	CmsAmsCm CmAfAm GfGfAf UmGmAm AmGmAm GmAmUms Ums-NAG1	133	AmsAfsUm CfUmCf(-)hmpNA(U)UmCm AfUmCf CmUfUm GfGmUf GmsCmsUm
TRD006942	210	CmsCmsAm AmGfGm AfUfGf AmAmGm AmGmAm UmUmAms Ums-NAG1	134	AmsUfsAm AfUmCf(-)hmpNA(U)CmUmUfCmAf UmCfCm UfUmGf GmsUmsGm
TRD006944	211	CmsAmsAm AmAfAm UfCfCf AmAmGm CmAmCm AmAmGms Ams-NAG1	135	UmsCfsUm UfGmUf(-)hmpNA(G)CmUmUfGmGf AmUfUm UfUmUf GmsGmsUm
TRD006947	212	AmsAmsAm UmGfAm AfAfUf GmAmAm UmAmAm AmUmAms Ams-NAG1	136	UmsUfsAm UfUmUf(-)hmpNA(A)UmUm CfAmUf UmUfCm AfUmUf UmsUmsGm

表 12 至表 15 中，将由 2-羟甲基-1,3-丙二醇为起始原料合成的核苷酸定义 hmpNA；hmpNA 为消旋结构；

(-)hmpNA(A)为实施例 1.1 节中核苷亚磷酰胺单体 1-1a 通过固相合成获得；

(+)hmpNA(A)为旋光异构体；

(-)hmpNA(G)为实施例 1.6 节中核苷亚磷酰胺单体 1-6a 通过固相合成获得；(+)hmpNA(G)为旋光异构体；

(-)hmpNA(C)为实施例 1.8 节中核苷亚磷酰胺单体 1-8a 通过固相合成获得；(+)hmpNA(C)为旋光异构体；

(-)hmpNA(U)为实施例 1.7 节中核苷亚磷酰胺单体 1-7a 通过固相合成获得；(+)hmpNA(U)为旋光异构体。

小写字母 m 表示该字母 m 上游相邻的一个核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 上游相邻的一个核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸；

小写字母 s 在大写字母中间时表示与该字母 s 两侧相邻的两个核苷酸之间的连接为硫代磷酸酯基连接；

小写字母 s 在 3’端第一个时表示与该字母 s 上游相邻的一个核苷酸末端为硫代磷酸酯基。

实施例 15 siRNA 序列 psiCHECK 在靶活性-单浓度点抑制活性筛选

在 Huh 7 细胞中对本公开化合物进行单点（10nM）体外分子水平模拟在靶活性筛选。

针对 siRNA 的反义链，构建与反义链完全互补的在靶质粒 GSCM，插入到 psiCHECK 质粒中，该质粒包含海肾荧光素酶基因及萤火虫荧光素酶基因。作为双报告基因系统，siRNA 的靶序列插入到海肾荧光素酶基因的 3’ UTR 区域，siRNA 对于靶标序列的活性可以通过经萤火虫荧光素酶校准后的海肾荧光素酶表达情况的检测来反映，检测使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）。

Huh 7 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 24h，将 Huh7 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 1 万个细胞，每孔 100μL 培养基。

按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染 siRNA 及对应质粒，每孔使用 0.2 μL Lipofectamine2000，质粒转染量为 10ng 每孔，siRNA 的浓度为 10nM。转染后 24h，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测在靶水平。检测序列的在靶活性如表 16 所示。

表 16. siRNA 序列 psiCHECK 在靶活性-单浓度点抑制活性筛选结果

化合物编号	mRNA 剩余表达水平（10 nM）	SD
TRD005305	15.4%	2.4%
TRD005306	14.5%	3.4%
TRD005307	23.1%	1.6%
TRD005308	19.2%	1.7%
TRD005309	13.8%	2.3%
TRD005352	57.5%	12.0%
TRD005353	20.7%	0.2%

TRD005354	37.2%	8.2%
TRD005355	18.4%	3.0%
TRD005356	63.5%	4.5%
TRD005357	13.9%	4.5%
TRD005358	19.9%	2.9%
TRD005359	65.3%	3.8%
TRD005360	29.1%	0.1%
TRD005361	38.2%	0.4%
TRD005397	16.8%	2.4%
TRD005398	15.3%	0.9%
TRD005399	13.7%	0.5%
TRD005400	17.5%	2.2%
TRD005401	11.4%	1.4%
TRD005402	12.0%	1.3%
TRD005403	8.4%	2.0%

实施例 16 siRNA 的 psiCHECK 在靶活性-五浓度点抑制活性筛选

在 HEK 293A 细胞上对 siRNA 进行 5 个浓度点体外分子水平模拟在靶活性筛选。

HEK 293A 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 24h，将 HEK 293A 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 8000 个细胞，每孔 100μL 培养基。

按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染 siRNA 及对应质粒，每孔使用 0.2μL Lipofectamine2000，质粒转染量为 10ng 每孔，siRNA 共设置 5 个浓度点，最高浓度点终浓度为 10nM，10 倍梯度稀释。转染后 24h，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测在靶水平。

表 17 结果表明，经 siRNA 处理后的 HSD17B13 的 mRNA 表达水平以剂量依赖的方式降低，siRNA 具有高水平的体外在靶抑制活性。

表 17. siRNA 的 psiCHECK 在靶活性-五浓度点抑制活性筛选结果

化合物编号	靶基因 mRNA 表达剩余百分比（平均值）					IC50 值（nM）
	10nM	1nM	0.1nM	0.01nM	0.001nM	
TRD005305	8.4%	7.7%	15.0%	47.0%	89.1%	0.0081
TRD005306	6.3%	6.2%	7.9%	25.7%	69.0%	0.0028
TRD005307	11.6%	9.9%	15.8%	51.0%	88.3%	0.0098
TRD005308	9.6%	4.6%	6.0%	14.9%	51.9%	0.0041
TRD005309	6.4%	6.3%	15.2%	54.4%	84.8%	0.0117
TRD005353	10.0%	7.3%	10.0%	33.1%	78.2%	0.0051
TRD005355	9.5%	7.1%	12.9%	60.2%	111.1%	0.0141
TRD005357	4.5%	4.4%	8.9%	36.1%	92.8%	0.0056
TRD005358	14.9%	8.0%	11.1%	39.1%	90.7%	0.0089
TRD005397	8.2%	4.3%	6.0%	20.6%	62.4%	0.0059
TRD005398	10.6%	4.1%	8.0%	45.3%	86.6%	0.0085

TRD005399	6.0%	3.8%	4.2%	11.3%	40.1%	<0.001
TRD005400	7.1%	4.0%	4.7%	22.4%	66.9%	0.0065
TRD005401	6.8%	7.1%	9.7%	35.9%	95.8%	0.0056
TRD005402	3.2%	3.0%	4.4%	12.6%	56.0%	0.0012
TRD005403	2.4%	2.7%	6.8%	33.5%	84.5%	0.0049

实施例 17 缀合的 siRNA 的 psiCHECK 在靶活性-11 浓度点抑制活性筛选

将缀合的 siRNA 经过修饰（反义链第 7 位修饰）后，在 HEK 293A 细胞中采用 11 个浓度点进行体外分子水平模拟在靶活性筛选。

HEK 293A 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 24h，将 HEK 293A 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 8000 个细胞，每孔 100μL 培养基。

按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染缀合的 siRNA 及对应质粒，每孔使用 0.2μL Lipofectamine2000，质粒转染量为 10ng 每孔，缀合的 siRNA 共设置 11 个浓度点，最高浓度点终浓度为 20nM，3 倍梯度稀释。转染 24h 后，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测在靶水平。

表 18 结果表明，经缀合的 siRNA 处理后的 HSD17B13 的 mRNA 水平以剂量依赖方式降低，缀合的 siRNA 具有高水平的体外在靶抑制活性。

表 18. 缀合的 siRNA 的 psiCHECK 在靶活性-11 浓度点抑制活性筛选结果

化合物编号	靶基因 mRNA 表达剩余百分比（平均值）					
	20nM	6.667nM	2.222nM	0.741nM	0.247nM	0.082nM
TRD006019	9.9%	8.9%	8.0%	8.3%	13.4%	26.4%
TRD006020	5.9%	5.8%	6.8%	6.4%	9.2%	15.4%
TRD006021	11.7%	12.3%	13.2%	16.0%	28.7%	48.9%
TRD006022	8.8%	5.1%	4.7%	5.1%	7.4%	14.6%
TRD006023	7.5%	5.4%	6.1%	7.9%	14.2%	31.9%
TRD006030	45.5%	26.9%	19.1%	15.6%	20.5%	38.3%
TRD006031	10.3%	7.6%	6.0%	5.9%	8.8%	22.0%
TRD006032	5.0%	4.9%	5.3%	5.3%	7.0%	12.2%
TRD006033	9.4%	7.1%	5.9%	6.3%	11.0%	24.3%
TRD006051	8.2%	6.9%	7.1%	8.2%	11.8%	21.3%
TRD006052	9.3%	11.2%	17.7%	31.3%	56.7%	72.4%
TRD006053	31.9%	28.5%	27.8%	31.8%	44.3%	61.6%
TRD006054	4.6%	4.0%	5.0%	7.0%	14.5%	37.2%
TRD006055	7.3%	8.8%	9.6%	14.2%	25.1%	48.7%
TRD006056	41.9%	44.3%	46.6%	52.0%	67.6%	86.0%
TRD006057	3.9%	3.6%	3.9%	3.6%	7.4%	17.9%
化合物编号	靶基因 mRNA 表达剩余百分比（平均值）					IC_{50} 值

	0.027nM	0.009nM	0.003nM	0.001nM	0.0003nM	（nM）
TRD006019	50.9%	72.3%	89.4%	94.6%	86.7%	0.0282
TRD006020	34.2%	57.3%	80.3%	86.5%	89.6%	0.0133
TRD006021	74.7%	92.5%	93.1%	101.8%	99.1%	0.082
TRD006022	32.3%	58.3%	80.1%	88.1%	85.7%	0.0133
TRD006023	60.4%	76.9%	88.1%	89.4%	89.5%	0.0398
TRD006030	63.3%	81.4%	96.1%	97.9%	98.5%	0.041
TRD006031	46.8%	77.4%	95.6%	96.6%	93.7%	0.0251
TRD006032	28.6%	58.7%	81.8%	102.5%	98.5%	0.012
TRD006033	54.6%	79.4%	91.1%	93.5%	100.3%	0.0304
TRD006051	48.3%	78.0%	90.3%	90.0%	96.1%	0.0265
TRD006052	91.9%	97.6%	98.0%	94.1%	95.1%	0.302
TRD006053	80.9%	84.2%	95.4%	97.1%	95.7%	0.1549
TRD006054	62.9%	82.3%	91.7%	94.2%	95.7%	0.0468
TRD006055	72.8%	87.8%	96.7%	95.7%	95.2%	0.0764
TRD006056	83.8%	90.5%	90.7%	88.6%	91.5%	0.955
TRD006057	38.5%	64.5%	84.9%	95.8%	97.0%	0.0167

实施例 18 缀合的 siRNA 的 AS 链 psiCHECK 脱靶水平验证

在 HEK 293A 细胞中采用 11 个浓度梯度进行体外分子水平模拟脱靶水平筛选，实验结果见表 19。

分别针对 siRNA 构建对应的脱靶序列，即构建与反义链 5’端 1-8 位完全互补，而其它位置的碱基完全不匹配的脱靶质粒 GSSM，碱基错配对应规则为 A 与 C 互配、G 与 T 互配；为了提高检测灵敏度，构建了 GSSM-5hits 脱靶质粒，即 5 条相同的 GSSM 序列通过 TTCC 连接组成，插入到 psiCHECK 质粒中，该质粒包含海肾荧光素酶基因及萤火虫荧光素酶基因。作为双报告基因系统，siRNA 的靶序列插入到海肾荧光素酶基因的 3’ UTR 区域，siRNA 对于靶标序列的活性可以通过经萤火虫荧光素酶校准后的海肾荧光素酶表达情况的检测来反映，检测使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）。

HEK 293A 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 24h，将 HEK 293A 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 8000 个细胞，每孔 100μL 培养基。

按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染缀合的 siRNA 及对应质粒，每孔使用 0.2μL Lipofectamine2000。质粒转染量为 10ng 每孔。对于脱靶序列质粒，缀合的 siRNA 共设置 11 个浓度点，最高浓度点终浓度为 20nM，3 倍梯度稀释。转染后 24h，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测脱靶水平。

表 19. 缀合的 siRNA 反义链种子区 psiCHECK 脱靶活性筛选结果（GSSM-5hits）

双链代码	靶基因 mRNA（GSSM-5hits）表达剩余百分比（平均值）											IC50 值（nM）
	20 nM	6.667 nM	2.222 nM	0.741 nM	0.247 nM	0.082 nM	0.0274 nM	0.0091 nM	0.003 nM	0.001 nM	0.0003 nM	
TRD006019	91.2%	91.9%	94.6%	93.1%	91.6%	99.1%	95.4%	97.6%	96.3%	97.6%	96.6%	155.9
TRD006020	50.7%	56.0%	67.8%	86.8%	102.5%	103.9%	102.5%	104.4%	102.5%	107.3%	109.4%	10.6
TRD006022	90.9%	88.2%	88.1%	92.4%	100.7%	107.9%	106.7%	106.0%	105.3%	106.7%	109.0%	127.0
TRD006031	117.6%	99.8%	101.4%	101.1%	98.2%	97.2%	96.8%	94.6%	95.5%	101.5%	102.5%	NA
TRD006032	65.1%	67.9%	76.3%	86.2%	91.0%	95.6%	95.2%	96.5%	97.1%	99.1%	105.1%	21.9
TRD006033	87.0%	84.2%	87.7%	93.2%	97.2%	100.5%	100.8%	99.8%	99.9%	101.7%	99.7%	87.1
TRD006051	80.9%	69.2%	71.4%	83.2%	83.5%	89.9%	89.5%	94.3%	95.8%	95.3%	97.5%	36.9
TRD006056	68.0%	81.5%	89.7%	102.2%	102.7%	103.7%	107.4%	102.9%	106.2%	105.3%	102.6%	37.6
TRD006057	76.6%	82.4%	89.1%	93.7%	97.2%	98.1%	95.2%	93.6%	104.0%	99.8%	97.8%	50.9
NA 表示无脱靶活性。												

实施例 19 缀合的 siRNA 对人原代肝细胞（PHH）中人 HSD17B13 的抑制-5 个浓度点抑制活性

在人原代肝细胞（PHH）中采用 5 个浓度梯度对 siRNA 进行人原代肝细胞（PHH）活性筛选。

人原代肝细胞（PHH）冻存于液氮中，转染前 24h，将人原代肝细胞（PHH）复苏后接种于 96 孔板，接种密度为每孔 4 万个细胞，每孔 100μL 培养基。

使用 Lipofectamine RNAi MAX（ThermoFisher，13778150）转染 siRNA，siRNA 共设置 5 个浓度点，最高浓度点终浓度为 10nM，10 倍梯度稀释，转染 24h 后，利用高通量细胞 RNA 提取试剂盒（凡知，FG0417）进行细胞总 RNA 提取，RNA 逆转录试剂盒（Takara ，6210A）逆转录和 Taqman 探针 Q-PCR 试剂盒（ThermoFisher ，4444964）检测人 HSD17B13 的 mRNA 表达水平，实验过程均参照产品说明手册。实验中以 GAPDH 作为内参基因，Taqman 探针引物信息见表 20，引物的工作浓度为 10μM，根据系统自动设定的阈值获取相应的 Ct 值，相对定量基因的表达，数据处理采用 2-ΔΔCt 法。结果以相对于经对照缀合的 siRNA 处理的细胞的人 HSD17B13 mRNA 表达剩余百分比来表示。抑制率的 IC50 结果见表 21。ΔΔCt = [（Ct 实验组目的基因-Ct 实验组内参）-（Ct 对照组目的基因-Ct 对照组内参）]。抑制率（%）=（1-目的基因表达剩余量）×100%。

表 20. Taqman 探针引物信息表

引物名称	品牌	货号
HSD17Bl3 Human probe	Thermo	Hs01068199_ml
Human GAPDH TaqMan Probe	Thermo	4326317E

表 21. 缀合的 siRNA 对人原代肝细胞（PHH）中
人 HSD17B13 的五浓度抑制活性结果

化合物编号	靶基因 mRNA（PHH）表达剩余百分比（平均值）					IC_{50} 值（nM）
	10nM	1nM	0.1nM	0.01nM	0.001nM	
TRD006020	20.1%	16.4%	26.8%	50.5%	74.9%	0.0107
TRD006022	14.8%	14.0%	26.5%	58.8%	71.8%	0.0190
TRD006031	11.1%	17.4%	41.8%	50.4%	77.1%	0.0162
TRD006032	11.2%	14.8%	34.4%	81.4%	132.4%	0.0391
TRD006057	6.7%	10.2%	17.5%	49.3%	59.9%	0.0097

实施例 20 缀合的 siRNA 的 SS 链 psiCHECK 脱靶水平验证

在 HEK 293A 细胞中采用 11 个浓度梯度对缀合的 siRNA 进行体外分子水平模拟脱靶水平筛选，实验结果见表 22 和表 23。

分别针对 siRNA 的 SS 链构建对应的脱靶序列，插入到 psiCHECK 质粒中。该质粒包含海肾荧光素酶基因及萤火虫荧光素酶基因。作为双报告基因系统，siRNA 的靶序列插入到海肾荧光素酶基因的 3' UTR 区域，siRNA 对于靶标序列的活性可以通过经萤火虫荧光素酶校准后的海肾荧光素酶表达情况的检测来反映，检测使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）。

siRNA 对应的靶标质粒构建规则如下：

针对 siRNA 的正义链，分别构建与 SS 链完全互补的脱靶质粒 PSCM；构建与正义链 5'端 1-8 位完全互补，而其它位置的碱基完全不匹配的脱靶质粒 PSSM，碱基错配对应规则为 A 与 C 互配、G 与 T 互配，为了提高检测灵敏度，构建了 PSSM-5hits 脱靶质粒，即 5 条相同的 PSSM 序列通过 TTCC 连接组成。

HEK 293A 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO_2 条件下培养。转染前 24h，将 HEK 293A 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 8000 个细胞，每孔 100μL 培养基。

按照说明书，使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染缀合的 siRNA 及对应质粒，每孔使用 0.2μL Lipofectamine2000。质粒转染量为 10ng 每孔。对于脱靶序列质粒，缀合的 siRNA 共设置 11 个浓度点，最高浓度点终浓度为 20nM，3 倍梯度稀释。转染后 24h，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测脱靶水平。

结果如表 22 和表 23 所示，缀合的 siRNA 无明显脱靶现象。

表 22. 缀合的 siRNA 正义链 psiCHECK 脱靶活性筛选结果（PSCM）

化合物编号	靶基因 mRNA（PSCM）表达剩余百分比（平均值）					
	20nM	6.667nM	2.222nM	0.741nM	0.247nM	0.082nM
TRD006020	80.6%	89.1%	97.4%	98.9%	104.4%	107.6%
TRD006022	74.6%	74.2%	79.3%	91.8%	101.8%	108.2%
TRD006031	99.3%	94.5%	96.1%	96.2%	105.0%	105.1%
TRD006057	92.8%	99.9%	99.9%	107.4%	123.4%	111.7%
化合物编号	靶基因 mRNA（PSCM）表达剩余百分比（平均值）					
	0.027nM	0.009nM	0.003nM	0.001nM	0.0003nM	IC50 值（nM）
TRD006020	103.6%	100.6%	103.1%	98.8%	96.0%	77.27
TRD006022	105.9%	107.0%	108.8%	104.9%	105.2%	36.87
TRD006031	103.0%	100.5%	103.4%	105.0%	104.2%	695.5
TRD006057	108.4%	112.9%	113.2%	116.1%	108.1%	327.3

表 23. 缀合的 siRNA 正义链 psiCHECK 脱靶活性筛选结果（PSSM-5hits）

化合物编号	靶基因 mRNA（PSCM）表达剩余百分比（平均值）					
	20nM	6.667nM	2.222nM	0.741nM	0.247nM	0.082nM
TRD006020	92.9%	95.0%	104.4%	108.5%	105.2%	106.8%
TRD006022	88.9%	75.5%	81.8%	89.4%	99.9%	101.4%
TRD006031	103.4%	97.6%	97.1%	102.5%	100.0%	106.1%
TRD006057	111.6%	110.5%	108.5%	110.4%	99.8%	96.1%
化合物编号	靶基因 mRNA（PSCM）表达剩余百分比（平均值）					
	0.027nM	0.009nM	0.003nM	0.001nM	0.0003nM	IC50 值（nM）
TRD006020	108.3%	104.3%	105.7%	107.0%	99.9%	268.1
TRD006022	104.5%	102.8%	106.7%	100.6%	96.8%	72.99
TRD006031	108.8%	104.3%	108.1%	101.1%	100.9%	NA
TRD006057	98.3%	103.3%	103.8%	101.3%	101.5%	NA

表 23 中 NA 表示无明显脱靶活性。

实施例 21 缀合的 siRNA 对人原代肝细胞（PHH）中人 HSD17B13 的抑制-多浓度点抑制活性

在人原代肝细胞(PHH)中采用多浓度梯度对 siRNA 进行人原代肝细胞(PHH)活性筛选。

人原代肝细胞（PHH）冻存于液氮中，转染前 24h，将人原代肝细胞（PHH）复苏后接种于 96 孔板，接种密度为每孔 4×10^4 个细胞，每孔 100μL 培养基。

参照产品说明手册，使用 Lipofectamine RNAi MAX(ThermoFisher，13778150)转染缀合的 siRNA，siRNA 共设置 11 个或 7 个浓度点，最高浓度点终浓度为 10nM，3 倍或 5 倍梯度稀释。在处理 24h 后，使用高通量细胞 RNA 提取试剂盒进行细胞总 RNA 提取、RNA 逆转录实验和定量实时 PCR 检测，测定人 HSD17B13 的 mRNA

水平，根据 GAPDH 内参基因水平对人 HSD17B13 的 mRNA 水平进行校正。

结果以相对于经过对照 siRNA 处理的细胞的人 HSD17B13 mRNA 表达剩余百分比来表示。抑制率的 IC_{50} 结果见表 24 和表 25。

表 24. 缀合的 siRNA 对人原代肝细胞（PHH）中人 HSD17B13 的 11 浓度抑制活性

化合物编号	靶基因 mRNA（PHH）表达剩余百分比（平均值）											IC_{50} 值（nM）
	10nM	3.333nM	1.111nM	0.370nM	0.123nM	0.0411nM	0.0137nM	0.0046nM	0.0015nM	0.0005nM	0.00017nM	
TRD006020	15.0%	12.4%	13.5%	16.0%	25.2%	38.0%	47.3%	62.9%	93.4%	97.8%	112.3%	0.0129
TRD006022	12.2%	12.0%	13.6%	18.5%	27.8%	35.4%	52.8%	63.3%	76.0%	70.3%	91.6%	0.0141
TRD006031	11.5%	11.8%	14.2%	21.0%	32.2%	40.6%	50.3%	59.9%	63.9%	78.0%	97.9%	0.0100
TRD006057	8.9%	11.5%	18.5%	26.0%	41.7%	55.0%	68.4%	79.3%	104.6%	109.9%	81.0%	0.0201

表 25. 缀合的 siRNA 对人原代肝细胞（PHH）中人 HSD17B13 的 7 浓度抑制活性

化合物编号	靶基因 mRNA（PHH）表达剩余百分比（平均值）							IC_{50} 值（nM）
	10nM	2nM	0.4nM	0.08nM	0.016nM	0.0032nM	0.00064nM	
TRD006941	15.7%	17.4%	15.8%	27.5%	64.1%	99.6%	103.6%	0.0251
TRD006942	8.2%	10.5%	13.7%	24.3%	71.4%	104.7%	77.6%	0.0324
TRD006944	9.7%	9.1%	14.5%	38.9%	78.7%	87.5%	80.0%	0.0566
TRD006947	5.4%	8.7%	14.2%	35.6%	71.2%	106.6%	86.5%	0.0438

虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本公开的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

权利要求书

1. 一种 siRNA，其包含形成双链区的正义链与反义链；

所述正义链包含至少 15 个连续核苷酸，且与 SEQ ID NO：24、4、6、11、3、5、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 中的任一核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸；

所述反义链包含至少 15 个连续核苷酸，且与 SEQ ID NO：46、26、28、33、25、27、29、30、31、32、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45 中的任一核苷酸序列相差不超过 3 个核苷酸。

2. 根据权利要求 1 所述的 siRNA，

所述正义链包含选自 SEQ ID NO：3 至 SEQ ID NO：24 中的任一核苷酸序列的至少 17 个连续核苷酸；

所述反义链包含选自 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 中的任一核苷酸序列的至少 19 个连续核苷酸；

优选地，所述正义链包含选自 SEQ ID NO：3 至 SEQ ID NO：24 中的任一核苷酸序列；

优选地，所述反义链包含选自 SEQ ID NO：25 至 SEQ ID NO：46 中的任一核苷酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 siRNA，其包含选自以下任一组：

组 1），SEQ ID NO：4 所示的正义链和 SEQ ID NO：26 所示的反义链；

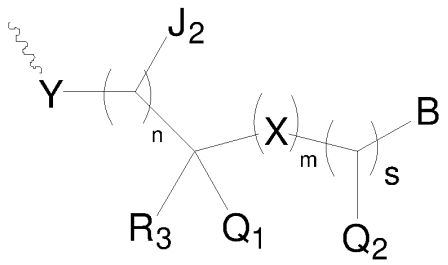
组 2），SEQ ID NO：6 所示的正义链和 SEQ ID NO：28 所示的反义链；

组 3），SEQ ID NO：11 所示的正义链和 SEQ ID NO：33 所示的反义链；

组 4），SEQ ID NO：24 所示的正义链和 SEQ ID NO：46 所示的反义链。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的 siRNA，所述正义链和/或反义链中至少一个核苷酸为修饰的核苷酸。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的 siRNA，所述反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位中的至少一个核苷酸包含式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（I）

其中：Y 选自 O、NH 和 S；

每个 X 独立地选自 $CR_4(R_4')$、S、NR_5 和 NH-CO，其中 R_4、R_4'、R_5 分别独立地为 H 或 C_1-C_6 烷基；

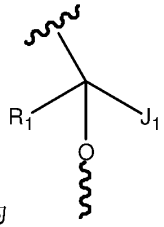
J_2 为 H 或 C_1-C_6 烷基；

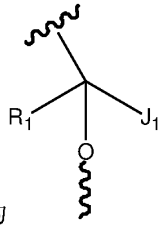
n=0、1 或 2；

m=0、1 或 2；

s=0 或 1；

R_3 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_pR_6$；其中 R_6 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，p=1、2 或 3；

Q_1 为 ，Q_2 为 R_2；或者

Q_1 为 R_2，Q_2 为 ；

其中：

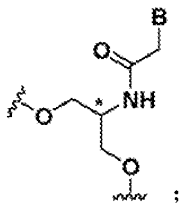
R_1 选自 H、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基和$(CH_2)_qR_7$；其中 R_7 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，q=1、2 或 3；

J_1 为 H 或 C_1-C_6 烷基；

R_2 选自 H、OH、卤素、NH_2、C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷氧基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、S-CH_3、$NCH_3(CH_3)$、$OCH_2CH_2OCH_3$、-O-烷基氨基和$(CH_2)_rR_8$；其中 R_8 选自 OH、卤素、甲氧基、乙氧基、N_3、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基，r=1、2 或 3；

任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

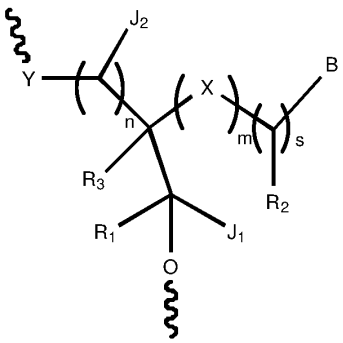
B 是碱基；



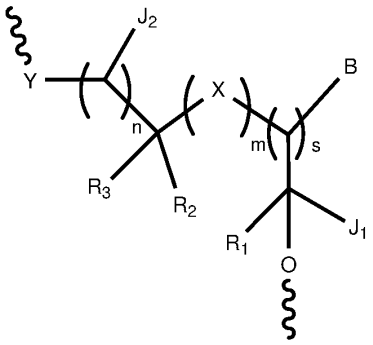
其中：所述式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰不是 ；

优选地，当 X 为 NH-CO 时，R_1 不是 H。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的 siRNA，所述反义链在其 5’区域的第 2 位至第 8 位中的至少一个核苷酸位置处包含式（I-1）或式（I-2）所示的化学修饰或其互变异构体修饰：



（式 I-1）



（I-2）。

7. 根据权利要求 6 所述的 siRNA，在式（I-1）和式（I-2）中，

Y 为 O 或 NH；

每个 X 独立地选自 NH-CO、CH_2 和 NH；

n=0 或 1；

m=0 或 1；

s=0 或 1；

每个 J_1、J_2 分别独立地为 H；

R_1 选自 H、甲基和 CH_2OH；

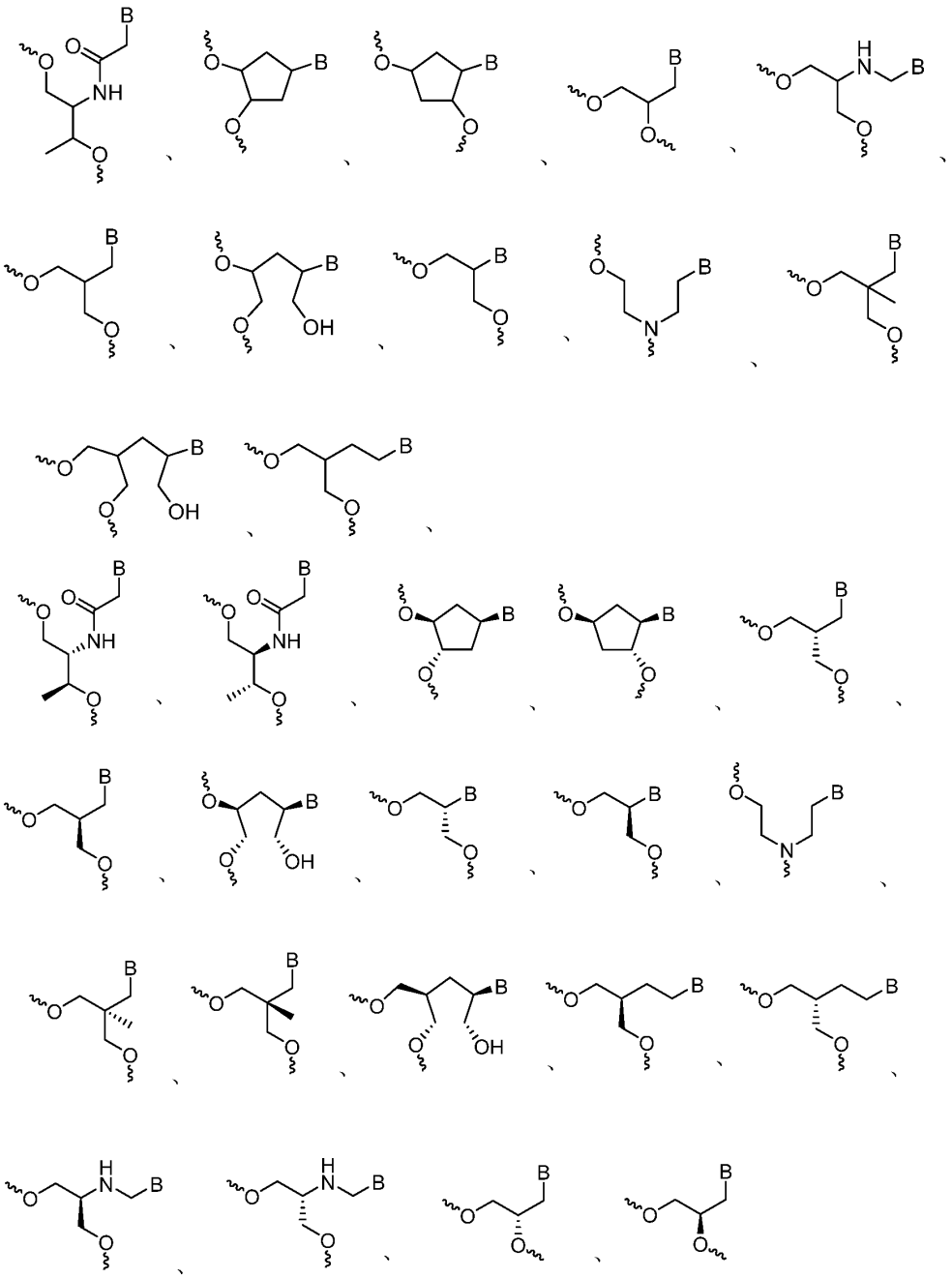
R_2 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

R_3 选自 H、OH、NH_2、甲基和 CH_2OH；

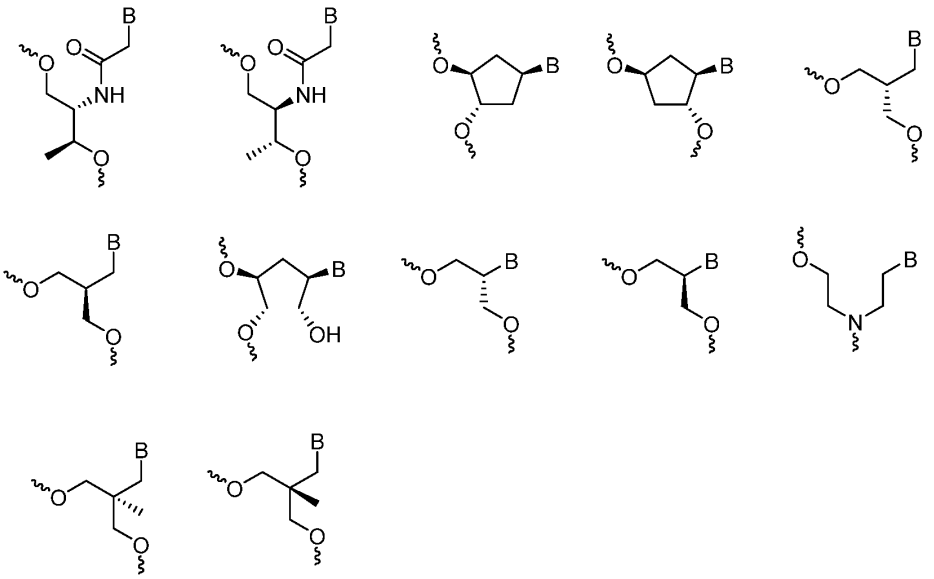
任选地，R_1 和 R_2 直接相连成环；

优选地，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

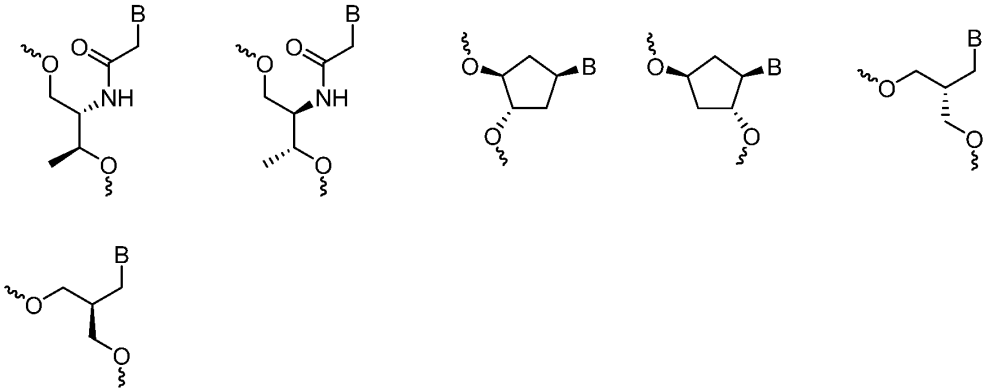
8. 根据权利要求 5 至 7 中任一项所述的 siRNA，所述式（I）所示的化学修饰选自：



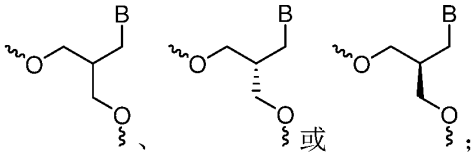
优选地，所述式（I）所示的化学修饰选自：



更优选地，所述式（I）所示的化学修饰选自：



进一步优选地，所述式（I）所示的化学修饰选自：



优选地，B 各自独立地选自所述反义链 5’区域的第 2 位至第 8 位的含有所述式（I-1）所示化学修饰的核苷酸位置上的碱基。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的 siRNA，所述反义链在其 5’区域的第 5 位、第 6 位或第 7 位包含权利要求 5 至 8 中任一项所定义的式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰；

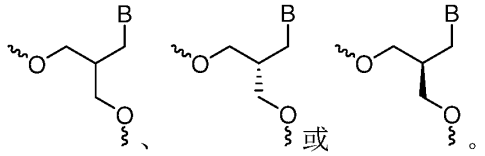
当式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰在 5’区域的第 5 位时，B 是所述反义链在其 5’区域的第 5 位的碱基；

当式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰在 5’区域的第 6 位时，B 是所

述反义链在其5’区域的第6位的碱基；

当式（I）所示的化学修饰或其互变异构体修饰在5’区域的第7位时，B是所述反义链在其5’区域的第7位的碱基。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的siRNA，其中所述反义链的核苷酸序列包含或为：SEQ ID NO：47至SEQ ID NO：68任一项，

其中，W’表示含有化学修饰或其互变异构体修饰的核苷酸，所述化学修饰选自、或。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的 siRNA，所述正义链和/或反义链中至少一个磷酸酯基为修饰的磷酸酯基，优选为硫代磷酸酯基。

12. 一种siRNA缀合物，其包含：

权利要求1至11中任一项所述的siRNA、和

连接至所述siRNA末端的靶向配体；

优选地，所述靶向配体连接至所述siRNA的正义链3’末端。

13. 根据权利要求12所述的siRNA缀合物，其中：

所述靶向配体包含至少一个靶向部分，

所述靶向部分各自独立地选自：半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基-半乳糖胺和N-异丁酰基-半乳糖胺；

优选地，所述靶向部分是N-乙酰基-半乳糖胺；

更优选地，所述靶向配体包含三个靶向部分。

14. 一种药物组合物，其包含：

权利要求1至11中任一项所述的siRNA或权利要求12至13中任一项所述的siRNA缀合物，和

药学上可接受的载体。

15. 一种抑制第13型17β-羟基类固醇脱氢酶（HSD17B13）基因表达的方法，包括给予受试者有效量或有效剂量的权利要求1至11中任一项所述的siRNA或权利要求12至13中任一项所述的siRNA缀合物、或权利要求14所述的药物组合物。

16. 一种治疗和/或预防受试者与 HSD17B13 基因表达相关的疾病的方法，包括步骤：给予受试者有效量或有效剂量的权利要求 1 至 11 中任一项所述的 siRNA 或权利要求 12 至 13 中任一项所述的 siRNA 缀合物、或权利要求 14 所述的药物组合物；

优选地，所述与 HSD17B13 基因表达相关的疾病为慢性纤维炎性肝病，

更优选地，所述慢性纤维炎性肝病与脂质液滴在肝脏中的蓄积及/或扩张有关。

17. 一种治疗和/或预防疾病的方法，包括步骤：给予受试者有效量或有效剂量的权利要求 1 至 11 中任一项所述的 siRNA 或权利要求 12 至 13 中任一项所述的 siRNA 缀合物、或权利要求 14 所述的药物组合物，

所述疾病选自肝炎、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝病、肝硬化、酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪肝病、HCV-相关的硬化、药物引起的肝损伤、或肝细胞坏死。

18. 一种用于降低患有脂肪变性的个体中发展慢性肝病的风险，和/或用于抑制脂肪变性的个体中脂肪变性至脂肪肝炎的进展，和/或用于抑制肝脏内脂质液滴蓄积的方法，包括步骤：给予受试者有效量或有效剂量的根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的 siRNA 或权利要求 12 至 13 中任一项所述的 siRNA 缀合物、或权利要求 14 所述的药物组合物。

19. 一种体内递送 siRNA 至肝脏的方法，包括步骤：给与受试者权利要求 1 至 11 中任一项所述的 siRNA 或权利要求 12 至 13 中任一项所述的 siRNA 缀合物、或权利要求 14 所述的药物组合物。

20. 一种制备 siRNA 或 siRNA 缀合物的方法，其包括：

合成权利要求 1 至 11 中任一项所述的 siRNA 或权利要求 12 至 13 中任一项所述的 siRNA 缀合物。