

靶向 PD-L1 的双链核糖核酸

相关申请的引用

本申请要求于 2023 年 08 月 04 日向中华人民共和国国家知识产权局提交的第 202310982666.0 号中国专利申请、于 2023 年 12 月 04 日向中华人民共和国国家知识产权局提交的第 202311654515.9 号中国专利申请以及于 2024 年 01 月 26 日向中华人民共和国国家知识产权局提交的第 202410114631.X 号中国专利申请的优先权和权益，在此将其全部内容以援引的方式整体并入文本中。

技术领域

本申请属于生物医药领域，涉及一种双链核糖核酸（dsRNA）、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物，其可用于抑制 PD-L1。

背景技术

乙型病毒性肝炎，简称乙肝，是一种由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus，简称 HBV）感染机体后所引起的疾病。乙型肝炎病毒是一种嗜肝病毒，主要存在于肝细胞内并损害肝细胞，引起肝细胞炎症、坏死、纤维化等。乙型病毒性肝炎分急性和慢性两种。急性乙型肝炎在成年人中大多数可通过其自身的免疫机制而自愈。但是慢性乙型肝炎（CHB）已成为全球健康保健所面临的极大挑战，同时也是引起慢性肝病、肝硬化（cirrhosis）和肝癌（HCC）的主要原因(Edward J. G., et al., The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology (2015); 63: 320-328)。

目前被批准上市的抗 HBV 药物主要是免疫调节剂（干扰素- α 和聚乙二醇干扰素- α -2a 等）和抗病毒治疗药物（拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、克拉夫定等）。其中，抗病毒治疗药物属于核苷或核苷酸类药物，其作用机制是抑制 HBV DNA 的合成，并不能直接减少 HBsAg 水平。与延长治疗一样，核苷或核苷酸类药物显示 HBsAg 清除速度类似于自然观察结果（Janssen et al. Lancet (2005), 365, 123-129; Marcellin et al. N. Engl.J.Med. (2004), 351, 1206-1217; Buster et al. Hepatology (2007), 46, 388-394.)。

免疫检查点抑制剂是近年来研究较多的免疫疗法，主要围绕着 PD-1/PD-L1 通路进行。PD-L1 是一种大小为 40kDa 的跨膜蛋白，与 PD-1 结合可抑制 T 细胞的活化，从而维持免疫稳态。正常情况下，PD-L1 在多数淋巴细胞上被诱导表达，例如上皮细胞、内皮细胞和一些肿瘤细胞。在正常肝脏组织中，PD-L1 主要表达在门静脉区，在肝实质细胞、肝窦内皮细胞上均有表达，呈低表达状态，病毒感染会使肝细胞上的 PD-L1 表达显著增高。在 HBV 感染时，肝细胞表面的 PD-L1 表达上调，与 T 细胞表面的 PD-1 受体相互作用，导致 T 细胞耗竭，因此，抑制 PD-L1 的表达，可增强 T 细胞功能，有助于恢复免疫反应，并引发免疫介导的对 HBV 感染的肝细胞的清除，这对于慢性乙肝的治愈至关重要。

小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）可以基于 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）机制，以序列特异性的方式抑制或阻断目标基因的翻译或转录来抑制目标基因表达，从 mRNA 水平发挥抑制作用，从而达到治疗疾病的目的。

发明概述

一方面，本申请提供一种双链核糖核酸（dsRNA）、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，所述 dsRNA 包含正义链和反义链，所述正义链含有长度不超过 23 个核苷酸的核苷酸序列，所述反义链含有长度不超过 25 个核苷酸的核苷酸序列，所述正义链或反义链任选地是经修饰的，所述双链核糖核酸（dsRNA）、其药学上可接受的盐或其配体缀合物靶向 PD-L1 mRNA。

另一方面，本申请提供一种双链核糖核酸(dsRNA)、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，所述 dsRNA 包含正义链和反义链，所述正义链含有如 SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.13 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 21 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 23 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.16 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.17 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.18 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.19 所示的核苷酸

序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.20 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.21 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.22 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.23 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.24 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.25 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.26 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.27 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 21 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 23 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.53 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸:

正义链: 5'-AGCAUAUGACAAUUGAAUGA-3' (SEQ ID NO.9),
反义链: 5'-UCAUCAAUUGUCAUAUUGCUAC-3' (SEQ ID NO.10);
正义链: 5'-AUUUACUGUCACGGUCCCCAA-3' (SEQ ID NO.11),
反义链: 5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.12);
正义链: 5'-CUAUUUUUUUGAGUCUGU-3' (SEQ ID NO.13),
反义链: 5'-ACAGACUAAAAUAAUAGGA-3' (SEQ ID NO.14);
正义链: 5'-UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU-3' (SEQ ID NO.15),
反义链: 5'-AUCUACUACAAUAUAUCUUCAAA-3' (SEQ ID NO.16);
正义链: 5'-UUGUCUCAUGUUUCAUCGUAA-3' (SEQ ID NO.17),
反义链: 5'-UUACGAUGAAACAUGAGACAAAA-3' (SEQ ID NO.18);
正义链: 5'-CUGUGCAGUAUCUGUCCAUU-3' (SEQ ID NO.19),
反义链: 5'-AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC-3' (SEQ ID NO.20);
正义链: 5'-AAUGAAAGGACUCACUUGGUA-3' (SEQ ID NO.21),
反义链: 5'-UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG-3' (SEQ ID NO.22);
正义链: 5'-GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUA-3' (SEQ ID NO.23),
反义链: 5'-UACCAUAGCUGAUCUAGCAGCGG-3' (SEQ ID NO.24);
正义链: 5'-GGUGCUUGGUCUCCUCUAUAA-3' (SEQ ID NO.25),
反义链: 5'-UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU-3' (SEQ ID NO.26);
正义链: 5'-AUUGGUCAUCCAGAACUACA-3' (SEQ ID NO.27),
反义链: 5'-UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC-3' (SEQ ID NO.28);
正义链: 5'-UAUUUAUUUUGAGUCUGUG-3' (SEQ ID NO.29),
反义链: 5'-CACAGACUAAAAUAAUAGG-3' (SEQ ID NO.30);
正义链: 5'-AUUUACUGUCACGGUCCCCAA-3' (SEQ ID NO.53),
反义链: 5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAAUGC-3' (SEQ ID NO.54);

所述正义链或反义链任选地是经修饰的。

另一方面, 本申请提供一种药物组合物, 其包括本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物, 和药学上可接受的载体或赋形剂。

另一方面, 本申请提供一种治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染的试剂盒, 其包括本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物; 以及任选的使用说明书。

另一方面, 本申请提供一种治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染的方法, 其包括给予治疗和/或预防对象 (下文也称为受试者) 本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物。

在一些实施方式中，本申请提供一种治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染的方法，其包括向治疗和/或预防对象给予治疗/预防有效量的本申请所述的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物。

另一方面，本申请提供本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物在制备治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

另一方面，本申请提供本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物在治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染中的用途。

另一方面，本申请提供用于治疗/或预防乙型肝炎病毒感染的本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物。

在部分实施方式中，所述乙型肝炎病毒感染可以处于疾病的任意阶段，例如急性乙型肝炎或慢性乙型肝炎，或由乙型肝炎病毒感染引起的肝脏疾病包括肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝衰竭或肝癌。在部分实施方式中，乙型肝炎病毒感染是慢性乙型肝炎。

在部分实施方式中，本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物作为用于治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染的单一治疗剂使用。

在部分实施方式中，本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物与用于治疗/或预防乙型肝炎病毒感染的其他治疗剂共同使用。

发明详述

以下将对本申请的示例性实施方式进行了描述，但是本领域技术人员将理解的是，本申请的保护范围并不限于此，而是可基于本申请的精神和构思进行各种修饰、修改或改变，这些修饰、修改或改变后的内容仍然落在本申请的范围之内。

本申请提供一种双链核糖核酸 (dsRNA)、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，所述 dsRNA 包含正义链和反义链，所述正义链含有如 SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.13 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 21 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 23 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.16 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.17 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.18 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.19 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.20 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.21 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.22 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.23 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.24 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.25 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.26 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.27 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 21 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 23 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.53 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；

正义链：5'-AGCAUAUGACAAUUGAAUGA-3' (SEQ ID NO.9)，

反义链：5'-UCAUCAAUUGUCAUAUUGCUAC-3' (SEQ ID NO.10)；

正义链：5'-AUUUACUGUCACGGUCCCAA-3' (SEQ ID NO.11),
反义链：5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.12);
正义链：5'-CUAUUUUUUUGAGUCUGU-3' (SEQ ID NO.13),
反义链：5'-ACAGACUAAAAUAAUAGGA-3' (SEQ ID NO.14);
正义链：5'-UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU-3' (SEQ ID NO.15),
反义链：5'-AUCUACUACAAUAAUUCUCAA-3' (SEQ ID NO.16);
正义链：5'-UUGUCUCAUGUUUCAUCGUAA-3' (SEQ ID NO.17),
反义链：5'-UUACGAUGAAACAUGAGACAAAA-3' (SEQ ID NO.18);
正义链：5'-CUGUGCAGUAUCUGUCCAUU-3' (SEQ ID NO.19),
反义链：5'-AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC-3' (SEQ ID NO.20);
正义链：5'-AAUGAAAGGACUCACUUGGUA-3' (SEQ ID NO.21),
反义链：5'-UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG-3' (SEQ ID NO.22);
正义链：5'-GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUA-3' (SEQ ID NO.23),
反义链：5'-UACCAUAGCUGAUGAUCGACGG-3' (SEQ ID NO.24);
正义链：5'-GGUGCUUGGUCUCCUCUAAUAA-3' (SEQ ID NO.25),
反义链：5'-UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU-3' (SEQ ID NO.26);
正义链：5'-AUUGGUCAUCCAGAACUACA-3' (SEQ ID NO.27),
反义链：5'-UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC-3' (SEQ ID NO.28);
正义链：5'-UAUUUUUUUUGAGUCUGUG-3' (SEQ ID NO.29),
反义链：5'-CACAGACUAAAAUAAUAGG-3' (SEQ ID NO.30);
正义链：5'-AUUUACUGUCACGGUCCCAA-3' (SEQ ID NO.53),
反义链：5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.54);

所述正义链或反义链任选地是经修饰的。

在部分实施方式中，所述正义链含有如 SEQ ID NO.9、11、15、17、19、21、23、25、27 或 53 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，其中所述至少 15 个连续的核苷酸可以选自 15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 个连续的核苷酸。

在部分实施方式中，所述反义链含有如 SEQ ID NO.10、12、16、18、20、22、24、26、28 或 54 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸，其中所述至少 15 个连续的核苷酸可以选自 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个连续的核苷酸。

在部分实施方式中，所述正义链含有如 SEQ ID NO.13 或 29 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 21 个核苷酸，其中所述至少 15 个连续的核苷酸可以选自 15、16、17、18、19、20 或 21 个连续的核苷酸。

在部分实施方式中，所述反义链含有如 SEQ ID NO.14 或 30 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 23 个核苷酸，其中所述至少 15 个连续的核苷酸可以选自 15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 个连续的核苷酸。

在部分实施方式中，本申请提供一种双链核糖核酸 (dsRNA)、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，所述 dsRNA 包含正义链和反义链，所述正义链含有如 SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.13 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 21 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 23 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.16 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.17 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.18 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.19 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.20 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义

链含有如 SEQ ID NO.21 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸,所述反义链含有如 SEQ ID NO.22 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸;或者,所述正义链含有如 SEQ ID NO.23 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸,所述反义链含有如 SEQ ID NO.24 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸;或者,所述正义链含有如 SEQ ID NO.25 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸,所述反义链含有如 SEQ ID NO.26 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸;或者,所述正义链含有如 SEQ ID NO.27 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸,所述反义链含有如 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸;或者,所述正义链含有如 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 21 个核苷酸,所述反义链含有如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 23 个核苷酸;或者,所述正义链含有如 SEQ ID NO.53 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸,所述反义链含有如 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸:

正义链: 5'-AGCAAUAUGACAAUUGAAUGA-3' (SEQ ID NO.9),
反义链: 5'-UCAUCAAUUGUCAUAUUGCUAC-3' (SEQ ID NO.10);
正义链: 5'-AUUUACUGUCACGGUCCCCAA-3' (SEQ ID NO.11),
反义链: 5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.12);
正义链: 5'-CUAUUUUUUUGAGUCUGU-3' (SEQ ID NO.13),
反义链: 5'-ACAGACUAAAAUAAAUAGGA-3' (SEQ ID NO.14);
正义链: 5'-UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU-3' (SEQ ID NO.15),
反义链: 5'-AUCUACUACAAUAUAUCUUCAAA-3' (SEQ ID NO.16);
正义链: 5'-UUGUCUCAUGUUUCAUCGUAA-3' (SEQ ID NO.17),
反义链: 5'-UUACGAUGAAACAUGAGACAAAA-3' (SEQ ID NO.18);
正义链: 5'-CUGUGCAGUAUCUGUCCAUU-3' (SEQ ID NO.19),
反义链: 5'-AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC-3' (SEQ ID NO.20);
正义链: 5'-AAUGAAAGGACUCACUUGGUA-3' (SEQ ID NO.21),
反义链: 5'-UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG-3' (SEQ ID NO.22);
正义链: 5'-GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUA-3' (SEQ ID NO.23),
反义链: 5'-UACCAUAGCUGAUGAUGCAGCGG-3' (SEQ ID NO.24);
正义链: 5'-GGUGCUUGGUCUCCUCUAUAA-3' (SEQ ID NO.25),
反义链: 5'-UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU-3' (SEQ ID NO.26);
正义链: 5'-AUUGGUCAUCCAGAACUACA-3' (SEQ ID NO.27),
反义链: 5'-UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC-3' (SEQ ID NO.28);
正义链: 5'-UAUUUAUUUUGAGUCUGUG-3' (SEQ ID NO.29),
反义链: 5'-CACAGACUAAAAUAAAUAGG-3' (SEQ ID NO.30);
正义链: 5'-AUUUACUGUCACGGUCCCCAA-3' (SEQ ID NO.53),
反义链: 5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.54);

所述正义链或反义链任选地是经修饰的。

在部分实施方式中,本申请提供一种双链核糖核酸(dsRNA)、其药学上可接受的盐或其配体缀合物,所述 dsRNA 包含正义链和反义链,所述正义链是如 SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.13 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.16 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.17 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.18 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.19 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.20 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.21 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.22 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.23 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.24 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.25 所示的核苷酸序列,所述反义链是如 SEQ ID NO.26 所示的核苷酸序列;或者,所述正义链是如 SEQ ID NO.27

所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.53 所示的核苷酸序列，所述反义链含有如 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列：

正义链：5'-AGCAAUAUGACAAUUGAAUGA-3' (SEQ ID NO.9)，
反义链：5'-UCAUUCAAUUGUCAUAUUGCUAC-3' (SEQ ID NO.10)；
正义链：5'-AUUUACUGUCACGGUCCCCAA-3' (SEQ ID NO.11)，
反义链：5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.12)；
正义链：5'-CUAUUUUUUUGAGUCUGU-3' (SEQ ID NO.13)，
反义链：5'-ACAGACUAAAAUAAAUAGGA-3' (SEQ ID NO.14)；
正义链：5'-UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU-3' (SEQ ID NO.15)，
反义链：5'-AUCUACUACAAUAUAUCUUCAAA-3' (SEQ ID NO.16)；
正义链：5'-UUGUCUCAUGUUUCAUCGUA-3' (SEQ ID NO.17)，
反义链：5'-UUACGAUGAAACAUGAGACAAA-3' (SEQ ID NO.18)；
正义链：5'-CUGUGCAGUAUCUGUCCAUU-3' (SEQ ID NO.19)，
反义链：5'-AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC-3' (SEQ ID NO.20)；
正义链：5'-AAUGAAAGGACUCACUUGGUA-3' (SEQ ID NO.21)，
反义链：5'-UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG-3' (SEQ ID NO.22)；
正义链：5'-GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUA-3' (SEQ ID NO.23)，
反义链：5'-UACCAUAGCUGAUC AUGCAGCGG-3' (SEQ ID NO.24)；
正义链：5'-GGUGCUUGGUCUCCUCAUAA-3' (SEQ ID NO.25)，
反义链：5'-UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU-3' (SEQ ID NO.26)；
正义链：5'-AUUGGUCAUCCAGAACUACA-3' (SEQ ID NO.27)，
反义链：5'-UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC-3' (SEQ ID NO.28)；
正义链：5'-UAUUUAUUUUGAGUCUGUG-3' (SEQ ID NO.29)，
反义链：5'-CACAGACUAAAAUAAAUAGG-3' (SEQ ID NO.30)；
正义链：5'-AUUUACUGUCACGGUCCCCAA-3' (SEQ ID NO.53)，
反义链：5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.54)；

所述正义链或反义链任选地是经修饰的。

本申请还提供一种 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，所述 dsRNA 包含正义链和反义链，所述正义链和反义链与上述正义链和反义链的核苷酸序列的全长分别具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 的序列同一性。

在部分实施方式中，本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物是一种 RNAi 药物。

在部分实施方式中，本申请的 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物是 siRNA 或其配体缀合物。

在具体的实施方式中，所述 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物具有由正义链和反义链互补构成的双链区，以及任选的位于正义链和/或反义链的 5'和/或 3'端的突出端。在优选的实施方式中，所述 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物具有由正义链和反义链互补构成的双链区，以及位于正义链和/或反义链的 5'和/或 3'端的突出端。在优选的实施方式中，所述 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物具有由正义链和反义链互补构成的双链区，以及位于反义链的 3'端的突出端。在优选的实施方式中，所述 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物具有由正义链和反义链互补构成的双链区，以及位于正义链的 3'端的突出端。

双链区

在部分实施方式中，所述 dsRNA 的双链区具有 19-23 对核苷酸的长度，例如所述 dsRNA 的双链区具有 19、20、21、22 或 23 对核苷酸的长度。

突出端

在部分实施方式中，所述正义链或反义链任选地包括位于 5'端和/或 3'端的突出端。

在部分实施方式中,所述突出端含有1、2、3、4或5个核苷酸。在部分实施方式中,所述突出端含有1或2个核苷酸。

在部分实施方式中,所述正义链任选地包括位于5'端和/或3'端的突出端。在一些实施方式中,所述正义链任选地包括位于5'端和/或3'端的1、2、3、4或5个核苷酸的突出端。在一些实施方式中,所述正义链任选地包括位于5'端和/或3'端的1或2个核苷酸的突出端。

在部分实施方式中,所述反义链任选地包括位于5'端和/或3'端的突出端。在一些实施方式中,所述反义链任选地包括位于5'端和/或3'端的1、2、3、4或5个核苷酸的突出端。在一些实施方式中,所述反义链任选地包括位于5'端和/或3'端的1或2个核苷酸的突出端。

在部分实施方式中,所述突出端选自未修饰或经修饰的A、G、C、U或T。

在具体的实施方式中,所述突出端可为正义链或反义链5'端和/或3'端的1、2、3、4或5个核苷酸,优选1或2个核苷酸。在具体的实施方式中,所述dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物包含额外序列作为突出端,所述额外序列可包含连接至正义链或反义链5'端和/或3'端的1、2、3、4或5个核苷酸、优选1或2个核苷酸。

作为示例,在正义链或反义链5'端和/或3'端的核糖核苷酸作为突出端的情况,当正义链为21个核苷酸且反义链为23个核苷酸,当正义链第1-21位与反义链第1-21位互补,则反义链第22-23位核苷酸构成位于反义链3'端的突出端,即,正义链的3'端为平端或钝端;当正义链为21个核苷酸且反义链为21个核苷酸,当正义链第1-20位与反义链第1-20位互补,则正义链和反义链第21位核苷酸分别构成位于正义链和反义链3'端的突出端;当正义链为21个核苷酸且反义链为23个核苷酸,当正义链第1-21位与反义链第3-23位互补,则反义链第1-2位核苷酸构成位于反义链5'端的突出端,即,正义链的5'端为平端或钝端。

在部分实施方式中,在正义链或反义链5'端和/或3'端的核苷酸作为突出端的情况,所述反义链任选地包括位于5'端和/或3'端的突出端,所述突出端选自未修饰或经修饰的核糖核苷酸序列GA、CA、AC、GC、AA、UG、GG、UU或UC。在部分实施方式中,所述反义链任选地包括位于3'端的突出端,所述突出端选自未修饰或经修饰的核糖核苷酸序列GA、CA、AC、GC、AA、UG、GG、UU或UC。

在具体的实施方式中,所述dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物在反义链或正义链的5'端和/或3'端包含额外序列作为突出端,所述额外序列可包含5'端和/或3'端的1、2、3、4或5个核苷、优选1或2个核苷酸。

在部分实施方式中,所述突出端为任选位于所述反义链的5'端和/或3'端的额外序列,所述突出端选自未修饰或经修饰的GA、CA、AC、GC、AA、UG、GG、UU或UC。在部分实施方式中,所述突出端为位于所述反义链的3'端的额外序列,所述突出端选自未修饰或经修饰的GA、CA、AC、GC、AA、UG、GG、UU或UC。

在部分实施方式中,所述作为突出端的额外序列包含未修饰或经修饰的U或T。

在部分实施方式中,当所述作为突出端的额外序列为1个核苷酸时,所述突出端选自未修饰或经修饰的U或T。在部分实施方式中,当所述作为突出端的额外序列为1个核苷酸时,所述突出端选自经2'-O-甲基修饰的U(下文也称为u)或脱氧胸腺嘧啶核苷酸(下文也称为dT)。

在部分实施方式中,当所述作为突出端的额外序列为2个核苷酸时,所述突出端选自未修饰或经修饰的UU或TT。在部分实施方式中,当所述作为突出端的额外序列为2个核苷酸时,所述突出端选自uu或dTdT。

在部分实施方式中,所述突出端为任选位于所述正义链的5'端和/或3'端的额外序列,所述突出端选自uu或dTdT。

在部分实施方式中,所述突出端为任选位于所述反义链的5'端和/或3'端的额外序列,所述突出端选自uu或dTdT。

在部分实施方式中,所述突出端与其相邻的核苷酸通过磷酸酯基或硫代磷酸酯基连接。

在部分实施方式中,所述突出端中的一个或多个核苷酸之间通过磷酸酯基或硫代磷酸酯基连接。

修饰

在部分实施方式中,所述正义链或反义链任选地是经修饰的。

在部分实施方式中,所述正义链或反义链的一个或多个核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中,每个核苷酸可以被相同或不同的修饰来修饰,该修饰可以包括非连接的磷酸酯氧中的一个或两个和/或连接的磷酸酯氧中的一个或多个的一种或多种改变;核糖的组分(例如,核糖上的2'羟基)的改变;用“脱磷”连接子全部置换磷酸酯部分;修饰天然存在的碱基;以及修饰核糖-磷酸酯骨架。

在部分实施方式中，每个核苷酸修饰前，其中的碱基选自天然存在的碱基，例如 A、U、C、G 及 T，当修饰发生在核苷酸碱基上是指在 A、U、C、G 及 T 的骨架基础上进行化学修饰。

在部分实施方式中，所述正义链的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个或 23 个核苷酸是经修饰的；或者前述任意值形成的范围内的核苷酸是经修饰的，例如 1-23 个、1-22 个、1-21 个、1-20 个、1-19 个、1-18 个、1-17 个、1-16 个、1-15 个、1-14 个、1-13 个、1-12 个、1-11 个或 1-10 个核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中，所述正义链的 1 个以上、2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上、6 个以上、7 个以上、8 个以上、9 个以上、10 个以上、11 个以上、12 个以上、13 个以上、14 个以上、15 个以上、16 个以上、17 个以上、18 个以上、19 个以上、20 个以上、21 个以上、22 个以上或 23 个以上核苷酸是经修饰的；典型地，所述正义链的 10 个以上、11 个以上、12 个以上、13 个以上、14 个以上、15 个以上、16 个以上、17 个以上、18 个以上、19 个以上、20 个以上或 21 个以上核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中，所述正义链的所有核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中，所述反义链的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个、23 个、24 个或 25 个核苷酸是经修饰的；或者前述任意值形成的范围内的核苷酸是经修饰的，例如 1-25 个、1-24 个、1-23 个、1-22 个、1-21 个、1-20 个、1-19 个、1-18 个、1-17 个、1-16 个、1-15 个、1-14 个、1-13 个、1-12 个、1-11 个或 1-10 个核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中，所述反义链的 1 个以上、2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上、6 个以上、7 个以上、8 个以上、9 个以上、10 个以上、11 个以上、12 个以上、13 个以上、14 个以上、15 个以上、16 个以上、17 个以上、18 个以上、19 个以上、20 个以上、21 个以上、22 个以上、23 个以上、24 个以上或 25 个以上核苷酸是经修饰的；典型地，所述反义链的 10 个以上、11 个以上、12 个以上、13 个以上、14 个以上、15 个以上、16 个以上、17 个以上、18 个以上、19 个以上、20 个以上、21 个以上、22 个以上或 23 个以上核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中，所述反义链的所有核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中，所述正义链的所有核苷酸和所述反义链的所有核苷酸是经修饰的。

在部分实施方式中，所述修饰选自核苷酸的糖基修饰、碱基的修饰、核苷酸间的连接键修饰或末端修饰。在部分实施方式中，所述修饰选自核苷酸的糖基修饰、核苷酸间的连接键修饰或末端修饰。

在部分实施方式中，所述核苷酸的糖基修饰选自脱羟基化、氟代、氨基化、烷基化、羟基烷基化或羟基烯基化。

在部分实施方式中，所述核苷酸的糖基修饰发生在糖基的 2' 位。

在部分实施方式中，所述糖基修饰选自 2'-脱羟基化、2'-氟代、2'-氨基、2'-烷基、2'-O-烷基、2'-O-醚基、2'-O-烯基。在部分实施方式中，所述糖基修饰选自 2'-脱羟基化、2'-氟代、2'-氨基、2'-甲基、2'-乙基、2'-甲基-O-甲基、2'-乙基-O-甲基、2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-O-乙基-O-甲基或 2'-O-烯丙基。

在部分实施方式中，所述核苷酸间的连接键修饰选自硫代磷酸酯 (PS)、二硫代磷酸酯 (PS2)、甲基膦酸酯 (MP)、甲氧基丙基膦酸酯 (MOP) 或氨基膦酸酯。在部分实施方式中，所述核苷酸间的连接键修饰选自硫代磷酸酯 (PS)。在部分实施方式中，所述核苷酸间以硫代磷酸二酯键连接。

在部分实施方式中，所述末端修饰选自末端的磷酸基或羟基上的修饰。在部分实施方式中，所述末端修饰选自 5'-末端修饰或 3'-末端修饰。在部分实施方式中，所述末端修饰选自在末端的核苷酸的核糖基团上的 5'-磷酸酯、5'-甲基膦酸酯 (5'-MP)、5'-硫代磷酸酯 (5'-PS) 或 5'-(E)-乙基膦酸酯 (5'-(E)-VP)。在部分实施方式中，所述末端修饰选自在末端的核苷酸的核糖基团上的 5'-磷酸酯基或 5'-(E)-乙基膦酸酯。

在部分实施方式中，所述修饰选自 2'-脱羟基化、2'-氟代、2'-氨基、2'-甲基、2'-乙基、2'-甲基-O-甲基、2'-乙基-O-甲基、2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-O-烯丙基、硫代磷酸酯基、甲基膦酸酯基、氨基膦酸酯基、5'-磷酸酯基、3'-磷酸酯基、5'-(E)-乙基膦酸酯或 3'-(E)-乙基膦酸酯。

在部分实施方式中，所述修饰选自 2'-脱羟基化、2'-氟代、2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-O-乙基-O-甲基、2'-O-烯丙基、硫代磷酸酯基或 5'-(E)-乙基膦酸酯。

在部分实施方式中，所述修饰选自 2'-氟代、2'-O-甲基、硫代磷酸酯基或 5'-(E)-乙基膦酸酯。

如下文中将详述的，当提及正义链和反义链的第 n 位核苷酸时，除无特别指明是 3'端开始计数以外，均从 5'端开始计数。

在部分实施方式中,在所述 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物的两条核酸链的两端之一或二者的前两位核苷酸之间和/或前三位核苷酸之间采用硫代磷酸酯基修饰。例如,以正义链为例,所述正义链的第 1、2 位核苷酸之间和/或正义链的第 2、3 位核苷酸之间和/或正义链的第 1、2 位核苷酸之间和第 2、3 位核苷酸之间采用硫代磷酸酯基修饰。

在部分实施方式中,对于无额外序列作为突出端的情况,所述正义链的第 1、2 位核苷酸之间和/或正义链的第 2、3 位核苷酸之间采用硫代磷酸酯基修饰。

在部分实施方式中,对于无额外序列作为突出端的情况,所述反义链的第 1、2 位核苷酸之间、反义链的第 2、3 位核苷酸之间、反义链的 3'端的第 1、2 位核苷酸之间和/或反义链的 3'端的第 2、3 位核苷酸之间采用硫代磷酸酯基修饰。

在部分实施方式中,在具有额外序列作为突出端时,硫代磷酸酯基修饰可位于额外序列中的核苷酸之间。

在部分实施方式中,所述反义链的 5'-末端的核苷酸具有 5'-(E)-乙烯基磷酸酯修饰。

在部分实施方式中,所述正义链有 2、3、4 或 5 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。在部分实施方式中,所述正义链有 14、15、16、17、18 或 19 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。在部分实施方式中,所述正义链有 3 或 4 个核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且有 15、16、17 或 18 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 1 至 6 位或第 1 至 8 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 1 至 6 位或第 1 至 8 位核苷酸中有 4 个、5 个、6 个、7 个或 8 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 7 至 9 位或第 9 至 11 位核苷酸中有 2 个或 3 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 7 至 9 位或第 9 至 11 位核苷酸中有 0 个或 1 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 10 至 19 位或第 12 至 21 位核苷酸中有 0 个或 1 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 10 至 19 位或第 12 至 21 位核苷酸中有 8 个、9 个、10 个、11 个或 12 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 7、8 和 9 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述正义链的第 1 至 6 和/或 10 至 19 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸也采用 2'-氟代修饰。在部分实施方式中,所述正义链的第 7、8 和 9 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述正义链的第 1 至 6 和 10 至 19 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸也采用 2'-氟代修饰。在一些实施方式中,所述正义链的第 7、8 和 9 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述正义链的第 1 至 6 和 10 至 19 位核苷酸中有 0 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述正义链的第 9、10 和 11 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述正义链的第 1 至 8 和/或 12 至 21 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸也采用 2'-氟代修饰。在部分实施方式中,所述正义链的第 9、10 和 11 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述正义链的第 1 至 8 和 12 至 21 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸也采用 2'-氟代修饰。在一些实施方式中,所述正义链的第 9、10 和 11 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述正义链的第 1 至 8 和 12 至 21 位核苷酸中有 0 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述反义链有 2、3、4、5、6 或 7 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述反义链有 14、15、16、17、18、19、20 或 21 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。

在部分实施方式中,所述反义链的第 2、6、14、16 位核苷酸中有 3 个或 4 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。在一些实施方式中,所述反义链的第 2、6、14、16 位核苷酸中有 4 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述反义链的第 2、6、8、9、14、16 位核苷酸中有 3 个、4 个、5 个或 6 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。在一些实施方式中,所述反义链的第 2、6、14、16 位核苷酸中有 3 个或 4 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。在一些实施方式中,所述反义链的第 2、6、8、9、14、16 位核苷酸中有 4 个或 6 个核苷酸采用 2'-氟代修饰。

在一些实施方案中,所述反义链的第 2、6、14 和 16 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述反义链的第 1、3 至 5、7 至 13、15、17 至 21 和/或 17 至 23 位核苷酸中任意一个或两个也采用 2'-氟代修饰。在一些实施方案中,所述反义链的第 2、6、14 和 16 位核苷酸采用 2'-氟代修饰,并且所述反义链的第 1、3 至 5、7 至 13、15、17 至 21 和/或 17 至 23 位核苷酸中任意一个或两个也采用 2'-氟代修饰。在一些实施方案

中,所述反义链的第2、6、14和16位核苷酸采用2'-氟代修饰,并且所述反义链的第1、3至5、7至13、15、17至21和/或17至23位核苷酸中0个核苷酸采用2'-氟代修饰。

在部分实施方式中,所述反义链的第1、3至5、7至13、15、17至21和/或17至23位核苷酸中有14、15、16、17、18或19个核苷酸采用2'-O-甲基修饰。

在一些实施方案中,所述反义链的第2、6、14和16位核苷酸采用2'-氟代修饰,并且所述反义链的第1、3至5、7至13、15、17至21和/或17至23位核苷酸中0个核苷酸采用2'-氟代修饰,所述反义链的第1、3至5、7至13、15、17至21和/或17至23位核苷酸中有14、15、16、17、18或19个核苷酸采用2'-O-甲基修饰。

在一些实施方案中,所述正义链有2、3、4或5个核苷酸采用2'-氟代修饰,所述正义链有14、15、16、17、18或19个核苷酸采用2'-O-甲基修饰;和/或;

所述反义链有2、3、4、5、6或7个核苷酸采用2'-氟代修饰,所述反义链有14、15、16、17、18、19、20或21个核苷酸采用2'-O-甲基修饰。

在一个具体的实施方式中,所述正义链的第7、8和9位或第9、10和11位核苷酸采用2'-氟代修饰,所述正义链的其他核苷酸采用2'-O-甲基修饰,并且所述反义链的第2、6、14和16位核苷酸采用2'-氟代修饰,所述反义链的其他核苷酸采用2'-O-甲基修饰。

在一个具体的实施方式中,所述正义链的第7、8和9位或第9、10和11位核苷酸采用2'-氟代修饰,所述正义链的其他核苷酸采用2'-O-甲基修饰,并且所述反义链的第2、6、14和16位核苷酸采用2'-氟代修饰,所述反义链的其他核苷酸采用2'-O-甲基修饰,并且正义链的第1、2位核苷酸之间、正义链的第2、3位核苷酸之间、反义链的第1、2位核苷酸之间、反义链的第2、3位核苷酸之间、反义链3'端的第1、2位核苷酸之间和/或反义链的第3、4位核苷酸之间采用硫代磷酸酯基修饰。任选地,所述反义链的5'-末端的核苷酸具有5'-(E)-乙烯基磷酸酯修饰。

配体

在部分实施方式中,所述配体包括分支基团和连接基团。在部分实施方式中,所述分支基团可包含靶向基团。

在部分实施方式中,所述配体通过连接基团与 dsRNA 连接。本文中,将连接有配体的 dsRNA 称为 dsRNA 配体缀合物。

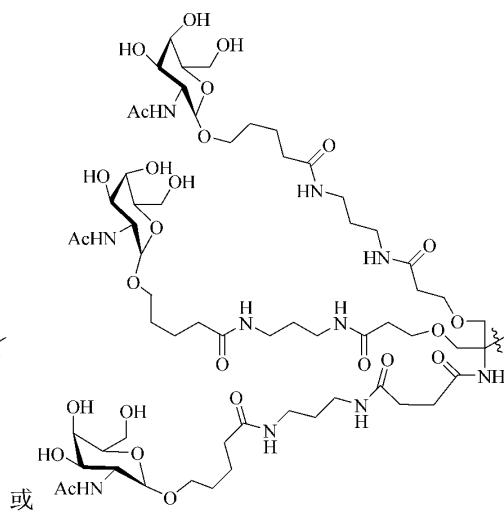
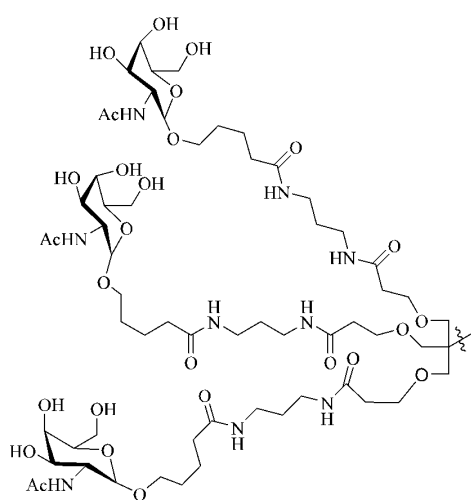
在部分实施方式中,所述配体通过分支基团连接一个或多个靶向基团。在部分实施方式中,所述分支基团包含靶向基团。

在部分实施方式中,所述配体含有至少一个靶向基团。在部分实施方式中,所述配体含有一个、二个、三个、四个或五个靶向基团。在部分实施方式中,所述配体含有二个、三个或四个靶向基团。在部分实施方式中,所述配体含有三个靶向基团。

在部分实施方式中,所述靶向基团选自 GalNAc 基团。

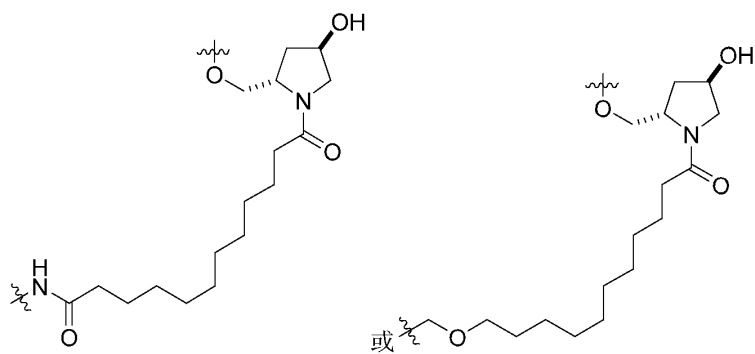
在部分实施方式中,所述配体含有一个、二个、三个、四个或五个 GalNAc 基团。在部分实施方式中,所述配体含有二个、三个或四个 GalNAc 基团。在部分实施方式中,所述配体含有三个 GalNAc 基团。

在部分实施方式中,所述分支基团选自:



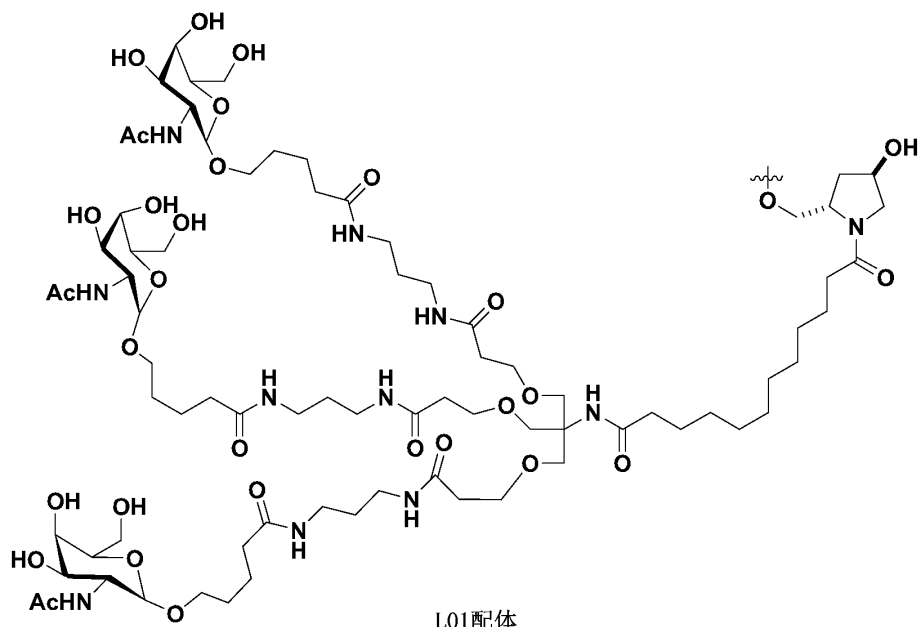
或

在部分实施方式中，所述连接基团选自：



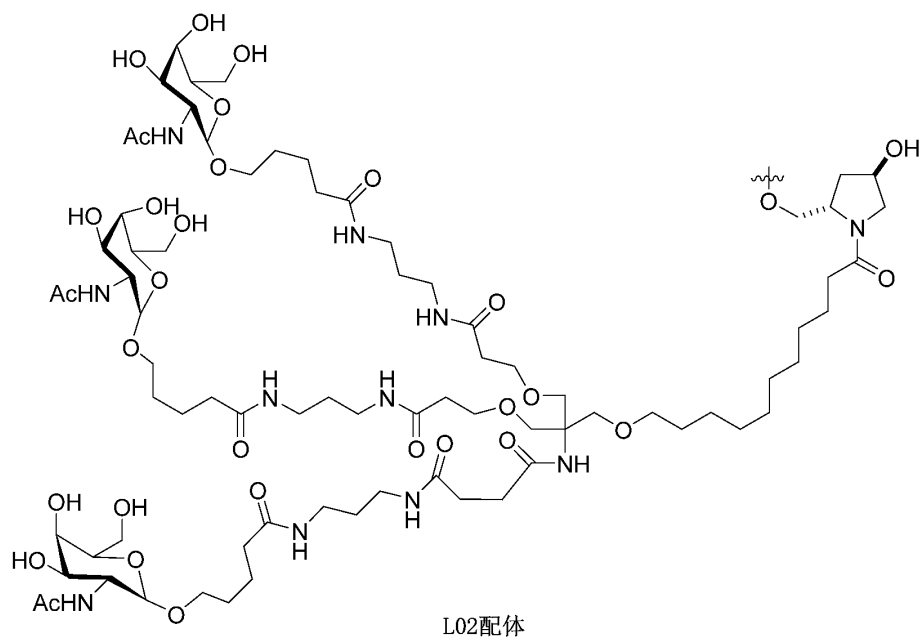
或

在部分实施方式中，所述配体选自：



L01配体

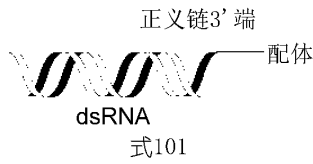
或



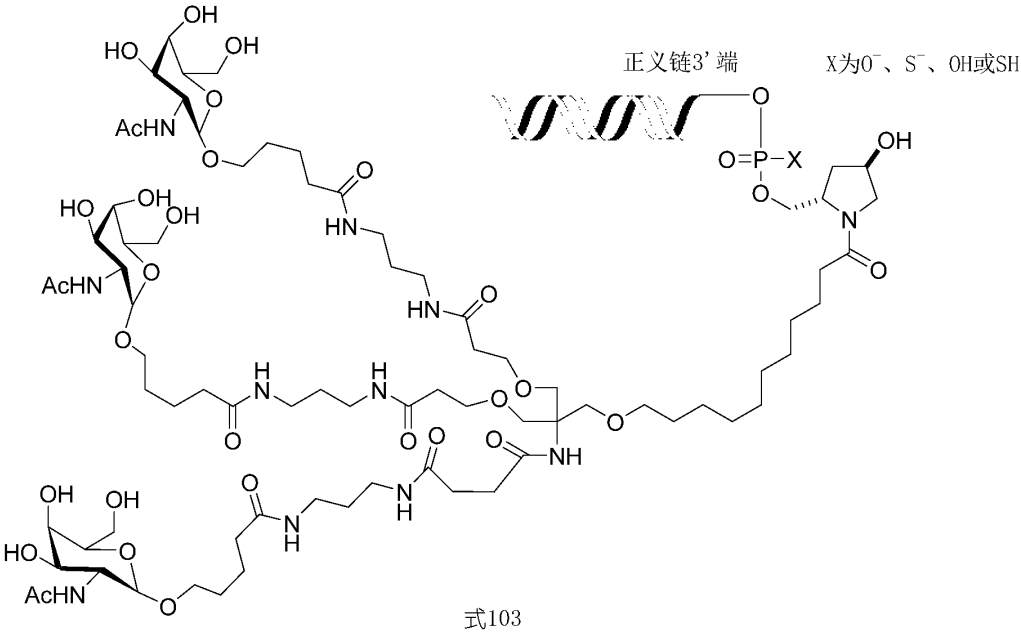
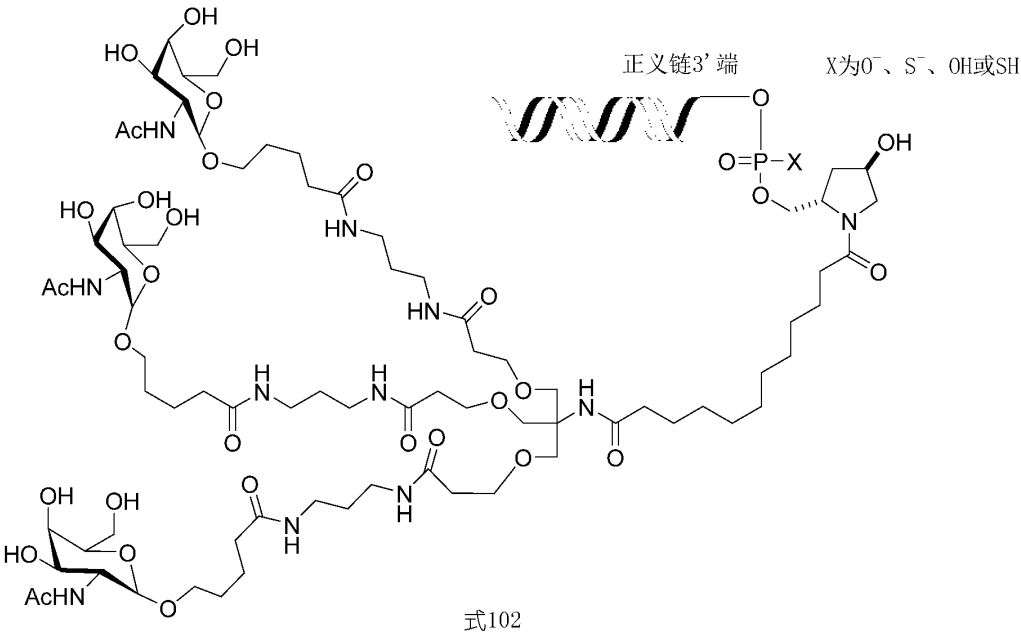
在部分实施方式中，所述配体与正义链或反义链连接。在部分实施方式中，所述配体与正义链或反义链的 5'或 3'末端连接。在部分实施方式中，所述配体与正义链的 3'末端连接。

在部分实施方式中，所述配体通过磷酸酯基或硫代磷酸酯基与 dsRNA 的正义链或反义链连接。在部分实施方式中，所述配体通过磷酸酯基或硫代磷酸酯基与正义链连接。在部分实施方式中，所述配体通过磷酸酯基或硫代磷酸酯基与正义链的 3'末端连接。

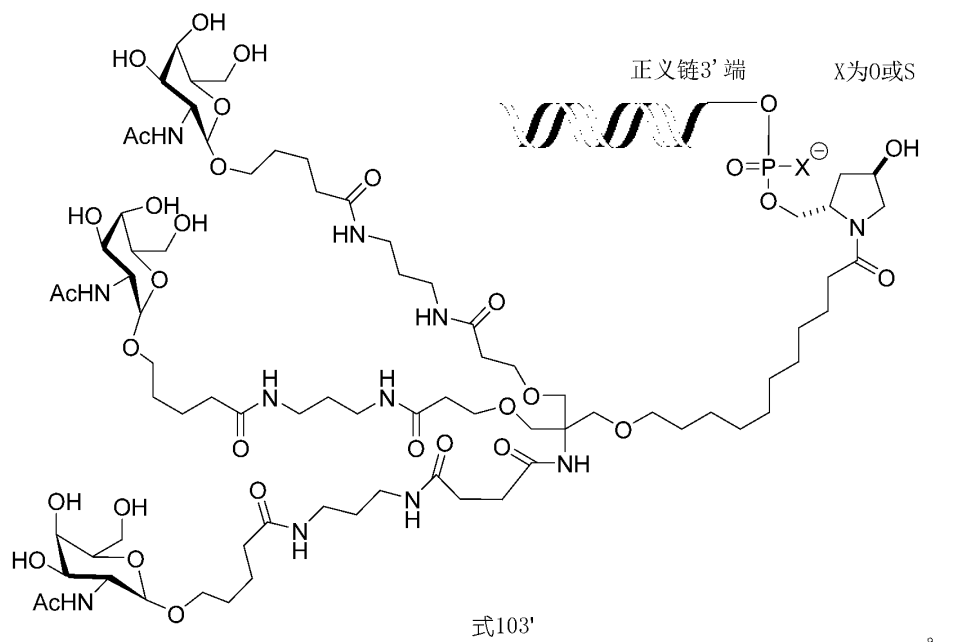
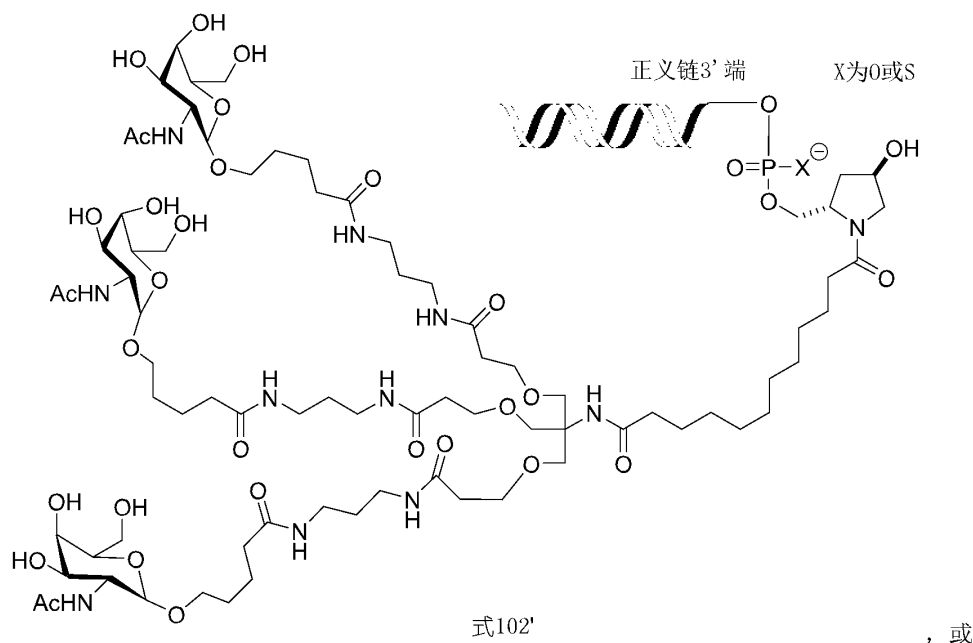
在部分实施方式中，所述 dsRNA 配体缀合物如下所示：



在部分实施方式中，所述 dsRNA 配体缀合物选自：



在部分实施方式中，所述 dsRNA 配体缀合物选自：



在部分实施方式中，所述 dsRNA 的未修饰的正义链选自：

表 1. 未修饰的正义链

SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向
9	AGCAAUAUGACAAUUGAAUGA
11	AUUUACUGUCACGGUUCCTAA
13	CUAUUUUUUUUGAGUCUGU
15	UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU
17	UUGUCUCAUGUUUCAUCGUAA
19	CUGUGCAGUAUCUGUUCCTAU
21	AAUGAAAGGACUCACUUGGUA
23	GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUA

25	GGUGCUUGGUCUCCUCUAUAA
27	AUUGGUCAUCCCAGAACUACA
29	UAUUUAUUUUGAGUCUGUG
53	AUUUACUGUCACGGUCCCAA

在部分实施方式中，所述 dsRNA 的未修饰的反义链选自：

表 2. 未修饰的反义链

SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向
10	UCAUUCAAUUGUCAUAAUUGCUAC
12	UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC
14	ACAGACUCAAAAUAAUAGGA
16	AUCUACUACAAUAUAUCUUCAAA
18	UUACGAUGAAACAUGAGACAAAA
20	AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC
22	UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG
24	UACCAUAGCUGAUCAUGCAGCGG
26	UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU
28	UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC
30	CACAGACUCAAAAUAAUAGG
54	UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC

在部分实施方式中，所述 dsRNA 的经修饰的正义链选自：

表 3. 经修饰的正义链

SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向
31	asgscaauauGfAfCfaauugaauga
33	asusuacugUfCfAfcgguucccaa
35	csusauuuAfUfUfuugagucugu
37	usgsaagauaUfAfUfuguaguagau
39	ususgucucaUfGfUfucaucguaa
41	csusgugcagUfAfUfcuguuccauu
43	asasugaaagGfAfCfucacuuggua
45	gscsugcaugAfUfCfagcuauggua
47	gsgsugcuugGfUfCfuccucuauaa
49	asusuggucaUfCfCfcagaacuaca
51	usasuuuaUfUfUfuagagucugug
55	asusuacugUfCfAfcgguucccaa

在部分实施方式中，所述 dsRNA 的经修饰的反义链选自：

表 4. 经修饰的反义链

SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向
32	usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc
34	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaauasgsc
36	asCfsagaCfucaaaauAfaAfuagsgsa
38	asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa
40	usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa

42	asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc
44	usAfsccaAfgugagucCfuUfucauusug
46	usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg
48	usUfsauaGfaggagacCfaAfgcaccsusu
50	usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc
52	csAfsdagAfcuacaaaUfaAfauasgsg
56	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaaausgsc

本申请的 dsRNA 可以通过包含上述正义链中的任一者以及上述反义链中的任一者而形成。

例如，所述 dsRNA 包含如下正义链中的任一者：SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51 或 SEQ ID NO: 55；并且

所述 dsRNA 包含如下反义链中的任一者：SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52 或 SEQ ID NO: 56。

在部分实施方式中，所述 dsRNA（或 siRNA，未经修饰）选自：

表 5. siRNA（未经修饰）

dsRNA 序号	正义链 SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向	反义链 SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向
AD01	9	AGCAAUAUGACAAUUG AAUGA	10	UCAUUCAAUUGUCAUAUUGCUAC
AD02	11	AUUUACUGUCACGGUU CCCAA	12	UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC
AD03	13	CUAUUUUUUUGAGUC UGU	14	ACAGACUCAAAAUAAUAGGA
AD04	15	UGAAGAUAAUUGUAG UAGAU	16	AUCUACUACAAUAUAUCUUCAAA
AD05	17	UUGUCUCAUGUUUCAU CGUAA	18	UUACGAUGAAACAUGAGACAAAA
AD06	19	CUGUGCAGUAUCUGUU CCAUU	20	AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC
AD07	21	AAUGAAAGGACUCACU UGGUA	22	UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG
AD08	23	GCUGCAUGAUCAGCUA UGGUA	24	UACCAUAGCUGAUCAUGCAGCGG
AD09	25	GGUGCUUGGUCUCCUC UAUAA	26	UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU
AD10	27	AUUGGUCAUCCAGAA CUACA	28	UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC
AD11	29	UAUUUAUUUUGAGUCU GUG	30	CACAGACUCAAAAUAAUAGG
AD12	53	AUUUACUGUCACGGUU CCCAA	54	UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC

在部分实施方式中，所述 dsRNA（经修饰）选自：

表 6. dsRNA（经修饰）

dsRNA 序号	正义链 SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向	反义链 SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向
M01	31	asgscaauauGfAfCfaauugaauga	32	usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc
M02	33	asusuuacugUfCfAfcgguucccaa	34	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaauasgsc
M03	35	csusauuuAfUfUfuugagucugu	36	asCfsagaCfucaaaauAfaAfuagsgsa
M04	37	usgsaagauaUfAfUfuguaguagau	38	asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa
M05	39	ususgucucaUfGfUfuucaucguaa	40	usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa
M06	41	csusgugcagUfAfUfcuguuccauu	42	asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc
M07	43	asasugaaagGfAfCfucacuuggua	44	usAfsccaAfgugagucCfuUfucuuusug
M08	45	gscsugcaugAfUfCfagcuauaggua	46	usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg
M09	47	gsgsugcuugGfUfCfuccucuaauaa	48	usUfsauaGfaggagacCfaAfgcaccsusu
M10	49	asusuggucaUfCfCfcagaacuaca	50	usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc
M11	51	usasuuuaUfUfUfugagucugug	52	csAfsccagAfcuacaaaUfaAfauasgsg
M12	55	asusuuacugUfCfAfcgguucccaa	56	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaauasgsc

在部分实施方式中，所述 siRNA（或 dsRNA）配体缀合物选自：

表 7. dsRNA 配体缀合物

dsRNA 序号	正义链 SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向	反义链 SEQ ID NO	序列 5'向 3'方向
AD01L	9	AGCAAUAUGACAAUUGAAUGAL	10	UCAUUCAAUUGUCAUAAUUGCUAC
AD02L	11	AUUUACUGUCACGGUUCCCAAL	12	UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC
AD03L	13	CUAUUUAAUUUUGAGUCUGUL	14	ACAGACUCAAAAUAUUUAGGA
AD04L	15	UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU	16	AUCUACUACAAUAUAUCUUCAAA
AD05L	17	UUGUCUCAUGUUUCAUCGUAAL	18	UUACGAUGAAACAUGAGACAAAA
AD06L	19	CUGUGCAGUAUCUGUCCAUUL	20	AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC
AD07L	21	AAUGAAAGGACUCACUUGGUAL	22	UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG
AD08L	23	GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUAL	24	UACCAUAGCUGAUCUAGCAGCGG
AD09L	25	GGUGCUUGGUCUCCUCUAUAAL	26	UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU
AD10L	27	AUUGGUCAUCCAGAACUACAL	28	UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC
AD11L	29	UAUUUAUUUUGAGUCUGUGL	30	CACAGACUCAAAAUAUUUAGG
AD12L	53	AUUUACUGUCACGGUUCCCAAL	54	UUGGGAACCGUGACAGUAAUUGC
M01L	31	asgscaauauGfAfCfaauugaauaL	32	usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc
M02L	33	asusuuacugUfCfAfcgguucccaaL	34	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaauasgsc
M03L	35	csusauuuAfUfUfuugagucuguL	36	asCfsagaCfucaaaauAfaAfuagsgsa
M04L	37	usgsaagauaUfAfUfuguaguagauL	38	asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa
M05L	39	ususgucucaUfGfUfuucaucguaaL	40	usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa
M06L	41	csusgugcagUfAfUfcuguuccauuL	42	asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc
M07L	43	asasugaaagGfAfCfucacuugguaL	44	usAfsccaAfgugagucCfuUfucuuusug
M08L	45	gscsugcaugAfUfCfagcuauagguaL	46	usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg
M09L	47	gsgsugcuugGfUfCfuccucuaauaL	48	usUfsauaGfaggagacCfaAfgcaccsusu
M10L	49	asusuggucaUfCfCfcagaacuacaL	50	usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc
M11L	51	usasuuuaUfUfUfugagucugugL	52	csAfsccagAfcuacaaaUfaAfauasgsg

M12L	55	asusuuacugUfCfAfcgguuccaaL	56	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaaausgsc
------	----	----------------------------	----	---------------------------------

其中，所述 L 代表配体，所述配体如前所述。在部分实施方式中，所述配体选自 L01 配体或 L02 配体。其中，正义链的序列 ID 编号是指正义链中核酸序列的序列 ID 编号。dsRNA 配体缀合物序号的正义链序列 3'端处的 L 表示在该 dsRNA 配体缀合物中，在正义链序列 3'端处连接有配体。

药理学上可接受的盐

在部分实施方式中，如上所述的盐选自碱加成盐、酸加成盐及其组合。

在部分实施方式中，碱加成盐选自钠、钾、钙、铵、有机胺、镁盐及其组合，酸加成盐选自无机酸盐、有机酸盐及其组合。

在部分实施方式中，无机酸选自盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、碳酸氢根、磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸及其组合，有机酸选自乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸及其组合。

在部分实施方式中，所述药理学上可接受的盐选自钠盐。

有益效果

本申请的双链核糖核酸、其药理学上可接受的盐或其配体缀合物具有良好的 PD-L1 抑制活性，体外沉默活性，体内（人源 PD-L1 模型小鼠或 AAV-hPD-L1 小鼠）抑制或降低 PD-L1 mRNA 表达。本申请的双链核糖核酸、其药理学上可接受的盐或其配体缀合物具有良好的稳定性，在体内可长期持续发挥作用。本申请的双链核糖核酸、其药理学上可接受的盐或其配体缀合物脱靶效应低，毒副作用小，安全性高。因此，其具有良好的成药前景。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照本领域普通技术人员所理解的含义去理解。当本文中出現商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

本申请中，除非另有说明，否则术语“包含、包括和含有”或等同物为开放式表述，意味着除所列出的要素、组分或步骤外，还可涵盖其他未指明的要素、组分或步骤。

当任何变量在化合物、核苷酸、单链或双链结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。例如，本申请所述的修饰是独立的发生，即除非另有所指，正义链的修饰不会影响反义链的修饰，某一核苷酸的修饰不会影响另一核苷酸的修饰，某一核苷酸的糖基上的修饰不会影响同一核苷酸的糖基的另一处的修饰。所述影响包括是否经修饰，也包括采用何种修饰类型。

本申请的 PD-L1 基因序列可以通过已公开的数据库取得，例如 Genbank 等，例如人 CD274 参考序列（NM_014143.4）。

如本领域所知，术语“干扰 RNA”或“RNAi”或“干扰 RNA 序列”指这样的单链 RNA（例如，成熟的 miRNA）或双链 RNA（例如，双链体 RNA 诸如 siRNA、aiRNA 或前-miRNA），当干扰 RNA 与靶基因或序列处于相同细胞中时，其能够降低或抑制该靶基因或序列的表达（例如，通过介导与干扰 RNA 序列互补的 mRNA 的降解或抑制与干扰 RNA 序列互补的 mRNA 的翻译或转录）。干扰 RNA 可以与靶基因或序列具有基本或完全的同源性，或可以包括错配区（即，错配序列）。

本申请的双链核糖核酸作为干扰 RNA 发挥作用。下文中，有时也将本申请的双链核糖核酸称为 siRNA。

如本领域所知，术语“错配区”或“错配序列”指干扰 RNA（例如，siRNA、aiRNA、miRNA）序列的一部分，该部分与其靶序列不具有 100%的互补性。干扰 RNA（例如，siRNA、aiRNA、miRNA）可以具有至少 1、2、3、4、5、6 或更多个错配区。错配区可以是连续的或可以被 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多个核苷酸分开。错配区可以包括单个核苷酸或可以包括 2、3、4、5、6 或更多个核苷酸。

术语“同源性”是指两个核苷酸序列之间或两个氨基酸序列之间的相似性。序列的同源性优选地涉及序列中的、在具有相同长度的两个或更多个序列中具有相同的位置的核苷酸或氨基酸的百分比。具体地，两个氨基酸序列或两个核苷酸序列的“%同源性”可以通过如下确定：以最优比较为目的比对序列（例如，可以在任一序列中引入空位以与另一序列最优比对）和比较相应位置的氨基酸或核苷酸。空位通常被视为不相同的位置，而无论其在比对中的实际位置。“最优比对”一般是导致最高同源性百分比的两个序列的比对。同源性百分比通过所比较的序列中相同核苷酸的数量来确定（即，%同源性＝相同位置数/总位置数×100）。本申请的序列同源性至少为 80%、85%、90%或 95%，优选为至少 90%，非限制性实例包括：80%、

81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%。可以利用本领域技术人员已知的数学算法完成两个序列之间同一性百分比的确定。

如本领域所知，干扰 RNA 包括“小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)”，其长度例如为约 15-60 个、15-50 个、15-40 个、15-30 个、15-25 个、19-25 个、19-23 个或 19-21 个核苷酸。本申请的双链核糖核酸可作为此类 siRNA 发挥作用，并可具有相应的长度。

如本申请所用，所述正义链或反义链的核苷酸的位次均从 5' 端开始计数。对于正义链为 21 个核苷酸，反义链为 23 个核苷酸的 dsRNA，例如，5'-AGCAAUAUGACAAUUGAAUGA-3' (SEQ ID NO: 9) 的第 1 位是 A，第 21 位是 A；5'-UCAUUCAAUUGUCAUUAUUGCUAC-3' (SEQ ID NO: 10) 的第 1 位是 U，第 23 位是 C。对于正义链为 21 个以上核苷酸，反义链为 23 个以上核苷酸的 dsRNA，例如，正义链在 SEQ ID NO: 9 基础上于末端增加若干个核苷酸，反义链在 SEQ ID NO: 10 基础上于末端增加若干个核苷酸，其正义链或反义链的核苷酸位次的计数方法不会因此而改变，即正义链的第 1 位仍是 SEQ ID NO: 9 的第 1 位，反义链的第 1 位仍是 SEQ ID NO: 10 的第 1 位。

如本领域所知，并且除非另外说明，使用术语“互补”描述第一核酸序列和第二核酸序列的关系时，是指在特定条件下含有第一核酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与含有第二核酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链结构的能力。如本申请所述，“互补”序列也可以包括由非 Watson-Crick 碱基配对和/或非天然或修饰的核苷酸形成的碱基配对形成的双链结构，或可以为完全由非 Watson-Crick 碱基配对和/或非天然或修饰的核苷酸形成的碱基配对形成的双链结构，只要满足相对于它们杂交的能力的上述要求。

如本领域所知，“完全互补”的序列包括含有第一核酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与含有第二核酸序列的寡核苷酸或多核苷酸的在第一核酸序列和第二核酸序列的全长上的碱基配对。

如本领域所知，“基本互补”表示两条核酸序列之间完全互补或至少 85% (例如 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%) 的重叠核苷酸是互补的。

本申请的术语“互补”、“完全互补”和“基本互补”可以根据 dsRNA 的正义链和反义链之间，或 dsRNA 的反义链和目标序列之间的碱基配对使用，如从它们使用的内容中可以理解。

在本技术领域中，“G”、“C”、“A”、“T”和“U”通常分别代表鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶的碱基，但本领域中也通常知晓，“G”、“C”、“A”、“T”和“U”每个通常也代表分别含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶作为碱基的核苷酸，这在表示脱氧核糖核酸序列和/或核糖核酸序列中是常见的方式，因此在本公开的上下文中，“G”、“C”、“A”、“T”、“U”表示的含义包括上述各种可能的情形。然而，应理解术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可以指一种经修饰的核苷酸(如本文其他部分进一步详述)或具有一种替代性的置换部分，本领域人员可以意识到，鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤以及尿嘧啶可以被其他部分置换而基本上不改变一种寡核苷酸(包括一种具有这种置换部分的核苷酸)的碱基配对特性。例如非限制性地，包括肌苷作为其碱基的核苷酸可以与包括腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸进行碱基配对。因此，含有尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本申请表征的 dsRNA 的核苷酸序列中由含有例如肌苷的核苷酸替换。在另一个实例中，寡核苷酸中任何地方的腺嘌呤和胞嘧啶可以分别地替换为鸟嘌呤和尿嘧啶，以形成与靶 mRNA 的 G-U 摇摆碱基配对。含有这类替换部分的序列适用于本公开表征的组合物和方法。

如本领域所知，所述“双链核糖核酸”、“双链 RNA”或“dsRNA”可相互替换使用。术语“dsRNA”包含两条反向平行且互补的核酸链，相对于靶标 RNA (例如 PD-L1 基因) 具有“正义”或“反义”的取向。在本申请的实施例中，dsRNA 可通过 RNA 干扰 (RNAi) 机制降解靶标 RNA (例如 mRNA)。

本申请的双链核糖核酸含有正义链和反义链。术语“正义链”或“有义链”是指 dsRNA 双链中，与反义链的一个区域基本互补的单链。术语“反义链”是指 dsRNA 双链中，与目标序列的一个区域基本互补的单链。若当正义链未与反义链完全互补时，可能在分子内部或末端区发生错配。通常，最能忍受的错配是在末端区内。若当反义链未与目标序列完全互补时，可能在分子内部或末端区发生错配。通常，最能忍受的错配是在末端区内。

如本领域所知，dsRNA 的双链可以具有相同或不同的核苷酸的数量。通过互补形成的双链区的长度可为容许降解靶标 RNA 的任何长度，且可能的长度在约 9 至 36 对核苷酸的范围内，例如 15 至 30 对、16 至 28 对、19 至 21 对等等。

如本领域所知，在双链区以外，dsRNA 可以包括一个或多个核苷酸突出端，所述突出端是指至少一个未配对的核苷酸/核苷类似物。例如，当 dsRNA 的一条链的 3' 端超出另一链 5' 端 (或反之亦然)，即存在突出端。在所述“突出端”的核苷酸可以包括 0-5 个核苷酸，其中“0”表示没有“突出端”，而“5”表示在 dsRNA 双链的单链上有 5 个额外的 (即未与另一单链形成配对的) 核苷酸。这些任选的“突出端”可以位于 dsRNA 两条链中的任意单链的 5' 和/或 3' 末端。在部分实施方式中，“突出端”包括 0-5 个核苷酸。在部分实施方式

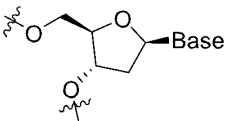
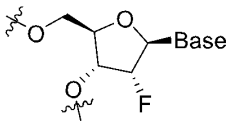
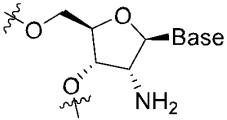
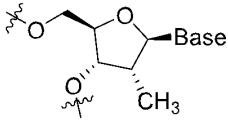
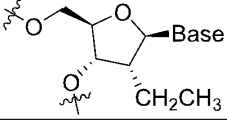
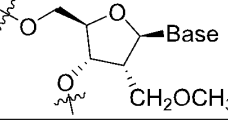
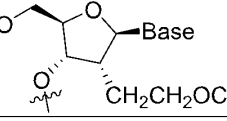
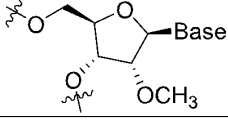
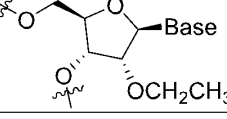
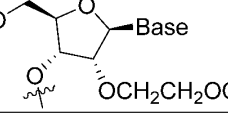
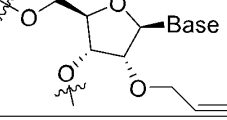
式中，“突出端”包括 0-2 个核苷酸。在部分实施方式中，dsRNA 的正义链 3’和/或 5’端的“突出端”具有 0-2 个核苷酸。在部分实施方式中，dsRNA 的反义链 3’和/或 5’端的“突出端”具有 0-2 个核苷酸。形成“突出端”的核苷酸可以是 A、G、C、U 或 T 或其修饰结构。形成“突出端”的核苷酸可以是 U、T 或 dT 或其修饰结构。在部分实施方式中，“突出端”包括但不限于“TT”、“dTdT”、“UU”或其相应的经修饰结构，例如经 2’甲氧基修饰的 UU，即 uu。在部分实施方式中，dsRNA 的反义链 3’和/或 5’端的“突出端”与靶标 RNA 基本互补。在部分实施方式中，dsRNA 的反义链 3’和/或 5’端的“突出端”与靶标 RNA 完全互补。在部分实施方式中，dsRNA 的反义链 3’端的“突出端”与靶标 RNA 完全互补。在部分实施方式中，dsRNA 的反义链 3’端的“突出端”选自未修饰或经修饰的 GA。术语“平端”或“钝端”是指在 dsRNA 的末端没有未配对的核苷酸，即没有核苷酸突出端。两端都是“平端”或“钝端”的 dsRNA 是全长都是双链区的 dsRNA，即在分子的任意一端都没有核苷酸突出端。

本申请中，术语“硫代磷酸酯键连接”或“硫代磷酸酯基”可以互换使用。

本申请中，所述 dsRNA 或其中任一单链任选地是被修饰的，无论是未修饰或经修饰的核糖核酸都在本申请的保护范围内。所述修饰不会导致所述 dsRNA 抑制 PD-L1 基因表达的功能明显削弱或丧失。所述 dsRNA 或其中任一单链的修饰可位于 5’端和/或 3’末端、核苷酸或核苷酸间的连接键。可采用本领域中公知的方法进行合成或修饰。

本申请中，所述正义链或反义链任选地是经修饰是指正义链或反义链的任一核苷酸任选地是经修饰。

本申请中，所述核苷酸的修饰包括但不限于发生在核苷酸的糖基上，包括一个或多个经取代或脱除的糖基部分基团，如脱除羰基上的羟基，或发生氟代、氨基化、烷基化、羟基烷基化或羟基烯基化。糖基上的修饰可发生在糖环上的各个位置。示例性地，所述核苷酸的糖基上的修饰包括但不限于 2’-脱羟基化、2’-氟代、2’-氨基、2’-甲基、2’-乙基、2’-甲基-O-甲基、2’-乙基-O-甲基、2’-O-甲基、2’-O-乙基、2’-O-乙基-O-甲基或 2’-O-烯丙基，修饰以及经修饰的核苷结构可如下所示：

修饰	核苷结构	修饰	核苷结构
2’-脱羟基化		2’-氟代	
2’-氨基		2’-甲基	
2’-乙基		2’-甲基-O-甲基	
2’-乙基-O-甲基		2’-O-甲基	
2’-O-乙基		2’-O-乙基-O-甲基	
2’-O-烯丙基			

其中 Base 表示碱基。

本申请中，所述核苷酸间的连接键的修饰包括对磷酸酯基的原子或官能团的取代或替换，例如硫代磷酸酯（PS）、二硫代磷酸酯（PS2）、甲基膦酸酯（MP）、甲氧基丙基膦酸酯（MOP）或氨基膦酸酯。

本申请中，大写字母 G、C、A、U 或 T 分别各自通常代表含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、尿嘧啶、

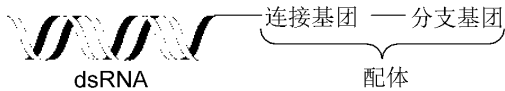
胸腺嘧啶作为碱基的核苷酸，其中，字母组合 dT 表示碱基为胸腺嘧啶的脱氧核糖核苷酸。小写字母 g、c、a、u 分别代表其相应大写字母所代表的核苷酸的核糖基团被 2'-甲氧基修饰，即 g、c、a、u 分别代表 2'-O-甲基 G、2'-O-甲基 C、2'-O-甲基 A、2'-O-甲基 U。大写字母加上其右侧的小写字母 f 代表其相应的大写字母所代表的核苷酸的核糖基团被 2'-氟修饰，即 Gf、Cf、Af、Uf 分别代表 2'-氟 G、2'-氟 C、2'-氟 A、2'-氟 U。小写字母 s 表示与 s 左右相邻的两个核苷酸残基之间为硫代磷酸酯基连接，例如“csu”表示 c 和 u 残基之间通过硫代磷酸酯基连接。VP-表示该连字符右侧的一个核苷酸为(E)-乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸，例如“VP-u”表示(E)-乙烯基磷酸酯修饰的 2'-O-甲基 U。

本申请中，所述 5'端和/或 3'端修饰指发生在 dsRNA 或其中任一单链 5'端和/或 3'端的修饰，例如磷酸化、接合或反向键联等。以 5'端为例，包括但不限于 5'-磷酸酯、5'-甲基磷酸酯（5'-MP）、5'-硫代磷酸酯（5'-PS）或 5'-(E)-乙烯基磷酸酯（5'-(E)-VP），修饰以及经修饰的核苷酸的结构可如下所示：

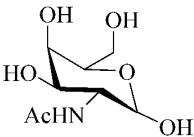
修饰	核苷酸结构	修饰	核苷酸结构
5'-磷酸酯		5'-甲基磷酸酯	
5'-硫代磷酸酯		5'-(E)-乙烯基磷酸酯	

其中 Base 表示碱基，X 选自羟基或糖基上的 2'修饰。

本申请中，所述配体是一种与 dsRNA 连接的基团，该配体包括分支基团（branched group）和连接基团（linker），并且所述 dsRNA、连接基团和分支基团依次连接（例如式 104 所示）。所述分支基团含有药学上可接受的至少一个（例如一个、二个、三个、四个或五个）靶向基团（targeting group），其将 dsRNA 靶向特定组织或增强细胞吸收作用。所述靶向基团例如但不限于 GalNAc（N-乙酰半乳糖胺，N-Acetylgalactosamine，例如式 105 所示）基团。多个所述靶向基团之间通过分支基团以串联或并联的方式连接。其中，GalNAc 基团可以是一价、二价、三价、四价。这里所述的一价、二价、三价、四价分别指 dsRNA 分子与含有作为靶向基团的 GalNAc 的配体形成 dsRNA 配体缀合物后，该 dsRNA 配体缀合物中 dsRNA 分子与 GalNAc 分子的摩尔比为 1:1、1:2、1:3 和 1:4。在部分实施方式中，当本申请的 dsRNA 与含有 GalNAc 的配体缀合时，GalNAc 分子是三价或四价。在部分实施方式中，当本申请的 dsRNA 与含有 GalNAc 的配体缀合时，GalNAc 分子是三价。



式104



式 105

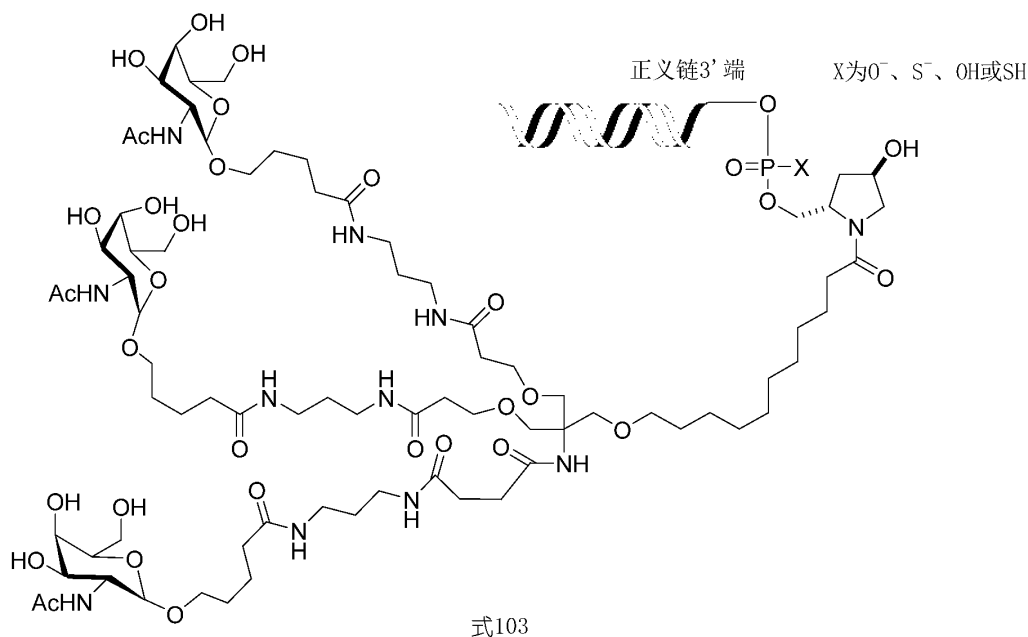
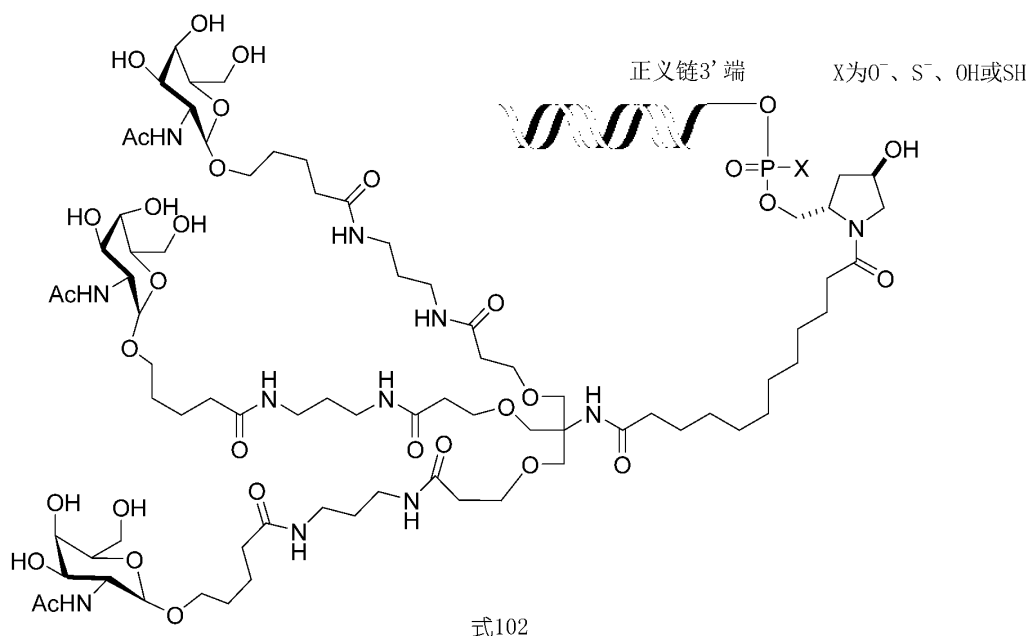
本申请中，所述配体可以连接在核苷酸的磷酸酯基、2'-位羟基、3'-位羟基或者碱基上。所述配体可以连接在 dsRNA 的任一核苷酸上，包括但不限于正义链或反义链的 5'或 3'末端核苷酸或非末端的中间位置核苷酸。当配体连接在 dsRNA 链的末端时，所述配体可以连接在核苷酸的磷酸酯基上；当配体连接在 dsRNA 的中间位置核苷酸时，所述配体可以连接在核苷酸的糖环或者碱基上。

本申请中，所述配体的种类或制备方法可参考本领域已知的方法，包括但不限于记载于 WO2009082607、WO2014025805、WO2015006740、WO2021249484 中的配体及其制备方法，以引用的方式将其全部公开内容并入本申请中。示例性的配体包括但不限于上文所述的 L01 或 L02。本申请所述的 L01 配体同现有技术中的 L96 配体。

本申请中，除非另有说明，“缀合”是指两个或多个各自具有特定功能的化学部分之间以非共价连接的

方式或共价连接的方式彼此连接；相应地，“缀合物”是指该各个化学部分之间通过非共价连接或共价连接而形成的化合物。本申请中，优选使用以共价连接的方式彼此连接的缀合物。

本申请中，所述配体与正义链或反义链的 5' 或 3' 末端连接。优选地，所述配体与正义链的 5' 或 3' 末端连接。更优选地，所述配体与正义链的 3' 末端连接。示例性地，所述 dsRNA 与配体连接形成的 dsRNA 配体缀合物如下式 102 或式 103 所示：



本申请的化合物（例如本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐、其配体缀合物）可以存在特定的几何或立体异构体形式，所有这些几何或立体异构体形式都属于本申请的范围之内。本申请设想所有的这类化合物，包括(R)-和(S)-对映体、非对映异构体，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申请的范围之内。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，均包括在本申请的范围之内。

除非另有说明，术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像的关系。

的立体异构体。

除非另有说明，用楔形实线键（）和楔形虚线键（）表示一个立体中心的绝对构型，用直形实线键（）和直形虚线键（）表示立体中心的相对构型，用波浪线（）表示楔形实线键（）或楔形虚线键（），或用波浪线（）表示直形实线键（）和/或直形虚线键（）。

除非另有说明，术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%，并且，该异构体或对映体的含量大于等于 60%，或者大于等于 70%，或者大于等于 80%，或者大于等于 90%，或者大于等于 95%，或者大于等于 96%，或者大于等于 97%，或者大于等于 98%，或者大于等于 99%，或者大于等于 99.5%，或者大于等于 99.6%，或者大于等于 99.7%，或者大于等于 99.8%，或者大于等于 99.9%。

除非另有说明，术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。例如，其中一种异构体或对映体的含量为 90%，另一种异构体或对映体的含量为 10%，则异构体或对映体过量（ee 值）为 80%。

可以通过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。如果想得到本申请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拆分，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）。本申请的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素标记化合物，比如氚（³H）、碘-125（¹²⁵I）或 C-14（¹⁴C）。又例如，可用重氢取代氢形成氘代药物，氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固，相比于未氘化药物，氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本申请的化合物的所有同位素组成的变换，无论是否具备放射性，都包括在本申请的范围之内。

术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂（例如本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物）进行给药以改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：(i)抑制疾病或疾病状态，即遏制其发展；(ii)缓解疾病或疾病状态，即使该疾病或疾病状态消退。

术语“预防”意为将本申请所述化合物或制剂（例如本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物）进行给药以预防疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：预防疾病或疾病状态在受试者中出现，特别是当这类受试者易患有该疾病状态，但尚未被诊断为已患有该疾病状态时。

术语“受试者”、“患者”或“对象”在本文中可互换使用，是指已成为治疗、观察或实验对象的动物。在部分实施方式中，所述受试者为哺乳动物，优选为灵长类动物，更优选为人。

术语“治疗有效量”意指(i)治疗或预防特定疾病、病况或障碍，(ii)减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状，或(iii)预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本申请化合物（例如本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物）的用量。构成“治疗有效量”的本申请化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被治疗的受试者的年龄而改变，但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本申请内容而确定。

本申请的化合物的治疗剂量可根据例如以下而定：治疗的具体用途、给予化合物的方式、患者的健康和状态，以及签处方医师的判断。本申请的化合物在药物组合物中的比例或浓度可不固定，取决于多种因素，它们包括剂量、化学特性（例如疏水性）和给药途径。例如可通过含约 0.1~10%w/v 该化合物的生理缓冲盐水溶液提供本申请化合物，用于肠胃外给药。某些典型剂量范围为约 1μg/kg~约 1g/kg 体重/日。在某些实施方式中，剂量范围为约 0.01mg/kg~约 100mg/kg 体重/日。剂量很可能取决于此类变量，如疾病或病症的种类和发展程度、具体患者的一般健康状态、所选择的化合物的相对生物学效力、赋形剂制剂及其给药途径。可通过由体外或动物模型试验系统导出的剂量-反应曲线外推，得到有效剂量。

术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和其他动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

作为药学上可接受的盐，例如，可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。

如本申请所用，所述药学上可接受的盐包括双链核糖核酸的药学上可接受的盐和双链核糖核酸配体缀

合物的药学上可接受的盐。

术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物（例如本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物）与药学上可接受的载体、辅料或赋形剂组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。在本文中，术语“药物组合物”和“制剂”具有相同的含义，并可互换使用。本文所用的载体、辅料或赋形剂包括适合于期望的特定剂型的任意的和所有的溶剂，稀释剂或其它液体赋形剂，分散剂或助悬剂，表面活性剂，等渗剂，增稠剂或乳化剂，防腐剂，固体粘合剂，润滑剂等。用于配制药学上可接受的组合物的各种载体、辅料或赋形剂和用于其制备的方法可采用已知技术。除了与本申请的化合物不相容（例如产生任何不良的生物学效应或者其它以有害方式与药学上可接受的组合物的任何其它组分相互作用）的任何常规载体介质，其使用都涵盖在本申请的范围内。在一些具体的实施方式中，本文所用的载体、辅料或赋形剂是 dsRNA 给药领域常规使用的载体、辅料或赋形剂。

本申请的药物组合物可通过将本申请的化合物与适宜的药学上可接受的载体、辅料或赋形剂组合而制备，例如可配制成固态、半固态、液态或气态制剂，如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球及气溶胶等。

给予本申请化合物或其药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、局部、吸入、肠胃外、舌下、阴道内、鼻内、眼内、腹膜内、肌肉、皮下、静脉内给药。

本申请的药物组合物可以采用本领域众所周知的方法制造，如常规的混合法、溶解法、制粒法、制糖衣药丸法、磨细法、乳化法、冷冻干燥法等。

在本申请的试剂盒中，其包括本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物；以及任选的使用本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐、其配体缀合物、或药物组合物治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染的说明书。

本申请所使用的溶剂可经市售获得。

如无特殊说明，本申请柱层析、制备薄层硅胶色谱所用溶剂配比均为体积比。

本领域知晓，可以通过使用具有相应修饰的核苷单体将修饰的核苷酸基团引入本申请所述的 dsRNA。本领域技术人员可以从现有技术中获知相应修饰的核苷单体的制备方法和将修饰的核苷酸基团引入 dsRNA 的方法。所有修饰的核苷单体可以从商业途径获取或采用已知的方法制备。

本领域知晓，可以通过本领域常规的核糖核酸制备方法（例如固相合成和液相合成）得到所需的核糖核酸，例如可以通过亚磷酸胺固相合成技术合成所需的核糖核酸。本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物的制备方法包含以下步骤：按照双链核糖核酸的正义链或反义链的核苷酸种类或顺序，以 3' 到 5' 的方向将核苷酸单体依次连接以合成正义链和反义链。每个核苷酸单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应。本领域技术人员可以采用常规的反应条件、试剂的种类和用量，或根据试验情况进行调整以实现所述脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化反应。

在一些实施方式中，对于含有配体的核糖核酸的合成，可以在寡核糖核苷酸的合成过程中或合成完成后通过偶联反应将配体与核糖核酸连接，也可以先将配体连接到固相载体，然后按照 3' 到 5' 的方向将核苷单体与配体-固相载体依次连接。

纯化和脱盐的方法是本领域技术人员所公知的。例如，可以通过制备型离子色谱方法完成核糖核酸的纯化。又例如，可以通过反相色谱纯化方法或超滤离心方法完成核糖核酸的脱盐。

退火的方法是本领域技术人员所公知的。例如可以将正义链和反义链以 1:1 摩尔量混合，加热至 70-95°C，随后降至室温以形成双链结构。

在合成过程中，可以通过例如离子交换色谱检测核糖核酸浓度，或通过液质联用色谱测定分子量，或通过微量分光光度计测定浓度以控制合成质量，此类检测方法是本领域技术人员所公知的。

除非另外特别说明，否则单数术语涵盖复数术语，并且复数术语涵盖单数术语。除非另外特别说明，否则词语“一个”或“一种”意指“至少一个”或“至少一种”。除非另外说明，否则“或”的使用意指“和/或”。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请人可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本文中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。

具体实施方式

下面通过实施例对本申请进行详细描述，但并不意味着对本申请构成任何不利限制。本申请的化合物

可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备，包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式，优选的实施方式包括但不限于本申请的实施例。对本领域的技术人员而言，在不脱离本申请精神和范围的情况下针对本申请具体实施方式进行各种变化和改进将是显而易见的。

可以通过质谱等检测方法确认制备得到的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物是目标产物。

试剂与材料

合成所用的市售保护单体

保护单体	CAS
5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-[(叔丁基)二甲基硅基]-N-异丁酰基鸟苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	147201-04-5
N-苯甲酰基-5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-[(叔丁基)二甲基硅基]腺苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	104992-55-4
N-乙酰基-5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-[(叔丁基)二甲基硅基]胞苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	121058-88-6
5'-O-[双(4-甲氧基苯基)苯基甲基]-2'-O-[(1,1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]-尿苷, 3'-[2-氰基乙基 N,N-双(1-甲基乙基)亚磷酰胺]	118362-03-1
5'-O-[双(4-甲氧基苯基)苯基甲基]-2'-脱氧胸苷, 3'-[2-氰基乙基 N,N-双(1-甲基乙基)亚磷酰胺]	98796-51-1
N-苯甲酰基-5'-O-[二(4-甲氧基苯基)苯基甲基]-2'-脱氧-2'-氟腺苷-3'-[2-氰基乙基-N,N-二异丙基]亚磷酰胺	136834-22-5
N-乙酰基-5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-2'-氟胞苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	159414-99-0
5'-O-[二(4-甲氧基苯基)苯基甲基]-2'-脱氧-2'-氟-N-(2-甲基-1-氧代丙基)-鸟苷-3'- (2-氰基乙基 N,N-二异丙基)亚磷酰胺	144089-97-4
5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧-2'-氟尿苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	146954-75-8
N-苯甲酰基-5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-甲基腺苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	110782-31-5
N-乙酰基-5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-甲基胞苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	199593-09-4
N-乙酰基-5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-甲基鸟苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	909033-40-5
5'-O-(4,4-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-甲基尿苷-3'-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基)亚磷酰胺	110764-79-9

合成所用的试剂

用途	
洗涤	无水乙腈
脱帽剂 DBK	3%TCA/DCM(3%三氯乙酸/DCM)
活化剂 ACT	0.25mol/L ETT(5-乙硫基四氮唑)/ACN
盖帽 A(Capping A)	25%NMI (N-甲基吗啉) /ACN
盖帽 B(Capping B)	20%乙酸酐, 30% 2,6-二甲基吡啶/ACN
氧化剂	0.025mol/L I2/ (吡啶/水/乙腈=9/1/10)
硫代试剂	0.2mol/L PADS(苯乙酰二硫化物)/ACN

本申请采用以下缩略词：

DCM 代表二氯甲烷；ACN 代表乙腈；DIC 代表二异丙基碳二亚胺；DMAP 代表二甲氨基吡啶；DMT 代表二对甲氧三苯甲基；MEM 代表 2-甲氧基乙氧基甲基。

制备实施例 1 将 GalNAc 配体（含有 GalNAc 基团作为靶向基团的配体）连接到固相载体上

称取氨基-CPG 1.0g（氨基载量：30-40 $\mu\text{mol/g}$ ），加入 5mL 脱帽剂 DBK，反应 1min，排干试剂，上述操作循环重复 4 次。按载量为 35 μmol 计算，加入 2 eq GalNAc 配体/乙腈溶液，再加入 2.5 eq DIC、2.5 eq DMAP 组成的缩合试剂。25-30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24h。结束后，滤除溶剂，无水乙腈清洗，再按上述用量加入 GalNAc 配体和缩合试剂，再反应 24h。反应结束后，无水乙腈清洗固相载体，加入 4mL Capping A 和 Capping B 的 1:1 混合试剂，反应 2min，排干后，再加入 4mL 上述混合试剂，反应 2min，排干，无水乙腈洗涤，30 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 1h，备用。此实施例 GalNAc 配体可以采用 L01 配体。

制备实施例 2 双链核糖核酸的制备

2.1.1 GalNAc 配体-ssRNA（正义链）的合成

在 K&A 核酸合成仪上，将上述 GalNAc 配体-固相载体放入合成柱中，按照标准的亚磷酰胺技术合成 ssRNA。具体步骤包括：

1) DMT 脱除（脱保护）：先用乙腈洗涤树脂两次，用 3%三氯乙酸/DCM 脱除树脂上的 DMT，乙腈洗涤 4~5 次。

2) 缩合（偶联）：合成柱中加入单体，加入缩合试剂，室温缩合 10 分钟。用乙腈洗涤 4~5 次。

3) 封闭（盖帽）：先用 Capping A，再用 Capping B 封闭未反应的羟基。用乙腈洗涤 4~5 次。

4) 氧化：加入氧化试剂，氧化时间 2 分钟，后用乙腈洗涤 4~5 次。

重复 1)~4) 的步骤，至所有序列合成完成，最后用脱帽剂 DBK 脱除 DMT，乙腈洗涤 4~5 次。

硫代磷酸酯键的形成：用硫代试剂替换氧化试剂，硫代时间设置为 10 分钟，完成硫代磷酸酯键的形成。

2.1.2 ssRNA（无配体正义链）的合成

在 K&A 核酸合成仪上，将通用性 CPG 固相载体放入合成柱中，按照标准的亚磷酰胺技术合成 ssRNA。具体步骤包括：

1) DMT 脱除（脱保护）：树脂先用乙腈洗涤两次，用 3%三氯乙酸/DCM 脱除树脂上的 DMT，乙腈洗涤 4~5 次。

2) 缩合（偶联）：合成柱中加入单体，加入缩合试剂，室温缩合 10 分钟。用乙腈洗涤 4~5 次。

3) 封闭（盖帽）：先用 Capping A，再用 Capping B 封闭未反应的羟基。用乙腈洗涤 4~5 次。

4) 氧化：加入氧化试剂，氧化时间 2 分钟，后用乙腈洗涤 4~5 次。

重复 1)~4) 的步骤，至所有序列合成完成，最后用脱帽剂 DBK 脱除 DMT，乙腈洗涤 4~5 次。

硫代磷酸酯键的形成：用硫代试剂替换氧化试剂，硫代时间设置为 10 分钟，完成硫代磷酸酯键的形成。

2.2 asRNA（无配体反义链）的合成

在 K&A 核酸合成仪上，将上述 CPG 固相载体放入合成柱中，参考 2.1.1 或 2.1.2 所述方法进行合成。

2.3 ssRNA 或 asRNA 与固相载体的分离

裂解试剂为氨水：乙醇=3:1，每 100mg 固相载体加入 5mL 裂解试剂，65-70 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 3h。反应结束，放至室温，用冰正丁醇沉淀，置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30min。离心得到沉淀，再加入正丁醇洗涤，重复 2 次。最后沉淀用丙酮洗涤，离心得到沉淀，真空干燥，得到粗品，进行质谱检测。

LC-MS（负离子模式）条件如下：

色谱柱：HILIC 色谱柱

流动相 A：20mm 甲酸铵，pH6.2

流动相 B：20mm 甲酸铵+95%ACN

柱温：45 $^{\circ}\text{C}$

流速：1mL/min。

2.4 退火形成 siRNA (dsRNA)

加水溶解单链 RNA 粗品，膜过滤除去载体。用微量分光光度计测定正义链和反义链的浓度，加入正义链和反义链（使二者摩尔含量比=1:1），混合，变性温度：94 $^{\circ}\text{C}$ ，维持 4min；退火温度：自然降温至室温。

2.5 siRNA (dsRNA)的纯化

通过施用 DNAPac RP 10*150 mm 4μm 色谱柱纯化，流动相 A 是 0.1 mol/L 三乙胺，pH8.0，流动相 B 是 0.1 mol/L 三乙胺，pH8.0+50% ACN；检测波长 215nm，260nm。收集主峰，旋蒸以除去大部分溶剂得到目标产物。

2.6 脱盐以及含量标定

使用 3K 的超滤离心管，12000×g，离心时间 12min，进行超滤浓缩并脱盐；旋蒸液浓缩完毕后，再加入水进行置换，重复 5 次以上。

浓度测定：浓缩后的样品，使用微量分光光度计进行浓度测定。

制备实施例 3

固相合成：（反义链）

称量单体，并加入计算量的无水乙腈，制得 0.2M 单体溶液。

- 1) 称量 Unylinker Support，参照 SOP 装柱要求装填 Fineline70P 合成柱。
- 2) 参照合成仪器标准操作流程，将单体溶液、试剂溶液与合成仪器相连，打开氮气压力阀门运行固相合成命令。
- 3) 固相合成完毕后，将柱子上端管路拆除，接氮气管路，正压排空柱筒里面的溶剂，吹扫 5min。
- 4) 将下口封闭，柱塞腔层阀门打开，压入氮气，将柱塞杆顶到开口处，泄压，拆除螺杆与阀门，将湿的 Oligo-Solid-support 倒在干净的结晶皿中。
- 5) 真空干燥直至恒重，干品净重 123.6g。

2、裂解

- 1) 向 3L 不锈钢反应釜中加入上述制备得到的中间体 123g，28 wt %浓氨水 1230 mL，搅拌转速设置为 100rpm。
- 2) 控制加热的外温 60~85℃间，内温在 50~60℃间，加热反应 12 小时。
- 3) 反应完毕后将料液倒至 Fineline70P 层析柱中，正压过滤得滤液，用纯化水淋洗滤饼，再次过滤，合并所有滤液得裂解液 2353.4 g，总 OD 值 1375420.4。

3、纯化

- 1) 柱效测试。
- 2) 进行柱消毒。
- 3) 准备样品、洗脱剂及样品收集瓶。记录需要纯化的样品重量及总 OD，并将配置好的洗脱剂连接至仪器相应管路，打开相应阀门。
- 4) 手动运行程序。手动运行需确保 A、B 泵均处于开启状态，冲洗和平衡柱子，洗脱过程根据粗品纯度和小试结果调整洗脱液百分比。
- 5) 运行结束后进行柱冲洗。
- 6) 根据中控结果，合并纯化收集液，并将收集液置于 2-8℃冰箱保存。

4、超滤

5、按照合成反义链的方法合成正义链。

6、退火

1) 向瓶中分别倒入反义链溶液 1402.5g 和正义链溶液 1356.2g，用 200g 纯化水润洗装溶液的玻璃瓶后一并倒入反应瓶中。

2) 开启搅拌，开启加热，温度设置 110℃；升高反应体系内温至 87-91℃，保温 30 分钟。关闭加热，降低反应体系内温至 25℃左右；取样测定双链纯度，双链含量为 94.44%。

3) 收集料液至经过消毒的 5L PP 物料桶中，并用少量纯化水润洗反应瓶，合并至料液，料液净重 2978.7g。

7、冻干，得冻干固体 71.6g。

双链核糖核酸如下所示：

表 8. 双链核糖核酸

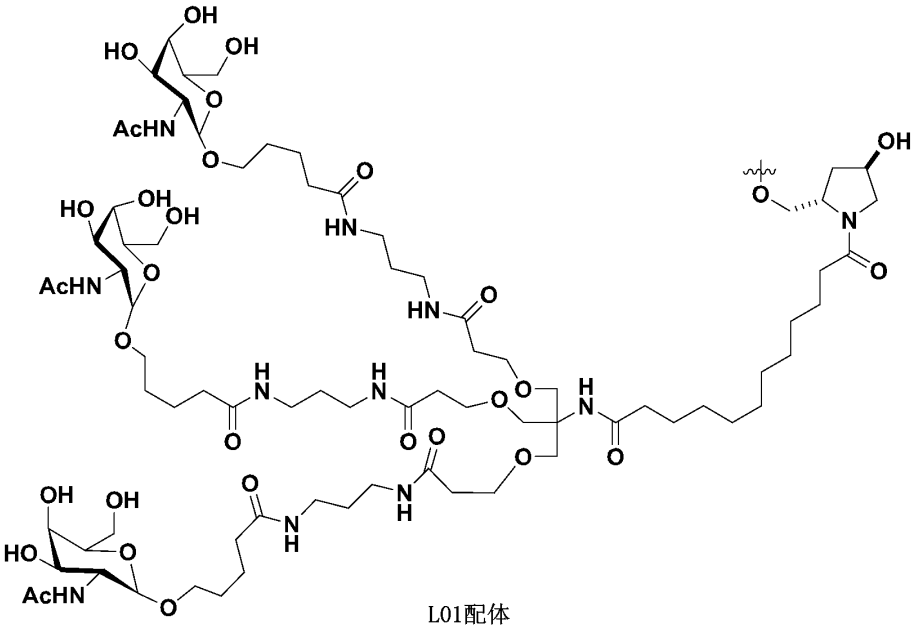
dsRNA	正义链	序列 5'向 3'方向	反义链	序列 5'向 3'方向
-------	-----	-------------	-----	-------------

序号	SEQ ID NO		SEQ ID NO	
AD01	9	AGCAAUAUGACAAUUGAAUGA	10	UCAUUCAAUUGUCAUAUUGCUAC
AD02	11	AUUUACUGUCACGGUUCCTAA	12	UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC
AD03	13	CUAUUUUUUUGAGUCUGU	14	ACAGACUCAAAAUAAAUAGGA
AD04	15	UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU	16	AUCUACUACAAUAAUUCUCAAAC
AD05	17	UUGUCUCAUGUUUCAUCGUAA	18	UUACGAUGAAACAUGAGACAAAAC
AD06	19	CUGUGCAGUAUCUGUCCAUU	20	AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC
AD07	21	AAUGAAAGGACUCACUUGGUA	22	UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG
AD08	23	GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUA	24	UACCAUAGCUGAUCAUGCAGCGG
AD09	25	GGUGCUUGGUCUCCUCUAUAA	26	UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU
AD10	27	AUUGGUCAUCCCAGAACUACA	28	UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC
AD11	29	UAUUUAUUUUGAGUCUGUG	30	CACAGACUCAAAAUAAAUAGG
AD12	53	AUUUACUGUCACGGUUCCTAA	54	UUGGGAACCGUGACAGUAAAUAGC
M01	31	asgscaauauGfAfCfaauugaauga	32	usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc
M02	33	asusuuacugUfCfAfcgguuccaa	34	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuauuasgsc
M03	35	csusauuuAfUfUfuugagucugu	36	asCfsagaCfucaaaauAfaAfuagsgsa
M04	37	usgsaagauaUfAfUfuguagua	38	asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa
M05	39	ususguucaUfGfUfuucauguaa	40	usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa
M06	41	csusgugcagUfAfUfcuguuccauu	42	asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc
M07	43	asasugaaagGfAfCfucacuugua	44	usAfsccaAfugagucCfuUfucuuusug
M08	45	gscsugcaugAfUfCfagcuaugua	46	usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg
M09	47	gsgsugcuugGfUfCfuccucuaa	48	usUfsauaGfaggagacCfaAfgcaccsusu
M10	49	asusuggucaUfCfCfcagaacuaa	50	usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc
M11	51	usasuuuaUfUfUfugagucugug	52	csAfsagAfcucaaaaUfaAfauasgsg
M12	55	asusuuacugUfCfAfcgguuccaa	56	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuauuasgsc
M01L	31	asgscaauauGfAfCfaauugaa	32	usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc

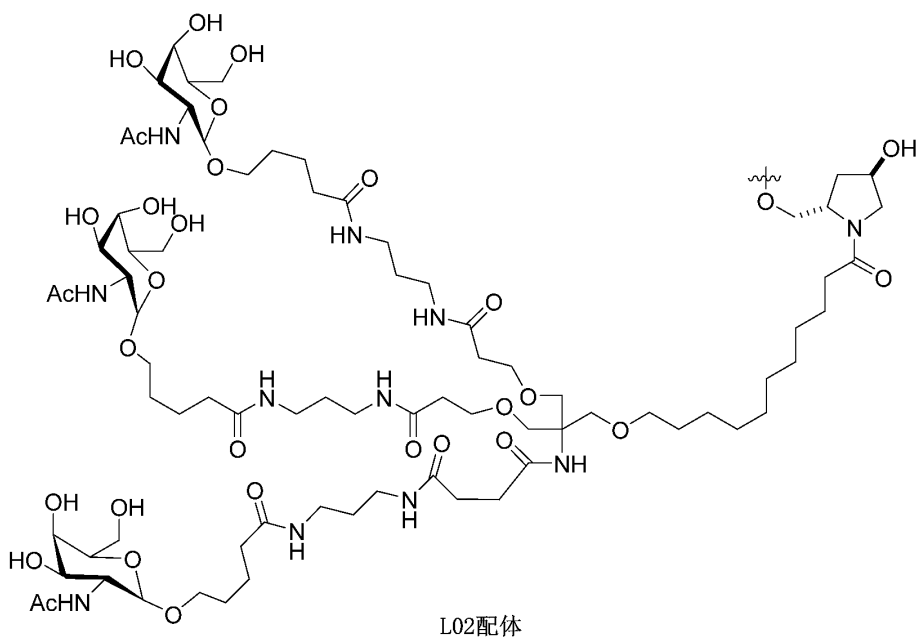
		ugaL		
M02L	33	asusuuacugUfCfAfcgguucc caaL	34	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuauasgsc
M03L	35	csusauuuAfUfUfuugagucug uL	36	asCfsagaCfucaaaaUfaAfuagsgsa
M04L	37	usgsaagauaUfAfUfuguagua gauL	38	asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa
M05L	39	ususgucucaUfGfUfuucaucg uaaL	40	usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa
M06L	41	csusgugcagUfAfUfcuguucc auuL	42	asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc
M07L	43	asasugaaagGfAfCfucacuug guaL	44	usAfsccaAfgugagucCfuUfucuuusug
M08L	45	gscsugcaugAfUfCfagcuau guaL	46	usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg
M09L	47	gsgsugcuugGfUfCfuccucua uaaL	48	usUfsauaGfaggagacCfaAfgaccsusu
M10L	49	asusuggucaUfCfCfcagaacu acaL	50	usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc
M11L	51	usasuuuaUfUfUfugagucugu gL	52	csAfsccagAfcuaaaaUfaAfauasgsg
M12L	55	asusuuacugUfCfAfcgguucc caaL	56	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuauasgsc
M01L01	31	asgscaauauGfAfCfaauugaa ugaL01	32	usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc
M02L01	33	asusuuacugUfCfAfcgguucc caaL01	34	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuauasgsc
M03L01	35	csusauuuAfUfUfuugagucug uL01	36	asCfsagaCfucaaaaUfaAfuagsgsa
M04L01	37	usgsaagauaUfAfUfuguagua gauL01	38	asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa
M05L01	39	ususgucucaUfGfUfuucaucg uaaL01	40	usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa
M06L01	41	csusgugcagUfAfUfcuguucc auuL01	42	asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc
M07L01	43	asasugaaagGfAfCfucacuug guaL01	44	usAfsccaAfgugagucCfuUfucuuusug
M08L01	45	gscsugcaugAfUfCfagcuau guaL01	46	usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg
M09L01	47	gsgsugcuugGfUfCfuccucua uaaL01	48	usUfsauaGfaggagacCfaAfgaccsusu
M10L01	49	asusuggucaUfCfCfcagaacu acaL01	50	usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc
M11L01	51	usasuuuaUfUfUfugagucugu gL01	52	csAfsccagAfcuaaaaUfaAfauasgsg
M12L01	55	asusuuacugUfCfAfcgguucc caaL01	56	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuauasgsc
M01L02	31	asgscaauauGfAfCfaauugaa ugaL02	32	usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc
M02L02	33	asusuuacugUfCfAfcgguucc	34	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuauasgsc

		caaL02		
M03L02	35	csusauuuAfUfUfuugagucuguL02	36	asCfsagaCfucaaaauAfaAfuagsgsa
M04L02	37	usgsaagauaUfAfUfuguaguaL02	38	asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa
M05L02	39	ususgucucaUfGfUfuucaucguaaL02	40	usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa
M06L02	41	csusgugcagUfAfUfcuguuccauuL02	42	asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc
M07L02	43	asasugaaagGfAfCfucacuuguaL02	44	usAfsccaAfugagucCfuUfucuuusug
M08L02	45	gscsugcaugAfUfCfagcuauguaL02	46	usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg
M09L02	47	gsgsugcuugGfUfCfuccucuaL02	48	usUfsauaGfaggagacCfaAfgaccsusu
M10L02	49	asusuggucaUfCfCfcagaacuaL02	50	usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc
M11L02	51	usasuuuaUfUfUfugagucugugL02	52	csAfscagAfcuaaaaUfaAfauasgsg
M12L02	55	asusuacugUfCfAfcgguuccaaL02	56	usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaaausgsc

其中，大写字母 G、C、A、或 U 分别各自通常代表含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、尿嘧啶作为碱基的核苷酸；小写字母 g、c、a、u 分别代表其相应大写字母所代表的核苷酸的核糖基团被 2'-甲氧基修饰，即 g、c、a、u 分别代表 2'-O-甲基 G、2'-O-甲基 C、2'-O-甲基 A、2'-O-甲基 U；大写字母加上其右侧的小写字母 f 代表其相应的大写字母所代表的核苷酸的核糖基团被 2'-氟修饰，即 Gf、Cf、Af、Uf 分别代表 2'-氟 G、2'-氟 C、2'-氟 A、2'-氟 U；小写字母 s 表示与 s 左右相邻的两个核苷酸残基之间为硫代磷酸酯基连接，例如“csu”表示 c 和 u 残基之间通过硫代磷酸酯基连接，L 表示配体，例如 L01 配体和 L02 配体的结构如下所示：



或



上述双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物（所述配体选自 L01 配体或 L02 配体）可以根据本申请所述方法或本领域已知方法制备得到。

本申请的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物的质谱检测数据符合预期，可以确认得到了目标产物。

试验例 1 体外筛选 A

1. 双荧光素酶法的细胞培养与质粒/转染

用含有 10% 的胎牛血清（Gibco，货号为 10099-141）的 DMEM（Viva Cell，货号为 C3113-0500）完全培养基于 37℃ 在含有 5% CO₂/95% 空气的培养箱中培养 Cos7 细胞（购自南京科佰生物科技有限公司）。待细胞生长至接近汇合，使用胰蛋白酶处理，从培养瓶中释出细胞。将 Cos7 细胞以 1.5×10^4 细胞/孔接种于 96 孔板内，培养过夜。使用具有约 3634bp 长度的插入片段的一种构建体将完整的人 CD274 参考序列（NM_014143.4）克隆到双荧光素酶 pmirGLO 载体（Promega，货号为 E1330）中（南京金斯瑞生物科技有限公司，C3872GD150），使用 Lipofectamine™ 3000（Invitrogen，货号为 L3000015）和 Lipofectamine™ RNAiMAX（Invitrogen，货号为 13778150）转染试剂将 pmirGLO 质粒与 siRNA 转染进 1.5×10^4 个细胞中。转染方法是取 0.3μL Lipofectamine™ 3000 转染试剂加入到 5μL 的 OPTI-MEM 培养基（Thermo，货号为 11058021），吹打混匀；再将质粒按照 50ng/孔 pmirGLO 质粒和 0.2μL/孔 P3000 加入到 5μL 的 OPTI-MEM 培养基（Thermo，货号为 11058021），吹打混匀；将稀释的质粒（按照 1:1 的比例）加入到含转染试剂的 OPTI-MEM 培养基中，吹打混匀，室温静置 5min；将复合物（稀释后转染试剂 Lipofectamine 3000 与稀释后质粒和 p3000 的混合物）加入到培养孔内，每孔再加入 90μL 的 DMEM 完全培养基，继续培养 8h；换液；用无酶水将 siRNA 稀释为 2μM、0.2μM；取 0.3μL 的 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂加入到 10μL 的 OPTI-MEM 培养基，吹打混匀；再将 0.5μL siRNA 加入到含转染试剂的 OPTI-MEM 培养基中，吹打混匀，室温静置 5min；将复合物加入到培养孔内，每孔再加入 90μL 的 DMEM 完全培养基，继续培养 48h，然后使用双荧光素酶检测试剂盒 Dual-Glo[®] luciferase assay system（Promega，货号为 E2940）测量荧光素酶；在最终双链体浓度为 10nM 和 1nM 的条件下执行单剂量实验。转染所用的 siRNA 为 AD01、AD02、AD03、AD04、AD05、AD06、AD07、AD08、AD09、AD10、AD11 和 AD12 所示的序列。

2. 荧光素酶测定法

在 siRNA 转染 48h 后，测量了萤火虫（转染对照）荧光素酶和海肾（与 PD-L1 靶序列融合）荧光素酶。首先，从细胞中去除培养液。然后通过向各孔中加入 75μL 等同于 PBS（pH 7.4）体积的 Dual-荧光素酶试剂并混合来测量萤火虫荧光素酶活性。将混合物在室温下温育 10min，然后在多功能酶标仪（TECAN）上测量发光度（500nm），以检测萤火虫荧光素酶信号。通过向各孔中加入 75μL 室温的 Stop & Glo 试剂测量了海肾荧光素酶活性，并将板孵育 10min，然后再次测量发光度以确定海肾荧光素酶的信号。Stop & Glo 试剂淬灭萤火虫荧光素酶信号并使得海肾荧光素酶反应持续发光。通过将各孔内的海肾（PD-L1）信号对萤火虫（对照）信号进行基准化来确定 siRNA 活性。然后与转染有相同载体但未经 siRNA 处理的或非靶向性

siRNA 处理的细胞比较，评估 siRNA 活性的量级。所有转染一式三份进行。

3. 细胞培养和用于 QuantiGene 法的转染：

用含有 10%的胎牛血清的 RPMI 1640 (Bio-Channel，货号为 BC-M-017-500mL) 完全培养基于 37℃ 在含有 5% CO₂/95%空气的培养箱中培养 HCC4006 细胞（购自南京科佰生物科技有限公司）。待细胞生长至接近汇合，使用胰蛋白酶处理，从培养瓶中释出细胞。将 HCC4006 细胞以 2×10⁵ 个细胞/孔接种于 96 孔板内，培养过夜。siRNA 的转染方法是用无酶水将 siRNA 稀释为 2μM、0.02μM；取 0.3μL Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂加入到 10μL 的 OPTI-MEM 培养基，吹打混匀；再将 0.5μL siRNA 加入到含转染试剂的 OPTI-MEM 培养基中，吹打混匀，室温静置 5min；将复合物加入到培养孔内，每孔再加入 90μL 的 RPMI 1640 完全培养基，继续培养 48h。在最终双链体浓度为 10nM 和 0.1nM 的条件下执行单剂量实验。对于剂量响应实验，使用从 10nM 开始的 8 次 ×3 倍连续稀释。转染所用 siRNA 为 M01、M02、M03、M04、M05、M06、M07、M08、M09、M10、M11 和 M12 所示的序列。

4. QuantiGene 法的检测

iGene 法的检测

在 siRNA 转染 48h 后,使用 QuantiGene™ 样品处理试剂盒 QuantiGene™ Sample Processing Kit(Thermo, 货号为 QS0103)、QuantiGene™ 探针 QuantiGene™ Probe Set (Thermo, 货号为 QGS-1000) 及 QuantiGene™ 信号检测试剂盒 QuantiGene™ Signalplex Assay Kit (Thermo, 货号为 QS0384) 检测细胞中 PD-L1 mRNA 表达水平。操作按照说明书进行，多功能读板仪 (TECAN) 读取化学发光值 (RLU)，抑制率 (%)=[1-siRNA 组 (RLU)/对照组(RLU)]×100；用 EXCEL 软件处理浓度-抑制率 (%) 数据，通过四参数非线性回归模型计算 siRNA 对 PD-L1 抑制作用的 EC50。所有转染一式两份进行。

结果如表 9、表 10 和表 11 所示。

表 9 双荧光素酶法的沉默效率 (%)

siRNA 序号	10nM		1nM	
	Avg	SD	Avg	SD
AD01	69.4%	7.6%	56.7%	1.6%
AD02	74.6%	1.3%	65.2%	1.3%
AD03	88.9%	1.8%	83.4%	1.2%
AD04	67.0%	4.9%	46.6%	2.9%
AD05	62.9%	2.8%	59.2%	1.4%
AD06	60.2%	3.9%	60.7%	2.6%
AD07	67.8%	8.2%	58.0%	0.0%
AD08	70.1%	6.1%	68.5%	2.1%
AD09	66.4%	2.1%	56.9%	1.3%
AD10	66.1%	1.7%	59.5%	6.6%
AD11	84.1%	0.6%	70.7%	5.1%
AD12	91.4%	0.8%	84.9%	3.5%

表 10 QuantiGene 法的单剂量实验沉默效率 (%)

siRNA 序号	10nM		0.1nM	
	Avg	SD	Avg	SD
M01	75.5%	8.4%	51.5%	3.2%
M02	54.9%	8.7%	20.0%	1.8%
M03	69.2%	4.2%	48.9%	0.8%
M04	74.5%	3.6%	50.6%	14.7%

M05	71.1%	6.7%	60.6%	4.3%
M06	65.8%	8.8%	47.0%	8.5%
M07	59.8%	7.8%	4.2%	8.9%
M08	42.5%	13%	0.5%	1.2%
M09	63.8%	4.2%	46.6%	10.7%
M10	57.7%	4.6%	47.6%	6.6%
M11	68.0%	1.8%	31.3%	11.9%

表 11 QuantiGene 法的 EC₅₀

siRNA 序号	EC ₅₀ (pM)	最大抑制率
M01	971.6	71.8%
M02	297.0	42.5%
M03	88.5	70.4%
M04	800.5	71.0%
M05	41.5	69.0%
M06	182.5	67.0%
M07	645.9	39.2%
M08	-	-
M09	499.4	66.0%
M11	136.1	65.0%

体外筛选结果显示，本申请的 siRNA 具有良好的体外沉默活性。

试验例 2 体外筛选 B

用含有 10%的胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基（Bio-Channel，货号为 BC-M-017-500mL）于 37℃ 在含有 5% CO₂/95%空气的培养箱中培养 HCC4006 细胞（购自南京科佰生物科技有限公司）。待细胞生长至接近汇合，使用胰蛋白酶处理，从培养瓶中释出细胞。将 HCC4006 细胞以 5×10⁴ 个细胞/孔接种于 48 孔板内，培养过夜。siRNA 的转染方法是用无酶水将 siRNA（20μM）稀释为 2μM、0.4μM、0.08μM、0.016μM、0.0032μM、0.00064μM；取 1.25μL Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen，货号为 13778150）转染试剂加入到 25μL 的 OPTI-MEM 培养基（Thermo，货号为 11058021），吹打混匀；再将 1.25μL 的不同浓度 siRNA 稀释液加入到含转染试剂的 25 μL 的 OPTI-MEM 培养基中，吹打混匀，室温静置 5min；将复合物加入到培养孔内，每孔再加入 225μL 的 RPMI 1640 完全培养基，继续培养 48h。在最终双链体浓度为 10nM 开始的 6 次 ×5 倍连续稀释的浓度条件下执行剂量响应实验。转染所用 siRNA 为 M03 和 M12 所示的序列，所有转染一式两份进行。

1. qRT-PCR 法的检测

在 siRNA 转染 48h 后，用 RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit（TAKARA，货号为 9767）根据说明书总 RNA 提取的操作步骤提取细胞总 RNA。

对于提取的细胞总 RNA，取 500ng 总 RNA 作为反转录的模板，使用反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Master Mix（Takara，货号为 RR036A）提供的试剂，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 10μL，对细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：将反转录反应体系置于 37℃ 孵育 15min，然后 85℃ 孵育 5s，反应结束后，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，取上述含 cDNA 的溶液作为 qPCR 的模板，使用 ChamQ SYBRqPCR Master Mix 试剂盒（诺唯赞生物科技有限公司，货号为 Q331）提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μL，其中，用于扩增目标基因 PD-L1 和内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列如表 12 所示，每条引物的终浓度为 10μM。将 qPCR 反应体系置于 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95℃ 预变性 3min，然后 95℃ 变性 10s，60℃ 退火 30s，重复上述变性、退火的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 PD-L1 和内参基因 GAPDH 的 PCR 扩增产物。PCR 扩增产物随即依次经过 95℃ 5s，65℃ 1min，97℃ 15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集 PCR 扩增产物中目标基因 PD-L1 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线，得到目标基因 PD-L1 和内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

表 12 引物序列

基因名称	SEQ ID NO.	核苷酸序列 (5' → 3')
人 PD-L1	3	TGGCTCCCAGAATTACCAAG
	4	TATGGTGGTGCCGACTACAA
人 GAPDH	57	GGTCGGAGTCAACGGATTT
	58	CCAGCATCGCCCCACTTGA

采用相对定量的方法，即 $\Delta\Delta C_t$ 值法，计算 PD-L1 mRNA 的表达水平。

计算方法如下：

$$\Delta C_t(\text{siRNA}) = C_t(\text{PD-L1}) - C_t(\text{GAPDH})$$
$$\Delta C_t(\text{NC}) = C_t(\text{PD-L1}) - C_t(\text{GAPDH})$$
$$\Delta\Delta C_t(\text{siRNA}) = \Delta C_t(\text{siRNA}) - \Delta C_t(\text{平均 NC})$$
$$\Delta\Delta C_t(\text{NC}) = \Delta C_t(\text{NC}) - \Delta C_t(\text{平均 NC})$$
$$\text{PD-L1 mRNA 相对表达水平} = 2^{-(\Delta\Delta C_t(\text{siRNA}))} \times 100\%$$
$$\text{siRNA 对 PD-L1 mRNA 的抑制率} = (1 - 2^{-(\Delta\Delta C_t(\text{siRNA}))}) \times 100\%$$

用 EXCEL 软件处理浓度-抑制率(%)数据，通过四参数非线性回归模型计算 siRNA 对 PD-L1 抑制作用的 EC_{50} 。

结果如表 13 所示。

表 13 qRT-PCR 法的 EC_{50}

dsRNA 序号	EC_{50} (pM)	最大抑制率
M03	115.2	77.3%
M12	56.4	53.0%

。

试验例 3 人源 PD-L1 模型小鼠体内活性的评价 A

将 6-8 周雄性人源 PD-L1 小鼠（购自上海南模生物科技股份有限公司），按照体重随机分组，每组 3 只，分别记为 PBS 组、各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）。

将各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）分别用 1×PBS（pH 7.4）配置成 1 mg/mL 的溶液。

对 PBS 组各小鼠皮下注射 10mL/kg 体重的 1×PBS（pH 7.4），对各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）组的各小鼠分别皮下注射相应的上述配制的溶液。每只动物给药体积 10 mL/kg 体重，给药剂量为 10 mg/kg 体重。首次给药当天设为第 0 天。给药后 14 天处死全部小鼠，收集肝脏，分别保存于含 1mL 动物组织 RNA 稳定液（上海碧云天生物技术有限公司，货号为 R0118）的 1.5mL 无菌 EP 管中。在 4℃冰箱放置 24h 后，转移到 -80℃保存。随后用组织匀浆仪匀浆各小鼠的肝组织，再用 RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit（TAKARA，货号为 9767）根据说明书总 RNA 提取的操作步骤分别提取各小鼠肝组织的总 RNA。

对于每个小鼠肝组织提取的总 RNA，取 1μg 总 RNA 作为反转录的模板，使用反转录试剂盒 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit（+gDNA wiper）（诺唯赞生物科技有限公司，货号为 R312）提供的试剂，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20μL，对得到的肝脏的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：将反转录反应体系置于 37℃孵育 15min，然后 85℃孵育 5s，反应结束后，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，取上述含 cDNA 的溶液作为 qPCR 的模板，使用 ChamQ SYBRqPCR Master Mix 试剂盒（诺唯赞生物科技有限公司，货号为 Q311）提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μL，其中，用于扩增目标基因 PD-L1 和 GAPDH 的 PCR 引物序列如表 14 所示，每条引物的终浓度为 0.2μM。将 qPCR 反应体系置于 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95℃预变性 5min，然后 95℃变性 10s，60℃退火 10s，72℃延伸 10s，重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 PD-L1 和内参基因 GAPDH 的 PCR 扩增产物。PCR 扩增产物随即依次经过 95℃ 5s，65℃1min，97℃15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集 PCR 扩增产物中目标基因 PD-L1 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线，得到目标基因 PD-L1 和内参基因 GAPDH 的 C_t 值。

表 14 引物序列

基因名称	SEQ ID NO.	核苷酸序列 (5' → 3')
人 PD-L1	1	TGGCATTGCTGAACGCATTT
	2	TGCAGCCAGGTCTAATTGTTTT
小鼠 PD-L1	5	CCGGGATGAGAGATGGAGTC
	6	TGTCGTCAGAATTCACCAGTC
小鼠 GAPDH	7	ATGAAGGGGTCGTTGATGGC
	8	GGGTTCTATAAATACGGACTGC

采用比较 Ct(Δ Δ Ct)法，计算本申请的 dsRNA 配体缀合物对 PD-L1 mRNA 的抑制率，计算方法如下：
Δ Ct(测试组)=Ct(测试组目标基因) - Ct(测试组内参基因)
Δ Ct(对照组)=Ct(对照组目标基因) - Ct(对照组内参基因)
Δ Δ Ct(测试组)= Δ Ct(测试组)- Δ Ct(对照组平均)
Δ Δ Ct(对照组)= Δ Ct(对照组)- Δ Ct(对照组平均)
其中，测试组是各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物），对照组是 PBS 组，Δ Ct(对照组平均)是 PBS 组各个动物的 Δ Ct(对照组)的算术平均值。从而，各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）的每个动物均对应一个 Δ Δ Ct(测试组)，PBS 组的每个动物均对应一个 Δ Δ Ct(对照组)。
dsRNA 配体缀合物对测试组每个动物的 PD-L1 mRNA 的抑制率=(1-2^{-(Δ Δ Ct(测试组))})/2^{-(Δ Δ Ct(对照组))})×100%，

各 dsRNA 配体缀合物对肝组织 PD-L1 mRNA 的抑制率如表 15 所示。
表 15 dsRNA 配体缀合物对 PD-L1 mRNA 的抑制率

组别	PD-L1 表达抑制率 (%)	
	Avg	SD
M01L01	59.3	19.6
M02L01	67.1	17.7
M03L01	78.2	7.8

试验例 4 人源 PD-L1 模型小鼠体内活性的评价 B

将 6-8 周雄性人源 PD-L1 小鼠（购自上海南模生物科技股份有限公司），按照体重随机分组，每组 3 只，分别记为 PBS 组、各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）。
将各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）分别用 1×PBS（pH 7.4）配置成 1 mg/mL 的溶液。
对 PBS 组各小鼠皮下注射 10mL/kg 体重的 1×PBS（pH 7.4），对各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）的各小鼠分别皮下注射相应的上述配制的溶液。每只动物给药体积 10 mL/kg 体重，给药剂量为 10 mg/kg 体重。首次给药当天设为第 0 天。给药后 14 天和 28 天活体取肝脏组织，分别保存于含 1mL 动物组织 RNA 稳定液（上海碧云天生物技术有限公司，货号为 R0118）的 1.5mL 无菌 EP 管中。在 4℃冰箱放置 24h 后，转移到-80℃保存。随后用组织匀浆仪匀浆各小鼠的肝组织，再用 RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit（TAKARA，货号为 9767）根据说明书总 RNA 提取的操作步骤分别提取各小鼠肝组织的总 RNA。

反转录合成 cDNA、荧光定量 PCR 操作步骤与引物及抑制率计算见试验例 3。
各 dsRNA 配体缀合物对肝组织 PD-L1 mRNA 的抑制率如表 16 所示。

表 16 dsRNA 配体缀合物对 PD-L1 mRNA 的抑制率

组别	PD-L1 表达抑制率 (%)			
	给药后 14 天		给药后 28 天	
	Avg	SD	Avg	SD
M07L01	49.0	7.7	-	-

M08L01	26.7	2.2	-	-
M10L01	64.6	5.3	47.0	8.1
M11L01	66.7	2.9	39.2	18.1
M12L01	78.6	9.4	50%	6.2

试验例 5 AAV-hPD-L1 小鼠体内活性的评价

AAV-CTM-PDL1（人源全长 PD-L1 基因，滴度 6.25×10^{13} vg/mL，购自山东维真生物科技有限公司）在注射前预先用无菌 PBS 配制成浓度为 5×10^{11} vg/mL 溶液。将 4-6 周雄性 C57BL/6 小鼠（购自上海必凯科翼生物科技有限公司）经尾静脉每只注射 200uL 的上述配制好的浓度为 5×10^{11} vg/mL 的 AAV-CTM-PDL1，感染后 14 天，取 2-5 只小鼠肝脏检测 PDL1 mRNA 表达水平，显示(Ct)值为 24 ± 2 ，表明造模成功。将小鼠按体重随机分组，每组 4 只。

将各样品组（本申请的 dsRNA 配体缀合物）分别用 1×PBS（pH 7.4）配置成 1 mg/mL 的溶液。

对 PBS 组各小鼠皮下注射 10mL/kg 体重的 1×PBS（pH 7.4），对各样品组的各小鼠分别皮下注射相应的上述配制的溶液。每只动物给药体积 10 mL/kg 体重，给药剂量为 10 mg/kg 体重。首次给药当天设为第 0 天。给药后 14 天和 28 天活体取肝脏组织，分别保存于含 1mL 动物组织 RNA 稳定液（上海碧云天生物技术有限公司，货号 R0118）的 1.5mL 无菌 EP 管中。在 4℃冰箱放置 24h 后，转移到-80℃保存。随后用组织匀浆仪匀浆各小鼠的肝组织，再使用全自动核酸提取仪（奥盛，型号为 AUTO-PURE96）并应用 RNA 提取试剂盒 Universal RNA Extraction CZ Kit（H）（Onrew，货号为 RNC643-03H）根据说明书总 RNA 提取的操作步骤分别提取各小鼠肝组织的总 RNA。

对于每个小鼠肝组织提取的总 RNA，取 500ng 总 RNA 作为反转录的模板，使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)（TaKaRa，货号为 RR036A）提供的试剂，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 10μL，对得到的肝脏的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：将反转录反应体系置于 37℃孵育 15min，然后 85℃孵育 5s，反应结束后，得到含 cDNA 的溶液。

荧光定量 PCR 操作步骤与引物及抑制率计算见试验例 3。

根据试验结果发现，本申请的 dsRNA 配体缀合物对肝组织 PD-L1 mRNA 的抑制率具有良好的抑制效果，给药后 14 天或 28 天的 PD-L1 表达抑制率大于 50%，优选大于 60%或更优先大于 70%。

试验例 6 体外肝匀浆稳定性的评价

1）按照每 200 mg 肝脏组织（C57BL/6 小鼠），加入 1mL 组织裂解液（100 mM Tris-HCl，1 mM MgCl₂，pH 6.0），在-30℃条件下组织研磨器研磨，收集研磨液，即空白肝匀浆液，-80℃放置备用。

2）吸取 40μL 的待测 dsRNA 配体缀合物的储备液（浓度为 1mg/mL）加 360μL 无酶水将储备液稀释至 100μg/mL 备用，体系中待测化合物终浓度为 10μg/mL（1:10）。

3）取小鼠空白肝匀浆液，于 37℃温孵 5min、24h、42h、48h。

4）吸取 720μL 温孵 48h 后空白肝匀浆液至 1.5mL Eppendorf 管中，加入 80 μL 待测化合物储备液（100μg/mL），涡旋混匀，即为 0h 样品。

5）吸取 720μL 温孵 5min 后空白肝匀浆液至 1.5mL Eppendorf 管中，加入 80 μL 待测化合物储备液（100μg/mL），涡旋混匀，在摇床（37℃，300 rpm）条件下放置 48h，即为 48h 样品。

6）样品前处理：

- （1）

将上述所有样品涡旋混匀。移取 50μL 待测样品，再加入 150μL Clarity 裂解液（phenomenex，货号：AL0-8579），涡旋 5min，15000rpm 离心 10min。
- （2）

在 Clarity OTX SPE 板（phenomenex，货号：8E-S103-EGA）中依次加入 1mL 甲醇和 1mL 平衡缓冲液(50 mM 乙酸铵(pH = 5.5)+0.5%Triton_X100)。
- （3）

吸取步骤 1) 中离心后的 185μL 上清液装载在 SPE 试剂盒上。
- （4）

用 1mL 平衡缓冲液（50mM 乙酸铵(pH = 5.5)）冲洗 3 次，然后再用 1mL 缓冲液(50 mM 乙酸铵(pH = 5.5) +50%乙腈)冲洗 3 次。
- （5）

用 1mL 洗脱液(100 mM 碳酸氢铵(pH=9.5)+40%乙腈+10%四氢呋喃)洗脱 2 次。
- （6）

最后在 65℃氮气吹干，加入 100μL TE buffer（10mM Tris-HCL+1mM EDTA(pH=8.0)）复溶，涡旋 5min，15000rpm 离心 10min，取上清后进样分析。

7）采用 LC-MS/MS 进行样品浓度检测，以零点作为对照，采用分析物内标峰面积来计算剩余百分比，分析数据。

根据试验结果发现，本申请的 dsRNA 配体缀合物具有良好的稳定性，正义链在孵育 48h 后的剩余量超过 30%或 40%，反义链在孵育 48h 后的剩余量超过 60%或 80%。

权利要求书

1. 一种双链核糖核酸 (dsRNA)、其药理学上可接受的盐或其配体缀合物, 所述 dsRNA 包含正义链和反义链, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.13 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 21 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 23 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.16 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.17 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.18 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.19 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.20 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.21 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.22 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.23 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.24 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.25 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.26 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.27 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 21 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 23 个核苷酸; 或者, 所述正义链含有如 SEQ ID NO.53 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且正义链的长度不超过 23 个核苷酸, 所述反义链含有如 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列中至少 15 个连续的核苷酸且反义链的长度不超过 25 个核苷酸;
- 正义链: 5'-AGCAAUAUGACAAUUGAAUGA-3' (SEQ ID NO.9),
反义链: 5'-UCAUUCAAUUGUCAUAUUGCUAC-3' (SEQ ID NO.10);
正义链: 5'-AUUUACUGUCACGGUCCCAA-3' (SEQ ID NO.11),
反义链: 5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAUAGC-3' (SEQ ID NO.12);
正义链: 5'-CUAUUUUUUUGAGUCUGU-3' (SEQ ID NO.13),
反义链: 5'-ACAGACUAAAAUAAUAGGA-3' (SEQ ID NO.14);
正义链: 5'-UGAAGAUAAUUGUAGUAGAU-3' (SEQ ID NO.15),
反义链: 5'-AUCUACUACAAUAUAUCUUCAAA-3' (SEQ ID NO.16);
正义链: 5'-UUGUCUCAUGUUUCAUCGUA-3' (SEQ ID NO.17),
反义链: 5'-UUACGAUGAAACAUGAGACAAA-3' (SEQ ID NO.18);
正义链: 5'-CUGUGCAGUAUCUGUCCAAU-3' (SEQ ID NO.19),
反义链: 5'-AAUGGAACAGAUACUGCACAGAC-3' (SEQ ID NO.20);
正义链: 5'-AAUGAAAGGACUCACUUGGUA-3' (SEQ ID NO.21),
反义链: 5'-UACCAAGUGAGUCCUUUCAUUUG-3' (SEQ ID NO.22);
正义链: 5'-GCUGCAUGAUCAGCUAUGGUA-3' (SEQ ID NO.23),
反义链: 5'-UACCAUAGCUGAUC AUGCAGCGG-3' (SEQ ID NO.24);
正义链: 5'-GGUGCUUGGUCUCCUCUAUAA-3' (SEQ ID NO.25),
反义链: 5'-UUAUAGAGGAGACCAAGCACCUU-3' (SEQ ID NO.26);
正义链: 5'-AUUGGUCAUCCAGAACUACA-3' (SEQ ID NO.27),

反义链：5'-UGUAGUUCUGGGAUGACCAAUUC-3' (SEQ ID NO.28)；

正义链：5'-UAUUUAUUUUGAGUCUGUG-3' (SEQ ID NO.29)，

反义链：5'-CACAGACUCAAAAUAAAUAGG-3' (SEQ ID NO.30)；

正义链：5'-AUUUACUGUCACGGUCCCCAA-3' (SEQ ID NO.53)，

反义链：5'-UUGGGAACCGUGACAGUAAAUGC-3' (SEQ ID NO.54)；

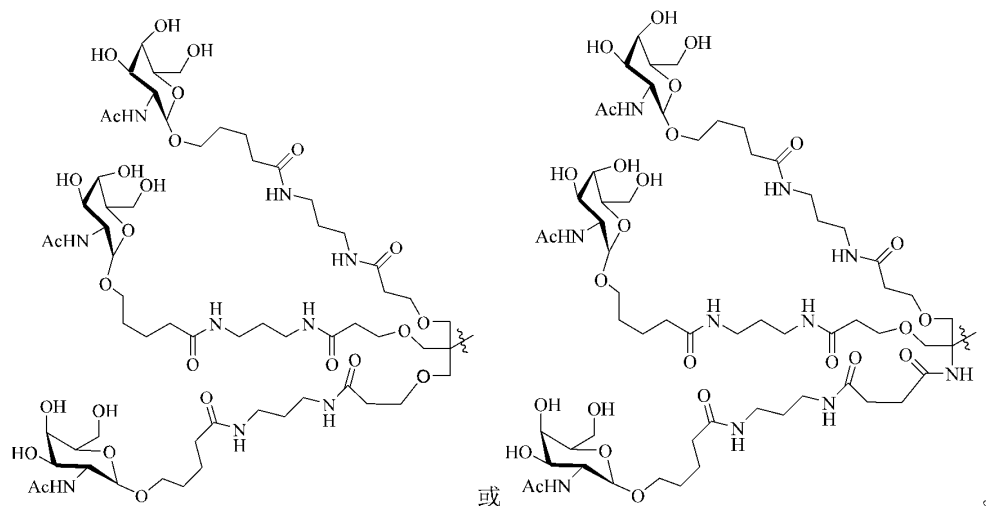
所述正义链或反义链任选地是经修饰的。

2. 根据权利要求 1 所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述正义链含有如 SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.13 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 21 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 23 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.16 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.17 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.18 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.19 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.20 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.21 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.22 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.23 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.24 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.25 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.26 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.27 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 21 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 23 个核苷酸；或者，所述正义链含有如 SEQ ID NO.53 所示的核苷酸序列且正义链的长度不超过 23 个核苷酸，所述反义链含有如 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列且反义链的长度不超过 25 个核苷酸。
3. 根据权利要求 1 所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述正义链是如 SEQ ID NO.9 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.10 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.11 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.12 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.13 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.14 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.15 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.16 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.17 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.18 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.19 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.20 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.21 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.22 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.23 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.24 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.25 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.26 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.27 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.28 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.29 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.30 所示的核苷酸序列；或者，所述正义链是如 SEQ ID NO.53 所示的核苷酸序列，所述反义链是如 SEQ ID NO.54 所示的核苷酸序列。
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物任选地包括位于 5'端和/或 3'端的突出端。
5. 根据权利要求 4 所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述突出端含有 1、2、3、4 或 5 个核苷酸；或者，所述突出端含有 1 或 2 个核苷酸；或者，所述突出端为所述正义链或所述反义链 5'端和/或 3'端的 1、2、3、4 或 5 个核苷酸；或者，所述 dsRNA、其药学上可接受的盐或其配体缀合物包含额外序列作为突出端。
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述作为突出端的额外序列选自未修饰或经修饰的 A、G、C、U 或 T；或者选自未修饰或经修饰的 U 或 T；或者当所述突出端为 1 个核苷酸时，所述作为突出端的额外序列选自 u 或 dT；或者当所述突出端为 2 个核

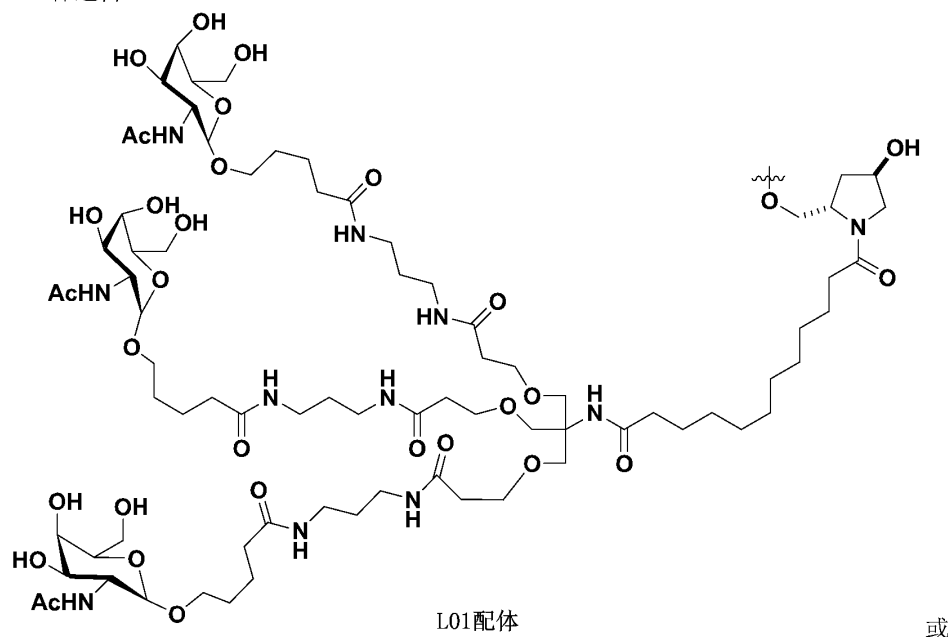
苷酸时，所述作为突出端的额外序列选自 uu 或 dTdT；或者当所述突出端为 2 个核苷酸时，所述作为突出端的额外序列选自未修饰或经修饰的 GA。

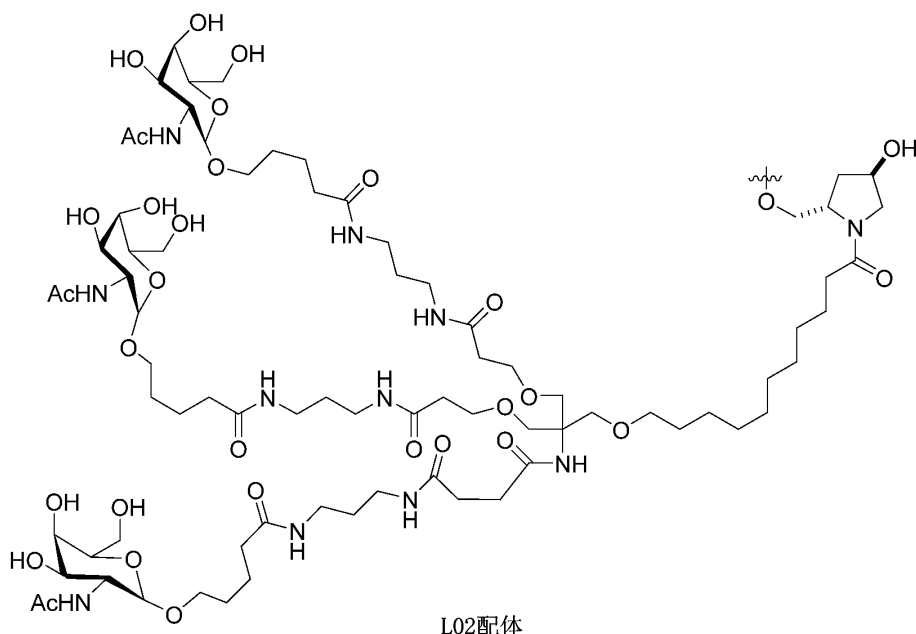
7. 根据权利要求 4 至 6 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述作为突出端的额外序列与其相邻的核苷酸通过磷酸酯基或硫代磷酸酯基连接；或者，所述作为突出端的额外序列中的一个或多个核苷酸之间通过磷酸酯基或硫代磷酸酯基连接。
8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述正义链的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个或 23 个核苷酸是经修饰的，或者前述任意值形成的范围内的核苷酸是经修饰的；或者所述正义链的 1 个以上、2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上、6 个以上、7 个以上、8 个以上、9 个以上、10 个以上、11 个以上、12 个以上、13 个以上、14 个以上、15 个以上、16 个以上、17 个以上、18 个以上、19 个以上、20 个以上、21 个以上、22 个以上或 23 个以上核苷酸是经修饰的；或者，所述正义链的所有核苷酸是经修饰的；和/或所述反义链的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个、23 个、24 个或 25 个核苷酸是经修饰的，或者前述任意值形成的范围内的核苷酸是经修饰的；或者所述反义链的 1 个以上、2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上、6 个以上、7 个以上、8 个以上、9 个以上、10 个以上、11 个以上、12 个以上、13 个以上、14 个以上、15 个以上、16 个以上、17 个以上、18 个以上、19 个以上、20 个以上、21 个以上、22 个以上、23 个以上、24 个以上或 25 个以上核苷酸是经修饰的；或者，所述反义链的所有核苷酸是经修饰的。
9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述修饰选自核苷酸的糖基修饰、碱基的修饰、核苷酸间的连接键修饰或末端修饰。
10. 根据权利要求 8 所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述核苷酸的糖基修饰选自 2'-脱羟基化、2'-氟代、2'-氨基、2'-烷基、2'-O-烷基、2'-O-醚基、2'-O-烯基；或者，所述核苷酸的糖基修饰选自 2'-脱羟基化、2'-氟代、2'-氨基、2'-甲基、2'-乙基、2'-甲基-O-甲基、2'-乙基-O-甲基、2'-O-甲基、2'-O-乙基、2'-O-乙基-O-甲基或 2'-O-烯丙基；所述核苷酸间的连接键修饰选自硫代磷酸酯 (PS)、二硫代磷酸酯 (PS₂)、甲基磷酸酯 (MP)、甲氧基丙基磷酸酯 (MOP) 或氨基磷酸酯；或者，所述核苷酸间的连接键修饰选自硫代磷酸酯 (PS)；和/或所述末端修饰选自 5'-末端修饰或 3'-末端修饰；或者，所述末端修饰选自 5'-磷酸酯、5'-甲基磷酸酯 (5'-MP)、5'-硫代磷酸酯 (5'-PS) 或 5'-(E)-乙基磷酸酯 (5'-(E)-VP)。
11. 根据权利要求 1 至 10 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述正义链的第 1、2 位核苷酸之间和/或正义链的第 2、3 位核苷酸之间采用硫代磷酸酯基修饰；和/或，所述反义链的第 1、2 位核苷酸之间、反义链的第 2、3 位核苷酸之间、反义链 3'端的第 1、2 位核苷酸之间和/或反义链的第 2、3 位核苷酸之间采用硫代磷酸酯基修饰。
12. 根据权利要求 1 至 11 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述正义链有 2、3、4 或 5 个核苷酸采用 2'-氟代修饰，所述正义链有 14、15、16、17、18 或 19 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰；和/或；所述反义链有 2、3、4、5、6 或 7 个核苷酸采用 2'-氟代修饰，所述反义链有 14、15、16、17、18、19、20 或 21 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。
13. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述正义链的第 1 至 6 位或第 1 至 8 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸采用 2'-氟代修饰，所述正义链的第 1 至 6 位或第 1 至 8 位核苷酸中有 4 个、5 个、6 个、7 个或 8 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰，所述正义链的第 7 至 9 位或第 9 至 11 位核苷酸中有 2 个或 3 个核苷酸采用 2'-氟代修饰，所述正义链的第 7 至 9 位或第 9 至 11 位核苷酸中有 0 个或 1 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰，所述正义链的第 10 至 19 位或第 12 至 21 位核苷酸中有 0 个或 1 个核苷酸采用 2'-氟代修饰，所述正义链的第 10 至 19 位或第 12 至 21 位核苷酸中有 8 个、9 个、10 个、11 个或 12 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰；或者所述正义链的第 7、8 和 9 位核苷酸采用 2'-氟代修饰，并且所述正义链的第 1 至 6 和/或 10 至 19 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸也采用 2'-氟代修饰；或者所述正义链的第 9、10 和 11 位核苷酸采用 2'-氟代修饰，并且所述正义链的第 1 至 8 和/或 12 至 21 位核苷酸中有 0 个、1 个或 2 个核苷酸也采用 2'-氟代修饰。
14. 根据权利要求 1 至 13 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述反义链的第 2、6、14、16 位核苷酸中有 3 个或 4 个核苷酸采用 2'-氟代修饰；或者反义链的第 2、6、8、9、14、16 位核苷酸中有 3 个、4 个、5 个或 6 个核苷酸采用 2'-氟代修饰；或者反义链的第 2、6、14 和 16 位核苷酸采用 2'-氟代修饰，并且所述反义链的第 1、3 至 5、7 至 13、15、17 至 21 和/或 17 至

- 23 位核苷酸中任意一个或两个也采用 2'-氟代修饰；或者反义链的第 1、3 至 5、7 至 13、15、17 至 21 位、和/或 17 至 23 核苷酸中有 14、15、16、17、18 或 19 个核苷酸采用 2'-O-甲基修饰。
15. 根据权利要求 1 至 14 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述配体含有至少一个靶向基团；或者所述配体含有一个、二个、三个、四个或五个靶向基团。
16. 根据权利要求 15 所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述靶向基团为 GalNAc 基团。
17. 根据权利要求 1 至 16 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述配体包括如下分支基团：



18. 根据权利要求 1 至 16 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述配体选自：





19. 根据权利要求1至18任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述配体与正义链或反义链的5'或3'末端连接；或者，所述配体与正义链的5'或3'末端连接；或者，所述配体与正义链的3'末端连接。
20. 根据权利要求1至19任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述双链核糖核酸包含如下正义链中的任一者：SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 51或SEQ ID NO: 55；并且
所述双链核糖核酸包含如下反义链中的任一者：SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 52或SEQ ID NO: 56。
21. 根据权利要求1至20任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中，所述双链核糖核酸包含如下正义链和反义链的序列对：SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13/SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15/SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17/SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21/SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31/SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 33/SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35/SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37/SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39/SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41/SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43/SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45/SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47/SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49/SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51/SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 55/SEQ ID NO: 56。
22. 根据权利要求1至20任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物，其中：
 - a) 所述正义链包括5'-asgscaauauGfAfCfaauugaugaL01-3' (SEQ ID NO:31)，所述反义链包括5'-usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc-3' (SEQ ID NO:32)；
 - b) 所述正义链包括5'-asgscaauauGfAfCfaauugaugaL02-3' (SEQ ID NO:31)，所述反义链包括5'-usCfsauuCfaauugucAfuAfuugcusasc-3' (SEQ ID NO:32)；
 - c) 所述正义链包括5'-asusuuacugUfCfAfcgguucccaaL01-3' (SEQ ID NO:33)，所述反义链包括5'-usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaauasgsc-3' (SEQ ID NO:34)；
 - d) 所述正义链包括5'-asusuuacugUfCfAfcgguucccaaL02-3' (SEQ ID NO:33)，所述反义链包括5'-usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaauasgsc-3' (SEQ ID NO:34)；

- e) 所述正义链包括 5'-csusauuuAfUfUfuugagucuguL01-3' (SEQ ID NO:35), 所述反义链包括 5'-asCfsagaCfucaaaauAfaAfuagsgsa-3' (SEQ ID NO:36);
- f) 所述正义链包括 5'-csusauuuAfUfUfuugagucuguL02-3' (SEQ ID NO:35), 所述反义链包括 5'-asCfsagaCfucaaaauAfaAfuagsgsa-3' (SEQ ID NO:36);
- g) 所述正义链包括 5'-usgsaagauaUfAfUfuguaguagauL01-3' (SEQ ID NO:37), 所述反义链包括 5'-asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa-3' (SEQ ID NO:38);
- h) 所述正义链包括 5'-usgsaagauaUfAfUfuguaguagauL02-3' (SEQ ID NO:37), 所述反义链包括 5'-asUfscuaCfuacaauaUfaUfcuucasasa-3' (SEQ ID NO:38);
- i) 所述正义链包括 5'-ususgucucaUfGfUfuucaucguuaL01-3' (SEQ ID NO:39), 所述反义链包括 5'-usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa-3' (SEQ ID NO:40);
- j) 所述正义链包括 5'-ususgucucaUfGfUfuucaucguuaL02-3' (SEQ ID NO:39), 所述反义链包括 5'-usUfsacgAfugaaacaUfgAfgacaasasa-3' (SEQ ID NO:40);
- k) 所述正义链包括 5'-csusgucagUfAfUfcuguuccauuL01-3' (SEQ ID NO:41), 所述反义链包括 5'-asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc-3' (SEQ ID NO:42);
- l) 所述正义链包括 5'-csusgucagUfAfUfcuguuccauuL02-3' (SEQ ID NO:41), 所述反义链包括 5'-asAfsuggAfacagauaCfuGfcacagsasc-3' (SEQ ID NO:42);
- m) 所述正义链包括 5'-asasugaaagGfAfCfucacuugguaL01-3' (SEQ ID NO:43), 所述反义链包括 5'-usAfsccaAfgugagucCfuUfucuuusug-3' (SEQ ID NO:44);
- n) 所述正义链包括 5'-asasugaaagGfAfCfucacuugguaL02-3' (SEQ ID NO:43), 所述反义链包括 5'-usAfsccaAfgugagucCfuUfucuuusug-3' (SEQ ID NO:44);
- o) 所述正义链包括 5'-gscsugcaugAfUfCfagcuaugguaL01-3' (SEQ ID NO:45), 所述反义链包括 5'-usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg-3' (SEQ ID NO:46);
- p) 所述正义链包括 5'-gscsugcaugAfUfCfagcuaugguaL02-3' (SEQ ID NO:45), 所述反义链包括 5'-usAfsccaUfagcugauCfaUfgcagcsgsg-3' (SEQ ID NO:46);
- q) 所述正义链包括 5'-gsgsugcuugGfUfCfuccucuaauaL01-3' (SEQ ID NO:47), 所述反义链包括 5'-usUfsauaGfaggagacCfaAfgcaccsusu-3' (SEQ ID NO:48);
- r) 所述正义链包括 5'-gsgsugcuugGfUfCfuccucuaauaL02-3' (SEQ ID NO:47), 所述反义链包括 5'-usUfsauaGfaggagacCfaAfgcaccsusu-3' (SEQ ID NO:48);
- s) 所述正义链包括 5'-asusuggucaUfCfCfcagaacuacaL01-3' (SEQ ID NO:49), 所述反义链包括 5'-usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc-3' (SEQ ID NO:50);
- t) 所述正义链包括 5'-asusuggucaUfCfCfcagaacuacaL02-3' (SEQ ID NO:49), 所述反义链包括 5'-usGfsuagUfucugggaUfgAfccaaususc-3' (SEQ ID NO:50);
- u) 所述正义链包括 5'-usasuuuaUfUfUfugagucugugL01-3' (SEQ ID NO:51), 所述反义链包括 5'-csAfsagAfcuaaaaUfaAfauasgsg-3' (SEQ ID NO:52);
- v) 所述正义链包括 5'-usasuuuaUfUfUfugagucugugL02-3' (SEQ ID NO:51), 所述反义链包括 5'-csAfsagAfcuaaaaUfaAfauasgsg-3' (SEQ ID NO:52);
- w) 所述正义链包括 5'-asusuuacugUfCfAfcgguuccaaL01-3' (SEQ ID NO:55), 所述反义链包括 5'-usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaaugsasc-3' (SEQ ID NO:56);
- x) 所述正义链包括 5'-asusuuacugUfCfAfcgguuccaaL02-3' (SEQ ID NO:55), 所述反义链包括 5'-usUfsgggAfaccgugaCfaGfuaaugsasc-3' (SEQ ID NO:56)。
23. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求 1-22 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物, 任选地包括药学上可接受的载体或赋形剂。
24. 权利要求 1-22 任一项所述的双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物或权利要求 23 所述的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。
25. 根据权利要求 24 所述的用途, 其中, 所述双链核糖核酸、其药学上可接受的盐或其配体缀合物、或药物组合物与其他治疗剂共同使用。