

提升双链寡核苷酸靶基因抑制效果的修饰模板及其组合与应用

本申请要求申请日为 2023/11/6 的中国专利申请 2023114633757 的优先权、申请日为 2024/9/26 的中国专利申请 2024113570897 的优先权以及申请日为 2024/7/8 的中国专利申请 2024109094050。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本公开属于核酸修饰技术领域，具体地，涉及提升双链寡核苷酸靶基因抑制效果的修饰模板及其组合与应用。

背景技术

寡核苷酸药物尤其是寡核苷酸药物，由于其基于中心法则作用于蛋白质表达的上游，按照 Watson-Crick 碱基互补配对原则结合致病蛋白表达相关的 mRNA，其具有高度的特异性和较强的靶标调控能力而得到广泛应用。寡核苷酸药物通常包括反义寡核苷酸（ASO）、小干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（miRNA）和核酸适配体等。

寡核苷酸是一类短的 DNA 或 RNA 分子、寡聚体，寡核苷酸很容易以序列特异性的方式与它们各自的互补寡核苷酸、DNA 或 RNA 结合，形成双链体，或者更不常见的是更高阶的杂合体。这种基本特性使得寡核苷酸在基因检测、研究和医药学中具有广泛的应用。在自然界中，寡核苷酸通常是在基因表达调节中起作用的小 RNA 分子，或者是源自较大核酸分子降解的中间体。

RNA 干扰（RNAi）是一种针对外源基因自然防御机制。siRNA 能够通过对特定序列的识别并分解目标 mRNA 的方式敲除目标基因。

经典 RNAi 的有效分子由标志性的 19 + 2 核苷酸聚合结构组成（一个由 21 个核苷酸 RNA 分子与 19 个对应碱基的核苷酸分子组成的双螺旋结构，包含有 2 个核苷酸的 3'端悬垂）。siRNA 的一条链（导引链或反义链）与目标基因的转录物 mRNA 互补，另一条链标定为乘客链（正义链）。siRNA（反义链）引导阿尔古蛋白（AGO2）与目标转录本互补，并成为 RNA 引导沉默复合体（RISC）的一部分。siRNA（反义链）与目标的完全互补导致在 AGO2 蛋白的催化下导引链（反义链）10-11 点位对面位置的目标转录本发生断裂。

siRNA 与小分子和抗体药物相比具有天然的优势，因为 siRNA 通过对 mRNA 完成 Watson-Crick 碱基配对以执行其功能，而小分子和单克隆抗体药物需要识别特定蛋白质复杂的空间结构。因此，很多疾病由于其目标分子具有高活性，并无法识别与其具有亲和力与结合特异性的分子结构，因无法通过小分子及单克隆抗体治疗。siRNA 药物的作用机制使其可从基因层面对靶标蛋白的表达进行调控，相比于小分子或抗体药，具有靶向特异性。其基于碱基互补配对原则的机理，也使得 siRNA 的治疗范围更宽、设计更加简单、研发周期更短。

寡核苷酸可序列特异性地与互补的 RNA 链结合，杂交后能够诱导 RNase H 裂解靶 RNA。天然的寡核苷酸中核苷酸由磷酸二酯键连接，在生理条件下，它们对核酸酶特别敏感，因此天然的、未经结构改造的、未经修饰的寡核苷酸药物，在体内容易被核酸酶快速降解，活性较低，成药性较差。对寡核苷酸结构进行化

学修饰是提高其活性的一种有效方式，可以提高其对核酸酶的稳定性、与 RNA 的亲性和，并能更好地促进细胞内吞和组织靶向，从而有效调控目的基因的表达。

依据寡核苷酸的基本结构碱基、糖环和磷酸骨架，可以分三个部分进行化学修饰：

1) 碱基的修饰：主要分为嘌呤修饰、嘧啶修饰以及碱基替换三种形式。嘌呤修饰包括 N6-甲基腺苷、N1-甲基腺苷、7-甲基鸟苷酸修饰；嘧啶修饰包括 3-甲基尿嘧啶核苷、5-甲基尿嘧啶核苷、5-甲基胞嘧啶核苷、N4-乙酰胞苷、假尿苷、硫尿核苷、丙炔尿嘧啶核苷以及二氢尿嘧啶核苷等修饰。

2) 糖环的修饰：主要分为糖环的修饰和替换。糖环的修饰包括 2'-修饰、4'-修饰、5'-修饰、异构修饰，以及这些修饰的组合。寡核苷酸中最为常见的是 2'-氟代修饰、2'-烷氧代(如 2'-O-甲氧基乙基（即 2'-MOE），2'-甲氧基）修饰、2,4'-LNA（2,4'-锁核苷酸）修饰、2,4'-cEt（2,4'-限制性乙基）修饰等。相比天然的寡核苷酸，修饰后的寡核苷酸具有更高的 Tm 值、更强的血清稳定性和更好的活性。

3) 磷酸骨架的修饰：主要为硫代磷酸酯的修饰；经甲基磷酸酯、硒代磷酸酯、甲硼基磷酸酯、双硫代磷酸酯，以及用硫原子取代磷酸二酯键连接区的桥氧原子修饰；将核苷之间的磷酸酯基整个替换为不含磷原子的基团，如将 P 原子替换成 C 原子、S 原子和/或 N 原子，形成胍基、S-甲基硫脲等。

4) 末端修饰：在正义链的 5'端或/和 3'端的末端共价缀合特殊的基团以及反义链 5'端磷酸化修饰。

上市的寡核苷酸药物，都是经过化学修饰的。从 1998 年第一个寡核苷酸药物 Fomivirsen(Vitravene)获批上市至今，寡核苷酸药物的化学修饰改造技术不断升级。迄今为止，全球已有 22 个寡核苷酸药物获批上市：

表1 全球已获批上市寡核苷酸药物

序号	通用名 (商品名)	公司	分类	适应症	批准 日期
1	Fomivirsen (Vitravene)	Ionis/Novartis	反义寡核苷酸	巨细胞病毒（CMV） 视网膜炎	1998- 08-01
2	Pegaptanib (Macugen)	NeXstar/Eyetech	核酸适配体	新生血管性年龄相关 性黄斑变性	2004- 12-01
3	Mipomersen (Kynamro)	Ionis/Genzyme/Kastle	反义寡核苷酸	纯合子家族性高胆固醇 血症	2013- 01-01
4	Defibrotide (Defitelio)	Jazz	寡核苷酸混合物	肝静脉闭塞病	2016- 03-01
5	Eteplirsen (Exondys 51)	Sarepta	反义寡核苷酸	杜氏肌营养不良症	2016- 09-01
6	Nusinersen (Spinraza)	Ionis/Biogen	反义寡核苷酸	脊髓性肌萎缩症	2016- 12-01
7	Patisiran (Onpattro)	Alnylam	siRNA	遗传性甲状腺素转运 蛋白淀粉样变性，多 发性神经病	2018- 08-01
8	Inotersen (Tegsedi)	Ionis/Akcea	反义寡核苷酸	遗传性甲状腺素转运 蛋白淀粉样变性，多 发性神经病	2018- 10-01
9	Volanesorsen (Waylivra)	Ionis	反义寡核苷酸	家族性乳糜微粒血症 综合征（FCS）	2019- 05-03
10	Givosiran (Givlaari)	Alnylam	siRNA	肝卟啉症	2019- 11-01
11	Golodirsen (Vyondys 53)	Sarepta	反义寡核苷酸	杜氏肌营养不良症	2019- 12-01

12	Viltolarsen (Viltepso)	Nippon Shinyaku	反义寡核苷酸	假肥大性肌营养不良	2020-03-25
13	Lumasiran (Oxlumo)	Alnylam Pharmaceuticals, Dicerna Pharmaceuticals (Novo Nordisk)	siRNA	高草酸尿症	2020-11-24
14	Casimersen (Amondys 45)	Sarepta Therapeutics, University of Western Australia	反义寡核苷酸	假肥大性肌营养不良	2021-02-25
15	Inclisiran (Leqvio)	Alnylam Pharmaceuticals, The Medicines Company(Novartis)	siRNA	动脉粥样硬化, 高胆固醇血症, 混合型高脂血症	2021-12-22
16	vutrisiran (Amvuttra)	Alnylam	siRNA	淀粉样变性多发性神经病变	2022-06-13
17	Tofersen (Qalsody)	Biogen	反义寡核苷酸	肌萎缩侧索硬化症 (ALS)	2023-04-25
18	Avacincaptad Pegol (Izervay)	Iveric Bio	核酸适配体	继发于年龄相关性黄斑变性(AMD)的地理萎缩(GA)	2023-08-04
19	Nedosiran (Rivfloza)	Dicerna Pharmaceuticals, Inc.	siRNA	原发性高草酸尿症	2023-09-29
20	Eplontersen (Wainua)	Ionis Pharmaceuticals/ AstraZeneca	ASO	成人遗传性转甲状腺素蛋白 (TTR) 介导的淀粉样变性的多发性神经病 (ATTRv-PN)	2023-12-21
21	诺西那生	Generium	ASO	脊髓性肌萎缩症	2024-05-14
22	Olezarsen	Akcea Therapeutics(Ionis Pharmaceuticals);Theratechnologies	ASO	家族性高乳糜微粒血症	2024-12-19

本领域需要对寡核苷酸药物的化学修饰改造技术进行进一步改进，以使得寡核苷酸药物药物的效果进一步提高。

发明内容

本公开基于包括单链寡核苷酸、siRNA 双链体在内的小核酸分子基础序列，对这些基础序列进行不同修饰模式(modification pattern)的修饰，从而制备出相应的修饰物。基于此，本公开提供了提升双链寡核苷酸靶基因抑制效果的修饰模板及其组合与应用。

本公开通过以下技术方案解决上述技术问题。

本公开一方面提供了一种提升双链寡核苷酸靶基因抑制效果的修饰模板，所述双链寡核苷酸是 siRNA，所述双链寡核苷酸含有正义链和反义链，所述正义链和反义链的每一个核苷酸均为修饰的核苷酸，其中，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分反向互补形成双链区；所述反向互补双链区的长度为 17~21 bp；

按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 2 的第 2-6 位核苷酸中至少 2 个核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 14 和/或 16 的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位、第 2 位和倒数第 2、3 位具有硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，所述核苷酸序列 2 的第 2-6 位核苷酸中至少 2 个核苷酸选自以下组合中的一种：

- (1) 第 2 和 6 位核苷酸；
- (2) 第 2、3、4 和 6 位核苷酸；
- (3) 第 2、4、5 和 6 位核苷酸；
- (4) 第 2、5 和 6 位核苷酸；
- (5) 第 2、3、5 和 6 位核苷酸；
- (6) 第 2、3 和 6 位核苷酸。

在本公开一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 采用以下方式进行修饰：

(1) 第 6 和 16 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 8-10 位核苷酸中至少 2 个核苷酸，优选第 8-10 位或第 8 和 10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位和第 2 位具有硫代磷酸骨架；或

(2) 第 7 和 17 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 9-11 位核苷酸中至少 2 个核苷酸，优选第 9-11 位或第 9 和 11 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位和第 2 位具有硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，所述核苷酸序列 1 的长度为 21 个或 20 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 23 个或 22 个。

在本公开一些实施方案中，所述核苷酸序列 1 的长度为 20 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 22 个；或者，所述核苷酸序列 1 的长度为 21 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 23 个。

在本公开一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述反义链中的核苷酸采用以下方式 A、B、C、D、E、F 和 G 中任一方式进行修饰：

A：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

B：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、4、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

C：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、4、5、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

D：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

E：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、

21、22 位具有硫代磷酸骨架；

F：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；G：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

H：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

和/或，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述正义链中的核苷酸采用以下方式 a~d 中任一方式进行修饰：

a：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、12、13、14、15、16、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10、11、17 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

b：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、10、12、13、14、15、16、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、11、17 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

c：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10、11 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

d：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述反义链中的核苷酸采用以下方式 A'、B'、C'、D'、E'、F'和 G'中任一方式进行修饰：

A'：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

B'：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、4、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

C'：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、4、5、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

D'：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、

21 位具有硫代磷酸骨架；

E': 表示所述反义链的 5'末端起始, 第 1、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 2、3、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

F': 表示所述反义链的 5'末端起始, 第 1、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 2、3、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

G': 表示所述反义链的 5'末端起始, 第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 2、6、14 位为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

和/或, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述正义链中的核苷酸采用以下方式 a'、b'、c'和 d'中任一方式进行修饰：

a': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、11、12、13、14、15、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 6、8、9、10、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

b': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、9、11、12、13、14、15、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 6、8、10、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

c': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 6、8、9、10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

d': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 6、8、9 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述双链寡核苷酸采用以下组合方式(i)-(x)中任一方式进行修饰：

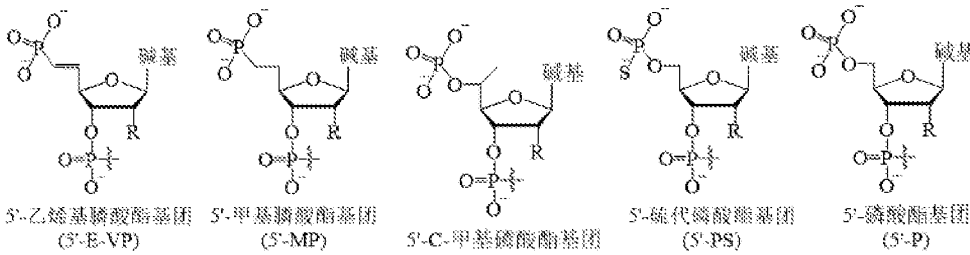
- (i) 所述反义链采用方式 A 进行修饰, 且所述正义链采用方式 a 进行修饰；
- (ii) 所述反义链采用方式 B 进行修饰, 且所述正义链采用方式 a 进行修饰；
- (iii) 所述反义链采用方式 C 进行修饰, 且所述正义链采用方式 a 进行修饰；
- (iv) 所述反义链采用方式 B 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰；
- (v) 所述反义链采用方式 C 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰；
- (vi) 所述反义链采用方式 G 进行修饰, 且所述正义链采用方式 c 进行修饰；
- (vii) 所述反义链采用方式 A 进行修饰, 且所述正义链采用方式 d 进行修饰；
- (viii) 所述反义链采用方式 D 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰；
- (ix) 所述反义链采用方式 E 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰；

(x)所述反义链采用方式F进行修饰，且所述正义链采用方式b进行修饰。

在本公开一些实施方案中，按照5'末端到3'末端的方向，所述双链寡核苷酸采用以下组合方式(1)-(8)中任一方式进行修饰：

- (1) 所述反义链采用方式A'进行修饰，且所述正义链采用方式a'进行修饰；
- (2) 所述反义链采用方式B'进行修饰，且所述正义链采用修饰方式a'进行修饰；
- (3) 所述反义链采用方式C'进行修饰，且所述正义链采用修饰方式a'进行修饰；
- (4) 所述反义链采用方式B'进行修饰，且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰；
- (5) 所述反义链采用方式C'进行修饰，且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰；
- (6) 所述反义链采用方式D'进行修饰，且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰；
- (7) 所述反义链采用方式E'进行修饰，且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰；
- (8) 所述反义链采用方式F'进行修饰，且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰。

在本公开一些实施方案中，所述反义链的5'末端起始第1位核苷酸为5'-磷酸核苷酸或5'-磷酸类似物修饰的核苷酸，其包括但不限于以下5'位磷酸化基团：5'-乙烯基磷酸酯基团(5'-E-VP)；5'-甲基磷酸酯基团(5'-MP)；5'-C-甲基磷酸酯基团；5'-硫代磷酸酯基团(5'-PS)；5'-磷酸酯基团(5'-P)，其结构示意图如下：

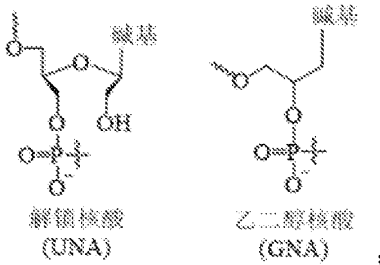


其中，R为氢、羟基、胺基、C₁₋₄烷基、芳香基、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄烷基羰基氨基或卤素；

碱基选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶。

在本公开一些实施方案中，所述反义链的5'末端起始第1位核苷酸为5'-乙烯基-(E)-磷酸酯-2'-甲氧基修饰的核苷酸。

在本公开一些实施方案中，反义链自5'端起第2至第8位中的一个或多个核苷酸，优选第6和/或第7位采用修饰基团，其中所述修饰基团优选自UNA、GNA或DNA，其中UNA和GNA结构如下：



其中，碱基选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶中的一种或多种。

本发明的另一方面提供了一种双链寡核苷酸，所述双链寡核苷酸经如本公开所述的修饰模板修饰。

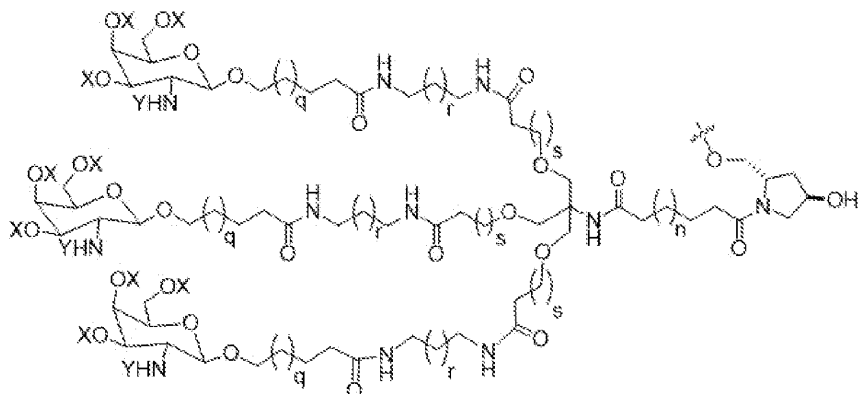
在本公开一些实施方案中，所述双链寡核苷酸靶向如下基因的 mRNA 中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因。

本公开的另一面提供了一种用于降低基因表达的缀合物，所述缀合物包括如本公开所述的双链寡核苷酸，及与其缀合的配体。

在本公开一些实施方案中，所述配体缀合在所述双链寡核苷酸的正义链的 3'-末端或 5'-末端。

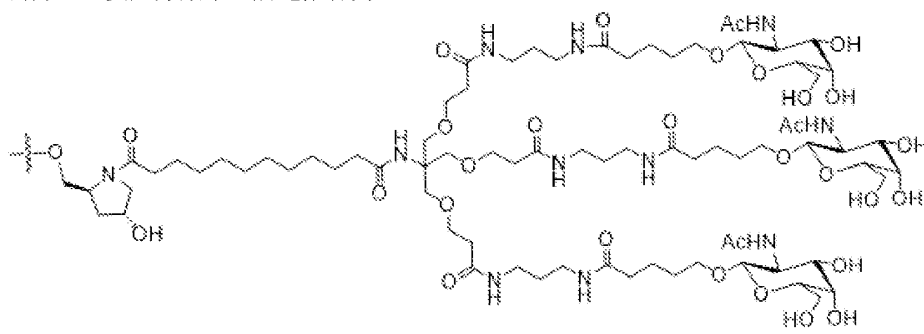
在本公开一些实施方案中，所述配体为一种或多种利用二价或三价的分支键联体附接的 GalNAc 衍生物。

在本公开一些实施方案中，所述配体为：

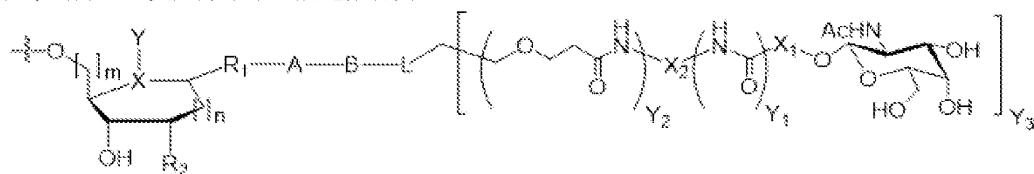


其中，X 为氢或一种羟基保护基或 H，所述羟基保护基包括乙酰基、苯甲酰基或异丁酰基；Y 是一种胺保护基或 H，所述胺保护基为甲酰基、乙酰基、丙酰基、正丁酰基或异丁酰基；n 是 0-20 之间的整数；q、r 和 s 独立地是 1-7 之间的整数。

在本公开一些实施方案中，所述配体为：



在本公开一些实施方案中，所述配体为：



其中，X 为氧、氮或硫；

Y 为烷基或芳香基；

R₁ 为氧或硫；

R₂ 为氢、胺基、C₁₋₄ 烷基、芳香基、C₁₋₄ 烷氧基或卤素；

A 为-(CH₂)_a-、-(CH₂CH₂O)_b-、-((CH₂)_cNHCO)_d-或-((CH₂)_cCONH)_d-，其中，a 是 1-15 的整数，b 是 1-7 的整数，c 为 1-7 的整数，d 为 1-5 的整数；

B 为-(CH₂)_e-，其中 e 为 0-7 的整数；

L 为-CONH-或-NHCO-；

X₁ 为-(CH₂)_f-或-(CH₂CH₂O)_fCH₂-，f 是 1-5 的整数；

X₂ 为-(CH₂)_g-，g 是 1-6 的整数；

Y₁ 为 0 或 1；

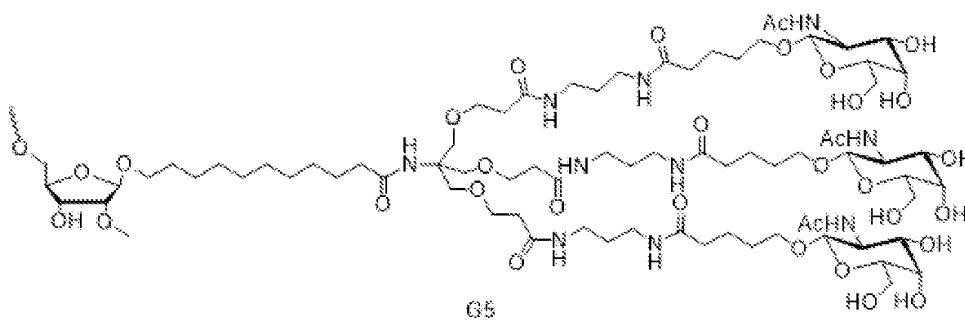
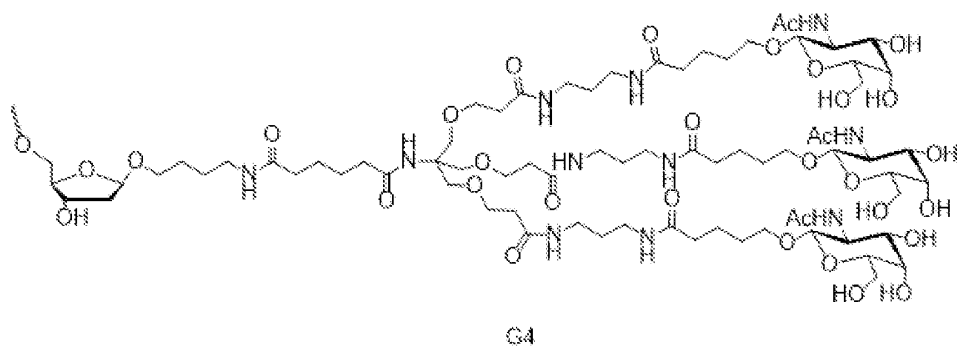
Y₂ 为 0、1 或 2；

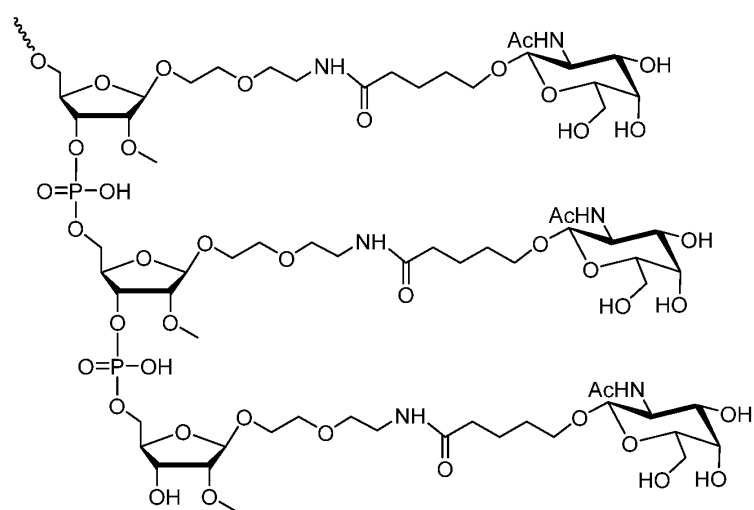
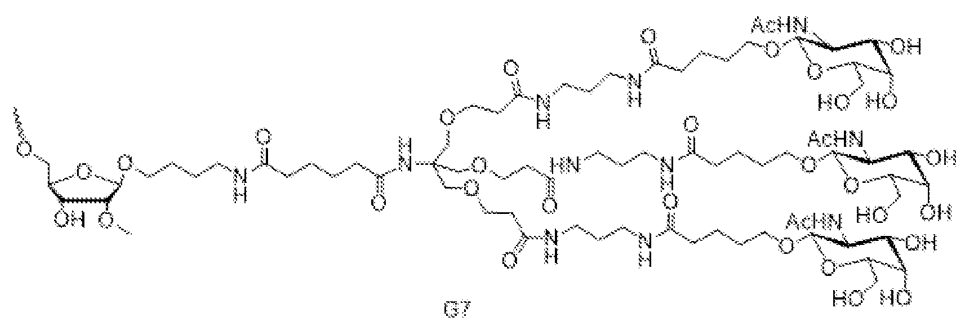
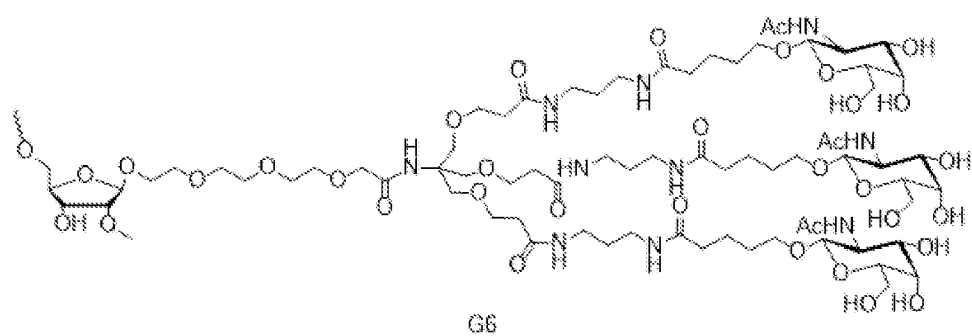
Y₃ 为 1、2 或 3；

m 为 0-4 的整数；

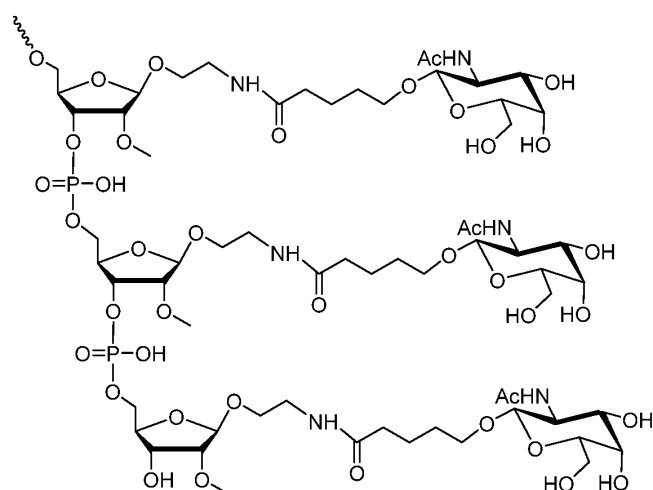
n 为 0-4 的整数。

在本公开一些实施方案中，所述配体为 G4、G5、G6、G7、G101、G102、G103、G105 或 G106：

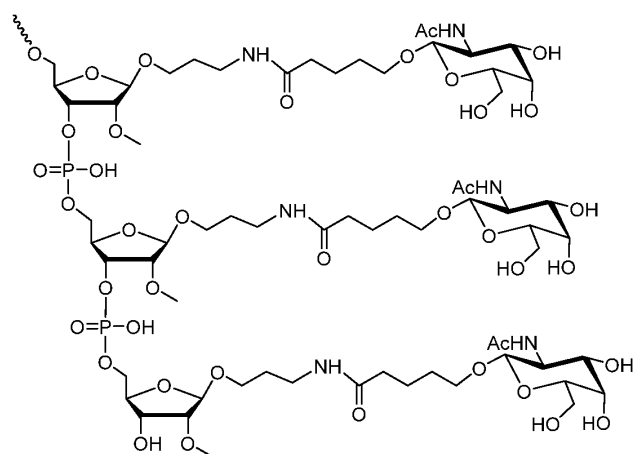




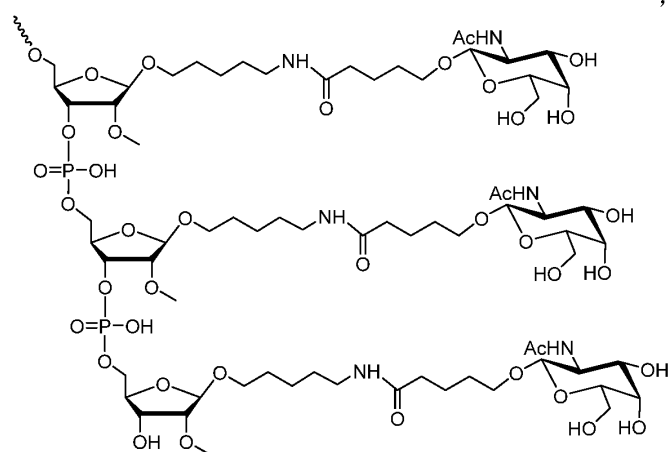
G101



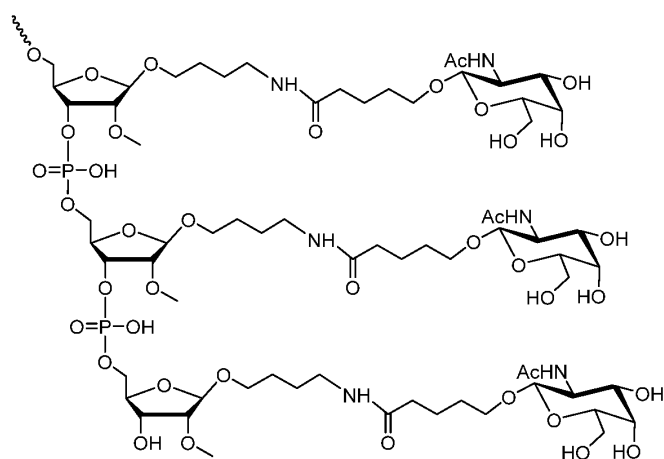
G102



G103



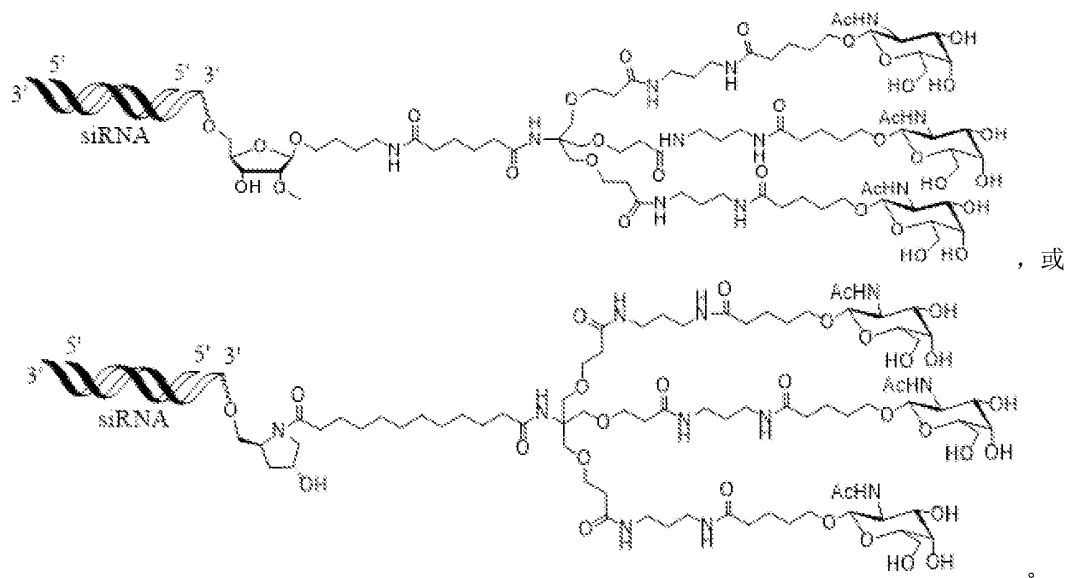
G105



G106

在本公开一些实施方案中，所述缀合物具有如下所示的结构：





在本公开一些实施方案中，所述双链寡核苷酸与配体 G4、G5、G6 或 G7 缀合。

在另一方面，本公开还提供了一种药物组合物，其包括如本公开双链寡核苷酸或如本公开所述的缀合物，以及药学上可接受的载体。

在本公开一些实施方案中，所述载体为水、盐水或缓冲溶液。

在本公开一些实施方案中，所述缓冲溶液中的缓冲剂包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐、Tris-盐酸或其任何组合；例如包括磷酸盐。

在另一方面，本公开还提供了如本公开所述的双链寡核苷酸、如本公开所述的缀合物或如本公开所述的药物组合物在制备调节或治疗疾病和病症的药物中的应用；所述药物通过所述双链寡核苷酸、所述缀合物或药物组合物下调基因表达达到调节或治疗疾病和病症的效果。

在本公开一些实施方案中，所述基因选自以下基因中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因。

在另一方面，本公开还提供了如本公开所述的双链寡核苷酸、如本公开所述的缀合物或所述的药物组合物，用于调节或治疗疾病和病症；所述双链寡核苷酸、所述缀合物或所述药物组合物过下调基因表达达到调节或治疗疾病和病症的效果。

本公开还提供了用于治疗或预防可通过下调基因表达进行调节或治疗疾病和病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的如本公开所述双链寡核苷酸、如本公开所述缀合物或如本公开所述药物组合物。

在本公开一些实施方案中，所述基因选自以下基因中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因。

在本公开一些实施方案中，所述疾病选自慢性乙型肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌，急性乙型肝炎，以及 HBV/丁型肝炎病毒合并感染相关疾病中的一种或多种。

在本公开一些实施方案中，所述疾病选自高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、高血压危症、高血压急迫状态、孤立性收缩期和舒张期高血压、妊娠相关的高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏高血压、高眼压症、青光眼、肺动脉

高压、门静脉高压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压；高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、库欣综合征和其他糖皮质激素过多状态(包括慢性类固醇治疗)、嗜铬细胞瘤、肾素瘤、继发性醛固酮增多症和其他盐皮质激素过多状态、睡眠呼吸暂停、甲状腺/甲状旁腺疾病、心力衰竭、心肌梗死、心绞痛、中风、糖尿病、肾病、肾衰竭、系统性硬化、宫内发育迟缓(IUGR)和胎儿生长受限。

在本公开一些实施方案中，所述疾病选自高胆固醇血症、动脉粥样硬化、血脂异常和心脑血管疾病中的一种。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：

(1) 采用多重修饰序列，抑制率最高可达 90%以上。并且，修饰序列与 GalNAc 化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并显著抑制靶基因表达，显著降低血压水平。

(2) 采用本公开修饰模板修饰的各序列，同现有技术公开的序列差异很小的无修饰序列相比，对靶基因抑制活性均显著提升，最多可提高 91.0%。

附图说明

为了更清楚地说明本公开实施例的技术方案，下面将对实施例的附图作简单介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅涉及本公开的一些实施例，而非对本公开的限制。

图 1 显示对 PCSK9 基因具有显著抑制作用的交替修饰序列，这些序列的抑制率均高于 50%。

图 2 显示对 PCSK9 基因抑制率在 30%-50%之间的交替修饰序列。

图 3 显示对 PCSK9 基因抑制率低于 30%的交替修饰序列。

图 4 显示对 PCSK9 基因抑制率低于 30%的交替修饰序列。

图 5 显示对 PCSK9 基因具有显著抑制作用的无修饰序列，这些序列的抑制率均高于 50%。

图 6 显示对 PCSK9 基因抑制率低于 40%的无修饰序列。

图 7 显示基础序列 5 采用不同模板修饰后对 PCSK9 基因的抑制率。

图 8 显示基础序列 5、51、81 和 84 采用模板修饰、防脱靶或/和 5'-E-VP 修饰序列对 PCSK9 基因的抑制率。

图 9 显示基础序列 5、51、81、82 和 84 采用不同修饰方案并与 GalNAc 化合物缀合后，对动物血清中 PCSK9 蛋白的抑制率。

图 10 显示基础序列 5、51、81、82 和 84 采用不同修饰方案并与 GalNAc 化合物缀合后，对动物血清中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 降低水平。

图 11 显示基础序列 5、51、81、82 和 84 采用不同修饰方案并与 GalNAc 化合物缀合后，对动物血清中总胆固醇 (TC) 降低水平。

图 12A 为候选 siRNA 序列 3 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠血清 HBsAg 水平。

图 12B 为候选 siRNA 序列 3 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠血清 HBV DNA 水平。

图 12C 为候选 siRNA 序列 3 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠血清 HBeAg 水平。

图 12D 为候选 siRNA 序列 3 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠血清 HBsAb 水平。

图 12E 为候选 siRNA 序列 3 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠血清 ALT 水平。

图 12F 为候选 siRNA 序列 3 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠体重变化。

图 13A 为二次攻毒后小鼠血清 HBsAg 水平。

图 13B 为二次攻毒后小鼠血清 HBV DNA 水平。

图 13C 为二次攻毒后小鼠血清 HBeAg 水平。

图 13D 为二次攻毒后小鼠血清 HBbAg 水平。

图 13E 为二次攻毒后小鼠血清 ALT 水平。

图 13F 为二次攻毒后小鼠体重变化。

图 14A 为候选 siRNA 序列 0.5 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠 HBsAg 水平。

图 14B 为候选 siRNA 序列 0.5 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠 HBV DNA 水平。

图 14C 为候选 siRNA 序列 0.5 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠 HBeAg 水平。

图 14D 为候选 siRNA 序列 0.5 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠 HBsAb 水平。

图 14E 为候选 siRNA 序列 0.5 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠 ALT 水平。

图 14F 为候选 siRNA 序列 0.5 mg/kg 水平下 AAV-HBV 模型小鼠体重变化。

图 15A 为偶联不同 GalNAc 的候选 siRNA 序列 AAV-HBV 模型小鼠 HBsAg 水平。

图 15B 为偶联不同 GalNAc 的候选 siRNA 序列 AAV-HBV 模型小鼠 HBV DNA 水平。

图 15C 为偶联不同 GalNAc 的候选 siRNA 序列 AAV-HBV 模型小鼠 HBeAg 水平。

图 15D 为偶联不同 GalNAc 的候选 siRNA 序列 AAV-HBV 模型小鼠 ALT 水平。

图 15E 为偶联不同 GalNAc 的候选 siRNA 序列 AAV-HBV 模型小鼠体重变化。

图 16 显示对 AGT 基因具有显著抑制作用的交替修饰序列，这些序列的抑制率均高于 40%。

图 17 显示对 AGT 基因抑制率在 25%-40%之间的交替修饰序列。

图 18 显示对 AGT 基因抑制率低于 25%的交替修饰序列。

图 19 显示对 AGT 基因具有显著抑制作用的无修饰序列，这些序列的抑制率均高于 45%。

图 20 显示对 AGT 基因抑制率低于 45%的无修饰序列。

图 21 显示无修饰序列 1579 采用不同模板修饰后对 AGT 基因的抑制率以及现有技术公开序列 579P 对 AGT 基因的抑制率。

图 22 显示无修饰序列 1578s 和 1835 采用模板修饰、防脱靶修饰序列对 AGT 基因的抑制率。

图 23 显示无修饰序列 1579、1789、1812、1576s、1578s、1585s 采用不同修饰方案并与 GalNAc 化合物缀合后，对动物血清中 AGT 蛋白的抑制率。

图 24 显示无修饰序列 1579、1789、1812、1576s、1578s、1585s 采用不同修饰方案并与 GalNAc 化合物缀合后，在不同时间点对动物血清中 AGT 蛋白的抑制率。

具体实施方式

为了使本公开可更容易理解，首先定义某些术语。此外，应该注意的是，每当一个值或一个参数的取值范围是列举的，其目的是表明这些引用值的中间值与范围也在成为本公开的部分。

如本文所用的冠词“一个”和“一种”（“a”和“an”）是指一个或超过一个（即，至少一个）该冠词的语法宾语。通过举例，“一个元素”是指一个元素或超过一个元素，例如多个元素。

术语“包括(including)”用在此处是指短语“包括但不限于”并且与之互换使用。

术语“或(or)”用在此处是指术语“和/或”并且与之互换使用，除非语境清楚的另外指明。

如本文所用，如应用于一种或多种目标值的术语“约”或“近似”是指与所述参考值类似的值。在某些实施方案中，除非另有说明或另外从上下文显而易见，否则术语“近似”或“约”是指落入所述参考值在任一方向(大于或小于)的 20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少内的值的范围(除非这种数字将超过可能值的 100%)。

如本文所用的，“PCSK9”是指前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 Kexin9 基因或蛋白。

如本文所用的，“HBV”是指乙型肝炎病毒，包括基因型为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 及其亚型的乙型肝炎病毒，而不局限于某一种基因型。

如本文所用的，“AGT”是指血管紧张素原基因或蛋白。

“G”、“C”、“A”以及“U”每一者通常分别代表包含鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤以及尿嘧啶作为碱基的核苷酸。“T”和“dT”在此可互换使用并且是指其中核碱基是胸腺嘧啶如脱氧核糖胸腺嘧啶（deoxyribothymine）、2'-脱氧胸苷或胸苷的脱氧核糖核苷酸。然而，应理解术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”或“脱氧核糖核苷酸”还可以指一种修饰的核苷酸（如以下进一步详述）或一种替代性的置换部分。技术人员应很好地意识到，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，而不限于此，包含肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸发生碱基配对。因此，包含尿嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤的核苷酸可以在本公开的核苷酸序列中被一种包含例如肌苷的核苷酸所置换。包含此类置换部分的序列适用于本公开的双链寡核苷酸、缀合物、药物组合物和方法。

术语“siRNA 双链体”、“siRNA”“双链寡核苷酸”“RNAi 剂”在此可互换使用它是一类双链 RNA 分子，在本领域中也称为短干扰 RNA 或沉默 RNA。siRNAs 通常包含正义链（也称为过客链）和反义链（也称为前导链），其中每条链的长度为 17 个至 30 个核苷酸，通常长度为 19 个至 25 个核苷酸，其中反义链与靶核酸互补（诸如至少 95%互补、诸如完全互补）（合适地是成熟的 mRNA 序列），并且正义链与反义链互补，使得正义链和反义链形成双链体或双链体区域。siRNA 链可形成平末端双链体，或者优选地，正义和反义链的 3'端可形成 3'突出端，例如 1 个、2 个或 3 个核苷酸，类似于 Dicer 生产的产物，可在体内形成 RISC 底物。Dicer 底物的有效扩展形式已在 US 8,349,809 和 US 8,513,207 中进行了描述，在此通过引用并入。在一些实施例中，正义链和/或反义链具有 2 个核苷酸的 3'突出端。因此，双链体区域的长度可以是例如 17 个至 25 个核苷酸，诸如长度为 21 个至 23 个核苷酸。在一些实施例中，siRNA 的每个核苷酸上均含有化学修饰。

术语“反义链”指 RNAi (例如 siRNA)的包括与靶序列实质上互补的区域的链。在本文中使用时，术语“互补性区域”指反义链上与本文定义的序列(例如靶序列)实质上互补的区域。当互补性区域与靶序列不完全互

补时，错配可以在分子的内部或末端区域。通常，最被容许的错配在末端区域，例如，在 5'和/或 3'末端的 5、4、3 或 2 个核苷酸内。

术语“正义链”在本文中使用时指 RNAi 的、包括与反义链(如该术语在本文中被定义的那样)的区域实质上互补的区域的链。

本文中的“基础序列”是指不包含修饰的核苷酸的单链寡核苷酸、siRNA 双链体等。在一些情况下，也指代反义寡核苷酸、siRNA 的相应核苷酸序列。在本文中，“反义寡核苷酸基础序列”、“无修饰的 ASO”、“ASO 基础序列”可互换使用；“siRNA 基础序列”、“无修饰的 siRNA”、“siRNA 双链体基础序列”可互换使用。

在本公开中，“其他降低 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达的药物”意指不包含本公开的 siRNA 和/或 siRNA 修饰物的药物。

本文所用的术语“降低”，可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“压制”、“抑制”和其他类似术语交替使用，并且包括任何水平的降低。

如本文所用的，短语“抑制 PCSK9 的表达”包括抑制任何 PCSK9 基因(如例如小鼠 PCSK9 基因、大鼠 PCSK9 基因、猴 PCSK9 基因、或人类 PCSK9 基因)以及 PCSK9 基因的变体(例如天然存在的变体)或突变体的表达。因此，该 PCSK9 基因可以是野生型 PCSK9 基因、突变 PCSK9 基因、或在遗传操作的细胞、细胞群组或生物体的情形下的转基因 PCSK9 基因。

“抑制 PCSK9 基因表达”包括任何水平的 PCSK9 基因的抑制，例如至少部分抑制 PCSK9 基因的表达，如抑制至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、或至少约 99%。

基于与 PCSK9 基因表达相关的任何变量水平，例如 PCSK9 mRNA 水平、PCSK9 蛋白水平、或血清脂质水平，可以评估 PCSK9 基因的表达。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。对照水平可以是本领域中利用的任何类型的对照水平，例如给药前基线水平或从类似的未经处理或经对照(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。

如本文所用的，“PCSK9 相关疾病”旨在包括任何与 PCSK9 基因或蛋白相关的疾病。这种疾病可以例如由 PCSK9 蛋白的过量产生、由 PCSK9 基因突变、由 PCSK9 蛋白的异常裂解、由 PCSK9 与其他蛋白质或其他内源或外源物质之间的异常相互作用引起。示例性 PCSK9 相关疾病包括脂血症，例如高脂血症、以及其他形式的脂质失衡，如高胆固醇血症、高甘油三酯血症以及与这些失调相关的病理情况，如心脏和循环系统疾病。

如本文所用的，短语“抑制 HBV 的基因表达”包括抑制 HBV DNA、HBV mRNA、HBsAg、HBeAg、乙型肝炎核心抗原(HBcAg)等的表达。

“抑制 HBV 抗原的表达”包括抑制 HBsAg、HBeAg、HBcAg 蛋白的表达。

“抑制 HBV 的基因表达”包括任何水平的 HBV DNA、HBV mRNA、HBsAg、HBeAg、HBcAg 的抑制，例如至少部分抑制 HBV DNA、HBV mRNA、HBsAg、HBeAg、HBcAg 的表达，如抑制至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至

少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、或至少约 99%。

基于与 HBV 基因表达相关的任何变量水平，例如 HBV DNA 水平、HBV mRNA 水平、HBV 抗原蛋白水平、HBV 病毒颗粒水平，可以评估 HBV 基因的表达。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。对照水平可以是本领域中利用的任何类型的对照水平，例如给药前基线水平或从类似的未经处理或经对照(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。

如本文所用的，“HBV 基因表达相关疾病”旨在包括任何与 HBV 基因或蛋白相关的疾病。这种疾病可以例如由 HBV 抗原蛋白的过量产生、由 HBV 基因突变、由 HBV 抗原蛋白的异常裂解、由 HBV 抗原蛋白与其他蛋白质或其他内源或外源物质之间的异常相互作用引起。示例性 HBV 相关疾病包括 HBV 感染相关的肝炎，例如慢性乙型肝炎，急性乙型肝炎，以及 HBV/丁型肝炎病毒 (HDV) 合并感染相关疾病。

短语“抑制 AGT 的表达”包括抑制任何 AGT 基因（例如小鼠 AGT 基因、大鼠 AGT 基因、猴 AGT 基因、或人类 AGT 基因）以及 AGT 基因的变体（例如天然存在的变体）或突变体的表达。因此，该 AGT 基因可以是野生型 AGT 基因、突变 AGT 基因、或在遗传操作的细胞、细胞群组或生物体的情形下的转基因 AGT 基因。

“抑制 AGT 基因表达”包括任何水平的 AGT 基因的抑制，例如至少部分抑制 AGT 基因的表达，如抑制至少约 5%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、或至少约 99%。

基于与 AGT 基因表达相关的任何变量水平，例如 AGT mRNA 水平或 AGT 蛋白水平，可以评估 AGT 基因的表达。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。对照水平可以是本领域中利用的任何类型的对照水平，例如给药前基线水平或从类似的未经处理或经对照(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。

如本文所用的，“AGT 相关疾病”旨在包括任何与 AGT 基因或蛋白相关的疾病。这种疾病可以例如由 AGT 蛋白的过量产生、由 AGT 基因突变、由 AGT 蛋白的异常裂解、由 AGT 与其他蛋白质或其他内源或外源物质之间的异常相互作用引起。示例性 AGT 相关疾病包括高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、高血压危症、高血压急迫状态、孤立性收缩期和舒张期高血压、妊娠相关的高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏高血压、高眼压症、青光眼、肺动脉高压、门静脉高压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压；高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、库欣综合征和其他糖皮质激素过多状态(包括慢性类固醇治疗)、嗜铬细胞瘤、肾素瘤、继发性醛固酮增多症和其他盐皮质激素过多状态、睡眠呼吸暂停、甲状腺/甲状旁腺疾病、心力衰竭、心肌梗死、心绞痛、中风、糖尿病、肾病、肾衰竭、系统

性硬化、宫内发育迟缓(IUGR)和胎儿生长受限。

如本文所用的,“患者”或“受试者”旨在包括人类或者非人类动物,优选哺乳动物,例如小鼠。最优选地,该受试者或患者是人。

如本文所用的,“治疗有效量”旨在包括当给予患者用于治疗一种 PCSK9/HBV 感染/AGT 相关疾病时足以实现该疾病的治疗(例如通过削弱、改善或维持该现有疾病或一种或多种疾病症状)的双链寡核苷酸的量。该“治疗有效量”可以取决于该双链寡核苷酸、该试剂如何给予、该疾病及其严重程度、和病史、年龄、体重、家族史、遗传组成、由 PCSK9 基因/HBV 基因/AGT 基因表达介导的病理过程的阶段、先前或伴随治疗(如果有的话)的类型、以及待治疗的患者的其他个体特征而变化。

如本文所用的,“预防有效量”旨在包括当给予尚未经历过或显示出一种 PCSK9 基因/HBV 基因/AGT 基因相关疾病的症状但可能易患该疾病的受试者时足以预防或改善该疾病或该疾病的一种或多种症状的双链寡核苷酸的量。改善疾病包括减缓疾病的进程或减少后发疾病的严重度。该“预防有效量”可以取决于该双链寡核苷酸、该试剂如何给予、该疾病的风险程度、和病史、年龄、体重、家族史、遗传组成、先前或伴随治疗(如果有的话)的类型、以及待治疗的患者的其他个体特征而变化。

“治疗有效量”或“预防有效量”还包括在适用于任何治疗的合理利益/风险比下产生某种所希望的局部或全身效应的双链寡核苷酸的量。本公开的方法中所用的双链寡核苷酸可以按足以产生适用于这样的治疗的合理利益/风险比的量给予。

如此处使用的,术语“样品”包括从受试者体内分离的类似的流体、细胞或组织,以及受试者体内存在的流体、细胞或组织的一个集合。生物流体的实例包括血液、血清和浆膜液、血浆、脑脊髓液、眼内液(ocular fluid)、淋巴液、尿液、唾液等。组织样品可包括来自组织、器官或局部区域的样品。例如样品可以源自特定器官、器官部分或这些器官内的流体或细胞。在某些实施例中,样品可源自肝脏(例如,整个肝脏或肝脏的一部分,或肝脏中的某些类型的细胞,例如,肝细胞)。在优选实施例中,“源自受试者的样品”是指从该受试者抽取的血液或血浆。在其他实施例中,“源自受试者的样品”是指源自该受试者的肝脏组织(或其亚成分)。

在一方面,本公开提供了一种提升双链寡核苷酸靶基因抑制效果的修饰模板,所述双链寡核苷酸是 siRNA,所述双链寡核苷酸含有正义链和反义链,所述正义链和反义链的每一个核苷酸均为修饰的核苷酸,其中,所述正义链包含核苷酸序列 1,所述反义链包含核苷酸序列 2,所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分反向互补形成双链区;所述反向互补双链区的长度为 17~21 bp。

在一些实施方案中,所述修饰的核苷酸选自以下构成的组中的任一者或两者以上的组合:脱氧-核苷酸、3'-末端脱氧-胸腺嘧啶核苷酸、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、解锁核苷酸、构型限制性核苷酸、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'-O-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、包含甲基磷酸酯基的核苷酸、包含 5'-磷酸酯的核苷酸、和包含 5'-磷酸酯模拟物的核苷酸。

在一些实施方案中,所述 siRNA 的长度为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述 siRNA 的长度为 10-30 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述 siRNA 的长度为 13-25 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述 siRNA 的长度为 13-20 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述核苷酸包含的修饰为核苷酸核糖的 2'位的化学修饰。

在一些实施方案中，所述核苷酸核糖的 2'位的化学修饰选自以下构成的组中的任一者或两者以上的组合：2'-甲氧基修饰、2'-O-甲氧基乙基修饰、2'-氟代修饰、2'-苄氧基修饰、2'-甲基羰基氨基修饰、2'-吡啶甲氧基修饰、2,4'-锁核苷酸修饰、和 2,4'-限制性乙基核苷酸修饰。

在一些实施方案中，所述核苷酸核糖的 2'位的化学修饰为 2,4'-锁核苷酸修饰。

在一些实施方案中，所述 siRNA 的部分核苷酸的所述核苷酸核糖的 2'位的化学修饰为 2,4'-限制性乙基核苷酸修饰。

在一些实施方案中，所述核苷酸之间以 3',5'-磷酸二酯键连接。

在一些实施方案中，所述 3',5'-磷酸二酯键包含硫代修饰。

在一些实施方案中，所述 3',5'-磷酸二酯键均包含硫代修饰，并形成手性纯的 3',5'-硫代磷酸二酯键。

在一些实施方案中，所述 siRNA 包含：双链区、3'突出末端和/或 5'突出末端。

在一些实施方案中，所述双链区由 6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个或 16 个连续核苷酸组成。

在一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 2 的第 2-6 位核苷酸中至少 2 个核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 14 和/或 16 的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位、第 2 位和倒数第 2、3 位具有硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，所述核苷酸序列 2 的第 2-6 位核苷酸中至少 2 个核苷酸选自以下组合中的一种：

- (1) 第 2 和 6 位核苷酸；
- (2) 第 2、3、4 和 6 位核苷酸；
- (3) 第 2、4、5 和 6 位核苷酸；
- (4) 第 2、5 和 6 位核苷酸；
- (5) 第 2、3、5 和 6 位核苷酸；
- (6) 第 2、3 和 6 位核苷酸。

在本公开一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 采用以下方式进行修饰：

(1) 第 6 和 16 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 8-10 位核苷酸中至少 2 个核苷酸，优选第 8-10 位或第 8 和 10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位和第 2 位具有硫代磷酸骨架；或

(2) 第 7 和 17 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 9-11 位核苷酸中至少 2 个核苷酸，优选第 9-11 位或第 9 和 11 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位和第 2 位具有硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，所述核苷酸序列 1 的长度为 21 个或 20 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 23

个或 22 个。

在本公开一些实施方案中，所述核苷酸序列 1 的长度为 20 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 22 个；或者，所述核苷酸序列 1 的长度为 21 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 23 个。

在本公开一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述反义链中的核苷酸采用以下方式 A、B、C、D、E、F 和 G 中任一方式进行修饰：

A：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

B：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、4、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

C：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、4、5、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

D：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

E：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

F：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

G：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

H：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

和/或，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述正义链中的核苷酸采用以下方式 a~d 中任一方式进行修饰：

a：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、12、13、14、15、16、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10、11、17 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

b：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、10、12、13、14、15、16、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、11、17 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具

有硫代磷酸骨架；

c: 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10、11 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

d: 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述反义链中的核苷酸采用以下方式 A'、B'、C'、D'、E'、F'和 G'中任一方式进行修饰：

A': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

B': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、4、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

C': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、4、5、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

D': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

E': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

F': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

G': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

和/或，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述正义链中的核苷酸采用以下方式 a'、b'、c'和 d'中任一方式进行修饰：

a': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、11、12、13、14、15、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 6、8、9、10、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

b': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、9、11、12、13、14、15、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 6、8、10、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架;

c': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 6、8、9、10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架;

d': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸, 且第 6、8、9 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸, 且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架。

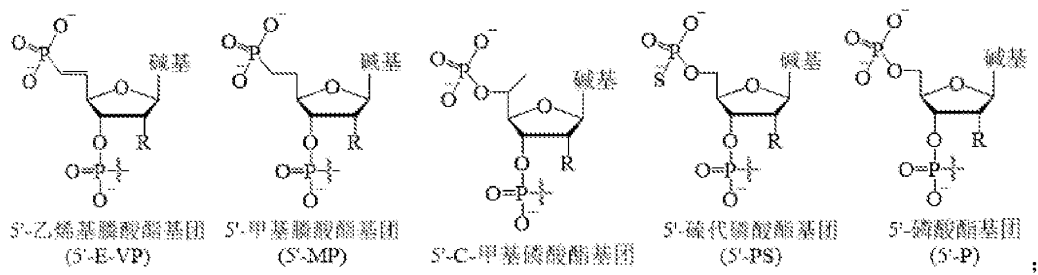
在本公开一些实施方案中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述双链寡核苷酸采用以下组合方式(i)-(x)中任一方案进行修饰:

- (i)所述反义链采用方式 A 进行修饰, 且所述正义链采用方式 a 进行修饰;
- (ii)所述反义链采用方式 B 进行修饰, 且所述正义链采用方式 a 进行修饰;
- (iii)所述反义链采用方式 C 进行修饰, 且所述正义链采用方式 a 进行修饰;
- (iv)所述反义链采用方式 B 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰;
- (v)所述反义链采用方式 C 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰;
- (vi)所述反义链采用方式 G 进行修饰, 且所述正义链采用方式 c 进行修饰;
- (vi)所述反义链采用方式 A 进行修饰, 且所述正义链采用方式 d 进行修饰;
- (viii)所述反义链采用方式 D 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰;
- (ix)所述反义链采用方式 E 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰;
- (x)所述反义链采用方式 F 进行修饰, 且所述正义链采用方式 b 进行修饰。

在本公开一些实施方案中, 按照 5'末端到 3'末端的方向, 所述双链寡核苷酸采用以下组合方式(1)-(8)中任一方式进行修饰:

- (1) 所述反义链采用方式 A'进行修饰, 且所述正义链采用方式 a'进行修饰;
- (2) 所述反义链采用方式 B'进行修饰, 且所述正义链采用修饰方式 a'进行修饰;
- (3) 所述反义链采用方式 C'进行修饰, 且所述正义链采用修饰方式 a'进行修饰;
- (4) 所述反义链采用方式 B'进行修饰, 且所述正义链采用修饰方式 b'进行修饰;
- (5) 所述反义链采用方式 C'进行修饰, 且所述正义链采用修饰方式 b'进行修饰;
- (6) 所述反义链采用方式 D'进行修饰, 且所述正义链采用修饰方式 b'进行修饰;
- (7) 所述反义链采用方式 E'进行修饰, 且所述正义链采用修饰方式 b'进行修饰;
- (8) 所述反义链采用方式 F'进行修饰, 且所述正义链采用修饰方式 b'进行修饰。

在本公开一些实施方案中, 所述反义链的 5'末端起始第 1 位核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸, 其包括但不限于以下 5'位磷酸化基团: 5'-乙烯基磷酸酯基团(5'-E-VP); 5'-甲基磷酸酯基团(5'-MP); 5'-C-甲基磷酸酯基团; 5'-硫代磷酸酯基团(5'-PS); 5'-磷酸酯基团(5'-P), 其结构示意图如下:



其中，R 为氢、羟基、胺基、C₁₋₄ 烷基、芳香基、C₁₋₄ 烷氧基、C₁₋₄ 烷基羰基氨基或卤素；

碱基选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶。

在本公开一些实施方案中，所述反义链的 5' 末端起始第 1 位核苷酸为 5'-乙烯基-(E)-膦酸酯-2'-甲氧基修饰的核苷酸。

在本公开一些实施方案中，所述反义链采用以下修饰方式的一种：

序号	反义链 (AS) 5'-3'																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A	2'-O-Me + P S	2'-F + P S	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me + P S	2'-O-Me + P S	2'-O-Me
B	2'-O-Me + P S	2'-F + P S	2'-F	2'-F	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me + P S	2'-O-Me + P S	2'-O-Me
C	2'-O-Me + P S	2'-F + P S	2'-O-Me	2'-F	2'-F	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me + P S	2'-O-Me + P S	2'-O-Me

且所述正义链采用以下修饰方式的一种：

序号	正义链 (SS) 5'-3'																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
a	2'-O-Me + P S	2'-O-Me + P S	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me - F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me

b	2'- O M e +P S	2'- O M e +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e
	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F	-F

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

反义链采用修饰方式 A，正义链采用修饰方式 a 的 siRNA 修饰模板命名为 DV25；

反义链采用修饰方式 B，正义链采用修饰方式 a 的 siRNA 修饰模板命名为 DV26；

反义链采用修饰方式 C，正义链采用修饰方式 a 的 siRNA 修饰模板命名为 DV27；

反义链采用修饰方式 B，正义链采用修饰方式 b 的 siRNA 修饰模板命名为 DV28；

反义链采用修饰方式 C，正义链采用修饰方式 b 的 siRNA 修饰模板命名为 DV29。

在本公开一些实施方案中，所述反义链采用以下修饰模板：

反义链 (AS) 5'-3'																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
2'- O M e +P S	2'- O M e +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e

且所述正义链采用以下修饰模板：

正义链 (SS) 5'-3'																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2'- O Me +P S	2'- O Me +P S	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，所述反义链采用以下修饰模板：

反义链 (AS) 5'-3'																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
2'- O Me +P S	2'- O Me +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e

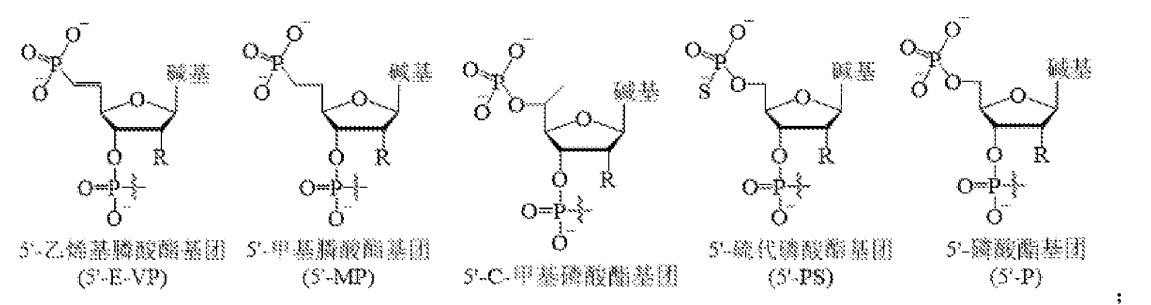
且所述正义链采用以下修饰模板：

正义链 (SS) 5'-3'																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2'- O Me +P S	2'- O Me +P S	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me

2'- O M e +P S	2'- O M e +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- F	2'- O M e	2'- F	2'- F	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e
-------------------------------	-------------------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	----------	--------------------	----------	----------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

在本公开一些实施方案中，所述反义链的 5'末端起始第 1 位核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸，其包括但不限于以下 5'位磷酸化基团：5'-乙烯基磷酸酯基团(5'-E-VP)；5'-甲基磷酸酯基团(5'-MP)；5'-C-甲基磷酸酯基团；5'-硫代磷酸酯基团(5'-PS)；5'-磷酸酯基团(5'-P)，其结构示意图如下：



其中，R为氢、羟基、胺基、C₁₋₄烷基、芳香基、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄烷基羰基氨基或卤素；

碱基选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶。

在本公开一些实施方案中，所述反义链的 5'末端起始第 1 位核苷酸为 5'-乙烯基-(E)-磷酸酯-2'-甲氧基修饰的核苷酸。

在本公开一些实施方案中，所述反义链采用以下修饰方式的一种：

序号	反义链 (AS) 5'-3'											
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe+PS+EVP	2'-F+PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+PS	2'-OMe+PS	2'-OMe	
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe+PS+EVP	2'-F+PS	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+PS	2'-OMe+PS	2'-OMe	
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+PS	2'-OMe+PS	2'-OMe	
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+PS	2'-OMe+PS	2'-OMe	
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+PS	2'-OMe+PS	2'-OMe	
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+PS	2'-OMe+PS	2'-OMe	
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+PS	2'-OMe+PS	2'-OMe	

且所述正义链采用以下修饰方式中的一种：

序号	正义链（SS） 5'-3'										
a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	

b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
c	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	

上表中 PS 为硫代磷酸骨架；

反义链采用修饰方式A，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV25P。

反义链采用修饰方式B，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV26P。

反义链采用修饰方式C，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV27P。

反义链采用修饰方式B，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV28P。

反义链采用修饰方式C，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV29P。

反义链采用修饰方式D，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV32P。

反义链采用修饰方式E，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV33P。

反义链采用修饰方式F，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV34P。

在本公开一些实施方案中，所述反义链采用以下修饰方式的一种：

序号	反义链（AS） 5'-3'										
A'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
B'	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F+PS	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
C'	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
D'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe

	2'- OMe +PS +EVP	2'- F +PS	2'- OMe	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe +PS	2'- OMe +PS	2'- OMe
E'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'- OMe +PS +EVP	2'- F +PS	2'-F	2'- OMe	2'-F	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'- OMe	2'- OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
F'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'- OMe	2'- OMe	2'-F	2'- OMe	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'-OMe +PS	2'- OMe +PS	2'- OMe
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'- OMe	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe +PS	2'- OMe +PS	2'- OMe

且所述正义链采用以下修饰方式的一种：

序号	正义链（SS） 5'-3'									
a'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'- F	2'- F	2'- F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'-OMe	2'-OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe
b'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- F	2'-O Me	2'-F	2'- OMe	2'- F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe
c'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'- OMe +PS	2'- OMe +PS	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'- F	2'- F	2'- F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe

上表中2'-OMe为2'-甲氧基；2'-F为2'-氟代；PS为硫代磷酸骨架；

反义链采用修饰方式A'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV25SP。

反义链采用修饰方式B'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV26SP。

反义链采用修饰方式C'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV27SP。

反义链采用修饰方式B'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV28SP。

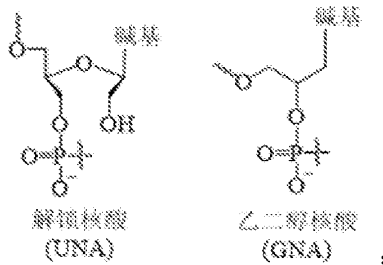
反义链采用修饰方式C'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV29SP。

反义链采用修饰方式D'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV32SP。

反义链采用修饰方式E'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV33SP。

反义链采用修饰方式F'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV34SP。

在本公开一些实施方案中，反义链自 5'端起第 2 至第 8 位中的一个或多个核苷酸，优选第 6 和/或第 7 位采用修饰基团，其中所述修饰基团优选自 UNA、GNA 或 DNA，其中 UNA 和 GNA 结构如下：



其中，碱基选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶。

在本公开一些实施方案中，反义链自 5'端起第 6 和/或第 7 位采用修饰基团，所述修饰基团为 DNA。

本发明的另一方面提供了一种双链寡核苷酸，所述双链寡核苷酸经本公开所述的修饰模板修饰。

在本公开一些实施方案中，所述双链寡核苷酸靶向如下基因的 mRNA 中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因。

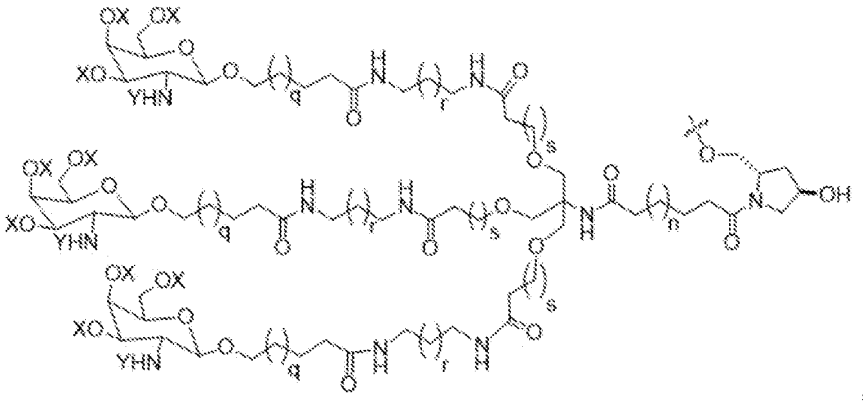
在本公开一些具体实施方案中，所述双链寡核苷酸的核苷酸序列如表 13、47、49、63-5、79 和 85 所示。

在另一方面，本公开提供了一种缀合物，所述缀合物包括前述的双链寡核苷酸，及与所述双链寡核苷酸缀合的配体。

在一些实施方案中，所述配体缀合在寡核苷酸正义链的 3'-末端或 5'-末端。

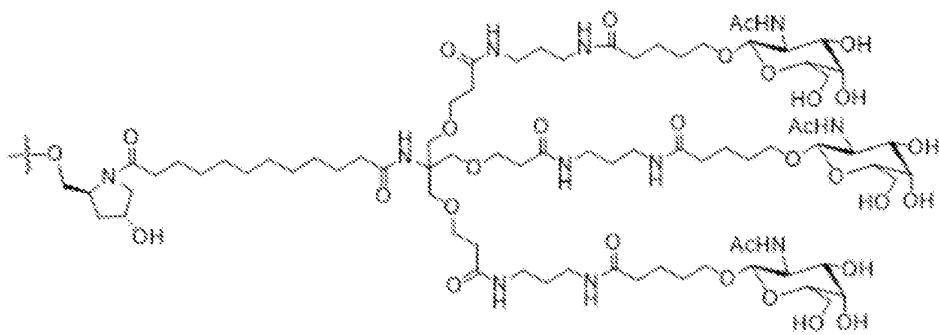
在一些实施方案中，所述配体为一种或多种利用二价或三价的分支键联体附接的 GalNAc 衍生物。

在一些实施方案中，所述配体为：

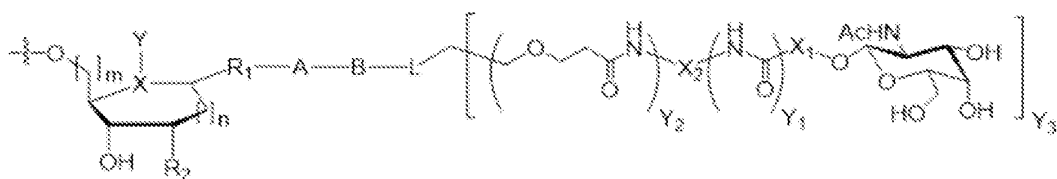


其中，X 为氢或一种羟基保护基或 H，所述羟基保护基包括乙酰基、苯甲酰基或异丁酰基；Y 为一种胺保护基或 H，所述胺保护基为甲酰基、乙酰基、丙酰基、正丁酰基或异丁酰基；n 为 0-20 之间的整数；q、r 和 s 独立地为 1-7 之间的整数。

在一些实施方案中，所述配体为：



在一些实施方案中, 所述配体为:



其中, X 为氧、氮或硫;

Y 为烷基或芳香基;

R_1 为氧或硫;

R_2 为氢、胺基、 C_{1-4} 烷基、芳香基、 C_{1-4} 烷氧基或卤素;

A 为 $-(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ 、 $-((\text{CH}_2)_c\text{NHCO})_d-$ 或 $-((\text{CH}_2)_c\text{CONH})_d-$, 其中, a 为 1-15 的整数, b 为 1-7 的整数, c 为 1-7 的整数, d 为 1-5 的整数;

B 为 $-(\text{CH}_2)_e-$, 其中 e 为 0-7 的整数;

L 为 $-\text{CONH}-$ 或 $-\text{NHCO}-$;

X_1 为 $-(\text{CH}_2)_f-$ 或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_f\text{CH}_2-$, f 为 1-5 的整数;

X_2 为 $-(\text{CH}_2)_g-$, g 为 1-6 的整数;

Y_1 为 0 或 1;

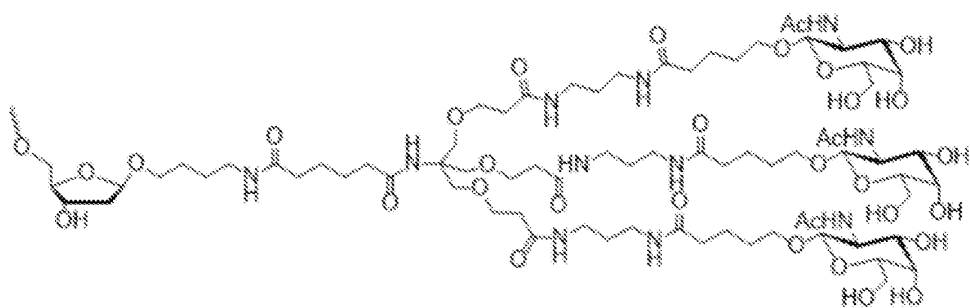
Y_2 为 0、1 或 2;

Y_3 为 1、2 或 3;

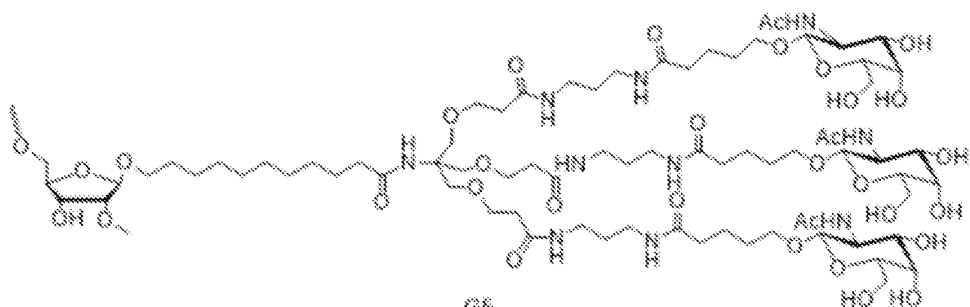
m 为 0-4 的整数;

n 为 0-4 的整数。

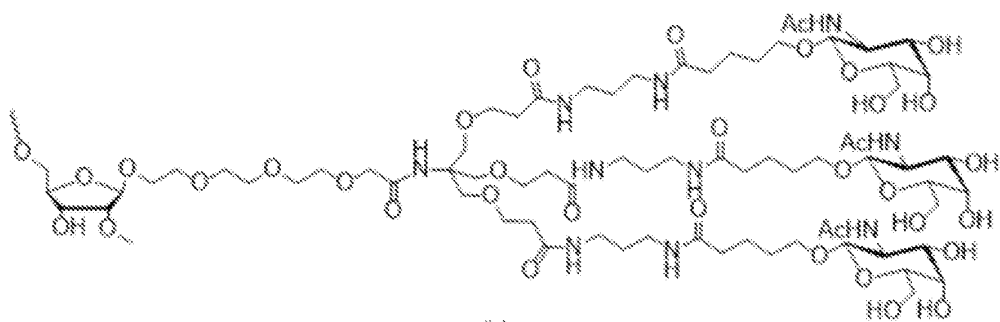
在一些实施方案中, 所述配体为 G4、G5、G6、G7、G101、G102、G103、G105 或 G106:



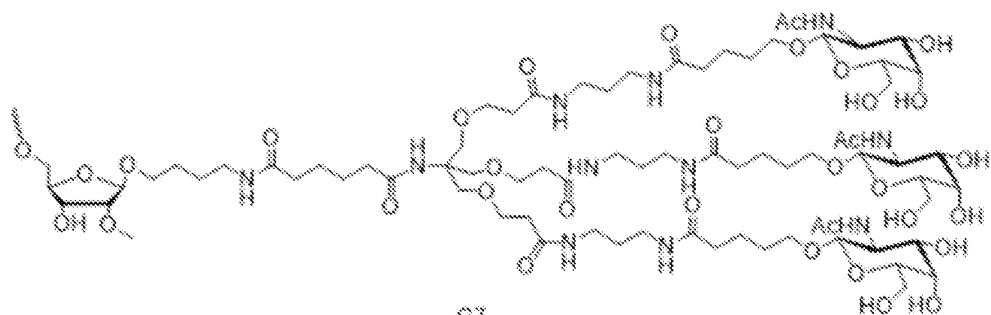
G4



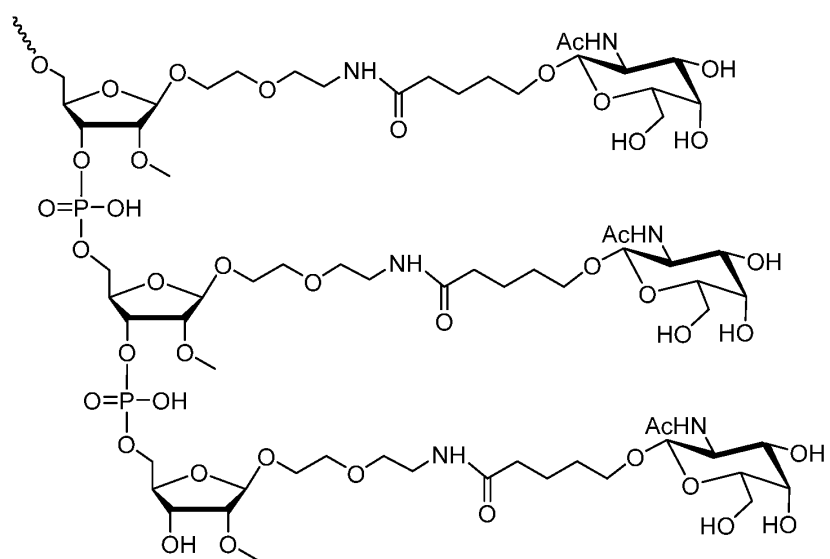
G5



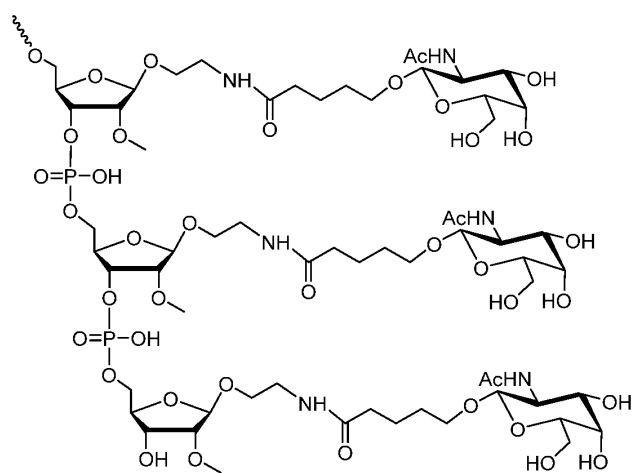
G6



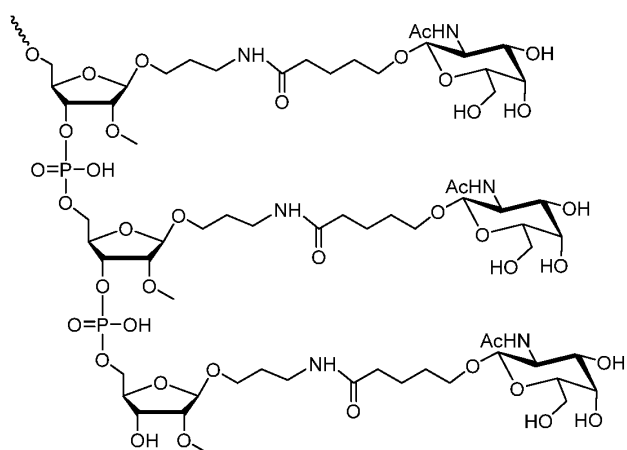
G7



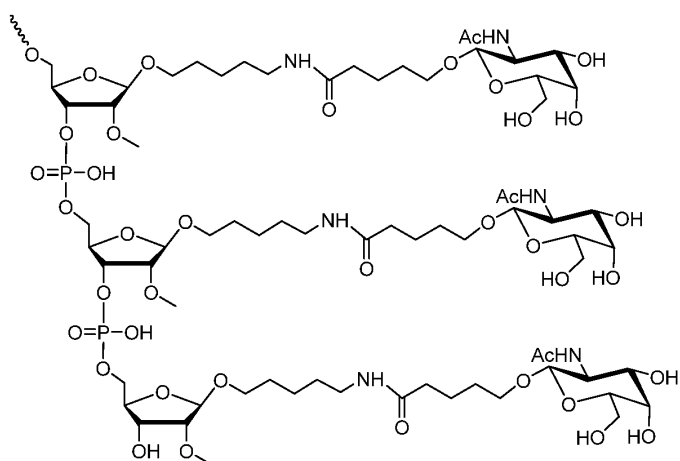
G101



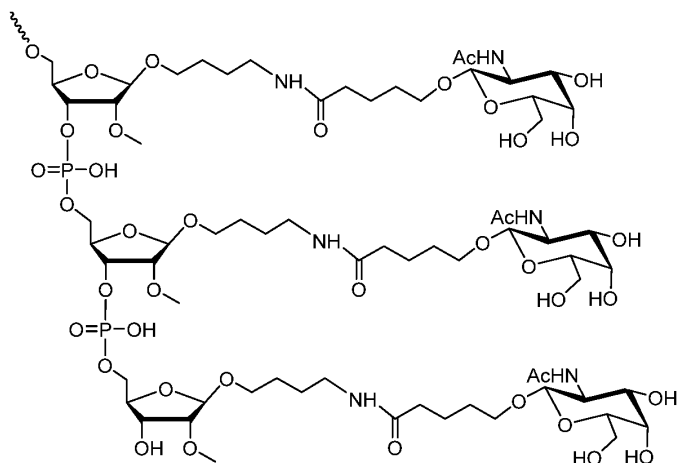
G102



G103

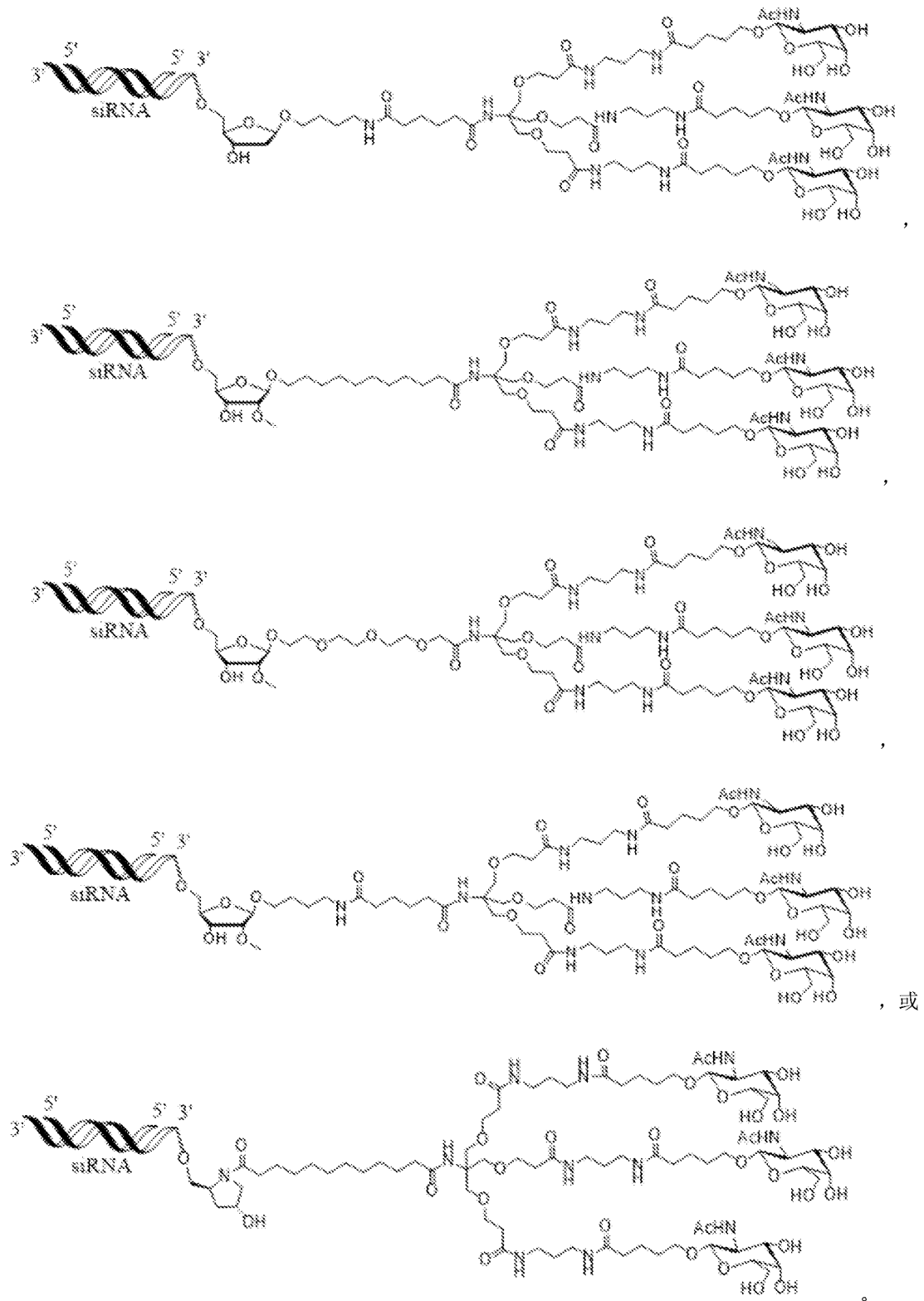


G105

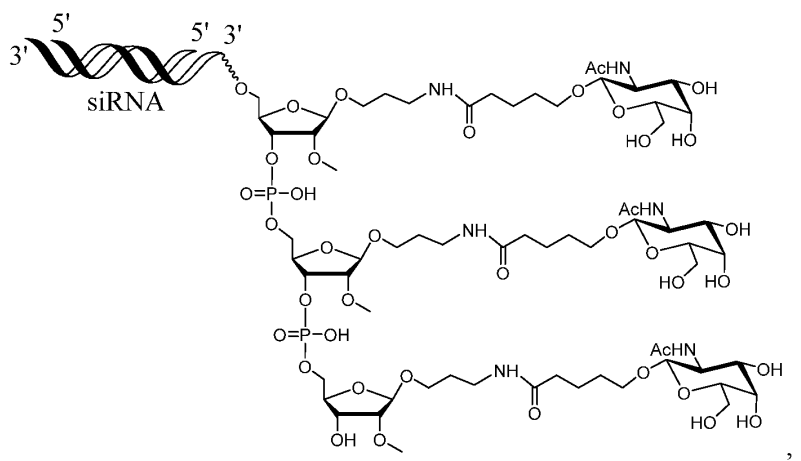
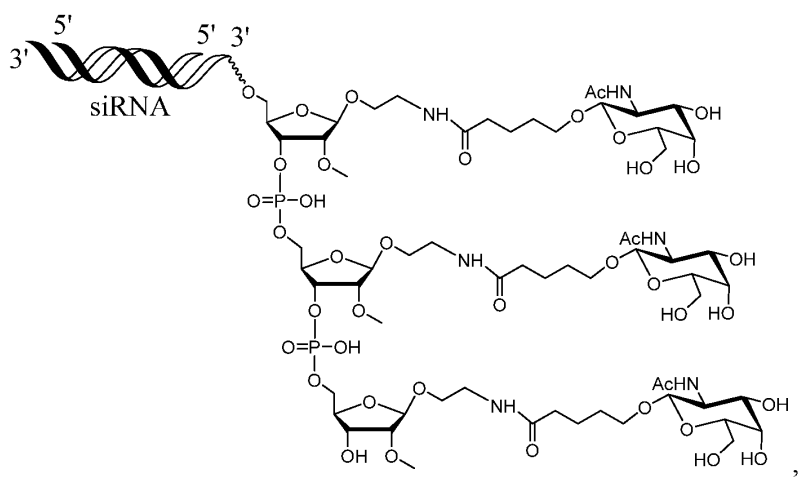
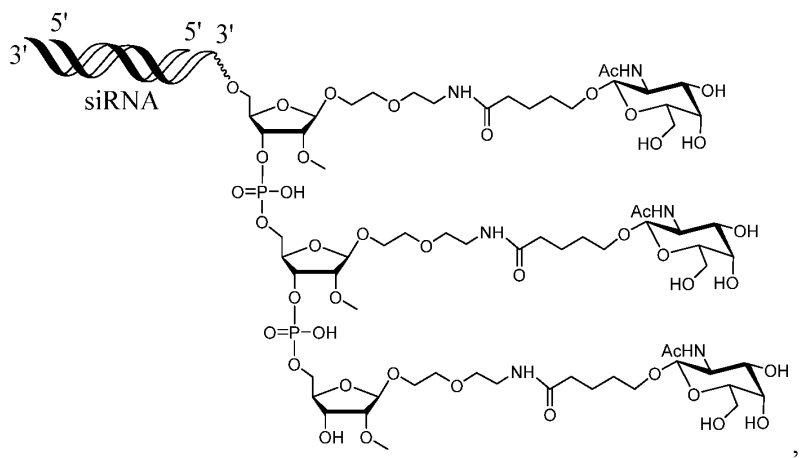


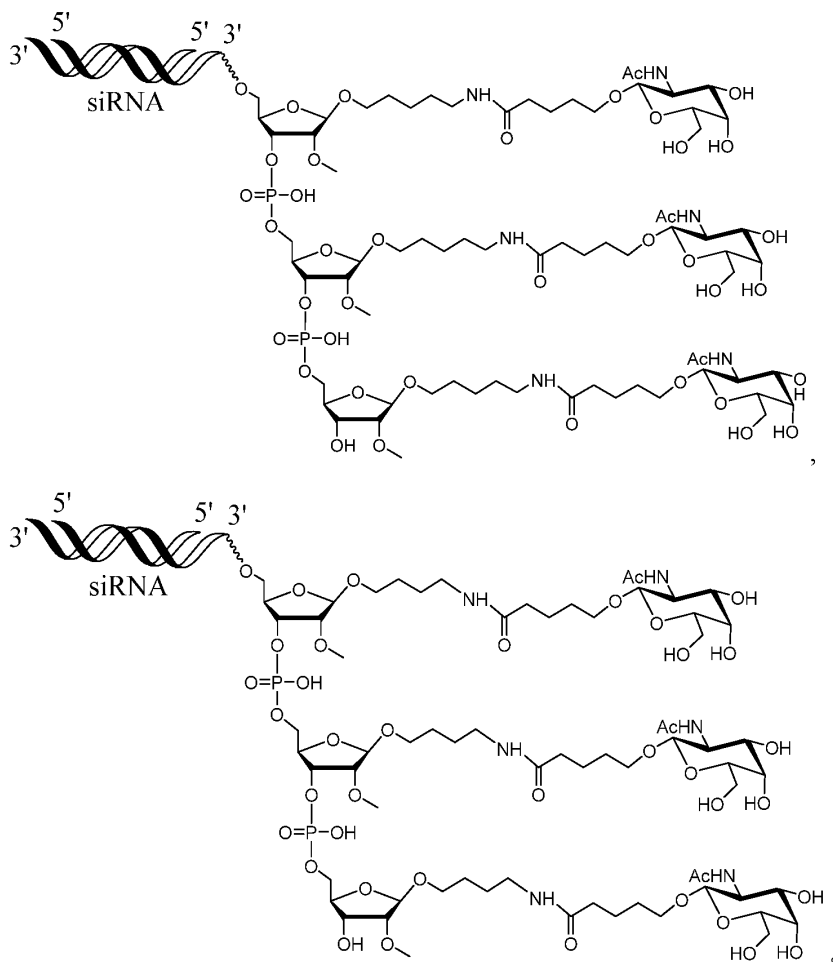
G106

在一些实施方案中，所述缀合物具有如下所示的结构：



在另一些实施方案中，所述缀合物具有如下所示的结构：





在一些实施方案中，所述缀合物用于抑制 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达。

在另一方面，本公开提供了一种药物组合物，所述药物组合物包括前述的双链寡核苷酸或前述的缀合物，以及药学上可接受的载体。

在一个实施例中，本文中提供含有如此处所述的双链寡核苷酸和药学上可接受的载体的药物组合物。含有双链寡核苷酸的药物组合物可用于治疗与 PCSK9、HBV 或 AGT 基因的表达或活性相关的疾病或病症，如脂质失调、高胆固醇血症、慢性乙型肝炎或高血压。基于递送模型配制这类药物组合物。一个实例是经配制以便通过肠胃外递送，例如通过静脉内(IV)或皮下注射(S.C.)递送来全身性施用的组合物。另一个实例是以下组合物，该组合物被配制用于直接递送到脑实质，例如通过输注到脑，例如通过连续泵输注。

包含本公开的双链寡核苷酸的药物组合物可以是例如具有或不具有一种缓冲液的溶液或含有药学上可接受的载体的组合物。这样的组合物包括例如水性或结晶组合物、脂质体制制品、胶束制品、乳剂以及基因治疗载体。

在本公开的方法中，该双链寡核苷酸可以在一种溶液中给予。一种游离双链寡核苷酸可以在一种非缓冲溶液中、例如在生理盐水中或在水中给予。可替代地，该游离双链寡核苷酸还可以在一种适合缓冲溶液中给予。该缓冲溶液可以包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐，或其任何组合。在一个优选实

施例中，该缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。可以将包含该双链寡核苷酸的缓冲液的 pH 与体积摩尔渗透压浓度进行调节，使得它适合于给予受试者。

在一些实施例中，该缓冲溶液进一步包含一种用于控制该溶液的克分子渗透压浓度的试剂，以使得克分子渗透压浓度被保持在一个所希望的值，例如在人血浆的生理值。可以加入到该缓冲溶液以控制克分子渗透压浓度的溶质包括(但不限于)蛋白质、肽、氨基酸、非代谢聚合物、维生素、离子、糖、代谢物、有机酸、脂质或盐。在一些实施例中，用于控制该溶液的克分子渗透压浓度的该试剂是一种盐。在某些实施例中，用于控制该溶液的克分子渗透压浓度的该试剂是氯化钠或氯化钾。

本公开的药物组合物可以按足以抑制 PCSK9、HBV 或 AGT 基因的表达的剂量给予。通常，本公开的双链寡核苷酸的适合剂量处于每日每千克体重约 0.001 至约 200.0 mg 范围内，通常处于每日每千克体重约 0.1 至 50 mg 范围内。例如双链寡核苷酸(例如 siRNA)可以按每个单剂量约 0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或约 50 mg/kg 施用。

可以将该药物组合物一日给予一次，或者可以将该双链寡核苷酸在一天内以适当的间隔给予两次、三次或更多次亚剂量，或者甚至可以通过控释配制品使用连续输注或递送而给予。在这种情况下，每个子剂量中所含的双链寡核苷酸必须相应地更少，以便实现每日总剂量。也可以将剂量单位复配用于在几天内递送，例如使用在几天时间范围内提供持久双链寡核苷酸释放的常规持续释放配制品。缓释配制品在本领域内是熟知的并且对于在特定位点递送试剂是特别有用的，由此可以与本公开的试剂使用。在这一实施例中，该剂量单位包含相应的多个每日剂量。

在其他实施例中，单一剂量的该药物组合物可以长久持续，从而后续剂量以不多于 3、4 或 5 天的间距或以不多于 1、2、3 或 4 周的间距施用。在本公开的一些实施例中，每周给予一次单剂量的本公开的药物组合物。在本公开的其他实施例中，每一月给予一次单剂量的本公开的药物组合物。

本领域技术人员将理解，某些因子可以影响有效治疗一个受试者所需的剂量和时间安排，这些因子包括(但不限于)疾病或病症的严重性、之前的治疗、该受试者的总体健康和/或年龄、以及其他存在的疾病。此外，用治疗有效剂量的组合物治疗一个受试者可以包括单一治疗或者一系列治疗。如本文中他处描述，使用常规方法或基于使用适宜动物模型的体内测试，可以估计本公开涵盖的各个双链寡核苷酸的有效剂量和体内半寿期。

取决于希望局部还是全身性治疗以及取决于有待治疗的区域，可以将本公开的药物组合物按许多方式给予。给予可以是局部的(例如通过皮肤药贴)；肺的；例如通过粉末或气溶剂的吸入或吹入，包括通过喷雾器；气管内的；鼻内的；表皮的以及经皮的、经口的或肠胃外的。肠胃外给予包括静脉内的、动脉内的、皮

下的、腹膜内的或肌内的注射或输注；真皮下的，例如，经由植入装置；或颅内的，例如脑实质内的、鞘内的或心室内的给予。

用于在本公开的组合物和方法中使用的双链寡核苷酸可以被配制成用于在膜性分子集合体中递送例如脂质体或胶束。如此处使用的，术语“脂质体”是指由设置在至少一个双层(例如一个双层或多个双层)中的两亲性脂质构成的囊泡。脂质体包括单层的或多层的囊泡，其具有一个形成自亲脂材料的膜以及一个水性内部。水性部分包含该双链寡核苷酸组合物。该亲脂性材料从典型地不包括双链寡核苷酸组合物的水性外部(尽管在一些实例中，它可能包括)分离该水性内部。脂质体对于将活性成分转移以及递送至作用位点是有用的。因为脂质体膜与生物膜结构上类似，当脂质体被施用到一种组织时，该脂质体双层与细胞膜的双层融合。随着脂质体与细胞的融合进行，包括双链寡核苷酸的内部水性内容物被递送到细胞中，其中该双链寡核苷酸可以特异性结合到一种靶标 RNA 并且可以介导 RNAi。在一些情况下，这些脂质体也是特异地靶向的，例如将该双链寡核苷酸引导到特定的细胞类型。

包含双链寡核苷酸的脂质体可以通过多种方法来制备。在一个实例中，脂质体的脂质组分溶解在洗涤剂中使得用脂质组分形成胶束。例如该脂质组分可以是两亲性阳离子脂质或脂质缀合物。该洗涤剂可具有高的临界胶束浓度并可以是非离子的。示例性的洗涤剂包括胆酸盐、CHAPS、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐和月桂酰肌氨酸。然后将该双链寡核苷酸制剂添加到包括该脂质组分的胶束中。该脂质上的阳离子基团与双链寡核苷酸相互作用并在双链寡核苷酸周围缩合以形成脂质体。缩合后，例如通过透析将该洗涤剂除去以得到双链寡核苷酸的脂质体制剂。

双链寡核苷酸，例如本公开的 siRNA 可以被完全封装在脂质配制品(例如 LNP 或其他核酸-脂质颗粒)中。

如在此使用的，术语“脂质纳米颗粒 (LNP)”是指一种稳定的核酸-脂质颗粒。LNP 含有一种阳离子脂质、一种非阳离子脂质以及一种阻止该颗粒聚集的脂质(例如一种 PEG-脂质缀合物)。LNP 对于合成应用是极其有用的，因为它们展示出在静脉内(i.v.)注射之后延长的循环寿命并且在远端位点积累(例如在与给予位点物理分开的位点)。

在一个实施例中，脂质与药物的比率(质量/质量比率)(例如脂质与 siRNA 的比率)将处于从大约 1:1 至大约 50:1，从大约 1:1 至大约 25:1，从大约 3:1 至大约 15:1，从大约 4:1 至大约 10:1，从大约 5:1 至大约 9:1，或大约 6:1 至大约 9:1 的范围内。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸或所述缀合物在一种非缓冲溶液中给予。

在一些实施方案中，所述非缓冲溶液为盐水或水。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸或所述缀合物与一种缓冲溶液给予。

在一些实施方案中，所述缓冲溶液包括乙酸盐、柠檬酸盐、醇溶谷蛋白、碳酸盐或磷酸盐或其任何组合。

在一些实施方案中，所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲盐。

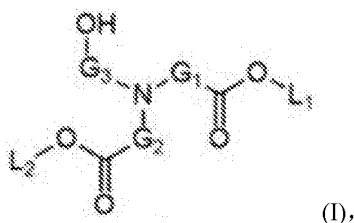
在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸或所述缀合物被配制成用于在膜性分子集合体中递送的脂质配制品。

在一些实施方案中，所述脂质配制品为核酸-脂质颗粒，例如脂质纳米颗粒。

在一些实施方案中，脂质与所述双链寡核苷酸或所述缀合物的质量/质量比率为 1:1-50:1，1:1-25:1，3:1-15:1，4:1-10:1，5:1-9:1，或 6:1-9:1。

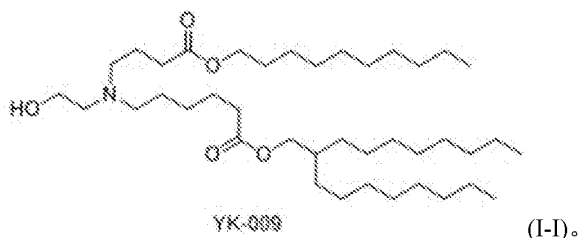
在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒包括阳离子脂质、中性脂质、结构性脂质和聚合物共轭脂质。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质为式(I)结构的化合物,或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体,

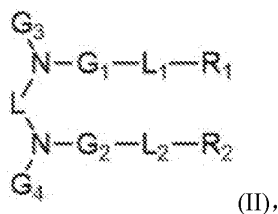


G₁ 为 C₁₋₆ 亚烷基; G₂ 为 C₂₋₈ 亚烷基; G₃ 为 C₁₋₃ 亚烷基; L₁ 为 C₆₋₁₅ 直链烷基; L₂ 为 C₁₂₋₂₅ 支链烷基。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质为式(I-I)结构的 YK-009 (参见专利 CN114044741B):

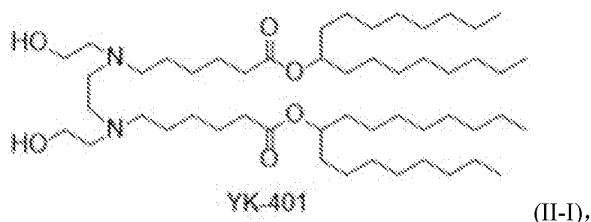


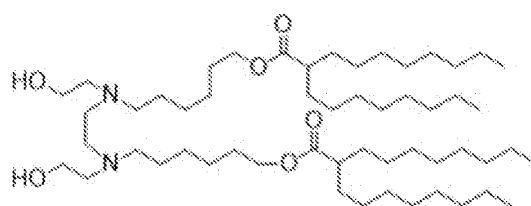
在一些实施方案中,所述阳离子脂质为式(II)结构的化合物,或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体,



G₁ 为 C₂₋₈ 亚烷基; G₂ 为 C₂₋₈ 亚烷基; L₁ 为 -C(O)O-或-OC(O)-; L₂ 为 -C(O)O-或-OC(O)-; R₁ 为 C₆₋₂₅ 直链或支链烷基; R₂ 为 C₆₋₂₅ 直链或支链烷基; G₃ 为 HO(CH₂)₂-或 HO(CH₂)₃-; G₄ 为 HO(CH₂)₂-或 HO(CH₂)₃-; L 为 (CH₂)₂-或-(CH₂)₃-或-(CH₂)₄-。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质为式(II-I)结构的 YK-401 或式(II-II)结构的 YK-402 (参见专利 CN115784921B):

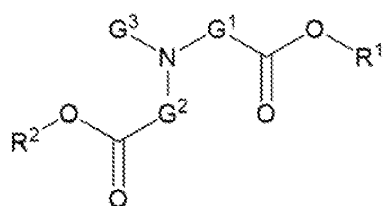




YK-402

(II-II)。

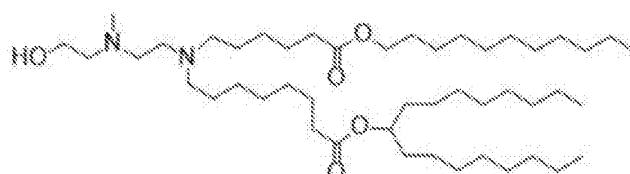
在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(III)结构的化合物，或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体，



(III)，

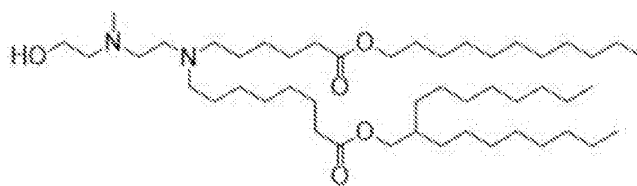
G_1 为 C_{1-6} 亚烷基； G_2 为 C_{2-8} 亚烷基； R_1 为 C_{6-20} 直链或支链烷基； R_2 为 C_{12-25} 支链烷基； G_3 为：
 $HO(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$ ， $HO(CH_2)_2N(CH_2CH_3)(CH_2)_2-$ ， $(HO(CH_2)_2)_2N(CH_2)_2-$ ， $CH_3O(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$ ，
 $(CH_3)_2N(CH_2)_3SC(O)O(CH_2)_2-$ ， $(CH_3)_2N(CH_2)_3SC(O)-$ ， $CH_3NH(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$ 或 $CH_3CH_2NH(CH_2)_2-$ 。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(III-I)结构的 YK-201 或式(III-II)结构的 YK-202（参见专利 CN115677518B）：



YK-201

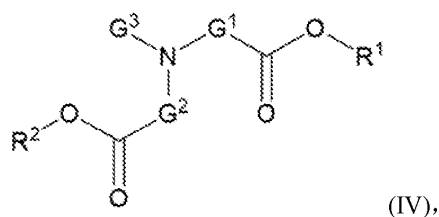
(III-I)，



YK-202

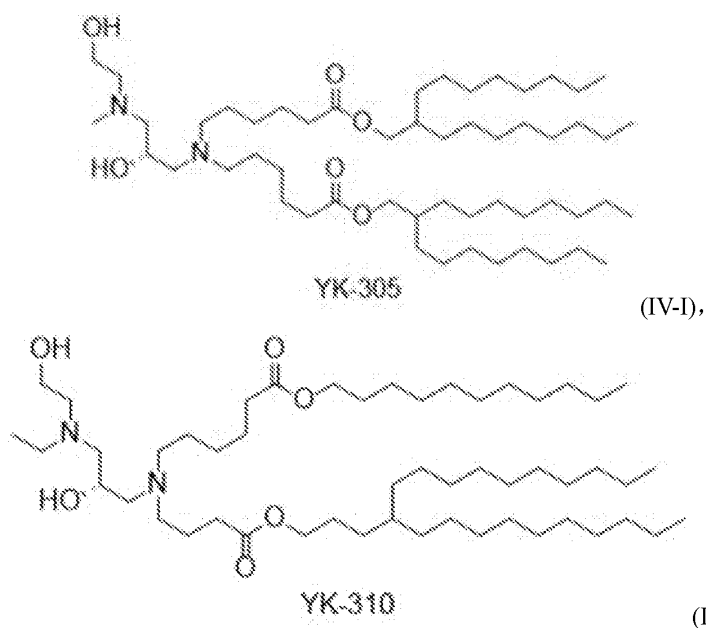
(III-II)。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(IV)结构的化合物，或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体，

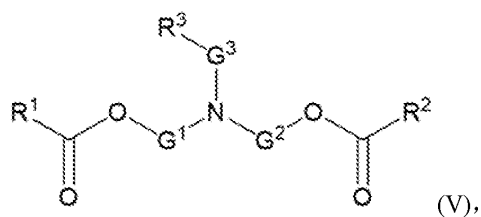


G_1 为 C_{1-8} 亚烷基； G_2 为 C_{2-8} 亚烷基； R_1 为 C_{6-25} 直链或支链烷基； R_2 为 C_{12-25} 直链或支链烷基； G_3 为： $HO(CH_2)_2N(R_3)CH_2CH(OH)CH_2-$ ，其中 R_3 为 $-CH_3$ 或 $-CH_2CH_3$ 或 $-CH_2CH_2OH$ 。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(IV-I)结构的 YK-305 或式(IV-II)结构的 YK-310（参见专利 CN115745820B）：

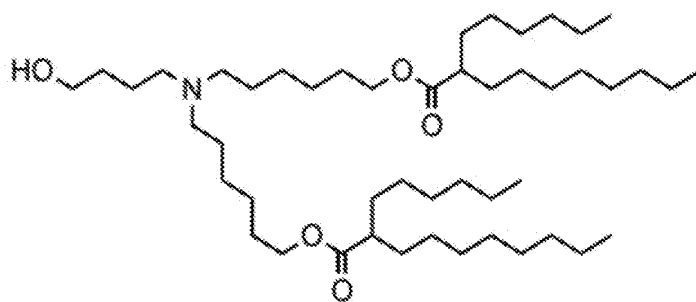


在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(V)结构的化合物，或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体，



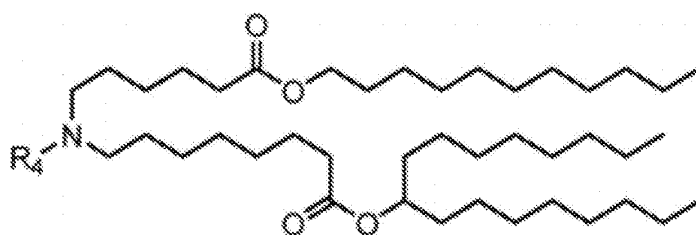
G^1 和 G^2 各自独立地为未取代的 C_6-C_{10} 亚烷基； G^3 为未取代的 C_1-C_{12} 亚烷基； R^1 和 R^2 各自独立地为 C_6-C_{24} 烷基或 C_6-C_{24} 烯基； R^3 为 OR^5 、 N 、 $-C(=O)OR^4$ 、 $-OC(=O)R^4$ 或 $-NR^5C(=O)R^4$ ； R^4 为 C_1-C_{12} 烃基；并且 R^5 为 H 或 C_1-C_6 烃基。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(V-I)结构的 ALC0315（参见专利 CN108368028B）：



(V-I)。

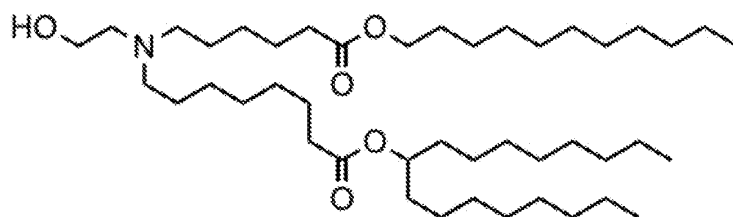
在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(VI)结构的化合物，或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体，



(VI)，

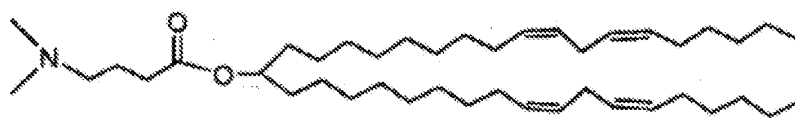
R_4 选自 $-(CH_2)_nQ$ 和 $-(CH_2)_nCHQR$ ； Q 选自由以下组成的组： $-OR$ 、 $-OH$ 、 $-O(CH_2)_mN(R)_2$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(H)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(H)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(O)N(H)(R)$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(S)N(H)(R)$ 、 $-N(R)S(O)_2R_8$ 和杂环； n 为 1、2 或 3。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(VI-I)结构的 SM102（参见专利 CN110520409A）：



(VI-I)。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质为式(VII)结构的化合物 DLIN-MC3-DMA（参见 CN102625696B），或其 N-氧化物、溶剂合物、药学上可接受的盐或立体异构体，



(VII)。

在一些实施方案中，所述阳离子脂质包括选自：YK-009、YK-401、YK-305、ALC0315、SM102 和 DLIN-MC3-DMA 中的一种或多种。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质与所述中性脂质的摩尔比为 1:1~10:1。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质与所述结构性脂质的摩尔比为 1:1~5:1。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构性脂质以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为(25~65):(5~25):(25~70):(0.5~5)。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构性脂质以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为(25~65):(5~25):(25~45):(0.5~5)。

在一些实施方案中,所述阳离子脂质、所述中性脂质、所述结构性脂质以及所述聚合物共轭脂质的摩尔比为 50:10:38.5:1.5 或 49:10:39.5:1.5。

在一些实施方案中,所述中性脂质包括选自:磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、神经酰胺、甾醇及其衍生物中的一种或多种。

在一些实施方案中,所述中性脂质选自以下中的一种或多种:1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双十一烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0 Diether PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-硬脂酰乙醇胺(SOPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(SOPC)、鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)以及其混合物。

在一些实施方案中,所述中性脂质是 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺和/或 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

在一些实施方案中,所述结构性脂质选自以下中的一种或多种:胆固醇、甾醇、谷固醇、麦角固醇、菜油甾醇、豆甾醇、芸苔甾醇、番茄碱、熊果酸、 α -生育酚和皮质类固醇。

在一些实施方案中,所述结构性脂质为胆固醇。

在一些实施方案中,所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种:PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的神经酰胺、PEG 修饰的二烷基胺、PEG 修饰的二酰基甘油和 PEG 修饰的二烷基甘油。

在一些实施方案中,所述聚合物共轭脂质选自以下中的一种或多种:二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000)、二肉豆蔻酰基甘油-3-甲氧基聚乙二醇 2000(DMG-PEG2000)和甲氧基聚乙二醇双十四烷基乙酰胺(ALC-0159)。

本公开的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂以及含脂质体制制品。这些组合物可以产生自多种组分，这些组分包括但不限于预成形的液体、自乳化固体以及自乳化半固体。特别优选的是当治疗肝脏病症(例如肝癌)时靶向肝脏的配制品。

本公开的药物组合物(可以方便地以单位剂型存在)可以根据医药工业内熟知的常规技术来制备。此类技术包括以下这样的步骤：将这些活性成分与该(这些)药物载体或赋形剂进行联合。总体而言，这些药物组合物是通过以下步骤来制备：使这些活性成分与液体载体或精细分散的固体载体或它们两者均匀地且精细地联合，并且如果需要，进而将产品成形。

本公开的药物组合物可以被配制为许多可能的剂型中的任一者，这些剂型例如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆剂、软胶囊、栓剂以及灌肠剂。本公开的药物组合物还可以被配制为在水性、非水性介质或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含增加该悬浮液的粘度的物质，这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该悬浮液还可以包含稳定剂。

本公开的某些药物组合物还向配制品中并入了载体化合物。如在此所使用的，“载体化合物”或“载体”可以指核酸或其类似物，它是惰性的(即本身不具有生物活性)，但在体内过程中被认为是核酸，例如通过降解生物活性的核酸或促进其从循环中的除去而减少具有生物活性的核酸的生物利用度。核酸和载体化合物的共施用(一般后一种物质过量)可以导致肝脏、肾脏或其他外循环储库中回收的核酸量大幅度缩减，假定归因于该载体化合物和该核酸之间对共同受体的竞争。例如与聚肌苷酸、硫酸葡聚糖、聚胞苷酸或 4-乙酰胺基-4'-异硫氰酸苄-2,2'-二磺酸共施用，肝组织中部分硫代磷酸酯化的 siRNA 的回收可以减少(宫尾(Miyao)等人，DsRNA 研究与研发(DsRNA Res.Dev.)，1995,5,115-121；高仓(Takakura)等人，DsRNA&核酸药物研发(DsRNA&Nucl.Acid Drug Dev.)，1996,6,177-183)。

与载体化合物相比，“药物载体”或“赋形剂”是用于向动物递送一种或多种核酸的药学上可接受的溶剂、悬浮剂或其他任意药学上惰性的媒介物。该赋形剂可以是液体或固体，并且当与核酸和特定药物组合物的其他组分组合时，参考意欲的给予方式，对赋形剂进行选择以提供希望的容积、稠度等。典型的药物载体包括但不限于、粘合剂(例如预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙甲基纤维素等)；填料(例如乳糖和其他糖、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯或磷酸氢钙等)；润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶态二氧化硅、硬脂酸、金属硬脂酸盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等)；崩解剂(例如淀粉、淀粉羟乙酸钠等)；和润湿剂(例如月桂基硫酸钠等)。

适合于非肠胃外给予的、不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂也可以用来配制本公开的药物组合物。适当的药学上可接受载体包括但不限于：水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

用于局部给予核酸的配制品可以包括在普通溶剂如醇中的无菌或非无菌的水溶液、非水溶液，或在液体或固体油基质中的核酸溶液。这些溶液还可以包括缓冲液、稀释液和其他合适的添加剂。可以使用适合于非肠胃外给予的、且不与核酸发生有毒反应的、药学上可接受的有机或无机赋形剂。

适当的药学上可接受赋形剂包括但不限于：水、盐溶液、醇、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

上述药物组合物的剂型、载体化合物、药物载体、赋形剂等在美国专利 US10125369B2 中描述，所述专

利通过引用方式结合在此。

在另一方面，本公开提供了一种套装药盒，所述套装药盒包含药盒 A，所述药盒 A 包括前述的双链寡核苷酸、缀合物或药物组合物中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述套装药盒还包括药盒 B，所述药盒 B 含有以下中的一种或两种：

(1) 其他降低 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达的药物或者包含所述降低 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达的药物组合物；

(2) 由激素制剂、靶向小分子制剂、蛋白酶体抑制剂、成像剂、诊断剂、化疗剂、溶瘤药物、细胞毒性剂、细胞因子、共刺激分子的激活剂、抑制性分子的抑制剂以及疫苗组成的群组中的一种或多种。

本文所述的“其他降低 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达的药物或者包含所述降低 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达的药物组合物”指的是不含本公开提供的双链寡核苷酸、缀合物或药物组合物的药物。

在另一方面，本公开提供了前述的双链寡核苷酸、缀合物或药物组合物在制备预防和/或治疗 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达相关疾病的药物中的应用。

在一些实施方案中，所述 PCSK9 表达相关疾病为高胆固醇血症、动脉粥样硬化、血脂异常或心脑血管疾病。

在一些实施方案中，所述 HBV 基因表达相关疾病选自以下疾病类型：慢性乙型肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌，急性乙型肝炎，以及 HBV/丁型肝炎病毒合并感染相关疾病。

在一些实施方案中，所述 AGT 基因表达相关疾病选自高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、高血压危症、高血压急迫状态、孤立性收缩期和舒张期高血压、妊娠相关的高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏高血压、高眼压症、青光眼、肺动脉高压、门静脉高压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压；高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、库欣综合征和其他糖皮质激素过多状态(包括慢性类固醇治疗)、嗜铬细胞瘤、肾素瘤、继发性醛固酮增多症和其他盐皮质激素过多状态、睡眠呼吸暂停、甲状腺/甲状旁腺疾病、心力衰竭、心肌梗死、心绞痛、中风、糖尿病、肾病、肾衰竭、动脉硬化、宫内发育迟缓(IUGR)和胎儿生长受限。

在另一方面，本公开提供了一种降低 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达或抑制 PCSK9、HBV 或 AGT 复制的方法，所述方法包括对样本施用前述的双链寡核苷酸、缀合物、药物组合物和套装药盒中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述方法为非预防和/或治疗目的的。

本文所述的“非预防和/或治疗目的的”指的是在例如实验室中出于科研目的降低 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达或抑制 PCSK9、HBV 或 AGT 复制。

在另一方面，本公开提供了一种预防和/或治疗患有 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达相关疾病的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者给予预防有效量或治疗有效量的前述的双链寡核苷酸、缀合物或药物组合物。

所述方法用于治疗 and/或预防可通过下调 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达进行调节的疾病和病症。例如，在此描述的双链寡核苷酸可用来治疗 PCSK9、HBV 或 AGT 基因表达相关疾病。这些方法包括给予该受试

者一个治疗有效量或预防有效量的一种本公开的双链寡核苷酸、缀合物或药物组合物。

在一些实施方案中，在此描述的双链寡核苷酸可用来治疗脂血症，例如高脂血症、以及其他形式的脂质失衡，如高胆固醇血症、高甘油三酯血症以及与这些失调相关的病理情况，如心脏和循环系统疾病。可通过下调 PCSK9 基因表达进行调节的其他疾病和病症包括溶酶体贮积病，包括但不限于，尼曼-皮克病、泰-萨克斯病、溶酶体酸性脂肪酶缺乏症、和高雪病。在此描述的 RNAi 剂可用来治疗心血管疾病例如冠心病(CHD)，脑血管病(CVD)，主动脉瓣狭窄，外周血管病，动脉粥样硬化，动脉硬化，心肌梗死(心脏病发作)，脑血管病(中风)，短暂性缺血发作(TIA)，心绞痛(稳定型和不稳定型)，心房颤动，心律失常，瓣膜病和/或充血性心力衰竭或任何其他性状。这些方法包括给予该受试者一个治疗有效量或预防有效量的一种本公开的双链寡核苷酸、缀合物或组合物。在一些实施例中，该方法包括向具有杂合 LDLR 基因型的患者给予治疗量的 PCSK9 siRNA。

本公开的双链寡核苷酸可以使用本领域中已知的任何给药模式给予给一名受试者，包括(但不限于)皮下、静脉内、肌肉内、眼内、支气管内、胸膜内、腹膜内、动脉内、经淋巴、经脑脊髓及其任何组合。在优选实施例中，这些试剂是皮下给予的。

在另外的实施例中，将 siRNA 与另外的治疗剂组合给予。siRNA 以及另外的治疗剂可以在相同的组合物中组合地给予，例如，肠胃外给予，或该另外的治疗剂可以作为一个单独的组合物的一部分或通过在此描述的另一方法给予。

另外的治疗剂的实例包括已知用来治疗乙型肝炎的药剂。例如，另外的治疗慢性乙型肝炎的药物选自核苷(酸)类似物(例如恩替卡韦、富马酸替诺福韦酯、富马酸丙酚替诺福韦和艾米替诺福韦等)， α 干扰素(例如聚乙二醇化 α 干扰素)。

另外的治疗剂的实例包括已知用来治疗高血压的药剂或已知用来治疗心脑血管疾病的药剂。例如，另外的治疗高血压的药剂选自血管紧张素转化酶抑制剂(例如卡托普利、依那普利、贝那普利、培哚普利等)、血管紧张素 II 受体拮抗剂(例如氯沙坦、氯沙坦氢氯噻嗪、缬沙坦、缬沙坦氢氯噻嗪、替米沙坦、替米沙坦氢氯噻嗪、奥美沙坦酯等)、 β 受体阻滞剂(例如普萘洛尔、比索洛尔、酒石酸美托洛尔、琥珀酸美托洛尔等)。

另外的治疗剂的实例包括已知用来治疗脂质失调如高胆固醇血症、动脉粥样硬化、血脂异常或心脑血管疾病的药物。例如，另外的治疗高脂血症的药物选自贝特类、他汀类、胆汁酸隔离剂和烟酸类。另外的治疗心脑血管疾病的药物选自血管紧张素转化酶抑制剂(例如卡托普利、依那普利、贝那普利、培哚普利等)、血管紧张素 II 受体拮抗剂(例如氯沙坦、氯沙坦氢氯噻嗪、缬沙坦、缬沙坦氢氯噻嗪、替米沙坦、替米沙坦氢氯噻嗪、奥美沙坦酯等)、 β 受体阻滞剂(例如普萘洛尔、比索洛尔、酒石酸美托洛尔、琥珀酸美托洛尔等)。

在一个实施例中，将双链寡核苷酸给予患者，并且随后将另外的治疗剂给予该患者(或反之亦然)。在另一个实施例中，将双链寡核苷酸和另外的治疗剂同时给予。

在一些实施方案中，所述受试者为灵长动物或啮齿动物。

在一些实施方案中，所述受试者为人。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸以 0.01mg/kg-10mg/kg 或 0.5mg/kg-50mg/kg 的剂量给予。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸以约 1-5 mg/kg 的剂量给予。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸皮下给予。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸静脉内给予。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸以两个或更多个剂量给予。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸以包括一个负荷阶段继之以一个维持阶段的给药方案给予，

所述负荷阶段包括给予 2mg/kg、1mg/kg 或 0.5mg/kg 的剂量，每周五次，并且，

所述维持阶段包括给予 2mg/kg、1mg/kg 或 0.5mg/kg 的剂量，每周一次、每周两次、每周三次，每两周一次，每三周一次，每月一次，每两个月一次，每三个月一次，每四个月一次，每五个月一次，或每六个月一次。

在一些实施方案中，所述双链寡核苷酸以选自下组的时间间隔给予：每 7 天一次、每 14 天一次、每 35 天一次、每 42 天一次以及每 49 天一次。

在一些实施方案中，所述 HBV 基因表达相关疾病选自以下疾病类型：慢性乙型肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌，急性乙型肝炎，以及 HBV/丁型肝炎病毒合并感染相关疾病。

本文核苷酸缩写如下：

A=腺苷-3'-磷酸酯

Am=2'-甲氧基腺苷-3'-磷酸酯

Ams=2'-甲氧基腺苷-3'-硫代磷酸酯

Af=2'-氟腺苷-3'-磷酸酯

Afs=2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯

G=鸟苷-3'-磷酸酯

Gm=2'-甲氧基鸟苷-3'-磷酸酯

Gms=2'-甲氧基鸟苷-3'-硫代磷酸酯

Gf=2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯

Gfs=2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯

C=胞苷-3'-磷酸酯

Cm=2'-甲氧基胞苷-3'-磷酸酯

Cms=2'-甲氧基胞苷-3'-硫代磷酸酯

Cf=2'-氟胞苷-3'-磷酸酯

Cfs=2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯

U=尿苷-3'-磷酸酯

Um=2'-甲氧基尿苷-3'-磷酸酯

Ums=2'-甲氧基尿苷-3'-硫代磷酸酯

Uf=2'-氟尿苷-3'-磷酸酯

Ufs=2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯

AmsEVP=5'-乙烯基-(E)-磷酸酯-2'-甲氧基腺苷-3'-硫代磷酸酯

UmsEVP=5'-乙烯基-(E)-膦酸酯-2'-甲氧基尿苷-3'-硫代磷酸酯

A(gna)=腺苷-二乙醇核酸

C(gna)=胞苷-二乙醇核酸

G(gna)=鸟苷-二乙醇核酸

T(gna)=胸苷-二乙醇核酸

U(gna)=尿苷-二乙醇核酸

dA=脱氧腺苷-3'-磷酸酯

dG=脱氧鸟苷-3'-磷酸酯

dC=脱氧胞苷-3'-磷酸酯

dT=脱氧胸苷-3'-磷酸酯

以下实施例用于说明本公开，但不用来限制本公开的范围。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段，所用原料均为市售商品。

实施例

实施例 1：交替修饰的小干扰寡核苷酸的合成

根据PCSK9 mRNA序列设计84条siRNA基础序列。为提升序列的抑制效率和稳定性，将基础序列采用2'-甲氧基（2'-OMe）与2'-氟代（2'-F）交替修饰，并且末端进行硫代。正义链奇数位均为2'-F修饰，偶数位均为2'-OMe修饰；反义链奇数位均为2'-OMe修饰，偶数位均为2'-F修饰。此外正义链5'端有两个硫代修饰；反义链5'与3'端各有两个硫代修饰。交替修饰的siRNA序列见表2。

1. 交替修饰序列P92-si5的合成

表2中序列编号为P92-si5的小干扰核糖核酸的基础序列为：

正义链：5'-AAGAUCUGCAUGUCUCCAU-3'（SEQ ID NO. 1）

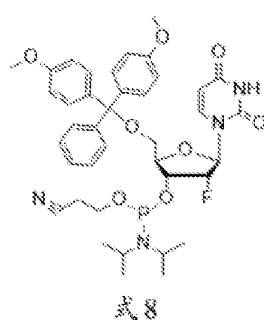
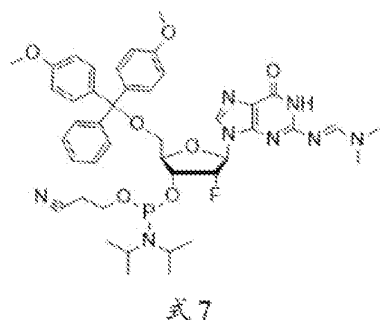
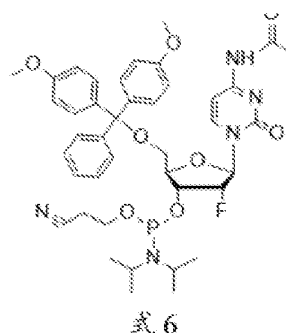
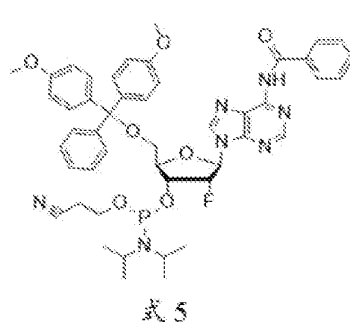
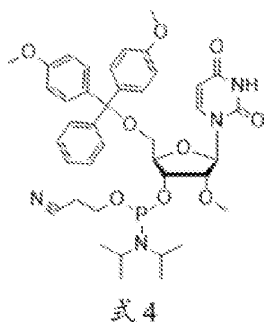
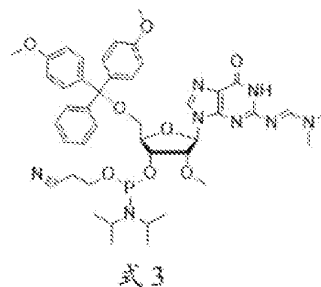
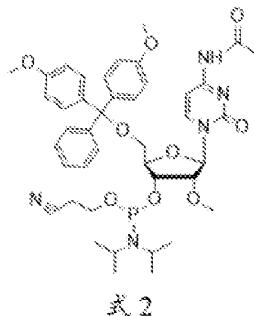
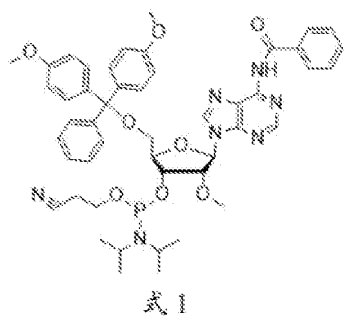
反义链：5'-AUGGAAGACAUGCAGGAUCUUGG-3'（SEQ ID NO. 13）

正义链奇数位均为2'-F修饰，偶数位均为2'-OMe修饰；反义链奇数位均为2'-OMe修饰，偶数位均为2'-F修饰。另外正义链5'端有两个硫代修饰；反义链5'与3'端各有两个硫代修饰。

仪器和试剂：擎科192 P型号DNA/RNA自动合成仪，其固相载体为交联聚苯乙烯珠的通用载体，型号为Primer support 5G Unylinker 350（cytiva厂家）。

制备方法：

依照单体浓度为0.15 M，用乙腈分别配制以下核苷酸单体溶液：DMT-A-OMe亚磷酰胺单体（式1）、DMT-C-OMe亚磷酰胺单体（式2）、DMT-G-OMe亚磷酰胺单体（式3）和DMT-U-OMe亚磷酰胺单体（式4）、DMT-A-F亚磷酰胺单体（式5）、DMT-C-F亚磷酰胺单体（式6）、DMT-G-F亚磷酰胺单体（式7）和DMT-U-F亚磷酰胺单体（式8）。



采用如下步骤制备：

(1) 脱保护

使用3%二氯乙酸甲苯溶液作为脱保护试剂，脱掉DMT保护基，之后使用乙腈进行清洗。

(2) 偶联

使用0.25 M 5-乙硫基四氮唑作为活化剂，对每个核苷酸单体的乙腈溶液进行偶联，之后使用乙腈进行冲洗。

(3) 氧化或硫化

氧化：使用0.05 M 碘的吡啶/水(90/10)溶液作为氧化剂，进行氧化，之后使用乙腈进行冲洗。

硫化：使用3% 氢化黄原素的吡啶溶液作为硫化剂，进行硫化，之后使用乙腈进行冲洗。

(4) 羟基保护

使用10% 乙酸酐四氢呋喃溶液（CAPA）四氢呋喃/吡啶/氮甲基咪唑 74/10/16(v/v/v)（CAPB）为羟基保护试剂，进行羟基保护，之后使用乙腈进行冲洗。

P92-si73	Gfs-Cms-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Af-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf	179/11	Ams-Ufs-Gm-Cf-Cm-Uf-Um-Af-Gm-Af-Am-Gf-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Gf-Cms-Cfs-Am	191/23
P92-si83	Gfs-Gms-Gf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Af-Um-Uf	180/12	Ams-Afs-Um-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cf-Cms-Afs-Gm	192/24
P92-si1	Gfs-Gms-Gf-Am-Uf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Uf	193/25	Ams-Gfs-Gm-Af-Um-Cf-Um-Uf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Am-Uf-Cm-Cf-Cms-Cfs-Gm	265/97
P92-si2	Afs-Ums-Af-Cm-Cf-Um-Cf-Am-Cf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af	194/26	Ums-Gfs-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-Gm-Af-Gm-Gf-Um-Af-Ums-Cfs-Cm	266/98
P92-si4	Cfs-Ams-Af-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf-Um-Cf-Cm-Af	195/27	Ums-Gfs-Gm-Af-Am-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Um-Cf-Um-Uf-Gms-Gfs-Um	267/99
P92-si6	Gfs-Gms-Cf-Um-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Uf-Gm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Uf	196/28	Ams-Cfs-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Cf-Am-Cf-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Af-Gm-Cf-Cms-Afs-Gm	268/100
P92-si7	Gfs-Cms-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Gf-Um-Uf	197/29	Ams-Afs-Cm-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cms-Afs-Gm	269/101
P92-si10	Cfs-Cms-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Um-Af-Um-Uf-Cm-Gf-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf	198/30	Cms-Ufs-Um-Uf-Um-Cf-Cm-Gf-Am-Af-Um-Af-Am-Af-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gms-Cfs-Cm	270/102
P92-si11	Gfs-Cms-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Gf	199/31	Cms-Cfs-Am-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Cms-Ufs-Um	271/103
P92-si12	Afs-Cms-Uf-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf-Uf	200/32	Ams-Gfs-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Am-Gf-Ums-Gfs-Gm	272/104
P92-si13	Ufs-Gms-Cf-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Cm-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Um-Af-Cm-Af	201/33	Ums-Gfs-Um-Af-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Cm-Gf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Gm-Cf-Ams-Gfs-Cm	273/105
P92-si14	Ufs-Gms-Gf-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Gf-Cm-Cf-Gm-Cf-Gm-Uf-Cm-Cf-Um-Cf-Am-Af	202/34	Ums-Ufs-Gm-Af-Gm-Gf-Am-Cf-Gm-Cf-Gm-Gf-Cm-Uf-Gm-Uf-Am-Cf-Cm-Cf-Ams-Cfs-Cm	274/106
P92-si15	Cfs-Gms-Uf-Cm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Gf-Cm-Cf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Af	203/35	Ums-Gfs-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Gm-Gf-Cm-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Gf-Am-Cf-Gms-Cfs-Gm	275/107
P92-si16	Gfs-Gms-Uf-Cm-Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Cf-Cm-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf	204/36	Gms-Cfs-Am-Gf-Cm-Gf-Gm-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Cm-Gf-Am-Cf-Cms-Cfs-Cm	276/108
P92-si17	Afs-Gms-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Af-Um-Uf-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af	205/37	Ums-Gfs-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Am-Af-Um-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Cf-Ums-Cfs-Cm	277/109
P92-si18	Ufs-Cms-Af-Um-Uf-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Gm-Af-Cm-Uf	206/38	Ams-Gfs-Um-Cf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Am-Af-Um-Gf-Ams-Ufs-Gm	278/110
P92-si19	Gfs-Ums-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af	207/39	Ums-Gfs-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Cms-Cfs-Am	279/111
P92-si20	Afs-Gms-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Uf	208/40	Ams-Afs-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Cf-Ums-Gfs-Gm	280/112
P92-si22	Gfs-Cms-Af-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Af-Gm-Af	209/41	Ums-Cfs-Um-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Cf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Cms-Ufs-Gm	281/113

P92-si23	Cfs-Ums-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Um-Cf-Am-Cf-Am-Gf-Am-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Am-Cf	210/42	Gms-Ufs-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Af-Cm-Af-Cm-Af-Am-Af-Gms-Cfs-Am	282/114
P92-si24	Afs-Gms-Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Cm-Af-Um-Cf-Am-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf	211/43	Ams-Gfs-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Af-Um-Gf-Um-Cf-Cm-Cf-Am-Cf-Ums-Cfs-Um	283/115
P92-si25	Afs-Ums-Cf-Am-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf-Am-Cf-Gm-Uf	212/44	Ams-Cfs-Gm-Uf-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Af-Ums-Gfs-Um	284/116
P92-si26	Ufs-Gms-Uf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Gf-Am-Gf-Cm-Cf-Gm-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af	213/45	Ums-Gfs-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Cf-Gm-Gf-Cm-Uf-Cm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Am-Cf-Ams-Gfs-Cm	285/117
P92-si27	Gfs-Gms-Cf-Cm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Af-Gm-Af-Cm-Uf	214/46	Ams-Gfs-Um-Cf-Um-Cf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Cm-Gf-Gm-Cf-Cms-Afs-Gm	286/118
P92-si28	Cfs-Ams-Uf-Cm-Cf-Am-Cf-Gm-Cf-Um-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Af	215/47	Ums-Gfs-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Af-Gm-Cf-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gms-Cfs-Um	287/119
P92-si29	Cfs-Cms-Cf-Am-Gf-Gm-Uf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af-Um-Gf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf	216/48	Ams-Cfs-Um-Uf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Am-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Gms-Gfs-Cm	288/120
P92-si30	Afs-Gms-Gf-Um-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Uf-Gm-Cf-Am-Af-Am-Gf-Um-Cf-Am-Af	217/49	Ums-Ufs-Gm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Cf-Am-Uf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Af-Cm-Cf-Ums-Gfs-Gm	289/121
P92-si32	Gfs-Ams-Af-Um-Gf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Af-Gm-Cf-Am-Uf	218/50	Ams-Ufs-Gm-Cf-Um-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Cms-Cfs-Am	290/122
P92-si33	Cfs-Ams-Af-Am-Gf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Gm-Af-Am-Uf	219/51	Ams-Ufs-Um-Cf-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Gms-Cfs-Am	291/123
P92-si34	Cfs-Cms-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Gm-Uf	220/52	Ams-Cfs-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Gm-Gf-Gms-Gfs-Cm	292/124
P92-si35	Gfs-Ams-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Cm-Uf	221/53	Ams-Gfs-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Uf-Cms-Gfs-Cm	293/125
P92-si36	Gfs-Cms-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Cm-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Gm-Af	222/54	Ums-Cfs-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Gf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Cms-Cfs-Am	294/126
P92-si37	Cfs-Cms-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Am-Cf-Gm-Uf	223/55	Ams-Cfs-Gm-Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Um-Cf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gms-Gfs-Cm	295/127
P92-si38	Cfs-Cms-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Gf-Um-Cf-Cm-Uf	224/56	Ams-Gfs-Gm-Af-Cm-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Cm-Cf-Cm-Af-Gm-Gf-Gms-Afs-Gm	296/128
P92-si39	Gfs-Gms-Gf-Cm-Cf-Um-Af-Cm-Gf-Cm-Cf-Gm-Uf-Am-Gf-Am-Cf-Am-Af-Cm-Af	225/57	Ums-Gfs-Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf-Am-Cf-Gm-Gf-Cm-Gf-Um-Af-Gm-Gf-Cm-Cf-Cms-Cfs-Cm	297/129
P92-si40	Gfs-Cms-Cf-Gm-Uf-Am-Gf-Am-Cf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Um-Af	226/58	Ums-Afs-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf-Am-Cf-Gm-Gf-Cms-Gfs-Um	298/130
P92-si41	Cfs-Cms-Gf-Um-Af-Gm-Af-Cm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Gm-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Am-Gf	227/59	Cms-Ufs-Am-Cf-Am-Cf-Am-Cf-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Gf-Um-Cf-Um-Af-Cm-Gf-Gms-Cfs-Gm	299/131
P92-si42	Ufs-Ams-Gf-Am-Cf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Um-Af-Gm-Uf-Cm-Af	228/60	Ums-Gfs-Am-Cf-Um-Af-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf-Ams-Cfs-Gm	300/132

P92-si43	Gfs-Ums-Gf-Um-Gf-Um-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Gf-Cm-Cf-Gm-Gf-Gm-Af	229/61	Ums-Cfs-Cm-Cf-Gm-Gf-Cm-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Am-Cf-Um-Af-Cm-Af-Cm-Af-Cms-Gfs-Um	301/133
P92-si44	Gfs-Ams-Gf-Cm-Cf-Gm-Gf-Gm-Af-Cm-Gf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Cm-Uf-Am-Cf	230/62	Gms-Ufs-Am-Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Cm-Gf-Um-Cf-Cm-Cf-Gm-Gf-Cm-Uf-Cms-Cfs-Um	302/134
P92-si45	Ufs-Cms-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Um-Af-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Af	231/63	Ums-Gfs-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Um-Af-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Ams-Cfs-Gm	303/135
P92-si46	Ufs-Cms-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Am-Af	232/64	Ums-Ufs-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Cf-Am-Gf-Um-Uf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Ams-Ufs-Gm	304/136
P92-si47	Gfs-Cms-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Uf-Am-Af-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Uf	233/65	Ams-Gfs-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Af-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Cms-Cfs-Cm	305/137
P92-si48	Ufs-Cms-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Uf-Am-Af-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Uf-Um-Af	234/66	Ums-Afs-Am-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Af-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Ams-Gfs-Cm	306/138
P92-si49	Cfs-Cms-Uf-Gm-Af-Um-Uf-Am-Af-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Uf-Um-Af-Gm-Cf	235/67	Gms-Cfs-Um-Af-Am-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Af-Um-Cf-Am-Gf-Gms-Gfs-Am	307/139
P92-si50	Gfs-Ams-Uf-Um-Af-Am-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Uf-Am-Gf-Cm-Uf-Um-Uf	236/68	Ams-Afs-Am-Gf-Cm-Uf-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Uf-Um-Af-Am-Uf-Cms-Afs-Gm	308/140
P92-si52	Gfs-Gms-Uf-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Uf	237/69	Ams-Afs-Gm-Gf-Cm-Af-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Am-Cf-Cms-Afs-Gm	309/141
P92-si53	Ufs-Cms-Af-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-Um-Uf	238/70	Ams-Afs-Am-Cf-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Cf-Am-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Um-Gf-Ams-Cfs-Cm	310/142
P92-si54	Gfs-Ums-Gf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Cm-Af	239/71	Ums-Gfs-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Am-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Cms-Afs-Gm	311/143
P92-si55	Afs-Gms-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Cf-Um-Af	240/72	Ums-Afs-Gm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Am-Gf-Um-Af-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Cf-Ums-Cfs-Am	312/144
P92-si56	Cfs-Cms-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Cf-Um-Af-Um-Gf	241/73	Cms-Afs-Um-Af-Gm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Am-Gf-Um-Af-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gms-Cfs-Um	313/145
P92-si57	Cfs-Ums-Uf-Um-Af-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Cf-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Am-Gf	242/74	Cms-Ufs-Gm-Gf-Cm-Af-Um-Af-Gm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Am-Gf-Um-Af-Am-Af-Gms-Gfs-Um	314/146
P92-si58	Gfs-Cms-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Af-Gm-Cf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Cf-Cm-Af-Am-Af	243/75	Ums-Ufs-Um-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Am-Gf-Cms-Cfs-Um	315/147
P92-si59	Ufs-Cms-Af-Cm-Cf-Um-Af-Gm-Gf-Am-Cf-Um-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Gm-Gf-Cm-Af	244/76	Ums-Gfs-Cm-Cf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Gm-Uf-Cm-Cf-Um-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Ams-Ufs-Gm	316/148
P92-si60	Afs-Cms-Uf-Gm-Af-Cm-Uf-Cm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Uf	245/77	Ams-Cfs-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Gf-Am-Gf-Um-Cf-Am-Gf-Ums-Cfs-Cm	317/149
P92-si61	Ufs-Cms-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Uf-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Af	246/78	Ums-Gfs-Cm-Af-Cm-Cf-Am-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Gf-Ams-Gfs-Um	318/150
P92-si62	Gfs-Gms-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Uf-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf	247/79	Cms-Afs-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Am-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Cms-Gfs-Am	319/151

P92-si63	Gfs-Cms-Af-Gm-Uf-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf	248/80	Ams-Gfs-Am-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Am-Cf-Um-Gf-Cms-Afs-Cm	320/152
P92-si64	Gfs-Ums-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Af	249/81	Ums-Gfs-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Af-Cms-Cfs-Am	321/153
P92-si65	Afs-Ams-Cf-Cm-Cf-Gm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Cm-Uf-Am-Cf-Cm-Cf-Gm-Gf-Cm-Af	250/82	Ums-Gfs-Cm-Cf-Gm-Gf-Gm-Uf-Am-Gf-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Cf-Gm-Gf-Gm-Uf-Ums-Gfs-Gm	322/154
P92-si66	Afs-Cms-Uf-Am-Cf-Cm-Cf-Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Cf-Am-Uf	251/83	Ams-Ufs-Gm-Uf-Gm-Uf-Am-Cf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Cf-Gm-Gf-Gm-Uf-Am-Gf-Ums-Gfs-Gm	323/155
P92-si67	Cfs-Cms-Uf-Am-Cf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Af-Gm-Af-Gm-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af	252/84	Ums-Ufs-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Cf-Um-Cf-Um-Gf-Um-Gf-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gms-Gfs-Gm	324/156
P92-si68	Cfs-Cms-Af-Gm-Gf-Am-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Gf-Um-Gf-Am-Uf	253/85	Ams-Ufs-Cm-Af-Cm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gms-Ufs-Cm	325/157
P92-si69	Afs-Gms-Af-Am-Cf-Gm-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Um-Gf	254/86	Cms-Afs-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Um-Cf-Gm-Uf-Um-Cf-Ums-Gfs-Cm	326/158
P92-si70	Ufs-Gms-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf-Gm-Gf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Uf	255/87	Ams-Afs-Am-Gf-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Ams-Ufs-Cm	327/159
P92-si71	Cfs-Gms-Uf-Um-Af-Um-Cf-Am-Cf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Uf	256/88	Ams-Afs-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Gm-Af-Um-Af-Am-Cf-Gms-Gfs-Am	328/160
P92-si72	Cfs-Ams-Cf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Gf	257/89	Cms-Cfs-Am-Gf-Um-Gf-Am-Af-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Gms-Afs-Um	329/161
P92-si74	Cfs-Gms-Gf-Am-Gf-Am-Uf-Gm-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Um-Gf	258/90	Cms-Afs-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Cf-Am-Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Gms-Cfs-Cm	330/162
P92-si75	Afs-Gms-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Af-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf-Gm-Gf-Um-Cf	259/91	Gms-Afs-Cm-Cf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Um-Af-Gm-Af-Am-Gf-Cm-Af-Um-Cf-Ums-Cfs-Cm	331/163
P92-si76	Afs-Cms-Af-Am-Cf-Um-Gf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Cm-Af	260/92	Ums-Gfs-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Cm-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Ums-Ufs-Gm	332/164
P92-si77	Cfs-Ams-Cf-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Cf-Am-Af-Gm-Cf-Am-Uf-Um-Uf	261/93	Ams-Afs-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Gms-Gfs-Gm	333/165
P92-si78	Cfs-Ams-Af-Gm-Cf-Am-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Cm-Uf	262/94	Ams-Gfs-Am-Uf-Am-Af-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Uf-Gms-Gfs-Gm	334/166
P92-si79	Ufs-Ums-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Cm-Uf-Gm-Uf-Cm-Cf-Um-Cf-Um-Cf-Um-Gf-Um-Uf	263/95	Ams-Afs-Cm-Af-Gm-Af-Gm-Af-Gm-Gf-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cf-Cm-Cf-Am-Af-Ams-Afs-Gm	335/167
P92-si80	Gfs-Ums-Cf-Um-Gf-Um-Cf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Uf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Uf	264/96	Ams-Afs-Gm-Gf-Cm-Af-Am-Cf-Am-Gf-Am-Gf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Af-Gm-Af-Cms-Cfs-Cm	336/168

实施例 2：交替修饰序列对 PCSK9 基因的抑制作用

将实施例 1 中合成的 2'-OMe 与 2'-F 交替修饰 siRNA 序列通过脂质纳米颗粒 (LNP) 转染进入 HELA 细胞后，利用 qPCR 技术检测各序列对 PCSK9 基因的抑制作用。

1. 实验材料

受试样品：表2中所列交替修饰小干扰核糖核酸序列P92-si1-84（实施例1中合成）。

细胞种类：海拉细胞系HELA细胞

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测样品对HELA细胞系PCSK9基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 细胞培养

取传代培养的HELA细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清RPMI 1640培养液（补充100×青、链霉素10 μL/mL），置于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将Lipofectamine RNAiMAX和Opti-MEM按1.5:98.5比例混合后涡旋混匀。

转染试剂配制：按照1:1（v/v）的比例取60 μL Opti-MEM稀释的siRNA溶液加入60 μL转染混合液，涡旋混匀后室温静置15 min，得到脂质纳米颗粒（LNP）。取12.5 μL用于包封率检测。

空白对照组转染试剂：在60 μL Opti-MEM中加入制备好的转染混合液60 μL。涡旋混匀，室温静置15 min。

将配制好的转染试剂加入24孔细胞培养板中（每孔100 μL），使最终每孔siRNA浓度为1 nM。加入500 μL细胞悬液（每毫升含 6×10^4 个细胞）。使用十字法混匀后，放入37℃，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 PCSK9 mRNA检测

1) RNA抽提

a. 吸去12孔板中的培养液，每孔加入0.5 mL 1 × PBS清洗细胞，吸去PBS。在孔中加入0.5 mL TRIzol试剂，枪头吹打细胞充分裂解，转移至1.5 mL无RNA酶的EP管中，室温静置5 min。

b. 每管加入0.1 mL氯仿，剧烈振荡15 sec，室温静置5 min。4℃离心，12,000 × g 15 min，取上清200 μL至新EP管中。

c. 加入等体积异丙醇，将管中液体上下颠倒轻轻混匀，-20℃静置10 min，4℃离心，12,000 × g 15 min，弃上清。

d. 加入0.5 mL 75% 乙醇，轻轻洗涤RNA沉淀，4℃ 12,000 × g离心5 min，吸去上清。重复漂洗一次，4℃ 12,000 × g 1 min，用微量枪头将残留乙醇去除干净。

e. 室温晾干残留乙醇2-3 min，加入40 μL RNase-free ddH₂O，溶解。

2) RNA浓度检测

使用nanodrop对RNA浓度进行检测。用2 μL RNase-free ddH₂O作空白对照，每次用2 μL RNA样本进行检测。记录样本浓度。

3) PCSK9 mRNA定量检测

在15 mL离心管中，按 $7.5 \times 84 = 630$ 份加入除引物、模板之外的其余成分，标记为A。

标记好1.5 mL EP管（84个），按照每管7份加入A 77 μL和420 ng总RNA，混匀备用（标记为B）。

内参基因GAPDH和目的基因PCSK9的上下游引物混匀备用（标记为C）。

在PCR板每孔分别加入B 11 μL + C 1 μL。盖上封板膜，3000 rpm离心1 min，上机。

*本环节在冰上操作，保持低温条件。

将板放入qPCR仪，按照以下程序运行：

反转录：55℃，15 min；

预变性：95℃，30 sec；

循环反应：95℃，10 sec；60℃，35 sec；40个循环；

熔解曲线：95℃，15 sec；60℃，60 sec；95℃，15 sec。

运行时间约为2 h。分析实验结果，计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2.4 数据处理

PCSK9 mRNA表达率（%）计算公式为：

表达率 = (PCSK9 mRNA表达量/空白对照组PCSK9 mRNA表达量) × 100%；

PCSK9基因表达抑制率 = 1 - 表达率（%）。

3. 实验结果

本实施例中抑制率为4次实验平均值，各序列对HELA细胞中PCSK9 mRNA的表达抑制率见表4-6。

实验结果表明，一些采用2'-OMe与2'-F交替修饰序列，包括P92-si5、P92-si51、P92-si81、P92-si82、P92-si84、P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si73和P92-si83（具体序列见表3），对HELA细胞中PCSK9 mRNA的表达具有显著抑制作用，抑制率均超过50%。其中P92-si5、P92-si81、P92-si82、P92-si3、P92-si8和P92-si31抑制率超过了70%。

其它各序列对PCSK9 mRNA的表达抑制作用较差，抑制率均低于50%。

表3 对PCSK9基因具有显著抑制作用的siRNA序列

序列编号	正义链序列5'-3'	序列 ID 号/ 对应基础 序列ID号	反义链序列5'-3'	序列 ID 号/ 对应基础序 列ID号
P92-si5	Afs-Ams-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Uf	169/1	Ams-Ufs-Gm-Gf-Am-Af-Gm-Af-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Uf-Cm-Uf-Ums-Gfs-Gm	181/13
P92-si51	Ufs-Gms-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Uf-Am-Gf-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf	170/2	Ams-Ufs-Cm-Cf-Am-Gf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Uf-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Ams-Ufs-Um	182/14
P92-si81	Cfs-Ums-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Af-Gm-Af-Um-Af-Um-Uf	171/3	Ams-Afs-Um-Af-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Gms-Cfs-Am	183/15
P92-si82	Gfs-Ams-Af-Gm-Af-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Uf-Cm-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Um-Uf	172/4	Ams-Afs-Am-Cf-Cm-Cf-Am-Gf-Am-Af-Um-Af-Am-Af-Um-Af-Um-Cf-Um-Uf-Cms-Afs-Am	184/16
P92-si84	Gfs-Ums-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Af-Um-Uf-Am-	173/5	Ums-Ufs-Am-Af-Um-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Cms-Cfs-Cm	185/17

	Af			
P92-si3	Cfs-Ams-Cf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Um-Cf-Um-Uf	174/6	Ams-Afs-Gm-Af-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-Gms-Afs-Gm	186/18
P92-si8	Cfs-Ums-Cf-Am-Uf-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Um-Af-Um-Uf	175/7	Ams-Afs-Um-Af-Am-Af-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Af-Gms-Gfs-Gm	187/19
P92-si9	Gfs-Gms-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Um-Af-Um-Uf-Cm-Gf-Gm-Af-Am-Af	176/8	Ums-Ufs-Um-Cf-Cm-Gf-Am-Af-Um-Af-Am-Af-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Cms-Ufs-Am	188/20
P92-si21	Cfs-Ams-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Af	177/9	Ums-Gfs-Um-Gf-Am-Cf-Am-Cf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gms-Cfs-Am	189/21
P92-si31	Gfs-Gms-Uf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af-Um-Gf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Am-Gf	178/10	Cms-Ufs-Um-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Am-Cf-Cms-Ufs-Gm	190/22
P92-si73	Gfs-Cms-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Af-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf	179/11	Ams-Ufs-Gm-Cf-Cm-Uf-Um-Af-Gm-Af-Am-Gf-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Gf-Cms-Cfs-Am	191/23
P92-si83	Gfs-Gms-Gf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Af-Um-Uf	180/12	Ams-Afs-Um-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cf-Cms-Afs-Gm	192/24

各序列对HELA细胞中PCSK9 mRNA的表达抑制率见表4-6。

(1) 设计的84条序列中，有12条序列对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率均超过50%，包括P92-si5、P92-si51、P92-si81、P92-si82、P92-si84、P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si73和P92-si83。其中P92-si5、P92-si81、P92-si82、P92-si3、P92-si8和P92-si31的抑制率超过了70%。

表4 对PCSK9基因具有显著抑制作用（抑制率高于50%）的交替修饰序列

基础序列号	序列编号	抑制率（%）	基础序列号	序列编号	抑制率（%）
5	P92-si5	72.7	8	P92-si8	72.0
51	P92-si51	61.4	9	P92-si9	63.9
81	P92-si81	71.8	21	P92-si21	62.8
82	P92-si82	75.3	31	P92-si31	70.4
84	P92-si84	66.2	73	P92-si73	60.6
3	P92-si3	70.9	83	P92-si83	58.8

从表4中可以看出，交替修饰序列P92-si5、P92-si51、P92-si81、P92-si82、P92-si84、P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si73和P92-si83（具体序列见表3），共12条序列，对PCSK9 mRNA的表达具有显著抑制作用，抑制率均在50%以上，其中P92-si5、P92-si81、P92-si82、P92-si3、P92-si8和P92-si31的抑制率超过了70%（图1）。这12条序列可作为候选序列。

(2) 26条序列对PCSK9基因的抑制率在30%-50%。例如，P92-si6和P92-si7的抑制率分别为38.3%和35.7%。

表5 对PCSK9基因抑制率在30%-50%的交替修饰序列

基础序列号	序列编号	抑制率 (%)	基础序列号	序列编号	抑制率 (%)
6	P92-si6	38.3	47	P92-si47	31.7
7	P92-si7	35.7	48	P92-si48	40.9
11	P92-si11	33.2	56	P92-si56	30.3
15	P92-si15	31.6	59	P92-si59	39.8
17	P92-si17	32.2	61	P92-si61	37.4
18	P92-si18	48.2	63	P92-si63	33.6
19	P92-si19	35.1	65	P92-si65	38.2
25	P92-si25	48.1	67	P92-si67	35.2
30	P92-si30	31.0	70	P92-si70	46.4
32	P92-si32	30.1	71	P92-si71	32.9
33	P92-si33	47.4	75	P92-si75	40.7
37	P92-si37	37.0	78	P92-si78	34.1
40	P92-si40	46.0	80	P92-si80	42.1

表5中所列26条序列对PCSK9基因的抑制作用较差，抑制率均低于50%，在30%-50%之间。例如，P92-si6和P92-si7的抑制率分别为38.3%和35.7%（图2）。

（3）46条序列对PCSK9基因的抑制率在30%以下。例如，P92-si1和P92-si20的抑制率分别仅为9.2%和6.0%。

表6 对PCSK9基因抑制率在30%以下的交替修饰序列

基础序列号	序列编号	抑制率 (%)	基础序列号	序列编号	抑制率 (%)
1	P92-si1	9.2	43	P92-si43	20.4
2	P92-si2	25.0	44	P92-si44	15.7
4	P92-si4	10.9	45	P92-si45	29.7
10	P92-si10	10.8	46	P92-si46	-6.4
12	P92-si12	-5.7	49	P92-si49	29.0
13	P92-si13	19.4	50	P92-si50	14.6
14	P92-si14	17.1	52	P92-si52	-1.2
16	P92-si16	-4.6	53	P92-si53	28.0
20	P92-si20	6.0	54	P92-si54	7.3
22	P92-si22	-2.8	55	P92-si55	14.1
23	P92-si23	26.1	57	P92-si57	18.2
24	P92-si24	2.9	58	P92-si58	25.4
26	P92-si26	-2.5	60	P92-si60	-4.6
27	P92-si27	21.6	62	P92-si62	4.7
28	P92-si28	11.1	64	P92-si64	-7.9
29	P92-si29	-6.0	66	P92-si66	22.9
34	P92-si34	-5.4	68	P92-si68	11.8
35	P92-si35	15.2	69	P92-si69	-6.0
36	P92-si36	-3.1	72	P92-si72	-3.9
38	P92-si38	5.5	74	P92-si74	-1.6
39	P92-si39	26.8	76	P92-si76	5.2
41	P92-si41	10.7	77	P92-si77	5.7
42	P92-si42	29.7	79	P92-si79	25.4

表6中所列的46条序列，对PCSK9 mRNA的表达抑制作用很差，抑制率均低于30%。例如，P92-si1和P92-si20的抑制率分别仅为9.2%和6.0%（图3和图4）。

(4) 序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如P92-si5的抑制率比P92-si4提高了61.8%，显著提升。
一些序列相近的 siRNA 对 PCSK9 mRNA 的抑制作用对比见表 7。

表7 相近序列的siRNA对PCSK9基因的表达抑制率对比

相近 序列 组	基础 序 列 号	序列 编 号	对应基础序列正义 链	对 应 基 础 序 列 SEQ ID NO:	对应基础序列反义链	对 应 基 础 序 列 SEQ ID NO:	抑制率 (%)
A	4	P92-si4	<u>CAAGAUC CUGC</u> <u>AUGUCUCCA</u>	27	<u>UGGAAGACAUGCA</u> <u>GGAUCUUGGU</u>	99	10.9
	5	P92-si5	<u>AAGAUC CUGCA</u> <u>UGUCUCCA U</u>	1	<u>AUGGAAGACAUGC</u> <u>AGGAUCUUGG</u>	13	72.7
B	50	P92-si50	<u>GAUUA A UGGAG</u> <u>GCUUAGCUU U</u>	68	<u>AAAGCUAAGCCUC</u> <u>CAUUA AUCAG</u>	140	14.6
	51	P92-si51	<u>UGGAGGCUUAG</u> <u>CUUUCUGGAU</u>	2	<u>AUCCAGAAAGCUA</u> <u>AGCCUCCA U U</u>	14	61.4
C	2	P92-si2	<u>AUACCU CACCA</u> <u>AGAUC CUGCA</u>	26	<u>UGCAGGAUCUUGG</u> <u>UGAGGUAUCC</u>	98	25.0
	3	P92-si3	<u>CACCAAGAUCC</u> <u>UGCAUGUCU U</u>	6	<u>AAGACAUGCAGGA</u> <u>UCUUGGUGAG</u>	18	70.9
D	9	P92-si9	<u>GGCCUGGAGU U</u> <u>UAUUCGGAAA</u>	8	<u>UUUCCGAAUAAAC</u> <u>UCCAGGCCUA</u>	20	63.9
	10	P92-si10	<u>CCUGGAGUUA</u> <u>UUCGGAAAAG</u>	30	<u>CUUUUCCGAAUAA</u> <u>ACUCCAGGCC</u>	102	10.8
E	21	P92-si21	<u>CAGCACCUGCU</u> <u>UUGUGUCACA</u>	9	<u>UGUGACACAAAGC</u> <u>AGGUGCUGCA</u>	21	62.8
	22	P92-si22	<u>GCACCUGCUU U</u> <u>GUGUCACAGA</u>	41	<u>UCUGUGACACAAA</u> <u>GCAGGUGCUG</u>	113	-2.8
F	30	P92-si30	<u>AGGUCUGGAAU</u> <u>GCAAAGUCA A</u>	49	<u>UUGACUUUGCAU U</u> <u>CCAGACCUGG</u>	121	31.0
	31	P92-si31	<u>GGUCUGGAAUG</u> <u>CAAAGUCAAG</u>	10	<u>CUUGACUUUGCAU</u> <u>UCCAGACCUG</u>	22	70.4
G	73	P92-si73	<u>GCGGAGAUGCU</u> <u>UCUAAGGCAU</u>	11	<u>AUGCCUUAAGAAGC</u> <u>AUCUCCGCCA</u>	23	60.6
	74	P92-si74	<u>CGGAGAUGCUU</u> <u>CUAAGGCAUG</u>	90	<u>CAUGCCUUAAGAAG</u> <u>CAUCUCCGCC</u>	162	-1.6

从表 7 中可以看出，一些序列相近的 siRNA，对 PCSK9 mRNA 的表达抑制作用差异非常大。

基础序列 4 与基础序列 5 相比，仅末端 1 个碱基不同。正义链：基础序列 4 的 5'末端多 1 个 C，基础序列 5 的 3'末端多 1 个 U，其它序列完全相同；反义链：基础序列 4 的 3'末端多 1 个 U，基础序列 5 的 5'末端多 1 个 A，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 P92-si5 的抑制率比 P92-si4 提高了 61.8%，显著提升。

基础序列 50 与基础序列 51 相比，仅末端 6 个碱基不同。正义链：基础序列 50 的 5'末端为 GAUUA A，序列 51 的 3'末端为 CUGGAU，其它序列完全相同；反义链，基础序列 50 的 3'末端为 AAUCAG，基础序列 51 的 5'末端为 AUCCAG，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 P92-si51 的抑制率比 P92-si50 提高了 46.8%，显著提升。

基础序列 2 与基础序列 3 相比，仅末端 6 个碱基不同。正义链：基础序列 2 的 5'末端为 AUACCU，基础序列 3 的 3'末端为 UGUCU U，其它序列完全相同；反义链：基础序列 2 的 3'末端为 GUAUCC，基础序列 3 的 5'末端为 AAGACA，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 P92-si3 的抑制率比 P92-si2 提高了 45.9%，显著提升。

基础序列 9 与基础序列 10 相比，仅末端 2 个碱基不同。正义链：基础序列 9 的 5'末端为 GG，基础序列 10 的 3'末端为 AG，其它序列完全相同；反义链：基础序列 9 的 3'末端为 UA，基础序列 10 的 5'末端为 CU，其它序列完全相同。但是交替序列 P92-si9 的抑制率比序列 P92-si10 提高了 53.1%，显著提升。

基础序列 21 与序列基础 22 相比，仅末端 2 个碱基不同。正义链：基础序列 21 的 5'末端为 CA，基础序列 22 的 3'末端为 GA，其它序列完全相同；反义链：基础序列 21 的 3'末端为 CA，基础序列 22 的 5'末端为 UC，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 P92-si21 的抑制率比 P92-si22 提高了 65.6%，显著提升。

基础序列 30 与基础序列 31 相比，仅末端 1 个碱基不同。正义链：基础序列 30 的 5'末端为 A，基础序列 31 的 3'末端为 G，其它序列完全相同；反义链：基础序列 30 的 3'末端为 G，基础序列 31 的 5'末端为 C，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 P92-si31 的抑制率比 P92-si30 提高了 39.4%，显著提升。

基础序列 73 与基础序列 74 相比，仅末端 1 个碱基不同。正义链：基础序列 73 的 5'末端为 G，基础序列 74 的 3'末端为 G，其它序列完全相同；反义链：基础序列 73 的 3'末端为 A，基础序列 74 的 5'末端为 C，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 P92-si73 的抑制率比 P92-si74 提高了 62.2%，显著提升。

因此，从针对 PCSK9 mRNA 序列设计的非常大量的寡核苷酸序列中筛选出具有显著抑制活性的序列并不容易，需要付出大量创造性劳动。

总结：

(1) 设计的84条序列中，有12条序列对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率均超过50%，包括P92-si5、P92-si51、P92-si81、P92-si82、P92-si84、P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si73和P92-si83。其中P92-si5、P92-si81、P92-si82、P92-si3、P92-si8和P92-si31的抑制率超过了70%。

(2) 26条序列对PCSK9基因的抑制率在30%-50%。例如，P92-si6和P92-si7的抑制率分别为38.3%和35.7%。

(3) 46条序列对PCSK9基因的抑制率在30%以下。例如，P92-si1和P92-si20的抑制率分别仅为9.2%和6.0%。

(4) 序列相近的 siRNA，活性差异非常大。例如 P92-si5 的抑制率比 P92-si4 提高了 61.8%，显著提升。因此，从针对 PCSK9 mRNA 序列设计的非常大量的寡核苷酸序列中筛选出具有显著抑制活性的序列并不容易，需要付出大量创造性劳动。

实施例 3：无修饰序列对 PCSK9 基因的抑制作用

本实施例中合成一些实施例 2 中修饰序列对应的无修饰序列(即基础序列)，并通过脂质纳米颗粒(LNP)转染进入 HELA 细胞，利用 qPCR 技术检测各无修饰序列对 PCSK9 基因的抑制作用，筛选出具有较好抑制效果的无修饰 siRNA 序列。

1. 实验材料

受试样品：

表8中所列无修饰小干扰核糖核酸序列。所有序列按照实施例1中方法进行合成。

表8 无修饰siRNA序列

序列编号	正义链序列（基础序列）5'-3'	序列 ID 号	反义链序列（基础序列）5'-3'	序列 ID 号
si5	AAGAUCUGCAUGUCUCCA	1	AUGGAAGACAUGCAGGAUCUUGG	13
si51	UGGAGGCUUAGCUUUCUGAU	2	AUCCAGAAAGCUAAGCCUCCA	14

si81	CUUUUGUAACUUGAAGAUUU	3	AAUAUCUUAAGUUACAAAAGCA	15
si82	GAAGAUUUUAUUCUGGGUUU	4	AAACCCAGAAUAAAUAUCUCAA	16
si84	GUUUUGUAGCAUUUUUAUUA	5	UUAAUAAAAAUGCUACAAAACCC	17
si3	CACCAAGAUCCUGCAUGUCUU	6	AAGACAUGCAGGAUCUUGGUGAG	18
si8	CUCAUAGGCCUGGAGUUUAUU	7	AAUAAACUCCAGGCCUAUGAGGG	19
si9	GGCCUGGAGUUUAUUCGGAAA	8	UUUCCGAAUAAACUCCAGGCCUA	20
si21	CAGCACCUGCUUUGUGUCACA	9	UGUGACACAAAGCAGGUGCUGCA	21
si31	GGUCUGGAAUGCAAAGUCAAG	10	CUUGACUUUGCAUUCAGACCUG	22
si73	GCGGAGAUGCUCUAAGGCAU	11	AUGCCUUAGAAGCAUCUCCGCCA	23
si83	GGGUUUUGUAGCAUUUUUAUU	12	AAUAAAAAUGCUACAAAACCCAG	24
si1	GGGAUACCUCACCAAGAUCU	25	AGGAUCUUGGUGAGGUAUCCCCG	97
si2	AUACCUCACCAAGAUCUGCA	26	UGCAGGAUCUUGGUGAGGUAUCC	98
si4	CAAGAUCUGCAUGUCUCCA	27	UGGAAGACAUGCAGGAUCUUGGU	99
si6	GGCUUCCUGGUGAAGAUGAGU	28	ACUCAUCUUCACCAGGAAGCCAG	100
si7	GCUGGAGCUGGCCUUGAAGUU	29	AACUUAAGGCCAGCUCCAGCAG	101
si10	CCUGGAGUUUAUUCGGAAG	30	CUUUUCCGAAUAAACUCCAGGCC	102
si11	GCCAGCUGGUCCAGCCUGUGG	31	CCACAGGCUGGACCAGCUGGCUU	103
si12	ACUGGUGGUGCUGCUGCCCCU	32	AGGGGCAGCAGCACCACCAGUGG	104
si13	UGCCCCUGGCGGGUGGGUACA	33	UGUACCCACCCGCCAGGGGCAGC	105
si14	UGGGUACAGCCGCGUCCUCAA	34	UUGAGGACGCGGCUUAGGCCAGC	106
si15	CGUCCUCAACGCCGCCUGCCA	35	UGGCAGGCGGCGUUGAGGACGCG	107
si16	GGUCGUGCUGGUCACCGCUGC	36	GCAGCGGUGACCAGCACGACCCC	108
si17	AGGACAUCAUUGGUGCCUCCA	37	UGGAGGCACCAAUGAUGUCCUCC	109
si18	UCAUUGGUGCCUCCAGCGACU	38	AGUCGCUGGAGGCACCAAUGAUG	110
si19	GUGCCUCCAGCGACUGCAGCA	39	UGCUGCAGUCGCUGGAGGCACCA	111
si20	AGCGACUGCAGCACCUGCUUU	40	AAAGCAGGUGCUGCAGUCGCUGG	112
si22	GCACCUGCUUUGUGUCACAGA	41	UCUGUGACACAAAGCAGGUGCUG	113
si23	CUUUGUGUCACAGAGUGGGAC	42	GUCCACUCUGUGACACAAAGCA	114
si24	AGUGGGACAUCACAGGCUGCU	43	AGCAGCCUGUGAUGUCCACUCU	115
si25	AUCACAGGCUGCUGCCCACGU	44	ACGUGGGCAGCAGCCUGUGAUGU	116
si26	UGUCUGCCGAGCCGGAGCUCA	45	UGAGCUCCGGCUCGGCAGACAGC	117
si27	GGCCGAGUUGAGGCAGAGACU	46	AGUCUCUGCCUCAACUCGGCCAG	118
si28	CAUCCACGCUUCCUGCUGCCA	47	UGGCAGCAGGAAGCGUGGAUGCU	119
si29	CCCAGGUCUGGAAUGCAAAGU	48	ACUUUGCAUUCAGACCUGGGGC	120
si30	AGGUCUGGAAUGCAAAGUCAA	49	UUGACUUUGCAUUCAGACCUGG	121
si32	GAAUGCAAAGUCAAGGAGCAU	50	AUGCUCUUGACUUUGCAUCCA	122
si33	CAAAGUCAAGGAGCAUGGAAU	51	AUCCAUGCUCCUUGACUUUGCA	123
si34	CCCUCAGGAGCAGGUGACCGU	52	ACGGUACCUUGCUCUAGGGGGC	124
si35	GAGGAGGGCUGGACCCUGACU	53	AGUCAGGGUCCAGCCUCCUCGC	125
si36	GCUGCAGUGCCCUCCUGGGA	54	UCCAGGGAGGGCACUGCAGCCA	126
si37	CCUCCUGGGACCUCCACGCU	55	ACGUGGGAGGUCCAGGGAGGGC	127
si38	CCCUGGGACCUCCACGUCCU	56	AGGACGUGGGAGGUCCAGGGAG	128
si39	GGCCUACGCCGUAGACAACA	57	UGUUGUCUACGGCGUAGGCCCC	129
si40	GCCGUAGACAACACGUGUGUA	58	UACACACGUGUUGUCUACGGCGU	130
si41	CCGUAGACAACACGUGUGUAG	59	CUACACACGUGUUGUCUACGGCG	131
si42	UAGACAACACGUGUGUAGUCA	60	UGACUACACACGUGUUGUCUACG	132
si43	GUGUGUAGUCAGGAGCCGGGA	61	UCCGGCUCUUGACUACACACGU	133

si44	GAGCCGGGACGUCAGCACUAC	62	GUAGUGCUGACGUCCCGGCUCCU	134
si45	UCAGCACUACAGGCAGACCA	63	UGGUGCUGCCUGUAGUGCUGACG	135
si46	UCUCCAGCUAACUGUGGAGAA	64	UUCUCCACAGUUAGCUGGAGAUG	136
si47	GCUCCCUGAUUAAUGGAGGCU	65	AGCCUCCAUAUAAUCAGGGAGCCC	137
si48	UCCCUGAUUAAUGGAGGCUUA	66	UAAGCCUCCAUAUAAUCAGGGAGC	138
si49	CCUGAUUAAUGGAGGCUUAGC	67	GCUAAGCCUCCAUAUAAUCAGGGA	139
si50	GAUUAUAAUGGAGGCUUAGCUUU	68	AAAGCUAAGCCUCCAUAUAAUCAG	140
si52	GGUGGUCACAGGCUGUGCCUU	69	AAGGCACAGCCUGUGACCACCAG	141
si53	UCACAGGCUGUGCCUUGGUUU	70	AAACCAAGGCACAGCCUGUGACC	142
si54	GUGCCUUGGUUUCCUGAGCCA	71	UGGCUCAGGAAACCAAGGCACAG	143
si55	AGCCACCUUUACUCUGCUCUA	72	UAGAGCAGAGUAAAGGUGGCUCA	144
si56	CCACCUUUACUCUGCUCUAUG	73	CAUAGAGCAGAGUAAAGGUGGCU	145
si57	CUUUACUCUGCUCUAUGCCAG	74	CUGGCAUAGAGCAGAGUAAAGGU	146
si58	GCUGUGCUGCAACACCCAAA	75	UUUGGGUGUUGCUAGCACAGCCU	147
si59	UCACCUAGGACUGACUCGGCA	76	UGCCGAGUCAGUCCUAGGUGAUG	148
si60	ACUGACUCGGCAGUGUGCAGU	77	ACUGCACACUGCCGAGUCAGUCC	149
si61	UCGGCAGUGUGCAGUGGUGCA	78	UGCACCACUGCACACUGCCGAGU	150
si62	GGCAGUGUGCAGUGGUGCAUG	79	CAUGCACCACUGCACACUGCCGA	151
si63	GCAGUGGUGCAUGCACUGUCU	80	AGACAGUGCAUGCACCACUGCAC	152
si64	GUGCAUGCACUGUCUCAGCCA	81	UGGCUGAGACAGUGCAUGCACCA	153
si65	AACCCGCUCCACUACCCGGCA	82	UGCCGGGUAGUGGAGCGGGUUGG	154
si66	ACUACCCGGCAGGGUACACAU	83	AUGUGUACCCUGCCGGGUAGUGG	155
si67	CCUACUUCACAGAGGAAGAAA	84	UUUCUCCUCUGUGAAGUAGGGG	156
si68	CCAGGAAGCUCGGUGAGUGAU	85	AUCACUCACCGAGCUUCCUGGUC	157
si69	AGAACGAUGCCUGCAGGCAUG	86	CAUGCCUGCAGGCAUCGUUCUGC	158
si70	UGCCUGCAGGCAUGGAACUUU	87	AAAGUCCAUGCCUGCAGGCAUC	159
si71	CGUUAUCACCCAGGCCUGAUU	88	AAUCAGGCCUGGGUGAUAAACGGA	160
si72	CACCCAGGCCUGAUUCACUGG	89	CCAGUGAAUCAGGCCUGGGUGAU	161
si74	CGGAGAUUCUUAAGGCAUG	90	CAUGCCUUAAGAAGCAUCUCCGCC	162
si75	AGAUGCUUCUAAGGCAUGGUC	91	GACCAUGCCUUAAGAAGCAUCUCC	163
si76	ACAACUGUCCCUCCUUGAGCA	92	UGCUCUAGGAGGGACAGUUGUUG	164
si77	CACCCAAGCAAGCAGACAUUU	93	AAAUGUCUGCUUGCUUGGGUGGG	165
si78	CAAGCAAGCAGACAUUUAUCU	94	AGAUAAAUGUCUGCUUGCUUGGG	166
si79	UUUGGGUCUGUCCUCUCUGUU	95	AACAGAGAGGACAGACCCAAAAG	167
si80	GUCUGUCCUCUCUGUUGCCUU	96	AAGGCAACAGAGAGGACAGACCC	168

细胞种类：海拉细胞系HELA细胞

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

2. 实验方法

参照实施例2。

3. 实验结果

各无修饰序列对PCSK9 mRNA表达抑制率见表9和表10。

无修饰序列si5、si51、si81、si82、si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83对HELA细胞中PCSK9 mRNA的表达具有显著抑制作用，抑制率均在50%以上，其中si5、si81、si82、si3和si8抑制率超过了60%。

(1) 12条无修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率均超过50%，包括si5、si51、si81、si82、

si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83。其中si5、si81、si82、si3和si8抑制超过了60%。

表9 对PCSK9基因具有显著抑制作用（抑制率高于50%）的无修饰序列

基础序列号	序列编号	抑制率（%）	基础序列号	序列编号	抑制率（%）
5	si5	60.3	8	si8	60.6
51	si51	53.4	9	si9	52.6
81	si81	62.0	21	si21	51.2
82	si82	63.1	31	si31	59.2
84	si84	55.7	73	si73	52.4
3	si3	62.3	83	si83	50.1

表9中所列各无修饰序列，包括si5、si51、si81、si82、si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83对PCSK9 mRNA的表达具有显著抑制作用，抑制率均在50%以上。其中si5、si81、si82、si3和si8抑制超过了60%（图5）。这12条序列可作为候选序列。

（2）其它无修饰序列对PCSK9基因的抑制率均低于40%。例如，si52和si74抑制率仅为0.5%和2.2%。

表10 对PCSK9基因抑制率低于40%的无修饰序列

基础序列号	序列编号	抑制率（%）	基础序列号	序列编号	抑制率（%）
2	si2	19.6	32	si32	27.3
4	si4	9.1	50	si50	10.8
6	si6	31.5	52	si52	0.5
7	si7	31.1	22	si22	-2.0
10	si10	11.4	72	si72	1.0
20	si20	-3.0	74	si74	2.2
30	si30	26.7	80	si80	38.5

表10中各序列对PCSK9 mRNA的表达抑制作用很差，抑制率均低于40%。例如si52和si74抑制率仅为0.5%和2.2%（图6）。

（3）序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如基础序列5的抑制率比基础序列4提高了51.2%，显著提升。

一些序列相近的 siRNA 对 PCSK9 mRNA 的抑制作用对比见表 11。

表 11 序列相近的无修饰序列对 PCSK9 基因的表达抑制率对比

相近序列组	基础序列号	序列编号	正义链	基础序列 SEQ ID NO:	反义链	基础序列 SEQ ID NO:	抑制率（%）
A	4	si4	CAAGAUC <u>CCUGC</u> AUGUCU <u>UCCA</u>	27	UGGAAGACA <u>UGC</u> AGGAUCU <u>UGGU</u>	99	9.1
	5	si5	AAGAUC <u>CGCA</u> UGUCU <u>UCCAU</u>	1	AUGGAAGACA <u>UG</u> CAGGAUCU <u>UGG</u>	13	60.3
B	50	si50	GAUUAA <u>UGGAG</u> GCUUAGCU <u>UU</u>	68	AAAGCUAAGCCU CCAUUAAUCAG	140	10.8
	51	si51	UGGAGGCU <u>UAG</u> CUUUCUGGAU	2	AUCCAGAAAGCU AAGCCUCCA <u>U</u>	14	53.4
C	2	si2	AUACCUCAC <u>CA</u> AGAUC <u>CGCA</u>	26	UGCAGGAUCU <u>UG</u> GUGAGGU <u>AUCC</u>	98	19.6
	3	si3	CACCAAGA <u>UCC</u>	6	AAGACAUGCAGG	18	62.3

			<u>UGCAUGUCUU</u>		<u>AUCUUGGUGAG</u>		
D	9	si9	<u>GGCCUGGAGUU</u> <u>UAUUCGAAA</u>	8	<u>UUUCCGAAUAAA</u> <u>CUCCAGGCCUA</u>	20	52.6
	10	si10	<u>CCUGGAGUUUA</u> <u>UUCGAAAAG</u>	30	<u>CUUUUCCGAAUA</u> <u>AACUCCAGGCC</u>	102	11.4
E	21	si21	<u>CAGCACCUGCU</u> <u>UUGUGUCACA</u>	9	<u>UGUGACACAAAAG</u> <u>CAGGUGCUGCA</u>	21	51.2
	22	si22	<u>GCACCUGCUUU</u> <u>GUGUCACAGA</u>	41	<u>UCUGUGACACAA</u> <u>AGCAGGUGCUG</u>	113	-2.0
F	30	si30	<u>AGGUCUGGAAU</u> <u>GCAAAGUCA</u>	49	<u>UUGACUUUGCAU</u> <u>UCCAGACCUGG</u>	121	26.7
	31	si31	<u>GGUCUGGAAUG</u> <u>CAAAGUCAAG</u>	10	<u>CUUGACUUUGCA</u> <u>UUCAGAGCCUG</u>	22	59.2
G	73	si73	<u>GCGGAGAUGCU</u> <u>UCUAAGGCAU</u>	11	<u>AUGCCUAGAAG</u> <u>CAUCUCCGCCA</u>	23	52.4
	74	si74	<u>CGGAGAUGCUU</u> <u>CUAAGGCAUG</u>	90	<u>CAUGCCUAGAA</u> <u>GCAUCUCCGCC</u>	162	2.2

从表 11 中可以看出，一些序列相近的 siRNA，对 PCSK9 mRNA 的表达抑制作用差异非常大。

基础序列 4 与基础序列 5 相比，仅末端 1 个碱基不同。正义链：基础序列 4 的 5'末端多 1 个 C，基础序列 5 的 3'末端多 1 个 U，其它序列完全相同；反义链：基础序列 4 的 3'末端多 1 个 U，基础序列 5 的 5'末端多 1 个 A，其它序列完全相同。但是基础序列 5 的抑制率比基础序列 4 提高了 51.2%，显著提升。

基础序列 50 与基础序列 51 相比，仅末端 6 个碱基不同。正义链：基础序列 50 的 5'末端为 GAUUA，基础序列 51 的 3'末端为 CUGGAU，其它序列完全相同；反义链，基础序列 50 的 3'末端为 AAUCAG，基础序列 51 的 5'末端为 AUCCAG，其它序列完全相同。但是基础序列 51 的抑制率比基础序列 50 提高了 42.6%，显著提升。

基础序列 2 与基础序列 3 相比，仅末端 6 个碱基不同。正义链：基础序列 2 的 5'末端为 AUACCU，基础序列 3 的 3'末端为 UGUCUU，其它序列完全相同；反义链：基础序列 2 的 3'末端为 GUAUCC，基础序列 3 的 5'末端为 AAGACA，其它序列完全相同。但是基础序列 3 的抑制率比基础序列 2 提高了 42.7%，显著提升。

基础序列 9 与基础序列 10 相比，仅末端 2 个碱基不同。正义链：基础序列 9 的 5'末端为 GG，基础序列 10 的 3'末端为 AG，其它序列完全相同；反义链：基础序列 9 的 3'末端为 UA，基础序列 10 的 5'末端为 CU，其它序列完全相同。但是基础序列 9 的抑制率比基础序列 10 提高了 41.2%，显著提升。

基础序列 21 与基础序列 22 相比，仅末端 2 个碱基不同。正义链：基础序列 21 的 5'末端为 CA，基础序列 22 的 3'末端为 GA，其它序列完全相同；反义链：基础序列 21 的 3'末端为 CA，基础序列 22 的 5'末端为 UC，其它序列完全相同。但是基础序列 21 的抑制率比基础序列 22 提高了 53.2%，显著提升。

基础序列 30 与基础序列 31 相比，仅末端 1 个碱基不同。正义链：基础序列 30 的 5'末端为 A，基础序列 31 的 3'末端为 G，其它序列完全相同；反义链：基础序列 30 的 3'末端为 G，基础序列 31 的 5'末端为 C，其它序列完全相同。但是基础序列 31 的抑制率比基础序列 30 提高了 32.5%，显著提升。

基础序列 73 与基础序列 74 相比，仅末端 1 个碱基不同。正义链：基础序列 73 的 5'末端为 G，基础序列 74 的 3'末端为 G，其它序列完全相同；反义链：基础序列 73 的 3'末端为 A，基础序列 74 的 5'末端为 C，其它序列完全相同。但是基础序列 73 的抑制率比基础序列 74 提高了 50.2%，显著提升。

因此，从针对 PCSK9 mRNA 序列设计的非常大量的寡核苷酸序列中筛选出具有显著抑制活性的序列并不容易，需要付出大量创造性劳动。

(4) 不同序列经过交替修饰后，对活性影响并不一致。有的抑制率显著提升，例如基础序列5，交替修饰比无修饰序列抑制率提高了12.4%；有的不明显，例如基础序列4、22和52，交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

表12 交替修饰序列与无修饰序列对PCSK9基因的抑制率比较

基础序列号	序列编号	无修饰抑制率 (%)	交替修饰抑制率 (%)	抑制率提高 (%)
5	si5	60.3	72.7	12.4
51	si51	53.4	61.4	8.0
81	si81	62.0	71.8	9.8
82	si82	63.1	75.3	12.2
84	si84	55.7	66.2	10.5
3	si3	62.3	70.9	8.6
8	si8	60.6	72.0	11.4
9	si9	52.6	63.9	11.3
21	si21	51.2	62.8	11.6
31	si31	59.2	70.4	11.2
73	si73	52.4	60.6	8.2
83	si83	50.1	58.8	8.7
2	si2	19.6	25.0	5.4
4	si4	9.1	10.9	1.8
6	si6	31.5	38.3	6.8
7	si7	31.1	35.7	4.6
10	si10	11.4	10.8	-0.6
20	si20	-3.0	6.0	9.0
22	si22	-2.0	-2.8	-0.8
30	si30	26.7	31.0	4.3
32	si32	27.3	30.1	2.8
50	si50	10.8	14.6	3.8
52	si52	0.5	-1.2	-1.7
72	si72	1.0	-3.9	-4.9
74	si74	2.2	-1.6	-3.8
80	si80	38.5	42.1	3.6

从表12可以看出，不同序列经过交替修饰，对PCSK9 mRNA抑制率的影响不一致。有的显著提升，例如基础序列5交替修饰比无修饰序列抑制率提高了12.4%，基础序列82交替修饰比无修饰序列抑制率提高了12.2%；有的不明显，例如基础序列4、22和52，交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

因此，不是所有的无修饰序列经过交替修饰都能使活性提高，交替修饰对不同序列的活性影响并不一致。

总结：

- (1) 12条无修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率均超过50%，包括si5、si51、si81、si82、si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83。其中si5、si81、si82、si3和si8抑制超过了60%。
- (2) 其它无修饰序列对PCSK9基因的抑制率低于40%。例如，si52和si74抑制率仅为0.5%和2.2%。
- (3) 序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如基础序列5的抑制率比基础序列4提高了51.2%，显著提

升。

(4) 不同序列经过交替修饰后，对活性影响并不一致。有的抑制率显著提升，例如基础序列5，交替修饰比无修饰序列抑制率提高了12.4%；有的不明显，例如基础序列4、22和52，交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

实施例 4：采用模板修饰的序列对 PCSK9 基因的抑制作用

本实施例通过将实施例3中筛选出的序列，即无修饰序列si5、si51、si81、si82、si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83，共12条序列，采用修饰模板进行修饰。其中DV25、DV26、DV27、DV28、DV29、DV30和DV31是本公开设计的新修饰模板，DV21和DV22是已公开的Advanced ESC修饰模板。

1. 实验材料

受试样品：

表13中所列采用不同模板（DV25、DV26、DV27、DV28、DV29、DV30、DV31、DV21和DV22）修饰的实施例3中序列si5、si51、si81、si82、si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83，以及这些序列对应的交替修饰序列P92-si5、P92-si51、P92-si81、P92-si82、P92-si84、P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si73和P92-si83（实施例1中合成）。

本公开修饰模板修饰原则如下：DV25~DV29：

反义链采用以下修饰方式的一种：

序号	反义链（AS） 5'-3'																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A	2'-O-Me+PS	2'-F+PS	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me+PS	2'-O-Me+PS	2'-O-Me
B	2'-O-Me+PS	2'-F+PS	2'-F	2'-F	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me+PS	2'-O-Me+PS	2'-O-Me
C	2'-O-Me+PS	2'-F+PS	2'-O-Me	2'-F	2'-F	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me-F	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me	2'-O-Me+PS	2'-O-Me+PS	2'-O-Me

正义链采用以下修饰方式的一种：

序号	正义链（SS） 5'-3'																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21

a	2'- O M e +P S	2'- O M e +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F	2'- O M e	2 ' - F	2'- F	2 ' - F	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e
b	2'- O M e +P S	2'- O M e +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F	2'- O M e	2 ' - F	2'- O M e	2 ' - F	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

反义链采用修饰方式 A，正义链采用修饰方式 a 的 siRNA 修饰模板命名为 DV25；

反义链采用修饰方式 B，正义链采用修饰方式 a 的 siRNA 修饰模板命名为 DV26；

反义链采用修饰方式 C，正义链采用修饰方式 a 的 siRNA 修饰模板命名为 DV27；

反义链采用修饰方式 B，正义链采用修饰方式 b 的 siRNA 修饰模板命名为 DV28；

反义链采用修饰方式 C，正义链采用修饰方式 b 的 siRNA 修饰模板命名为 DV29。

DV30:

反义链:

反义链 (AS) 5'-3'																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
2'- O M e + P S	2 ' - F + P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F M e	2 ' - O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e + P S	2'- O M e + P S	2'- O M e

正义链:

正义链 (SS) 5'-3'																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2'- O Me +P S	2'- O M e +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F M e	2'- O M e	2 ' - F M e	2 ' - F M e	2 ' - F M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

DV31:

反义链:

反义链 (AS) 5'-3'																								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

2'- O Me +P S	2 ' - F + P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e + P S	2'- O M e + P S	2'- O M e
---------------------------	---------------------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-----------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-----------------------	--------------------	-----------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	--------------------

正义链：

正义链 (SS) 5'-3'																					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
2'- O M e +P S	2'- O M e +P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2 ' - F e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

DV21:

反义链：

反义链 (AS) 5'-3'																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
2'- O Me +P S	2 ' - F + P S	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e + P S	2'- O M e + P S	2'- O M e

正义链：

正义链 (SS) 5'-3'																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2'- O Me +P S	2'- O Me +P S	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2 ' - F e	2'- O Me	2 ' - F e	2 ' - F e	2 ' - F e	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2 ' - F e	2 ' - F e	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me	2'- O Me

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

DV22:

反义链：

反义链 (AS) 5'-3'																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2 ' - F e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e	2'- O M e + PS	2'- O M e + PS	2'- O M e

+	+																			
P	P																			
S	S																			

正义链:

正义链 (SS) 5'-3'																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O	2'-O
Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me
+P	+P																			
S	S																			

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

各模板修饰序列详见表13，各序列合成方法同实施例1。

表13 采用不同修饰模板修饰的序列

基 础 序 列 号	模 板 修 饰 序 列 编 号	正义链序列 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO:/对应基 础序列SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO:/对 应 基 础 序 列 SEQ ID NO:
5	P92-si5-DV25	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	376/13
	P92-si5-DV26	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gf-Gf-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	377/13
	P92-si5-DV27	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gf-Af-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	378/13
	P92-si5-DV28	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	338/1	Ams-Ufs-Gf-Gf-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	377/13
	P92-si5-DV29	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	338/1	Ams-Ufs-Gm-Gf-Af-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	378/13
	P92-si5-DV30	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Um-Cm-Cm-Am-Um	339/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gm-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	379/13
	P92-si5-DV31	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Am-Um-Gm-Um-Cm-Um-Um-Cm-Cm-Am-Um	340/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	376/13
	P92-si5-DV21	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Uf-Uf-Cm-Cm-Am-Um	341/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	376/13

	P92-si5-DV22	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Um-Cm-Cm-Am-Um	339/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	376/13
51	P92-si51-DV25	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	342/2	Ams-Ufs-Cm-Cm-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	380/14
	P92-si51-DV26	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	342/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	381/14
	P92-si51-DV27	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	342/2	Ams-Ufs-Cm-Cf-Af-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	382/14
	P92-si51-DV28	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Am-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	343/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	381/14
	P92-si51-DV29	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Am-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	343/2	Ams-Ufs-Cm-Cf-Af-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	382/14
	P92-si51-DV30	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gm-Am-Um	344/2	Ams-Ufs-Cm-Cm-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cm-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	383/14
	P92-si51-DV31	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gm-Cm-Um-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gm-Am-Um	345/2	Ams-Ufs-Cm-Cm-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	380/14
	P92-si51-DV21	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cf-Uf-Gm-Gm-Am-Um	346/2	Ams-Ufs-Cm-Cm-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	380/14
	P92-si51-DV22	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gm-Am-Um	344/2	Ams-Ufs-Cm-Cm-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	380/14
81	P92-si81-DV25	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
	P92-si81-DV26	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	385/15
	P92-si81-DV27	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	386/15
	P92-si81-DV28	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	Ams-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	385/15

	P92-si81-DV29	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	Ams-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	386/15
	P92-si81-DV30	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Am-Um-Am-Um-Um	349/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cm-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	387/15
	P92-si81-DV31	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Um-Um-Gm-Am-Am-Gm-Am-Um-Am-Um-Um	350/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
	P92-si81-DV21	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gf-Af-Um-Am-Um-Um	351/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
	P92-si81-DV22	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Am-Um-Am-Um-Um	349/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
82	P92-si82-DV25	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	352/4	Ams-Afs-Am-Cm-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	388/16
	P92-si82-DV26	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	352/4	Ams-Afs-Af-Cf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	389/16
	P92-si82-DV27	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	352/4	Ams-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	390/16
	P92-si82-DV28	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	353/4	Ams-Afs-Af-Cf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	389/16
	P92-si82-DV29	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	353/4	Ams-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	390/16
	P92-si82-DV30	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gm-Gm-Um-Um-Um	354/4	Ams-Afs-Am-Cm-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Am-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	391/16
	P92-si82-DV31	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Am-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gm-Gm-Um-Um-Um	355/4	Ams-Afs-Am-Cm-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	388/16
	P92-si82-DV21	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gf-Gf-Gm-Um-Um-Um	356/4	Ams-Afs-Am-Cm-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	388/16
	P92-si82-DV22	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gm-Gm-Um-Um-Um	354/4	Ams-Afs-Am-Cm-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	388/16

84	P92-si84-DV25	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Am-Am-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	392/17
	P92-si84-DV26	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	393/17
	P92-si84-DV27	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	394/17
	P92-si84-DV28	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	358/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	393/17
	P92-si84-DV29	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	358/5	Ums-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	394/17
	P92-si84-DV30	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Am-Um-Um-Am-Am	359/5	Ums-Ufs-Am-Am-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cm-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	395/17
	P92-si84-DV31	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Um-Um-Am-Am	360/5	Ums-Ufs-Am-Am-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	392/17
	P92-si84-DV21	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Uf-Af-Um-Um-Am-Am	361/5	Ums-Ufs-Am-Am-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	392/17
	P92-si84-DV22	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Am-Um-Um-Am-Am	359/5	Ums-Ufs-Am-Am-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	392/17
3	P92-si3-DV25	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	362/6	Ams-Afs-Gm-Am-Cm-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	396/18
	P92-si3-DV26	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	362/6	Ams-Afs-Gf-Af-Cm-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	397/18
	P92-si3-DV27	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	362/6	Ams-Afs-Gm-Af-Cf-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	398/18
	P92-si3-DV28	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	363/6	Ams-Afs-Gf-Af-Cm-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	397/18
	P92-si3-DV29	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	363/6	Ams-Afs-Gm-Af-Cf-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	398/18

8	P92-si8-DV25	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cf-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	364/7	Ams-Afs-Um-Am-Am-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	399/19
	P92-si8-DV26	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cf-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	364/7	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	400/19
	P92-si8-DV27	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cf-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	364/7	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	401/19
	P92-si8-DV28	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	365/7	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	400/19
	P92-si8-DV29	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	365/7	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	401/19
9	P92-si9-DV25	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Uf-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	366/8	Ums-Ufs-Um-Cm-Cm-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	402/20
	P92-si9-DV26	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Uf-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	366/8	Ums-Ufs-Uf-Cf-Cm-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	403/20
	P92-si9-DV27	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Uf-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	366/8	Ums-Ufs-Um-Cf-Cf-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	404/20
	P92-si9-DV28	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	367/8	Ums-Ufs-Uf-Cf-Cm-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	403/20
	P92-si9-DV29	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	367/8	Ums-Ufs-Um-Cf-Cf-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	404/20
21	P92-si21-DV25	Cms-Ams-Gm-Cm-Am-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Uf-Um-Um-Gm-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Cm-Am	368/9	Ums-Gfs-Um-Gm-Am-Cf-Am-Cm-Am-Am-Am-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gm-Cm-Um-Gms-Cms-Am	405/21
	P92-si21-DV26	Cms-Ams-Gm-Cm-Am-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Uf-Um-Um-Gm-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Cm-Am	368/9	Ums-Gfs-Uf-Gf-Am-Cf-Am-Cm-Am-Am-Am-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gm-Cm-Um-Gms-Cms-Am	406/21
	P92-si21-DV27	Cms-Ams-Gm-Cm-Am-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Uf-Um-Um-Gm-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Cm-Am	368/9	Ums-Gfs-Um-Gf-Af-Cf-Am-Cm-Am-Am-Am-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gm-Cm-Um-Gms-Cms-Am	407/21
	P92-si21-DV28	Cms-Ams-Gm-Cm-Am-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Um-Gm-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Cm-Am	369/9	Ums-Gfs-Uf-Gf-Am-Cf-Am-Cm-Am-Am-Am-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gm-Cm-Um-Gms-Cms-Am	406/21

	P92-si21-DV29	Cms-Ams-Gm-Cm-Am-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Um-Gm-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Cm-Am	369/9	Ums-Gfs-Um-Gf-Af-Cf-Am-Cm-Am-Am-Am-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gm-Cm-Um-Gms-Cms-Am	407/21
31	P92-si31-DV25	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Uf-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	370/10	Cms-Ufs-Um-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	408/22
	P92-si31-DV26	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Uf-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	370/10	Cms-Ufs-Uf-Gf-Am-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	409/22
	P92-si31-DV27	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Uf-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	370/10	Cms-Ufs-Um-Gf-Af-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	410/22
	P92-si31-DV28	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Um-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	371/10	Cms-Ufs-Uf-Gf-Am-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	409/22
	P92-si31-DV29	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Um-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	371/10	Cms-Ufs-Um-Gf-Af-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	410/22
73	P92-si73-DV25	Gms-Cms-Gm-Gm-Am-Gm-Af-Um-Gf-Cf-Uf-Um-Cm-Um-Am-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Um	372/11	Ams-Ufs-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Am	411/23
	P92-si73-DV26	Gms-Cms-Gm-Gm-Am-Gm-Af-Um-Gf-Cf-Uf-Um-Cm-Um-Am-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Um	372/11	Ams-Ufs-Gf-Cf-Cm-Uf-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Am	412/23
	P92-si73-DV27	Gms-Cms-Gm-Gm-Am-Gm-Af-Um-Gf-Cf-Uf-Um-Cm-Um-Am-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Um	372/11	Ams-Ufs-Gm-Cf-Cf-Uf-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Am	413/23
	P92-si73-DV28	Gms-Cms-Gm-Gm-Am-Gm-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Am-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Um	373/11	Ams-Ufs-Gf-Cf-Cm-Uf-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Am	412/23
	P92-si73-DV29	Gms-Cms-Gm-Gm-Am-Gm-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Am-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Um	373/11	Ams-Ufs-Gm-Cf-Cf-Uf-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Am	413/23
83	P92-si83-DV25	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Af-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	374/12	Ams-Afs-Um-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	414/24
	P92-si83-DV26	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Af-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	374/12	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	415/24
	P92-si83-DV27	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Af-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	374/12	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	416/24

P92-si83-DV28	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	375/12	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	415/24
P92-si83-DV29	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	375/12	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	416/24

细胞种类：HEP3B细胞系细胞

药物溶媒：无菌无酶水、gibco DMEM（购自赛默飞世尔；货号：10569010）

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测受试样品对HEP3B细胞系PCSK9基因mRNA表达的抑制情况。Hep3B细胞，由上海药明康德新药开发有限公司提供(ATCC-tings-1618164)。

2.1 细胞培养

取传代培养的HEP3B细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清RPMI 1640培养液（补充青、链霉素各100 μL/mL），置于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将Lipofectamine RNAiMAX和Opti-MEM按1.5:98.5比例混合后涡旋混匀。

转染试剂配制：按照1:1（v/v）的比例取60 μL Opti-MEM稀释的siRNA溶液加入60 μL转染混合液，涡旋混匀后室温静置15 min，得到脂质纳米颗粒（LNP）。取12.5 μL用于包封率检测。

空白对照组转染试剂：在60μL Opti-MEM中加入制备好的转染混合液60 μL。涡旋混匀，室温静置15 min。

将配制好的转染试剂加入24孔细胞培养板中（每孔100 μL），使最终每孔siRNA浓度为0.05 nM。加入500 μL细胞悬液（每毫升含6×10⁴个细胞）。使用十字法混匀后，放入37℃，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 PCSK9 mRNA检测

步骤同实施例2中的“2.3 PCSK9 mRNA检测”。

2.4 数据处理

PCSK9 mRNA表达率（%）计算公式为：
表达率 = (PCSK9 mRNA表达量/空白对照组PCSK9 mRNA表达量) × 100%；
PCSK9基因表达抑制率 = 1-表达率（%）。

2.5 EC₅₀实验

本实验中各序列EC₅₀实验的siRNA浓度选择从0.2 nM起始，4倍稀释，共8个浓度点（0.2 nM、0.05 nM、0.0125 nM、3.13 pM、0.78 pM、0.2 pM、0.05 pM和0.01 pM），并对各浓度下各序列的抑制率进行测定，并绘图，计算各序列EC₅₀浓度。

3. 实验结果

经过3次重复实验，各修饰序列对Hep3B细胞PCSK9基因的抑制率见表14-25。

活性检测实验结果表明，12条候选序列（无修饰序列si5、si51、si81、si82、si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83）采用本公开设计的修饰模板DV25-29进行修饰，对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率

均在70%以上。其中P92-si81-DV26、P92-si82-DV27和P92-si82-DV29抑制率达到了89.3%、89.3%和89.1%。

采用本公开修饰模板DV25~DV29修饰序列，与交替修饰序列相比，对PCSK9基因表达的抑制率显著提升。例如，基础序列51采用模板DV27修饰序列P92-si51-DV27抑制率比交替修饰序列提高了29.1%，基础序列81采用模板DV26修饰序列P92-si81-DV26抑制率比交替修饰序列提高了26.9%。

并且，同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，基础序列51采用本公开修饰模板DV27修饰序列，与采用本公开修饰模板DV31修饰序列相比，抑制率提高22.8%；与采用已公开Advanced ESC模板DV21修饰序列相比，抑制率提高21.3%。

EC₅₀实验表明，采用本公开设计修饰模板修饰的序列，EC₅₀值在0.0001-0.005 nM。例如P92-si81-DV27、P92-si84-DV26和P92-si82-DV27的EC₅₀值分别为0.0003 nM、0.0004 nM和0.0006 nM。这些序列在低浓度下即可有效抑制PCSK9基因的表达。

(i) 各基础序列采用模板修饰后对PCSK9基因抑制作用

(1) 基础序列5

表14 基础序列5采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
5	P92-si5-DV25	81.8	65.4	16.4
	P92-si5-DV26	84.9	65.4	19.5
	P92-si5-DV27	82.0	65.4	16.6
	P92-si5-DV28	80.1	65.4	14.7
	P92-si5-DV29	80.7	65.4	15.3
	P92-si5-DV30	65.3	65.4	-0.1
	P92-si5-DV31	62.4	65.4	-3.0
	P92-si5-DV21	68.2	65.4	2.8
	P92-si5-DV22	69.1	65.4	3.7

I. 本公开DV25~DV29模板

基础序列5采用本公开设计的修饰模板DV25~DV29修饰，对PCSK9基因的抑制率均超过了80%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对PCSK9基因的抑制率显著提升。例如采用模板DV26和DV27修饰后，P92-si5-DV26和P92-si5-DV27抑制率分别提高了19.5%和16.6%（图7）。

II. 本公开其它修饰模板

基础序列5采用模板DV30和DV31修饰后，P92-si5-DV30和P92-si5-DV31对PCSK9基因的抑制率分别为65.3%和62.4%，比对应的交替修饰序列分别降低了0.1%和3.0%。

采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，P92-si5-DV26和P92-si5-DV27抑制率分别比P92-si5-DV30提高了19.6%和16.7%，比P92-si5-DV31提高了22.5%和19.6%，显著提升。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV21（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10、11、16和17）和DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

基础序列5采用模板DV21和DV22修饰后，P92-si5-DV21和P92-si5-DV22对PCSK9基因的抑制率分别为68.2%和69.1%，分别比交替修饰序列提高了2.8%和3.7%。

采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，P92-si5-DV26和P92-si5-DV27抑制率分别比P92-si5-DV21

提高了16.7%和13.8%，比P92-si5-DV22提高了15.8%和12.9%，显著提升。

由此可知：

- 1) 基础序列5采用本公开修饰模板DV25~DV29修饰序列，与交替修饰序列相比，对PCSK9基因抑制作用显著提升。例如，基础序列5采用DV26修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高19.5%。
- 2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，基础序列5采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，与采用本公开修饰模板DV30和DV31修饰序列相比，抑制率最多可提高22.5%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV21和DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高16.7%，显著提升。
- 3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差20%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(2) 基础序列51

表15 基础序列51采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
51	P92-si51-DV25	83.1	56.5	26.6
	P92-si51-DV26	84.2	56.5	27.7
	P92-si51-DV27	85.6	56.5	29.1
	P92-si51-DV28	76.8	56.5	20.3
	P92-si51-DV29	78.9	56.5	22.4
	P92-si51-DV30	63.5	56.5	7.0
	P92-si51-DV31	62.8	56.5	6.3
	P92-si51-DV21	64.3	56.5	7.8
	P92-si51-DV22	65.1	56.5	8.6

I. 本公开DV25-29模板

基础序列51采用本公开设计的模板DV25~DV29修饰后，对PCSK9基因的抑制率均超过了75%，与采用2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV26和DV27修饰后，P92-si51-DV26和P92-si51-DV27抑制率分别提高了27.7%和29.1%。

II. 本公开其它修饰模板

基础序列51采用模板DV30和DV31修饰后，P92-si51-DV30和P92-si51-DV31对PCSK9基因的抑制率分别为63.5%和62.8%，比对应的交替修饰序列分别仅提高7.0%和6.3%。

采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，P92-si51-DV26和P92-si51-DV27抑制率分别比P92-si51-DV30提高了20.7%和22.1%，比P92-si51-DV31提高了21.4%和22.8%，显著提升。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV21（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10、11、16和17）和DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

基础序列51采用已公开Advanced ESC模板DV21和DV22修饰后，P92-si51-DV21和P92-si51-DV22对PCSK9基因的抑制率分别为64.3%和65.1%，分别比交替修饰序列提高7.8%和8.6%。

采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，P92-si51-DV26和P92-si51-DV27抑制率分别比P92-si51-DV21提高了19.9%和21.3%，比P92-si51-DV22提高了19.1%和20.5%，显著提升。

由此可知：

1) 基础序列51采用本公开修饰模板DV25~DV29修饰序列，与交替修饰序列相比，对PCSK9基因抑制作用显著提升。例如，基础序列51采用DV27修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高29.1%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，基础序列51采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，与采用本公开修饰模板DV30和DV31修饰序列相比，抑制率最多可提高22.8%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV21和DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高21.3%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差20%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(3) 基础序列81

表16 基础序列81采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
81	P92-si81-DV25	85.9	62.4	23.5
	P92-si81-DV26	89.3	62.4	26.9
	P92-si81-DV27	87.1	62.4	24.7
	P92-si81-DV28	84.8	62.4	22.4
	P92-si81-DV29	85.6	62.4	23.2
	P92-si81-DV30	71.6	62.4	9.2
	P92-si81-DV31	73.5	62.4	11.1
	P92-si81-DV21	78.3	62.4	15.9
	P92-si81-DV22	75.1	62.4	12.7

I. 采用本公开DV25~DV29模板修饰

基础序列81采用本公开设计的模板DV25~DV29修饰，对PCSK9基因的抑制率均超过了80%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV26和DV27修饰后，P92-si81-DV26和P92-si81-DV27抑制率分别提高了26.9%和24.7%。

II. 本公开其它修饰模板

基础序列81采用模板DV30和DV31修饰后，P92-si81-DV30和P92-si81-DV31对PCSK9基因的抑制率分别为71.6%和73.5%，比对应的交替修饰序列分别提高了9.2%和11.1%。

采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，P92-si81-DV26和P92-si81-DV27抑制率分别比P92-si81-DV30提高了17.7%和15.5%，比P92-si81-DV31提高了15.8%和13.6%，显著提升。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV21（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10、11、16和17）和DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

基础序列81采用模板DV21和DV22修饰后，P92-si81-DV21和P92-si81-DV22对PCSK9基因的抑制率分别为78.3%和75.1%，分别比交替修饰序列提高了15.9%和12.7%。

采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列，P92-si81-DV26和P92-si81-DV27抑制率分别比P92-si81-DV21提高了11.0%和8.8%，比P92-si81-DV22提高了14.2%和12.0%，显著提升。

由此可知：

- 1) 基础序列81采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列,与交替修饰序列相比,对PCSK9基因抑制作用显著提升。例如,基础序列81采用DV26修饰序列,抑制率比交替修饰序列提高26.9%。
- 2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后,活性差异非常大。例如,基础序列81采用本公开修饰模板DV26和DV27修饰序列,与采用本公开修饰模板DV30和DV31修饰序列相比,抑制率最多可提高17.7%,显著提升;与采用已公开Advanced ESC模板DV21和DV22修饰序列相比,抑制率最多可提高14.2%,显著提升。
- 3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大,最多可相差近20%。由此可知,siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(4) 基础序列82

表17 基础序列82采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
82	P92-si82-DV25	83.8	69.7	14.1
	P92-si82-DV26	84.4	69.7	14.7
	P92-si82-DV27	89.3	69.7	19.6
	P92-si82-DV28	86.7	69.7	17.0
	P92-si82-DV29	89.1	69.7	19.4
	P92-si82-DV30	70.2	69.7	0.5
	P92-si82-DV31	69.7	69.7	0.0
	P92-si82-DV21	76.5	69.7	6.8
	P92-si82-DV22	75.4	69.7	5.7

I. 本公开DV25~DV29模板

基础序列82采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰,对PCSK9基因的抑制率均超过了80%,与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比,对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV27和DV29修饰后,P92-si82-DV27和P92-si82-DV29抑制率分别提高了19.6%和19.4%。

II. 本公开其它修饰模板

基础序列82采用模板DV30和DV31修饰后,P92-si82-DV30和P92-si82-DV31对PCSK9基因的抑制率分别为70.2%和69.7%,与对应的交替修饰序列相当。

采用本公开修饰模板DV27和DV29修饰序列,P92-si82-DV27和P92-si82-DV29抑制率分别比P92-si82-DV30提高了19.1%和18.9%,比P92-si82-DV31提高了19.6%和19.4%,显著提升。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV21 (氟代位点:反义链2、6、14和16位,正义链7、9、10、11、16和17)和DV22 (氟代位点:反义链2、6、14和16位,正义链7、9、10和11位)

基础序列82采用模板DV21和DV22修饰后,P92-si82-DV21和P92-si82-DV22对PCSK9基因的抑制率分别为76.5%和75.4%,分别比交替修饰序列提高了6.8%和5.7%。

采用本公开修饰模板DV27和DV29修饰序列,P92-si82-DV27和P92-si82-DV29抑制率分别比P92-si82-DV21提高了12.8%和12.6%,比P92-si82-DV22提高了13.9%和13.7%,显著提升。

由此可知:

- 1) 基础序列82采用本公开修饰模板DV25~DV29修饰序列,与交替修饰序列相比,对PCSK9基因抑制作

用显著提升。例如，基础序列82采用DV27修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高19.6%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，基础序列82采用本公开修饰模板DV27和DV29修饰序列，与采用本公开修饰模板DV30和DV31修饰序列相比，抑制率最多可提高19.6%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV21和DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高13.9%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差近20%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(5) 基础序列84

表18 基础序列84采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
84	P92-si84-DV25	86.0	61.6	24.4
	P92-si84-DV26	85.7	61.6	24.1
	P92-si84-DV27	86.8	61.6	25.2
	P92-si84-DV28	88.4	61.6	26.8
	P92-si84-DV29	87.5	61.6	25.9
	P92-si84-DV30	70.3	61.6	8.7
	P92-si84-DV31	72.4	61.6	10.8
	P92-si84-DV21	77.7	61.6	16.1
	P92-si84-DV22	75.1	61.6	13.5

I. 本公开DV25-29模板

基础序列84采用本公开设计的修饰模板DV25~DV29修饰，对PCSK9基因的抑制率均超过了85%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV28和DV29修饰后，P92-si84-DV28和P92-si84-DV29抑制率分别提高了26.8%和25.9%。

II. 本公开其它修饰模板

基础序列84采用模板DV30和DV31修饰后，P92-si84-DV30和P92-si84-DV31对PCSK9基因的抑制率分别为70.3%和72.4%，比对应的交替修饰序列分别提高了8.7%和10.8%。

采用本公开修饰模板DV28和DV29修饰序列，P92-si84-DV28和P92-si84-DV29抑制率分别比P92-si84-DV30提高了18.1%和17.2%，比P92-si84-DV31提高了16.0%和15.1%，显著提升。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV21（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10、11、16和17）和DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

基础序列84采用模板DV21和DV22修饰后，P92-si84-DV21和P92-si84-DV22对PCSK9基因的抑制率分别为77.7%和75.1%，分别比交替修饰序列提高了16.1%和13.5%。

采用本公开修饰模板DV28和DV29修饰序列，P92-si84-DV28和P92-si84-DV29抑制率分别比P92-si84-DV21提高了10.7%和9.8%，比P92-si84-DV22提高了13.3%和12.4%，显著提升。

由此可知：

1) 基础序列84采用本公开修饰模板DV25~DV29修饰序列，与交替修饰序列相比，对PCSK9基因抑制作用显著提升。例如，基础序列84采用DV28修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高26.8%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后,活性差异非常大。例如,基础序列84采用本公开修饰模板DV28和DV29修饰序列,与采用本公开修饰模板DV30和DV31修饰序列相比,抑制率最多可提高18.1%,显著提升;与采用已公开Advanced ESC模板DV21和DV22修饰序列相比,抑制率最多可提高13.3%,显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大,最多可相差近20%。由此可知,siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(6) 基础序列3

表19 基础序列3采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
3	P92-si3-DV25	79.7	60.3	19.4
	P92-si3-DV26	80.9	60.3	20.6
	P92-si3-DV27	83.0	60.3	22.7
	P92-si3-DV28	84.3	60.3	24.0
	P92-si3-DV29	85.0	60.3	24.7

1) 基础序列3采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰,对PCSK9基因的抑制率均超过了75%,与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比,对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV28和DV29修饰后,P92-si3-DV28和P92-si3-DV29抑制率分别提高了24.0%和24.7%。

2) 由此可知,基础序列3采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列,与采用交替修饰相比,对PCSK9基因的抑制活性显著提升。

(7) 基础序列8

表20 基础序列8采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
8	P92-si8-DV25	79.8	61.9	17.9
	P92-si8-DV26	80.6	61.9	18.7
	P92-si8-DV27	81.6	61.9	19.7
	P92-si8-DV28	82.1	61.9	20.2
	P92-si8-DV29	79.5	61.9	17.6

1) 基础序列8采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰,对PCSK9基因的抑制率均超过了75%,与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比,对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV27和DV28修饰后,P92-si8-DV27和P92-si8-DV28抑制率分别提高了19.7%和20.2%。

2) 由此可知,基础序列8采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列,与采用交替修饰相比,对PCSK9基因的抑制活性显著提升。

(8) 基础序列9

表21 基础序列9采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
9	P92-si9-DV25	71.9	52.4	19.5
	P92-si9-DV26	73.7	52.4	21.3

	P92-si9-DV27	79.6	52.4	27.2
	P92-si9-DV28	77.8	52.4	25.4
	P92-si9-DV29	76.8	52.4	24.4

1) 基础序列9采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰, 对PCSK9基因的抑制率均超过了70%, 与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV27和DV28修饰后, P92-si9-DV27和P92-si9-DV28抑制率分别提高了27.2%和25.4%。

2) 由此可知, 基础序列9采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 与采用交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制活性显著提升。

(9) 基础序列21

表22 基础序列21采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
21	P92-si21-DV25	74.0	49.6	24.4
	P92-si21-DV26	76.1	49.6	26.5
	P92-si21-DV27	71.1	49.6	21.5
	P92-si21-DV28	71.5	49.6	21.9
	P92-si21-DV29	72.0	49.6	22.4

1) 基础序列21采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰, 对PCSK9基因的抑制率均超过了70%, 与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV25和DV26修饰后, P92-si21-DV25和P92-si21-DV26抑制率分别提高了24.4%和26.5%。

2) 由此可知, 基础序列21采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 与采用交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制活性显著提升。

(10) 基础序列31

表23 基础序列31采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
31	P92-si31-DV25	79.2	56.3	22.9
	P92-si31-DV26	78.9	56.3	22.6
	P92-si31-DV27	71.2	56.3	14.9
	P92-si31-DV28	70.6	56.3	14.3
	P92-si31-DV29	70.0	56.3	13.7

1) 基础序列31采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰, 对PCSK9基因的抑制率均超过了70%, 与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV25和DV26修饰后, P92-si31-DV25和P92-si31-DV26抑制率分别提高了22.9%和22.6%。

2) 由此可知, 基础序列31采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 与采用交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制活性显著提升。

(11) 基础序列73

表24 基础序列73采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
73	P92-si73-DV25	70.1	49.4	20.7
	P92-si73-DV26	71.8	49.4	22.4
	P92-si73-DV27	77.6	49.4	28.2
	P92-si73-DV28	80.0	49.4	30.6
	P92-si73-DV29	82.1	49.4	32.7

1) 基础序列73采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰, 对PCSK9基因的抑制率均超过了70%, 与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV28和DV29修饰后, P92-si73-DV28和P92-si73-DV29抑制率分别提高了30.6%和32.7%。

2) 由此可知, 基础序列73采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 与采用交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制活性显著提升。

(12) 基础序列83

表25 基础序列83采用模板修饰后对PCSK9基因抑制率

基础序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
83	P92-si83-DV25	77.9	51.7	26.2
	P92-si83-DV26	75.0	51.7	23.3
	P92-si83-DV27	82.6	51.7	30.9
	P92-si83-DV28	78.6	51.7	26.9
	P92-si83-DV29	81.4	51.7	29.7

1) 基础序列83采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰, 对PCSK9基因的抑制率均超过了75%, 与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV27和DV29修饰后, P92-si83-DV27和P92-si83-DV29抑制率分别提高了30.9%和29.7%。

2) 由此可知, 基础序列83采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 与采用交替修饰相比, 对PCSK9基因的抑制活性显著提升。

总结:

(1) 筛选出的基础序列5、51、81、82、84、3、8、9、21、31、73和83, 采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰后, 对PCSK9基因表达具有显著抑制作用, 抑制率均在70%以上。其中P92-si81-DV26、P92-si82-DV27和P92-si82-DV29抑制率达到了89.3%、89.3%和89.1%。

(2) 上述12条序列采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 与交替修饰序列相比, 对PCSK9基因表达的抑制率显著提升。例如, 基础序列51采用模板DV27修饰序列P92-si51-DV27抑制率比交替修饰序列提高了29.1%, 基础序列81采用模板DV26修饰序列P92-si81-DV26抑制率比交替修饰序列提高了26.9%。

(3) 相同序列采用本公开修饰模板DV25-29修饰, 与采用现有技术公开的修饰模板相比, 对PCSK9基因表达的抑制率显著提升。例如, 基础序列51采用本公开修饰模板DV27修饰序列, 与采用已公开Advanced ESC模板DV21修饰序列相比, 抑制率提高21.3%。

(4) 相同序列采用本公开修饰模板DV25-29修饰, 与采用本公开其它修饰模板DV30和DV31相比, 对PCSK9基因表达的抑制率显著提升。例如, 基础序列51采用本公开修饰模板DV27修饰序列, 与采用本公开

修饰模板DV31修饰序列相比，抑制率提高22.8%。

(5) 不同模板修饰序列活性差异巨大，例如，基础序列5采用DV26修饰，比采用DV31修饰抑制率提高了22.5%；基础序列51采用DV27修饰，比采用DV22修饰抑制率提高了20.5%。由此可知，siRNA序列采用哪一种修饰模板进行修饰能够具有高活性是不确定的。

(ii) EC₅₀实验

挑选了一些模板修饰序列，包括P92-si5-DV26、P92-si51-DV25、P92-si81-DV27、P92-si82-DV27、P92-si84-DV26、P92-si3-DV28、P92-si8-DV29、P92-si9-DV28、P92-si21-DV25、P92-si31-DV27、P92-si73-DV28和P92-si83-DV26，共12条序列，开展EC₅₀实验，测定各序列的EC₅₀浓度。实验结果见表26。

表26 各修饰序列EC₅₀实验结果

序列编号	序列 EC ₅₀ (nM)	序列编号	序列 EC ₅₀ (nM)
P92-si5-DV26	0.0010	P92-si8-DV29	0.0039
P92-si51-DV25	0.0027	P92-si9-DV28	0.0047
P92-si81-DV27	0.0003	P92-si21-DV25	0.0048
P92-si82-DV27	0.0006	P92-si31-DV27	0.0035
P92-si84-DV26	0.0004	P92-si73-DV28	0.0044
P92-si3-DV28	0.0022	P92-si83-DV26	0.0025

从表26中可以看出，这12条序列的EC₅₀值在0.0001 nM至0.005 nM之间。其中P92-si81-DV27、P92-si84-DV26和P92-si82-DV27的EC₅₀值分别为0.0003 nM、0.0004 nM和0.0006 nM。表明在低浓度下，这些序列即可有效抑制PCSK9基因表达。

实施例 5：与现有技术公开序列对 PCSK9 基因抑制作用对比

本实施例将现有技术公开的与本公开基础序列3、5、8、9、31、81、82、83和84相同或相近的无修饰序列，与本公开交替修饰序列和采用DV25-29模板修饰的序列，对PCSK9基因的抑制效率进行对比。

1. 实验材料

受试样品：

(1) 现有技术公开序列

表27 现有技术公开序列

序 列 编号	位置	正义链	序 列 ID 号	反义链	序 列 ID 号	出处
si81	3546	CUUUUGUAACUU GAAGAUUU	3	AAUAUCUUCAAGUUA CAAAAGCA	15	CN115992138 A
si84	3574	GUUUUGUAGCAU UUUUUUUAA	5	UUAAUAAAAAUGCUA CAAAACCC	17	CN115992138 A
si3	614	CACCAAGAUCU GCAUGUCUU	6	AAGACAUGCAGGAUC UUGGUGAG	18	WO2014089313 A1，第 104 页
si8	1083	CUCAUAGGCCUG GAGUUUUUU	7	AAUAAACUCCAGGCC UAUGAGGG	19	CN108220295 B， 第 91 页
si9	1089	GGCCUGGAGUUU AUUCGGA	8	UUUCCGAUUAACUC CAGGCCUA	20	WO2014089313 A1，第 106 页

si83	3572	GGUUUUUGUAGC AUUUUUUAUU	12	AAUAAAAAUGCUACA AAACCCAG	24	CN115992138 A, 第 16 页
5P	618	AAGAUCCUGCAU GUCUCCA	1	AUGGAAGACAUGCAG GAUCUU	417	WO2023/017004 A1
82P	3557	GAAGAUUUUU UCUGGGUUU	4	AAACCCAGAAUAAU AUCUUC	418	WO2023/017004 A1
31P	2103	GGUCUGGAAUGC AAAGUCAAG	10	CUUGACUUUGCAUUC CAGACC	419	CN115066498 A, 第 25 页

注：以上专利申请中公开序列均为无修饰序列RNA。

(2) 实施例2中采用2'-OMe与2'-F交替修饰，加末端硫代修饰的siRNA序列：P92-si5、P92-si81、P92-si82、P92-si84、P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si31和P92-si83；

(3) 采用修饰模板DV25-29修饰siRNA序列，具体序列见表28。

表28 采用DV25-29修饰模板修饰的各序列

基 础 序 列 号	模 板 修 饰 序 列 编 号	正 义 链 序 列 5'-3'	修 饰 序 列 SEQ ID NO:/ 对 应 基 础 序 列 SEQ ID NO:	反 义 链 序 列 5'-3'	修 饰 序 列 SEQ ID NO:/ 对 应 基 础 序 列 SEQ ID NO:
5	P92-si5-DV25	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	376/13
	P92-si5-DV26	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gf-Gf-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	377/13
	P92-si5-DV27	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gf-Af-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	378/13
	P92-si5-DV28	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	338/1	Ams-Ufs-Gf-Gf-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	377/13
	P92-si5-DV29	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	338/1	Ams-Ufs-Gm-Gf-Af-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	378/13
81	P92-si81-DV25	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
	P92-si81-DV26	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	385/15
	P92-si81-DV27	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	386/15
	P92-si81-DV28	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	Ams-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	385/15

		Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um		Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	
	P92-si81-DV29	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	Ams-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	386/15
82	P92-si82-DV25	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	352/4	Ams-Afs-Am-Cm-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	388/16
	P92-si82-DV26	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	352/4	Ams-Afs-Af-Cf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	389/16
	P92-si82-DV27	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	352/4	Ams-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	390/16
	P92-si82-DV28	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	353/4	Ams-Afs-Af-Cf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	389/16
	P92-si82-DV29	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um	353/4	Ams-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	390/16
84	P92-si84-DV25	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Am-Am-Um-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	392/17
	P92-si84-DV26	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	393/17
	P92-si84-DV27	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	394/17
	P92-si84-DV28	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	358/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	393/17
	P92-si84-DV29	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	358/5	Ums-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	394/17
3	P92-si3-DV25	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	362/6	Ams-Afs-Gm-Am-Cm-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	396/18
	P92-si3-DV26	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	362/6	Ams-Afs-Gf-Af-Cm-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	397/18
	P92-si3-DV27	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	362/6	Ams-Afs-Gm-Af-Cf-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	398/18

		Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um		Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	
	P92-si3-DV28	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	363/6	Ams-Afs-Gf-Af-Cm-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	397/18
	P92-si3-DV29	Cms-Ams-Cm-Cm-Am-Am-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gm-Cm-Am-Um-Gf-Um-Cm-Um-Um	363/6	Ams-Afs-Gm-Af-Cf-Af-Um-Gm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gm-Gm-Um-Gms-Ams-Gm	398/18
8	P92-si8-DV25	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cf-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	364/7	Ams-Afs-Um-Am-Am-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	399/19
	P92-si8-DV26	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cf-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	364/7	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	400/19
	P92-si8-DV27	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cf-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	364/7	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	401/19
	P92-si8-DV28	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	365/7	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	400/19
	P92-si8-DV29	Cms-Ums-Cm-Am-Um-Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Gm-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	365/7	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Cm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Um-Gm-Am-Gms-Gms-Gm	401/19
9	P92-si9-DV25	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Uf-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	366/8	Ums-Ufs-Um-Cm-Cm-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	402/20
	P92-si9-DV26	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Uf-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	366/8	Ums-Ufs-Uf-Cf-Cm-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	403/20
	P92-si9-DV27	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Uf-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	366/8	Ums-Ufs-Um-Cf-Cf-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	404/20
	P92-si9-DV28	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	367/8	Ums-Ufs-Uf-Cf-Cm-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	403/20
	P92-si9-DV29	Gms-Gms-Cm-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Gf-Uf-Uf-Um-Am-Um-Um-Cm-Gf-Gm-Am-Am-Am	367/8	Ums-Ufs-Um-Cf-Cf-Gf-Am-Am-Um-Am-Am-Am-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Gm-Cm-Cms-Ums-Am	404/20
31	P92-si31-DV25	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Uf-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	370/10	Cms-Ufs-Um-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	408/22
	P92-si31-DV26	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Uf-Gf-	370/10	Cms-Ufs-Uf-Gf-Am-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-	409/22

		Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm		Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	
	P92-si31-DV27	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Uf-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	370/10	Cms-Ufs-Um-Gf-Af-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	410/22
	P92-si31-DV28	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Um-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	371/10	Cms-Ufs-Uf-Gf-Am-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	409/22
	P92-si31-DV29	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Am-Af-Um-Gf-Cm-Am-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Gm	371/10	Cms-Ufs-Um-Gf-Af-Cf-Um-Um-Um-Gm-Cm-Am-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Ums-Gm	410/22
83	P92-si83-DV25	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Af-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	374/12	Ams-Afs-Um-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	414/24
	P92-si83-DV26	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Af-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	374/12	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	415/24
	P92-si83-DV27	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Af-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	374/12	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	416/24
	P92-si83-DV28	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	375/12	Ams-Afs-Uf-Af-Am-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	415/24
	P92-si83-DV29	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Gm-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Um-Um-Um-Uf-Um-Am-Um-Um	375/12	Ams-Afs-Um-Af-Af-Af-Am-Am-Um-Gm-Cm-Um-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Ams-Gm	416/24

细胞种类：Hep3B细胞，由上海药明康德新药开发有限公司提供(ATCC-tings-1618164)。

Hep3B细胞在含10%胎牛血清（FBS，ExCell Bio-FSP500）、1%青霉素-链霉素（HyClone-SV30010）、1%非必需氨基酸溶液（Gibco-11140-050）、1% GlutaMAX补充液（Gibco-35050-061）的EMEM培养基（ATCC-30-2003）中培养。

药物溶媒：无菌无酶水、gibco DMEM。

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测测受试样品对HEP3B细胞系PCSK9基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 细胞培养

取传代培养的Hep3B细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清RPMI 1640培养液（补充青、链霉素各100 μL/mL），置于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

按照1:0.06（wt/wt）取 2 μL siRNA（1 μg/μL）加入18 μL无菌无酶水，混匀，再加入制备好的LNP 22 μL。混匀，室温静置15 min。取12.5 μL用于包封率检测，最终每孔转染量=（1 μg理论上样量/siRNA纯度）/载药

浓度，最终siRNA浓度为0.05 nM。

阴性对照组：20 μ L 无菌无酶水中加入制备好的LNP 22 μ L。混匀，室温静置15 min。

使用十字法混匀后，放入37°C，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 PCSK9 mRNA检测

1) RNA抽提

步骤同实施例2中的“2.3 PCSK9 mRNA检测”中的“1) RNA抽提”。

2) RNA浓度检测

步骤同实施例2中的“2.3 PCSK9 mRNA检测”中的“2) RNA浓度检测”。

3) PCSK9 mRNA定量检测

在15 mL离心管中，按7.5 $\times$ 48=360份加入除引物、模板之外的其余成分，标记为A。

标记好1.5mL EP管，按照每管7份加入A 77 μ L和420 ng总RNA，混匀备用。

内参基因GAPDH和目的基因PCSK9的上下游引物混匀备用。

在PCR板上每孔分别加入B 11 μ L+C 1 μ L。盖上封板膜，3000 rpm离心1 min，上机。

*本环节在冰上操作，保持低温条件。

将板放入qPCR仪，按照以下程序运行：

反转录：55°C，15 min；

预变性：95°C，30 sec；

循环反应：95°C，10 sec；60°C，35 sec；40个循环；

熔解曲线：95°C，15 sec；60°C，60 sec；95°C，15 sec。

运行时间约为2h。分析实验结果，计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2.4 数据处理

PCSK9 mRNA表达率(%)计算公式为：

表达率=(实验组PCSK9 mRNA表达量/空白对照组PCSK9 mRNA表达量) $\times$ 100%；

PCSK9基因表达抑制率=1-表达率(%)。

3. 实验结果

具体实验结果见表29和表30。

实验结果表明，本公开中交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列，与现有技术中公开相同或相近的无修饰序列相比，对PCSK9抑制活性显著提升。例如，完全相同的无修饰序列si84抑制率为38.6%，交替修饰后抑制率为61.6%，比无修饰序列si84提高了23.0%，采用本公开修饰模板DV26修饰后，抑制率达到了86.8%，比无修饰序列提高了48.2%。

现有技术公开序列31P与本公开序列si31相比，仅是反义链3'末端少2个碱基UG，其它完全相同，但本公开无修饰序列si31抑制率比31P提高了10.4%，交替修饰序列抑制率为59.5%，比31P提高了21.2%，采用本公开修饰模板DV26修饰后，抑制率达到了80.2%，比31P提高了41.9%。

(1)与现有技术公开完全相同的无修饰序列相比，本公开交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰序列，对PCSK9基因抑制率显著提升，最多可提高40%。

与现有技术公开的完全相同的序列相比，本公开中交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列，对PCSK9基因抑制率显著提升。例如，无修饰序列si84的抑制率为38.6%，交替修饰后抑制率为61.6%，比无修饰序列si84提高了23.0%，采用本公开修饰模板DV26修饰后，抑制率达到了86.8%，比无修饰序列提高了48.2%。

表29 现有技术完全相同序列对PCSK9基因抑制率

现有技术公开序列		交替修饰序列			模板修饰序列		
名称	抑制率(%)	序列编号	抑制率(%)	比现有技术公开序列提高(%)	序列编号	抑制率(%)	比现有技术公开序列提高(%)
si81	50.0	P92-si81	60.4	10.4	P92-si81-DV25	85.5	35.5
					P92-si81-DV26	87.7	37.7
					P92-si81-DV27	86.7	36.7
					P92-si81-DV28	84.6	34.6
					P92-si81-DV29	84.0	34.0
si84	38.6	P92-si84	61.6	23.0	P92-si84-DV25	84.9	46.3
					P92-si84-DV26	86.8	48.2
					P92-si84-DV27	84.5	45.9
					P92-si84-DV28	86.2	47.6
					P92-si84-DV29	86.4	47.8
si3	51.7	P92-si3	61.7	10.0	P92-si3-DV25	77.4	25.7
					P92-si3-DV26	78.5	26.8
					P92-si3-DV27	84.2	32.5
					P92-si3-DV28	82.5	30.8
					P92-si3-DV29	85.2	33.5
si8	55.2	P92-si8	62.4	7.2	P92-si8-DV25	77.2	22.0
					P92-si8-DV26	78.3	23.1
					P92-si8-DV27	72.0	16.8
					P92-si8-DV28	73.1	17.9
					P92-si8-DV29	74.8	19.6
si9	41.5	P92-si9	54.7	13.2	P92-si9-DV25	71.2	29.7
					P92-si9-DV26	70.8	29.3
					P92-si9-DV27	80.1	38.6
					P92-si9-DV28	76.5	35.0
					P92-si9-DV29	75.0	33.5
si83	35.2	P92-si83	51.5	16.3	P92-si83-DV25	78.6	43.4
					P92-si83-DV26	77.3	42.1
					P92-si83-DV27	81.4	46.2
					P92-si83-DV28	79.2	44.0
					P92-si83-DV29	83.4	48.2

表29中现有技术公开的无修饰序列si81、si84、si3、si8、si9和si83，与本公开序列完全相同，采用交替修饰和本公开修饰模板修饰后，对PCSK9抑制作用显著提升。例如，无修饰序列si84的抑制率为38.6%，交替修饰后，P92-si84抑制率为61.6%，比无修饰序列si84提高了23.0%，采用本公开修饰模板DV25-29修饰后，P92-si84-DV25、P92-si84-DV26、P92-si84-DV27、P92-si84-DV28和P92-si84-DV29抑制率分别达到了84.9%、86.8%、84.5%、86.2%和86.4%，均比无修饰序列si84提高了40%以上。

(2) 与现有技术公开的仅有很小差异的无修饰序列相比，本公开无修饰序列、交替修饰序列和采用特

定修饰模板修饰的序列，对PCSK9基因抑制率显著提升，最多可提高40%。

与现有技术公开的仅有很小差异的序列相比，本公开中无修饰序列、交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列，对PCSK9基因抑制率显著提升。例如，无修饰序列31P的抑制率为38.3%，本公开序列相近的无修饰序列si31抑制率为48.7%，比31P提高了10.4%，交替修饰序列抑制率为59.5%，比31P提高了21.2%，采用本公开修饰模板DV26修饰后，抑制率达到了80.2%，比31P提高了41.9%。

表30 现有技术与本公开相近序列对PCSK9基因抑制率

现有技术公开序列		本公开无修饰序列			本公开交替修饰序列			本公开模板修饰序列		
名称	抑制率 (%)	序列编号	抑制率 (%)	比现有技术公开序列提高 (%)	序列编号	抑制率 (%)	比现有技术公开序列提高 (%)	序列编号	抑制率 (%)	比现有技术公开序列提高 (%)
5P	41.8	si5	50.1	8.3	P92-si5	63.8	22.0	P92-si5-DV25	81.2	39.4
								P92-si5-DV26	81.5	39.7
								P92-si5-DV27	82.6	40.8
								P92-si5-DV28	77.0	35.2
								P92-si5-DV29	76.1	34.3
82P	46.7	si82	53.8	7.1	P92-si82	68.3	21.6	P92-si82-DV25	82.1	35.4
								P92-si82-DV26	84.2	37.5
								P92-si82-DV27	88.0	41.3
								P92-si82-DV28	86.7	40.0
								P92-si82-DV29	89.5	42.8
31P	38.3	si31	48.7	10.4	P92-si31	59.5	21.2	P92-si31-DV25	79.6	41.3
								P92-si31-DV26	80.2	41.9
								P92-si31-DV27	70.0	31.7
								P92-si31-DV28	73.9	35.6
								P92-si31-DV29	70.8	32.5

I. 序列对比

表30中现有技术公开序列5P、31P和82P与本公开序列si5、si31和si82的序列非常接近，仅有很小差异，具体对比见下表：

表31 现有技术公开序列与本公开序列对比

名称	正义链	基础序列 SEQ ID NO:	反义链	基础序列 SEQ ID NO:	出处
5P	AAGAUCUGCAUGUCUCCA	1	AUGGAAGACAUGCAGGAUCU	417	WO2023/017004 A1

si5	AAGAUCUGCAUG UCUCCA	1	AUGGAAGACAUGCAGG AUCUUGG	13	本公开设计序列
31P	GGUCUGGAAUGCA AAGUCAAG	10	CUUGACUUUGCAUCC AGACC	419	CN115066498 A, 第 25 页
si31	GGUCUGGAAUGCA AAGUCAAG	10	CUUGACUUUGCAUCC AGACCUG	22	本公开设计序列
82P	GAAGAUUUUAUU CUGGGUUU	4	AAACCCAGAAUAAUA UCUUC	418	WO2023/017004 A1
si82	GAAGAUUUUAUU CUGGGUUU	4	AAACCCAGAAUAAUA UCUCAA	16	本公开设计序列

表31中可以看出,现有技术公开序列5P与本公开序列si5相比,仅是反义链3'末端少2个碱基GG;序列31P与本公开序列si31相比,仅是反义链3'末端少2个碱基UG;序列82P与本公开序列si82相比,仅是反义链3'末端少2个碱基AA,其它序列完全相同。

II. 活性比较

1) 本公开中无修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比,活性显著提升。例如,本公开无修饰序列si31比结构相近的31P相比,抑制率提高了10.4%。

本公开中无修饰序列si5对PCSK9基因抑制率为50.1%,比现有技术公开相近的序列5P(抑制率为41.8%)提高了8.3%,显著提升。

本公开中无修饰序列si82对PCSK9基因抑制率为53.8%,比现有技术公开相近的序列82P(抑制率为46.7%)提高了7.1%,显著提升。

本公开中无修饰序列si31对PCSK9基因抑制率为48.7%,比现有技术公开相近的序列31P(抑制率为38.3%)提高了10.4%,显著提升。

2) 本公开中交替修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比,活性显著提升。例如,与序列5P相比,本公开交替修饰序列P92-si5抑制率提高了22.0%。

本公开基础序列5采用交替修饰后,P92-si5对PCSK9基因抑制率为63.8%,比现有技术公开无修饰序列5P提高了22.0%,显著提升。

本公开基础序列82采用交替修饰后,P92-si82对PCSK9基因抑制率为68.3%,比现有技术公开无修饰序列82P提高了21.6%,显著提升。

本公开基础序列31采用交替修饰后,P92-si31对PCSK9基因抑制率为59.5%,比现有技术公开无修饰序列31P提高了21.2%,显著提升。

3) 采用本公开修饰模板修饰的序列与现有技术公开相近无修饰序列相比,活性显著提升。例如,与序列82P相比,本公开交替修饰序列P92-si82-DV29抑制率提高了42.8%。

本公开基础序列5采用修饰模板25-29修饰后,与现有技术公开无修饰序列5P相比,抑制率均可提高30%以上。例如,P92-si5-DV27提高了40.8%,显著提升。

本公开基础序列82采用修饰模板25-29修饰后,与现有技术公开无修饰序列82P相比,抑制率均可提高30%以上。例如,P92-si82-DV29提高了42.8%,显著提升。

本公开基础序列31采用修饰模板25-29修饰后,与现有技术公开无修饰序列31P相比,抑制率均可提高30%以上。例如,P92-si31-DV26提高了41.9%,显著提升。

由此可知,与现有技术相近的无修饰序列相比,本公开无修饰序列、采用本公开交替修饰和模板修饰序列,均可显著增强对PCSK9的抑制活性,抑制率最多可提高40%。

总结:

(1)与现有技术公开的完全相同的序列相比,本公开中交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列,对PCSK9基因抑制作用显著提升。例如,无修饰序列si84的抑制率为38.6%,交替修饰后抑制率为61.6%,比无修饰序列si84提高了23.0%,采用本公开修饰模板DV26修饰后,抑制率达到了86.8%,比无修饰序列提高了48.2%。

(2)与现有技术公开的相近的序列相比,本公开中无修饰序列、交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰序列,对PCSK9基因抑制作用显著提升。例如,本公开无修饰序列si31与现有技术公开序列相近的31P相比,抑制率提高了10.4%。本公开序列si5交替修饰序列P92-si5,与现有技术公开的与si5序列相近的无修饰序列5P相比,抑制率提高了22.0%。本公开序列si82采用本公开修饰模板DV29修饰的序列P92-si82-DV29,与现有技术公开的与si82序列相近的无修饰序列82P相比,抑制率提高了42.8%。

实施例6:采用特定防脱靶设计的序列对 PCSK9 及脱靶基因的抑制作用

siRNA 的实际应用中存在大量与导引链(反义链)仅有部分互补性的非目标 mRNA 表达被抑制的情况。阿尔尼拉姆公司的研究表明, n-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 偶联 siRNA 的肝细胞毒性,主要归咎于脱靶效应造成的通过类似微小 RNA (miRNA) 的识别机制对错误目标进行的基因抑制。

为解决这一问题,阿尔尼拉姆公司在最新的第五代模板设计中,采用了在 siRNA 反义链的点位 7 放置一个乙二醇核酸 (GNA) 修饰以扰乱反义链的种子区域,从而显著减轻脱靶效应,缓和肝细胞毒性。此类修饰能够影响 siRNA 与非设计目标通过种子区识别的方式结合,抑制脱靶效应。

自然的 5'端磷酸化或简单直接的 5'端磷酸化可能在细胞内发生去磷酸化,直接的 5'端磷酸化寡核酸链可在血液中循环 2 小时后出现 90%的去磷酸化,并在 24 小时后全部消失。5'端磷酸化设计 (5'-E-VP) 利用 E-乙烯基磷酸酯替代桥接氧,具有最好的磷酸化效果及较高稳定性。

综合以上,为了降低序列的脱靶效应,并检验 5'末端磷酸化对脱靶效用的影响,本实施例中采用 DV25-29 修饰的基础序列 5、51、81 和 84,在反义链的 5'末端加入 5'-E-VP 修饰和 7 位 GNA 防脱靶修饰。

并且,将采用 2'-甲氧基与 2'-氟代交替修饰序列 P92-si3、P92-si8、P92-si21、P92-si31、P92-si73 和 P92-si83,以及含有反义链 7 位 GNA 防脱靶修饰设计的上述序列 P92-si3+、P92-si8+、P92-si21+、P92-si31+、P92-si73+和 P92-si83+,进行比较,检测脱靶效应。

实验结果显示,在 10 nM 浓度下,采用防脱靶设计的序列,对靶基因 PCSK9 均具有显著抑制作用,对于脱靶基因的抑制效果显著降低。表明采用防脱靶设计,不会影响本公开交替修饰和模板修饰序列对 PCSK9 基因的抑制效果,却能够显著抑制脱靶效应。

1. 实验材料

1) 受试样品:

交替修饰序列:采用交替修饰的序列P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si73和P92-si83。

交替修饰和防脱靶设计的序列:P92-si3+、P92-si8+、P92-si9+、P92-si21+、P92-si31+、P92-si73+和P92-si83+ (表32)。

基础序列5、84、81和51采用模板修饰序列、采用模板修饰和5'-E-VP修饰序列、采用模板修饰和防脱靶设计的序列，以及采用模板修饰、5'-E-VP修饰和防脱靶设计的序列（表33）。

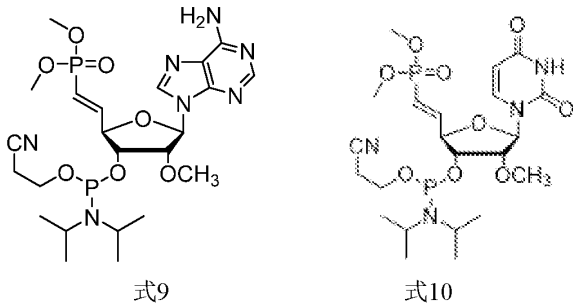
2) 序列合成:

I. 交替修饰序列和模板修饰序列

合成方法参照实施例1。

II. 含5'-E-VP的siRNA序列

参照实施例1合成siRNA序列，在合成反义链5'端的碱基（最后一个碱基）时采用5'端含有磷酸基团的单体，例如，乙烯基-(E)-磷酸酯-A-OMe亚磷酰胺单体（式9），乙烯基-(E)-磷酸酯-U-OMe亚磷酰胺单体（式10），其结构示例如下：



III. 含有防脱靶设计的siRNA序列

参照实施例1合成siRNA序列，在合成反义链5'端起第7个碱基时采用GNA单体合成序列，GNA单体结构如下：

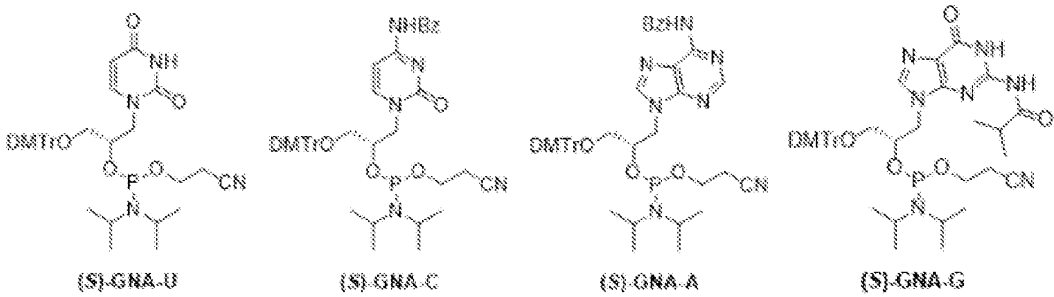


表32 交替修饰加防脱靶修饰序列

序列 编号	正义链5'-3'	修 饰 序 列	反义链5'-3'	修 饰 序 列
		SE Q ID N O: /对 应		SE Q ID N O: /对 应

		基础 序 列 SEQ ID NO:		基础 序 列 SEQ ID NO:
P92- si3+	Cfs-Ams-Cf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf- Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Um-Cf- Um-Uf	17 4/6	Ams-Afs-Gm-Af-Cm-Af-Ugna-Gf-Cm-Af- Gm-Gf-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-Gms- Afs-Gm	42 0/1 8
P92- si8+	Cfs-Ums-Cf-Am-Uf-Am-Gf-Gm-Cf- Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Uf-Um-Af- Um-Uf	17 5/7	Ams-Afs-Um-Af-Am-Af-Cgna-Uf-Cm-Cf- Am-Gf-Gm-Cf-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Af-Gms- Gfs-Gm	42 1/1 9
P92- si9+	Gfs-Gms-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf- Um-Uf-Um-Af-Um-Uf-Cm-Gf-Gm-Af- Am-Af	17 6/8	Ums-Ufs-Um-Cf-Cm-Gf-Agna-Af-Um-Af- Am-Af-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Cms- Ufs-Am	42 2/2 0
P92- si21 +	Cfs-Ams-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Gf- Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Cm-Af- Cm-Af	17 7/9	Ums-Gfs-Um-Gf-Am-Cf-Agna-Cf-Am-Af- Am-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gms- Cfs-Am	42 3/2 1
P92- si31 +	Gfs-Gms-Uf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af- Um-Gf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Af- Am-Gf	17 8/1 0	Cms-Ufs-Um-Gf-Am-Cf-Ugna-Uf-Um-Gf- Cm-Af-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Am-Cf-Cms- Ufs-Gm	42 4/2 2
P92- si73 +	Gfs-Cms-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Um-Gf- Cm-Uf-Um-Cf-Um-Af-Am-Gf-Gm-Cf- Am-Uf	17 9/1 1	Ams-Ufs-Gm-Cf-Cm-Uf-Ugna-Af-Gm-Af- Am-Gf-Cm-Af-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Gf-Cms- Cfs-Am	42 5/2 3
P92- si83 +	Gfs-Gms-Gf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf- Am-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Af- Um-Uf	18 0/1 2	Ams-Afs-Um-Af-Am-Af-Agna-Af-Um-Gf- Cm-Uf-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cf-Cms- Afs-Gm	42 6/2 4

上述序列均采用2'位甲氧基（2'-OMe）和2'位氟代（2'-F）交替修饰方案。其中：

- （1）正义链奇数位均为2'-F修饰，偶数位均为2'-OMe修饰；
- （2）反义链奇数位均为2'-OMe修饰，偶数位均为2'-F修饰；
- （3）正义链5'端以及反义链5'与3'端各有两个硫代修饰；
- （4）反义链第7个碱基（5'-3'方向）采用GNA修饰。

表33 模板修饰、5'-E-VP修饰、防脱靶设计各序列

序列编 号	正义链 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO: / 对应基础 序列 SEQ ID NO:	反义链 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO:/对 应基础序 列 SEQ ID NO:
D5- DV25	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm- Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um- Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am- Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf- Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	376/13
D5- DV25+	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm- Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um- Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Ggna- Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm- Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	427/13
D5- DV25P	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm- Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um- Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	AmsEVP-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm- Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm- Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	428/13

D5-DV25+P	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um	337/1	AmsEVP-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Ggna-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	429/13
D51-DV26	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	342/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	381/14
D51-DV26+	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	342/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Agna-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	430/14
D51-DV26P	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	342/2	AmsEVP-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	431/14
D51-DV26+P	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um	342/2	AmsEVP-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Agna-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	432/14
D81-DV25	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
D81-DV25+	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	433/15
D81-DV25P	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	AmsEVP-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	434/15
D81-DV25+P	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	AmsEVP-Afs-Um-Am-Um-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	435/15
D81-DV27	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	386/15
D81-DV27+	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	Ams-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	436/15
D81-DV27P	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	AmsEVP-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	437/15
D81-DV27+P	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	347/3	AmsEVP-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	438/15
D81-DV28	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	Ams-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	385/15
D81-DV28+	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	Ams-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	439/15
D81-DV28P	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	AmsEVP-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	440/15
D81-DV28+P	Cms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um	348/3	AmsEVP-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	441/15

D84-DV26	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	393/17
D84-DV26+	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Agna-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	442/17
D84-DV26P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	UmsEVP-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	443/17
D84-DV26+P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	UmsEVP-Ufs-Af-Af-Um-Af-Agna-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	444/17
D84-DV27	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	394/17
D84-DV27+	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	Ums-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Agna-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	445/17
D84-DV27P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	UmsEVP-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	446/17
D84-DV27+P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am	357/5	UmsEVP-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Agna-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	447/17

细胞种类：Hep3B细胞，由上海药明康德新药开发有限公司提供(ATCC-tings-1618164)。

Hep3B细胞在含10%胎牛血清（FBS，ExCell Bio-FSP500）、1%青霉素-链霉素（HyClone-SV30010）、1%非必需氨基酸溶液（Gibco-11140-050）、1% GlutaMAX补充液（Gibco-35050-061）的EMEM培养基（ATCC-30-2003）中培养。

药物溶媒：无菌无酶水、gibco DMEM。

2. 实验方法

1) 化合物稀释

脱靶实验将受试样品稀释为10 nM浓度，3复孔检测。

Hep3B细胞消化计数：

取出密度达到80%的Hep3B细胞，用杜氏磷酸盐缓冲盐溶液DPBS润洗后，加0.05%胰蛋白酶进行消化3-10 min，收集细胞后用Countstar Rigel S2计数，并将细胞调整到2×10⁵/mL密度。

2) 转染试剂配制

配制RNAiMAX转染试剂，以RNAiMAX：Opti-MEM=3：97比例按需配置适量体积于15 mL离心管，涡旋15 sec，混匀，室温孵育15 min。向对应位置每孔加入40 μL RNAiMAX Opti-MEM，并取相应浓度40 μL稀释好的化合物加入稀释板相应的孔中，混匀并孵育15 min。

3) 细胞铺板

接种Hep3B细胞（2 × 10⁴细胞/孔）到96孔细胞板，铺板同时将siRNA化合物与RNAiMAX Opti-MEM转染试剂混合后加入各孔细胞中，同时设置含RNAiMAX Opti-MEM的无siRNA化合物对照组。

防脱靶实验：从稀释板取化合物和RNAiMAX Opti-MEM混合物加入96孔细胞培养板中（20 μL/孔），随后加100 μL/孔细胞到96孔板中，每孔终体积为120 μL。铺板后置于5% CO₂、37 °C培养箱中培养24 h。

4) RNA提取及反转录

转染24 h后，去除培养基并收集细胞用于RNA提取。根据试剂盒说明书使用RNeasy® 96 Kit (QIAGEN-74182)提取总RNA。随后根据说明书使用FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN-KR116-02)合成cDNA。

5) RT-qPCR

靶标cDNA通过qPCR进行检测，同时GAPDH cDNA作为内部对照进行平行检测。在384孔中加入8 μL配置好的qPCR反应液和2 μL样本cDNA。TaqMan qPCR反应程序为：95 °C加热10 min，然后进入循环模式，95 °C加热15s，随后60 °C 1 min，共40个循环。SYBR qPCR反应程序为：50 °C加热2 min，95 °C加热10 min，然后进入循环模式，95 °C加热15 sec，随后60 °C 1 min，共40个循环；最后溶解曲线在95 °C下加热15 sec, 60 °C 下加热1 min, 95 °C 下加热15 sec。

6) 数据分析

依据各样品的Ct值计算样品中的目的基因 RNA表达水平，通过 $\Delta\Delta Ct$ 相对定量法进行计算。目的基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

计算公式如下：

$\Delta Ct = \text{目的基因平均Ct值} - \text{内参基因平均Ct值}$ ；

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{加药组}) - \Delta Ct (\text{RNAiMAX对照组})$ ；

目的基因mRNA相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

抑制率 = $(1 - \text{样品相对表达量} / \text{RNAiMAX 对照平均表达量}) \times 100\%$

3. 实验结果

(1) 不同修饰序列均对PCSK9基因具有显著抑制作用。例如，交替修饰P92-si3抑制率达到了75.6%，模板修饰和5'-E-VP修饰序列D84-DV27P的抑制率高达94.4%。

所有受试样品对PCSK9基因的抑制率见表34-36。

所有交替修饰序列在10 nM浓度下均对PCSK9具有显著抑制作用，例如，交替修饰序列P92-si3抑制率达到了75.6%。

I. 交替修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率均超过了60%，其中P92-si3达到了75.6%。

表34 交替修饰序列PCSK9基因的抑制率

基础序列号	交替修饰序列编号	抑制率 (%)
3	P92-si3	75.6
8	P92-si8	74.0
9	P92-si9	69.7
21	P92-si21	67.3
31	P92-si31	72.3
51	P92-si51	70.1
73	P92-si73	69.9
83	P92-si83	66.5

从上表可以看出，在10 nM浓度下，交替修饰序列P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si51、P92-si73和P92-si83均对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率均超过了60%，其中抑制率最高的P92-si3，达到了75.6%。

II. 模板修饰序列采用防脱靶设计或/和5'-E-VP修饰，对PCSK9基因具有显著抑制作用。例如，模板修饰和5'-E-VP修饰序列D84-DV27P的抑制率高达94.4%。

表35 模板修饰及采用防脱靶或/和5'-E-VP修饰序列对PCSK9基因的抑制率

基础序列号	序列编号	修饰方式	抑制率 (%)
5	D5-DV25	模板修饰	87.2
	D5-DV25+	模板修饰和防脱靶	82.2
	D5-DV25P	模板修饰和 5'-E-VP	87.9
	D5-DV25+P	模板修饰、防脱靶和 5'-E-VP	82.7
51	D51-DV26	模板修饰	90.7
	D51-DV26+	模板修饰和防脱靶	87.2
	D51-DV26P	模板修饰和 5'-E-VP	91.8
	D51-DV26+P	模板修饰、防脱靶和 5'-E-VP	84.0
81	D81-DV25	模板修饰	92.6
	D81-DV25+	模板修饰和防脱靶	88.1
	D81-DV25P	模板修饰和 5'-E-VP	93.3
	D81-DV25+P	模板修饰、防脱靶和 5'-E-VP	87.5
81	D81-DV27	模板修饰	93.0
	D81-DV27+	模板修饰和防脱靶	86.5
	D81-DV27P	模板修饰和 5'-E-VP	93.7
	D81-DV27+P	模板修饰、防脱靶和 5'-E-VP	87.8
81	D81-DV28	模板修饰	90.7
	D81-DV28+	模板修饰和防脱靶	89.2
	D81-DV28P	模板修饰和 5'-E-VP	91.6
	D81-DV28+P	模板修饰、防脱靶和 5'-E-VP	87.8
84	D84-DV26	模板修饰	92.0
	D84-DV26+	模板修饰和防脱靶	90.1
	D84-DV26P	模板修饰和 5'-E-VP	93.1
	D84-DV26+P	模板修饰、防脱靶和 5'-E-VP	89.8
84	D84-DV27	模板修饰	91.5
	D84-DV27+	模板修饰和防脱靶	89.2
	D84-DV27P	模板修饰和 5'-E-VP	94.4
	D84-DV27+P	模板修饰、防脱靶和 5'-E-VP	90.4

1) 基础序列5、51、81和84采用本公开修饰模板修饰后，对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率可超过90%。并且，相比于交替修饰序列抑制作用进一步增强。例如，基础序列51交替修饰后，P92-si51的抑制率为70.1%(见表34)，采用模板DV26修饰后，D51-DV26抑制率达到了90.7%，比交替修饰序列提高了20.6%，显著提升（图8）。

2) 采用模板修饰后，再进行防脱靶设计，对PCSK9基因表达具有显著抑制活性。例如，基础序列84采用模板DV26修饰再进行防脱靶设计，D84-DV26+抑制率高达90.1%。

3) 采用模板修饰后, 再进行5'-E-VP修饰, 可提升对PCSK9基因的抑制作用。例如, 基础序列84采用模板DV27修饰, D84-DV27抑制率为91.5%, 再进行5'-E-VP修饰, D84-DV27P抑制率为94.4%, 提高了2.9%。

4) 采用模板修饰后, 再进行防脱靶设计和5'-E-VP修饰, 对PCSK9基因的抑制活性可达90%以上。例如, 基础序列84采用模板DV27修饰, 再进行防脱靶和5'-E-VP修饰, D84-DV27+P抑制率可达90.4%。

由此可知, 采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 相比于交替修饰序列, 可进一步增强抑制效果。并且, 采用本公开修饰模板DV25-29修饰的序列, 再进行防脱靶设计或/和5'-E-VP修饰, 对PCSK9基因表达具有显著抑制作用, 抑制率可达90%以上。

(2) 采用本公开多种修饰方式中的任一种或多种修饰后, 再进行防脱靶设计, 对脱靶基因均具有显著的防脱靶效果, 降低对脱靶基因的抑制作用。

实验结果表明:

1) 本公开交替修饰或模板修饰序列, 采用防脱靶设计, 均可降低对脱靶基因的抑制作用, 即具有显著的防脱靶效果;

2) 采用模板修饰后的序列, 同时采用防脱靶设计和5'-E-VP修饰, 对脱靶基因的抑制率均显著降低, 即具有显著的防脱靶效果。

I. 本公开交替修饰序列采用防脱靶设计, 具有显著的防脱靶效果, 对脱靶基因的抑制率可降低20%。

表36 交替修饰及其防脱靶修饰序列对脱靶基因的抑制率

基础序列号	序列编号	脱靶基因	平均抑制率(%)	比无防脱靶设计抑制率降低(%)
3	P92-si3	AARSD1	43.5	-
	P92-si3+		23.5	20.0
3	P92-si3	ACAP2	56.0	-
	P92-si3+		35.5	20.5
8	P92-si8	AIFM2	17.3	-
	P92-si8+		10.1	7.2
31	P92-si31	ERG	16.8	-
	P92-si31+		8.4	8.4
9	P92-si9	MACF1	24.9	-
	P92-si9+		20.1	4.8
8	P92-si8	RETREG2	14.1	-
	P92-si8+		8.2	5.9

从表36中可以看出, 本公开交替修饰序列采用防脱靶设计后, 对脱靶基因的抑制率均降低, 具有防脱靶效果。例如, 采用防脱靶设计的交替修饰序列P92-si3+比无防脱靶设计序列P92-si3, 对脱靶基因AARSD1的抑制率降低了20.0%, 对脱靶基因ACAP2的抑制率降低了20.5%, 显著降低。

II. 采用本公开修饰模板修饰序列采用防脱靶设计, 具有显著的防脱靶效果, 对脱靶基因的抑制率最多可降低73.6%。

表37 模板修饰序列及其防脱靶或/和5'-E-VP修饰对脱靶基因的抑制率

基础序列号	序列编号	脱靶基因	对脱靶基因抑制率(%)	比无防脱靶设计抑制率降低(%)
5	D5-DV25	DTWD1	26.4	0
	D5-DV25+		15.5	10.9

	D5-DV25P		40	-13.6
	D5-DV25+P		18.7	7.7
51	D51-DV26	NEPRO	37.8	0
	D51-DV26+		11.9	25.9
	D51-DV26P		18.1	19.7
	D51-DV26+P		-4.8	42.6
51	D51-DV26	KIF1B	35.9	0
	D51-DV26+		13.1	22.8
	D51-DV26P		24.8	11.1
	D51-DV26+P		-5.7	41.6
81	D81-DV25	DSE	56.2	0
	D81-DV25+		31.9	24.2
	D81-DV25P		45.1	11.0
	D81-DV25+P		51.0	5.1
	D81-DV27		44.5	0
	D81-DV27+		23.7	20.8
	D81-DV27P		43.7	0.7
	D81-DV27+P		29.6	14.9
81	D81-DV25	PCYOX1	64.1	0
	D81-DV25+		10.0	54.1
	D81-DV25P		47.1	17.0
	D81-DV25+P		34.2	29.9
	D81-DV27		54.4	0
	D81-DV27+		17.0	37.4
	D81-DV27P		58.0	-3.6
	D81-DV27+P		23.3	31.1
84	D84-DV26	MXD1	69.3	0
	D84-DV26+		29.4	39.9
	D84-DV26P		59.3	10.0
	D84-DV26+P		-4.3	73.6
	D84-DV27		44.6	0
	D84-DV27+		28.1	16.5
	D84-DV27P		49.1	-4.5
	D84-DV27+P		37.2	7.4

1) 只采用防脱靶设计（序列编号中用“+”表示）

将采用模板修饰后的序列经过防脱靶设计后，对脱靶基因的抑制作用显著降低，例如D84-DV26+对MXD1基因抑制率降低了39.9%，D81-DV25+对PCYOX1基因抑制率降低了54.1%，D51-DV26+对NEPRO基因抑制率降低了25.9%，D5-DV25+对DTWD1基因抑制率降低了10.9%。

表明基础序列5、51、81和84采用本公开设计的修饰模板修饰后，经过防脱靶设计，均具有显著的防脱靶效果。

2) 同时采用防脱靶设计和5'-E-VP修饰（序列编号中用“+P”表示）

同时采用模板修饰和5'-E-VP修饰的序列，对脱靶基因的抑制率均显著降低，具有显著防脱靶效果。例如，D84-DV26+P对脱靶基因MXD1的抑制率降低了73.6%，D81-DV27+P对脱靶基因PCYOX1的抑制率降低了31.1%，D51-DV26+P对脱靶基因KIF1B抑制率降低了41.6%，显著降低。

表明基础序列5、51、81和84采用本公开设计的修饰模板修饰后，同时采用防脱靶设计和5'-E-VP修饰，具有显著脱靶效果。

总结：

1. 不同修饰序列均对PCSK9基因具有显著抑制作用。例如，交替修饰P92-si3抑制率达到了75.6%，模板修饰和5'-E-VP修饰序列D84-DV27P的抑制率高达94.4%。

(1) 交替修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用，抑制率均超过了60%，其中P92-si3达到了75.6%。

(2) 模板修饰序列采用防脱靶设计或和5'-E-VP修饰，对PCSK9基因具有显著抑制作用。例如，模板修饰和5'-E-VP修饰序列D84-DV27P的抑制率高达94.4%。

2. 采用本公开多种修饰方式中的任一种或多种修饰后，再进行防脱靶设计，对脱靶基因均具有显著的防脱靶效果，降低对脱靶基因的抑制作用。

(1) 本公开交替修饰序列采用防脱靶设计，具有显著的防脱靶效果，对脱靶基因的抑制率可降低20%。

(2) 采用本公开修饰模板修饰序列采用防脱靶设计，具有显著的防脱靶效果，对脱靶基因的抑制率最多可降低73.6%。

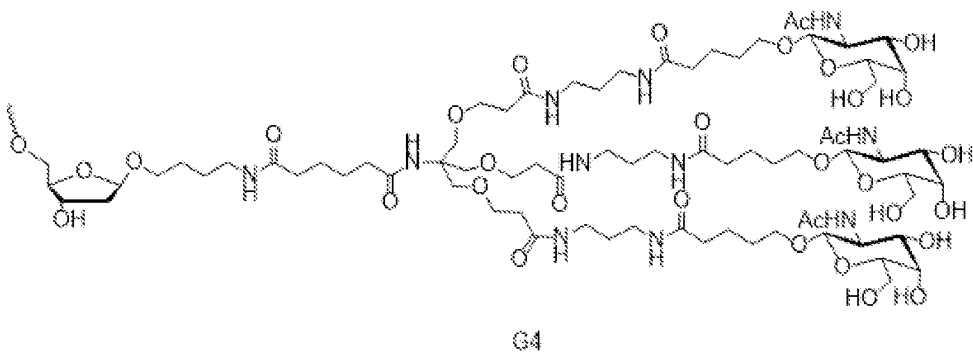
实施例 7：采用本公开修饰模板修饰的序列对小鼠血清中 PCSK9、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）和总胆固醇（TC）的作用

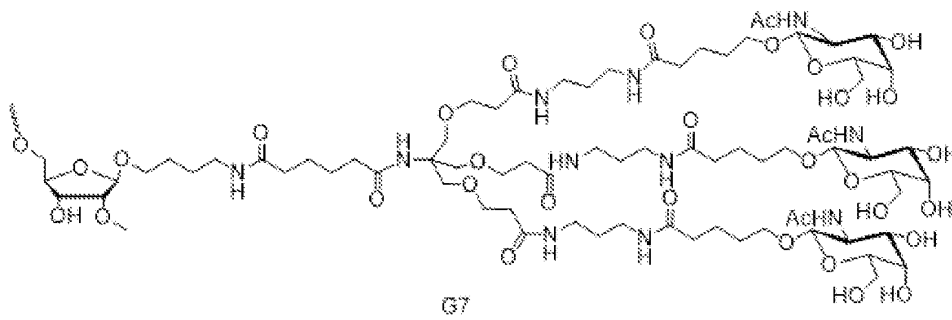
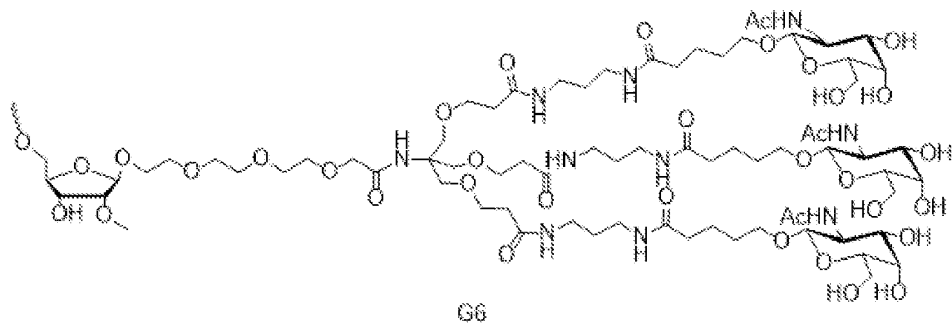
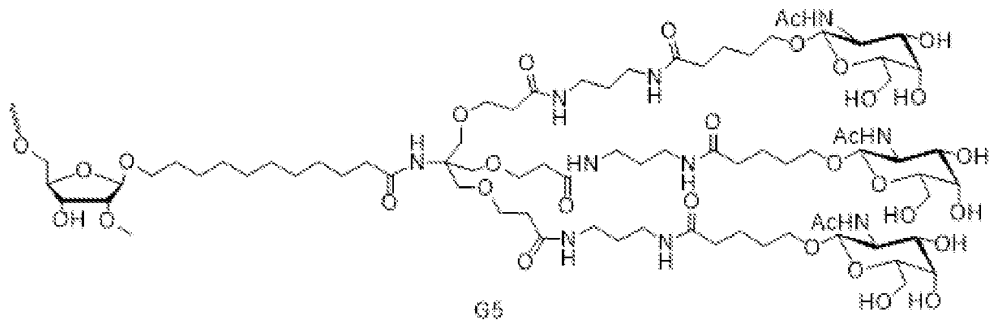
本实施例示例性选择一些序列，包括基础序列 5、51、81、82 和 84，对这些序列进行修饰，例如只采用模板修饰、同时采用模板修饰和防脱靶设计、同时采用模板修饰和 5'-E-VP 修饰，以及同时采用模板修饰、5'-E-VP 和防脱靶设计。利用表达人源 PCSK9 基因的转基因小鼠，通过 ELISA 手段检测上述各序列在不同时间点对血清中 PCSK9、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）和总胆固醇（TC）的抑制作用。

1. 实验材料

受试药品：

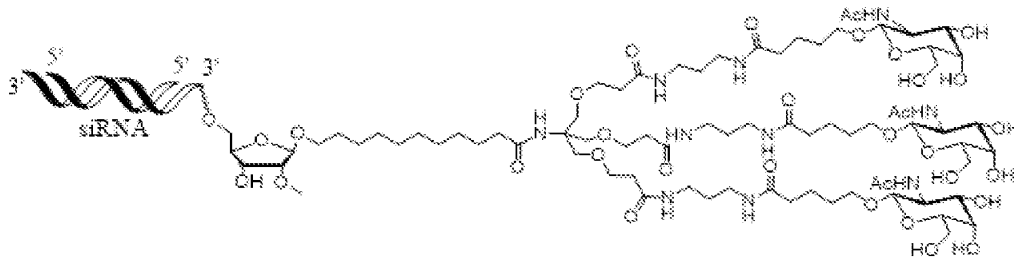
表38中各序列，包括只采用模板修饰序列、采用模板修饰和5'-E-VP修饰的序列、采用模板修饰和防脱靶设计序列，以及同时采用模板修饰、5'-E-VP和防脱靶设计的序列，这些序列正义链3'端偶联GalNAc配体G4、G5、G6或G7：

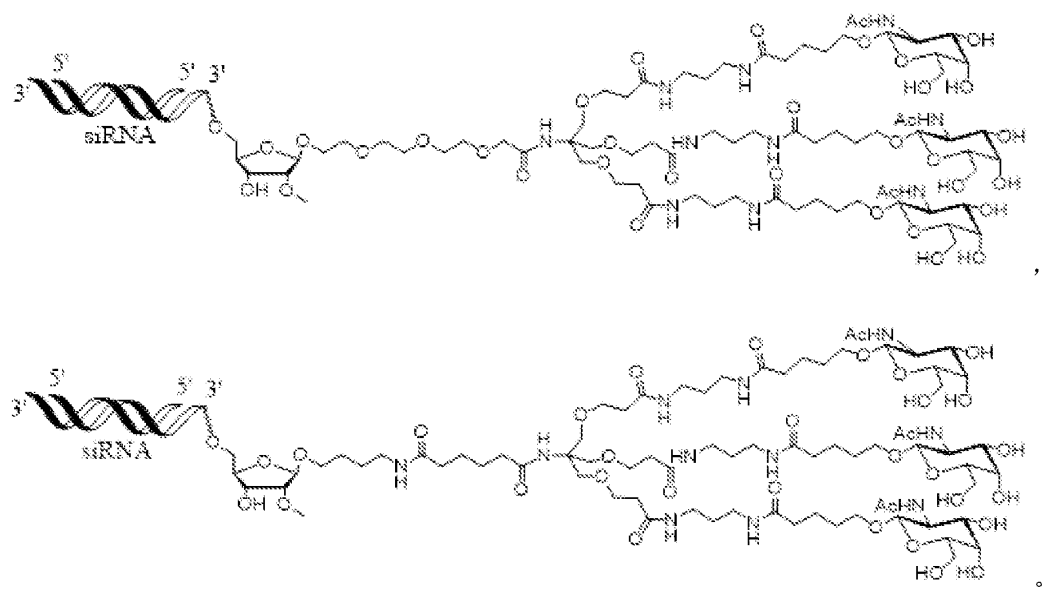




寡核苷酸与配体G4、G5、G6或G7的偶联方法同专利申请CN116854754A实施例3中缀合物4、缀合物5、缀合物6和缀合物7的制备方法，即将YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306和YK-GAL-307与寡核苷酸偶联。YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306和YK-GAL-307合成方法同此专利申请实施例1。

寡核苷酸与配体形成如下所示的缀合物:





各序列具体序列见表 38，序列编号中 G4、G5、G6 和 G7 表示序列与 GalNAc 配体 G4、G5、G6 或 G7 偶联。

表38 动物实验中各序列

序列编号	正义链 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO: /对应基础序列 SEQ ID NO:	反义链 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO: /对应基础序列 SEQ ID NO:
D5-DV25+G4	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um-G4	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Ggna-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	427/13
D5-DV25+G7	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um-G7	337/1	Ams-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Ggna-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	427/13
D5-DV25PG4	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um-G4	337/1	AmsEVP-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	428/13
D5-DV25PG5	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um-G5	337/1	AmsEVP-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	428/13
D5-DV25PG7	Ams-Ams-Gm-Am-Um-Cm-Cf-Um-Gf-Cf-Af-Um-Gm-Um-Cm-Um-Uf-Cm-Cm-Am-Um-G7	337/1	AmsEVP-Ufs-Gm-Gm-Am-Af-Gm-Am-Cm-Am-Um-Gm-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Um-Cm-Um-Ums-Gms-Gm	428/13
D51-DV26G4	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um-G4	342/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	381/14

D51-DV26-G6	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um-G6	342/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	381/14
D51-DV26+G5	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um-G5	342/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Agna-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	430/14
D51-DV26+G7	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um-G7	342/2	Ams-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Agna-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	430/14
D51-DV26PG6	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um-G6	342/2	AmsEVP-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	431/14
D51-DV26PG7	Ums-Gms-Gm-Am-Gm-Gm-Cf-Um-Uf-Af-Gf-Cm-Um-Um-Um-Cm-Uf-Gm-Gm-Am-Um-G7	342/2	AmsEVP-Ufs-Cf-Cf-Am-Gf-Am-Am-Am-Gm-Cm-Um-Am-Af-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Cm-Ams-Ums-Um	431/14
D81-DV25-G4	Cms-Ums-Um-Um-Um-Um-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um-G4	347/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
D81-DV25-G7	Cms-Ums-Um-Um-Um-Um-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um-G7	347/3	Ams-Afs-Um-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	384/15
D81-DV27PG4	Cms-Ums-Um-Um-Um-Um-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um-G4	347/3	AmsEVP-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	437/15
D81-DV27+PG5	Cms-Ums-Um-Um-Um-Um-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um-G5	347/3	AmsEVP-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	438/15
D81-DV27+PG7	Cms-Ums-Um-Um-Um-Um-Uf-Am-Af-Cf-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um-G7	347/3	AmsEVP-Afs-Um-Af-Uf-Cf-Ugna-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	438/15
D81-DV28-G6	Cms-Ums-Um-Um-Um-Um-Uf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gm-Am-Am-Gm-Af-Um-Am-Um-Um-G6	348/3	Ams-Afs-Uf-Af-Um-Cf-Um-Um-Cm-Am-Am-Gm-Um-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Gms-Cms-Am	385/15
D82-DV27PG5	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um-G5	352/4	AmsEVP-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	448/16
D82-DV27PG7	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Uf-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um-G7	352/4	AmsEVP-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	448/16
D82-DV29-G4	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um-G4	353/4	Ams-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	390/16

D82-DV29-G7	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um-G7	353/4	Ams-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	390/16
D82-DV29P-G5	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um-G5	353/4	AmsEVP-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	448/16
D82-DV29P-G6	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um-G6	353/4	AmsEVP-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	448/16
D82-DV29P-G7	Gms-Ams-Am-Gm-Am-Um-Af-Um-Uf-Um-Af-Um-Um-Cm-Um-Gm-Gf-Gm-Um-Um-Um-G7	353/4	AmsEVP-Afs-Am-Cf-Cf-Cf-Am-Gm-Am-Am-Um-Am-Am-Af-Um-Af-Um-Cm-Um-Um-Cms-Ams-Am	448/16
D84-DV26-G4	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am-G4	357/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	393/17
D84-DV26-G6	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am-G6	357/5	Ums-Ufs-Af-Af-Um-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	393/17
D84-DV27P-G4	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am-G4	357/5	UmsEVP-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	446/17
D84-DV27P-G6	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am-G6	357/5	UmsEVP-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Am-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	446/17
D84-DV27+PG4	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am-G4	357/5	UmsEVP-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Agna-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	447/17
D84-DV27+PG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am-G5	357/5	UmsEVP-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Agna-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	447/17
D84-DV27+PG7	Gms-Ums-Um-Um-Um-Gm-Uf-Am-Gf-Cf-Af-Um-Um-Um-Um-Af-Um-Um-Am-Am-G7	357/5	UmsEVP-Ufs-Am-Af-Uf-Af-Agna-Am-Am-Am-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	447/17

受试药品配制：

药物溶媒：PBS缓冲液

配制条件：无菌环境

标识方法：所配制的给药制剂用标签标识，外包装注明专题编号、名称、浓度、数量、配制日期、配制者、贮存条件；

保存条件：现用现配，剩余样品-80℃保存。

实验动物信息：

种属/品系：hPCSK9转基因小鼠

等级：SPF

性别：雄

数量：214只

年龄：4~7周

体重：18~20g

来源：江苏集萃药康生物科技股份有限公司

生产许可证号：SCXK(苏)2018-0008

实验动物伦理审查 (IACUC):

实验动物接收后饲养于有济（天津）医药科技有限公司，使用许可证编号：SYXK（津滨）2019-0002。本项目已经通过有济（天津）医药科技有限公司实验动物伦理委员会审查，试验过程严格按照IACUC要求进行，保证动物福利。

饲养及管理:

饲养条件：实验动物接收后饲养于有济（天津）医药科技有限公司，使用许可证编号：SYXK（津滨）2019-0002。饲养于饲养笼中，笼具规格为长 × 宽 × 高 = 29.0 cm × 18.5 cm × 13.0 cm；设定温度范围20 - 26℃，设定湿度范围40%~70%，换气次数不少于15次全新风/小时，12小时明12小时暗交替人工照明。

饲养环境条件标准参照中华人民共和国国家标准GB14925-2010，由组合式空调机组控制环境。

动物自由采食，自由饮水。饮水瓶和瓶中动物饮用水应每周至少更换2次，使用后饮水瓶经脉动真空灭菌器高压消毒后再次使用。

动物饲养笼具和垫料每周至少更换1次，所有动物饲养笼具和垫料均通过脉动真空灭菌器高压消毒后进入屏障环境使用；动物饲养笼架每周至少清洁、消毒擦拭1次。

动物饲养观察室每天进行清洁消毒，包括平板架、地面、桌面等。

屏障环境使用的消毒液包括：6.67%新洁尔灭溶液、0.5%84消毒液、75%消毒液、0.08%百毒杀，4种消毒液轮流使用，不可混合使用。

实验动物饲料：SPF大小鼠维持饲料：斯贝福（北京）生物技术有限公司生产，动物饲料生产许可证号为SCXK（京）2019-0010，北京市科学技术委员会签发。

饲料检测：每批饲料均有质量合格证，每季度由本公司进行一次微生物检测，每半年由饲料供应单位提供一份近期第三方饲料检测报告。饲料营养成分检测参照中华人民共和国国家标准GB14924.3-2010，污染物指标检测参照中华人民共和国国家标准GB14924.2-2001。

实验动物饮水：饮用水：过滤系统制备的无菌水，用饮水瓶直接灌装。

饮用水检测：每季度由本公司进行一次微生物检测，每年送第三方检测机构进行一次水质检测。饮用水检测参照中华人民共和国国家标准GB5749-2006。

动物垫料：玉米芯垫料：斯贝福（北京）生物技术有限公司生产，动物垫料生产许可证号为SCXK（京）2019-0004，北京市科学技术委员会签发。

垫料检测：每季度由本公司进行一次微生物检测，每半年由垫料供应单位至少提供一份第三方垫料检测报告。垫料检测参照中华人民共和国国家标准GB14924.2-2001。

2. 实验方法

剂量设计及分组

试验日期定义：动物给药溶媒或受试药当天定义为第0天（day 0）。

分组及给药：于试验动物适应性饲养后，按血清PCSK9蛋白含量随机分为阴性对照组、受试药组，每组5只。通过皮下单次注射给药，给药剂量为6 mg/kg，给药体积为1 mL/kg，给药浓度为6 mg/mL，给药当天记为day 0。

动物标识采用耳标号进行个体标识。通过悬挂笼卡的方式对饲养笼进行识别。在实验室门口悬挂实验室标识牌。分组信息详见表39。

表39

组别	药物	剂量 (mg/kg)	给药方式/频率	周期(天)	动物只数
阴性对照组	溶媒	/	/	35	5
受试药组	siRNA6	6	s.c./once	35	5

检测指标

（1）一般观察

自给药前1周至试验结束，每天观察1次。

观察内容：笼旁观察动物的死亡或濒死、精神状态、行为活动、粪便性状、饲料和饮水的供应情况等。

检测动物：阴性对照组和受试药组所有动物。

（2）血清中PCSK9蛋白的表达

检测时间：day -3给药前（day -3）、day 7给药1周（1 w）、day 14给药2周（2 w）、day 21给药3周（3 w）、day 28给药4周（4 w）、day 35给药5周（5 w）。

PCSK9蛋白水平检测方法：采用ELISA试剂盒检测；血清样品避免反复冻融。

检测动物：阴性对照组和受试药组所有动物。

（3）血脂测定

检测时间：day -3给药前（day -3）、day 7给药1周（1 w）、day 14给药2周（2 w）、day 21给药3周（3 w）、day 28给药4周（4 w）、day 35给药5周（5 w），目内眦取血约200 μL。全血样品离心前冰盒中暂存，于2~8℃、离心力约3000 g离心10分钟，分为2管（其中1份约60 μL，剩余血清存于另1管），-70~-86℃保存，用于血脂检测。

（4）数据处理与统计分析

试验数据以平均数±标准差（Mean±SD）表示，采用GraphPad Prism 8.3分析软件进行数据分析。方差齐性采用LSD检验，方差不齐采用Dunnett T3，P<0.05表示有统计学意义。

3. 实验结果

具体实验结果见表40-42。

可以看出，这些序列可以持续显著抑制血清中PCSK9蛋白，并显著降低血清中低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）和血清总胆固醇（TC）水平。例如，D81-DV25G7组在第7天、第14天和第28天，对血清中PCSK9蛋白抑制率分别达到了83.1%、82.2%和70.3%；D82-DV27PG5组在第7天、第14天和第28天，血清中LDL-C

水平分别降低了32.6%、35.8%和21.7%；D82-DV29PG7组在第7天、第14天和第28天血清中TC水平分别降低了32.2%、26.8%和19.6%。

(1) 本公开的序列，例如基础序列5、51、81、82和84采用不同修饰，对血清中PCSK9蛋白表达具有显著抑制作用。例如，D81-DV25G7在第7天、第14天和第28天抑制率分别达到了83.1%、82.2%和70.3%。

表40 不同序列对血清中PCSK9蛋白抑制率

基础序列号	序列编号	抑制率 (%)		
		第 7 天	第 14 天	第 28 天
5	D5-DV25PG4	78.1	70.5	53.8
	D5-DV25PG5	77.0	64.7	58.4
51	D51-DV26PG6	78.2	82.6	68.2
	D51-DV26+G5	74.7	68.0	59.3
	D51-DV26+G7	70.6	75.3	58.1
81	D81-DV25G4	80.2	81.6	63.8
	D81-DV25G7	83.1	82.2	70.3
82	D82-DV27PG5	88.2	87.4	69.2
	D82-DV27PG7	81.9	86.3	72.6
	D82-DV29G4	74.2	81.6	72.6
	D82-DV29PG5	83.8	90.0	76.4
84	D84-DV26G4	81.7	77.4	65.8
	D84-DV26G6	75.6	79.5	56.3
	D84-DV27+PG5	84.0	76.1	63.4
	D84-DV27+PG7	78.9	77.6	60.8

从表40中可以看出，各序列与GalNAc化合物缀合所形成的缀合物对血清中PCSK9蛋白表达具有显著抑制作用。例如，D81-DV25G7在第7天、第14天和第28天抑制率分别达到了83.1%、82.2%和70.3%（图9）。

表明本公开设计的基础序列，例如5、51、81、82和84，采用本公开的模板修饰，或同时再采用5'-E-VP修饰或/和防脱靶设计，与GalNAc化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并显著抑制PCSK9基因表达。

(2) 本公开的序列，例如基础序列5、51、81、82和84采用不同修饰，可显著降低血清中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。例如，D82-DV27PG5组在第7天、第14天和第28天分别降低了32.6%、35.8%和21.7%。

表41 不同序列对血清中低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）降低水平

基础序列号	序列编号	降低水平 (%)		
		第 7 天	第 14 天	第 28 天
5	D5-DV25PG5	21.2	16.9	15.4
	D5-DV25PG7	20.7	18.7	19.2
51	D51-DV26G4	19.7	21.9	17.7
	D51-DV26G6	24.5	18.4	16.8
81	D81-DV27PG4	25.2	25.3	17.3
	D81-DV27+PG5	25.2	18.3	18.2
	D81-DV27+PG7	21.9	17.9	16.8
82	D82-DV27PG5	32.6	35.8	21.7
	D82-DV29G4	29.3	34.1	22.5
	D82-DV29G7	30.6	32.9	23.7
	D82-DV29PG5	30.1	31.2	22.8
84	D84-DV27PG4	30.1	26.1	20.7

	D84-DV27PG6	28.9	29.6	18.5
--	-------------	------	------	------

从表41中可以看出，各实验组中血清LDL-C均显著降低。例如，D82-DV27PG5组在第7天、第14天和第28天分别降低了32.6%、35.8%和21.7%（图10）。

表明本公开设计的基础序列，例如5、51、81、82和84，采用本公开的模板修饰，或同时再采用5'-E-VP修饰或/和防脱靶设计，与GalNAc化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并显著降低血清中低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平。

（3）本公开的序列，例如基础序列5、51、81、82和84采用不同修饰，可显著降低血清中总胆固醇（TC）水平。例如，D82-DV29PG7，第7天、第14天和第28天分别降低了32.2%、26.8%和19.6%。

表42 不同序列对血清总胆固醇（TC）降低水平

基础序列号	序列编号	降低水平（%）		
		第 7 天	第 14 天	第 28 天
5	D5-DV27+G4	21.5	20.8	13.2
	D5-DV27+G7	19.7	18.7	9.2
51	D51-DV26PG6	24.1	18.3	11.9
	D51-DV26PG7	19.7	20.3	10.7
81	D81-DV25G7	21.7	22.2	13.1
	D81-DV27+PG5	21.1	16.1	15.6
	D81-DV27+PG7	17.9	21.6	13.8
	D81-DV28G6	22.9	19.1	13.4
82	D82-DV29PG5	31.4	27.0	18.5
	D82-DV29PG6	28.9	29.6	17.1
	D82-DV29PG7	32.2	26.8	19.6
84	D84-DV26G6	28.9	29.6	18.5
	D84-DV27+PG4	28.4	25.7	14.9
	D84-DV27+PG5	22.8	22.9	16.5

从表42中可以看出，各实验组中血清总胆固醇（TC）均显著降低。例如，D82-DV29PG7组第7天、第14天和第28天分别降低了32.2%、26.8%和19.6%（图11）。

表明本公开设计的基础序列，例如5、51、81、82和84，采用本公开的模板修饰，或同时再采用5'-E-VP修饰或/和防脱靶设计，与GalNAc化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并显著降低血清中总胆固醇（TC）水平。

总结：

本公开设计的基础序列，例如5、51、81、82和84，采用本公开的模板修饰，或同时再采用5'-E-VP修饰或/和防脱靶设计，与GalNAc化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并可持续显著抑制血清中PCSK9蛋白表达，降低血清低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）和血清总胆固醇（TC）水平。

例如，D81-DV25G7组血清中PCSK9蛋白表达抑制率，在第7天、第14天和第28天抑制率分别达到了83.1%、82.2%和70.3%；D82-DV27PG5组血清低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平，在第7天、第14天和第28天分别降低了32.6%、35.8%和21.7%；D82-DV29PG7组血清总胆固醇（TC）水平，在第7天、第14天和第28天分别降低了32.2%、26.8%和19.6%。

结论：

本公开基于PCSK9 mRNA序列设计了一系列siRNA, 对其进行交替修饰和利用一组特定的修饰模板进行修饰, 并对其中一些序列进行防脱靶设计和5'-E-VP修饰。结果表明:

(1) 无修饰序列, 包括基础序列5、51、81、82、84、3、8、9、21、31、73和83, 对PCSK9均具有显著抑制作用, 抑制率最高可超过60%。

(2) 采用多重修饰序列, 抑制率最高可达90%以上。并且, 修饰序列与GalNAc化合物缀合, 可以高效递送至动物肝脏, 并显著抑制PCSK9基因表达, 显著降低血清中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, 显著降低血清中总胆固醇 (TC) 水平。

具体如下:

1. 本公开交替修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用

(1) 设计的84条序列中, 有12条序列对PCSK9基因具有显著抑制作用, 抑制率均超过50%, 包括P92-si5、P92-si51、P92-si81、P92-si82、P92-si84、P92-si3、P92-si8、P92-si9、P92-si21、P92-si31、P92-si73和P92-si83。其中P92-si5、P92-si81、P92-si82、P92-si3、P92-si8和P92-si31的抑制率超过了70%。

(2) 26条序列对PCSK9基因的抑制率在30%-50%。例如, P92-si6和P92-si7的抑制率分别为38.3%和35.7%。

(3) 46条序列对PCSK9基因的抑制率在30%以下。例如, P92-si1和P92-si20的抑制率分别仅为9.2%和6.0%。

(4) 序列相近的siRNA, 活性差异非常大。例如P92-si5的抑制率比P92-si4提高了61.8%, 显著提升。

2. 本公开无修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用

(1) 12条无修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用, 抑制率均超过50%, 包括si5、si51、si81、si82、si84、si3、si8、si9、si21、si31、si73和si83。其中si5、si81、si82、si3和si8抑制超过了60%。

(2) 其它无修饰序列对PCSK9基因的抑制率均低于40%。例如, si52和si74抑制率仅为0.5%和2.2%。

(3) 序列相近的siRNA, 活性差异非常大。例如基础序列5的抑制率比基础序列4提高了51.2%, 显著提升。

(4) 不同序列经过交替修饰后, 对活性影响并不一致。有的抑制率显著提升, 例如基础序列5, 交替修饰比无修饰序列抑制率提高了12.4%; 有的不明显, 例如基础序列4、22和52, 交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

3. 采用本公开修饰模板修饰的序列对PCSK9基因具有显著抑制作用

(1) 基础序列5、51、81、82、84、3、8、9、21、31、73和83, 采用本公开设计的修饰模板DV25-29修饰后, 对PCSK9基因表达具有显著抑制作用, 抑制率均在70%以上。其中P92-si81-DV26、P92-si82-DV27和P92-si82-DV29抑制率达到了89.3%、89.3%和89.1%。

(2) 上述12条序列采用本公开修饰模板DV25-29修饰序列, 与交替修饰序列相比, 对PCSK9基因表达的抑制率显著提升。例如, 基础序列51采用模板DV27修饰序列P92-si51-DV27抑制率比交替修饰序列提高了29.1%, 基础序列81采用模板DV26修饰序列P92-si81-DV26抑制率比交替修饰序列提高了26.9%。

(3) 相同序列采用本公开修饰模板DV25-29修饰, 与采用现有技术公开的修饰模板相比, 对PCSK9基因表达的抑制率显著提升。例如, 基础序列51采用本公开修饰模板DV27修饰序列, 与采用已公开Advanced ESC模板DV21修饰序列相比, 抑制率提高21.3%。

(4) 相同序列采用本公开修饰模板DV25-29修饰, 与采用本公开其它修饰模板DV30和DV31相比, 对PCSK9基因表达的抑制率显著提升。例如, 基础序列51采用本公开修饰模板DV27修饰序列, 与采用本公开修饰模板DV31修饰序列相比, 抑制率提高22.8%。

(5) 上述12条序列的EC50值在0.0001 nM至0.005 nM之间。其中P92-si81-DV27、P92-si84-DV26和P92-si82-DV27的EC50值分别为0.0003 nM、0.0004 nM和0.0006 nM。表明在低浓度下, 这些序列即可有效抑制PCSK9基因表达。

4. 本公开采用交替修饰和本公开修饰模板修饰的各序列, 同现有技术公开的序列完全相同或差异很小的无修饰序列相比, 对PCSK9抑制活性均显著提升。

(1) 与现有技术公开完全相同的无修饰序列相比, 本公开交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰序列, 对PCSK9基因抑制率显著提升, 最多可提高40%。

(2) 与现有技术公开的仅有很小差异的无修饰序列相比, 本公开无修饰序列、交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列, 对PCSK9基因抑制率显著提升, 最多可提高40%。

I. 本公开中无修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比, 活性显著提升。例如, 本公开无修饰序列si31比结构相近的31P相比, 抑制率提高了10.4%。

II. 本公开中交替修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比, 活性显著提升。例如, 与序列5P相比, 本公开交替修饰序列P92-si5抑制率提高了22.0%。

III. 采用本公开修饰模板修饰的序列与现有技术公开相近无修饰序列相比, 活性显著提升。例如, 与序列82P相比, 本公开交替修饰序列P92-si82-DV29抑制率提高了42.8%。

5. 本公开交替修饰序列和模板修饰序列, 采用特定防脱靶设计, 对PCSK9基因具有显著抑制作用, 对脱靶基因的抑制作用显著降低。

(1) 不同修饰序列均对PCSK9基因具有显著抑制作用。例如, 交替修饰P92-si3抑制率达到了75.6%, 模板修饰和5'-E-VP修饰序列D84-DV27P的抑制率高达94.4%。

I. 交替修饰序列对PCSK9基因具有显著抑制作用, 抑制率均超过了60%, 其中P92-si3达到了75.6%。

II. 模板修饰序列采用防脱靶设计或/和5'-E-VP修饰, 对PCSK9基因具有显著抑制作用。例如, 模板修饰和5'-E-VP修饰序列D84-DV27P的抑制率高达94.4%。

(2) 采用本公开多种修饰方式中的任一种或多种修饰后, 再进行防脱靶设计, 对脱靶基因均具有显著的防脱靶效果, 降低对脱靶基因的抑制作用。

I. 本公开交替修饰序列采用防脱靶设计, 具有显著的防脱靶效果, 对脱靶基因的抑制率可降低20%。

II. 采用本公开修饰模板修饰序列采用防脱靶设计, 具有显著的防脱靶效果, 对脱靶基因的抑制率最多可降低73.6%。

6. 采用本公开修饰模板修饰的序列或显著抑制小鼠血清中PCSK9表达, 显著降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和总胆固醇(TC)水平

(1) 本公开基础序列5、51、81、82和84采用不同修饰, 对血清中PCSK9蛋白表达具有显著抑制作用。例如, D81-DV25G7在第7天、第14天和第28天抑制率分别达到了83.1%、82.2%和70.3%。

(2) 本公开基础序列5、51、81、82和84采用不同修饰, 可显著降低血清中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-

C) 水平。例如, D82-DV27PG5 组在第 7 天、第 14 天和第 28 天分别降低了 32.6%、35.8%和 21.7%。

(3) 本公开基础序列 5、51、81、82 和 84 采用不同修饰, 可显著降低血清中总胆固醇 (TC) 水平。例如, D82-DV29PG7, 第 7 天、第 14 天和第 28 天分别降低了 32.2%、26.8%和 19.6%。

实施例 8: 采用 DV29P 模板修饰的小干扰寡核苷酸的合成

共设计 36 条 siRNA 基础序列, 将 Alnylam 的 VIR-2218 作为阳参 (专利号: CN108064294B), 在本实施例中序列编号为 APC-VIR; 将 ANC-DV29P 作为阴性对照。为提升序列的抑制效率和稳定性, 将基础序列采用 DV29P 或 DV29SP 模板修饰。正义链 7、9、11、17 位为 2'-F 修饰, 其余点位为 2'-OMe 修饰; 反义链 2、4、5、6、14、16 位为 2'-F 修饰, 其余点位为 2'-OMe 修饰。此外正义链 5'端有两个硫代修饰; 反义链 5'与 3'端各有两个硫代修饰; 反义链 5'端有一个 EVP 修饰。DV29P 模板修饰的 siRNA 序列见表 43。

1. DV29P模板修饰序列A194-DV29P的合成

表 43 中序列编号为 A194-DV29P 的小干扰核糖核酸的基础序列为:

正义链: 5'- UCGUGUUACAGGCGGGGUUUU -3' (SEQ ID NO: 463)

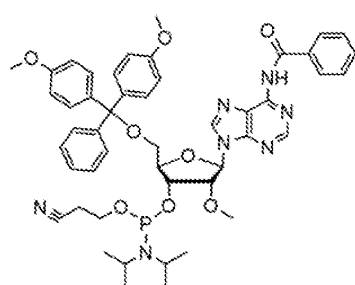
反义链: 5'- AAAACCCCCGCCUGUACACGAGA -3' (SEQ ID NO: 495)

正义链 7、9、11、17 位为 2'-F 修饰, 其余点位为 2'-OMe 修饰; 反义链 2、4、5、6、14、16 位为 2'-F 修饰, 其余点位为 2'-OMe 修饰。此外正义链 5'端有两个硫代修饰; 反义链 5'与 3'端各有两个硫代修饰; 反义链 5'端有一个 EVP 修饰。

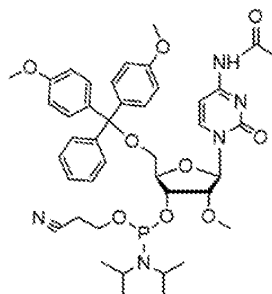
仪器和试剂: 擎科 192 P 型号 DNA/RNA 自动合成仪, 其固相载体为交联聚苯乙烯珠的通用载体, 型号为 Primer support 5G Unylinker 350 (cytiva 厂家)。

制备方法:

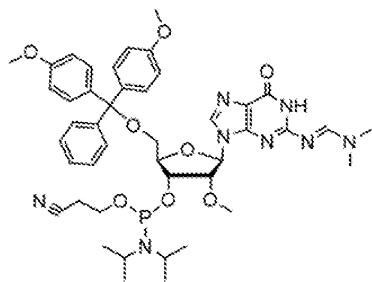
依照单体浓度为 0.15 M, 用乙腈分别配制以下核苷酸单体溶液: DMT-A-OMe 亚磷酰胺单体 (式 1)、DMT-C-OMe 亚磷酰胺单体 (式 2)、DMT-G-OMe 亚磷酰胺单体 (式 3) 和 DMT-U-OMe 亚磷酰胺单体 (式 4)、DMT-A-F 亚磷酰胺单体 (式 5)、DMT-C-F 亚磷酰胺单体 (式 6)、DMT-G-F 亚磷酰胺单体 (式 7)、DMT-U-F 亚磷酰胺单体 (式 8)、乙烯基-(E)-磷酸酯-A-OMe 亚磷酰胺单体 (式 11)、乙烯基-(E)-磷酸酯-U-OMe 亚磷酰胺单体 (式 12)。



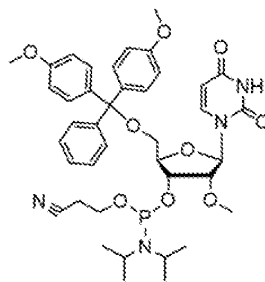
式 1



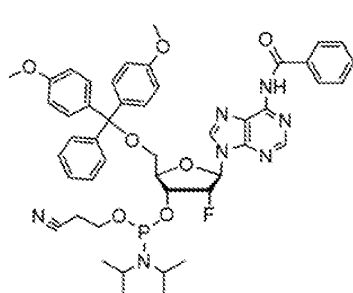
式 2



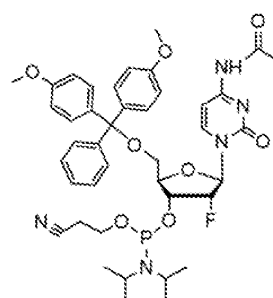
式 3



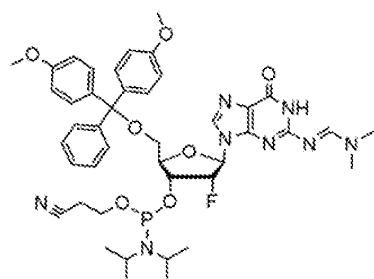
式 4



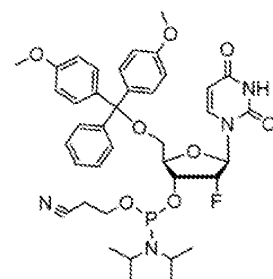
式 5



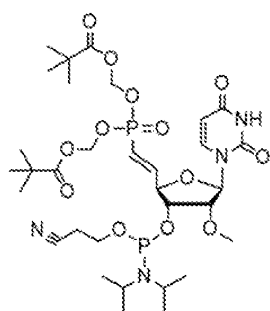
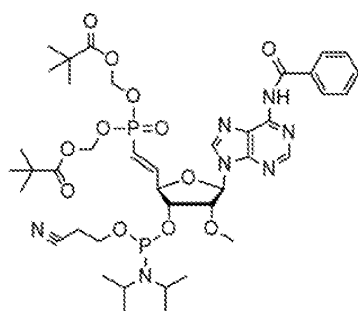
式 6



式 7



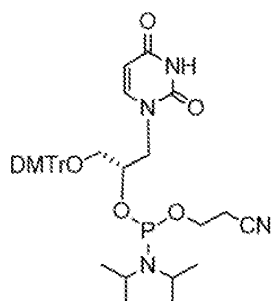
式 8



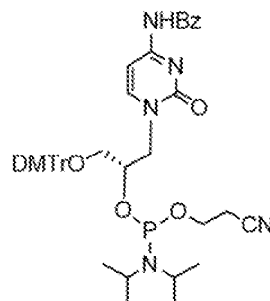
式 11

式 12

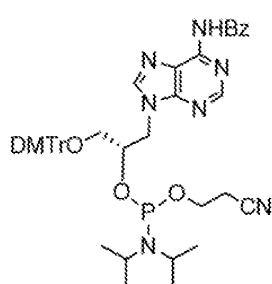
阳参序列 APC-VIR 反义链 5'端起第 7 个碱基含二醇核酸 (GNA) 修饰, GNA 单体结构如下:



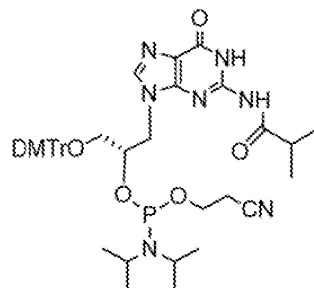
(S)-GNA-U



(S)-GNA-C



(S)-GNA-A



(S)-GNA-G

采用如下步骤制备:

(1) 脱保护

使用 3%二氯乙酸的甲苯溶液作为脱保护试剂, 脱掉 DMT 保护基, 之后使用乙腈进行清洗。

(2) 偶联

使用 0.25 M 5-乙硫基四氮唑的乙腈溶液作为活化剂, 对每个核苷酸单体的乙腈溶液进行偶联, 之后使用乙腈进行冲洗。

(3) 氧化/硫化

氧化: 使用 0.05 M 碘的吡啶/水(90/10)溶液作为氧化剂, 进行氧化, 之后使用乙腈进行冲洗。

硫化: 使用 3%氢化黄原素的吡啶溶液作为硫化剂, 进行硫化, 之后使用乙腈进行冲洗。

(4) 羟基保护

使用 10%乙酸酐的四氢呋喃溶液 (CAPA) 和四氢呋喃/吡啶/氮甲基咪唑 74/10/16(v/v/v) (CAPB) 为羟基保护试剂, 进行羟基保护, 之后使用乙腈进行冲洗。

重复以上操作, 按照设定的序列循环进行, 得到全保护的产物。

(5) 使用 3%二氯乙酸的甲苯溶液为脱保护试剂, 脱掉最后一个核苷酸的 DMT 保护基, 之后使用乙醇进行清洗。

(6) 氨解及纯化

将固相载体转移至反应器中, 加入浓氨水 (25-28%), 在 60°C保持氨解 12 h 后, 体系降至室温, 并将混合物过滤, 用纯化水与乙醇的混合溶液进行淋洗, 合并滤液, 过层析柱, 浓缩, 冻干, 得产品。

(7) 退火

将纯化后的正义链及反义链按 1: 1 比例混合后, 加热到 95°C并保持 3 min 后, 缓慢降温至室温, 形成双链。

A194-DV29P 纯度 90.52%; 实测分子量: 14727.09。

2. 其它序列的合成

按照上述方法合成表 43 中所列其它各条序列。

表43 DV29P模板修饰siRNA序列

基础序列编号	序列编号	正义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对应基础序列 SEQ ID NO	反义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对应基础序列 SEQ ID NO
B207S	B207S-DV29SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	627	456
A1550	A1550-DV29P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	534	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	635	457
B1572	B1572-DV29P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	539	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gf-Af-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	643	458
B1575	B1575-DV29P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am	544	452	UmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	649	459
A1573	A1573-DV29P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm-Cm-Um-Um	549	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cf-Gf-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	655	460
B418S	B418S-DV29SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	554	454	AmsEVP-Afs-Gm-Af-Af-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	661	461
A416	A416-DV29P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-	559	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Af-Um-Gm-Am-	667	462

		Gm-Cf-Cm-Um- Cm-Am-Um-Cf- Um-Um-Cm-Um			Gm-Gm-Cm-Am-Uf- Am-Gf-Cm-Am-Gm- Cm-Ams-Gms-Gm		
A194	A194- DV29P	Ums-Cms-Gm-Um- Gm-Um-Uf-Am-Cf- Am-Gf-Gm-Cm- Gm-Gm-Gm-Gf- Um-Um-Um-Um	604	463	AmsEVP-Afs-Am-Af- Cf-Cf-Cm-Cm-Gm- Cm-Cm-Um-Gm-Uf- Am-Af-Cm-Am-Cm- Gm-Ams-Gms-Am	721	495
A200	A200- DV29P	Ums-Ams-Cm-Am- Gm-Gm-Cf-Gm-Gf- Gm-Gf-Um-Um- Um-Um-Um-Cf- Um-Um-Gm-Um	605	464	AmsEVP-Cfs-Am-Af- Gf-Af-Am-Am-Am- Am-Cm-Cm-Cm-Cf- Gm-Cf-Cm-Um-Gm- Um-Ams-Ams-Cm	722	496
A203	A203- DV29P	Ams-Gms-Gm-Cm- Gm-Gm-Gf-Gm-Uf- Um-Uf-Um-Um- Cm-Um-Um-Gf- Um-Um-Gm-Am	606	465	UmsEVP-Cfs-Am-Af- Cf-Af-Am-Gm-Am- Am-Am-Am-Am-Cf- Cm-Cf-Cm-Gm-Cm- Cm-Ums-Gms-Um	723	497
A205	A205- DV29P	Gms-Cms-Gm-Gm- Gm-Gm-Uf-Um-Uf- Um-Uf-Cm-Um- Um-Gm-Um-Uf- Gm-Am-Cm-Am	564	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cf- Af-Af-Cm-Am-Am- Gm-Am-Am-Am-Af- Am-Cf-Cm-Cm-Cm- Gm-Cms-Cms-Um	673	498
A206	A206- DV29P	Cms-Gms-Gm-Gm- Gm-Um-Uf-Um-Uf- Um-Cf-Um-Um- Gm-Um-Um-Gf- Am-Cm-Am-Am	607	467	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf- Cf-Af-Am-Cm-Am- Am-Gm-Am-Am-Af- Am-Af-Cm-Cm-Cm- Cm-Gms-Cms-Cm	724	499
A248	A248- DV29P	Gms-Ums-Cm-Um- Am-Gm-Af-Cm-Uf- Cm-Gf-Um-Gm- Gm-Um-Gm-Gf- Am-Cm-Um-Um	608	468	AmsEVP-Afs-Gm-Uf- Cf-Cf-Am-Cm-Cm- Am-Cm-Gm-Am-Gf- Um-Cf-Um-Am-Gm- Am-Cms-Ums-Cm	725	500
A255	A255- DV29P	Cms-Ums-Cm-Gm- Um-Gm-Gf-Um-Gf- Gm-Af-Cm-Um- Um-Cm-Um-Cf- Um-Cm-Am-Am	609	469	UmsEVP-Ufs-Gm-Af- Gf-Af-Gm-Am-Am- Gm-Um-Cm-Cm-Af- Cm-Cf-Am-Cm-Gm- Am-Gms-Ums-Cm	726	501
A256	A256- DV29P	Ums-Cms-Gm-Um- Gm-Gm-Uf-Gm-Gf- Am-Cf-Um-Um- Cm-Um-Cm-Uf- Cm-Am-Am-Um	610	470	AmsEVP-Ufs-Um-Gf- Af-Gf-Am-Gm-Am- Am-Gm-Um-Cm-Cf- Am-Cf-Cm-Am-Cm- Gm-Ams-Gms-Um	727	502
A258	A258- DV29P	Gms-Ums-Gm-Gm- Um-Gm-Gf-Am-Cf- Um-Uf-Cm-Um- Cm-Um-Cm-Af- Am-Um-Um-Um	611	471	AmsEVP-Afs-Am-Uf- Uf-Gf-Am-Gm-Am- Gm-Am-Am-Gm-Uf- Cm-Cf-Am-Cm-Cm- Am-Cms-Gms-Am	728	503
A259	A259- DV29P	Ums-Gms-Gm-Um- Gm-Gm-Af-Cm-Uf- Um-Cf-Um-Cm- Um-Cm-Am-Af- Um-Um-Um-Um	612	472	AmsEVP-Afs-Am-Af- Uf-Uf-Gm-Am-Gm- Am-Gm-Am-Am-Gf- Um-Cf-Cm-Am-Cm- Cm-Ams-Cms-Gm	729	504
A261	A261- DV29P	Gms-Ums-Gm-Gm- Am-Cm-Uf-Um-Cf- Um-Cf-Um-Cm-	574	473	AmsEVP-Gfs-Am-Af- Af-Af-Um-Um-Gm- Am-Gm-Am-Gm-Af-	685	505

		Am-Am-Um-Uf- Um-Um-Cm-Um			Am-Gf-Um-Cm-Cm- Am-Cms-Cms-Am		
A381	A381- DV29P	Gms-Ums-Gm-Um- Cm-Um-Gf-Cm-Gf- Gm-Cf-Gm-Um- Um-Um-Um-Af- Um-Cm-Am-Um	613	474	AmsEVP-Ufs-Gm-Af- Uf-Af-Am-Am-Am- Cm-Gm-Cm-Cm-Gf- Cm-Af-Gm-Am-Cm- Am-Cms-Ams-Um	730	506
A413	A413- DV29P	Ums-Cms-Cm-Um- Gm-Cm-Uf-Gm-Cf- Um-Af-Um-Gm- Cm-Cm-Um-Cf- Am-Um-Cm-Um	614	475	AmsEVP-Gfs-Am-Uf- Gf-Af-Gm-Gm-Cm- Am-Um-Am-Gm-Cf- Am-Gf-Cm-Am-Gm- Gm-Ams-Ums-Gm	731	507
A463	A463- DV29P	Ams-Ums-Gm-Um- Um-Gm-Cf-Cm-Cf- Gm-Uf-Um-Um- Gm-Um-Cm-Cf- Um-Cm-Um-Am	615	476	UmsEVP-Afs-Gm-Af- Gf-Gf-Am-Cm-Am- Am-Am-Cm-Gm-Gf- Gm-Cf-Am-Am-Cm- Am-Ums-Ams-Cm	732	508
A536	A536- DV29P	Cms-Ums-Gm-Cm- Um-Cm-Af-Am-Gf- Gm-Af-Am-Cm- Cm-Um-Cm-Uf- Am-Um-Gm-Um	616	477	AmsEVP-Cfs-Am-Uf- Af-Gf-Am-Gm-Gm- Um-Um-Cm-Cm-Uf- Um-Gf-Am-Gm-Cm- Am-Gms-Ums-Am	733	509
A707	A707- DV29P	Ums-Ams-Gm-Gm- Gm-Cm-Uf-Um-Uf- Cm-Cf-Cm-Cm- Cm-Am-Cm-Uf- Gm-Um-Um-Um	617	478	AmsEVP-Afs-Am-Cf- Af-Gf-Um-Gm-Gm- Gm-Gm-Gm-Am-Af- Am-Gf-Cm-Cm-Cm- Um-Ams-Cms-Gm	734	510
A734	A734- DV29P	Cms-Ams-Gm-Um- Um-Am-Uf-Am-Uf- Gm-Gf-Am-Um- Gm-Am-Um-Gf- Um-Gm-Gm-Um	618	479	AmsEVP-Cfs-Cm-Af- Cf-Af-Um-Cm-Am- Um-Cm-Cm-Am-Uf- Am-Uf-Am-Am-Cm- Um-Gms-Ams-Am	735	511
A1260	A1260- DV29P	Cms-Ums-Gm-Cm- Cm-Gm-Af-Um-Cf- Cm-Af-Um-Am- Cm-Um-Gm-Cf- Gm-Gm-Am-Am	619	480	UmsEVP-Ufs-Cm-Cf- Gf-Cf-Am-Gm-Um- Am-Um-Gm-Gm-Af- Um-Cf-Gm-Gm-Cm- Am-Gms-Ams-Gm	736	512
A1266	A1266- DV29P	Ams-Ums-Cm-Cm- Am-Um-Af-Cm-Uf- Gm-Cf-Gm-Gm- Am-Am-Cm-Uf- Cm-Cm-Um-Am	620	481	UmsEVP-Afs-Gm-Gf- Af-Gf-Um-Um-Cm- Cm-Gm-Cm-Am-Gf- Um-Af-Um-Gm-Gm- Am-Ums-Cms-Gm	737	513
A1518	A1518- DV29P	Ams-Cms-Cm-Am- Cm-Gm-Gf-Gm-Gf- Cm-Gf-Cm-Am- Cm-Cm-Um-Cf- Um-Cm-Um-Um	621	482	AmsEVP-Afs-Gm-Af- Gf-Af-Gm-Gm-Um- Gm-Cm-Gm-Cm-Cf- Cm-Cf-Gm-Um-Gm- Gm-Ums-Cms-Gm	738	514
A1520	A1520- DV29P	Cms-Ams-Cm-Gm- Gm-Gm-Gf-Cm-Gf- Cm-Af-Cm-Cm- Um-Cm-Um-Cf- Um-Um-Um-Am	622	483	UmsEVP-Afs-Am-Af- Gf-Af-Gm-Am-Gm- Gm-Um-Gm-Cm-Gf- Cm-Cf-Cm-Cm-Gm- Um-Gms-Gms-Um	739	515
A1547	A1547- DV29P	Cms-Ums-Cm-Cm- Cm-Cm-Gf-Um-Cf- Um-Gf-Um-Gm- Cm-Cm-Um-Uf- Cm-Um-Cm-Am	623	484	UmsEVP-Gfs-Am-Gf- Af-Af-Gm-Gm-Cm- Am-Cm-Am-Gm-Af- Cm-Gf-Gm-Gm-Gm- Am-Gms-Ums-Cm	740	516

A1548	A1548-DV29P	Ums-Cms-Cm-Cm-Cm-Gm-Uf-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cm-Cm-Um-Um-Cf-Um-Cm-Am-Um	624	485	AmsEVP-Ufs-Gm-Af-Gf-Af-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Gf-Am-Cf-Gm-Gm-Gm-Gm-Ams-Gms-Um	741	517
B208	B208-DV29P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cf-Am-Am-Gm-Am	569	486	UmsEVP-Cfs-Um-Uf-Gf-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	679	518
B262	B262-DV29P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Cm-Um-Am	579	487	UmsEVP-Afs-Gm-Af-Af-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	691	519
B264	B264-DV29P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Am-Gm-Am	584	488	UmsEVP-Cfs-Um-Af-Gf-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	697	520
B1556	B1556-DV29P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	589	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gf-Gf-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	703	521
B1560	B1560-DV29P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Af-Cm-Cm-Gm-Um	594	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gf-Uf-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	709	522
B416S	B416S-DV29P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cm-Um-Um-Am	599	491	UmsEVP-Afs-Am-Gf-Af-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	715	523
APC	APC-VIR	Gms-Ums-Gm-Um-Gf-Cm-Af-Cf-Uf-Um-Cm-Gm-Cm-Um-Um-Cm-Am-Cm-Am	625	493	Ums-Gfs-Um-Gm-Am-A(gna)-Gm-Cf-Gf-Am-Am-Gm-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Am-Cms-Ums-Um	742	527
ANC	ANC-DV29P	Gms-Gms-Um-Cm-Um-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Af-Um-Cm-Gm-Am-Um-Cf-Um-Um-Am-Um	626	494	AmsEVP-Ufs-Am-Af-Gf-Af-Um-Cm-Gm-Am-Um-Am-Gm-Af-Am-Gf-Am-Gm-Am-Cm-Cms-Cms-Am	743	528

实施例 9：DV29P 模板修饰序列对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用

将实施例 8 中合成的 DV29P 或 DV29SP 模板修饰 siRNA 序列通过脂质纳米颗粒（LNP）转染进入 HepG2.2.15 细胞后，利用 ELISA 技术检测各序列对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用。

1. 实验材料

受试样品：表 43 中所列 DV29P 或 DV29SP 模板修饰 siRNA 序列（实施例 8 中合成）。

细胞种类：HepG2.2.15 细胞

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM（Thermo Fisher Scientific）。

2. 实验方法

采用 ELISA 检测样品对 HepG2.2.15 细胞系 HBsAg、HBeAg 的抑制情况。

2.1 细胞培养

传代培养：HepG2.2.15 细胞在含 10%胎牛血清、370 µg/ml GENETICIN、1%左旋谷酰胺、1%非必需氨基酸、1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中传代培养，置于 37°C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中，每三天传代一次。用 0.25%胰酶消化传代，800 r/min 离心 3 min 后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

铺板培养：HepG2.2.15 细胞在含 10%胎牛血清、1%左旋谷酰胺、1%非必需氨基酸、1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中铺板培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将 Lipofectamine™ RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) 和 Opti-MEM 按 2:98 比例混合后涡旋混匀。

转染复合物配制：按照 1:1 (v/v) 的比例取 30 µL Opti-MEM 稀释的 siRNA 溶液加入 30 µL 转染混合液，涡旋混匀后室温静置 15 min，得到转染复合物。

转染对照组转染试剂配制：在 15 µL Opti-MEM 中加入制备好的转染混合液 15 µL。涡旋混匀，室温静置 15 min。

将配制好的转染复合物加入 96 孔细胞培养板中（每孔 15 µL，每条序列 3 个复孔），使最终每孔 siRNA 浓度为 0.3 nM。加入 135 µL 细胞悬液（含 2.25×10^4 个细胞）。使用十字法混匀后，放入 37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

2.3 细胞上清 HBsAg、HBeAg 检测

1) 细胞上清收集

- 在细胞转染后第 3 天进行换液，弃掉细胞上清，并添加 150 µL/孔新鲜培养基继续培养。
- 在转染后第 6 天收集细胞上清，用于 HBsAg、HBeAg 含量检测。

2) HBsAg、HBeAg 定量检测

使用乙型肝炎病毒 e 抗原检测试剂盒（安图生物 CL0310），乙型肝炎病毒表面抗原检测试剂盒（安图生物 CL0312）对 HBsAg、HBeAg 浓度进行检测。具体操作步骤如下：

- 将试剂盒和待测样品恢复至室温。
- 将待测样品、标准品、阴性对照、阳参分别加入孔板中，各 50 µL。
- 每孔加入酶结合物各 50 µL。充分混匀后于 37°C 孵育 60 min。
- 去掉孔板中的液体，并用洗液清洗 5 次，最后将孔板在吸水纸上拍干。
- 将发光底物 A、B 等比例混合，按 50 µL/孔加入，室温避光反应 3 min。
- 在酶标仪上测定发光值。

2.4 数据处理

HBsAg 和 HBeAg 抑制率计算公式如下：

HBsAg 抑制率 (%) = $(1 - \text{样品 HBsAg 表达量} / \text{同板中转染对照组 HBsAg 表达量}) \times 100\%$;

HBeAg 抑制率 (%) = $(1 - \text{样品 HBeAg 表达量} / \text{同板中转染对照组 HBeAg 表达量}) \times 100\%$ 。

HBsAg 相对于阳参的抑制率（阳参抑制率设为 1）=样品 HBsAg 抑制率（%）/同板中阳参抑制率（%）；应了解，该值大于 1 表示该序列对 HBsAg 的抑制效果优于阳参，该值小于 1 表示该序列对 HBsAg 的抑制效率低于阳参。

HBeAg 相对于阳参的抑制率（阳参抑制率设为 1）= 样品 HBeAg 抑制率（%）/同板中阳参抑制率（%）；应了解，该值大于 1 表示该序列对 HBeAg 的抑制效果优于阳参，该值小于 1 表示该序列对 HBeAg 的抑制效率低于阳参。

2.5 EC₅₀ 实验

本实验中各序列浓度设置从 10 nM 起始，4 倍稀释，共 8 个浓度点（10 nM、2.5 nM、0.625 nM、0.15625 nM、39.06 pM、9.77 pM、2.44 pM 和 0.61 pM），并对各浓度下各序列的抑制率进行测定，并绘图，计算各序列及阳参的 EC₅₀ 浓度。

2.6 细胞毒性实验

在进行 EC₅₀ 实验时，收集细胞上清后，采用 CellTiter-Glo[®]（Promega）试剂盒测定细胞活力，方法简述如下：将 CellTiter-Glo 试剂与培养基 1:1 混匀，每孔加入 100 μL，室温孵育 10 min 后，用酶标仪检测发光信号值。

细胞活力计算公式为：细胞活力（%）=（样品信号值 - 空白对照平均值）/（转染对照平均值 - 空白对照平均值）× 100%。

3. 实验结果

实验结果显示，序列 B207S-DV29SP、A1550-DV29P、B1572-DV29P、B1575-DV29P、A1573-DV29P、B418S-DV29SP、A416-DV29P 对 HBsAg 的抑制效果显著优于其他序列，对 HBeAg 的抑制效果显著优于其他序列。

实施例 10：无修饰序列对 HBV 基因的抑制作用

本实施例中合成一些实施例 8 中修饰序列对应的无修饰序列，并通过脂质纳米颗粒（LNP）转染进入 HepG2.2.15 细胞，利用 ELISA 技术检测各序列对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用，筛选出具有较好抑制效果的无修饰 siRNA 序列。

1. 实验材料

受试样品：

表 44 中所列无修饰小干扰核糖核酸序列。所有序列按照实施例 8 中方法进行合成。

表44 无修饰siRNA序列

序 列 编 号	正义链序列5'-3'	SEQ ID NO:	反义链序列5'-3'	SEQ ID NO:
B207S	GGGGUUUUUCUUGUUGAC AA	449	UUGUCAACAAGAAAAACCCC GC	456
A1550	CCCGUCUGUGCCUUCUCAU CU	450	AGAUGAGAAGGCACAGACGG GGA	457
B1572	CCGGACCGUGUGCACUUCG CU	451	AGCGAAGUGCACACGGUCCG GCA	458
B1575	GACCGUGUGCACUUCGCUU CA	452	UGAAGCGAAGUGCACACGGU CCG	459
A1573	CGGACCGUGUGCACUUCGC	453	AAGCGAAGUGCACACGGUCC	460

	UU		GGC	
B418S	CUGCUAUGCCUCAUCUUCU U	454	AAGAAGAUGAGGCAUAGCAG CA	461
A416	UGCUGCUAUGCCUCAUCUU CU	455	AGAAGAUGAGGCAUAGCAGC AGG	462
A194	UCGUGUUACAGGCGGGGUU UU	463	AAAACCCCGCCUGUAACACGA GA	495
A200	UACAGGCGGGGUUUUUCUU GU	464	ACAAGAAAAACCCCGCCUGUA AC	496
A203	AGGCGGGGUUUUUCUUGU UGA	465	UCAACAAGAAAAACCCCGCCU GU	497
A205	GCGGGGUUUUUCUUGUUG ACA	466	UGUCAACAAGAAAAACCCCGC CU	498
A206	CGGGGUUUUUCUUGUUGAC AA	467	UUGUCAACAAGAAAAACCCG GCC	499
A248	GUCUAGACUCGUGGUGGAC UU	468	AAGUCCACCACGAGUCUAGAC UC	500
A255	CUCGUGGUGGACUUCUCUC AA	469	UUGAGAGAAGUCCACCACGA GUC	501
A256	UCGUGGUGGACUUCUCUCA AU	470	AUUGAGAGAAGUCCACCACG AGU	502
A258	GUGGUGGACUUCUCUCAAU UU	471	AAAUUGAGAGAAGUCCACCA CGA	503
A259	UGGUGGACUUCUCUCAAUU UU	472	AAAAUUGAGAGAAGUCCACC ACG	504
A261	GUGGACUUCUCUCAAUUUU CU	473	AGAAAAUUGAGAGAAGUCCA CCA	505
A381	GUGUCUGCGGCGUUUUAUC AU	474	AUGAUAAAACGCCGCAGACA CAU	506
A413	UCCUGCUGCUAUGCCUCAU CU	475	AGAUGAGGCAUAGCAGCAGG AUG	507
A463	AUGUUGCCCGUUUGUCCUC UA	476	UAGAGGACAAACGGGCAACA UAC	508
A536	CUGCUCAAGGAACCUCUAU GU	477	ACAUAGAGGUUCCUUGAGCA GUA	509
A707	UAGGGCUUUCCTCCACUGU UU	478	AAACAGUGGGGGAAAGCCCU ACG	510
A734	CAGUUAUAUGGAUGAUGU GGU	479	ACCACAUCAUCCAUAUAACUG AA	511
A1260	CUGCCGAUCCAUAACUGCGG AA	480	UUCCGCAGUAUGGAUCGGCA GAG	512
A1266	AUCCAUAACUGCGGAACUCC UA	481	UAGGAGUCCGCAGUAUGGA UCG	513
A1518	ACCACGGGGCGCACCUCUC UU	482	AAGAGAGGUGCGCCCCGUGG UCG	514
A1520	CACGGGGCGCACCUCUCUU UA	483	UAAAGAGAGGUGCGCCCCGU GGU	515
A1547	CUCCCCGUCUGUGCCUUCU CA	484	UGAGAAGGCACAGACGGGGA GUC	516
A1548	UCCCCGUCUGUGCCUUCUC AU	485	AUGAGAAGGCACAGACGGGG AGU	517
B208	GGUUUUUUCUUGUUGACA AGA	486	UCUUGUCAACAAGAAAAACC CCG	518
B262	UGGACUUCUCUCAAUUUUC UA	487	UAGAAAAUUGAGAGAAGUCC ACG	519
B264	GACUUCUCUCAAUUUUCUA	488	UCUAGAAAAUUGAGAGAAGU	520

	GA		CCA	
B1556	UGUGCCUUCUCAUCUGCCG GA	489	UCCGGCAGAUGAGAAGGCAC AGA	521
B1560	CCUUCUCAUCUGCCGGACC GU	490	ACGGUCCGGCAGAUGAGAAG GCA	522
B416S	UGCUGCUAUGCCUCAUCUU A	491	UAAGAUGAGGCAUAGCAGCA GG	523
APC	GUGUGCACUUCGCUUCACA	493	UGUGAAGCGAAGUGCACACU U	527
ANC	GGUCUCUUCUAUCGAUCUU AU	494	AUAAGAUCGAUAGAAGAGAC CCA	528

细胞种类：HepG2.2.15 细胞

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

2. 实验方法

参照实施例 2。

3. 实验结果

实验结果显示，序列 B207S、A1550、B1572、B1575、A1573、B418S、A416 对 HBsAg 的抑制效果显著优于其他序列，对 HBeAg 的抑制效果显著优于其他序列。

实施例 11：采用不同模板修饰的序列对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用

本实施例通过将无修饰序列 A205、B208、B207S、A261、B262、B264、A1550、B1556、B1560、B1575、A1573、B1572、B418S、A416、B416S，共 15 条序列，分别采用本公开设计的 8 个修饰模板 DV25P、DV26P、DV27P、DV28P、DV29P、DV32P、DV33P 和 DV34P 进行修饰（对于其中较短的序列分别采用 DV25SP、DV26SP、DV27SP、DV28SP、DV29SP、DV32SP、DV33SP、DV34SP 进行修饰），以及现有公开模板 DV30P、DV31P、DV21P、DV22P 或 DV30SP、DV31SP、DV21SP、DV22SP 进行修饰，共 154 条序列。通过脂质纳米颗粒（LNP）转染进入 HepG2.2.15 细胞后，利用 ELISA 技术检测各序列对 HBsAg、HBeAg 的抑制作用。

1. 实验材料

受试样品：表 47 中所列为由 15 条 siRNA 基础序列采用不同模板（DV25P、DV26P、DV27P、DV28P、DV29P、DV32P、DV33P、DV34P、DV30P、DV31P、DV21P、DV22P、DV25SP、DV26SP、DV27SP、DV28SP、DV29SP、DV32SP、DV33SP、DV34SP 和 DV22SP）修饰的序列（合成方法参照实施例 8）。

细胞种类：HepG2.2.15 细胞

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM

本公开修饰模板修饰原则如下：

对于修饰模板 DV25P~DV29P, DV32P~DV34P

反义链采用如表 45-1 所示修饰方式的一种：

表45-1 反义链修饰

序号	反义链（AS） 5'-3'											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2'- OMe+	2'- F	2'- OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe

	PS+E VP	+P S										
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-F	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'- OMe+P S	2'-OMe +PS	2'-OMe	
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'- OMe +PS +EVP	2'- F +P S	2'- F	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-F	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'- OMe+P S	2'-OMe +PS	2'-OMe	
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'- OMe +PS +EVP	2'- F +P S	2'- OMe	2'-F	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-F	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'- OMe+P S	2'-OMe +PS	2'-OMe	
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'- OMe +PS +EVP	2'- F +P S	2'- OMe	2'- OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-F	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'- OMe +PS +EVP	2'- F +P S	2'-F	2'- OMe	2'-F	2'-F	2'- OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-F	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'- OMe +PS +EVP	2'- F +P S	2'-F	2'- OMe	2'- OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'-F	2'-OMe	2'- OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'- OMe +PS	2'- OMe+P S	2'- OMe	

正义链采用如表 45-2 所示修饰方式的一种：

表45-2 正义链修饰

序号	正义链 (SS) 5'-3'										
a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	
b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	

上表中 2'-OMe 为 2'-甲氧基；2'-F 为 2'-氟代；PS 为硫代磷酸骨架；EVP 为 5'-乙烯基-(E)-膦酸酯；

反义链采用修饰方式A，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV25P。

反义链采用修饰方式B，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV26P。

反义链采用修饰方式C，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV27P。

反义链采用修饰方式B，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV28P。

反义链采用修饰方式C，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV29P。

反义链采用修饰方式D，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV32P。

反义链采用修饰方式E，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV33P。

反义链采用修饰方式F，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV34P。

反义链采用修饰方式A，正义链采用修饰方式c的siRNA修饰模板命名为DV22P。

对于修饰模板 DV25SP~DV29SP, DV32SP~DV34SP

反义链采用如表 46-1 所示修饰方式的一种：

表46-1 反义链修饰

序号	反义链 (AS) 5'-3'										
A'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe
B'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F+PS	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
C'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
D'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
E'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
F'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe

正义链采用表46-2所示修饰方式的一种：

表46-2 正义链修饰

序号	正义链 (SS) 5'-3'									
a'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
b'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-O Me	2'-F	2'-OMe	2'-F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-	2'-	2'-	2'-	2'-OMe	2'-	2'-OMe

				OMe	OMe	F	OMe		OMe	
c'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'- OMe +PS	2'- OMe +PS	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- F	2'- OMe	2'- F	2'- F	2'- F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe

上表中2'-OMe为2'-甲氧基；2'-F为2'-氟代；PS为硫代磷酸骨架；

反义链采用修饰方式A'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV25SP。

反义链采用修饰方式B'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV26SP。

反义链采用修饰方式C'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV27SP。

反义链采用修饰方式B'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV28SP。

反义链采用修饰方式C'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV29SP。

反义链采用修饰方式D'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV32SP。

反义链采用修饰方式E'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV33SP。

反义链采用修饰方式F'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV34SP。

反义链采用修饰方式A'，正义链采用修饰方式c'的siRNA修饰模板命名为DV22SP。

对于DV30SP：

反义链：

反义链（AS） 5'-3'																					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2'- OMe +P S+ E V P	2'- OMe +P S	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe - F	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe - F	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe +P S	2'- OMe +P S	2'- OMe

正义链：

正义链（SS） 5'-3'																			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2'- OMe +PS	2'- OMe +P S	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe - F	2'- OMe	2'- OMe - F	2'- OMe - F	2'- OMe - F	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe	2'- OMe

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

对于DV31SP：

反义链：

反义链（AS） 5'-3'

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
2'-O Me +P S +E VP	2'-O F +P S	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O - F e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O - F e	2'-O M e	2'-O - F e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e	2'-O M e +P S	2'-O M e +P S	2'-O M e

正义链：

正义链 (SS) 5'-3'																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
2'-O Me +P S	2'-O Me +P S	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O - F e	2'-O Me	2'-O - F e	2'-O - F e	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me	2'-O Me

上表中 PS 为硫代磷酸骨架。

各序列合成方法同实施例 8。

表47 采用不同修饰模板修饰的序列

序 列 编 号	正义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对应基础序列 SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对 应 基 础 序 列 SEQ ID NO:
B207S-DV29SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	627	456
B207S-DV26SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	530	449	UmsEVP-Ufs-Gf-Uf-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	628	456
B207S-DV27SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	530	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	627	456
B207S-DV28SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gf-Uf-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	628	456
B207S-DV32SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	629	456
B207S-DV34SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gf-Um-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	630	456
B207S-DV25SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	530	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	631	456

B207S-DV33SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gf-Um-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	632	456
B207S-DV30SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am-Am	531	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	633	456
B207S-DV31SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am-Am	532	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	634	456
B207S-DV21SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Gm-Um-Uf-Gf-Am-Cm-Am-Am	533	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	634	456
B207S-DV22SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am-Am	531	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cm-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	634	456
A1550-DV29P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	534	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	635	457
B1550-DV26P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	535	450	AmsEVP-Gfs-Af-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	636	457
B1550-DV27P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	535	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	635	457
B1550-DV28P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	534	450	AmsEVP-Gfs-Af-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	636	457
B1550-DV32P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	534	450	AmsEVP-Gfs-Am-Um-Gf-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	637	457
B1550-DV34P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	534	450	AmsEVP-Gfs-Af-Um-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	638	457
B1550-DV25P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	535	450	AmsEVP-Gfs-Am-Um-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	639	457
B1550-DV33P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	534	450	AmsEVP-Gfs-Af-Um-Gf-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	640	457
B1550-DV30P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um	536	450	AmsEVP-Gfs-Am-Um-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gm-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	641	457
B1550-	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-	537	450	AmsEVP-Gfs-Am-Um-Gm-	642	457

DV31P	Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cm-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um			Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am		
B1550-DV21P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cf-Am-Um-Cm-Um	538	450	AmsEVP-Gfs-Am-Um-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	642	457
B1550-DV22P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um	536	450	AmsEVP-Gfs-Am-Um-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	642	457
B1572-DV29P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	539	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gf-Af-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	643	458
B1572-DV26P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gf-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	540	451	AmsEVP-Gfs-Cf-Gf-Am-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	644	458
B1572-DV27P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gf-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	540	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gf-Af-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	643	458
B1572-DV28P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	539	451	AmsEVP-Gfs-Cf-Gf-Am-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	644	458
B1572-DV32P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	539	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gm-Af-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	645	458
B1572-DV34P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gm-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	539	451	AmsEVP-Gfs-Cf-Gm-Am-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	646	458
B1572-DV30P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gf-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um	541	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gm-Am-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gm-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	647	458
B1572-DV31P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gf-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um	542	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gm-Am-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	648	458
B1572-DV21P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gf-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Uf-Uf-Cm-Gm-Cm-Um	543	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gm-Am-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	648	458
B1572-DV22P	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gf-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um	541	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gm-Am-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	648	458
B1575-DV29P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am	544	452	UmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	649	459
B1575-DV26P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cf-Af	545	452	UmsEVP-Gfs-Af-Af-Gm-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-	650	459

	Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am			Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm		
B1575-DV27P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cf-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am	545	452	UmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	649	459
B1575-DV28P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am	544	452	UmsEVP-Gfs-Af-Af-Gm-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	650	459
B1575-DV32P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am	544	452	UmsEVP-Gfs-Am-Am-Gf-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	651	459
B1575-DV34P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am	544	452	UmsEVP-Gfs-Af-Am-Gm-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	652	459
B1575-DV30P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cf-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um-Um-Cm-Am	546	452	UmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Am-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	653	459
B1575-DV31P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cf-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um-Um-Cm-Am	547	452	UmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	654	459
B1575-DV21P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cf-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gf-Cf-Um-Um-Cm-Am	548	452	UmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	654	459
B1575-DV22P	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cf-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um-Um-Cm-Am	546	452	UmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	654	459
A1573-DV29P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm-Cm-Um-Um	549	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cf-Gf-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	655	460
B1573-DV26P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Uf-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm-Cm-Um-Um	550	453	AmsEVP-Afs-Gf-Cf-Gm-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	656	460
B1573-DV27P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Uf-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm-Cm-Um-Um	550	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cf-Gf-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	655	460
B1573-DV28P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm-Cm-Um-Um	549	453	AmsEVP-Afs-Gf-Cf-Gm-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	656	460
B1573-DV32P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm-Cm-Um-Um	549	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cm-Gf-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	657	460
B1573-DV34P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm-Cm-Um-Um	549	453	AmsEVP-Afs-Gf-Cm-Gm-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-	658	460

	Gm-Cm-Um-Um			Cm-Cm-Gms-Gms-Cm		
B1573-DV30P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Uf-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um-Um	551	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cm-Gm-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	659	460
B1573-DV31P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um-Um	552	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cm-Gm-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	660	460
B1573-DV21P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Uf-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cf-Gm-Cm-Um-Um	553	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cm-Gm-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	660	460
B1573-DV22P	Cms-Gms-Gm-Am-Cm-Cm-Gf-Um-Gf-Uf-Gf-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cm-Um-Um	551	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cm-Gm-Af-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm-Cm-Gms-Gms-Cm	660	460
B418S-DV29SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	554	454	AmsEVP-Afs-Gm-Af-Af-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	661	461
B418S-DV26SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cf-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	555	454	AmsEVP-Afs-Gf-Af-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	662	461
B418S-DV27SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cf-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	555	454	AmsEVP-Afs-Gm-Af-Af-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	661	461
B418S-DV28SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	554	454	AmsEVP-Afs-Gf-Af-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	662	461
B418S-DV32SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	554	454	AmsEVP-Afs-Gm-Am-Af-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	663	461
B418S-DV34SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	554	454	AmsEVP-Afs-Gf-Am-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	664	461
B418S-DV30SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cf-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Cm-Um-Um	556	454	AmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Am-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	665	461
B418S-DV31SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Cm-Um-Um	557	454	AmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	666	461
B418S-DV21SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cf-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cf-Uf-Um-Cm-Um-Um	558	454	AmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	666	461
B418S-DV22SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cf-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Cm-Um-Um	556	454	AmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	666	461

A416-DV29P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	559	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	667	462
B416-DV26P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	560	455	AmsEVP-Gfs-Af-Af-Gm-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	668	462
B416-DV27P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	560	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	667	462
B416-DV28P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	559	455	AmsEVP-Gfs-Af-Af-Gm-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	668	462
B416-DV32P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	559	455	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Gf-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	669	462
B416-DV34P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	559	455	AmsEVP-Gfs-Af-Am-Gm-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	670	462
B416-DV30P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Cm-Um	561	455	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gm-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	671	462
B416-DV31P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Cm-Um	562	455	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	672	462
B416-DV21P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um	563	455	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	672	462
B416-DV22P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Cm-Um	561	455	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Gm-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	672	462
A205-DV29P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Uf-Gm-Am-Cm-Am	564	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cf-Af-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	673	498
B205-DV26P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Uf-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Uf-Gm-Am-Cm-Am	565	466	UmsEVP-Gfs-Uf-Cf-Am-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	674	498
B205-DV27P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Uf-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Uf-Gm-Am-Cm-Am	565	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cf-Af-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	673	498
B205-DV28P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Uf-Gm-Am-Cm-Am	564	466	UmsEVP-Gfs-Uf-Cf-Am-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	674	498
B205-	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-	564	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cm-Af-	675	498

DV32P	Gm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Uf-Gm-Am-Cm-Am			Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um		
B205-DV34P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Uf-Gm-Am-Cm-Am	564	466	UmsEVP-Gfs-Uf-Cm-Am-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	676	498
B205-DV30P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Uf-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am	566	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cm-Am-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	677	498
B205-DV31P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Uf-Um-Cm-Um-Um-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am	567	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cm-Am-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	678	498
B205-DV21P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Uf-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Uf-Uf-Gm-Am-Cm-Am	568	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cm-Am-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	678	498
B205-DV22P	Gms-Cms-Gm-Gm-Gm-Gm-Uf-Um-Uf-Uf-Uf-Cm-Um-Um-Gm-Um-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am	566	466	UmsEVP-Gfs-Um-Cm-Am-Af-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cm-Cm-Gm-Cms-Cms-Um	678	498
A261-DV29P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Uf-Um-Um-Cm-Um	574	473	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Af-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	685	505
B261-DV26P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Uf-Um-Um-Cm-Um	575	473	AmsEVP-Gfs-Af-Af-Am-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	686	505
B261-DV27P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Uf-Um-Um-Cm-Um	575	473	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Af-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	685	505
B261-DV28P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Uf-Um-Um-Cm-Um	574	473	AmsEVP-Gfs-Af-Af-Am-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	686	505
B261-DV32P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Uf-Um-Um-Cm-Um	574	473	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Af-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	687	505
B261-DV34P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Uf-Um-Um-Cm-Um	574	473	AmsEVP-Gfs-Af-Am-Am-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	688	505
B261-DV30P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um	576	473	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Am-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gm-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	689	505
B261-DV31P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um	577	473	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Am-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	690	505
B261-DV21P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-	578	473	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Am-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-	690	505

	Um-Cm-Am-Am-Uf-Uf-Um-Um-Cm-Um			Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am		
B261-DV22P	Gms-Ums-Gm-Gm-Am-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Um-Um-Cm-Um	576	473	AmsEVP-Gfs-Am-Am-Am-Af-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Um-Cm-Cm-Am-Cms-Cms-Am	690	505
B208-DV29P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cf-Am-Am-Gm-Am	569	486	UmsEVP-Cfs-Um-Uf-Gf-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	679	518
B208-DV26P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cf-Am-Am-Gm-Am	570	486	UmsEVP-Cfs-Uf-Uf-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	680	518
B208-DV27P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cf-Am-Am-Gm-Am	570	486	UmsEVP-Cfs-Um-Uf-Gf-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	679	518
B208-DV28P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cf-Am-Am-Gm-Am	569	486	UmsEVP-Cfs-Uf-Uf-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	680	518
B208-DV32P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cf-Am-Am-Gm-Am	569	486	UmsEVP-Cfs-Um-Um-Gf-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	681	518
B208-DV34P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cf-Am-Am-Gm-Am	569	486	UmsEVP-Cfs-Uf-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	682	518
B208-DV30P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am	571	486	UmsEVP-Cfs-Um-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Am-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	683	518
B208-DV31P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am	572	486	UmsEVP-Cfs-Um-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	684	518
B208-DV21P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Af-Cf-Am-Am-Gm-Am	573	486	UmsEVP-Cfs-Um-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	684	518
B208-DV22P	Gms-Gms-Gm-Um-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Gm-Um-Um-Gm-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am	571	486	UmsEVP-Cfs-Um-Um-Gm-Uf-Cm-Am-Am-Cm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Am-Cm-Cm-Cms-Cms-Gm	684	518
B262-DV29P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Cm-Um-Am	579	487	UmsEVP-Afs-Gm-Af-Af-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	691	519
B262-DV26P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cf-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Cm-Um-Am	580	487	UmsEVP-Afs-Gf-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	692	519
B262-DV27P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cf-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Cm-Um-Am	580	487	UmsEVP-Afs-Gm-Af-Af-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	691	519

	Um-Cm-Um-Am			Cm-Ams-Cms-Gm		
B262-DV28P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Cm-Um-Am	579	487	UmsEVP-Afs-Gf-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	692	519
B262-DV32P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Cm-Um-Am	579	487	UmsEVP-Afs-Gm-Am-Af-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	693	519
B262-DV34P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Cm-Um-Am	579	487	UmsEVP-Afs-Gf-Am-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	694	519
B262-DV30P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cf-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um-Am	581	487	UmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	695	519
B262-DV31P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cf-Um-Cm-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um-Am	582	487	UmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	696	519
B262-DV21P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cf-Uf-Cm-Am-Am-Um-Uf-Uf-Um-Cm-Um-Am	583	487	UmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	696	519
B262-DV22P	Ums-Gms-Gm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Uf-Cf-Uf-Cm-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um-Am	581	487	UmsEVP-Afs-Gm-Am-Am-Af-Am-Um-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gf-Am-Af-Gm-Um-Cm-Cm-Ams-Cms-Gm	696	519
B264-DV29P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Am-Gm-Am	584	488	UmsEVP-Cfs-Um-Af-Gf-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	697	520
B264-DV26P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cf-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Am-Gm-Am	585	488	UmsEVP-Cfs-Uf-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	698	520
B264-DV27P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cf-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Am-Gm-Am	585	488	UmsEVP-Cfs-Um-Af-Gf-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	697	520
B264-DV28P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Am-Gm-Am	584	488	UmsEVP-Cfs-Uf-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	698	520
B264-DV32P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Am-Gm-Am	584	488	UmsEVP-Cfs-Um-Am-Gf-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	699	520
B264-DV34P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Am-Gm-Am	584	488	UmsEVP-Cfs-Uf-Am-Gm-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	700	520
B264-DV30P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cf-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um-Am-Gm-Am	586	488	UmsEVP-Cfs-Um-Am-Gm-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	701	520

B264-DV31P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um-Am-Gm-Am	587	488	UmsEVP-Cfs-Um-Am-Gm-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	702	520
B264-DV21P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cf-Af-Am-Um-Um-Um-Uf-Cf-Um-Am-Gm-Am	588	488	UmsEVP-Cfs-Um-Am-Gm-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	702	520
B264-DV22P	Gms-Ams-Cm-Um-Um-Cm-Uf-Cm-Uf-Cf-Af-Am-Um-Um-Um-Um-Cm-Um-Am-Gm-Am	586	488	UmsEVP-Cfs-Um-Am-Gm-Af-Am-Am-Am-Um-Um-Gm-Am-Gf-Am-Gf-Am-Am-Gm-Um-Cms-Cms-Am	702	520
B1556-DV29P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	589	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gf-Gf-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	703	521
B1556-DV26P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	590	489	UmsEVP-Cfs-Cf-Gf-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	704	521
B1556-DV27P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	590	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gf-Gf-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	703	521
B1556-DV28P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	589	489	UmsEVP-Cfs-Cf-Gf-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	704	521
B1556-DV32P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	589	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gm-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	705	521
B1556-DV34P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	589	489	UmsEVP-Cfs-Cf-Gm-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	706	521
B1556-DV30P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Am	591	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gm-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	707	521
B1556-DV31P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cm-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Am	592	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gm-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	708	521
B1556-DV21P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gf-Cf-Cm-Gm-Gm-Am	593	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gm-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	708	521
B1556-DV22P	Ums-Gms-Um-Gm-Cm-Cm-Uf-Um-Cf-Uf-Cf-Am-Um-Cm-Um-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Am	591	489	UmsEVP-Cfs-Cm-Gm-Gm-Cf-Am-Gm-Am-Um-Gm-Am-Gm-Af-Am-Gf-Gm-Cm-Am-Cm-Ams-Gms-Am	708	521
B1560-DV29P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Af-Cm-Cm-Gm-Um	594	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gf-Uf-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	709	522
B1560-	Cms-Cms-Um-Um-Cm-	595	490	AmsEVP-Cfs-Gf-Gf-Um-Cf-	710	522

DV26P	Um-Cf-Am-Uf-Cf-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Af-Cm-Cm-Gm-Um			Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am		
B1560-DV27P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Af-Cm-Cm-Gm-Um	595	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gf-Uf-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	709	522
B1560-DV28P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Af-Cm-Cm-Gm-Um	594	490	AmsEVP-Cfs-Gf-Gf-Um-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	710	522
B1560-DV32P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Af-Cm-Cm-Gm-Um	594	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gm-Uf-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	711	522
B1560-DV34P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Af-Cm-Cm-Gm-Um	594	490	AmsEVP-Cfs-Gf-Gm-Um-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	712	522
B1560-DV30P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Am-Cm-Cm-Gm-Um	596	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gm-Um-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	713	522
B1560-DV31P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Um-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Am-Cm-Cm-Gm-Um	597	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gm-Um-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	714	522
B1560-DV21P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gf-Af-Cm-Cm-Gm-Um	598	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gm-Um-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	714	522
B1560-DV22P	Cms-Cms-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Uf-Gm-Cm-Cm-Gm-Gm-Am-Cm-Cm-Gm-Um	596	490	AmsEVP-Cfs-Gm-Gm-Um-Cf-Cm-Gm-Gm-Cm-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gms-Cms-Am	714	522
B416S-DV29SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cm-Um-Um-Am	599	491	UmsEVP-Afs-Am-Gf-Af-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	715	523
B416S-DV26SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Uf-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cm-Um-Um-Am	600	491	UmsEVP-Afs-Af-Gf-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	716	523
B416S-DV27SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Uf-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cm-Um-Um-Am	600	491	UmsEVP-Afs-Am-Gf-Af-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	715	523
B416S-DV28SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cm-Um-Um-Am	599	491	UmsEVP-Afs-Af-Gf-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	716	523
B416S-DV32SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cm-Um-Um-Am	599	491	UmsEVP-Afs-Am-Gm-Af-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	717	523
B416S-DV34SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Um-Gf-Cm-	599	491	UmsEVP-Afs-Af-Gm-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-	718	523

	Cm-Um-Cm-Am-Uf-Cm-Um-Um-Am			Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm		
B416S-DV30SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Uf-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Am	601	491	UmsEVP-Afs-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	719	523
B416S-DV31SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Uf-Gm-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Am	602	491	UmsEVP-Afs-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	720	523
B416S-DV21SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Uf-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Af-Uf-Cm-Um-Um-Am	603	491	UmsEVP-Afs-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	720	523
B416S-DV22SP	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cf-Um-Af-Uf-Gf-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um-Um-Am	601	491	UmsEVP-Afs-Am-Gm-Am-Uf-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Um-Af-Gm-Cf-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	720	523

2. 实验方法

参照实施例 9，单浓度筛选实验浓度设置为 0.3 nM。

3. 实验结果

实验结果显示，序列 B207S-DV32SP、A1550-DV27P、B1572-DV27P、B1575-DV27P、B207S-DV29SP、A1573-DV29P、B1575-DV29P、B418S-DV34SP、A416-DV27P 对 HBsAg 的抑制效果显著优于阳参序列，对 HBeAg 的抑制效果显著优于阳参序列。

实施例 12：与现有技术公开序列对 HBV 基因抑制作用对比

本实施例将现有技术公开的与本公开基础序列 B207S、B1575、B1550、B1572、A416、B1573、B418S 相同或相近的无修饰序列，与现有公开修饰模板 DV30P、DV31P、DV21P、DV22P（或 DV30SP、DV31SP、DV21SP、DV22SP）修饰的序列和采用本公开修饰模板 DV25P、DV26P、DV27P、DV28P、DV29P、DV32P、DV33P 和 DV34P（或 DV25SP、DV26SP、DV27SP、DV28SP、DV29SP、DV32SP、DV33SP 和 DV34SP）修饰的序列，对 HBV 基因的抑制效率进行对比。

1. 实验材料

受试样品：

（1）现有技术公开序列，见表 48。

表48 现有技术公开序列

序 列 编号	位置	正义链	SEQ ID NO:	反义链	SEQ ID NO:	出处
P206	206-226	CGGGGUUUUUCUUGUUGACAA	467	UUGUCAACAAGAAAAACCCCG	524	WO2023093896A1
P413	413-433	UCCUGCUGCUAUGC CUCAUCU	475	AUGAGGCAUAGCAGCAGGATT	525	US20060287266A1
P1551	1551-1571	CCGUCUGUGCCUUC UACUCUA	492	UAGAUGAGAAGGCACAGACGGGG	526	CN108064294B
APC	1579-1597	GUGUGCACUUCGCU UCACA	493	UGUGAAGCGAAGUGCACACUU	527	CN108064294B

注：以上专利申请中公开序列均为无修饰序列 RNA。

(2) 实施例 11 中采用修饰模板 DV25P、DV26P、DV27P、DV28P、DV29P、DV32P、DV33P、DV34P、DV30P、DV30P、DV31P、DV21P、DV22P、DV25SP、DV26SP、DV27SP、DV28SP、DV29SP、DV32SP、DV33SP、DV34SP、DV30SP、DV31SP、DV21SP 修饰的 siRNA 序列。

细胞种类：HepG2.2.15 细胞
药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM

2. 实验方法

参照实施例 9，单浓度筛选实验浓度设置为 0.3 nM。

3. 实验结果

实验结果显示，本公开基础序列 B207S、A1550、B1572、B1575、A1573、B418S、A416 对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率均显著优于序列相似的 P206、P413、P1551 和 APC，经过模板修饰后，抑制率进一步提升。

实施例 13：采用特定防脱靶设计的序列对 HBV 及脱靶基因的抑制作用

siRNA 的实际应用中存在大量与导引链(反义链)仅有部分互补性的非目标 mRNA 表达被抑制的情况。阿尔尼拉姆公司的研究表明，n-乙酰半乳糖胺（GalNAc）偶联 siRNA 的肝细胞毒性，主要归咎于通过类似微小 RNA（miRNA）的识别机制对错误目标进行的基因抑制而造成的脱靶效应。

为解决这一问题，可在反义链种子区的点位 6、7 进行热不稳定核苷酸修饰，如乙二醇核酸（GNA）、解锁核苷酸（UNA）、DNA 等，以扰乱反义链的种子区，从而影响 siRNA 与非目标 mRNA 通过种子区识别方式的结合，进而显著减轻脱靶效应，缓和肝细胞毒性。阿尔尼拉姆公司在最新的第五代模板设计中，即采用了在 siRNA 反义链的点位 7 放置一个 GNA 修饰的方法来降低 siRNA 的脱靶效应。

为了降低序列的脱靶效应，本实施例中采用序列 B418S-DV34SP、B416-DV27P、B1550-DV27P、B207S-DV29SP、B207S-DV32SP，在反义链点位 6、7 位进行 DNA 或 GNA 防脱靶修饰，并与未进行防脱靶修饰的序列进行活性和脱靶效应比较。

1. 实验材料

受试样品：表 49 中所列模板修饰序列和防脱靶设计的序列（合成方法参照实施例 8）。

细胞种类：HepG2.2.15 细胞
药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

表49 模板修饰和防脱靶设计序列

序 列 编 号	正义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对应基 础序列 SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对 应 基 础 序 列 SEQ ID NO:
B207S- DV29SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um- Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um- Um-Gm-Um-Um-Gf- Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-Af- Am-Cm-Am-Am-Gm-Am- Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm- Cms-Gms-Cm	627	456
C207S- DV29SP d67B	Gms-Gms-Gm-Gm-Um- Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-	744	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-dA- dA-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-	759	456

	Um-Gm-dT-dT-Gf-Am-Cm-Am-Am			Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm		
C207S-DV29SP d7B	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-dT-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	745	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-Af-dA-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	760	456
C207S-DV29SP +	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	746	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-A(gna)-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	761	456
B207S-DV32SP	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	529	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	629	456
C207S-DV32SP d67B	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-dT-dT-Gf-Am-Cm-Am-Am	747	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cf-dA-dA-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	762	456
C207S-DV32SP d7B	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-dT-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	748	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cf-Af-dA-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	763	456
C207S-DV32SP +	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am	749	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cf-A(gna)-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	764	456
B1550-DV27P	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	535	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	635	457
C1550-DV27Pd 67B	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-dC-dT-Cf-Am-Um-Cm-Um	750	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-dA-dG-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	765	457
C1550-DV27Pd 7B	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-dC-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	751	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-Af-dG-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	766	457
C1550-DV27P+	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um	752	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-A(gna)-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	767	457
B418S-DV34SP	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	554	454	AmsEVP-Afs-Gf-Am-Am-Gf-Am-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	664	461
C418S-DV34SP d67B	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-dT-dC-Uf-Um-Cm-Um-Um	753	454	AmsEVP-Afs-Gf-Am-Am-dG-dA-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	768	461
C418S-DV34SP d7B	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm-Am-dT-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um	754	454	AmsEVP-Afs-Gf-Am-Am-Gf-dA-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am	769	461
C418S-DV34SP +	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-	755	454	AmsEVP-Afs-Gf-Am-Am-G(gna)-Am-Um-Gm-Am-Gm-	770	461

	Cm-Am-Um-Cm-Uf-Um-Cm-Um-Um			Gm-Cm-Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms-Cms-Am		
B416-DV27P	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	560	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Af-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	667	462
C416-DV27Pd 67B	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-dA-dT-Cf-Um-Um-Cm-Um	756	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-dA-dT-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	771	462
C416-DV27Pd 7B	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-dA-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	757	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Af-dT-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	772	462
C416-DV27P+	Ums-Gms-Cm-Um-Gm-Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um	758	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-A(gna)-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm-Ams-Gms-Gm	773	462

2. 实验方法

采用 qRT-PCR 方法检测样品对 HepG2.2.15 细胞 HBV 及脱靶基因的抑制情况。

2.1 细胞培养

传代培养：HepG2.2.15 细胞在含 10%胎牛血清、370 μg/ml GENETICIN、1%左旋谷酰胺、1%非必需氨基酸、1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中传代培养，置于 37℃含 5%CO₂ 的细胞培养箱中，每三天传代一次。用 0.25%胰酶消化传代，800 r/min 离心 3 min 后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

铺板培养：HepG2.2.15 细胞在含 10%胎牛血清、1%左旋谷酰胺、1%非必需氨基酸、1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中铺板培养。

2.2 细胞转染

转染试剂配制：将 Lipofectamine RNAiMAX 和 Opti-MEM 按 2:98 比例混合后涡旋混匀。

转染复合物配制：按照 1:1 (v/v) 的比例取 30 μL Opti-MEM 稀释的 siRNA 溶液加入 30 μL 转染混合液，涡旋混匀后室温静置 15 min，得到转染复合物。

转染对照组转染试剂配制：在 15 μL Opti-MEM 中加入制备好的转染混合液 15 μL。涡旋混匀，室温静置 15 min。

将配制好的转染复合物加入 96 孔细胞培养板中（每孔 15 μL，每条序列 3 个复孔），使最终每孔 siRNA 浓度为分别为 0.065、0.14、0.28 nM，每种 siRNA 设置 3 个浓度，每个浓度设置 3 个复孔。加入 135 μL 细胞悬液（含 2.25×10⁴ 个细胞）。使用十字法混匀后，放入 37℃，5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

2.3 RNA 提取及反转录

转染 48 h 后，去除培养基并收集细胞用于 RNA 提取。根据试剂盒说明书使用 RNeasy® 96 Kit (QIAGEN-74182) 提取总 RNA。随后根据说明书使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (Vazyme) 将 RNA 反转录为 cDNA。

2.4 RT-qPCR

HBV 及脱靶基因 cDNA 通过 qPCR 进行检测，同时 GAPDH cDNA 作为内部对照进行平行检测。在 384 孔中加入 8 μL 配置好的 qPCR 反应液和 2 μL 样本 cDNA。SYBR qPCR 反应程序为：50℃加热 2 min，95℃

加热 2 min，然后进入循环模式，95 °C 加热 5s，随后 60 °C 30 s，共 40 个循环；最后溶解曲线在 95 °C 下加热 15 s，60 °C 下加热 1 min，95 °C 下加热 15 s。

2.5 数据分析

依据各样品的 CT 值计算样品中的目的基因 RNA 表达水平，通过 $\Delta\Delta CT$ 相对定量法进行计算。目的基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

计算公式如下：

$\Delta CT = \text{目的基因平均 CT 值} - \text{GAPDH 平均 CT 值}$ ；

$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{实验组}) - \Delta CT (\text{转染对照组})$ ；

目的基因 mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$

基因表达抑制率 (%) = $(1 - \text{样品 mRNA 表达量} / \text{转染对照组 mRNA 表达量}) \times 100\%$

3. 实验结果

实验结果显示，序列 B207S-DV32SP、A1550-DV27P、B207S-DV29SP 无脱靶效应。序列 B418S-DV34SP、A416-DV27P 采用防脱靶设计后，对于脱靶基因的抑制效果显著降低，而不影响靶基因 HBV 的抑制效果。表明采用防脱靶设计，不会影响本公开模板修饰序列对 HBV 基因的抑制效果，却能够显著抑制脱靶效应。

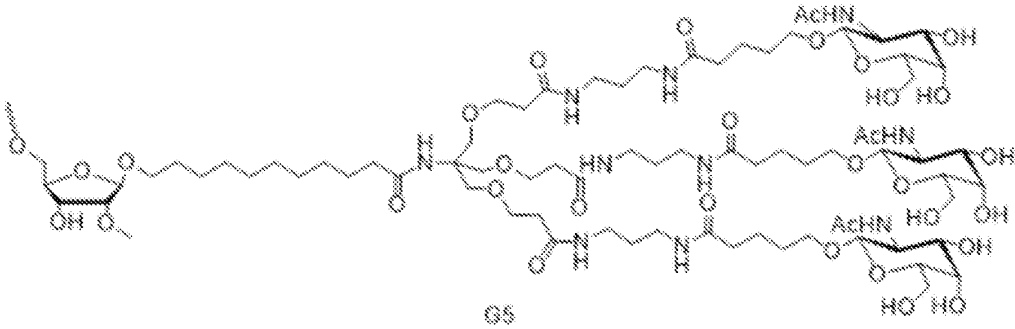
实施例 14：采用本公开修饰模板修饰的序列对小鼠血清中 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 的作用及对小鼠重建适应性免疫功能的影响（高剂量）

本实施例示例性选择一些序列，包括基础序列 B418S、A416、B1550、B207S、B1575、B1572、B1573，对这些序列进行修饰，例如只采用模板修饰、同时采用模板修饰和防脱靶设计，并且偶联 GalNAc 配体。利用 AAV-HBV 小鼠模型分析这些 RNAi 剂的体内药效。此小鼠模型在感染带有可复制的 HBV 基因组的重组腺相关病毒（AAV）后，可以持续产生 HBV 病毒颗粒和 HBV 抗原且 1 年以上无血清转化，重现了临床慢乙肝患者的部分免疫学特征。因而，此模型也被用来评估新的基于免疫的疗法和抗病毒治疗。在本实施例中，利用 AAV-HBV 小鼠模型，检测上述各序列在不同时间点对血清中 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 的抑制作用，以及各序列在特定时间点对小鼠重建适应性免疫功能的影响。

1. 实验材料

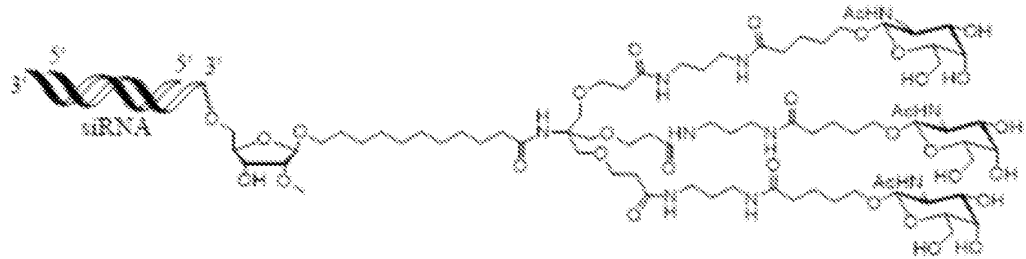
受试药品：

表 50 中各序列，包括只采用模板修饰序列、采用模板修饰和防脱靶设计的序列，这些序列正义链 3'端偶联 GalNAc 配体 G5，G5 的结构式如下：



寡核苷酸与配体 G5 的偶联方法参考专利申请 CN116854754A 实施例 10 中的制备方法。

寡核苷酸与配体 G5 形成如下所示的缀合物：



各序列具体序列见表 50，序列编号中 G5 表示序列与 GalNAc 配体 G5 偶联，GL 表示序列与 GalNAc 配体 L96 偶联。

L96 的结构式如下：

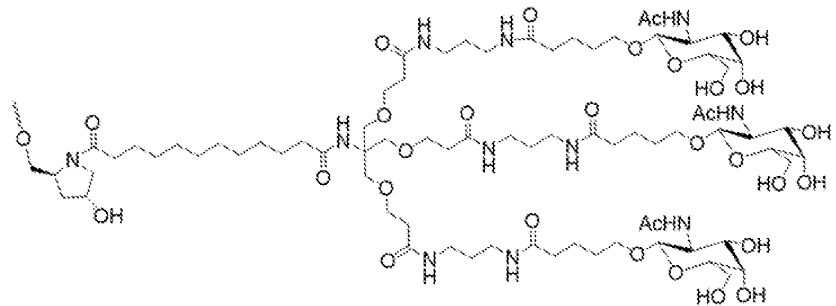


表50 动物实验中各siRNA序列

基础序列编号	序列编号	正义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对应基础序列 SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	对应基础序列 SEQ ID NO:
B20 7S	C207S - DV29 SPG5	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am-G5	774	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Uf-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	627	456
B20 7S	C207S - DV32 SPG5	Gms-Gms-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Gm-Um-Um-Gf-Am-Cm-Am-Am-G5	775	449	UmsEVP-Ufs-Gm-Um-Cf-Af-Am-Cm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Cms-Gms-Cm	629	456
A15 50	C1550 - DV27 PG5	Cms-Cms-Cm-Gm-Um-Cm-Uf-Gm-Uf-Gf-Cf-Cm-Um-Um-Cm-Um-Cf-Am-Um-Cm-Um-G5	776	450	AmsEVP-Gfs-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Am-Am-Gm-Gm-Cm-Am-Cf-Am-Gf-Am-Cm-Gm-Gm-Gms-Gms-Am	635	457
B15 72	C1572 - DV27 PG5	Cms-Cms-Gm-Gm-Am-Cm-Cf-Gm-Uf-Gf-Uf-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Uf-Cm-Gm-Cm-Um-G5	777	451	AmsEVP-Gfs-Cm-Gf-Af-Af-Gm-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Am-Cf-Gm-Gf-Um-Cm-Cm-Gm-Gms-Cms-Am	643	458
B15 75	C1575 - DV27 PG5	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm-Um-Gf-Um-Gf-Cf-Af-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um-Um-Cm-Am-G5	778	452	UmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Cf-Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm-Um-Cms-Cms-Gm	649	459

B15 75	C1575 - DV29 PG5	Gms-Ams-Cm-Cm-Gm- Um-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Cm- Um-Um-Cm-Gm-Cf-Um- Um-Cm-Am-G5	779	452	UmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Cf- Gm-Am-Am-Gm-Um-Gm- Cm-Af-Cm-Af-Cm-Gm-Gm- Um-Cms-Cms-Gm	649	459
A15 73	C1573 - DV29 PG5	Cms-Gms-Gm-Am-Cm- Cm-Gf-Um-Gf-Um-Gf-Cm- Am-Cm-Um-Um-Cf-Gm- Cm-Um-Um-G5	780	453	AmsEVP-Afs-Gm-Cf-Gf-Af- Am-Gm-Um-Gm-Cm-Am- Cm-Af-Cm-Gf-Gm-Um-Cm- Cm-Gms-Gms-Cm	655	460
B41 8S	C418S - DV34 SPd7B G5	Cms-Ums-Gm-Cm-Um-Af- Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cm- Am-dT-Cm-Uf-Um-Cm- Um-Um-G5	781	454	AmsEVP-Afs-Gf-Am-Am-Gf- dA-Um-Gm-Am-Gm-Gm-Cm- Af-Um-Af-Gm-Cm-Am-Gms- Cms-Am	769	461
A41 6	C416- DV27 Pd7B G5	Ums-Gms-Cm-Um-Gm- Cm-Uf-Am-Uf-Gf-Cf-Cm- Um-Cm-dA-Um-Cf-Um- Um-Cm-Um-G5	782	455	AmsEVP-Gfs-Am-Af-Gf-Af- dT-Gm-Am-Gm-Gm-Cm-Am- Uf-Am-Gf-Cm-Am-Gm-Cm- Ams-Gms-Gm	772	462
AP C	VIR- 2218- GL	Gms-Ums-Gm-Um-Gf-Cm- Af-Cf-Uf-Um-Cm-Gm-Cm- Um-Um-Cm-Am-Cm-Am- GL	783	493	Ums-Gfs-Um-Gm-Am- A(gna)-Gm-Cf-Gf-Am-Am- Gm-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Am- Cms-Ums-Um	742	527
AN C	CNC- G5	Gms-Gms-Um-Cm-Um- Cm-Uf-Um-Cf-Um-Af-Um- Cm-Gm-Am-Um-Cm-Um- Um-Am-Um-G5	784	494	AmsEVP-Ufs-Am-Af-Gf-Af- Um-Cm-Gm-Am-Um-Am- Gm-Af-Am-Gf-Am-Gm-Am- Cm-Cms-Cms-Am	743	528

受试药品配制：

药物溶媒：PBS 缓冲液

配制条件：无菌环境

标识方法：所配制的给药制剂用标签标识，外包装注明专题编号、名称、浓度、数量、配制日期、配制者、贮存条件；

保存条件：现用现配，剩余样品-80℃保存。

实验动物信息：

种属/品系：AAV-HBV 小鼠

等级：SPF

性别：雄

数量：100 只

年龄：7 周

体重：19~24 g

来源：广东至远生物医药科技有限公司

生产许可证号：SCXK(粤)2021-0057

实验动物伦理审查（IACUC）：

实验动物接收后饲养于广州吉妮欧生物科技有限公司，使用许可证编号：JENNIO（津滨）2019-0002。本项目已经通过广州吉妮欧生物科技有限公司实验动物伦理委员会审查，IACUC 编号为 JENNIO-IACUC-2024-A005，试验过程严格按照 IACUC 要求进行，保证动物福利。

饲养及管理：

饲养条件：实验动物接收后饲养于广州吉妮欧生物科技有限公司。饲养于饲养笼中，笼具规格为长 × 宽 × 高 = 29.0 cm × 18.5 cm × 13.0 cm；设定温度范围 20 - 26℃，设定湿度范围 40% ~ 70%，自动照明，12 小时明暗交替。

饲养环境条件标准参照中华人民共和国国家标准 GB14925-2010。

动物自由采食，自由饮水。饲料为辐照灭菌实验鼠维持饲料，由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供，生产许可证号为苏饲证（2019）01008。饲料营养成分检测参照中华人民共和国国家标准 GB14924.3-2010，污染物含量检测参照中华人民共和国国家标准 GB14924.2-2001，由饲料供应商提供每批检测报告。饮用水为反渗透水，用饮水瓶盛装，饮用水检测参照中华人民共和国国家标准 GB5750-2006，每年送第三方检测机构进行一次检测。

动物垫料为玉米芯垫料，由广州市赛柏诺生物科技有限公司提供，动物垫料生产许可证号为 SCXK（京）2019-0004，垫料污染物含量检测参照中华人民共和国国家标准 GB14924.2-2001，由垫料供应商每批提供检测报告。

动物饲养笼具和垫料每周至少更换 1 次，所有动物饲养笼具和垫料均通过脉动真空灭菌器高压消毒后进入屏障环境使用；动物饲养笼架每周至少清洁、消毒擦拭 1 次。

动物饲养观察室每天进行清洁消毒，包括平板架、地面、桌面等。

屏障环境使用的消毒液包括：6.67%新洁尔灭溶液、0.5% 84 消毒液、75%消毒液、0.08%百毒杀，4 种消毒液轮流使用，不可混合使用。

2. 实验方法**2.1 AAV-HBV 小鼠造模**

试验日期定义：动物给药溶媒或受试药当天定义为第 0 天（day 0）。

220 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠，屏障设施内适应性饲养 7 天，日常观察，确认小鼠健康无异常后进行造模。小鼠随机分为 2 批，其中 1 批 180 只小鼠尾静脉注射 rAAV8-1.3HBV（广州派真生物技术有限公司，名称：AAV8[HBV-D_{ayw}](D#2012)，批号：HBV101-6)，每只小鼠注射 1×10^{11} GC/100 μ L，作为低基线组动物；剩余 40 只小鼠尾静脉注射 rAAV-HBV1.3-mer WT replicon（武汉枢密脑科学技术有限公司，批号：ayw1-P4-230516），每只小鼠注射 1×10^{10} vg/100 μ L，作为高基线组动物。在造模后于第 5、6 周（D-14、D-7）对动物进行采血、离心和收集血浆并检测 HBV DNA、HBsAg 和 HBeAg 3 个指标。成模标准：HBV DNA > 10^5 IU/mL 且上下浮动不超过 $2 \log_{10}$ ，HBsAg 上下浮动不超过 $1 \log_{10}$ ，低基线组动物 HBsAg 均值达到 2000-4000 IU/mL，高基线组动物 HBsAg 均值达到 1 万-1.5 万 IU/mL。

2.2 动物分组及给药

试验日期定义：动物给药溶媒或受试药当天定义为第 0 天（D 0）。

以造模第 6 周（D-7）指标进行分组，从造模成功的低基线组动物中挑选出 72 只按照 HBsAg 指标随机分为 12 组，每组 6 只；从造模成功的高基线组动物中挑选出 18 只按照 HBsAg 指标随机分为 3 组，每组 6 只。确保各组间 HBsAg 平均值在相同水平，组间 HBV DNA、HBeAg 指标无统计学差异，分组后在造模第 7 周（D 0）时进行给药，分组及给药详情如表 51。

表51 组别设置及给药详情表

组别		给药方案	给药方式	动物只数
低基线组	siRNA（11 组）	3 mg/kg，D0/ 7/ 14 给药	s.c.	6 只/组×11 组
	溶媒对照（1 组）	PBS，D0/ 7/ 14 各 1 次给药	s.c.	6 只/组
高基线组	siRNA（2 组，分别为 C207S-DV29SPG5 和阳参 VIR-2218-GL）	3 mg/kg D0/ 7/ 14/ 35/ 42/ 49 给药	s.c.	6 只/组×2 组
	溶媒对照（1 组）	PBS，D0/ 7/ 14/ 35/ 42/ 49 给药	s.c.	6 只/组

注：s.c.：皮下注射。

2.3 二次攻毒实验

在给药 D 60 时，挑选 2 组动物，每组 3 只共 6 只小鼠尾静脉水动力注射 8 μg pAAV-HBV 1.2 质粒（丰晖生物），注射体积为 100 μL/g 进行攻毒，剩余 6 只不处理。

2.4 观察及指标监测

（1）一般观察

造模期和试验期内每日对动物进行观察并做观察记录，观察内容包括：是否死亡、濒死、饲料饮水摄入情况、外伤、粪便、外观及被毛、精神状况、活动状况等。

（2）体重

适应期：动物接收时称重记录，适应期结束当天对动物进行称重记录。

试验期：试验期内每周对动物进行称重记录，如果当天需要给药或取血，则在操作前称重、处死前称重。

（3）血清中 HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBsAb、ALT 水平测定

动物于造模后 4 周（D-14）、5 周（D-7）、给药前（D 0）、给药后每周进行 1 次眼眶内眦部采血 200 μL 加入 EDTA-k2 抗凝管中抗凝，以 1000 g 离心 10 min 后收集收集血浆。攻毒操作的 2 组 12 只小鼠在给药 D60 时进行攻毒操作，并在 D63、D67、D74、D81 分别进行 1 次眼眶内眦部采血 200 μL 加入 EDTA-k2 抗凝管中抗凝，以 1000 g 离心 10 min 后收集血浆。取 20 μL 血浆加入 980 μL PBS，涡旋混匀，用于检测 HBsAg、HBV DNA、HBeAg、ALT 指标；另取 15 μL 血浆加入 210 μL PBS，涡旋混匀，用于检测 HBsAb 指标。所有处理后的待测样本由广州华银医学检验中心有限公司进行检测，检测剩余血浆置于-80℃条件进行保存。

2.5 体外免疫指标检测

在固定时间点分离肝脏、脾脏单个核细胞进行免疫学检测，采用 ELISpot 方法检测肝脏单个核细胞中 IFN-γ 分泌水平，采用 ELISpot 方法检测脾脏单个核细胞中 IFN-γ、IFN-α、IL-2 分泌水平，采用 ELISpot 方法检测脾脏单个核细胞中效应 B 细胞、记忆 B 细胞中 HBsAg 特异性 IgG 分泌水平；采用流式细胞术检测脾脏中 HBsAg 特异性记忆 B 细胞的比例，采用流式细胞术检测脾脏中 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞的比例及分泌 IFN-γ、IFN-α、IL-2 细胞的比例。

2.6 数据处理与统计分析

试验数据以平均数±标准差（Mean±SD）表示，采用 GraphPad Prism 8.3 分析软件进行数据分析。数据符合正态分布及方差齐性，采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行检验；当方差不齐时采用 Welch ANOVA 方法进行检验，当数据不符合正态分布时则采用非参数检验的 Kruskal-Wallis H 方法进行检验，P<

0.05 认为有统计学差异。

3. 实验结果

实验结果显示，与溶媒对照组和阴性对照组相比，序列 B207S-DV32SP、A1550-DV27P、B1572-DV27P、B1575-DV27P、B207S-DV29SP、A1573-DV29P、B1575-DV29P、B418S-DV34SPd7B、A416-DV27Pd7B 在偶联缀合物 G5 后可靶向递送至肝脏，持续显著抑制血清中 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 水平。

其中，序列 C207S-DV32SPG5、C207S-DV29SPG5、C418S-DV34SPd7BG5 展现出优越的降 HBsAg、HBV DNA、HBeAg 效果，显著优于阳参序列 VIR-2218-GL，此外序列 C207S-DV32SPG5 和 C207S-DV29SPG5 最终都实现了组内所有小鼠 HBsAg、HBV DNA 的阴转，均产生了较高水平的抗体，序列 C418S-DV34SPd7BG5 组小鼠最终也有 3/6 只小鼠实现了 HBsAg 的阴转，同时也产生了较高水平的抗体。

二次攻毒实验结果显示，空白组（D56 之前未感染过 HBV 病毒）在攻毒后体内出现了 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA，提示攻毒方式有效。C207S-DV32SPG5 组攻毒组的小鼠在攻毒后 HBV DNA 先上升随后下降至检测下限，同时血清 HBsA 抗体出现明显上升，HBsAg 维持低于检测限水平，证明攻毒有效，且经过该小核酸序列治疗的乙肝小鼠，能够免受 HBV 病毒的再次攻击。证明了经过该小核酸序列治疗的乙肝小鼠，能够免受 HBV 病毒的再次攻击。

(i) 各序列组小鼠 HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBsAb、ALT 水平随时间的变化

各组小鼠 HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBsAb、ALT 以及体重水平随时间的变化见表 51-1-表 51-9 和图 12A-图 12F，从表中可看出，序列 C207S-DV32SPG5、C207S-DV29SPG5、C418S-DV34SPd7BG5 展现出优越的降 HBsAg、HBV DNA、HBeAg 效果，显著优于阳参序列 VIR-2218-GL，此外序列 C207S-DV32SPG5 和 C207S-DV29SPG5 最终都实现了组内所有小鼠 HBsAg、HBV DNA 的阴转，均产生了较高水平的抗体，其中 C207S-DV32SPG5 组分别于给药后第 14 天，第 21 天实现组内所有小鼠的 HBsAg、HBV DNA 阴转，并一直持续到实验终点，可认为小鼠均实现了功能性治愈。序列 C418S-DV34SPd7BG5 组小鼠最终也有 3/6 只小鼠实现了 HBsAg 的阴转，同时也产生了较高水平的抗体。以上数据证明了 C207S-DV32SPG5、C207S-DV29SPG5、C418S-DV34SPd7BG5 序列在药效方面的优越性。

表51-1 各序列组小鼠血浆HBsAg水平变化

基 础 序 列 编 号	序列编号	Log10 HBsAg (IU/mL)										
		D-7	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
	PBS	3.27 ± 0.60	3.16 ± 0.50	3.71 ± 0.51	3.64 ± 0.34	3.85 ± 0.35	4.08 ± 0.40	4.12 ± 0.36	3.96 ± 0.48	4.17 ± 0.35	4.17 ± 0.44	4.14 ± 0.51
APC	VIR-2218- GL	3.49 ± 0.16	3.09 ± 0.38	1.61 ± 0.17* *	1.01 ± 0.19* *	0.74 ± 0.28**	1.15 ± 0.23**	1.26 ± 0.22**	1.54 ± 0.45**	1.63 ± 0.25	1.75 ± 0.29	2.29 ± 0.44
A1550	C1550- DV27PG5	3.49 ± 0.15	3.48 ± 0.18	2.83 ± 0.21	2.38 ± 0.40	2.18 ± 0.47	2.28 ± 0.48	2.51 ± 0.65	2.63 ± 0.52	-	-	-
B1572	C1572- DV27PG5	3.50 ± 0.13	3.44 ± 0.36	2.76 ± 0.54	2.39 ± 0.58	2.29 ± 0.52	2.49 ± 0.50	2.58 ± 0.77	2.65 ± 0.73	-	-	-

A1573	C1573-DV29PG5	3.50 ± 0.13	3.44 ± 0.30	2.98 ± 0.56	2.64 ± 0.44	2.67 ± 0.38	2.62 ± 0.35	2.76 ± 0.39	2.67 ± 0.51	-	-	-
B1575	C1575-DV27PG5	3.49 ± 0.15	3.45 ± 0.24	1.62 ± 0.51*	1.24 ± 0.56*	1.22 ± 0.50*	1.47 ± 0.61*	1.71 ± 0.66*	1.73 ± 0.68*	2.12 ± 0.43	2.07 ± 0.45	1.97 ± 0.74
B1575	C1575-DV29PG5	3.50 ± 0.12	3.40 ± 0.18	2.31 ± 0.29	1.76 ± 0.34	1.93 ± 0.44	2.23 ± 0.36	2.29 ± 0.31	2.48 ± 0.29	-	-	-
B207S	C207S-DV29SPG5	3.50 ± 0.11	3.69 ± 0.27	1.88 ± 0.32*	0.43 ± 0.08*	0.41 ± 0.03** ##	0.43 ± 0.08** ##	0.45 ± 0.12** ##	0.45 ± 0.12** ##	0.40 ± 0.00** ##	0.41 ± 0.03** ##	0.40 ± 0.00** ##
B207S	C207S-DV32SPG5	3.50 ± 0.13	3.35 ± 0.26	1.29 ± 0.53*	0.40 ± 0.00*	0.40 ± 0.00** ##	0.40 ± 0.00** ##	0.40 ± 0.00** ##	0.40 ± 0.00** ##	0.40 ± 0.00** ##	0.40 ± 0.00** ##	/
A416	C416-DV27Pd7BG5	3.47 ± 0.20	3.47 ± 0.16	1.90 ± 0.30*	1.52 ± 0.31	1.44 ± 0.34	1.79 ± 0.31	2.08 ± 0.27	2.41 ± 0.13	-	-	-
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	3.47 ± 0.23	3.41 ± 0.26	1.27 ± 0.50*	0.60 ± 0.40*	0.51 ± 0.27** #	0.53 ± 0.31** ##	0.49 ± 0.22** ##	0.61 ± 0.45** #	0.59 ± 0.35** #	0.70 ± 0.51** #	0.95 ± 0.69** #
ANC	CNC-G5	3.47 ± 0.22	3.43 ± 0.23	3.83 ± 0.21	3.66 ± 0.29	3.82 ± 0.32	3.88 ± 0.20	4.02 ± 0.30	4.17 ± 0.30	4.02 ± 0.35	4.04 ± 0.35	-

注：“-”表示停止检测；“/”表示在给药 D56 时挑选 C207S-DV32SPG5 组作为攻毒试验动物。与 PBS 组比较，*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ 。与阳性对照组 VIR-2218-GL 组进行比较，#表示 $P<0.05$ ；##表示 $P<0.01$ 。

表51-2 各序列组小鼠血浆HBV DNA水平变化

基础序 列编号	序列编号	Log10 HBV DNA (IU/mL)										
		D-7	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
	PBS	6.76 ±0.75	6.25 ±0.61	6.98±0.54	7.22±0.35	7.40±0.30	7.55±0.17	7.79±0.24	7.64±0.11	7.84±0.16	8.01±0.28	7.78±0.90
APC	VIR-2218-GL	6.93 ±0.30	6.47 ±0.63	5.22±0.36*	4.66±0.33*	4.75±0.53**	4.72±0.69*	4.64±0.76**	5.45±0.64*	5.54±0.48	5.69±0.69	6.44±0.69
A1550	C1550-DV27PG5	7.01 ±0.47	7.12 ±0.33	6.92±0.41	6.20±0.67	5.94±0.80	6.04±0.99	6.21±1.00	6.79±0.69	-	-	-
B1572	C1572-DV27PG5	6.83 ±0.50	6.30 ±0.78	6.10±1.16	5.86±1.03	5.90±0.92	5.82±1.19	6.09±1.31	6.69±1.16	-	-	-
A1573	C1573-DV29PG5	7.14 ±0.22	6.63 ±0.78	6.56±0.74	6.43±0.69	6.37±0.38	6.37±0.32	6.59±0.4	6.63±0.67	-	-	-
B1575	C1575-DV27PG5	6.98 ±0.39	6.81 ±0.50	5.53±0.44*	5.18±0.49	5.08±0.51*	5.34±0.30	5.73±0.42*	5.93±0.33	6.19±0.40	6.39±0.71	6.04±0.81
B1575	C1575-	6.94	6.65	5.96±	5.59±	5.59±0.	5.99±0.	5.96±0.	6.46±0.	-	-	-

	DV29PG5	±0.2 9	±0.2 7	0.53* 0.55	75	70	43	61			
B207S	C207S-DV29SPG5	6.96±0.34	7.14±0.46	5.61±0.56* 0.19*	3.76±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***
B207S	C207S-DV32SPG5	6.96±0.39	6.65±0.50	5.92±0.38* 0.45*	3.84±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	3.54±0.00***	/
A416	C416-DV27Pd7BG5	6.99±0.40	6.90±0.40	5.94±0.51* 0.39	5.16±0.59*	5.14±0.49*	6.10±0.39	6.73±0.42	-	-	-
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	6.94±0.52	6.95±0.50	5.47±0.38* 0.52*	4.38±0.24**	3.72±0.44**	3.70±0.32**	4.04±0.59**	4.03±0.52*	4.39±0.41*	4.78±0.74*
ANC	CNC-G5	6.76±0.89	6.65±0.90	7.14±0.63	7.33±0.56	7.41±0.54	7.53±0.44	7.48±0.51	7.79±0.67	7.66±0.47	7.77±0.70

注：“-”表示停止检测；“/”表示在给药 D56 时挑选 C207S-DV32SPG5 组作为攻毒试验动物。与 PBS 组比较，*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ 。与阳性对照组 VIR-2218-GL 组进行比较，#表示 $P<0.05$ ；##表示 $P<0.01$ 。

表51-3 各序列组小鼠血浆HBeAg水平变化

基础序列编号	序列编号	Log10 HBeAg (S/CO)										
		D-7	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
/	PBS	3.76±0.06	3.76±0.06	3.40±0.17	3.72±0.05	3.63±0.08	3.70±0.06	3.74±0.05	3.75±0.06	3.75±0.04	3.66±0.06	3.66±0.10
APC	VIR-2218-GL	3.80±0.08	3.76±0.05	2.80±0.28* 0.27*	2.96±0.27* 0.27*	2.79±0.25**	2.90±0.24**	3.09±0.26*	3.18±0.22*	3.27±0.20**	3.24±0.22*	3.36±0.20
A1550	C1550-DV27PG5	3.77±0.06	3.72±0.09	3.00±0.31	3.26±0.19	3.09±0.18**	3.22±0.19	3.34±0.18	3.37±0.17	-	-	-
B1572	C1572-DV27PG5	3.74±0.08	3.75±0.06	3.25±0.31	3.33±0.28	3.12±0.26*	3.25±0.26	3.33±0.26	3.39±0.27	-	-	-
A1573	C1573-DV29PG5	3.78±0.04	3.75±0.09	3.33±0.18	3.51±0.07	3.34±0.07**	3.46±0.05	3.56±0.03	3.52±0.06	-	-	-
B1575	C1575-DV27PG5	3.77±0.05	3.71±0.05	2.69±0.33* 0.33*	2.78±0.26* 0.26*	2.68±0.14**	2.87±0.17**	3.04±0.17**	3.14±0.14**	3.20±0.10**	3.24±0.12**	3.30±0.07
B1575	C1575-DV29PG5	3.76±0.07	3.73±0.04	2.95±0.23	3.07±0.26* 0.26*	2.98±0.24**	3.17±0.20	3.25±0.17	3.32±0.13	-	-	-
B207S	C207S-DV29SPG5	3.75±0.03	3.71±0.09	2.99±0.16	3.02±0.07* 0.07*	2.75±0.12**	2.76±0.10**	2.73±0.08***	2.73±0.09***	2.64±0.13***	2.59±0.11***	2.61±0.14***
B207S	C207S-DV32SPG5	3.75±0.03	3.75±0.05	2.79±0.23* 0.23*	2.83±0.11**	2.50±0.19***	2.54±0.11***	2.57±0.09***	2.61±0.10***	2.56±0.09***	2.47±0.09***	/
A416	C416-DV27Pd7BG5	3.75±0.05	3.77±0.06	3.25±0.14	3.49±0.09	3.33±0.06**	3.51±0.06	3.61±0.06	3.67±0.04	-	-	-
B418S	C418S-	3.70	3.70	3.17±	3.29±	3.09±0	2.94±0	3.02±0	3.01±0	2.94±0	2.89±0	2.90±0

	DV34SPd7BG5	±0.10	±0.09	0.18	0.11	.15**	22**	22**	23**	24***	24***	18***
ANC	CNC-G5	3.76±0.07	3.71±0.07	3.32±0.14	3.66±0.06	3.70±0.06	3.69±0.05	3.76±0.09	3.74±0.08	3.71±0.08	3.64±0.06	/

注：“-”表示停止检测；“/”表示在给药 D56 时挑选 C207S-DV32SPG5 组作为攻毒试验动物。与 PBS 组比较，*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ 。与阳性对照组 VIR-2218-GL 组进行比较，#表示 $P<0.05$ ；##表示 $P<0.01$ 。

表51-4 各序列组小鼠HBsAg转阴只数变化

基础序列编号	序列编号	HBsAg 转阴只数									
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63	
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	0/6	4/6	5/6	5/6	5/6	4/6	4/6	4/6	3/6	
B207S	C207S-DV32SPG5	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	
B1575	C1575-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
B207S	C207S-DV29SPG5	0/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	6/6	5/6	6/6	
APC	VIR-2218-GL	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
A416	C416-DV27Pd7BG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
B1575	C1575-DV29PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
B1572	C1572-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
A1550	C1550-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
A1573	C1573-DV29PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
ANC	CNC-G5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
	PBS	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	

表 51-5 各序列组小鼠HBV DNA转阴只数变化

基础序列编号	序列编号	HBVDNA 转阴只数									
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63	
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	0/6	0/6	0/6	5/6	4/6	2/6	0/6	0/6	0/6	
B207S	C207S-DV32SPG5	0/6	3/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	2/6	
B1575	C1575-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
B207S	C207S-DV29SPG5	0/6	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	
APC	VIR-2218-GL	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
A416	C416-DV27Pd7BG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
B1575	C1575-DV29PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
B1572	C1572-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
A1550	C1550-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
A1573	C1573-DV29PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
ANC	CNC-G5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
	PBS	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	

表51-6 各序列组小鼠中产生抗体只数变化

基础序列编号	序列编号	产生抗体只数									
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63	
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	2/6	4/6	4/6	4/6	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6	
B207S	C207S-DV32SPG5	2/6	2/6	3/6	3/6	4/6	4/6	4/6	5/6	5/6	
B1575	C1575-DV27PG5	0/6	1/6	2/6	0/6	0/6	2/6	2/6	2/6	2/6	
B207S	C207S-DV29SPG5	1/6	4/6	1/6	2/6	3/6	5/6	5/6	4/6	5/6	
APC	VIR-2218-GL	2/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	2/6	2/6	1/6	
A416	C416-DV27Pd7BG5	2/6	2/6	3/6	2/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
B1575	C1575-DV29PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
B1572	C1572-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
A1550	C1550-DV27PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	NA	NA	NA	
A1573	C1573-DV29PG5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	NA	NA	NA	

ANC	CNC-G5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	PBS	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

表51-7 各序列组小鼠血浆HBsAb水平变化

基础序列编号	序列编号	HBsAb (mIU/mL)								
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	35	117	257	180	145	191	311	293	363
B207S	C207S-DV32SPG5	52	88	69	65	84	111	237	383	597
B157S	C157S-DV27PG5	30	30	34	30	30	33	34	49	37
B207S	C207S-DV29SPG5	37	39	31	31	64	119	179	172	264
APC	VIR-2218-GL	31	92	226	306	362	203	161	142	97
A416	C416-DV27Pd7BG5	33	36	39	34	30	30	NA	NA	NA
B157S	C157S-DV29PG5	30	30	30	30	30	30	NA	NA	NA
B1572	C1572-DV27PG5	30	30	30	30	30	30	NA	NA	NA
A1550	C1550-DV27PG5	30	30	30	30	30	30	NA	NA	NA
A1573	C1573-DV29PG5	30	30	30	30	30	31	NA	NA	NA
ANC	CNC-G5	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	PBS	30	30	30	30	30	30	30	30	30

表51-8 各序列组小鼠血浆ALT水平变化

基础序列编号	序列编号	ALT (U/L)								
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	75	83	138	75	75	80	75	80	75
B207S	C207S-DV32SPG5	75	78	75	78	75	78	75	75	95
B157S	C157S-DV27PG5	75	75	75	75	75	75	75	75	78
B207S	C207S-DV29SPG5	75	75	75	98	75	78	223	75	75
APC	VIR-2218-GL	75	75	85	75	75	75	98	105	103
A416	C416-DV27Pd7BG5	75	75	75	75	75	75	NA	NA	NA
B157S	C157S-DV29PG5	75	75	75	75	75	75	NA	NA	NA
B1572	C1572-DV27PG5	75	75	75	83	75	75	NA	NA	NA
A1550	C1550-DV27PG5	75	80	88	83	75	75	NA	NA	NA
A1573	C1573-DV29PG5	75	75	75	75	75	75	NA	NA	NA
ANC	CNC-G5	75	75	75	75	75	75	75	75	83
	PBS	75	75	75	75	75	75	75	75	78

表51-9 各序列组小鼠体重变化

基础序列编号	序列编号	体重 (g)								
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D63
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	28.9	29.2	28.8	28.8	29.1	29.9	30.3	30.5	29.8
B207S	C207S-DV32SPG5	29.2	29.7	29.9	30.0	30.2	30.8	31.0	31.2	31.2
B157S	C157S-DV27PG5	27.7	28.3	28.2	28.4	28.7	28.6	29.0	29.0	28.6
B207S	C207S-DV29SPG5	27.4	27.6	27.7	27.6	27.7	28.1	28.3	28.5	28.1
APC	VIR-2218-GL	28.4	28.9	29.0	28.6	29.4	29.6	30.0	30.2	29.9
A416	C416-DV27Pd7BG5	29.7	30.6	30.0	30.0	29.8	30.8	NA	NA	NA
B157S	C157S-DV29PG5	29.4	30.0	30.0	29.4	29.8	29.8	NA	NA	NA
B1572	C1572-DV27PG5	29.6	29.9	30.2	30.1	29.2	29.2	NA	NA	NA
A1550	C1550-DV27PG5	28.1	28.7	28.5	29.0	29.2	29.2	NA	NA	NA
A1573	C1573-DV29PG5	27.5	27.6	27.3	27.3	27.0	27.6	NA	NA	NA
ANC	CNC-G5	28.4	29.0	29.2	28.6	28.9	29.4	29.5	29.7	29.8
	PBS	29.2	29.8	30.2	30.0	30.2	30.2	31.0	32.3	32.4

(ii) 序列 CS7S-DV32PG5 对小鼠二次攻毒的保护作用

CS7S-DV32PG5 组小鼠在 D60 经尾静脉高压水动力注射 HBV 质粒以模拟 HBV 的二次感染。实验结果见图 13A-图 13F 显示, 空白组 (D56 之前未感染过 HBV 病毒) 在高压水动力注射 HBV 质粒后体内出现了 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA, 提示攻毒方式有效。C207S-DV32SPG5 组攻毒组小鼠在攻毒后, HBV DNA

先上升随后下降至检测下限，同时血清 HBsA 抗体出现明显上升，HBsAg 维持低于检测限水平，此结果证明攻毒有效，且经过该小核酸序列治疗的乙肝小鼠，能够免受 HBV 病毒的再次攻击。

实施例 15：采用本公开修饰模板修饰的序列（低剂量）在小鼠体内对 HBV 的抑制作用

本实施例示例性选择一些序列，如实施例 14 中的序列 C207S-DV32SPG5、C207S-DV29SPG5、C418S-DV34SPd7BG5 及 C1575-DV27PG5，见表 49，利用 AAV-HBV 小鼠模型分析这些 RNAi 剂在低剂量，如 0.5 mg/kg 水平下的体内药效。

1. 实验材料

实施例 14 中的序列 C207S-DV32SPG5、C207S-DV29SPG5、C418S-DV34SPd7BG5、C1575-DV27PG5 及 VIR-2218-GL 见表 50，以及恩替卡韦（ETV）。

2. 实验方法

同实施例 7，分组及给药详情如表 51-10。

表 51-10 组别设置及给药详情表

组别	给药方案	给药方式	动物只数
siRNA（6 组）	0.5 mg/kg，D0/ 7/ 14 给药	s.c.	6 只/组×6 组
ETV（1 组）	0.1 mg/kg，每天	i.g.	6 只/组×1 组
溶媒对照（1 组）	PBS，D0/ 7/ 14 各 1 次给药	s.c.	6 只/组×1 组

注：s.c.：皮下注射；i.g.：灌胃。

3. 实验结果

各组小鼠 HBsAg、HBeAg、HBV DNA、HBsAb、ALT 水平随时间的变化见表 51-11-表 51-18 和图 14A-图 14F，实验结果表明，序列 C207S-DV32SPG5、C207S-DV29SPG5 在抑制 HBsAg、HBV DNA、HBeAg 中效果显著优于阳参序列 VIR-2218-GL，其中以 C207S-DV32SPG5 的效果为最佳，第 56 天可降低 HBsAg 约 2.9 个 log10，比 C207S-DV29SPG5 高约 1.4 个 log10，且在第 56 天有 3 只小鼠 HBsAg 转阴，4 只小鼠产生抗体，C207S-DV29SPG5 组暂无阴转小鼠。以上数据再次证明了序列 C207S-DV32SPG5 在药效方面的优越性。

表 51-11 各序列组小鼠血浆HBsAg水平变化

基 础 序 列编号	序列编号	Log10 HBsAg（IU/mL）									
		D-7	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
/	PBS	3.36± 0.30	3.46± 0.27	3.43±0. 36	3.61±0. 41	3.69±0. 59	3.81±0. 68	3.81±0. 70	3.86±0. 67	3.92±0. 65	4.10±0. 62
/	ETV	3.36± 0.26	3.47± 0.34	3.50±0. 33	3.54±0. 25	3.74±0. 14	3.94±0. 27	3.96±0. 39	4.04±0. 40	4.22±0. 33	4.20±0. 30
APC	VIR-2218-GL	3.33± 0.33	3.60± 0.24	2.47±0. 27**	2.26±0. 45*	2.36±0. 42**	2.62±0. 28	2.88±0. 34	3.18±0. 29	3.46±0. 47	3.59±0. 30
B1575	C1575- DV27PG5	3.34± 0.34	3.40± 0.52	2.96±0. 49	2.69±0. 57	2.80±0. 62*	2.95±0. 52	3.21±0. 65	3.23±0. 92	3.46±0. 68	3.64±0. 66
B207S	C207S- DV29SPG5	3.33± 0.33	3.51± 0.30	2.70±0. 22**	2.36±0. 29*	2.00±0. 33**	1.88±0. 32	1.77±0. 31*	1.67±0. 27*	1.77±0. 29*	1.94±0. 40
B207S	C207S- DV32SPG5	3.33± 0.32	3.55± 0.34	2.37±0. 43**	1.82±0. 34**	1.22±0. 41**	0.90±0. 47**	0.82±0. 44**	0.79±0. 67**	0.75±0. 41**	0.63±0. 37**
B418S	C418S- DV34SPd7B G5	3.33± 0.33	3.40± 0.32	2.68±0. 40**	2.43±0. 66*	2.56±0. 69**	2.76±0. 77	3.06±0. 63	3.30±0. 65	3.65±0. 75	3.93±0. 61

注：与 PBS 组比较，*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ 。

表 51-12各序列组小鼠血浆HBV DNA水平变化

基 础 序 列编号	序列编号	Log10 HBV DNA (IU/mL)									
		D-7	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
/	PBS	6.97± 0.28	7.22± 0.41	7.20±0. 49	7.54±0. 72	7.55±0. 63	7.65±0. 57	7.65±0. 46	7.72±0. 56	7.96±0. 35	8.05±0. 57
/	ETV	6.65± 0.58	6.91± 0.58	4.49±0. 54**	3.85±0. 24**	3.89±0. 31**	3.77±0. 37**	3.74±0. 25**	3.63±0. 08**	3.97±0. 13**	4.04±0. 32**
APC	VIR-2218-GL	6.81± 0.63	7.20± 0.15	6.16±0. 78	6.03±0. 76	6.22±0. 88	6.59±0. 46	7.07±0. 31	7.31±0. 27	7.43±0. 47	7.92±0. 29
B157S	C157S- DV27PG5	6.87± 0.43	7.04± 0.66	6.78±0. 48	6.60±0. 70	7.07±0. 40	6.95±0. 44	7.15±0. 52	7.09±1. 14	7.34±0. 58	7.86±0. 44
B207S	C207S- DV29SPG5	6.98± 0.23	7.07± 0.39	6.51±0. 25	6.29±0. 33	5.95±0. 19	5.56±0. 36	5.70±0. 37	5.38±0. 40	5.78±0. 37	6.31±0. 44
B207S	C207S- DV32SPG5	6.83± 0.42	7.23± 0.58	6.20±0. 35	5.59±0. 28	5.29±0. 43	4.79±0. 36	4.97±0. 26	4.83±0. 57	4.88±0. 36*	4.91±0. 38*
B418S	C418S- DV34SPd7B G5	6.68± 0.78	6.71± 0.75	6.39±0. 75	6.25±0. 88	6.84±0. 67	6.85±0. 91	7.21±0. 84	7.28±1. 00	7.58±1. 12	8.12±0. 89

注：与 PBS 组比较，*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$

表 51-13 各序列组小鼠血浆HBcAg水平变化

基 础 序 列编号	序列编号	Log10 HBcAg (S/CO)									
		D-7	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
/	PBS	3.76± 0.17	3.73± 0.10	3.61±0. .07	3.69± 0.13	3.67± 0.14	3.69± 0.14	3.66± 0.15	3.65± 0.13	3.62± 0.19	3.24± 1.01
/	ETV	3.77± 0.06	3.73± 0.06	3.72±0. .05	3.72± 0.03	3.66± 0.05	3.71± 0.06	3.66± 0.05	3.68± 0.05	3.69± 0.08	3.70± 0.04
APC	VIR-2218- GL	3.78± 0.11	3.77± 0.13	3.35±0. .15*	3.39± 0.15	3.32± 0.19	3.39± 0.19	3.46± 0.17	3.52± 0.12	3.60± 0.13	3.59± 0.13
B157S	C157S- DV27PG5	3.75± 0.19	3.68± 0.13	3.48±0. .12	3.51± 0.18	3.43± 0.20	3.50± 0.15	3.51± 0.17	3.37± 0.38	3.60± 0.16	3.59± 0.20
B207S	C207S- DV29SPG5	3.78± 0.06	3.70± 0.07	3.50±0. .13	3.47± 0.09	3.31± 0.12	3.20± 0.13	3.07± 0.11	3.06± 0.15	3.00± 0.14	3.05± 0.18
B207S	C207S- DV32SPG5	3.77± 0.04	3.72± 0.04	3.45±0. .04**	3.40± 0.12	3.08± 0.13	2.97± 0.12	2.84± 0.10*	2.94± 0.35	2.73± 0.11*	2.77± 0.13
B418S	C418S- DV34SPd7B G5	3.74± 0.30	3.66± 0.26	3.38±0. .33	3.49± 0.31	3.46± 0.30	3.55± 0.33	3.49± 0.34	3.51± 0.31	3.52± 0.32	3.59± 0.28

注：与 PBS 组比较，*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ 。

表 51-14 各序列组小鼠血浆HBsAg阴转只数

基础序列编号	序列编号	HBsAg 阴转个数							
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
B207S	C207S-DV32SPG5	0	0	0	1	1	2	1	3
B207S	C207S-DV29SPG5	0	0	0	0	0	0	0	0
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	0	0	0	0	0	0	0	0
B1575	C1575-DV27PG5	0	0	0	0	0	0	0	0
APC	VIR-2218-GL	0	0	0	0	0	0	0	0
/	ETV	0	0	0	0	0	0	0	0
/	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0

表 51-15 各序列组小鼠血浆HBV DNA阴转只数

基础序列编号	序列编号	HBV DNA 阴转个数							
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
B207S	C207S-DV32SPG5	0	0	0	0	0	0	0	0
B207S	C207S-DV29SPG5	0	0	0	0	0	0	0	0
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	0	0	0	0	0	0	0	0
B1575	C1575-DV27PG5	0	0	0	0	0	0	0	0
APC	VIR-2218-GL	0	0	0	0	0	0	0	0
/	ETV	1	1	1	3	3	2	0	0
/	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0

表 51-16 各序列组小鼠产生HBsAb只数

基础序列编号	序列编号	产生 HBsAb 个数							
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
B207S	C207S-DV32SPG5	1	1	2	3	4	4	4	4
B207S	C207S-DV29SPG5	0	0	0	0	2	3	3	2
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	0	0	0	0	0	0	0	0
B1575	C1575-DV27PG5	0	1	1	1	1	1	1	0
APC	VIR-2218-GL	0	0	0	0	0	0	0	0
/	ETV	0	0	0	0	0	0	0	0
/	PBS	0	0	0	0	0	0	0	0

表 51-17 各序列组小鼠血浆HBsAb水平变化

基础序列编号	序列编号	HBsAb (mIU/mL)							
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
B207S	C207S-DV32SPG5	45	79	135	136	124	109	130	122
B207S	C207S-DV29SPG5	30	30	30	30	36	44	52	44
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	30	30	30	30	30	30	30	30
B1575	C1575-DV27PG5	30	32	38	36	33	34	35	30
APC	VIR-2218-GL	30	30	30	30	30	30	30	30
	ETV	30	30	30	30	30	30	30	30
	PBS	30	30	30	30	30	30	30	30

表 51-18 各序列组小鼠血浆ALT水平变化

基础序列编号	序列编号	ALT (U/L)							
		D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56
B207S	C207S-DV32SPG5	75	80	90	75	78	75	75	85
B207S	C207S-DV29SPG5	75	78	80	75	100	93	75	75
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	75	75	75	75	75	85	75	75
B1575	C1575-DV27PG5	75	75	75	75	75	75	75	75
APC	VIR-2218-GL	80	75	75	75	75	75	75	75
	ETV	75	75	75	75	75	75		
	PBS	75	75	75	75	75	75		

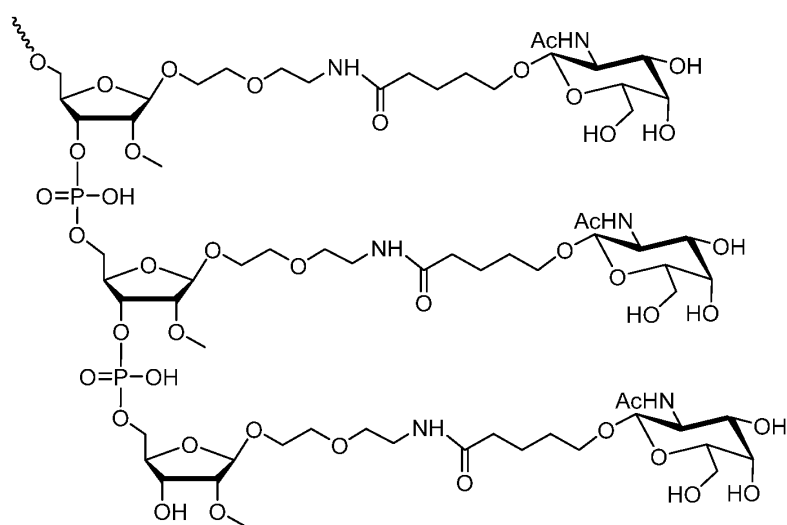
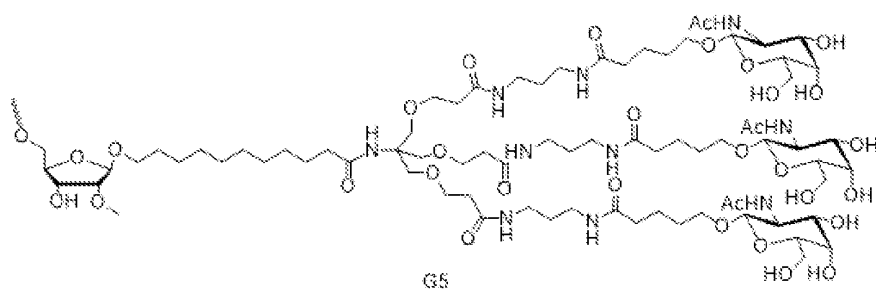
实施例 16：采用本公开递送配体修饰的序列在小鼠体内对 HBV 的抑制作用

本实施例示例性选择一些序列，包括基础序列 B418S、B207S，对这些序列进行修饰，例如只采用模板修饰、同时采用模板修饰和防脱靶设计，并且偶联递送不同的配体。利用 AAV-HBV 小鼠模型分析这些 RNAi 剂的体内药效。

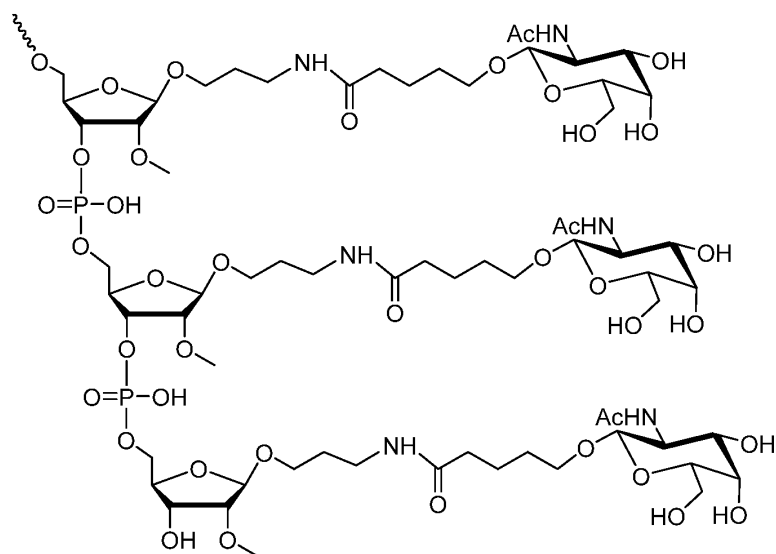
1. 实验材料

受试药品：

本实施例中各序列，包括只采用模板修饰序列、采用模板修饰和防脱靶设计的序列，这些序列正义链 3' 端偶联递送配体 G5、G101 或 G103，结构式如下：



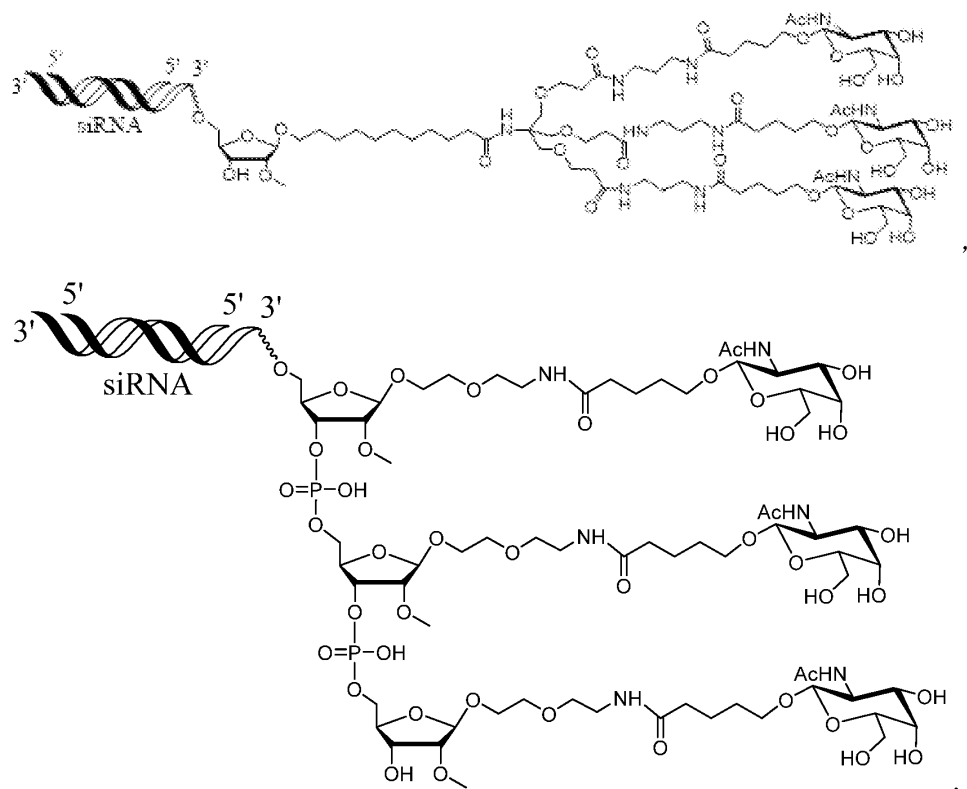
G101

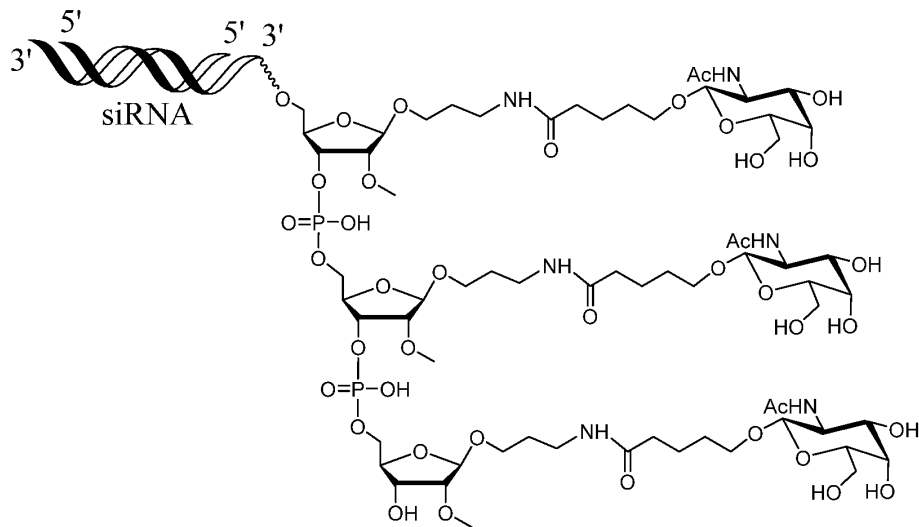


G103

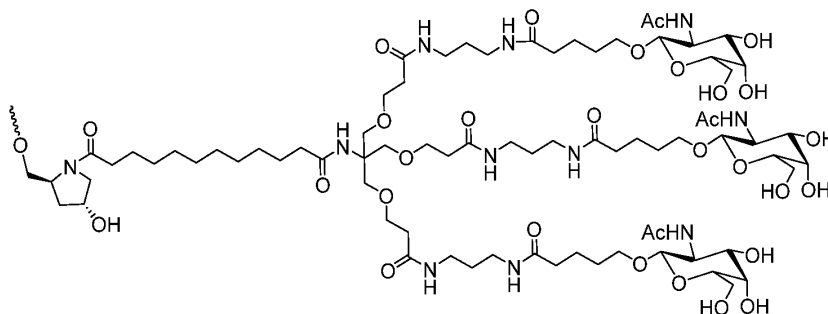
寡核苷酸与配体 G5、G101 或 G103 的偶联方法参考专利申请 CN116854754A 实施例 3 中的制备方法。

寡核苷酸与配体 G5、G101 或 G103 形成如下所示的缀合物：





在本实施例中的序列中,基于修饰模板 DV25SP~DV34SP 针对基础序列 B207S 设计了六种 siRNA 序列,具体包括:基于 D29SP 修饰模板设计的 C207S-DV29SPG5、C207S-DV29SPG101 和 C207S-DV29SPG103,以及基于 D32SP 修饰模板设计的 C207S-DV32SPG5、C207S-DV32SPG101 和 C207S-DV32SPG103 (C207S-DV29SP 和 C207S-DV32SP 的序列参见表 50)。针对基础序列 B418S,基于 D34SP 修饰模板设计了 C418S-DV34SPd7BG5、C418S-DV34SPd7BG101 和 C418S-DV34SPd7BG103 三种 siRNA 序列 (C418S-DV34SPd7B 的序列参见表 50)。本实施例还采用针对阳参基础序列 APC 的 VIR-2218-GL 和针对基础序列 ANC 的 CNC-G5 (参见表 50)。本实施例中各序列编号中 G5 表示序列与递送配体 G5 偶联, G101 表示序列与递送配体 G101 偶联, G103 表示序列与递送配体 G103 偶联, GL 表示序列与递送配体 L96 偶联。L96 的结构式如下:



受试药品配制:

同实施例 14。

实验动物信息:

种属/品系: AAV-HBV 小鼠

等级: SPF

性别：雄

数量: 82 只

年龄：5 周
体重：19~24 g
来源：北京维通利华实验动物技术有限公司
生产许可证号：SCXK(京)2021-0006

实验动物伦理审查 (IACUC):

实验动物接收后饲养于北京维通达生物科技有限公司，使用许可证编号：SCXK(京)2022-0013。本项目已经通过北京维通达生物科技有限公司实验动物伦理委员会审查，IACUC 编号为 VST-SY-24062701，试验过程严格按照 IACUC 要求进行，保证动物福利。

饲养及管理:

动物在负压屏障环境中饲养，采用塑料（聚碳酸酯）盒（体积 370×157×180mm）IVC 饲养，由于实验动物为雄性好斗，故单只单笼饲养。动物的饲养由北京维通达生物技术有限公司负责。

动物饲料、垫料及饮用水的使用、检测均遵照 GB14925-2010《实验动物环境及设施》规范执行。动物饲养环境的控制，包括温湿度、压差、噪音、照度、换气次数、氨浓度等暂按 GB50447-2008《实验动物设施建筑技术规范》执行。动物房温度控制为室温 20~26℃（日温差≤4℃）；相对湿度控制为 40~70%；采用人工照明方式光照，12/12 小时昼夜明暗交替。压缩刨花垫料购自北京科澳协力饲料有限公司（批号：23109613），大小鼠生长繁殖饲料购自北京科澳协力饲料有限公司（批号：23103313）。实验期间动物饲养管理及环境控制产生的相关记录保存于北京维通达生物技术有限公司。

2. 实验方法

2.1 AAV-HBV 小鼠造模

试验日期定义：动物给药溶媒或受试药当天定义为第 0 天（day 0）。

100 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠，屏障设施内适应性饲养 7 天，日常观察，确认小鼠健康无异常后进行造模。通过尾部静脉注射 rAAV8-1.3HBV，制备持续性 HBV 感染的小鼠动物模型。AAV 病毒注射剂量为 1.00×10^{10} vg/只，将 AAV 病毒用无菌 PBS 稀释至 5.00×10^{10} vg/mL，每只小鼠注射 200 μL，注射病毒 4 周后开始检测血清中 HBV DNA、HBcAg 和 HBsAg 含量。

2.2 动物分组及给药

试验日期定义：动物给药溶媒或受试药当天定义为第 0 天（D 0）。

第-2 天，所有的小鼠经颌下采血收集血浆。收集的血样用 EDTA 抗凝，5000 rpm 离心 10 min，取上清用于 HBV 造模检测。第 0 天，根据第-2 天的检测结果挑选出 72 只动物进行分组，每组 6 只，共 12 组。分组及给药详情如表 51-19。

表 51-19 组别设置及给药详情表

组别	给药方案	给药方式	动物只数
siRNA（11 组）	3 mg/kg，D0 给药	s.c.	6 只/组×11 组
溶媒对照（1 组）	PBS，D0 给药	s.c.	6 只/组×1 组

注：s.c.：皮下注射。

2.4 观察及指标监测

(1) 一般观察

造模期和试验期内每日对动物进行观察并做观察记录，观察内容包括：是否死亡、濒死、饲料饮水摄入情况、外伤、粪便、外观及被毛、精神状况、活动状况等。

(2) 体重

适应期：动物接收时称重记录，适应期结束当天对动物进行称重记录。
试验期：试验期内每周对动物进行称重记录，如果当天需要给药或取血，则在操作前称重、处死前称重。

(3) 血清中 HBsAg、HBeAg、HBV DNA、ALT 水平测定

所有动物于第-2、6、13、20、27、34 天时各经颌下采血收集血浆。收集的血样用 EDTA 抗凝，5000 rpm 离心 10 min，分离血清。取血后分离血清，用 PBS 溶液稀释后送检。每份样品取出血清 10 μL，用 PBS 溶液稀释到 500 μL（稀释 50 倍），送北京迪安医学检验实验室有限公司检测血清 HBV DNA、HBeAg、HBsAg。每份样品取出血清 30 μL，用 PBS 溶液稀释到 120 μL（稀释 4 倍），送北京迪安医学检验实验室有限公司检测血清 ALT。检测剩余血浆置于-80℃条件进行保存。

3. 实验结果

各组小鼠 HBsAg、HBeAg、HBV DNA、ALT 水平以及体重随时间的变化见表 51-20 表 51-24 和图 15A-图 15E，实验结果表明，所有序列药效表现均优于阳参序列 VIR-2218-GL，其中 C207S-DV29SPG101、C207S-DV29SPG103、C207S-DV32SPG101、C207S-DV32SPG103 展现出优越的降 HBsAg、HBV DNA、HBeAg 效果，显著优于阳参序列 VIR-2218-GL，在给药后第 28 天仍可降低 HBsAg 超过 3 个 log10，降低 HBV DNA 超过 3 个 log10，且尚未发生反弹，表现出优秀的抗 HBV 药效。

表 51-20 各序列组小鼠血浆HBsAg水平变化

基础序列 编号	序列编号	Log10 HBsAg (IU/mL)						
		D-2	D7	D14	D21	D28	D35	D42
/	PBS	4.47±0.12	4.38±0.15	4.36±0.21	4.26±0.27	4.3±0.21	4.37±0.17	4.22±0.16
B207S	C207S-DV29SPG5	4.46±0.13	3.11±0.67	2.54±0.79	2.16±0.8	1.94±0.9	1.78±0.95	1.56±0.98
B207S	C207S-DV29SPG101	4.43±0.16	2.65±0.32	1.8±0.59	1.47±0.7	1.44±0.69	1.19±0.77	1±0.83
B207S	C207S-DV29SPG103	4.46±0.15	2.54±0.37	1.66±0.47	1.36±0.58	1.22±0.71	1.04±0.71	1.02±0.73
B207S	C207S-DV32SPG5	4.45±0.15	2.86±0.49	2.34±0.7	2.08±0.66	1.88±0.74	1.75±0.83	1.56±1
B207S	C207S-DV32SPG101	4.46±0.12	2.5±0.2	1.66±0.22	1.47±0.31	1.27±0.39	1.12±0.51	1.19±0.43
B207S	C207S-DV32SPG103	4.42±0.22	2.25±0.64	1.33±0.64	1.3±0.59	1.21±0.53	1.18±0.55	1.18±0.62
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	4.43±0.15	2.92±0.19	2.99±0.19	3.23±0.31	3.58±0.31	3.83±0.22	3.81±0.42
B418S	C418S-DV34SPd7BG103	4.46±0.11	2.68±0.55	2.51±0.56	2.69±0.51	2.94±0.6	3.26±0.46	3.52±0.35
APC	VIR-2218-GL	4.46±0.14	3.66±0.24	3.71±0.23	3.84±0.37	3.86±0.39	3.87±0.41	3.82±0.45
ANC	CNC-G5	4.44±0.21	4.27±0.13	4.21±0.3	4.33±0.32	4.25±0.3	4.26±0.4	4.22±0.33

表 51-21 各序列组小鼠血浆HBV DNA水平变化

基 础 序 列 编 号	序列编号	Log10 HBV DNA (IU/mL)						
		D-2	D7	D14	D21	D28	D35	D42
/	PBS	8.47±0. 27	8.58±0. 21	8.68±0. 28	8.71±0. 38	8.57±0. 53	8.73±0. 46	8.7±0.6 4
B207S	C207S-DV29SPG5	8.47±0. 23	7.46±0. 67	6.74±0. 97	6.32±0. 77	5.97±1. 43	6.01±1. 09	5.69±1. 16
B207S	C207S- DV29SPG101	8.5±0.1 7	7.21±0. 32	5.78±0. 51	5.53±0. 85	5.3±0.9 4	5.33±0. 69	4.91±1. 22
B207S	C207S- DV29SPG103	8.51±0. 25	6.8±0.3 2	5.41±0. 51	5.48±0. 8	4.97±1. 14	4.98±1. 17	5.09±1. 09
B207S	C207S-DV32SPG5	8.49±0. 21	7.5±0.5	6.7±0.7 4	6.24±0. 88	6.39±0. 78	6.29±0. 8	6.15±0. 78
B207S	C207S- DV32SPG101	8.47±0. 27	6.88±0. 47	5.1±0.5	5.3±1.0 7	5.06±1	5.24±0. 7	5.29±0. 61
B207S	C207S- DV32SPG103	8.49±0. 28	6.84±0. 64	5.64±0. 73	5.31±0. 91	5.41±0. 67	5.25±1. 1	5.51±0. 86
B418S	C418S- DV34SPd7BG5	8.5±0.1 5	7.57±0. 18	7.68±0. 26	8.02±0. 34	8.48±0. 37	8.77±0. 22	8.78±0. 47
B418S	C418S- DV34SPd7BG101	8.53±0. 12	7.17±0. 27	6.89±0. 69	7.12±0. 73	7.66±0. 67	7.94±0. 5	8.07±0. 68
B418S	C418S- DV34SPd7BG103	8.53±0. 2	7.13±0. 44	7.01±0. 58	7.18±0. 66	7.56±0. 65	7.94±0. 47	8.29±0. 38
APC	VIR-2218-GL	8.42±0. 3	8.24±0. 27	8.43±0. 31	8.62±0. 41	8.57±0. 47	8.49±0. 66	8.57±0. 57
ANC	CNC-G5	8.43±0. 29	8.58±0. 29	8.55±0. 29	8.76±0. 21	8.83±0. 31	8.72±0. 41	8.79±0. 33

表 51-22 各序列组小鼠血浆HBcAg水平变化

基 础 序 列 编 号	序列编号	Log10 HBcAg (IU/mL)						
		D-2	D7	D14	D21	D28	D35	D42
/	PBS	3.43±0.0 6	3.44±0.0 2	3.46±0.0 3	3.45±0.0 3	3.39±0.0 6	3.43±0.0 4	3.49±0.0 3
B207S	C207S-DV29SPG5	3.42±0.0 3	3.18±0.1	3.04±0.1 7	2.81±0.2 1	2.67±0.2 4	2.59±0.2 7	2.65±0.2 8
B207S	C207S- DV29SPG101	3.43±0.0 2	3.18±0.0 4	2.87±0.1 4	2.58±0.1 1	2.43±0.1	2.39±0.0 7	2.39±0.1
B207S	C207S- DV29SPG103	3.44±0.0 4	3.22±0.0 6	2.82±0.0 8	2.61±0.0 8	2.47±0.1	2.46±0.0 6	2.45±0.0 6
B207S	C207S-DV32SPG5	3.44±0.0 3	3.24±0.0 4	3.03±0.0 9	2.77±0.1 4	2.63±0.1 2	2.6±0.14	2.65±0.1 5
B207S	C207S- DV32SPG101	3.44±0.0 3	3.17±0.0 6	2.81±0.1	2.58±0.0 7	2.42±0.0 6	2.39±0.0 6	2.4±0.06
B207S	C207S- DV32SPG103	3.46±0.0 3	3.19±0.0 7	2.91±0.1	2.69±0.1 3	2.57±0.1 2	2.52±0.1 3	2.56±0.1 2
B418S	C418S- DV34SPd7BG5	3.43±0.0 3	3.18±0.0 9	3.25±0.0 6	3.3±0.04	3.24±0.0 6	3.3±0.06	3.38±0.0 4
B418S	C418S- DV34SPd7BG101	3.41±0.0 5	3.19±0.0 7	3.25±0.0 9	3.22±0.0 7	3.18±0.0 7	3.2±0.08	3.3±0.06
B418S	C418S- DV34SPd7BG103	3.43±0.0 2	3.17±0.0 3	3.21±0.0 4	3.26±0.0 6	3.16±0.0 8	3.19±0.1	3.28±0.0 8
APC	VIR-2218-GL	3.4±0.07	3.09±0.0 7	3.2±0.09	3.29±0.0 5	3.25±0.0 8	3.27±0.1	3.35±0.1 7

ANC	CNC-G5	3.42±0.0 3	3.42±0.0 4	3.46±0.0 5	3.47±0.0 4	3.42±0.0 5	3.41±0.0 5	3.47±0.0 4
-----	--------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------

表 51-23 各序列组小鼠血浆ALT水平变化

基础序列编号	序列编号	ALT(U/L)					
		D7	D14	D21	D28	D35	D42
B207S	C207S-DV29SPG5	30	53	111	68	71	41
	C207S-DV29SPG101	50	45	129	83	50	61
	C207S-DV29SPG103	44	63	129	57	49	35
	C207S-DV32SPG5	51	49	122	71	43	40
	C207S-DV32SPG101	41	61	103	61	48	43
	C207S-DV32SPG103	29	45	146	56	49	33
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	34	49	41	48	49	36
	C418S-DV34SPd7BG101	48	30	48	75	44	76
	C418S-DV34SPd7BG103	42	30	62	69	41	32
APC	VIR-2218-GL	47	35	37	79	50	49
CNC	CNC-G5	48	51	60	60	61	58
	PBS	51	53	49	75	65	59

表 51-24 各序列组小鼠体重变化

基础序列编号	序列编号	体重(g)					
		D7	D14	D21	D28	D35	D42
B207S	C207S-DV29SPG5	25.8	25.6	25.6	26	27.0	27.5
	C207S-DV29SPG101	24.8	24.4	24.5	24.4	25.6	26.0
	C207S-DV29SPG103	25.7	25.4	25.2	25.5	26.6	27.0
	C207S-DV32SPG5	25.6	25.7	25.7	25.5	26.4	26.4
	C207S-DV32SPG101	24.6	24.4	24.1	24.4	25.3	26.0
	C207S-DV32SPG103	25	25	24.6	24.7	25.8	26.1
B418S	C418S-DV34SPd7BG5	25.6	25.7	25.8	26.2	26.6	27.1
	C418S-DV34SPd7BG101	25.4	25.6	25.4	25.9	26.8	27.4
	C418S-DV34SPd7BG103	26.1	26.2	26.5	27	27.8	28.5
APC	VIR-2218-GL	25.5	25.9	26	26.3	27.0	27.3
CNC	CNC-G5	25.4	25.5	25.5	26.4	26.9	27.1
	PBS	25.3	25.1	25.6	25.9	26.7	26.6

实施例 17：交替修饰的小干扰寡核苷酸的合成

根据AGT mRNA序列（NM_001384479.1）设计99条siRNA无修饰序列。为提升序列的抑制效率和稳定性，将无修饰序列采用2'-甲氧基（2'-OMe）与2'-氟代（2'-F）交替修饰，并且末端进行硫代。对于正义链的长度为奇数的序列，正义链奇数位均为2'-F修饰，偶数位均为2'-OMe修饰；但对于正义链的长度为偶数的序列，正义链奇数位均为2'-OMe修饰，偶数位均为2'-F修饰，；反义链奇数位均为2'-OMe修饰，偶数位均为2'-F修饰。此外正义链5'端有两个硫代修饰；反义链5'与3'端各有两个硫代修饰。交替修饰的siRNA序列见表52。

1. 交替修饰序列B1579-AL的合成

表52中序列编号为B1579-AL的小干扰核糖核酸的无修饰序列为：

正义链：5'-CCUUUUCUUCUAAUGAGUCGA-3'（SEQ ID NO: 788）

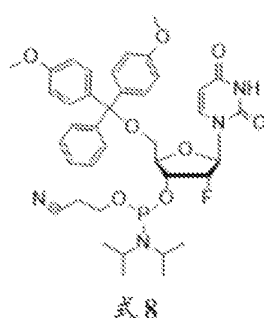
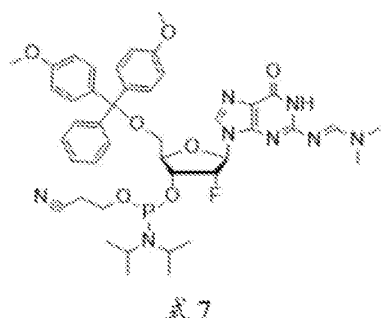
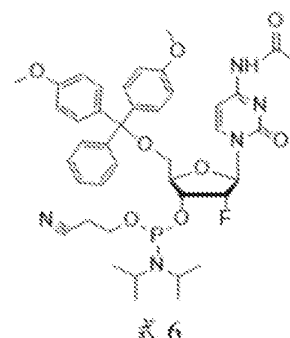
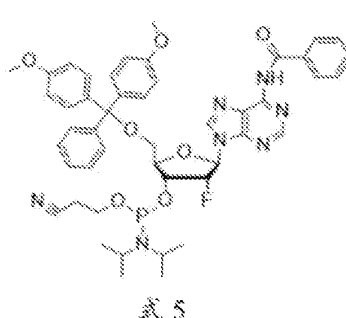
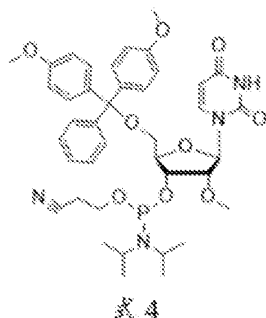
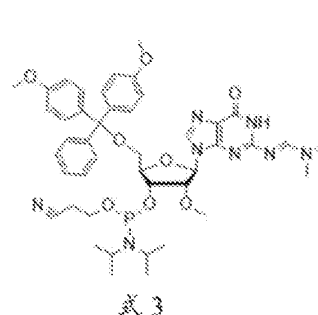
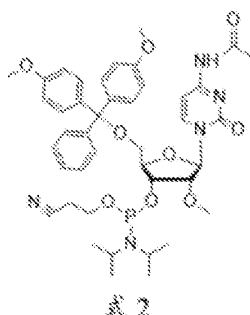
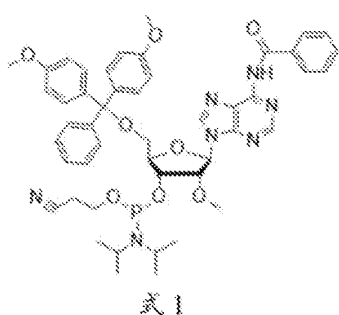
反义链：5'-UCGACUCAUUAGAAGAAAAGGUG-3'（SEQ ID NO: 801）

正义链奇数点位与反义链偶数点位均采用2'-F修饰，其它点位采用2'-OMe修饰。另外正义链5'端有两个硫代修饰；反义链5'与3'端各有两个硫代修饰。

仪器和试剂：擎科192 P型号DNA/RNA自动合成仪，其固相载体为交联聚苯乙烯珠的通用载体，型号为Primer support 5G Unylinker 350（cytiva厂家）。

制备方法：

依照单体浓度为0.15 M，用乙腈分别配制以下核苷酸单体溶液：DMT-A-OMe亚磷酰胺单体（式1）、DMT-C-OMe亚磷酰胺单体（式2）、DMT-G-OMe亚磷酰胺单体（式3）和DMT-U-OMe亚磷酰胺单体（式4）、DMT-A-F亚磷酰胺单体（式5）、DMT-C-F亚磷酰胺单体（式6）、DMT-G-F亚磷酰胺单体（式7）和DMT-U-F亚磷酰胺单体（式8）。



采用如下步骤制备：

向合成仪指定位置装入固相载体，经过若干次合成循环得到相应的全保护的产物，合成循环包括（1）脱保护、（2）偶联、（3）氧化/硫化和（4）羟基保护，循环过程及所使用试剂描述如下：

(1) 脱保护

使用3%二氯乙酸甲苯溶液作为脱保护试剂，脱掉DMT保护基，之后使用乙腈进行清洗。

(2) 偶联

使用0.25 M 5-乙硫基四氮唑作为活化剂，对每个核苷酸单体的乙腈溶液进行偶联，之后使用乙腈进行冲洗。

(3) 氧化/硫化

氧化：使用0.05 M碘的吡啶/水(90/10)溶液作为氧化剂，进行氧化，之后使用乙腈进行冲洗。

硫化：使用3%氢化黄原素的吡啶溶液作为硫化剂，进行硫化，之后使用乙腈进行冲洗。

(4) 羟基保护

使用10%乙酸酐四氢呋喃溶液（CAPA）四氢呋喃/吡啶/氮甲基咪唑 74/10/16(v/v/v)（CAPB）为羟基保护试剂，进行羟基保护，之后使用乙腈进行冲洗。

重复以上操作，按照设定的序列循环进行，得到全保护的产物。

(5) 使用3%二氯乙酸甲苯溶液为脱保护试剂，脱掉最后一个核苷酸的DMT保护基，之后使用乙腈进行清洗。

(6) 氨解及纯化

将固相载体转移至反应器中，加入浓氨水（25-28%），在60℃保持氨解12 h后，体系降至室温，并将混合物转移至压滤罐中，用纯化水与乙醇的混合溶液进行淋洗，合并滤液，过层析柱，浓缩，冻干，得产品。

(7) 退火

将纯化后的正义链及反义链按1: 1比例混合后，加热到95℃并保持3 min后，缓慢降温至室温，形成双链。

B1579-AL纯度90.61%；实测分子量：14437.86。

2. 其它序列的合成

按照上述方法合成表52中所列其它各条序列，共99条siRNA序列。

表52 交替修饰小干扰核糖核酸序列

序 列 编 号	正义链序列 5'-3'	序 列 SEQ ID NO: 对 应无修饰 序 列 SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	序 列 SEQ ID NO: 对 应无修饰 序 列 SEQ ID NO:
B183 5-AL	Ufs-Ums-Gf-Gm-Gf-Um-Uf-Um- Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Af- Am-Gf-Um-Af	983/785	Ums-Afs-Cm-Uf-Um-Uf-Am-Af-Um-Uf- Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cf-Cm-Af- Ams-Ufs-Um	996/798
B181 6-AL	Ufs-Ums-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um- Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af- Am-Af-Um-Uf	984/786	Ams-Afs-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf- Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af- Ams-Afs-Am	997/799
B181 2-AL	Cfs-Cms-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Am- Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af- Cm-Af-Am-Af	985/787	Ums-Ufs-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af- Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf- Gms-Gfs-Am	998/800
B157 9-AL	Cfs-Cms-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um- Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf-Am-Gf- Um-Cf-Gm-Af	986/788	Ums-Cfs-Gm-Af-Cm-Uf-Cm-Af-Um-Uf- Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf- Gms-Ufs-Gm	999/801

B183 6-AL	Ufs-Gms-Gf-Gm-Uf-Um-Uf-Um- Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Af-Am-Af- Gm-Uf-Am-Uf	987/789	Ams-Ufs-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af-Am-Uf- Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cf- Ams-Afs-Um	1000/80 2
B178 9-AL	Gfs-Ums-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Am- Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af- Gm-Uf-Gm-Uf	988/790	Ams-Cfs-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf- Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Af-Am-Af- Cms-Afs-Am	1001/80 3
B183 9-AL	Gfs-Ums-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am- Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af- Um-Af-Cm-Af	989/791	Ums-Gfs-Um-Af-Um-Af-Cm-Uf-Um-Uf- Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af- Cms-Cfs-Cm	1002/80 4
B179 1-AL	Ufs-Ums-Gf-Um-Gf-Am-Af-Am- Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf- Gm-Uf-Um-Af	990/792	Ums-Afs-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf- Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Af- Ams-Afs-Cm	1003/80 5
B179 5-AL	Gfs-Ams-Af-Am-Cf-Am-Af-Am- Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf- Cm-Cf-Um-Uf	991/793	Ams-Afs-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf- Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf- Cms-Afs-Cm	1004/80 6
B158 5s- AL	Cms-Ufs-Um-Cf-Um-Af-Am-Uf- Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf- Um-Uf-Um-Af	992/794	Ums-Afs-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf- Um-Cf-Am-Uf-Um-Af-Gm-Af-Am-Gfs- Ams-Af	1005/80 7
B157 6s- AL	Cms-Cfs-Am-Cf-Cm-Uf-Um-Uf- Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af- Um-Gf-Am-Af	993/795	Ums-Ufs-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af- Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Gfs- Gms-Af	1006/80 8
B157 8s- AL	Ams-Cfs-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf- Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf- Am-Gf-Um-Af	994/796	Ums-Afs-Cm-Uf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf- Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Ufs- Gms-Gf	1007/80 9
B183 8-AL	Gfs-Gms-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am- Af-Am-Uf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf- Am-Uf-Am-Af	995/797	Ums-Ufs-Am-Uf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af- Am-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf- Cms-Cfs-Am	1008/81 0
B100 8-AL	Cfs-Ums-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm- Af-Gm-Af-Gm-Cf-Gm-Cf-Cm-Uf- Gm-Cf-Cm-Uf	1009/811	Ams-Gfs-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf- Um-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Am-Af- Gms-Gfs-Gm	1095/89 7
B101 1-AL	Cfs-Ams-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am- Gf-Cm-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Cf- Um-Gf-Cm-Uf	1010/812	Ams-Gfs-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Gf- Cm-Gf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Uf- Gms-Afs-Am	1096/89 8
B101 4-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Af-Gm-Cf-Gm- Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf- Um-Gf-Cm-Uf	1011/813	Ams-Gfs-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf- Am-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Cf-Um-Cf- Ams-Gfs-Um	1097/89 9
B101 6-AL	Afs-Gms-Af-Gm-Cf-Gm-Cf-Cm- Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf- Cm-Uf-Gm-Af	1012/814	Ums-Cfs-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf- Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Cf- Ums-Cfs-Am	1098/90 0
B101 7-AL	Gfs-Ams-Gf-Cm-Gf-Cm-Cf-Um- Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf- Um-Gf-Am-Uf	1013/815	Ams-Ufs-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af- Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Gf-Cm-Uf- Cms-Ufs-Cm	1099/90 1
B102 0-AL	Cfs-Gms-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm- Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af- Um-Cf-Cm-Af	1014/816	Ums-Gfs-Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af- Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf- Gms-Cfs-Um	1100/90 2
B102 4-AL	Ufs-Gms-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um- Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Af- Gm-Cf-Cm-Uf	1015/817	Ams-Gfs-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Cf- Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf- Ams-Gfs-Gm	1101/90 3
B102 6-AL	Cfs-Cms-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm- Uf-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf- Cm-Uf-Cm-Af	1016/818	Ums-Gfs-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af- Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf- Gms-Cfs-Am	1102/90 4
B102 8-AL	Ufs-Gms-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm- Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf- Cm-Af-Cm-Uf	1017/819	Ams-Gfs-Um-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf- Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf- Ams-Gfs-Gm	1103/90 5
B102 9-AL	Gfs-Cms-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am- Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Cf-Um-Cf- Am-Cf-Um-Af	1018/820	Ums-Afs-Gm-Uf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Uf- Gm-Gf-Am-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf- Cms-Afs-Gm	1104/90 6

B103 0-AL	Cfs-Ums-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Um- Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Af- Cm-Uf-Am-Uf	1019/821	Ams-Ufs-Am-Gf-Um-Gf-Am-Gf-Gm-Cf- Um-Gf-Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af- Gms-Cfs-Am	1105/90 7
B103 8-AL	Cfs-Cms-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm- Af-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf- Cm-Uf-Gm-Af	1020/822	Ums-Cfs-Am-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf- Am-Gf-Um-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf- Gms-Afs-Um	1106/90 8
B104 1-AL	Gfs-Cms-Cf-Um-Cf-Am-Cf-Um- Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Um-Gf- Am-Cf-Cm-Uf	1021/823	Ams-Gfs-Gm-Uf-Cm-Af-Gm-Af-Gm-Gf- Cm-Af-Um-Af-Gm-Uf-Gm-Af-Gm-Gf- Cms-Ufs-Gm	1107/90 9
B104 4-AL	Ufs-Cms-Af-Cm-Uf-Am-Uf-Gm- Cf-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Af-Cm-Cf- Um-Gf-Gm-Af	1022/824	Ums-Cfs-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Gf- Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf-Am-Gf-Um-Gf- Ams-Gfs-Gm	1108/91 0
B104 6-AL	Afs-Cms-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm- Uf-Cm-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Gf- Gm-Af-Cm-Af	1023/825	Ums-Gfs-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Cf- Am-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf-Am-Gf- Ums-Gfs-Am	1109/91 1
B104 7-AL	Cfs-Ums-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um- Cf-Um-Gf-Am-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf- Am-Cf-Am-Af	1024/826	Ums-Ufs-Gm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Uf- Cm-Af-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Um-Af- Gms-Ufs-Gm	1110/91 2
B105 3-AL	Cfs-Ums-Cf-Um-Gf-Am-Cf-Cm- Uf-Gm-Gf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf- Um-Gf-Gm-Af	1025/827	Ums-Cfs-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf- Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Uf-Cm-Af-Gm-Af- Gms-Gfs-Cm	1111/91 3
B105 7-AL	Gfs-Ams-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am- Cf-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Af- Gm-Gf-Gm-Uf	1026/828	Ams-Cfs-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Cm-Cf- Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Uf- Cms-Afs-Gm	1112/91 4
B106 1-AL	Ufs-Gms-Gf-Am-Cf-Am-Af-Gm- Gf-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Gm-Uf- Cm-Uf-Cm-Af	1027/829	Ums-Gfs-Am-Gf-Am-Cf-Cm-Cf-Um-Cf- Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Cf- Ams-Gfs-Gm	1113/91 5
B106 5s- AL	Cms-Afs-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Gf- Am-Gf-Gm-Gf-Um-Cf-Um-Cf- Am-Cf-Um-Uf	1028/830	Ams-Afs-Gm-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Cm-Cf- Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Um-Gfs- Ums-Cf	1114/91 6
B107 1-AL	Gfs-Gms-Af-Gm-Gf-Gm-Uf-Cm- Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf- Am-Gf-Cm-Af	1029/831	Ums-Gfs-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af-Am-Gf- Um-Gf-Am-Gf-Am-Cf-Cm-Cf-Um-Cf- Cms-Afs-Cm	1115/91 7
B126 0-AL	Cfs-Ams-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Gm- Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Cf- Um-Gf-Am-Af	1030/832	Ums-Ufs-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf- Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Cm-Uf- Gms-Afs-Um	1116/91 8
B126 2-AL	Gfs-Gms-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm- Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf- Am-Af-Cm-Af	1031/833	Ums-Gfs-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf- Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf- Cms-Ufs-Gm	1117/91 9
B126 5-AL	Ufs-Gms-Gf-Gm-Gf-Gm-Af-Gm- Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Am-Cf- Am-Gf-Cm-Af	1032/834	Ums-Gfs-Cm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Am-Gf- Cm-Af-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Cm-Cf- Ams-Cfs-Cm	1118/92 0
B126 6-AL	Gfs-Gms-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm- Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm-Af- Gm-Cf-Am-Uf	1033/835	Ams-Ufs-Gm-Cf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Af- Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Cf- Cms-Afs-Cm	1119/92 1
B126 7-AL	Gfs-Gms-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Um- Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Gf- Cm-Af-Um-Uf	1034/836	Ams-Afs-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf- Am-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Cf- Cms-Cfs-Am	1120/92 2
B126 8-AL	Gfs-Gms-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm- Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm-Af-Gm-Cf- Am-Uf-Um-Uf	1035/837	Ams-Afs-Am-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Um-Uf- Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf- Cms-Cfs-Cm	1121/92 3
B127 9-AL	Afs-Ams-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Um- Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Af- Gm-Cf-Um-Uf	1036/838	Ams-Afs-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Af- Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Uf- Ums-Cfs-Am	1122/92 4
B128 1-AL	Cfs-Ams-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um- Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf- Um-Uf-Gm-Af	1037/839	Ums-Cfs-Am-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af- Am-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf- Gms-Ufs-Um	1123/92 5

B128 2-AL	Afs-Gms-Cf-Am-Uf-Um-Uf-Um- Uf-Um-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Cm-Uf- Um-Gf-Am-Af	1038/840	Ums-Ufs-Cm-Af-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af- Am-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Gm-Cf- Ums-Gfs-Um	1124/92 6
B136 2-AL	Gfs-Gms-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Cm- Uf-Gm-Af-Am-Cf-Cm-Gf-Cm-Cf- Cm-Af-Um-Uf	1039/841	Ams-Afs-Um-Gf-Gm-Gf-Cm-Gf-Gm-Uf- Um-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Cf- Cms-Ufs-Cm	1125/92 7
B136 5-AL	Gfs-Ams-Cf-Cm-Cf-Um-Gf-Am- Af-Cm-Cf-Gm-Cf-Cm-Cf-Am-Uf- Um-Cf-Cm-Uf	1040/842	Ams-Gfs-Gm-Af-Am-Uf-Gm-Gf-Gm-Cf- Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Gf-Gm-Uf- Cms-Afs-Cm	1126/92 8
B136 7-AL	Cfs-Cms-Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm- Cf-Gm-Cf-Cm-Cf-Am-Uf-Um-Cf- Cm-Uf-Gm-Uf	1041/843	Ams-Cfs-Am-Gf-Gm-Af-Am-Uf-Gm-Gf- Gm-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Gf- Gms-Ufs-Cm	1127/92 9
B136 9-AL	Cfs-Ums-Gf-Am-Af-Cm-Cf-Gm- Cf-Cm-Cf-Am-Uf-Um-Cf-Cm-Uf- Gm-Uf-Um-Uf	1042/844	Ams-Afs-Am-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Am-Uf- Gm-Gf-Gm-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af- Gms-Gfs-Gm	1128/93 0
B139 3-AL	Gfs-Ums-Gf-Um-Af-Um-Gf-Am- Uf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Cf-Gm-Cf- Cm-Af-Cm-Uf	1043/845	Ams-Gfs-Um-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Uf- Um-Gf-Am-Uf-Cm-Af-Um-Af-Cm-Af- Cms-Afs-Gm	1129/93 1
B140 1-AL	Ufs-Cms-Af-Am-Af-Gm-Cf-Gm- Cf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf- Um-Gf-Cm-Af	1044/846	Ums-Gfs-Cm-Af-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf- Um-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Uf-Um-Gf- Ams-Ufs-Cm	1130/93 2
B140 4-AL	Afs-Ams-Gf-Cm-Gf-Cm-Cf-Am- Cf-Um-Gf-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf- Am-Cf-Um-Uf	1045/847	Ams-Afs-Gm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Gf- Cm-Af-Gm-Uf-Gm-Gf-Cm-Gf-Cm-Uf- Ums-Ufs-Gm	1131/93 3
B140 7-AL	Cfs-Gms-Cf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm- Cf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Uf- Um-Cf-Cm-Uf	1046/848	Ams-Gfs-Gm-Af-Am-Gf-Um-Gf-Cm-Af- Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Gm-Cf- Gms-Cfs-Um	1132/93 4
B155 4-AL	Gfs-Cms-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Gm- Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af- Gm-Uf-Cm-Uf	1047/849	Ams-Gfs-Am-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf- Um-Gf-Am-Cf-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Gf- Cms-Ufs-Gm	1133/93 5
B155 8-AL	Ufs-Gms-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm- Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Cm-Uf- Cm-Cf-Cm-Af	1048/850	Ums-Gfs-Gm-Gf-Am-Gf-Am-Cf-Um-Gf- Gm-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Cf- Ams-Ufs-Cm	1134/93 6
B156 1-AL	Gfs-Ums-Cf-Am-Cf-Cm-Cf-Cm- Cf-Am-Gf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Cf- Am-Cf-Cm-Uf	1049/851	Ams-Gfs-Gm-Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af- Cm-Uf-Gm-Gf-Gm-Gf-Gm-Uf-Gm-Af- Cms-Afs-Cm	1135/93 7
B156 2-AL	Ufs-Cms-Af-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm- Af-Gm-Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Af- Cm-Cf-Um-Uf	1050/852	Ams-Afs-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Am-Gf- Am-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf-Um-Gf- Ams-Cfs-Am	1136/93 8
B156 4-AL	Afs-Cms-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Gm- Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf- Um-Uf-Um-Uf	1051/853	Ams-Afs-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Gf- Am-Gf-Am-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf- Ums-Gfs-Am	1137/93 9
B159 1-AL	Afs-Ums-Gf-Am-Gf-Um-Cf-Gm- Af-Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf- Um-Gf-Gm-Af	1052/854	Ums-Cfs-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af- Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Cm-Af- Ums-Ufs-Am	1138/94 0
B159 2-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am- Cf-Um-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Cm-Uf- Gm-Gf-Am-Af	1053/855	Ums-Ufs-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af- Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Cf- Ams-Ufs-Um	1139/94 1
B159 3-AL	Gfs-Ams-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm- Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Gf- Gm-Af-Am-Af	1054/856	Ums-Ufs-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf- Am-Af-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf- Cms-Afs-Um	1140/94 2
B159 6-AL	Ufs-Cms-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um- Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af- Am-Gf-Cm-Af	1055/857	Ums-Gfs-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf- Cm-Uf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf- Ams-Cfs-Um	1141/94 3
B160 2-AL	Ufs-Ums-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm- Gf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf- Cm-Gf-Um-Uf	1056/858	Ams-Afs-Cm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf- Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af- Ams-Afs-Gm	1142/94 4

B160 3-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Cf-Gm-Uf-Um-Uf	1057/859	Ams-Afs-Am-Cf-Gm-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Ams-Afs-Am	1143/94 5
B160 8-AL	Ufs-Gms-Gf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Uf	1058/860	Ams-Gfs-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Cm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf-Ams-Gfs-Cm	1144/94 6
B161 2-AL	Afs-Ams-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Gm-Uf	1059/861	Ams-Cfs-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Cm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Ums-Ufs-Cm	1145/94 7
B177 5-AL	Cfs-Ams-Af-Cm-Cf-Gm-Af-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Af	1060/862	Ums-Afs-Cm-Af-Am-Af-Cm-Af-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Um-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Gms-Gfs-Am	1146/94 8
B179 0-AL	Ufs-Ums-Uf-Gm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Gf-Um-Gf-Um-Uf	1061/863	Ams-Afs-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Cf-Am-Af-Ams-Cfs-Am	1147/94 9
B179 6-AL	Afs-Ams-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Um-Uf	1062/864	Ams-Afs-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Ums-Cfs-Am	1148/95 0
B179 8s- AL	Ams-Cfs-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Uf	1063/865	Ams-Afs-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Ufs-Ums-Uf	1149/95 1
B179 9-AL	Cfs-Ams-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Af	1064/866	Ums-Gfs-Am-Af-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gms-Ufs-Um	1150/95 2
B181 0-AL	Ufs-Cms-Cf-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af	1065/867	Ums-Gfs-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Ams-Afs-Cm	1151/95 3
B181 1-AL	Cfs-Cms-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af	1066/868	Ums-Ufs-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Af-Am-Af-Gm-Gf-Gms-Afs-Am	1152/95 4
B181 4-AL	Ufs-Ums-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af	1067/869	Ums-Ufs-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Ams-Gfs-Gm	1153/95 5
B181 5-AL	Ufs-Ums-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf	1068/870	Ams-Ufs-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Af-Ams-Afs-Gm	1154/95 6
B181 7-AL	Ufs-Cms-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Gf	1069/871	Cms-Afs-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Ams-Afs-Am	1155/95 7
B182 8-AL	Afs-Cms-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Uf	1070/872	Ams-Ufs-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Ums-Ufs-Cm	1156/95 8
B183 8s- AL	Gms-Gfs-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af-Um-Af	1071/873	Ums-Afs-Um-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cfs-Cms-Af	1157/95 9
B201 8-AL	Afs-Ums-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Uf-Um-Af-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf	1072/874	Ams-Afs-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Am-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Af-Ums-Gfs-Gm	1158/96 0
B202 0-AL	Afs-Gms-Cf-Um-Gf-Gm-Uf-Um-Af-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf	1073/875	Ams-Cfs-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Am-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Ums-Afs-Um	1159/96 1
B202 5-AL	Gfs-Ums-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Am-Af	1074/876	Ums-Ufs-Am-Af-Cm-Af-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Am-Af-Am-Uf-Am-Af-Cms-Cfs-Am	1160/96 2
B203 0-AL	Ufs-Ums-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Af-Gm-Uf-Am-Af-Um-Af	1075/877	Ums-Afs-Um-Uf-Am-Cf-Um-Af-Am-Cf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Ams-Afs-Um	1161/96 3

B203 1-AL	Ufs-Cms-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Um- Gf-Um-Gf-Um-Uf-Am-Gf-Um-Af- Am-Uf-Am-Af	1076/878	Ums-Ufs-Am-Uf-Um-Af-Cm-Uf-Am-Af- Cm-Af-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Gf- Ams-Afs-Am	1162/96 4
B203 2-AL	Cfs-Ums-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm- Uf-Gm-Uf-Um-Af-Gm-Uf-Am-Af- Um-Af-Am-Af	1077/879	Ums-Ufs-Um-Af-Um-Uf-Am-Cf-Um-Af- Am-Cf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af- Gms-Afs-Am	1163/96 5
B203 3-AL	Ufs-Cms-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Um- Gf-Um-Uf-Am-Gf-Um-Af-Am-Uf- Am-Af-Am-Af	1078/880	Ums-Ufs-Um-Uf-Am-Uf-Um-Af-Cm-Uf- Am-Af-Cm-Af-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Gf- Ams-Gfs-Am	1164/96 6
B729 -AL	Afs-Gms-Af-Am-Cf-Um-Gf-Gm- Af-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Gf- Cm-Uf-Gm-Af	1079/881	Ums-Cfs-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Af- Cm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Um-Cf- Ums-Gfs-Um	1165/96 7
B731 -AL	Afs-Ams-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um- Gf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf- Gm-Af-Gm-Af	1080/882	Ums-Cfs-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf- Am-Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Uf- Ums-Cfs-Um	1166/96 8
B732 -AL	Afs-Cms-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gm- Uf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf- Am-Gf-Am-Af	1081/883	Ums-Ufs-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf- Cm-Af-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Am-Gf- Ums-Ufs-Cm	1167/96 9
B734 -AL	Ufs-Gms-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Um- Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Gf- Am-Af-Gm-Uf	1082/884	Ums-Cfs-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Cf- Am-Gf-Cm-Af-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf- Ams-Gfs-Um	1168/97 0
B734 s-AL	Ums-Gfs-Gm-Af-Um-Gf-Um-Uf- Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af- Gm-Af-Am-Af	1083/885	Ums-Ufs-Um-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af- Gm-Cf-Am-Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Afs- Gms-Uf	1169/97 1
B736 -AL	Gfs-Ams-Uf-Gm-Uf-Um-Gf-Cm- Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af- Gm-Af-Um-Uf	1084/886	Ams-Afs-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af- Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Am-Cf-Am-Uf- Cms-Cfs-Am	1170/97 2
B743 -AL	Cfs-Ums-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Gm- Af-Am-Gf-Am-Uf-Um-Gf-Am-Cf- Am-Gf-Gm-Uf	1085/887	Ams-Cfs-Cm-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Am-Uf- Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af- Gms-Cfs-Am	1171/97 3
B753 s-AL	Gms-Afs-Um-Uf-Gm-Af-Cm-Af- Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Um-Gf- Cm-Af-Gm-Af	1086/888	Ums-Cfs-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Am-Af- Cm-Cf-Um-Gf-Um-Cf-Am-Af-Um-Cfs- Ums-Uf	1172/97 4
B963 -AL	Gfs-Cms-Af-Cm-Uf-Gm-Gf-Am- Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf- Am-Gf-Gm-Af	1087/889	Ums-Cfs-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gm-Uf- Cm-Af-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Um-Gf- Cms-Ufs-Gm	1173/97 5
B966 -AL	Cfs-Ums-Gf-Gm-Af-Gm-Uf-Gm- Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Gf- Am-Cf-Am-Af	1088/890	Ums-Ufs-Gm-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af- Um-Gf-Um-Cf-Am-Cf-Um-Cf-Cm-Af- Gms-Ufs-Gm	1174/97 6
B969 -AL	Gfs-Ams-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am- Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Af- Am-Cf-Um-Uf	1089/891	Ams-Afs-Gm-Uf-Um-Gf-Um-Cf-Cm-Uf- Gm-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Uf- Cms-Cfs-Am	1175/97 7
B971 -AL	Gfs-Ums-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Cm- Cf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Af-Am-Cf- Um-Uf-Cm-Uf	1090/892	Ams-Gfs-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Um-Cf- Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Af- Cms-Ufs-Cm	1176/97 8
B982 -AL	Gfs-Ams-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um- Cf-Um-Cf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Cf- Um-Cf-Am-Af	1091/893	Ums-Ufs-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf- Gm-Af-Gm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Uf- Cms-Cfs-Um	1177/97 9
B984 -AL	Cfs-Ams-Af-Cm-Uf-Um-Cf-Um- Cf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Um-Cf- Am-Af-Gm-Uf	1092/894	Ams-Cfs-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af- Cm-Cf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Gf-Um-Uf- Gms-Ufs-Cm	1178/98 0
B992 -AL	Cfs-Gms-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Um- Cf-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf- Um-Uf-Cm-Af	1093/895	Ums-Gfs-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Cf- Um-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf- Gms-Afs-Gm	1179/98 1
B994 -AL	Gfs-Ums-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Am- Af-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf-Um-Uf- Cm-Af-Cm-Uf	1094/896	Ams-Gfs-Um-Gf-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Cf- Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af- Cms-Cfs-Gm	1180/98 2

实施例 18：交替修饰序列对 AGT 基因的抑制作用

将实施例 17 中合成的 2'-OMe 与 2'-F 交替修饰 siRNA 序列通过脂质纳米颗粒 (LNP) 转染进入 HepG2 细胞后，利用 qPCR 技术检测各序列对 AGT 基因的抑制作用。

1. 实验材料

受试样品：表52中所列交替修饰小干扰核糖核酸序列（实施例17中合成）。

细胞种类：HepG2细胞系

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测样品对HepG2细胞系AGT基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 细胞培养

取传代培养的HepG2细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清DMEM培养液（补充100×青霉素、100×链霉素10 μL/mL），置于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，800 r/min离心3 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将Lipofectamine RNAiMAX和Opti-MEM按2:98比例混合后涡旋混匀。

转染试剂配制：按照1:1 (v/v) 的比例取65 μL Opti-MEM稀释的siRNA溶液加入65 μL转染混合液，涡旋混匀后室温静置15 min，得到脂质纳米颗粒 (LNP)。取12.5 μL用于包封率检测。

空白对照组转染试剂：在65μL Opti-MEM中加入制备好的转染混合液65 μL。涡旋混匀，室温静置15 min。

将配制好的转染试剂加入24孔细胞培养板中（每孔100 μL），使最终每孔siRNA浓度为0.07 nM。加入500 μL细胞悬液（每毫升含 1.5×10^5 个细胞）。使用十字法混匀后，放入37℃，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 AGT mRNA检测**1) RNA抽提**

a. 吸去12孔板中的培养液，每孔加入0.5 mL 1 × PBS清洗细胞，吸去PBS。在孔中加入0.5 mL TRIzol试剂，枪头吹打细胞充分裂解，转移至1.5 mL无RNA酶的EP管中，室温静置5 min。

b. 每管加入0.1 mL氯仿，剧烈振荡15 sec，室温静置5 min。4℃离心，12000 × g 15 min，取上清200 μL至新EP管中。

c. 加入等体积异丙醇，将管中液体上下颠倒轻轻混匀，-20℃静置10 min，4℃离心，12000 × g，离心15 min，弃上清。

d. 加入0.5 mL 75% 乙醇，轻轻洗涤RNA沉淀，4℃ 12000 × g，离心5 min，吸去上清。重复漂洗一次，4℃ 12000 × g，离心1 min，用微量枪头将残留乙醇去除干净。

e. 室温晾干残留乙醇2-3 min，加入40 μL RNase-free ddH₂O，溶解。

2) RNA浓度检测

使用nanodrop对RNA浓度进行检测。用2 μL RNase-free ddH₂O作空白对照，每次用2 μL RNA样本进行检测。记录样本浓度。

3) AGT mRNA反转录

按体积比2:5:3混合反转录试剂、RNA溶液和水，于PCR仪中以37℃反应15 min、85℃反应5 s，最后维持在4℃。使用无菌无酶水将反应结束获得的cDNA稀释5倍。

4) AGT mRNA定量检测

在15 mL离心管中，按体积比5:0.1:0.1加入qPCR试剂、上游引物和下游引物并混匀，标记为A溶液。
标记好1.5 mL EP管，按体积比1:3.8，分别加入稀释的cDNA和水并混匀，标记为B溶液。
在96孔PCR板每孔分别加入A溶液5.2 μL + B溶液4.8 μL。盖上封板膜，3000 rpm离心1 min，上机检测。
*本环节在冰上操作，保持低温条件。

将板放入qPCR仪，按照以下程序运行：

预变性：95℃，30 sec；
循环反应：95℃，5 sec；60℃，34 sec；40个循环；
熔解曲线：95℃，15 sec；60℃，60 sec；95℃，15 sec。
运行时间约为2 h。分析实验结果，计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2.4 数据处理

AGT mRNA表达率（%）计算公式为：
表达率 = (AGT mRNA表达量/空白对照组AGT mRNA表达量) × 100%；
AGT基因表达抑制率 = 100% - 表达率（%）。

3. 实验结果

本实施例中抑制率为3次实验平均值，各序列对HepG2细胞中AGT mRNA的表达抑制率见表53-表56。
实验结果表明，一些采用2'-OMe与2'-F交替修饰序列，包括B1789-AL序列，对HepG2细胞中AGT mRNA的表达具有显著抑制作用，抑制率均超过45%。其中B1576s-AL抑制率超过了60%。
其它各序列对AGT mRNA的表达抑制作用较差，抑制率均低于45%。

(1) 设计的99条序列中，有33条序列对AGT基因具有显著抑制作用，抑制率均超过40%。其中部分序列的抑制率超过了60%。

表53 对AGT基因具有显著抑制作用（抑制率高于40%）的交替修饰序列

无修饰序列号	交替修饰序列编号	抑制率（%）	无修饰序列号	交替修饰序列编号	抑制率（%）
1576s	B1576s-AL	64.6	734s	B734s-AL	56.4
1578s	B1578s-AL	63.9	1798s	B1798s-AL	54.4
1838	B1838-AL	63.6	736	B736-AL	53.3
1789	B1789-AL	63.5	1608	B1608-AL	52.5
1812	B1812-AL	62.9	1282	B1282-AL	51.8
1835	B1835-AL	62.3	1811	B1811-AL	51.5
1791	B1791-AL	61.8	1281	B1281-AL	50.4
1579	B1579-AL	61.1	1799	B1799-AL	49.2
1816	B1816-AL	60.9	1603	B1603-AL	48.6
1790	B1790-AL	60.3	1828	B1828-AL	46.6
1836	B1836-AL	59.8	1592	B1592-AL	44.4

1585s	B1585s-AL	59.3	1814	B1814-AL	43.2
1839	B1839-AL	59.1	1593	B1593-AL	42.4
1838s	B1838s-AL	58.4	1810	B1810-AL	42.1
1796	B1796-AL	57.9	1365	B1365-AL	42.0
1795	B1795-AL	57.5	1279	B1279-AL	41.4
1817	B1817-AL	57.3			

从表 53 中可以看出，上表中的交替修饰序列（具体序列见表 52），对 AGT mRNA 的表达具有显著抑制作用，抑制率均在 40%以上，其中前 10 条的抑制率超过了 60%（图 16）。

表 53 中的化合物序列如下表 54。

表54 对AGT基因具有显著抑制作用的siRNA序列

序列编号	正义链序列5'-3'	序列 SEQ ID NO:/ 对应无修饰序列 SEQ ID NO:	反义链序列5'-3'	序列 SEQ ID NO:/ 对应无修饰序列 SEQ ID NO:
B1576s-AL	Cms-Cfs-Am-Cf-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf-Am-Af	993/795	Ums-Ufs-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Gfs-Gms-Af	1006/808
B1578s-AL	Ams-Cfs-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf-Am-Gf-Um-Af	994/796	Ums-Afs-Cm-Uf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Ufs-Gms-Gf	1007/809
B1838-AL	Gfs-Gms-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Uf-Am-Af	995/797	Ums-Ufs-Am-Uf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af-Am-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cms-Cfs-Am	1008/810
B1789-AL	Gfs-Ums-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf	988/1238	Ams-Cfs-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Af-Am-Af-Cms-Afs-Am	1001/803
B1812-AL	Cfs-Cms-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af	985/787	Ums-Ufs-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gms-Gfs-Am	998/800
B1835-AL	Ufs-Ums-Gf-Gm-Gf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af	983/785	Ums-Afs-Cm-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cf-Cm-Af-Ams-Ufs-Um	996/798
B1791-AL	Ufs-Ums-Gf-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Af	990/792	Ums-Afs-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Af-Ams-Afs-Cm	1003/805
B1579-AL	Cfs-Cms-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af	986/788	Ums-Cfs-Gm-Af-Cm-Uf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gms-Ufs-Gm	999/801
B1816-AL	Ufs-Ums-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Uf	984/786	Ams-Afs-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Ams-Afs-Am	997/799
B1790-AL	Ufs-Ums-Uf-Gm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Uf	1061/863	Ams-Afs-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Cf-Am-Af-Ams-Cfs-Am	1147/949
B1836-AL	Ufs-Gms-Gf-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Uf	987/789	Ams-Ufs-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af-Am-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cf-Ams-Afs-Um	1000/802
B1585s-AL	Cms-Ufs-Um-Cf-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af	992/794	Ums-Afs-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Am-Uf-Um-Af-Gm-Af-Am-Gfs-Ams-Af	1005/807
B1839-	Gfs-Ums-Uf-Um-Uf-Am-Af-	989/791	Ums-Gfs-Um-Af-Um-Af-Cm-Uf-	1002/804

AL	Am-Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af-Um-Af-Cm-Af		Um-Uf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cms-Cfs-Cm	
B1838s-AL	Gms-Gfs-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af-Um-Af	1071/873	Ums-Afs-Um-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cfs-Cms-Af	1157/959
B1796-AL	Afs-Ams-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Um-Uf	1062/864	Ams-Afs-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Ums-Cfs-Am	1148/950
B1795-AL	Gfs-Ams-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf	991/793	Ams-Afs-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cms-Afs-Cm	1004/806
B1817-AL	Ufs-Cms-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Gf	1069/871	Cms-Afs-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Ams-Afs-Am	1155/957
B734s-AL	Ums-Gfs-Gm-Af-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af	1083/885	Ums-Ufs-Um-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Afs-Gms-Uf	1169/971
B1798s-AL	Ams-Cfs-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Uf	1063/865	Ams-Afs-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Ufs-Ums-Uf	1149/951
B736-AL	Gfs-Ams-Uf-Gm-Uf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Um-Uf	1084/886	Ams-Afs-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Am-Cf-Am-Uf-Cms-Cfs-Am	1170/972
B1608-AL	Ufs-Gms-Gf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Uf	1058/860	Ams-Gfs-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Cm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf-Ams-Gfs-Cm	1144/946
B1282-AL	Afs-Gms-Cf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Af	1038/840	Ums-Ufs-Cm-Af-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Gm-Cf-Ums-Gfs-Um	1124/926
B1811-AL	Cfs-Cms-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af	1066/868	Ums-Ufs-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Af-Am-Af-Gm-Gf-Gms-Afs-Am	1152/954
B1281-AL	Cfs-Ams-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Uf-Gm-Af	1037/839	Ums-Cfs-Am-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Gms-Ufs-Um	1123/925
B1799-AL	Cfs-Ams-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Af	1064/866	Ums-Gfs-Am-Af-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gms-Ufs-Um	1150/952
B1603-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Cf-Gm-Uf-Um-Uf	1057/859	Ams-Afs-Am-Cf-Gm-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Ams-Afs-Am	1143/945
B1828-AL	Afs-Cms-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Uf	1070/872	Ams-Ufs-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Ums-Ufs-Cm	1156/958
B1592-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af	1053/855	Ums-Ufs-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Ams-Ufs-Um	1139/941
B1814-AL	Ufs-Ums-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af	1067/869	Ums-Ufs-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Ams-Gfs-Gm	1153/955
B1593-AL	Gfs-Ams-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af	1054/856	Ums-Ufs-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Cms-Afs-Um	1140/942
B1810-AL	Ufs-Cms-Cf-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af	1065/867	Ums-Gfs-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Ams-Afs-Cm	1151/953
B1365-	Gfs-Ams-Cf-Cm-Cf-Um-Gf-	1040/842	Ams-Gfs-Gm-Af-Am-Uf-Gm-Gf-	1126/928

AL	Am-Af-Cm-Cf-Gm-Cf-Cm-Cf-Am-Uf-Um-Cf-Cm-Uf		Gm-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Gf-Gm-Uf-Cms-Afs-Cm	
B1279-AL	Afs-Ams-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Uf	1036/838	Ams-Afs-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Uf-Ums-Cfs-Am	1122/924

(2) 23条序列对AGT基因的抑制率在25%-40%。例如，B734-AL和B994-AL的抑制率分别为39.2%和37.3%。

表55 对AGT基因抑制率在25%-40%的交替修饰序列

无修饰序列号	序列编号	抑制率 (%)	无修饰序列号	序列编号	抑制率 (%)
734	B734-AL	39.2	2020	B2020-AL	30.4
1591	B1591-AL	37.9	753s	B753s-AL	30.2
969	B969-AL	37.3	2032	B2032-AL	30.2
994	B994-AL	37.3	1602	B1602-AL	29.0
984	B984-AL	36.9	1029	B1029-AL	28.6
743	B743-AL	33.8	1612	B1612-AL	28.6
1393	B1393-AL	33.4	2018	B2018-AL	27.9
2030	B2030-AL	33.0	2025	B2025-AL	26.6
1267	B1267-AL	31.5	731	B731-AL	26.4
2033	B2033-AL	31.5	1011	B1011-AL	26.2
2031	B2031-AL	31.0	732	B732-AL	25.4
1815	B1815-AL	30.4			

表55中所列22条序列对AGT基因的抑制作用较差，抑制率均低于40%，在25%-40%之间。例如，B734-AL和B994-AL的抑制率分别为39.2%和37.3%（图17）。

(3) 43条序列对AGT基因的抑制率在25%以下。例如，B1017-AL的抑制率仅为23.1%。

表56 对AGT基因抑制率在25%以下的交替修饰序列

无修饰序列号	序列编号	抑制率 (%)	无修饰序列号	序列编号	抑制率 (%)
1030	B1030-AL	23.5	1041	B1041-AL	6.0
1017	B1017-AL	23.1	1008	B1008-AL	5.6
992	B992-AL	20.5	966	B966-AL	4.8
1362	B1362-AL	17.5	1046	B1046-AL	4.5
1061	B1061-AL	17.1	1071	B1071-AL	4.1
982	B982-AL	17.1	1038	B1038-AL	3.9
729	B729-AL	16.4	1016	B1016-AL	3.5
1020	B1020-AL	16.3	1026	B1026-AL	3.4
1775	B1775-AL	15.5	1554	B1554-AL	1.7
1596	B1596-AL	15.0	1367	B1367-AL	1.6
971	B971-AL	15.0	1407	B1407-AL	1.3
1057	B1057-AL	14.8	1260	B1260-AL	0.9
1268	B1268-AL	14.2	1558	B1558-AL	0.9
1564	B1564-AL	13.8	1401	B1401-AL	-0.6
1028	B1028-AL	10.4	1053	B1053-AL	-1.6
1065s	B1065s-AL	10.0	1561	B1561-AL	-2.0

1024	B1024-AL	9.9	1404	B1404-AL	-2.4
1044	B1044-AL	9.9	1369	B1369-AL	-2.8
963	B963-AL	9.8	1562	B1562-AL	-3.3
1266	B1266-AL	8.2	1262	B1262-AL	-6.0
1014	B1014-AL	6.5	1265	B1265-AL	-8.8
1047	B1047-AL	6.4			

表 56 中所列的 43 条序列，对 AGT mRNA 的表达抑制作用很差，抑制率均低于 25%。例如，B1017-AL 的抑制率仅为 23.1%（图 18）。

（4）序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如B1365-AL的抑制率比B1367-AL提高了40.4%，显著提升。

一些序列相近的 siRNA 对 AGT mRNA 的抑制作用对比见表 57。

表57 相近序列的siRNA对AGT基因的表达抑制率对比

相近序列组	无修饰序列号	序列编号	对应无修饰序列正义链 5'-3'	对应无修饰序列 SEQ ID NO:	对应无修饰序列反义链 5'-3'	对应无修饰序列 SEQ ID NO:	抑制率 (%)
A	1367	B1367-AL	<u>CCCUGAACCGCCC</u> <u>AUCCUGU</u>	843	<u>ACAGGAAUGGGCGGUUC</u> <u>AGGGUC</u>	929	1.6
	1365	B1365-AL	<u>GACCCUGAACCGC</u> <u>CCAUCCU</u>	842	<u>AGGAAUGGGCGGUUCAG</u> <u>GGUCAC</u>	928	42.0
B	1815	B1815-AL	<u>UUUCAAGUUGAGA</u> <u>ACAAAAAU</u>	870	<u>AUUUUUGUUCUCAACU</u> <u>GAAAAAG</u>	956	30.4
	1816	B1816-AL	<u>UUCAAGUUGAGAA</u> <u>CAAAAAAU</u>	786	<u>AAUUUUUGUUCUCAACU</u> <u>UGAAAA</u>	799	60.9
C	729	B729-AL	<u>AGAACUGGAUGUU</u> <u>GCUGCUGA</u>	881	<u>UCAGCAGCAACAUCAG</u> <u>UUCUGU</u>	967	16.4
	734s	B734s-AL	<u>UGGAUGUUGCUGC</u> <u>UGAGAAA</u>	885	<u>UUUCUCAGCAGCAACAU</u> <u>CCAGU</u>	971	56.4

从表 57 中可以看出，一些序列相近的 siRNA，对 AGT mRNA 的表达抑制作用差异非常大。

无修饰序列 1367 与无修饰序列 1365 相比，仅末端 2 个碱基不同。正义链：无修饰序列 58 的 5'末端为 GA，无修饰序列 59 的 3'末端为 GU，其它序列完全相同；反义链：无修饰序列 144 的 3'末端为 AC，无修饰序列 145 的 5'末端为 AC，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 B1365-AL 的抑制率比 B1367-AL 提高了 40.4%，显著提升。

无修饰序列 1815 与无修饰序列 1816 相比，仅末端 1 个碱基不同。正义链：无修饰序列 86 的 5'末端为 U，序列 2 的 3'末端为 U，其它序列完全相同；反义链，无修饰序列 172 的 3'末端为 G，无修饰序列 15 的 5'末端为 A，其它序列完全相同。但是交替修饰序列 B1816-AL 的抑制率比 B1815-AL 提高了 30.5%，显著提升。

无修饰序列 729 与无修饰序列 734s 相比，仅末端 5 个碱基不同。正义链：无修饰序列 97 的 5'末端为 AGAAC，无修饰序列 101 的 3'末端为 GAAA，其它序列完全相同；反义链：无修饰序列 183 的 3'末端为

UCUGU, 无修饰序列 187 的 5'末端为 UUUC, 其它序列完全相同。但是交替修饰序列 B734s-AL 的抑制率比 B729-AL 提高了 40.0%, 显著提升。

因此, 从针对 AGT mRNA 序列设计的非常大量的寡核苷酸序列中筛选出具有显著抑制活性的序列并不容易, 需要付出大量创造性劳动。

总结:

(1) 设计的99条序列中, 有33条序列对AGT基因具有显著抑制作用, 抑制率均超过40%。其中10条的抑制率超过了60%。

(2) 23条序列对AGT基因的抑制率在25%-40%。例如, B734-AL和B994-AL的抑制率分别为39.2%和37.3%。

(3) 43条序列对AGT基因的抑制率在25%以下。例如, B1017-AL的抑制率仅为23.1%。

(4) 序列相近的 siRNA, 活性差异非常大。例如 B1365-AL 的抑制率比 B1367-AL 提高了 40.4%, 显著提升。因此, 从针对 AGT mRNA 序列设计的非常大量的寡核苷酸序列中筛选出具有显著抑制活性的序列并不容易, 需要付出大量创造性劳动。

实施例 19: 无修饰序列对 AGT 基因的抑制作用

本实施例中合成一些实施例 18 中修饰序列对应的无修饰序列, 并通过脂质纳米颗粒 (LNP) 转染进入 HepG2 细胞, 利用 qPCR 技术检测各无修饰序列对 AGT 基因的抑制作用, 筛选出具有较好抑制效果的无修饰 siRNA 序列。

1. 实验材料

受试样品: 表58中所列无修饰小干扰核糖核酸序列。

2. 无修饰序列1579的合成

表58中序列编号为1579的小干扰核糖核酸的序列为:

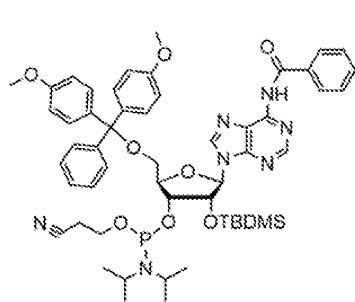
正义链: 5'-CCUUUUCUUCUAAUGAGUCGA-3' (SEQ ID NO: 788)

反义链: 5'-UCGACUCAUUAGAAGAAAAGGUG-3' (SEQ ID NO: 801)

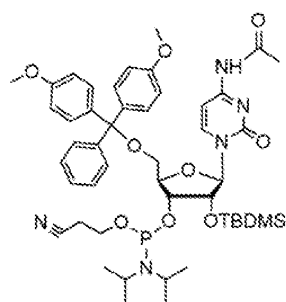
仪器和试剂: 擎科192 P型号DNA/RNA自动合成仪, 其固相载体为交联聚苯乙烯珠的通用载体, 型号为 Primer support 5G Unylinker 350 (cytiva厂家)。

制备方法:

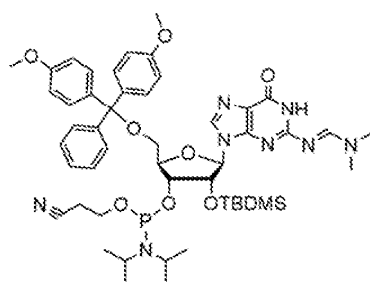
依照单体浓度为0.15 M, 用乙腈分别配制以下核苷酸单体溶液: DMT-A-2'-O-TBDMS亚磷酰胺单体(式13)、DMT-C-2'-O-TBDMS亚磷酰胺单体(式14)、DMT-G-2'-O-TBDMS亚磷酰胺单体(式15)和DMT-U-2'-O-TBDMS亚磷酰胺单体(式16)。



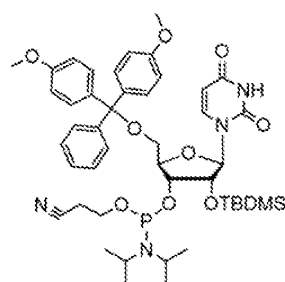
式 15



式 16



式 17



式 18

采用如下步骤制备：

向合成仪指定位置装入固相载体，经过若干次合成循环得到相应的全保护的产物，合成循环包括（1）脱保护、（2）偶联、（3）氧化/硫化和（4）羟基保护，循环过程及所使用试剂描述如下：

（1）脱保护

使用3%二氯乙酸甲苯溶液作为脱保护试剂，脱掉DMT保护基，之后使用乙腈进行清洗。

（2）偶联

使用0.25 M 5-乙硫基四氮唑作为活化剂，对每个核苷酸单体的乙腈溶液进行偶联，之后使用乙腈进行冲洗。

（3）氧化/硫化

氧化：使用0.05 M碘的吡啶/水(90/10)溶液作为氧化剂，进行氧化，之后使用乙腈进行冲洗。

硫化：使用3%氢化黄原素的吡啶溶液作为硫化剂，进行硫化，之后使用乙腈进行冲洗。

（4）羟基保护

使用10%乙酸酐四氢呋喃溶液（CAPA）四氢呋喃/吡啶/氮甲基咪唑 74/10/16(v/v/v)（CAPB）为羟基保护试剂，进行羟基保护，之后使用乙腈进行冲洗。

重复以上操作，按照设定的序列循环进行，得到全保护的产物。

（5）使用3%二氯乙酸甲苯溶液为脱保护试剂，脱掉最后一个核苷酸的DMT保护基，之后使用乙腈进行清洗。

（6）氨解及纯化

将反应完的固相载体转移至反应器中，加入浓氨水（25-28%），在60℃保持氨解12 h后，体系降至室温，并将混合物转移至压滤罐中，用纯化水与乙醇的混合溶液进行淋洗，合并滤液，过层析柱，浓缩，冻干，得2'-O-TBDMS保护的产品。

(7) 脱TBDMS

向得到的产品中加入DMSO和三乙胺氢氟酸，在60℃下反应2h，然后向反应液中加入醋酸铵水溶液，震荡混匀，加入无水乙醇，震荡混匀后在-20℃下析晶8-12h。离心后倒掉上清液，沉淀用无水乙醇淋洗得无修饰的单链产品。

(8) 退火

将得到的无修饰的正义链及反义链按1:1比例混合后，加热到95℃并保持3 min后，缓慢降温至室温，形成无修饰的双链。

无修饰序列1579纯度97.4%；实测分子量：13990.9。

3. 其他序列的合成

按上述方法合成表58中的其他序列。

表58 无修饰siRNA序列

序 列 编 号	正义链序列（无修饰序列）5'-3'	SEQ ID NO:	反义链序列（无修饰序列）5'-3'	SEQ ID NO:
1835	UUGGGUUUUAAAAUAAAGUA	785	UACUUUAAUUUUAAAACCCAAUU	798
1816	UUCAAGUUGAGAACAAAAAUU	786	AAUUUUUGUUCUACUUGAAAA	799
1812	CCUUUUCAGUUGAGAACAAA	787	UUUGUUCUACUUGAAAAGGGA	800
1579	CCUUUUCUUCUAAUGAGUCGA	788	UCGACUCAUUAGAAGAAAAGGUG	801
1836	UGGGUUUUAAAAUAAAGUAU	789	AUACUUUAAUUUUAAAACCCAAU	802
1789	GUUUGUGAAACAAAAAAGUGU	790	ACACUUUUUUGUUUCACAAACAA	803
1839	GUUUUAAAAUAAAGUAUACA	791	UGUAUACUUUAAUUUUAAAACCC	804
1791	UUGUGAAACAAAAAAGUGUUA	792	UAAACUUUUUUGUUUCACAAAC	805
1795	GAAACAAAAAAGUGUUCUUU	793	AAGGGAACACUUUUUUGUUUCAC	806
1585s	CUUCUAAUGAGUCGACUUUA	794	UAAAGUCGACUCAUUAGAAGAA	807
1576s	CCACCUUUUCUUCUAAUGAA	795	UUCAUUAGAAGAAAAGGUGGGA	808
1578s	ACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	796	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	809
1838	GGUUUUAAAAUAAAGUAUAA	797	UUUAUUUUUUUUUUAAAACCCA	810
1008	CUUCACUGAGAGCGCCUGCCU	811	AGGCAGGCGCUCUCAGUGAAGGG	897
1011	CACUGAGAGCGCCUGCCUGCU	812	AGCAGGCAGGCGCUCUCAGUGAA	898
1014	UGAGAGCGCCUGCCUGCUGCU	813	AGCAGCAGGCAGGCGCUCUCAGU	899
1016	AGAGCGCCUGCCUGCUGCUGA	814	UCAGCAGCAGGCAGGCGCUCUCA	900
1017	GAGCGCCUGCCUGCUGCUGAU	815	AUCAGCAGCAGGCAGGCGCUCUC	901
1020	CGCCUGCCUGCUGCUGAUCCA	816	UGGAUCAGCAGCAGGCAGGCGCU	902
1024	UGCCUGCUGCUGAUCCAGCCU	817	AGGCUGGAUCAGCAGCAGGCAGG	903
1026	CCUGCUGCUGAUCCAGCCUCA	818	UGAGGCUGGAUCAGCAGCAGGCA	904
1028	UGCUGCUGAUCCAGCCUCACU	819	AGUGAGGCUGGAUCAGCAGCAGG	905
1029	GCUGCUGAUCCAGCCUCACUA	820	UAGUGAGGCUGGAUCAGCAGCAG	906
1030	CUGCUGAUCCAGCCUCACUAU	821	AUAGUGAGGCUGGAUCAGCAGCA	907
1038	CCAGCCUCACUAUGCCUCUGA	822	UCAGAGGCAUAGUGAGGCUGGAU	908
1041	GCCUCACUAUGCCUCUGACCU	823	AGGUCAGAGGCAUAGUGAGGCUG	909

1044	UCACUAUGCCUCUGACCUGGA	824	UCCAGGUCAGAGGCAUAGUGAGG	910
1046	ACUAUGCCUCUGACCUGGACA	825	UGUCCAGGUCAGAGGCAUAGUGA	911
1047	CUAUGCCUCUGACCUGGACAA	826	UUGUCCAGGUCAGAGGCAUAGUG	912
1053	CUCUGACCUGGACAAGGUGGA	827	UCCACCUUGUCCAGGUCAGAGGC	913
1057	GACCUGGACAAGGUGGAGGGU	828	ACCCUCCACCUUGUCCAGGUCAG	914
1061	UGGACAAGGUGGAGGGUCUCA	829	UGAGACCCUCCACCUUGUCCAGG	915
1065s	CAAGGUGGAGGGUCUCACUU	830	AAGUGAGACCCUCCACCUUGUC	916
1071	GGAGGGUCUCACUUUCCAGCA	831	UGCUGGAAAGUGAGACCCUCCAC	917
1260	CAGGGUGGGGGAGGUGCUGAA	832	UUCAGCACCUCUCCCCACCCUGAU	918
1262	GGGUGGGGGAGGUGCUGAACA	833	UGUUCAGCACCUCUCCCCACCCUG	919
1265	UGGGGGAGGUGCUGAACAGCA	834	UGCUGUUCAGCACCUCUCCCCACC	920
1266	GGGGGAGGUGCUGAACAGCAU	835	AUGCUGUUCAGCACCUCUCCCCAC	921
1267	GGGGAGGUGCUGAACAGCAUU	836	AAUGCUGUUCAGCACCUCUCCCCA	922
1268	GGGAGGUGCUGAACAGCAUUU	837	AAAUGCUGUUCAGCACCUCUCCCC	923
1279	AACAGCAUUUUUUUGAGCUU	838	AAGCUCAAAAAAAAAUGCUGUUA	924
1281	CAGCAUUUUUUUGAGCUUGA	839	UCAAGCUCAAAAAAAAAUGCUGUU	925
1282	AGCAUUUUUUUGAGCUUGAA	840	UUCAAGCUCAAAAAAAAAUGCUGU	926
1362	GGUGACCCUGAACCGCCCAUU	841	AAUGGGCGGUUCAGGGUCACCUC	927
1365	GACCCUGAACCGCCCAUUCCU	842	AGGAAUGGGCGGUUCAGGGUCAC	928
1367	CCCUGAACCGCCCAUUCCUGU	843	ACAGGAAUGGGCGGUUCAGGGUC	929
1369	CUGAACCGCCCAUUCCUGUUU	844	AAACAGGAAUGGGCGGUUCAGGG	930
1393	GUGUAUGAUCAAAGCGCCACU	845	AGUGGCGCUUUGAUCAUACACAG	931
1401	UCAAAAGCGCCACUGCCCUGCA	846	UGCAGGGCAGUGGCGCUUUGAUC	932
1404	AAGCGCCACUGCCCUGCACUU	847	AAGUGCAGGGCAGUGGCGCUUUG	933
1407	CGCCACUGCCCUGCACUUCCU	848	AGGAAGUGCAGGGCAGUGGCGCU	934
1554	GCGAUGUGUCACCCCCAGUCU	849	AGACUGGGGGUGACACAUCGCUG	935
1558	UGUGUCACCCCCAGUCUCCCA	850	UGGGAGACUGGGGGUGACACAUC	936
1561	GUCACCCCCAGUCUCCCACCU	851	AGGUGGGAGACUGGGGGUGACAC	937
1562	UCACCCCCAGUCUCCCACCUU	852	AAGGUGGGAGACUGGGGGUGACA	938
1564	ACCCCCAGUCUCCCACCUUUU	853	AAAAGGUGGGAGACUGGGGGUGA	939
1591	AUGAGUCGACUUUGAGCUGGA	854	UCCAGCUCAAAGUCGACUCAUUA	940
1592	UGAGUCGACUUUGAGCUGGAA	855	UUCCAGCUCAAAGUCGACUCAU	941
1593	GAGUCGACUUUGAGCUGGAAA	856	UUUCCAGCUCAAAGUCGACUCAU	942
1596	UCGACUUUGAGCUGGAAAGCA	857	UGC UUUCCAGCUCAAAGUCGACU	943
1602	UUGAGCUGGAAAGCAGCCGUU	858	AACGGCUGCUUCCAGCUCAAAG	944
1603	UGAGCUGGAAAGCAGCCGUUU	859	AAACGGCUGCUUCCAGCUCAAA	945
1608	UGGAAAGCAGCCGUUUCUCCU	860	AGGAGAAACGGCUGCUUCCAGC	946
1612	AAGCAGCCGUUUCUCCUUGGU	861	ACCAAGGAGAAACGGCUGCUUUC	947
1775	CAACCGACCAGCUUGUUUGUA	862	UACAAACAAGCUGGUCGGUUGGA	948
1790	UUUGUGAAACAAAAAAGUGUU	863	AACACUUUUUUGUUUCACAAACA	949
1796	AAACAAAAAAGUGUCCCUUU	864	AAAGGGAACACUUUUUUGUUUCA	950
1798s	ACAAAAAAGUGUCCCUUUU	865	AAAAGGGAACACUUUUUUGUUU	951
1799	CAAAAAAAGUGUCCCUUUUCA	866	UGAAAAGGGAACACUUUUUUGUU	952
1810	UCCCUUUUCAAGUUGAGAACA	867	UGUUCUCAACUUGAAAAGGGAAC	953
1811	CCCUUUUCAAGUUGAGAACAA	868	UUGUUCUCAACUUGAAAAGGGA	954
1814	UUUUUCAAGUUGAGAACAAAA	869	UUUUUGUUCUCAACUUGAAAAGG	955
1815	UUUCAAGUUGAGAACAAAAAU	870	AUUUUUGUUCUCAACUUGAAAAG	956

1817	UCAAGUUGAGAACAAAAUUG	871	CAAUUUUUGUUCUACUUGAAA	957
1828	ACAAAAAUUGGGUUUUAAAAU	872	AUUUUAAAACCCAAUUUUUGUUC	958
1838s	GGUUUUAAAAUUAAGUAUA	873	UAUACUUUAAUUUUAAAACCCA	959
2018	AUAGCUGGUUAAUUCUCCCUU	874	AAGGGAGAAAUAACCAGCUAUGG	960
2020	AGCUGGUUAAUUCUCCCUUGU	875	ACAAGGGAGAAAUAACCAGCUAU	961
2025	GUUAUUUCUCCCUUGUGUUA	876	UUAACACAAGGGAGAAAUAACCA	962
2030	UUCUCCCUUGUGUUAGUAAUA	877	UAUUACUAACACAAGGGAGAAU	963
2031	UCUCCCUUGUGUUAGUAAUA	878	UUAUUACUAACACAAGGGAGAAA	964
2032	CUCCCUUGUGUUAGUAAUAAA	879	UUUAAUACUAACACAAGGGAGAA	965
2033	UCCCUUGUGUUAGUAAUAAA	880	UUUUAAUACUAACACAAGGGAGA	966
729	AGAACUGGAUGUUGCUGCUGA	881	UCAGCAGCAACAUCCAGUUCUGU	967
731	AACUGGAUGUUGCUGCUGAGA	882	UCUCAGCAGCAACAUCCAGUUCU	968
732	ACUGGAUGUUGCUGCUGAGAA	883	UUCUCAGCAGCAACAUCCAGUUC	969
734	UGGAUGUUGCUGCUGAGAAGA	884	UCUUCUCAGCAGCAACAUCCAGU	970
734s	UGGAUGUUGCUGCUGAGAAA	885	UUUCUCAGCAGCAACAUCCAGU	971
736	GAUGUUGCUGCUGAGAAGAUU	886	AAUCUUCUCAGCAGCAACAUCCA	972
743	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGU	887	ACCUGUCAAUCUUCUCAGCAGCA	973
753s	GAUUGACAGGUUCAUGCAGA	888	UCUGCAUGAACCUGUCAAUCUU	974
963	GCACUGGAGUGACAUCCAGGA	889	UCCUGGAUGUCACUCCAGUGCUG	975
966	CUGGAGUGACAUCCAGGACAA	890	UUGUCCUGGAUGUCACUCCAGUG	976
969	GAGUGACAUCCAGGACAACUU	891	AAGUUGUCCUGGAUGUCACUCCA	977
971	GUGACAUCCAGGACAACUUCU	892	AGAAGUUGUCCUGGAUGUCACUC	978
982	GACAACUUCUCGGUGACUCAA	893	UUGAGUCACCGAGAAGUUGUCCU	979
984	CAACUUCUCGGUGACUCAAGU	894	ACUUGAGUCACCGAGAAGUUGUC	980
992	CGGUGACUCAAGUGCCCUUCA	895	UGAAGGGCACUUGAGUCACCGAG	981
994	GUGACUCAAGUGCCCUUCACU	896	AGUGAAGGGCACUUGAGUCACCG	982

细胞种类：肝癌细胞系HepG2细胞。

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

3. 实验方法

实验步骤和siRNA浓度参照实施例18。

4. 实验结果

各无修饰序列对AGT mRNA表达抑制率见表59和表60。

无修饰序列1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795和1585s对HepG2细胞中AGT mRNA的表达具有显著抑制作用，抑制率均在45%以上，其中1576s、1578s、1838、1835、1812、1579和1789抑制率超过了50%。本公开无修饰序列与现有技术序列的抑制效果对比参见表80。

(1) 13条无修饰序列对AGT基因具有显著抑制作用，抑制率均超过45%，包括1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795和1585s。其中1576s、1578s、1838、1835、1812、1579和1789抑制超过了50%。

表59 对AGT基因具有显著抑制作用（抑制率高于45%）的无修饰序列

序列编号	抑制率（%）	序列编号	抑制率（%）
1576s	59.1	1836	46.5

1578s	55.2	1789	54.5
1838	50.6	1839	45.7
1835	51.6	1791	46.5
1816	46.8	1795	49.6
1812	56.8	1585s	48.9
1579	58.2		

表59中所列各无修饰序列，包括1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795和1585s对AGT mRNA的表达具有显著抑制作用，抑制率均在45%以上。其中1576s、1578s、1838、1835、1812、1579和1789抑制超过了50%（图19）。

（2）部分无修饰序列对AGT基因的抑制率均低于45%。例如，731和1011抑制率仅为1.3%和2.1%。

表60 对AGT基因抑制率低于45%的无修饰序列

序列编号	抑制率（%）	序列编号	抑制率（%）
1608	39.3	1393	38.2
1811	37.7	2030	36.3
1281	26.2	1267	36.8
1799	34.9	2033	34.9
1603	26.7	2031	36.4
1828	31.5	1815	37.1
1592	38.6	2020	32.5
1593	41.6	753s	27.8
1810	24.5	2032	17.6
1365	24.3	1602	22.3
1279	41.5	1029	18.5
734	43.0	1612	9.6
1591	37.4	2018	14.1
969	27.3	2025	7.2
994	36.6	731	1.3
984	31.6	1011	2.1
743	29.3		

表60中各序列对AGT mRNA的表达抑制作用很差，抑制率均低于45%。例如731和1011抑制率仅为1.3%和2.1%（图20）。

（3）无修饰序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如无修饰序列1812的抑制率比无修饰序列1810提高了32.3%，显著提升。

一些序列相近的 siRNA 对 AGT mRNA 的抑制作用对比见表 61。

表61 序列相近的无修饰序列对AGT基因的表达抑制率对比

相近 序列组	基础序列 号	正义链 5'-3'	无修饰序列 SEQ ID NO:	反义链 5'-3'	无修饰序列 SEQ ID NO:	抑制率 (%)
A	1608	UGGAAAGCAGC CGUUUCUCCU	860	AGGAGAAACGGCUG CUUCCAGC	946	39.3
	1612	AAGCAGCCGUU UCUCCUUGGU	861	ACCAAGGAGAAACG GCUGCUUUC	947	9.6
B	2025	GUUAUUCUCCC UUGUGUUA	876	UUAACACAAGGGAG AAUAACCA	962	7.2
	2030	UUCUCCUUGU GUUAGUAAUA	877	UAUUACUAAACAAG GGAGAAAU	963	36.3
C	731	AACUGGAUGUU GCUGCUGAGA	882	UCUCAGCAGCAACAU CCAGUUCU	968	1.3
	734	UGGAUGUUGCU GCUGAGAAGA	884	UCUUCUCAGCAGCAA CAUCCAGU	970	43.0
D	1812	CCUUUUAAGU UGAGAACAA	787	UUUGUUCUCAACUUG AAAAGGGA	800	56.8
	1810	UCCCUUUUCAAG UUGAGAACA	867	UGUUCUCAACUUGAA AAGGGAAC	953	24.5

从表 61 中可以看出，一些序列相近的 siRNA，对 AGT mRNA 的表达抑制作用差异非常大。

无修饰序列 1608 与无修饰序列 1612 相比，仅末端 4 个碱基不同。正义链：无修饰序列 76 的 5'末端为 UGGA，无修饰序列 77 的 3'末端为 UGGU，其它序列完全相同；反义链：无修饰序列 162 的 3'末端为 CAGC，无修饰序列 163 的 5'末端为 ACCA，其它序列完全相同。但是无修饰序列 1608 的抑制率比 1612 提高了 29.7%，显著提升。

无修饰序列 2025 与无修饰序列 2030 相比，仅末端 6 个碱基不同。正义链：无修饰序列 92 的 5'末端为 GUUAU、3'末端为 A，序列 93 的 3'末端为 GUAAUA，其它序列完全相同；反义链，无修饰序列 178 的 3'末端为 AACCA、5'末端为 U，无修饰序列 179 的 5'末端为 UAUUAC，其它序列完全相同。但是无修饰序列 2030 的抑制率比 2025 提高了 29.1%，显著提升。

无修饰序列 731 与无修饰序列 734 相比，仅末端 3 个碱基不同。正义链：无修饰序列 98 的 5'末端为 AAC，无修饰序列 100 的 3'末端为 AGA，其它序列完全相同；反义链：无修饰序列 184 的 3'末端为 UCU，无修饰序列 186 的 5'末端为 UCU，其它序列完全相同。但是无修饰序列 734 的抑制率比 731 提高了 41.7%，显著提升。

无修饰序列 1812 与无修饰序列 1810 相比，仅末端 2 个碱基不同。正义链：无修饰序列 3 的 3'末端为 AA，无修饰序列 83 的 5'末端为 UC，其它序列完全相同；反义链：无修饰序列 16 的 5'末端为 UU，无修饰序列 169 的 3'末端为 AC，其它序列完全相同。无修饰序列 1812 的抑制率比无修饰序列 1810 提高了 32.3%，显著提升。

因此，从针对 AGT mRNA 序列设计的非常大量的寡核苷酸序列中筛选出具有显著抑制活性的无修饰的无修饰序列并不容易，需要付出大量创造性劳动。

(4) 不同序列经过交替修饰后，对活性提高的影响并不一致。有的抑制率显著提升，例如无修饰序列 731，交替修饰比无修饰序列抑制率提高了 25.1%；有的不明显，例如无修饰序列 994、1279 和 1591，交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

表62 交替修饰序列与无修饰序列对AGT基因的抑制率比较

序列编号	无修饰序列抑制率%	交替修饰序列编号	交替修饰序列抑制率%	抑制率提升/%
731	1.3	B731-AL	26.4	25.1
734	43.0	B734-AL	39.2	-3.8
743	29.3	B743-AL	33.8	4.5
753s	27.8	B753s-AL	30.2	2.4
969	27.3	B969-AL	37.3	10.0
984	31.6	B984-AL	36.9	5.3
994	36.6	B994-AL	37.3	0.7
1011	2.1	B1011-AL	26.2	24.1
1029	18.5	B1029-AL	28.6	10.1
1267	36.8	B1267-AL	31.5	-5.3
1279	41.5	B1279-AL	41.4	-0.1
1281	26.2	B1281-AL	50.4	24.2
1365	24.3	B1365-AL	42.0	17.7
1393	38.2	B1393-AL	33.4	-4.8
1576s	59.1	B1576s-AL	64.6	5.5
1578s	55.2	B1578s-AL	63.9	8.7
1579	58.2	B1579-AL	61.1	2.9
1585s	48.9	B1585s-AL	59.3	10.4
1591	37.4	B1591-AL	37.9	0.5
1592	38.6	B1592-AL	44.4	5.8
1593	41.6	B1593-AL	42.4	0.8
1602	22.3	B1602-AL	29.0	6.7
1603	26.7	B1603-AL	48.6	21.9
1608	39.3	B1608-AL	52.5	13.2
1612	9.6	B1612-AL	28.6	19.0
1789	54.5	B1789-AL	63.5	9.0
1791	46.5	B1791-AL	61.8	15.3
1795	49.6	B1795-AL	57.5	7.9
1799	34.9	B1799-AL	49.2	14.3
1810	24.5	B1810-AL	42.1	17.6
1811	37.7	B1811-AL	51.5	13.8
1812	56.8	B1812-AL	62.9	6.1
1815	37.1	B1815-AL	30.4	-6.7
1816	46.8	B1816-AL	60.9	14.1
1828	31.5	B1828-AL	46.6	15.1
1835	51.6	B1835-AL	62.3	10.7
1836	46.5	B1836-AL	59.8	13.3
1838	50.6	B1838-AL	63.6	13.0
1839	45.7	B1839-AL	59.1	13.4
2018	14.1	B2018-AL	27.9	13.8
2020	32.5	B2020-AL	30.4	-2.1
2025	7.2	B2025-AL	26.6	19.4
2030	36.3	B2030-AL	33.0	-3.3
2031	36.4	B2031-AL	31.0	-5.4
2032	17.6	B2032-AL	30.2	12.6

2033	34.9	B2033-AL	31.5	-3.4
------	------	----------	------	------

从表62可以看出，不同序列经过交替修饰，对AGT mRNA抑制率的影响不完全一致。有的显著提升，例如无修饰序列731，交替修饰比无修饰序列抑制率提高了25.1%；有的不明显，例如无修饰序列994、1279和1591，交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

因此，不是所有的无修饰序列经过交替修饰都能使活性大幅提高，交替修饰对不同序列的活性影响并不一致。

总结：

(1) 13条无修饰序列对AGT基因具有显著抑制作用，抑制率均超过45%，包括1576s、1579、1812、1578s、1789、1835、1838、1795、1585s、1816、1791、1836和1839。其中1576s、1578s、1812、1579、1789、1835和1838抑制率超过了50%。

(2) 其它无修饰序列对AGT基因的抑制率低于45%。例如，731和1011抑制率仅为1.3%和2.1%。

(3) 序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如无修饰序列734的抑制率比无修饰序列731提高了41.7%，显著提升。

(4) 不同序列经过交替修饰后，对活性影响并不一致。有的抑制率显著提升，例如无修饰序列731，交替修饰比无修饰序列抑制率提高了25.1%；有的不明显，例如无修饰序列994、1279和1591，交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

实施例 20：采用模板修饰的序列对 AGT 基因的抑制作用

本实施例通过将实施例19中筛选出的序列，即无修饰序列1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795以及1585s，共13条序列，采用修饰模板进行修饰。其中DV25P、DV26P、DV27P、DV28P、DV29P、DV32P、DV33P、DV34P、DV25SP、DV26SP、DV27SP、DV28SP、DV29SP、DV32SP、DV33SP和DV34SP是本公开设计的新修饰模板，DV22是已公开的Advanced ESC修饰模板（Foster, D. J., et al. (2018). "Advanced siRNA Designs Further Improve In Vivo Performance of GalNAc-siRNA Conjugates." Mol Ther 26(3): 708-717.）。

自然的 5'端磷酸化或简单直接的 5'端磷酸化可能在细胞内发生去磷酸化，直接的 5'端磷酸化寡核酸链可在血液中循环 2 小时后出现 90%的去磷酸化，并在 24 小时后全部消失。5'端磷酸化设计（5'-E-VP）利用 E-乙烯基磷酸酯替代桥接氧，具有改善的磷酸化效果及稳定性。本公开修饰模板 DV25-29P、DV32-34P 反义链 5'端均含有 5'-E-VP 磷酸化设计。

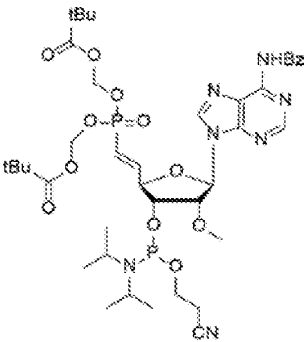
1. 实验材料

受试样品：

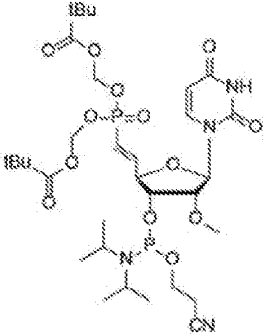
表63中所列采用不同模板（DV25P、DV26P、DV27P、DV28P、DV29P、DV30P、DV32P、DV33P、DV34P、DV22、DV25SP、DV26SP、DV27SP、DV28SP、DV29SP、DV30SP、DV32SP、DV33SP、DV34SP和DV22S）修饰的实施例19中序列1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795和1585s，以及这些序列对应的交替修饰序列B1576s-AL、B1578s-AL、B1838-AL、B1835-AL、B1816-AL、B1812-AL、B1579-AL、B1836-AL、B1789-AL、B1839-AL、B1791-AL、B1795-AL和B1585s-AL（实施例17中合成）。

序列合成：

参照实施例17合成siRNA序列，在合成反义链5'端的碱基（最后一个碱基）时采用5'端含有磷酸基团的单体，例如，乙烯基-(E)-磷酸酯-A-OMe亚磷酰胺单体（式13），乙烯基-(E)-磷酸酯-U-OMe亚磷酰胺单体（式14），其结构示例如下：



式 13



式 14

本公开修饰模板修饰原则如下：

DV22、DV25P~D29P、D32P~34P：

反义链采用表63-1所示修饰方式的一种：

表63-1 反义链修饰

序号	反义链（AS） 5'-3'											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2'-OMe+P S+EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+P S	2'-OMe+PS	2'-OMe	
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+P S	2'-OMe+PS	2'-OMe	
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe+P S	2'-OMe+PS	2'-OMe	
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2'-OMe +PS	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	

正义链采用表63-2所示修饰方式的一种：

表63-2 正义链修饰

序号	正义链 (SS) 5'-3'											
a	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F	
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe		
b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe		
c	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F	
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe		

上表中PS为硫代磷酸骨架。

反义链采用修饰方式A，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV25P。
反义链采用修饰方式B，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV26P。
反义链采用修饰方式C，正义链采用修饰方式a的siRNA修饰模板命名为DV27P。
反义链采用修饰方式B，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV28P。
反义链采用修饰方式C，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV29P。
反义链采用修饰方式D，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV32P。
反义链采用修饰方式E，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV33P。
反义链采用修饰方式F，正义链采用修饰方式b的siRNA修饰模板命名为DV34P。
反义链采用修饰方式G，正义链采用修饰方式c的siRNA修饰模板为DV22。

DV22S、DV25P~DV29SP、DV32P~DV34SP

对于正、反义链分别为20/22碱基的化合物，反义链采用表63-3所示修饰方式的一种：

表63-3 反义链修饰

序号	反义链（AS） 5'-3'										
A'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
B'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F+PS	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
C'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
D'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe

E'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe
F'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	2'-OMe +PS +EVP	2'-F +PS	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe

正义链采用表63-4所示修饰方式的一种：

表63-4 正义链修饰

序号	正义链 (SS) 5'-3'									
a'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
b'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe
c'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2'-OMe +PS	2'-OMe +PS	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-F	2'-OMe	2'-F	2'-F	2'-F
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe	2'-OMe

上表中 2'-OMe 为 2'-甲氧基；2'-F 为 2'-氟代；PS 为硫代磷酸骨架。

反义链采用修饰方式A'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV25SP。
反义链采用修饰方式B'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV26SP。
反义链采用修饰方式C'，正义链采用修饰方式a'的siRNA修饰模板命名为DV27SP。
反义链采用修饰方式B'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV28SP。
反义链采用修饰方式C'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV29SP。
反义链采用修饰方式D'，正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV32SP。

反义链采用修饰方式E', 正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV33SP。

反义链采用修饰方式F', 正义链采用修饰方式b'的siRNA修饰模板命名为DV34SP。

反义链采用修饰方式G', 正义链采用修饰方式c'的siRNA修饰模板命名为DV22S。

各模板修饰序列详见表63-5, 各序列合成方法同实施例17。

表63-5 采用不同修饰模板修饰的序列

无修饰序列号	模板修饰序列编号	正义链序列 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO./对应无修饰序列 SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO./对应无修饰序列 SEQ ID NO:
1835	C1835-DV29P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181/785	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1216/1582
	C1835-DV26P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217/1582
	C1835-DV27P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1216/1582
	C1835-DV28P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217/1582
	C1835-DV32P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181/785	UmsEVP-Afs-Cm-Um-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1218/1582
	C1835-DV34P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181/785	UmsEVP-Afs-Cf-Um-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1219/1582
	C1835-DV25P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cm-Um-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1220/1582
	C1835-DV33P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181/785	UmsEVP-Afs-Cf-Um-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1221/1582
1816	C1835-DV22	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Am-Am-Gm-Um-Am	1183/785	Ums-Afs-Cm-Um-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1222/1582
	C1816-DV29P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184/786	AmsEVP-Afs-Um-Uf-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1223/1583
	C1816-DV26P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185/786	AmsEVP-Afs-Uf-Uf-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1224/1583
	C1816-DV27P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185/786	AmsEVP-Afs-Um-Uf-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1223/1583
	C1816-DV28P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184/786	AmsEVP-Afs-Uf-Uf-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1224/1583
	C1816-DV32P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184/786	AmsEVP-Afs-Um-Um-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1225/1583

	C181 6-DV 34P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf -Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-A m-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184/786	AmsEVP-Afs-Uf-Um-Um-Uf-Um-G m-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf- Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1226/158 3
	C181 6-DV 25P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf -Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-A m-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185/786	AmsEVP-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um- Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-C f-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1227/158 3
	C181 6-DV 33P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf -Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-A m-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184/786	AmsEVP-Afs-Uf-Um-Uf-Uf-Um-G m-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf- Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1228/158 3
	C181 6-DV 22	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf -Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-A m-Am-Am-Am-Am-Um-Um	1186/786	Ams-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um-Gm- Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-U m-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1229/158 3
181 2	C181 2-DV 29P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-G m-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gf-Uf-Uf-Cm-U m-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1230/158 4
	C181 2-DV 26P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm -Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188/787	UmsEVP-Ufs-Uf-Gf-Um-Uf-Cm-U m-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1231/158 4
	C181 2-DV 27P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm -Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gf-Uf-Uf-Cm-U m-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1230/158 4
	C181 2-DV 28P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-G m-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187/787	UmsEVP-Ufs-Uf-Gf-Um-Uf-Cm-U m-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1231/158 4
	C181 2-DV 32P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-G m-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Uf-Uf-Cm-U m-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1232/158 4
	C181 2-DV 34P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-G m-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187/787	UmsEVP-Ufs-Uf-Gm-Um-Uf-Cm-U m-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1233/158 4
	C181 2-DV 25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm -Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm- Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-A f-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1234/158 4
	C181 2-DV 33P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-G m-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187/787	UmsEVP-Ufs-Uf-Gm-Uf-Uf-Cm-U m-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1235/158 4
	C181 2-DV 22	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm -Am-Am-Cm-Am-Am-Am	1189/787	Ums-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Um- Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-A m-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1236/158 4
157 9	C157 9-DV 29P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-G m-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Af-Cf-Uf-Cm-A m-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1237/158 5
	C157 9-DV 26P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm -Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191/788	UmsEVP-Cfs-Gf-Af-Cm-Uf-Cm-A m-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1238/158 5
	C157 9-DV 27P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm -Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Af-Cf-Uf-Cm-A m-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1237/158 5
	C157 9-DV 28P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-G m-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190/788	UmsEVP-Cfs-Gf-Af-Cm-Uf-Cm-A m-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1238/158 5
	C157 9-DV 32P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-G m-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cf-Uf-Cm-A m-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1239/158 5
	C157 9-DV 34P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-G m-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190/788	UmsEVP-Cfs-Gf-Am-Cm-Uf-Cm-A m-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1240/158 5

	C157 9-DV 25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm -Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm- Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-A f-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1241/158 5
	C157 9-DV 33P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-G m-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190/788	UmsEVP-Cfs-Gf-Am-Cf-Uf-Cm-A m-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af- Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1242/158 5
	C157 9-DV 22	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm -Am-Gm-Um-Cm-Gm-Am	1192/788	Ums-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm-Am- Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-A m-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1243/158 5
183 6	C183 6-DV 29P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf- -Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-A m-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193/789	AmsEVP-Ufs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-A m-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af- Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1244/158 6
	C183 6-DV 26P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf- -Um-Af-Af-Af-Am-Um-Um-A m-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1194/789	AmsEVP-Ufs-Af-Cf-Um-Uf-Um-A m-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af- Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1245/158 6
	C183 6-DV 27P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf- -Um-Af-Af-Af-Am-Um-Um-A m-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1194/789	AmsEVP-Ufs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-A m-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af- Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1244/158 6
	C183 6-DV 28P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf- -Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-A m-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193/789	AmsEVP-Ufs-Af-Cf-Um-Uf-Um-A m-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af- Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1245/158 6
	C183 6-DV 32P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf- -Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-A m-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193/789	AmsEVP-Ufs-Am-Cm-Uf-Uf-Um-A m-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af- Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1246/158 6
	C183 6-DV 34P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf- -Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-A m-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193/789	AmsEVP-Ufs-Af-Cm-Um-Uf-Um-A m-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af- Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1247/158 6
	C178 9-DV 29P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195/789	AmsEVP-Cfs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af- Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1248/158 6
	C178 9-DV 26P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/789	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af- Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249/158 6
	C178 9-DV 27P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/789	AmsEVP-Cfs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af- Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1248/158 6
	C178 9-DV 28P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195/790	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af- Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249/158 7
178 9	C178 9-DV 32P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195/790	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Uf-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af- Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1250/158 7
	C178 9-DV 34P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195/790	AmsEVP-Cfs-Af-Cm-Um-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af- Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1251/158 7
	C178 9-DV 25P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/790	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-A f-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1252/158 7
	C178 9-DV 33P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195/790	AmsEVP-Cfs-Af-Cm-Uf-Uf-Um-U m-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af- Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1253/158 7
	C178 9-DV 22	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf- -Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-A m-Am-Am-Gm-Um-Gm-Um	1197/790	Ams-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-Um- Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-C m-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1254/158 7
	C183 9-DV 29P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af- -Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-G m-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198/791	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-U m-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf- Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255/158 8

	C183 9-DV 26P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af -Am-Af-Uf-Uf-Am-Am-Am-G m-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1199/791	UmsEVP-Gfs-Uf-Af-Um-Af-Cm-U m-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf- Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1256/158 8
	C183 9-DV 27P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af -Am-Af-Uf-Uf-Am-Am-Am-G m-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1199/791	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-U m-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf- Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255/158 8
	C183 9-DV 28P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af -Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-G m-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198/791	UmsEVP-Gfs-Uf-Af-Um-Af-Cm-U m-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf- Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1256/158 8
	C183 9-DV 32P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af -Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-G m-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198/791	UmsEVP-Gfs-Um-Am-Uf-Af-Cm-U m-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf- Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1257/158 8
	C183 9-DV 34P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af -Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-G m-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198/791	UmsEVP-Gfs-Uf-Am-Um-Af-Cm-U m-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf- Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1258/158 8
179 1	C179 1-DV 29P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af -Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-A m-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200/792	UmsEVP-Afs-Am-Cf-Af-Cf-Um-U m-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf- Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1259/158 9
	C179 1-DV 26P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af -Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-A m-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1201/792	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-U m-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf- Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260/158 9
	C179 1-DV 27P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af -Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-A m-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1201/792	UmsEVP-Afs-Am-Cf-Af-Cf-Um-U m-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf- Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1259/158 9
	C179 1-DV 28P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af -Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-A m-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200/792	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-U m-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf- Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260/158 9
	C179 1-DV 32P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af -Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-A m-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200/792	UmsEVP-Afs-Am-Cm-Af-Cf-Um-U m-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf- Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1261/158 9
	C179 1-DV 34P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af -Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-A m-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200/792	UmsEVP-Afs-Af-Cm-Am-Cf-Um-U m-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf- Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1262/158 9
179 5	C179 5-DV 29P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af -Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-U m-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202/793	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Af-Am-C m-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf- Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1263/159 0
	C179 5-DV 26P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af -Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-U m-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1203/793	AmsEVP-Afs-Gf-Gf-Gm-Af-Am-C m-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf- Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1264/159 0
	C179 5-DV 27P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af -Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-U m-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1203/793	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Af-Am-C m-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf- Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1263/159 0
	C179 5-DV 28P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af -Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-U m-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202/793	AmsEVP-Afs-Gf-Gf-Gm-Af-Am-C m-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf- Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1264/159 0
	C179 5-DV 32P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af -Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-U m-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202/793	AmsEVP-Afs-Gm-Gm-Gf-Af-Am-C m-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf- Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1265/159 0
	C179 5-DV 34P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af -Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-U m-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202/793	AmsEVP-Afs-Gf-Gm-Gm-Af-Am-C m-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf- Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1266/159 0
158 5s	C158 5s-D V29S P	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am -Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-A m-Cf-Um-Um-Um-Am	1204/794	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-G m-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af- Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267/159 1

	C158 5s-D V26S P	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am -Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-A m-Cf-Um-Um-Um-Am	1205/794	UmsEVP-Afs-Af-Af-Gm-Uf-Cm-G m-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af- Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1268/159 1
	C158 5s-D V27S P	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am -Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-A m-Cf-Um-Um-Um-Am	1205/794	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-G m-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af- Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267/159 1
	C158 5s-D V28S P	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am -Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-A m-Cf-Um-Um-Um-Am	1204/794	UmsEVP-Afs-Af-Af-Gm-Uf-Cm-G m-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af- Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1268/159 1
	C158 5s-D V32S P	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am -Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-A m-Cf-Um-Um-Um-Am	1204/794	UmsEVP-Afs-Am-Am-Gf-Uf-Cm-G m-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af- Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1269/159 1
	C158 5s-D V34S P	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am -Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-A m-Cf-Um-Um-Um-Am	1204/794	UmsEVP-Afs-Af-Am-Gm-Uf-Cm-G m-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af- Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1270/159 1
	C158 5s-D V22S	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am -Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-A m-Cm-Um-Um-Um-Am	1206/794	Ums-Afs-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Gm- Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-G m-Am-Am-Gms-Ams-Am	1271/159 1
157 6s	C157 6s-D V29S P	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um- Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-A m-Af-Um-Gm-Am-Am	1207/795	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-G m-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf- Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272/159 2
	C157 6s-D V28S P	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um- Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-A m-Af-Um-Gm-Am-Am	1207/795	UmsEVP-Ufs-Cf-Af-Um-Uf-Am-G m-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf- Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1273/159 2
	C157 6s-D V26S P	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um- Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am -Af-Um-Gm-Am-Am	1208/795	UmsEVP-Ufs-Cf-Af-Um-Uf-Am-G m-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf- Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1273/159 2
	C157 6s-D V25S P	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um- Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am -Af-Um-Gm-Am-Am	1208/795	UmsEVP-Ufs-Cm-Am-Um-Uf-Am- Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-G f-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1274/159 2
	C157 6s-D V27S P	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um- Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am -Af-Um-Gm-Am-Am	1208/795	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-G m-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf- Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272/159 2
	C157 6s-D V22S	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um- Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am -Am-Um-Gm-Am-Am	1209/795	Ums-Ufs-Cm-Am-Um-Uf-Am-Gm- Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-G m-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1275/159 2
157 8s	C157 8s-D V29S P	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um- -Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-U m-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-U m-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af- Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276/159 3
	C157 8s-D V28S P	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um- -Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-U m-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210/796	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Cm-Af-Um-U m-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af- Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1277/159 3
	C157 8s-D	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um- -Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-U m-Gf-Am-Gm-Um-Am	1211/796	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Cm-Af-Um-U m-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af- Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1277/159 3

	V26S P				
	C157 8s-D V25S P	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um -Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-U m-Gf-Am-Gm-Um-Am	1211/796	UmsEVP-Afs-Cm-Um-Cm-Af-Um- Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-A f-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1278/159 3
	C157 8s-D V27S P	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um -Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-U m-Gf-Am-Gm-Um-Am	1211/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-U m-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af- Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276/159 3
	C157 8s-D V22S	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um -Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-U m-Gm-Am-Gm-Um-Am	1212/796	Ums-Afs-Cm-Um-Cm-Af-Um-Um- Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-A m-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1279/159 3
183 8	C183 8-DV 29P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af -Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-A m-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1213/797	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-U m-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af- Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1280/159 4
	C183 8-DV 28P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af -Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-A m-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1213/797	UmsEVP-Ufs-Af-Uf-Am-Cf-Um-U m-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af- Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1281/159 4
	C183 8-DV 26P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af -Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-A m-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1214/797	UmsEVP-Ufs-Af-Uf-Am-Cf-Um-U m-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af- Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1281/159 4
	C183 8-DV 25P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af -Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-A m-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1214/797	UmsEVP-Ufs-Am-Um-Am-Cf-Um- Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-A f-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1282/159 4
	C183 8-DV 27P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af -Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-A m-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1214/797	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-U m-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af- Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1280/159 4
	C183 8-DV 22	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af -Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-A m-Gm-Um-Am-Um-Am-Am	1215/797	Ums-Ufs-Am-Um-Am-Cf-Um-Um- Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-A m-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1283/159 4

细胞种类：HepG2细胞系细胞

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测受试样品对HepG2细胞系AGT基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 细胞培养

取传代培养的HepG2细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清DMEM培养液（补充青、链霉素各100 μL/mL），置于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将Lipofectamine RNAiMAX和Opti-MEM按2:98比例混合后涡旋混匀。

转染试剂配制：按照1:1（v/v）的比例取60 μL Opti-MEM稀释的siRNA溶液加入60 μL转染混合液，涡旋混匀后室温静置15 min，得到脂质纳米颗粒（LNP）。取12.5 μL用于包封率检测。

空白对照组转染试剂：在60μL Opti-MEM中加入制备好的转染混合液60 μL。涡旋混匀，室温静置15 min。

将配制好的转染试剂加入24孔细胞培养板中（每孔100 μL），使最终每孔siRNA浓度为0.02 nM。加入500 μL细胞悬液（每毫升含1.5×10⁵个细胞）。使用十字法混匀后，放入37℃，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 AGT mRNA检测

步骤同实施例18中的“2.3 AGT mRNA检测”。

2.4 数据处理

AGT mRNA表达率（%）计算公式为：
表达率 =（AGT mRNA表达量/空白对照组AGT mRNA表达量）×100%；
AGT基因表达抑制率 = 1-表达率（%）。

2.5 IC₅₀实验

本实验中各序列IC₅₀实验的siRNA浓度选择从1.0 nM起始，4倍稀释，共8个浓度点（1.0 nM、0.25 nM、0.0625 nM、15.6 pM、3.9 pM、0.977 pM、0.244 pM和0.061 pM），并对各浓度下各序列的抑制率进行测定，并绘图，计算各序列IC₅₀浓度。

3. 实验结果

经过3次重复实验，各修饰序列对HepG2细胞AGT基因的抑制率见表64-表76。

活性检测实验结果表明，13条候选序列（无修饰序列1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795和1585s）采用本公开设计的修饰模板DV25P~ DV29P，DV32P~ DV34P或DV25SP~ DV29SP，DV32SP~ DV34SP进行修饰，对AGT基因具有显著抑制作用，抑制率均在40%以上。其中C1812-DV25P、C1579-DV33P和C1789-DV26P抑制率达到了74.4%、74.0%和73.6%。

采用本公开修饰模板DV25P~DV29P，DV32P~DV34P或DV25SP~ DV29SP，DV32SP~ DV34SP修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因表达的抑制率显著提升。例如，无修饰序列1579采用模板DV33P修饰序列C1579-DV33抑制率比交替修饰序列提高了12.9%，无修饰序列1812采用模板DV25P修饰序列C1812-DV25P抑制率比交替修饰序列提高了11.5%。

并且，同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1579采用本公开修饰模板DV33P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV28P修饰序列相比，抑制率提高29.8%；与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率提高18.4%。

IC₅₀实验表明，采用本公开设计修饰模板修饰的序列，IC₅₀值在0.0019-0.0615 nM。例如C1789-DV25P、C1812-DV25P和C1789-DV26P的IC₅₀值分别为0.0019 nM、0.0022 nM和0.0026 nM。这些序列在低浓度下即可有效抑制AGT基因的表达。

(i) 各无修饰序列采用模板修饰后对AGT基因抑制作用

(1) 无修饰序列1576s

表64 无修饰序列1576s采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率（%）	对应交替修饰序列抑制率（%）	抑制率相对于交替修饰序列提高（%）
1576s	C1576s-DV26SP	73.4	64.6	8.8
	C1576s-DV28SP	58.8		-5.8
	C1576s-DV29SP	79.3		14.7
	C1576s-DV25SP	73.3		8.7
	C1576s-DV27SP	69.7		5.1
	C1576s-DV22S	63.9		-0.7

I. 本公开DV25SP~DV29SP模板

无修饰序列1576s采用本公开设计的修饰模板DV25SP、DV26SP、DV29SP修饰，对AGT基因的抑制率均超过了70%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率显著提升。例如采用模板DV25SP和DV29SP修饰后，C1576s-DV25SP和C1576s-DV29SP抑制率分别提高了8.7%和14.7%。

II. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1576s采用模板DV22S修饰后，C1576s-DV22SP对AGT基因的抑制率为63.9%，比交替修饰序列降低了0.7%。

采用本公开修饰模板DV25SP和DV29SP修饰序列，C1576s-DV25SP和C1576s-DV29SP抑制率分别比C1576s-DV22S提高了9.4%和15.4%，显著提升。

由此可知：

- 1）无修饰序列1576s采用本公开修饰模板DV25SP~DV29SP修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1576s采用DV26SP修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高8.8%。
- 2）同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1576s采用本公开修饰模板DV25SP和DV29SP修饰序列，与采用本公开修饰模板DV28SP相比，抑制率最多可提高20.5%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22S修饰序列相比，抑制率最多可提高15.4%，显著提升。
- 3）不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差20.5%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(2) 无修饰序列1578s

表65 无修饰序列1578s采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率（%）	对应交替修饰序列抑制率（%）	抑制率相对于交替修饰序列提高（%）
1578s	C1578s-DV26SP	69.7	63.9	5.8
	C1578s-DV28SP	56.9		-7.0
	C1578s-DV29SP	77.1		13.2
	C1578s-DV25SP	75.8		11.9
	C1578s-DV27SP	73.1		9.2
	C1578s-DV22S	61.1		-2.8

I. 本公开DV25SP~DV29SP模板

无修饰序列1578s采用本公开设计的修饰模板DV25SP、DV27SP、DV29SP修饰，对AGT基因的抑制率均超过了70%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率显著提升。例如采用模板DV25SP和DV29SP修饰后，C1578s-DV25SP和C1578s-DV29SP抑制率分别提高了11.9%和13.2%。

II. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1578s采用模板DV22S修饰后，C1578s-DV22S对AGT基因的抑制率为61.1%，比交替修饰序

列降低了2.8%。

采用本公开修饰模板DV25SP和DV29SP修饰序列，C1578s-DV25SP和C1578s-DV29SP抑制率分别比C1578s-DV22S提高了14.7%和16.0%，显著提升。

由此可知：

1) 无修饰序列1578s采用本公开修饰模板DV25SP~DV29SP修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1578s采用DV27SP修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高9.2%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1578s采用本公开修饰模板DV25SP和DV29SP修饰序列，与采用本公开修饰模板DV28SP相比，抑制率最多可提高20.2%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22S修饰序列相比，抑制率最多可提高16.0%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差20.2%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(3) 无修饰序列1838

表66 无修饰序列1838采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	抑制率相对于交替修饰序列提高 (%)
1838	C1838-DV26P	67.2	63.6	3.6
	C1838-DV28P	60.3		-3.3
	C1838-DV29P	75.6		12.0
	C1838-DV25P	69.3		5.7
	C1838-DV27P	72.3		8.7
	C1838-DV22	62.7		-0.9

I. 本公开DV25P~DV29P模板

无修饰序列1838采用本公开设计的修饰模板DV27P、DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了70%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率显著提升。例如采用模板DV27P和DV29P修饰后，C1838-DV27P和C1838-DV29P抑制率分别提高了8.7%和12.0%。

II. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1838采用模板DV22修饰后，C1838-DV22对AGT基因的抑制率为62.7%，比交替修饰序列降低了0.9%。

采用本公开修饰模板DV27P和DV29P修饰序列，C1838-DV27P和C1838-DV29P抑制率分别比C1838-DV22提高了9.6%和12.9%，显著提升。

由此可知：

1) 无修饰序列1838采用本公开修饰模板DV25P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1838采用DV27P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高8.7%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1838采用本公开修饰模板DV27P和DV29P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV28P相比，抑制率最多可提高15.3%，显著提

升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高12.9%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差15.3%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(4) 无修饰序列1579

表67 无修饰序列1579采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
1579	C1579-DV25P	72.2	61.1	11.1
	C1579-DV26P	70.8		9.7
	C1579-DV27P	63.3		2.2
	C1579-DV28P	44.2		-16.9
	C1579-DV29P	71.7		10.6
	C1579-DV32P	68.9		7.8
	C1579-DV33P	74.0		12.9
	C1579-DV34P	63.9		2.8
	C1579-DV22	55.6		-5.5

I. 本公开DV25P~DV29P模板

无修饰序列1579采用本公开设计的修饰模板DV25P、DV26P、DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了70%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率显著提升。例如采用模板DV25P和DV29P修饰后，C1579-DV25P和C1579-DV29P抑制率分别提高了11.1%和10.6%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1579采用模板DV32P、DV33P和DV34P修饰后，C1579-DV32P、C1579-DV33P和C1579-DV34P对AGT基因的抑制率分别为68.9%、74.0和63.9%，比对应的交替修饰序列分别提高了7.8%、12.9%和2.8%。

采用本公开修饰模板DV25P和DV29P修饰序列，C1579-DV25P和C1579-DV29P抑制率分别比C1579-DV32P提高了3.3%和2.8%，比C1579-DV33P降低了1.8%和2.3%，比C1579-DV34P提高了8.3%和7.8%。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1579采用模板DV22修饰后，C1579-DV22对AGT基因的抑制率为55.6%，比交替修饰序列降低了5.5%。

采用本公开修饰模板DV25P和DV29P修饰序列，C1579-DV25P和C1579-DV29P抑制率分别比C1579-DV22提高了16.6%和16.1%，显著提升。

由此可知：

1) 无修饰序列1579采用本公开修饰模板DV25P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1579采用DV26修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高9.7%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1579采用本公开修饰模板DV25P和DV29P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV28P相比，抑制率最多可提高28.0%，显著提

升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高16.6%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差28.0%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(5) 无修饰序列1585s

表68 无修饰序列1585s采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
1585s	C1585s-DV26SP	62.6	59.3	3.3
	C1585s-DV27SP	64.6		5.3
	C1585s-DV28SP	49.5		-9.8
	C1585s-DV29SP	59.2		-0.1
	C1585s-DV32SP	61.8		2.5
	C1585s-DV34SP	54.1		-5.2
	C1585s-DV22S	55.2		-4.1

I. 本公开DV26SP~DV29SP模板

无修饰序列1585s采用本公开设计的模板DV26SP、DV27SP、DV29SP修饰后，对AGT基因的抑制率均超过了50%，与采用2'位甲基基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率均显著提升。例如采用模板DV26SP和DV27SP修饰后，C1585s-DV26SP和C1585s-DV27SP抑制率分别提高了3.3%和5.3%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1585s采用模板DV32SP和DV34SP修饰后，C1585s-DV32SP和C1585s-DV34SP对AGT基因的抑制率分别为61.8%和54.1%，比对应的交替修饰序列分别提高2.5%和-5.2%。

采用本公开修饰模板DV26SP和DV27SP修饰序列，C1585s-DV26SP和C1585s-DV27SP抑制率分别比C1585s-DV32SP提高了0.8%和2.8%，比C1585s-DV34SP提高了8.5%和10.5%。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22S（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1585s采用模板DV22S修饰后，C1585s-DV22S对AGT基因的抑制率为55.2%，比交替修饰序列降低了4.1%。

采用本公开修饰模板DV26SP和DV27SP修饰序列，C1585s-DV26SP和C1585s-DV27SP抑制率分别比C1585s-DV22S提高了7.4%和9.4%，显著提升。

由此可知：

- 1) 无修饰序列1585s采用本公开修饰模板DV26SP~DV29SP修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1585s采用DV27SP修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高5.3%。
- 2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列51采用本公开修饰模板DV27SP修饰序列，与采用本公开修饰模板DV28SP修饰序列相比，抑制率可提高15.1%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22S修饰序列相比，抑制率最多可提高9.4%，显著提升。。
- 3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差15.1%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板

修饰能具有高活性是不确定的。

(6) 无修饰序列1789

表69 无修饰序列1789采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率（%）	对应交替修饰序列抑制率（%）	提高（%）
1789	C1789-DV25P	69.0	63.5	5.5
	C1789-DV26P	73.6		10.1
	C1789-DV27P	66.3		2.8
	C1789-DV28P	63.1		-0.4
	C1789-DV29P	64.5		1
	C1789-DV32P	61.8		-1.7
	C1789-DV33P	57.9		-5.6
	C1789-DV34P	56.9		-6.6
	C1789-DV22	60.3		-3.2

I. 采用本公开DV25P~DV29P模板修饰

无修饰序列1789采用本公开设计的模板DV25P~DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了60%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率均有提升。例如采用模板DV25P和DV26P修饰后，C1789-DV25P和C1789-DV26P抑制率分别提高了5.5%和10.1%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1789采用模板DV32P~DV34P修饰后，C1789-DV32P、C1789-DV33P和C1789-DV34P对AGT基因的抑制率分别为61.8%、57.9和56.9%，比对应的交替修饰序列分别降低了1.7%、5.6和6.6%。

采用本公开修饰模板DV25P和DV26P修饰序列，C1789-DV25P和C1789-DV26P抑制率分别比C1789-DV32P提高了7.2%和11.8%，比C1789-DV33P提高了11.1%和15.7%，比C1789-DV34P提高了12.1%和16.7%。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1789采用模板DV22修饰后，C1789-DV22对AGT基因的抑制率为60.3%，比交替修饰序列降低了3.2%。

采用本公开修饰模板DV25P和DV26P修饰序列，C1789-DV25P和C1789-DV26P抑制率分别比C1789-DV22提高了8.7%和13.3%，显著提升。

由此可知：

- 1) 无修饰序列1789采用本公开修饰模板DV25P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列81采用DV26P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高10.1%。
- 2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1789采用本公开修饰模板DV25P和DV26P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV32P~DV34P修饰序列相比，抑制率最多可提高16.7%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高13.3%，显著提升。
- 3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差16.7%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板

修饰能具有高活性是不确定的。

(7) 无修饰序列1791

表70 无修饰序列1791采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
1791	C1791-DV26P	70.3	61.8	8.5
	C1791-DV27P	63.6		1.8
	C1791-DV28P	64.6		2.8
	C1791-DV29P	59.4		-2.4
	C1791-DV32P	65.9		4.1
	C1791-DV34P	66.7		4.9

I. 本公开DV26P-29P模板

无修饰序列1791采用本公开设计的修饰模板DV26P~DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了55%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率显著提升。例如采用模板DV26P和DV28P修饰后，C1791-DV26P和C1791-DV28P抑制率分别提高了8.5%和2.8%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1791采用模板DV32P和DV34P修饰后，C1791-DV32P和C1791-DV34P对AGT基因的抑制率分别为65.9%和66.7%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比抑制率分别提高了4.1%和4.9%。

采用本公开修饰模板DV26P修饰序列，C1791-DV26P抑制率分别比C1791-DV32P提高了4.4%，比C1791-DV34P提高了3.6%。

由此可知：

1) 无修饰序列1791采用本公开修饰模板DV26P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1791采用DV26P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高8.5%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1791采用本公开修饰模板DV26P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV29P修饰序列相比，抑制率可提高10.9%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差10.9%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(8) 无修饰序列1795

表71 无修饰序列1795采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
1795	C1795-DV26P	59.3	57.5	1.8
	C1795-DV27P	63.3		5.8
	C1795-DV28P	51.9		-5.6
	C1795-DV29P	61.6		4.1
	C1795-DV32P	55.8		-1.7
	C1795-DV34P	55.0		-2.5

I. 本公开DV25-29P模板

无修饰序列1795采用本公开设计的修饰模板DV26P~DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了50%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率均有所提升。例如采用模板DV27P和DV29P修饰后，C1795-DV27P和C1795-DV29P抑制率分别提高了5.8%和4.1%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1795采用模板DV32P和DV34P修饰后，C1795-DV32P和C1795-DV34P对AGT基因的抑制率分别为55.8%和55.0%，比对应的交替修饰序列分别降低了1.7%和2.5%。

采用本公开修饰模板DV27P和DV29P修饰序列，C1795-DV27P和C1795-DV29P抑制率分别比C1795-DV32P提高了7.5%和5.8%，比C1795-DV34P提高了8.3%和6.6%。

由此可知：

- 1) 无修饰序列1795采用本公开修饰模板DV25P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列84采用DV27P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高5.8%。
- 2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1795采用本公开修饰模板DV27P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV28P修饰序列相比，抑制率可提高11.4%，显著提升。
- 3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差11.4%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(9) 无修饰序列1812

表72 无修饰序列1812采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率 (%)	对应交替修饰序列抑制率 (%)	提高 (%)
1812	C1812-DV25P	74.4	62.9	11.5
	C1812-DV26P	58.0		-4.9
	C1812-DV27P	63.9		1.0
	C1812-DV28P	55.3		-7.6
	C1812-DV29P	66.9		4.0
	C1812-DV32P	63.6		0.7
	C1812-DV33P	54.2		-8.7
	C1812-DV34P	60.7		-2.2
	C1812-DV22	63.6		0.7

I. 采用本公开DV25P-29P模板修饰

无修饰序列1812采用本公开设计的模板DV25P~DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了55%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率有所提升。例如采用模板DV25P修饰后，C1812-DV25P抑制率提高了11.5%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1812采用模板DV32P~DV34P修饰后，C1812-DV32P、C1812-DV33P和C1812-DV34P对AGT基因的抑制率分别为63.6%、54.2%和60.7%，比对应的交替修饰序列分别提高了0.7%、-8.7%和-2.2%。

采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，C1812-DV25P抑制率分别比C1812-DV32P提高了10.8%，比

C1812-DV33P提高了20.2%，比C1812-DV34P提高了13.7%，显著提升。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1812采用模板DV22修饰后，C812-DV22对AGT基因的抑制率为63.6%，比交替修饰序列提高了0.7%。

采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，C1812-DV25P抑制率比C1812-DV22提高了10.8%，显著提升。

由此可知：

1) 无修饰序列1812采用本公开修饰模板DV25P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1812采用DV25P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高11.5%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1812采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV33P修饰序列相比，抑制率可提高20.2%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高10.8%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差20.2%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

（10）无修饰序列1816

表73 无修饰序列1816采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率（%）	对应交替修饰序列抑制率（%）	提高（%）
1816	C1816-DV25P	68.1	60.9	7.2
	C1816-DV26P	58.5		-2.4
	C1816-DV27P	64.5		3.6
	C1816-DV28P	49.2		-11.7
	C1816-DV29P	68.5		7.6
	C1816-DV32P	58.6		-2.3
	C1816-DV33P	48.4		-12.5
	C1816-DV34P	38.5		-22.4
	C1816-DV22	66.7		5.8

I. 采用本公开DV25P~DV29P模板修饰

无修饰序列1816采用本公开设计的模板DV25P、DV26P、DV27P、DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了55%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率均有提升。例如采用模板DV29P修饰后，C1812-DV25P抑制率提高了7.6%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1816采用模板DV32P~DV34P修饰后，C1816-DV32P、C1816-DV33P和C1816-DV34P对AGT基因的抑制率分别为58.6%、48.4%和38.5%，比对应的交替修饰序列分别降低了2.3%、12.5%和22.4%。

采用本公开修饰模板DV29P修饰序列，C1816-DV25P抑制率分别比C1816-DV32P提高了9.9%，比C1816-DV33P提高了20.1%，比C1816-DV34P提高了30.0%，显著提升。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1816采用模板DV22修饰后，C1816-DV22对AGT基因的抑制率为66.7%，比交替修饰序列提高了5.8%。

采用本公开修饰模板DV29P修饰序列，C1816-DV29P抑制率比C1816-DV22提高了1.8%。

由此可知：

1) 无修饰序列1816采用本公开修饰模板DV25P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1816采用DV29P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高7.6%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1816采用本公开修饰模板DV29P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV34P修饰序列相比，抑制率可提高30.0%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率可提高1.8%。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差30.0%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(11) 无修饰序列1835

表74 无修饰序列1835采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率（%）	对应交替修饰序列抑制率（%）	提高（%）
1835	C1835-DV25P	68.2	62.3	5.9
	C1835-DV26P	71.8		9.5
	C1835-DV27P	51.2		-11.1
	C1835-DV28P	70.0		7.7
	C1835-DV29P	64.9		2.6
	C1835-DV32P	53.3		-9.0
	C1835-DV33P	64.9		2.6
	C1835-DV34P	71.8		9.5
	C1835-DV22	58.2		-4.1

I. 采用本公开DV25P-29P模板修饰

无修饰序列1835采用本公开设计的模板DV25P~DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了50%，除DV27P外，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率均有提升。例如采用模板DV26P修饰后，C1835-DV26P抑制率提高了9.5%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1835采用模板DV32P~DV34P修饰后，C1835-DV32P、C1835-DV33P和C1835-DV34P对AGT基因的抑制率分别为53.3%、64.9%和71.8%，比对应的交替修饰序列分别提高了-9.0%、2.6%和9.5%。

采用本公开修饰模板DV26P修饰序列，C1835-DV26P抑制率分别比C1835-DV32P提高了18.5%，比C1835-DV33P提高了10.7%，比C1835-DV34P提高了0.0%。

III. 现有技术已公开Advanced ESC模板DV22（氟代位点：反义链2、6、14和16位，正义链7、9、10和11位）

无修饰序列1835采用模板DV22修饰后，C1835-DV22对AGT基因的抑制率为58.2%，比交替修饰序列降

低了4.1%。

采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，C1835-DV26P抑制率比C1835-DV22提高了13.6%，显著提升。

由此可知：

1) 无修饰序列1835采用本公开修饰模板DV25P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1835采用DV26P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高9.5%。

2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1835采用本公开修饰模板DV26P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV27P修饰序列相比，抑制率可提高20.6%，显著提升；与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率最多可提高13.6%，显著提升。

3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差20.6%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(12) 无修饰序列1836

表75 无修饰序列1836采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率（%）	对应交替修饰序列抑制率（%）	提高（%）
1836	C1836-DV26P	63.8	59.8	4.0
	C1836-DV27P	58.9		-0.9
	C1836-DV28P	63.8		4.0
	C1836-DV29P	56.9		-2.9
	C1836-DV32P	49.2		-10.6
	C1836-DV34P	63.0		3.2

- I. 采用本公开DV26P~DV29P模板修饰
- 无修饰序列1836采用本公开设计的模板DV26PDV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了55%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率有所提升。例如采用模板DV26P、DV28P修饰后，C1836-DV26P、C1836-DV28P抑制率提高了4.0%。
- II. 本公开其它修饰模板
- 无修饰序列1836采用模板DV32P、DV34P修饰后，C1836-DV32P和C1836-DV34P对AGT基因的抑制率分别为49.2%和63.0%，比对应的交替修饰序列分别降低了2.9%和10.6%。
- 采用本公开修饰模板DV26P、DV28P修饰序列，C1836-DV26P、C1836-DV28P抑制率分别比C1836-DV32P提高了14.6%，比C1836-DV34P提高了0.8%。
- 由此可知：
- 1) 无修饰序列1836采用本公开修饰模板DV26P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1836采用DV26P、DV28P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高4.0%。
- 2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1836采用本公开修饰模板DV26P、DV28P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV32P修饰序列相比，抑制率可提高14.6%，显著提升。
- 3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差14.6%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

(13) 无修饰序列1839

表76 无修饰序列1839采用模板修饰后对AGT基因抑制率

无修饰序列号	模板修饰序列编号	模板修饰抑制率（%）	对应交替修饰序列抑制率（%）	提高（%）
1839	C1839-DV26P	48.6	59.1	-10.5
	C1839-DV27P	63.9		4.8
	C1839-DV28P	51.4		-7.7
	C1839-DV29P	64.2		5.1
	C1839-DV32P	63.7		4.6
	C1839-DV34P	55.9		-3.2

I. 采用本公开DV26P~DV29P模板修饰

无修饰序列1839采用本公开设计的模板DV26P~DV29P修饰，对AGT基因的抑制率均超过了50%，与2'位甲氧基和2'位氟代交替修饰相比，对AGT基因的抑制率有所提升。例如采用模板DV29P修饰后，C1839-DV29P抑制率提高了5.1%。

II. 本公开其它修饰模板

无修饰序列1839采用模板DV32P、DV34P修饰后，C1839-DV32P和C1839-DV34P对AGT基因的抑制率分别为63.7%和55.9%，比对应的交替修饰序列分别提高了4.6%和-3.2%。

采用本公开修饰模板DV29P修饰序列，C1839-DV29P抑制率分别比C1839-DV32P提高了0.5%，比C1839-DV34P提高了8.3%。

由此可知：

- 1) 无修饰序列1839采用本公开修饰模板DV26P~DV29P修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因抑制作用显著提升。例如，无修饰序列1839采用DV29P修饰序列，抑制率比交替修饰序列提高5.1%。
- 2) 同一siRNA序列采用不同修饰模板进行修饰后，活性差异非常大。例如，无修饰序列1839采用本公开修饰模板DV29P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV26P修饰序列相比，抑制率可提高15.6%，显著提升。
- 3) 不同模板修饰的siRNA序列活性差异巨大，最多可相差15.6%。由此可知，siRNA序列采用哪种模板修饰能具有高活性是不确定的。

总结：

- (1) 筛选出的无修饰序列1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795和1585s，采用本公开设计的修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰后，对AGT基因表达具有显著抑制作用，抑制率均在40%以上。其中C1812-DV25P、C1579-DV33P和C1789-DV26P抑制率达到了74.4%、74.0%和73.6%。
- (2) 上述12条序列采用本公开修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因表达的抑制率显著提升。例如，无修饰序列1812采用模板DV25P修饰序列C1812-DV25P抑制率比交替修饰序列提高了11.5%，无修饰序列1791采用模板DV26P修饰序列C1791-DV26P抑制率比交替修饰序列提高了8.5%。
- (3) 相同序列采用本公开修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰，与采用现有技术公开的修

饰模板相比，对AGT基因表达的抑制率显著提升。例如，无修饰序列1579采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率提高16.6%。

(4) 相同序列采用本公开修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰，与采用本公开其它修饰模板DV32P~DV34P相比，对AGT基因表达的抑制率显著提升。例如，无修饰序列1812采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV33P修饰序列相比，抑制率提高20.2%。

(5) 不同模板修饰序列活性差异巨大，例如，无修饰序列1816采用DV29P修饰，比采用DV34修饰抑制率提高了30.0%；无修饰序列1579采用DV33P修饰，比采用DV28P修饰抑制率提高了29.8%。由此可知，siRNA序列采用哪一种修饰模板进行修饰能够具有高活性是不确定的。

(ii) IC₅₀实验

挑选了一些模板修饰序列，包括C1816-DV29P、C1816-DV25P、C1812-DV25P、C1579-DV32P、C1789-DV26P、C1789-DV25P、C1839-DV29P、C1795-DV27P、C1585s-DV27SP、C1835-DV26P、C1835-DV25P、C1579-DV25P、C1836-DV26P、C1791-DV26P、C1585s-DV29SP、C1604-DV29P、C1606-DV29P、C1607-DV29P、C1835-DV29P、C1838-DV29P、C1579-DV29P、C1576s-DV29SP、C1578s-DV29SP和C1579s-DV29SP共24条序列，开展IC₅₀实验，测定各序列的IC₅₀浓度。实验结果见表77。

表77 各修饰序列IC₅₀实验结果

序列编号	序列 IC ₅₀ (pM)	序列编号	序列 IC ₅₀ (pM)
C1816-DV29P	27.925	C1836-DV26P	12.838
C1816-DV25P	3.530	C1791-DV26P	7.812
C1812-DV25P	2.160	C1585s-DV29SP	13.333
C1579-DV32P	4.712	C1604-DV29P	23.160
C1789-DV26P	2.643	C1606-DV29P	46.237
C1789-DV25P	1.884	C1607-DV29P	61.498
C1839-DV29P	3.301	C1835-DV29P	53.143
C1795-DV27P	3.570	C1838-DV29P	15.393
C1585s-DV27SP	2.863	C1579-DV29P	15.837
C1835-DV26P	14.565	C1576s-DV29SP	11.214
C1835-DV25P	14.683	C1578s-DV29SP	8.568
C1579-DV25P	10.532	C1579s-DV29SP	30.601

从表77中可以看出，这24条序列的IC₅₀值在1.884 pM至61.498 pM之间。其中C1789-DV25P、C1812-DV25P、C1789-DV26P的IC₅₀值分别为1.884 pM、2.160 pM和2.643 pM。表明在低浓度下，这些序列即可有效抑制AGT基因表达。

实施例 21：与现有技术公开序列对 AGT 基因抑制作用对比

本实施例将本申请公开的无修饰序列1579、1789、1812、1576s、1578s、1585s、1816、1835、1836、1838、1839和1791，与现有技术公开的与相近的无修饰序列，采用与本申请公开的交替修饰序列和采用

DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP模板修饰的序列，对AGT基因的抑制效率进行对比。

1. 实验材料

受试样品：

(1) 现有技术公开序列，见表78。

表78 现有技术公开序列

序列编号	正义链	序 列 ID 号	反义链	序列 ID 号	出处
579P	ACCUUUUCUUCUAAU GAGUCU	1284	AGACUCAUUAGAAGAAA AGGUGG	1297	CN117751189A
789P	UUUGUGAAACAAAA AGUGA	1285	UCACUUUUUUGUUUCACA AACA	1298	WO2024031101A1
812P	UUGUUCUCAACUUGA AAAGGGA	1286	CCUUUUCAAGUUGAGAAC AA	1299	WO2024031101A1
576P	CCACCUUUUCUUCUA AUGAGU	1287	ACUCAUUAGAAGAAAAG GUGGGA	1300	CN112313335A
578P	CACCUUUUCUUCUAA UGAGUA	1288	UACUCAUUAGAAGAAAA GGUGGG	1301	CN112313335A
585P	UUCUAAUGAGUCGAC UUUA	1289	UAAAGUCGACUCAUUAG AA	1302	CN112852809A
AD-60771	AGAACAAAAAUUGGG UUUUA	1290	UUAAAACCCAAUUUUUG UUCUCA	1303	CN112852809A
AD-85481	GUCAUCCACAAUGAG AGUACA	1291	UGUACUCUCAUUGUGGA UGACGA	1304	CN112852809A
816P	UCAAGUUGAGAACAA AAUA	1292	UAUUUUUGUUCUCAACU UGAAA	1305	WO2024031101A1
835P	GGGUUUUAAAAUUAA AGUAUA	1293	UACUUUAAUUUUAAAAC CCAA	1306	CN113862268A
836P	GGUUUUAAAAUUAAA GUAUAC	1294	AUACUUUAAUUUUAAAA CCCA	1307	CN113862268A
839P	GUUUUAAAAUUAAAG UAUACA	1295	UAUACUUUAAUUUUAAA ACCC	1308	CN113862268A
791P	UUGUGAAACAAAAAA GUGUUU	1296	ACACUUUUUUGUUUCACA AUU	1309	CN106574268B

(2) 实施例18中采用2'-OMe与2'-F交替修饰，加末端硫代修饰的siRNA序列；

(3) 采用修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰siRNA序列，具体序列见表79。

表79 采用DV25P~DV29P修饰模板修饰的各序列

无修 饰序 列号	模 板 修 饰 序 列 编 号	正义链序列 5'-3'	修 饰 序 列 SEQ ID NO./ 对 应 无 修 饰 序 列 SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	修 饰 序 列 SEQ ID NO./ 对 应 无 修 饰 序 列 SEQ ID NO:
1579	C1579- DV25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf- Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um- Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191/ 788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm- Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm- Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1241/ 801

1579	C1579-DV26P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191/788	UmsEVP-Cfs-Gf-Af-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1238/801
1579	C1579-DV27P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Af-Cf-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1237/801
1579	C1579-DV28P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190/788	UmsEVP-Cfs-Gf-Af-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1238/801
1579	C1579-DV29P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Af-Cf-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1237/801
1789	C1789-DV25P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/790	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1252/803
1789	C1789-DV26P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/789	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249/802
1789	C1789-DV27P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/789	AmsEVP-Cfs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1248/802
1789	C1789-DV28P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195/790	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249/803
1789	C1789-DV29P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195/789	AmsEVP-Cfs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1248/802
1812	C1812-DV25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1234/800
1812	C1812-DV26P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188/787	UmsEVP-Ufs-Uf-Gf-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1231/800
1812	C1812-DV27P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gf-Uf-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1230/800
1812	C1812-DV28P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187/787	UmsEVP-Ufs-Uf-Gf-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1231/800
1812	C1812-DV29P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gf-Uf-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1230/800
1576s	C1576s-DV29SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1207/795	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272/808
1576s	C1576s-DV28SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1207/795	UmsEVP-Ufs-Cf-Af-Um-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1273/808
1576s	C1576s-DV26SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1208/795	UmsEVP-Ufs-Cf-Af-Um-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1273/808
1578s	C1578s-DV29SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276/809

1578s	C1578s-DV28SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210/796	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Cm-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1277/809
1578s	C1578s-DV26SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1211/796	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Cm-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1277/809
1585s	C1585s-DV26SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Am	1205/794	UmsEVP-Afs-Af-Af-Gm-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1268/807
1585s	C1585s-DV27SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Am	1205/794	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267/807
1585s	C1585s-DV28SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Am	1204/794	UmsEVP-Afs-Af-Af-Gm-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1268/807
1585s	C1585s-DV29SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Am	1204/794	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267/807
1789	C1789-DV26P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/789	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249/802
1789	C1789-DV27P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196/789	AmsEVP-Cfs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1248/802
1816	C1816-DV25P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185/786	AmsEVP-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1227/799
1816	C1816-DV26P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185/786	AmsEVP-Afs-Uf-Uf-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1224/799
1816	C1816-DV27P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185/786	AmsEVP-Afs-Um-Uf-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1223/799
1816	C1816-DV28P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184/786	AmsEVP-Afs-Uf-Uf-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1224/799
1816	C1816-DV29P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184/786	AmsEVP-Afs-Um-Uf-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1223/799
1835	C1835-DV25P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cm-Um-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1220/798
1835	C1835-DV26P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217/798
1835	C1835-DV27P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1216/798
1835	C1835-DV28P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217/798
1835	C1835-DV29P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181/785	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1216/798

1838	C1838-DV29P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1213/797	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1280/810
1838	C1838-DV28P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1213/797	UmsEVP-Ufs-Af-Uf-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1281/810
1838	C1838-DV26P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1214/797	UmsEVP-Ufs-Af-Uf-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1281/810
1836	C1836-DV26P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Af-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1194/789	AmsEVP-Ufs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1245/802
1836	C1836-DV27P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Af-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1194/789	AmsEVP-Ufs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1244/802
1836	C1836-DV28P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193/789	AmsEVP-Ufs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1245/802
1836	C1836-DV29P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193/789	AmsEVP-Ufs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1244/802
1839	C1839-DV26P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Uf-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1199/791	UmsEVP-Gfs-Uf-Af-Um-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1256/804
1839	C1839-DV27P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Uf-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1199/791	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Uf-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255/804
1839	C1839-DV28P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198/791	UmsEVP-Gfs-Uf-Af-Um-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1256/804
1839	C1839-DV29P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198/791	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255/804
1791	C1791-DV26P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1201/792	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260/805
1791	C1791-DV27P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1201/792	UmsEVP-Afs-Am-Cf-Af-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1259/805
1791	C1791-DV28P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200/792	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260/805
1791	C1791-DV29P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200/792	UmsEVP-Afs-Am-Cf-Af-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1259/805

细胞种类: HepG2细胞, 由塞业生物科技有限公司提供(H1-1701)。

HepG2细胞在含10%胎牛血清 (FBS, ExCell Bio-FSP500)、1%青霉素-链霉素 (HyClone-SV30010) 的

DMEM培养基（ATCC-30-2003）中培养。

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测受试样品对HepG2细胞系AGT基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 细胞培养

取传代培养的HepG2细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清DMEM培养液（补充青霉素、链霉素各100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ）培养，置于37°C含5% CO_2 的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将Lipofectamine RNAiMAX和Opti-MEM按2:98比例混合后涡旋混匀。

转染试剂配制：按照1:1（v/v）的比例取60 μL Opti-MEM稀释的siRNA溶液加入60 μL 转染混合液，涡旋混匀后室温静置15 min，得到脂质纳米颗粒（LNP）。取12.5 μL 用于包封率检测。

空白对照组转染试剂：在60 μL Opti-MEM中加入制备好的转染混合液60 μL 。涡旋混匀，室温静置15 min。

将配制好的转染试剂加入24孔细胞培养板中（每孔100 μL ），使最终每孔siRNA浓度为0.02 nM。加入500 μL 细胞悬液（每毫升含 1.5×10^5 个细胞）。使用十字法混匀后，放入37°C，5% CO_2 细胞培养箱，培养40 h。

2.3 AGT mRNA检测

1) RNA抽提

步骤同实施例18中的“2.3 AGT mRNA检测”中的“1）RNA抽提”。

2) RNA浓度检测

步骤同实施例18中的“2.3 AGT mRNA检测”中的“2）RNA浓度检测”。

3) AGT mRNA定量检测

在15 mL离心管中，按 $7.5 \times 48 = 360$ 份加入除引物、模板之外的其余成分，标记为A。

标记好1.5 mL EP管，按照每管7份加入A 77 μL 和420 ng总RNA，混匀备用。

内参基因GAPDH和目的基因AGT的上下游引物混匀备用。

在PCR板上每孔分别加入B 11 μL +C 1 μL 。盖上封板膜，3000 rpm离心1 min，上机。

*本环节在冰上操作，保持低温条件。

将板放入qPCR仪，按照以下程序运行：

反转录：55°C，15 min；

预变性：95°C，30 sec；

循环反应：95°C，10 sec；60°C，35 sec；40个循环；

熔解曲线：95°C，15 sec；60°C，60 sec；95°C，15 sec。

运行时间约为2h。分析实验结果，计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

2.4 数据处理

AGT mRNA表达率（%）计算公式为：

表达率=（实验组AGT mRNA表达量/空白对照组AGT mRNA表达量） $\times 100\%$ ；

AGT基因表达抑制率=1-表达率（%）。

3. 实验结果

具体实验结果见表80。

实验结果表明，本公开中交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列，与现有技术中公开相近的无修饰序列相比，对AGT抑制活性显著提升。例如，现有技术公开序列812P与本公开序列1812相比，正义链3'端少1个碱基A；反义链5'端少1个碱基U，其他完全相同。但本公开无修饰序列1812抑制率比812P提高了14.3%，交替修饰序列抑制率为62.9%，比812P提高了20.4%，采用本公开修饰模板DV25P修饰后，抑制率达到了74.4%，比31P提高了31.9%。

（1）与现有技术公开的比较相近的无修饰序列相比，本公开无修饰序列、交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列，对AGT基因抑制率显著提升，最多可提高91.0%。

与现有技术公开的比较相近的序列相比，本公开中无修饰序列、交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列，对AGT基因抑制率显著提升。例如，无修饰序列812P的抑制率为42.5%，本公开序列相近的无修饰序列1812抑制率为56.8%，比812P提高了14.3%，交替修饰序列抑制率为62.9%，比812P提高了20.4%，采用本公开修饰模板DV25修饰后，抑制率达到了74.4%，比812P提高了31.9%。

表80 现有技术与本公开相近序列对AGT基因抑制率

现有技术公开序列		本公开无修饰序列			本公开交替修饰序列			本公开模板修饰序列		
名称	抑制率 (%)	序列编号	抑制率 (%)	比现有技术公开序列提高 (%)	序列编号	抑制率 (%)	比现有技术公开序列提高 (%)	序列编号	抑制率 (%)	比现有技术公开序列提高 (%)
579 P	47	1579	58.2	11.2	B1579-AL	61.1	14.1	C1579-DV25P	55.6	8.6
								C1579-DV26P	72.2	25.2
								C1579-DV27P	70.8	23.8
								C1579-DV28P	63.3	16.3
								C1579-DV29P	44.2	-2.8
789 P	51.9	1789	54.5	2.6	B1789-AL	63.5	11.6	C1789-DV25P	69	17.1
								C1789-DV26P	73.6	21.7
								C1789-DV27P	66.3	14.4
								C1789-DV28P	63.1	11.2
								C1789-DV29P	64.5	12.6
812 P	42.5	1812	56.8	14.3	B1812-AL	62.9	20.4	C1812-DV25P	74.4	31.9
								C1812-DV26P	58	15.5
								C1812-DV27P	63.9	21.4
								C1812-DV28P	55.3	12.8
								C1812-DV29P	66.9	24.4
576 P	38.2	1576s	59.1	20.9	B1576s-AL	64.6	26.4	C1576s-DV26SP	73.4	35.2
								C1576s-DV28SP	58.8	20.6

								C1576s-DV29SP	79.3	41.1
								C1576s-DV25SP	73.3	35.1
								C1576s-DV27SP	69.7	31.5
578 P	33.6	1578s	55.2	21.6	B1578s-AL	63.9	30.3	C1578s-DV26SP	69.7	36.1
								C1578s-DV28SP	56.9	23.3
								C1578s-DV29SP	77.1	43.5
								C1578s-DV25SP	75.8	42.2
								C1578s-DV27SP	73.1	39.5
585 P	47.33	1585s	48.9	1.57	B1585s-AL	59.3	11.97	C1585s-DV26SP	62.6	15.27
								C1585s-DV27SP	64.6	17.27
								C1585s-DV28SP	49.5	2.17
								C1585s-DV29SP	59.2	11.87
816 P	64.5	1816	46.8	-17.7	B1816-AL	60.9	-3.6	C1816-DV25P	68.1	3.6
								C1816-DV26P	58.5	-6
								C1816-DV27P	64.5	0
								C1816-DV28P	49.2	-15.3
								C1816-DV29P	68.5	4
835 P	13.9	1835	51.6	37.7	B1835-AL	62.3	48.4	C1835-DV25P	68.2	54.3
								C1835-DV26P	71.8	57.9
								C1835-DV27P	51.2	37.3
								C1835-DV28P	70	56.1
								C1835-DV29P	64.9	51
836 P	41.9	1836	46.5	4.6	B1836-AL	59.8	17.9	C1836-DV26P	63.8	21.9
								C1836-DV27P	58.9	17
								C1836-DV28P	63.8	21.9
								C1836-DV29P	56.9	15
839 P	-15.4	1839	45.7	61.1	B1839-AL	59.1	74.5	C1839-DV26P	48.6	64
								C1839-DV27P	63.9	79.3
								C1839-DV28P	51.4	66.8
								C1839-DV29P	64.2	79.6
		1838	50.6	66.0	B1838-AL	63.6	79.0	C1838-DV26P	67.2	82.6
								C1838-DV28P	60.3	75.7
								C1838-DV29P	75.6	91
								C1838-DV25P	69.3	84.7
791 P	50.8	1791	46.5	-4.3	B1791-AL	61.8	11	C1838-DV27P	72.3	87.7
								C1791-DV26P	70.3	19.5
								C1791-DV27P	63.6	12.8
								C1791-DV28P	64.6	13.8
								C1791-DV29P	59.4	8.6

I. 序列结构对比

表81中现有技术公开序列与本公开的序列非常接近，差异较小，具体对比见下表：

表81 现有技术公开序列与本申请公开序列对比

序列编号	正义链 5'-3'	SEQ ID NO:	反义链 5'-3'	SEQ ID NO:	出处
579P	<u>ACCUUUUCUUCUAAU</u> <u>GAGUCU</u>	1284	<u>AGACUCAUUAGAAGA</u> <u>AAAGGUGG</u>	1297	CN117751189A
1579	<u>CCUUUUCUUCUAAUG</u> <u>AGUCGA</u>	788	<u>UCGACUCAUUAGAAG</u> <u>AAAAGGUG</u>	801	本公开的序列
789P	<u>UUUGUGAAACAAAAA</u> <u>AGUGA</u>	1285	<u>UCACUUUUUUGUUUC</u> <u>ACAAACA</u>	1298	WO2024031101A1
1789	<u>GUUUGUGAAACAAAA</u> <u>AAGUGU</u>	790	<u>ACACUUUUUUGUUUC</u> <u>ACAAACA</u>	803	本公开的序列
812P	<u>CCUUUUCAAGUUGAG</u> <u>AACAA</u>	1286	<u>UUGUUCUCAACUUGA</u> <u>AAAGGGA</u>	1299	WO2024031101A1
1812	<u>CCUUUUCAAGUUGAG</u> <u>AACAA</u>	787	<u>UUUGUUCUCAACUUG</u> <u>AAAAGGGA</u>	800	本公开的序列
576P	<u>CCACCUUUUCUUCUA</u> <u>AUGAGU</u>	1287	<u>ACUCAUUAGAAGAAA</u> <u>AGGUGGGA</u>	1300	CN112313335A
1576s	<u>CCACCUUUUCUUCUA</u> <u>AUGAA</u>	795	<u>UUCAUUAGAAGAAAA</u> <u>GGUGGGA</u>	808	本公开的序列
578P	<u>CACCUUUUCUUCUAA</u> <u>UGAGUA</u>	1288	<u>UACUCAUUAGAAGAA</u> <u>AAGGUGGG</u>	1301	CN112313335A
1578s	<u>ACCUUUUCUUCUAAU</u> <u>GAGUA</u>	796	<u>UACUCAUUAGAAGAA</u> <u>AAGGUGG</u>	809	本公开的序列
585P	<u>UUCUAAUGAGUCGAC</u> <u>UUUA</u>	1289	<u>UAAAGUCGACUCAUU</u> <u>AGAA</u>	1302	CN112852809A
1585s	<u>CUUCUAAUGAGUCGA</u> <u>CUUUA</u>	794	<u>UAAAGUCGACUCAUU</u> <u>AGAAGAA</u>	807	本公开的序列
816P	<u>UCAAGUUGAGAACAA</u> <u>AAAU</u>	1292	<u>UAUUUUUGUUCUCAA</u> <u>CUUGAAA</u>	1305	WO2024031101A1
1816	<u>UUCAAGUUGAGAACA</u> <u>AAAAUU</u>	786	<u>AAUUUUUGUUCUCAA</u> <u>CUUGAAAA</u>	799	本公开的序列
835P	<u>GGGUUUUAAAAUUAA</u> <u>AGUAUA</u>	1293	<u>UACUUUAAUUUUAAA</u> <u>ACCCAA</u>	1306	CN113862268A
1835	<u>UUGGGUUUUAAAAUU</u> <u>AAAGUA</u>	785	<u>UACUUUAAUUUUAAA</u> <u>ACCCAAU</u>	798	本公开的序列
836P	<u>GGUUUUAAAAUUAAA</u> <u>GUUAC</u>	1294	<u>AUACUUUAAUUUUAA</u> <u>AACCCA</u>	1307	CN113862268A
1836	<u>UGGGUUUUAAAAUUA</u> <u>AAGUAU</u>	789	<u>AUACUUUAAUUUUAA</u> <u>AACCCAAU</u>	802	本公开的序列
839P	<u>GUUUUAAAAUUAAAG</u> <u>UAUACA</u>	1295	<u>UAUACUUUAAUUUUA</u> <u>AAACCC</u>	1308	CN113862268A
1839	<u>GUUUUAAAAUUAAAG</u> <u>UAUACA</u>	791	<u>UGUAUACUUUAAUUU</u> <u>UAAAACCC</u>	804	本公开的序列
1838	<u>GGUUUUAAAAUUAAA</u> <u>GUUUA</u>	797	<u>UUUAUACUUUAAUUU</u> <u>AAAACCCA</u>	810	本公开的序列
791P	<u>UUGUGAAACAAAAAA</u> <u>GUGUUU</u>	1296	<u>ACACUUUUUUGUUUC</u> <u>ACAAUU</u>	1309	CN106574268B
1791	<u>UUGUGAAACAAAAAA</u> <u>GUGUUA</u>	792	<u>UAACACUUUUUUGUU</u> <u>UCACAAAC</u>	805	本公开的序列

表81中可以看出：

现有技术公开序列579P与本公开序列1579相比，正义链5'端多1个碱基A，3'端1个碱基U不同；反义链5'

端1个碱基A不同，3'端多1个碱基G。

现有技术公开序列789P与本公开序列1789相比，正义链5'端少1个碱基G，3'端1个碱基A不同；反义链5'端1个碱基U不同，3'端少1个碱基A。

现有技术公开序列812P与本公开序列1812相比，正义链3'端少1个碱基A；反义链5'端少1个碱基U。

现有技术公开序列576P与本公开序列1576s相比，正义链3'端2个碱基GU不同；反义链5'端2个碱基AC不同。

现有技术公开序列578P与本公开序列1578s相比，正义链5'端多1个碱基C；反义链3'端多1个碱基G。

现有技术公开序列585P与本公开序列1585s相比，正义链5'端少1个碱基C；反义链3'端少3个碱基GAA。

现有技术公开序列816P与本公开序列1816相比，正义链5'端少1个碱基U；反义链5'端1个碱基U不同，3'端少1个碱基A。

现有技术公开序列835P与本公开序列1835相比，正义链5'端少2个碱基UU；反义链3'端少2个碱基UU。

现有技术公开序列836P与本公开序列1836相比，正义链5'端少2个碱基UG；反义链3'端少2个碱基AU。

现有技术公开序列839P与本公开序列1839相比，正义链完全相同；反义链5'端少2个碱基UG。与本公开序列1838相比，正义链5'端少1个碱基G，3'端2个碱基CA不同；反义链5'端少1个碱基U，3'端少1个碱基A。

现有技术公开序列791P与本公开序列1791相比，正义链3'端1个碱基U不同；反义链5'端少2个碱基UA，3'端2个碱基UU不同。

II. 活性比较

1) 本公开中无修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比，活性显著提升。例如，本公开无修饰序列1576s比结构相近的576P相比，抑制率提高了20.9%。

本公开中无修饰序列1579对AGT基因抑制率为58.2%，比现有技术公开相近的序列579P（抑制率为47%）提高了11.2%，显著提升（图21）。

本公开中无修饰序列1789对AGT基因抑制率为54.5%，比现有技术公开相近的序列789P（抑制率为51.9%）提高了2.6%。

本公开中无修饰序列1812对AGT基因抑制率为56.8%，比现有技术公开相近的序列812P（抑制率为42.5%）提高了14.3%，显著提升。

本公开中无修饰序列1576s对AGT基因抑制率为59.1%，比现有技术公开相近的序列576P（抑制率为38.2%）提高了20.9%，显著提升。

本公开中无修饰序列1578s对AGT基因抑制率为55.2%，比现有技术公开相近的序列578P（抑制率为33.6%）提高了21.6%，显著提升。

本公开中无修饰序列1585s对AGT基因抑制率为48.9%，比现有技术公开相近的序列585P（抑制率为47.33%）提高了1.57%。

本公开中无修饰序列1816对AGT基因抑制率为46.8%，比现有技术公开相近的序列816P（抑制率为64.5%）提高了-17.7%，显著提升。

本公开中无修饰序列1835对AGT基因抑制率为51.6%，比现有技术公开相近的序列835P（抑制率为13.9%）提高了37.7%，显著提升。

本公开中无修饰序列1836对AGT基因抑制率为46.5%，比现有技术公开相近的序列836P（抑制率为41.9%）提高了4.6%。

本公开中无修饰序列1839对AGT基因抑制率为45.7%，比现有技术公开相近的序列839P（抑制率为-15.4%）提高了61.1%，显著提升。

本公开中无修饰序列1838对AGT基因抑制率为50.6%，比现有技术公开相近的序列839P（抑制率为-15.4%）提高了66.0%，显著提升。

本公开中无修饰序列1791对AGT基因抑制率为46.5%，比现有技术公开相近的序列791P（抑制率为50.8%）降低了4.3%。

2) 本公开中交替修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比，活性显著提升。例如，与序列579P相比，本公开交替修饰序列B1579-AL抑制率提高了14.1%。

本公开无修饰序列1579采用交替修饰后，B1579-AL对AGT基因抑制率为61.1%，比现有技术公开无修饰序列579P提高了14.1%，显著提升。

本公开无修饰序列1789采用交替修饰后，B1789-AL对AGT基因抑制率为63.5%，比现有技术公开无修饰序列789P提高了11.6%，显著提升。

本公开无修饰序列1812采用交替修饰后，B1812-AL对AGT基因抑制率为62.9%，比现有技术公开无修饰序列812P提高了20.4%，显著提升。

本公开无修饰序列1576s采用交替修饰后，B1576s-AL对AGT基因抑制率为64.6%，比现有技术公开无修饰序列576P提高了26.4%，显著提升。

本公开无修饰序列1578s采用交替修饰后，B1578s-AL对AGT基因抑制率为63.9%，比现有技术公开无修饰序列578P提高了30.3%，显著提升。

本公开无修饰序列1585s采用交替修饰后，B1585s-AL对AGT基因抑制率为59.3%，比现有技术公开无修饰序列585P提高了11.97%，显著提升。

本公开无修饰序列1816采用交替修饰后，B1816-AL对AGT基因抑制率为60.9%，比现有技术公开无修饰序列816P降低了3.6%。

本公开无修饰序列1835采用交替修饰后，B1835-AL对AGT基因抑制率为62.3%，比现有技术公开无修饰序列835P提高了48.4%，显著提升。

本公开无修饰序列1836采用交替修饰后，B1836-AL对AGT基因抑制率为59.8%，比现有技术公开无修饰序列836P提高了17.9%，显著提升。

本公开无修饰序列1839采用交替修饰后，B1839-AL对AGT基因抑制率为59.1%，比现有技术公开无修饰序列839P提高了74.5%，显著提升。

本公开无修饰序列1838采用交替修饰后，B1838-AL对AGT基因抑制率为63.6%，比现有技术公开无修饰序列839P提高了79%，显著提升。

本公开无修饰序列1791采用交替修饰后，B1791-AL对AGT基因抑制率为61.8%，比现有技术公开无修饰序列791P提高了11%，显著提升。

3) 采用本公开修饰模板修饰的序列与现有技术公开相近无修饰序列相比，活性显著提升。例如，与序

列579P相比，本公开修饰序列C1579-DV26P抑制率提高了25.2%。

本公开无修饰序列1579采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列579P相比，抑制率可提高20%以上。例如，C1579-DV26P提高了25.2%，显著提升。

本公开无修饰序列1789采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列789P相比，抑制率可提高20%以上。例如，C1789-DV26P提高了21.7%，显著提升。

本公开无修饰序列1812采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列812P相比，抑制率可提高30%以上。例如，C1812-DV25P提高了31.9%，显著提升。

本公开无修饰序列1576s采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列576P相比，抑制率可提高40%以上。例如，C1576s-DV29SP提高了41.1%，显著提升。

本公开无修饰序列1578s采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列578P相比，抑制率可提高40%以上。例如，C1578s-DV29SP 提高了43.5%，显著提升。

本公开无修饰序列1585s采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列585P相比，抑制率可提高10%以上。例如，C1585s-DV27SP提高了17.27%，显著提升。

本公开无修饰序列1816采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列816P相比，抑制率提升不明显。

本公开无修饰序列1835采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列835P相比，抑制率可提高50%以上。例如，C1835-DV26P提高了57.9%，显著提升。

本公开无修饰序列1836采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列836P相比，抑制率可提高20%以上。例如，C1836-DV26P提高了21.9%，显著提升。

本公开无修饰序列1839采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列839P相比，抑制率可提高70%以上。例如，C1839-DV29P提高了79.6%，显著提升。

本公开无修饰序列1838采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列839P相比，抑制率可提高90%以上。例如，C1838-DV29P提高了91%，显著提升。

本公开无修饰序列1791采用修饰模板DV25P~DV29P修饰后，与现有技术公开无修饰序列791P相比，抑制率可提高10%以上。例如，C1791-DV26P提高了19.5%，显著提升。

由此可知，与现有技术相近的无修饰序列相比，本公开无修饰序列、采用本公开交替修饰和模板修饰序列，都可显著增强对AGT的抑制活性，抑制率最多可提高91%。

总结：

与现有技术公开相近的序列相比，本公开中无修饰序列、交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰序列，都对AGT基因抑制作用显著提升。例如，本公开无修饰序列1839与现有技术公开序列相近的839P相比，抑制率提高了61.1%。本公开序列1835交替修饰序列B1835-AL，与现有技术公开的与1835序列相近的无修饰序列835P相比，抑制率提高了48.4%。本公开序列1812采用本公开修饰模板DV25P修饰的序列C1812-DV25P，与现有技术公开的与1812序列相近的无修饰序列812P相比，抑制率提高了31.9%。

实施例 22：修饰序列的脱靶效果实验

siRNA 的实际应用中存在大量与导引链(反义链)仅有部分互补性的非目标 mRNA 表达被抑制的情况。

阿尔尼拉姆公司的研究表明，n-乙酰半乳糖胺（GalNAc）偶联 siRNA 的肝细胞毒性，主要归咎于脱靶效应造成的通过类似微小 RNA（miRNA）的识别机制对错误目标进行的基因抑制。

为了研究本公开的序列是否会产生脱靶效应，本实施例研究了实施例 20 中活性较高的序列在 HepG2 细胞中对潜在脱靶基因的抑制效率，并与已进入临床 II 期的药物 Zilebesiran 进行比较。对于 C1576s-DV29SP、C1578s-DV29SP、C1579-DV25P、C1789-DV25P、C1789-DV26P、C1791-DV26P、C1795-DV27P、C1812-DV25P、C1816-DV25P、C1835-DV26P、C1838-DV29P 和 C1585s-DV27SP 等 13 条序列，通过 blast 检索了序列相似度较高的潜在脱靶基因。C1585s-DV27SP 未检索到相似度较高的基因因而未进行检测。其余 12 条序列在 16 pM 至 10 nM 浓度下，对 AGT 均有明显抑制作用；除 C1578s-DV29SP、C1835-DV26P 外的序列对潜在脱靶基因的抑制效果均不显著（IC₅₀ 相差 200 倍以上）。

1. 实验材料

1) 受试样品：

实施例20中活性较高的12条序列及阳性对照序列APC-ZL（表82）。APC-ZL为不连接GalNAc递送载体的 Zilebesiran 序列。

表82 模板修饰各序列

序列编号	正义链序列5'-3'	SEQ ID NO:	反义链序列5'-3'	SEQ ID NO:
C1576s-DV29SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1207	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272
C1578s-DV29SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276
C1579-DV25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1241
C1789-DV25P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1252
C1789-DV26P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249
C1791-DV26P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1201	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260
C1795-DV27P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1203	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1263
C1812-DV25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1234
C1816-DV25P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185	AmsEVP-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1227
C1835-DV26P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217
C1838-	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-	1213	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-Um-	1280

DV29P	Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am		Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	
C1839-DV29P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255
APC-ZL	Gms-Ums-Cm-Am-Um-Cm-Cf-Am-Cf-Af-Af-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Um-Am-Cm-Am	1347	Ums-Gfs-Um-Am-Cm-Tgna-Cm-Um-Cm-Am-Um-Um-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Um-Gm-Am-Cms-Gms-Am	1371

细胞种类：HepG2细胞，由塞业生物科技有限公司提供（H1-1701）。

HepG2细胞在含10%胎牛血清（FBS，ExCell Bio-FSP500）、1%青霉素-链霉素（HyClone-SV30010）的DMEM培养基（ATCC-30-2003）中培养。

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测受试样品对HepG2细胞系AGT基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 细胞培养

取传代培养的HepG2细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清DMEM培养液（补充青、链霉素各100 μL/mL），置于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将Lipofectamine RNAiMAX和Opti-MEM按2:98比例混合后涡旋混匀。

转染试剂配制：按照1:1（v/v）的比例取60 μL Opti-MEM稀释的siRNA溶液加入60 μL转染混合液，涡旋混匀后室温静置15 min，得到脂质纳米颗粒（LNP）。取12.5 μL用于包封率检测。

空白对照组转染试剂：在60μL Opti-MEM中加入制备好的转染混合液60 μL。涡旋混匀，室温静置15 min。

将配制好的转染试剂加入24孔细胞培养板中（每孔100 μL），使最终每孔siRNA浓度为0.016 nM/ 0.08 nM/0.4 nM/2 nM/10 nM。加入500 μL细胞悬液（每毫升含1.5×10⁵个细胞）。使用十字法混匀后，放入37℃，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 RNA提取及反转录

转染24 h后，去除培养基并收集细胞用于RNA提取。根据试剂盒说明书使用RNeasy® 96 Kit（QIAGEN-74182）提取总RNA。随后根据说明书使用FastKing RT Kit（With gDNase）（TIANGEN-KR116-02）合成cDNA。

2.4 RT-qPCR

见实施例18的16.3节中mRNA定量检测部分。

2.5 数据分析

依据各样品的Ct值计算样品中的目的基因 RNA表达水平，通过ΔΔCt 相对定量法进行计算。目的基因相对表达量使用2^{-ΔΔCT}表示。

计算公式如下：

$$\Delta CT = \text{目的基因平均Ct值} - \text{内参基因平均Ct值};$$
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{加药组}) - \Delta CT (\text{RNAiMAX对照组});$$
$$\text{目的基因mRNA相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

抑制率 = (1 - 样品相对表达量 / RNAiMAX 对照平均表达量) × 100%

3. 实验结果

3.1 各序列对 AGT 基因均有明显抑制效果。例如，C1576s-DV29SP 在 10 nM 下对 AGT 的抑制效率达到了 83.8%。

各序列在不同浓度下对 AGT 的抑制效率见下表 83。各序列对 AGT 均有明显抑制效果。例如，C1576s-DV29SP 在 10 nM 下对 AGT 的抑制效率达到了 83.8%。

表83 不同浓度下序列对AGT的抑制率

序列名称	AGT 抑制率 (%)				
	10.0 nM	2.0 nM	0.4 nM	0.08 nM	0.016 nM
C1576s-DV29SP	83.8	81.3	82.4	68.9	56.1
C1578s-DV29SP	85.7	84.9	82.6	77.5	66.7
C1579-DV25P	85.0	84.9	82.7	77.9	58.3
C1789-DV25P	82.6	84.2	82.1	79.6	66.1
C1789-DV26P	79.3	82.8	81.3	78.8	64.5
C1791-DV26P	86.3	87.4	83.7	76.0	57.9
C1795-DV27P	87.4	84.1	83.1	74.2	57.8
C1812-DV25P	88.2	88.0	86.8	82.5	66.4
C1816-DV25P	84.5	83.8	80.2	73.5	56.3
C1835-DV26P	89.2	88.3	88.4	82.4	72.2
C1838-DV29P	80.0	79.3	80.8	74.1	52.4
C1839-DV29P	82.2	83.2	81.8	73.8	64.9
APC-ZL	90.7	87.4	76.5	76.4	53.9

3.2 C1578s-DV29SP 和 C1835-DV26P 存在一定的脱靶效应，其他序列脱靶效应不明显。

各序列在各浓度下对 AGT 和潜在脱靶基因的抑制效率、IC₅₀ 见下表 84。

表84 不同浓度下序列对潜在脱靶基因的抑制率及IC₅₀

序列名称	基因名称	抑制率 (%)						
		10.0 nM	2.0 nM	0.4 nM	0.08 nM	0.016 nM	IC ₅₀ /nM	比值
C1576s-DV29SP	AGT	83.8	81.3	82.4	68.9	56.1	<0.016	1.0
	DSE	-138.9	-89.7	-79.0	-7.1	-70.7	>10.0	>625.0
C1578s-DV29SP	AGT	85.7	84.9	82.6	77.5	66.7	0.004	1.0
	MIA2	-12.9	-4.3	-13.5	4.0	-3.8	>10.0	>2500.0
	CHST15	57.9	63.1	64.0	63.6	5.0	0.019	4.8
	ERRFI1	66.9	65.9	69.9	74.1	16.3	0.021	5.3
C1579-DV25P	AGT	85.0	84.9	82.7	77.9	58.3	0.011	1.0
	GLTP	42.3	17.4	-43.6	-91.0	-136.7	>10.0	>909.1
C1789-DV25P	AGT	82.6	84.2	82.1	79.6	66.1	0.008	1.0
	MRPL42	2.7	-2.0	-19.6	3.6	-16.6	>10.0	>1250.0

	NSD3	15.0	9.1	-15.4	8.5	-4.5	>10.0	>1250.0
	LUC7L	15.9	13.0	-2.2	1.8	-8.9	>10.0	>1250.0
C1789-DV26P	AGT	79.3	82.8	81.3	78.8	64.5	<0.016	1.0
	MRPL42	14.6	-7.5	-21.2	-22.6	-21.4	>10.0	>625.0
	NSD3	28.2	16.7	-7.0	-25.8	-24.4	>10.0	>625.0
	LUC7L	21.8	10.7	-0.5	-13.4	-12.8	>10.0	>625.0
C1791-DV26P	AGT	86.3	87.4	83.7	76.0	57.9	0.008	1.0
	ORC2	-58.0	-69.3	-105.6	-54.9	-4.4	>10.0	>1250.0
	RBM23	-24.7	-81.8	-97.9	-48.2	1.3	>10.0	>1250.0
	SLC2A13	2.1	-2.0	-8.7	8.0	-5.9	>10.0	>1250.0
	KANK1	21.8	25.7	1.1	20.7	-11.8	>10.0	>1250.0
	LUC7L	25.5	22.0	14.9	8.8	-13.6	>10.0	>1250.0
C1795-DV27P	AGT	87.4	84.1	83.1	74.2	57.8	0.010	1.0
	BCKDHB	16.6	-2.3	-5.8	-14.2	-7.6	>10.0	>1000.0
	ACBD5	25.7	5.5	1.4	-1.7	-1.0	>10.0	>1000.0
	MPDZ	12.0	-8.2	7.9	-10.9	1.6	>10.0	>1000.0
	TRIP11	2.7	-23.4	-30.1	-23.8	-0.7	>10.0	>1000.0
	WDPCP	14.4	6.2	-16.2	-6.2	-3.2	>10.0	>1000.0
C1812-DV25P	AGT	88.2	88.0	86.8	82.5	66.4	0.008	1.0
	ISOC1	-11.1	-15.4	-34.8	-20.6	-14.5	>10.0	>1250.0
	ATXN10	-21.9	-19.0	-30.1	-11.7	-10.3	>10.0	>1250.0
	PARP14	-58.2	-102.4	-110.3	-20.2	-24.9	>10.0	>1250.0
	SRGAP1	-53.4	-45.6	-46.1	-14.9	-3.2	>10.0	>1250.0
C1816-DV25P	AGT	84.5	83.8	80.2	73.5	56.3	0.011	1.0
	FOXN3	48.6	40.8	25.8	16.7	18.0	>10.0	>909.1
C1835-DV26P	AGT	89.2	88.3	88.4	82.4	72.2	<0.016	1.0
	MTF2	15.3	-5.6	0.2	-8.1	-1.8	12.227	764.2
	CCNA2	74.6	50.3	22.0	-9.8	4.3	1.766	110.4
	SMNDC1	-24.5	-30.7	-22.1	-30.3	-12.9	>10.0	>625.0
	ZNF107	14.1	3.3	-4.6	-19.6	0.2	>10.0	>625.0
	RFC3	43.3	18.3	5.2	-8.7	7.7	>10.0	>625.0
C1838-DV29P	AGT	80.0	79.3	80.8	74.1	52.4	<0.016	1.0
	AKAP9	-45.3	-55.3	-37.0	-9.6	-13.0	>10.0	>625.0
	DENR	19.2	-3.6	-26.3	-7.9	-31.1	>10.0	>625.0
	PGRMC1	40.9	6.1	-27.2	-13.9	-18.9	>10.0	>625.0
	ZNF626	20.3	-0.6	-5.2	-6.8	3.1	>10.0	>625.0
C1839-DV29P	AGT	82.2	83.2	81.8	73.8	64.9	<0.016	1.0
	GRB14	5.8	-11.9	-4.7	-12.4	-42.1	>10.0	>625.0
	JADE1	-38.2	-26.1	-40.0	-46.0	-43.5	>10.0	>625.0
	STAT5B	13.2	0.3	-6.5	-25.4	-0.4	>10.0	>625.0
	ABCD3	35.4	18.2	-0.8	-3.2	-0.8	>10.0	>625.0
APC-ZL	AGT	90.7	87.4	76.5	76.4	53.9	0.012	1.0
	BAP1	24.4	14.1	14.0	2.1	21.7	>10.0	>833.3
	NFAT5	2.4	-8.0	10.4	0.6	-17.5	>10.0	>833.3
	ZNF460	40.6	42.1	30.3	27.1	12.8	>10.0	>833.3

由上表可知：

(1) 部分序列对潜在脱靶基因抑制效率较低。例如 C1789-DV25P，在 10 nM 下对 MRPL42 的抑制率仅

为 2.7%，抑制效应不明显。

(2) 部分序列在高浓度下对潜在脱靶基因有一定抑制效果，但抑制潜在脱靶基因的 IC_{50} 远高于抑制 AGT 的 IC_{50} 。例如 C1579-DV25P 在 10 nM 下对 GLTP 的抑制率为 42.3%，但对 GLTP 的 IC_{50} 大于 10 nM，而对 AGT 的 IC_{50} 为 0.011 nM，比值远大于 200，可认为脱靶效应不明显。

(3) C1578s-DV29SP 在 10 nM 下对 ERFF11 的抑制率为 66.9%， IC_{50} 为 0.021 nM，该序列对 AGT 的 IC_{50} 为 0.004 nM， IC_{50} 比值仅为 5.3；C1835-DV26P 在 10 nM 下对 CCNA2 抑制率为 74.6， IC_{50} 为 1.766 nM，该序列对 AGT 的 IC_{50} 小于 0.016 nM， IC_{50} 比值的最小值为 110.4。上述 2 条序列可认为存在一定的脱靶效应，需要通过防脱靶修饰降低其对脱靶基因的抑制率。

总结：

(1) 各序列对 AGT 均有明显抑制效果。例如，C1576s-DV29SP 在 10 nM 下对 AGT 的抑制效率达到了 83.8%。

(2) C1578s-DV29SP 和 C1835-DV26P 存在一定的脱靶效应，其他序列脱靶效应不明显。

实施例 23：采用特定防脱靶设计的序列对 AGT 及脱靶基因的抑制作用

siRNA 的实际应用中存在大量与引导链(反义链)仅有部分互补性的非目标 mRNA 表达被抑制的情况。阿尔尼拉姆公司的研究表明，n-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 偶联 siRNA 的肝细胞毒性，主要归咎于脱靶效应造成的通过类似微小 RNA (miRNA) 的识别机制对错误目标进行的基因抑制。

为解决这一问题，阿尔尼拉姆公司在最新的第五代模板设计中，采用了在 siRNA 反义链的点位 7 放置一个乙二醇核酸 (GNA) 修饰以扰乱反义链的种子区域，从而显著减轻脱靶效应，缓和肝细胞毒性。此类修饰能够影响 siRNA 与非设计目标通过种子区识别的方式结合，抑制脱靶效应。

此外，在 2008 年的一项研究中，研究人员发现，将 siRNA 双链位于反义链 5' 端的 8 个碱基对全部替换为 DNA 能够显著降低 siRNA 的脱靶效应，且不会影响 siRNA 的活性。对于 mRNA 切割位点的研究表明，DNA 替换并未影响 RISC 复合体在反义链第 10 和 11 位核苷酸之间切割 mRNA，而是影响了 mRNA 在次要位点的切割，其机制可能是 DNA 替换抑制了 RNA 酶对双链 RNA 的非特异性切割。

综合以上，为了降低序列的脱靶效应，本实施例中采用 DV25~DV29P 对无修饰序列 1578s 和 1835 进行修饰，将反义链第 7 号位或第 6、7 号位核苷酸替换为 DNA，同时将正义链互补配对位置的核苷酸也替换为 DNA，以降低序列的脱靶效应，并将这两种防脱靶修饰与反义链第 7 号位替换为(S)-GNA 的防脱靶设计进行比较。

实验结果显示，在 10 nM 至 16 pM 浓度下，采用防脱靶设计的序列，对靶基因 AGT 均具有显著抑制作用，部分序列对于脱靶基因的抑制效果显著降低。表明采用防脱靶设计，不会影响本公开交替修饰和模板修饰序列对 AGT 基因的抑制效果，却能够抑制部分序列的脱靶效应。

1. 实验材料

1) 受试样品：

无修饰序列 1578s、1835 和 1838 采用模板修饰序列、采用模板修饰和防脱靶设计的序列 (表 85)。

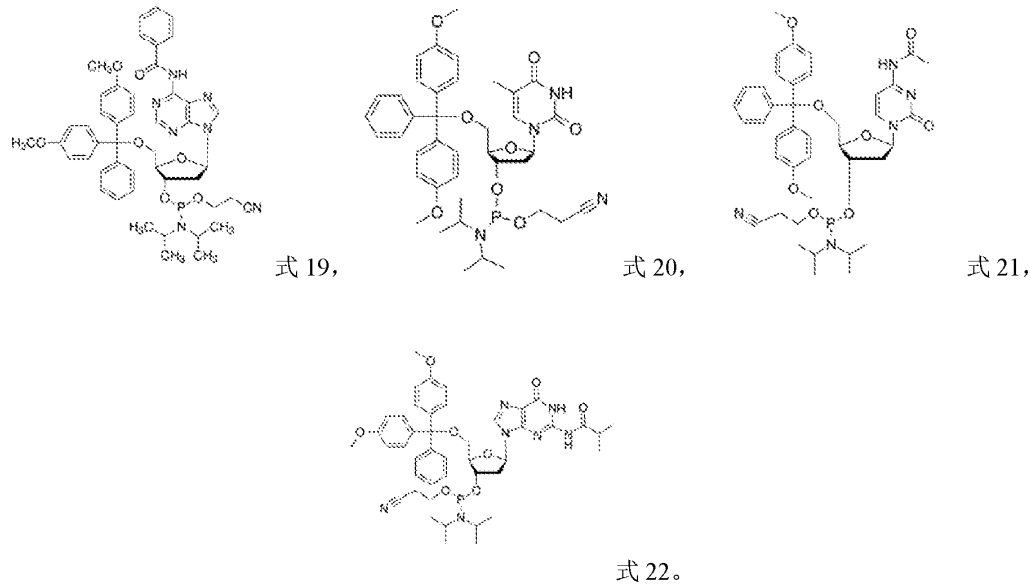
2) 序列合成：

I. 模板修饰序列

合成方法参照实施例17，交替修饰序列合成部分。

II. 含DNA防脱靶设计的siRNA序列

参照实施例17合成siRNA序列，在合成反义链5'端的第6或第7个核苷酸时使用DNA单体DMT-dA亚磷酰胺单体（式19）、DMT-dT亚磷酰胺单体（式20）、DMT-dC亚磷酰胺单体（式21）、DMT-dG亚磷酰胺单体（式22），其结构如下：



III. 含有GNA防脱靶设计的siRNA序列

参照实施例17合成siRNA序列，在合成反义链5'端起第7个碱基时采用GNA单体合成序列，GNA单体结构如下：

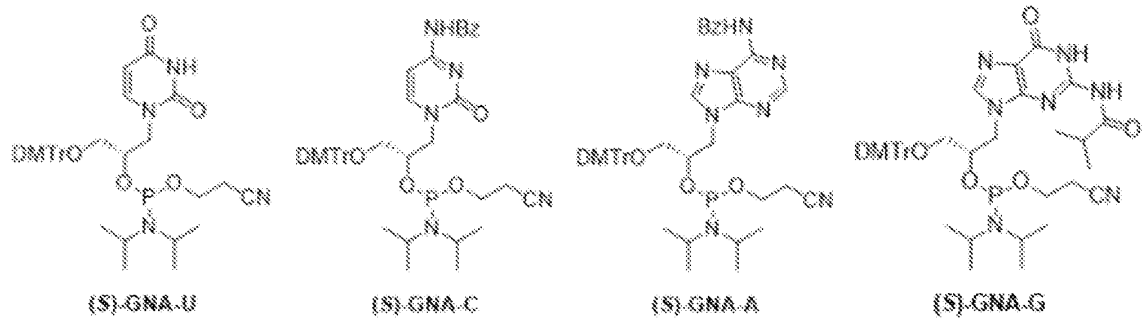


表85 模板修饰、防脱靶设计各序列

序 列 编 号	正义链 5'-3'	修 饰 序 列 SEQ ID NO:/ 对应 无 修 饰 序 列 SEQ ID NO:	反义链 5'-3'	修 饰 序 列 SEQ ID NO:/ 对应无 修 饰 序 列 SEQ ID NO:

D835-DV26P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217/798
D835-DV26P+	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Tgna-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1348/798
D835-DV26Pd7B	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Td-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1310/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Ad-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1349/798
D835-DV26Pd67B	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Td-Ad-Af-Am-Gm-Um-Am	1311/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Td-Ad-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1350/798
D578s-DV29SP+	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Agna-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1351/809
D578s-DV29SPd67B	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Td-Gf-Am-Gm-Um-Am	1312/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Ad-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1352/809
D578s-DV29SPd7B	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1313/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1353/809
D578s-DV29SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276/809

细胞种类：HepG2细胞，由塞业提供（H1-1701）。

HepG2细胞在含10%胎牛血清（FBS，ExCell Bio-FSP500）、1%青霉素-链霉素（HyClone-SV30010）的DMEM培养基（ATCC-30-2003）中培养。

药物溶媒：无菌无酶水、gibco Opti-MEM。

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测受试样品对HepG2细胞系AGT和潜在脱靶基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 细胞培养

取传代培养的HepG2细胞株，将对数生长的细胞用10%胎牛血清DMEM培养液（补充青、链霉素各100 μL/mL），置于37℃含5% CO₂的细胞培养箱中，每天换液一次。用0.25%胰酶消化传代，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入新鲜培养基传代培养。

2.2 细胞转染

转染混合液配制：将Lipofectamine RNAiMAX和Opti-MEM按2:98比例混合后涡旋混匀。

转染试剂配制：按照1:1（v/v）的比例取60 μL Opti-MEM稀释的siRNA溶液加入60 μL转染混合液，涡旋混匀后室温静置15 min，得到脂质纳米颗粒（LNP）。取12.5 μL用于包封率检测。

空白对照组转染试剂：在60 μL Opti-MEM中加入制备好的转染混合液60 μL。涡旋混匀，室温静置15 min。

将配制好的转染试剂加入24孔细胞培养板中（每孔100 μL），使最终每孔siRNA浓度为16pM/80 pM/400 pM/2 nM/10 nM。加入500 μL细胞悬液（每毫升含1.5×10⁵个细胞）。使用十字法混匀后，放入37℃，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 RNA提取及反转录

转染24 h后，去除培养基并收集细胞用于RNA提取。根据试剂盒说明书使用RNeasy® 96 Kit（QIAGEN-

74182)提取总RNA。随后根据说明书使用FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN-KR116-02)合成cDNA。

2.4 RT-qPCR

靶标cDNA通过qPCR进行检测，同时GAPDH cDNA作为内部对照进行平行检测。在384孔中加入8 μL配置好的qPCR反应液和2 μL样本cDNA。TaqMan qPCR反应程序为：95 °C加热10 min，然后进入循环模式，95 °C加热15s，随后60 °C 1 min，共40个循环。SYBR qPCR反应程序为：50 °C加热2 min，95 °C加热10 min，然后进入循环模式，95 °C加热15 sec，随后60 °C 1 min，共40个循环；最后溶解曲线在95 °C下加热15 sec，60 °C下加热1 min，95 °C 下加热15 sec。

2.5 数据分析

依据各样品的Ct值计算样品中的目的基因 RNA表达水平，通过 $\Delta\Delta Ct$ 相对定量法进行计算。目的基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

计算公式如下：

$\Delta Ct = \text{目的基因平均Ct值} - \text{内参基因平均Ct值}$ ；

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{加药组}) - \Delta Ct (\text{RNAiMAX对照组})$ ；

$\text{目的基因mRNA相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

$\text{抑制率} = (1 - \text{样品相对表达量} / \text{RNAiMAX 对照平均表达量}) \times 100\%$

3. 实验结果

(1) 不同修饰序列均对AGT基因具有显著抑制作用。例如，模板修饰序列D578s-DV29P抑制率达到了85.7%，模板修饰和防脱靶修饰序列D578s-DV29Pd7B的抑制率高达81.3%。

所有受试样品对AGT基因的抑制率见表86和图22。

D838-DV29P+以外的所有模板修饰序列在10 nM浓度下均对AGT具有显著抑制作用，例如，模板修饰序列D578s-DV29P抑制率达到了85.7%。

表86 模板修饰及采用防脱靶修饰序列对AGT基因的抑制率

无修饰序列	序列编号	修饰方式	抑制率 (%)
1578s	D578s-DV29SP	模板修饰	85.7
	D578s-DV29SP+	模板修饰和 GNA 防脱靶	78.2
	D578s-DV29SPd67B	模板修饰和 d67B 防脱靶	79.3
	D578s-DV29SPd7B	模板修饰和 d7B 防脱靶	81.3
1835	D835-DV26P	模板修饰	89.2
	D835-DV26P+	模板修饰和 GNA 防脱靶	84.4
	D835-DV26Pd67B	模板修饰和 d67B 防脱靶	85.4
	D835-DV26Pd7B	模板修饰和 d7B 防脱靶	84.6

采用模板修饰后，再进行防脱靶设计，对AGT基因表达具有显著抑制活性。例如，无修饰序列1578s采用模板DV29SP修饰再进行防脱靶设计，序列D578s-DV29SPd7B的抑制率高达81.3%。

(2) 采用本公开多种修饰方式中的任一种或多种修饰后，再进行防脱靶设计，对部分脱靶基因有显著的防脱靶效果，降低对脱靶基因的抑制作用。

如表87所示，实验结果表明：

本公开模板修饰序列，采用防脱靶设计，可降低对脱靶基因的抑制作用，即具有防脱靶效果。采用本公开修饰模板修饰序列采用防脱靶设计，具有防脱靶效果，对脱靶基因的抑制率最多可降低72.535%。

表87 模板修饰序列及其防脱靶修饰对脱靶基因的抑制率

无修饰序列号	序列编号	脱靶基因	对脱靶基因抑制率(%)	比无防脱靶设计抑制率降低(%)
1578s	D578s-DV29SP	ERRFI1	66.894	0.000
	D578s-DV29SP+		19.447	47.447
	D578s-DV29SPd67B		12.678	54.216
	D578s-DV29SPd7B		-5.641	72.535
1835	D835-DV26P	CCNA2	74.619	0.000
	D835-DV26P+		35.133	39.486
	D835-DV26Pd67B		33.215	41.404
	D835-DV26Pd7B		20.953	53.666

1) 只采用模板修饰设计

部分采用模板修饰后的序列，存在一定的脱靶效应，如无修饰序列1578s采用DV29SP修饰模板的修饰序列D578s-DV29SP，对潜在脱靶基因ERRFI1的抑制效率为66.894%；无修饰序列1835采用DV26P模板的修饰序列D835-DV26P，对潜在脱靶基因CCNA2的抑制效率为74.619%。

2) 同时采用防脱靶设计（序列编号中用“d67B”或“d7B”表示）

部分同时采用模板修饰和防脱靶修饰的序列，对脱靶基因的抑制率显著降低，具有显著防脱靶效果。例如，D578s-DV25SPd7B对ERRFI1的抑制率降低了72.535%，显著降低；D835-DV26Pd7B对CCNA2的抑制率降低了53.666%，显著降低。

总结：

1. 不同修饰序列均对AGT基因具有显著抑制作用。例如，模板修饰序列D578s-DV29SP抑制率达到了85.7%，模板修饰和防脱靶修饰序列D578s-DV29SPd7B的抑制率高达81.3%。
2. 采用本公开多种修饰方式中的任一种或多种修饰后，再进行防脱靶设计，对部分脱靶基因有显著的防脱靶效果，降低对脱靶基因的抑制作用。

1) 部分采用模板修饰后的序列，存在一定的脱靶效应，如无修饰序列1578s采用DV29SP修饰模板的修饰序列D578s-DV29SP，对潜在脱靶基因ERRFI1的抑制效率为66.894%；无修饰序列1835采用DV26P模板的修饰序列D835-DV26P，对潜在脱靶基因CCNA2的抑制效率为74.619%。

2) 本公开模板修饰序列，采用防脱靶设计，可降低对部分脱靶基因的抑制作用，即具有防脱靶效果，对脱靶基因的抑制率最多可降低72.535%。

实施例 24：采用本公开修饰模板修饰的序列对人原代肝细胞中 AGT 的抑制作用

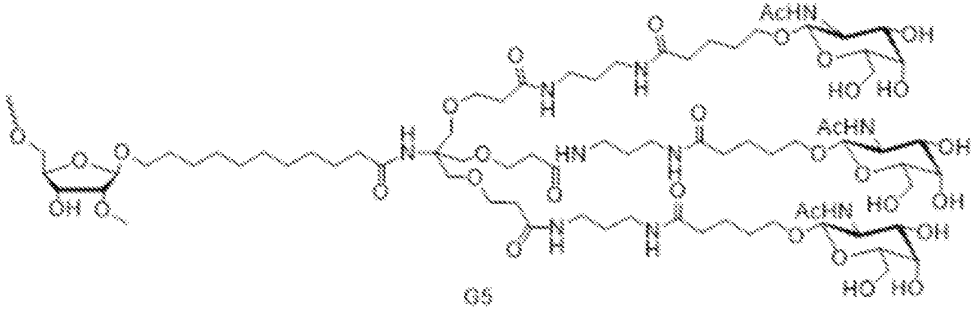
本实施例研究了实施例 20 中活性较高的序列在人原代肝细胞中对潜在脱靶基因的抑制效率，并与已进入临床 II 期的药物 Zilebesiran 进行比较。对于 C1576s-DV29SP、C1578s-DV29SP、C1579-DV25P、C1812-DV25P 和 C1585s-DV27SP5 条序列，使用各自的修饰模板或同时使用修饰模板和防脱靶修饰，并同时偶联 GalNAc 以实现肝细胞的自由摄取。在 0.0064 nM 至 100 nM 的浓度范围下，以自由摄取的方式使用表 88 中

的序列处理人原代肝细胞，拟合量效关系曲线并计算每条序列的 IC₅₀。结果显示部分序列的 IC₅₀ 优于阳参 Zilebesiran，例如 D576s-DV29SPG5 的 IC₅₀ 为 4.698 nM，优于阳参 Zilebesiran 的 7.071 nM。

1. 实验材料

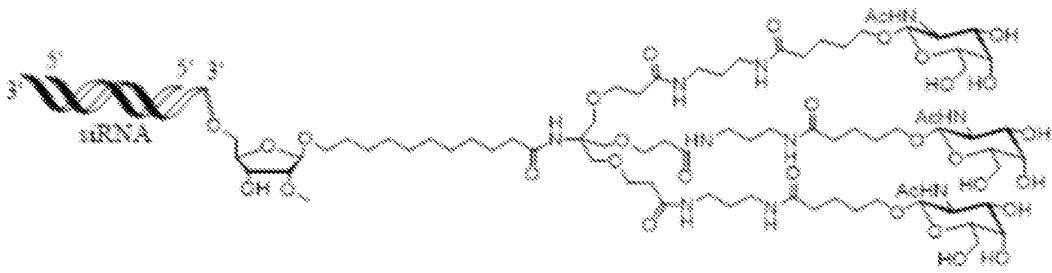
1) 受试样品:

表88中各序列为采用模板修饰序列以及同时采用模板修饰和防脱靶设计的序列，这些序列正义链3'端偶联GalNAc配体G5:



寡核苷酸与配体G5的偶联方法同中国专利CN116854754A中实施例19中缀合物4、缀合物5、缀合物6和缀合物7的制备方法，即将YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306和YK-GAL-307与寡核苷酸偶联。YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306和YK-GAL-307合成方法同CN116854754A中实施例17。

寡核苷酸与配体形成如下所示的缀合物:



各序列具体序列见表88，序列编号中G5表示序列与GalNAc配体G5偶联，GL表示序列与GalNAc配体L96偶联。

表88 模板修饰各序列

序 列 编 号	正义链5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO:/ 对应 无修饰序 列SEQ ID NO:	反义链5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO:/ 对应 无修饰序 列SEQ ID NO:
D579-DV25PG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1314/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1241/801
D579-DV25Pd7BG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gd-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1315/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cd-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1354/801

D579-DV25Pd67BG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gd-Ad-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1316/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Td-Cd-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1355/801
D812-DV25PG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am-G5	1325/787	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1234/800
D576s-DV29SPG5	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am-G5	1338/795	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272/808
D578s-DV29SPd7BG5	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am-G5	1342/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1353/809
D585s-DV27SPG5	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-G5	1344/794	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267/807
Zilebesiran	Gms-Ums-Cm-Am-Um-Cm-Cf-Am-Cf-Af-Af-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Um-Am-Cm-Am-GL	1345/1291	Ums-Gfs-Um-Am-Cm-Tgna-Cm-Um-Cm-Am-Um-Um-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Um-Gm-Am-Cms-Gms-Am	1371/1304

细胞种类：人原代肝细胞，由立沃生物科技有限公司提供（LV-PHH001）。

药物溶媒：无菌无酶水、人原代肝细胞维持培养基（LV-WEM001）。

2. 实验方法

采用qRT-PCR检测受试样品对人原代肝细胞AGT基因mRNA表达的抑制情况。

2.1 人原代肝细胞复苏及培养

培养基在37°C恒温环境预热30 min以上。向胶原包被24孔板中每孔加入300 μL PBS，摇晃数次后吸弃PBS。将细胞冻存管从液氮罐中取出，置于37°C水浴中，轻轻晃动直至管中仅残留一小部分冰晶，将细胞悬液一次性倒入复苏培养基中。吸取1 mL复苏培养基润洗冻存管内壁2~3次。将复苏培养基细胞悬液颠倒混匀。于室温以50 g离心5 min，升速设置为5，降速设置为3。使用铺板培养基将细胞稀释至3×10⁵个/mL，接种至24孔板，每孔0.5 mL，放至培养箱培养24 h。

2.2 人原代肝细胞自由摄取

使用人原代肝细胞维持培养基将受试品稀释至100–0.0064 nM。取出培养的人原代肝细胞，吸弃铺板培养基，每孔加入500 μL稀释的受试品，放回37°C，5% CO₂细胞培养箱，培养40 h。

2.3 RNA提取及反转录

转染24 h后，去除培养基并收集细胞用于RNA提取。根据试剂盒说明书使用RNeasy® 96 Kit（QIAGEN-74182）提取总RNA。随后根据说明书使用FastKing RT Kit（With gDNase）（TIANGEN-KR116-02）合成cDNA。

2.4 RT-qPCR

见实施例18的16.3节中mRNA定量检测部分。

2.5 数据分析

依据各样品的Ct值计算样品中的目的基因 RNA表达水平，通过ΔΔCt 相对定量法进行计算。目的基因相对表达量使用2-ΔΔCT表示。

计算公式如下：

$$\Delta CT = \text{目的基因平均Ct值} - \text{内参基因平均Ct值};$$
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{（加药组）} - \Delta CT \text{（RNAiMAX对照组）};$$

目的基因mRNA相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$

抑制率 = $(1 - \text{样品相对表达量} / \text{RNAiMAX 对照平均表达量}) \times 100\%$

3. 实验结果

各序列在不同浓度下对 AGT 的抑制效率见下表 89。各序列对 AGT 均有明显抑制效果。例如，D576s-DV29PG5 在 100 nM 下对 AGT 的抑制效率达到了 83.1%。此外，部分序列的 IC₅₀ 优于阳参 Zilebesiran，例如 D576s-DV29PG5 的 IC₅₀ 为 4.698 nM，优于阳参的 7.071 nM。

表89 不同浓度下序列对AGT的抑制率及IC₅₀

序列名称	AGT 抑制率 (%)							IC ₅₀ (nM)
	100 nM	20 nM	4 nM	0.8 nM	0.16 nM	0.032 nM	0.0064 nM	
Zilebesiran	65.5	57.8	42.8	22.6	9.9	5.2	14.9	7.071
D579-DV25Pd7BG5	71.7	58.8	63.2	12.7	2.1	-5.5	-6.2	1.998
D576s-DV29SPG5	83.1	66.8	46.4	-0.5	3.0	-1.2	-2.8	4.698
D576s-DV29PG5	74.4	63.3	45.4	10.9	7.8	1.4	1.1	5.659
D812-DV25PG5	61.5	43.0	17.3	-7.7	-12.5	-27.5	-13.0	30.720
D578s-DV29SPd7BG5	56.9	47.5	33.9	13.5	-3.8	-8.7	2.5	20.470
D585s-DV27SPG5	76.1	73.3	42.0	19.9	24.4	2.3	-12.2	5.719
D579-DV25PG5	72.6	60.2	32.9	12.5	-0.9	6.3	8.6	9.818

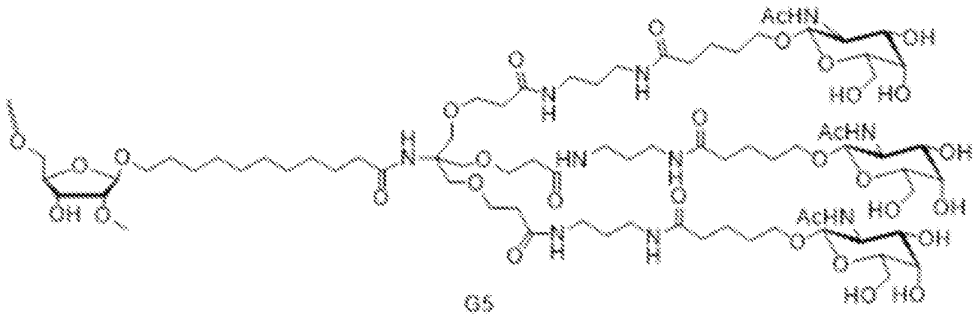
实施例 25：采用本公开修饰模板修饰的序列对小鼠血清中 AGT 的抑制作用

本实施例示例性选择一些序列，包括无修饰序列 1576s、1578s、1579、1585s、1789、1791、1795、1812、1816、1835、1838 和 1839，对这些序列进行修饰，例如只采用模板修饰、同时采用模板修饰和防脱靶设计。阳性对照药使用目前处于临床 II 期阶段的 siRNA 药物 Zilebesiran。利用表达人源 AGT 基因的转基因小鼠，通过 ELISA 手段检测上述各序列在不同时间点对血清中 AGT 的抑制作用。

1. 实验材料

受试药品：

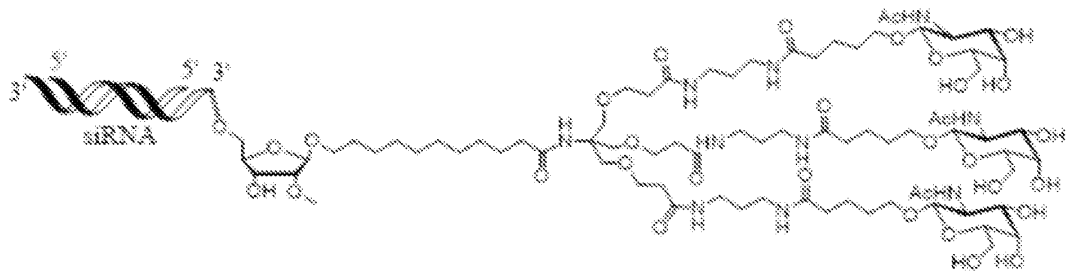
表90中各序列为采用模板修饰序列以及同时采用模板修饰和防脱靶设计的序列，这些序列正义链3'端偶联GalNAc配体G5：



寡核苷酸与配体G5的偶联方法同中国专利CN116854754A中实施例19中缀合物4、缀合物5、缀合物6和缀合物7的制备方法，即将YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306和YK-GAL-307与寡核苷酸偶联。YK-

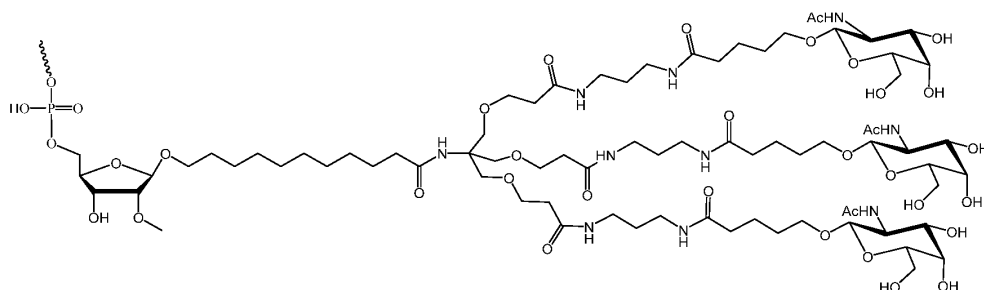
GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306和YK-GAL-307合成方法同CN116854754A中实施例17。

寡核苷酸与配体形成如下所示的缀合物：



各序列具体序列见表90，序列编号中G5表示序列与GalNAc配体G5偶联，GL表示序列与GalNAc配体L96偶联。

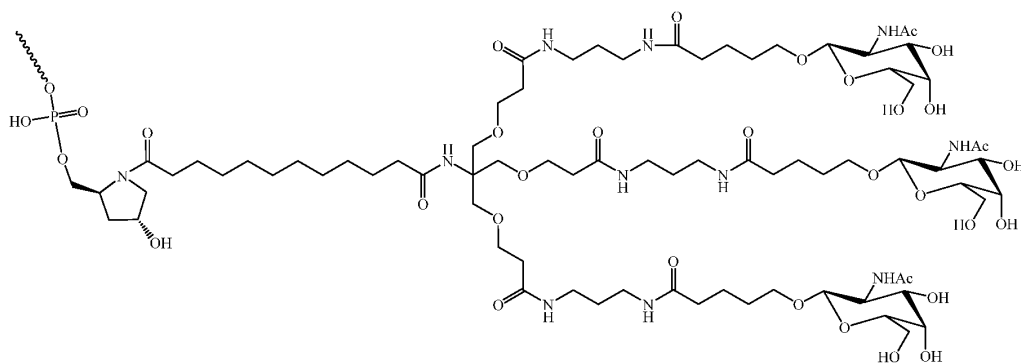
G5结构如下：



[[[(1R,2R,3R,4R)-1-[[28-[[2-(acetamino)-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl]oxy]-13,13-bis[[3-[[3-[[5-[[2-(acetamino)-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl]oxy]-1-oxopentyl]amino]propyl]amino]-3-oxopropoxy]methyl]-11,18,24-trioxo-15-oxa-12,19,23-triazaoctacosan-1-yl]oxy]-2-O-methyl-5-β-D-ribofuranosyl]hydrogen phosphate]

[[[(1R, 2R, 3R, 4R) -1-[[28-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-13,13-双[[3-[[3-[[5-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-1-氧代戊基]氨基]丙基]氨基]-3-氧代丙氧基]甲基]-11,18,24-三氧代-15-氧杂-12,19,23-三氮杂二十八烷-1-基]氧基]-2-甲氧基-5-β-D-呋喃核糖基]磷酸氢。

GL结构如下：



[[[(2S,4R)-1-[29-[[2-(acetylamino)-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl]oxy]-14,14-bis[[3-[[3-[[5-[[2-(acetylamino)-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl]oxy]-1-oxopentyl]amino]propyl]amino]-3-oxopropoxy]methyl]-1,12,19,25-tetraoxo-16-oxa-13,20,24-triazanonacos-1-yl]-4-hydroxy-2-pyrrolidinyl]methyl hydrogen phosphate]

[[[(2S,4R)-1-[29-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-14,14-双[[3-[[3-[[5-[[2-(乙酰氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基]氧基]-1-氧代戊基]氨基]丙基]氨基]-3-氧代丙氧基]甲基]-1,12,19,25-四氧代-16-氧杂-13,20,24-三氮杂二十九烷-1-基]-4-羟基-2-吡咯烷基]甲基磷酸氢]

表90 动物实验中各序列

序 列 编 号	正义链 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO:/ 对应无修饰序列 SEQ ID NO:	反义链 5'-3'	修饰序列 SEQ ID NO:/ 对应无修饰序列 SEQ ID NO:
D579-DV25PG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1314/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1241/801
D579-DV25Pd7BG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gd-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1315/788	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cd-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1354/801
D789-DV26PG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1317/790	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249/803
D789-DV25PG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1317/790	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1252/803
D789-DV26Pd7BG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Ad-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1318/790	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1356/803
D789-DV25Pd7BG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Ad-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1318/790	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1357/803
D791-DV26PG5	Ums-Ums-Gm-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am-G5	1320/792	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260/805
D791-DV26Pd7BG5	Ums-Ums-Gm-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Ad-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am-G5	1321/792	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1360/805
D795-DV27PG5	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um-G5	1323/793	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1263/806
D812-DV25PG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am-G5	1325/787	UmsEVP-Ufs-Um-Um-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1234/800
D816-DV25PG5	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um-G5	1327/786	AmsEVP-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1227/799
D835-DV26PG5	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am-G5	1329/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217/798
D835-DV26Pd7BG5	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Td-Am-Af-Am-Gm-Um-Am-G5	1330/785	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Ad-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1349/798

D838-DV29PG5	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am-G5	1332/797	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1280/810
D838-DV29Pd7BG5	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Ad-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am-G5	1333/797	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Td-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1365/810
D839-DV29PG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am-G5	1335/791	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255/804
D839-DV29Pd7BG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gd-Um-Af-Um-Am-Cm-Am-G5	1336/791	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cd-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1367/804
D576s-DV29SPG5	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am-G5	1338/795	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272/808
D576s-DV29SPd7BG5	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Td-Am-Af-Um-Gm-Am-Am-G5	1339/795	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Ad-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1369/808
D578s-DV29SPG5	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am-G5	1341/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276/809
D578s-DV29SPd7BG5	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am-G5	1342/796	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1353/809
D585s-DV27SPG5	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-G5	1344/794	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267/807
Zilebesiran	Gms-Ums-Cm-Am-Um-Cm-Cf-Am-Cf-Af-Af-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Um-Am-Cm-Am-GL	1345/1291	Ums-Gfs-Um-Am-Cm-Tgna-Cm-Um-Cm-Am-Um-Um-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Um-Gm-Am-Cms-Gms-Am	1371/1304
DNC-DV29PG5	Gms-Ums-Gm-Am-Am-Am-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Cm-Um-Cm-G5	1346/NA	UmsEVP-Afs-Gm-Af-Gf-Gf-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1372/NA

受试药品配制:

药物溶媒: 生理盐水

配制条件: 无菌环境

标识方法: 所配制的给药制剂用标签标识, 外包装注明专题编号、名称、浓度、数量、配制日期、配制者、贮存条件;

保存条件: 现用现配, 剩余样品-80℃保存。

实验动物信息:

种属/品系: hAGT转基因小鼠

等级: SPF

性别: 雄

数量: 150只

年龄: 6~8周

体重: 18~28g

来源：江苏集萃药康生物科技股份有限公司

生产许可证号：SCXK(苏)2018-0008

实验动物伦理审查 (IACUC):

实验动物接收后饲养于北京博瑞世安科技有限公司，使用许可证编号：SYXK(京)2022-0025。本项目已经通过北京博瑞世安科技有限公司实验动物伦理委员会审查，试验过程严格按照IACUC要求进行，保证动物福利。

饲养及管理:

饲养条件: 实验动物接收后饲养于北京博瑞世安科技有限公司，使用许可证编号：SYXK(京)2022-0025。饲养于饲养笼中，笼具规格为长 × 宽 × 高 = 29.0 cm × 18.5 cm × 13.0 cm；设定温度范围20 - 26℃，设定湿度范围40%~70%，换气次数不少于15次全新风/小时，12小时明12小时暗交替人工照明。

饲养环境条件标准参照中华人民共和国国家标准GB14925-2010，由组合式空调机组控制环境。

动物自由采食，自由饮水。饮水瓶和瓶中动物饮用水应每周至少更换2次，使用后饮水瓶经脉动真空灭菌器高压消毒后再次使用。

动物饲养笼具和垫料每周至少更换1次，所有动物饲养笼具和垫料均通过脉动真空灭菌器高压消毒后进入屏障环境使用；动物饲养笼架每周至少清洁、消毒擦拭1次。

动物饲养观察室每天进行清洁消毒，包括平板架、地面、桌面等。

屏障环境使用的消毒液包括：6.67%新洁尔灭溶液、0.5%84消毒液、75%消毒液、0.08%百毒杀，4种消毒液轮流使用，不可混合使用。

实验动物饲料：SPF大小鼠维持饲料：斯贝福（北京）生物技术有限公司生产，动物饲料生产许可证号为SCXK(京)2019-0010，北京市科学技术委员会签发。

饲料检测：每批饲料均有质量合格证，每季度由本公司进行一次微生物检测，每半年由饲料供应单位提供一份近期第三方饲料检测报告。饲料营养成分检测参照中华人民共和国国家标准GB14924.3-2010，污染物指标检测参照中华人民共和国国家标准GB14924.2-2001。

实验动物饮水：饮用水：过滤系统制备的无菌水，用饮水瓶直接灌装。

饮用水检测：每季度由本公司进行一次微生物检测，每年送第三方检测机构进行一次水质检测。饮用水检测参照中华人民共和国国家标准GB5749-2006。

动物垫料：玉米芯垫料：斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物垫料生产许可证号为SCXK(京)2019-0004，北京市科学技术委员会签发。

垫料检测：每季度由本公司进行一次微生物检测，每半年由垫料供应单位至少提供一份第三方垫料检测报告。垫料检测参照中华人民共和国国家标准GB14924.2-2001。

2. 实验方法

剂量设计及分组

试验日期定义：动物给药溶媒或受试药当天定义为第0天 (day 0)。

分组及给药：于试验动物适应性饲养3天后，按血清AGT蛋白含量随机分为阴性对照组、受试药组，每组6只。通过皮下单次注射给药，给药剂量为3 mg/kg，给药体积为5 mL/kg，给药浓度为0.6 mg/mL，给药当

天记为day 0。

动物标识采用耳标号进行个体标识。通过悬挂笼卡的方式对饲养笼进行识别。在实验室门口悬挂实验室标识牌。分组信息详见下表91：

表91 分组信息

组别	药物	剂量 (mg/kg)	给药方式/频率	周期(天)	动物只数
阴性对照组	溶媒	/	/	56	6
受试药组	siRNA	3	s.c./once	56	6

检测指标

(1) 一般观察

自给药前1周至试验结束，每天观察1次。

观察内容：笼旁观察动物的死亡或濒死、精神状态、行为活动、粪便性状、饲料和饮水的供应情况等。

检测动物：阴性对照组和受试药组所有动物。

(2) 血清中AGT蛋白的表达

检测时间：day -3给药前（day -3）、day 7给药1周（1 w）、day 14给药2周（2 w）、day 21给药3周（3 w）、day 28给药4周（4 w）、day 35给药5周（5 w）。

AGT蛋白水平检测方法：采用ELISA试剂盒检测；血清样品避免反复冻融。

检测动物：阴性对照组和受试药组所有动物。

(4) 数据处理与统计分析

试验数据以平均数±标准差（Mean±SD）表示，采用GraphPad Prism 8.3分析软件进行数据分析。使用双因素方差分析和事后检验进行统计学分析，方差齐性采用LSD检验，方差不齐采用Dunnett T3，P<0.05表示有统计学意义。

3. 实验结果

具体实验结果见表92。

可以看出，这些序列可以持续显著抑制血清中AGT蛋白。例如，D576s-DV29PG5在第7天、第14天和第28天抑制率分别达到了84.09%、82.11%和85.25%。

(1) 本公开的序列，例如无修饰序列1579、1789、1812、1576s、1578s和1585s采用不同修饰，对血清中AGT蛋白表达具有显著抑制作用。例如，D576s-DV29SPG5在第7天、第14天和第21天抑制率分别达到了84.09%、82.11%和85.25%（图23）。

表92 不同序列对血清中AGT蛋白抑制率

无修饰 序列号	序列编号	抑制率（%）							
		第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天	第 56 天
	生理盐水	-12.05	-4.17	-14.50	-17.18	-6.21	-5.65	-13.98	-8.02
	DNC-DV29PG5	4.14	-17.92	9.78	3.04				
	Zilebesiran	72.52	67.96	74.49	70.53	57.13	55.50	40.41	29.90
1576s	D576s-DV29SPd7BG5	75.91	61.16	54.05	32.94				
1576s	D576s-DV29SPG5	84.09	82.11	85.25	84.61	83.67	82.63	76.08	74.43

1578s	D578s-DV29SPd7BG5	81.76	80.52	83.37	80.74	75.71	75.38	67.58	59.76
1578s	D578s-DV29SPG5	84.16	81.73	85.02	83.70				
1579	D579-DV25PG5	80.18	82.30	80.62	78.42	78.42	79.22	74.17	70.95
1579	D579-DV25Pd7BG5	82.45	83.37	81.28	80.19	76.74	76.95	69.05	64.51
1585s	D585s-DV27SPG5	80.37	76.55	77.88	75.02	65.47	60.63	41.16	29.04
1789	D789-DV25Pd7BG5	63.75	64.84	51.52	40.12				
1789	D789-DV26Pd7BG5	72.49	70.00	55.31	42.63				
1789	D789-DV25PG5	69.90	73.61	69.45	61.94				
1789	D789-DV26PG5	74.52	77.51	72.40	68.56	63.15	60.50	47.62	37.35
1791	D791-DV26Pd7BG5	74.54	70.80	62.16	49.77				
1791	D791-DV26PG5	73.28	73.36	66.01	59.54				
1795	D795-DV27PG5	60.21	60.31	62.70	55.58				
1812	D812-DV25PG5	81.87	81.67	82.22	82.83	81.77	81.17	76.58	72.98
1816	D816-DV25PG5	73.58	72.79	63.17	60.38				
1835	D835-DV26Pd7BG5	52.91	35.34	18.61	25.60				
1835	D835-DV26PG5	65.38	63.25	59.95	59.09				
1838	D838-DV29Pd7BG5	69.83	64.03	59.38	56.69				
1838	D838-DV29PG5	69.85	73.02	73.01	70.69				
1839	D839-DV29PG5	67.89	62.97	65.43	63.36				
1839	D839-DV29Pd7BG5	75.62	72.52	73.96	67.02				

从表92中可以看出，各序列与GalNAc化合物缀合所形成的缀合物对血清中AGT蛋白表达具有显著抑制作用。例如，D576s-DV29SPG5在第7天、第14天和第21天抑制率分别达到了84.09%、82.11%和85.25%（图24）。

表明本公开设计的无修饰序列，例如1579、1789、1812、1576s、1578s和1585s，采用本公开的模板修饰，或同时再采用防脱靶设计，与GalNAc化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并显著抑制AGT基因表达。

总结：

本公开设计的无修饰序列，例如1579、1789、1812、1576s、1578s和1585s，采用本公开的模板修饰，或同时再采用防脱靶设计，与GalNAc化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并可持续显著抑制血清中AGT蛋白表达。

例如，D576s-DV29SPG5在第7天、第14天和第28天抑制率分别达到了84.09%、82.11%和85.25%。

结论：

本公开基于AGT mRNA序列设计了一系列siRNA，对其进行交替修饰和利用一组特定的修饰模板进行修饰，并对其中一些序列进行防脱靶设计。结果表明：

（1）13条无修饰序列对AGT基因具有显著抑制作用，抑制率均超过45%，包括1576s、1579、1812、1578s、1789、1835、1838、1795、1585s、1816、1791、1836和1839。

（2）采用多重修饰序列，抑制率最高可达70%以上。并且，修饰序列与GalNAc化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并显著抑制AGT基因表达。

具体如下：

1. 本公开交替修饰序列对AGT基因具有显著抑制作用

（1）设计的99条序列中，有33条序列对AGT基因具有显著抑制作用，抑制率均超过40%。其中10条的

抑制率超过了60%。

(2) 23条序列对AGT基因的抑制率在25%-40%。例如，B734-AL和B994-AL的抑制率分别为39.2%和37.3%。

(3) 43条序列对AGT基因的抑制率在25%以下。例如，B1017-AL的抑制率仅为23.1%。

(4) 序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如B1365-AL的抑制率比B1367-AL提高了40.4%，显著提升，而两者仅末端2个碱基不同；B1816-AL的抑制率比B1815-AL提高了30.5%，显著提升，而两者仅末端1个碱基不同。因此，从针对AGT mRNA序列设计的非常大量的寡核苷酸序列中筛选出具有显著抑制活性的序列并不容易，需要付出大量创造性劳动。

2. 本公开无修饰序列对AGT基因具有显著抑制作用

(1) 13条无修饰序列对AGT基因具有显著抑制作用，抑制率均超过45%，包括1576s、1579、1812、1578s、1789、1835、1838、1795、1585s、1816、1791、1836和1839。其中1576s、1578s、1812、1579、1789、1835和1838抑制超过了50%。

(2) 其它无修饰序列对AGT基因的抑制率低于45%。例如，731和1011抑制率仅为1.3%和2.1%。

(3) 序列相近的siRNA，活性差异非常大。例如无修饰序列734的抑制率比无修饰序列731提高了41.7%，显著提升。

(4) 不同序列经过交替修饰后，对活性影响并不一致。有的抑制率显著提升，例如无修饰序列731，交替修饰比无修饰序列抑制率提高了25.1%；有的不明显，例如无修饰序列994、1279和1591，交替修饰序列和无修饰序列抑制率基本无变化。

3. 采用本公开修饰模板修饰的序列对AGT基因具有显著抑制作用

(1) 筛选出的无修饰序列1576s、1578s、1838、1835、1816、1812、1579、1836、1789、1839、1791、1795和1585s，采用本公开设计的修饰模板DV25P-29P或DV25SP-29SP修饰后，对AGT基因表达具有显著抑制作用，抑制率均在40%以上。其中C1812-DV25P、C1579-DV33P和C1789-DV26P抑制率达到了74.4%、74.0%和73.6%。

(2) 上述12条序列采用本公开修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰序列，与交替修饰序列相比，对AGT基因表达的抑制率显著提升。例如，无修饰序列1812采用模板DV25P修饰序列C1812-DV25P抑制率比交替修饰序列提高了11.5%，无修饰序列1791采用模板DV26P修饰序列C1791-DV26P抑制率比交替修饰序列提高了8.5%。

(3) 相同序列采用本公开修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰，与采用现有技术公开的修饰模板相比，对AGT基因表达的抑制率显著提升。例如，无修饰序列1579采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，与采用已公开Advanced ESC模板DV22修饰序列相比，抑制率提高16.6%。

(4) 相同序列采用本公开修饰模板DV25P~DV29P或DV25SP~DV29SP修饰，与采用本公开其它修饰模板DV32P~DV34P或DV32SP~DV34SP相比，对AGT基因表达的抑制率显著提升。例如，无修饰序列1812采用本公开修饰模板DV25P修饰序列，与采用本公开修饰模板DV33P修饰序列相比，抑制率提高20.2%。

(5) 不同模板修饰序列活性差异巨大，例如，无修饰序列1816采用DV29P修饰，比采用DV34修饰抑制率提高了30.0%；无修饰序列1579采用DV33P修饰，比采用DV28P修饰抑制率提高了29.8%。由此可知，siRNA

序列采用哪一种修饰模板进行修饰能够具有高活性是不确定的。

(6) 上述24条序列的IC₅₀值在1.884 pM至61.498 pM之间。其中C1789-DV25P、C1812-DV25P、C1789-DV26P的IC₅₀值分别为1.884 pM、2.160 pM和2.643 pM。表明在低浓度下，这些序列即可有效抑制AGT基因表达。

4. 本采用交替修饰和本修饰模板修饰的各序列，同现有技术公开的序列差异很小的无修饰序列相比，对AGT抑制活性显著提升。

与现有技术公开的仅有很小差异的无修饰序列相比，本公开无修饰序列、交替修饰序列和采用特定修饰模板修饰的序列，对AGT基因抑制率显著提升，最多可提高91%。

I. 本公开中无修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比，活性显著提升。例如，本公开无修饰序列1835比结构相近的835P相比，抑制率提高了37.7%。

II. 本公开中交替修饰序列与现有技术公开相近无修饰序列相比，活性显著提升。例如，与序列812P相比，本公开交替修饰序列B1812-AL抑制率提高了20.4%。

III. 采用本公开修饰模板修饰的序列与现有技术公开相近无修饰序列相比，活性显著提升。例如，与序列576P相比，本公开交替修饰序列C1576s-DV29SP抑制率提高了41.1%。

5. 本公开交替修饰序列和模板修饰序列，采用特定防脱靶设计，对 AGT 基因具有显著抑制作用，对脱靶基因的抑制作用显著降低。

(1) 不同修饰序列均对 AGT 基因具有显著抑制作用。例如，模板修饰序列 D576s-DV29SP 抑制率达到了 83.8%，模板修饰和防脱靶修饰序列 D576s-DV29SPd7B 的抑制率高达 85.4%。

(2) 采用本公开多种修饰方式中的任一种或多种修饰后，再进行防脱靶设计，对部分脱靶基因有显著的防脱靶效果，降低对脱靶基因的抑制作用，即具有防脱靶效果，对脱靶基因的抑制率最多可降低 72.535%。

6. 采用本公开修饰模板修饰的序列或显著抑制小鼠血清中 AGT 表达。

本公开设计的无修饰序列，例如 1579、1789、1812、1576s、1578s 和 1585s，采用本公开的模板修饰，同时再采用防脱靶设计，与 GalNAc 化合物缀合，可以高效递送至动物肝脏，并可持续显著抑制血清中 AGT 蛋白表达。

例如，D576s-DV29SPG5 在第 7 天、第 14 天和第 21 天抑制率分别达到了 84.09%、82.11%和 85.25%。

本公开的序列表

序列编号	正义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:	反义链序列 5'-3'	SEQ ID NO:
1835	UUGGGUUUUAAAAUUAAGUA	785	UACUUUAAUUUUAAAACCCAAUU	798
1816	UUCAAGUUGAGAACAAAAAUU	786	AAUUUUUGUUCUACUUGAAAA	799
1812	CCUUUUAAGUUGAGAACAAA	787	UUUGUUCUACUUGAAAAGGGA	800
1579	CCUUUUCUUCUAAUGAGUCGA	788	UCGACUCAUUGAAGAAAAGGUG	801
1836	UGGGUUUUAAAAUUAAGUAU	789	AUACUUUAAUUUUAAAACCCAAU	802
1789	GUUUGUGAAACAAAAAAGUGU	790	ACACUUUUUUGUUUCACAAACAA	803
1839	GUUUUAAAAUUAAGUAUACA	791	UGUAUACUUUAAUUUUAAAACCC	804
1791	UUGUGAAACAAAAAAGUGUUA	792	UAACACUUUUUUGUUUCACAAAC	805
1795	GAAACAAAAAAGUGUUCUUU	793	AAGGGAACACUUUUUUGUUUCAC	806
1585s	CUUCUAAUGAGUCGACUUUA	794	UAAAGUCGACUCAUUGAAGAA	807
1576s	CCACUUUUUCUUCUAAUGAA	795	UUCAUUGAAGAAAAGGUGGGA	808

1578s	ACCUUUUUCUUAUGAGUA	796	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	809
1838	GGUUUUAAAAUUAAGUAUAA	797	UUAUACUUUAAUUUUAAAACCCA	810
1008	CUUCACUGAGAGCGCCUGCCU	811	AGGCAGGCGCUCUCAGUGAAGGG	897
1011	CACUGAGAGCGCCUGCCUGCU	812	AGCAGGCAGGCGCUCUCAGUGAA	898
1014	UGAGAGCGCCUGCCUGCUGCU	813	AGCAGCAGGCAGGCGCUCUCAGU	899
1016	AGAGCGCCUGCCUGCUGCUGA	814	UCAGCAGCAGGCAGGCGCUCUCA	900
1017	GAGCGCCUGCCUGCUGCUGAU	815	AUCAGCAGCAGGCAGGCGCUCUC	901
1020	CGCCUGCCUGCUGCUGAUCCA	816	UGGAUCAGCAGCAGGCAGGCGCU	902
1024	UGCCUGCUGCUGAUCCAGCCU	817	AGGCUGGAUCAGCAGCAGGCAGG	903
1026	CCUGCUGCUGAUCCAGCCUCA	818	UGAGGCUGGAUCAGCAGCAGGCA	904
1028	UGCUGCUGAUCCAGCCUCACU	819	AGUGAGGCUGGAUCAGCAGCAGG	905
1029	GCUGCUGAUCCAGCCUCACUA	820	UAGUGAGGCUGGAUCAGCAGCAG	906
1030	CUGCUGAUCCAGCCUCACUAU	821	AUAGUGAGGCUGGAUCAGCAGCA	907
1038	CCAGCCUCACUAUGCCUCUGA	822	UCAGAGGCAUAGUGAGGCUGGAU	908
1041	GCCUCACUAUGCCUCUGACCU	823	AGGUCAGAGGCAUAGUGAGGCUG	909
1044	UCACUAUGCCUCUGACCUGGA	824	UCCAGGUCAGAGGCAUAGUGAGG	910
1046	ACUAUGCCUCUGACCUGGACA	825	UGUCCAGGUCAGAGGCAUAGUGA	911
1047	CUAUGCCUCUGACCUGGACAA	826	UUGUCCAGGUCAGAGGCAUAGUG	912
1053	CUCUGACCUGGACAAGGUGGA	827	UCCACCUUGUCCAGGUCAGAGGC	913
1057	GACCUGGACAAGGUGGAGGGU	828	ACCCUCCACCUUGUCCAGGUCAG	914
1061	UGGACAAGGUGGAGGGUCUCA	829	UGAGACCCUCCACCUUGUCCAGG	915
1065s	CAAGGUGGAGGGUCUCACUU	830	AAGUGAGACCCUCCACCUUGUC	916
1071	GGAGGGUCUCACUUUCCAGCA	831	UGCUGGAAAGUGAGACCCUCCAC	917
1260	CAGGGUGGGGGAGGUGCUGAA	832	UUCAGCACCUCUCCCCACCCUGAU	918
1262	GGGUGGGGGAGGUGCUGAACA	833	UGUUCAGCACCUCUCCCCACCCUG	919
1265	UGGGGGAGGUGCUGAACAGCA	834	UGCUGUUCAGCACCUCUCCCCACC	920
1266	GGGGGAGGUGCUGAACAGCAU	835	AUGCUGUUCAGCACCUCUCCCCAC	921
1267	GGGGAGGUGCUGAACAGCAUU	836	AAUGCUGUUCAGCACCUCUCCCCA	922
1268	GGGAGGUGCUGAACAGCAUUU	837	AAAUGCUGUUCAGCACCUCUCCCC	923
1279	AACAGCAUUUUUUUUGAGCUU	838	AAGCUCAAAAAAAUUGCUGUUA	924
1281	CAGCAUUUUUUUUGAGCUUGA	839	UCAAGCUCAAAAAAAUUGCUGUU	925
1282	AGCAUUUUUUUUGAGCUUGAA	840	UUCAAGCUCAAAAAAAUUGCUGU	926
1362	GGUGACCCUGAACCGCCCAUU	841	AAUGGGCGGUUCAGGGUCACCUC	927
1365	GACCCUGAACCGCCCAUUCU	842	AGGAUUGGGCGGUUCAGGGUCAC	928
1367	CCCUGAACCGCCCAUUCUUGU	843	ACAGGAUUGGGCGGUUCAGGGUC	929
1369	CUGAACCGCCCAUUCUUGUU	844	AAACAGGAUUGGGCGGUUCAGGG	930
1393	GUGUAUGAUCAAAGCGCCACU	845	AGUGGCGCUUUGAUCAUACACAG	931
1401	UCAAAGCGCCACUGCCUGCA	846	UGCAGGGCAGUGGCGCUUUGAUC	932
1404	AAGCGCCACUGCCUGCACUU	847	AAGUGCAGGGCAGUGGCGCUUUG	933
1407	CGCCACUGCCUGCACUUCU	848	AGGAAGUGCAGGGCAGUGGCGCU	934
1554	GCGAUGUGUACCCCCAGUCU	849	AGACUGGGGGUGACACAUCGCUG	935
1558	UGUGUACCCCCAGUCUCCCA	850	UGGGAGACUGGGGGUGACACAUC	936
1561	GUCACCCCCAGUCUCCACCU	851	AGGUGGGAGACUGGGGGUGACAC	937
1562	UCACCCCCAGUCUCCACCUU	852	AAGUGGGAGACUGGGGGUGACA	938
1564	ACCCCCAGUCUCCACCUUUU	853	AAAAGGUGGGAGACUGGGGGUGA	939
1591	AUGAGUCGACUUUGAGCUGGA	854	UCCAGCUCAAAGUCGACUCAUU	940
1592	UGAGUCGACUUUGAGCUGGAA	855	UUCACGUCAAAGUCGACUCAUU	941
1593	GAGUCGACUUUGAGCUGGAAA	856	UUUCCAGCUCAAAGUCGACUCAU	942
1596	UCGACUUUGAGCUGGAAAGCA	857	UGC UUCCAGCUCAAAGUCGACU	943
1602	UUGAGCUGGAAAGCAGCCGUU	858	AACGGCUGCUUCCAGCUCAAAG	944
1603	UGAGCUGGAAAGCAGCCGUUU	859	AAACGGCUGCUUCCAGCUCAAA	945
1608	UGGAAAGCAGCCGUUUCUCCU	860	AGGAGAAACGGCUGCUUCCAGC	946
1612	AAGCAGCCGUUUCUCCUUGGU	861	ACCAAGGAGAAACGGCUGCUUUC	947
1775	CAACCGACCAGCUUGUUUGUA	862	UACAAACAAGCUGGUCGGUUGGA	948
1790	UUUGUGAAACAAAAAGUGUU	863	AACACUUUUUUGUUUCACAAACA	949

1796	AAACAAAAAAGUGUCCCCUUU	864	AAAGGGAACACUUUUUUUGUUUCA	950
1798s	ACAAAAAAGUGUCCCCUUU	865	AAAAGGGAACACUUUUUUUGUUU	951
1799	CAAAAAAGUGUCCCCUUUCA	866	UGAAAAGGGAACACUUUUUUUGUU	952
1810	UCCCUUUUCAAGUUGAGAACA	867	UGUUCUCAACUUGAAAAGGGAAC	953
1811	CCCUUUUCAAGUUGAGAACAA	868	UUGUUCUCAACUUGAAAAGGGAA	954
1814	UUUUCAAGUUGAGAACAAAAA	869	UUUUUGUUCUCAACUUGAAAAGG	955
1815	UUUCAAGUUGAGAACAAAAAU	870	AUUUUUGUUCUCAACUUGAAAAG	956
1817	UCAAGUUGAGAACAAAAAUUG	871	CAAUUUUUGUUCUCAACUUGAAA	957
1828	ACAAAAAUUGGGUUUUAAAAU	872	AUUUUAAAACCCAAUUUUUGUUC	958
1838s	GGUUUUAAAAUUAAAGUAUA	873	UAUACUUUAAUUUUAAAACCCA	959
2018	AUAGCUGGUUAAUUUCUCCCUU	874	AAGGGAGAAAUAACCAGCUAUGG	960
2020	AGCUGGUUAAUUUCUCCCUUGU	875	ACAAGGGAGAAAUAACCAGCUAU	961
2025	GUUAAUUUCUCCCUUGUGUUA	876	UUAACACAAGGGAGAAAUAACCA	962
2030	UUCUCCCUUGUGUUAGUAAUA	877	UAUUACUAACACAAGGGAGAAU	963
2031	UCUCCCUUGUGUUAGUAAUA	878	UUAUUACUAACACAAGGGAGAAA	964
2032	CUCUCCCUUGUGUUAGUAAUA	879	UUUAUUACUAACACAAGGGAGAA	965
2033	UCCCUUGUGUUAGUAAUAAAA	880	UUUUAAUUACUAACACAAGGGAGA	966
729	AGAACUGGAUGUUGCUGCUGA	881	UCAGCAGCAACAUCAGUUCUGU	967
731	AACUGGAUGUUGCUGCUGAGA	882	UCUCAGCAGCAACAUCAGUUCU	968
732	ACUGGAUGUUGCUGCUGAGAA	883	UUCUCAGCAGCAACAUCAGUUC	969
734	UGGAUGUUGCUGCUGAGAAGA	884	UCUUCUCAGCAGCAACAUCAGU	970
734s	UGGAUGUUGCUGCUGAGAAA	885	UUUCUCAGCAGCAACAUCAGU	971
736	GAUGUUGCUGCUGAGAAGAUU	886	AAUCUUCUCAGCAGCAACAUCCA	972
743	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGU	887	ACCUGUCAAUUCUCAGCAGCA	973
753s	GAUUGACAGGUUCAUGCAGA	888	UCUGCAUGAACCUGUCAAUUCU	974
963	GCACUGGAGUGACAUCAGGA	889	UCCUGGAUGUCACUCCAGUCCUG	975
966	CUGGAGUGACAUCAGGACAA	890	UUGUCCUGGAUGUCACUCCAGUG	976
969	GAGUGACAUCAGGACAACUUC	891	AAGUUGUCCUGGAUGUCACUCCA	977
971	GUGACAUCAGGACAACUUCU	892	AGAAGUUGUCCUGGAUGUCACUC	978
982	GACAACUUCUCGGUGACUCAA	893	UUGAGUCACCGAGAAGUUGUCCU	979
984	CAACUUCUCGGUGACUCAAGU	894	ACUUGAGUCACCGAGAAGUUGUC	980
992	CGGUGACUCAAGUGCCCUUCA	895	UGAAGGGCACUUGAGUCACCGAG	981
994	GUGACUCAAGUGCCCUUCACU	896	AGUGAAGGGCACUUGAGUCACCG	982
B1835-AL	Ufs-Ums-Gf-Gm-Gf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af	983	Ums-Afs-Cm-Uf-Um-Uf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cf-Cm-Af-Ams-Ufs-Um	996
B1816-AL	Ufs-Ums-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Uf	984	Ams-Afs-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Ams-Afs-Am	997
B1812-AL	Cfs-Cms-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af	985	Ums-Ufs-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gms-Gfs-Am	998
B1579-AL	Cfs-Cms-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af	986	Ums-Cfs-Gm-Af-Cm-Uf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gms-Ufs-Gm	999
B1836-AL	Ufs-Gms-Gf-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Uf	987	Ams-Ufs-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af-Am-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cf-Ams-Afs-Um	1000
B1789-AL	Gfs-Ums-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf	988	Ams-Cfs-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Af-Am-Af-Cms-Afs-Am	1001
B1839-AL	Gfs-Ums-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af-Um-Af-Cm-Af	989	Ums-Gfs-Um-Af-Um-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cms-Cfs-Cm	1002

B1791-AL	Ufs-Ums-Gf-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Af	990	Ums-Afs-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Af-Ams-Afs-Cm	1003
B1795-AL	Gfs-Ams-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf	991	Ams-Afs-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Uf-Cms-Afs-Cm	1004
B1585s-AL	Cms-Ufs-Um-Cf-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af	992	Ums-Afs-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Am-Uf-Um-Af-Gm-Af-Am-Gfs-Ams-Af	1005
B1576s-AL	Cms-Cfs-Am-Cf-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf-Am-Af	993	Ums-Ufs-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Gfs-Gms-Af	1006
B1578s-AL	Ams-Cfs-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Af-Um-Gf-Am-Gf-Um-Af	994	Ums-Afs-Cm-Uf-Cm-Af-Um-Uf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Ufs-Gms-Gf	1007
B1838-AL	Gfs-Gms-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Uf-Am-Af	995	Ums-Ufs-Am-Uf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Af-Am-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cms-Cfs-Am	1008
B1008-AL	Cfs-Ums-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Gm-Cf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf	1009	Ams-Gfs-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Am-Af-Gms-Gfs-Gm	1095
B1011-AL	Cfs-Ams-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Gf-Cm-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf	1010	Ams-Gfs-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Gf-Cm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Uf-Gms-Afs-Am	1096
B1014-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Af-Gm-Cf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf	1011	Ams-Gfs-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Cf-Um-Cf-Ams-Gfs-Um	1097
B1016-AL	Afs-Gms-Af-Gm-Cf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af	1012	Ums-Cfs-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Cf-Ums-Cfs-Am	1098
B1017-AL	Gfs-Ams-Gf-Cm-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Uf	1013	Ams-Ufs-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Cm-Gf-Cm-Uf-Cms-Ufs-Cm	1099
B1020-AL	Cfs-Gms-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Af	1014	Ums-Gfs-Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Gms-Cfs-Um	1100
B1024-AL	Ufs-Gms-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf	1015	Ams-Gfs-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Cf-Ams-Gfs-Gm	1101
B1026-AL	Cfs-Cms-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Af	1016	Ums-Gfs-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Gms-Cfs-Am	1102
B1028-AL	Ufs-Gms-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Af-Cm-Uf	1017	Ams-Gfs-Um-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Ams-Gfs-Gm	1103
B1029-AL	Gfs-Cms-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Am-Cf-Um-Af	1018	Ums-Afs-Gm-Uf-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cms-Afs-Gm	1104
B1030-AL	Cfs-Ums-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Am-Uf	1019	Ams-Ufs-Am-Gf-Um-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gms-Cfs-Am	1105
B1038-AL	Cfs-Cms-Af-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Af	1020	Ums-Cfs-Am-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf-Am-Gf-Um-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Gms-Afs-Um	1106
B1041-AL	Gfs-Cms-Cf-Um-Cf-Am-Cf-Um-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Um-Gf-Am-Cf-Cm-Uf	1021	Ams-Gfs-Gm-Uf-Cm-Af-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Um-Af-Gm-Uf-Gm-Af-Gm-Gf-Cms-Ufs-Gm	1107

B1044-AL	Ufs-Cms-Af-Cm-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af	1022	Ums-Cfs-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf-Am-Gf-Um-Gf-Ams-Gfs-Gm	1108
B1046-AL	Afs-Cms-Uf-Am-Uf-Gm-Cf-Cm-Uf-Cm-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Cm-Af	1023	Ums-Gfs-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Gf-Am-Gf-Gm-Cf-Am-Uf-Am-Gf-Ums-Gfs-Am	1109
B1047-AL	Cfs-Ums-Af-Um-Gf-Cm-Cf-Um-Cf-Um-Gf-Am-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Cf-Am-Af	1024	Ums-Ufs-Gm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Uf-Cm-Af-Gm-Af-Gm-Gf-Cm-Af-Um-Af-Gms-Ufs-Gm	1110
B1053-AL	Cfs-Ums-Cf-Um-Gf-Am-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Af	1025	Ums-Cfs-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Uf-Cm-Af-Gm-Af-Gms-Gfs-Cm	1111
B1057-AL	Gfs-Ams-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Gm-Uf	1026	Ams-Cfs-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Uf-Cms-Afs-Gm	1112
B1061-AL	Ufs-Gms-Gf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Gm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af	1027	Ums-Gfs-Am-Gf-Am-Cf-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf-Cm-Cf-Ams-Gfs-Gm	1113
B1065s-AL	Cms-Afs-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Gf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Cf-Um-Uf	1028	Ams-Afs-Gm-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Cm-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Um-Gfs-Ums-Cf	1114
B1071-AL	Gfs-Gms-Af-Gm-Gf-Gm-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Af	1029	Ums-Gfs-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af-Am-Gf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Cf-Cm-Cf-Um-Cf-Cms-Afs-Cm	1115
B1260-AL	Cfs-Ams-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Af	1030	Ums-Ufs-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Cm-Uf-Gms-Afs-Um	1116
B1262-AL	Gfs-Gms-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm-Af	1031	Ums-Gfs-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Cms-Ufs-Gm	1117
B1265-AL	Ufs-Gms-Gf-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Gf-Cm-Af	1032	Ums-Gfs-Cm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Cm-Cf-Ams-Cfs-Cm	1118
B1266-AL	Gfs-Gms-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Uf	1033	Ams-Ufs-Gm-Cf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Cf-Cms-Afs-Cm	1119
B1267-AL	Gfs-Gms-Gf-Gm-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Uf	1034	Ams-Afs-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Cms-Cfs-Am	1120
B1268-AL	Gfs-Gms-Gf-Am-Gf-Gm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Uf-Um-Uf	1035	Ams-Afs-Am-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cms-Cfs-Cm	1121
B1279-AL	Afs-Ams-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Uf	1036	Ams-Afs-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Uf-Ums-Cfs-Am	1122
B1281-AL	Cfs-Ams-Gf-Cm-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Uf-Gm-Af	1037	Ums-Cfs-Am-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Gf-Cm-Uf-Gms-Ufs-Um	1123
B1282-AL	Afs-Gms-Cf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Af	1038	Ums-Ufs-Cm-Af-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Gm-Cf-Ums-Gfs-Um	1124
B1362-AL	Gfs-Gms-Uf-Gm-Af-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Af-Am-Cf-Cm-Gf-Cm-Cf-Cm-Af-Um-Uf	1039	Ams-Afs-Um-Gf-Gm-Gf-Cm-Gf-Gm-Uf-Um-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Um-Cf-Am-Cf-Cms-Ufs-Cm	1125
B1365-AL	Gfs-Ams-Cf-Cm-Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm-Cf-Gm-Cf-Cm-Cf-Am-Uf-Um-Cf-Cm-Uf	1040	Ams-Gfs-Gm-Af-Am-Uf-Gm-Gf-Gm-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Gf-Gm-Uf-Cms-Afs-Cm	1126

B1367-AL	Cfs-Cms-Cf-Um-Gf-Am-Af-Cm-Cf-Gm-Cf-Cm-Cf-Am-Uf-Um-Cf-Cm-Uf-Gm-Uf	1041	Ams-Cfs-Am-Gf-Gm-Af-Am-Uf-Gm-Gf-Gm-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gm-Gf-Gms-Ufs-Cm	1127
B1369-AL	Cfs-Ums-Gf-Am-Af-Cm-Cf-Gm-Cf-Cm-Cf-Am-Uf-Um-Cf-Cm-Uf-Gm-Uf-Um-Uf	1042	Ams-Afs-Am-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Am-Uf-Gm-Gf-Gm-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Gms-Gfs-Gm	1128
B1393-AL	Gfs-Ums-Gf-Um-Af-Um-Gf-Am-Uf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Cf-Gm-Cf-Cm-Af-Cm-Uf	1043	Ams-Gfs-Um-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Uf-Um-Gf-Am-Uf-Cm-Af-Um-Af-Cm-Af-Cms-Afs-Gm	1129
B1401-AL	Ufs-Cms-Af-Am-Af-Gm-Cf-Gm-Cf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af	1044	Ums-Gfs-Cm-Af-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Gm-Cf-Gm-Cf-Um-Uf-Um-Gf-Ams-Ufs-Cm	1130
B1404-AL	Afs-Ams-Gf-Cm-Gf-Cm-Cf-Am-Cf-Um-Gf-Cm-Cf-Cm-Uf-Gm-Cf-Am-Cf-Um-Uf	1045	Ams-Afs-Gm-Uf-Gm-Cf-Am-Gf-Gm-Gf-Cm-Af-Gm-Uf-Gm-Gf-Cm-Gf-Cm-Uf-Ums-Ufs-Gm	1131
B1407-AL	Cfs-Gms-Cf-Cm-Af-Cm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf-Um-Gf-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Cf-Cm-Uf	1046	Ams-Gfs-Gm-Af-Am-Gf-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Gm-Cf-Gms-Cfs-Um	1132
B1554-AL	Gfs-Cms-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Cm-Uf	1047	Ams-Gfs-Am-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Gf-Cms-Ufs-Gm	1133
B1558-AL	Ufs-Gms-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Af	1048	Ums-Gfs-Gm-Gf-Am-Gf-Am-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Cf-Ams-Ufs-Cm	1134
B1561-AL	Gfs-Ums-Cf-Am-Cf-Cm-Cf-Cm-Cf-Am-Gf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Am-Cf-Cm-Uf	1049	Ams-Gfs-Gm-Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Cm-Uf-Gm-Gf-Gm-Gf-Gm-Uf-Gm-Af-Cms-Afs-Cm	1135
B1562-AL	Ufs-Cms-Af-Cm-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf	1050	Ams-Afs-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Am-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf-Um-Gf-Ams-Cfs-Am	1136
B1564-AL	Afs-Cms-Cf-Cm-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Uf	1051	Ams-Afs-Am-Af-Gm-Gf-Um-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Am-Cf-Um-Gf-Gm-Gf-Gm-Gf-Ums-Ufs-Am	1137
B1591-AL	Afs-Ums-Gf-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af	1052	Ums-Cfs-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Cm-Af-Ums-Ufs-Am	1138
B1592-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af	1053	Ums-Ufs-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Ams-Ufs-Um	1139
B1593-AL	Gfs-Ams-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af	1054	Ums-Ufs-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Am-Af-Am-Gf-Um-Cf-Gm-Af-Cm-Uf-Cms-Afs-Um	1140
B1596-AL	Ufs-Cms-Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af	1055	Ums-Gfs-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Cm-Gf-Ams-Cfs-Um	1141
B1602-AL	Ufs-Ums-Gf-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Gf-Um-Uf	1056	Ams-Afs-Cm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Cm-Af-Ams-Afs-Gm	1142
B1603-AL	Ufs-Gms-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Cf-Gm-Uf-Um-Uf	1057	Ams-Afs-Am-Cf-Gm-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Cf-Ams-Afs-Am	1143
B1608-AL	Ufs-Gms-Gf-Am-Af-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Uf	1058	Ams-Gfs-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Cm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Um-Uf-Cm-Cf-Ams-Gfs-Cm	1144
B1612-AL	Afs-Ams-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Cm-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Gm-Uf	1059	Ams-Cfs-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Cm-Gf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Ums-Ufs-Cm	1145

B1775-AL	Cfs-Ams-Af-Cm-Cf-Gm-Af-Cm-Cf-Am-Gf-Cm-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Af	1060	Ums-Afs-Cm-Af-Am-Af-Cm-Af-Am-Gf-Cm-Uf-Gm-Gf-Um-Cf-Gm-Gf-Um-Uf-Gms-Gfs-Am	1146
B1790-AL	Ufs-Ums-Uf-Gm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Gf-Um-Gf-Um-Uf	1061	Ams-Afs-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Cf-Am-Af-Ams-Cfs-Am	1147
B1796-AL	Afs-Ams-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af-Am-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Um-Uf	1062	Ams-Afs-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Ums-Cfs-Am	1148
B1798s-AL	Ams-Cfs-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Uf	1063	Ams-Afs-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Ufs-Ums-Uf	1149
B1799-AL	Cfs-Ams-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Af	1064	Ums-Gfs-Am-Af-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Am-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gms-Ufs-Um	1150
B1810-AL	Ufs-Cms-Cf-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af	1065	Ums-Gfs-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Ams-Afs-Cm	1151
B1811-AL	Cfs-Cms-Cf-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af	1066	Ums-Ufs-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Af-Am-Af-Gm-Gf-Gms-Afs-Am	1152
B1814-AL	Ufs-Ums-Uf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Cm-Af-Am-Af-Am-Af	1067	Ums-Ufs-Um-Uf-Um-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Am-Af-Ams-Gfs-Gm	1153
B1815-AL	Ufs-Ums-Uf-Cm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf	1068	Ams-Ufs-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Am-Af-Ams-Afs-Gm	1154
B1817-AL	Ufs-Cms-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Gf	1069	Cms-Afs-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Gf-Ams-Afs-Am	1155
B1828-AL	Afs-Cms-Af-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Gm-Gf-Gm-Uf-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Uf	1070	Ams-Ufs-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Cf-Cm-Cf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Um-Gf-Ums-Ufs-Cm	1156
B1838s-AL	Gms-Gfs-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Af-Am-Gf-Um-Af-Um-Af	1071	Ums-Afs-Um-Af-Cm-Uf-Um-Uf-Am-Af-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Af-Cm-Cfs-Cms-Af	1157
B2018-AL	Afs-Ums-Af-Gm-Cf-Um-Gf-Gm-Uf-Um-Af-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf	1072	Ams-Afs-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Am-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Um-Af-Ums-Gfs-Gm	1158
B2020-AL	Afs-Gms-Cf-Um-Gf-Gm-Uf-Um-Af-Um-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf	1073	Ams-Cfs-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Am-Cf-Cm-Af-Gm-Cf-Ums-Afs-Um	1159
B2025-AL	Gfs-Ums-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Am-Af	1074	Ums-Ufs-Am-Af-Cm-Af-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Am-Af-Am-Uf-Am-Af-Cms-Cfs-Am	1160
B2030-AL	Ufs-Ums-Cf-Um-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Af-Gm-Uf-Am-Af-Um-Af	1075	Ums-Afs-Um-Uf-Am-Cf-Um-Af-Am-Cf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Gm-Af-Ams-Afs-Um	1161
B2031-AL	Ufs-Cms-Uf-Cm-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Am-Gf-Um-Af-Am-Uf-Am-Af	1076	Ums-Ufs-Am-Uf-Um-Af-Cm-Uf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Am-Gf-Ams-Afs-Am	1162
B2032-AL	Cfs-Ums-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Gm-Uf-Gm-Uf-Um-Af-Gm-Uf-Am-Af-Um-Af-Am-Af	1077	Ums-Ufs-Um-Af-Um-Uf-Am-Cf-Um-Af-Am-Cf-Am-Cf-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Af-Gms-Afs-Am	1163
B2033-AL	Ufs-Cms-Cf-Cm-Uf-Um-Gf-Um-Gf-Um-Uf-Am-Gf-Um-Af-Am-Uf-Am-Af-Am-Af	1078	Ums-Ufs-Um-Uf-Am-Uf-Um-Af-Cm-Uf-Am-Af-Cm-Af-Cm-Af-Am-Gf-Gm-Gf-Ams-Gfs-Am	1164

B729-AL	Afs-Gms-Af-Am-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af	1079	Ums-Cfs-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Um-Cf-Ums-Gfs-Um	1165
B731-AL	Afs-Ams-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Gm-Af	1080	Ums-Cfs-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Uf-Ums-Cfs-Um	1166
B732-AL	Afs-Cms-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af	1081	Ums-Ufs-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Ums-Ufs-Cm	1167
B734-AL	Ufs-Gms-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af	1082	Ums-Cfs-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Ams-Gfs-Um	1168
B734s-AL	Ums-Gfs-Gm-Af-Um-Gf-Um-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Af	1083	Ums-Ufs-Um-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Afs-Gms-Uf	1169
B736-AL	Gfs-Ams-Uf-Gm-Uf-Um-Gf-Cm-Uf-Gm-Cf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Af-Gm-Af-Um-Uf	1084	Ams-Afs-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Cm-Af-Gm-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Am-Cf-Am-Uf-Cms-Cfs-Am	1170
B743-AL	Cfs-Ums-Gf-Cm-Uf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Gf-Gm-Uf	1085	Ams-Cfs-Cm-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Am-Uf-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Am-Gf-Cm-Af-Gms-Cfs-Am	1171
B753s-AL	Gms-Afs-Um-Uf-Gm-Af-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Uf-Cm-Af-Um-Gf-Cm-Af-Gm-Af	1086	Ums-Cfs-Um-Gf-Cm-Af-Um-Gf-Am-Af-Cm-Cf-Um-Gf-Um-Cf-Am-Af-Um-Cfs-Ums-Uf	1172
B963-AL	Gfs-Cms-Af-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Af	1087	Ums-Cfs-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Um-Gf-Cms-Ufs-Gm	1173
B966-AL	Cfs-Ums-Gf-Gm-Af-Gm-Uf-Gm-Af-Cm-Af-Um-Cf-Cm-Af-Gm-Gf-Am-Cf-Am-Af	1088	Ums-Ufs-Gm-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Um-Gf-Um-Cf-Am-Cf-Um-Cf-Cm-Af-Gms-Ufs-Gm	1174
B969-AL	Gfs-Ams-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf	1089	Ams-Afs-Gm-Uf-Um-Gf-Um-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Uf-Cms-Cfs-Am	1175
B971-AL	Gfs-Ums-Gf-Am-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Af-Am-Cf-Um-Uf-Cm-Uf	1090	Ams-Gfs-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gf-Um-Cf-Cm-Uf-Gm-Gf-Am-Uf-Gm-Uf-Cm-Af-Cms-Ufs-Cm	1176
B982-AL	Gfs-Ams-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Am-Af	1091	Ums-Ufs-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Uf-Cms-Cfs-Um	1177
B984-AL	Cfs-Ams-Af-Cm-Uf-Um-Cf-Um-Cf-Gm-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf	1092	Ams-Cfs-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Gm-Af-Gm-Af-Am-Gf-Um-Uf-Gms-Ufs-Cm	1178
B992-AL	Cfs-Gms-Gf-Um-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Cm-Af	1093	Ums-Gfs-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Cm-Cf-Gms-Afs-Gm	1179
B994-AL	Gfs-Ums-Gf-Am-Cf-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Gm-Cf-Cm-Cf-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Uf	1094	Ams-Gfs-Um-Gf-Am-Af-Gm-Gf-Gm-Cf-Am-Cf-Um-Uf-Gm-Af-Gm-Uf-Cm-Af-Cms-Cfs-Gm	1180
C1835-DV29P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1216
C1835-DV26P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217
C1835-DV27P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1216

C1835-DV28P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217
C1835-DV32P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181	UmsEVP-Afs-Cm-Um-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1218
C1835-DV34P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181	UmsEVP-Afs-Cf-Um-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1219
C1835-DV25P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182	UmsEVP-Afs-Cm-Um-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1220
C1835-DV33P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Am-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1181	UmsEVP-Afs-Cf-Um-Uf-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1221
C1835-DV22	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Am-Am-Gm-Um-Am	1183	Ums-Afs-Cm-Um-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1222
C1816-DV29P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184	AmsEVP-Afs-Um-Uf-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1223
C1816-DV26P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185	AmsEVP-Afs-Uf-Uf-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1224
C1816-DV27P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185	AmsEVP-Afs-Um-Uf-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1223
C1816-DV28P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184	AmsEVP-Afs-Uf-Uf-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1224
C1816-DV32P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184	AmsEVP-Afs-Um-Um-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1225
C1816-DV34P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184	AmsEVP-Afs-Uf-Um-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1226
C1816-DV25P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1185	AmsEVP-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1227
C1816-DV33P	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Am-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Af-Am-Am-Um-Um	1184	AmsEVP-Afs-Uf-Um-Uf-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1228
C1816-DV22	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Am-Am-Am-Am-Am-Um-Um	1186	Ams-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1229
C1812-DV29P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187	UmsEVP-Ufs-Um-Gf-Uf-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1230
C1812-DV26P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188	UmsEVP-Ufs-Uf-Gf-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1231
C1812-DV27P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188	UmsEVP-Ufs-Um-Gf-Uf-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1230
C1812-DV28P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187	UmsEVP-Ufs-Uf-Gf-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1231

C1812-DV32P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Uf-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1232
C1812-DV34P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187	UmsEVP-Ufs-Uf-Gm-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1233
C1812-DV25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1188	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1234
C1812-DV33P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gm-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am	1187	UmsEVP-Ufs-Uf-Gm-Uf-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1235
C1812-DV22	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Am-Cm-Am-Am-Am	1189	Ums-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1236
C1579-DV29P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190	UmsEVP-Cfs-Gm-Af-Cf-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1237
C1579-DV26P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191	UmsEVP-Cfs-Gf-Af-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1238
C1579-DV27P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191	UmsEVP-Cfs-Gm-Af-Cf-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1237
C1579-DV28P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190	UmsEVP-Cfs-Gf-Af-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1238
C1579-DV32P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cf-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1239
C1579-DV34P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190	UmsEVP-Cfs-Gf-Am-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1240
C1579-DV25P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1191	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1241
C1579-DV33P	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am	1190	UmsEVP-Cfs-Gf-Am-Cf-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1242
C1579-DV22	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gm-Um-Cm-Gm-Am	1192	Ums-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1243
C1836-DV29P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193	AmsEVP-Ufs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1244
C1836-DV26P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Af-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1194	AmsEVP-Ufs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1245
C1836-DV27P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Af-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1194	AmsEVP-Ufs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1244
C1836-DV28P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193	AmsEVP-Ufs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1245
C1836-DV32P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193	AmsEVP-Ufs-Am-Cm-Uf-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1246

C1836-DV34P	Ums-Gms-Gm-Gm-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Af-Am-Um-Um-Am-Am-Af-Gm-Um-Am-Um	1193	AmsEVP-Ufs-Af-Cm-Um-Uf-Um-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Cm-Cm-Cm-Ams-Ams-Um	1247
C1789-DV29P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195	AmsEVP-Cfs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1248
C1789-DV26P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249
C1789-DV27P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196	AmsEVP-Cfs-Am-Cf-Uf-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1248
C1789-DV28P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249
C1789-DV32P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Uf-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1250
C1789-DV34P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195	AmsEVP-Cfs-Af-Cm-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1251
C1789-DV25P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1196	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1252
C1789-DV33P	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Am-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um	1195	AmsEVP-Cfs-Af-Cm-Uf-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1253
C1789-DV22	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Am-Gm-Um-Gm-Um	1197	Ams-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1254
C1839-DV29P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255
C1839-DV26P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Uf-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1199	UmsEVP-Gfs-Uf-Af-Um-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1256
C1839-DV27P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Uf-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1199	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1255
C1839-DV28P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198	UmsEVP-Gfs-Uf-Af-Um-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1256
C1839-DV32P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198	UmsEVP-Gfs-Um-Am-Uf-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1257
C1839-DV34P	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gm-Um-Af-Um-Am-Cm-Am	1198	UmsEVP-Gfs-Uf-Am-Um-Af-Cm-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1258
C1791-DV29P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200	UmsEVP-Afs-Am-Cf-Af-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1259
C1791-DV26P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1201	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260
C1791-DV27P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1201	UmsEVP-Afs-Am-Cf-Af-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1259

C1791-DV28P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260
C1791-DV32P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200	UmsEVP-Afs-Am-Cm-Af-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1261
C1791-DV34P	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Am-Af-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am	1200	UmsEVP-Afs-Af-Cm-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1262
C1795-DV29P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1263
C1795-DV26P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1203	AmsEVP-Afs-Gf-Gf-Gm-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1264
C1795-DV27P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1203	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1263
C1795-DV28P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202	AmsEVP-Afs-Gf-Gf-Gm-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1264
C1795-DV32P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202	AmsEVP-Afs-Gm-Gm-Gf-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1265
C1795-DV34P	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um	1202	AmsEVP-Afs-Gf-Gm-Gm-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1266
C1585s-DV29SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Am	1204	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267
C1585s-DV26SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Am	1205	UmsEVP-Afs-Af-Af-Gm-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1268
C1585s-DV27SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Am	1205	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267
C1585s-DV28SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Am	1204	UmsEVP-Afs-Af-Af-Gm-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1268
C1585s-DV32SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Am	1204	UmsEVP-Afs-Am-Am-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1269
C1585s-DV34SP	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gm-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Am	1204	UmsEVP-Afs-Af-Am-Gm-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1270
C1585s-DV22S	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Um-Am	1206	Ums-Afs-Am-Am-Gm-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1271
C1576s-DV29SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1207	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272
C1576s-DV28SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1207	UmsEVP-Ufs-Cf-Af-Um-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1273
C1576s-DV26SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1208	UmsEVP-Ufs-Cf-Af-Um-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1273

C1576s-DV25SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1208	UmsEVP-Ufs-Cm-Am-Um-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1274
C1576s-DV27SP	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am	1208	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272
C1576s-DV22S	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Uf-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Am-Um-Gm-Am-Am	1209	Ums-Ufs-Cm-Am-Um-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1275
C1578s-DV29SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276
C1578s-DV28SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Cm-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1277
C1578s-DV26SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1211	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Cm-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1277
C1578s-DV25SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1211	UmsEVP-Afs-Cm-Um-Cm-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1278
C1578s-DV27SP	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1211	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276
C1578s-DV22S	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Uf-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gm-Am-Gm-Um-Am	1212	Ums-Afs-Cm-Um-Cm-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1279
C1838-DV29P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1213	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1280
C1838-DV28P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1213	UmsEVP-Ufs-Af-Uf-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1281
C1838-DV26P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1214	UmsEVP-Ufs-Af-Uf-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1281
C1838-DV25P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1214	UmsEVP-Ufs-Am-Um-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1282
C1838-DV27P	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am	1214	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1280
C1838-DV22	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Af-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Um-Am-Um-Am-Am	1215	Ums-Ufs-Am-Um-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1283
579P	ACCUUUUCUUCUAAUGAGUCU	1284	AGACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	1297
789P	UUUGUGAAACAAAAAGUGA	1285	UCACUUUUUUGUUUCACAAACA	1298
812P	UUGUUCUCAACUUGAAAAGGGA	1286	CCUUUUCUAGUUGAGAACAA	1299
576P	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	1287	ACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGGA	1300
578P	CACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	1288	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGG	1301
585P	UUCUAAUGAGUCGACUUUA	1289	UAAAGUCGACUCAUUAGAA	1302
AD-60771	AGAACAAAAUUGGGUUUUAA	1290	UUAAAACCCAAUUUUUGUUCUCA	1303
AD-85481	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	1291	UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA	1304
816P	UCAAGUUGAGAACAAAAUA	1292	UAUUUUUGUUCUCAACUUGAAA	1305

835P	GGGUUUUAAAAUUAAGUAUA	1293	UACUUUAAUUUUAAAAACCCAA	1306
836P	GGUUUUUAAAAUUAAGUAUAC	1294	AUACUUUAAUUUUAAAAACCCA	1307
839P	GUUUUAAAAUUAAGUAUACA	1295	UAUACUUUAAUUUUAAAAACCC	1308
791P	UUGUGAAACAAAAAAGUGUUU	1296	ACACUUUUUUGUUUCACAAUU	1309
D835-DV26P	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217
D835-DV26P+	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1182	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Tgna-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1348
D835-DV26Pd 7B	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Td-Am-Af-Am-Gm-Um-Am	1310	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Ad-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1349
D835-DV26Pd 67B	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Td-Ad-Af-Am-Gm-Um-Am	1311	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Td-Ad-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1350
D578s-DV29SP +	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1210	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Agna-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1351
D578s-DV29SP d67B	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Td-Gf-Am-Gm-Um-Am	1312	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Ad-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1352
D578s-DV29SP d7B	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am	1313	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1353
D579-DV25PG 5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gm-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1314	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cm-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1241
D579-DV25Pd 7BG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gd-Am-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1315	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Uf-Cd-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1354
D579-DV25Pd 67BG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Um-Uf-Cf-Uf-Am-Am-Um-Gd-Ad-Gf-Um-Cm-Gm-Am-G5	1316	UmsEVP-Cfs-Gm-Am-Cm-Td-Cd-Am-Um-Um-Am-Gm-Am-Af-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Ums-Gm	1355
D789-DV26PG 5	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1317	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1249
D789-DV25PG 5	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Am-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1317	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1252
D789-DV26Pd 7BG5	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Ad-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1318	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Uf-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1356
D789-DV25Pd 7BG5	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Ad-Am-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1318	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Uf-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1357
D789-DV26Pd 67BG5	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Ad-Ad-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1319	AmsEVP-Cfs-Af-Cf-Um-Td-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1358
D789-DV25Pd 67BG5	Gms-Ums-Um-Um-Gm-Um-Gf-Am-Af-Af-Cf-Am-Am-Am-Ad-Ad-Af-Gm-Um-Gm-Um-G5	1319	AmsEVP-Cfs-Am-Cm-Um-Td-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Cm-Af-Cm-Am-Am-Am-Cms-Ams-Am	1359
D791-DV26PG 5	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Am-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am-G5	1320	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1260

D791-DV26Pd 7BG5	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Ad-Gm-Uf-Gm-Um-Um-Am-G5	1321	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cf-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1360
D791-DV26Pd 67BG5	Ums-Ums-Gm-Um-Gm-Am-Af-Am-Cf-Af-Af-Am-Am-Am-Ad-Gd-Uf-Gm-Um-Um-Am-G5	1322	UmsEVP-Afs-Af-Cf-Am-Cd-Td-Um-Um-Um-Um-Um-Gm-Uf-Um-Uf-Cm-Am-Cm-Am-Ams-Ams-Cm	1361
D795-DV27PG 5	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-Um-Um-Cf-Cm-Cm-Um-Um-G5	1323	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Af-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1263
D795-DV27Pd 67BG5	Gms-Ams-Am-Am-Cm-Am-Af-Am-Af-Af-Af-Gm-Um-Gm-Td-Td-Cf-Cm-Cm-Um-Um-G5	1324	AmsEVP-Afs-Gm-Gf-Gf-Ad-Ad-Cm-Am-Cm-Um-Um-Um-Uf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1362
D812-DV25PG 5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gm-Am-Af-Cm-Am-Am-Am-G5	1325	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Um-Uf-Cm-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1234
D812-DV25Pd 67BG5	Cms-Cms-Um-Um-Um-Um-Cf-Am-Af-Gf-Uf-Um-Gm-Am-Gd-Ad-Af-Cm-Am-Am-Am-G5	1326	UmsEVP-Ufs-Um-Gm-Um-Td-Cd-Um-Cm-Am-Am-Cm-Um-Uf-Gm-Af-Am-Am-Am-Gm-Gms-Gms-Am	1363
D816-DV25PG 5	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Ad-Ad-Af-Am-Am-Um-Um-G5	1327	AmsEVP-Afs-Um-Um-Um-Uf-Um-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1227
D816-DV25Pd 67BG5	Ums-Ums-Cm-Am-Am-Gm-Uf-Um-Gf-Af-Gf-Am-Am-Cm-Ad-Ad-Af-Am-Am-Um-Um-G5	1328	AmsEVP-Afs-Um-Um-Um-Td-Td-Gm-Um-Um-Cm-Um-Cm-Af-Am-Cf-Um-Um-Gm-Am-Ams-Ams-Am	1364
D835-DV26PG 5	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Um-Am-Af-Am-Gm-Um-Am-G5	1329	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Am-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1217
D835-DV26Pd 7BG5	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Td-Am-Af-Am-Gm-Um-Am-G5	1330	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Uf-Ad-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1349
D835-DV26Pd 67BG5	Ums-Ums-Gm-Gm-Gm-Um-Uf-Um-Uf-Af-Af-Am-Am-Um-Td-Ad-Af-Am-Gm-Um-Am-G5	1331	UmsEVP-Afs-Cf-Uf-Um-Td-Ad-Am-Um-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Cm-Cm-Cm-Am-Ams-Ums-Um	1350
D838-DV29PG 5	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Am-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am-G5	1332	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1280
D838-DV29Pd 7BG5	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Ad-Gm-Uf-Am-Um-Am-Am-G5	1333	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cf-Td-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1365
D838-DV29Pd 67BG5	Gms-Gms-Um-Um-Um-Um-Af-Am-Af-Am-Uf-Um-Am-Am-Ad-Gd-Uf-Am-Um-Am-Am-G5	1334	UmsEVP-Ufs-Am-Uf-Af-Cd-Td-Um-Um-Am-Am-Um-Um-Uf-Um-Af-Am-Am-Am-Cm-Cms-Cms-Am	1366
D839-DV29Pd 7BG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gd-Um-Af-Um-Am-Cm-Am-G5	1336	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Af-Cd-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1367
D839-DV29Pd 67BG5	Gms-Ums-Um-Um-Um-Am-Af-Am-Af-Um-Uf-Am-Am-Am-Gd-Td-Af-Um-Am-Cm-Am-G5	1337	UmsEVP-Gfs-Um-Af-Uf-Ad-Cd-Um-Um-Um-Am-Am-Um-Uf-Um-Uf-Am-Am-Am-Am-Cms-Cms-Cm	1368
D576s-DV29SP G5	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Um-Am-Af-Um-Gm-Am-Am-G5	1338	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Am-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1272
D576s-DV29SP d7BG5	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Td-Am-Af-Um-Gm-Am-Am-G5	1339	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Uf-Ad-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1369
D576s-DV29SP d67BG5	Cms-Cms-Am-Cm-Cm-Uf-Um-Uf-Um-Cf-Um-Um-Cm-Td-Ad-Af-Um-Gm-Am-Am-G5	1340	UmsEVP-Ufs-Cm-Af-Uf-Td-Ad-Gm-Am-Am-Gm-Am-Am-Af-Am-Gf-Gm-Um-Gm-Gms-Gms-Am	1370

D578s-DV29SP-G5	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Am-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am-G5	1341	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Um-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1276
D578s-DV29SP-d7BG5	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Um-Gf-Am-Gm-Um-Am-G5	1342	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Af-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1353
D578s-DV29SP-d67BG5	Ams-Cms-Cm-Um-Um-Uf-Um-Cf-Um-Uf-Cm-Um-Am-Ad-Td-Gf-Am-Gm-Um-Am-G5	1343	UmsEVP-Afs-Cm-Uf-Cf-Ad-Td-Um-Am-Gm-Am-Am-Gm-Af-Am-Af-Am-Gm-Gm-Ums-Gms-Gm	1352
D585s-DV27SP-G5	Cms-Ums-Um-Cm-Um-Af-Am-Uf-Gf-Af-Gm-Um-Cm-Gm-Am-Cf-Um-Um-Um-Am-G5	1344	UmsEVP-Afs-Am-Af-Gf-Uf-Cm-Gm-Am-Cm-Um-Cm-Am-Uf-Um-Af-Gm-Am-Am-Gms-Ams-Am	1267
Zilebesiran	Gms-Ums-Cm-Am-Um-Cm-Cf-Am-Cf-Af-Af-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Um-Am-Cm-Am-GL	1345	Ums-Gfs-Um-Am-Cm-Tgna-Cm-Um-Cm-Am-Um-Um-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Um-Gm-Am-Cms-Gms-Am	1371
DNC-DV29PG5	Gms-Ums-Gm-Am-Am-Am-Cf-Am-Af-Cm-Uf-Am-Gm-Um-Gm-Cm-Af-Cm-Cm-Um-Cm-G5	1346	UmsEVP-Afs-Gm-Af-Gf-Gf-Um-Gm-Cm-Am-Cm-Um-Am-Gf-Um-Uf-Gm-Um-Um-Um-Cms-Ams-Cm	1372
APC-ZL	Gms-Ums-Cm-Am-Um-Cm-Cf-Am-Cf-Af-Af-Um-Gm-Am-Gm-Am-Gm-Um-Am-Cm-Am	1347	Ums-Gfs-Um-Am-Cm-Tgna-Cm-Um-Cm-Am-Um-Um-Gm-Uf-Gm-Gf-Am-Um-Gm-Am-Cms-Gms-Am	1371

虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求书

1. 一种提升双链寡核苷酸靶基因抑制效果的修饰模板，所述双链寡核苷酸是 siRNA，所述双链寡核苷酸含有正义链和反义链，所述正义链和所述反义链的每一个核苷酸均为修饰的核苷酸，其特征在于，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分反向互补形成双链区；所述反向互补双链区的长度为 17~21 bp；

按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 2 的第 2-6 位核苷酸中至少 2 个核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 14 和/或 16 的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位、第 2 位和倒数第 2、3 位具有硫代磷酸骨架。

2. 如权利要求 1 所述的修饰模板，其特征在于，所述核苷酸序列 2 的第 2-6 位核苷酸中至少 2 个核苷酸选自以下组合中的一种：

- (1) 第 2 和 6 位核苷酸；
- (2) 第 2、3、4 和 6 位核苷酸；
- (3) 第 2、4、5 和 6 位核苷酸；
- (4) 第 2、5 和 6 位核苷酸；
- (5) 第 2、3、5 和 6 位核苷酸；
- (6) 第 2、3 和 6 位核苷酸；

和/或，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 采用以下方式进行修饰：

(1) 第 6 和 16 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 8-10 位核苷酸中至少 2 个核苷酸，优选第 8-10 位或第 8 和 10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位和第 2 位具有硫代磷酸骨架；或

(2) 第 7 和 17 位的核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，第 9-11 位核苷酸中至少 2 个核苷酸，优选第 9-11 位或第 9 和 11 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，其余位点的核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 1 位和第 2 位具有硫代磷酸骨架。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的修饰模板，其特征在于，所述核苷酸序列 1 的长度为 21 个或 20 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 23 个或 22 个；

较佳地，所述核苷酸序列 1 的长度为 20 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 22 个；或者，所述核苷酸序列 1 的长度为 21 个，所述核苷酸序列 2 的长度为 23 个。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的修饰模板，其特征在于，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述反义链中的核苷酸采用以下方式 A、B、C、D、E、F 和 G 中任一方式进行修饰：

A：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

B：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、4、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

C：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、

22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、4、5、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

D：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

E：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

F：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；G：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

G：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22、23 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、21、22 位具有硫代磷酸骨架；

和/或，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述正义链中的核苷酸采用以下方式 a-d 任一方案进行修饰：

a：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、12、13、14、15、16、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10、11、17 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

b：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、10、12、13、14、15、16、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、11、17 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

c：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10、11 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

d：表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、6、8、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 7、9、10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的修饰模板，其特征在于，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述反义链中的核苷酸采用以下方式 A'、B'、C'、D'、E'、F'和 G'中任一方式进行修饰：

A'：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

B'：表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、

22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、4、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

C': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、4、5、6、14、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

D': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

E': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、5、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

F': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、3、6、14、16 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

G': 表示所述反义链的 5'末端起始，第 1、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 2、6、14 位为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2、20、21 位具有硫代磷酸骨架；

和/或，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述正义链中的核苷酸采用以下方式 a'、b'、c'和 d'中任一方式进行修饰：

a': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、11、12、13、14、15、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 6、8、9、10、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

b': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、9、11、12、13、14、15、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 6、8、10、16 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

c': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 6、8、9、10 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

d': 表示所述正义链的 5'末端起始第 1、2、3、4、5、7、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 位核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸，且第 6、8、9 位核苷酸为 2'-氟代修饰的核苷酸，且第 1、2 位具有硫代磷酸骨架；

较佳地，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述双链寡核苷酸采用以下组合方式(i)-(x)中任一方案进行修饰：

(i)所述反义链采用方式 A 进行修饰，且所述正义链采用方式 a 进行修饰；

(ii)所述反义链采用方式 B 进行修饰，且所述正义链采用方式 a 进行修饰；

(iii)所述反义链采用方式 C 进行修饰，且所述正义链采用方式 a 进行修饰；

(iv)所述反义链采用方式B进行修饰,且所述正义链采用方式b进行修饰;

(v)所述反义链采用方式C进行修饰,且所述正义链采用方式b进行修饰;

(vi)所述反义链采用方式G进行修饰,且所述正义链采用方式c进行修饰;

(vi)所述反义链采用方式A进行修饰,且所述正义链采用方式d进行修饰;

(viii)所述反义链采用方式D进行修饰,且所述正义链采用方式b进行修饰;

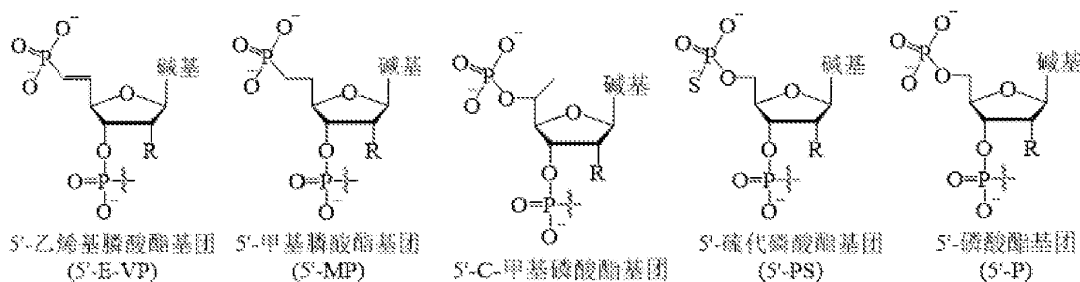
(ix)所述反义链采用方式E进行修饰,且所述正义链采用方式b进行修饰;

(x)所述反义链采用方式F进行修饰,且所述正义链采用方式b进行修饰;

或,按照5'末端到3'末端的方向,所述双链寡核苷酸采用以下组合方式(1)-(8)中任一方式进行修饰:

- (1) 所述反义链采用方式A'进行修饰,且所述正义链采用方式a'进行修饰;
- (2) 所述反义链采用方式B'进行修饰,且所述正义链采用修饰方式a'进行修饰;
- (3) 所述反义链采用方式C'进行修饰,且所述正义链采用修饰方式a'进行修饰;
- (4) 所述反义链采用方式B'进行修饰,且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰;
- (5) 所述反义链采用方式C'进行修饰,且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰;
- (6) 所述反义链采用方式D'进行修饰,且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰;
- (7) 所述反义链采用方式E'进行修饰,且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰;
- (8) 所述反义链采用方式F'进行修饰,且所述正义链采用修饰方式b'进行修饰。

6. 如权利要求1-5任一项所述的修饰模板,其特征在于,所述反义链的5'末端起始第1位核苷酸为5'-磷酸核苷酸或5'-磷酸类似物修饰的核苷酸,其包括但不限于以下5'位磷酸化基团:5'-乙烯基磷酸酯基团(5'-E-VP);5'-甲基磷酸酯基团(5'-MP);5'-C-甲基磷酸酯基团;5'-硫代磷酸酯基团(5'-PS);5'-磷酸酯基团(5'-P),其结构示意图如下:

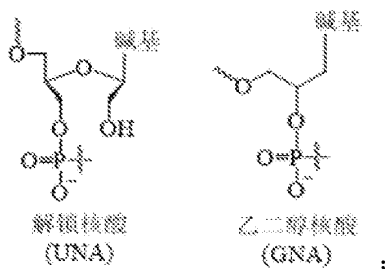


其中,R为氢、羟基、胺基、C₁₋₄烷基、芳香基、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄烷基羰基氨基或卤素;

碱基选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶;

较佳地,所述反义链的5'末端起始第1位核苷酸为5'-乙烯基-(E)-磷酸酯-2'-甲氧基修饰的核苷酸。

7. 如权利要求1-6任一项所述的修饰模板,其特征在于,反义链自5'端起第2至第8位中的一个或多个核苷酸,优选第6和/或第7位采用修饰基团,其中所述修饰基团优选自UNA、GNA或DNA,其中UNA和GNA结构如下:



所述双链寡核苷酸中的碱基选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶以及尿嘧啶中的一种或多种。

8. 一种双链寡核苷酸，其特征在于，所述双链寡核苷酸经如权利要求 1-7 中任一项所述的修饰模板修饰；

较佳地，所述双链寡核苷酸靶向如下基因的 mRNA 中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因。

9. 一种用于降低基因表达的缀合物，其特征在于，所述缀合物包括如权利要求 8 所述的双链寡核苷酸，及与其缀合的配体。

10. 如权利要求 9 述的缀合物，其特征在于，所述配体缀合在所述双链寡核苷酸的正义链的 3'-末端或 5'-末端；

较佳地，所述配体为一种或多种利用二价或三价的分支键联体附接的 GalNAc 衍生物；

更佳地，所述双链寡核苷酸与配体 L96、G4、G5、G6 或 G7 缀合。

11. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包括如权利要求 8 述的双链寡核苷酸或如权利要求 9 或 10 所述的缀合物，以及药学上可接受的载体。

12. 如权利要求 8 所述的双链寡核苷酸、如权利要求 9 或 10 所述的缀合物或如权利要求 11 所述的药物组合物在制备调节或治疗疾病和病症的药物中的应用；所述药物通过所述双链寡核苷酸、所述缀合物或药物组合物下调基因表达达到调节或治疗疾病和病症的效果；

较佳地，所述基因选自以下基因中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因；

更佳地，所述疾病选自慢性乙型肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌，急性乙型肝炎，以及 HBV/丁型肝炎病毒合并感染相关疾病中的一种或多种；

所述疾病选自高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、高血压危症、高血压急迫状态、孤立性收缩期和舒张期高血压、妊娠相关的高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏高血压、高眼压症、青光眼、肺动脉高压、门静脉高压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压；高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、库欣综合征和其他糖皮质激素过多状态(包括慢性类固醇治疗)、嗜铬细胞瘤、肾素瘤、继发性醛固酮增多症和其他盐皮质激素过多状态、睡眠呼吸暂停、甲状腺/甲状旁腺疾病、心力衰竭、心肌梗死、心绞痛、中风、糖尿病、肾病、肾衰竭、系统性硬化、宫内发育迟缓(IUGR)和胎儿生长受限；或

所述疾病选自高胆固醇血症、动脉粥样硬化、血脂异常和心脑血管疾病中的一种。

13. 如权利要求 8 所述的双链寡核苷酸、如权利要求 9 或 10 所述的缀合物或如权利要求 11 所述的药物组合物，用于调节或治疗疾病和病症；所述双链寡核苷酸、所述缀合物或所述药物组合物过下调基因表达达到调节或治疗疾病和病症的效果；

较佳地，所述基因选自以下基因中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因；

更佳地，所述疾病选自慢性乙型肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌，急性乙型肝炎，以及 HBV/丁型肝炎病毒合并感染相关疾病中的一种或多种；

所述疾病选自高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、高血压危症、高血压急迫状态、孤立性收缩期和舒张期高血压、妊娠相关的高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏高血压、高眼压症、青光眼、肺动脉高压、门静脉高压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压；高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、库欣综合征和其他糖皮质激素过多状态(包括慢性类固醇治疗)、嗜铬细胞瘤、肾素瘤、继发性醛固酮增多症和其他盐皮质激素过多状态、睡眠呼吸暂停、甲状腺/甲状旁腺疾病、心力衰竭、心肌梗死、心绞痛、中风、糖尿病、肾病、肾衰竭、系统性硬化、宫内发育迟缓(IUGR)和胎儿生长受限；或

所述疾病选自高胆固醇血症、动脉粥样硬化、血脂异常和心脑血管疾病中的一种。

14. 一种用于治疗或预防可通过下调基因表达进行调节或治疗疾病和病症的方法，其特征在于，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的如权利要求 8 所述的双链寡核苷酸、如权利要求 9 或 10 所述的缀合物或如权利要求 11 所述的药物组合物；

较佳地，所述基因选自以下基因中的一种：PCSK9 基因、HBV 基因和 AGT 基因；

更佳地，所述疾病选自慢性乙型肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌，急性乙型肝炎，以及 HBV/丁型肝炎病毒合并感染相关疾病中的一种或多种；

所述疾病选自高血压、临界性高血压、原发性高血压、继发性高血压、高血压危症、高血压急迫状态、孤立性收缩期和舒张期高血压、妊娠相关的高血压、糖尿病性高血压、顽固性高血压、难治性高血压、阵发性高血压、肾血管性高血压、戈德布拉特氏高血压、高眼压症、青光眼、肺动脉高压、门静脉高压、系统性静脉高血压、收缩期高血压、不稳定性高血压；高血压性心脏病、高血压性肾病、动脉粥样硬化、动脉硬化、血管病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、慢性心力衰竭、心肌病、糖尿病性心肌病、肾小球硬化症、主动脉缩窄、主动脉瘤、心室纤维化、库欣综合征和其他糖皮质激素过多状态(包括慢性类固醇治疗)、嗜铬细胞瘤、肾素瘤、继发性醛固酮增多症和其他盐皮质激素过多状态、睡眠呼吸暂停、甲状腺/甲状旁腺疾病、心力衰竭、心肌梗死、心绞痛、中风、糖尿病、肾病、肾衰竭、系统性硬化、宫内发育迟缓(IUGR)和胎儿生长受限；或

所述疾病选自高胆固醇血症、动脉粥样硬化、血脂异常和心脑血管疾病中的一种。