

LPA 抑制剂及其用途

交叉引用

本申请要求 2021 年 09 月 18 日递交的，第 202111110773.1 号，名称为 **LPA 抑制剂及其用途** 的中国专利申请，和 2022 年 01 月 20 日递交的，第 202210068123.3 号，名称为 **siRNA 缀合物及其用途** 中国专利申请的优先权，它们通过引用全文结合至本申请中。

技术领域

本申请涉及生物医药技术领域，具体的涉及一种 LPA 抑制剂及其用途。

背景技术

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。由于使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达 (其中长度超过三十的 dsRNA 会引起干扰素毒性)，所以该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的治疗领域。短 dsRNA 在包括脊椎动物的许多生物体中引导基因特异性转录后沉默，这已成为一种可用于研究基因功能的工具。RNAi 由 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)介导，RISC 是一种由 siRNA 与 Argonaute 蛋白和 Dicer 酶复合形成的复合物。其中，先由 Dicer 酶剪切得到小 dsRNA 中间分子即小 RNA 双链，然后这些小 RNA 双链先解链，形成“有功能的”单链，由此为 RISC 复合体起到“向导”作用。对于每一个小 dsRNA 分子来说，只有一条链，即向导链才能与特定的 Argonaute 蛋白结合，形成活化的 RISC 复合体。RNA 干扰剂诸如 siRNA 和微小 RNA 是通过基因沉默，即通过使 mRNA 分子降解来抑制蛋白质的基因翻译以阻止形成蛋白质的寡核苷酸。

脂蛋白(a)[Lp(a)]是一种异质型低密度脂蛋白(LDL)-样颗粒，其含有脂质核心和载脂蛋白 B(apoB-100)，及独特的组分，即通过二硫键附接至 apoB-100 的载脂蛋白(a) (apo(a))。

Lp(a)(Apo(a))基因主要在肝脏中表达，并且表达限于人类和非人灵长类动物。人类体内的 Lp(a)水平经遗传限定，并且不随饮食、运动或其它生活方式改变而显著改变。Lp(a)的长度根据存在的 Kringle KIV2 结构域的数目而变化，且其表达与存在的结构域的数目呈负相关。

在多项研究中对 Lp(a)水平的分析提示高 Lp(a)水平是心血管疾病、中风和其它相关病症(包括动脉粥样硬化性狭窄)的独立风险因子。此外,全基因组关联分析也涉及 LPA 作为诸如动脉粥样硬化性狭窄的疾病的遗传风险因子。因此,需要研发出能与 LPA 相关疾病相关的治疗剂,尤其是降低 LPA 表达水平的药物制剂。

发明内容

本申请的目的之一在于提供一种能够调节(如降低)细胞、受试者如哺乳动物(例如人)中 LPA(apo(a))水平的 LPA RNAi 剂及方法。LPA 是编码载脂蛋白(a) (apo(a)) (即脂蛋白(a)颗粒(Lp(a))的关键组分)基因的名称,人类的 DNA 序列 (SEQ ID NO.1) 如图 1a 和图 1b 所示。LPA(也被称为 apo(a))RNA 干扰(RNAi)剂(也被称为 RNAi 触发剂或触发剂)和含有 LPA RNAi 剂的组合物以用于选择性且有效地抑制 LPA 基因的表达。

本申请的另一目的还在于提供包含所述 LPA RNAi 剂的药物组合物。

本申请的另一目的还在于提供所述的 LPA RNAi 剂在用于预防或治疗疾病或病症或者制备预防或治疗疾病或病症所用的药物中的用途。

本申请第一方面提供一种 LPA RNA 干扰(RNAi)剂,包含第一核苷酸序列,所述第一核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 2 至 SEQ ID NO: 183 中的任一个核苷酸序列或者与之互补的核苷酸序列中的至少 12 个连续核苷酸,或者与所述至少 12 个连续核苷酸相差不超过 3 个核苷酸的序列,所述核苷酸为经修饰或者未被修饰的状态。

优选地,所述第一核苷酸序列由 12 至 30 个核苷酸组成,优选为 19 至 23 个核苷酸。

优选地,所述第一核苷酸序列为单链寡核苷酸或双链核苷酸。

优选地,所述第一核苷酸序列中的一个或多个核苷酸被修饰以形成经修饰的核苷酸。

优选地,所述第一核苷酸序列包括表 2 中列举的任意一个经修饰的正义链核苷酸序列或与之相差不超过 3 个核苷酸的序列。

优选地,所述第一核苷酸序列为正义链或反义链。

优选地,所述第一核苷酸序列包括反义链和正义链的双链结构。

优选地,所述正义链和/或反义链独立地包含一个或多个经修饰的核苷酸。

优选地,修饰核苷酸是 2'-氟修饰核苷酸、2'-O-甲基修饰核苷酸、2'-O-甲氧基乙基修饰核苷酸、2'-O-烷基修饰核苷酸、2'-O-烯丙基修饰核苷酸、双环核苷酸、脱氧核糖核苷酸、EVP、UNA 和 GNA 中的至少一种。

优选地, 所述反义链 5'端第 2 位、第 5 位、第 6 位、第 8 位、第 10 位、第 14 位和第 16 位中的至少一个位点被 2'-氟修饰核苷酸修饰, 优选为其中 5-7 个位点被 2'-氟修饰核苷酸修饰。

优选地, 所述正义链和/或反义链独立地包含一个或多个硫代磷酸酯键; 优选地, 所述正义链在 3'和 5'末端的末端核苷酸之间包含两个连续的硫代磷酸酯键, 或者, 所述反义链在 3'和 5'末端的末端核苷酸之间包含两个连续的硫代磷酸酯键。

在某些实施方案中, 所述反义链包括表 2 中任意一个经修饰的反义链核苷酸序列或与其相差不超过 3 个核苷酸的序列。

进一步优选地, 所述正义链和反义链具有以下特征: (1) 所述正义链包含表 2 中列举的经修饰的正义链序列或由其组成, 所述反义链包含表 2 中列举的经修饰的反义链序列或由其组成

优选地, 所述 RNA 干扰剂还包含配体。

优选地, 所述配体包括靶向基团。

优选地, 所述靶向基团包括脱唾液酸糖蛋白受体配体。

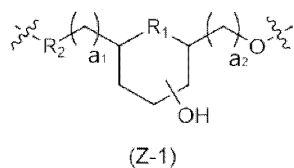
优选地, 所述脱唾液酸糖蛋白受体配体包含半乳糖簇。

优选地, 所述配体用于缀合至所述正义链和/或反义链, 优选地, 用于缀合至正义链。

在一个实施方式中, 所述 LPARNA 干扰剂包括如下结构:

Z-X (I),

其中 X 为核苷酸序列, Z 为核苷酸序列的第一接头部分, 其中 Z 与 X 可以直接连接, 也可以通过化学基团连接, 且 Z 的通式如(Z-1)所示, 其中 O 基一端与核苷酸序列连接:



其中 R_1 是 O、S、 NR_3 或者 CR_3R_4 , 其中 R_3 和 R_4 各自独立地是氢、卤素、取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、或者 取代或未取代的杂环或取代或未取代的环烷基;

其中 R_2 为 -O-, -S-, -NH-, -CH₂-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -CH₂NH-, -CH₂O-, -NH-C(O)-CH₂-, -C(O)-CH₂-NH-, 或者 -NH(CO)NH-, 其中, 所述 -CH₂-还可以任选被选自卤素、烷基、烷氧基和烷氨基中的一种取代基取代; 所述 a_1 和 a_2 相同或者不

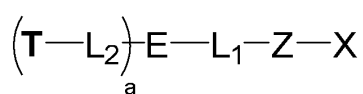
相同，并且分别选自 0 到 20 的整数，优选为 1 到 10 的整数。

优选地，X 代表的核苷酸序列为上述第一核苷酸序列。

优选地，所述第一接头部分 Z 与第二接头部分 L₁ 连接，所述第二接头部分 L₁ 与分支点基团 E 连接。

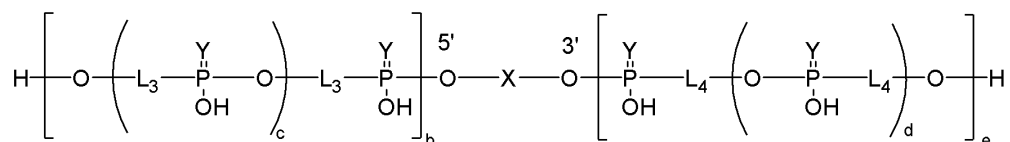
优选地，所述分支点基团 E 与 a 个靶向组合体连接，所述 a 为选自 0 到 10 的整数，优选 1 到 5 的整数；其中所述靶向组合体包括 1:1 比例的栓系部分 L₂ 和靶向部分 T。

具体地，所述 LPARNA 干扰剂结构式可以表示为：



(I-0)。

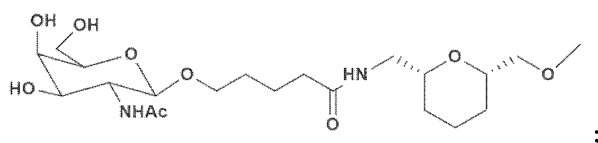
一个实施方案中，所述 LPARNA 干扰剂具有如下结构：



(II)，

通式 (II) 中：

L₃ 包括第三接头部分，L₄ 为靶向部分，具体地，L₃ 和 L₄ 可以相同或者不同，优选地，L₃ 和 L₄ 分别为以下结构：



X 为核苷酸序列，可以为正义链或反义链，

Y 是 O 或 S，

其中 b, c, d 和 e 分别选自 0 到 10 的整数，且 b 和 e 不同时为 0。在一个实施例中，b 为 0，e 为 3 至 6 的整数。

另一方面，本申请还提供了前述的 LPARNA 干扰剂在制备药物中的用途，所述药物用于减少哺乳动物中 LPA mRNA 或蛋白质表达，或者用于预防和/或治疗相关疾病或病症、或者降低疾病或病症的风险。

在某些实施方案中，所述相关疾病或病症是指 LPA 蛋白的表达水平为 100 nmol/L 或以

上。

在某些实施方案中，其中所述疾病或病症包括肝源性疾病。

在某些实施方案中，其中所述疾病或病症包括炎性、心脑血管或代谢疾病。

在某些实施方案中，其中所述心脑血管疾病包括高脂血症、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄。

在某些实施方案中，所述药物包括药学上可接受的赋形剂、优选地，所述药学上可接受的赋形剂为 PBS 缓冲液或生理盐水。

在某些实施方案中，所述药物为组合物，还包括 LDL-C、胆固醇和甘油三酯降低剂中的至少一种。

在某些实施方案中，所述药物为组合物，还包括 PCSK9 RNAi 抑制剂、PCSK9 抗体抑制剂和 PCSK9 小分子抑制剂。

另一方面，本申请提供一种用于减少细胞或组织中 LPA mRNA 或蛋白质表达的方法，其包括：使细胞或组织与有效量的前述的 LPARNAi 剂或前述的药物组合物的接触。

在某些实施方案中，其中所述细胞是肝细胞。

在某些实施方案中，其中所述组织是肝脏组织。

在某些实施方案中，其中所述细胞和组织是离体的。

在某些实施方案中，其中所述细胞和组织位于受试者体内。

另一方面，本申请提供一种用于减少受试者体内 LPA mRNA 或蛋白质表达的方法，其包括：向有此需要的受试者施用有效量的前述的 LPARNAi 剂或前述的药物组合物。

另一方面，本申请提供一种预防或治疗疾病或病症的方法，所述方法包括向目标受试者施用有效量的前述的 LPARNAi 剂或前述的药物组合物。

在某些实施方案中，其中所述化合物或所述药物组合物以皮下方式、静脉内方式、口服、经直肠或腹膜内施加途径向受试者施用。

有益效果：实验证明，本申请的 LPARNAi 剂，在离体实验和活体（在体）实验（小鼠体内）中，均可以显著抑制 Apo(a) 蛋白及对应的 mRNA 的表达。其中，在小鼠实验中，对于 Apo(a) 蛋白的表达，高剂量下最高可以实现 99% 的敲低抑制。

附图说明

图 1a-1b 为 SEQ ID NO.1 的具体序列。

图 2 为本发明实施例 7 的实验结果。

图 3 为本发明实施例 8 的实验结果。

图 4 为本发明实施例 9 的实验结果。

图 5 为本发明实施例 10 的实验结果。

图 6 为本发明实施例 11 的实验结果。

具体实施方式

为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白，以下结合附图、实施例及化学反应式，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

术语定义

单击或点击此处输入文字。

在本申请中，术语“LPA”，“Apo(a)”或“apo(a)”可以互换使用，通常意指编码 apo(a)的任何核酸或蛋白质序列。例如，在某些实施方案中，apo(a)包括编码 apo(a)的 DNA 序列、从编码 apo(a)的 DNA(包括含有内含子和外显子的基因组 DNA)转录的 RNA 序列、编码 apo(a)的 mRNA 序列或 apo(a)的肽序列。

在本申请中，术语“apo(a)特异性抑制剂”是指能够特异性地抑制 apo(a)核酸和/或 apo(a)蛋白的表达的任何试剂。例如，apo(a)特异性抑制剂包括核酸(包括反义寡核苷酸)、肽、抗体、小分子和其它能够抑制 apo(a)核酸和/或 apo(a)蛋白的表达的试剂。在某些实施方案中，通过特异性地调节 apo(a)核酸表达和/或 apo(a)蛋白表达，apo(a)特异性抑制剂可影响脂质运输系统的其它组分，包括下游组分。类似地，在某些实施方案中，apo(a)特异性抑制剂可影响动物中的其它分子过程。

在本申请中，术语“核酸”和“多核苷酸”可互换使用，并指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或者核糖核苷酸或者其类似物)的聚合形式，可以是双链和单链分子。以下是多核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段(例如探针、引物、EST 或 SAGE 标签)、外显子、内含子、信使 RNA(mRNA)、转移 RNA、核糖体 RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支的多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针、siRNA、miRNA、shRNA、RNAi 试剂和引物。多核苷酸可以在一个或多个碱基、糖和/或磷酸酯处以本领域已

知的任何各种修饰或取代进行修饰或取代。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸，例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。此外，可以在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。多聚核苷酸可以在聚合后修饰，例如通过与标记组分偶联。除非另有说明或要求，否则本申请作为多核苷酸的任何实施方案包括双链形式和已知或据预测构成双链形式的两种互补单链形式中的每一种。

在本申请中，“靶核酸”或“靶序列”通常意指反义化合物意图与其杂交以产生希望的效应（如反义活性）的核酸分子。示例性的反义化合物包括反义寡核苷酸，反义寡核苷酸与其靶核酸具有足够的互补性以允许在生理条件下杂交。在某些实施方案中，“靶核酸”包括但不限于编码哺乳动物 LPA 的 DNA 或 RNA，诸如人 LPA mRNA。

在本申请中，术语“寡核苷酸”通常是指由多个核苷酸残基(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或其相关的结构变体或合成类似物)通过磷酸二酯键(或其相关的结构变体或合成类似物)连接组成的聚合物。因此，虽然术语“寡核苷酸”一般指其中核苷酸残基和它们之间的连接是天然产生的核苷酸聚合物，但应理解，该术语的范围也包括各种类似物，包括但不限于：肽核酸(PNA)、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核酸等。该分子的确切大小可取决于具体应用。寡核苷酸一般长度较短，通常约有 10-30 个核苷酸残基，但该术语也可指任何长度的分子，尽管术语“多核苷酸”或“核酸”一般用于较大的寡核苷酸。

在某些实施方案中，寡核苷酸包含一个或多个未修饰的核糖核苷(RNA)和/或未修饰的脱氧核糖核苷(DNA)和/或一个或多个修饰核苷。术语“修饰寡核苷酸”通常意指包含至少一个修饰核苷和/或至少一个修饰的核苷间键联的寡核苷酸。

在本申请中，术语“修饰的核苷”通常意指与天然存在的 RNA 或 DNA 核苷相比包含至少一个化学修饰的核苷。修饰的核苷包含修饰的糖部分和/或修饰的核碱基。

在本申请中，术语“核碱基”通常意指杂环嘧啶或嘌呤化合物，它是所有核酸的组分且包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。核苷酸可包括经修饰的核苷酸或核苷酸模拟物、无碱基位点(Ab 或 X)或替代物替代部分。如本申请所使用，“核碱基序列”通常意指不依赖于任何糖、键联或核碱基修饰的连续核碱基的顺序。术语“未修饰的核碱基”或“天然存在的核碱基”通常意指 RNA 或 DNA 的天然存在的杂环核碱基：嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)；以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)(包括 5-甲基 C)和尿嘧啶(U)。“修饰的核碱基”通常意指并非天然存在的核碱基的任何核碱基。

在本申请中，术语“糖部分”通常意指核苷的天然存在的糖部分或修饰的糖部分。术语“天

然存在的糖部分”通常意指如在天然存在的RNA中发现的呋喃核糖基或如在天然存在的DNA中发现的脱氧呋喃核糖基。“修饰的糖部分”意指取代的糖部分或糖替代物。

在本申请中，术语“核苷间键联”通常意指寡核苷酸中相邻核苷之间的共价键联。“天然存在的核苷间键联”意指3'至5'磷酸二酯键联。“修饰的核苷间键联”意指除了天然存在的核苷间键联之外的任何核苷间键联。

在本申请中，术语“反义寡核苷酸”是指单链寡核苷酸分子，其具有与靶核酸(例如，目标基因组序列，mRNA前体，或mRNA分子)的相应片段互补的核碱基序列。在某些实施方案中，反义寡核苷酸的长度为12至30个核碱基。在某些实施方案中，反义寡核苷酸是具有与靶核酸(如LPA多核苷酸)序列互补的核苷酸序列的未经修饰或经修饰的核酸。

在本申请中，术语“反义链”通常是指RNAi剂(例如dsRNA)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”通常指反义链上与本申请定义的序列(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'末端和/或3'末端的5、4、3或2个核苷酸内。

在本申请中，术语“正义链”(S)通常是指RNAi剂的这样一条链，所述链包括与作为在此定义的术语反义链的区域基本互补的区域。“正义”链有时被称为“有义”链。借助它们的序列，反义链靶向所希望的mRNA，同时正义链靶向不同靶标。因此，如果反义链被掺入RISC中，则正确的靶标被靶向。正义链的掺入可以导致脱靶效应。这些脱靶效应可以通过在正义链上使用修饰或使用5'端帽加以限制。

在本申请中，术语“互补”当用于描述就第二核苷酸序列(如RNAi剂反义链)而言的第一核苷酸序列(如RNAi剂正义链或LPA mRNA)时是指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一定条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交(形成碱基对氢键)并形成双链体或双螺旋结构的能力。互补序列包括沃森-克里克碱基对(Watson-Crick base pairs)或非沃森-克里克碱基对，并且包括天然或经修饰的核苷酸或核苷酸模拟物，只要以上关于它们的杂交能力而言的需求得以实现。“互补”不必需在每个核苷上均具有核碱基互补性。相反，可以容忍一些错配。

在本申请中，术语“完全互补”通常意指第一多核苷酸的连续序列中的全部(100%)碱基将与第二多核苷酸的连续序列中的相同数目的碱基杂交。连续序列可以包含第一或第二核苷酸序列的全部或一部分。如本申请所用，“部分互补”通常意指在杂交的碱基序列对中，第一多

核苷酸的连续序列中至少约 70% 的碱基将与第二多核苷酸的连续序列中相同数目的碱基杂交。如本申请所用,“基本上互补”通常意指在杂交的碱基序列对中,第一多核苷酸的连续序列中至少约 90% 的碱基将与第二多核苷酸的连续序列中相同数目的碱基杂交。如本申请所用的术语“互补”、“完全互补”和“基本上互补”可以就在 RNAi 剂的正义链与反义链之间或者在 RNAi 剂的反义链与 LPA mRNA 的序列之间的碱基匹配而言使用。序列同一性或互补性不依赖于修饰。为了测定同一性或互补性的目的,例如,A 和 Af 与 U(或 T)互补并且与 A 同一。

在本申请中,术语“配体”通常是指能够共价地或以其它化学方式与生物活性物质(如寡核苷酸)结合的任何化合物或分子。在某些实施方案中,配体能够与另一种化合物例如受体直接或间接地相互作用,与配体相互作用的受体可以存在于细胞表面上,或可替代地可以是细胞内和/或细胞间受体,配体与受体的相互作用可以导致生化反应,或可以仅仅是物理相互作用或结合。

在本申请中,术语“诱导”、“抑制”、“加强”、“升高”、“增加”、“减少”、“降低”等通常表示两个状态之间的定量差异。例如,“有效抑制 apo(a) 的活性或表达的量”意指处理样品中 apo(a) 的活性或表达的水平将低于未处理样品中 apo(a) 活性或表达的水平。所述术语例如适用于表达水平和活性水平。术语“减少”和“降低”可互换使用并且通常表示小于原来的任何变化。“减少”和“降低”是相对的术语,需要在测量前和测量后间进行比较。“减少”和“降低”包括完全耗竭。

在某些实施方案中,术语“降低”可以通过本领域已知标准方法(诸如本申请中描述的那些)检测的,基因、基因产物例如蛋白质或生物标志物在第一样品中的表达水平/量与相应基因、基因产品例如蛋白质或生物标志物在第二样品中的表达水平/量相比约 5% 至 95%、或 100% 的总体降低。在某些实施方案中,术语“降低”指受试样品中基因或生物标志物的表达水平/量的降低,其中该降低是指相应基因或生物标志物的表达水平/量的至少约 0.9 倍至 0.01 倍。

在本申请中,术语“表达”通常意指基因最终产生蛋白质的过程。表达包括但不限于转录、转录后修饰(例如,剪接、聚腺苷酸化、添加 5'-帽)以及翻译。

在本申请中,术语“药学上可接受的”通常是指不干扰活性成分生物学活性的有效性的一种或多种无毒物质。这类制剂通常可含有盐、赋形剂、缓冲剂、防腐剂、相容性载体和任选的其它治疗剂。用于医药时,盐应该是药学上可接受的盐,但可方便地使用非药学上可接受的盐来制备药学上可接受的盐,不能将它们排除在本申请范围以外。这类药理学和药学上可接受的盐包括由以下酸制备的盐:氢氯酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨

酸、柠檬酸、硼酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。药学上可接受的盐也可制备成碱金属盐或碱土金属盐，如钠盐、钾盐或钙盐。

在本申请中，术语“预防和/或治疗”不仅包括预防和/或治疗疾病，还通常包括预防疾病的发作，减缓或逆转疾病的进展，预防或减缓与疾病相关的一种或多种症状的发作，减少和/或减轻与疾病相关的一种或多种症状，降低疾病和/或与其相关的任何症状的严重程度和/或持续时间和/或预防疾病和/或与其相关的任何症状的严重程度的进一步增加，预防、减少或逆转由疾病引起的任何生理损伤，以及通常对正在治疗的患者有益的任何药理学作用。本申请的 RNAi 剂或药物组合物形成可行的治疗剂不需要实现完全治愈或根除疾病的任何症状或表现。如在相关领域中所认识到的，用作治疗剂的药物可降低给定疾病状态的严重程度，但不需要消除疾病的每种表现才能被认为是有用治疗剂。类似地，预防性施用的治疗构成可行的预防剂不需要完全有效地预防病症的发作。简单地在受试者中减少疾病的影响(例如，通过减少其症状的数量或严重程度，或通过提高另一种治疗的有效性，或通过产生另一种有益效果)，或减少疾病发生或恶化的可能性就足够了。

在本申请中，术语“疾病”或“病症”可以互换使用，通常是指受试者与正常状态的任意偏离，例如身体或某些器官的状态的任何变化，妨碍或扰乱了功能的履行，和/或在患病或与其接触的人中引起症状例如不适、机能障碍、痛苦或甚至死亡。疾病或病症还可以称为失调(distemper)、不适(ailing)、小病(ailment)、疾病(malady)、紊乱(disorder)、疾病(sickness)、生病(illness)、身体不适(complaint)、inderdisposition 或 affectation。

本申请中，术语“施用”通常是指通过任意引入或递送途径将本申请药物制剂引入受试者的身体中。可以采用本领域技术人员已知的用于使细胞、器官或组织与所述药物接触的任何方法。所述施用可以包括而不限于静脉内、动脉内、鼻内、腹内、肌内、皮下或口服。每日剂量可以划分成一个、两个或更多个合适形式的剂量以在某个时间段期间的一个、两个或更多个时间施用。

在本申请中，术语“接触”通常是指两种两个或更多个不同类型的物质以任何顺序、任何方式以及任何时长接触在一起。接触可以发生在体内(in vivo)、间接体内(ex vivo)或体外(in vitro)。在一些实施方案中，可以是指使本申请的 RNAi 剂或组合物直接接触细胞或组织。在另一些实施方案中，该术语是指使本申请的 RNAi 剂或组合物间接接触细胞或组织。例如，本申请的方法包括其中受试者接触本申请的 RNAi 剂或组合物，然后 RNAi 剂或组合物通过扩散或本领域已知的任何其他主动运输或被动运输过程(化合物通过该过程在体内循环)接触

细胞或组织的方法。

在本申请中，术语“有效量”或“有效剂量”通常是指足以实现或至少部分实现所需效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”通常是当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时促进疾病消退(这通过疾病症状严重程度降低、疾病无症状期的频度和持续时间的增加、或者由于罹患疾病而引起的损害或残疾的预防来证明)的任何药物量。药物的“预防有效量”或“预防有效剂量”通常是指当单独或与另一种治疗剂组合给有疾病发展或疾病复发的风险的受试者施用抑制疾病的发展或复发的药物量。在某些实施方案中，“有效量”是指产生预期药理学、治疗性或预防性结果的 RNAi 剂的量。

在本申请中，术语“受试者”通常是指需要诊断、预后、改善、预防和/或治疗疾病的人或非人动物(包括哺乳动物)，诸如人、非人灵长类动物(猿、长臂猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩、猕猴)、家畜(狗和猫)、农场动物(马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。人受试者包括胎儿、新生儿、婴儿、青少年和成人受试者。受试者包括动物疾病模型。

在本申请中，术语“包括”、“包含”、“具有”、“可以”、“含有”及其变体通常旨在是开放式过渡性短语、术语或词语，其不排除额外行为或结构的可能性。术语“由……组成”通常表示不能存在别的组分(或同样地，特征、整数、步骤、等)。除非上下文另有明确规定，未限定数量的名词也包括复数指示物。

当术语“约”用于指涉数值范围时，截值或特定数值用于指示所载明的数值可与该列举数值有多达 10% 的差异。因此，术语“约”可用于涵盖自特定值 $\pm 10\%$ 或更少的变异、 $\pm 5\%$ 或更少的变异、 $\pm 1\%$ 或更少的变异、 $\pm 0.5\%$ 或更少的变异、或 $\pm 0.1\%$ 或更少的变异。

LPA RNAi 剂

本申请所述的用于抑制 LPA 基因的表达的 RNAi 剂(在本申请中被称为 LPA RNAi 剂)在递送至表达 LPA 基因的细胞后，通过 RNA 干扰(RNAi)的生物过程在体外和/或体内抑制或敲低 LPA 的表达。如本申请所用，除非另外特别指示，否则 LPA 在适当情况下可能是指 LPA 基因、LPA mRNA 或 LP(a) 蛋白质。RNAi 剂包括但不限于：短干扰 RNA(siRNA)、双链 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA) 和短发夹 RNA(shRNA)。

一方面，本申请提供了一种 LPA RNAi 剂，其可以包含靶向编码 LPA(apo(a)) 的核酸分子的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含 SEQ ID NO: 2 至 SEQ ID NO: 183 中的任一个核苷酸序列中的至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22 或至少 23 个连续核苷酸。所述核苷酸序列可以为修饰状态(以及修饰后加上配

体) 和无修饰的原始状态。

在某些实施方案中, 所述寡核苷酸由12至30个核苷酸组成。例如, 所述寡核苷酸的长度可以为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸长。又例如, 所述的所述寡核苷酸的长度可以为17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核苷酸长。

在某些实施方案中, 其中所述寡核苷酸包含选自以下序列的核苷酸序列: SEQ ID NO: 2至SEQ ID NO: 183中任意一个或与其相差不超过3个核苷酸的序列。例如, 当不同于SEQ ID NO: 2至SEQ ID NO: 183中任意一个所示的核苷酸序列, 发生最多一个、二个或三个核苷酸替代(例如, 腺苷被尿嘧啶替代)、缺失或添加时, 衍生的RNAi剂仍可以具有降低的抑制活性, 与作为衍生物来源的SEQ ID NO: 2至SEQ ID NO: 183中任意一个所示的核苷酸序列相比, 不低于20%的抑制作用。

在某些实施方案中, 其中所述寡核苷酸为单链寡核苷酸或双链寡核苷酸。

例如, 所述寡核苷酸可以为反义寡核苷酸。又例如, 所述寡核苷酸为siRNA。

例如, 所述寡核苷酸可以仅包含反义链。又例如, 所述寡核苷酸可以包含正义链与反义链。

在某些实施方案中, 所述的LPA RNAi剂正义链和反义链的长度独立地为17至30个核苷酸长。在某些实施方案中, 正义链和反义链独立地为17至26个核苷酸长。在某些实施方案中, 正义链和反义链为19-26个核苷酸长。在某些实施方案中, 所述的RNAi剂正义链和反义链独立地为17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核苷酸长。正义链和反义链可为相同长度或它们可为不同长度。在某些实施方案中, 正义链和反义链各自为26个核苷酸长。在某些实施方案中, 正义链为23个核苷酸长且反义链为21个核苷酸长。在某些实施方案中, 正义链为22个核苷酸长且反义链为21个核苷酸长。在某些实施方案中, 正义链为21个核苷酸长且反义链为21个核苷酸长。在某些实施方式中, 正义链为19个核苷酸长且反义链为21个核苷酸长。

在某些实施方案中, 反义链序列与LPA mRNA中存在的核苷酸序列(有时被称为靶序列)100%(完美)互补或至少90%(基本上)互补。正义链序列与反义链中的序列100%(完美)互补或至少90%(基本上)互补, 并因此正义链序列与LPA mRNA中存在的核苷酸序列(靶序列)完美相同或至少90%相同。

在某些实施方案中, 所述LPA RNAi剂的正义链和反义链退火以形成双链体。LPA RNAi

剂的正义链和反义链彼此部分、基本上或完全互补。在互补双链体区域内，正义链核心序列与反义核心序列至少90%互补或100%互补。在某些实施方案中，正义链核心序列含有与反义链核心序列的相应的17、18、19、20或21个核苷酸序列至少90%或100%互补的至少17、至少18、至少19、至少20或至少21个核苷酸的序列(即，LPARNAi剂的正义链和反义核心序列具有至少90%的碱基配对或100%的碱基配对的至少17、至少18、至少19、至少20或至少21个核苷酸的区域)。

在某些实施方案中，正义链和/或反义链可以在核心序列的3'末端、5'末端或3'和5'末端两处任选且独立地含有另外的1、2、3、4、5或6个核苷酸(延伸)。反义链如果存在另外的核苷酸，那么与LPA mRNA中的相应序列互补或者不能互补。正义链如果存在另外的核苷酸，那么可能与LPA mRNA中的相应序列相同或者不相同(identical)。反义链如果存在另外的核苷酸，那么可能与相应的正义链的另外核苷酸互补或者不互补。

在某些实施方案中，所述LPARNAi剂包含具有1、2、3、4、5或6个核苷酸长的3'延伸的反义链。在其它实施方案中，所述LPARNAi剂包含具有1、2或3个核苷酸长的3'延伸的反义链。在某些实施方案中，一个或多个反义链延伸核苷酸包括尿嘧啶或胸苷核苷酸或与相应的LPA mRNA序列互补的核苷酸。

在某些实施方案中，LPARNAi剂包含具有1、2、3、4或5个核苷酸长的5'延伸的反义链。在其它实施方案中，LPARNAi剂包含具有1或2个核苷酸长的5'延伸的反义链。在某些实施方案中，一个或多个反义链延伸核苷酸包括尿嘧啶或胸苷核苷酸或与相应的LPA mRNA序列互补的核苷酸。反义链可以具有上述任何3'延伸与所述的任何5'反义链延伸的组合。

在某些实施方案中，所述LPARNAi剂包含具有1、2、3、4或5个核苷酸长的3'延伸的正义链。在某些实施方案中，一个或多个正义链延伸核苷酸包括腺苷、尿嘧啶或胸苷核苷酸、AT二核苷酸或与LPA mRNA序列中的核苷酸对应的核苷酸。

在某些实施方案中，LPARNAi剂包含具有1、2、3、4、5或6个核苷酸长的5'延伸的正义链。在某些实施方案中，一个或多个正义链延伸核苷酸包含尿嘧啶或腺苷核苷酸或与LPA mRNA序列中的核苷酸对应的核苷酸。正义链可具有3'延伸和/或5'延伸。

在某些实施方案中，其中所述反义链包含以下的核苷酸序列：SEQ ID NO: 2至SEQ ID NO: 92中任意一个或与其相差不超过3个核苷酸的序列。

在某些实施方案中，其中所述正义链包含以下的核苷酸序列：SEQ ID NO: 93-183中任意一个或与其相差不超过3个核苷酸的序列。

在某些实施方案中，其中所述LPA RNAi剂的反义链和正义链序列如表1所示。

本申请所述的LPA RNAi剂可以通过使反义链与正义链退火形成。可使含有表1中列出的序列的正义链与任何反义链杂交，只要这两条序列在连续的16、17、18、19、20或21个核苷酸序列上具有至少90%互补性。

在某些实施方案中，LPA RNAi剂反义链包含表1中任何反义链序列的核苷酸序列。在某些实施方案中，LPA RNAi剂反义链包含表1中的任何反义链序列的核苷酸1-17、2-17、1-18、2-18、1-19、2-19、1-20、2-20、1-21、2-21、1-22、2-22、3-22、1-23、2-23、3-23或4-23的序列。在某些实施方案中，LPA RNAi剂正义链包含表1中的任何正义链序列的核苷酸序列。在某些实施方案中，LPA RNAi剂正义链包含表1中的任何正义序列的核苷酸1-17、2-17、1-18、2-18、1-19、2-19、1-20、2-20、1-21或2-21的序列。

在某些实施方案中，本申请所述的LPA RNAi剂的正义链和反义链含有相同数目的核苷酸。在某些实施方案中，本申请所述的LPA RNAi剂的正义链和反义链含有不同数目的核苷酸。在某些实施方案中，LPA RNAi剂的正义链5'末端和反义链3'末端形成平末端。在某些实施方案中，LPA RNAi剂的正义链3'末端和反义链5'末端形成平末端。在某些实施方案中，RNAi剂的两个末端形成平末端。在某些实施方案中，LPA RNAi剂的两个末端都不是平末端。如本申请所用，平末端是指其中两条退火链的末端核苷酸互补(形成互补碱基对)的双链RNAi剂的末端。在某些实施方案中，LPA RNAi剂的正义链5'末端和反义链3'末端形成散损末端。在某些实施方案中，RNAi剂的正义链3'末端和反义链5'末端形成散损末端。在某些实施方案中，LPA RNAi剂的两个末端形成散损末端。在某些实施方案中，LPA RNAi剂的两个末端都不是散损末端。如本申请所用，散损末端通常是指其中两条退火链的末端核苷酸形成对(即不形成突出端)但不互补(即形成非互补对)的双链RNAi剂的末端。本申请中，突出端是在双链RNAi剂的一条链的末端处的一个或多个未配对的核苷酸的段。未配对的核苷酸可以在正义链或反义链上，从而产生3'或5'突出端。在某些实施方案中，LPA RNAi剂含有：平末端和散损末端、平末端和5'突出末端、平末端和3'突出末端、散损末端和5'突出末端、散损末端和3'突出末端、两个5'突出末端、两个3'突出末端、5'突出末端和3'突出末端、两个散损末端或两个平末端。

在某些实施方案中，将LPA RNAi剂制备为盐、混合盐或游离酸。

经修饰的核苷酸

本申请的LPA RNAi试剂包括未修饰的核酸以及为提高功效而修饰的核酸，和核苷替代

物的多聚体。未修饰核酸是指其中糖、碱基和磷酸酯结构成份与天然的成份一样或基本相同，优选为人体内的天然成份。现有技术将稀有的或不寻常但是天然发生的RNAs看作是修饰的RNAs，参见Limbach等，(1994)Nucleic Acids Res.22: 2183-2196。这样的稀有或不寻常的修饰的RNAs通常被称为修饰的RNAs(很显然是因为它们转录后修饰的结果)，并在本申请属于未修饰的RNA。在本申请所使用的修饰的RNA是指其中核酸的组分，即糖、碱基和磷酸酯结构的一或多个成份，与天然的成份不一样，优选为不同于产生自人体的天然成份。核苷替代物是这样一些分子，其中核糖磷酸酯主链被非核糖磷酸酯构造所替代，该构造使碱基处于正确的空间关系，以便杂交与所见到的与核糖磷酸酯主链的杂交基本相似，例如，非带电的核糖磷酸酯主链的类似物。

在某些实施方案中，LPA RNAi剂含有一个或多个经修饰的核苷酸。

在某些实施方案中，LPA RNAi剂中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%的核苷酸经修饰。

在某些实施方案中，其中所述正义链和/或反义链独立地包含一种或多种经修饰的核苷酸。

对RNAi剂进行修饰的两个主要目的是获得它们对生物环境抗降解的稳定性以及改进药理学性质，例如药效性质。RNAi剂可以包含非天然存在的碱基，或者非天然存在的糖，如非糖类化合物环形载体分子，用于RNAi试剂的非天然存在的糖的典型特性。RNAi试剂可以包括核苷酸之间的键(例如手性硫代磷酸酯键)，用于增加核酸酶抗性。RNAi试剂此外还可包含，或者可选择地包含，核糖类似物以增加核酸酶抗性。

经修饰的核苷酸包括但不限于脱氧核苷酸、核苷酸模拟物、无碱基核苷酸(在本申请中表示为X、Ab)、2'-修饰的核苷酸、3'至3键联(反向)核苷酸(在本申请中表示为invdN、invN、invn、invX、invAb、包含非天然碱基的核苷酸、桥接核苷酸、肽核酸(PNA)、2', 3'-断核苷酸模拟物(解锁核碱基类似物，在本申请中表示为NUNA或NUNA)、锁核苷酸(在本申请中表示为NLNA或NLNA)、3'-O-甲氧基(2'核苷间连接的)核苷酸(在本申请中表示为3'-OMen)、2'-F-阿拉伯糖核苷酸(在本申请中表示为NfANA或NfANA)、5'-Me, 2'-氟核苷酸(在本申请中表示为5Me-Nf)、吗啉代核苷酸、磷酸乙烯酯脱氧核糖核苷酸(在本申请中表示为vpdN)、含磷酸乙烯酯的核苷酸和含磷酸环丙酯的核苷酸(cPrpN)。2'-修饰的核苷酸(即在五元糖环的2'位置处具有除了羟基基团之外的基团的核苷酸)包括但不限于2'-O-甲基核苷酸(在本申请中表示为核苷酸序列中的小写字母n)、2'-脱氧-2'-氟核苷酸(在本申请中表示为Nf，在本申请中还表示为2'-氟

核苷酸)、2'-脱氧核苷酸(在本申请中表示为dN)、2'-甲氧基乙基(2'-O-2-甲氧基乙基)核苷酸(在本申请中表示为NM或2'-MOE)、2'-氨基核苷酸和2'-烷基核苷酸。具体地,可以在单个LPA RNAi剂中或甚至在其单核苷酸中掺入多于一种的修饰。可通过本领域已知的方法合成和/或修饰LPA RNAi剂正义链和反义链。一个核苷酸处的修饰独立于另一个核苷酸处的修饰。

经修饰的核苷酸还包括具有经修饰的碱基的核苷酸。经修饰的碱基包括但不限于合成和天然碱基,5-取代的嘧啶,6-氮杂嘧啶及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶,5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物,2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶,胞嘧啶和胸腺嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代特别是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤。

在某些实施方案中,LPA RNAi剂的一个或多个核苷酸通过非标准键联或主链(即经修饰的核苷间键联或经修饰的主链)连接。在某些实施方案中,经修饰的核苷间键联是非含磷酸酯的共价核苷间键联。经修饰的核苷间键联或主链包括具有正常3'-5'键联的5'-硫代磷酸酯基团(在本申请中表示为核苷酸之前的小写s,如在sN、sn、sNf或sdN中),手性硫代磷酸酯,硫代磷酸酯(thiophosphate),二硫代磷酸酯,磷酸三酯,氨基烷基-磷酸三酯,膦酸甲酯和其它烷基酯包括3'-亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯,次膦酸酯(phosphinate),氨基磷酸酯包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯,硫羰基氨基磷酸酯,硫羰基烷基-膦酸酯,硫羰基烷基磷酸三酯,吗啉代键联和硼烷磷酸酯;这些物质的2'-5'连接类似物,和具有反向极性的那些,其中核苷单元的相邻对是3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接的。在其它实施方案中,经修饰的核苷间键联或主链没有磷原子。没有磷原子的经修饰的核苷间键联包括但不限于短链烷基或环烷基糖内键联,混合杂原子和烷基或环烷基糖内键联,一种或多种短链杂原子或杂环糖内键联。在某些实施方案中,经修饰的核苷间主链包括但不限于硅氧烷主链、硫化物、亚砷和砷主链;甲酰基(formacetyl)和硫代甲酰基主链,亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链,含烯烃的主链,氨基磺酸酯主链,亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链,磺酸酯和磺酰胺主链,酰胺主链;和具有混合的N、O、S和CH₂组分部分的其它。

配体

在某些实施方案中,其中所述LPA RNAi剂还包含配体。

在某些实施方案中，配体改变了与其结合的RNAi剂的分布、靶向或寿命。在某些实施例中，与缺乏配体的种类相比较，配体增强了所选择的靶的亲合力。所选择的靶，例如为分子、细胞或细胞类别和诸如细胞或器官腔隙的腔隙、组织、器官或身体的某个区域。

在某些实施方案中，配体能够促进运输、杂交和特异性的特性，并能够促进所获天然或修饰的寡核糖核苷酸的核酸酶抗性，或者促进含有任一在本申请所描述的单体和/或天然或修饰的核糖核苷酸的结合体的多聚体分子的核酸酶抗性。

例如，配体还可以包括靶向基团，例如，细胞或组织靶向试剂，如凝集素、糖蛋白、脂或蛋白质，例如结合到某一个特定的细胞如肝细胞或空肠细胞的抗体。靶向基团可以为促甲状腺素、促黑细胞激素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘液素碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、多价甘露糖、多价海藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、铁传递蛋白、二磷酸酯、聚谷氨酸酯、聚天冬氨酸酯、脂、胆固醇、类固醇、胆酸、叶酸、维生素B12或生物素。

在某些实施方案中，所述配体包括靶向基团。

在某些实施方案中，该靶向基团可以是单价、二价、三价、四价的或具有更高的化合价。代表性靶向基团包括对细胞表面分子具有亲和力的化合物、细胞受体配体、半抗原、抗体、单克隆抗体、抗体片段和对体细胞表面分子具有亲和力的抗体模拟物。

在某些实施方案中，其中所述靶向基团能够靶向肝细胞或肝脏。

在某些实施方案中，其中所述靶向基团包括脱唾液酸糖蛋白受体配体。

在某些实施方案中，脱唾液酸糖蛋白受体配体包括一种或多种半乳糖衍生物或半乳糖簇或由一种或多种半乳糖衍生物或半乳糖簇组成。本申请中，术语半乳糖衍生物包括半乳糖，和具有对脱唾液酸糖蛋白受体的亲合力(等于或大于半乳糖的亲合力)的半乳糖衍生物两者。半乳糖衍生物包括：半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基半乳糖胺、N-乙酰基-半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正-丁酰基-半乳糖胺和N-异-丁酰基半乳糖-胺。半乳糖衍生物已经用于在体内通过结合至在肝细胞表面上的脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)使分子靶向至肝细胞。ASGPr配体与ASGPr的结合促进细胞-特异性靶向至肝细胞并将分子内吞至肝细胞中。可以使用本领域已知的方法将半乳糖簇附接至RNAi多核苷酸的3'或5'末端。

在某些实施方案中，其中使所述配体缀合至所述正义链和/或反义链。例如，所述配体可以缀合至正义链和/或反义链的5'端和/或3'端。

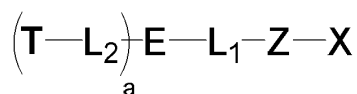
递送媒介物

在某些实施方案中，递送媒介物可用于将LPA RNAi剂递送至细胞或组织。递送媒介物是一种改善LPA RNAi剂向细胞或组织递送的化合物。递送媒介物可包括以下或由以下组成：聚合物，诸如两亲性聚合物，可逆修饰的聚合物或肽，或可逆修饰的膜活性聚胺。

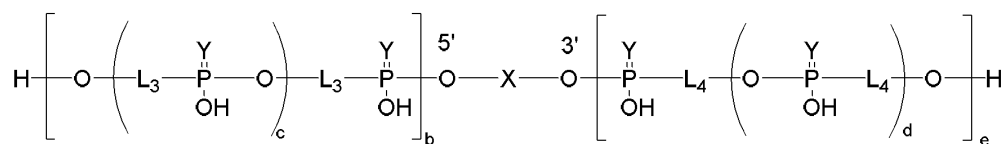
在某些实施方案中，LPARNai剂可以与本领域可获得的脂质、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束或其它递送系统组合。还可使LPARNai剂化学缀合至靶向基团、脂质(包括胆固醇和胆固醇基衍生物)、纳米颗粒、聚合物或本领域可获得的其它递送系统。

本申请描述了用于体内递送LPA RNAi剂至哺乳动物的肝细胞的方法。在某些实施方案中，可以使用递送媒介物。递送媒介物可以是但不限于：聚合物(诸如两亲性聚合物，膜活性聚合物)，配体等。在某些实施方案中，使LPA RNAi剂连接至包括脱唾液酸糖蛋白配体的靶向配体。例如，可以使LPA RNAi剂连接至包含半乳糖簇或由半乳糖簇组成的靶向配体。

如上所述, 本申请提供一种 siRNA 缀合物, 其通式如下所示,



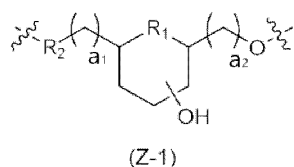
(I-0)或者



(II),

通式 (I) 中:

X 为核苷酸序列，可以为 siRNA 的正义链或反义链，Z 为核苷酸序列的第一接头部分，其中 Z 与 X 可以直接连接，也可以通过化学基团连接，且 Z 的通式如(Z-1)所示，其中 O 基一端与核苷酸序列连接：



其中 R_1 是 O、S、 NR_3 或者 CR_3R_4 , 其中 R_3 和 R_4 各自独立地是氢、卤素、取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、或者取代或未取代的杂环或取代

或未取代的环烷基;

其中 R_2 为 $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-CH_2-$, $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2NH-$, $-CH_2O-$, $-NH-C(O)-CH_2-$, $-C(O)-CH_2-NH-$, 或者 $-NH(CO)NH-$, 其中, 所述 $-CH_2-$ 还可以任选被选自卤素、烷基、烷氧基和烷氨基中的一种取代基取代; 所述 a_1 和 a_2 相同或者不相同, 并且分别选自 0 到 20 的整数, 优选为 1 到 10 的整数, 进一步优选 1 到 5 的整数。

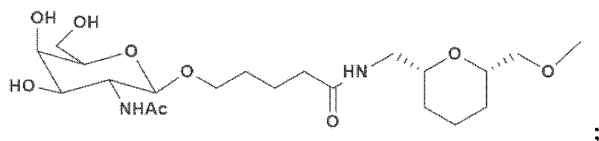
优选地, X 代表的核苷酸序列为上述第一核苷酸序列。

优选地, 所述第一接头部分 Z 与第二接头部分 L_1 连接, 所述第二接头部分 L_1 与分支点基团 E 连接。

优选地, 所述分支点基团 E 与 a 个靶向组合体连接, 所述 a 为选自 0 到 10 的整数, 优选 1 到 5 的整数; 其中所述靶向组合体包括 1: 1 比例的栓系部分 L_2 和靶向部分 T。

通式 (II) 中:

L_3 包括第三接头部分, L_4 为靶向部分, 具体地, 通式 (I) 中的 T 和通式 (II) 中的 L_3 和 L_4 可以相同或者不同, 优选地, L_3 和 L_4 分别为以下结构:

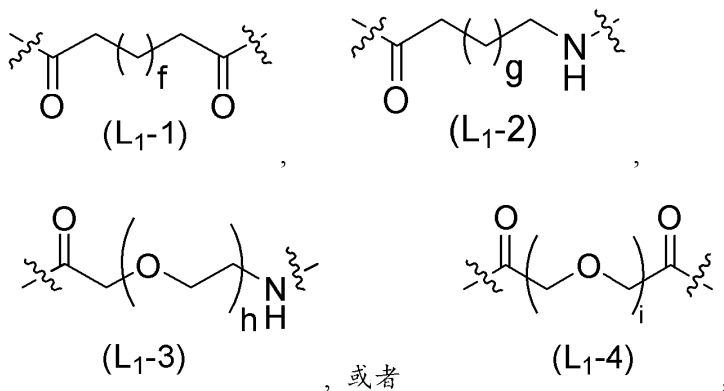


X 为核苷酸序列, 可以为正义链或反义链,

Y 是 O 或 S,

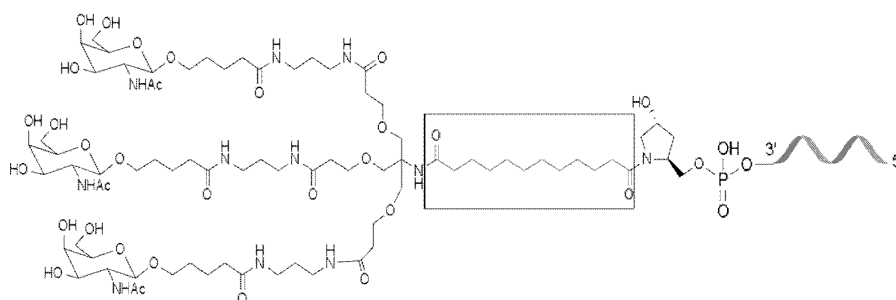
其中 b, c, d 和 e 分别选自 0 到 10 的整数, 且 b 和 e 不同时为 0。在一个实施例中, b 为 0, e 为 3 至 6 的整数。

本发明另一方面, 所述第二接头部分 L_1 具有以下结构:

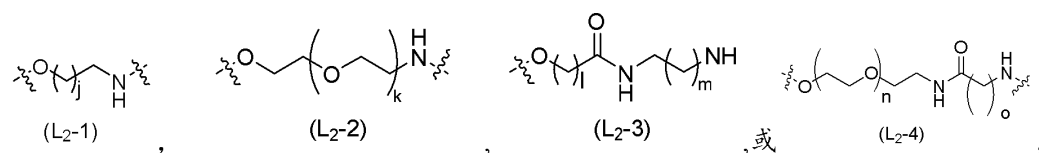


其中 f, g, h 和 i 分别是 1 至 20 的整数, 优选为 1 至 10 的整数。

一个实施例中， L_1 在配体中的位置如下面的框结构所示：

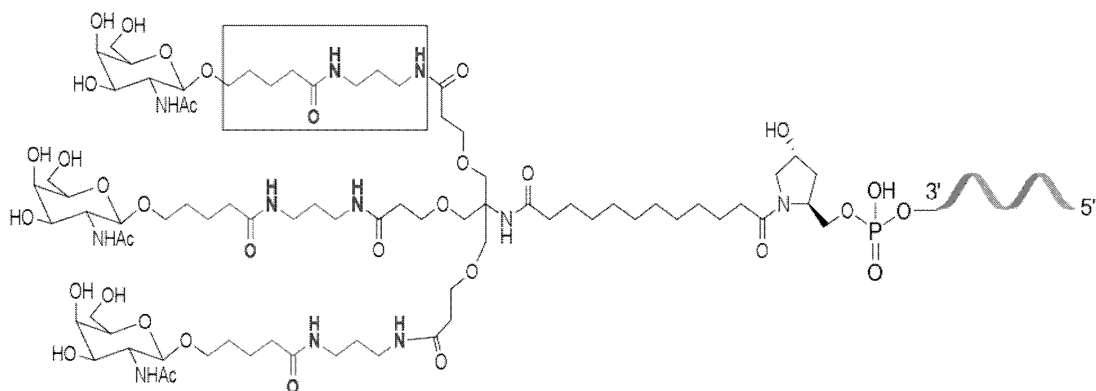


本发明另一方面，所述栓系部分 L_2 具有如下结构式：



其中 j, k, l, m, n 和 o 分别是 1 至 20 的整数, 优选为 1 至 10 的整数。

具体的, L_2 在配体中的位置如下面的框结构所示:

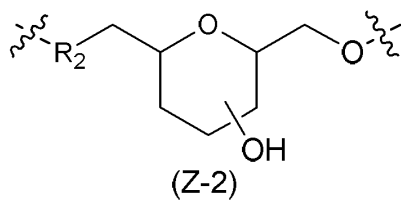


本发明另一方面还提供一种 LPA RNA 干扰剂, 包括: 正义链和反义链, 以及上述 siRNA 缀合物。

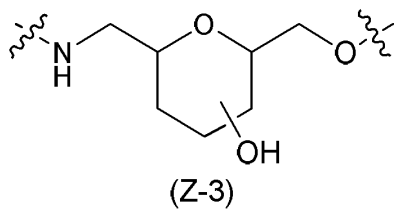
本发明实施例的另一目的在于提供一种包括上述 RNA 干扰剂的组合物。

本发明实施例提供的 siRNA 缀合物可以提高靶向部分结合细胞或细胞受体的效率，增加 RNA 干扰的作用效果。

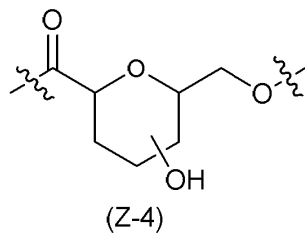
一个优选实施方案中，所述靶向配体中化合物Z的通式如下（Z-2）所示：



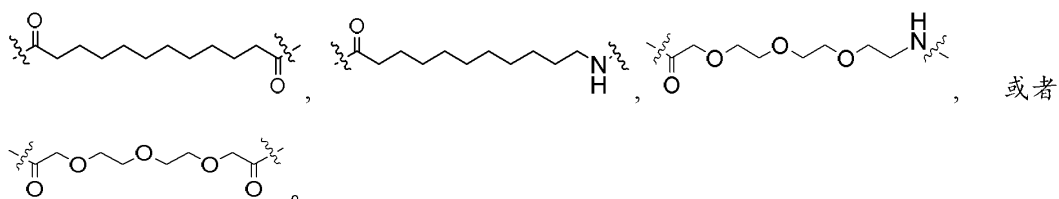
优选地 R₂ 为 -NH-, 此时化合物 Z 为:



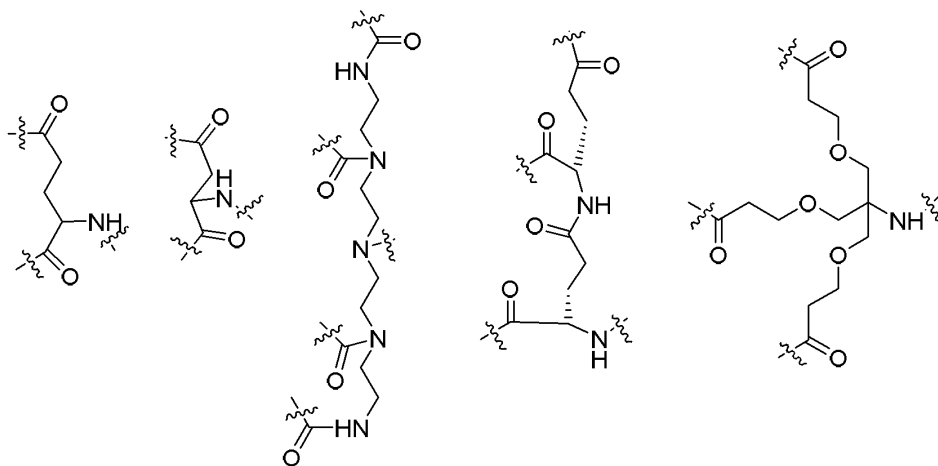
优选地 R₂ 为 -C(O)-, 此时化合物 Z 为



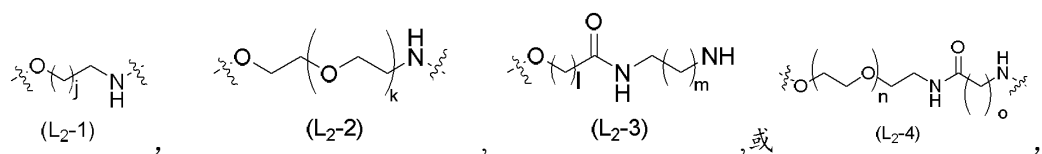
优选地, L₁ 为以下结构:



一个实施方案中, 在通式 (I) 中, 所述化合物 E 选自以下五种结构中的一种:

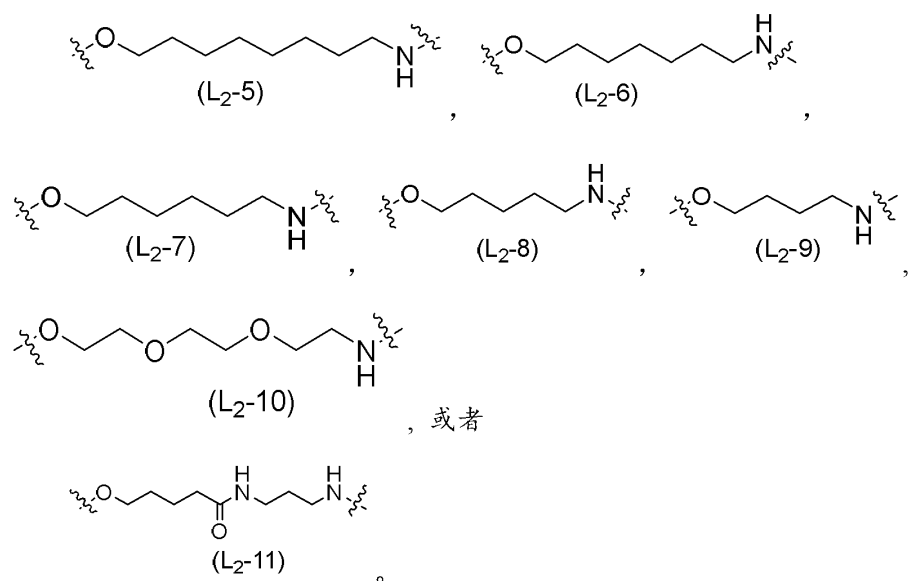


一个实施例中，通式 (I) 中的化合物 L_2 为

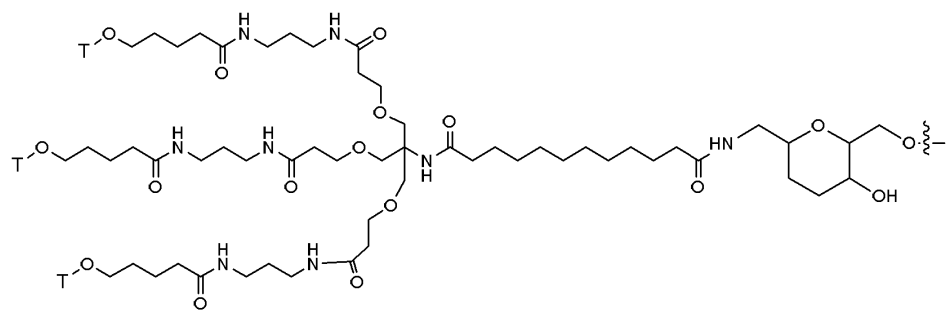


其中 j, k, l, m, n 和 o 分别是 1 至 20 的整数；

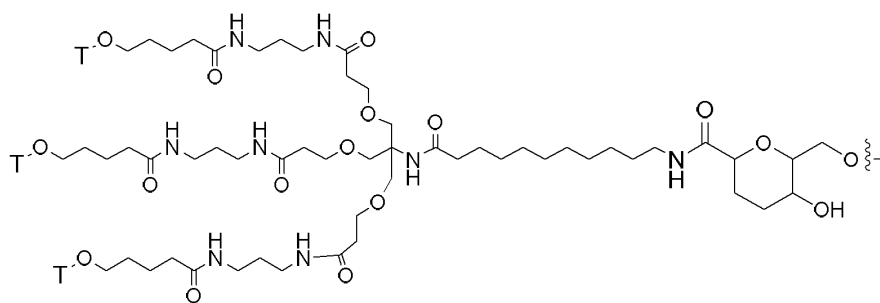
优选地， L_2 具有以下结构式：



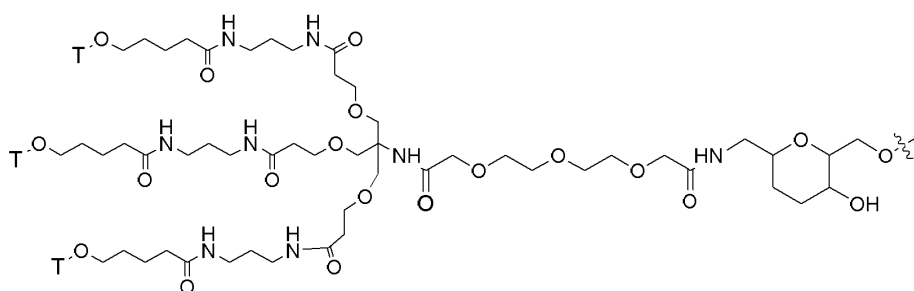
优选实施方案中，通式 (I) 所述靶向配体（不含 X 部分）具有以下结构：



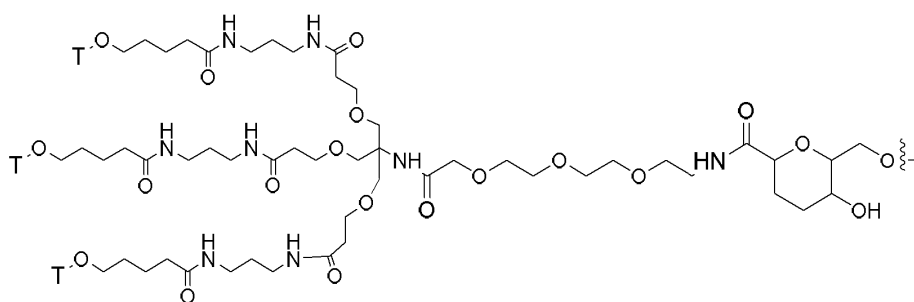
(I-I),



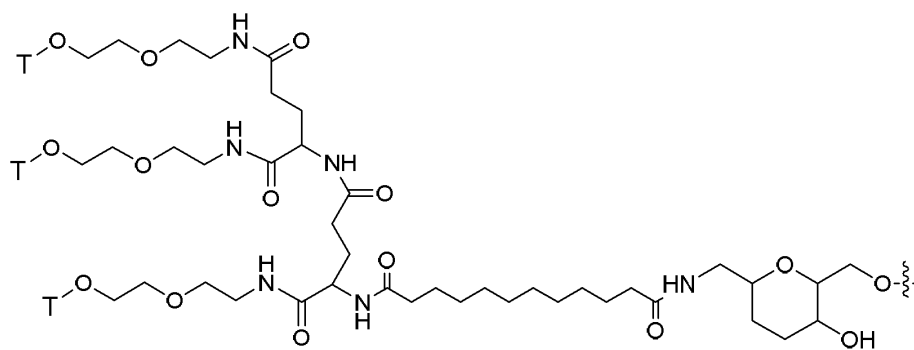
(I-II),



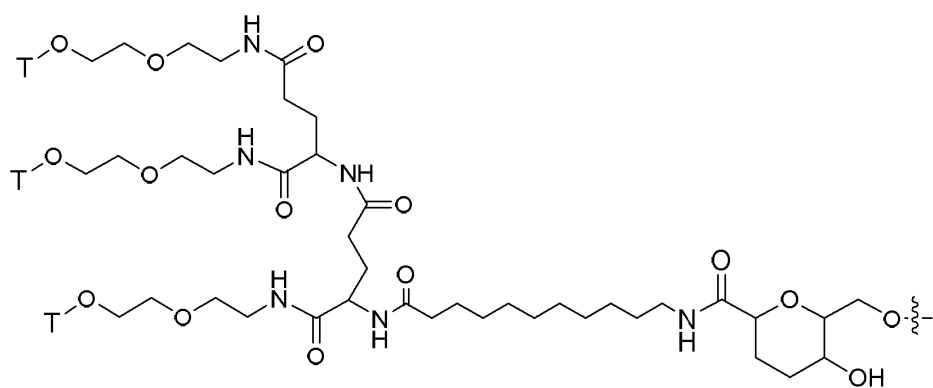
(I-III),



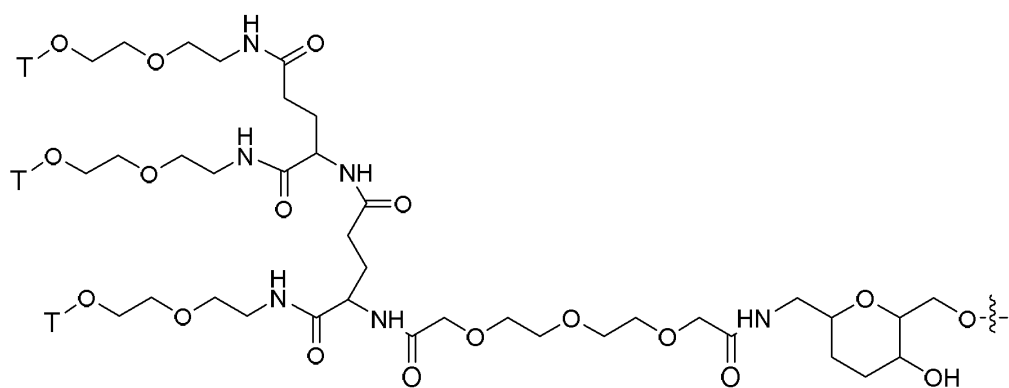
(I-IV),



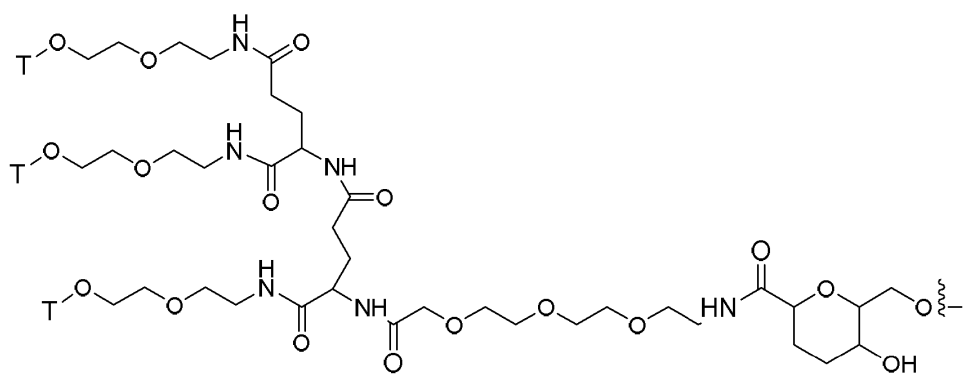
(I-V),



(I-VI),

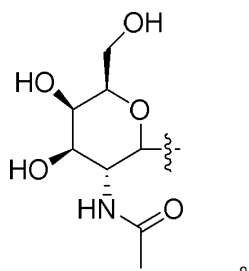


(I-VII), 或



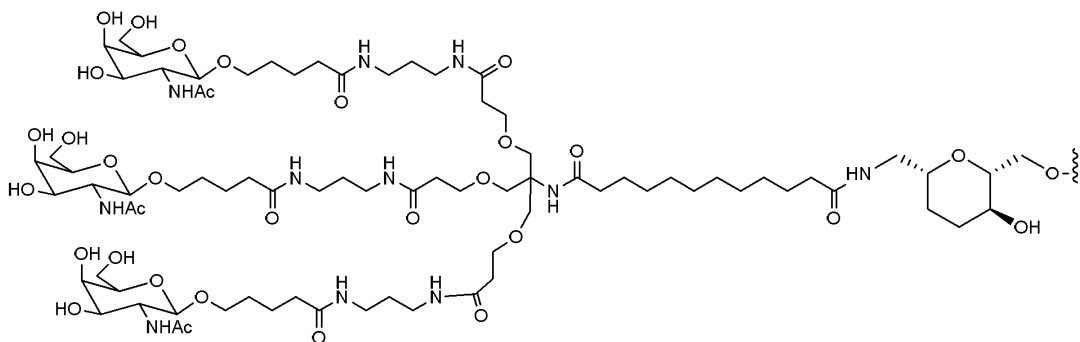
(I-VIII)。

一个实施方案中, 所述靶向配体中 T 选自 N-乙酰基-半乳糖胺、半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基-半乳糖胺、N-丙酰基-半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺和 N-异丁酰基-半乳糖胺中的一种, 优选为 N-乙酰基-半乳糖胺, 结构式如下:

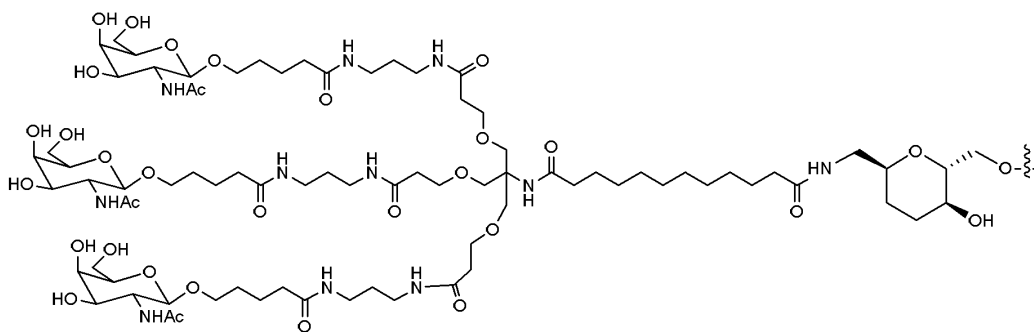


优选实施例中，通式 (I) 中的靶向配体通过磷酸酯基团或硫代磷酸酯基团或膦酸基团与 siRNA 末端连接。

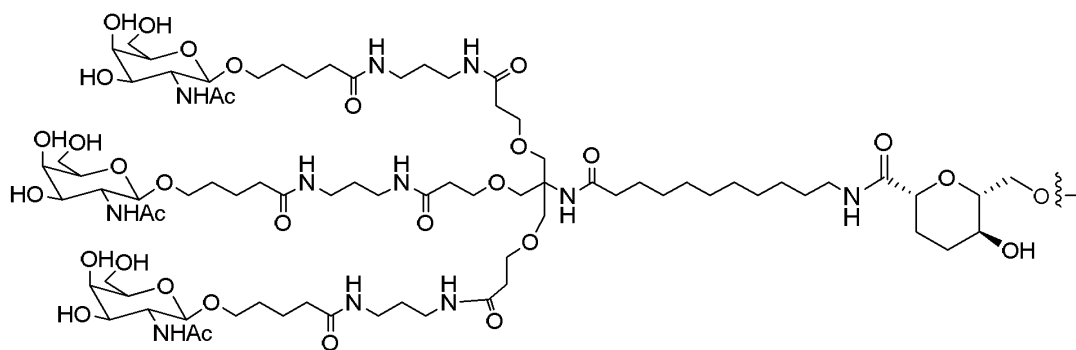
优选实施例中，所述靶向配体具有以下结构：



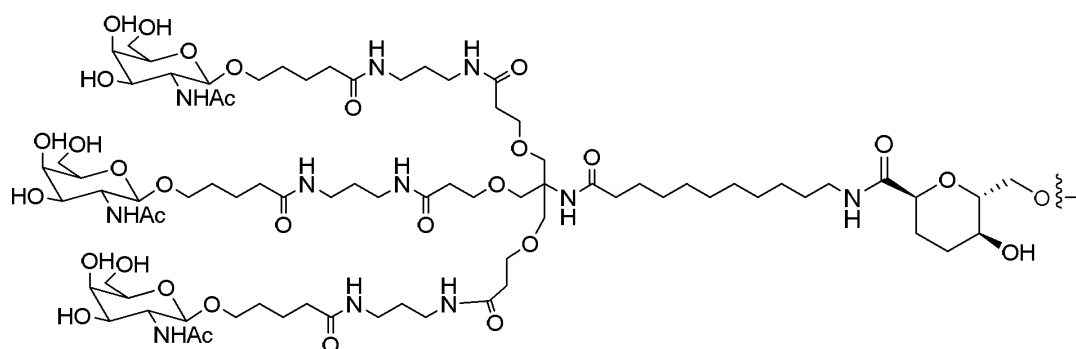
(I-1), (Gal-5-3)



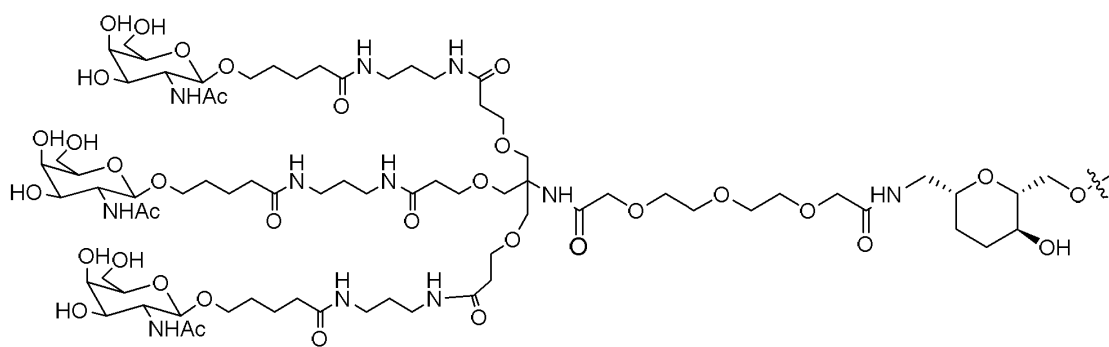
(I-2),



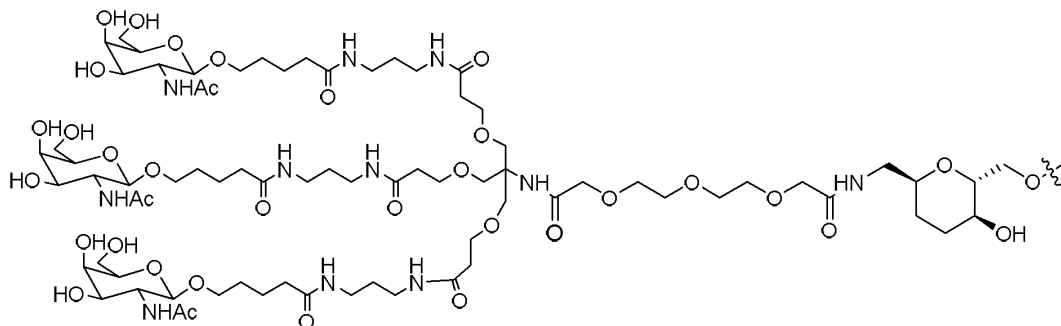
(I-3),

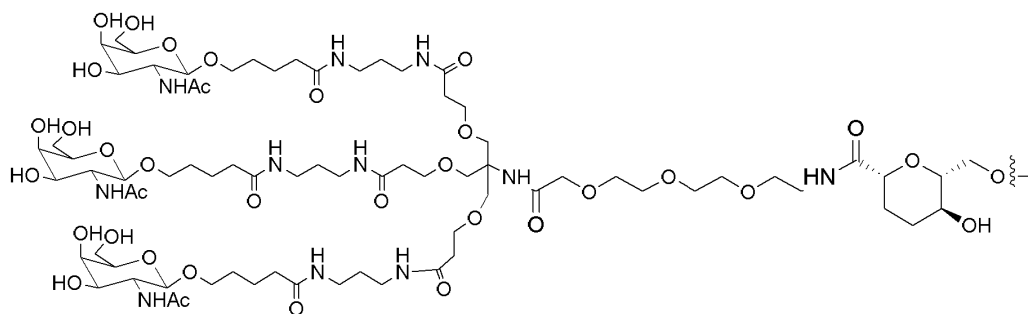


(I-4),

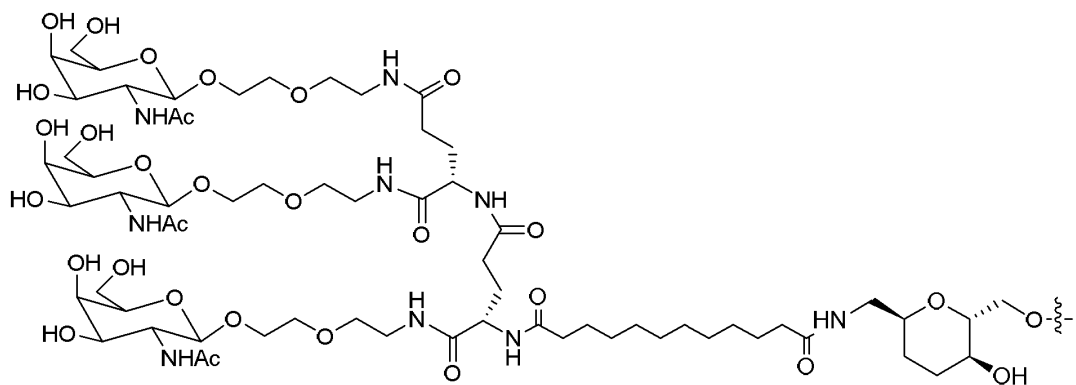


(I-5),

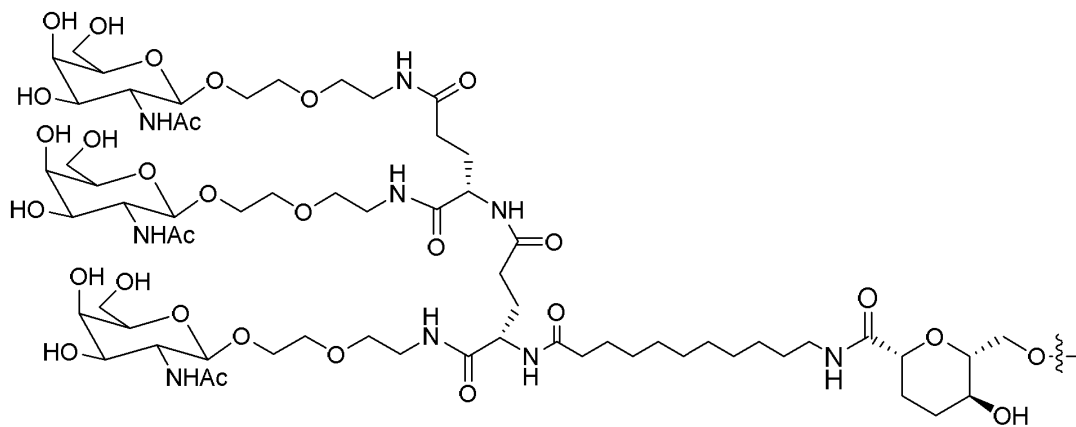


[illegible][illegible]

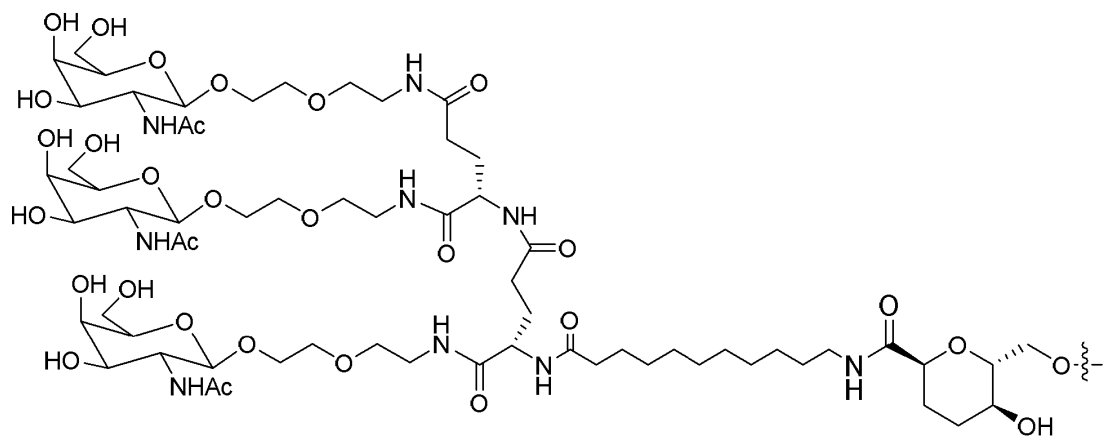
(I-9),



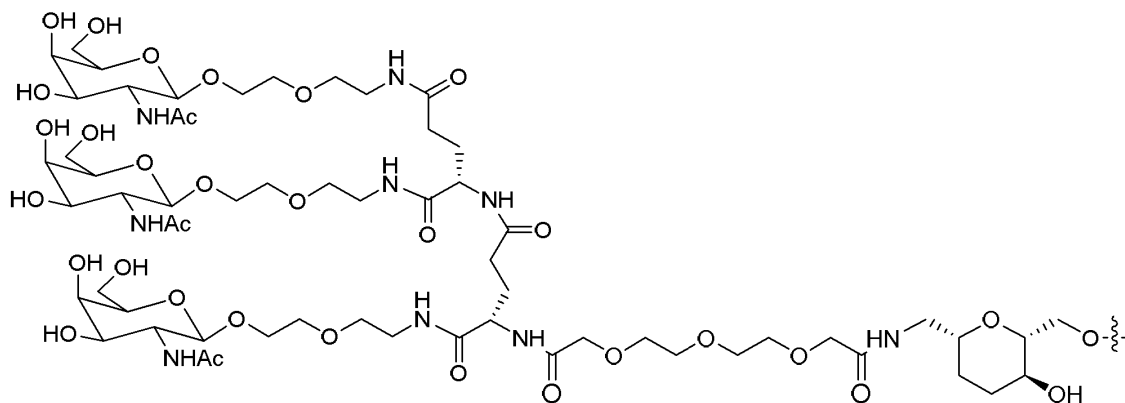
(I-10),



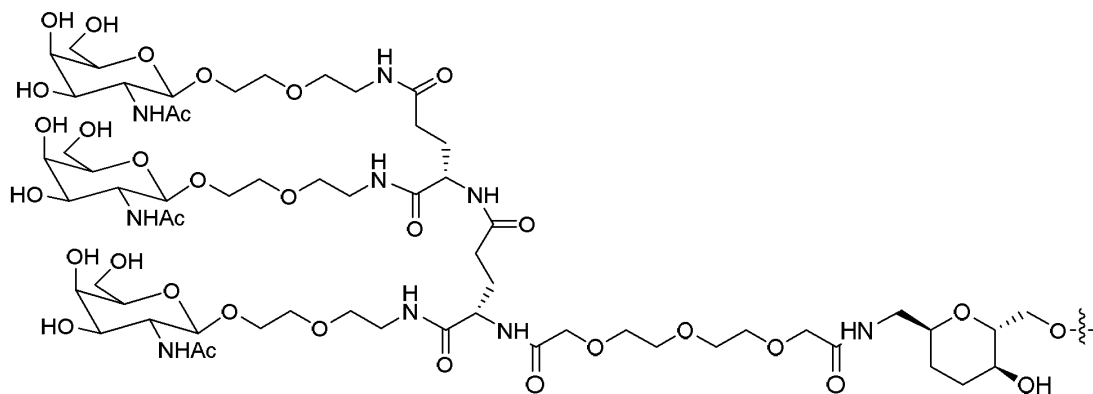
(I-11),



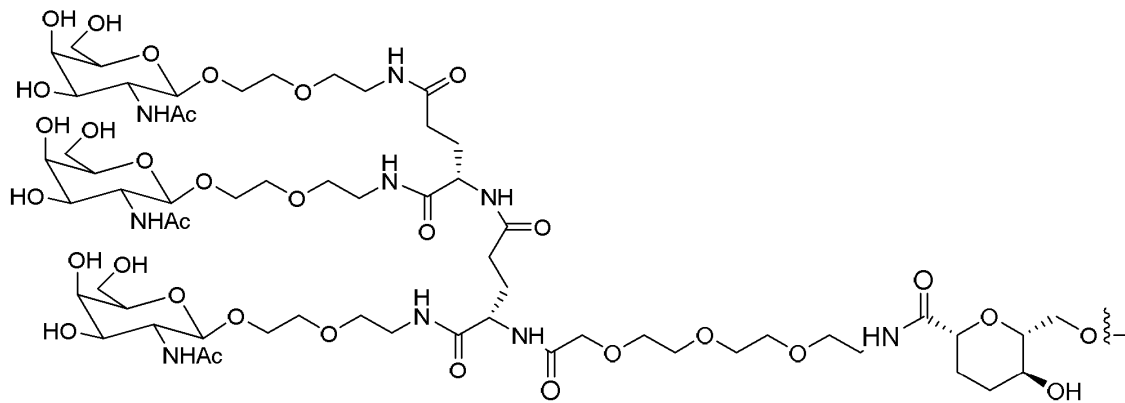
(I-12),



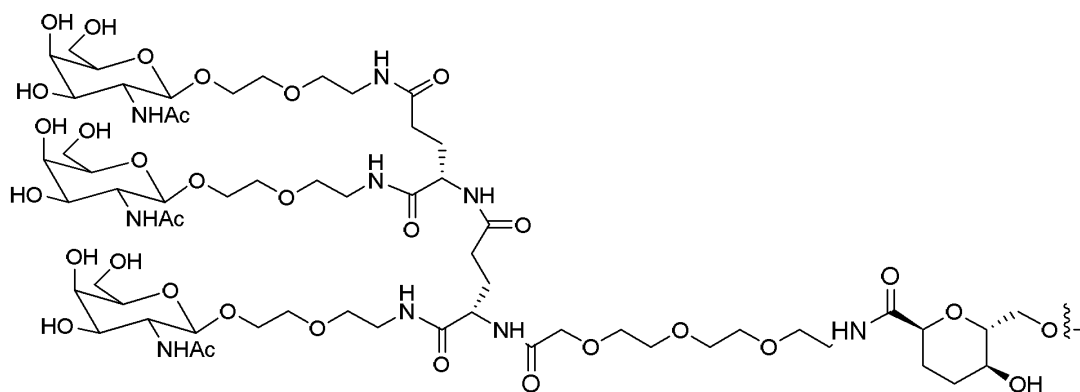
(I-13),



(I-14),

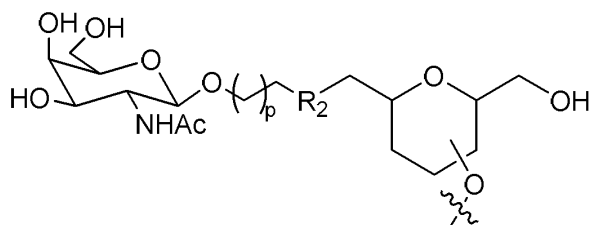


(I-15), 或

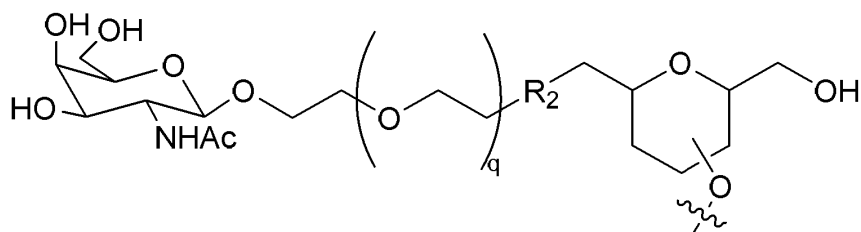


(I-16);

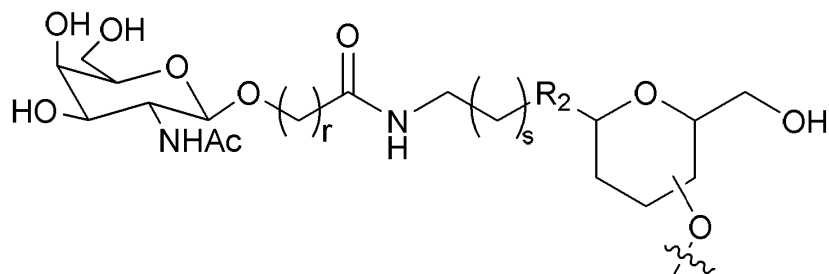
在关于通式 (II) 的一个实施方案中, 所述靶向配体中 $H-O-L_3$ 为:



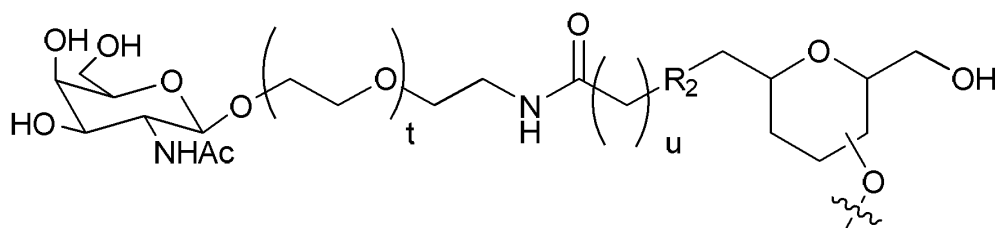
(II-a-I) ,



(II-a-II) ,



(II-a-III) , 或

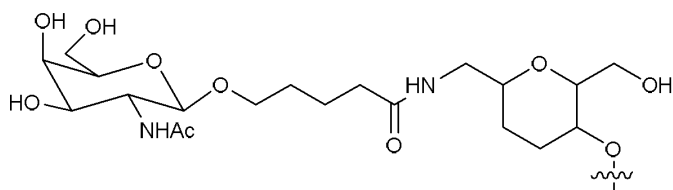


(II-a-III),

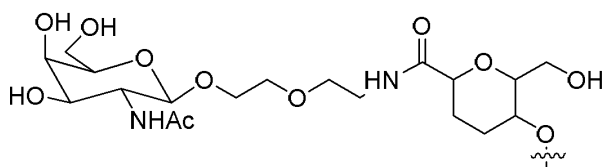
其中 R_2 各自独立的是-O-, -S-, -NH-, -CH₂-, -C(O)-, -OC(O)-, -C(O)O-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -CH₂NH-, -CH₂O-, -NH-C(O)-CH₂-, -C(O)-CH₂-NH-, -NH(CO)NH-, 所述-CH₂-还可以任选被卤素或烷基取代, 其中所述烷基任选进一步被选自羟基、氨基、卤素、烷氧基和烷氨基中的一种取代基取代);

所述 p, q, r, s, t 和 u 分别独立地选自 0 到 20 的整数, 优选为 1 到 10 的整数。

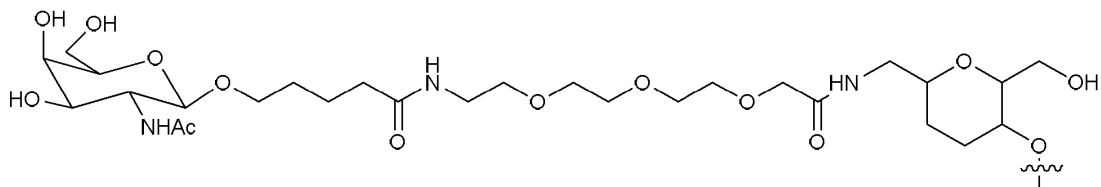
在优选的实施例中, H—O—L₃ 具有以下结构:



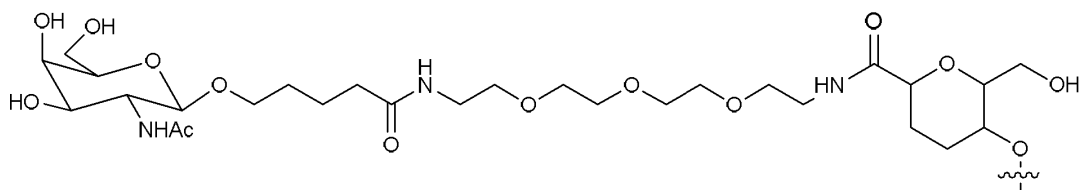
(II-a-1),



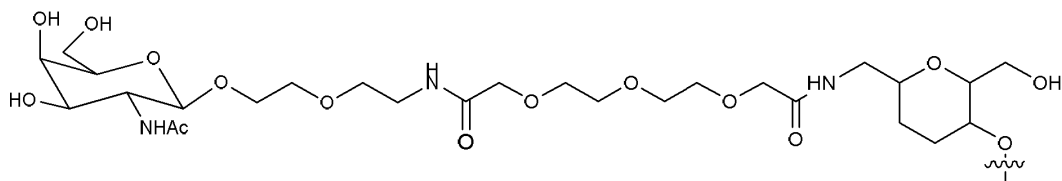
(II-a-2),



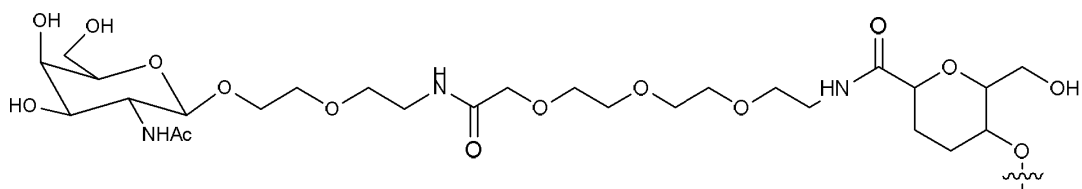
(II-a-3),



(II-a-4),

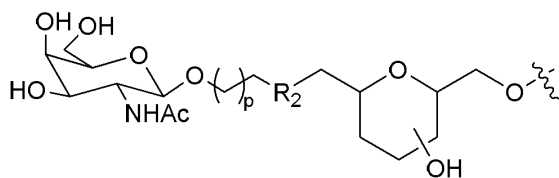


(II-a-5), 或

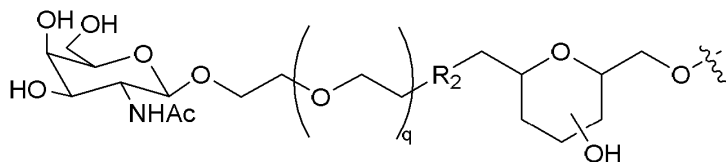


(II-a-6)。

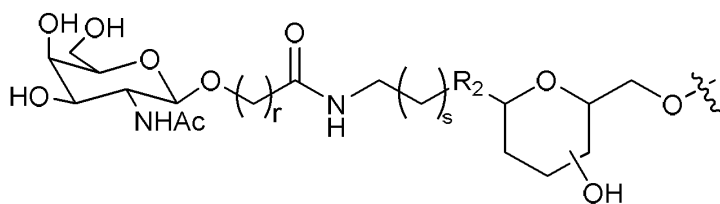
在通式 (II) 的另一优选实施方案中, 所述靶向配体中 H—O—L₄ 为:



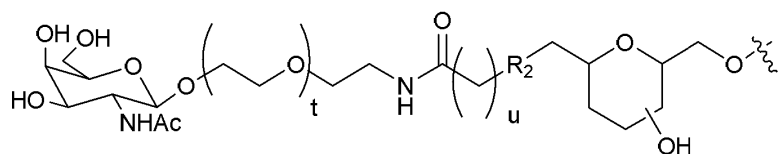
(II-a-IV) ,



(II-a-V) ,

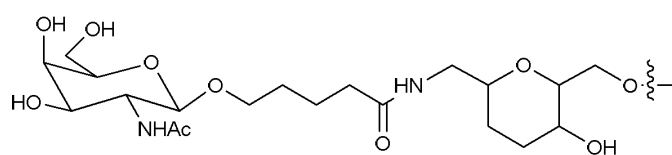


(II-a-VI) , 或

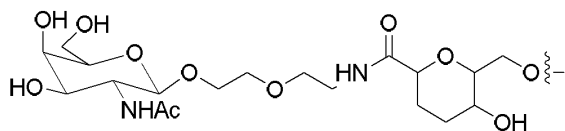


(II-a-VII) 。

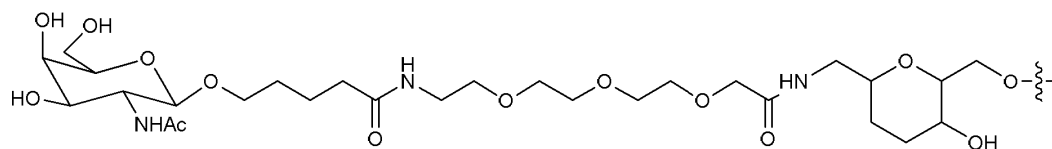
在一个优选实施例中, H—O—L₄ 具有以下结构:



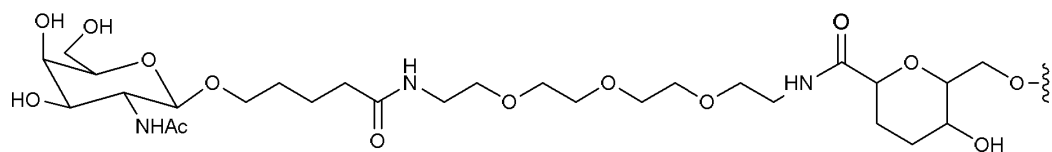
(II-a-7) ,



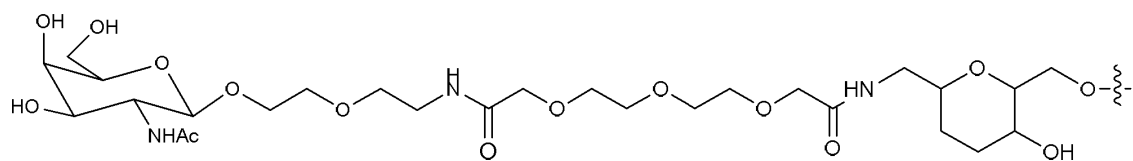
(II-a-8) ,



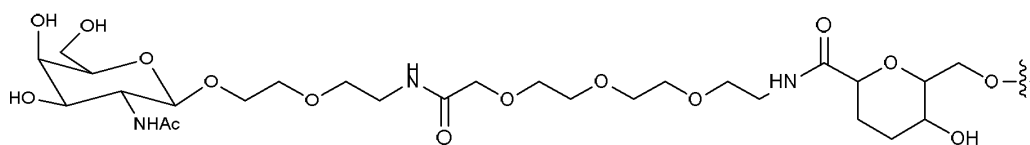
(II-a-9) ,



(II-a-10) ,

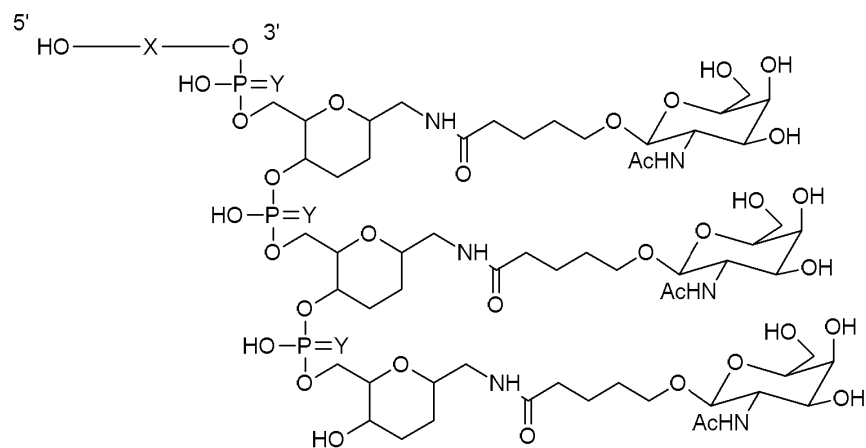


(II-a-11) , 或

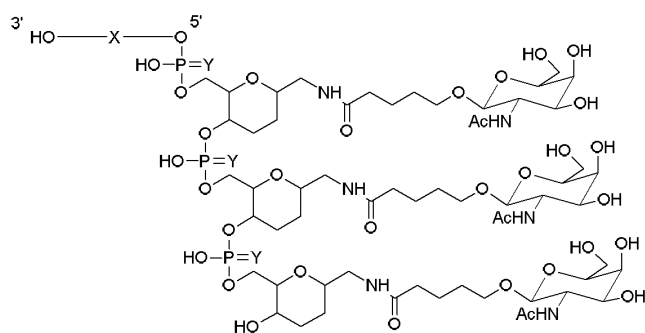


(II-a-12)。

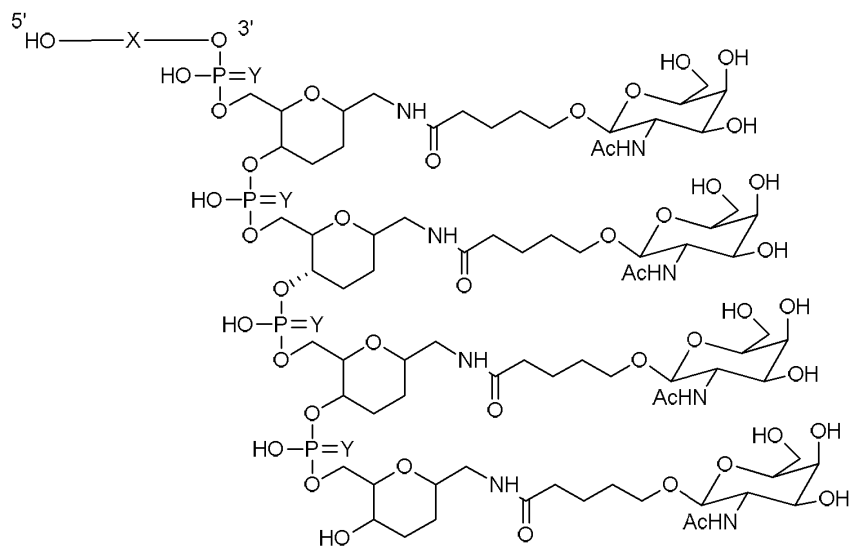
一个优选实施方案中，通式 (II) 具有以下结构：



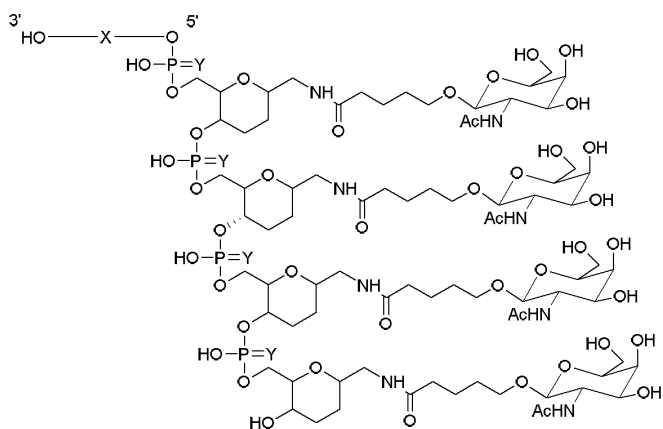
(II-1),



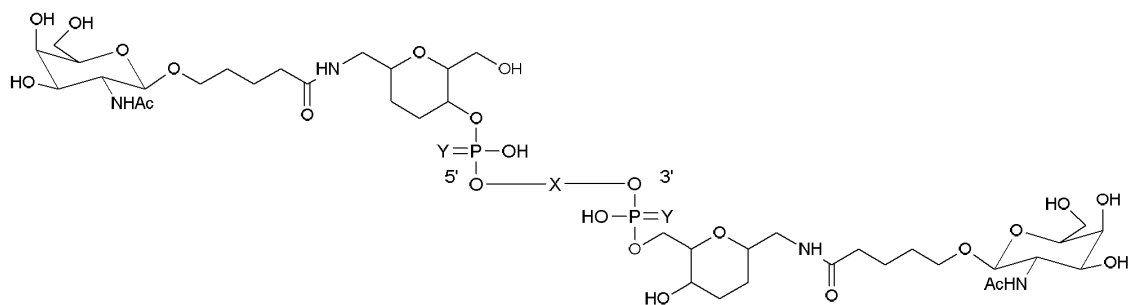
(II-2) ,



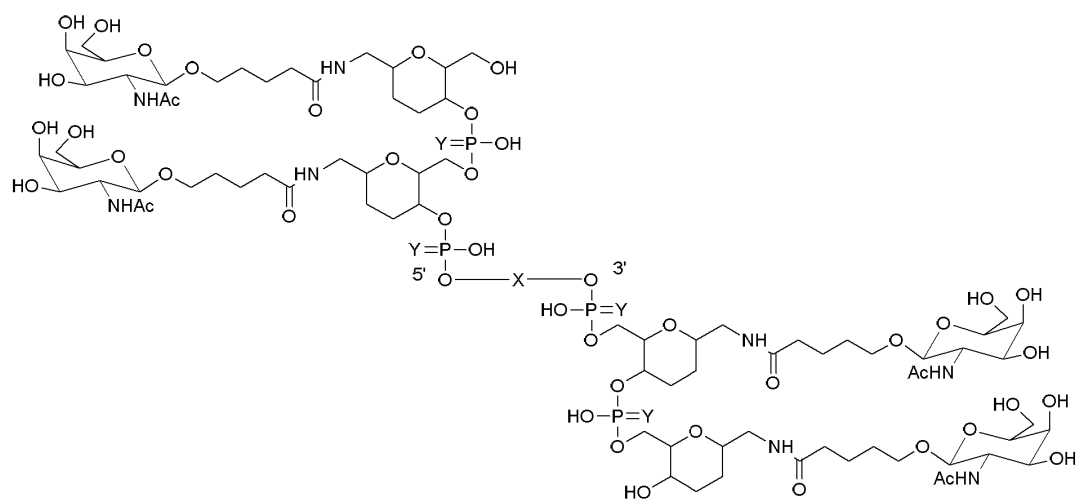
(II-3),



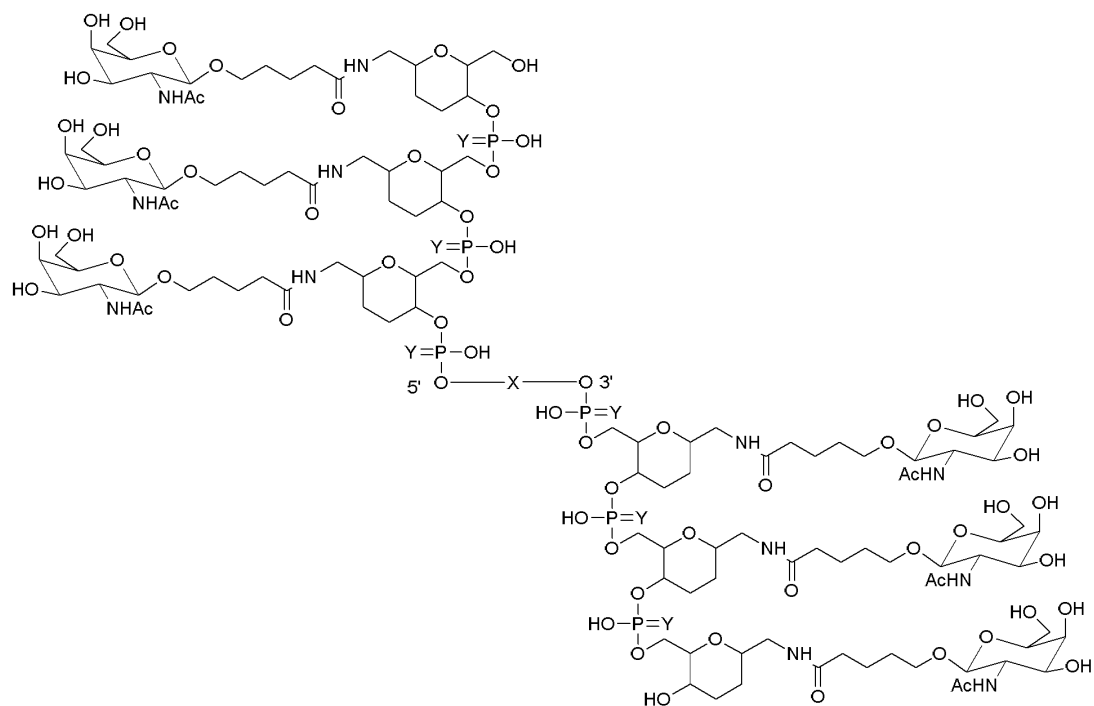
(II-4),



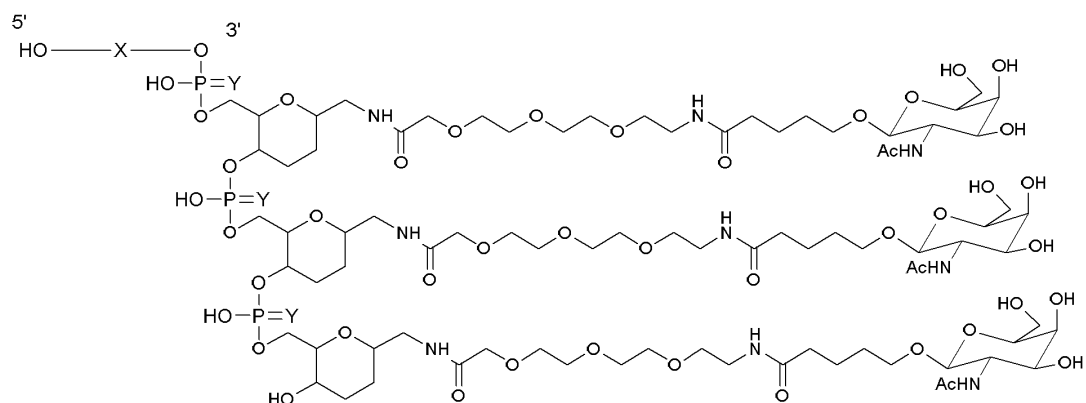
(II-5),



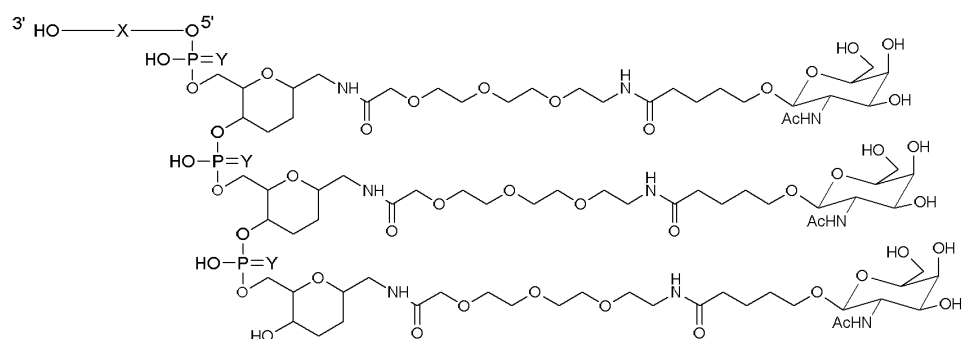
(II-6),



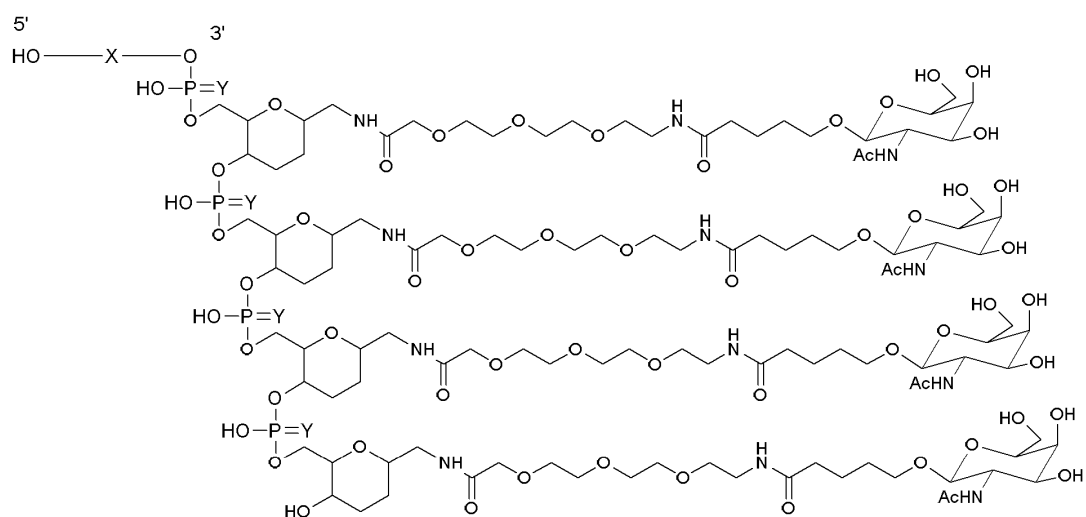
(II-7),



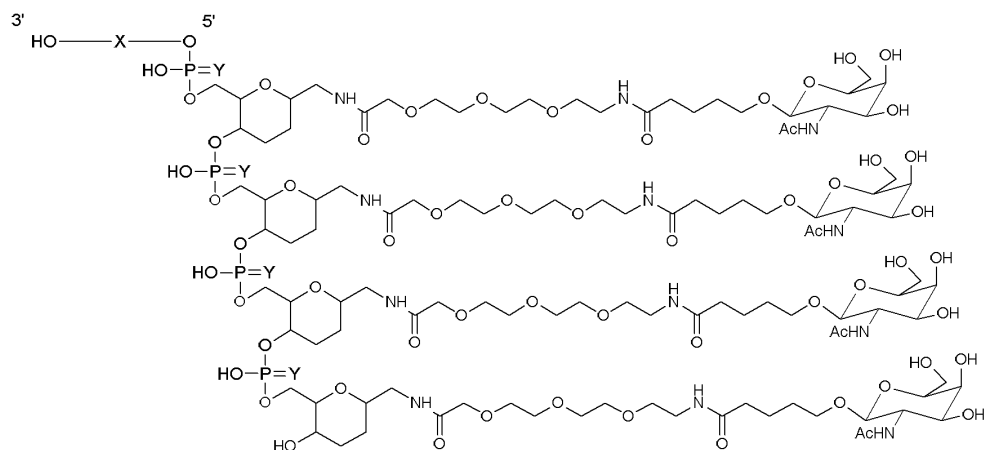
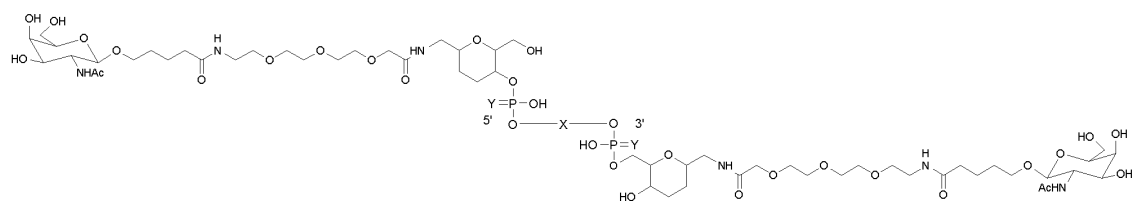
(II-8),



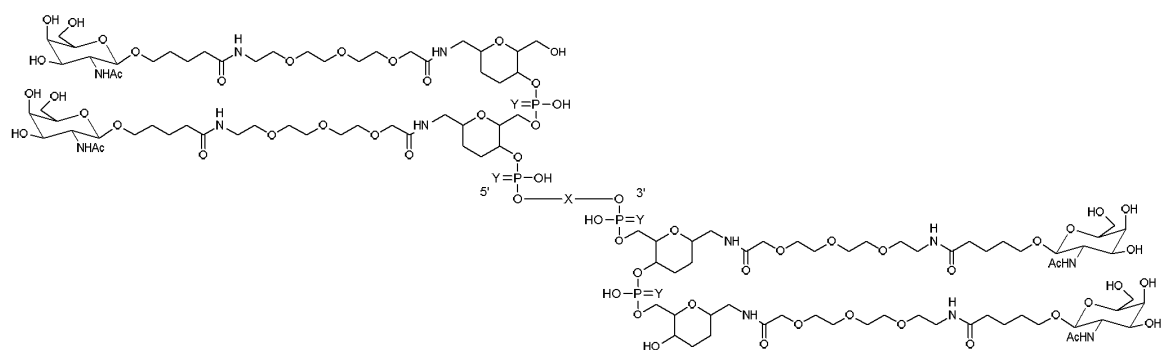
(II-9),



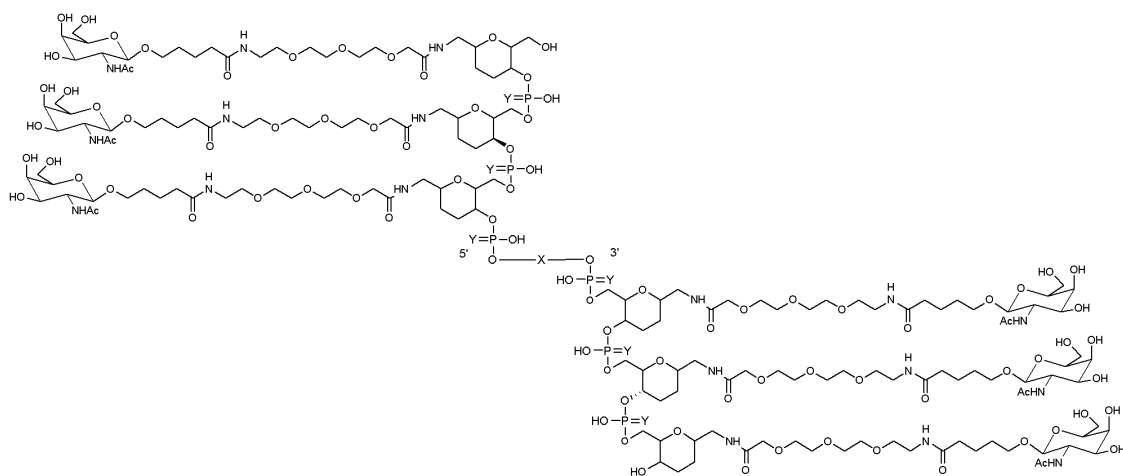
(II-10),


$$(II-11) \quad ,$$


(II-12),



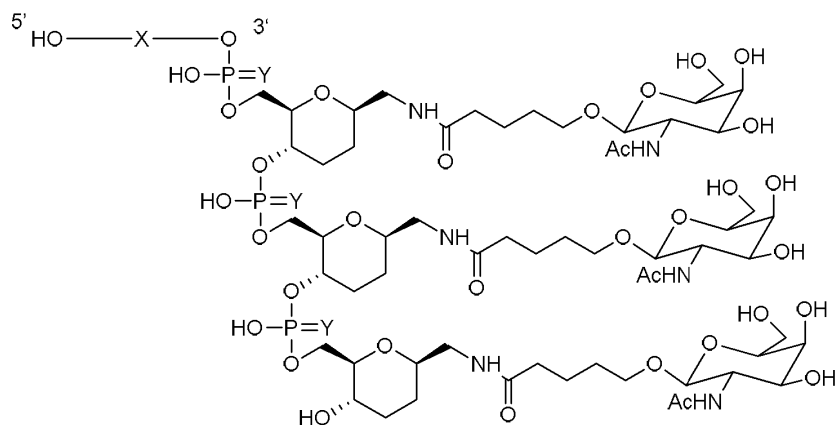
(II-13),



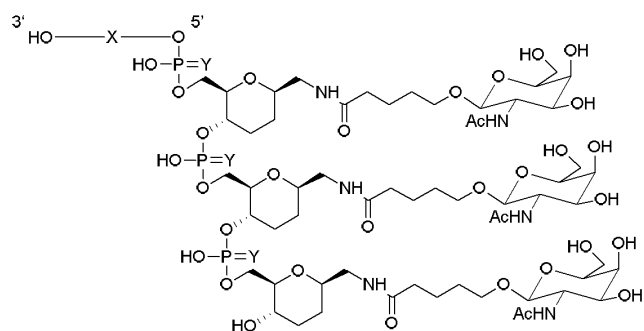
(II-14),

其中 Y 为 O 或者 S。

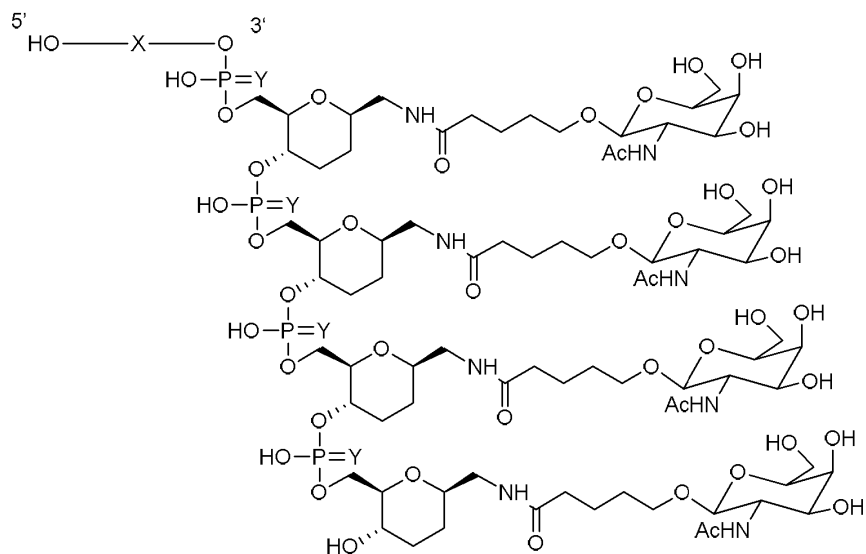
另一优选实施方案中，所述 siRNA 缀合物具有以下结构：



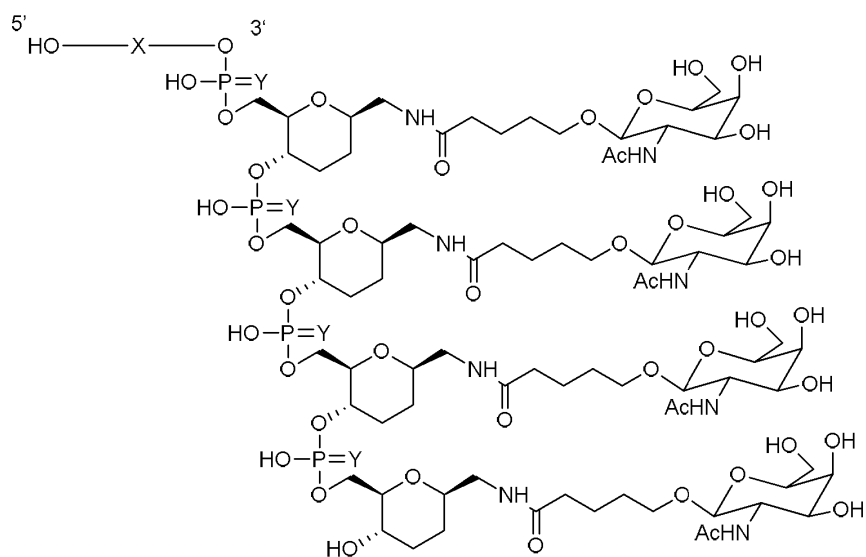
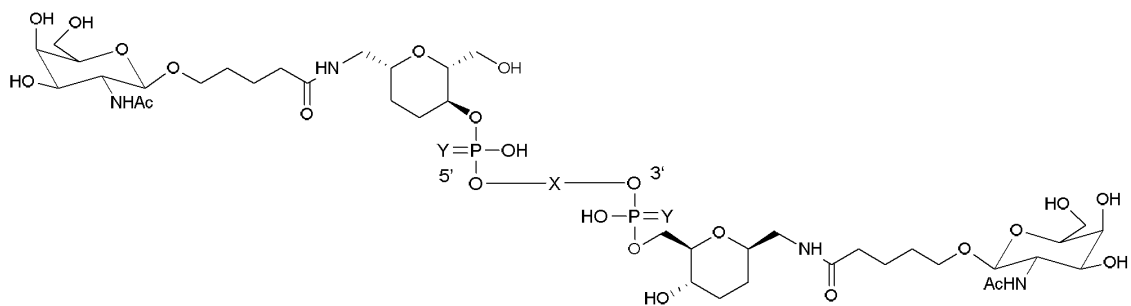
(II-15) ,

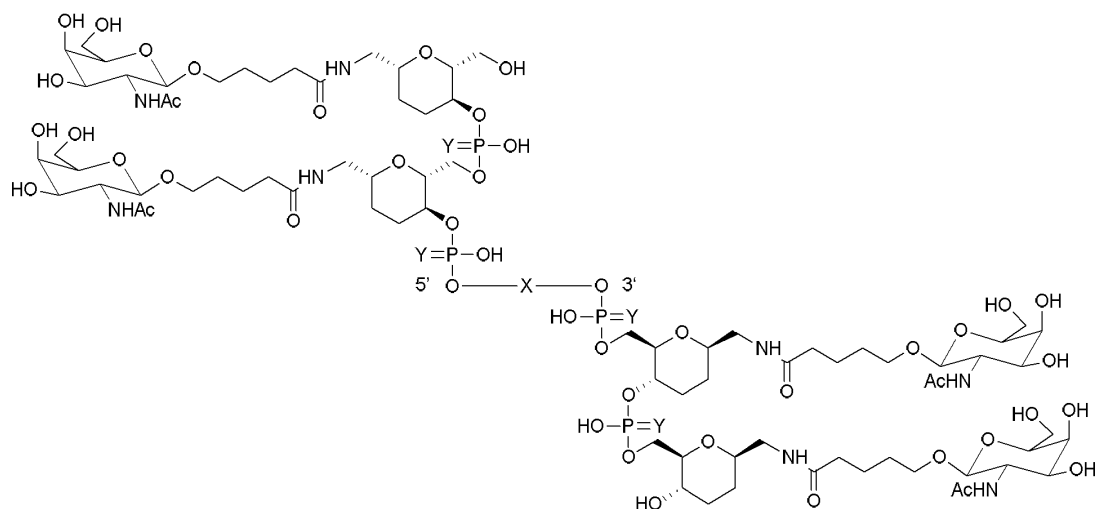


(II-16),

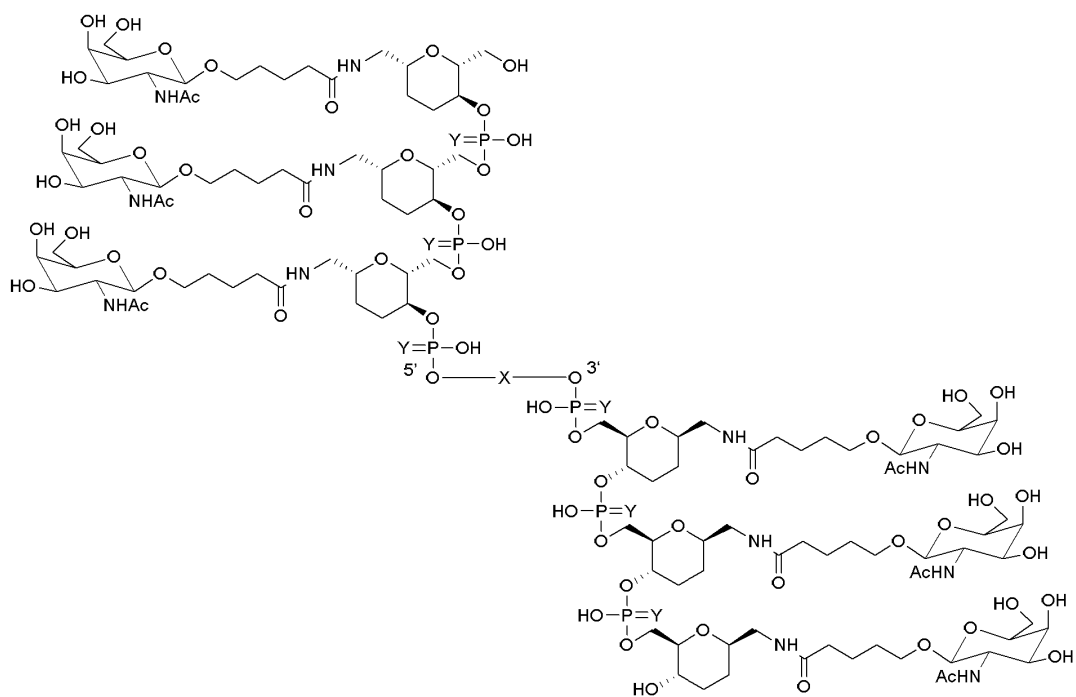


(II-17),

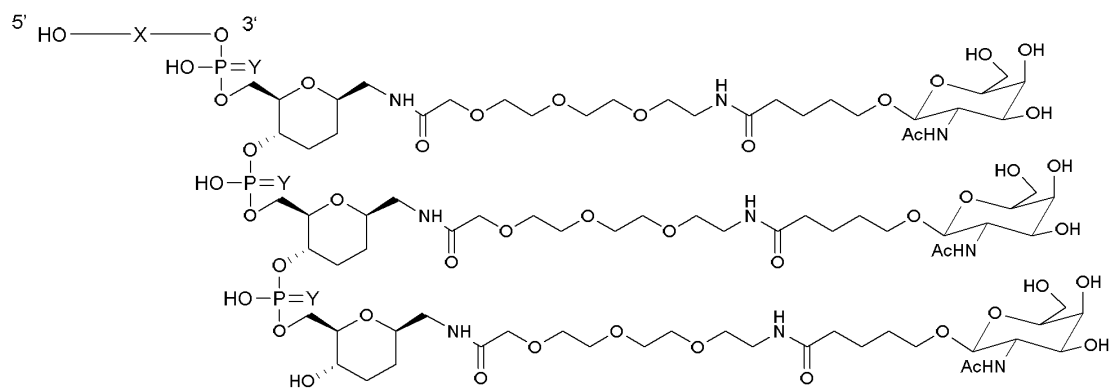

$$(II-18) ,$$

$$(II-19) \quad ,$$



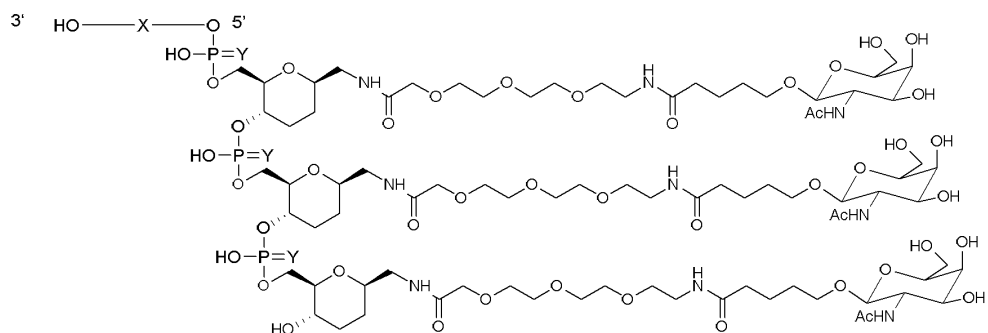
(II-20) ,



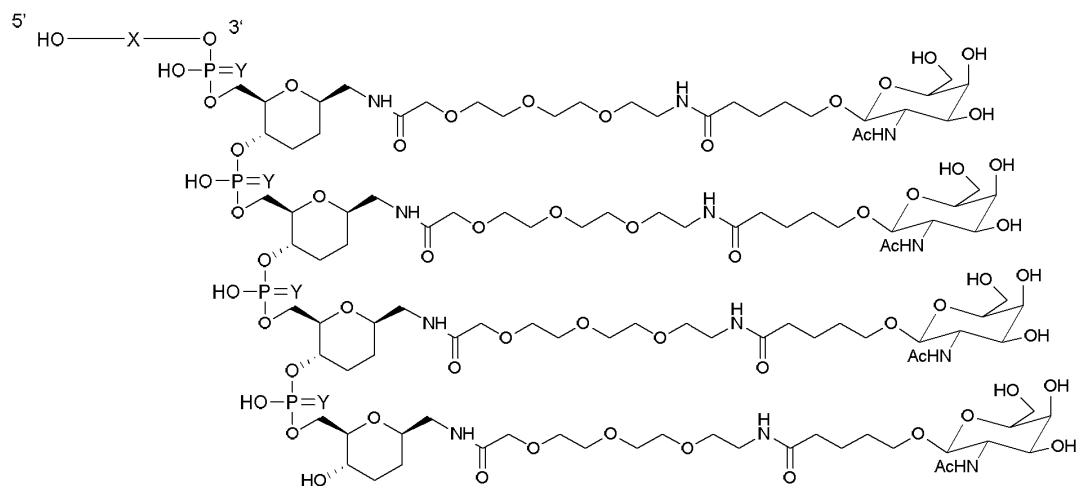
(II-21) ,



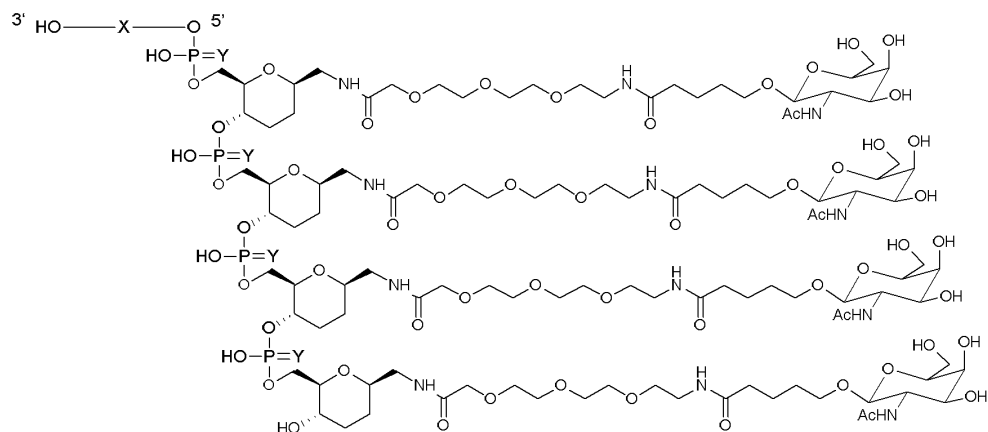
(II-22) ,



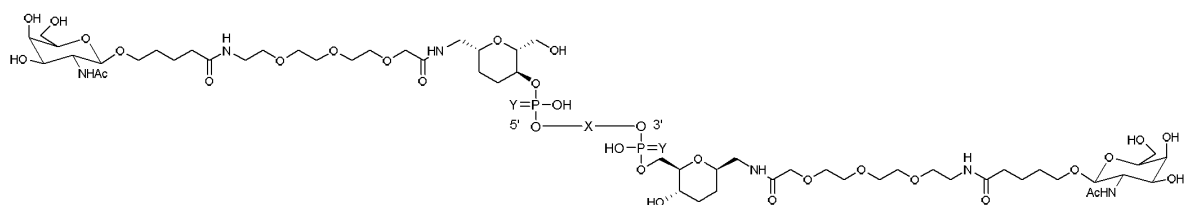
(II-23),



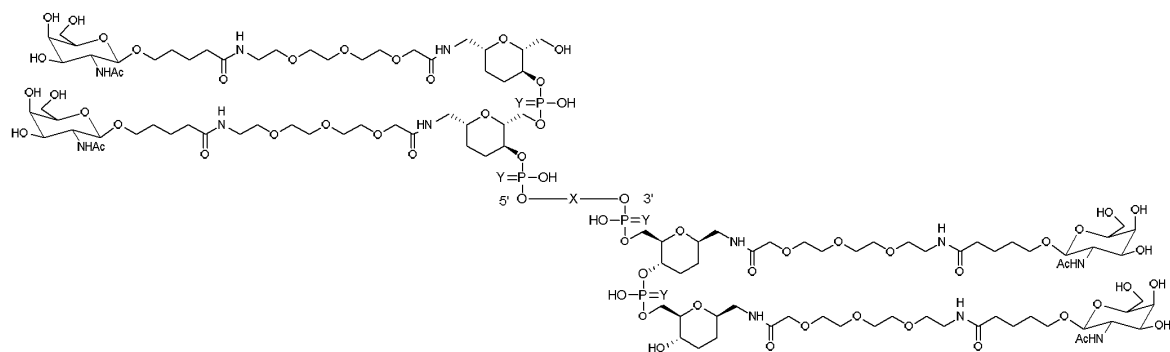
(II-24) ,



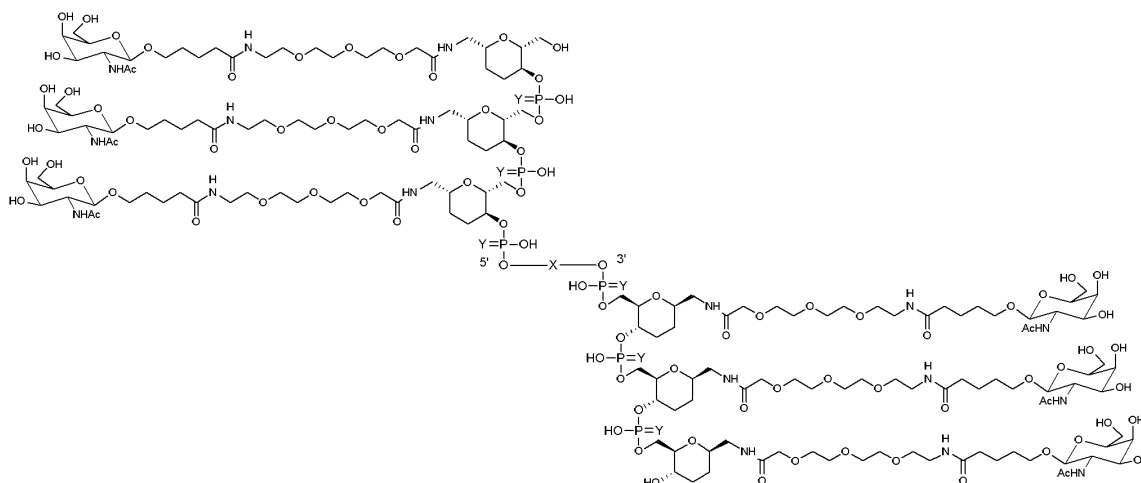
(II-25),



(II-26) ,



(II-27) , 或


$$(II-28) \quad ,$$

其中 Y 为 O 或者 S。

另一方面, 上述结合至 3' 端的结构均可以结合至 X 的 5' 端。

藥物組合物實施例

另一方面，本申请提供了一种药物组合物，其包含前述的LPA RNAi剂以及任选地药学上可接受的赋形剂。

在某些实施方案中，所述LPA RNAi剂可用于抑制如受试者中的细胞、细胞群或组织中LPA的表达。在某些实施方案中，LPA RNAi剂用于配制用于施用给受试者的组合物，即药物组合物或药物。例如，药物组合物或药物可以包含药理学有效量的至少一种所述LPA RNAi剂和一种或多种药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂(赋形剂)是经过适当安全评价且有意包含在药物递送系统中的除了活性药物成分(API，治疗性产物，如LPA RNAi剂)以外的物质。赋形剂在预定剂量下不发挥或不意在发挥治疗效果。赋形剂可用于a)在制造期间有助于药物递送系统的处理，b)保护、支持或增强API的稳定性、生物利用度或患者可接受性，c)有助于产物鉴别和/或d)增强在储存或使用期间递送API的整体安全性、有效性的任何其它属性。药学上可接受的赋形剂可以或可以不是惰性物质。

赋形剂包括：吸收促进剂、抗粘剂、消泡剂、抗氧化剂、粘合剂、粘合剂、缓冲剂、载体、包衣剂、颜料、递送促进剂、递送聚合物、葡聚糖、右旋糖、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、香味剂、助流剂、保湿剂、润滑剂、油、聚合物、防腐剂、盐水、盐、溶剂、糖、助悬剂、持续释放基质、甜味剂、增稠剂、张力剂、媒介物、憎水剂和润湿剂。

药物组合物可以含有药物组合物中常见的其它另外组分。此类另外的组分包括但不限于：止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂(如抗组胺剂、苯海拉明等)。还设想表达或包含本申请定义的RNAi剂的细胞、组织或分离的器官可以用作“药物组合物”。

在某些实施方案中，将所述LPA RNAi剂与一种或多种另外的治疗剂或治疗组合，所述治疗剂或治疗包括但不限于：小分子药物、抗体、抗体片段和/或疫苗。可将所述RNAi剂及包含本申请公开的LPA RNAi剂的药物组合物包装或包含在试剂盒、容器、包装或分配器中。可将LPA RNAi剂和包含所述LPA RNAi剂的药物组合物包装在预充式注射器或小瓶中。

本申请药物组合物可用于抑制细胞、组织或生物体中LPA基因的表达。在某些实施方案中，所述药物组合物用于治疗患有将从LPA表达减少或抑制受益的疾病、疾患或病症的受试者。在某些实施方案中，所述药物组合物用于治疗处于发展将受益于LPA表达减少或抑制的疾病、疾患或病症的风险的受试者。将受益于LPA表达减少或抑制的疾病、疾患或病症包括但不限于：伯格氏病、外周动脉疾病、冠状动脉疾病、代谢综合征、急性冠脉综合征、主动脉瓣狭窄、主动脉瓣反流、主动脉夹层、视网膜动脉阻塞、脑血管疾病、肠系膜缺血、肠系膜上动脉阻塞、肾动脉狭窄、稳定型/不稳定型心绞痛、急性冠脉综合征、杂合子或纯合子家族性高胆固醇血症、高载脂蛋白 β 脂蛋白血症、脑血管动脉粥样硬化、脑血管疾病和静脉血栓形成。在某些实施方案中，受试者是哺乳动物，包括但不限于人。

考虑包含本申请所述的至少一种LPA RNAi剂的细胞、组织和非人类生物体。通过以本领域可获得任何方式将LPA RNAi剂递送至细胞、组织或非人类生物体来制备该细胞、组织或非人类生物体。在某些实施方案中，细胞是哺乳动物细胞，包括但不限于人类细胞。细胞、组织或非人类生物体可用于研究或作为研究工具(如药物测试或诊断)。

用途

另一方面，本申请提供前述的LPA RNAi剂或前述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病或病症、或者降低疾病或病症的风险。

在某些实施方案中，其中所述疾病或病症包括与含Lp(a)粒子的水平升高相关的疾病或病症。在本申请中，术语“Lp(a)”通常指包含apo(a)和含有apoB的LDL样颗粒。apo(a)通过二硫键连接至apoB。

在某些实施方案中，其中所述疾病或病症包括肝源性疾病。

在某些实施方案中，其中所述疾病或病症包括炎性、心脑血管或代谢疾病。

在本申请中，术语“代谢疾病或病症”通常是指以代谢功能的改变或紊乱为特征的病状。

“代谢的”和“代谢”是本领域中熟知的术语并且通常包括发生在活有机体内的整个范围的生物化学过程。代谢病症包括但不限于高血糖症、前驱糖尿病、糖尿病(1型和2型)、肥胖症、胰岛素抵抗、代谢综合征和2型糖尿病引起的血脂异常。

在本申请中，术语“炎性疾病或病症”是指疾病、疾病状态、综合征或其它导致炎症的病状。例如，类风湿性关节炎和肝纤维化是炎性病状。炎性病状的其它实例包括败血症、心肌缺血/再灌注损伤、成人呼吸窘迫综合征、肾炎、移植排斥、炎性肠病、多发性硬化、动脉硬化、动脉粥样硬化和血管炎。

在本申请中，术语“心脑血管疾病或病症的症状”通常是指由心脑血管疾病或病症引起并伴随心脑血管疾病或病症的现象，并且充当心脑血管疾病或病症的指示。

另一方面，本申请提供一种预防和/或治疗疾病或病症的方法，所述方法包括向目标受试者施用有效量的包含前述的LPARNai剂和/或前述的药物组合物。

在某些实施方案中，本申请所述的LPARNai剂可用于治疗通过降低LPA表达来受益的疾病或病症。该疾病或病症的实例包括但不限于：伯格氏病、外周动脉疾病、冠状动脉疾病、代谢综合征、急性冠脉综合征、主动脉瓣狭窄、主动脉瓣反流、主动脉夹层、视网膜动脉阻塞、脑血管疾病、肠系膜缺血、肠系膜上动脉阻塞、肾动脉狭窄、稳定型/不稳定型心绞痛、急性冠脉综合征、杂合子或纯合子家族性高胆固醇血症、高载脂蛋白 β 脂蛋白血症、脑血管动脉粥样硬化、脑血管疾病和静脉血栓形成。在某些实施方案中，该方法包括施用组合物，诸如包含本申请所述的LPARNai剂的药物组合物给目标哺乳动物。

在某些实施方案中，将治疗有效量的一种或多种所述LPA RNai剂施用给受试者，从而抑制受试者中LPA的表达(如，有效抑制受试者中LPA表达的量)。

在某些实施方案中，该方法还包括施用第二治疗剂或治疗的步骤。在某些实施方案中，第二治疗剂是另一种LPA RNai剂(如，靶向LPA靶标内不同序列的LPA RNai剂)。在其它实施方案中，第二治疗剂可选自：小分子药物、抗体、抗体片段和疫苗。

施用途径是使RNai剂与身体接触的途径。通常，用于治疗受试者的药物和核酸的施用方法在本领域中是众所周知的，并且可以应用于本申请所述的组合物的施用。本申请所述的化合物可以经由任何适合的途径在针对特定途径适当定制的制剂中施用。因此，本申请所述的化合物可以通过注射，例如静脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内施用。

在某些实施方案中，可以使用本领域已知的寡核苷酸递送技术将本申请所述的LPARNai剂或组合物递送至细胞、细胞群、组织或受试者。通常，本领域公认的用于递送核酸分子(体

外或体内)的任何适合的方法可以适用于本申请所述的 LPARNAi 剂。例如,递送可通过局部施用(local administration)(如,直接注射、植入或局部施用(topical administering),全身施用,或皮下、静脉内、经口、腹膜内或肠胃外途径,包括颅内(如心室内、实质内和鞘内)、肌内、透皮、气道(气雾剂)、经鼻、经直肠或局部(包括经颊和舌下)施用。在某些实施方案中,通过皮下或静脉内输注或注射施用组合物。

在某些实施方案中,LPARNAi 剂可以与本领域可获得的脂质、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束或其它递送系统组合。还可将 RNAi 剂化学缀合至靶向基团、脂质(包括但不限于胆固醇和胆固醇衍生物)、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束或本领域可获得的其它递送系统。可使 LPARNAi 剂缀合至递送聚合物。在某些实施方案中,递送聚合物是可逆掩蔽/修饰的两亲性膜活性聚胺。

表达的抑制

另一方面,本申请提供一种用于减少细胞或组织中 LPA mRNA 或蛋白质表达的方法,其包括:使细胞或组织与有效量的前述的 LPARNAi 剂或前述的药物组合物的接触。

在某些实施方案中,其中所述细胞是肝细胞。在某些实施方案中,其中所述组织是肝脏组织。

在某些实施方案中,其中所述细胞和组织是离体的。在另一些实施方案中,其中所述细胞和组织是在体内的。

另一方面,本申请提供一种用于减少受试者中 LPA mRNA 或蛋白质表达的方法,其包括:向目标受试者施用有效量的前述的 LPARNAi 剂或前述的药物组合物。

如本申请所用,术语“沉默”、“减少”、“抑制”、“下调”或“敲低基因表达”当提及 LPA 基因时,意指当将细胞、细胞群或组织用所述 LPA RNAi 剂处理时,相较于在施用 LPA RNAi 剂之前相同的细胞、细胞群或组织,基因的表达(如通过其中转录 LPA 基因的细胞、细胞群或组织中从基因转录的 RNA 的水平或者从 mRNA 翻译的多肽、蛋白质或蛋白质亚基的水平测量的)降低。

在某些实施方案中,施用所述 LPARNAi 剂的受试者中 LPA 的基因表达水平和/或 mRNA 水平,相对于施用 LPARNAi 剂之前的受试者或未接受 LPARNAi 剂的受试者减少至少约 5% 以上,例如 5%至 98%。受试者中的基因表达水平和/或 mRNA 水平可在受试者的细胞、细胞群和/或组织中减少。在某些实施方案中,施用所述 LPARNAi 剂的受试者中 LPA 的蛋白质水平,相对于施用 LPARNAi 剂之前的受试者或未接受 LPARNAi 剂的受试者减少 5% 以上,例

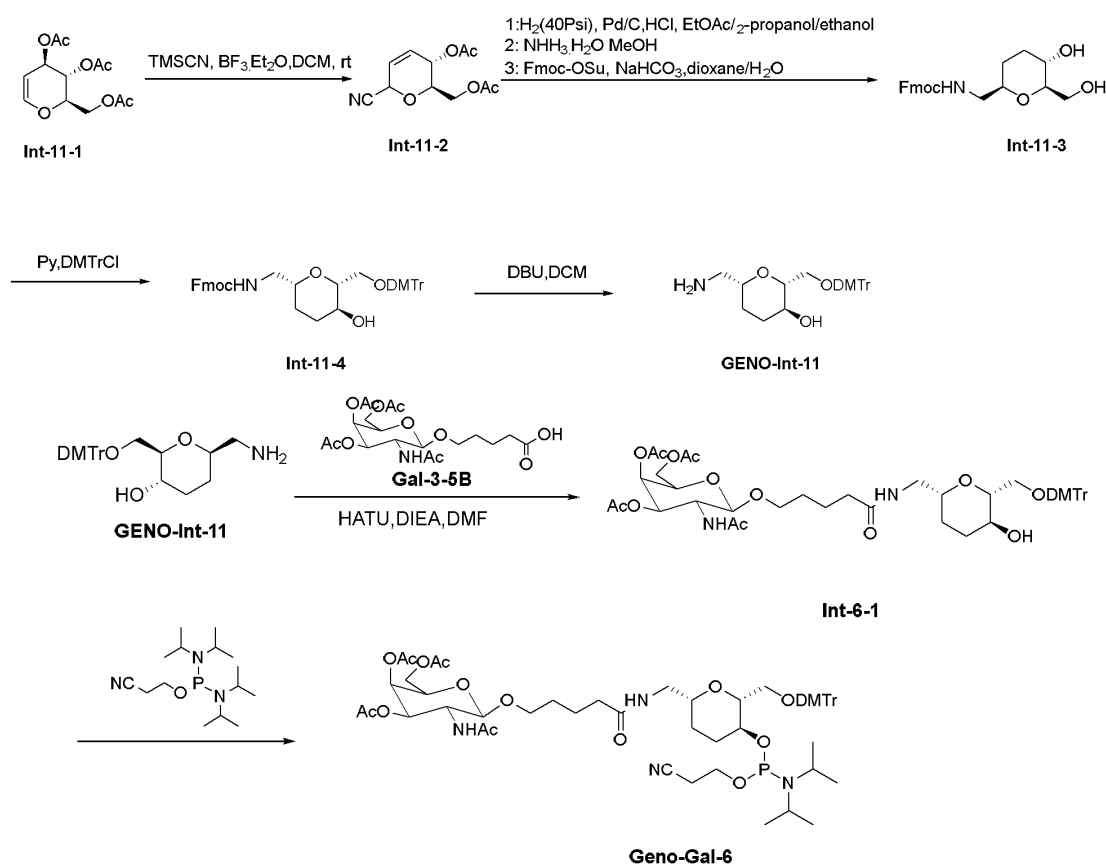
如 5%至 98%。受试者中的蛋白质水平可以在受试者的细胞、细胞群、组织、血液和/或其它流体中减少。可以通过本领域已知的任何方法评估基因表达、mRNA 或蛋白质水平的减少。LPA mRNA 水平和/或蛋白质水平的减少或降低在本申请中被统称为 LPA 的减少或降低, 或抑制或减少 LPA 的表达。

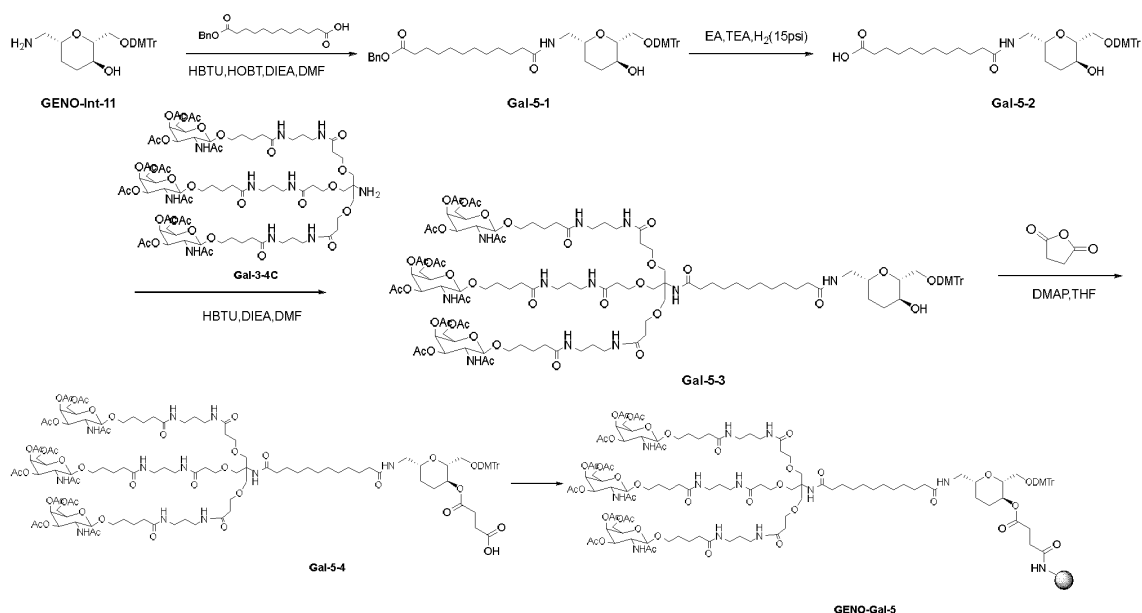
引入细胞当提及 LPA RNAi 剂时意指将 LPA RNAi 剂功能性地递送至细胞中。功能性递送意指 RNAi 剂被递送至细胞并具有预期的生物活性(如, 基因表达的序列-特异性抑制)。

以下通过具体实施例对本申请进行进一步描述。

实施例 1 化合物 GENO-Gal-6 合成

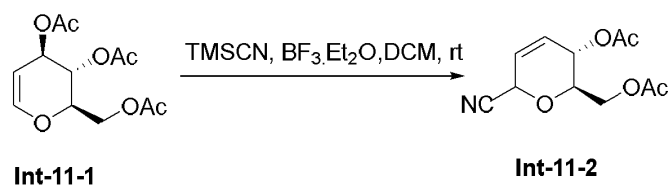
(1) 合成路线





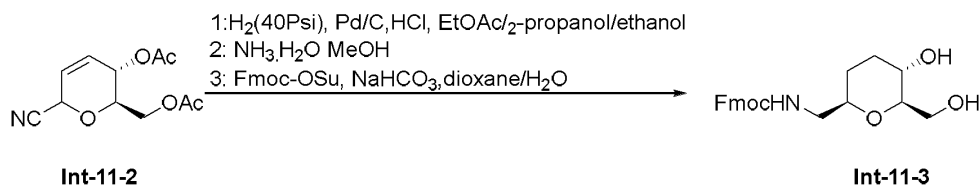
(2) 具体合成步骤

1) 化合物 Int-11-2 的制备



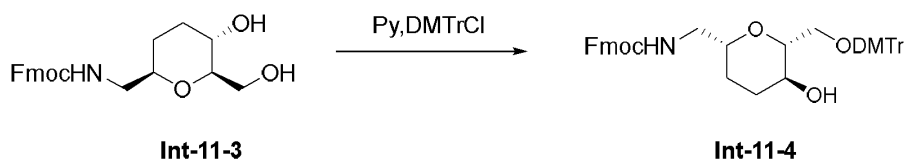
将 Int-11-1 (10 g) 溶于 (140 mL) DCM (Dichloromethane) 并降温至 0°C, 滴加 TMSCN (Trimethylsilyl cyanide, 三甲基胍硅烷(TMSCN)) (4.01 g) 和 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.83 mL), 反应 10 min。TLC 板监测反应 (使用 Hexane: EtOAc = 5 : 1, KMnO_4 显色, 原料 $R_f = 0.3$, α 构型 $R_f = 0.28$, β 构型 $R_f = 0.27$) 原料反应完全。反应完全后, 将 100 mL 饱和 NaHCO_3 水溶液加入到反应液中, 另加入 100 mL DCM 分出有机相, 将有机相用饱和食盐水洗一次, 使有机相浓缩, 然后溶于 EtOAc (200 mL), 用 NaHCO_3 水溶液 (100 mL) 洗一次, 饱和食盐水洗一次, 有机相使用无水硫酸钠干燥, 浓缩。然后用正向硅胶柱纯化, 缓慢增加极性, 其中 Hexane/EtOAc = 20% 时出 α 构型, 25% 时出 β 构型, α 构型得到 (5.3 g) 白色固体, β 构型得到 (3.7 g) 无色油状。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.03~6.06 (dt, 1H), 5.91~5.94 (dt, 1H), 5.35 (dq, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.30 (dd, 1H), 4.30 (dd, 1H), 3.82 (ddd, 1H), 2.10~2.12 (2s, 6H)。

2) 化合物 Int-11-3 的制备



将 HCl 水溶液(1 M, 17.2 mL)加入到 Int-11-2 (3.7 g, β 构型, 无色油状) 和 10% Pd/C (377 mg) 的悬浮液中, 加入乙酸乙酯/2-丙醇/乙醇(2:1:1, 共 90 mL)的混合物中, 在氢气(40 Psi)下搅拌反应 48 小时。利用 TLC 监测反应, 通过硅藻土过滤去除催化剂, 减压浓缩溶剂。将得到的粗品用甲苯带洗两遍, 然后溶于(10 mL 甲醇中, 加入 28% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (30 mL), 室温搅拌 16 小时, 反应液浓缩后, 用甲苯乙腈 1:1 混合溶液 (50 mL) 带洗 3 次。将上述粗品取 1 g 溶于 (40 mL) H_2O 降温至 0°C , 加入 NaHCO_3 (1.4 g), Na_2CO_3 (0.88 g), 将 FmocOSu (2.13 g) 溶于二氧六环(dioxane) (40 mL)溶剂, 然后滴加到上述水溶液中, 室温反应 1 小时。TLC 监测反应 (DCM : MeOH=10 : 1, 254nm, $R_f = 0.5$)。正向柱纯化, MeOH/DCM=5% 出产物, 得 Int-11-3 (340 mg) 无色固体。 ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.76-7.78 (d, 2H), 7.58-7.60 (d, 2H), 7.39-7.42 (t, 2H), 7.30-7.34 (t, 2H), 5.12 (t, 1H), 4.42-4.52 (m, 2H), 4.22 (t, 1H), 3.84 (br. s, 2H), 3.47-3.57 (m, 3H), 3.11-3.24 (m, 2H), 1.30-1.56, 1.67-1.72, 2.05-2.22 (m, 4H)。

3) 化合物 Int-11-4 的制备



将 Int-11-3 (340 mg) 溶于 2 ml 吡啶, 降温至 0°C , 将 DMTrCl (450 mg)溶于 2 ml 吡啶后逐滴滴加到上述溶液中, TLC 监测, 原料反应完全。加 5 ml 水溶液淬灭反应, 反向柱 C18 纯化 MeCN/ H_2O =80% 出产物 int-11-4 (290 mg)。

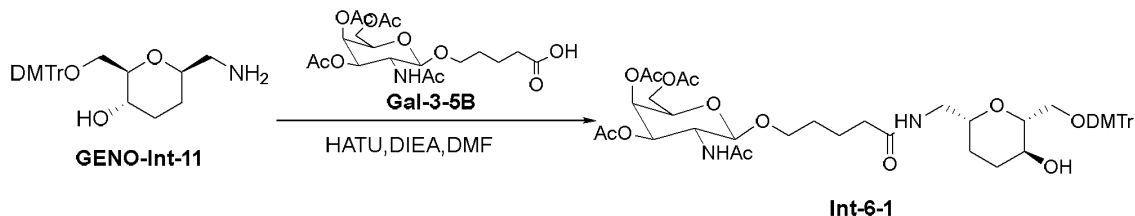
4) 化合物 GENO-Int-11 的制备



将 Int-11-4 (700 mg, 1.02 mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷, 然后将 DBU (310 mg, 2.04 mmol) 加到上述溶液中, TLC 监测, 原料反应完全。加 5 ml 饱和 Na_2CO_3 溶液淬灭反应, 用二氯甲烷 20 mL 萃取, 有机相浓缩用 DCM : MeOH = 10 : 1, (254nm, $R_f = 0.5$)。正向柱纯化,

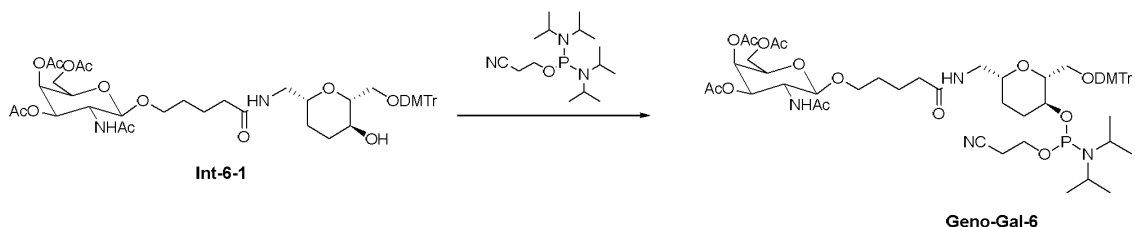
MeOH/DCM=5% 出产物, 得 GENO-Int-11(550 mg) 黄色固体。

5) 化合物 Int-6-1 的制备



将**Gal-3-5B** (1.45g, 3.24 mmol) 溶于无水DMF (10 mL) 溶剂中, 然后加入HATU (1.64 g, 4.32 mmol), 3A分子筛 (1g) 和DIEA(1.07 mL, 6.47 mmol), 反应液室温下搅拌30min, 然后把 **GENO-int-11** (1g, 2.16 mmol) 溶于DMF(10 mL)加入到上述反应液中, 反应液在氩气保护下室温搅拌过夜。反应液过滤, 通过反向柱C18纯化 MeCN/ H₂O=60% 出产物得到**Int-6-1** (1.8 g)。¹H NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.80 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.71-7.73 (m, 1H), 7.39-7.41 (m, 2H), 7.24-7.30 (m, 6H), 7.18-7.21 (m, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 5.21 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.95-4.98 (m, 1H), 4.59 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.00-4.05 (m, 2H), 3.83-3.90 (m, 1H), 3.64-3.73 (m, 7H), 3.23-3.38 (m, 8H), 2.97-3.14 (m, 3H), 2.04-2.14 (m, 5H), 1.98 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.64-4.66 (m, 1H) 1.42-1.50 (m, 4H).

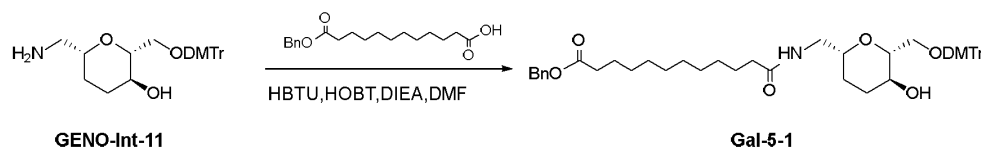
5) 化合物 Geno-Gal-6 的制备



将**Int-6-1** (2.1g, 2.35 mmol) 溶于DCM(30 mL), 加入Tetrazole(33 mg, 0.47 mmol), NMI(77.2 mg, 0.94 mmol) 和2g分子筛, 反应液用氩气置换三次, 在室温下搅拌20min, 然后把磷试剂 (920.81 mg, 3.06 mmol) 溶于少量二氯甲烷加入到反应液中, 室温下搅拌1小时。反应液用饱和NaHCO₃水溶液洗两次, 水洗一次, 食盐水洗一次, 室温浓缩浓缩, 通过反向柱C18纯化 MeCN/ H₂O=65% 出产物得到**GENO-Gal-6** (1.5 g)。¹H NMR: (400 MHz, CD₃CN) δ 7.48-7.50 (m, 2H), 7.20-7.36 (m, 7H), 6.83-6.87 (m, 4H), 6.45-6.51 (m, 1H), 5.28 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.98-5.02 (m, 1H), 4.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.90-4.12 (m, 4H), 3.24-3.76 (m, 20H), 3.02-3.11 (m, 1H),

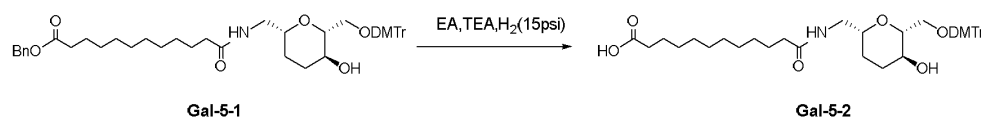
2.49-2.59 (m, 1H), 2.36-2.39 (m, 1H), 2.08-2.25 (m, 9H), 1.97 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.71-1.74 (m, 1H), 1.46-1.63 (m, 5H), 0.85-1.39 (m, 20H).

6) 化合物 Gal-5-1 的制备



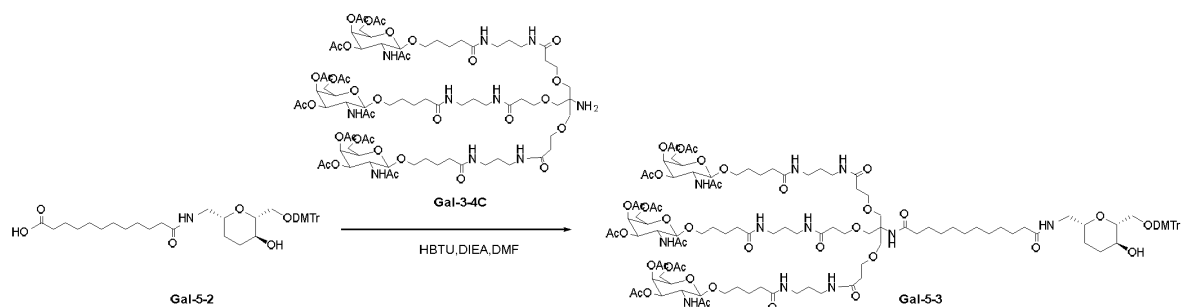
将 1,12-十二烷二酸单苄酯 (387 mg, 1.2 mmol) 溶于无水 DMF (N,N-Dimethylformamide) (10 mL) 溶剂中, 然后加入 HBTU (O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate) (546 mg, 1.44 mmol), DIEA (N,N-Diisopropylethylamine) (0.65 mL, 3.6 mmol), HOBT (1-Hydroxybenzotriazole) (324 mg, 2.4 mmol) 和 GENO-Int-11 (560 mg, 1.2 mmol), 然后在氩气保护下室温搅拌过夜。反应液通过反向柱 C18 纯化 MeCN/H₂O=70% 出产物得到 Gal-5-1 (200 mg)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.68 (t, 1H), 7.49–7.12 (m, 14H), 6.86 (d, 4H), 5.07 (s, 2H), 4.58 (d, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.38 (dd, 1H), 3.28–3.16 (m, 3H), 3.22-2.85 (m, 3H), 2.41–2.25 (m, 2H), 2.11–2.00 (m, 2H), 1.92 (dd, 1H), 1.64 (d, 1H), 1.57–1.41 (m, 4H), 1.27–1.06 (m, 14H)。

7) 化合物 Gal-5-2 的制备



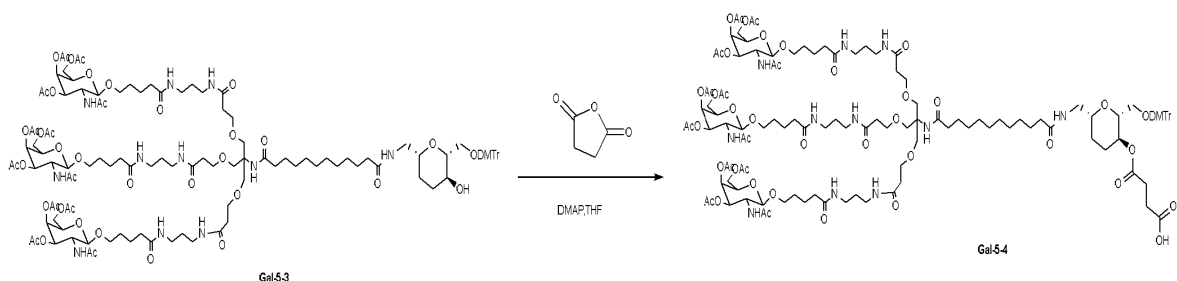
将 Gal-5-1 (200 mg, 0.26 mmol) 溶于 5 mL 乙酸乙酯中, 加入 50 毫克钯炭和三乙胺 (0.11 mL, 0.78 mmol), 反应液在氩气 (15 psi), 室温下搅拌 16 小时, 反应液过滤浓缩得 Gal-5-2 (150 mg)。

8) 化合物 Gal-5-3 的制备



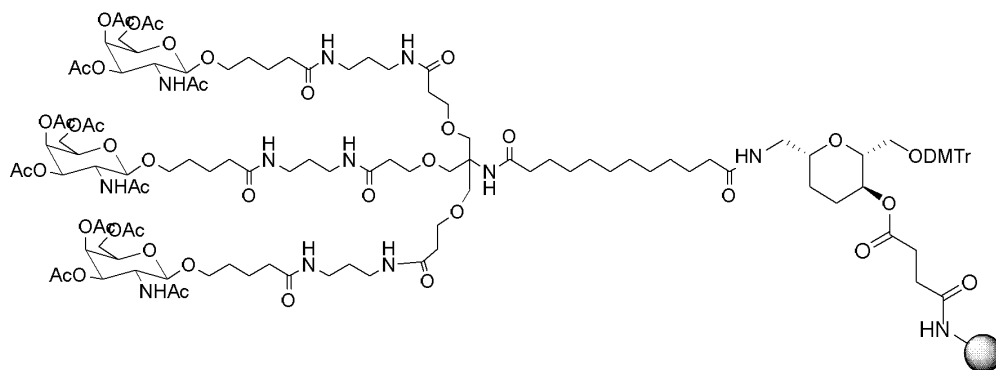
将 Gal-5-2 (对应式 I-1) (150 mg, 0.22 mmol) 溶于 5 mL 无水 DMF 中, 向此溶液中加入 HBTU (101 mg, 0.27 mmol), DIEA (0.16 mL), 3A 分子筛 (1 g) 和 Gal-3-4C (441 mg, 0.22 mmol)。然后上述混合物于室温下搅拌 16 小时, 反应液通过反向柱 C18 纯化 MeCN/ H₂O=60% 出产物得到 Gal-5-3 (380 mg)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.91 – 7.67 (m, 10H), 7.42 (d, 2H), 7.34 – 7.24 (m, 6H), 7.20 (d, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.87 (d, 4H), 5.21 (d, 3H), 4.97 (dd, 3H), 4.60 (s, 1H), 4.48 (d, 3H), 4.09 – 3.95 (m, 10H), 3.93 – 3.82 (m, 3H), 3.77 – 3.66 (m, 9H), 3.61 – 3.48 (m, 12H), 3.45 (d, 3H), 3.09 – 2.95 (m, 15H), 2.27 (t, 6H), 2.10 (s, 9H), 2.05 (dd, 10H), 1.99 (s, 9H), 1.89 (s, 9H), 1.76 (d, 9H), 1.63 – 1.38 (m, 24H), 1.16 (s, 14H)。

9) 化合物 Gal-5-4 的制备



将 Gal-5-3 (370 mg, 0.15 mmol), 丁二酸酐 (75 mg, 0.76 mmol), 3A 分子筛 (0.5 g) 和 DMAP (4-Dimethylaminopyridine) (46 mg, 0.38 mmol) 溶于 5 mL THF (Tetrahydrofuran) 中, 然后反应液 40°C 搅拌过夜, 反应液通过反向柱 C18 纯化 MeCN/ H₂O=40% 出产物得到 Gal-5-4 (220 mg)。

10) 连接到固相载体上的氨基半乳糖化合物 GENO-Gal-5 合成



GENO-Gal-5

将 Gal-5-4 (220 mg, 0.086 mmol) 悬浮于 4 mL CH_3CN 和 2 mL DMF 中, 滴加 DIEA (0.035 mL, 0.216 mmol) 和 HBTU (49.07 mg, 0.129 mmol), 室温搅拌 5 分钟, 向反应液中加入氨基树脂 (99.51 mg, 100-200 目, 氨基载量 250 $\mu\text{mol/g}$, 25°C 下进行摇床反应, 转速 220 转/分钟, 反应 16h 后过滤, 滤饼以 DCM 淋洗 3 次, 每次 30 mL, 乙腈淋洗 3 次, 每次 30 mL, 30 mL 正己烷淋洗 3 次, 真空油泵干燥 2h, 随后加入混合试剂 (CapB1, 4-二甲氨基吡啶, N-甲基咪唑和乙腈, 11.2 mL/12.4 mg/0.50 mL/4.32 mL) 进行盖帽反应。25°C 下置于摇床上, 转速 220 转/分钟, 反应 16h, 反应液过滤, 滤饼用乙腈淋洗 3 次, 每次 30 mL, 抽滤至干, 真空油泵减压下干燥过夜, 得目标产物, GNEO-Gal-5 化合物 160 mg。

实施例 2 siRNA 的合成

未修饰的 siRNA 由药明康德提供 (序列见表 1)。修饰的 siRNA (见表 2 和表 3) 合成过程简要描述如下: 于 Dr. Oligo 48 合成器 (Biolytic) 上, 以 Universal CPG 载体为起始, 根据合成程序逐个连接核苷亚磷酸胺单体, 其中 2'-F RNA、2'-O-甲基 RNA 等核苷亚磷酸胺单体原料购自芜湖华仁和上海兆维。采用 5-乙基硫-1H-四唑 (ETT) 作为活化剂 (0.6 M 乙腈溶液), 使用 0.22 M 的 PADS 溶于 1:1 体积比的乙腈和三甲基吡啶 (上海凌江) 混合溶剂中, 得到的溶液作为硫化试剂, 使用碘吡啶/水溶液 (上海凌江) 作为氧化剂。

在寡核苷酸中, 核苷酸单体通过 5'-3'-磷酸二酯键相互连接, 包含硫代磷酸酯连键和磷酸二酯连键。

固相合成完成后, 寡核糖核苷酸自该固体支撑物裂解, 采用 3:1 的 28% 氨水和乙醇溶液在 50°C 条件下浸泡 15 小时。然后离心, 将上清液转移到另一个离心管中, 浓缩蒸发干后, 使用 C18 反向色谱纯化, 流动相为 0.1 M TEAA 和乙腈, 并使用 3% 三氟乙酸溶液脱除 DMTr。目标寡核苷酸收集后冻干, 并经 LC-MS 鉴定为目标产物, 再经过 UV (260 nm) 定量。

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

表 1，表 2 和表 3 的序列中，各符号分别用于表示如下修饰的核苷酸(酯)：

- A = 腺苷-3'-磷酸酯
- C = 胞苷-3'-磷酸酯
- G = 鸟苷-3'-磷酸酯
- U = 尿苷-3'-磷酸酯
- Am = 2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯
- Ams = 2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯
- Cm = 2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯
- Cms = 2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯
- Gm = 2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯
- Gms = 2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯
- Um = 2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯
- Ums = 2'-O-甲基尿苷-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
- Cf = 2'-氟胞苷-3'-磷酸酯
- Cfs = 2'-氟胞苷-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
- Uf = 2'-氟尿苷-3'-磷酸酯
- Ufs = 2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯

其中：小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸；

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

小写字母 s 在 3'端第一个时表示与该字母 s 左侧相邻的一个核苷酸末端为硫代磷酸酯基；

表 1 靶向人的 LPA mRNA 的未修饰 siRNA 编号和序列

LPA RNAi 剂 ID	反义链碱基序列(5'→3')	SEQ ID NO.	正义链碱基序列(5'→3')	SEQ ID NO.
Geno-1-001	UAAUCUCAGCAUCUGGAUCCUG	2	GGAAUCCAGAUGCUGAGAUUA	93
Geno-1-002	AAACAGCCGUGGACGUCGCAAGG	3	UUGCGACGUCCACGGCUGUUU	94
Geno-1-003	AUAGACGACCAAGACUGACAUGU	4	AUGUCAGUCUUGGUCGUCUAU	95
Geno-1-004	AUUGACAUGUCCUCCUGUGACA	5	UCACAGGAAGGACAUGUCAAU	96
Geno-1-005	AUGCUUCCAGGACAUUUCUUCGG	6	GAAGAAAUGUCCUGGAAGCAU	97
Geno-1-006	UCAUUCUCAUAACAAGGAGCUG	7	GCUCCUUGUUAUUGAGAAUGA	98
Geno-1-007	UAACAAACCUUGAAACACGAGCA	8	CUCGUGUUUCAAGGUUUGUUA	99
Geno-1-008	AUAACUCUGUCCAUAUACCAU	9	UGGUAAUGGACAGAGUUAUUU	100
Geno-1-009	AUAACUCUGUCCAUAUACCAUGGU	10	CAUGGUAAUGGACAGAGUUAU	101
Geno-1-010	AACUCUGUCCAUCACCAUGGUAG	11	ACCAUGGUGAUGGACAGAGUU	102
Geno-1-011	AUAACUCUGUCCAUCACCAUGGU	12	CAUGGUGAUGGACAGAGUUAU	103
Geno-1-012	AUGUGCCUCGAUAACUCUGUCCA	13	GACAGAGUUAUCGAGGCACAU	104
Geno-1-014	AAGUAACAAACCUUGAAACACGA	14	GUGUUUCAAGGUUUGUUACUU	105
Geno-1-015	UUCAUUCUCAUAACAAGGAGCU	15	CUCCUUGUUAUUGAGAAUGAA	106
Geno-1-016	UACAAUGCUUCCAGGACAUUUCU	16	AAAUGUCCUGGAAGCAUUGUA	107
Geno-1-017	AAGAUUGACAUGUCCUCCUGUG	17	CAGGAAGGACAUGUCAAUUCU	108
Geno-1-018	AUUCUGUCACUGGACAUCGUGUC	18	CACGAUGUCCAGUGACAGAAU	109
Geno-1-019	AUGUCCUCCUGUAACAGUGGUG	19	CCACUGUUACAGGAAGGACAU	110
Geno-1-020	AAGGACUAAUCUCAGCAUCUGGA	20	CAGAUGCUGAGAUUAGUCCUU	111
Geno-1-021	AACACCAAGGACUAAUCUCAGCA	21	CUGAGAUUAGUCCUUGGUGUU	112

Geno-1-022	AUUCUGUGGUUCUCUGAUGCCAG	22	GGCAUCAGAGAACCACAGAAU	113
Geno-1-023	UUUCUCAGGUGGUGCUUGUUCAG	23	GAACAAGCACCACCUGAGAAA	114
Geno-1-024	UUCCUGCAGUAGUUCAUUGUCAG	24	GACAAUGAACUACUGCAGGAA	115
Geno-1-025	UUGUUCUGAGACUGACUUGCCAG	25	GGCAAGUCAGUCUCAGAACAA	116
Geno-1-026	UUGCACACUUCAUUCUCAUAUAC	26	UAUUGAGAAUGAAGUGUGCAA	117
Geno-1-027	UGAGCCUCGAUAACUCUGUUU	27	ACAGAGUUAUCGAGGGCUCATT	118
Geno-1-029	UAUGUGCCUCGAUAACUCUGUCC	28	ACAGAGUUAUCGAGGCACAUA	119
Geno-1-030	AUGAGCCUCGAUAACUCUGUCCA	29	GACAGAGUUAUCGAGGCUCAU	120
Geno-1-031	AAUGAGCCUCGAUAACUCUGUCC	30	ACAGAGUUAUCGAGGCUCAU	121
Geno-1-032	UUCUCCUGUGACAGUGGUGGAG	31	CCACCACUGUCACAGGAAGAA	122
Geno-1-034	UUCGUUUGAUUGCUGUCUAUUAU	32	AAUAGACAGCAAUCAACGAA	123
Geno-1-035	UAUAGUGAUUGCACACUUCAUUC	33	AUGAAGUGUGCAAUCACUAUA	124
Geno-1-036	UUCCAAACCUUGUUCUGAGACUG	34	GUCUCAGAACAAGGUUUGGAA	125
Geno-1-037	UACAGUCUUGUUCAGAAGGAGGC	35	CUCCUUCUGAACAAGACUGUA	126
Geno-1-038	UUUUCUCAGGUGGUGCUUGUUCA	36	AACAAGCACCACCUGAGAAAA	127
Geno-1-039	UAGUAUUCUGUGGUUCUCUGAUG	37	UCAGAGAACCACAGAAUACUA	128
Geno-1-040	UAACACCAAGGACUAAUCUCAGC	38	UGAGAUUAGUCCUUGGUGUUA	129
Geno-1-041	AUAACACCAAGGACUAAUCUCAG	39	GAGAUUAGUCCUUGGUGUUAU	130
Geno-1-042	UUGAUUCCAUCACUGGACAUUGC	40	AAUGUCCAGUGAUGGAAUCAA	131
Geno-1-043	AUAUGCCUCGAUAACUCCGUCCA	41	GACGGAGUUAUCGAGGCAUAU	132
Geno-1-044	AUACAGUCUUGUUCAGAAGGAGG	42	UCCUUCUGAACAAGACUGUAU	133

Geno-1-045	UUCAAGCAGUGAGCAGCAGUCAG	43	GACUGCUGCUCACUGCUUGAA	134
Geno-1-046	UACUUAUAGUGAUUGCACACUUC	44	AGUGUGCAAUCACUAUAAGUA	135
Geno-1-047	UACAGAAUUUGUCAGUCAGACCU	45	GUCUGACUGACAAAUUCUGUA	136
Geno-1-049	UUCAUGAUCAAGCCAGCAUUUGG	46	AAAUGCUGGCUUGAUGAUGAA	137
Geno-1-050	UUCCUGUGACAGUGGUAGAGAAU	47	UCUCUACCACUGUCACAGGAA	138
Geno-1-051	AAUAUUCUGUUGUCCUCUGAUGC	48	AUCAGAGGACAACAGAAUAUU	139
Geno-1-052	CAGUAGUUCAUGAUCAAGCCAGC	49	UGGCUUGAUGAUGAACUACUG	140
Geno-1-054	AUACAGAAUUUGUCAGUCAGACC	50	UCUGACUGACAAAUUCUGUAU	141
Geno-1-055	UAUUUGUCCUUCUCGAAGCAAAC	51	UUGCUUCGAGAAGGACAAAUA	142
Geno-1-056	UUCUUCAAGCAGUGAGCAGCAGU	52	UGCUGCUCACUGCUUGAAGAA	143
Geno-1-057	AACAUAACAGUCUUGUUCAGAAGG	53	UUCUGAACAAGACUGUAUGUU	144
Geno-1-058	UUCUGUUUCUGAGCAUUGUGUCA	54	ACACAAUGCUCAGAAACAGAA	145
Geno-1-059	UUCAGUUGGUGCUUCUUCAGAAG	55	UCUGAAGAAGCACCAACUGAA	146
Geno-1-060	UAUAACACCAAGGACUAAUCUCA	56	AGAUUAGUCCUUGGUGUUAUA	147
Geno-1-061	UUCUGUCACUGGACAUUGUGUCA	57	ACACAAUGUCCAGUGACAGAA	148
Geno-1-062	AUAACUCUGUCCAUCACCUCGGU	58	CGAGGUGAUGGACAGAGUUAU	149
Geno-1-063	AUUCUGUUUCUGAGCAUUGUGUC	59	CACAAUGCUCAGAAACAGAAU	150
Geno-1-064	UUUCUUGGAUUCAUUGUGUAGCA	60	CUACACAAUGAAUCCAAGAAA	151
Geno-1-065	UAUUUCCUGAACAUGAGAUUCGA	61	GAAUCUCAUGUUCAGGAAAUA	152
Geno-1-066	AAUGUAUUUGUCCUUCUCGAAGC	62	UUCGAGAAGGACAAAUAUAU	153
Geno-1-067	AAUACAGAAUUUGUCAGUCAGAC	63	CUGACUGACAAAUUCUGUAUU	154

Geno-1-069	AUUCCUGCAGUAGUUCAUGAUCA	64	AUCAUGAACUACUGCAGGAAU	155
Geno-1-070	UAAUAUUCUGUUGUCCUCUGAUG	65	UCAGAGGACAACAGAAUAUUA	156
Geno-1-071	AUAAUAUUCUGUUGUCCUCUGAU	66	CAGAGGACAACAGAAUAUUAU	157
Geno-1-072	AUAACAAUAAGGAGCUGCCACAG	67	GUGGCAGCUCCUUAUUGUUAU	158
Geno-1-074	UAAUACAGAAUUUGUCAGUCAGA	68	UGACUGACAAAUUCUGUAUUA	159
Geno-1-075	AAACACGAGCAUAGACACCAGGC	69	CUGGUGUCUAUGCUCGUGUUU	160
Geno-1-076	UCUAUUUCCUGAACAUGAGAUUC	70	AUCUCAUGUUCAGGAAAUAGA	161
Geno-1-077	AUCACAGUAGUCAAAAAGUUUUC	71	AAACUUUUUGACUACUGUGAU	162
Geno-1-078	UCUAGGACACCUGAUUCUGUUUC	72	AACAGAAUCAGGUGUCCUAGA	163
Geno-1-079	UUCUUCCUGUGAUAGUGGUGGAG	73	CCACCACUAUCACAGGAAGAA	164
Geno-1-080	AUUCUGUCACUGGACAUUGUGUC	74	CACAAUGUCCAGUGACAGAAU	165
Geno-1-081	UUGAUUCUGUCACUGGACAUUGU	75	AAUGUCCAGUGACAGAAUCAA	166
Geno-1-082	UGUUCUUCCUGUGAUAGUGGUGG	76	ACCACUAUCACAGGAAGAACA	167
Geno-1-083	UUCAGAAUGAGCCUCCAUGCUUG	77	AGCAUGGAGGCUCAUUCUGAA	168
Geno-1-084	AAUCAAAUGAAGAGGAUGCACAG	78	GUGCAUCCUCUUCAUUUGAUU	169
Geno-1-085	AUUACUUUGUCAGUGAUGACGGC	79	CGUCAUCACUGACAAAGUAAU	170
Geno-1-086	UGAAACACGAGCAUAGACACCAG	80	GGUGUCUAUGCUCGUGUUUCA	171
Geno-1-087	UUAUAUACAGAAUUUGUCAGUCAG	81	GACUGACAAAUUCUGUAUUA	172
Geno-1-089	UAUAACAAUAAGGAGCUGCCACA	82	UGGCAGCUCCUUAUUGUUAUA	173
Geno-1-090	AUCUCAGCAUCUGGAUUCCUGCA	83	CAGGAAUCCAGAUGCUGAGAU	174
Geno-1-091	AAUCUCAGCAUCUGGAUUCCUGC	84	AGGAAUCCAGAUGCUGAGAUU	175

Geno-1-092	UCGUAAUACAAUAAGGAGCUGCC	85	CAGCUCCUUAUUGUUAUACGA	176
Geno-1-094	UUCAAAUCAAAAUAAGUGCAGAG	86	CUGCACUUAUUUUGAUUUGAA	177
Geno-1-095	UUGAAACACGAGCAUAGACACCA	87	GUGUCUAUGCUCGUGUUUCA	178
Geno-1-096	AUGUAACAUUCAGUCCUGGCGGU	88	CGCCAGGACUGAAUGUUACA	179
Geno-1-097	UUCCCACAAUCAAAUGAAGAGGA	89	CUCUUCAUUUGAUUGUGGGAA	180
Geno-1-098	AUGUCCUCCUGUGACAGUGGUG	90	CCACUGUCACAGGAAGGACA	181
Geno-1-099	AUGUUCUCCUGUGAUAGUGGUG	91	CCACUAUCACAGGAAGAACA	182
Geno-1-100	AAGGACACUUGAUUCUGUCACUG	92	GUGACAGAAUCAAGUGUCCU	183

表 2 靶向人的 LPA mRNA 的修饰 siRNA 编号和序列

双链编号	反义链编号	反义链 5'→3'	原始 SEQ ID NO.	正义链编号	正义链 5'→3'	原始 SEQ ID NO.
Geno-1-010M	LPA-1AS	AmsAfsCm UmCmUf GmUmCm CmAmUm CmAfCm CfAmUm GmGmUms AmsGm	11	LPA-69SS	AmsCmsCm AmUmGm GfUmGf AfUfGm GmAmCm AmGmAm GmUmUm	102
Geno-1-011M	LPA-2AS	AmsUfsAm AmCmUf CmUmGm UmCmCm AmUfCm AfCmCm AmUmGms GmsUm	12	LPA-70SS	CmsAmsUm GmGmUm GfAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUm	103
Geno-1-019M	LPA-3AS	AmsUfsGm UmCmCf UmUmCm CmUmGm UmAfAm CfAmGm UmGmGms UmsGm	19	LPA-71SS	CmsCmsAm CmUmGm UfUmAf CfAfGm GmAmAm GmGmAm CmAmUm	110
Geno-1-022M	LPA-4AS	AmsUfsUm CmUmGf UmGmGm UmUmCm UmCfUm GfAmUm	22	LPA-72SS	GmsGmsCm AmUmCm AfGmAf GfAfAm CmCmAm	113

		GmCmCms AmsGm			CmAmGm AmAmUm	
Geno-1-023M	LPA-5AS	UmsUfsUm CmUmCf AmGmGm UmGmGm UmGfCm UfUmGm UmUmCms AmsGm	23	LPA-73SS	GmsAmsAm CmAmAm GfCmAf CfCfAm CmCmUm GmAmGm AmAmAm	114
Geno-1-030M	LPA-6AS	AmsUfsGm AmGmCf CmUmCm GmAmUm AmAfCm UfCmUm GmUmCms CmsAm	29	LPA-74SS	GmsAmsCm AmGmAm GfUmUf AfUfCm GmAmGm GmCmUm CmAmUm	120
Geno-1-031M	LPA-7AS	AmsAfsUm GmAmGf CmCmUm CmGmAm UmAfAm CfUmCm UmGmUms CmsCm	30	LPA-75SS	AmsCmsAm GmAmGm UfUmAf UfCfGm AmGmGm CmUmCm AmUmUm	121
Geno-1-035M	LPA-8AS	UmsAfsUm AmGmUf GmAmUm UmGmCm AmCfAm CfUmUm CmAmUms UmsCm	35	LPA-76SS	AmsUmsGm AmAmGm UfGmUf GfCfAm AmUmCm AmCmUm AmUmAm	2012 6
Geno-1-041M	LPA-9AS	AmsUfsAm AmCmAf CmCmAm AmGmGm AmCfUm AfAmUm CmUmCms AmsGm	039	LPA-77SS	GmsAmsGm AmUmUm AfGmUf CfCfUm UmGmGm UmGmUm UmAmUm	130
Geno-1-050M	LPA-10AS	UmsUfsCm CmUmGf UmGmAm CmAmGm UmGfGm UfAmGm AmGmAms AmsUm	47	LPA-78SS	UmsCmsUm CmUmAm CfCmAf CfUfGm UmCmAm CmAmGm GmAmAm	138
Geno-1-051M	LPA-11AS	AmsAfsUm AmUmUf CmUmGm UmUmGm UmCfCm UfCmUm GmAmUms GmsCm	48	LPA-79SS	AmsUmsCm AmGmAm GfGmAf CfAfAm CmAmGm AmAmUm AmUmUm	139
Geno-1-060M	LPA-12AS	UmsAfsUm AmAmCf AmCmCm AmAmGm GmAfCm UfAmAm UmCmUms CmsAm	56	LPA-80SS	AmsGmsAm UmUmAm GfUmCf CfUfUm GmGmUm GmUmUm AmUmAm	147
Geno-1-	LPA-	UmsUfsCm UmGmUf	57	LPA-	AmsCmsAm	148

061M	13AS	CmAmCm UmGmGm AmCfAm UfUmGm UmGmUms CmsAm		81SS	CmAmAm UfGmUf CfCfAm GmUmGm AmCmAm GmAmAm	
Geno-1-064M	LPA-14AS	UmsUfsUm CmUmUf GmGmAm UmUmCm AmUfUm GfUmGm UmAmGms CmsAm	60	LPA-82SS	CmsUmsAm CmAmCm AfAmUf GfAfAm UmCmCm AmAmGm AmAmAm	151
Geno-1-070M	LPA-15AS	UmsAfsAm UmAmUf UmCmUm GmUmUm GmUfCm CfUmCm UmGmAms UmsGm	65	LPA-83SS	UmsCmsAm GmAmGm GfAmCf AfAfCm AmGmAm AmUmAm UmUmAm	156
Geno-1-076M	LPA-16AS	UmsCfsUm AmUmUf UmCmCm UmGmAm AmCfAm UfGmAm GmAmUms UmsCm	70	LPA-84SS	AmsUmsCm UmCmAm UfGmUf UfCfAm GmGmAm AmAmUm AmGmAm	161
Geno-1-080M	LPA-17AS	AmsUfsUm CmUmGf UmCmAm CmUmGm GmAfCm AfUmUm GmUmGms UmsCm	74	LPA-85SS	CmsAmsCm AmAmUm GfUmCf CfAfGm UmGmAm CmAmGm AmAmUm	165
Geno-1-081M	LPA-18AS	UmsUfsGm AmUmUf CmUmGm UmCmAm CmUfGm GfAmCm AmUmUms GmsUm	75	LPA-86SS	AmsAmsUm GmUmCm CfAmGf UfGfAm CmAmGm AmAmUm CmAmAm	166
Geno-1-082M	LPA-19AS	UmsGfsUm UmCmUf UmCmCm UmGmUm GmAfUm AfGmUm GmGmUms GmsGm	76	LPA-87SS	AmsCmsCm AmCmUm AfUmCf AfCfAm GmGmAm AmGmAm AmCmAm	167
Geno-1-086M	LPA-20AS	UmsGfsAm AmAmCf AmCmGm AmGmCm AmUfAm GfAmCm AmCmCms AmsGm	80	LPA-88SS	GmsGmsUm GmUmCm UfAmUf GfCfUm CmGmUm GmUmUm UmCmAm	171
Geno-1-072M	LPA-21AS	AmsUfsAm AmCmAf AmUmAm AmGmGm AmGfCm UfGmCm CmAmCms AmsGm	67	LPA-89SS	GmsUmsGm GmCmAm GfCmUf CfCfUm UmAmUm UmGmUm	158

					UmAmUm	
Geno-1-089M	LPA-22AS	UmsAfsUm AmAmCf AmAmUm AmAmGm GmAfGm CfUmGm CmCmAms CmsAm	82	LPA-90SS	UmsGmsGm CmAmGm CfUmCf CfUfUm AmUmUm GmUmUm AmUmAm	173
Geno-1-001M	LPA-23AS	UmsAfsAm UmCmUf CmAmGm CmAmUm CmUfGm GfAmUm UmCmCms UmsGm	2	LPA-91SS	GmsGmsAm AmUmCm CfAmGf AfUfGm CmUmGm AmGmAm UmUmAm	93
Geno-1-018M	LPA-24AS	AmsUfsUm CmUmGf UmCmAm CmUmGm GmAfCm AfUmCm GmUmGms UmsCm	18	LPA-92SS	CmsAmsCm GmAmUm GfUmCf CfAfGm UmGmAm CmAmGm AmAmUm	109
Geno-1-055M	LPA-25AS	UmsAfsUm UmUmGf UmCmCm UmUmCm UmCfGm AfAmGm CmAmAms AmsCm	51	LPA-93SS	UmsUmsGm CmUmUm CfGmAf GfAfAm GmGmAm CmAmAm AmUmAm	142
Geno-1-100M	LPA-26AS	AmsAfsGm GmAmCf AmCmUm UmGmAm UmUfCm UfGmUm CmAmCms UmsGm	92	LPA-94SS	GmsUmsGm AmCmAm GfAmAf UfCfAm AmGmUm GmUmCm CmUmUm	183
Geno-1-099M	LPA-27AS	AmsUfsGm UmUmCf UmUmCm CmUmGm UmGfAm UfAmGm UmGmGms UmsGm	91	LPA-95SS	CmsCmsAm CmUmAm UfCmAf CfAfGm GmAmAm GmAmAm CmAmUm	182
Geno-1-005M	LPA-28AS	AmsUfsGm CmUmUf CmCmAm GmGmAm CmAfUm UfUmCm UmUmCms GmsGm	6	LPA-96SS	GmsAmsAm GmAmAm AfUmGf UfCfCm UmGmGm AmAmGm CmAmUm	97
Geno-1-075M	LPA-29AS	AmsAfsAm CmAmCf GmAmGm CmAmUm AmGfAm CfAmCm CmAmGms GmsCm	69	LPA-97SS	CmsUmsGm GmUmGm UfCmUf AfUfGm CmUmCm GmUmGm UmUmUm	160
Geno-1-085M	LPA-30AS	AmsUfsUm AmCmUf UmUmGm UmCmAm	79	LPA-98SS	CmsGmsUm CmAmUm CfAmCf	170

		GmUfGm AfUmGm AmCmGms GmsCm			UfGfAm CmAmAm AmGmUm AmAmUm	
Geno-1-084M	LPA-31AS	AmsAfsUm CmAmAf AmUmGm AmAmGm AmGfGm AfUmGm CmAmCms AmsGm	78	LPA-99SS	GmsUmsGm CmAmUm CfCmUf CfUfUm CmAmUm UmUmGm AmUmUm	169
Geno-1-092M	LPA-32AS	UmsCfsGm UmAmUf AmAmCm AmAmUm AmAfGm GfAmGm CmUmGms CmsCm	85	LPA-100SS	CmsAmsGm CmUmCm CfUmUf AfUfUm GmUmUm AmUmAm CmGmAm	176
Geno-1-026M	LPA-33AS	UmsUfsGm CmAmCf AmCmUm UmCmAm UmUfCm UfCmAm AmUmAms AmsCm	26	LPA-101SS	UmsAmsUm UmGmAm GfAmAf UfGfAm AmGmUm GmUmGm CmAmAm	117
Geno-1-059M	LPA-34AS	UmsUfsCm AmGmUf UmGmGm UmGmCm UmUfCm UfUmCm AmGmAms AmsGm	55	LPA-102SS	UmsCmsUm GmAmAm GfAmAf GfCfAm CmCmAm AmCmUm GmAmAm	146
Geno-1-071M	LPA-35AS	AmsUfsAm AmUmAf UmUmCm UmGmUm UmGfUm CfCmUm CmUmGms AmsUm	66	LPA-103SS	CmsAmsGm AmGmGm AfCmAf AfCfAm GmAmAm UmAmUm UmAmUm	157
Geno-1-037M	LPA-36AS	UmsAfsCm AmGmUf CmUmUm GmUmUm CmAfGm AfAmGm GmAmGms GmsCm	35	LPA-104SS	CmsUmsCm CmUmUm CfUmGf AfAfCm AmAmGm AmCmUm GmUmAm	124
Geno-1-066M	LPA-37AS	AmsAfsUm GmUmAf UmUmUm GmUmCm CmUfUm CfUmCm GmAmAms GmsCm	62	LPA-105SS	UmsUmsCm GmAmGm AfAmGf GfAfCm AmAmAm UmAmCm AmUmUm	153
Geno-1-036M	LPA-38AS	UmsUfsCm CmAmAf AmCmCm UmUmGm UmUfCm UfGmAm GmAmCms UmsGm	34	LPA-106SS	GmsUmsCm UmCmAm GfAmAf CfAfAm GmGmUm UmUmGm GmAmAm	125

Geno-1-098M	LPA-39AS	AmsUfsGm UmCmCf UmUmCm CmUmGm UmGfAm CfAmGm UmGmGms UmsGm	90	LPA-107SS	CmsCmsAm CmUmGm UfCmAf CfAfGm GmAmAm GmGmAm CmAmUm	181
Geno-1-058M	LPA-40AS	UmsUfsCm UmGmUf UmUmCm UmGmAm GmCfAm UfUmGm UmGmUms CmsAm	54	LPA-108SS	AmsCmsAm CmAmAm UfGmCf UfCfAm GmAmAm AmCmAm GmAmAm	145
Geno-1-090M	LPA-41AS	AmsUfsCm UmCmAf GmCmAm UmCmUm GmGfAm UfUmCm CmUmGms CmsAm	83	LPA-109SS	CmsAmsGm GmAmAm UfCmCf AfGfAm UmGmCm UmGmAm GmAmUm	174
Geno-1-039M	LPA-42AS	UmsAfsGm UmAmUf UmCmUm GmUmGm GmUfUm CfUmCm UmGmAms UmsGm	37	LPA-110SS	UmsCmsAm GmAmGm AfAmCf CfAfCm AmGmAm AmUmAm CmUmAm	128
Geno-1-003M	LPA-43AS	AmsUfsAm GmAmCf GmAmCm CmAmAm GmAfCm UfGmAm CmAmUms GmsUm	4	LPA-111SS	AmsUmsGm UmCmAm GfUmCf UfUfGm GmUmCm GmUmCm UmAmUm	95
Geno-1-014M	LPA-44AS	AmsAfsGm UmAmAf CmAmAm AmCmCm UmUfGm AfAmAm CmAmCms GmsAm	14	LPA-112SS	GmsUmsGm UmUmUm CfAmAf GfGfUm UmUmGm UmUmAm CmUmUm	105
Geno-1-040M	LPA-45AS	UmsAfsAm CmAmCf CmAmAm GmGmAm CmUfAm AfUmCm UmCmAms GmsCm	38	LPA-113SS	UmsGmsAm GmAmUm UfAmGf UfCfCm UmUmGm GmUmGm UmUmAm	129
Geno-1-047M	LPA-46AS	UmsAfsCm AmGmAf AmUmUm UmGmUm CmAfGm UfCmAm GmAmCms CmsUm	45	LPA-114SS	GmsUmsCm UmGmAm CfUmGf AfCfAm AmAmUm UmCmUm GmUmAm	136
Geno-1-045M	LPA-47AS	UmsUfsCm AmAmGf CmAmGm UmGmAm GmCfAm GfCmAm	43	LPA-115SS	GmsAmsCm UmGmCm UfGmCf UfCfAm CmUmGm	134

		GmUmCms AmsGm			CmUmUm GmAmAm	
Geno-1-057M	LPA-48AS	AmsAfsCm AmUmAf CmAmGm UmCmUm UmGfUm UfCmAm GmAmAms GmsGm	53	LPA-116SS	UmsUmsCm UmGmAm AfCmAf AfGfAm CmUmGm UmAmUm GmUmUm	144
Geno-1-097M	LPA-49AS	UmsUfsCm CmCmAf CmAmAm UmCmAm AmAfUm GfAmAm GmAmGms GmsAm	89	LPA-117SS	CmsUmsCm UmUmCm AfUmUf UfGfAm UmUmGm UmGmGm GmAmAm	180
Geno-1-046M	LPA-50AS	UmsAfsCm UmUmAf UmAmGm UmGmAm UmUfGm CfAmCm AmCmUms UmsCm	44	LPA-118SS	AmsGmsUm GmUmGm CfAmAf UfCfAm CmUmAm UmAmAm GmUmAm	135
Geno-1-021M	LPA-51AS	AmsAfsCm AmCmCf AmAmGm GmAmCm UmAfAm UfCmUm CmAmGms CmsAm	21	LPA-119SS	CmsUmsGm AmGmAm UfUmAf GfUfCm CmUmUm GmGmUm GmUmUm	112
Geno-1-024M	LPA-52AS	UmsUfsCm CmUmGf CmAmGm UmAmGm UmUfCm AfUmUm GmUmCms AmsGm	24	LPA-120SS	GmsAmsCm AmAmUm GfAmAf CfUfAm CmUmGm CmAmGm GmAmAm	115
Geno-1-020M	LPA-53AS	AmsAfsGm GmAmCf UmAmAm UmCmUm CmAfGm CfAmUm CmUmGms GmsAm	20	LPA-121SS	CmsAmsGm AmUmGm CfUmGf AfGfAm UmUmAm GmUmCm CmUmUm	111
Geno-1-091M	LPA-54AS	AmsAfsUm CmUmCf AmGmCm AmUmCm UmGfGm AfUmUm CmCmUms GmsCm	84	LPA-122SS	AmsGmsGm AmAmUm CfCmAf GfAfUm GmCmUm GmAmGm AmUmUm	175
Geno-1-004M	LPA-55AS	AmsUfsUm GmAmCf AmUmGm UmCmCm UmUfCm CfUmGm UmGmAms CmsAm	5	LPA-123SS	UmsCmsAm CmAmGm GfAmAf GfGfAm CmAmUm GmUmCm AmAmUm	96
Geno-1-	LPA-	AmsUfsAm AmCmUf	10	LPA-	CmsAmsUm	101

009M	56AS	CmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm		124SS	GmGmUm AfAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUm	
Geno-1-062M	LPA-57AS	AmsUfsAm AmCmUf CmUmGm UmCmCm AmUfCm AfCmCm UmCmGms GmsUm	58	LPA-125SS	CmsGmsAm GmGmUm GfAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUm	149
Geno-1-079M	LPA-58AS	UmsUfsCm UmUmCf CmUmGm UmGmAm UmAfGm UfGmGm UmGmGms AmsGm	73	LPA-126SS	CmsCmsAm CmCmAm CfUmAf UfCfAm CmAmGm GmAmAm GmAmAm	164
Geno-1-006M	LPA-59AS	UmsCfsAm UmUmCf UmCmAm AmUmAm AmCfAm AfGmGm AmGmCms UmsGm	7	LPA-127SS	GmsCmsUm CmCmUm UfGmUf UfAfUm UmGmAm GmAmAm UmGmAm	98
Geno-1-017M	LPA-60AS	AmsAfsGm AmUmUf GmAmCm AmUmGm UmCfCm UfUmCm CmUmGms UmsGm	17	LPA-128SS	CmsAmsGm GmAmAm GfGmAf CfAfUm GmUmCm AmAmUm CmUmUm	108
Geno-1-063M	LPA-61AS	AmsUfsUm CmUmGf UmUmUm CmUmGm AmGfCm AfUmUm GmUmGms UmsCm	59	LPA-129SS	CmsAmsCm AmAmUm GfCmUf CfAfGm AmAmAm CmAmGm AmAmUm	150
Geno-1-096M	LPA-62AS	AmsUfsGm UmAmAf CmAmUm UmCmAm GmUfCm CfUmGm GmCmGms GmsUm	88	LPA-130SS	CmsGmsCm CmAmGm GfAmCf UfGfAm AmUmGm UmUmAm CmAmUm	179
Geno-1-044M	LPA-63AS	AmsUfsAm CmAmGf UmCmUm UmGmUm UmCfAm GfAmAm GmGmAms GmsGm	42	LPA-131SS	UmsCmsCm UmUmCm UfGmAf AfCfAm AmGmAm CmUmGm UmAmUm	133
Geno-1-015M	LPA-64AS	UmsUfsCm AmUmUf CmUmCm AmAmUm AmAfCm AfAmGm	15	LPA-132SS	CmsUmsCm CmUmUm GfUmUf AfUfUm GmAmGm	106

		GmAmGms CmsUm			AmAmUm GmAmAm	
Geno-1-077M	LPA-65AS	AmsUfsCm AmCmAf GmUmAm GmUmCm AmAfAm AfAmGm UmUmUms UmsCm	71	LPA-133SS	AmsAmsAm CmUmUm UfUmUf GfAfCm UmAmCm UmGmUm GmAmUm	162
Geno-1-042M	LPA-66AS	UmsUfsGm AmUmUf CmCmAm UmCmAm CmUfGm GfAmCm AmUmUms GmsCm	40	LPA-134SS	AmsAmsUm GmUmCm CfAmGf UfGfAm UmGmGm AmAmUm CmAmAm	131
Geno-1-027M	LPA-67AS	UGAGCCUmCGAUAAAC U CUmGUdTdT	27	LPA-135SS	ACmAGAmGmUUA CGmAGmGm CmUmCmTdT	118
Geno-1-008M	LPA-68AS	AUAACUCmUGUCCA U ACmCAdTdT	9	LPA-136SS	UGmGUAmAmUG G ACmGAmGm UmUmAUmdTdT	100

表 3 缀合配体的靶向人的 LPA mRNA 的修饰 siRNA 编号和序列

双链 编号	反义 链 编号	反义链 5'→3'	原始 SEQ ID NO.	正义 链 编号	正义链 5'→3'	原始 SEQ ID NO.
Geno-1-105M	359 AS	AmsUfsAm AmCfUmCmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	36 8S S	[Gal-6]sCmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]	101
Geno-1-106M	359 AS	AmsUfsAm AmCfUmCmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	36 9S S	[Gal-6]s[Gal-6]sCmAmUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUm[Gal-6][Gal-6]	101
Geno-1-107M	359 AS	AmsUfsAmAmCfUmCm UmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal-6]s[Gal-6]	101
Geno-1-	359 AS	AmsUfsAm AmCfUmCmUmGm	10	37 1S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm	101

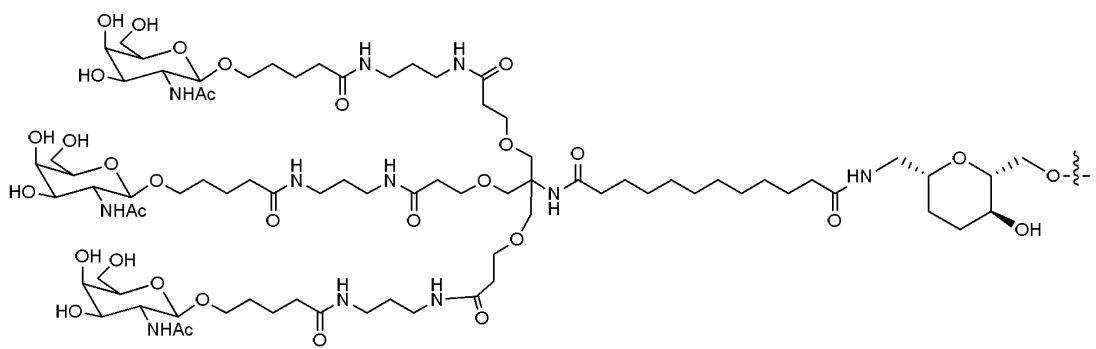
108M		UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm		S	CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-5]	
Geno- 1- 109M	382 AS	AmsUfsAmAmCmUfCm UmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	39 6S S	CmsAmsUm GmGmUm AfAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101
Geno- 1- 110M	383 AS	AmsUfsAm AmCmUfCmUfGf UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	39 6S S	CmsAmsUm GmGmUm AfAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101
Geno- 1- 111M	384 AS	VP(U)sUfsAmAmCfUmC mUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101
Geno- 1- 112M	385 AS	AmsUfsAm AmCfUmCmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCf AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101
Geno- 1- 113M	386 AS	AmsUfsAm AmCmUmCmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCf AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101
Geno- 1- 114M	387 AS	AmsUfsAm AmCfUfCmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101
Geno- 1- 115M	388 AS	AmsUfsAm AmCmUfCfUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101
Geno- 1- 116M	389 AS	AmsUfsAf AmCmUfCmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal- 6]s[Gal-6]	101

Geno-1-117M	359 AS	AmsUfsAm AmCfUmCmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	39 7S S	CmsAmsUm GmGmUm AfAmUf GfGfAf CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6] s[Gal-6]s[Gal-6]	101
Geno-1-118M	LP A- 60 AS	AmsAfsGm AmUmUf GmAmCm AmUmGm UmCfCm UfUmCm CmUmGms UmsGm	17	39 8S S	CmsAmsGm GmAmAm GfGmAf CfAfUm GmUmCm AmAmUm CmUmUms[Gal-6]s[Gal-6] s[Gal-6]	108
Geno-1-119M	494 AS	AmsUfsAm AmCfUm(UNA- C)UmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	37 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AmAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUms[Gal-6]s[Gal-6] s[Gal-6]	101
Geno-1-120M	498 AS	AmsAfsGm AmUfUm GmAmCm AmUmGm UmCfCm UfUmCm CmUmGms UmsGm	17	51 1S S	CmsAmsGm GmAmAm GmGmAf CfAfUm GmUmCm AmAmUm CmUmUms[Gal-6]s[Gal-6] s[Gal-6]	108
Geno-1-1001M	LP A- 56 AS	AmsUfsAm AmCmUf CmUmGm UmCmCm AmUfUm AfCmCm AmUmGms GmsUm	10	33 0S S	CmsAmsUm GmGmUm AfAmUf GfGfAm CmAmGm AmGmUm UmAmUm[L96]	101
Geno-1-1002M	331 AS	AmsUfsAm AfCmUf CmUfGm UfCmCf AmUfUm AfCmsCfs Gm	184	33 2S S	CfsGmsGfUm AfAmUf GmGfAm CfAmGf AmGfUm UfAmUfs[L96]	187
Geno-1-1003M	AM -AS	UmsCfsGmUfAmUfAmA mCmAmAmUfAmAfGm GfGmGfCmsUfsGm	185	A M- SS	[NAG25]sCmsAmGmCmC mCmCmUmUfAfUfUmGm UmUmAmUmAmCmGms[i nvdA]	188
Geno-1-1004M	331 AS	AmsUfsAm AfCmUf CmUfGm UfCmCf AmUfUm AfCmsCfs Gm	186	36 5S S	[ST23sST23sST23sC6XLT]s CfsGmsGf UmAf AmUfGmGfAmCfAmGf AmGfUmUfsAmsUf	189

上述 Geno-1-1002M 未修饰的序列为：AUAACUCUGUCCAUAUACCG (SEQ ID No. 184); 对应的正义链未修饰序列为：CGGUAAUGGACAGAGUUAU (SEQ ID No. 188)。上述 Geno-1-1003M 未修饰的序列为：UCGUUAUACAAUAAGGGGCUG (SEQ ID No. 185); 对应的正义链未修饰序列为：CAGCCCCUUAUUGUUAUACGA (SEQ ID No. 189)。上述 Geno-1-

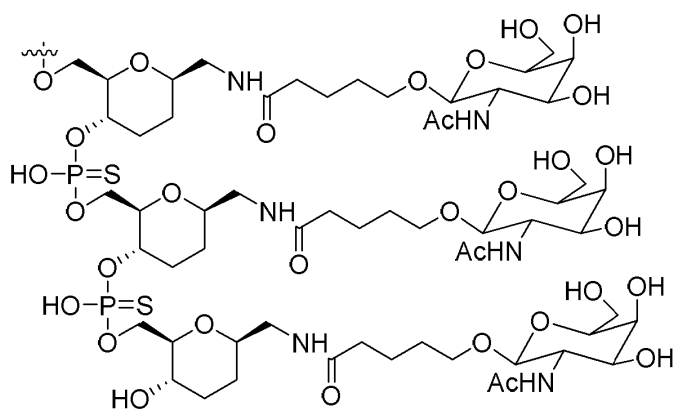
1004M 未修饰的序列为：AUAACUCUGUCCAUAUACCG (SEQ ID No. 186)；对应的正义链未修饰序列为：CGGUA AUGGACAGAGUUAU (SEQ ID No. 189)。

[Gal-5]结构式：

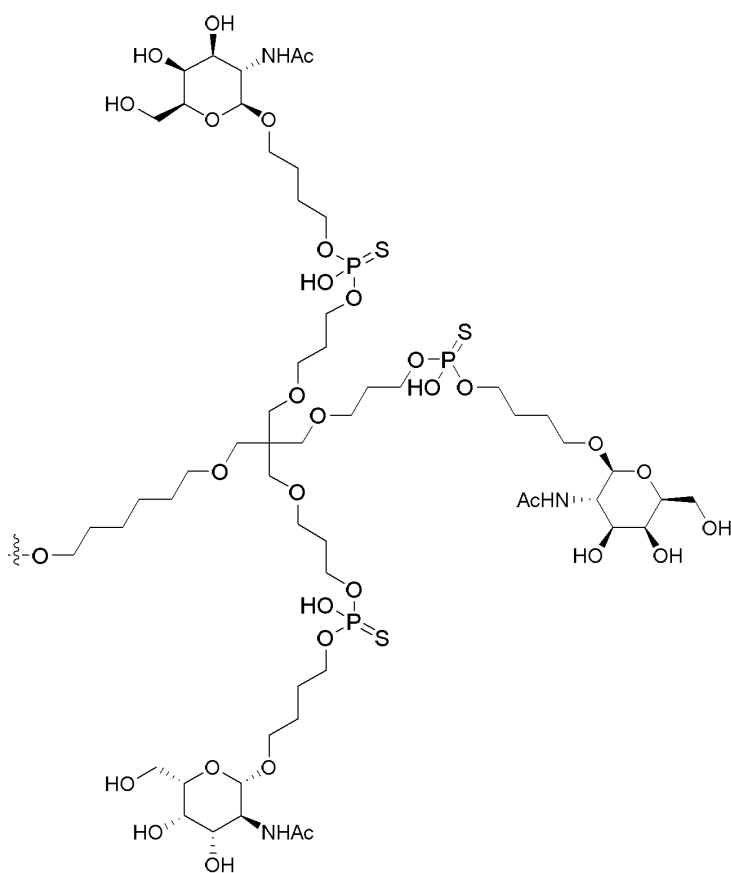


Gal-6 为实施例 1 步骤 5) 制备的目标产物 Geno-Gal-6 的简写；

[Gal-6]_s[Gal-6]_s[Gal-6]结构式：



[ST23sST23sST23sC6XLT]结构式：



实施例 3 LPA RNAi 剂的体外实验

我们合成了91种经计算确定的潜在LPA RNAi剂(表1), 并筛选其体外功效。

为了筛选目的，将人类LPA cDNA序列(登记号NM_005577.1)或其片段从可商购获得的哺乳动物表达载体 (Origene) 亚克隆到可商购获得的基于报告子的筛选质粒psiCHECK2(Promega)，产生海肾萤光素酶/LPA融合mRNA。对于人类背景中的LPARNAi剂功效，将Huh7细胞(人类肝细胞癌系)以约10,000个细胞/孔以96孔格式铺板。将每种LPARNAi剂以两种浓度(1nM和0.1nM)与每孔25ng psiCHECK2-LPA质粒DNA和每孔0.2μL LipoFectamine 2000 一起共转染。通过使用双萤光素酶报告子测定(Promega)测量归一化至同样存在于psiCHECK2质粒上的组成型表达的萤火虫萤光素酶的水平的海肾萤光素酶水平来确定基因敲低(表4)。

如表4显示, 91条序列中的66条序列在1nM时显示出大于60%的敲低效率; 61条序列在0.1nM时显示出大于50%的敲低效率。

表4.通过双萤光素酶报告子测定确定的LPA RNAi剂的体外功效筛选结果

化合物编号 Compound ID	抑制率 Inhibition%	
	1nM	0.1nM
Geno-1-001	78.18	60.57
Geno-1-002	18.19	0.79
Geno-1-003	65.09	55.86
Geno-1-004	69.45	56.78
Geno-1-005	76.00	67.92
Geno-1-006	75.74	57.81
Geno-1-007	-10.00	-9.37
Geno-1-010	93.06	86.75
Geno-1-011	86.65	77.88
Geno-1-014	82.13	69.88
Geno-1-015	62.17	40.78
Geno-1-016	-0.04	-5.14
Geno-1-017	71.17	55.74
Geno-1-018	68.30	64.22
Geno-1-019	84.44	81.88
Geno-1-020	67.32	43.77
Geno-1-021	77.85	60.29
Geno-1-022	75.88	68.58
Geno-1-023	83.04	80.59
Geno-1-024	77.55	60.52
Geno-1-025	51.88	25.06
Geno-1-026	78.57	65.11
Geno-1-030	86.03	80.89
Geno-1-031	83.81	75.38
Geno-1-035	86.58	82.78
Geno-1-036	70.26	60.91
Geno-1-037	81.46	74.44
Geno-1-038	5.10	3.16
Geno-1-039	77.03	66.79
Geno-1-040	69.92	55.90
Geno-1-041	81.97	73.79
Geno-1-042	63.01	44.87
Geno-1-043	-6.86	-11.04
Geno-1-044	69.39	48.30
Geno-1-045	73.01	61.20
Geno-1-046	66.89	53.89
Geno-1-050	72.83	65.84
Geno-1-051	86.40	74.10

Geno-1-055	73.37	66.42
Geno-1-056	-6.78	-5.78
Geno-1-057	74.65	57.12
Geno-1-058	86.67	73.20
Geno-1-059	77.75	70.33
Geno-1-060	91.34	81.49
Geno-1-061	90.34	83.21
Geno-1-062	67.81	51.32
Geno-1-063	75.74	64.82
Geno-1-064	94.24	88.92
Geno-1-065	11.71	-0.21
Geno-1-066	71.04	60.00
Geno-1-070	80.00	67.11
Geno-1-071	78.50	57.74
Geno-1-075	71.01	58.21
Geno-1-076	82.21	72.31
Geno-1-077	78.06	60.96
Geno-1-078	41.18	14.44
Geno-1-079	63.34	47.73
Geno-1-080	90.15	80.39
Geno-1-081	93.02	86.90
Geno-1-082	80.40	74.00
Geno-1-083	5.59	2.06
Geno-1-084	78.77	68.91
Geno-1-085	77.73	66.81
Geno-1-086	79.34	74.16
Geno-1-090	69.09	55.55
Geno-1-091	60.89	33.31
Geno-1-095	-10.72	-9.86
Geno-1-096	75.27	55.43
Geno-1-097	77.78	71.38
Geno-1-098	81.48	72.03
Geno-1-099	75.57	60.84
Geno-1-100	74.28	60.79
Geno-1-027	84.03	75.13
Geno-1-009	64.75	50.17
Geno-1-012	3.07	-7.03
Geno-1-029	5.67	0.99
Geno-1-032	7.26	-0.51
Geno-1-049	7.32	6.57
Geno-1-052	2.96	4.52
Geno-1-069	5.85	-1.42

Geno-1-072	83.39	80.69
Geno-1-089	86.55	74.21
Geno-1-092	80.11	69.67
Geno-1-008	50.89	37.03
Geno-1-034	5.35	-10.01
Geno-1-047	55.57	62.42
Geno-1-054	-13.83	-13.81
Geno-1-067	-18.62	-13.62
Geno-1-074	-12.83	-15.93
Geno-1-087	-16.56	-17.15
Geno-1-094	-22.42	-19.66

实施例 4 LPA RNAi 剂 EC50 测定

使用与实施例3相同的细胞和转染条件产生七点EC50曲线，其中LPA RNAi剂浓度范围为0.1fM-10M。EC50 值将通过 GraphPad Prism 使用“Sigmoidal 剂量反应（可变斜率）”拟合的剂量反应曲线确定(表5)。

如表5所示，测定化合物的EC50介于1pM-60pM之间。

表5.体外测定的指定的LPA RNAi剂的EC50值(pM)

LPA RNAi 剂 ID	EC50 (pM)	LPA RNAi 剂 ID	EC50 (pM)
Geno-1-001	13.16	Geno-1-050	8.102
Geno-1-003	NA	Geno-1-051	5.861
Geno-1-004	19.72	Geno-1-055	9.449
Geno-1-005	10.46	Geno-1-057	16.05
Geno-1-006	17.01	Geno-1-058	11.55
Geno-1-010	3.495	Geno-1-059	8.994
Geno-1-011	12.61	Geno-1-060	18.58
Geno-1-014	10.32	Geno-1-061	8.115
Geno-1-015	NA	Geno-1-062	55.48
Geno-1-017	NA	Geno-1-063	15.12
Geno-1-018	NA	Geno-1-064	3.104
Geno-1-019	6.852	Geno-1-066	16.99

Geno-1-020	8.324	Geno-1-070	14.51
Geno-1-021	16.65	Geno-1-071	16.84
Geno-1-022	5.928	Geno-1-072	18.87
Geno-1-023	3.388	Geno-1-075	11.3
Geno-1-024	21.88	Geno-1-076	9.823
Geno-1-026	9.508	Geno-1-077	20.88
Geno-1-027	5.44	Geno-1-079	27.85
Geno-1-030	3.114	Geno-1-080	8.466
Geno-1-031	5.853	Geno-1-081	11.46
Geno-1-035	6.414	Geno-1-082	9.531
Geno-1-036	7.389	Geno-1-084	7.988
Geno-1-037	1.974	Geno-1-085	11.92
Geno-1-039	13.55	Geno-1-086	6.002
Geno-1-040	5.001	Geno-1-090	19.78
Geno-1-041	4.361	Geno-1-096	39.39
Geno-1-042	26	Geno-1-097	10.19
Geno-1-044	8.591	Geno-1-098	4.67
Geno-1-045	3.016	Geno-1-099	15.63
Geno-1-046	27.33	Geno-1-100	38.62

实施例 5 修饰 LPA RNAi 剂的体外试验结果分析

通过初步筛选的序列，经修饰后，使用与实施例3相同的细胞和转染条件，将每种LPA RNAi剂以1nM浓度与每孔25ng psiCHECK2-LPA质粒DNA和每孔0.2μL LipoFectamine 2000一起共转染。通过使用双萤光素酶报告子测定(Promega, Madison, WI)测量归一化至同样存在于psiCHECK2质粒上的组成型表达的萤火虫萤光素酶的水平的海肾萤光素酶水平来确定基因敲低(表6)。

如表6所示，71条序列中有41条显示出大于60%的敲低效率。

表6 .通过双萤光素酶报告子测定确定的LPA RNAi剂的体外功效筛选结果

化合物编号 Compound ID	抑制率 Inhibition % (1nM)
Geno-1-001M	58.00
Geno-1-003M	47.13
Geno-1-004M	71.11
Geno-1-005M	52.21
Geno-1-006M	70.00
Geno-1-009M	89.39
Geno-1-010M	78.45
Geno-1-011M	84.58
Geno-1-014M	80.29
Geno-1-015M	73.55
Geno-1-017M	71.98
Geno-1-018M	67.59
Geno-1-019M	61.85
Geno-1-020M	61.80
Geno-1-021M	44.08
Geno-1-022M	62.18
Geno-1-023M	32.89
Geno-1-024M	55.27
Geno-1-026M	73.35
Geno-1-030M	84.39
Geno-1-031M	56.31
Geno-1-035M	68.26
Geno-1-036M	64.07
Geno-1-037M	52.63
Geno-1-039M	72.51
Geno-1-040M	58.20
Geno-1-041M	54.25
Geno-1-042M	65.20
Geno-1-044M	65.44
Geno-1-045M	33.35

Geno-1-046M	75.78
Geno-1-047M	3.80
Geno-1-050M	55.11
Geno-1-051M	61.79
Geno-1-055M	55.97
Geno-1-057M	54.52
Geno-1-058M	60.63
Geno-1-059M	64.08
Geno-1-060M	47.53
Geno-1-061M	56.16
Geno-1-062M	80.93
Geno-1-063M	71.69
Geno-1-064M	69.74
Geno-1-066M	65.90
Geno-1-070M	71.81
Geno-1-071M	55.91
Geno-1-072M	-10.82
Geno-1-075M	61.53
Geno-1-076M	53.98
Geno-1-077M	79.55
Geno-1-079M	29.32
Geno-1-080M	65.69
Geno-1-081M	75.32
Geno-1-082M	42.32
Geno-1-084M	50.80
Geno-1-085M	51.56
Geno-1-086M	71.99
Geno-1-089M	7.90
Geno-1-090M	61.57
Geno-1-091M	52.38
Geno-1-092M	1.15
Geno-1-096M	45.30
Geno-1-097M	62.95
Geno-1-098M	57.05
Geno-1-099M	62.93
Geno-1-100M	66.52
Geno-1-009M	80.82
Geno-1-072M	62.73
Geno-1-089M	53.75
Geno-1-092M	62.58
Geno-1-047M	66.07

实施例 6 通过抑制人 RT-4 细胞中的 LPA mRNA 表达对非缀合 LPARNAi 剂的筛选

将每种 LPA RNAi 剂以 50nM 浓度与每孔 0.4 μ L RNAiMax (Invitrogen)一起孵育。将 RT-4 细胞(人类膀胱移行细胞乳头瘤细胞系)以约 70,000 个细胞/孔以 24 孔板形式铺板, 接种在

孵育好的转染复合物之上。在转染之后 24 小时, 使用 RNeasy 96 试剂盒(Qiagen)提取总的 RNA。使用诺维赞 cDNA 反转录试剂盒和 qPCR 试剂盒, 进行 cDNA 合成和实时 PCR 检测。相对于相应样品中的作为持家转录物的 GAPDH mRNA 表达, 通过 qRT-PCR 来测定 LPA mRNA 水平 (表 7)。

5 表7. 通过qRT-PCR测定确定的LPA RNAi剂的体外功效筛选结果

Compound ID	Inhibition % (50 nM)
Geno-1-004M	-60.71
Geno-1-006M	-51.12
Geno-1-009M	46.29
Geno-1-010M	-0.08
Geno-1-011M	44.31
Geno-1-014M	2.73
Geno-1-015M	22.70
Geno-1-017M	14.12
Geno-1-026M	-91.64
Geno-1-030M	13.43
Geno-1-039M	23.94
Geno-1-046M	1.06
Geno-1-062M	25.41
Geno-1-063M	-11.46
Geno-1-064M	1.71
Geno-1-070M	-18.22
Geno-1-077M	-108.01
Geno-1-081M	-45.73
Geno-1-086M	11.98
Geno-1-092M	6.23

实施例 7 缀合 LPA RNAi 剂皮下给药后在野生型小鼠肝脏和肾脏中的分布比例

将 30 只 C57BL/6/J 小鼠分为 10 组，将指定的 5 组 LPA RNAi 剂在第一天以 10mg/kg 的剂量对每组小鼠进行皮下注射。5 组小鼠在给药后 1 小时进行组织收集，另外 5 组小鼠在给药后 24 小时进行组织收集。将收集的组织样本快速冻，并转移至 -80℃ 保存。组织匀浆后，通过杂交荧光探针-酶联免疫吸附测定法测量肝组织匀浆液与肾组织匀浆液中对应 LPA RNAi 剂的浓度，以肝组织匀浆液浓度除以肾组织匀浆液浓度，计算肝肾比进行评价。结果如表 8。

15 图2显示了 SC 给药 10mg/kg LPARNAi 剂后,野生型小鼠肝脏与肾脏化合物浓度比值。结果显示 Geno-1-105M~Geno-1-108M 在靶向器官肝脏中的浓度在不同时间点均远高于在非

靶向器官肾脏中的浓度，肝脏比肾脏的药物浓度比值远大于 1。同时 Geno-1-1004M 在测试的两个时间点中,非靶向器官肾脏中的浓度均大于肝脏,肝脏比肾脏的药物浓度比值小于 1。

表 8 SC 给药 10mg/kg LPA RNAi 剂后，野生型小鼠肝脏与肾脏化合物浓度比值

	1 小时肝肾 比平均值	SD%	24 小时肝肾 比平均值	SD%
Geno-1-105M	12.1	21%	65.9	30%
Geno-1-106M	29.5	14%	128.6	39%
Geno-1-107M	16.5	1%	94.2	8%
Geno-1-108M	19.3	24%	74.8	25%
Geno-1-1004M	0.2	13%	0.3	21%

5 **实施例 8 C57 瞬时转基因小鼠中 LPA RNAi 剂功效的体内检测**

在 LPA RNAi 剂施用前两周，通过尾静脉高压注射，向野生型小鼠（雄性, C57 BL/6）注射含有在小鼠白蛋白启动子控制下的 SEAP 基因的质粒（该质粒含有人 LPA 基因靶标序列克隆），这些小鼠被称为 SEAP-LPA-HDI 小鼠。在第 0 天给 SEAP-LPA-HDI 小鼠皮下注射 1mg/Kg 或 3mg/Kg 的 LPA RNAi Geno-1-1001M 或者 Geno-1-1002M 溶液，给药体积为 10 5ml/Kg, 对照组小鼠给予等体积的磷酸盐缓冲液（PBS）。在给药前 14 天（Day-14），给药当天（Day0）以及给药后第 7 天， 14 天， 21 天，28 天和 35 天收取小鼠血清（21~35 天仅收取 Geno-1-1001M 组）。

通过使用化学发光报告系统 Phospha-Light™ (Life Technologies)检测小鼠血清中 SEAP 蛋白水平来评价 LPA 表达敲低情况。为了归一化， 将给定时间点的每只动物的 SEAP 水平 15 除以在此动物中的预处理水平以确定“归一化至预处理”的表达的比率；然后将各只动物的“归一化至预处理”比率除以对照组中所有小鼠的平均“归一化至预处理”比率，将特定时间点的表达归一化至对照组。这就使每个时间点的表达归一化至对照组的表达。

图 3 显示了本实施例的检测结果。

将缀合的 LPARNai 剂如上所述施用给 SEAP-LPA-HDI 小鼠。每只小鼠接受单次皮下注射(SC) 剂量 1mg/kg 或 3 mg/kg LPA RNAi 剂 Geno-1-1001M 或者 Geno-1-1002M 溶液， 监 20 测血清中的 SEAP 蛋白质水平长达 35 天。敲低水平和响应持续时间示于表 9 中。1mg/kg 和 3 mg/kg LPARNai 剂 Geno-1-1002M 施用后第七天显示出 SEAP 蛋白水平≥57%和≥67%的最大敲低，施用后第 14 天 SEAP 蛋白水平就已经恢复到对照组水平，未显示出敲低作用。

1mg/kg 和 3 mg/kg LPA RNAi 剂 Geno-1-1001M 施用后第七天显示出 SEAP 蛋白水平 $\geq$ 87%和 $\geq$ 57%的最大敲低, 并且在 3 mg/kg LPA RNAi 剂 Geno-1-1001M 施用后持续到第 35 天还显示出 SEAP 蛋白水平 $\geq$ 72%的敲低。相同剂量下 LPA RNAi 剂 Geno-1-1001M 对 SEAP 蛋白水平的敲低作用和敲低持续时间明显优于 LPA RNAi 剂 Geno-1-1002M。

5 表 9 皮下施用缀合的不同剂量的 LPA RNAi 剂后小鼠血清中的相对 Apo(a)水平

处理	第0天		第7天		第14天		第21天		第28天		第35天	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
PBS	1.00	0.00	1.00	0.39	1.00	0.64	1.00	0.78	1.00	0.79	1.00	0.86
Geno-1-1001M-1.0mpk	1.00	0.00	0.42	0.16	0.75	0.28	0.82	0.33	0.97	0.25	1.04	0.36
Geno-1-1001M-3.0mpk	1.00	0.00	0.13	0.07	0.16	0.08	0.17	0.09	0.17	0.08	0.27	0.15
Geno-1-1002M-1.0mpk	1.00	0.00	0.43	0.23	1.14	0.71	/	/	/	/	/	/
Geno-1-1002M-3.0mpk	1.00	0.00	0.32	0.17	1.05	0.71	/	/	/	/	/	/

实施例 9 NOD SCID 瞬时转基因小鼠中 LPA RNAi 剂功效的体内检测

在 LPA RNAi 剂施用前 10 天, 通过尾静脉高压注射, 向 NOD SCID 小鼠(雄性)注射含有人 LPA 基因靶标序列克隆的微环 DNA (MC hLPA), 这些小鼠被称为 MC hLPA HDI
10 小鼠。在第 0 天给这些小鼠皮下注射 0.3mg/Kg, 1mg/Kg, 3mg/Kg 或 9mg/kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-107M, Geno-1-1003M 和 Geno-1-1004M) 溶液, 给药体积为 5ml/Kg, 对照组小鼠给予等体积的磷酸盐缓冲液 (PBS)。在给药前 3 天 (Day-3), 给药当天 (Day0) 以及给药后第 4 天, 第 7 天, 14 天, 21 天, 28 天和 35 天天收取小鼠血清。

通过使用 ELISA 方法(Apo(a), Abcam)检测小鼠血清中 Apo(a) 蛋白水平来评价 LPA 表
15 达敲低情况。为了归一化, 将给定时间点的每只动物的 Apo(a)水平除以在此动物中的预处理水平 (Day0) 以确定“归一化至预处理”的表达的比率; 然后将各只动物的“归一化至预处理”比率除以对照组中所有小鼠的平均“归一化至预处理”比率, 将特定时间点的表达归一化至对照组。这就使每个时间点的表达归一化至对照组的表达。

图 4 显示了本实施例的检测结果。

20 将缀合的 LPA RNAi 剂如上所述施用给 MC hLPA HDI 小鼠。每只小鼠接受单次皮下注射(SC) 剂量 0.3mg/Kg, 1mg/Kg, 3mg/Kg 或 9mg/kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-107M, Geno-1-1003M 和 Geno-1-1004M) 溶液, 监测血清中的 Apo(a) 蛋白水平长达 35 天。敲低水平和响应持续时间示于表 10 中。0.3mg/Kg, 1mg/Kg 或 3mg/Kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-1004M) 溶液施用后第 7 天显示出 Apo(a)蛋白水平的最大敲低, 敲低分别达到 33%, 58%和 79%。在施用后第 28 天 0.3mg/Kg, 1mg/Kg 或 3mg/Kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-1004M) 对 Apo(a)蛋白水平
25 的敲低分别达到 20%, 42%和 45%。3mg/Kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-1004M) 施用后持续到

第 35 天显示出对 Apo(a)蛋白水平 $\geq 20\%$ 的敲低。 1mg/Kg 或 3mg/Kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-1003M)溶液施用后第 7 天显示出 Apo(a)蛋白水平的最大敲低,敲低分别达到 79%和 92%。

在施用后第 28 天 1mg/Kg 或 3mg/Kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-1003M) 对 Apo(a)蛋白水平的敲低分别达到 52%和 90%。3mg/Kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-1003M) 施用后持续到第 35 天还显

示出对 Apo(a)蛋白水平 $\geq 83\%$ 的敲低。0.3mg/Kg, 1mg/Kg, 3mg/Kg 或 9mg/kg LPA RNAi (Geno-1-107M) 溶液施用后第 7 天显示出 Apo(a)蛋白水平的最大敲低,敲低分别达到 45%, 71%, 96%和 99%。在施用后第 28 天 0.3mg/Kg, 1mg/Kg, 3mg/Kg 或 9mg/kg LPA RNAi 剂 (Geno-1-107M) 对 Apo(a)蛋白水平的敲低分别达到 33%, 45%, 88%和 98%。并且在 3 mg/kg LPA RNAi 剂 Geno-1-107M 施用后持续到第 35 天还显示出对 Apo(a)蛋白水平 $\geq 74\%$ 的敲低。

9 mg/kg LPA RNAi 剂 Geno-1-107M 施用后持续到第 35 天还显示出对 Apo(a)蛋白水平 $\geq 97\%$ 的敲低。在相同剂量 3mg/kg LPA RNAi 剂施用后,相同时间点, Geno-1-107M 对 Apo(a)蛋白水平的敲低作用明显优于 Geno-1-1004M, 与 Geno-1-1003M 敲低作用相当。

表 10 皮下施用缀合的不同剂量的 LPA RNAi 剂后小鼠血清中的相对 Apo(a)水平

处理	第0天		第4天		第7天		第14天		第21天		第28天		第35天	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
PBS	1.00	0.00	1.00	0.22	1.00	0.34	1.00	0.32	1.00	0.44	1.00	0.29	1.00	0.29
Geno-1-107M 0.3mpk	1.00	0.00	0.56	0.11	0.55	0.18	0.55	0.12	0.61	0.21	0.67	0.08	0.93	0.22
Geno-1-107M 1mpk	1.00	0.00	0.35	0.13	0.29	0.12	0.33	0.18	0.35	0.26	0.55	0.29	0.75	0.44
Geno-1-107M 3mpk	1.00	0.00	0.06	0.05	0.04	0.02	0.04	0.02	0.07	0.03	0.12	0.05	0.26	0.09
Geno-1-107M 9mpk	1.00	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05
Geno-1-1004M 0.3mpk	1.00	0.00	0.85	0.15	0.67	0.08	0.81	0.11	0.72	0.20	0.80	0.26	1.20	0.27
Geno-1-1004M 1mpk	1.00	0.00	0.52	0.10	0.42	0.11	0.47	0.12	0.42	0.10	0.58	0.11	0.70	0.15
Geno-1-1004M 3mpk	1.00	0.00	0.23	0.12	0.21	0.10	0.23	0.11	0.28	0.06	0.55	0.15	0.80	0.20
Geno-1-1003M 1mpk	1.00	0.00	0.40	0.06	0.21	0.05	0.21	0.03	0.25	0.09	0.48	0.15	0.61	0.16
Geno-1-1003M 3mpk	1.00	0.00	0.17	0.05	0.08	0.01	0.04	0.03	0.07	0.03	0.10	0.03	0.17	0.09

15 **实施例 10 NOD SCID 瞬时转基因小鼠中 LPA RNAi 剂功效的体内检测（单剂量）**

在 LPA RNAi 剂施用前 10 天,通过尾静脉高压注射,向 NOD SCID 小鼠(雄性)注射含有 LPA 基因靶标序列克隆的微环 DNA (MC hLPA)。这些小鼠被称为 MC hLPA HDI 小鼠。在第 0 天给这些小鼠皮下注射 1mg/Kg LPA RNAi 剂待测物溶液, 给药体积为 5ml/Kg, 对照组小鼠给予等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)。在给药前 3 天(Day-3), 给药当天(Day0)

以及给药后第 4 天,第 7 天, 14 天, 21 天和 28 天收取小鼠血清(仅部分组收取 21 天和 28 天样本)。

通过使用 ELISA 方法(Apo(a), Abcam)检测小鼠血清中 Apo(a) 蛋白水平来评价 LPA 表达敲低情况。为了归一化, 将给定时间点的每只动物的 Apo(a)水平除以在此动物中的预处理水平 (Day0) 以确定“归一化至预处理”的表达的比率; 然后将各只动物的“归一化至

预处理”比率除以对照组中所有小鼠的平均“归一化至预处理”比率, 将特定时间点的表达归

一化至对照组。这就使每个时间点的表达归一化至对照组的表达。

图 5 显示了本实施例的检测结果。

将缀合的 LPA RNAi 剂如上所述施用给 MC hLPA HDI 小鼠。每只小鼠接受单次皮下注射(SC) 剂量 1mg/Kg LPA RNAi 剂溶液， 监测血清中的 Apo(a) 蛋白水平长达 28 天。敲低
5 水平和响应持续时间示于表 11 中。施用第 7 天时，有 10 个施用的 LPARNAi 剂 1mg/Kg 显示出大于 50%的敲低；其中有 3 个施用的 LPARNAi 剂 1mg/Kg 显示出大于 70%的敲低；其中一个 Geno-1-107M 对 Apo(a) 蛋白水平敲低大于 84%。施用第 14 天时，有 8 个施用的 LPARNAi 剂 1mg/Kg 显示出大于 50%的敲低，其中有 1 个施用的 LPARNAi 剂 Geno-1-112M 1mg/Kg 显示出大于 70%的敲低；有 2 个施用的 LPARNAi 剂 Geno-1-107M 和 Geno-1-1003M
10 对 Apo(a) 蛋白水平敲低大于 80%。施用第 28 天时，有 2 个施用的 LPA RNAi 剂 Geno-1-107M 和 Geo-1-111M 对 Apo(a) 蛋白水平敲低仍保持 65%和 54%。

表 11 皮下施用缀合的 LPA RNAi 剂 1mg/Kg 后小鼠血清中的相对 Apo(a)水平

处理	第0天		第4天		第7天		第14天		第21天		第28天	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
PBS	1.00	0.00	1.00	0.28	1.00	0.16	1.00	0.21	1.00	0.26	1.00	0.18
Geno-1-1003M	1.00	0.00	0.46	0.24	0.30	0.11	0.18	0.03	/	/	/	/
Geno-1-109M	1.00	0.00	0.50	0.20	0.70	0.19	0.73	0.26	/	/	/	/
Geno-1-110M	1.00	0.00	0.55	0.17	0.50	0.15	0.64	0.21	/	/	/	/
Geno-1-107M	1.00	0.00	0.31	0.08	0.15	0.06	0.18	0.06	0.30	0.10	0.35	0.11
Geno-1-111M	1.00	0.00	0.34	0.08	0.28	0.07	0.32	0.12	0.41	0.14	0.46	0.17
Geno-1-112M	1.00	0.00	0.49	0.19	0.39	0.12	0.30	0.06	/	/	/	/
Geno-1-113M	1.00	0.00	0.68	0.31	0.55	0.15	0.58	0.18	/	/	/	/
Geno-1-114M	1.00	0.00	0.45	0.15	0.47	0.15	0.30	0.12	/	/	/	/
Geno-1-115M	1.00	0.00	0.61	0.22	0.44	0.10	0.43	0.14	/	/	/	/
Geno-1-116M	1.00	0.00	0.37	0.13	0.50	0.18	0.56	0.24	/	/	/	/
Geno-1-117M	1.00	0.00	0.24	0.05	0.28	0.09	0.35	0.19	/	/	/	/
Geno-1-118M	1.00	0.00	0.45	0.23	0.35	0.12	0.40	0.21	/	/	/	/

实施例 11 NOD SCID 瞬时转基因小鼠中 LPA RNAi 剂功效的体内检测

15 在 LPA RNAi 施用前 27 天，通过尾静脉高压注射，向 NOD SCID 小鼠（雄性）注射含有 LPA 基因靶标序列克隆的微环 DNA (MC hLPA)。这些小鼠被称为 MC hLPA HDI 小鼠。在第 0 天给这些小鼠皮下注射 1mg/Kg LPARNAi 待测物溶液， 给药体积为 5ml/Kg, 对照组小鼠给予等体积的磷酸盐缓冲液（PBS）。 在给药前 3 天（Day-3），给药当天（Day0）以及给药后第 4 天，第 11 天和第 18 天收取小鼠血清。

20 通过使用 ELISA 方法(Apo(a), Abcam)检测小鼠血清中 Apo(a) 蛋白水平来评价 LPA 表达敲低情况。为了归一化， 将给定时间点的每只动物的 Apo(a)水平除以在此动物中的预处

理水平（Day0）以确定“归一化至预处理”的表达的比率；然后将各只动物的“归一化至预处理”比率除以对照组中所有小鼠的平均“归一化至预处理”比率，将特定时间点的表达归一化至对照组。这就使每个时间点的表达归一化至对照组的表达。

图 6 显示了本实施例的检测结果。

- 5
- 将 Gal-6 缀合的 LPA RNAi 剂如上所述施用给 MC hLPA HDI 小鼠。每只小鼠接受单次皮下注射(SC) 剂量 1mg/Kg LPA RNAi 剂溶液， 监测血清中的 Apo(a) 蛋白水平 18 天。敲低水平和响应持续时间示于表 12 中。施用第 4 天时，LPA RNAi 剂 Geno-1-107M 和 Geno-1-120M 1mg/Kg 显示出 69%和 66%的敲低；施用第 11 天时，LPA RNAi 剂 Geno-1-107M 和 Geno-1-120M 1mg/Kg 显示出 70%和 73%的敲低。施用第 18 天时,LPA RNAi 剂 Geno-1-107M 和 Geno-1-1003M 1mg/Kg 显示出 64%和 56%的敲低。

表 12 皮下施用 Gal-6-缀合的 LPA RNAi 剂 1mg/Kg 后小鼠血清中的相对 Apo(a)水平

处理	第0天		第4天		第11天		第18天	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
PBS	1.00	0.00	1.00	0.10	1.00	0.17	1.00	0.33
Geno-1-107M	1.00	0.00	0.31	0.05	0.30	0.13	0.36	0.11
Geno-1-120M	1.00	0.00	0.34	0.08	0.27	0.09	0.44	0.10

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种 LPA 的 RNA 干扰剂, 包含第一核苷酸序列, 所述第一核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 2 至 SEQ ID NO: 183 中的任一个核苷酸序列或者与之互补的核苷酸序列中的至少 12 个连续核苷酸, 或者与所述至少 12 个连续核苷酸相差不超过 3 个核苷酸的序列, 所述核苷酸为经修饰或者未被修饰的状态。

2、根据权利要求 1 所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述第一核苷酸序列由 12 至 30 个核苷酸组成, 优选为 19 至 23 个核苷酸。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述第一核苷酸序列为单链寡核苷酸或双链核苷酸。

4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述第一核苷酸序列中的一个或多个核苷酸被修饰以形成经修饰的核苷酸。

5、根据权利要求 4 所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述第一核苷酸序列包括表 2 中经修饰的任意一个核苷酸序列或与之相差不超过 3 个核苷酸的序列。

6、根据权利要求 1-5 中任一项所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述第一核苷酸序列为正义链或反义链。

7、根据权利要求 1-6 中任一项所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述第一核苷酸序列包括反义链和正义链的双链结构。

8、根据权利要求 7 所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述正义链和/或反义链独立地包含一个或多个经修饰的核苷酸。

9、根据权利要求 4 或 5 所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 修饰核苷酸是 2'-氟修饰核苷酸、2'-O-甲基修饰核苷酸、2'-O-甲氧基乙基修饰核苷酸、2'-O-烷基修饰核苷酸、2'-O-烯丙基修饰核苷酸、双环核酸、脱氧核糖核苷酸、EVP、UNA 和 GNA 中的至少一种。

10、根据权利要求 6-9 中任一项所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述反义链 5'端第 2 位、第 5 位、第 6 位、第 8 位、第 10 位、第 14 位和第 16 位中的至少一个位点被 2'-氟修饰或者甲氧代修饰, 优选为其中 5-7 个位点被 2'-氟修饰或甲氧代修饰。

11、根据权利要求 6-9 中任一项所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述正义链和/或反义链独立地包含一个或多个硫代磷酸酯键; 优选地, 所述正义链在 3'和 5'末端的末端核苷酸之间包含两个连续的硫代磷酸酯键, 或者, 所述反义链在 3'和 5'末端的末端核苷酸之间包含两个连续的硫代磷酸酯键。

12、根据权利要求 7 所述的 RNA 干扰剂, 其中所述反义链包括表 2 中反义链编号栏中任

意一个或与其相差不超过 3 个核苷酸的序列。

13、根据权利要求 1-12 中任一项所述的 RNA 干扰剂，其中所述 RNA 干扰剂还包含缀合配体。

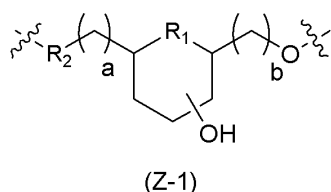
14、根据权利要求 13 所述的 RNA 干扰剂，其中所述配体包括靶向基团，优选地，所述靶向基团包括脱唾液酸糖蛋白受体配体；进一步优选地，所述脱唾液酸糖蛋白受体配体包含半乳糖簇。

15、根据权利要求 13 或 14 所述的 RNA 干扰剂，其特征在于，所述配体用于缀合至正义链和/或反义链，优选地，缀合至正义链。

16、根据权利要求 13-15 中任一项所述的 RNA 干扰剂，所述配体包括如下结构：

Z-X (I),

其中 Z 为核苷酸序列的第一接头部分，且 Z 的通式如(Z-1)所示：



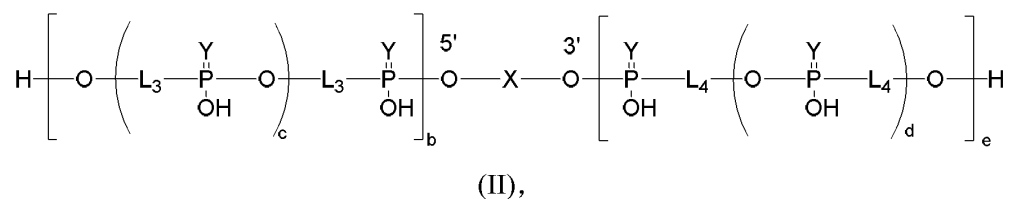
其中 R₁ 是 O、S、NR₃ 或者 CR₃R₄，其中 R₃ 和 R₄ 各自独立地是氢、卤素、取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂环或取代或未取代的环烷基；

其中 R₂ 为 -O-、-S-、-NH-、-CH₂-、-C(O)-、-OC(O)-、-C(O)O-、-NHC(O)-、-C(O)NH-、-CH₂NH-、-CH₂O-、-NH-C(O)-CH₂-、-C(O)-CH₂-NH-，或者 -NH(CO)NH-，其中，所述 -CH₂- 还可以任选被选自卤素，烷基，烷氧基，烷氨基的取代基取代；所述 a 和 b 相同或者不相同，并且分别选自 0 到 20 的整数，优选为 1 到 10 的整数。

17、根据权利要求 16 所述的 RNA 干扰剂，其特征在于，所述第一接头部分 Z 与第二接头部分 L₁ 连接，所述第二接头部分 L₁ 与分支点基团 E 连接。

18、根据权利要求 17 所述的 RNA 干扰剂，其特征在于，所述分支点基团 E 还连接于 a 个与靶向部分连接的栓系部分 L₂，所述 a 为选自 0 到 10 的整数，优选 1 到 5 的整数。

19、根据权利要求 16-18 中任一项所述的 RNA 干扰剂，其特征在于，所述配体具有如下结构：



通式 (II) 中:

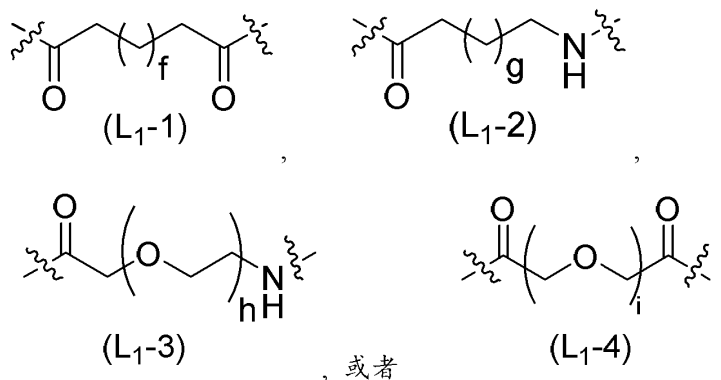
其中 L_4 为靶向部分,

X 为核苷酸序列,

Y 是 O 或 S

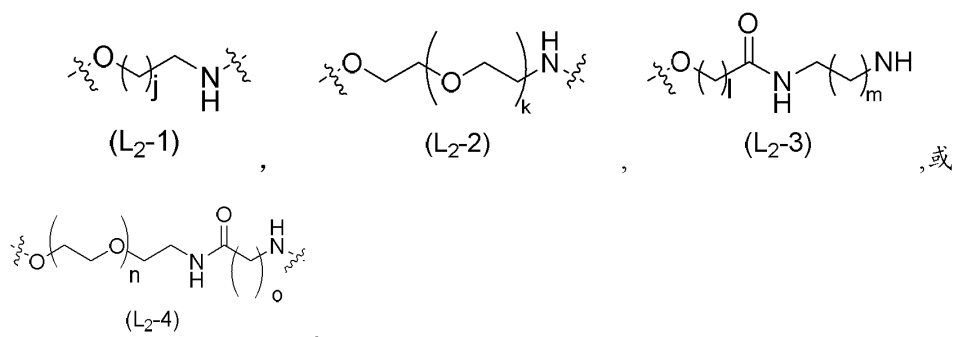
其中 b, c, d 和 e 分别选自 0 到 10 的整数, 且 b 和 e 不同时为 0。

20、根据权利要求 16-19 中任一项所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述第二接头部分 L_1 具有以下结构:



其中 f, g, h 和 i 分别是 1 至 20 的整数, 优选为 1 至 10 的整数。

21、根据权利要求 18 所述的 RNA 干扰剂, 其特征在于, 所述栓系部分 L_2 具有如下结构式:

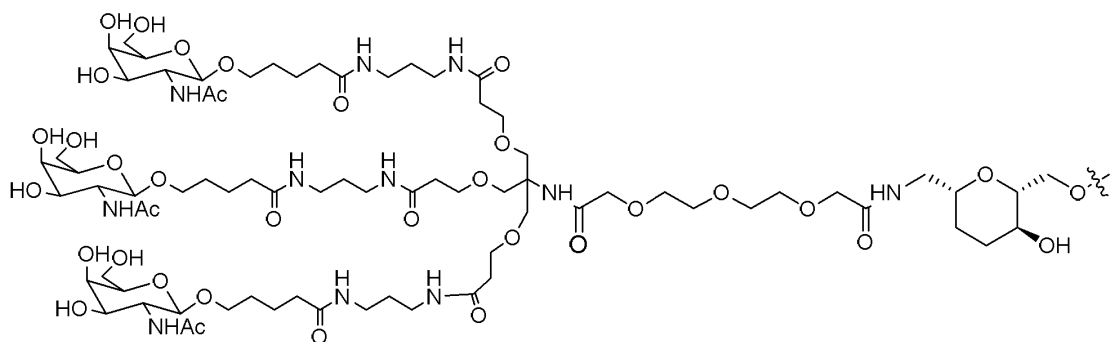


其中 j, k, l, m, n 和 o 分别是 1 至 20 的整数, 优选为 1 至 10 的整数。

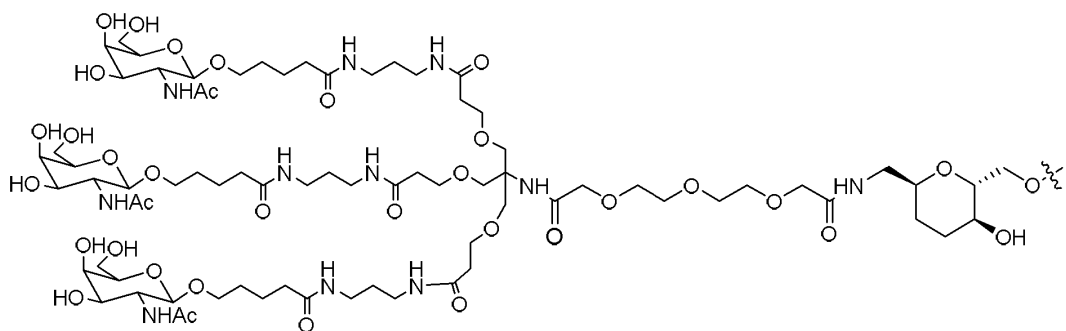
22、根据权利要求 13-21 中任一项所述的 RNA 干扰剂, 所述配体包括化学式为 I-1 至 I-

The chemical structure shows a branched dendritic polymer. It features three N-acetylglucosamine (GlcNAc) units, each represented as a six-membered pyranose ring with an N-acetyl group (NHAc) at the C2 position and hydroxyl groups at C3, C4, and C6. These units are linked via their C1 positions to a central core. The core consists of a central carbon atom bonded to three oxygen atoms, which are part of ether linkages connecting to the GlcNAc units. Additionally, the central carbon is bonded to a hydrogen atom and a long, flexible chain. This chain includes a secondary amide group (NH) and a terminal amide group (NH) that is linked to a six-membered ring containing an oxygen atom and a hydroxyl group. The structure is highly symmetrical and represents a complex, branched molecule.

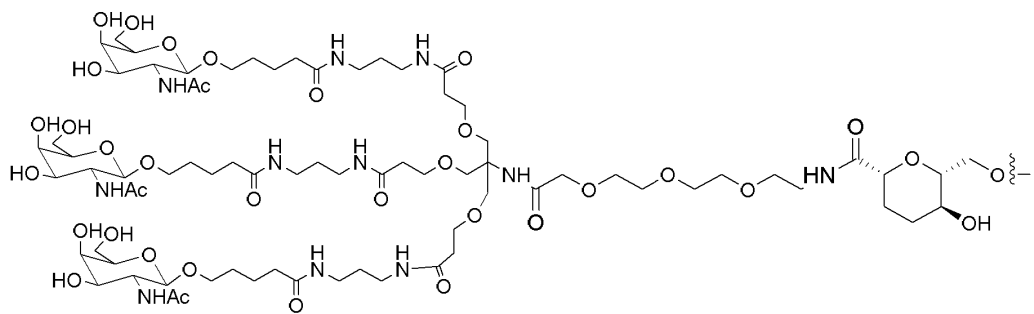
(I-4),



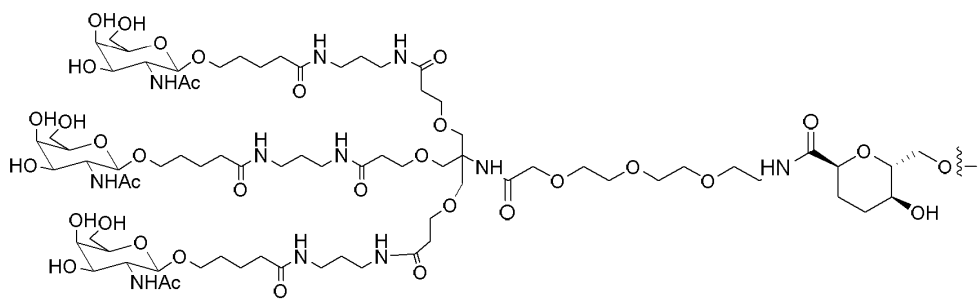
(I-5),



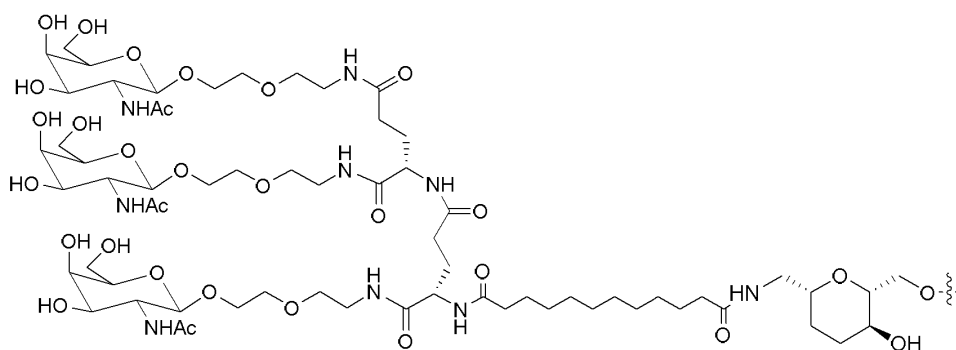
(I-6),



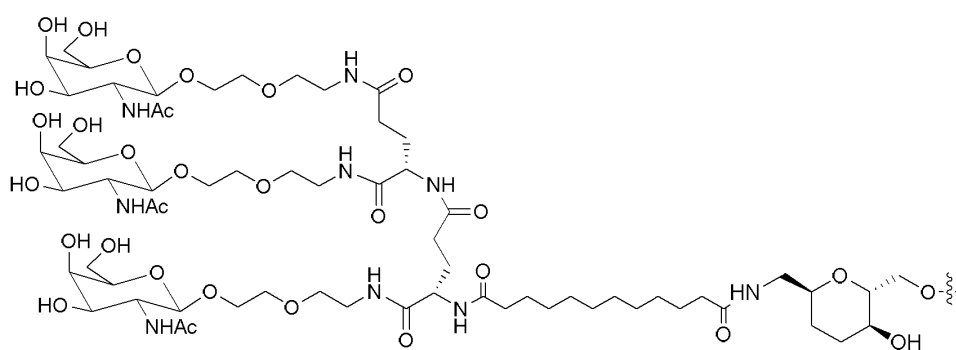
(I-7),



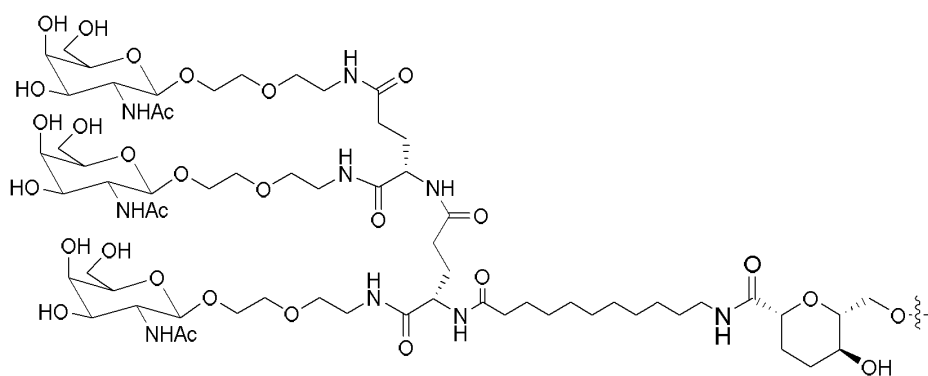
(I-8),



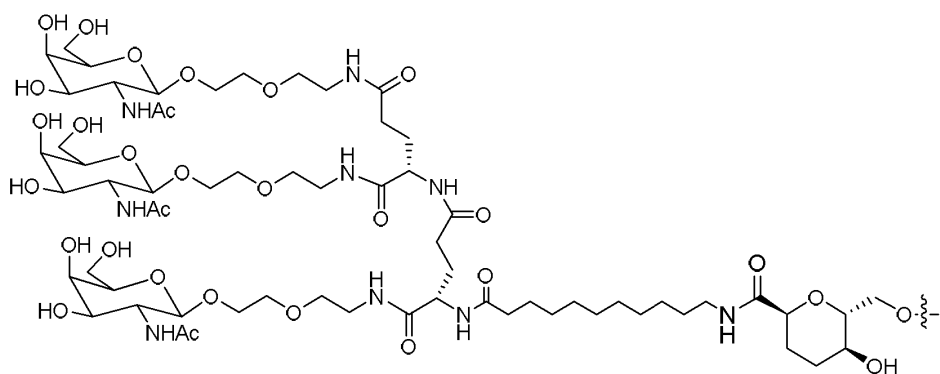
(I-9),



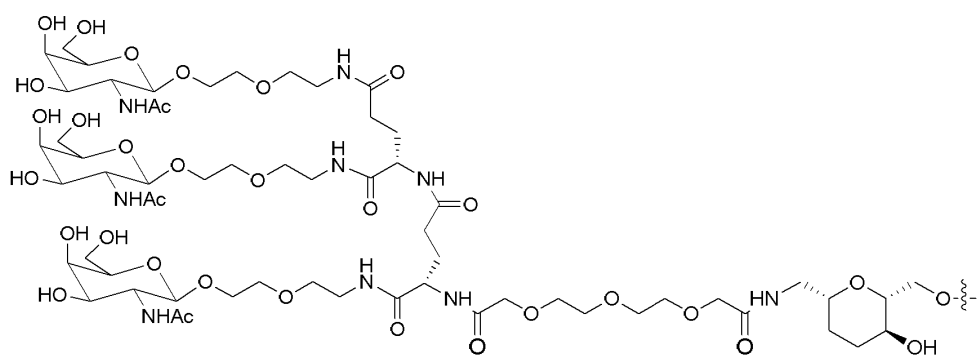
(I-10),



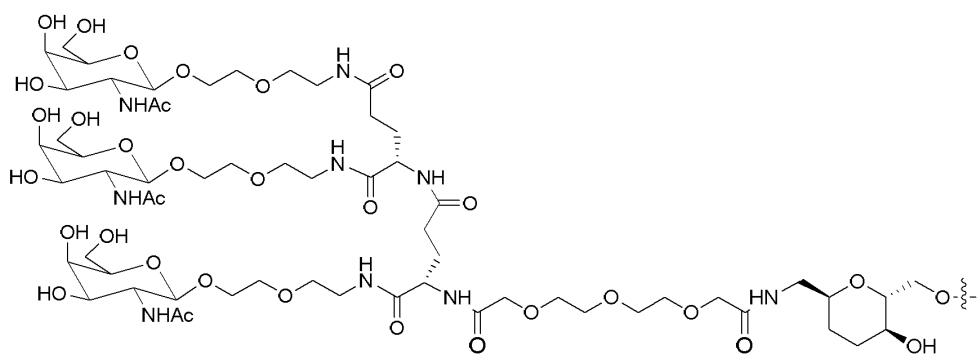
(I-11),



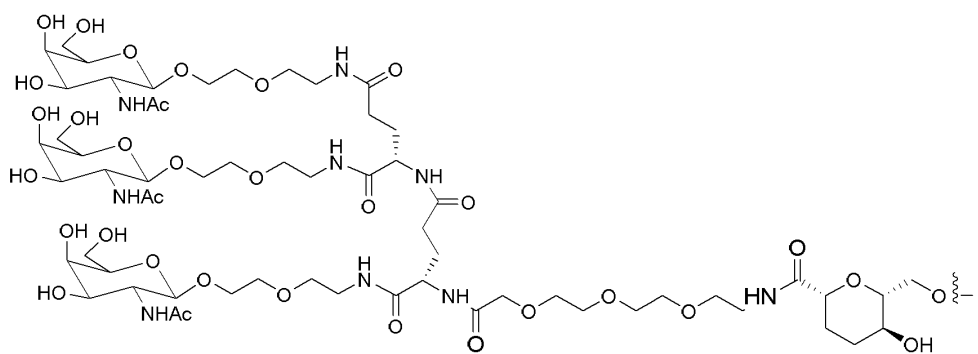
(I-12),



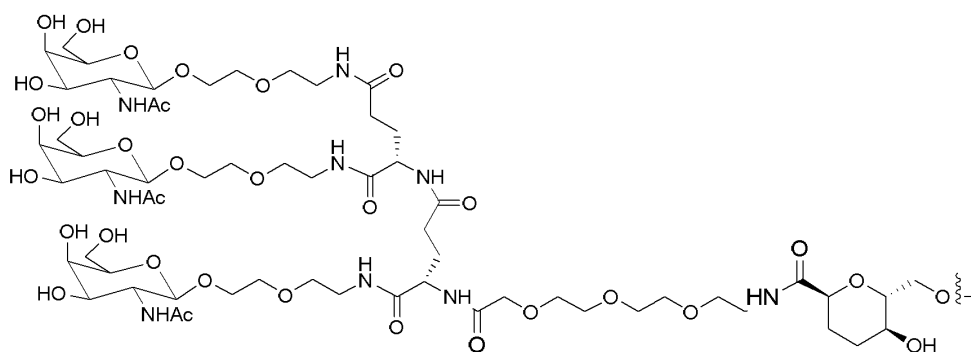
(I-13),



(I-14),

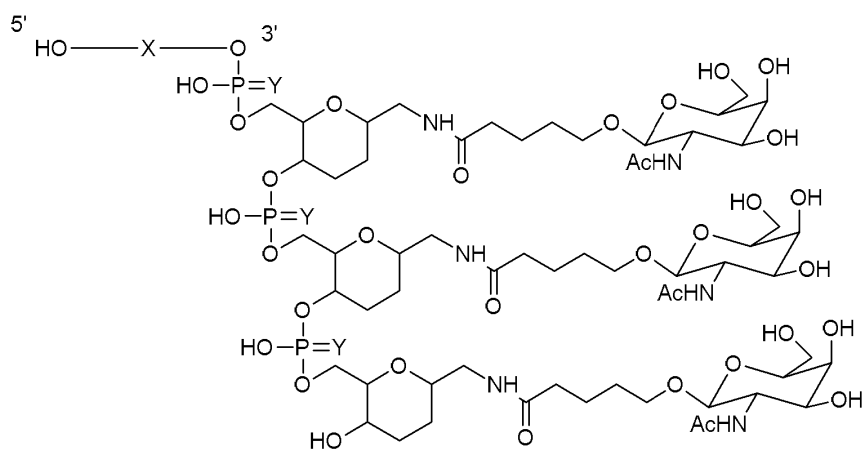


(I-15),

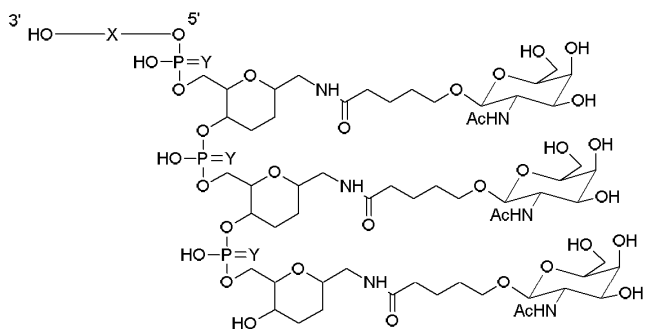


(I-16);

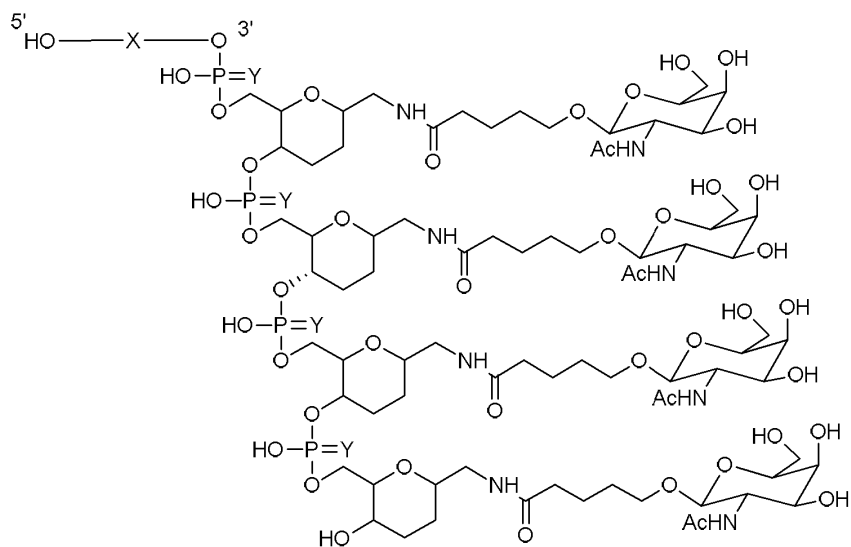
或者结构式为 II-1 至 II-28 中的至少一种:



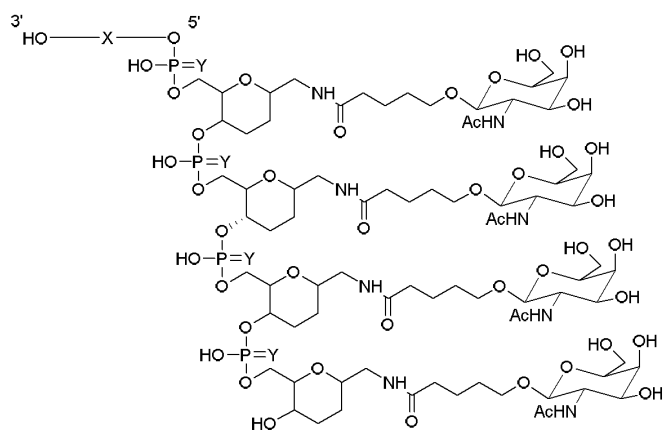
(II-1),



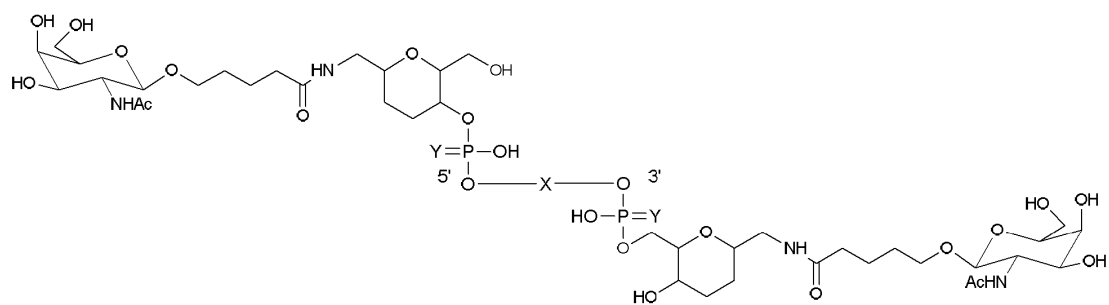
(II-2),



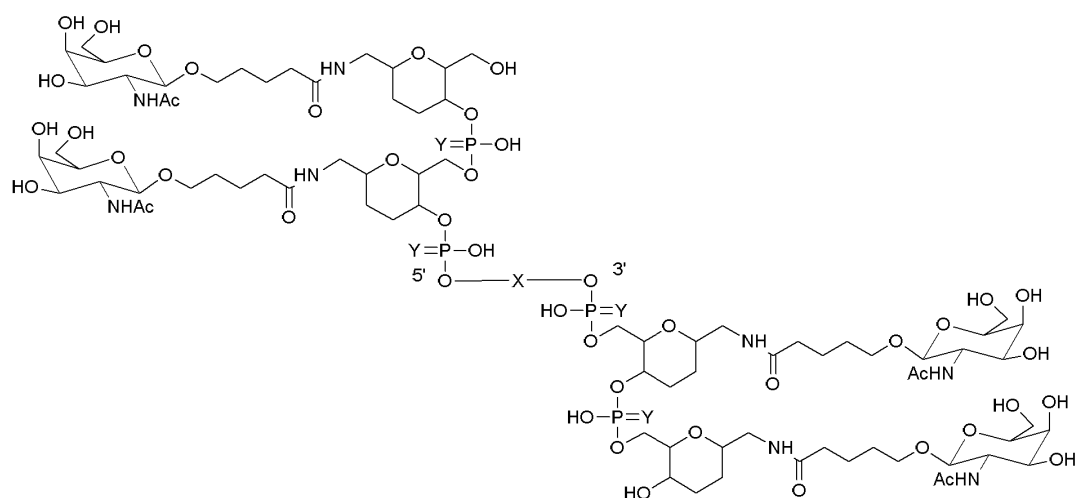
(II-3),



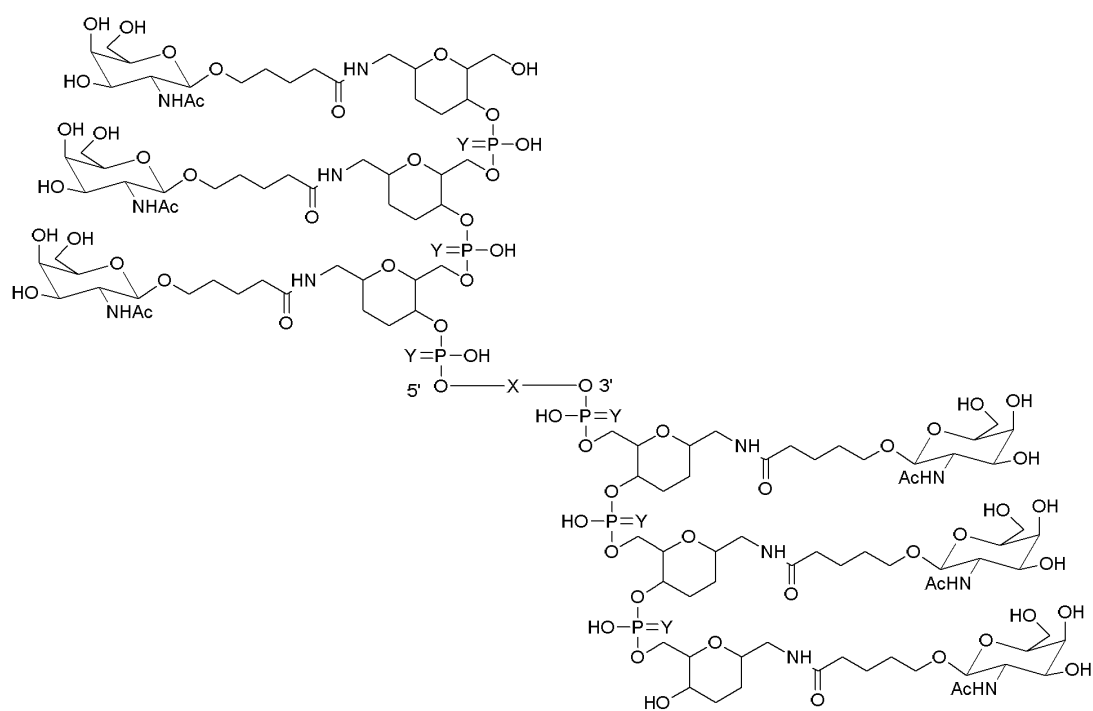
(II-4),



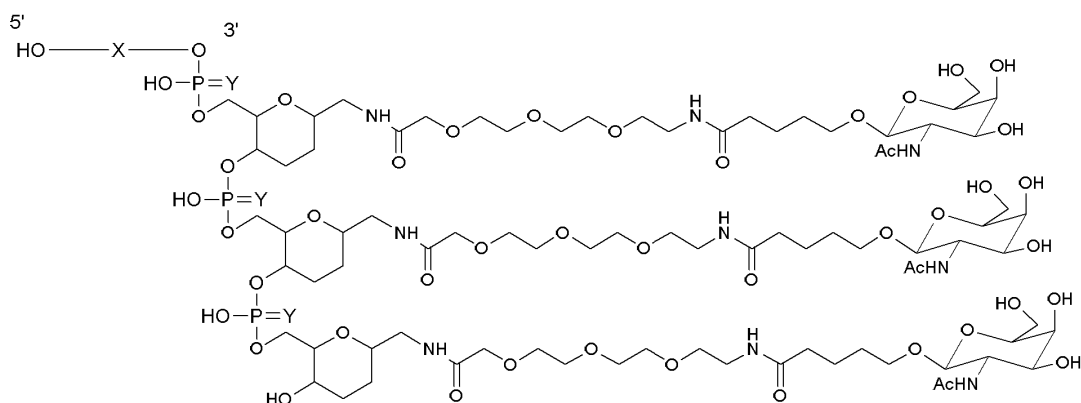
(II-5),



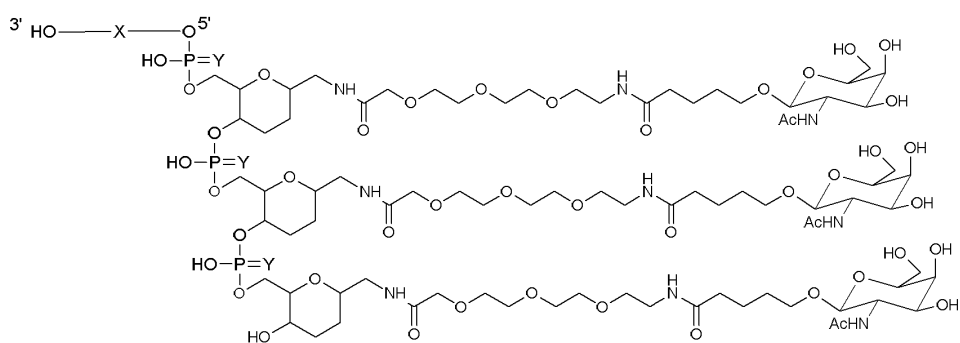
(II-6),



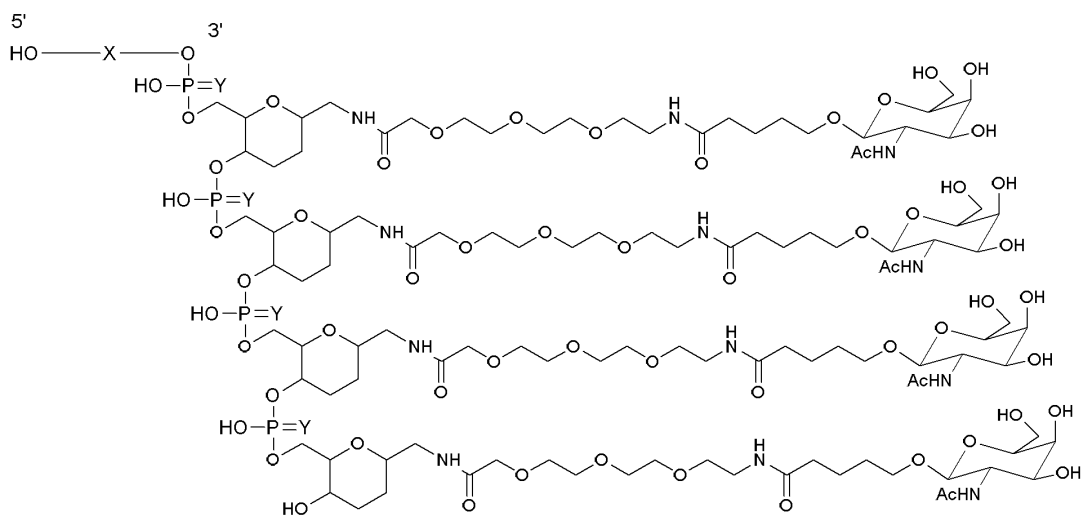
(II-7),



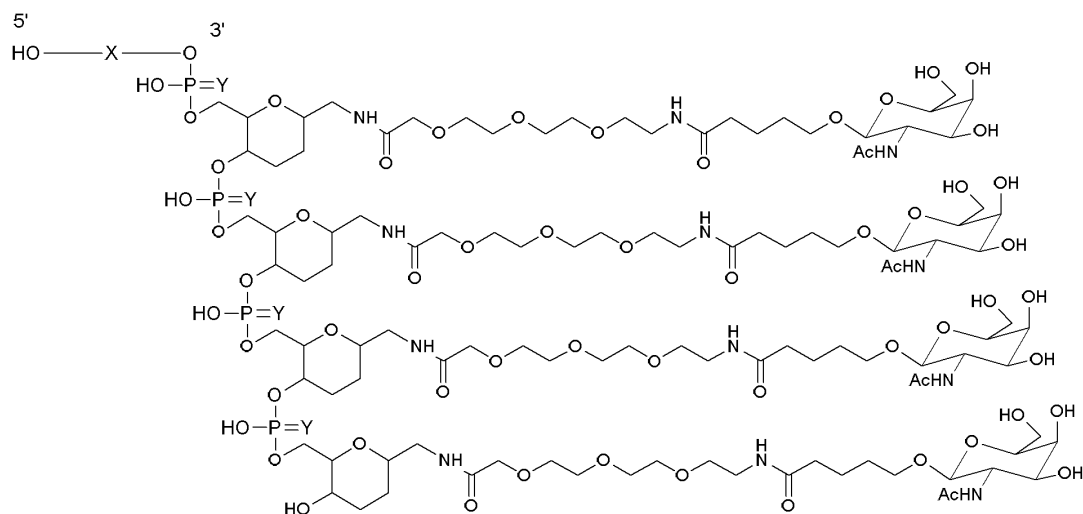
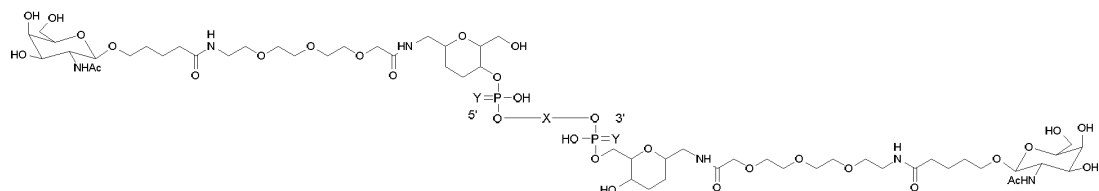
(II-8),



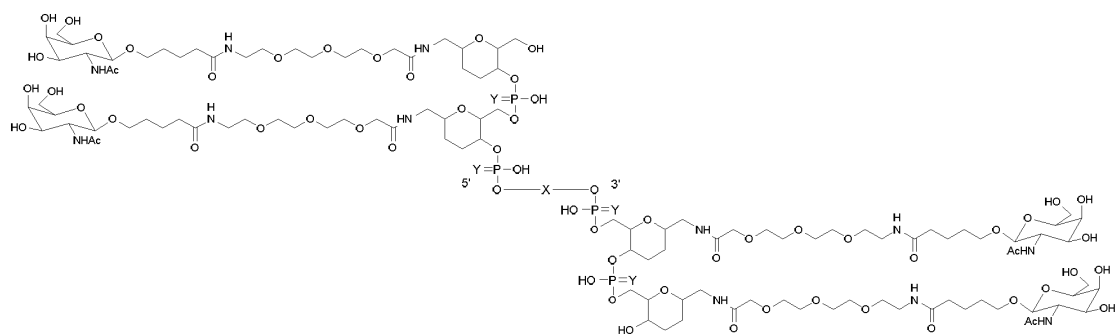
(II-9), ,



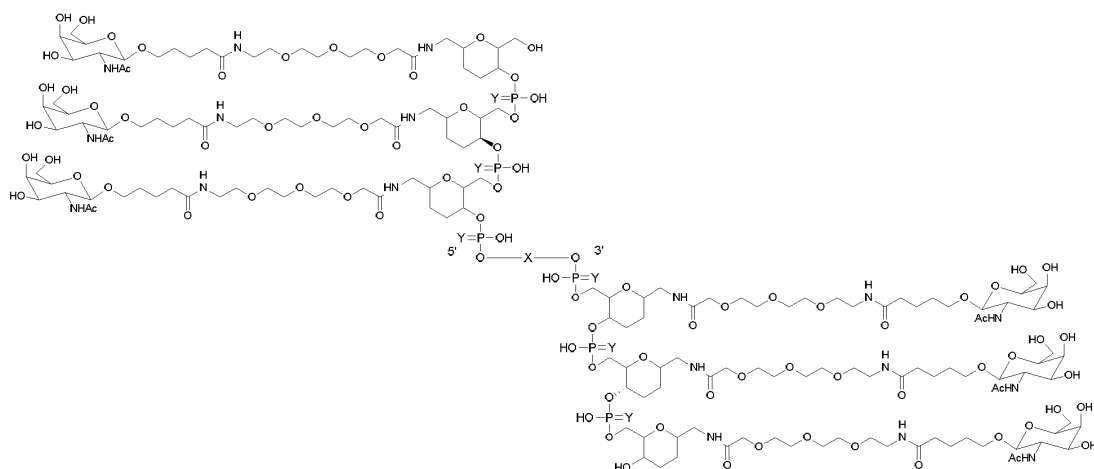
(II-10),


$$(II-11),$$


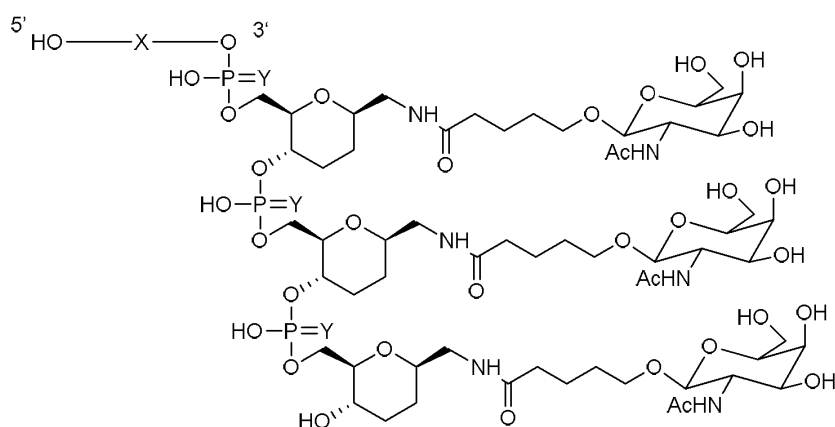
(II-12),



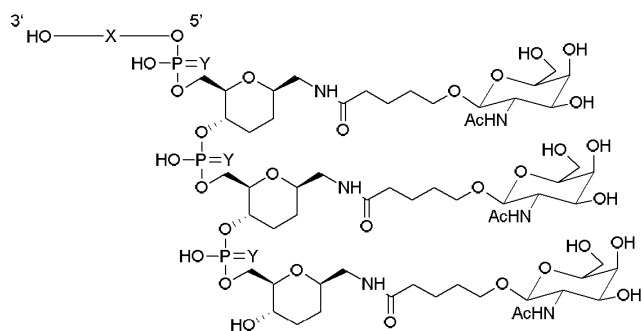
(II-13),



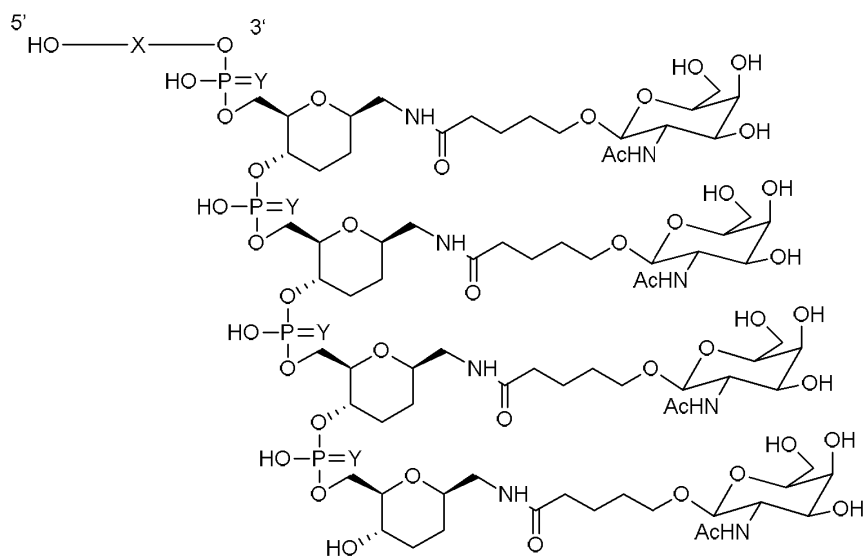
(II-14),



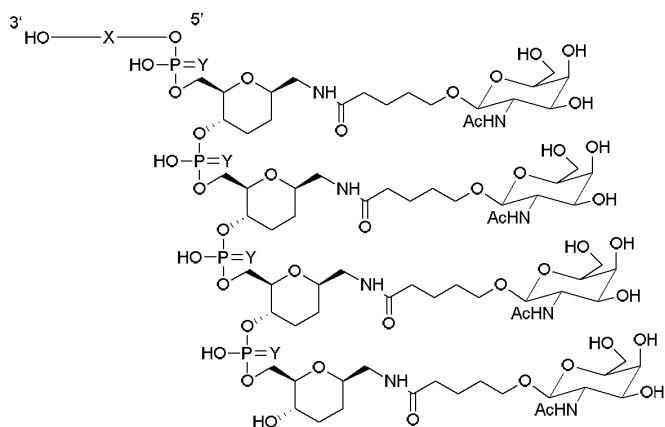
(II-15) ,



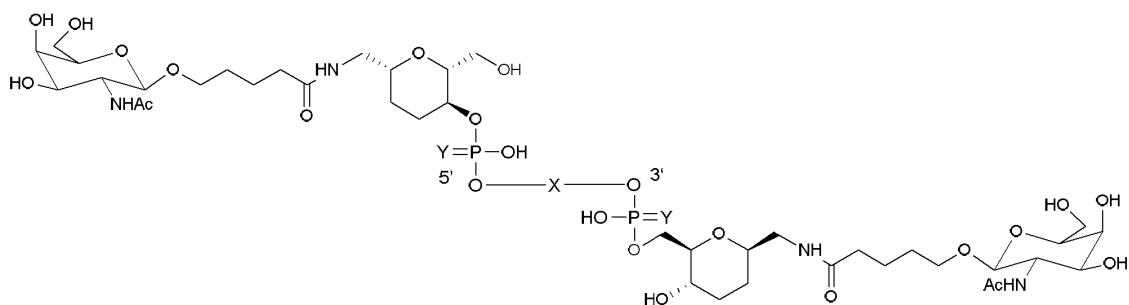
(II-16),



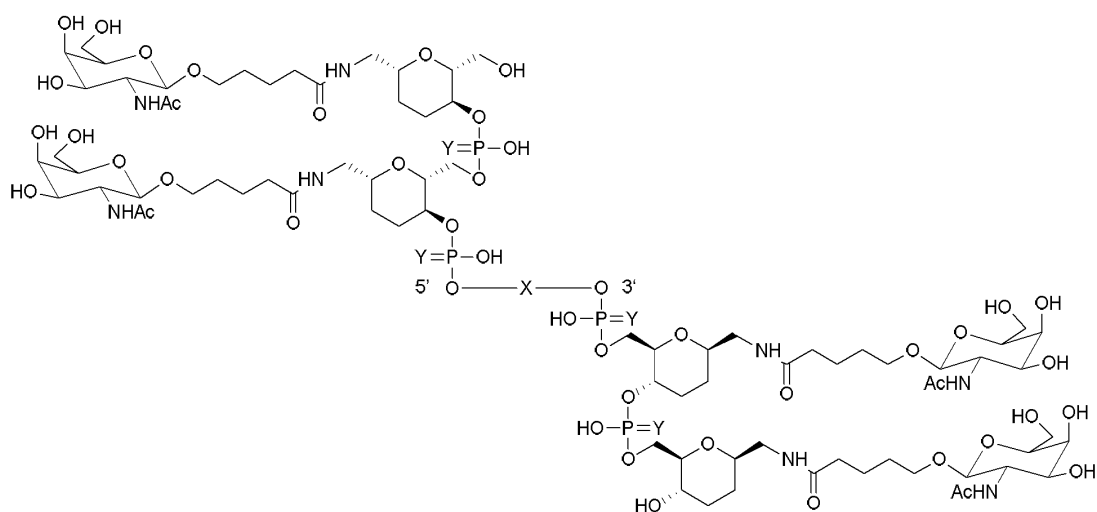
(II-17) ,



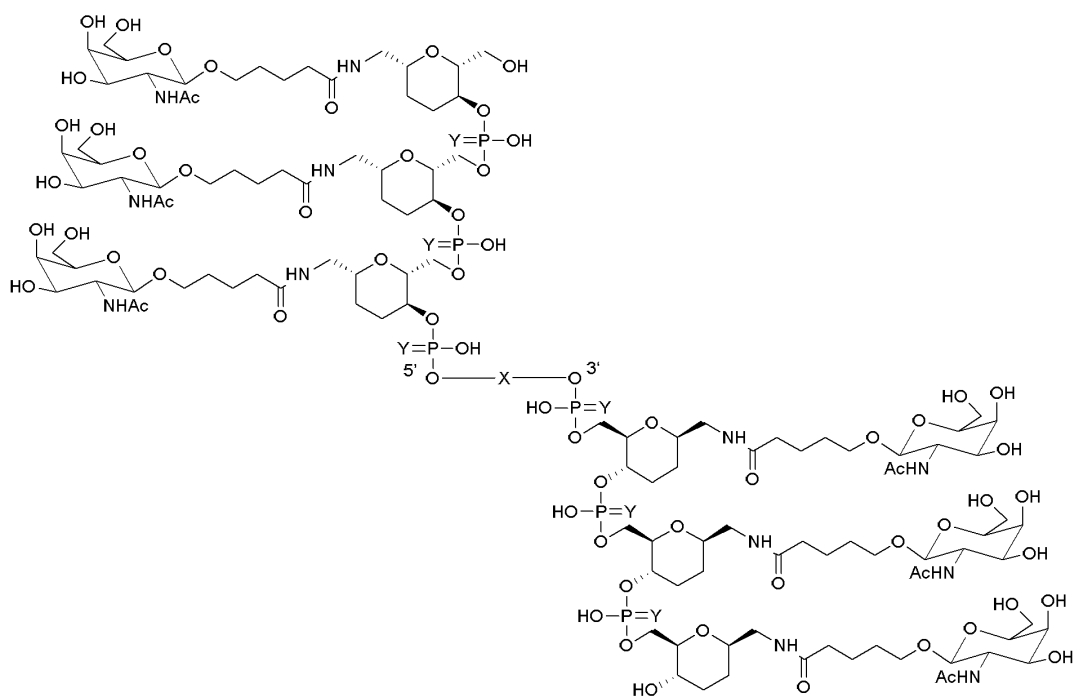
(II-18)



(II-19) ,



(II-20) ,



(II-21) ,