

抑制 LPA (Apo(a)) 蛋白表达的组合物和方法

技术领域

本发明的部分实施方案涉及可用于抑制 LPA (Apo(a)) 蛋白表达的组合物和方法。

5

背景技术

Lp(a)粒子是主要在肝中表达的异质低密度脂蛋白粒子(Witztum 和 Ginsberg, J Lipid Res. 2016 年 3 月; 57(3):336-9)。它们由载脂蛋白(a) (Apolipoprotein(a)) (Apo(a)或 Lp(a)由 LPA 基因编码)通过 ApoB 多肽连接于 LDL 样粒子组成。遗传限定的高 Lp(a)粒子血清水平不受膳食和运动的影响,并且通过相关联的动脉粥样硬化潜在性而与罹患心血管疾病的风险增加相关联(Alonso 等, Journal of the American College of Cardiology 第 63 卷, 第 19 期, 2014)。根据诊断学和预防医学,患者的 Lp(a)粒子血清水平是冠心病和主动脉瓣狭窄的一种高度普遍的独立遗传风险因素(Saeedi 和 Frohlich Clinical Diabetes and Endocrinology(2016)2:7)。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、中风和其他相关病症(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发现 LPA 作为诸如动脉粥样硬化性狭窄的疾病的遗传风险因子。当使用治疗性脂蛋白清血法降低高脂血症患者体内的 Lp(a)和 LDL 水平两者时,观察到心血管事件显著减少。因此,需要与这些和其它 LPA 相关疾病相关的治疗剂和治疗。

然而,除间接标准一般性 LDL 降低措施之外,不存在当前被核准的特定 Lp(a)粒子降低疗法。因此,当前需要用于有效治疗、预防诸如以下以及与以下相关的病症以及降低罹患诸如以下以及与以下相关的病症的风险的方法:伯格氏病(Berger's disease)、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理以及其他尚未鉴定的相关病症、病理或综合征。本发明解决这个未满足的医学需要。

发明内容

根据本发明的一个方面,提供了一种抑制 LPA (Apo(a)) 表达的双链核糖核酸(dsRNA)试剂,该 dsRNA 试剂包含正义链和反义链,在反义链中的核苷酸位置 2 至 18 处包含与 LPA RNA

转录物互补的区域，其中互补区域包含与表 1-3 中所列出的反义序列之一相差 0、1、2 或 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸，并且任选地包含靶向配体。在一些实施方案中，与 LPA RNA 转录物互补的区域包含与表 1-3 中所列出的反义序列之一相差不超过 3 个核苷酸的至少 15、16、17、18 或 19 个连续核苷酸。在某些实施方案中，dsRNA 的反义链与人 LPA 基因 mRNA 的任意靶区域至少基本互补，并且在表 1-3 之一中提供。在某些实施方案中，dsRNA 的反义链与人 LPA 基因 mRNA 的任意靶区域完全互补并且在表 1-3 之一中提供。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含表 1-3 中所列出的任一个正义链序列，其中正义链序列与 dsRNA 试剂中的反义链序列至少基本上互补。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含表 1-3 中列出的任一个正义链序列，其中正义链序列与 dsRNA 试剂中的反义链序列完全互补。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含表 1-3 中列出的任一个反义链序列。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含表 1-3 中作为双链体序列列出的任一个序列。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含与式 (A) 相差 0、1、2 或 3 个核苷酸的正义链：5'-Z₁GUUAUCGAGGCACAUAZ₂-3' 式 (A)，其中 Z₁ 为包含 0-15 个核苷酸基序的核苷酸序列，Z₂ 选自 A、U、C、G 中的一种或者不存在。在某些实施方案中，Z₂ 为 A。在某些实施方案中，Z₁ 核苷酸序列选自以下基序：A、AA、UA、GA、CA、AGA、UGA、GGA、CGA、UAGA、CAGA、AAGA、ACAGA、GACAGA、GGACAGA、UGGACAGA、AUGGACAGA、AAUGGACAGA、UAAUGGACAGA、GUAAUGGACAGA、GGUAAUGGACAGA、UGGUAAUGGACAGA、AUGGUAAUGGACAGA 或者不存在中的一种。在某些实施方案中，Z₁ 为包含 1、2、3 或 4 个核苷酸基序的核苷酸序列，选自以下基序：A、AA、UA、GA、CA、AGA、UGA、GGA、CGA、UAGA、CAGA、AAGA、ACAGA。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含与式 (B) 相差 0、1、2 或 3 个核苷酸的反义链：5'-Z₃UAUGUGCCUCGAUAACZ₄-3' 式 (B)，其中 Z₃ 选自 A、U、C、G 中的一种或者不存在，Z₄ 为包含 0-15 个核苷酸基序的核苷酸序列。在某些实施方案中，Z₃ 为 U。在某些实施方案中，Z₄ 核苷酸序列选自以下基序：U、UU、UA、UC、UG、UCU、UCA、UCC、UCG、UCUC、UCUA、UCUG、UCUU、UCUGU、UCUGUC、UCUCUU、UCUCGA、UCUGUCC、UCUGUCCA、UCUGUCCAU、UCUGUCCAU、UCUGUCCAUU、UCUGUCCAUUA、UCUGUCCAUUAC、UCUGUCCAUUACC、UCUGUCCAUUACCA、UCUGUCCAUUACCAU 或者不存在。在某些实施方案中，Z₄ 为包含 1、2、3 或 4 个核苷酸基序的核苷酸序列，选自以下基序：U、UU、UA、UC、UG、UCU、UCA、UCC、UCG、UCUC、UCUA、UCUG、UCUU。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包

含正义链和反义链，所述的正义链和反义链分别包括具有本文所述与式（A）和式（B）相差 0、1、2 或 3 个核苷酸表示的核苷酸序列，并且任选地包含靶向配体。在某些实施方案中，dsRNA 试剂所述的正义链式（A）和反义链式（B）每条链的长度不超过 35 个核苷酸。在某些实施方案中，Z₁ 和 Z₄ 核苷酸基序是完全或者部分互补的。在某些实施方案中，Z₂ 和 Z₃ 核苷酸基序是完全或者部分互补的。在某些实施方案中，正义链与反义链互补或实质互补，并且互补区域的长度在 16 至 23 个核苷酸之间。在一些实施方案中，互补区域长度为 19-21 个核苷酸。在一些实施方案中，其中所述正义链的长度不超过 35 个核苷酸，包括与所述反义链互补的区域，包括至少 15、16、17、18 或 19 个核苷酸。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含与式（C）相差 0、1、2 或 3 个核苷酸的正义链：5'-Z₅CCAAGCUUGGUCAUCUZ₆-3' 式（C），其中 Z₅ 为包含 0-15 个核苷酸基序的核苷酸序列，Z₆ 选自 A、U、C、G 中的一种或者不存在。在某些实施方案中，Z₆ 为 A。在某些实施方案中，Z₅ 核苷酸序列选自以下基序：G、AG、UG、GG、CG、AUG、UUG、GUG、CUG、UUUG、CUUG、AUUG、ACUUG、AACUUG、GAACUUG、AGAACUUG、AAGAACUUG、GAAGAACUUG、GGAAGAACUUG、AGGAAGAACUUG、CAGGAAGAACUUG、ACAGGAAGAACUUG、CACAGGAAGAACUUG 或者不存在中的一种。在某些实施方案中，Z₅ 为包含 1、2、3 或 4 个核苷酸基序的核苷酸序列，选自以下基序：G、AG、UG、GG、CG、AUG、UUG、GUG、CUG、UUUG、CUUG、AUUG。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含与式（D）相差 0、1、2 或 3 个核苷酸的反义链：5'-Z₇AGAUGACCAAGCUUGGZ₈-3' 式（D），其中 Z₇ 选自 A、U、C、G 中的一种或者不存在，Z₈ 为包含 0-15 个核苷酸基序的核苷酸序列。在某些实施方案中，Z₇ 为 U。在某些实施方案中，Z₈ 核苷酸序列选自以下基序：C、CU、CA、CC、CG、CAU、CAA、CAC、CAG、CAAC、CAAA、CAAG、CAAU、CAAGU、CAAGUU、CAACUU、CAACGA、CAAGUUC、CAAGUUCU、CAAGUUCUU、CAAGUUCUUC、CAAGUUCUUCUCC、CAAGUUCUUCUCCU、CAAGUUCUUCUCCUG、CAAGUUCUUCUCCUGU、CAAGUUCUUCUCCUGUG 或者不存在。在某些实施方案中，Z₈ 为包含 1、2、3 或 4 个核苷酸基序的核苷酸序列，选自以下基序：C、CU、CA、CC、CG、CAU、CAA、CAC、CAG、CAAC、CAAA、CAAG、CAAU。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含正义链和反义链，所述的正义链和反义链分别包括具有本文所述与式（C）和式（D）相差 0、1、2 或 3 个核苷酸表示的核苷酸序列，并且任选地包含靶向配体。在某些实施方案中，dsRNA 试剂所述的正义链式（C）和反义链式（D）每条链的长度不超过 35 个核苷酸。在某些实施方案中，Z₅ 和 Z₈ 核苷酸基序是完全或

者部分互补的。在某些实施方案中，Z₆和Z₇核苷酸基序是完全或者部分互补的。在某些实施方案中，正义链与反义链互补或实质互补，并且互补区域的长度在16至23个核苷酸之间。在一些实施方案中，互补区域长度为19-21个核苷酸。在一些实施方案中，其中所述正义链的长度不超过35个核苷酸，包括与所述反义链互补的区域，包括至少15、16、17、18或

5 19个核苷酸。在一些实施方案中，dsRNA试剂包含与式(E)相差0、1、2或3个核苷酸的正义链：5'-Z₉GACAGAGUUAUCGAGGZ₁₀-3' 式(E)，其中Z₉为包含0-15个核苷酸基序的核苷酸序列，Z₁₀选自A、U、C、G中的一种或者不存在。在某些实施方案中，Z₁₀为A。在某些实施方案中，Z₉核苷酸序列选自以下基序：G、AG、UG、GG、CG、AUG、UUG、GUG、CUG、CAUG、UAUG、GAUG、AAUG、UGAUG、GUGAUG、GGUGAUG、UGGUGAUG、

10 AUGGUGAUG、CAUGGUGAUG、CCAUGGUGAUG、ACCAUGGUGAUG、UACCAUGGUGAUG、CUACCAUGGUGAUG、GCUACCAUGGUGAUG或者不存在中的一种。在某些实施方案中，Z₉为包含1、2、3或4个核苷酸基序的核苷酸序列，选自以下基序：G、AG、UG、GG、CG、AUG、UUG、GUG、CUG、CAUG、UAUG、GAUG、AAUG。在某些实施方案中，dsRNA试剂包含与式(F)相差0、1、2或3个核苷酸的反义链：

15 5'-Z₁₁CCUCGAUAACUCUGUCZ₁₂-3' 式(F)，其中Z₁₁选自A、U、C、G中的一种或者不存在，Z₁₂为包含0-15个核苷酸基序的核苷酸序列。在某些实施方案中，Z₁₁为U。在某些实施方案中，Z₁₂核苷酸序列选自以下基序：C、CU、CA、CC、CG、CAU、CAA、CAC、CAG、CAUA、CAUG、CAUC、CAUU、CAUCA、CAUCAC、CAUGUU、CAUGGA、CAUCACC、CAUCACCA、CAUCACCAU、CAUCACCAUG、CAUCACCAUGG、CAUCACCAUGGU、

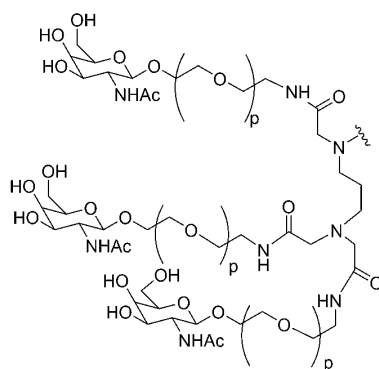
20 CAUCACCAUGGUA、CAUCACCAUGGUAG、CAUCACCAUGGUAGC或者不存在。在某些实施方案中，Z₁₂为包含1、2、3或4个核苷酸基序的核苷酸序列，选自以下基序：C、CU、CA、CC、CG、CAU、CAA、CAC、CAG、CAUA、CAUG、CAUC、CAUU。在某些实施方案中，dsRNA试剂包含正义链和反义链，所述的正义链和反义链分别包括具有本文所述与式(E)和式(F)相差0、1、2或3个核苷酸表示的核苷酸序列，并且任选地包含靶

25 向配体。在某些实施方案中，dsRNA试剂所述的正义链式(F)和反义链式(F)每条链的长度不超过35个核苷酸。在某些实施方案中，Z₉和Z₁₂核苷酸基序是完全或者部分互补的。在某些实施方案中，Z₁₀和Z₁₁核苷酸基序是完全或者部分互补的。在某些实施方案中，正义链与反义链互补或实质互补，并且互补区域的长度在16至23个核苷酸之间。在某些实施方案中，正义链与反义链互补或实质互补，并且互补区域的长度在16至23个核苷酸之间。在某些实施方案中，正义链与反义链互补或实质互补，并且互补区域的长度在16至23个核苷酸之间。

案中，互补区域长度为 19-21 个核苷酸。在一些实施方案中，其中所述正义链的长度不超过 35 个核苷酸，包括与所述反义链互补的区域，包括至少 15、16、17、18 或 19 个核苷酸。

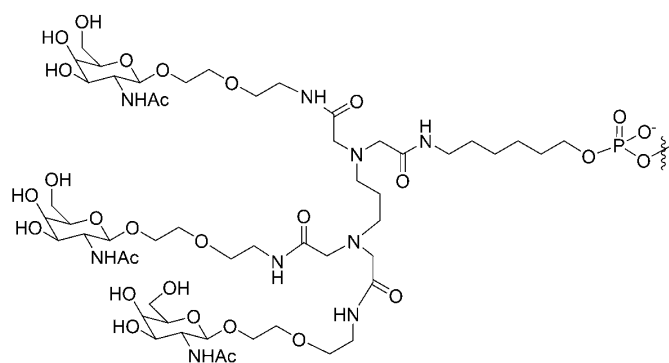
在一些实施方案中，dsRNA 试剂包含至少一种修饰的核苷酸。在某些实施方案中，反义链的所有核苷酸或基本上所有核苷酸都是修饰的核苷酸。在一些实施方案中，至少一种修饰的核苷酸包括：2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2',3'-seco 核苷酸模拟物、锁核苷酸、开环核酸核苷酸（unlocked nucleic acid nucleotide, UNA）、乙二醇核酸核苷酸（glycol nucleic acid nucleotide, GNA）、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、无碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向 2'-OMe 核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸和 3'-OMe 核苷酸、包括 5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸、或与胆固醇衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、氨基磷酸酯或包含核苷酸的非天然碱基。在一些实施方案中，反义链包含 15 个或更多个独立选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸的修饰核苷酸，其中少于 6 个 2'-氟核苷酸修饰的核苷酸。在某些实施方案中，反义链包含 3 个或 5 个 2'-氟核苷酸，优选地，反义链包含 5 个 2'-氟核苷酸。在一些实施方案中，正义链包含 15 个或更多个独立选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸的修饰核苷酸，其中少于 4 个 2'-氟核苷酸修饰的核苷酸。在某些实施方案中，正义链包含 3 个 2'-氟核苷酸。在一些实施方案中，反义链包含 15 个或更多个独立选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸的修饰核苷酸，其中至少 16 个修饰核苷酸是 2'-O-甲基核苷酸并且位于反义链 5'端的第 2、7、12、14 和/或 16 位是 2'-氟核苷酸修饰的核苷酸（从反义链 5'第一个配对的核苷酸开始计算）。在一些实施例中，正义链包含独立地选自 2'-O-甲基核苷酸和 2'-氟核苷酸的 15 个或更多修饰核苷酸，其中至少 18 个修饰核苷酸是 2'-O-甲基核苷酸并且位于正义链 3'端的第 9、11 和/或 13 位是 2'-氟核苷酸修饰的核苷酸（从正义链 3'第一个配对的核苷酸开始计算）。在一些实施例中，反义链包含在从 5'末端到 3'末端的方向上，反义链的第 2、7、12、14 和 16 位的核苷酸是 2'-氟修饰的核苷酸，从反义链 5'端第一个配对的核苷酸开始计算，并且每个反义链中其他位置的核苷酸独立地是非氟修饰的核苷酸。在一些实施方案中，反义链在从 5'末端到 3'末端的方向上包含位置反义链的第 2、5、12、14 和 18 个是 2'-氟修饰的核苷酸，从反义链 5'第一个配对的核苷酸开始计算，并且反义链中其他位置的每个核苷酸独立地是非氟修饰的核苷酸。在一些实施例中，正义链包含在从 3'末端到 5'末端的方向上，在正义链的位置 9、11 和 13 的核苷酸是 2'-氟修饰的核苷酸，从正义链 3'端第一个配对的核苷酸开始计算，并且每个核苷酸在正义链中的其

他位置独立地是非氟修饰的核苷酸。在一些实施方案中，dsRNA 试剂包括在引导链的 5'末端处的 E-乙烯基磷酸酯核苷酸。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，正义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，正义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，反义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。在某些实施方案中，正义链和反义链的所有或基本上所有核苷酸都是修饰的核苷酸。在某些实施方案中，修饰的正义链是表 2-3 中列出的修饰的正义链序列。在某些实施方案中，修饰的反义链是表 2-3 中列出的修饰的反义链序列。在某些实施方案中，正义链与反义链互补或基本互补，并且互补区域的长度在 16 至 23 个核苷酸之间。在某些实施方案中，互补区域的长度为 19-21 个核苷酸。在某些实施方案中，互补区域的长度为 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度不超过 40 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度不超过 30 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度不超过 25 个核苷酸。在某些实施方案中，每条链的长度不超过 23 个核苷酸。在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含至少一种修饰的核苷酸并且还包含一个或多个靶向基团或连接基团。在某些实施方案中，一个或多个靶向基团或连接基团与正义链缀合。在某些实施方案中，靶向基团或连接基团包括 N-乙酰基-半乳糖胺 (GalNAc)。在某些实施方案中，靶向基团中的靶向部分具有为以下结构片段，

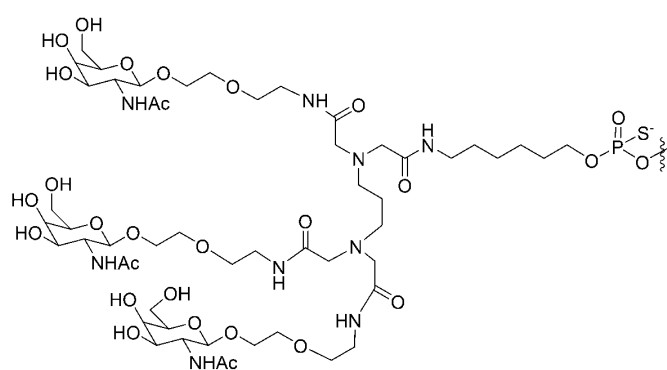


p 为 1 或者 2。

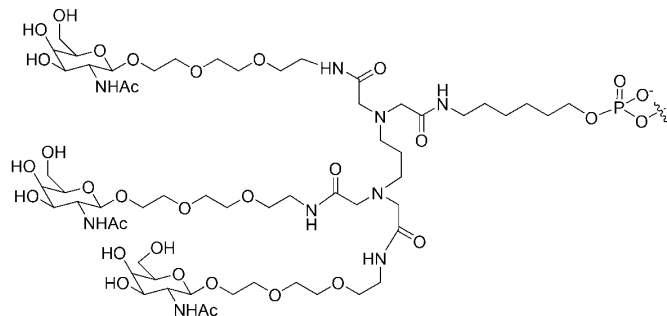
在某些实施方案中，靶向基团具有以下结构：



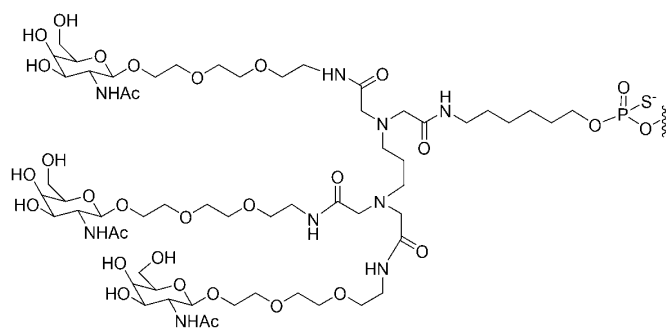
GLO-1,



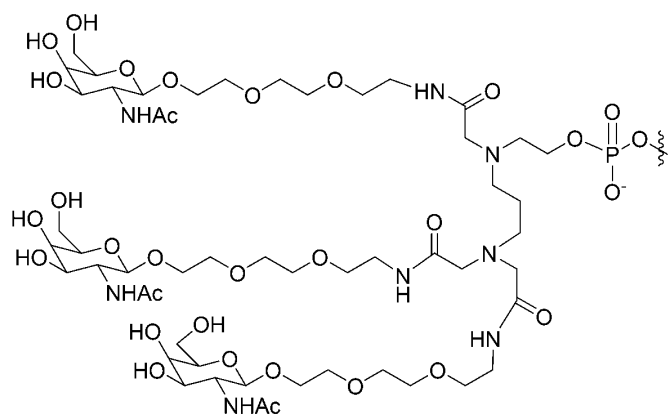
GLS-1,



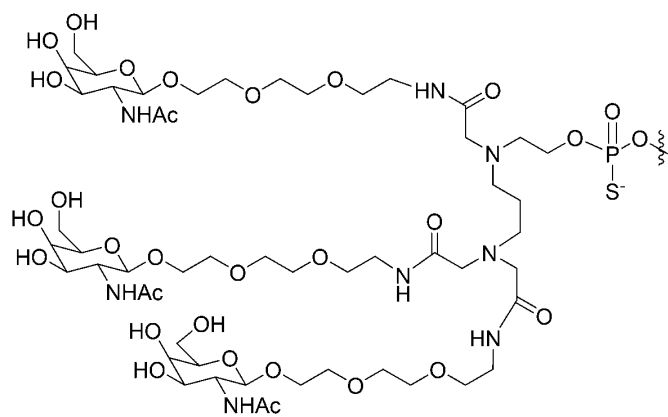
GLO-2,



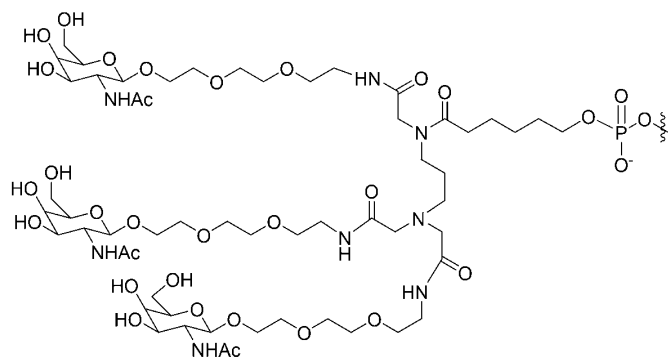
GLS-2,



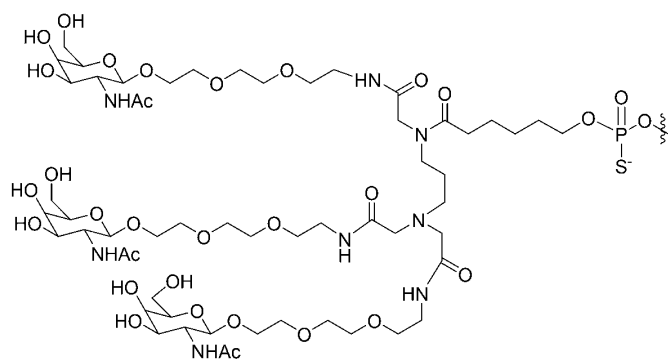
GLO-3,



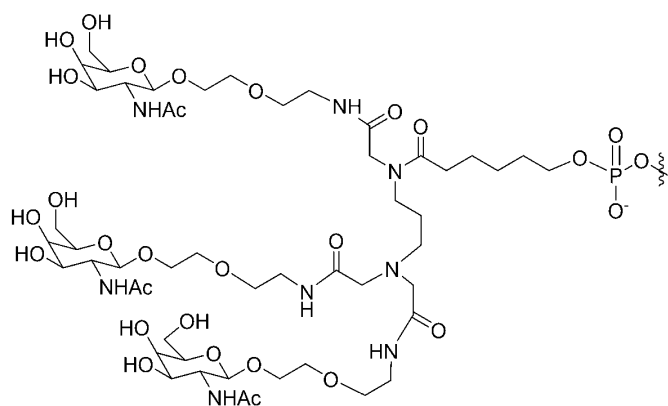
GLS-3,



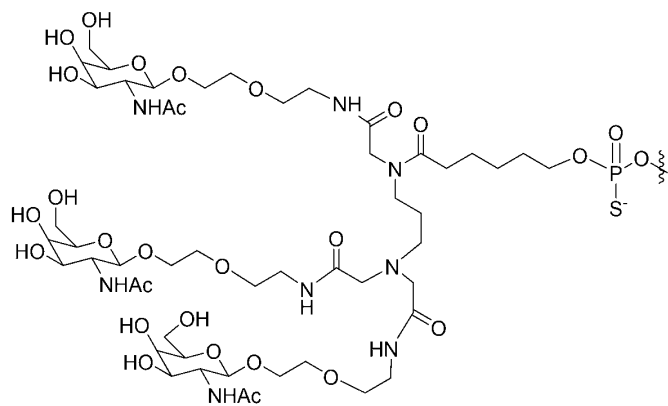
GLO-4,



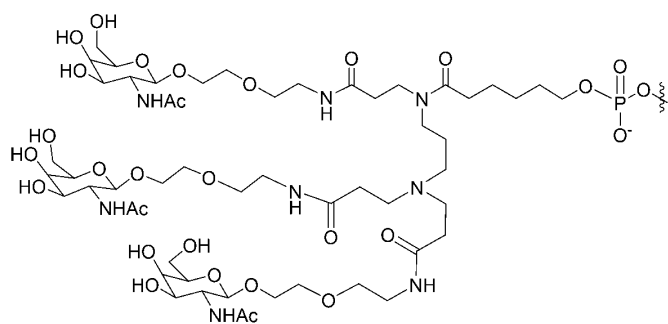
GLS-4,



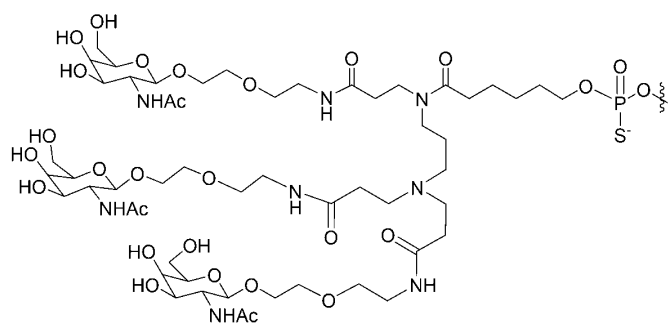
GLO-5,



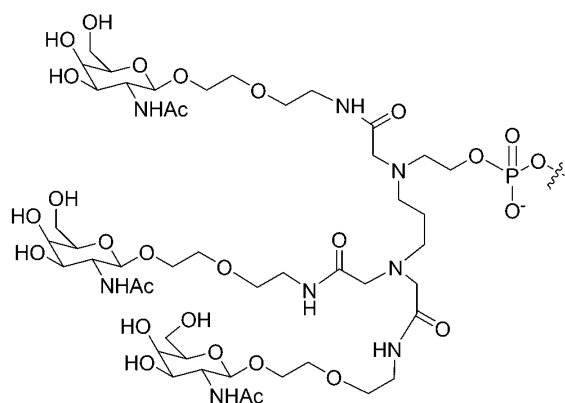
GLS-5,



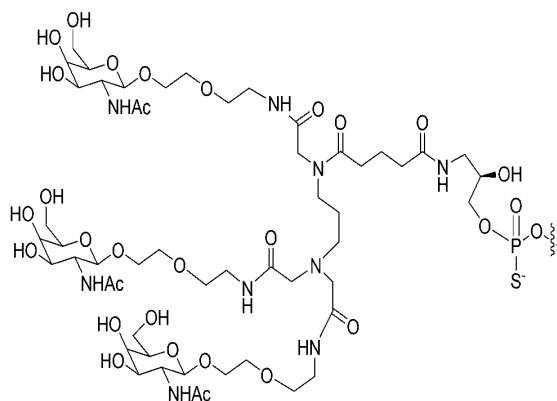
GLO-6,



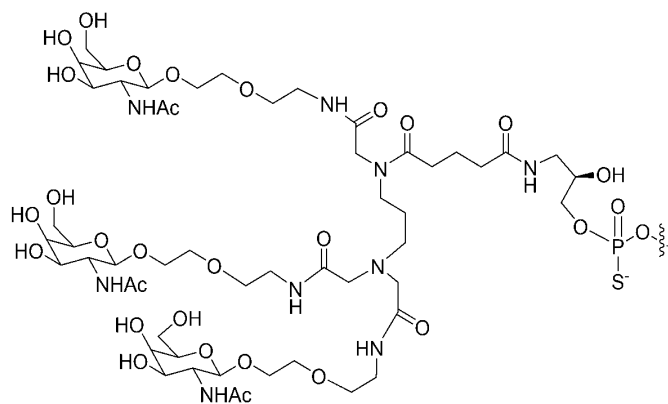
GLS-6,



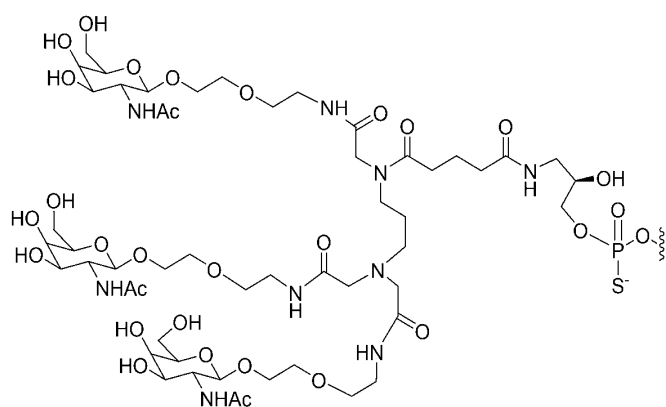
GLO-7,



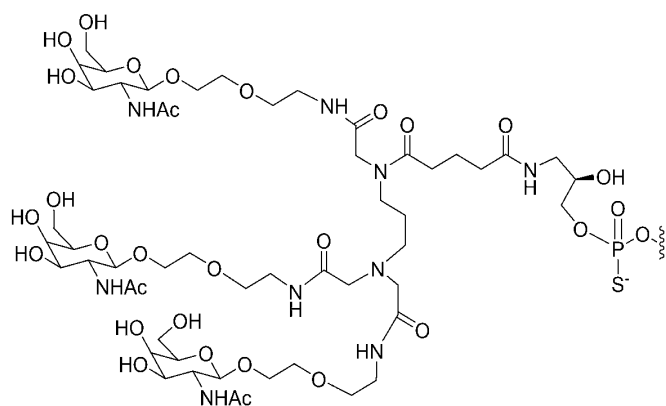
GLS-7,



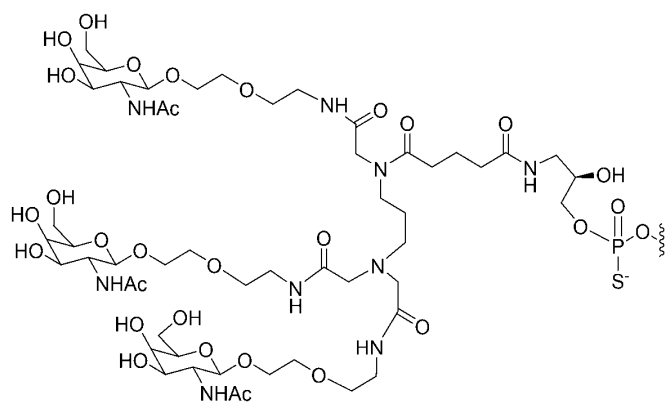
GLO-8,



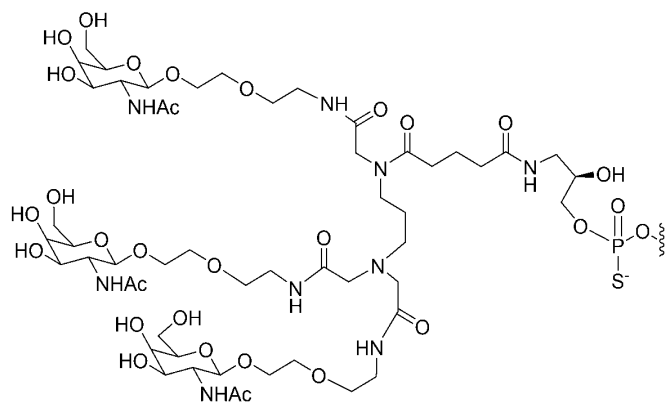
GLS-8,



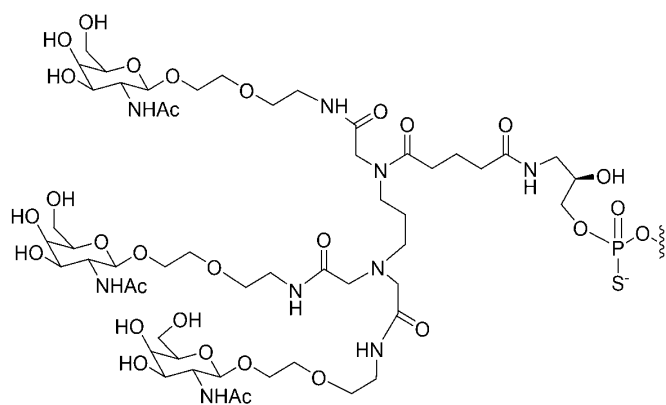
GLO-9,



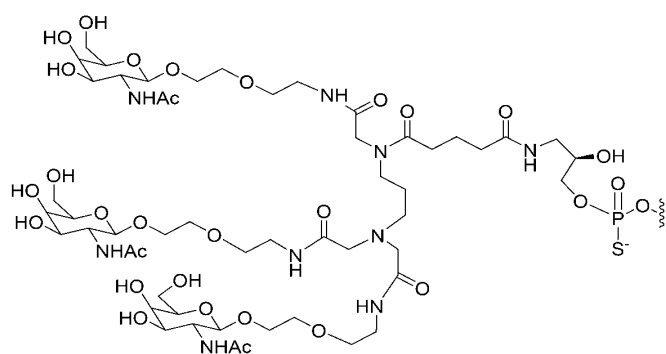
GLS-9,



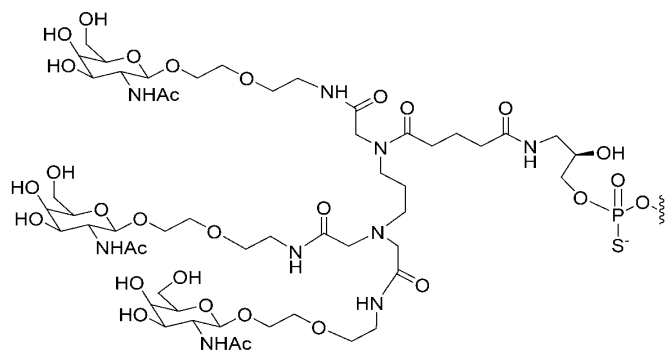
GLO-10,



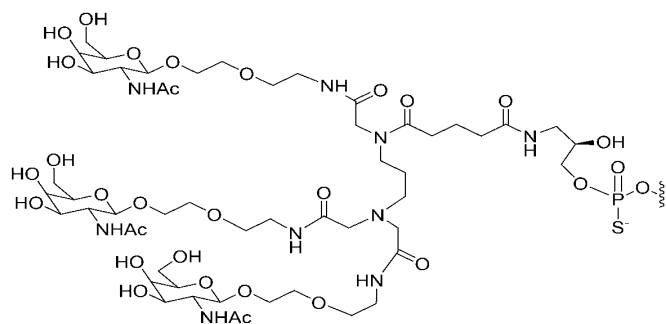
GLS-10,



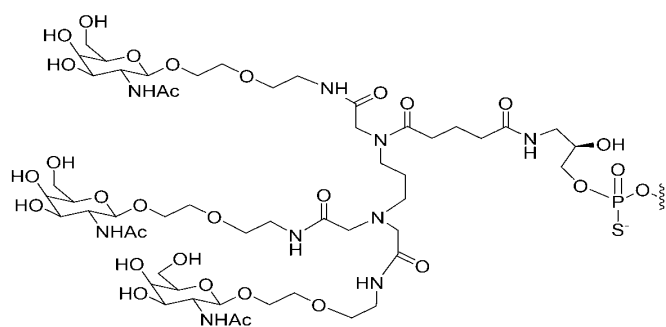
GLO-11,



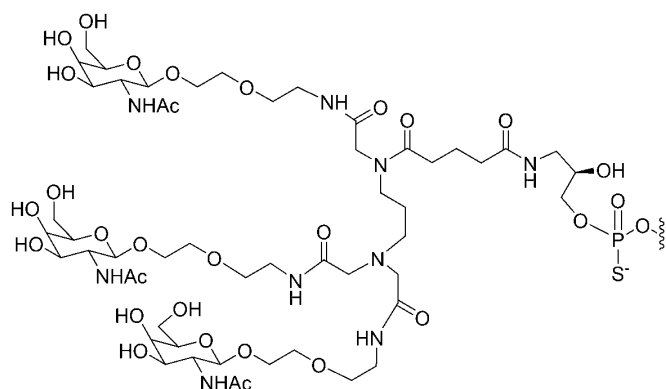
GLS-11,



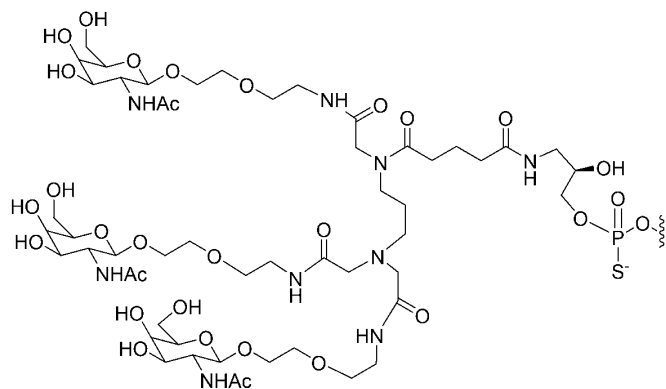
GLO-12,



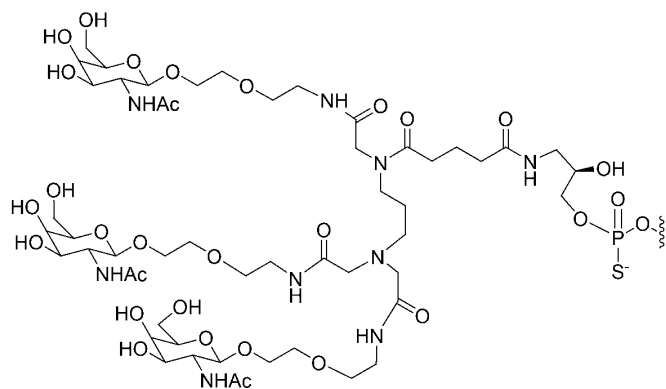
GLS-12,



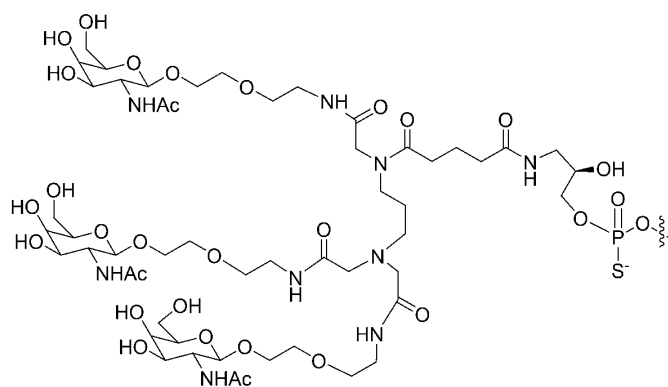
GLO-13,



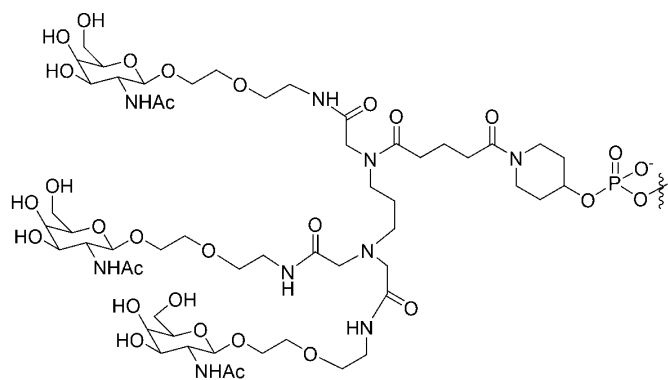
GLS-13,



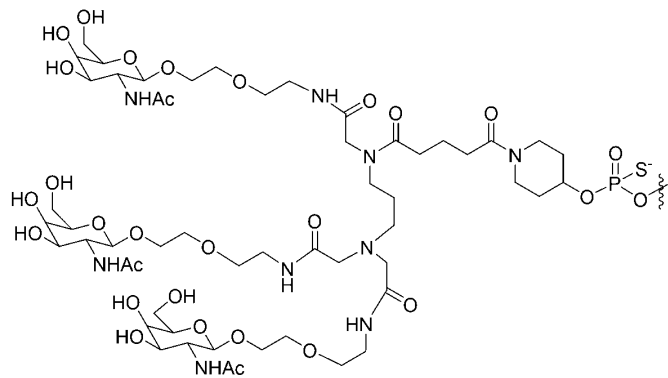
GLO-14,



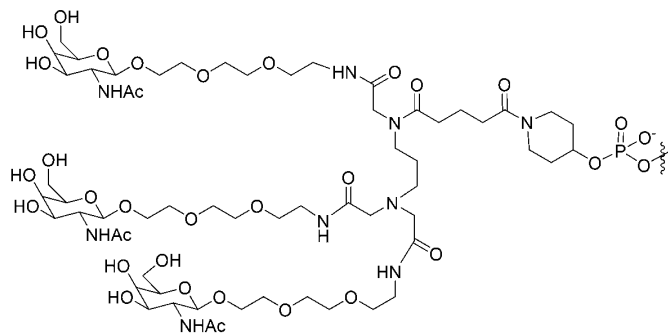
GLS-14,



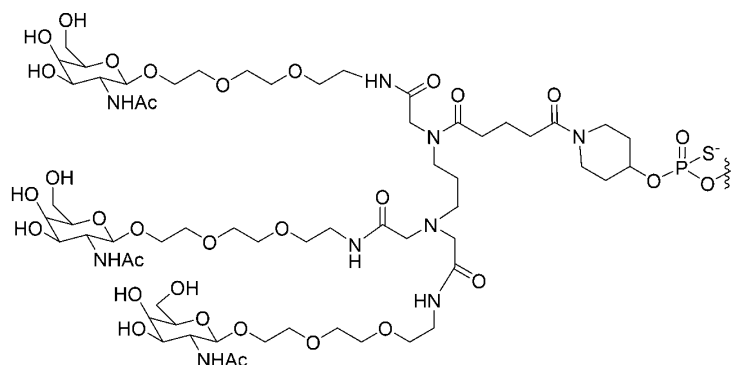
GLO-15,



GLS-15,



GLO-16, 或



GLS-16。

在某些实施方案中，dsRNA 试剂包含与正义链的 5'-末端缀合的靶向基团。在一些实施方案中，dsRNA 试剂包含与正义链的 3'-末端缀合的靶向基团。在某些实施方案中，反义链在 3'-末端包含一个反向无碱基残基。在某些实施方案中，正义链在 3'或/和 5'末端包含一个或两个反向无碱基残基。在某些实施方案中，正义链在 3'或/和 5'末端包含一个或两个异甘露醇残基。在某些实施方案中，正义链在 3'和 5'末端分别独立地包含一个异甘露醇残基。在某些实施方案中，正义链在 3'和 5'末端分别独立地包含一个异甘露醇残基，进一步包含 5'-末端缀合的靶向基团，靶向基团优选为上述 GLS-15。在某些实施方案中，dsRNA 试剂具有两个平末端。在某些实施方案中，至少一条链包含至少 1 个核苷酸长的 3'突出端。在某些实施方案中，至少一条链包含至少 2 个核苷酸长的 3'突出端。

在某些实施方案中，一种抑制 LPA (Apo(a)) 表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 试剂，该 dsRNA 试剂包含正义链和反义链，在反义链中的核苷酸位置 2 至 18 处包含与 LPA RNA 转录物互补的区域，反义链与正义链完全或者部分互补，并且任选地包含靶向配体，其中每条链的长度为 14 至 30 个核苷酸，其中正义链序列可由式 (I) 表示：



其中：每个 N'_F 表示一个 2'-氟修饰的核苷酸；每个 N'_{N1} , N'_{N2} , N'_{N3} 和 N'_{N4} ，独立地表示一个修饰或者未修饰的核苷酸；每个 N'_L 独立代表修饰或未修饰的核苷酸但不代表 2'-氟修饰的核苷酸， n' 为 0-7 的整数， m' 为 0-3 的整数。在某些实施方案中，每个 N'_{N3} 代表 2'-氟修饰的核苷酸， N'_{N1} , N'_{N2} 和 N'_{N4} 独立地表示修饰或未修饰的核苷酸但不代表 2'-氟修饰的核苷酸， m' 为 1。在某些实施方案中，每个 N'_{N4} 代表 2'-氟修饰的核苷酸， N'_{N1} , N'_{N2} 和 N'_{N3} 独立地表示修饰或未修饰的核苷酸但不代表 2'-氟修饰的核苷酸， m' 为 1。在某些实施方案中， n' 为 3， m' 为 1；或者 n' 为 0， m' 为 0；或 n' 为 3， m' 为 3。在某些实施方案中，式 (I) 中仅有 3 个 2'-氟修饰的核苷酸。

在某些实施方案中，本发明涉及用于治疗的开环核酸 (UNA) 寡聚体。开环核酸

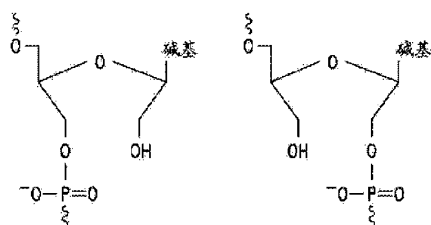
(unlocked nucleic acid, UNA) 是 RNA 的无环类似物, 其中核糖环的 C2'和 C3'原子之间的键已被切断。已经证明, 掺入 UNA 对 siRNA 基因沉默活性具有良好的耐受性, 在某些情况下甚至可以增强其活性 (Meghan A. et al. "Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): contrasting structures work towards common therapeutic goals". *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 5680–5689)。

UNA 是一种热不稳定修饰, 用 UNA 替换核糖核苷酸会降低碱基配对强度和双链体稳定性。将 UNA 策略性地放置在 siRNA 反义链的种子区域可以降低通过 microRNA (miRNA) 介导的基因沉默机制中的脱靶活性。miRNA 主要通过反义种子区 (从 5'端开始的第 2-8 位) 与靶 mRNA 之间的碱基配对来识别靶基因, 以进行基因抑制。每个 miRNA 都可能调节大量基因。RNA 诱导沉默复合物 (RISC) 所加载的 siRNA 反义链也可以通过 miRNA 介导的机制潜在地调节大量非预期基因。因此, 在 siRNA 的种子区域中加入热不稳定的核苷酸, 如 UNA, 可以降低脱靶活性 (Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep 15;4(9):e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23. PMID: 26372022; PMCID: PMC4877448.)。具体而言, 这样的 RNA 寡核苷酸或 RNA 寡核苷酸的复合物在种子区域含有至少一个 UNA 核苷酸单体 (Narendra Vaish et al. "Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analog". *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 5 1823–1832)。

根据本技术方案, 在 RNA 寡核苷酸或 RNA 寡核苷酸的复合物中并入 UNA 的潜在优势包括但不限于:

1. 减少脱靶活性。在 siRNA 种子区添加 UNA 会降低种子区的碱基配对强度, 从而降低由 micro-RNA 机制引起的潜在脱靶活性。
2. UNA 在 siRNA 活性方面具有良好的耐受性。在某些情况下, UNA 可以导致活性增强。

可用于本技术方案的示例性 UNA 单体包括但不限于:



根据本发明的一个方面, 提供了一种组合物, 其包含本发明上述 dsRNA 试剂方面的任意实施方案。在某些实施方案中, 组合物还包含药学上可接受的载体。在一些实施方案中,

组合物还包含一种或更多种另外的治疗剂，如 HMg Co-A 还原酶抑制剂（他汀类）、依折麦布、PCSK-9 抑制剂、CTEP 抑制剂、靶向 ANGPTL3 的疗法、靶向 AGT 的疗法、靶向 APOC3 的疗法和烟酸，或上述任何的组合。在某些实施方案中，组合物被包装在药盒、容器、包装物、分配器、预填充注射器或小瓶中。在一些实施方案中，组合物被配制用于皮下给药或被配制用于静脉内（IV）给药。

根据本发明的另一方面，提供了一种细胞，其包含本发明上述 dsRNA 试剂方面的任意实施方案。在一些实施方案中，细胞是哺乳动物细胞，任选地是人细胞。

根据本发明的另一方面，提供了一种抑制细胞中 LPA 基因表达的方法，该方法包括：(i) 制备包含有效量的上述 dsRNA 试剂或上述组合物方面的任意实施方案的细胞。在某些实施方案中，该方法还包括：(ii) 将制备的细胞维持足够的时间以获得 LPA 基因的 mRNA 转录物的降解，从而抑制细胞中 LPA 基因的表达。在一些实施方案中，细胞在对象体内并且 dsRNA 试剂经皮下施用于对象。在一些实施方案中，细胞在对象体内并且 dsRNA 试剂通过 IV 给药施用于对象。在某些实施方案中，该方法还包括在向对象施用 dsRNA 试剂后评估对 LPA 基因的抑制，其中评估的手段包括：(i) 确定对象中 LPA 相关疾病或病症的一个或多个生理特征，以及(ii) 将所确定的生理特征与 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或 LPA 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较，其中的比较结果指示对象中 LPA 基因表达的抑制存在或不存在。在一些实施方案中，所确定的生理特征是在血液中的 Lp(a) 水平。血液中 LPA 水平的降低表明对象中 LPA 基因表达的降低。

根据本发明的另一方面，提供了一种抑制对象中 LPA 基因表达的方法，其包括向对象施用有效量的前述 dsRNA 试剂方面的实施方案或前述组合物的实施方案。在一些实施方案中，将 dsRNA 试剂皮下施用于对象。在某些实施方案中，dsRNA 试剂通过 IV 给药施用于对象。在一些实施方案中，该方法还包括：在施用 dsRNA 试剂后评估 LPA 基因的抑制，其中评估手段包括：(i) 确定对象的 LPA 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征；(ii) 将确定的生理特征与 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或 LPA 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较；其中比较结果指示对象中 LPA 基因表达的抑制存在或不存在。在一些实施方案中，所确定的生理特征是在血液中的 Lp(a) 水平。血液中 LPA 水平的降低表明对象中 LPA 基因表达的降低。

根据本发明的另一方面，提供了一种治疗与 LPA 蛋白相关之疾病或病症的方法，其包括：向对象施用有效量的本发明的前述 dsRNA 试剂方面的任意实施方案或本发明的前述组合物的任意实施方案，以抑制 LPA 基因表达。在某些实施方式中，LPA 相关障碍是心血管疾病，其中所述心血管疾病包括伯格氏病（Berger's disease）、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。在一些实施方案中，该方法还包括：向对象施用另外的治疗方案。在一些实施方案中，另外的治疗方案包括 LPA 相关疾病或病症的治疗。在某些实施方案中，另外的治疗方案包括：向对象施用一种或更多种本发明的 LPA 反义多核苷酸；向对象施用非 LPA dsRNA 治疗剂；以及在对象中进行行为改变。在一些实施方案中，非 LPA dsRNA 治疗剂是以下中的一种另外的治疗剂，如 HMg Co-A 还原酶抑制剂（他汀类）、依折麦布、PCSK-9 抑制剂、CTEP 抑制剂、靶向 ANGPTL3 的疗法、靶向 APOC3 的疗法和烟酸，或上述任何的组合。

10 在一些实施方案中，将 dsRNA 试剂皮下施用于对象。在某些实施方案中，dsRNA 试剂通过 IV 给药施用于对象。在一些实施方案中，该方法还包括确定所施用的双链核糖核酸（dsRNA）试剂在对象中的功效。在一些实施方案中，确定治疗在对象中的功效的手段包括：(i) 确定对象中 LPA 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征；(ii) 将确定的生理特征与 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征进行比较，其中该比较结果指示对对象施用双链核糖核酸（dsRNA）试剂的功效存在、不存在和水平中的一种或更多种。在一些实施方案中，所确定的生理特征是在血液中的 Lp(a)水平。血液中 LPA 水平的降低表明对对象施用双链核糖核酸（dsRNA）试剂的有效性的存在。

根据本发明的另一方面，提供了与对象中 LPA 蛋白的基线治疗前水平相比降低对象中 LPA 蛋白水平的方法，其包括向对象施用有效量的本发明的前述 dsRNA 试剂方面的任意实施方案或本发明的前述组合物的任意实施方案，以降低 LPA 基因表达的水平。 20 在一些实施方案中，将 dsRNA 试剂皮下施用于对象或通过 IV 施用于对象。

根据本发明的另一方面，提供了与对象中 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征相比改变对象中 LPA 相关疾病或病症的生理特征的方法，该方法包括向对象施用有效量的本发明前述 dsRNA 试剂方面的任意实施方案或本发明的前述组合物的任意实施方案，以改变对象中 LPA 相关疾病或病症的生理特征。 25 在一些实施方案中，将 dsRNA 试剂皮下施用于对象或通过 IV 施用于对象。在某些实施方案中，生理特征是在血液中的 Lp(a)水平。

序列说明

双链体 AV00122 至 AD00484-1, AD00474-2, AV01867-AV01968 显示在表 1 中并且显示了其正义链序列。

30 双链体 AV00122 至 AD00484-1, AD00474-2, AV01867-AV01968 显示在表 1 中并且显示了其反义链序列。

在显示于表 2 的序列中，化学修饰表示为：大写：2'-氟；小写：2'-OMe；硫代磷酸酯：

*。

在显示于表 3 的序列中，体内研究中使用的递送分子在每条正义链的 3'末端表示为“GLO-0”。体内研究中使用的递送分子在每条正义链的 5'末端表示为“GLS-5”或者“GLS-15”化学修饰表示为：大写：2'-氟；小写：2'-OMe；硫代磷酸酯：*；开环核酸：UNA。

5 以下为人 Lp(a) 的 mRNA 序列（SEQ ID NO: 1）：NM_005577.4 Homo sapiens lipoprotein(a) (LPA), mRNA

GTAAGTCAACAATGTCCTGGGATTGGGACACACTTTCTGGGCACTGCTGGCCAGTCCC
AAAATGGAACATAAGGAAGTGGTTCTTCTACTTCTTTTATTTCTGAAATCAGCAGCACC
TGAGCAAAGCCATGTGGTCCAGGATTGCTACCATGGTGATGGACAGAGTTATCGAGGC
10 ACGTACTCCACCACTGTACAGGAAGGACCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCAC
ATCAACATAATAGGACCACAGAAACTACCCAAATGCTGGCTTGATCATGAACTACTGC
AGGAATCCAGATGCTGTGGCAGCTCCTTATTGTTATACGAGGGATCCCGGTGTCAGGTG
GGAGTACTGCAACCTGACGCAATGCTCAGACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCC
GACTGTTACCCCGGTTCCAAGCCTAGAGGCTCCTTCCGAACAAGCACCGACTGAGCAA
15 AGGCCTGGGGTGCAGGAGTGCTACCATGGTAATGGACAGAGTTATCGAGGCACATACT
CCACCACTGTACAGGAAGAACCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCA
TAGTCGGACCCCAGAATACTACCCAAATGCTGGCTTGATCATGAACTACTGCAGGAATC
CAGATGCTGTGGCAGCTCCTTATTGTTATACGAGGGATCCCGGTGTCAGGTGGGAGTAC
TGCAACCTGACGCAATGCTCAGACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTA
20 CCCCAGTTCCAAGCCTAGAGGCTCCTTCCGAACAAGCACCGACTGAGCAAAGGCCTG
GGGTGCAGGAGTGCTACCATGGTAATGGACAGAGTTATCGAGGCACATACTCCACCAC
TGTCACAGGAAGAACCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGG
ACCCCAGAATACTACCCAAATGCTGGCTTGATCATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGC
TGTGGCAGCTCCTTATTGTTATACGAGGGATCCCGGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACC
25 TGACGCAATGCTCAGACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTACCCCGGT
TCCAAGCCTAGAGGCTCCTTCCGAACAAGCACCGACTGAGCAGAGGCCTGGGGTGCA
GGAGTGCTACCACGTAATGGACAGAGTTATCGAGGCACATACTCCACCACTGTCACT
GGAAGAACCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAG
AATACTACCCAAATGCTGGCTTGATCATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGTGGCA
30 GCTCCTTATTGTTATACGAGGGATCCCGGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACGCA
ATGCTCAGACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTACCCCGGTTCCAAGC
CTAGAGGCTCCTTCCGAACAAGCACCGACTGAGCAAAGGCCTGGGGTGCAGGAGTGC
TACCATGGTAATGGACAGAGTTATCGAGGCACATACTCCACCACTGTACAGGAAGAA

CCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAGAATACTAC
CCAAATGCTGGCTTGATCATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGTGGCAGCTCCTTA
TTGTTATACGAGGGATCCCGGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACGCAATGCTCA
GACGCAGAAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTACCCCGGTTCCAAGCCTAGAGG
5 CTCCTTCCGAACAAGCACCGACTGAGCAAAGGCCTGGGGTGCAGGAGTGCTACCATG
GTAATGGACAGAGTTATCGAGGCACATACTCCACCACTGTCACAGGAAGAACCTGCCA
AGCTTGGTCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAGAATACTACCCAAATG
CTGGCTTGATCATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGTGGCAGCTCCTTATTGTTATA
CGAGGGATCCCGGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACGCAATGCTCAGACGCAG
10 AAGGGACTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTACCCCGGTTCCAAGCCTAGAGGCTCCTTC
CGAACAAGCACCGACTGAGCAAAGGCCTGGGGTGCAGGAGTGCTACCATGGTAATGG
ACAGAGTTATCGAGGCACATACTCCACCACTGTCACAGGAAGAACCTGCCAAGCTTGG
TCATCTATGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAGAATACTACCCAAATGCTGGCTT
GATCATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGTGGCAGCTCCTTATTGTTATACGAGGG
15 ATCCCGGTGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACGCAATGCTCAGACGCAGAAGGGA
CTGCCGTCGCGCCTCCGACTGTTACCCCGGTTCCAAGCCTAGAGGCTCCTTCCGAACA
AGCACCGACTGAGCAGAGGCCTGGGGTGCAGGAGTGCTACCACGGTAATGGACAGAG
TTATCGAGGCACATACTCCACCACTGTCACTGGAAGAACCTGCCAAGCTTGGTCATCTA
TGACACCACACTCGCATAGTCGGACCCCAGAATACTACCCAAATGCTGGCTTGATCATG
20 AACTACTGCAGGAATCCAGATCCTGTGGCAGCCCCCTTATTGTTATACGAGGGATCCCAG
TGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGACACAATGCTCAGACGCAGAAGGGACTGCCGT
CGCGCCTCCAATATTACCCCGATTCCAAGCCTAGAGGCTCCTTCTGAACAAGCACCAA
CTGAGCAAAGGCCTGGGGTGCAGGAGTGCTACCACGGAAATGGACAGAGTTATCAAG
GCACATACTTCATTACTGTCACAGGAAGAACCTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCA
25 CACTCGCATAGTCGGACCCCAGCATACTACCCAAATGCTGGCTTGATCAAGAACTACTG
CCGAAATCCAGATCCTGTGGCAGCCCCCTTGGTGTATACAACAGATCCCAGTGTGAGGT
GGGAGTACTGCAACCTGACACGATGCTCAGATGCAGAATGGACTGCCTTCGTCCCTCC
GAATGTTATTCTGGCTCCAAGCCTAGAGGCTTTTTTTGAACAAGCACTGACTGAGGAA
ACCCCGGGGTACAGGACTGCTACTACCATTATGGACAGAGTTACCGAGGCACATACTC
30 CACCACTGTCACAGGAAGAACTTGCCAAGCTTGGTCATCTATGACACCACACCAGCAT
AGTCGGACCCCAGAAAATACCCAAATGCTGGCCTGACCAGGAACCTACTGCAGGAATC
CAGATGCTGAGATTGCCCTTGGTGTACACCATGGATCCCAGTGTGAGGTGGGAGTAC
TGCAACCTGACACAATGCCTGGTGACAGAATCAAGTGTCTTGCAACTCTACGGTGG
TCCCAGATCCAAGCACAGAGGCTTCTTCTGAAGAAGCACCAACGGAGCAAAGCCCCG

GGGTCCAGGATTGCTACCATGGTGATGGACAGAGTTATCGAGGCTCATTCTCTACCACT
GTCACAGGAAGGACATGTCAGTCTTGGTCTCTATGACACCACACTGGCATCAGAGGA
CAACAGAATATTATCCAAATGGTGGCCTGACCAGGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCT
GAGATTAGTCCTTGGTGTTATACCATGGATCCCAATGTCAGATGGGAGTACTGCAACCT
5 GACACAATGTCCAGTGACAGAATCAAGTGTCTTGGCGACGTCCACGGCTGTTTCTGAA
CAAGCACCAACGGAGCAAAGCCCCACAGTCCAGGACTGCTACCATGGTGATGGACAG
AGTTATCGAGGCTCATTCTCCACCACTGTTACAGGAAGGACATGTCAGTCTTGGTCCTC
TATGACACCACACTGGCATCAGAGAACCACAGAATACTACCCAAATGGTGGCCTGACC
AGGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCTGAGATTCGCCCTTGGTGTTATACCATGGATCC
10 CAGTGTGATGAGGAGTACTGCAACCTGACGCAATGTCCAGTGATGGAATCAACTCTC
CTCACAACCTCCACGGTGGTCCCAGTTCCAAGCACAGAGCTTCCTTCTGAAGAAGCAC
CAACTGAAAACAGCACTGGGGTCCAGGACTGCTACCGAGGTGATGGACAGAGTTATC
GAGGCACACTCTCCACCACTATCACAGGAAGAACATGTCAGTCTTGGTCGTCTATGAC
ACCACATTGGCATCGGAGGATCCCATTATACTATCCAAATGCTGGCCTGACCAGGAACT
15 ACTGCAGGAATCCAGATGCTGAGATTCGCCCTTGGTGTTACACCATGGATCCCAGTGTC
AGGTGGGAGTACTGCAACCTGACACGATGTCCAGTGACAGAATCGAGTGTCTCACA
CTCCACAGTGGCCCCGGTTCCAAGCACAGAGGCTCCTTCTGAACAAGCACCACTGA
GAAAAGCCCTGTGGTCCAGGATTGCTACCATGGTGATGGACGGAGTTATCGAGGCATAT
CCTCCACCACTGTACAGGAAGGACCTGTCAATCTTGGTCATCTATGATACCACACTGG
20 CATCAGAGGACCCAGAAAACCTACCCAAATGCTGGCCTGACCGAGAACTACTGCAGG
AATCCAGATTCTGGGAAACAACCCTGGTGTTACACAACCGATCCGTGTGTGAGGTGGG
AGTACTGCAATCTGACACAATGCTCAGAAACAGAATCAGGTGTCTAGAGACTCCCAC
TGTTGTTCCAGTTCCAAGCATGGAGGCTCATTCTGAAGCAGCACCAACTGAGCAAACC
CCTGTGGTCCGGCAGTGCTACCATGGTAATGGCCAGAGTTATCGAGGCACATTCTCCAC
25 CACTGTACAGGAAGGACATGTCAATCTTGGTCATCCATGACACCACACCGGCATCAG
AGGACCCCAGAAAACCTACCCAAATGATGGCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAG
ATGCCGATACAGGCCCTTGGTGTTTTACCATGGACCCCAGCATCAGGTGGGAGTACTGC
AACCTGACGCGATGCTCAGACACAGAAGGGACTGTGGTTCGCTCCTCCGACTGTCATCC
AGGTTCCAAGCCTAGGGCCTCCTTCTGAACAAGACTGTATGTTTGGGAATGGGAAAGG
30 ATACCGGGGCAAGAAGGCAACCACTGTTACTGGGACGCCATGCCAGGAATGGGCTGCC
CAGGAGCCCCATAGACACAGCACGTTTCATTCCAGGGACAAATAAATGGGCAGGTCTGG
AAAAAAATTACTGCCGTAACCCTGATGGTGACATCAATGGTCCCTGGTGCTACACAATG
AATCCAAGAAAACCTTTTGAAGTACTGTGATATCCCTCTCTGTGCATCCTCTTCATTTGAT
TGTGGGAAGCCTCAAGTGGAGCCGAAGAAATGTCCTGGAAGCATTGTAGGGGGGTGT

GTGGCCACCCACATTCCTGGCCCTGGCAAGTCAGTCTCAGAACAAGGTTTGGAAAGC
ACTTCTGTGGAGGCACCTTAATATCCCCAGAGTGGGTGCTGACTGCTGCTCACTGCTTG
AAGAAGTCCTCAAGGCCTTCATCCTACAAGGTCATCCTGGGTGCACACCAAGAAGTGA
ACCTCGAATCTCATGTTCAAGGAAATAGAAGTGTCTAGGCTGTTCTTGGAGCCCACACA
5 AGCAGATATTGCCTTGCTAAAGCTAAGCAGGCCTGCCGTCATCACTGACAAAGTAATGC
CAGCTTGTCTGCCATCCCCAGACTACATGGTCACCGCCAGGACTGAATGTTACATCACT
GGCTGGGGAGAAACCCAAGGTACCTTTGGGACTGGCCTTCTCAAGGAAGCCCAGCTC
CTTGTTATTGAGAATGAAGTGTGCAATCACTATAAGTATATTTGTGCTGAGCATTG GCC
AGAGGCACTGACAGTTGCCAGGGTGACAGTGGAGGGCCTCTGGTTTGCTTCGAGAAG
10 GACAAATACATTTTACAAGGAGTCACTTCTTGGGGTCTTGGCTGTGCACGCCCCAATAA
GCCTGGTGTCTATGCTCGTGTTCAGGTTTGTTACTTGGATTGAGGGAATGATGAGAA
ATAATTAATTGGACGGGAGACAGAGTGAAGCATCAACCTACTTAGAAGCTGAAACGTG
GGTAAGGATTTAGCATGCTGGAAATAATAGACAGCAATCAAACGAAGACACTGTTCCC
AGCTACCAGCTATGCCAAACCTTGGCATTGTTTGGTATTTTGTGTATAAGCTTTTAAGGT
15 CTGACTGACAAATTCTGTATTAAGGTGTCATAGCTATGACATTTGTTAAAAATAAACTCT
GCACTTATTTTGATTGAA

附图说明：

图 1 表示猴子血清 LPA 蛋白水平示意图；

图 2 表示 2mpk 剂量的 AD00480-8 在猴子血清 LPA 蛋白水平示意图。

20

具体实施方式

本发明的部分实施方案包括能够抑制 LPA (Apo(a)) 基因表达的 RNAi 试剂，例如但
不限于双链(ds)RNAi 试剂。本发明的部分实施方案还包括包含 LPA RNAi 试剂的组合物和使
用该组合物的方法。本文公开的 LPA RNAi 试剂可接附于递送化合物以递送至细胞，包括递
25 送至肝细胞。本发明的药物组合物可包含至少一种 dsRNA 试剂和递送化合物。在本发明
的一些实施方案中，递送化合物是含 GalNAc 的递送化合物。递送至细胞的 LPA RNAi 试剂能
够抑制 LPA 基因表达，从而降低基因的 LPA 蛋白产物。本发明的 dsRNAi 试剂可用于治疗
LPA 相关疾病和病症。这样的 dsRNAi 试剂包括例如表 1 中所显示的双链体 AV00122 至
AD00484-1，AD00474-2，AV01867-AV01968。在其他一些实施方案中，这样的 dsRNAi 试
30 剂包括双链体变体，例如双链体 AV00122 至 AD00484-1，AD00474-2，AV01867-AV01968
的变体。

在本发明的一些实施方案中，降低细胞或对象中 LPA 表达分别治疗与细胞或对象中

LPA 表达相关的疾病或病症。可通过降低 LPA 表达治疗的疾病和病症的非限制性实例是心血管疾病，其中所述心血管疾病包括伯格氏病 (Berger's disease)、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。

下面描述了如何制备和使用包含 LPA 单链 (ssRNA) 和双链 (dsRNA) 试剂的组合物来抑制 LPA 基因表达，以及用于治疗由 LPA 基因表达引起或调节的疾病和病症的组合物和方法。术语“RNAi”也是本领域已知的，并且可以被称为“siRNA”。

如本文所用，术语“RNAi”是指包含 RNA 并通过 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 途径介导 RNA 转录物的靶向切割的试剂。如本领域已知的，RNAi 靶区域是指在基因转录过程中形成的 RNA 分子的核苷酸序列的连续部分，其包括信使 RNA (mRNA)，它是初级转录产物 RNA 的加工产物。该序列的靶标部分将至少足够长以用作在该部分处或附近进行 RNAi 定向切割的底物。靶序列可以是 8-30 个核苷酸长 (包括端值)、10-30 个核苷酸长 (包括端值)、12-25 个核苷酸长 (包括端值)、15-23 个核苷酸长 (包括端值)、16-23 个核苷酸长 (包括端值)，或 18-23 个核苷酸长 (包括端值)，并包括每个规定范围内的所有较短长度。在本发明的一些实施方案中，靶序列为 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或 26 个核苷酸长。在某些实施方案中，靶序列的长度在 9 到 26 个核苷酸之间 (包括端值)，包括其间的所有子范围和整数。例如，虽然不意在限制，但在本发明的某些实施方案中，靶序列为 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸长，该序列与 LPA 基因的 RNA 转录物的至少一部分完全或至少基本上互补。本发明的一些方面包括包含一种或更多种 LPA dsRNA 试剂和药学上可接受的载体的药物组合物。在本发明的某些实施方案中，如本文所述的 LPA RNAi 抑制 LPA 蛋白的表达。

如本文所用，“dsRNA 试剂”是指包含 RNA 或 RNA 样 (例如，化学修饰的 RNA) 寡核苷酸分子的组合物，其能够降解或抑制靶 mRNA 转录物的翻译。尽管不希望限于特定理论，但本发明的 dsRNA 试剂可通过 RNA 干扰机制起作用 (即，通过与哺乳动物细胞的 RNA 干扰途径机制 (RNA 诱导的沉默复合物或 RISC) 相互作用来诱导产生 RNA 干扰)，或通过任何替代机制或途径起作用。在植物、无脊椎动物和脊椎动物细胞中实现基因沉默的方法是本领域所公知的 (参见例如，Sharp et al., Genes Dev. 2001, 15:485; Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363; Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309; 以及 Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)，其各自的公开内容通过引用整体并入本文。本领域已知的基因沉默手段可与本文

提供的公开内容结合使用以实现抑制 LPA 的表达。

本文公开的 dsRNA 试剂由正义链和反义链组成，其包括但不限于：短干扰 RNA (siRNA)、RNAi 试剂、微 RNA (miRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 和切丁酶 (Dicer) 底物。本文描述的 dsRNA 试剂的反义链至少部分地与所靶向的 mRNA 互补，本领域能够理解，多种长度的 dsRNA 双链体结构可用于抑制靶基因表达。例如，已知具有 19、20、21、22 和 23 个碱基对的双链体结构的 dsRNA 可有效诱导 RNA 干扰(Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888)。本领域还已知较短或较长的 RNA 双链体结构也可有效诱导 RNA 干扰。本发明的某些实施方案中的 LPA dsRNA 可以包含至少一条长度至少为 21 nt 的链，或者双链体可以具有基于表 1-3 中任何列出的序列之一的长度减 1、2、3 nt 或更短的长度。与分别在表 1-3 中列出的 dsRNA 相比，在其一端或两端减少 4 个核苷酸也可以是有效的。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂可具有来自表 1-3 的一个或更多个序列的至少 15、16、17、18、19、20 或更多个连续核苷酸的部分序列，并且它们抑制 LPA 基因表达的能力与由包含全序列（此处也称为“亲本”序列）的 dsRNA 产生的抑制水平相差不超过 5%、10%、15%、20%、25%或 30%。

本发明的组合物和方法的某些实施方案在组合物中包含单链 RNA 和/或将单链 RNA 施用于对象。例如，表 1-3 任一项中所列的反义链可以作为一种组合物或在一种组合物内，该组合物施用给对象会降低对象中 LPA 多肽和/或 LPA 基因的表达。表 1-3 显示了某些 LPA dsRNA 试剂的反义链和正义链核心延伸碱基序列。可以包含在本发明的某些组合物中和/或在本发明的某些方法中施用的单链反义分子在本文中称为“单链反义试剂”或“反义多核苷酸试剂”。可以包含在某些组合物中和/或在本发明的某些方法中施用的单链正义分子在本文中称为“单链正义试剂”或“正义多核苷酸试剂”。术语“碱基序列”在本文中是指没有化学修饰或递送化合物的多核苷酸序列。例如，表 1 所示的正义链对应于是表 3 中的相应碱基序列；但表 3 中的相应序列中显示了各自的化学修饰和递送化合物。在此公开的序列可以被分配标识符。例如，单链正义序列可以用“正义链 SS#”来标识；单链反义序列可以用“反义链 AS#”来标识；并且包含正义链和反义链的双链体可以用“双链体 AD#”来标识。

表 1 包括正义链和反义链，并提供了由表 1 中同一行上的正义链和反义链形成的双链体的标识号。在本发明的某些实施方案中，反义序列在其第 1 位中包含核碱基 u 或核碱基 a。在本发明的某些实施方案中，反义序列在反义序列的第 1 位包含核碱基 u。如本文所用，术语“匹配位置”在某种意义上是指当两条链作为双链体时每条链中互相“配对”的位置。例如，在 21 核碱基正义链和 21 核碱基反义链中，正义链第 1 位与反义链第 21 位的核碱基处于“匹配位置”。在另一个非限制性实例中，对于 23 核碱基正义链和 23 核碱基反义链，正义链的第 2 位核碱基与反义链的第 22 位处于匹配位置。在另一个非限制性实例中，在 18 核碱基正义链和 18 核碱基反义链中，正义链第 1 位核碱基与反义链第 18 位核碱基处于匹配位置；并且

正义链中的第 4 位核碱基与反义链中的第 15 位核碱基处于匹配位置。技术人员会理解如何识别双链和成对链的正义和反义链之间的匹配位置。

表 1 中的一列表示双链体的双链体 AV#、AD#，该双链体在同一表格行中包含正义和反义序列。例如，表 1 公开了指定为“双链体 AV00122”的双链体，其包含相应的正义链序列和反义链序列。因此，表 1 中的每一行都标识了本发明的双链体，每一个都包含显示在同一行中的正义和反义序列，每个双链体的指定标识符均显示在该行的最后一列中。

在本发明方法的一些实施方案中，向对象施用包含表 1 中所示多核苷酸序列的 RNAi 试剂。在本发明的一些实施方案中，向对象施用的 RNAi 试剂包括双链体，所述双链体包含表 1 中列出的碱基序列中的至少一个，并包含 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个序列修改。在本发明方法的一些实施方案中，还包括将表 1 中所示多核苷酸序列的 RNAi 试剂连接至递送分子上，其非限制性实例是包含 GalNAc 的递送化合物。

表 1：无修饰的 LPA RNAi 试剂反义链和正义链序列。所有序列均显示为 5'到 3'方向。双链体 AV#或 AD#是分配给表中同一行中两条链的双链体的编号

双链体编号	正义链碱基序列	Seq ID NO	反义链碱基序列	Seq ID NO
AV00122	CUGGUCCAGGAUUGCUACCAA	2	UUGGUAGCAAUCCUGGACCAG	129
AV00123	CUGAUGGACAGAGUUAUCGAA	3	UUCGAUAACUCUGUCCAUCAG	130
AV00124	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	4	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	131
AV00125	GCCUGCCAAGCUUGGUCAUCA	5	UGAUGACCAAGCUUGGCAGGC	132
AV00126	GCUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	6	UAGAUGACCAAGCUUGGCAGC	133
AV00127	CCCAAGCUUGGUCAUCUAUGA	7	UCAUAGAUGACCAAGCUUGGG	134
AV00128	GAAGCUUGGUCAUCUAUGACA	8	UGUCAUAGAUGACCAAGCUUC	135
AV00129	GACUACCCAAAUGCUGGCUUA	9	UAAGCCAGCAUUUGGGUAGUC	136
AV00130	GUACCCAAAUGCUGGCUUGAA	10	UUCAAGCCAGCAUUUGGGUAC	137
AV00131	GACCCAAAUGCUGGCUUGAUA	11	UAUCAAGCCAGCAUUUGGGUC	138
AV00132	GGCUCCUUAUUGUUAUACGAA	12	UUCGUUAUAACAAUAAGGAGCC	139
AV00133	GGCCUAGAGGCUCCUUCCGAA	13	UUCGGAAGGAGCCUCUAGGCC	140
AV00134	GUAGAGGCUCCUUCCGAACAA	14	UUGUUCGGAAGGAGCCUCUAC	141

AV00135	GAAGCACCGACUGAGCAAAGA	15	UCUUUGCUCAGUCGGUGCUUC	142
AV00136	CGAGUGCUACCAUGGUAAUGA	16	UCAUUACCAUGGUAGCACUCG	143
AV00137	GGUGCUACCAUGGUAAUGGAA	17	UUCCAUUACCAUGGUAGCACC	144
AV00138	GACCAUGGUAAUGGACAGAGA	18	UCUCUGUCCAUUACCAUGGUC	145
AV00139	GUGGUAAUGGACAGAGUUAUA	19	UAUAACUCUGUCCAUUACCAC	146
AV00140	GGGUAAUGGACAGAGUUAUCA	20	UGAUAACUCUGUCCAUUACCC	147
AV00141	CUAAUGGACAGAGUUAUCGAA	21	UUCGAUAACUCUGUCCAUUAG	148
AV00142	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	22	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUC	149
AV00143	CAGUUAUCGAGGCACAUACUA	23	UAGUAUGUGCCUCGAUAACUG	150
AV00144	GACCACGGUAAUGGACAGAGA	24	UCUCUGUCCAUUACCGUGGUC	151
AV00145	GACUGCAGGAAUCCAGAUCCA	25	UGGAUCUGGAUCCUGCAGUC	152
AV00146	GGGCAGCCCCUUAUUGUUAUA	26	UAUAACAAUAAGGGGCUGCCC	153
AV00147	GAGCCCCUUAUUGUUAUACGA	27	UCGUAAACAAUAAGGGGCUC	154
AV00148	GCAGUGUCAGGUGGGAGUACA	28	UGUACUCCCACCUGACACUGC	155
AV00149	CUACUGCAACCUGACACAAUA	29	UAUUGUGUCAGGUUGCAGUAG	156
AV00150	GGACACAAUGCUCAGACGCAA	30	UUGCGUCUGAGCAUUGUGUCC	157
AV00151	GUAGAGGCUCCUUCUGAACAA	31	UUGUUCAGAAGGAGCCUCUAC	158
AV00152	CAGGCUCCUUCUGAACAAAGCA	32	UGCUUGUUCAGAAGGAGCCUG	159
AV00153	GAAGCACCAACUGAGCAAAGA	33	UCUUUGCUCAGUUGGUGCUUC	160
AV00154	GGGAAAUGGACAGAGUUAUCA	34	UGAUAACUCUGUCCAUUUCCC	161
AV00155	CAAAUGGACAGAGUUAUCAA	35	UUUGAUAACUCUGUCCAUUUG	162
AV00156	GGGACAGAGUUAUCAAGGCAA	36	UUGCCUUGAUAACUCUGUCCC	163
AV00157	GUCAAGAACUACUGCCGAAAA	37	UUUUCGGCAGUAGUUCUUGAC	164
AV00158	GCAAGAACUACUGCCGAAUA	38	UAUUUCGGCAGUAGUUCUUGC	165
AV00159	GAAGAACUACUGCCGAAAUCA	39	UGAUUUCGGCAGUAGUUCUUC	166
AV00160	GACUGCCGAAAUCCAGAUCCA	40	UGGAUCUGGAUUUCGGCAGUC	167
AV00161	CUACUGCAACCUGACACGAUA	41	UAUCGUGUCAGGUUGCAGUAG	168
AV00162	GGACACGAUGCUCAGAUGCAA	42	UUGCAUCUGAGCAUCGUGUCC	169

AV00163	CGACUGCUACUACCAUUAUGA	43	UCAUAAUGGUAGUAGCAGUCG	170
AV00164	CACUGCUACUACCAUUAUGGA	44	UCCAUAAUGGUAGUAGCAGUG	171
AV00165	GCUGCUACUACCAUUAUGGAA	45	UUCCAUAAUGGUAGUAGCAGC	172
AV00166	GACUACCAUUAUGGACAGAGA	46	UCUCUGUCCAUAUUGGUAGUC	173
AV00167	GCUUGCCAAGCUUGGUCAUCA	47	UGAUGACCAAGCUUGGCAAGC	174
AV00168	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	48	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	175
AV00169	GAUAGUCGGACCCCAGAAAAA	49	UUUUUCUGGGGUCCGACUAUC	176
AV00170	GCAGGAACUACUGCAGGAUA	50	UAUUCCUGCAGUAGUCCUGC	177
AV00171	CAAUCCAGAUGCUGAGAUUCA	51	UGAAUCUCAGCAUCUGGAUUG	178
AV00172	CAGAUUCGCCCUGGUGUUA	52	UUAACACCAAGGGCGAAUCUG	179
AV00173	CCCCUUGGUGUUACACCAUGA	53	UCAUGGUGUAACACCAAGGGG	180
AV00174	GUGGUGACAGAAUCAAGUGUA	54	UACACUUGAUUCUGUCACCAC	181
AV00175	GAUCAAGUGUCCUUGCAACUA	55	UAGUUGCAAGGACACUUGAUC	182
AV00176	CGGGUCCAGGAUUGCUACCAA	56	UUGGUAGCAAUCCUGGACCCG	183
AV00177	GUGUCACAGGAAGGACAUGUA	57	UACAUGUCCUUCCUGUGACAC	184
AV00178	CGAAGGACAUGUCAGUCUUGA	58	UCAAGACUGACAUGUCCUUCG	185
AV00179	CAAGGACAUGUCAGUCUUGGA	59	UCCAAGACUGACAUGUCCUUG	186
AV00180	CUCAGUCUUGGUCCUCUAUGA	60	UCAUAGAGGACCAAGACUGAG	187
AV00181	CUCCUUGGUGUUAUACCAUGA	61	UCAUGGUUAUACACCAAGGAG	188
AV00182	GUGGUGUUAUACCAUGGAUCA	62	UGAUCCAUGGUUAUACACCAC	189
AV00183	GGGUGUUAUACCAUGGAUCCA	63	UGGAUCCAUGGUUAUACACCC	190
AV00184	CUUAUACCAUGGAUCCCAAUA	64	UAUUGGGAUCCAUGGUUAUAG	191
AV00185	GAUACCAUGGAUCCCAAUGUA	65	UACAUUGGGAUCCAUGGUUAUC	192
AV00186	GCCUGACACAAUGUCCAGUGA	66	UCACUGGACAUUGUGUCAGGC	193
AV00187	GGACACAAUGUCCAGUGACAA	67	UUGUCACUGGACAUUGUGUCC	194
AV00188	GAAUGUCCAGUGACAGAAUCA	68	UGAUUCUGUCACUGGACAUUC	195
AV00189	GAUGUCCAGUGACAGAAUCAA	69	UUGAUUCUGUCACUGGACAUUC	196
AV00190	GUGUCCAGUGACAGAAUCAA	70	UUUGAUUCUGUCACUGGACAC	197

AV00191	GGUCCAGUGACAGAAUCAAGA	71	UCUUGAUUCUGUCACUGGACC	198
AV00192	GCAGUGACAGAAUCAAGUGUA	72	UACACUUGAUUCUGUCACUGC	199
AV00193	GAUUCUCCACCACUGUUACAA	73	UUGUAAACAGUGGUGGAGAAUC	200
AV00194	GCCACCACUGUUACAGGAAGA	74	UCUUCCUGUAACAGUGGUGGC	201
AV00195	GACAGAAUACUACCCAAAUGA	75	UCAUUUGGGUAGUAUUCUGUC	202
AV00196	GCAGAAUACUACCCAAAUGGA	76	UCCAUUUUGGGUAGUAUUCUGC	203
AV00197	GGAUUCGCCCCUUGGUGUUUA	77	UAUAACACCAAGGGCGAAUCC	204
AV00198	CAUUCGCCCCUUGGUGUUUAA	78	UUUAACACCAAGGGCGAAUG	205
AV00199	GUCGCCCCUUGGUGUUUAACCA	79	UGGUUAACACCAAGGGCGAC	206
AV00200	CCCCUUGGUGUUUAACCAUGA	80	UCAUGGUUAACACCAAGGGG	207
AV00201	GGAUGUCCAGUGACAGAAUCA	81	UGAUUCUGUCACUGGACAUC	208
AV00202	GCAGAGGCUCUUCUGAACAA	82	UUGUUCAGAAGGAGCCUCUGC	209
AV00203	GAUCUUGGUCAUCUAUGAUAA	83	UUAUCAUAGAUGACCAAGAUC	210
AV00204	GGACACAAUGCUCAGAAACAA	84	UUGUUUCUGAGCAUUGUGUCC	211
AV00205	CCAGUGCUACCAUGGUAAUGA	85	UCAUUACCAUGGUAGCACUGG	212
AD00149	CAGCCCCUUAUUGUUUAACGA	86	UCGUUAACAAUAAGGGGCUG	213
AD00150	AGUUAUCGAGGCUCAUUCUCA	87	UGAGAAUGAGCCUCGAUAACU	214
AD00151	UGACACAAUGCUCAGACGCAA	88	UUGCGUCUGAGCAUUGUGUCA	215
AD00331	GACCCAAAUGCUGGCUUGAUA	89	UAUCAAGCCAGCAUUUGGGUC	216
AD00332	GGGUAAUGGACAGAGUUUAUCA	90	UGAUAACUCUGUCCAUAUACC	217
AD00333	CUAAUGGACAGAGUUUAUCGAA	91	UUCGAUAACUCUGUCCAUAAG	218
AD00334	CAGUUAUCGAGGCACAUACUA	92	UAGUAUGUGCCUCGAUAACUG	219
AD00335	CUACUGCAACCUGACACAAUA	93	UAUUGUGUCAGGUUGCAGUAG	220
AD00336	CGACUGCUACUACCAUUAUGA	94	UCAUAAUGGUAGUAGCAGUCG	221
AD00337	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	95	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	222
AD00338	CAGAUUCGCCCCUUGGUGUUAA	96	UUAACACCAAGGGCGAAUCUG	223
AD00339	CGAAGGACAUGUCAGUCUUGA	97	UCAAGACUGACAUGUCCUUCG	224
AD00340	CUCCUUGGUGUUUAUACCAUGA	98	UCAUGGUUAACACCAAGGAG	225

AD00341	CCCCUUGGUGUUUAUACCAUGA	99	UCAUGGUUAUACACCAAGGGG	226
AD00342	GGACACAAUGCUCAGAAACAA	100	UUGUUUCUGAGCAUUGUGUCC	227
AD00433	CUGAUGGACAGAGUUAUCGAA	101	UUCGAUAACUCUGUCCAUCAG	228
AD00434	GGCUCCUUAUUGUUUAUCGAA	102	UUCGUUAUACAAUAAGGAGCC	229
AD00435	GAAGCACCAACUGAGCAAAGA	103	UCUUUGCUCAGUUGGUGCUUC	230
AD00436	GGGAAAUGGACAGAGUUAUCA	104	UGAUAACUCUGUCCAUUUCCC	231
AD00437	GCUGCUACUACCAUUAUGGAA	105	UUCCAUAUUGGUAGUAGCAGC	232
AD00438	CAAUCCAGAUGCUGAGAUUCA	106	UGAAUCUCAGCAUCUGGAUUG	233
AD00439	GAUUCUCCACCACUGUUACAA	107	UUGUAACAGUGGUGGAGAAUC	234
AD00440	GCAGAAUACUACCCAAAUGGA	108	UCCAUUUGGGUAGUAUUCUGC	235
AD00441	GGAUUCGCCCUGGUGUUUAUA	109	UAUAACACCAAGGGCGAAUCC	236
AD00442	CAUUCGCCCUGGUGUUUAUA	110	UUAUAACACCAAGGGCGAAUG	237
AD00474	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	111	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	238
AD00475	GCUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	112	UAGAUGACCAAGCUUGGCAGC	239
AD00476	CCCAAGCUUGGUCAUCUAUGA	113	UCAUAGAUGACCAAGCUUGGG	240
AD00477	GGUGCUACCAUGGUAAUGGAA	114	UCCAUAUACCAUGGUAGCACC	241
AD00478	GACCAUGGUAAUGGACAGAGA	115	UCUCUGUCCAUAUACCAUGGUC	242
AD00479	GUGGUAAUGGACAGAGUUAUA	116	UAUAACUCUGUCCAUAUACCAC	243
AD00480	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	117	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUC	244
AD00481	CAAAUGGACAGAGUUAUCAA	118	UUUGAUAACUCUGUCCAUAUUG	245
AD00482	GGGACAGAGUUAUCAAGGCAA	119	UUGCCUUGAUAACUCUGUCCC	246
AD00483	GAUCAAGUGUCCUUGCAACUA	120	UAGUUGCAAGGACACUUGAUC	247
AD00484	CGGGUCCAGGAUUGCUACCAA	121	UUGGUAGCAAUCCUGGACCCG	248
AD00485	GUGUCACAGGAAGGACAUGUA	122	UACAUGUCCUUCCUGUGACAC	249
AD00486	GAUGUCCAGUGACAGAAUCAA	123	UUGAUUCUGUCACUGGACAUC	250
AD00487	GCAGAGGCUCCUUCUGAACAA	124	UUGUUCAGAAGGAGCCUCUGC	251
AD00474-1	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	125	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	252
AD00478-1	GACCAUGGUAAUGGACAGAGA	126	UCUCUGUCCAUAUACCAUGGUC	253

AD00482-1	GGGACAGAGUUAUCAAGGCAA	127	UUGCCUUGAUAAACUCUGUCCC	254
AD00484-1	CGGGUCCAGGAUUGCUACCAA	128	UUGGUAGCAAUCCUGGACCCG	255
AD00474-2	GAUGGACAGAGUUAUCGAGGU	514	ACCUCGAUAACUCUGUCCAUC	608
AV01867	GAGAGUUAUCGAGGCACAUA	515	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUC	609
AV01868	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAU	516	AUAUGUGCCUCGAUAACUCUC	610
AV01869	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAAC	517	GUAUGUGCCUCGAUAACUCUC	611
AV01870	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAAG	518	CUAUGUGCCUCGAUAACUCUC	612
AV01871	GUUAUCGAGGCACAUA	519	UUAUGUGCCUCGAUAAC	613
AV01872	AGUUAUCGAGGCACAUA	520	UUAUGUGCCUCGAUAACU	614
AV01873	AAGUUAUCGAGGCACAUA	521	UUAUGUGCCUCGAUAACUU	615
AV01874	UAGUUAUCGAGGCACAUA	522	UUAUGUGCCUCGAUAACUA	616
AV01875	GAGUUAUCGAGGCACAUA	523	UUAUGUGCCUCGAUAACUC	617
AV01876	CAGUUAUCGAGGCACAUA	524	UUAUGUGCCUCGAUAACUG	618
AV01877	AGAGUUAUCGAGGCACAUA	525	UUAUGUGCCUCGAUAACUCU	619
AV01878	UGAGUUAUCGAGGCACAUA	526	UUAUGUGCCUCGAUAACUCA	620
AV01879	GGAGUUAUCGAGGCACAUA	527	UUAUGUGCCUCGAUAACUCC	621
AV01880	CGAGUUAUCGAGGCACAUA	528	UUAUGUGCCUCGAUAACUCG	622
AV01881	UAGAGUUAUCGAGGCACAUA	529	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUA	623
AV01882	CAGAGUUAUCGAGGCACAUA	530	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUG	624
AV01883	AAGAGUUAUCGAGGCACAUA	531	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUU	625
AV01884	ACAGAGUUAUCGAGGCACAUA	532	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUGU	626
AV01885	GACAGAGUUAUCGAGGCACAUA	533	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUGUC	627
AV01886	GGACAGAGUUAUCGAGGCACAUA	534	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUGUC C	628
AV01887	UGGACAGAGUUAUCGAGGCACAUA A	535	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUGUC CA	629
AV01888	AUGGACAGAGUUAUCGAGGCACAU AA	536	UUAUGUGCCUCGAUAACUCUGUC CAU	630

AV01889	AUGGUAAUGGACAGAGUUAUCGAG GCACAUAA	537	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUGUC CAUUACCAU	631
AV01890	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	538	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUCUU	632
AV01891	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	539	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUCGA	633
AV01892	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	540	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUC	634
AV01893	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	541	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUC	635
AV01894	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	542	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUC	636
AV01895	GAGAGUUAUCGAGGCGCAUAA	543	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUC	637
AV01896	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	544	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUC	638
AV01897	GAGAGUUAUCGAGGCACAUAA	545	UUAUGUGCCUCGAUAAACUCUC	639
AV01898	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	546	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	640
AV01899	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUU	547	AAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	641
AV01900	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUC	548	GAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	642
AV01901	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUG	549	CAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	643
AV01902	CCAAGCUUGGUCAUCUA	550	UAGAUGACCAAGCUUGG	644
AV01903	GCCAAGCUUGGUCAUCUA	551	UAGAUGACCAAGCUUGGC	645
AV01904	AGCCAAGCUUGGUCAUCUA	552	UAGAUGACCAAGCUUGGCU	646
AV01905	UGCCAAGCUUGGUCAUCUA	553	UAGAUGACCAAGCUUGGCA	647
AV01906	GGCCAAGCUUGGUCAUCUA	554	UAGAUGACCAAGCUUGGCC	648
AV01907	CGCCAAGCUUGGUCAUCUA	555	UAGAUGACCAAGCUUGGCG	649
AV01908	AUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	556	UAGAUGACCAAGCUUGGCAU	650
AV01909	UUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	557	UAGAUGACCAAGCUUGGCAA	651
AV01910	GUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	558	UAGAUGACCAAGCUUGGCAC	652
AV01911	CUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	559	UAGAUGACCAAGCUUGGCAG	653
AV01912	UUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	560	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAA	654
AV01913	CUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	561	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAG	655
AV01914	AUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	562	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAU	656
AV01915	ACUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	563	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAGU	657

AV01916	AACUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	564	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAGUU	658
AV01917	GAACUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	565	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAGUU C	659
AV01918	AGAACUUGCCAAGCUUGGUCAUCU A	566	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAGUU CU	660
AV01919	AAGAACUUGCCAAGCUUGGUCAUC UA	567	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAGUU CUU	661
AV01920	CACAGGAAGAACUUGCCAAGCUUG GUCAUCUA	568	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAGUU CUUCCUGUG	662
AV01921	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	569	UAGAUGACCAAGCUUGGCAACUU	663
AV01922	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	570	UAGAUGACCAAGCUUGGCAACGA	664
AV01923	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	571	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	665
AV01924	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	572	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	666
AV01925	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	573	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	667
AV01926	GUUGCCAAGCUUGGUUAUCUA	574	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	668
AV01927	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCCA	575	UGGAUGACCAAGCUUGGCAAC	669
AV01928	GUUGCCAAGCUUGGUCAUCUA	576	UAGAUGACCAAGCUUGGCAAC	670
AV01929	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	577	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	671
AV01930	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGU	578	ACCUCGAUAACUCUGUCCAUG	672
AV01931	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGC	579	GCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	673
AV01932	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGG	580	CCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	674
AV01933	GACAGAGUUAUCGAGGA	581	UCCUCGAUAACUCUGUC	675
AV01934	GGACAGAGUUAUCGAGGA	582	UCCUCGAUAACUCUGUCC	676
AV01935	AGGACAGAGUUAUCGAGGA	583	UCCUCGAUAACUCUGUCCU	677
AV01936	UGGACAGAGUUAUCGAGGA	584	UCCUCGAUAACUCUGUCCA	678
AV01937	GGGACAGAGUUAUCGAGGA	585	UCCUCGAUAACUCUGUCCC	679
AV01938	CGGACAGAGUUAUCGAGGA	586	UCCUCGAUAACUCUGUCCG	680
AV01939	AUGGACAGAGUUAUCGAGGA	587	UCCUCGAUAACUCUGUCCAU	681

AV01940	UUGGACAGAGUUAUCGAGGA	588	UCCUCGAUAACUCUGUCCAA	682
AV01941	GUGGACAGAGUUAUCGAGGA	589	UCCUCGAUAACUCUGUCCAC	683
AV01942	CUGGACAGAGUUAUCGAGGA	590	UCCUCGAUAACUCUGUCCAG	684
AV01943	UAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	591	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUA	685
AV01944	GAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	592	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUC	686
AV01945	AAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	593	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUI	687
AV01946	UGAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	594	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUCA	688
AV01947	GUGAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	595	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUCAC	689
AV01948	GGUGAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	596	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUCAC C	690
AV01949	UGGUGAUGGACAGAGUUAUCGAGG A	597	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUCAC CA	691
AV01950	AUGGUGAUGGACAGAGUUAUCGAG GA	598	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUCAC CAU	692
AV01951	GCUACCAUGGUGAUGGACAGAGUU AUCGAGGA	599	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUCAC CAUGGUAGC	693
AV01952	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	600	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUGUU	694
AV01953	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	601	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUGGA	695
AV01954	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	602	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	696
AV01955	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	603	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	697
AV01956	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	604	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	698
AV01957	CAUGGACAGAGUUAUUGAGGA	605	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	699
AV01958	CAUGGACAGAGUUAUCGAGAA	606	UUCUCGAUAACUCUGUCCAUG	700
AV01959	CAUGGACAGAGUUAUCGAGGA	607	UCCUCGAUAACUCUGUCCAUG	701

表 2 显示了本发明的某些化学修饰的 LPA RNAi 剂反义链和正义链序列。在本发明方法的一些实施方案中，将具有表 2 中所示多核苷酸序列的 RNAi 试剂施用于细胞和/或对象。在本发明方法的一些实施方案中，将具有表 2 中所示多核苷酸序列的 RNAi 试剂施用于对象。在本发明的一些实施方案中，向对象施用的 RNAi 试剂包含在表 2 第一列中标注的双链体，

并且分别包含显示在表 2 中同一行第三列和第六列的正义和反义链序列中的序列修饰。在本发明方法的一些实施方案中，表 2 中所示的序列可以连接到（在本文中也称为“缀合到”）能够将 RNAi 试剂递送至对象的细胞和/或组织的化合物上。可用于本发明的某些实施方案中的递送化合物的非限制性实例是含 GalNAc 的化合物。在表 2 中，第一列表示碱基序列的双链体 AD#，与表 1 对应。对于双链体 AD#标识的碱基序列，不仅显示正义和反义链所包含的碱基序列，而且具有表 2 同一行中所示的指定化学修饰。例如，表 1 第一行显示了正义和反义碱基单链序列，它们一起构成双链体，标识为：双链体 AV00122；而表 2 列出的双链体 AV00122 中，作为双链体，其包含 AV00122-SS 和 AV00122-AS 的碱基序列，而且分别包含在第三列和第六列中显示的正义和反义序列中的化学修饰。表 2 第 2 列中的“正义链 SS#”是同一行中第 3 列所示正义序列（包括修饰）的指定标识符。表 2 第五列中的“反义链 AS#”是第六列中显示的反义序列（包括修饰）的指定标识符。

表 2：化学修饰的 LPA RNAi 试剂反义链和正义链序列。所有序列都显示为 5'到 3'。这些序列用于本文所述的某些体外测试研究。化学修饰表示为：大写：2'-氟；小写：2'-OMe；硫代磷酸酯：*

双链体 AV#	正义链 SS#	正义序列	SEQ ID NO	反义链 AS#	反义序列	SEQ ID NO
AV00122	AV00122-SS	c*u*gguccaGgAuUgcuacca*a	256	AV00122-AS	u*U*gguaGcaauCcUgGacc*a*g	340
AV00123	AV00123-SS	c*u*gauggaCaGaGuuauca*a	257	AV00123-AS	u*U*cgauAacucUgUcCauc*a*g	341
AV00124	AV00124-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	258	AV00124-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	342
AV00125	AV00125-SS	g*c*cugccaAgCuUggucauc*a	259	AV00125-AS	u*G*augaCcaagCuUgGcag*g*c	343
AV00126	AV00126-SS	g*c*ugccaaGcUuGgucaucu*a	260	AV00126-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*g*c	344
AV00127	AV00127-SS	c*c*caagcuUgGuCaucuaua*g	261	AV00127-AS	u*C*auagAugaCaAgCuug*g*g	345
AV00128	AV00128-SS	g*a*agcuugGuCaUcuauagac*a	262	AV00128-AS	u*G*ucauAgaugAcCaAgcu*u*c	346
AV00129	AV00129-SS	g*a*cuaccAaAuGcuggcuu*a	263	AV00129-AS	u*A*agccAgcauUuGgGuag*u*c	347
AV00130	AV00130-SS	g*u*acccaaAuGcUggcuuga*a	264	AV00130-AS	u*U*caagCcagcAuUuGggua*a*c	348
AV00131	AV00131-SS	g*a*cccaaaUgCuGcuugau*a	265	AV00131-AS	u*A*ucaaGccagCaUuUggg*u*c	349
AV00132	AV00132-SS	g*g*cuccuuAuUgUuauacga*a	266	AV00132-AS	u*U*cguaUaacaAuAaGgag*c*c	350
AV00133	AV00133-SS	g*g*ccuagaGgCuCcuuccga*a	267	AV00133-AS	u*U*cggaAggagCcUcUagg*c*c	351
AV00134	AV00134-SS	g*u*agaggcUcCuUccgaaca*a	268	AV00134-AS	u*U*guucGgaagGaGcCucu*a*c	352

AV00135	AV00135-SS	g*a*agcaccGaCuGagcaaag*a	269	AV00135-AS	u*C*uuugCucagUcGgUgcu*u*c	353
AV00136	AV00136-SS	c*g*agugcuAcCaUgguaaag*a	270	AV00136-AS	u*C*auuaCcaugGuAgCacu*c*g	354
AV00137	AV00137-SS	g*g*ugcuacCaUgGuaaugga*a	271	AV00137-AS	u*U*ccauUaccaUgGuAgca*c*c	355
AV00138	AV00138-SS	g*a*ccauggUaAuGgacagag*a	272	AV00138-AS	u*C*ucugUccauUaCcAugg*u*c	356
AV00139	AV00139-SS	g*u*gguaauGgAcAgaguau*a	273	AV00139-AS	u*A*uaacUcuguCcAuUacc*a*c	357
AV00140	AV00140-SS	g*g*guaaagGaCaGaguuauc*a	274	AV00140-AS	u*G*auaaCucugUcCaUuac*c*c	358
AV00141	AV00141-SS	c*u*aauggaCaGaGuuaucga*a	275	AV00141-AS	u*U*cgauAacucUgUcCauu*a*g	359
AV00142	AV00142-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	276	AV00142-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	360
AV00143	AV00143-SS	c*a*guuaucGaGgCacauacu*a	277	AV00143-AS	u*A*guauGugccUcGaUaac*u*g	361
AV00144	AV00144-SS	g*a*ccacggUaAuGgacagag*a	278	AV00144-AS	u*C*ucugUccauUaCcGugg*u*c	362
AV00145	AV00145-SS	g*a*cugcagGaAuCcagauc*c*a	279	AV00145-AS	u*G*gaucUggauUcCuGcag*u*c	363
AV00146	AV00146-SS	g*g*gcagccCcUuAuuguuau*a	280	AV00146-AS	u*A*uaacAauaaGgGgCugc*c*c	364
AV00147	AV00147-SS	g*a*gcccuUaUuGuuauacg*a	281	AV00147-AS	u*C*guauAacaaUaAgGggc*u*c	365
AV00148	AV00148-SS	g*c*agugucAgGuGggaguac*a	282	AV00148-AS	u*G*uacuCccacCuGaCacu*g*c	366
AV00149	AV00149-SS	c*u*acugcaAcCuGacacaua*a	283	AV00149-AS	u*A*uuguGucagGuUgCagu*a*g	367
AV00150	AV00150-SS	g*g*acacaaUgCuCagacgca*a	284	AV00150-AS	u*U*gcguCugagCaUuGugu*c*c	368
AV00151	AV00151-SS	g*u*agaggcUcCuUcugaaca*a	285	AV00151-AS	u*U*guucAgaagGaGcCucu*a*c	369
AV00152	AV00152-SS	c*a*ggcuccUuCuGaacaagc*a	286	AV00152-AS	u*G*cuugUucagAaGgAgcc*u*g	370
AV00153	AV00153-SS	g*a*agcaccAaCuGagcaaag*a	287	AV00153-AS	u*C*uuugCucagUuGgUgcu*u*c	371
AV00154	AV00154-SS	g*g*gaaugGaCaGaguuauc*a	288	AV00154-AS	u*G*auaaCucugUcCaUuuc*c*c	372
AV00155	AV00155-SS	c*a*aauggaCaGaGuuaucga*a	289	AV00155-AS	u*U*ugauAacucUgUcCauu*a*g	373
AV00156	AV00156-SS	g*g*gacagaGuUaUcaaggca*a	290	AV00156-AS	u*U*gccuUgauaAcUcUguc*c*c	374
AV00157	AV00157-SS	g*u*caagaaCuAcUgccgaaa*a	291	AV00157-AS	u*U*uucgGcaguAgUuCuug*a*c	375
AV00158	AV00158-SS	g*c*aagaacUaCuGccgaaau*a	292	AV00158-AS	u*A*uuucGgcagUaGuUcuu*g*c	376
AV00159	AV00159-SS	g*a*agaacuAcUgCcgaaau*c*a	293	AV00159-AS	u*G*auuuCggcaGuAgUucu*u*c	377
AV00160	AV00160-SS	g*a*cugccgAaAuCcagauc*c*a	294	AV00160-AS	u*G*gaucUggauUuGgGcag*u*c	378
AV00161	AV00161-SS	c*u*acugcaAcCuGacacgau*a	295	AV00161-AS	u*A*ucguGucagGuUgCagu*a*g	379
AV00162	AV00162-SS	g*g*acacgaUgCuCagaugca*a	296	AV00162-AS	u*U*gcguCugagCaUcGugu*c*c	380

AV00163	AV00163-SS	c*g*acugcuAcUaCcauuug*a	297	AV00163-AS	u*C*auaaUgguaGuAgCagu*c*g	381
AV00164	AV00164-SS	c*a*cugcuaCuAcCauuauug*a	298	AV00164-AS	u*C*cauaAugguAgUaGcag*u*g	382
AV00165	AV00165-SS	g*c*ugcuacUaCcAuauugga*a	299	AV00165-AS	u*U*ccauAugguUaGuAgca*g*c	383
AV00166	AV00166-SS	g*a*cuaccaUuAuGgacagag*a	300	AV00166-AS	u*C*ucugUccauAaUgGuag*u*c	384
AV00167	AV00167-SS	g*c*uugccaAgCuUggucauc*a	301	AV00167-AS	u*G*augaCcaagCuUgGcaa*g*c	385
AV00168	AV00168-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucauc*a	302	AV00168-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	386
AV00169	AV00169-SS	g*a*uagucgGaCcCcgaaaa*a	303	AV00169-AS	u*U*uuucUggggUcCgAcua*u*c	387
AV00170	AV00170-SS	g*c*aggaacUaCuGcaggaau*a	304	AV00170-AS	u*A*uuccUgcagUaGuUccu*g*c	388
AV00171	AV00171-SS	c*a*auccagAuGcUgagauuc*a	305	AV00171-AS	u*G*aaucUcagcAuCuGgau*u*g	389
AV00172	AV00172-SS	c*a*gauucgCcCuUgguguua*a	306	AV00172-AS	u*U*aacaCcaagGgCgAauc*u*g	390
AV00173	AV00173-SS	c*c*ccuuggUgUuAcaccaug*a	307	AV00173-AS	u*C*auggUguuaCaCcAagg*g*g	391
AV00174	AV00174-SS	g*u*ggugacAgAaUcaagugu*a	308	AV00174-AS	u*A*cacuUgauuCuGuCacc*a*c	392
AV00175	AV00175-SS	g*a*ucaaguGuCcUugcaacu*a	309	AV00175-AS	u*A*guugCaaggAcAcUuga*u*c	393
AV00176	AV00176-SS	c*g*gguccaGgAuUgcuacca*a	310	AV00176-AS	u*U*gguaGcaauCcUgGacc*c*g	394
AV00177	AV00177-SS	g*u*gucacaGgAaGgacaugu*a	311	AV00177-AS	u*A*caugUccuuCcUgUgac*a*c	395
AV00178	AV00178-SS	c*g*aaggacAuGuCagucuug*a	312	AV00178-AS	u*C*aagaCugacAuGuCcuu*c*g	396
AV00179	AV00179-SS	c*a*aggacaUgUcAgucuugg*a	313	AV00179-AS	u*C*caagAcugaCaUgUccu*u*g	397
AV00180	AV00180-SS	c*u*cagucuUgGuCcucuaug*a	314	AV00180-AS	u*C*auagAggacCaAgAcug*a*g	398
AV00181	AV00181-SS	c*u*ccuuggUgUuAuaccaug*a	315	AV00181-AS	u*C*auggUauaaCaCcAagg*a*g	399
AV00182	AV00182-SS	g*u*gguguuAuAcCauggauc*a	316	AV00182-AS	u*G*auccAugguAuAaCacc*a*c	400
AV00183	AV00183-SS	g*g*guguuaUaCcAuggaucc*a	317	AV00183-AS	u*G*gaucCauggUaUaAcac*c*c	401
AV00184	AV00184-SS	c*u*uauaccAuGgAucccaau*a	318	AV00184-AS	u*A*uuggGauccAuGgUaua*a*g	402
AV00185	AV00185-SS	g*a*uaccauGgAuCccaaugu*a	319	AV00185-AS	u*A*cauuGggauCcAuGgua*u*c	403
AV00186	AV00186-SS	g*c*cugacaCaAuGuccagug*a	320	AV00186-AS	u*C*acugGacauUgUgUcag*g*c	404
AV00187	AV00187-SS	g*g*acacaaUgUcCagugaca*a	321	AV00187-AS	u*U*gucaCuggaCaUuGugu*c*c	405
AV00188	AV00188-SS	g*a*auguccAgUgAcagauc*a	322	AV00188-AS	u*G*auucUgucaCuGgAcau*u*c	406
AV00189	AV00189-SS	g*a*uguccaGuGaCagaauc*a	323	AV00189-AS	u*U*gauuGugucAcUgGaca*u*c	407
AV00190	AV00190-SS	g*u*guccagUgAcAgaauca*a	324	AV00190-AS	u*U*ugauUcuguCaCuGgac*a*c	408

AV00191	AV00191-SS	g*g*uccaguGaCaGaaucag*a	325	AV00191-AS	u*C*uugaUucugUcAcUgga*c*c	409
AV00192	AV00192-SS	g*c*agugacAgAaUcaagugu*a	326	AV00192-AS	u*A*cacuUgauuCuGuCacu*g*c	410
AV00193	AV00193-SS	g*a*uucuccAcCaCuguuaca*a	327	AV00193-AS	u*U*guaaCagugGuGgAga*u*c	411
AV00194	AV00194-SS	g*c*caccacUgUuAcaggaag*a	328	AV00194-AS	u*C*uuccUguuaCaGuGgug*g*c	412
AV00195	AV00195-SS	g*a*cagaauAcUaCccaaug*a	329	AV00195-AS	u*C*auuuGgguaGuAuUcug*u*c	413
AV00196	AV00196-SS	g*c*agaauaCuAcCcaaugg*a	330	AV00196-AS	u*C*cauuUggguAgUaUucu*g*c	414
AV00197	AV00197-SS	g*g*auucgcCcUuGguguuau*a	331	AV00197-AS	u*A*uaacAccaaGgGcGaau*c*c	415
AV00198	AV00198-SS	c*a*uucgccCuUgGuguuaua*a	332	AV00198-AS	u*U*auaaCaccaAgGgCgaa*u*g	416
AV00199	AV00199-SS	g*u*cgcccuUgGuGuuauacc*a	333	AV00199-AS	u*G*guauAacacCaAgGgcg*a*c	417
AV00200	AV00200-SS	c*c*ccuuggUgUuAuaccaug*a	334	AV00200-AS	u*C*auggUauaaCaCcAagg*g*g	418
AV00201	AV00201-SS	g*g*auguccAgUgAcagauc*a	335	AV00201-AS	u*G*auucUgucaCuGgAcau*c*c	419
AV00202	AV00202-SS	g*c*agaggcUcCuUcugaaca*a	336	AV00202-AS	u*U*guucAgaagGaGcCucu*g*c	420
AV00203	AV00203-SS	g*a*ucuuggUcAuCuaugaua*a	337	AV00203-AS	u*U*aucaUagauGaCcAaga*u*c	421
AV00204	AV00204-SS	g*g*acacaaUgCuCagaaca*a	338	AV00204-AS	u*U*guuuCugagCaUuGugu*c*c	422
AV00205	AV00205-SS	c*c*agugcuAcCaUgguaaug*a	339	AV00205-AS	u*C*auuaCcaugGuAgCacu*g*g	423
AV01867	AV01867-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	702	AV01867-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	795
AV01868	AV01868-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*u	703	AV01868-AS	a*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	796
AV01869	AV01869-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*c	704	AV01869-AS	g*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	797
AV01870	AV01870-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*g	705	AV01870-AS	c*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	798
AV01871	AV01871-SS	g*u*uaUcGaGgcacaua*a	706	AV01871-AS	u*U*auguGccucGaUa*A*c	799
AV01872	AV01872-SS	a*g*uuaUcGaGgcacaua*a	707	AV01872-AS	u*U*auguGccucGaUaA*c*u	800
AV01873	AV01873-SS	a*a*guuaUcGaGgcacaua*a	708	AV01873-AS	u*U*auguGccucGaUaAc*u*u	801
AV01874	AV01874-SS	u*a*guuaUcGaGgcacaua*a	709	AV01874-AS	u*U*auguGccucGaUaAc*u*a	802
AV01875	AV01875-SS	g*a*guuaUcGaGgcacaua*a	710	AV01875-AS	u*U*auguGccucGaUaAc*u*c	803
AV01876	AV01876-SS	c*a*guuaUcGaGgcacaua*a	711	AV01876-AS	u*U*auguGccucGaUaAc*u*g	804
AV01877	AV01877-SS	a*g*aguuaUcGaGgcacaua*a	712	AV01877-AS	u*U*auguGccucGaUaAcu*c*u	805
AV01878	AV01878-SS	u*g*aguuaUcGaGgcacaua*a	713	AV01878-AS	u*U*auguGccucGaUaAcu*c*a	806
AV01879	AV01879-SS	g*g*aguuaUcGaGgcacaua*a	714	AV01879-AS	u*U*auguGccucGaUaAcu*c*c	807

AV01880	AV01880-SS	c*g*aguuaUcGaGgcacaua*a	715	AV01880-AS	u*U*auguGccucGaUaAcu*c*g	808
AV01881	AV01881-SS	u*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	716	AV01881-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*a	809
AV01882	AV01882-SS	c*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	717	AV01882-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*g	810
AV01883	AV01883-SS	a*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	718	AV01883-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*u	811
AV01884	AV01884-SS	a*c*agaguuaUcGaGgcacaua*a	719	AV01884-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucu*g* u	812
AV01885	AV01885-SS	g*a*cagaguuaUcGaGgcacaua* a	720	AV01885-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucug*u *c	813
AV01886	AV01886-SS	g*g*acagaguuaUcGaGgcacaua *a	721	AV01886-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucugu* c*c	814
AV01887	AV01887-SS	u*g*gacagaguuaUcGaGgcacau a*a	722	AV01887-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucuguc *c*a	815
AV01888	AV01888-SS	a*u*ggacagaguuaUcGaGgcaca ua*a	723	AV01888-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucugucc *a*u	816
AV01889	AV01889-SS	a*u*gguauggacagaguuaUcGa Ggcacaua*a	724	AV01889-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucugucc auuacc*a*u	817
AV01890	AV01890-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	725	AV01890-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucuc*u *u	818
AV01891	AV01891-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	726	AV01891-AS	u*U*auguGccucGaUaAcucuc*g *a	819
AV01892	AV01892-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	727	AV01892-AS	u*U*aug(uUNA)GccucGaUaAcu c*u*c	820
AV01893	AV01893-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	728	AV01893-AS	u*U*augu(gUNA)ccucGaUaAcu c*u*c	821
AV01894	AV01894-SS	g*a*gaguuaUCGaggcacaua*a	729	AV01894-AS	u*U*augUgccucgaUaAcuc*u*c	822
AV01895	AV01895-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcgcacaua*a	730	AV01895-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	823
AV01896	AV01896-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacauu*a	731	AV01896-AS	u*A*auguGccucGaUaAcuc*u*c	824
AV01897	AV01897-SS	g*a*gaguuaUcGaGgcacaua*a	732	AV01897-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	825

AV01898	AV01898-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	733	AV01898-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	826
AV01899	AV01899-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*u	734	AV01899-AS	a*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	827
AV01900	AV01900-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*c	735	AV01900-AS	g*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	828
AV01901	AV01901-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*g	736	AV01901-AS	c*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	829
AV01902	AV01902-SS	c*c*aaGcUuGgucaucu*a	737	AV01902-AS	u*A*gaugAccaaGcUu*G*g	830
AV01903	AV01903-SS	g*c*caaGcUuGgucaucu*a	738	AV01903-AS	u*A*gaugAccaaGcUuG*g*c	831
AV01904	AV01904-SS	a*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	739	AV01904-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*u	832
AV01905	AV01905-SS	u*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	740	AV01905-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*a	833
AV01906	AV01906-SS	g*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	741	AV01906-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*c	834
AV01907	AV01907-SS	c*g*ccaaGcUuGgucaucu*a	742	AV01907-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGg*c*g	835
AV01908	AV01908-SS	a*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	743	AV01908-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*u	836
AV01909	AV01909-SS	u*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	744	AV01909-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*a	837
AV01910	AV01910-SS	g*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	745	AV01910-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*c	838
AV01911	AV01911-SS	c*u*gccaaGcUuGgucaucu*a	746	AV01911-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgc*a*g	839
AV01912	AV01912-SS	u*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	747	AV01912-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*a	840
AV01913	AV01913-SS	c*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	748	AV01913-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*g	841
AV01914	AV01914-SS	a*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	749	AV01914-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*u	842
AV01915	AV01915-SS	a*c*uugccaaGcUuGgucaucu*a	750	AV01915-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaa*g* u	843
AV01916	AV01916-SS	a*a*cuugccaaGcUuGgucaucu* a	751	AV01916-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaag*u *u	844
AV01917	AV01917-SS	g*a*acuugccaaGcUuGgucaucu *a	752	AV01917-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaagu* u*c	845
AV01918	AV01918-SS	a*g*aacuugccaaGcUuGgucauc u*a	753	AV01918-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaaguu *c*u	846
AV01919	AV01919-SS	a*a*gaacuugccaaGcUuGgucau cu*a	754	AV01919-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaaguuc *u*u	847
AV01920	AV01920-SS	c*a*caggaagaacuugccaaGcUu	755	AV01920-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaaguuc	848

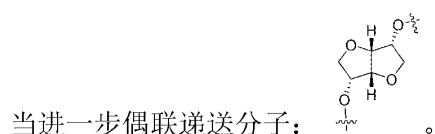
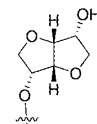
		Ggucaucu*a			uuccug*u*g	
AV01921	AV01921-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	756	AV01921-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaac*u*	849
					u	
AV01922	AV01922-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	757	AV01922-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgcaac*g*	850
					a	
AV01923	AV01923-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	758	AV01923-AS	u*A*gau(gUNA)AccaaGcUuGgc	851
					a*a*c	
AV01924	AV01924-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a	759	AV01924-AS	u*A*gaug(aUNA)ccaaGcUuGgc	852
					a*a*c	
AV01925	AV01925-SS	g*u*ugccaaGCUuggucaucu*a	760	AV01925-AS	u*A*gauGaccaagcUuGgca*a*c	853
AV01926	AV01926-SS	g*u*ugccaaGcUuGguuauucu*a	761	AV01926-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	854
AV01927	AV01927-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucc*a	762	AV01927-AS	u*G*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	855
AV01928	AV01928-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucauc*u*a	763	AV01928-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	856
AV01929	AV01929-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	764	AV01929-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	857
AV01930	AV01930-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*u	765	AV01930-AS	a*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	858
AV01931	AV01931-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*c	766	AV01931-AS	g*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	859
AV01932	AV01932-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*g	767	AV01932-AS	c*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	860
AV01933	AV01933-SS	g*a*caGaGuUaucgagg*a	768	AV01933-AS	u*C*cucgAuaacUcUg*U*c	861
AV01934	AV01934-SS	g*g*acaGaGuUaucgagg*a	769	AV01934-AS	u*C*cucgAuaacUcUgU*c*c	862
AV01935	AV01935-SS	a*g*gacaGaGuUaucgagg*a	770	AV01935-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUc*c*u	863
AV01936	AV01936-SS	u*g*gacaGaGuUaucgagg*a	771	AV01936-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUc*c*a	864
AV01937	AV01937-SS	g*g*gacaGaGuUaucgagg*a	772	AV01937-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUc*c*c	865
AV01938	AV01938-SS	c*g*gacaGaGuUaucgagg*a	773	AV01938-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUc*c*g	866
AV01939	AV01939-SS	a*u*ggacaGaGuUaucgagg*a	774	AV01939-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcc*a*u	867
AV01940	AV01940-SS	u*u*ggacaGaGuUaucgagg*a	775	AV01940-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcc*a*a	868
AV01941	AV01941-SS	g*u*ggacaGaGuUaucgagg*a	776	AV01941-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcc*a*c	869
AV01942	AV01942-SS	c*u*ggacaGaGuUaucgagg*a	777	AV01942-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcc*a*g	870
AV01943	AV01943-SS	u*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	778	AV01943-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*a	871

AV01944	AV01944-SS	g*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	779	AV01944-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*c	872
AV01945	AV01945-SS	a*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	780	AV01945-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*u	873
AV01946	AV01946-SS	u*g*auggacaGaGuUaucgagg*a	781	AV01946-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccau*c*a	874
AV01947	AV01947-SS	g*u*gauggacaGaGuUaucgagg*a	782	AV01947-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccauc*a*	875
AV01948	AV01948-SS	g*g*ugauggacaGaGuUaucgagg*a	783	AV01948-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccaucac*c	876
AV01949	AV01949-SS	u*g*gugauggacaGaGuUaucgagg*a	784	AV01949-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccaucac*c*a	877
AV01950	AV01950-SS	a*u*ggugauggacaGaGuUaucgagg*a	785	AV01950-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccaucacc*a*u	878
AV01951	AV01951-SS	g*c*uaccauggugauggacaGaGuUaucgagg*a	786	AV01951-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccaucacc*auggua*g*c	879
AV01952	AV01952-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	787	AV01952-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccaug*u*	880
AV01953	AV01953-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	788	AV01953-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUccaug*g*	881
AV01954	AV01954-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	789	AV01954-AS	u*C*cuc(gUNA)AuaacUcUgUccaug*a*u*g	882
AV01955	AV01955-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	790	AV01955-AS	u*C*cucg(aUNA)uaacUcUgUccaug*a*u*g	883
AV01956	AV01956-SS	c*a*uggacaGAGuaaucgagg*a	791	AV01956-AS	u*C*cucGuaaacucUgUcca*u*g	884
AV01957	AV01957-SS	c*a*uggacaGaGuUauugagg*a	792	AV01957-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	885
AV01958	AV01958-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgaga*a	793	AV01958-AS	u*U*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	886
AV01959	AV01959-SS	c*a*uggacaGaGuUaucgagg*a	794	AV01959-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	887

表 3 显示了本发明的某些化学修饰的 LPA RNAi 试剂反义链和正义链序列。在本发明方法的一些实施方案中，将表 3 中所示的 RNAi 试剂施用于细胞和/或对象。在本发明方法的一些实施方案中，将具有表 3 中所示多核苷酸序列的 RNAi 试剂施用于对象。在本发明的一些实施方案中，向对象施用的 RNAi 试剂包含在表 3 的第一列中标识的双链体，并且分别包含在表 3 中同一行第三列和第六列的正义和反义链序列中显示的序列修饰和/或递送化合物。该序列用于本文别处描述的某些体内测试研究。在本发明方法的一些实施方案中，表 3 中所示的序列可以连接到（在本文中也称为“缀合到”）用于递送的化合物上，其非限制性实例是含 GalNAc 的化合物，即在表 3 中第三列的正义链上具有标识为“GLX-n”的递送化合物。如本文所用和表 3 所示，“GLX-n”用于表示所连接的含 GalNAc 的化合物，其是化合物 GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-5、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、GLO-14、GLO-15 和 GLO-16 中的任一种。其中每一个的结构在本文别处提供。表 3 的第一列提供了分配给表中该行中的正义和反义序列的双链体的双链体 AD#。例如，双链体 AD00122 是正义链 AD00122-SS 和反义链 AD00122-AS 构成的双链体。表 3 中的每一行提供了一条正义链和一条反义链，并公开了所示正义链和反义链构成的双链体。表 3 第二列中的“正义链 SS#”是同一行第 3 列所示正义序列（包括修改）的指定标识符。表 3 第五列中的“反义链 AS#”是第六列中显示的反义序列（包括修饰）的指定标识符。某些所连接的含 GalNAc 的 GLO 化合物的标识符显示为 GLO-0，并且应当理解，GLO-n 或 GLS-n 化合物中的另一种可以替代显示为 GLO-0 的化合物，所得化合物也包括在本发明的方法和/或组合物的实施方案中。

表 3 提供了用于体内测试的化学修饰的 LPA RNAi 试剂反义链和正义链序列。所有序列都显示为 5'到 3'。这些序列用于本文别处描述的某些体内测试研究。体内研究中使用的递送分子在每条正义链的 3'末端表示为“GLO-0”。体内研究中使用的递送分子在每条正义链的 5'末端表示为“GLS-5”或者“GLS-15”。化学修饰表示为：大写：2'-氟；小写：2'-OMe；硫代

磷酸酯：*；开环核酸：UNA； invab = 反向无碱基； imann：在每条链末端时：



双链 体 AD#	正义链 SS#	正义序列	SE Q ID NO	反义链 AS#	反义序列	SE Q ID NO
AD00 149	AD0014 9-SS	c*a*gccccuUaUuGuuauacg*a(GLO-0)	424	AD0014 9-AS	u*C*guauAacaaUaAgGggc*u*g	469
AD00 150	AD0015 0-SS	a*g*uuaucgAgGcUcauucuc*a(GLO-0)	425	AD0015 0-AS	u*G*agaaUgagcCuCgAuaa*c*u	470
AD00 151	AD0015 1-SS	u*g*acacaaUgCuCagacgca*a(GLO-0)	426	AD0015 1-AS	u*U*gcguCugagCaUuGugu*c* a	471
AD00 331	AD0033 1-SS	g*a*cccaaaUgCuGgcuugau*a(GLO-0)	427	AD0033 1-AS	u*A*ucaaGccagCaUuUggg*u*c	472
AD00 332	AD0033 2-SS	g*g*guaaugGaCaGaguuauc*a(GLO-0)	428	AD0033 2-AS	u*G*auaaCucugUcCaUuac*c*c	473
AD00 333	AD0033 3-SS	c*u*aauggaCaGaGuuauacg*a(GLO-0)	429	AD0033 3-AS	u*U*cgauAacucUgUcCauu*a*g	474
AD00 334	AD0033 4-SS	c*a*guuauacGaGgCacauacu*a(GLO-0)	430	AD0033 4-AS	u*A*guauGugccUcGaUaac*u*g	475
AD00 335	AD0033 5-SS	c*u*acugcaAcCuGacacaa*a(GLO-0)	431	AD0033 5-AS	u*A*uuguGucagGuUgCagu*a* g	476
AD00 336	AD0033 6-SS	c*g*acugcuAcUaCcauuaug*a(GLO-0)	432	AD0033 6-AS	u*C*auaaUgguaGuAgCagu*c*g	477
AD00 337	AD0033 7-SS	g*u*ugccaaGcUuGgucaucu*a(GLO-0)	433	AD0033 7-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	478
AD00 338	AD0033 8-SS	c*a*gauucgCcCuUgguguua*a(GLO-0)	434	AD0033 8-AS	u*U*aacaCcaagGgCgAauc*u*g	479
AD00 339	AD0033 9-SS	c*g*aaggacAuGuCagucuug*a(GLO-0)	435	AD0033 9-AS	u*C*aagaCugacAuGuCcuu*c*g	480

AD00 340	AD0034 0-SS	c*u*ccuuggUgUuAuaccaug*a(GLO-0)	436	AD0034 0-AS	u*C*auggUauaaCaCcAagg*a*g	481
AD00 341	AD0034 1-SS	c*c*ccuuggUgUuAuaccaug*a(GLO-0)	437	AD0034 1-AS	u*C*auggUauaaCaCcAagg*g*g	482
AD00 342	AD0034 2-SS	g*g*acacaaUgCuCagaaaca*a(GLO-0)	438	AD0034 2-AS	u*U*guuuCugagCaUuGugu*c* c	483
AD00 433	AD0043 3-SS	(GLS-5)*(Invab)*cugauggaCaGaGuuau cgaa*(Invab)	439	AD0043 3-AS	u*U*cgauAacucUgUcCauc*a*g	484
AD00 434	AD0043 4-SS	(GLS-5)*(Invab)*ggcuccuuAuUgUuaua cgaa*(Invab)	440	AD0043 4-AS	u*U*cguaUaacaAuAaGgag*c*c	485
AD00 435	AD0043 5-SS	(GLS-5)*(Invab)*gaagcaccAaCuGagca aaga*(Invab)	441	AD0043 5-AS	u*C*uuugCucagUuGgUgcu*u* c	486
AD00 436	AD0043 6-SS	(GLS-5)*(Invab)*gggaaaugGaCaGaguu auca*(Invab)	442	AD0043 6-AS	u*G*auaaCucugUcCaUuuc*c*c	487
AD00 437	AD0043 7-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcugcuacUaCcAuaua ggaa*(Invab)	443	AD0043 7-AS	u*U*ccauAauggUaGuAgca*g*c	488
AD00 438	AD0043 8-SS	(GLS-5)*(Invab)*cauuccagAuGcUgaga uuca*(Invab)	444	AD0043 8-AS	u*G*aaucUcagcAuCuGgau*u*g	489
AD00 439	AD0043 9-SS	(GLS-5)*(Invab)*gauucuccAcCaCuguu acaa*(Invab)	445	AD0043 9-AS	u*U*guaaCagugGuGgAgaa*u* c	490
AD00 440	AD0044 0-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcagaaCuAcCcaaa ugga*(Invab)	446	AD0044 0-AS	u*C*cauuUggguAgUaUucu*g* c	491
AD00 441	AD0044 1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ggauucgcCcUuGugugu uaua*(Invab)	447	AD0044 1-AS	u*A*uaacAccaaGgGcGaauc*c*c	492
AD00 442	AD0044 2-SS	(GLS-5)*(Invab)*cauucgccCuUgGuguu auaa*(Invab)	448	AD0044 2-AS	u*U*auaaCaccaAgGgCgaa*u*g	493
AD00 474	AD0047 4-SS	(GLS-15)*(Invab)*cauggacaGaGuUauc gagga*(Invab)	449	AD0047 4-AS	u*C*cuCg(aUNA)uacUcUgUc ca*u*g	494

AD00 475	AD0047 5-SS	(GLS-15)*(Invab)*gcugccaaGcUuGguc aucua*(Invab)	450	AD0047 5-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*g*c	495
AD00 476	AD0047 6-SS	(GLS-15)*(Invab)*cccaagcuUgGuCauc uauga*(Invab)	451	AD0047 6-AS	u*C*auagAugacCaAgCuug*g*g	496
AD00 477	AD0047 7-SS	(GLS-15)*(Invab)*ggugcuacCaUgGuaa uggaa*(Invab)	452	AD0047 7-AS	u*U*ccauUaccaUgGuAgca*c*c	497
AD00 478	AD0047 8-SS	(GLS-15)*(Invab)*gaccauggUaAuGgac agaga*(Invab)	453	AD0047 8-AS	u*C*ucUg(uUNA)ccauUaCcAu gg*u*c	498
AD00 479	AD0047 9-SS	(GLS-15)*(Invab)*gugguauGgAcAga guuaua*(Invab)	454	AD0047 9-AS	u*A*uaacUcuguCcAuUacc*a*c	499
AD00 480	AD0048 0-SS	(GLS-15)*(Invab)*gagaguuaUcGaGgca cauaa*(Invab)	455	AD0048 0-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	500
AD00 481	AD0048 1-SS	(GLS-15)*(Invab)*caauggaCaGaGuua ucaaa*(Invab)	456	AD0048 1-AS	u*U*ugauAacucUgUcCauu*u* g	501
AD00 482	AD0048 2-SS	(GLS-15)*(Invab)*gggacagaGuUaUcaa ggcaa*(Invab)	457	AD0048 2-AS	u*U*gcCu(uUNA)gauaAcUcUg uc*c*c	502
AD00 483	AD0048 3-SS	(GLS-15)*(Invab)*gaucaaguGuCcUugc aacua*(Invab)	458	AD0048 3-AS	u*A*guugCaaggAcAcUuga*u* c	503
AD00 484	AD0048 4-SS	(GLS-15)*(Invab)*cggguccaGgAuUgcu accaa*(Invab)	459	AD0048 4-AS	u*U*ggUa(gUNA)caauCcUgGa cc*c*g	504
AD00 485	AD0048 5-SS	(GLS-15)*(Invab)*gugucacaGgAaGgac auga*(Invab)	460	AD0048 5-AS	u*A*caugUccuuCcUgUgac*a*c	505
AD00 486	AD0048 6-SS	(GLS-15)*(Invab)*gauguccaGuGaCaga aucaa*(Invab)	461	AD0048 6-AS	u*U*gauuCugucAcUgGaca*u*c	506
AD00 487	AD0048 7-SS	(GLS-15)*(Invab)*gcagaggcUcCuUcug aacia*(Invab)	462	AD0048 7-AS	u*U*guucAgaagGaGcCucu*g*c	507
AD00 474-1	AD0047 4-1-SS	(GLS-15)*(Invab)*cauggacaGaGuUauc gagga*(Invab)	463	AD0047 4-1-AS	u*C*cucgAuaacUcUgUcca*u*g	508

AD00 478-1	AD0047 8-1-SS	(GLS-15)*(Invab)*gaccauggUaAuGgac agaga*(Invab)	464	AD0047 8-1-AS	u*C*ucugUccauUaCcAugg*u*c	509
AD00 482-1	AD0048 2-1-SS	(GLS-15)*(Invab)*gggacagaGuUaUcaa ggcaa*(Invab)	465	AD0048 2-1-AS	u*U*gccuUgauaAcUcUguc*c*c	510
AD00 484-1	AD0048 4-1-SS	(GLS-15)*(Invab)*cggguccaGgAuUgcu accaa*(Invab)	466	AD0048 4-1-AS	u*U*gguaGcaauCcUgGacc*c*g	511
AD00 337-1	AD0033 7-1-SS	(GLS-15)*(Invab)*guugccaaGcUuGguc aucua*(Invab)	467	AD0033 7-1-AS	u*A*gaugAccaaGcUuGgca*a*c	512
AD00 436-1	AD0043 6-1-SS	(GLS-15)*(Invab)*gggaaugGaCaGagu uauca*(Invab)	468	AD0043 6-1-AS	u*G*auaaCucugUcCaUuuc*c*c	513
AD00 474-2	AD0047 4-2-SS	(GLS-15)*(Invab)*gauggacaGaGuuAuc gagg*u*(Invab)	888	AD0047 4-2-AS	a*C*cuCg(aUNA)uacUcUguc Ca*u*c	892
AD00 480-8	AD0048 0-8-SS	(GLS-15)*(Imann)*gagaguuaUcGaGgc acaua*a*(Imann)	889	AD0048 0-8-AS	u*U*auguGccucGaUaAcuc*u*c	893
AD00 480-1	AD0048 0-1-SS	(GLS-15)*(Invab)*gagaguuaUcGagGca caua*a*(Invab)	890	AD0048 0-1-AS	u*U*augugccucGaUaacuc*u*c	894
AD00 480-2	AD0048 0-2-SS	(GLS-15)*(Invab)*gagaguuaU*cGagG* cacaua*a*(Invab)	891	AD0048 0-2-AS	u*U*augugccucG*aU*aacuc*u* c	895

错配

本领域技术人员已知，对于 dsRNA 的功效而言，错配是可以容忍的，尤其是错配在 dsRNA 的末端区域内的情况。某些错配具有更好的耐受性，例如具有摆动碱基对 G:U 和 A:C 的错配对功效的耐受性更好（Du et al., A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. Nucleic Acids Res. 2005 Mar 21;33(5):1671-7. Doi: 10.1093/nar/gki312. Nucleic Acids Res. 2005;33(11):3698）。本发明的方法和化合物的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂可以含有一个或更多个与 LPA 靶序列的错配。在一些实施方案中，本发明的 LPA dsRNA 试剂不包含错配。在某些实施方案中，本发明的 LPA dsRNA 试剂包含不超过 1 个错配。在一些实施方案中，本发明的 LPA dsRNA 试剂包含不超过 2 个错配。在某些实施方案中，本发明的 LPA dsRNA 试剂包含不超过 3 个错配。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂的反义链包含与不位于互补区域中心的 LPA

靶序列的错配。在一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂的反义链包含 1、2、3、4 或更多个错配，其位于互补区域的 5'或 3'末端之一或两者的最末 5、4、3、2 或 1 个核苷酸内。本文所述的方法和/或本领域已知的方法可用于确定包含与 LPA 靶序列错配的 LPA dsRNA 试剂是否有效抑制 LPA 基因的表达。

5

互补性

如本文所用，除非另有说明，否则术语“互补性/互补”当用于描述第一核苷酸序列（例如，LPA dsRNA 试剂正义链或靶标 LPA mRNA）与第二核苷酸序列（例如，LPA dsRNA 试剂反义链或单链反义多核苷酸）的相关性时，是指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交[在哺乳动物生理条件（或体外类似条件）下形成碱基对间氢键]、并且在某些条件下形成双螺旋或双螺旋结构的能力。其中也可以应用其他条件，例如在生物体内可能遇到的生理相关条件。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用确定最适合测试两个序列互补性的条件集。互补序列包括沃森-克里克碱基对或非沃森-克里克碱基对，并且包括天然或修饰的核苷酸或核苷酸模拟物，只要至少达到上述杂交要求的程度即可。序列同一性或互补性与修饰无关。

例如，在如本文所述的 LPA dsRNA 内的互补序列包含含有第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在一个或两个核苷酸序列的全长上的碱基配对。此类序列在本文中可被称为彼此“完全互补”。应当理解，在设计两个寡核苷酸以在杂交时形成一个或更多个单链突出端的实施方案中，这种突出端在本文中不被视为基于互补性确定的错配。例如，LPA dsRNA 试剂包含一个长度为 19 个核苷酸的寡核苷酸和另一个长度为 20 个核苷酸的寡核苷酸，其中较长的寡核苷酸包含与较短的寡核苷酸完全互补的 19 个核苷酸的序列，出于本文所述的目的，此种情况可以称为“完全互补”。因此，如本文所用，“完全互补”是指第一多核苷酸的连续序列中的所有（100%）碱基会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部分。

如本文所用，术语“基本互补”是指在核碱基序列的杂交对中，第一多核苷酸的连续序列中的碱基的至少约 85%（但不是全部）会与第二多核苷酸的连续序列中相同数目的碱基杂交。如果两个序列在杂交时包含一个或更多个错配碱基对，例如至少 1、2、3、4 或 5 个错配碱基对，则可以使用术语“基本上互补”来指第一序列相对于第二序列形成多达 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个碱基对(bp)的双链体，同时保留在与其最终应用最相关的条件下杂交的能力，例如，通过 RISC 途径抑制 LPA 基因表达。术语“部分互补”在本文中可用于指核碱基序列的杂交对中，第一多核苷酸的连续序列中碱基的至少 75%（但不是全部）会与第二多核苷酸的连续序列中相同数目的碱基杂交。在一

些实施方案中，“部分互补”是指第一多核苷酸的连续序列中至少 76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的碱基会与第二多核苷酸的连续序列中相同数量的碱基杂交。

5 术语“互补”、“完全互补”、“基本互补”和“部分互补”在本文中使用时可用于指 LPA dsRNA 试剂的正义链与反义链之间的碱基匹配、LPA dsRNA 试剂的反义链与靶 LPA mRNA 的序列之间的碱基匹配，或单链反义寡核苷酸与靶 LPA mRNA 序列之间的碱基匹配。应当理解，术语“LPA dsRNA 试剂的反义链”可以指与“LPA 反义多核苷酸试剂”相同的序列。

10 如本文所用，在提及核酸序列时使用的术语“基本相同”或“基本同一性”是指核酸序列与参考序列相比，包含具有至少约 85%或更高序列同一性的序列，优选至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性。序列同一性的百分比通过在比对窗口上比较两个序列的最佳比对来确定。百分比是通过以下方式计算的：确定在两个序列中出现相同核酸碱基的位置数以产生匹配位置的数量；将匹配位置的数量除以比对窗口中的位置总数，然后将结果乘以 100，从而得出序列同
15 一性的百分比。本文公开的发明包括与本文公开（例如，在表 1-5 中）的那些基本相同的核苷酸序列。在一些实施方案中，所述核苷酸序列与本文公开（例如，在表 1-3 中）的序列完全相同，或具有至少约 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性。

20 如本文所用，术语“包含序列的链”是指包含核苷酸链的寡核苷酸，所述核苷酸链由使用标准核苷酸命名法指代的序列描述。如本文所用，术语“双链 RNA”或“dsRNA”指包含 RNA 分子或 RNAi 分子复合物的序列，所述分子或复合物具有包含两条反向平行且基本或完全互补的核酸链的杂交双链区，其分别被称为相对于靶 LPA RNA 具有“正义”和“反义”方向。双链区可以具有允许通过 RISC 途径特异性降解靶标 LPA RNA 的任何所需长度，但通常长度为 9 至 30 个碱基对，例如长度为 15-30 个碱基对。考虑到 9 到 30 个碱基对之间的双链体，
25 双链体可以是此范围内的任何长度，例如，9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个碱基对，以及其中的任何子范围，包括但不限于 15-30 个碱基对、15-26 个碱基对；15-23 碱基对、15-22 碱基对、15-21 碱基对、15-20 碱基对、15-19 碱基对、15-18 碱基对、15-17 碱基对、18-30 个碱基对、18-26 个碱基对、18-23 个碱基对、18-22 个碱基对、18-21 个碱基对、18-20 个碱基对、19-30 个碱基对、
30 19-26 个碱基对、19-23 个碱基对、19-22 个碱基对、19-21 个碱基对、19-20 个碱基对、20-30 个碱基对、20-26 个碱基对、20-25 个碱基对、20-24 个碱基对、20-23 个碱基对、20-22 个碱基对、20-21 个碱基对、21-30 个碱基对、21-26 个碱基对、21-25 个碱基对、21-24 个碱基对、21-23 个碱基对或 21-22 个碱基对。通过用切丁酶和类似酶加工在细胞中产生的 LPA dsRNA

试剂的长度通常在 19-22 个碱基对的范围内。LPA dsDNA 剂的双链区的一条链包含与靶 LPA RNA 的区域基本互补的序列。形成双链体结构的两条链可以来自具有至少一个自身互补区的单个 RNA 分子，或者可以由两个或更多个单独的 RNA 分子形成。在双链区由单个分子形成的情况下，该分子可以具有由单链核苷酸链在 3'-末端的一条链和相应的 5'-末端的另一条链形成的双链体结构（本文称为“发夹环”）。在本发明的一些实施方案中，发夹构型包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个或多个未配对的核苷酸。当 LPA dsRNA 试剂的基本互补的两条链由单独的 RNA 分子组成时，这些分子不需要共价连接，但也可以共价连接。当两条链通过发夹环以外的方式共价连接时，连接结构被称为“接头”。术语“siRNA”在本文中也用于指如本文所述的 dsRNA 试剂。

在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂可以包含在 dsRNA 试剂的一个或两个末端具有未配对核苷酸或核苷酸类似物的正义和反义序列。没有未配对核苷酸的末端被称为“平末端”并且没有核苷酸突出端。如果 dsRNA 试剂的两端都是平末端，则 dsRNA 被称为“平末端的”。在本发明的一些实施方案中，dsRNA 试剂的第一末端是平末端的，在一些实施方案中，dsRNA 试剂的第二末端是平末端的，并且在本发明的某些实施方案中，LPA dsRNA 试剂的两个末端都是平末端的。

在本发明的 dsRNA 试剂的一些实施方案中，dsRNA 不具有一个或两个平末端。在这种情况下，在 dsRNA 试剂的一条链的末端有至少一个未配对的核苷酸。例如，当 dsRNA 一条链的 3'-末端延伸超出另一条链的 5'-末端时，则存在核苷酸突出端，反之亦然。dsRNA 可包含至少 1、2、3、4、5、6 或更多个核苷酸的突出端。核苷酸突出端可包含核苷酸/核苷类似物或由其组成，包括脱氧核苷酸/核苷。应当理解，在一些实施方案中，核苷酸突出端在 dsRNA 试剂的正义链上、在 dsRNA 试剂的反义链上，或在 dsRNA 试剂的两端，突出端的核苷酸可存在于 dsRNA 的反义链或正义链的 5' 端、3' 端或两端。在本发明的某些实施方案中，突出端中的一个或多个核苷酸被核苷硫代磷酸酯替换。

如本文所用，术语“反义链”或“引导链”是指包含与 LPA 靶序列基本互补的区域的 LPA dsRNA 试剂的链。如本文所用，术语“正义链”或“过客链”是指包含与 LPA dsRNA 试剂的反义链的区域基本互补的区域的 LPA dsRNA 试剂的链。

修饰

在本发明的一些实施方案中，LPA RNAi 剂的 RNA 被化学修饰以获得增强的稳定性和/或一种或更多种其他有益特性。本发明的某些实施方案中的核酸可以通过本领域公知的方法合成和/或修饰，例如，见 “Current protocols in Nucleic Acid Chemistry,” Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA，其作为参考在此并入本文。可以存在于

本发明的 LPA dsRNA 试剂的某些实施方案中的修饰包括例如：(a) 末端修饰，例如 5' 端修饰（磷酸化、缀合、反向连接等）、3' 端修饰（缀合、DNA 核苷酸、反向连接等）；(b) 碱基修饰，例如用稳定碱基、去稳定碱基或与扩展的配偶体库进行碱基配对的碱基替换、缺失碱基（无碱基核苷酸）或缀合碱基；(c) 糖修饰（例如，在 2' 位置或 4' 位置）或糖的替换；以及 (d) 骨架修饰，包括磷酸二酯键的修饰或替换。在本发明的 LPA dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和 LPA 正义多核苷酸的某些实施方案中可用的 RNA 化合物的具体实例包括但不限于包含修饰骨架或没有天然核苷间键联的 RNA。作为非限制性实例，具有骨架修饰的 RNA 在骨架中可以不具有磷原子。在其核苷间骨架中没有磷原子的 RNA 可称为寡核苷。在本发明的某些实施方案中，修饰的 RNA 在其核苷间骨架中具有磷原子。

应当理解，术语“RNA 分子”或“RNA”或“核糖核酸分子”不仅包括在自然界中表达或发现的 RNA 分子，还包括 RNA 的类似物和衍生物，其包含一种或更多种如本文所述或本领域已知的核糖核苷酸/核糖核苷类似物或衍生物。术语“核糖核苷”和“核糖核苷酸”在本文中可互换使用。RNA 分子可以在核碱基结构或核糖-磷酸骨架结构中进行修饰（例如，如下文所述），并且包含核糖核苷类似物或衍生物分子必须保留形成双链体的能力。作为非限制性实例，RNA 分子还可包含至少一种修饰的核糖核苷，其包括但不限于 2'-O-甲基修饰的核苷、包含 5' 硫代磷酸酯基团的核苷、与胆固醇衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团相连的末端核苷、锁核苷、无碱基核苷、2'-脱氧-2'-氟修饰的核苷、2'-氨基修饰的核苷、2'-烷基修饰的核苷、吗啉代核苷、氨基磷酸酯或包含核苷的非天然碱基，或其任何组合。在本发明的一些实施方案中，RNA 分子包含以下数量的修饰的核糖核苷：至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或长达 LPA dsRNA 试剂分子的核糖核苷的全长。对于这种 RNA 分子中的多个修饰的核糖核苷中的每一个，修饰不必相同。

在一些实施方案中，本发明的 dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸可以包含一个或更多个独立选择的修饰核苷酸和/或一个或更多个独立选择的非磷酸二酯键。本文所用的术语“独立选择”用于指选定的要素，例如修饰的核苷酸、非磷酸二酯键等，是指两个或更多个选定的要素可以彼此相同但不必彼此相同。如本文所用，“核苷酸碱基”、“核苷酸”或“核碱基”是杂环嘧啶或嘌呤化合物，其是所有核酸的标准成分，并且包括形成核苷酸的碱基：腺嘌呤 (a)、鸟嘌呤 (g)、胞嘧啶 (c)、胸腺嘧啶 (t) 和尿嘧啶 (u)。核碱基可进一步修饰以包括（但不旨在限制）：通用碱基、疏水性碱基、混杂碱基、尺寸扩大的碱基和氟化碱基。术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”在本文中可用于指未修饰的核苷酸、修饰的核苷酸或替代部分。本领域技术人员将认识到，鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤和尿嘧啶可以被其他部分替换，而不会显著改变包含带有这种替换部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对特性。

在一个实施方案中，预期用于本文所述的方法和组合物中的修饰的 RNA 是肽核酸（PNA），其具有形成所需双链体结构并且允许或介导靶 RNA 经由 RISC 途径的特异性降

解的能力。在本发明的某些实施方案中，LPA RNA 干扰剂包括与靶 LPA RNA 序列相互作用以指导靶 LPA RNA 切割的单链 RNA。

修饰的 RNA 骨架可以包含例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯（包括 3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯）、次磷酸酯、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）、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯，和硼酸磷酸酯（其具有正常 3'-5' 连接的，以及这些的 2'-5'连接类似物，以及具有倒置极性的那些，其中相邻的核苷单元对以 3'-5'至 5'-3'或 2'-5'至 5'-2'形式连接）。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。制备含磷键的方法是本领域的常规实施手段，并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的 LPA dsRNA 试剂、某些修饰的 LPA 反义多核苷酸和/或某些修饰的 LPA 正义多核苷酸。

其中不包含磷原子的修饰的 RNA 骨架具有由短链烷基或环烷基核苷间键联、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键联、或一个或更多个短链杂原子或杂环核苷间键联形成的骨架。其包括具有吗啉键的那些（部分由核苷的糖部分形成）；硅氧烷骨架；硫化物、亚砷和砷骨架；甲乙酰和硫甲乙酰骨架；亚甲基甲乙酰和硫甲乙酰骨架；含有烯烃的骨架；氨基磺酸盐骨架；亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架；磺酸盐和磺酰胺骨架；酰胺骨架；以及其他混合有 N、O、S 和 CH₂ 成分的部分。制备不含磷原子的修饰的 RNA 骨架的方法在本领域中是常规实践，并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的 LPA dsRNA 试剂、某些修饰的 LPA 反义多核苷酸和/或某些修饰的 LPA 正义多核苷酸。

在本发明的某些实施方案中，RNA 模拟物被包括在 LPA dsRNA、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸中，例如但不限于用新基团替换核苷酸单元的糖和核苷间键联（即骨架）。在此类实施方案中，保持碱基单位以与合适的 LPA 核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物（已被证明具有优异杂交特性的 RNA 模拟物），被称为肽核酸（PNA）。在 PNA 化合物中，RNA 的糖骨架被含有酰胺的骨架，特别是氨乙基甘氨酸骨架取代。核碱基被保留并直接或间接地与骨架酰胺部分的氮杂氮原子结合。制备 RNA 模拟物的方法是本领域常规实践的，并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的 LPA dsRNA 试剂。

本发明的一些实施方案包括具有硫代磷酸酯骨架的 RNA 和具有杂原子骨架的寡核苷，特别是-CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[称为亚甲基（甲基亚氨基）或 MMI 骨架]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--以及--N(CH₃)--CH₂---[其中天然磷酸二酯骨架表示为--O--P--O--CH₂--]。制备具有硫代磷酸酯骨架的 RNA 和具有杂原子骨架的寡核苷的方法是本领域常规实践的，并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的 LPA dsRNA 试剂、某些 LPA 反义多核苷酸和/或某些 LPA 正义多核苷酸。

修饰的 RNA 还可以包含一个或更多个取代的糖部分。本发明的 LPA dsRNA、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸可在 2'位置包含以下之一：OH；F；O--、S--、或 N-

烷基；O--、S--或N-烯基；O-、S-或N-炔基；或O-烷基-O-烷基，其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。示例性的合适的修饰包括：
O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、以及
O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂，其中n和m为1至约10。在其他实施方案中，dsRNA在2'位置
5 包括以下之一：C₁至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳
烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、
NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基；取代的甲硅烷基、RNA裂解
基团、报告基团、嵌入剂；用于改善LPA dsRNA试剂的药代动力学特性的基团；或用于改
善LPA dsRNA试剂、LPA反义多核苷酸和/或LPA正义多核苷酸的药效学特性的基团，和
10 其他具有类似性质的取代基。在一些实施方案中，修饰包括2'-甲氧基乙氧基
(2'-O--CH₂CH₂OCH₃，也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin et al., Helv. Chim. Acta,
1995, 78:486-504)，即烷氧基-烷氧基。另一种示例性修饰是2'-二甲氨基乙氧基乙氧基，即
O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团，也称为2'-DMAOE，如下文实施例中所述；以及2'-二甲氨基乙氧基
基乙氧基（在本领域中也称为2'-O-二甲氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE），即
15 2'-O--CH₂-O--CH₂--N(CH₂)₂。制备所描述的那些的修饰RNA的方法是本领域常规实践的，
并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的LPA dsRNA试剂。

其他修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-
氟(2'-F)。类似的修饰也可以在本发明的LPA dsRNA试剂、LPA反义多核苷酸的RNA上的
20 的其他位置、LPA正义多核苷酸和/或LPA正义多核苷酸的其他位置，特别是3'末端核苷酸
上或2'-5'连接的LPA dsRNA、LPA反义多核苷酸或LPA正义多核苷酸中的糖的3'位置、和
5'末端核苷酸的5'位置进行。LPA dsRNA试剂、LPA反义多核苷酸和/或LPA正义多核苷酸
也可以具有糖模拟物，例如代替呋喃戊糖的环丁基部分。制备例如所描述的那些的修饰RNA
的方法是本领域常规实践的，并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的LPA dsRNA试
剂、LPA反义多核苷酸和/或LPA正义多核苷酸。

25 在一些实施方案中，LPA dsRNA试剂、LPA反义多核苷酸和/或LPA正义多核苷酸可
以包括核碱基（在本领域中通常简称为“碱基”）修饰或取代。如本文所用，“未修饰的”或“天
然”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)，以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿
嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他合成和天然核碱基，例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟
甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基和其他腺嘌呤和鸟嘌呤的烷基衍生
30 物、2-丙基和其他腺嘌呤和鸟嘌呤的烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、
5-卤尿嘧啶和胞嘧啶、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、5-尿
嘧啶（假尿嘧啶）、4-硫尿嘧啶；8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基以及其他
8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤；5-卤代，特别是5-溴、5-三氟甲基和其他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、7-氮杂鸟嘌呤和7-氮杂

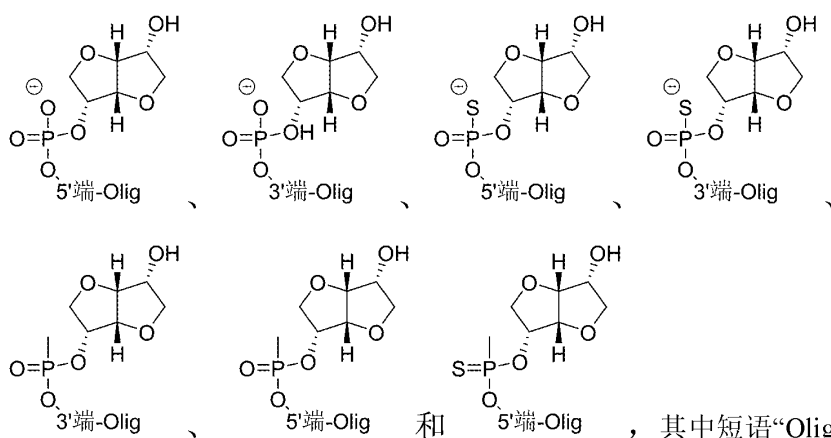
腺嘌呤以及 3-氮杂鸟嘌呤和 3-氮杂腺嘌呤。可以包含在本发明的 LPA dsRNA 试剂的某些实施方案中的另外的核碱基是本领域已知的，参见例如：Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. Ed. Wiley-VCH, 2008; The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., Ed. John Wiley & Sons, 1990, English et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993。制备包含核碱基修饰和/或取代的 dsRNA、LPA 反义链多核苷酸和/或 LPA 正义链多核苷酸(例如本文所述的那些)的方法是本领域常规实践的，并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的 LPA dsRNA 试剂、LPA 正义多核苷酸和/或 LPA 反义多核苷酸。

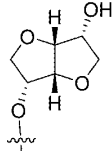
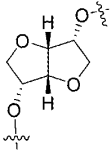
本发明的 LPA dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸的某些实施方案包括经修饰以包括一种或更多种锁核酸 (LNA) 的 RNA。锁核酸是具有这样的修饰核糖部分的核苷酸，其包含额外的连接 2' 和 4' 碳的桥。这种结构有效地将核糖“锁定”在 3'-内结构构象中。在本发明的 LPA dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸中添加锁核酸可以增加血清中的稳定性，并减少脱靶效应 (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, O R. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。制备包含锁核酸的 dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸的方法是本领域常规实施的，并且此类方法可用于制备本发明的某些修饰的 LPA dsRNA 试剂。本发明的 LPA dsRNA 化合物、正义多核苷酸和/或反义多核苷酸的某些实施方案包括至少一种修饰的核苷酸，其中所述至少一种修饰的核苷酸包含：2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2',3'-seco 核苷酸模拟物、锁核苷酸、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸和 3'-Ome 核苷酸、包含 5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸，或与胆固醇衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、氨基磷酸酯或包含核苷酸的非天然碱基。在一些实施方案中，LPA dsRNA 化合物在反义链（在本文中也称为引导链）的 5' 末端处包含 E-乙基膦酸酯核苷酸。

本发明的某些实施方案中，在 LPA dsRNA 化合物、正义多核苷酸的 3' 和 5' 末端和/或反义多核苷酸的 3' 末端包含至少一种修饰的核苷酸，其中至少一种修饰的核苷酸包括：无碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向 2'-OMe 核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸。本领域技术人员已知，在寡核苷酸末端包含无碱基或反向无碱基核苷酸可增强稳定性 (Czaderna et al. Structural variations and stabilizing modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 2003;31(11):2705-2716. doi:10.1093/nar/gkg393)。

本发明的某些实施方案中，在 LPA dsRNA 在正义链的 3' 和 5' 末端包含一个或两个异甘露醇残基。在某些实施方案中，正义链在 3' 或和 5' 末端分别独立地包含一个异甘露醇残基。

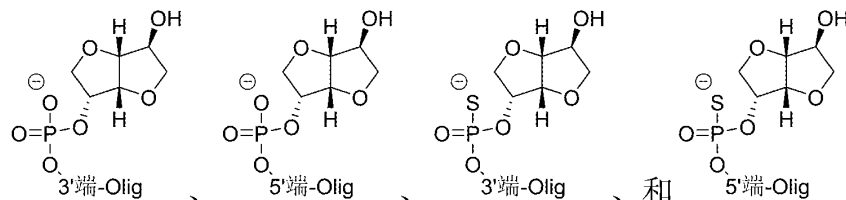
包含异甘露醇残基具有以下示例:



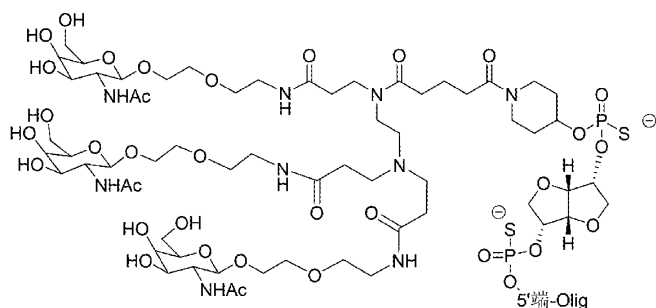
其中短语“Olig”各自独立地代表多核苷酸部分。 示例性异甘露醇残基 (imann) 包括但不限于以下:  or 

5

在某些实施方案中, 异甘露醇残基还可以使用其立体异构体替代, 非限制性



的示例性: 3'端-Olig, 5'端-Olig, 3'端-Olig, 和 5'端-Olig。在某些实施方案中, 正义链在 3'和 5'末端分别独立地包含一个异甘露醇残基 (imann), 进一步包含 5'-末端缀合的靶向基团, 例如, 靶向基团 N-乙酰-半乳糖胺, 优选为上述 GLS-15, 示例性结构如下: .



10

, 其中短语“Olig”各自独立地代表多核

苷酸部分。

本发明的某些实施方案中, LPA dsRNA 化合物、反义多核苷酸包含至少一种修饰的核

苷酸，其中所述至少一种修饰的核苷酸包含开环核酸核苷酸（UNA）或/和二醇核酸核苷酸（GNA）。本领域技术人员已知，UNA 和 GNA 是热不稳定化学修饰，可以显著改善 siRNA 化合物的脱靶谱（Janas, et al., Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. Nat Commun. 2018;9(1):723. doi:10.1038/s41467-018-02989-4; Laursen et al., Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo. Mol BioSyst. 2010;6:862–70）。

可以在本发明的某些实施方案的 LPA dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸的 RNA 中包含另一种修饰，其包括分别增强 LPA dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸的一种或更多种特征的一种或更多种配体、部分或与 RNA 化学连接的缀合物。可以增强的特征的非限制性实例是：LPA dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸活性、细胞分布、LPA dsRNA 试剂的递送、LPA dsRNA 试剂的药代动力学特性以及 LPA dsRNA 试剂的细胞摄取。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂包含一个或更多个靶向基团或连接基团，在本发明的 LPA dsRNA 试剂的某些实施方案中，其与正义链缀合。靶向基团的非限制性实例是包含 N-乙酰基-半乳糖胺（GalNAc）的化合物。术语“靶向基团”、“靶向剂”、“连接剂”、“靶向化合物”和“靶向配体”在本文中可互换使用。在本发明的某些实施方案中，LPA dsRNA 试剂包含与正义链的 5'-末端缀合的靶向化合物。在本发明的某些实施方案中，LPA dsRNA 试剂包含与正义链的 3'-末端缀合的靶向化合物。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂包含含有 GalNAc 的靶向基团。在本发明的某些实施方案中，LPA dsRNA 试剂不包含与正义链的 3'-末端和 5'-末端之一或两者缀合的靶向化合物。在本发明的某些实施方案中，LPA dsRNA 试剂不包含与正义链的 5'-末端和 3'-末端之一或两者缀合的含有 GalNAc 的靶向化合物。

另外的靶向和连接剂是本领域众所周知的，例如，可用于本发明的某些实施方案中的靶向和连接剂包括但不限于脂质部分，例如胆固醇部分（Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556）、胆酸（Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060）、硫醚，例如 beryl-S-三苯甲基硫醇（Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770）、硫胆固醇（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538）、脂肪链，例如十二烷二醇或十一烷基残基（Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54）、磷脂，例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基-铵 1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-磷酸酯（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783）、聚胺或聚乙二醇链（Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973）或金刚烷乙酸（Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654）、棕榈酰部分（Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237）或十八胺或己氨基-羰氧基胆固醇部分（Crooke et al., J. Pharmacol. Exp.

Ther., 1996, 277:923-937)。

包含 LPA dsRNA 试剂、LPA 反义多核苷酸和/或 LPA 正义多核苷酸的组合物的某些实施方案可包含改变 LPA dsRNA 试剂的分布、靶向等性质的配体。在包含本发明的 LPA dsRNA 试剂的组合物的一些实施方案中，例如与不存在此类配体的物种相比，配体增加对选定靶标（例如分子、细胞或细胞类型、区室，例如细胞或器官区室、组织、器官或身体区域）的亲和力。在本发明的组合物和/或方法中有用的配体可以是天然存在的物质，例如蛋白质（例如人血清白蛋白（HSA）、低密度脂蛋白（LDL）或球蛋白）、碳水化合物（例如，葡聚糖、支链淀粉、几丁质、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸）或脂质。配体也可以是重组或合成分子，例如合成聚合物，例如合成聚氨基酸或聚胺。聚氨基酸的实例是聚赖氨酸（PLL）、聚 L-天冬氨酸、聚 L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙醇酸)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物（HMPA）、聚乙二醇（PEG）、聚乙烯醇（PVA）、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物，或聚磷嗪。多胺的示例包括：聚乙烯亚胺、聚赖氨酸（PLL）、精胺、亚精胺、多胺、假肽-多胺、拟肽多胺、树枝状多胺、精氨酸、脒、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、多胺的季盐或 α 螺旋肽。

本发明的组合物和/或方法中包含的配体可包含靶向基团，其非限制性实例为细胞或组织靶向剂，例如，凝集素、糖蛋白、脂质或蛋白质，例如结合特定细胞类型如肾细胞或肝细胞的抗体。靶向基团可以是促甲状腺素、促黑素、凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白 A、黏蛋白碳水化合物、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、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、双膦酸盐、聚谷氨酸盐、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素 B12、维生素 A、生物素或 RGD 肽或 RGD 肽模拟物。

配体的其他实例包括染料、嵌入剂（例如吡啶）、交联剂（例如补骨脂素、丝裂霉素 C）、卟啉（TPPC4、texaphyrin、Sapphyrin）、多环芳烃（例如吩嗪、二氢吩嗪）；人工核酸内切酶（例如 EDTA）、亲脂性分子，例如胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、香叶氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、O3-(油酰基)胆酸、二甲氧基三苯甲基或吩噻嗪和肽缀合物（例如，触角肽、Tat 肽）、烷化剂、磷酸盐、氨基、巯基、PEG（例如，PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、取代烷基、放射性标记物、酶、半抗原（例如生物素）、转运/吸收促进剂（例如阿司匹林、维生素 E、叶酸）、合成核糖核酸酶（例如咪唑、双咪唑、组胺、咪唑簇、吡啶-咪唑偶联物、四氮杂大环的 Eu³⁺复合物）、二硝基苯基、HRP 或 AP。

本发明的组合物和/或方法中包括的配体可以是蛋白质，例如糖蛋白或肽，例如对共配

体具有特定亲和力的分子，或抗体，例如与特定细胞类型如癌细胞、内皮细胞、心肌细胞 或骨细胞结合的抗体。在本发明的组合物和/或方法的实施方案中有用的配体可以是激素或激素受体。在本发明的组合物和/或方法的实施方案中有用的配体可以是脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅酶、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或多价岩藻糖。在本发明的组合物和/或方法的实施方案中有用的配体可以是例如通过破坏细胞的细胞骨架（例如，通过破坏细胞的微管、微丝和/或中间丝）而增加 LPA dsRNA 试剂向细胞中的摄取的物质。此类试剂的非限制性实例是：taxon、长春新碱、长春碱、细胞松弛素、诺考达唑、japlakinolide、latrunculin A、鬼笔环肽、swinholidide A、indanocine 和 myoservin。

10 在一些实施方案中，与本发明的 LPA dsRNA 试剂连接的配体用作药代动力学(PK)调节剂。可用于本发明的组合物和方法的 PK 调节剂的实例包括但不限于：亲脂剂、胆汁酸、类固醇、磷脂类似物、肽、蛋白质结合剂、PEG、维生素、胆固醇、脂肪酸、胆酸、石胆酸、二烷基甘油酯、二酰基甘油酯、磷脂、鞘脂、萘普生、布洛芬、维生素 E、生物素、结合血清蛋白的适体等。还已知包含许多硫代磷酸酯键的寡核苷酸与血清蛋白结合，因此，在骨架中包含多个硫代磷酸酯键的短寡核苷酸，例如约 5 个碱基、10 个碱基、15 个碱基或 20 个碱基的寡核苷酸也可用作本发明的组合物和/或方法中的配体。

15

LPA dsRNA 试剂组合物

在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂在组合物中。本发明的组合物可包含一种或更多种 LPA dsRNA 试剂和任选的一种或更多种药学上可接受的载体、递送剂、靶向剂、可检测标签等，根据本发明方法的一些实施方案可用的靶向剂的非限制性实例是将本发明的 LPA dsRNA 试剂引导至和/或进入待治疗细胞的试剂。靶向剂的选择将取决于以下要素：LPA 相关疾病或病症的性质，以及靶细胞类型。在一个非限制性实例中，在本发明的一些实施方案中，可能需要将 LPA dsRNA 试剂靶向至和/或进入肝细胞。应当理解，在本发明方法的一些实施方案中，治疗剂包含仅具有递送剂的 LPA dsRNA 试剂，例如包含 N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）的递送剂，而没有任何附加的连接元件。例如，在本发明的一些方面，LPA dsRNA 试剂可以连接到包含 GalNAc 的递送化合物上，并且包含在含有药学上可接受载体的组合物中，并且在没有任何连接至 LPA dsRNA 试剂的可检测标记或靶向剂等的情况下施用至细胞或对象。

20

25

30 在本发明的 LPA dsRNA 试剂与一种或更多种递送剂、靶向剂、标记剂等一起施用和/或连接到其上的情况下，本领域技术人员能够了解并能够选择和使用适合的试剂用于本发明的方法中。在本发明的某些方法中可以使用标记试剂来确定 LPA dsRNA 试剂在细胞和组织中的位置，并且可用于确定已在本发明的方法中施用的包含 LPA dsRNA 试剂的治疗组合物

的细胞、组织或器官位置。接附和使用标记试剂如酶标记、染料、放射性标记等的手段是本领域公知的。应当理解，在本发明的组合物和方法的一些实施方案中，标记试剂连接至 LPA dsRNA 试剂中所包含的正义多核苷酸和反义多核苷酸之一或两者。

5 LPA dsRNA 试剂和 LPA 反义多核苷酸试剂的递送

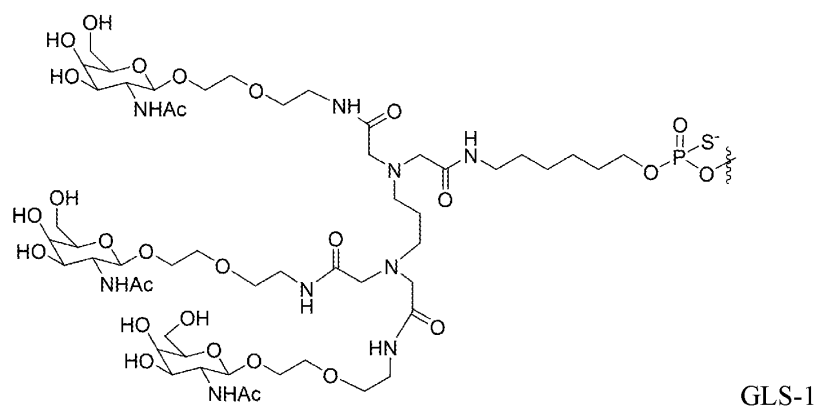
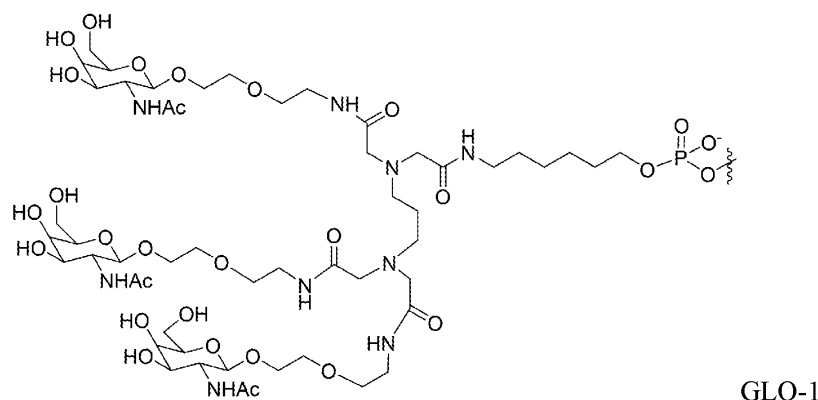
本发明方法的某些实施方案包括将 LPA dsRNA 试剂递送到细胞中。如本文所用，术语“递送”是指促进或影响细胞摄取或吸收。LPA dsRNA 试剂的吸收或摄取可通过独立的扩散或活性细胞过程来发生，或通过使用可与本发明的 LPA dsRNA 试剂相关的递送剂、靶向剂等来进行。适用于本发明方法的递送方式包括但不限于体内递送，其中将 LPA dsRNA 试剂注射到组织部位或全身给药。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂连接至递送剂。

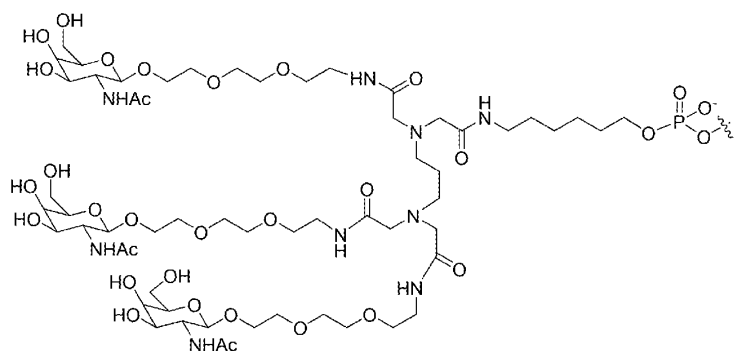
可用于将 LPA dsRNA 试剂递送至细胞、组织和/或对象的方法的非限制性实例包括：LPA dsRNA-GalNAc 缀合物、SAMI RNA 技术、基于 LNP 的递送方法和裸 RNA 递送。这些和其他递送方法已在本领域成功地用于递送治疗性 RNAi 试剂以治疗各种疾病和病症，例如但不限于：肝病、急性间歇性卟啉症（AIP）、血友病、肺纤维化等。多种递送方式的详细信息可在出版物中找到，例如：Nikam, R.R. & K. R. Gore (2018) *Nucleic Acid Ther*, 28 (4), 209-224 Aug 2018; Springer A.D. & S.F. Dowdy (2018) *Nucleic Acid Ther*. Jun 1; 28(3): 109-118; Lee, K. et al., (2018) *Arch Pharm Res*, 41(9), 867-874; 和 Nair, J.K. et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136:16958-16961，其内容均以引用方式并入本文。

本发明的一些实施方案包括使用脂质纳米颗粒（LNP）将本发明的 LPA dsRNA 试剂递送至细胞、组织和/或对象。LNP 通常用于体内递送 LPA dsRNA 试剂，包括治疗性 LPA dsRNA 试剂。使用 LNP 或其他递送剂的一个好处是，当使用 LNP 或其他递送剂递送至对象时，LPA RNA 剂的稳定性增加。在本发明的一些实施方案中，LNP 包含负载有一种或更多种本发明的 LPA RNAi 分子的阳离子 LNP。将包含 LPA RNAi 分子的 LNP 施用于对象，LNP 及其接附的 LPA RNAi 分子通过胞吞作用被细胞摄取，它们的存在导致 RNAi 触发分子的释放，从而介导 RNAi。

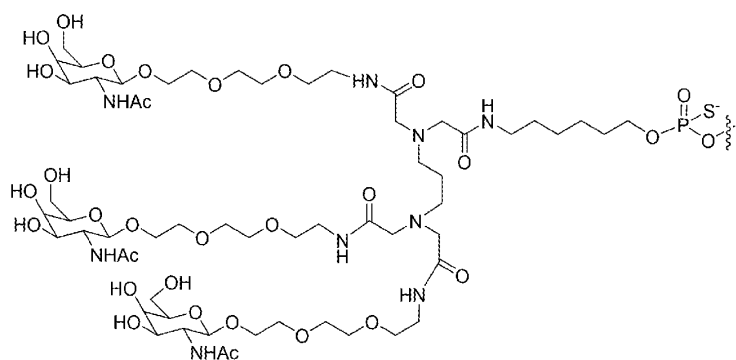
可用于本发明的实施方案以将本发明的 LPA dsRNA 试剂递送至细胞、组织和/或对象的递送剂的另一个非限制性实例是：包含 GalNAc 的试剂，其与本发明的 LPA dsRNA 试剂连接并将 LPA dsRNA 试剂递送至细胞、组织和/或对象。PCT 申请 WO2020191183A1 中公开了可用于本发明的方法和组合物的某些实施方案中的某些包含 GalNAc 的其他递送剂的实例。可用于本发明的组合物和方法中以将 LPA dsRNA 试剂递送至细胞的 GalNAc 靶向配体的非限制性实例是靶向配体簇。在此提出的靶向配体簇的实例如：具有磷酸二酯键的 GalNAc 配体（GLO）和具有硫代磷酸酯键的 GalNAc 配体（GLS）。术语“GLX-n”在本文中可用于

表示所连接的含 GalNAC 的化合物是以下化合物：GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-5、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、GLO-14、GLO-15 和 GLO-16 中的任一种，每个的
 5 结构如下所示，下图中 GalNAc 靶向配体与本发明的 RNAi 剂的连接位置在每个靶向配体的最右侧。应当理解，本发明的任何 RNAi 和 dsRNA 分子都可以连接到 GLS-1、GLS-2、GLS-3、GLS-4、GLS-5、GLS-6、GLS-7、GLS-8、GLS-9、GLS-10、GLS-11、GLS-12、GLS-13、GLS-14、GLS-15、GLS-16、GLO-1、GLO-2、GLO-3、GLO-4、GLO-5、GLO-6、GLO-7、GLO-8、GLO-9、GLO-10、GLO-11、GLO-12、GLO-13、GLO-14、GLO-15 和 GLO-16 上，
 10 以下是 GLO-1 到 GLO-16 和 GLS-1 到 GLS-16 的结构。

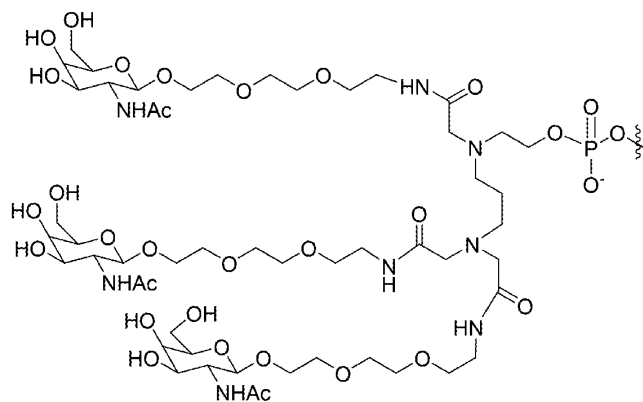




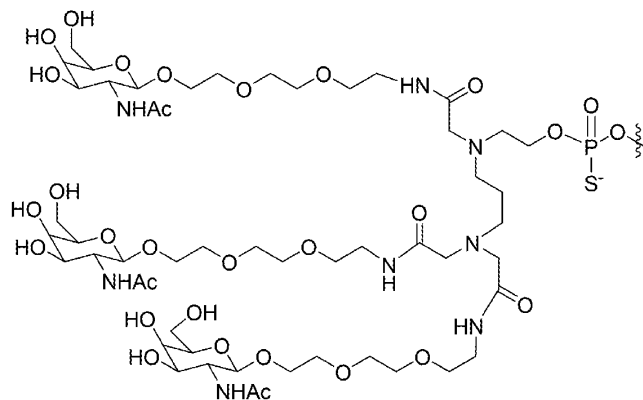
GLO-2



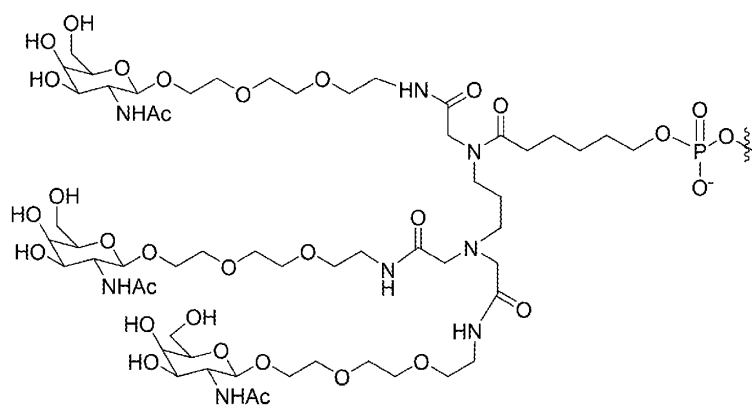
GLS-2



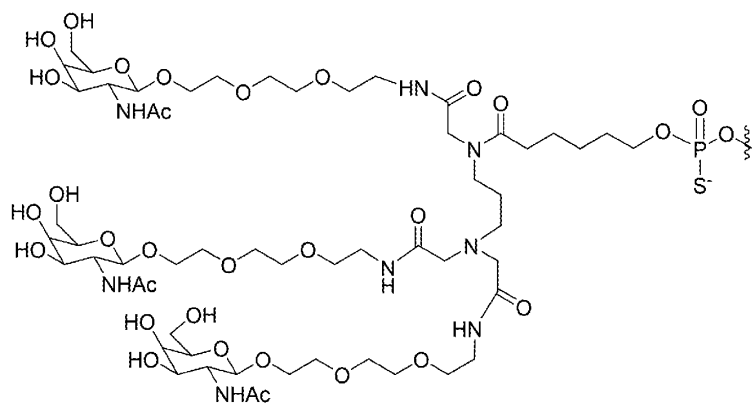
GLO-3



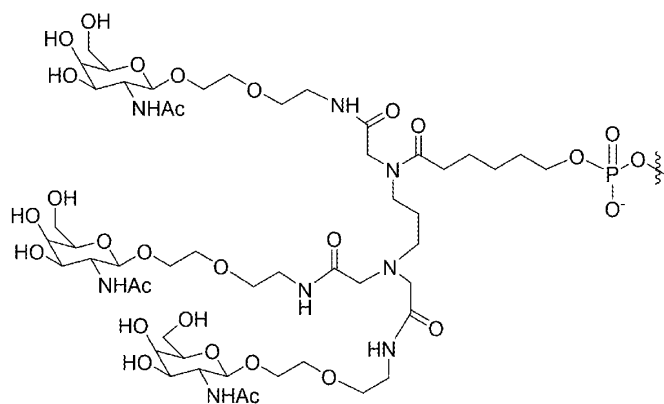
GLS-3



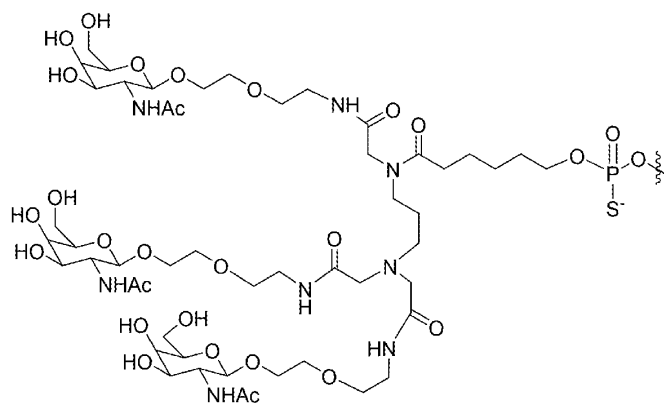
GLO-4



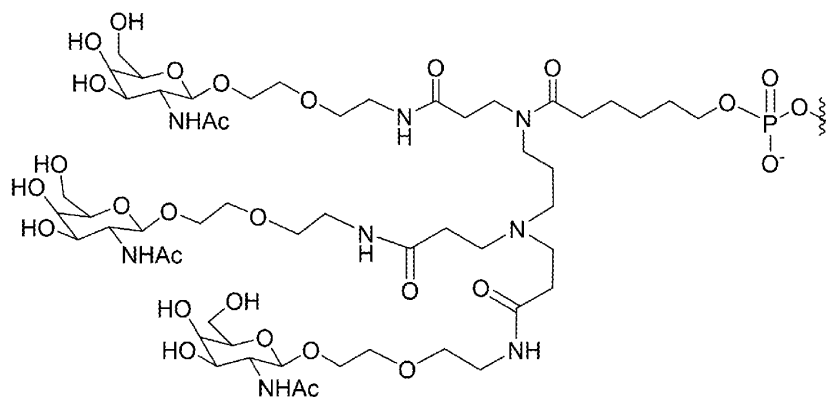
GLS-4



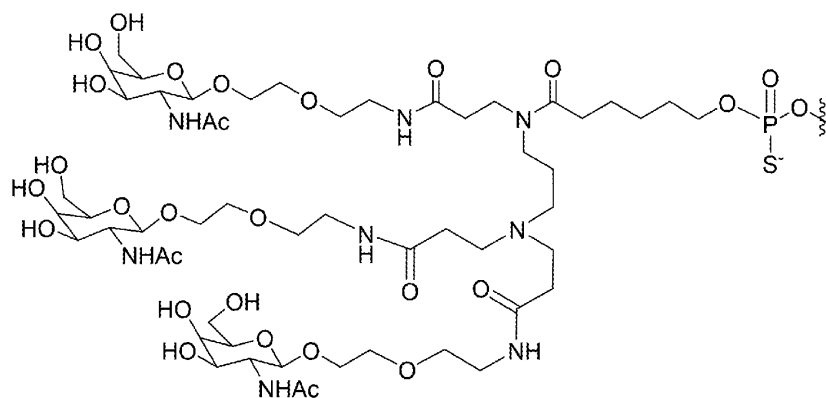
GLO-5



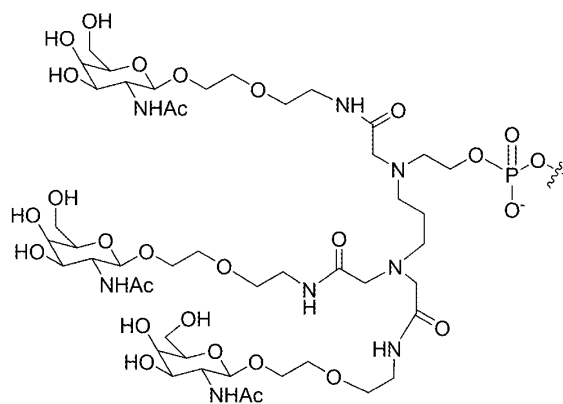
GLS-5



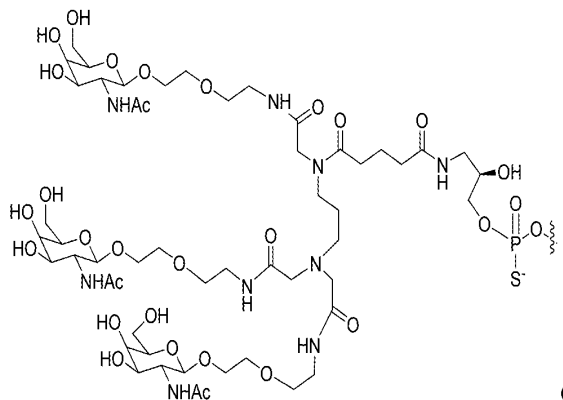
GLO-6



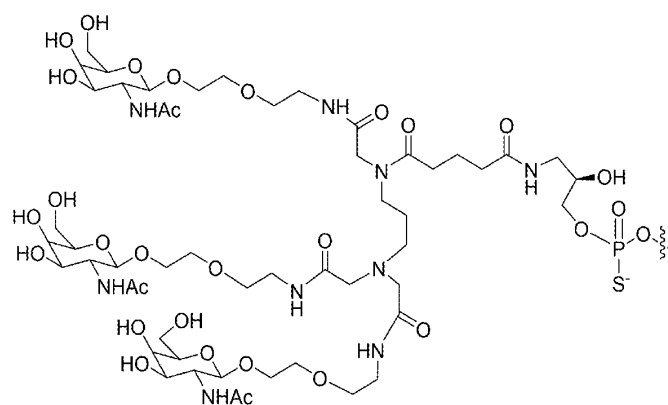
GLS-6



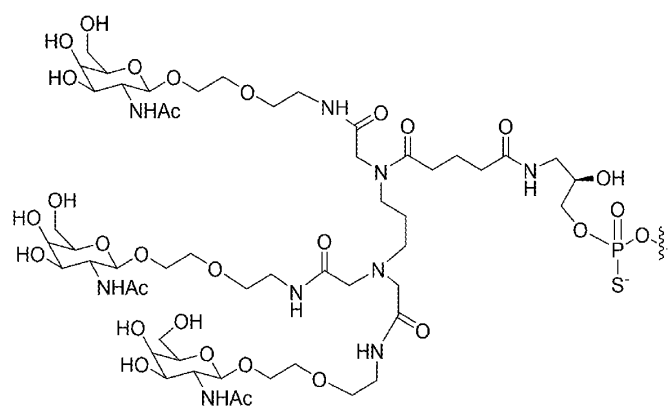
GLO-7



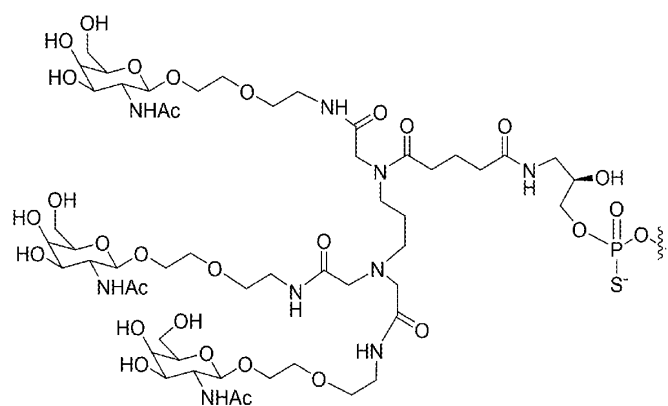
GLS-7



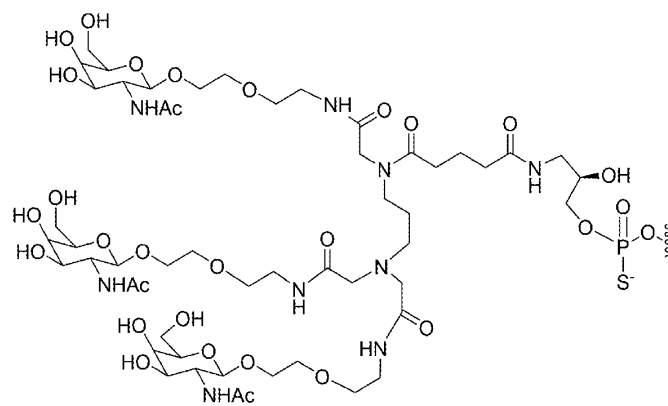
GLO-8



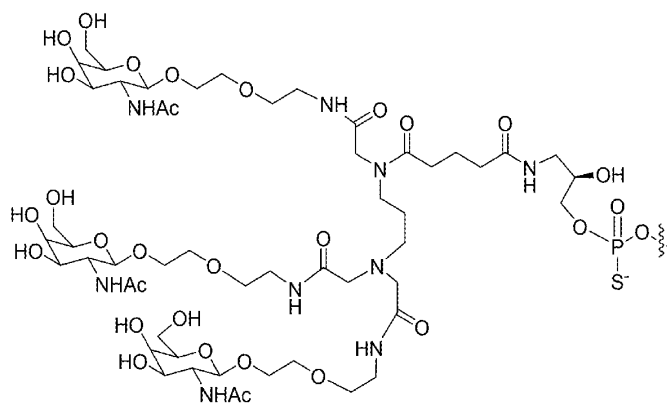
GLS-8



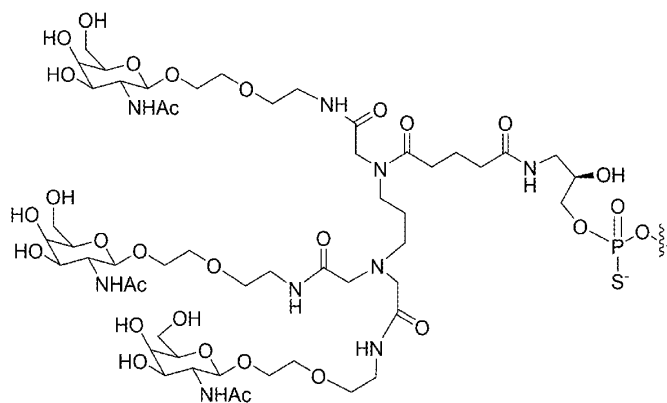
GLO-9



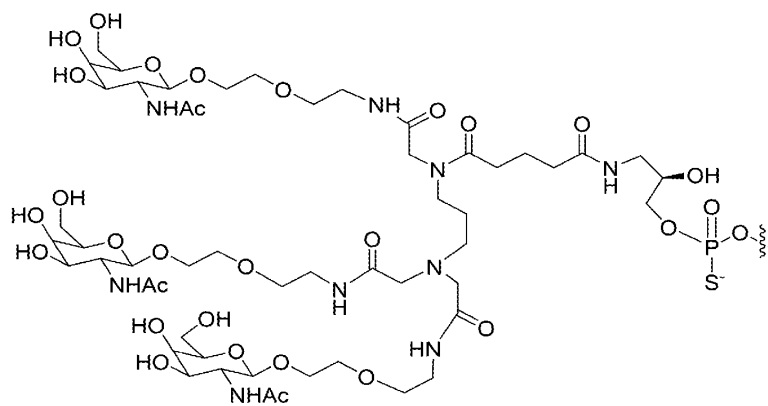
GLS-9



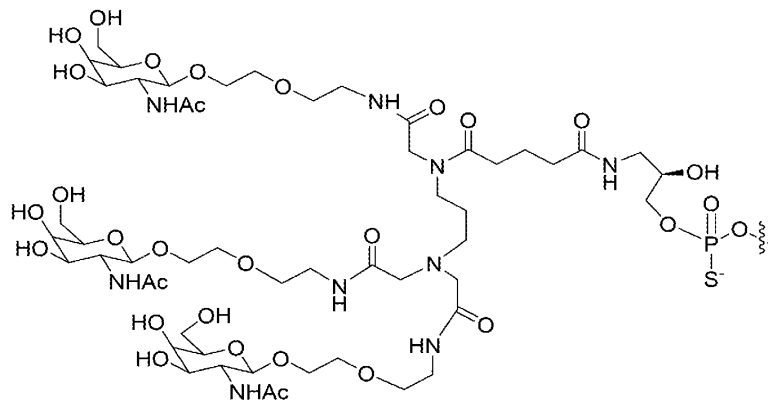
GLO-10



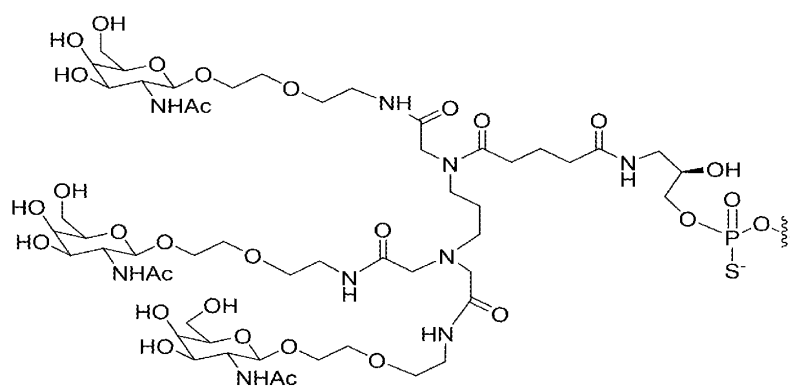
GLS-10



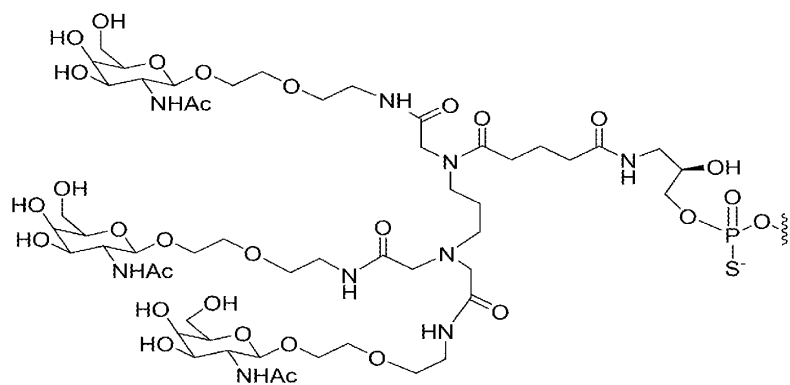
GLO-11



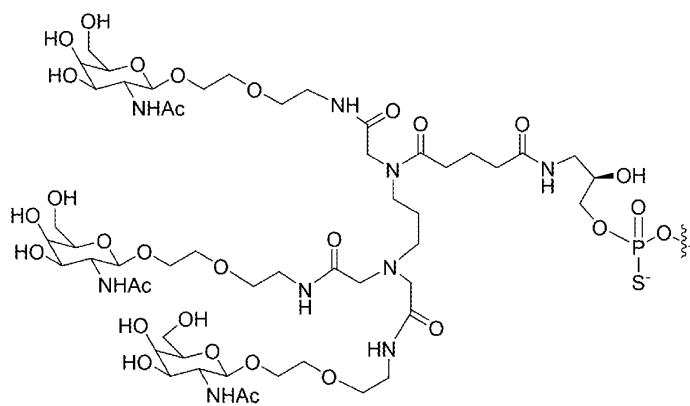
GLS-11



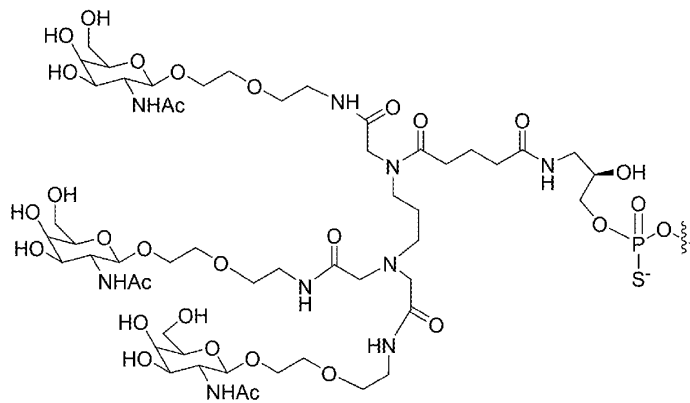
GLO-12



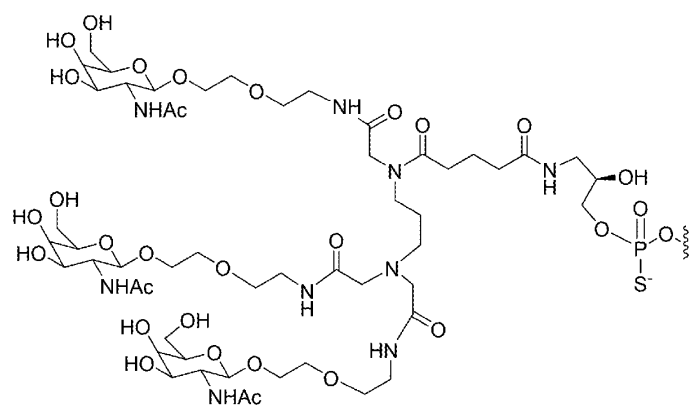
GLS-12



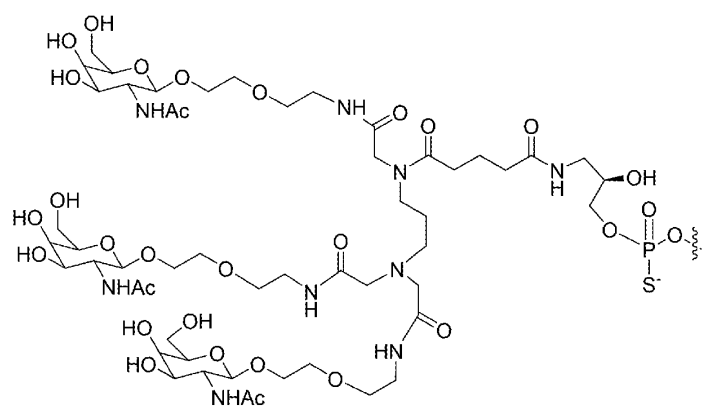
GLO-13



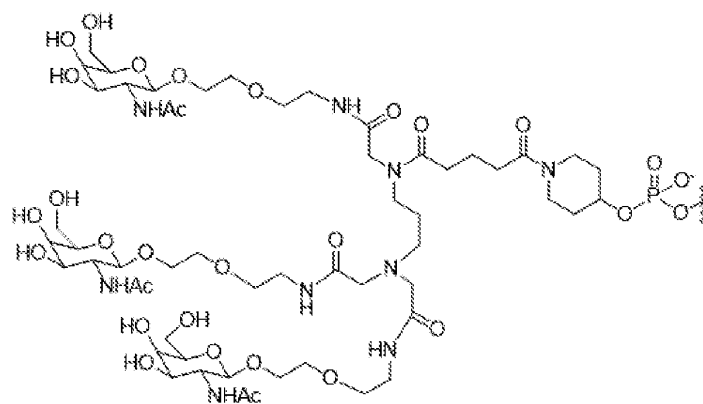
GLS-13



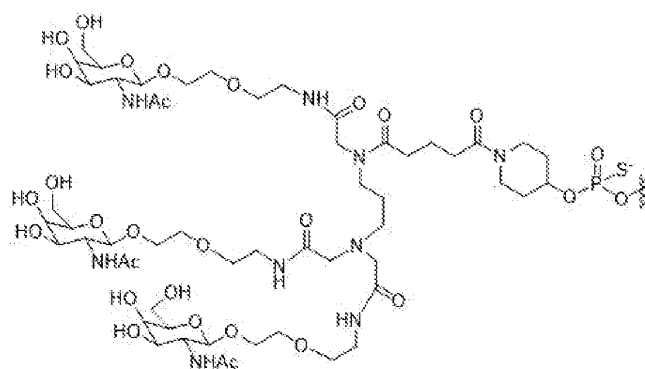
GLO-14



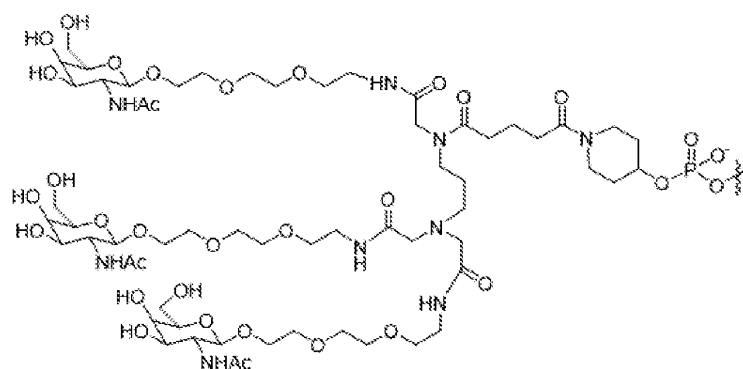
GLS-14



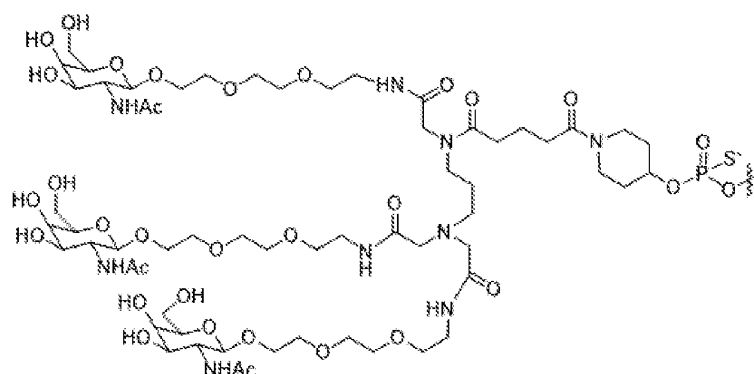
GLO-15,



GLS-15,



GLO-16,



GLS-16。

在本发明的一些实施方案中，体内递送也可以通过 β -葡聚糖递送系统，例如美国专利
 5 No. 5,032,401 和 5,607,677，以及美国公布 No. 2005/0281781 中描述的那些，它们的全部内容
 通过引用并入本文。也可以使用本领域已知的方法例如电穿孔和脂质转染将 LPA RNAi 试剂
 体外引入细胞。在本发明方法的某些实施方案中，LPA dsRNA 在没有靶向剂的情况下被递送。
 这些 RNA 可以作为“裸”RNA 分子递送。作为非限制性实例，本发明的 LPA dsRNA 可以
 在包含 RNAi 试剂但不包含靶向剂（例如 GalNAc 靶向化合物）的药物组合物中施用于
 10 对象，以治疗对象的 LPA 相关疾病或病症，例如心血管疾病，其中所述心血管疾病包括伯
 格氏病（Berger's disease）、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
 15 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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒
 子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。

应当理解，除了本文描述的某些递送方式之外，其他 RNAi 递送方式可以与本文描述的
 的 LPA RNAi 试剂和治疗方法的实施方案结合使用，例如但不限于本文描述的那些和本领域

中使用的那些。

5 本发明的 LPA dsRNA 试剂可以以有效降低细胞和/或对象中 LPA 多肽的水平的方式施用于对象。在本发明方法的一些实施方案中，将一种或更多种 LPA dsRNA 试剂施用于细胞和/或对象以治疗与 LPA 表达相关的疾病或病症。在一些实施方案中，本发明的方法包括向需要此类治疗的对象施用一种或更多种 LPA dsRNA 试剂以减轻对象中与 LPA 表达相关的疾病或病症。可以施用本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂以降低体外、离体和体内细胞中的一种或更多种中的 LPA 表达。

10 在本发明的一些实施方案中，通过将 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂递送（例如引入）细胞中来降低细胞中 LPA 多肽的水平。靶向剂和方法可用于帮助将 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂递送至对象内的特定细胞类型、细胞亚型、器官、空间区域，和/或细胞内的亚细胞区域。LPA dsRNA 试剂可以在本发明的某些方法中单独地或与一种或更多种另外的 LPA dsRNA 试剂组合施用。在一些实施方案中，向对象施用 2、3、4 或更多种独立选择的 LPA dsRNA 试剂。在本发明的某些实施方案中，将 LPA dsRNA 试剂与一种或更多种用于治疗 LPA 相关疾病或病症的另外的治疗方案联合施用于对象以治疗 LPA 相关疾病或病症。另外的治疗方案的非限制性实例是：施用一种或更多种本发明的 LPA 反义多核苷酸、施用非 LPA dsRNA 治疗剂和行为改变。可以在以下一个或更多个时间施用另外的治疗方案：在施用本发明的 LPA dsRNA 试剂之前、同时和之后。应当理解，本文所用的“同时”是指
15 是指在零时间的 5 分钟内、零时间的 10 分钟内、零时间的 30 分钟内、零时间的 45 分钟内和零时间的 60 分钟内，其中“零时间”是向对象施用本发明的 LPA dsRNA 试剂的时间。非 LPA dsRNA 治疗剂的非限制性实例是：另外的治疗剂，如 HMg Co-A 还原酶抑制剂（他汀类）、依折麦布、PCSK-9 抑制剂、CTEP 抑制剂、靶向 ANGPTL3 的疗法、靶向 APOC3 的疗法和烟酸，或上述任何的组合。行为改变的非限制性实例是：饮食方案、咨询和锻炼方案。这些和其他治疗剂以及行为改变是本领域已知的，并且可用于治疗对象的 LPA 疾病或病症，并且还可以与一种或更多种本发明的 LPA dsRNA 试剂组合，向对象给药以治疗 LPA 疾病或
20 病症。向细胞或对象施用以治疗 LPA 相关疾病或病症的本发明的 LPA dsRNA 试剂可以与一种或更多种其他治疗剂或活性成分以协同方式起作用，从而增加一种或更多种治疗剂或活性成分的有效性和/或增加 LPA dsRNA 试剂治疗 LPA 相关疾病或病症的有效性。

30 本发明的治疗方法包括施用 LPA dsRNA 试剂，可在 LPA 相关疾病或病症发作之前和/或当存在 LPA 相关疾病或病症时使用，包括在疾病或病症的早期、中期、晚期阶段以及任何这些阶段之前和之后的所有时间使用。本发明的方法还可以治疗先前已经接受过一种或更多种其他治疗剂和/或治疗活性成分的 LPA 相关疾病或病症治疗的对象，其中一种或更多种其他治疗剂和/或治疗活性成分在治疗对象的 LPA 相关疾病或病症方面不成功、成功性最小和/或不再成功。

载体编码的 dsRNA

在本发明的某些实施方案中，可以使用载体将 LPA dsRNA 试剂递送到细胞中。LPA dsRNA 试剂转录单位可包含在 DNA 或 RNA 载体中。用于将序列递送到细胞和/或对象中的此类编码转基因的载体的制备和使用是本领域公知的。可在本发明的方法中使用导致 LPA dsRNA 瞬时表达的载体，瞬时表达例如至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 小时或更多小时、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 周或更多周。瞬时表达的长度可以使用基于以下要素的常规方法确定：例如但不限于所选的特定载体构建体和靶细胞和/或组织。此类转基因可作为线性构建体、环状质粒或病毒载体引入，其可为整合或非整合载体。也可以构建转基因以使其作为染色体外质粒遗传（Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292）。

LPA dsRNA 试剂的一条或更多条单链可以从表达载体上的启动子转录。在要表达两条单独的链以产生例如 dsRNA 的情况下，可以使用例如转染或感染的方式将两个单独的表达载体共同引入细胞。在某些实施方案中，本发明的 LPA dsRNA 试剂的每条单独链都可以被包含在同一表达载体上的启动子转录。在本发明的某些实施方案中，LPA dsRNA 试剂被表达为通过接头多核苷酸序列连接的反向重复多核苷酸，使得 LPA dsRNA 试剂具有茎环结构。

RNA 表达载体的非限制性实例是 DNA 质粒或病毒载体。在本发明的实施方案中有用的表达载体可以与真核细胞相容。真核细胞表达载体在本领域是常规使用的，并且可从许多商业来源获得。LPA dsRNA 表达载体的递送可以是全身性的，例如通过静脉内或肌肉内给药、通过给药至从对象移出的靶细胞然后将靶细胞重新引入对象，或通过允许引入所需靶细胞的任何其他方式来进行。

可包括在该方法的实施方案中的病毒载体系统包括但不限于：(a)腺病毒载体；(b) 逆转录病毒载体，包括但不限于慢病毒载体、莫洛尼鼠白血病病毒等；(c) 腺相关病毒载体；(d) 单纯疱疹病毒载体；(e) SV 40 载体；(f) 多瘤病毒载体；(g) 乳头状瘤病毒载体；(h) 小核糖核酸病毒载体；(i) 痘病毒载体，例如正痘病毒载体，例如痘苗病毒载体或禽痘病毒载体，例如金丝雀痘或家禽痘病毒载体；(j) 辅助依赖型或无肠腺病毒载体。用于重组表达 LPA dsRNA 试剂的构建体可以包含调节元件，例如启动子、增强子等，它们可以被选择以提供组成型或调节型/诱导型表达。病毒载体系统以及启动子和增强子的使用等在本领域是常规的并且可以与本文所述的方法和组合物结合使用。

本发明的某些实施方案包括使用病毒载体将 LPA dsRNA 试剂递送到细胞中。许多基于腺病毒的递送系统在本领域中常规用于递送至例如肺、肝、中枢神经系统、内皮细胞和肌肉。可用于本发明方法的病毒载体的非限制性实例是：AAV 载体、痘病毒如痘苗病毒、改良安

卡拉病毒（MVA）、NYVAC、禽痘如禽痘或金丝雀痘病毒。

本发明的某些实施方案包括使用载体将 LPA dsRNA 试剂递送到细胞中的方法，并且此类载体可以在药学上可接受的载体中，所述载体可以但不必包括其中嵌入基因递送载体的缓释基质。在一些实施方案中，用于递送 LPA dsRNA 的载体可以由重组细胞产生，并且本发
5 明的药物组合物可以包括一种或更多种产生 LPA dsRNA 递送系统的细胞。

含有 LPA dsRNA 或 ssRNA 试剂的药物组合物

本发明的某些实施方案包括含有 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂和药学上可接受的载体的药物组合物的用途。包含 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的药物组
10 合物可用于本发明的方法中以降低细胞中的 LPA 基因表达，并可用于治疗 LPA 相关疾病或病症。此类药物组合物可以基于递送方式来配制。用于递送方式的制剂的非限制性实例是：配制用于皮下递送的组合物、配制用于通过肠胃外递送全身给药的组合物、配制用于静脉内（IV）递送的组合物、配制用于鞘内递送的组合物、配制用于直接递送至脑中的组合物等。可以使用一种或更多种方式施用本发明的药物组合物以将 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核
15 苷酸试剂递送到细胞中，例如：表面（例如，通过透皮贴剂）；肺部，例如通过吸入或吹入粉末或气雾剂，包括通过雾化器；气道内、鼻内、表皮和透皮、口服或肠胃外。肠胃外给药包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注；表皮下，例如通过植入装置；或颅内，例如通过实质内；鞘内或心室内施用。LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂也可以直接递送至靶组织，例如直接递送至肝脏、直接递送至肾脏等。可以理解的是，“递送 LPA
20 dsRNA 试剂”或“递送 LPA 反义多核苷酸试剂”到细胞中分别包括递送 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂、直接在细胞中表达 LPA dsRNA 试剂以及从递送到细胞中的编码载体表达 LPA dsRNA 试剂，或使得 LPA dsRNA 或 LPA 反义多核苷酸试剂出现在细胞中的任何合适的方式。制剂的制备和使用以及用于递送抑制性 RNA 的手段是本领域公知的和常规使用的。

如本文所用，“药物组合物”包含药理学有效量的本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反
25 义多核苷酸剂和药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”是指用于施用治疗剂的载体。此类载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。该术语明确排除细胞培养基。对于口服给药的药物，药学上可接受的载体包括但不限于药学上可接受的赋形剂，例如惰性稀释剂、崩解剂、黏合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙以及乳糖，而玉米淀粉和藻酸是合
30 适的崩解剂。黏合剂可包括淀粉和明胶，而润滑剂（如果存在）通常是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。如果需要，片剂可以用例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯之类的材料包衣，以延迟在胃肠道中的吸收。包含在药物制剂中的试剂在下文进一步描述。如本文所用的术语，例如“药理学有效量”、“治疗有效量”和“有效量”，是指本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反

义多核苷酸试剂产生预期的药理学、治疗或预防结果的量。例如，如果与疾病或障碍相关的可测量参数至少降低 10% 时，则认为给定的临床治疗有效，那么用于治疗该疾病或病症的药物的治疗有效量是使该参数降低至少 10%所需的量。例如，治疗有效量的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂可以将 LPA 多肽水平降低至少 10%。药物组合物可以包含这样的 dsRNAi 试剂，其包括例如表 1 中所显示的双链体。在其他一些实施方案中，这样的 dsRNAi 试剂包括表 1 中双链体的变体。

有效量

在一些方面，本发明的方法包括将细胞与有效量的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂接触以减少所接触细胞中的 LPA 基因表达。本发明方法的某些实施方案包括以有效降低 LPA 基因表达和治疗对象的 LPA 相关疾病或病症的量向对象施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂。就减少 LPA 的表达和/或用于治疗 LPA 相关疾病或病症而言，所使用的“有效量”是实现所需生物学效果所必需或足够的量。例如，治疗 LPA 相关疾病或病症的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的有效量可以是：(i) 减缓或停止疾病或病症的进展所需的量；(ii) 逆转、减少或消除疾病或病症的一种或更多种症状。在本发明的一些方面，有效量是当施用于需要治疗 LPA 相关疾病或病症的对象时，导致疾病或病症的预防和/或治疗的治疗响应的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的量。根据本发明的一些方面，有效量是本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂当与针对 LPA 相关疾病或病症的另一种治疗性治疗组合或共同施用时，导致预防和/或治疗该疾病或病症的治疗响应的量。在本发明的一些实施方案中，用本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂治疗对象的生物学效应可以由 LPA 相关疾病或病症引起的症状的改善和/或完全消除。在本发明的一些实施方案中，生物学效应是 LPA 相关疾病或病症的完全消除，例如通过指示对象没有 LPA 相关疾病或病症的诊断测试来证明。可检测的生理症状的非限制性实例包括在施用本发明的试剂后对象肝脏中脂质积累的减少。其他评估 LPA 相关疾病或病症状态的本领域已知方式可用于确定本发明的试剂和/或方法对 LPA 相关疾病或病症的影响。

通常在临床试验中确定将 LPA 多肽降低至治疗 LPA 相关疾病或病症的水平水平的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的有效量，这样的临床试验在盲法研究中为测试人群与对照人群建立有效剂量。在一些实施方案中，有效量是导致所需响应的量，例如减少细胞、组织和/或患有疾病或病症的对象中的 LPA 相关疾病或病症的量。因此，用于治疗可通过降低 LPA 多肽治疗的 LPA 相关疾病或病症的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的有效量可以是这样的量：当施用时，将对象中 LPA 多肽的量降低至低于在未施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的情况下将存在于细胞、组织和/或对象中的量。在本发明的某些方面，存在于未接触或施用过本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的细胞、

组织和/或对象中的 LPA 多肽和/或 LPA 基因表达的水平被称为“对照”量。在本发明方法的一些实施方案中，对象的对照量是对象的治疗前量；换言之，对象在施用 LPA 试剂之前的水平可以是该对象的对照水平，并且用于与其在向对象施用 siRNA 后的 LPA 多肽和/或 LPA 基因表达水平相比较。在治疗 LPA 相关疾病或病症的情况下，期望的响应可以是减少或消除细胞、组织和/或对象中疾病或病症的一种或更多种症状。减少或消除可以是暂时的，也可以是永久性的。应当理解，可以使用确定 LPA 多肽、LPA 基因表达、症状评估、临床测试等的方法来监测 LPA 相关疾病或病症的状态。在本发明的一些方面，对治疗 LPA 相关疾病或病症的期望响应是延迟疾病或病症的发作或甚至预防疾病或病症的发作。

降低 LPA 多肽的化合物的有效量也可以通过以下方式确定：评估施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂对细胞或对象的生理作用，例如施用后 LPA 相关疾病或病症的减少。对象的测定和/或症状监测可用于确定本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的功效（其可以在本发明的药物化合物中给药），并确定对治疗是否有响应。一个非限制性实例是一种或更多种本领域已知的血清脂质谱测试。另一个非限制性示例是：在用本发明的 LPA dsRNA 试剂治疗对象之前和之后，可以使用一种或更多种本领域已知的肝功能测试来确定对象的 LPA 相关疾病或病症的状态。在另一个非限制性实例中，使用一种或更多种本领域已知的肝脏中胆固醇积累测试来确定对象中 LPA 相关疾病的状态。在该实施例中，疾病包括胆固醇积累，并且该测试用于确定在用本发明的 LPA dsRNA 试剂治疗对象之前和之后对象中的胆固醇水平。

本发明的一些实施方案包括确定向对象施用的本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂来治疗 LPA 相关疾病或病症之功效的方法，其通过评估和/或监测对象中 LPA 相关疾病或病症的一种或更多种“生理特征”来进行。LPA 相关疾病或病症的生理特征的非限制性实例是对象的血清 LPA 水平、对象的血清脂质水平、对象的低密度脂蛋白水平、对象的 HDL 水平、对象的 LDL: HDL 比率、对象的甘油三酯水平、对象肝脏中存在的脂肪、身体症状等。确定这种生理特征的标准方法是本领域已知的，包括但不限于血液测试、成像研究、身体检查等。

可以理解的是，可以至少部分地基于这种对对象确定的疾病和/或病症状态和/或生理特征的测定结果来修改向对象施用的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的量。治疗量可以通过例如以下方式改变：通过改变施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的组合物、通过改变给药途径、通过改变给药时间等，来增加或减少 LPA-dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的量。LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的有效量将随着所治疗的特定病症、所治疗对象的年龄和身体状况、病情的严重程度、治疗的持续时间、共同治疗的性质（如果有的话）、具体的给药途径以及健康从业者知识和专业知识范围内的其他因素而变化。例如，有效量可取决于对治疗 LPA 相关疾病或病症有效的 LPA 多肽水平和/或 LPA 基因表达的所需

水平。技术人员可以凭经验确定用于本发明方法的特定 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的有效量，而无需过度实验。结合本文提供的教导，通过从本发明的多种 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂中进行选择，并权衡例如效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的严重程度和优选的给药方式等因素，可以规划有效的预防性或治疗性治疗方案以有效治疗特定对象。如在本发明的实施方案中使用的，本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的有效量可以是当与细胞接触时在细胞中产生所需生物学效应的量。

应当认识到，LPA 基因沉默可以在表达 LPA 的任何细胞中通过组成型或通过基因组工程进行，并通过任何合适的测定来确定。在本发明的一些实施方案中，通过施用本发明的 LPA dsRNA 试剂，LPA 基因表达降低至少 5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 100%。在本发明的一些实施方案中，通过施用本发明的 LPA dsRNA 试剂，LPA 基因表达减少 5%至 10%、5%至 25%、10%至 50%、10%至 75%、25%至 75%、25%至 100%或 50%至 100%。

15 给药

LPA dsRNA 试剂和 LPA 反义多核苷酸试剂以足以抑制 LPA 基因表达的剂量在药物组合物中递送。在本发明的某些实施方案中，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的剂量为每千克接受者体重每天 0.01 至 200.0 毫克，一般为每天 1 至 50mg/kg 体重、5 至 40mg/kg 体重、10 至 30mg/kg 体重、1 至 20mg/kg 体重、1 至 10mg/kg 体重、4 至 15mg/kg 体重，包括端值。例如，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的每单次给药可以从约 0.01 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg、1.6 mg/kg、1.7 mg/kg、1.8 mg/kg、1.9 mg/kg、2 mg/kg、2.1 mg/kg、2.2 mg/kg、2.3 mg/kg、2.4 mg/kg、2.5 mg/kg、2.6 mg/kg、2.7 mg/kg、2.8 mg/kg、2.9 mg/kg、3.0 mg/kg、3.1 mg/kg、3.2 mg/kg、3.3 mg/kg、3.4 mg/kg、3.5 mg/kg、3.6 mg/kg、3.7 mg/kg、3.8 mg/kg、3.9 mg/kg、4 mg/kg、4.1 mg/kg、4.2 mg/kg、4.3 mg/kg、4.4 mg/kg、4.5 mg/kg、4.6 mg/kg、4.7 mg/kg、4.8 mg/kg、4.9 mg/kg、5 mg/kg、5.1 mg/kg、5.2 mg/kg、5.3 mg/kg、5.4 mg/kg、5.5 mg/kg、5.6 mg/kg、5.7 mg/kg、5.8 mg/kg、5.9 mg/kg、6 mg/kg、6.1 mg/kg、6.2 mg/kg、6.3 mg/kg、6.4 mg/kg、6.5 mg/kg、6.6 mg/kg、6.7 mg/kg、6.8 mg/kg、6.9 mg/kg、7 mg/kg、7.1 mg/kg、7.2 mg/kg、7.3 mg/kg、7.4 mg/kg、7.5 mg/kg、7.6 mg/kg、7.7 mg/kg、7.8 mg/kg、7.9 mg/kg、8 mg/kg、8.1 mg/kg、8.2 mg/kg、8.3 mg/kg、8.4 mg/kg、8.5 mg/kg、8.6 mg/kg、8.7 mg/kg、8.8 mg/kg、8.9 mg/kg、9 mg/kg、9.1 mg/kg、9.2 mg/kg、9.3 mg/kg、9.4 mg/kg、9.5 mg/kg、9.6 mg/kg、9.7 mg/kg、9.8 mg/kg、9.9 mg/kg、10 mg/kg、11 mg/kg、12 mg/kg、13mg/kg、14 mg/kg、15 mg/kg、16 mg/kg、17 mg/kg、18 mg/kg、

19 mg/kg、20 mg/kg、21 mg/kg、22 mg/kg、23mg/kg、24 mg/kg、25 mg/kg、26 mg/kg、27 mg/kg、28 mg/kg、29 mg/kg、30 mg/kg、31 mg/kg、32 mg/kg、33mg/kg、34 mg/kg、35 mg/kg、36 mg/kg、37 mg/kg、38 mg/kg、39 mg/kg、40 mg/kg、41 mg/kg、42 mg/kg、43mg/kg、44 mg/kg、45 mg/kg、46 mg/kg、47 mg/kg、48 mg/kg、49 mg/kg 至 50 mg/kg 体重的量来施用。

5 在确定本发明的 LPA dsRNA 试剂的递送剂量和时间时可以考虑多种因素。递送的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的绝对量将取决于多种因素，包括共同治疗、剂量数和个体对象参数，包括年龄、身体状况、体格大小和体重。这些是本领域普通技术人员众所公知的因素，并且可以通过常规实验解决。在一些实施方案中，可以使用最大剂量，即根据合理的医学判断的最高安全剂量。

10 在一些实施方案中，本发明的方法可包括向对象施用 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个剂量的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂。在一些情况下，可以至少每天、每隔一天、每周、每隔一周、每月等向对象施用药物化合物（例如，包含 LPA dsRNA 试剂或包含 LPA 反义多核苷酸剂）的剂量，可以每天给药一次或每天给药多于一次，例如在一个 24 小时周期内给药 2、3、4、5 或更多次。本发明的药物组合物可以每天给药一次；
15 或者 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂可以在一天中以适当的间隔以两个、三个或更多个亚剂量给药，或者甚至使用连续输注或通过控释制剂递送。在本发明方法的一些实施方案中，将本发明的药物组合物每天一次或更多次、每周一次或更多次、每月一次或更多次或每年一次或更多次施用给对象。

在某些方面，本发明的方法包括单独施用药物化合物；与一种或更多种其他 LPA dsRNA
20 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂组合；和/或与对患有 LPA 相关疾病或病症的对象施用的其他药物疗法或治疗活动或方案组合。药物化合物可以以药物组合物的形式给药。本发明方法中使用的药物组合物可以是无菌的，并且含有一定量的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂，其会将 LPA 多肽的水平降低到足以在适合施用于对象的重量或体积单位中产生所需响应的水平。可以根据不同参数选择向对象施用的包含 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷
25 酸剂药物组合物的剂量以降低 LPA 蛋白水平，特别是根据所使用的给药方式和对象的状态来进行选择。其他因素包括所需的治疗时间。如果对象在初始剂量下的响应不足，则可以在患者耐受性允许的范围内采用更高的剂量（或通过不同的、更局部的递送途径有效地提高剂量）。

30 治疗

如本文所用的，术语“预防”或“进行预防”，当用于指将受益于 LPA 基因表达降低的疾病、病症或其病况时，是指对象发生与此类疾病、病症或病况相关的症状的可能性降低，所

述与此类疾病、病症或病况相关的症状是例如心血管疾病，其中所述心血管疾病包括伯格氏病（Berger's disease）、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。在这样的情况下发生此类疾病的可能性被降低：例如，当个体具有一种或更多种心血管疾病风险因素，但未发生心血管疾病或仅发生严重程度较低的心血管疾病的情况下，其相对于具有相同风险因素且未接受本文所述治疗的人群而言，未能发展出相关疾病、病症或病况，或与此类疾病、病症或病况相关的症状的发展程度降低（例如，在临床上患有该疾病或病症的量表上降低至少约 10%），或延迟症状的表现（例如，延迟数天、数周、数月或数年），则被认为是有效的预防。

对于 LPA 相关疾病和病症，其中 LPA 多肽的水平降低可有效治疗该疾病或病症，可以使用本发明的方法和 LPA dsRNA 试剂来治疗以抑制 LPA 表达。可以用本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂和本发明的治疗方法治疗的疾病和病症的实例包括但不限于：伯格氏病（Berger's disease）、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。此类疾病和病症在本文中可称为“LPA 相关疾病和病症”和“由 LPA 引起和/或调节的疾病和病症”。

在本发明的某些方面，可以在诊断 LPA 相关疾病或病症之前或之后的一个或多个时间向对象施用本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂。在本发明的一些方面，对象处于患有或发展 LPA 相关疾病或病症的风险中。与发展 LPA 相关疾病或病症的对照风险相比，有发展 LPA 相关疾病或病症风险的对象是发展 LPA 相关疾病或病症的可能性提高的对象。在本发明的一些实施方案中，与风险的对照水平相比，风险水平在统计上是显著的。有风险的对象可包括，例如：是或将是具有预先存在的疾病和/或遗传异常的对象，其使得该对象比没有预先存在的疾病或遗传异常的对照对象更易患 LPA 相关疾病或病症；具有 LPA 相关疾病或病症的家族和/或个人病史的对象；以及先前已接受 LPA 相关疾病或病症治疗的对象。应当理解，使对象对 LPA 相关疾病或病症更易感的预先存在的疾病和/或遗传异常可以是这样的疾病或遗传异常：当存在时，其先前已被确定为与发展 LPA 相关疾病或病症的更高可能性具有相关关系。

应当理解，可以基于个体对象的医学状况向对象施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂。例如，为对象提供的医疗保健可以评估从对象获得的样品中测量的 LPA 水平，并确定通过施用本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂来降低对象的 LPA 水平是期望的。在一个非限制性实例中，可以从对象获得生物样品，例如血液或血清样品，并且在样品中确定对象的 LPA 水平。向对象施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂，并且在给药后从对象获得血液或血清样品，并且使用该样品测定 LPA 水平，并将该结果与对象给药前（先前）样品中确定的结果进行比较。与给药前水平相比，随后样品中对象的 LPA 水平降低则表明所施用的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂在降低对象的 LPA 水平方面的功效。在一个非限制性实例中，血液中的 Lp(a)水平可以被认为是 LPA 相关病症的生理特征，即使对象没有被诊断为患有 LPA 相关疾病，例如本文公开的疾病。医疗保健提供者可以监测对象血液中的 Lp(a)水平的变化，作为施用的本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的功效的量度。

本发明方法的某些实施方案包括调整治疗，所述治疗包括至少部分地基于对对象中由治疗引起的 LPA 相关疾病或病症一种或更多种生理特征的变化评估，来向对象施用本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂。例如，在本发明的一些实施方案中，可以确定对对象施用的本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的作用，并用于帮助调节随后向对象施用的本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的量。在一个非限制性实例中，对对象施用本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂，并在施用后测定对象在血液中的 Lp(a)水平；并且至少部分基于所确定的水平，确定是否需要更高量的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂以提高所施用试剂的生理作用，例如降低或进一步降低对象在血液中的 Lp(a)水平。在另一个非限制性实例中，向对象施用本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂，并在给药后确定对象在血液中的 Lp(a)水平，并且至少部分地基于所确定的水平，预期向对象施用更低量的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂。

因此，本发明的一些实施方案包括评估由对象先前治疗引起的一种或更多种生理特征的变化，以调整随后施用于对象的本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的量。本发明方法的一些实施方案包括对 LPA 相关疾病或病症的生理特征的 1、2、3、4、5、6 或更多次测定；评估和/或监测施用的本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的功效；并任选地使用所测定的结果来调整以下一项或更多项：本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂治疗对象中 LPA 相关疾病或病症的剂量、给药方案和/或给药频率。在本发明方法的一些实施方案中，向对象施用有效量的本发明的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的期望结果是：与为对象确定的先前在血液中的 Lp(a)水平相比，对象血液中的 Lp(a)水平降低；对象在血液中的 Lp(a)水平处于正常范围内。

如本文所用，术语“治疗”、“治疗性”或“治疗的”当用于 LPA 相关疾病或病症时可指预

防性治疗、降低对象发展 LPA 相关疾病或病症的可能性，并且也可以指在对象已经发展出 LPA 相关疾病或病症之后为了消除或降低 LPA 相关疾病或病症的水平而进行治疗、防止 LPA 相关疾病或病症变得更严重，和/或与在不存在降低对象中 LPA 多肽水平的疗法的情况下的对象相比，减缓对象中 LPA 相关疾病或病症的进展。

5 本发明的试剂、组合物和方法的某些实施方案可用于抑制 LPA 基因表达。如本文所用，关于 LPA 基因的表达，术语“抑制”、“沉默”、“减少”、“下调”和“敲低”是指例如通过以下一种或更多种情况改变 LPA 基因的表达：分别与由 LPA 基因转录的 RNA 的对照水平、由 mRNA 翻译的 LPA 的对照水平相比，当细胞、细胞群、组织、器官或对象与本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂接触（例如，用其处理）时，其中由基因转录的 RNA 的水平、
10 表达的 LPA 的水平，以及由细胞、细胞群、组织、器官或对象中的 mRNA 翻译的 LPA 多肽、蛋白质或蛋白质亚基的水平降低。在一些实施方案中，对照水平是未接触 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂（例如用其处理）的细胞、组织、器官或对象中的水平。

施用方法

15 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的多种给药途径可用于本发明的方法。特定递送模式的选择将至少部分取决于所治疗的特定病症和治疗功效所需的剂量。一般而言，本发明的方法可以使用医学上可接受的任何给药模式来实施，这意味着产生 LPA 相关疾病或病症的有效治疗水平而不引起临床上不可接受的副作用的任何模式。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂可以通过口服、肠内、黏膜、皮下和/或肠胃外
20 途径施用。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、鞘内、肌内、腹膜内和胸骨内注射或输注技术。其他途径包括但不限于鼻（例如，通过胃鼻管）、经皮、阴道、直肠、舌下和吸入。本发明的递送途径可包括鞘内、心室内或颅内。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂可以放置在缓释基质中并通过将基质放置在对象中来施用。在本发明的一些方面，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂可以使用涂覆有靶向特定细胞或细胞器的递送剂的纳米颗粒递送至对象细胞。多种递送方式、方法、试剂是本领域已知的。递送方法和递送剂的非限制性实例在本文别处另外提供。在本发明的一些方面，关于 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的术语“递送”可以是指：向细胞或对象施用一种或更多种
25 “裸”LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂序列。在本发明的某些方面，“递送”是指通过转染方式给予细胞或对象、将包含 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的细胞递送给对象、将编码 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的载体递送到细胞和/或对象等
30 中。使用转染方式递送 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂可包括向细胞和/或对象施用载体。

在本发明的一些方法中，一种或更多种 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂可

以以制剂形式给药，也可以在药学上可接受的溶液中给药，其通常可以含有药学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载体、佐剂和任选的其他治疗成分。在本发明的一些实施方案中，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂可以与另一种治疗剂一起配制成用于同时给药。根据本发明的方法，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂可以以药物组合物的形式给药。通常，药物组合物包含 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂和任选的药学上可接受的载体。药学上可接受的载体是本领域普通技术人员公知的。如本文所用，药学上可接受的载体是指不干扰活性成分生物活性（例如，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂抑制细胞或对象中 LPA 基因表达的能力）有效性的无毒材料。施用和递送用于治疗用途的 dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的多种方法是本领域已知的并且可用于本发明的方法中。

药学上可接受的载体包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和本领域公知的其他材料。示例性的药学上可接受的载体描述于美国专利 No. 5,211,657 中，而其他载体是本领域技术人员已知的。这种制剂通常可以含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载体和任选的其他治疗剂。用于医药时，该盐应当是药学上可接受的，但非药学上可接受的盐可以方便地用于制备其药学上可接受的盐，不排除在本发明的范围之外。此类药理学和药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。此外，药学上可接受的盐可以制备为碱金属盐或碱土金属盐，例如钠盐、钾盐或钙盐。

本发明方法的一些实施方案包括将一种或更多种 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂直接施用于组织。在一些实施方案中，施用化合物的组织是其中存在或可能出现 LPA 相关疾病或病症的组织，其非限制性实例是肝脏或肾脏。直接组织给药可以通过直接注射或其他方式实现。许多口服递送的化合物自然进入并通过肝脏和肾脏，本发明的治疗方法的一些实施方案包括向对象口服施用一种或更多种 LPA dsRNA 试剂。LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂，单独或与其他治疗剂联合，可以施用一次，或者它们可以多次施用。如果多次给药，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂可以通过不同途径给药。例如，虽然不算限制，第一次（或前几次）给药可以通过皮下方式进行，并且一次或更多次额外给药可以是口服和/或全身给药。

对于其中希望全身性施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂的本发明实施方案，可以配制 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂用于通过注射例如通过推注或连续输注肠胃外施用。注射制剂可以以单位剂型存在，例如安瓿或多剂量容器，其添加或不添加防腐剂。LPA dsRNA 试剂制剂（也称为药物组合物）可采用油性或水性载体中的混悬液、溶液或乳液等形式，并且可含有配制剂，例如混悬剂、稳定剂和/或分散剂。

肠胃外给药的制剂包括无菌水溶液或非水溶液、混悬液和乳液。非水溶剂的例子是丙

二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、酒精/水溶液、乳液或混悬液，包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖溶液、葡萄糖和氯化钠溶液、乳酸林格氏液或固定油。静脉内赋形剂包括流体和营养补充剂、电解质补充剂（例如基于林格氏葡萄糖溶液的那些）等。也可以存在防腐剂和其他添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。其他形式的给药，例如静脉给药，将导致较低的剂量。如果对象在初始剂量下的反应不足，则可以在患者耐受性允许的范围内采用更高的剂量（或通过不同的、更局部的递送途径有效地提高剂量）。可以根据需要每天使用多次剂量以实现一种或更多种 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的适当全身或局部水平，并实现 LPA 蛋白水平适当降低。

在其他实施方案中，本发明的方法包括使用递送载体，例如生物相容性微粒、纳米颗粒或适合植入受体例如对象的植入物。PCT 公开 WO 95/24929（通过引用并入本文）中描述了可根据该方法使用的示例性可生物降解植入物，其描述了用于包含生物大分子的生物相容的、可生物降解的聚合物基质。

不可生物降解的和可生物降解的聚合物基质都可用于本发明的方法中，以将一种或更多种 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂递送给对象。在一些实施方案中，基质可以是可生物降解的。基质聚合物可以是天然或合成聚合物。可以基于期望释放的时间段来选择聚合物，通常在几小时到一年或更长时间的数量级。通常，可以使用在几小时到三到十二个月之间的一段时间内的释放。聚合物任选地呈水凝胶形式，其可以吸收高达其重量约 90% 的水，并且还任选地与多价离子或其他聚合物交联。

通常，LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂在本发明的一些实施方案中可以使用可生物降解的植入物通过扩散或通过聚合物基质的降解来递送。用于这种用途的示例性合成聚合物是本领域公知的。使用本领域已知的方法，可生物降解的聚合物和不可生物降解的聚合物可用于递送 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂。生物黏附聚合物如可生物侵蚀的水凝胶（H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587）也可用于递送 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂，以治疗 LPA 相关疾病或病症。其他合适的递送系统可以包括定时释放、延迟释放或持续释放递送系统。此类系统可避免重复施用 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸剂，从而提高对象和医疗保健专业人员的便利性。许多类型的释放递送系统是可用的并且是本领域普通技术人员已知的。见例如美国专利 No. 5,075,109、4,452,775、4,675,189、5,736,152、3,854,480、5,133,974 和 5,407,686。此外，可以使用基于泵的硬件输送系统，其中一些也适用于植入。

长期持续释放植入物的使用可以适用于对象的预防性治疗和具有发生复发性 LPA 相关疾病或病症的风险的对象。如本文所用，长期释放是指将植入物构建和布置成以至少长达 10 天、20 天、30 天、60 天、90 天、六个月、一年或更长时间递送治疗水平的 LPA dsRNA 试

剂或 LPA 反义多核苷酸试剂。长期持续释放植入物是本领域普通技术人员众所公知的并且包括上述的一些释放系统。

LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂的治疗制剂可以通过将具有所需纯度的分子或化合物与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂[Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, (2006)]以冻干制剂或水溶液的形式混合来制备用于储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的，并且包括缓冲剂，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂（例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲铵氯化物；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸酯类，例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如 EDTA；蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇等糖类；形成盐的反离子，如钠；金属配合物（例如，锌-蛋白质配合物）；和/或非离子表面活性剂，例如 TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇（PEG）。

细胞、对象和对照

本发明的方法可以与细胞、组织、器官和/或对象结合使用。在本发明的一些方面，对象是人或脊椎动物哺乳动物，包括但不限于狗、猫、马、牛、山羊、小鼠、大鼠和灵长类动物，例如猴。因此，本发明可用于治疗人和非人对象的 LPA 相关疾病或病症。在本发明的一些方面，对象可以是农场动物、动物园动物、驯养动物或非驯养动物，并且本发明的方法可用于兽医预防和治疗方案。在本发明的一些实施方案中，对象是人并且本发明的方法可用于人预防和治疗方案。

可应用本发明的对象的非限制性实例是被诊断患有、怀疑患有或有风险患有与以下疾病或病症相关的疾病或病症的对象：高于期望的 LPA 表达，也称为“升高的 LPA 表达水平”。与高于期望水平的 LPA 表达相关的疾病和病症的非限制性实例在本文别处描述。本发明的方法可应用于在治疗时已被诊断为患有该疾病或病症的对象、与高于期望的 LPA 表达相关的对象，或被认为处于患有或发展与高于期望的 LPA 表达相关的疾病或病症的风险中的对象。在本发明的一些方面，与高于期望的 LPA 表达水平相关的疾病或病症是急性疾病或病症；在本发明的某些方面，与高于期望的 LPA 表达水平相关的疾病或病症是慢性疾病或病症。

在一个非限制性实例中，将本发明的 LPA dsRNA 试剂施用于被诊断心血管疾病，其中

所述心血管疾病包括伯格氏病 (Berger's disease)、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。本发明的方法可应用于在治疗时已被诊断为患有该疾病或病症的对象,或被认为有患或发展该疾病或病症的风险的对象。

在另一个非限制性实例中,将本发明的 LPA dsRNA 试剂施用以治疗指因肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活导致或与其相关的疾病或障碍,或其症状或进展响应于 RAAS 失活的疾病或障碍。术语“LPA 相关疾病”包括因 LPA 表达降低而受益的疾病、障碍或病症。这类疾病通常与高的血压相关。LPA 相关疾病的非限制实例包括心血管疾病,其中所述心血管疾病包括伯格氏病 (Berger's disease)、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。

可应用本发明方法的细胞包括体外、体内、离体细胞。细胞可以在对象中、在培养物中和/或混悬液中,或处于任何其他合适的状态或条件中。可以应用本发明的方法的细胞可以是:肝脏细胞 (liver cell)、肝细胞 (hepatocyte)、心脏细胞、胰腺细胞、心血管细胞、肾细胞或其他类型的脊椎动物细胞,包括人和非人哺乳动物细胞。在本发明的某些方面,可应用本发明方法的细胞是健康的正常细胞,其未知为疾病细胞。在本发明的某些实施方案中,将本发明的方法和组合物应用于肝脏细胞、肝细胞、心脏细胞、胰腺细胞、心血管细胞和/或肾细胞的细胞。在本发明的某些方面,对照细胞是正常细胞,但应当理解,具有疾病或病症的细胞也可以在特定情况下用作对照细胞,例如在比较具有疾病或病症的经处理细胞与具有疾病或病症的未处理细胞的结果等的情况下。

根据本发明的方法,可以确定 LPA 多肽水平并将其与 LPA 多肽对照水平进行比较。对照可以是预定值,其可以采取多种形式。它可以是单个截止值,例如中位数或平均值。它可以基于比较组来建立,例如在具有正常水平的 LPA 多肽的组和具有增加的 LPA 多肽活性水平的组中。比较组的另一个非限制性实例可以是具有 LPA 相关疾病或病症的一种或更多种症状或诊断的群体与没有疾病或病症的一种或更多种症状或诊断的群体;已对其施用本发明的 siRNA 治疗的对象组与未对其施用本发明的 siRNA 治疗的对象组。通常,对照可以基于

适当年龄组中的明显健康的正常个体或明显健康的细胞。应当理解，除了预定值之外，根据本发明的对照可以是与实验材料平行测试的材料样品。示例包括来自对照群体的样品或通过制造产生的对照样品，以用于与实验样品进行平行测试。在本发明的一些实施方案中，对照可包括未用本发明的 LPA dsRNA 试剂接触或处理的细胞或对象，在这种情况下，可以比较 LPA 多肽的对照水平以及

5 与本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂接触的细胞或对象中 LPA 多肽的水平。

在本发明的一些实施方案中，对照水平可以是对象确定的 LPA 多肽水平，其中将在不同时间为同一对象确定的 LPA 多肽水平与该对照水平进行比较。在一个非限制性实例中，在从未接受过本发明的 LPA 治疗的对象获得的生物样品中确定 LPA 的水平。在一些实施方案中，生物样品是血清样品。从对象获得的样品中测定的 LPA 多肽水平可作为对象的基线或对照值。在本发明的治疗方法中向对象施用一次或更多次 LPA dsRNA 试剂之后，可以从对象获得一个或更多个另外的血清样品，并且可以将随后的一个或更多个样品中的 LPA 多肽水平与对象的对照/基线水平进行比较。此类比较可用于评估对象中 LPA 相关疾病或病症的发作、进展或消退。例如，从对象获得的基线样品中 LPA 多肽的水平高于在给予对象本

10 发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂后从同一对象获得的水平，则表示 LPA 相关疾病或病症的消退并且表示施用的本发明的 LPA dsRNA 试剂治疗 LPA 相关疾病或病症产生的功效。

在本发明的某些方面，为对象确定的 LPA 多肽水平中的一个或更多个值可以作为对照值，并用于稍后在同一对象中比较 LPA 多肽水平，从而允许评估对象中“基线”LPA 多肽水平的变化。因此，将初始水平用作该对象的对照水平的情况下，初始 LPA 多肽水平可以用于显示和/或确定本发明的方法和化合物在对象中所能够降低对象中 LPA 多肽的水平。

20

使用本发明的方法，可以将本发明的 LPA dsRNA 试剂和/或 LPA 反义多核苷酸试剂施用于对象。这样的 dsRNAi 试剂包括例如表 1 中所显示的双链体。在其他一些实施方案中，这样的 dsRNAi 试剂包括双链体变体，例如表 1 中所显示的双链体的变体。可以如下评估本发明的施用和治疗的功效：与先前时间点从对象获得的血清样品中 LPA 多肽的给药前水平相比，或与非接触对照水平（例如对照血清样品中的 LPA 多肽水平）相比，当施用和治疗后，从对象获得的血清样品中 LPA 多肽的水平降低至少 0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80 %、90%、95%或更多。应当理解，LPA 多肽的水平都与 LPA 基因表达的水平相关。本发明方法的某些实施方案包括以有效抑制 LPA 基因表达的量向对象施用本发明的 LPA dsRNA 和/或 LPA 反义试剂，从而降低对象中 LPA 多肽的水平。

25

30

本发明的一些实施方案包括从一个或更多个对象获得的一个或更多个生物样品中确定 LPA 多肽的存在、不存在和/或量（本文也称为水平）。该测定可用于评估本发明的治疗方法的功效。例如，本发明的方法和组合物可用于确定生物样品中 LPA 多肽的水平，该生物

样品获自先前用施用本发明的 LPA dsRNA 试剂和/或 LPA 反义剂治疗的对象。与先前时间点从对象获得的血清样品中 LPA 多肽的给药前水平相比，或与非接触对照水平（例如对照血清样品中的 LPA 多肽水平）相比，当施用和治疗后，从对象获得的血清样品中 LPA 多肽的水平降低至少 0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80 %、90%、95%或更多，则表明给予对象的治疗的功效水平。

在本发明的一些实施方案中，针对对象确定的 LPA 相关疾病或病症的生理特征可以作为对照结果，并将同一对象在不同时间的生理特征的确定结果与对照结果进行比较。在一个非限制性实例中，血液中的 Lp(a)水平（和/或 LPA 疾病或病症的其他生理特征）测量自从未给予本发明的 LPA 治疗的对象，其可用作对象的基线或对照值。在本发明的治疗方法中向对象施用一次或更多次 LPA dsRNA 试剂之后，测量血液中的 Lp(a)水平并分别与对象的对照/基线水平进行比较。此类比较可用于评估对象中 LPA 相关疾病或病症的发作、进展或消退。例如，从对象获得的基线 LPA 水平高于在对对象施用本发明的 LPA dsRNA 试剂或 LPA 反义多核苷酸试剂后从同一对象测定的 LPA 水平，则表示 LPA 相关疾病或病症的消退并且表示施用的本发明的 LPA dsRNA 试剂治疗 LPA 相关疾病或病症的功效。

在本发明的一些方面，为对象确定的 LPA 相关疾病或病症的一种或更多种生理特征的值可以作为对照值，用于稍后对同一对象的生理特征进行比较，从而允许评估对象“基线”生理特征的变化。因此，可以获得个体中的初始生理特征，用初始生理特征测定作为该对象的对照，并且显示和/或确定本发明的方法和化合物可用于降低个体中 LPA 多肽的水平的效果。使用本发明的方法，本发明的 LPA dsRNA 试剂和/或 LPA 反义多核苷酸试剂可以以治疗 LPA 疾病或病症的有效量施用于对象。可以通过确定 LPA 疾病或病症的一种或更多种生理特征的变化来评估本发明的施用和治疗的功效。在一个非限制性实例中，与先前时间点从对象获得的血液中的 Lp(a)水平相比，或与非接触对照中的 LPA 水平进行比较，对象血液中的 Lp(a)水平降低，直到对象血液中的 Lp(a)水平处于正常范围内。

本发明的一些实施方案包括使用例如但不限于以下方法确定 LPA 相关疾病或病症的生理特征的存在、不存在和/或变化：(1) 测量对象的血液中的 Lp(a)水平；(2)评估从一名或更多名对象获得的一份或更多份生物样品的生理特征；(3) 或对对象进行身体检查。该测定可用于评估本发明的治疗方法的功效。

药盒

包含一种或更多种 LPA dsRNA 试剂和/或 LPA 反义多核苷酸试剂及其在本发明方法中的使用说明的药盒也在本发明的范围内。本发明的药盒可包含可用于治疗 LPA 相关疾病或病症的 LPA dsRNA 试剂、LPA 正义多核苷酸和 LPA 反义多核苷酸试剂中的一种或更多种。

可以制备包含一种或更多种 LPA dsRNA 试剂、LPA 正义多核苷酸和 LPA 反义多核苷酸试剂的药盒以用于本发明的治疗方法。本发明药盒的组分可以以水性介质或冻干形式包装。本发明的药盒可以包含被分隔开以在其中封闭地收纳一个或更多个容器装置或一系列容器装置（例如试管、小瓶、烧瓶、瓶子、注射器等）的载体。第一容器装置或一系列容器装置可包含一种或更多种化合物，例如 LPA dsRNA 试剂和/或 LPA 正义或反义多核苷酸试剂。第二容器装置或一系列容器装置可包含靶向剂、标记剂、递送剂等，其可作为在本发明的治疗方法的实施方案中施用的 LPA dsRNA 试剂和/或 LPA 反义多核苷酸的一部分包括在内。

本发明的药盒还可包含说明书。说明通常采用书面形式，并且将为执行由药盒体现的治疗和基于该治疗做出决定提供指导。

提供以下实施例以说明本发明实践的具体实例，其并不旨在限制本发明的范围。对本领域普通技术人员来说明显的是，本发明可应用于多种组合物和方法。

实施例

实施例 1.RNAi 试剂的合成

上表 2-3 中所示的 LPA RNAi 试剂双链体是根据以下通用程序合成的：

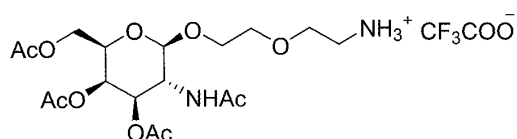
使用基于亚磷酰胺化学的成熟固相合成方法，在寡核苷酸合成仪上合成 siRNA 的正义和反义链序列。寡核苷酸链的增长是通过 4 步循环实现的：去保护、缩合、加帽和用于添加每个核苷酸的氧化或硫化步骤。合成是在由可控多孔玻璃（CPG, 1000 Å）制成的固体支持物上进行的。单体亚磷酰胺购自商业来源。根据本文实施例 2-3 的程序合成具有 GalNAc 配体簇的亚磷酰胺（GLPA1 和 GLPA2 作为非限制性实例）。对于用于体外筛选的 siRNA（表 2），合成是在 2 μmol 规模下进行的；对于用于体内测试的 siRNA（表 3、4 至 5），合成规模为 5 μmol 或更大。在 GalNAc 配体（作为非限制性实例的 GLO-0）连接在正义链的 3'-末端的情况下，使用连接有 GalNAc 配体的 CPG 固体支持物。在 GalNAc 配体（GLS-1 或 GLS-2 作为非限制性实例）连接在正义链的 5'-末端的情况下，将 GalNAc 亚磷酰胺（GLPA1 或 GLPA2 作为非限制性实例）用于最后的偶联反应。将 3%二氯甲烷中的三氯乙酸（TCA）用于 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基（DMT）的脱保护。5-乙硫基-1H-四唑用作活化剂。THF/Py/H₂O 中的 I₂ 和吡啶/MeCN 中的苯乙酰二硫化物（PADS）分别用于氧化和硫化反应。在最后的固相合成步骤之后，通过用 1:1 体积的 40wt%甲胺水溶液和 28%氢氧化铵溶液处理来切割固体载体结合的低聚物并去除保护基团。为了合成用于体外筛选的 siRNA，将粗混合物浓缩。将剩余的固体溶解在 1.0 M NaOAc 中，加入冰冷的 EtOH 以沉淀出作为钠盐的单链产物，其无需进一步纯化即可用于退火。为了合成用于体内测试的 siRNA，粗单链产物通过离子对反相 HPLC（IP-RP-HPLC）进一步纯化。通过将来自 IP-RP-HPLC 的纯化单链寡核苷酸产物溶解在 1.0 M NaOAc 中并通过添加冰冷的 EtOH 进行沉淀，将其转化为钠盐。在水

中通过等摩尔互补进行正义链和反义链寡核苷酸的退火，以形成双链 siRNA 产物，将其冻干以提供蓬松的白色固体。

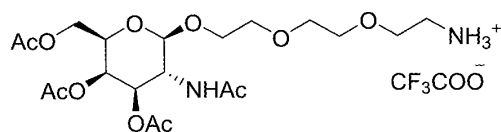
实施例 2. 中间体-A 和中间体-B 的制备

5 如以下方案 1 所示，通过在二氯甲烷（DCM）中用三甲基甲硅烷基三氟甲磺酸酯（TMSOTf）处理市售的半乳糖胺五乙酸酯来合成中间体-A。然后用 Cbz 保护的 2-(2-氨基乙氧基)乙-1-醇进行糖基化，得到化合物 II。通过氢化除去 Cbz 保护基团以提供作为三氟乙酸盐（TFA）盐的中间体-A。除了使用 Cbz 保护的 2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-醇作为原料之外，中间体 B 基于相同的方案合成。

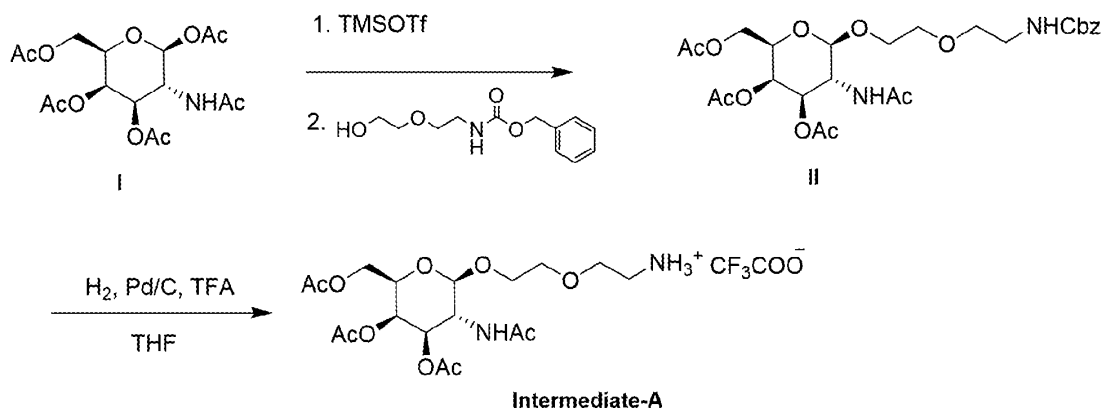
10



中间体-A



中间体-B



15 方案 1

向化合物 I (20.0 g, 51.4 mmol) 在 100 mL 1,2-二氯乙烷(DCE)中的溶液中加入 TMSOTf (17.1 g, 77.2 mmol)。将所得反应溶液在 60°C 下搅拌 2 小时，然后在 25°C 下搅拌 1 小时；Cbz 保护的 2-(2-氨基乙氧基)乙-1-醇 (13.5 g, 56.5 mmol) 在 DCE (100 mL) 中用 4 Å 粉末分

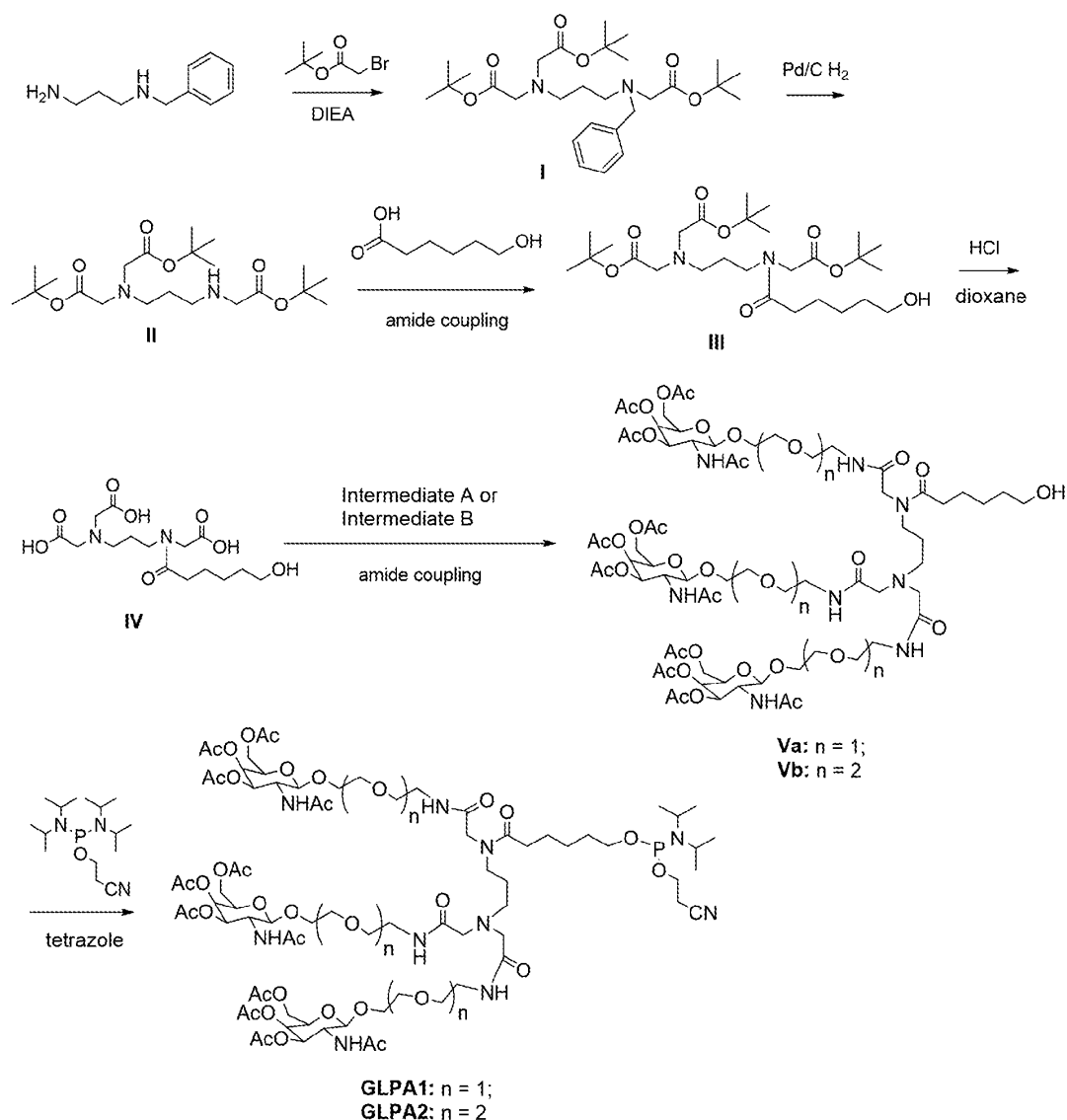
子筛 (10 g) 干燥, 在 N_2 气氛下在 $0^\circ C$ 滴加到上述反应溶液中。在 N_2 气氛下, 将所得反应混合物在 $25^\circ C$ 下搅拌 16 小时。过滤反应混合物并用饱和 $NaHCO_3$ (200mL)、水 (200mL) 和饱和盐水 (200mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩, 得到粗产物, 将其与 2-甲基四氢呋喃/庚烷 (5/3, v/v, 1.80L) 一起研磨 2 小时。将所得混合物过滤并干燥以得到呈白色固体状的化合物 II (15.0g, 产率 50.3%)。

将 10% Pd/C (1.50 g) 小心地加入到干燥和氩气吹扫的氢化瓶中, 然后加入 10 毫升四氢呋喃 (THF), 然后是化合物 II (15.0 克, 26.4 毫摩尔) 在 THF (300 毫升) 和 TFA (三氟乙酸, 3.00 克, 26.4 毫摩尔) 中的溶液。将所得混合物脱气并用 H_2 吹扫 3 次并在 H_2 (45 psi) 气氛下在 $25^\circ C$ 下搅拌 3 小时。薄层色谱法 (TLC, 溶剂: DCM:MeOH = 10:1) 表明化合物 II 已完全消耗。过滤反应混合物并减压浓缩。将残余物溶解在无水 DCM (500mL) 中并浓缩。该过程重复 3 次以得到呈泡沫状白色固体的中间体-A (14.0g, 产率 96.5%)。 ^1H NMR (400 MHz DMSO- d_6): δ ppm 7.90 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 7.78 (br s, 3 H), 5.23 (d, J = 3.26 Hz, 1 H), 4.98 (dd, J = 11.29, 3.26 Hz, 1 H), 4.56 (d, J = 8.53 Hz, 1 H), 3.98 - 4.07 (m, 3 H), 3.79 - 3.93 (m, 2 H), 3.55 - 3.66 (m, 5 H), 2.98 (br d, J = 4.77 Hz, 2 H), 2.11 (s, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.90 (s, 3 H), 1.76 (s, 3 H)。

使用与合成中间体-A 类似的程序合成中间体-B。 ^1H NMR (400 MHz DMSO- d_6): δ ppm 7.90 (br d, J = 9.03 Hz, 4 H), 5.21 (d, J = 3.51 Hz, 1 H), 4.97 (dd, J = 11.1 Hz, 1 H), 4.54 (d, J = 8.53 Hz, 1 H), 3.98 - 4.06 (m, 3 H), 3.88 (dt, J = 10.9 Hz, 1 H), 3.76 - 3.83 (m, 1 H), 3.49 - 3.61 (m, 9 H), 2.97 (br s, 2 H), 2.10 (s, 3 H), 1.99 (s, 3 H), 1.88 (s, 3 H), 1.78 (s, 3 H)。计算质谱 $C_{20}H_{34}N_2O_{11}$: 478.22; 实测: 479.3 ($M+H^+$)。

实施例 3. GalNAc 配体簇亚磷酰胺 GLPA1、GLPA2 和 GLPA15 的合成。

按照以下方案 2 制备 GLPA1 和 GLPA2。从苄基保护的丙烷-1,3-二胺开始, 用 2-溴乙酸叔丁酯对其进行烷基化, 得到三酯化合物 I。通过氢化除去苄基保护基, 得到仲胺化合物 II。将酰胺与 6-羟基己酸偶联得到化合物 III。然后在用二氧六环中的 HCl 处理时除去叔丁基保护基以生成三酸化合物 IV。进行三酸化合物 IV 和中间体-A 或中间体-B 之间的酰胺偶联以提供化合物 Va 或 Vb。亚磷酰胺 GLPA1 或 GLPA2 是通过化合物 Va 或 Vb 与 2-氰乙基 N,N-二异丙基氯亚磷酰胺和催化量的 1H-四唑的亚磷酸化合成的。



方案 2

向 N-苄基-1,3-丙二胺 (5.00 g, 30.4 mmol) 在二甲基甲酰胺 (DMF, 100 mL) 中的溶液中加入 2-溴乙酸叔丁酯 (23.7 g, 121 mmol); 然后滴加二异丙基乙胺 (DIEA, 23.61 g, 182 mmol)。将所得反应混合物在 25-30°C 搅拌 16 小时。LCMS 显示 N-苄基-1,3-丙二胺被完全消耗。反应混合物用 H_2O (500 mL) 稀释并用 EtOAc (500 mL $\times$ 2) 萃取。合并的有机物用饱和盐水 (1 L) 洗涤, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 减压浓缩, 得到粗产物; 经硅胶柱层析纯化 (梯度: 石油醚: 乙酸乙酯 20:1 至 5:1)。获得无色油状化合物 **I** (12.1 g, 产率 78.4%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.26 - 7.40 (m, 5 H), 3.79 (s, 2 H), 3.43 (s, 4 H), 3.21 (s, 2 H), 2.72 (dt, $J = 16.9, 7.34$ Hz, 4 H), 1.70 (quin, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 1.44 - 1.50 (m, 27 H)。

干燥的氢化瓶用氩气吹扫3次。加入Pd/C(200mg, 10%), 然后加入MeOH(5mL), 然后加入化合物I(1.00g, 1.97mmol)在MeOH(5mL)中的溶液。反应混合物在真空下脱气并重新填充H₂。这个过程重复3次。将混合物在H₂(15 psi)气氛下在25°C搅拌12小时。LCMS显示化合物I被完全消耗。在N₂气氛下减压过滤反应混合物。减压浓缩滤液, 得到黄色油状化合物II(655mg, 产率79.7%), 其无需进一步纯化即可用于下一步。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.44(s, 4 H), 3.31(s, 2 H), 2.78(t, *J* = 7.1 Hz, 2 H), 2.68(t, *J* = 6.9 Hz, 2 H), 1.88(br s, 1 H), 1.69(quin, *J* = 7.03 Hz, 2 H), 1.44 - 1.50(s, 27 H)。

化合物II(655mg, 1.57mmol)、6-羟基己酸(249mg, 1.89mmol)、DIEA(1.02g, 7.86mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI, 904mg, 4.72mmol)和1-羟基苯并三唑(HOBt, 637mg, 4.72mmol)的DMF(6mL)溶液的混合物脱气并用N₂吹扫3次; 然后在N₂气氛下在25°C搅拌3小时。LCMS指示所需产物。反应混合物用H₂O(10mL)稀释并用EtOAc 20mL(10mL×2)萃取。合并有机物并用饱和盐水(20mL)洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩以得到粗产物; 将其通过硅胶柱色谱法(梯度: 石油醚:乙酸乙酯从5:1至1:1)纯化, 得到呈黄色油状的化合物III(650mg, 产率77.8%)。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.90 - 3.95(s, 2 H), 3.63(t, *J* = 6.40 Hz, 2 H), 3.38 - 3.45(m, 6 H), 2.72(t, *J* = 6.65 Hz, 2 H), 2.40(t, *J* = 7.28 Hz, 2 H), 1.55 - 1.75(m, 8 H), 1.44(s, 27 H)。计算质谱C₂₇H₅₀N₂O₈: 530.36; 实测: 531.3 (M+H⁺)。

将化合物III(5.5g, 10.3mmol)在HCl/二氧六环(2M, 55mL)中的混合物在25°C下搅拌3小时。LCMS显示完全消耗化合物III。过滤反应混合物, 用EtOAc(50mL)洗涤, 减压干燥, 得到粗产物。将其溶解在CH₃CN(50mL)中, 真空除去挥发物。重复该过程3次以得到呈白色固体状的化合物IV(2.05g, 产率54.5%)。¹H NMR(400 MHz, D₂O): δ ppm 4.21(s, 1 H), 4.07(d, *J* = 4.5 Hz, 4 H), 3.99(s, 1 H), 3.45 - 3.52(m, 3 H), 3.42(t, *J* = 6.5 Hz, 1 H), 3.32 - 3.38(m, 1 H), 3.24 - 3.31(m, 1 H), 2.37(t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 2.24(t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 1.99(dt, *J* = 15.5, 7.53 Hz, 1 H), 1.85 - 1.94(m, 1 H), 1.85 - 1.94(m, 1 H), 1.39 - 1.56(m, 4 H), 1.19 - 1.31(m, 2 H)。

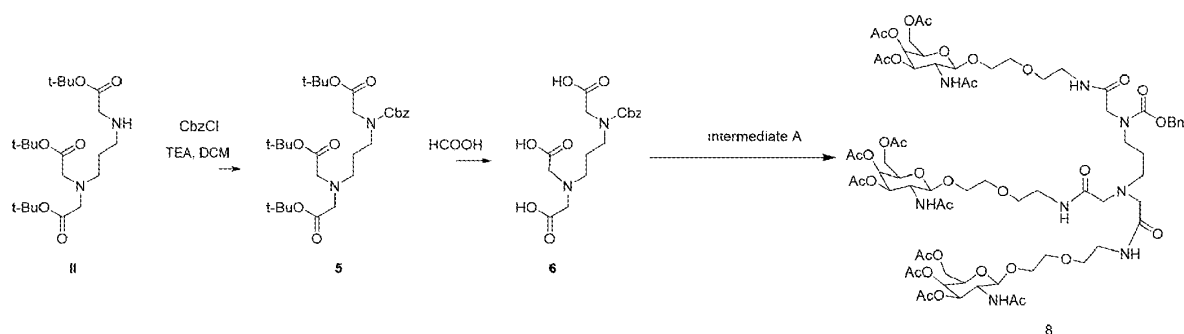
将化合物IV(500 mg, 1.05 mmol)、中间体-A(2.02 g, 3.67 mmol)、DIEA(813 mg, 6.30 mmol)、EDCI(704 mg, 3.67 mmol)和在DMF(10 毫升)中的HOBt(496 mg, 3.67 mmol)的混合物脱气并用N₂吹扫3次, 然后将混合物在N₂气氛下在25°C搅拌3小时。LCMS指示所需产物。通过加入H₂O(10mL)淬灭反应混合物, 用DCM(10mL×2)萃取。合并的有机物用10%柠檬酸(20mL)萃取。水相用饱和NaHCO₃溶液中和并用DCM(10 mL×2)再萃取。有机物经硫酸钠干燥, 过滤并在减压下浓缩以产生呈白色固体状的化合物Va(570mg, 0.281mmol, 产率26.8%)。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) ppm δ 7.84 - 8.12(m, 3 H), 6.85 - 7.15(m, 2 H), 6.66 - 6.81(m, 1 H), 5.36(br d, *J* = 2.7 Hz, 3 H), 5.11 - 5.27(m, 3 H), 4.63 -

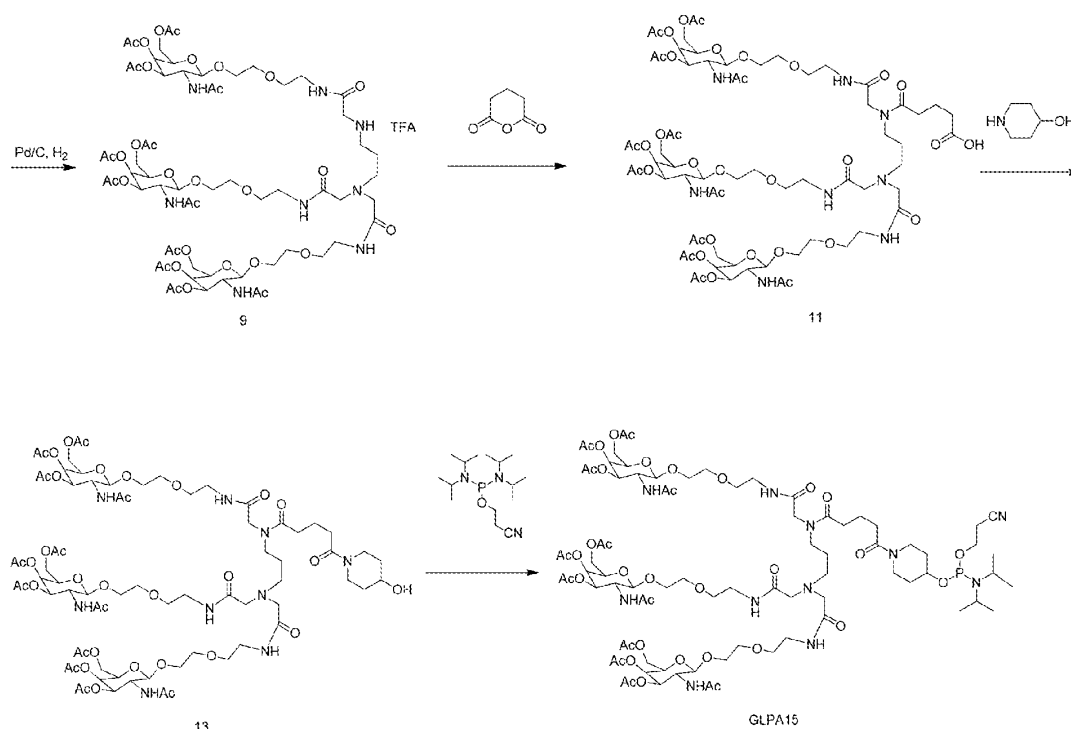
4.85 (m, 3 H), 3.90 - 4.25 (m, 18 H), 3.37 - 3.75 (m, 28 H), 3.15 - 3.28 (m, 4 H), 2.64 (br d, $J = 6.53$ Hz, 2 H), 2.30 - 2.46 (m, 2 H), 2.13 - 2.18 (m, 9 H), 2.05 (s, 9 H), 1.94 - 2.03 (m, 18 H), 1.68 (br s, 2 H), 1.45 (br s, 2 H), 1.12 (br t, $J = 7.0$ Hz, 2 H)。

向化合物 Va (260 mg, 0.161 mmol) 的无水 DCM (5 mL) 溶液中加入四唑二异丙基铵 (30.3 mg, 0.177 mmol); 然后在环境温度和 N_2 下滴加 3-双(二异丙基氨基)膦酰氧基丙腈 (194 mg, 0.645 mmol)。将反应混合物在 20 至 25°C 搅拌 2 小时。LCMS 表明化合物 Va 被完全消耗。冷却至 -20°C 后, 将反应混合物在 0°C 加入搅拌的盐水/饱和 $NaHCO_3$ (1:1, 5mL) 溶液。搅拌 1 分钟后, 加入 DCM (5mL)。出现分层。有机层用盐水/饱和 $NaHCO_3$ 水溶液 (1:1, 5 mL) 洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并浓缩至体积约 1 mL。在搅拌下将残余溶液滴加到 20mL 甲基叔丁基醚 (MTBE) 中。这导致白色固体沉淀。将混合物离心, 收集固体。将固体重新溶解在 1mL DCM 中并通过加入 MTBE (20mL) 沉淀。再次通过离心分离固体。将收集的固体溶解在无水 CH_3CN 中。除去挥发物。该过程再重复两次, 得到呈白色固体状的 GalNAc 配体亚磷酰胺化合物 GLPA1 (153 mg, 84.4 μ mol)。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): ppm δ 7.71 - 8.06 (m, 2 H), 6.60 - 7.06 (m, 3 H), 5.37 (br d, $J = 3.0$ Hz, 3 H), 5.18 - 5.32 (m, 3 H), 4.70 - 4.86 (m, 3 H), 3.92 - 4.25 (m, 18 H), 3.42 - 3.85 (m, 30 H), 3.25 (m, 4 H), 2.59 - 2.75 (m, 4 H), 2.27 - 2.44 (m, 2 H), 2.15 - 2.20 (s, 9 H) 2.07 (s, 9 H), 1.96 - 2.03 (m, 18 H), 1.65 (br s, 4 H), 1.44 (br d, $J = 7.28$ Hz, 2 H), 1.14 - 1.24 (m, 12 H)。 ³¹P NMR ($CDCl_3$): ppm δ 147.15。

除了使用中间体-B 之外, 使用相同的程序合成 GalNAc 配体亚磷酰胺化合物 GLPA2。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): ppm δ 7.94 - 8.18 (m, 1 H), 7.69 (br s, 1 H), 6.66 - 7.10 (m, 3 H), 5.35 (d, $J = 3.5$ Hz, 3 H), 5.07 - 5.25 (m, 3 H), 4.76 - 4.86 (m, 3 H), 4.01 - 4.31 (m, 10 H), 3.91 - 4.01 (m, 8 H), 3.74 - 3.86 (m, 4 H), 3.52 - 3.71 (m, 30 H), 3.42 - 3.50 (m, 6 H), 3.15 - 3.25 (m, 4 H), 2.52 - 2.70 (m, 4 H), 2.22 - 2.45 (m, 2 H), 2.15 - 2.22 (s, 9 H), 2.06 (s, 9 H), 1.95 - 2.03 (m, 18 H), 1.77 (br s, 2 H), 1.58 - 1.66 (m, 4 H), 1.40 (m, 2 H), 1.08 - 1.24 (m, 12 H)。 ³¹P NMR ($CDCl_3$): ppm δ 147.12。

按照以下方案 3 制备 GLPA15。





方案 3

5 向中间体化合物II (275 g, 660 mmol, 1.00 *eq.*) 的二氯甲烷(2.75 L)溶液中加入三乙胺(133 g, 1.32 mol, 2.00 *eq.*), 随后滴加入Cbz-Cl (169 g, 990 mmol, 1.50 *eq.*)。反应液在25 °C 搅拌2小时, LCMS显示化合物II完全转化。反应液依次用 NaHCO₃ (800 mL)饱和溶液、饱和食盐水 (500 mL) 洗涤, 有机相用无水Na₂SO₄干燥。过滤除去干燥剂后, 滤液浓缩至干。该粗品经柱层析后(SiO₂, PE/EA=100/1 to 5/1)得到无色油状化合物5 (290 g, 527 mmol, 产率75.7%)。¹H NMR (400 MHz in DMSO-d₆): δ ppm 7.23 - 7.40 (m, 5 H), 5.00 - 5.12 (m, 2 H), 3.86 - 3.95 (m, 2 H), 3.23 - 3.39 (m, 6 H), 2.55 - 2.67 (m, 2 H), 1.56 - 1.64 (m, 2 H), 1.31 - 1.46 (m, 27 H). MS (ESI) [M+H]⁺ m/z: **551.6**。

10

向化合物5 (145 g, 263 mmol, 1.00 *eq.*) 中加入 HCOOH (2.9 L), 该溶液在 60 °C下搅拌12小时, LCMS显示化合物5转化完全。向反应液中加入1.5 L甲苯 和1.5L乙腈, 减压浓缩至约500 mL, 随后加入甲苯/乙腈 (1:1, ~750 mL) 并浓缩至约500 mL, 然后加入乙腈(~1000 mL)并浓缩至干, 粗品用700 mL乙腈在60 °C 粉碎2小时, 过滤。收集固体, 干燥得白色固体化合物6 (105 g, 定量)。¹H NMR (400 MHz in DMSO-d₆): δ ppm 7.26 - 7.40 (m, 5 H), 5.02 - 5.10 (m, 2 H), 3.89 - 4.00 (m, 2 H), 3.36 - 3.45 (m, 4 H), 3.24 - 3.34 (m, 2 H), 2.59 - 2.72 (m, 2 H), 1.40 (s, 2 H). MS (ESI) [M+H]⁺ m/z: **383.0**。

15

向化合物**6**(100 g, 261 mmol)和中间体-A (502 g, 915. mmol, 3.50 *eq.*) 的DMF (1.0 L)溶液中加入TBTU(327 g, 1.02 mol, 3.90 *eq.*), 三乙胺 (212 g, 2.09 mol, 8.00 *eq.*), 反应在25 °C进行1小时, LCMS显示化合物**6**转化完成。将反应液加入到 4000 mL水中, 并用甲基叔丁基醚 (2000 mL 分两次) 萃取除去杂质, 剩余水相用二氯甲烷(3000 mL 分两次)萃取。二氯甲烷相依次用
5 10%柠檬酸水溶液 (2000 mL 分两次)、饱和 NaHCO₃ (2.0 L 分两次), 饱和盐水 (2.0 L) 洗涤, 无水Na₂SO₄干燥。过滤得滤液, 减压浓缩得到白色固体化合物**8** (260 g, 159 mmol, 产率 60.9%)。 ¹H NMR (400 MHz in DMSO-d₆): δ ppm 7.99 - 8.08 (m, 2 H), 7.93 (br d, *J*=5.50 Hz, 1 H), 7.79 - 7.86 (m, 3 H), 7.26 - 7.39 (m, 5 H), 5.22 (d, *J*=3.13 Hz, 3 H), 4.95 - 5.08 (m, 5 H), 4.54 (br d, *J*=8.38 Hz, 3 H), 4.03 (s, 9 H), 3.81 - 3.93 (m, 5 H), 3.76 (br d, *J*=4.88 Hz, 3 H), 3.44 - 3.62
10 (m, 10 H), 3.34 - 3.43 (m, 6 H), 3.24 (br d, *J*=6.13 Hz, 7 H), 3.02 - 3.09 (m, 4 H), 2.40 - 2.47 (m, 2 H), 2.10 (s, 9 H), 1.99 (s, 9 H), 1.89 (s, 9 H), 1.77 (s, 9 H), 1.57 - 1.68 (m, 2 H)。 MS (ESI) [M+H]⁺ *m/z*: **816.4**。

用氩气惰性化2 L氢化釜并小心加入干Pd/C (9 g), 加入 MeOH (50 mL) 润湿Pd/C, 然后在氩气气氛下缓慢加入化合物**8** (90 g, 55.1 mmol, 1.00 *eq.*) 和三氟乙酸 (6.29 g, 55.1 mmol, 1.00
15 *eq.*) 的MeOH (850 mL)溶液。混合物经脱气/加H₂三次置换为氢气气氛, 在25 °C搅拌10小时。LCMS显示化合物**8**转化完全, 过滤除去Pd/C, 滤液经减压浓缩得到化合物**9** (80 g, 产率90.2%)。 ¹H NMR (400 MHz in DMSO-d₆): δ ppm 9.12 (br s, 2 H), 8.50 (br t, *J*=5.19 Hz, 1 H), 8.10 (br t, *J*=5.50 Hz, 2 H), 7.85 - 7.91 (m, 3 H), 5.22 (d, *J*=3.25 Hz, 3 H), 4.95 - 5.01 (m, 3 H), 4.52 - 4.58 (m, 3 H), 4.03 (s, 9 H), 3.84 - 3.93 (m, 3 H), 3.75 - 3.83 (m, 3 H), 3.39 - 3.61 (m, 16 H), 3.23 - 3.32 (m,
20 6 H), 3.15 - 3.18 (m, 3 H), 2.97 - 3.05 (m, 2 H), 2.54 - 2.61 (m, 2 H), 2.10 (s, 9 H), 2.00 (s, 9 H), 1.89 (s, 9 H), 1.77 - 1.80 (m, 9 H), 1.70 - 1.76 (m, 2 H)。 MS (ESI) [M+H]⁺ *m/z*: **749.3**。

向化合物**9** (270 g, 168 mmol, 1.00 *eq.*)和戊二酸酐 (28.6 g, 252 mmol, 1.50 *eq.*) 的二氯甲烷 (2.7 L) 溶液中加入三乙胺(67.8 g, 672 mmol, 4.00 *eq.*), 该溶液在25 °C 搅拌1小时, LCMS显示化合物**9**完全转化为化合物**11**。向反应液中加入4-羟基哌啶(42.4 g, 420 mmol, 2.50 *eq.*)
25 和 TBTU(107 g, 335 mmol, 2.00 *eq.*), 并在25 °C继续搅拌1小时。LCMS显示化合物**11**转化完全。 缓慢加入饱和NH₄Cl (3.0 L)淬灭反应, 分层, 水相用二氯甲烷(2 x 1000 mL) 萃取并与先前的有机相合并。合并的有机相用饱和NaHCO₃ (aq)和饱和盐水的1:1混合液(3.0 L)洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥, 过滤减压浓缩。粗品溶于1.5 L二氯甲烷, 滴加到甲基叔丁基醚 (7.5 L)中, 半

透明的白色沉淀在滴加过程中逐渐形成。真空过滤沉淀，收集固体真空干燥得到白色固体化合物**13** (207 g, 产率72.8%)。¹H NMR (400 MHz in DMSO-d₆): δ ppm 8.05 (br d, *J*=2.00 Hz, 2 H), 7.82 (br d, *J*=7.38 Hz, 3 H), 5.21 (br s, 3 H), 4.98 (br d, *J*=10.26 Hz, 3 H), 4.72 (br s, 1 H), 4.54 (br d, *J*=7.88 Hz, 3 H), 4.03 (br s, 9 H), 3.74 - 3.94 (m, 9 H), 3.45 - 3.71 (m, 12 H), 3.40 (br s, 6 H), 3.24 (br s, 7 H), 3.07 (br d, *J*=14.13 Hz, 5 H), 2.91 - 3.01 (m, 1 H), 2.24 - 2.44 (m, 5 H), 2.20 (br s, 1 H), 2.10 (s, 9 H), 1.96 - 2.04 (m, 9 H), 1.89 (br s, 9 H), 1.74 - 1.81 (m, 9 H), 1.51 - 1.73 (m, 6 H), 1.07 - 1.36 (m, 3 H). MS (ESI) [M+H]⁺ *m/z*: 848.0。

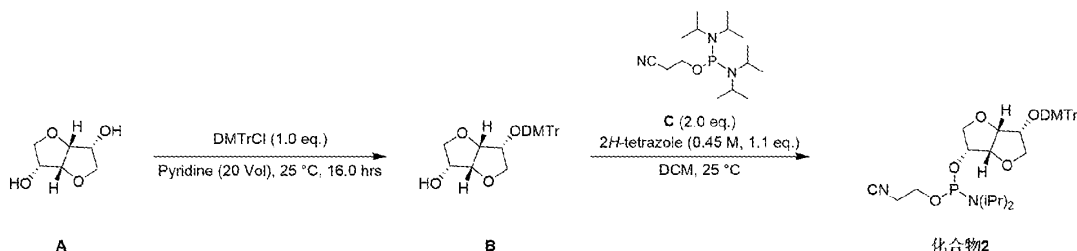
向化合物 **13** (200 g, 118 mmol, 1.00 *eq.*)、四唑二异丙基铵 (8.08 g, 47.2 mmol, 0.40 *eq.*) 的二氯甲烷 (2.0 L) 溶液中加入3-双(二异丙基氨基)膦酰氧基丙腈, (53.3 g, 177 mmol, 1.50 *eq.*), 反应液在40 °C 搅拌2小时, LCMS显示化合物**13**转化完成。反应液用饱和 NaHCO₃ 和饱和食盐水的1:1混合液(2.0 L)洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥, 滤液浓缩后所得粗品溶于二氯甲烷(1.2 L), 滴加到搅拌的甲基叔丁基醚 (6.0 L)中, 过滤悬浊液, 滤饼用基叔丁基醚淋洗, 收集固体进行真空干燥, 将产品溶于二氯甲烷(1.0 L)并浓缩至干, 重复操作4次以除去残留叔丁基醚得到 GLPA15 (164 g, 产率73.3%)。 ¹H NMR (400 MHz in DMSO-d₆): δ ppm 8.05 (br d, *J* = 6.50 Hz, 2 H), 7.81 (br d, *J*=9.01 Hz, 3 H), 5.22 (d, *J*=3.25 Hz, 3 H), 4.98 (dd, *J*=11.26, 3.25 Hz, 3 H), 4.55 (br d, *J*=8.50 Hz, 3 H), 4.03 (s, 9 H), 3.64 - 3.97 (m, 12 H), 3.55 - 3.63 (m, 6 H), 3.50 (br s, 5 H), 3.40 (br d, *J*=6.13 Hz, 6 H), 3.17 - 3.30 (m, 9 H), 3.07 (br d, *J*=14.26 Hz, 4 H), 2.76 (t, *J*=5.82 Hz, 2 H), 2.18 - 2.47 (m, 6 H), 2.10 (s, 9 H), 1.99 (s, 9 H), 1.89 (s, 9 H), 1.78 (s, 9 H), 1.52 - 1.74 (m, 6 H), 1.12 - 1.19 (m, 12 H). ³¹P NMR (DMSO-d₆): ppm δ 145.25. MS (ESI) [M+H]⁺ *m/z*: 1895.7。

在某些研究中, 提供了用于将包含 GalNAc (本文也称为 GalNAc 递送化合物) 的靶向基团连接到正义链的 5'-末端的方法, 其包括在固相合成的最后一个偶联步骤中使用 GalNAc 亚磷酰胺 (GLPA1), 使用这样的合成工艺, 例如在寡核苷酸链延长时使用的 (即在正义链的 5'末端添加核苷酸) 工艺, 以将其连接到正义链的 5'-末端。

在一些研究中, 将包含 GalNAc 的靶向基团连接到正义链的 3'-末端的方法包括使用包含 GLO-n 的固体支持物 (CPG)。在一些研究中, 将包含 GalNAc 的靶向基团连接到正义链的 3'-末端的方法包括: 将 GalNAc 靶向基团通过酯键连接到 CPG 固体支持物上, 并在合成正义链时使用带有连接的 GalNAc 靶向基团的所得 CPG, 这导致 GalNAc 靶向基团连接在正义链的 3'-末端。其他 GalNAc 亚磷酰胺化合物 (GLPAn) 也同样可以在使用合理对应的中间体后, 采用本文类似或者本领域中熟知的方法获得, 并作为靶向基团连接到 siRNA 双链体

合适的位置。

实施例 4. 异甘露醇亚磷酰胺（化合物 2）的合成



将在吡啶（400 毫升）中的 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷（DMTrCl，232 克，684 毫摩尔，1.0 当量），加入到化合物 A（异甘露醇，100 克，684 毫摩尔，1.0 当量）的吡啶（600 毫升）溶液中，将混合物在 25°C 下搅拌 16 小时。LC-MS 显示化合物 A 被完全消耗，并且检测到一个具有所需质量的主峰。将所得反应混合物用水（500 毫升）稀释，用二氯甲烷（500 毫升*2）萃取，合并的有机相，用盐水（500 毫升）洗涤，用 Na₂SO₄ 干燥并在真空中浓缩以获得残留物。残余物用柱层析（DCM/MeOH=100/1 至 50/1，0.1%Et₃N）纯化，得到化合物 B（150 克，收率 48.9%）的黄色固体。¹H NMR: EC4783-404-P1B1_C (400 MHz, DMSO-*d*₆)

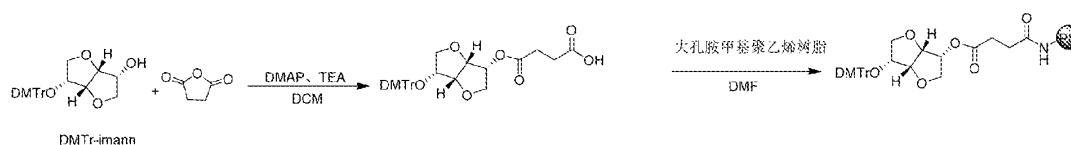
δ ppm 7.46 (br d, *J*=7.63 Hz, 2 H) 7.28 - 7.37 (m, 6 H) 7.19 - 7.25 (m, 1 H) 6.90 (br d, *J*=7.88 Hz, 4 H) 4.70 (d, *J*=6.50 Hz, 1 H) 3.99 - 4.09 (m, 6 H) 3.88 - 3.96 (m, 2 H) 3.83 (br dd, *J*=7.82, 6.94 Hz, 1 H) 3.74 (s, 6 H) 3.41 (br t, *J*=8.13 Hz, 1 H) 3.05 (t, *J*=8.44 Hz, 1 H) 2.85 (br t, *J*=7.50 Hz, 1 H).

在 N₂ 大气压下，在向化合物 B（80.0 克，178 毫摩尔，1.0 当量）的二氯甲烷（5.0 毫升）溶液中，在 25°C 下滴加 2H-四氮唑（0.45M，436 毫升，1.1 当量），然后滴加化合物 C（2-氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺，80.6 克，267 毫摩尔，85.0 毫升，1.5 当量）中的二氯甲烷（200 毫升）的溶液；将反应混合物在 25°C 下搅拌 1.0 小时；LC-MS 显示化合物 B 被完全消耗，并且检测到一个具有所需质量的主峰。将所得反应混合物冷却至 -20°C 并倒入冰冷的坐下；NaHCO₃（500 毫升），用二氯甲烷（500 毫升*3）提取，合并的有机层用 NaHCO₃/盐水=1: 1（300 毫升/300 毫升）洗涤，用 Na₂SO₄ 干燥，并在真空（35°C）中浓缩以获得残留物（100 毫升）。残余物用柱层析法纯化（Al₂O₃，DCM/MeOH=100/1 至 50/1，0.1%Et₃N），得到异甘露醇亚磷酰胺化合物 2（77 g，119 mmol，收率 66.5%）为白色固体。¹H NMR: EC4783-423-P1B1_C (400 MHz, DMSO-*d*₆)

δ ppm 7.22 (br d, $J=7.50$ Hz, 2 H) 7.05 - 7.14 (m, 6 H) 6.96 - 7.02 (m, 1 H) 6.67 (br dd, $J=8.82$, 1.81 Hz, 4 H) 3.95 - 4.07 (m, 2 H) 3.73 - 3.83 (m, 1 H) 3.62 - 3.72 (m, 2 H) 3.48 - 3.53 (m, 6 H) 3.27 - 3.37 (m, 3 H) 3.11 (s, 6 H) 2.82 (td, $J=8.54$, 2.31 Hz, 1 H) 2.47 - 2.63 (m, 3 H) 2.28 (br d, $J=1.63$ Hz, 3 H) 0.82 - 1.00 (m, 13 H).

5

实施例 5. 包含异甘露醇单体的固体载体的制备



表示大孔胺甲基聚乙烯树脂载体部分

10 将50 L玻璃釜在氮气保护下，向玻璃釜中加入二氯甲烷(19.50kg)，开动搅拌。控温20~30°C，向玻璃釜中加入DMTr-imann(1.47 kg)，向反应釜中加入三乙胺(1.50 kg)、4-二甲氨基吡啶(0.164 kg)，以及加入丁二酸酐(1.34 kg)。体系保温20~30°C反应18h后取样，结束反应。向反应完体系中加入饱和碳酸氢钠溶液(22.50 kg)，搅拌10~20min后静置至分层，下层有机相转移至，上层水相用二氯甲烷萃取2次，合并有机相，采用无水硫酸钠干燥，过滤滤液，再转移旋蒸浓缩至无馏分，形成成固体灰色至类白色固体1.83 kg。

15 在向100L玻璃釜中加入N,N-二甲基甲酰胺(23.50 kg)，开动搅拌。控温20~30°C，氮气保护下，通过固体加料漏斗向上述100L玻璃釜中加入上步产物、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐(0.33 kg)、加入N,N-二异丙基乙胺(0.13kg)，加料完毕搅拌10~30 分钟后放出至50 L镀锌桶待用。通过固体加料漏斗向上述100 L固相合成釜中加入大孔胺甲基树脂(3.25 kg) (购于天津南开和成科技有限公司，批号HA2X1209,负载量0.48mmol/g)，控温20~30°C，向固相合成釜中加入N,N-二甲基甲酰胺(21.00kg+21.00 kg)，和上步镀锌桶待用反应液。体系于保温反应，跟踪至固体载量 $\geq 250\mu\text{mol/g}$ ，载量检测方法为UV。体系用氮气压滤，滤饼用N,N-二甲基甲酰胺淋洗三次(26.00kg+26.10kg+26.00 kg)，滤饼留在釜中。向80L玻璃釜中加入CAP.A(4.40kg+4.42kg+4.30kg)和CAP.B(4.40kg+4.40kg+4.47kg)，搅拌3~8min后待用。此操作重复进行3次进行盖帽，向固相合成釜中加入乙腈(18.00 kg+18.00 kg+18.00 kg+17.50 kg+17.50 kg)，氮气鼓泡10~30min后压滤。重复此操作四次，滤饼在固相合成釜中使用氮气吹扫2~4 h后转移至50 L压滤罐，控温15~30°C，继续干燥，将烘干后黄色至白色固体产品，重量: 3.516 kg。

25

异山梨醇残基（imann）可以通过本领域技术人员熟知方法，如反向无碱基（invab）同样的工艺方法，将其添加到寡核苷酸链的5'末端或者3'末端，并进一步添加靶向基团。

实施例 6. 应用 Huh7 细胞和双荧光报告基因载体进行 LPA siRNA 双链体的体外筛选

5 Huh7 细胞调整到合适的密度，然后接种到 96 孔板中。根据制造商的建议，在接种的同时，使用 Lipofectamine RNAiMax（Invitrogen -13778-150）将含靶基因的双荧光报告基因载体 psciCHECK2 与 siRNA 共同转染进入 Huh7 细胞。用测试 siRNA 或对照 siRNA 转染细胞。siRNA 以两个浓度(0.1 nM 和 1.0 nM)一式三份进行测试，转染后 48 小时，加入 Dual-Glo® Luciferase Assay Reagent 试剂检测荧光值。计算海肾发光和萤火虫发光的比，并将其基于对照 siRNA 处理的样品的比进行归一化，以计算敲低效率。结果如表 4 所示，使用的双链体 AV#来源于对应表 2 中所示的序列。

10

表 4 提供了使用多种 LPA RNAi 试剂抑制 LPA 表达的体外研究的实验结果。

化合物 ID	抑制%						平均±SD	
	1nM			0.1nM			1nM	0.1nM
AV00122	46.88	39.56	29.62	-10.77	-1.49	-18.62	38.69±8.66	-10.29±8.57
AV00123	42.34	26.55	36.79	-7.68	-31.59	-10.12	35.23±8.01	-16.46±13.16
AV00124	62.09	60.30	65.01	23.45	32.98	27.50	62.47±2.38	27.98±4.78
AV00125	25.96	19.54	13.62	10.87	5.64	8.35	19.71±6.17	8.28±2.62
AV00126	57.79	49.37	49.63	24.96	28.22	13.57	52.26±4.79	22.25±7.69
AV00127	60.31	51.67	54.57	22.52	12.95	13.87	55.52±4.4	16.44±5.28
AV00128	14.45	19.71	8.00	14.39	2.08	-5.46	14.05±5.87	3.67±10.02
AV00129	37.12	38.30	20.18	26.01	12.46	-1.20	31.87±10.14	12.42±13.61
AV00130	5.18	5.32	10.82	21.04	18.38	13.33	7.11±3.22	17.58±3.92
AV00131	30.07	31.44	38.14	8.51	25.97	23.80	33.22±4.32	19.43±9.51
AV00132	26.46	16.87	24.53	26.67	-5.93	18.47	22.62±5.07	13.07±16.96
AV00133	30.64	13.58	30.46	1.27	16.57	14.84	24.9±9.8	10.89±8.38
AV00134	-1.69	23.47	3.75	-10.06	-11.46	2.31	8.51±13.24	-6.4±7.58
AV00135	-0.25	15.11	11.55	-0.35	-1.05	-10.59	8.8±8.04	-4±5.72
AV00136	-5.77	2.13	5.80	10.89	14.96	2.82	0.72±5.91	9.56±6.18

AV00137	19.35	21.06	29.49	15.89	13.70	10.16	23.3±5.43	13.25±2.89
AV00138	48.10	46.49	44.67	19.50	13.68	19.53	46.42±1.71	17.57±3.37
AV00139	61.67	63.90	49.21	26.21	27.72	25.37	58.26±7.92	26.44±1.19
AV00140	34.63	29.60	28.49	16.87	25.81	23.73	30.91±3.27	22.14±4.68
AV00141	37.26	40.08	34.19	24.02	10.49	7.39	37.17±2.95	13.96±8.84
AV00142	31.56	38.44	47.32	32.86	30.04	7.52	39.11±7.9	23.47±13.89
AV00143	16.55	5.61	25.08	2.56	1.09	14.66	15.75±9.76	6.1±7.44
AV00144	34.87	36.47	22.09	-1.37	23.23	-2.57	31.14±7.88	6.43±14.56
AV00145	12.58	20.84	23.93	6.89	17.73	18.90	19.12±5.87	14.51±6.62
AV00146	17.23	2.18	35.70	9.75	-14.56	9.86	18.37±16.79	1.68±14.07
AV00147	37.07	29.40	30.89	-12.86	12.78	3.28	32.46±4.07	1.07±12.96
AV00148	18.91	24.27	20.66	15.39	-0.29	10.06	21.28±2.74	8.38±7.97
AV00149	34.67	35.51	42.00	17.63	14.16	0.91	37.39±4.01	10.9±8.83
AV00150	23.64	32.49	39.08	8.26	27.22	4.10	31.74±7.75	13.2±12.32
AV00151	29.63	18.23	33.40	-11.53	4.85	3.28	27.08±7.9	-1.14±9.04
AV00152	7.14	8.73	11.52	-10.32	7.00	19.93	9.13±2.22	5.54±15.18
AV00153	15.18	17.10	11.01	-2.68	18.17	8.92	14.43±3.11	8.14±10.45
AV00154	3.76	8.40	-2.82	3.55	11.84	23.76	3.11±5.64	13.05±10.16
AV00155	40.39	35.99	24.94	20.29	4.72	8.22	33.78±7.96	11.08±8.17
AV00156	48.03	53.87	44.46	19.65	4.24	0.54	48.79±4.75	8.14±10.14
AV00157	5.83	0.73	14.54	8.81	0.28	-5.20	7.03±6.98	1.29±7.06
AV00158	-25.20	-13.67	-10.50	-19.74	-27.38	-8.06	-16.46±7.74	-18.39±9.73
AV00159	-0.49	-1.23	3.57	12.19	7.24	-8.92	0.62±2.59	3.5±11.04
AV00160	-14.61	-0.51	-16.26	-13.95	4.74	-36.43	-10.46±8.65	-15.21±20.61
AV00161	37.16	23.76	20.23	0.03	3.95	4.53	27.05±8.94	2.84±2.45
AV00162	15.17	30.06	26.53	1.97	4.32	9.94	23.92±7.78	5.41±4.1
AV00163	26.51	6.32	4.45	3.68	-6.42	-0.56	12.43±12.23	-1.1±5.08
AV00164	12.92	3.15	0.52	4.68	-0.72	-5.31	5.53±6.54	-0.45±5

AV00165	8.82	27.01	-8.40	6.07	-1.25	-4.54	9.14±17.71	0.09±5.43
AV00166	-0.92	-11.91	4.33	-1.21	5.41	7.70	-2.83±8.29	3.97±4.63
AV00167	38.80	26.25	13.39	16.98	9.31	1.68	26.14±12.7	9.32±7.65
AV00168	50.66	44.21	42.59	-3.68	18.09	24.86	45.82±4.27	13.09±14.91
AV00169	-4.71	1.84	-6.06	-7.67	0.35	-1.47	-2.97±4.23	-2.93±4.2
AV00170	-26.60	-24.07	-18.79	-25.70	8.71	12.90	-23.15±3.98	-1.36±21.18
AV00171	-9.86	0.81	8.35	-18.50	-8.10	-28.33	-0.23±9.15	-18.31±10.11
AV00172	21.83	29.14	21.85	14.74	8.44	-2.30	24.28±4.21	6.96±8.62
AV00173	18.80	11.14	9.85	0.53	4.28	2.49	13.26±4.84	2.44±1.87
AV00174	20.20	3.18	27.08	0.74	11.08	-3.33	16.82±12.3	2.83±7.43
AV00175	17.95	12.15	13.36	12.15	17.57	-0.95	14.49±3.06	9.59±9.52
AV00176	44.25	48.81	43.11	7.78	25.40	20.96	45.39±3.02	18.05±9.16
AV00177	23.93	36.34	27.92	23.12	-5.39	9.75	29.4±6.34	9.16±14.26
AV00178	0.00	6.42	-9.82	9.86	18.29	4.30	-1.13±8.18	10.82±7.04
AV00179	10.09	0.83	15.90	17.67	0.27	-3.09	8.94±7.6	4.95±11.15
AV00180	23.19	31.99	32.14	1.35	-1.15	10.37	29.11±5.12	3.52±6.06
AV00181	-2.78	-11.51	-6.05	3.14	3.68	17.42	-6.78±4.41	8.08±8.1
AV00182	-42.00	-13.22	-16.52	-18.26	-6.23	-5.03	-23.91±15.75	-9.84±7.32
AV00183	-6.80	7.22	-13.19	-5.60	-3.55	-10.33	-4.26±10.44	-6.49±3.48
AV00184	-19.87	-3.42	2.48	-11.82	5.71	-5.44	-6.93±11.58	-3.85±8.87
AV00185	7.87	12.20	6.68	7.79	20.31	8.12	8.92±2.91	12.07±7.14
AV00186	16.29	14.22	8.71	4.34	1.60	19.64	13.07±3.92	8.53±9.72
AV00187	27.62	23.09	32.62	-0.06	-7.08	-2.73	27.78±4.77	-3.29±3.55
AV00188	25.32	11.82	9.96	6.89	2.45	5.45	15.7±8.39	4.93±2.26
AV00189	36.90	25.16	27.89	9.72	26.25	13.84	29.98±6.14	16.6±8.61
AV00190	-19.33	-3.61	17.31	2.40	13.23	6.97	-1.88±18.38	7.53±5.44
AV00191	-8.17	2.85	-14.56	7.21	6.42	4.45	-6.63±8.81	6.03±1.42
AV00192	-15.69	7.96	7.26	5.66	16.15	10.03	-0.16±13.46	10.61±5.27

AV00193	-4.92	15.62	-2.27	2.99	-3.76	3.73	2.81±11.17	0.98±4.13
AV00194	-33.87	-19.43	-28.60	-43.88	-20.84	-7.36	-27.3±7.31	-24.03±18.47
AV00195	0.20	18.94	13.75	-12.53	-16.30	-4.18	10.96±9.68	-11±6.21
AV00196	13.36	2.83	9.10	-11.87	1.83	-11.47	8.43±5.3	-7.17±7.8
AV00197	16.31	10.80	17.97	15.72	3.62	-12.32	15.03±3.75	2.34±14.07
AV00198	9.66	-9.58	13.15	11.57	25.56	9.67	4.41±12.24	15.6±8.67
AV00199	1.16	4.54	7.07	18.16	-2.74	13.05	4.26±2.97	9.49±10.9
AV00200	0.38	17.21	5.05	11.62	-19.20	-21.34	7.55±8.69	-9.64±18.44
AV00201	13.46	3.72	-1.04	-2.48	-6.79	13.82	5.38±7.39	1.51±10.87
AV00202	17.81	27.79	23.96	24.33	16.06	14.70	23.19±5.04	18.36±5.22
AV00203	23.36	24.72	14.70	12.28	0.46	11.09	20.93±5.44	7.94±6.51
AV00204	9.50	27.29	11.48	-0.63	11.79	-7.73	16.09±9.75	1.14±9.88
AV00205	5.30	6.46	11.40	-3.32	4.30	-15.98	7.72±3.24	-5±10.24

实施例 7. LPA siRNA 双链体的体内测试

为了评估 LPA siRNA 的体内活性,使用了感染了编码人 LPA 和萤光素酶基因的 AAV 的小鼠(每组 4 只小鼠)。在 siRNA 给药前 14 天,对雌性 C57BL/6J 小鼠通过静脉注射 2×10^{11} viral particle of 编码人 LPA 和萤光素酶基因的腺相关病毒 8 (AAV8) 载体的原液来进行感染。在第 0 天,小鼠皮下注射单剂量 6 mg/kg 的 LPA siRNA 试剂或 PBS。在第 0 天、siRNA 给药前和第 7 天终止时收集血样。测量萤光素酶活性。通过比较 siRNA 处理组给药前血样的萤光素酶活性和第 7 天终止时收集血样的萤光素酶活性并且基于来自 PBS 处理组的血清样品中的萤光素酶活性变化进行归一化,以计算敲低百分比。结果如表 5 所示,使用的双链体 AD#来源于对应在表 3 中所示的序列。

表 5 提供了使用多种 LPA_RNAi 单次 6 mpk 药剂抑制 LPA 表达的体内研究的实验结果。第 7 天,相对于第 0 天剩余的萤光素酶活性,通过 PBS 处理组中的变化归一化(平均 $\pm$ SD)

双链体 AD#	第 7 天, 相对于 PBS 的萤光素酶活性(平均 $\pm$ SD)
AD00433	0.71 $\pm$ 0.23
AD00434	0.66 $\pm$ 0.33
AD00438	0.69 $\pm$ 0.22
AD00436	0.22 $\pm$ 0.07
AD00441	0.54 $\pm$ 0.08

实施例 8. LPA siRNA 双链体的体内测试

为了评估 LPA siRNA 的体内活性,使用了感染了编码人 LPA 和萤光素酶基因的 AAV 的小鼠(每组 4 只小鼠)。在 siRNA 给药前 14 天,对雌性 C57BL/6J 小鼠通过静脉注射 2×10^{11} viral particle of 编码人 LPA 和萤光素酶基因的腺相关病毒 8 (AAV8) 载体的原液来进行感染。在第 0 天,小鼠皮下注射单剂量 6 mg/kg 的 LPA siRNA 试剂或 PBS。在第 0 天 siRNA 给药前、第 7 天和 14 天终止时收集血样。测量萤光素酶活性,通过比较 siRNA 处理组给药前血样的萤光素酶活性与第 7 和 14 天时收集血样的萤光素酶活性并且基于来自 PBS 处理组的血清样品中的萤光素酶活性变化进行归一化,以计算敲低百分比。通过比较 siRNA 处理组和 PBS 处理组的第 14 天小鼠肝脏中人 LPA mRNA 水平(qPCR 确定)敲低(保留)百分比,结果如表 6 所示,使用的双链体 AD#来源于对应在表 3 中所示的序列。

表 6. 提供了使用多种 LPA_RNAi 单次 6 mpk 药剂抑制 LPA 表达的体内研究的实验结果。

双链体 AD#	第 7 天, 相对于 PBS 的 荧光素酶活性(平均± SD)	第 14 天, 相对于 PBS 的 荧光素酶活性(平均± SD)	qPCR 检测人 LPA mRNA 在 小鼠肝脏中保留的百分比(平 均± SD)
AD00474	0.36±0.05	0.31±0.18	0.36±0.24
AD00475	0.53±0.56	0.36±0.27	0.14±0.1
AD00476	0.73±0.46	0.38±0.1	0.17±0.08
AD00477	1.11±0.3	0.64±0.14	0.82±0.14
AD00478	0.73±0.39	0.61±0.17	0.38±0.31
AD00479	0.48±0.26	0.48±0.07	0.18±0.11
AD00480	0.31±0.18	0.22±0.14	0.14±0.12
AD00481	0.93±0.35	0.72±0.32	0.57±0.12
AD00482	0.47±0.37	0.4±0.33	0.15±0.08
AD00474-1	0.48±0.1	0.3±0.1	0.33±0.4
AD00478-1	0.48±0.09	0.32±0.05	0.32±0.1
AD00482-1	0.4±0.1	0.34±0.07	0.18±0.13
AD00483	0.49±0.16	0.6±0.21	0.65±0.4
AD00484	0.83±0.11	1.08±0.35	0.77±0.32
AD00485	0.41±0.09	0.54±0.14	0.49±0.16
AD00486	0.4±0.19	0.69±0.09	NA
AD00487	0.44±0.11	0.83±0.18	NA
AD00484-1	0.51±0.16	0.64±0.35	0.45±0.49
AD00342	0.6±0.18	0.58±0.13	0.59±0.21

NA 表示未检测。

实施例 9. LPA siRNA 双链体的体内测试

- 5 为了评估 LPA siRNA 的体内活性, 使用了感染了编码人 LPA 和萤光素酶基因的 AAV 的小鼠(每组 4 只小鼠)。在 siRNA 给药前 7 天, 对雌性 C57BL/6J 小鼠通过静脉注射 2×10^{11}

viral particle of 编码人 LPA 和萤光素酶基因的腺相关病毒 8（AAV8）载体的原液来进行感染。在第 0 天，小鼠皮下分别注射单剂量 3 mg/kg，6 mg/kg 和 10 mg/kg 的 LPA siRNA 试剂或 PBS。终止时处死小鼠。通过比较 siRNA 处理组和 PBS 处理组的第 14 天小鼠肝脏中人 LPA mRNA 水平（qPCR 确定）敲低（保留）百分比，结果如表 7 所示，使用的双链体 AD# 来源于对应在表 3 中所示的序列。

表 7. 提供了使用多种 LPA_RNAi 分别单次 3 mpk、6 mpk 以及 10 mpk 药剂抑制 LPA 表达的体内研究的实验结果。

双链体 AD#	qPCR 检测人 LPA mRNA 在小鼠肝脏中保留的百分比(平均±SD)		剂量 mg/kg
	Mean	SD	
AD00436	0.31	0.07	3
	0.29	0.07	6
	0.29	0.20	10
AD00337	0.59	0.23	3
	0.72	0.39	6
	0.46	0.23	10

实施例 10. LPA siRNA 双链体的体内测试

为了评估 LPA siRNA 的体内活性，使用了感染了编码人 LPA 和萤光素酶基因的 AAV 的小鼠（每组 4 只小鼠）。在 siRNA 给药前 7 天，对雌性 C57BL/6J 小鼠通过静脉注射 2x10¹¹ viral particle of 编码人 LPA 和萤光素酶基因的腺相关病毒 8（AAV8）载体的原液来进行感染。在第 0 天，小鼠皮下注射单剂量 2 mg/kg 或者 6 mg/kg 的 LPA siRNA 试剂或 PBS。分别 在第 0 天、siRNA 给药前和第 7、14 和 21 天终止时收集血样。测量萤光素酶活性。通过比较 siRNA 处理组给药前血样的萤光素酶活性与第 7、14 和 21 天终止时收集血样的萤光素酶活性并且基于来自 PBS 处理组的血清样品中的萤光素酶活性变化进行归一化，以计算敲低百分比。结果如表 8 所示，使用的双链体 AD#来源于对应在表 3 中所示的序列。

表 8. 提供了使用多种 LPA_RNAi 单次 2 和 6 mpk 药剂抑制 LPA 表达的体内研究的实验结果，第 7、14 和 21 天，相对于第 0 天剩余的萤光素酶活性，通过 PBS 处理组中的变化归一化(平均 ± SD)。

双链体 AD#	相对于 PBS 的荧光素酶活性(平均± SD)			剂量 mg/kg
	7 天	14 天	21 天	
PBS	1.00± 0.38	1.00± 0.23	1.00± 0.37	
AD00436	0.53± 0.36	0.45± 0.09	0.40± 0.29	2
AD00436	0.34± 0.07	0.30± 0.06	0.31± 0.11	6
AD00474	0.98± 0.66	0.52± 0.20	0.66± 0.39	2
AD00474	0.36± 0.16	0.19± 0.10	0.21± 0.07	6
AD00475	0.48± 0.21	0.34± 0.17	0.34± 0.21	2
AD00475	0.47± 0.20	0.15± 0.03	0.18± 0.12	6
AD00476	0.75± 0.33	0.38± 0.13	0.52± 0.26	2
AD00476	0.65± 0.04	0.36± 0.14	0.29± 0.16	6
AD00479	0.53± 0.34	0.41± 0.19	0.53± 0.25	2
AD00479	0.41± 0.17	0.34± 0.08	0.31± 0.17	6
AD00480	0.35± 0.15	0.23± 0.02	0.24± 0.13	2
AD00480	0.28± 0.07	0.15± 0.05	0.24± 0.08	6
AD00482	0.71± 0.37	0.50± 0.13	0.56± 0.27	2
AD00482	0.41± 0.33	0.27± 0.08	0.31± 0.08	6
AD00474-1	0.42± 0.11	0.35± 0.11	0.29± 0.04	6
AD00478-1	0.54± 0.15	0.28± 0.08	0.37± 0.01	6
AD00482-1	0.24± 0.15	0.28± 0.14	0.15± 0.04	6
AD00337	0.41± 0.19	0.62± 0.21	0.74± 0.16	2
AD00337	0.47± 0.21	0.45± 0.33	0.37± 0.19	6
AD00150	0.83± 0.35	0.74± 0.26	0.58± 0.10	2
AD00150	0.41± 0.20	0.25± 0.09	0.28± 0.24	6

实施例 11. LPA siRNA 双链体的体内测试

为了评估 LPA siRNA 的体内活性，本研究共招募雄性食蟹猴（13-22 岁，体重 7~9 公斤）， 每组 3 只，每只动物皮下注射给予 2mg/kg 供试品，使用的供试品对应于表 3 中

所示的化合物（AD00377-1、AD00436-1、AD00480、AD00480-1、AD00480-2、AD00474-2）。禁食过夜后，在第 -14 天（给药前）、-7（给药前）、1（给药前）和给药后第 8、15、22、29、43、50、57、64、71、78、 85 、92 和 99 天进行采血。将采集的血样在室温下放置至少 30 分钟凝固，然后在 4℃ 下以 3500 rpm 的转速离心 10 分钟。将收集的血清（约 1.0 mL）转移到两个预先标记的聚丙烯螺旋盖小瓶中（0.5 ml/小瓶，一个用于 ELISA 测定，另一个备用），储存在 -80℃ 的冰箱中直至测试。LPA 剩余百分比（标准化至第 -14 天（给药前）、-7（给药前）、1（给药前）均值，siRNA 的预给药）如图 1 所示。

实施例 12. LPA siRNA 双链体的体内测试

为了评估 LPA siRNA 的体内活性，本研究共招募雄性食蟹猴（2-6 岁，体重 2~6 公斤），每组 4 只，每只动物皮下注射给予生理盐水、2mg/kg 的 AD00480-8 供试品，使用的供试品 AD00480-8 对应于表 3 中所示的化合物。禁食过夜后，在第 -14 天（给药前）、0（给药前）和给药后第 7、14 和 21 天进行采血。附图将采集的血样在室温下放置至少 30 分钟凝固，然后在 4℃ 下以 3500 rpm 的转速离心 10 分钟。将收集的血清（约 1.0 mL）转移到两个预先标记的聚丙烯螺旋盖小瓶中（0.5 ml/小瓶，一个用于 ELISA 测定，另一个备用），储存在 -80℃ 的冰箱中直至测试。LPA 剩余百分比（标准化至第 -14 天（给药前）、0（给药前）均值，siRNA 的预给药）如图 2 所示。

实施例 13. 应用 Huh7 细胞和双荧光报告基因载体进行 LPA siRNA 双链体的体外筛选

Huh7 细胞调整到合适的密度，然后接种到 96 孔板中。根据制造商的建议，在接种的同时，使用 Lipofectamine RNAiMax（Invitrogen -13778-150）将含靶基因的双荧光报告基因载体 psciCHECK2 与 siRNA 共同转染进入 Huh7 细胞。用测试 siRNA 或对照 siRNA 转染细胞。siRNA 以两个浓度（0.1 nM 和 1.0 nM）一式三份进行测试，转染后 48 小时，加入 Dual-Glo® Luciferase Assay Reagent 试剂检测荧光值。计算海肾发光和萤火虫发光的比，并将其基于对照 siRNA 处理的样品的比进行归一化，以计算敲低效率。结果如表 9 所示，使用的双链体 AV#来源于对应在表 2 中所示的序列。

表 9 提供了使用多种 LPA RNAi 试剂抑制 LPA 表达的体外研究的实验结果。

化合物	抑制%(MEAN±SD)		化合物	抑制%(MEAN±SD)	
	1nM	0.1nM		1nM	0.1nM
AV01867	46.80±4.94	20.67±6.22	AV01921	43.98±3.11	10.24±2.51
AV01868	49.97±3.00	21.34±5.62	AV01922	48.03±3.11	16.51±1.01

AV01873	22.50±6.76	6.04±3.83	AV01923	50.53±4.02	30.41±4.87
AV01874	20.31±1.71	1.22±8.37	AV01924	57.72±3.14	34.72±1.99
AV01875	27.87±1.62	-5.41±4.13	AV01925	49.37±3.12	28.89±5.77
AV01876	25.57±6.31	-7.12±10.15	AV01926	57.83±4.08	38.92±1.85
AV01877	32.85±3.12	7.02±1.04	AV01927	32.41±9.25	16.81±3.52
AV01878	37.56±0.72	2.90±8.20	AV01928	58.81±3.31	40.57±2.02
AV01879	38.63±0.47	14.23±4.04	AV01929	58.05±4.18	33.99±5.29
AV01880	36.24±5.54	9.07±11.68	AV01930	58.89±3.50	35.67±3.53
AV01881	45.01±3.67	19.69±5.00	AV01931	49.37±2.20	19.50±3.95
AV01882	35.40±2.43	7.05±4.97	AV01932	30.69±0.79	4.38±5.60
AV01883	44.89±0.46	13.21±3.78	AV01934	34.14±3.07	13.58±4.37
AV01884	26.17±1.54	12.79±1.48	AV01935	44.01±2.35	16.32±4.15
AV01885	25.52±7.87	10.49±2.89	AV01936	50.96±4.79	24.30±9.44
AV01892	53.83±2.87	25.26±5.37	AV01937	48.58±2.39	14.95±3.03
AV01893	36.28±2.27	6.31±2.85	AV01938	32.80±16.53	4.91±7.45
AV01894	35.36±3.10	11.69±5.37	AV01939	53.10±3.18	27.01±2.43
AV01895	45.05±3.74	23.56±4.75	AV01940	50.61±0.41	25.92±2.96
AV01896	40.16±7.76	17.86±5.24	AV01941	60.07±2.85	35.89±2.87
AV01897	45.63±7.21	19.64±4.51	AV01942	53.04±2.48	25.26±6.30
AV01898	49.62±9.10	16.53±7.32	AV01943	54.83±2.70	29.55±3.91
AV01899	57.70±3.74	35.66±2.89	AV01944	53.74±3.75	23.32±1.22
AV01900	53.18±2.20	30.51±3.16	AV01945	56.37±2.30	25.57±1.53
AV01901	44.34±6.20	13.45±5.55	AV01946	54.40±1.99	27.22±1.92
AV01904	35.60±7.26	2.08±11.15	AV01947	46.31±3.73	10.99±5.81
AV01905	40.65±4.84	15.01±4.32	AV01948	34.03±5.43	13.50±5.30
AV01906	44.74±0.90	13.56±2.16	AV01949	29.76±2.51	7.70±1.98
AV01907	34.73±0.26	14.73±1.92	AV01952	49.08±1.47	27.95±4.70
AV01908	49.62±7.01	31.33±6.37	AV01953	46.02±3.99	21.19±4.05

AV01909	47.80±0.70	21.96±2.27	AV01954	48.61±1.50	25.36±2.97
AV01910	51.88±0.67	20.22±6.09	AV01955	53.20±2.87	30.14±2.11
AV01911	35.42±2.80	11.40±6.02	AV01956	53.62±4.74	35.02±4.48
AV01912	49.53±7.27	20.62±3.24	AV01957	54.16±3.13	13.92±6.54
AV01913	47.11±0.39	17.63±1.31	AV01958	57.25±3.76	28.45±5.01
AV01914	45.76±1.63	22.16±4.50	AV01959	57.76±2.66	35.48±2.07
AV01915	48.93±1.28	23.82±3.60	AV00124	60.09±1.74	33.15±2.78
AV01916	32.73±3.88	-3.38±3.58	AV00142	56.94±1.21	27.73±1.55
AV01917	23.54±4.29	-0.21±6.61			

等同物

尽管本文已经描述和说明了本发明的几个实施例，但本领域普通技术人员很容易理解，用于执行此处描述的功能和/或获得结果和/或一个或多个优点的多种其他手段和/或结构，以及这些变化和/或修改中的每一个都被认为在本发明的范围内。更一般地，本领域技术人员将容易理解，此处描述的所有参数、尺寸、材料和配置都是示例性的，并且实际参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用本发明教导的具体应用。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文描述的本发明的特定实施例的许多等价物。因此，应当理解，前述实施例仅通过示例的方式呈现并且属于所附权利要求及其等效物的范围内，本发明可以以不同于具体描述和要求保护的方式实施。本发明针对在此描述的每个单独的特征、系统、物品、材料和/或方法。此外，两个或更多个此类特征、系统、物品、材料和/或方法的任何组合，如果此类特征、系统、物品、材料和/或方法相互不矛盾，则也包括在本发明的范围内。

如本文所定义和使用的所有定义应理解为对照字典定义、通过引用并入的文件中的定义和/或所定义术语的普通含义。

在说明书和权利要求中并未使用数量限定的情况，除非明确指出相反，否则应理解为“至少一个”。

说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为表示如此结合的要素中的“一个或两个”，即这样的要素在某些情况下组合出现而在其他情况下分离出现。除了由“和/或”具体标识的要素之外，除非明确指出相反，否则可以可选地存在其他要素，无论与那些具体标识的要素相关或不相关。

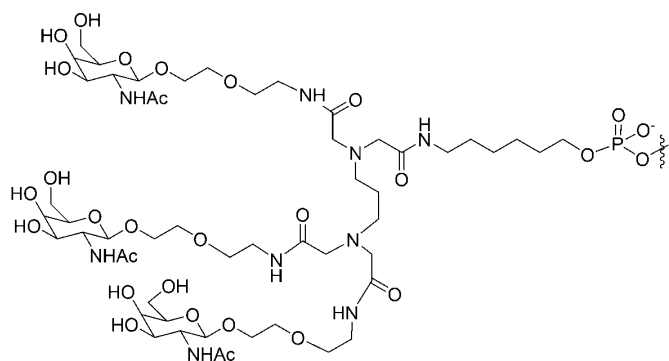
本申请中引用或参考的所有参考文献、专利和专利申请和出版物均通过引用整体并入本文。

权利要求

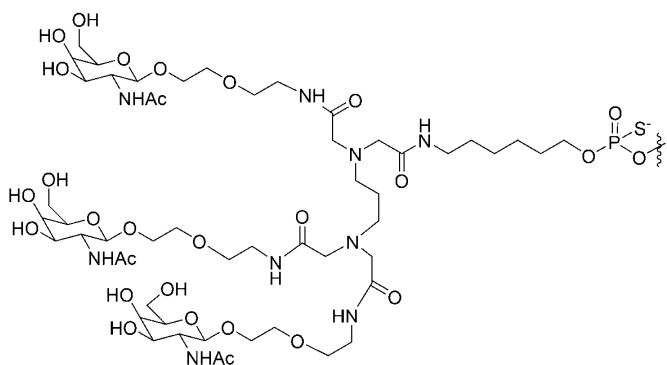
1. 抑制 LPA (Apo(a)) 表达的双链核糖核酸 (dsRNA) 试剂, 其中所述 dsRNA 试剂包含正义链和反义链, 所述反义链中的核苷酸第 2 至 18 位包含与 LPA RNA 转录物互补的区域, 其中互补区域包含与表 1-3 之一中所列出的反义序列之一相差 0、1、2 或 3 个核苷酸的至少 15 个连续核苷酸, 并且任选地包含靶向配体。
2. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述与 LPA RNA 转录物互补的区域包含至少 15、16、17、18 或 19 个连续核苷酸, 其与表 1-3 之一中所列出的反义序列之一相差不超过 3 个核苷酸。
3. 权利要求 1 或 2 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述 dsRNA 的反义链与人 LPA 基因 mRNA 中的任一个靶区域至少基本上互补, 并且在表 1-3 的任一个中提供。
4. 权利要求 3 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述 dsRNA 的反义链与人 LPA 基因 mRNA 中的任一靶区完全互补, 并在表 1-3 的任一个中提供。
5. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述 dsRNA 试剂包含表 1-3 中任一项所述的正义链序列, 其中所述正义链序列与所述 dsRNA 试剂中的反义链序列至少基本上互补。
6. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述 dsRNA 试剂包含表 1-3 中任一项所述的正义链序列, 其中所述正义链序列与所述 dsRNA 试剂中的反义链序列完全互补。
7. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述 dsRNA 试剂包含表 1-3 中任一项所列出的反义链序列。
8. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述 dsRNA 试剂包含表 1-3 中任一项中作为双链体序列所列出的序列。
9. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述 dsRNA 试剂包含至少一种修饰的核苷酸。
10. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述反义链中的所有或基本上所有核苷酸是修饰的核苷酸。
11. 权利要求 5 或 6 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述至少一种修饰的核苷酸包括: 2'-O-甲基核苷酸、2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'3'-seco 核苷酸模拟物、锁定核苷酸、开环核苷酸 (UNA)、乙二醇核酸核苷酸 (GNA)、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、2'-甲氧基乙基核苷酸、无碱基核苷酸、核糖醇、反向核苷酸、反向无碱基核苷酸、反向 2'-OMe 核苷酸、反向 2'-脱氧核苷酸、2'-氨基修饰核苷酸、2'-烷基修饰核苷酸、吗啉代核苷酸和 3'-OMe 核苷酸、包含 5'-硫代磷酸酯基团的核苷酸, 或与胆固醇衍生物或十二烷酸双癸酰胺基团连接的末端核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、氨基磷酸酯, 或包含核苷酸的非天然碱基。

12. 权利要求 9 或 10 所述的 dsRNA 试剂，其中在引导链的 5' 末端包含 E-乙烯基磷酸酯核苷酸。
13. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述 dsRNA 试剂包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。
- 5 14. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述正义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。
15. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述反义链包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。
- 10 16. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述正义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。
17. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述反义链包含 1、2、3、4、5 或 6 个硫代磷酸酯核苷间键联。
18. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述正义链和反义链的全部或基本上全部核苷酸是修饰的核苷酸。
- 15 19. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中修饰的正义链是表 2-3 之一中所列出的修饰的正义链序列。
20. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中修饰的反义链是表 2-3 之一中所列出的修饰的反义链序列。
21. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述正义链与反义链互补或基本上互补，并且互补区域的长度为 16 至 23 个核苷酸。
- 20 22. 权利要求 21 所述的 dsRNA 试剂，其中所述互补区域的长度为 19 至 21 个核苷酸。
23. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中每条链的长度为不超过 30 个核苷酸。
24. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中每条链的长度为不超过 25 个核苷酸。
25. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中每条链的长度为不超过 23 个核苷酸。
- 25 26. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述 dsRNA 试剂包含至少一种修饰的核苷酸，并且还包含一种或更多种靶向基团或连接基团。
27. 权利要求 26 所述的 dsRNA 试剂，其中所述一种或更多种靶向基团或连接基团与所述正义链缀合。
28. 权利要求 26 或 27 所述的 dsRNA 试剂，其中所述靶向基团或连接基团包括 N-乙酰基-半乳糖胺（GalNAc）。
- 30

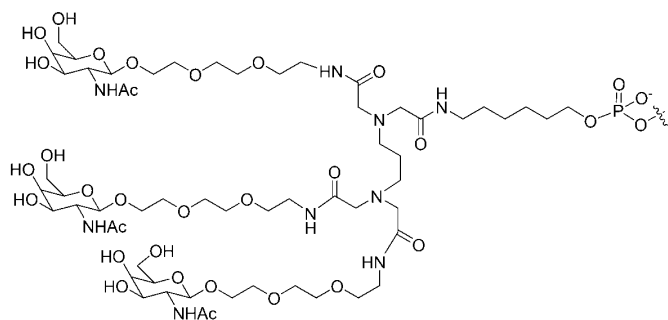
29. 权利要求 26 或 27 所述的 dsRNA 试剂, 其中所述靶向基团具有以下结构:



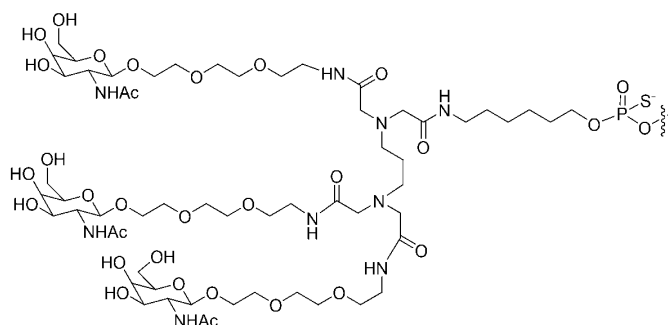
GLO-1,



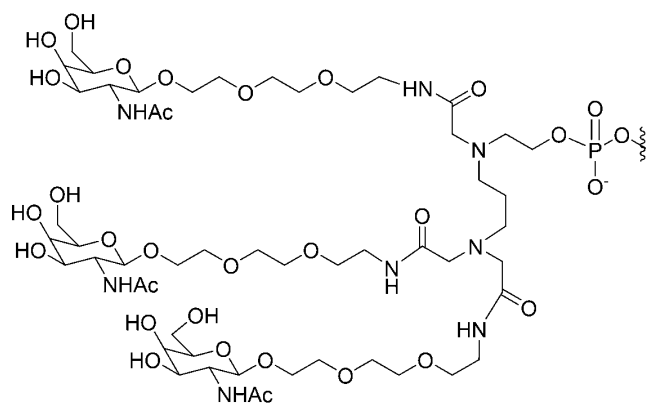
GLS-1,



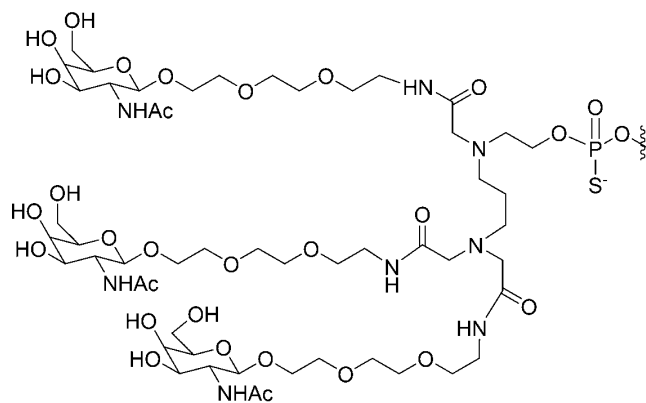
GLO-2,



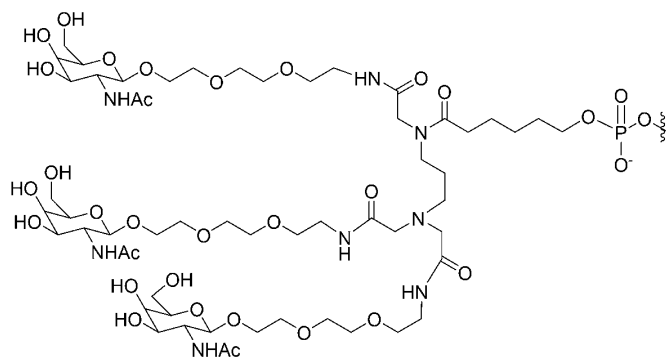
GLS-2,



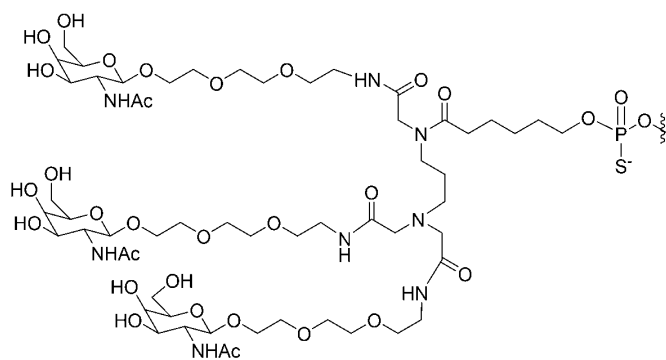
GLO-3,



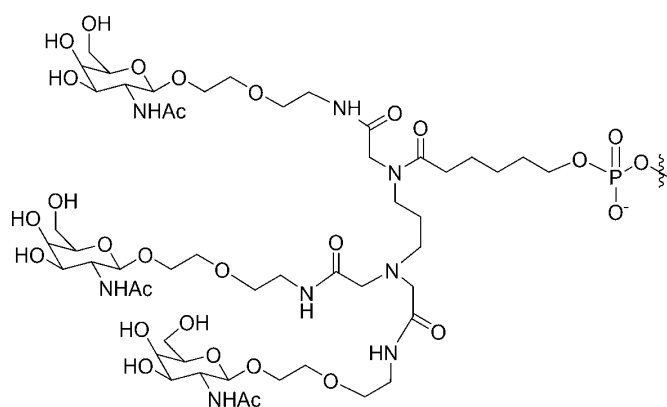
GLS-3,



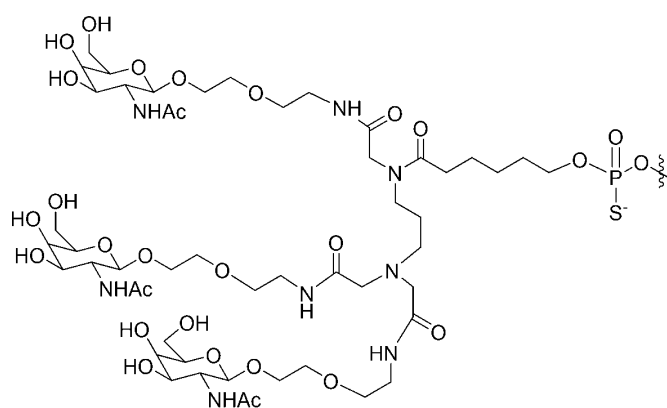
GLO-4,



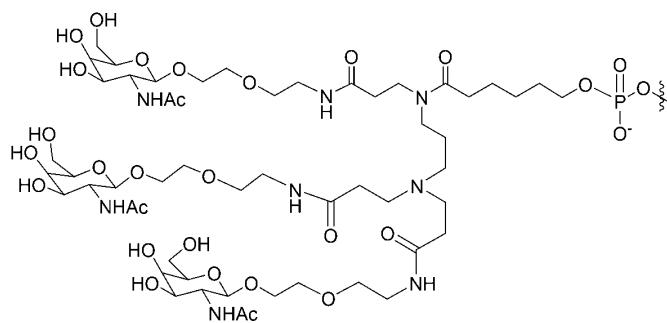
GLS-4,



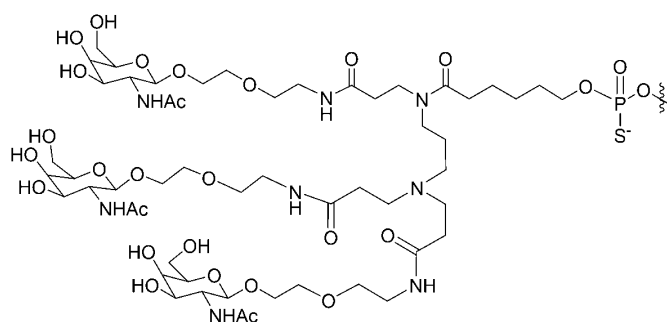
GLO-5,



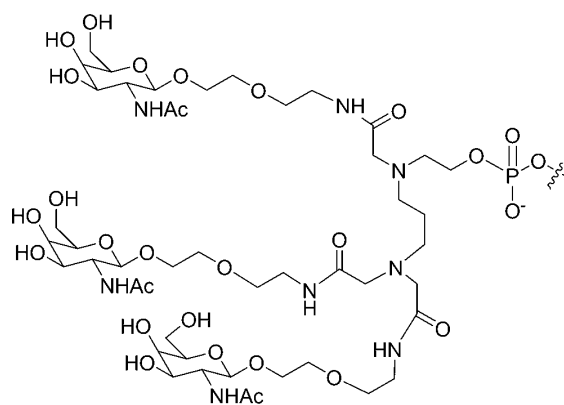
GLS-5,



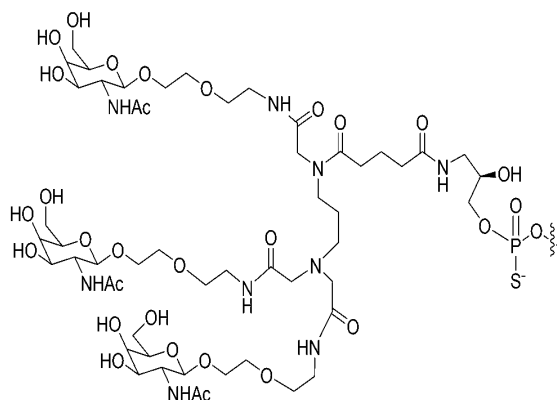
GLO-6,



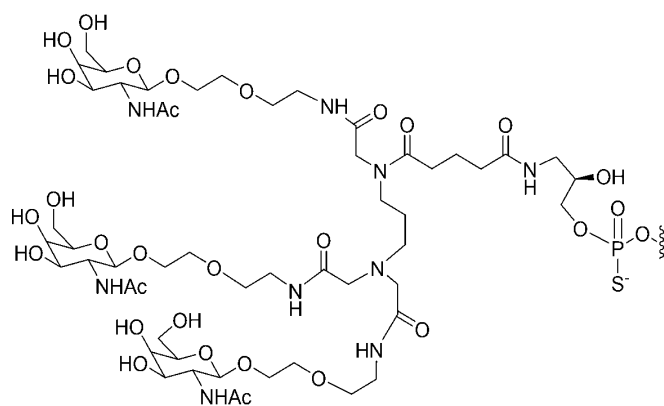
GLS-6,



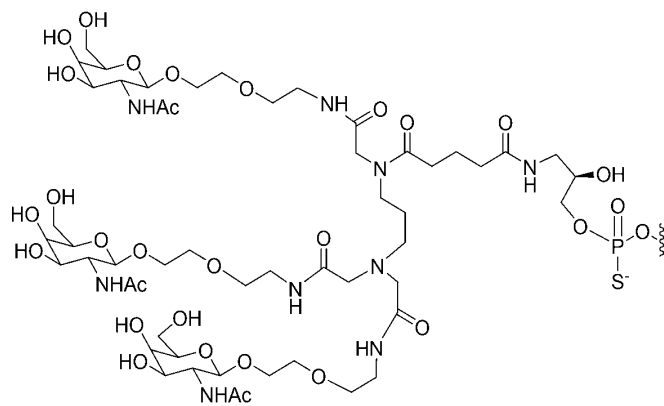
GLO-7,



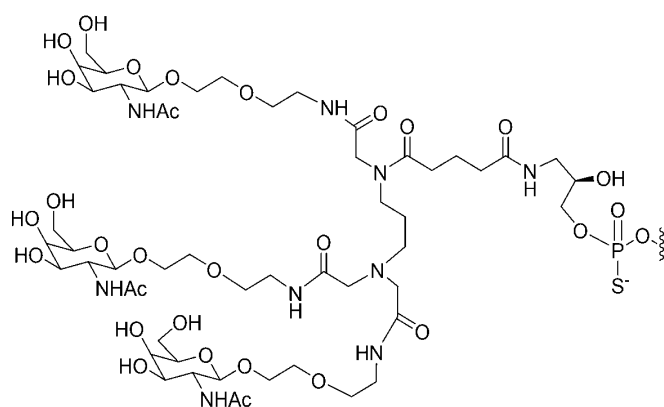
GLS-7,



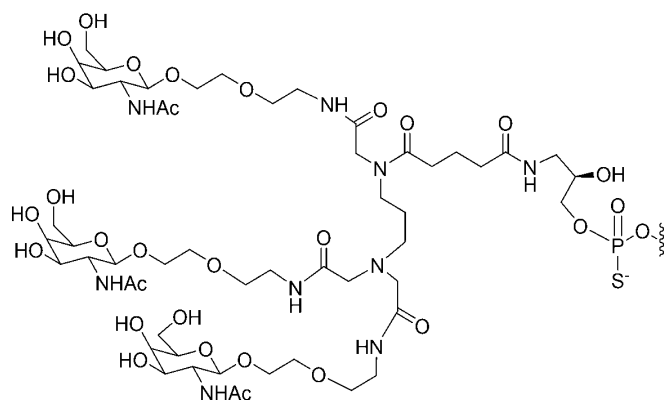
GLO-8,



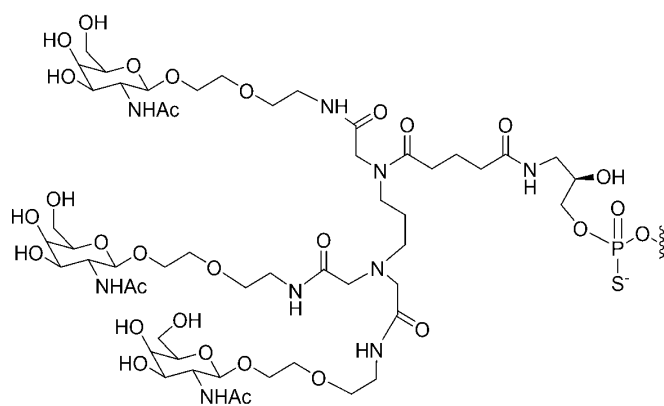
GLS-8,



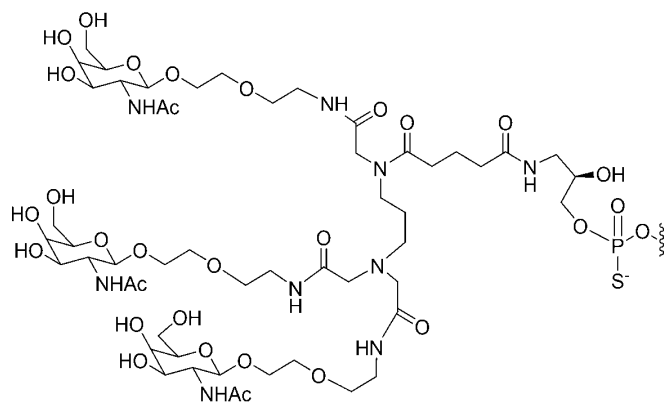
GLO-9,



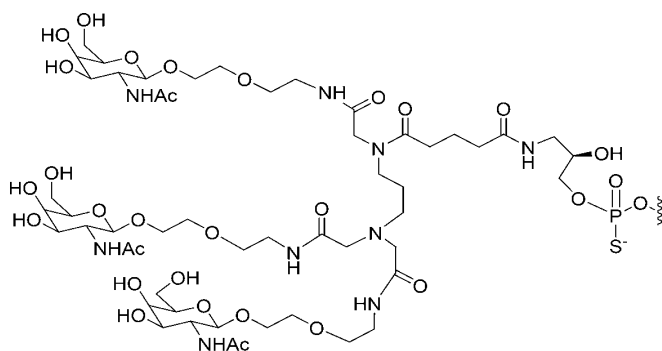
GLS-9,



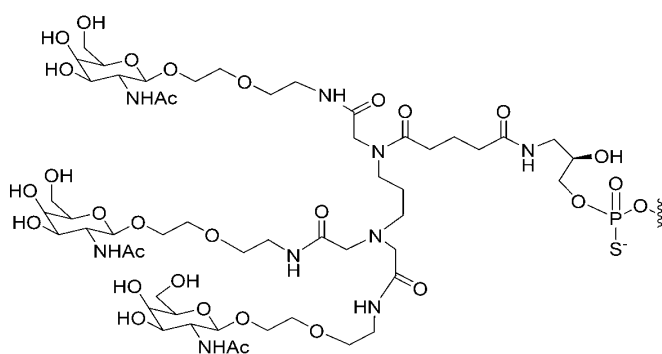
GLO-10,



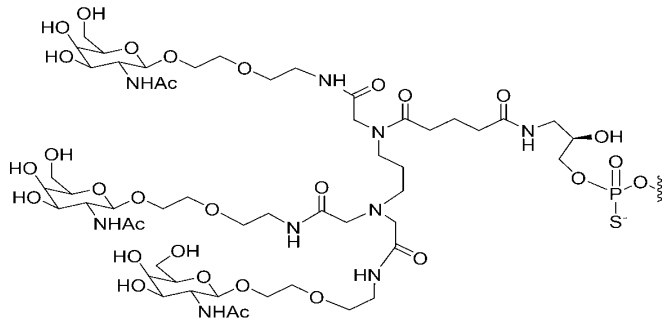
GLS-10,



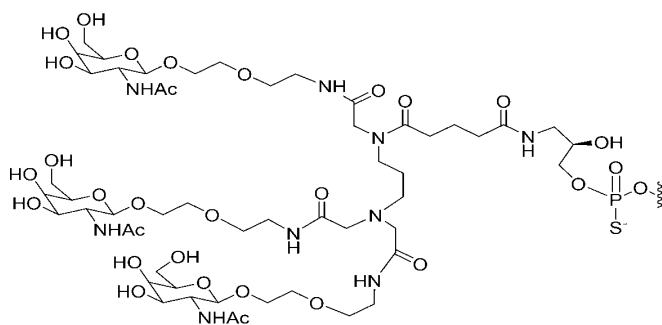
GLO-11,



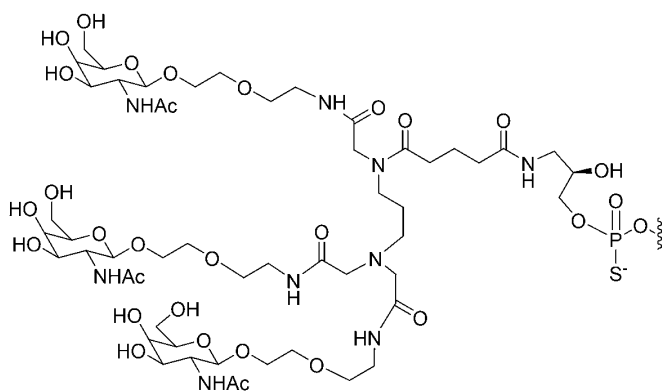
GLS-11,



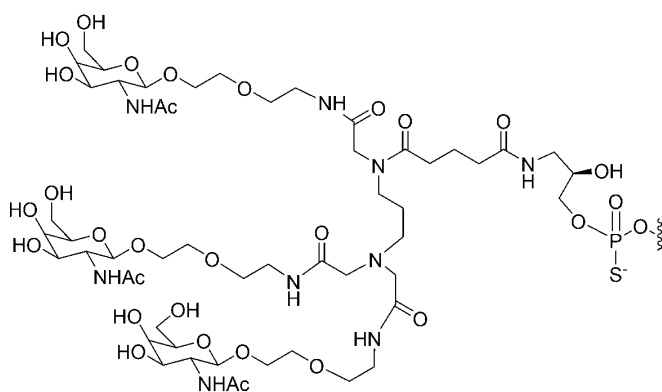
GLO-12,



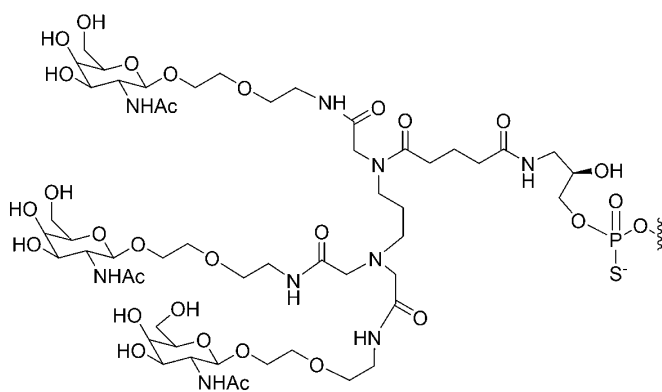
GLS-12,



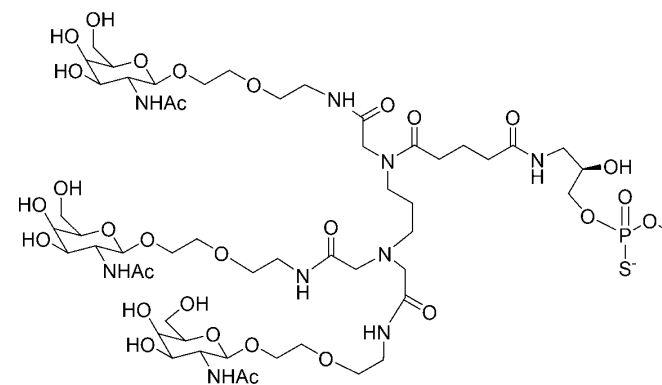
GLO-13,



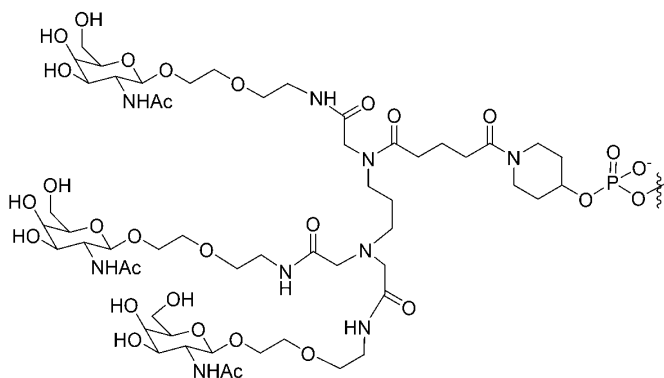
GLS-13,



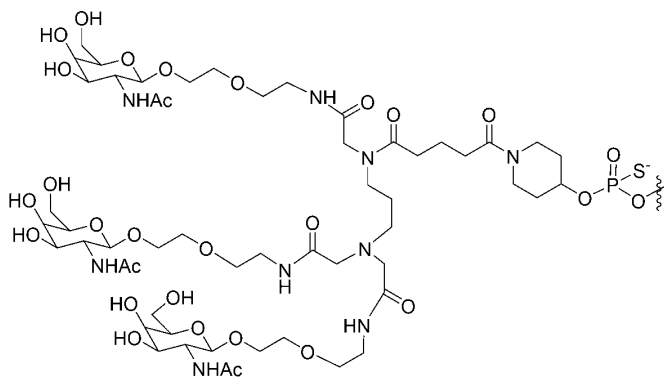
GLO-14,



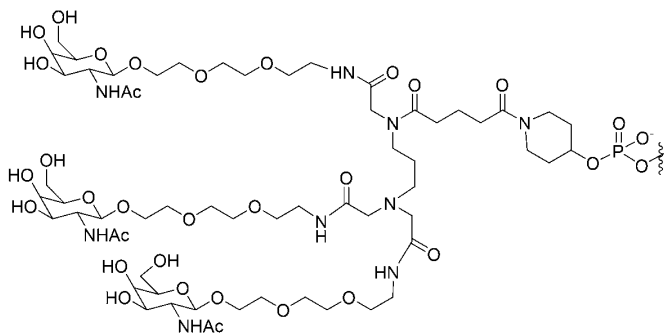
GLS-14,



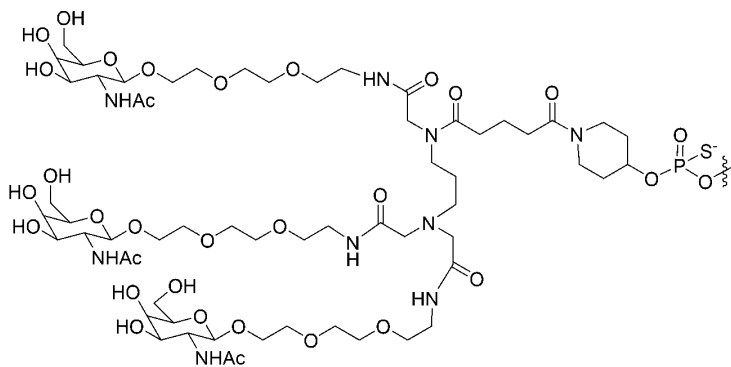
GLO-15,



GLS-15,



GLO-16, 或者



GLS-16。

缀合的靶向基团。

31. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述 dsRNA 试剂包含与所述正义链的 3'-末端缀合的靶向基团。

32. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述反义链在 3'-末端包含一个反向无碱基残基。

33. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述正义链在 3'或/和 5'末端包含一个或两个反向无碱基残基；或正义链在 3'或/和 5'末端包含一个或两个异甘露醇残基。

34. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中所述 dsRNA 试剂具有两个平末端。

35. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中至少一条链包含至少 1 个核苷酸的 3'突出端。

36. 权利要求 1 所述的 dsRNA 试剂，其中至少一条链包含至少 2 个核苷酸的 3'突出端。

37. 包含权利要求 1 至 36 中任一项所述的 dsRNA 试剂的组合物。

38. 权利要求 37 所述的组合物，其还包含药学上可接受的载体。

39. 权利要求 38 所述的组合物，还包含一种或更多种另外的治疗剂。

40. 权利要求 39 所述的组合物，其中所述组合物被包装在药盒、容器、包装物、分配器、预填充注射器或小瓶中。

41. 权利要求 37 所述的组合物，其中所述组合物被配制成用于皮下给药或被配制成用于静脉内（IV）给药。

42. 包含权利要求 1 至 36 中任一项所述的 dsRNA 试剂的细胞。

43. 权利要求 42 所述的细胞，其特征在于，所述细胞是哺乳动物细胞，任选地是人细胞。

44. 抑制细胞中 LPA 基因表达的方法，其包括：

(i) 制备包含有效量的权利要求 1 至 36 中任一项所述的双链核糖核酸（dsRNA）试剂或权利要求 37 至 41 中任一项所述的组合物的细胞。

45. 权利要求 44 所述的方法，其还包括：

(ii) 将权利要求 44 的(i)中制备的细胞维持足够的时间，以获得 LPA 基因的 mRNA 转录物的降解，从而抑制细胞中 LPA 基因的表达。

46. 权利要求 44 所述的方法，其特征在于，所述细胞在对象体内并且将所述 dsRNA 试剂皮下施用至所述对象。

47. 权利要求 44 所述的方法，其中所述细胞在对象体内并且通过 IV 施用将所述 dsRNA

试剂施用至所述对象。

48. 权利要求 46 或 47 所述的方法，其还包括在向所述对象施用所述 dsRNA 试剂之后评估对 LPA 基因的抑制，其中用于评估的手段包括：

(i) 确定对象中 LPA 相关疾病或病症的一种或多种生理特征，以及

5 (ii) 将所确定的生理特征与 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或 LPA 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较，

其中经过比较表明对象中 LPA 基因表达抑制存在或不存在中的一种或更多种。

49. 权利要求 48 所述的方法，其中所确定的生理特征是在血液中的 Lp(a)水平。

50. 权利要求 49 所述的方法，其中所述对象在血液中的 Lp(a)水平的降低表明对象中
10 LPA 基因表达的降低。

51. 抑制对象中 LPA 基因表达的方法，所述方法包括向对象施用有效量的权利要求 1 至 36 中任一项所述的双链核糖核酸（dsRNA）试剂或权利要求 37 至 41 中任一项所述的组合物。

52. 权利要求 51 所述的方法，其中将所述 dsRNA 试剂皮下施用于所述对象。

15 53. 权利要求 51 所述的方法，其中所述 dsRNA 试剂通过 IV 给药施用于所述对象。

54. 权利要求 51 至 53 中任一项所述的方法，其还包括在向所述对象施用所述 dsRNA 试剂之后评估对 LPA 基因的抑制，其中用于评估的手段包括：

(i) 确定对象中 LPA 相关疾病或病症的一种或多种生理特征，以及

20 (ii) 将所确定的生理特征与 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征和/或 LPA 相关疾病或病症的对照生理特征进行比较，

其中经过比较表明对象中 LPA 基因表达抑制存在或不存在中的一种或更多种。

55. 权利要求 54 所述的方法，其中所确定的生理特征是在血液中的 Lp(a)水平。

56. 权利要求 55 所述的方法，其中所述对象在血液中的 Lp(a)水平的降低表明对象中 LPA 基因表达的降低。

25 57. 治疗及预防与 LPA 蛋白相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向对象施用有效量的权利要求 1 至 36 中任一项所述的双链核糖核酸（dsRNA）试剂或权利要求 37 至 41 中任一项所述的组合物，以抑制 LPA 基因表达。

58. 权利要求 57 所述的方法，其中所述疾病或病症是心血管疾病，其中所述心血管疾病包括：伯格氏病（Berger's disease）、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、中风、动脉粥样硬化、血栓形成、冠心病或主动脉瓣狭窄和/或与含 Lp(a)粒子的水平升高相关的任何其他疾病或病理。

59. 权利要求 57 所述的方法，其还包括对所述对象施用另外的治疗方案。

60. 权利要求 59 所述的方法，其中所述另外的治疗方案包括：向所述对象施用一种或更多种本发明的 LPA 反义多核苷酸，向所述对象施用非 LPA dsRNA 治疗剂，以及所述对象的行为改变。

61. 权利要求 60 所述的方法，其中所述非 LPA dsRNA 治疗剂是以下中的一种或更多种另外的治疗剂，如 HMg Co-A 还原酶抑制剂（他汀类）、依折麦布、PCSK-9 抑制剂、CTEP 抑制剂、靶向 ANGPTL3 的疗法、靶向 AGT 的疗法、靶向 APOC3 的疗法和烟酸，或上述任何的组合。

62. 权利要求 57 所述的方法，其中所述 dsRNA 试剂皮下施用于所述对象。

63. 权利要求 57 所述的方法，其中所述 dsRNA 试剂通过 IV 给药施用于所述对象。

64. 权利要求 57 至 63 中任一项所述的方法，其还包括确定所施用的双链核糖核酸（dsRNA）试剂在所述对象中的功效。

65. 权利要求 64 所述的方法，其中确定治疗在所述对象中的功效的手段包括：

(i) 确定对象中 LPA 相关疾病或病症的一种或多种生理特征，并且

(ii) 将所确定的生理特征与 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征进行比较，

其中通过比较表明对对象施用双链核糖核酸（dsRNA）试剂的功效的存在、不存在和功效水平中的一种或更多种。

66. 权利要求 65 所述的方法，其中所确定的生理特征是在血液中的 Lp(a)水平。

67. 权利要求 65 所述的方法，其中所述对象在血液中的 Lp(a)水平的降低表示对对象施用双链核糖核酸（dsRNA）试剂存在功效。

68. 与对象中 LPA 蛋白的基线治疗前水平相比降低对象中 LPA 蛋白水平的方法，所述方法包括向对象施用有效量的权利要求 1 至 36 中任一项所述的双链核糖核酸（dsRNA）试剂或权利要求 37 至 41 中任一项的组合物，以降低 LPA 基因表达水平。

69. 权利要求 68 所述的方法，其中将所述 dsRNA 试剂皮下施用于所述对象或通过 IV 施用于所述对象。

70. 与对象中 LPA 相关疾病或病症的基线治疗前生理特征相比改变对象中 LPA 相关疾病或病症的生理特征的方法，所述方法包括向对象施用有效量的权利要求 1 至 36 中任一项所述的双链核糖核酸（dsRNA）试剂或权利要求 37 至 41 中任一项所述的组合物，以改变对象中 LPA 相关疾病或病症的生理特征。

5 71. 权利要求 70 所述的方法，其中将所述 dsRNA 试剂皮下施用于所述对象或通过 IV 施用于所述对象。

72. 权利要求 70 所述的方法，其中所述生理特征是在血液中的 Lp(a)水平。