

一种核酸配体及其缀合物、其制备方法和用途

技术领域

本公开涉及一种配体及其制备方法。本公开还涉及配体与核酸通过共价键连接形成的核酸配体缀合物，使得到的核酸配体缀合物可以被靶向递送到肝细胞内，发挥 RNA 干扰的作用。

背景技术

RNA 干扰是一种有效的沉默基因表达的方式。据统计，在人体内的疾病相关蛋白中，大约超过 80% 的蛋白质不能被目前常规的小分子药物以及生物大分子制剂所靶向，属于不可成药蛋白。利用 RNA 干扰技术，可以根据编码这些蛋白的 mRNA，设计合适的 siRNA，特异性靶向目标 mRNA 并降解目标 mRNA，从而达到抑制相关的蛋白生成。因此 siRNA 具有非常重要的药物开发前景。然而要实现体内的治疗目的 RNA 干扰效应，需要向体内特定的细胞递送 siRNA 分子。

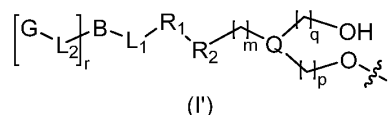
采用靶向配体缀合 siRNA，利用靶向配体与细胞膜表面的受体分子结合，从而内吞进入到细胞内，是一种有效的药物递送方式。例如，去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）是肝细胞特异性表达的受体，在肝细胞表面具有高丰度、胞内外转换快速的特点。半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺等单糖和多糖分子对 ASGPR 有高亲和性。文献报道（Yuanyu H, LIANG Zicai L, Asialoglycoprotein Receptor and Its Application in Liver-targeted Drug Delivery, Prog. Biochem. Biophys. 2015; 42 (6)）使用氨基半乳糖分子簇（GalNAc）可以有效递送 RNA 到肝细胞，GalNAc 分子被设计成三价或四价的分子簇，可以显著提高单价或二价的 GalNAc 分子靶向肝细胞的能力。

不同分子簇结构，和与 RNA 之间不同的连接方式会明显的影响 siRNA 在体内的活性，更高的活性意味着更好的治疗效果，或更低的给药剂量，在同等药效下，更低的给药剂量也意味着更低的毒性反应。因此合理设计靶向配体和 siRNA 的共价连接方式具有重要意义。

本公开提供了一种新的 GalNAc 分子与 RNA 连接的分子结构，具有更简洁的合成结构，并且具有更优的递送活性，具有更佳的 RNA 干扰活性。

发明内容

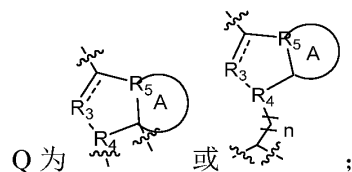
第一方面，本公开提供了一种具有如式 (I') 所示结构的配体，



其中， L_1 为 C_1 - C_{30} 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 $\text{C}=\text{O}$ 间断的

C₁-C₃₀ 烷基链；

R₁ 和 R₂ 独立地为化学键、-NR₆-、-C(=O)-或-OC(=O)-；



或 ；
 为单键或双键，且当 为单键时，R₃ 独立地为 CR₇R₈、NR₆、O 或 S，
 当 为双键时，R₃ 独立地为 CR₉ 或 N；

R₄ 独立地为 CR₉ 或 N；

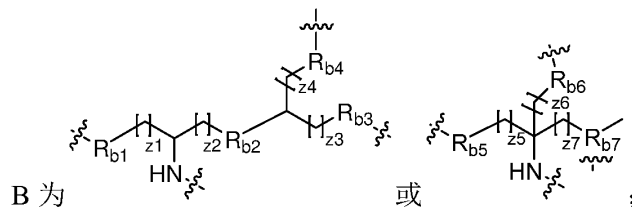
环 A 不存在，或为环烷基、杂环基、芳基或杂芳基，且当环 A 存在时，R₅ 独立地为 CR₉ 或 N，当环 A 不存在时，R₅ 独立地为 CR₇R₈、NR₆ 或 O；

R₆ 和 R₉ 独立地为氢、氘、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、SR'、S(=O)R'、S(=O)₂R'、S(=O)₂NR'(R'')、NR'(R'')、C(=O)R'、C(=O)OR' 或 C(=O)NR'(R'')，所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基、氰基、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₃₋₇ 环烷基、3-12 元杂环基、5-12 元芳基、5-12 元杂芳基、SR'、S(=O)R'、S(=O)₂R'、S(=O)₂NR'(R'')、NR'(R'')、C(=O)R'、C(=O)OR' 和 C(=O)NR'(R'')中的基团所取代；

R₇ 和 R₈ 独立地为氢、氘、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、SR'、S(=O)R'、S(=O)₂R'、S(=O)₂NR'(R'')、NR'(R'')、C(=O)R'、C(=O)OR' 或 C(=O)NR'(R'')，所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基、氰基、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₃₋₇ 环烷基、3-12 元杂环基、5-12 元芳基、5-12 元杂芳基、SR'、S(=O)R'、S(=O)₂R'、S(=O)₂NR'(R'')、NR'(R'')、C(=O)R'、C(=O)OR' 和 C(=O)NR'(R'')中的基团所取代；

R' 和 R'' 独立地为氢、氘、羟基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基，所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基和氰基中的取代基所取代；

m、n、p 和 q 独立地为 0、1、2、3 或 4；



R_{b1}、R_{b2}、R_{b3}、R_{b4}、R_{b5}、R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 -C(=O)-、-NHC(=O)-、-C(=O)O-、
 -C(=O)-(CH₂)_{z8}-O-或-NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-；

z₁、z₂、z₃、z₄、z₅、z₆、z₇、z₈ 和 z₉ 独立地为 0-10 的整数；

L₂ 为 C₁-C₃₀ 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 C=O 间断的 C₁-C₃₀

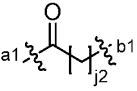
烷基链；

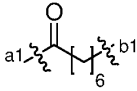
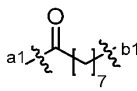
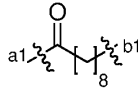
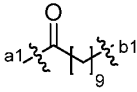
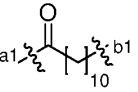
G 为与细胞受体结合的靶向部分；

r 为 1-10 的整数。

在一些实施方案中，某些基团的定义如下，未定义的基团同前任一方案所述（以下简称“在一些实施方案中”）， L_1 可为 L_3 或 $L_3-R_{10}-R_{11}-L_3$ ，其中， L_3 独立地为 C_1-C_{12} 烷基链、 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ 或 $-(CH_2)_{j3}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j4}-$ ， R_{10} 和 R_{11} 独立地为化学键、 $-NR_{12}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ， R_{12} 为氢或 C_1-C_{12} 烷基， j_1 、 j_2 、 j_3 和 j_4 独立地为 0-10 的整数，优选 0-2 或 4-10 的整数，更优选 0、1、2、6、7、8、9 或 10。

在一些实施方案中， L_1 可为 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ ， j_1 和 j_2 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中， L_1 可为 ， j_1 和 j_2 的定义同前任一方案所述，其中，a1 端与 B 相连，b1 端与 R_1 相连。

在一些实施方案中， L_1 可为 、、、 或 ，其中，a1 端与 B 相连，b1 端与 R_1 相连。

在一些实施方案中， R_1 可为化学键且 R_2 可为 $C=O$ 。

在一些实施方案中， R_1 可为化学键且 R_2 可为 NR_6 ， R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中， R_1 可为化学键且 R_2 可为 $-OC(=O)-$ 。

在一些实施方案中， R_1 可为 NR_6 且 R_2 可为 $C=O$ ， R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中， R_1 可为 NR_6 且 R_2 可为 $-OC(=O)-$ ， R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中， R_2 可为 NR_6 且 R_1 可为 $C=O$ ， R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中， R_2 可为 NR_6 且 R_1 可为 $-OC(=O)-$ ， R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中， R_6 可为氢或 C_{1-6} 烷基。

在一些实施方案中， R_6 可为氢、甲基、乙基、丙基或异丙基。

在一些实施方案中， R_6 可为氢。

在一些实施方案中， R_7 和 R_8 可为氢。

在一些实施方案中， R_9 可为氢。

在一些实施方案中，环 A 存在时，环 A 可为 C_{6-10} 芳基，优选苯基。

在一些实施方案中， m 可为 0 或 1。

在一些实施方案中， m 可为 3。

在一些实施方案中， n 可为 0 或 1。

在一些实施方案中， p 和 q 独立地为 0 或 1。

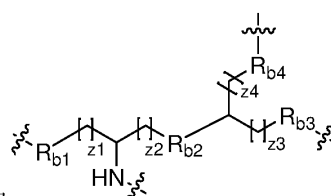
在一些实施方案中， $p=1$ 且 $q=1$ 。

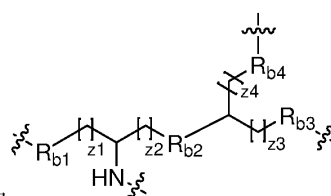
在一些实施方案中， $p=1$ 且 $q=0$ 。

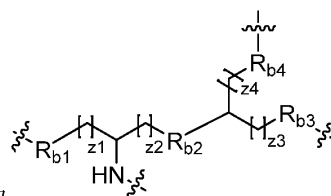
在一些实施方案中， $p=0$ 且 $q=1$ 。

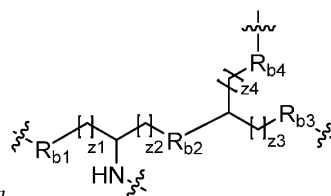
在一些实施方案中， $p=0$ 且 $q=0$ 。

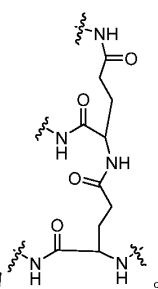
在一些实施方案中， z_1 、 z_2 、 z_3 、 z_4 、 z_5 、 z_6 、 z_7 、 z_8 和 z_9 可独立地为 0-4 的整数，优选 0、1 或 2。

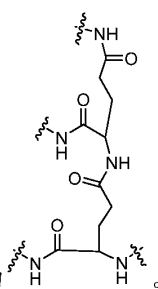


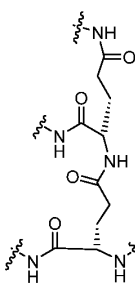
在一些实施方案中，B 可为 , R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 独立地为 $-C(=O)-$ 或 $-NHC(=O)-$ ，N 原子与 L_1 相连， z_1 、 z_2 、 z_3 和 z_4 的定义同前任一方案所述。



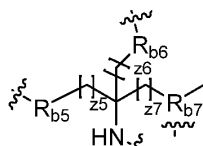
在一些实施方案中，B 可为 , R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 独立地为 $-C(=O)-$ 或 $-NHC(=O)-$ ，N 原子与 L_1 相连， R_{b1} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 相同， z_1 、 z_2 、 z_3 和 z_4 的定义同前任一方案所述。



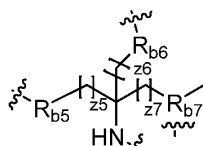
在一些实施方案中，B 可为 。



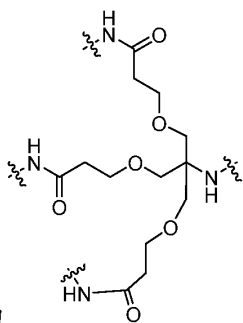
在一些实施方案中, B 可为



在一些实施方案中, B 可为, R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 或 $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$, N 原子与 L_1 相连, $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 的定义同前任一方案所述。



在一些实施方案中, B 可为, R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 或 $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$, N 原子与 L_1 相连, R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 相同, $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 的定义同前任一方案所述。

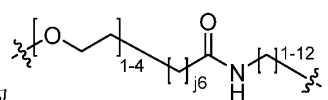


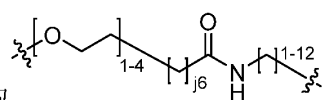
在一些实施方案中, B 可为

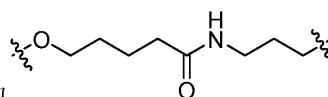
在一些实施方案中, L_2 可为 L_4 或 $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$, 其中, L_4 独立地为 C_1-C_{12} 烷基链或 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$, R_{13} 和 R_{14} 独立地为化学键、 $-NR_{15}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$, R_{15} 独立地为氢或 C_1-C_{12} 烷基, $j5$ 和 $j6$ 独立地为 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, 更优选 0、1、2、3 或 4。

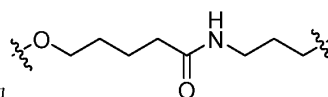
在一些实施方案中, L_2 可为 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$, $j5$ 和 $j6$ 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, L_2 可为 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---}$ 、 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---}$ 、 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---}$ 或 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---}$, 其中, O 原子与 G 相连, C 原子与 B 相连, 优选 L_2 为 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---}$ 或 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---}$ 。



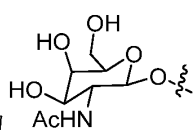
在一些实施方案中， L_2 可为 ，其中， j_6 的定义同前任一方案所述，O 原子与 G 相连，C 原子与 B 相连。

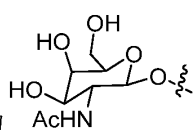


在一些实施方案中， L_2 可为 ，其中，O 原子与 G 相连，C 原子与 B 相连。

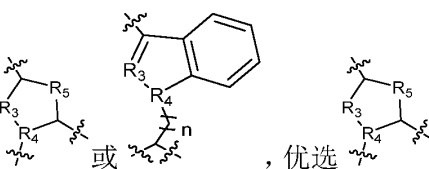
在一些实施方案中，G 可为去唾液酸糖蛋白受体靶向部分。

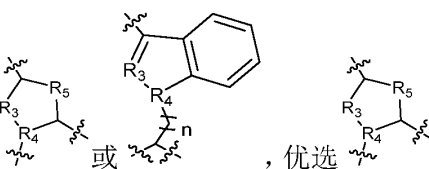
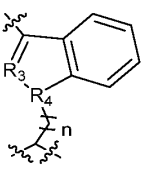
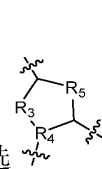
在一些实施方案中，G 可为半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺或 N-异丁酰基半乳糖胺。

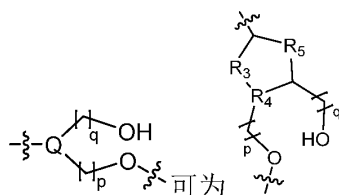


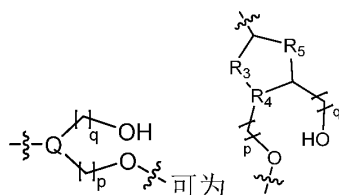
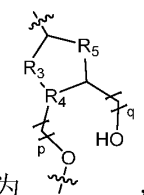
在一些实施方案中，G 可为 。

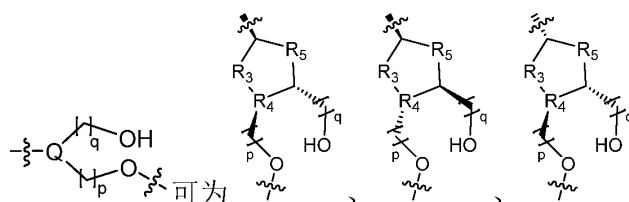
在一些实施方案中，r 可为 3、4、5 或 6，例如 3。

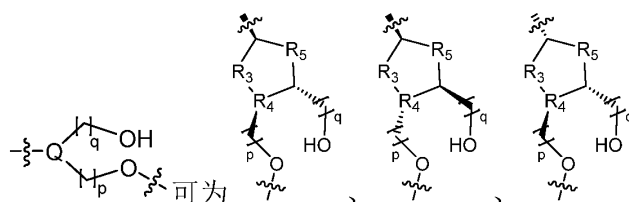
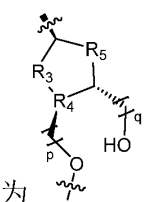
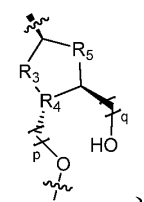
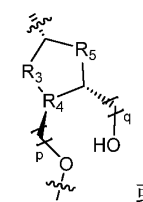


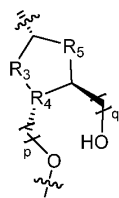
在一些实施方案中，Q 可为  或 ，优选 ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 和 n 的定义同前任一方案所述。

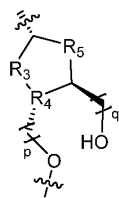


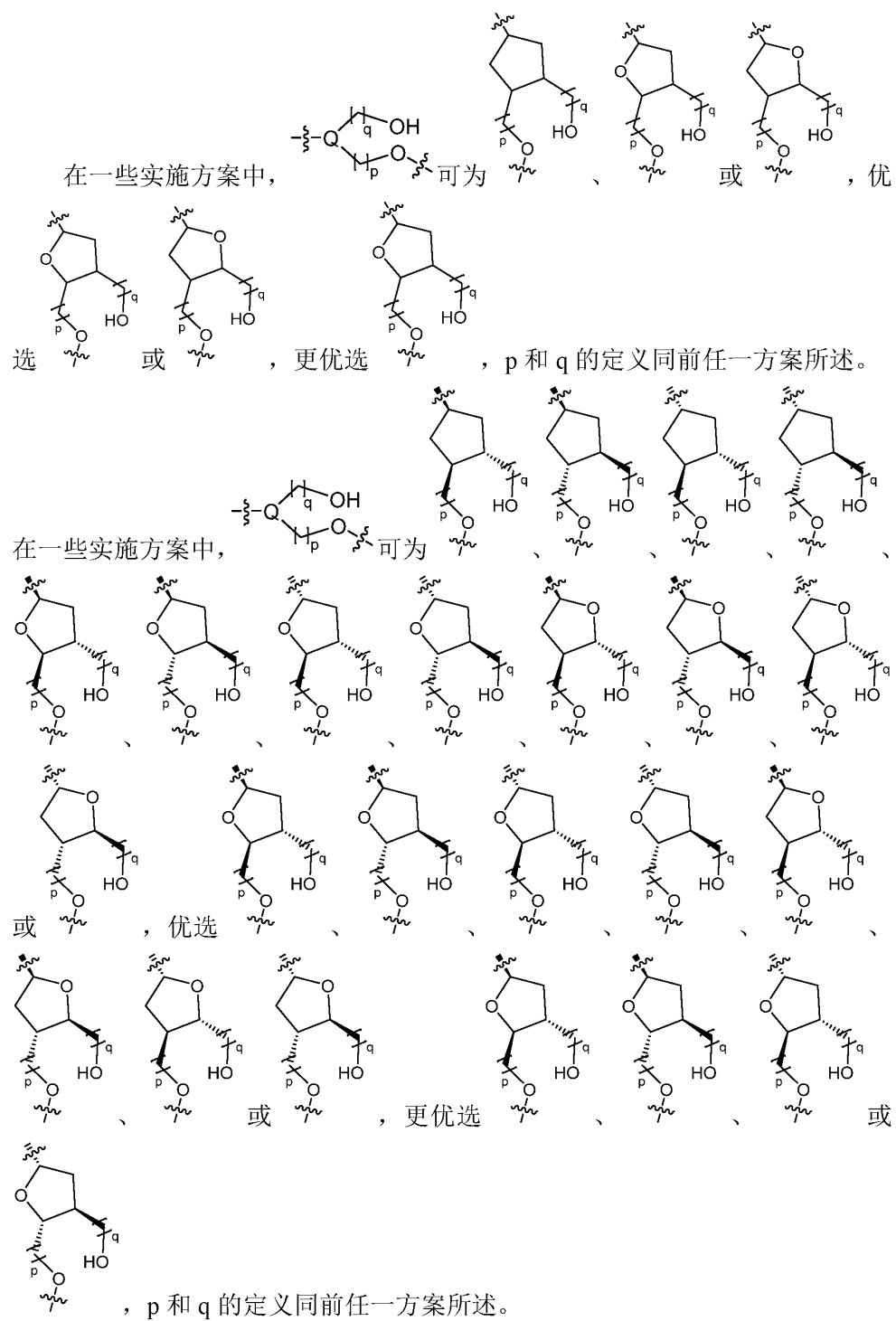
在一些实施方案中， 可为 ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、p 和 q 的定义同前任一方案所述。

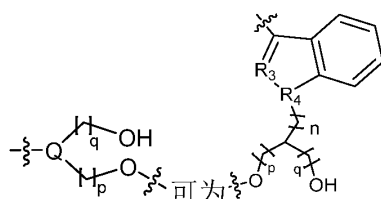


在一些实施方案中， 可为 、、 或

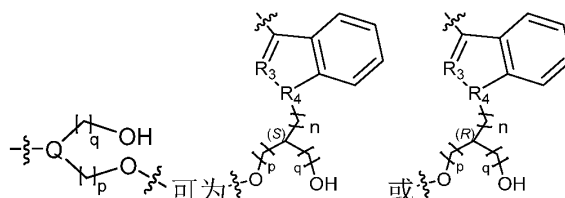


，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、p 和 q 的定义同前任一方案所述。

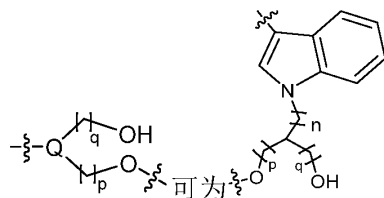




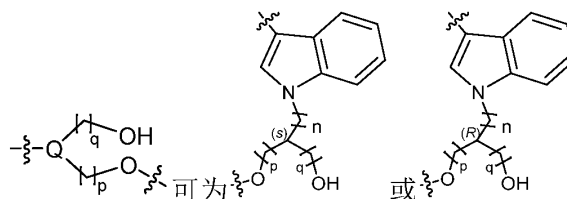
在一些实施方案中， $\text{--}\text{Q--}\text{OH}$ 可为 $\text{--}\text{O--}\text{OH}$ ，其中， R_3 、 R_4 、 n 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。



在一些实施方案中， $\text{--}\text{Q--}\text{OH}$ 可为 $\text{--}\text{O--}\text{OH}$ 或 $\text{--}\text{O--}\text{OH}$ ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 n 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。

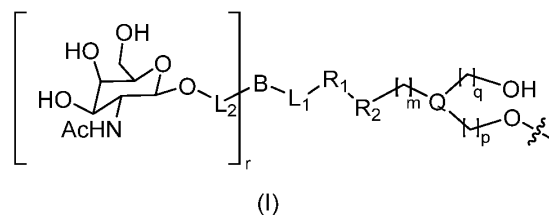


在一些实施方案中， $\text{--}\text{Q--}\text{OH}$ 可为 $\text{--}\text{O--}\text{OH}$ ， n 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。



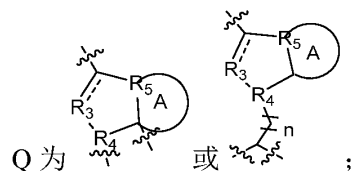
在一些实施方案中， $\text{--}\text{Q--}\text{OH}$ 可为 $\text{--}\text{O--}\text{OH}$ 或 $\text{--}\text{O--}\text{OH}$ ， n 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。

本公开提供了一种具有如式 (I) 所示结构的配体，



其中， L_1 为 C_1 - C_{30} 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 $\text{C}=\text{O}$ 间断的 C_1 - C_{30} 烷基链；

R_1 和 R_2 独立地为化学键、 $-\text{NR}_6-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{OC}(=\text{O})-$ ；



--- 为单键或双键, 且当 --- 为单键时, R_3 独立地为 CR_7R_8 、 NR_6 、O 或 S, 当 --- 为双键时, R_3 独立地为 CR_9 或 N;

R_4 独立地为 CR_9 或 N;

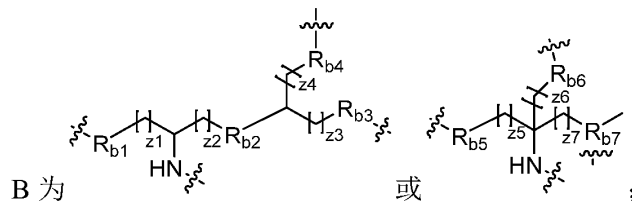
环 A 不存在, 或为环烷基、杂环基、芳基或杂芳基, 且当环 A 存在时, R_5 独立地为 CR_9 或 N, 当环 A 不存在时, R_5 独立地为 CR_7R_8 、 NR_6 或 O;

R_6 和 R_9 独立地为氢、氘、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$, 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 环烷基、3-12 元杂环基、5-12 元芳基、5-12 元杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基团所取代;

R_7 和 R_8 独立地为氢、氘、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$, 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 环烷基、3-12 元杂环基、5-12 元芳基、5-12 元杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基团所取代;

R' 和 R'' 独立地为氢、氘、羟基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基, 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基和氰基中的取代基所取代;

m、n、p 和 q 独立地为 0、1、2、3 或 4;



R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 、 R_{b4} 、 R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 或 $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$;

$z1$ 、 $z2$ 、 $z3$ 、 $z4$ 、 $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 独立地为 0-10 的整数;

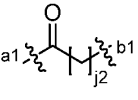
L_2 为 C_1 - C_{30} 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 $C=O$ 间断的 C_1 - C_{30} 烷基链;

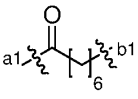
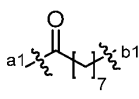
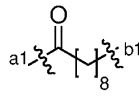
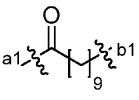
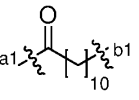
r 为 1-10 的整数。

在一些实施方案中, L_1 可为 L_3 或 $L_3-R_{10}-R_{11}-L_3$, 其中, L_3 独立地为 C_1 - C_{12} 烷基链、 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ 或 $-(CH_2)_{j3}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j4}-$; R_{10} 和 R_{11} 独立地为化学键、 $-NR_{12}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$; R_{12} 为氢或 C_1 - C_{12} 烷基; $j1$ 、 $j2$ 、 $j3$ 和 $j4$ 独立地为 0-10 的整数, 优选 0-2 或 4-10 的整数, 更优选 0、1、2、6、7、8、

9 或 10。

在一些实施方案中, L_1 可为 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$, j_1 和 j_2 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, L_1 可为 , j_1 和 j_2 的定义同前任一方案所述, 其中, a_1 端与 B 相连, b_1 端与 R_1 相连。

在一些实施方案中, L_1 可为 , , , , 或 , 其中, a_1 端与 B 相连, b_1 端与 R_1 相连。

在一些实施方案中, R_1 可为化学键且 R_2 可为 $C=O$ 。

在一些实施方案中, R_1 可为化学键且 R_2 可为 NR_6 , R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, R_1 可为化学键且 R_2 可为 $-OC(=O)-$ 。

在一些实施方案中, R_1 可为 NR_6 且 R_2 可为 $C=O$, R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, R_1 可为 NR_6 且 R_2 可为 $-OC(=O)-$, R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, R_2 可为 NR_6 且 R_1 可为 $C=O$, R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, R_2 可为 NR_6 且 R_1 可为 $-OC(=O)-$, R_6 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, R_6 可为氢或 C_{1-6} 烷基。

在一些实施方案中, R_6 可为氢、甲基、乙基、丙基或异丙基。

在一些实施方案中, R_6 可为氢。

在一些实施方案中, R_7 和 R_8 可为氢。

在一些实施方案中, R_9 可为氢。

在一些实施方案中, 环 A 存在时, 环 A 可为 C_{6-10} 芳基, 优选苯基。

在一些实施方案中, m 可为 0 或 1。

在一些实施方案中, m 可为 3。

在一些实施方案中, n 可为 0 或 1。

在一些实施方案中, p 和 q 独立地为 0 或 1。

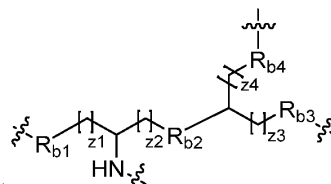
在一些实施方案中, $p=1$ 且 $q=1$ 。

在一些实施方案中, $p=1$ 且 $q=0$ 。

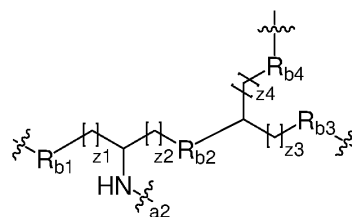
在一些实施方案中, $p=0$ 且 $q=1$ 。

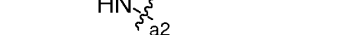
在一些实施方案中, $p=0$ 且 $q=0$ 。

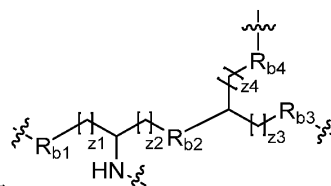
在一些实施方案中, z_1 、 z_2 、 z_3 、 z_4 、 z_5 、 z_6 、 z_7 、 z_8 和 z_9 可独立地为 0-4 的整数, 优选 0、1 或 2。



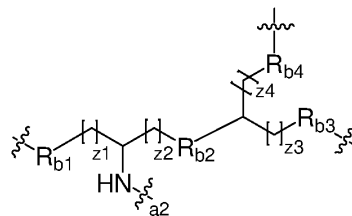
在一些实施方案中, B 可为 , R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 独立地为 $-C(=O)-$ 或 $-NHC(=O)-$, N 原子与 L_1 相连, z_1 、 z_2 、 z_3 和 z_4 的定义

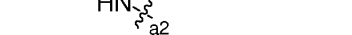


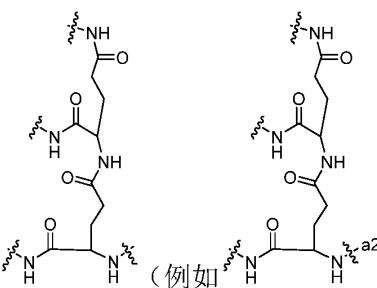
同前任一方案所述 (例如,  其中 a2 端的 N 原子与 L_1 相连)。

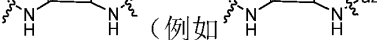
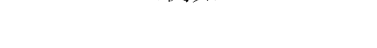


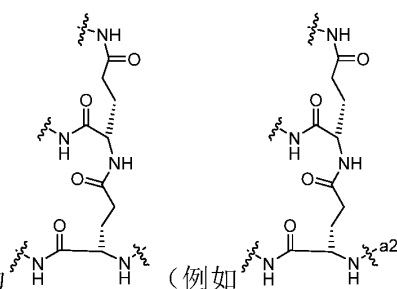
在一些实施方案中, B 可为 , R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 独立地为 $-C(=O)-$ 或 $-NHC(=O)-$, N 原子与 L_1 相连, R_{b1} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 相同, z_1 、



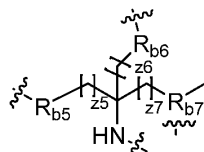
z_2 、 z_3 和 z_4 的定义同前任一方案所述 (例如,  其中 a2 端的 N 原子与 L_1 相连)。



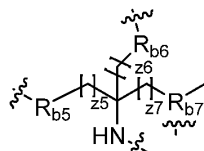
在一些实施方案中, B 可为  (例如 , 其中 a2 端的 N 原子与 L_1 相连)。



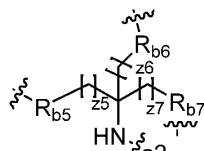
在一些实施方案中，B 可为  (例如 ，其中 a2 端的 N 原子与 L₁ 相连)。



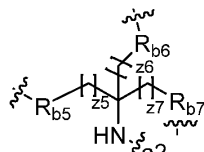
在一些实施方案中，B 可为 , R_{b5}、R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 -C(=O)-(CH₂)₂₈-O-或-NHC(=O)-(CH₂)₂₉-O-, N 原子与 L₁ 相连, z5、z6、z7、z8 和 z9 的定义同前任一方案所述。



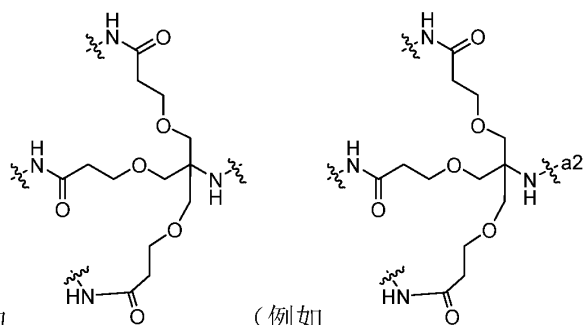
在一些实施方案中，B 可为 ，R_{b5}、R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 -C(=O)-(CH₂)_{z8}-O-或-NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-，N 原子与 L₁ 相连，R_{b5}、R_{b6} 和 R_{b7} 相同，z5、z6、z7、z8 和 z9 的定义同前任一方案所述。



在一些实施方案中，B 可为 $\text{HN}(\text{C}(\text{R}_{b5})\text{R}_{b6})\text{R}_{b7}$ ， R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{z8}-\text{O}-$ 或 $-\text{NHC}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{z9}-\text{O}-$ ，a2 端的 N 原子与 L_1 相连，z5、z6、z7、z8 和 z9 的定义同前任一方案所述。



在一些实施方案中，B 可为 $\text{HN}(\text{C}(\text{R}_{b5})\text{R}_{b6})\text{C}(\text{R}_{b7})\text{C}(\text{R}_{b5})\text{C}(\text{R}_{b6})\text{C}(\text{R}_{b7})$ ， R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{z8}-\text{O}-$ 或 $-\text{NHC}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{z9}-\text{O}-$ ，a2 端的 N 原子与 L_1 相连， R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 相同， $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 的定义同前任一方案所述。



在一些实施方案中, B 可为
其中 a2 端的 N 原子与 L₁ 相连)。

在一些实施方案中, L₂ 可为 L₄ 或 L₄-R₁₃-R₁₄-L₄, 其中, L₄ 独立地为 C₁-C₁₂ 烷基链或-(CH₂)_{j5}-(OCH₂CH₂)₁₋₄-(CH₂)_{j6}-, R₁₃ 和 R₁₄ 独立地为化学键、-NR₁₅-、-C(=O)-或-OC(=O)-, R₁₅ 独立地为氢或 C₁-C₁₂ 烷基, j₅ 和 j₆ 独立地为 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, 更优选 0、1、2、3 或 4。

在一些实施方案中, L₂ 可为-(CH₂)_{j5}-(OCH₂CH₂)₁₋₄-(CH₂)_{j6}-, j₅ 和 j₆ 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中, L₂ 可为 , 其中, O 原子与 G 相连, C 原子与 B 相连。

在一些实施方案中, L₂ 可为 C₁-C₁₂ 烷基链。

在一些实施方案中, L₂ 可为 。

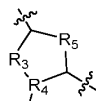
在一些实施方案中, L₂ 可为 , 优选 ,

更优选 , 其中, a₃ 端与 O 相连, b₃ 端与 B 相连。

在一些实施方案中, L₂ 可为 , 其中, a₃ 端与 O 相连, b₃ 端与 B 相连。

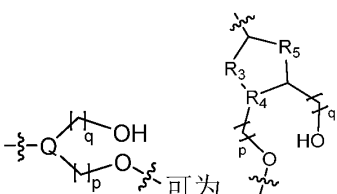
在一些实施方案中, L₂ 可为 。

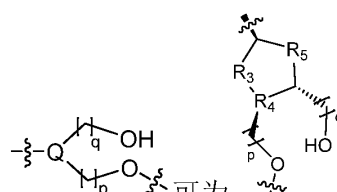
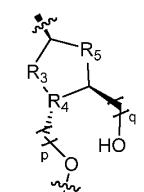
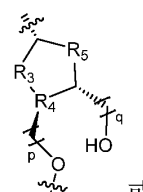
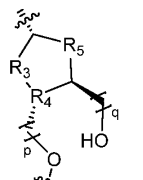
在一些实施方案中, r 可为 3、4、5 或 6, 优选 3。

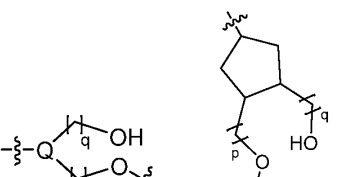
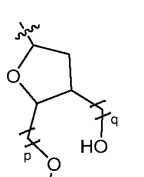
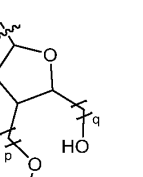
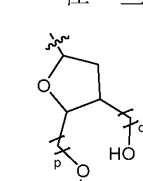
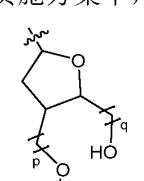
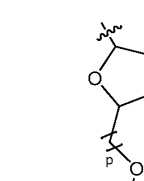


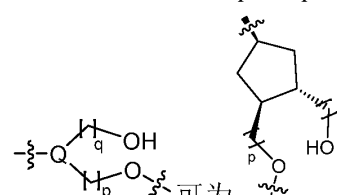
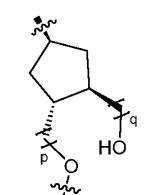
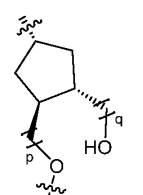
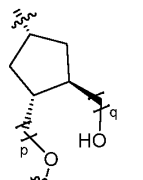
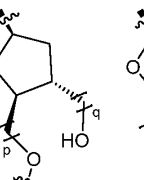
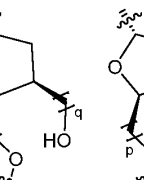
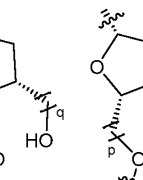
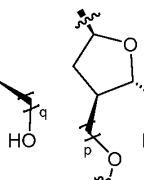
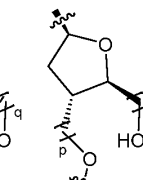
在一些实施方案中, Q 可为 , 其中, R₃、R₄、R₅ 的定义同前任一方

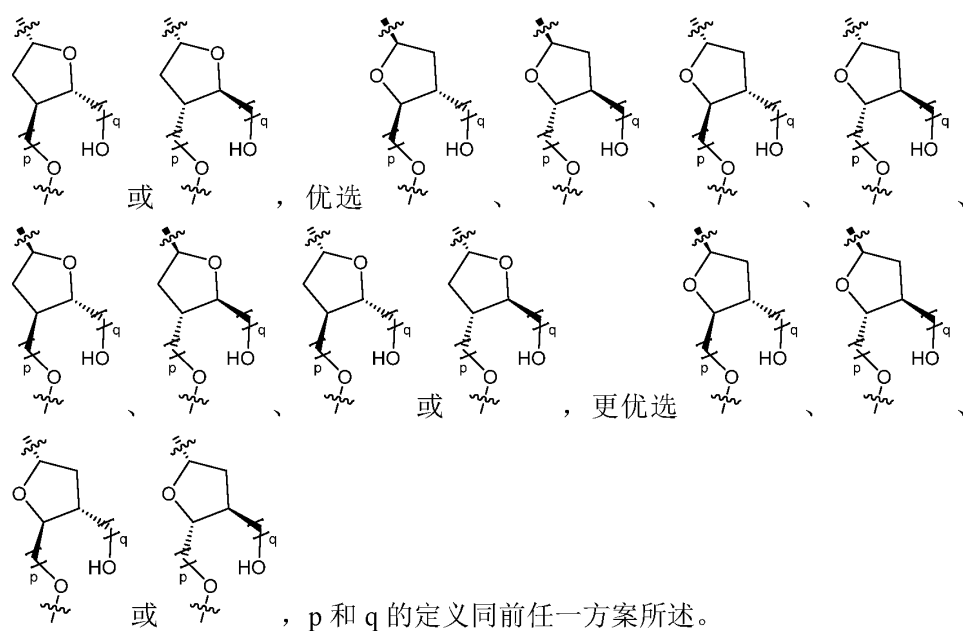
案所述。

在一些实施方案中，，其中，R₃、R₄、R₅、p 和 q 的定义同前一方案所述。

在一些实施方案中，、、 或 ，其中，R₃、R₄、R₅、p 和 q 的定义同前一方案所述。

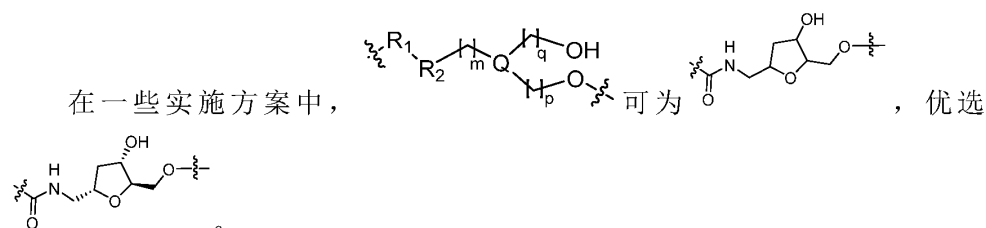
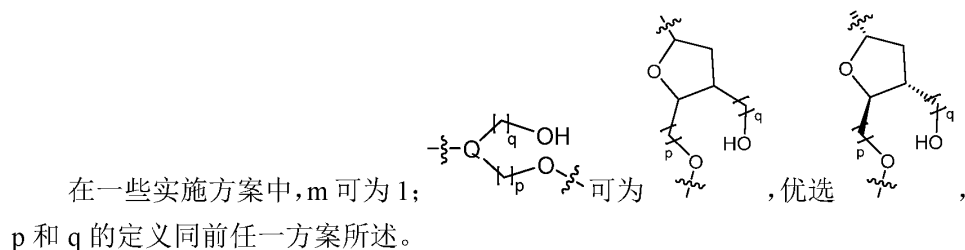
在一些实施方案中，、 或 ，优选  或 ，更优选 ，p 和 q 的定义同前一方案所述。

在一些实施方案中，、、、、、、、、、、、、、<

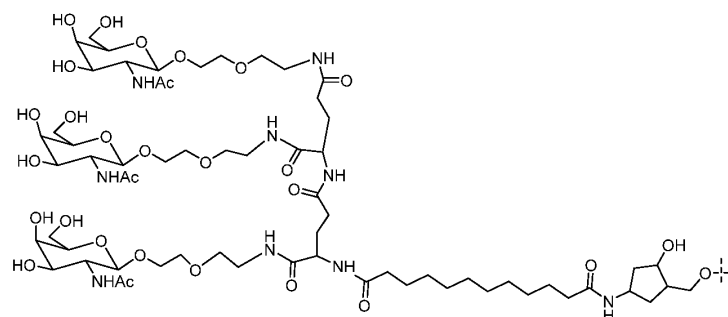


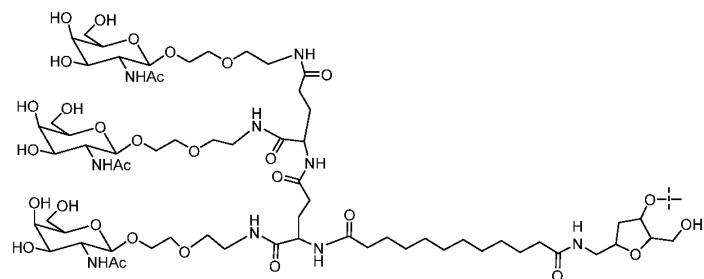
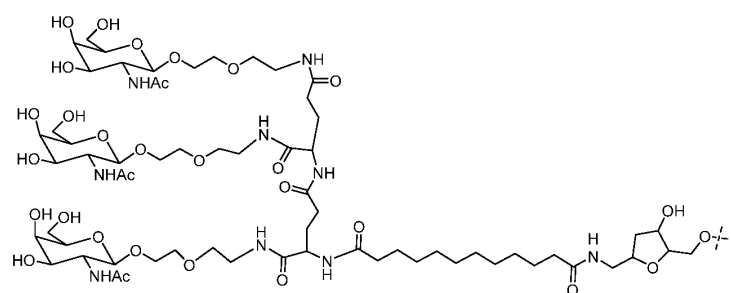
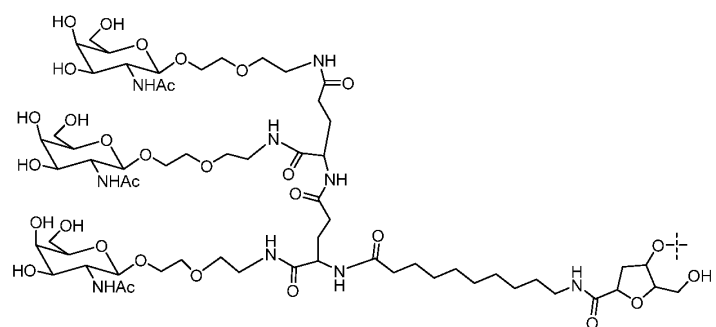
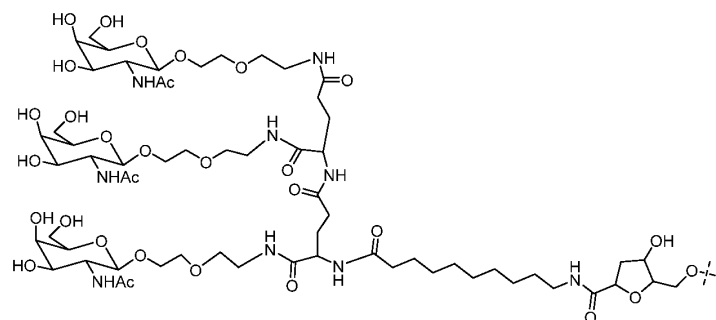
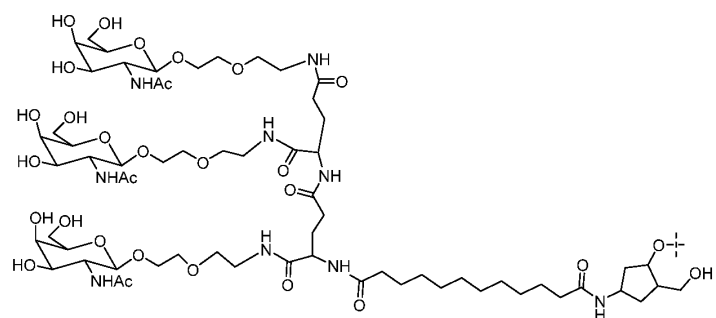
在一些实施方案中, $-R_1-R_2-$ 可为 $-C(=O)-NR_6-$, 其中 C 原子优选与 L_1 相连, R_6 的定义同前任一方案所述。

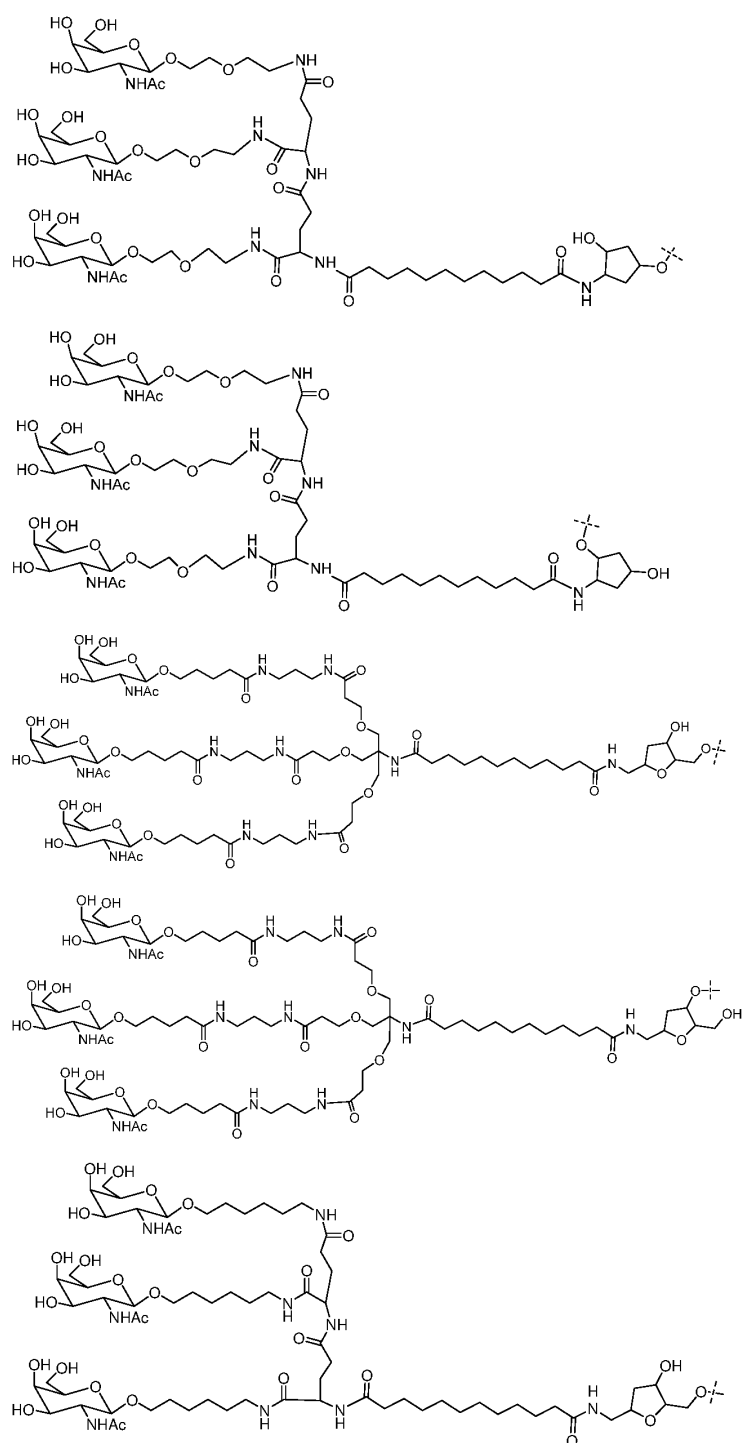
在一些实施方案中, m 可为 1。



在一些实施方案中, 所述的配体可为以下任一结构,

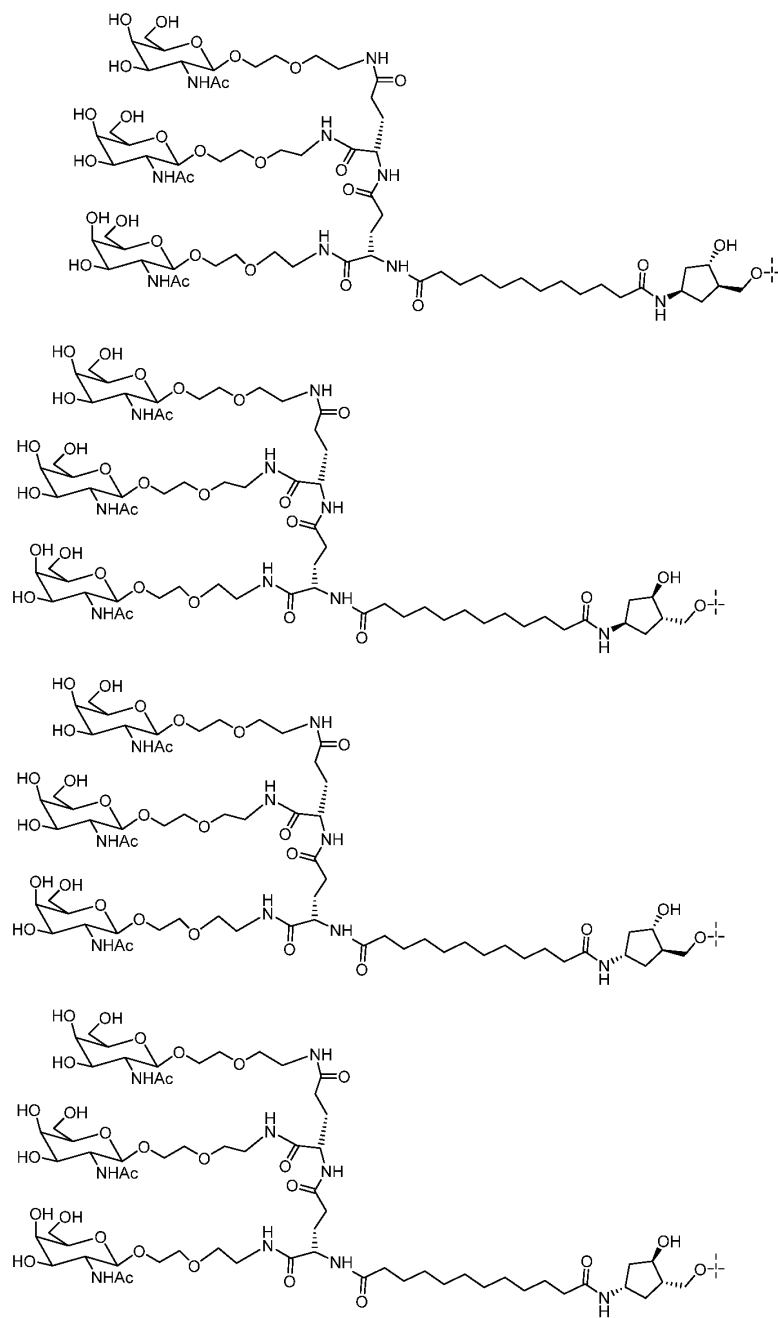


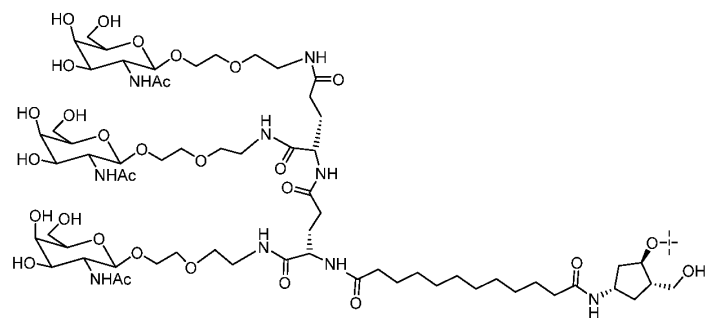
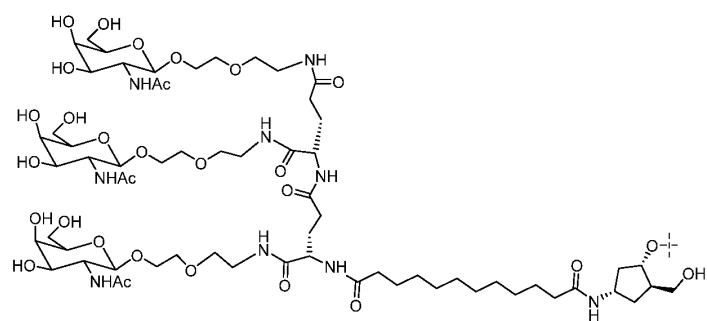
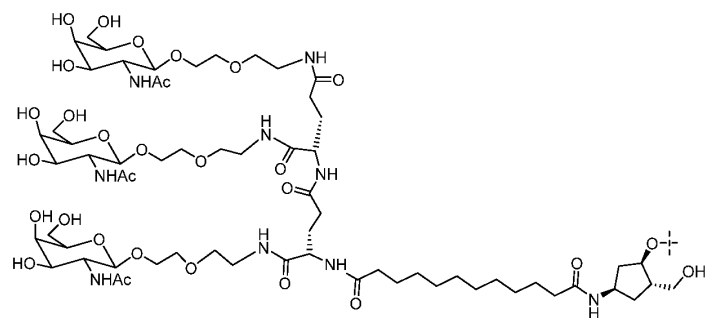
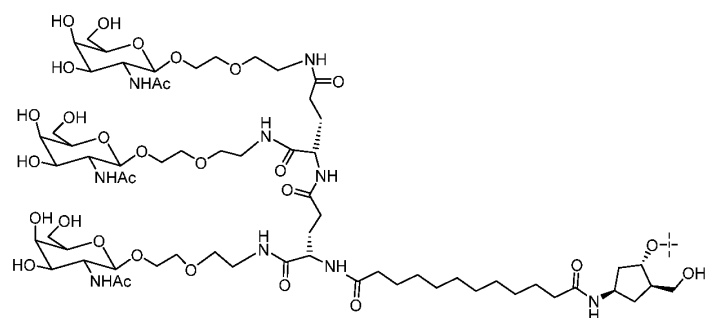


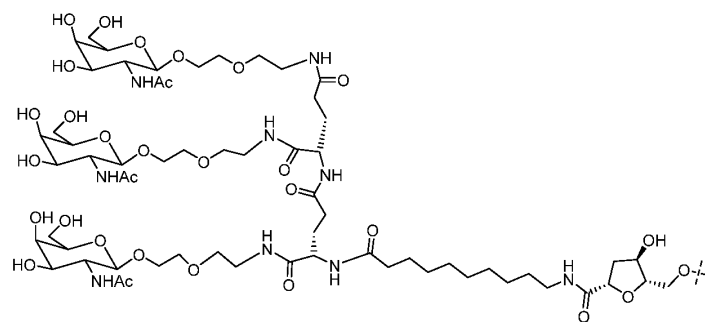
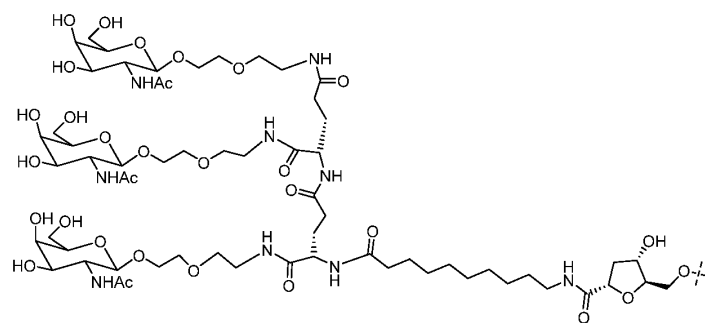
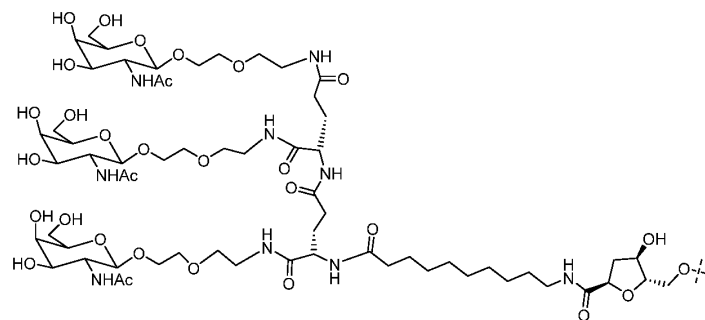
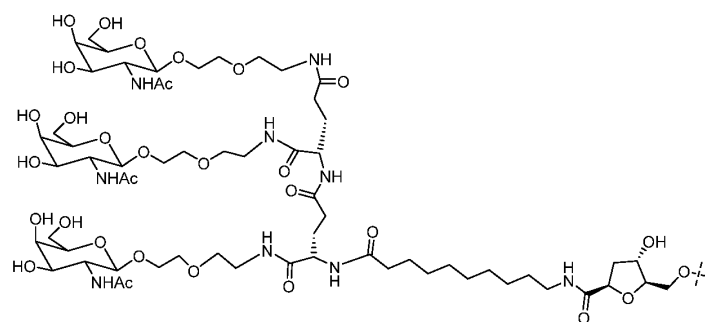


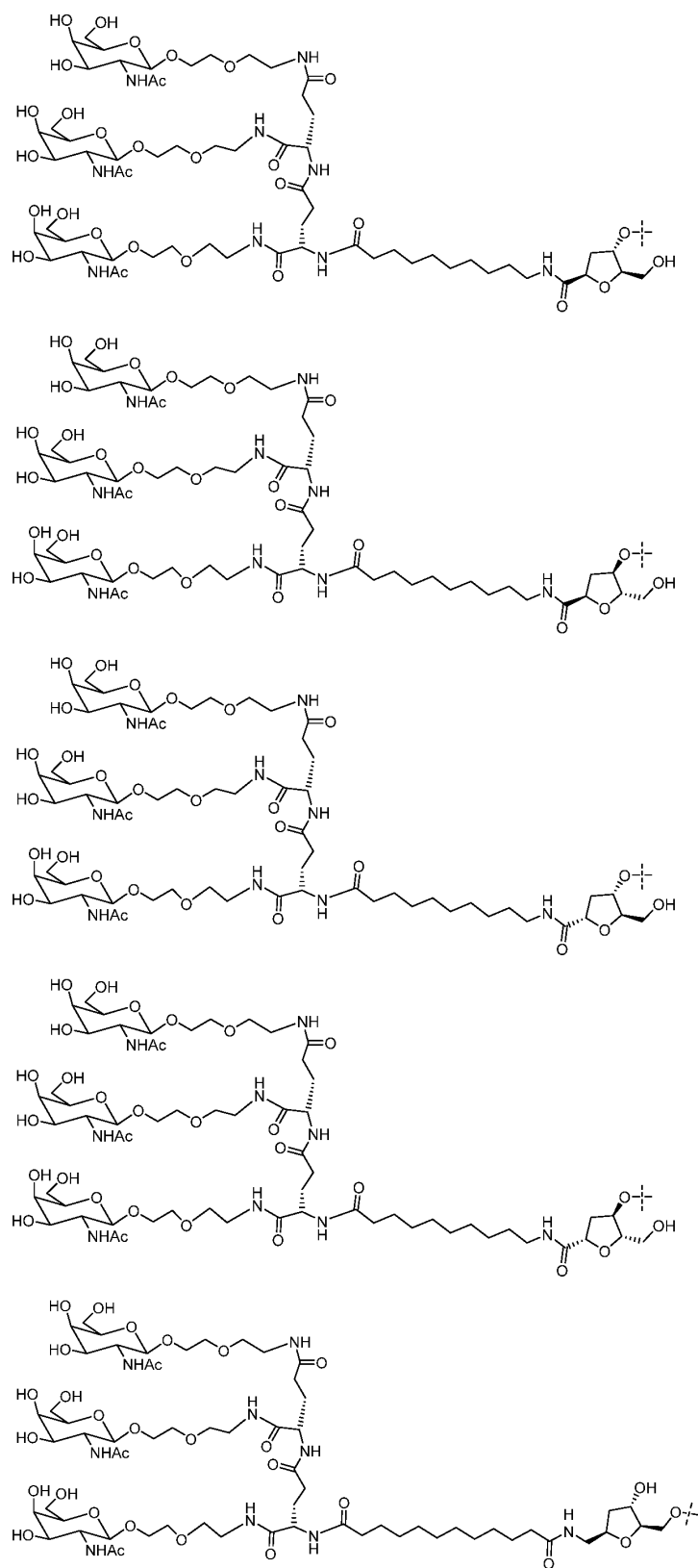


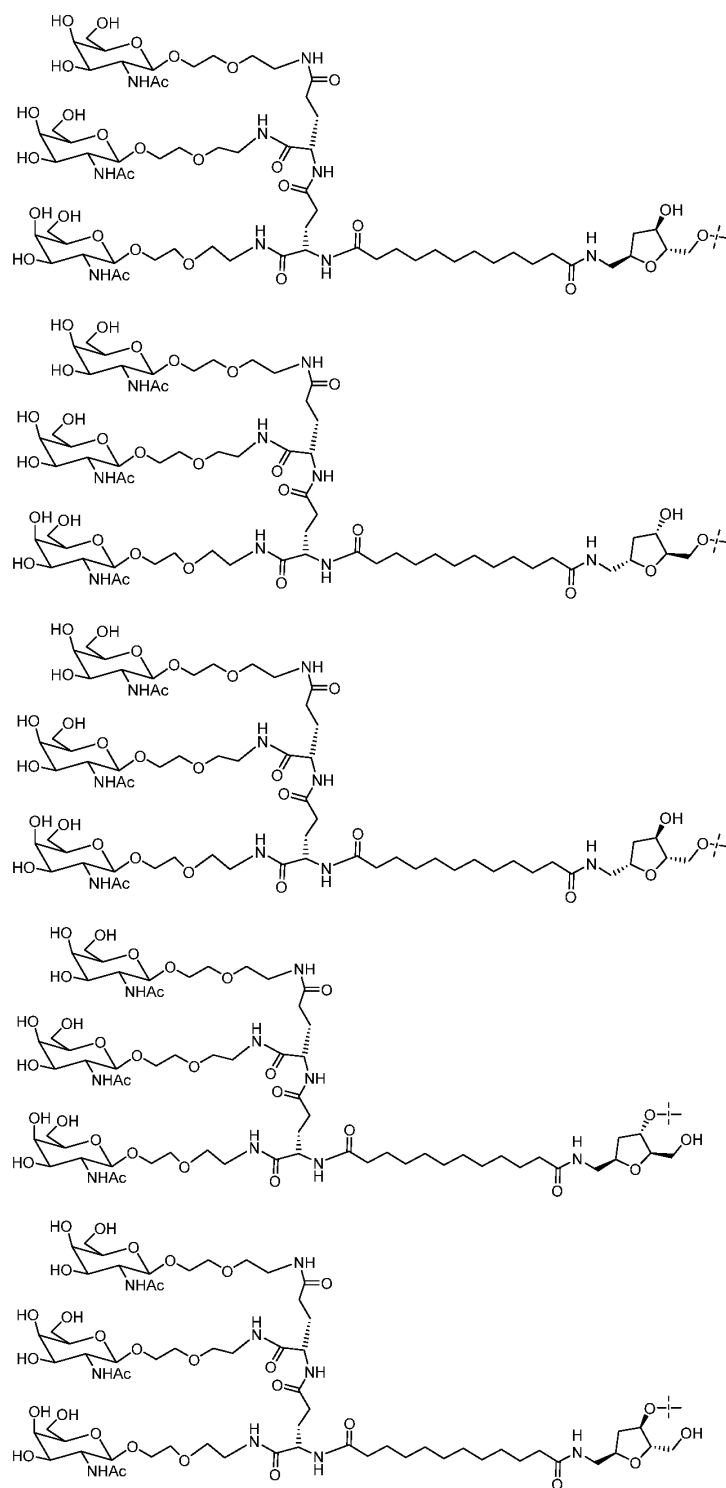
在一些实施方案中，所述的配体可为以下任一结构，

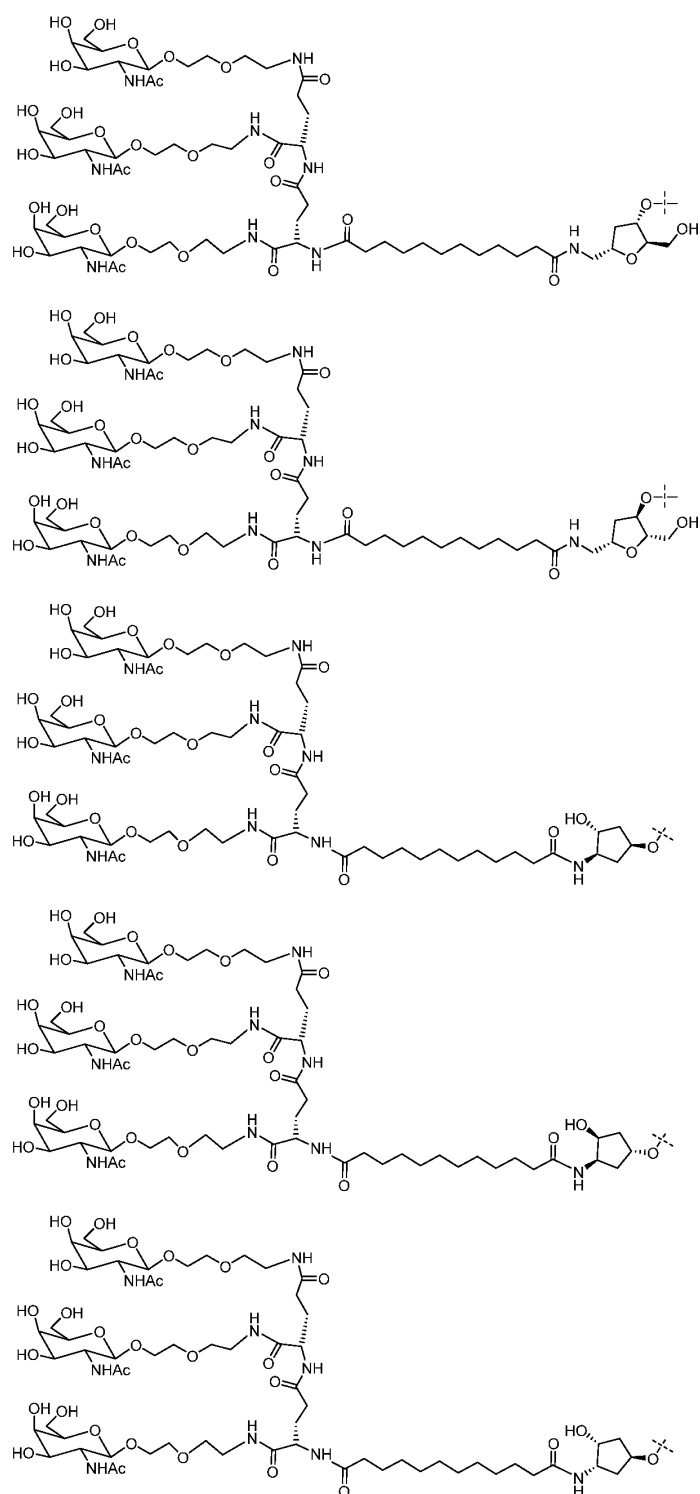


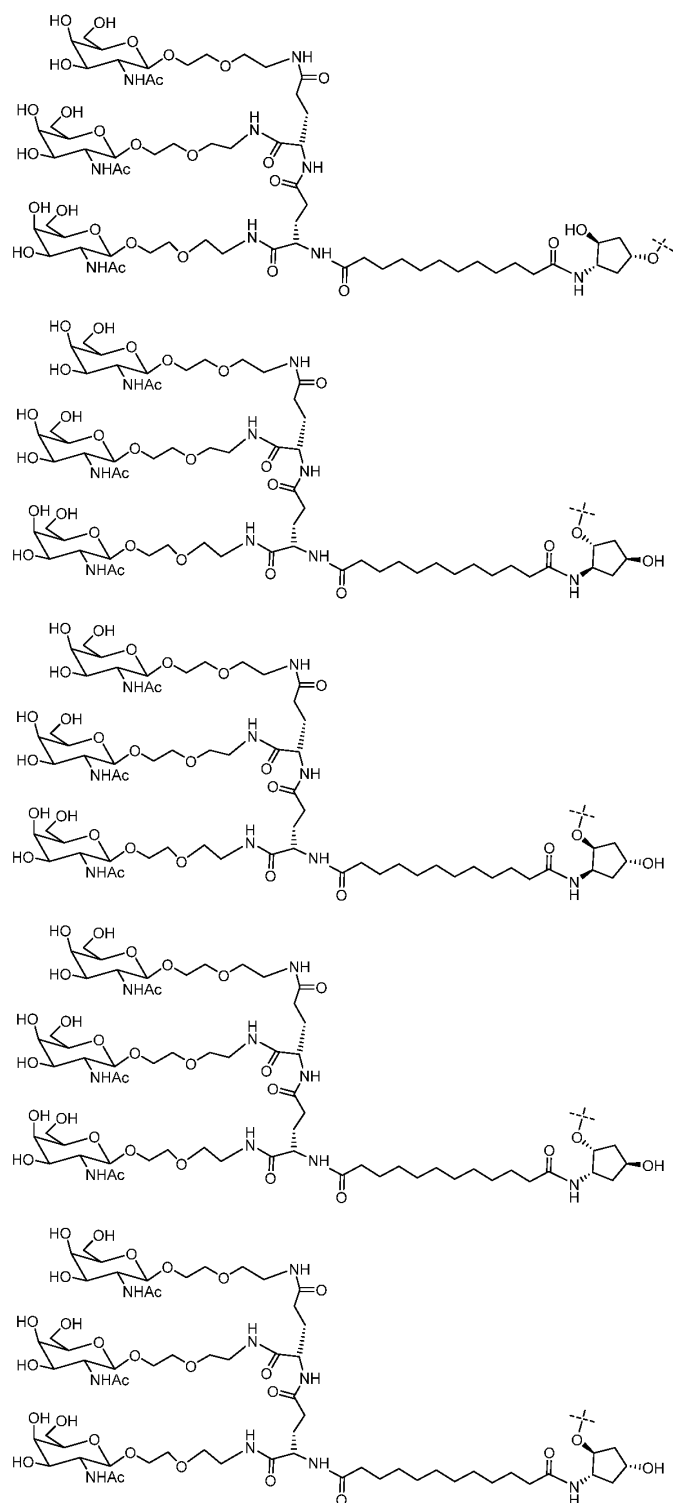


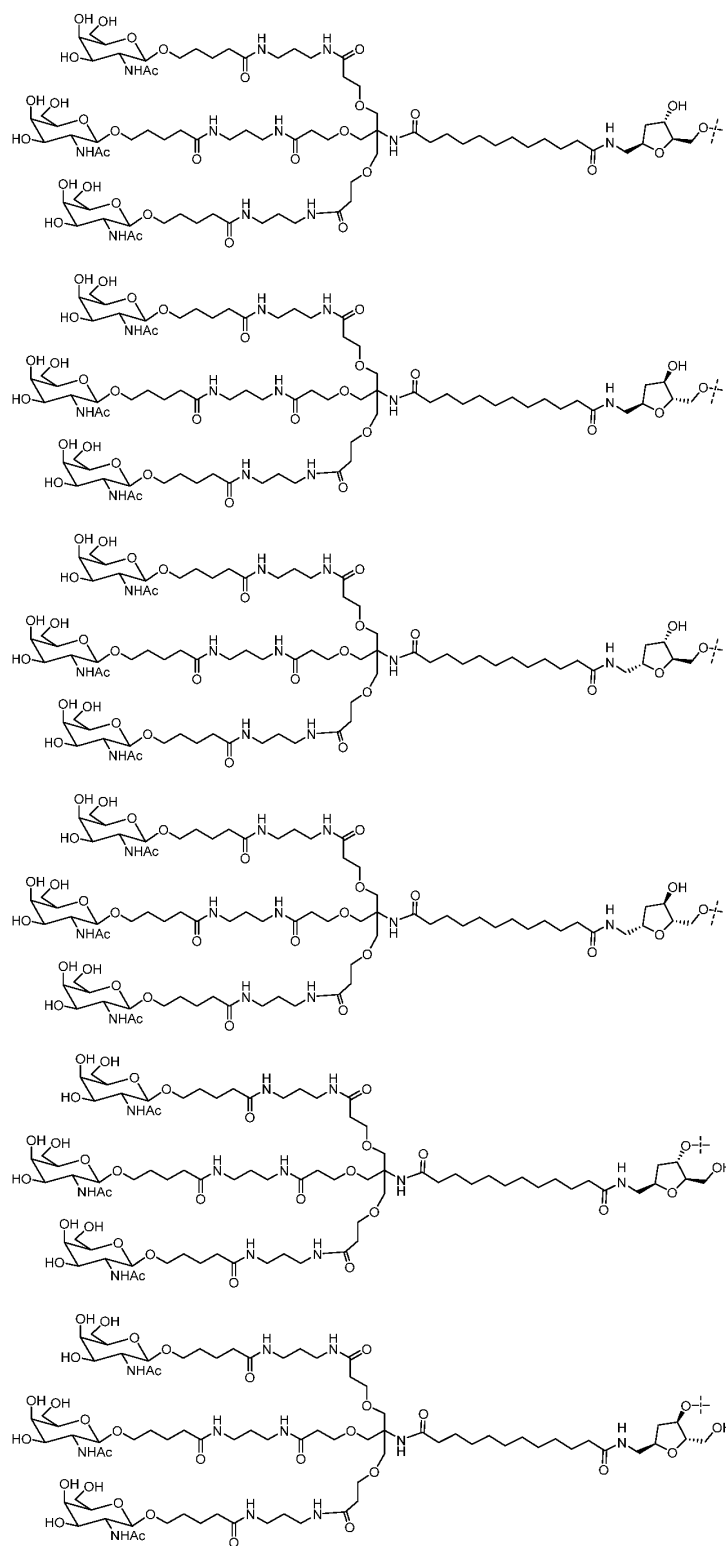


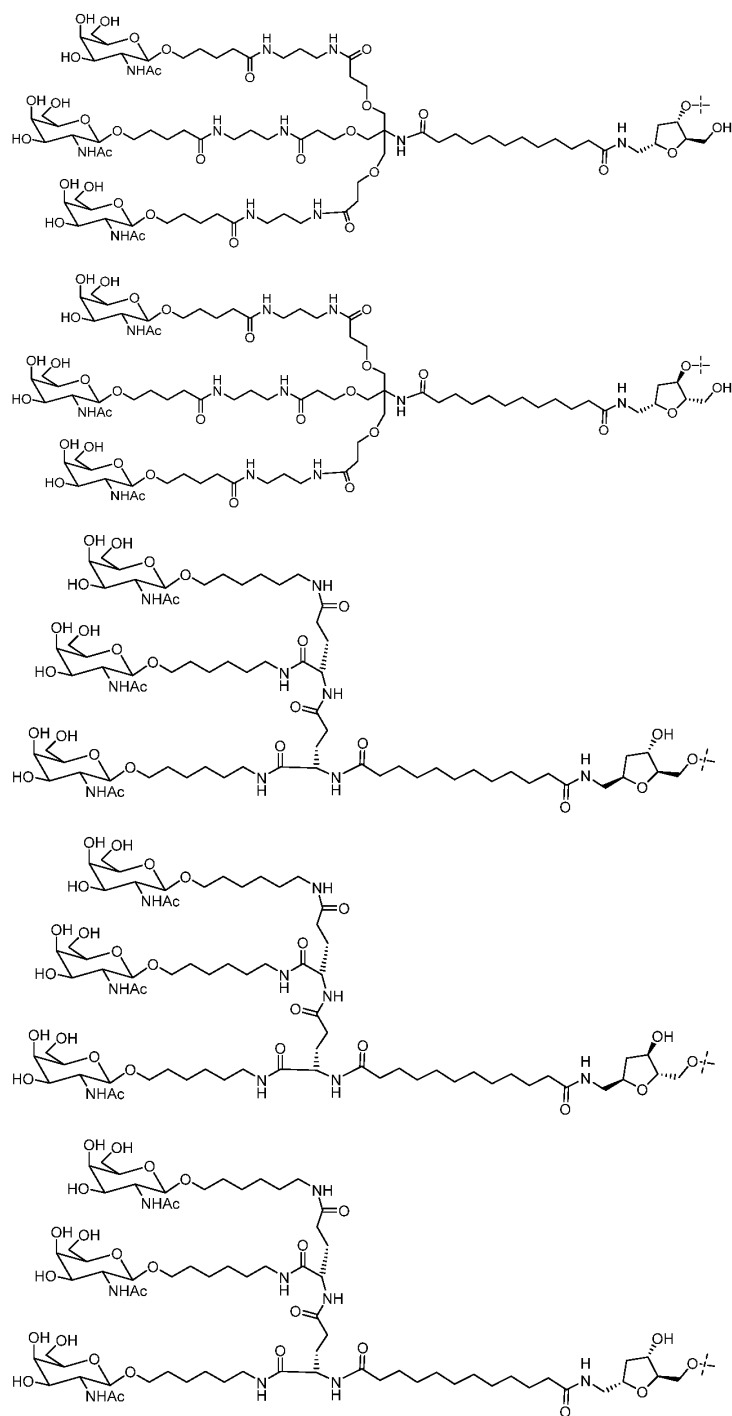


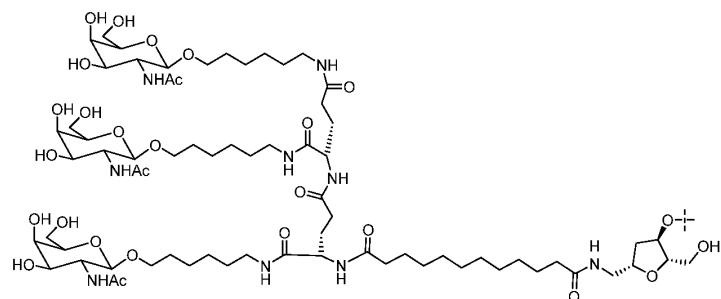
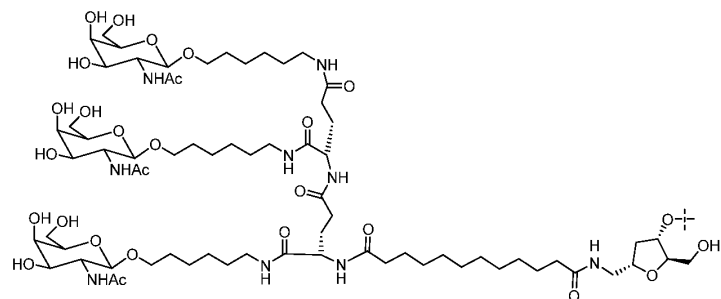
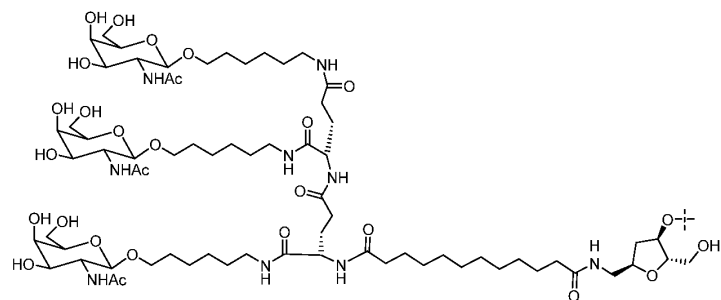
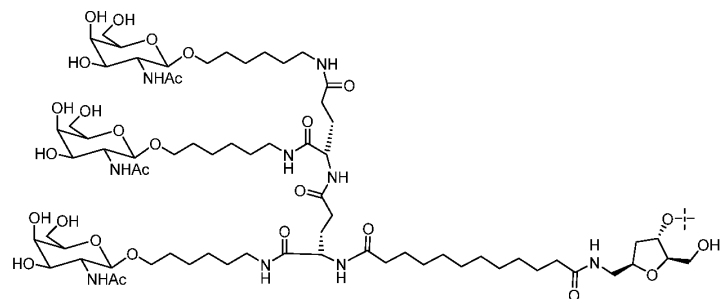
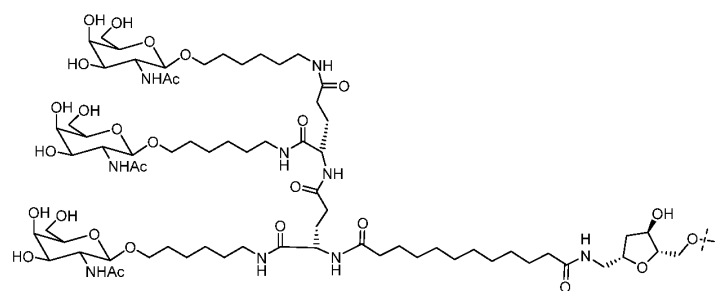


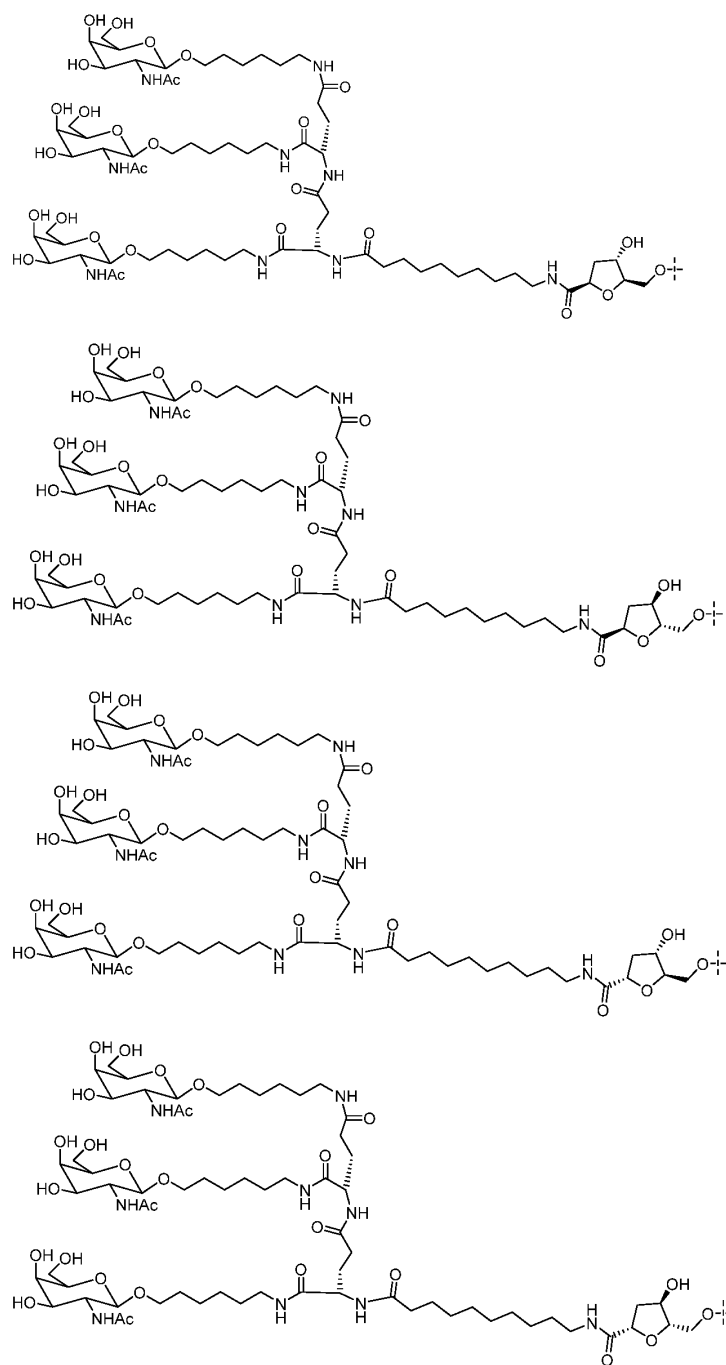


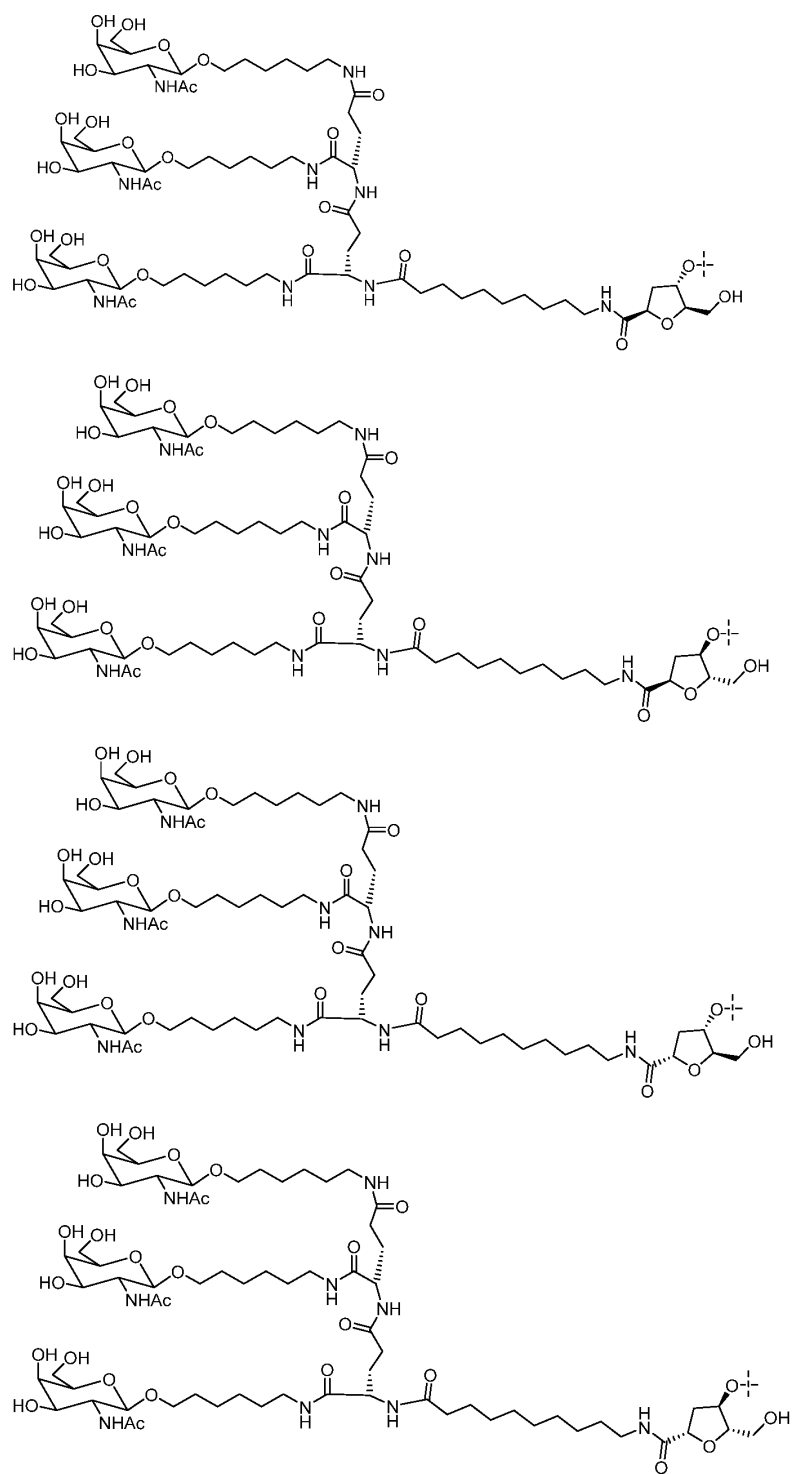


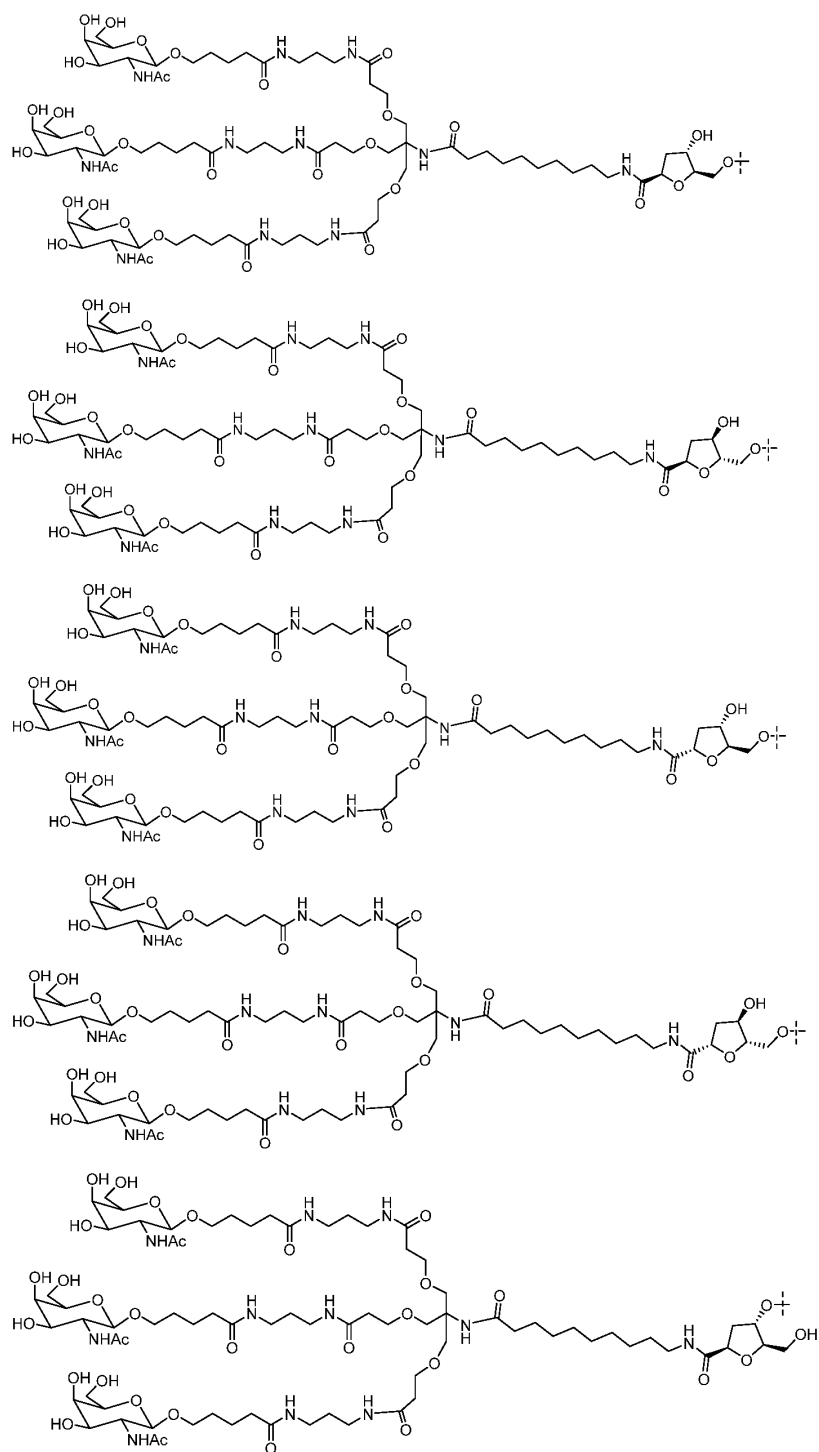


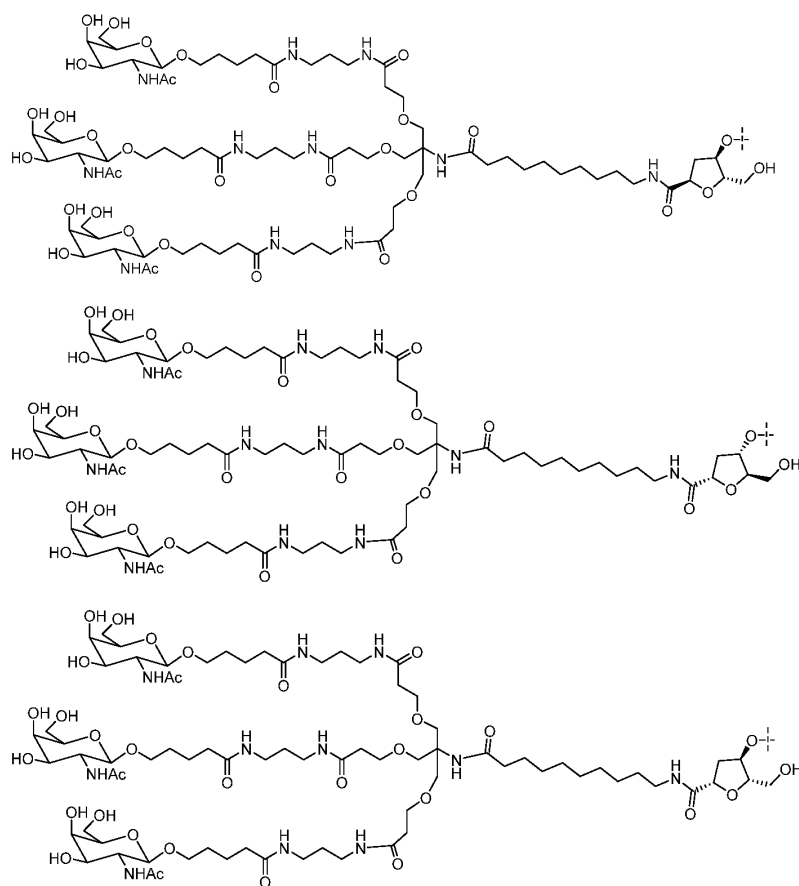






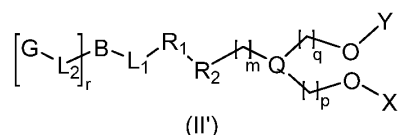






在一些实施方案中，可以 N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺或 N-异丁酰基半乳糖胺替换以上配体中的 N-乙酰基-半乳糖胺部分。

第二方面，本公开提供了一种如式 (II') 所示化合物，



其中，X 为羟基保护基；Y 为氢、氘、

j7 为 1、2、3 或 4；

W 为高分子化合物；

G 为与细胞受体结合的靶向部分；

L₁、R₁、R₂、Q、B、L₂、m、p、q 和 r 的定义同具有如式 (I') 所示结构的配体中的任一方案所述。

在一些实施方案中，所述羟基保护基可为酯基保护基、烷氧基甲基保护基、烷基保护基、硅烷基保护基或芳基保护基，优选芳基保护基，更优选 MMTr 和

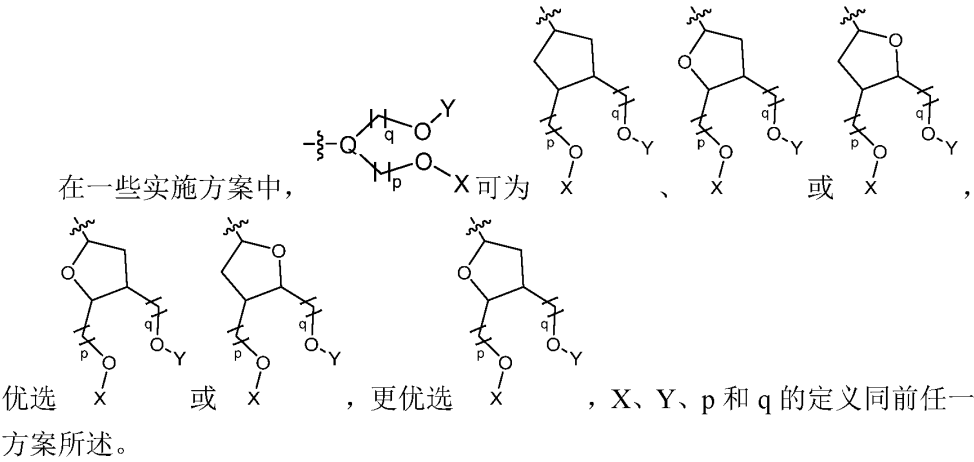
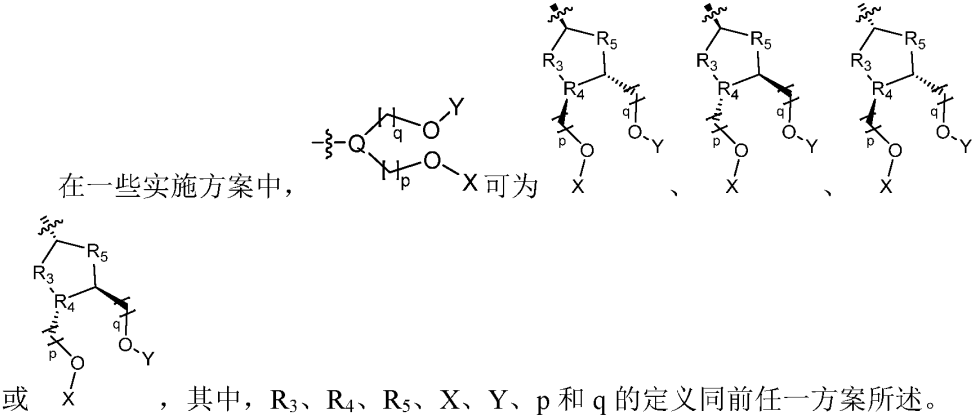
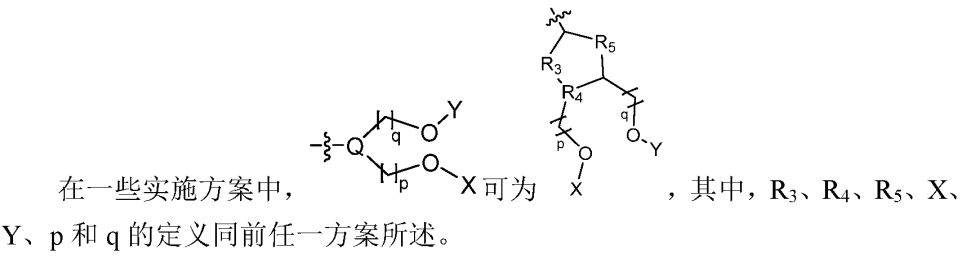
DMTr, 进一步优选 DMTr。

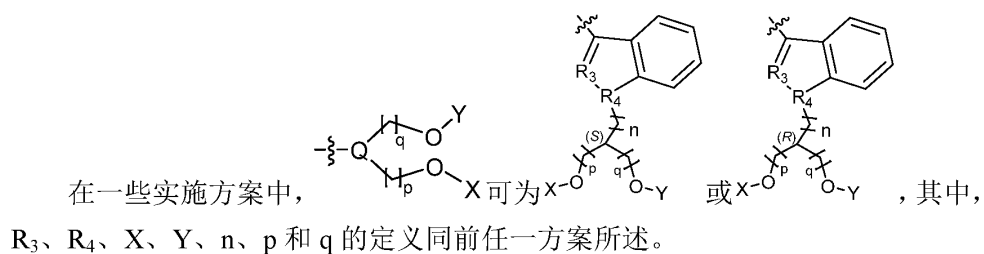
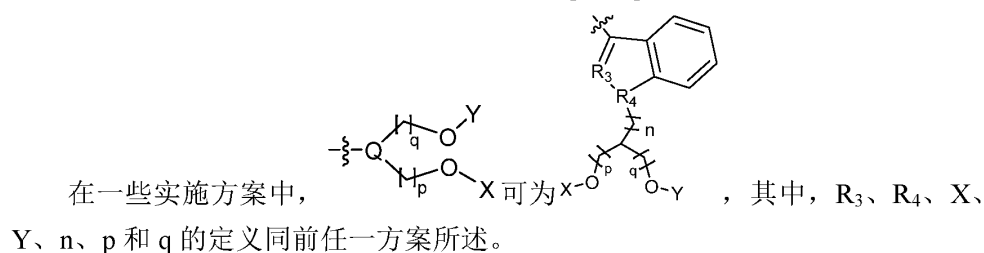
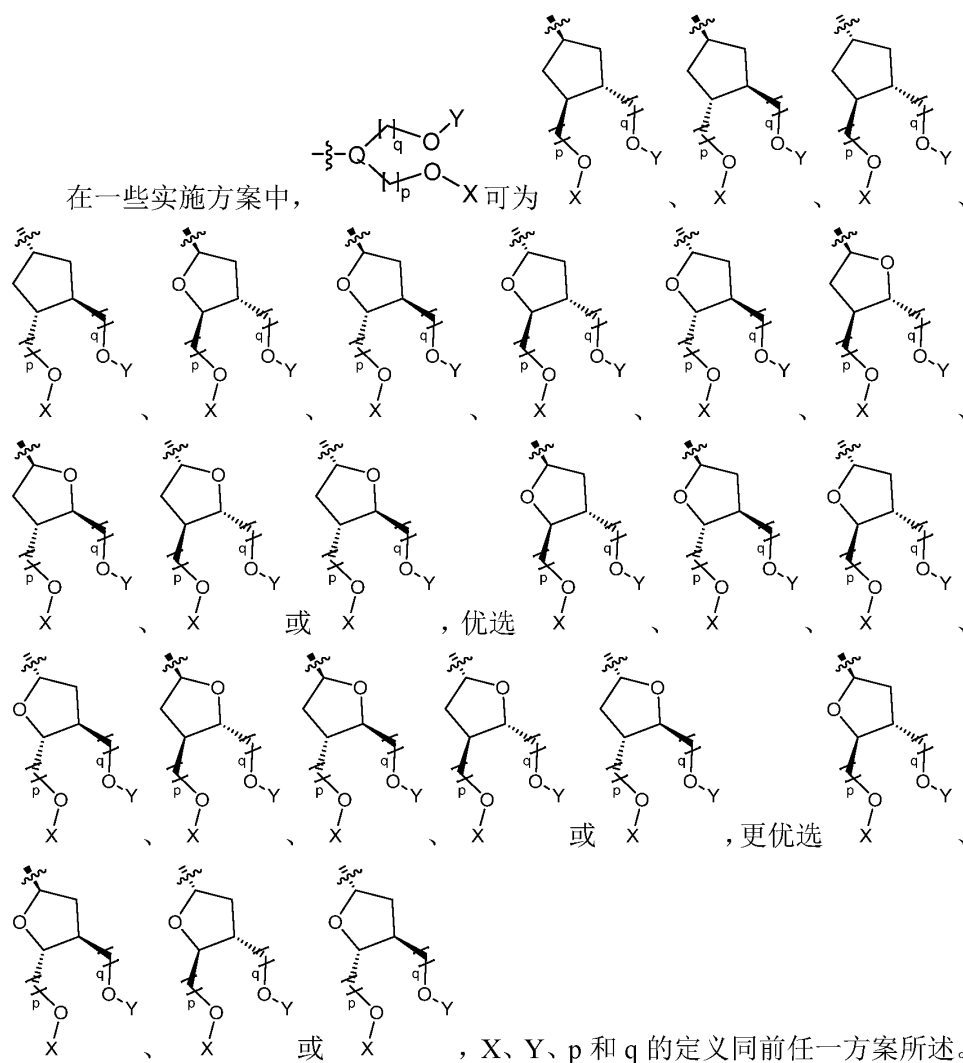
在一些实施方案中, j7 可为 2。

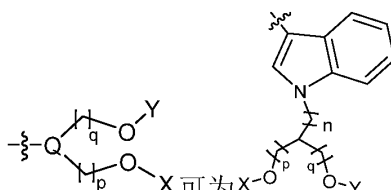
在一些实施方案中, G 可为去唾液酸糖蛋白受体靶向部分。

在一些实施方案中, G 可为 N-乙酰基-半乳糖胺三乙酸酯、N-三氟乙酰基半乳糖胺三乙酸酯、N-丙酰基半乳糖胺三乙酸酯、N-正丁酰基半乳糖胺三乙酸酯或 N-异丁酰基半乳糖胺三乙酸酯, 优选 N-乙酰基-半乳糖胺三乙酸酯。

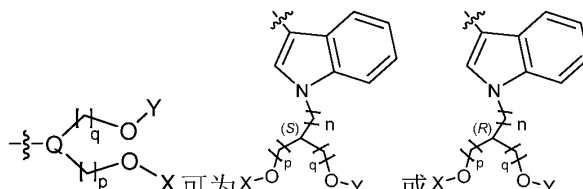
在一些实施方案中, 所述高分子化合物可为树脂, 优选大孔树脂, 更优选为大孔胺甲基树脂。





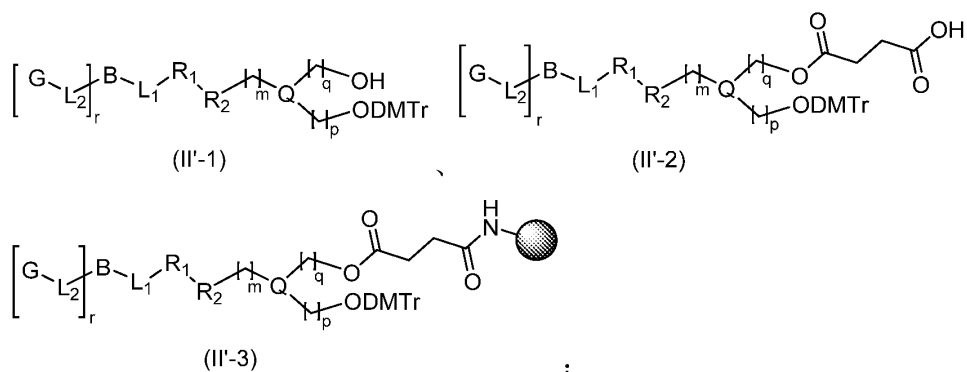


在一些实施方案中， X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。



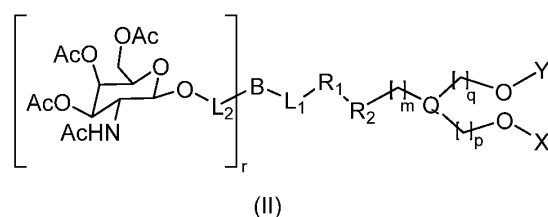
在一些实施方案中， X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。

在一些实施方案中，所述化合物可为以下式 (II'-1)、(II'-2) 或 (II'-3) 所示化合物，



其中， ● 为树脂，优选大孔树脂，更优选大孔胺甲基树脂； L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 G 、 m 、 p 、 q 和 r 的定义同式 (II') 所示化合物中的任一方案所述。

本公开提供了一种如式 (II) 所示化合物，



其中， X 为羟基保护基； Y 为氢、氘、 H_2O 或 W ；

j_7 为 1、2、3 或 4；

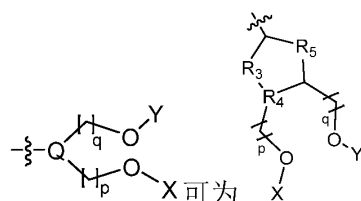
W 为高分子化合物；

L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定义同具有如式 (I) 所示结构的配体中的任一方案所述。

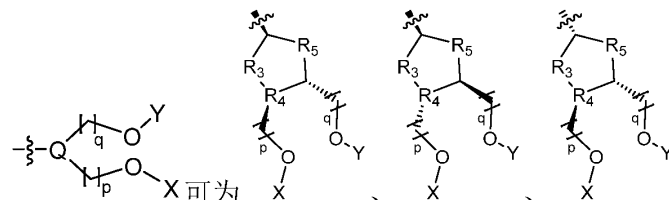
在一些实施方案中，所述羟基保护基可为酯基保护基、烷氧基甲基保护基、烷基保护基、硅烷基保护基或芳基保护基，优选芳基保护基，更优选 MMTr 和 DMTr，进一步优选 DMTr。

在一些实施方案中，j7 可为 2。

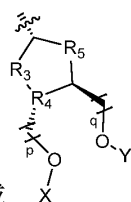
在一些实施方案中，所述高分子化合物可为树脂，优选大孔树脂，更优选大孔胺甲基树脂。



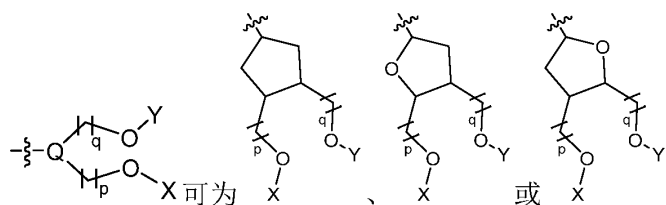
在一些实施方案中， $\text{--}\text{Q--}\text{O--}\text{Y}$ 可为 $\text{--}\text{Q--}\text{O--}\text{Y}$ ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 X 、 Y 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。



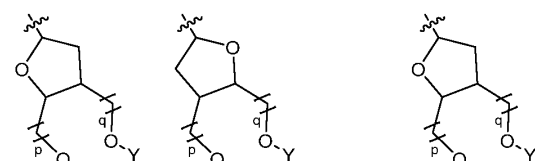
在一些实施方案中，



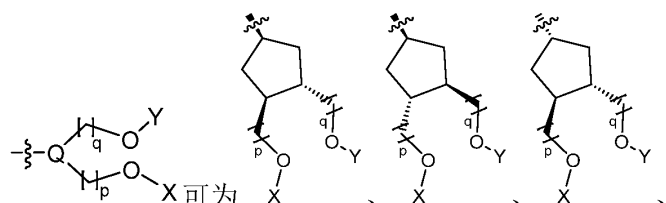
或 $\text{--}\text{Q--}\text{O--}\text{Y}$ ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 X 、 Y 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。



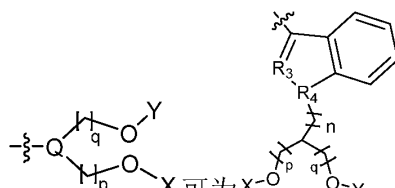
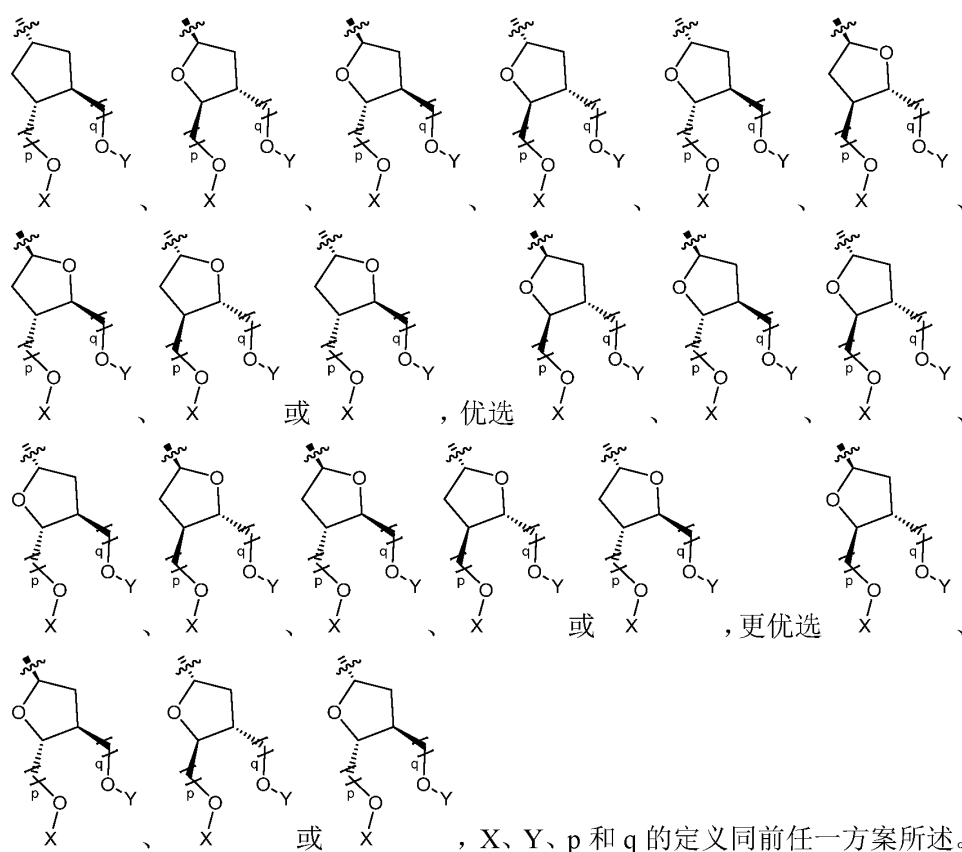
在一些实施方案中，



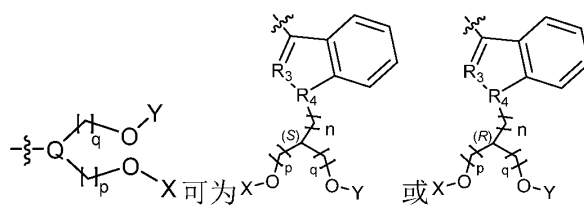
优选 $\text{--}\text{Q--}\text{O--}\text{Y}$ 或 $\text{--}\text{Q--}\text{O--}\text{Y}$ ，更优选 $\text{--}\text{Q--}\text{O--}\text{Y}$ ， X 、 Y 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。



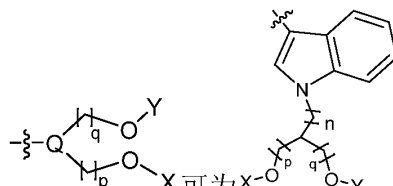
在一些实施方案中，



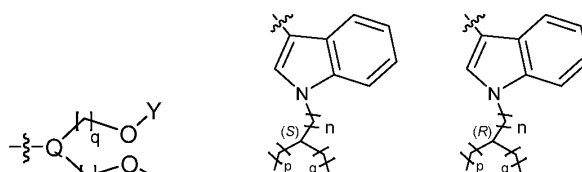
在一些实施方案中，X可为，其中，R₃、R₄、X、Y、n、p和q的定义同前任一方案所述。



在一些实施方案中，X可为或，其中，R₃、R₄、X、Y、n、p和q的定义同前任一方案所述。

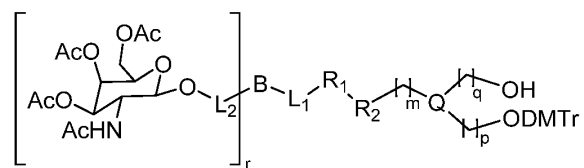


在一些实施方案中，X可为 $X-O^p-O^q-Y$ ，X、Y、n、p和q的定义同前任一方案所述。

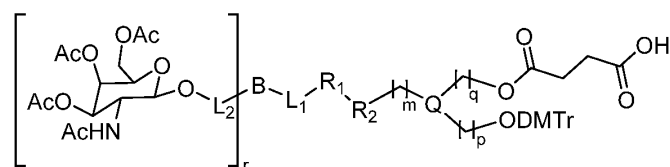


在一些实施方案中， X 可为 $\text{X}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{Q})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{O}-\text{Y}$ 或 $\text{X}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{Q})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{O}-\text{Y}$ ， X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定义同前任一方案所述。

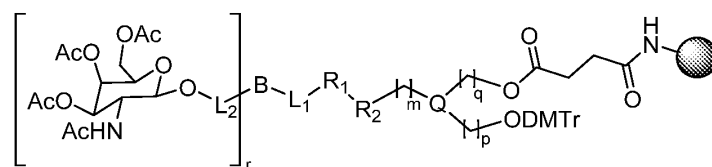
在一些实施方案中，所述化合物可为以下式(II-1)、(II-2)或(II-3)所示化合物，



(II-1)



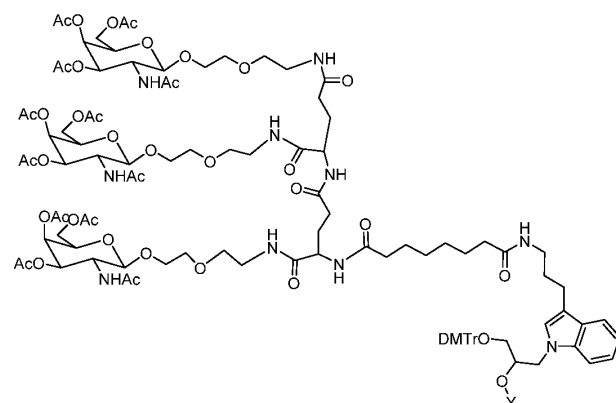
(II-2)

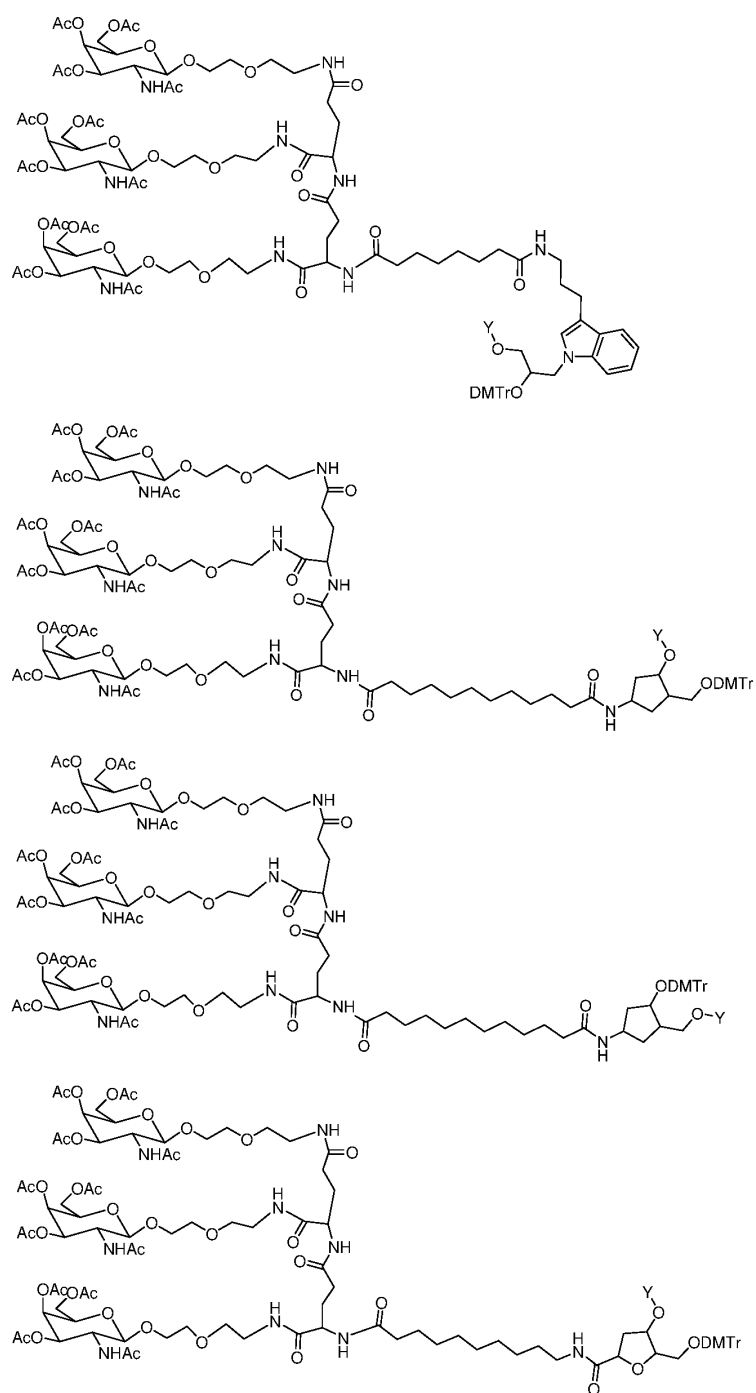


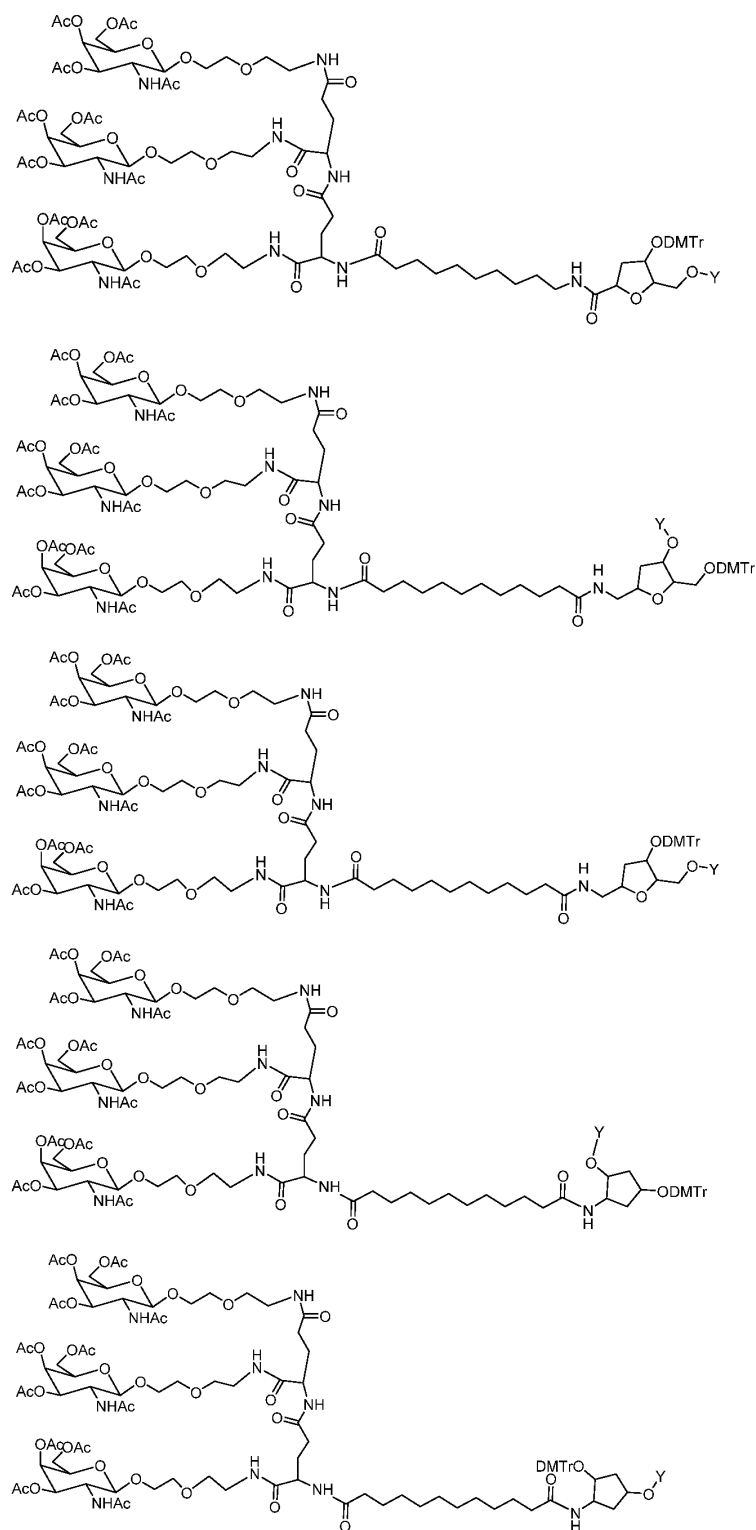
(II-3)

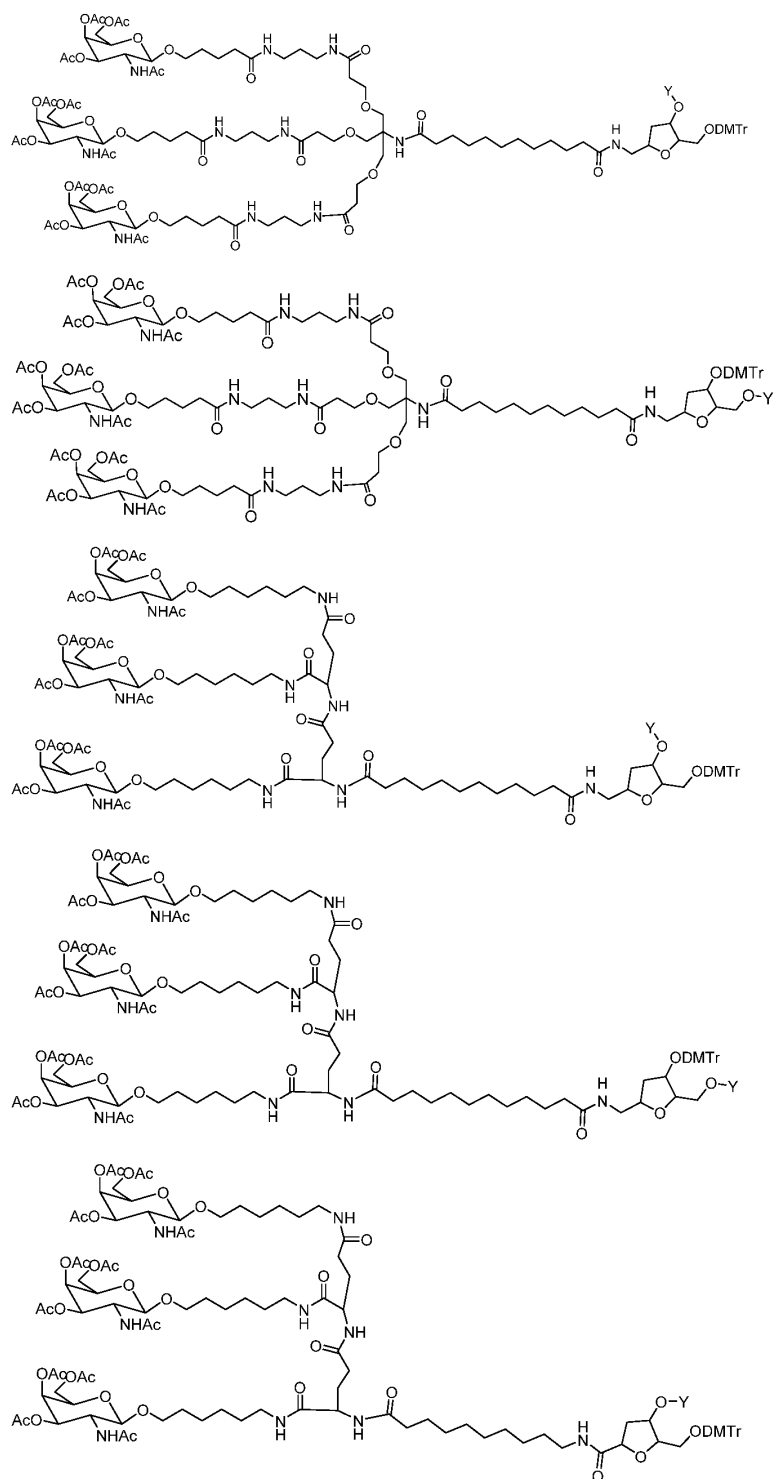
其中，为树脂，优选大孔树脂，更优选大孔胺甲基树脂； L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定义同式(II)所示化合物中的任一方案所述。

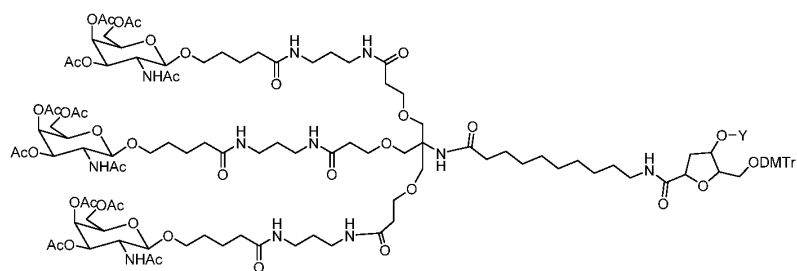
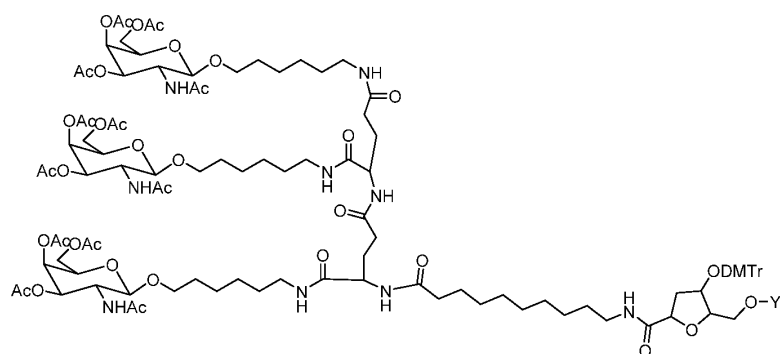
在一些实施方案中，所述化合物可为以下任一结构，



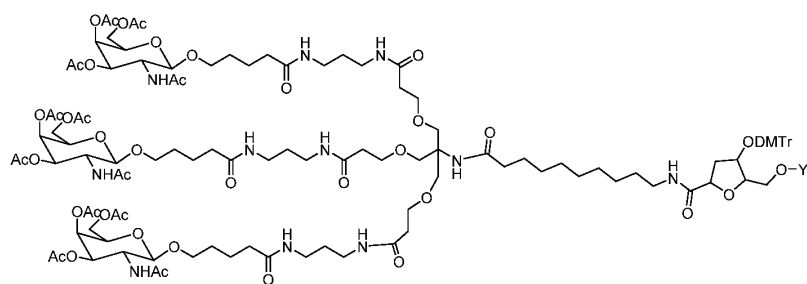




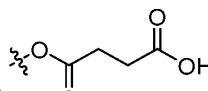


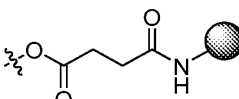


或

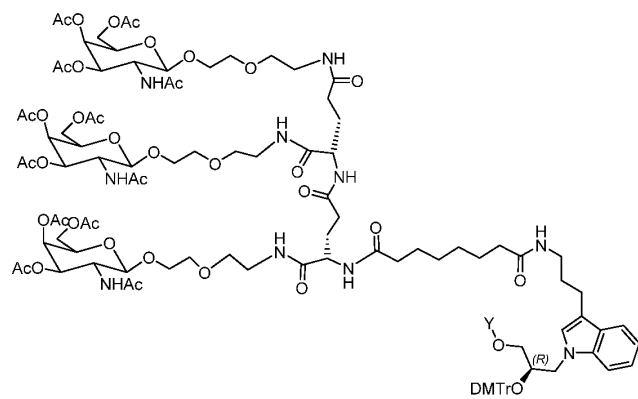
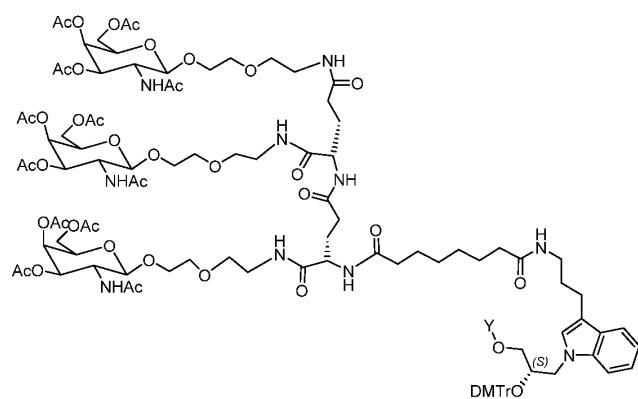
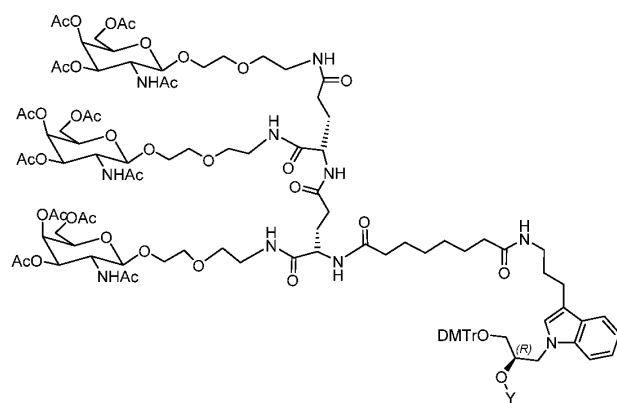
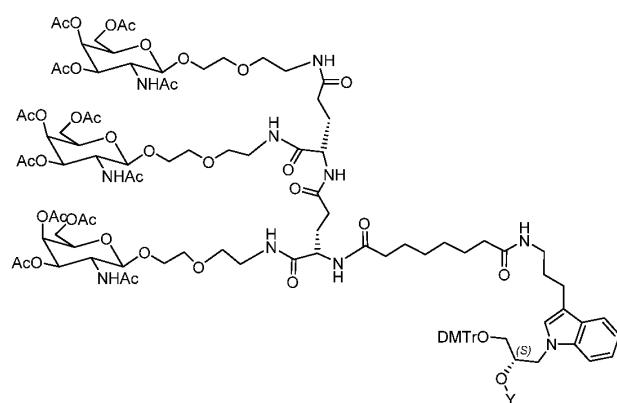


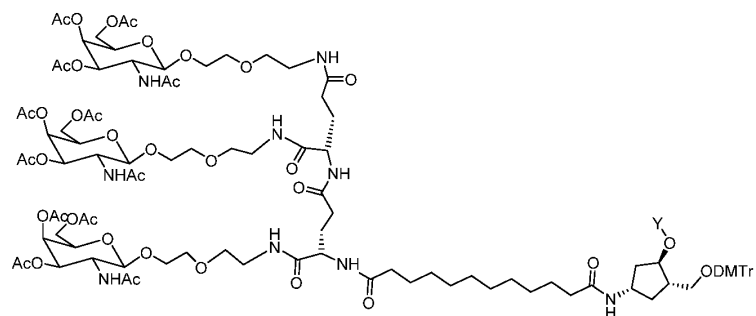
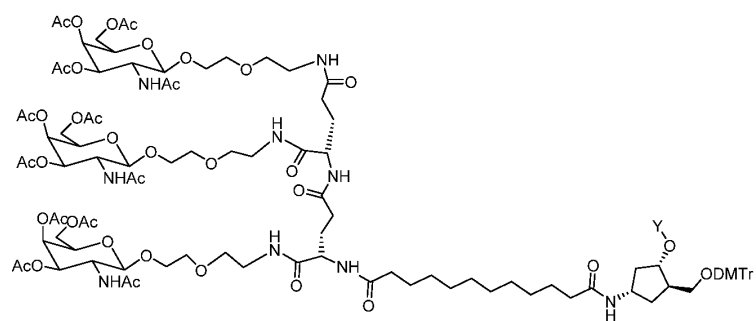
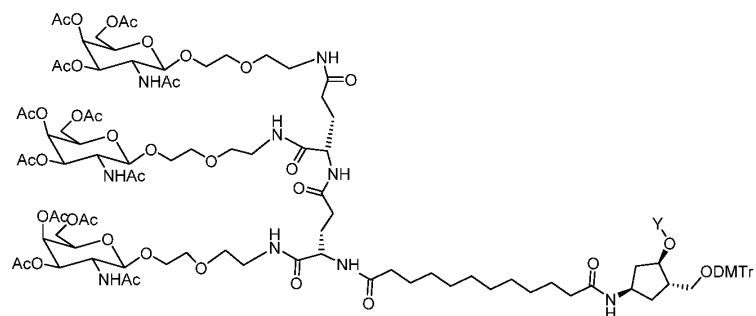
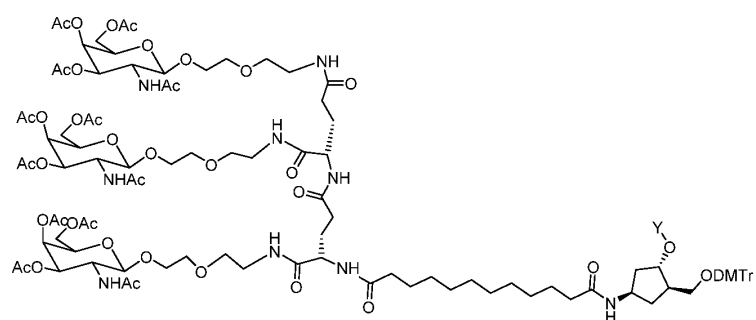
;

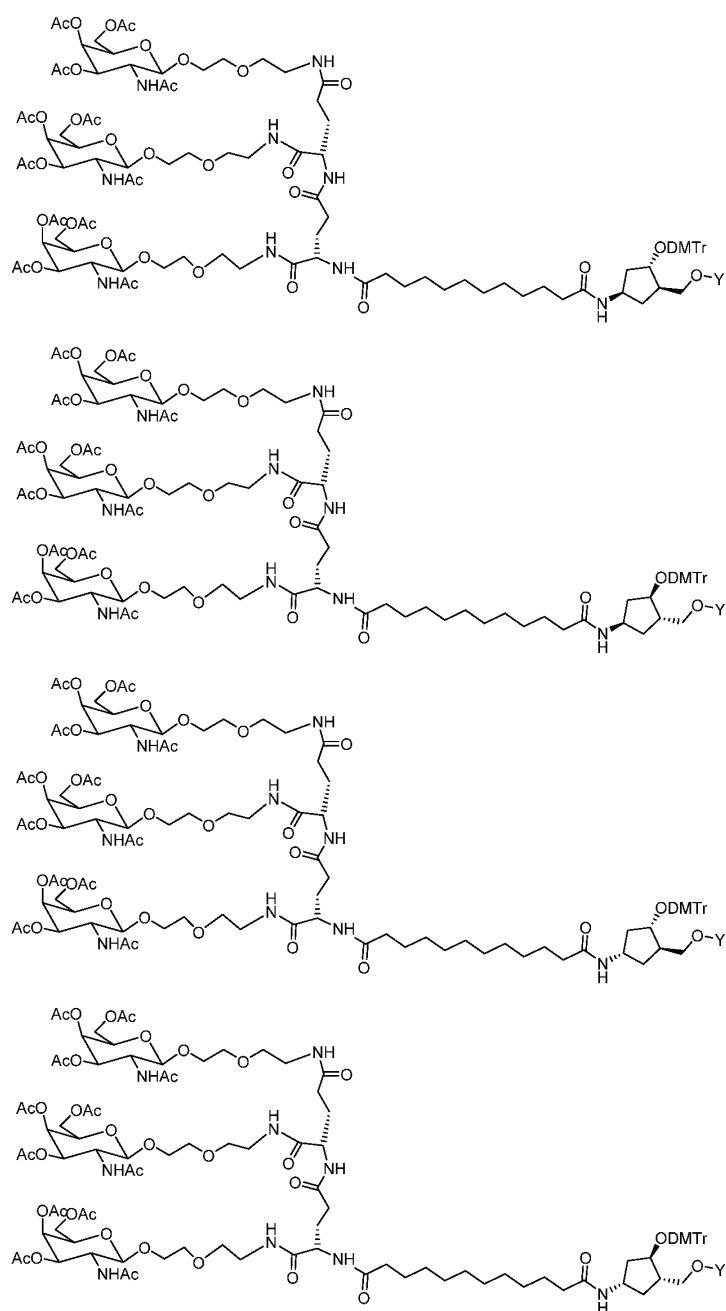
其中, Y 为氢或  ;

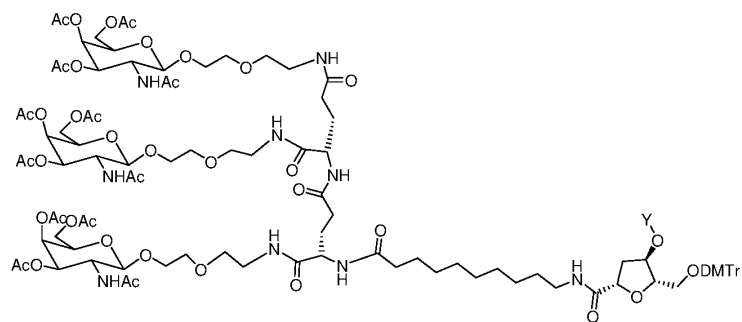
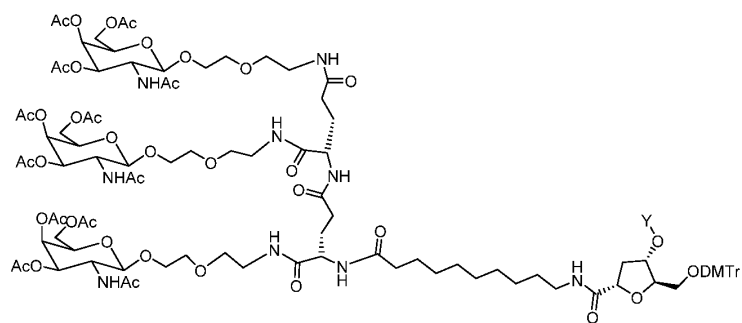
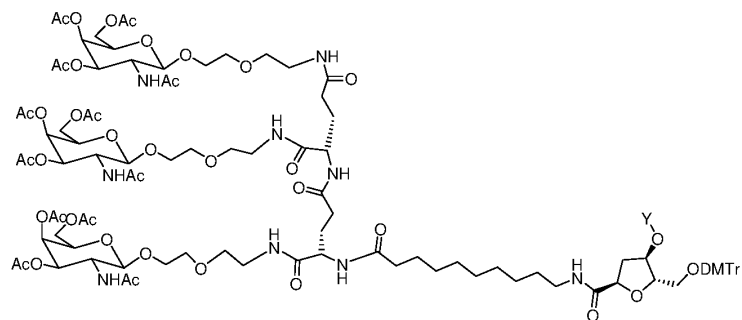
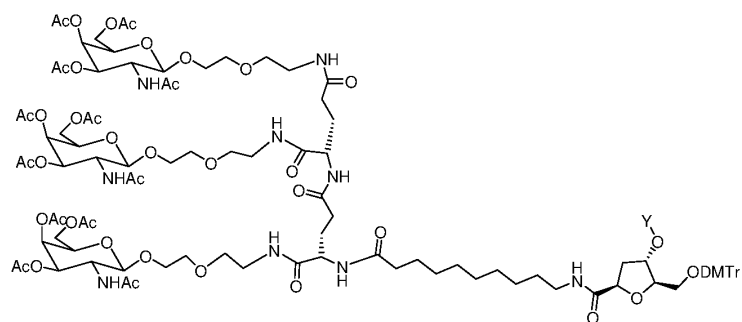
或者, Y 为  ,  为树脂, 优选大孔树脂, 更优选大孔胺甲基树脂。

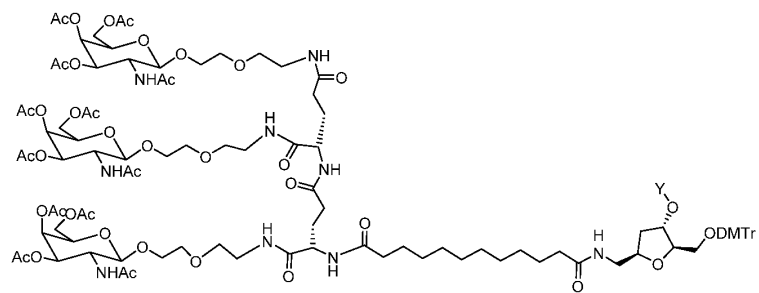
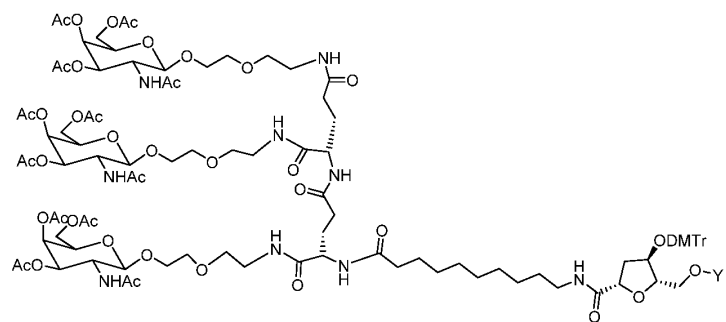
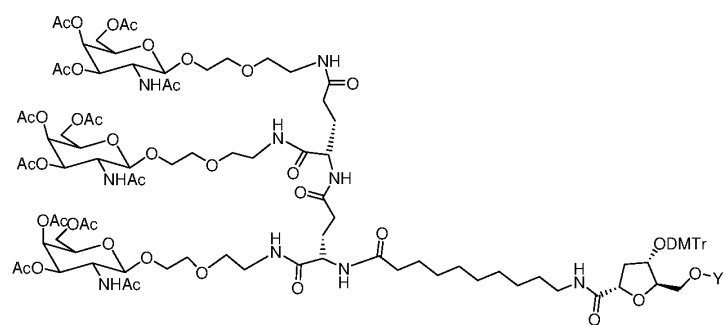
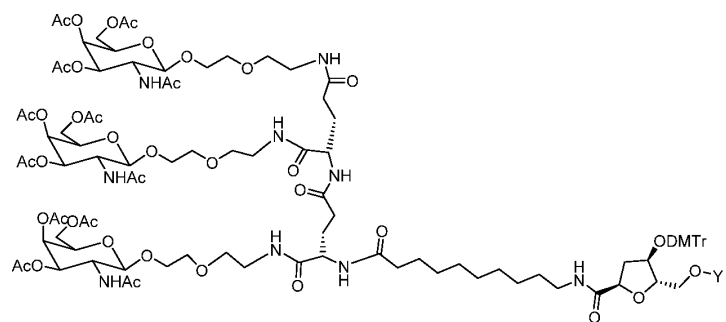
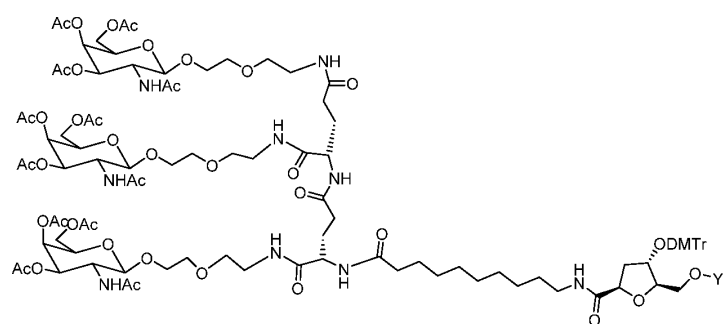
在一些实施方案中, 所述化合物可为以下任一结构,

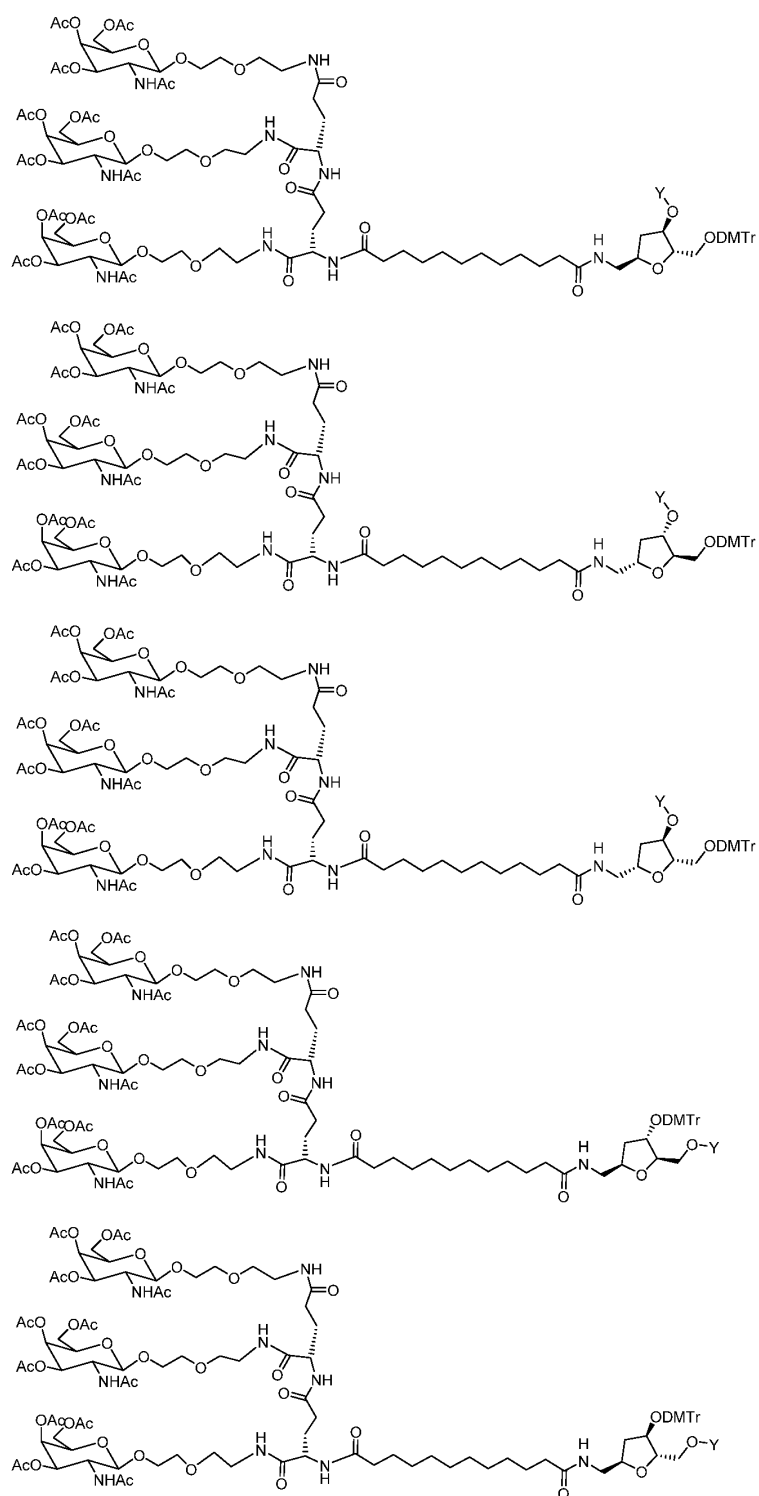


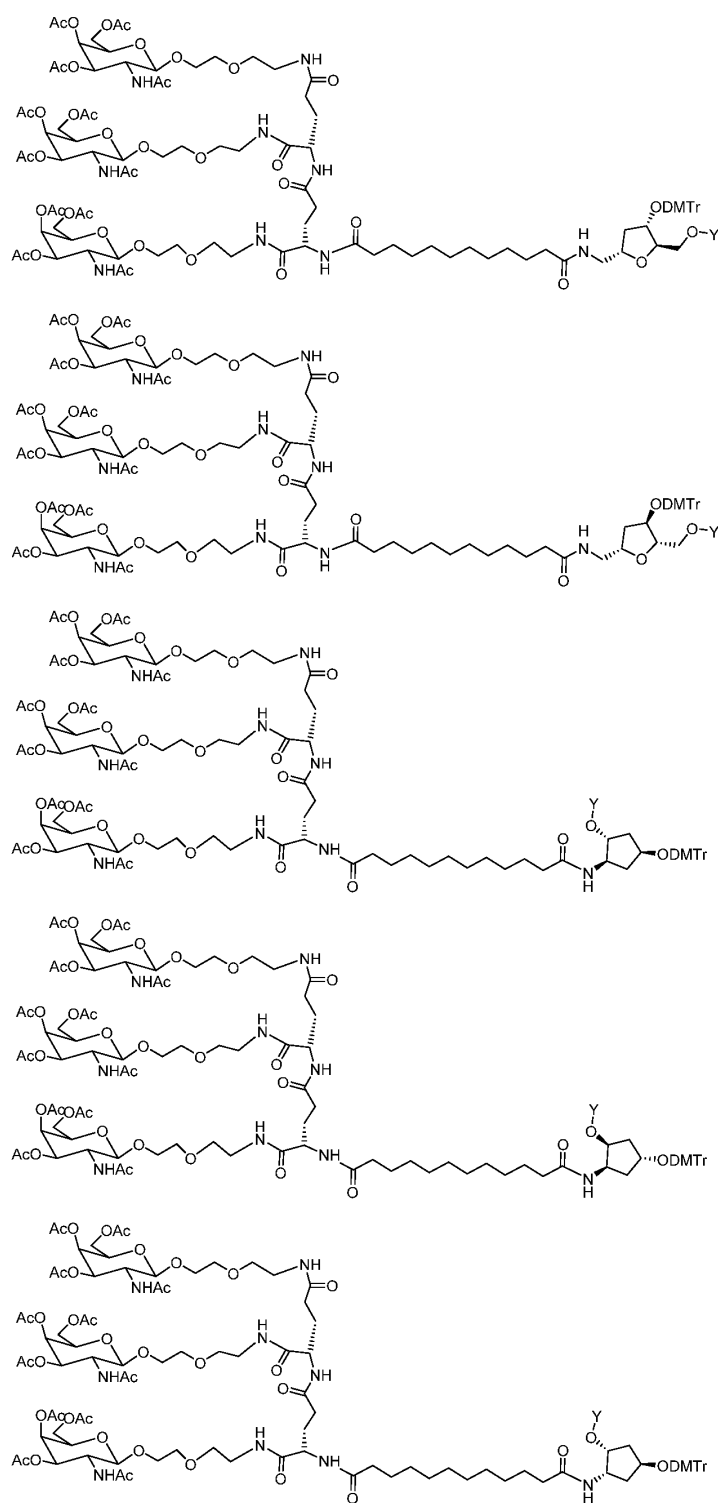


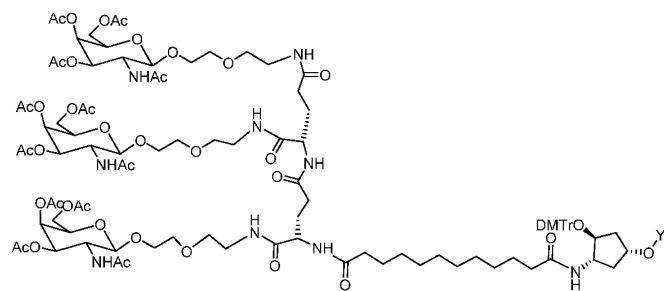
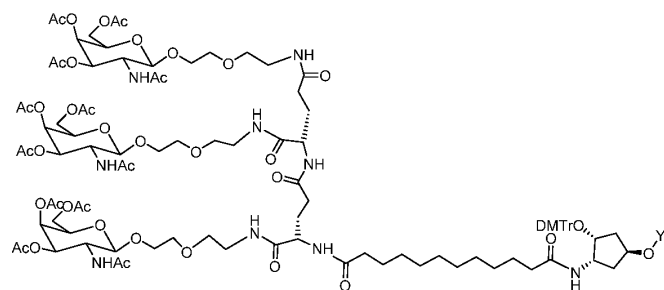
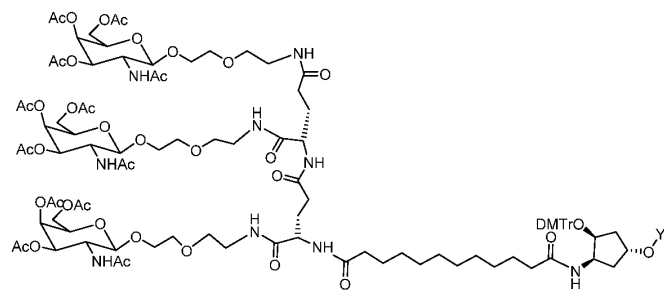
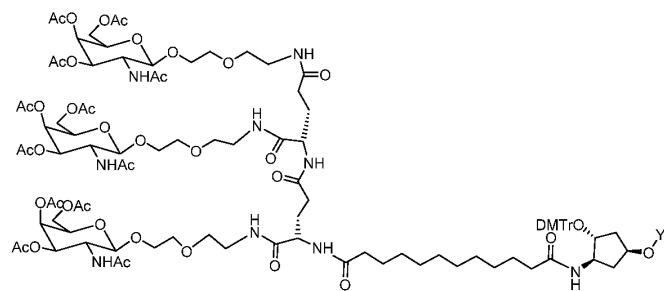
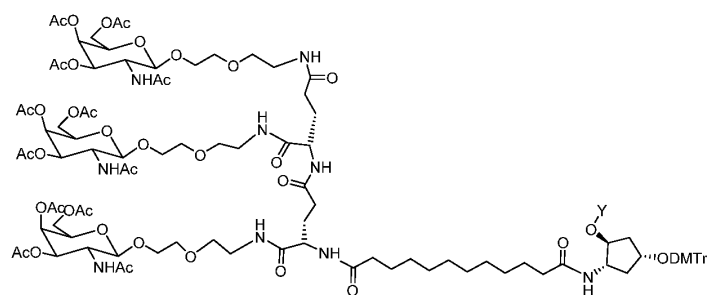


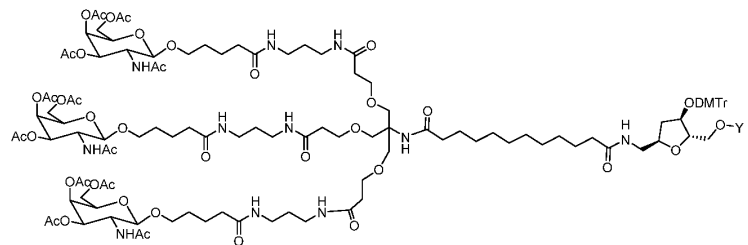
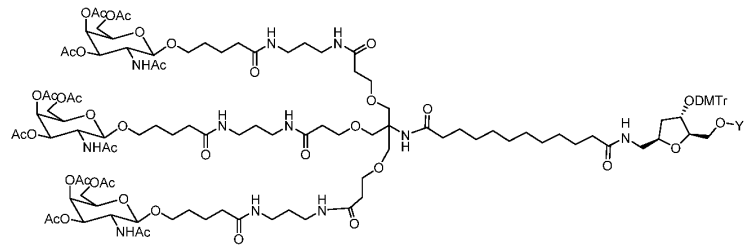
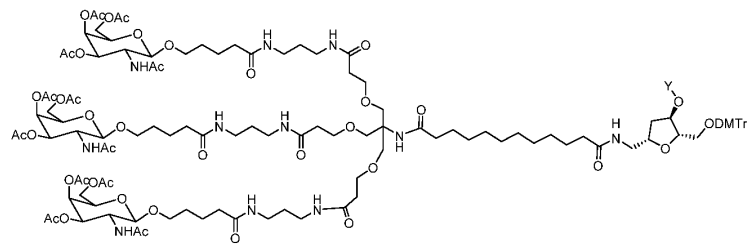
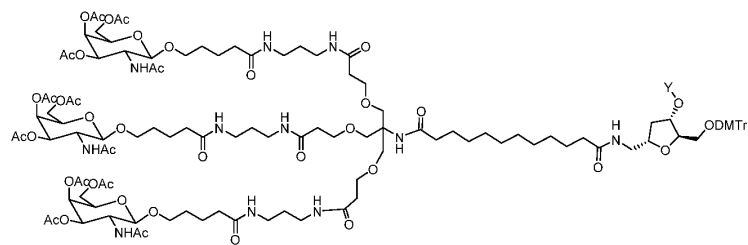
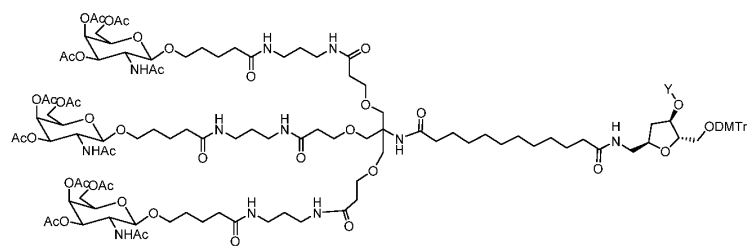
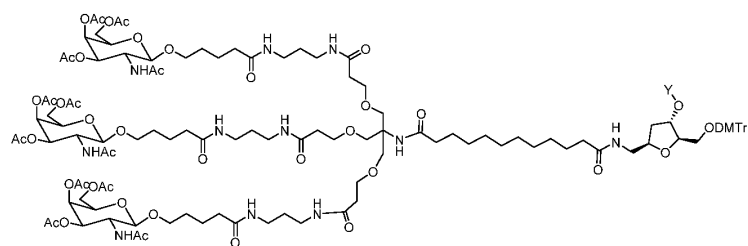


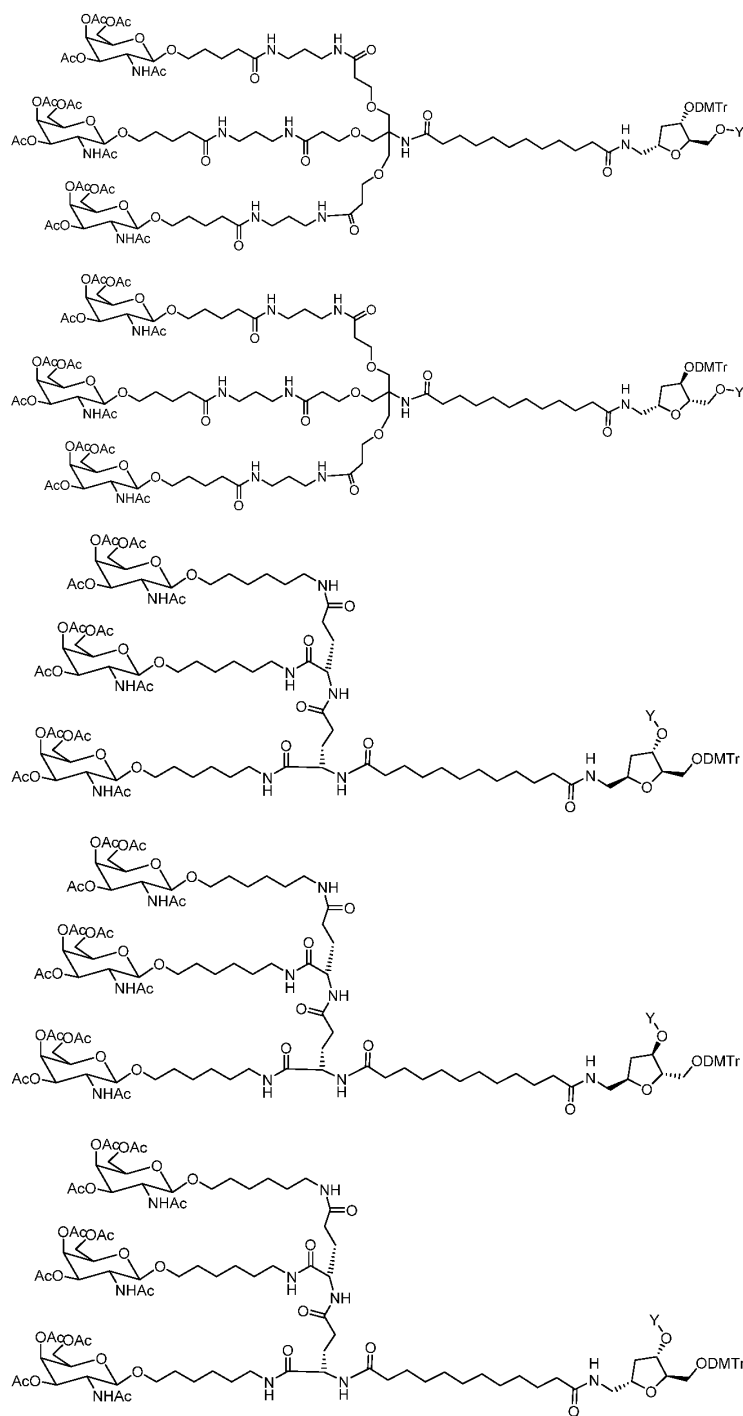


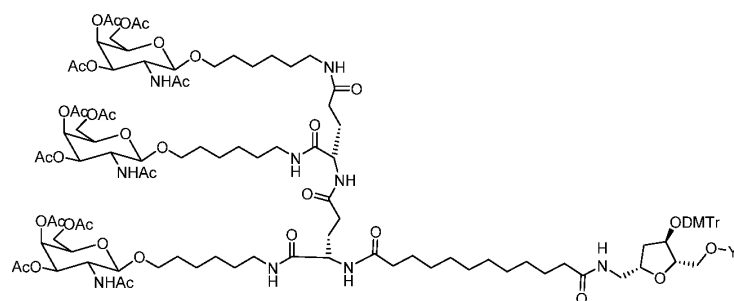
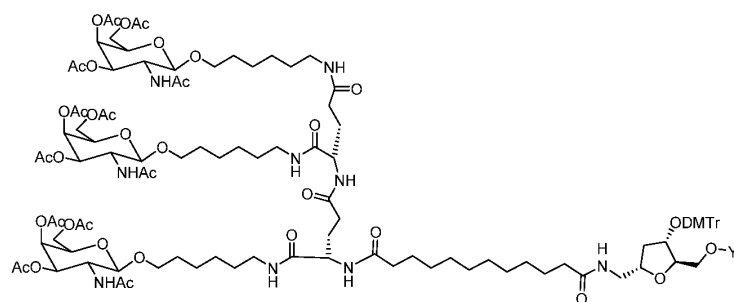
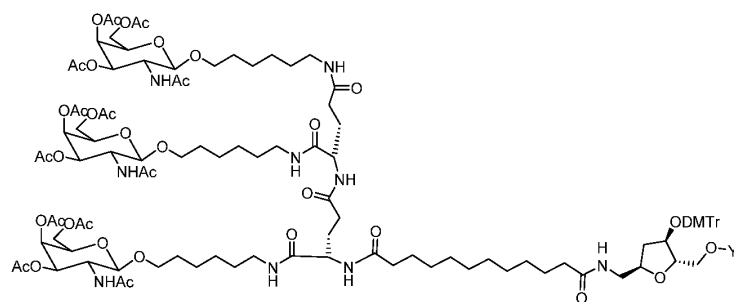
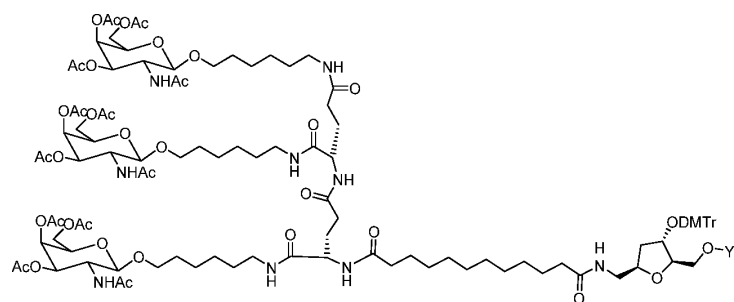
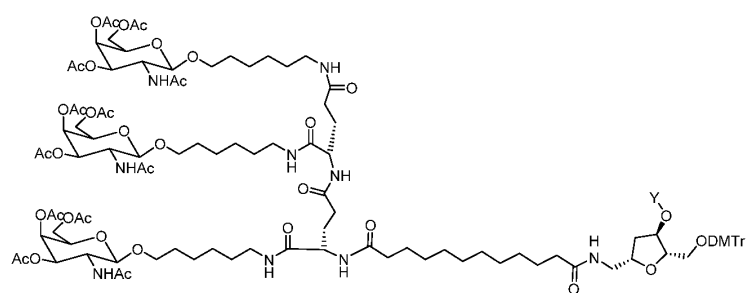


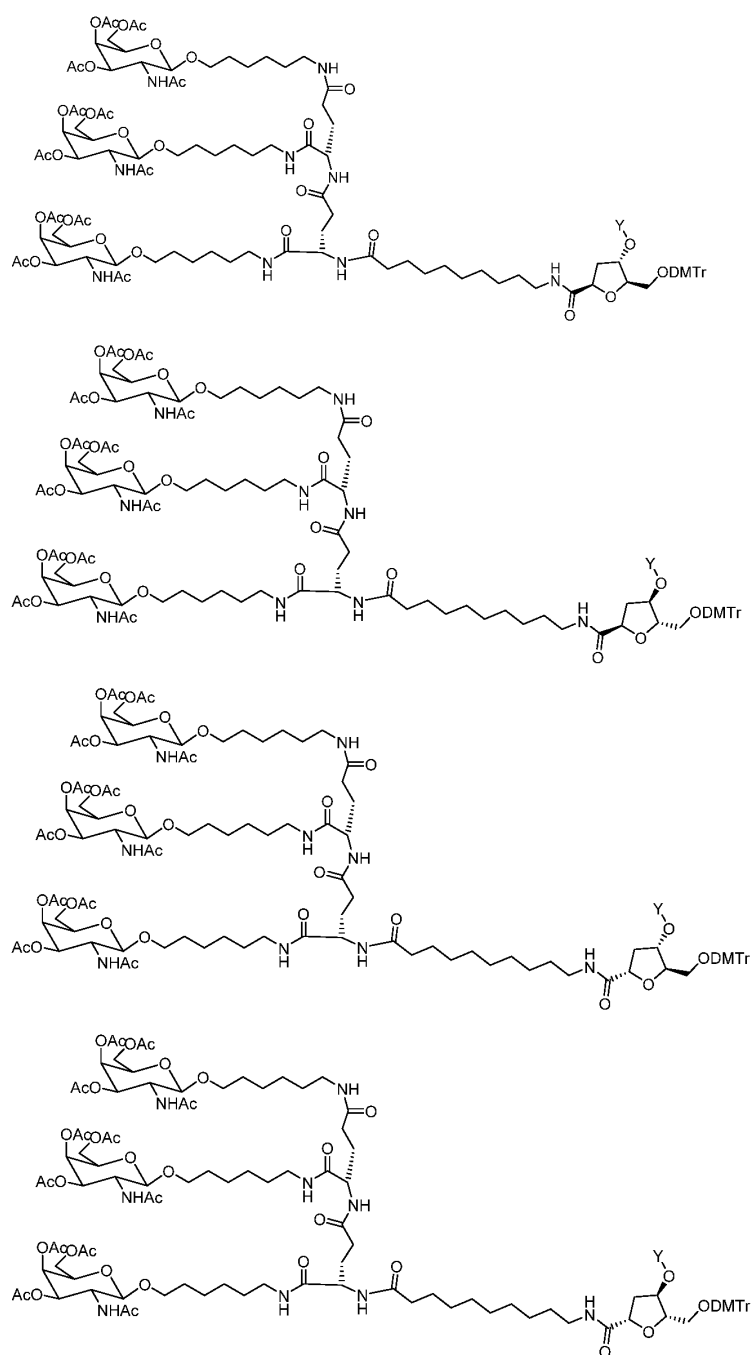


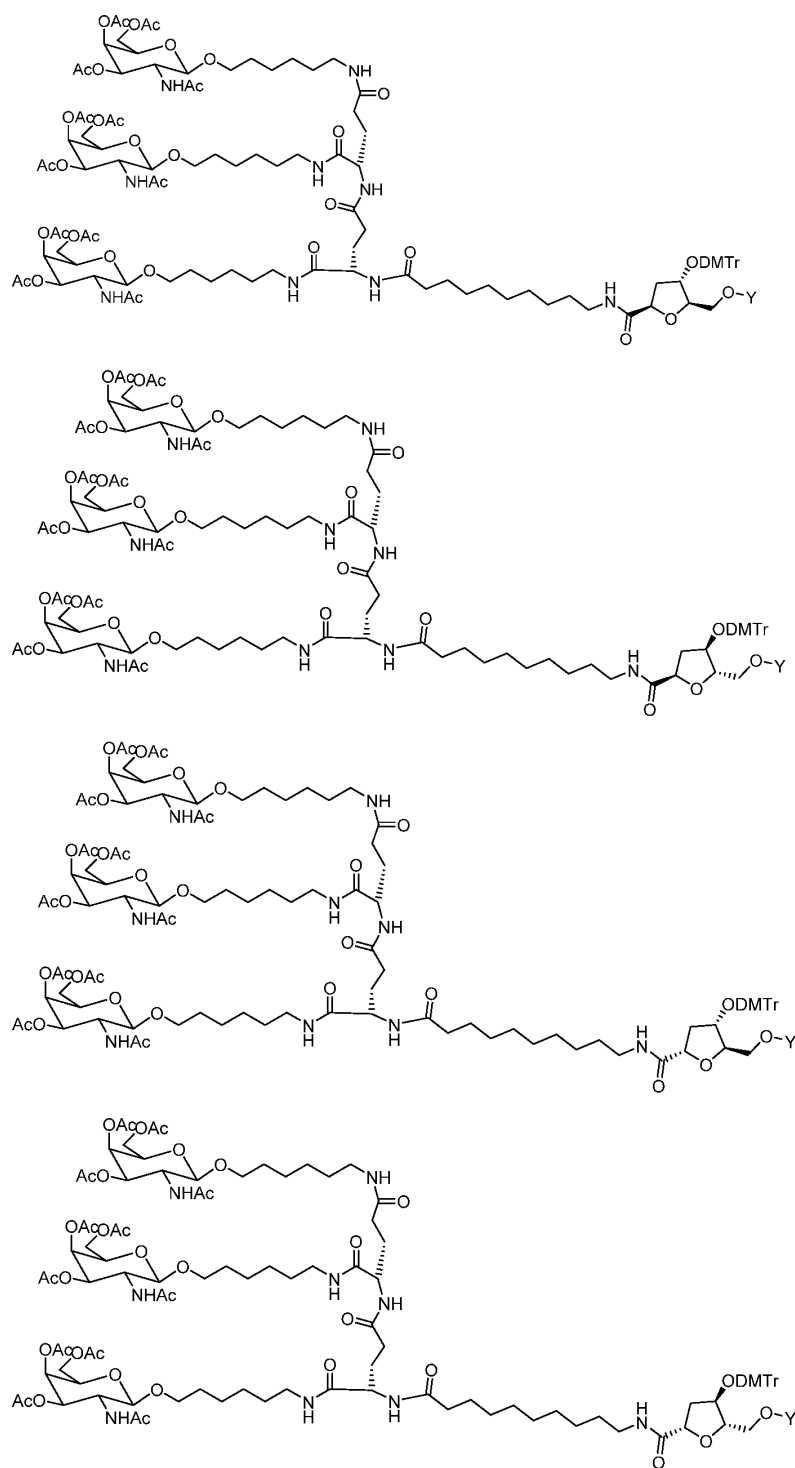


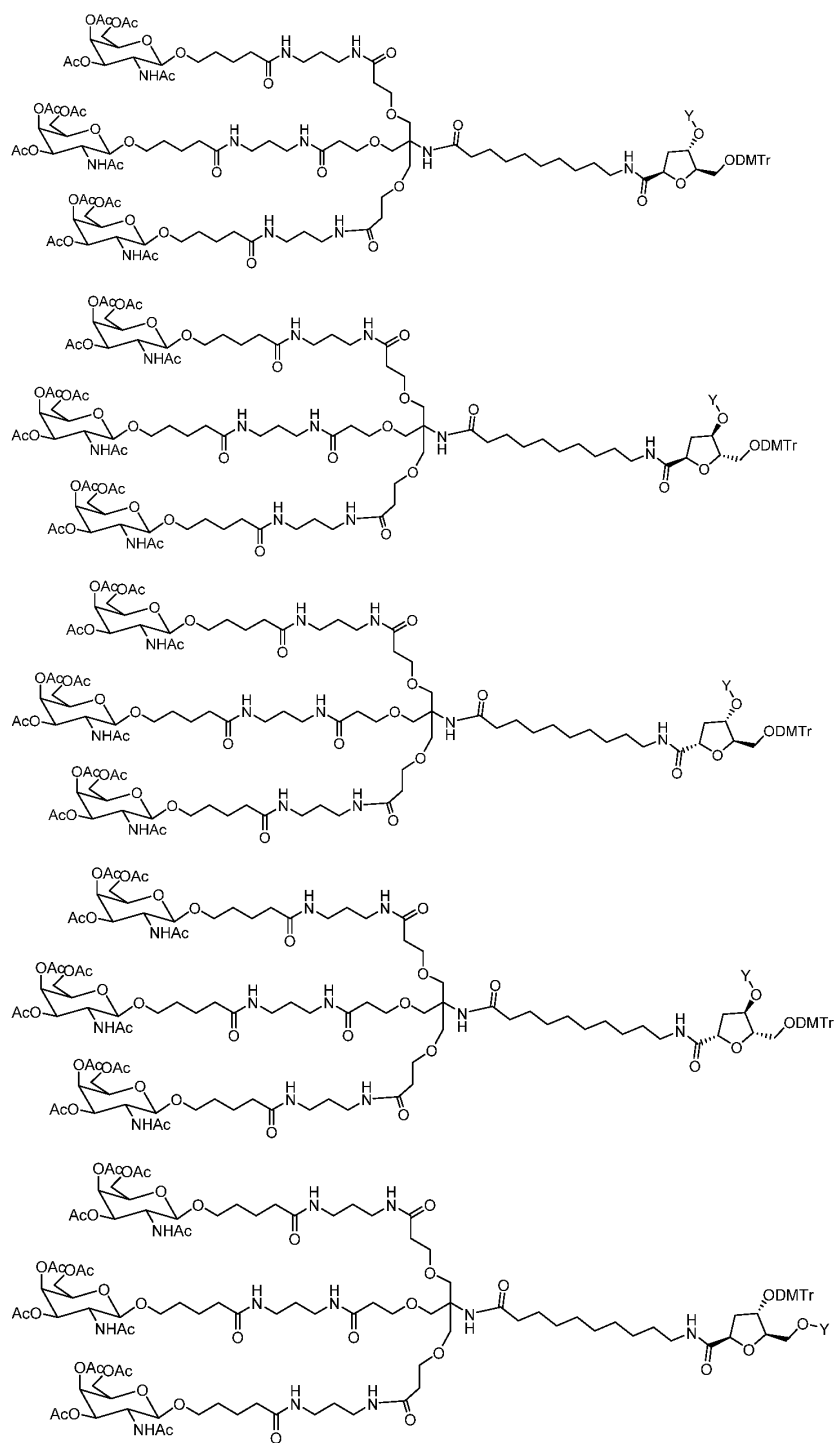


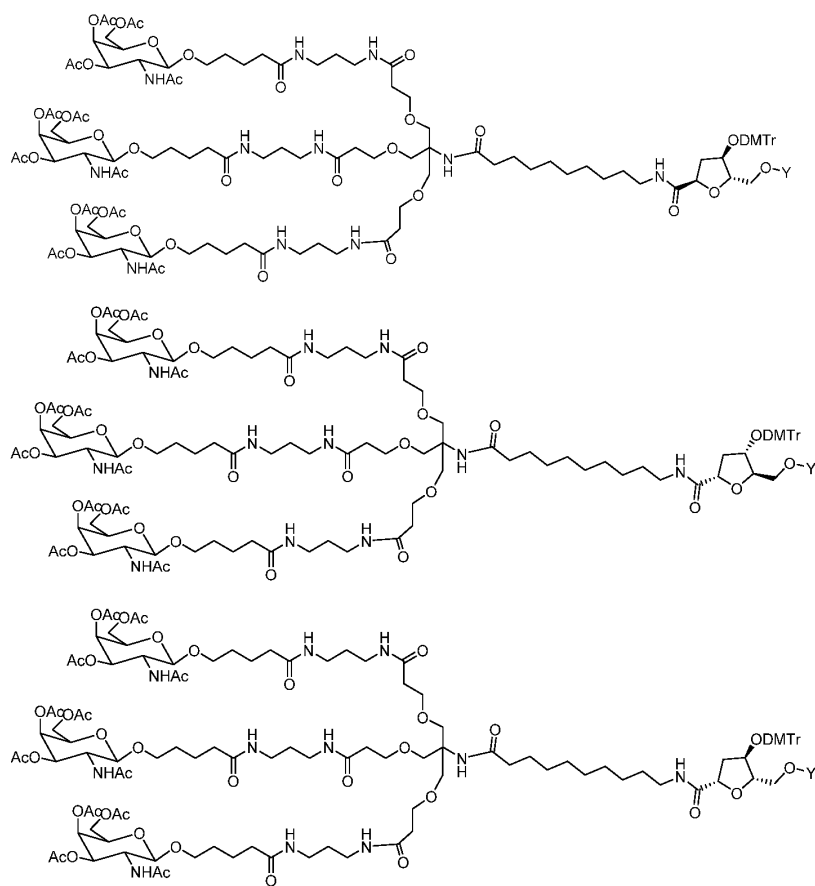






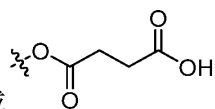




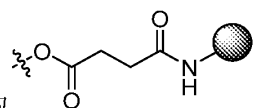


或

;



其中, Y 为氢或 $\text{O}=\text{C}$;



或者, Y 为 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{array}$,  为树脂, 优选大孔树脂, 更优选大孔

胺甲基树脂。

在一些实施方案中，可以 N-三氟乙酰基半乳糖胺三乙酸酯、N-丙酰基半乳糖胺三乙酸酯、N-正丁酰基半乳糖胺三乙酸酯或 N-异丁酰基半乳糖胺三乙酸酯替换上述化合物中的 N-乙酰基-半乳糖胺三乙酸酯部分。

本公开提供了一种核酸配体缀合物，其包含核酸和一个或多个上述的配体，所述配体与核酸末端缀合，所述配体相同或不同。

在一些实施方案中,所述核酸与配体可通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团连接。

在一些实施方案中，所述核酸可包括但不限于：寡核苷酸、单链寡核苷酸、单链反义寡核苷酸、短干扰 RNA(siRNA)、双链 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、

短发夹 RNA(shRNA)、核糖酶、干扰 RNA 分子和 Dicer 酶底物。

在一些实施方案中，所述核酸的 3'端可与配体缀合。

在一些实施方案中，所述核酸可为单链核酸。

在一些实施方案中，所述单链核酸可为 siRNA 的正义链。

在一些实施方案中，所述单链核酸可为 siRNA 的反义链。

在一些实施方案中，所述核酸可为双链核酸。所述双链核酸可包含至少一个双链体区域，双链体区域内第一链核酸与第二链核酸至少部分互补，其中：

(1) 第一链核酸两个末端不与配体缀合；且第二链核酸 5'端与配体缀合，3'端不与配体缀合，或第二链核酸 3'端与配体缀合，5'端不与配体缀合，或第二链核酸 3'端和 5'端均与配体缀合；

(2) 第二链核酸两个末端不与配体缀合；且第一链核酸 5'端与配体缀合，3'端不与配体缀合，或第一链核酸 3'端与配体缀合，5'端不与配体缀合，或第一链核酸 3'端和 5'端均与配体缀合；

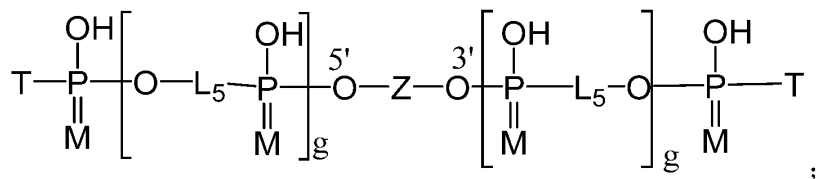
(3) 第一链核酸与第二链核酸 5'端均与配体缀合，3'端均不与配体缀合；或第一链核酸与第二链核酸 3'端均与配体缀合，5'端均不与配体缀合；或第一链核酸与第二链核酸 3'端和 5'端均与配体缀合；或第一链核酸 3'端与第二链核酸 5'端均与配体缀合，第一链核酸 5'端与第二链核酸 3'端均不与配体缀合；或第一链核酸 5'端与第二链核酸 3'端均与配体缀合，第一链核酸 3'端与第二链核酸 5'端均不与配体缀合；

(4) 第一链核酸 3'端和 5'端均与配体缀合，第二链核酸 5'端或 3'端之一与配体缀合；或第二链核酸 3'端和 5'端均与配体缀合，第一链核酸 5'端或 3'端之一与配体缀合。

在一些实施方案中，所述双链核酸可为 siRNA。

在一些实施方案中，所述核酸可包括一个或多个修饰的核苷酸。

在一些实施方案中，所述核酸配体缀合物可为以下结构或其药学上可接受的盐：



其中，T 为上述配体，T 各自相同或不同；

L₅ 独立地为 C₁-C₃₀ 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 C=O 间断的 C₁-C₃₀ 烷基链；

M 独立地为 O 或 S；

g 独立地为 0-4 的整数；

—O—Z—O— 代表核酸。

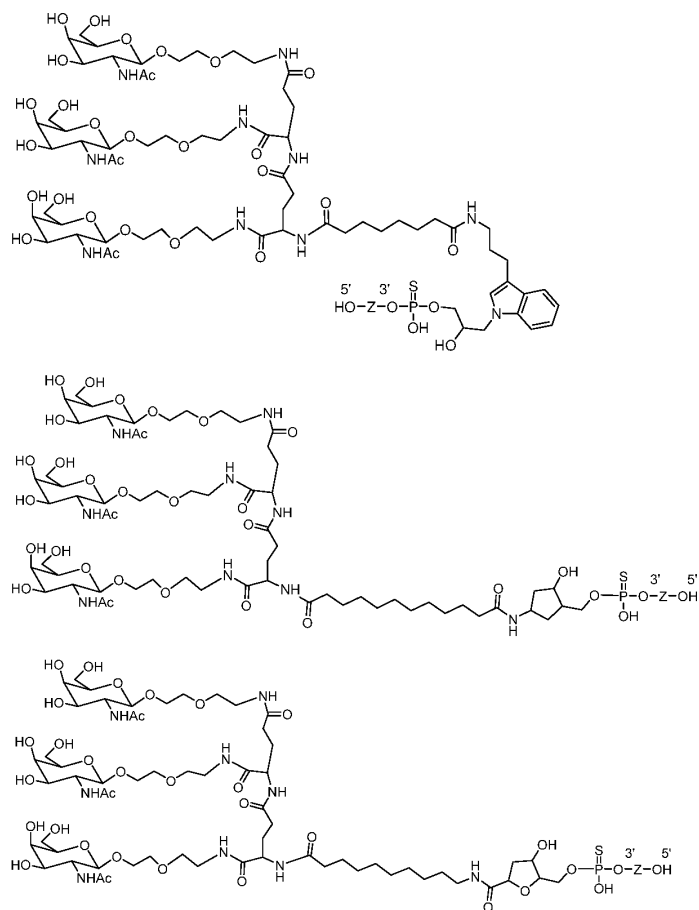
在一些实施方案中， L_5 可为 $\text{—O—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ 、
 $\text{—O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ 或
 $\text{—O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{O—CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ 。

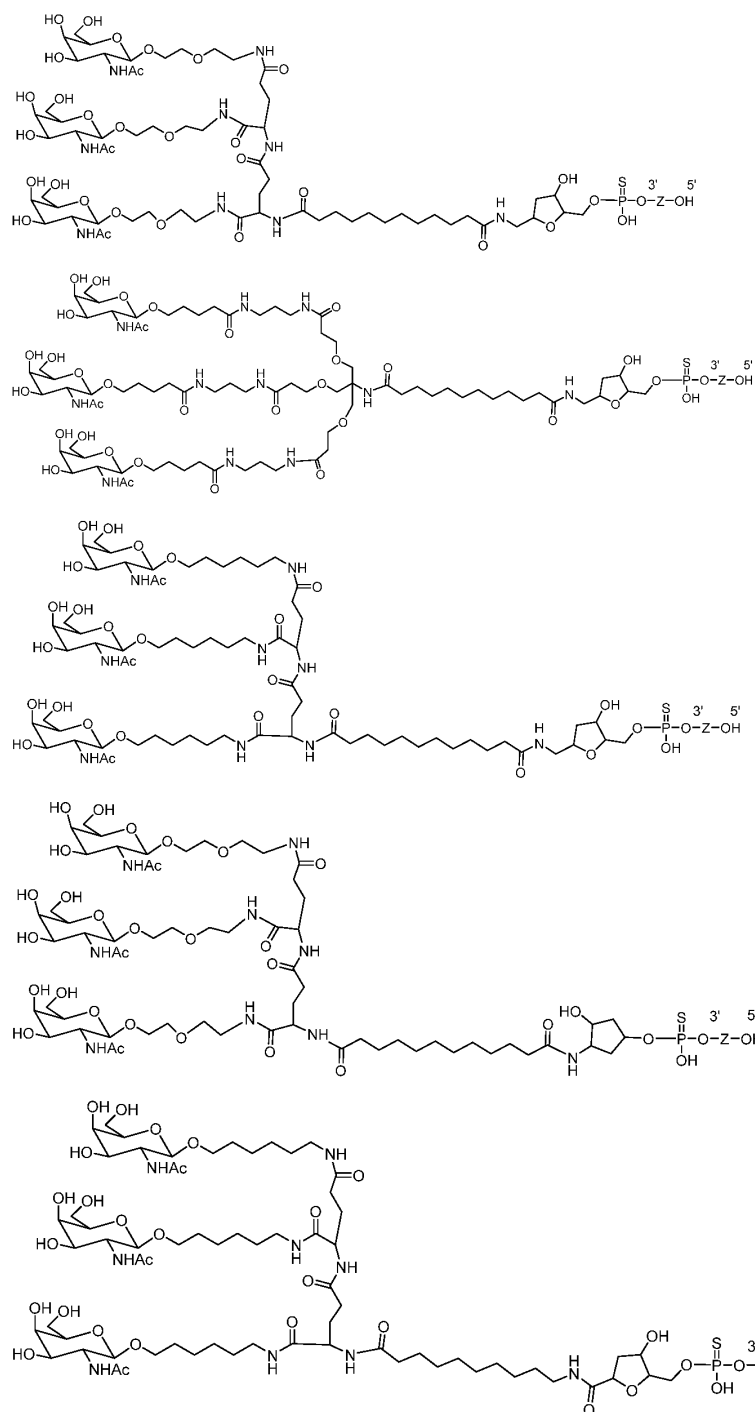
在一些实施方案中， g 可为 0 或 1。

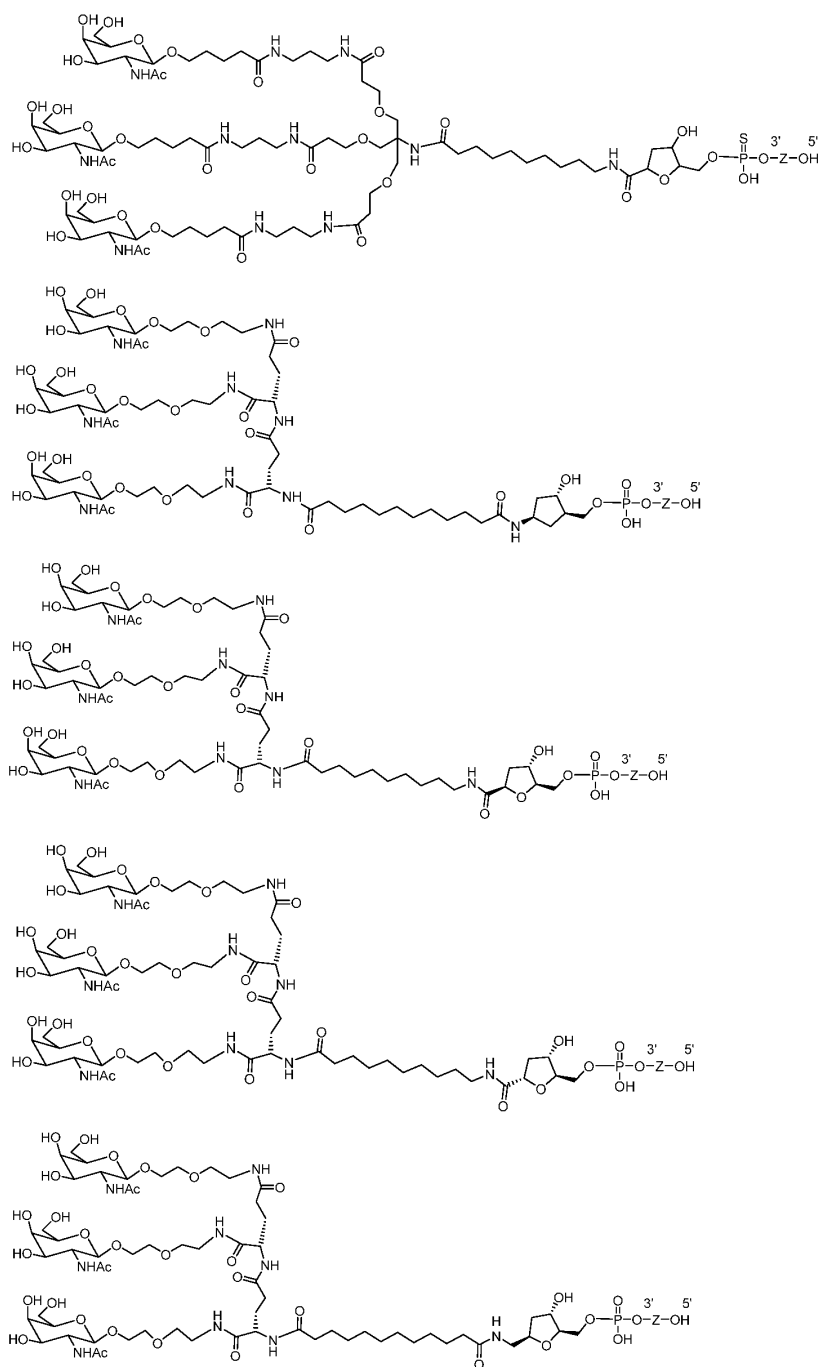
在一些实施方案中， g 可为 0。

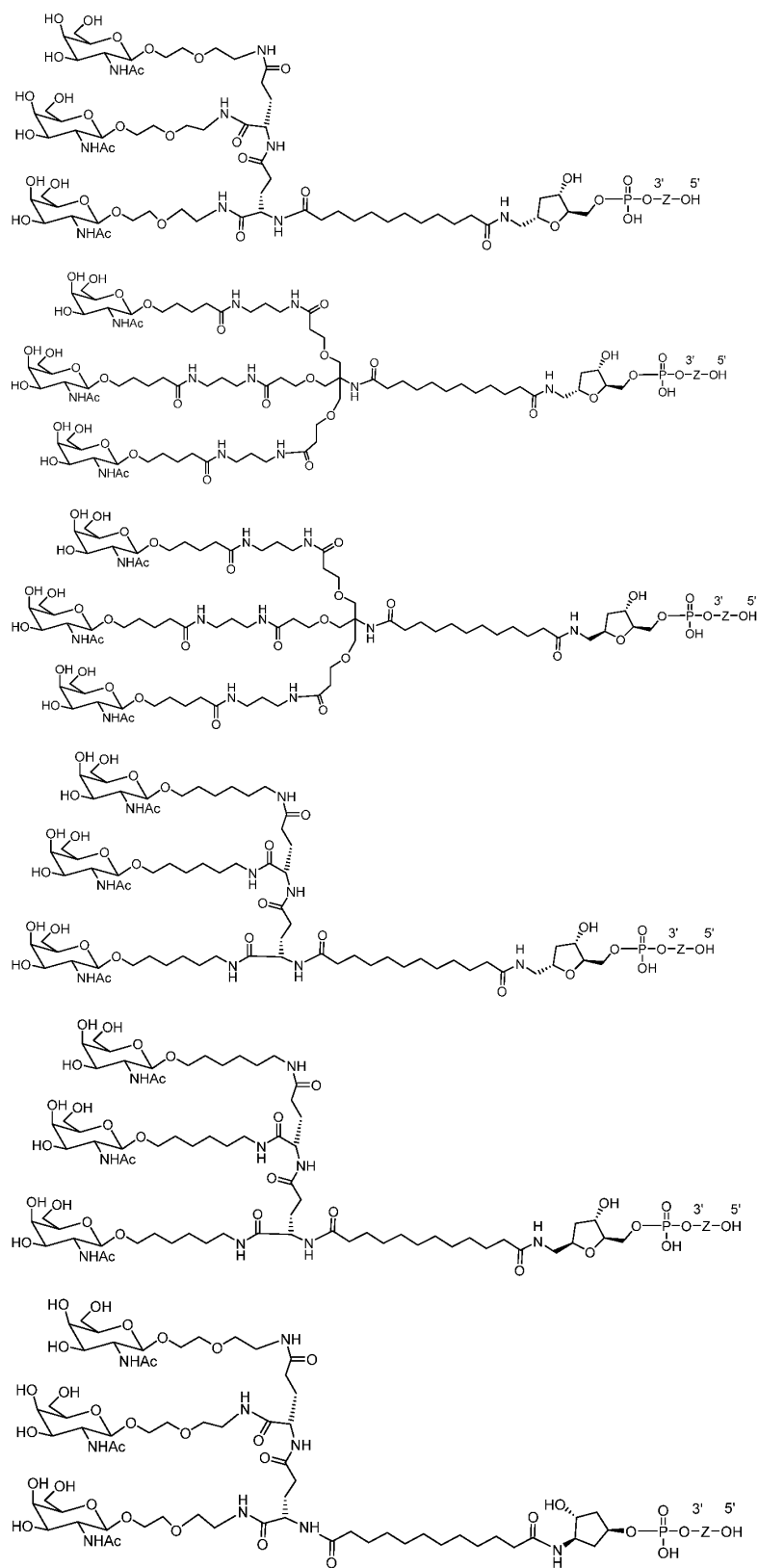
在一些实施方案中， M 可为 S。

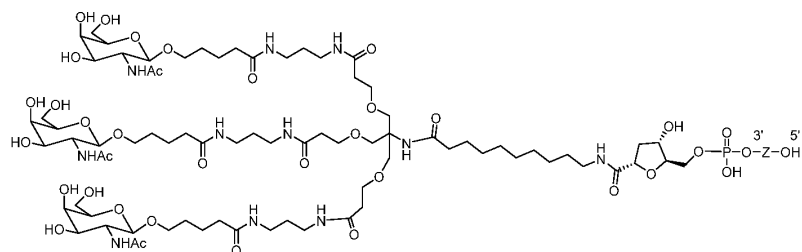
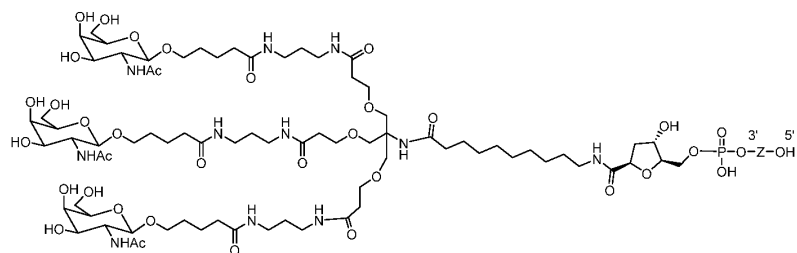
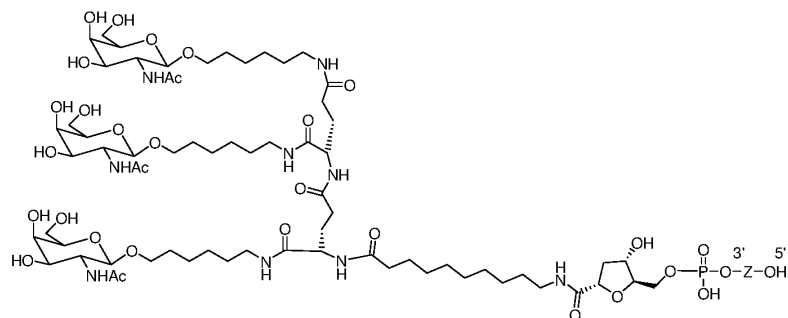
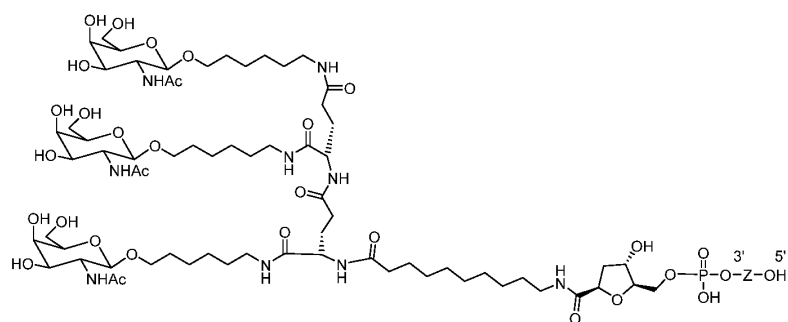
在一些实施方案中，所述核酸配体缀合物可为以下任一结构或其药学上可接受的盐，





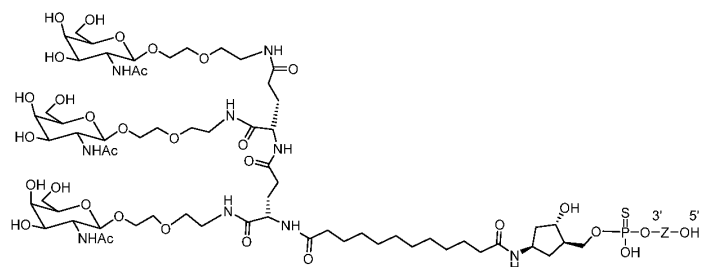


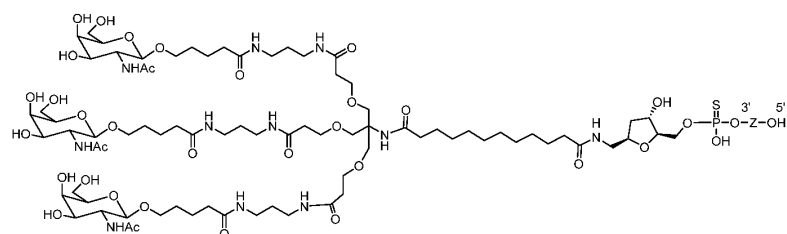
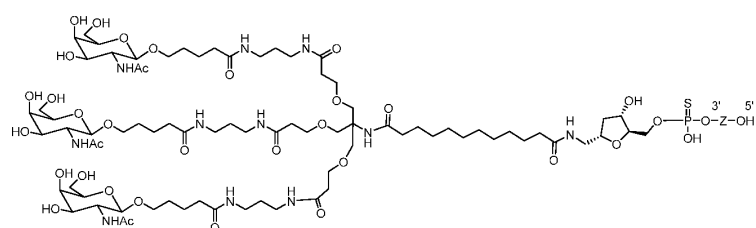
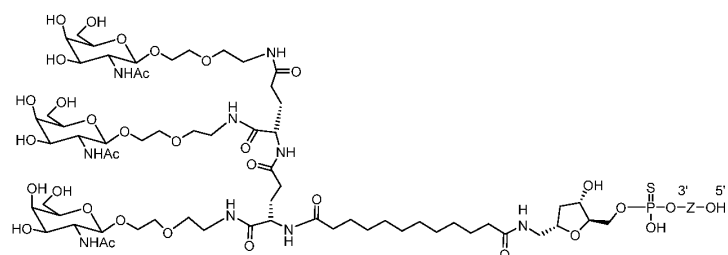
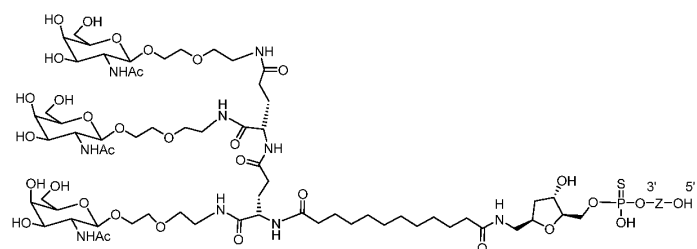
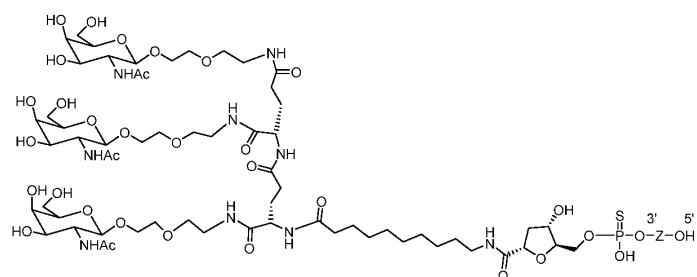
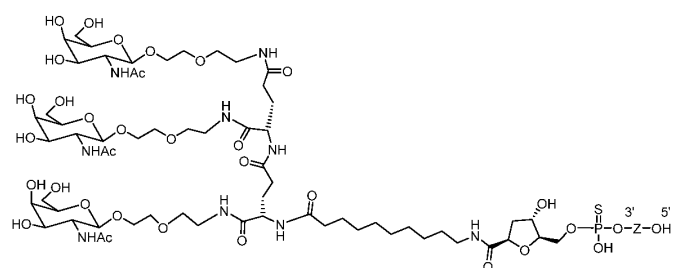


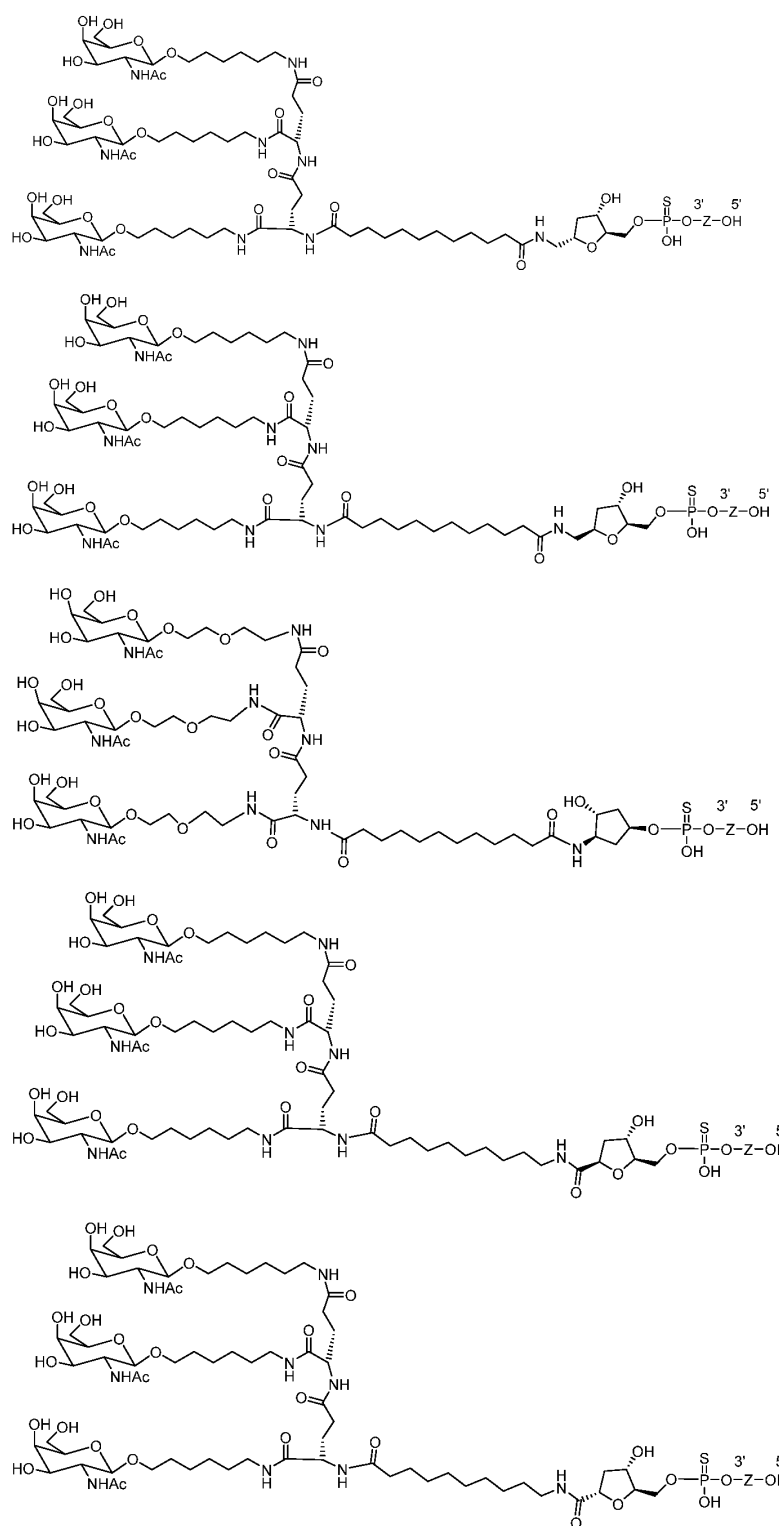


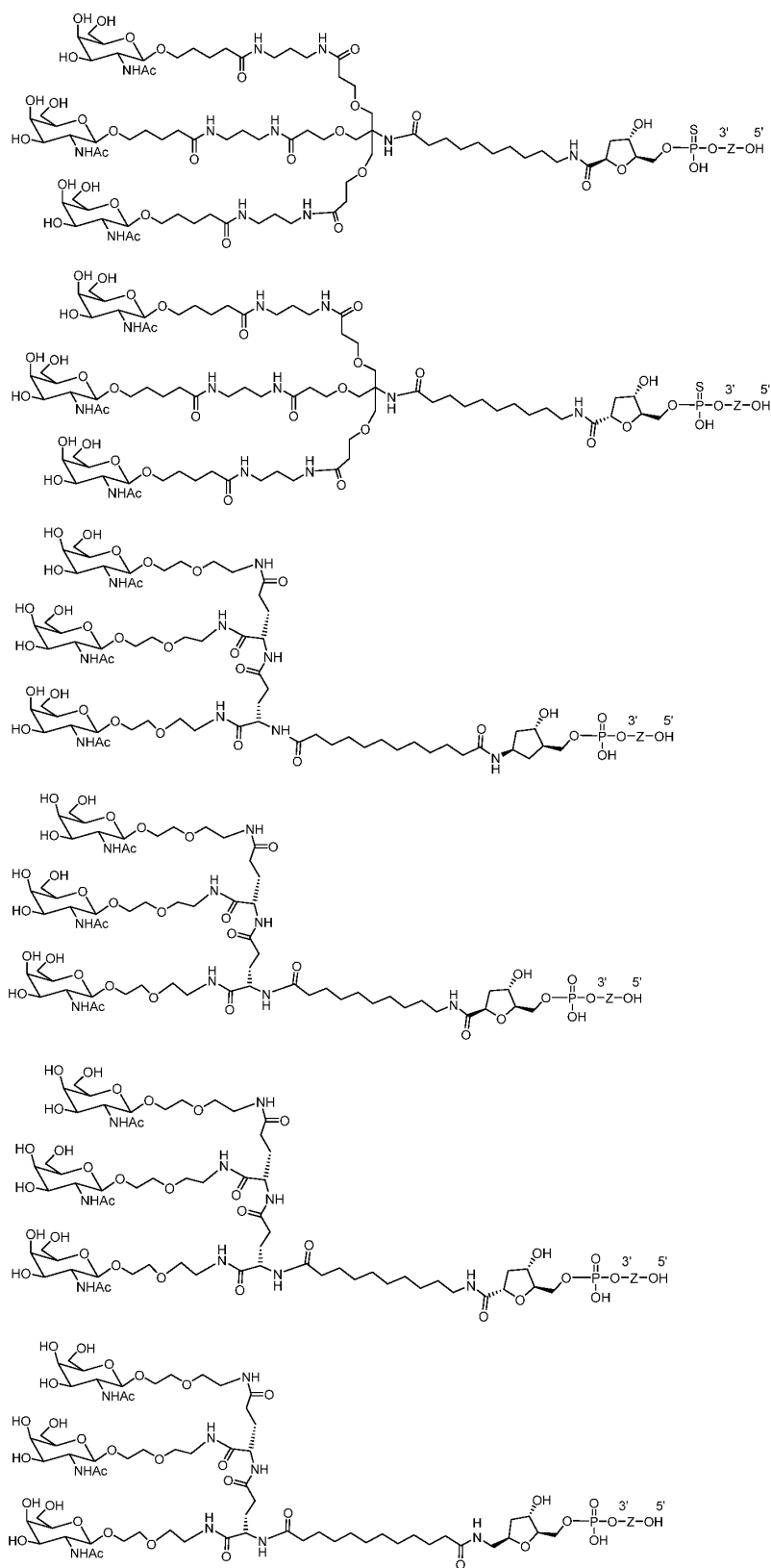
或

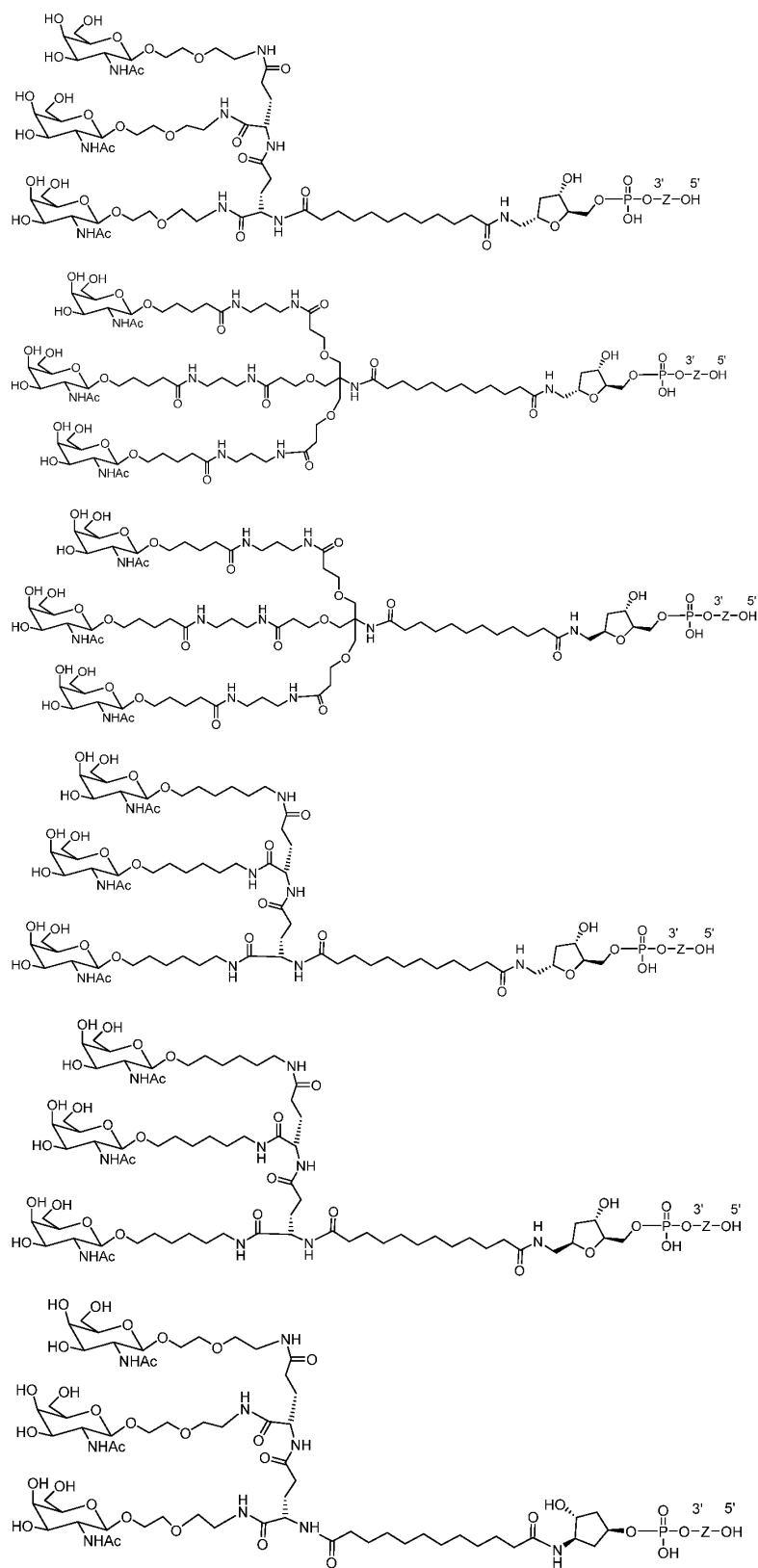
在一些实施方案中,所述核酸配体缀合物可为以下任一结构或其药学上可接受的盐,

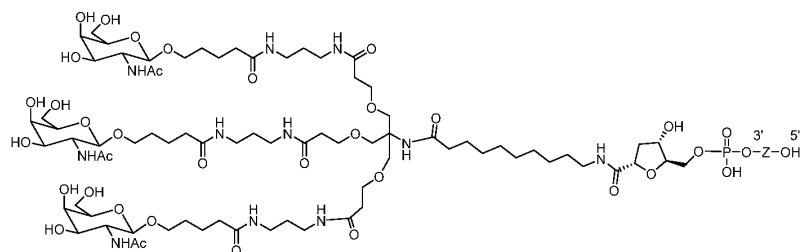
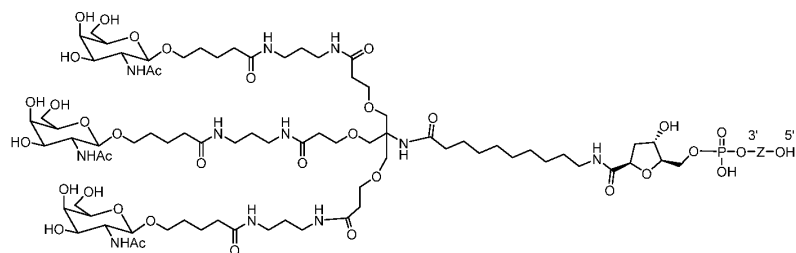
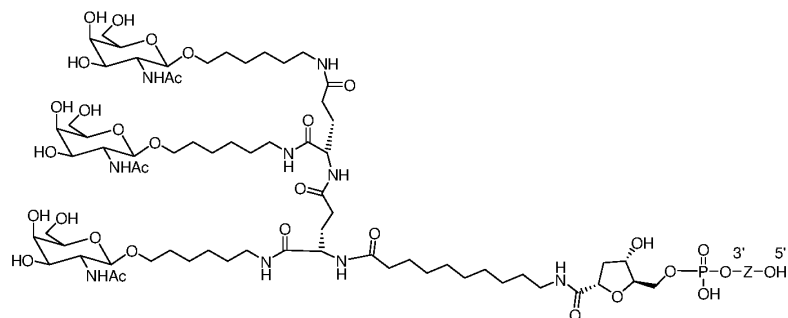
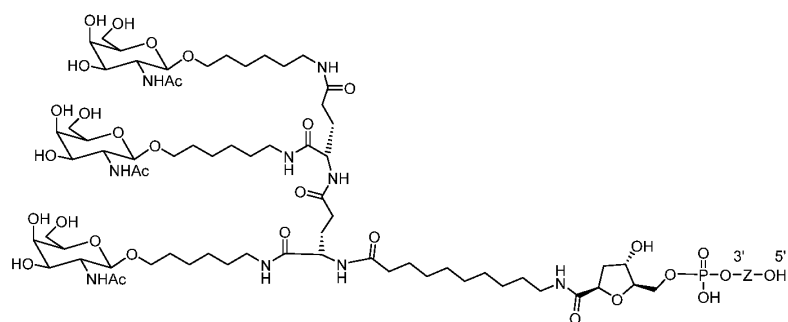












或

在一些实施方案中,所述药学上可接受的盐可为本领域常规的盐,包括但不限于:钠盐、钾盐、铵盐、胺盐等。

另一方面,本公开提供了一种 RNAi 试剂,其包含上述的核酸配体缀合物。

在一些实施方案中,所述 RNAi 试剂可包括但不限于:单链寡核苷酸、单链反义寡核苷酸、短干扰 RNA(siRNA)、双链 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、短发夹 RNA(shRNA)和 Dicer 底物。

在一些实施方案中,所述 RNAi 试剂可为 siRNA。

另一方面,本公开提供了一种组合物,其包含上述的核酸配体缀合物或上述的 RNAi 试剂,和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

在一些实施方案中，所述的药学上可接受的赋形剂可为例如载剂、运载体、稀释剂、和/或递送聚合物。

在一些实施方案中，所述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂可为治疗有效量。

在一些实施方案中，所述的组合物的单位剂量可为 0.001mg-1000mg。

在一些实施方案中，基于组合物的总重量，所述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂的含量可为 0.01-99.99%，又可为 0.1-99.9%，还可为 0.5%-99.5%，进一步可为 1%-99%，更进一步可为 2%-98%。

在一些实施方案中，基于组合物的总重量，所述药学上可接受的赋形剂的含量可为 0.01-99.99%，又可为 0.1-99.9%，还可为 0.5%-99.5%，进一步可为 1%-99%，更进一步可为 2%-98%。

在一些实施方案中，本公开所述的核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物，当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA(bDNA)的方法、或基于蛋白质的方法，如免疫荧光分析法，例如 Western Blot 或流式细胞术测定的，上述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂会抑制靶基因的表达至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%。

在一些实施方案中，上述缀合物或 RNAi 试剂或组合物当接触到表达靶基因的细胞时，由例如：psiCHECK 活性筛选和荧光素酶报告基因检测法，其他如 PCR 或基于分支 DNA(bDNA)的方法、或基于蛋白质的方法，如免疫荧光分析法，例如 Western Blot 或流式细胞术测定的，上述 siRNA 引起的靶基因 mRNA 剩余表达百分比为不高于 99%、不高于 95%、不高于 90%、不高于 85%、不高于 80%、不高于 75%、不高于 70%、不高于 65%、不高于 60%、不高于 55%、不高于 50%、不高于 45%、不高于 40%、不高于 35%、不高于 30%、不高于 25%、不高于 20%、不高于 15%、或不高于 10%。

另一方面，本公开提供了一种上述核酸配体缀合物或上述 RNAi 试剂或上述组合物在制备治疗患者疾病的药物中的用途。所述疾病优选肝源性疾病。

本公开提供了一种用于治疗患者疾病的核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物，所述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物同前所述。所述疾病优选肝源性疾病。

本公开提供了一种用于抑制患者体内 mRNA 表达的核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物，所述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物同前所述。

本公开提供了一种用于将表达抑制性寡聚化合物体内递送至肝脏的配体、核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物，所述配体、核酸配体缀合物或 RNAi 试剂

或组合物同前所述。

另一方面，本公开提供了一种治疗患者疾病的方法，其包括向患者给予上述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物。所述疾病优选肝源性疾病。所述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物可为治疗有效量。

另一方面，本公开提供了一种抑制患者体内 mRNA 表达的方法，其包括向患者给予上述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物。所述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物可为治疗有效量。

另一方面，本公开提供了一种将表达抑制性寡聚化合物体内递送至肝脏的方法，其包括向患者给予上述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物。所述核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物可为治疗有效量。

本文所公开的核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物和方法可以在细胞、细胞群、组织或受试者中降低靶 mRNA 的水平，包括：向所述受试者给予治疗有效量的本文所述的表达抑制性寡聚化合物，所述表达抑制性寡聚化合物与配体连接，从而抑制靶 mRNA 在受试者中的表达，所述配体同前所述。

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

本公开所述的患者是指患有将会受益于靶 mRNA 表达之减少或抑制的疾病或病症的受试者。

递送可以通过局部给药（例如，直接注射或植入）或全身给药，也可通过口服、直肠或胃肠外途径进行给药，所述肠胃外途径包括但不限于皮下注射、静脉注射、肌肉注射、腹腔注射、透皮给药、吸入给药（如气溶胶）、粘膜给药（如舌下、鼻内给药）、颅内给药等。

在一些实施方案中，本公开提供的核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物可以通过注射给予，例如，静脉内、肌内、皮内、皮下、十二指肠内或腹膜内注射。

在一些实施方案中，本公开提供的核酸配体缀合物或 RNAi 试剂或组合物可被包装在试剂盒中。

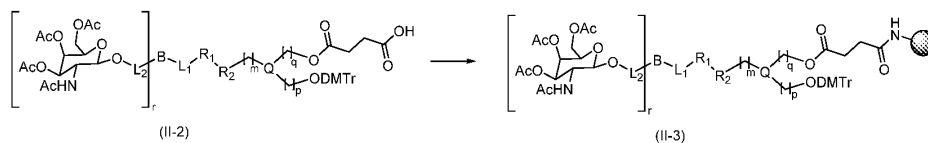
在一些实施方案中，本公开还提供了一种细胞，其包含上述的核酸配体缀合物或 RNAi 试剂。

本公开提供了一种核酸配体缀合物的制备方法，其包括以下步骤：以上述如式 (II-3) 或式 (II'-3) 作为起始，按照核苷酸排布顺序自 3'-5' 方向逐一连接核苷单体。

在一些实施方案中，每连接一个单体都包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应，待最后一个单体连接完成后，依次对固相载体上连接的核酸序列进行切割、脱保护、纯化、脱盐，随后冻干获得核酸配体缀合物。

本公开提供了一种上述如式 (II-3) 所示化合物的制备方法，其包括以下步骤：将上述如式 (II-2) 所示化合物与高分子化合物进行缀合，得所述如式 (II-3)

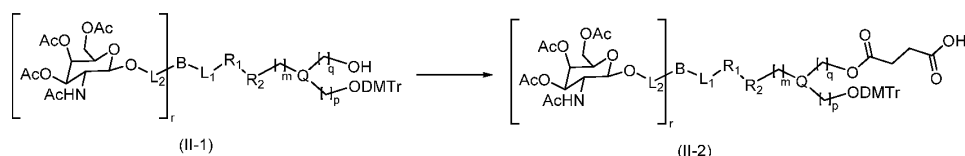
所示化合物,



其中, L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 、 r 和 [Sphere] 的定义同前所述。

在一些实施方案中,所述缀合的条件和操作可为本领域常规的条件和操作。

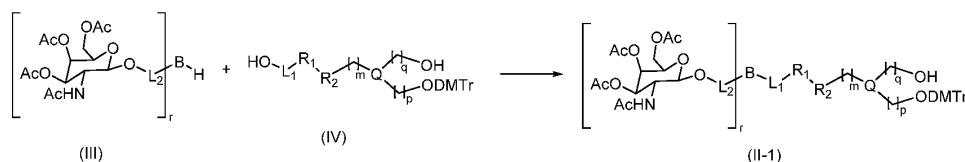
在一些实施方案中,所述如式 (II-2) 所示化合物可通过以下步骤制得: 溶剂中,在碱的作用下,将上述如式 (II-1) 所示化合物与丁二酸酐进行如下所示反应,得所述如式 (II-2) 所示化合物;



L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定义同前所述。

在一些实施方案中,所述反应的条件和操作可为本领域该类反应常规的条件和操作。

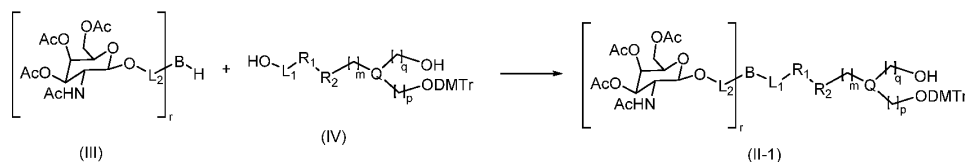
在一些实施方案中,所述如式 (II-1) 所示化合物可通过以下步骤制得: 将如式 (III) 所示化合物与如式 (IV) 所示化合物进行如下所示的反应,得所述如式 (II-1) 所示化合物;



L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定义同前所述。

在一些实施方案中,所述反应的条件和操作可为本领域该类反应常规的条件和操作。

本公开提供了一种上述如式 (II-1) 所示化合物的制备方法,其包括以下步骤: 将如式 (III) 所示化合物与如式 (IV) 所示化合物进行如下所示的反应,得所述如式 (II-1) 所示化合物;



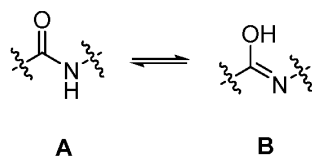
L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定义同前所述。

在一些实施方案中,所述反应的条件和操作可为本领域该类反应常规的条件和操作。

术语定义

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

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



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

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

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

本公开还包括一些与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本公开化合物。可结合到本公开化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、

硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

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

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

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

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

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

如无特殊说明，本公开的“化合物”、“配体”、“核酸配体缀合物”、“核酸”均可独立地以盐、混合盐或非盐（例如游离酸或游离碱）的形式存在。当以盐或混合盐的形式存在时，其可为药学上可接受的盐。

术语“药学上可接受的盐”包括药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的碱加成盐。

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

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

术语“烷基”指饱和脂肪族烃基团，其为包含1至30个碳原子的直链或支链基团，优选含有1至12个碳原子的烷基，更优选1至10个碳原子的烷基，更优选1至6个碳原子的烷基，进一步优选1至4个碳原子的烷基。非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各种支链异构体等。更优选的是含有1至6个碳原子的烷基，非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、

异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，所述取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、氧代基、羧基或羧酸酯基。

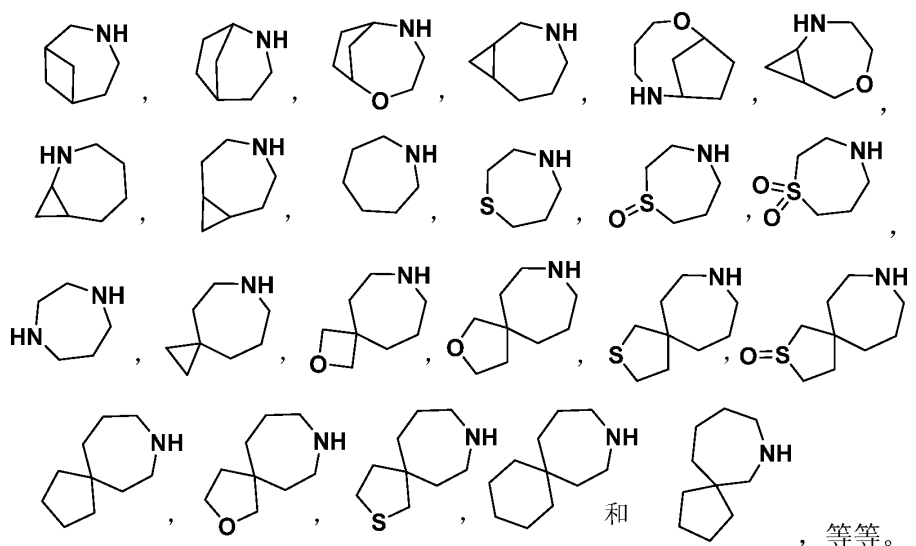
术语“亚烷基”表示烷烃分子中去除 2 个氢原子后余下的部分，包括 1 至 20 个碳原子的直链和支链亚基团。含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基，非限制性实施例包括亚甲基（ $-\text{CH}_2-$ ）、亚乙基（如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ ）、亚丙基（如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ ）、亚丁基（如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）。如无特殊说明，亚烷基可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，优选一个或多个以下基团，独立地选自氘、芳基、杂芳基、卤素所取代。

术语“环烷基”或“碳环”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，环烷基环包含 3 至 20 个碳原子，优选包含 3 至 7 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基等；多环环烷基包括螺环、稠环和桥环的环烷基。环烷基可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，优选一个或多个以下基团，独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基，所述 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

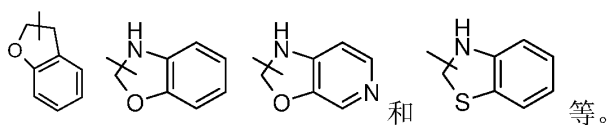
所述环烷基环可以稠合于芳基或杂芳基环上，其中与母体结构连接在一起的环为环烷基，非限制性实例包括茚满基、四氢萘基、苯并环庚烷基等。环烷基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基，所述 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

术语“杂环烷基”或“杂环”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基，其包含 3 至 20 个环原子，其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $\text{S}(\text{O})_m$ (其中 m

是整数 0 至 2) 的杂原子, 但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分, 其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子, 其中 1~4 个是杂原子; 更优选包含 3 至 7 个环原子。单环杂环烷基的非限制性实例包括吡咯烷基、咪唑烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、二氢咪唑基、二氢呋喃基、二氢吡唑基、二氢吡咯基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等。多环杂环烷基包括螺环、稠环和桥环的杂环烷基。“杂环烷基”非限制性实例包括:

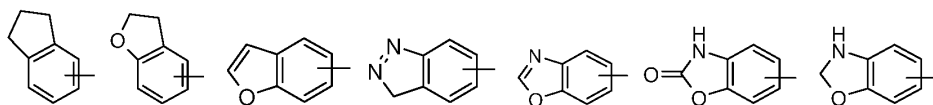


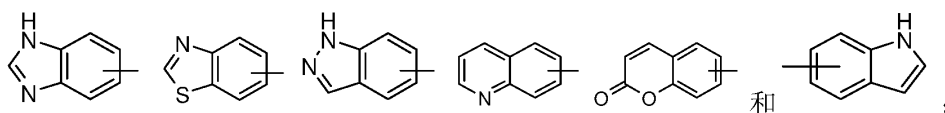
所述杂环烷基环可以稠合于芳基或杂芳基环上, 其中与母体结构连接在一起的环为杂环烷基, 其非限制性实例包括:



杂环烷基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯氧基、C₂₋₆ 炔氧基、C₃₋₆ 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C₃₋₈ 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基，所述 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯氧基、C₂₋₆ 炔氧基、C₃₋₆ 环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C₃₋₈ 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

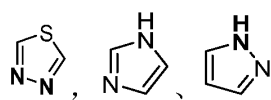
术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的6至14元全碳单环或耦合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团,优选为6至12元,例如苯基和萘基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环烷基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为芳基环,其非限制性实例包括:



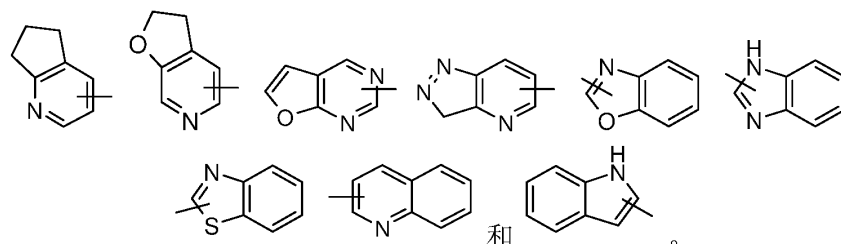


芳基可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

术语“杂芳基”指包含1至4个杂原子、5至14个环原子的杂芳族体系,其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为5至12元,更优选为5元或6元。例如。其非限制性实例包括:咪唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡唑基、噁唑基(oxazolyl)、异噁唑基(isoxazolyl)、吡咯基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、噻二唑、

吡嗪基、三唑基、吡唑基、苯并咪唑基、等。

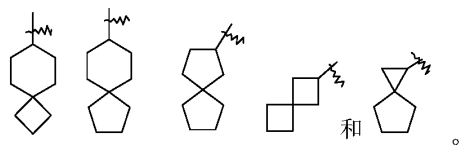
所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环烷基或环烷基环上,其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环,其非限制性实例包括:



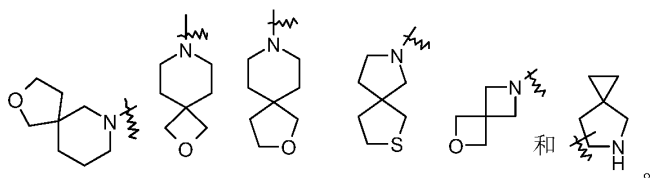
杂芳基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基,所述 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、 C_{3-8} 环烯氧基、5至6元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。

术语“螺环”指两环共用一个原子的化合物。

术语“螺环烷基”指5至20元的单环之间共用一个碳原子(称螺原子)的多环基团,其可以含有一个或多个双键,但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为6至14元,更优选为7至10元。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺环烷基分为单螺环烷基、双螺环烷基或多螺环烷基,优选为单螺环烷基和双螺环烷基。更优选为4元/4元、4元/5元、4元/6元、5元/5元或5元/6元单螺环烷基。“螺碳环”指的是螺环烷基中的环系。螺环烷基的非限制性实例包括:

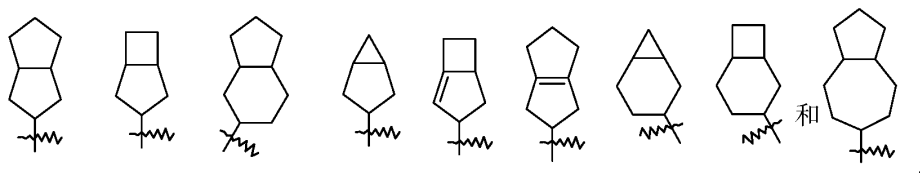


术语“螺杂环基”指 5 至 20 元的单环之间共用一个原子(称螺原子)的多环杂环基团, 其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子, 其余环原子为碳。其可以含有一个或多个双键, 但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元, 更优选为 7 至 10 元。根据环与环之间共用螺原子的数目将螺杂环基分为单螺杂环基、双螺杂环基或多螺杂环基, 优选为单螺杂环基和双螺杂环基。更优选为 4 元/4 元、4 元/5 元、4 元/6 元、5 元/5 元或 5 元/6 元单螺杂环基。“螺杂环”指的是螺杂环基中的环系。螺杂环基的非限制性实例包括:

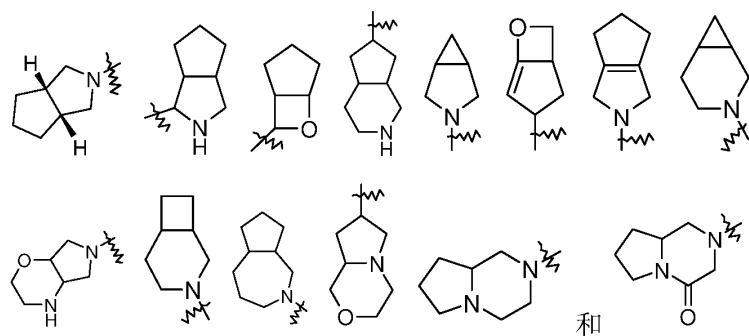


术语“稠环”指两个或两个以上环通过共用两个相邻的原子稠合而成的化合物。

术语“稠环烷基”指 5 至 20 元, 系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对碳原子的全碳多环基团, 其中一个或多个环可以含有一个或多个双键, 但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元, 更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠环烷基, 优选为双环或三环, 更优选为 5 元/5 元或 5 元/6 元双环烷基。稠环烷基的非限制性实例包括:



术语“稠杂环基”指 5 至 20 元, 系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对原子的多环杂环基团, 一个或多个环可以含有一个或多个双键, 但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统, 其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2) 的杂原子, 其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元, 更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环稠杂环基, 优选为双环或三环, 更优选为 5 元/5 元或 5 元/6 元双环稠杂环基。“稠杂环”指的是稠杂环基中的环系。稠杂环基的非限制性实例包括:

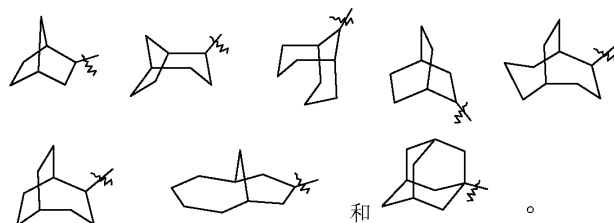


术语“稠杂芳基”可以是含有 5-14 个环原子(其中至少含有一个杂原子),由两个或两个以上环状结构彼此共用两个相邻的原子连接起来形成的不饱和的具有芳香性的稠环结构,同时包括碳原子、氮原子和硫原子可以被氧代的情况,优选“5-12 元稠杂芳基”、“7-12 元稠杂芳基”、“9-12 元稠杂芳基”等,例如苯并呋喃基、苯并异呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、异吲哚基、苯并噁唑基、苯并咪唑基、吲唑基、苯并三唑基、喹啉基、2-喹啉酮基、4-喹啉酮基、1-异喹啉酮基、异喹啉基、吡啶基、菲啶基、苯并哒嗪基、酞嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、酚嗪基、喋啶基、嘌呤基、茶啶基、吩嗪基、吩噻嗪基等。“稠杂芳环”指的是稠杂芳基中的环系。

稠杂芳基可以是任选取代的或非取代的,当被取代时,取代基优选为一个或多个以下基团,其独立地选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、卤素、巯基、羟基、硝基、氰基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、环烷氧基、杂环烷氧基、环烷硫基、杂环烷硫基、羧基或羧酸酯基。

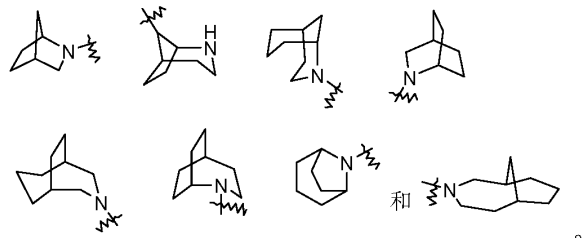
术语“桥环”指两个或两个以上环状结构彼此共用两个非相邻的环原子所形成的结构。

术语“桥环烷基”指 5 至 20 元,任意两个环共用两个不直接连接的碳原子的全碳多环基团,其可以含有一个或多个双键,但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。优选为 6 至 14 元,更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥环烷基,优选为双环、三环或四环,更有选为双环或三环。桥环烷基的非限制性实例包括:



术语“桥杂环基”指 5 至 14 元,任意两个环共用两个不直接连接的原子的多环杂环基团,其可以含有一个或多个双键,但没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统,其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整数 0 至 2)

的杂原子，其余环原子为碳。优选为 6 至 14 元，更优选为 7 至 10 元。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥杂环基，优选为双环、三环或四环，更有选为双环或三环。桥杂环基的非限制性实例包括：



术语“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的环烷基)，其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C₃₋₈环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基，所述 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C₃₋₈环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、氘、羟基、氧代、硝基、氰基所取代。同理，“炔氧基”、“烯氧基”、“环烷氧基”、“杂环烷氧基”、“环烯氧基”的定义如上述“烷氧基”定义。

术语“取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多 5 个，更优选为 1~3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。不言而喻，取代基仅处在它们的可能的化学位置，本领域技术人员能够在不付出过多努力的情况下（通过实验或理论）确定可能或不可能的取代。

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

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

术语“直接连接”指第一化合物或基团与第二化合物或基团在没有任何间插原子或原子基团的情况下连接。术语“间接连接”指第一化合物或基团与第二化合物或基团通过中间基团、化合物或分子（例如，连接基团）连接。

术语“羟基”指-OH。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

术语“卤代烷基”指被卤素取代的烷基，其中烷基如上所定义。

术语“氰基”指-CN。

术语“硝基”指-NO₂。

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

术语“氨基”指-NH₂。

术语“氰基”指-CN。

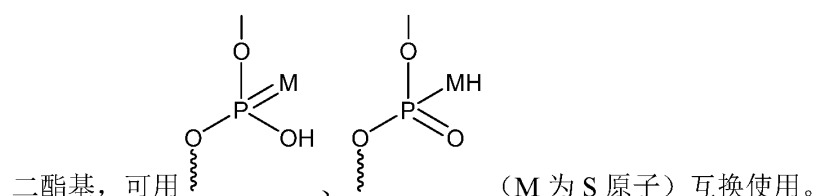
术语“羧基”指-C(O)OH。

术语“醛基”指-CHO。

本公开中，术语“包含”、“包括”可替换为“由……组成”。

本公开中，“磷酸酯基团”、“磷酸酯基”、“磷酸酯键”可互换使用，包括磷酸一酯、磷酸二酯或磷酸三酯。“硫代磷酸酯基团”中的“磷酸酯基团”也具有同样的含义。若无特别说明，天然核苷酸间磷酸酯基为磷酸二酯基。

本公开中，硫代磷酸酯基是指一个非桥接氧原子被硫原子替代而修饰的磷酸



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

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

如本文所使用的，术语“互补”或“反向互补”一词可互相替代使用，并具有本领域技术人员周知的含义，即，在双链核酸分子中，一条链的碱基与另一条链上的碱基以互补的方式相配对。在 DNA 中，嘌呤碱基腺嘌呤(A)始终与嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)(或者在 RNA 中为尿嘧啶(U))相配对；嘌呤碱基鸟嘌呤(C)始终与嘧啶碱基胞嘧啶(G)相配对。每个碱基对都包括一个嘌呤和一个嘧啶。当一条链上的腺嘌呤始终与另一条链上的胸腺嘧啶(或尿嘧啶)配对，以及鸟嘌呤始终与胞嘧啶配对时，两条链被认为是彼此相互补的，以及从其互补链的序列中可以推断出该链的序列。与此相应地，“错配”在本领域中意指在双链核酸中，对应位置上的碱基并未以互补的形式配对存在。

如本文所使用，“化学修饰”或“修饰”意指当与天然存在的对应物相比时具有化学差异的结构，包括经化学手段的所有改变，例如化学部分的添加或去除，

或以一个化学部分取代另一个化学部分。

在本公开上下文中，Bz 表示苯甲酰基；MMTr 表示甲氧基苯基二苯甲基；DMTr 表示二甲氧三苯甲基。

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

如无特别说明，在本公开上下文中，大写字母 C、G、U、A、T 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 d 表示该字母 d 右侧相邻的一个核苷酸为脱氧核糖核苷酸；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸；小写字母 s 表示与该字母 s 左右相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接。

如本文所使用的，术语“氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被氟取代形成的核苷酸；所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

如本文所使用的，术语“抑制”，可以与“减少”、“沉默”、“下调”、“阻抑”和其他类似术语交替使用，并且包括任何水平的抑制。抑制可通过这些变量中的一个或多个与对照水平相比的绝对或相对水平的减少来评估。该对照水平可以是本领域中使用的任何类型的对照水平，例如给药前基线水平或从类似的未经处理或经对照(例如仅缓冲液对照或惰性剂对照)处理的受试者、细胞、或样品确定的水平。例如，可以采用 mRNA 剩余表达量来表征 siRNA 对靶基因表达的抑制程度，如 mRNA 剩余表达量为不高于 99%、不高于 95%、不高于 90%、不高于 85%、不高于 80%、不高于 75%、不高于 70%、不高于 65%、不高于 60%、不高于 55%、不高于 50%、不高于 45%、不高于 40%、不高于 35%、不高于 30%、不高于 25%、不高于 20%、不高于 15%、或不高于 10%。靶基因表达的抑制率可以采用 Dual-Glo® Luciferase Assay System 检测，分别读取萤火虫 (Firefly) 化学发光值和海肾 (Renilla) 化学发光值，计算相对值 $\text{Ratio} = \text{Ren}/\text{Fir}$ ；本公开中，剩余 mRNA 表达量比例(或剩余活性%) = $\text{Ratio}(\text{siRNA 处理组}) / \text{Ratio}(\text{无 siRNA 对照组})$ ，抑制率(%) = $100\% - \text{剩余 mRNA 表达量}(\%)$ 。

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

进展。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据例如以下因素而变化：待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

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

在一些实施方式中，在将寡聚化合物递送至表达基因的细胞后，寡聚化合物能够抑制潜在基因的表达，并且在本文中被称为“表达抑制性寡聚化合物”，可以体外或体内抑制基因表达。“寡聚化合物”包括但不限于：寡核苷酸、单链寡核苷酸、单链反义寡核苷酸、短干扰 RNA(siRNA)、双链 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、短发夹 RNA(shRNA)、核糖酶、干扰 RNA 分子和 Dicer 酶底物。

除非另外指出，本文所使用符号 λ 表示其可以根据本文所述公开范围连接一个或多个任何基团。

如本文所用，第一链可被称为反义链，第二链可被称为正义链。术语第一链和反义链或第二链和正义链应视为可互换的。

本公开中所述“RNAi 试剂”指含有能够以序列特异性方式降解或抑制靶信使 RNA(mRNA)转录并翻译的 RNA 或 RNA 样(例如，化学修饰的 RNA)寡核苷酸分子的试剂。本公开中 RNAi 试剂可以通过 RNA 干扰机制(即，通过与哺乳动物细胞的 RNA 干扰通路构成机制(RNA 诱导的沉默复合物或 RISC)相互作用诱导 RNA 干扰)操纵，或通过任何其它机制或途径起作用。RNAi 试剂包括但不限于：单链寡核苷酸、单链反义寡核苷酸、短干扰 RNA(siRNA)、双链 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、短发夹 RNA(shRNA)和 Dicer 底物。

本文所述的 RNAi 试剂包括寡核苷酸，所述寡核苷酸具有与靶向的 mRNA 至少部分互补的链。

附图说明

图 1 为缀合物 TRD002218、TRD007203、TRD007204 和 TRD007205 在给药后 7 天 TTR 中 mRNA 的表达量。

图 2 为缀合物 TRD002218、TRD007203、TRD007204 和 TRD007205 在给药后 28 天 TTR 中 mRNA 的表达量。

图 3 为试验例 6 中 GalNAc 缀合 siRNA 对于鼠原代肝细胞 mTTR 基因表达抑制活性。

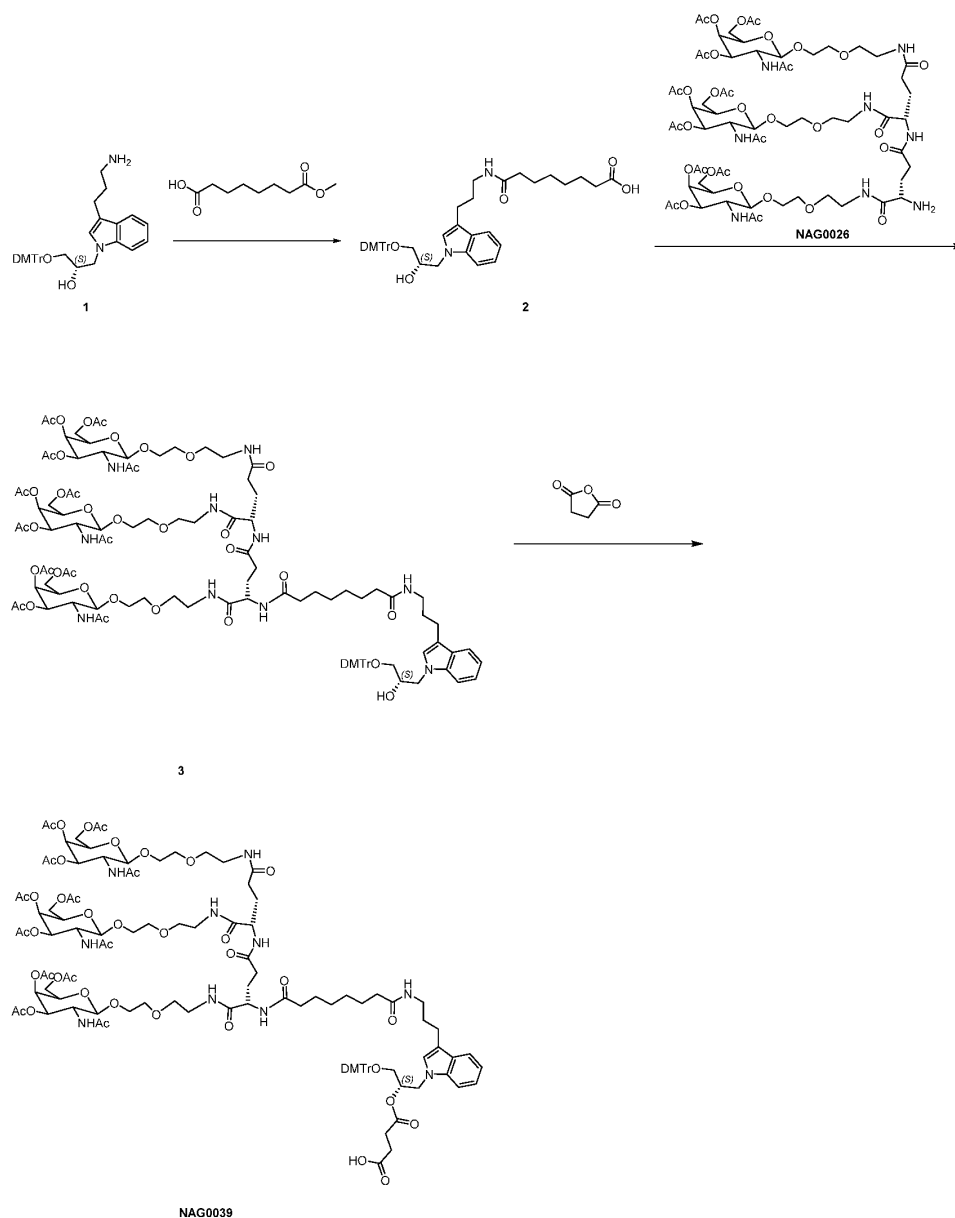
图 4 为试验例 7 中 GalNAc 缀合 siRNA 对于小鼠 mTTR 基因的体内抑制活性。

具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本公开,但这些实施例并非限制着本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,则该试剂可自任意分子生物学试剂的供应商以用于分子生物学应用的质量/纯度而获得。

化合物 **NAG0024**、**NAG0026** 购买自天津药明康德新药开发有限公司。除非特别说明,以下实施例中所用的试剂均为市售商品。

制备例 1: 化合物 **NAG0039** 的合成



化合物 **2**

室温, 氮气氛下, 在化合物 **1** (1.00 g, 1.82 mmol) 的干燥 THF (20 mL)

溶液中依次加入 DIEA (469 mg, 3.63 mmol)、3A 分子筛、辛二酸单甲酯 (342 mg, 1.82 mmol)、DCC (487 mg, 2.36 mmol) 和 HOBt (319 mg, 2.36 mmol)。在 40℃ 反应过夜。反应液过滤浓缩, 通过反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 冻干得到中间体 (1.14 g, 1.58 mmol, 产率 87%)。

将此中间体 (1.14 g, 1.58 mmol) 溶于 THF (3 mL) 和 MeOH (3 mL), 然后滴加 NaOH (126 mg, 3.16 mmol) 的水 (3 mL) 溶液。反应液室温搅拌 4 h。减压除去大部分的有机溶剂, 然后通过反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 得到化合物 **2** (851 mg, 1.17 mmol, 钠盐, 产率 74%)。

化合物 3

室温, 氮气氛围下, 在化合物 **NAG0026** (863 mg, 0.566 mmol) 的干燥 THF (15 mL) 溶液中依次加入 DIEA (146 mg, 1.13 mmol)、3A 分子筛、化合物 **2** (400 mg, 0.566 mmol)、DCC (140 mg, 0.679 mmol) 和 HOBt (92 mg, 0.679 mmol)。在 45℃ 反应过夜。反应液过滤浓缩, 通过反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 冻干得到化合物 **3** (918 mg, 0.415 mmol, 产率 73%)。

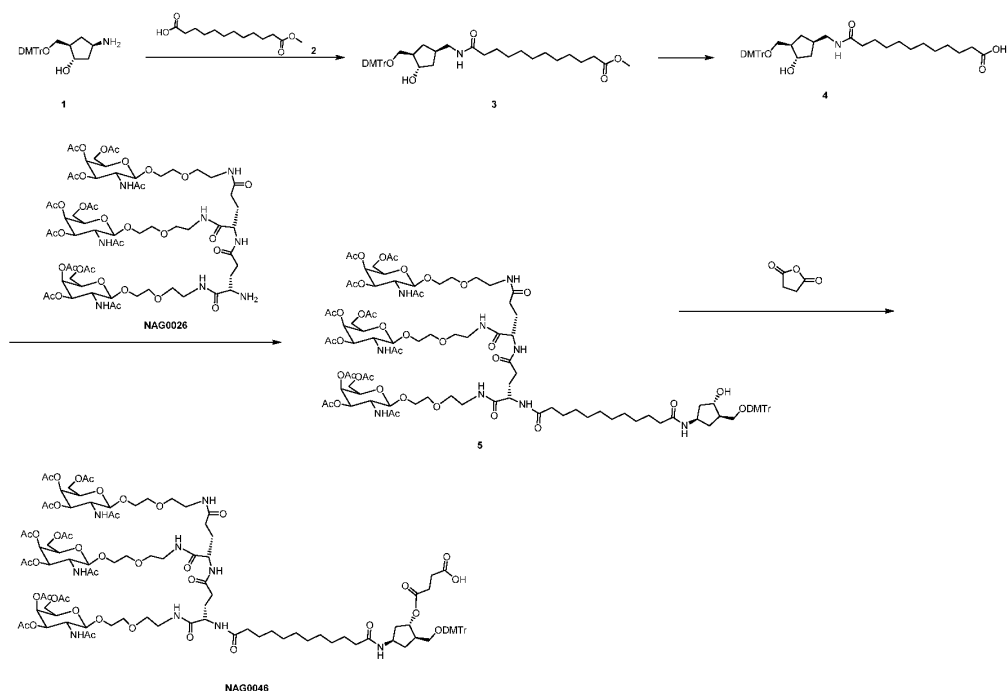
化合物 NAG0039

室温, 向化合物 **3** (400 mg, 0.181 mmol) 的吡啶溶液中加入 3A 分子筛、丁二酸酐 (36 mg, 0.361 mmol)、DMAP (22 mg, 0.181 mmol), 氮气氛围下, 45℃ 反应过夜。反应液过滤, 减压浓缩, 通过反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 分离纯化, 得到 248 mg 粗产物, 两批次此粗产物合并后经过 HPLC 制备色谱法 (色谱柱: Xbridge 150x50mm, 5 μm; 流动相: A: 0.1% NH₃H₂O+0.005% FA 水溶液 B: MeCN; 梯度: 20% B-95% B 9 min 内) 分离, 得到化合物 **NAG0039** (240 mg, 0.104 mmol, 产率 33%)。

MS (ESI) m/z = 2312.3 [M-1]⁻, 理论: 2313.0。

¹H NMR (400 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.63-6.59 (m, 27H), 5.40-5.22 (m, 4H), 5.16-5.02 (m, 3H), 4.74-4.57 (m, 3H), 4.45-3.05 (m, 47H), 2.70-1.96 (m, 57H), 1.63-1.27 (m, 11H)。

制备例 2: 化合物 NAG0046 的合成



化合物 3

氮气氛下，在溶剂 DCM (5 mL)中加入化合物 **2** (203 mg, 0.830 mmol)、DIEA (0.206 mL, 1.246 mmol)、HATU (237mg, 0.623 mmol)。于 20℃搅拌，再将化合物 **1** (200 mg, 0.415 mmol)加上述体系中。加毕，在氮气氛下，20 ℃反应 1 h。反应液中加入 H₂O (10 mL) 用 DCM (3 x 20 mL)萃取，无水 Na₂SO₄干燥，过滤，浓缩，残余物用柱层析色谱法纯化(DCM: MeOH (100: 0-90:10))，得到化合物 **3** (250 mg, 收率 82%)。

LCMS: 色谱条件 10-80AB_2min, 保留时间 1.534 min; MS (ESI) $m/z = 682.6$ $[M+Na]^+$ 。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.34-7.29 (m, 6H), 7.21-7.17 (m, 2H), 6.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H), 4.44 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.31-4.08 (m, 1H), 4.01-3.84 (m, 1H), 3.82 (d, *J* = 2.0 Hz, 6H), 3.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 3H), 3.17-3.06 (m, 1H), 2.36-2.25 (m, 3H), 2.19-1.97 (m, 4H), 1.57-1.54 (m, 3H), 1.47 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H), 1.28 (br d, *J* = 6.8 Hz, 10H)。

化合物 4

化合物 **3** (250 mg, 0.348 mmol) 溶于 MeOH (1 mL) 和 H₂O (0.5 mL) 中, 然后加入 LiOH (146 mg, 3.48 mmol), 室温反应 12 h。反应液过反相柱得到化合物 **4** (166 mg, 收率 71%)。

LCMS: 色谱条件 10-80CD_3min, 保留时间 1.353 min; MS (ESI) $m/z = 668.6$ $[M+Na]^+$ 。

HPLC: 色谱条件 10-80CD₂ 6min, 保留时间 1.897 min。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.45 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.34-7.27 (m, 6H), 7.24-7.19 (m, 1H), 6.92-6.83 (m, 4H), 4.32 (q, J = 8.0 Hz, 1H), 4.13-4.02 (m, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.21-3.14 (m, 1H), 3.13-3.06 (m, 1H), 2.37-2.28 (m, 1H), 2.14 (td, J = 7.5, 15.6 Hz, 5H), 1.99-1.89 (m, 1H), 1.72-1.70 (m, 1H), 1.59-1.50 (m, 4H), 1.36-1.23 (m, 13H)。

化合物 5

将化合物 **NAG0026** (120 mg, 0.079 mmol) 溶于无水 THF (2 mL) 和无水 DMF (2 mL), 加入 3A 分子筛 (50 mg), 再依次加入化合物 **4** (54 mg, 0.084 mmol)、HOBT (28 mg, 0.205 mmol)、DCC (39 mg, 0.189 mmol) 和 DIEA (0.08 mL, 0.472 mmol)。反应液 40℃ 反应 20 h。LC-MS 显示反应完全后, 加水淬灭, 过滤。滤液减压浓缩后, 经反相柱色谱法纯化 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O), 得到化合物 **5** (90 mg, 收率 53%)。

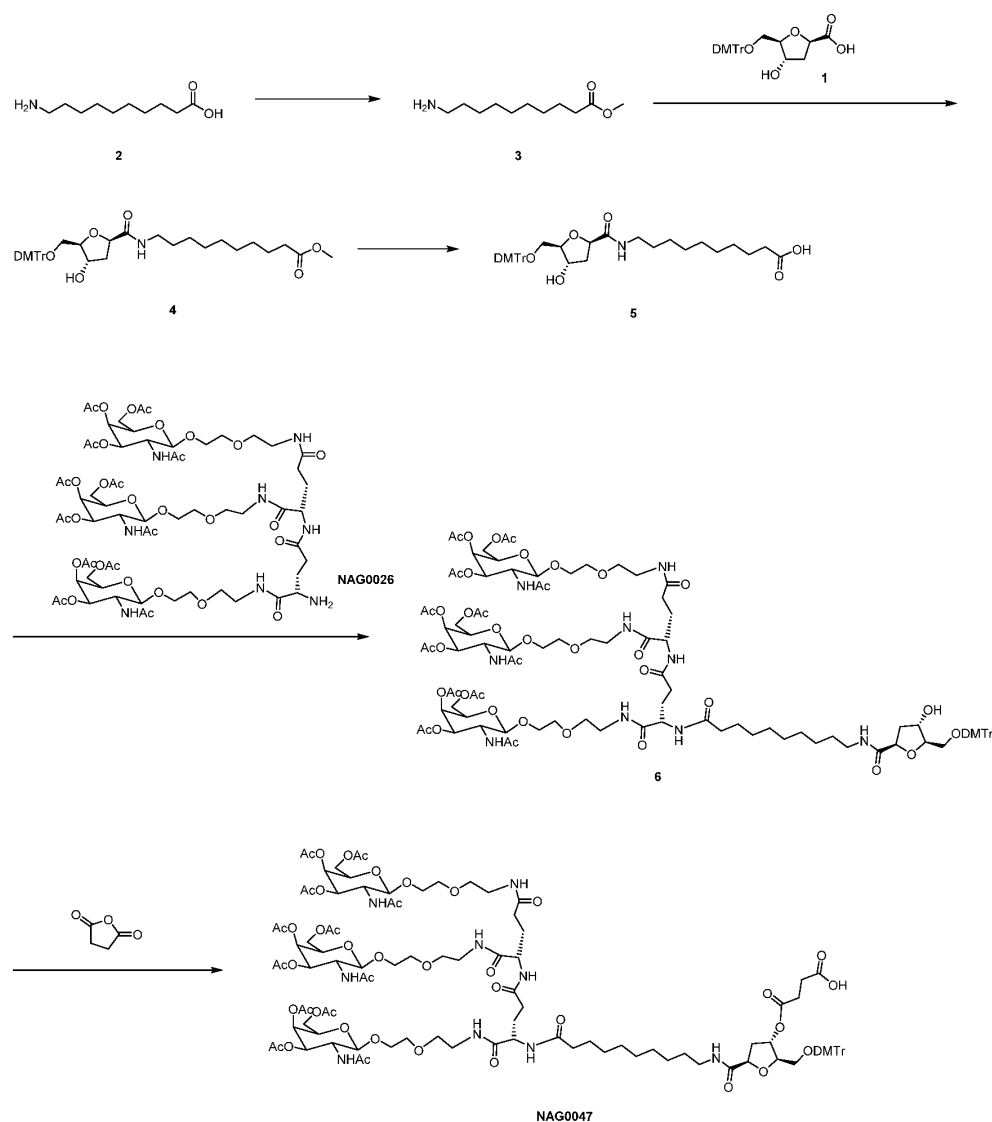
化合物 NAG0046

将化合物 **5** (90 mg, 0.042 mmol) 溶于无水吡啶 (3 mL) 中, 加入 3A 分子筛 (50 mg)、DMAP (26 mg, 0.209 mmol) 和丁二酸酐 (42 mg, 0.364 mmol)。反应液 50℃ 搅拌 48 h。LC-MS 显示原料反应约 50%, 反应液过滤, 浓缩, 经反相柱色谱法 (Boston C18 柱, H₂O/MeCN, 从 5% 到 70% 洗脱) 纯化, 得到 **NAG0046** (30 mg)。

MS (ESI) m/z = 2251.4 [M-1]⁻, 理论: 2252.0。

¹H NMR (400 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.50-7.14 (m, 14H), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 7H), 6.56 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.32 (d, J = 3.4 Hz, 3H), 5.09 (t, J = 12.5 Hz, 4H), 4.65 (dd, J = 8.6, 4.8 Hz, 3H), 4.32-3.11 (m, 52H), 2.54 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 2.32 (d, J = 7.6 Hz, 16H), 2.14-2.04 (m, 17H), 1.89 (d, J = 2.9 Hz, 10H), 1.75 (dt, J = 14.6, 7.9 Hz, 4H), 1.62-1.49 (m, 5H), 1.29 (s, 13H)。

制备例 3: 化合物 NAG0047 的合成



化合物 3

在 0 °C 以及氮气氛围下,向化合物 **2** (300 mg, 1.60 mmol) 的 MeOH (10 mL) 溶液中逐滴加入 SOCl₂ (0.581 mL, 8.009 mmol)。该混合物在 60 °C 搅拌 3 小时。将该反应液浓缩后得到化合物 **3** (0.32 g, 1.510 mmol, 产率 95%)。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 3.75-3.59 (m, 3H), 2.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.64 (td, *J* = 7.0, 14.4 Hz, 4H), 1.48-1.27 (m, 10H)。

化合物 4

在 0 °C 以及氮气氛围下,向化合物 **1** (250 mg, 0.538 mmol) 的 THF (25 mL) 溶液中分别加入 DIEA (0.267 mL, 1.61 mmol)、4A 分子筛(500 mg)、化合物 **3** (271 mg, 1.08 mmol)、DCC (333 mg, 1.61 mmol) 和 HOBt (218 mg, 1.61 mmol)。该反

应液在 50 °C 搅拌 5 小时。反应结束之后用 H₂O (50 mL) 淬灭, 并且用 EtOAc (100 mL x 3) 萃取, 将合并的有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩后通过硅胶柱层析色谱法 (0-80% EtOAc/PE) 得到化合物 **4** (420 mg, 0.486 mmol, 产率 90%)。

LCMS: 色谱条件 10-80CD_7min, 保留时间 5.586 min; MS (ESI) m/z = 670.3 [M+Na]⁺。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.44 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.36-7.29 (m, 6H), 7.28-7.22 (m, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 4.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.35-4.27 (m, 1H), 4.02 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.86-3.74 (m, 6H), 3.66 (s, 3H), 3.52-3.42 (m, 1H), 3.33-3.30 (m, 1H), 3.29-3.23 (m, 1H), 3.18 (td, *J* = 7.0, 13.5 Hz, 1H), 3.00 (td, *J* = 7.0, 13.5 Hz, 1H), 2.33-2.22 (m, 3H), 2.14 (ddd, *J* = 5.8, 7.8, 13.3 Hz, 1H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.73 (td, *J* = 3.6, 13.2 Hz, 2H), 1.66-1.53 (m, 3H), 1.43-1.26 (m, 7H)。

化合物 **5**

在 20 °C, 向化合物 **4** (420 mg, 0.486 mmol) 的 THF (5 mL) 和 H₂O (2 mL) 溶液中加入 LiOH (82 mg, 1.95 mmol)。该反应液在 20 °C 搅拌 15 小时。反应结束后浓缩, 通过反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 得到化合物 **5** (236 mg, 0.155 mmol, 产率 32%, 锂盐)。

LCMS: 色谱条件 0-60CD_7min, 保留时间 3.950 min; MS (ESI) m/z = 656.4 [M+Na]⁺。

化合物 **6**

将化合物 **NAG0026** (236 mg, 0.155 mmol) 溶解于无水 THF (3 mL), 加入 3A 分子筛 (100 mg), 再依次加入化合物 **5** (98 mg, 0.155 mmol)、HOBt (25 mg, 0.186 mmol)、DCC (41 mg, 0.201 mmol) 和 DIEA (0.08 mL, 0.464 mmol)。反应液 40 °C 反应 16 h。LC-MS 显示反应完全后, 加水淬灭, 过滤。滤液浓缩后, 经反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 得到化合物 **6** (160 mg, 0.075 mmol, 产率 48%)。

化合物 **NAG0047**

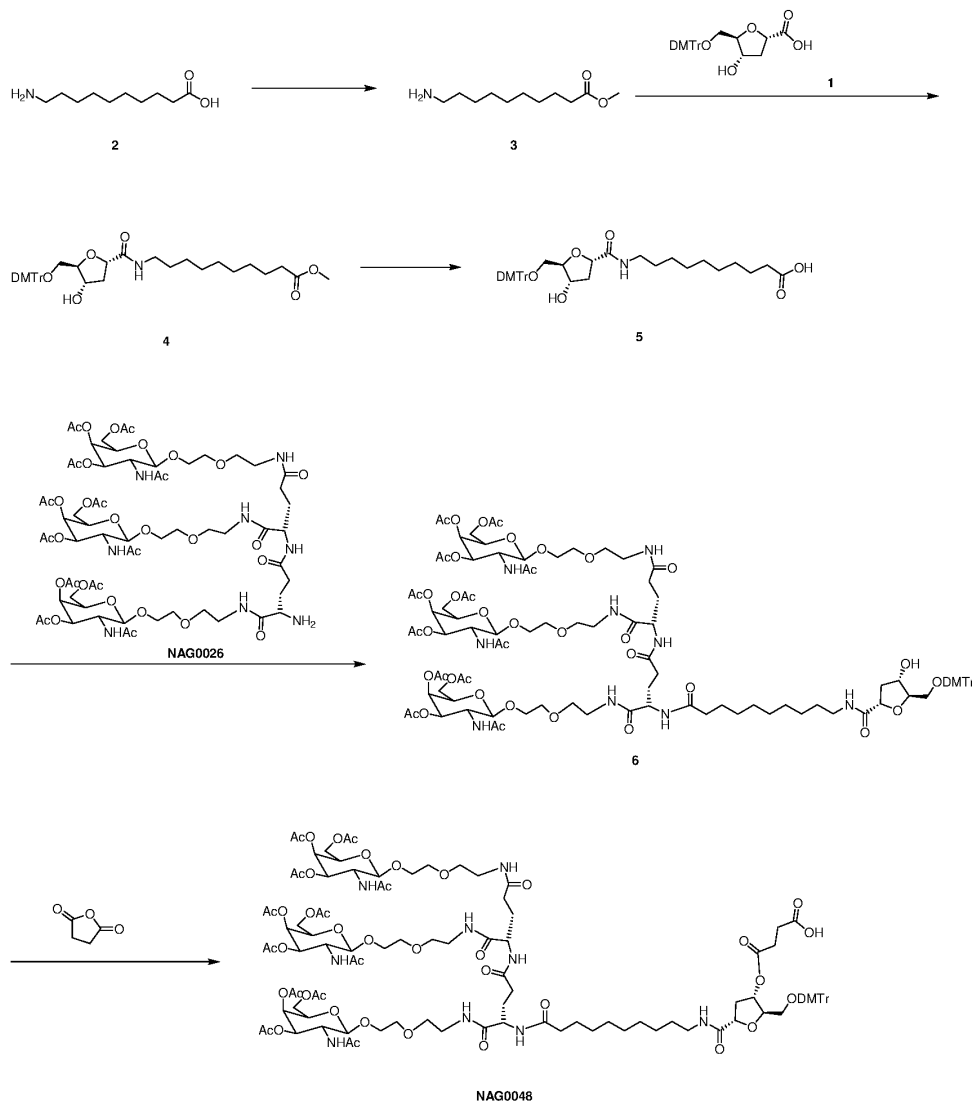
将化合物 **6** (160 mg, 0.075 mmol) 溶解于无水吡啶 (3 mL) 中, 依次加入 3A 分子筛 (100 mg)、DMAP (46 mg, 0.374 mmol) 和丁二酸酐 (75 mg, 0.747 mmol)。反应液 50 °C 搅拌 48 h, 反应液过滤, 浓缩, 经反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 得到 **NAG0047** (80 mg)。

MS (ESI) m/z = 2239.1 [M-1]⁻, 理论: 2240.0。

¹H NMR (400 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.53-7.09 (m, 14H), 6.89 (dd, *J* = 7.2, 5.1 Hz, 8H), 5.31 (dt, *J* = 3.2, 1.5 Hz, 3H), 5.22-5.05 (m, 4H), 4.70-4.61 (m, 3H), 4.44 (dd, *J* = 9.7, 6.7 Hz, 1H), 4.29 (dq, *J* = 14.6, 7.6 Hz, 2H), 4.18-3.84 (m, 16H), 3.80 (s, 6H), 3.69 (dd, *J* = 11.2, 4.3 Hz, 3H), 3.64-3.03 (m, 24H), 2.57 (h, *J* = 2.3 Hz, 5H), 2.36-2.27 (m, 7H), 2.24-2.16 (m, 4H), 2.11 (s, 3H), 2.01-1.96 (m, 22H), 1.88 (q, *J* =

2.9, 2.2 Hz, 8H), 1.56 (s, 2H), 1.24 (d, $J = 17.7$ Hz, 13H)。

制备例 4：化合物 NAG0048 的合成



化合物 3

在 0 °C 以及氮气氛下, 向化合物 **2** (500 mg, 2.67 mmol) 的 MeOH (10 mL) 溶液中逐滴加入 SOCl₂ (0.968 mL, 13.3 mmol)。该混合物在 60 °C 搅拌 12 小时。将该反应液浓缩后得到化合物 **3** (550 mg, 2.46 mmol, 92%)。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 3.69-3.62 (m, 3H), 2.94 (s, 2H), 2.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.73-1.57 (m, 4H), 1.46-1.31 (m, 10H)。

化合物 4

在 0 °C 以及氮气氛下, 向化合物 **1** (250 mg, 0.538 mmol) 的 THF (25 mL) 溶液中分别加入 DIEA (0.267 mL, 1.614 mmol)、4A 分子筛 (500 mg)、化合物 **3** (271

mg, 1.08 mmol)、DCC (333 mg, 1.61 mmol) 和 HOBt (218 mg, 1.61 mmol)。该反应液在 50 °C 搅拌 5 小时。反应结束之后用 H₂O (50 mL) 淬灭, 并且用 EtOAc (100 mL x 3) 萃取, 将合并的有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩后通过硅胶柱层析色谱法 (0-80% EtOAc/PE) 纯化, 得到化合物 **4** (350 mg, 0.486 mmol, 产率 90%)。

LCMS: 色谱条件 10-80CD_7min, 保留时间 5.670 min; MS (ESI) m/z = 670.3 [M+Na]⁺。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.36-7.27 (m, 6H), 7.25-7.19 (m, 1H), 6.90-6.85 (m, 4H), 4.50 (dd, *J* = 4.6, 9.0 Hz, 1H), 4.27 (td, *J* = 3.0, 5.6 Hz, 1H), 4.20-4.14 (m, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.68-3.62 (m, 3H), 3.53-3.43 (m, 1H), 3.27-3.18 (m, 3H), 3.16-3.09 (m, 1H), 2.54 (ddd, *J* = 5.8, 8.8, 13.2 Hz, 1H), 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.08 (td, *J* = 4.0, 13.2 Hz, 1H), 1.91-1.82 (m, 2H), 1.73 (td, *J* = 3.6, 13.2 Hz, 2H), 1.67-1.50 (m, 5H), 1.39-1.32 (m, 2H), 1.27-1.12 (m, 3H)。

化合物 5

在 20 °C 时, 向化合物 **4** (350 mg, 0.486 mmol) 的 THF (5 mL) 和 H₂O (2 mL) 溶液中加入 LiOH (82 mg, 1.95 mmol)。该反应液在 20 °C 搅拌 15 小时。反应结束之后直接浓缩得到化合物 **5** (300 mg, 0.469 mmol, 产率 96%)。

LCMS: 色谱条件 0-60CD_7min, 保留时间 4.081min; MS (ESI) m/z = 656.4 [M+Na]⁺。

化合物 6

将化合物 **NAG0026** (300 mg, 0.197 mmol) 溶解于无水 THF (5 mL), 加入 3A 分子筛 (100 mg), 再依次加入化合物 **5** (125 mg, 0.197 mmol)、HOBt (32 mg, 0.236 mmol)、DCC (53 mg, 0.256 mmol) 和 DIEA (0.10 mL, 0.590 mmol)。反应液 40 °C 反应 16 h。LC-MS 显示反应完全后, 加水淬灭, 过滤。滤液减压浓缩后, 经反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 得到化合物 **6** (260 mg, 产率 62%)。

化合物 NAG0048

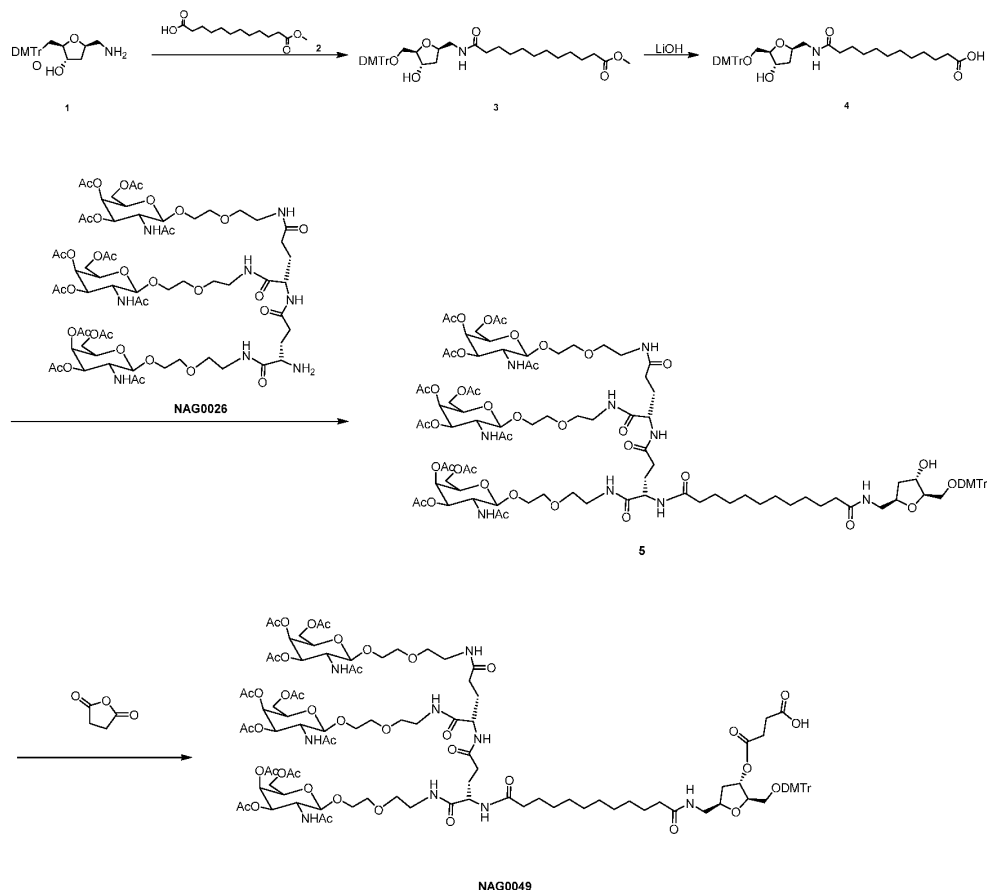
将化合物 **6** (260 mg, 0.121 mmol) 溶解于无水吡啶 (4 mL) 中, 依次加入 3A 分子筛 (100 mg)、DMAP (30 mg, 0.242 mmol) 和 丁二酸酐 (73 mg, 0.726 mmol)。反应液 50 °C 搅拌 48 h。LC-MS 显示原料反应约 70%, 反应液过滤, 浓缩, 经反相柱色谱法 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 纯化, 得到 **NAG0048** (170 mg, 产率 62%)。

MS (ESI) m/z = 2239.1 [M-1]⁻, 理论: 2240.0。

¹H NMR (400 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.68 (s, 3H), 7.51-7.17 (m, 12H), 7.11-6.85 (m, 7H), 5.31 (dt, *J* = 2.5, 1.3 Hz, 3H), 5.18-5.04 (m, 4H), 4.74-4.53 (m, 4H), 4.30 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 4.21-3.93 (m, 12H), 3.79 (s, 9H), 3.69 (dt, *J* = 10.4, 4.7

Hz, 3H), 3.62-3.14 (m, 22H), 3.09 (dd, $J = 10.1, 4.4$ Hz, 2H), 2.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.46 (s, 6H), 2.28 (ddt, $J = 28.8, 20.0, 7.2$ Hz, 8H), 2.11 (s, 3H), 2.01-1.96 (m, 18H), 1.90-1.87 (m, 8H), 1.54 (d, $J = 25.2$ Hz, 4H), 1.37-1.18 (m, 16H)。

制备例 5: 化合物 NAG0049 的合成



化合物 3

将化合物 2 (293 mg, 1.20 mmol) 溶于 DCM (3 mL), 加入 DIEA (0.298 mL, 1.80 mmol) 和 HATU (457 mg, 1.20 mmol), 再加入化合物 1 (300 mg, 0.601 mmol, 来源于制备例 7), 20℃ 反应 1 小时。将反应液加入二氯甲烷 (60 mL) 和水 (60 mL) 萃取, 有机相用水 (60 mL x 3) 洗涤三次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩。残余物通过柱层析色谱法纯化 (PE:EtOAc=0:1), 得到化合物 3 (300 mg, 产率 90%)。

LCMS: 色谱条件 30-90CD₃min, 保留时间 2.225 min; MS (ESI) $m/z = 698.4$ $[M+Na]^+$ 。

化合物 4

将化合物 3 (300 mg, 0.444 mmol) 溶于 THF (3 mL) 和 H₂O (1 mL), 加入 LiOH·H₂O (75 mg, 1.78 mmol), 20℃ 反应 12 小时。将反应液减压浓缩, 用水 (5 mL)

和甲醇 (5 mL)溶解,用反向柱色谱法纯化(Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O), 得到化合物 **4** (212 mg, 收率 100%)。

LCMS: 色谱条件 10-80CD₃ 3min, 保留时间 1.333 min; MS (ESI) m/z = 684.3 [M+Na]⁺。

HPLC: 色谱条件 10-80CD₃ 6min, 保留时间 1.853min。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.47-7.38 (m, 2H), 7.35-7.25 (m, 6H), 7.24-7.17 (m, 1H), 6.86 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 4.30-4.17 (m, 2H), 3.99-3.88 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.42-3.33 (m, 2H), 3.16-3.04 (m, 2H), 2.18-2.05 (m, 4H), 1.92-1.70 (m, 2H), 1.65-1.46 (m, 4H), 1.36-1.17 (m, 12H)。

化合物 **5**

将化合物 **NAG0026** (300 mg, 0.197 mmol)溶解于无水 DMF (3 mL), 加入 3A 分子筛 (100 mg), 再依次加入化合物 **4** (143 mg, 0.216 mmol)、HOBt (32 mg, 0.236 mmol)、DCC (53 mg, 0.256 mmol)和 DIEA (0.1 mL, 0.590 mmol)。反应液 40℃ 反应 16 h。LC-MS 显示反应完全后, 加水淬灭, 过滤。滤液浓缩后, 经反相柱色谱法纯化(Boston C18 柱, H₂O/MeCN, 从 5%到 80%洗脱), 得到化合物 **5** (110 mg, 产率 28%)。

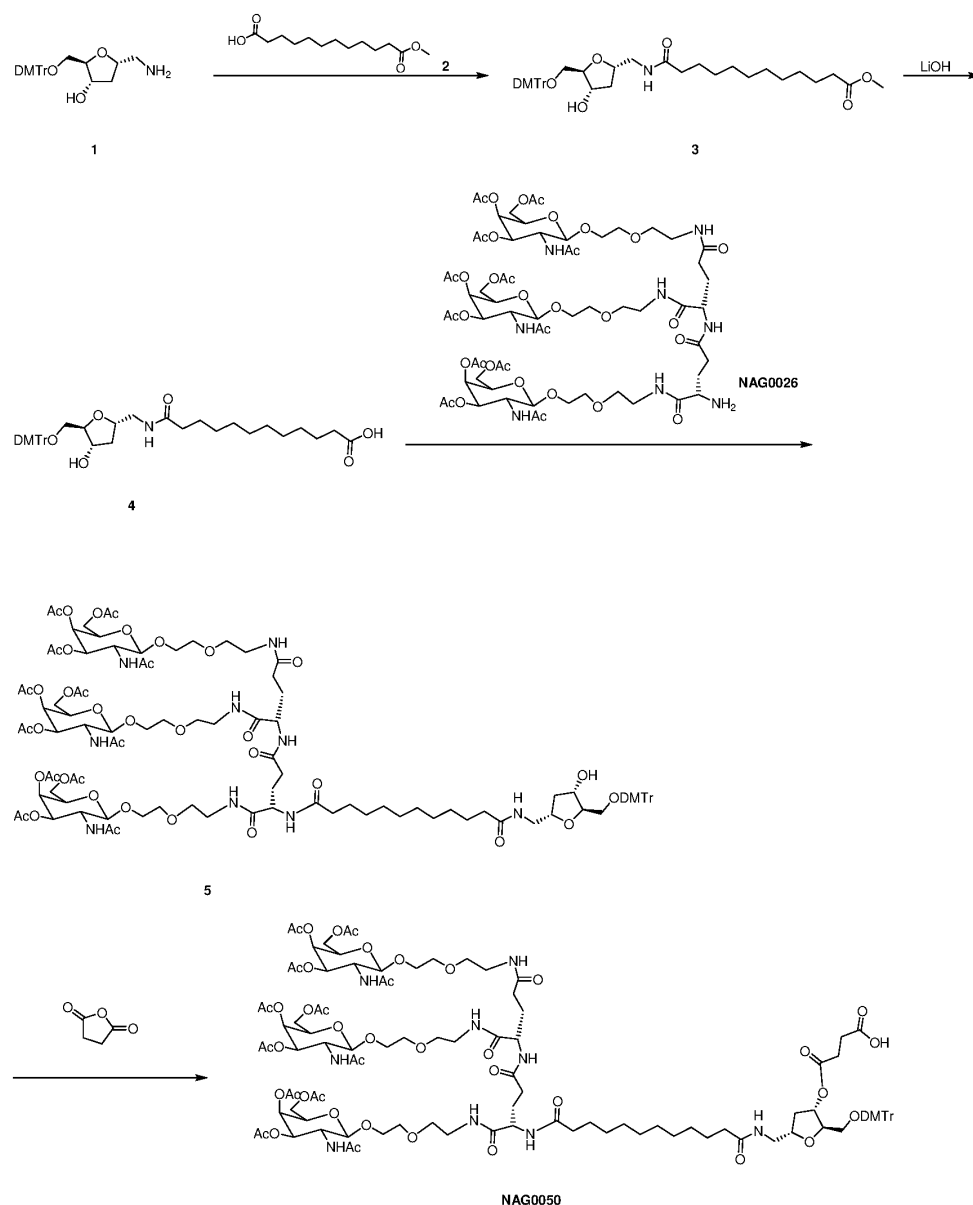
化合物 **NAG0049**

将化合物 **5** (110 mg, 0.051 mmol)溶解于无水吡啶 (3 mL)中, 依次加入 3A 分子筛 (100 mg)、DMAP (31 mg, 0.255 mmol)和丁二酸酐 (51 mg, 0.510 mmol)。反应液 50℃ 搅拌 48 h。LC-MS 显示原料反应约 50%, 反应液过滤, 浓缩, 经反相柱色谱法纯化(Boston C18 柱, H₂O/MeCN, 从 5%到 70%洗脱), 得到 **NAG0049** (45 mg, 产率 39%)。

MS (ESI) m/z = 2267.0 [M-1]⁻, 理论: 2268.0。

¹H NMR (400 MHz, CH₃CN-*d*₃) δ 7.62-6.40 (m, 22H), 5.31 (s, 3H), 5.21-5.02 (m, 4H), 4.64 (dd, J = 8.7, 6.2 Hz, 3H), 4.16 (s, 2H), 4.13-3.94 (m, 14H), 3.79 (s, 10H), 3.72-3.38 (m, 24H), 3.32-3.11 (m, 5H), 2.56 (t, J = 3.4 Hz, 4H), 2.34-2.20 (m, 16H), 1.99 (d, J = 11.3 Hz, 24H), 1.41 (d, J = 127.6 Hz, 21H)。

制备例 6: 化合物 **NAG0050** 的合成



化合物 3

将化合物 **2** (435 mg, 1.780 mmol) 溶于 DCM (10 mL), 加入 DIEA (0.441 mL, 2.67 mmol) 和 HATU (677 mg, 1.78 mmol) 后, 再加入化合物 **1** (400 mg, 0.890 mmol, 来源于制备例 8), 20℃ 反应 1 小时。将反应液加入二氯甲烷 (60 mL) 和水 (60 mL) 萃取, 有机相用水 (60 mL x 3) 洗涤三次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物用柱层析色谱法纯化 (PE:EtOAc=0:1), 得到化合物 **3** (600 mg, 产率 90%)。

LCMS: 色谱条件 30-90CD_3min, 保留时间 2.745 min; MS (ESI) m/z =698.4 $[M+Na]^+$ 。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.46-7.38 (m, 2H), 7.35-7.24 (m, 6H),

7.22-7.16 (m, 1H), 6.90-6.78 (m, 4H), 4.29-4.21 (m, 2H), 4.02-3.95 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.66-3.62 (m, 3H), 3.41 (s, 1H), 3.18-3.04 (m, 2H), 2.36-2.17 (m, 5H), 1.71-1.50 (m, 5H), 1.39-1.25 (m, 14H)。

化合物 4

将化合物 **3** (600 mg, 0.799 mmol)溶于 THF (3 mL)和 H₂O (1 mL), 加入 LiOH·H₂O (134 mg, 3.20 mmol), 20℃反应 12 小时。将反应液减压浓缩, 用水(5 mL)和甲醇(5 mL)溶解, 用反向柱色谱法纯化(Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O), 得到化合物 **4** (460 mg, 产率 100%, 锂盐)。

LCMS: 色谱条件 10-80CD_3min, 保留时间 1.346 min; MS (ESI) m/z =684.3 [M+Na]⁺。

HPLC: 色谱条件 10-80CD_6min, 保留时间 1.879 min。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.47-7.39 (m, 2H), 7.35-7.24 (m, 6H), 7.22-7.15 (m, 1H), 6.91-6.79 (m, 4H), 4.31-4.18 (m, 2H), 4.02-3.95 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.44-3.33 (m, 2H), 3.18-3.04 (m, 2H), 2.35-2.27 (m, 1H), 2.24-2.10 (m, 4H), 1.70-1.51 (m, 5H), 1.31-1.23 (m, 12H)。

化合物 5

将化合物 **NAG0026**(300 mg, 0.197 mmol)溶解于无水 DMF(3 mL), 加入 3A 分子筛(100 mg), 再依次加入化合物 **4**(143 mg, 0.216 mmol)、HOBt(32 mg, 0.236 mmol)、DCC(53 mg, 0.256 mmol)和 DIEA(0.1 mL, 0.590 mmol)。反应液 40℃反应 16 h。LC-MS 显示反应完全后, 加水淬灭, 过滤。滤液浓缩后, 经反相柱色谱法纯化(Boston C18 柱, H₂O/MeCN, 从 5%到 80%洗脱), 得到化合物 **5**(300 mg, 产率 73%)。

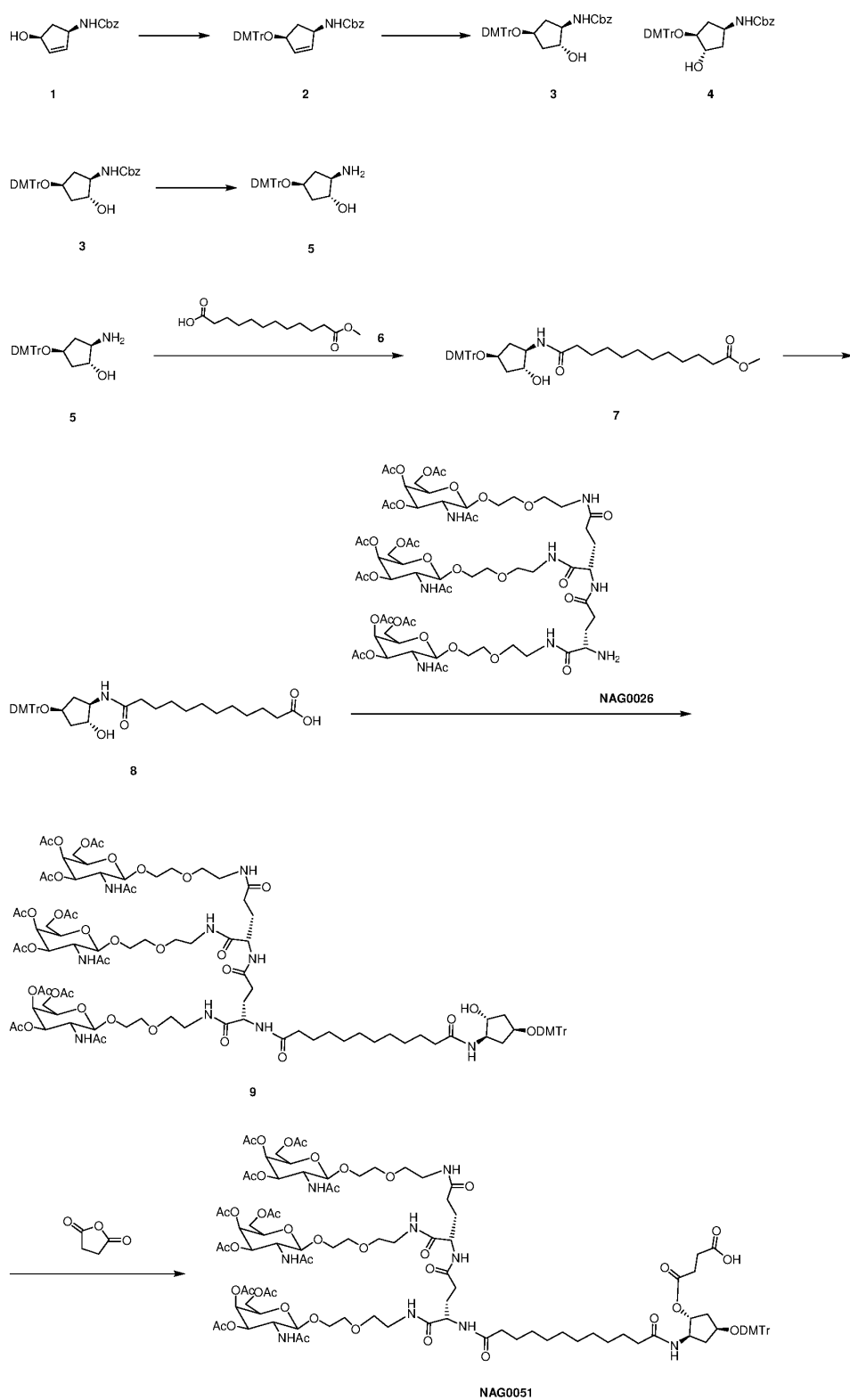
化合物 NAG0050

将化合物 **5** (310 mg, 0.143 mmol)溶解于无水吡啶(5 mL)中, 依次加入 3A 分子筛(100 mg)、DMAP(87 mg, 0.714 mmol)和丁二酸酐(143 mg, 1.429 mmol)。反应液 50℃搅拌 48 h。LC-MS 显示原料反应约 50%, 反应液过滤, 浓缩, 经反相柱色谱法纯化(Boston C18 柱, H₂O/MeCN, 从 5%到 70%洗脱), 得到 **NAG0050**(140 mg, 产率 43%)。

MS (ESI) m/z = 2267.1 [M-1]⁻, 理论: 2268.0。

¹H NMR (400 MHz, CH₃CN-*d*₃) δ 7.54-7.14 (m, 14H), 6.97-6.64 (m, 8H), 5.32 (d, *J* = 3.4 Hz, 3H), 5.21-5.04 (m, 4H), 4.71-4.60 (m, 3H), 4.30 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 4.17-3.95 (m, 14H), 3.93-3.84 (m, 3H), 3.79 (s, 7H), 3.74-3.65 (m, 3H), 3.63-3.08 (m, 26H), 2.57 (d, *J* = 2.0 Hz, 6H), 2.46-2.28 (m, 8H), 2.20 (dt, *J* = 15.1, 7.4 Hz, 5H), 2.11 (s, 2H), 2.01-1.97 (m, 16H), 1.90-1.88 (m, 9H), 1.65-1.55 (m, 4H), 1.39-1.20 (m, 14H)。

制备例 7: 化合物 NAG0051



化合物 2

在溶剂二氯甲烷(100 mL)中加入化合物 **1** (5.00 g, 21.4 mmol)和 TEA (8.04 mL, 57.9 mmol)。于 0 °C 搅拌, 将 DMTrCl (9.08 g, 26.8 mmol)缓慢加入上述体系中。加毕升温至 25 °C 反应 12 h。将饱和碳酸氢钠溶液 (100 mL) 加入到反应液, DCM (100 x 3) 萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残余物通过柱层析色谱法纯化 (PE: EtOAc 100: 0-70: 30), 得到化合物 **2** (12 g, 收率 94%)。

LCMS: 色谱条件 5-95AB_1.5min, 保留时间 1.166 min; MS (ESI) $m/z = 558.1$ $[M+Na]^+$ 。

1H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.52-7.47 (m, 2H), 7.42-7.35 (m, 8H), 7.34-7.27 (m, 3H), 7.26-7.19 (m, 1H), 6.89-6.81 (m, 4H), 5.68 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 5.18-5.08 (m, 3H), 4.83 (br d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.55-4.42 (m, 2H), 3.82 (s, 6H), 2.43-2.29 (m, 1H), 1.39-1.32 (m, 2H)。

化合物 3

在溶剂 THF (100 mL)中加入化合物 **2** (6.00 g, 10.1 mmol), 在 0 °C 将 $BH_3 \cdot THF$ (1M, 20.2 mL, 20.2 mmol) 加入上述体系中。加毕, 20 °C 反应 12 h。然后再降至 0 °C, 先后在 0 °C 缓慢加入 EtOH (6 mL)、NaOH (20 mL, 60.0 mmol), 最后在 0 °C 将 H_2O_2 (20 mL, 33.4 mmol) 慢慢滴加到该反应液中, 然后慢慢升至 20 °C 反应 12 h。将反应液过滤, 加入 H_2O (200 mL) 和 EtOAc (200 mL), 用 EtOAc (3 x 200 mL) 萃取, 用饱和 Na_2SO_3 (100 mL) 溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 减压浓缩。得到的残留物柱层析色谱法纯化 (DCM/MeOH), 得到粗品 3.5 g, 产物通过碱性制备分离 (色谱柱: Xbridge 150x50mm, 5 μm ; 流动相: A: 0.1% $NH_3 \cdot H_2O$ +0.005% FA 水溶液 B: MeCN; 梯度: 20% B-95% B in 9 min) 得到化合物 **3** (850 mg, 收率 15%) 和化合物 **4** (800 mg, 收率 14%)。

化合物 3

LCMS: 色谱条件 10-80AB_7min, 保留时间 4.214 min; MS (ESI) $m/z = 576.3$ $[M+Na]^+$ 。

1H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.31-7.23 (m, 6H), 7.23-7.19 (m, 5H), 7.12-7.08 (m, 3H), 6.79-6.73 (m, 4H), 5.12 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.01-3.95 (m, 1H), 3.75-3.71 (m, 6H), 2.48-2.27 (m, 1H), 2.12-1.84 (m, 2H), 1.57 (br d, $J = 14.6$ Hz, 1H)。

化合物 4

LCMS: 色谱条件 10-80AB_7min, 保留时间 4.305 min; MS (ESI) $m/z = 576.3$ $[M+Na]^+$ 。

1H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.37-7.33 (m, 1H), 7.31-7.19 (m, 11H), 7.15-7.08 (m, 2H), 6.78-6.69 (m, 4H), 5.08-4.98 (m, 3H), 4.39-4.05 (m, 2H), 3.71 (m, 6H), 3.54-3.36 (m, 1H), 2.37-1.97 (m, 1H), 1.87-1.65 (m, 2H), 1.14-0.99 (m, 1H)。

化合物 5

将 Pd/C 5% (300 mg, 0.141 mmol) 加入到化合物 **3** (600 mg, 1.030 mmol) 的 EtOAc (10 mL) 溶液中。该反应液在氢气氛围下 (15 psi), 20 °C 反应 2 h。过滤, 浓缩得粗品, 粗品通过碱性制备分离 (色谱柱: Xbridge 150x50mm, 5 μ m; 流动相: A: 0.1% NH₃H₂O+0.005% FA 水溶液 B: MeCN; 梯度: 20% B-95% B in 9 min) 得到化合物 **5** (301 mg, 收率 70%)。

LCMS: 色谱条件 10-80CD_3min, 保留时间 2.444 min; MS (ESI) m/z = 839.5 [2M+H]⁺。

HPLC: 色谱条件 10-80CD_7min, 保留时间 4.100 min。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.49-7.44 (m, 2H), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.32-7.26 (m, 2H), 7.24-7.18 (m, 1H), 6.91-6.82 (m, 4H), 4.22-4.11 (m, 1H), 3.85-3.81 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 2.78-2.68 (m, 1H), 1.90-1.83 (m, 1H), 1.73-1.65 (m, 1H), 1.41-1.33 (m, 1H), 1.29-1.25 (m, 1H)。

化合物 7

化合物 **6** (233 mg, 0.953 mmol)、HATU (272 mg, 0.715 mmol)、DIEA (0.236 mL, 1.430 mmol) 溶于 DCM (10 mL), 加入化合物 **5** (200 mg, 0.477 mmol), 25 °C 反应 1 小时。加 H₂O (20 mL), 用 DCM (20 mL x 3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物通过柱层析色谱法分离 (PE/ EtOAc = 1 / 1 ~ 1 / 2), 得到化合物 **7** (290 mg)。

LCMS: 色谱条件 10-80CD_3min, 保留时间 2.834 min; MS (ESI) m/z = 668.4 [M+Na]⁺。

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.49-7.44 (m, 2H), 7.41-7.30 (m, 6H), 7.25-7.18 (m, 1H), 6.89-6.79 (m, 4H), 4.30-4.07 (m, 2H), 3.87-3.79 (m, 7H), 3.73-3.64 (m, 4H), 2.8-2.80 (m, 7H), 2.32 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.24-2.13 (m, 2H), 2.01-1.89 (m, 1H), 1.80-1.75 (m, 1H), 1.65-1.60 (m, 5H), 1.58 (s, 4H), 1.20-1.10 (m, 1H)。

化合物 8

化合物 **7** (290 mg, 0.404 mmol) 溶于 THF (10 mL) 和 H₂O (5 mL), 加入 LiOH (51 mg, 1.212 mmol), 25 °C 反应 3 小时。TLC (DCM/ MeOH = 10 / 1) 显示约 20% 原料没有反应完成, 补加 LiOH (50 mg), 25 °C 反应 12 小时, TLC (DCM/ MeOH = 10 / 1) 显示原料反应完成。反应液浓缩, 残余物通过反相色谱法分离 (H₂O/ CH₃CN = 5 / 1 ~ 3 / 1), 得到化合物 **8** (217 mg)。

LCMS: 色谱条件 5-95CDN_1.5min, 保留时间 0.879 min; MS (ESI) m/z = 630.3 [M-H]⁺。

HPLC: 色谱条件 10-80CD_7min, 保留时间 2.677 min。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.50-7.44 (m, 2H), 7.38-7.32 (m, 4H), 7.32-7.27 (m, 2H), 7.24-7.19 (m, 1H), 6.91-6.85 (m, 4H), 4.25-4.14 (m, 1H), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.73-3.65 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 4H), 1.97-1.86 (m,

1H), 1.75-1.70 (m, 1H), 1.66-1.53 (m, 4H), 1.51-1.41 (m, 1H), 1.37-1.26 (m, 13H)。

化合物 9

将化合物 **NAG0026**(300 mg, 0.197 mmol)溶解于无水 DMF(4 mL)，加入 3A 分子筛(100 mg)，再依次加入化合物 **8**(137 mg, 0.217 mmol)、HOBt(32 mg, 0.236 mmol)、DCC(53 mg, 0.256 mmol)和 DIEA(0.10 mL, 0.591 mmol)。反应液 40℃反应 16 h。加水淬灭，过滤。滤液浓缩后，经反相柱色谱法纯化(Boston C18 柱，H₂O/MeCN，从 5%到 80%洗脱)，得到化合物 **9**(330 mg)。

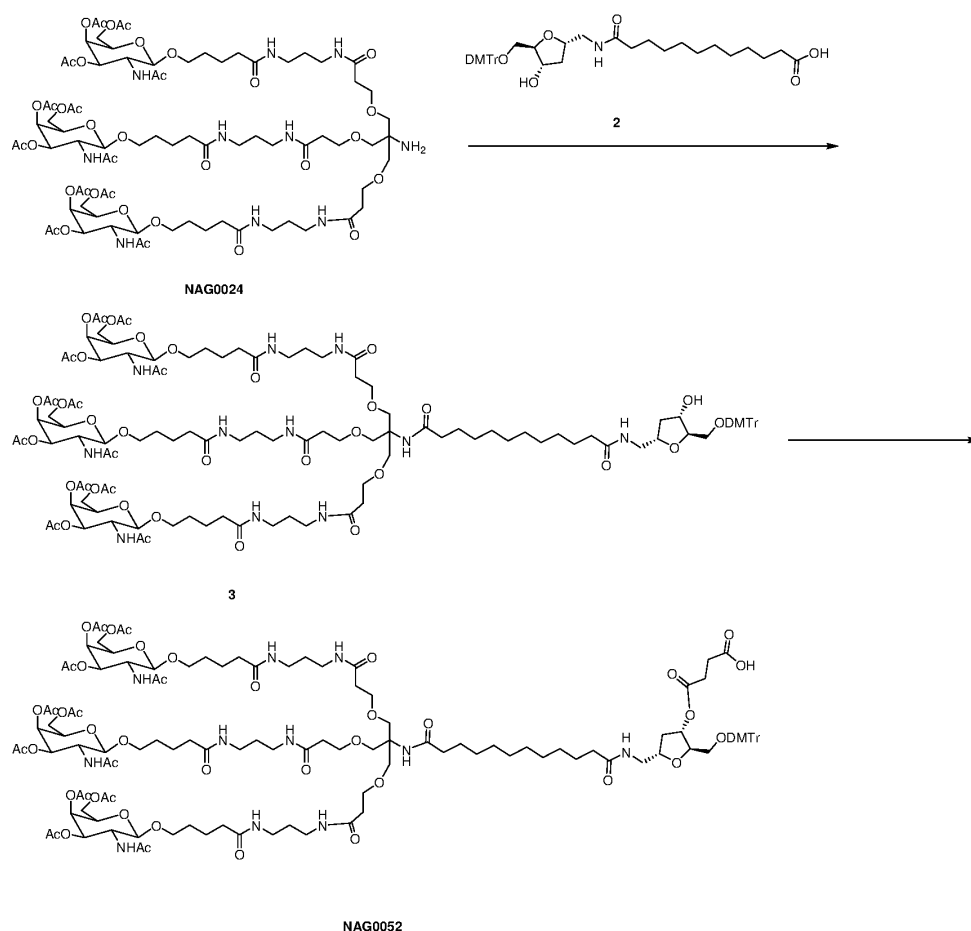
化合物 **NAG0051**

将化合物 **9**(330 mg, 0.154 mmol)溶解于无水吡啶(5 mL)中，依次加入 3A 分子筛(100 mg)、DMAP(94 mg, 0.771 mmol)和丁二酸酐(154 mg, 1.543 mmol)。反应液 50℃搅拌 48 h。LC-MS 显示原料反应约 60%，反应液过滤，浓缩，经反相柱色谱纯化(Boston C18 柱，H₂O/MeCN，从 5%到 70%洗脱)，得到 **NAG0051**(190 mg)。

MS (ESI) $m/z = 2237.3$ [M-1]⁻，理论：2238.0。

¹H NMR (400 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.54-7.16 (m, 14H), 7.01-6.53 (m, 8H), 5.32 (d, $J = 5.1$ Hz, 3H), 5.20-4.89 (m, 4H), 4.65 (q, $J = 7.2$ Hz, 3H), 4.38-3.20 (m, 52H), 2.51-2.44 (m, 4H), 2.36-2.20 (m, 20H), 2.02-1.97 (m, 20H), 1.64-1.20 (m, 22H)。

制备例 8: **NAG0052** 的合成



化合物 3

室温, 氮气氛下, 将化合物 **NAG0024** (271 mg, 0.151 mmol) 溶解于无水 THF (2 mL) 和无水 DMF (4 mL), 加入 3A 分子筛, 再依次加入化合物 **2** (100 mg, 0.151 mmol)、HOBt (25 mg, 0.181 mmol)、DCC (38 mg, 0.181 mmol) 和 DIEA (39 mg, 0.302 mmol)。反应液 45°C 反应 16 h。LC-MS 显示反应完全后, 加水淬灭, 过滤。滤液浓缩后, 经反相柱色谱法纯化 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O), 得到化合物 **3** (210 mg, 产率 57%)。

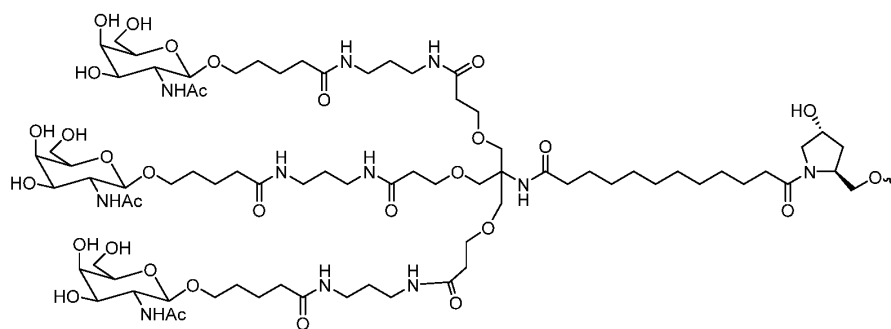
化合物 NAG0052

室温, 化合物 **3** (230 mg, 0.094 mmol) 溶于吡啶 (5 mL), 加入分子筛, 加入 DMAP (12 mg, 0.283 mmol)、丁二酸酐 (28 mg, 0.283 mmol)。氮气氛下, 50°C 搅拌 16 小时。LCMS 检测反应完全, 过滤, 减压浓缩。残余物经反相柱色谱法纯化 (Boston C18 柱, 0-100% MeCN/H₂O) 后, 由制备 HPLC 色谱法 (色谱柱: Xbridge 150x50mm, 5 μm; 流动相: A: 0.1% NH₃H₂O+0.005% FA 水溶液 B: MeCN; 梯度: 20% B-95% B in 9 min) 二次纯化, 得到化合物 **NAG0052** (123 mg, 0.048 mmol, 产率 51%)。

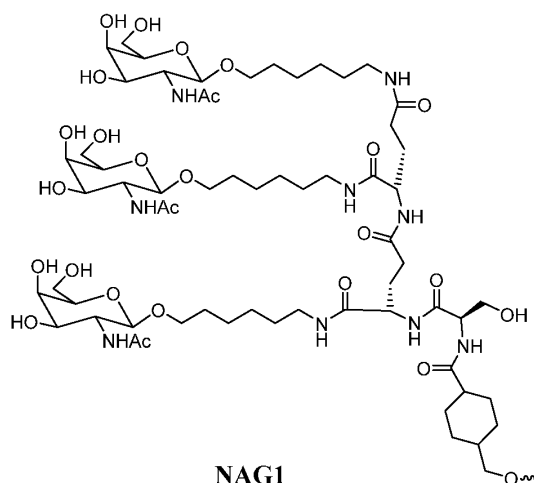
MS (ESI) $m/z = 2535.3$ [M-1]⁻, 理论: 2536.2。

¹H NMR (400 MHz, CH₃CN-*d*₃) δ 7.48-7.43 (m, 2H), 7.37-7.12 (m, 11H), 7.00-6.85 (m, 10H), 6.66 (s, 1H), 5.31 (dd, $J = 3.4, 1.1$ Hz, 3H), 5.20-5.13 (m, 1H), 5.05 (dd, $J = 11.3, 3.4$ Hz, 3H), 4.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 3H), 4.30 (dd, $J = 7.7, 5.3$ Hz, 1H), 4.18-3.93 (m, 14H), 3.79 (s, 10H), 3.65 (q, $J = 4.7, 3.6$ Hz, 13H), 3.56-3.07 (m, 24H), 2.56 (s, 6H), 2.37 (t, $J = 5.8$ Hz, 10H), 2.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 9H), 2.02-1.96 (m, 20H), 1.88 (s, 8H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.60 (dt, $J = 15.0, 7.3$ Hz, 16H), 1.27 (s, 13H)。

制备例 9: L96 和 NAG1 的合成



L96



NAG1

L96 按照专利申请 WO2014025805A1 记载的方法制备获得, NAG1 按照专利申请 WO2021254360A1 记载的方法制备获得, 上述专利申请(全文)通过援引的方式并入本文。

制备例 10: 核酸配体缀合物的合成

1、制备带有载体的树脂

将含有羧酸基团的化合物 **NAG0050** (140 mg, 0.062 mmol)溶于无水 DMF (3 mL), 待底物完全溶解后, 依次加入无水乙腈(4 mL)、DIEA(0.03 mL, 0.154mmol),

2.5 eq)和 HBTU(35 mg, 0.093 mmol, 1.5 eq)。反应液混合均匀后, 再加入大孔胺甲基树脂(476 mg, 空白载量为 0.41 mmol/g, 目标载量为 0.1 mmol/g)。将反应液放入摇床上(温度: 25 °C, 转速: 200 rpm)振摇过夜。反应液过滤, 滤饼依次分别用 DCM、无水乙腈洗涤, 收集固体, 真空干燥过夜。

将上步固体分散于无水乙腈(5 mL), 依次加入吡啶(0.18 mL)、DMAP(3 mg)、NMI(0.12 mL)和 CapB1(2.68 mL)。将反应液放入摇床上(温度: 25 °C, 转速: 200 rpm)振摇 2 h。反应液过滤, 滤饼用无水乙腈洗涤, 收集固体, 真空干燥过夜, 得到带有载体的树脂。载量经过测定为 0.1 mmol/g。

化合物 **NAG0051** 和 **NAG0052** 用相同的反应条件得到带有载体的树脂。

2、对于已经连接在树脂上的 **NAG0050-NAG0052**, 使用该树脂作为起始, 按照核苷酸排布顺序自 3'-5'方向逐一连接核苷单体。每连接一个核苷单体都包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应。

仪器设备型号: Biolytic Dr. Oligo 48 固相合成仪, 逗点生物 Embed™ CPG Frits 通用合成柱 DS0200, 逗点生物 96 孔板脱盐柱 DC189650 (80mg)。

表 1 合成 siRNA 缀合物使用的试剂

试剂名称	试剂组成	规格	用途	厂家
ACT	0.6M ETT 在 ACN 中	4L	催化剂	柯乐马
Cap A	N-甲基咪唑: 乙腈 2:8	4L	盖帽试剂	柯乐马
Cap B1	乙酸酐: 乙腈 40:60	4L		柯乐马
Cap B2	吡啶: 乙腈 60:40	4L		柯乐马
OXD	50 nM 碘的吡啶溶液: 水 90:10	4L	氧化剂	柯乐马
DCA	二氯乙酸的二氯甲烷溶液 (3% v/v)	1kg	脱 DMT 保护试剂	柯乐马
乙腈	水含量小于 20ppm (实际 10ppm 左右)	4L	溶剂	柯乐马
PADS (二硫化二苯乙醚)	将三甲基吡啶和乙腈等体积混合后, 配制 0.05M PADS 溶液		硫化试剂	柯乐马
三甲基吡啶				柯乐马

合成条件如下:

核苷单体以 0.05M 浓度的乙腈溶液提供, 每一步的脱保护反应的条件相同, 即温度为 25°C, 反应时间为 3 分钟, 脱保护试剂为 DCA, 进样体积 180 μL。

每一步偶联反应条件均相同, 包括温度为 25°C, 反应时间为 3 分钟。核苷单体进样体积 90 μL, 催化剂 ACT 进样体积 110 μL。

每一步盖帽条件均相同, 包括温度为 25°C, 反应时间为 2 分钟。盖帽试剂溶液的摩尔比为 1:1 的 CapA 和 CapB (CapB1: CapB2=1:1) 的混合溶液。盖帽试剂进样体积 180 μL。

每一步氧化反应条件均相同, 包括温度为 25°C, 反应时间为 3 分钟, 氧化试剂 OXD 进样体积为 180 μL。

每一步硫化反应条件均相同, 包括温度为 25°C, 反应时间为 4 分钟, 硫化

试剂为 0.05 M PADS 的吡啶乙腈溶液。硫化试剂进样体积 180 μL。

3、待最后一个核苷单体连接完成后，依次对固相载体上连接的核酸序列进行切割、脱保护、纯化、脱盐，随后冻干获得正义链和反义链，其中：

3-1 切割和脱保护条件如下：将合成的连接有载体的核苷酸序列加入氨水：乙醇=3:1 的混合溶液至体积为 0.8 mL。在 50℃反应 15h，过滤除去剩余载体，将上清液真空浓缩至干。

3-2 纯化和脱盐条件如下：利用逗点生物 96 孔板脱盐柱 DC189650 (80mg) 进行脱盐。具体条件包括：

3-2-1 样品的准备

向寡核苷酸样品中加入 0.1M 的 TEAA（三乙胺醋酸盐）至体积为 0.8 mL。

3-2-2 96 孔板的活化

活化：0.8 mL 乙腈通过 96 孔板的每个孔中进行活化。

平衡：用 0.8 mL TEAA（pH 7.0）溶液进行 96 孔板的平衡。

3-2-3 纯化过程依次按照如下操作：

将 0.8 mL 包含寡核苷酸的溶液通过脱盐柱；用 0.8 mL 6.5%氨水洗涤 96 孔板 2 次，去除失败的序列；用 0.8 mL 去离子水冲洗 96 孔板 2 次，去除盐分；用 0.8 mL 3%三氟乙酸冲洗 96 孔板 3 次，去除 DMT，观察到吸附层变橙红色；用 0.8 mL 0.1 M TEAA 冲洗 96 孔板；用 0.8 mL 去离子水冲洗 96 孔板 2 次，去除三氟乙酸和残余的盐分；用 0.6 mL 20%乙腈进行洗脱，并收集冻干。

检测方法如下：使用 Waters Acquity UPLC-SQD2 LCMS（柱：ACQUITY UPLC BEH C18）检测上述正义链和反义链纯度并分析分子量。实测值与理论值相符，表明所合成的是 3’末端缀合了缀合分子的正义链以及反义链。

4、退火操作如下：

将步骤 3 合成的正义链和反义链分别溶于注射用水中，得到 1000 ng/μL 的溶液，在 QPCR 仪（Applied Biosystems QuantStudio 6&7 Pro）上以等摩尔比混合，90℃加热 10 分钟，每降 5℃保持 3 分钟，最后 25℃保持 10 分钟，使它们通过氢键形成双链结构。实测值与理论值相符，说明所合成的 siRNA 缀合物是目标设计的带有缀合分子的双链核酸序列。所述 siRNA 具有表 2 和表 3 中所示的正义链和反义链。

表 2

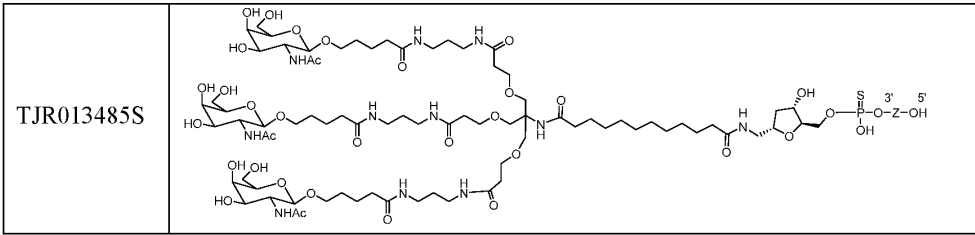
核酸配体缀合物编号	siRNA 缀合物正义链编号	siRNA 缀合物反义链编号
TRD002218	TJR4373-SS	TJR0414-AS
TRD007203	TJR013483S	TJR0414-AS
TRD007204	TJR013484S	TJR0414-AS
TRD007205	TJR013485S	TJR0414-AS

表 3 正义链和反义链的核酸序列

		序列方向 5'-3'
正义链	TJR4373-SS	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am- L96
	TJR013483S	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams- NAG0050'
	TJR013484S	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams- NAG0051'
	TJR013485S	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams- NAG0052'
反义链	TJR0414-AS	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm

以上缀合物的结构如下：

siRNA 缀合物正义链编号	结构
TJR4373-SS	
TJR013483S	
TJR013484S	



其中，缀合物 TRD002218 作为参比阳性化合物。

试验例 1

本实验考察本公开的缀合不同结构的 siRNA 缀合物在体内对靶基因 mRNA 表达量的抑制效率。

将雄性 6-8 周龄 C57BL/6 小鼠随机分组，每组共 6 只，每个时间点各 3 只，分别向每组小鼠给予本公开的缀合物（3 个，TRD007203、TRD007204、TRD007205）、参比阳性核酸配体缀合物 TRD002218 以及 PBS。

所有动物依据体重计算给药量，采用皮下注射方式单次给药，siRNA 缀合物给药剂量（以 siRNA 的量计）为 1 mg/kg，给药体积为 5mL/kg。给药 7 天、28 天后处死小鼠，收集肝脏，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；随后用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用组织 RNA 提取试剂盒（凡知医疗科技，FG0412）根据操作说明书标注的操作步骤提取得到肝组织总 RNA。将总 RNA 反转录成 cDNA 并采用实时荧光定量 PCR 方法检测肝组织中的 TTR mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以甘油醛 3-磷酸脱氢酶（GAPDH）基因作为内参基因，使用针对 TTR 和 GAPDH 的 Taqman 探针引物分别检测 TTR 和 GAPDH 的 mRNA 表达量。

表 4 小鼠体内试验化合物分组信息

化合物编号	剂量	mRNA 定量	动物数目	备注
PBS	-	D7, 28	6	每个时间点各 3 只
TRD002218	1mpk s.c.	D7, 28	6	每个时间点各 3 只
TRD007203	1mpk s.c.	D7, 28	6	每个时间点各 3 只
TRD007204	1mpk s.c.	D7, 28	6	每个时间点各 3 只
TRD007205	1mpk s.c.	D7, 28	6	每个时间点各 3 只

表 5 检测引物的序列

引物名称	正向引物
mTTR-F	GGGAAGACCGCGGAGTCT
mTTR-R	CAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACAAA
mTTR-P	5' 6-FAM-CTGCACGGGCTCACCACAGATGA-3' BHQ1
mGAPDH-F	CGGCAAATTCAACGGCACAG

mGAPDH-R	CCACGACATACTCAGCACCG
mGAPDH-P	5'TET-ACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACT-3'BHQ2

TTR mRNA 表达量按照如下等式计算：

TTR mRNA 表达量= [(测试组 TTR mRNA 表达量/测试组 GAPDH mRNA 表达量)/(对照组 TTR mRNA 表达量/对照组 GAPDH mRNA 表达量)]x 100%。

给药 7 天、28 天后，本公开的缀合不同结构的 siRNA 缀合物在体内对靶基因 mRNA 表达量的抑制效率分别见图 1 和图 2。由图 1 的结果可知，NAG0050 的缀合物 TRD007203 和 NAG0052 的 TRD007205 在给药后 7 天对于 TTR mRNA 的表达抑制均具有良好的效果，其中，NAG0050 的 TRD007203 明显优于 L96 的缀合物 TRD002218,说明其能够介导更高效的 siRNA 递送效率。由图 2 可知，给药 28 天后，NAG0050 的缀合物 TRD007203、NAG0051 的缀合物 TRD007204 和 NAG0052 的缀合物 TRD007205 对靶基因 mRNA 表达量的抑制作用均优于 L96 的缀合物 TRD002218，其中，NAG0050 的缀合物 TRD007203 优势最为明显。

制备例 11：核酸配体缀合物的合成

参考制备例 10 的步骤合成以下 siRNA 缀合物，所述 siRNA 具有表 6 和 7 中所所示的正义链和反义链。

表 6 核酸化合物列表

基因	siRNA 缀合物 编号	siRNA 缀合物正义链编号	siRNA 缀合物反义链编号
FXI	TRD008002	TJR014937S	TJR013318A
	TRD008003	TJR014938S	TJR013314A
ANGPT L3	TRD008004	TJR014939S	TJR013287A
	TRD008005	TJR014940S	TJR013288A
	TRD008006	TJR014941S	TJR013289A
MARC1	TRD008024	TJR014963S	TJR014959A
	TRD008025	TJR014964S	TJR014960A
	TRD008026	TJR014965S	TJR014961A
	TRD008027	TJR014966S	TJR014962A
	TRD6233	TJR12296-SS	TJR12338-AS
	TRD6238	TJR12301-SS	TJR12343-AS
	TRD6253	TJR12316-SS	TJR12358-AS

其中，缀合物 TRD6233、TRD6238、TRD6253 作为参比阳性化合物。

表 7 正义链和反义链的核酸序列

	编号	序列方向 5'-3'
正义链	TJR014937S	CmsUmsUm GmCfAm AfCfAf AmAmGm AmCmAm UmUmUm Am-NAG0052'
	TJR014938S	UmsCmsAm GmGfAm UfGfAf UmUmUm UmCmUm UmAmUm Um-NAG0052'

	TJR014939S	GmsAmsAm GmAfGm CfAfAf CmUmAm AmCmUm AmAmCm Um-NAG0052'
	TJR014940S	AmsGmsGm UmAfAm AfGfAf AmUmAm UmGmUm CmAmCm Um-NAG0052'
	TJR014941S	AmsGmsUm GmAfAm GfCfAf AmUmCm UmAmAm UmUmAm Um-NAG0052'
	TJR014963S	GmsUmsAm UmGfUm CfCfUf GmGmAm AmUmAm UmUmAm Am-NAG0052'
	TJR014964S	AmsCmsAm AmGfAm CfAfGf GmAmUm UmCmUm GmAmAm Am-NAG0052'
	TJR014965S	CmsUmsCm UmAfAm GfAfUf CmUmGm AmUmGm AmAmGm Um-NAG0052'
	TJR014966S	AmsGmsUm UmGfAm CfUfAf AmAmCm UmUmGm AmAmAm Am-NAG0052'
	TJR12296-SS	GmsUmsAm UmGfUm CfCfUf GmGmAm AmUmAm UmUmAm Am-NAG1
	TJR12301-SS	AmsCmsAm AmGfAm CfAfGf GmAmUm UmCmUm GmAmAm Am-NAG1
	TJR12316-SS	CmsUmsCm UmAfAm GfAfUf CmUmGm AmUmGm AmAmGm Um-NAG1
反义链	TJR013318A	UmsAfsAm AfUmGf U(036)CmUm UfUmGf UmUfGm CfAmAf GmsCmsGm
	TJR013314A	UmsAfsUm AfAmGf A(036)AmAm AfUmCf AmUfCm CfUmGf AmsAmsAm
	TJR013287A	AmsGfsUm UfAmGf U(036)UmAm GfUmUf GmCfUm CfUmUf CmsUmsAm
	TJR013288A	AmsGfsUm GfAmCf A(036)UmAm UfUmCf UmUfUm AfCmCf UmsCmsUm
	TJR013289A	AmsUfsAm AfUmUf A(036)GmAm UfUmGf CmUfUm CfAmCf UmsAmsUm
	TJR014959A	UmsUfsAm AfUmAf U(036)UmCm CfAmGf GmAfCm AfUmAf CmsGmsGm
	TJR014960A	UmsUfsUm CfAmGf A(036)AmUm CfCmUf GmUfCm UfUmGf UmsCmsAm
	TJR014961A	AmsCfsUm UfCmAf U(036)CmAm GfAmUf CmUfUm AfGmAf GmsUmsUm
	TJR014962A	UmsUfsUm UfCmAf A(036)GmUm UfUmAf GmUfCm AfAmCf UmsUmsCm
	TJR12338-AS	UmsUfsAm AfUmAf U(036)UmCf CmAmGf GmAfCm AfUmAf CmsGmsGm
	TJR12343-AS	UmsUfsUm CfAmGf A(036)AmUf CmCmUf GmUfCm UfUmGf UmsCmsAm
	TJR12358-AS	AmsCfsUm UfCmAf U(036)CmAf GmAmUf CmUfUm AfGmAf GmsUmsUm

其中, 036 代表 WO2022028462A1 中公开的(-)hmpNA(A)修饰(碱基随序列

改变)。

试验例 2 siRNA 序列 psiCHECK 11 浓度点在靶活性

在 HEK293A 细胞（南京科佰）中采用 11 个浓度梯度对表 6 中的 siRNA 序列进行体外分子水平模拟在靶活性筛选。

以人 FXI、ANGPTL3、MARC1 基因构建 siRNA 对应的在靶序列，插入到 psiCHECK-2 质粒中（生工生物工程股份有限公司）。该质粒包含海肾荧光素酶基因及萤火虫荧光素酶基因。作为双报告基因系统，siRNA 的靶序列插入到海肾荧光素酶基因的 3' UTR 区域，siRNA 对于靶标序列的活性可以通过经萤火虫荧光素酶校准后的海肾荧光素酶表达情况的检测来反映，检测使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）。

HEK293A 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，在 37℃，5% CO₂ 条件下培养。转染前 24 h，将 HEK293A 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 8×10³ 个细胞，每孔 100 μL 培养基。

使用 Lipofectamine2000（ThermoFisher，11668019）对细胞共转染 siRNA 及对应质粒，每孔使用 0.2 μL Lipofectamine2000 和 20 ng 质粒。对于在靶序列质粒，siRNA 共设置 11 个浓度点，最高浓度点终浓度为 20nM，3 倍梯度稀释。转染后 24h，采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）检测在靶水平。数据使用 GraphPad Prism5 进行分析，结果如表 8 所示。

表 8 siRNA 序列 psi-CHECK 在靶活性筛选结果

siRNA 缀合物 编号	不同 siRNA 浓度下靶基因 mRNA（GSCM）表达剩余百分比（平均值）					
	20 nM	6.6667 nM	2.2222 nM	0.7407 nM	0.2469 nM	0.0823 nM
TRD008002	6.4%	5.9%	6.5%	7.8%	9.7%	15.0%
TRD008003	3.9%	3.4%	3.8%	4.1%	5.1%	9.2%
TRD008004	5.4%	4.9%	4.0%	5.6%	6.8%	17.5%
TRD008005	5.5%	3.7%	3.7%	5.0%	5.5%	12.7%
TRD008006	4.2%	3.1%	3.3%	3.8%	5.7%	10.6%
TRD008024	26.91%	20.16%	18.02%	16.21%	17.50%	25.18%
TRD008025	24.41%	21.09%	22.07%	18.86%	20.28%	29.57%
TRD008026	10.66%	10.26%	9.51%	11.47%	15.20%	24.28%
TRD008027	20.33%	15.44%	15.61%	14.39%	15.31%	27.01%
siRNA 缀合物 编号	不同 siRNA 浓度下靶基因 mRNA（GSCM）表达剩余百分比（平均值）					GSCM IC ₅₀ 值 (nM)
	0.0274 nM	0.0091 nM	0.0030 nM	0.0010 nM	0.0003 nM	
TRD008002	34.7%	74.2%	93.6%	98.7%	93.7%	0.0179
TRD008003	20.2%	54.0%	77.3%	96.3%	88.0%	0.0099
TRD008004	38.0%	73.3%	97.3%	102.2%	84.5%	0.0196
TRD008005	33.6%	69.4%	112.9%	124.6%	103.1%	0.0157

TRD008006	23.5%	51.2%	75.9%	89.2%	88.7%	0.0093
TRD008024	44.20%	71.85%	99.14%	95.71%	100.03%	0.0204
TRD008025	48.80%	88.00%	100.83%	98.83%	100.45%	0.0267
TRD008026	49.72%	99.29%	103.55%	104.57%	100.83%	0.0288
TRD008027	47.05%	81.86%	114.93%	122.14%	100.28%	0.0238

结果表明，本公开的配体 NAG0052 缀合不同结构序列的 siRNA 在细胞上均能有效地抑制靶基因 mRNA 的表达。

试验例 3 siRNA 对人原代肝细胞 (PHH) 中人 FXI、ANGPTL3、MACR1 的抑制

在人原代肝细胞 (PHH, Novabiosis) 中采用 5 个或 7 个浓度梯度对表 6 中 siRNA 进行人原代肝细胞 (PHH) 活性筛选。

人原代肝细胞 (PHH) 冻存于液氮中，转染前 24 h，将人原代肝细胞 (PHH) 复苏后接种于 96 孔板，接种密度为每孔 3×10^4 个细胞，每孔 80 μ L 培养基。使用 Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150) 转染 siRNA。7 个浓度点实验的 siRNA 转染梯度终浓度为 10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0.016 nM、0.0032 nM 和 0.00064 nM。5 个浓度点实验 siRNA 转染梯度终浓度为 5nM、0.625nM、0.0781nM、0.00977nM 和 0.00122nM。在处理 24 小时后，使用高通量细胞 RNA 提取试剂盒 (凡知, FG0417) 进行细胞总 RNA 提取，使用 RNA 逆转录试剂盒 (Takara, 6210A) 逆转录，和使用 Taqman 探针 Q-PCR 试剂盒 (ThermoFisher, 4444964) 测定人 FXI、ANGPTL3、MACR1 的 mRNA 水平。根据 GAPDH 内参基因水平对人 FXI、ANGPTL3、MACR1 的 mRNA 水平进行校正。Taqman 探针引物信息见表 9。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，结果以相对于经过对照 siRNA 处理的细胞的人 FXI、ANGPTL3、MACR1 mRNA 表达剩余百分比来表示，抑制率的 IC₅₀ 结果见表 10 和表 11。

$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ 实验组目的基因} - Ct \text{ 实验组内参}) - (Ct \text{ 对照组目的基因} - Ct \text{ 对照组内参})]$ 。

抑制率 (%) = (1-目的基因表达剩余量) $\times$ 100%。

表 9 Taqman 引物信息表

引物名称	引物序列
hFXI-PF	TTTGCTGGGAGAGGGTGTG
hFXI-PR	TACAAACACCAAGCCCCTTCA
hFXI-P	CCAGCATGCTTCCTCCACAGTAACACG
hANG3-PF1-MGB	TTACTGGCAATGTCCCAATG
hANG3-PR1-MGB	TGAAGTGTCTTTTGTCTTGTGA
hANG3-P1-MGB	ACAAAGATTTGGTGTTC
hMARC1-PF	GCTCAGGAGGATGGTTGTGTAGT
hMARC1-PR	GAAGGAGCACTCCGTCATTAGC

hMARC1-P	CCCTGGATCCTTGCCATTCCCCTC
hGAPDH-PF1-MGB	GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC
hGAPDH-PR1-MGB	TTGACGGTGCCATGGAATTT
hGAPDH-P1-MGB	TTACATGTTCCAATATGATTCC

表 10 siRNA 在 PHH 细胞中多剂量抑制活性

siRNA 缀合物编号	不同 siRNA 浓度下靶基因 mRNA (PHH) 表达剩余百分比 (平均值)							IC ₅₀ 值 (nM)
	10nM	2nM	0.4nM	0.08nM	0.016nM	0.0032nM	0.00064nM	
TRD008002	16.61%	23.16%	34.70%	38.35%	52.77%	91.37%	105.17%	0.0295
TRD008003	19.15%	25.65%	39.67%	42.81%	55.62%	80.31%	91.47%	0.0465
TRD008004	4.27%	6.24%	7.34%	15.42%	41.23%	68.30%	81.65%	0.0098
TRD008005	5.85%	5.66%	8.71%	24.52%	47.34%	88.18%	84.60%	0.0176
TRD008006	6.52%	5.99%	8.44%	10.76%	33.06%	58.39%	63.74%	0.0066
TRD008024	12.72%	8.30%	8.86%	9.68%	19.98%	36.58%	65.77%	0.0015
TRD008025	9.63%	9.62%	9.93%	20.08%	28.44%	38.41%	55.92%	0.0011
TRD008026	7.44%	9.15%	10.37%	15.59%	33.72%	53.33%	68.26%	0.0044

表 11 siRNA 在 PHH 细胞中多剂量抑制活性

siRNA 缀合物编号	不同 siRNA 浓度下 MARC1 mRNA (PHH) 表达剩余百分比 (平均值)					IC ₅₀ 值 (nM)
	5nM	0.63nM	0.078nM	0.0098nM	0.0012nM	
TRD6233	5.70%	6.45%	ND	44.32%	76.77%	0.0074
TRD6238	6.46%	12.07%	29.28%	63.63%	118.05%	0.0186
TRD6253	7.90%	12.13%	33.85%	56.02%	65.52%	0.0206

结果表明, 本公开的配体 NAG0052 缀合不同结构序列的 siRNA 在人原代肝细胞上均能有效地抑制靶基因 mRNA 的表达。缀合 NAG0052 的缀合物 TRD008024、TRD008025、TRD008026 在 PHH 细胞上体现出比缀合 NAG1 的缀合物 TRD6233、TRD6238、TRD6253 更优的抑制活性。

试验例 4 siRNA 对食蟹猴原代肝细胞 (PCH) 中 FXI 的抑制-7 个浓度点抑制活性

在猴原代肝细胞 (PCH, 妙顺生物) 中采用 7 个浓度梯度对表 6 中 FXI 的 2 条 siRNA 进行反向转染活性筛选。各个 siRNA 样品转染起始终浓度为 10 nM, 5 倍梯度稀释和 7 个浓度点。

猴原代肝细胞 (PCH) 冻存于液氮中, 转染前将猴原代肝细胞 (PCH) 复苏后接种于 96 孔板, 接种密度为每孔 3×10^4 个细胞, 每孔 90 μ L 培养基。使用 Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150) 转染 siRNA, siRNA 转染的梯度终浓度为 10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0.016 nM、0.0032 nM 和 0.00064 nM。在处理 24 小时后, 使用高通量细胞 RNA 提取试剂盒 (凡知, FG0417) 进行细胞总 RNA 提取, 使用 RNA 逆转录试剂盒 (Takara, 6210A) 逆转录, 和

使用 Taqman 探针 Q-PCR 试剂盒(ThermoFisher ,4444964)测定猴 FXI 的 mRNA 水平。根据 GAPDH 内参基因水平对猴 FXI 的 mRNA 水平进行校正。Taqman 探针引物信息见表 12。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,结果以相对于经过对照 siRNA 处理的细胞的猴 FXI mRNA 表达剩余百分比来表示,抑制率的 IC₅₀ 结果见表 13。

$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ 实验组目的基因}-Ct \text{ 实验组内参}) - (Ct \text{ 对照组目的基因}-Ct \text{ 对照组内参})]$ 。

抑制率 (%) = (1-目的基因表达剩余量) × 100%。

表 12 猴 Taqman 探针引物信息表

引物名称	引物序列
mkFXI-VI-PF1	CTGGATATTGTTGCTGTGAAAGGT
mkFXI-VI-PR1	CCTTCGTTGCAAGATGCTTGA
mkFXI-VI-P1	CTGTGCACCAATGCCGTCCGC
mkGAPDH-PF1-MGB	AGTCAGCCGCATTTTCTCTTG
mkGAPDH-PR1-MGB	AAATCCGTTGACTCCGACCTT
mkGAPDH-P1-MGB	ATCGCCAGCGCATC

表 13 siRNA 在 PCH 中多剂量抑制活性

siRNA 缀合物编号	不同 siRNA 浓度下靶基因 mRNA (HCH) 表达剩余百分比 (平均值)							IC ₅₀ 值 (nM)
	10nM	2nM	0.4nM	0.08nM	0.016nM	0.0032nM	0.00064nM	
TRD008002	11.69%	29.29%	48.51%	49.83%	42.10%	47.34%	76.09%	0.0398
TRD008003	6.83%	9.29%	51.01%	33.91%	55.43%	65.33%	71.83%	0.0369

结果表明,缀合 NAG0052 的 TRD008002、TRD008003 缀合物在 PCH 细胞针对 FXI 有很好的抑制活性。

试验例 5 siRNA 对 Huh7 细胞中人 ANGPTL3 的抑制-7 个浓度点抑制活性

在 Huh7 细胞 (南京科佰) 中采用 7 个浓度梯度对表 6 中 siRNA 进行 Huh7 细胞活性筛选。各个 siRNA 样品转染起始终浓度为 10 nM, 5 倍梯度稀释, 7 个浓度点。

Huh7 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。转染前 24 h,将 Huh7 细胞接种于 96 孔板,接种密度为每孔 1 万个细胞,每孔 100 μL 培养基。使用 Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150) 转染 siRNA, siRNA 转染的终浓度为 10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0.016 nM、0.0032 nM 和 0.00064 nM。在处理 24 小时后,使用高通量细胞 RNA 提取试剂盒 (凡知, FG0417) 进行细胞总 RNA 提取,使用 RNA 逆转录试剂盒 (Takara , 6210A) 逆转录,和使用 Taqman 探针 Q-PCR 试剂盒(ThermoFisher , 4444964) 测定人 ANGPTL3 的 mRNA 水平。根据 GAPDH 内参基因水平对人 ANGPTL3 的 mRNA 水平进行校正。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,结果以相对于经过

对照 siRNA 处理的细胞的人 ANGPTL3 mRNA 表达剩余百分比来表示。抑制率的 IC₅₀ 结果见表 14。

$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ 实验组目的基因}-Ct \text{ 实验组内参}) - (Ct \text{ 对照组目的基因}-Ct \text{ 对照组内参})]$ 。

抑制率 (%) = (1-目的基因表达剩余量) ×100%。

表 14 siRNA 在 Huh7 中对人 ANGPTL3 多剂量抑制活性

siRNA 缀合物编号	不同 siRNA 浓度下靶基因 mRNA (Huh7) 表达剩余百分比 (平均值)							IC ₅₀ 值 (nM)
	10nM	2nM	0.4nM	0.08nM	0.016nM	0.0032nM	0.00064nM	
TRD008004	20.41%	29.83%	38.24%	66.52%	91.40%	100.41%	102.12%	0.1995
TRD008005	18.80%	25.78%	28.90%	57.12%	77.19%	93.56%	95.33%	0.1047
TRD008006	19.14%	30.21%	37.88%	61.27%	83.49%	98.09%	99.08%	0.1738

结果表明，在 Huh7 细胞中，缀合 NAG0052 的 TRD008004、TR008005、TRD008006 缀合物对 ANGPTL3 表现出有效的抑制活性。

制备例 12：核酸配体缀合物的合成

参考制备例 10 的步骤合成以下 siRNA 缀合物用于试验例 6 和 7, 所述 siRNA 具有表 15 所示的正义链和反义链。

表 15

siRNA 缀合物编号	SS 链 (5'-3')	AS 链 (5'-3')
S-1	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am -NAG1	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm
S-L96	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am -L96	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm

试验例 6 氨基半乳糖分子簇缀合的 siRNA 在肝原代细胞中对 mRNA 表达的抑制

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

原代肝细胞分离后, 按照 10 万每孔接种于 24 孔板中, 按照终浓度为 50nM、10nM、2nM、0.4nM、0.08nM、0.016nM、0.0032nM、0.00064nM 分别加入待测 siRNA 化合物。随后, 将原代肝细胞置于 37℃, 5% CO₂ 的环境中培养 24 小时。24h 后, 采用 qPCR 方法检测 mTTR 的 mRNA 表达水平。

图 3 显示了不同浓度的 siRNA 缀合物 S-1 (NAG1 缀合) 和 S-L96 (L96 缀合) 对 mRNA 的抑制率。如图 3 所示, S-1 表现了优秀的 mTTR 基因表达抑制

效率。与对照组 S-L96 的 IC_{50} 值 0.280nM 相比, S-1 的 IC_{50} 值为 0.131nM, 表明 NAG1 缀合的 siRNA 体外被原代肝细胞自由摄取的效率优于对照组, 缀合 NAG1 能更高效介导 siRNA 进入原代肝细胞。由于在试验例 3 中, NAG0052 缀合的 siRNA 显示出比 NAG1 缀合的 siRNA 更强的抑制靶基因表达的活性, 综合数据表明 NAG0052 缀合物具有比 L96 缀合物更优的抑制活性。

试验例 7 氨基半乳糖分子簇缀合的 siRNA 在体内对 mRNA 表达的抑制

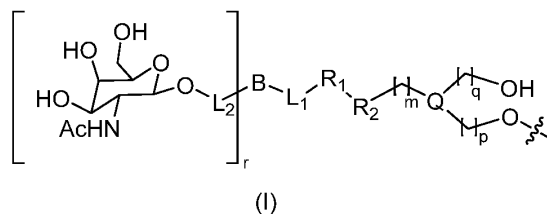
使用 8 周龄的 C57BL/6 小鼠 (昭衍生物, SPF 级, 雌性), 采用上述的氨基半乳糖分子簇缀合的 siRNA 经皮下注射递送。在第 1 天, 在小鼠肩颈部的松弛皮肤上, 给予 100 μ l 溶液的皮下注射, 其含有 PBS (称为 Mock 组, 即空白对照组) 或 PBS 配制的 1mg/kg(mpk)、0.2mpk 剂量的对应的氨基半乳糖分子簇缀合的 siRNA (S-L96 或 S-1)。各个组别注射 6 只小鼠。

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

图 4 显示了分别给药不同剂量的 S-1 和 S-L96 后, 小鼠肝组织中 mRNA 的表达水平。如图 4 所示, S-1 表现了优异的 mTTR 基因表达抑制效率。S-1 在 1mpk 及 0.2mpk 的活性水平优于对照组 S-L96。由于在试验例 3 中, NAG0052 缀合的 siRNA 显示出比 NAG1 缀合的 siRNA 更强的抑制靶基因表达的活性, 综合数据表明 NAG0052 缀合物具有比 L96 缀合物更优的抑制活性。

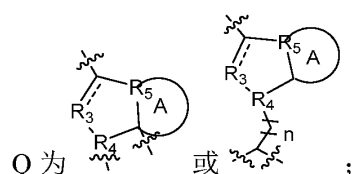
权利要求书:

1. 一种具有如式 (I) 所示结构的配体,



其中, L_1 为 C_1 - C_{30} 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 $C=O$ 间断的 C_1 - C_{30} 烷基链;

R_1 和 R_2 独立地为化学键、 $-NR_6-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$;



为单键或双键, 且当 为单键时, R_3 独立地为 CR_7R_8 、 NR_6 、O 或 S, 当 为双键时, R_3 独立地为 CR_9 或 N;

R_4 独立地为 CR_9 或 N;

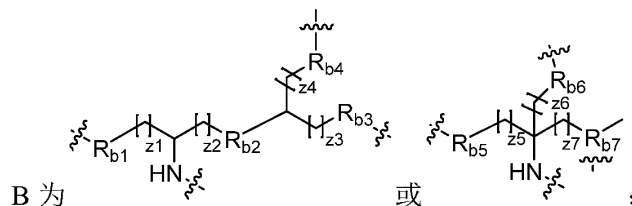
环 A 不存在, 或为环烷基、杂环基、芳基或杂芳基, 且当环 A 存在时, R_5 独立地为 CR_9 或 N, 当环 A 不存在时, R_5 独立地为 CR_7R_8 、 NR_6 或 O;

R_6 和 R_9 独立地为氢、氘、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$, 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 环烷基、3-12 元杂环基、5-12 元芳基、5-12 元杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基团所取代;

R_7 和 R_8 独立地为氢、氘、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$, 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 环烷基、3-12 元杂环基、5-12 元芳基、5-12 元杂芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基团所取代;

R' 和 R'' 独立地为氢、氘、羟基、烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基, 所述烷基、烷氧基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氧代、硝基和氰基中的取代基所取代;

m 、 n 、 p 和 q 独立地为 0、1、2、3 或 4;



R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 、 R_{b4} 、 R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 独立地为 $-C(=O)-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 或 $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ；

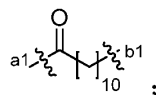
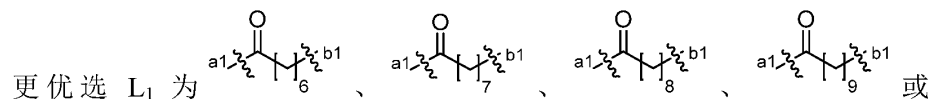
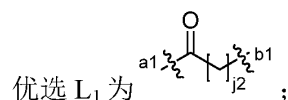
$z1$ 、 $z2$ 、 $z3$ 、 $z4$ 、 $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 独立地为 0-10 的整数；

L_2 为 C_1 - C_{30} 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 $C=O$ 间断的 C_1 - C_{30} 烷基链；

r 为 1-10 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的配体，其中， L_1 为 L_3 或 $L_3-R_{10}-R_{11}-L_3$ ，其中， L_3 独立地为 C_1 - C_{12} 烷基链、 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ 或 $-(CH_2)_{j3}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j4}-$ ； R_{10} 和 R_{11} 独立地为化学键、 $-NR_{12}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ； R_{12} 为氢或 C_1 - C_{12} 烷基； $j1$ 、 $j2$ 、 $j3$ 和 $j4$ 独立地为 0-10 的整数，优选 0-2 或 4-10 的整数，更优选 0、1、2、6、7、8、9 或 10。

3. 根据权利要求 2 所述的配体，其中， L_1 为 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ ，



其中， $a1$ 端与 B 相连， $b1$ 端与 R_1 相连。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的配体，其中， R_1 和 R_2 为以下任一组合，

组合 1: R_1 为化学键且 R_2 为 $C=O$ ；

组合 2: R_1 为化学键且 R_2 为 NR_6 ；

组合 3: R_1 为化学键且 R_2 为 $-OC(=O)-$ ；

组合 4: R_1 为 NR_6 且 R_2 为 $C=O$ ；

组合 5: R_1 为 NR_6 且 R_2 为 $-OC(=O)-$ ；

组合 6: R_2 为 NR_6 且 R_1 为 $C=O$ ；

组合 7: R_2 为 NR_6 且 R_1 为 $-OC(=O)-$ 。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的配体, 其中, R_6 为氢或 C_{1-6} 烷基, 优选氢、苄基、甲基、乙基、丙基或异丙基, 更优选氢;

和/或, R_7 和 R_8 为氢;

和/或, R_9 为氢。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的配体, 其中, m 为 0 或 1。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的配体, 其中, p 和 q 可为以下任一组合,

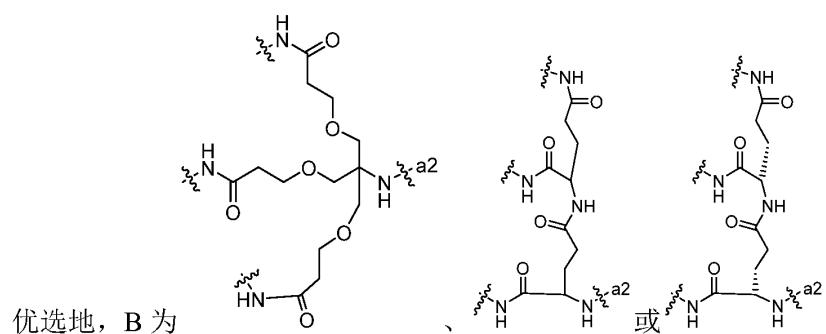
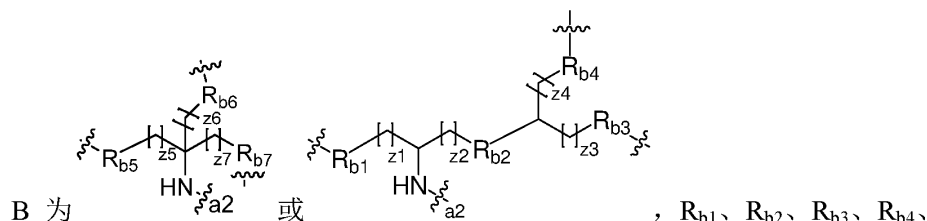
组合 1: $p=1$ 且 $q=1$;

组合 2: $p=1$ 且 $q=0$;

组合 3: $p=0$ 且 $q=1$;

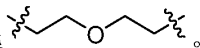
组合 4: $p=0$ 且 $q=0$ 。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的配体, 其中,

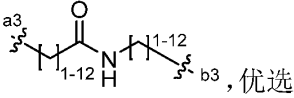
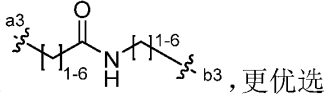
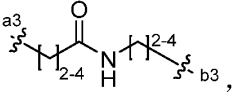
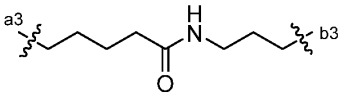


9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的配体, 其中,

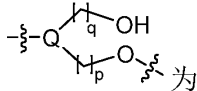
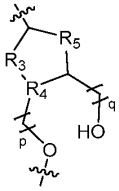
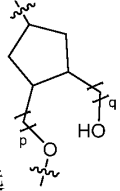
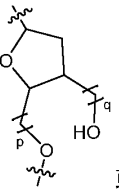
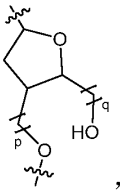
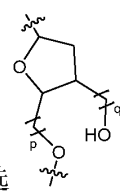
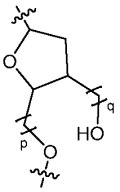
L_2 为 L_4 或 $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$, 其中, L_4 独立地为 C_1-C_{12} 烷基链或 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$, R_{13} 和 R_{14} 独立地为化学键、 $-NR_{15}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$, R_{15} 独立地为氢或 C_1-C_{12} 烷基, j_5 和 j_6 独立地为 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, 更优选 0、1、2、3 或 4。

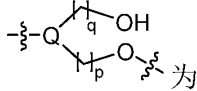
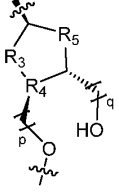
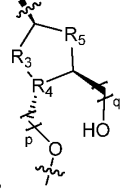
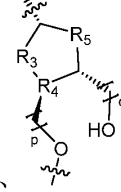
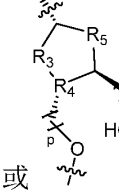
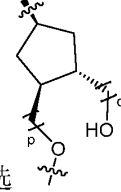
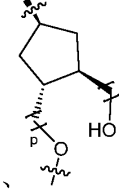
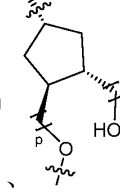
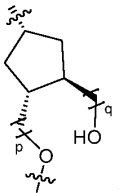
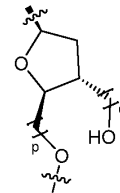
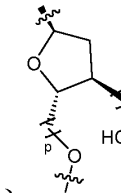
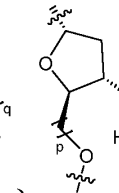
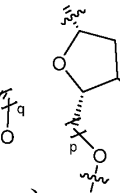
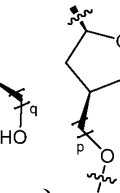
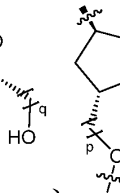
10. 根据权利要求 9 所述的配体, 其中, L_2 为 $-(CH_2)_j5-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_j6-$,
 优选 .

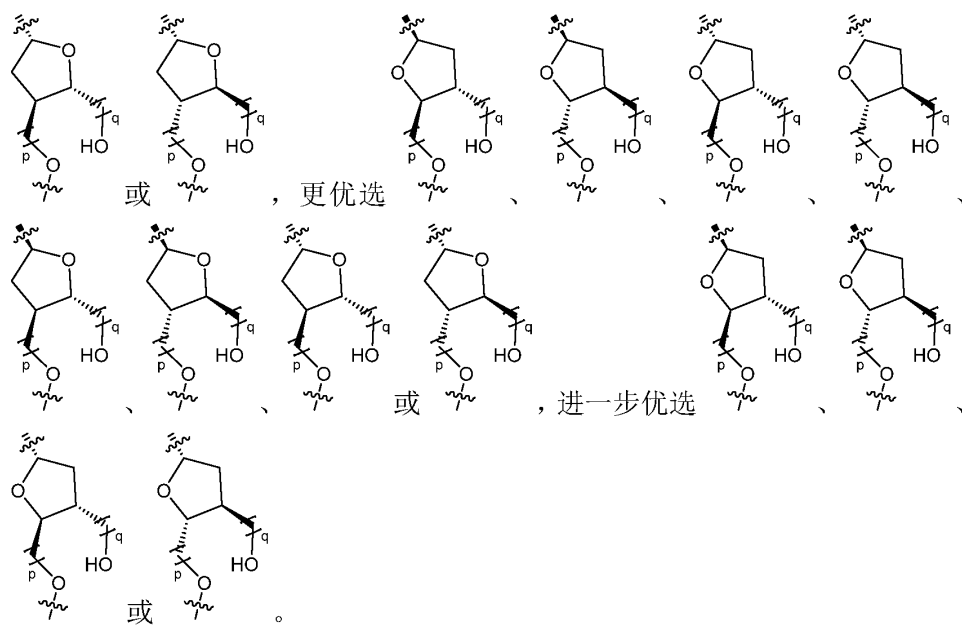
11. 根据权利要求 9 所述的配体, 其中,

L_2 为 , 优选 , 更优选 ,
 进一步优选 , 其中, a_3 端与 O 相连, b_3 端与 B 相连。

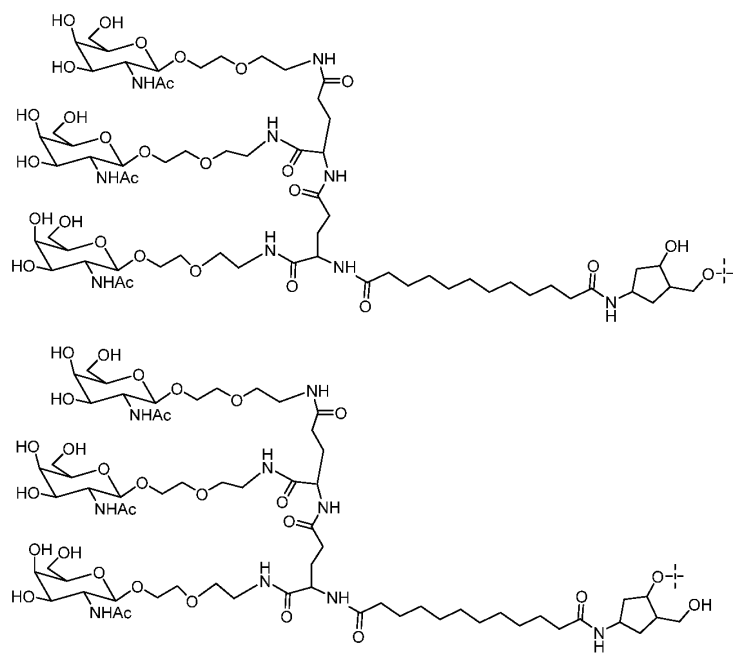
12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的配体, 其中, r 为 3。

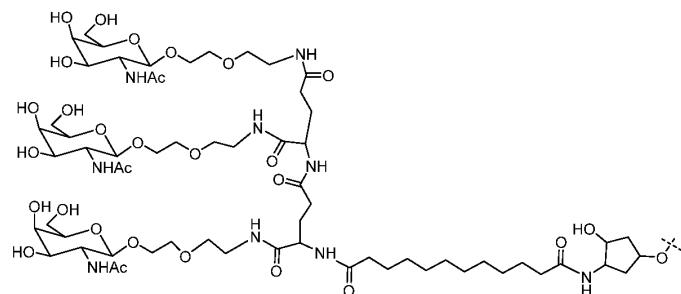
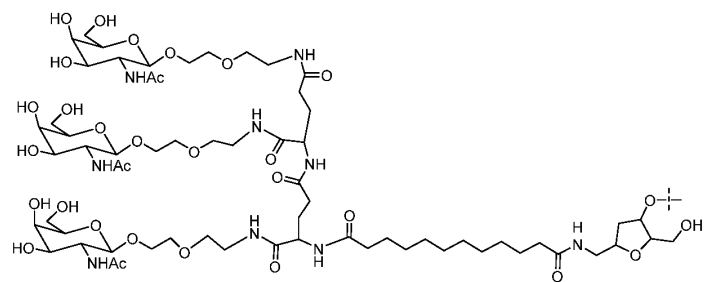
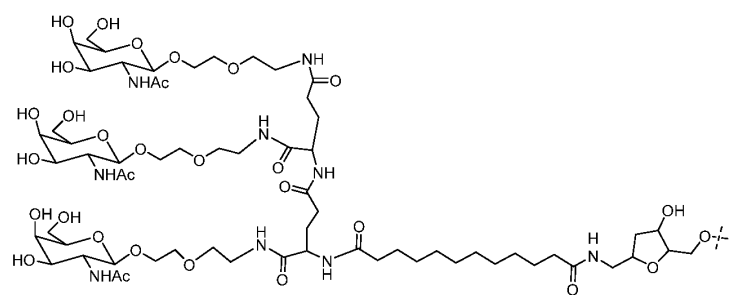
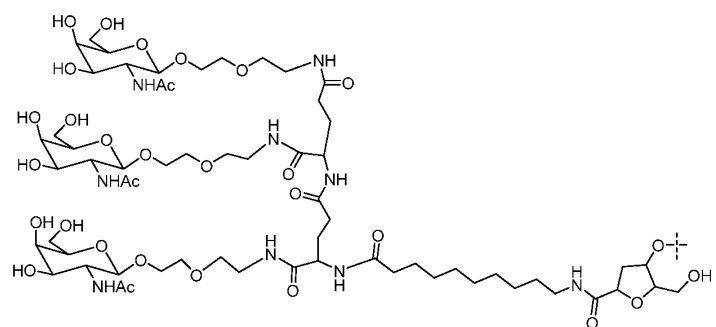
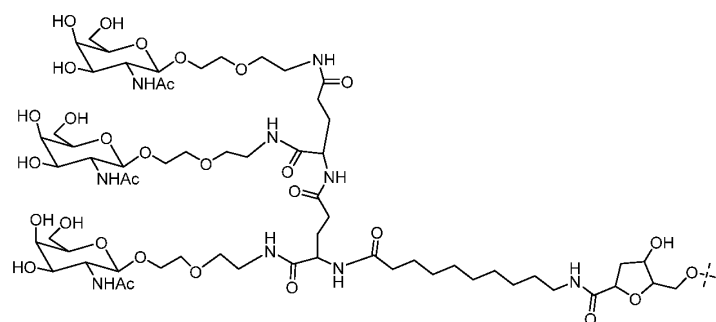
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的配体, 其中,  为
, 优选 , 或 , 更优选 , 或 ,
 进一步优选 .

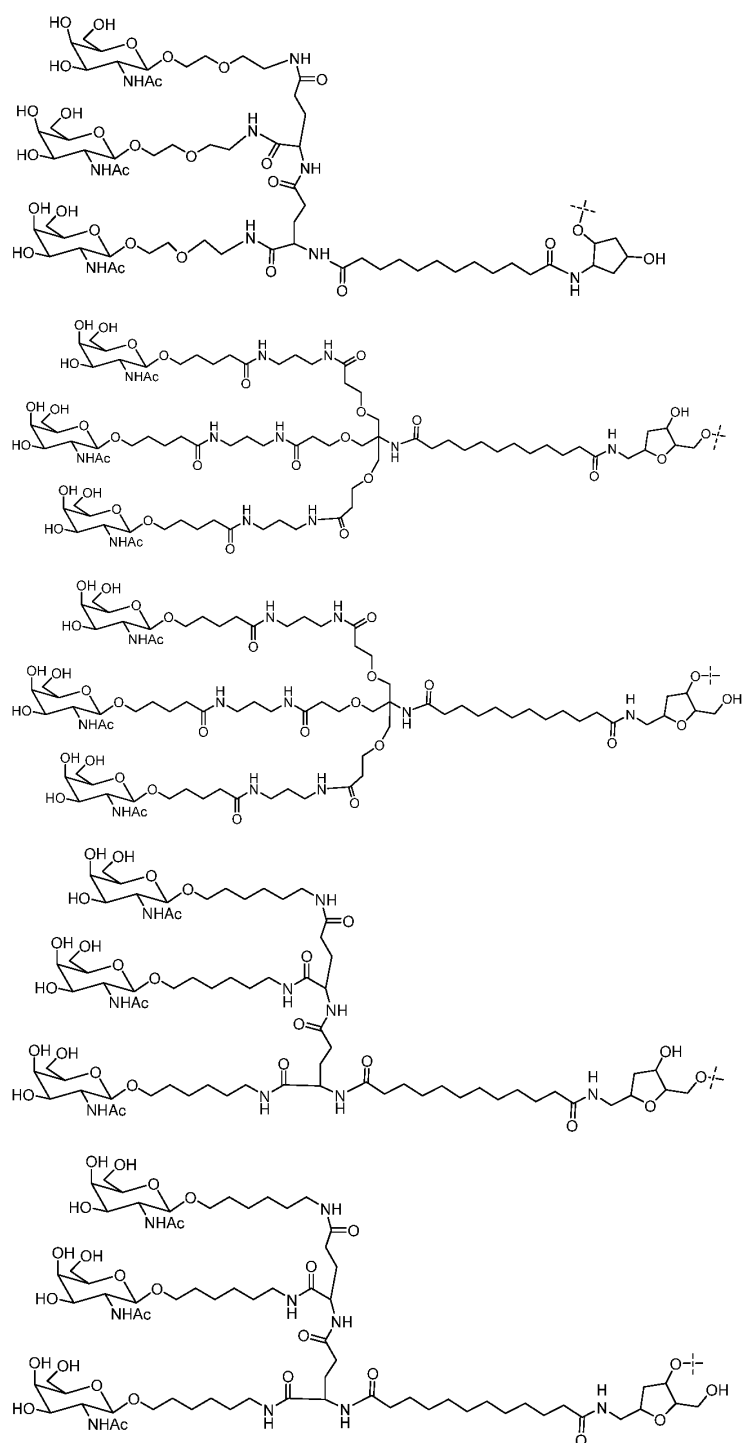
14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的配体, 其中,  为
, , , 或 , 优选 , , ,
, , , , , , .

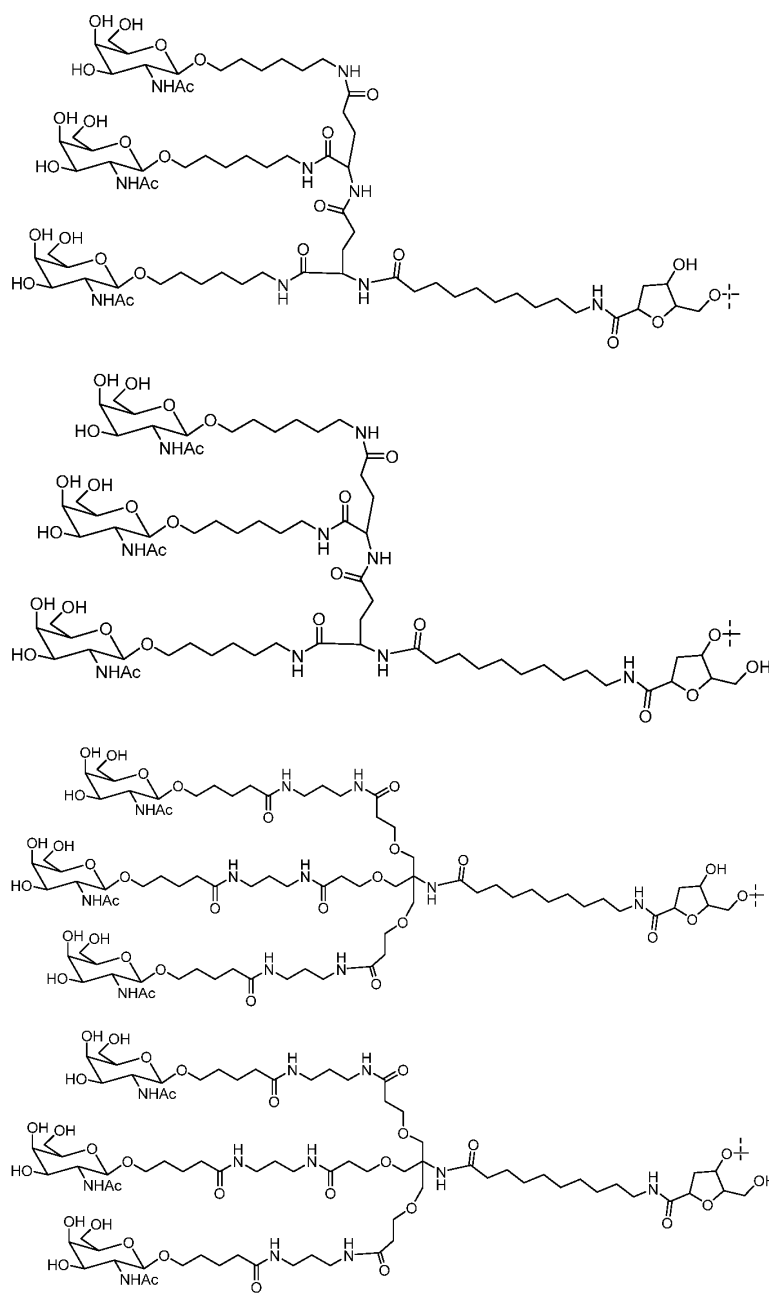


15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的配体，所述配体为以下任一结构，

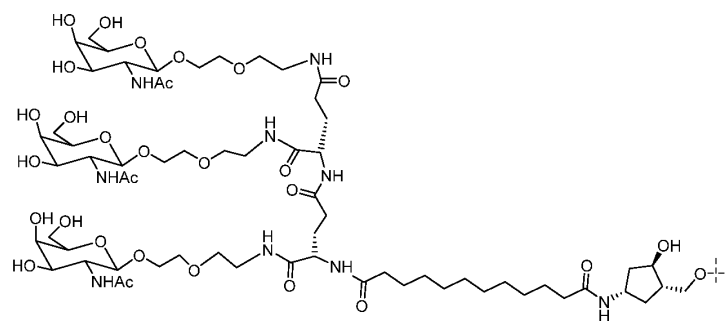
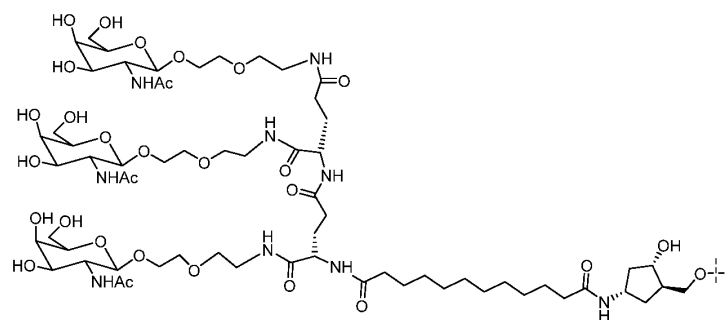
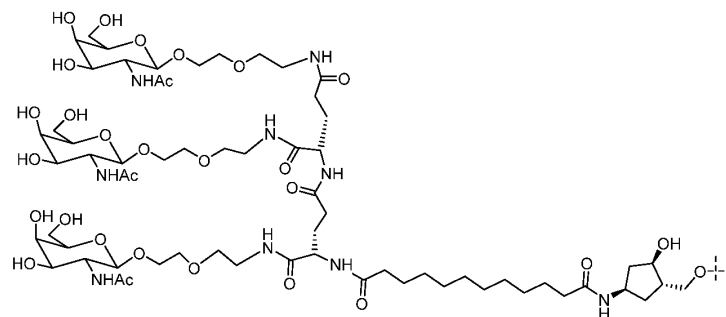
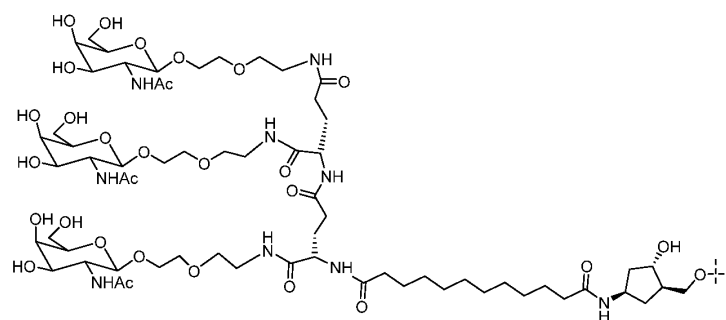


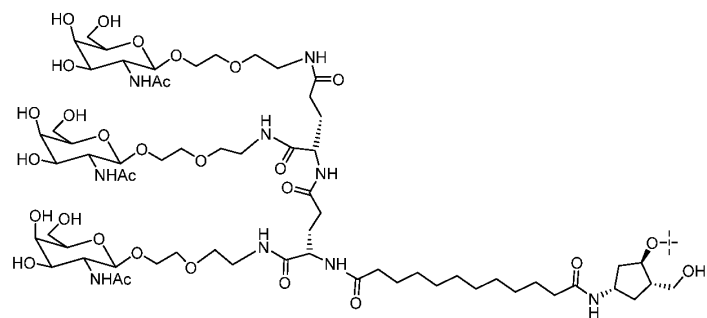
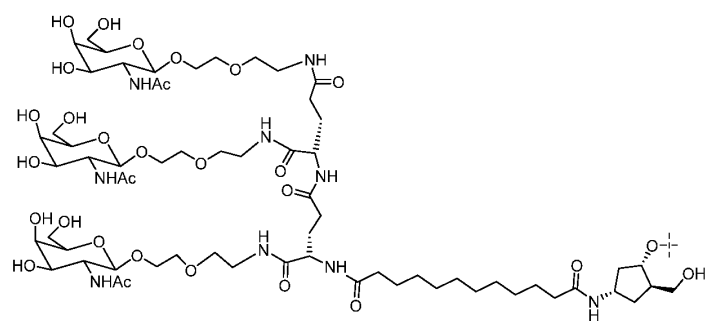
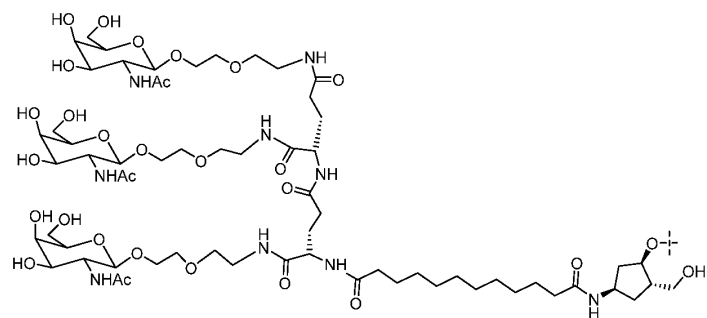
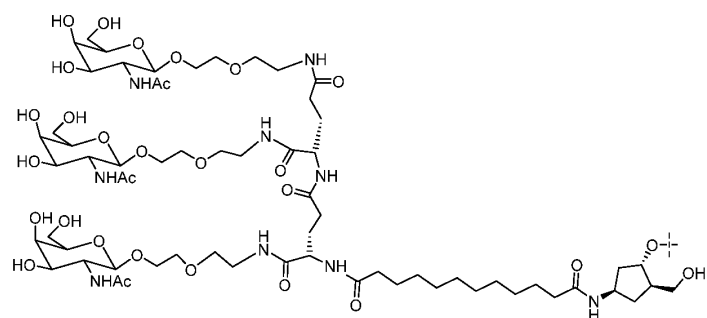


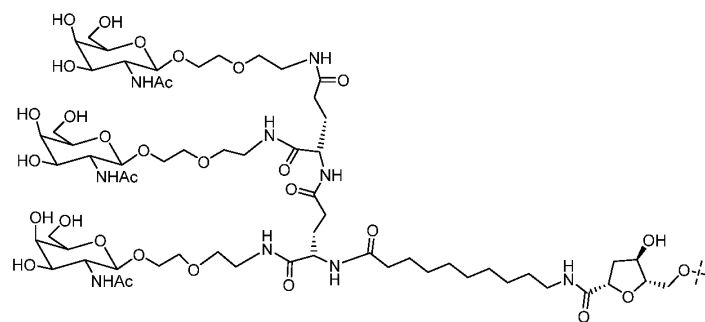
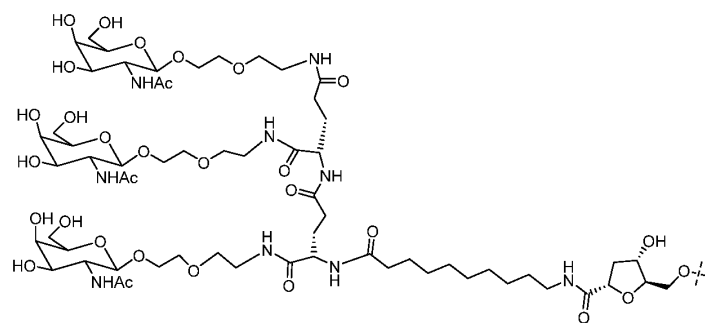
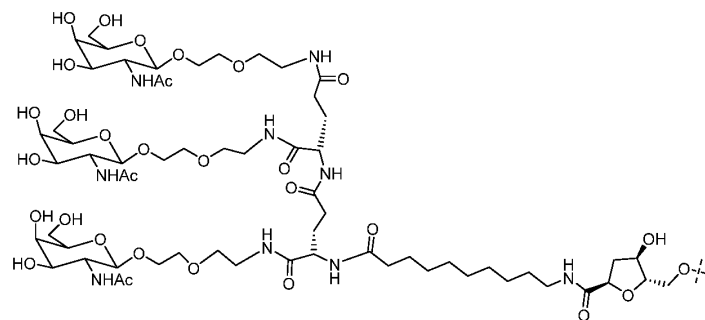
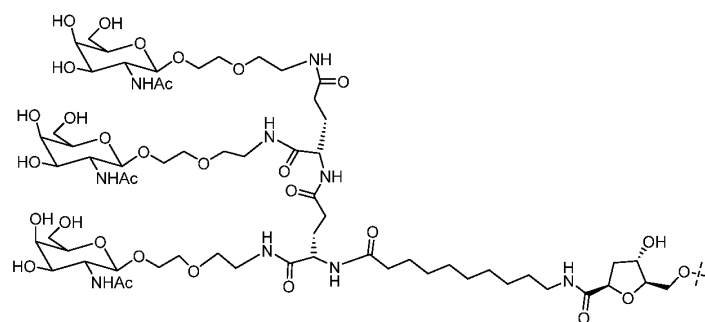


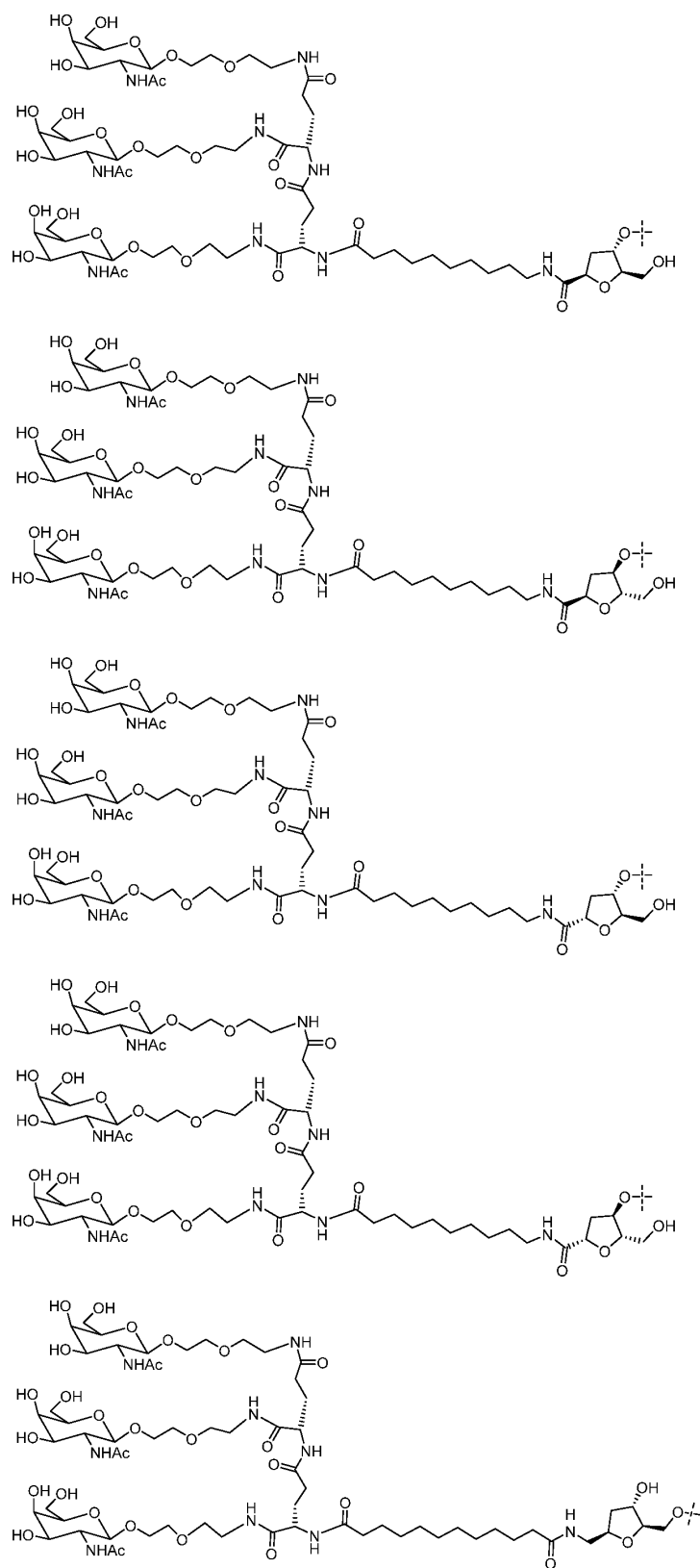


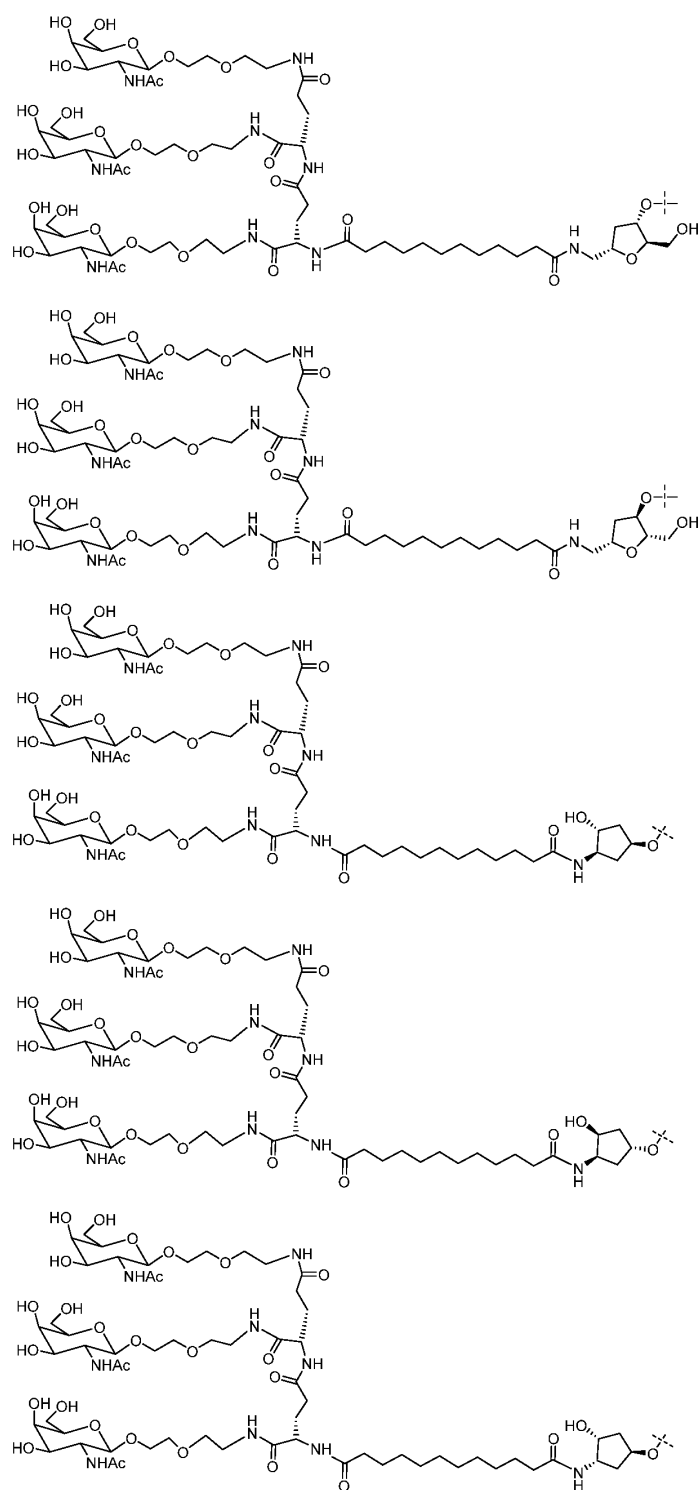
16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的配体，所述配体为以下任一结构，

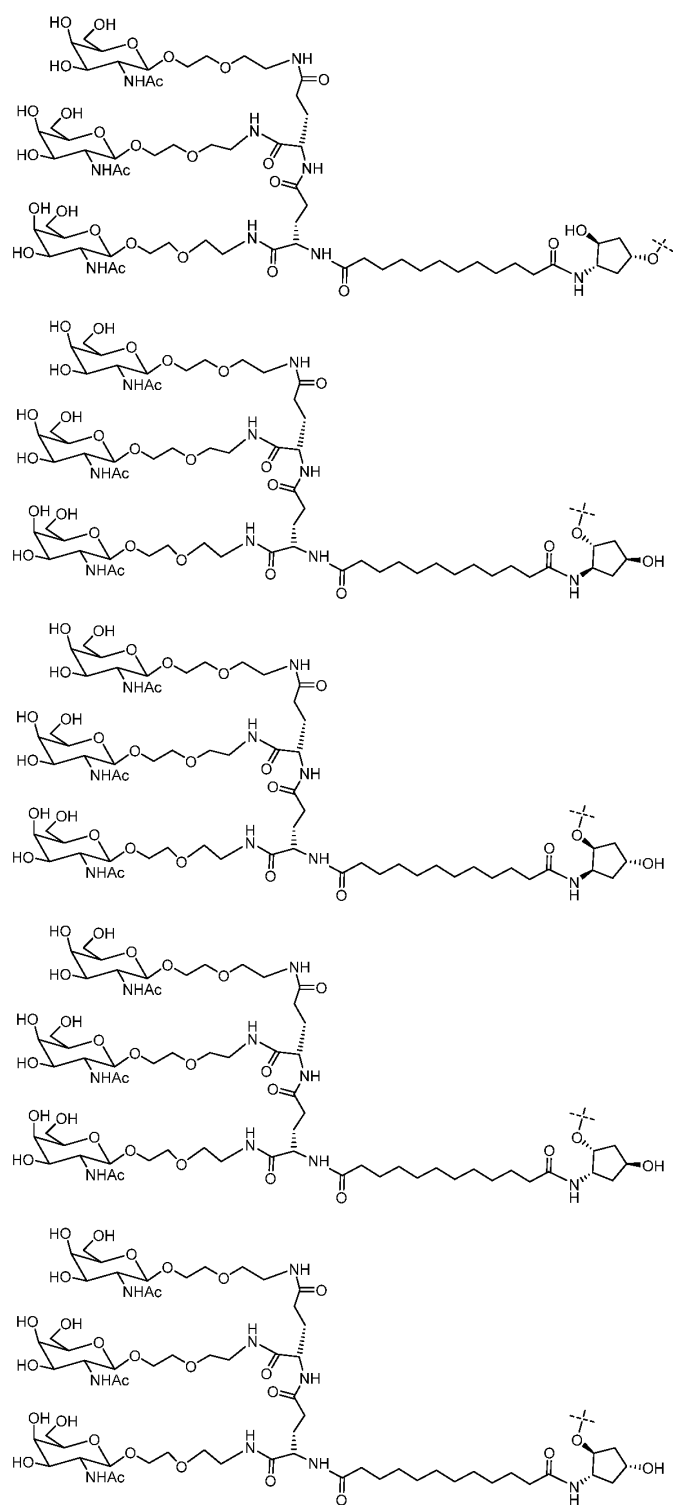


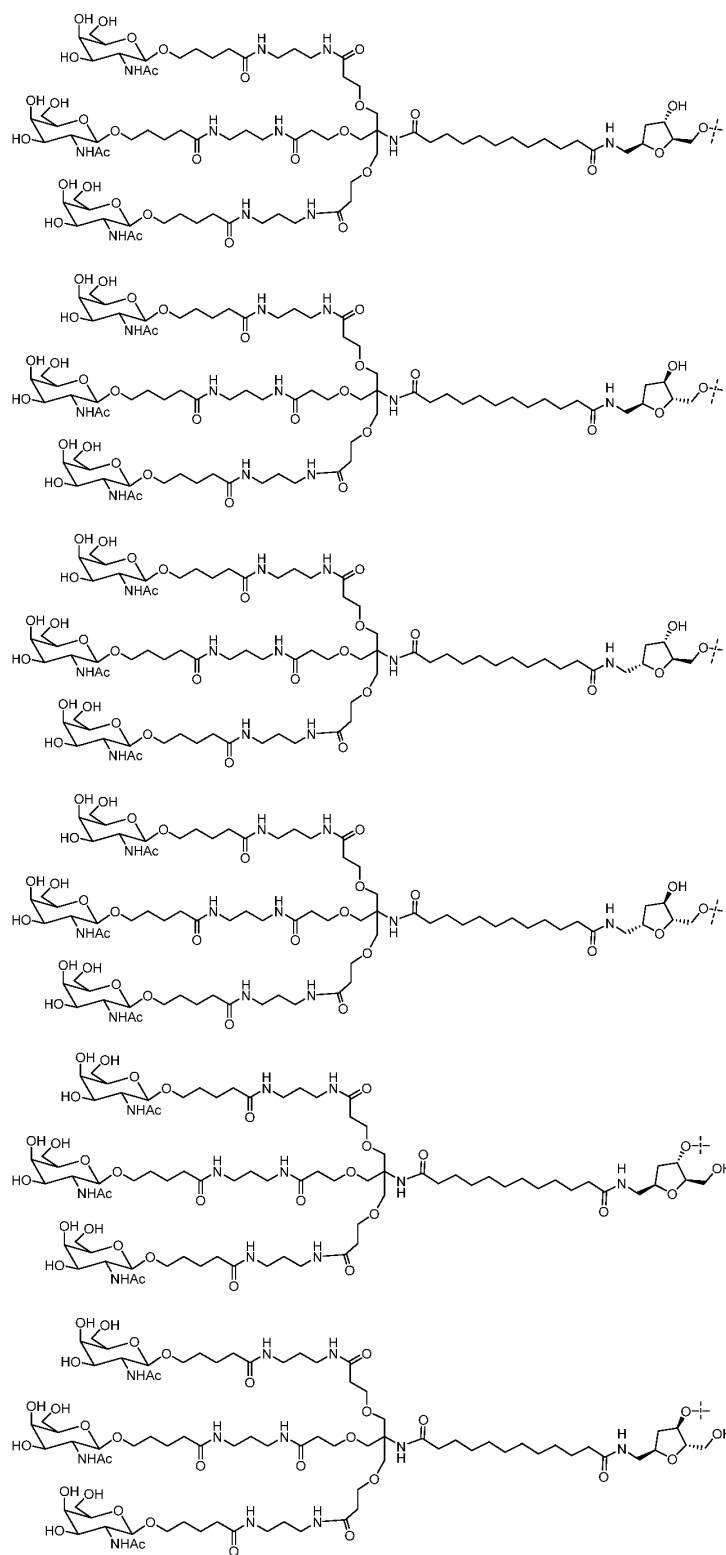


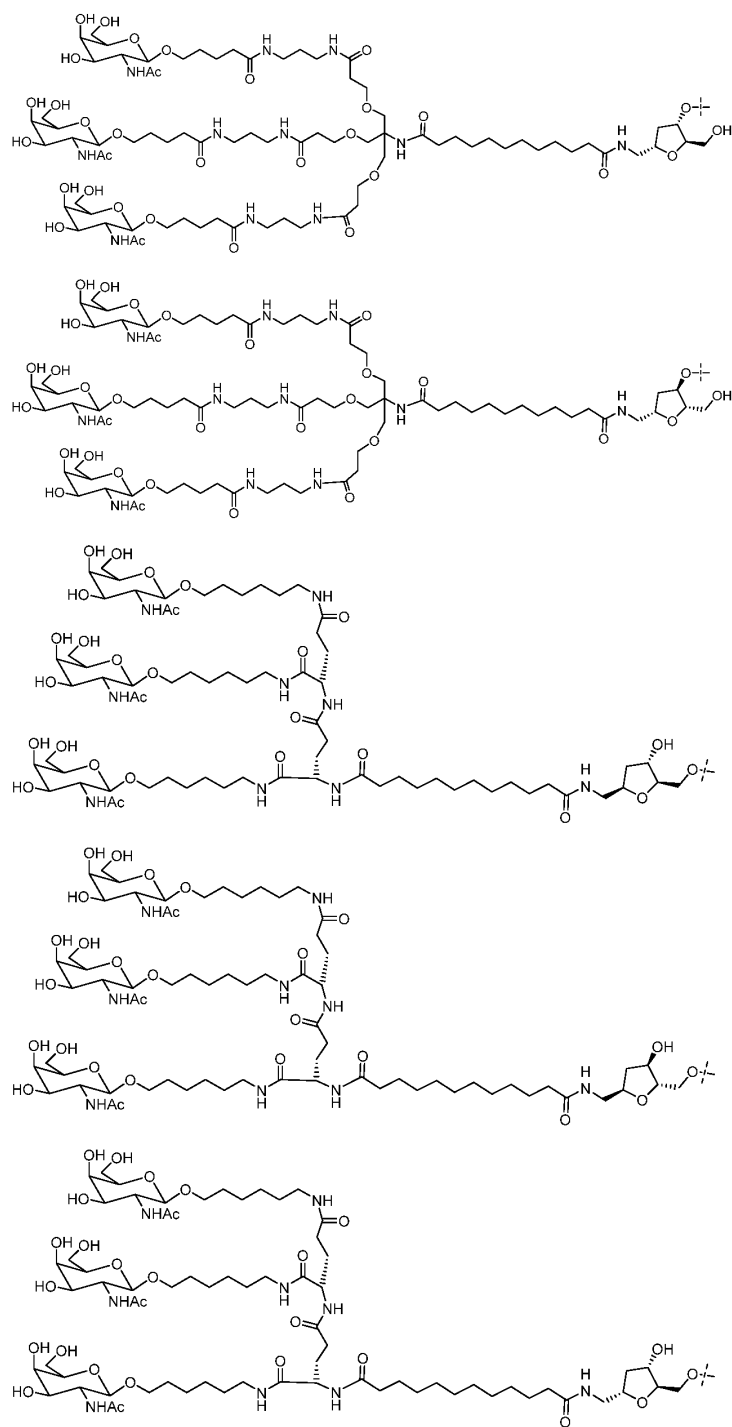


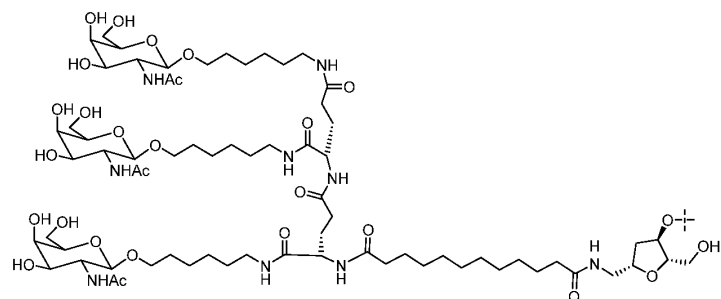
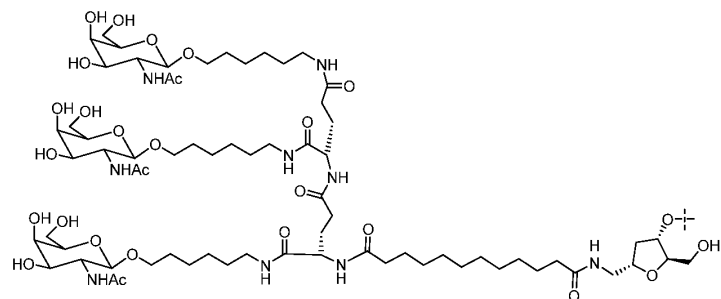
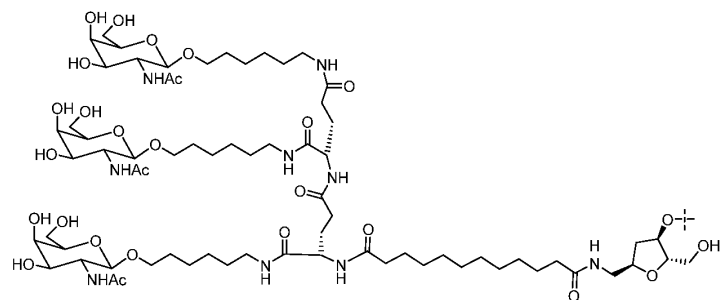
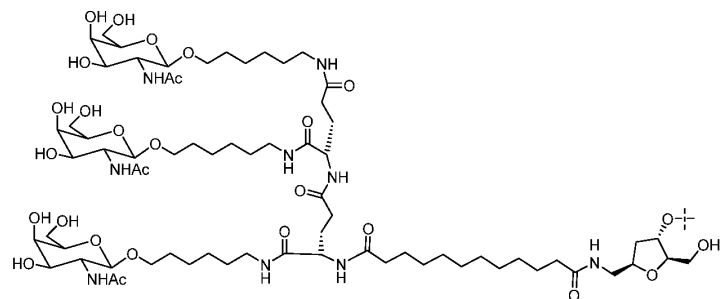
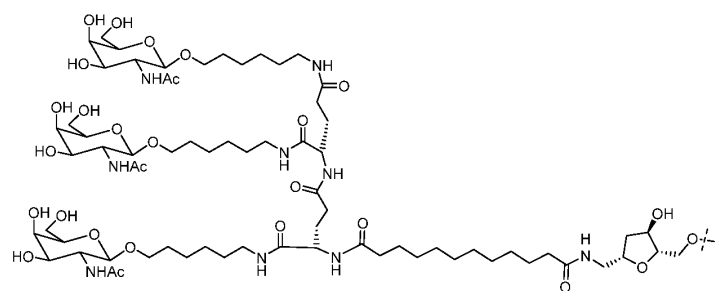


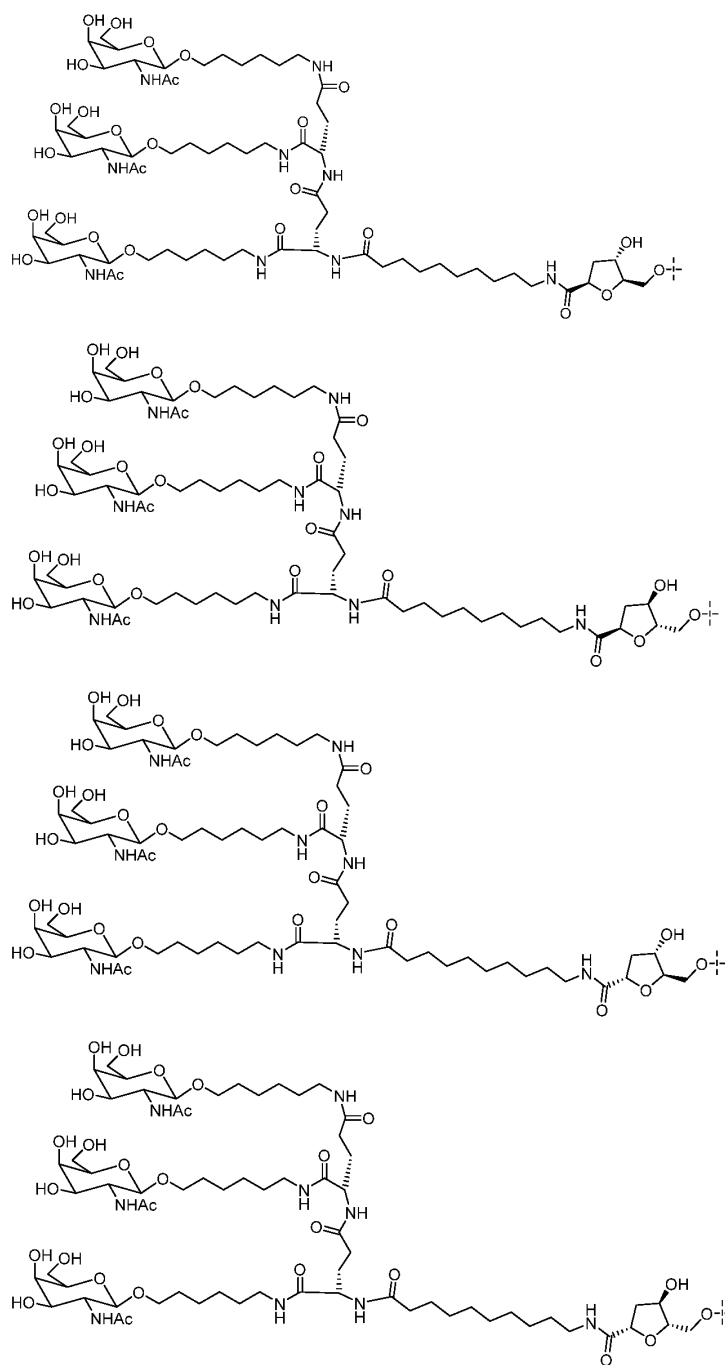


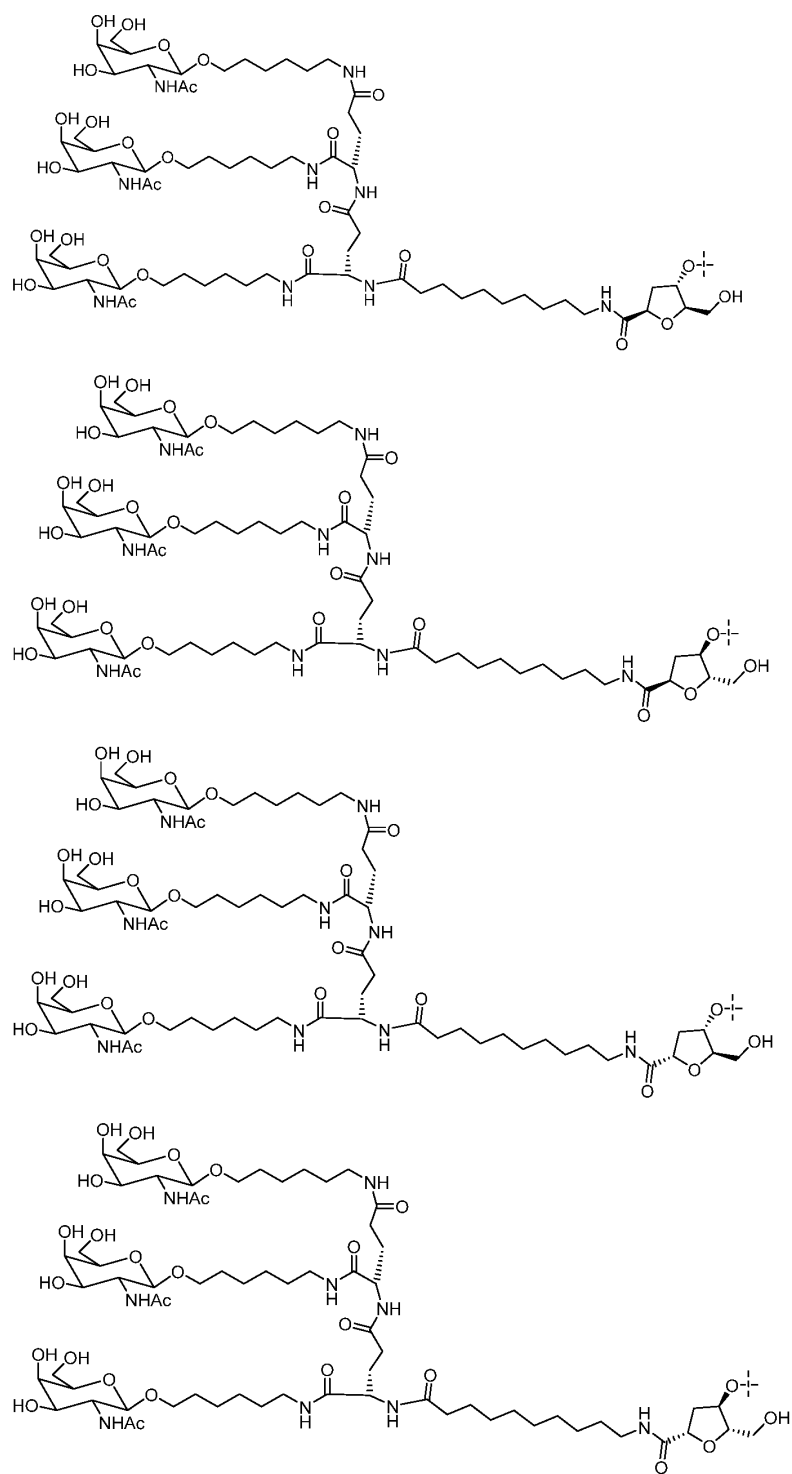


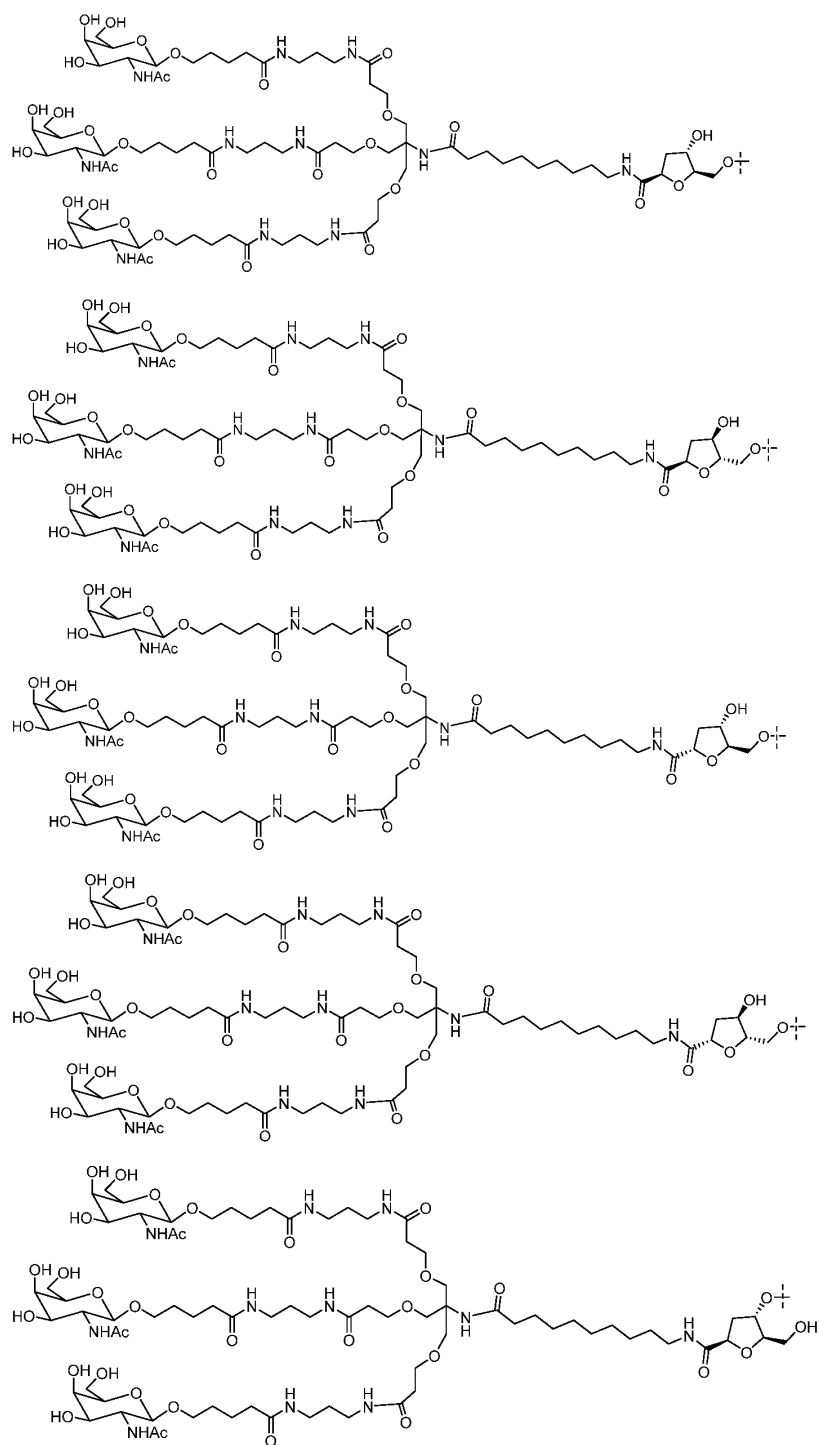


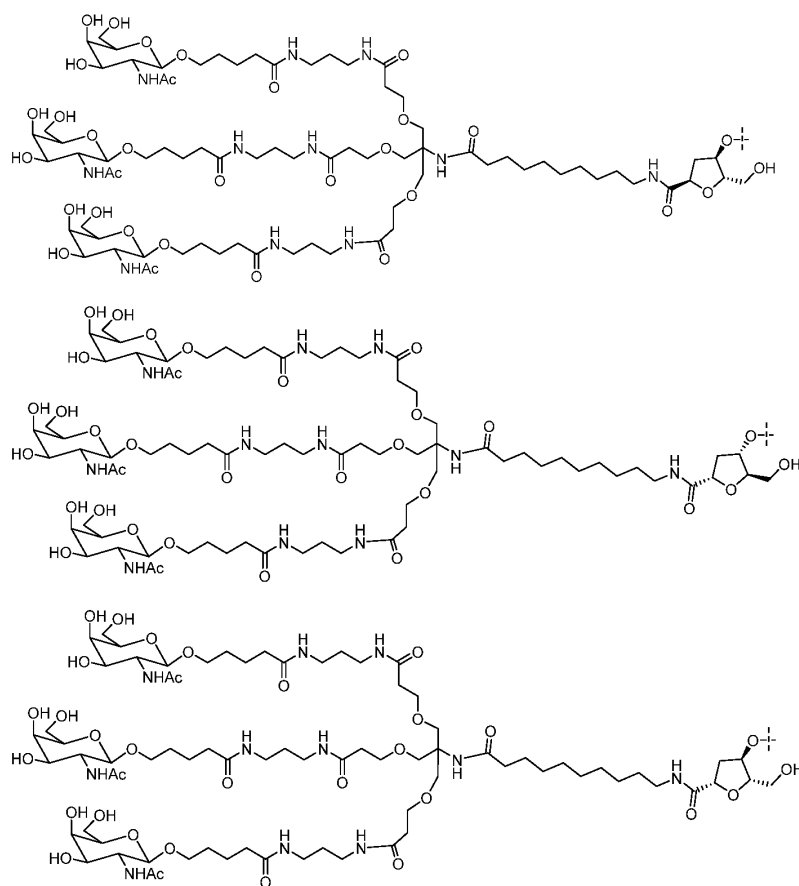






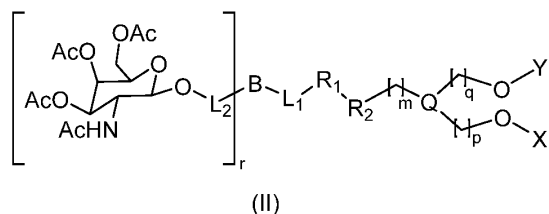






或

17. 一种如式 (II) 所示化合物,



其中, X 为羟基保护基, 所述羟基保护基优选为酯基保护基、烷氧基甲基保护基、烷基保护基、硅烷基保护基或芳基保护基, 更优选 MMTTr 和 DMTr, 进一步优选 DMTr;

Y 为氢、氘、 $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 或 $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{W}$;

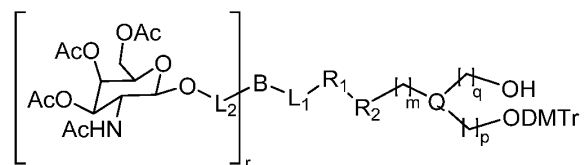
j7 为 1、2、3 或 4, 优选为 2;

W 为高分子化合物, 优选为树脂, 更优选大孔树脂, 进一步优选大孔胺甲基树脂;

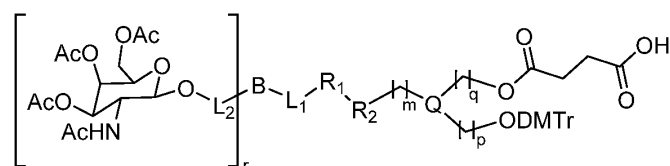
L_1 、 R_1 、 R_2 、Q、B、 L_2 、m、p、q 和 r 的定义根据权利要求 1-16 中任一项

所述。

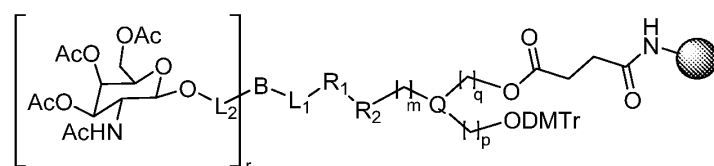
18. 根据权利要求 17 所述的化合物，其为以下式 (II-1)、(II-2) 或 (II-3) 所示化合物，



(II-1)



(11-2)

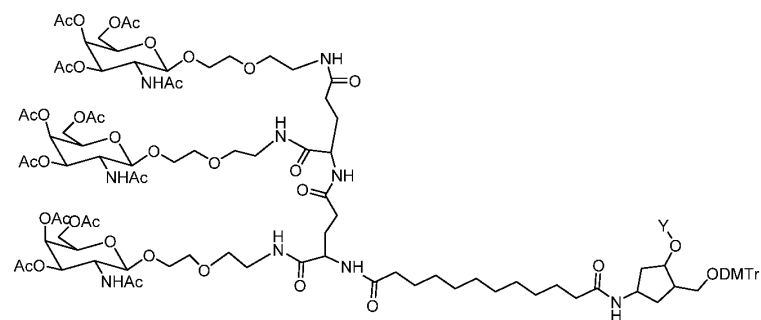


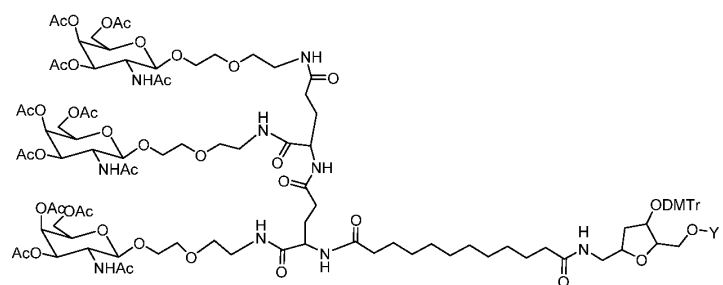
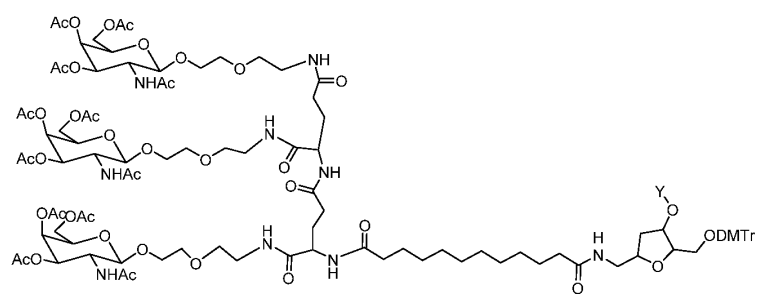
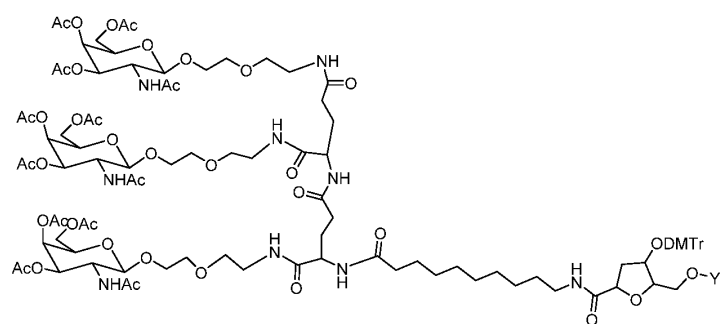
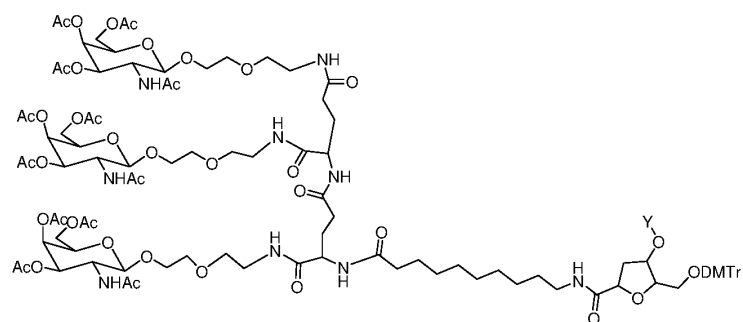
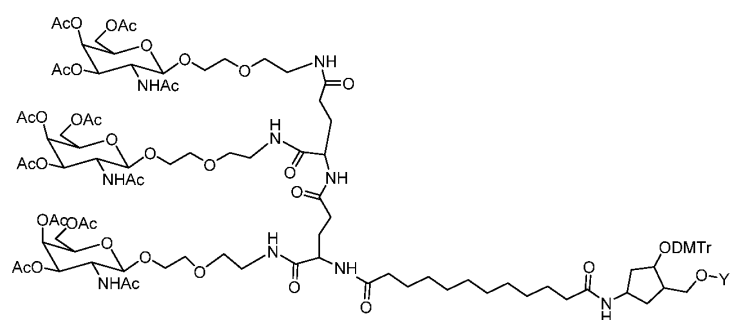
(11-3)

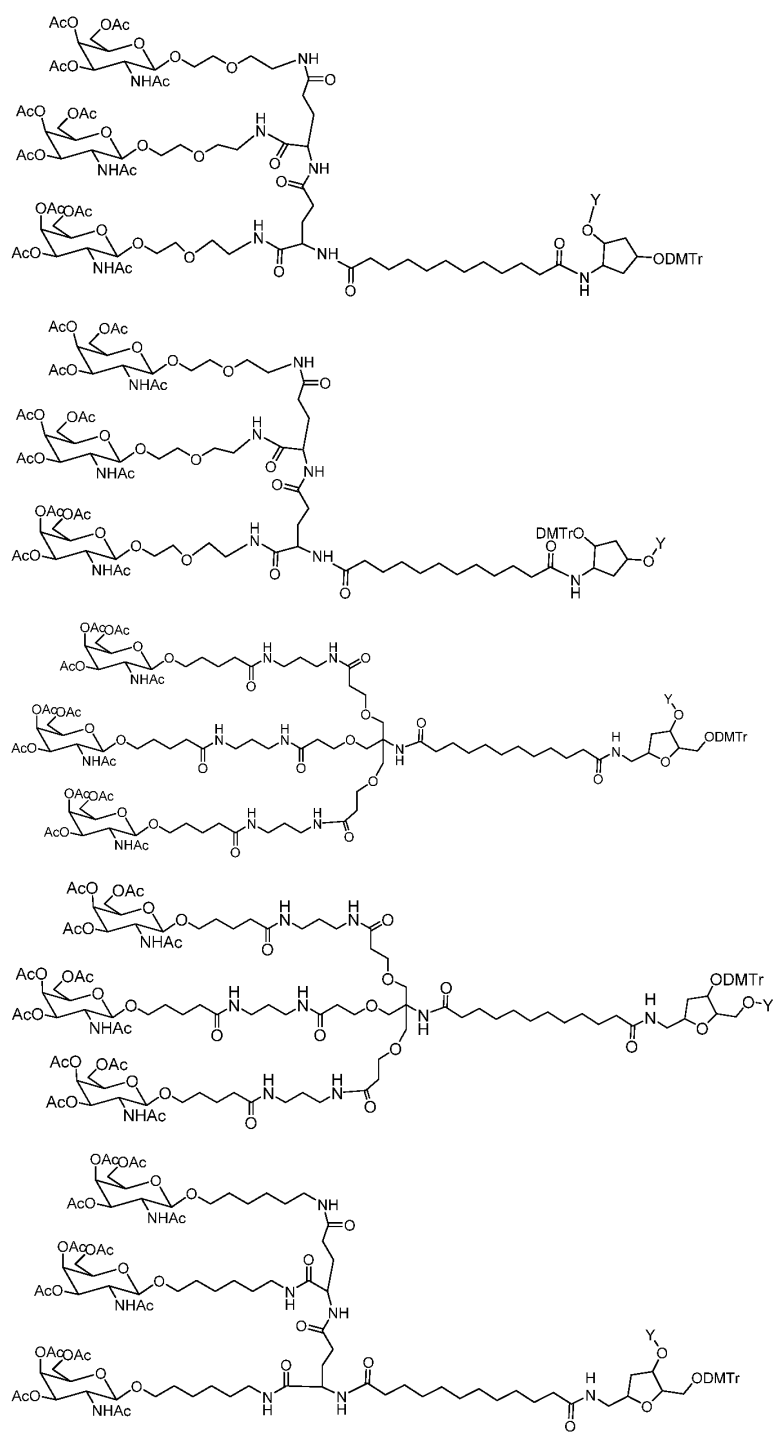
其中,  为树脂, 优选大孔树脂, 更优选大孔胺甲基树脂,

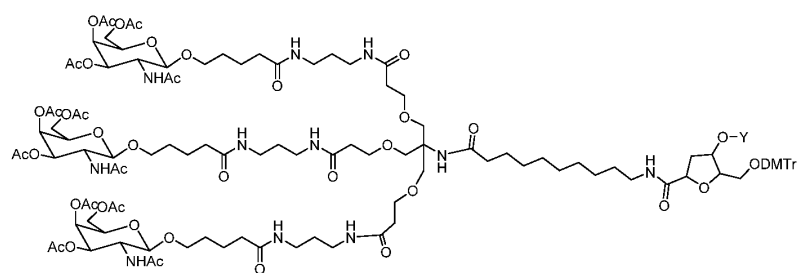
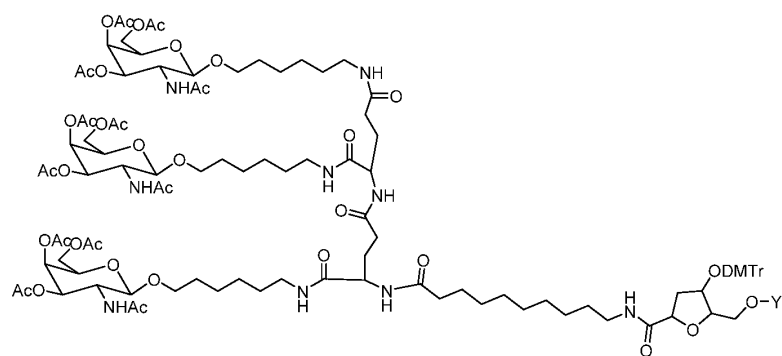
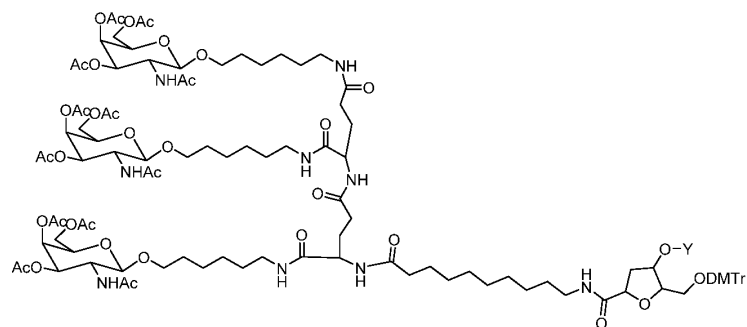
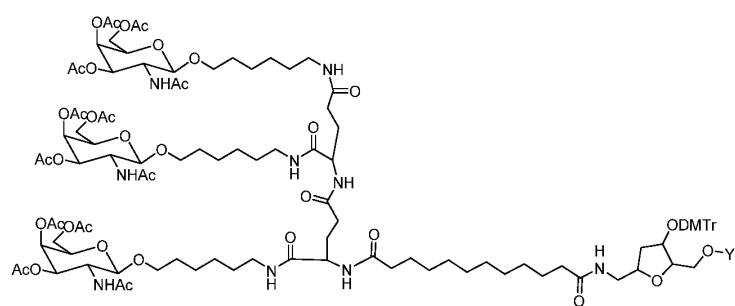
L₁、R₁、R₂、B、L₂、m、p、q 和 r 的定义根据权利要求 1-16 中任一项所述。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的化合物, 其为以下任一结构,

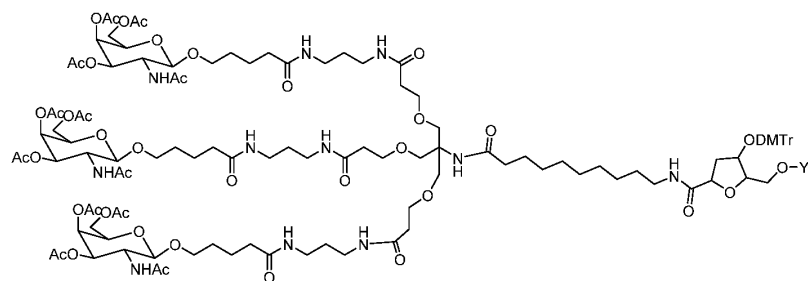




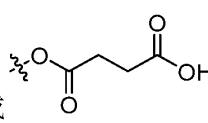


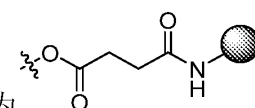


或

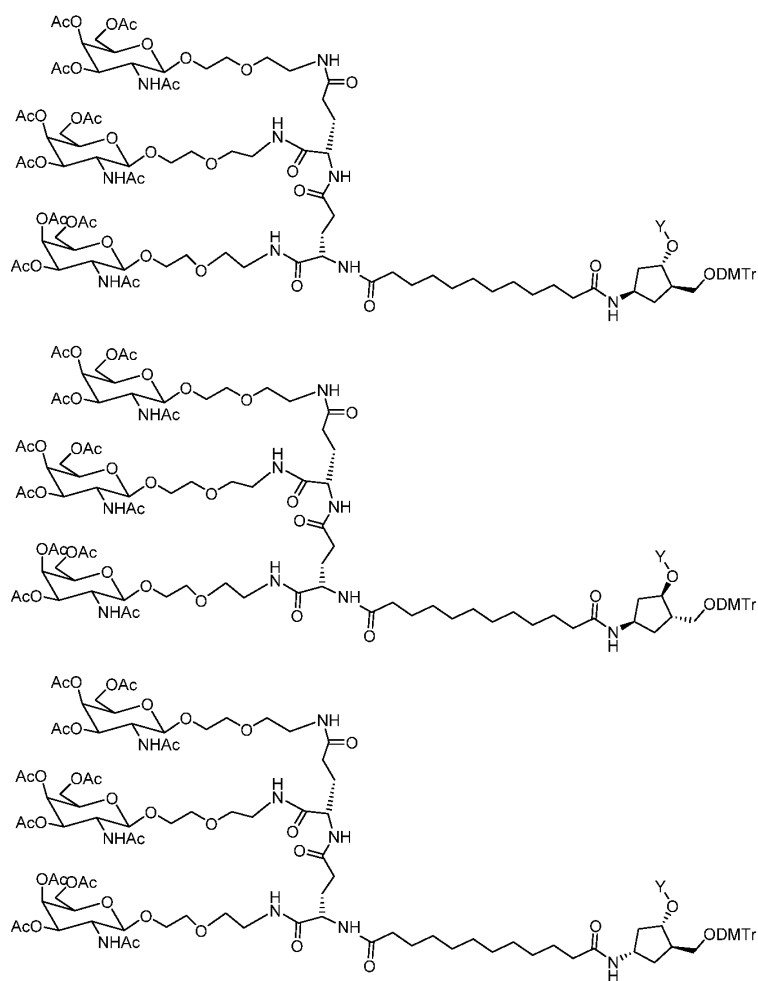


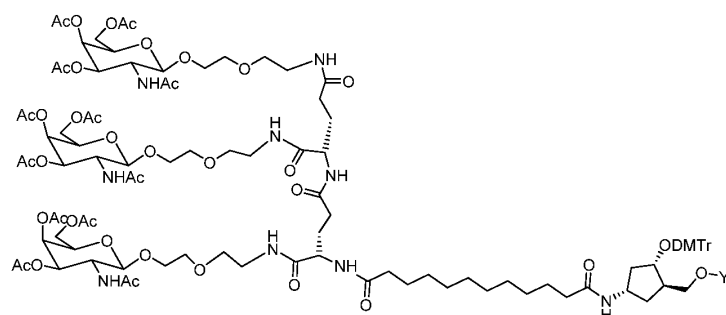
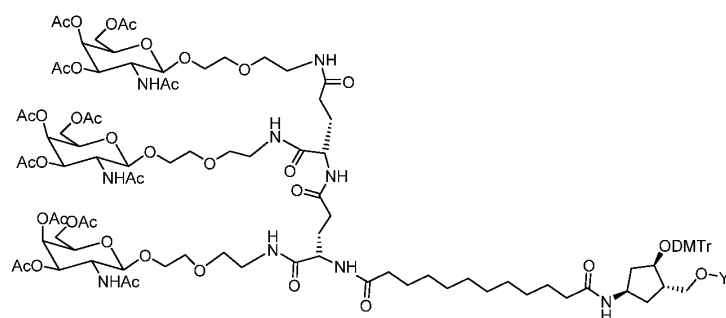
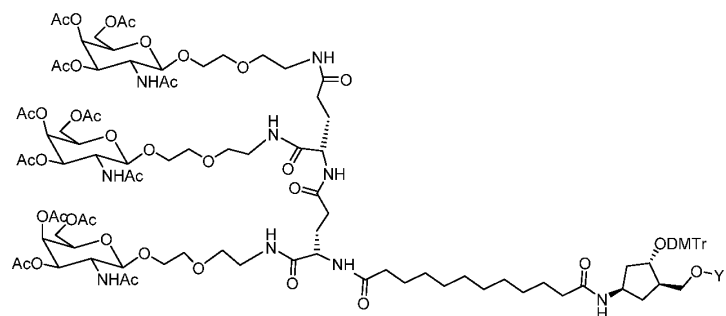
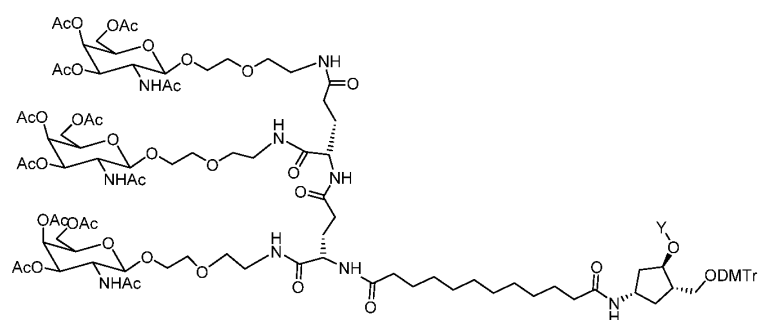
;

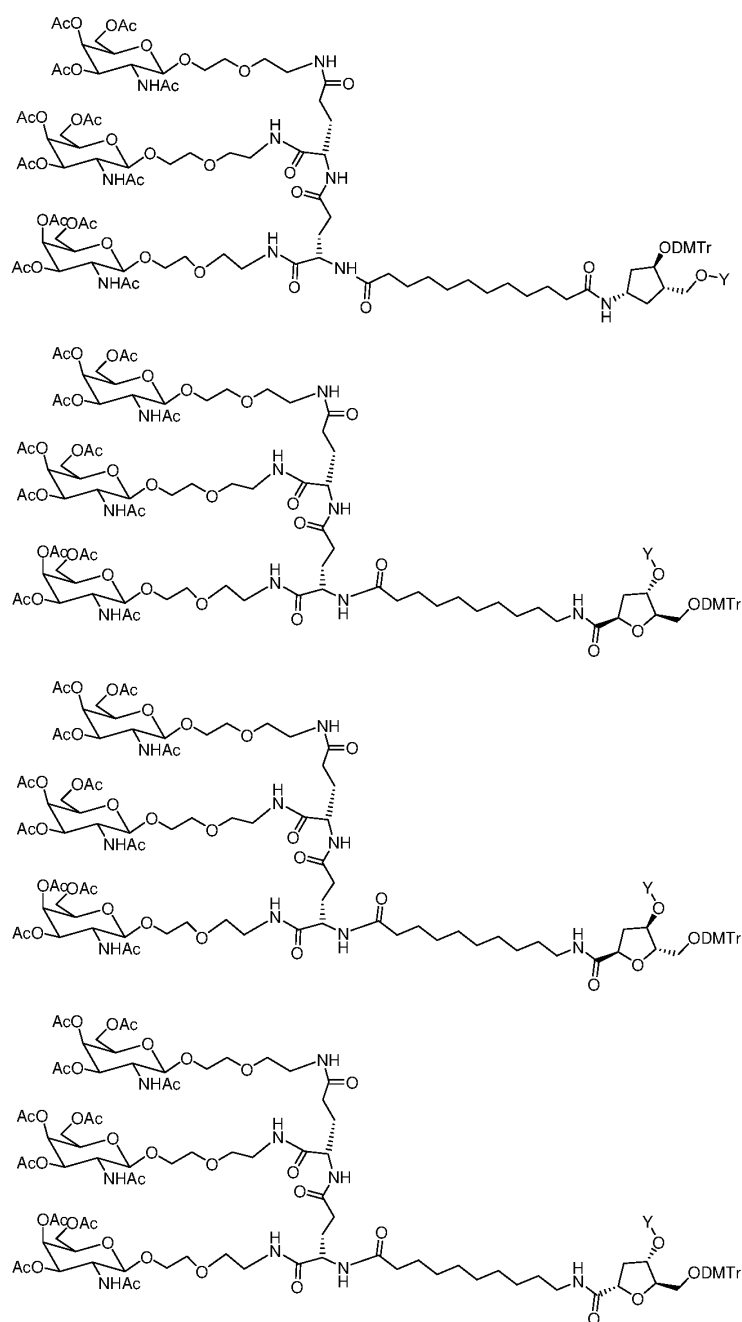
其中, Y 为氢或  ;

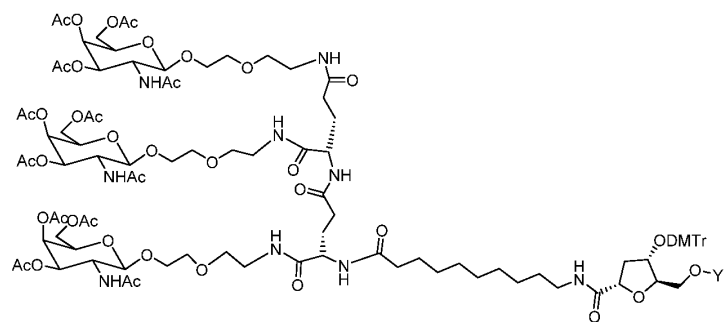
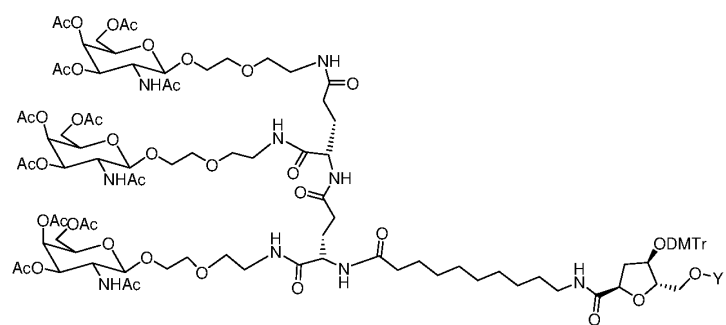
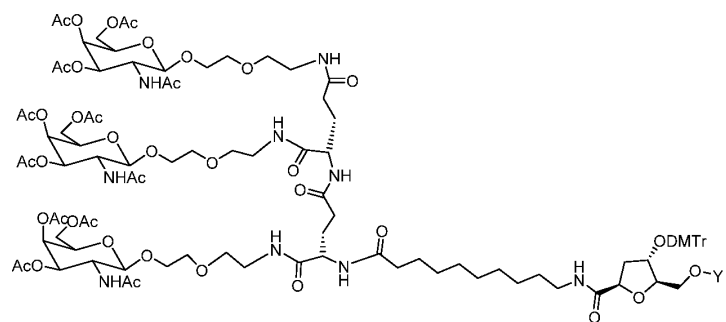
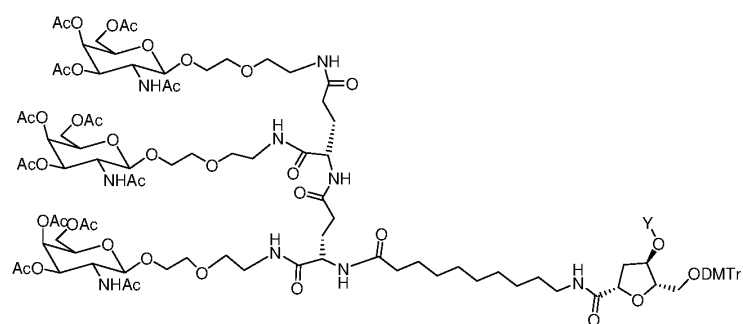
或者, Y 为  ,  为树脂, 优选大孔树脂, 更优选大孔胺甲基树脂。

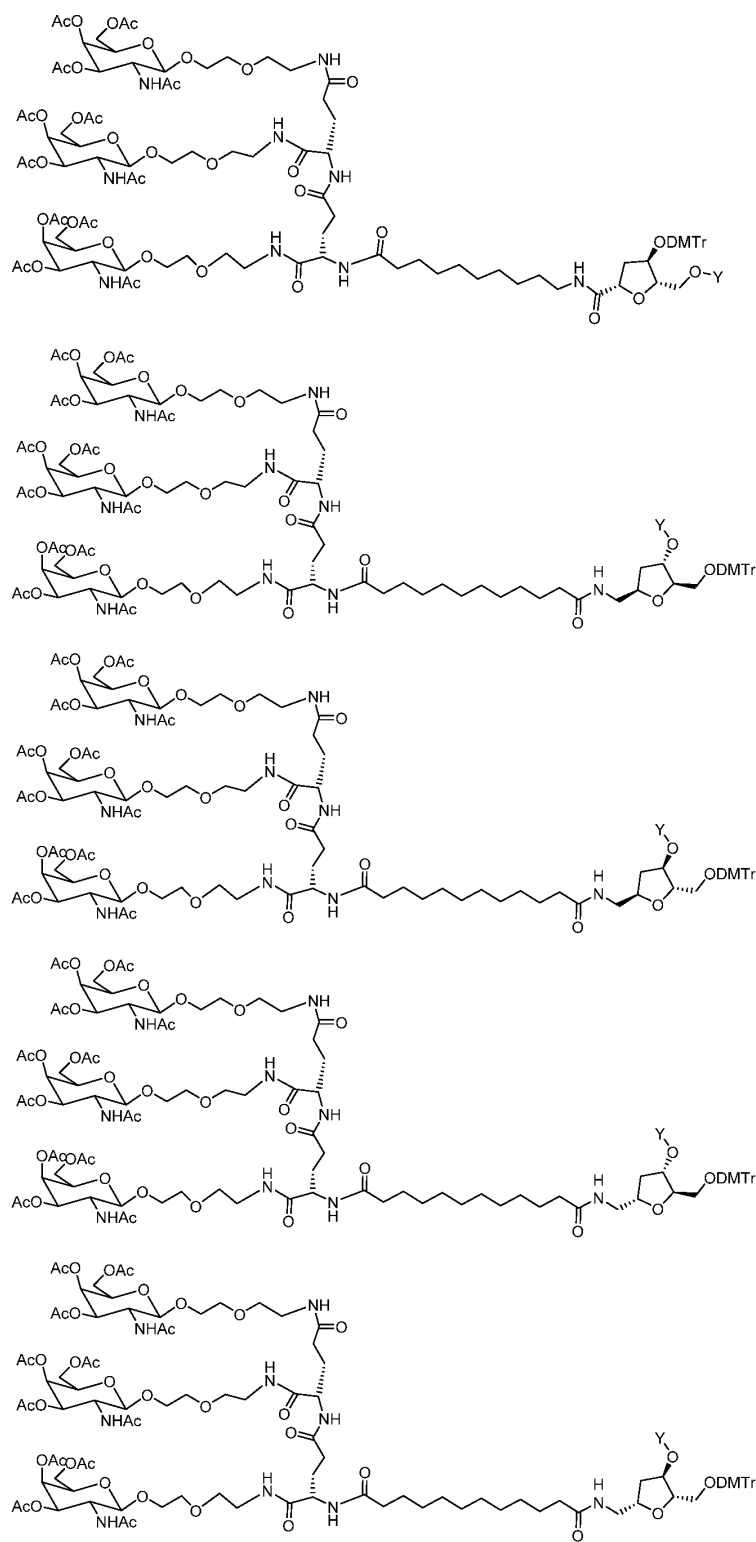
20. 根据权利要求 17-19 中任一项所述的化合物, 其为以下任一结构,

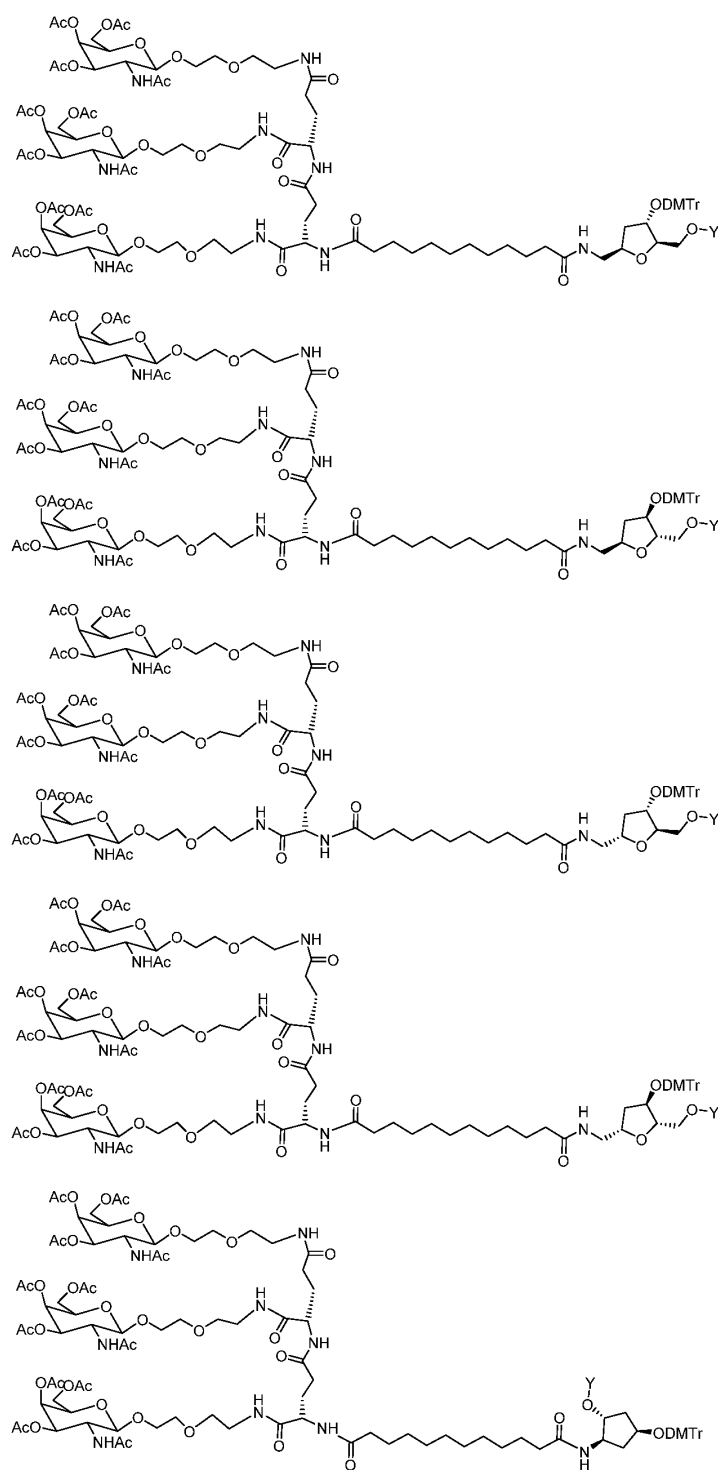


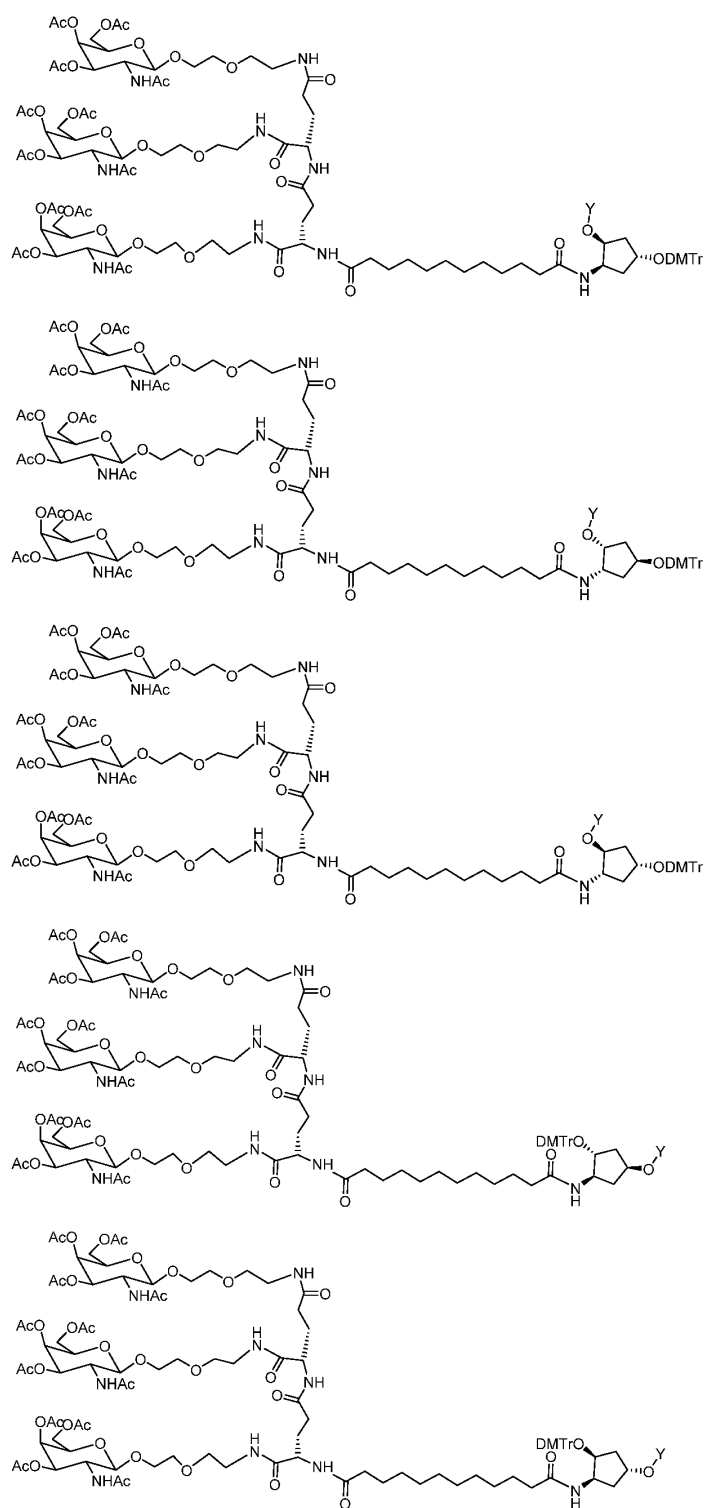


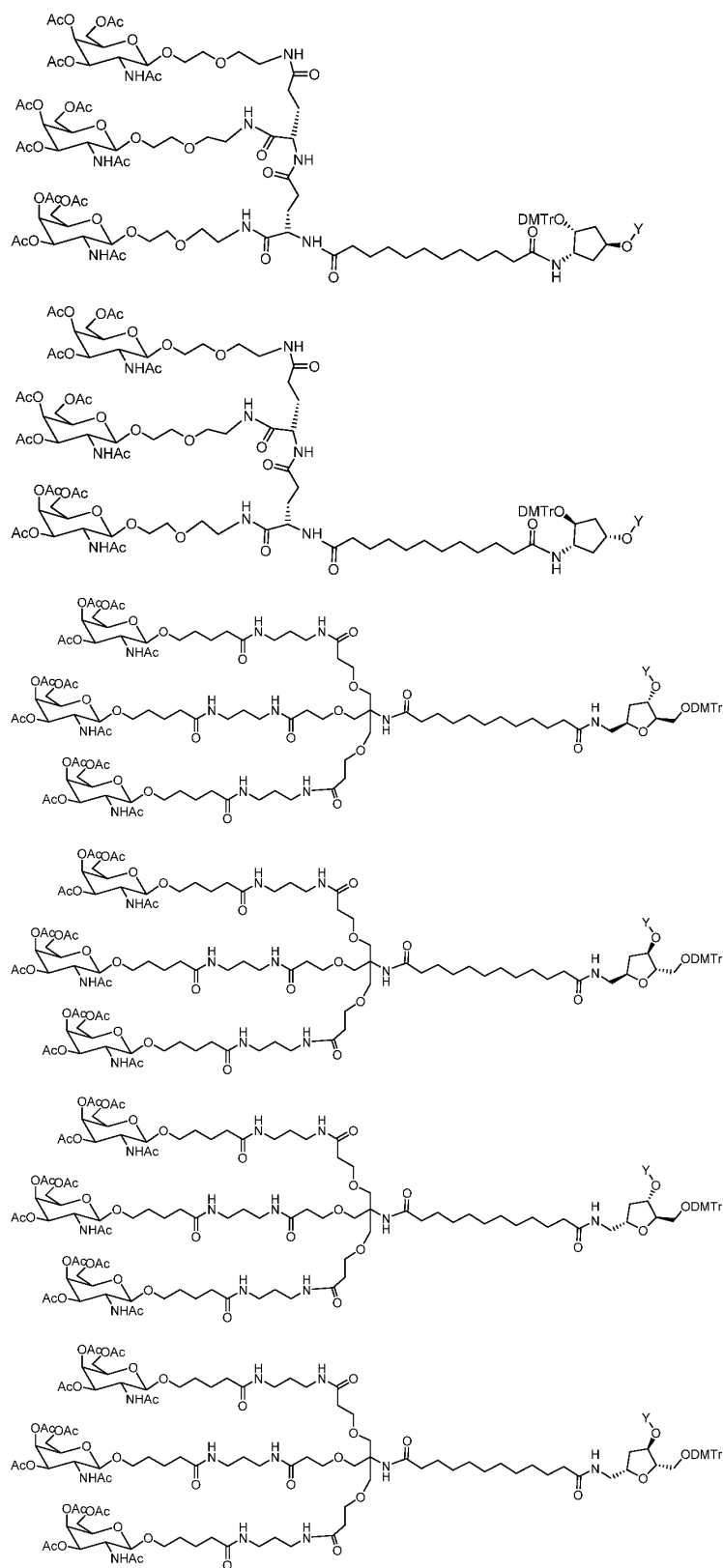


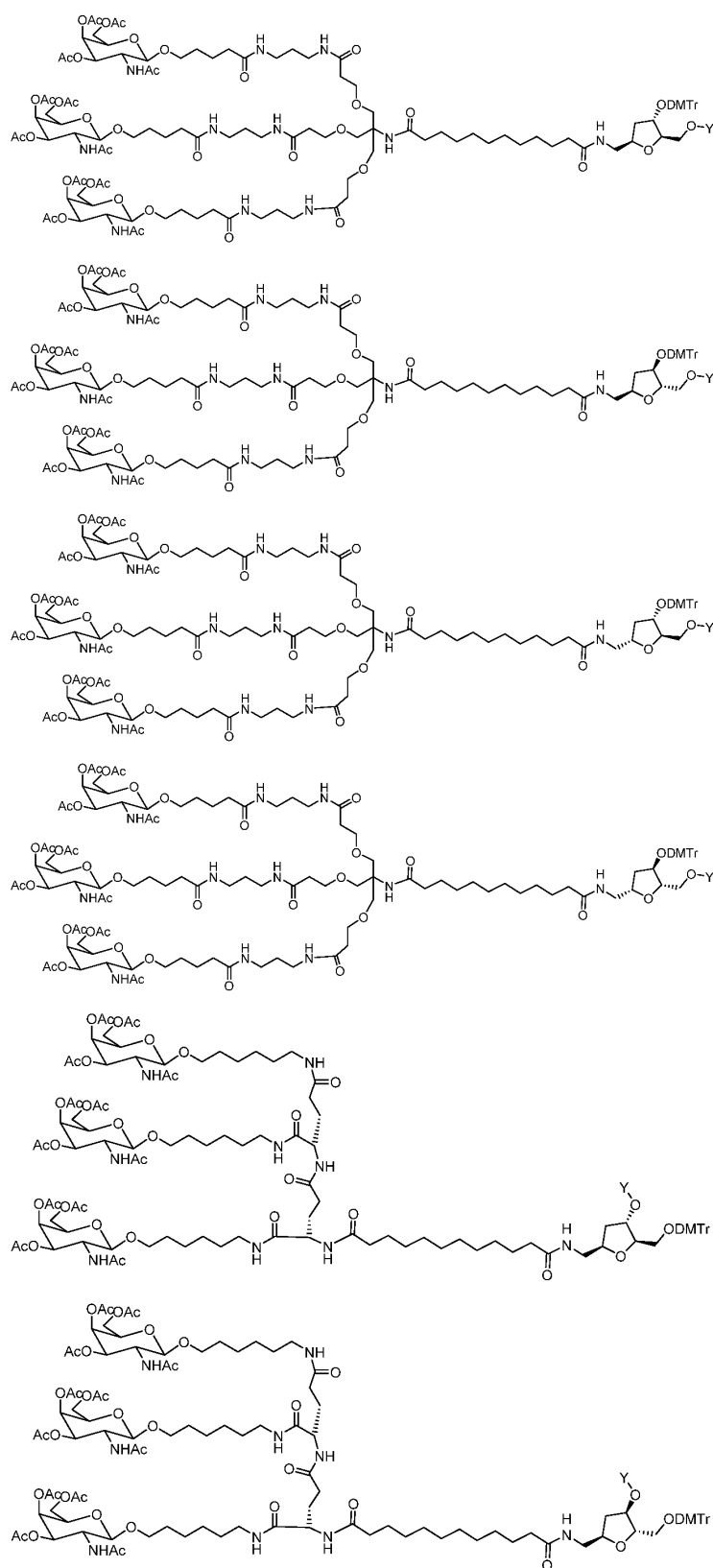


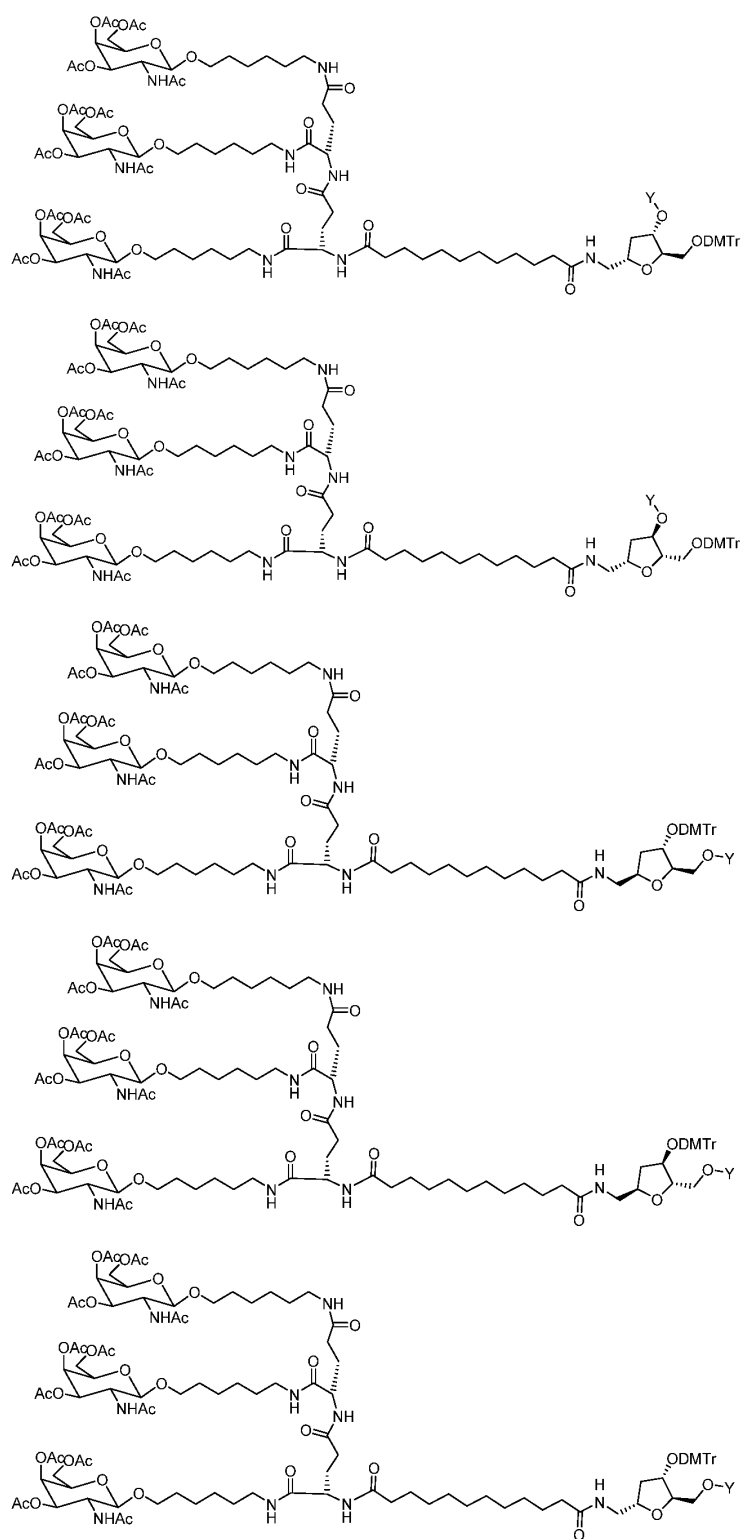


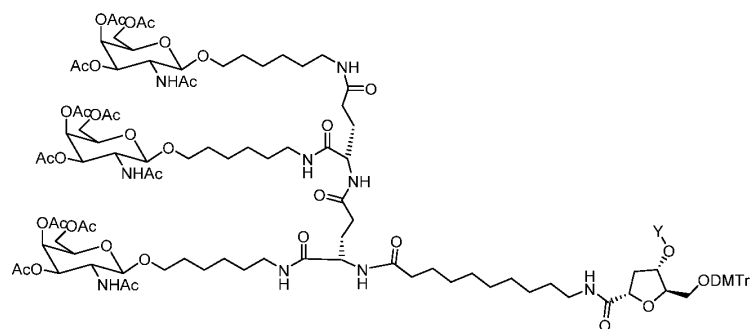
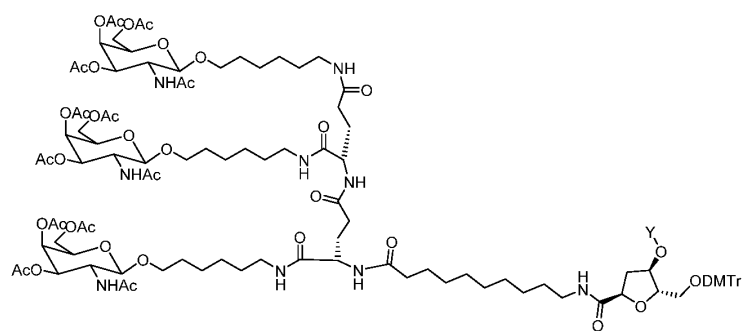
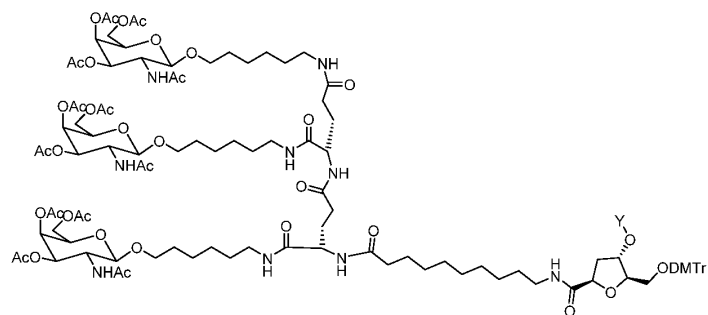
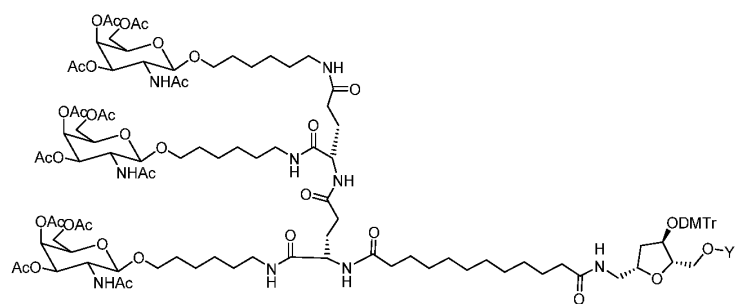


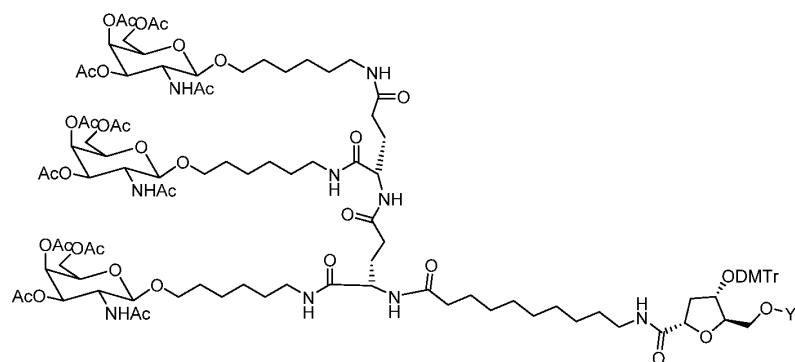
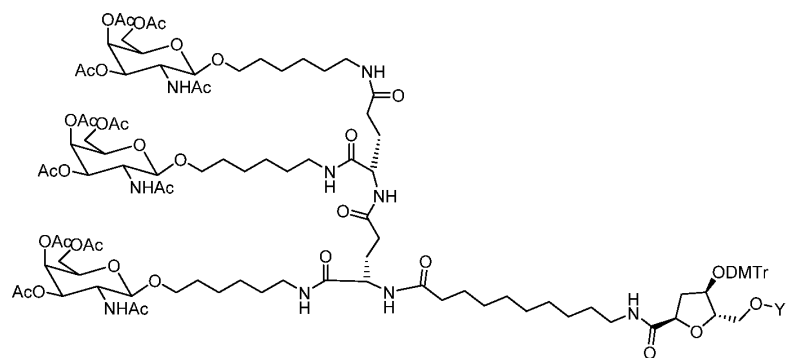
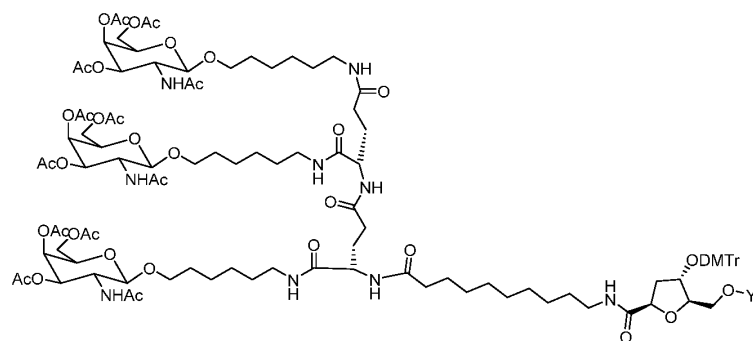
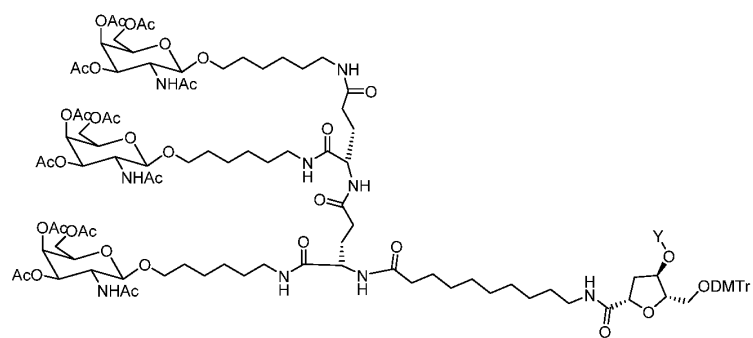


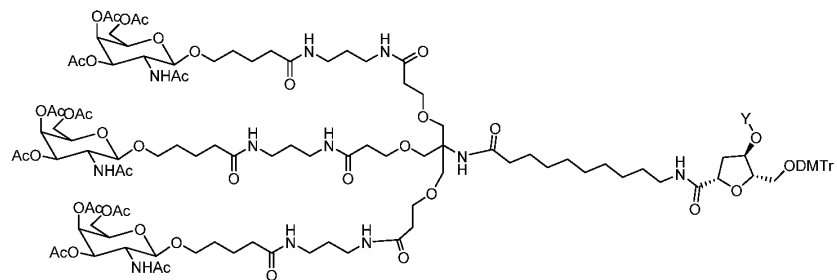
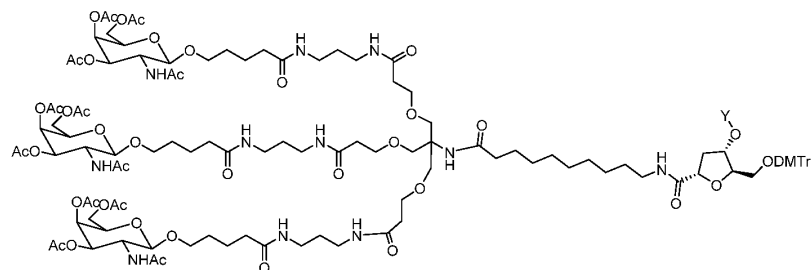
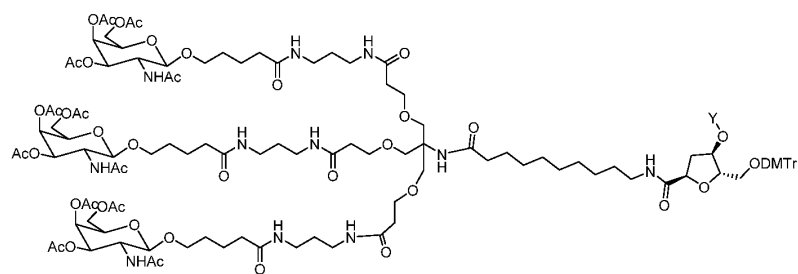
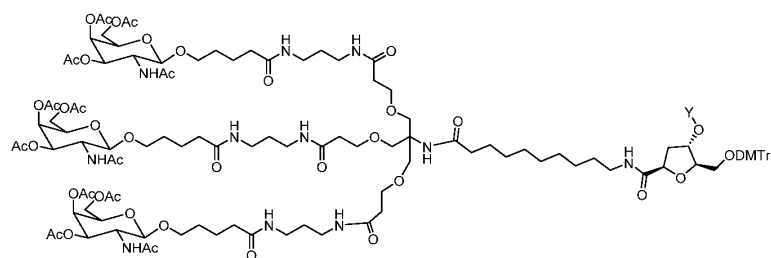
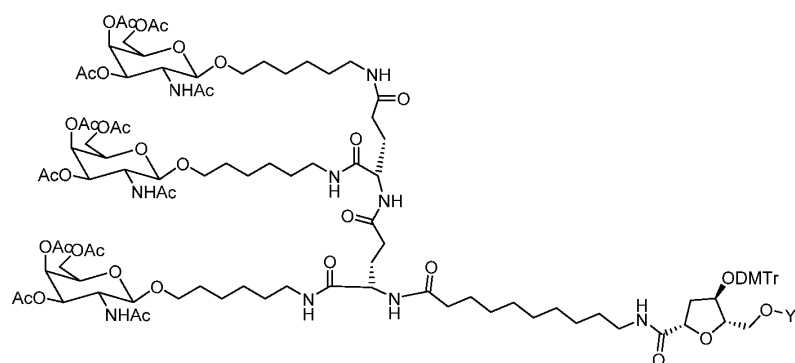


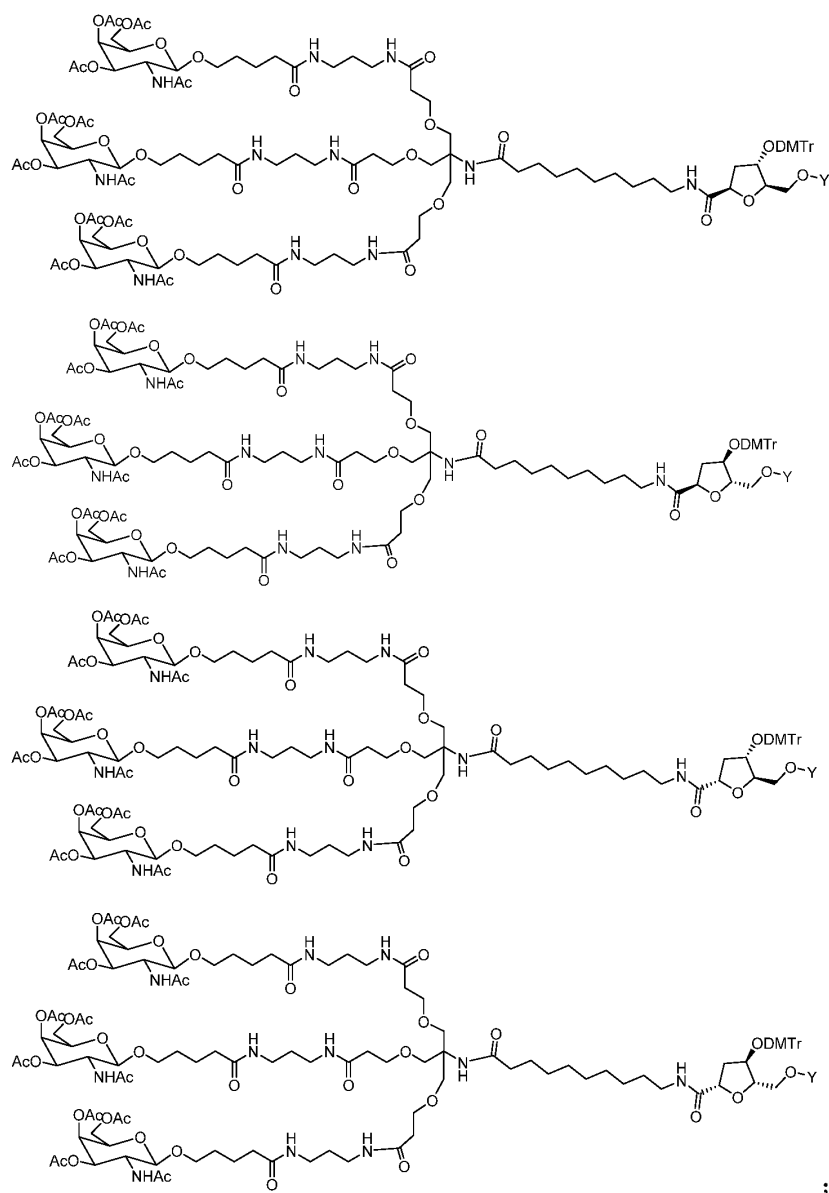




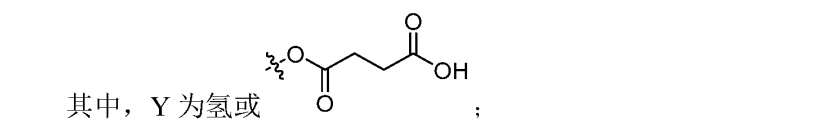




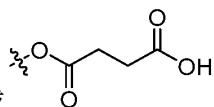




或

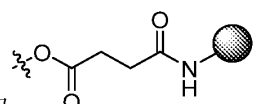


其中, Y 为氢或



;

或者, Y 为



, 为树脂, 优选大孔树脂, 更优选大孔

胺甲基树脂。

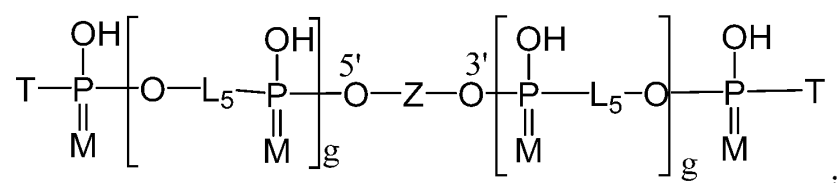
21. 一种核酸配体缀合物, 其包含核酸和一个或多个根据权利要求 1-16 中任一项所述的配体, 所述配体与核酸末端缀合, 所述配体相同或不同。

22. 根据权利要求 21 所述的核酸配体缀合物, 所述核酸与所述配体通过磷酸酯基团、硫代磷酸酯基团或膦酸基团连接;

和/或, 所述核酸的 3' 端与配体缀合;

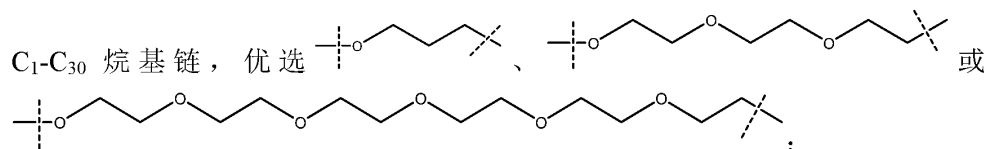
和/或, 所述核酸为单链核酸, 优选 siRNA 的正义链。

23. 根据权利要求 21 或 22 所述的核酸配体缀合物, 所述核酸配体缀合物为以下结构或其药学上可接受的盐:



其中, T 为根据权利要求 1-16 任一项所述的配体, T 各自相同或不同;

L₅ 独立地为 C₁-C₃₀ 烷基链、或被一个或多个氧、硫、氮原子或 C=O 间断的

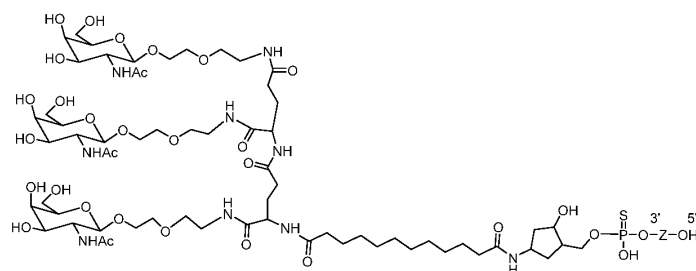


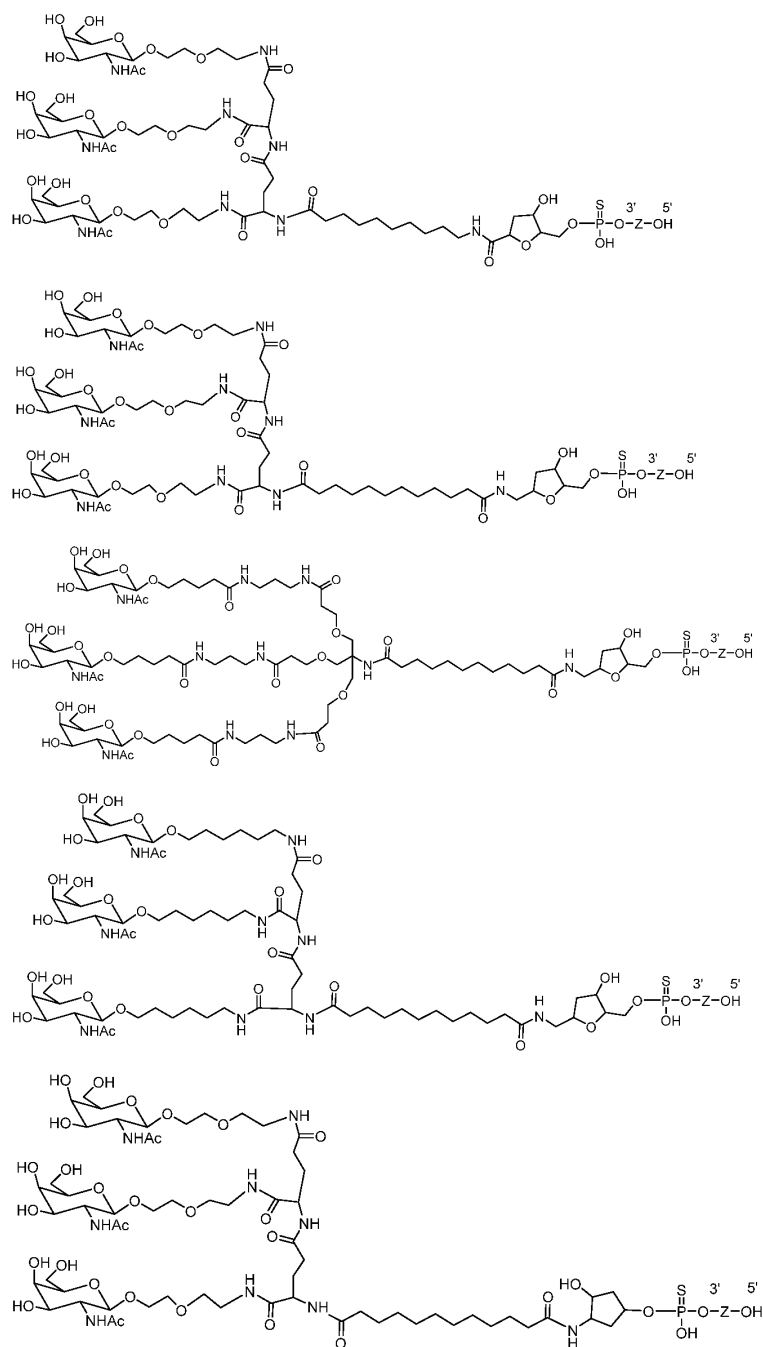
M 独立地为 O 或 S;

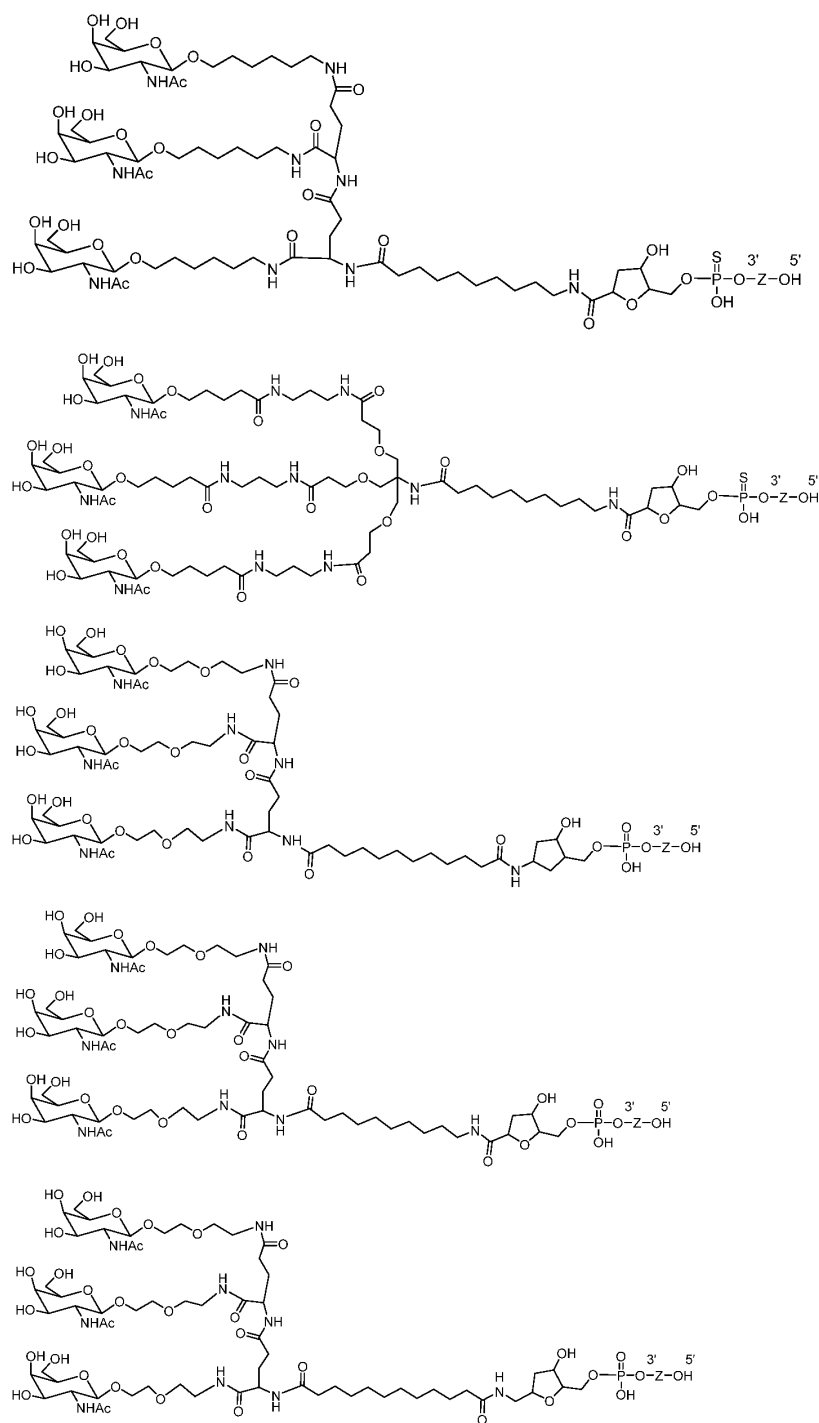
g 独立地为 0-4 的整数, 优选 0 或 1, 更优选 0;

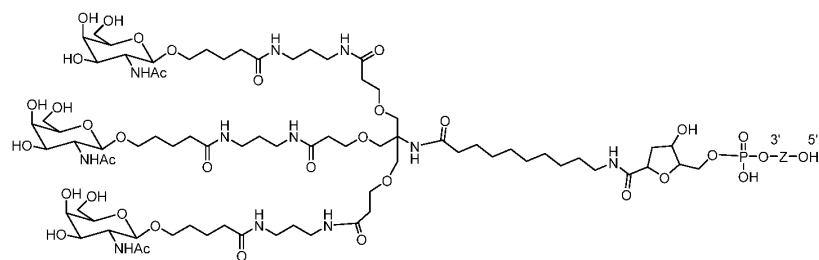
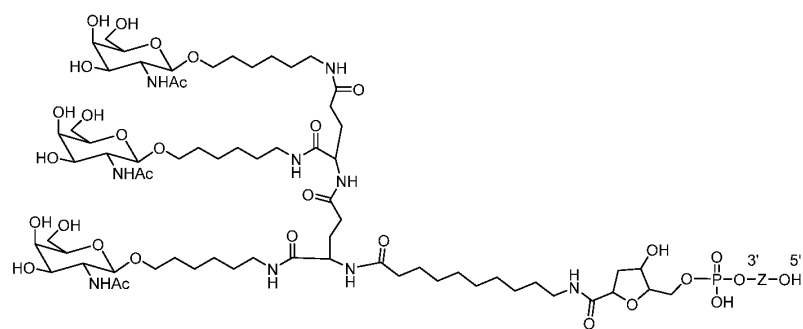
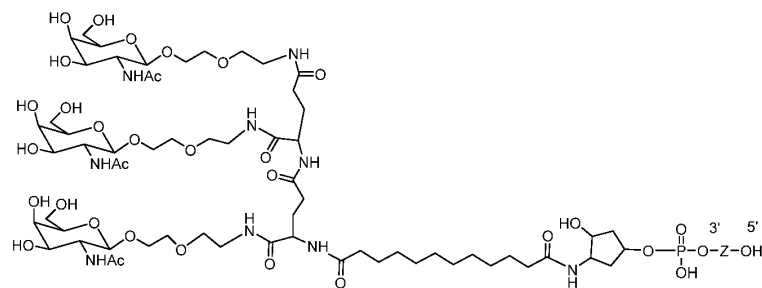
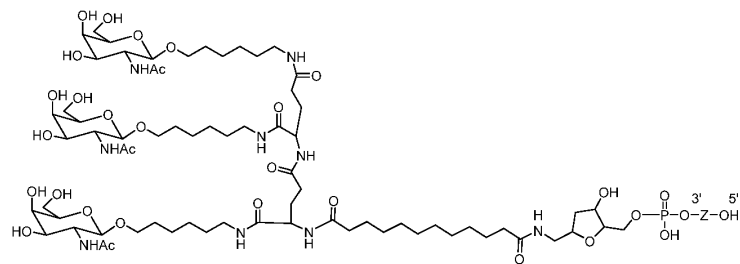
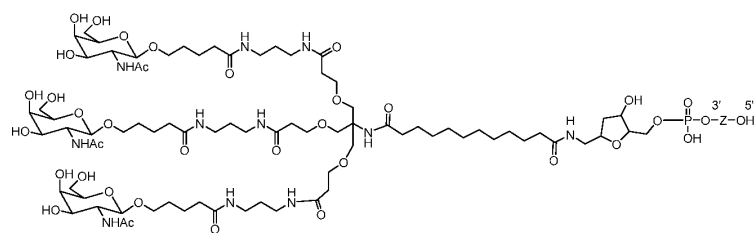
—O—Z—O— 代表核酸。

24. 根据权利要求 21-23 中任一项所述的核酸配体缀合物, 所述核酸配体缀合物为以下任一结构或其药学上可接受的盐,



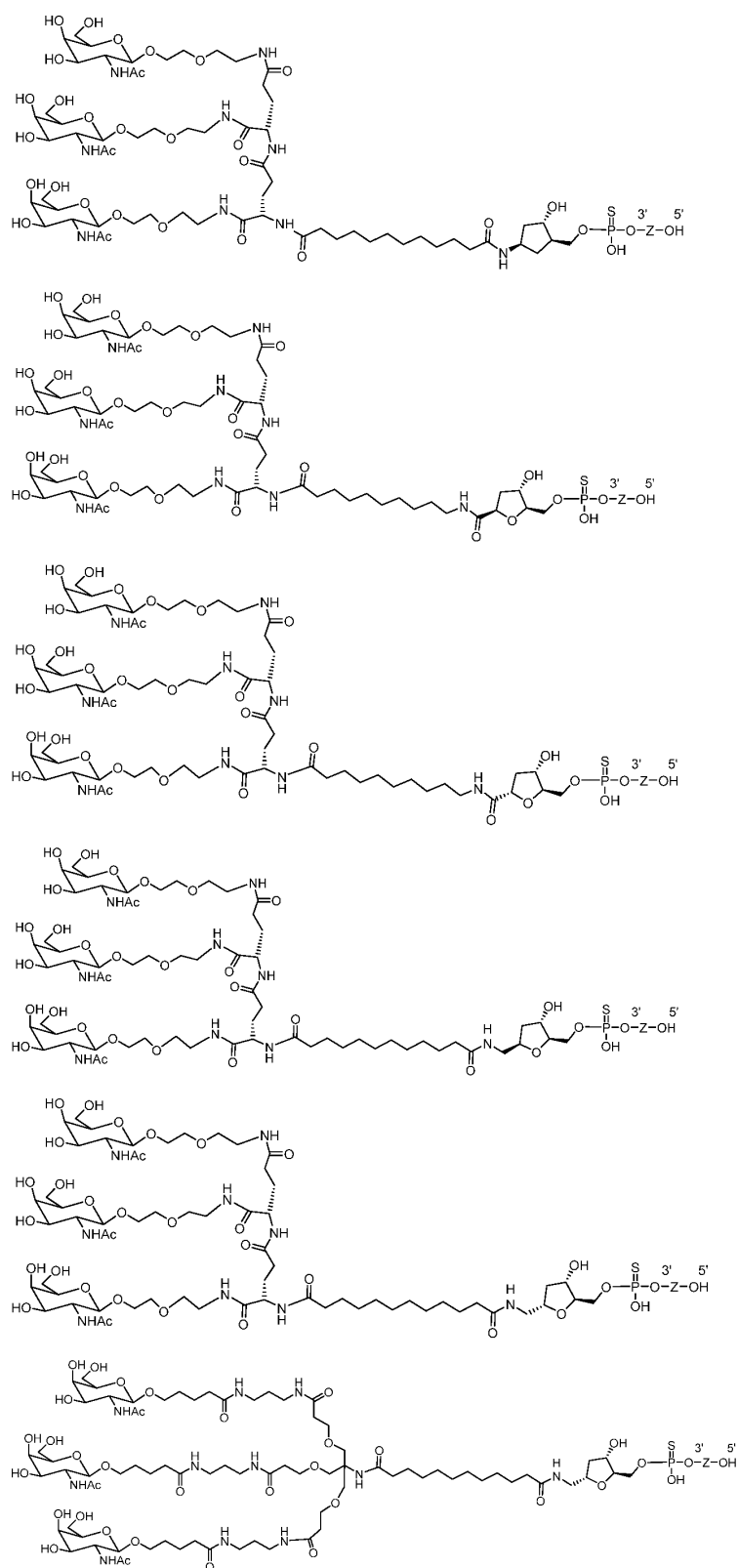


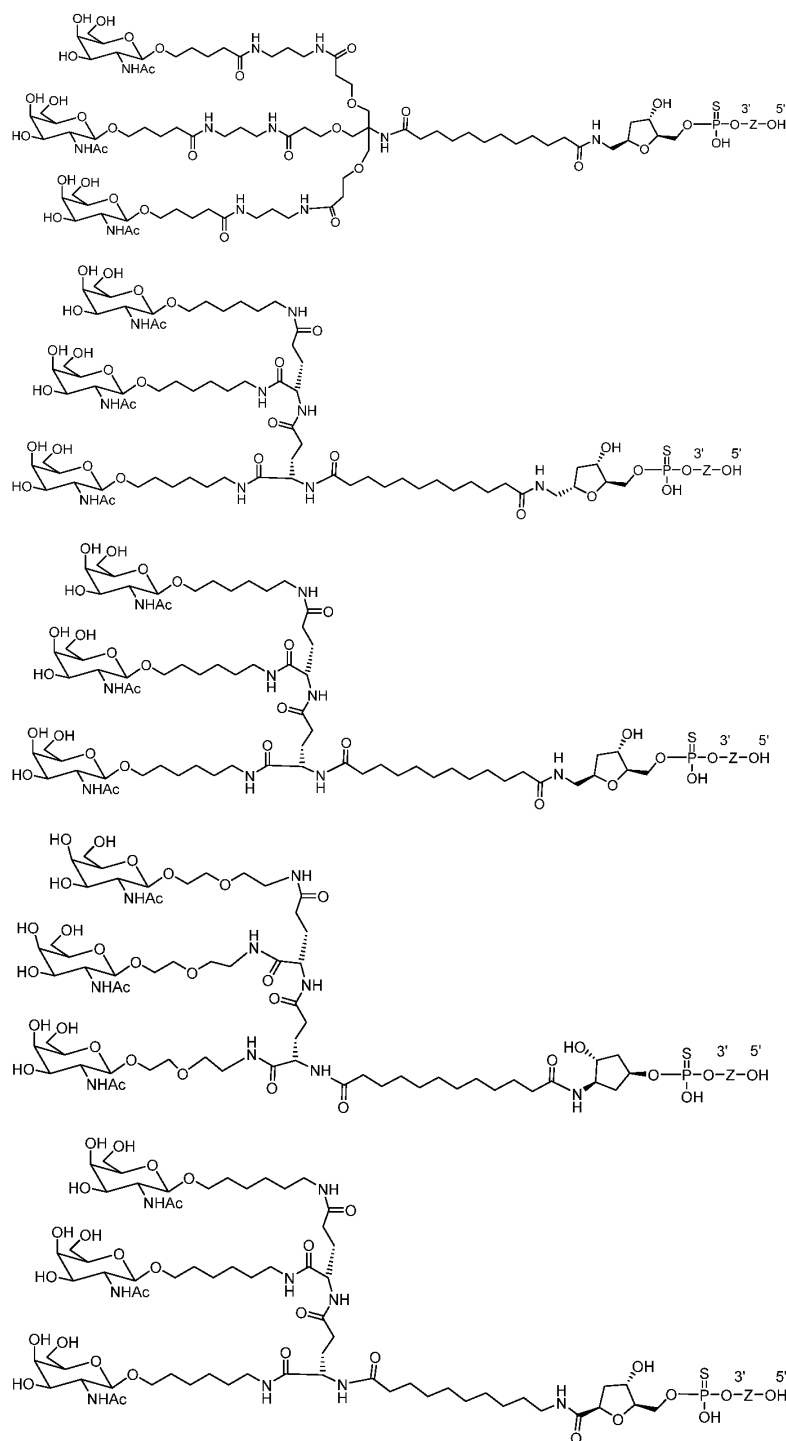


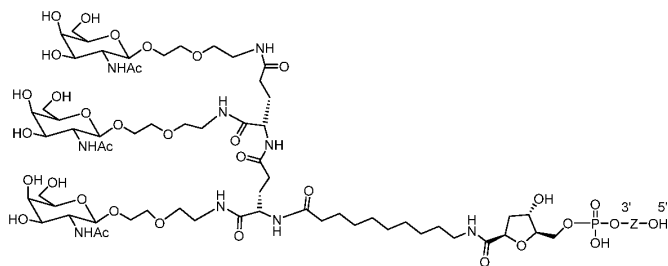
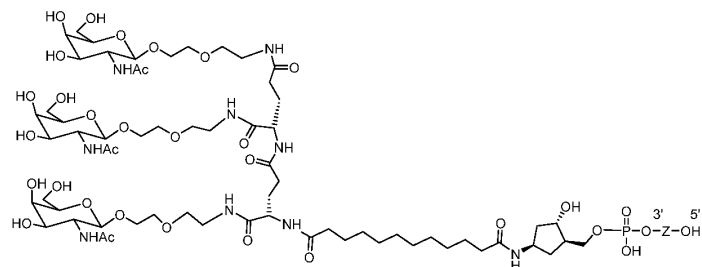
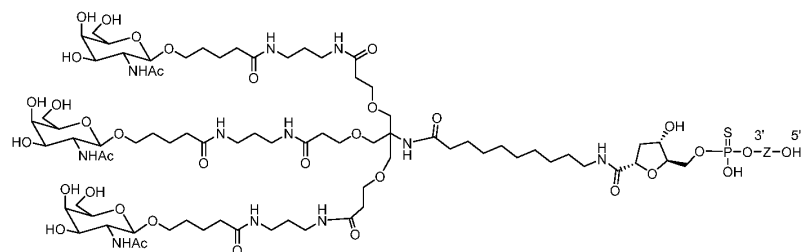
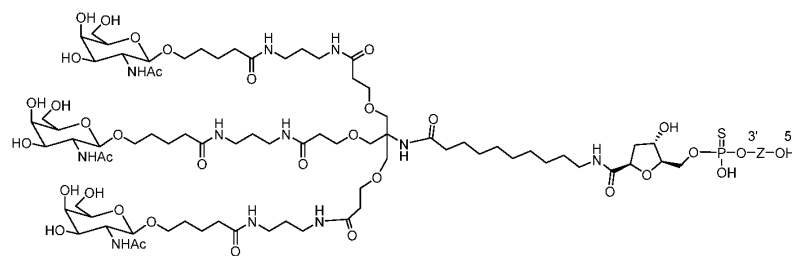
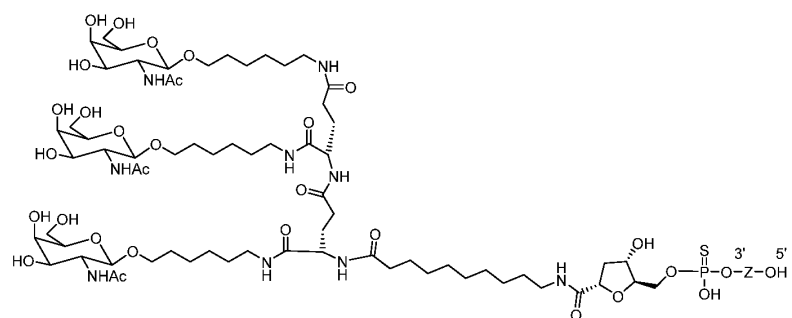


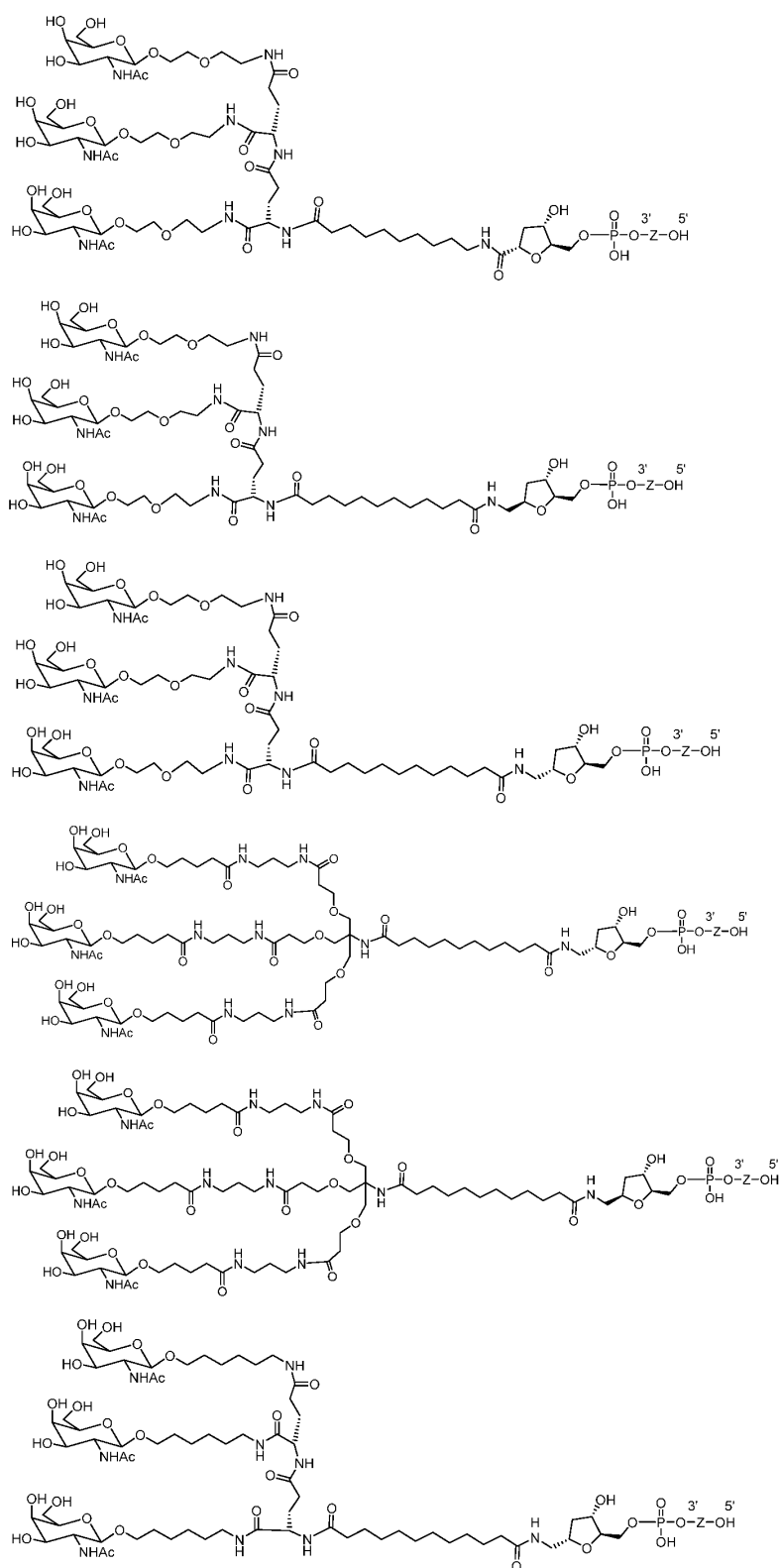
或

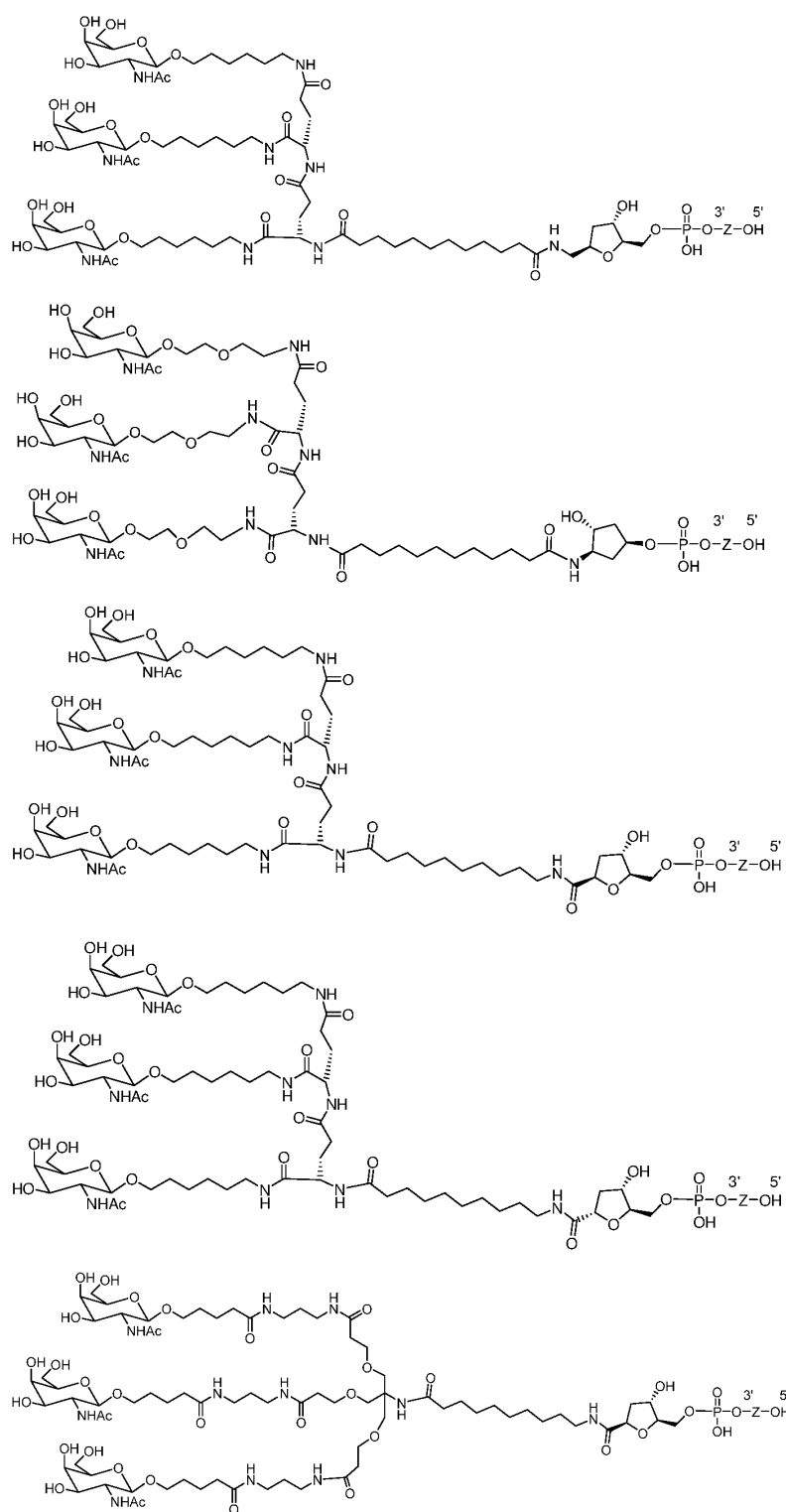
25. 根据权利要求 21-24 中任一项所述的核酸配体缀合物，所述核酸配体缀合物为以下任一结构或其药学上可接受的盐，



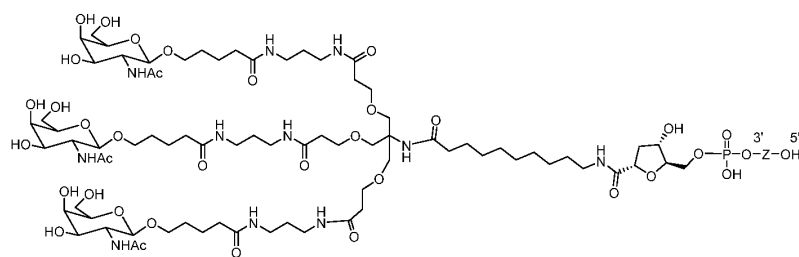








或



26. 一种 RNAi 试剂，其包含根据权利要求 21-25 中任一项所述的核酸配体缀合物，所述 RNAi 试剂优选为 siRNA。

27. 一种组合物，其包含根据权利要求 21-25 中任一项所述的核酸配体缀合物或根据权利要求 26 所述的 RNAi 试剂，和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

28. 一种根据权利要求 21-25 中任一项所述的核酸配体缀合物或根据权利要求 26 所述的 RNAi 试剂或根据权利要求 27 所述的组合物在制备治疗患者疾病的药物中的用途，所述疾病优选肝源性疾病。

29. 一种抑制患者体内 mRNA 表达或将表达抑制性寡聚化合物体内递送至肝脏的方法，其包括向患者给予根据权利要求 21-25 中任一项所述的核酸配体缀合物或根据权利要求 26 所述的 RNAi 试剂或根据权利要求 27 所述的组合物。

30. 一种根据权利要求 21-25 中任一项所述的核酸配体缀合物的制备方法，其包括以下步骤：以根据权利要求 17-20 中任一项所述的化合物作为起始，按照核苷酸排布顺序自 3'-5' 方向逐一连接核苷单体。