

一种含有核糖环或其衍生结构的 GalNAc 化合物及其寡核苷酸缀合物

本申请要求发明名称为“一种含有核糖环或其衍生结构的GalNAc化合物及其寡核苷酸缀合物”的中国专利申请20231118366.4的优先权，此全文引用上述中国专利申请公开的内容以作为本申请的一部分。

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种具有核糖环结构的GalNAc化合物，由其制备的GalNAc寡核苷酸缀合物。

背景技术

核酸药物尤其是寡核苷酸药物，由于其合成简单、活性较高而得到广泛应用。寡核苷酸药物通常包括反义寡核苷酸（ASO）、小干扰RNA（siRNA）、微小RNA（miRNA）和核酸适配体等。

寡核苷酸是一类短的DNA或RNA分子、寡聚体，寡核苷酸很容易以序列特异性的方式与它们各自的互补寡核苷酸、DNA或RNA结合，形成双链体，或者更不常见的是更高阶的杂合体。这种基本特性使得寡核苷酸在基因检测、靶向基因治疗的研究和医药学中具有广泛的应用。这些小片段的核酸可以制造为具有任何指定序列的单链分子。在自然界中，寡核苷酸通常是在基因表达调节中起作用的小RNA分子，或者是源自较大核酸分子分解的降解中间体。

RNA干涉是一个针对外源基因的自然防御机制。siRNA能够通过对特定序列的识别并分解目标mRNA的方式敲除目标基因。

N-乙酰半乳糖胺（GalNAc），是一种与肝表面去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）结合的配体。去唾液酸糖蛋白受体是肝细胞表面特异性表达的一种内吞型受体。近年来，利用ASGPR的高亲和性配体GalNAc作为靶向分子，在核酸药物的肝靶向递送方面取得了一定的进展。例如，阿尔尼拉姆公司（Alnylam pharmaceuticals, Inc.）报道了基于GalNAc缀合技术的siRNA在小鼠体内发挥基因沉默活性（Nair JK, et al. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958）。文中报道了GalNAc与siRNA的缀合物，在体内和体外实验中均展现

了良好的递送活性。通过皮下给药的小鼠体内实验，单一剂量的ED₅₀确定为1 mg/kg，单次注射剂量小于1 mL。在长期给药实验中，每周皮下注射一次，可获得长达9个月的稳定干扰活性。研究发现，四触角和三触角GalNAc化合物，对ASGPR的亲合力要远远高于双触角和单触角GalNAc化合物。

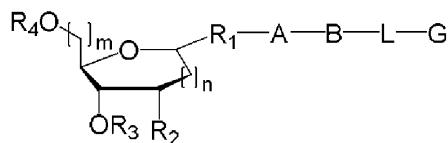
前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (PCSK9) 是一种由692个氨基酸组成的糖蛋白，属前蛋白转化酶 (PCs) 家族中的第九个成员，是一种分泌型丝氨酸蛋白酶，主要在肝脏和肠道等组织中表达，然后分泌到血液中。PCSK9进入血液循环后可与肝细胞表面的低密度脂蛋白受体 (LDL-R) 的表皮生长因子样结构域特异性结合，引导其进入肝细胞到达溶酶体，使LDL-R在溶酶体中降解，从而导致肝细胞表面LDL-R减少，进而降低肝脏结合和清除LDL-C的能力，最终导致血液中LDL-C水平升高。因此，可通过抑制PCSK9治疗高胆固醇血症。此外，最新研究显示，PCSK9升高与肥胖及2型糖尿病密切相关，也与肾病综合症及蛋白尿等慢性肾病密切相关，因此，通过抑制PCSK9可以成为预防和治疗这些与其相关的疾病的重要手段。

不同的GalNAc配体结构，对核酸递送效果差别很大。为了提高对肝靶向药物，例如PCSK9抑制剂类药物的递送效果，本领域仍然有开发新的GalNAc配体化合物的需求。

发明内容

本发明设计了一系列新型GalNAc化合物，通过固相合成方法，本发明的新型GalNAc化合物可以与寡核苷酸高效缀合，由其制备的GalNAc寡核苷酸缀合物，与现有技术结构类似的GalNAc化合物相比，显著提高了肝靶向递送效率。

第一方面，本发明提供式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐：



I

其中，

R₁为氧或硫，优选为氧；

R₂为氢、C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基或卤素；

R₃为氢、羟基保护基、含磷活性反应基团、-CO(CH₂)_xCONH-○ 或

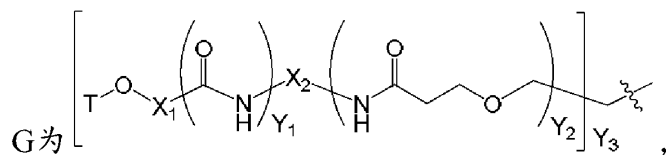
$-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$, 其中 x 是1-10的整数, $\bigcirc$ 为可控孔玻璃或聚苯乙烯;

R_4 为氢或羟基保护基;

A 为 $-(\text{CH}_2)_a-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ 、 $-(\text{CH}_2)_c\text{NHCO}-$ 或 $-(\text{CH}_2)_c\text{CONH}-$, 其中,
 a 是1-15的整数, 优选为3-13的整数, b 是1-7的整数, 优选为2-5的整数, c 为
1-7的整数, 优选为2-6的整数, d 为1-5的整数, 优选为1-3的整数;

B 为 $-(\text{CH}_2)_e-$, 其中 e 为0-7的整数, 优选为1-5的整数。

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



其中,

T 为羟基用酰基全保护的N-乙酰-半乳糖胺、羟基用酰基全保护的半乳糖、羟基用酰基全保护的半乳糖胺、羟基用酰基全保护的N-甲酰-半乳糖胺(N-formyl-galactosamine)、羟基用酰基全保护的N-丙酰-半乳糖胺(N-propionyl-galactosamine)、羟基用酰基全保护的N-正丁酰-半乳糖胺(N-n-butanoyl-galactosamine)或羟基用酰基全保护的N-异丁酰-半乳糖胺(N-isobutanoyl-galactosamine), 优选为羟基用酰基全保护的N-乙酰-半乳糖胺, 其中酰基例如为乙酰基或苯甲酰基, 优选为乙酰基;

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

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

Y_1 为0或1;

Y_2 为0、1或2;

Y_3 为1、2或3;

m 为0-4的整数, 优选为0、1或2;

n 为0-4的整数, 优选为0、1或2。

在一种实施方案中, A 为 $-(\text{CH}_2)_{10}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_7-$ 、 $-(\text{CH}_2)_8-$ 、 $-(\text{CH}_2)_9-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{11}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{12}-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCO}-$ 或 $-(\text{CH}_2)_6\text{NHCO}-$ 。

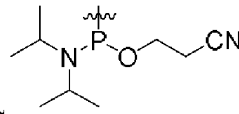
在一种实施方案中, B 为 $-(\text{CH}_2)_0-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-$ 或 $-(\text{CH}_2)_3-$ 。

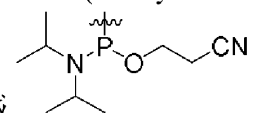
在一种实施方案中, R_1 为氧。

在一种实施方案中, R_1 为 α 构型或 β 构型。

在一种实施方案中, R_2 为氢或 $-\text{OCH}_3$ 。

在一种实施方案中, R_3 为羟基保护基或含磷活性反应基团。优选地, R_3 为酰基、甲硅烷基(silyl)、三苯甲基(trityl)、单甲氧基三苯甲基、4,4'-二甲氧

基三苯甲基或 。更优选地, R_3 为乙酰基、1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷基(TIPDS, 1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxanylidene)、叔丁基二甲基甲硅烷基(t-butyl dimethylsilyl)、苯基二甲基甲硅烷基、4,4'-二甲氧基三苯甲基

或 。

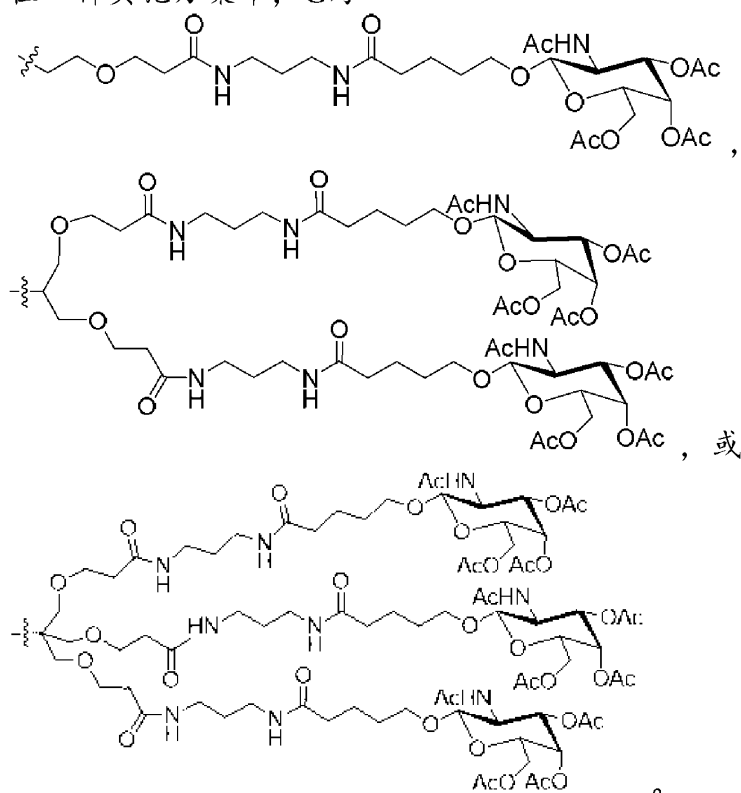
在另一种实施方案中, R_3 为 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}-\text{O}$ 。在又一种实施方案中, R_3 为 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ 。

在一种实施方案中, R_4 为羟基保护基, 优选为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或 4,4'-二甲氧基三苯甲基, 更优选为 4,4'-二甲氧基三苯甲基。

在一种实施方案中, m 为 1。

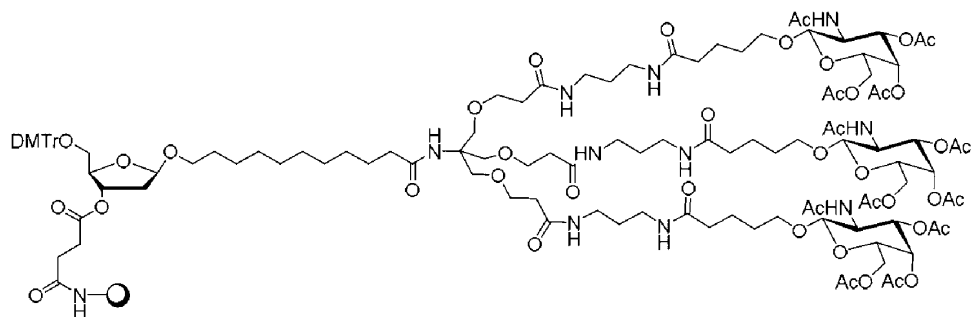
在一种实施方案中, n 为 0。

在一种实施方案中, G 为

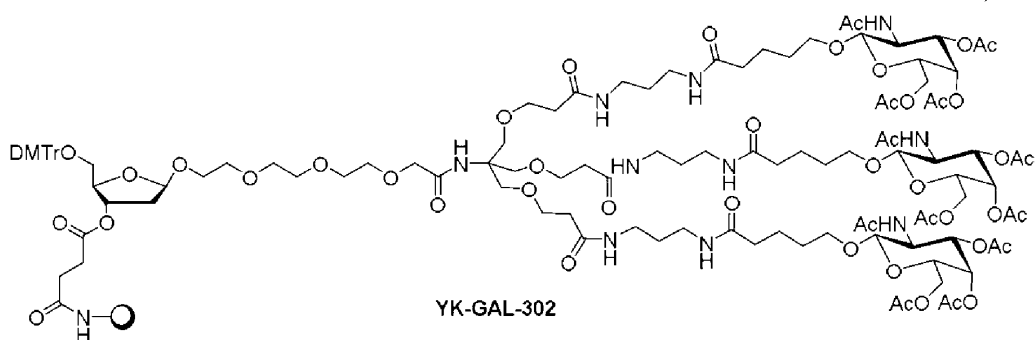


在一种实施方案中, 所述式 (I) 化合物为具有以下结构的化合物

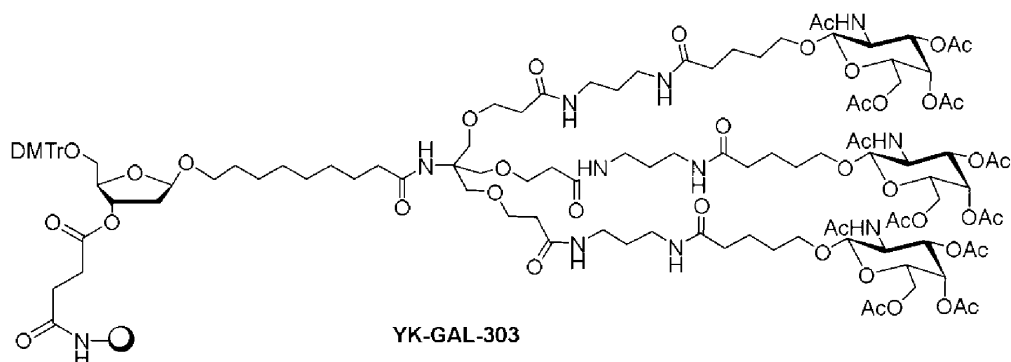
YK-GAL-301、YK-GAL-302、YK-GAL-303、YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306、YK-GAL-307、YK-GAL-308、YK-GAL-309、YK-GAL-310、YK-GAL-311、YK-GAL-312或YK-GAL-313:



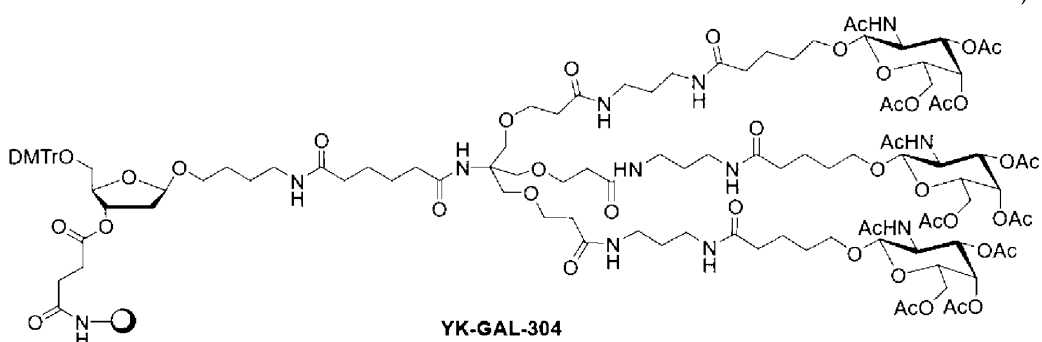
YK-GAL-301



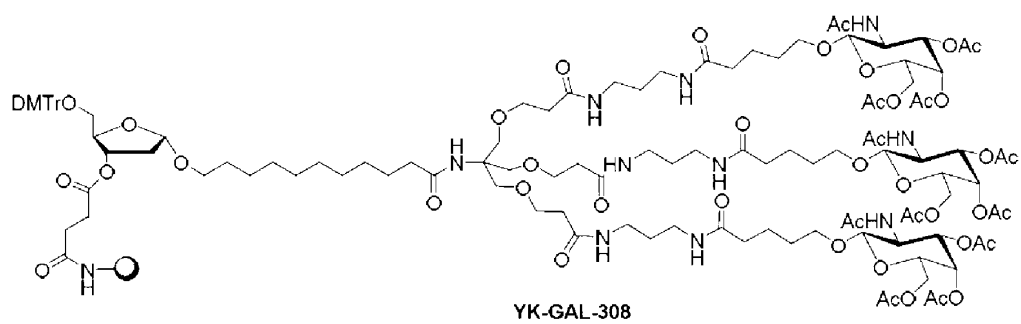
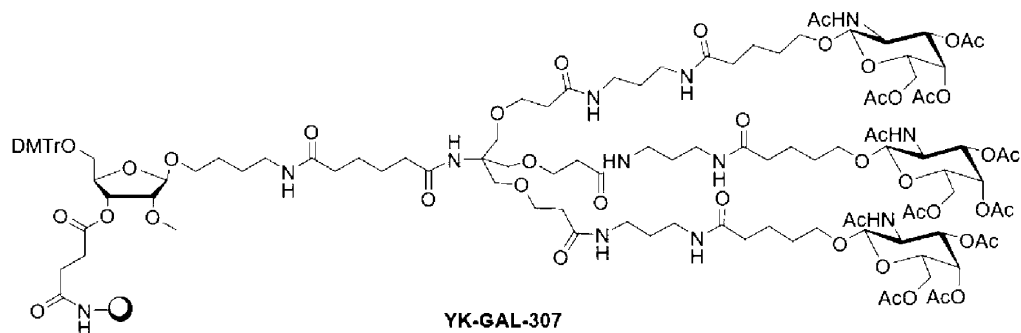
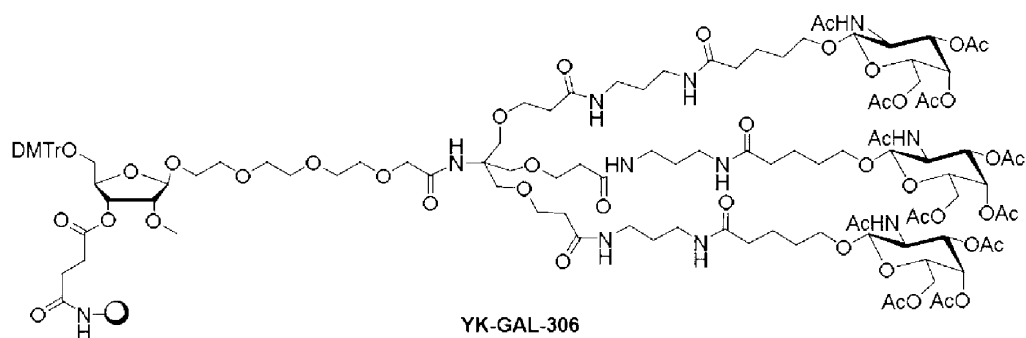
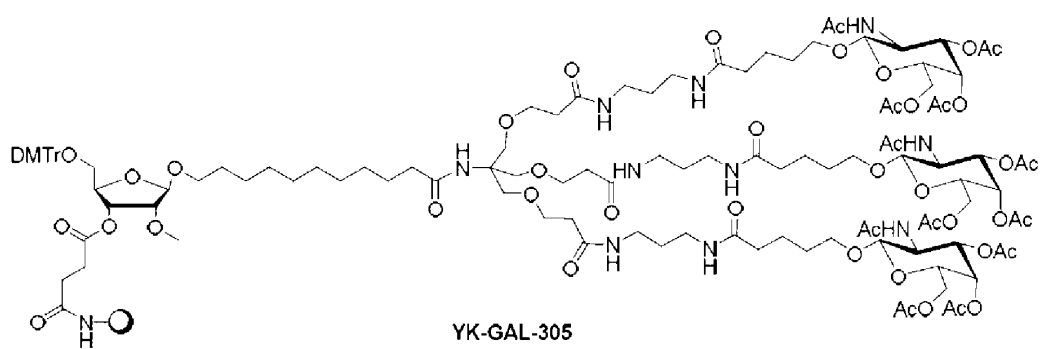
YK-GAL-302

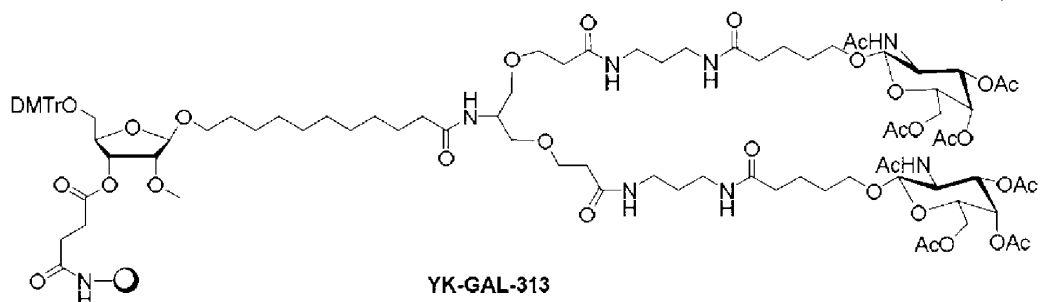
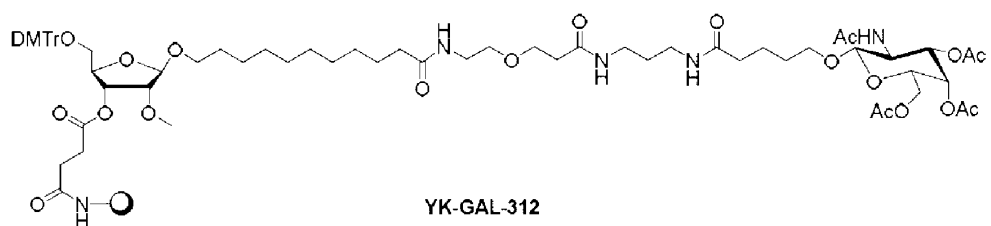
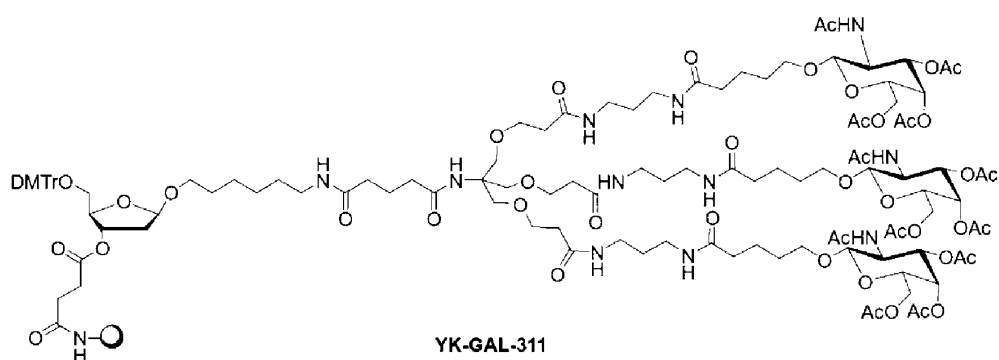
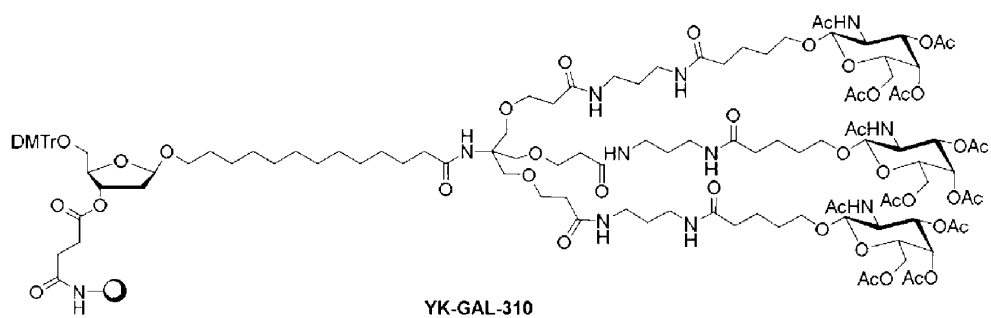
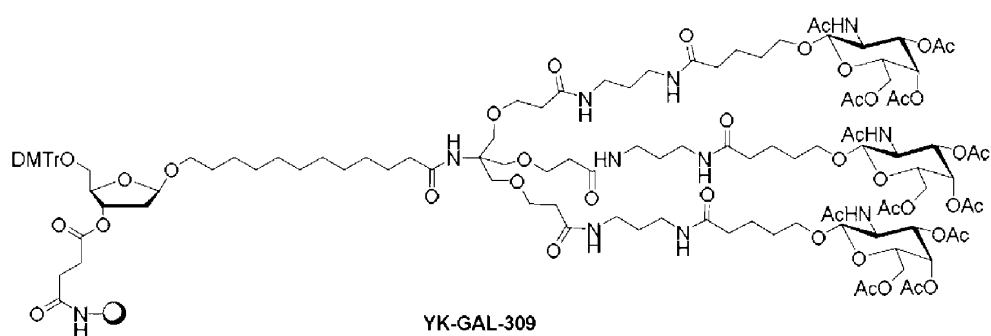


YK-GAL-303



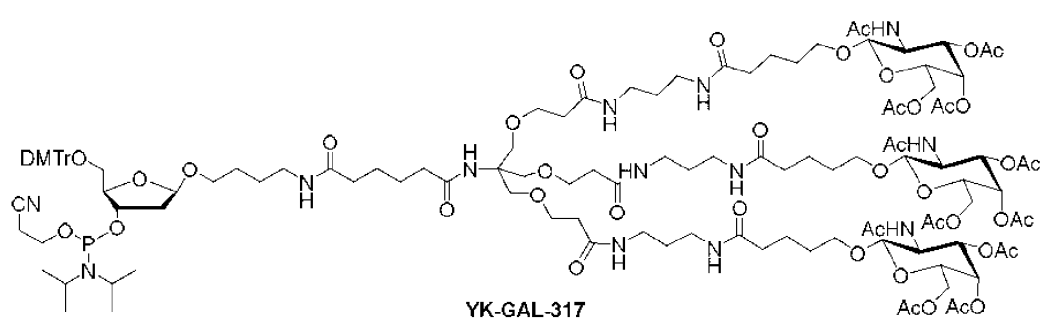
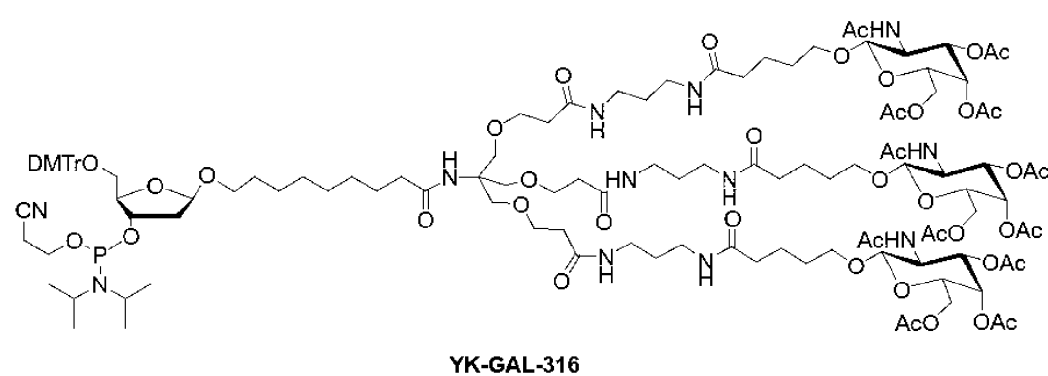
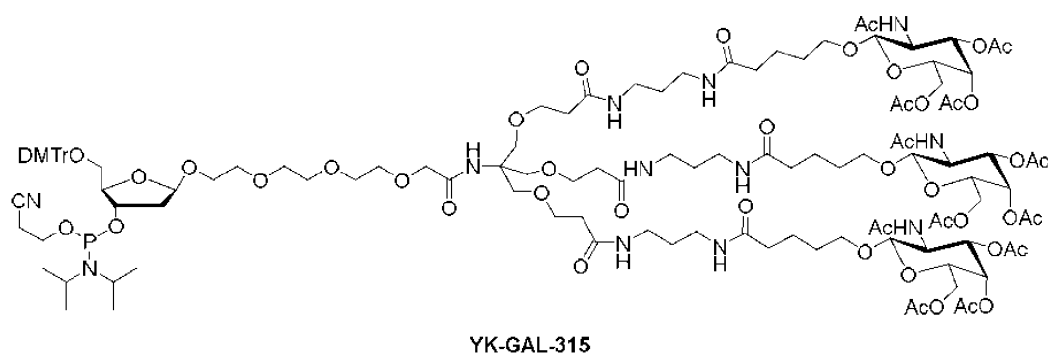
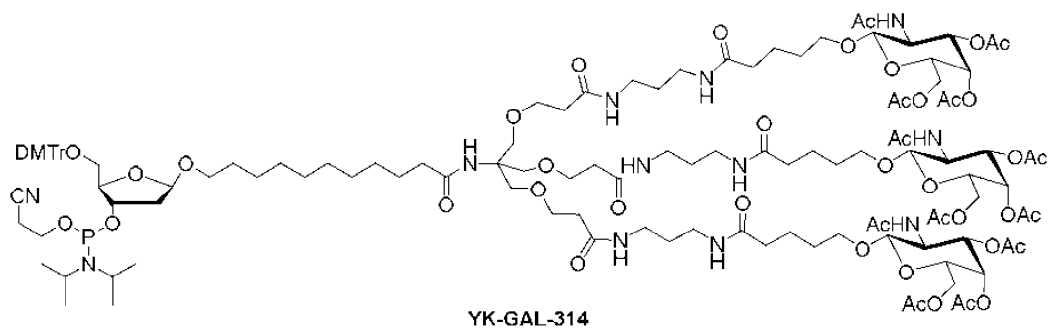
YK-GAL-304

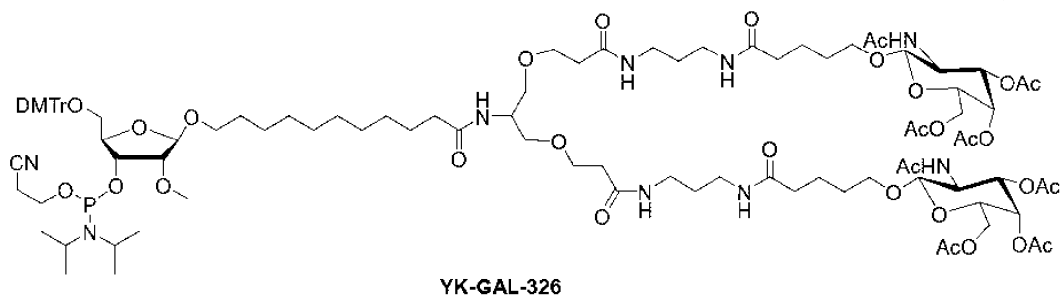
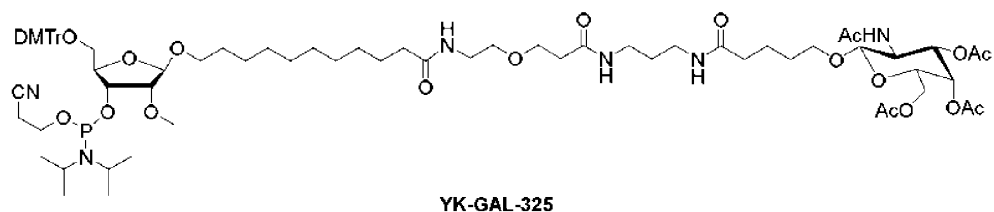
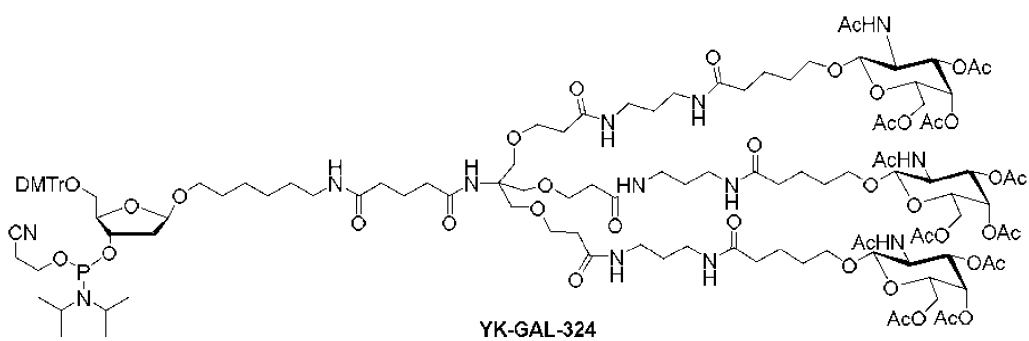
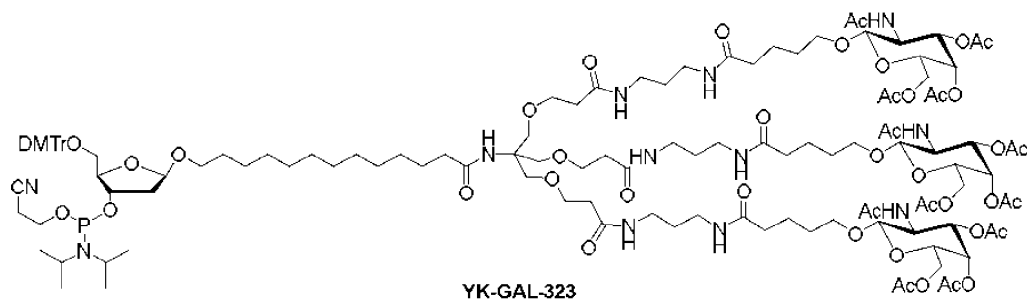
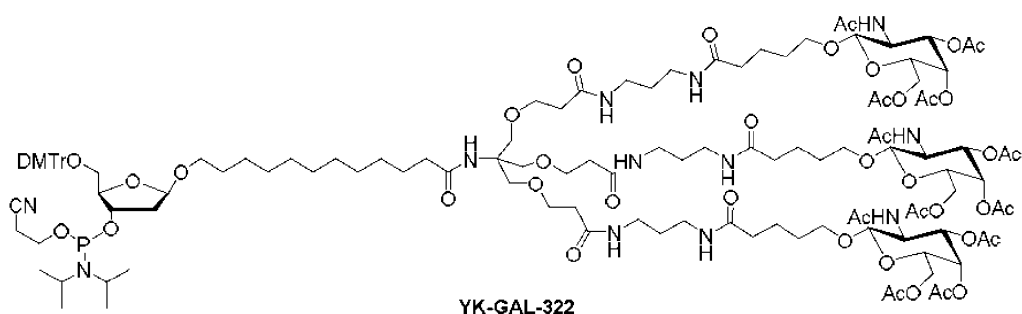




其中○为可控孔玻璃。

在另一种实施方案中，所述式 (I) 化合物为具有以下结构的化合物 YK-GAL-314、YK-GAL-315、YK-GAL-316、YK-GAL-317、YK-GAL-318、YK-GAL-319、YK-GAL-320、YK-GAL-321、YK-GAL-322、YK-GAL-323、YK-GAL-324、YK-GAL-325或YK-GAL-326：

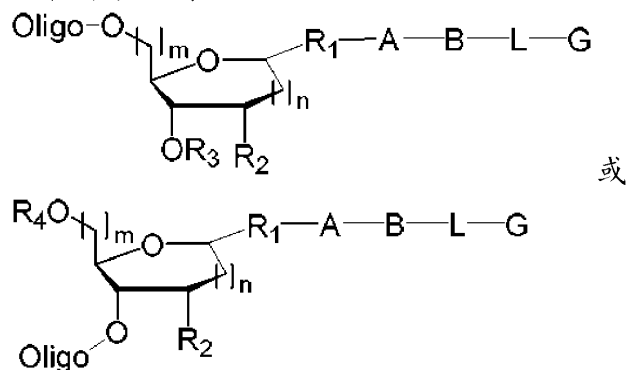




可选地，上述式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐能够结合脱唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR)。

第二方面，本发明提供一种缀合物，其包含寡核苷酸和GalNAc部分，

具有如下所示结构：



其中，Oligo代表寡核苷酸， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、A、B、L、G、m和n如前所述。

可选地，在所述缀合物中的G的N-乙酰-半乳糖胺中的羟基保护基乙酰基被脱除。

可选地，所述寡核苷酸包括非硫代寡核苷酸和硫代寡核苷酸。在一种实施方案中，所述非硫代寡核苷酸和所述GalNAc部分通过磷酸酯键连接。在另一种实施方案中，所述硫代寡核苷酸和所述GalNAc部分通过硫代磷酸酯键连接。

可选地，所述寡核苷酸包括小干扰核苷酸（siRNA）、DNA、微小RNA（miRNA）、小激活RNA（saRNA）、小向导RNA（small guide RNA, sgRNA）、转运RNA（tRNA）、反义核苷酸（ASO）或适配体（Aptamer），优选为反义核苷酸（ASO）或小干扰核苷酸（siRNA）。在一种实施方案中，所述反义核苷酸（ASO）或小干扰核苷酸（siRNA）中每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。

可选地，所述寡核苷酸调节靶基因的表达。

第三方面，本发明提供一种药物组合物，其包含上述第二方面的缀合物和至少一种药学上可接受的赋形剂。

第四方面，本发明提供上述第二方面的缀合物或上述第三方面的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防由肝细胞中特定基因的表达而引起的病理状况或疾病的药物中的用途，可选地，所述特定基因选自乙型肝炎病毒基因、血管生成素蛋白3基因或者载脂蛋白C3基因。

在一种实施方案中，所述疾病选自慢性肝病、肝炎、肝纤维化疾病、肝增生性疾病和血脂异常；可选地，所述血脂异常为高胆固醇血症、高甘油三

酯血症或动脉粥样硬化。

第五方面，本发明提供一种抑制肝细胞中特定基因表达的方法，包括将有效量的上述第二方面的缀合物或上述第三方面的药物组合物与所述肝细胞进行接触；

可选地，所述特定基因选自以下基因中的一种：前蛋白转化酶枯草溶菌素9基因（PCSK9）、ApoB、ApoC、ANGPTL3、SCD1、FVII、p53、HBV、HCV；

可选地，所述特定基因选自前蛋白转化酶枯草溶菌素9基因（PCSK9）、乙型肝炎病毒基因、血管生成素样蛋白3基因或者载脂蛋白C3基因。

第六方面，本发明提供一种试剂盒，其包括上述第二方面的缀合物。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对实施例的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅涉及本发明的一些实施例，而非对本发明的限制。

图1显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13、G18-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在第7天和第14天对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率。

图2显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G1、inc-G2、inc-G3、inc-G8、inc-G9、inc-G10、inc-G25、G26-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在第7天和第14天对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率。

图3显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13、G18-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在第14天对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率。

图4显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G1、inc-G2、inc-G3、inc-G8、inc-G9、inc-G10、inc-G25、G26-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在第14天对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率。

图5显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13、G18-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在第7天和第14天对小鼠血清中LDL-C水平的影响。

图6显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G1、inc-G2、inc-G3、inc-G8、inc-G9、

inc-G10、inc-G25、G26-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在第7天和第14天对小鼠血清中LDL-C水平的影响。

图7显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G5、inc-G7、inc-L96和inc-GalNAc 1b组给药8小时后，小鼠活性成像情况。(a: inc-G5; b: inc-G7; c: inc-L96; d: inc-GalNAc 1b)

图8显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13、G18-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在小鼠肝脏中半衰期。

图9显示GalNAc缀合siRNA序列inc-G1、inc-G2、inc-G3、inc-G8、inc-G9、inc-G10、inc-G25、G26-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2在小鼠肝脏中半衰期。

具体实施方式

为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明实施例的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例是本发明的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于所描述的本发明的实施例，本领域普通技术人员在无需创造性劳动的前提下所获得的所有其它实施例，都属于本发明保护的范围。

本发明可在不偏离本发明基本属性的情况下以其它具体形式来实施。应该理解的是，在不冲突的前提下，本发明的任一和所有实施方案都可与任一其它实施方案或多个其它实施方案中的技术特征进行组合以得到另外的实施方案。本发明包括这样的组合得到的另外的实施方案。

本发明中提及的所有出版物和专利在此通过引用以它们的全部内容纳入本发明。如果通过引用纳入的任何出版物和专利中使用的用途或术语与本发明中使用的用途或术语冲突，那么以本发明的用途和术语为准。

本文所用的章节标题仅用于组织文章的目的，而不应被解释为对所述主题的限制。

除非另有规定，本文使用的所有技术术语和科学术语具有要求保护主题所属领域的通常含义。倘若对于某术语存在多个定义，则以本文定义为准。

除了在工作实施例中或另外指出之外，在说明书和权利要求中陈述的定量性质例如剂量的所有数字应理解为在所有情况中被术语“约”修饰。还应理

解的是，本申请列举的任何数字范围意在包括该范围内的所有的子范围和该范围或子范围的各个端点的任何组合。

本发明中使用的“包括”、“含有”或者“包含”等类似的词语意指出现该词前面的要素涵盖出现在该词后面列举的要素及其等同，而不排除未记载的要素。本文所用的术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由...组成”、或“由...组成”。

术语“药学上可接受的”在本申请中是指：化合物或组合物在化学上和/或在毒理学上与构成制剂的其它成分和/或与用其预防或治疗疾病或病症的人类或哺乳动物相容。

术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的相对无毒、无机酸或有机酸加成盐。例如，参见S. M. Berge等人“Pharmaceutical Salts”，*J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1-19。其中，无机酸例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸或硝酸等；有机酸例如甲酸、乙酸、乙酰乙酸、丙酮酸、三氟乙酸、丙酸、丁酸、己酸、庚酸、十一酸、月桂酸、苯甲酸、水杨酸、2-(4-羟基苯甲酰基)-苯甲酸、樟脑酸、肉桂酸、环戊烷丙酸、二葡萄糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、烟酸、巴莫酸、果胶酯酸、3-苯基丙酸、苦味酸、特戊酸、2-羟基乙磺酸、衣康酸、胺基磺酸、三氟甲磺酸、十二烷基硫酸、乙磺酸、苯磺酸、对-甲苯磺酸、甲磺酸、2-萘磺酸、萘二磺酸、樟脑磺酸、柠檬酸、酒石酸、硬脂酸、乳酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、己二酸、海藻酸、马来酸、富马酸、D-葡萄糖酸、扁桃酸、抗坏血酸、葡庚糖酸、甘油磷酸、天冬胺酸、磺基水杨酸等。例如，可使用HCl(或盐酸)、HBr(或氢溴酸溶液)、甲磺酸、硫酸、酒石酸或富马酸与式(I)所示的化合物形成药学上可接受的盐。

术语“烷基”在本申请中是指包括具有规定碳原子数的支链和直链饱和脂族一价烃基。例如“C₁₋₄烷基”包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

术语“烷氧基”是指式-OR，其中R为本文所定义的烷基。烷氧基的非限制性列表为甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基(异丙氧基)、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、苯氧基和苯甲酰氧基。在一些情况下，烷氧基可以是-OR，其中R为未取代的C₁₋₄烷基。烷氧基可以是取代的或未取代的。

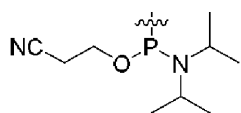
“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)和碘(I)，优选地是氟(F)和氯(Cl)。

在一种实施方案中，卤素是氟。

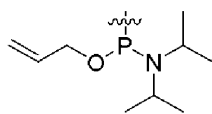
本文所用的术语“保护基”是指引入分子中以防止分子中现有基团进行不期望的化学反应的任何原子或原子团，其可以被去除以留下未受保护的基团。

羟基保护基可以使用例如在RNA或其衍生物的合成中通常被用于保护核糖结构的羟基的保护基团，也可参照Green等在Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Edition, 1999, John Wiley & Sons, Inc.文献中记载的保护基团，例如：乙酰基、苯氧乙酰基、新戊酰基、苄基、4-甲氧基苄基、苯甲酰基、三苯基甲基、4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr)、单甲氧基三苯甲基(MMTr, monomethoxytrityl)、9-苯基-咕吨-9-基(9-phenyl-xanthen-9-yl)、9-对甲苯基-咕吨-9-基(9-(p-tolyl)-xanthen-9-yl)、三甲基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、氟基甲氧基甲基、2-(氟基乙氧基)乙基、氟基乙氧基甲基等，优选4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr, 4,4'-dimethoxytrityl)。

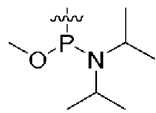
本文所用术语“含磷活性反应基团”是指能够通过亲核攻击反应，与包含在另一个分子中、尤其是另一个核苷酸单元中或另一个核苷酸类似物中的羟基或胺基发生反应的含磷基团。通常，这样的反应产生核苷酸单元或核苷酸类似物单元与另一个核苷酸单元或核苷酸类似物单元连接的酯型核苷间键。这些含磷活性反应基团是本领域已知的并且包含P^{III}或P^V价态的磷原子，所述含磷活性反应基团包括但不限于亚磷酰胺、H-磷酸酯、磷酸三酯和含磷手性助剂。含磷活性反应基团例如：



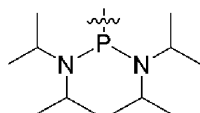
2-氰乙氧基-N,N-二异丙胺基磷基、



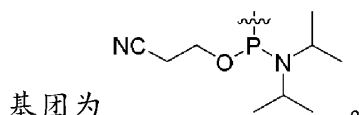
2-丙烯氧基--N,N-二异丙胺基磷基、



甲氧基-N,N-二异丙胺基磷基、



双二异丙胺基磷基等。在一种实施方案中，含磷活性反应



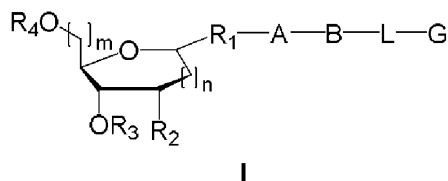
本文所述的可控孔玻璃(CPG)和聚苯乙烯(高度交联的聚苯乙烯微珠)是用于寡核苷酸合成的固体载体,其在合成过程中与寡核苷酸结合的不溶性颗粒,是可商购的。

本文所用的术语“核苷酸”包括天然存在的核苷酸和化学修饰的核苷酸。化学修饰的核苷酸是非天然存在的核苷酸,在本文中也称为“核苷酸类似物”。

本文中针对“T”描述的“羟基用酰基全保护的”是指半乳糖结构中除了用于与X₁连接的羟基之外其它羟基都被酰基保护,其中酰基例如为乙酰基、氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基、新戊酰基、异丁酰基或苯甲酰基。

式(I) 化合物或其药学上可接受的盐

本发明提供式(I) 化合物或其药学上可接受的盐:



其中,

R₁为氧或硫, 优选为氧;

R₂为氢、C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基或卤素;

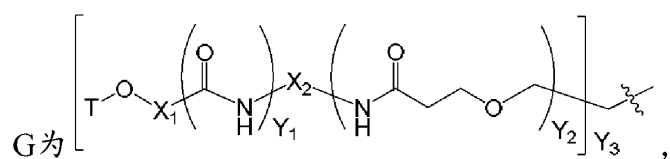
R₃为氢、羟基保护基、含磷活性反应基团、-CO(CH₂)_xCONH-○或-CO(CH₂)_xCOOH, 其中x是1-10的整数, ○为可控孔玻璃或聚苯乙烯;

R₄为氢或羟基保护基;

A为-(CH₂)_a-、-(CH₂CH₂O)_b-、-((CH₂)_cNHCO)_d-或-((CH₂)_cCONH)_d-, 其中, a是1-15的整数, 优选为3-13的整数, b是1-7的整数, 优选为2-5的整数, c为1-7的整数, 优选为2-6的整数, d为1-5的整数, 优选为1-3的整数;

B为-(CH₂)_e-, 其中e为0-7的整数, 优选为1-5的整数。

L为-CONH-或-NHCO-;



其中,

T为羟基用酰基全保护的N-乙酰-半乳糖胺、羟基用酰基全保护的半乳糖、羟基用酰基全保护的半乳糖胺、羟基用酰基全保护的N-甲酰-半乳糖胺(N-formyl-galactosamine)、羟基用酰基全保护的N-丙酰-半乳糖胺(N-propionyl-galactosamine)、羟基用酰基全保护的N-正丁酰-半乳糖胺(N-n-butanoyl-galactosamine)或羟基用酰基全保护的N-异丁酰-半乳糖胺(N-isobutanoyl-galactosamine)。例如, T为羟基用酰基全保护的N-乙酰-半乳糖胺, 其中酰基为乙酰基或苯甲酰基, 优选为乙酰基;

X_1 为 $-(CH_2)_f-$ 或 $-(CH_2CH_2O)_fCH_2-$, 其中f是1-5的整数;

X_2 为 $-(CH_2)_g-$, 其中g是1-6的整数;

Y_1 为0或1;

Y_2 为0、1或2;

Y_3 为1、2或3;

m为0-4的整数, 优选为0、1或2;

n为0-4的整数, 优选为0、1或2。

在一种实施方案中, A为 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_7-$ 、 $-(CH_2)_8-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{11}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_3-$ 、 $-(CH_2)_4NHCO-$ 或 $-(CH_2)_6NHCO-$ 。

在一种实施方案中, B为 $-(CH_2)_0-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 或 $-(CH_2)_3-$ 。

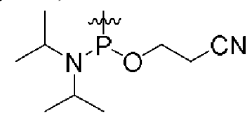
在一种实施方案中, R_1 为氧。

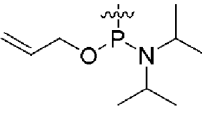
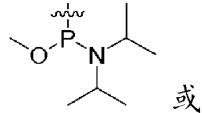
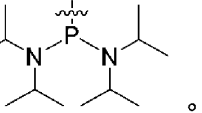
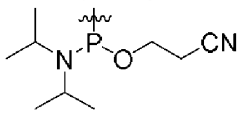
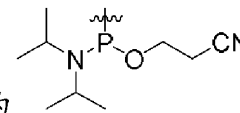
在一种实施方案中, R_1 为 α 构型或 β 构型。

在一种实施方案中, R_2 为氢或 $-OCH_3$ 。

在一种实施方案中, R_3 为羟基保护基或含磷活性反应基团。羟基保护基例如可以为酰基(例如, 乙酰基, 苯氧乙酰基, 4-异丙基苯氧乙酰基)、甲硅烷基(silyl)、三苯甲基(trityl)、单甲氧基三苯甲基(MMTr)或4,4'-二甲氧基三苯

甲基(DMTr), 含磷活性反应基团例如可以为





 或
 
 。优选地, R_3 为乙酰基、1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷基(TIPDS, 1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxanylidene)、叔丁基二甲基甲硅烷基(t-butyldimethylsilyl)、苯基二甲基甲硅烷基、4,4'-二甲氧基三苯甲基或
 
 。更优选地, R_3 为
 
 。

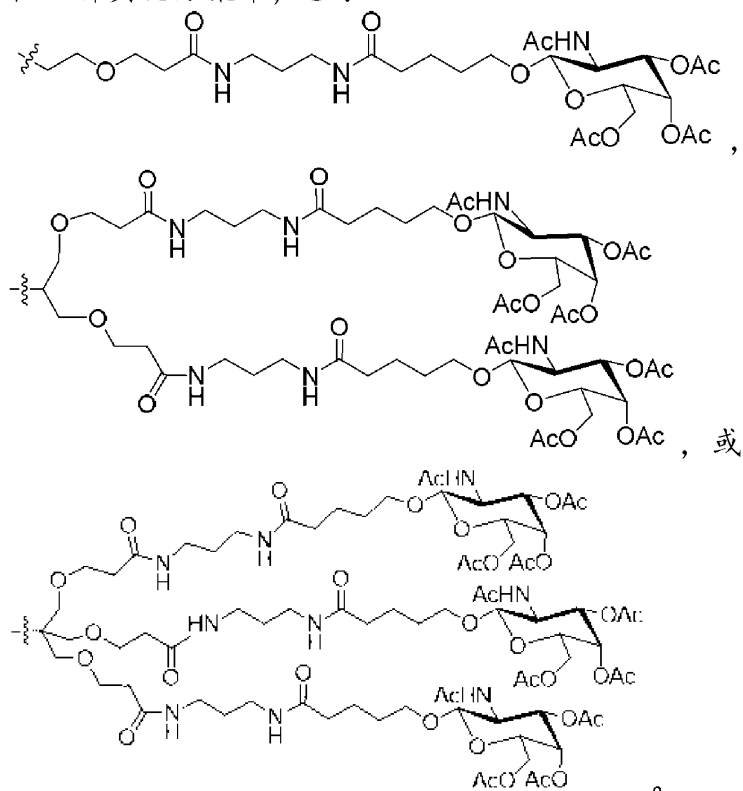
在另一种实施方案中, R_3 为 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}-\text{O}$ 。在又一种实施方案中, R_3 为 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ 。

在一种实施方案中, R_4 为羟基保护基, 优选为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或4,4'-二甲氧基三苯甲基, 更优选为4,4'-二甲氧基三苯甲基。

在一种实施方案中, m 为1。

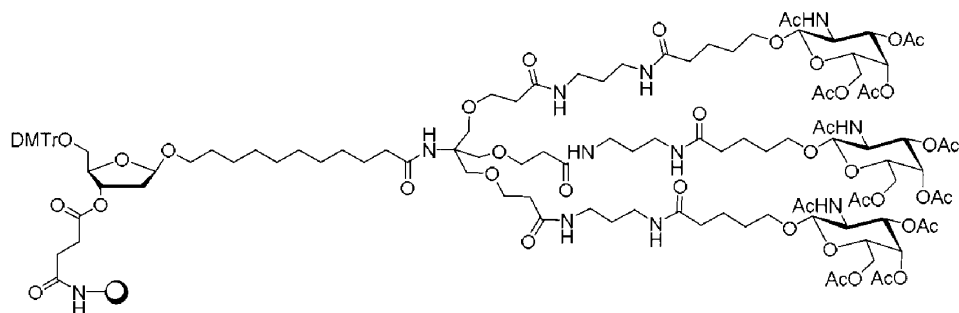
在一种实施方案中, n 为0。

在一种实施方案中, G 为

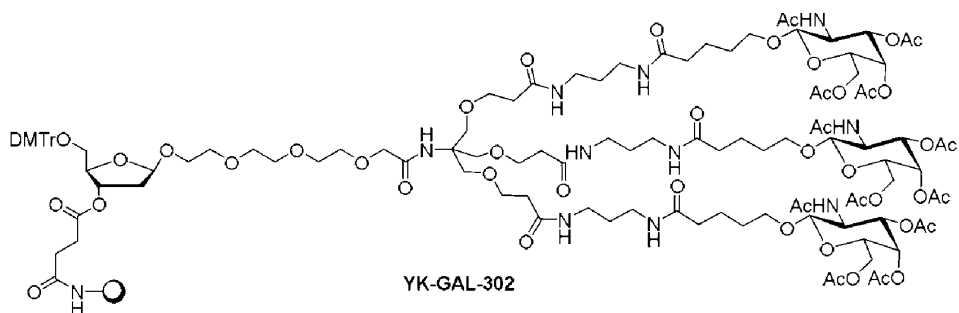


在一种实施方案中, 所述式 (I) 化合物为具有以下结构的化合物 YK-GAL-301、YK-GAL-302、YK-GAL-303、YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306、YK-GAL-307、YK-GAL-308、YK-GAL-309、YK-GAL-310、

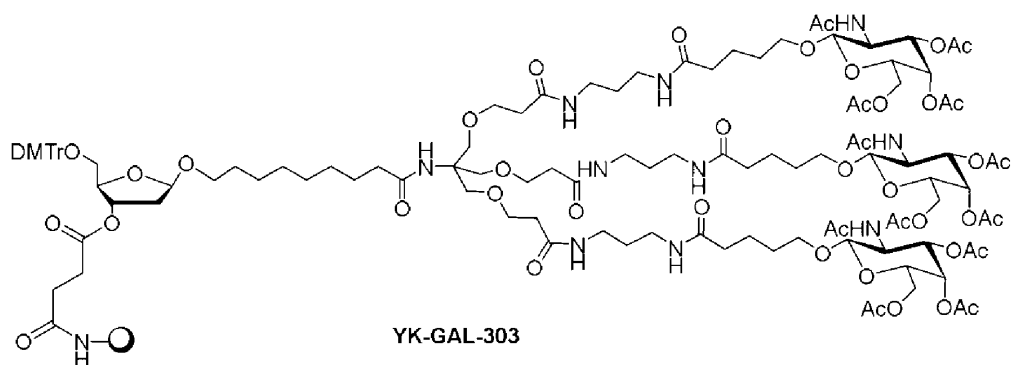
YK-GAL-311、YK-GAL-312或YK-GAL-313:



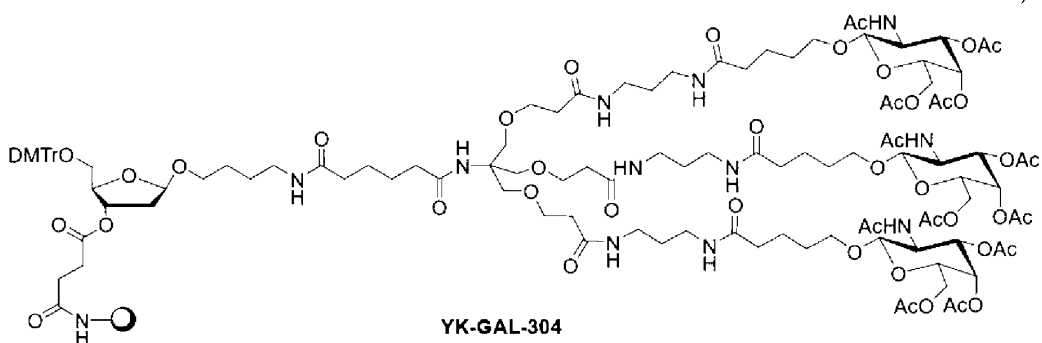
YK-GAL-301



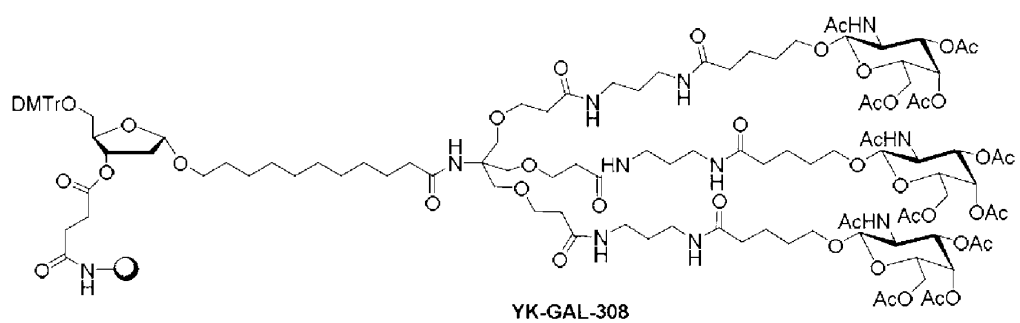
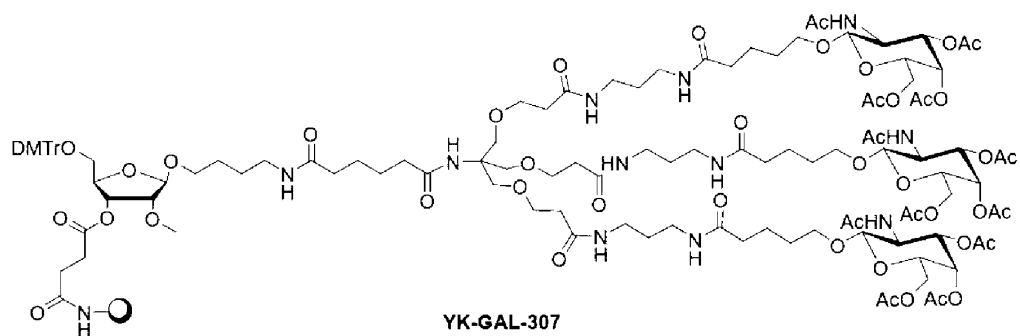
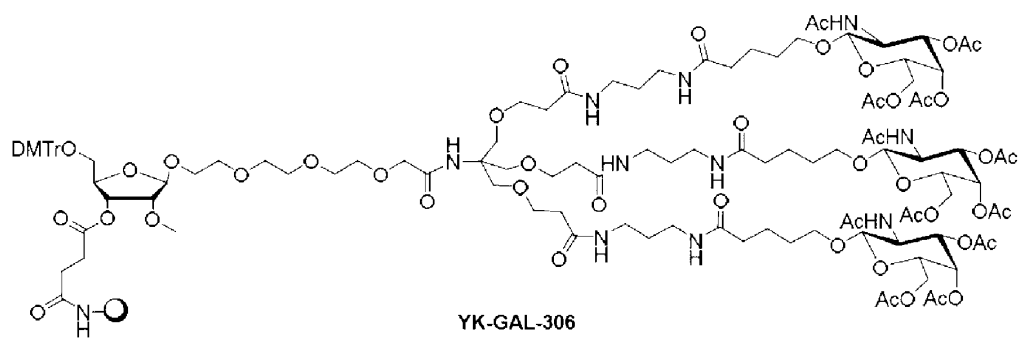
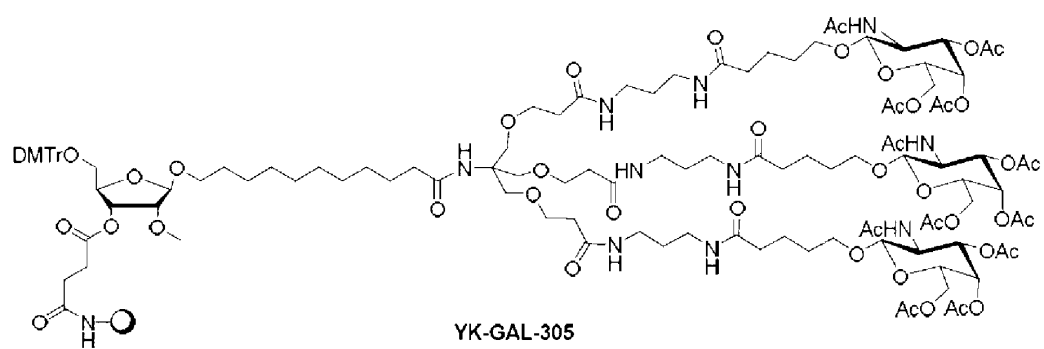
YK-GAL-302

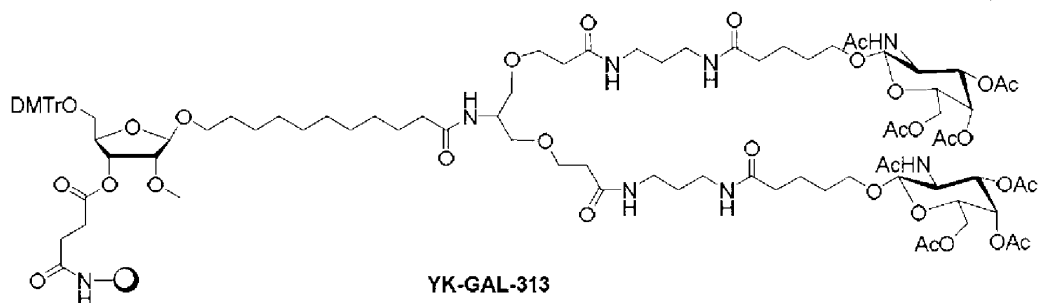
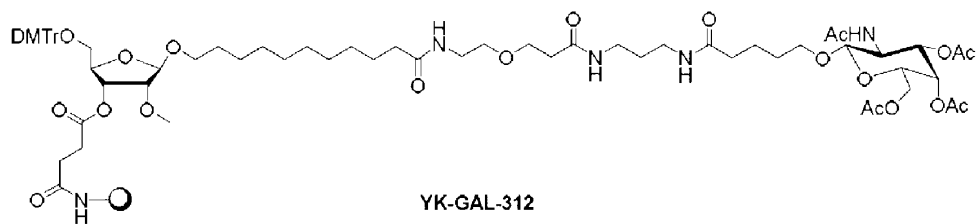
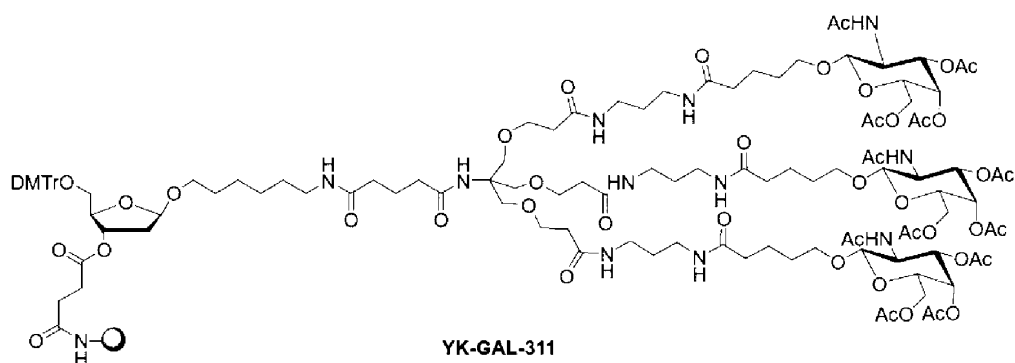
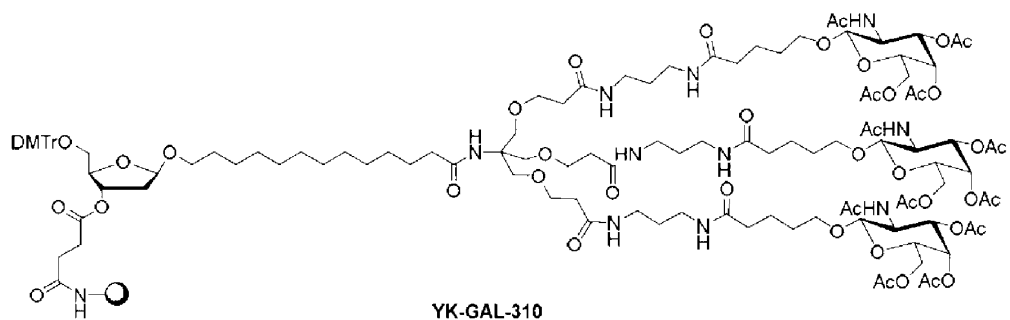
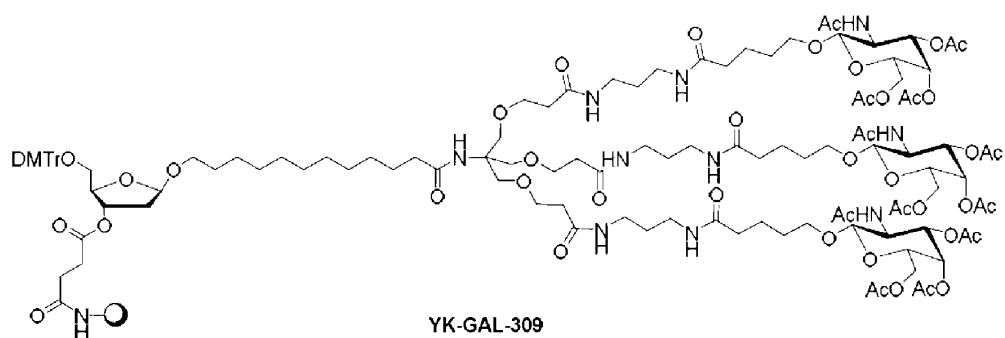


YK-GAL-303



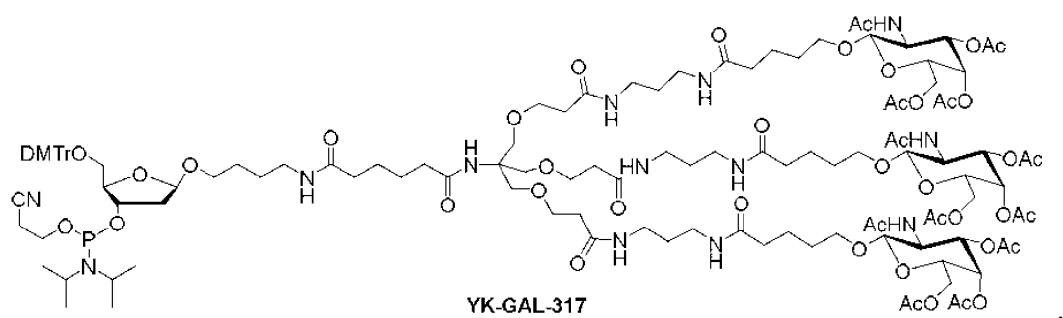
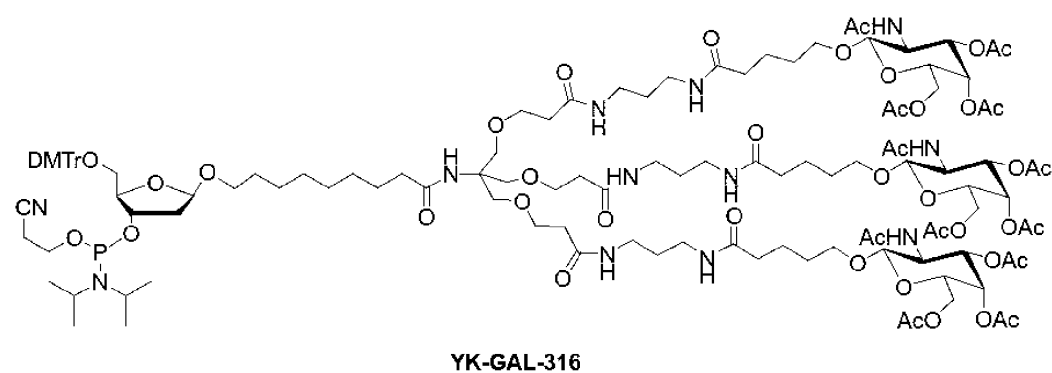
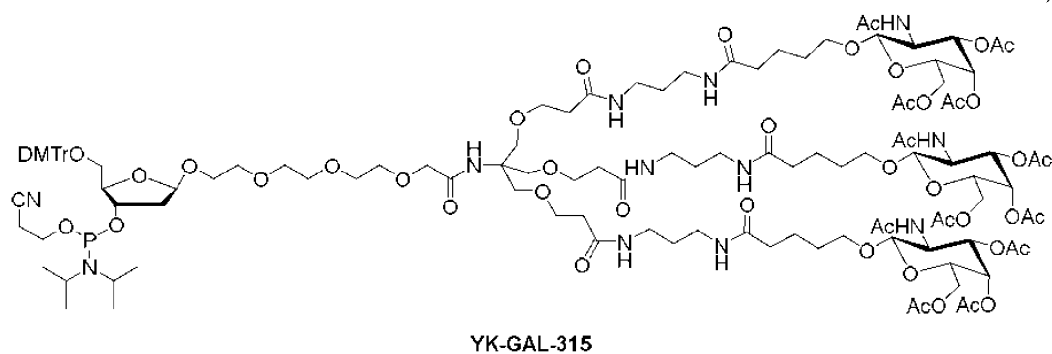
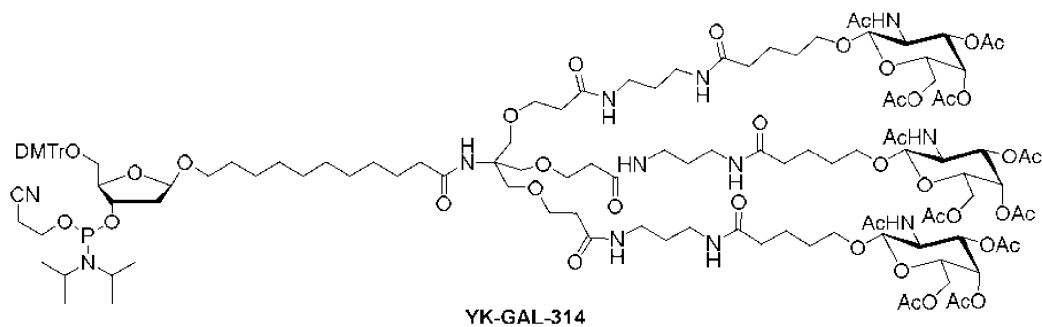
YK-GAL-304

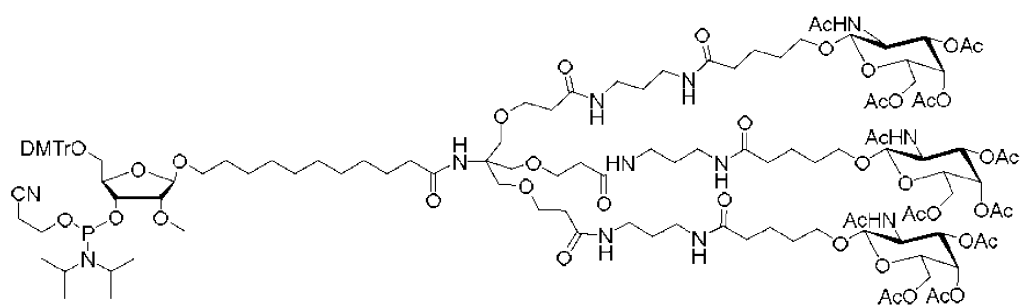




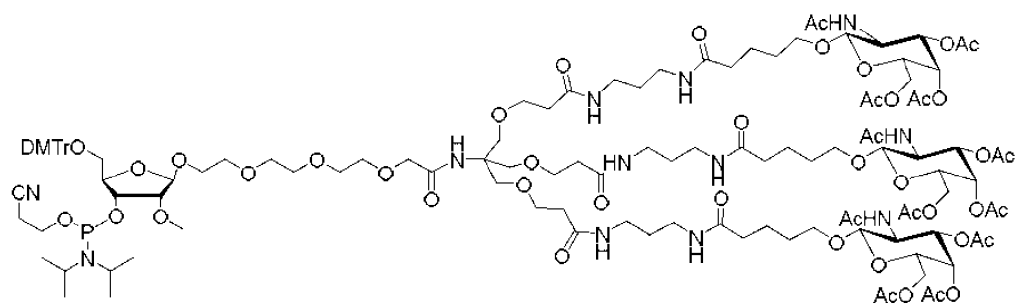
其中○为可控孔玻璃。

在另一种实施方案中，所述式(I)化合物为具有以下结构的化合物YK-GAL-314、YK-GAL-315、YK-GAL-316、YK-GAL-317、YK-GAL-318、YK-GAL-319、YK-GAL-320、YK-GAL-321、YK-GAL-322、YK-GAL-323、YK-GAL-324、YK-GAL-325或YK-GAL-326：

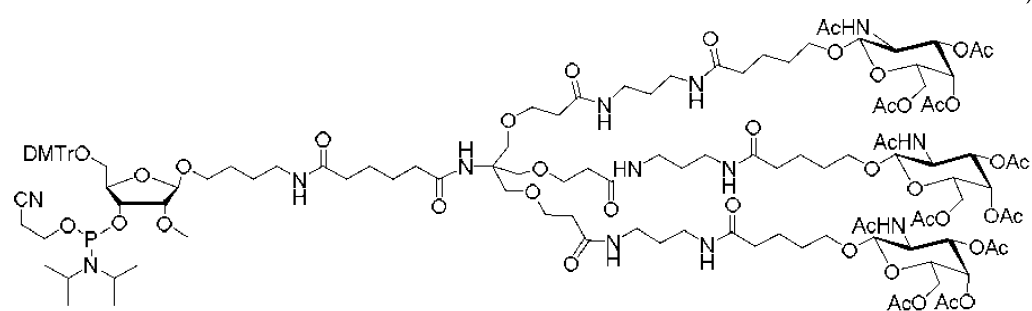




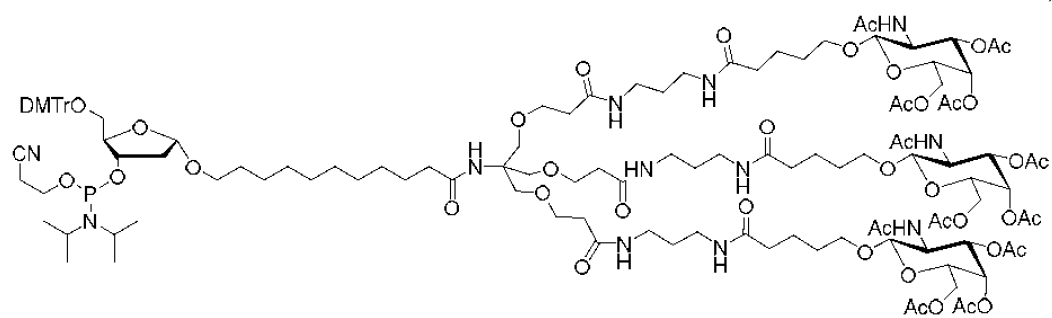
YK-GAL-318



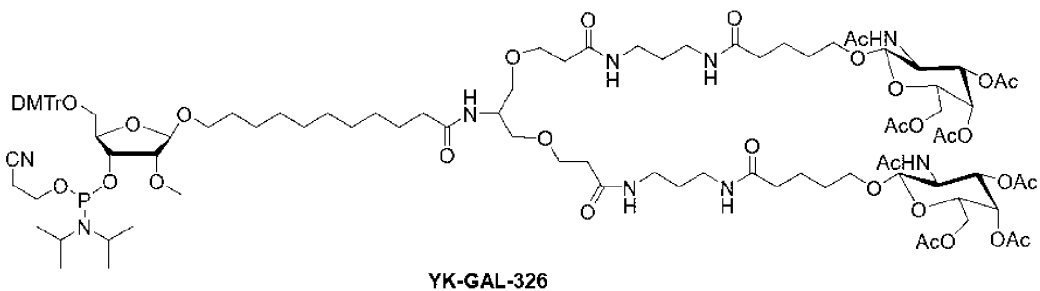
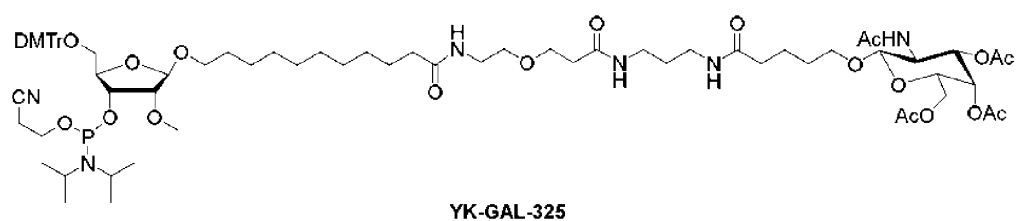
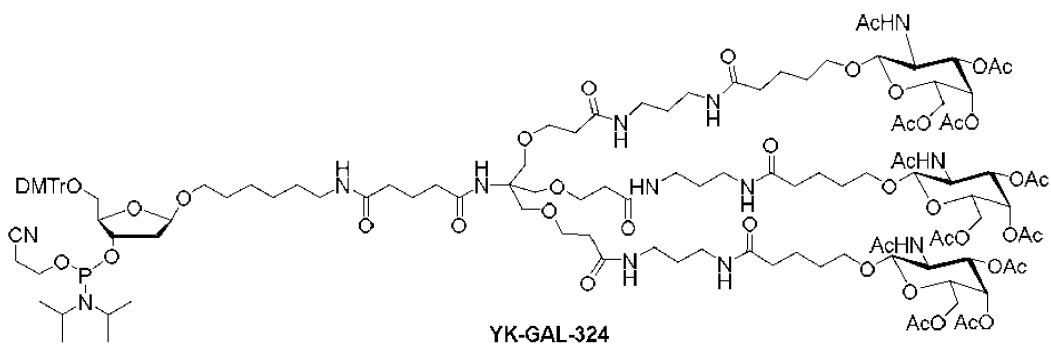
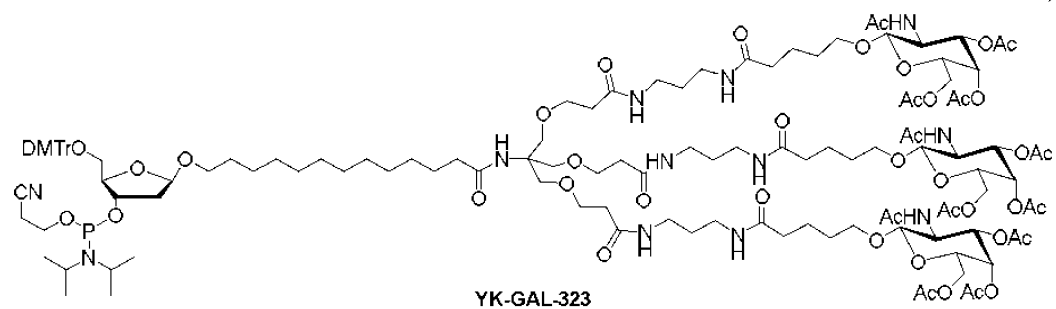
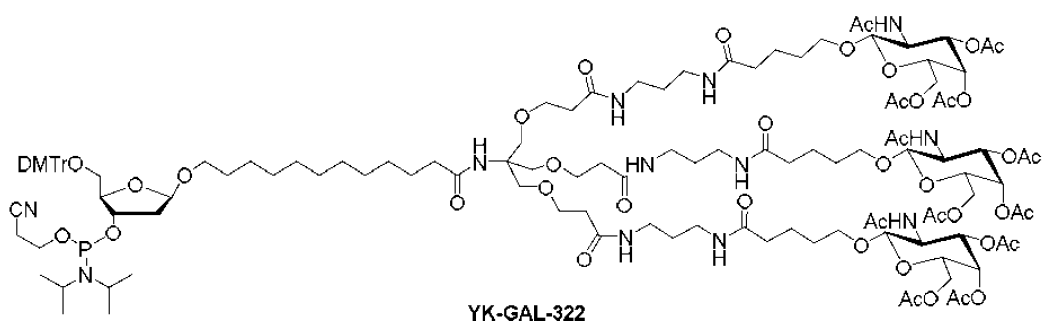
YK-GAL-319



YK-GAL-320



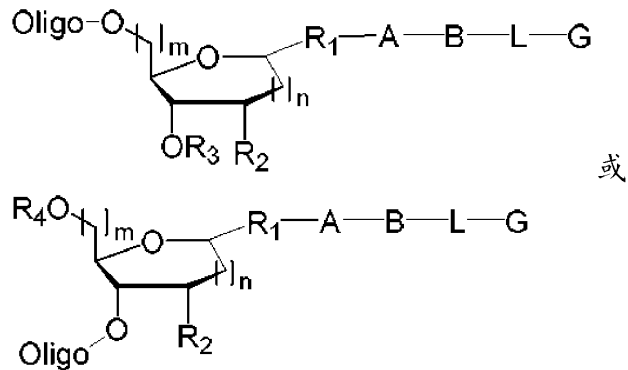
YK-GAL-321



可选地，上述式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐能够结合脱唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR)。

綴合物

本发明提供一种缀合物，其包含寡核苷酸和GalNAc部分，具有如下所示结构：



其中，Oligo代表寡核苷酸，R₁、R₂、R₃、R₄、A、B、L、G、m和n如前所述。

本发明的缀合物可以通过上述式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐与寡核苷酸的固相合成反应制备。GalNAc与寡核苷酸缀合常规的方法是固相合成方法。一种方法是把GalNAc化合物连接到CPG (Controlled Pore Glass, 可控微孔玻璃) 柱上, 通过固相合成实现GalNAc化合物与寡核苷酸的连接。另一种方法是将GalNAc化合物先制备成亚磷酰胺单体, 通过固相合成实现GalNAc化合物与寡核苷酸任意位置的连接。

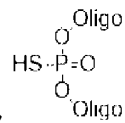
本申请中的寡核苷酸包括单链寡核苷酸（例如反义核苷酸，简称ASO）和双链寡核苷酸（例如小干扰核苷酸，简称siRNA）。在一种优选的实施方案中，寡核苷酸包含7-30个核苷酸。通过这样的寡核苷酸制得的缀合物将更具有治疗价值。

在一种实施方案中，寡核苷酸选自小干扰核苷酸、DNA、微小RNA (miRNA)、小激活RNA (saRNA)、小向导RNA (small guide RNA, sgRNA)、转运RNA (tRNA)、反义核苷酸或适配体 (aptamer)，优选寡核苷酸为反义核苷酸或小干扰核苷酸。

本申请中的寡核苷酸包括天然的寡核苷酸和化学修饰的寡核苷酸。此处的化学修饰包括核苷修饰(包括糖部分修饰和核碱基修饰)和核苷间键联修饰。寡核苷酸的化学修饰不包括仅在核碱基序列上有差异的情形。此处的天然是指天然存在的RNA或DNA对应的情形。

天然的寡核苷酸进入细胞困难,且易被胞内核酸酶降解,作用效果较差。通过对寡核苷酸的化学修饰,可以改善其特性,增加其生物利用度。在众多

修饰的寡核苷酸中，最具代表性的是硫代寡核苷酸，其中一种硫代方式为磷

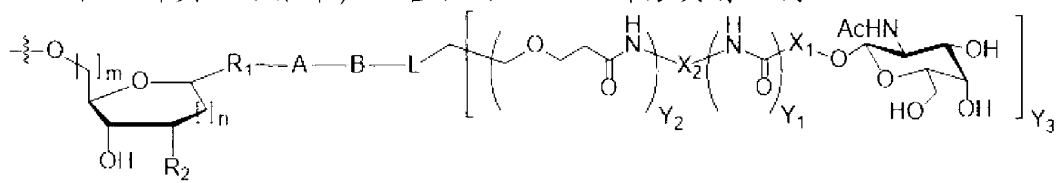


酸二酯键中的一个非桥氧原子被硫原子所取代，例如

硫代寡核苷酸可以是市售的，也可以通过常规的固相合成方法制备。可以使用氢化黄元素作为硫化剂。例如，可参考CN1479745A和CN113150041A合成硫代寡核苷酸。

可选地，在所述缀合物中的G的N-乙酰-半乳糖胺中的羟基保护基乙酰基被脱除，例如，通过在碱性溶液中水解得到羟基。

在一种实施方案中，缀合物的GalNAc部分具有结构



R_1 、 R_2 、 A 、 B 、 L 、 X_1 、 X_2 、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 m 和 n 如前所述。

例如，寡核苷酸和所述GalNAc部分通过键或可切割的连接体连接。此处的键可包括但不限于磷酸酯键和硫代磷酸酯键。

本申请中所用的可切割的连接体是指内化后由细胞内代谢进行切割的连接体，例如通过水解、还原或酶促反应进行切割。合适的连接体包括但不限于酸不稳定连接体、水解不稳定连接体、酶促可切割连接体和还原不稳定连接体。酸不稳定连接体可参考ADC药物（Mylotarg, Besponsas, Trodelvys）中的酸不稳定连接体。

可选地，所述寡核苷酸包括非硫代寡核苷酸和硫代寡核苷酸。在一种实施方案中，所述非硫代寡核苷酸和所述GalNAc部分通过磷酸酯键连接。在另一种实施方案中，所述硫代寡核苷酸和所述GalNAc部分通过硫代磷酸酯键连接。

可选地，所述寡核苷酸包括小干扰核苷酸(siRNA)、DNA、微小RNA(miRNA)、小激活RNA(saRNA)、小向导RNA(small guide RNA, sgRNA)、转运RNA(tRNA)、反义核苷酸(ASO)或适配体(Aptamer)，优选为反义核苷酸(ASO)或小干扰核苷酸(siRNA)。在一种实施方案中，所述反义核苷酸(ASO)或小干扰核苷酸(siRNA)中每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。

可选地，所述寡核苷酸调节靶基因的表达。

药物组合物

除缀合物外，本申请提供的组合物可以包括可用于药物组合物中的任何物质。例如，组合物可以包括一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助成分，如但不限于一种或多种溶剂、分散介质、稀释剂、分散助剂、悬浮助剂、造粒助剂、崩解剂、填充剂、助流剂、液体媒剂、粘合剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、缓冲剂、润滑剂、油、防腐剂、调味剂、着色剂等。赋形剂例如淀粉、乳糖或糊精。药学上可接受的赋形剂是本领域中众所周知的(参见例如Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, A.R.Gennaro; Lippincott, Williams&Wilkins, Baltimore, MD, 2006)。

可药用的稀释剂包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)，例如是无菌磷酸盐缓冲盐水。在一些实施方案中，缀合物以50-500 μ M溶液的浓度用于可药用的稀释剂中。WO 2007/031091提供合适的可药用的稀释剂、载体和辅料，还提供了合适的剂量、制剂、施用途径、组合物、剂型、与其他治疗药组合、前药制剂(该文献通过引用的方式并入)。

本发明的寡核苷酸缀合物可以与可药用的活性物质或惰性物质混合以制备药物组合物或制剂，可以通过常规消毒技术消毒，或可以进行无菌过滤。

试剂盒

本申请还提供包含如上所述的缀合物的试剂盒。在一些实施方案中，本申请提供的试剂盒包含容器，其包含如上所述的缀合物。在一些实施方案中，本申请提供的试剂盒进一步包括药学上可接受的辅料，例如稳定剂或防腐剂。在一些实施方案中，所述试剂盒还包含用于将缀合物与药学上可接受的辅料或其它成分(如果存在)进行混合的说明书。

实施例

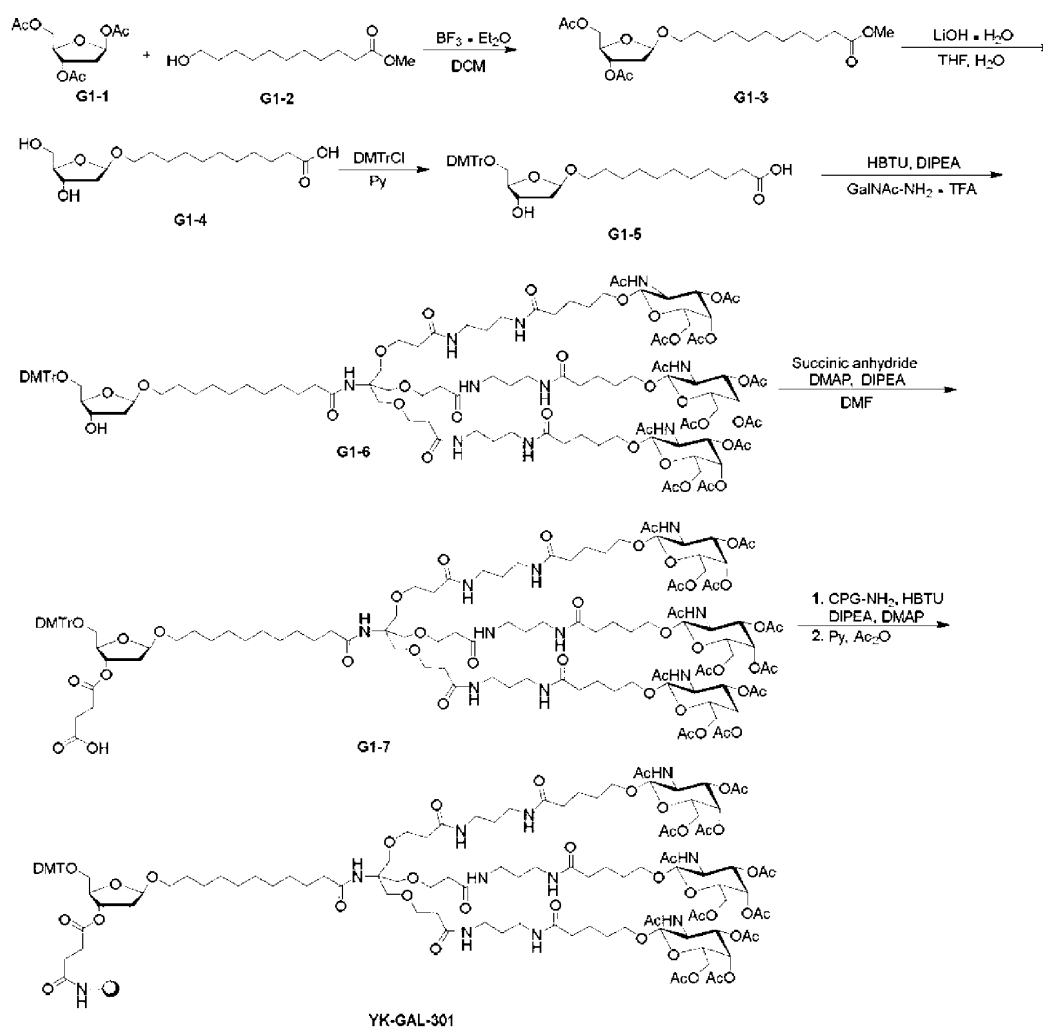
下面结合实施例对本发明作进一步描述。但本发明并不限于以下实施例。实施例中采用的实施条件可以根据具体使用的不同要求做进一步调整，未注明的实施条件为本行业中的常规条件。本发明中具体实施例中，所使用的原料均可通过市售获得。除非另有说明，所有的温度以摄氏度给出。本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

实施例1: GalNAc-CPG化合物的合成

以下缩写字母分别代表如下试剂: DCM: 二氯甲烷; PE: 石油醚; EA: 乙酸乙酯; THF: 四氢呋喃; DMF: N, N-二甲基甲酰胺; ACN: 乙腈; $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$: 三氟化硼乙醚; $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$: 一水氢氧化锂; DMTTrCl: 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷; TEAB: 三乙胺碳酸氢铵水溶液; HBTU: O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐; DIPEA: N, N-二异丙基乙胺; DMAP: 4-二甲氨基吡啶; TMSOTf: 三甲硅烷基三氟甲磺酸酯; TIPDSCl_2 : 1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷; $\text{TEA} \cdot 3\text{HF}$: 三乙胺三氢氟酸盐; Proton sponge: 1,8-双二甲氨基萘。

1. YK-GAL-301的合成

合成路线如下:



步骤1: G1-3的合成

往干燥的化合物 **G1-1** (781 mg, 3.00 mmol), 干燥的化合物 **G1-2** (0.50 g, 2.31 mmol) 和 3A 分子筛 (2.0 g) 中加入二氯甲烷 (20 mL), 降温至 0 °C 后加入三氟化硼乙醚 (656 mg, 4.62 mmol), 并继续搅拌 2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (20 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 (10 mL × 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得黄色油状物 **G1-3** (1.17 g, 2.81 mmol, α 、 β 混合异构体, 93.7%), 经高压制备分离得 **G8-1** (533.2 mg, 1.28 mmol, α 构型, 42.7%), **G1-3** (625.6 mg, 1.5 mmol, β 构型, 50.1%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.23 – 5.13 (m, 2H), 4.27 (dd, J = 11.0, 5.6 Hz, 1H), 4.23 – 4.15 (m, 1H), 4.09 (dd, J = 11.0, 6.4 Hz, 1H), 3.69 – 3.63 (m, 4H), 3.37 – 3.28 (m, 1H), 2.39 – 2.33 (m, 1H), 2.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.19 – 1.94 (m, 8H), 1.65 – 1.56 (m, 2H), 1.53 – 1.48 (m, 2H), 1.32 – 1.21 (m, 11H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 439.1$ 。

步骤2: G1-4的合成

将 **G1-3** (0.12 g, 288 μ mol) 溶解在四氢呋喃 (3.0 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (38.7 mg, 921 μ mol) 的水溶液 1.5 mL, 15 °C 搅拌 12 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得黄色固体。粗产物 **G1-4** (92 mg) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 341.2$ 。

步骤3: G1-5的合成

粗产物 **G1-4** (92 mg, 288 μ mol) 和无水吡啶 (20 mL × 3) 共旋蒸除水。将干燥后的 **G1-4** 和 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (195 mg, 576 μ mol) 溶解在吡啶 (3.0 mL) 中, 氮气保护下 15 °C 搅拌 28 h。加入甲醇 (10 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM NH₄HCO₃)-ACN), 得白色固体 **G1-5** (109.5 mg, 176.5 μ mol), 收率 61.3%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.48 – 7.41 (m, 2H), 7.37 – 7.27 (m, 6H), 7.21 (dd, J = 8.2, 6.2 Hz, 1H), 6.88 – 6.78 (m, 4H), 5.15 (dd, J = 5.3, 2.2 Hz, 1H), 4.43 – 4.39 (m, 1H), 3.98 – 3.91 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.62 – 3.56 (m, 1H), 3.35 – 3.23 (m, 2H), 3.15 (dd, J = 9.4, 6.8 Hz, 1H), 2.33 (t, J = 7.4 Hz, 5H), 2.21 – 2.15 (m, 2H), 2.07 – 2.00 (m, 1H), 1.66 – 1.59 (m, 2H), 1.44 – 1.41 (m, 2H), 1.29 – 1.22 (m, 10H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 643.4$ 。

步骤4: G1-6的合成

将 **G1-5** (40 mg, 64.4 μ mol), 二异丙基乙胺 (16.7 mg, 129 μ mol) 和 O-

苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (36.7 mg, 96.6 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (0.5 mL) 中, 加入GalNAc-NH₂·TFA (123 mg, 64.4 μmol , TFA), 氮气保护下15 °C搅拌1 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-} = 1197.4$ 。

步骤5: G1-7的合成

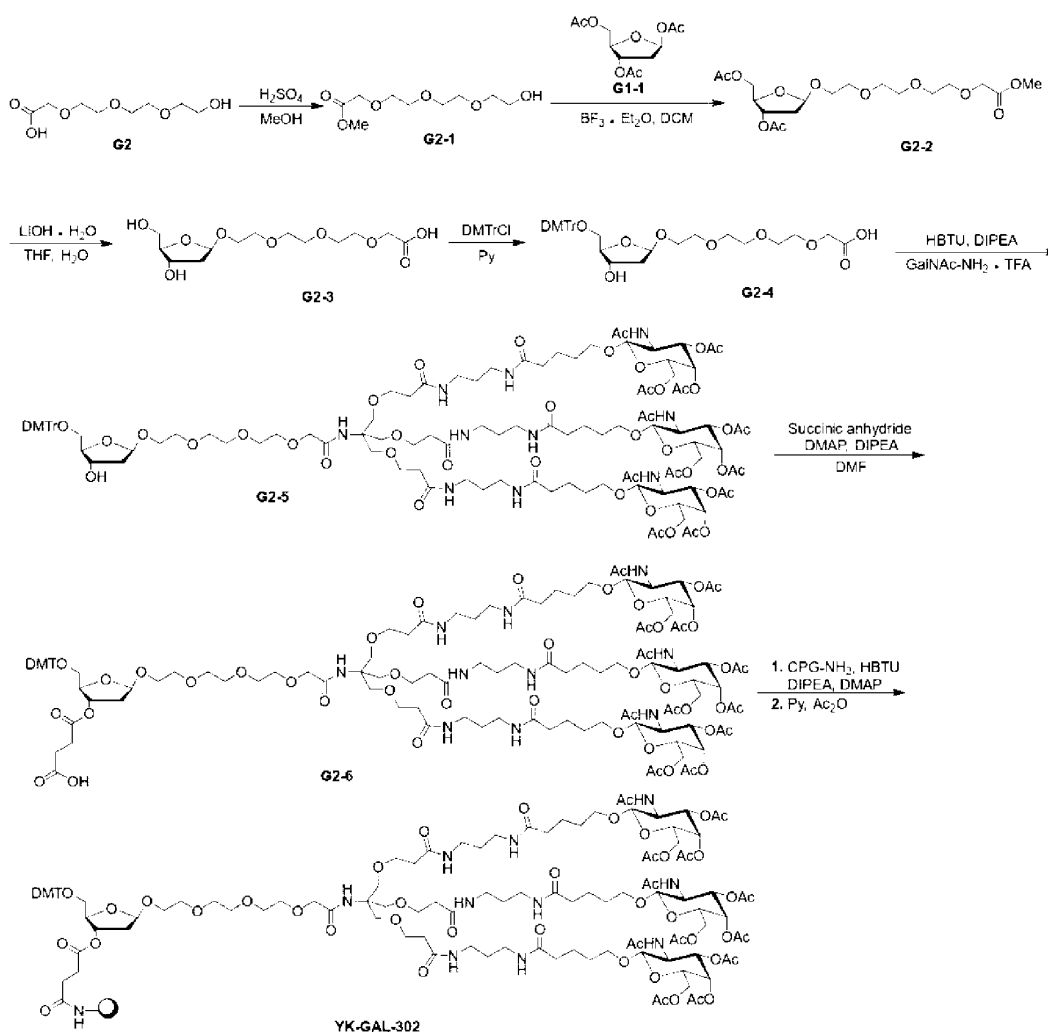
将 **G1-7** (154 mg, 64.2 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (15.7 mg, 128 μmol), 二异丙基乙胺 (16.6 mg, 128 μmol), 和丁二酸酐 (64.4 mg, 642 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (2.0 mL) 中, 氮气保护下 30 °C 搅拌 48 h。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM TEAB)-ACN), 得白色固体 **G1-7** (59 mg, 26.7 μmol), 收率 41.5%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.44 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 3H), 7.25 – 7.14 (m, 5H), 6.97 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H), 6.78 (dd, $J = 11.8$, 8.6 Hz, 6H), 6.48 (s, 1H), 5.33 (d, $J = 3.2$ Hz, 3H), 5.19 – 5.15 (m, 5H), 4.59 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H), 4.18 – 4.03 (m, 10H), 3.95 – 3.88 (m, 6H), 3.77 (s, 6H), 3.68 – 3.61 (m, 13H), 3.52 – 3.46 (m, 3H), 3.39 – 3.09 (m, 15H), 2.61 – 2.48 (m, 4H), 2.42 (t, $J = 5.8$ Hz, 5H), 2.31 – 2.09 (m, 20H), 2.03 – 1.99 (m, 16H), 1.98 – 1.93 (m, 21H), 1.72 – 1.54 (m, 16H), 1.41 (s, 2H), 1.24 – 1.21 (m, 10H)。MS (ESI) m/z $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-} = 1247.4$ 。

步骤6: YK-GAL-301的合成

将**G1-7** (59 mg, 22.7 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (2.77 mg, 22.7 μmol), 二异丙基乙胺 (23.5 mg, 182 μmol), 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (43.1 mg, 113 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (4.0 mL) 中, 随后加入CPG-NH₂ (425 mg), 40 °C搅拌12 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到4 mL乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C搅拌0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥12 h, 得白色固体化合物**YK-GAL-301** (338 mg, 载量27.0 $\mu\text{mol/g}$)。

2. YK-GAL-302的合成

合成路线如下:



步骤1: G2-1的合成

将化合物**G2** (800 mg, 3.84 mmol) 溶解在甲醇 (16 mL) 中, 加入硫酸 (1.18 g, 11.7 mmol), 70 °C 搅拌 16 h。加入 10 mL 硫酸钠淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (DCM/MeOH), 得无色油状物**G2-1** (470 mg, 2.11 mmol), 收率 55.0%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 4.17 (s, 2H), 3.78 – 3.65 (m, 13H), 3.61 (dd, $J = 5.4, 3.7$ Hz, 2H), 2.30 (s, 1H)

步骤2: G2-2的合成

往化合物 **G1-1** (660 mg, 2.54 mmol), 化合物 **G2-1** (470 mg, 2.11 mmol) 和 4A 分子筛 (900 mg) 中加入二氯甲烷 (9.0 mL), 降温至 0 °C 后加入三氟化硼乙醚 (600 mg, 4.23 mmol), 并继续搅拌 2 h。随后 15 °C 搅拌 3 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (30 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 (30 mL $\times$ 3) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化

(PE/EA), 得黄色油状物 **G2-2** (443.3 mg, 1.05 mmol), 收率 49.8%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.24 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.04 – 5.00 (m, 1H), 4.36 – 4.23 (m, 2H), 4.19 – 4.14 (m, 3H), 3.87 – 3.80 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.73 – 3.68 (m, 5H), 3.67 – 3.64 (m, 6H), 2.45 – 2.38 (m, 1H), 2.11 – 2.01 (m, 7H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 445.0$ 。

步骤3: G2-3的合成

将 **G2-2** (320 mg, 757 μ mol) 溶解在四氢呋喃 (2.5 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (95.3 mg, 2.27 mmol) 的水溶液 2.5 mL, 15 °C 搅拌 16 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得白色固体。粗产物 **G2-3** (245 mg) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 346.9$ 。

步骤4: G2-4的合成

将干燥的粗产物 **G2-3** (245 mg, 755 μ mol) 和 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (511 mg, 1.51 mmol) 溶解在吡啶 (3.0 mL) 中, 氮气保护下 15 °C 搅拌 6 h。加入甲醇 (2 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM NH₄HCO₃)-ACN), 得白色固体 **G2-4** (309.1 mg, 494 μ mol, 65.2% yield)。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.47 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.39 – 7.33 (m, 4H), 7.20 – 7.16 (m, 1H), 6.82 – 6.80 (m, 4H), 5.13 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.43 – 4.38 (m, 2H), 4.05 – 4.38 (m, 5H), 3.79 – 3.78 (m, 8H), 3.67 – 3.52 (m, 10H), 3.46 – 3.13 (m, 4H), 2.13 – 2.16 (m, 1H), 2.03 – 1.98 (m, 1H)。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 625.4$ 。

步骤5: G2-5的合成

将 **G2-4** (80.0 mg, 127 μ mol), 二异丙基乙胺 (33.0 mg, 255 μ mol, 44.4 μ L) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (72.6 mg, 191 μ mol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (2.0 mL) 中, 加入 GalNAc-NH₂·TFA (206 mg, 108 μ mol, TFA), 氮气保护下 15 °C 搅拌 4 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1200.3$ 。

步骤6: G2-6的合成

将 **G2-5** (305 mg, 126 μ mol), 4-二甲氨基吡啶 (62.0 mg, 507 μ mol), 二异丙基乙胺 (49.2 mg, 380 μ mol), 和丁二酸酐 (114 mg, 1.14 mmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (3.0 mL) 中, 氮气保护下 30 °C 搅拌 48 h。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM TEAB)-ACN), 得白色固体 **G2-6** (130 mg, 51.9 μ mol), 收

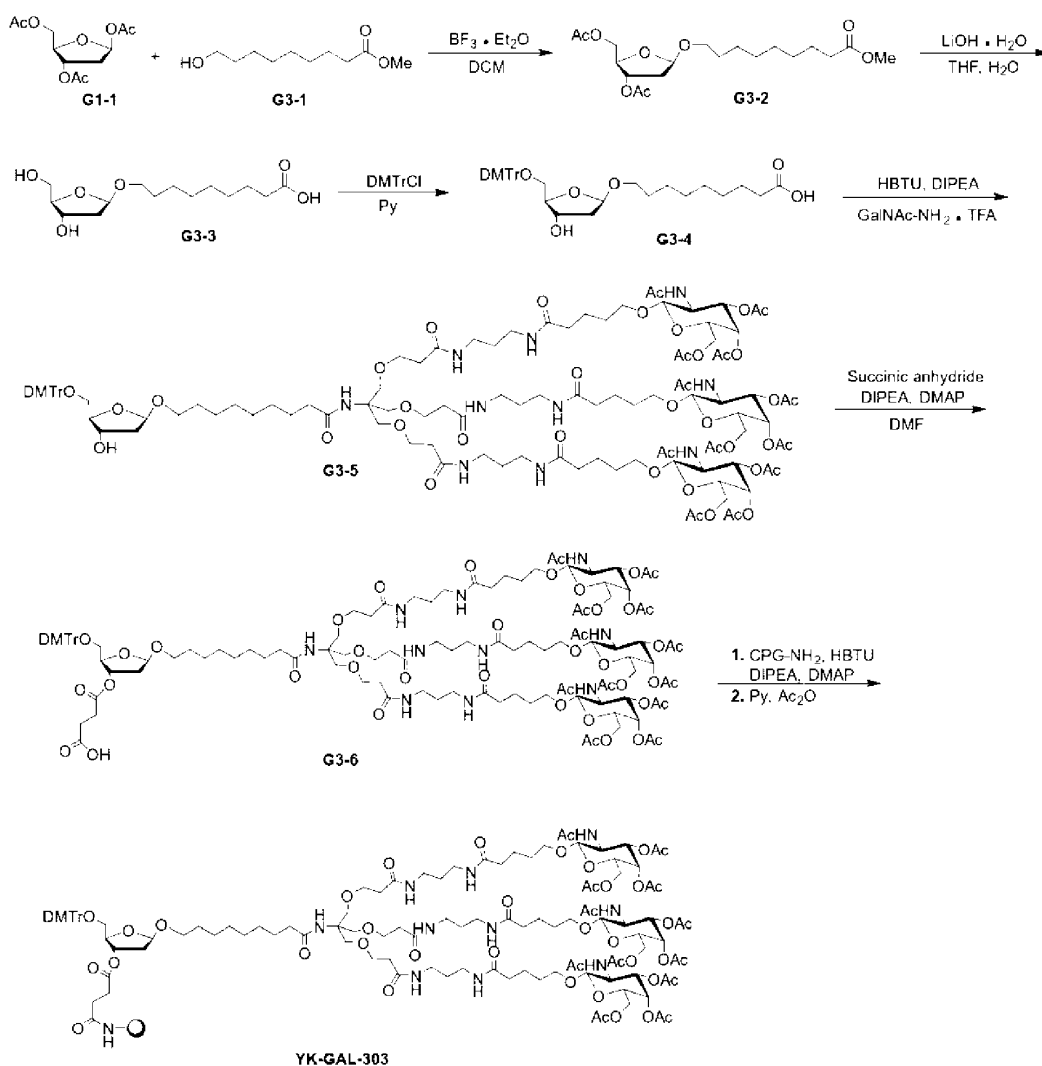
率40.9%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.45 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.25 – 7.16 (m, 4H), 6.95 (dd, J = 36.7, 13.2 Hz, 4H), 6.85 – 6.72 (m, 6H), 5.35 (d, J = 3.4 Hz, 2H), 5.22 (td, J = 11.0, 10.3, 4.0 Hz, 4H), 4.63 (dd, J = 8.3, 2.6 Hz, 2H), 4.12 (dtd, J = 27.6, 11.1, 4.6 Hz, 9H), 3.96 – 3.85 (m, 7H), 3.78 (d, J = 2.6 Hz, 5H), 3.71 – 3.62 (m, 14H), 3.54 (dd, J = 25.9, 6.2 Hz, 7H), 3.33 – 3.16 (m, 12H), 2.83 (s, 10H), 2.67 – 2.53 (m, 4H), 2.42 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 2.28 – 2.14 (m, 14H), 2.11 – 1.93 (m, 26H), 1.67 (ddd, J = 39.3, 13.2, 7.3 Hz, 16H), 1.23 (d, J = 7.4 Hz, 15H)。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-}$ = 1250.3。

步骤7: YK-GAL-302的合成

将G2-6 (130 mg, 51.9 μ mol)、4-二甲氨基吡啶 (6.35 mg, 51.9 μ mol)、二异丙基乙胺 (53.7 mg, 415 μ mol) 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (98.7 mg, 259.5 μ mol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (6.0 mL) 中, 随后加入CPG-NH₂ (830 mg, 1.41 mmol), 30 °C搅拌16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到12 mL乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C搅拌0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥12 h, 得白色固体化合物YK-GAL-302 (840 mg, 载量34.9 μ mol/g)。

3. YK-GAL-303的合成

合成路线如下:



步骤1: G3-2的合成

往干燥的化合物 **G1-1** (1.19 g, 4.58 mmol), 干燥的化合物 **G3-1** (663.2 mg, 3.52 mmol) 和 3A 分子筛 (2.0 g) 中加入二氯甲烷 (26 mL), 降温至 0°C 后加入三氟化硼乙醚 (999.95 mg, 7.05 mmol), 随后 25°C 搅拌 2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (30 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 ($30\text{ mL} \times 3$) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得黄色油状物 **G3-2** (612.2 mg, 1.58 mmol), 收率 44.8%。MS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 411.0$ 。

步骤2: G3-3的合成

将 **G3-2** (130 mg, 335 μmol) 溶解在四氢呋喃 (2.0 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (44.9 mg, 1.07 mmol) 的水溶液 1.0 mL, 室温搅拌 16 h。反应液减

压浓缩除去溶剂，得黄色固体。粗产物 **G3-3** (97 mg) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 289.3$ 。

步骤3: G3-4的合成

将干燥后的 **G3-3** (97 mg, 335 μmol) 和 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (406 mg, 1.2 mmol) 溶解在吡啶 (4.0 mL)，氮气保护下室温搅拌 16 h。加入甲醇 (10 mL) 淬灭反应，减压浓缩除去溶剂，得粗产物。柱层析纯化 (DCM/MeOH)，得白色固体 **G3-4** (126.7 mg, 213.9 μmol)，收率 63.86%。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 591.5$ 。

步骤4: G3-5的合成

将 **G3-4** (85 mg, 143 μmol)，二异丙基乙胺 (37.1 mg, 287 μmol , 49.9 μL) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脒六氟磷酸盐 (81.6 mg, 215 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (3.0 mL) 中，加入 GalNAc-NH₂.TFA (274 mg, 143 μmol , TFA)，氮气保护下室温搅拌 2 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1183.2$ 。

步骤5: G3-6的合成

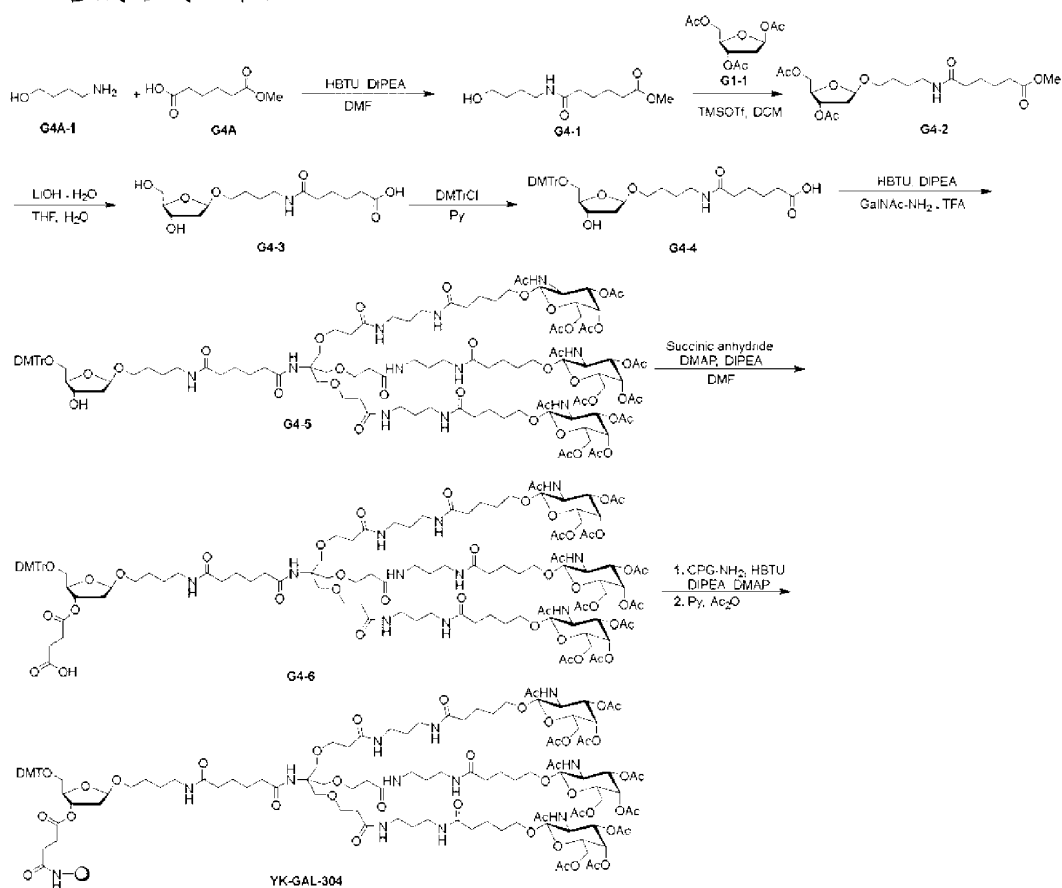
将 **G3-5** (339 mg, 143 μmol)，4-二甲氨基吡啶 (17.5 mg, 143 μmol)，二异丙基乙胺 (74.1 mg, 573 μmol) 和丁二酸酐 (71.7 mg, 717 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (3.0 mL) 中，氮气保护下 30 °C 搅拌 16 h。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM TEAB)-ACN)，得白色固体 **G3-6** (187 mg, 75.7 μmol)，收率 52.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.46 – 7.41 (m, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 5H), 7.25 – 7.21 (m, 2H), 7.19 – 7.14 (m, 1H), 7.05 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.83 – 6.75 (m, 4H), 6.50 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 5.34 – 5.31 (m, 2H), 5.18 (dt, $J = 11.3, 3.9$ Hz, 4H), 4.60 (dd, $J = 8.4, 2.6$ Hz, 3H), 4.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.18 – 4.04 (m, 9H), 3.95 – 3.88 (m, 5H), 3.76 (s, 5H), 3.69 – 3.58 (m, 12H), 3.52 – 3.46 (m, 3H), 3.32 – 3.11 (m, 14H), 2.80 (q, $J = 7.2$ Hz, 8H), 2.57 – 2.54 (m, 1H), 2.48 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.41 (t, $J = 5.8$ Hz, 5H), 2.29 – 2.06 (m, 18H), 2.05 – 1.91 (m, 24H), 1.76 – 1.51 (m, 18H), 1.40 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.23 – 1.19 (m, 7H), 1.16 – 1.13 (m, 12H)。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1233.3$ 。

步骤6: YK-GAL-303的合成

将 **G3-6** (50 mg, 19.1 μmol)，4-二甲氨基吡啶 (2.34 mg, 19.1 μmol)，二异丙基乙胺 (19.8 mg, 153 μmol)，和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (36.3 mg, 95.7 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (4.0 mL) 中，随后加入 CPG-NH₂ (332 mg)，40 °C 搅拌 16 h。反应液过滤，过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤，真空干燥。再将过滤物加到 4 mL 乙酸酐/吡啶 (1:4) 溶液中，40 °C 搅拌 0.5 h。过滤，依次用二氯甲烷和甲醇洗涤，过滤物真空干燥 12 h，得白色固体化合物 **YK-GAL-303** (292 mg, 载量 31.7 $\mu\text{mol/g}$)。

4. YK-GAL-304的合成

合成路线如下：



步骤1: G4-1的合成

将 **G4A** (3.00 g, 18.7 mmol)，二异丙基乙胺 (4.84 g, 37.4 mmol) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (7.81 g, 20.6 mmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (30.0 mL) 中，加入 **G4A-1** (1.50 g, 16.9 mmol)，15 °C 搅拌 2 h。

制备色谱纯化 (H₂O (0.1% TFA) - ACN) , 得白色固体 **G4-1** (1.70 g) 。

¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.73 – 7.75 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.35 – 3.57 (m, 2H), 2.99 – 3.02 (m, 2H), 2.27 – 2.30 (m, 2H), 2.04 – 2.05 (m, 2H), 1.38 – 1.48 (s, 8H)。MS (ESI) m/z [M + H]⁺ = 231.9。

步骤2: G4-2的合成

往化合物 **G1-1** (900 mg, 3.46 mmol), 化合物 **G4-1** (880 mg, 3.80 mmol) 和 4A 分子筛 (1.60 g) 中加入二氯甲烷 (16.0 mL) , 降温至 0 °C 后加入三甲硅烷基三氟甲磺酸酯 (1.54 g, 6.92 mmol) , 并继续搅拌 2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (20.0 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 (20.0 mL $\times$ 3) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物 **G4-2** (617.7 mg, 1.43 mmol) , 收率 41.4 %。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.69 – 5.54 (m, 1H), 5.30 – 5.17 (m, 1H), 4.31 – 4.04 (m, 3H), 3.75 – 3.62 (m, 4H), 3.43 – 3.34 (m, 1H), 3.31 – 3.19 (m, 2H), 2.41 – 2.29 (m, 3H), 2.21 – 2.16 (m, 3H), 2.13 – 2.00 (m, 5H), 1.72 – 1.51 (m, 10H)。MS (ESI) m/z [M + Na]⁺ = 454.0。

步骤3: G4-3的合成

将 **G4-2** (160 mg, 371 μ mol) 溶解在四氢呋喃 (2.2 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (49.8 mg, 1.19 mmol) 的水溶液 1.0 mL, 20 °C 搅拌 16 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得白色固体。粗产物 **G4-3** (123 mg) 直接用于下一步。

步骤4: G4-4的合成

将干燥的 **G4-3** (123 mg, 369 μ mol) 和 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (463 mg, 1.37 mmol) 溶解在吡啶 (1.50 mL) 中, 氮气保护下 25 °C 搅拌 48 h。加入甲醇 (1.00 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。制备色谱纯化 (H₂O (10mM TEAB)-ACN) , 得白色固体 **G4-4** (148 mg, 233 μ mol) , 收率 62.8%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.19 – 7.41 (m, 9H), 6.73 – 6.77 (m, 4H), 5.81 – 5.65 (m, 2H), 5.07 – 5.08 (s, 1H), 4.31 – 4.34 (m, 1H), 3.91 – 3.92 (m, 1H), 3.54 – 3.71 (m, 6H), 3.42 – 3.54 (m, 1H), 3.16 – 3.17 (m, 1H), 3.10 – 3.14 (m, 1H), 3.06 – 3.09 (m, 4H), 2.22 – 2.25 (m, 2H), 1.92 – 2.10 (m, 4H), 1.54 – 1.57 (m, 4H), 1.12 – 1.16 (m, 4H)。MS (ESI) m/z [M - H]⁻ = 634.4。

步骤5: G4-5的合成

将 **G4-4** (30.0 mg, 47.2 μmol) , 二异丙基乙胺 (12.2 mg, 94.4 μmol) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (26.8 mg, 70.8 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (1.0 mL) 中, 加入 GalNAc-NH₂.TFA (45.0 mg, 23.6 μmol , TFA) , 氮气保护下 25 °C 搅拌 2 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z [M - 2H]²⁻ = 1204.8。

步骤6: **G4-6**的合成

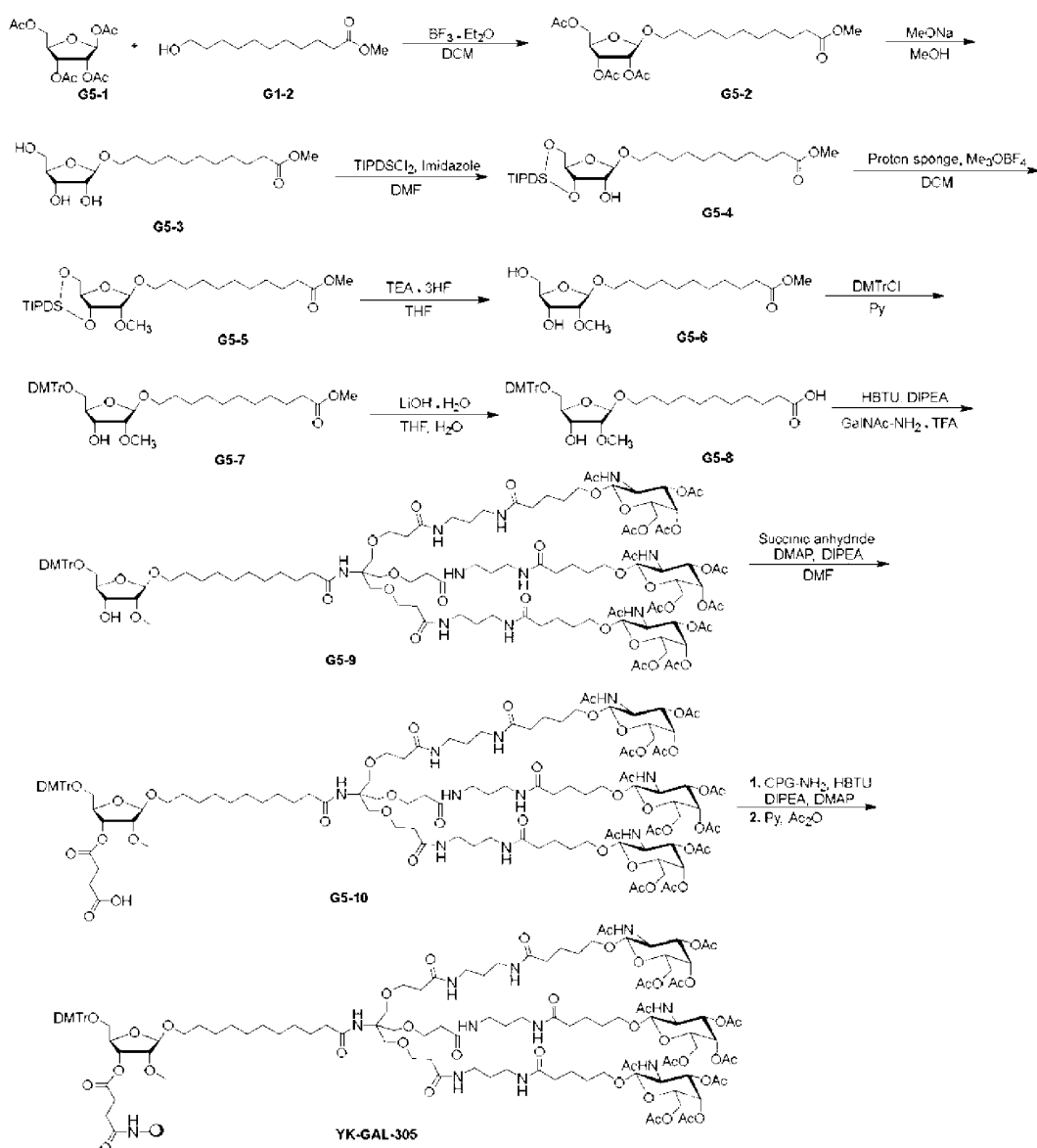
将 **G4-5** (113 mg, 46.9 μmol) , 4-二甲氨基吡啶 (23.1 mg, 187 μmol) , 二异丙基乙胺 (66.7 mg, 515 μmol) , 和丁二酸酐 (42.2 mg, 421 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (1.0 mL) 中, 氮气保护下 30 °C 搅拌 48 h。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM TEAB)-ACN) , 得白色固体 **G4-6** (55.3 mg, 22 μmol) , 收率 47.0%。MS (ESI) m/z [M - 2H]²⁻ = 1254.1。

步骤7: **YK-GAL-304**的合成

将 **G4-6** (20 mg, 7.57 μmol) , 4-二甲氨基吡啶 (1.00 mg, 8.20 μmol) , 二异丙基乙胺 (7.82 mg, 60.5 μmol) , 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (14.4 mg, 37.8 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (1.5 mL) 中, 随后加入 CPG-NH₂ (131 mg) , 40 °C 搅拌 16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到 1.20 mL 乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C 搅拌 0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥 12 h, 得白色固体化合物 **YK-GAL-304** (100 mg, 载量 35.57 $\mu\text{mol/g}$) 。

5. **YK-GAL-305**的合成

合成路线如下:



步骤1: G5-2的合成

往干燥的化合物G5-1(3.53 g, 11.1 mmol), 干燥的化合物G1-2(2.0 g, 9.25 mmol)和3A分子筛(10.0 g)中加入二氯甲烷(100.0 mL), 降温至 0°C 后加入三氟化硼乙醚(2.62 g, 18.5 mmol), 继续搅拌2 h。加入三乙胺(2.7 mL)淬灭反应, 用饱和碳酸氢钠水溶液(50 mL)洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化(PE/EA), 得无色油状物G5-2(2.11 g, 4.46 mmol), 收率48.2%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.32 (dd, $J = 6.7, 4.8$ Hz, 1H), 5.25 – 5.18 (m, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.39 – 4.22 (m, 2H), 4.14 – 4.00 (m, 1H), 3.73 – 3.60 (m, 4H), 3.36 (dt, $J = 9.3, 6.7$ Hz, 1H), 2.29 (t, $J = 7.5$

Hz, 2H), 2.11 – 2.04 (m, 8H), 1.64 – 1.52 (m, 5H), 1.30 – 1.24 (m, 12H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 497.1$ 。

步骤2: G5-3的合成

将 **G5-2** (1.80 g, 3.79 mmol) 溶解在甲醇 (10.0 mL) 中, 加入甲醇钠 (68.3 mg, 379 μ mol), 15 °C 搅拌 2 h。加入氢离子交换树脂淬灭反应, 过滤并减压浓缩滤液除去溶剂, 得黄色固体。粗产物 **G5-3** (1.32 g) 直接用于下一步。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.91 (s, 1H), 4.32 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.08 – 3.97 (m, 2H), 3.76 (dd, $J = 11.8, 3.3$ Hz, 1H), 3.71 – 3.57 (m, 5H), 3.41 (dt, $J = 9.3, 6.5$ Hz, 1H), 2.74 (s, 2H), 2.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.55 (dq, $J = 20.6, 7.0$ Hz, 5H), 1.28 – 1.25 (m, 12H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 371.2$ 。

步骤3: G5-4的合成

将 **G5-3** (1.32 g, 3.79 mmol) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (10.0 mL) 中, 加入 1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷 (1.31 g, 4.17 mmol) 和咪唑 (645 mg, 9.47 mmol), 氮气保护下 15 °C 搅拌 2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (10 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物 **G5-4** (1.20 g, 2.03 mmol), 收率 53.6%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.91 (s, 1H), 4.51 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.06 – 3.97 (m, 3H), 3.76 (dd, $J = 10.4, 8.7$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.61 (dt, $J = 9.6, 6.8$ Hz, 1H), 3.34 (dt, $J = 9.5, 6.4$ Hz, 1H), 2.97 (s, 1H), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.61 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.51 (q, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.27 – 1.32 (m, 12H), 1.11 – 1.02 (m, 26H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 613.4$ 。

步骤4: G5-5的合成

将 **G5-4** (1.20 g, 2.03 mmol) 溶解在二氯甲烷 (12.0 mL) 中, 加入 1,8-双(二甲基氨基)萘 (1.18 g, 5.48 mmol) 和三甲基氧鎗四氟硼酸 (751 mg, 5.08 mmol), 氮气保护下 15 °C 搅拌 16 h。加入氯化铵水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (10 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物 **G5-5** (1.05 g, 1.74 mmol), 收率 85.5%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.84 (s, 1H), 4.49 (dd, $J = 7.6, 4.3$ Hz, 1H), 3.98 (dq, $J = 9.0, 3.1$ Hz, 2H), 3.86 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 1H), 3.69 – 3.54 (m, 8H), 3.40 – 3.27 (m, 1H), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.65 – 1.57 (m, 2H), 1.53 – 1.48 (m, 2H), 1.33 – 1.24 (m, 12H), 1.11 – 0.97 (m, 28H)。MS (ESI) m/z

$[M + Na]^+ = 627.4$ 。

步骤5: G5-6的合成

将 **G5-5** (1.05 g, 1.74 mmol) 溶解在四氢呋喃 (10.0 mL) 中, 加入三乙胺三氢氟酸 (839 mg, 5.20 mmol), 15 °C 搅拌 16 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (10 mL × 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物 **G5-6** (0.63 g), 直接用于下一步。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.93 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 4.25 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.02 – 3.94 (m, 1H), 3.75 – 3.54 (m, 6H), 3.48 – 3.31 (m, 4H), 2.55 (brs, 1H), 2.23 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.53 (dp, $J = 14.1, 7.0$ Hz, 4H), 1.22 (d, $J = 5.8$ Hz, 12H), 0.99 (dq, $J = 5.8, 3.1, 2.6$ Hz, 2H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 385.2$ 。

步骤6: G5-7的合成

将干燥的 **G5-6** (0.63 g, 1.74 mmol) 和 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (618 mg, 1.83 mmol) 溶解在吡啶 (10.0 mL) 中, 氮气保护下 15 °C 搅拌 16 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (10.00 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 (15.0 mL × 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得白色固体 **G5-7** (1.01 g, 1.52 mmol), 收率 87.4%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.52 – 7.46 (m, 2H), 7.40 – 7.34 (m, 4H), 7.29 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 6.83 – 6.78 (m, 4H), 5.02 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.19 (dt, $J = 8.3, 5.5$ Hz, 1H), 4.04 (td, $J = 5.8, 3.8$ Hz, 1H), 3.78 (brs, 6H), 3.76 – 3.63 (m, 6H), 3.50 (s, 3H), 3.38 (dt, $J = 9.4, 6.8$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 9.9, 3.8$ Hz, 1H), 3.14 (dd, $J = 9.9, 5.6$ Hz, 1H), 2.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.29 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.60 (d, $J = 14.7$ Hz, 2H), 1.28 – 1.23 (m, 11H)。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 663.6$ 。

步骤7: G5-8的合成

将 **G5-7** (1.00 g, 1.50 mmol) 溶解在四氢呋喃 (12.0 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (94.7 mg, 2.26 mmol) 的水溶液 6.0 mL, 15 °C 搅拌 12 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得黄色固体。粗产物 **G5-8** (0.98 g) 直接用于下一步。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.53 – 7.45 (m, 2H), 7.35 (d, $J = 8.50$ Hz, 4H), 7.23 (t, $J = 7.19$ Hz, 2H), 7.19 – 7.14 (m, 1H), 6.84 – 6.73 (m, 4H), 5.04 (s, 1H), 4.26 – 4.00 (m, 2H), 3.80 – 3.63 (m, 8H), 3.45 (s, 3H), 3.39 (s, 1H), 3.30 – 3.20

(m, 1H), 3.12 (br s, 1H), 2.12 – 2.05 (m, 1H), 2.04 – 1.98 (m, 3H), 1.58 – 1.41 (m, 4H), 1.19 (br s, 12H),。 MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 649.6$ 。

步骤8: G5-9的合成

将 **G5-8** (0.97 g, 1.49 mmol), 二异丙基乙胺 (385 mg, 2.98 mmol) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (848 mg, 2.24 mmol) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (35.0 mL) 中, 加入 GalNAc-NH₂.TFA (2.84 g, 1.49 mmol, TFA), 氮气保护下 15 °C 搅拌 1 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1212.4$ 。

步骤9: G5-10的合成

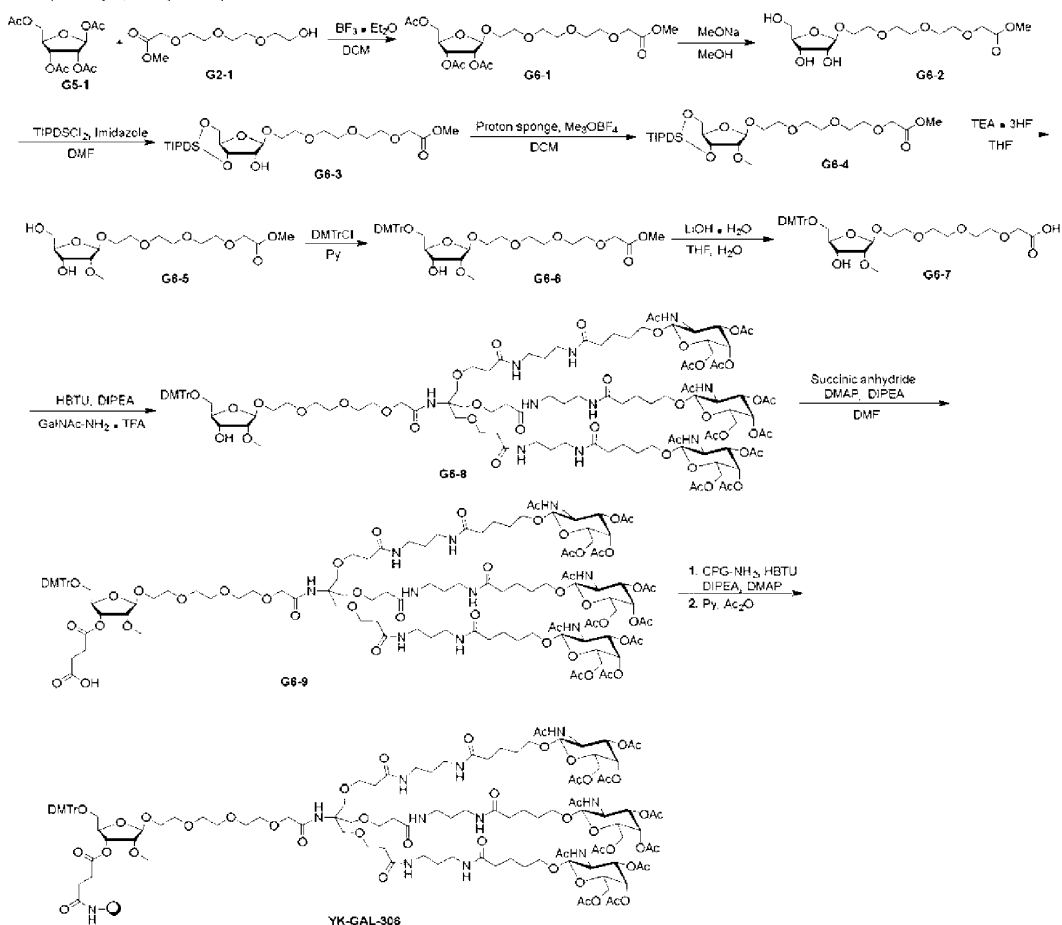
将 **G5-9** (3.62 g, 1.49 mmol), 4-二甲氨基吡啶 (364 mg, 2.98 mmol), 二异丙基乙胺 (771 mg, 5.97 mmol), 和丁二酸酐 (896 mg, 8.95 mmol) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (35.0 mL) 中, 氮气保护下 30 °C 搅拌 48 h。制备色谱纯化 (H₂O (50 mM TEAB)-ACN), 得白色固体 **G5-10** (2.10 g, 937 μ mol), 收率 62.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.48 – 7.41 (m, 2H), 7.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H), 7.28 – 7.21 (m, 5H), 7.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.99 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 6.87 – 6.77 (m, 5H), 6.49 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J = 3.3$ Hz, 3H), 5.21 – 5.13 (m, 3H), 4.98 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.23 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.19 – 4.01 (m, 8H), 3.91 (dt, $J = 13.1, 5.6$ Hz, 6H), 3.77 (s, 5H), 3.68 (d, $J = 7.6$ Hz, 11H), 3.55 – 3.44 (m, 3H), 3.39 – 3.19 (m, 14H), 3.11 (dd, $J = 9.9, 5.0$ Hz, 1H), 2.80 – 2.59 (m, 13H), 2.49 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.42 (t, $J = 5.7$ Hz, 5H), 2.30 – 2.06 (m, 16H), 2.06 – 1.91 (m, 22H), 1.81 – 1.44 (m, 19H), 1.31 – 1.19 (m, 10H), 1.11 (t, $J = 7.2$ Hz, 16H)。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1262.5$ 。

步骤10: YK-GAL-305的合成

将 **G5-10** (1.00 g, 380 μ mol), 4-二甲氨基吡啶 (46.5 mg, 381 μ mol), 二异丙基乙胺 (393 mg, 3.04 mmol), 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (722 mg, 1.90 mmol) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (65.0 mL) 中, 随后加入 CPG-NH₂ (6.60 g), 40 °C 搅拌 16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到 65 mL 乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C 搅拌 0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥 12 h, 得白色固体化合物 **YK-GAL-305** (7.05 g, 载量 34.4 μ mol/g)。

6. YK-GAL-306的合成

合成路线如下:



步骤1: G6-1的合成

往干燥的化合物**G5-1** (1.58 g, 4.95 mmol), 干燥的化合物**G2-1** (1.00 g, 4.50 mmol) 和3A分子筛 (1.50 g, 4.50 mmol) 中加入二氯甲烷 (15.0 mL), 降温至0 °C后加入三氟化硼乙醚 (1.28 g, 9.00 mmol), 继续搅拌2 h。随后升温至15 °C继续搅拌2 h。加入三乙胺 (1.32 mL) 淬灭反应, 用饱和碳酸氢钠水溶液 (30.0 mL × 2) 洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得黄色油状物**G6-1** (1.60 g, 3.33 mmol), 收率74.0%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.34 (dd, *J* = 6.7, 4.8 Hz, 1H), 5.26 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.37 – 4.25 (m, 2H), 4.12 (dd, *J* = 11.3, 5.9 Hz, 2H), 3.89 – 3.77 (m, 1H), 3.75 – 3.56 (m, 16H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H)。MS (ESI) *m/z* [M + Na]⁺ = 503.0。

步骤2: G6-2的合成

将 **G6-1** (1.60 g, 3.33 mmol) 溶解在甲醇 (16.0 mL) 中, 加入甲醇钠 (60.0 mg, 333 μ mol), 15 °C 搅拌 2 h。加入氢离子交换树脂淬灭反应, 过滤并减压浓缩滤液除去溶剂, 得白色固体。粗产物 **G6-2** (1.18 g) 直接用于下一步。¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ 4.89 (s, 1H), 4.13 (dd, *J* = 7.1, 4.7 Hz, 1H), 3.99 – 3.89 (m, 2H), 3.88 – 3.80 (m, 1H), 3.78 – 3.53 (m, 18H)。MS (ESI) *m/z* [M + Na]⁺ = 376.9。

步骤3: G6-3的合成

将 **G6-2** (1.18 g, 3.33 mmol) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (12.0 mL) 中, 加入 1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷 (1.16 g, 3.66 mmol) 和咪唑 (567 mg, 8.33 mmol), 氮气保护下 15 °C 搅拌 2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (10 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物 **G6-3** (1.38 g, 2.27 mmol), 收率 68.0%。¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ ppm 4.52 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.09 – 3.97 (m, 3H), 3.80 – 3.54 (m, 20H), 1.09 – 1.02 (m, 28H)。

步骤4: G6-4的合成

将 **G6-3** (1.25 g, 2.09 mmol) 溶解在二氯甲烷 (17.0 mL) 中, 加入 1,8-双(二甲基氨基)萘 (1.48 g, 6.91 mmol) 和三甲基氧鎓四氟硼酸 (929 mg, 6.28 mmol), 氮气保护下 15 °C 搅拌 6 h。加入氯化铵水溶液 (30.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (15 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物 **G6-4** (1.11 g, 1.82 mmol), 收率 86%。¹H NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ ppm 4.43 (dd, *J* = 8.1, 4.3 Hz, 1H), 3.95 – 3.44 (m, 26H), 1.03 – 0.95 (m, 28H)。

步骤5: G6-5的合成

将 **G6-4** (1.11 g, 1.82 mmol) 溶解在四氢呋喃 (20.0 mL) 中, 加入三乙胺三氢氟酸 (1.46 g, 9.09 mmol), 20 °C 搅拌 2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (25 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得到无色油状物。粗产物 **G6-5** (0.67 g) 直接用于下一步。

步骤6: G6-6的合成

将干燥的 **G6-5** (0.67 g, 1.82 mmol) 和 4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (616 mg, 1.82 mmol) 溶解在吡啶 (10.0 mL) 中, 氮气保护下 25 °C 搅拌 2 h。加入甲醇

(1.00 mL) 淬灭反应，减压浓缩除去溶剂，得粗产物。制备色谱纯化 (H_2O (10 mM NH_4HCO_3)-ACN)，得白色固体 **G6-6** (1.05 g, 1.57 mmol)，收率 86.0 %。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ ppm 7.46 – 7.36 (m, 2H), 7.31 – 7.25 (m, 4H), 7.22 – 7.16 (m, 2H), 7.15 – 7.06 (m, 1H), 6.79 – 6.71 (m, 4H), 4.15 (s, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.97 (td, $J = 6.1, 3.8$ Hz, 1H), 3.77 – 3.42 (m, 27H), 3.21 (dd, $J = 9.9, 3.7$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 9.9, 5.8$ Hz, 1H)。MS (ESI) m/z $[\text{M} - \text{H}]^- = 669.4$ 。

步骤7: G6-7的合成

将 **G6-6** (195 mg, 291 μmol) 溶解在四氢呋喃 (1.0 mL) 中，加入一水氢氧化锂 (60.0 mg, 333 μmol) 的水溶液 1.0 mL，25 °C 搅拌 12 h。反应液减压浓缩除去溶剂，得白色固体。粗产物 **G6-7** (190 mg) 直接用于下一步。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) δ ppm 7.52 – 7.45 (m, 2H), 7.39 – 7.31 (m, 4H), 7.31 – 7.24 (m, 2H), 7.24 – 7.15 (m, 1H), 6.92 – 6.80 (m, 4H), 4.22 (dd, $J = 7.2, 4.7$ Hz, 1H), 4.07 – 4.03 (m, 1H), 3.86 – 3.68 (m, 10H), 3.65 – 3.51 (m, 12H), 3.49 (s, 3H), 3.27 (dd, $J = 10.0, 3.1$ Hz, 1H), 3.12 (dd, $J = 10.0, 5.8$ Hz, 1H)。MS (ESI) m/z $[\text{M} - \text{H}]^- = 655.4$ 。

步骤8: G6-8的合成

将 **G6-7** (190 mg, 293 μmol)，二异丙基乙胺 (112 mg, 868 μmol) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (165 mg, 433 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (5.0 mL) 中，加入 GalNAc- NH_2 ·TFA (442 mg, 232 μmol , 0.8 eq, TFA)，氮气保护下 15 °C 搅拌 2 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-} = 1215.0$ 。

步骤9: G6-9的合成

将 **G6-8** (703 mg, 289 μmol)，4-二甲氨基吡啶 (70.6 mg, 578 μmol)，二异丙基乙胺 (261 mg, 2.02 mmol)，和丁二酸酐 (173 mg, 1.73 mmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (1.0 mL) 中，氮气保护下 30 °C 搅拌 48 h。制备色谱纯化 (H_2O (50 mM TEAB)-ACN)，得白色固体 **G6-9** (300 mg, 118 μmol)，收率 50.0%。MS (ESI) m/z $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-} = 1265.3$ 。

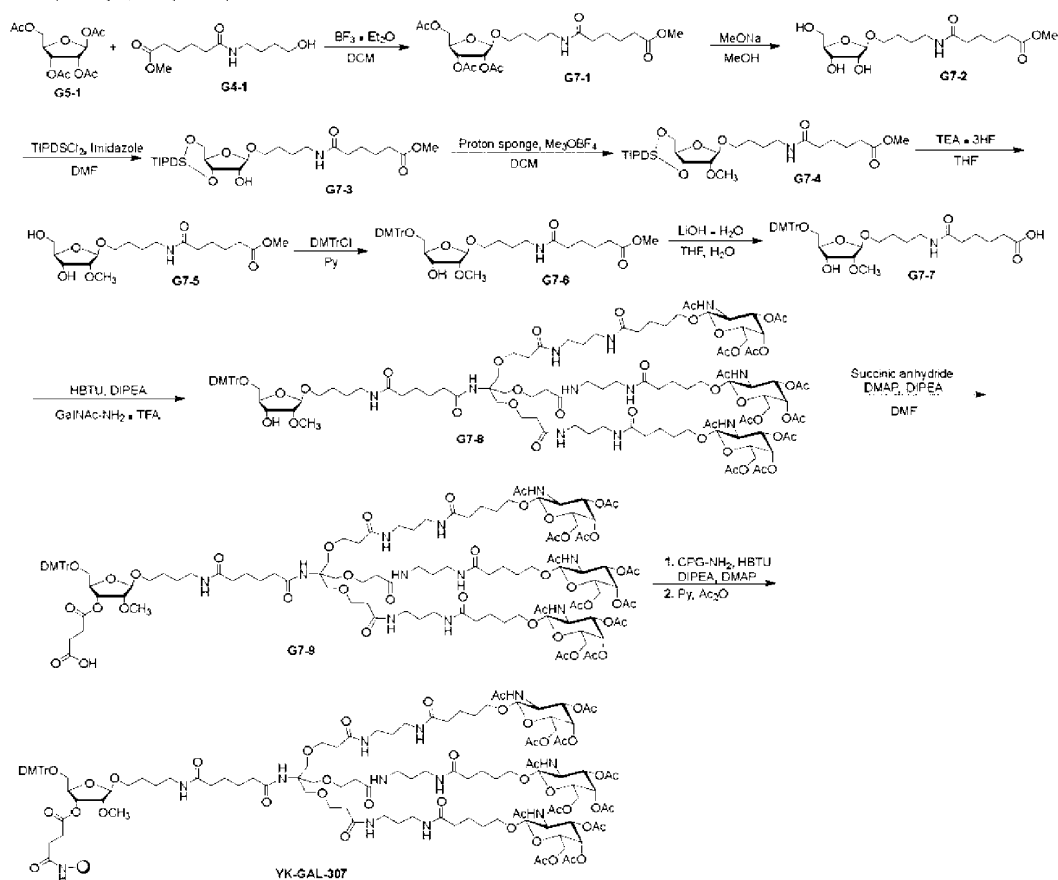
步骤10: YK-GAL-306的合成

将 **G6-9** (300 mg, 110 μmol)，4-二甲氨基吡啶 (13.4 mg, 109 μmol)，二异丙基乙胺 (113 mg, 877 μmol)，和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (208 mg, 548 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (16.0 mL) 中，随后加入

CPG-NH₂ (1.9 g), 40 °C搅拌12 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到20 mL乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C搅拌0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥12 h, 得白色固体化合物YK-GAL-306 (1.94 g, 载量37.43 μmol/g)。

7. YK-GAL-307的合成

合成路线如下:



步骤1: G7-1的合成

往干燥的化合物G5-1 (5.00 g, 15.7 mmol), 干燥的化合物G4-1 (3.50 g, 15.1 mmol) 和4A分子筛 (1.0 g) 中加入二氯甲烷 (70.0 mL), 降温至0 °C后加入三氟化硼乙醚 (4.30 g, 30.2 mmol), 继续搅拌2 h。加入三乙胺 (3.06 g, 30.2 mmol) 淬灭反应, 用饱和碳酸氢钠水溶液 (20 mL) 洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物G7-1 (3.70 g, 7.56 mmol), 收率50.1%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.74 (d, *J* = 31.1 Hz, 1H), 5.33 – 5.14 (m, 1H), 4.98 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H),

4.30 – 4.26 (m, 1H), 4.19 – 4.03 (m, 2H), 3.87 – 3.61 (m, 4H), 3.43 – 3.37 (m, 1H), 3.33 – 3.18 (m, 2H), 2.35 – 2.31 (m, 2H), 2.23 – 1.98 (m, 11H), 1.71 – 1.50 (m, 9H)。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 512.1$ 。

步骤2: G7-2的合成

将G7-1 (3.10 g, 6.33 mmol) 溶解在甲醇 (30.0 mL) 中, 加入甲醇钠 (114 mg, 633 μ mol), 25 °C 搅拌 2 h。加入氢离子交换树脂淬灭反应, 过滤并减压浓缩滤液除去溶剂, 得黄色油状物。粗产物G7-2 (2.20 g) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 362.2$ 。

步骤3: G7-3的合成

将 G7-2 (2.20 g, 6.05 mmol) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (20.0 mL) 中, 加入 1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷 (2.10 g, 6.66 mmol) 和咪唑 (1.03 g, 15.1 mmol), 氮气保护下 25 °C 搅拌 2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (10 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得黄色油状物 G7-3 (2.15 g, 3.56 mmol), 收率 58.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.59 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.49 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.08 – 3.91 (m, 3H), 3.80 – 3.60 (m, 6H), 3.40 – 3.35 (m, 1H), 3.26 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.35 – 2.32 (m, 2H), 2.22 – 2.15 (m, 2H), 1.68 – 1.64 (p, $J = 3.7$ Hz, 4H), 1.59 – 1.54 (m, 4H), 1.10 – 1.02 (m, 28H)。MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 606.4$ 。

步骤4: G7-4的合成

将 G7-3 (1.0 g, 1.65 mmol) 溶解在二氯甲烷 (15.0 mL) 中, 加入 1,8-双(二甲基氨基)萘 (955 mg, 4.46 mmol) 和三甲基氧鎓四氟硼酸 (610 mg, 4.13 mmol), 氮气保护下 15 °C 搅拌 6 h。加入氯化铵水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (10 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物 G7-4 (890.2 mg, 1.43 mmol), 收率 87.1%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.59 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.53 – 4.42 (m, 1H), 4.08 – 3.85 (m, 3H), 3.80 – 3.60 (m, 5H), 3.58 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.47 – 3.31 (m, 3H), 3.27 – 3.20 (m, 2H), 2.38 – 2.29 (m, 2H), 2.18 (q, $J = 6.2, 5.0$ Hz, 2H), 1.66 (h, $J = 3.8$ Hz, 4H), 1.60 – 1.51 (m, 4H), 1.17 – 0.89 (m, 28H)。MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 620.5$ 。

步骤5: G7-5的合成

将G7-4 (300 mg, 484 μmol) 溶解在四氢呋喃 (10.0 mL) 中, 加入三乙胺三氢氟酸 (390 mg, 2.42 mmol), 25 °C 搅拌 3 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (10.0 mL) 淬灭, 用二氯甲烷 (20 mL $\times$ 3) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得黄色油状物。粗产物G7-6 (182 mg) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 378.2$ 。

步骤6: G7-6的合成

将干燥的G7-5 (180 mg, 477 μmol) 和4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (161 mg, 477 μmol) 溶解在吡啶 (2.0 mL) 中, 氮气保护下 25 °C 搅拌 3 h。加入甲醇 (2.00 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。制备色谱纯化 (H_2O (10 mM NH_4HCO_3)-ACN), 得白色固体G7-6 (262 mg, 385.7 μmol), 收率 80.85%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.52 – 7.45 (m, 2H), 7.40 – 7.32 (m, 4H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.19 (dd, $J = 14.1, 8.0$ Hz, 1H), 6.87 – 6.78 (m, 4H), 5.38 (s, 1H), 5.01 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.26 – 4.17 (m, 1H), 4.07 – 4.03 (m, 1H), 3.82 – 3.71 (m, 7H), 3.66 (d, $J = 6.2$ Hz, 4H), 3.51 (d, $J = 2.2$ Hz, 3H), 3.41 (dd, $J = 9.7, 5.9$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 10.0, 3.7$ Hz, 1H), 3.22 – 3.07 (m, 3H), 2.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.34 – 2.29 (m, 2H), 2.07 – 1.98 (m, 2H), 1.60 – 1.47 (m, 8H)。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 678.5$ 。

步骤7: G7-7的合成

将G7-6 (100 mg, 147 μmol) 溶解在四氢呋喃 (2.5 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (9.26 mg, 220 μmol) 的水溶液 2.5 mL, 15 °C 搅拌 16 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得黄色固体。粗产物G7-7 (0.95 g) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 664.5$ 。

步骤8: G7-8的合成

将G7-7 (90.0 mg, 135 μmol), 二异丙基乙胺 (34.9 mg, 270 μmol) 和O-苯并三氮唑-四甲基脒六氟磷酸盐 (76.9 mg, 202 μmol) 溶解在N,N-二甲基甲酰胺 (2.0 mL) 中, 加入GalNAc- NH_2 ·TFA (206 mg, 108 μmol , TFA), 氮气保护下 15 °C 搅拌 4 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1219.9$ 。

步骤9: G7-9的合成

将G7-8 (280 mg, 114 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (28.0 mg, 229 μmol), 二异丙基乙胺 (44.4 mg, 344 μmol), 和丁二酸酐 (91.8 mg, 917 μmol) 溶解

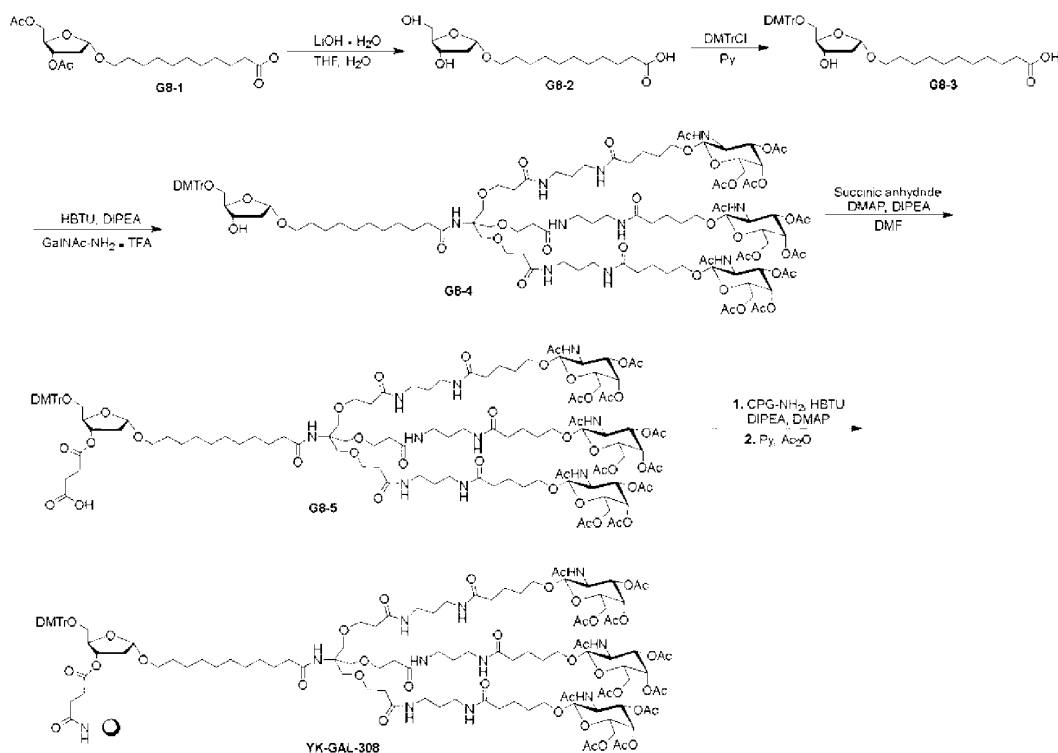
在N,N-二甲基甲酰胺 (2.0 mL) 中, 氮气保护下30 °C搅拌48 h。制备色谱纯化 (H₂O (50 mM TEAB)-ACN), 得黄色固体**G7-9** (172 mg, 68.1 μmol), 收率59.7%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.54 – 7.45 (m, 4H), 7.38 – 7.24 (m, 7H), 7.23 – 7.20 (m, 1H), 7.15 – 7.07 (m, 5H), 6.83 (dd, *J* = 8.8, 3.8 Hz, 4H), 5.37 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 5.24 – 5.16 (m, 3H), 5.01 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H), 4.65 (dd, *J* = 8.4, 3.9 Hz, 2H), 4.26 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.21 – 4.07 (m, 8H), 3.99 – 3.91 (m, 6H), 3.81 – 3.75 (m, 8H), 3.70 – 3.65 (m, 11H), 3.55 – 3.50 (m, 2H), 3.40 (d, *J* = 3.9 Hz, 3H), 3.29 – 3.25 (m, 12H), 2.81 – 2.64 (m, 16H), 2.52 (dd, *J* = 7.8, 4.0 Hz, 2H), 2.46 – 2.42 (m, 5H), 2.26 – 2.16 (m, 16H), 2.09 – 1.94 (m, 26H), 1.75 – 1.54 (m, 14H), 1.16 – 1.11 (m, 18H)。MS (ESI) *m/z* [M - 2H]²⁻ = 1269.9。

步骤10: YK-GAL-307的合成

将**G7-9** (120 mg, 47.2 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (5.77 mg, 47.2 μmol), 二异丙基乙胺 (48.8 mg, 377 μmol), 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (89.5 mg, 236 μmol) 溶解在N,N-二甲基甲酰胺 (10.0 mL) 中, 随后加入CPG-NH₂ (790 mg), 40 °C搅拌16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到12 mL乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C搅拌0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥12 h, 得白色固体化合物**YK-GAL-307** (810 mg, 载量38.9 μmol/g)。

8. YK-GAL-308的合成

合成路线如下:



步骤1: G8-2的合成

将G8-1 (0.34 g, 816 μmol) 溶解在四氢呋喃 (8.0 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (109 mg, 2.61 mmol) 的水溶液4.0 mL, 15 °C搅拌12 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得黄色固体。粗产物G8-2 (0.26 g) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 341.2$ 。

步骤2: G8-3的合成

粗产物G8-2 (0.26 g, 816 μmol) 和无水吡啶 (20 mL $\times$ 3) 共旋蒸除水。将干燥后的G8-2和4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (580 mg, 1714 μmol) 溶解在吡啶 (6.0 mL) 中, 氮气保护下15 °C搅拌36 h。加入甲醇 (20 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。制备色谱纯化 (H_2O (10 mM NH_4HCO_3)-ACN), 得白色固体G8-3 (401.9 mg, 647.9 μmol), 收率79.4%。MS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 643.4$ 。

步骤3: G8-4的合成

将G8-3 (90 mg, 145 μmol), 二异丙基乙胺 (37.5 mg, 290 μmol) 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (82.5 mg, 217 μmol) 溶解在N,N-二甲基甲酰胺 (3.0 mL) 中, 加入GalNAc-NH₂·TFA (331.3 mg, 174 μmol , 1.2 eq, TFA),

氮气保护下15 °C搅拌2 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1197.3$ 。

步骤4: G8-5的合成

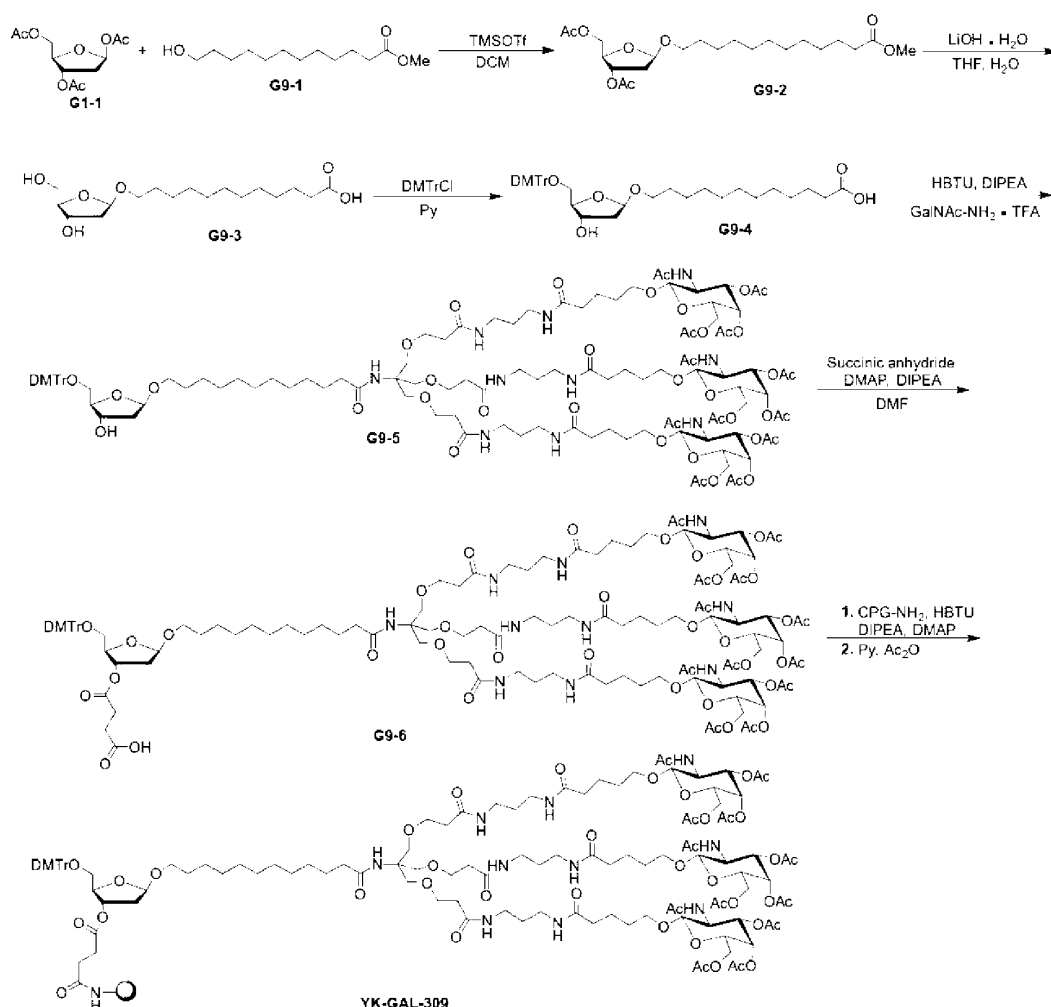
将**G8-4**, 4-二甲氨基吡啶 (35.4 mg, 289 μmol) , 二异丙基乙胺 (149.8 mg, 1158 μmol) , 和丁二酸酐 (159.4 mg, 1592 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (3.0 mL) 中, 氮气保护下30 °C搅拌48 h。制备色谱纯化 (H_2O (10 mM TEAB)-ACN), 得白色固体**G8-5** (190 mg, 85.9 μmol), 收率59.4%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.34 – 7.26 (m, 8H), 7.20 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 5.7$ Hz, 4H), 6.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 6.72 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.57 (s, 1H), 5.35 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 5.26 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 5.23 – 5.12 (m, 4H), 4.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H), 4.23 – 4.04 (m, 10H), 3.95 – 3.89 (m, 6H), 3.78 (s, 6H), 3.73 – 3.62 (m, 14H), 3.53 – 3.47 (m, 4H), 3.43 – 3.35 (m, 2H), 3.30 – 3.24 (m, 12H), 3.17 (dd, $J = 9.9, 4.0$ Hz, 2H), 2.62 – 2.57 (m, 4H), 2.43 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H), 2.28 – 2.15 (m, 13H), 2.10 – 1.92 (m, 30H), 1.74 – 1.51 (m, 22H), 1.238 – 1.26 (m, 14H)。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1247.4$ 。

步骤5: YK-GAL-308的合成

将**G8-5** (190 mg, 76.1 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (9.30 mg, 76.1 μmol) , 二异丙基乙胺 (78.7 mg, 609 μmol) , 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (144 mg, 381 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (12 mL) 中, 随后加入CPG-NH₂ (1.27 g), 40 °C搅拌16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到12 mL乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C搅拌0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥12 h, 得白色固体化合物**YK-GAL-308** (1.24 g, 载量29.7 $\mu\text{mol/g}$)。

9. YK-GAL-309的合成

合成路线如下:



步骤1: G9-2的合成

往干燥的化合物**G1-1** (734 mg, 2.82 mmol), 干燥的化合物**G9-1** (0.50 g, 2.17 mmol) 和3A分子筛 (2.0 g) 中加入二氯甲烷 (20 mL), 降温至0 °C后加入三氟化硼乙醚 (616 mg, 4.34 mmol), 并继续搅拌2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (20 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 (10 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得黄色油状物**G9-2** (589 mg, 1.37 mmol), 收率48.5%。MS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 453.1$ 。

步骤2: G9-3的合成

将**G9-2** (0.30 g, 696 μmol) 溶解在四氢呋喃 (4.0 mL) 中, 加入一水氧化锂 (93.6 mg, 2.23 mmol) 的水溶液2.0 mL, 15 °C搅拌12 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得黄色固体。粗产物**G9-3** (0.23 g) 直接用于下一步。MS (ESI)

$m/z [M + Na]^+ = 355.0$ 。

步骤3: G9-4的合成

粗产物**G9-3** (0.23 g, 692 μmol) 和无水吡啶 (20 mL x 3) 共旋蒸除水。将干燥后的**G9-3**和4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (534.58 mg, 1579.8 μmol) 溶解在吡啶 (5.0 mL) 中, 氮气保护下15 °C搅拌28 h。加入甲醇 (10 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。制备色谱纯化 (H_2O (10 mM NH_4HCO_3)-ACN), 得白色固体**G9-4** (337.3 mg, 531.7 μmol), 收率76.84%。MS (ESI) $m/z [M - H]^- = 633.5$ 。

步骤4: G9-5的合成

将**G9-4** (30 mg, 47.3 μmol), 二异丙基乙胺 (12.2 mg, 94.5 μmol) 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (26.9 mg, 70.9 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (0.5 mL) 中, 加入GalNAc- NH_2 .TFA (90.2 mg, 47.3 μmol , TFA), 氮气保护下15 °C搅拌1 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) $m/z [M - 2H]^{2-} = 1204.3$ 。

步骤5: G9-6的合成

将**G9-5** (114 mg, 47.3 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (11.55 mg, 94.58 μmol), 二异丙基乙胺 (55.1 mg, 425.45 μmol), 和丁二酸酐 (52.1 mg, 519 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (2.0 mL) 中, 氮气保护下30 °C搅拌36 h。制备色谱纯化 (H_2O (10 mM TEAB)-ACN), 得白色固体**G9-6** (56.7 mg, 22.6 μmol), 收率47.8%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.44 – 7.38 (m, 2H), 7.33 – 7.26 (m, 6H), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 6.86 – 6.79 (m, 4H), 5.24 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.27 – 4.21 (m, 1H), 4.19 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.74 (dd, $J = 9.6, 6.8$ Hz, 1H), 3.40 (dt, $J = 9.6, 6.5$ Hz, 2H), 3.27 (s, 1H), 3.16 – 3.07 (m, 3H), 2.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.21 – 2.15 (m, 1H), 2.02 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H), 1.67 – 1.52 (m, 4H), 1.23 – 1.30 (d, $J = 13.9$ Hz, 13H)。MS (ESI) $m/z [M - 2H]^{2-} = 1254.4$ 。

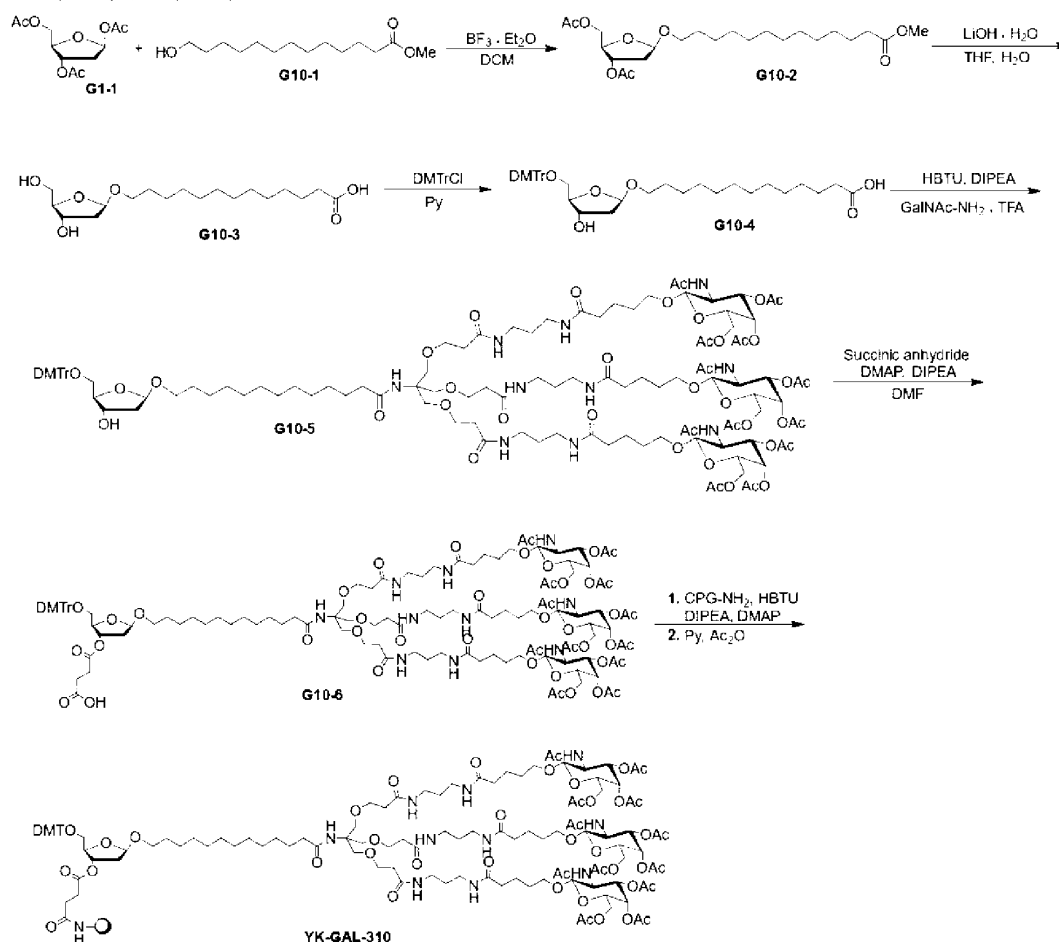
步骤6: YK-GAL-309的合成

将**G9-6** (32 mg, 12.7 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (1.56 mg, 12.7 μmol), 二异丙基乙胺 (13.2 mg, 102 μmol), 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (24.2 mg, 63.7 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (4.0 mL) 中, 随后加入CPG- NH_2 (221 mg), 40 °C搅拌12 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到4 mL乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中,

40 °C搅拌0.5 h。过滤，依次用二氯甲烷和甲醇洗涤，过滤物真空干燥12 h，得白色固体化合物YK-GAL-309 (103 mg, 载量24.5 $\mu\text{mol/g}$)。

10. YK-GAL-310的合成

合成路线如下：



步骤1: G10-2的合成

往干燥的化合物G1-1 (692 mg, 2.66 mmol), 干燥的化合物G10-1 (500 mg, 2.05 mmol) 和3A分子筛 (2.0 g) 中加入二氯甲烷 (20 mL), 降温至0 °C后加入三氟化硼乙醚 (581 mg, 4.09 mmol), 随后升温至25 °C并继续搅拌2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (20 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 (10 mL $\times$ 2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物G10-2 (576.6 mg, 1.30 mmol), 收率48.8%。MS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 467.1$ 。

步骤2: G10-3的合成

将**G10-2** (69 mg, 155 μmol) 溶解在四氢呋喃 (2.0 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (20.8 mg, 497 μmol) 的水溶液 1.0 mL, 室温搅拌 16 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得黄色油状物。粗产物**G10-3** (53.8 mg) 直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M + Na]^+ = 369.0$ 。

步骤3: G10-4的合成

粗产物**G10-3** (53.8 mg, 155 μmol) 和无水吡啶 (20 mL $\times$ 3) 共旋蒸除水。将干燥后的**G10-3**和4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (189 mg, 559 μmol) 溶解在吡啶 (3.0 mL) 中, 氮气保护下室温搅拌 16 h。加入甲醇 (10 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (DCM/MeOH), 得淡黄色固体**G10-4** (79.1 mg, 122 μmol), 收率 78.7%。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 647.5$ 。

步骤4: G10-5的合成

将**G10-4** (39 mg, 60.1 μmol), 二异丙基乙胺 (15.5 mg, 120 μmol) 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (34.2 mg, 90.2 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (1.5 mL) 中, 加入GalNAc-NH₂.TFA (115 mg, 60.1 μmol), 氮气保护下室温搅拌 1 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1211.3$ 。

步骤5: G10-6的合成

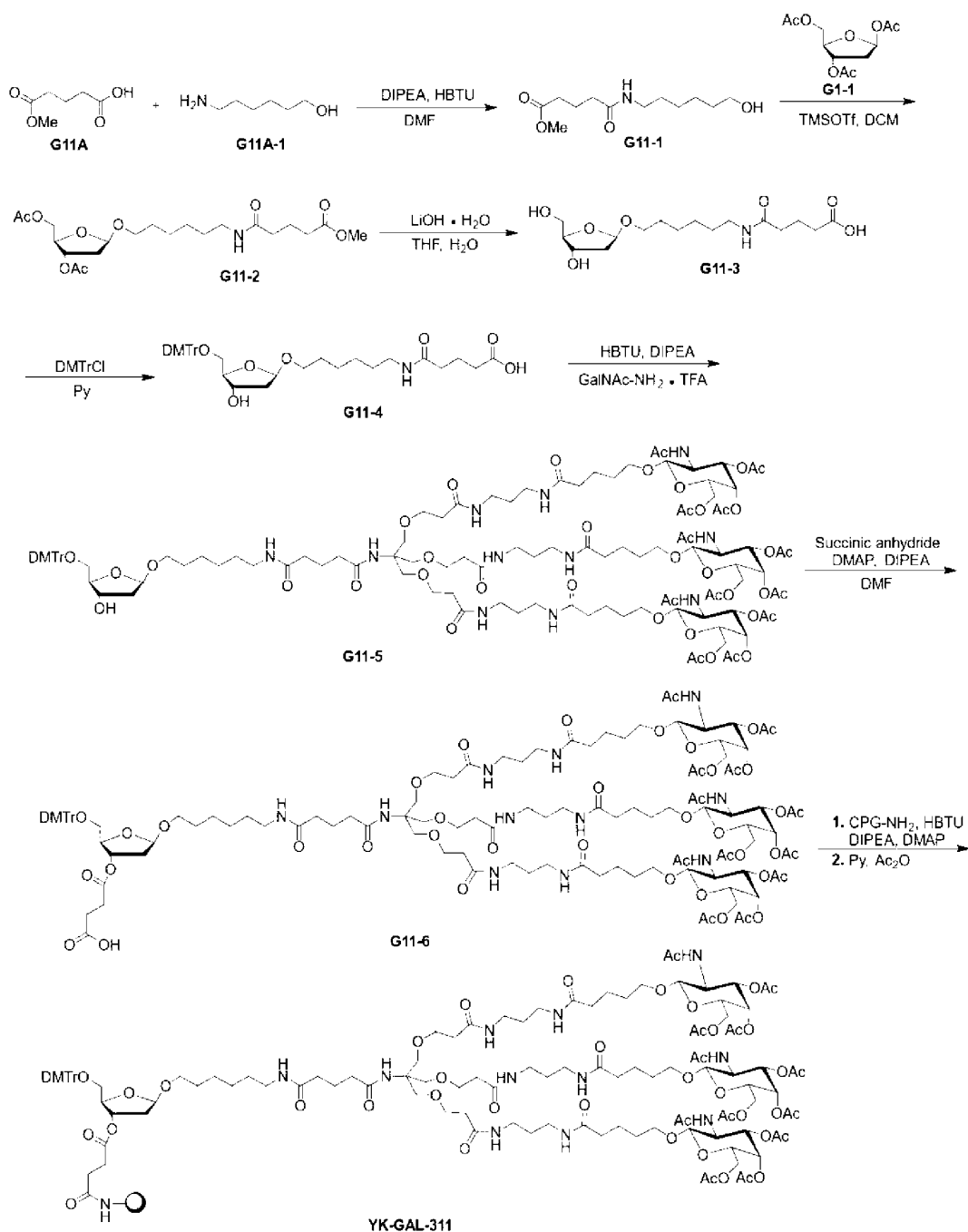
将**G10-5** (146 mg, 60.1 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (7.34 mg, 60.1 μmol), 二异丙基乙胺 (31.1 mg, 240 μmol), 和丁二酸酐 (30.1 mg, 301 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (1.5 mL) 中, 氮气保护下 30 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 16 h。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM TEAB)-ACN), 得白色固体**G10-6** (74.2 mg, 49.4 μmol), 收率 48.9%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.49 – 7.42 (m, 2H), 7.36 – 7.31 (m, 4H), 7.28 – 7.23 (m, 8H), 7.21 – 7.16 (m, 1H), 6.99 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H), 6.79 (dd, $J = 11.8, 8.8$ Hz, 6H), 6.47 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.35 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 5.23 – 5.17 (dt, $J = 11.2, 3.8$ Hz, 4H), 4.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.19 – 4.04 (m, 9H), 3.99 – 3.86 (m, 6H), 3.78 (d, $J = 2.1$ Hz, 6H), 3.69 – 3.60 (m, 11H), 3.53 – 3.48 (m, 3H), 3.35 – 3.14 (m, 15H), 2.60 – 2.50 (m, 4H), 2.43 (t, $J = 5.7$ Hz, 7H), 2.29 – 2.13 (m, 24H), 2.10 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H), 2.04 (s, 9H), 1.99 (s, 9H), 1.94 (d, $J = 2.5$ Hz, 8H), 1.75 – 1.55 (m, 18H), 1.42 (s, 2H), 1.26 – 1.21 (d, $J = 3.6$ Hz, 15H)。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1261.1$ 。

步骤6: YK-GAL-310的合成

将**G10-6** (59 mg, 22.1 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (2.70 mg, 22.13 μmol), 二异丙基乙胺 (22.88 mg, 177.01 μmol), 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (41.96 mg, 110.63 μmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (4.0 mL) 中, 随后加入CPG-NH₂ (383 mg), 40 °C搅拌16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到4 mL乙酸酐/吡啶 (1:4) 溶液中, 40 °C搅拌0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥12 h, 得白色固体化合物**YK-GAL-310** (362 mg, 载量30.2 $\mu\text{mol/g}$)。

11. YK-GAL-311的合成

合成路线如下:



步骤1: G11-1的合成

将G11A (2.00 g, 13.7 mmol, 1.72 mL), 二异丙基乙胺 (3.54 g, 27.3 mmol) 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (5.71 g, 15.0 mmol) 溶解在N,N-二甲基甲酰胺 (20.0 mL) 中, 加入G11A-1 (1.92 g, 16.4 mmol), 15 °C搅拌2 h。制备色谱纯化 (H₂O (0.1% TFA) - ACN), 得白色固体G11-1 (2.00 g, 8.15 mmol), 收率59.5%。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.76 – 7.73 (m, 1H),

4.38 – 4.30 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.36 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.02 – 2.97 (m, 2H), 2.28 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.76 – 1.68 (m, 2H), 1.42 – 1.18 (m, 8H)。MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 245.9$ 。

步骤2: G11-2的合成

往化合物G11-1 (500 mg, 1.92 mmol), 化合物G11-1 (565 mg, 2.31 mmol) 和 4A分子筛 (1.0 g) 中加入二氯甲烷 (10.0 mL), 降温至0 °C后加入三甲硅烷基三氟甲磺酸酯 (854 mg, 3.84 mmol), 并继续搅拌2 h。加入饱和碳酸氢钠水溶液 (30.0 mL) 淬灭反应, 用二氯甲烷 (15.0 mL $\times$ 3) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。柱层析纯化 (PE/EA), 得无色油状物G11-2 (400 mg, 899 μ mol), 收率46.8%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.61 – 5.54 (m, 1H), 5.24 – 5.20 (m, 1H), 4.32 – 4.00 (m, 3H), 3.67 (d, $J = 1.0$ Hz, 4H), 3.34 (dt, $J = 9.4, 6.6$ Hz, 1H), 3.27 – 3.19 (m, 2H), 2.42 – 2.30 (m, 3H), 2.27 – 2.02 (m, 9H), 2.02 – 1.90 (m, 3H), 1.57 – 1.45 (m, 4H), 1.37 – 1.31 (m, 4H)。MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 446.0$ 。

步骤3: G11-3的合成

将G11-2 (180 mg, 404 μ mol, 1.0 eq) 溶解在四氢呋喃 (1.8 mL) 中, 加入一水氢氧化锂 (67.8 mg, 1.62 mmol, 4.0 eq) 的水溶液0.9 mL, 35 °C搅拌16 h。反应液减压浓缩除去溶剂, 得棕色油状物。粗产物G11-3 (140.36 mg) 直接用于下一步。

步骤4: G11-4的合成

将干燥的G11-3 (40.0 mg, 115 μ mol) 和4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷 (65.0 mg, 191 μ mol) 溶解在吡啶 (1.00 mL) 中, 氮气保护下15 °C搅拌8 h。加入甲醇 (2.00 mL) 淬灭反应, 减压浓缩除去溶剂, 得粗产物。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM TEAB)-ACN), 得白色固体G11-4 (54.7 mg, 84.3 μ mol), 收率73.3%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.29 – 7.20 (m, 6H), 7.13 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), 5.60 (s, 1H), 5.08 (dd, $J = 5.5, 2.3$ Hz, 1H), 4.34 (q, $J = 6.2$ Hz, 1H), 3.89 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.56 – 3.50 (m, 1H), 3.29 – 3.17 (m, 3H), 3.16 – 3.06 (m, 3H), 2.33 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 2.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.01 – 1.95 (m, 1H), 1.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.40 – 1.31 (m, 4H), 1.21 – 1.15 (m, 4H)。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 648.2$ 。

步骤5: G11-5的合成

将**G11-4** (17.0 mg, 26.1 μmol), 二异丙基乙胺 (6.76 mg, 52.3 μmol) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (14.8 mg, 39.2 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (0.3 mL) 中, 加入 GalNAc-NH₂·TFA (62.4 mg, 27.4 μmol , TFA), 氮气保护下 15 °C 搅拌 6 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1211.6$ 。

步骤6: **G11-6**的合成

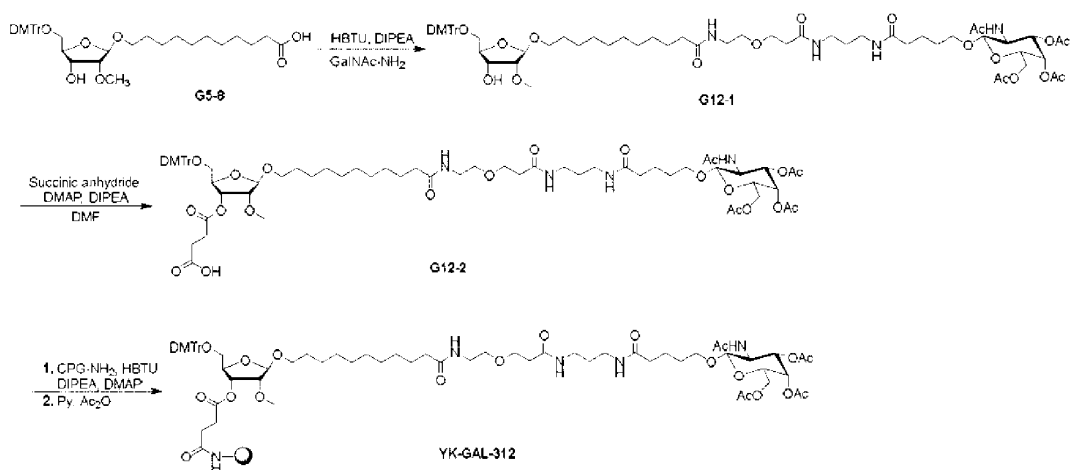
将**G11-5** (63.0 mg, 25.9 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (6.35 mg, 51.9 μmol), 二异丙基乙胺 (6.71 mg, 51.9 μmol), 和丁二酸酐 (13.0 mg, 129 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (0.5 mL) 中, 氮气保护下 30 °C 搅拌 16 h。制备色谱纯化 (H₂O (10 mM TEAB)-ACN), 得白色固体**G11-6** (35.0 mg, 13.8 μmol), 收率 53.3%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.49 – 7.44 (m, 5H), 7.35 – 7.31 (m, 4H), 7.28 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.01 – 7.00 (m, 3H), 6.91 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.83 – 6.72 (m, 6H), 5.35 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 5.19 (dd, $J = 10.9, 3.3$ Hz, 5H), 4.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 3H), 4.18 – 4.05 (m, 10H), 3.95 – 3.89 (m, 6H), 3.78 (s, 7H), 3.67 – 3.61 (m, 12H), 3.50 (s, 4H), 3.31 – 3.15 (m, 17H), 2.57 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.51 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.41 (t, $J = 5.8$ Hz, 6H), 2.28 – 2.12 (m, 21H), 2.12 – 1.84 (m, 34H), 1.75 – 1.61 (m, 20H), 1.25 (s, 4H)。MS (ESI) m/z $[M - 2H]^{2-} = 1261.9$ 。

步骤7: **YK-GAL-311**的合成

将**G11-7** (35.0 mg, 13.8 μmol), 4-二甲氨基吡啶 (1.69 mg, 13.8 μmol), 二异丙基乙胺 (14.3 mg, 110 μmol), 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (26.2 mg, 69.3 μmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (2.0 mL) 中, 随后加入 CPG-NH₂ (220 mg), 40 °C 搅拌 16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到 12.0 mL 乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C 搅拌 0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥 12 h, 得淡黄色固体化合物**YK-GAL-311** (205 mg, 载量 32.4 $\mu\text{mol/g}$)。

12. **YK-GAL-312**的合成

合成路线如下:



步骤1: G12-1的合成

将 **G5-8** (1.3 g, 2.0 mmol), 二异丙基乙胺 (517 mg, 4.0 mmol) 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.14 g, 3.0 mmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (100.0 mL) 中, 加入 GalNAc-NH₂ (该化合物按照专利 CN115315263A 的合成方法进行合成, 总收率 20.18%) (1.24 g, 2.0 mmol), 氮气保护下 15 °C 搅拌 1 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 1249.9$ 。

步骤2: G12-2的合成

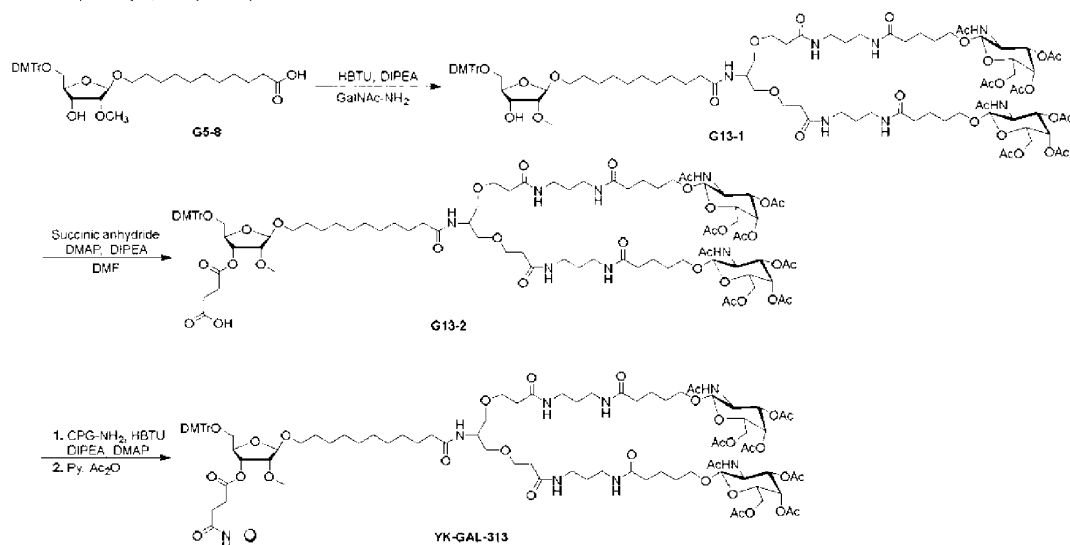
将 **G12-1** (2.0 mmol), 4-二甲氨基吡啶 (488.7 mg, 4.0 mmol), 二异丙基乙胺 (1.03 g, 8.0 mmol), 和丁二酸酐 (1.2 g, 12.0 mmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (100.0 mL) 中, 氮气保护下 30 °C 搅拌 48 h。制备色谱纯化 (H₂O (50 mM TEAB)-ACN), 得白色固体 **G12-2** (1.9 g, 1.31 mmol), 收率 65.5%。MS (ESI) m/z $[M - H]^- = 1350.1$ 。

步骤3: YK-GAL-312的合成

将 **G12-2** (1.9 g, 1.31 mmol), 4-二甲氨基吡啶 (160 mg, 1.31 mmol), 二异丙基乙胺 (1.35 g, 10.48 mmol), 和 O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (2.48 g, 6.55 mmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (210 mL) 中, 随后加入 CPG-NH₂ (13.6 g), 40 °C 搅拌 16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到 124 mL 乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中, 40 °C 搅拌 0.5 h。过滤, 依次用二氯甲烷和甲醇洗涤, 过滤物真空干燥 12 h, 得白色固体化合物 **YK-GAL-312** (24.3 g, 载量 36.2 $\mu\text{mol/g}$)。

13. YK-GAL-313的合成

合成路线如下：



步骤1: G13-1的合成

将G5-8 (1.3 g, 2.0 mmol), 二异丙基乙胺 (517 mg, 4.0 mmol) 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.14 g, 3.0 mmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (100.0 mL) 中, 加入GalNAc-NH₂ (该化合物按照专利WO2023288033A1的合成方法进行合成, 总收率2.1%) (2.41 g, 2.0 mmol), 氮气保护下15 °C 搅拌1 h。反应液直接用于下一步。MS (ESI) m/z [M - H]⁻ = 1837.5。

步骤2: G13-2的合成

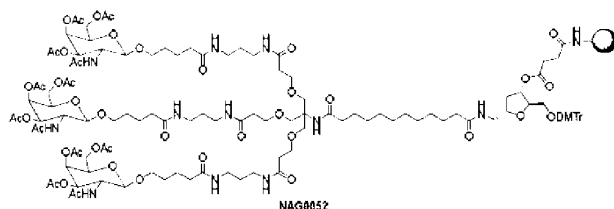
将G13-1 (2.0 mmol), 4-二甲氨基吡啶 (488.7 mg, 4.0 mmol), 二异丙基乙胺 (1.03 g, 8.0 mmol), 和丁二酸酐 (1.2 g, 12.0 mmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (100.0 mL) 中, 氮气保护下30 °C 搅拌48 h。制备色谱纯化 (H₂O (50 mM TEAB)-ACN), 得白色固体G13-2 (2.66 g, 1.29 mmol), 收率 64.5%。MS (ESI) m/z [M - H]⁻ = 1937.2。

步骤3: YK-GAL-313的合成

将G13-2 (2.66 g, 1.29 mmol), 4-二甲氨基吡啶 (157.6 mg, 1.29 mmol), 二异丙基乙胺 (1.33 g, 10.32 mmol), 和O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐 (2.45 g, 6.45 mmol) 溶解在N, N-二甲基甲酰胺 (210.0 mL) 中, 随后加入CPG-NH₂ (18.9 g), 40 °C 搅拌16 h。反应液过滤, 过滤物依次用甲醇和二氯甲烷洗涤, 真空干燥。再将过滤物加到173mL乙酸酐/吡啶 (1:5) 溶液中,

40 °C搅拌0.5 h。过滤，依次用二氯甲烷和甲醇洗涤，过滤物真空干燥12 h，得白色固体化合物YK-GAL-313 (26.3 g, 载量37.1 $\mu\text{mol/g}$)。

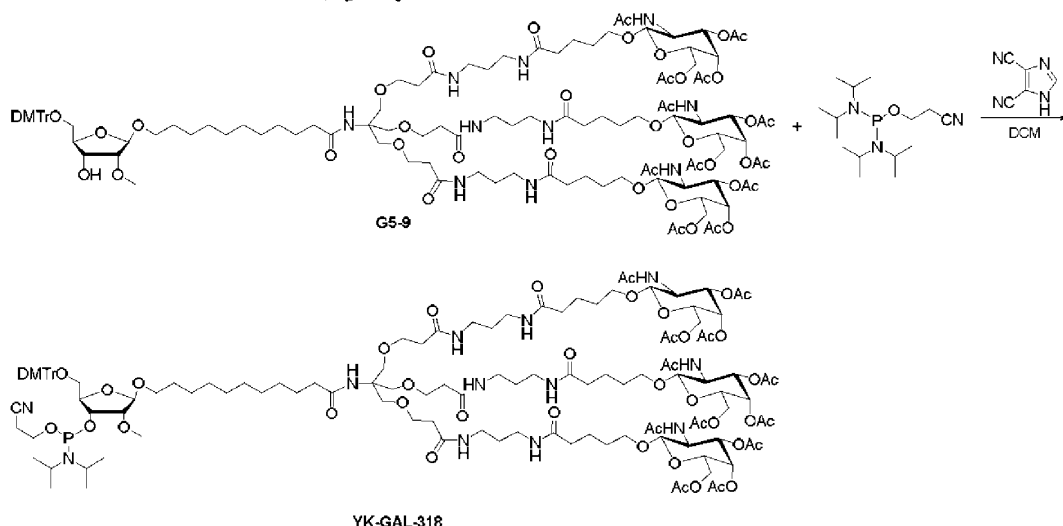
14. NAG0052的合成



按照WO2023109938A1第100页中NAG0052的合成方法，得到产物288 mg，总收率1.26%，载量31.5 $\mu\text{mol/g}$ 。

实施例2：GalNAc亚磷酰胺化合物的合成

1. YK-GAL-318的合成

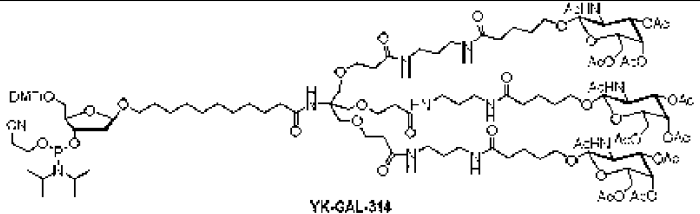
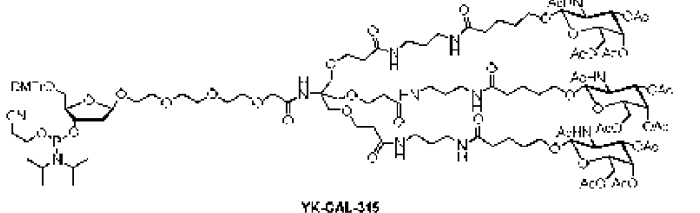
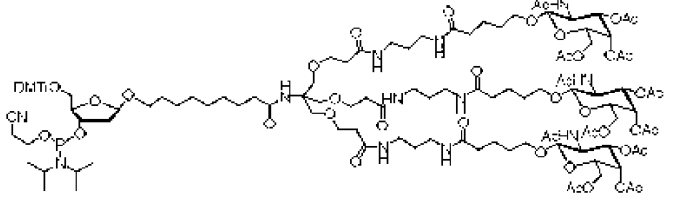
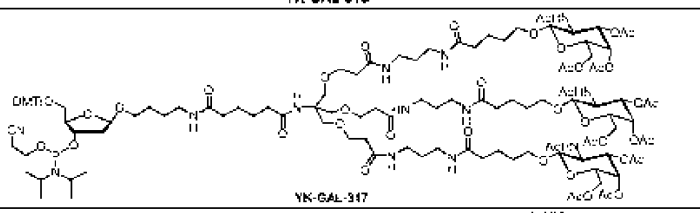
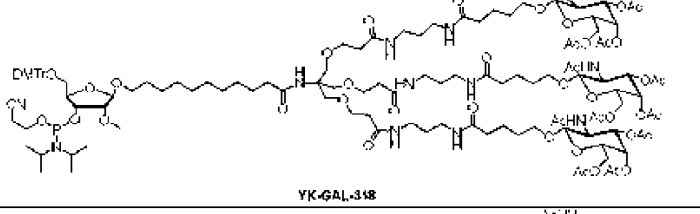
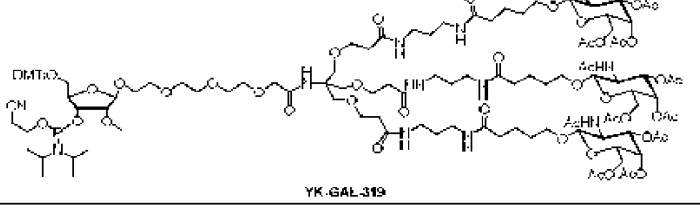


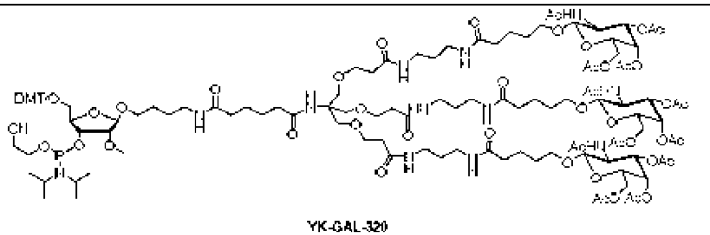
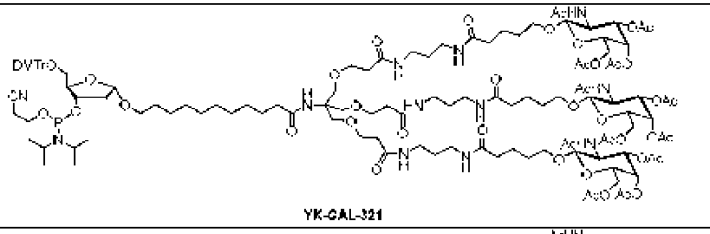
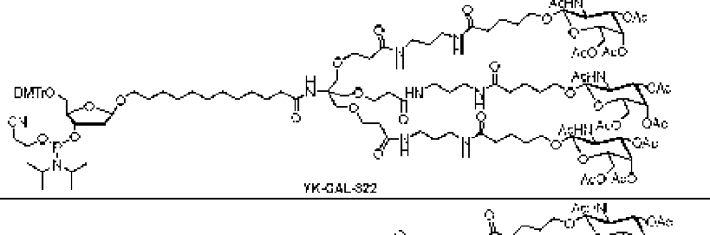
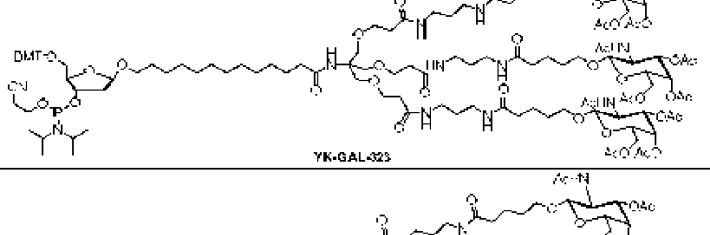
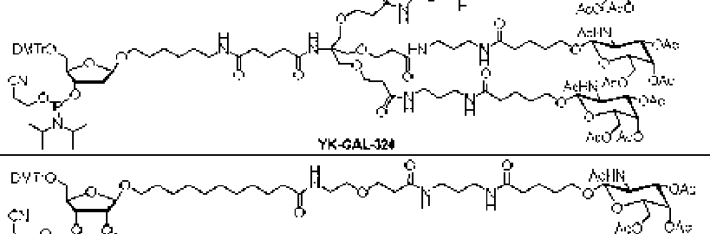
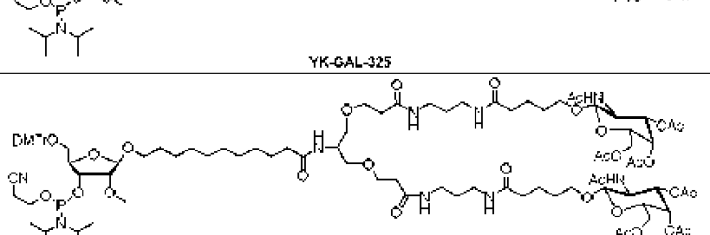
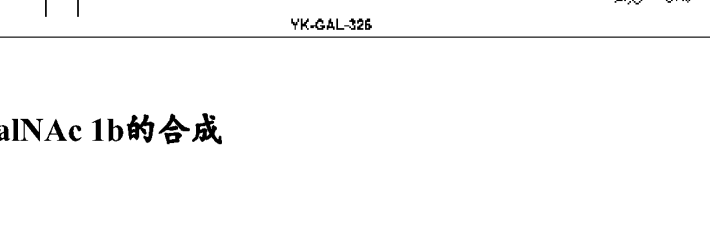
将化合物G5-9 (2.43 g, 1.0 mmol) 和DCM (25 mL) 加入反应瓶，搅拌至溶解，依次加入3-双(二异丙基氨基)膦酰氧基丙腈 (0.75 g, 2.5 mmol) 和4,5-二氰基咪唑 (0.24 g, 2.0 mmol)，10 °C搅拌2 h。反应液用DCM (100 mL) 稀释并用NaHCO₃ (100 mL) 洗涤2次。有机相用无水Na₂SO₄干燥，并浓缩去除溶剂得残留物。将残留物溶于DCM (30 mL)，于10-15 °C条件下用正庚烷/甲基叔丁基醚 (5/1) 打浆10 min，共打浆3次，得白色固体2.39 g，收率91%。MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 2626.8$ 。

2. 其它GalNAc亚磷酰胺化合物的合成

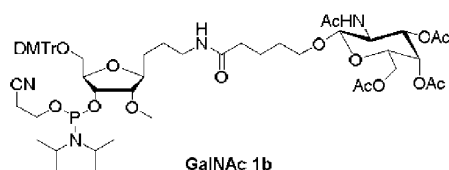
分别以G1-6、G2-5、G3-5、G4-5、G6-8、G7-8、G8-4、G9-5、G10-5、G11-5、G12-1和G13-1为起始原料，按照合成YK-GAL-318的方法，合成出表1中所列其它GalNAc亚磷酰胺化合物。

表1：GalNAc亚磷酰胺化合物

名称	化合物结构	收率 (%)	MS (ESI) m/z [M - H] ⁻
YK-GAL-314	 YK-GAL-314	90	2596.8
YK-GAL-315	 YK-GAL-315	88	2602.9
YK-GAL-316	 YK-GAL-316	91	2569.1
YK-GAL-317	 YK-GAL-317	85	2612.1
YK-GAL-318	 YK-GAL-318	91	2626.8
YK-GAL-319	 YK-GAL-319	87	2632.9

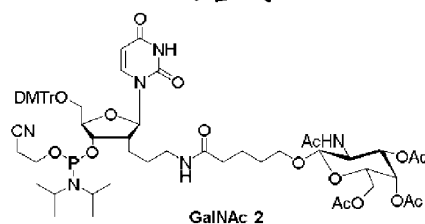
YK-GAL-320		85	2642.4
YK-GAL-321		81	2597.0
YK-GAL-322		88	2611.2
YK-GAL-323		85	2624.9
YK-GAL-324		82	2625.8
YK-GAL-325		90	1452.2
YK-GAL-326		86	2039.8

3. GalNAc 1b的合成



按照WO2023014938A1第145页中GalNAc 1b的合成方法,得到产物377.2 mg, 总收率0.58%, MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 1137.9$ 。

4. GalNAc 2的合成



按照WO2023049258A1第216页中GalNAc 2的合成方法,得到产物468.5 mg, 总收率1.75%, MS (ESI) m/z $[M + H]^+ = 1217.7$ 。

实施例3: GalNAc化合物与寡核苷酸的偶联

本实施例中使用同一个siRNA序列进行合成, 缀合的siRNA序列为编号为inc的序列, inc序列如下:

正义链 (inc-SS):

5'-Cms-Ums-Am-Gm-Am-Cm-Cf-Um-Gf-Um-dT-Um-Um-Gm-Cm-Um-Um-Um-Um-Gm-Um-3' (SEQ ID NO:1),

反义链 (inc-AS):

5'-Ams-Cfs-Am-Af-Af-Af-Gm-Cf-Am-Af-Am-Af-Cm-Af-Gm-Gf-Um-Cf-Um-Am-Gms-Ams-Am-3' (SEQ ID NO:2)。

其中, A、U、C、G代表核苷酸的碱基组成; dT表示脱氧胸腺嘧啶核苷酸; m代表m左侧相邻的核苷酸为2'-OMe修饰; f代表m左侧相邻的核苷酸为2'-F修饰; s代表s左右相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接。

序列来自于公开序列, 为国外已上市siRNA药物inclisiran的寡核苷酸序列。

Inclisiran序列是一种合成的化学修饰的双链小干扰核糖核酸 (siRNA), 通过靶向结合编码PCSK9蛋白的mRNA, 通过RNA干扰机制抑制PCSK9蛋白

的生成，从而调控LDL受体的回收和再利用增强其与LDL的结合，达到降低血液中LDL的目的。

1. 制备GalNAc缀合的siRNA正义链

根据亚磷酸胺化学法在固相载体上合成寡核苷酸GalNAc缀合物。

合成缀合物1-11和18(序列编号为inc-G1、inc-G2、inc-G3、inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G8、inc-G9、inc-G10、inc-G11和inc-NAG0052)时，使用实施例1中所合成的GalNAc-CPG化合物(包括YK-GAL-301、YK-GAL-302、YK-GAL-303、YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306、YK-GAL-307、YK-GAL-308、YK-GAL-309、YK-GAL-310、YK-GAL-311和NAG0052)作为固相载体；合成缀合物17(序列编号为inc-L96)时，使用购买的CPG-L96(购自天津药明康德新药开发有限公司，L96为US 10465194B2中公开，权利要求10)作为固相载体，其中固相载体合成规模1 μ mol。这些GalNAc化合物都缀合到寡核苷酸的3'末端。

合成缀合物12-16、19和20(序列编号为inc-G12、inc-G13、G18-inc、inc-G25、G26-inc、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2)时，使用通用CPG固相载体，将实施例2中合成的GalNAc亚磷酸胺化合物(YK-GAL-318、YK-GAL-325、YK-GAL-326、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2)作为第一个单体或最后一个单体进行固相合成，其中固相载体合成规模1 μ mol。其中缀合物12(序列编号为inc-G12)、13(序列编号为inc-G13)、15(序列编号为inc-G25)、19(序列编号为inc-GalNAc 1b)和20(序列编号为inc-GalNAc 2)，是GalNAc配体化合物缀合到寡核苷酸的3'末端，缀合物14(序列编号为G18-inc)和16(序列编号为G26-inc)，是GalNAc配体化合物缀合到寡核苷酸的5'末端。

(1) 试剂和单体准备

通过采用单体的乙腈溶液(1/20, w/v)，0.25M的5-苄硫基四氮唑的乙腈溶液作为活化剂，0.2M的氢化黄原素的乙腈/吡啶(1/4, v/v)溶液作为硫代试剂，0.05M的碘的水/吡啶(1/9, v/v)溶液作为氧化试剂，20%的乙酸酐在乙腈中(v/v)作为盖帽剂A，20/30/50(1-甲基咪唑/吡啶/乙腈, v/v/v)作为盖帽剂B，20%的二乙胺在乙腈中(v/v)作为脱氟乙基试剂，3%的二氯乙酸在甲苯中(v/v)作为脱DMT试剂。并装入192 P型号DNA/RNA自动合成

仪中指定的试剂位置中。

(2) 粗品合成

输入指定的寡核苷酸序列，并设定好合成程序，检查无误后，开始循环寡核苷酸的合成。单体偶合时间约1分钟，其中氧代时间约30-45秒，硫代时间约2分钟。循环结束后，完成寡核苷酸的固相合成。

(3) 脱保护

在合成结束后，将固相载体转移至反应器中，在50-60 °C条件下用浓氨水（25-28%）从固相载体上裂解寡核苷酸16-24 小时，体系降至室温，然后过滤，用纯化水与乙醇的混合溶液进行淋洗，合并滤液，滤液低温浓缩，得粗品残留物。

(4) 纯化

将脱保护后的粗品残留物用纯化水溶解，进行HPLC纯化，收集产物峰溶液并用酶标仪测含量，并且通过ESI MS证实分子量。

该步骤将实施例1所合成的GalNAc-CPG化合物和实施例2所合成的GalNAc亚磷酰胺化合物缀合到siRNA的正义链3'或5'末端。

合成缀合物12时使用 **YK-GAL-325** 作为亚磷酰胺单体，因为 **YK-GAL-325** 具有单触角，因此在合成序列中重复3次，使合成的缀合物12具有3个GalNAc修饰基团。

合成缀合物13时使用 **YK-GAL-326** 作为亚磷酰胺单体，因为 **YK-GAL-326** 是具有双触角，因此在合成序列中重复2次，使合成的缀合物13具有4个GalNAc修饰基团。

2. 制备无GalNAc缀合的siRNA反义链

按照合成siRNA正义链的方法合成siRNA反义链，其中使用通用CPG固相载体，每个与正义链互补反义链的合成规模为1 μmol。

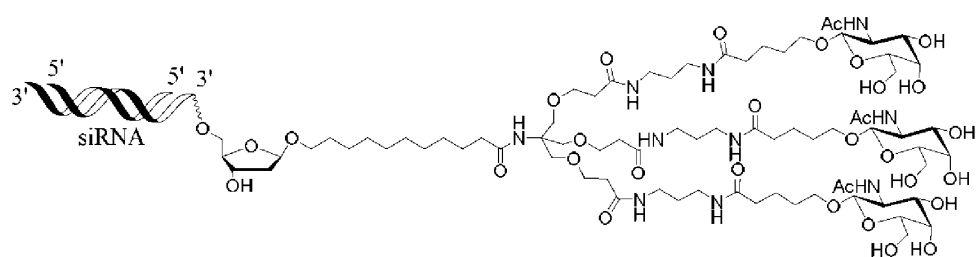
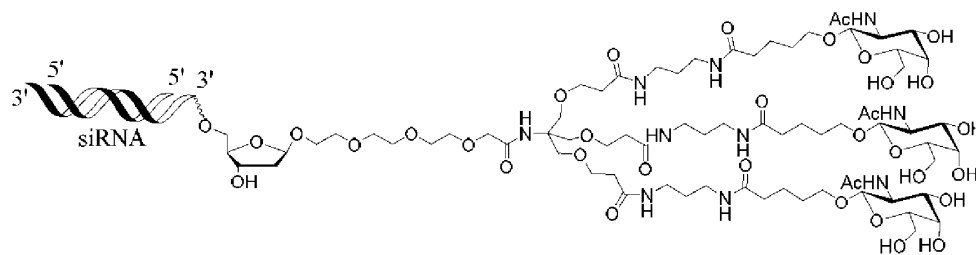
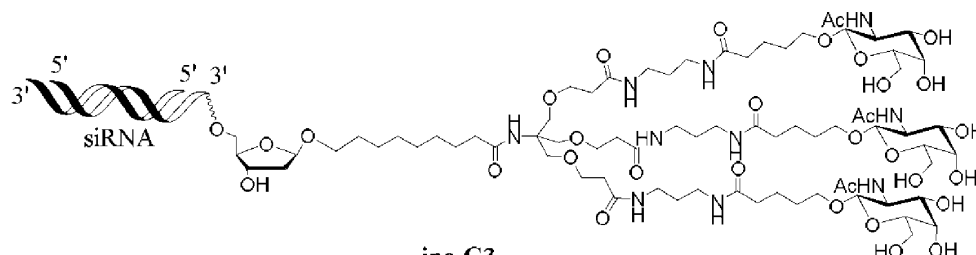
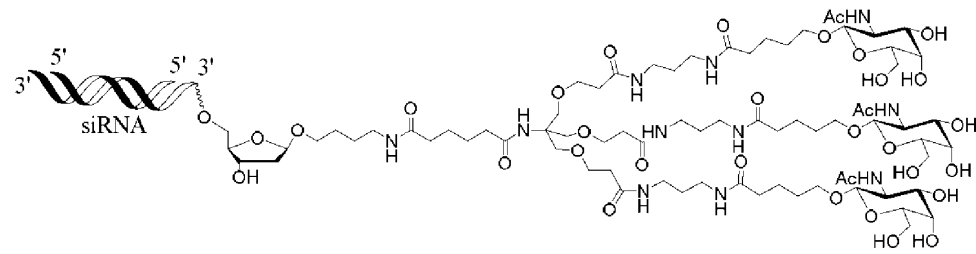
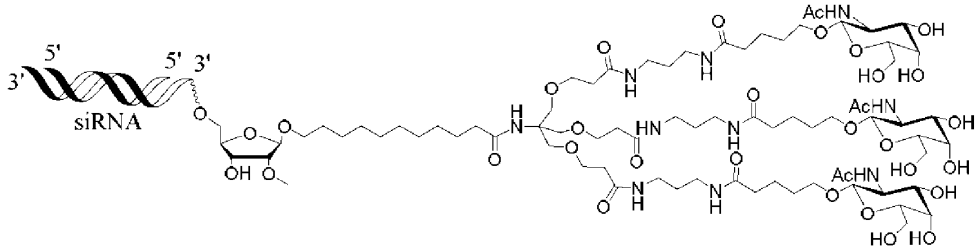
3. 制备缀合的双链siRNA

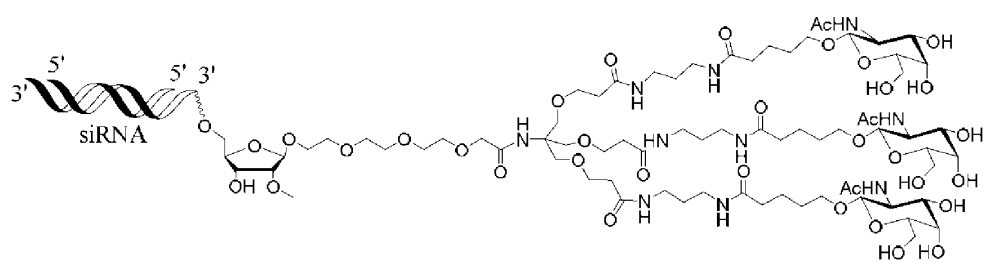
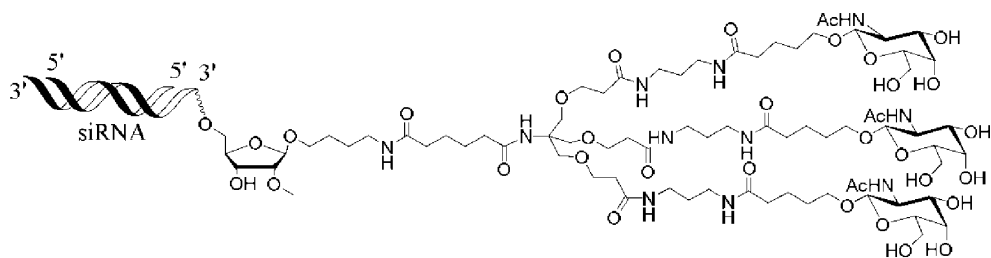
将siRNA正义链和互补反义链按照紫外吸收含量1:1混合，加热至95°C，3分钟后冷却至室温，形成双链。将所得双链溶液用HPLC表征产品纯度合格后用酶标仪测定含量，冻干得到固体粉末保存备用。所得GalNAc缀合的siRNA双链序列及分子量如表2所示。

表2：GalNAc缀合的双链siRNA

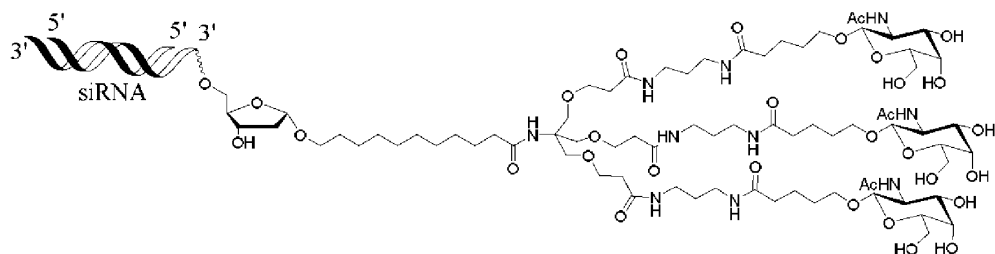
缀合物	缀合正义链位置	序列编号	序列方向5'-3'		理论分子量	实测分子量
缀合物1	3'端	inc-G1	SS	inc-SS-G1	8630.4	8630.4
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物2	3'端	inc-G2	SS	inc-SS-G2	8636.3	8631.9
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物3	3'端	inc-G3	SS	inc-SS-G3	8602.4	8601.5
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物4	3'端	inc-G4	SS	inc-SS-G4	8645.4	8643.4
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物5	3'端	inc-G5	SS	inc-SS-G5	8660.5	8656.0
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物6	3'端	inc-G6	SS	inc-SS-G6	8666.4	8661.9
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物7	3'端	inc-G7	SS	inc-SS-G7	8675.4	8670.8
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物8	3'端	inc-G8	SS	inc-SS-G8	8630.4	8629.5
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物9	3'端	inc-G9	SS	inc-SS-G9	8644.5	8644.0
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物10	3'端	inc-G10	SS	inc-SS-G10	8658.5	8658.0
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物11	3'端	inc-G11	SS	inc-SS-G11	8659.4	8658.9
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物12	3'端	inc-G12	SS	inc-SS-G12	9507.3	9504.1
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物13	3'端	inc-G13	SS	inc-SS-G13	9545.4	9544.3
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物14	5'端	G18-inc	SS	G18-inc-SS	8660.5	8658.4
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物15	3'端	inc-G25	SS	inc-SS-G25	7737.4	7736.5
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物16	5'端	G26-inc	SS	G26-inc-SS	8198.9	8195.4
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物17	3'端	inc-L96	SS	inc-SS-L96	8641.4	8640.0
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物18	3'端	inc-NAG0052	SS	inc-SS-NAG0052	8671.5	8670.2
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物19	3'端	inc-GalNAc 1b	SS	inc-SS- GalNAc 1b	8564.1	8562.3
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6
缀合物20	3'端	inc-GalNAc 2	SS	inc-SS- GalNAc 2	7503.0	7502.6
			AS	inc-AS	7698.2	7697.6

其中：SS为正义链，AS为反义链，所得缀合的siRNA结构如下：

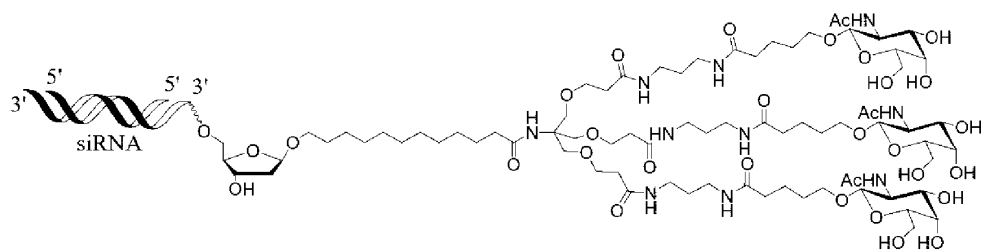
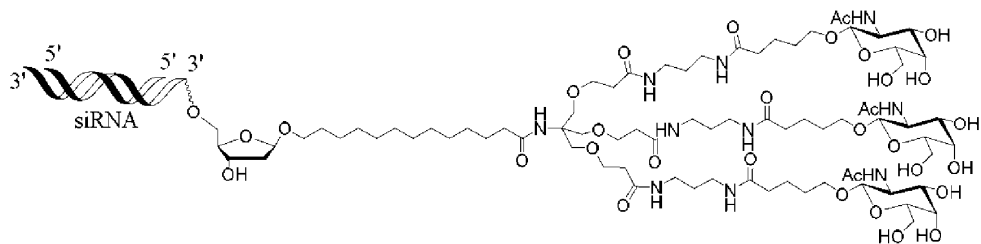
**inc-G1****inc-G2****inc-G3****inc-G4****inc-G5**

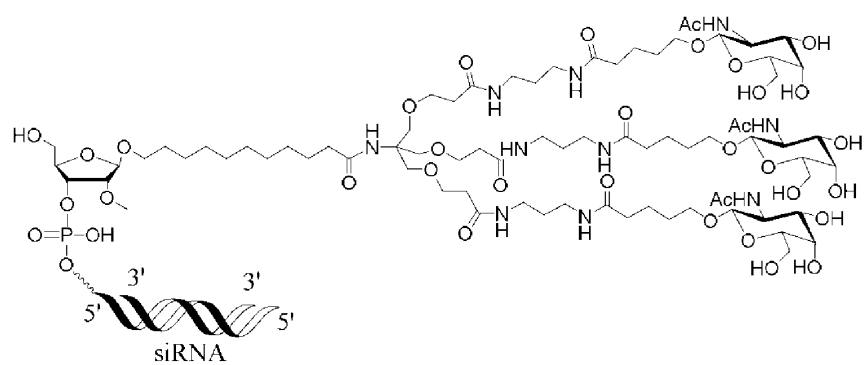
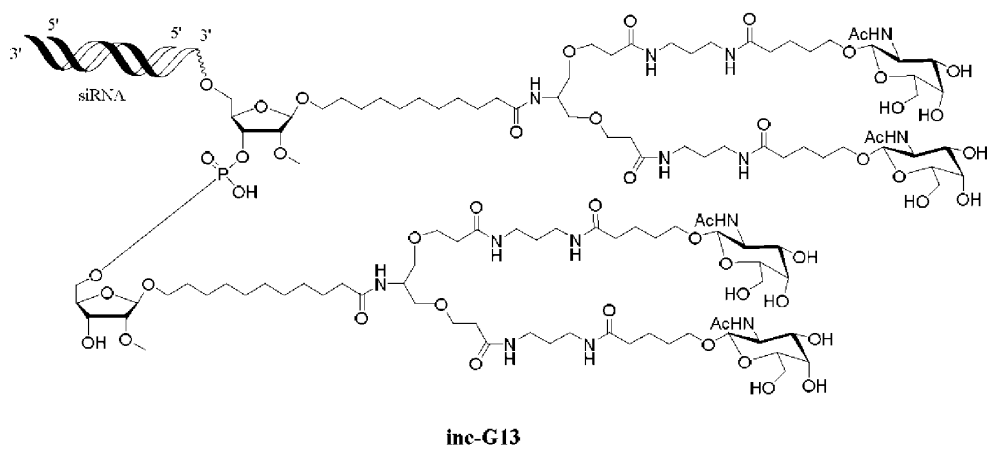
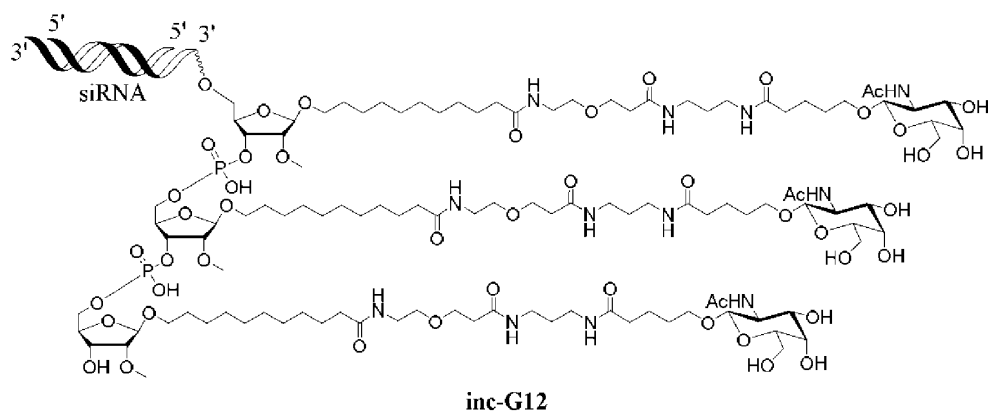
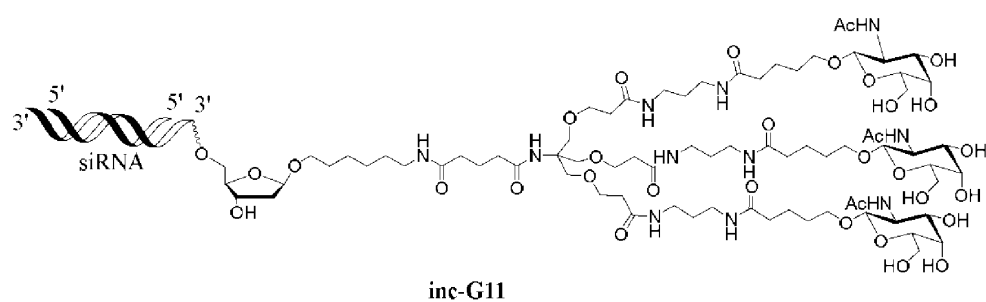
**inc-G6**

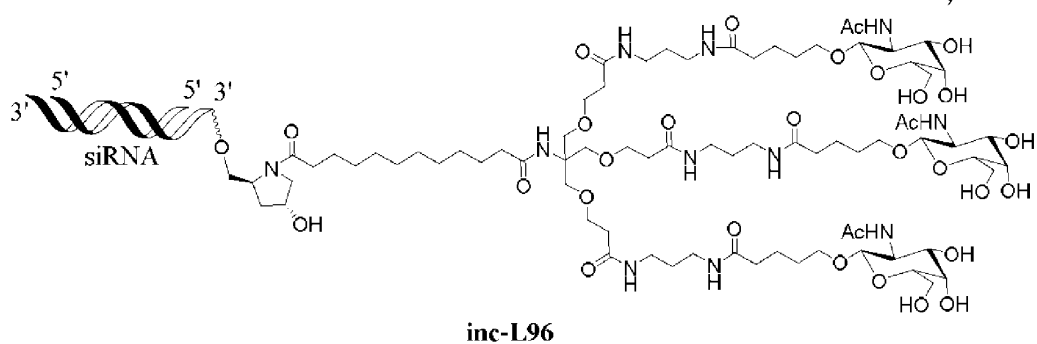
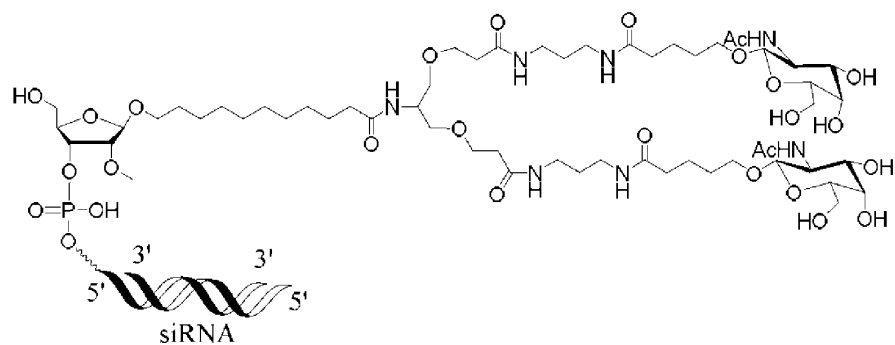
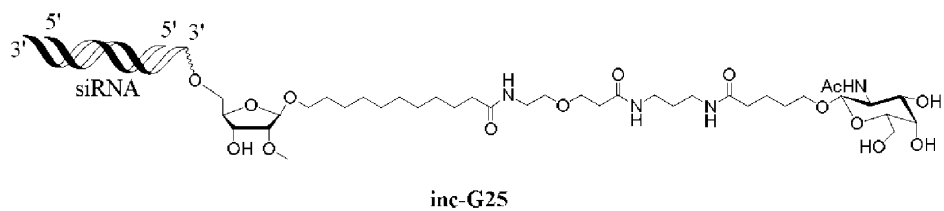
inc-G7



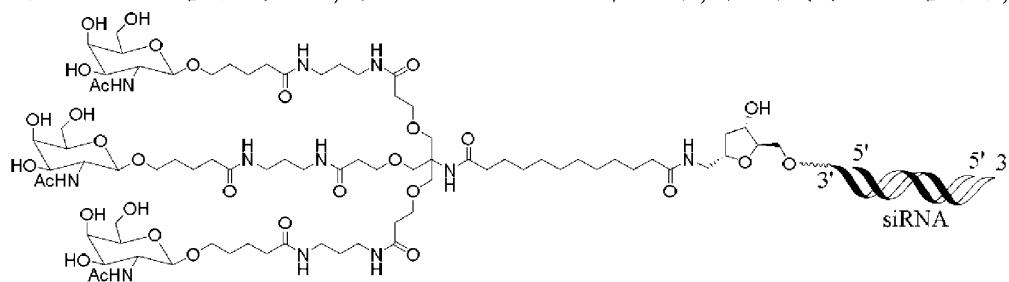
inc-G8

**inc-G9****inc-G10**

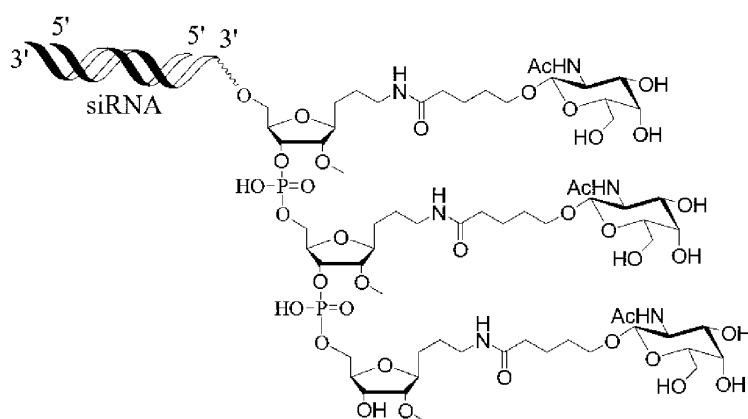




(GalNAc化合物为L96, 在US10465194B2中公开, 权利要求10化合物),

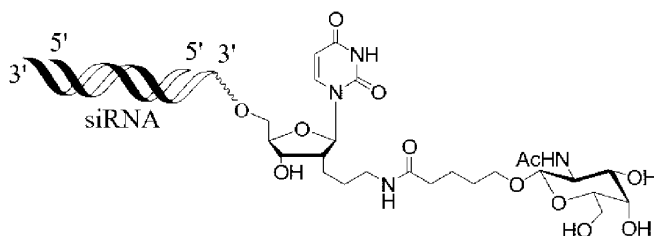


(GalNAc化合物为NAG0052, WO2023109938A1, 第100页),



inc-GalNAc 1b

(GalNAc化合物为GalNAc 1b, WO2023014938A1, 第145页),



inc-GalNAc 2

(GalNAc化合物为GalNAc 2, WO2023049258A1, 第216页)。

实施例4: GalNAc缀合siRNA对小鼠血清及肝脏中PCSK9表达的抑制作用及对LDL-C水平的影响

本实施例将表2中的siRNA缀合物对小鼠血清及肝脏中PCSK9表达的抑制率及对LDL-C水平影响进行考察。GalNAc缀合的Inclisiran siRNA序列进入血液后，首先通过GalNAc与肝细胞膜上的去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）进行特异性结合，从而进入肝细胞内。Inclisiran siRNA序列进入肝细胞后，与RNA诱导沉默复合体（RISC）结合，并在反义链的介导下与编码PCSK9蛋白的mRNA结合，抑制PCSK9蛋白的产生。肝脏中PCSK9蛋白的减少促进LDL-R的循环，从而通过增加肝细胞表面LDL-R受体数量，增加对血浆LDL-C的摄取和降解，进一步能够降低血浆LDL-C水平。因此递送至肝脏的Inclisiran siRNA序列量越高，即GalNAc递送效率越高，则肝脏中和血清中PCSK9蛋白量越低，肝脏中LDL-C的水平也越低。

结果显示,与现有技术GalNAc寡核苷酸缀合物相比,inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc实验组,小鼠血清及

肝脏中PCSK9表达抑制率和LDL-C降低水平均显著提升。例如，与inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比，inc-G5对血清中PCSK9抑制率，第7天分别提高了14.2%、13.1%、14.5%和51.2%，第14天分别提高了10.2%、10.7%、10.4%和43.0%；对小鼠肝脏中PCSK9抑制率分别提高了11.1%、13.2%、11.0%和44.0%；LDL-C降低水平，第7天分别提高了20.4%、17.1%、15.8%和29.8%，第14天分别提高了23.5%、20.5%、20.0%和33.3%。

动物准备：

首先将hPCSK9转基因小鼠（等级SPF，购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司）适应性饲养后，按血清PSCK9蛋白含量随机分为阴性对照组（不给药）、siRNA受试药组（表2中inc-G1至inc-G13、G18-inc、inc-G25、G26-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2），每组5只，均为雄性。

给药方式及给药剂量：

通过皮下单次注射给药，给药剂量为6 mg/kg，给药体积为1 mL/kg，给药浓度为6 mg/mL，给药当天记为第0天。

1. 不同GalNAc缀合的siRNA对hPCSK9小鼠血清中PCSK9抑制效率

对hPCSK9小鼠血清中PCSK9抑制效率结果表明，本发明GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物与现有技术GalNAc相比，对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率显著提升。例如，与inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比，inc-G5第7天抑制率分别提高了14.2%、13.1%、14.5%和51.2%，第14天抑制率分别提高了10.2%、10.7%、10.4%和43.0%。

实验过程：

实验动物给药前（D0）、给药后7天（D7）和给药后14天（D14），眼眶静脉丛取血约200 μ L（不抗凝）。全血样品离心前冰盒中暂存，于4℃条件下4000 r/min离心10 min分离血清，采用 ELISA kit（Sino Biological公司）检测血清中PCSK9蛋白水平。

实验结果：

阴性对照组和各受试药组给药后7天和给药后14天对血清中PCSK9蛋白抑制率如表4所示。利用GraphPad Prism 9软件进行数据统计及分析。

1) 结构区别

GalNAc寡核苷酸缀合物结构区别见表3：

表3：GalNAc寡核苷酸缀合物结构对比

序列编号	GalNAc 个数	GalNAc偶联 单元的触角数	链中是否 有核糖环	与核糖环 连接位置	与核糖位 连接原子	缀合到寡核苷 酸链的位置
inc-G1	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G2	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G3	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G4	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G5	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G6	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G7	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G8	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G9	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G10	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G11	3	3	是	1'位	氮	3'末端
inc-G12	3	1	是	1'位	氮	3'末端
inc-G13	4	2	是	1'位	氮	3'末端
G18-inc	3	3	是	1'位	氮	5'末端
inc-G25	1	1	是	1'位	氮	3'末端
G26-inc	2	2	是	1'位	氮	5'末端
inc-L96	3	3	否	-	-	3'末端
inc-NAG0052	3	3	是	1'位	碳	3'末端
inc-GalNAc 1b	3	1	是	1'位	碳	3'末端
inc-GalNAc 2	1	1	是	2'位	碳	3'末端

2) 对hPCSK9小鼠血清中PCSK9抑制效率

表4：小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率

实验组	第 7 天 抑制率 (%)	抑制率高出 (%)				第 14 天 抑制率 (%)	抑制率高出 (%)			
		inc- L96	inc- NAG0052	inc- GalNAc 1b	inc- GalNAc 2		inc- L96	inc- NAG0052	inc- GalNAc 1b	inc- GalNAc 2
阴性对照	-6.1	-86.3	-87.4	-86.0	-49.3	-12.3	-97.7	-97.2	-97.5	-64.9
inc-G4	91.3	11.1	10.0	11.4	48.1	93.0	7.6	8.1	7.8	40.4
inc-G5	94.4	14.2	13.1	14.5	51.2	95.6	10.2	10.7	10.4	43.0
inc-G6	92.5	12.3	11.2	12.6	49.3	94.3	8.9	9.4	9.1	41.7
inc-G7	92.1	11.9	10.8	12.2	48.9	93.2	7.8	8.3	8.0	40.6
inc-G11	92.0	11.8	10.7	12.1	48.8	93.8	8.4	8.9	8.6	41.2
inc-G12	93.8	13.6	12.5	13.9	50.6	95.3	9.9	10.4	10.1	42.7
inc-G13	94.2	14.0	12.9	14.3	51.0	95.5	10.1	10.6	10.3	42.9
G18-inc	93.5	13.3	12.2	13.6	50.3	95.2	9.8	10.3	10.0	42.6
inc-G1	73.0	-7.2	-8.3	-6.9	29.8	79.8	-5.6	-5.1	-5.4	27.2
inc-G2	84.6	4.4	3.3	4.7	41.4	88.0	2.6	3.1	2.8	35.4
inc-G3	85.9	5.7	4.6	6.0	42.7	89.2	3.8	4.3	4.0	36.6
inc-G8	84.2	4.0	2.9	4.3	41.0	89.0	3.6	4.1	3.8	36.4
inc-G9	85.0	4.8	3.7	5.1	41.8	88.0	2.6	3.1	2.8	35.4
inc-G10	77.8	-2.4	-3.5	-2.1	34.6	82.1	-3.3	-2.8	-3.1	29.5
inc-G25	55.9	-24.3	-25.4	-24.0	12.7	60.1	-25.3	-24.8	-25.1	7.5
G26-inc	72.3	-7.9	-9.0	-7.6	29.1	75.7	-9.7	-9.2	-9.5	23.1
inc-L96	80.2	0.0	-1.1	0.3	37.0	85.4	0.0	0.5	0.2	32.8
inc-NAG0052	81.3	1.1	0.0	1.4	38.1	84.9	-0.5	0.0	-0.3	32.3
inc-GalNAc 1b	79.9	-0.3	-1.4	0.0	36.7	85.2	-0.2	0.3	0.0	32.6
inc-GalNAc 2	43.2	-37.0	-38.1	-36.7	0.0	52.6	-32.8	-32.3	-32.6	0.0

1) inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率最高。例如，inc-G5第7天和第14天抑制率分别达到了94.4%和95.6%。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度，发挥更好的药效。

从表4可以看出，由本发明设计的GalNAc化合物制备的缀合物，对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制效果差别很大。inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc抑制率显著高于其它组，在第7天和第14天抑制率均超过了90%。抑制率最高的是inc-G5，第7天和第14天分别达到了94.4%和95.6%。（图1）

inc-G2、inc-G3、inc-G8和inc-G9的抑制率也较高，在85%左右。inc-G1、inc-G10和G26-inc抑制率在70-80%之间。抑制率最低的是inc-G25，为55.9%。（图2）

抑制率最高的inc-G5在第7天和第14天分别比抑制率最低的inc-G25提高了38.5%和35.5%，具有显著差异。

2) 由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物, 制备得到具有3个或4个GalNAc基团的缀合物, 均具有非常高的抑制率, 并且GalNAc化合物无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端, 均可高效抑制PCSK9蛋白表达。

本发明设计的GalNAc化合物YK-GAL-325有1个触角, YK-GAL-326有2个触角(见实施例2中表1)。inc-G12是将YK-GAL-325通过2个磷酸二酯键连接, 得到具有3个GalNAc基团的缀合物。inc-G13是将YK-GAL-326通过1个磷酸二酯键连接, 得到具有4个GalNAc基团的缀合物。活性检测结果表明, inc-G12和inc-G13对小鼠血清中PCSK9蛋白表达也具有显著抑制作用, 第7天抑制率分别达到了93.8%和94.2%, 第14天抑制率分别达到了95.3%和95.5%, 与inc-G5相当。

G18-inc的GalNAc配体与寡核苷酸5'末端缀合, 而inc-G5的GalNAc配体与寡核苷酸3'末端缀合。活性检测结果显示, G18-inc对小鼠血清中PCSK9蛋白表达也具有显著抑制效果, 在第7天和第14天抑制率分别达到了93.5%和95.2%, 抑制率与inc-G5相当。

由此可知, 由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物, 制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物, 均具有非常高的递送效率, 并且无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端, 均可高效递送寡核苷酸Inclisiran siRNA序列至肝脏, 实现对小鼠血清中PCSK9蛋白表达的显著抑制作用。

3) 由本发明设计的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物, 与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比, 对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率显著提升。例如, inc-G5比inc-L96提高14.2%。

由现有技术GalNAc化合物制备的缀合物, 包括inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2, 对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率第7天分别为80.2%、81.3%、79.9%和43.2%, 第14天分别为85.4%、84.9%、85.2%和52.6%。

本发明GalNAc化合物制备的缀合物, 包括inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc, 与现有技术GalNAc相比, 对

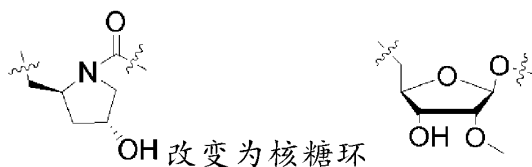
小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率显著提升。

例如，inc-G5第7天抑制率分别比inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2提高了14.2%、13.1%、14.5%和51.2%，第14天分别提高了10.2%、10.7%、10.4%和43.0%。inc-G25与inc-GalNAc 2均是具有1个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，但inc-G25抑制率比inc-GalNAc 2提高了12.7%，显著提升。

4) 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率极有可能差异巨大；结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率也极有可能非常接近。

从GalNAc寡核苷酸缀合物结构图（实施例3）和表3中结构对比可以看出，本发明设计的此系列GalNAc化合物之间结构非常相近，仅各别基团稍有差别，与现有技术GalNAc化合物L-96、NAG0052、GalNAc 1b和GalNAc 2结构也都非常类似。但是，由这些结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率，有的接近，有的却相差非常大。

例如，inc-G5与inc-L96相比，仅是将inc-L96主链中脯氨酸结构



OH改变为核糖环，其它结构完全相同，但是对PCSK9蛋白表达抑制率，inc-G5可比inc-L96提高14.2%，抑制活性显著提升。

inc-G12与GalNAc 1b相比，仅是与核糖环1'位相连的原子不同，GalNAc 1b是碳，而inc-G12是氧，inc-G12的连接臂比GalNAc 1b要长，其它结构完全相同，但是inc-G12的抑制率比GalNAc 1b提高了13.9%，显著提升。

inc-G5与inc-G1相比仅是核糖环2'位不同，inc-G5是甲氧基，而inc-G1是氢，但是inc-G5抑制率比inc-G1提高了21.4%。

因此，并不是化学结构相近的GalNAc化合物对寡核苷酸递送效率就一定接近，由其制备的GalNAc寡核苷酸缀合物对小鼠血清中PCSK9基因抑制效果并不一致，极有可能具有非常巨大的差异。

2. 不同GalNAc缀合的siRNA对hPCSK9小鼠肝脏中PCSK9抑制效率

实验过程：

实验动物给药后第14天（D14）将试验动物麻醉处死后进行灌流，收集肝脏。

按组织重量：RNA裂解液（trizol，Ambion公司）=100 mg：1 mL，快速放入准备好盛有1 mL RNA裂解液（trizol）的1.5 mL无RNA酶的EP管中，向管中加入3颗3 mm钢珠（经无RNA处理），放入组织匀浆仪中，50 Hz运行30秒，间停10秒，运行3次，制备成组织匀浆。

4 °C 离心， $12,000 \times g$ 3 分钟，将400 μ L匀浆上清转移至1.5 mL无RNA酶的EP管中，置于冰上。每管加入80 μ L氯仿，剧烈振荡15秒，室温静置5分钟。4 °C 离心， $12,000 \times g$ 15分钟，取上清150 μ L至新EP管中。

加入等体积异丙醇，将管中液体上下颠倒轻轻混匀，-20 °C 静置10分钟，4 °C 离心， $12,000 \times g$ 15分钟，弃上清。

加入1 mL 75%乙醇，轻轻洗涤RNA沉淀，4 °C $7,500 \times g$ 离心5分钟，吸去上清。重复漂洗一次，4 °C $7,500 \times g$ 5分钟，用微量枪头将残留乙醇去除干净。

室温晾干残留乙醇10分钟，加入150 μ L RNase-free ddH₂O，溶解。使用微量紫外分光光度计对RNA浓度进行检测。通过qPCR检测PCSK9基因表达情况，测定的是mRNA，结果见表5。

实验结果：

通过对qPCR结果（Mean $\pm$ SD）统计，利用GraphPad Prism 9软件进行绘图及数据分析，具体结果见表5。

表5 小鼠肝脏中给药后第14天PCSK9基因表达抑制率

实验组	抑制率 (%)	抑制率高出 (%)			
		inc-L96	inc-NAG0052	inc-GalNAc 1b	inc-GalNAc 2
阴性对照组	0	-80.1	-78.0	-80.2	-47.2
inc-G4	88.9	8.8	10.9	8.7	41.7
inc-G5	91.2	11.1	13.2	11.0	44.0
inc-G6	90.0	9.9	12.0	9.8	42.8
inc-G7	88.5	8.4	10.5	8.3	41.3
inc-G11	89.2	9.1	11.2	9.0	42.0
inc-G12	90.1	10.0	12.1	9.9	42.9
inc-G13	89.9	9.8	11.9	9.7	42.7
G18-inc	89.7	9.6	11.7	9.5	42.5
inc-G1	69.9	-10.2	-8.1	-10.3	22.7
inc-G2	83.5	3.4	5.5	3.3	36.3
inc-G3	81.9	1.8	3.9	1.7	34.7
inc-G8	73.9	-6.2	-4.1	-6.3	26.7
inc-G9	76.5	-3.6	-1.5	-3.7	29.3
inc-G10	60.9	-19.2	-17.1	-19.3	13.7
inc-G25	61.6	-18.5	-16.4	-18.6	14.4
G26-inc	72.8	-7.3	-5.2	-7.4	25.6
inc-L96	80.1	0.0	2.1	-0.1	32.9
inc-NAG0052	78.0	-2.1	0.0	-2.2	30.8
inc-GalNAc 1b	80.2	0.1	2.2	0.0	33.0
inc-GalNAc 2	47.2	-32.9	-30.8	-33.0	0.0

1) inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc对小鼠肝脏中PCSK9抑制率最高。例如，inc-G5、inc-G6和inc-G12抑制率均达到了90%。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度，发挥更好的药效。

从表5可以看出，由本发明设计的GalNAc化合物制备的缀合物，对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率差别很大。inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc抑制率最高，均在85%以上，其中inc-G5、inc-G6和inc-G12，达到了90%。（图3）

inc-G2和inc-G3抑制率也较高，在80-85%之间。inc-G8、inc-G9和G26-inc抑制率在70-80%之间。inc-G1、inc-G10和inc-G25抑制率在60-70%之间。（图4）

抑制率最高的inc-G5比抑制率最低的inc-G10提高了30.3%，具有显著差

异。

2) 本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，均具有非常高的抑制率，并且这些GalNAc化合物，无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，均可高效抑制PCSK9基因表达。

本发明设计的GalNAc化合物YK-GAL-325有1个触角，YK-GAL-326有2个触角（见实施例2中表1）。inc-G12是将YK-GAL-325通过2个磷酸二酯键连接，得到具有3个GalNAc基团的缀合物。inc-G13是将YK-GAL-326通过1个磷酸二酯键连接，得到具有4个GalNAc基团的缀合物。活性检测结果表明，inc-G12和inc-G13对小鼠肝脏中PCSK9基因表达也具有显著抑制效果，抑制率分别为90.1%和89.9%，与inc-G5相当。

G18-inc的GalNAc配体与寡核苷酸5'末端缀合，而inc-G5的GalNAc配体与寡核苷酸3'末端缀合。活性检测结果显示，G18-inc对小鼠肝脏中PCSK9基因表达也具有显著抑制效果，抑制率为89.7%，与inc-G5相当。

由此可知，由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，均具有非常高的递送效率，并且无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，均可高效递送寡核苷酸Inclisiran siRNA序列至肝脏，对小鼠肝脏中PCSK9基因表达具有显著抑制作用。

3) 由本发明设计的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比，抑制率显著提升。例如，inc-G5比inc-L96提高11.1%。

由现有技术GalNAc化合物制备的缀合物，包括inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2，对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率分别为80.1%、78.0%、80.2%和47.2%。

本发明GalNAc化合物制备的缀合物，包括inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc，与现有技术GalNAc相比，对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率显著提升。

例如，inc-G5抑制率分别比inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2提高了11.1%、13.2%、11.0%和44.0%。inc-G25与inc-GalNAc 2均是具有1个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，但inc-G25抑制率比inc-GalNAc

2提高了14.4%，显著提升。

4) 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率极可能差异巨大；结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率也极有可能非常接近。

从GalNAc寡核苷酸缀合物结构图（实施例3）和表3中结构对比可以看出，本发明设计的此系列GalNAc化合物之间结构非常接近，仅各别基团稍有差别，与现有技术GalNAc化合物L-96、NAG0052、GalNAc 1b和GalNAc 2结构也都非常接近。但是，由这些结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率，有的接近，有的却相差非常大。

例如，inc-G5与inc-L96相比，仅是将inc-L96主链中脯氨酸结构改变为核糖环结构，其它结构完全相同，但是对PCSK9基因表达抑制率，inc-G5可比inc-L96提高11.1%，抑制活性显著提升。

inc-G12与GalNAc 1b相比，仅是与核糖环1'位相连的原子不同，GalNAc 1b是碳，而inc-G12是氧，inc-G12的连接臂比GalNAc 1b要长，其它结构完全相同，但是inc-G12的抑制率比GalNAc 1b提高了9.9%，显著提升。

inc-G5与inc-G1相比仅是核糖环2'位不同，inc-G5是甲氧基，而inc-G1是氢，但是inc-G5抑制率比inc-G1提高了21.3%。

inc-GalNAc 2与inc-G25中均是具有1个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，但inc-G25抑制率比inc-GalNAc 2提高了14.4%，显著提升。

因此，并不是化学结构相近的GalNAc化合物对寡核苷酸递送效率就一定接近，由其制备的GalNAc寡核苷酸缀合物对小鼠肝脏中PCSK9基因抑制效果并不一致，极有可能具有非常巨大的差异。

3. 不同GalNAc缀合的siRNA对hPCSK9小鼠LDL-C水平的影响

实验过程：

实验动物给药前（D0）、给药后第7天（D7）、给药后14天（D14），眼眶静脉丛取血约200 μ L（不抗凝）。全血样品离心前冰盒中暂存，于4 $^{\circ}$ C条件下4000 r/min离心10分钟分离血清，对血清LDL-C的水平进行检测。

实验结果：

通过对血清LDL-C (Mean±SD) 统计, 利用GraphPad Prism 9软件进行绘图及数据分析, 具体结果见表6。

表6: 各实验组血清中LDL-C降低水平

实验组	第7天 降低水平 (%)	降低水平高出 (%)				第14天 降低水平 (%)	降低水平高出 (%)			
		inc- L96	inc- NAG0052	inc- GalNAc 1b	inc- GalNAc 2		inc- L96	inc- NAG0052	inc- GalNAc 1b	inc- GalNAc 2
阴性对照	-2.5	-31.7	-35	-36.3	-22.3	-2.6	-33.2	-36.2	-36.7	-23.4
inc-G4	37.4	8.2	4.9	3.6	17.6	38.9	8.3	5.3	4.8	18.1
inc-G5	49.6	20.4	17.1	15.8	29.8	54.1	23.5	20.5	20.0	33.3
inc-G6	43.0	13.8	10.5	9.2	23.2	45.8	15.2	12.2	11.7	25.0
inc-G7	41.7	12.5	9.2	7.9	21.9	43.0	12.4	9.4	8.9	22.2
inc-G11	36.2	7.0	3.7	2.4	16.4	37.4	6.8	3.8	3.3	16.6
inc-G12	48.5	19.3	16.0	14.7	28.7	51.9	21.3	18.3	17.8	31.1
inc-G13	47.3	18.1	14.8	13.5	27.5	49.5	18.9	15.9	15.4	28.7
G18-inc	45.6	16.4	13.1	11.8	25.8	47.9	17.3	14.3	13.8	27.1
inc-G1	15.9	-13.3	-16.6	-17.9	-3.9	17.0	-13.6	-16.6	-17.1	-3.8
inc-G2	33.9	4.7	1.4	0.1	14.1	34.8	4.2	1.2	0.7	14.0
inc-G3	30.2	1.0	-2.3	-3.6	10.4	32.1	1.5	-1.5	-2.0	11.3
inc-G8	31.8	2.6	-0.7	-2.0	12.0	33.4	2.8	-0.2	-0.7	12.6
inc-G9	23.1	-6.1	-9.4	-10.7	3.3	24.9	-5.7	-8.7	-9.2	4.1
inc-G10	17.3	-11.9	-15.2	-16.5	-2.5	18.6	-12.0	-15.0	-15.5	-2.2
inc-G25	21.4	-7.8	-11.1	-12.4	1.6	23.2	-7.4	-10.4	-10.9	2.4
G26-inc	26.7	-2.5	-5.8	-7.1	6.9	27.6	-3.0	-6.0	-6.5	6.8
inc-L96	29.2	0.0	-3.3	-4.6	9.4	30.6	0.0	-3.0	-3.5	9.8
inc-NAG0052	32.5	3.3	0.0	-1.3	12.7	33.6	3.0	0.0	-0.5	12.8
inc-GalNAc 1b	33.8	4.6	1.3	0.0	14.0	34.1	3.5	0.5	0.0	13.3
inc-GalNAc 2	19.8	-9.4	-12.7	-14	0.0	20.8	-9.8	-12.8	-13.3	0.0

1) inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc对LDL-C降低水平显著高于其它组。例如, inc-G5第7天和第14天分别达到了49.6%和54.1%。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度, 发挥更好的药效。

从表6可以看出, 由本发明设计的GalNAc化合物制备的缀合物, inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc对小鼠血清中LDL-C降低水平最高, 在第7天和第14天均超过了35%, 显著高于其它实验组。其中降低水平最高的是inc-G5, 第7天和第14天分别达到了49.6%和54.1%。(图5)

inc-G2、inc-G3和inc-G8降低水平在30-35%之间。inc-G9、inc-G25和G26-inc降低水平均在20-30%之间, inc-G1和inc-G10降低水平低于20%, 其中inc-G1第7天和第14天分别仅为15.9%和17.0%。(图6)

降低水平最高的inc-G5比最低的inc-G1提高了30%以上, 差异显著。

2) 本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物, 制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物, 均具有非常高的降低水平,

并且这些GalNAc化合物，无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，均可高效降低LDL-C水平。

本发明设计的GalNAc化合物YK-GAL-325有1个触角，YK-GAL-326有2个触角（见实施例2中表1）。inc-G12是将YK-GAL-325通过2个磷酸二酯键连接，得到具有3个GalNAc基团的缀合物。inc-G13是将YK-GAL-326通过1个磷酸二酯键连接，得到具有4个GalNAc基团的缀合物。活性检测结果表明，inc-G12和inc-G13也可显著降低小鼠血清中LDL-C水平，在第7天降低水平分别为48.5%和47.3%，第14天分别为51.9%和49.5%，与inc-G5相当。

G18-inc的GalNAc配体与寡核苷酸5'末端缀合，而inc-G5的GalNAc配体与寡核苷酸3'末端缀合。活性检测结果显示，G18-inc也可显著降低小鼠血清中LDL-C水平，在第7天和第14天降低水平分别为45.6%和47.9%，与inc-G5相当。

由此可知，由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，对PCSK9基因表达均具有显著抑制效果，并且无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，均可高效递送寡核苷酸Inclisiran siRNA序列至肝脏，实现对小鼠血清中PCSK9基因表达的显著抑制作用，进而降低LDL-C水平。

3) 由本发明设计的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比，小鼠血清中LDL-C降低水平显著提升。例如，inc-G5第7天和第14天分别比inc-L96提高20.4%和23.5%。

由现有技术GalNAc化合物制备的缀合物中，inc-L96、inc-NAG0052和inc-GalNAc 1b的降低水平在25-35%之间，inc-GalNAc 2的降低水平在20%左右。

本发明GalNAc化合物制备的缀合物，包括inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc，与现有技术GalNAc相比，对小鼠血清中LDL-C降低水平显著提升。

例如，inc-G5第7天降低水平分别比inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2提高了20.4%、17.1%、15.8%和29.8%，第14天分别提高了23.5%、20.5%、20.0%和33.3%。

4) 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠血清中

LDL-C降低水平极有可能差异巨大；结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠血清中LDL-C降低水平也极有可能非常接近。

从GalNAc寡核苷酸缀合物结构图（实施例3）和表3中结构对比可以看出，本发明设计的此系列GalNAc化合物之间结构非常接近，仅各别基团稍有差别，与现有技术GalNAc化合物L-96、NAG0052、GalNAc 1b和GalNAc 2结构也都非常类似。但是，由这些结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠血清中LDL-C水平的影响，有的接近，有的却相差非常大。

例如，inc-G5与inc-L96相比，仅是将inc-L96主链中脯氨酸结构改变为核糖环结构，其它结构完全相同，但是对血清中LDL-C降低水平，inc-G5可比inc-L96提高20%以上，显著提升。inc-G12与GalNAc 1b相比，仅是与核糖环1'位相连的原子不同，GalNAc 1b是碳，而inc-G12是氧，inc-G12的连接臂比GalNAc 1b要长，其它结构完全相同，但是inc-G12的降低水平比GalNAc 1b提高了15%以上，显著提升。inc-G5与inc-G1相比仅是核糖环2'位不同，inc-G5是甲氧基，而inc-G1是氢，但是对小鼠血清中LDL-C水平影响，inc-G5可降低50%，而inc-G1仅降低15%左右，降低水平inc-G5比inc-G1提高30%以上，差异显著。

因此，并不是化学结构相近的GalNAc化合物对寡核苷酸递送效率就一定接近，由其制备的GalNAc寡核苷酸缀合物对小鼠血清中LDL-C水平的影响并不一致，极有可能具有非常巨大的差异。

实施例5：不同GalNAc缀合的siRNA在小鼠体内不同组织器官的分布情况

偶联GalNAc配体的Inclisiran siRNA序列进入血液后首先在GalNAc的帮助下部分进入肝细胞，对目标基因起到抑制作用。其余在血清中的siRNA则通过肾脏清除。由于血浆中的siRNA主要通过肾脏清除，因此除了肝脏外，siRNA序列在肾脏中也有分布。

实验过程：

使用6-8周野生型C57BL/6小鼠，每组6只小鼠。每组分别给予带Cy5荧光基团的siRNA缀合物inc-G1、inc-G2、inc-G3、inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G8、inc-G9、inc-G10、inc-G11、inc-G12、inc-G13、G18-inc、inc-G25、G26-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2。阴性对照组不给药。小鼠称重后按照6 mg/kg剂量给药，皮下注射给药，根据给药体

积确定，注射量不超过0.1- 0.2 mL。

给药后将小鼠腹部毛推净，异氟烷麻醉后以仰式将小鼠置于小动物活体成像系统中，Cy5通道下观察给药后4小时和8小时后小鼠成像情况。利用活体成像软件Living Image统计小鼠发光强度，比较不同受试组间差异。

实验结果：

小鼠肝脏及肾脏中荧光强度（可以代表寡核酸相对含量）检测结果见表7。

表7：小鼠肝脏及肾脏中荧光强度

实验组	4 小时-肝脏	4 小时-肾脏	8 小时-肝脏	8 小时-肾脏
阴性对照组	6.14E+07	5.54E+07	6.35E+07	5.75E+07
inc-G4	8.50E+09	6.39E+09	9.03E+09	6.35E+09
inc-G5	9.12E+09	4.31E+09	9.16E+09	3.44E+09
inc-G6	8.92E+09	5.70E+09	9.03E+09	4.11E+09
inc-G7	8.84E+09	6.67E+09	9.09E+09	5.90E+09
inc-G11	8.58E+09	6.45E+09	9.03E+09	5.09E+09
inc-G12	9.01E+09	4.15E+09	9.09E+09	3.02E+09
inc-G13	8.98E+09	4.20E+09	9.01E+09	3.22E+09
G18-inc	8.95E+09	3.99E+09	9.13E+09	3.10E+09
inc-G1	6.00E+09	7.32E+09	7.42E+09	9.19E+09
inc-G2	8.17E+09	7.97E+09	8.45E+09	7.07E+09
inc-G3	8.13E+09	7.67E+09	8.01E+09	7.01E+09
inc-G8	8.05E+09	7.91E+09	8.10E+09	8.35E+09
inc-G9	7.99E+09	8.86E+09	7.69E+09	8.92E+09
inc-G10	7.83E+09	8.88E+09	7.64E+09	8.62E+09
inc-G25	5.89E+09	6.40E+09	5.08E+09	6.33E+09
G26-inc	7.02E+09	5.52E+09	6.65E+09	5.87E+09
inc-L96	8.22E+09	9.01E+09	5.99E+09	9.15E+09
inc-NAG0052	8.01E+09	8.83E+09	6.52E+09	8.94E+09
inc-GalNAc 1b	7.75E+09	8.42E+09	6.35E+09	8.77E+09
inc-GalNAc 2	4.33E+09	4.01E+09	4.03E+09	5.24E+09

1) inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc肝脏荧光强度显著高于其它组。例如，最高的inc-G5在4小时和8小时荧光强度分别可达9.12E+09和9.16E+09。说明巧妙设计的连接结构可显著改善寡核苷酸药物的递送效果。

从表7可以看出，采用Cy5荧光标记的寡核苷酸在小鼠肝脏和肾脏均中分

布，由本发明设计的GalNAc化合物制备的缀合物，荧光强度差别很大。inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G12、inc-G13和G18-inc在肝中荧光强度显著高于其它组，即寡核苷酸相对含量显著高于其它组。其中荧光强度最高的是inc-G5，在4小时达到了 $9.12\text{E}+09$ ，在8小时达到了 $9.16\text{E}+09$ 。（图7）

inc-G2、inc-G3和inc-G8的荧光强度也较高，4小时和8小时均在 $8.00\text{E}+09$ 至 $8.50\text{E}+09$ 之间。inc-G9、inc-G10和G26-inc荧光强度在4小时为 $7.00\text{E}+09$ 至 $8.00\text{E}+09$ 之间，在8小时为 $6.50\text{E}+09$ 至 $8.00\text{E}+09$ 之间。inc-G1和inc-G25荧光强度在 $5.00\text{E}+09$ 至 $7.50\text{E}+09$ 之间。

荧光强度最高的inc-G5，在4小时和8小时，可分别比荧光强度最低的inc-G1提高52.0%和23.5%，显著提升。

2) 本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，肝脏均具有非常高的荧光强度，并且这些GalNAc化合物，无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，均可高效递送寡核苷酸至肝脏。

本发明设计的GalNAc化合物YK-GAL-325有1个触角，YK-GAL-326有2个触角（见实施例2中表1）。inc-G12是将YK-GAL-325通过2个磷酸二酯键连接，得到具有3个GalNAc基团的缀合物。inc-G13是将YK-GAL-326通过1个磷酸二酯键连接，得到具有4个GalNAc基团的缀合物。inc-G12和inc-G13在4小时荧光强度分别为 $9.01\text{E}+09$ 和 $8.98\text{E}+09$ ，在8小时荧光强度分别为 $9.09\text{E}+09$ 和 $9.01\text{E}+09$ ，与inc-G5相当。

G18-inc的GalNAc配体与寡核苷酸5'末端缀合，而inc-G5的GalNAc配体与寡核苷酸3'末端缀合。G18-inc在4小时和8小时荧光强度分别为 $8.95\text{E}+09$ 和 $9.13\text{E}+09$ ，与inc-G5相当。

由此可知，由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，均具有非常高的递送效率，并且无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，均可高效递送寡核苷酸Inclisiran siRNA序列至肝脏。

3) 由本发明设计的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比，小鼠肝脏荧光吸收强度显著提升。例如，inc-G5比inc-L96提高50%以上。

从表7和图7可以看出，采用Cy5荧光标记的寡核苷酸在小鼠肝脏和肾脏中分布，inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G12、inc-G13和G18-inc在肝中荧光强度，在4小时和8小时均显著高于inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2。例如，inc-G5在4小时和8小时肝脏荧光强度分别为 $9.12\text{E}+09$ 和 $9.16\text{E}+09$ ，比inc-L96提高了10.9%和52.9%，比inc-NAG0052提高了13.9%和40.5%，比inc-GalNAc 1b提高了17.7%和44.3%，比inc-GalNAc 2提高了110.6%和127.3%，显著提升。inc-G6在4小时和8小时荧光强度分别为 $8.92\text{E}+09$ 和 $9.03\text{E}+09$ ，比inc-L96提高了8.5%和50.8%，比inc-NAG0052提高了11.4%和38.5%，比inc-GalNAc 1b提高了15.1%和42.2%，比inc-GalNAc 2提高了106.0%和124.1%，显著提升。

4) 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，将寡核苷酸递送至肝脏效率极有可能差异巨大；结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，将寡核苷酸递送至肝脏效率也极有可能非常接近。

从GalNAc寡核苷酸缀合物结构图（实施例3）和表3中结构对比可以看出，本发明设计的此系列GalNAc化合物之间结构非常相近，仅各别基团稍有差别，与现有技术GalNAc化合物L-96、NAG0052、GalNAc 1b和GalNAc 2结构也都非常类似。但是，由这些结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率，有的接近，有的却相差非常大。

例如，inc-G5与inc-L96相比，仅是将inc-L96主链中脯氨酸结构改变为核糖环结构，其它结构完全相同，但是inc-G5肝脏荧光强度可比inc-L96提高50%以上，递送效率显著提升。

inc-G12与GalNAc 1b相比，仅是与核糖环1'位相连的原子不同，GalNAc 1b是碳，而inc-G12是氧，inc-G12的连接臂比GalNAc 1b要长，其它结构完全相同，但是inc-G12肝脏荧光强度比GalNAc 1b提高了40%以上。

inc-G5与inc-G1相比仅是核糖环2'位不同，inc-G5是甲氧基，而inc-G1是氢，但inc-G5肝脏荧光强度比inc-G1提高了50%以上。

因此，并不是化学结构相近的GalNAc化合物对寡核苷酸递送效率就一定接近，相反，极有可能具有非常巨大的差异。

实施例6：不同GalNAc缀合的siRNA在动物肝脏中的药代动力学

实验过程：

实验动物采用6-9周的SD雄性大鼠，每组30只大鼠。每组分别给予siRNA缀合物inc-G1、inc-G2、inc-G3、inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G8、inc-G9、inc-G10、inc-G11、inc-G12、inc-G13、G18-inc、inc-G25、G26-inc、inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2。大鼠称重后按照5 mg/kg剂量给药，皮下注射给药，给药浓度为1 mg/mL，给药体积为5 mL。取给药后6、24、72、168、336、504、672、1008和1344 h共9个时间点进行组织样品收集：将试验动物用二氧化碳处死后，取肝脏并用预冷的生理盐水冲洗后用滤纸擦干，称重后转移至贴有标签的管中，在冰冷条件下按照1: 9（1 g组织加入9 mL匀浆液）匀浆（匀浆液：100mM Tris, 10mMEDTA, pH8.0），匀浆后的样品取约800μL储存在-80℃中，之后用LC-MS/MS检测肝脏中药物浓度。

实验结果：半衰期、药峰浓度和药-时曲线下面积数据见表8。

表8：半衰期、药峰浓度和药-时曲线下面积数据

实验组	半衰期(h)	药峰浓度(ng/mL)	药-时曲线下面积(h*ng/mL)
inc-G4	94	4057	292836
inc-G5	110	4450	339466
inc-G6	103	4200	343186
inc-G7	103	4077	329675
inc-G11	85	4249	292469
inc-G12	101	4351	330245
inc-G13	95	4280	329874
G18-inc	102	4179	304785
inc-G1	56	3210	218457
inc-G2	84	4020	274861
inc-G3	78	3920	248637
inc-G8	60	3408	249106
inc-G9	73	3426	245634
inc-G10	64	3358	221649
inc-G25	75	3504	253012
G26-inc	82	3980	301254
inc-L96	74	3537	250520
inc-NAG0052	75	3612	257841
inc-GalNAc 1b	79	3705	261218
inc-GalNAc 2	65	3401	231250

1) inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc半衰期与其它组相比显著提升。例如，inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G12和G18-inc半衰期分别达到了110小时、103小时、103小时、101小时和102小时。说明巧妙设计的连接结构可显著改善药物的体内药代动力学特性。

从表8可以看出，由本发明设计的GalNAc化合物制备的缀合物半衰期差别很大。inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc半衰期与其它组相比显著提升。例如，inc-G5、inc-G6、inc-G7和G18-inc半衰期分别达到了110小时、103小时、103小时和102小时，inc-G4、inc-G11和inc-G13也均达到了85小时。（图8）

inc-G2、inc-G3、inc-G9、inc-G25和G26-inc半衰期在70-85小时之间。inc-G8和inc-G10半衰期在60-70小时之间。半衰期最短的是inc-G1，为56小时。（图9）

半衰期最长的inc-G5和最短的inc-G1相差54小时，inc-G5达到了inc-G1的2倍，差异非常显著。

各受试药物组药峰浓度和药-时曲线下面积升高或降低趋势也与半衰期一致。

2) 由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的缀合物，在小鼠体内均具有较长半衰期，并且GalNAc化合物无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，半衰期均较长。

本发明设计的GalNAc化合物YK-GAL-325有1个触角，YK-GAL-326有2个触角（见实施例2中表1）。inc-G12是将YK-GAL-325通过2个磷酸二酯键连接，得到具有3个GalNAc基团的缀合物。inc-G13是将YK-GAL-326通过1个磷酸二酯键连接，得到具有4个GalNAc基团的缀合物。inc-G12和inc-G13在小鼠体内半衰期分别为101小时和95小时，与inc-G5相当。

G18-inc的GalNAc配体与寡核苷酸5'末端缀合，而inc-G5的GalNAc配体与寡核苷酸3'末端缀合。G18-inc在小鼠体内半衰期达到了102小时，与inc-G5相当。

由此可知，由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，在小鼠体内均很稳

定，并且无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，半衰期均较长。

各受试药物组药峰浓度和药-时曲线下面积升高或降低趋势也与半衰期一致。

3) 由本发明设计的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比，在小鼠体内半衰期显著提升。例如，inc-G5比inc-L96提高48.6%。

由现有技术GalNAc化合物制备的缀合物，包括inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2，在小鼠体内半衰期分别为74小时、75小时、79小时和65小时。本发明GalNAc化合物制备的缀合物，包括inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc，与现有技术GalNAc相比，在小鼠体内半衰期显著提升。

例如，inc-G5半衰期分别比inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2提高了48.6%、46.7%、39.2%和69.2%，显著提升。

inc-G25与inc-GalNAc 2均是具有1个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物，但inc-G25半衰期比inc-GalNAc 2提高了15.4%，显著提升。

各受试药物组药峰浓度和药-时曲线下面积升高或降低趋势也与半衰期一致。

4) 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，在小鼠体内半衰期极有可能差异巨大；结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，在小鼠体内半衰期也极有可能非常接近。

从GalNAc寡核苷酸缀合物结构图（实施例3）和表3中结构对比可以看出，本发明设计的此系列GalNAc化合物之间结构非常相近，仅各别基团稍有差别，与现有技术GalNAc化合物L-96、NAG0052、GalNAc 1b和GalNAc 2结构也都非常类似。但是，由这些结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，在小鼠体内半衰期，有的却相差非常大。

例如，inc-G5与inc-L96相比，仅是将inc-L96主链中脯氨酸结构改变为核糖环结构，其它结构完全相同，但是inc-G5半衰期可比inc-L96提高48.6%，显著提升。

inc-G12与GalNAc 1b相比，仅是与核糖环1'位相连的原子不同，GalNAc 1b是碳，而inc-G12是氧，inc-G12的连接臂比GalNAc 1b要长，其它结构完全相同，但是inc-G12的半衰期比GalNAc 1b提高了27.8%，显著提升。

inc-G5与inc-G1相比仅是核糖环2'位不同，inc-G5是甲氧基，而inc-G1是氢，但是inc-G5半衰期比inc-G1提高了96.4%%，显著提升。

因此，并不是化学结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，在小鼠体内半衰期就一定接近，相反，极有可能具有非常巨大的差异。

各受试药物组药峰浓度和药-时曲线下面积升高或降低趋势也与半衰期一致。

本发明设计了一系列新型GalNAc化合物，例如YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306、YK-GAL-307、YK-GAL-311、YK-GAL-318、YK-GAL-325和YK-GAL-326，由其制备的GalNAc寡核苷酸缀合物，可以实现高效肝靶向递送，相比于现有技术代表性GalNAc化合物活性及半衰期显著提升。

1. 设计的GalNAc化合物，与现有技术GalNAc化合物相比，化学结构显著不同。本发明设计的GalNAc化合物，在连接臂中引入了核糖环结构，并在核糖环的1'位引入了氧或硫原子。

2. 本发明设计的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc，递送效率和半衰期与其它组相比显著提升。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度和改善药物的药代动力学特性，发挥更好的药效。由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物，制备得到具有3个或4个GalNAc基团的缀合物，均具有高活性和长半衰期。并且，结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，活性和半衰期极有可能差异巨大；结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，活性和半衰期也极有可能非常接近。

具体如下：

1) 对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率

I. inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率显著高于其它组。例如，inc-G5第7天和第14天抑制率分别达到了94.4%和95.6%。并且，与现有技术代表性GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比，对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率显著提升。例如，inc-G5比inc-L96提高14.2%。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度，发挥更好的药效。

II. 由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物,制备得到具有3个或4个GalNAc基团的缀合物,均具有非常高的抑制率,并且GalNAc化合物无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端,均可高效抑制血清中PCSK9蛋白表达。

III. 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物,对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率极有可能差异巨大;结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物,对小鼠血清中PCSK9蛋白表达抑制率也极有可能非常接近。

2) 对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率

I. inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率显著高于其它组。例如,inc-G5、inc-G6和inc-G12抑制率均达到了90%。并且,与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比,抑制率显著提升。例如,inc-G5比inc-L96提高11.1%。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度,发挥更好的药效。

II. 本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物,制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物,均具有非常高的抑制率,并且这些GalNAc化合物,无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端,均可高效抑制肝脏中PCSK9基因表达。

III. 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物,对小鼠肝脏中PCSK9蛋白表达抑制率极有可能差异巨大;结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物,对小鼠肝脏中PCSK9基因表达抑制率也极有可能非常接近。

3) 对小鼠LDL-C水平的影响

I. inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc导致LDL-C下降水平显著高于其它组。例如,inc-G5第7天和第14天下降水平分别达到了49.6%和54.1%。并且,与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比,小鼠血清中LDL-C降低水平显著提升。例如,inc-G5第7天和第14天分别比inc-L96提高20.4%和23.5%。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度,发挥更好的药效。

II. 本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物, 制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物, 均具有非常高的降低水平, 并且这些GalNAc化合物, 无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端, 均可高效降低LDL-C水平。

III. 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物, 对小鼠血清中LDL-C降低水平极有可能差异巨大; 结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物, 对小鼠血清中LDL-C降低水平也极有可能非常接近。

4) 在小鼠肝脏的分布情况

I. inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc荧光强度显著高于其它组。例如, inc-G5在4小时和8小时荧光强度分别可达 $9.12\text{E}+09$ 和 $9.16\text{E}+09$ 。并且, 与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比, 小鼠肝脏荧光吸收强度显著提升。例如, inc-G5比inc-L96提高50%以上。说明巧妙设计的连接结构可显著提高药物的生物利用度, 发挥更好的药效。

II. 本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物, 制备得到具有3个或4个GalNAc基团的寡核苷酸缀合物, 均具有非常高的荧光强度, 并且这些GalNAc化合物, 无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端, 均可高效递送寡核苷酸至肝脏。

III. 结构相近的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物, 将寡核苷酸递送至肝脏效率极有可能差异巨大; 结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物, 将寡核苷酸递送至肝脏效率也极有可能非常接近。

5) 在小鼠体内半衰期

I. inc-G4、inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G11、inc-G12、inc-G13和G18-inc半衰期与其它组相比显著提升。例如, inc-G5、inc-G6、inc-G7、inc-G12和G18-inc半衰期分别达到了110小时、103小时、103小时、101小时和102小时。并且, 与现有技术GalNAc化合物制备的inc-L96、inc-NAG0052、inc-GalNAc 1b和inc-GalNAc 2相比, 在小鼠体内半衰期显著延长。例如, inc-G5比inc-L96提高48.6%。说明巧妙设计的连接结构可显著改善药物的体内药代动力学特性。

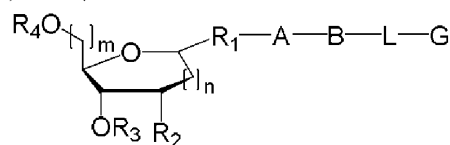
II. 由本发明设计的具有3触角、1触角或2触角的GalNAc化合物, 制备得到具有3个或4个GalNAc基团的缀合物, 在小鼠体内均具有较长半衰期,

并且GalNAc化合物无论缀合到寡核苷酸的3'末端还是5'末端，半衰期均较长。

III. 结构相近的GalNAc化合物制备的缀合物，在小鼠体内半衰期极有可能差异巨大；结构差异大的GalNAc化合物制备的寡核苷酸缀合物，在小鼠体内半衰期也极有可能非常接近。

权 利 要 求 书

1. 式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐:



I

其中,

R_1 为氧或硫;

R_2 为氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基或卤素;

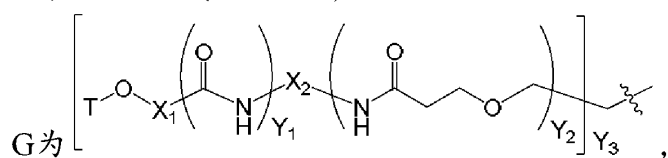
R_3 为氢、羟基保护基、含磷活性反应基团、 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{CONH}-\bigcirc$ 或 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$, 其中 x 是 1-10 的整数, $\bigcirc$ 为可控孔玻璃或聚苯乙烯;

R_4 为氢或羟基保护基;

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

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

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



其中,

T 为羟基用酰基全保护的 N -乙酰-半乳糖胺、羟基用酰基全保护的半乳糖、羟基用酰基全保护的半乳糖胺、羟基用酰基全保护的 N -甲酰-半乳糖胺、羟基用酰基全保护的 N -丙酰-半乳糖胺、羟基用酰基全保护的 N -正丁酰-半乳糖胺或羟基用酰基全保护的 N -异丁酰-半乳糖胺, 其中酰基为乙酰基或苯甲酰基;

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

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

Y_1 为 0 或 1;

Y_2 为 0、1 或 2;

Y_3 为 1、2 或 3;

m为0-4的整数；

n为0-4的整数。

2. 根据权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中A为 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_7-$ 、 $-(CH_2)_8-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{11}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_3-$ 、 $-(CH_2)_4NHCO-$ 或 $-(CH_2)_6NHCO-$ 。

3. 根据权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中B为 $-(CH_2)_0-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 或 $-(CH_2)_3-$ 。

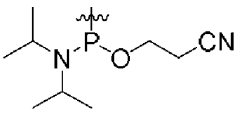
4. 根据权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_1 为氧。

5. 根据权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_1 为 α 构型或 β 构型。

6. 根据权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_2 为氢或 $-OCH_3$ 。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_3 为羟基保护基或含磷活性反应基团。

8. 根据权利要求7所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_3 为乙酰基、1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、苯基二甲

基甲硅烷基、4,4'-二甲氧基三苯甲基或 。

9. 根据权利要求1-6任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_3 为 $-CO(CH_2)_2CONH-O-$ 。

10. 根据权利要求1-6任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_3 为 $-CO(CH_2)_2COOH$ 。

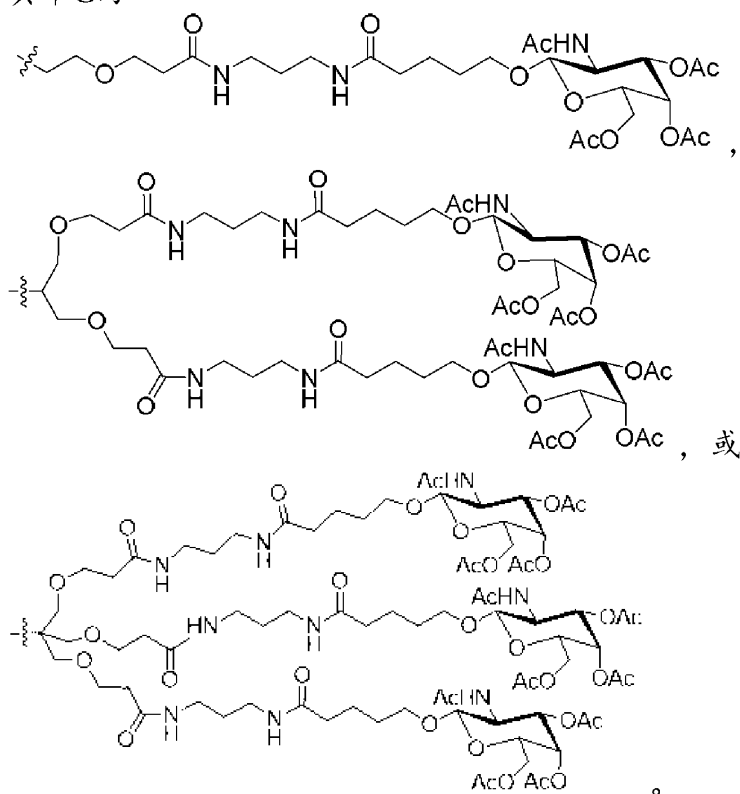
11. 根据权利要求1-6任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_4 为羟基保护基。

12. 根据权利要求11所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_4 为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或4,4'-二甲氧基三苯甲基。

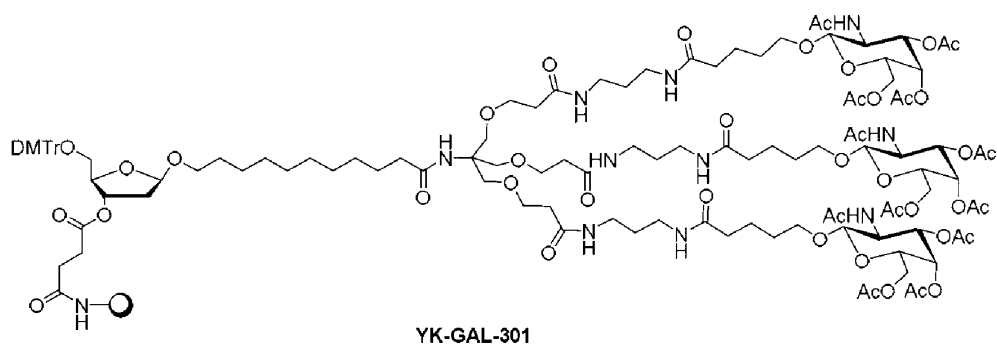
13. 根据权利要求1-6任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中m为1。

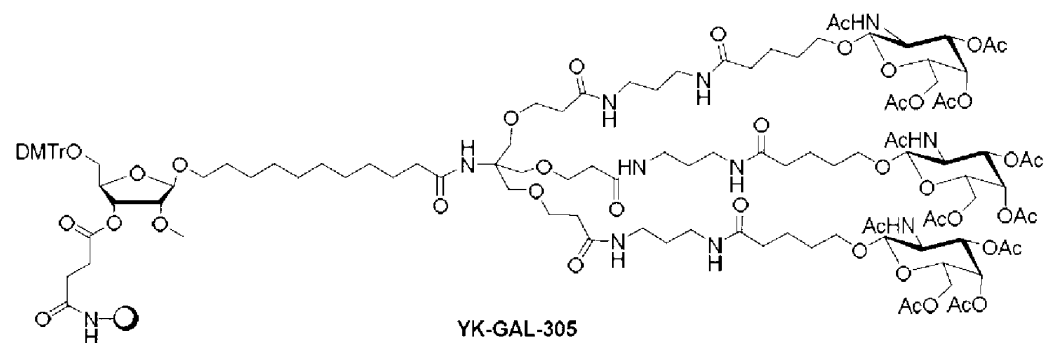
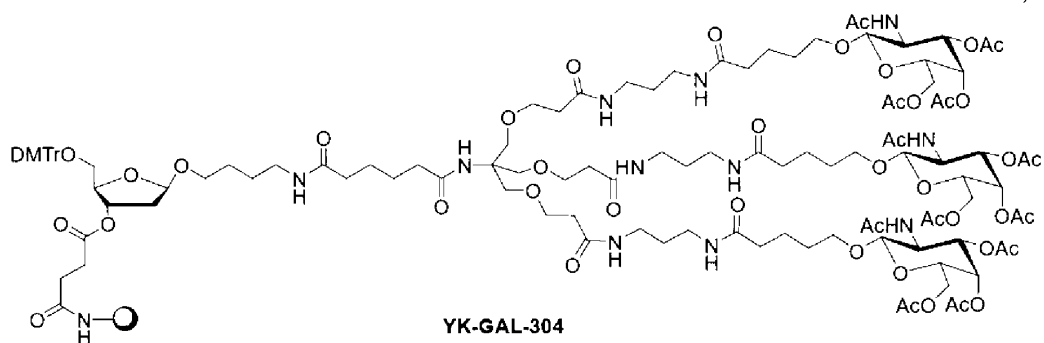
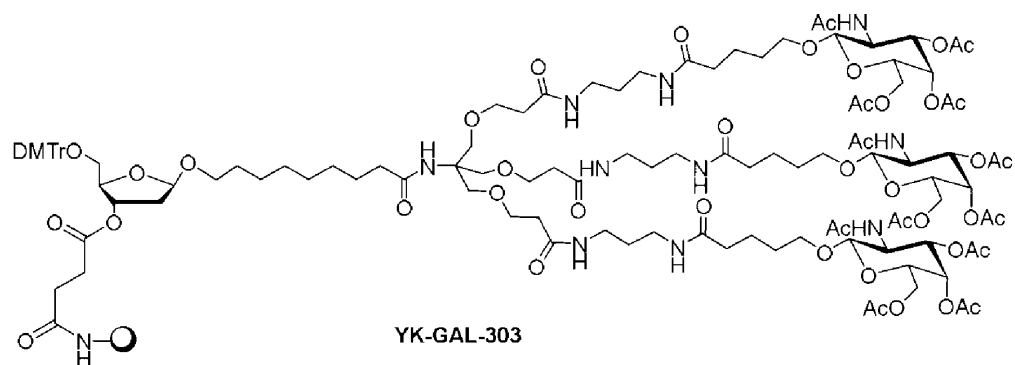
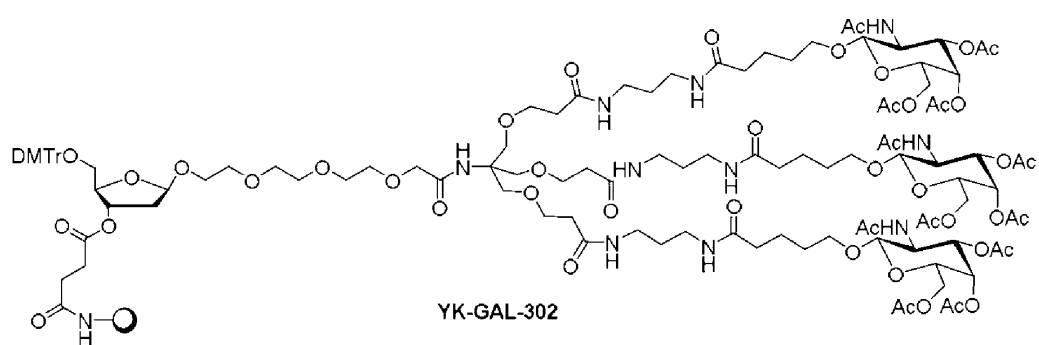
14. 根据权利要求1-6任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐，其中n为0。

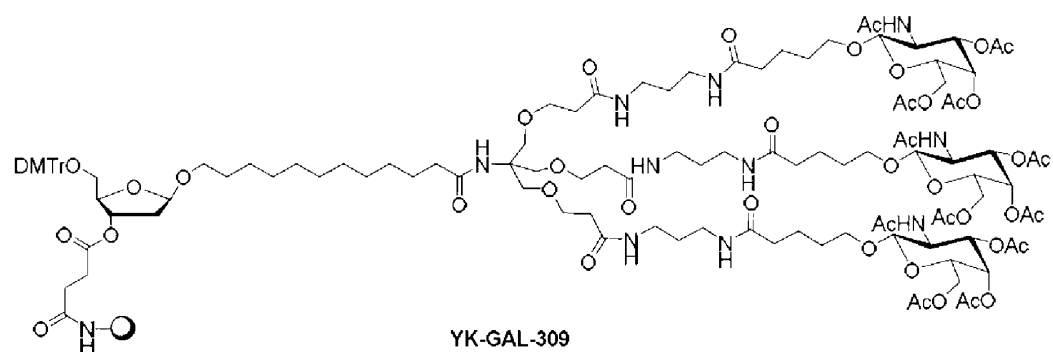
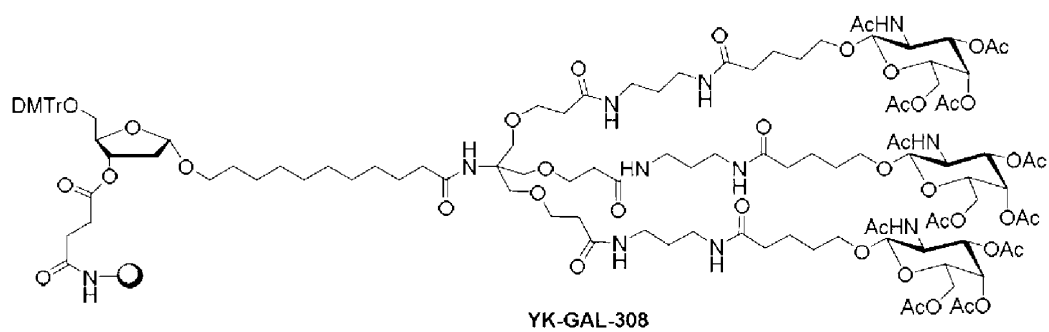
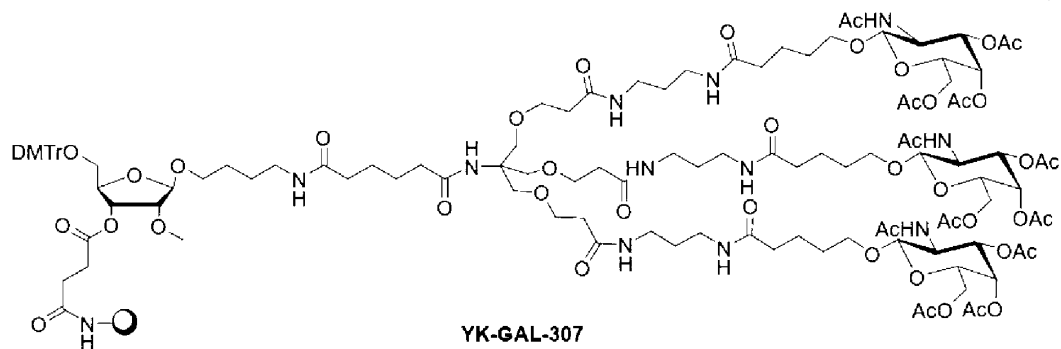
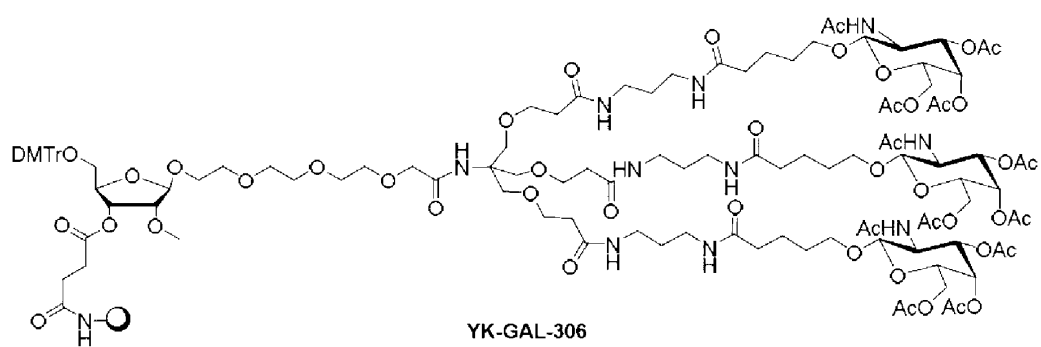
15. 根据权利要求1-6任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐, 其中G为

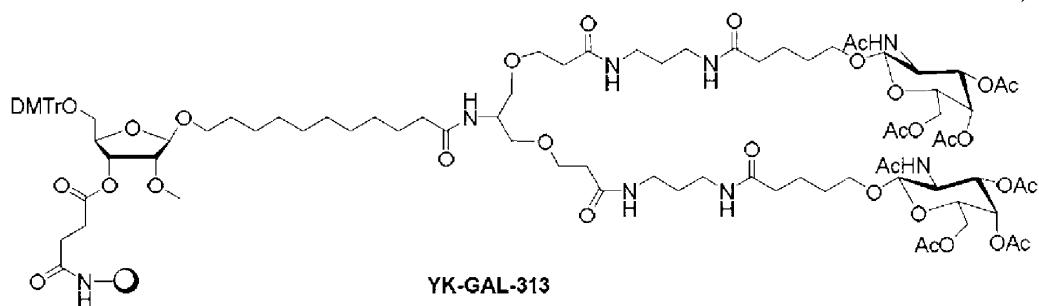
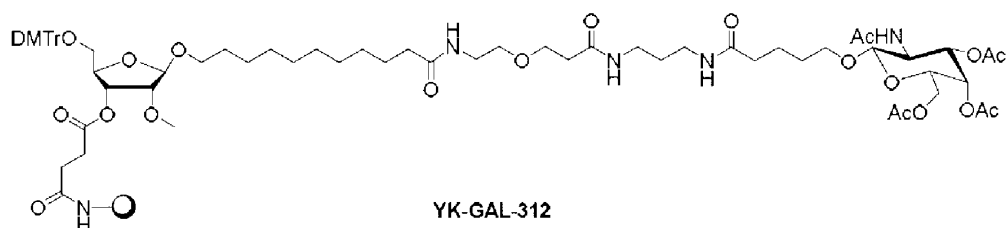
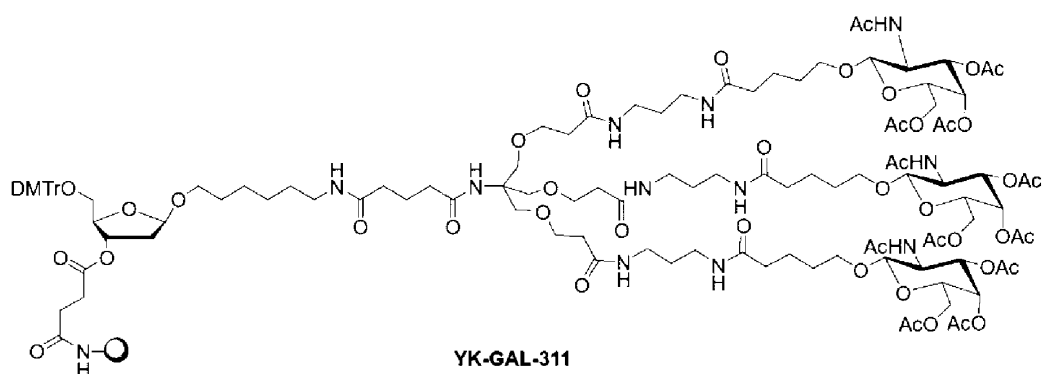
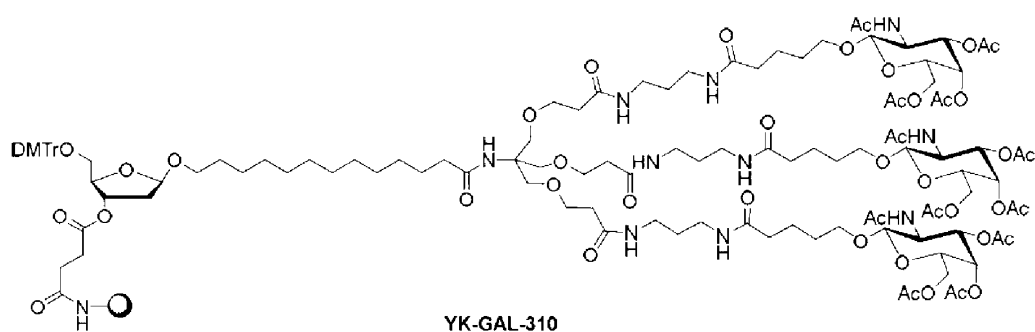


16. 根据权利要求1所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,所述式(I)化合物为具有以下结构的化合物YK-GAL-301、YK-GAL-302、YK-GAL-303、YK-GAL-304、YK-GAL-305、YK-GAL-306、YK-GAL-307、YK-GAL-308、YK-GAL-309、YK-GAL-310、YK-GAL-311、YK-GAL-312或YK-GAL-313:



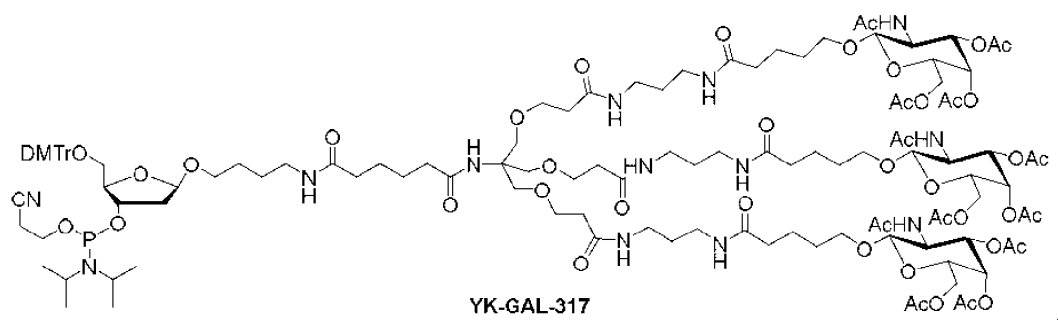
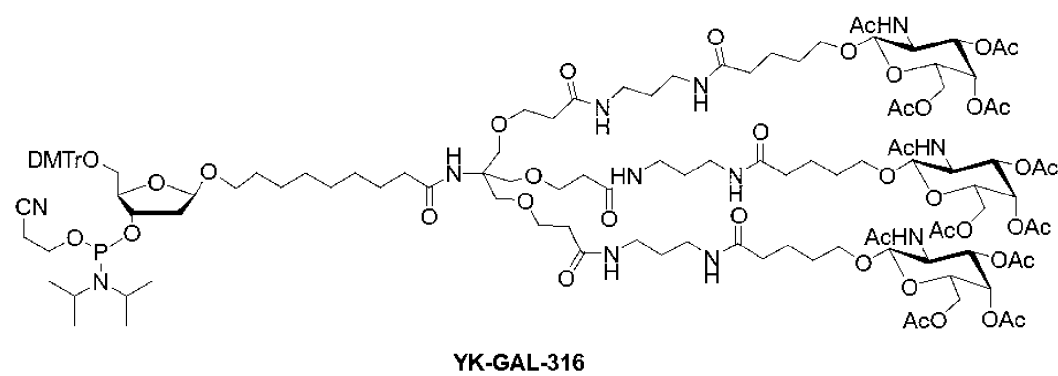
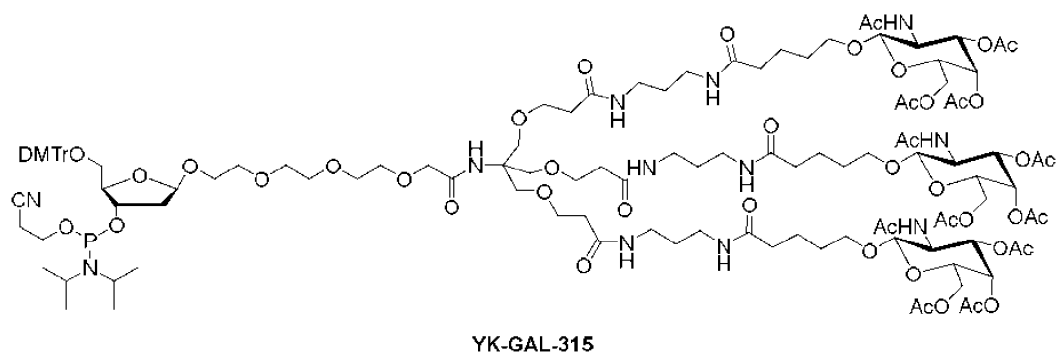
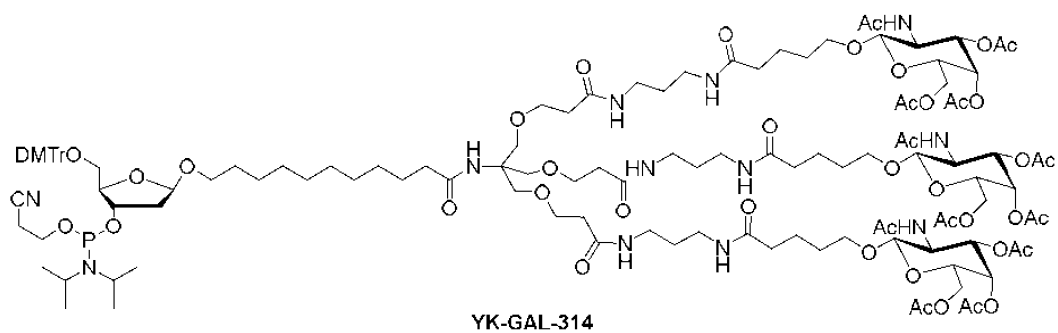


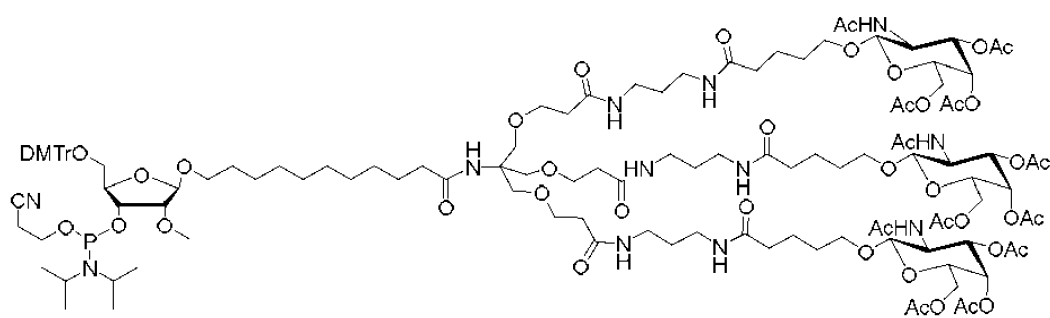




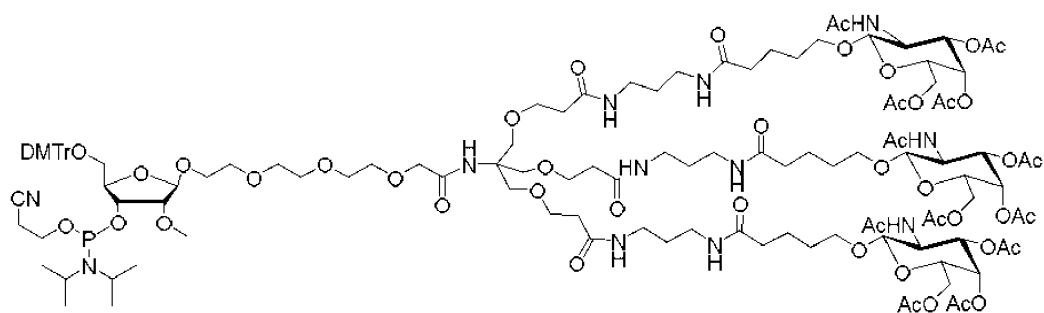
其中○为可控孔玻璃。

17. 根据权利要求1所述的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐, 所述式 (I) 化合物为具有以下结构的化合物YK-GAL-314、YK-GAL-315、YK-GAL-316、YK-GAL-317、YK-GAL-318、YK-GAL-319、YK-GAL-320、YK-GAL-321、YK-GAL-322、YK-GAL-323、YK-GAL-324、YK-GAL-325或YK-GAL-326:

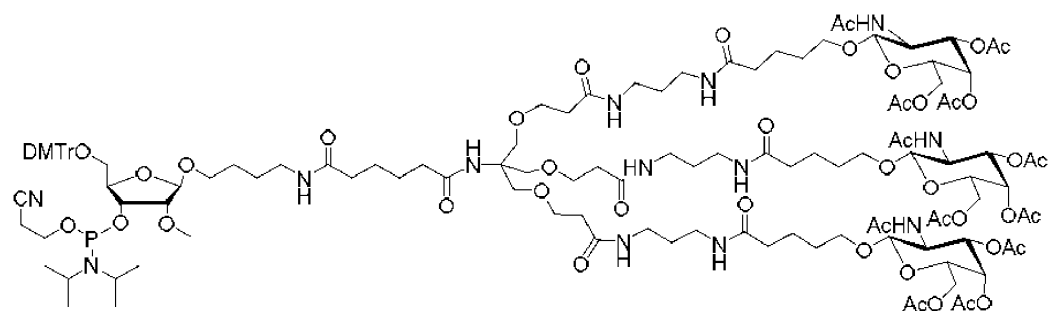




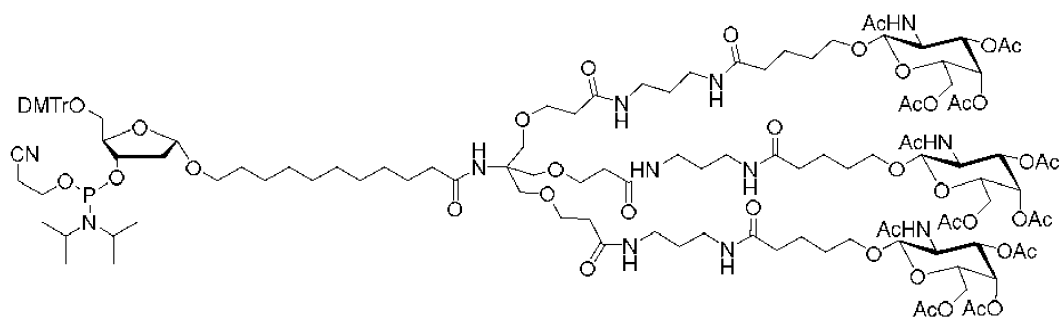
YK-GAL-318



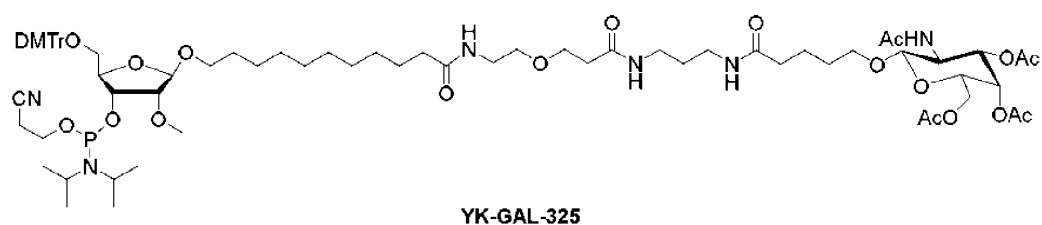
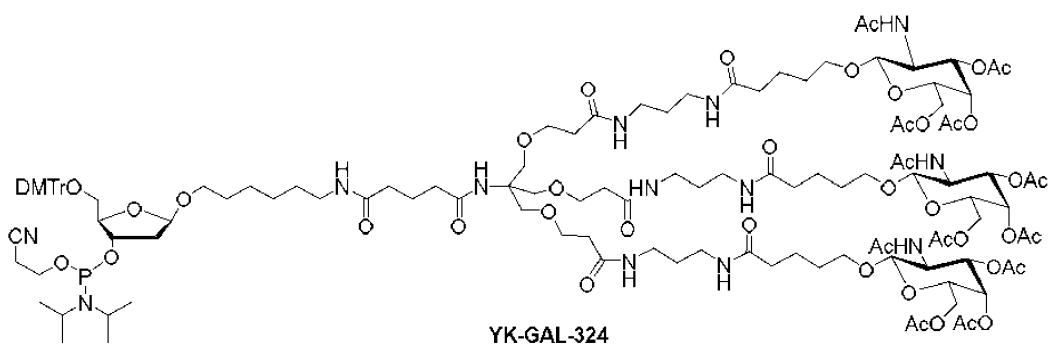
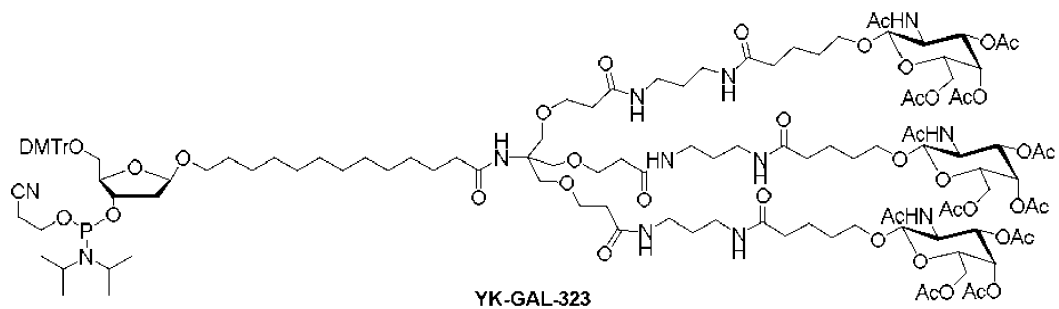
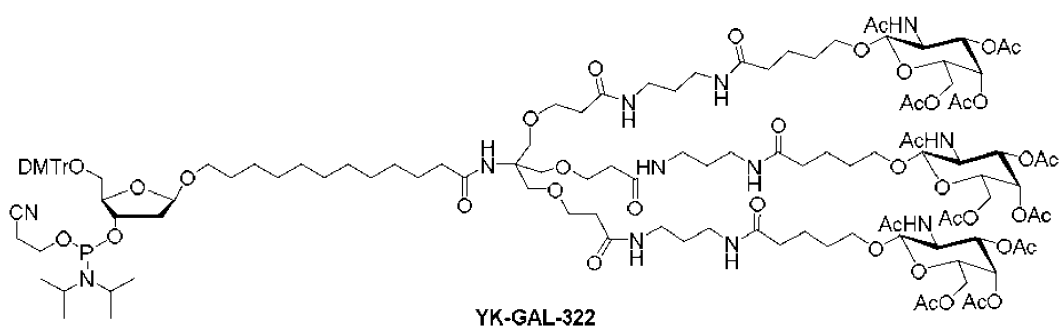
YK-GAL-319



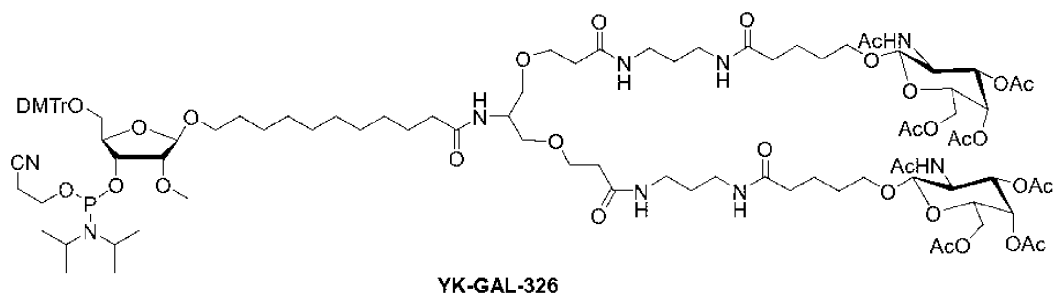
YK-GAL-320



YK-GAL-321



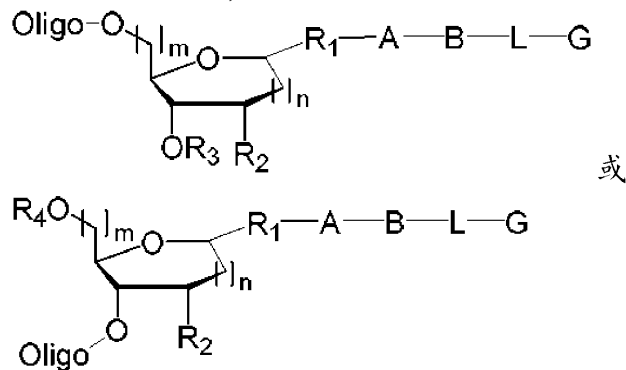
或



18. 根据权利要求1-6中任一项所述的式(I)化合物或其药学上可接受

的盐，其能够结合脱唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR)。

19. 一种缀合物，其包含寡核苷酸和GalNAc部分，具有如下所示结构：



其中，Oligo代表寡核苷酸，R₁、R₂、R₃、R₄、A、B、L、G、m和n同权利要求1。

20. 根据权利要求19所述的缀合物，其中G的N-乙酰-半乳糖胺中的羟基保护基乙酰基被脱除。

21. 根据权利要求19或20所述的缀合物，其中所述寡核苷酸包括非硫代寡核苷酸和硫代寡核苷酸。

22. 根据权利要求21所述的缀合物，其中所述非硫代寡核苷酸和所述GalNAc部分通过磷酸酯键连接。

23. 根据权利要求21所述的缀合物，其中所述硫代寡核苷酸和所述GalNAc部分通过硫代磷酸酯键连接。

24. 根据权利要求21所述的缀合物，其中所述寡核苷酸包括小干扰核苷酸（siRNA）、DNA、微小RNA（miRNA）、小激活RNA（saRNA）、小向导RNA（small guide RNA, sgRNA）、转运RNA（tRNA）、反义核苷酸（ASO）或适配体（Aptamer）。

25. 根据权利要求24所述的缀合物，其中所述反义核苷酸（ASO）或干扰核苷酸（siRNA）中每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。

26. 根据权利要求21所述的缀合物，其中所述寡核苷酸调节靶基因的表达。

27. 一种药物组合物, 其包含权利要求19-26中任一项所述的缀合物和至少一种药学上可接受的赋形剂。

28. 根据权利要求19-26中任一项所述的缀合物或根据权利要求27所述的药物组合物在制备用于治疗/和/或预防由肝细胞中特定基因的表达而引起

的病理状况或疾病的药物中的用途，可选地，所述特定基因选自乙型肝炎病毒基因、血管生成素蛋白3基因或者载脂蛋白C3基因。

29. 根据权利要求28所述的用途，其中，所述疾病选自慢性肝病、肝炎、肝纤维化疾病、肝增生性疾病和血脂异常；可选地，所述血脂异常为高胆固醇血症、高甘油三酯血症或动脉粥样硬化。

30. 一种抑制肝细胞中特定基因表达的方法，包括将有效量的根据权利要求19-26中任一项所述的缀合物或根据权利要求27所述的药物组合物与所述肝细胞进行接触；

可选地，所述特定基因选自以下基因中的一种：前蛋白转化酶枯草溶菌素9基因（PCSK9）、ApoB、ApoC、ANGPTL3、SCD1、FVII、p53、HBV、HCV；

可选地，所述特定基因选自前蛋白转化酶枯草溶菌素9基因（PCSK9）、乙型肝炎病毒基因、血管生成素样蛋白3基因或者载脂蛋白C3基因。

31. 一种试剂盒，该试剂盒包括根据权利要求19-26中任一项所述的缀合物。