

一种核酸缀合物、制备方法及应用

技术领域

本公开属于核酸递送领域，具体涉及一种核酸缀合物、制备方法及应用。

5

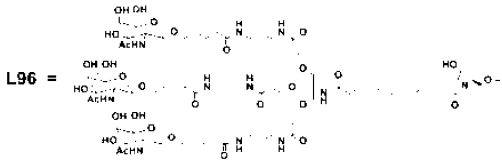
背景技术

siRNA 是由两条寡核苷酸链组成的带有负电荷的大分子，自身无法有效靶向至体内靶组织，也无法自主进入细胞内。siRNA 需要借助特殊的递送载体来实现 siRNA 的靶器官富集，并使其进入细胞，以发挥 siRNA 的治疗作用。

脂质纳米粒 (Lipid Nanoparticle, LNP) 可以将 siRNA 包裹并有效实现肝靶向递送，采用 LNP 技术的药物 Onpattro 已经上市。然而 LNP 技术的临床应用仍然存在诸多不足，例如：LNP 制剂有效期短；在应用中产生免疫反应，常需要协同使用地塞米松等免疫抑制剂，这使得 LNP 的临床应用复杂化。

通过细胞表面受体介导的内吞作用将药物靶向递送至细胞内部是一个有效的策略。去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 是在肝实质细胞表面高度特异性表达的受体，具有丰度高、受体循环利用效率高的特性。将能够特异性识别 ASGPR 的配体，如半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 等单糖和多糖分子与 siRNA 共价偶联，可以将 siRNA 靶向递送至肝实质细胞内，使 siRNA 发挥对靶基因的基因沉默作用。因此，研发适用于 siRNA 递送的靶向配体，对于 siRNA 的临床应用具有重要意义。

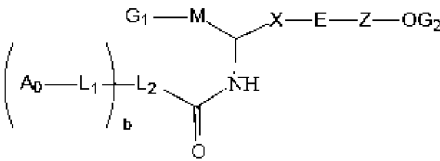
目前全球范围内通过靶向 ASGPR 实现 siRNA 有效肝靶向递送的研究有了部分进展，代表性的递送分子有 Alnylam Pharmaceuticals 的 L96 (其结构式如下所示)，其已用于四款上市 siRNA 药物，在体外及体内实验中均表现出良好的递送活性和选择性；但是目前仍然存在着 siRNA 体内生物活性和功效还可以进一步提高及递送分子 CMC (化学成分生产和控制) 工艺和技术复杂、生产成本高等问题。



发明内容

本公开的递送化合物及相应的核酸缀合物以天然氨基酸如丝氨酸、苏氨酸等作为核心连接骨架，得到了一类全新化学结构的 GalNAc 缀合物。与现有递送技术相比有着分子结构简单、原料价廉易得、CMC 工艺易于开发等优点，同时有着良好的寡核苷酸合成效率和体内生物活性。

在第一方面，本公开提供一种化合物，该化合物具有式 (I) 所示的结构：



式 (I)

其中，

A₀ 代表对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体或者

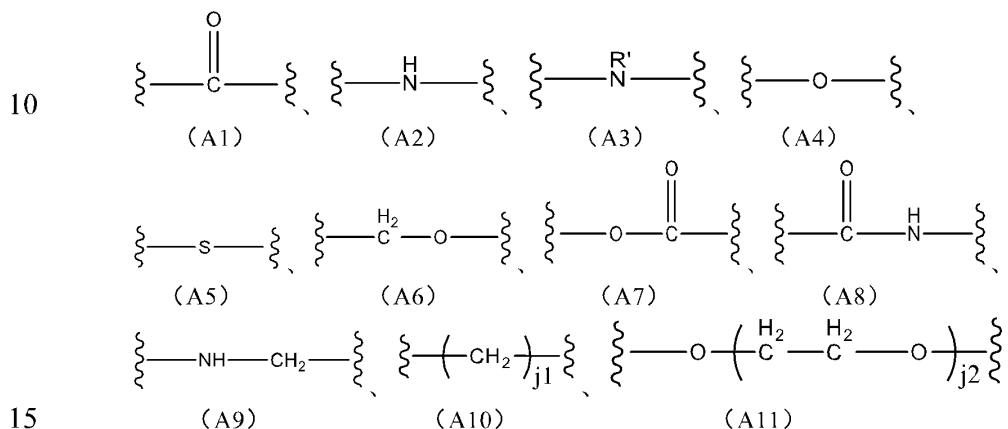
代表所述配体中的羟基全部或部分地被 KCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个 K 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种；

其中所述配体优选地各自独立地选自下述中的任意一种：D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-

- 吡喃半乳糖、 α -D-呋喃半乳糖、 β -D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基- α -神经氨酸、5-硫代- β -D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代- β -D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代- α -D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖；

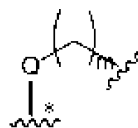
b 为 1-4 范围内的整数，优选 1、2 或 3，更优选 1 或 3；

L_1 和 L_2 彼此独立地代表选自式 A1-A11 基团中的一种或多种的连接组合：



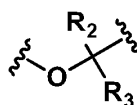
其中， j_1 为 1-20 的整数； j_2 为 1-20 的整数； R' 为 C_1 - C_{10} 的烷基；

M 代表如式 (A12) 所示的结构式：



式 (A12)

- 20 其中，m 代表 0-6 的整数，优选为 0、1 或 2；* 表示与 G_1 相连的键，Q 代表式 (A13) 所示的结构式：

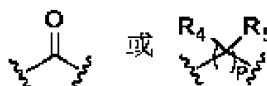


式 (A13)

- 25 其中，与 O 相连的 wavy line 表示与 G_1 相连的键； R_2 、 R_3 相同或不同，且彼此独立地选自 H、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基，优选 H、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基；

Z 不存在或代表 C_1 - C_{10} 亚烷基，优选 C_1 - C_3 亚烷基；

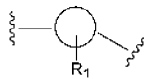
X 代表式 (A14-1) 或 (A14-2) 或所示的结构式：



(A14-1) (A14-2)

- 30 其中 R_4 、 R_5 相同或不同，且彼此独立地选自 H、氟、羟基、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基，优选 H、氟、羟基、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基；p 为 1-6 的整数，优选 1、2 或 3；任选地， R_4 和 R_5 直接相连形成三到六元饱和碳环；

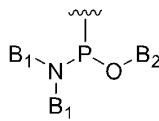
E 代表如式 (A15) 所示的结构式：



式 (A15)

5 其中, 代表 C₃-C₁₈ 环烷基或 C₃-C₁₈ 杂环基, 优选代表 C₄-C₈ 环烷基或 C₃-C₈ 杂环基, 更优选代表 C₃-C₆ 杂环基, 更优选四到六元含氮饱和环烷基, 并且 R₁ 选自 H、氟、羟基、氰基、C₁-C₂₀ 烷基、C₁-C₂₀ 烷氧基、C₂-C₂₀ 烯基、C₂-C₂₀ 炔基, 优选选自 H、氟、羟基、氰基、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基;

10 G₁ 和 G₂ 各自代表具有式 (G-1) 所示结构的亚磷酸胺官能团或羟基保护基团, 前提是 G₁ 和 G₂ 中至少一个具有式 (G-1) 所示的结构, 所述羟基保护基团选自三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、4,4'-双甲氧基三苯甲基 (DMTr) 和 4,4',4'-三甲氧基苯甲基中的任意一种, 优选 4,4'-双甲氧基三苯甲基;

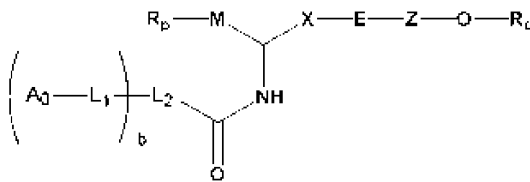


式 (G-1)

15 其中, B₁ 选自取代或未取代的 C₁-C₅ 的烷基, 可选地, B₁ 为甲基、乙基或异丙基; B₂ 选自 C₁-C₅ 的烷基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的一种, 可选地, B₂ 为氧乙基;

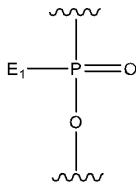
本文中, 表示基团共价键连接的位点。

在第二方面, 本发明提供了一种核酸缀合物, 在所述缀合物中含有与寡核苷酸序列上的任意位置连接的一个或一个以上具有式 (II) 所示的结构, 优选两个、三个或四个连续连接的具有式 (II) 所示的结构:



式 (II)

20 其中, R_p 和 R_q 各自为 H 或具有式 A16 所示的结构, 前提是 R_p 和 R_q 中至少一个具有式 A16 所示的结构;



式 (A16)

25 其中, E₁ 为 OH、SH 或 BH₂,

A₀、b、L₁、L₂、M、Z、X、E 等同式 (I), 此处不再赘述。

在第三方面, 本发明提供了第二方面核酸缀合物的制备方法。

在第四方面, 本发明提供了本发明的核酸缀合物在制备用于治疗 and/或预防肝源性疾病的药物中的用途。

30 在第五方面, 本发明提供了一种治疗由肝细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的方法, 所述方法包括向患有该疾病的患者给予第二方面的核酸缀合物。

在第六方面, 本发明提供了一种试剂盒, 该试剂盒包含本发明的核酸缀合物。

附图说明

图 1 是实施例 10 中的小鼠体内测试 siRNA 缀合物的活性实验结果; 其中图 1 中**代表 P

小于 0.01, ***代表 P 小于 0.001。

具体实施方式

以下对本公开的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是, 此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本公开, 并不用于限制本公开。

5 定义

需要说明的是, 除非另外定义, 本申请使用的技术术语或者科学术语应当为所属领域的技术人员所理解的通常意义。

在本公开中, 通式(I)所示的化合物包括其互变异构体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、其混合物等形式。

10 如本文所使用的, 不介于两个字母之间或两个符号之间的短横(“-”)是用于指示取代基连接点的位置。

如本文所使用的, “任选的”或“任选地”是指其后描述的事件或状况可以发生或不发生, 并且所述描述包括事件或状况发生的情况和其中不发生的情况。例如, “任选的取代的烷基”包括下文定义的“烷基”和“取代烷基”。本领域技术人员将理解的是, 对于包含一个或多个取代基的任何基团, 这些基团
15 不打算引入空间上不切实际、合成上不可行和/或内在不稳定的任何取代或取代型式。

如本文所使用的, “烷基”是指具有指定数量的碳原子的直链和支链。当提及具有特定数量的碳的烷基残基时, 旨在涵盖具有该数量的碳的所有支链和直链形式; 因此, 例如, “丁基”意味着包括正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基。亚烷基是烷基的子集, 指与烷基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的, “烯基”是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和支链或直链烷基, 所述碳-碳双键
20 是通过从母体烷基的相邻碳原子中各自失去一个氢原子而获得的。该基团可以处于双键的顺式或反式构型。典型的烯基基团包括但不限于: 乙烯基; 丙烯基, 如丙-1-烯-1-基、丙-1-烯-2-基、丙-2-烯-1-基(烯丙基)、丙-2-烯-2-基; 丁烯基, 例如丁-1-烯-1-基、丁-1-烯-2-基、2-甲基丙-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、丁-2-烯-2-基、丁-1,3-二烯-1-基、丁-1,3-二烯-2-基等等。亚烯基是烯基的一个子集, 指与烯基相同、但具有两个连接点的残基。

25 如本文所使用的, “炔基”是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和支链或直链烷基, 所述碳-碳三键是通过从母体烷基的相邻碳原子中各自失去两个氢原子而获得的。典型的炔基基团包括但不限于: 乙炔基; 丙炔基, 如丙-1-炔-1-基, 丙-2-炔-1-基; 丁炔基, 例如丁-1-炔-1-基, 丁-1-炔-3-基, 丁-3-炔-1-基等。

如本文所使用的, “烷氧基”是指通过氧桥连接的指定数量碳原子的烷基, 例如, 甲氧基、乙氧基、
30 丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、2-戊氧基、异戊氧基、新戊氧基、己氧基、2-己氧基、3-己氧基、3-甲基戊氧基等。烷氧基通常具有 1 至 10 个、1 至 8 个、1 至 6 个, 或 1 至 4 个通过氧桥连接的碳原子。

如本文所使用的, “环烷基”是指非芳香碳环, 通常具有 3 至 7 个环状碳原子。环可以是饱和的, 或具有一个或多个碳-碳双键。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环
35 己烯基, 以及桥联和笼状环基团, 如降冰片烷(norbornane)。

如本文所使用的, “卤素取代基”或“卤”指氟代、氯代、溴代和碘代, 术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

如本文所使用的, “卤代烷基”是指具有指定数量的碳原子的烷基被一个或多个、直至最大允许数
40 量的卤素原子取代。卤代烷基的实例包括但不限于三氟甲基、二氟甲基、2-氟乙基和五氟乙基。

40 “杂环基”是指稳定的 3 至 18 元非芳香族环基, 其包含 2-12 个碳原子和选自氮、氧和硫的 1-6 个杂原子。除非说明书中另有说明, 否则杂环基是单环、双环、三环或四环系统, 可包括稠环或桥环系统。杂环基中的杂原子可以任选地被氧化。一个或多个氮原子(如果存在的话)任选地被季铵化。杂环基是部分饱和或完全饱和的。杂环基可以通过任何环原子连接至分子的其余部分。此类杂环基的实例包括但不限于: 二噁烷基、噻吩基[1,3]二硫酰基(thienyl[1,3]dithianyl)、十氢异喹啉基、咪唑基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噻唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧杂哌嗪基、2-氧杂
45 哌啶基、2-氧杂吡咯烷基、噻唑烷基、吡啶基、吡啶基、4-吡啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三硫酰基(trithianyl)、四氢吡喃基、硫代吗啉基(thiomorpholinyl)、硫杂吗啉基(thiamorpholinyl)、1-氧代硫吗啉基(1 oxo thiomorpholinyl)和 1,1-二氧代硫吗啉基(1,1 dioxo thiomorpholinyl)。

50 在本公开中可以使用各种羟基保护基团。一般来说, 保护基团使化学官能团对特定的反应条件不敏感, 并且可以在分子中的该官能团上附加以及去除, 而在实质上并不损害分子的其余部分。代表性的羟基保护基团公开于 Beaucage 等人, Tetrahedron 1992, 48, 2223-2311, 以及 Greeneand Wuts,

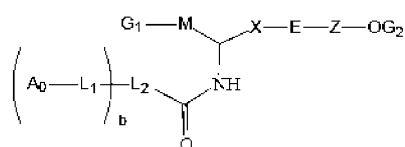
Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991 中, 以引用的方式将上述文献整体并入本文。在一些实施方式中, 保护基团在碱性条件下稳定, 但在酸性条件下脱除。在一些实施方式中, 本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括二甲氧基三苯甲基 (DMT)、单甲氧基三苯甲基、9-苯基黄嘌呤-9-基 (Pixyl) 和 9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基 (Mox)。在 5 一些实施方式中, 本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括 Tr (三苯甲基)、MMTr (4-甲氧基三苯甲基)、DMTr (4,4'-二甲氧基三苯甲基) 和 TMTTr (4,4',4''-三甲氧基三苯甲基) 和叔丁基二甲基硅烷基 (TBS 或 TBDMS)。本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括烷基酰基。

“受试者”一词, 如本文所使用的, 指任何动物, 例如哺乳动物或有袋动物。本公开的受试者包括但不 10 限于人类、非人灵长类 (例如, 恒河猴或其他类型的猕猴)、小鼠、猪、马、驴、牛、绵羊、大鼠和任何种类的家禽。

如本文所使用的, “治疗”、“减轻”、或“改善”可在此处互换使用。这些术语指的是获得有益的或期望的结果的方法, 包括但不限于治疗益处。“治疗益处”意味着根除或改善被治疗的潜在障碍。此外, 治疗益处通过根除或改善与潜在障碍相关的一个或多个生理症状, 从而在受试者中观察到改善而获得, 尽管受试者可能仍然受到潜在障碍的折磨。

如本文所使用的, “防止”和“预防”可互换使用。这些术语指获得有益或期望的结果的方法, 包括 15 但不限于预防性益处。为了获得“预防性益处”, 可将缀合物或组合物给予有罹患特定疾病风险的受试者, 或给予报告疾病的一种或多种病理症状的受试者, 即便可能该疾病的诊断尚未作出。

根据本发明的第一方面, 提供一种化合物, 该化合物具有式 (I) 所示的结构:



其中,

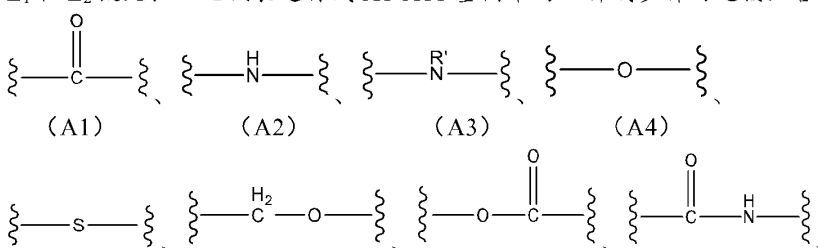
A₀ 代表对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体或者

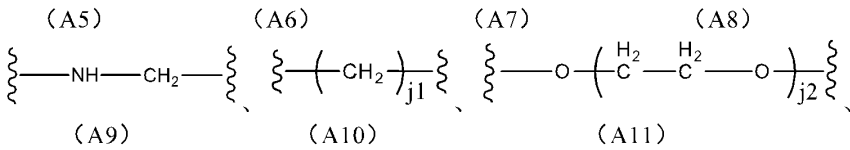
代表所述配体中的羟基全部或部分地被 KCOO-基团取代而形成的基团, 其中, 每个 K 独立 25 地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种;

其中所述配体优选地各自独立地选自下述中的任意一种: D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D- 30 吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖 35 苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡萄糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖;

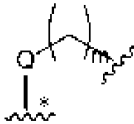
b 为 1-4 范围内的整数, 优选 1、2 或 3, 更优选 1 或 3;

L₁ 和 L₂ 彼此独立地代表选自式 A1-A11 基团中的一种或多种的连接组合:



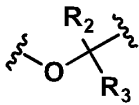


其中, j_1 为 1-20 的整数; j_2 为 1-20 的整数; R' 为 C_1 - C_{10} 的烷基;
M 代表如式 (A12) 所示的结构式:



式 (A12)

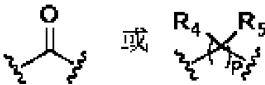
其中, m 代表 0-6 的整数, 优选为 0、1 或 2; *表示与 G_1 相连的键,
Q 代表式 (A13) 所示的结构式:



式 (A13)

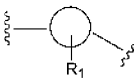
其中, 与 O 相连的 表示与 G_1 相连的键; R_2 、 R_3 相同或不同, 且彼此独立地选自 H、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基, 优选 H、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基;

Z 不存在或代表 C_1 - C_{10} 亚烷基, 优选 C_1 - C_3 亚烷基;
X 代表式 (A14-1) 或 (A14-2) 或所示的结构式:



(A14-1) (A14-2)

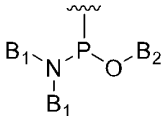
其中 R_4 、 R_5 相同或不同, 且彼此独立地选自 H、氟、羟基、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基, 优选 H、氟、羟基、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基; p 为 1-6 的整数, 优选 1、2 或 3; 任选地, R_4 和 R_5 直接相连形成三到六元饱和碳环;
E 代表如式 (A15) 所示的结构式:



式 (A15)

其中, 代表 C_3 - C_{18} 环烷基或 C_3 - C_{18} 杂环基, 优选代表 C_4 - C_8 环烷基或 C_3 - C_8 杂环基, 更优选代表 C_3 - C_6 杂环基, 更优选四到六元含氮饱和和环烷基, 并且 R_1 选自 H、氟、羟基、氟基、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基, 优选选自 H、氟、羟基、氟基、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基;

G_1 和 G_2 各自代表具有式 (G-1) 所示结构的亚磷酰胺官能团或羟基保护基团, 前提是 G_1 和 G_2 中至少一个具有式 (G-1) 所示的结构, 所述羟基保护基团选自三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、4,4'-双甲氧基三苯甲基 (DMTr) 和 4,4',4'-三甲氧基苯甲基中的任意一种, 优选 4,4'-双甲氧基三苯甲基;



式 (G-1)

其中，表示基团共价键连接的位点；

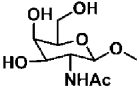
B₁选自取代或未取代的 C₁-C₅ 的烃基，可选地，B₁为甲基、乙基或异丙基；B₂选自 C₁-C₅ 的烷基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的一种，可选地，B₂为氧乙基。

5 在一些实施方式中，L₁或 L₂彼此独立地选自 A1、A2、A4、A6、A7、A8、A9、A10 中的一种或多种的连接组合。在一些实施方式中，L₁或 L₂彼此独立地选自 A1、A2、A4、A8、A9、A10 中的至少 2 个的连接组合。在一些实施方式中，其中 L₁或 L₂彼此独立地选自 A1、A4、A8、A10 中的至少 2 个的连接组合。在一些实施方式中，L₁或 L₂ 的长度彼此独立地为 1-25 个原子，所述 L₁或 L₂ 的长度是指最长直链上的成链原子的个数。在一些实施方式中，L₁或 L₂ 的长度彼此独立地为 1-20 个原子。

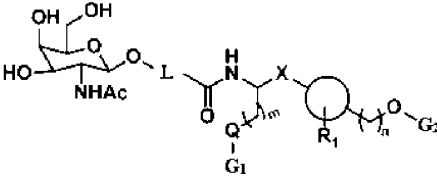
10 在一些实施方式中，每个 j₁ 彼此独立地为 1-10 的整数，每个 j₂ 彼此独立地为 1-10 的整数。

在一些实施方式中，每个 j₁ 彼此独立地为 1-8 的整数，每个 j₂ 彼此独立地为 1-8 的整数。

15 在一些实施方式中，A₀为如下所示的 N-乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 基团或其羟基全部或部分地被 KCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个 K 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种：



在一些实施方式中，所述化合物具有以下所示结构(I-1)：



(I-1)

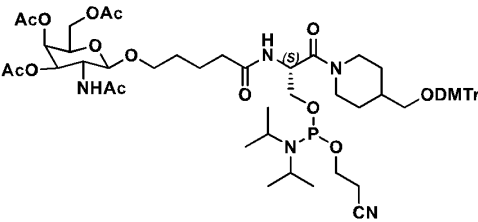
20 在一些实施方式中，L 为 A10，其中 j₁ 为 2-8 的整数，或者为 A11，其中 j₂ 为 1-7 的整数。

在一些实施方式中，m 为 0、1 或 2。

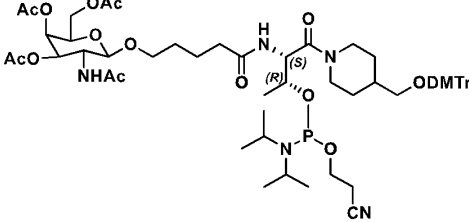
在一些实施方式中，n 为 0、1、2 或 3。

25 在一些实施方式中，代表四到八元全碳或含氮饱和环。在一些实施方式中，为含有一或两个氮原子的四、五或六元饱和环烷基。

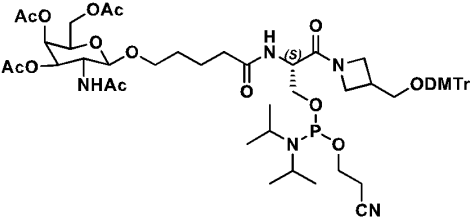
在一个具体实施方案中，本公开的化合物具有以下所示结构中的任意一种：



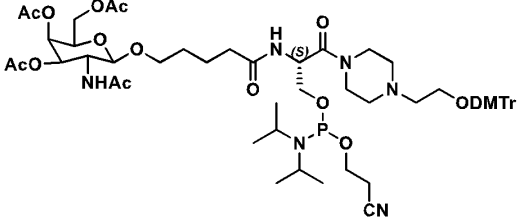
(I-1-1)



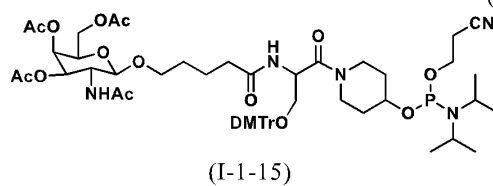
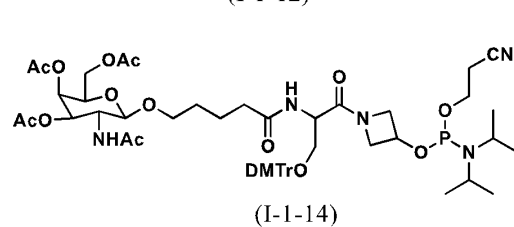
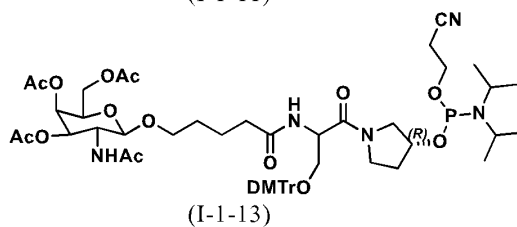
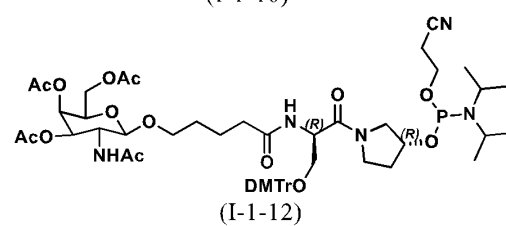
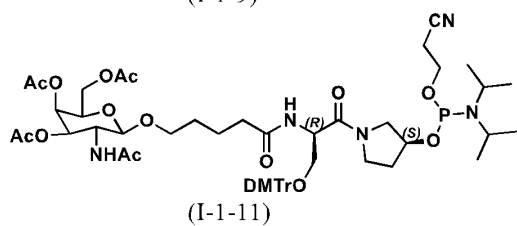
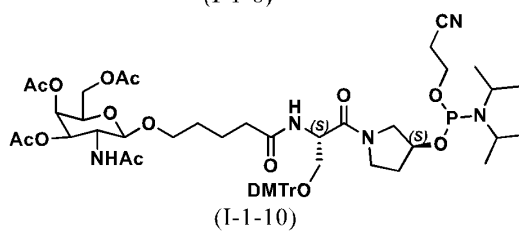
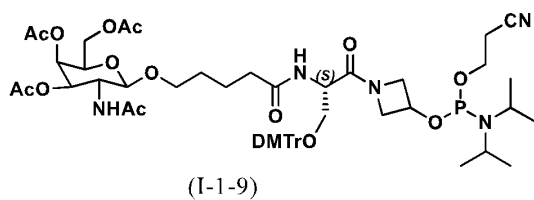
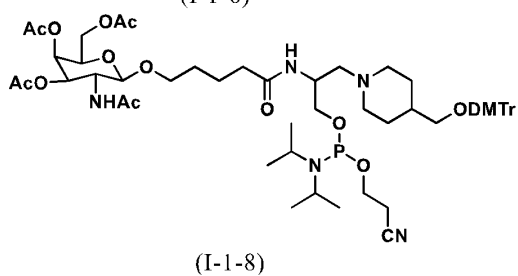
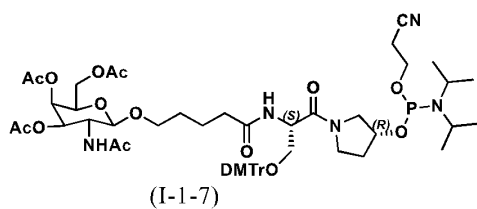
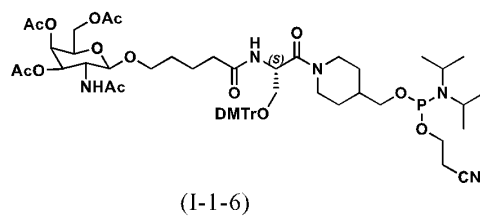
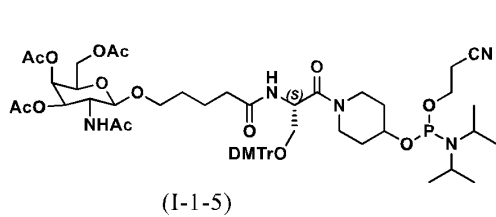
(I-1-2)

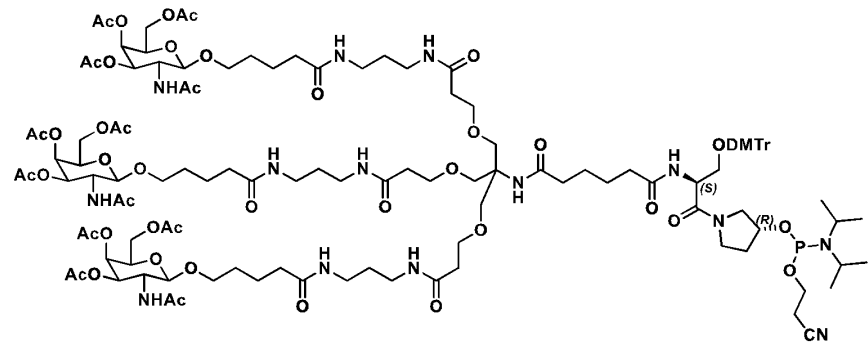


(I-1-3)

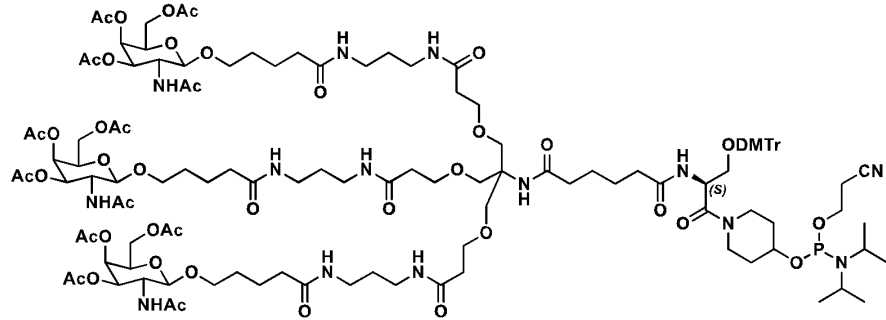


(I-1-4)



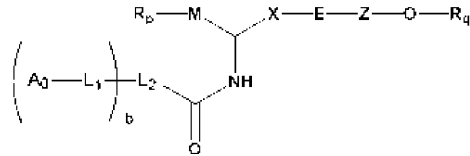


(I-1-16)



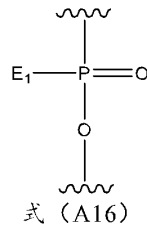
(I-1-17)

5 根据本发明的第二方面，提供一种核酸缀合物，在所述缀合物中含有与寡核苷酸序列上的任意位置连接的一个或一个以上具有式 (II) 所示的结构，优选两个、三个或四个连续连接的具有式 (II) 所示的结构：



(II)

10 其中， R_p 和 R_q 各自为 H 或具有式 A16 所示的结构，前提是 R_p 和 R_q 中至少一个具有式 A16 所示的结构：



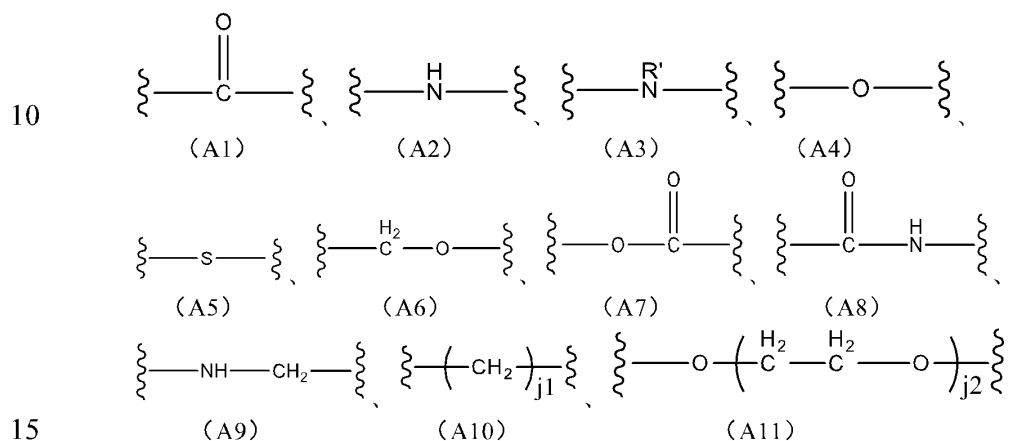
式 (A16)

15 其中， E_1 为 OH、SH 或 BH_2 ， A_0 代表对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体或者代表所述配体中的羟基全部或部分地被 $KCOO$ -基团取代而形成的基团，其中，每个 K 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种；
20 其中所述配体优选地各自独立地选自下述中的任意一种：D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 α -D-呋喃甘露糖、 β -D-呋喃甘露糖、 α -D-吡喃甘露糖、 β -D-吡喃甘露糖、 α -D-吡喃葡萄糖、 β -D-吡喃葡萄糖、 α -D-呋喃葡萄糖、 β -D-呋喃葡萄糖、 α -D-呋喃果糖、 α -D-吡喃果糖、 α -D-吡喃半乳糖、 β -D-吡喃半乳糖、 α -D-呋喃半乳糖、 β -D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳

糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡萄糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖；

b 为 1-4 范围内的整数，优选 1、2 或 3，更优选 1 或 3；

L₁ 和 L₂ 彼此独立地代表选自式 A1-A11 基团中的一种或多种的连接组合：



其中，j₁ 为 1-20 的整数；

j₂ 为 1-20 的整数；

R' 为 C₁-C₁₀ 的烷基；

M 代表如式 (A12) 所示的结构式：



其中，m 代表 0-6 的整数，优选为 0、1 或 2；* 表示与 R_p 相连的键，

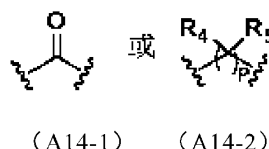
Q 代表式 (A13) 所示的结构式：



其中，与 O 相连的 wavy line 表示与 R_p 相连的键；R₂、R₃ 相同或不同，且彼此独立地选自 H、C₁-C₂₀ 烷基、C₁-C₂₀ 烷氧基、C₂-C₂₀ 烯基、C₂-C₂₀ 炔基，优选 H、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基；

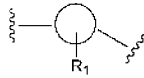
Z 不存在或代表 C₁-C₁₀ 亚烷基，优选 C₁-C₃ 亚烷基；

30 X 代表式 (A14-1) 或 (A14-2) 或所示的结构式：



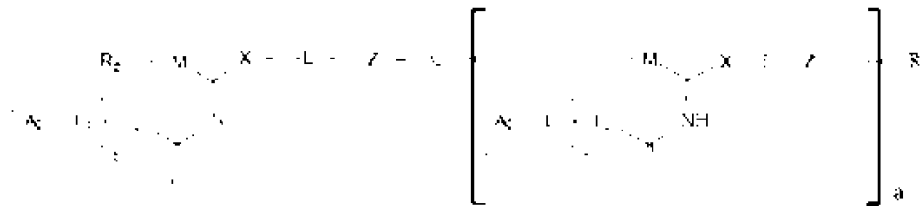
其中 R₄、R₅ 相同或不同，且彼此独立地选自 H、氟、羟基、C₁-C₂₀ 烷基、C₁-C₂₀ 烷氧基、C₂-C₂₀ 烯基、C₂-C₂₀ 炔基，优选 H、氟、羟基、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基

基；p 为 1-6 的整数，优选 1、2 或 3；任选地，R₄ 和 R₅ 直接相连形成三到六元饱和碳环；
E 代表如式 (A15) 所示的结构式：



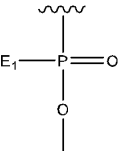
式 (A15)

- 5 其中，表示基团共价键连接的位点；代表 C₃-C₁₈ 环烷基或 C₃-C₁₈ 杂环基，优选代表 C₄-C₈ 环烷基或 C₃-C₈ 杂环基，更优选代表 C₃-C₆ 杂环基，更优选四到六元含氮饱和环烷基，并且 R₁ 选自 H、氟、羟基、氰基、C₁-C₂₀ 烷基、C₁-C₂₀ 烷氧基、C₂-C₂₀ 烯基、C₂-C₂₀ 炔基，优选选自 H、氟、羟基、氰基、C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基。
- 10 在第三方面，本发明提供了一种核酸缀合物，其中所述缀合物含有与寡核苷酸序列上的任意位置连接的一个以上具有式 (II-A) 所示的结构：



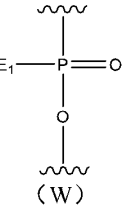
(II-A)

- 其中，
a 代表 0-7 的整数，优选 0-3 的整数，更优选 0、1、2 或 3 的整数；
15 Rp 和 Rq 各自为 H 或具有式 A16 所示的结构，并且其中至少一个具有式 A16 所示的结构；



式 (A16)

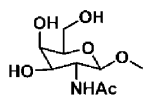
W 的结构如下式所示：



(W)

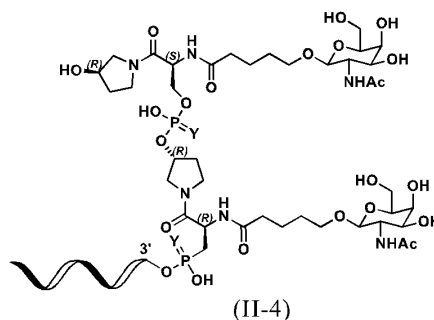
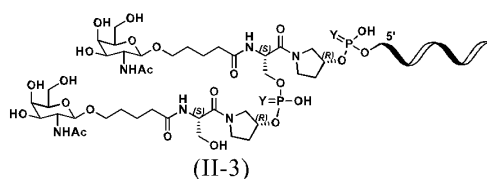
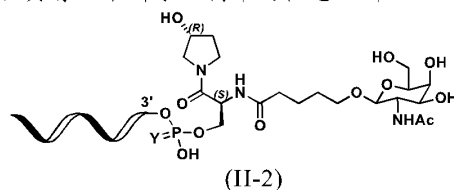
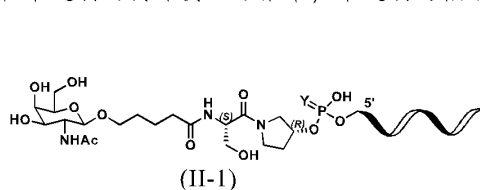
- 20 其中，E₁ 为 OH、SH 或 BH₂，
A₀、b、L₁、L₂、M、Z、X、E 等同式 (II)，此处不再赘述。
- 25 在一些实施方式中，L₁ 或 L₂ 彼此独立地选自 A1、A2、A4、A6、A7、A8、A9、A10 中的一种或多种的连接组合。在一些实施方式中，L₁ 或 L₂ 彼此独立地选自 A1、A2、A4、A8、A9、A10 中的至少 2 个的连接组合。在一些实施方式中，其中 L₁ 或 L₂ 彼此独立地选自 A1、A4、A8、A10 中的至少 2 个的连接组合。在一些实施方式中，L₁ 或 L₂ 的长度彼此独立地为 1-25 个原子，所述 L₁ 或 L₂ 的长度是指最长直链上的成链原子的个数。在一些实施方式中，L₁ 或 L₂ 的长度彼此独立地为 1-20 个原子。
- 30 在一些实施方式中，每个 j₁ 彼此独立地为 1-10 的整数，每个 j₂ 彼此独立地为 1-10 的整数。在一些实施方式中，每个 j₁ 彼此独立地为 1-8 的整数，每个 j₂ 彼此独立地为 1-8 的整数。在一些实施方式中，A₀ 为如下所示的 N-乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 基团或其羟基全部或部

分地被 KCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个 K 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种：

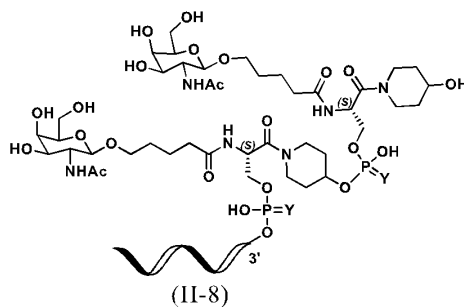
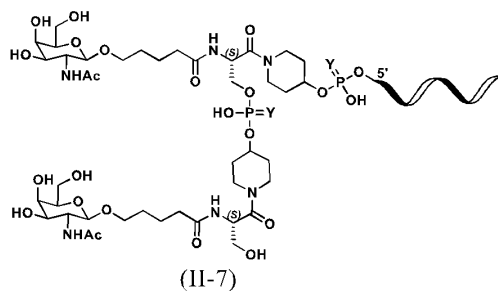
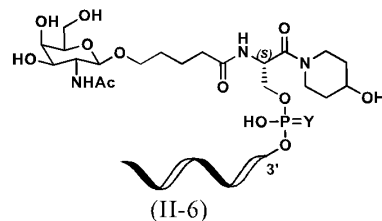
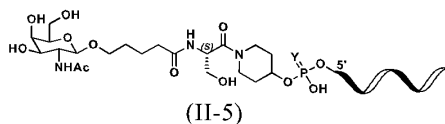


5 在本公开的上下文中，除非另有说明，“缀合”是指两个或多个各自具有特定功能的化学部分之间以共价连接的方式彼此连接；相应地，“缀合物”是指该各个化学部分之间通过共价连接而形成的化合物。进一步地，“核酸缀合物”表示一个或多个具有特定功能的化学部分共价连接至寡核苷酸上而形成的化合物。在下文中，有时也将本公开的核酸缀合物简称为“缀合物”。

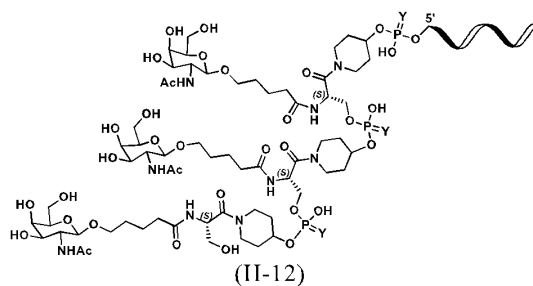
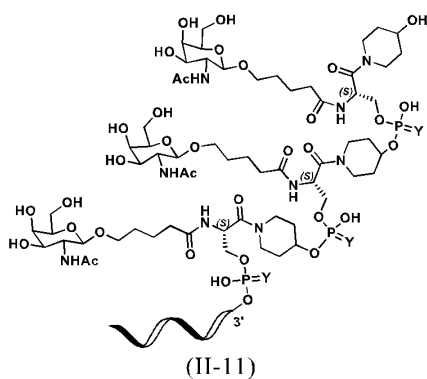
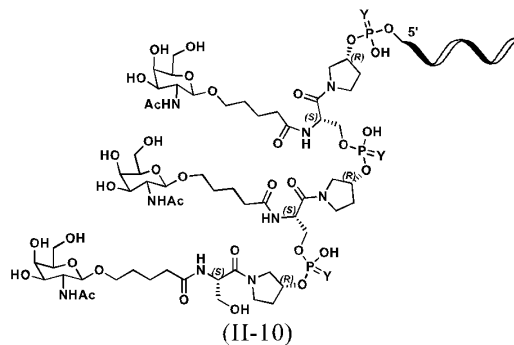
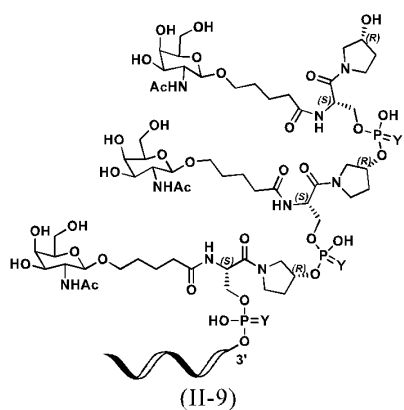
10 在本发明的具体实施方案中，本发明的核酸缀合物具有以下所示结构中的任意一种：



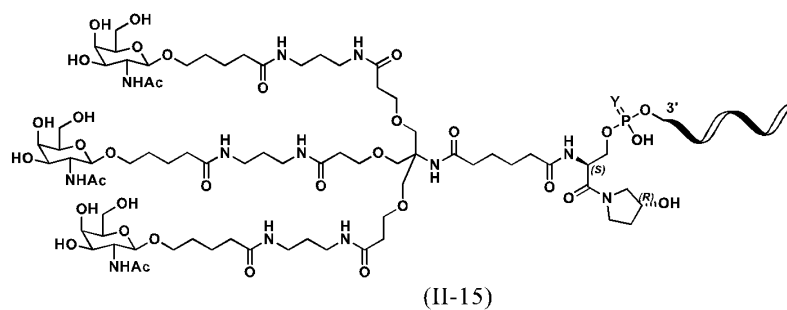
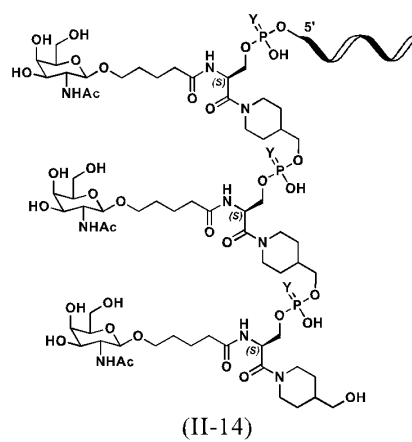
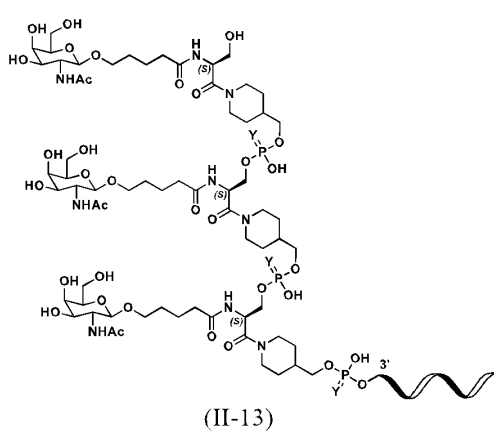
15



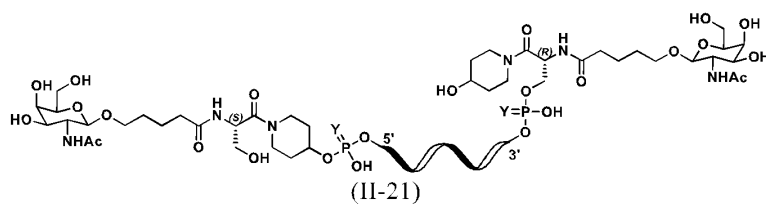
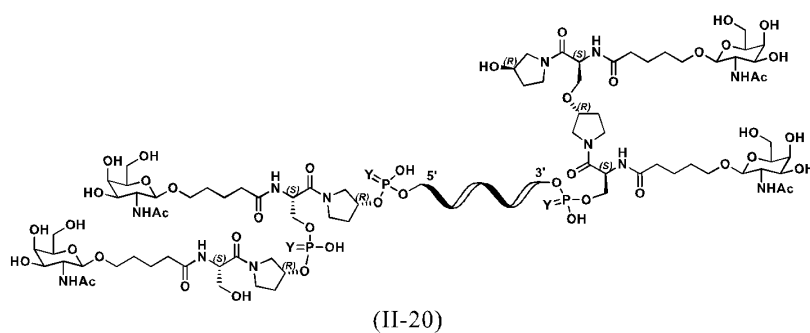
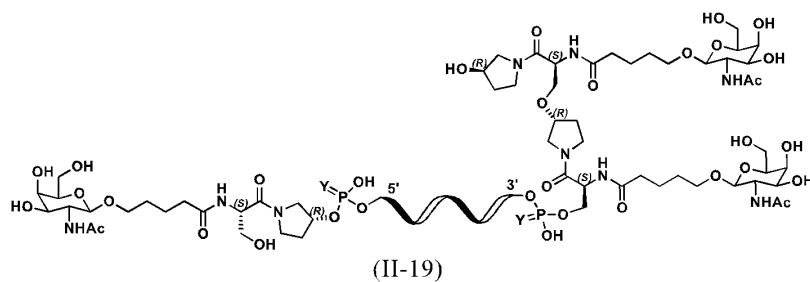
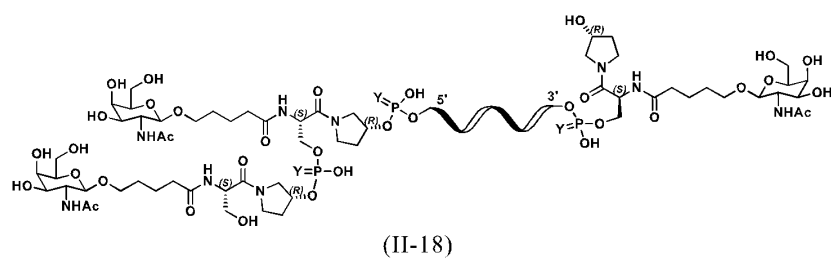
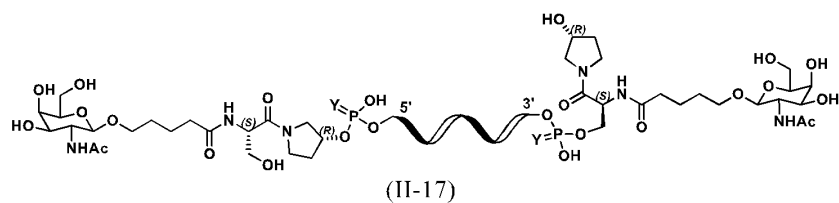
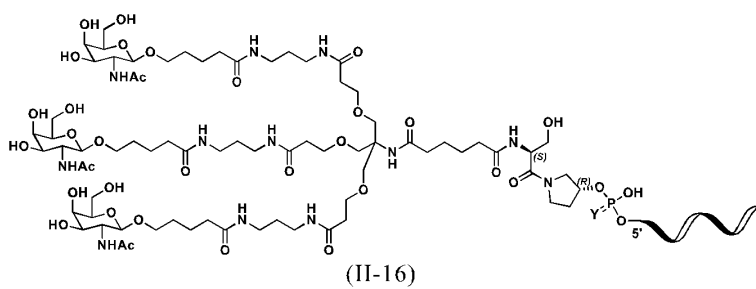
20

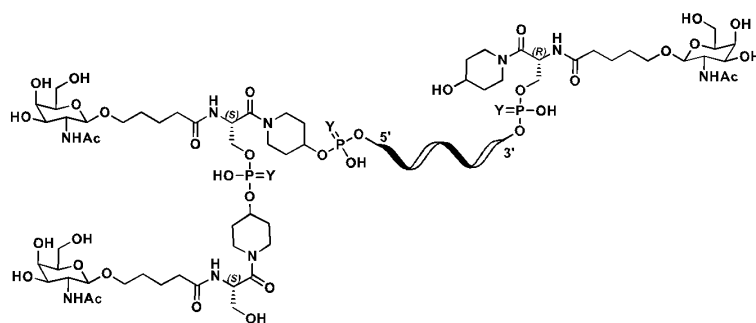


5

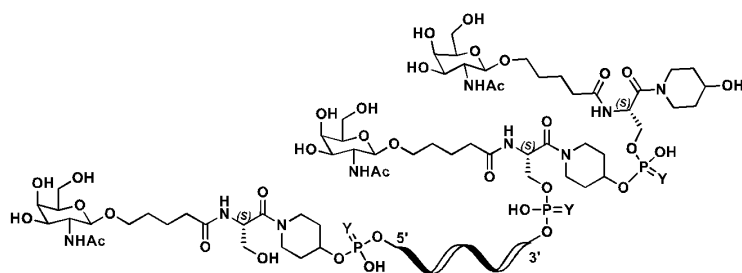


10

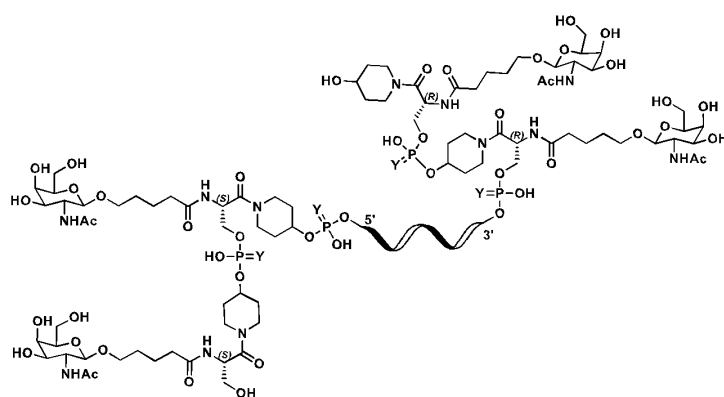




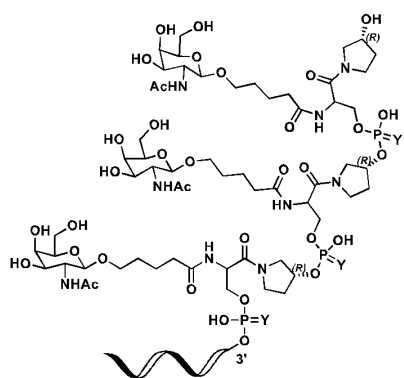
(II-22)



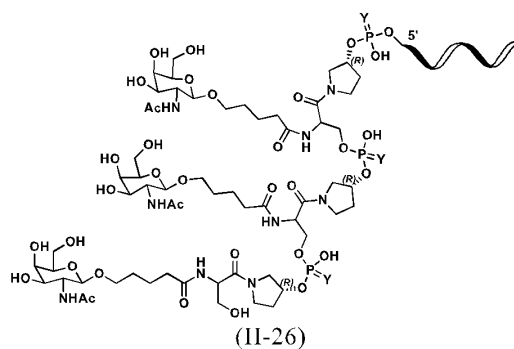
(II-23)



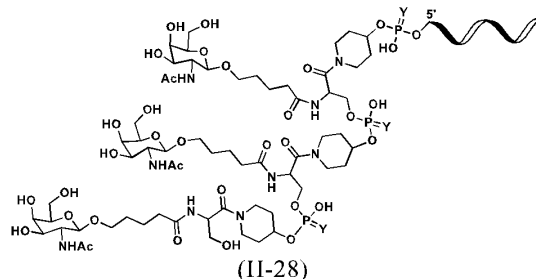
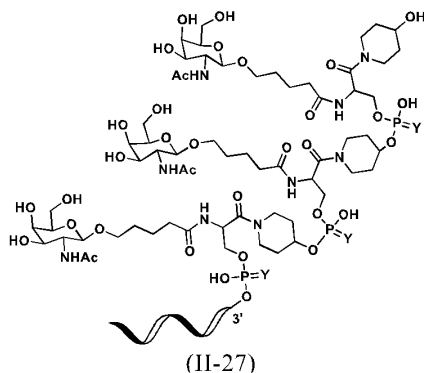
(II-24)



(II-25)



(II-26)



其中 Y 为 O 或者 S,  为寡核苷酸。

在本公开的一些实施方式中, 所述寡核苷酸选自小干扰 RNA、微小 RNA、抗微小 RNA、微小 RNA 拮抗剂、微小 RNA 模拟物、诱饵寡核苷酸、免疫刺激物、G-四极子、可变剪接体、单链 RNA、反义核酸、核酸适配体、茎环 RNA、mRNA 片段、激活 RNA 中的一种; 可选地, 所述寡核苷酸为单链寡核苷酸或者双链寡核苷酸; 可选地, 所述寡核苷酸为单链寡核苷酸, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述单链寡核苷酸的端部, 所述单链寡核苷酸的端部指所述单链寡核苷酸中从一端起算的前 4 个核苷酸; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述单链寡核苷酸的末端; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述单链寡核苷酸的 3' 末端;

可选地, 所述寡核苷酸为双链寡核苷酸, 所述双链寡核苷酸包含正义链和反义链, 所述式 (A16) 中的 P 原子连接到所述双链寡核苷酸的端部, 所述双链寡核苷酸的端部指所述正义链或所述反义链中从一端起算的前 4 个核苷酸; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述正义链或所述反义链的末端; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述反义链的 5' 末端; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子通过形成磷酸二酯键连接至所述核酸缀合物中的核苷酸的 2' 位、3' 位或 5' 位。

在一些实施方式中, “靶序列”是靶 mRNA。在本公开的上下文中, “靶 mRNA”是指在肝细胞中异常表达的基因对应的 mRNA, 它既可以是过量表达的基因对应的 mRNA, 或者是表达不足的基因对应的 mRNA。由于大部分疾病源于 mRNA 的过量表达, 因此, 在本公开中, 靶 mRNA 尤其指过量表达的基因对应的 mRNA。在本公开的一些实施方式中, 相应于上述异常表达的基因, 所述靶 mRNA 可以是 ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV 等基因对应的 mRNA。在一些实施方式中, 所述靶 mRNA 可以由对应 HBV 基因转录而得的 mRNA、或者 ANGPTL3 基因所对应的 mRNA、或者 APOC3 基因所对应的 mRNA。

本领域技术人员公知, siRNA 含有核苷酸基团作为基本结构单元, 所述核苷酸基团含有磷酸基团、核糖基团和碱基。通常具有活性的, 即功能性的 siRNA 的长度约为 12-40 个核苷酸, 在一些实施方式中约为 15-30 个核苷酸, 所述 siRNA 中的每个核苷酸可以独立地是修饰或未修饰的核苷酸, 为了增加稳定性, 所述 siRNA 中至少一个核苷酸是修饰的核苷酸。

本公开的发明人发现, 下面的实施方式中所述的 siRNA 具有较高的活性和/或稳定性, 因而可以作为本公开中 siRNA 的发明目的。

在一些实施方式中, 本公开的 siRNA 缀合物中的 siRNA (以下, 也称为本公开的 siRNA) 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸, 该 siRNA 含有正义链和反义链, 其中, 所述正义链包含核苷酸序列 1, 所述反义链包含核苷酸序列 2, 所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 的长度均为 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 个核苷酸, 并且至少部分地反向互补形成互补双链区, 所述核苷酸序列 2 的至少一部分与第一段核苷酸序列互补, 所述第一段核苷酸序列为靶 mRNA 中的一段核苷酸序列。

在一些实施方式中, 所述核苷酸序列 1 与所述第一段核苷酸序列长度相等, 且不超过 3 个核苷酸差异; 所述核苷酸序列 2 与核苷酸序列 B 长度相等, 且不超过 3 个核苷酸差异; 所述核苷酸序列 B 为与所述第一段核苷酸序列完全反向互补的核苷酸序列。在不愿受到限制的情况下, 这些特定的核苷酸差异并不会显著降低 siRNA 缀合物的靶基因抑制能力, 而这些包含特定核苷酸差异的 siRNA 缀合物也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方式中, 所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 基本上反向互补、基本上完全反向互补或完全反向互补。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 与所述第一段核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 2 与所述核苷酸序列 B 不多于 1 个核苷酸差异。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 2 与所述核苷酸序列 B 之间的核苷酸差异包括按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 2 上的第一个核苷酸 Z'位置上的差异。在一些实施方式中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 上的最后一个核苷酸 Z 是与 Z'互补的核苷酸。

在一些实施方式中，所述正义链还含有核苷酸序列 3，所述反义链还含有核苷酸序列 4，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度相等且均为 1-4 个核苷酸，所述核苷酸序列 3 连接在所述核苷酸序列 1 的 5'末端，并且所述核苷酸序列 4 连接在所述核苷酸序列 2 的 3'末端，所述核苷酸序列 4 与第二段核苷酸序列互补，该第二段核苷酸序列是指靶 mRNA 中与所述第一段核苷酸序列相邻、且长度与所述核苷酸序列 4 相同的核苷酸序列。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 基本上完全反向互补或完全反向互补。因此，所述正义链和反义链的长度可以是 19-23 个核苷酸。

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 还含有核苷酸序列 5，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 至 3 个核苷酸，连接在所述反义链的 3'末端，从而构成所述反义链的 3'突出端；在一些实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 或 2 个核苷酸。这样，在一些实施方式中，本公开的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比可以是 19/20、19/21、20/21、20/22、21/22、21/23、22/23、22/24、23/24 或 23/25。

在一个实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 2 个核苷酸，并且按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 5 为连续的 2 个脱氧胸腺嘧啶核苷酸、连续的 2 个尿嘧啶核苷酸、或者与第三段核苷酸序列互补，所述第三段序列是指靶 mRNA 中与所述第一段核苷酸序列相邻、或者和所述第二段核苷酸序列相邻，并且长度与所述核苷酸序列 5 相等的核苷酸序列。在一个实施方式中，本公开的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比为 19/21 或 21/23，此时，本公开的 siRNA 具有更好的肝细胞 mRNA 沉默活性。

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 中的核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。在一些实施方式中，本公开的 siRNA 不含修饰的核苷酸基团；在一些实施方式中，本公开的 siRNA 含有修饰的核苷酸基团。

目前，本领域存在多种可用于修饰 siRNA 的方式，包括骨架修饰（也称为核苷酸间连接修饰，如磷酸基团修饰）、核糖基团修饰及碱基修饰等（例如，请参见 Watts, J.K., G.F.Deleavey and M.J.Damha, Chemically modified siRNA: tools and applications. Drug Discov Today, 2008.13(19-20): p.842-55, 以引用的方式将其整体内容并入本文）。

在本公开的上下文中，所使用的术语“修饰的核苷酸”是指核苷酸的核糖基被修饰，比如 2' 位羟基被其他基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物，或者核苷酸上的碱基是经修饰的碱基的核苷酸。

在本公开的一些实施方式中，所述正义链或所述反义链中的至少一个核苷酸为修饰的核苷酸，和/或至少一个磷酸酯基为具有修饰基团的磷酸酯基，换句话说，所述正义链和所述反义链中至少一条单链的磷酸-糖骨架中的磷酸酯基和/或核糖基的至少一部分为具有修饰基团的磷酸酯基和/或具有修饰基团的核糖基（或修饰的磷酸酯基和/或修饰的核糖基）。本公开的一些实施方式中，所述正义链和/或所述反义链中的全部核苷酸均为修饰的核苷酸。

在一些实施方式中，正义链和反义链中的每一个核苷酸独立地为氟代修饰的核苷酸或非氟代修饰的核苷酸。

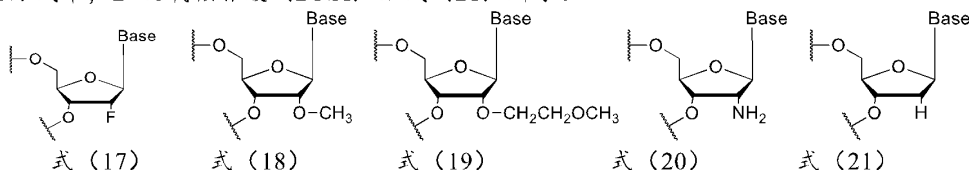
氟代修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被氟取代形成的核苷酸，其具有以下式 (17) 所示的结构。

非氟代修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物。在一些实施方式中，每一个非氟代修饰的核苷酸独立地选自核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物中的一种。

核糖基 2' 位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸是本领域技术人员所公知的，这些核苷酸可以选自 2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸中的一种。

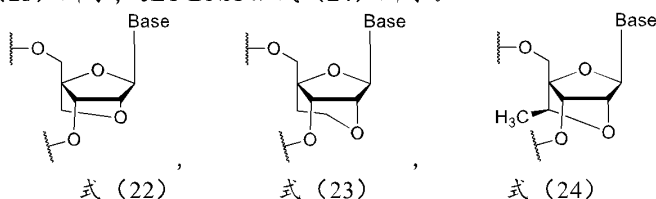
在一些实施方式中，2'-烷氧基修饰的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸 (2'-OMe)，如式 (18) 所示。2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸，例如可以是 2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸 (2'-MOE)，如式 (19) 所示。在一些实施方式中，2'-氨基修饰的核苷酸 (2'-NH₂) 如式 (20) 所示。在一些

实施方式中，2'-脱氧核苷酸（DNA）如式（21）所示。

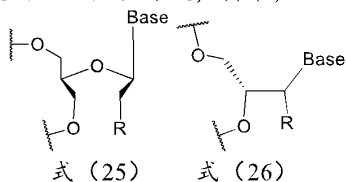


核苷酸类似物指能够在核酸中代替核苷酸，但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶的基团。在一些实施方式中，所述核苷酸类似物可以为如异核苷酸、桥联核酸（bridged nucleic acid，简称 BNA）核苷酸或无环核苷酸。

BNA 核苷酸是指受约束的或不能接近的核苷酸。BNA 可以含有五元环、六元环、或七元环的具有“固定的”C3'-内切糖缩拢的桥联结构。通常将该桥掺入到该核糖环的 2'-、4'-位处以提供一个 2', 4'-BNA 核苷酸，如 LNA、ENA、cET BNA 等，其中，LNA 如式（22）所示，ENA 如式（23）所示，cET BNA 如式（24）所示。

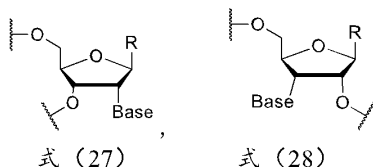


无环核苷酸是核苷酸的糖环被打开形成的一类核苷酸，如解锁核酸（UNA）核苷酸或甘油核酸（GNA）核苷酸，其中，UNA 如式（25）所示，GNA 如式（26）所示。



其中，R 选自 H、OH 或烷氧基（O-烷基）。

异核苷酸是指核苷酸中碱基在核糖环上的位置发生改变而形成的化合物，例如，碱基从核糖环的 1'-位移动至 2'-位或 3'-位而形成的化合物，如式（27）或（28）所示。



其中，Base 表示碱基，例如 A、U、G、C 或 T；R 选自 H、OH、F 或者如上所述的非氟基团。

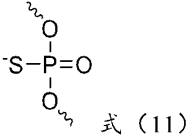
在一些实施方式中，核苷酸类似物选自异核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA 和 GNA 中的一种。在一些实施方式中，每一个非氟代修饰的核苷酸均为甲氧基修饰的核苷酸，所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

在上文及下文中，“氟代修饰的核苷酸”、“2'-氟修饰的核苷酸”、“核糖基团的 2'-羟基被氟取代的核苷酸”和“2'-氟代核糖基”意义相同，均指核苷酸的 2'-羟基被氟取代而形成的具有如式（17）所示结构的化合物；“甲氧基修饰的核苷酸”、“2'-甲氧基修饰的核苷酸”、“核糖基团的 2'-羟基被甲氧基取代的核苷酸”和“2'-甲氧基核糖基”意义相同，均指核苷酸核糖基团的 2'-羟基被甲氧基取代，而形成如式（18）所示的结构。

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA：正义链和反义链均包含氟代修饰的核苷酸和非氟代修饰的核苷酸，所述氟代修饰的核苷酸位于前述的核苷酸序列 1 和核苷酸序列 2 中，所述核苷酸序列 1 中氟代修饰的核苷酸不多于 5 个，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 的第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸；所述核苷酸序列 2 中氟代修饰的核苷酸不多于 7 个，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 2 的第 2、

6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。在一些实施方式中，本公开的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA：按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的正义链中所述核苷酸序列 1 的第 7、8、9 位的核苷酸为-氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在一些实施方式中，本公开的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA：或者按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的正义链中所述核苷酸序列 1 的第 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在一些实施方式中，本公开的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA：按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的正义链中所述核苷酸序列 1 的第 7、8 和 9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的反义链中所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14 和 16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸。

15 在本公开所述 siRNA 的一些具体实施方式中，所述核苷酸含有磷酸基团修饰。在本公开的上下文中，磷酸基团修饰在一个实施方式中为如下式 (11) 所示的硫代磷酸 (phosphorothioate) 修饰，即，用一个硫原子取代磷酸二酯键中的非桥氧原子，从而以硫代磷酸二酯键替换磷酸二酯键。在一些实施方式中，该修饰能稳定 siRNA 的结构，保持碱基配对的高特异性和高亲和力。

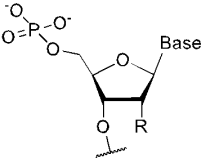


20 根据本公开的一些实施方式，所述 siRNA 中，硫代磷酸酯基连接存在于由以下位置的组成的组中的至少一处：正义链或反义链任意一端的第一个和第二个核苷酸之间；正义链或反义链任意一端的第二个和第三个核苷酸之间；或上述的任意组合。在一些实施方式中，硫代磷酸酯基连接存在于除正义链 5'末端以外的全部上述位置处。在一些实施方式中，硫代磷酸酯基连接存在于除正义链 3'末端以外的全部上述位置处。在一些实施方式中，硫代磷酸酯基连接存在于以下位置中的至少一处：

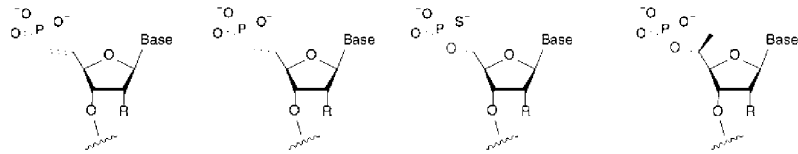
- 所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；
- 所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；
- 所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；
- 所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；
- 30 所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；
- 所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；
- 所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；以及
- 所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接。

35 按照本公开的一些实施方式，所述 siRNA 分子的反义链序列 5'末端核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸。

在一些实施方式中，5'-磷酸核苷酸可具有式 (12) 所示结构：



同时，常用的所述 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸的种类是本领域技术人员公知的，例如，Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48 中公开的如下如式 (13) - (16) 所示的 4 种核苷酸：



式 (13) 式 (14) 式 (15) 式 (16),

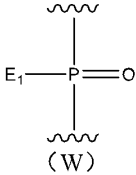
其中, R 表示选自由 H、OH、F 和甲氧基所组成的组的基团;

Base 表示选自 A、U、C、G 或 T 的碱基。

5 在一些实施方式中, 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸为式 (13) 所示的含有乙烯基磷酸酯 (E-vinylphosphonate, E-VP) 的核苷酸、式 (12) 所示的含有 5'-磷酸修饰的核苷酸或式 (15) 所示的含有 5'-硫代磷酸修饰的核苷酸。

在本公开的一些实施方式中, 所述双链寡核苷酸为 siRNA。

10 根据本发明的第三方面, 提供一种本发明公开的核酸缀合物的制备方法, 包括本发明所述的式(I)化合物中的亚磷酸胺官能团氧化为式 (W) 所示的结构, 然后与寡核苷酸结合, 再进行切割和脱去保护基团, 得到所述缀合物。



其中, ~~~~ 表示基团共价键连接的位点;

15 E₁ 为 OH、SH 或 BH₂。

可以采用任意合理的合成路线来制备本公开的核酸缀合物。

例如, 本公开的核酸缀合物的制备方法可以包括: 在亚磷酸胺官能团相合成的条件下, 分别按照所述功能性寡核苷酸的核苷酸种类和顺序, 按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接, 每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应。

20 在本公开的一些实施方式中, 所述偶联反应在活化剂的存在下进行, 所述活化剂例如选自 1H-四氮唑、5-乙硫基 1H-四氮唑、5-苄硫基 1H-四氮唑中的一种或多种, 在一些实施方式中为 5-乙硫基 1H-四氮唑。

在本公开的一些实施方式中, 所述氧化反应条件包括温度为 0-50°C, 在一些实施方式中为 15-35°C, 反应时间为 1-100 秒, 在一些实施方式中为 5-50 秒, 氧化试剂在一些实施方式中为碘 (在进一步实施方式中, 以碘水的形式提供)。

25 根据本发明的第四方面, 提供一种本发明公开的核酸缀合物在制备用于治疗 and/或预防肝源性疾病的药物中的用途。

根据本发明的第五方面, 提供一种治疗由肝细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的方法, 所述方法包括向患有该疾病的患者给予本发明公开的核酸缀合物。

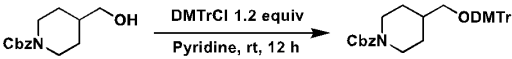
30 根据本发明的第六方面, 提供一种试剂盒, 该试剂盒包本发明公开的核酸缀合物。

以下实施例仅示例性地说明本发明, 并非限制性。下述实施例中所用的原料、试剂等, 如无特殊说明, 均为市售产品。

实施例 1 化合物 I-1-1 的制备

1.1 中间体 1-1 的制备

35



1-1

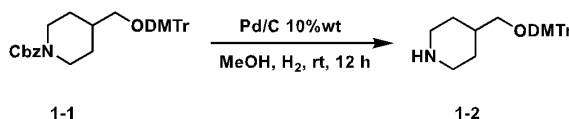
40 将化合物 1-Cbz-4-羟甲基吡啶 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) (40.1 mmol, 10.0 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 吡啶, 室温下加入 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (1.2 equiv, 48.1 mmol, 16.3 g), 随后室温继续搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 乙酸乙酯, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 - 4/1), 得到淡黄色油状物化合物 1-1 (21.7 g, 39.3 mmol, 98%收率)。化合物 1-1 分子式: C₃₅H₃₇O₅N, 分子量: 551.3, LC-MS 实测: 552.4 (M+H)⁺。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.31 -

45

7.22 (m, 9H), 7.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 5H), 6.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 4.99 (s, 2H), 3.93 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H), 3.66 (s, 6H), 2.78–2.61 (m, 4H), 2.44 (s, 1H), 1.62 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H), 0.97 (qd, $J = 12.7, 3.6$ Hz, 2H).

1.2 中间体 1-2 的制备

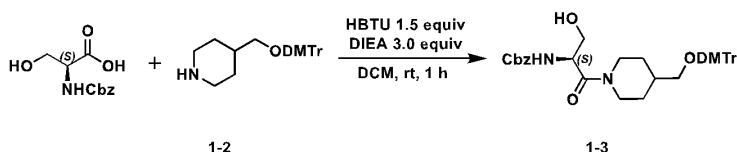
5



10 将化合物 1-1 (39.3 mmol, 21.7 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 150 mL 甲醇, 室温氢气下加入钯碳 (湿基, 10% Pd/C) (10%wt, 2.2 g), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后过滤除去钯碳, 滤液浓缩, 得到粗产品白色固体化合物 1-2 (16.1 g, 38.5 mmol, 98%收率), 未纯化直接投入下一步反应。化合物 1-2 分子式: $C_{27}H_{31}O_3N$, 分子量: 417.2, LC-MS 实测: 418.4 (M+H).

1.3 中间体 1-3 的制备

15

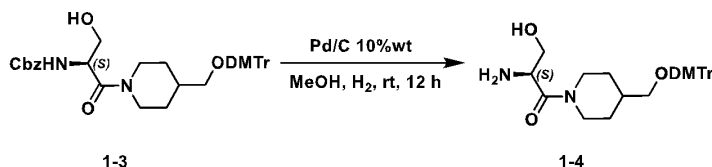


20 将化合物 N-苄氧羰基-L-丝氨酸 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) (35.0 mmol, 8.4 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷, 室温下加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.5 equiv, 52.5 mmol, 19.9 g)、化合物 1-2 (1.1 equiv, 38.5 mmol, 16.1 g) 和 N,N-二异丙基乙胺 (3.0 equiv, 105.0 mmol, 13.5 g), 随后室温搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 二氯甲烷, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 10/1 - 2/3), 得到白色固体化合物 1-3 (14.9 g, 23.5 mmol, 67%收率)。

25 化合物 1-3 分子式: $C_{38}H_{42}O_7N_2$, 分子量: 638.3, LC-MS 实测: 639.4 (M+H). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.42–7.26 (m, 9H), 7.23 (d, $J = 8.7$ Hz, 5H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 5.03–4.96 (m, 2H), 4.79 (dt, $J = 25.7, 5.4$ Hz, 1H), 4.55–4.48 (m, 1H), 4.36 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 4.01 (dt, $J = 24.8, 8.8$ Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.56 (ddd, $J = 18.7, 12.7, 5.8$ Hz, 1H), 3.43–3.38 (m, 1H), 3.00 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H), 2.85–2.79 (m, 2H), 2.69 (s, 1H), 2.56 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 1.88 (d, $J = 21.0$ Hz, 1H), 1.69 (dd, $J = 36.5, 11.3$ Hz, 2H), 1.19–0.98 (m, 2H).

1.4 中间体 1-4 的制备

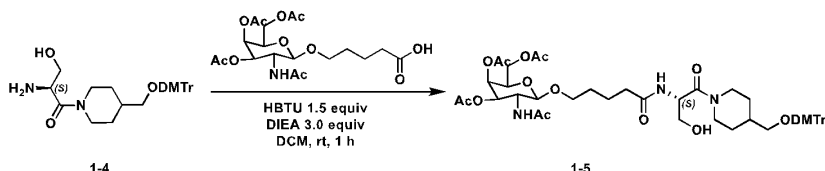
35



40 将化合物 1-3 (23.5 mmol, 14.9 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 甲醇, 室温氢气下加入钯碳 (湿基, 10% Pd/C) (10%wt, 1.5 g), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后过滤除去钯碳, 滤液浓缩, 得到粗产品白色固体化合物 1-4 (11.6 g, 23.0 mmol, 98%收率), 未纯化直接投入下一步反应。化合物 1-4 分子式: $C_{30}H_{36}O_5N_2$, 分子量: 504.2, LC-MS 实测: 527.6 (M+Na). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 5H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 4.39 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.69 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.43–3.36 (m, 5H), 3.01–2.92 (m, 2H), 2.83 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.84 (dd, $J = 11.6, 8.1$ Hz, 1H), 1.72 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.17–0.91 (m, 2H).

1.5 中间体 1-5 的制备

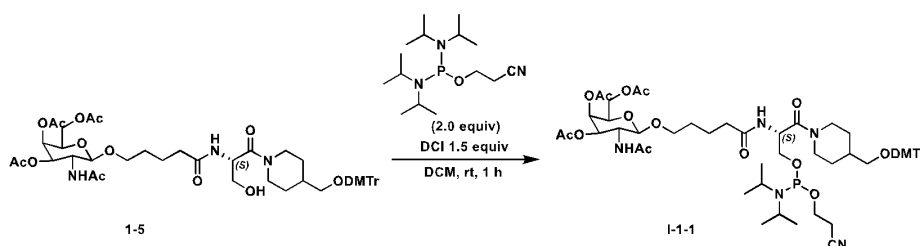
50



55 将化合物 5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰氨基-4,5-二乙氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸 (市售, 购买于诺甘林生物医药科技(苏州)有限公司) (9.3 g, 20.9 mmol) 置于洁净干燥

反应瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷, 室温下加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基胍六氟磷酸盐 (1.5 equiv, 31.3 mmol, 11.9 g), 搅拌十分钟, 随后向反应体系中加入化合物 1-4 (1.1 equiv, 23.0 mmol, 11.6 g) 和 N,N-二异丙基乙胺 (3.0 equiv, 62.7 mmol, 8.1 g), 随后室温继续搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 二氯甲烷, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 50/1 - 20/1), 得到白色固体化合物 1-5 (15.4 g, 16.5 mmol, 79% 收率)。化合物 1-5 分子式: $C_{49}H_{63}O_{13}N_5$, 分子量: 933.4, LC-MS 实测: 932.5 (M-H). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.93 (dd, $J = 24.8, 8.3$ Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 8.8, 5.3$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 8.7$ Hz, 5H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 5.21 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.97 (dd, $J = 11.2, 3.4$ Hz, 1H), 4.79 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 4.47 (dd, $J = 8.0, 3.6$ Hz, 1H), 4.37 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 4.05 - 4.00 (m, 5H), 3.87 (dd, $J = 20.2, 10.3$ Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.57 - 3.50 (m, 1H), 3.14 (qd, $J = 7.3, 4.3$ Hz, 1H), 2.99 (t, $J = 14.2$ Hz, 1H), 2.82 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 2.10 (s, 5H), 1.99 - 1.98 (m, 6H), 1.89 (s, 3H), 1.76 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H), 1.25 (dd, $J = 12.6, 6.5$ Hz, 5H), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

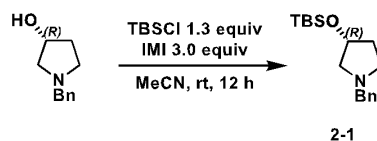
1.6 化合物 I-1-1 的制备



将化合物 1-5 (16.5 mmol, 15.4 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 无水二氯甲烷。室温氩气保护下加入化合物 2-氰乙基 N,N,N',N'-四异丙基亚磷酸二胺 (2.0 equiv, 33.0 mmol, 9.9 g) 和 4,5-二氰咪唑 (1.5 equiv, 24.7 mmol, 2.9 g), 室温下继续搅拌一小时。反应后向反应液中加入 50 mL 二氯甲烷, 并用 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品经 C18 反相柱 (规格: 30 μ m; 100 $\text{\AA}$, 市售, 购买于上海博蕴生物科技有限公司) ($MeCN:H_2O = 75\%:25\%$) 制备得到白色固体 I-1-1 (11.6 g, 10.2 mmol, 62% 收率)。化合物 I-1-1 分子式: $C_{58}H_{80}O_{15}N_6P$, 分子量: 1133.5, LC-MS 实测: 1132.4 (M-H). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8.22 - 8.04 (m, 1H), 7.79 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 7.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 5H), 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 5.21 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.93 (ddd, $J = 18.3, 11.7, 4.3$ Hz, 2H), 4.49 - 4.45 (m, 1H), 4.40 - 4.30 (m, 1H), 3.99 (p, $J = 8.9$ Hz, 4H), 3.85 (dt, $J = 13.0, 6.6$ Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 3.71 (s, 2H), 3.68 - 3.62 (m, 2H), 3.49 (ddd, $J = 15.7, 13.6, 6.6$ Hz, 2H), 3.42 - 3.36 (m, 1H), 3.00 (t, $J = 14.4$ Hz, 1H), 2.82 - 2.79 (m, 2H), 2.77 - 2.72 (m, 1H), 2.69 - 2.64 (m, 1H), 2.60 - 2.54 (m, 1H), 2.10 (s, 5H), 1.98 (dd, $J = 8.7, 3.5$ Hz, 3H), 1.89 (s, 4H), 1.77 - 1.63 (m, 5H), 1.50 - 1.37 (m, 4H), 1.19 - 1.10 (m, 12H). ^{31}P NMR (162 MHz, $DMSO-d_6$): δ 147.90, 147.30.

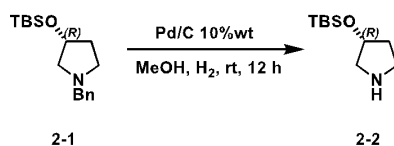
实施例 2 化合物 I-1-7 的制备

2.1 中间体 2-1 的制备



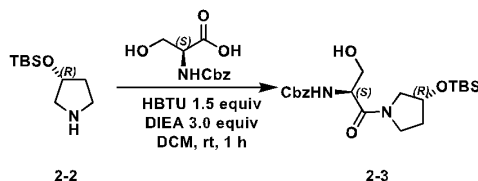
将化合物(R)-(+)-N-苄基-3-羟基吡咯烷 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) (16.9 mmol, 3.0 g) 和咪唑 (3.0 equiv, 50.7 mmol, 3.45 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 乙腈, 室温下缓慢加入叔丁基二甲基氯硅烷 (1.3 equiv, 21.9 mmol, 3.31 g), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后向反应液中加入 100 mL 乙酸乙酯, 并用 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 100 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 - 5/1), 得到无色油状物化合物 2-1 (4.9 g, 16.8 mmol, 99% 收率)。化合物 2-1 分子式: $C_{17}H_{29}ONSi$, 分子量: 291.2, LC-MS 实测: 292.4 (M+H).

2.2 中间体 2-2 的制备



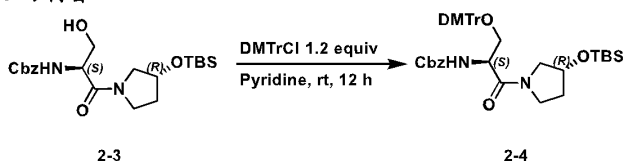
将化合物 2-1 (16.8 mmol, 4.9 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 甲醇, 室温氢气下加入钯碳 (湿基, 10% Pd/C) (10%wt, 490.0 mg), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后过滤除去钯碳, 滤液浓缩, 得到粗产品白色固体化合物 2-2 (3.31 g, 16.5 mmol, 98%收率), 未纯化直接投入下一步反应。化合物 2-2 分子式: $C_{10}H_{23}ONSi$, 分子量: 201.1, LC-MS 实测: 202.3 (M+H).

2.3 中间体 2-3 的制备



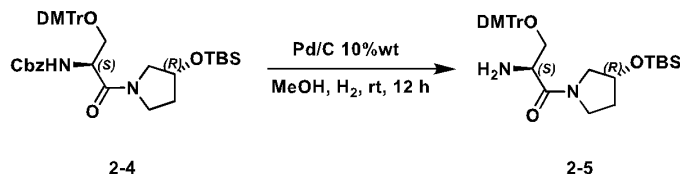
将化合物 N-苄氧羰基-L-丝氨酸 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) (15.0 mmol, 3.58 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷, 室温下加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.5 equiv, 22.5 mmol, 8.53 g)、化合物 2-2 (1.1 equiv, 16.5 mmol, 3.31 g) 和 N,N-二异丙基乙胺 (3.0 equiv, 45.0 mmol, 5.78 g), 随后室温搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 二氯甲烷, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 10/1 - 1/3), 得到白色固体化合物 2-3 (4.5 g, 10.65 mmol, 63%两步收率)。化合物 2-3 分子式: $C_{21}H_{34}O_5N_2Si$, 分子量: 422.2, LC-MS 实测: 423.3 (M+H). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.35 – 7.29 (m, 5H), 5.96 (dd, J = 14.3, 8.3 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.61 – 4.40 (m, 2H), 3.85 – 3.68 (m, 2H), 3.65 – 3.49 (m, 2H), 3.41 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 3.31 (s, 1H), 1.95 (qdd, J = 15.0, 11.8, 5.3 Hz, 2H), 1.77 (s, 1H), 0.86 (s, 9H), 0.06 (d, J = 3.1 Hz, 6H).

2.4 中间体 2-4 的制备



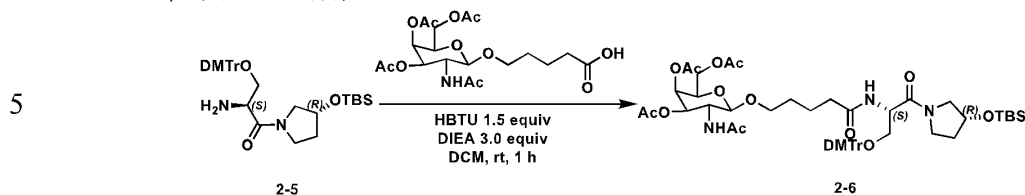
将化合物 2-3 (10.65 mmol, 4.5 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 吡啶, 室温下加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯 (1.2 equiv, 12.78 mmol, 4.32 g), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 乙酸乙酯, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 - 1/1), 得到淡黄色油状物化合物 2-4 (7.56 g, 10.43 mmol, 98%收率)。化合物 2-4 分子式: $C_{42}H_{52}O_7N_2Si$, 分子量: 724.3, LC-MS 实测: 747.4 (M+Na). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.35 – 7.31 (m, 1H), 7.28 (d, J = 4.7 Hz, 4H), 7.27 – 7.23 (m, 2H), 7.23 – 7.14 (m, 5H), 7.13 – 7.11 (m, 2H), 6.80 – 6.78 (m, 1H), 6.76 (dd, J = 7.7, 5.4 Hz, 4H), 5.72 (dd, J = 22.7, 8.3 Hz, 1H), 5.08 – 4.99 (m, 2H), 4.69 – 4.59 (m, 1H), 4.35 – 4.30 (m, 1H), 3.73 (dd, J = 4.5, 3.7 Hz, 6H), 3.65 – 3.44 (m, 2H), 3.36 – 3.20 (m, 3H), 1.86 – 1.81 (m, 1H), 1.70 (s, 1H), 0.80 (d, J = 13.1 Hz, 9H), -0.02 (dd, J = 14.9, 4.2 Hz, 6H).

2.5 中间体 2-5 的制备



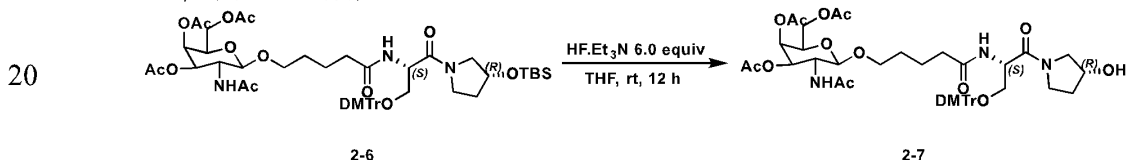
将化合物 2-4 (10.43 mmol, 7.56 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 甲醇, 室温氢气下加入钯碳 (湿基, 10% Pd/C) (10%wt, 750.0 mg), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后过滤除去钯碳, 滤液浓缩, 得到粗产品白色固体化合物 2-5 (6.0 g, 10.22 mmol, 98%收率), 未纯化直接投入下一步反应。化合物 2-5 分子式: $C_{34}H_{46}O_5N_2Si$, 分子量: 590.3, LC-MS 实测: 591.6 (M+H).

2.6 中间体 2-6 的制备



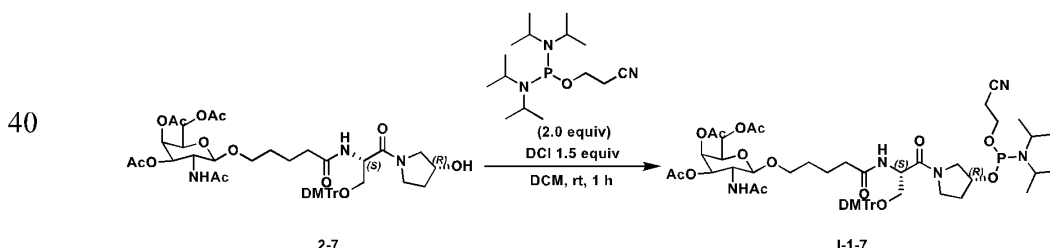
10 将化合物 5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰氨基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸 (市售, 购买于诺甘林生物医药科技(苏州)有限公司) (2.06 g, 4.62 mmol) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷, 室温下加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.5 equiv, 6.93 mmol, 2.63 g), 搅拌十分钟, 随后向反应体系中加入化合物 2-5 (1.1 equiv, 5.08 mmol, 3.0 g) 和 N,N-二异丙基乙胺 (3.0 equiv, 13.86 mmol, 17.91 g), 随后室温继续搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 二氯甲烷, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 50/1 - 10/1), 得到白色固体化合物 2-6 (3.58 g, 3.51 mmol, 76% 收率)。化合物 2-6 分子式: $C_{53}H_{73}O_{15}N_3Si$, 分子量: 1019.3, LC-MS 实测: 1018.3 (M-H)。

2.7 中间体 2-7 的制备



25 将化合物 2-6 (3.51 mmol, 3.58 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 吡啶, 室温下加入三乙胺氯化氢 (5.0 equiv, 17.55 mmol, 2.97 g), 随后室温继续搅拌 12 小时。反应后向反应液中加入 100 mL 乙酸乙酯, 并用 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 100 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 50/1 - 10/1), 得到淡黄色油状物化合物 2-7 (2.4 g, 2.65 mmol, 76% 收率)。化合物 2-7 分子式: $C_{47}H_{59}O_{15}N_3$, 分子量: 905.3, LC-MS 实测: 904.4 (M-H)。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.30 (dd, J = 4.2, 1.9 Hz, 1H), 7.29 - 7.25 (m, 5H), 7.19 - 7.15 (m, 4H), 6.85 - 6.81 (m, 4H), 5.40 - 5.34 (m, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.26 - 5.19 (m, 1H), 5.13 (ddd, J = 14.5, 10.9, 3.3 Hz, 1H), 4.85 - 4.78 (m, 1H), 4.75 - 4.71 (m, 1H), 4.68 - 4.61 (m, 1H), 4.50 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.18 - 4.11 (m, 2H), 4.06 - 3.97 (m, 1H), 3.90 (dt, J = 10.6, 6.8 Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.67 - 3.46 (m, 4H), 3.25 - 3.19 (m, 2H), 2.34 - 2.23 (m, 1H), 2.17 - 2.15 (m, 3H), 2.10 - 2.03 (m, 5H), 1.98 (dt, J = 12.9, 2.4 Hz, 4H), 1.76 - 1.61 (m, 4H), 1.37 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

2.8 化合物 I-1-7 的制备

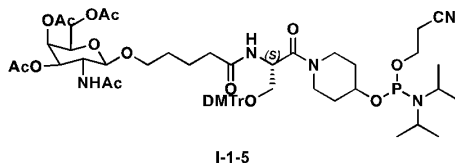


45 将化合物 2-7 (2.65 mmol, 2.4 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 无水二氯甲烷 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司)。室温氮气保护下加入化合物 2-氧乙基 N,N,N',N'-四异丙基亚磷酸二胺 (2.0 equiv, 5.3 mmol, 1.6 g) 和 4,5-二氧咪唑 (1.5 equiv, 3.97 mmol, 470.0 mg), 室温下继续搅拌一小时。反应后向反应液中加入 50 mL 二氯甲烷, 并用 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品经 C18 反相柱 (规格: 30 μ m; 100 $\text{\AA}$, 市售, 购买于上海博蕴生物科技有限公司) (MeCN:H₂O = 75%:25%) 制备得到白色固体 I-1-7 (2.03 g, 1.84 mmol, 70% 收率)。化合物 I-1-7 分子式: $C_{56}H_{76}O_{15}N_6P$, 分子量: 1105.5, LC-MS 实测: 1128.4 (M+Na)。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.12 - 8.06 (m, 1H), 7.78 (dd, J = 9.1, 2.0 Hz, 1H), 7.35 - 7.28 (m, 4H), 7.23 - 7.17 (m, 5H), 6.88 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 5.21 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.97 (dd, J = 11.2, 3.0 Hz, 1H), 4.86 - 4.75 (m, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.47 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.04 - 3.98 (m, 3H), 3.91 - 3.83 (m, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.70 - 3.60 (m, 3H), 3.58 - 3.47 (m, 3H), 3.39 (t, J = 11.7 Hz, 2H), 3.31 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 3.19 (qd, J = 8.7, 3.8 Hz, 1H), 3.02 (dt, J = 19.9, 6.8 Hz, 1H), 2.78 - 2.70 (m, 1H), 2.60 (td, J = 5.8, 1.8 Hz, 1H), 2.09 (s, 5H), 1.98 (s, 4H), 1.89 (s, 3H), 1.73 (s,

3H), 1.44 (s, 4H), 1.20 – 0.88 (m, 14H). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ 148.22 (s), 146.82 (t, J = 35.8 Hz).

实施例 3 化合物 I-1-5 的制备

5



I-1-5

10

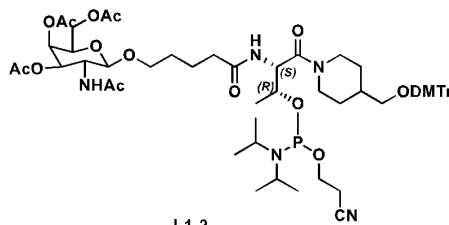
根据实施例 2 的合成方法, 由起始原料 N-苄基-4-羟基哌啶 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) 制备得到白色固体 I-1-5 (3.0 g, 2.68 mmol, 72% 收率)。化合物 I-1-5 分子式: $\text{C}_{57}\text{H}_{78}\text{O}_{15}\text{N}_6\text{P}$, 分子量: 1119.5, LC-MS 实测: 1142.4 (M+Na). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.14 – 8.08 (m, 1H), 7.80 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.29 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 7.5 Hz, 5H), 6.87 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 5.22 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 5.02 – 4.96 (m, 2H), 4.49 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.02 (tt, J = 7.9, 3.8 Hz, 4H), 3.88 (dd, J = 19.8, 8.9 Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.72 – 3.66 (m, 3H), 3.63 – 3.54 (m, 3H), 3.38 (dd, J = 11.9, 7.7 Hz, 3H), 3.32 – 3.31 (m, 1H), 3.19 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.06 (s, 1H), 2.77 – 2.74 (m, 2H), 2.14 – 2.07 (m, 5H), 1.98 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.75 (s, 4H), 1.46 (s, 6H), 1.27 – 1.05 (m, 13H). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ 148.24 (s), 145.47 (dd, J = 15.7, 11.5 Hz).

15

20

实施例 4 化合物 I-1-2 的制备

25



I-1-2

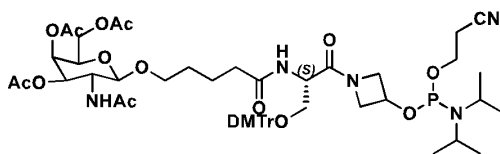
30

根据实施例 1 的合成方法, 由起始原料 L-苏氨酸 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) 制备得到白色固体 I-1-2 (1.2 g, 1.05 mmol, 56% 收率)。化合物 I-1-2 分子式: $\text{C}_{59}\text{H}_{82}\text{O}_{15}\text{N}_6\text{P}$, 分子量: 1147.5, LC-MS 实测: 1170.3 (M+Na). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.79 (dt, J = 12.8, 4.5 Hz, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 4H), 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 5H), 6.88 (d, J = 7.7 Hz, 4H), 5.21 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.97 (dd, J = 11.0, 3.3 Hz, 1H), 4.88 (dt, J = 11.6, 4.7 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 10.6, 5.5 Hz, 1H), 4.41 – 4.32 (m, 1H), 4.16 – 4.08 (m, 1H), 4.04 – 3.99 (m, 3H), 3.92 – 3.82 (m, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.70 – 3.63 (m, 2H), 3.30 – 3.24 (m, 5H), 2.90 (dd, J = 10.7, 5.2 Hz, 1H), 2.82 (dt, J = 9.3, 5.6 Hz, 2H), 2.76 – 2.66 (m, 1H), 2.34 – 2.32 (m, 1H), 2.20 – 2.14 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.01 – 1.96 (m, 4H), 1.89 – 1.81 (m, 4H), 1.77 – 1.65 (m, 5H), 1.53 – 1.38 (m, 5H), 1.23 – 0.94 (m, 17H). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ 148.02.

35

实施例 5 化合物 I-1-9 的制备

40



45

I-1-9

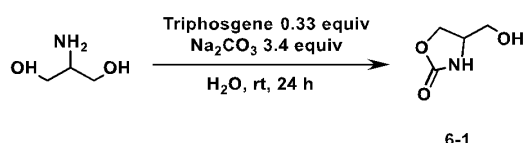
50

根据实施例 2 的合成方法, 由起始原料 1-苄氧羰基-3-羟基氮杂环丁烷 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) 制备得到白色固体 I-1-9 (3.02 g, 2.77 mmol, 83% 收率)。化合物 I-1-9 分子式: $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{O}_{15}\text{N}_6\text{P}$, 分子量: 1091.4, LC-MS 实测: 1114.3 (M+Na). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.09 – 8.02 (m, 1H), 7.78 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 4H), 7.24 – 7.19 (m, 5H), 6.89 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 5.21 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.97 (dd, J = 11.2, 3.1 Hz, 1H), 4.77 – 4.61 (m, 1H), 4.57 – 4.50 (m, 1H), 4.47 (dd, J = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 4.24 – 4.06 (m, 2H), 4.04 – 3.98 (m, 3H), 3.92 – 3.81 (m, 1H), 3.78 (dd, J = 6.7, 3.8 Hz, 1H), 3.69 (ddd, J = 9.9, 5.5, 2.7 Hz, 2H), 3.61 – 3.51 (m, 2H), 3.40 – 3.35 (m, 1H), 3.16 (q, J = 7.7 Hz, 1H), 3.04 – 2.98 (m, 1H), 2.80 – 2.74 (m, 2H), 2.21 – 2.06 (m, 5H), 1.98 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.74 (d, J = 2.5 Hz, 3H), 1.51 – 1.37 (m, 4H), 1.18 – 1.10 (m, 12H), 1.06 (d, J = 6.7 Hz, 2H). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ 146.95 (dd, J = 65.4, 20.5 Hz).

55

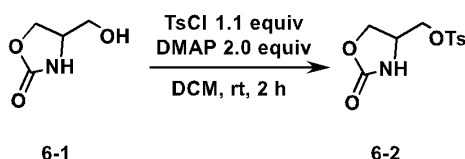
实施例 6 化合物 I-1-8 的制备

6.1 中间体 6-1 的制备



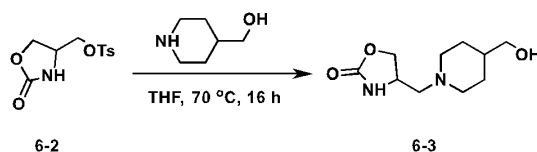
将化合物丝氨酸 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司阿达玛斯) (54.9 mmol, 5.0 g) 置于洁净反应瓶中, 加入 90 mL 水溶解, 室温下加入碳酸钠 (3.4 equiv, 183.8 mmol, 19.5 g), 冰水浴下, 缓慢分批加入三光气 (0.33 equiv, 18.3 mmol, 5.4 g), 随后室温继续搅拌 24 小时。减压浓缩除去溶剂, 加乙醇搅拌 2 h, 抽滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 100/1 - 9/1), 得到白色固体化合物 6-1 (4.6 g, 39.3 mmol, 72% 收率)。化合物 6-1 分子式: $C_4H_7NO_3$, 分子量: 117.1, LC-MS 实测: 118.4 (M+H). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.58 (s, 1H), 4.31 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 8.5, 5.0 Hz, 1H), 3.78 - 3.72 (m, 1H), 3.36 (d, J = 5.0 Hz, 2H).

6.2 中间体 6-2 的制备



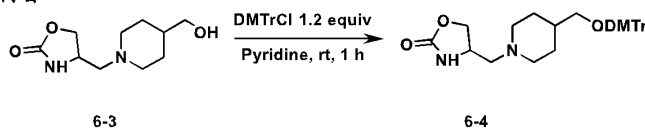
将化合物 6-1 (47.0 mmol, 5.5 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 300 mL 二氯甲烷, 加入 DMAP (2.0 equiv, 93.9 mmol, 11.5 g), 冰水浴下, 缓慢分批加入 TsCl (1.1 equiv, 51.7 mmol, 9.8 g), 随后室温继续搅拌 2 小时。反应后反应液依次用 100 mL 1M HCl、100 mL 水和 100 mL 饱和盐水洗涤, 干燥, 旋干得白色粉末 6-2 (12.3 g, 45.3 mmol, 97% 收率), 粗产品未经纯化直接投入下一步反应。化合物 6-2 分子式: $C_{11}H_{13}NO_5S$, 分子量: 271.1, LC-MS 实测: 272.4 (M+H).

6.3 中间体 6-3 的制备



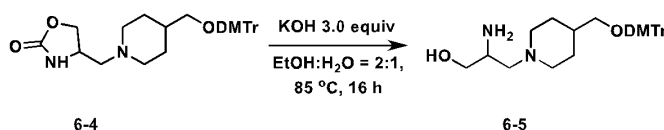
将化合物 6-2 (45.5 mmol, 12.3 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 四氢呋喃溶解, 加入 4-哌啶甲醇 (3.0 equiv, 136.6 mmol, 15.7 g), 加热到回流反应 16 h。反应液浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 100/1 - 9/1), 得到无色糖浆状化合物 6-3 (7.9 g, 36.8 mmol, 81% 收率)。化合物 6-3 分子式: $C_{10}H_{18}N_2O_3$, 分子量: 214.1, LC-MS 实测: 215.3 (M+H). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.61 (s, 1H), 4.38 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 4.33 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 3.97 (dd, J = 8.3, 5.5 Hz, 1H), 3.94 - 3.87 (m, 1H), 3.22 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.82 (t, J = 10.5 Hz, 2H), 2.37 - 2.28 (m, 2H), 1.97 - 1.86 (m, 2H), 1.59 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 1.34 - 1.23 (m, 1H), 1.10 (pd, J = 12.3, 3.9 Hz, 2H).

6.4 中间体 6-4 的制备



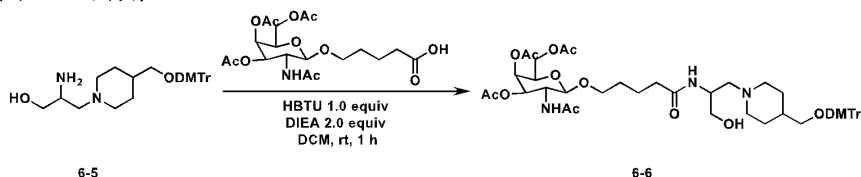
将化合物 6-3 (23.3 mmol, 5.0 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 50 mL 吡啶, 室温下加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯 (1.2 equiv, 28.0 mmol, 9.5 g), 随后室温继续搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 乙酸乙酯, 分别用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 100/0 - 100/3), 得到类白色泡沫状固体化合物 6-4 (8.2 g, 15.9 mmol, 68% 收率)。化合物 6-4 分子式: $C_{31}H_{36}N_2O_5$, 分子量: 516.2, LC-MS 实测: 515.3 (M-H). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.61 (s, 1H), 7.38 - 7.35 (m, 2H), 7.30 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.24 - 7.21 (m, 5H), 6.88 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 4.32 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 8.2, 5.4 Hz, 1H), 3.89 (dt, J = 13.2, 6.8 Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 2.80 (t, J = 9.2 Hz, 4H), 2.37 - 2.27 (m, 2H), 1.94 (dd, J = 26.3, 11.7 Hz, 2H), 1.63 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 1.56 - 1.50 (m, 1H), 1.23 - 1.08 (m, 2H).

6.5 中间体 6-5 的制备



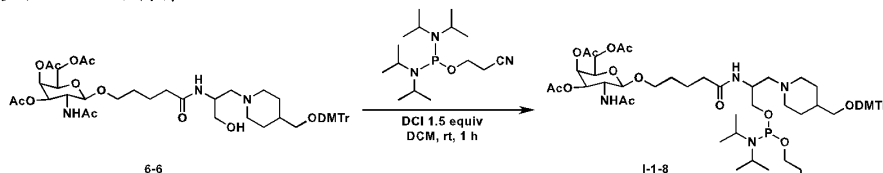
- 5 将化合物 6-4 (15.9 mmol, 8.2 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 82 mL 乙醇溶解, 室温下加入氢氧化钾 (3.0 equiv, 47.6 mmol, 2.7 g) 的 41 mL 水溶液, 升温到 85°C 反应过夜。浓缩除去溶剂, 向反应液中加入 100 mL 乙酸乙酯, 并用 60 mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 水相加 50 mL 乙酸乙酯反萃, 合并有机相, 干燥, 过滤并浓缩, 得白色泡沫状固体 6-5 (7.6 g, 15.5 mmol, 98% 收率), 粗产品未经纯化直接投入下一步反应。化合物 6-5 分子式: $C_{30}H_{38}N_2O_4$, 分子量: 490.2, LC-MS 实测: 491.3 (M+H).

6.6 中间体 6-6 的制备



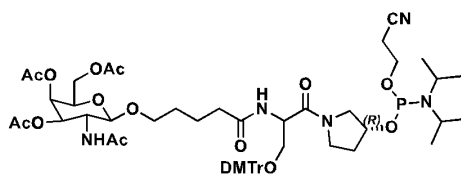
- 10 将化合物 5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰氨基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊酸 (市售, 购买于诺甘林生物医药科技(苏州)有限公司) (6.9 g, 15.5 mmol) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 80 mL 二氯甲烷, 室温下加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (1.0 equiv, 15.5 mmol, 5.9 g), 搅拌十分钟, 随后向反应体系中加入化合物 6-5 (1.0 equiv, 15.5 mmol, 7.6 g) 和 N,N-二异丙基乙胺 (2.0 equiv, 31.0 mmol, 4.0 g), 随后室温继续搅拌 1 小时。反应后向反应液中加入 150 mL 二氯甲烷, 并用 150 mL 饱和碳酸氢钠溶液和 150 mL 饱和食盐水洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩,
- 15 所得粗产品硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷/甲醇 = 100/1 - 10/1), 得到白色泡沫状固体化合物 6-6 (7.7 g, 8.4 mmol, 54% 收率)。化合物 6-6 分子式: $C_{49}H_{65}N_3O_{14}$, 分子量: 919.4, LC-MS 实测: 918.3 (M-H). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.81 (dd, $J = 9.2, 3.1$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.30 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.24 - 7.21 (m, 5H), 6.88 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 5.21 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.97 (dd, $J = 11.2, 3.0$ Hz, 1H), 4.48 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 1H), 4.04 - 3.98 (m, 3H), 3.87 (dd, $J = 19.9, 9.3$ Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 3.71 - 3.67 (m, 1H), 3.43 - 3.35 (m, 2H), 2.84 (dd, $J = 17.8, 8.8$ Hz, 4H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.98 (d, $J = 1.4$ Hz, 4H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.65 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H), 1.53 - 1.41 (m, 5H), 1.26 - 1.23 (m, 1H), 1.14 (dt, $J = 22.4, 9.2$ Hz, 2H).

6.7 化合物 I-1-8 的制备



- 25 将化合物 6-6 (2.2 mmol, 2.0 g) 置于洁净干燥反应瓶中, 加入 20 mL 无水二氯甲烷。室温氮气保护下加入化合物 2-氧乙基 N,N,N',N'-四异丙基亚磷酸二胺 (2.0 equiv, 4.4 mmol, 1.3 g) 和 4,5-二氰咪唑 (1.5 equiv, 3.3 mmol, 0.38 g), 室温下继续搅拌一小时。反应后向反应液中加入 20 mL 二氯甲烷, 并用 50 mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 干燥有机相, 过滤并浓缩, 所得粗产品经 C18 反相柱 (规格: 30 μ m; 100 $\text{\AA}$, 市售, 购买于上海博蕴生物科技有限公司) ($MeCN:H_2O = 75\%:25\%$) 制备得到白色固体 I-1-8 (1.1 g, 1.0 mmol, 45% 收率)。化合物 I-1-8 分子式: $C_{58}H_{82}O_{15}N_5P$, 分子量: 1119.5, LC-MS 实测: 1118.4 (M-H). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.83 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.31 (dd, $J = 9.2, 6.0$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.6$ Hz, 5H), 6.88 (dd, $J = 8.8, 1.5$ Hz, 4H), 5.21 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.97 (dd, $J = 11.3, 3.3$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.06 - 3.96 (m, 4H), 3.87 (dd, $J = 20.0, 9.0$ Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.72 - 3.69 (m, 2H), 3.59 - 3.52 (m, 1H), 2.81 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 2.73 (dt, $J = 9.7, 6.0$ Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.07 - 2.03 (m, 2H), 1.99 - 1.98 (m, 4H), 1.88 (d, $J = 5.1$ Hz, 4H), 1.77 (s, 3H), 1.69 - 1.59 (m, 2H), 1.48 - 1.40 (m, 5H), 1.23 - 1.11 (m, 12H). ^{31}P NMR (162 MHz, $DMSO-d_6$): δ 146.45.

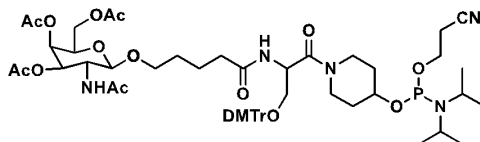
实施例 7 化合物 I-1-13 的制备



I-1-13

根据实施例 2 的合成方法, 由起始原料 N-苄氧羰基-DL-丝氨酸 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) 制备得到白色固体 I-1-13 (2.32 g, 2.1 mmol, 81% 收率)。化合物 I-1-13 分子式: $C_{56}H_{76}O_{15}N_6P$, 分子量: 1105.5, LC-MS 实测: 1128.6 (M+Na). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.09 – 8.03 (m, 1H), 7.75 (dd, J = 9.1, 2.0 Hz, 1H), 7.32 – 7.25 (m, 4H), 7.17 (ddd, J = 13.7, 8.2, 2.3 Hz, 5H), 6.85 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 5.18 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.94 (dd, J = 11.2, 3.0 Hz, 1H), 4.83 – 4.72 (m, 1H), 4.49 – 4.43 (m, 2H), 4.01 – 3.95 (m, 3H), 3.88 – 3.80 (m, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.67 – 3.44 (m, 6H), 3.36 (t, J = 11.7 Hz, 2H), 3.28 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 3.16 (qd, J = 8.7, 3.8 Hz, 1H), 2.99 (dt, J = 19.9, 6.8 Hz, 1H), 2.75 – 2.67 (m, 1H), 2.57 (td, J = 5.8, 1.8 Hz, 1H), 2.06 (s, 5H), 1.95 (s, 4H), 1.86 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.16 – 0.96 (m, 16H). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ 147.08, 146.82, 146.78, 146.64.

实施例 8 化合物 I-1-15 的制备



I-1-15

根据实施例 2 的合成方法, 由起始原料 N-苄基-4-羟基哌啶 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) 以及 N-苄氧羰基-DL-丝氨酸 (市售, 购买于上海泰坦科技股份有限公司) 制备得到白色固体 I-1-15 (2.1 g, 1.88 mmol, 78% 收率)。化合物 I-1-15 分子式: $C_{57}H_{78}O_{15}N_6P$, 分子量: 1119.5, LC-MS 实测: 1142.6 (M+Na). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.10 – 8.05 (m, 1H), 7.76 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.25 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 7.5 Hz, 5H), 6.84 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 5.18 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.98 – 4.92 (m, 2H), 4.45 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.01 – 3.95 (m, 4H), 3.84 (dd, J = 19.8, 8.9 Hz, 1H), 3.70 (s, 6H), 3.69 – 3.63 (m, 3H), 3.59 – 3.50 (m, 2H), 3.34 (dd, J = 11.9, 7.7 Hz, 2H), 3.28 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 3.16 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.73 – 2.70 (m, 2H), 2.11 – 2.03 (m, 5H), 1.95 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.72 (s, 4H), 1.43 (s, 6H), 1.12 – 1.09 (m, 15H). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ 145.56, 145.49, 145.46, 145.39.

实施例 9 siRNA 缀合物的制备

通过固相亚磷酸胺法, 利用上述步骤制备的特殊修饰化合物及商业购买的常规修饰的单体 (合成修饰核苷酸 dT、Am、Cm、Gm、Um、Af、Cf、Gf、Uf 的亚磷酸胺单体, 均购自上海兆维科技发展有限公司), 按照核苷酸排布顺序自 3' – 5' 方向逐一连接核苷单体。其中特殊修饰的防脱靶化合物置于反义链的种子区 (从 5' 端开始数第 4-8 位任一位置), 其中递送单体化合物按照普通单体自由设定放在 3' 端或者 5' 端, 每连接一个核苷单体都包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应。正义链和反义链采用的合成条件。

仪器设备型号: MerMade 12 Oligonucleotide synthesizer 固相合成仪, 北京海精 6 mL 合成柱, 思拓凡 SourceTM 15Q 4.6/100PE 纯化柱。

合成 siRNA 缀合物所使用的试剂购自苏州柯乐玛生物技术有限公司。

合成简介如下:

单链合成反应过程是从 3' – 5' 方向延伸, 在固相合成仪上完成。包括四个主要的反应步骤:

- 脱 DMTr 反应: 用二氯乙酸脱去核苷酸上的保护基团 DMTr 获得 5' – 羟基端;
- 偶联反应: 保护的核苷酸亚磷酸胺单体, 与活化剂乙硫基四氮唑混合, 亚磷酸胺基团被活化, 5' – 羟基仍然被 DMTr 保护, 与连接在固相载体上的 5' – 羟基发生缩合反应, 生成亚磷酸三酯;
- 氧化反应: 在氧化剂碘的作用下, 上步缩合反应所得的亚磷酸三酯转变为更稳定的磷酸酯。(即将三价磷氧化成五价磷);
- 硫化反应: 在硫代试剂 PADS (苯乙酰胺基二硫化物) 的作用下, 将上步缩合反应所得的亚磷酸三酯转变为硫代磷酸酯 (根据序列设计选择氧化或硫化)。
- 盖帽反应: 缩合反应中可能有极少数没有参加反应 5' – 羟基 (少于 2%), 用乙酸酐和 1-甲基咪唑与其反应, 形成不能参与后续反应的乙酸酯封端, 阻止其后续发生反应, 这种短片段可以在纯化时分离掉。

- 重复进行以上四步的循环，直至合成完所需的序列，其主要的化学反应方程式如下
- 待最后一个核苷单体连接完成后，依次对固相载体上连接的核酸序列进行切割、脱保护、纯化、脱盐，随后冻干获得正义链和反义链，其中：
- 切割和脱保护条件如下：先配置好氨解溶液(氨水：乙醇=3:1 的混合溶液至体积为 2 mL)，固相载体加入上述反应瓶中，充分震荡均匀。在恒温水浴内 50℃氨解 16 小时。氨解 16 小时后，水浴冷却至温 (25℃±2℃)，用砂芯漏斗过滤，圆底烧瓶收集滤液，并用 50%乙醇水溶液冲洗滤渣，收集滤液，旋转蒸发仪浓缩，再转移至玻璃瓶中，取粗品小样送分析部门检测粗品 LC-MS。检测方法如下：使用 Waters Acquity UPLC-LTQ LCMS (column: ACQUITY UPLC BEH C18) 检测上述正义链和反义链纯度并分析分子量。实测值与理论值相符，见表 1。
- 纯化和脱盐条件如下：利用离子交换色谱柱进行纯化并配合使用思拓凡 HiPrep™ 26/10 Desalting 凝胶柱脱盐，然后单链冻干。单链冻干后，需要取样测 LC-MS。
- 最后需要将获得的正义链和反义链退火成双链。
- 退火操作如下：将纯化后获得的正义链和反义链分别溶于注射用水中，配制 0.1mg/mL-40mg/mL 的溶液，用 Thermo Scientific Nanodrop Eight 标定等摩尔比混合，90℃加热 5 分钟，再缓慢自然降温，使它们通过氢键形成双链结构，取样送检测产品的 SEC 纯度，见表 2，将双链样品冻干。

表 1 递送分子缀合 siRNA 编号和序列信息

缀合物编号	单链碱基序列信息		单链理论分子量	单链实测分子量
SD003317	正义链碱基序列(5'→3')	AmsAmsGfCmAfAmGfAmUfAfUfUmUfUmUmAfUmAfAmUmAmL96	8682.3	8681.5
	反义链碱基序列(5'→3')	UmsAfsUfUmAfUmAmAfAmAfAmUmAmUfCmUfUmGfCmUmUmsUmsUmdTdT	8100.2	8099.0
SD003974	正义链碱基序列(5'→3')	AmsAmsGfCmAfAmGfAmUfAfUfUmUfUmUmAfUmAfAmUmAm I-1-1 I-1-1 I-1-1	8595.9	8593.4
	反义链碱基序列(5'→3')	UmsAfsUfUmAfUmAmAfAmAfAmUmAmUfCmUfUmGfCmUmUmsUmsUmdTdT	8100.2	8099.0
SD004119	正义链碱基序列(5'→3')	AmsAmsGfCmAfAmGfAmUfAfUfUmUfUmUmAfUmAfAmUmAm I-1-7 I-1-7 I-1-7	8511.8	8510.9
	反义链碱基序列(5'→3')	UmsAfsUfUmAfUmAmAfAmAfAmUmAmUfCmUfUmGfCmUmUmsUmsUmdTdT	8100.2	8099.0
SD004122	正义链碱基序列(5'→3')	AmsAmsGfCmAfAmGfAmUfAfUfUmUfUmUmAfUmAfAmUmAm I-1-5 I-1-5 I-1-5	8553.8	8551.8
	反义链碱基序列(5'→3')	UmsAfsUfUmAfUmAmAfAmAfAmUmAmUfCmUfUmGfCmUmUmsUmsUmdTdT	8100.2	8099.0
SD004125	正义链碱基序列(5'→3')	AmsAmsGfCmAfAmGfAmUfAfUfUmUfUmUmAfUmAfAmUmAm I-1-13 I-1-13 I-1-13	8511.8	8510.3
	反义链碱基序列(5'→3')	UmsAfsUfUmAfUmAmAfAmAfAmUmAmUfCmUfUmGfCmUmUmsUmsUmdTdT	8100.2	8099.0

表 2 双链 SEC-HPLC 纯度

缀合物编号	双链 SEC-HPLC 纯度
SD003317	96%
SD003974	92%
SD004119	92%
SD004122	92%
SD004125	94%

- 实施例 10 小鼠体内测试 siRNA 缀合物的活性**
- 选择 6-8 周龄的 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠，小鼠的体重为 20±2 g。给药前对上述小鼠称重并观察状态，选取体重均一、状态无异常的动物进行随机分组，每组 4 只，其中实验组小鼠给予缀合物，溶媒组小鼠给予磷酸盐缓冲盐水 (PBS)，按照每只小鼠给予 1 mg/kg 缀合物的剂量进行皮下给药。给药后 20 天，动物安乐死，取肝组织，按照常规方法，将肝脏切块并置于 RNALater(Invitrogen, AM7021M) 中，用于后续 RNA 提取。将肝组织放入裂解液 (长春市志昂生物科技有限公司, MNTR/FX96) 中研磨 (上海净信实业发展有限公司, JXFSTPRP-48L) 提取总 RNA，反转录为 cDNA (Takara, 6210B)，

通过荧光法 qPCR (Vazyme, Q711) 检测靶基因补体 C5 mRNA 的表达水平。

目的基因引物:

正向引物: CCAGCCCAATCAAGTTCCTAGAG ;

反向引物: CGGCGTGTAACAGGTTTGTC;

5 内参基因 GAPDH 引物:

正向引物: TGCACCACCAACTGCTTAG ;

反向引物: GATGCAGGGATGATGTTC ;

10 结果以 siRNA 给药组相比于溶媒组 (溶媒组为 100%) 的剩余表达水平表示, 用于注射的缀合物的 siRNA 序列见表 1。如图 1 和表 3 所示, 与阳性缀合物 SD003317 相比, 缀合物 SD003974 表现出了相当的靶基因补体 C5 mRNA 沉默活性; 缀合物 SD004119、SD004122 和 SD004125 表现出了显著优于缀合物 SD003317 靶基因的补体 C5 mRNA 沉默活性。

表 3 受试缀合物给药 20 天后靶基因补体 C5 mRNA 相对剩余表达水平

15	缀合物编号	相对剩余百分比%
	溶媒	100.25
	SD003317	42.70
20	SD003974	42.55
	SD004119	28.95
	SD004122	27.33
25	SD004125	28.87

上文及表 1 中提到的序列, 各符号分别用于表示如下修饰的核苷酸

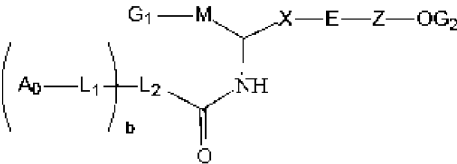
A = 腺苷-3'-磷酸酯; C = 胞苷-3'-磷酸酯; G = 鸟苷-3'-磷酸酯; U = 尿苷-3'-磷酸酯; dT = 胸腺嘧啶脱氧核苷酸; Am = 2'-O-甲基腺苷-3'-磷酸酯; Ams = 2'-O-甲基腺苷-3'-硫代磷酸酯; Cm = 2'-O-甲基胞苷-3'-磷酸酯; Cms = 2'-O-甲基胞苷-3'-硫代磷酸酯; Gm = 2'-O-甲基鸟苷-3'-磷酸酯; Gms = 2'-O-甲基鸟苷-3'-硫代磷酸酯; Um = 2'-O-甲基尿苷-3'-磷酸酯; Ums = 2'-O-甲基尿苷-3'-硫代磷酸酯; Af = 2'-氟腺苷-3'-磷酸酯; Afs = 2'-氟腺苷-3'-硫代磷酸酯; Cf = 2'-氟胞苷-3'-磷酸酯; Cfs = 2'-氟胞苷-3'-硫代磷酸酯; Gf = 2'-氟鸟苷-3'-磷酸酯; Gfs = 2'-氟鸟苷-3'-硫代磷酸酯; Uf = 2'-氟尿苷-3'-磷酸酯; Ufs = 2'-氟尿苷-3'-硫代磷酸酯

30

35 本文已公开了示例实施方式, 并且虽然采用特定术语, 但是它们仅以一般和描述性含义使用和说明, 并非出于限制的目的。在一些情况下, 如本领域技术人员自提交本申请起显而易见的是, 结合特定实施方式描述的特性、特征和/或元件可以单独地使用或与结合其他实施方式描述的特性、特征和/或元件的组合使用, 除非另有明确指示。因此, 本领域技术人员应理解, 可在不偏离权利要求书中阐述的本发明的精神和范围下作出形式和细节的各种变化。

权 利 要 求 书

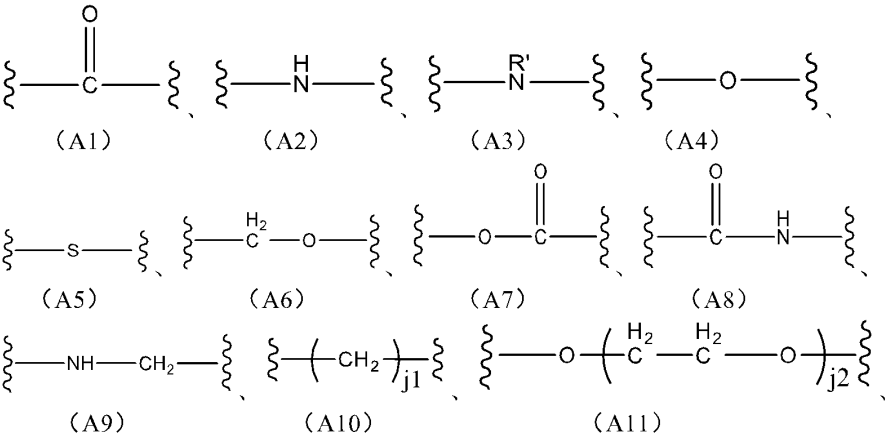
1. 一种化合物，该化合物具有式 (I) 所示的结构：



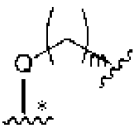
(I)

5 其中，
A₀代表对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体，或者代表所述配体中的羟基全部或部分地被KCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个K独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种；

10 b为1-4范围内的整数；
L₁和L₂彼此独立地代表选自式A1-A11基团中的一种或多种的连接组合：

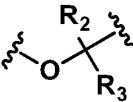


15 其中，j₁为1-20的整数；j₂为1-20的整数；R'为C₁-C₁₀的烷基；
20 M代表如式 (A12) 所示的结构式：



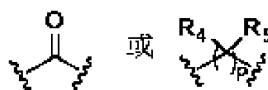
式 (A12)

其中，m代表0-6的整数；*表示与G₁相连的键，
Q代表式 (A13) 所示的结构式：



式 (A13)

25 其中，与O相连的~~~~表示与G₁相连的键；R₂、R₃相同或不同，且彼此独立地选自H、C₁-C₂₀烷基、C₁-C₂₀烷氧基、C₂-C₂₀烯基、C₂-C₂₀炔基；
Z不存在或代表C₁-C₁₀亚烷基；
30 X代表式 (A14-1) 或 (A14-2) 或所示的结构式：



(A14-1)

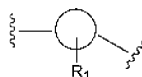


(A14-2)

其中 R_4 , R_5 相同或不同, 且彼此独立地选自 H、氟、羟基、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基; p 为 1-6 的整数; 任选地, R_4 和 R_5 直接相连形成三到六元饱和碳环;

5

E 代表如式 (A15) 所示的结构式:

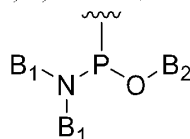


式 (A15)

其中,  代表 C_3 - C_{18} 环烷基或 C_3 - C_{18} 杂环基, 并且 R_1 选自 H、氟、羟基、氰基、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_1 - C_{20} 烷氧基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基;

10

G_1 和 G_2 各自代表具有式 (G-1) 所示结构的亚磷酸胺官能团或羟基保护基团, 前提是 G_1 和 G_2 中至少一个具有式 (G-1) 所示的结构, 所述羟基保护基团选自三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、4,4'-双甲氧基三苯甲基 (DMTr) 和 4,4',4'-三甲氧基苯甲基中的任意一种;



式 (G-1)

15

其中, B_1 选自取代或未取代的 C_1 - C_5 的烷基;

~~~~~ 表示基团共价键连接的位点。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中  $L_1$  或  $L_2$  彼此独立地选自 A1、A2、A4、A6、A7、A8、A9、A10、A11 中的一种或多种的连接组合;

20

所述配体各自独立地选自下述中的任意一种: D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃甘露糖、 $\beta$ -D-呋喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃甘露糖、 $\beta$ -D-吡喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖、 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃葡萄糖、 $\beta$ -D-呋喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃果糖、 $\alpha$ -D-吡喃果糖、 $\alpha$ -D-吡喃半乳糖、 $\beta$ -D-吡喃半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃半乳糖、 $\beta$ -D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基- $\alpha$ -神经氨酸、5-硫代- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代- $\beta$ -D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖;

30

$b$  为 1、2 或 3;

$m$  为 0、1 或 2;

$R_2$ 、 $R_3$  彼此独立地选自 H、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、 $C_2$ - $C_6$  炔基;

Z 不存在或代表  $C_1$ - $C_3$  亚烷基;

$R_4$ 、 $R_5$  彼此独立地选自 H、氟、羟基、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、 $C_2$ - $C_6$  炔基;

35

$p$  为 1、2 或 3;



代表  $C_4$ - $C_8$  环烷基或  $C_3$ - $C_8$  杂环基; 并且  $R_1$  选自 H、氟、羟基、氰基、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、 $C_2$ - $C_6$  炔基;

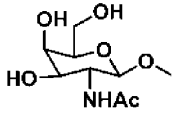
$B_1$  为甲基、乙基或异丙基;  $B_2$  选自  $C_1$ - $C_5$  的烷基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的一种。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $b$  为 1 或 3;



代表 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 杂环基；

A<sub>0</sub> 为如下所示的 N-乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 基团或其羟基全部或部分地被 KCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个 K 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种：



5

羟基保护基团为 4,4'-双甲氧基三苯甲基；

L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 的长度彼此独立地为 1-25 个原子，所述 L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 的长度是指最长直链上的成链原子的个数；

每个 j<sub>1</sub> 彼此独立地为 1-10 的整数，每个 j<sub>2</sub> 彼此独立地为 1-10 的整数。



10

4. 根据权利要求 3 所述的化合物，其中

L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 的长度彼此独立地为 1-20 个原子；

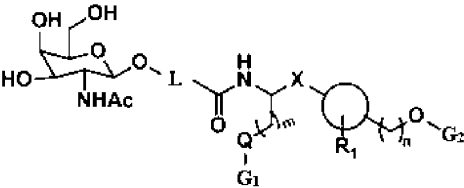
每个 j<sub>1</sub> 彼此独立地为 1-8 的整数，每个 j<sub>2</sub> 彼此独立地为 1-8 的整数。

5. 根据权利要求 2 所述的化合物，其中 L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 彼此独立地选自 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>4</sub>、A<sub>8</sub>、A<sub>9</sub>、A<sub>10</sub>、A<sub>11</sub> 中的至少 2 个的连接组合。

15

6. 根据权利要求 2 所述的化合物，其中 L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 彼此独立地选自 A<sub>1</sub>、A<sub>4</sub>、A<sub>8</sub>、A<sub>10</sub>、A<sub>11</sub> 中的至少 2 个的连接组合。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述化合物具有以下所示结构(I-1)：



(I-1)

20

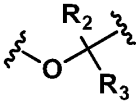
其中，

L 为 A<sub>10</sub>，其中 j<sub>1</sub> 为 2-8 的整数，或者为 A<sub>11</sub>，其中 j<sub>2</sub> 为 1-7 的整数；

m 为 0、1 或 2；

n 为 0、1、2 或 3；

Q 代表式 (A13) 所示的结构式：



25

式 (A13)

其中， 表示基团共价键连接的位点；R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 彼此独立地选自 H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基；

X 代表式 (A14-1) 或 (A14-2) 或所示的结构式：



30

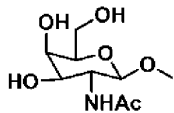
(A14-1) (A14-2)

其中 R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub> 彼此独立地选自 H、氟、羟基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基；p 为 1、2 或 3；任选地，R<sub>4</sub> 和 R<sub>5</sub> 直接相连形成三到六元饱和或破坏；



代表四到八元全碳或含氮饱和环，

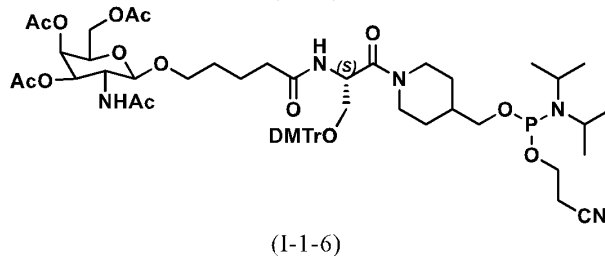
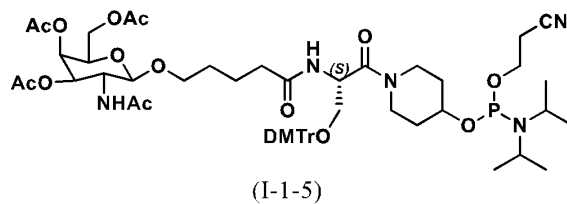
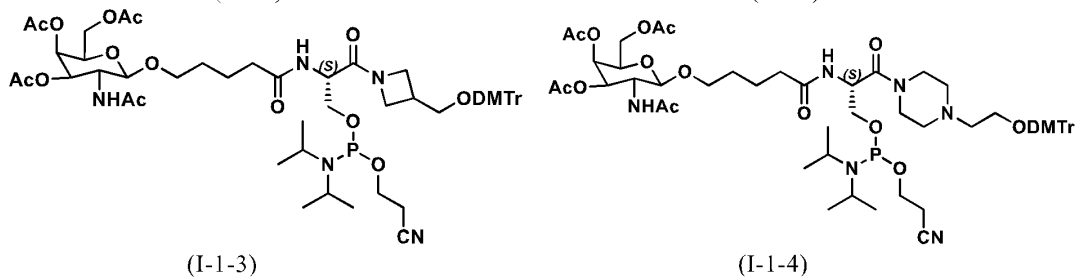
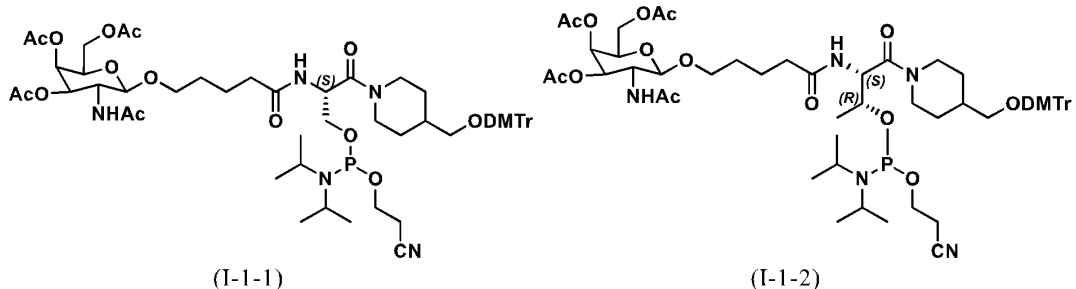
R<sub>1</sub> 选自 H、氟、羟基、氰基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基；

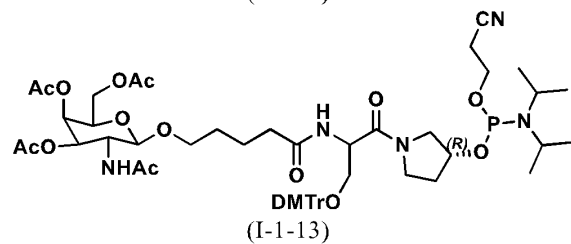
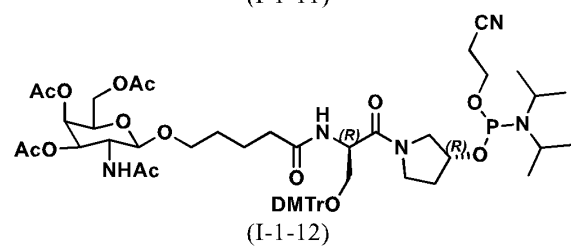
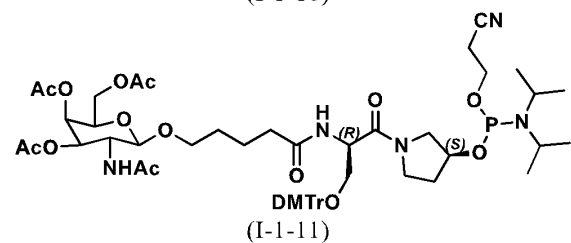
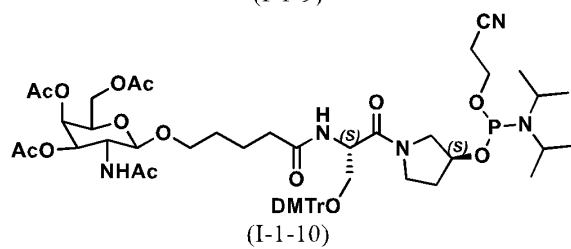
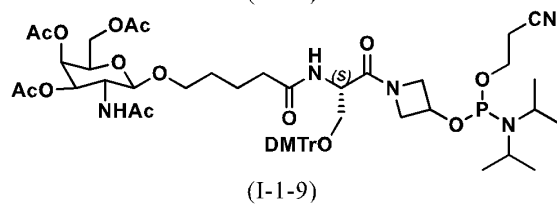
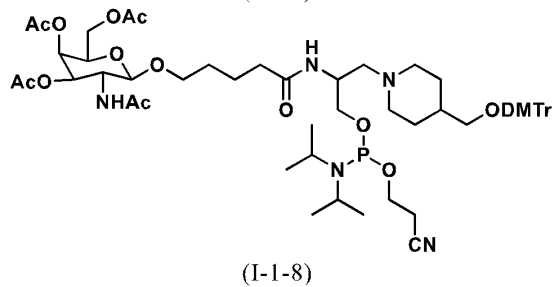
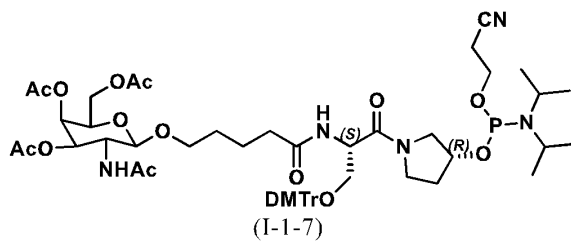


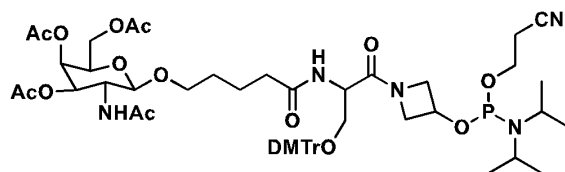
其中，中的羟基全部或部分地被 KCOO-基团取代，其中，每个 K 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中为含有一或两个氮原子的四、五或六元饱和和环烷基。

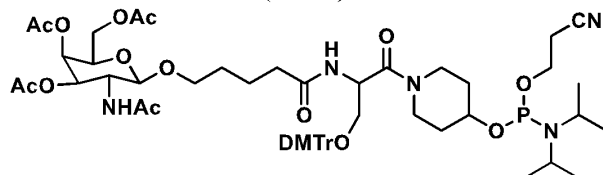
9. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述化合物具有以下所示结构中的任意一种：



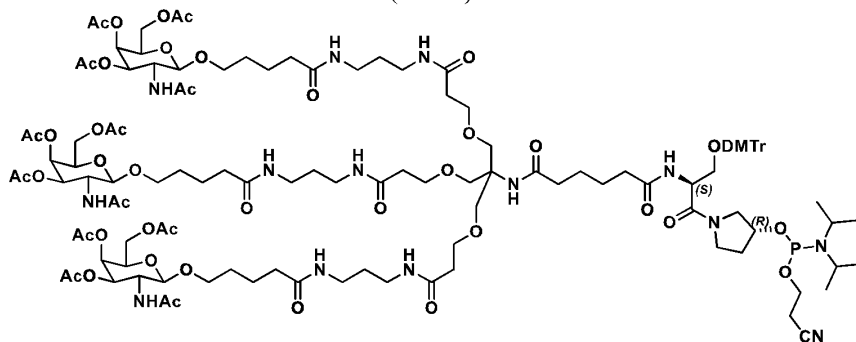




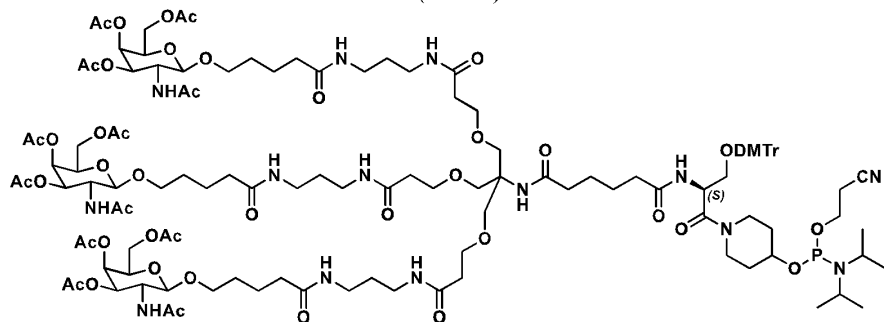
(I-1-14)



(I-1-15)

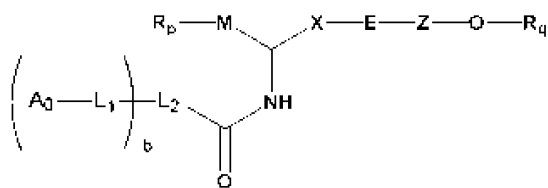


(I-1-16)



(I-1-17)

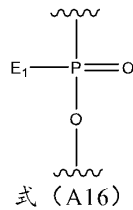
10. 一种核酸缀合物, 其中所述缀合物含有与寡核苷酸序列上的任意位置连接的一个或一个以上具有式 (II) 所示的结构:



(II)

其中,

15  $R_p$  和  $R_q$  各自为 H 或具有式 A16 所示的结构, 前提是  $R_p$  和  $R_q$  中至少一个具有式 A16 所示的结构;



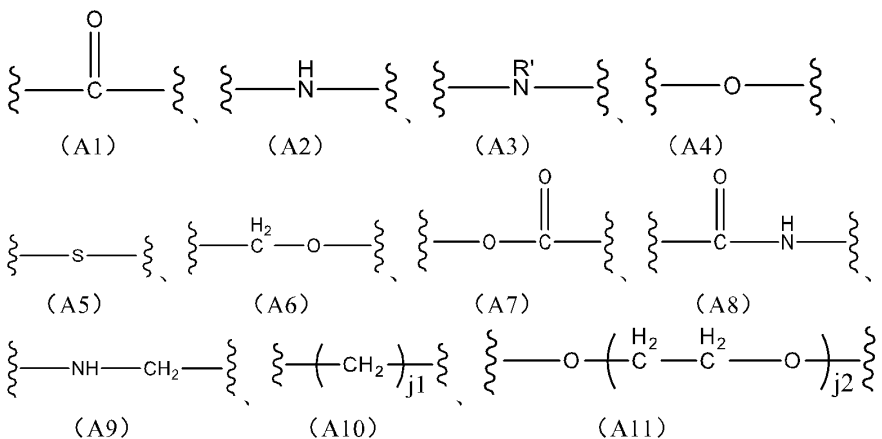
其中,  $\sim$  表示基团共价键连接的位点;

$E_1$  为 OH、SH 或  $BH_2$ ;

- 5  $A_0$  代表对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体或者代表所述配体中的羟基全部或部分地被  $KCOO$ -基团取代而形成的基团, 其中, 每个  $K$  独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种;

$b$  为 1-4 范围内的整数;

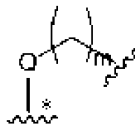
- 10  $L_1$  和  $L_2$  彼此独立地代表选自式 A1-A11 基团中的一种或多种的连接组合:



- 15

其中,  $j_1$  为 1-20 的整数;  $j_2$  为 1-20 的整数;  $R'$  为  $C_1$ - $C_{10}$  的烷基;

$M$  代表如式 (A12) 所示的结构式:

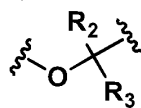


- 20

式 (A12)

其中,  $\sim$  表示基团共价键连接的位点;  $m$  代表 0-6 的整数;  $*$  表示与  $R_p$  相连的键,

$Q$  代表式 (A13) 所示的结构式:



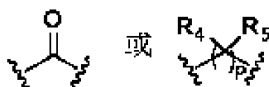
式 (A13)

- 25

其中,  $\sim$  表示基团共价键连接的位点, 与  $O$  相连的  $\sim$  表示与  $R_p$  相连的键;  $R_2$ 、 $R_3$  相同或不同, 且彼此独立地选自  $H$ 、 $C_1$ - $C_{20}$  烷基、 $C_1$ - $C_{20}$  烷氧基、 $C_2$ - $C_{20}$  烯基、 $C_2$ - $C_{20}$  炔基, 优选  $H$ 、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、 $C_2$ - $C_6$  炔基;

$Z$  不存在或代表  $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基;

$X$  代表式 (A14-1) 或 (A14-2) 或所示的结构式:

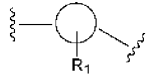


- 30

(A14-1) (A14-2)

其中  $R_4$ ,  $R_5$  相同或不同, 且彼此独立地选自 H、氟、羟基、 $C_1$ - $C_{20}$  烷基、 $C_1$ - $C_{20}$  烷氧基、 $C_2$ - $C_{20}$  烯基、 $C_2$ - $C_{20}$  炔基, 优选 H、氟、羟基、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、 $C_2$ - $C_6$  炔基;  $p$  为 1-6 的整数; 任选地,  $R_4$  和  $R_5$  直接相连形成三到六元饱和碳环;

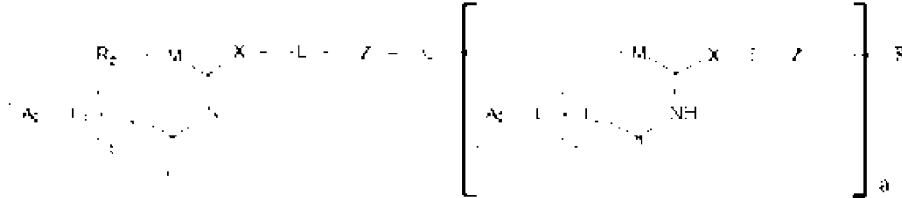
5 E 代表如式 (A15) 所示的结构式:



式 (A15)

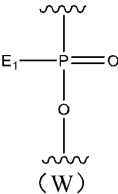
其中,  $\sim$  表示基团共价键连接的位点;  代表  $C_3$ - $C_{18}$  环烷基或  $C_3$ - $C_{18}$  杂环基, 并且  $R_1$  选自 H、氟、羟基、氟基、 $C_1$ - $C_{20}$  烷基、 $C_1$ - $C_{20}$  烷氧基、 $C_2$ - $C_{20}$  烯基、 $C_2$ - $C_{20}$  炔基。

10 11. 根据权利要求 10 所述的核酸缀合物, 其中所述缀合物含有与寡核苷酸序列上的任意位置连接的一个以上具有式 (II-A) 所示的结构:



(II-A)

其中,  
a 代表 0-7 的整数;  
W 的结构如下式所示:



其中,  $\sim$  表示基团共价键连接的位点;  $E_1$  为 OH、SH 或  $BH_2$ 。

20 12. 根据权利要求 11 所述的核酸缀合物, 其中 a 代表 0、1、2 或 3 的整数。

13. 根据权利要求 10 或 11 所述的核酸缀合物, 其中  $L_1$  或  $L_2$  彼此独立地选自 A1、A2、A4、A6、A7、A8、A9、A10、A11 中的一种或多种的连接组合;

所述配体各自独立地选自下述中的任意一种: D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃甘露糖、 $\beta$ -D-呋喃甘露糖、 $\alpha$ -D-吡喃甘露糖、 $\beta$ -D-吡喃甘露糖、 $\alpha$ -D-呋喃葡萄糖、 $\beta$ -D-呋喃葡萄糖、 $\alpha$ -D-呋喃果糖、 $\beta$ -D-呋喃果糖、 $\alpha$ -D-吡喃半乳糖、 $\beta$ -D-吡喃半乳糖、 $\alpha$ -D-呋喃半乳糖、 $\beta$ -D-呋喃半乳糖、葡萄糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基- $\alpha$ -神经氨酸、5-硫代- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代- $\beta$ -D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖脎、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖;

b 为 1、2 或 3;

m 为 0、1 或 2;

$R_2$ 、 $R_3$  彼此独立地选自 H、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烷氧基、 $C_2$ - $C_6$  烯基、 $C_2$ - $C_6$  炔基;

Z 不存在或代表  $C_1$ - $C_3$  亚烷基;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>彼此独立地选自 H、氟、羟基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>炔基；  
p 为 1、2 或 3；

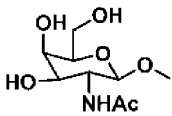
代表 C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>环烷基或 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环基；并且 R<sub>1</sub>选自 H、氟、羟基、氟基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>炔基；

5 B<sub>1</sub>为甲基、乙基或异丙基；B<sub>2</sub>选自 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>的烷基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的一种。

14. 根据权利要求 13 所述的核酸缀合物，其中 b 为 1 或 3；

代表 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>杂环基；

10 A<sub>0</sub>为如下所示的 N-乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 基团或其羟基全部或部分地被 KCOO-基团取代而形成的基团，其中，每个 K 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种：



羟基保护基团为 4,4'-双甲氧基三苯甲基；

15 L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 的长度彼此独立地为 1-25 个原子，所述 L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 的长度是指最长直链上的成链原子的个数；

每个 j<sub>1</sub> 彼此独立地为 1-10 的整数，每个 j<sub>2</sub> 彼此独立地为 1-10 的整数。

15. 根据权利要求 14 所述的核酸缀合物，其中 代表四到六元含氮饱和环烷基；

L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 的长度彼此独立地为 1-20 个原子；

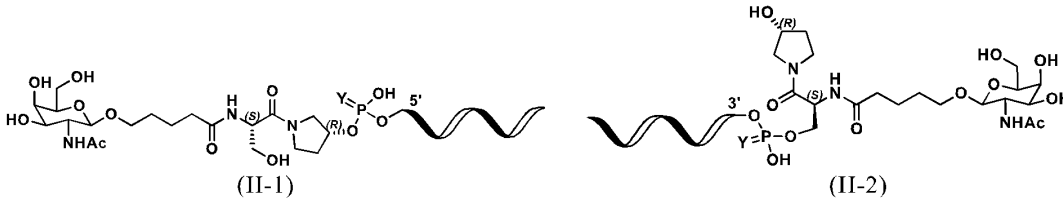
每个 j<sub>1</sub> 彼此独立地为 1-8 的整数，每个 j<sub>2</sub> 彼此独立地为 1-8 的整数。

20 16. 根据权利要求 10 或 11 所述的核酸缀合物，其中 L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 彼此独立地选自 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>4</sub>、A<sub>8</sub>、A<sub>9</sub>、A<sub>10</sub> 中的至少 2 个的连接组合。

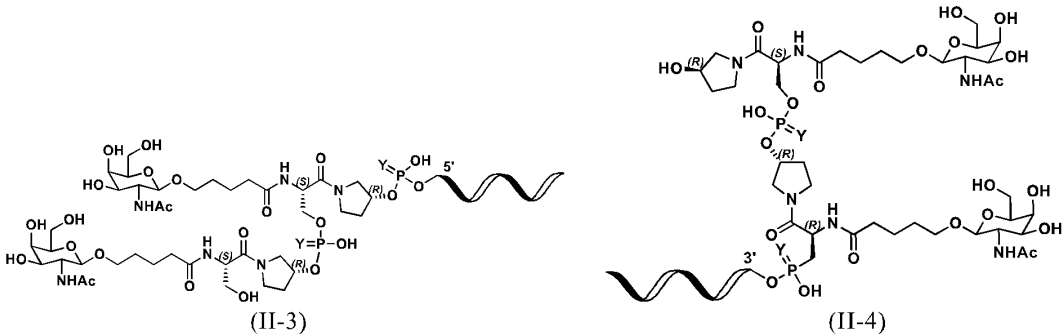
17. 根据权利要求 10 或 11 所述的核酸缀合物，其中 L<sub>1</sub> 或 L<sub>2</sub> 彼此独立地选自 A<sub>1</sub>、A<sub>4</sub>、A<sub>8</sub>、A<sub>10</sub> 中的至少 2 个的连接组合。

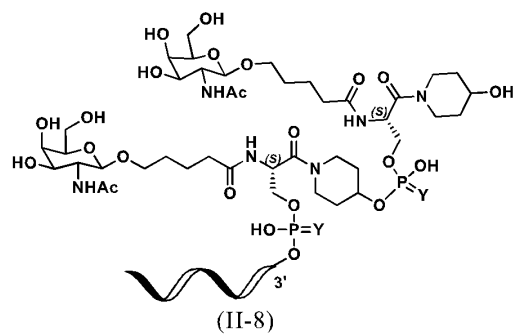
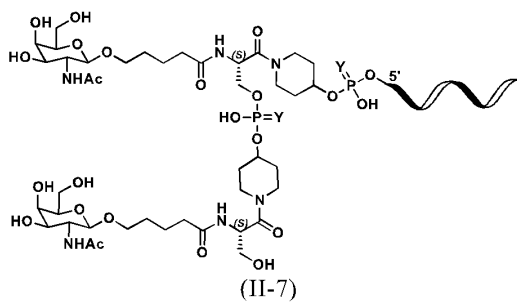
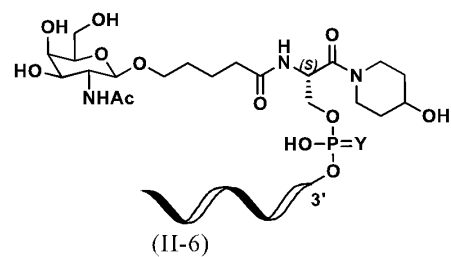
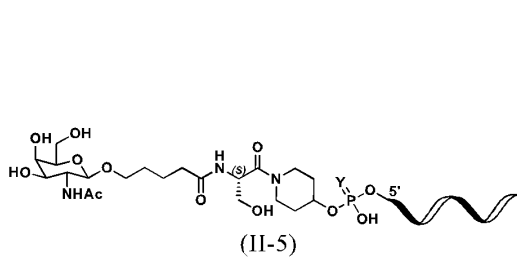
18. 根据权利要求 10 或 11 所述的核酸缀合物，其具有以下所示结构中的任意一种：

25

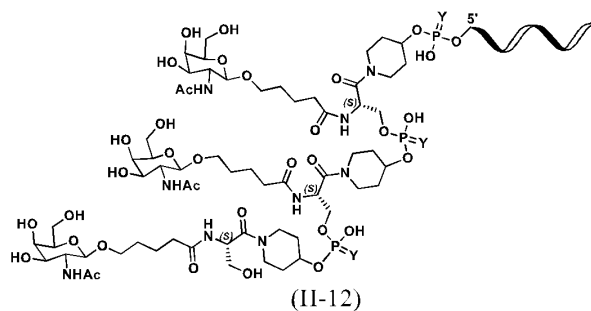
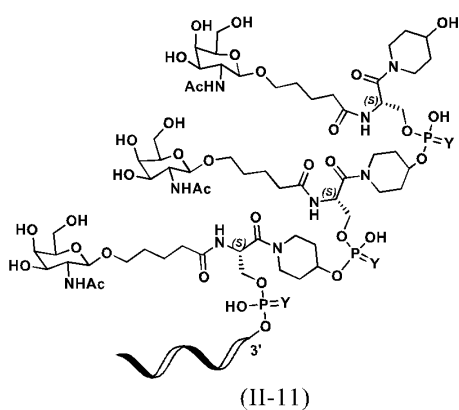
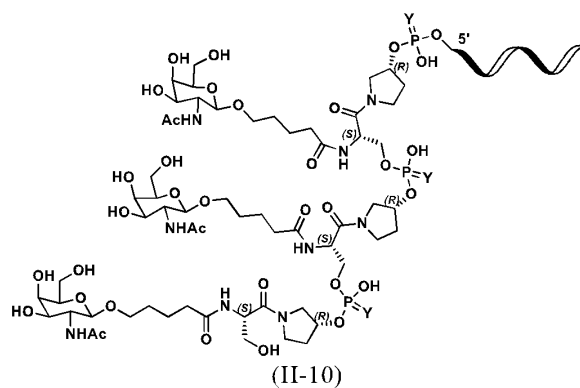
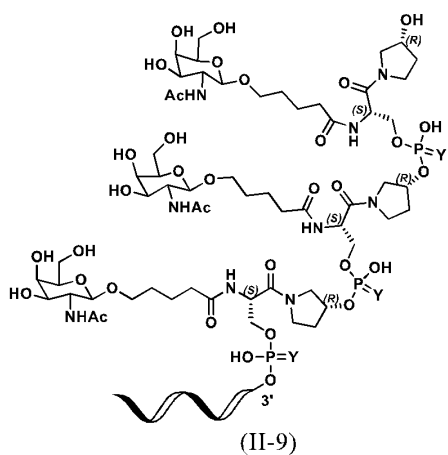


30

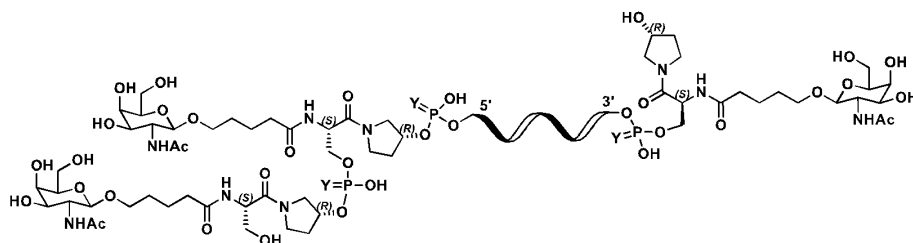
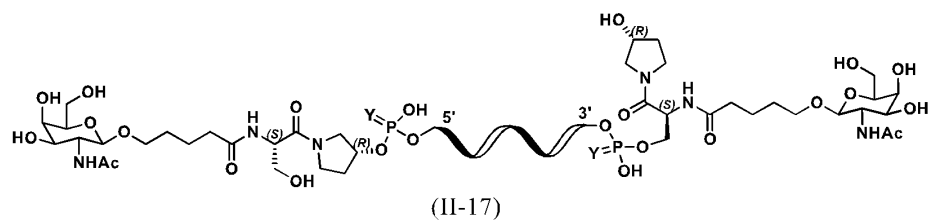
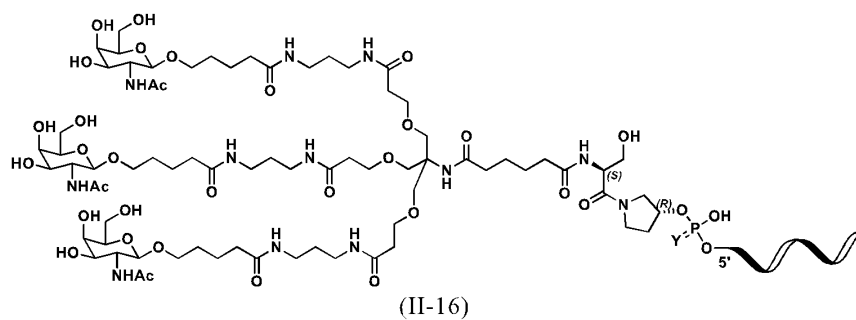
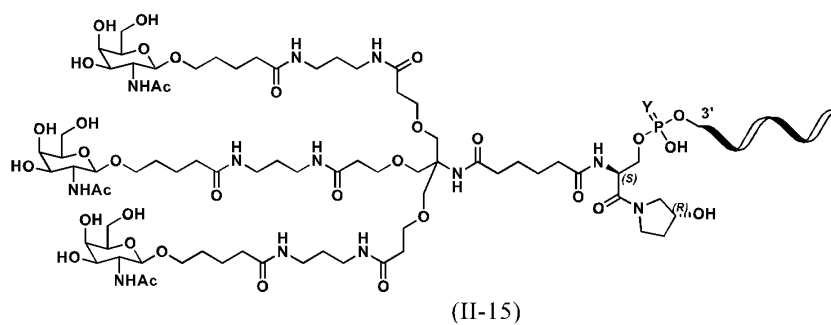
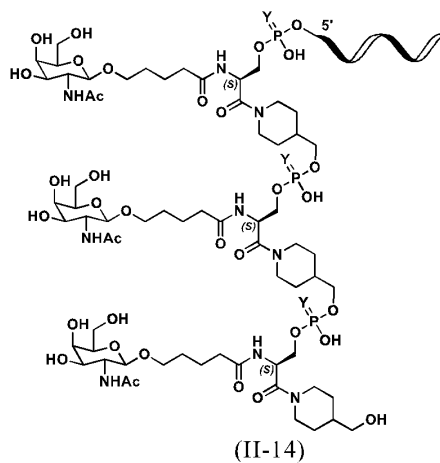
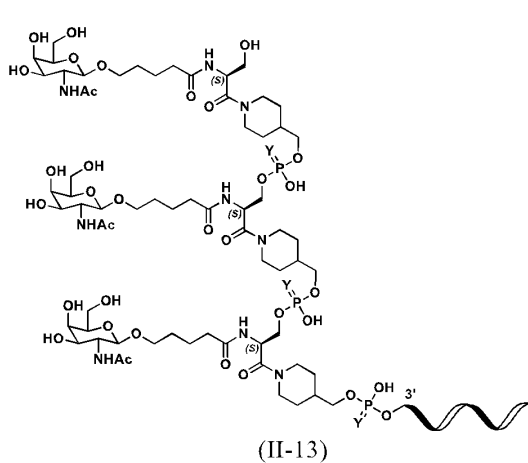




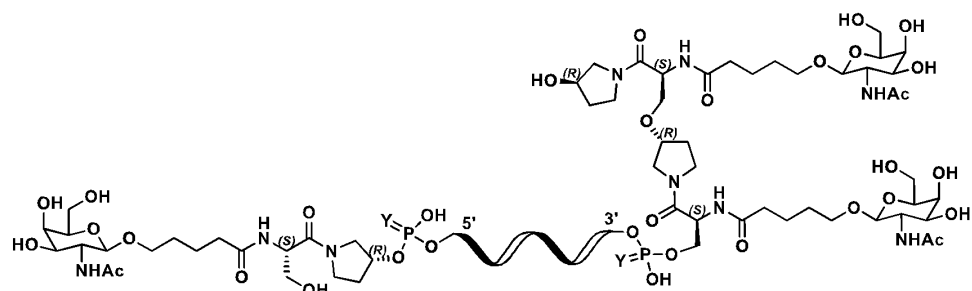
5



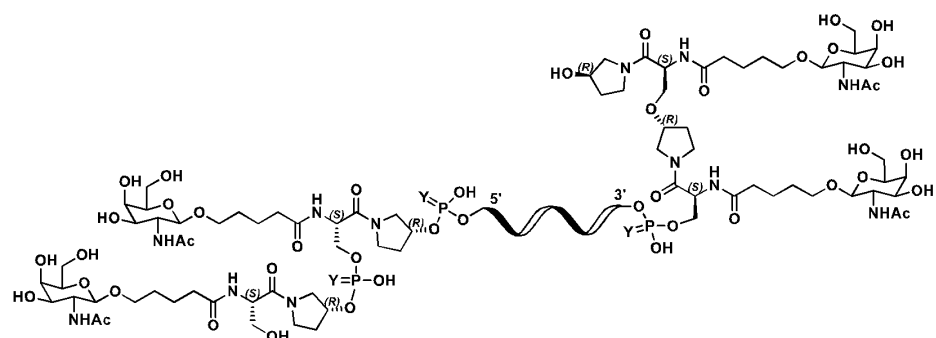
10



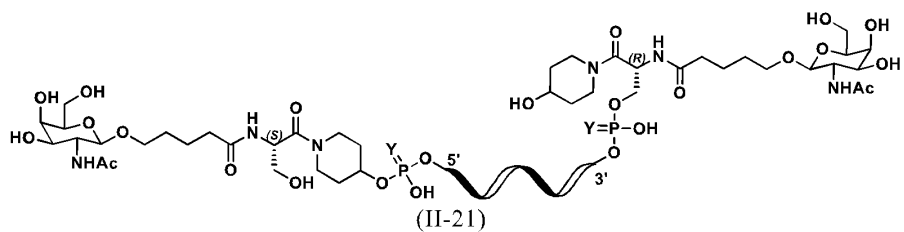
(II-18)



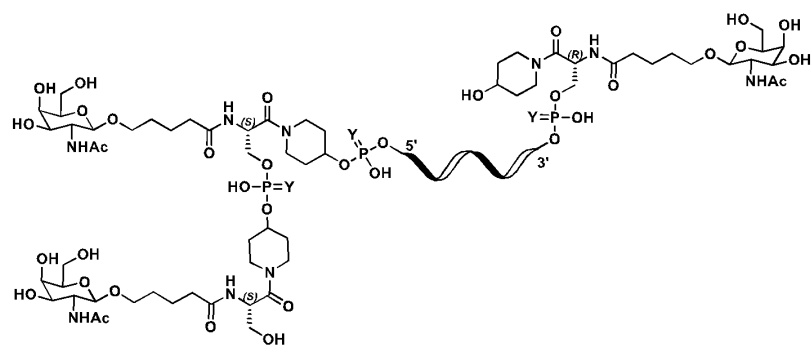
(II-19)



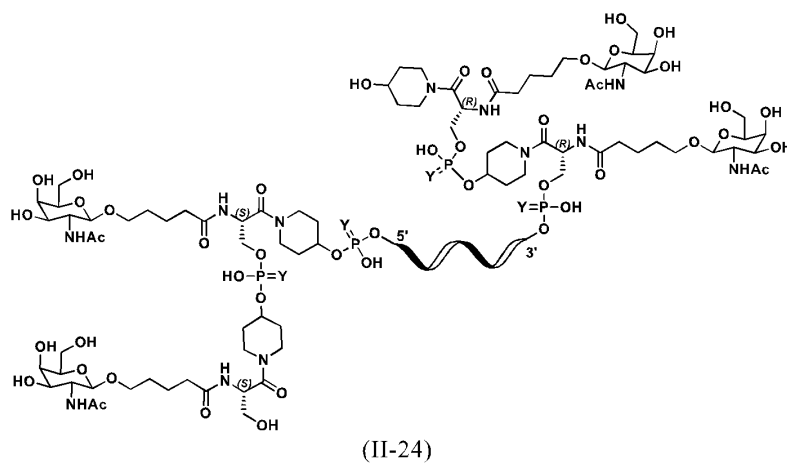
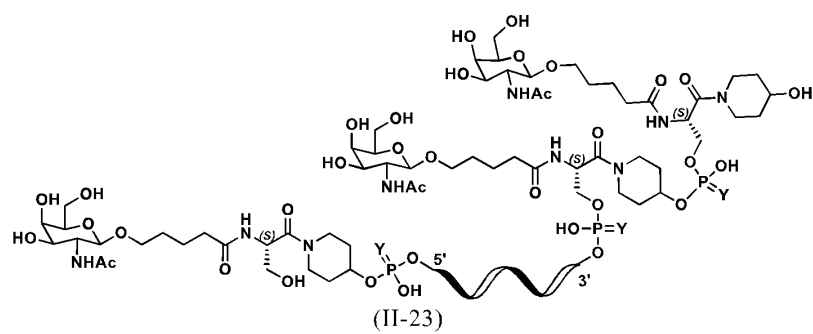
(II-20)



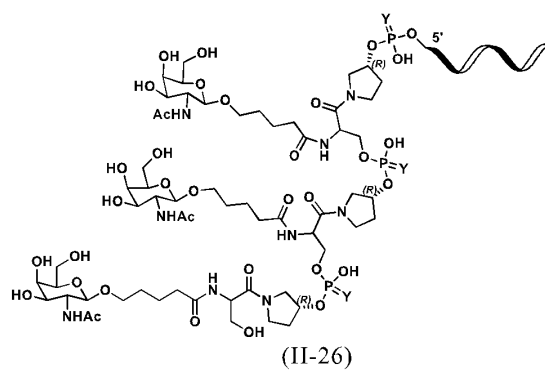
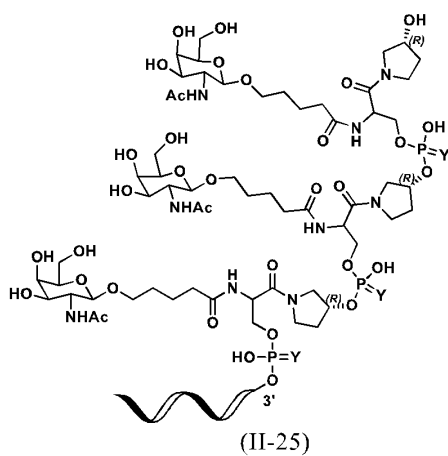
(II-21)

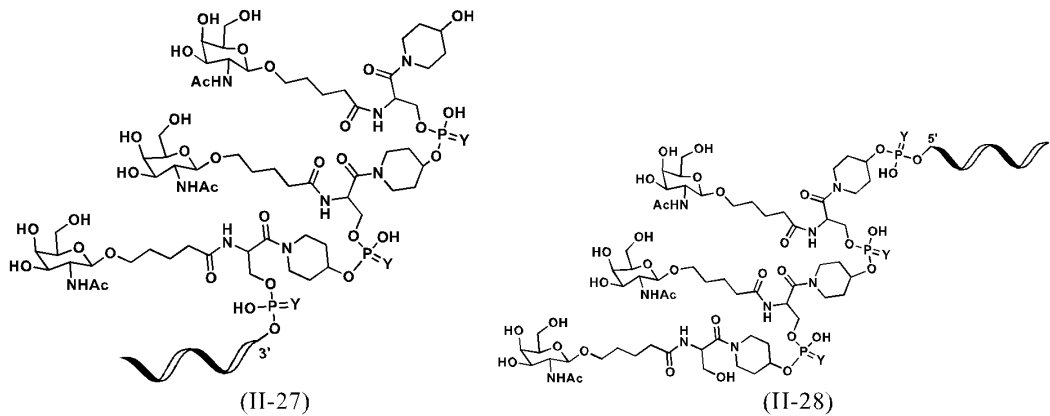


(II-22)



5



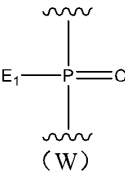


其中 Y 为 O 或者 S, 为寡核苷酸。

19. 根据权利要求 10 或 11 所述的核酸缀合物, 其中, 所述寡核苷酸选自小干扰 RNA、微小 RNA、抗微小 RNA、微小 RNA 拮抗剂、微小 RNA 模拟物、诱饵寡核苷酸、免疫刺激物、G-四极子、可变剪接体、单链 RNA、反义核酸、核酸适配体、茎环 RNA、mRNA 片段、激活 RNA 中的一种; 可选地, 所述寡核苷酸为单链寡核苷酸或者双链寡核苷酸; 可选地, 所述寡核苷酸为单链寡核苷酸, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述单链寡核苷酸的端部, 所述单链寡核苷酸的端部指所述单链寡核苷酸中从一端起算的前 4 个核苷酸; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述单链寡核苷酸的末端; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述单链寡核苷酸的 3' 末端; 可选地, 所述寡核苷酸为双链寡核苷酸, 所述双链寡核苷酸包含正义链和反义链, 所述式 (A16) 中的 P 原子连接到所述双链寡核苷酸的端部, 所述双链寡核苷酸的端部指所述正义链或所述反义链中从一端起算的前 4 个核苷酸; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述正义链或所述反义链的末端; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子连接到所述反义链的 5' 末端; 可选地, 式 (A16) 中的 P 原子通过形成磷酸二酯键连接至所述核酸缀合物中的核苷酸的 2' 位、3' 位或 5' 位。

20. 根据权利要求 19 所述的核酸缀合物, 其中, 所述双链寡核苷酸为 siRNA。

21. 权利要求 10-20 中任一项所述的核酸缀合物的制备方法, 包括将权利要求 1-9 所述的式 (I) 化合物中的亚磷酰胺官能团氧化为式 (W) 所示的结构, 然后与寡核苷酸结合, 再进行切割和脱去保护基团, 得到所述缀合物;



其中, 表示基团共价键连接的位点;

$E_1$  为 OH、SH 或  $BH_2$ 。

22. 权利要求 10-20 中任一项所述的核酸缀合物在制备用于治疗 and/或预防肝源性疾病的药物中的用途。
23. 一种治疗由肝细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的方法, 所述方法包括向患有该疾病的患者给予权利要求 10-20 中任一项所述的核酸缀合物。
24. 一种试剂盒, 该试剂盒包含权利要求 10-20 中任一项所述的核酸缀合物。