



(10) 授权公告号 CN 112074290 B

(45) 授权公告日 2024.09.10

(21) 申请号 201980028704.0

(22) 申请日 2019.04.26

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112074290 A

(43) 申请公布日 2020.12.11

(30) 优先权数据  
62/663763 2018.04.27 US  
62/790372 2019.01.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.10.27

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/029393 2019.04.26

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/210200 EN 2019.10.31

(73) 专利权人 箭头药业股份有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李珍 J·卡尔森 A·尼古拉斯  
X·李 D·舒 M·富勒-沃特斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001  
专利代理人 初明明 黄希贵

(51) Int.Cl.  
A61K 38/17 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 102026671 A, 2011.04.20  
CN 1284944 A, 2001.02.21

审查员 李小晶

权利要求书12页 说明书133页  
序列表2页

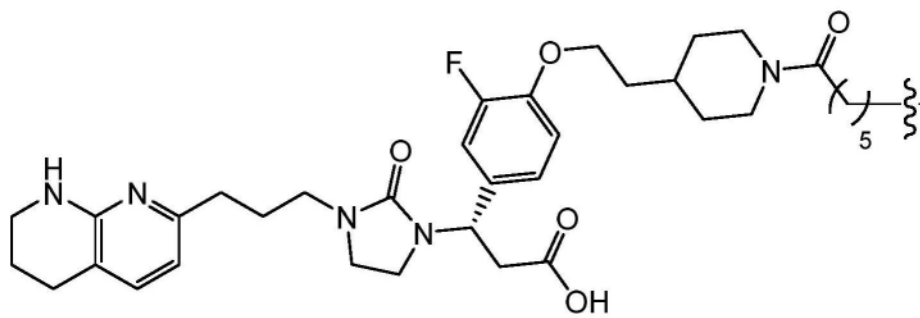
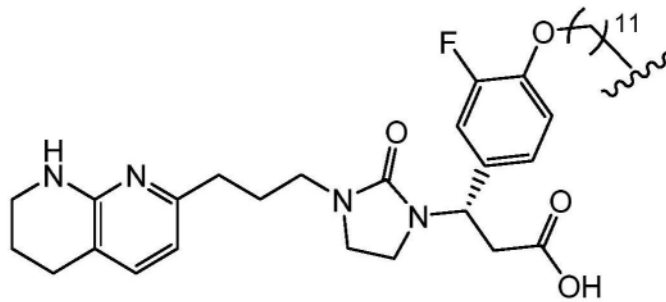
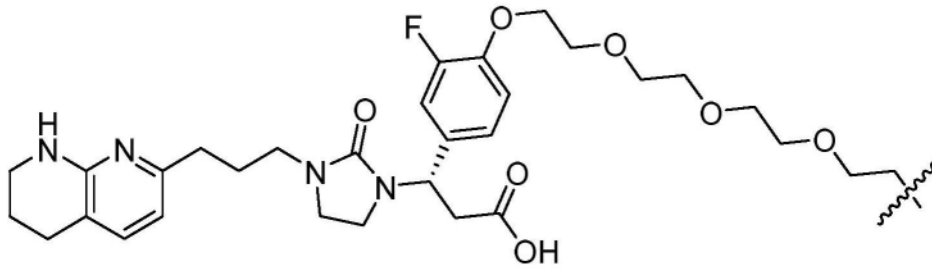
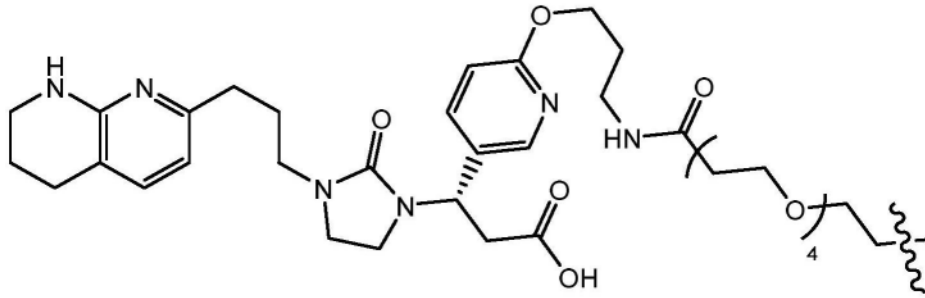
(54) 发明名称

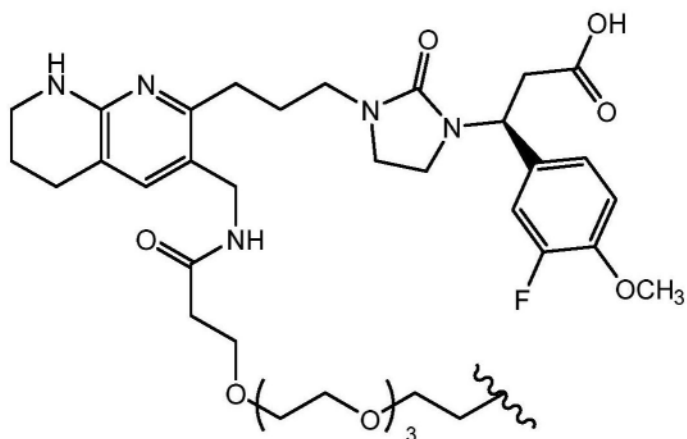
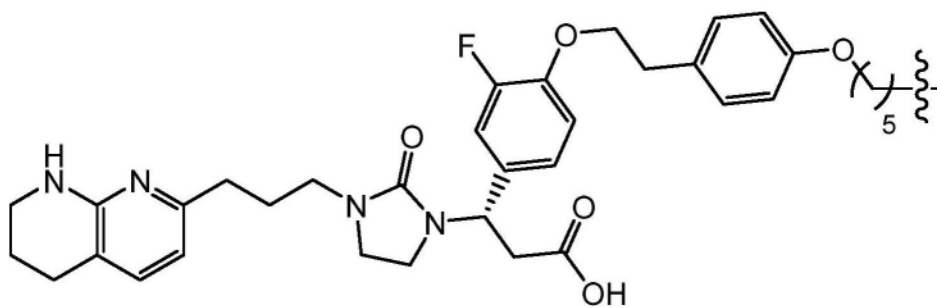
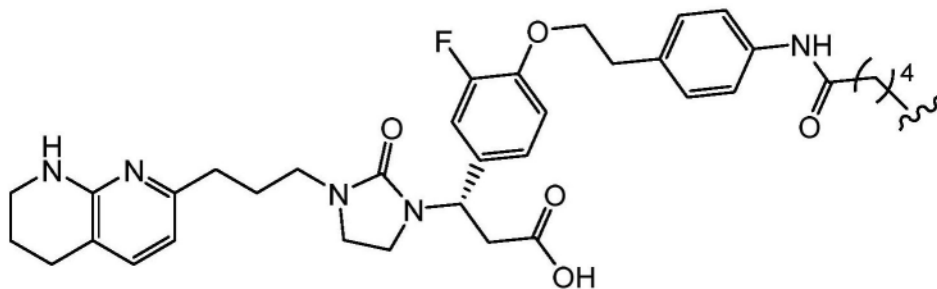
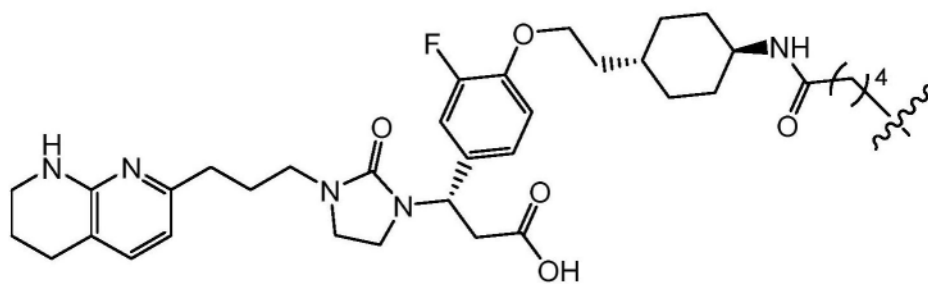
整联蛋白靶向配体和其用途

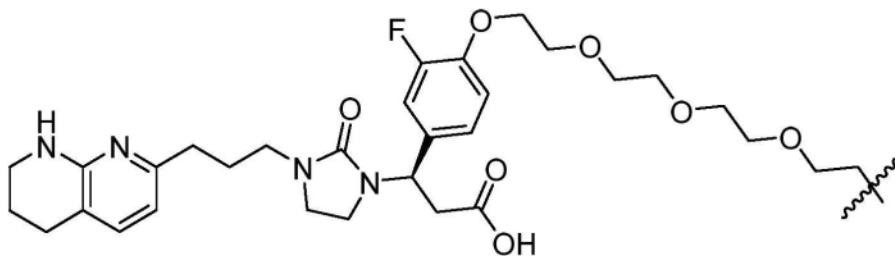
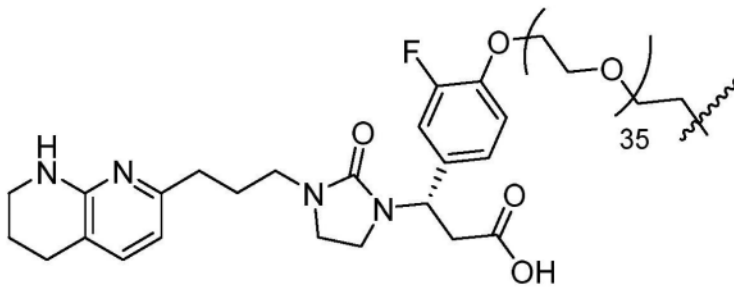
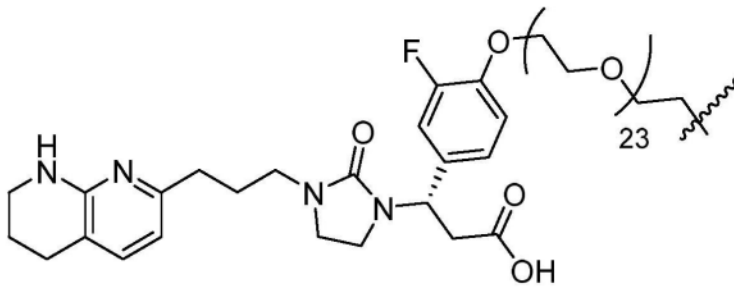
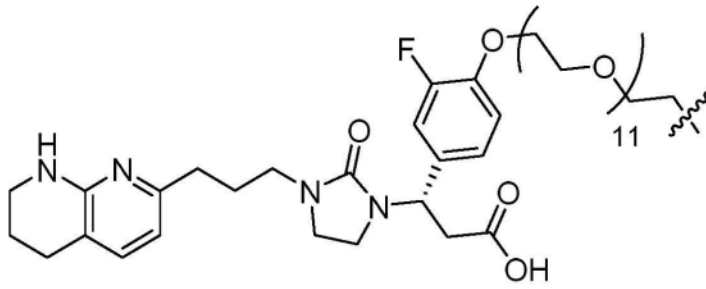
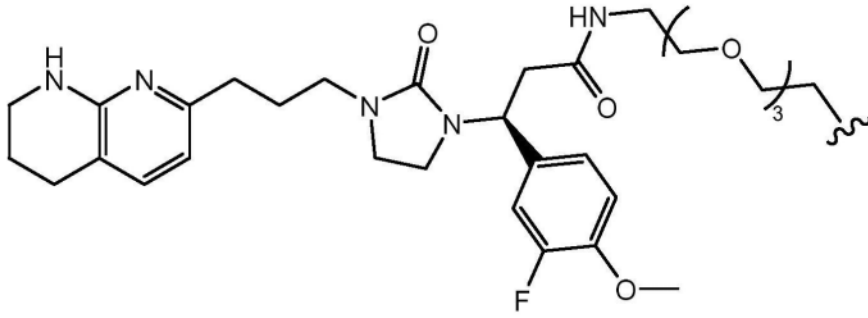
(57) 摘要

描述了对整联蛋白具有亲和力的化合物、这些化合物的合成和这些化合物作为配体以促进递送货物分子至表达整联蛋白的细胞的用途。所描述的整联蛋白靶向配体具有血清稳定性和对 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白和/或 $\alpha v \beta 5$ 整联蛋白的亲合力,和适合于缀合至货物分子,例如基于寡核苷酸的治疗剂(例如RNAi剂),以促进递送货物分子至细胞和组织,例如肿瘤细胞,其表达整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 、整联蛋白 $\alpha v \beta 5$ 或整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 和整联蛋白 $\alpha v \beta 5$ 二者。还描述了包括整联蛋白靶向配体的组合物和使用方法。

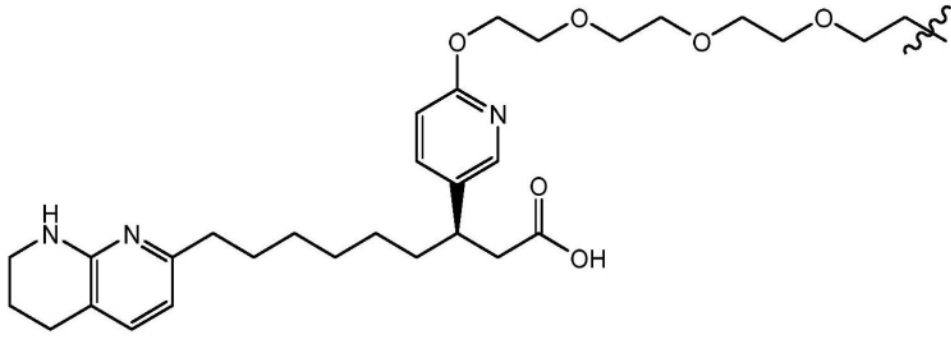
1. 包含选自以下的式的整联蛋白靶向配体:



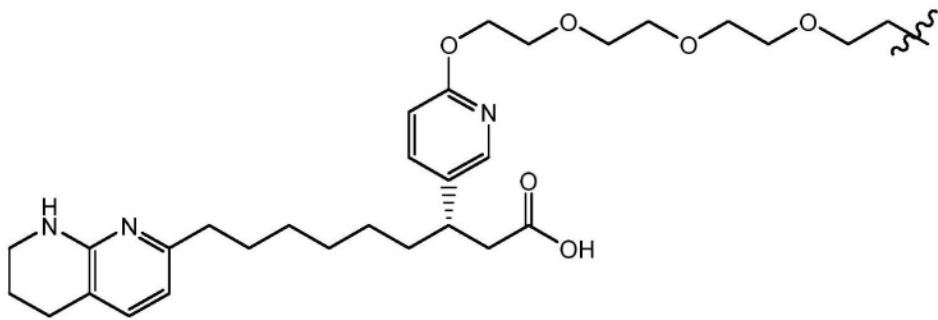




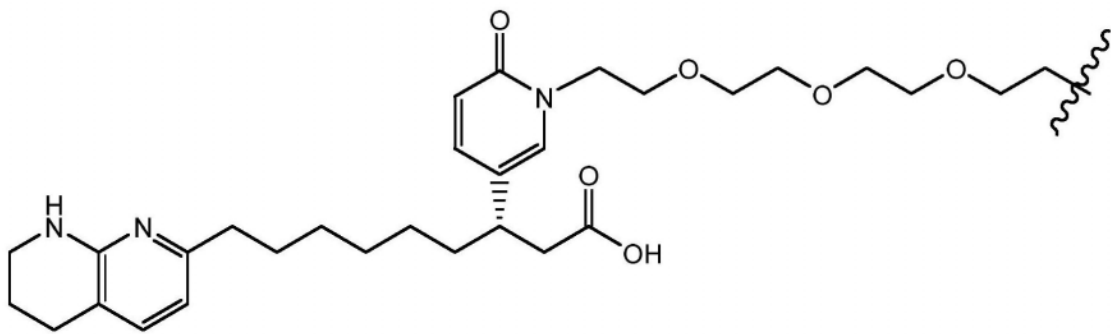




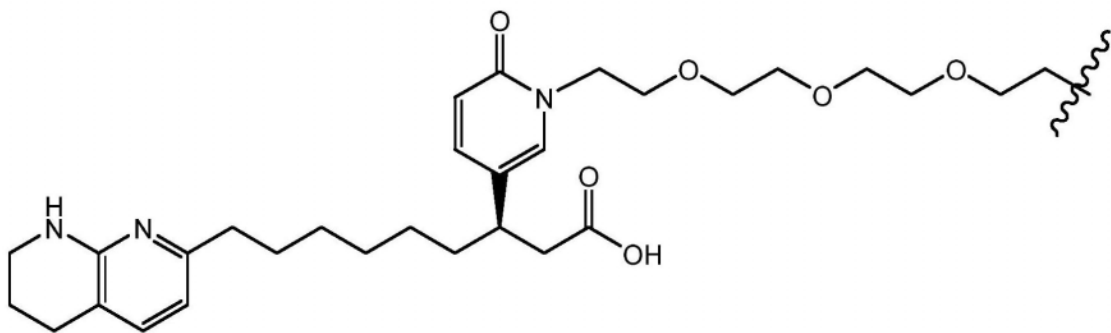
(结构 28a);



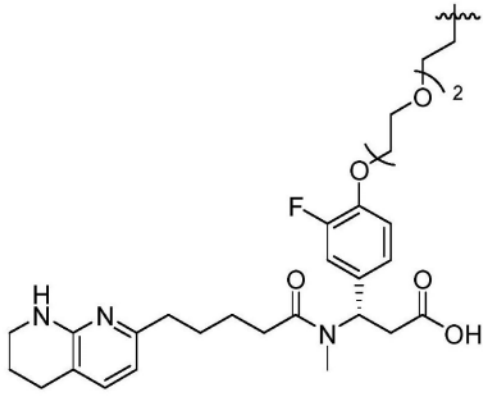
(结构 29a);



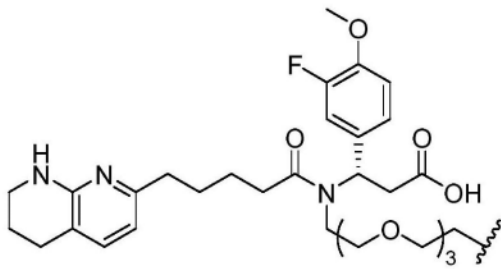
(结构 30a);



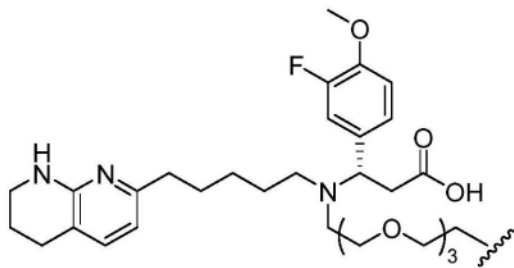
(结构 31a);



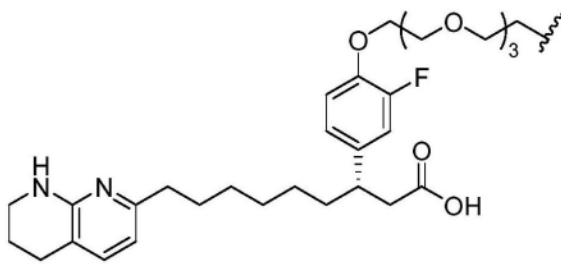
(结构 32a);



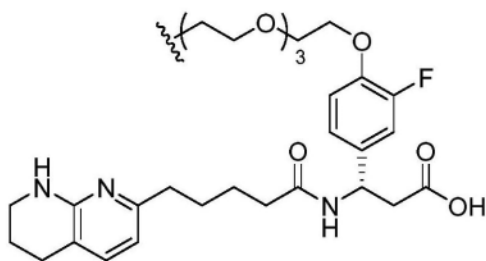
(结构 33a);



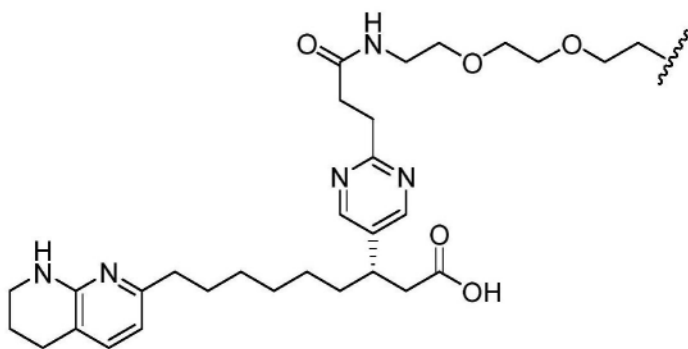
(结构 34a);



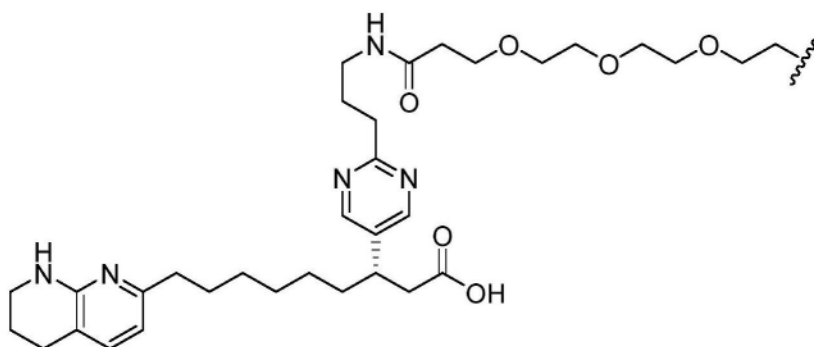
(结构 36a);



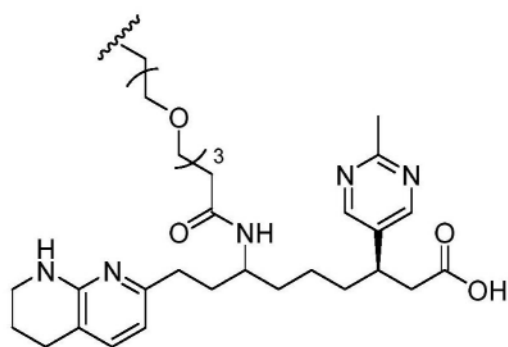
(结构 37a);



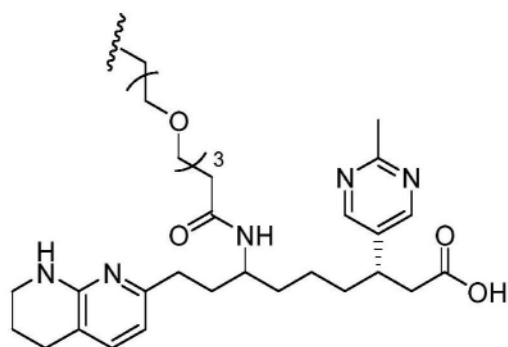
(结构 38a);



(结构 39a);



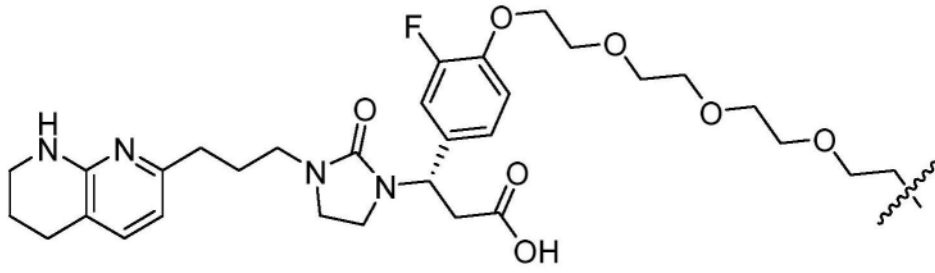
(结构 40a); 和



(结构 41a)

或其药学上可接受的盐,其中 $\text{~}$ 表示与包含基于寡核苷酸的化合物的部分的连接点。

2. 权利要求1的整联蛋白靶向配体,其中所述整联蛋白靶向配体具有结构:



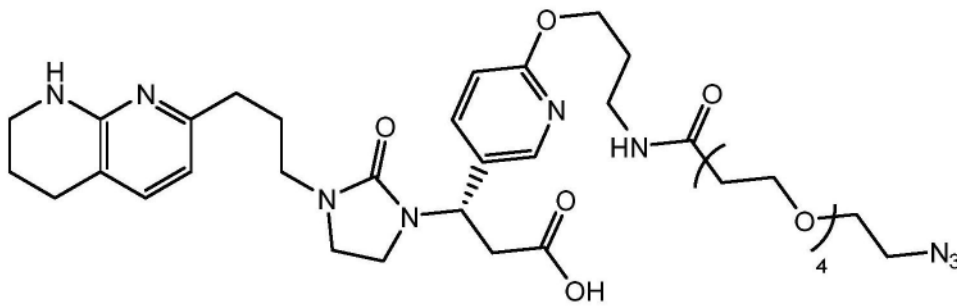
(结构 2a)

或其药学上可接受的盐。

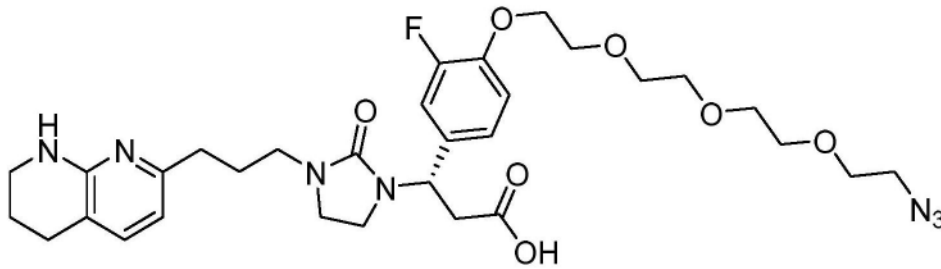
3. 权利要求1或2的整联蛋白靶向配体,其中所述基于寡核苷酸的化合物是RNAi剂。

4. 权利要求1或2的整联蛋白靶向配体,进一步包含具有2-20个环氧乙烷单元的聚乙二醇接头。

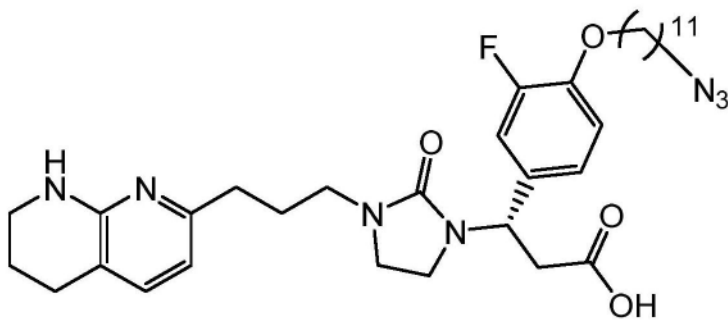
5. 整联蛋白靶向配体前体,其具有通过由以下组成的组表示的结构:



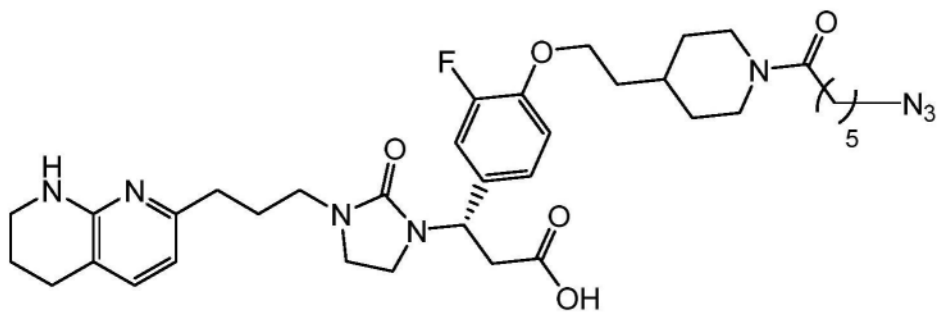
(结构 1c),



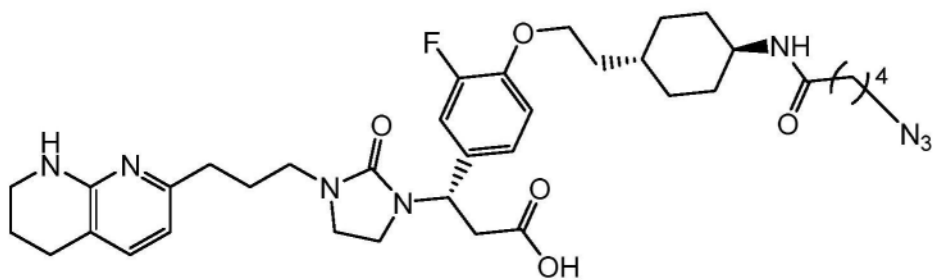
(结构 2c),



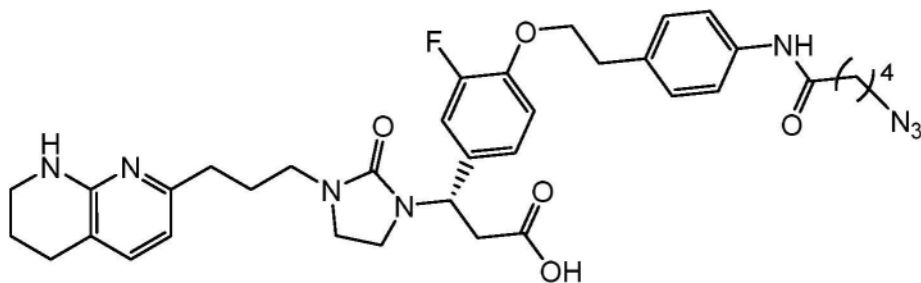
(结构 2.1c),



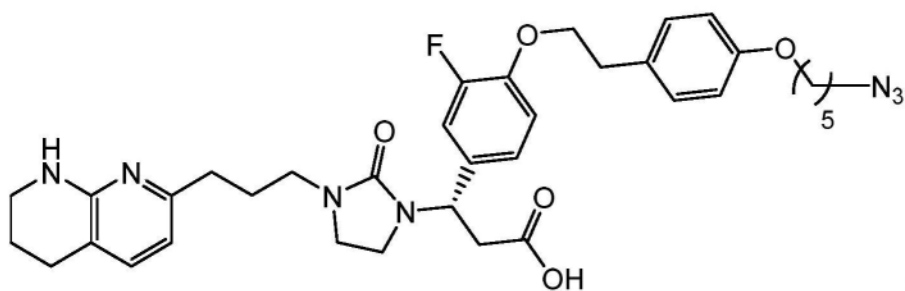
(结构 2.2c),



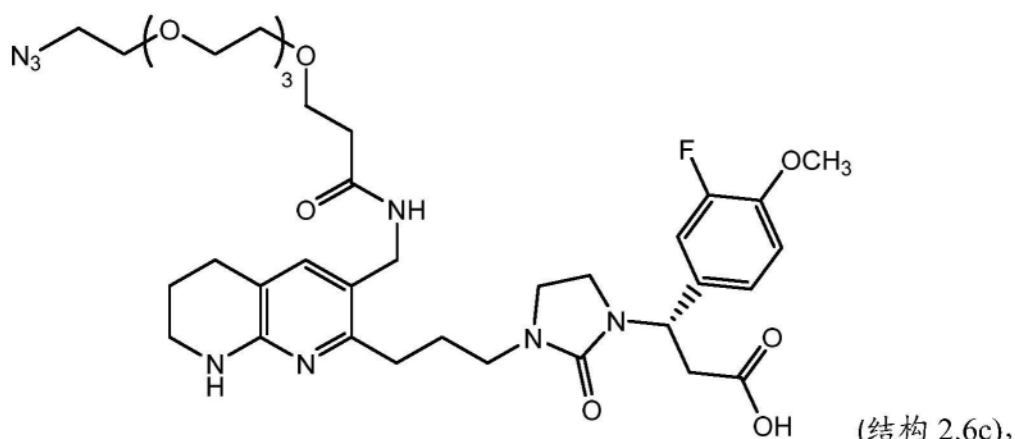
(结构 2.3c),



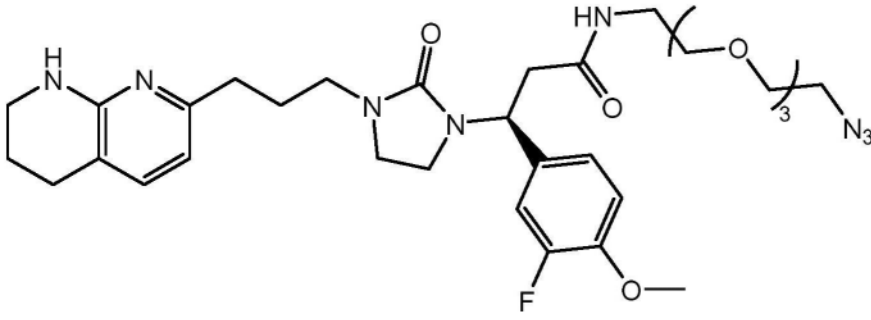
(结构 2.4c),



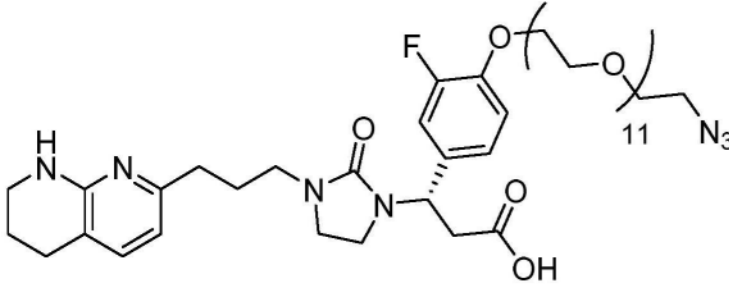
(结构 2.5c),



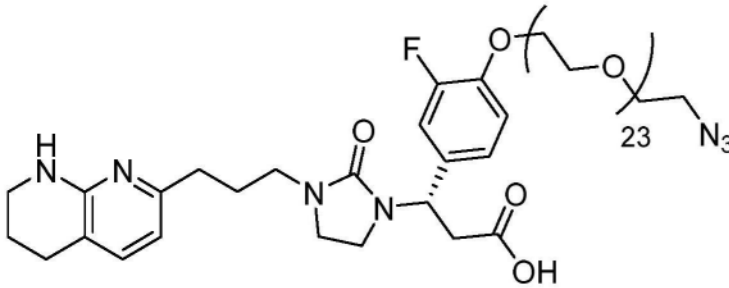
(结构 2.6c),



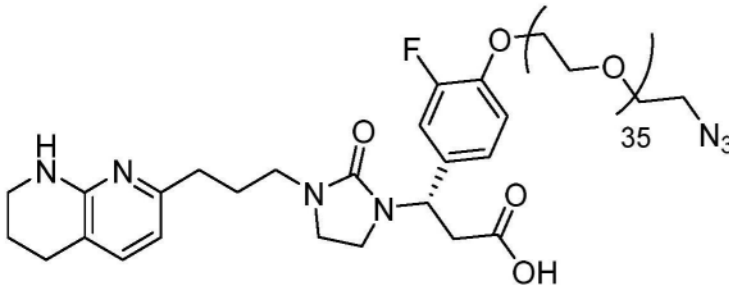
(结构 2.7c),



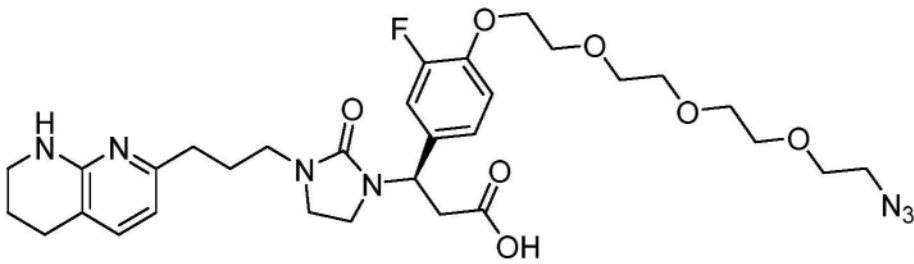
(结构 2.8c),



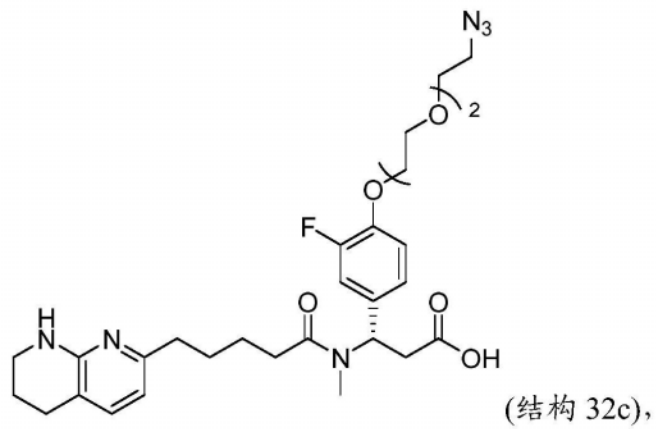
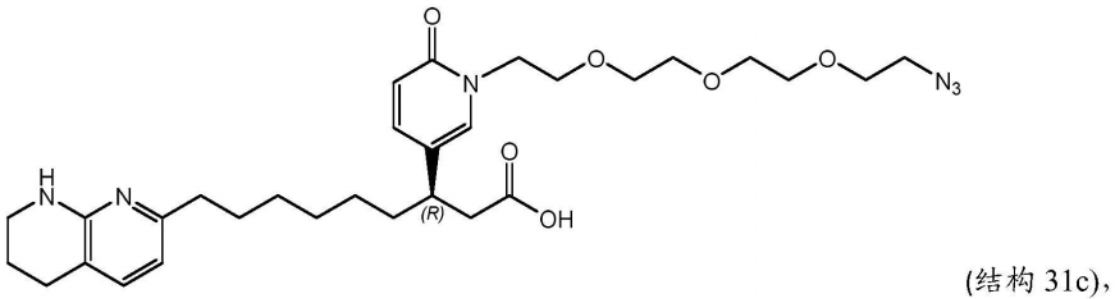
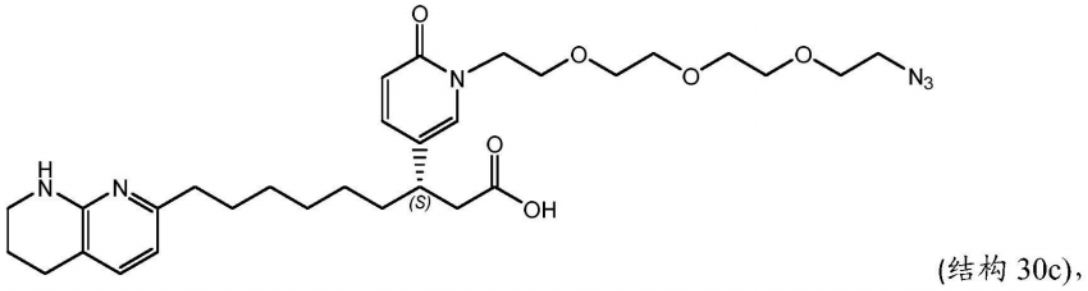
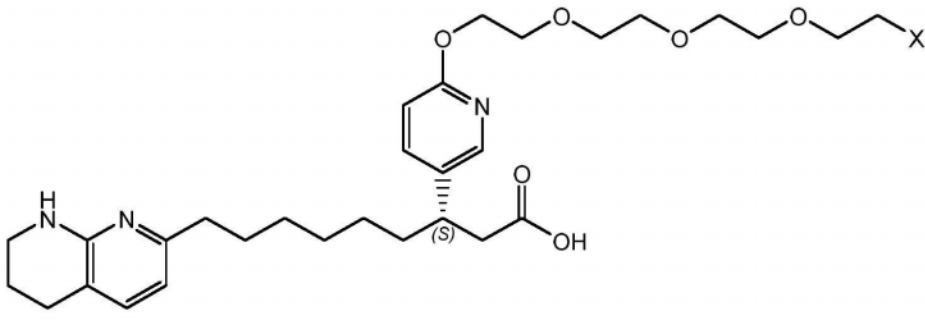
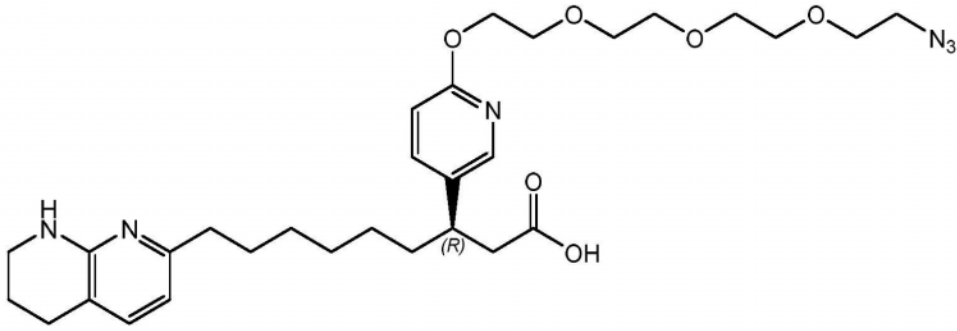
(结构 2.9c),

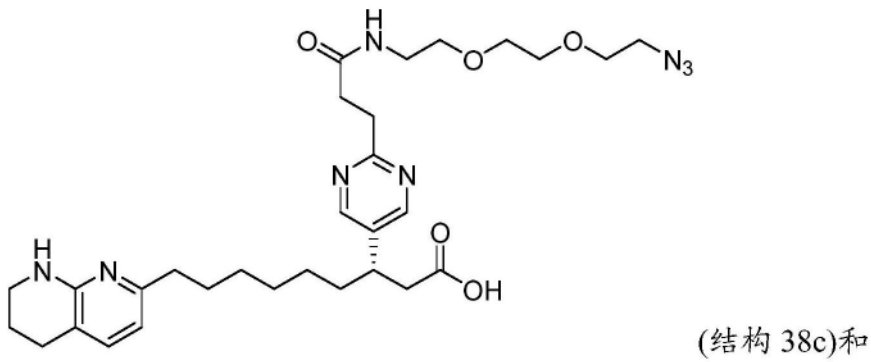
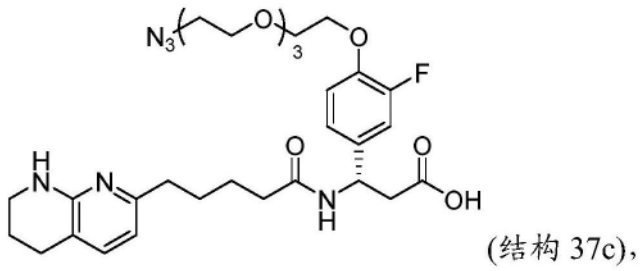
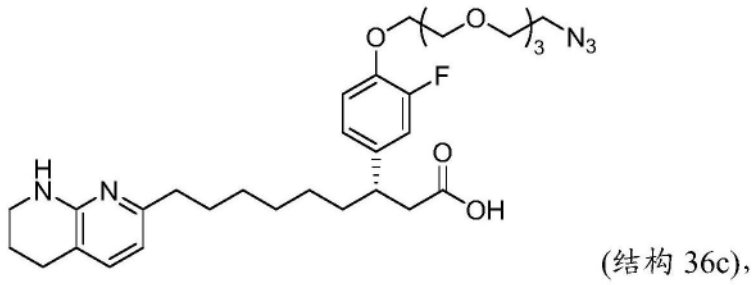
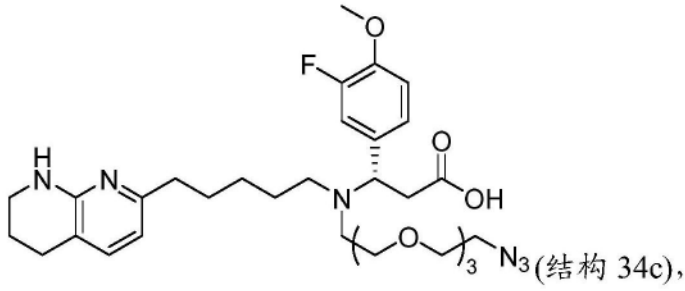
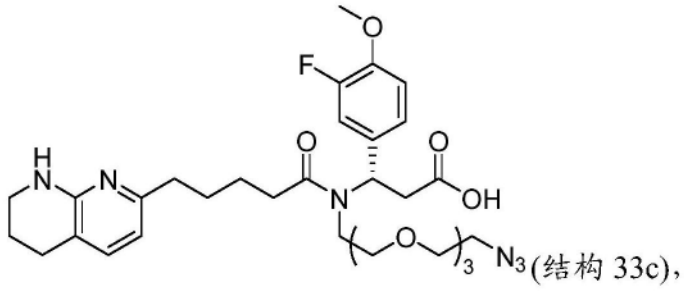


(结构 2.10c),

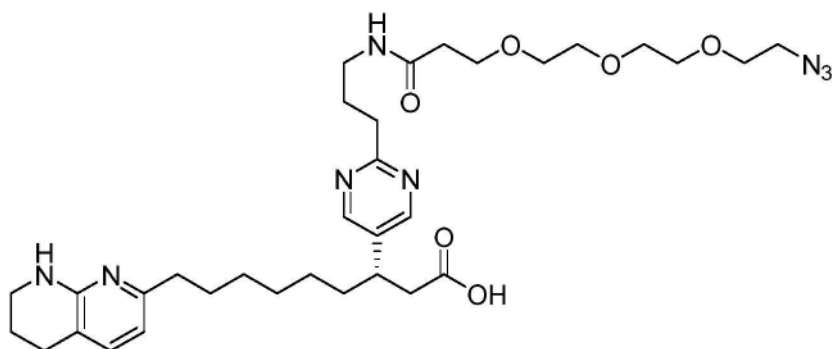


(结构 2.11c),









(结构 39c)。

6. 缀合物,其包含与权利要求1-4中任一项的整联蛋白靶向配体连接的基于寡核苷酸的治疗剂。

7. 权利要求6的缀合物,其中基于寡核苷酸的治疗剂是RNAi剂。

8. 组合物,其包含权利要求1-4中任一项的整联蛋白靶向配体和药学上可接受的赋形剂。

9. 组合物,其包含权利要求1-4中任一项的整联蛋白靶向配体,其中所述整联蛋白靶向配体与基于寡核苷酸的化合物缀合,所述基于寡核苷酸的化合物能够抑制表达整联蛋白的细胞中靶基因的表达。

10. 权利要求9的组合物,其中所述整联蛋白靶向配体与RNAi剂缀合,所述RNAi剂能够抑制表达整联蛋白的细胞中靶基因的表达。

11. 权利要求8-10中任一项的组合物,其中所述整联蛋白是整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 或 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$ 二者。

12. 权利要求8-11中任一项的组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途,其中所述疾病或病症是肾细胞癌。

13. 权利要求12的用途,其中基于寡核苷酸的化合物是RNAi剂。

14. 权利要求8-11中任一项的组合物在制备用于递送基于寡核苷酸的化合物至肾细胞的药物中的用途。

## 整联蛋白靶向配体和其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月27日提交的美国临时专利申请号62/663,763和2019年1月9日提交的美国临时专利申请号62/790,372的优先权,其整体通过引用并入本文。

### 发明领域

[0003] 本文公开了对整联蛋白具有亲和力的化合物、合成这样的化合物的方法和这样的化合物作为配体以体内递送货物分子的用途。

[0004] 背景

[0005] 整联蛋白是介导细胞-细胞和细胞-基质相互作用的跨膜糖蛋白。整联蛋白 $\alpha$ -v beta-3 ( $\alpha$ v $\beta$ 3)和 $\alpha$ -v beta-5 ( $\alpha$ v $\beta$ 5)是粘附分子的整联蛋白超家族的成员,并且已知是细胞外基质(ECM)蛋白玻连蛋白的受体(Horton, MA, 29(5) Int.J.Biochem.Cell Biol.721-725(1997))。认为某些整联蛋白,包括整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3和整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 5的表达改变有助于肿瘤进展、侵袭和转移。

[0006] 实际上,整联蛋白,包括整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3和 $\alpha$ v $\beta$ 5的过表达,已在许多肿瘤细胞中报道(Desgrosellier, JS等, NatRevCancer, 10(1):9-22(2010))。 $\alpha$ v $\beta$ 3(以及在较少程度上 $\alpha$ v $\beta$ 5)的拮抗剂已被考虑用于各种与改变的整联蛋白功能有关的疾病。例如,已尝试开发 $\alpha$ v $\beta$ 3抑制剂作为潜在的癌症治疗,这是因为 $\alpha$ v $\beta$ 3受体的抑制已显示抑制血管生成,从而阻止新血管形成,新血管形成被认为是肿瘤生长所必需的(参见例如Brooks等, 79Cell 1157-1164(1994); Mas-Moruno等, Anticancer Agents Med Chem, 10(10):753-768)。然而, $\alpha$ v $\beta$ 3抑制剂的一个主要实例,拮抗剂西仑吉肽,显示在目的是限制具有成胶质细胞瘤的患者的肿瘤血管生成和进展的临床试验中无效(参见例如Ley等, Integrin-based Therapeutics: Biological Basis, Clinical Use and New Drugs, 15(3) Nat.Rev. Drug Discov. 173-183(2016))。

[0007] 一般而言,体内递送货物分子(包括治疗有效的药物化合物或活性药物成分)至需要的细胞和/或组织在开发治疗可行的药物产品方面一直是普遍挑战。一直需要稳定和有效的靶向化合物,其对特定细胞和组织具有亲和力和/或能够选择性结合特定细胞和组织,所述靶向化合物能够被利用或采用作为配体以促进治疗性货物分子递送至所述特定细胞或组织。此外,对于能够选择性靶向整联蛋白 $\alpha$ -v beta-3和适合与货物分子缀合并体内递送货物分子至表达这样的整联蛋白的细胞例如肿瘤细胞的化合物,存在特定需要。特别地,对于寡核苷酸和基于寡核苷酸的治疗剂(例如基于寡核苷酸的化合物,例如反义寡核苷酸或RNAi剂),一直需要能够靶向整联蛋白 $\alpha$ -v beta-3和/或整联蛋白 $\alpha$ -v beta-5并促进这些基于寡核苷酸的化合物递送至表达这样的整联蛋白的细胞的配体。

[0008] 概述

[0009] 本文描述对某些整联蛋白,包括 $\alpha$ v $\beta$ 3和 $\alpha$ v $\beta$ 5具有亲和力的化合物,其可用作配体(本文称为“整联蛋白靶向配体”、“ $\alpha$ v $\beta$ 3整联蛋白靶向配体”、“ $\alpha$ v $\beta$ 3整联蛋白配体”或简称“整联蛋白配体”)以将它们所连接的化合物或其它分子选择性导向表达整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3和/

或 $\alpha v\beta 5$ 的细胞或组织。本文公开的整联蛋白靶向配体在血清中是稳定的,并对这些整联蛋白具有亲和力,和可特异性结合这些整联蛋白。本文公开的整联蛋白靶向配体可与货物分子缀合以促进递送货物分子至表达整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 和/或 $\alpha v\beta 5$ 的细胞或组织。

[0010] 在另一个方面,本文描述了体内递送货物分子至表达整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 和/或整联蛋白 $\alpha v\beta 5$ 的组织和/或细胞的方法,其中所述方法包括向受试者施用本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体,所述配体已与一种或多种货物分子缀合。本文进一步公开了治疗具有疾病、症状或病症的受试者的方法,对于所述疾病、症状或病症,递送治疗性货物分子(例如活性药物成分)至表达 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白和/或 $\alpha v\beta 5$ 整联蛋白的细胞能够治疗所述受试者,其中所述方法包括向受试者施用本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体,所述配体已与一种或多种治疗性货物分子缀合。

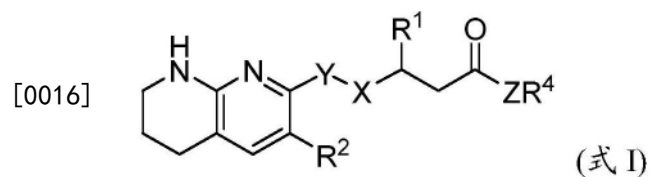
[0011] 本文进一步描述了体外或体内抑制细胞中靶基因的表达的方法,其中所述方法包括向所述细胞施用有效量的缀合物,所述缀合物包括本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体,所述配体已与一种或多种基于寡核苷酸的治疗剂(例如RNAi剂)缀合,所述治疗剂能够抑制细胞中靶基因的表达。在一些实施方案中,本文描述了抑制受试者的细胞中靶基因的表达的方法,其中向所述受试者施用有效量的一种或多种基于寡核苷酸的治疗剂(例如RNAi剂),所述治疗剂已与本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体缀合。

[0012] 在又一个方面,本文描述了包括本文公开的整联蛋白靶向配体的组合物。本文描述的组合物可以是药物组合物或药物,其包括与一种或多种治疗性货物分子(例如RNAi剂或其它货物分子或治疗性物质)缀合的本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体。

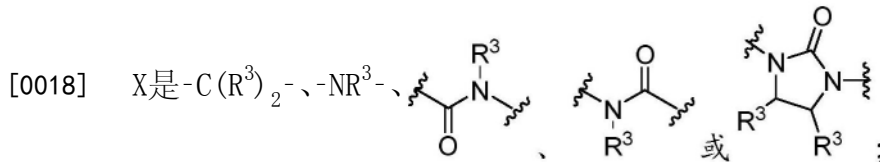
[0013] 在一些实施方案中,本文描述了治疗具有至少部分由表达整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 的细胞中靶基因的表达介导的疾病或病症的受试者的方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的药物组合物,其中所述药物组合物包括一种或多种能够抑制靶基因的表达的基于寡核苷酸的治疗剂,例如RNAi剂,其与本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体缀合。在一些实施方案中,本文描述了治疗具有至少部分由肿瘤细胞中靶基因的表达介导的疾病或病症的受试者的方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的药物组合物,其中所述药物组合物包括一种或多种能够抑制靶基因的表达的基于寡核苷酸的治疗剂,例如RNAi剂,其与本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体缀合。在一些实施方案中,本文描述了治疗具有至少部分由肾肿瘤细胞,例如透明细胞肾癌肿瘤细胞中靶基因的表达介导的疾病或病症的受试者的方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的药物组合物,其中所述药物组合物包括一种或多种能够抑制靶基因的表达的基于寡核苷酸的治疗剂,例如RNAi剂,其与本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体缀合。

[0014] 在第一方面,本公开内容提供了合成的整联蛋白靶向配体。

[0015] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包括具有下式的结构:



[0017] 或其药学上可接受的盐,其中



[0019] Y是任选取代的 $C_1-C_8$ 亚烷基;

[0020] Z是O、 $NR^3$ 或S;

[0021] n是1-8的整数;

[0022]  $R^1$ 是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或 $R^1$ 包含货物分子;

[0023]  $R^2$ 是H、任选取代的烷基或 $R^2$ 包含货物分子;

[0024]  $R^3$ 的每个实例独立地选自H和任选取代的烷基,或 $R^3$ 包含货物分子;

[0025]  $R^4$ 是H或任选取代的烷基;和

[0026] 其中Y、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 的任何实例和 $R^4$ 中的至少一个包含货物分子。

[0027] 任何本文公开的整联蛋白靶向配体可连接至货物分子、反应性基团和/或受保护的反应性基团。例如,连接至反应性基团可用于促进整联蛋白靶向配体与货物分子的缀合。本文公开的整联蛋白靶向配体可增加货物分子向表达整联蛋白(包括 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白和/或 $\alpha v\beta 5$ 整联蛋白)的细胞的靶向。货物分子可以是但不限于,药物活性成分或化合物、前药或具有已知的治疗益处的其它物质。在一些实施方案中,货物分子可以是但不限于,小分子、抗体、抗体片段、免疫球蛋白、单克隆抗体、标签或标记物、脂质、天然或修饰的寡核苷酸、基于修饰的寡核苷酸的化合物(例如反义寡核苷酸或RNAi剂)、天然或修饰的核酸、肽、适体、聚合物、聚胺、蛋白、毒素、维生素、聚乙二醇、半抗原、地高辛配基、生物素、放射性原子或分子、或荧光团。在一些实施方案中,货物分子包括药物活性成分或前药。在一些实施方案中,货物分子是或包括基于寡核苷酸的治疗剂,例如反义化合物或RNAi剂。在一些实施方案中,货物分子是或包括基于寡核苷酸的化合物,其是药物活性成分。在一些实施方案中,货物分子是或包括RNAi剂,其是药物活性成分。

[0028] 本文描述了所描述的 $\alpha v\beta 3/5$ 整联蛋白靶向配体靶向表达整联蛋白的细胞并递送货物分子至表达整联蛋白的细胞的用途。所述货物分子可体外、原位、离体或体内递送至细胞。

[0029] 在另一个方面,本公开内容提供了包括一种或多种本文所述的整联蛋白靶向配体的组合物。例如,在一些实施方案中,包含本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体的组合物包括一种或多种基于寡核苷酸的化合物,例如一种或多种RNAi剂,其待体内递送至细胞。在一些实施方案中,本文描述了用于体内递送RNAi剂至细胞的组合物,其中所述RNAi剂与一种或多种整联蛋白靶向配体连接。

[0030] 描述了包括一种或多种整联蛋白靶向配体的组合物。在一些实施方案中,组合物包含药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,包括一种或多种整联蛋白靶向配体的组合物包含一种或多种其它药用物质或药物活性成分或化合物。在一些实施方案中,本文描述了包括一种或多种整联蛋白靶向配体的药物。

[0031] 包括本文公开的一种或多种整联蛋白靶向配体的组合物可体内或体外递送至各种癌细胞,包括例如透明细胞肾癌肿瘤细胞(例如A498)、其它肾癌细胞(例如ACHN、CAKI-2、

769-P、786-0)、黑素瘤细胞(例如A375)、成胶质细胞瘤细胞(例如U87MG)、胰腺癌细胞(例如PANC-1)、肺癌细胞(例如H460、H661、H1573、H2126)、结肠癌细胞(例如HT29、HCT116)、肝癌细胞(例如Hep2G、Hep3B)、乳腺癌细胞(例如MCF7、SK-BR3)、前列腺癌细胞(例如DU145、PC3、LNCaP、MDA-PCa-2b)、口腔癌细胞(例如KB)、舌癌细胞(例如CAL27、SCC9)、咽癌细胞(例如Detroit562)和/或卵巢癌细胞(例如OVCAR3、SKOV3、A2780)和/或其它患者来源的异种移植物。

[0032] 在另一个方面,本公开内容提供了方法,包括使用本文所述的一种或多种整联蛋白靶向配体和/或组合物,并且如果需要,使所公开的整联蛋白靶向配体和/或组合物成为适合作为药物产品施用的形式。在其它实施方案中,本公开内容提供了用于制备本文所述的配体和组合物,例如药物的方法。

[0033] 包括一种或多种整联蛋白靶向配体的组合物可使用本领域已知的根据寻求施用的货物分子而适合于这样的施用的施用途径,包括例如皮下、静脉内、瘤内、吸入(气雾剂或干粉制剂)、鼻内、腹膜内、皮内、经皮、口服、舌下或局部施用,体内施用至受试者。在一些实施方案中,包括一种或多种整联蛋白靶向配体的组合物可经施用用于全身递送,例如通过静脉内或皮下施用。

[0034] 在一些实施方案中,本文公开了用于体内递送一种或多种所需的货物分子至透明细胞肾癌肿瘤细胞的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用一种或多种与一种或多种货物分子缀合的整联蛋白靶向配体。

[0035] 在一些实施方案中,本文公开了体内递送基于寡核苷酸的化合物至肿瘤细胞的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用一种或多种与一种或多种基于寡核苷酸的化合物缀合的整联蛋白靶向配体。在一些实施方案中,本文公开了体内递送RNAi剂至肿瘤细胞的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用一种或多种与一种或多种RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体。在一些实施方案中,本文公开了体内抑制透明细胞肾癌肿瘤细胞中靶基因的表达的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用与一种或多种配体缀合的RNAi剂,所述配体对 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白和/或 $\alpha v \beta 5$ 整联蛋白具有亲和力。

[0036] 根据以下详细描述和权利要求,本发明的其它目标、特征、方面和优点将显而易见。

[0037] 详细描述

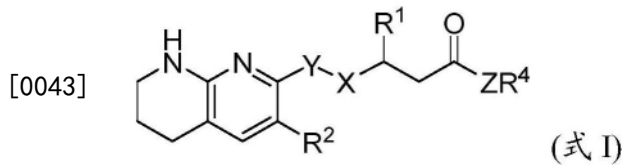
[0038] 整联蛋白靶向配体

[0039] 本文描述了化合物,其对整联蛋白具有亲和力,显示体内血清稳定性,并可用作配体以促进递送货物分子至表达整联蛋白、例如整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 和/或整联蛋白 $\alpha v \beta 5$ 的细胞和/或组织。整联蛋白靶向配体可用于体外、原位、离体和/或体内靶向表达整联蛋白的细胞。

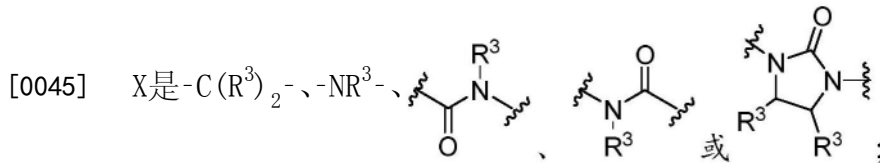
[0040] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体可与一种或多种货物分子缀合以优先将货物分子导向和靶向表达整联蛋白,包括整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 和/或整联蛋白 $\alpha v \beta 5$ 的细胞或组织。在一些实施方案中,货物分子包括药物活性化合物或由其组成。在一些实施方案中,货物分子包括基于寡核苷酸的化合物,例如RNAi剂,或由其组成。在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体与货物分子缀合以在体内将货物分子导向肿瘤细胞。在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体与货物分子缀合以在体内将货物分子导向透明细胞肾癌肿瘤细胞。

[0041] 式I

[0042] 在一个方面,本发明提供了具有以下结构的整联蛋白配体:



[0044] 其中



[0046] Y是任选取代的亚烷基;

[0047] Z是O、 $NR^3$ 或S;

[0048] n是1-8的整数;

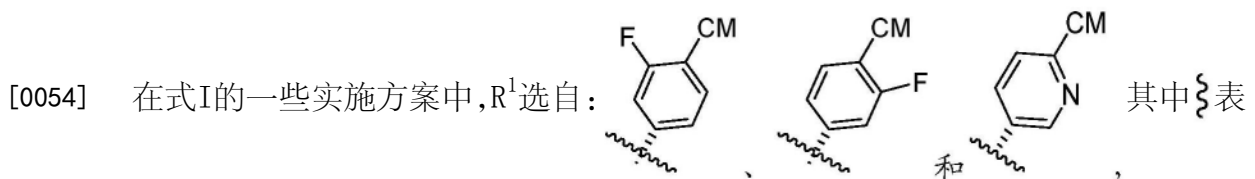
[0049]  $R^1$ 是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或 $R^1$ 包含货物分子;

[0050]  $R^2$ 是H、任选取代的烷基,或 $R^2$ 包含货物分子;

[0051]  $R^3$ 的每个实例独立地选自H和任选取代的烷基,或 $R^3$ 包含货物分子;

[0052]  $R^4$ 是H或任选取代的烷基;和

[0053] 其中Y、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 的任何实例和 $R^4$ 中的至少一个包含货物分子。

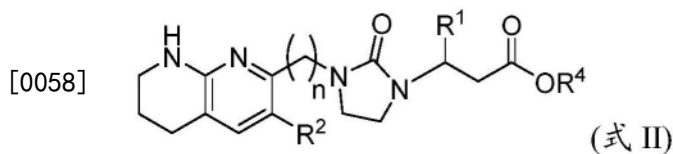


示连接点和CM包含货物分子。

[0055] 在式I的一些实施方案中,Y是 $C_1-C_6$ 亚烷基。

[0056] 式II

[0057] 在式I的一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包括具有下式的结构:



[0059] 或其药学上可接受的盐,其中

[0060] n是1-8的整数;

[0061]  $R^1$ 是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或 $R^1$ 包含货物分子;

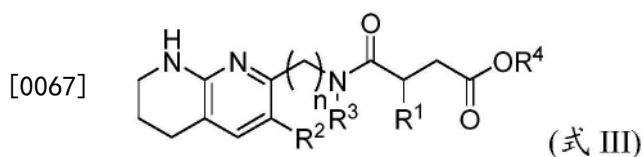
[0062]  $R^2$ 是H、任选取代的烷基,或 $R^2$ 包含货物分子;

[0063]  $R^4$ 是H或任选取代的烷基;和

[0064] 其中 $R^1$ 或 $R^2$ 中的至少一个包含货物分子。

[0065] 式III

[0066] 在式I的一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包括具有下式的结构:



[0068] 或其药学上可接受的盐,其中

[0069] n是1-8的整数;

[0070] R<sup>1</sup>是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或R<sup>1</sup>包含货物分子;

[0071] R<sup>2</sup>是H、任选取代的烷基,或R<sup>2</sup>包含货物分子;

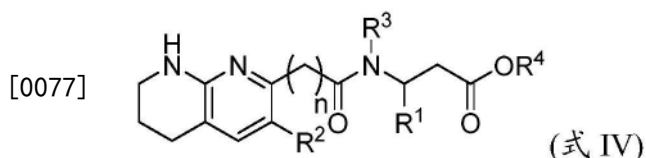
[0072] R<sup>3</sup>选自H和任选取代的烷基,或R<sup>3</sup>包含货物分子;

[0073] R<sup>4</sup>是H或任选取代的烷基;和

[0074] 其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>中的至少一个包含货物分子。

[0075] 式IV

[0076] 在式I的一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包括具有下式的结构:



[0078] 或其药学上可接受的盐,其中

[0079] n是1-8的整数;

[0080] R<sup>1</sup>是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或R<sup>1</sup>包含货物分子;

[0081] R<sup>2</sup>是H、任选取代的烷基,或R<sup>2</sup>包含货物分子;

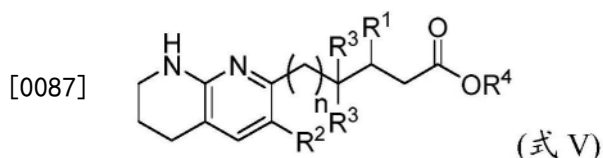
[0082] R<sup>3</sup>选自H和任选取代的烷基,或R<sup>3</sup>包含货物分子;

[0083] R<sup>4</sup>是H或任选取代的烷基;和

[0084] 其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>中的至少一个包含货物分子。

[0085] 式V

[0086] 在式I的一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包括具有下式的结构:



[0088] 或其药学上可接受的盐,其中

[0089] n是1-8的整数;

[0090] R<sup>1</sup>是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或R<sup>1</sup>包含货物分子;

[0091] R<sup>2</sup>是H、任选取代的烷基,或R<sup>2</sup>包含货物分子;

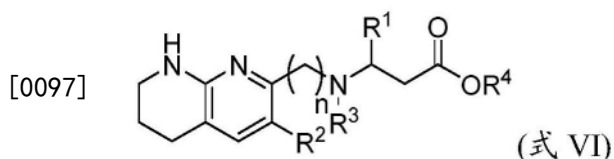
[0092] R<sup>3</sup>的每个实例独立地选自H和任选取代的烷基,或R<sup>3</sup>包含货物分子;

[0093]  $R^4$ 是H或任选取代的烷基;和

[0094] 其中 $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^3$ 中的至少一个包含货物分子。

[0095] 式VI

[0096] 在式I的一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包括具有下式的结构:



[0098] 或其药学上可接受的盐,其中

[0099]  $n$ 是1-8的整数;

[0100]  $R^1$ 是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或 $R^1$ 包含货物分子;

[0101]  $R^2$ 是H、任选取代的烷基,或 $R^2$ 包含货物分子;

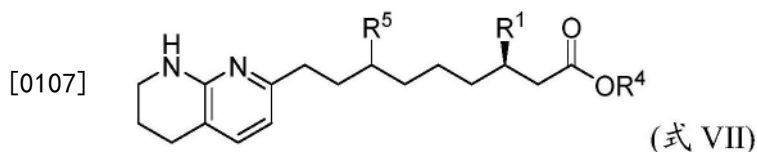
[0102]  $R^3$ 的每个实例独立地选自H和任选取代的烷基,或 $R^3$ 包含货物分子;

[0103]  $R^4$ 是H或任选取代的烷基;和

[0104] 其中 $R^1$ 、 $R^2$ 和 $R^3$ 中的至少一个包含货物分子。

[0105] 式VII

[0106] 在式I的一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包括具有下式的结构:



[0108] 或其药学上可接受的盐,其中

[0109]  $R^1$ 是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或 $R^1$ 包含货物分子;

[0110]  $R^2$ 是H、任选取代的烷基,或 $R^2$ 包含货物分子;

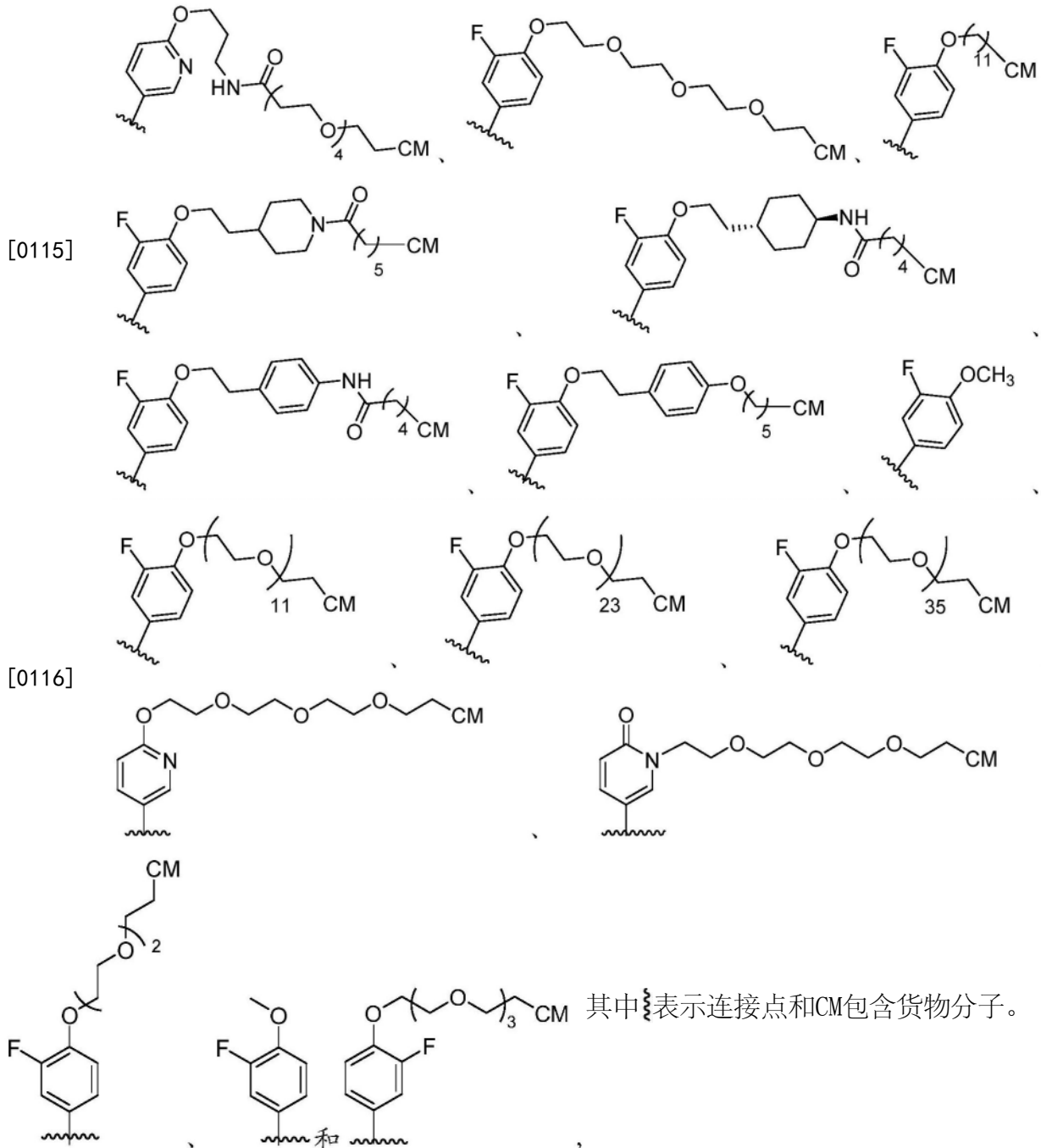
[0111]  $R^4$ 是H或任选取代的烷基;和

[0112] 其中 $R^1$ 、 $R^4$ 和 $R^5$ 中至少一个包含货物分子。

[0113]  $R^1$

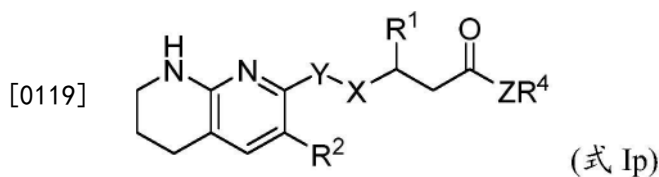
[0114] 在式I的实施方案中, $R^1$ 是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或 $R^1$ 包含货物分子。在一些实施方案中, $R^1$ 选自:



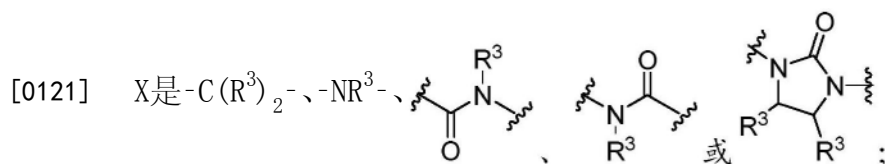


[0117] 整联蛋白靶向配体前体

[0118] 在一些实施方案中,本发明提供了整联蛋白靶向配体前体,其可用于将整联蛋白靶向配体连接至包含货物分子的部分。本文提供了具有下式的整联蛋白靶向配体前体:



[0120] 其中



[0122] Y是任选取代的亚烷基；

[0123] Z是O、 $NR^3$ 或S；

[0124] n是1-8的整数；

[0125]  $R^1$ 是任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、任选取代的环烷基或 $R^1$ 包含货物分子；

[0126]  $R^2$ 是H、任选取代的烷基，或 $R^2$ 包含货物分子；

[0127]  $R^3$ 的每个实例独立地选自H和任选取代的烷基，或 $R^3$ 包含货物分子；

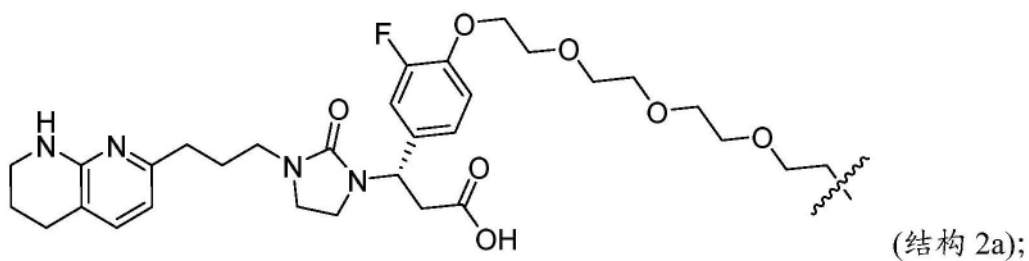
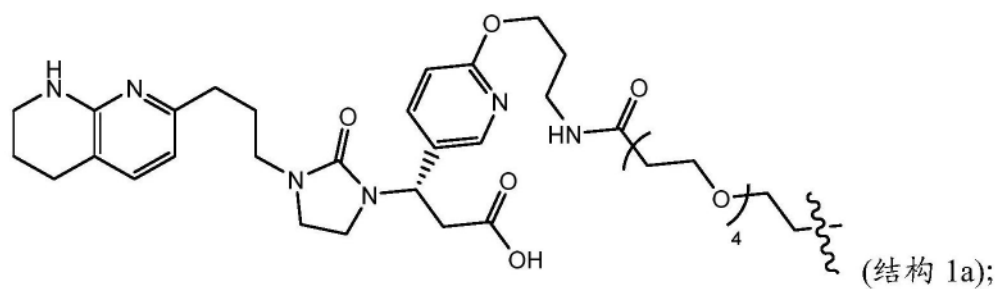
[0128]  $R^4$ 是H或任选取代的烷基；和

[0129] 其中Y、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 的任何实例和 $R^4$ 中的至少一个包含反应性基团。

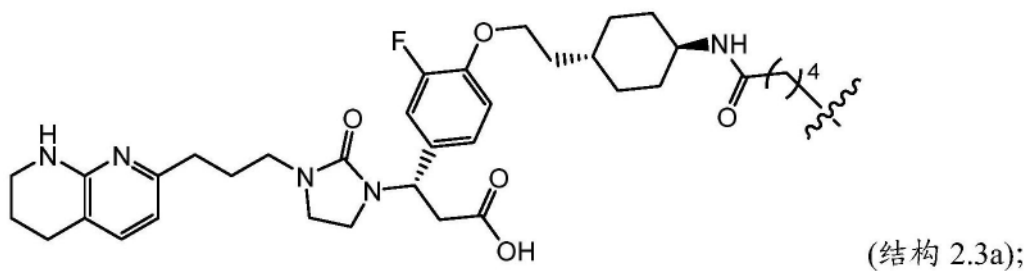
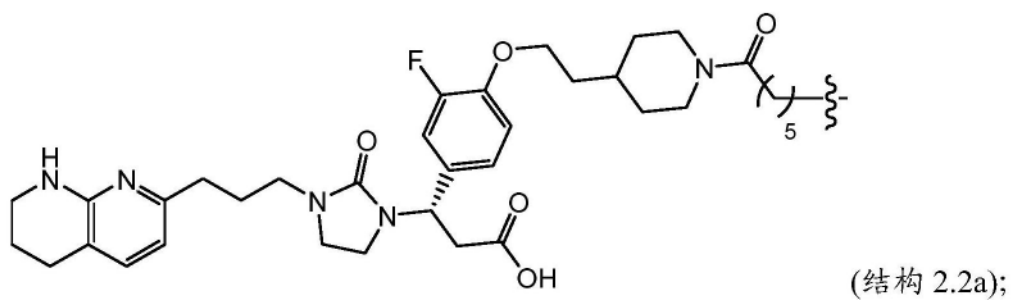
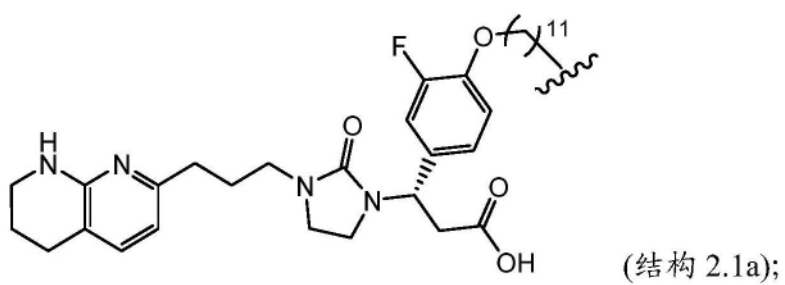
[0130] 在式Ip的化合物的一些实施方案中，反应性基团包含叠氮化物。

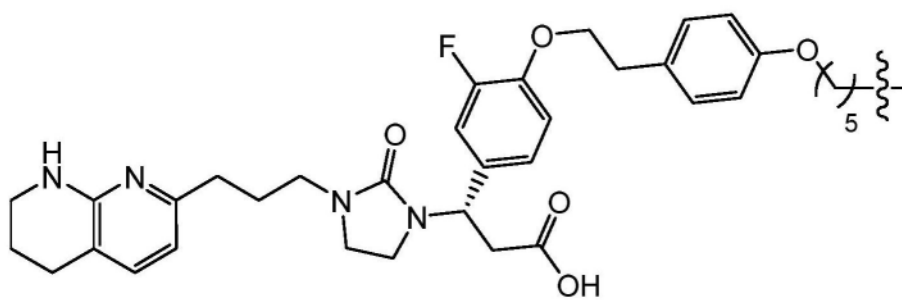
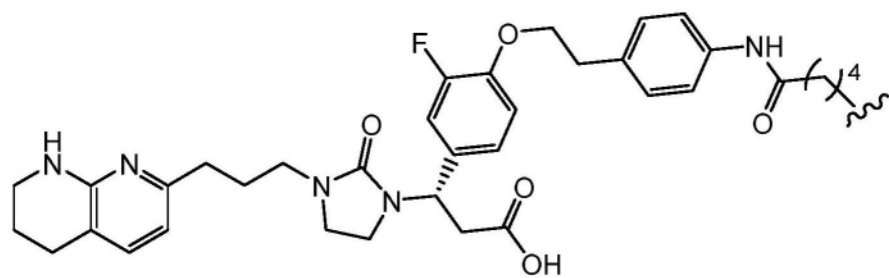
[0131] 式I的化合物

[0132] 在一些实施方案中，本文公开的整联蛋白靶向配体具有包括由以下表示的结构中的任何一种，由其组成或基本上由其组成的结构：

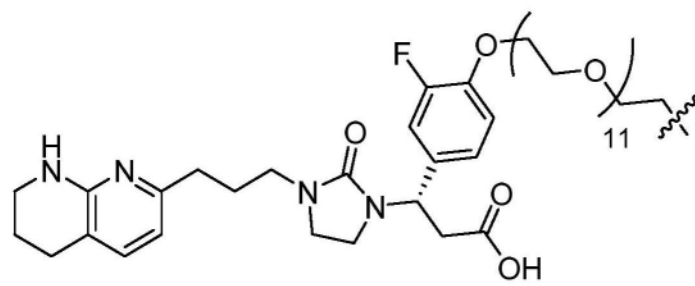
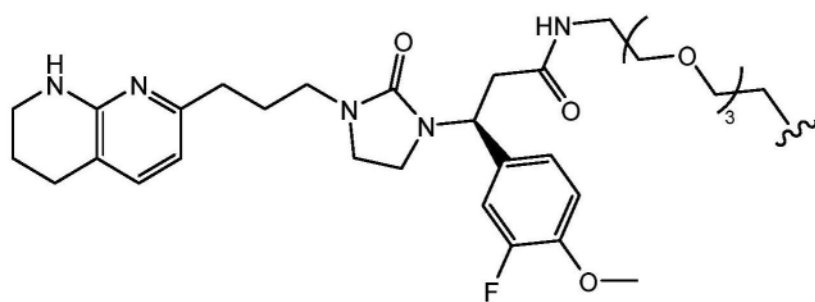
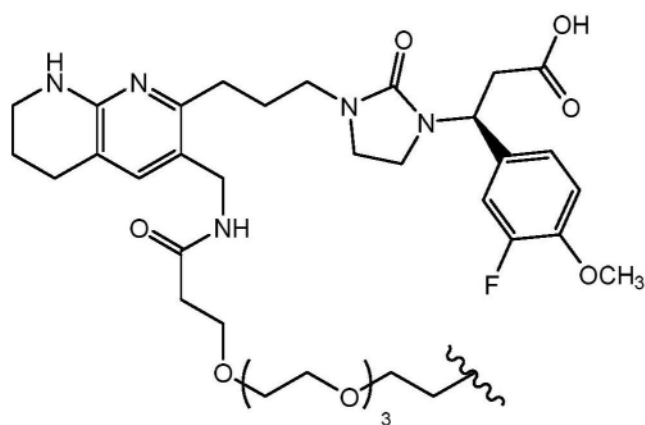


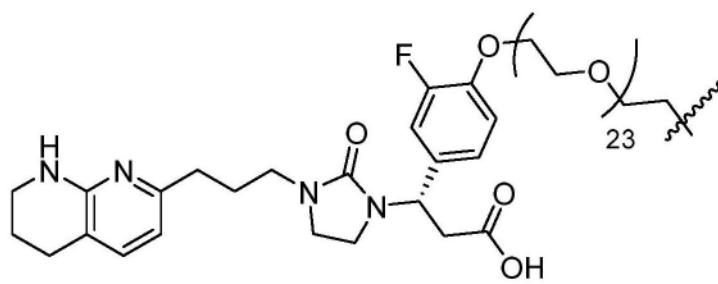
[0133]



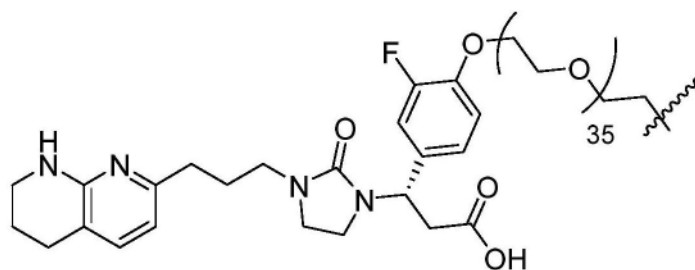


[0134]



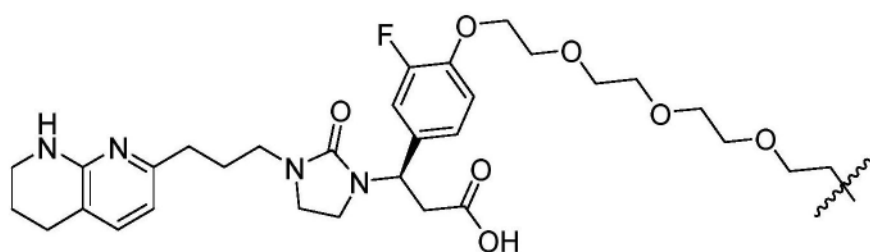


(结构 2.9a);

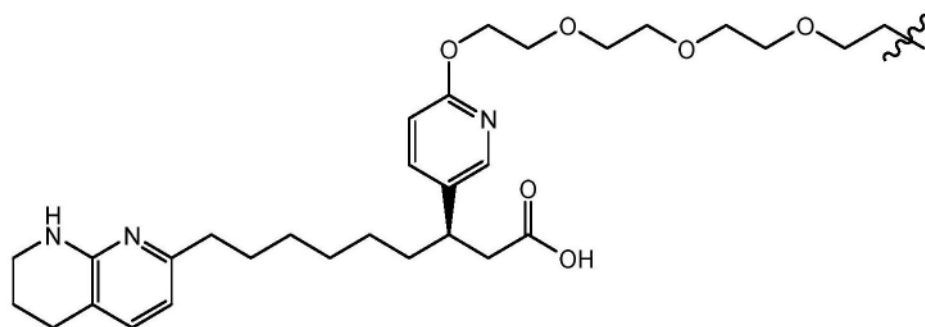


(结构 2.10a);

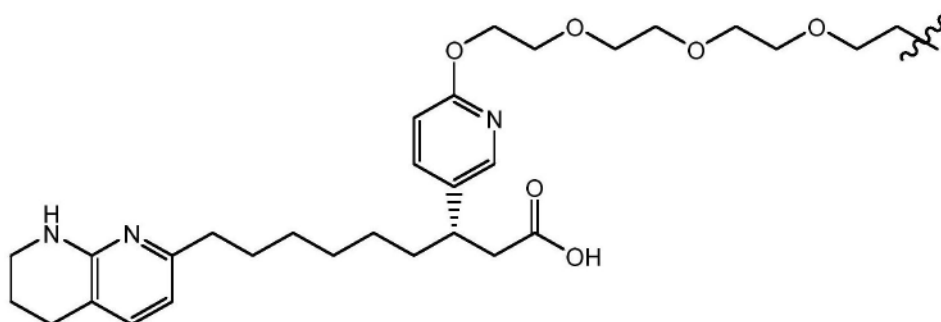
[0135]



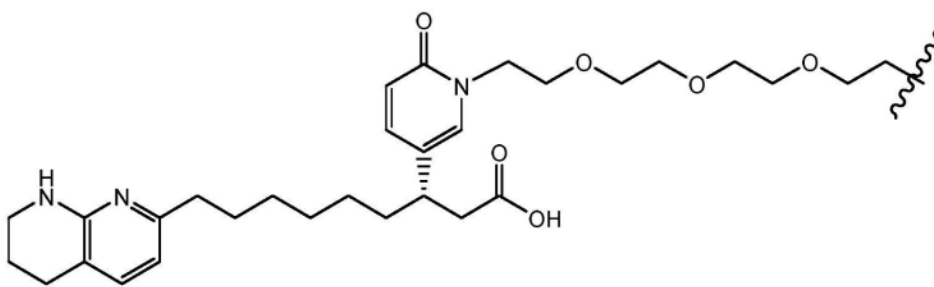
(结构 2.11a);



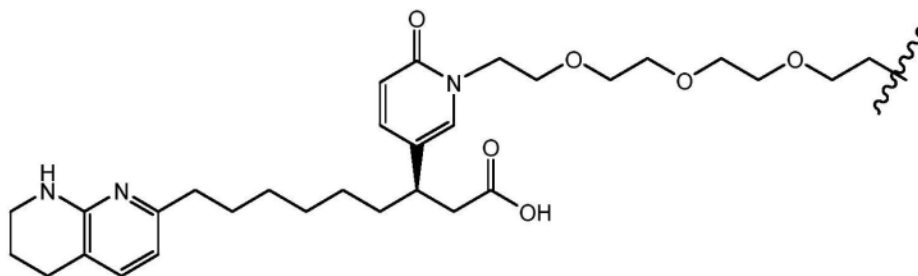
(结构 28a);



(结构 29a);

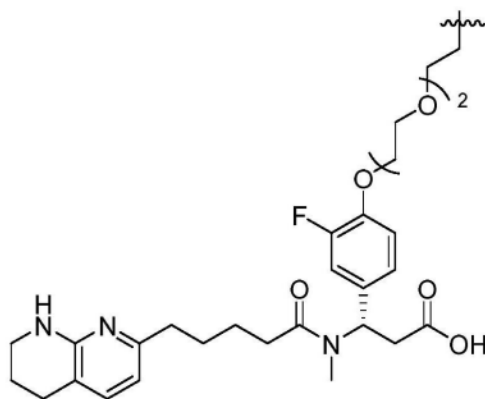


(结构 30a);

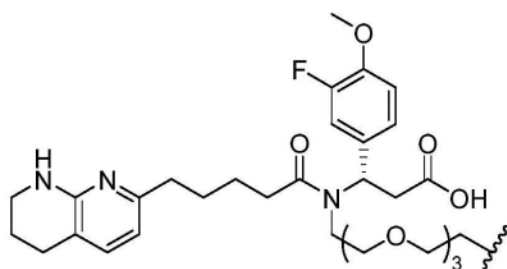


(结构 31a);

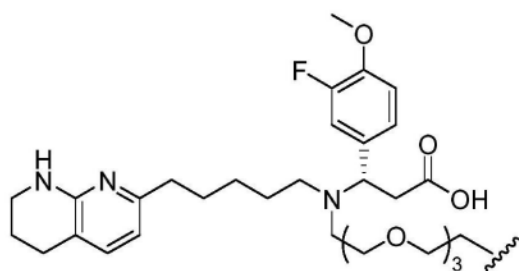
[0136]



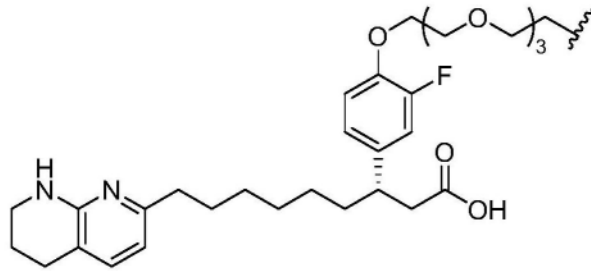
(结构 32a);



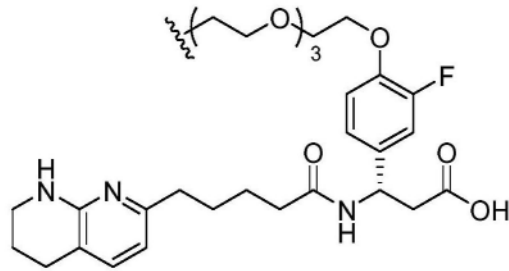
(结构 33a);



(结构 34a);

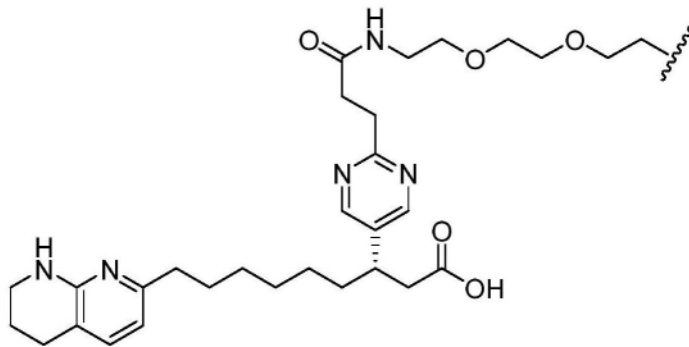


(结构 36a);

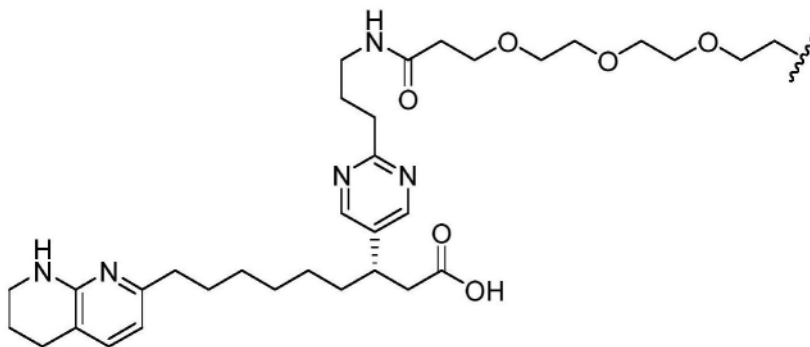


(结构 37a);

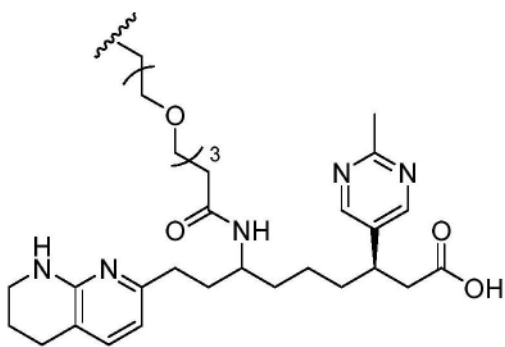
[0137]



(结构 38a);

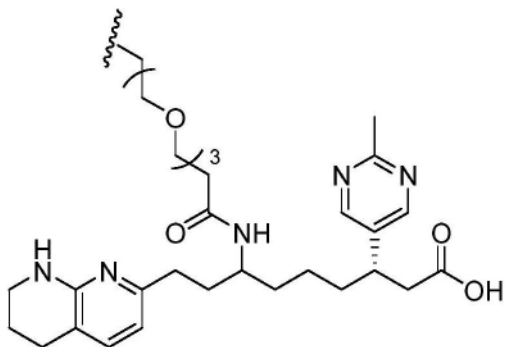


(结构 39a);



(结构 40a); 和

[0138]



(结构 41a)。

[0139] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体可与一种或多种(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10;或1-10、2-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-10、3-10、4-10、5-10、2-5、2-4或3-5种)货物分子(例如本文描述或本领域已知的货物分子中的任何一种)缀合。

[0140] 在一些实施方案中,超过一种本文公开的整联蛋白靶向配体(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30;或1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、5-30、5-25、5-20、5-15、5-10、10-30、10-25、10-20、10-15、15-30、15-25、15-20、20-30、20-25或25-30种整联蛋白靶向配体)可与一种货物分子(例如本文描述或本领域已知的货物分子中的任何一种)缀合。

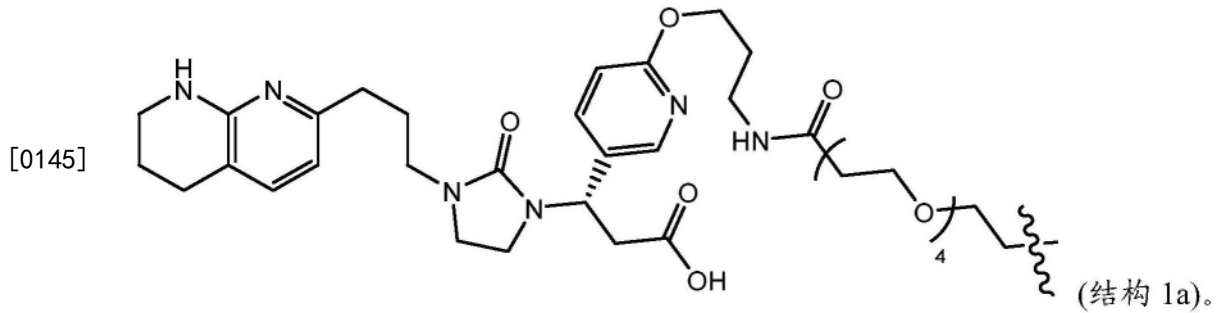
[0141] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体任选地通过连接基团,例如聚乙二醇(PEG)基团,与一种或多种货物分子缀合。

[0142] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体任选地通过包括至少一个对于每种配体的连接点和至少一个对于每种货物分子的连接点的支架,与一种或多种货物分子缀合。在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体包含与一种货物分子缀合的整联蛋白靶向配体,由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体包含与超过一种货物分子缀合的整联蛋白靶向配体,由其组成或基本上由其组成。

[0143] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体包含结构1a、结构2a、结构2.1a、结构2.2a、结构2.3a、结构2.4a、结构2.5a、结构2.6a、结构2.8a、结构2.9a、结构2.10a、结构2.11a、结构28a、结构29a、结构30a、结构31a、结构32a、结构33a、结构34a、结构36a、结构37a、结构38a、结构39a、结构40a和结构41a中的任何一种,由其组成或基本上由其组成,各自如本文所公开的。

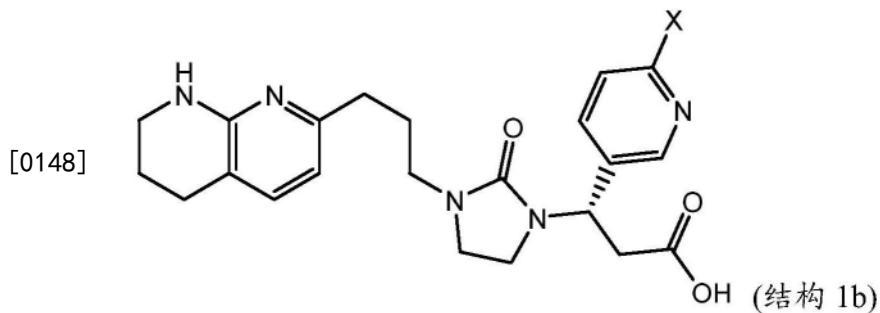
[0144] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:





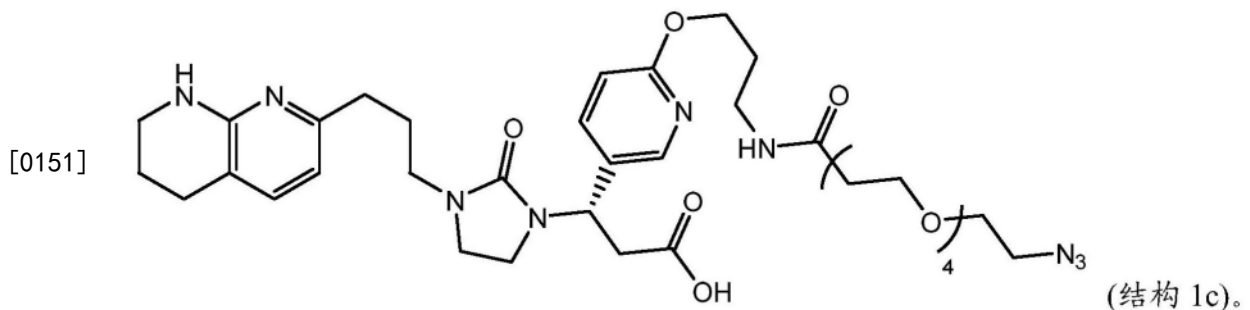
[0146] 在一些实施方案中,结构1a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0147] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:



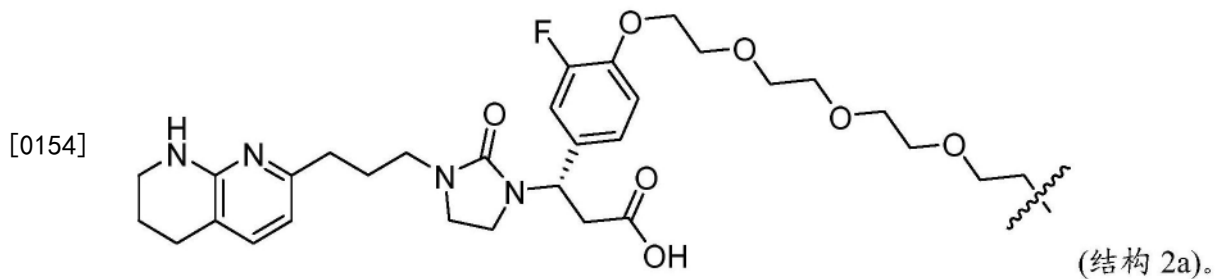
[0149] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0150] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体前体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



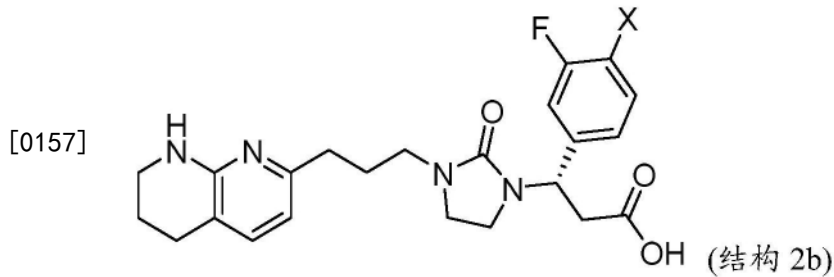
[0152] 反应性基团(或受保护的反应性基团)可用于促进整联蛋白靶向配体与目标分子,例如货物分子的缀合(直接或通过一种或多种支架和/或接头)。

[0153] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



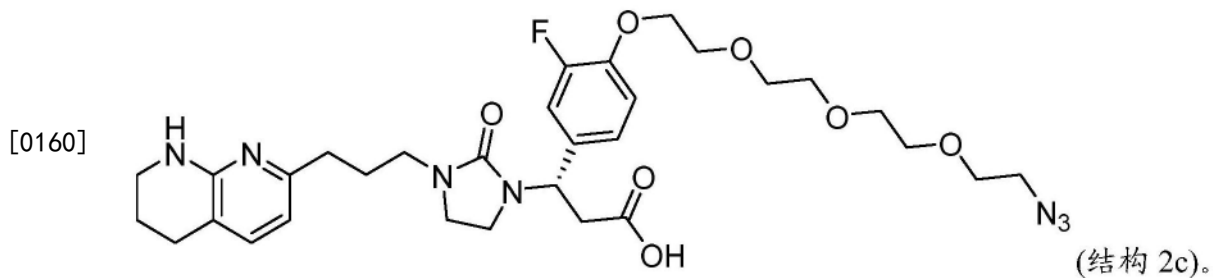
[0155] 在一些实施方案中,结构2a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0156] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的  
反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

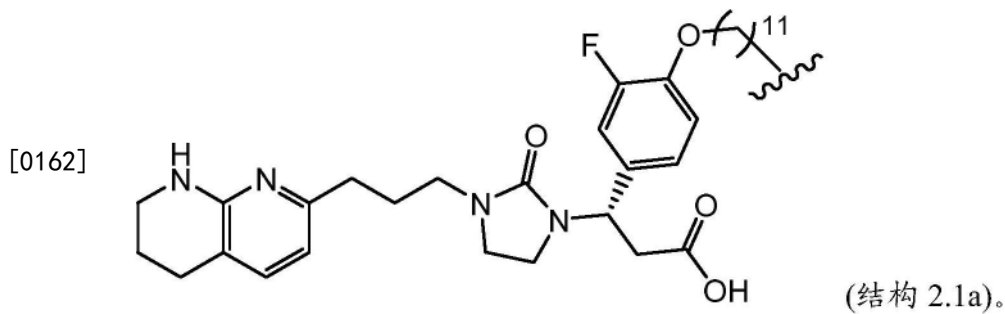


[0158] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0159] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和  
包含以下结构:

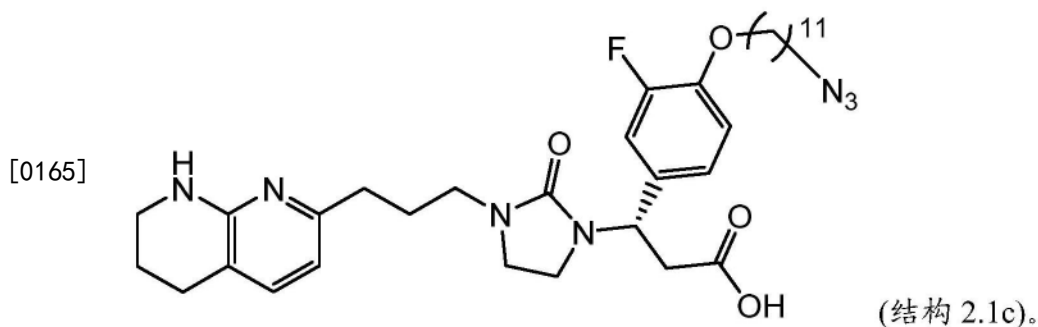


[0161] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

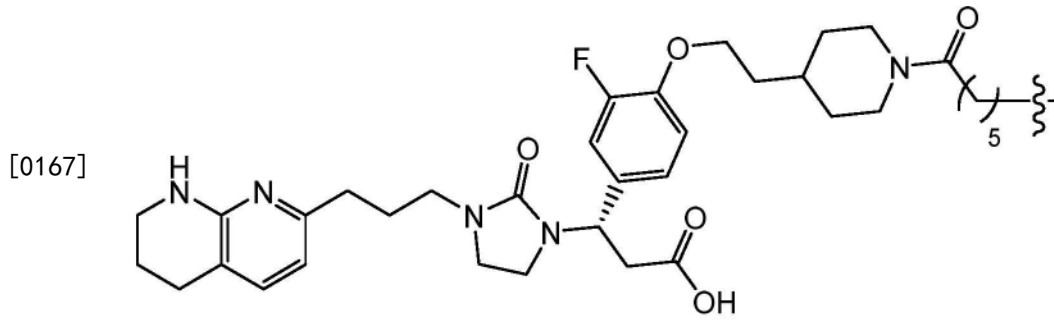


[0163] 在一些实施方案中,结构2.1a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如  
RNAi剂)连接。

[0164] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和  
包含以下结构:

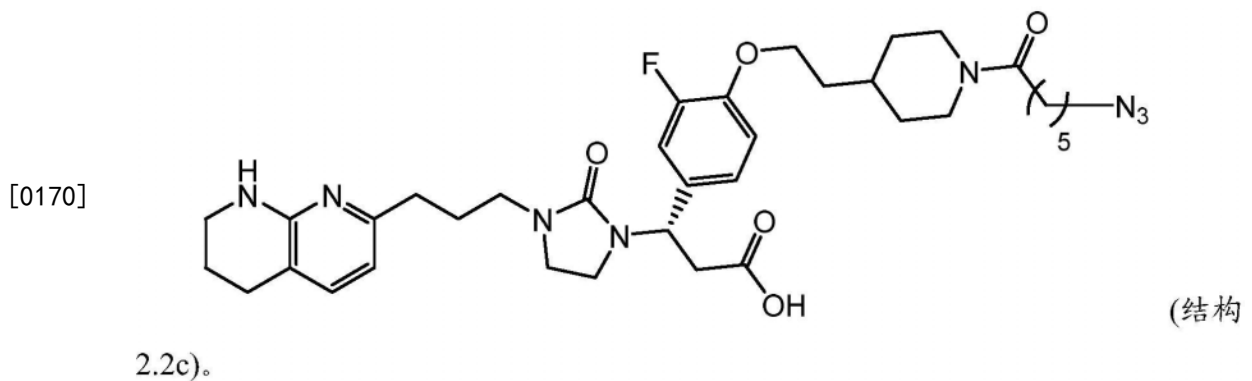


[0166] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

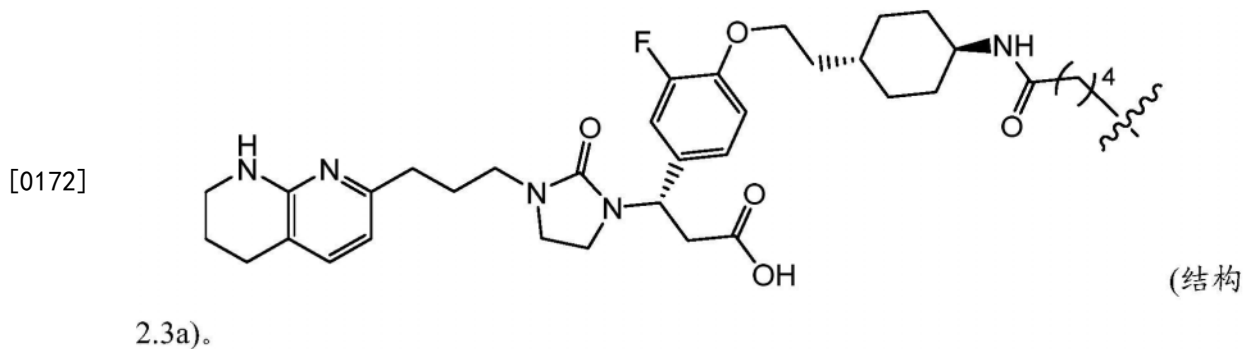


[0168] 在一些实施方案中,结构2.2a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0169] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



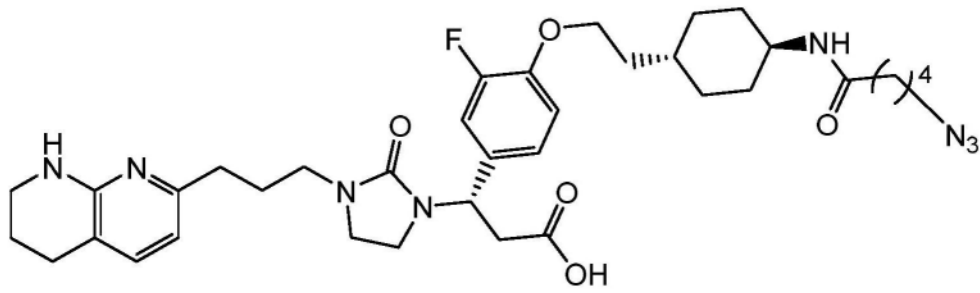
[0171] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



[0173] 在一些实施方案中,结构2.3a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0174] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

[0175]

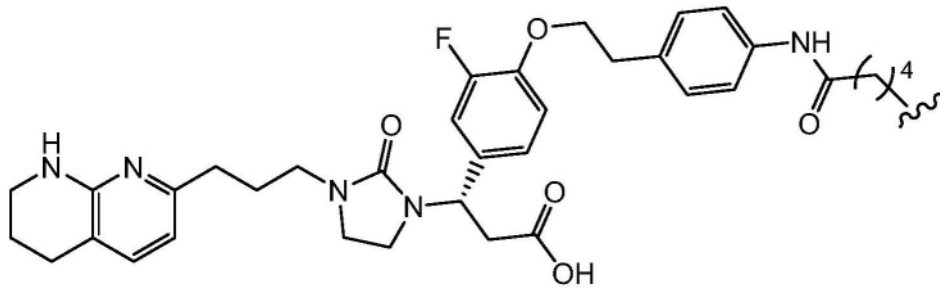


(结构

2.3c)。

[0176] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0177]

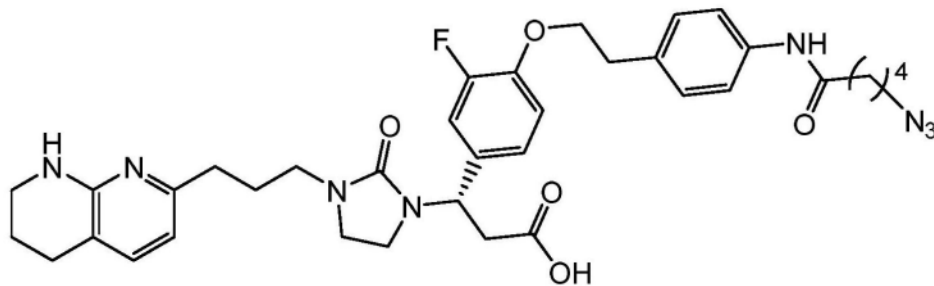


(结构 2.4a)。

[0178] 在一些实施方案中,结构2.4a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0179] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

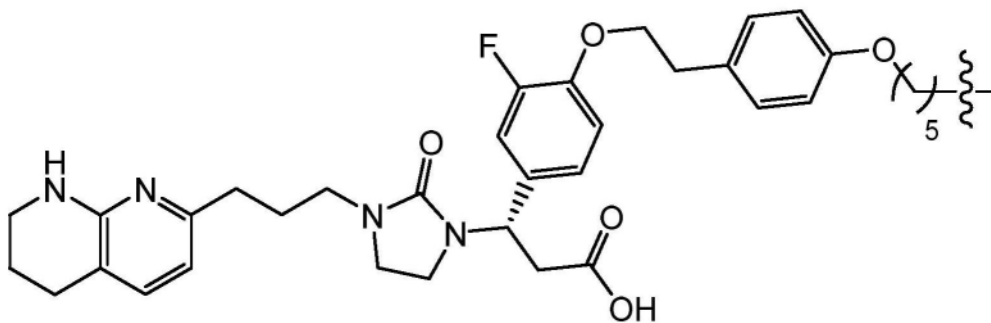
[0180]



(结构 2.4c)。

[0181] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0182]



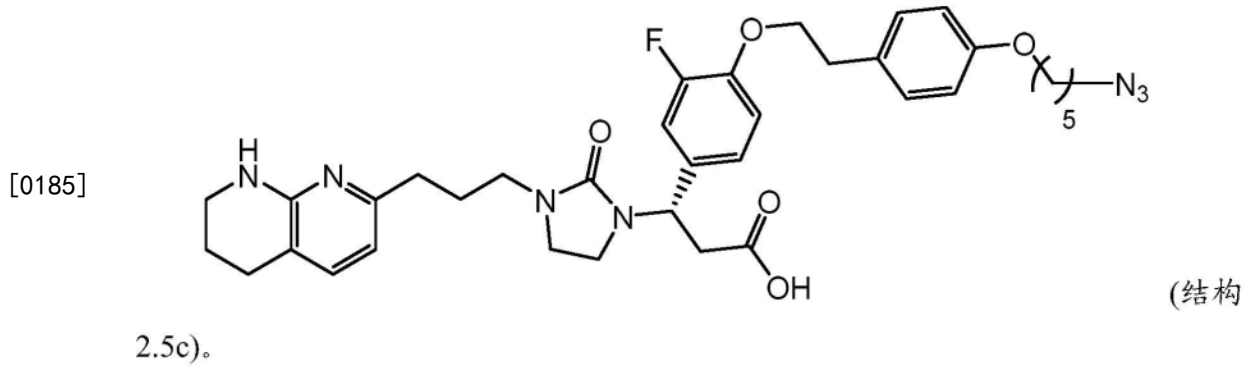
(结构

2.5a)。

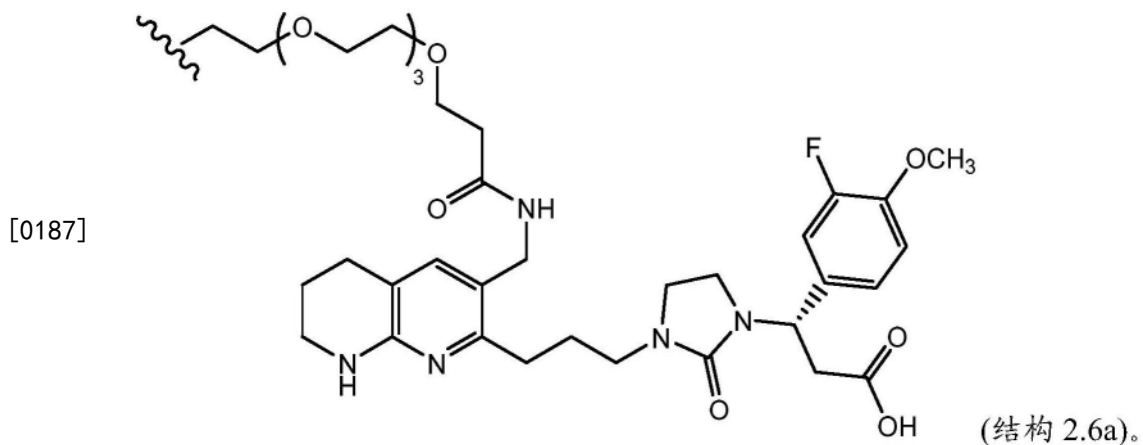
[0183] 在一些实施方案中,结构2.5a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0184] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和

包含以下结构：

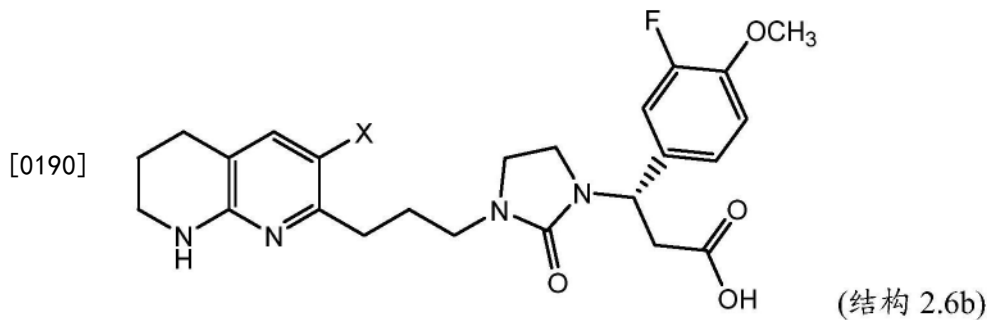


[0186] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



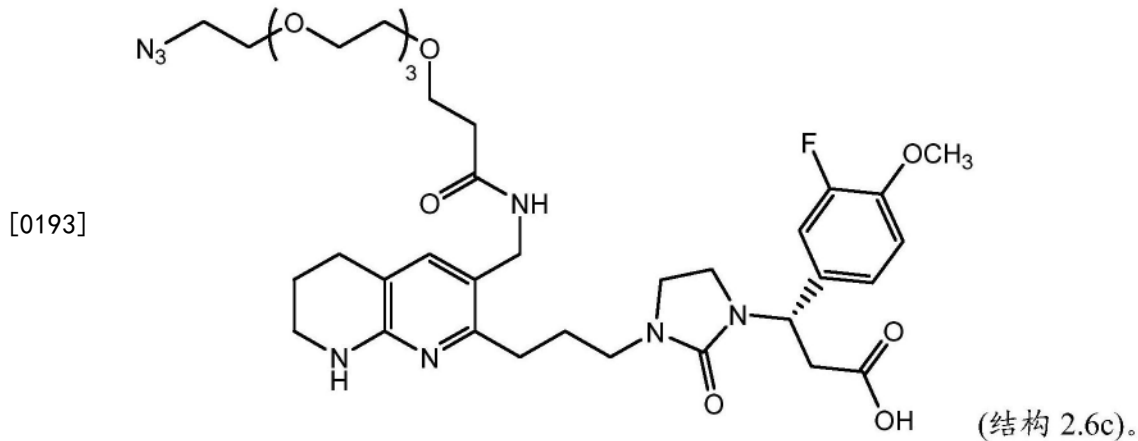
[0188] 在一些实施方案中,结构2.6a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0189] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:



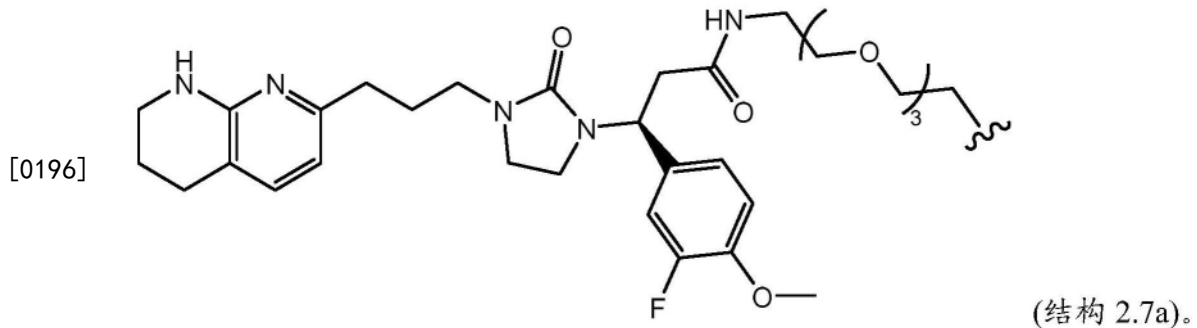
[0191] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0192] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



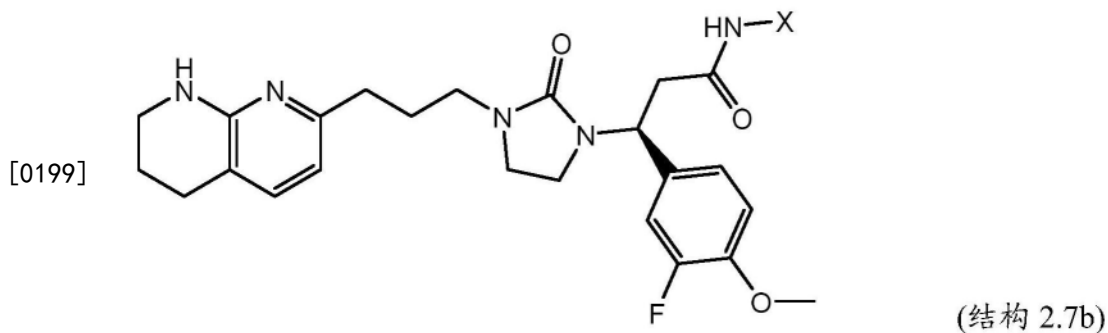
[0194] 反应性基团(或受保护的反应性基团)可用于促进整联蛋白靶向配体与目标分子,例如货物分子的缀合(直接或通过一种或多种支架和/或接头)。

[0195] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



[0197] 在一些实施方案中,结构2.7a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

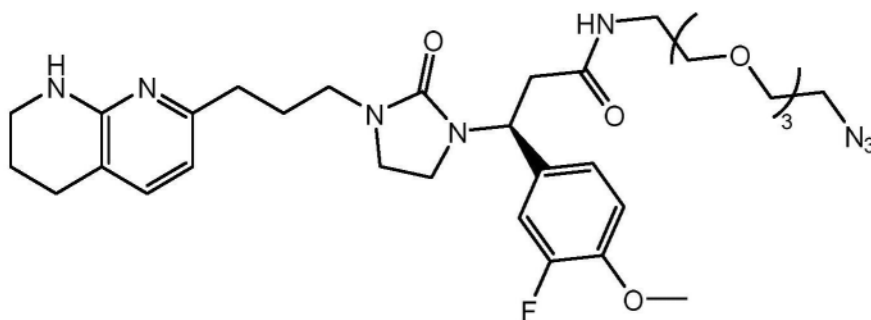
[0198] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:



[0200] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0201] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

[0202]

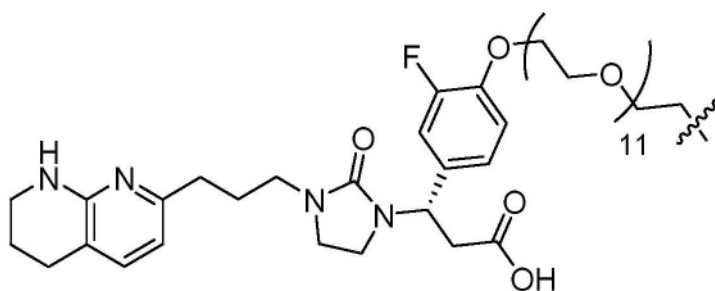


(结构 2.7c)。

[0203] 反应性基团(或受保护的反应性基团)可用于促进整联蛋白靶向配体与目标分子,例如货物分子的缀合(直接或通过一种或多种支架和/或接头)。

[0204] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0205]

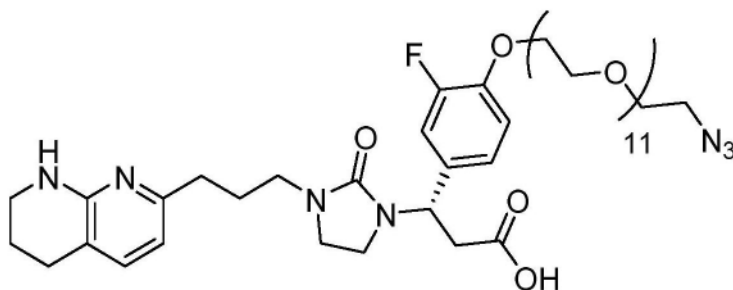


(结构 2.8a)。

[0206] 在一些实施方案中,结构2.8a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0207] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

[0208]

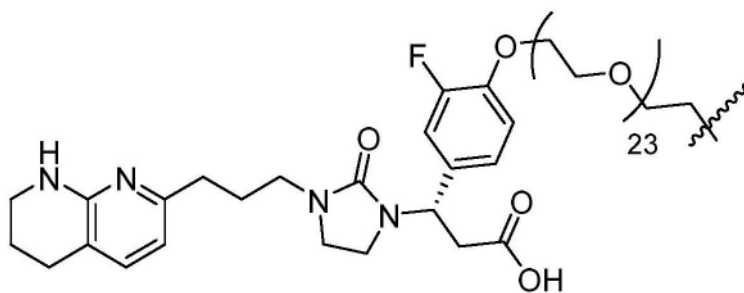


(结构 2.8c)。

[0209] 反应性基团(或受保护的反应性基团)可用于促进整联蛋白靶向配体与目标分子,例如货物分子的缀合(直接或通过一种或多种支架和/或接头)。

[0210] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

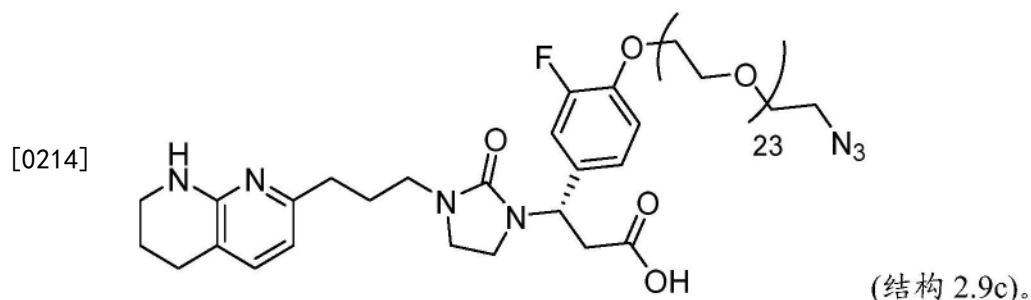
[0211]



(结构 2.9a)。

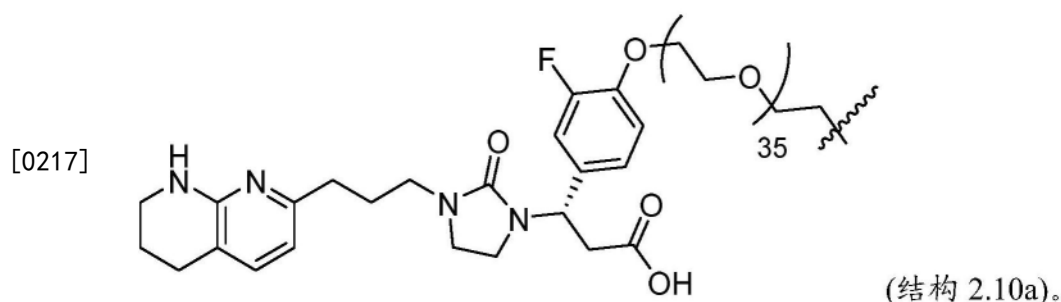
[0212] 在一些实施方案中,结构2.9a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0213] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



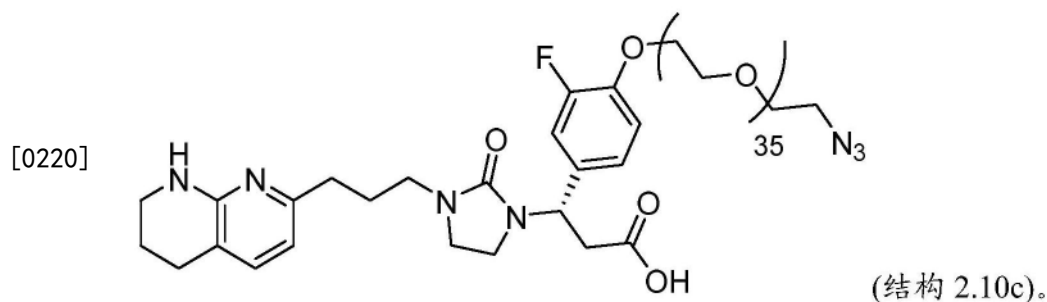
[0215] 反应性基团(或受保护的反应性基团)可用于促进整联蛋白靶向配体与目标分子,例如货物分子的缀合(直接或通过一种或多种支架和/或接头)。

[0216] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



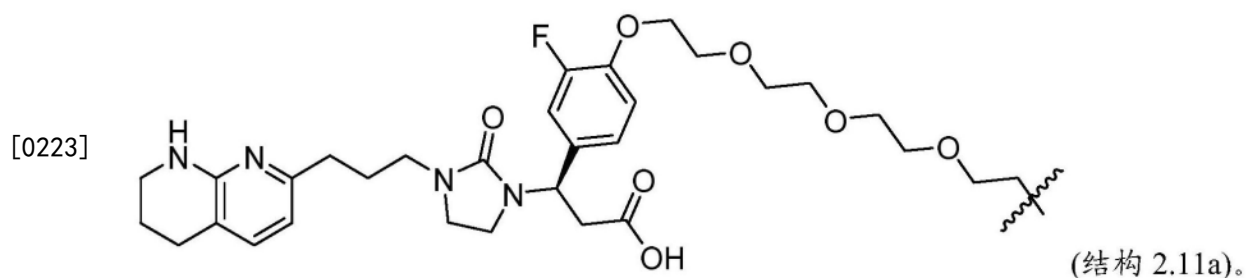
[0218] 在一些实施方案中,结构2.10a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0219] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



[0221] 反应性基团(或受保护的反应性基团)可用于促进整联蛋白靶向配体与目标分子,例如货物分子的缀合(直接或通过一种或多种支架和/或接头)。

[0222] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

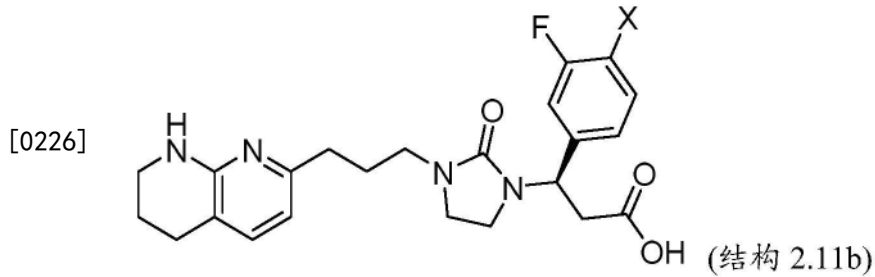


[0224] 在一些实施方案中,结构2.11a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如



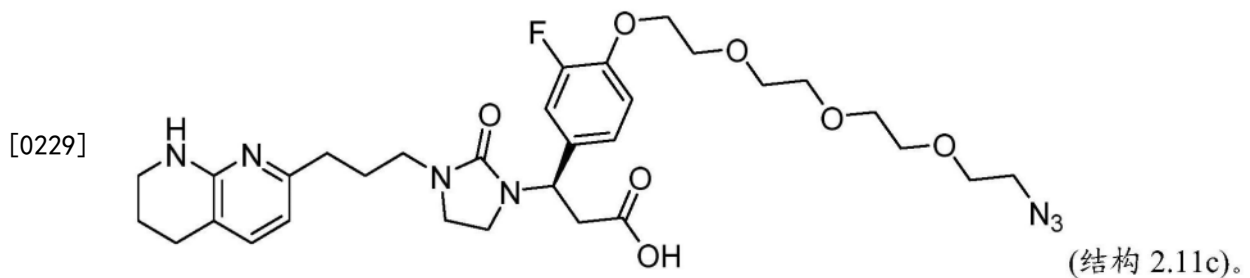
RNAi剂)连接。

[0225] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:



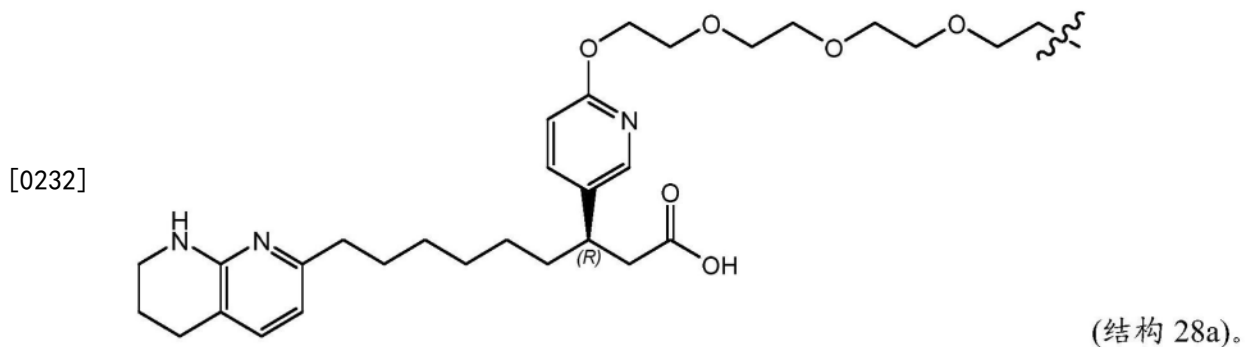
[0227] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0228] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



[0230] 反应性基团(或受保护的反应性基团)可用于促进整联蛋白靶向配体与目标分子,例如货物分子的缀合(直接或通过一种或多种支架和/或接头)。

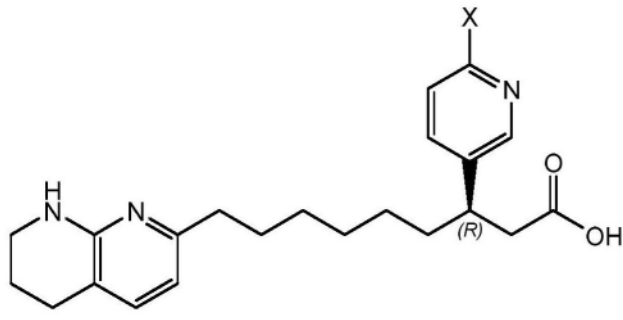
[0231] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



[0233] 在一些实施方案中,结构28a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0234] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

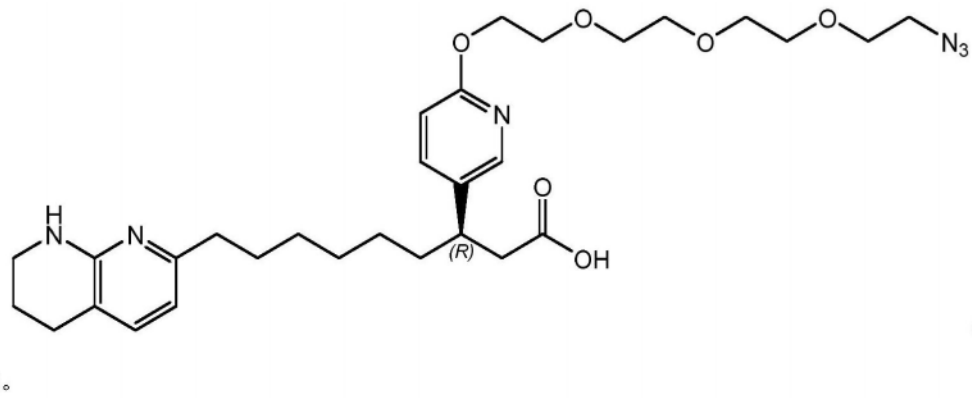
[0235]



[0236] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

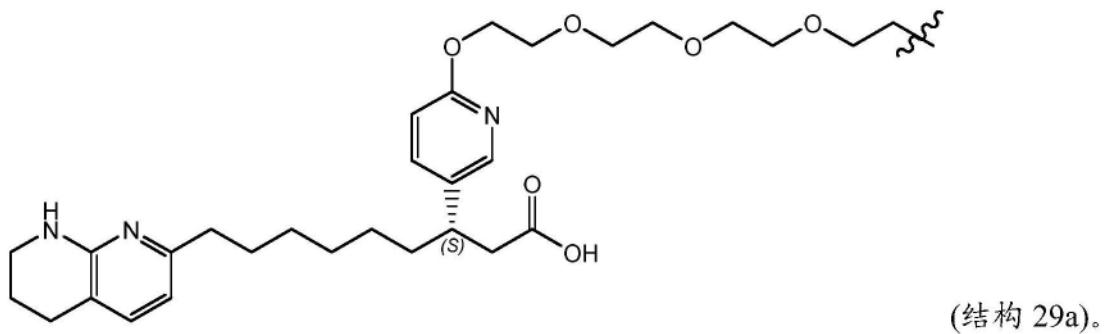
[0237] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

[0238]



[0239] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

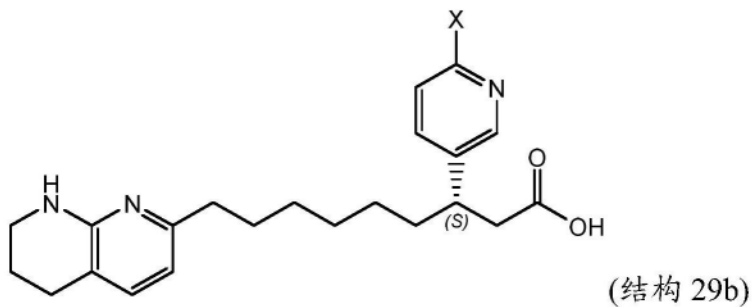
[0240]



[0241] 在一些实施方案中,结构29a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

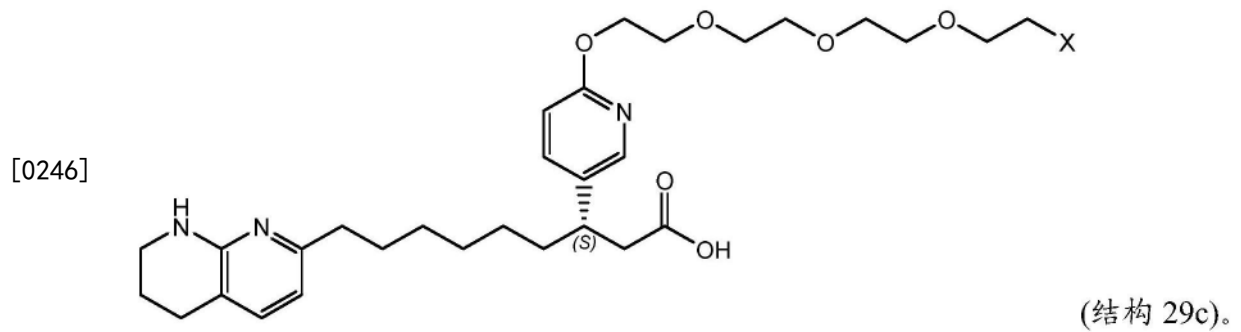
[0242] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0243]

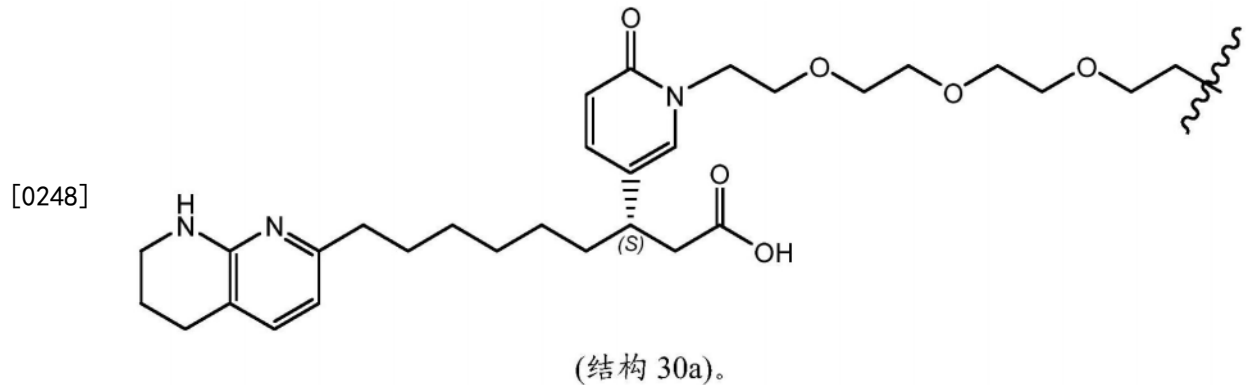


[0244] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0245] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

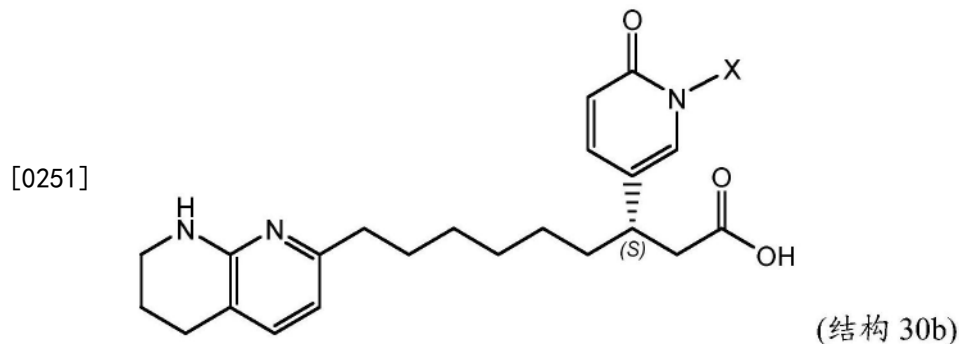


[0247] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



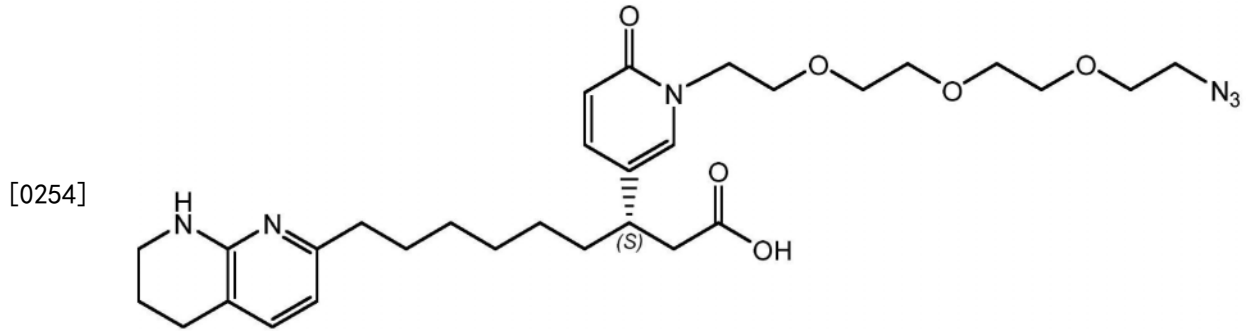
[0249] 在一些实施方案中,结构30a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0250] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:



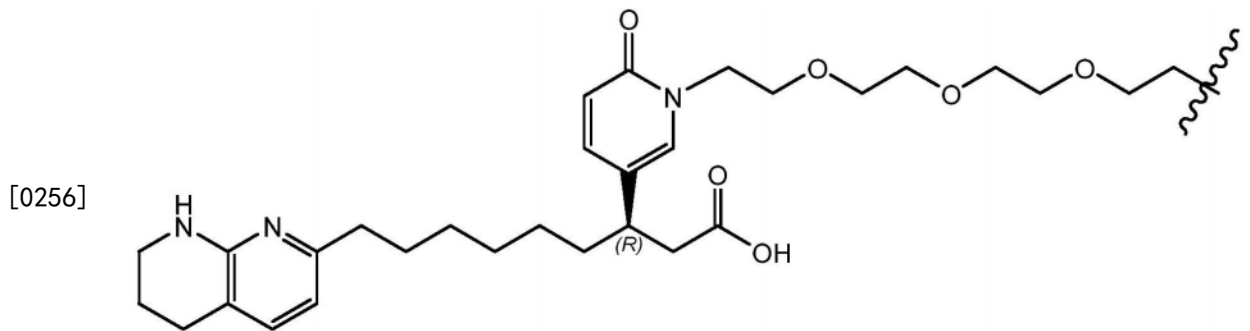
[0252] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0253] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



(结构 30c)。

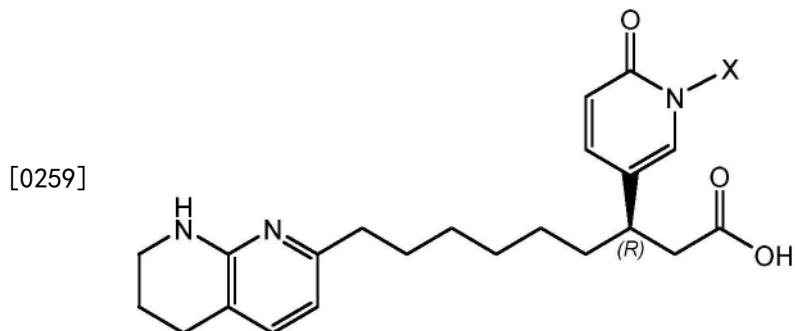
[0255] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:



(结构 31a)。

[0257] 在一些实施方案中,结构31a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0258] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

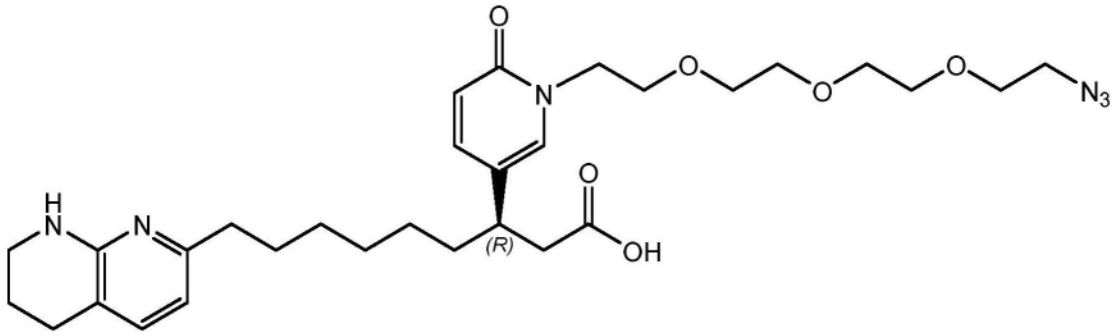


(结构 31b)

[0260] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0261] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

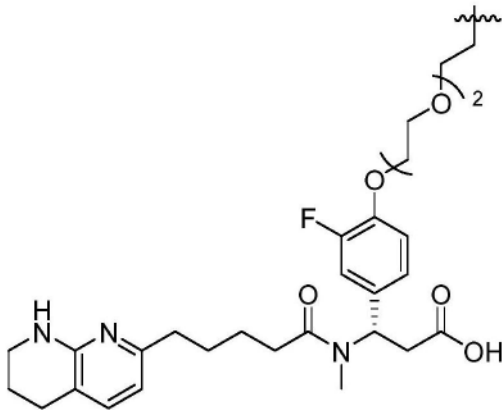
[0262]



(结构 31c)。

[0263] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0264]

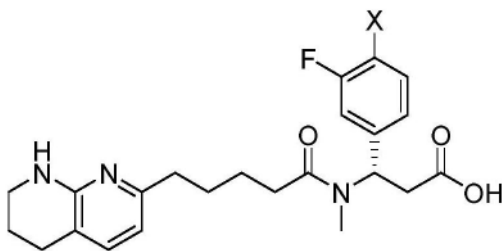


(结构 32a)。

[0265] 在一些实施方案中,结构32a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0266] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0267]

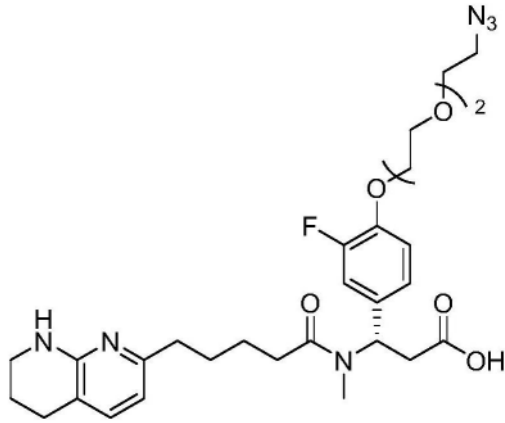


(结构 32b)

[0268] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0269] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

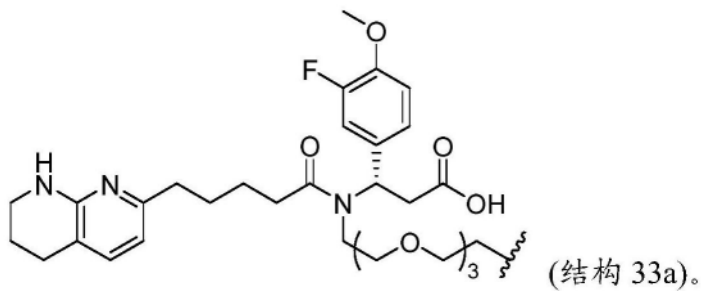
[0270]



(结构 32c)。

[0271] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0272]

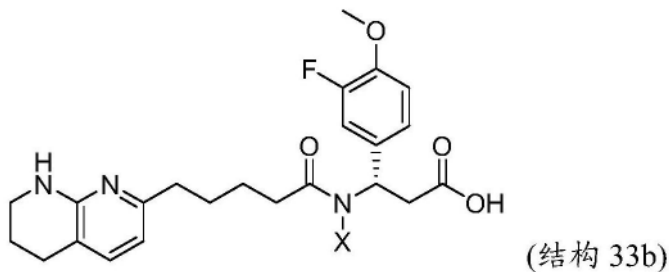


(结构 33a)。

[0273] 在一些实施方案中,结构33a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0274] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0275]

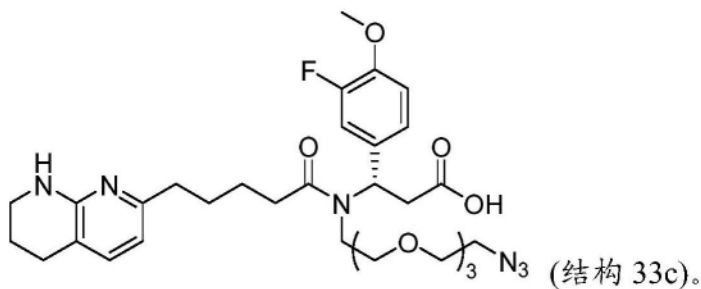


(结构 33b)

[0276] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0277] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

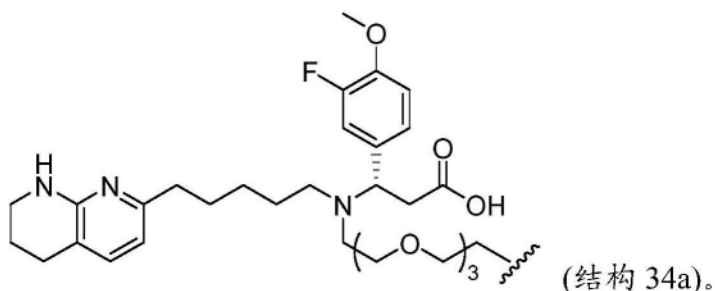
[0278]



(结构 33c)。

[0279] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

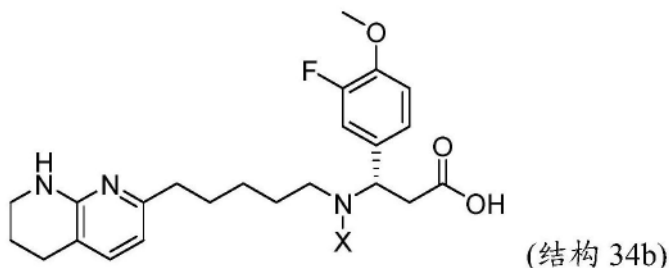
[0280]



[0281] 在一些实施方案中,结构34a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0282] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

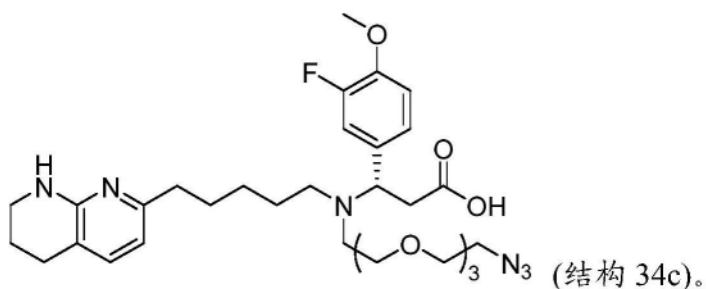
[0283]



[0284] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

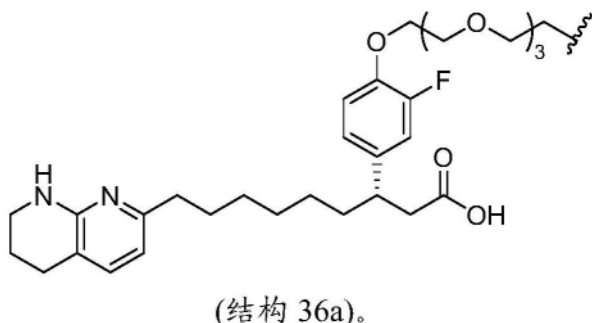
[0285] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

[0286]



[0287] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

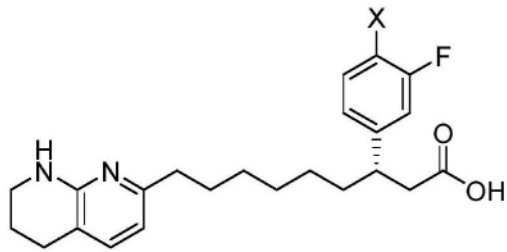
[0288]



[0289] 在一些实施方案中,结构36a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0290] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0291]

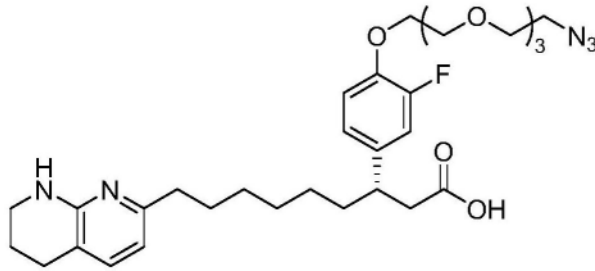


(结构 31b)

[0292] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0293] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

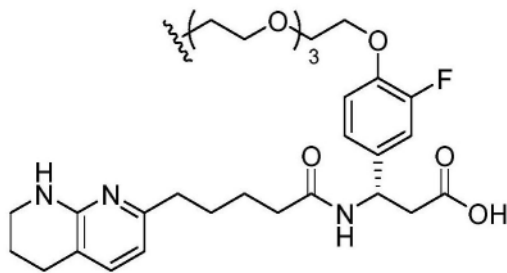
[0294]



(结构 31c)。

[0295] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0296]

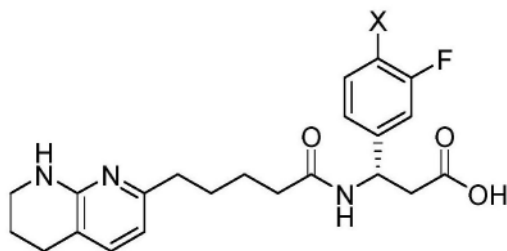


(结构 37a)。

[0297] 在一些实施方案中,结构37a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0298] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0299]



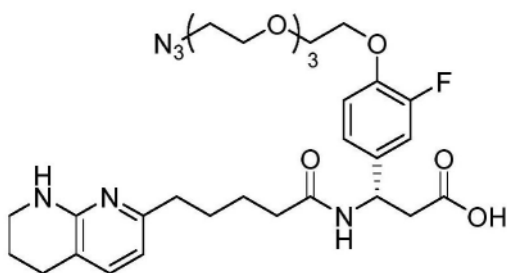
(结构 37b)

[0300] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0301] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:



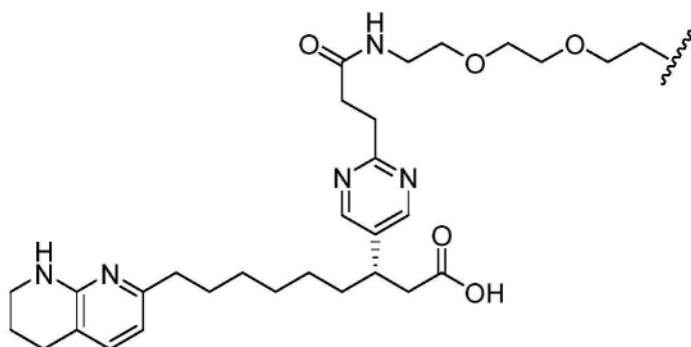
[0302]



(结构 37c)。

[0303] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0304]

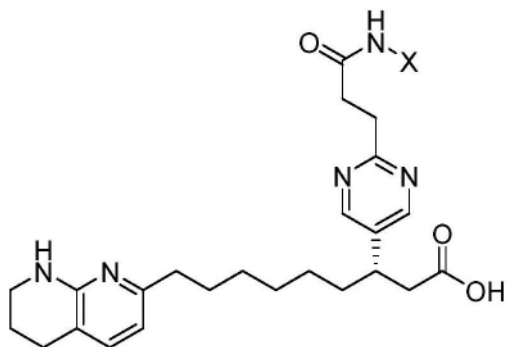


(结构 38a)。

[0305] 在一些实施方案中,结构38a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0306] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0307]

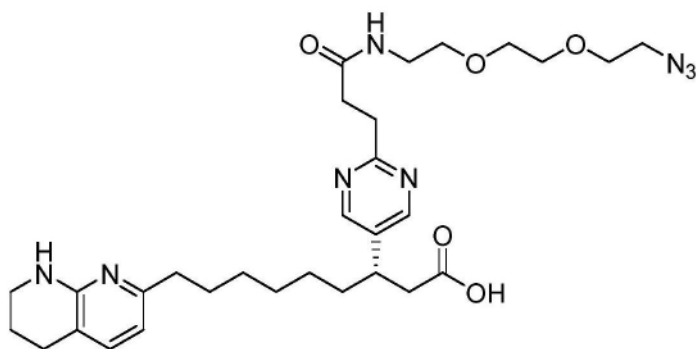


(结构 38b)

[0308] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0309] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

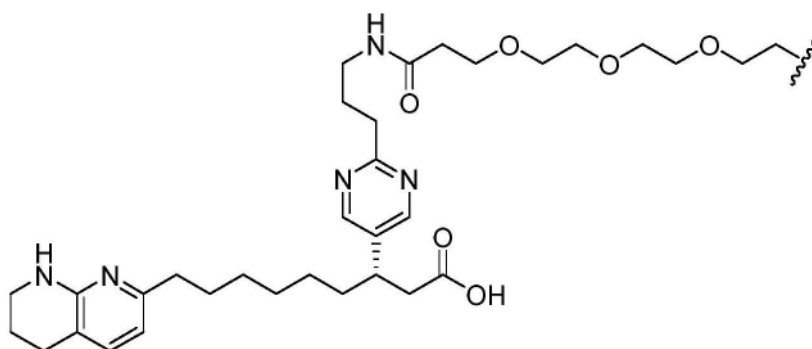
[0310]



(结构 38c)。

[0311] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0312]

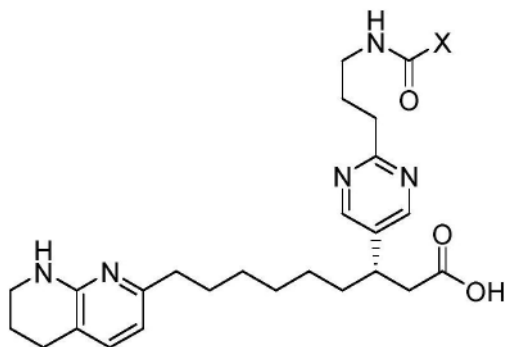


(结构 39a)。

[0313] 在一些实施方案中,结构39a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0314] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0315]

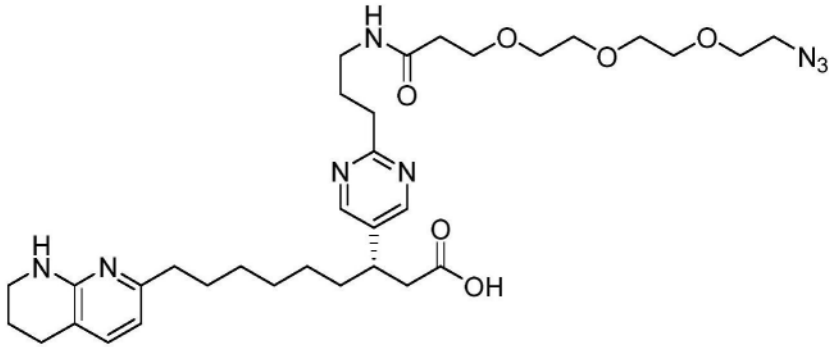


(结构 39b)

[0316] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0317] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

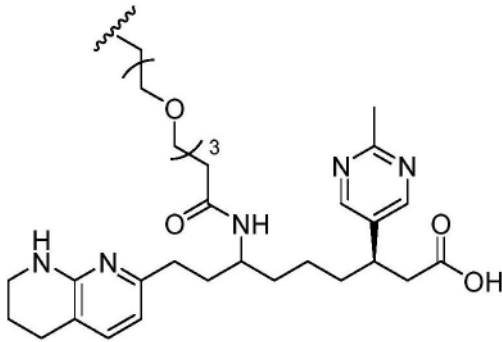
[0318]



(结构 39c)。

[0319] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0320]

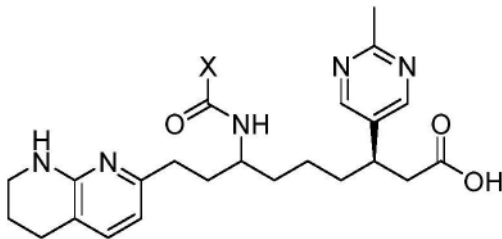


(结构 40a)。

[0321] 在一些实施方案中,结构40a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0322] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0323]

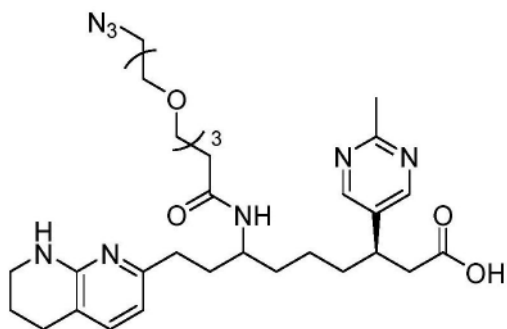


(结构 40b)

[0324] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0325] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

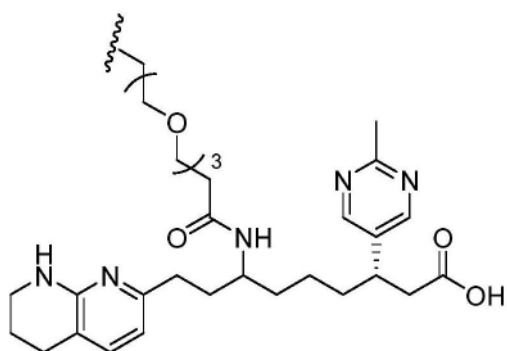
[0326]



(结构 40c)。

[0327] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体包含以下结构:

[0328]

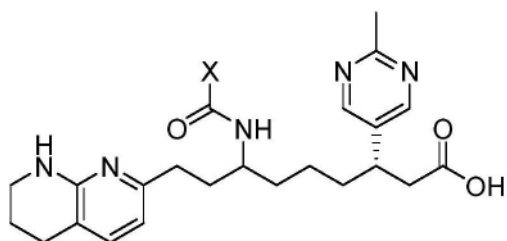


(结构 41a)。

[0329] 在一些实施方案中,结构41a的整联蛋白靶向配体与一种或多种货物分子(例如RNAi剂)连接。

[0330] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子,和包含以下结构:

[0331]

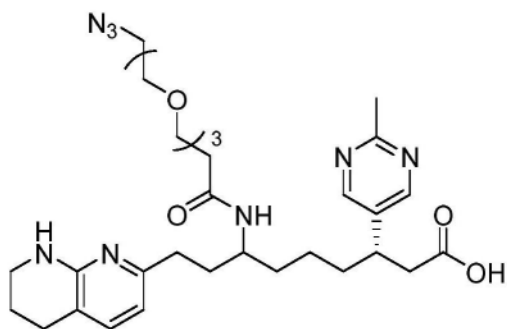


(结构 41b)

[0332] 其中X包括反应性基团、受保护的反应性基团或货物分子(例如RNAi剂)。

[0333] 在一些实施方案中,整联蛋白靶向配体可经合成以包括叠氮化物反应性基团,和包含以下结构:

[0334]



(结构 41c)。

[0335] 在结构1c、结构2c、结构2.1c、结构2.2c、结构2.3c、结构2.4c、结构2.5c、结构2.6c、结构2.7c、结构2.8c、结构2.9c、结构2.10c、结构2.11c、结构28c、结构29c、结构30c、结构31c、结构32c、结构33c、结构34c、结构36c、结构37c、结构38c、结构39c、结构40c和结构41c的任何一种中公开的叠氮化物反应性基团可用于连接整联蛋白靶向配体至目标分子，即货物分子，例如RNAi剂。货物分子可以是需要靶向表达整联蛋白的细胞的任何分子。

[0336] 除非另有说明，如本文所用，术语“烷基”指具有从1至10个碳原子的直链或支链的饱和脂族烃基团。例如，“C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基”包括具有1、2、3、4、5或6个碳原子的直链或支链排列的烷基基团。烷基基团的非限制性实例包括甲基、乙基、异丙基、叔丁基、正己基。如本文所用，术语“氨基烷基”指以正常化合价允许的方式在任何位置被一个或多个氨基基团取代的如上定义的烷基基团。氨基基团可以是未取代的、单取代的或二取代的。氨基烷基基团的非限制性实例包括氨基甲基、二甲基氨基甲基和2-氨基丙-1-基。

[0337] 除非另有说明，如本文所用，术语“环烷基”指具有从3至14个碳原子的饱和或不饱和的非芳族烃环基团。环烷基基团的非限制性实例包括但不限于环丙基、甲基-环丙基、2,2-二甲基-环丁基、2-乙基-环戊基和环己基。环烷基可以包括多个螺环或稠环。环烷基基团任选以正常化合价允许的方式在任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0338] 除非另有说明，如本文所用，术语“烯基”指含有至少一个碳-碳双键，并具有从2至10个碳原子的直链或支链的非芳族烃基团。在这样的基团中可以存在至多五个碳-碳双键。例如，“C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>”烯基定义为具有从2至6个碳原子的烯基基团。烯基基团的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基和环己烯基。烯基基团的直链、支链或环状部分可以含有双键，并且任选以正常化合价允许的方式在任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。术语“环烯基”指具有特定数量的碳原子和至少一个碳-碳双键的单环烃基基团。

[0339] 除非另有说明，如本文所用，术语“炔基”指含有从2至10个碳原子，并且含有至少一个碳-碳三键的直链或支链的烃基基团。可以存在至多5个碳-碳三键。因此，“C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>炔基”指具有从2至6个碳原子的炔基基团。炔基基团的实例包括但不限于乙炔基、2-丙炔基和2-丁炔基。炔基基团的直链或支链部分可任选以正常化合价允许的方式在任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0340] 如本文所用，“烷氧基 (alkoxy)”或“烷氧基 (alkoxy)”指具有指定数目的碳原子的-O-烷基基团。例如，C<sub>1-6</sub>烷氧基意在包括C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>和C<sub>6</sub>烷氧基基团。例如C<sub>1-8</sub>烷氧基意在包括C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>7</sub>和C<sub>8</sub>烷氧基基团。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、仲戊氧基、正庚氧基和正辛氧基。

[0341] 如本文所用,“酮基”指通过羰基桥连接的本文定义的任何烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环基、杂芳基或芳基基团。酮基基团的实例包括但不限于烷酰基(例如乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基或己酰基)、烯酰基(例如丙烯酰基)、炔酰基(例如乙炔酰基、丙炔酰基、丁炔酰基、戊炔酰基或己炔酰基)、芳酰基(例如苯甲酰基)、杂芳酰基(例如吡咯酰基、咪唑酰基、喹啉酰基或吡啶酰基)。

[0342] 如本文所用,“烷氧基羰基”指通过羰基桥连接的如上定义的任何烷氧基基团(即,-C(O)O-烷基)。烷氧基羰基基团的实例包括但不限于甲氧基羰基、乙氧基羰基、异丙氧基羰基、正丙氧基羰基、叔丁氧基羰基、苄氧基羰基或正戊氧基羰基。

[0343] 如本文所用,“芳氧基羰基”指通过氧羰基桥连接的如本文定义的任何芳基基团(即,-C(O)O-芳基)。芳氧基羰基基团的实例包括但不限于苯氧基羰基和萘氧基羰基。

[0344] 如本文所用,“杂芳氧基羰基”指通过氧羰基桥连接的如本文定义的任何杂芳基(即,-C(O)O-杂芳基)。杂芳氧基羰基的实例包括但不限于2-吡啶氧基羰基、2-噁唑氧基羰基、4-噻唑氧基羰基或嘧啶氧基羰基。

[0345] 如本文所用,“芳基”或“芳族的”指在每个环中具有至多6个原子的任何稳定的单环或多环碳环,其中至少一个环是芳族的。芳基基团的实例包括但不限于苯基、萘基、蒽基、四氢萘基、二氢茛基和联苯基。在其中芳基取代基是双环的并且一个环是非芳族的情况下,应理解连接是经由芳族环进行的。芳基基团任选以正常化合价允许的方式在任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0346] 如本文所用,术语“杂芳基”代表每个环中具有至多7个原子的稳定的单环或多环的环,其中至少一个环是芳族的,并且含有1-4个选自O、N和S的杂原子。杂芳基基团的实例包括但不限于吡啶基、呋唑基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、吡嗪基、吡啶基、苯并三唑基、呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑酮基(benzimidazolonyl)、苯并噁唑酮基(benzoxazolonyl)、喹啉基、异喹啉基、二氢异吲哚酮基(dihydroisoindolonyl)、咪唑并吡啶基、异吲哚酮基、吡啶基、噁唑基、噁二唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基和四氢喹啉。“杂芳基”还应理解为包括任何含氮杂芳基的N-氧化物衍生物。在其中杂芳基取代基是双环的并且一个环是非芳族的或不杂原子的情况下,应理解连接是经由芳族环或经由含杂原子的环进行的。杂芳基基团任选以正常化合价允许的方式在任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0347] 如本文所用,术语“杂环”、“杂环的”或“杂环基”指含有从1至4个选自O、N和S的杂原子的3-至14-元芳族或非芳族杂环,包括多环基团。如本文所用,术语“杂环的”也被认为与术语“杂环”和“杂环基”同义,并且应理解为也具有本文给出的相同定义。“杂环基”包括上述杂芳基,以及其二氢和四氢类似物。杂环基基团的实例包括但不限于氮杂环丁烷基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并呋喃基(benzofurazanyl)、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、呋唑基、呋喃基、噁唑基、咪唑基、二氢吡啶基、吡啶基、吡啶吡嗪基(indolazinylyl)、吡啶基、异苯并呋喃基、异吡啶基、异喹啉基、异噻唑基、异噁唑基、萘吡啶基(naphthpyridinylyl)、噁二唑基、氧代噁唑烷基、噁唑基、噁唑啉、氧代哌嗪基、氧代吡咯烷基、氧代吗啉基、异噁唑啉、氧杂环丁烷基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、吡嗪基、吡啶并吡啶基(pyridopyridinylyl)、吡嗪基、吡啶基、吡啶酮基、嘧啶基、嘧啶酮基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、喹啉基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、四氢噻喃基、四氢异喹啉基、四唑基、四唑并吡啶基

(tetrazolopyridyl)、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、三唑基、1,4-二氧杂环己烷基、六氢氮杂萘基(hexahydroazepinyl)、哌嗪基、哌啶基、吡啶-2-酮基、吡咯烷基、吗啉基、硫代吗啉基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并噻吩基、二氢苯并噁唑基、二氢呋喃基、二氢咪唑基、二氢吡啶基、二氢异噁唑基、二氢异噻唑基、二氢噁二唑基、二氢噁唑基、二氢吡嗪基、二氢吡唑基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢吡咯基、二氢喹啉基、二氢四唑基、二氢噻二唑基、二氢噻唑基、二氢噻吩基、二氢三唑基、二氢氮杂环丁烷基、二氧化硫代吗啉基、亚甲基二氧苯甲酰基、四氢呋喃基和四氢噻吩基,及其N-氧化物。杂环基取代基的连接可经由碳原子或经由杂原子发生。杂环基基团任选以正常化合价允许的方式在任何位置上被单-、二-、三-、四-或五-取代。

[0348] 如本文所用,术语“治疗”(“treat”,“treatment”)等指为减轻或缓解受试者中疾病的一种或多种症状的数量、严重性和/或频率所采取的方法或步骤。如本文所用,“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”可包括预防、控制、预防性治疗和/或抑制受试者中疾病的一种或多种症状的数量、严重性和/或频率。

[0349] 如本文所用,短语“递送至细胞”等当涉及货物分子时是指在功能上递送货物分子至细胞。短语“在功能上递送”是指以使货物分子能够具有预期的生物活性的方式递送货物分子至细胞。当特别涉及作为RNAi剂的货物分子时,预期的生物活性是例如,基因表达的序列特异性抑制。

[0350] 除非另有说明,本文所用的符号  的用途指任何一个或多个基团可与其连接,这符合本文所述发明的范围。

[0351] 如本文所用,术语“异构体”指具有相同分子式但在其原子的性质或键合顺序或其原子的空间排列上不同的化合物。在其原子空间排列方面不同的异构体称为“立体异构体”。彼此不成镜像的立体异构体称为“非对映异构体”,并且不能重叠镜像的立体异构体称为“对映异构体”,或有时称为光学异构体。与四个不相同的取代基键合的碳原子被称为“手性中心”。

[0352] 如本文所用,连接基团是将一个分子或分子的一部分连接到另一个分子或分子的另一部分的一个或多个原子。在本领域中,术语连接基团和间隔基团有时可互换使用。类似地,如本领域中所用,术语支架有时与连接基团互换使用。在一些实施方案中。在一些实施方案中,连接基团可以包括PEG基团或PEG部分,或由其组成。

[0353] 如本文所用,术语“连接”或“缀合”在涉及两个分子之间的连接时意指两个分子通过共价键连接或两个分子经由非共价键(例如氢键或离子键)缔合。在一些实例中,当术语“连接”指两个分子之间经由非共价键的缔合时,两个不同分子之间的缔合在生理学可接受的缓冲液(例如,磷酸盐缓冲盐水)中具有小于 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ (例如,小于 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、小于 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或小于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ )的 $K_D$ 。除非另有说明,如本文所用的术语连接可以指第一化合物和第二化合物之间的连接,其中具有或不具有任何插入的原子或原子团。

[0354] 本领域普通技术人员将容易理解和领会,本文公开的化合物和组合物可具有质子化或去质子化状态的某些原子(例如,N,O或S原子),这取决于化合物或组合物所处的环境。因此,如本文所用,本文所公开的结构设想某些官能团,诸如,例如OH、SH或NH可被质子化或去质子化。如本领域普通技术人员将容易理解的,本文的公开内容旨在涵盖所公开的化合

物和组合物,而不管它们基于环境pH的质子化状态。

[0355] 如本文权利要求中所用,短语“由…组成”排除权利要求中未指明的任何要素、步骤或成分。当在本文的权利要求中使用时,短语“基本上由…组成”将权利要求的范围限制到指定的材料或步骤以及那些不实质上影响要求保护的本发明的一个或多个基本和新颖特征的材料或步骤。

[0356] 除非另有定义,如本文所用,所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明的实践或测试,但在下文描述合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均通过整体引用并入本文中。在冲突的情况下,以本说明书,包括定义为准。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,而不是限制性的。

[0357] 多齿 $\alpha\nu\beta 3$ 整联蛋白配体和支架

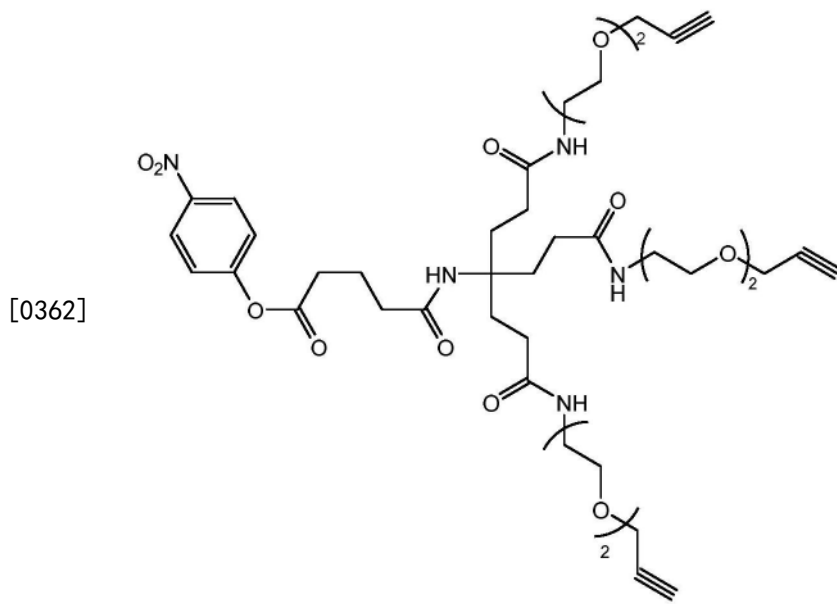
[0358] 如本文所公开的,在一些实施方案中,一个或多个 $\alpha\nu\beta 3/5$ 整联蛋白配体可与一个或多个货物分子连接。在一些实施方案中,仅一个整联蛋白配体与货物分子缀合(本文称为“单齿”或“单价”配体)。在一些实施方案中,两个整联蛋白配体与货物分子缀合(本文称为“二齿”或“二价”靶向基团)。在一些实施方案中,三个整联蛋白配体与货物分子缀合(本文称为“三齿”或“三价”靶向基团)。在一些实施方案中,四个整联蛋白配体与货物分子缀合(本文称为“四齿”或“四价”靶向基团)。在一些实施方案中,多于四个整联蛋白配体与货物分子缀合。

[0359] 在一些实施方案中,当仅一个整联蛋白配体与货物分子缀合(本文称为“单齿”配体)时,整联蛋白配体可直接与货物分子缀合。在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白配体可以经由支架或其它接头结构与货物分子缀合。

[0360] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白配体包括一个或多个支架。支架,有时在本领域也称为连接基团或接头,可用于促进一个或多个货物分子与本文公开的一个或多个整联蛋白配体的连接。与本文公开的配体相容的有用支架通常是本领域已知的。可与本文公开的 $\alpha\nu\beta 3$ 整联蛋白配体一起使用的支架的非限制性实例包括但不限于聚合物和聚氨基酸(例如,双谷氨酸、聚-L-赖氨酸等)。在一些实施方案中,支架可以包括半胱氨酸接头或基团、DBCO-PEG<sub>1-24</sub>-NHS、炔丙基-PEG<sub>1-24</sub>-NHS和/或多齿DBCO和/或炔丙基部分。

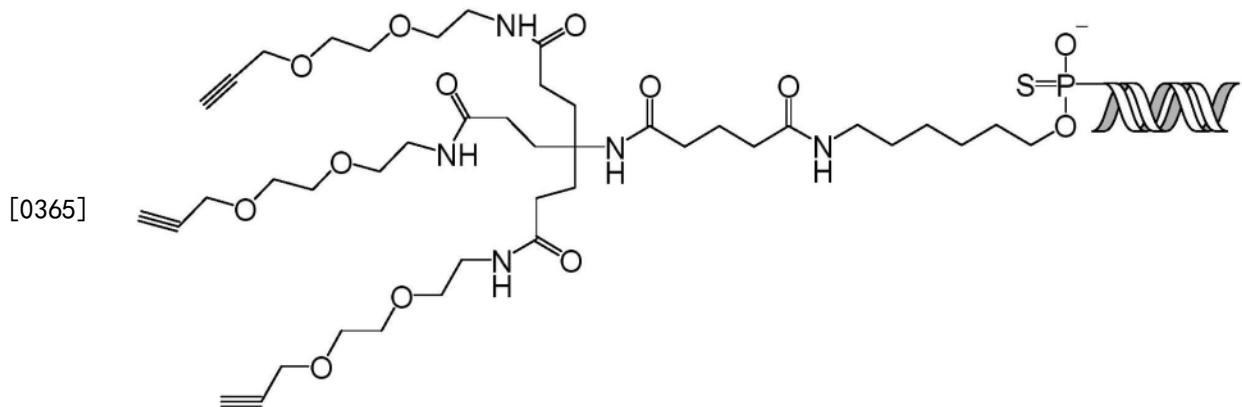
[0361] 在一些实施方案中,用于将本文公开的一个或多个整联蛋白配体与一个或多个货物分子连接的支架具有以下结构:





[0363] 例如, 支架1的使用促进与整联蛋白配体单体和一个或多个货物分子两者的有效缀合。支架1包括胺反应性对硝基苯酚(也称为4-硝基苯酚)酯、酰胺键和三个PEG<sub>2</sub>单元臂, 以及末端炔。4-硝基苯酚酯可以通过酰胺形成与货物分子上的伯胺(诸如用末端胺基(例如NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>)配制的RNA引发剂上的伯胺)缀合。末端炔可以通过铜催化的点击化学与叠氮基修饰的配体(肽和小分子两者)缀合。

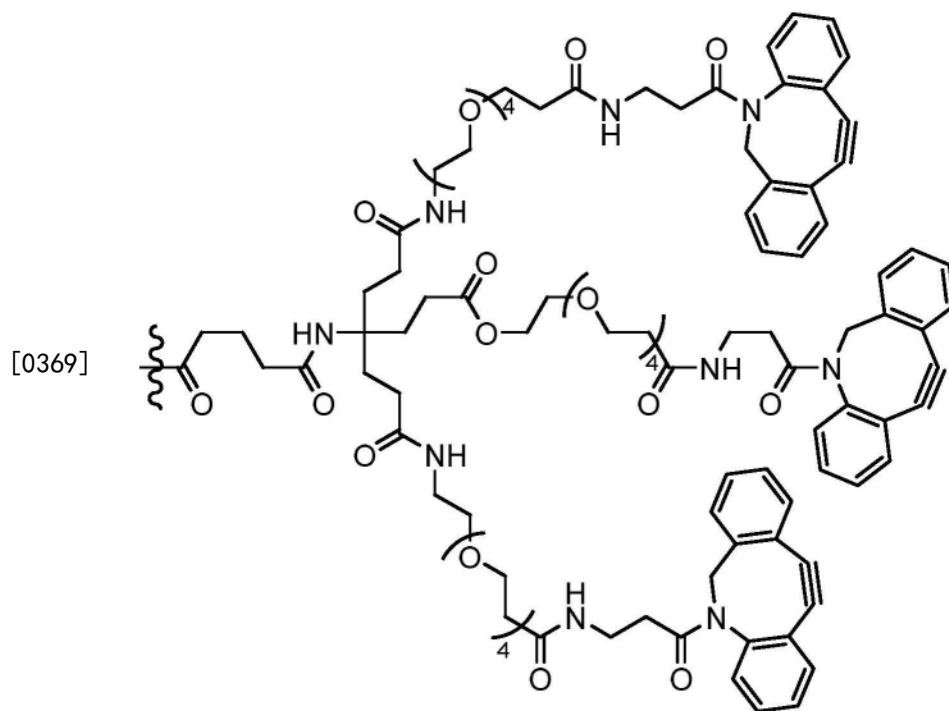
[0364] 在一些实施方案中, 货物分子是RNAi剂。在一些实施方案中, 支架1可以与RNAi剂的末端连接, 诸如与RNAi剂的有义链的5'末端连接。例如, 可以修饰RNAi剂的有义链的5'末端以包括连接至RNAi剂的5'末端核苷酸的5'末端的C<sub>6</sub>胺(-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>)。具有这样的C<sub>6</sub>胺修饰(或产生末端胺的其它修饰)的RNAi剂可容易地与支架1缀合, 如下述结构中的表述所示:




[0366] (结构380), 其中  表示RNAi剂。

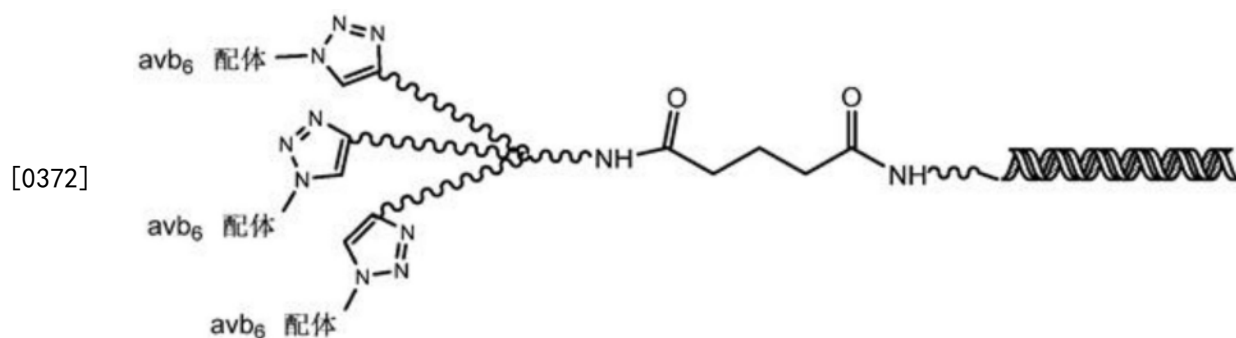
[0367] 然后, 可以将上述结构380的炔基与本文公开的整联蛋白配体缀合以形成三齿整联蛋白靶向基团。



[0368] 在一些实施方案中, 支架可使用DBCO(二苯并环辛炔)合成, 其可由以下结构代表:



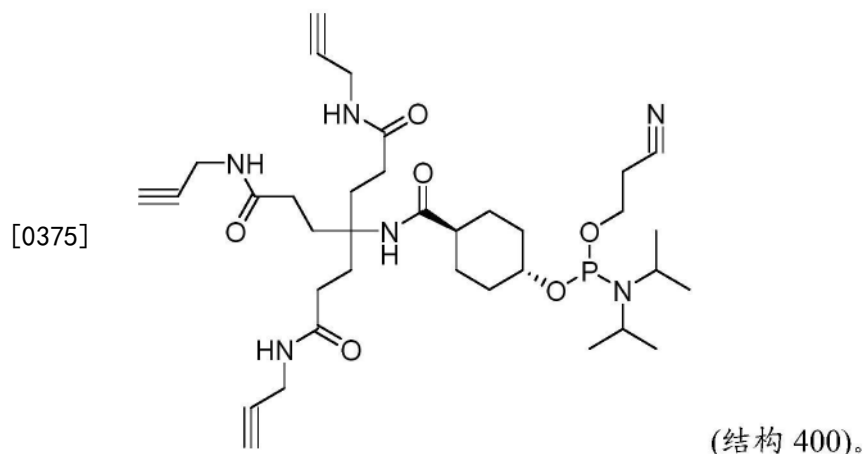
[0370] (结构381), 其中  表示与包含货物分子的反应性基团或部分的连接。

[0371] 在一些实施方案中, 在RNAi剂和本文公开的整联蛋白配体之间形成三唑基团, 如下列通用结构所示:



[0373] (结构390), 其中  表示可用于将配体与RNAi剂结合的任何合适的支架或接头, 并且  表示RNAi剂。

[0374] 在一些实施方案中, 支架可作为亚磷酸胺化合物合成, 其实例在以下结构中显示:

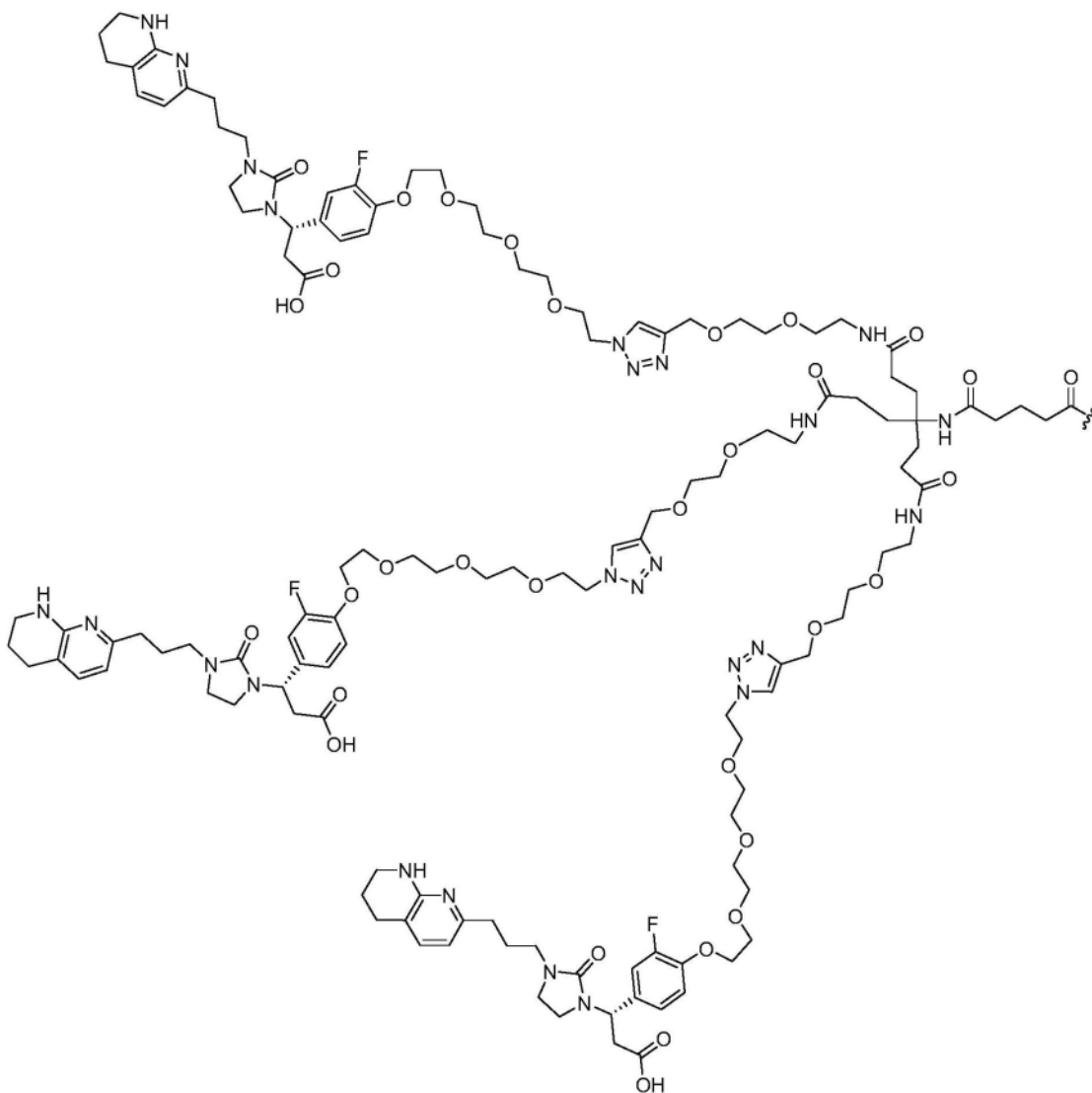


[0376] 结构400的三炔化合物允许三齿配体容易与RNAi剂的有义链的5'末端通过炔与包含叠氮化物的靶向配体的点击反应偶联。

[0377] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向基团包含结构1a、结构2a、结构2.1a、结构2.2a、结构2.3a、结构2.4a、结构2.5a、结构2.6a、结构2.7a、结构2.8a、结构2.9a、结构2.10a、结构2.11a、结构28a、结构29a、结构30a、结构31a、结构32a、结构33a、结构34a、结构36a、结构37a、结构38a、结构39a、结构40a和结构41a,其中 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 整联蛋白靶向基团是三齿靶向基团并包含三个配体。

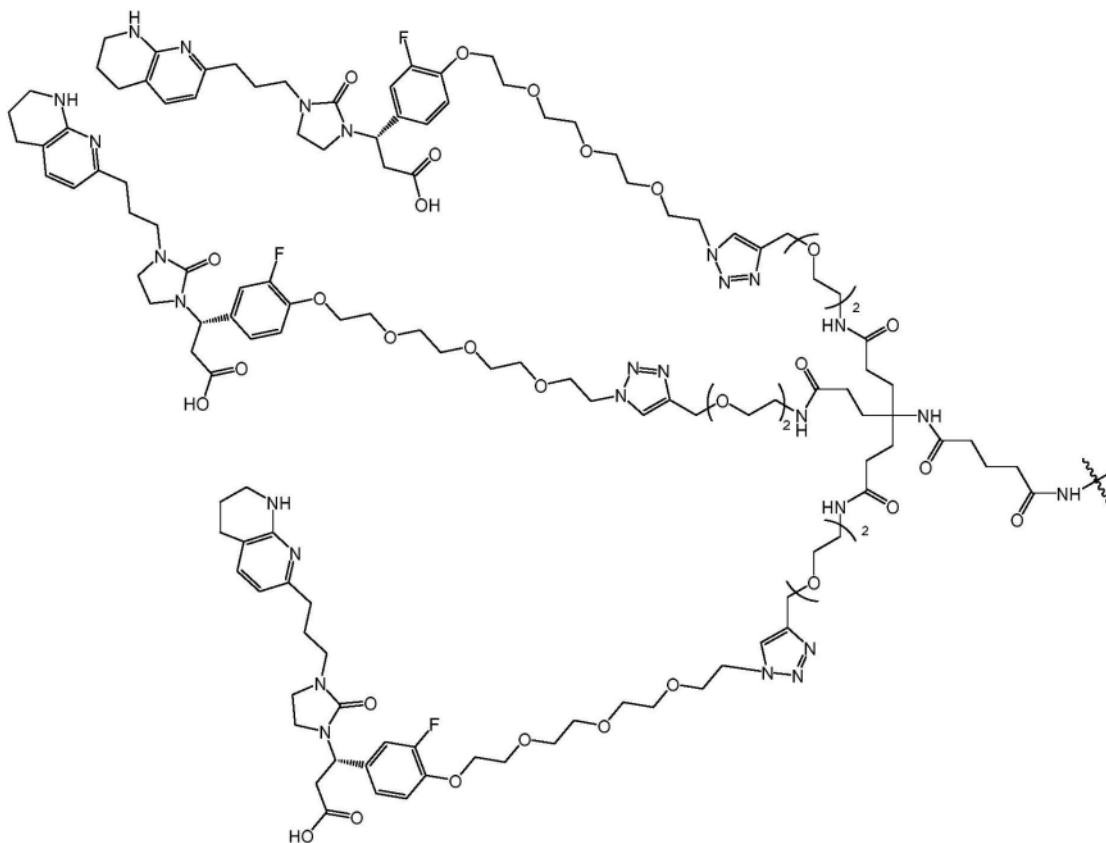
[0378] 在一些实施方案中,本文公开的 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 三齿靶向基团包含三个结构2a的配体,和可通过以下结构表示:

[0379]



(结构 700)

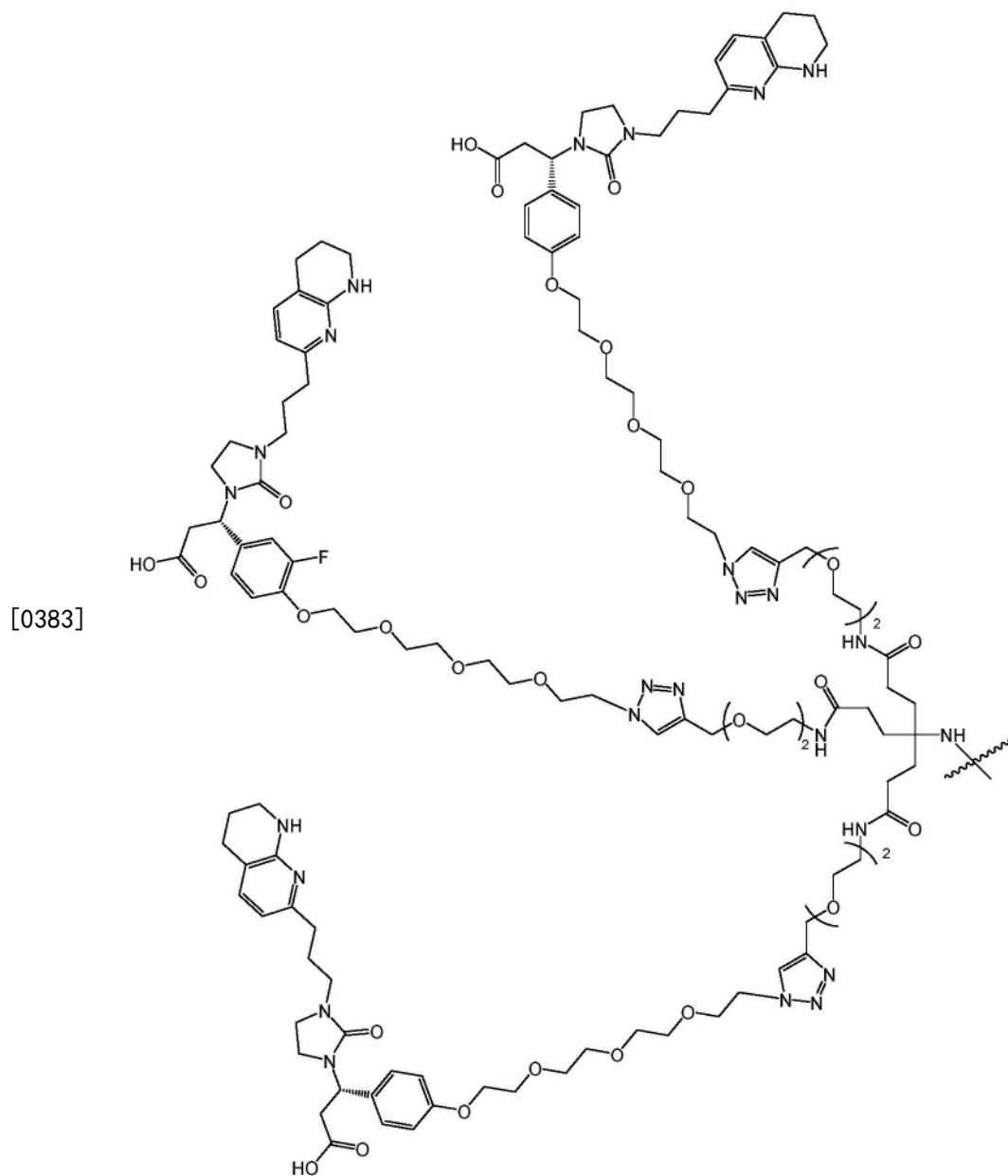
[0380] 在一些实施方案中,本文公开的三齿靶向基团包含三个结构2a的配体,和可通过以下结构表示:



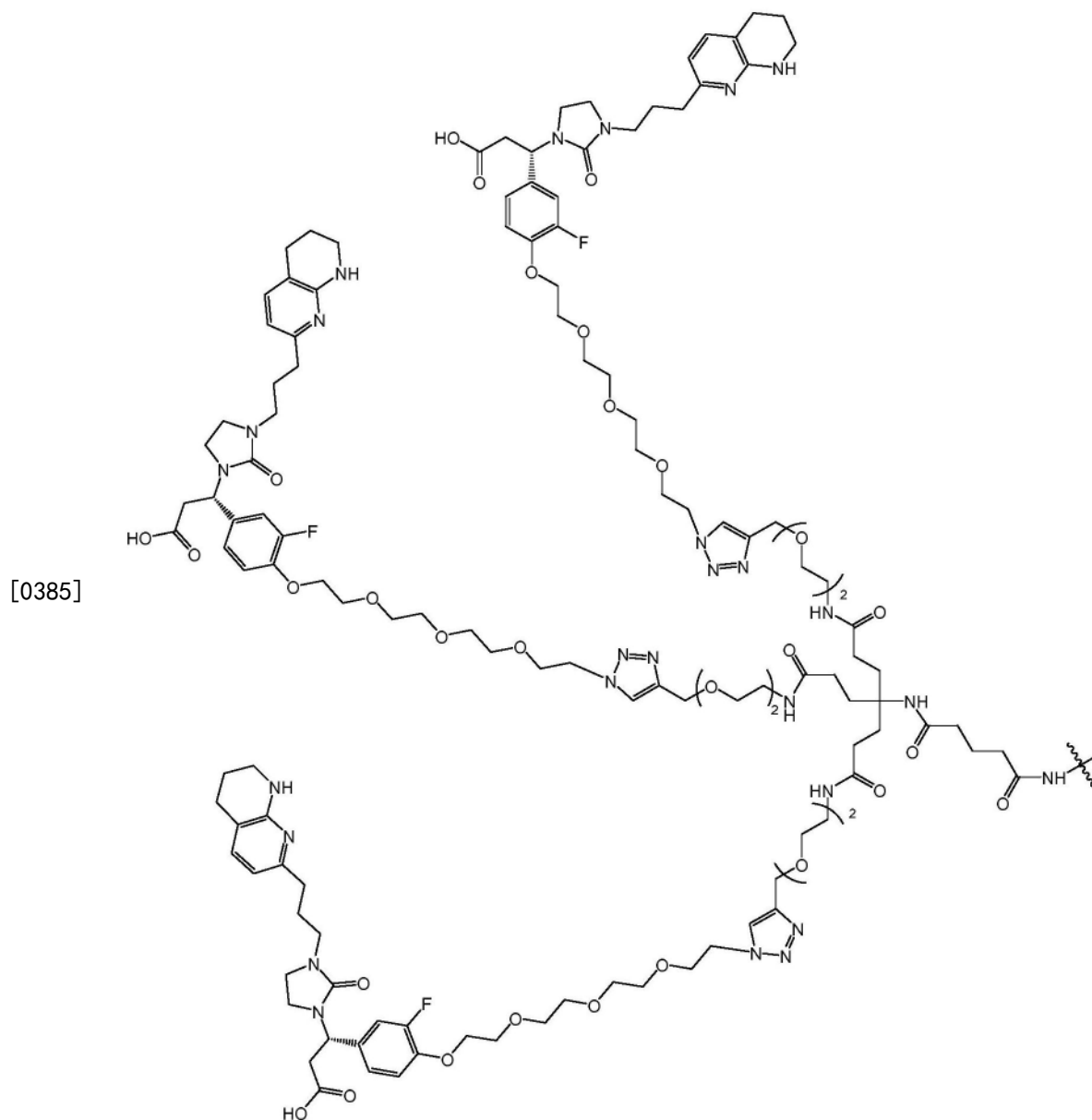
[0381]

(结构 701)

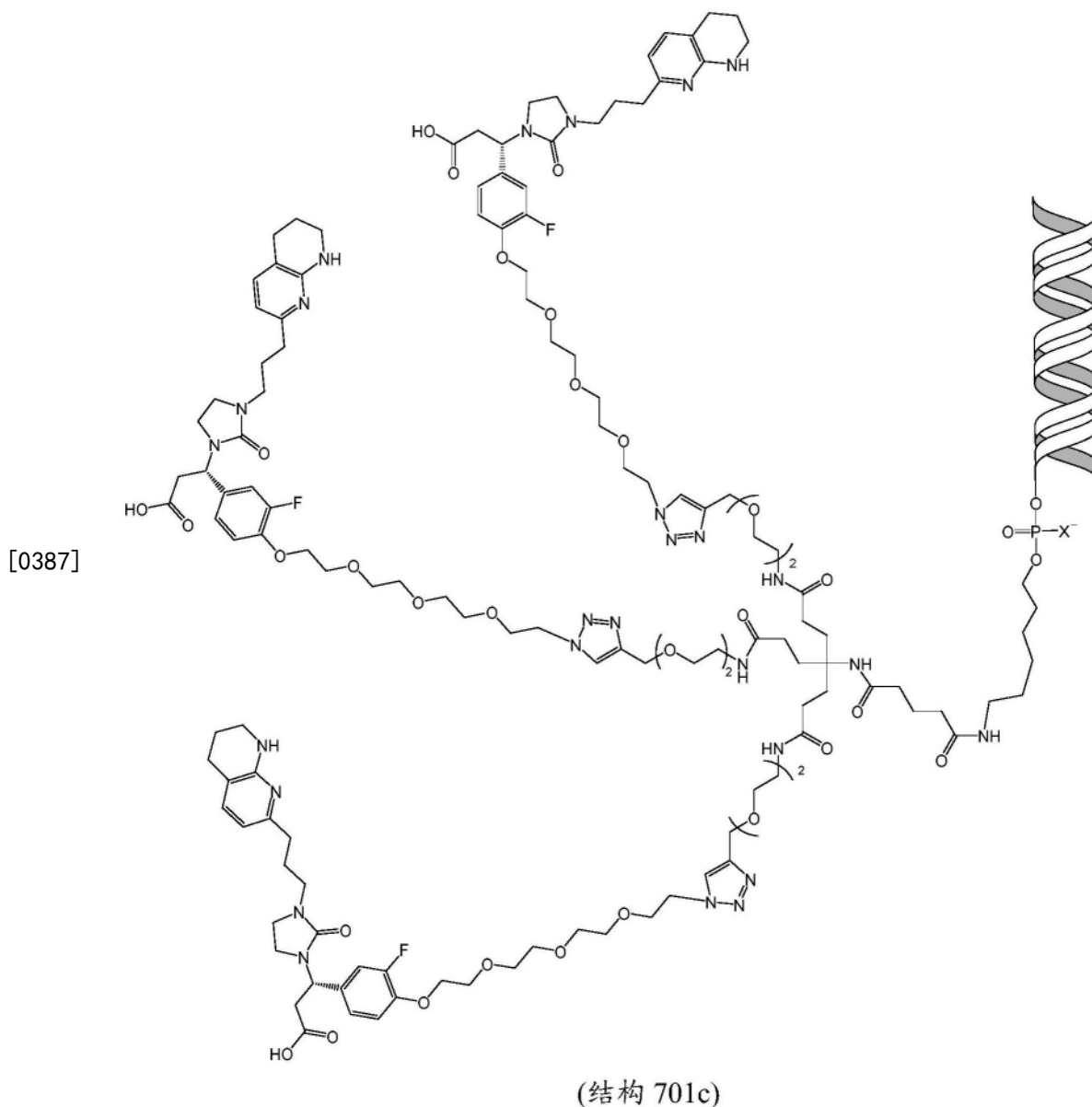
[0382] 在一些实施方案中,本文公开的三齿靶向基团包含三个结构2a的配体,和可通过以下结构表示:



[0384] 在一些实施方案中,包含戊二酸接头的三齿靶向基团包含三个结构2a的配体,和可通过以下结构表示:



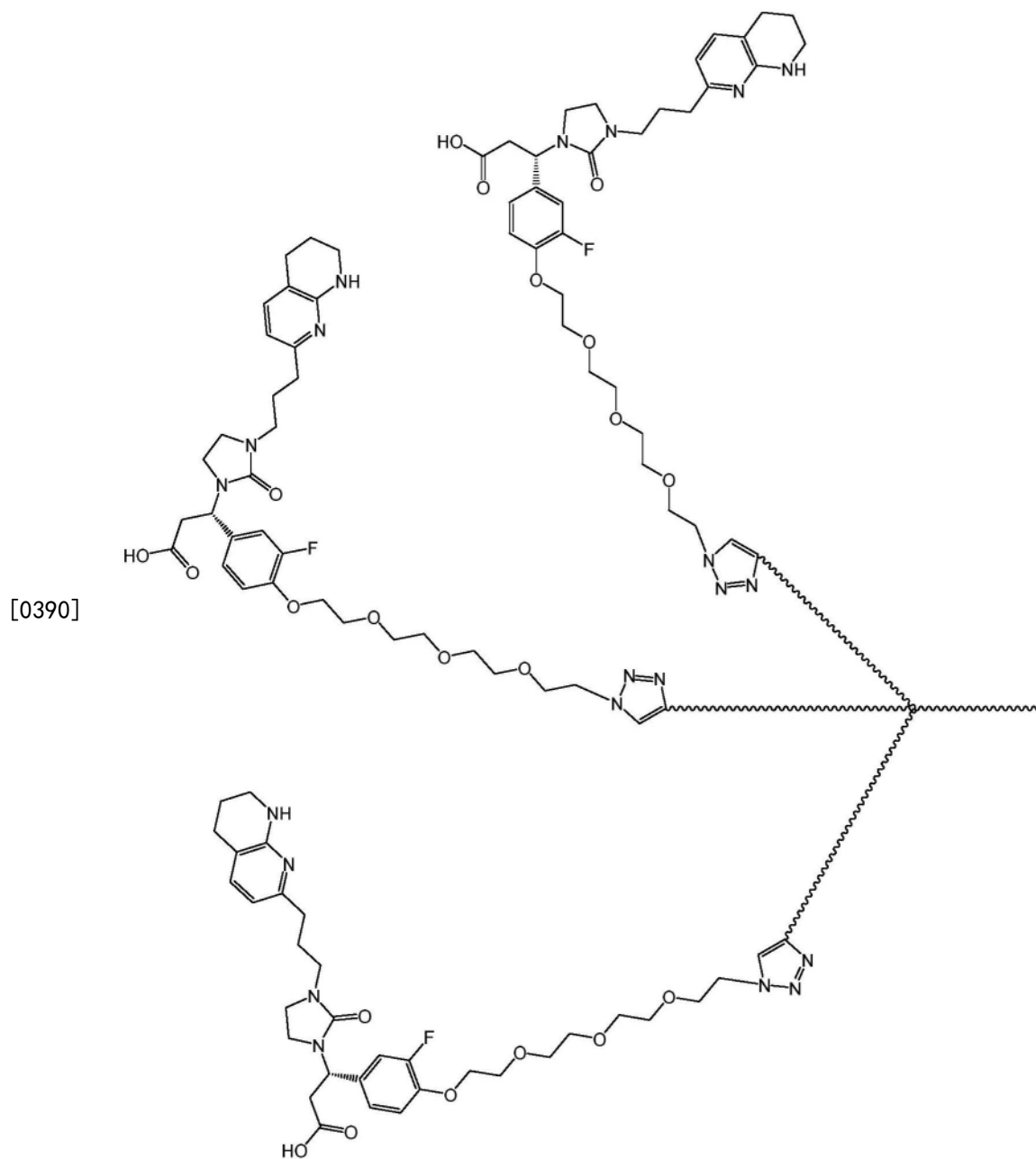
[0386] 在一些实施方案中,本文公开的三齿靶向基团包含三个结构2a的配体,和可通过以下结构表示:



[0388] 其中  表示RNAi剂和X=O或S。

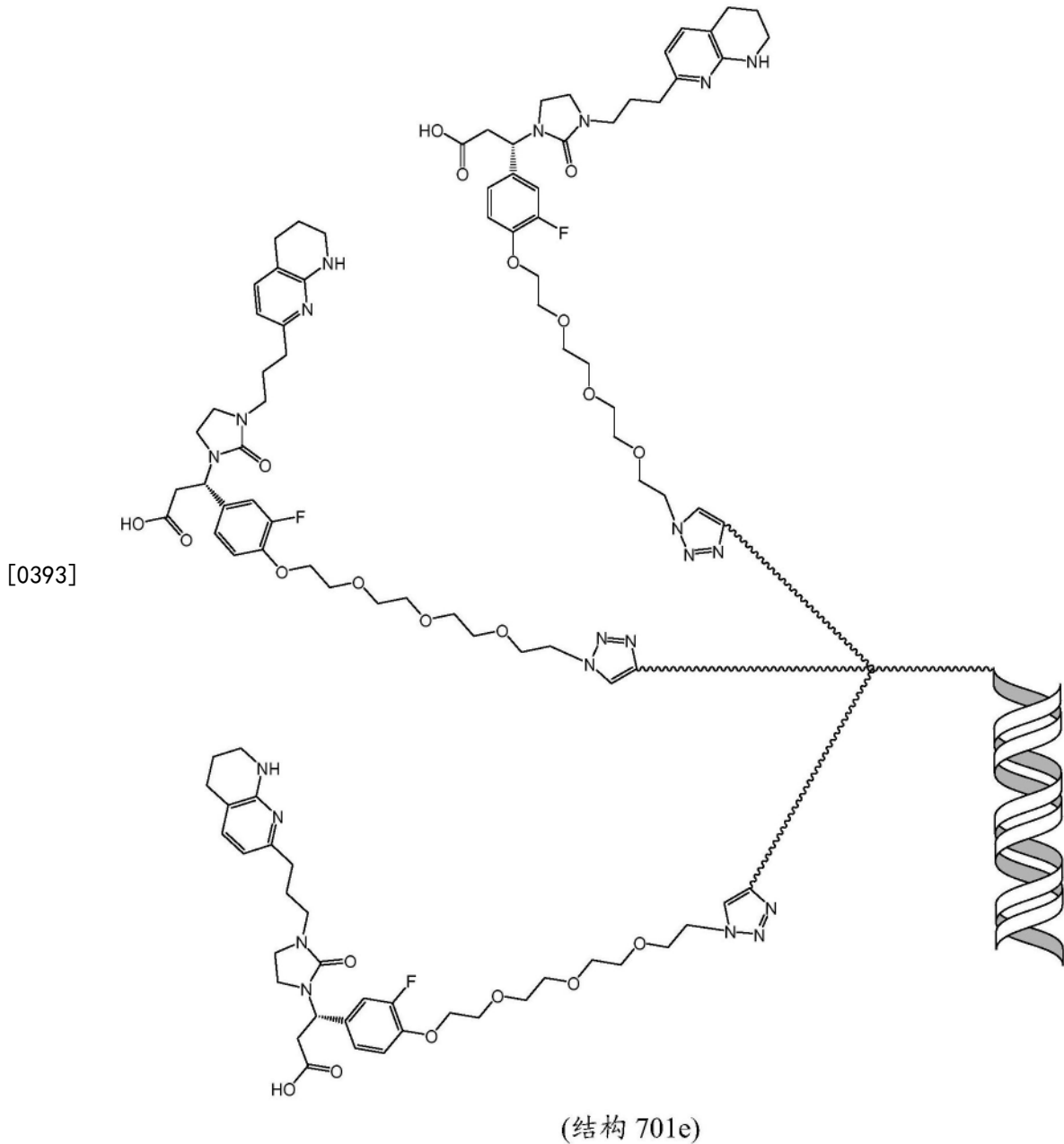
[0389] 在一些实施方案中,本文公开的三齿靶向基团包含三个结构2a的配体,和可通过以下结构表示:





[0391] 其中  表示可用于结合配体和货物分子的任何合适的支架或接头。

[0392] 在一些实施方案中,与RNAi剂缀合的 $\alpha v\beta 3$ 三齿靶向基团包含三个结构2a的配体,和可通过以下结构表示:



[0394] 其中  表示可用于结合配体和RNAi剂的任何合适的支架或接头,和



表示RNAi剂。

[0395] 反应性基团和受保护的反应性基团

[0396] 反应性基团是本领域公知的,并且提供两个分子或反应物之间的共价键的形成。用于本发明范围的合适的反应性基团包括但不限于:氨基、酰胺基、羧酸基、叠氮化物、炔、炔丙基、BCN(二环[6.1.0]壬炔)、DBC0(二苯并环辛炔)、硫醇、马来酰亚胺基、氨基氧基、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或其它活化酯(例如PNP、TFP、PFP)、溴基、醛、碳酸酯基、甲苯磺酸酯基、四嗪、反式环辛烯(TCO)、酰肼、羟基、二硫化物和邻吡啶基二硫化物基团。

[0397] 反应性基团的并入可促进本文所公开的整联蛋白配体与货物分子的缀合。缀合反应是本领域公知的,并且提供了两个分子或反应物之间的共价键的形成。用于本发明范围

的合适的缀合反应包括但不限于酰胺偶联反应、迈克尔加成反应、腓形成反应和点击化学环加成反应。

[0398] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体被合成为四氟苯基(TFP)酯,其可以被反应性氨基取代以连接货物分子。在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白靶向配体被合成为叠氮化物,其可例如经由点击化学环加成反应与炔丙基或DBCO基团缀合,以连接货物分子。

[0399] 受保护的反应性基团也是本领域常用的。保护基提供在非保护基团反应的条件下反应性基团向不反应的基团的暂时化学转化,例如,在随后的化学反应中提供化学选择性。用于本发明范围的合适的受保护的反应性基团包括,但不限于,BOC基团(叔丁氧基羰基)、Fmoc(9-芴基甲氧基羰基)、羧基苄基(CBZ)基团、苄基酯和PBF(2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基)。

[0400] 货物分子(包括RNAi剂)

[0401] 货物分子是当与本文所述的整联蛋白配体分离时将包含整联蛋白受体的细胞具有期望的作用的任何分子。货物分子可以是但不限于药物成分、药物产品、前药、具有已知治疗益处的物质、小分子、抗体、抗体片段、免疫球蛋白、单克隆抗体、标签或标记物、脂质、天然或修饰的核酸或多核苷酸、肽、聚合物、聚胺、蛋白、适体、毒素、维生素、PEG、半抗原、地高辛配基、生物素、放射性原子或分子、或荧光团。在一些实施方案中,一种或多种货物分子(例如,相同或不同的货物分子)与一种或多种整联蛋白配体连接,以将货物分子靶向表达整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 和/或整联蛋白 $\alpha v\beta 5$ 的细胞。

[0402] 在一些实施方案中,一种或多种货物分子是药物成分或药物组合物。在一些实施方案中,一种或多种货物分子是基于寡核苷酸的化合物。如本文所用,“基于寡核苷酸的化合物”是包含约10-50(例如,10至48、10至46、10至44、10至42、10至40、10至38、10至36、10至34、10至32、10至30、10至28、10至26、10至24、10至22、10至20、10至18、10至16、10至14、10至12、12至50、12至48、12至46、12至44、12至42、12至40、12至38、12至36、12至34、12至32、12至30、12至28、12至26、12至24、12至22、12至20、12至18、12至16、12至14、14至50、14至48、14至46、14至44、14至42、14至40、14至38、14至36、14至34、14至32、14至30、14至28、14至26、14至24、14至22、14至20、14至18、14至16、16至50、16至48、16至46、16至44、16至42、16至40、16至38、16至36、16至34、16至32、16至30、16至28、16至26、16至24、16至22、16至20、16至18、18至50、18至48、18至46、18至44、18至

[0403] 42、18至40、18至38、18至36、18至34、18至32、18至30、18至28、18至

[0404] 26、18至24、18至22、18至20、20至50、20至48、20至46、20至44、20至

[0405] 42、20至40、20至38、20至36、20至34、20至32、20至30、20至28、20至

[0406] 26、20至24、20至22、22至50、22至48、22至46、22至44、22至42、22至

[0407] 40、22至38、22至36、22至34、22至32、22至30、22至28、22至26、22至

[0408] 24、24至50、24至48、24至46、24至44、24至42、24至40、24至38、24至

[0409] 36、24至34、24至32、24至30、24至28、24至26、26至50、26至48、26至

[0410] 46、26至44、26至42、26至40、26至38、26至36、26至34、26至32、26至

[0411] 30、26至28、28至50、28至48、28至46、28至44、28至42、28至40、28至

[0412] 38、28至36、28至34、28至32、28至30、30至50、30至48、30至46、30至

[0413] 44、30至42、30至40、30至38、30至36、30至34、30至32、32至50、32至

[0414] 48、32至46、32至44、32至42、32至40、32至38、32至36、32至34、34至

[0415] 50、34至48、34至46、34至44、34至42、34至40、34至38、34至36、36至

[0416] 50、36至48、36至46、36至44、36至42、36至40、36至38、38至50、38至

[0417] 48、38至46、38至44、38至42、38至40、40至50、40至48、40至46、40至

[0418] 44、40至42、42至50、42至48、42至46、42至44、44至50、44至48、44至46、46至50、46至48或48至50)个核苷酸或核苷酸碱基对的核苷酸序列。在一些实施方案中,基于寡核苷酸的化合物具有与细胞内表达的靶核酸或靶基因(例如靶基因的基因转录物或mRNA)中的编码序列至少部分互补的核碱基序列。在一些实施方案中,基于寡核苷酸的化合物在递送至表达基因的细胞后能够抑制潜在基因的表达,并且在本文中称为“表达抑制性基于寡核苷酸的化合物”。基因表达可以在体外或体内被抑制。

[0419] “基于寡核苷酸的化合物”包括但不限于:单链寡核苷酸、单链反义寡核苷酸、短或小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、核酶、干扰RNA分子和dicer底物。在一些实施方案中,基于寡核苷酸的化合物是单链寡核苷酸,诸如反义寡核苷酸。在一些实施方案中,基于寡核苷酸的化合物是双链寡核苷酸。在一些实施方案中,基于寡核苷酸的化合物是双链寡核苷酸,其是RNAi剂。

[0420] 在一些实施方案中,一种或多种货物分子是“RNAi剂”,其如本文所定义是包含RNA或RNA样(例如,化学修饰的RNA)寡核苷酸分子的化学组合物,所述RNA或RNA样寡核苷酸分子能够以序列特异性方式降解或抑制靶mRNA的信使RNA(mRNA)转录物的翻译。如本文所用, RNAi剂可通过RNA干扰机制(即,通过与哺乳动物细胞的RNA干扰途径机制(RNA诱导的沉默复合体或RISC)相互作用诱导RNA干扰)或通过任何一种或多种替代机制或途径起作用。尽管据信, RNAi剂,如本文所用的术语,主要通过RNA干扰机制起作用,但所公开的RNAi剂不受任何特定途径或作用机制的束缚或限制。本文公开的RNAi剂由有义链和反义链组成,并且包括但不限于:短(或小)干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)和dicer底物。本文所述RNAi剂的反义链至少部分地与被靶向的mRNA互补。RNAi剂可包括一种或多种修饰的核苷酸和/或一种或多种非磷酸二酯键。

[0421] 通常, RNAi剂可至少由包括第一序列的有义链(也称为过客链)和包括第二序列的反义链(也称为引导链)组成。RNAi剂有义链和反义链的长度可以各自为16至49个核苷酸的长度。在一些实施方案中, RNAi剂的有义链和反义链的长度独立地为17至26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链和反义链的长度独立地为19至26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链和反义链的长度独立地为21至26个核苷酸。在一些实施方案中,有义链和反义链的长度独立地为21至24个核苷酸。在一些实施方案中,有义链和反义链的长度各自为21个核苷酸。有义链和反义链可以是相同长度或不同长度。RNAi剂包括与靶基因中的序列至少部分互补的反义链序列,并且在递送至表达靶的细胞后, RNAi剂可在体内或体外抑制一种或多种靶基因的表达。

[0422] 基于寡核苷酸的化合物,特别是RNAi剂,通常可以由修饰的核苷酸和/或一种或多种非磷酸二酯键组成。如本文所用,“修饰的核苷酸”是核糖核苷酸(2'-羟基核苷酸)以外的核苷酸。在一些实施方案中,至少50%(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核苷酸是修饰的核苷酸。如本文所用,修

饰的核苷酸包括但不限于脱氧核糖核苷酸、核苷酸模拟物、无碱基核苷酸、2'-修饰的核苷酸、3'至3'键(反向)核苷酸、含非天然碱基的核苷酸、桥连核苷酸、肽核酸、2',3'-无环核苷酸模拟物(未锁定的核碱基类似物)、锁定的核苷酸、3'-O-甲氧基(2'核苷间连接的)核苷酸、2'-F-阿拉伯糖核苷酸、5'-Me,2'-氟核苷酸、吗啉代核苷酸、乙烯基磷酸酯脱氧核糖核苷酸、含乙烯基磷酸酯的核苷酸和含环丙基磷酸酯的核苷酸。2'-修饰的核苷酸(即在五元糖环的2'位具有羟基以外的基团的核苷酸)包括但不限于2'-O-甲基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-甲氧基乙基(2'-O-2-甲氧基乙基)核苷酸、2'-氨基核苷酸和2'-烷基核苷酸。

[0423] 此外,基于寡核苷酸的化合物(诸如RNAi剂)的一个或多个核苷酸可通过非标准键或骨架(即,修饰的核苷间键或修饰的骨架)连接。修饰的核苷间键合可以是含非磷酸酯的共价核苷间键。修饰的核苷间键或骨架包括但不限于5'-硫代磷酸酯基团、手性硫代磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基-磷酸三酯、烷基磷酸酯(例如甲基磷酸酯或3'-亚烷基磷酸酯)、手性磷酸酯、次磷酸酯、磷酰胺酯(例如3'-氨基磷酰胺酯、氨基烷基磷酰胺酯或硫代磷酰胺酯)、硫代烷基-磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯、吗啉代键、具有正常3'-5'键的硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯的2'-5'连接类似物、或具有相反极性的硼烷磷酸酯,其中相邻的核苷单元对连接3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。

[0424] 给定化合物中的所有位置不必均匀地修饰。相反,可以将多于一种修饰并入单个基于寡核苷酸的化合物中或甚至其单个核苷酸中。

[0425] 在一些实施方案中,货物分子是用于抑制HIF-2 $\alpha$ (EPAS1)基因表达的RNAi剂。货物分子可以是国际专利申请公开号WO 2016/196239和WO 2014/134255中描述的RNAi剂,其各自通过引用整体并入本文。

[0426] RNAi剂有义链和反义链可通过本领域已知的方法合成和/或修饰。例如,涉及抑制HIF-2 $\alpha$ 基因表达的RNAi剂的公开内容可以见于例如国际专利申请公开号WO

[0427] 2016/196239,其通过引用整体并入本文。

[0428] 在一些实施方案中,一种或多种货物分子可以包括PEG部分或由PEG部分组成,所述PEG部分可以作为药代动力学(PK)增强剂或调节剂。在一些实施方案中,一种或多种货物分子可包括具有约20-900个环氧乙烷(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)单元的PEG部分(例如,20至850、20至800、20至750、20至700、20至650、20至600、20至550、20至500、20至450、20至400、20至350、20至300、20至250、20至200、20至150、20至100、20至75、20至50、100至850、100至800、100至750、100至700、100至650、100至600、100至550、100至500、100至450、100至400、100至350、100至300、100至250、100至200、100至150、200至850、200至800、200至750、200至700、200至650、200至600、200至550、200至500、200至450、200至400、200至350、200至300、200至250、250至900、250至850、250至800、250至750、250至700、250至650、250至600、250至550、250至500、250至450、250至400、250至350、250至300、300至900、300至850、300至800、300至750、300至700、300至650、300至600、300至550、300至500、300至450、300至400、300至350、350至900、350至850、350至800、350至750、350至700、350至650、350至600、350至550、350至500、350至450、350至400、400至900、400至850、400至800、400至750、400至700、400至650、400至600、400至550、400至500、400至450、450至900、450至850、450至800、450至750、450至700、450至650、450至600、450至550、450至500、500至900、500至850、500至800、500至750、500至700、

500至650、500至600、500至550、550至900、550至850、550至800、550至750、550至700、550至650、550至600、600至900、600至850、600至800、600至750、600至700、600至650、650至900、650至850、650至800、650至750、650至700、700至900、700至850、700至800、700至750、750至900、750至850、750至800、800至900、850至900或850至900个环氧乙烷单元)。在一些实施方案中,所述一种或多种货物分子由具有约455个环氧乙烷单元(约20千道尔顿(kDa)分子量)的PEG部分组成。在一些实施方案中,PEG部分具有约2千道尔顿的分子量。在一些实施方案中,PEG部分具有约20千道尔顿的分子量。在一些实施方案中,PEG部分具有约40千道尔顿的分子量。本文所述的PEG部分可以是直链或支链的。PEG部分可以是离散的(单分散的)或非离散的(多分散的)。用作PK增强货物分子的PEG部分可以商购。在一些实施方案中,所述一种或多种货物分子包括可以作为PK调节剂或增强剂的PEG部分,以及不同的货物分子,诸如药物活性成分或化合物。

[0429] 所述整联蛋白配体包括其盐或溶剂化物。整联蛋白配体的溶剂化物意指惰性溶剂分子在整联蛋白配体上的加合,其由于它们的相互吸引力而形成。溶剂化物是例如单或二水合物或与醇的加成化合物,诸如,例如与甲醇或乙醇的加成化合物。

[0430] 游离氨基基团或游离羟基基团可以作为整联蛋白配体的取代基与相应的保护基一起提供。

[0431] A $\nu\beta$ 3整联蛋白配体还包括例如衍生物,即用例如烷基或酰基、糖或寡肽修饰的整联蛋白配体,其在体外或在生物体中裂解。

[0432] 在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白配体促进货物分子通过配体介导的胞吞作用、胞饮作用或通过其它方式递送到在其表面上存在整联蛋白 $\alpha\nu\beta$ 3和/或整联蛋白 $\alpha\nu\beta$ 5的细胞的胞浆中。在一些实施方案中,本文公开的整联蛋白配体促进货物分子递送至存在整联蛋白 $\alpha\nu\beta$ 3和/或整联蛋白 $\alpha\nu\beta$ 5的细胞的质膜。

[0433] 药物组合物

[0434] 在一些实施方案中,本公开提供了药物组合物,其包括本文公开的一种或多种整联蛋白配体、由其组成、或基本上由其组成。

[0435] 如本文所用,“药物组合物”包含药理学有效量的活性药物成分(API)和任选一种或多种药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂(赋形剂)是除有意包括在药物递送系统中的活性药物成分(API,治疗产品)之外的物质。赋形剂在预期剂量下不发挥或不意图发挥治疗效果。赋形剂可以用于a)在制造过程中辅助药物递送系统的加工,b)保护、支持或增强API的稳定性、生物利用度或患者可接受性,c)帮助产品鉴定,和/或d)在储存或使用过程中增强API递送的总体安全性、有效性的任何其它属性。药学上可接受的赋形剂可以是或可以不是惰性物质。

[0436] 赋形剂包括但不限于:吸收增强剂、抗粘附剂、消泡剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲剂、载体、包衣剂、着色剂、递送增强剂、递送聚合物、葡聚糖、右旋糖、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、调味剂、助流剂、湿润剂、润滑剂、油、聚合物、防腐剂、盐水、盐、溶剂、糖、悬浮剂、持续释放基质、甜味剂、增稠剂、张度剂、媒介物、疏水剂和润湿剂。

[0437] 本文所述的药物组合物可以含有通常在药物组合物中发现的其它附加组分。在一些实施方案中,所述附加组分是药物活性材料。药物活性材料包括但不限于:止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂(例如抗组胺药、苯海拉明等)、小分子药物、抗体、抗体片段、适体

和/或疫苗。

[0438] 药物组合物还可以含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、气味剂、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、包衣剂或抗氧化剂。它们还可以含有具有已知治疗益处的其它试剂。

[0439] 药物组合物可以以多种方式施用,这取决于是需要局部治疗还是全身治疗以及取决于待治疗的区域。可以通过本领域公知的任何方式进行施用,诸如但不限于局部(例如通过透皮贴剂)、肺部(例如通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过雾化器、气管内、鼻内)、表皮、透皮、口服或肠胃外施用。肠胃外施用包括但不限于静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;皮下(例如,经由植入的装置)、颅内、脑实质内(intraparenchymal)、鞘内和心室内施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物通过静脉内注射或输注或皮下注射施用。药物组合物可以口服施用,例如以片剂、包衣片剂、糖锭剂、硬或软明胶胶囊、溶液、乳剂或混悬剂的形式。施用也可以经直肠进行,例如使用栓剂;局部或经皮,例如使用软膏、乳膏、凝胶或溶液;或肠胃外,例如使用可注射溶液。

[0440] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性的)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲盐水。其在生产和储存条件下应该是稳定的,并且应该被保存以防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其合适的混合物。例如,通过使用包衣诸如卵磷脂,通过在分散液的情况下保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)和氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长的吸收。

[0441] 无菌可注射溶液可以通过将活性化合物以所需量与上述列举的成分之一或组合一起并入适当溶剂中,根据需要,随后过滤灭菌来制备。通常,通过将活性化合物并入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基本分散介质和来自以上列举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上任何附加所需成分的粉末,所述任何附加所需成分来自其先前无菌过滤的溶液。

[0442] 适于关节内施用的制剂可以是本文所述的任何配体的无菌水性制剂的形式,其可以是微晶形式,例如,水性微晶混悬剂的形式。脂质体制剂或可生物降解的聚合物系统也可用于提供本文所述的任何配体以用于关节内和眼部施用两者。

[0443] 活性化合物可以用载体制备,所述载体将保护化合物免于从体内快速消除,诸如控释制剂,包括植入物和微囊包封的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这样的制剂的方法对本领域技术人员是显而易见的。脂质体混悬剂也可用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述。

[0444] 药物组合物可以含有通常见于药物组合物中的其它附加组分。这样的附加组分包括但不限于:止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂(例如抗组胺药、苯海拉明等)。如本文所用,“药理学有效量”、“治疗有效量”或简单地“有效量”指产生药理学、治疗或预防效果的药

物活性剂的量。

[0445] 含有 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白配体的药物也是本发明的目的,制备这样的药物的方法也是本发明的目的,所述方法包括将一种或多种含有 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白配体的化合物,和如果需要,一种或多种具有已知治疗益处的其它物质,制成药学上可接受的形式。

[0446] 本文公开的所述整联蛋白配体和包含整联蛋白配体的药物组合物可以被包装或包括在试剂盒、容器、包装或分配器中。整联蛋白配体和包含整联蛋白配体的药物组合物可以被包装在预填充的注射器或小瓶中。

[0447] 连接基团、药代动力学(PK)增强剂、药效学(PD)调节剂、递送媒介物和靶向基团

[0448] 在一些实施方案中, $\alpha v\beta 3$ 配体与一个或多个非核苷酸基团缀合,所述非核苷酸基团包括但不限于连接基团、药代动力学(PK)增强剂(也称为PK调节剂)、药效学(PD)调节剂、递送聚合物或递送媒介物。非核苷酸基团可以增强货物分子的靶向、递送或附着。靶向基团和连接基团的支架的实例在本文公开。非核苷酸基团可以共价连接到有义链和/或反义链的3'和/或5'端。在其中货物分子是RNAi剂的实施方案中,所述RNAi剂含有与有义链的3'和/或5'端连接的非核苷酸基团。在一些实施方案中,非核苷酸基团与RNAi剂有义链的5'末端连接。本文公开的整联蛋白配体可直接或经由接头/连接基团间接连接至货物分子。在一些实施方案中,整联蛋白配体经由不稳定的、可裂解的或可逆的键或接头与货物分子连接。

[0449] 在一些实施方案中,非核苷酸基团增强RNAi剂或其所连接的缀合物的药代动力学或生物分布特性,以改善RNAi剂或缀合物的细胞或组织特异性分布和细胞特异性摄取。在一些实施方案中,非核苷酸基团增强RNAi剂的胞吞作用。在一些实施方案中,非核苷酸基团增强或调节RNAi剂或其所连接的缀合物的药效学特性,以改善RNAi剂或缀合物的细胞或组织特异性分布和细胞特异性摄取。

[0450] 靶向基团或靶向部分增强它们所连接的货物分子的药代动力学或生物分布特性,以改善货物分子的细胞特异性(在一些情况下,包括器官特异性)分布和细胞特异性(或器官特异性)摄取。在一些实施方案中,靶向基团可以包含如本文所述的 $\alpha v\beta 3$ 配体。在一些实施方案中,靶向基团包含接头。在一些实施方案中,靶向基团包含PK增强剂。在一些实施方案中, $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白配体使用接头(诸如PEG接头或一个、两个或三个无碱基的和/或核糖醇(无碱基核糖)残基,其在一些情况下可用作接头)与货物分子连接。靶向基团可包含一个或多个靶向配体。在一些实施方案中,靶向基团可包含1-4个本文公开的整联蛋白配体。在一些实施方案中,靶向基团是三齿靶向基团和包含3个本文公开的整联蛋白配体。

[0451] 可以合成具有反应性基团诸如氨基(在本文中也称为胺)的货物分子。在货物分子是RNAi剂的实施方案中,反应性基团可在5'-末端和/或3'-末端连接。随后可以使用本领域典型的方法,使用反应性基团连接 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白配体。

[0452] 例如,在一些实施方案中,合成在RNAi剂的有义链的5'末端具有 $NH_2-C_6$ 基团的RNAi剂。末端氨基随后可以与例如包括整联蛋白靶向配体的基团反应形成缀合物。在一些实施方案中,合成在RNAi剂的有义链的5'末端具有一个或多个炔基基团的RNAi剂。一个或多个末端炔基基团可以随后与例如包括 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白靶向配体的基团反应以形成缀合物。

[0453] 在一些实施方案中,连接基团与 $\alpha v\beta 3$ 配体缀合。连接基团促进 $\alpha v\beta 3$ 配体与货物分子、PK增强剂、递送聚合物或递送媒介物的共价连接。连接基团的实例包括但不限于:A1k-SMPT-C6、A1k-SS-C6、DBCO-TEG、Me-A1k-SS-C6和C6-SS-A1k-Me,反应性基团诸如伯胺和炔



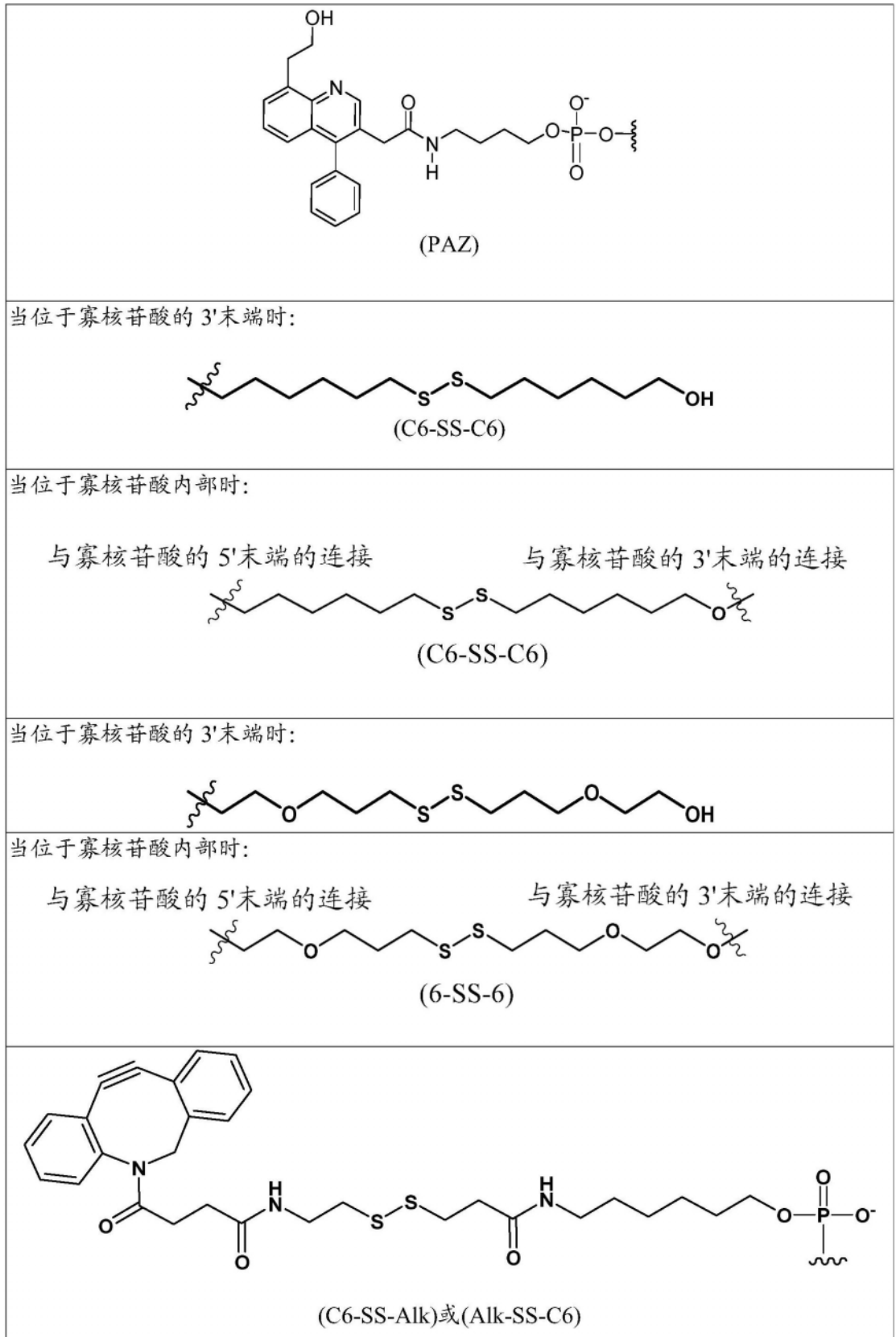
烃、烷基基团、无碱基残基/核苷酸、氨基酸、三炔官能化基团、核糖醇和/或PEG基团。

[0454] 接头或连接基团是两个原子之间的连接,其经由一个或多个共价键将一个化学基团(诸如RNAi剂)或感兴趣的片段与另一个化学基团(诸如 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 整联蛋白配体、PK增强剂、PD调节剂或递送聚合物)或感兴趣的片段连接。不稳定的连接含有不稳定的键。连接可任选包括增加两个连接原子之间距离的间隔基团。间隔基团可进一步增加连接的柔性和/或长度。间隔基团包括但不限于烷基基团、烯基基团、炔基基团、芳基基团、芳烷基基团、芳烯基基团和芳炔基基团;其中的每一个可以含有一个或多个杂原子、杂环、氨基酸、核苷酸和糖。间隔基团是本领域公知的,并且前述列表不意味着限制本说明书的范围。

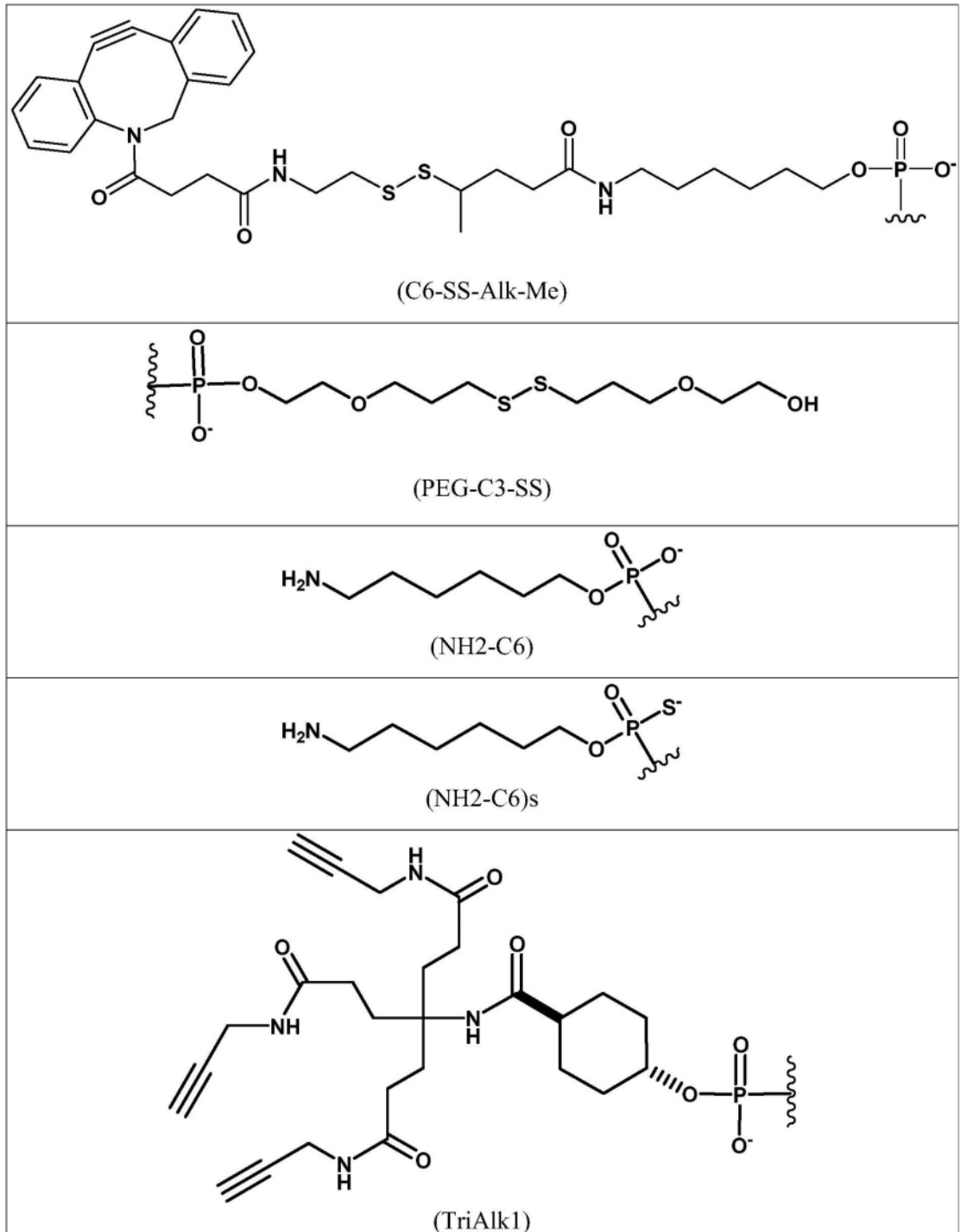
[0455] 在一些实施方案中, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 配体不使用附加接头而与货物分子连接。在一些实施方案中, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ 配体被设计成具有容易存在的接头以促进与货物分子的连接。在一些实施方案中,当组合物中包括两种或更多种RNAi剂时,可以用相同的接头将两种或更多种RNAi剂与它们各自的靶向基团连接。在一些实施方案中,当组合物中含有两种或更多种RNAi剂时,用不同的接头将两种或更多种RNAi剂与它们各自的靶向基团连接。

[0456] 某些连接基团和支架的实例提供于表A中。

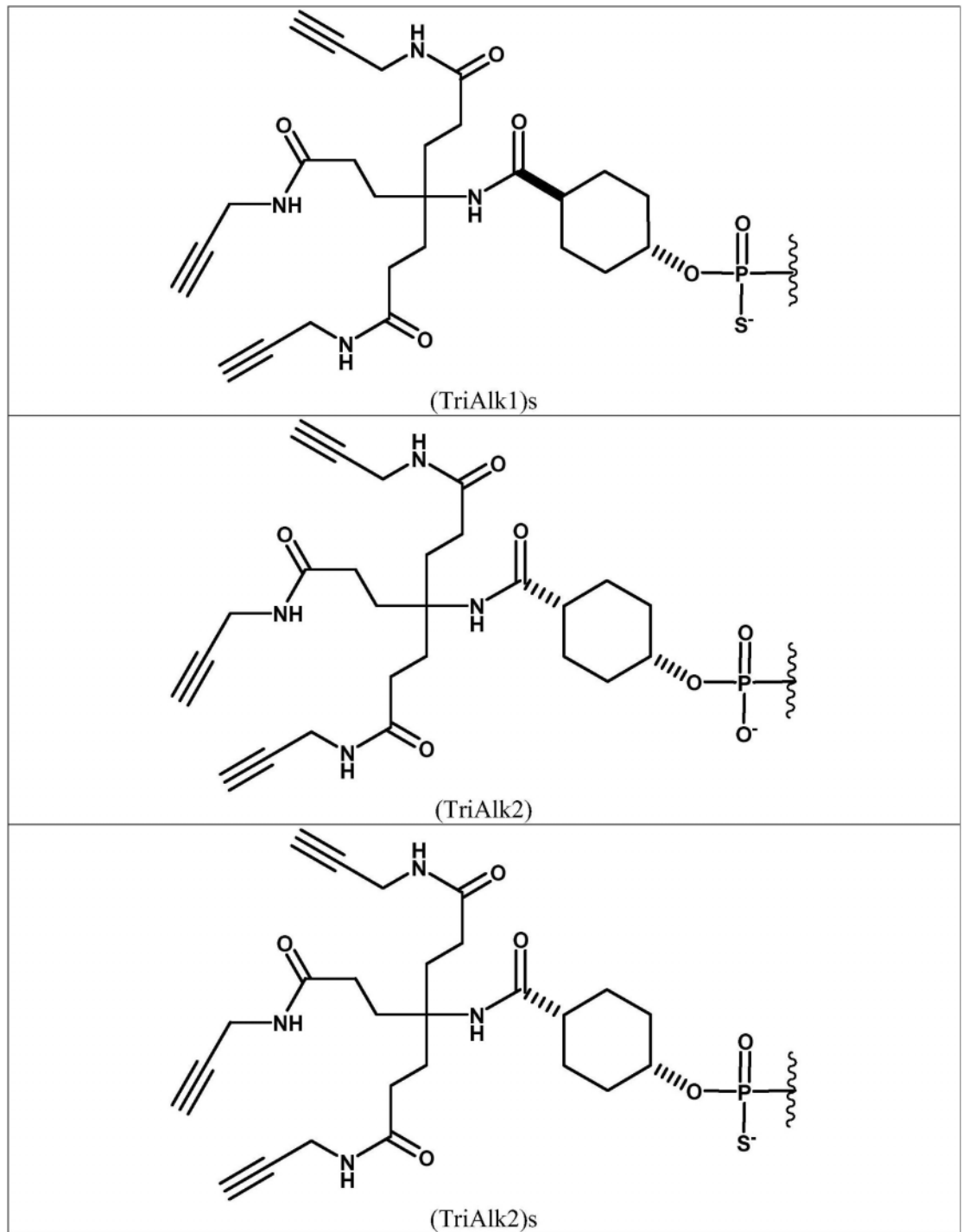
[0457] 表A. 代表各种连接基团和支架的结构



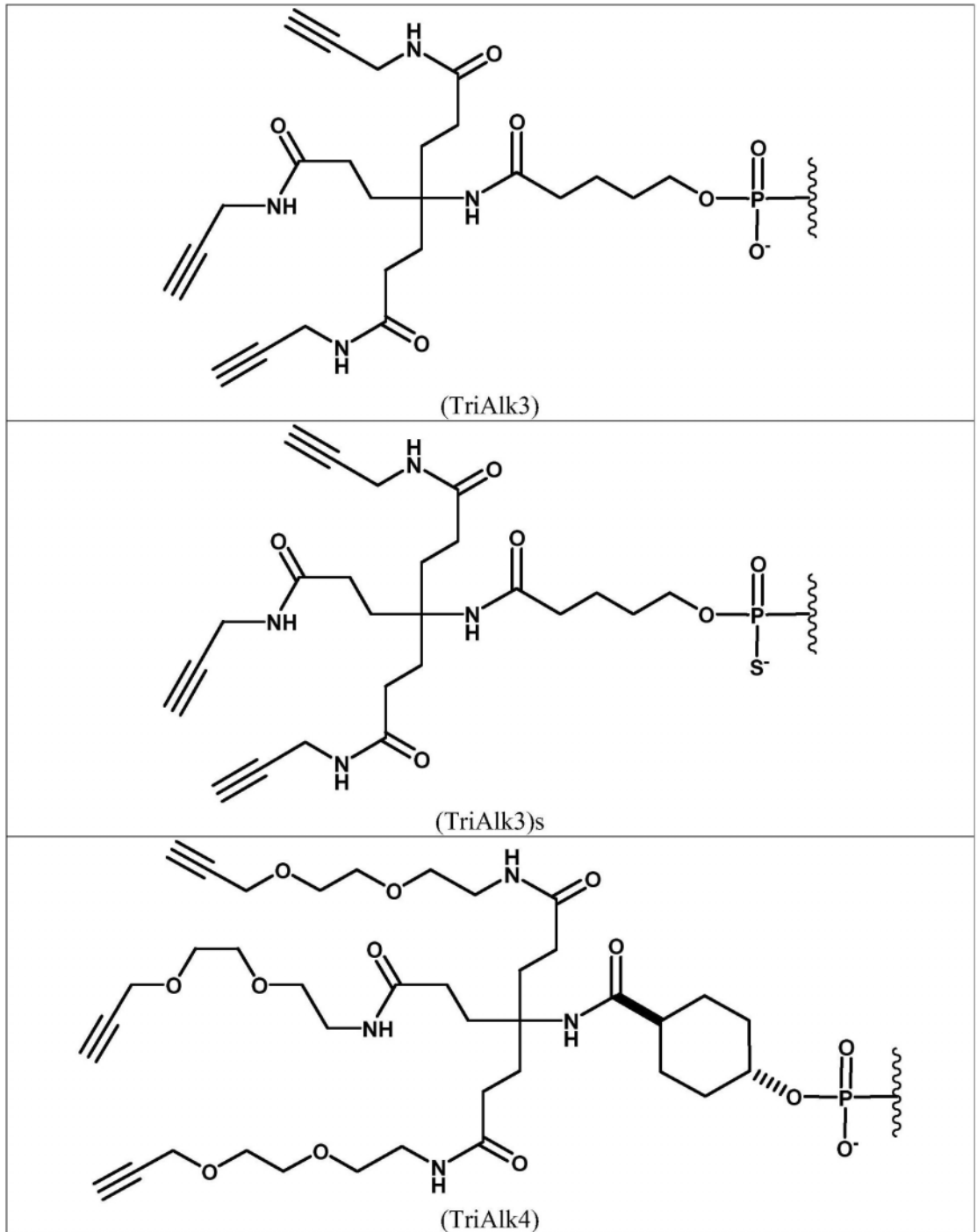
[0458]



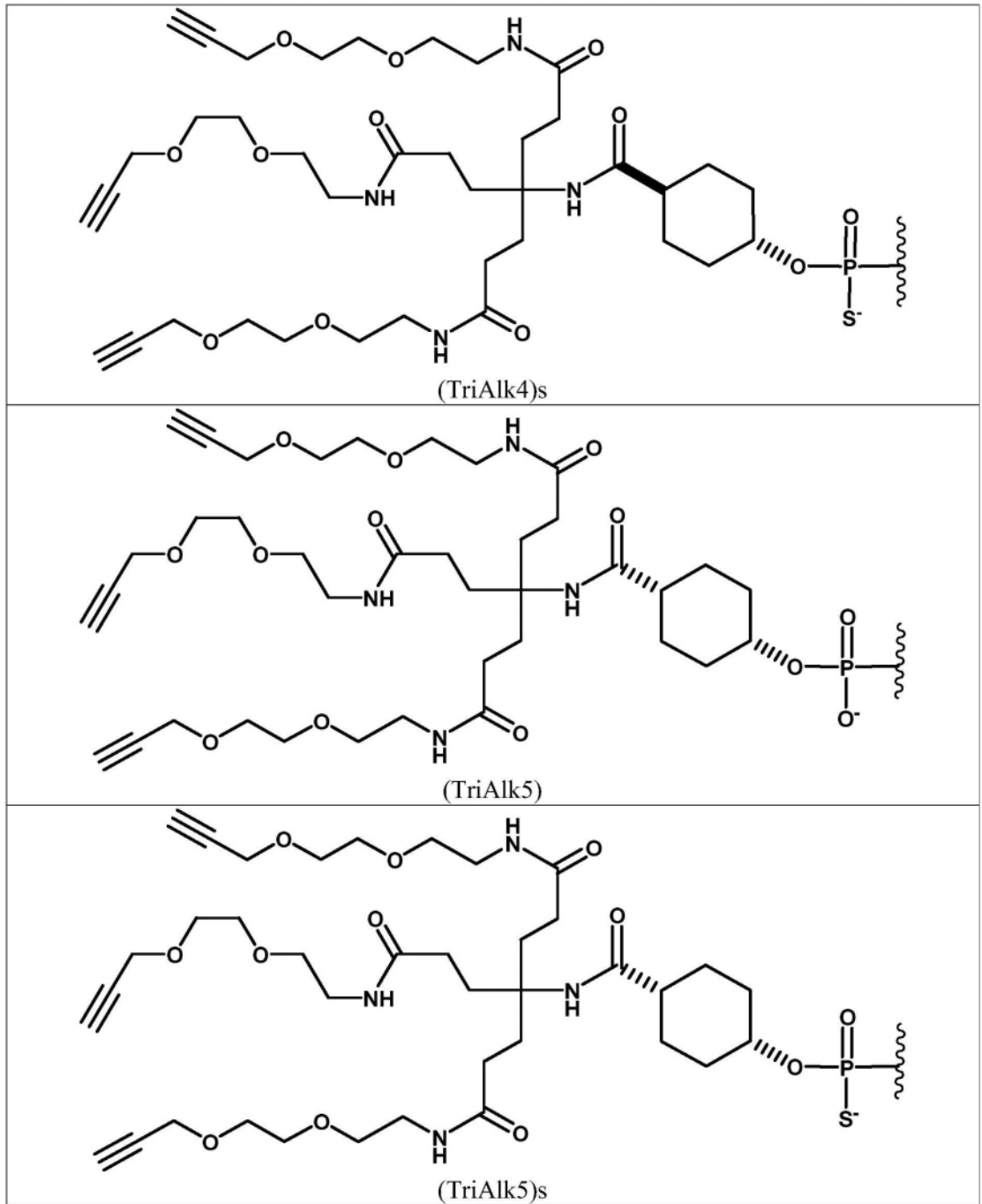
[0460]



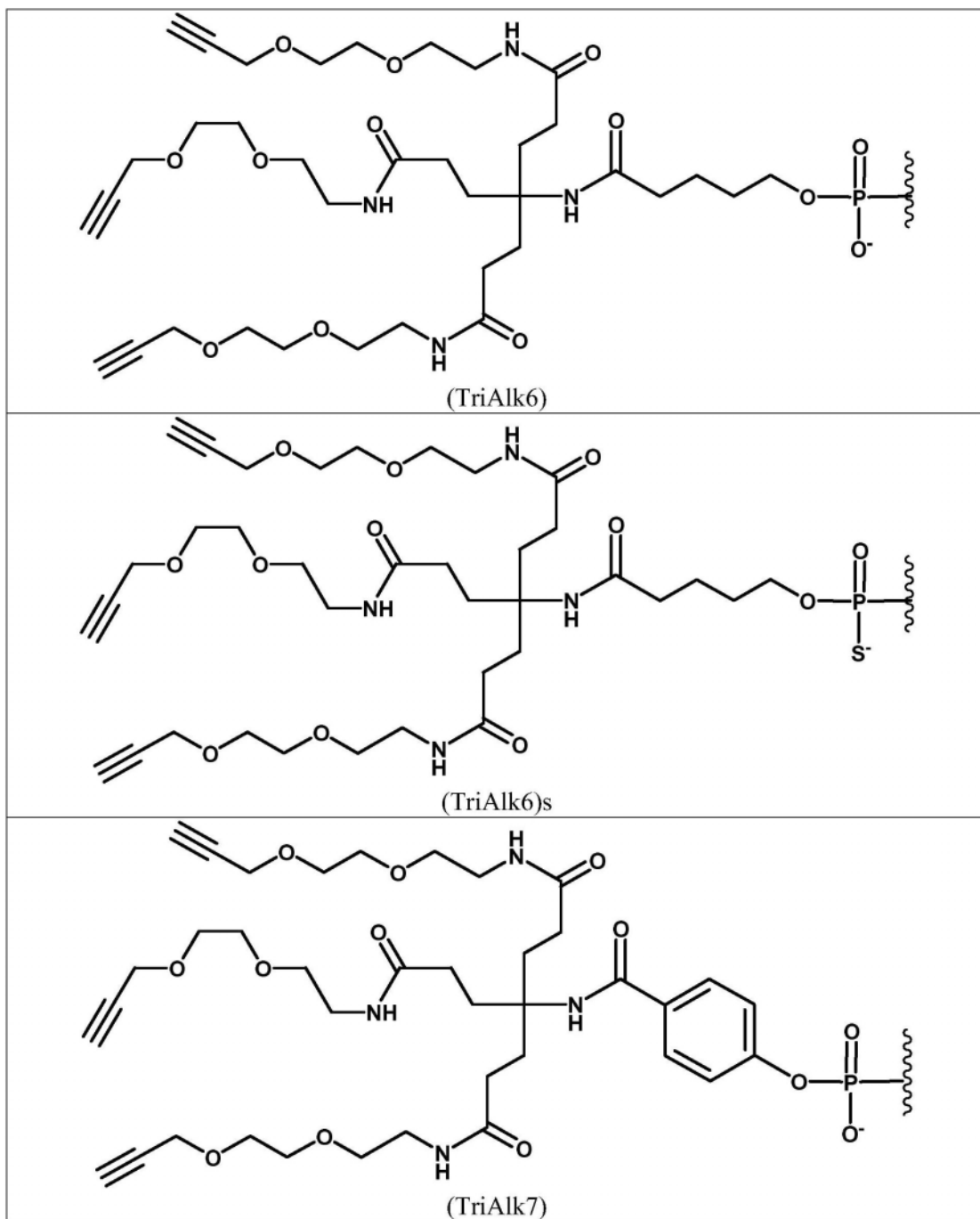
[0461]



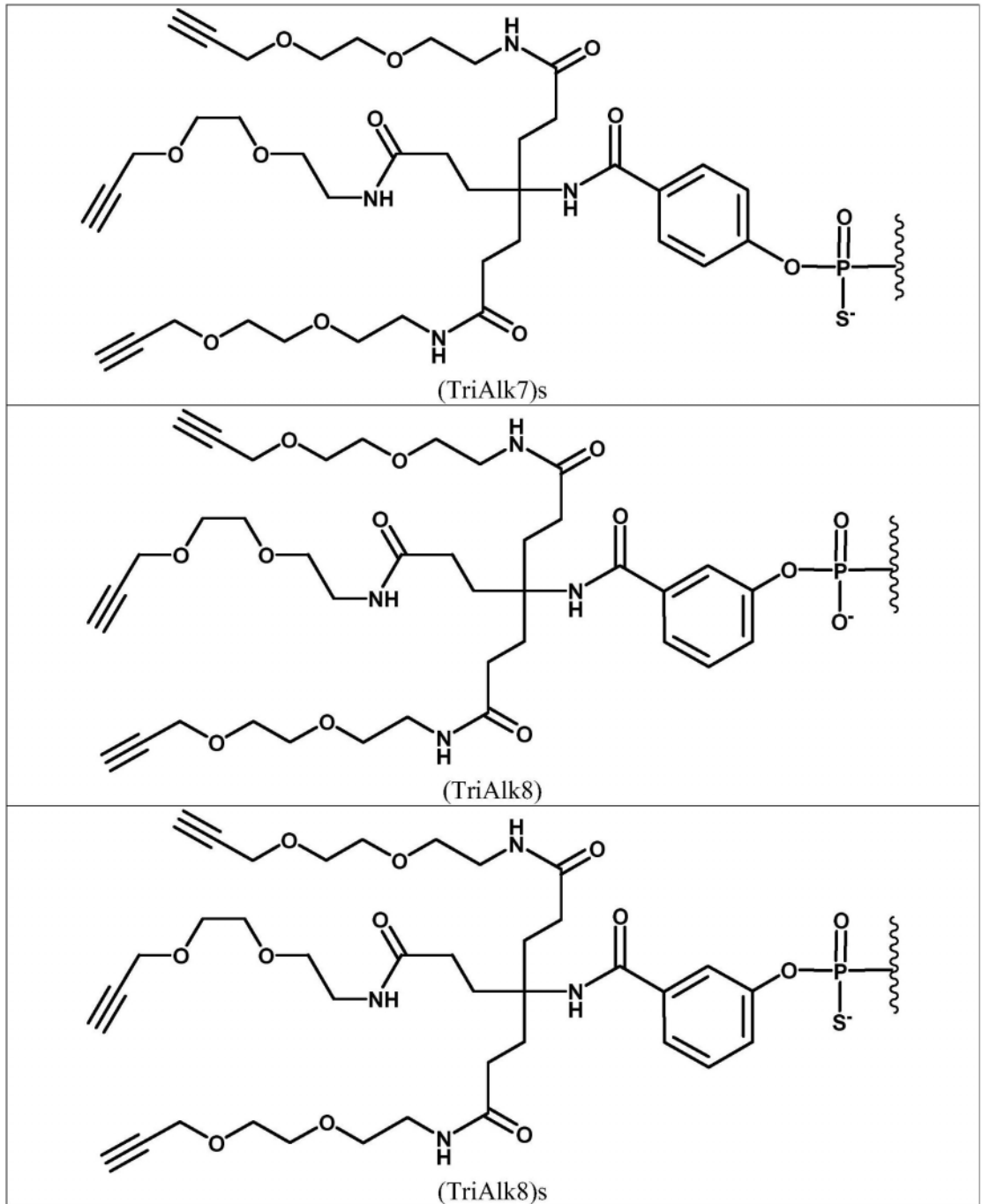
[0462]



[0463]

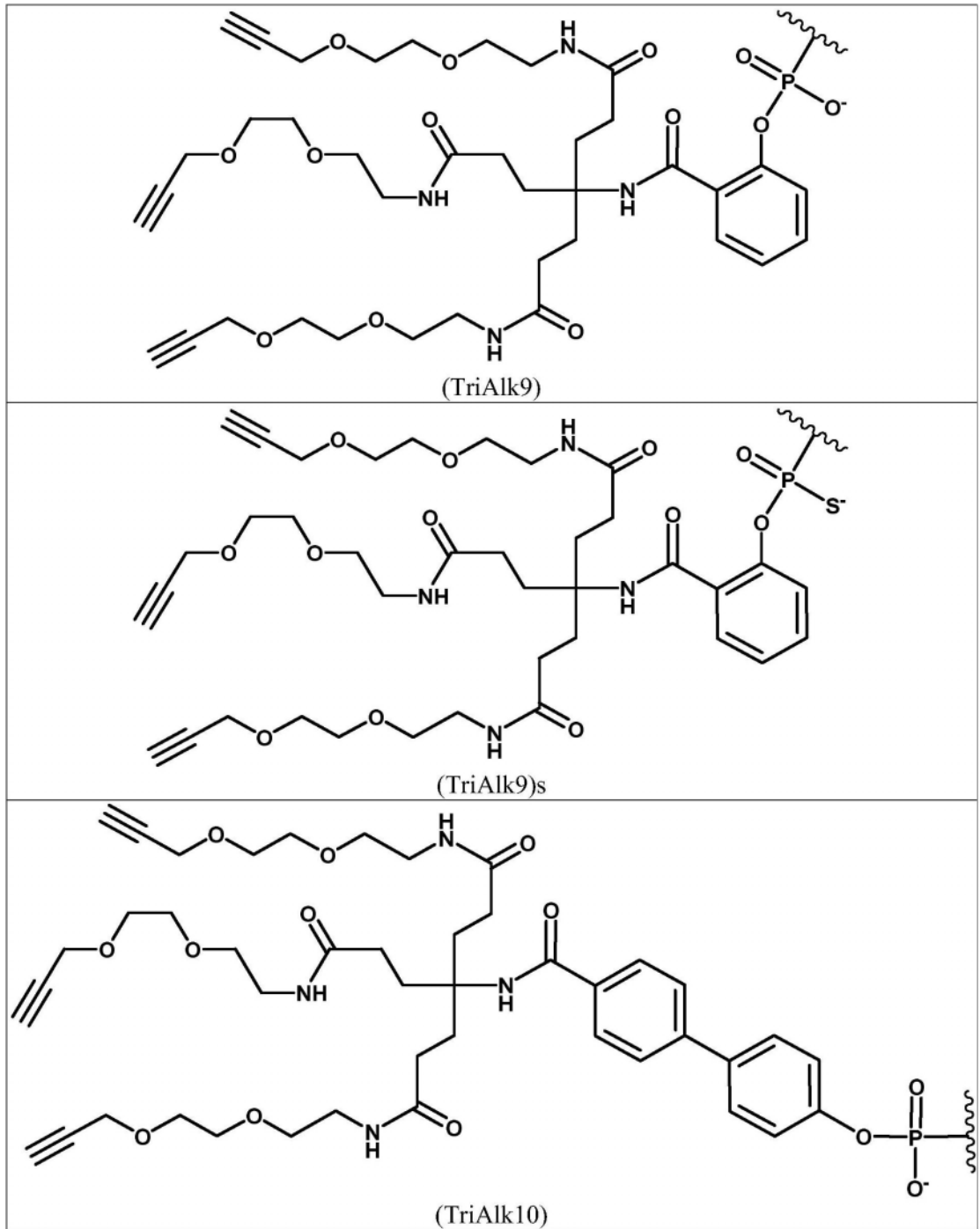


[0464]

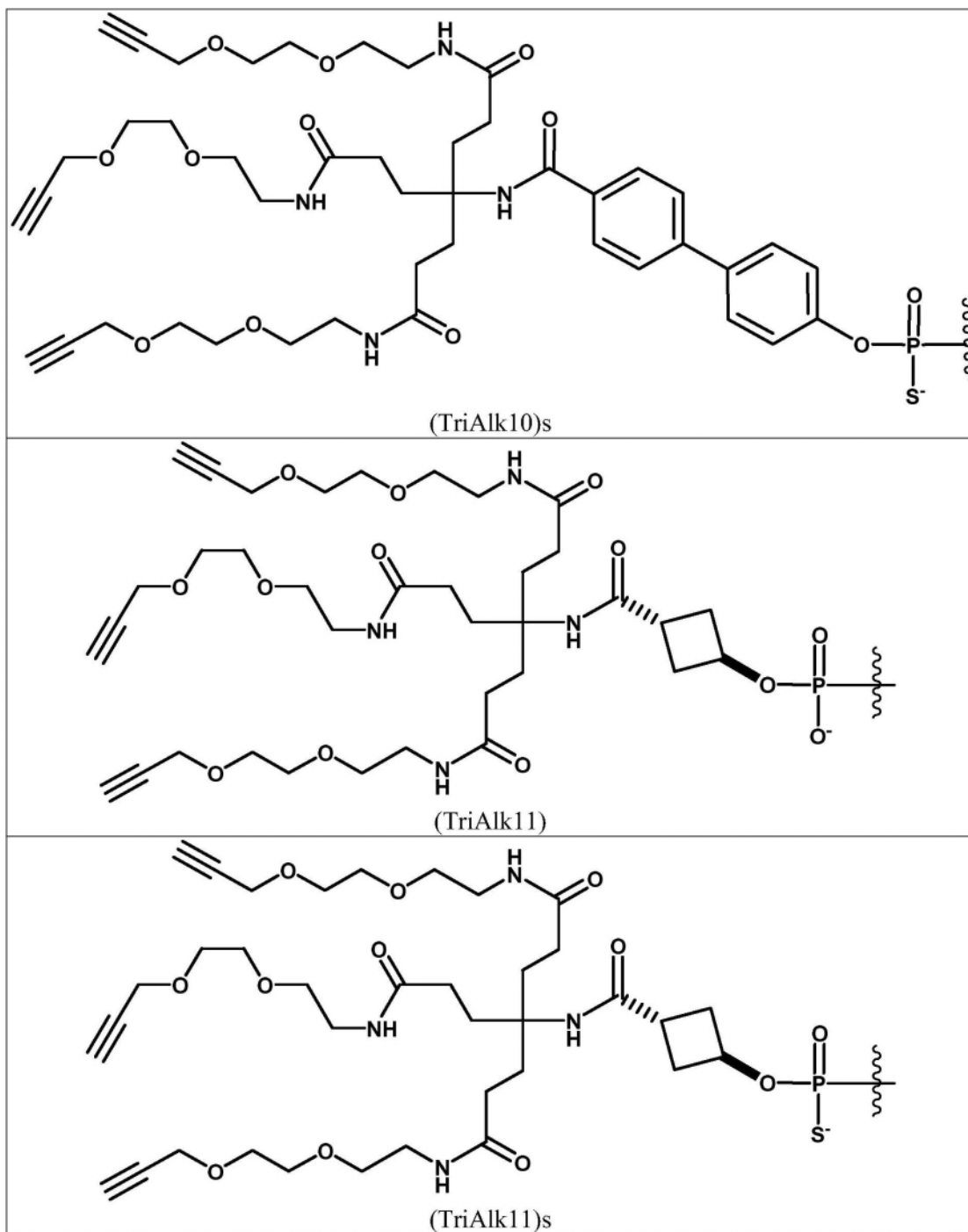




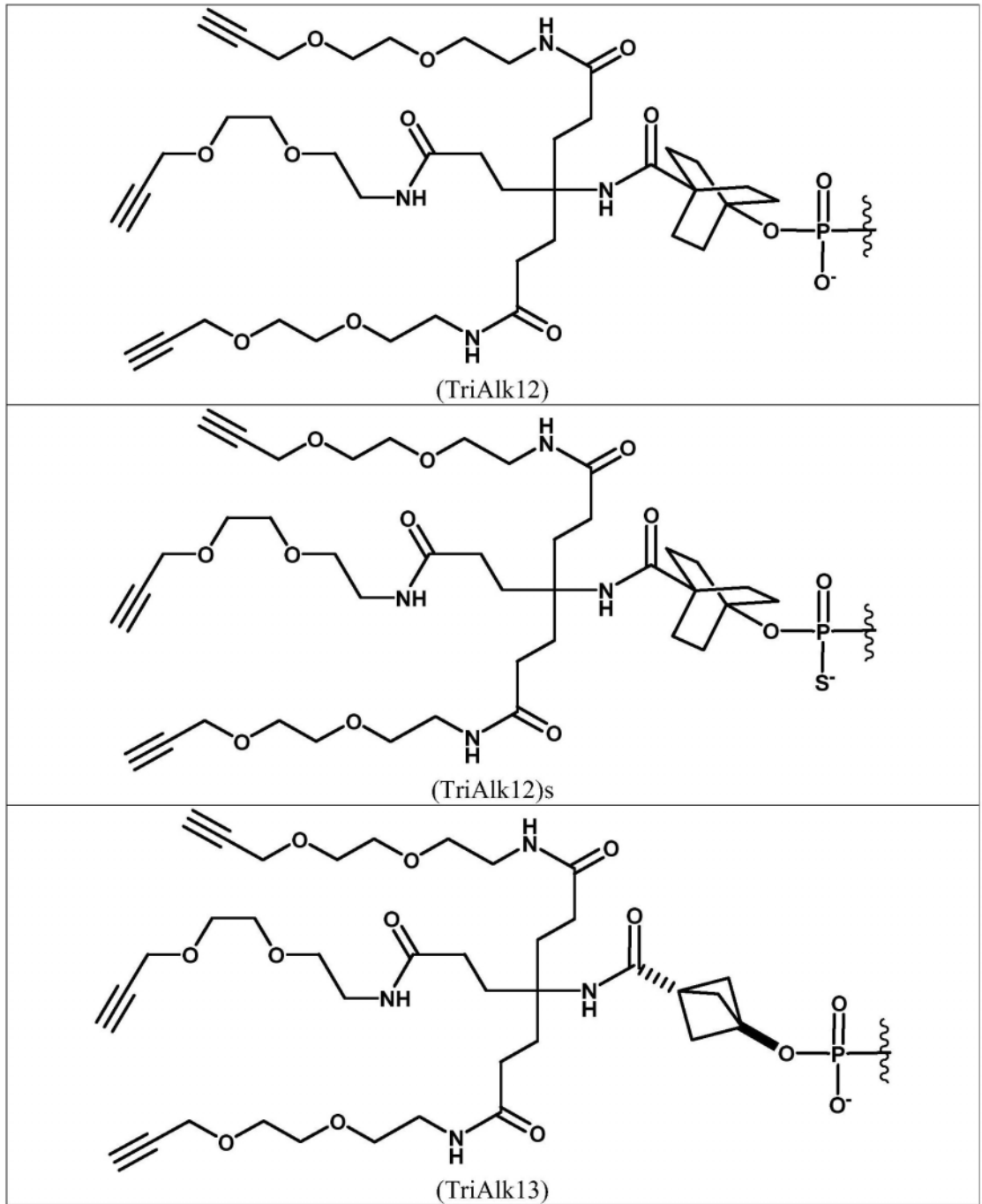
[0465]

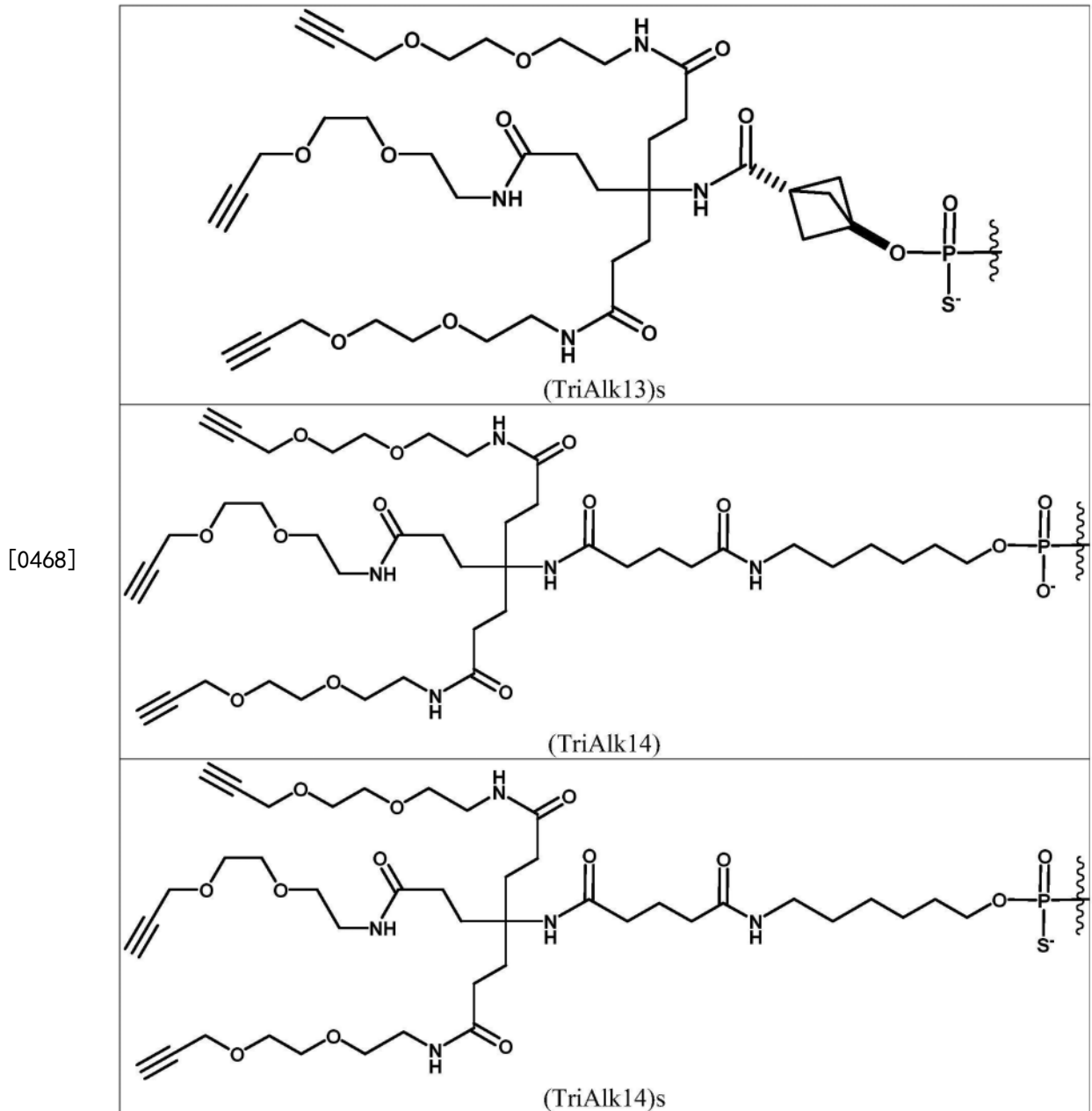


[0466]



[0467]





[0469] 其中  $\text{wavy line}$  表示与货物分子的连接点。

[0470] 或者,可以使用本领域已知的其它连接基团。合适的连接基团的实例在PCT申请号PCT/US19/18232提供,其通过引用以其整体并入本文。

[0471] 现在通过以下非限制性的实施例来举例说明以上提供的实施方案和项目。

[0472] 内部连接的靶向配体

[0473] 在一些实施方案中当本文描述的整联蛋白靶向配体结合或连接至RNAi分子时,整联蛋白靶向配体可结合至有义链或反义链的内部核苷酸。在一些实施方案中,至多15个靶向配体可与RNAi剂的有义链上的内部核苷酸缀合。在一些实施方案中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个靶向配体可与HIF-2 $\alpha$ RNAi剂的有义链上的内部核苷酸缀合。在一些实施方案中,1-5(例如1、2、3、4或5)个靶向配体与RNAi剂的有义链上的内部核苷酸缀合。在一些实施方案中,3-4个靶向配体与RNAi剂的有义链上的内部核苷酸缀合。

[0474] 在一些实施方案中,内部靶向配体的放置可影响RNAi剂的功效或效力。在与RNAi剂结合的 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白靶向配体的一些实施方案中,靶向基团与有义链的5'末端缀合,和至少10个核苷酸位于在有义链的5'末端上定位的三齿靶向基团和在有义链上定位的下一个最近的靶向配体之间。在一些实施方案中,至少5个核苷酸位于在有义链的5'末端上定位的三齿靶向基团和在有义链上定位的下一个最近的靶向配体之间。

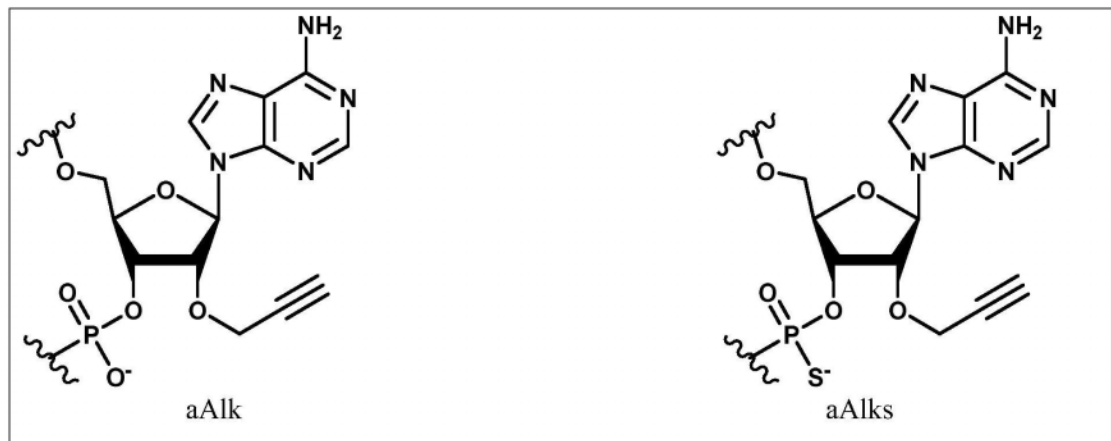
[0475] 在其中两个或更多个靶向配体与RNAi剂的有义链上定位的内部核苷酸缀合的一些实施方案中,在两个与靶向配体缀合的内部核苷酸之间存在至少1个不与靶向配体缀合的核苷酸的间距。在其中两个或更多个靶向配体与RNAi剂的有义链缀合的一些实施方案中,至少两个不与靶向配体缀合的核苷酸位于两个与靶向配体缀合的内部核苷酸之间。

[0476] 在一些实施方案中,从与反义链上的核苷酸形成碱基对的最远3'核苷酸开始,按从3'至5'编号,靶向配体与有义链上的第2、第4和第6个核苷酸缀合。在一些实施方案中,从与反义链形成碱基对的有义链上3'末端核苷酸开始,靶向配体与第2、第4、第6和第8个核苷酸(3'→5')缀合。

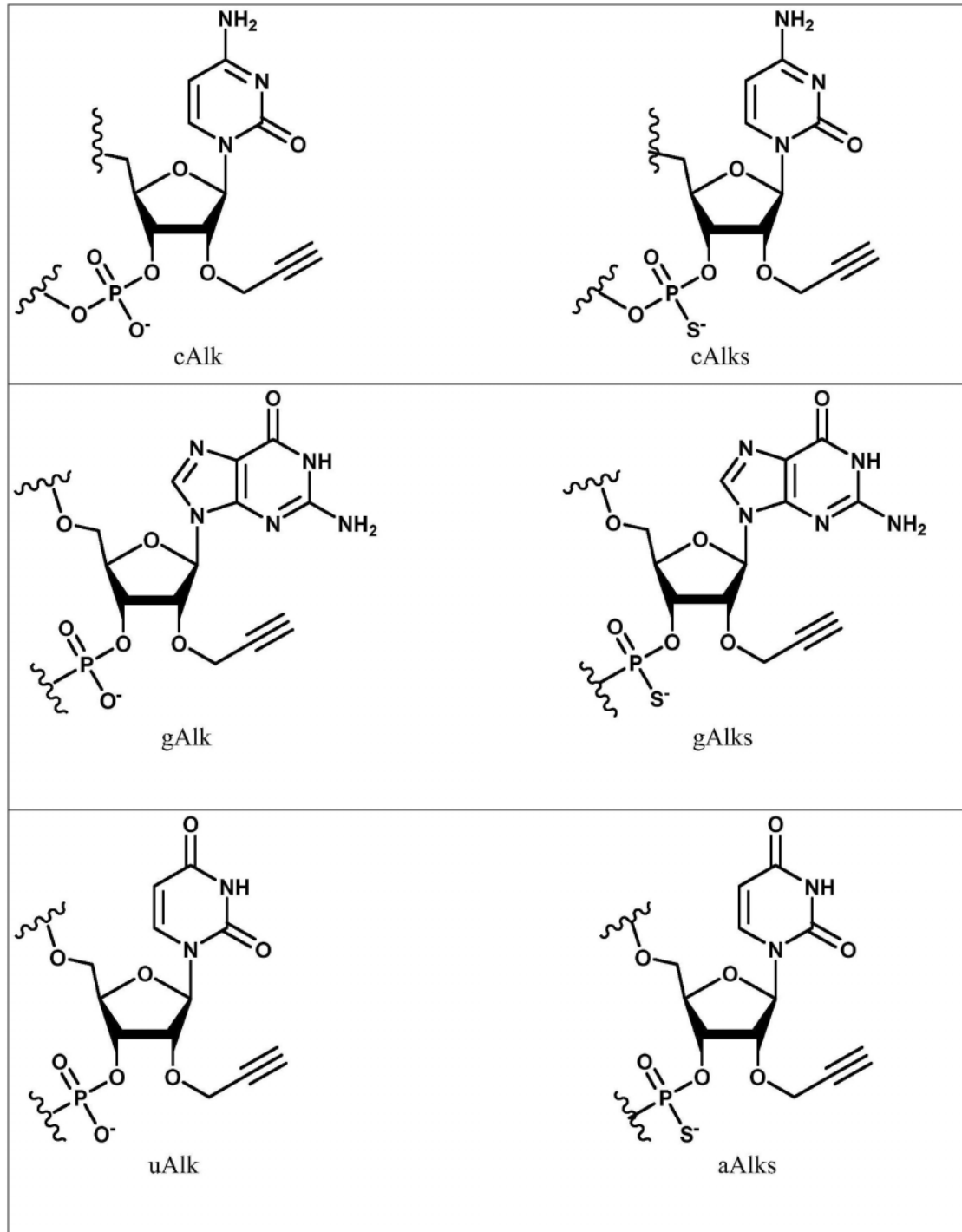
[0477] 用于连接内部靶向配体的修饰的核苷酸的实例在下表B中显示:

[0478] 表B.代表用于连接靶向配体的修饰的核苷酸的结构

[0479]



[0480]



### 实施例

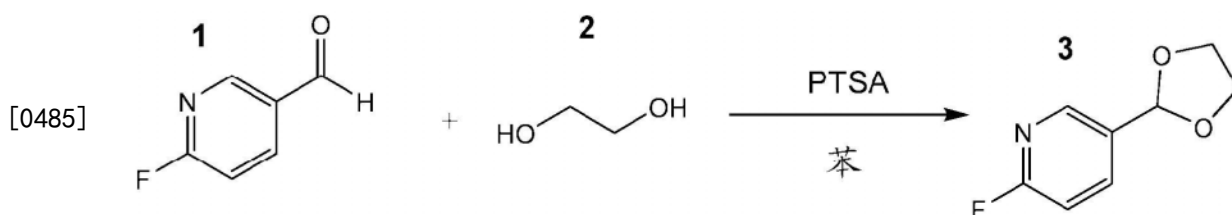
[0481] 以下实施例不是限制性的,并且旨在举例说明本文公开的某些实施方案。

[0482] 实施例1. 整联蛋白靶向配体的合成

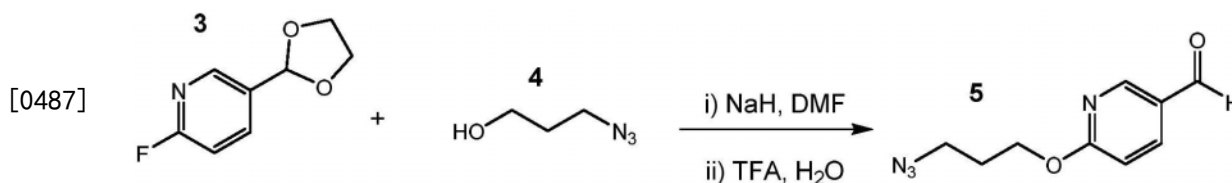
[0483] 在实施例合成的以下实验细节中使用的一些缩写定义如下:h或hr=小时;min=分钟;mol=摩尔;mmol=毫摩尔;M=摩尔; $\mu$ M=微摩尔;g=克; $\mu$ g=微克;rt或RT=室温;L=升;mL=毫升;wt=重量;Et<sub>2</sub>O=乙醚;THF=四氢呋喃;DMSO=二甲亚砜;EtOAc=乙酸乙酯;Et<sub>3</sub>N或TEA=三乙胺;i-Pr<sub>2</sub>NEt或DIPEA或DIEA=二异丙基乙胺;CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>或DCM=二氯甲

烷;CHCl<sub>3</sub>=氯仿;CDCl<sub>3</sub>=氘化氯仿;CCl<sub>4</sub>=四氯化碳;MeOH=甲醇;EtOH=乙醇;DMF=二甲基甲酰胺;BOC=叔丁氧基羰基;CBZ=苄氧基羰基;TBS=叔丁基二甲基甲硅烷基;TBSCl或TBDMSCl=叔丁基二甲基氯硅烷;TFA=三氟乙酸;DMAP=4-二甲基氨基吡啶;NaN<sub>3</sub>=叠氮化钠;Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=硫酸钠;NaHCO<sub>3</sub>=碳酸氢钠;NaOH=氢氧化钠;MgSO<sub>4</sub>=硫酸镁;K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>=碳酸钾;KOH=氢氧化钾;NH<sub>4</sub>OH=氢氧化铵;NH<sub>4</sub>Cl=氯化铵;SiO<sub>2</sub>=二氧化硅;Pd-C=碳载钯;HCl=氯化氢或盐酸;NMM=N-甲基吗啉;H<sub>2</sub>=氢气;KF=氟化钾;EDC-HCl=N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐;MTBE=甲基叔丁基醚;MeOH=甲醇;Ar=氩气;N<sub>2</sub>=氮气;SiO<sub>2</sub>=二氧化硅;R<sub>T</sub>=保留时间;PTSA=对甲苯磺酸;PPTS=对甲苯磺酸吡啶鎓。

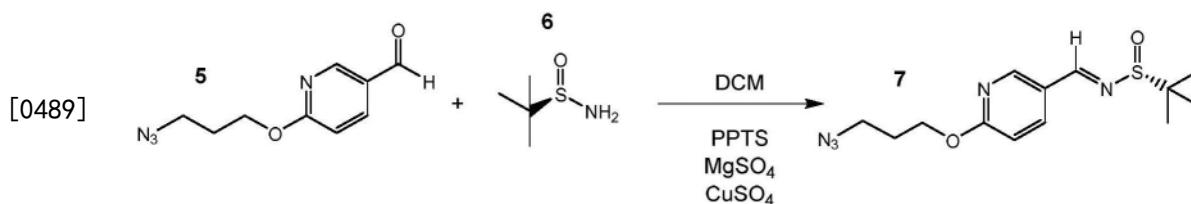
[0484] 结构1c((S)-3-(6-((1-叠氨基-15-氧代-3,6,9,12-四氧杂-16-氮杂十九烷-19-基)氧基)吡啶-3-基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成



[0486] 将在苯(25mL)中含有化合物1(1.03g,8.23mmol)、化合物2(0.92g 14.8mmol)和PTSA水合物(156mg,0.82mmol)的混合物在dean stark装置中回流过夜。第二天早上,将反应混合物倾倒入饱和碳酸氢钠中,和随后加入乙酸乙酯。将有机相分离,经硫酸钠过滤和浓缩以得到化合物3,收率为95%,其随后无需进一步纯化而使用。

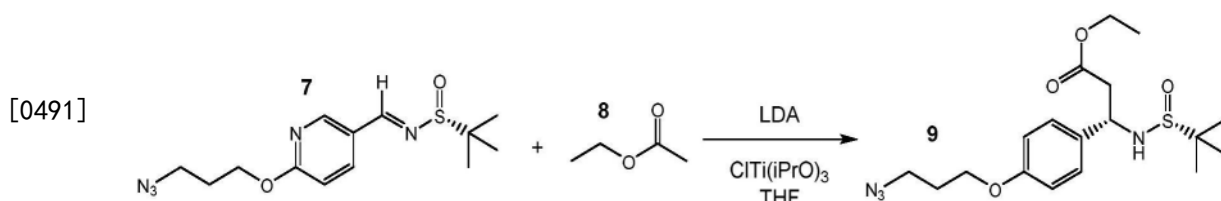


[0488] 向在DMF(100mL)中含有化合物4(5.39g,53.3mmol)和3Å分子筛的溶液中加入氢化钠(60wt%,2.13g,53.3mmol),并将反应物搅拌1小时。随后加入化合物3(7.52g,7.52g)/DMF(20mL)的溶液,并将悬浮液在80℃加热过夜。完成后,悬浮液经棉塞过滤和在减压下浓缩。残留物在乙醚和水之间分配,将有机相分离,经硫酸钠过滤和在减压下浓缩。残留物用20ml的10% H<sub>2</sub>O/TFA处理和搅拌30分钟。完成后,将溶液冷却至0℃并用6M NaOH调节pH至11,之后产物作为油沉淀。用乙醚从油性悬浮液萃取化合物5三次。合并有机相,经硫酸钠过滤和浓缩。然后化合物5通过在二氧化硅上分离,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,以26%收率分离。



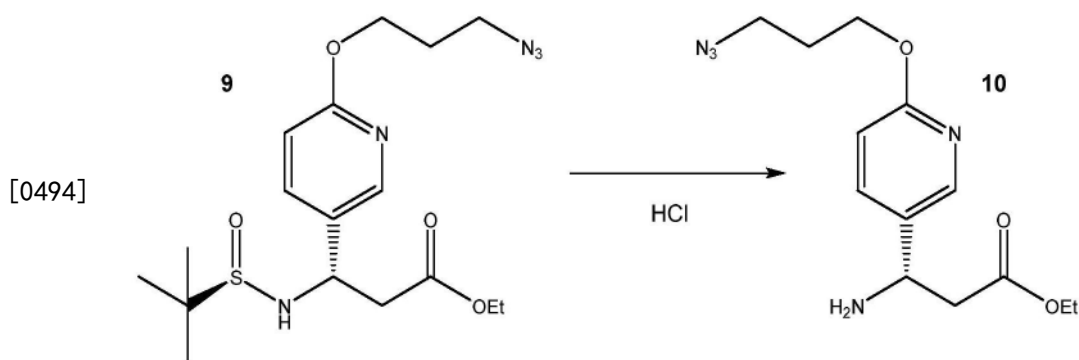
[0490] 将在DCM(22mL)中含有化合物5(2.29g,9.94mmol)、化合物6(4.82g,39.8mmol)、PPTS(125mg,0.50mmol)、硫酸镁(3g,24.9mmol)、硫酸铜(3.97g,24.9mmol)和3埃分子筛的

混合物加热至回流过夜。完成后,将混合物过滤和在减压下浓缩。然后化合物7通过在二氧化硅上分离,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,以76%收率分离。

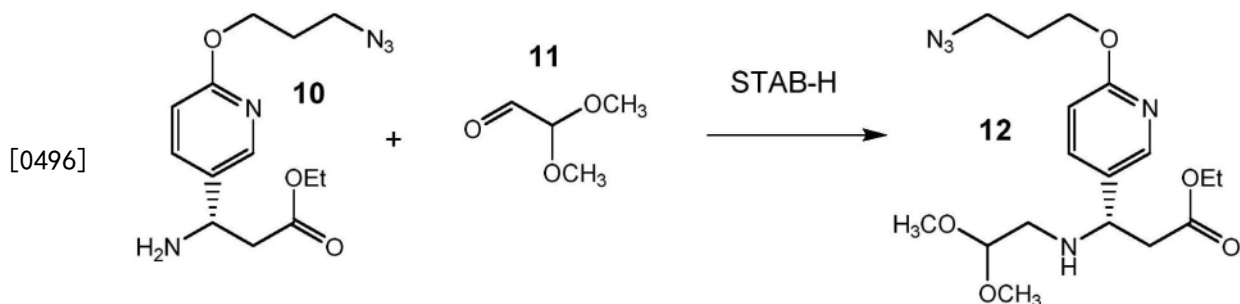


[0492] 向火焰干燥烧瓶中加入THF (40mL) 和二异丙基胺 (2.29g, 22.6mmol)。将其冷却至-20℃和通过插管加入n-BuLi (2.5M, 8.64mL, 21.6mmol)。在-20℃下将溶液搅拌10min,然后冷却至-78℃。逐滴加入化合物8 (2.02mL, 20.6mmol),同时剧烈搅拌。添加后,在-78℃下将溶液搅拌30min。接着,通过加料漏斗经大约10分钟,作为THF (10mL) 中的溶液加入ClTi (iPrO)<sub>3</sub> (11.26g, 43.2mmol),同时剧烈搅拌。在-78℃下将反应物搅拌30分钟。最后,作为THF中的悬浮液逐滴加入化合物7 (2.29g, 6.86mmol) 和在-78℃下搅拌1.25小时,直到反应完成。在-78℃下向反应物中加入饱和水性氯化铵。然后将反应物从冷却下移出,并使水相逐渐融化和淬灭(黄橙色消失)。将混合物在EtOAc和饱和水性氯化铵之间分配。将有机相分离和用EtOAc萃取水相两次。合并有机相和经盐水干燥,然后经硫酸钠干燥,然后过滤和浓缩。残留物经二氧化硅纯化,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱。

[0493] 纯化后,化合物9作为单一非对映异构体,以75%收率获得。



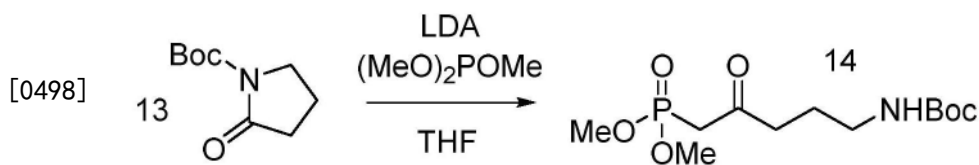
[0495] 化合物9 (1.28g, 3.21mmol) / MeOH (3.2mL) 用HCl/二噁烷 (4M, 3.2mL, 12.9mmol) 处理和室温下搅拌30分钟。完成后,反应混合物用水稀释和用乙醚洗涤。随后,使用2N水性NaOH调节pH至11和产物用乙酸乙酯萃取。有机相经硫酸钠干燥,过滤和浓缩,以92%收率得到化合物10,其随后无需进一步纯化而使用。



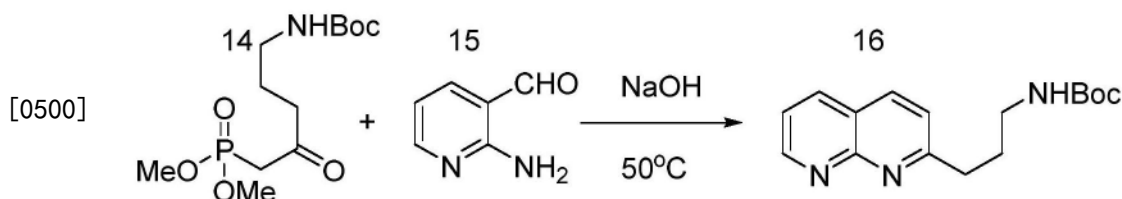
[0497] 在15℃下向化合物10 (0.78g, 2.67mmol) 和化合物11 (0.60g, 3.46mmol) 在THF (6mL) 中的混合物中作为固体分批加入STAB-H (1.29g, 6.12mmol)。添加后,除去冷却和将混合物搅拌大约2.5小时至完成。通过加入饱和水性碳酸氢钠将反应物淬灭和使pH变成9。用



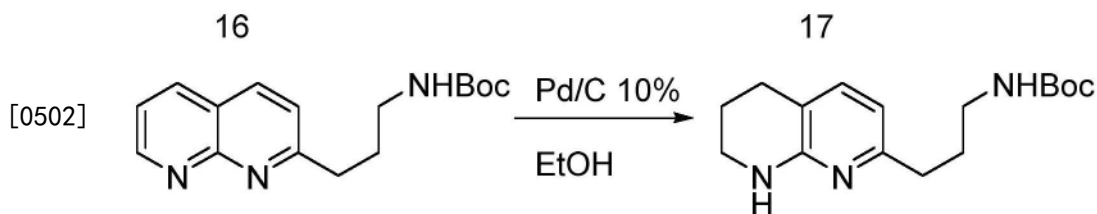
EtOAc萃取产物三次,合并有机相,用盐水干燥,然后经硫酸钠过滤和浓缩。化合物12通过在二氧化硅上分离,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,以85%收率分离。



[0499] 在 $-10^\circ\text{C}$ 下通过烘箱干燥的气密注射器经2分钟向DIPEA(7.53mL,53.75mmol)/THF(35mL)中加入n-BuLi(2.5M,19.9mL,49.8mmol)。在 $-10^\circ\text{C}$ 将混合物搅拌10分钟,然后冷却至 $-60^\circ\text{C}$ 和将二甲基甲基膦酸酯(6.42g,51.8mmol)/THF(8mL)的溶液经5-10分钟逐滴加入。在 $-60^\circ\text{C}$ 下熟化约1小时后,化合物13(7.37g,39.82mmol)作为THF(15mL)中的溶液在 $-60^\circ\text{C}$ 下经5分钟逐滴加入。将反应混合物在 $-60^\circ\text{C}$ 搅拌1小时,然后在 $-41^\circ\text{C}$ 搅拌约1.5小时。将反应物通过加入2.6当量的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ (2.0M)淬灭和用乙酸乙酯( $\sim 50\text{mL}$ )萃取三次。合并有机相和用盐水干燥,经硫酸钠过滤,和短暂浓缩以确定粗重量,并获得样品用于NMR。在确定干重量后,将化合物14溶于MeOH,无需进一步纯化用于下一反应。计算为75.83%收率。通过NMR,粗品wt/wt%为76.3%。 $^1\text{H}$  NMR:400MHz  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ 4.75(s,1H),3.81(s,3H),3.78(s,3H),3.10-3.14(m,2H),3.04-3.09(m,2H),2.68(t,2H),1.82-1.75(m,2H),1.44(s,9H)。

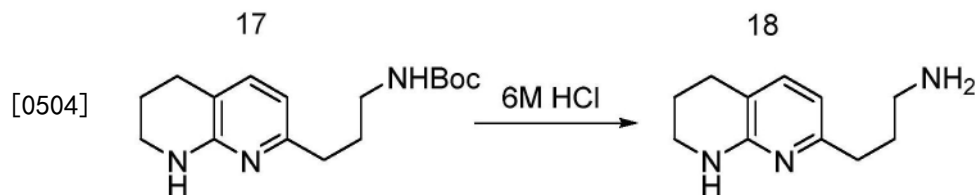


[0501] 向化合物14(从 $\sim 12\text{g}$ 粗品的NMR,根据重量,9.33g,30.16mmol)/MeOH(40mL)中加入NaOH(1.45g,36.2mmol)/水(1.5mL)的溶液。将混合物加热至 $50^\circ\text{C}$ 和加入化合物15(2.76g,22.62mmol)。搅拌30分钟后,加入第二部分的化合物15(736mg,6.03mmol),和将反应混合物在 $50^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。然后将反应混合物浓缩成油,和在2体积EtOAc和1体积 $\text{H}_2\text{O}$ 之间分配。将有机相分离和用1体积的水洗涤。将水性洗涤液合并和用EtOAc反萃取(2x,1vol)。合并的有机相经硫酸钠干燥,过滤和浓缩。将粗品在大约20g二氧化硅上干燥。化合物16通过在二氧化硅上分离,以含有1%三乙胺的乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,以69%收率分离。 $^1\text{H}$  NMR:400MHz  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ 9.09(dd,1H),8.17(dd,1H),8.12(d,1H),7.46(dd,1H),7.41(d,1H),4.78(s,1H),3.24(q,2H),3.10(t,2H),2.12(quin,2H),1.43(s,9H)。

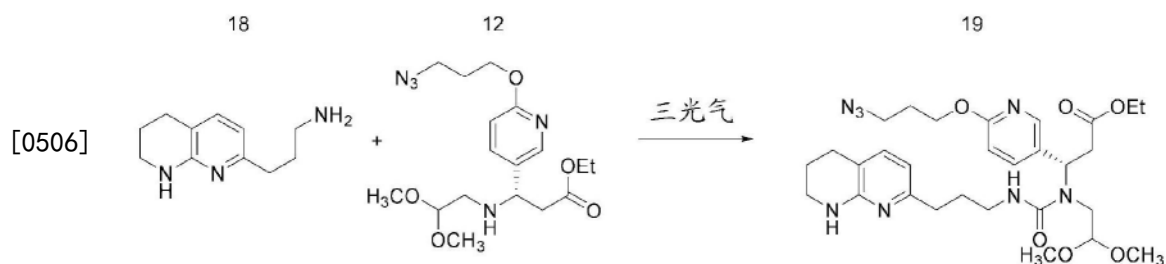


[0503] 向化合物16(5.98g,20.8mmol)/EtOH(50mL)的溶液中加入钯(10%,在碳上,2.22g,2.08mmol)和1个大气压的氢气。反应混合物在室温下搅拌过夜。完成后,反应混合物经Celite®过滤和浓缩。化合物17通过在二氧化硅上分离,以含有1%三乙胺的乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,以79%收率分离。 $^1\text{H}$  NMR:400MHz  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ 7.05(d,1H),6.34(d,1H),5.48(s,1H),4.81(s,1H),3.36-3.43(m,2H),3.16(q,2H),2.68(t,2H),2.59(t,2H),1.90(dt,2H),

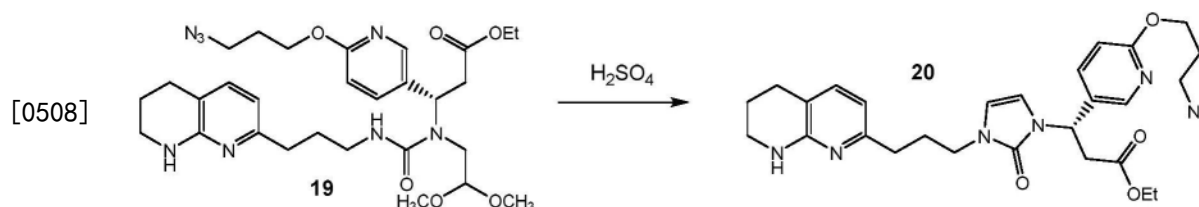
1.83(quin,2H),1.44(s,9H)。



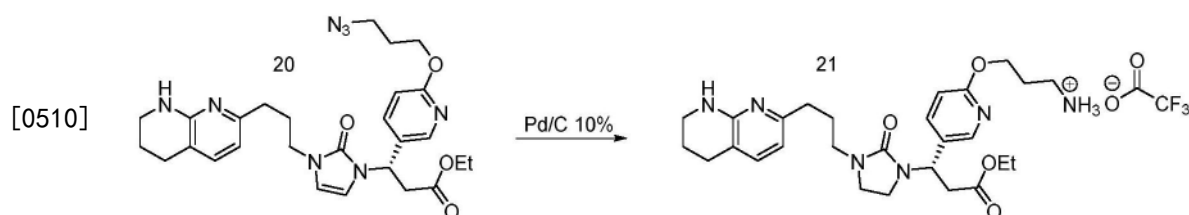
[0505] 将化合物17(4.81g,16.53mmol)溶于水性6MHCl(16.4mL)和在42℃加热2小时。然后加入另外一部分6MHCl(2.8mL)和将反应混合物搅拌另外2小时。向反应物中加入氯化钠,接着加入水性2NNaOH,直到产物作为油沉淀(pH大于12)。用2-丁醇萃取混合物三次。合并的有机相经硫酸钠干燥,过滤和浓缩。化合物18以85%收率获得和随后无需进一步纯化而使用。<sup>1</sup>H NMR:400MHz CDCl<sub>3</sub>δ7.06(d,1H),6.35(d,1H),4.83(s,1H),3.35-3.46(m,2H),2.75-2.67(m,4H),2.58(t,2H),1.88-1.95(m,2H),1.84-1.76(m,4H)。



[0507] 在-10℃下在火焰干燥烧瓶中向三光气(85mg,0.28mmol)/THF(0.9mL)的溶液中逐滴加入化合物18(236mg,0.62mmol)和TEA(0.134mL,0.96mmol)在THF(0.5mL)中的溶液。将反应混合物升温至室温。在TLC指示完全反应后,加入另外的TEA(0.134mL),接着作为固体加入化合物12(166mg,0.87mmol)。将异质混合物在50℃加热2小时,同时剧烈搅拌。完成后,反应混合物用1体积的水淬灭和用EtOAc萃取三次。合并的有机相用盐水干燥,经硫酸钠过滤和浓缩。获得化合物19,假定100%收率,和随后无需进一步纯化而使用。

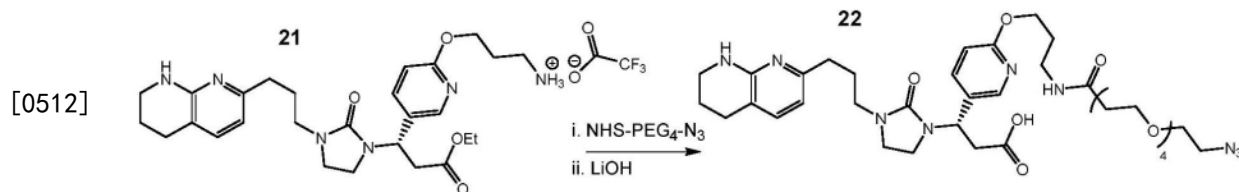


[0509] 向溶于THF(37mL)的粗化合物19(400mg,0.62mmol,假定)加入H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(2M,0.6mL)和将混合物在室温下搅拌过夜。第二天早上,加入另外一部分的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.65当量)。4小时后,反应完成。反应混合物用乙酸乙酯稀释。将有机相分离和水相用乙酸乙酯反萃取一次。合并的有机相经硫酸钠过滤和浓缩。化合物20通过经二氧化硅分离,以MeOH/DCM的梯度洗脱,以75%收率分离。



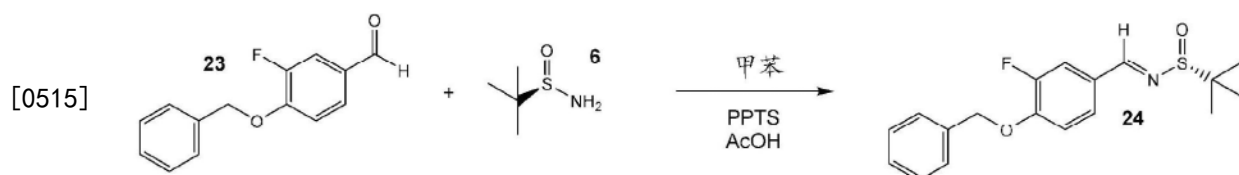
[0511] 向化合物20(251mg,0.47mmol)和Pd/C(10wt%,100mg,0.094mmol)在乙醇(9mL)中

的悬浮液中加入 $H_2$ 至1个大气压和在 $35^\circ C$ 搅拌过夜。完成后,经Celite®过滤除去钯。化合物21通过反相HPLC,使用 $C_{18}$ 5u 19x250mm BEH柱 (Waters Corp.),以含有1% TFA的乙腈/ $H_2O$ 的梯度洗脱,作为TFA盐以20%收率分离。

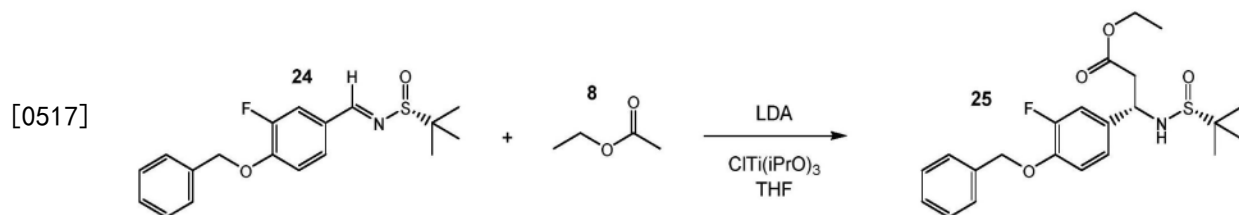


[0513] 向化合物21 (61mg, 0.097mmol) /DCM (250uL) 的溶液中加入TEA (8uL, 0.24mmol), 接着作为DCM (275uL) 中的溶液加入NHS-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (41.4mg, 0.11mmol)。将反应混合物搅拌15分钟和LC-MS检查,其表明反应完成。除去所有挥发物,并将残留物溶于EtOH (0.4mL) 和水 (0.4mL)。加入LiOH (11.2mg, 0.47mmol) 和将反应混合物在 $40^\circ C$ 加热2小时。完成后,反应混合物在减压下浓缩。化合物22 (结构1c) 通过反相HPLC,使用 $C_{18}$ 5u 19x250mm BEH柱 (Waters Corp.),以含有1% TFA的乙腈/ $H_2O$ 的梯度洗脱,以42%收率分离。

[0514] 结构2c ((S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-3-氟苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成

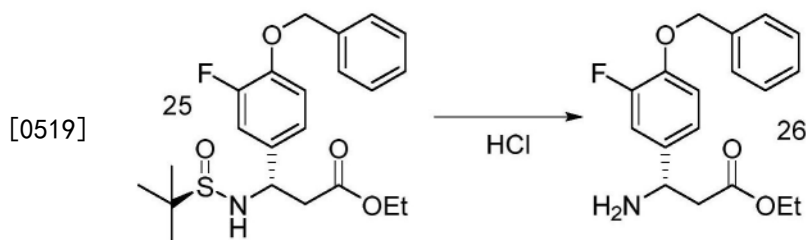


[0516] 向化合物23 (10g, 43.4mmol) /甲苯 (80mL) 的溶液中加入化合物6 (21.1g, 0.17mol)、PPTS (0.55g, 2.2mmol), 然后乙酸 (1.24mL, 21.7mmol)。反应容器配备有Dean Stark分离器,然后加热至回流过夜。完成后,将反应混合物浓缩和在60克二氧化硅上干燥和用乙酸乙酯/己烷的梯度经 $SiO_2$ 纯化,以66%收率得到化合物24。 $^1H$ NMR: 400MHz  $CDCl_3$   $\delta$  8.47 (s, 1H), 7.68 (d, 1H), 7.31-7.56 (m, 6H), 6.98-7.16 (m, 1H), 5.23 (s, 2H), 1.26 (s, 9H)。

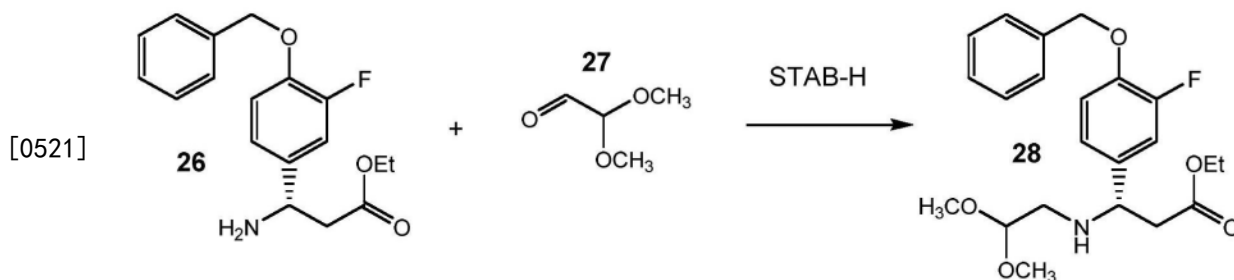


[0518] 向火焰干燥烧瓶中加入THF (190mL) 和DIPEA (9.07g, 89.7mmol), 冷却至 $-20^\circ C$ , 然后加入通过插管n-BuLi (2.5M, 34.2mL, 85.6mmol)。在 $-20^\circ C$ 将溶液搅拌10min, 然后冷却至 $-78^\circ C$ 。将化合物8 (8mL, 81.5mmol) 逐滴加入, 同时剧烈搅拌。添加后, 在 $-78^\circ C$ 搅拌30min。接着, 作为THF (40mL) 中的溶液通过加料漏斗经10分钟加入 $ClTi(iPrO)_3$  (44.6g, 0.171mol)。将反应物在 $-78^\circ C$ 搅拌30分钟。最后, 将化合物24 (9.06g, 27.2mmol) 作为THF (20mL) 中的悬浮液逐滴加入和在 $-78^\circ C$ 搅拌1.25小时, 直到反应完成。在 $-78^\circ C$ 向反应物中加入饱和水性氯化铵。然后将反应物从冷却下移出和使水相逐渐融化和淬灭(黄橙色消失)。混合物在EtOAc和饱和水性氯化铵之间分配。将有机相分离和用EtOAc洗涤水相两次。合并有机相和经盐水干燥, 然后经硫酸钠干燥, 过滤和浓缩。化合物25通过在二氧化硅上分离, 以乙酸乙

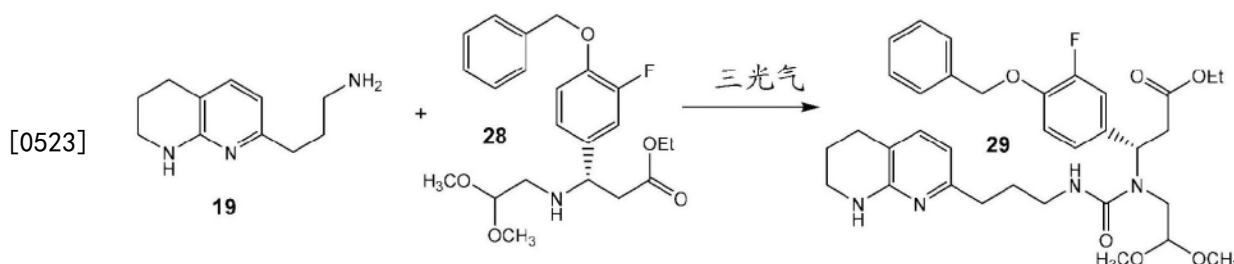
酯/己烷的梯度洗脱,作为单一非对映异构体以70%收率获得。 $^1\text{H NMR}$ :400MHz  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ 7.31-7.48(m,5H),7.09(dd,1H),6.89-7.04(m,2H),5.13(s,2H),4.59-4.76(m,2H),4.13(q,2H),2.81(dd,2H),1.21-1.25(m,12H)。



[0520] 向化合物25(8.07g,19.1mmol)加入水性HCl(6M,20.7mL,0.124mol),接着加入MeOH(60mL)。加入THF,直到获得均质溶液,并将反应混合物在室温下搅拌6小时。用水性2N NaOH将反应混合物碱化至pH 10,然后用EtOAc萃取三次。合并的有机相用盐水干燥,经硫酸钠过滤和浓缩。化合物26以95%收率获得和随后无需进一步纯化而使用。 $^1\text{H NMR}$ :400MHz  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ 7.28-7.46(m,6H),7.18(d,1H),6.99(t,1H),5.11(s,2H),4.57(t,1H),4.09(q,2H),2.97-3.09(m,1H),2.81-2.93(m,1H),1.18(t,3H)。

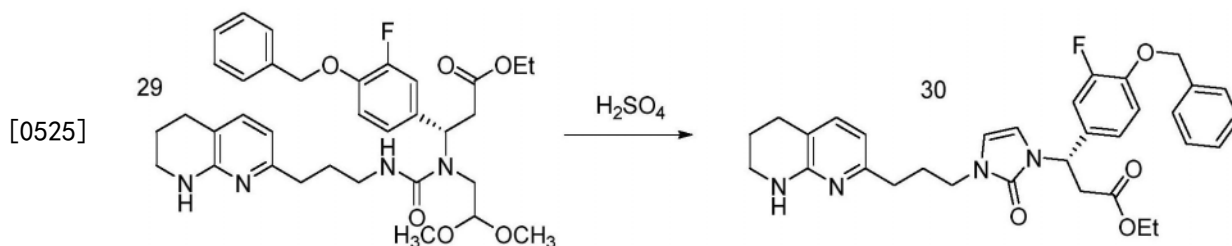


[0522] 在 $0^\circ\text{C}$ 向化合物26(5.76g,18.2mmol)和化合物27(4.09g,23.6mmol)在THF(40mL)中的混合物中作为固体分批加入STAB-H(8.85g,41.8mmol)。最后添加后,除去冷却和将混合物搅拌大约2.5小时至完成。反应混合物通过加入饱和水性碳酸氢钠淬灭。用EtOAc萃取混合物三次。合并的有机相用盐水干燥,经硫酸钠过滤和浓缩。化合物28通过在二氧化硅上分离,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,以73%收率分离。 $^1\text{HNMR}$ :400MHz  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ 7.30-7.49(m,5H),7.11(dd,1H),6.88-7.02(m,2H),5.13(s,2H),4.40(t,1H),4.10(q,2H),4.00(dd,1H),3.35(s,3H),3.31(s,3H),2.47-2.75(m,4H),1.20(t,3H)。

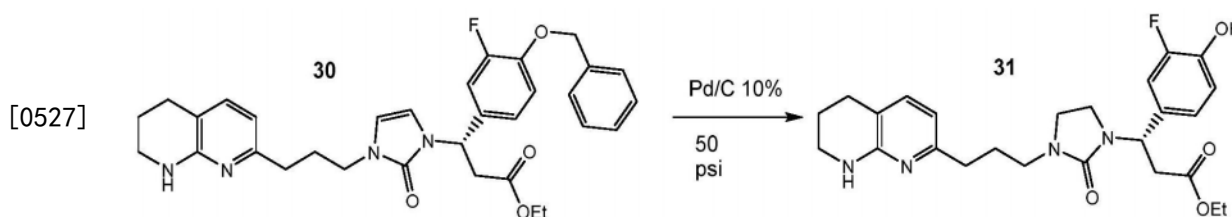


[0524] 在火焰干燥烧瓶中在 $-10^\circ\text{C}$ 下向三光气(1.2g,4.04mmol)/THF(24mL)的溶液中逐滴加入化合物19(3.64g,8.99mmol)和TEA(1.94mmol,13.9mmol)在THF(6mL)中的溶液。将反应混合物升温至室温。在TLC指示完全反应后,加入另外的TEA(3.3mL,23.6mmol),接着作为固体加入化合物28(2.61g,13.7mmol)。异质混合物在 $50^\circ\text{C}$ 加热2小时,同时剧烈搅拌。完成后,反应混合物用1体积的水淬灭和用EtOAc萃取三次。合并的有机相用盐水干燥,经硫酸钠

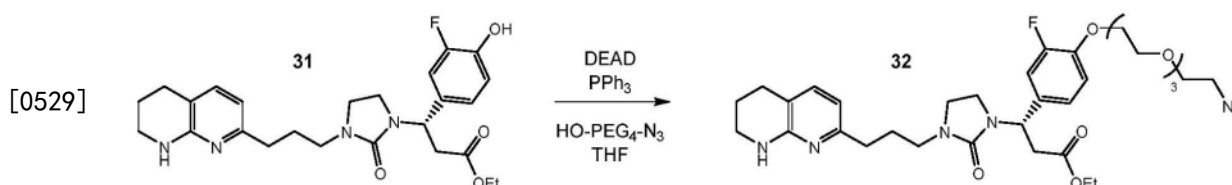
过滤和浓缩。获得化合物29,假定100%收率,和粗品随后无需进一步纯化而使用。



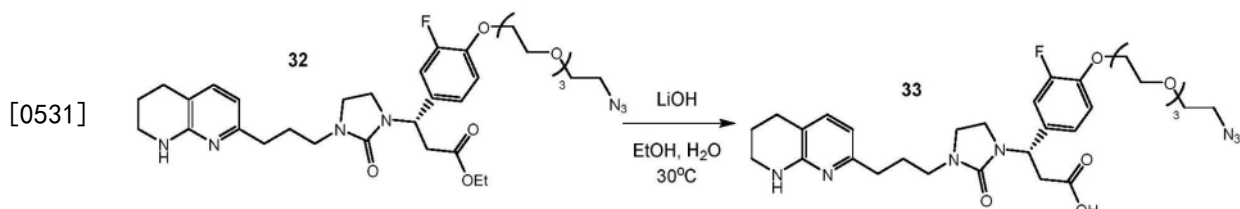
[0526] 向溶于THF (37mL) 的化合物29 (5.59g, 8.97mmol) 中加入水 (0.8mL) 和 $H_2SO_4$  (2M, 8.07mL, 16.2mmol), 和反应混合物在28°C搅拌过夜。第二天早上,使用碳酸氢钠将混合物的pH调节至9和用DCM萃取三次。合并的有机相用盐水干燥,经硫酸钠过滤和浓缩。化合物30通过在二氧化硅上分离,以含有1% TEA的MeOH/DCM的梯度洗脱,以82%收率分离。



[0528] 向溶于EtOH (30mL) 的化合物30 (4.13g, 7.39mmol) 中加入Degussa®钯 (10wt%, 3.15g, 2.96mmol) 和氢气至50psi。混合物在室温下搅拌过夜。第二天,反应完成64%。反应混合物经Celite®过滤和浓缩。残留物溶于EtOH和加入钯 (10wt%, 1.57g, 1.48mmol) 和氢气至50psi。搅拌48小时后,反应混合物加热至30°C和搅拌另外24小时。完成后,悬浮液经Celite®过滤和真空除去所有挥发物。残留物经二氧化硅纯化,以MeOH/DCM的梯度洗脱,以72%收率得到化合物31。 $^1H$  NMR: 400MHz DMSO- $d_6$   $\delta$  9.88 (s, 1H), 7.02-7.14 (m, 2H), 6.86-6.93 (m, 2H), 6.50-6.76 (m, 1H), 6.31 (d, 1H), 5.17 (t, 1H), 4.00 (q, 2H), 3.23-3.28 (m, 4H), 2.79-3.18 (m, 7H), 2.61 (t, 2H), 2.41 (t, 2H), 1.65-1.78 (m, 4H), 1.09 (t, 3H)。

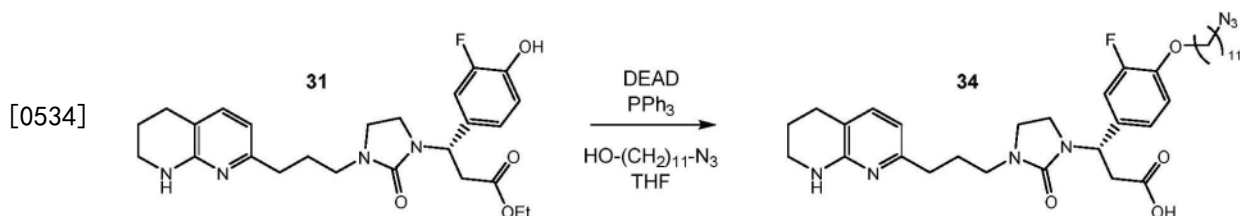


[0530] 在-10°C向 $PPh_3$  (699mg, 2.66mmol) /THF (0.47mL) 的溶液中逐滴加入DEAD的溶液。将混合物升温至室温和加入至化合物31 (600mg, 1.33mmol) 和HO-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (466mg, 3.06mmol) 的纯混合物中和搅拌过夜。反应混合物然后在减压下浓缩,和残留物经二氧化硅纯化,以MeOH/DCM的梯度洗脱,以50%收率得到化合物32。 $^1H$  NMR: 400MHz DMSO- $d_6$   $\delta$  7.10-7.19 (m, 2H), 6.97-7.06 (m, 2H), 6.18-6.31 (m, 2H), 5.20 (t, 1H), 4.13-4.16 (m, 1H), 3.98-4.04 (m, 2H), 3.71-3.80 (m, 2H), 3.52-3.61 (m, 8H), 3.38-3.37 (m, 5H), 3.10-3.25 (m, 5H), 2.79-3.08 (m, 5H), 2.59 (t, 2H), 2.31-2.42 (m, 2H), 1.65-1.75 (m, 4H), 1.10 (t, 3H)。



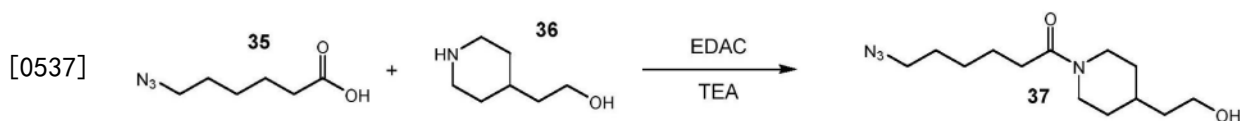
[0532] 向化合物32 (826mg, 1.23mmol) 中加入EtOH (3mL) 和H<sub>2</sub>O (3mL), 接着加入LiOH (97mg, 4.05mmol)。将混合物在30℃搅拌过夜。完成后, 使用6M水性HCl将混合物中和至pH=5和浓缩。残留物通过反相HPLC纯化, 用Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10μm柱, 以含有0.1%的乙腈/水的梯度洗脱, 以81%收率得到化合物33 (结构2c)。<sup>1</sup>H NMR: 400MHz D<sub>2</sub>O δ 7.30 (d, 1H), 7.01-7.19 (m, 3H), 6.45 (d, 1H), 5.24 (t, 1H), 4.14-4.32 (m, 2H), 3.84-3.92 (m, 2H), 3.59-3.77 (m, 10H), 3.14-3.45 (m, 8H), .02-3.12 (m, 1H), 2.97 (d, 2H), 2.85 (q, 1H), 2.50-2.72 (m, 4H), 1.68-1.94 (m, 4H)。

[0533] 结构2.1c ((S)-3-(4-((11-叠氮基十一烷基)氧基)-3-氟苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成

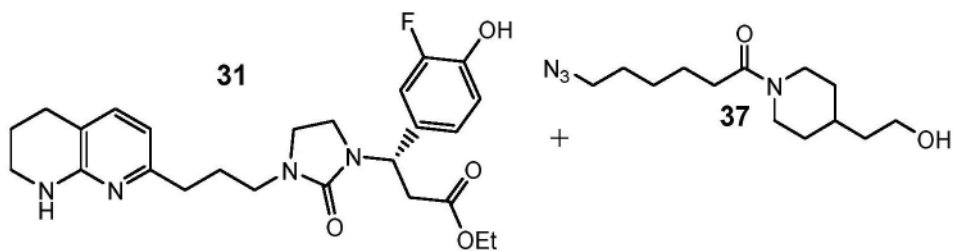


[0535] 在室温下向PPh<sub>3</sub>/THF的溶液中逐滴加入DEAD的溶液。将混合物转移至含有化合物31和OH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-N<sub>3</sub>的混合物的小瓶, 和反应混合物在室温下搅拌过夜。从反应混合物除去挥发物并将粗品溶于EtOH。LiOH作为在H<sub>2</sub>O中的溶液加入, 和加入额外的水/EtOH, 直到反应混合物变成均质。在室温下搅拌1.5小时后, 用H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将混合物酸化至pH3, 浓缩和通过反相HPLC纯化 (Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10μm, 含0.1% TFA的乙腈/水, 梯度洗脱)。

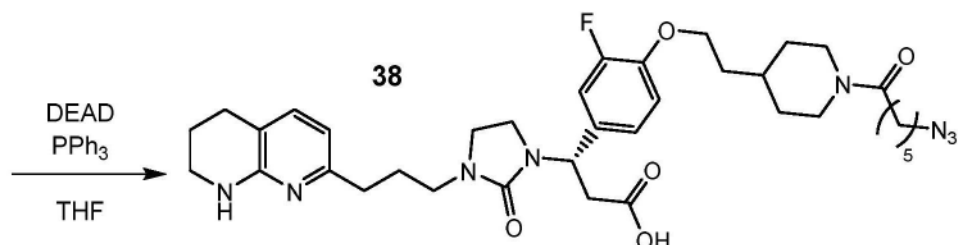
[0536] 结构2.2c ((S)-3-(4-(2-(1-(6-叠氮基己酰基)哌啶-4-基)乙氧基)-3-氟苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成



[0538] 溶于DCM的化合物35在0℃用EDAC处理, 和加入乙腈以帮助溶解。5分钟后, 加入TEA和化合物36, 除去冷却和继续搅拌2小时。完成后, 加入饱和氯化铵和有机相分离, 经硫酸钠过滤和浓缩。获得的粗品随后无需进一步纯化而使用。

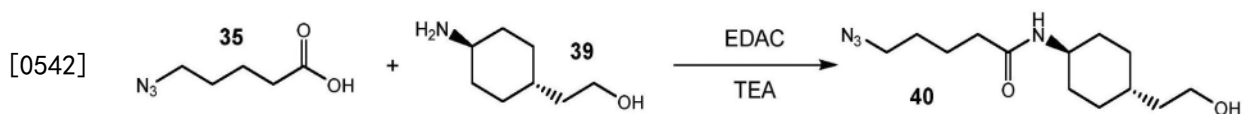


[0539]

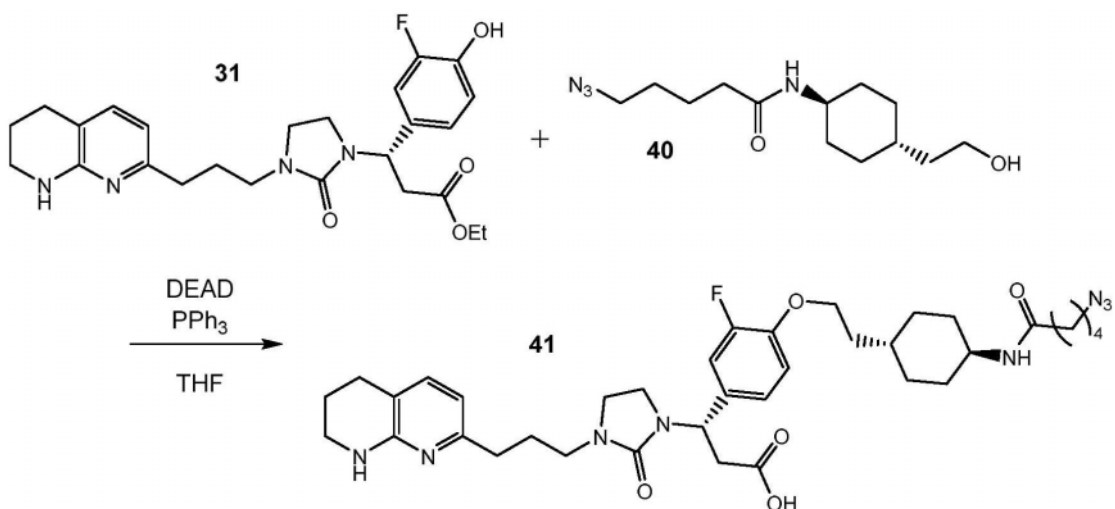


[0540] 在室温下向 $\text{PPh}_3/\text{THF}$ 的溶液中逐滴加入DEAD的溶液,同时剧烈搅拌。将混合物转移至含有化合物31和化合物37的混合物的小瓶,和反应混合物在室温下搅拌过夜。从反应混合物除去挥发物和将粗品溶于 $\text{EtOH}$ 。 $\text{LiOH}$ 作为 $\text{H}_2\text{O}$ 中的溶液加入,和加入另外的水,直到反应混合物变成均质。在室温下搅拌1.5小时后,用 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 将混合物酸化至 $\text{pH}3$ ,浓缩和通过反相HPLC纯化(Phenomenex Gemini C18, 50x 250mm, 10 $\mu\text{m}$ , 含0.1% TFA的乙腈/水, 梯度洗脱),得到化合物38(结构2.2c)。

[0541] 结构2.3c((S)-3-(4-(2-((1r,4S)-4-(5-叠氮基戊酰氨基)环己基)乙氧基)-3-氟苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成



[0543] 在 $0^\circ\text{C}$ 向化合物35在DCM中的悬浮液中加入作为DCM中的溶液的EDAC。5分钟后,除去冷却和加入化合物39,接着加入TEA。异质混合物在室温下搅拌过夜。第二天,反应物用DCM稀释和沉淀溶解。混合物用5%  $\text{KHSO}_4$ 洗涤两次和用盐水洗涤一次。有机相经硫酸钠过滤和浓缩。含有化合物40的粗残余物无需进一步纯化而使用。

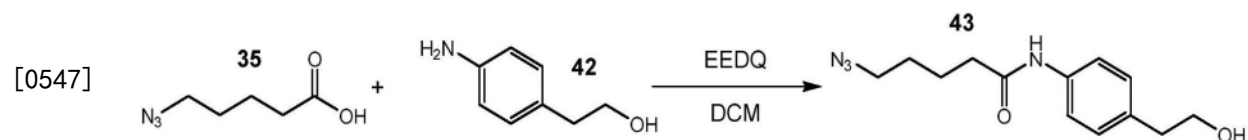


[0544]

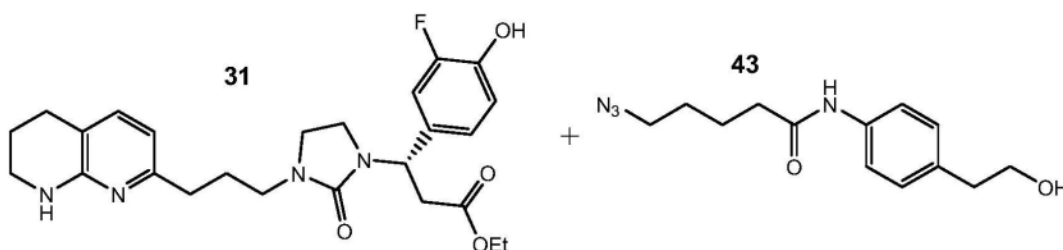
[0545] 在室温下向 $\text{PPh}_3/\text{THF}$ 的溶液中逐滴加入DEAD的溶液,同时剧烈搅拌。将混合物转

移至含有化合物31和化合物40的混合物的小瓶,和反应混合物在室温下搅拌过夜。从反应混合物除去挥发物和将粗品溶于EtOH。LiOH作为H<sub>2</sub>O中的溶液加入,和加入另外的水,直到反应混合物变成均质。在室温下搅拌1.5小时后,用H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将混合物酸化至pH3,浓缩和通过反相HPLC纯化(Phenomenex Gemini C18, 50x 250mm, 10 $\mu$ m, 含0.1% TFA的乙腈/水, 梯度洗脱), 得到化合物41(结构2.3c)。

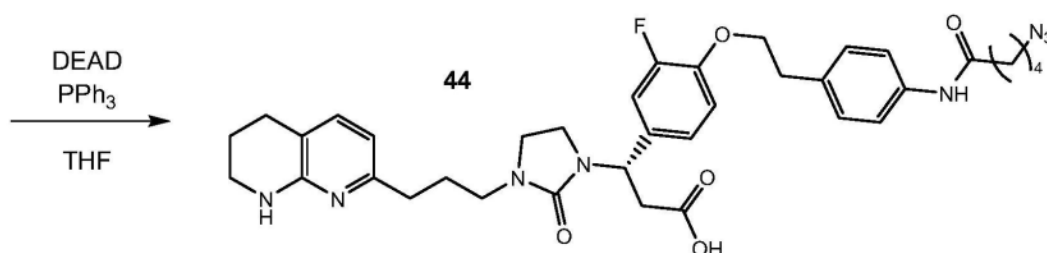
[0546] 结构2.4c((S)-3-(4-(4-(5-叠氨基戊酰氨基)苯乙氧基)-3-氟苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成



[0548] 向化合物35和化合物42在DCM中的混合物中加入EEDQ, 和将溶液在室温下搅拌过夜。反应混合物然后用DCM稀释, 用1M HCl洗涤三次, 和用盐水洗涤一次。有机相经硫酸钠干燥, 过滤和浓缩。化合物43然后无需进一步纯化而使用。

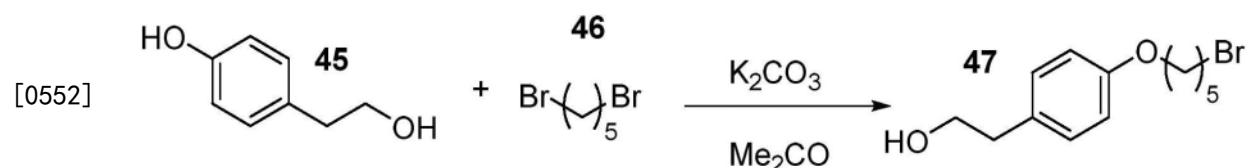


[0549]



[0550] 在室温下向PPh<sub>3</sub>/THF的溶液中逐滴加入DEAD的溶液, 同时剧烈搅拌。将混合物转移至含有化合物31和化合物43的混合物的小瓶, 和反应混合物在室温下搅拌过夜。从反应混合物除去挥发物和将粗品溶于EtOH。LiOH作为H<sub>2</sub>O中的溶液加入, 和加入另外的水, 直到反应混合物变成均质。在室温下搅拌1.5小时后, 用H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将混合物酸化至pH3, 浓缩和通过反相HPLC纯化(Phenomenex Gemini C18, 50x 250mm, 10 $\mu$ m, 含0.1% TFA的乙腈/水, 梯度洗脱), 得到化合物44(结构2.4c)。

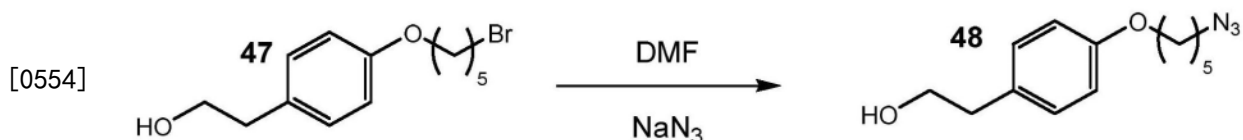
[0551] 结构2.5c((S)-3-(4-(4-((5-叠氨基戊基)氧基)苯乙氧基)-3-氟苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成



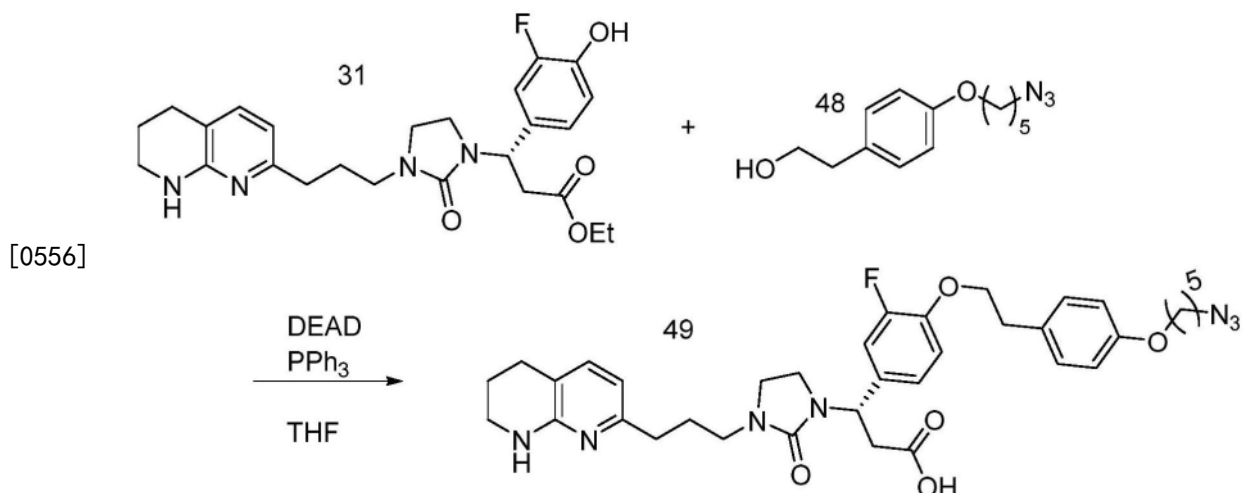
[0553] 向化合物45和化合物46在丙酮中的溶液中加入碳酸钾。将混合物在密封小瓶中作为悬浮液加热至65 $^{\circ}$ C, 同时在N<sub>2</sub>保护下剧烈搅拌过夜。反应物然后过滤, 浓缩和经二氧化硅



纯化,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,得到化合物47。

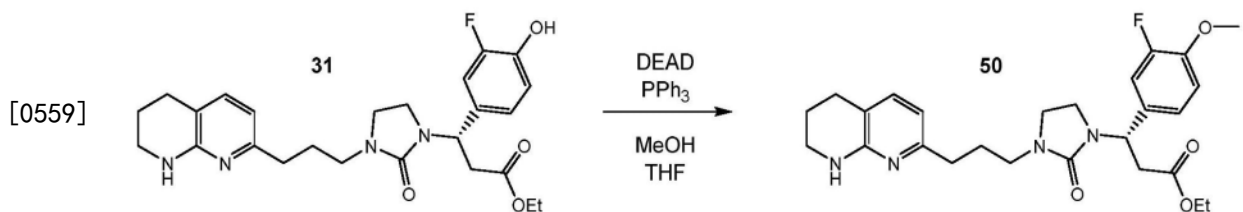


[0555] 向化合物47/DMF的溶液中加入叠氮化钠并将混合物在80℃在密封小瓶中在氮气保护下搅拌过夜。完成后,加入1体积的水和产物用乙酸乙酯萃取。分离的有机相经硫酸钠过滤和浓缩。化合物48的粗品无需进一步纯化而使用。

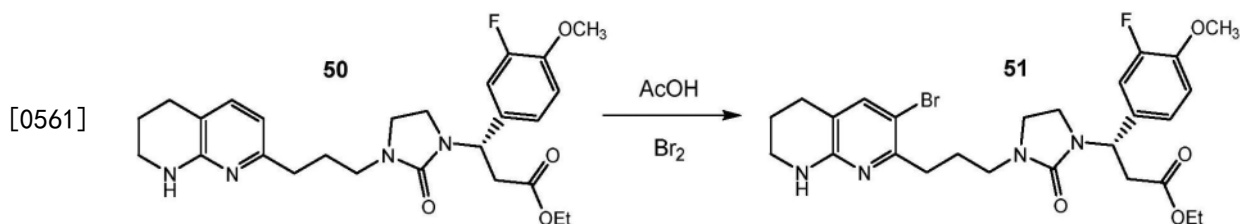


[0557] 在室温下向PPh<sub>3</sub>/THF的溶液中逐滴加入DEAD的溶液,同时剧烈搅拌。将混合物转移至含有化合物31和化合物48的混合物的小瓶,和反应混合物在室温下搅拌过夜。从反应混合物除去挥发物和将粗品溶于EtOH。LiOH作为H<sub>2</sub>O中的溶液加入,和加入另外的水,直到反应混合物变成均质。在室温下搅拌1.5小时后,用H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将混合物酸化至pH3,浓缩和通过反相HPLC纯化(Phenomenex Gemini C18, 50x 250mm, 10μm, 含0.1% TFA的乙腈/水,梯度洗脱),得到化合物49(结构2.5c)。

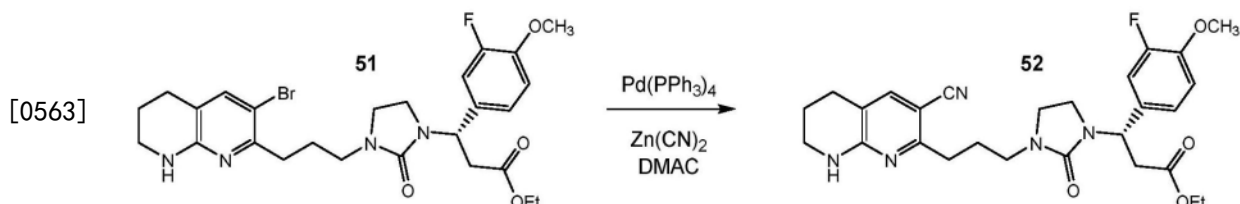
[0558] 结构2.6c((S)-3-(3-(3-(3-(17-叠氮基-3-氧代-6,9,12,15-四氧杂-2-氮杂十七烷基)-5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)-2-氧代咪唑烷-1-基)-3-(3-氟-4-甲氧基苯基)丙酸)的合成



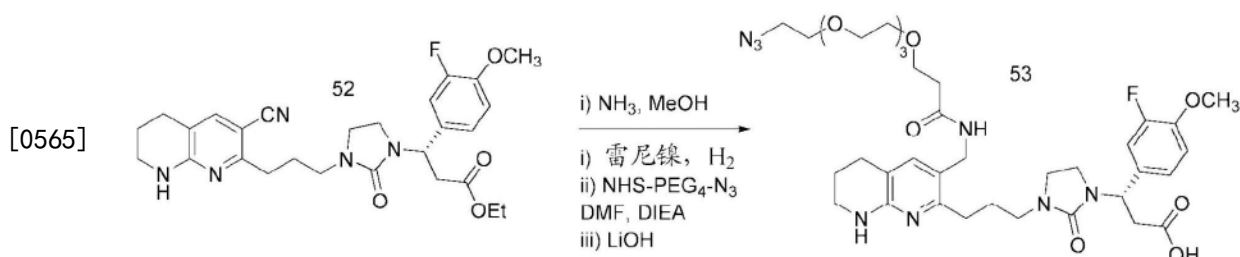
[0560] 在0℃向PPh<sub>3</sub>/THF的溶液中逐滴加入DEAD的溶液。完成添加后,将混合物转移至含有化合物31和MeOH的纯混合物的小瓶。小瓶用N<sub>2</sub>加封和在室温下搅拌过夜。完成后,除去所有挥发物和获得的粗品经二氧化硅纯化,以MeOH/DCM的梯度洗脱,得到化合物50。



[0562] 向化合物50/AcOH的溶液中加入溴,并将混合物搅拌0.5小时。完成后,反应物用5体积的乙酸乙酯和2.5体积的水稀释。用饱和水性碳酸氢钠将水层中和至pH7,和有机相分离。用乙酸乙酯萃取水层另外两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,过滤和浓缩。化合物51的获得的粗品随后无需进一步纯化而使用。

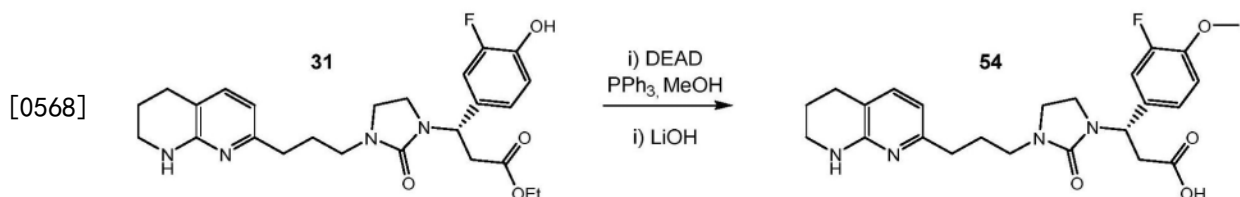


[0564] 化合物51、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>和Zn(CN)<sub>2</sub>在DMAC中的溶液用氮气脱气30分钟。在128℃在密封小瓶中将混合物加热过夜。完成后,混合物用5体积的EtOAc稀释。有机相分离,然后用水洗涤两次,用盐水洗涤两次,然后有机相经硫酸钠过滤和浓缩。残留物经二氧化硅纯化,以100%EtOAc洗脱,得到化合物52。



[0566] 向化合物52/MeOH的溶液中加入氨,然后加入用甲醇预冲洗三次的雷尼镍浆液。向Parr®烧瓶中加入60psi的氢气和在室温下搅拌16小时。完成后,悬浮液过滤和浓缩。获得的粗残余物重新溶于DMF。加入DIEA和NHS-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>和将混合物搅拌1小时。完成后,除去所有挥发物和粗残余物重新溶于MeOH和THF的混合物。加入LiOH/H<sub>2</sub>O和混合物在室温下搅拌17小时。在反应完成后,用TFA调节pH至3和混合物直接注射到半制备型反相HPLC上(Phenomenex Gemini C18, 250x 21.2mm, 5μm, 含0.1% TFA的水/ACN, 梯度洗脱),得到化合物53(结构2.6c)。

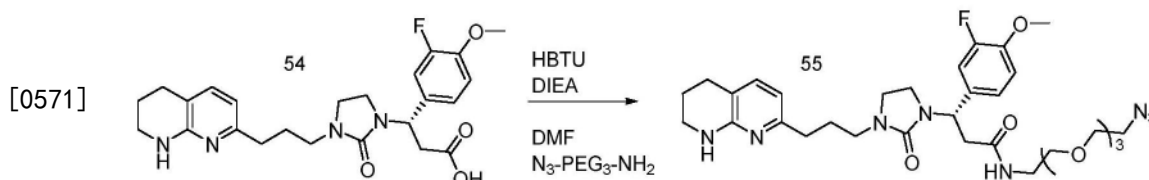
[0567] 结构2.7c((S)-N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-(3-氟-4-甲氧基苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酰胺)、结构2.8c、结构2.9c和结构2.10c的合成



[0569] 在0℃向化合物31中序贯逐滴加入THF、PPh<sub>3</sub>和DEAD的溶液。将混合物在室温下搅

拌16小时。混合物然后冷却至 $-20^{\circ}\text{C}$ ，持续1小时和过滤以除去三苯基氧化膦。将滤出液浓缩和0-烷基化的中间体通过在二氧化硅上纯化，以含有1% TEA的乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱来分离。分离的中间体然后悬浮于THF和 $\text{H}_2\text{O}$ 的混合物中，用 $\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}$ 处理和和在 $35^{\circ}\text{C}$ 搅拌16小时。完成后，用2M HCl调节pH至7和除去所有挥发物。将粗品悬浮于 $\text{H}_2\text{O}$ 中，加入氯化钠和用乙酸乙酯萃取化合物54五次。合并有机相，经硫酸钠过滤和浓缩。

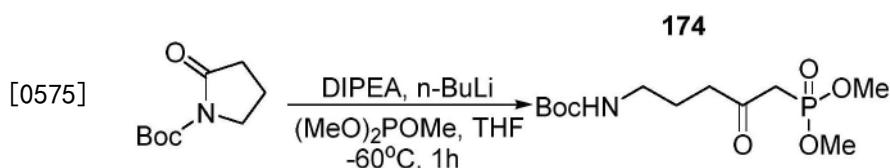
[0570] 化合物54随后无需进一步纯化而使用。



[0572] 化合物54/DMF的溶液用HBTU处理和搅拌5分钟。随后加入DIEA和 $\text{N}_3\text{-PEG}_3\text{-NH}_2$ ，和混合物在室温下搅拌16小时。完成后，用TFA调节pH至3和化合物55通过直接注射到半制备型反相HPLC中分离(Phenomenex Gemini C18, 250x 21.2mm, 5 $\mu\text{m}$ ，含0.1% TFA的水/ACN，梯度洗脱)，得到化合物55。

[0573] 分别使用 $\text{N}_3\text{-PEG}_{11}\text{-NH}_2$ 、 $\text{N}_3\text{-PEG}_{23}\text{-NH}_2$ 和 $\text{N}_3\text{-PEG}_{35}\text{-NH}_2$ ，使用类似的程序合成化合物2.8c、2.9c和2.10c。

[0574] 结构2.11c ((R)-3-(4-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-3-氟苯基)-3-(2-氧代-3-(3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基)咪唑烷-1-基)丙酸)的合成

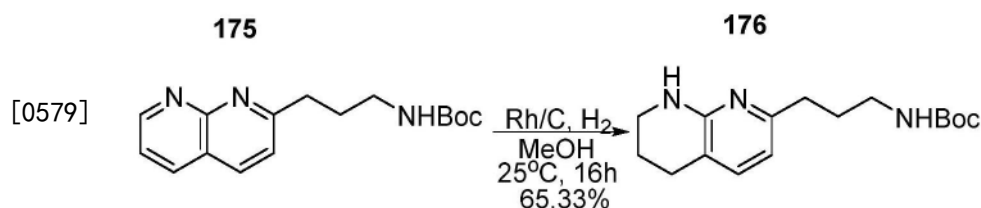


[0576] 向用氮气惰性气氛吹扫和维持的3-L4颈圆底烧瓶中放置THF (1.50L)、DIPEA (150.00mL, 716.000mmol, 0.88当量)、n-BuLi (430.00mL, 680.000mmol, 0.84当量)。接着在 $-60^{\circ}\text{C}$ 下加入亚磷酸三甲酯(195.00mL)和在 $-60^{\circ}\text{C}$ 下搅拌1h。在 $-60^{\circ}\text{C}$ 下向其中加入2-氧代吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(150.00g, 809.835mmol, 1.00当量)。得到的溶液在 $-60^{\circ}\text{C}$ 下在液氮浴中搅拌1h。反应然后通过加入350mL的 $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2N) 淬灭和用1.5L的 $\text{H}_2\text{O}$ 稀释。得到的溶液用2x1 L的乙酸乙酯萃取。得到的混合物用1x1 L的 $\text{H}_2\text{O}$ 洗涤，经无水硫酸钠干燥和在真空下浓缩。这产生200g(粗品)的N-[5-(二甲氧基磷酰基)-4-氧代戊基]氨基甲酸叔丁酯，为黄色油。

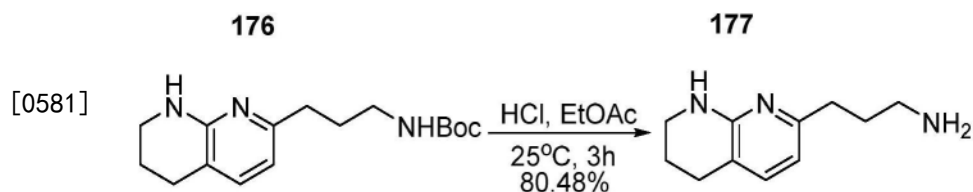


[0578] 向3-L圆底烧瓶中放置N-[5-(二甲氧基磷酰基)-4-氧代戊基]氨基甲酸叔丁酯(200.00g, 1500.00mmol, 1.50当量)、MeOH (1.50L)、2-氨基吡啶-3-甲醛(53.00g, 1000.00mmol, 1.00当量)、NaOH(50.00g, 1500.00mmol, 1.50当量)。得到的溶液在 $50^{\circ}\text{C}$ 在油浴中搅拌16h。用 $\text{NaHCO}_3$  (aq.) 将溶液的pH值调节至8。得到的混合物浓缩。反应然后通过加

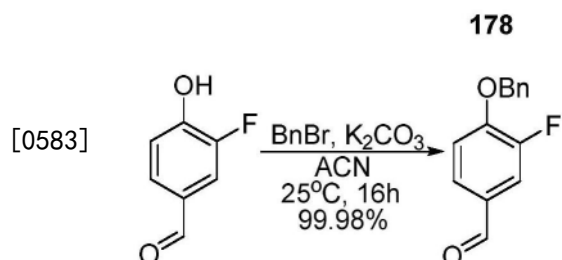
入1.5L的水淬灭和用2x1.5 L的乙酸乙酯萃取。合并的有机层经无水硫酸钠干燥和在真空下浓缩。这产生160g(粗品)的N-[3-(1,8-萘啶-2-基)丙基]氨基甲酸叔丁酯,为黄色油。



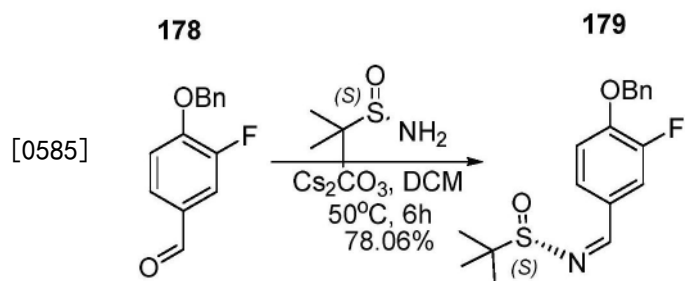
[0580] 向5-L圆底烧瓶中放置N-[3-(1,8-萘啶-2-基)丙基]氨基甲酸叔丁酯(160.00g, 556.787mmol, 1.00当量)、MeOH(2.00L)、Rh/C(140.00g, 1.360mmol)、H<sub>2</sub>(40Psi)。得到的溶液在25°C搅拌16h。将固体滤出。得到的混合物浓缩。这产生106g(65.33%)的N-[3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基]氨基甲酸叔丁酯,为黄色固体。



[0582] 向1-L圆底烧瓶中放置N-[3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基]氨基甲酸叔丁酯(106.00g, 363.767mmol, 1.00当量)、EtOAc(500.00mL)、HCl/EtOAc(4M, 400.00mL)。得到的溶液在25°C搅拌3h。得到的溶液用1L的H<sub>2</sub>O稀释。NaOH(aq.)用于调节pH至11。得到的溶液用2x1 L的乙酸乙酯萃取。合并的有机层经无水硫酸钠干燥和在真空下浓缩。这产生56g(80.48%)的3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙-1-胺,为黄色固体。

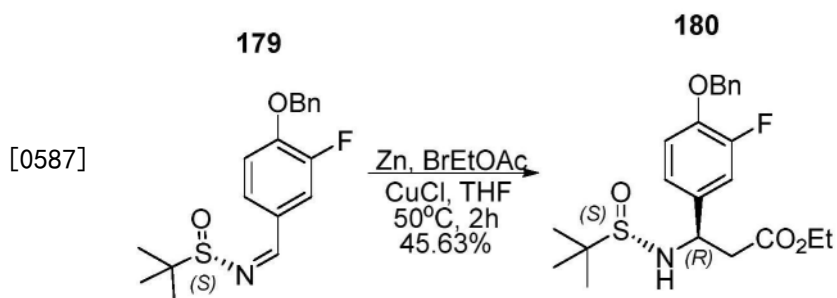


[0584] 向2-L圆底烧瓶中放置3-氟-4-羟基苯甲醛(140.00g, 999.194mmol, 1.00当量)、ACN(1000mL)、(溴甲基)苯(205.08g, 1199.039mmol, 1.20当量)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(414.28g, 2997.581mmol, 3.00当量)。得到的溶液在25°C搅拌16h。将固体滤出。得到的混合物浓缩。这产生230g(99.98%)的4-(苄氧基)-3-氟苯甲醛,为白色固体。

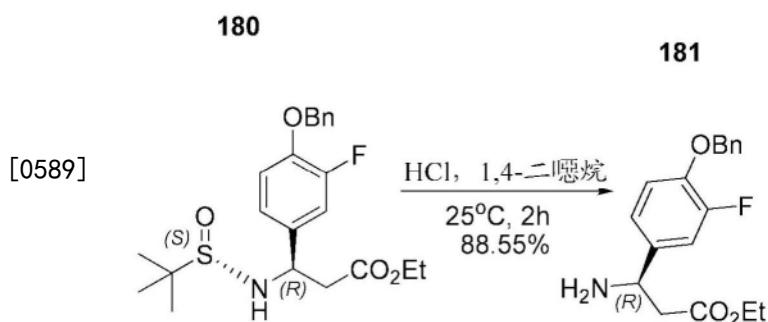


[0586] 向3-L圆底烧瓶中放置4-(苄氧基)-3-氟苯甲醛(230.00g, 998.966mmol, 1.00当量)、DCM(1600mL)、(S)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺(145.29g, 1198.762mmol, 1.20当量)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(650.97g, 1997.933mmol, 2.00当量)。得到的溶液在50°C在油浴中搅拌6h。将固体滤

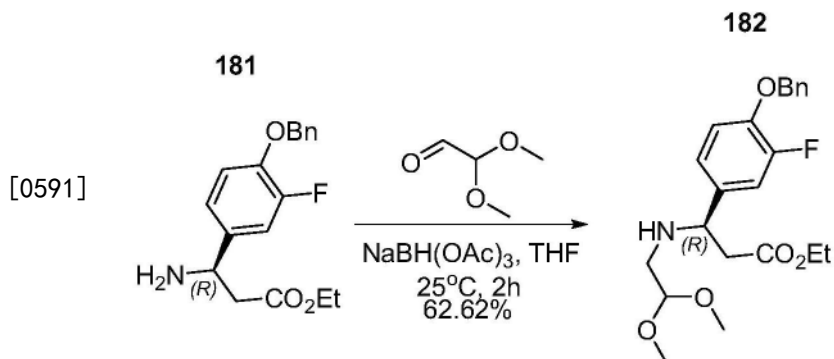
出。得到的混合物浓缩。这产生260g (78.06%) 的(S)-N-[[4-(苄氧基)-3-氟苯基]亚甲基]-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺,为白色固体。



[0588] 向用氮气惰性气氛吹洗和维持的3-L圆底烧瓶中放置THF (2.0L)、Zn (1.02kg, 15595.945mmol, 20.00当量)、CuCl (115.80g, 1169.696mmol, 1.50当量)、2-溴乙酸乙酯 (325.57g, 1949.498mmol, 2.50当量)、(S)-N-[[4-(苄氧基)-3-氟苯基]亚甲基]-2-甲基丙烷-2-亚磺酰胺 (260.00g, 779.797mmol, 1.00当量)。得到的溶液在0°C在水/冰浴中搅拌30min。使得到的溶液反应另外的2h,同时搅拌,同时温度在50°C在油浴中维持。将固体滤出。得到的混合物浓缩。反应然后通过加入2L的水淬灭和用2x2 L的乙酸乙酯萃取。合并的有机层经无水硫酸钠干燥和在真空下浓缩。这产生150g (45.63%) 的(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[[S)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰基]氨基]丙酸乙酯,为黄色油。

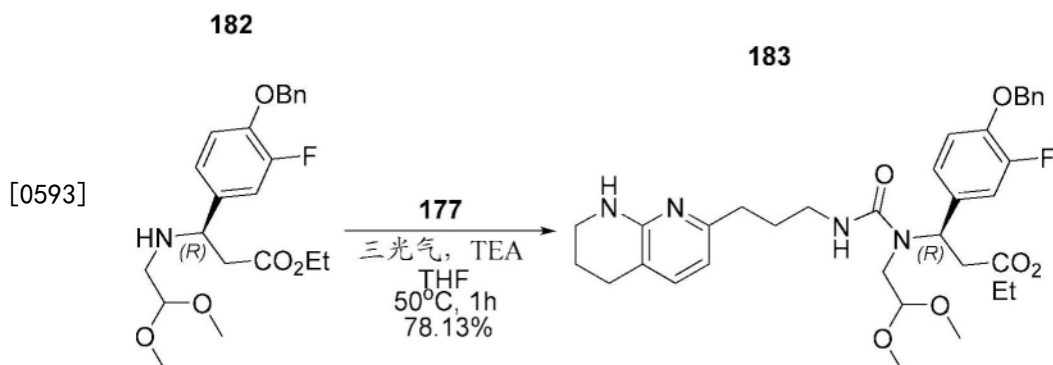


[0590] 向1-L圆底烧瓶中放置(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[[S)-2-甲基丙烷-2-亚磺酰基]氨基]丙酸乙酯 (150.00g, 355.847mmol, 1.00当量)、HCl/1,4-二噁烷 (400.00mL, 4M)。得到的溶液在25°C搅拌2h。得到的混合物浓缩。反应然后通过加入1L的水淬灭。NaHCO<sub>3</sub> (aq.) 用于调节pH至8。得到的溶液用2x1 L的乙酸乙酯萃取,经无水硫酸钠干燥和浓缩。这产生100g (88.55%) 的(3R)-3-氨基-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]丙酸乙酯,为黄色油。

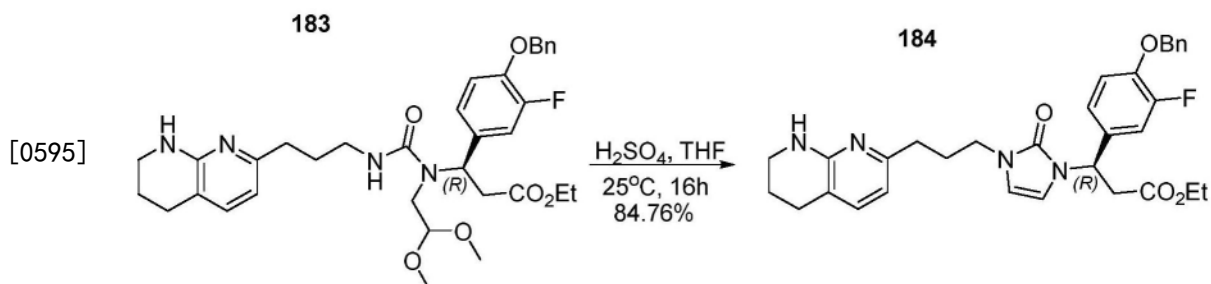


[0592] 向2-L圆底烧瓶中放置(3R)-3-氨基-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]丙酸乙酯 (100.00g, 315.100mmol, 1.00当量)、THF (1.00L)、2,2-二甲氧基乙醛 (49.21g,

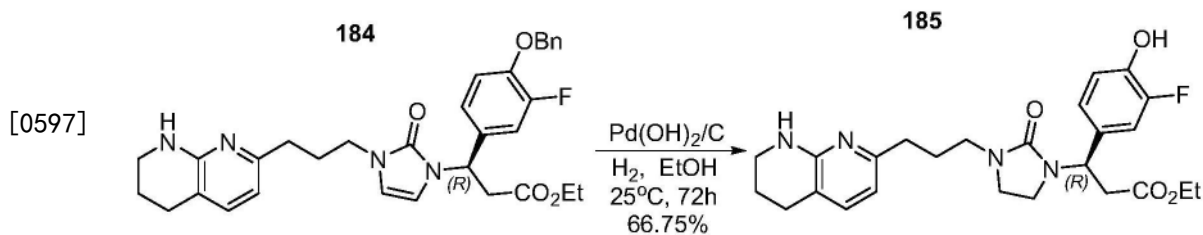
472.696mmol, 1.50当量)、NaBH(OAc)<sub>3</sub> (133.57g, 630.199mmol, 2.00当量)。得到的溶液在25℃搅拌2h。反应然后通过加入1L的水淬灭。得到的溶液用2x1 L的乙酸乙酯萃取,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥和在真空下浓缩。这产生80g (62.62%)的(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[(2,2-二甲氧基乙基)氨基]丙酸乙酯,为黄色油。



[0594] 向2-L 3颈圆底烧瓶中放置三光气 (22.25g, 74.975mmol, 0.38当量)、THF (500mL)、(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[(2,2-二甲氧基乙基)氨基]丙酸乙酯 (80.00g, 197.304mmol, 1.00当量)、TEA (29.95g, 295.956mmol, 1.50当量)、3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙-1-胺 (化合物177, 33.97g, 177.573mmol, 0.90当量)。得到的溶液在50℃在油浴中搅拌1h。反应然后通过加入1L的水淬灭。NaHCO<sub>3</sub> (aq.) 用于调节pH至8。得到的溶液用2x1L的乙酸乙酯萃取,经无水硫酸钠干燥和浓缩。这产生96g (78.13%)的(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[(2,2-二甲氧基乙基)氨基]丙酸乙酯,为黄色粗制油。



[0596] 向1000-mL圆底烧瓶中放置(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[(2,2-二甲氧基乙基)氨基]丙酸乙酯 (96.00g, 154.158mmol, 1.00当量)、THF (500.00mL)、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (180.00mL, 2M)。得到的溶液在25℃搅拌16h。NaOH (5M) 用于调节pH至8。得到的溶液用2x1L的二氯甲烷萃取,经无水硫酸钠干燥和浓缩。残留物用二氯甲烷/甲醇 (50/1) 施加到二氧化硅凝胶柱上。收集的流分合并和浓缩。这产生73g (84.76%)的(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[(2-氧代-3-[3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基]-2,3-二氢-1H-咪唑-1-基)氨基]丙酸乙酯,为黄色油。

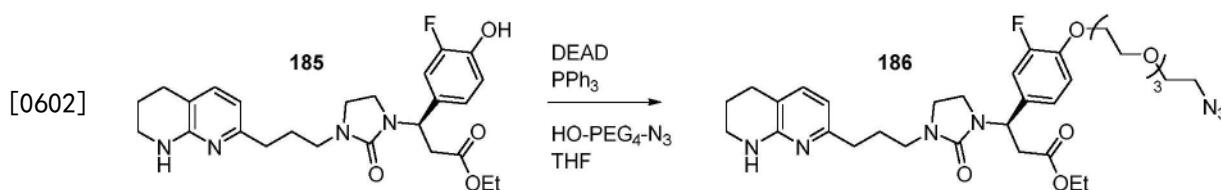


[0598] 向3-L圆底烧瓶中放置(3R)-3-[4-(苄氧基)-3-氟苯基]-3-[2-氧代-3-[3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基]-2,3-二氢-1H-咪唑-1-基]丙酸乙酯(73.00g, 130.671mmol, 1.00当量)、EtOH(1.50L)、Pd(OH)<sub>2</sub>/C(60.00g, 427.259mmol, 3.27当量)、H<sub>2</sub>(50atm)。得到的溶液在25℃搅拌72h。将固体滤出。残留物用二氯甲烷/甲醇(9/1)施加到二氧化硅凝胶柱上。收集的流分合并和浓缩。这产生41.0415g(66.75%)的(3R)-3-(3-氟-4-羟基苯基)-3-[2-氧代-3-[3-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)丙基]咪唑烷-1-基]丙酸乙酯,为黄色油。

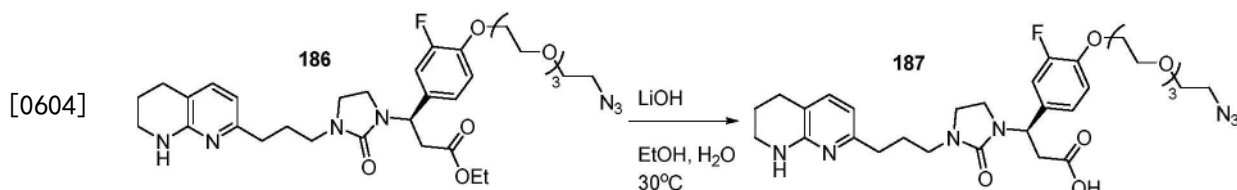
[0599] LCMS-PH-ARP-052-0: [MS+1]<sup>+</sup>=471。

[0600] 旋光性 $[\alpha]_D^{20.0}=+37.5^\circ$ (C=1g/100ml, 在MeOH中)。

[0601] H-NMR: (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm)  $\delta$ 9.84(s, 1H), 7.07-7.00(m, 2H), 6.95-6.850(m, 2H), 6.24(d, 2H), 5.18(t, 1H), 4.06-3.96(m, 2H), 3.32-2.75(m, 10H), 2.60(t, 2H), 2.37(t, 2H), 1.77-1.67(m, 4H), 1.10(t, 3H)。

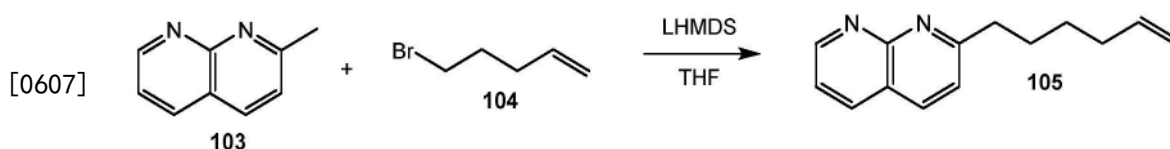


[0603] 在-10℃向PPh<sub>3</sub>/THF的溶液中逐滴加入DEAD的溶液。将混合物升温至室温和加入至化合物185和HO-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>的纯混合物并搅拌过夜。反应混合物然后在减压下浓缩,和残留物经二氧化硅纯化,以MeOH/DCM的梯度洗脱,得到化合物186。



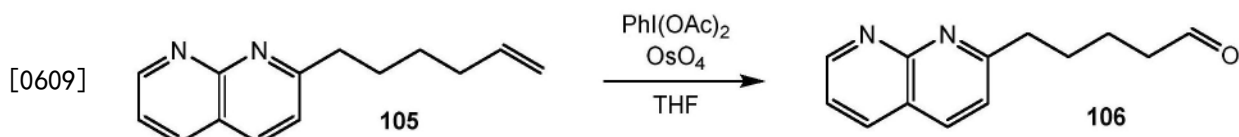
[0605] 向化合物186中加入EtOH和H<sub>2</sub>O,接着加入LiOH。将混合物在30℃搅拌过夜。完成后,使用6M水性HCl将混合物中和至pH=5和浓缩。残留物用Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10 $\mu$ m柱,通过反相HPLC纯化,以含有0.1%的乙腈/水的梯度洗脱,得到化合物187(结构2.11c)。

[0606] 结构28c(化合物118a)、结构29c(化合物118b)、结构31c(化合物119a)和结构30c(化合物119b)的合成

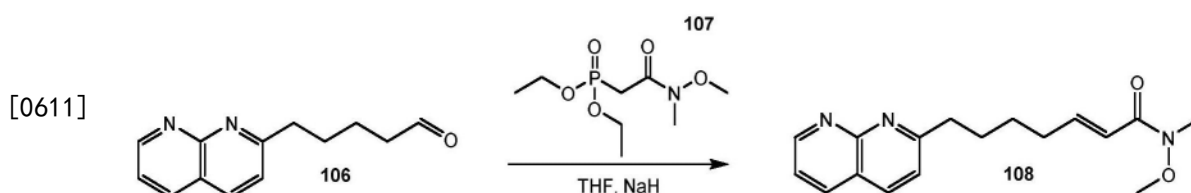


[0608] 在-78℃向LHMDS(1.0M, 在THF中, 95mL, 95mmol)和THF(60mL)的溶液中逐滴加入化合物103(2-甲基-[1,8]萘啶(12.5g, 86.7mmol))在THF(180mL)中的溶液。搅拌30分钟后,将化合物104(5-溴-1-戊烯(19.4g, 130mmol))在THF(120mL)中的溶液逐滴加入至反应混合物。反应混合物升温至0℃和搅拌4小时。反应混合物用饱和水性NH<sub>4</sub>Cl溶液(100mL)和去离子水(100mL)淬灭,然后用乙酸乙酯萃取(2x400mL)。合并的有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤,浓缩和化合物105通过CombiFlash®分离,以50-100%乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱。化合物105的

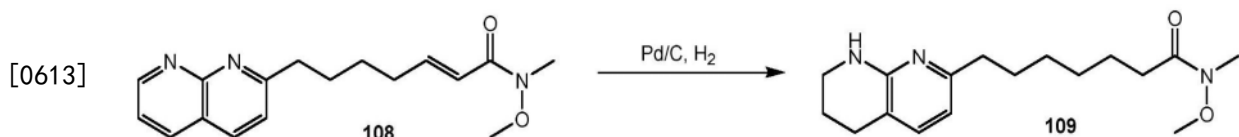
收率:7.93g(43%)。



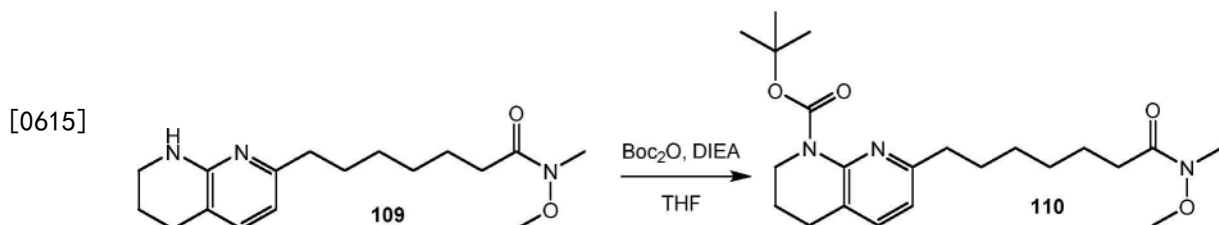
[0610] 在室温下向化合物105 (2.50g, 11.8mmol) 在丙酮 (67.5mL)、水 (7.5mL) 和2,6-二甲基吡啶 (2.74mL, 23.6mmol) 中的溶液中加入4-甲基吗啉N-氧化物 (2.07g, 17.7mmol) 和四氧化钨 (2.5wt%, 在t-丁醇中, 2.40g, 0.24mmol)。搅拌75分钟后, 将(二乙酰氧基碘)苯 (5.69g, 17.7mmol) 加入至反应混合物。将反应混合物搅拌2小时, 然后用饱和和水性硫代硫酸钠溶液 (100mL) 淬灭和用乙酸乙酯萃取 (2x100mL)。合并的有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤, 浓缩和化合物106通过 CombiFlash® 分离, 以0-5% 甲醇/乙酸乙酯的梯度洗脱。化合物106的收率:1.12g(44%)。



[0612] 在0℃向氢化钠 (60%分散体, 在矿物油中, 0.185g, 4.64mmol) 在THF (9mL) 中的悬浮液中加入化合物107 ((N-甲氧基-N-甲基氨基甲酰基甲基) 膦酸二乙酯) (1.06g, 4.43mmol) 在THF (5mL) 中的溶液。搅拌30分钟后, 将化合物106 (0.903g, 4.21mmol) 在THF (9mL) 中的溶液逐滴加入。在0℃将反应混合物搅拌10分钟, 然后用饱和水性NH<sub>4</sub>Cl溶液 (30mL) 淬灭和用乙酸乙酯萃取 (3x30mL)。合并的有机相用半饱和水性NaHCO<sub>3</sub>溶液洗涤两次。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤和浓缩。化合物108的收率:1.40g (假定100%收率和无需进一步纯化而用于后续步骤)。



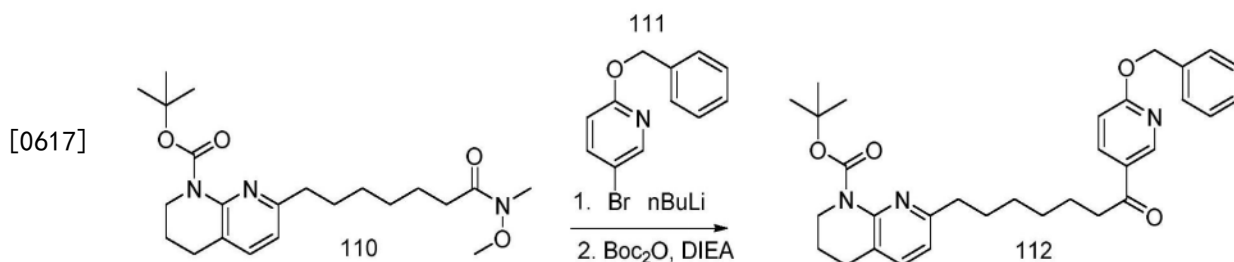
[0614] 向化合物108 (1.31g, 4.38mmol) 在乙酸乙酯 (20mL) 中的溶液中加入Pd/C (10%负载, 0.466g, 0.44mmol)。反应容器用H<sub>2</sub>加压至50PSI。搅拌3.5小时后, 反应混合物经 Celite® 过滤和用甲醇冲洗。滤出液浓缩和化合物109通过 CombiFlash® 分离, 以含有1% 三乙胺的50-100%乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱。化合物109的收率:0.833g (62%)。



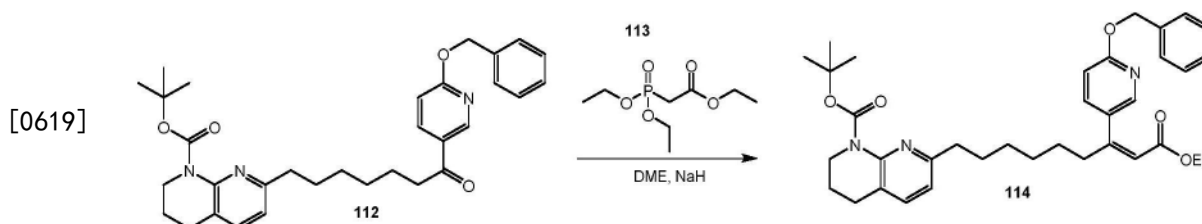
[0616] 向化合物109 (0.833g, 2.73mmol) 在THF (10mL) 中的溶液中加入DIEA (0.590mL, 3.41mmol) 和二碳酸二叔丁酯 (0.744g, 3.41mmol)。反应混合物加热至50℃, 持续5小时。根据LC/MS, 反应不完全, 和加入另外部分的DIEA (0.590mL, 3.41mmol) 和二碳酸二叔丁酯 (0.744g, 3.41mmol)。反应混合物在50℃加热另外16小时。反应混合物浓缩和化合物110通



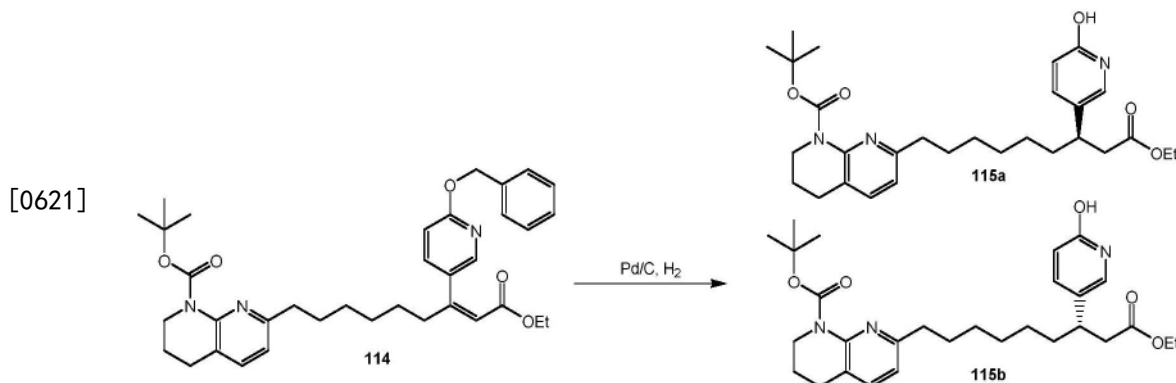
过 CombiFlash® 分离, 以 50-100% 乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱。化合物 110 的收率: 0.934g (84%)。



[0618] 在  $-78^{\circ}\text{C}$  经 3 分钟向正丁基锂的溶液 (2.5M, 在己烷中, 0.70mL, 1.8mmol) 和 THF (1.5mL) 中逐滴加入作为 THF (0.8mL) 中的溶液的化合物 111 (5-溴-2-(苯基甲氧基)-吡啶) (0.465g, 1.8mmol)。化合物 110 (0.535g, 1.3mmol) 然后作为 THF (1mL) 中的溶液加入。搅拌 30 分钟后, 反应物升温至  $0^{\circ}\text{C}$ , 用饱和水性  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液 (10mL) 淬灭, 和进一步用 6M 水性 HCl 酸化至 pH7。混合物用乙酸乙酯萃取 (3x10mL)。合并的有机相经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤和浓缩。向粗品在 THF (8mL) 中的溶液中加入 DIEA (0.94mL, 5.4mmol) 和二碳酸二叔丁酯 (1.18g, 5.4mmol)。将混合物在  $40^{\circ}\text{C}$  搅拌过夜。反应混合物浓缩和化合物 112 通过 CombiFlash® 分离, 以 0-40% 乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱。化合物 112 的收率: 471mg (50%)。



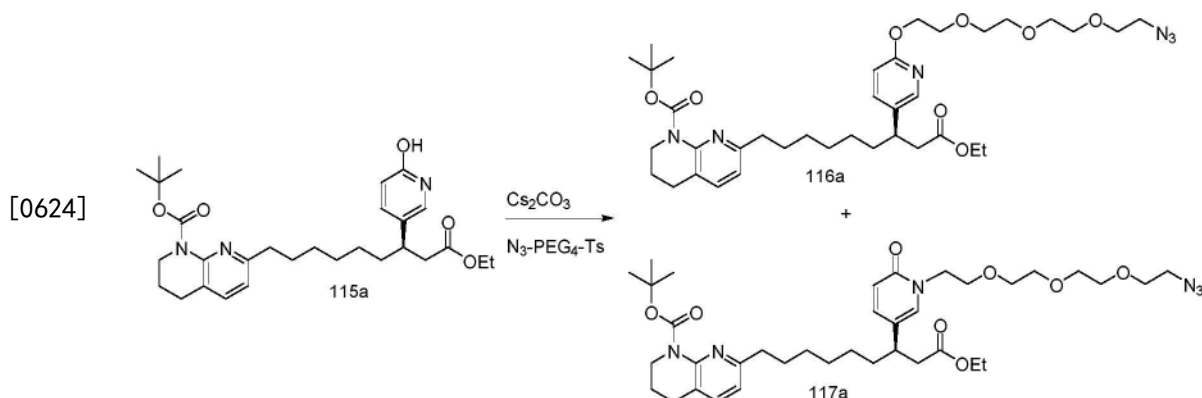
[0620] 在  $0^{\circ}\text{C}$  向氢化钠 (60% 分散体, 在矿物油中, 0.106g, 2.65mmol) 在二甲氧基乙烷 (2mL) 中的悬浮液中加入作为二甲氧基乙烷 (1mL) 中的溶液的化合物 113 (磷酸三乙酯) (0.593g, 2.65mmol)。搅拌 20 分钟后, 将反应混合物升温至室温和加入化合物 112 (0.467g, 0.88mmol) 在二甲氧基乙烷 (2mL) 中的溶液。反应混合物在  $70^{\circ}\text{C}$  加热 4 小时。将反应物用饱和水性  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液 (10mL) 淬灭和产物用乙酸乙酯萃取 (3x15mL)。有机相经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤, 浓缩和化合物 114 作为顺式: 反式异构体的 1:1 混合物通过 CombiFlash® 分离, 以 0-30% 乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱。化合物 114 的收率: 392mg (74%)。



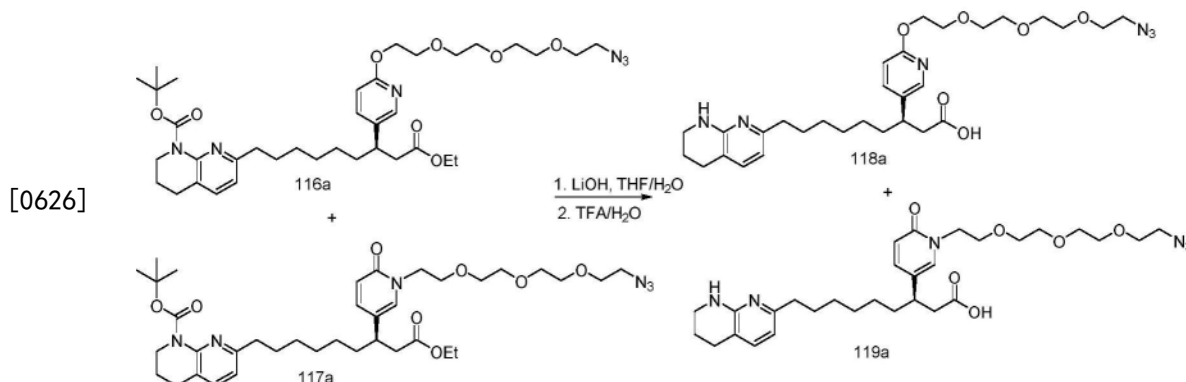
[0622] 向化合物 114 (390mg, 0.65mmol) 在乙醇 (6mL) 中的溶液中加入 Pd/C (10% 负载, 69mg, 0.07mmol)。反应容器用  $\text{H}_2$  加压至 50PSI。搅拌 4 小时后, 反应混合物经 Celite® 过滤和用

甲醇冲洗。滤出液浓缩和化合物115作为外消旋混合物通过 CombiFlash® 分离,以0-10% 甲醇/DCM的梯度洗脱。化合物115的收率:95mg (29%)。手性半制备型HPLC (250x21mm Chiralpak® AD柱, 5 $\mu$ m, 90/10己烷/EtOH, 40mL/min) 用于分离42mg的第一洗脱R-异构体 ( $R_T$  = 12-14m, >99% ee, 化合物115a) 和40mg的第二洗脱S-异构体 ( $R_T$  = 15-18m, >98% ee, 化合物115b)。R-和S-异构体的身份基于由Coleman等47J. Med. Chem. 4834 (2004) 报道的结构类似化合物的洗脱顺序指定。

[0623] 结构28c ((R)-3-(6-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)吡啶-3-基)-9-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)壬酸) 和31c ((R)-3-(1-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-基)-9-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)壬酸)



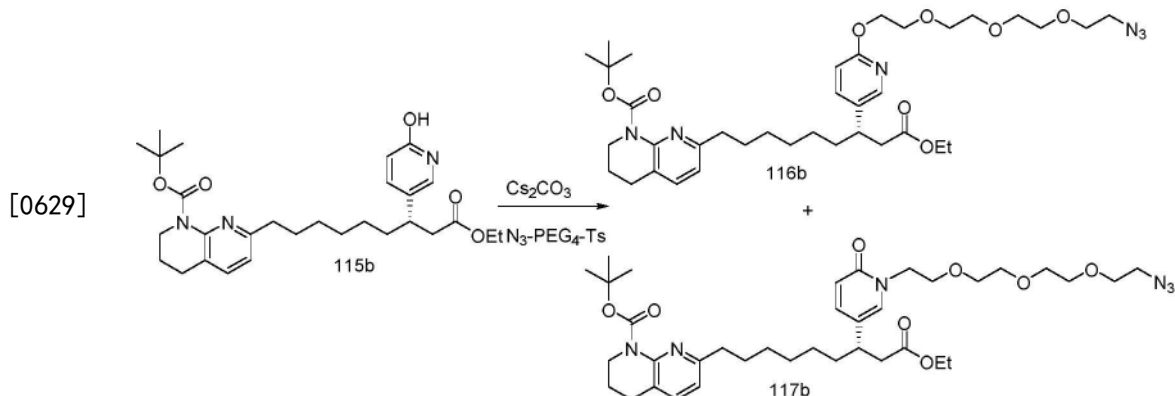
[0625] 向化合物115a (41mg, 0.08mmol) 和N<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-OTs (61mg, 0.16mmol) 在DMF (0.5mL) 中的溶液中加入碳酸铯 (53mg, 0.16mmol)。将反应混合物在40℃搅拌1小时。反应混合物用水性NaHCO<sub>3</sub>溶液 (1mL) 淬灭,然后用乙酸乙酯萃取 (3x3mL)。有机相在减压下浓缩。N-和O-烷基化的区域异构体的粗制混合物随后无需进一步纯化而使用。



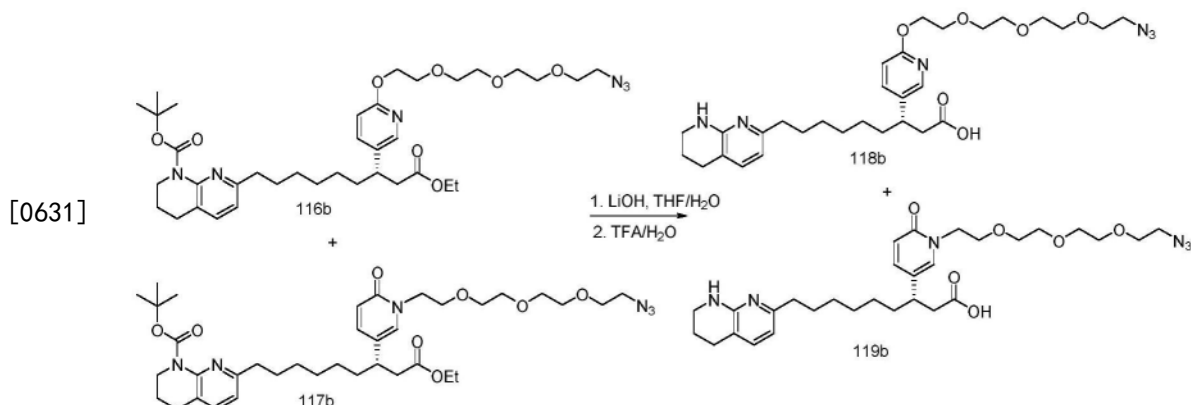
[0627] 向化合物116a和117a (58mg, 0.08mmol, 9a:10a的4:6混合物) 在THF (1.0mL) 和去离子水 (1.0mL) 中的溶液中加入氢氧化锂 (6mg, 0.25mmol)。反应混合物在室温下搅拌1小时,然后在35℃下搅拌2小时。加入另外一部分的氢氧化锂 (4mg, 0.16mmol) 和反应温度增加至40℃。搅拌3小时后,加入最后一部分的氢氧化锂 (4mg, 0.25mmol, 总共16mg, 0.66mmol)。将反应混合物在50℃搅拌3小时。用6N水性HCl将反应混合物酸化至pH 7和在减压下浓缩。区域异构体,化合物118a和119a,以含有0.5% 乙酸的0-5% 甲醇/DCM的梯度洗脱,通过 CombiFlash® 分离。化合物118a进一步通过反相HPLC纯化 (Thermo Scientific™ Aquasil™

C18, 250x21.2mm, 5 $\mu$ m, 20mL/min, 含0.1% TFA的水/ACN, 梯度洗脱), 得到13mg的化合物118a (结构28c)。化合物119a在相同条件下纯化, 得到16mg的化合物119a (结构31c)。

[0628] 结构29c ((S)-3-(6-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)吡啶-3-基)-9-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)壬酸)和30c ((S)-3-(1-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-基)-9-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)壬酸)

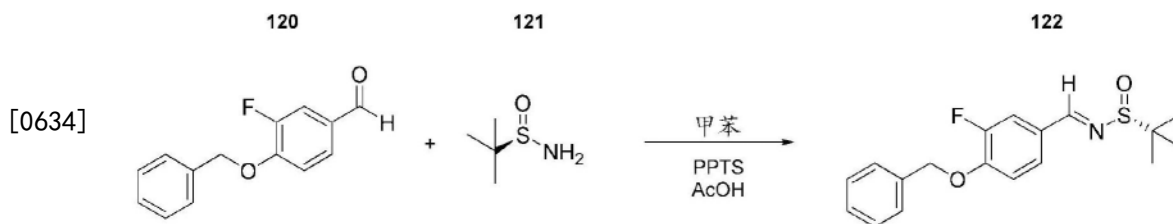


[0630] 向化合物115b (40mg, 0.08mmol) 和N<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-OTs (58mg, 0.16mmol) 在DMF (0.5mL) 中的溶液中加入碳酸铯 (51mg, 0.16mmol)。将反应混合物在40℃搅拌30分钟。反应混合物用水性NaHCO<sub>3</sub>溶液 (1mL) 淬灭, 然后用乙酸乙酯萃取 (3x3mL)。有机相在减压下浓缩。N-和O-烷基化的区域异构体的粗制混合物随后无需进一步纯化而使用。

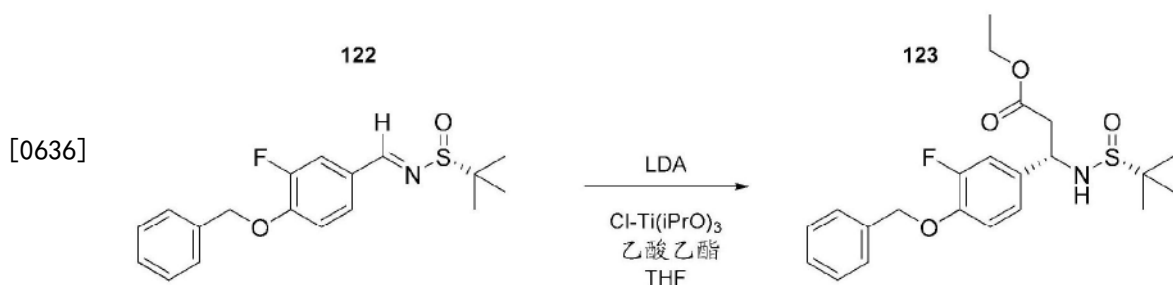


[0632] 向化合物116b和117b (56mg, 0.08mmol, 9a:10a的4:6混合物) 在THF (0.75mL) 和去离子水 (0.75mL) 中的溶液中加入氢氧化锂 (6mg, 0.25mmol)。将反应混合物在45℃搅拌2.5小时。加入另外一部分的氢氧化锂 (6mg, 0.25mmol) 和反应混合物搅拌2.5小时。反应温度降低至35℃和将混合物搅拌过夜。用6N水性HCl将反应混合物酸化至pH=7和在减压下浓缩。区域异构体, 化合物118b和119b, 以含有0.5% 乙酸的0-5% 甲醇/DCM的梯度洗脱, 通过CombiFlash分离。化合物118b进一步通过反相HPLC纯化 (Thermo Scientific™ Aquasil™ C18, 250x 21.2mm, 5 $\mu$ m, 20mL/min, 含0.1% TFA的水/ACN, 梯度洗脱), 得到14mg的化合物118b (结构29c)。化合物119b在相同条件下纯化, 得到18mg的化合物119b (结构30c)。

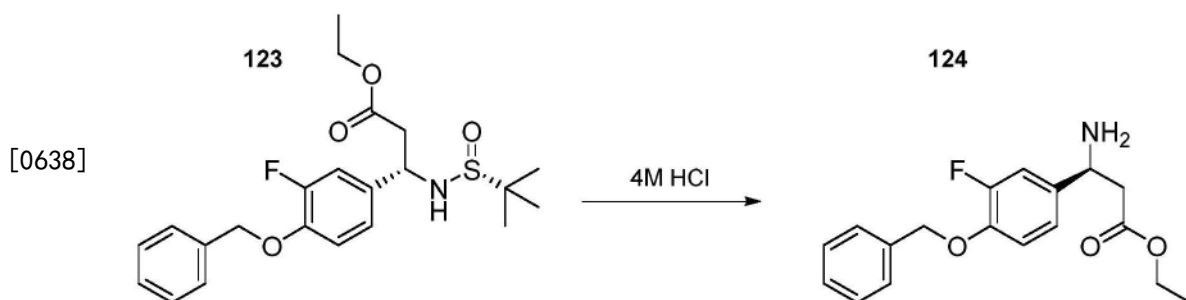
[0633] 结构32c ((R)-3-(4-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)-3-氟苯基)-3-(N-甲基-5-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)戊酰氨基)丙酸)的合成



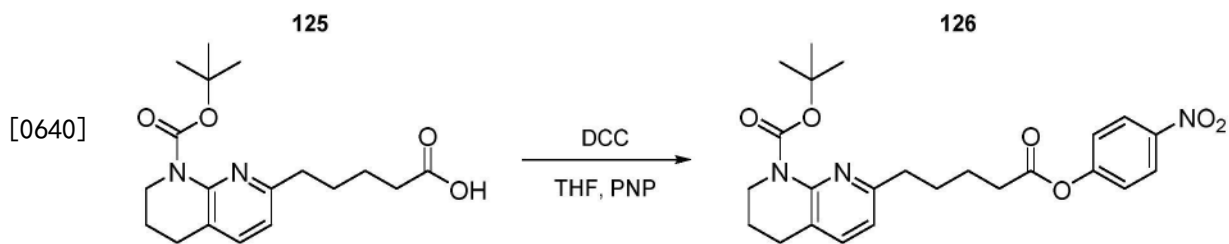
[0635] 向经3Å筛子的化合物120 (2.75g, 11.94mmol) /甲苯 (80mL) 中加入化合物121 (5.79g, 47.78mmol), 接着PPTS (300mg, 1.19mmol), 然后AcOH (683uL, 11.94mmol)。使反应物回流过夜。完成后, 通过加入饱和碳酸氢钠将反应物淬灭。有机层用2体积的乙酸乙酯稀释, 分离和经硫酸钠过滤。产物经二氧化硅分离, 以乙酸乙酯 (0-30%) /己烷的梯度洗脱, 得到2.054g (54%)。



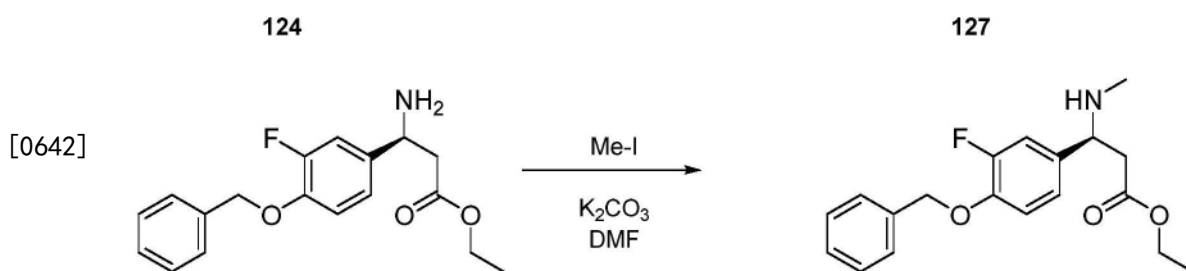
[0637] 在-78℃向DIA (2.85mL, 20.33mmol) /THF (15mL) 中逐滴加入n-BuLi的2.5M溶液 (7.76mL, 19.41mmol)。在-78℃继续搅拌5分钟和逐滴加入乙酸乙酯 (1.81mL, 18.48mmol)。在-78℃继续搅拌另外10分钟和逐滴加入三异丙氧化氯钛 (9.27mL, 38.381mmol) 在THF (10mL) 中的溶液。在-78℃继续搅拌另外15分钟和逐滴加入化合物122 (2.054g, 6.16mmol) 在THF (10mL) 中的溶液。在-78℃继续搅拌1.5小时。完成后, 将反应物通过加入饱和碳酸氢铵淬灭。悬浮液用6体积的乙酸乙酯稀释和有机层分离, 经硫酸钠干燥, 过滤和浓缩。产物经二氧化硅分离, 以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱, 得到1.043g (53%)。



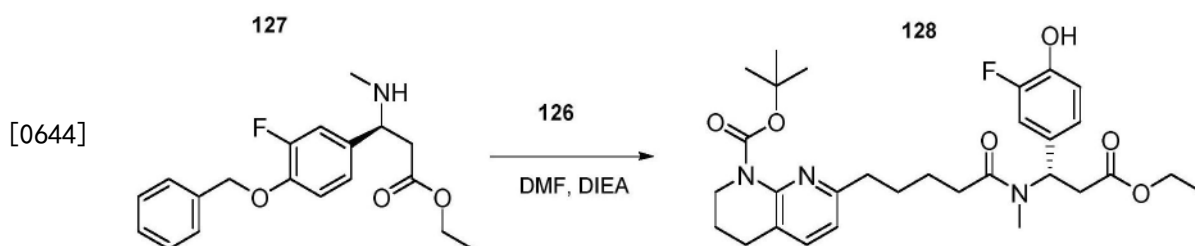
[0639] 向在MeOH (3mL) 中搅拌的化合物123 (1.043g, 2.47mmol) 中加入4M HCl溶液/二噁烷 (3.09mL, 12.37mmol)。脱保护完成后, 溶液用水 (8mL) 稀释和用乙醚 (6mL) 洗涤两次。水层随后用氢氧化钠调节至pH 11。沉淀物用乙酸乙酯萃取, 和合并的有机萃取物经硫酸钠干燥, 过滤和浓缩, 得到0.616g (78.5%) 的产物124, 其无需进一步纯化而使用。



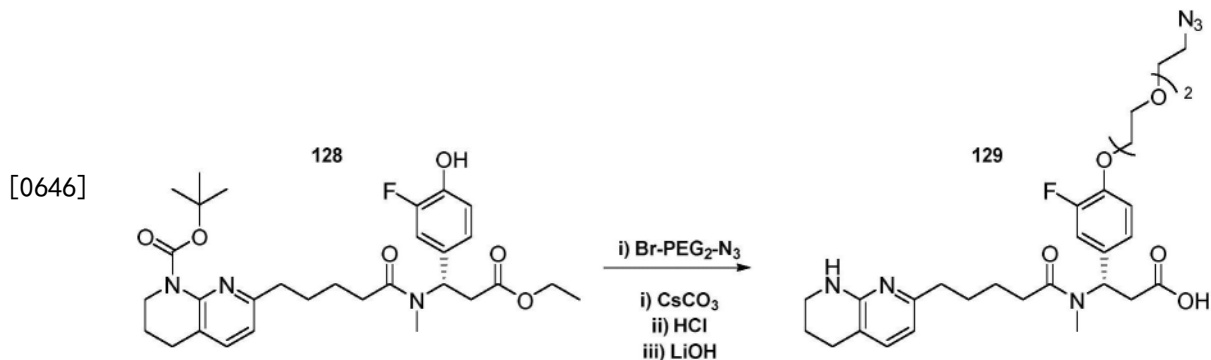
[0641] 向化合物125 (92.1mg, 0.275mmol) / THF (1.5mL) 中在0℃加入DCC (68.1mg, 0.331mmol)。5分钟后加入PNP (106.1mg, 0.331mmol), 除去冰浴和继续搅拌1小时。完成后, 悬浮液冷却至-20℃, 持续1小时和沉淀物通过过滤除去。上清液浓缩, 得到129mg (103%) 的粗产物126, 其随后无需进一步纯化而使用。



[0643] 含有化合物124 (148.6mg, 0.468mmol) 和碳酸钾 (129mg, 0.937mmol) 的混合物/DMF (2mL) 用甲基碘 (66.5mg, 0.468mmol) 处理和在50℃搅拌3小时。烷基化完成后, 除去所有挥发物和产物经二氧化硅分离, 以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱, 各自用1% TEA缓冲, 得到94.6mg (61%)。



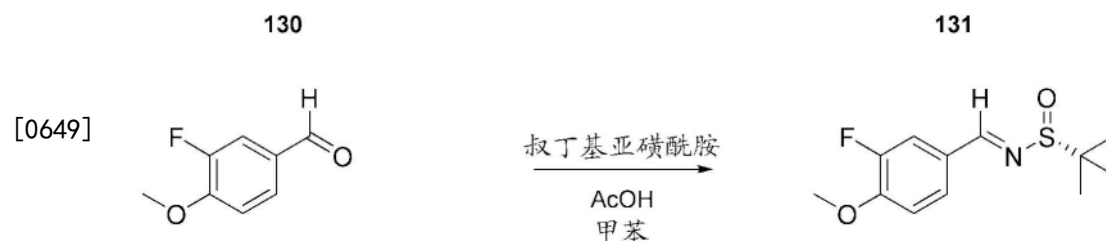
[0645] 向化合物127 (94.5mg, 0.285mmol) / DMF (2mL) 中加入DIEA (149μL, 0.856mmol), 接着化合物126 (129.9mg, 0.285mmol), 和将混合物在80℃搅拌1小时。完成后, 除去所有挥发物和粗品溶于MeOH, 用10%披钨碳 (20mg) 处理, 和向烧瓶加入60PSI的氢气。完成后, 悬浮液过滤。上清液浓缩和获得的粗产物随后无需进一步纯化而使用。



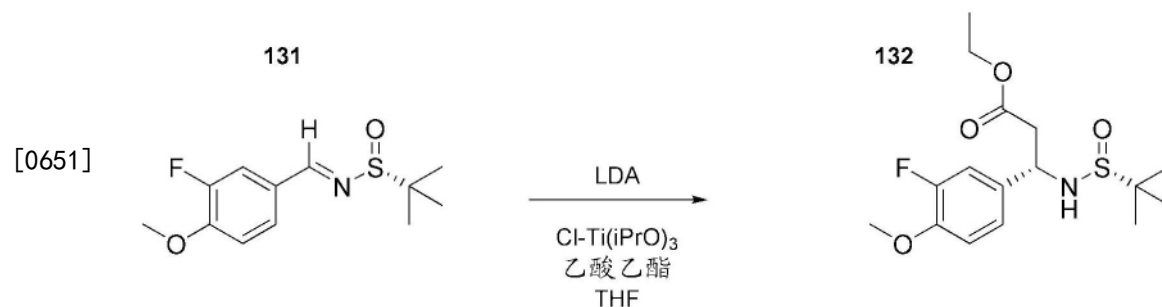
[0647] 将含有化合物128 (159mg, 0.285mmol)、溴-PEG<sub>2</sub>-叠氮化物 (74.7mg, 0.314mmol) 和碳酸铯 (204mg, 0.627mmol) 的混合物/DMF (2mL) 加热至60℃, 持续2小时。完成后, 除去所有

挥发物和粗品用4M HCl/二噁烷(0.5mL, 2mmol)处理和加热至40℃,持续3小时。完成后,除去所有挥发物。将粗品悬浮于THF(1mL)、MeOH(1.5mL)和H<sub>2</sub>O(1.5mL)的混合物中,用氢氧化钾(83.5mg, 3.48mmol)处理和加热至40℃,持续16小时。完成后,用TFA调节pH至3,和产物通过经Phenomenex® Gemini® C18柱(21.2x250mm, 5micron)分离,以含有0.1% TFA的乙腈/水的梯度洗脱,分离得到33.1mg (20%)。

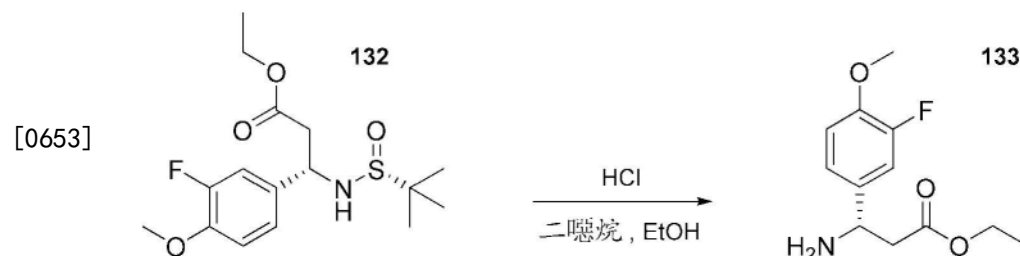
[0648] 结构33c ((R)-1-叠氮基-13-(3-氟-4-甲氧基苯基)-12-(5-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)戊酰基)-3,6,9-三氧杂-12-氮杂十五烷-15-酸)的合成



[0650] 将含有化合物130(1.5g, 9.73mmol)、(R)叔丁基亚磺酰胺(2.36g, 19.46mmol)和AcOH(0.14mL)的混合物/甲苯(45mL)在配备有Dean-Stark分离器的烧瓶中回流16小时。完成后,通过加入饱和碳酸氢钠将反应物淬灭。有机层分离,经硫酸钠干燥,过滤和浓缩。产物通过经二氧化硅分离,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,分离得到1.714g (68.4%)。

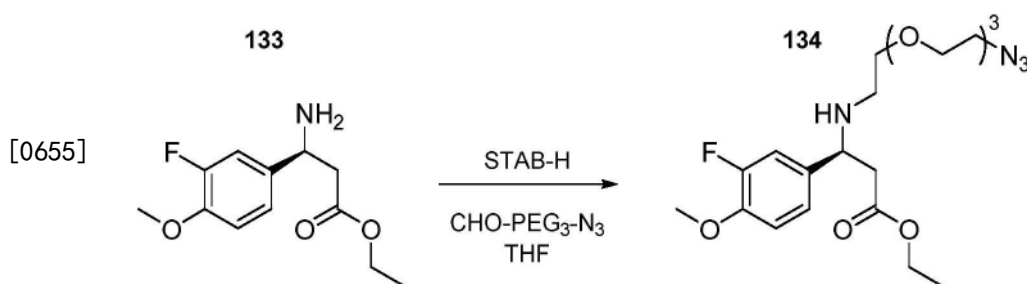


[0652] 向DIA(3.056mL, 21.80mmol)/THF(18mL)中在-78℃逐滴加入n-BuLi的2.5M溶液(8.324mL, 20.81mmol)。在-78℃继续搅拌5分钟和逐滴加入乙酸乙酯(1.94mL, 19.82mmol)。在-78℃继续搅拌另外10分钟和逐滴加入三异丙氧化氯钛(9.94mL, 41.62mmol)在THF(10mL)中的溶液。在-78℃继续搅拌另外15分钟和逐滴加入化合物131(1.70g, 6.61mmol)在THF(12mL)中的溶液。在-78℃继续搅拌1.5小时。完成后,将反应物通过加入饱和碳酸氢铵淬灭。悬浮液用7体积的乙酸乙酯稀释和有机层分离,经硫酸钠干燥,过滤和浓缩。产物经二氧化硅分离,以乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,得到0.984g (43%)。

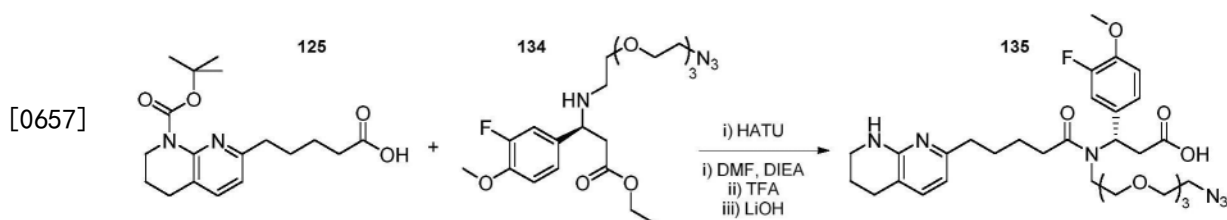


[0654] 向化合物132(0.975g, 2.82mmol)/EtOH(6mL)中在0℃加入4M HCl(2.12mL, 8.47mmol)/二噁烷和搅拌30分钟。完成后,反应物用水(15mL)稀释和用乙醚洗涤。有机层分离和水层的pH用氢氧化钠调节至12。水层用5体积的乙酸乙酯洗涤和有机层分离,经硫酸钠

过滤和浓缩。产物通过经二氧化硅分离,以含有1% TEA的乙酸乙酯/己烷的梯度洗脱,分离得到0.434g (64%)。

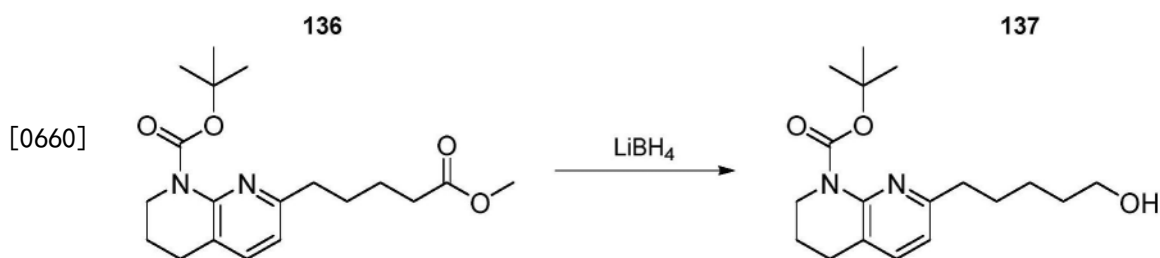


[0656] 向经3Å分子筛的化合物133 (0.120g, 0.497mmol) 和PEG (0.151g, 0.696mmol) 的混合物/THF (2mL) 中加入STAB-H (0.253g, 1.19mmol) 和将悬浮液在室温下搅拌16小时。完成后,将反应物通过加入饱和碳酸氢钠淬灭和粗品用三部分的乙酸乙酯萃取。分离的有机萃取物合并,经硫酸钠干燥,过滤和浓缩。获得的粗品随后无需进一步纯化而使用。

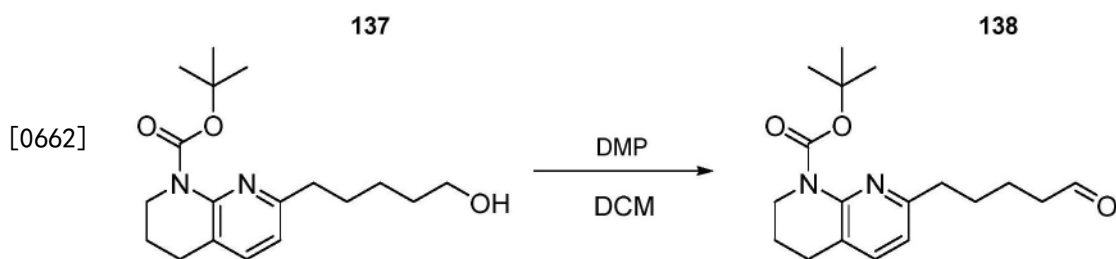


[0658] 化合物134 (0.200g, 0.597mmol) /DMF (2mL) 用HATU (0.227g, 0.597mmol) 处理和搅拌5分钟。向活化酯中加入DIEA (0.259mL, 1.49mmol), 接着化合物125 (0.220g, 0.497mmol) /DMF (1mL) 和得到的混合物搅拌1小时。除去所有挥发物和得到的粗品在40℃用纯TFA (3.8mL) 处理和搅拌3小时。完成BOC去除后,除去所有挥发物和将粗品悬浮于THF (4mL)、水 (8mL) 和MeOH (8mL) 的混合物中。得到的混合物用LiOH (71.6mg, 2.98mmol) 处理和加热至40℃,持续16小时。完成后用TFA调节pH至3,和产物通过经 Phenomenex® Gemini® c 18柱 (21.2x250mm, 5micron) 分离,以含有0.1% TFA的乙腈/水的梯度洗脱,分离得到56.2mg (18%, 3步)。

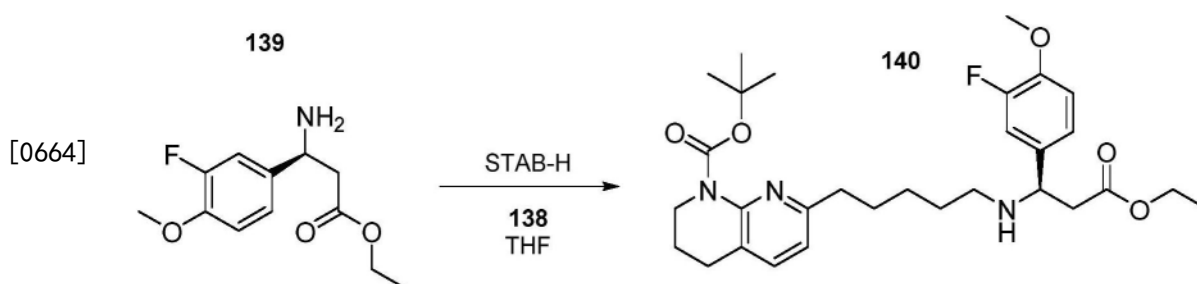
[0659] 结构34c ((S)-1-叠氮基-13-(3-氟-4-甲氧基苯基)-12-(5-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)戊基)-3,6,9-三氧杂-12-氮杂十五烷-15-酸) 的合成



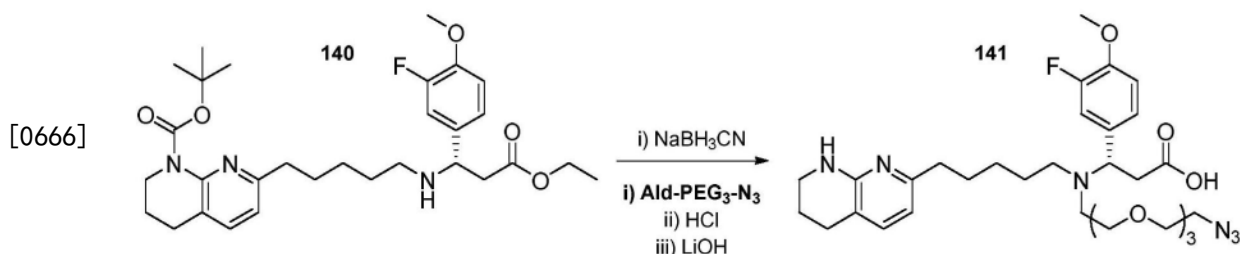
[0661] 化合物136 (0.500g, 1.45mmol) /THF (9.0mL) 和MeOH (0.5mL) 的混合物在0℃用硼氢化锂 (94.5mg, 4.34mmol) 处理。除去冷却和继续搅拌,直到气体逸出停止。反应混合物用5体积的EtOAc稀释。有机层用碳酸氢铵洗涤,经硫酸钠干燥,过滤和浓缩。产物通过经二氧化硅洗脱,使用乙酸乙酯/己烷的梯度,分离得到309mg (67%)。



[0663] 向在DCM (9mL) 中含有化合物137 (0.305g, 0.952mmol) 的溶液在0℃以数个部分加入马丁试剂。加入几滴水, 除去冷却和将反应物搅拌3小时。完成后, 混合物用饱和碳酸氢钠, 然后饱和硫代硫酸钠洗涤。分离的有机物经硫酸钠干燥, 过滤和浓缩。产物138经二氧化硅分离, 以MeOH/DCM的梯度洗脱, 得到140mg (46%)。



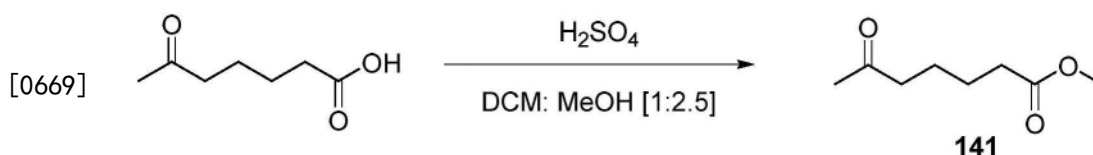
[0665] 向经3Å分子筛在THF (2.5mL) 中含有化合物1 (85.2mg, 0.353mmol) 和138 (134.9mg, 0.424mmol) 的混合物中加入STAB-H (0.150g, 0.706mmol) 和得到的悬浮液加热至40℃, 持续16小时。完成后, 反应物用5体积的乙酸乙酯稀释和用饱和碳酸氢钠处理。有机层分离, 经硫酸钠干燥, 过滤和浓缩。产物通过经二氧化硅分离, 以含有1% TEA的MeOH/DCM的梯度洗脱, 分离得到64mg (33%)。



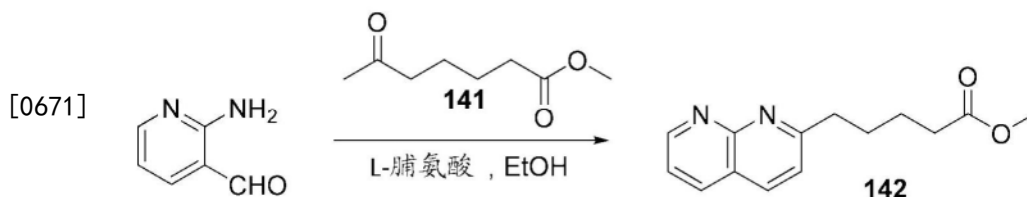
[0667] 向经3Å分子筛在MeOH (1mL) 中含有化合物140 (60mg, 0.110mmol)、Ald-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (71.9mg, 0.331mmol) 和AcOH (3μL, 0.0276mmol) 的混合物中加入氰基硼氢化钠 (28.9mg, 0.276mmol) 和将反应物在40℃搅拌3小时。完成后, 混合物冷却至0℃, 加入水 (0.15mL) 和使用HCl (4M) / 二噁烷将溶液酸化至pH7。随后除去所有甲醇, 加入4MHCl (0.138mL, 0.552mmol) / 二噁烷和将混合物在40℃搅拌2小时。完成BOC除去后, 除去所有挥发物和将粗品悬浮于THF (1mL)、水 (2mL) 和MeOH (2mL) 的混合物中和用氢氧化锂 (26.5mg, 1.104mmol) 处理。完成酯除去后, 通过加入TFA调节pH至3和产物通过在 Phenomenex® (21.2x250mm) C18柱上分离, 以含有0.1% TFA的乙腈/水的梯度洗脱, 分离得到16.4mg (24%, 3步)。

[0668] 结构36c ((S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-3-氟苯基)-9-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)壬酸) 的合成

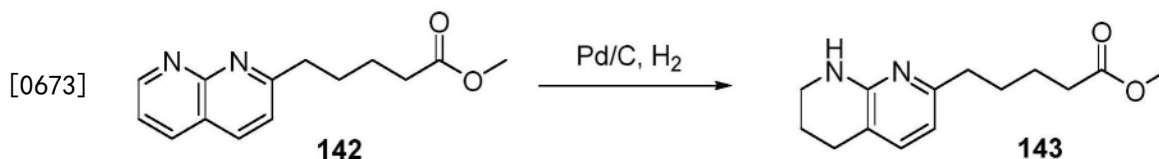




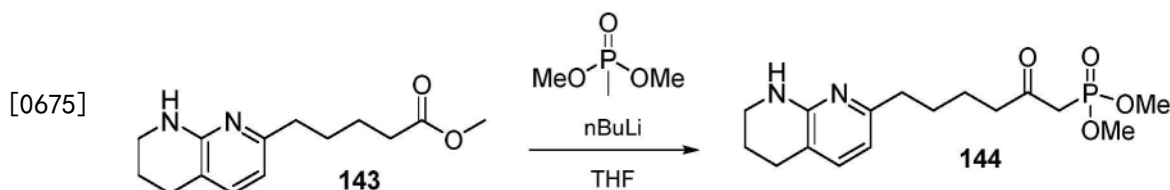
[0670] 在室温下向6-氧代庚酸(9.74g, 68mmol)在DCM(30mL)和MeOH(75mL)中的溶液中加入浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.18mL, 3.4mmol)。反应混合物回流过夜。反应混合物然后浓缩成油,重新溶于DCM(150mL)和用饱和水性NaHCO<sub>3</sub>(2x 40mL)和盐水(40mL)洗涤。有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤和浓缩。产物无需进一步纯化而用于下一步骤。化合物141的收率:10.2g(95%)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): $\delta$ 3.58(s, 3H), 2.43(t, 2H), 2.29(t, 2H), 1.46(m, 4H)。



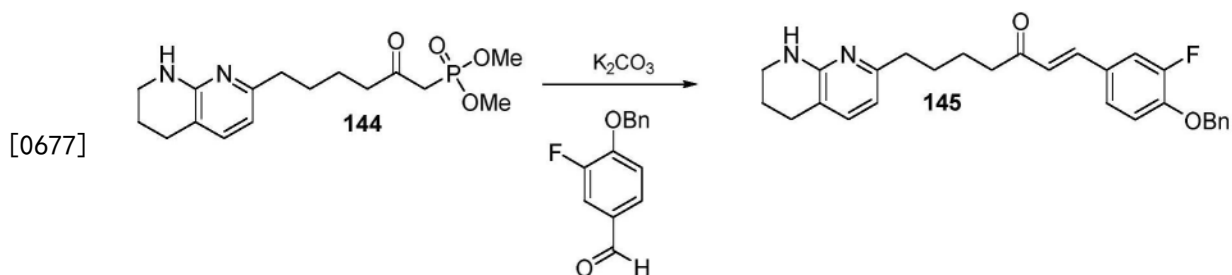
[0672] 向化合物141(10.2g, 65mmol)和2-氨基-3-甲酰基吡啶(7.89g, 65mmol)在EtOH(80mL)中的溶液中加入L-脯氨酸(3.72g, 32mmol)。反应混合物回流加热过夜。反应混合物然后浓缩,溶于EtOAc(50mL)和用水(3x 30mL)洗涤。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化,使用二氧化硅凝胶作为固定相和用EtOAc/DCM(10-100%)的梯度洗脱。化合物142的收率:6.08g(39%)。对于C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>计算的质量:245.13,实测:245.21。



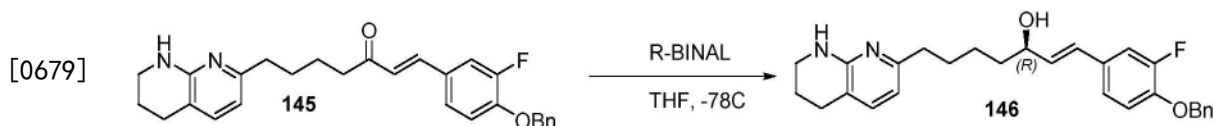
[0674] 向化合物142(6.08g, 24.9mmol)在MeOH(50mL)中的溶液中加入Pd/C(10%负载, Degussa型, 1.99g, 1.87mmol)。向反应烧瓶中加入氮气,抽空和用氮气回填三次。该过程用氢气重复,和最后向反应容器中加入氢气(1atm)和在室温下搅拌过夜。反应混合物经Celite®过滤,用MeOH冲洗垫,和滤出液浓缩。产物化合物143无需进一步纯化而用于下一步骤,假定100%收率。对于C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>计算的质量:249.16,实测:249.08。



[0676] 在-78℃通过注射泵经1h向二甲基甲基膦酸酯(12.3g, 100mmol)在无水THF(120mL)中的溶液中加入n-BuLi溶液(2.5M, 在己烷中, 40mL, 100mmol)。经45分钟在-78℃将化合物143(6.175g, 24.9mmol)在THF(40mL)中的溶液加入至反应混合物。在-78℃搅拌20分钟后,反应混合物用饱和水性NH<sub>4</sub>Cl溶液(200mL)淬灭,升温至室温和用EtOAc(400mL)萃取。有机层用水(200mL)和盐水(200mL)洗涤。有机相分离,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤和浓缩。产物无需进一步纯化而用于下一步骤。化合物144的收率:7.86g(93%)。对于C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P[M+H]<sup>+</sup>计算的质量:341.17,实测:341.17。

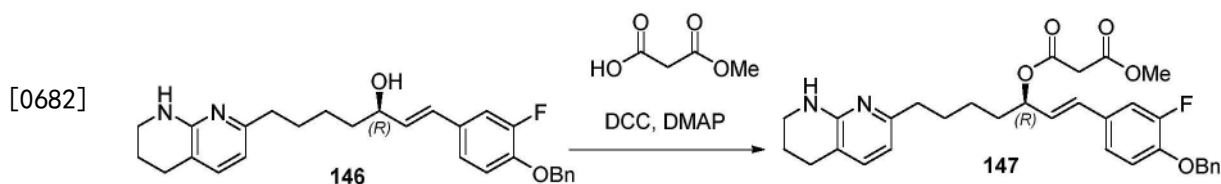


[0678] 3-氟-4-(苯基甲氧基)-苯甲醛 (0.38g, 1.65mmol)、化合物144 (0.67g, 1.98mmol) 和无水碳酸钾 (0.547g, 3.96mmol) 在THF (13.5mL) 中的悬浮液回流加热过夜。加入另外的3-氟-4-(苯基甲氧基)-苯甲醛 (0.19g, 0.83mmol) 和碳酸钾 (0.23g, 1.65mmol), 和反应混合物回流另外4h。混合物用EtOAc (100mL) 稀释和用水 (30mL) 和盐水 (30mL) 洗涤。有机相分离, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相和用MeOH/DCM (0-10%) 的梯度洗脱。化合物145的收率: 446mg (61%)。对于C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 445.23, 实测: 445.41。



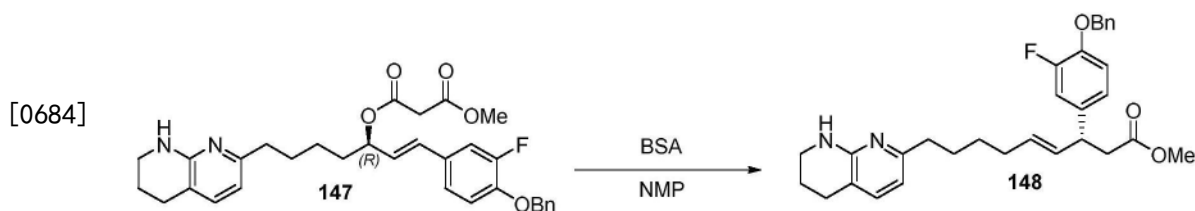
[0680] 制备R-BINAL: 向LAH (0.396g, 10.4mmol, 0.98eq) / 无水THF (34mL) 的浆液中经10分钟加入作为THF (3.2mL) 中的溶液的EtOH (0.492g, 10.65mmol, 1.00eq), 同时保持内部温度 < 35°C。熟化30分钟后, R-BINOL (3.05g, 10.65mmol, 1.00eq) 作为THF (10mL) 中的溶液加入, 保持内部温度 < 35°C (约10分钟)。在室温下搅拌2h后, 反应混合物在干冰/丙酮浴中冷却至 -78°C。

[0681] 将化合物145 (1.18g, 2.65mmol) 与无水甲苯 (50mL) 共沸干燥和溶于无水THF (12mL)。通过注射泵经45分钟在 -78°C 将化合物145的溶液逐滴加入至R-BINAL的溶液。1.5h后, 反应容器转移至非常大的dewar中, 其用干冰/丙酮填充并用铝箔覆盖。将反应混合物在 -78°C 开放搅拌。大部分还原在前1.5h内发生, 仅少量另外转化过夜。将反应物通过加入饱和水性NH<sub>4</sub>Cl (150mL) 淬灭和升温至室温。使用6NHCl将混合物进一步酸化至pH=7, 然后用EtOAc (2x 250mL) 萃取。合并的有机相用水 (125mL) 和盐水 (125mL) 洗涤。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相和用MeOH/DCM (0-5%) 的梯度洗脱。化合物146的收率: 634mg (53%)。手性纯度通过分析型手性HPLC, Chiralpak AD-H柱4.6x 250mm, 5微米, EtOH 0.1% 二乙基胺等度, 1.75mL/min测定。第一洗脱R异构体是86面积% 纯的, 对应于72% ee。化合物6进一步通过手性半制备型HPLC (ChiralpakAD-H 21.2x 250mm, 5微米, EtOH 0.1% 二乙基胺, 20mL/min) 纯化。化合物146的最终收率: 445mg (98% ee)。对于C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 447.25, 实测: 447.30。



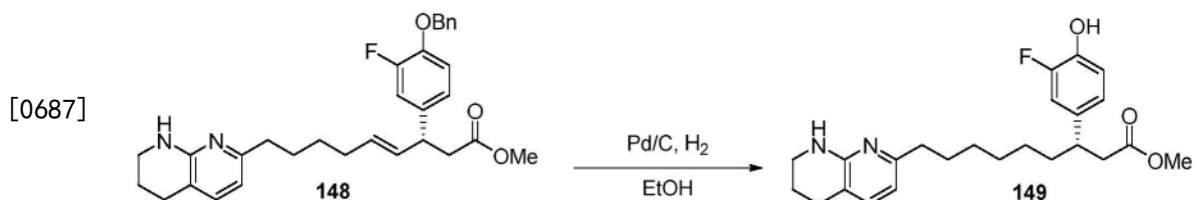
[0683] 向化合物146 (0.325g, 0.73mmol) 和丙二酸单甲酯 (0.103g, 0.87mmol) 在DCM (3mL) 中的溶液中加入DMAP (9mg, 0.073mmol) 在DCM中的溶液。混合物冷却至0°C 和加入DCC

(0.180g, 0.87mmol)。除去冷却浴, 并将反应物在室温下开放搅拌。反应混合物然后用DCM (10mL) 稀释和过滤。滤出液浓缩和通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 用MeOH(0-5%)/DCM的梯度洗脱。化合物147的收率: 142mg (37%)。对于 $C_{32}H_{35}FN_2O_5$  [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 547.26, 实测: 547.58。

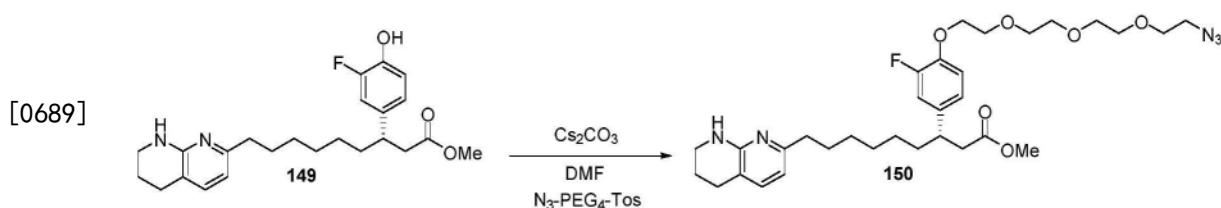


[0685] 在室温下向化合物147 (0.232g, 0.42mmol) 在NMP (0.5mL) 中的溶液中加入N,0-双(三甲基甲硅烷基)乙酰胺 (0.229g, 1.12mmol)。将混合物在60°C加热30分钟。以两个部分经5分钟加入盐水 (58 $\mu$ L)。反应混合物然后在90°C加热3h, 然后室温过夜。反应混合物用EtOAc (12mL) 稀释和用水 (3mL) 洗涤。水层用EtOAc (12mL) 反萃取。合并的有机层浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相和用MeOH/DCM的梯度洗脱。化合物148的收率: 140mg (66%)。对于 $C_{31}H_{35}FN_2O_3$

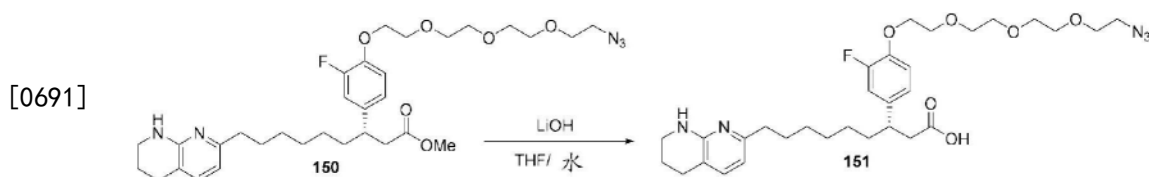
[0686] [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 503.27, 实测: 503.29。



[0688] 向化合物148 (0.169g, 0.34mmol) 在EtOH (3mL) 中的溶液中加入Pd/C (10%负载, 36mg, 0.034mmol) 在EtOH (1mL) 中的浆液。反应容器加压和用氢气通气三次。反应容器再加压至55psi, 持续3h。反应混合物用MeOH (5mL) 稀释和过滤。滤出液浓缩和产物化合物149无需进一步纯化而用于下一步骤, 假定100%收率。对于 $C_{24}H_{31}FN_2O_3$  [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 415.24, 实测: 415.07。

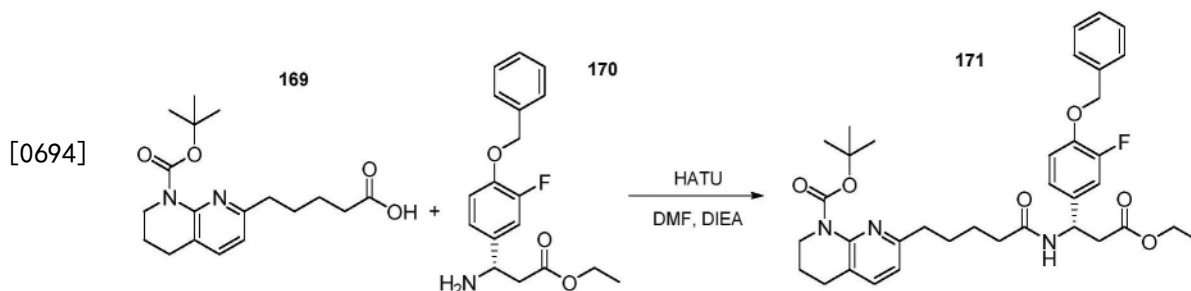


[0690] 向化合物149 (139mg, 0.34mmol) 和叠氨基-PEG<sub>4</sub>-甲苯磺酸酯 (0.188mg, 0.50mmol) 在DMF (2.5mL) 中的溶液中加入碳酸铯 (164mg, 0.50mmol)。反应混合物在40°C加热1h, 然后用饱和水性NaHCO<sub>3</sub> (3mL) 淬灭。混合物用EtOAc萃取 (3x 10mL)。合并的有机相用水 (2x 5mL) 洗涤。有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤, 浓缩和无需进一步纯化而用于下一步骤。对于 $C_{32}H_{46}FN_5O_6$  [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 616.35, 实测: 616.90。

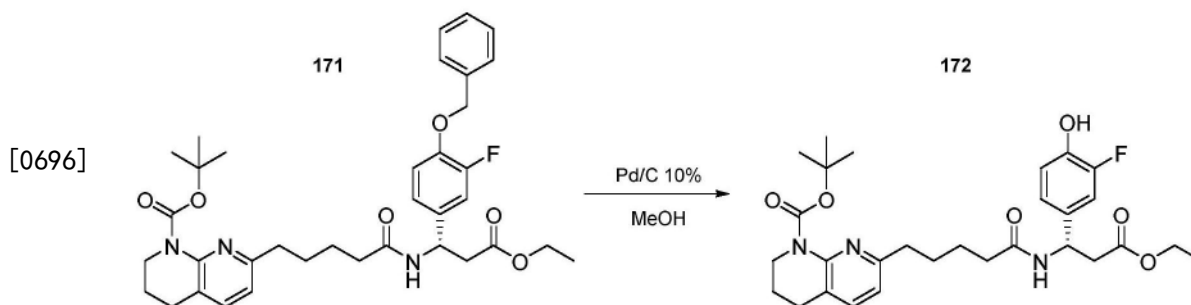


[0692] 向化合物150 (0.207mg, 0.34mmol) 在THF (1.5mL) 和水 (1.5mL) 中的溶液中加入氢氧化钾 (0.040g, 1.68mmol)。反应混合物加热至40°C过夜。第二天早上, 反应混合物用6N HCl 酸化至pH=7和在减压下浓缩。残留物溶于35% ACN/H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA和通过RP-HPLC纯化 (Thermo Aquasil C18, 250x 21mm, 5μm, 20mL/min, 含有0.1% TFA的ACN/H<sub>2</sub>O梯度)。化合物151 (SM36) 的收率: 125mg (52%, 经3步)。对于C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 计算的质量: 602.34, 实测: 602.85。

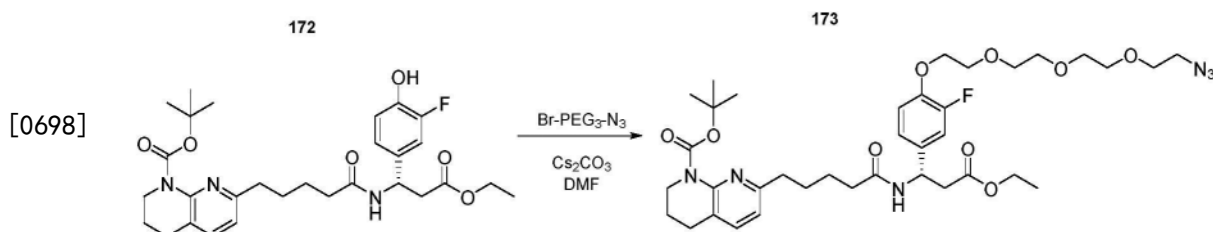
[0693] 结构37c ((S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-3-氟苯基)-3-(5-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)戊酰氨基)丙酸)的合成



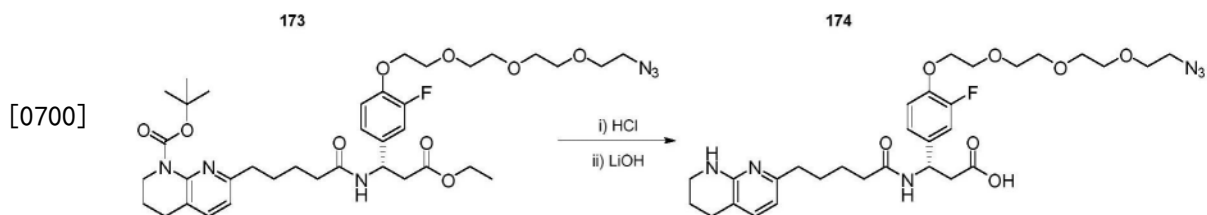
[0695] 化合物169 (90mg, 0.268mmol) /DMF (1.5mL) 用HATU (112mg, 0.295mmol) 处理和搅拌5分钟。随后加入含有在DMF (0.5) 中的化合物170 (94mg, 0.295mmol) 和DIEA (0.154mL, 0.884mmol) 的混合物和继续搅拌1小时。完成后, 除去所有挥发物和化合物171通过经二氧化硅分离, 以MeOH/DCM的梯度洗脱, 分离得到123mg (72%)。



[0697] 向含有在MeOH (2mL) 中的10% 披钨碳 (21mg, 0.0194mmol) 和化合物171 (123mg, 0.194mmol) 的悬浮液中加入60PSI氢气和搅拌1小时。完成后, 悬浮液经Celite® 过滤和浓缩得到88mg (83%) 的粗品, 其随后无需进一步纯化而使用。

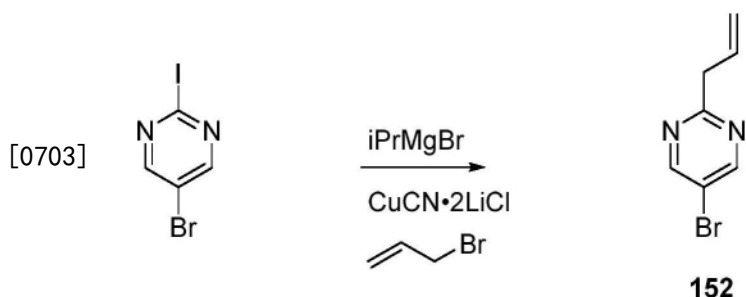


[0699] 含有在DMF (1mL) 中的化合物172 (87mg, 0.160mmol)、Br-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (50mg, 0.176mmol) 和碳酸铯 (115mg, 0.352mmol) 的悬浮液加热至60°C和搅拌2小时。完成后, 除去所有挥发物和化合物173通过经二氧化硅分离, 以MeOH/DCM的梯度洗脱, 分离得到91mg (76%)。

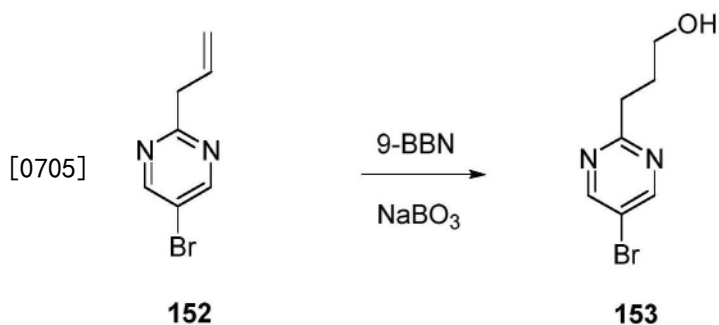


[0701] 化合物173 (50mg, 0.067mmol) / 二噁烷 (0.5mL) 用4M HCl (0.671mmol, 0.168mL) / 二噁烷溶液处理和在40℃搅拌3小时。完成后, 除去所有挥发物。粗品溶于H<sub>2</sub>O (0.4mL)、THF (0.2mL) 和MeOH (0.4mL) 的混合物, 用LiOH (8mg, 0.356mmol) 处理和在40℃搅拌16小时。完成后, 用TFA调节pH至3和产物通过经Phenomenx Gemini C18柱 (21.2x250mm, 5微米) 分离, 以含有0.1% TFA的乙腈/水的梯度洗脱, 分离得到25mg (60%, 2步)。

[0702] 结构38c ((S)-3-(2-(3-((2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)-3-氧代丙基)嘧啶-5-基)-9-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)壬酸) 和结构39c ((S)-3-(2-(1-叠氨基-12-氧代-3,6,9-三氧杂-13-氮杂十六烷-16-基)嘧啶-5-基)-9-(5,6,7,8-四氢-1,8-萘啶-2-基)壬酸) 的合成

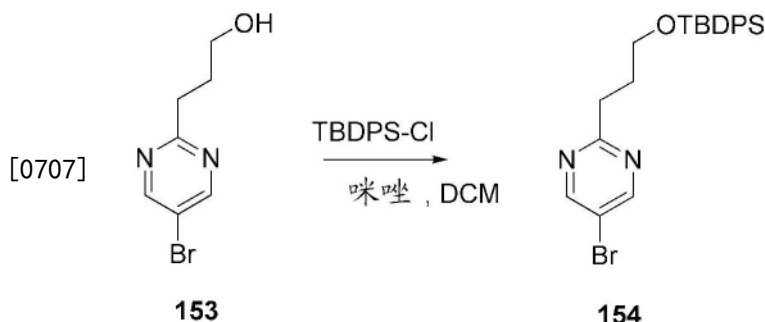


[0704] 在-78℃向5-溴-2-碘-嘧啶 (8.00g, 28.1mmol) 在无水THF (95mL) 中的溶液中加入 i-PrMgBr/THF溶液 (0.75M, 56mL, 42.0mmol), 同时保持内部温度<-70℃ (约15分钟)。得到的溶液然后搅拌15分钟, 然后加入CuCN·2LiCl/THF溶液 (1M, 31mL, 31.0mmol), 然后加入作为THF (10mL) 中的溶液的烯丙基溴 (5.10g, 42mmol)。将反应混合物升温至室温和搅拌1h。反应混合物用MeOH (40mL) 淬灭和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 和用EtOAc/己烷 (0-20%) 梯度洗脱。化合物152的收率: 4.13g (74%)。对于C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 198.99, 实测: 199.05。

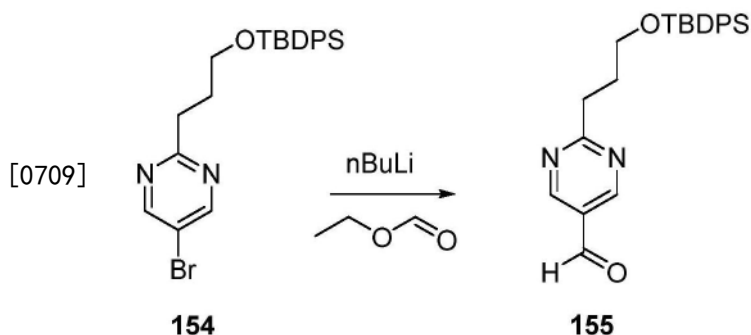


[0706] 在0℃经30分钟向化合物152 (7.70g, 38.7mmol) 在THF (115mL) 中的溶液中加入9-BBN/THF溶液 (0.5M, 131mL, 65.8mmol)。将反应混合物升温至室温和搅拌过夜。在0℃向反应混合物中加入NaHCO<sub>3</sub> (48.7g, 580mmol) / 水 (100mL) 的浆液, 接着NaBO<sub>3</sub>一水合物 (46.3g, 464mmol) / 水 (100mL) 的浆液。除去冷却浴, 和将混合物剧烈搅拌1h。反应混合物转移至分液

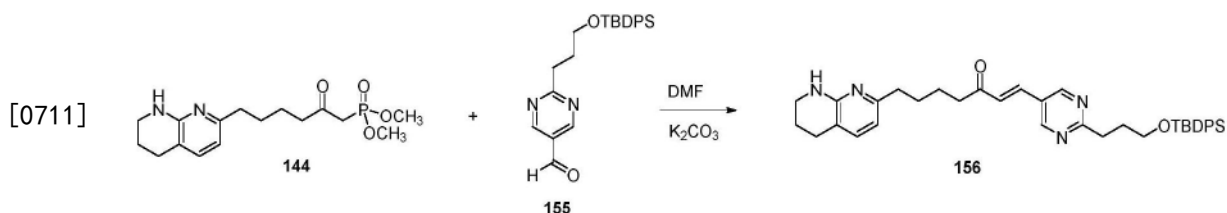
漏斗和分离各层。水层用EtOAc (200mL) 萃取。合并有机相和用盐水 (100mL) 洗涤。盐水层用EtOAc (100mL) 反萃取。合并的有机相经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤和浓缩得到约15g粗品, 黄色油。粗品通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 和用EtOAc/己烷 (50-100%) 梯度洗脱。化合物153的收率: 3.44g (41%)。对于 $\text{C}_7\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  计算的质量: 217.00, 实测: 216.97。



[0708] 在 $0^\circ\text{C}$ 向化合物153 (3.44g, 15.8mmol) 在DCM (40mL) 中的溶液中加入咪唑 (1.73g, 25.4mmol) 和TBDPSCl (5.23g, 19.0mmol) /DCM (12mL) 溶液。反应物升温至室温和搅拌过夜。反应混合物用DCM (75mL) 稀释和用水 (50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤。有机层经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 和用EtOAc (0-8%) /己烷的梯度洗脱。化合物154的收率: 5.56g (77%)。对于 $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{OSi}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  计算的质量: 455.12, 实测: 455.44。



[0710] 在 $-75^\circ\text{C}$ 向化合物154 (6.07g, 13.3mmol) 在THF (150mL) 中的溶液中逐滴加入nBuLi/THF溶液 (2.5M, 5.6mL, 14.0mmol), 保持内部温度 $<-70^\circ\text{C}$  (约10分钟)。3分钟后, 逐滴加入甲酸乙酯 (1.04g, 1.13mL, 14.0mmol) 在THF (5mL) 中的溶液, 保持内部温度 $<-70^\circ\text{C}$ 。将混合物在 $-78^\circ\text{C}$ 搅拌20分钟, 然后用HCl/二噁烷 (4M, 3.67mL, 14.7mmol) 淬灭, 其进一步用THF (5mL) 稀释, 保持内部温度 $<-65^\circ\text{C}$ 。除去冷却浴, 和反应物升温至环境温度和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 和用EtOAc/己烷 (0-20%) 梯度洗脱。化合物155的收率: 1.79g (33%)。 $^1\text{H}$ NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 10.09 (s, 1H), 9.06 (s, 2H), 7.64 (m, 4H), 7.38 (m, 6H), 3.77 (t, 2H), 3.20 (t, 2H), 2.17 (q, 2H), 1.03 (s, 9H)。



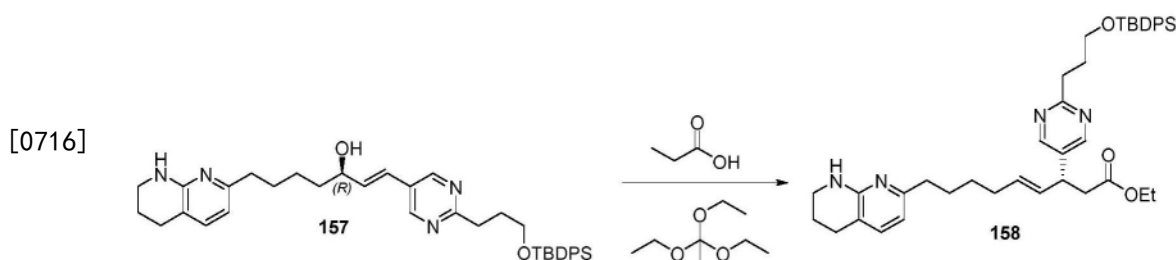
[0712] 向化合物144 (1.68g, 4.15mmol) 和化合物155 (1.70g, 4.98mmol) 在THF (25mL) 中的

溶液中加入 $K_2CO_3$  (0.861g, 6.23mmol)。反应混合物加热至 $40^\circ C$ , 持续2.5h, 然后加热至 $50^\circ C$ , 持续12h。反应混合物用EtOAc (100mL) 稀释和用水 (50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤。有机相经 $Na_2SO_4$ 干燥, 过滤和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 和用含有1%三乙胺的EtOAc (0-100%) / 己烷的梯度洗脱。化合物156的收率: 2.04g (79%)。对于 $C_{38}H_{46}N_4O_2Si [M+H]^+$ 计算的质量: 619.35, 实测: 619.69。

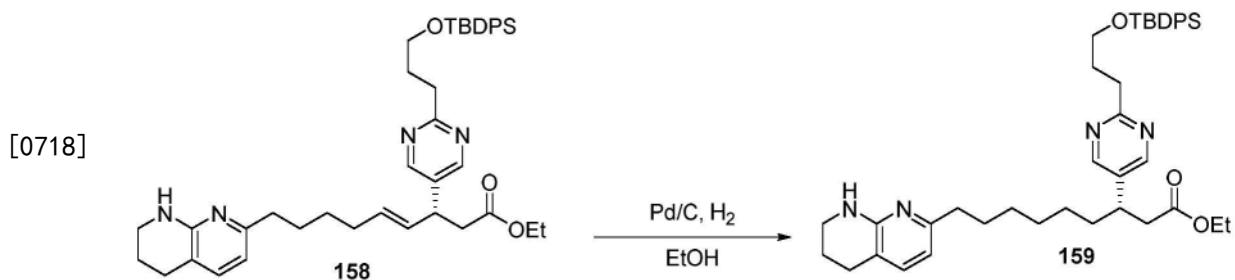


[0714] 制备R-BINAL: 将LAH (1.169g, 30.8mmol) 在无水THF (90mL) 中浆化。向浆液中加入作为THF中的溶液的EtOH (6M, 5.2mL, 31.4mmol), 保持 $T_{int} < 40^\circ C$ 。混合物在 $35^\circ C$ 熟化40分钟, 然后冷却至 $30^\circ C$ 。加入R-(BINOL) (9.00g, 31.4mmol) 在THF (45mL) 中的溶液, 保持 $T_{int} < 40^\circ C$ 。混合物在 $50^\circ C$ 熟化1h, 冷却至环境温度, 然后加热至 $50^\circ C$ 和加入TMEDA (14.1mL, 11.0g, 94.3mmol)。混合物在 $50^\circ C$ 熟化1h, 冷却至环境温度, 然后与化合物156一起使用。

[0715] 在 $-78^\circ C$ 经5分钟向R-BINAL ( $\sim 0.2M$ , 110mL, 22.0mmol) 在THF中的溶液中加入化合物16 (1.16g, 1.88mmol) 在THF (12mL) 中的溶液。30分钟后, 反应混合物用饱和水性 $NH_4Cl$ 淬灭, 升温至室温, 和产物用EtOAc (3x 125mL) 萃取。有机层经 $Na_2SO_4$ 干燥, 过滤和浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 和用含有1%三乙胺的MeOH (0-5%) / EtOAc的梯度洗脱。化合物157的收率: 0.96g (82%)。手性纯度通过分析型手性HPLC (ChiralpakAD-H柱4.6x 250mm, 5微米, 25%EtOH, 75%己烷, 0.1%二乙基胺等度, 2mL/min) 测定。第二洗脱R异构体是 $\sim 95$ 面积%纯的, 对应于 $\sim 90\%$  ee。对于 $C_{38}H_{48}N_4O_2Si [M+H]^+$ 计算的质量: 621.36, 实测: 621.71。

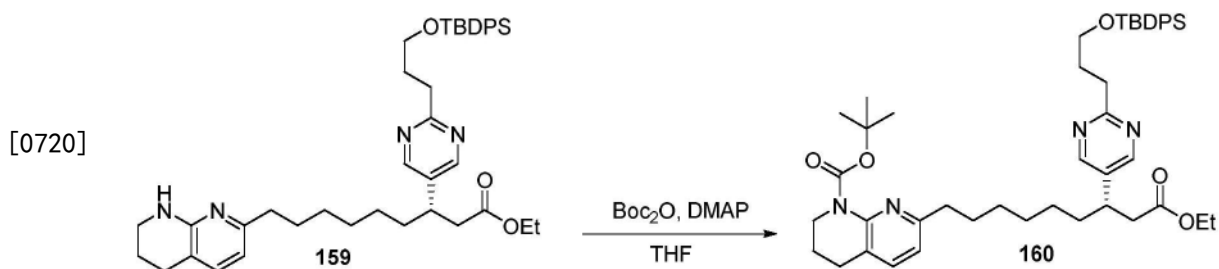


[0717] 向化合物157 (0.925g, 1.49mmol) 在三乙基原乙酸酯 (9.25mL) 中的溶液中加入丙酸在三甲基原乙酸酯中的溶液 (0.15M, 0.55mL, 0.08mmol)。反应混合物在 $140^\circ C$ 在密封小瓶中加热1.5h。反应混合物浓缩, 和残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 用含有1%三乙胺的EtOAc (0-50%) / 己烷的梯度洗脱。化合物158的收率: 0.898g (87%)。对于 $C_{42}H_{54}N_4O_3Si [M+H]^+$ 计算的质量: 691.41, 实测: 691.93。

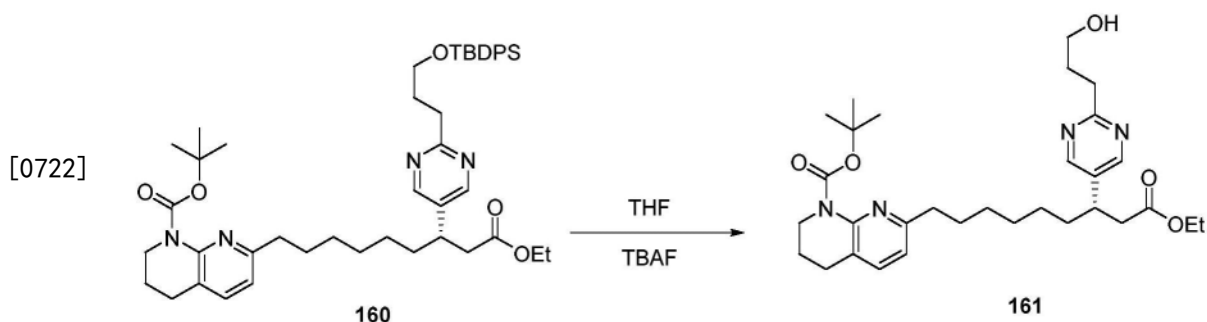


[0719] 向化合物158 (0.893g, 1.30mmol) 在EtOH (10mL) 中的溶液中加入Pd/C (负载度:

10wt%, 0.138g, 0.13mmol) 在EtOH (4mL) 中的浆液。向反应混合物中加入50psi H<sub>2</sub>和搅拌4.5h。反应混合物过滤, 浓缩和无需进一步纯化而用于下一步骤。化合物159的收率: 0.885g (99%)。对于C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 693.42, 实测: 693.82。

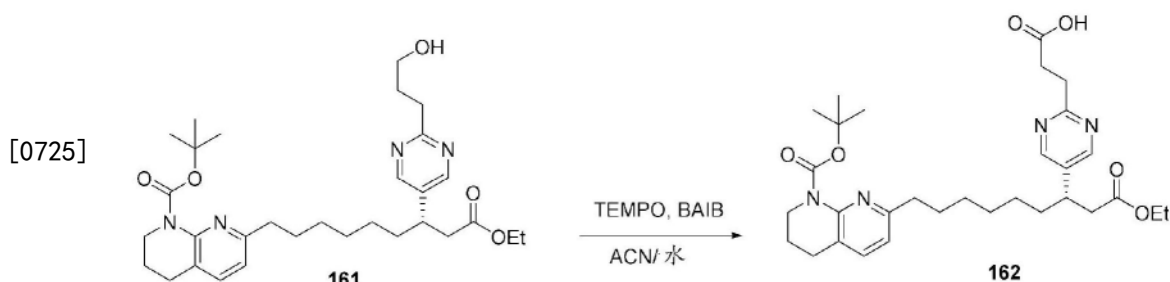


[0721] Boc酐 (0.836g, 3.83mmol) 在THF (2.5mL) 中的溶液加入至化合物159 (0.885g, 1.28mmol), 接着DMAP溶液 (20mg/mL, 在THF中, 155uL, 0.0031g, 0.026mmol)。将混合物加热至60°C, 持续6h。反应混合物浓缩和残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 用EtOAc (0-50%) / 己烷梯度洗脱。化合物160的收率: 0.721g (71%)。对于C<sub>47</sub>H<sub>64</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 793.47, 实测: 794.28。



[0723] 在0°C向化合物160 (0.621g, 0.783mmol) 在THF (6mL) 中的溶液中加入TBAF在THF中的溶液 (1M, 1.2mL, 1.2mmol)。将反应混合物升温至室温和搅拌2h。反应混合物用EtOAc (30mL) 稀释和用饱和水性NH<sub>4</sub>Cl (2x 10mL) 洗涤。有机层浓缩。残留物通过CombiFlash纯化, 使用二氧化硅凝胶作为固定相, 和用EtOAc (50-100%) / 己烷梯度洗脱。化合物21的收率: 0.362g (83%)。手性纯度通过分析型手性HPLC, Chiralpak AD-H柱4.6x 250mm, 5微米, 20% EtOH, 80% 己烷, 0.1% 二乙基胺, 等度, 1.5mL/min测定。第二洗脱R异构体是93%纯的, 对应于86% ee。化合物161进一步通过手性半制备型HPLC (ChiralpakAD-H 21.2x 250mm, 5微米, 20% EtOH, 80% 己烷, 0.1% 二乙基胺, 60mL/min) 纯化。化合物161的最终收率: 308mg (99% ee)。对于C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

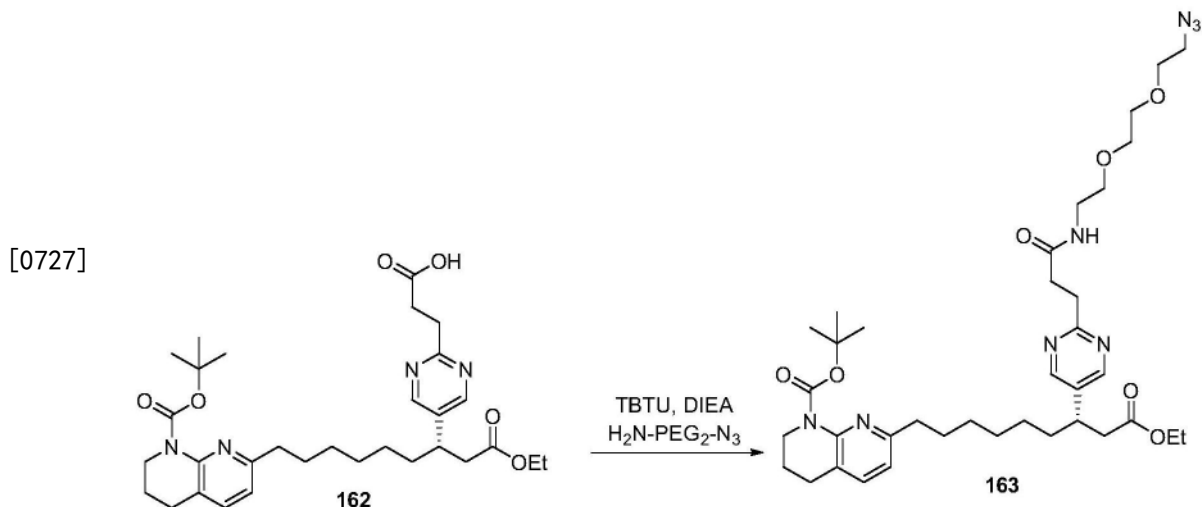
[0724] [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 555.36, 实测: 555.72。



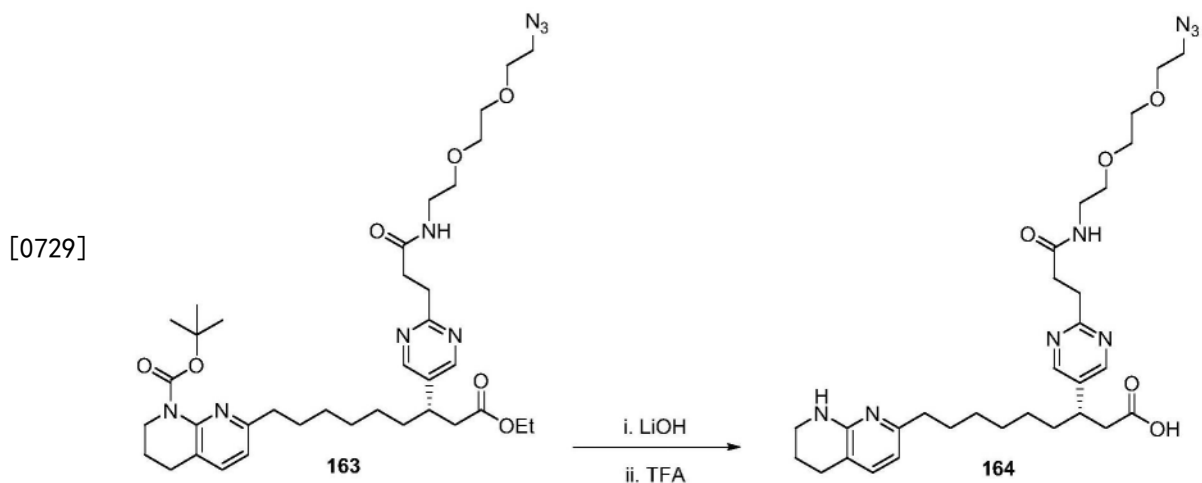
[0726] 在室温下向化合物161 (0.030g, 0.054mmol) 在ACN (0.30mL) 中的溶液中加入BAIB (0.042g, 0.130mmol) 和TEMPO (2.5mg, 0.016mmol), 接着水 (0.30mL)。2hr后, 反应混合物浓



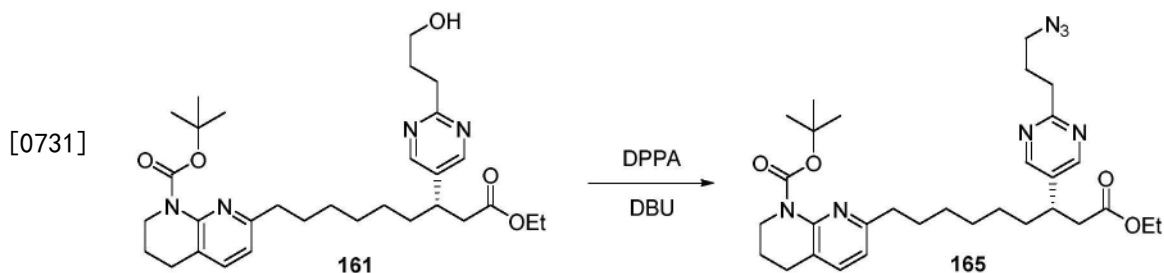
缩。残留物通过RP-HPLC纯化(Phenomenex Gemini C1821.2 x 250mm, 5微米, 0.1% TFA水/ACN, 30-80% ACN梯度)。化合物162的收率: 0.030g (97%)。对于 $C_{31}H_{44}N_4O_6$  [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 569.34, 实测: 569.68。



[0728] 在0℃向化合物162 (33mg, 0.058mmol) 和氨基-PEG<sub>2</sub>-叠氮化物 (15mg, 0.087mmol) 在DMF (0.5mL) 中的溶液中加入TBTU (32mg, 0.099mmol), 然后DIEA (35μL, 26mg, 0.203mmol)。将反应混合物升温至室温和搅拌30分钟。反应混合物浓缩, 和产物化合物163无需纯化而用于下一步骤。对于 $C_{37}H_{56}N_8O_7$  [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 725.44, 实测: 725.77。

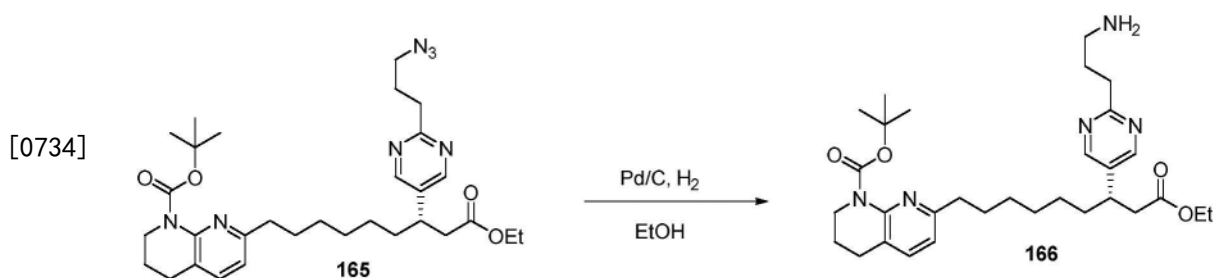


[0730] 向化合物163 (42mg, 0.058mmol) 在THF (0.30mL) 中的溶液中加入1M LiOH溶液 (0.174mL, 0.174mmol)。反应混合物在40℃加热1hr。加入另外一部分的LiOH (0.174mL, 0.174mmol)。3h后, 反应停止, 和加入另外一部分的LiOH (0.174mL, 0.174mmol)。反应物搅拌另外2hr (总共9eq LiOH, 5hr)。使用3N HCl将反应混合物中和至pH=5和浓缩。残留物溶于TFA: 水 [95:5] 和在室温下搅拌2小时。反应混合物浓缩, 和残留物通过RP-HPLC纯化(Phenomenex Gemini C1821.2 x 250mm, 5微米, 含有0.1% TFA的水/ACN, 20-50% ACN梯度)。化合物164 (结构38c) 的收率: 23mg (66%)。对于 $C_{30}H_{44}N_8O_5$  [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 597.35, 实测: 597.85。

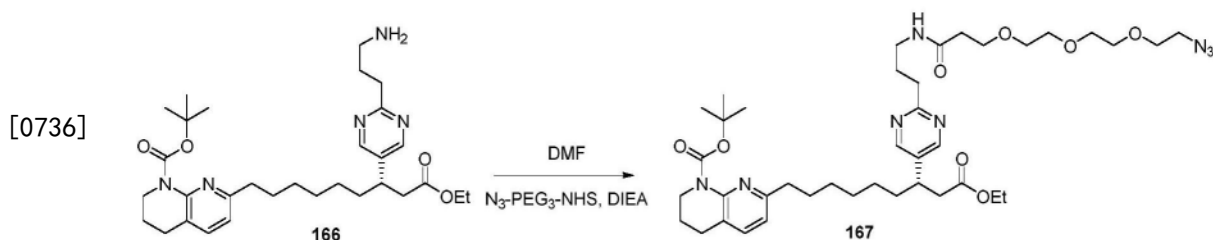


[0732] 在0℃向化合物161 (30mg, 0.054mmol) 在THF (150μL) 中的溶液中加入二苯基磷酰基叠氮化物 (35μL, 45mg, 0.162mmol), 接着DBU (12μL, 12mg, 0.081mmol)。反应混合物升温至rt和搅拌过夜。第二天早上, 反应混合物在60℃加热7h。反应混合物浓缩和通过RP-HPLC纯化(Phenomenex Gemini C1821.2 x 250mm, 5微米, 0.1% TFA水/ACN, 32-60% ACN梯度)。化合物165的收率: 14mg (44%)。对于C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>

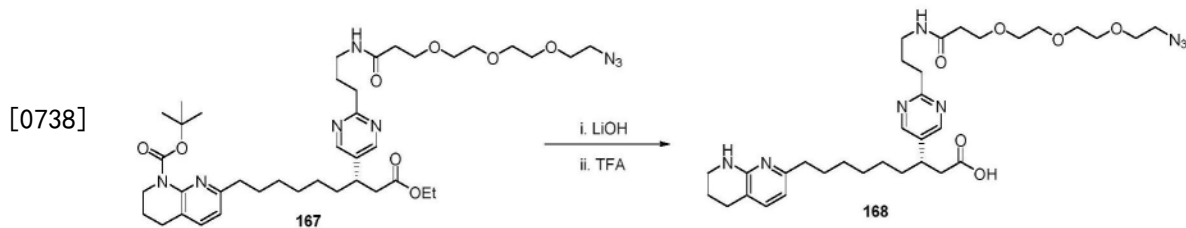
[0733] [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 580.36, 实测: 580.66。



[0735] 向化合物165 (18mg, 0.031mmol) 在EtOH (100μL) 中的溶液中加入Pd/C (10%负载, 3.3mg, 0.003mmol) 在EtOH (170μL) 中的浆液。向反应容器中加入H<sub>2</sub>, 然后抽空三次, 然后加入H<sub>2</sub> (1atm)。30分钟后, 反应混合物过滤, 浓缩和无需进一步纯化而用于下一步骤。化合物166的收率: 17mg (99%)。对于C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 554.37, 实测: 554.73。



[0737] 在室温下向化合物166 (17mg, 0.031mmol) 和叠氮基-PEG<sub>3</sub>-NHS酯 (14mg, 0.040mmol) 在DMF (170μL) 中的溶液中加入DIEA (16μL, 12mg, 0.092mmol)。在室温下将反应混合物搅拌1h, 浓缩, 然后无需纯化而用于下一步骤。对于C<sub>40</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>计算的质量: 783.48, 实测: 783.84。



[0739] 向化合物167 (24mg, 0.031mmol) 在THF (180μL) 中的溶液中加入1M LiOH溶液 (153μL, 0.153mmol)。反应混合物在40℃加热。1hr后, 加入另外一部分的LiOH (153μL, 0.153mmol),

5eq)。将反应混合物在40℃搅拌3h,然后室温搅拌过夜。使用3NHC1将反应混合物中和至pH=5和浓缩。残留物溶于TFA:水[95:5]和在室温下搅拌3小时。反应混合物浓缩,和残留物通过RP-HPLC纯化(Phenomenex Gemini C1821.2 x250mm,5微米,含有0.1%TFA的水/ACN,15-45%ACN梯度)。化合物168(结构39c)的收率:9.8mg(49%)。对于 $C_{33}H_{50}N_8O_6$ [M+H]<sup>+</sup>计算的质量:655.40,实测:656.01。

[0740] 实施例2.三齿整联蛋白靶向配体、RNAi剂的合成和整联蛋白靶向配体与货物分子(RNAi剂)的缀合

[0741] 整联蛋白靶向配体可与一种或多种可用于抑制一种或多种靶基因在表达整联蛋白的细胞中的表达的RNAi剂缀合。本文公开的整联蛋白靶向配体促进RNAi剂向靶细胞和/或组织的递送。上文的实施例1描述了本文公开的某些整联蛋白靶向配体的合成。下面描述在本文给出的非限制性实施例中举例说明的合成某些整联蛋白靶向配体-RNAi剂缀合物的一般程序。

[0742] A.RNAi剂的合成。RNAi剂可以使用本领域公知的方法合成。对于本文实施例中举例说明的RNAi剂的合成,根据亚磷酰胺技术在寡核苷酸合成中所用的固相上合成RNAi剂的有义链和反义链。根据规模,使用MerMade96E®(Bioautomation)、MerMade12®(Bioautomation)或OP Pilot100(GE Healthcare)。合成在由可控孔度玻璃(CPG,500 Å或600 Å,得自Prime Synthesis,Aston,PA,USA)制成的固体载体上进行。所有RNA和2'-修饰的RNA亚磷酰胺购自Thermo Fisher Scientific(Milwaukee,WI,USA)。具体地,使用了下列2'-O-甲基亚磷酰胺:(5'-O-二甲氧基三苯甲基-N<sup>6</sup>-(苯甲酰基)-2'-O-甲基-腺苷-3'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺、5'-O-二甲氧基-三苯甲基-N<sup>4</sup>-(乙酰基)-2'-O-甲基-胞苷-3'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺、(5'-O-二甲氧基三苯甲基-N<sup>2</sup>-(异丁酰基)-2'-O-甲基-鸟苷-3'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺和5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-O-甲基-尿苷-3'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺。2'-脱氧-2'-氟亚磷酰胺带有与2'-O-甲基RNA亚酰胺(amidite)相同的保护基。5'-二甲氧基三苯甲基-2'-O-甲基-肌苷-3'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺购自Glen Research(Virginia)。反向无碱基(3'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧核糖-5'-O-(2-氰乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺购自ChemGenes(Wilmington,MA,USA)。使用下列UNA亚磷酰胺:5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N<sup>6</sup>-(苯甲酰基)-2',3'-断(seco)-腺苷、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-乙酰基-2',3'-断(seco)-胞嘧啶、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-N-异丁酰基-2',3'-断(seco)-鸟苷、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺、和5'-(4,4'-二甲氧基-三苯甲基)-2',3'-断(seco)-尿苷、2'-苯甲酰基-3'-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺。TFA氨基连接臂亚磷酰胺也是商业购买的(ThermoFisher)。

[0743] 在一些实例中,通过将组分连接至包括三炔基团的支架,或连接至如上文表B所示的包含炔丙基的修饰的核苷酸,将本文公开的整联蛋白靶向配体与RNAi剂缀合。在一些实例中,通过使用含三炔基的亚磷酰胺添加三炔基团,所述亚磷酰胺可在RNAi剂的有义链的5'末端添加。当与本文某些实施例中提供的RNAi剂结合使用时,将含三炔基的亚磷酰胺溶解于无水二氯甲烷或无水乙腈(50mM)中,同时将所有其它亚磷酰胺溶解于无水乙腈

(50mM)中,并加入分子筛(3 Å)。5-苄硫基-1H-四唑(BTT,250mM于乙腈中)或5-乙硫基-1H-四唑(ETT,250mM于乙腈中)用作活化剂溶液。偶联时间为10分钟(RNA)、90秒(2'-O-Me)和60秒(2'-F)。为了引入硫代磷酸酯键,使用3-苯基1,2,4-二噻唑啉-5-酮(POS,得自PolyOrg,Inc,Leomister,MA,USA)在无水乙腈中的100mM溶液。

[0744] 或者,当整联蛋白靶向配体经由三炔烃支架与RNAi剂偶联时,代替使用亚磷酰胺方法,可以合成后引入含三炔烃的化合物(参见例如下文的E部分)。当与本文列出的某些实施例中提供的RNAi剂结合使用时,当将三炔烃基团合成后连接至有义链的5'末端时,用在5'末端包括伯胺的核苷酸官能化所述有义链的5'末端核苷酸,以促进与含三炔烃的支架的连接。将TFA氨基连接臂亚磷酰胺溶解在无水乙腈(50mM)中,加入分子筛(3 Å)。5-苄硫基-1H-四唑(BTT,250mM于乙腈中)或5-乙硫基-1H-四唑(ETT,250mM于乙腈中)用作活化剂溶液。偶联时间为10分钟(RNA)、90秒(2'-O-Me)和60秒(2'-F)。为了引入硫代磷酸酯键,使用3-苯基1,2,4-二噻唑啉-5-酮(POS,得自PolyOrg,Inc,Leomister,MA,USA)在无水乙腈中的100mM溶液。

[0745] 在本文所示的实例中,以下显示了用于合成的双链体的修饰的核苷酸序列:

[0746] 双链体AD04545:

[0747] 修饰的反义链序列(5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO:1)

[0748] 修饰的有义链序列(5' → 3): (NH<sub>2</sub>-C6) scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa (invAb) (SEQ ID NO:2)

[0749] 双链体AD04546:

[0750] 修饰的反义链序列(5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO:3)

[0751] 修饰的有义链序列(5' → 3):

[0752] (NH<sub>2</sub>-C6) scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa (invAb) (C6-S-Mal-X) (SEQ ID NO:4)

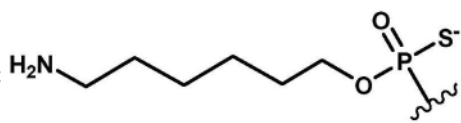
[0753] 双链体AD05971:

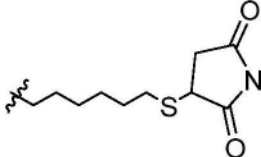
[0754] 修饰的反义链序列(5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO:5)

[0755] 修饰的有义链序列(5' → 3):

[0756] (NH<sub>2</sub>-C6) scsaacguaaCfGfAfuuuAlkcaAlkugAlkaaAlksa (invAb) (C6-S-Mal-C18二酸部分) (SEQ ID NO:6)

[0757] 对于上文所列的修饰的核苷酸序列,a、c、g和u分别表示2'-O-甲基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;Af、Cf、Gf和Uf分别表示2'-氟腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;aAlk、cAlk、gAlk和uAlk分别表示2'-O-炔丙基腺苷、胞苷、鸟苷或尿苷;(invAb)表示反向无碱基残基(反向无碱基脱

氧核糖核苷酸);s表示硫代磷酸酯键;(NH<sub>2</sub>-C6)s表示:和

[0758] (C6-S-Mal-L) 表示:  ,其中L是PEG链或乙基,如下文实施例

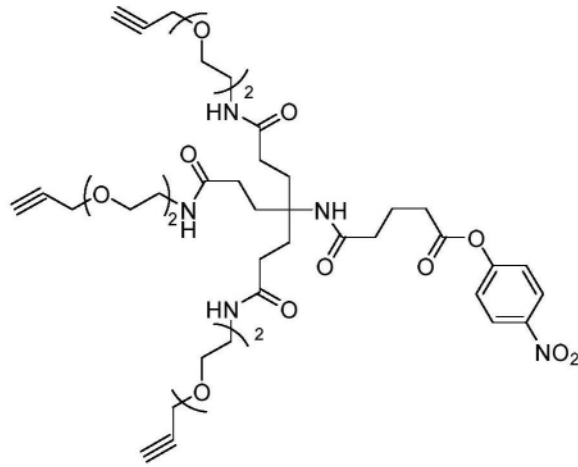
所指示的。对于本文的实施方案,当考虑各个链5' → 3' 时,插入反向无碱基,使得脱氧核糖的3' 位置在各个链上前面单体的3' 末端处连接。

[0759] B. 裂解和脱保护与载体结合的低聚物。在固相合成完成后,将干燥的固体载体用1:1体积的40wt%甲胺的水溶液和28%-31%氢氧化铵溶液(Aldrich)在30°C处理1.5小时。蒸发溶液并将固体残余物在水中重构(见下文)。

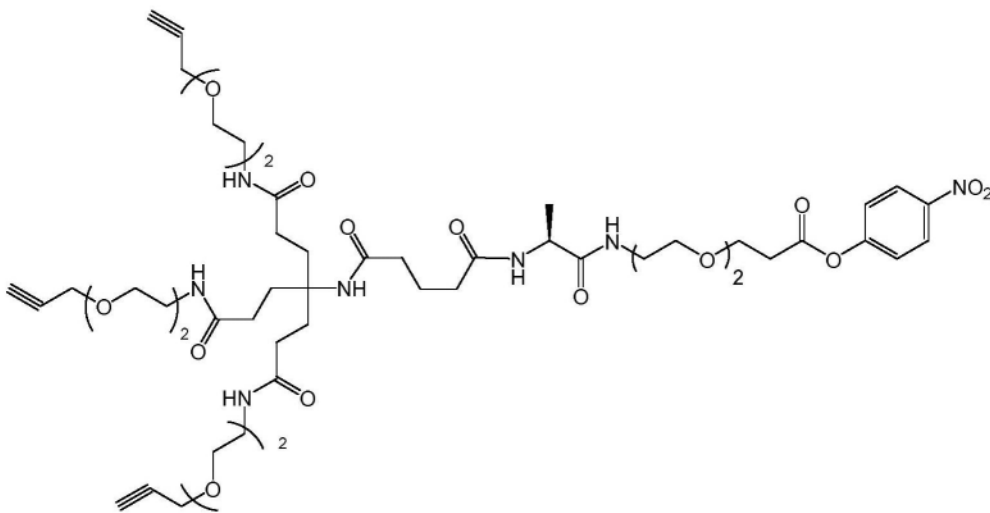
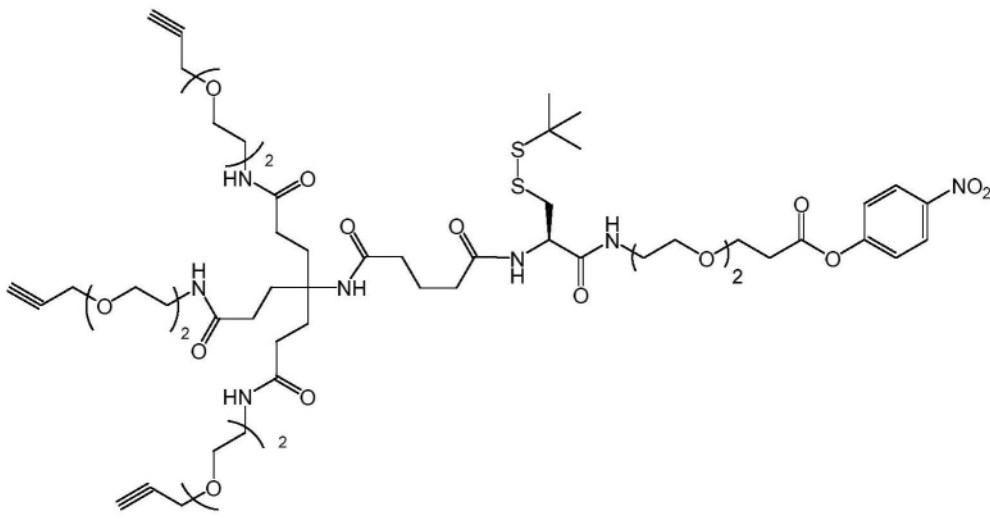
[0760] C. 纯化。使用TSKgel SuperQ-5PW13 $\mu$ m柱和Shimadzu LC-8系统,通过阴离子交换HPLC纯化粗低聚物。缓冲液A是20mM Tris、5mM EDTA, pH9.0, 含有20%乙腈,且缓冲液B与缓冲液A相同,加入1.5M氯化钠。记录260nm处的UV痕迹。合并合适的级分,然后使用填充有Sephadex G-25Fine的GE Healthcare XK16/40柱在尺寸排阻HPLC上运行,运行缓冲液为100mM碳酸氢铵, pH6.7和20%乙腈或过滤水。

[0761] D. 退火。通过将等摩尔RNA溶液(有义和反义)在1 $\times$  PBS(磷酸盐缓冲盐水, 1x, Corning, Cellgro)中组合,混合互补链,以形成RNAi剂。将一些RNAi剂冻干并储存在-15至-25°C。通过在UV-Vis分光光度计上在1 $\times$  PBS中测量溶液吸光度来测定双链体浓度。然后将260nm处的溶液吸光度乘以转换因子和稀释因子以确定双链体浓度。所使用的转换因子为0.037mg/(mL $\cdot$ cm),或,对于一些实验替代地,由实验确定的消光系数来计算转换因子。

[0762] E. 三炔烃支架的偶联。在退火之前或之后, RNAi剂的5'或3' 胺官能化有义链可以与三炔烃支架缀合。可用于形成本文公开的结构体的示例性三炔烃支架结构包括以下:



[0763]

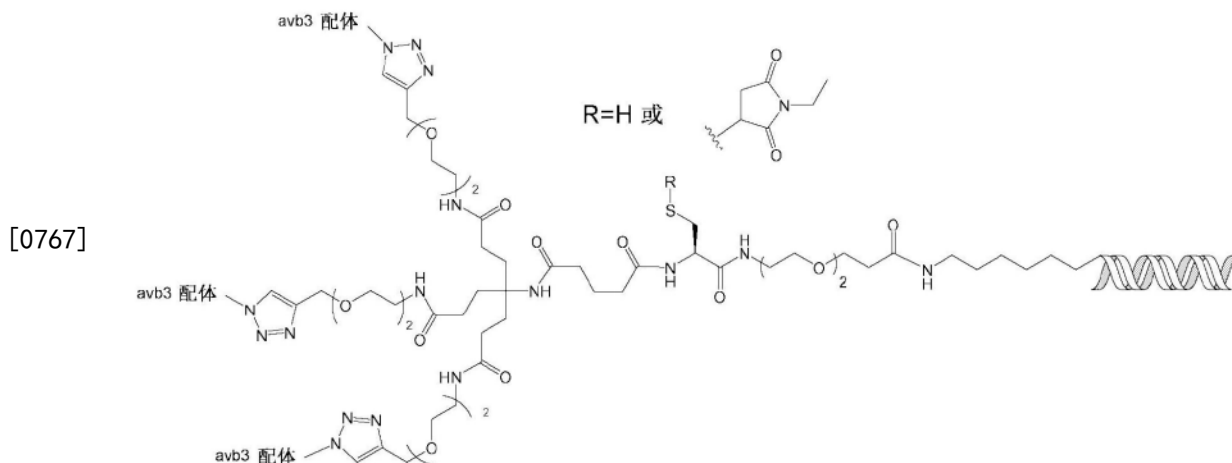


[0764] 以下描述了三炔烃支架与退火双链体的缀合：将胺官能化的双链体以 ~ 50 至 70mg/mL 溶解于 90% DMSO/10% H<sub>2</sub>O 中。加入 40 当量三乙胺，然后加入 3 当量三炔烃-PNP。一旦完成，在 1x 磷酸盐缓冲盐水/乙腈 (1:14 比例) 的溶剂系统中沉淀缀合物两次，并干燥。

[0765] F. 整联蛋白靶向配体的缀合。在退火之前或之后，将 5' 或 3' 三炔烃官能化的有义链与整联蛋白靶向配体缀合。以下实施例描述了  $\alpha v\beta 3/5$  整联蛋白靶向配体与退火双链体的缀合：在去离子水中制备 0.5M 三(3-羟丙基三唑基甲基)胺 (THPTA)、0.5M 五水合硫酸 Cu

(II)  $(\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$  和 2M 抗坏血酸钠溶液的储备溶液。制备整联蛋白靶向配体的 DMSO 中的 75mg/mL 溶液。在含有三炔炔官能化双链体 (3mg, 75 $\mu\text{L}$ , 40mg/mL, 在去离子水中,  $\sim 15000\text{g/mol}$ ) 的 1.5mL 离心管中, 加入 25 $\mu\text{L}$  的 1M HEPES pH8.5 缓冲液。涡旋后, 加入 35 $\mu\text{L}$  DMSO, 并将溶液涡旋。将整联蛋白靶向配体加入到反应物中 (6 当量/双链体, 2 当量/炔炔,  $\sim 15\mu\text{L}$ ), 并将溶液涡旋。用 pH 试纸检查 pH 并确认为 pH  $\sim 8$ 。在单独的 1.5mL 离心管中, 将 50 $\mu\text{L}$  0.5M 的 THPTA 与 10 $\mu\text{L}$  0.5M 的  $\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  混合, 涡旋, 并在室温培育 5 分钟。5 分钟后, 将 THPTA/Cu 溶液 (7.2 $\mu\text{L}$ , 6 当量 5:1 THPTA:Cu) 加入到反应小瓶中, 并涡旋。之后立即将 2M 抗坏血酸盐 (5 $\mu\text{L}$ , 50 当量/双链体, 16.7/炔炔) 加入反应小瓶中并涡旋。一旦反应完成 (通常在 0.5-1 小时内完成), 立即通过非变性阴离子交换色谱纯化反应物。

[0766] G. 半胱氨酸接头上的巯基的官能化。在一些实施方案中, 半胱氨酸接头可用于促进整联蛋白靶向配体与 RNAi 剂的缀合。在退火之前或之后, 将 5' 或 3' 三齿炔炔-Cys (Stbu) -PEG<sub>2</sub> 官能化的有义链用含马来酰亚胺的部分官能化, 或可以还原并作为游离硫醇留下, 如下列结构所示:



[0768] 以下实施例描述了用 N-乙基马来酰亚胺修饰三炔炔-Cys (Stbu) -PEG<sub>2</sub>-双链体: 将三炔炔-Cys (Stbu) -PEG<sub>2</sub>-双链体 (35mg) 溶解在 500 $\mu\text{L}$  去离子的 H<sub>2</sub>O 中。将 HEPES 缓冲液 (1M, pH8.5, 82 $\mu\text{L}$ ) 加入到反应物中, 并将溶液涡旋。加入 1M 二硫苏糖醇溶液 (DTT, 100 当量, 236 $\mu\text{L}$ ), 并将该溶液置于涡旋振荡器上 3 小时。通过变性 RP-HPLC 证实二硫化物被还原后, 在 1x 磷酸盐缓冲盐水/乙腈 (1:14 比例) 的溶剂系统中沉淀缀合物三次。将沉淀的颗粒在 0.5mL 的 0.1M HEPES (pH6.5) 中重构, 并将 N-乙基马来酰亚胺 (3mg, 10 当量) 加入到溶液中, 并置于涡旋混合器上保持  $\sim 15$  分钟。反应完成后, 在 1x 磷酸盐缓冲盐水/乙腈 (1:14 比例) 的溶剂系统中沉淀缀合物三次, 脱盐, 并干燥。

[0769] 实施例 3. 整联蛋白靶向配体的结合活性

[0770] 如下表 1 中所报告的, 对于结构 1c、2c 和 3c 的整联蛋白靶向配体以及 RGD-模拟肽, 获得 IC<sub>50</sub> 结合数据:

[0771] 表 1. IC<sub>50</sub> 结合活性

组	IC50 (nM)		
	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$
[0772] 结构 1c	0.3	0.6	5.3
结构 2c	0.3	5.6	8.9
结构 3c	0.8	1.8	81
RGD-模拟肽	1.6	2.5	81

[0773] 如上表1所示,结构1、2和3各自显示与 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白和 $\alpha v \beta 5$ 整联蛋白的有效结合,其中例如结构2和3显示特别偏好结合 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白(分别 $IC_{50}=0.3nM$ 和 $0.8nM$ )。此外,与RGD-模拟肽(参见例如美国专利号9,487,556中公开的RGD-模拟配体结构)相比,结构1、2和3各自显示对 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白的略微增加的结合活性。此外,尽管RGD-模拟配体显示具有结合活性,但在体内血清稳定性和离体化学稳定性两个方面,与所述基于肽的RGD-模拟配体相比,本公开内容的整联蛋白靶向配体具有增加的稳定性。

[0774] 实施例4.携带肾肿瘤的小鼠模型(同位异种移植)

[0775] 表达SEAP的透明细胞肾细胞癌(ccRCC)A498细胞的产生

[0776] 在CMV启动子下表达报告基因分泌型碱性磷酸酶(SEAP)的pCR3.1表达载体通过从Clontech的pSEAP2-基本载体PCR扩增的SEAP编码序列的定向克隆制备。方便的限制性位点添加到用于扩增用于克隆到pCR3.1载体(Invitrogen)中的SEAP编码序列的引物上。得到的构建体pCR3-SEAP用于产生表达SEAP的A498 ccRCC细胞系。简言之,按照制造商的推荐通过电穿孔将pCR3-SEAP质粒转染到A498 ccRCC细胞中。通过G418抗性选择稳定的转染子。评价选择的A498-SEAP克隆的SEAP表达和整合稳定性。

[0777] 表达SEAP的透明细胞肾细胞癌(ccRCC)A498细胞的植入

[0778] 雌性无胸腺裸小鼠用~3%异氟烷麻醉和以右侧卧位放置。在左肋腹中产生0.5-1cm的腹部纵向小切口。使用潮湿的棉头拭子,将左肾提高到腹膜外并轻轻稳定。紧在注射前,向1.0ml注射器中填充细胞/基质胶混合物和将27号套针连接到注射器尖端。填充的注射器然后连接到注射泵(Harvard Apparatus,PHD2000型)和准备以除去空气。连接到注射器的27号套针的尖端紧在肾囊下方在尾极附近插入,和针的尖端然后小心沿囊向头推进3-4mm。使用注射泵将含有约300,000个细胞的2:1(vol:vol)细胞/基质胶®混合物的10 $\mu$ l等分试样缓慢注入肾实质中。针留在肾中15-20秒,以确保注射完成。然后从肾移出针和将棉头拭子放置在注射位点上30秒,以防止细胞泄漏或出血。然后轻轻把肾放回到腹部内,和关闭腹壁。植入后每7-14天收集血清以使用市售的SEAP测定试剂盒监测肿瘤生长。对于大多数研究,在植入后5-6周使用肿瘤小鼠,此时肿瘤测量通常为约4-8mm。

[0779] HIF2 mRNA表达的测定

[0780] 对于在本文的实施例中报告的研究,在注射后的确定一天将小鼠安乐死和使用Trizol试剂按照制造商的推荐从肾肿瘤分离总RNA。如下文所述,相对Hif2 $\alpha$ mRNA水平通过RT-qPCR测定,并与仅用递送缓冲液(等渗葡萄糖)处理的小鼠比较。

[0781] 在定量PCR的准备中,按照制造商的方案,从在TriReagent(Molecular Research Center,Cincinnati,OH)中均质化的组织样品分离总RNA。使用High Capacity cDNA ReverseTranscriptionKit(LifeTechnologies)反转录大约500ngRNA。对于人(肿瘤)Hif2 $\alpha$ (EPAS1)表达,使用TaqMan Gene ExpressionMasterMix(Life Technologies)或VeriQuest Probe MasterMix(Affymetrix),用于人Hif2 $\alpha$ (Catalog#4331182)和CycA(PPIA)Catalog#:



4326316E)的预制造的TaqMan基因表达测定在二重反应中一式三份使用。定量PCR使用7500Fast或StepOnePlus Real-Time PCR系统(Life Technologies)进行。 $\Delta \Delta C_T$ 方法用于计算相对基因表达。

[0782] 实施例5.在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$  (EPAS1)的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0783] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术,在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所述。RNAi剂包括具有与HIF-2 $\alpha$  (Hif2 $\alpha$ 或EPAS1)基因至少部分互补的核碱基序列的反义链。EPAS1是HIF(低氧诱导因子)基因家族的成员和编码参与由氧调节的基因的诱导的转录因子的一半,并且其在氧水平下降(称为低氧的条件)时被诱导,和已知经常在透明细胞肾癌细胞中过表达。设计Hif2 $\alpha$ RNAi剂以能够以序列特异性方式降解或抑制Hif2 $\alpha$ 的信使RNA(mRNA)转录物的翻译,从而抑制EPAS1基因的表达。Hif2 $\alpha$ RNAi剂包含修饰的核苷酸和超过一个非磷酸二酯键。

[0784] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0785] 表2.实施例5中携带肾肿瘤的小鼠的给药组

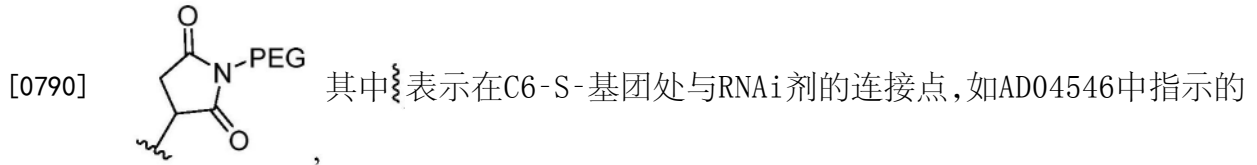
组	RNAi剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(5%葡萄糖/水(d5w))(无RNAi剂)	在第1天单次注射
[0786] 2	7.5 mg/kg 的与 40 千道尔顿(kDa) PEG 部分缀合的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546)(未连接整联蛋白靶向配体),在等渗葡萄糖中配制。	在第1天单次注射

组	RNAi剂和剂量	给药方案
3	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与基于 RGD-模拟肽的配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第1天单次注射
4	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 1a 的整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第1天单次注射
5	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第1天单次注射
[0787] 6	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与四个结构 2a 的整联蛋白靶向配体缀合(即四齿靶向基团), 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第1天单次注射
7	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04545), 其与含有四个结构 2a 的整联蛋白靶向配体(即四齿靶向基团)的簇缀合(没有 PEG 部分), 在等渗葡萄糖中配制。	在第1天单次注射
8	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 20 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第1天单次注射

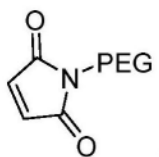
[0788] 合成实施例5的RNAi剂,其具有针对靶向人Hif2 $\alpha$ 基因的核苷酸序列,和包括在有义链的5'末端的官能化的胺反应性基团(NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)以促进与整联蛋白靶向配体的缀合(或者

对于组3,与基于RGD-模拟肽的配体的缀合)。修饰的RNAi剂序列显示于上文实施例2中。对于组4和5,单个整联蛋白靶向配体(本文称为“单齿”配体)通过DBC0-PEG<sub>5</sub>-NHS酯接头(BroadPharm)与RNAi剂缀合,所述接头缀合至有义链的5'末端上的末端伯胺。合成具有叠氮化物反应性基团的各个整联蛋白靶向配体(见例如实施例1),叠氮化物反应性基团然后缀合至接头的DBC0组分。

[0789] 合成具有PK调节剂的RNAi剂,所述PK调节剂称为“20kDAPEG部分”或“40kDA PEG部分”,具有以下结构:

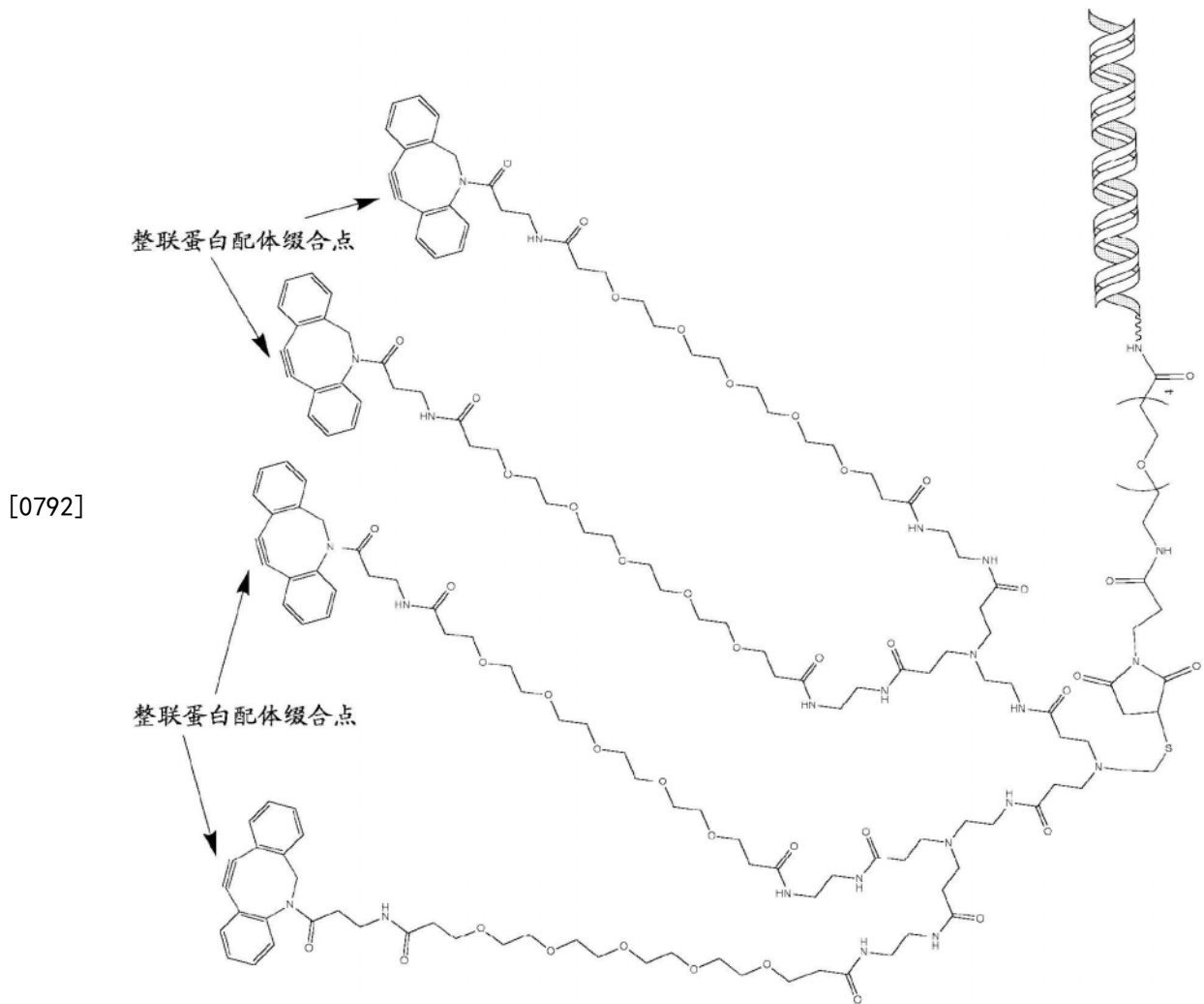


(见实施例2),和PEG表示20kDa或40kDaPEG链。PK调节剂通过还原C6-SS-C6基团而缀合至有

义链的3'末端,如表A中所示,其然后与以下化合物经历迈克尔加成: 其中PEG

表示20kDa或40kDa PEG链。

[0791] 对于组6和7,四个整联蛋白靶向配体通过四齿支架缀合,所述四齿支架包括DBC0官能化的PAMAM-G1脬胺核心,其具有由以下表示的一般结构:



[0793] 如上表2所示,在一些组中,40kDa或20kDaPEG部分经连接以用作PK增强剂以增加药物产品-缀合物的循环时间。40kDa或20kDaPEG部分使用下式的试剂连接:

[0794] 在每组中三(3)只携带肿瘤的小鼠被给药( $n=3$ )。在注射后研究第8天处死小鼠,并根据实施例4中所示的程序从肾肿瘤分离总RNA。相对人HIF2 $\alpha$ mRNA表达然后通过基于探针的定量PCR(RT-qPCR)定量,对人亲环蛋白A(PPIA)表达进行标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值, $\pm 95\%$ 置信区间),如实施例4中解释的。

[0795] 表3. 实施例5中处死时的平均相对huHif2 $\alpha$ mRNA表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低(误差)	高(误差)
组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.069	0.074
[0796] 组 2 (7.5 mg/kg RNAi 剂) (无配体, 40 kDa PEG)	0.563	0.016	0.017
组 3 (7.5 mg/kg RNAi 剂-基于 RGD 模拟肽的配体, 40 kDa PEG)	0.400	0.087	0.112
组 4 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 1a 的整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.390	0.027	0.029

[0797]	<b>组 5</b> (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.308	0.061	0.077
	<b>组 6</b> (7.5 mg/kg RNAi 剂-整联蛋白靶向配体结构 2a 的四齿靶向基团, 40 kDa PEG)	0.289	0.069	0.091
	<b>组 7</b> (7.5 mg/kg RNAi 剂-整联蛋白靶向配体结构 2a 的四齿靶向基团)	0.589	0.050	0.054
	<b>组 8</b> (7.5 mg/kg RNAi 剂-整联蛋白靶向配体结构 2a, 20 kDa PEG)	0.647	0.098	0.115

[0798] 如上表3所示,各Hif2 $\alpha$ RNAi剂显示与对照相比在小鼠中mRNA表达降低。包括40kDa PEG部分作为PK增强剂总体上改进了靶基因的表达抑制。此外,组3、4和5的比较显示,本文所述的结构1a的整联蛋白靶向配体与已知对 $\alpha v \beta 3$ 具有亲和力的基于RGD模拟肽的配体是相当的,和结构2a的配体显示超过RGD模拟配体几乎10%的敲减改进。例如,组3(RGD模拟)具有大约60%敲减(0.400);组4(结构1a)具有大约61%敲减(0.390);和组5(结构2a)具有大约69%敲减(0.308)。

[0799] 重要的是,数据还显示配体依赖性,因为包括本文公开的整联蛋白靶向配体显示与没有配体时的相同构建体相比的改进。例如,组6(三齿整联蛋白靶向配体结构2a)显示大约72%敲减(0.289),相比之下,组2(没有整联蛋白靶向配体)仅显示大约44%敲减(0.563)。

[0800] 另外,组6显示超过组5的小改进,表明相较于单齿配体,略微偏好多齿配体;然而,两种形式均是有效的,和递送RNAi剂至肾(如通过RNAi剂的基因表达抑制显示的)。

[0801] 实施例6.在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0802] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$ (EPAS1)。

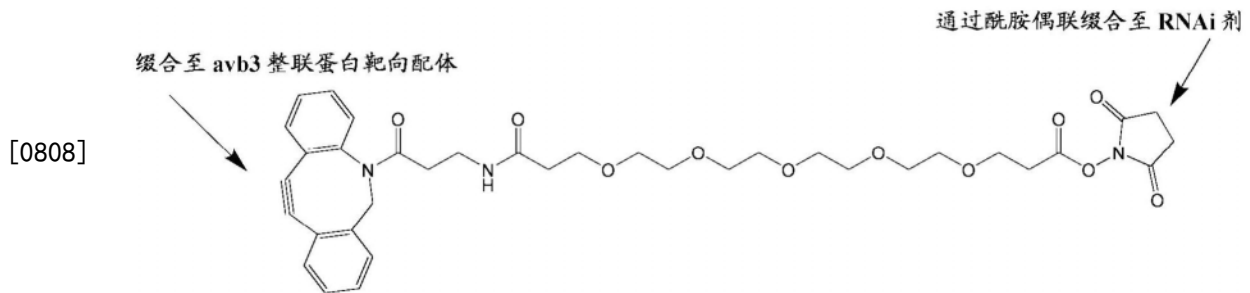
[0803] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0804] 表4.实施例6中携带肾肿瘤的小鼠的给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(d5w)(无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
2	30 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与基于 RGD-模拟肽的配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
3	15 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与基于 RGD-模拟肽的配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
4	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与基于 RGD-模	在第 1 天单次注射

	拟肽的配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	
[0806]	5 30 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
	6 15 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0807] 合成具有针对靶向人 Hif2 $\alpha$  基因的核苷酸序列的 RNAi 剂, 并且其包括在有义链的 5' 末端的官能化的胺反应性基团 (NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) 以促进缀合至整联蛋白靶向配体 (或者, 对于组 2、3 和 4, RGD 模拟肽)。对于组 5 和 6, 单个整联蛋白靶向配体 (“单齿”配体) 通过以下 DBCO-PEG<sub>5</sub>-NHS 酯缀合至 RNAi 剂:



[0809] 在每个组中三 (3) 只携带肿瘤的小鼠被给药 (n=3)。在注射后研究第 8 天处死小鼠, 和根据实施例 4 中所示的程序从肾肿瘤分离总 RNA。相对人 HIF2 $\alpha$  mRNA 表达然后通过基于探针的定量 PCR (RT-qPCR) 定量, 对人亲环蛋白 A (PPIA) 表达标准化和表示为媒介物对照组 (等渗葡萄糖) 的分数 (几何平均值, +/- 95% 置信区间), 如实施例 4 中解释的。

[0810] 表 5. 实施例 6 中处死时的平均相对人 Hif2 $\alpha$  mRNA 表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低(误差)	高(误差)
组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.072	0.078
组 2 (30 mg/kg RNAi 剂-基于 RGD 肽的配体, 40 kDa PEG)	0.300	0.041	0.047
组 3 (15 mg/kg RNAi 剂-基于 RGD 肽的配体, 40 kDa PEG)	0.330	0.080	0.106
组 4 (7.5 mg/kg RNAi 剂-基于 RGD 肽的配体, 40 kDa PEG)	0.446	0.068	0.080
组 5 (30 mg/kg RNAi 剂-整联蛋白靶向配体结构 2a, 40 kDa PEG)	0.198	0.007	0.007
组 6 (15 mg/kg RNAi 剂-整联蛋白靶向配体结构 2a, 40 kDa PEG)	0.271	0.012	0.012

[0812] 如上表 5 所示, 各 Hif2 $\alpha$  RNAi 剂显示与对照相比 mRNA 表达降低。此外, 组 5 和 6, 其含有本文公开的结构 2a 的整联蛋白靶向配体, 显示与组 2 和 3 的基于 RGD-模拟肽的配体相比, Hif2 $\alpha$  mRNA 敲减改进 (例如, 比较组 6 (15 mg/kg RNAi 剂时大约 73% 敲减 (0.271)) 与组 3 (15 mg/kg RNAi 剂时大约 67% 敲减 (0.330))。

[0813] 实施例 7. 在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向 HIF-2 $\alpha$  的 RNAi 剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0814] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序, 根据亚磷酰胺技术在固相

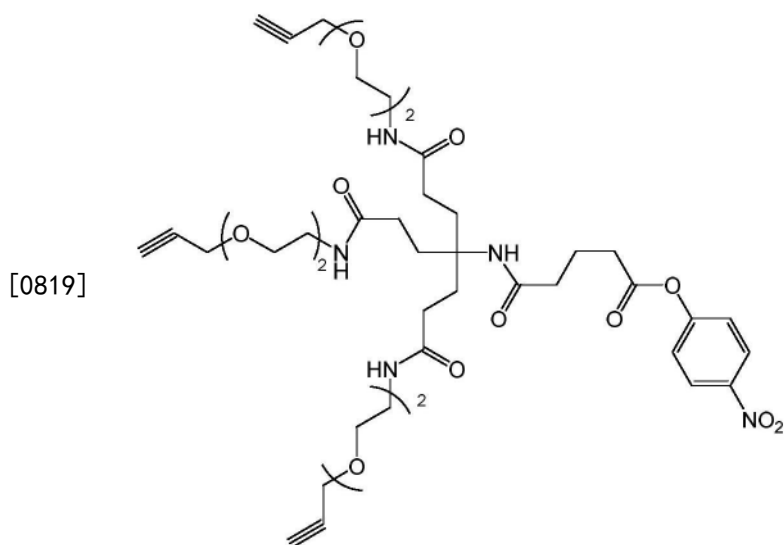
上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$  (EPAS1)。

[0815] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0816] 表6. 实施例7中携带肾肿瘤的小鼠的给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
2	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
3	30 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
4	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2.8a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
5	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2.9a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
6	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2.10a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
7	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2.10a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与有义链上的 3'硫醇连接的 N-乙基马来酰亚胺, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
8	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的单齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0818] 合成具有针对靶向人Hif2 $\alpha$ 基因的核苷酸序列的RNAi剂,并且其包括在有义链的5'末端的官能化的胺反应性基团(NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)以促进缀合至整联蛋白靶向配体。对于组2至7,以下化合物用于将具有三齿支架的缀合物官能化:



[0820] 对于组8, 炔-PEG<sub>4</sub>-NHS酯用于连接单齿整联蛋白靶向配体至有义链上的5'胺。如

本文所示,组4至7使用具有不同PEG长度的整联蛋白靶向配体。

[0821] 在每个组中三(3)只携带肿瘤的小鼠被给药( $n=3$ )。在注射后研究第8天处死小鼠,和根据实施例4中所示的程序从肾肿瘤分离总RNA。相对人HIF2 $\alpha$  mRNA表达然后通过基于探针的定量PCR(RT-qPCR)定量,对人亲环蛋白A(PPIA)表达标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值, +/-95%置信区间),如实施例4中解释的。

[0822] 表7. 实施例7中处死时的平均相对Hif2 $\alpha$  mRNA表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低(误差)	高(误差)
组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.078	0.085
组 2 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.361	0.025	0.026
组 3 (30 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.259	0.024	0.026
[0823] 组 4 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2.8a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.428	0.062	0.073
组 5 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2.9a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.481	0.014	0.014
组 6 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2.10a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.419	0.040	0.044
组 7 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2.10a 的三齿整联蛋白靶向配体, N-乙基-马来酰亚胺)	0.627	0.054	0.060
组 8 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的单齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.537	0.041	0.045

[0824] 如上表7所示,各Hif2 $\alpha$  RNAi剂显示与对照相比mRNA表达降低。例如,组2,其包括剂量的7.5mg/kg的与结构2a的三齿整联蛋白靶向配体缀合的RNAi剂(其包括PEG<sub>4</sub>基团),显示Hif2 $\alpha$ 的大约64%敲减(0.361)。另外,尽管增加PEG基团长度至达到PEG<sub>36</sub>的构建体(例如组6和7)全都显示敲减,但与结构2a中存在的PEG<sub>4</sub>基团相比,未观察到益处。

[0825] 实施例8. 在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体的剂量响应研究

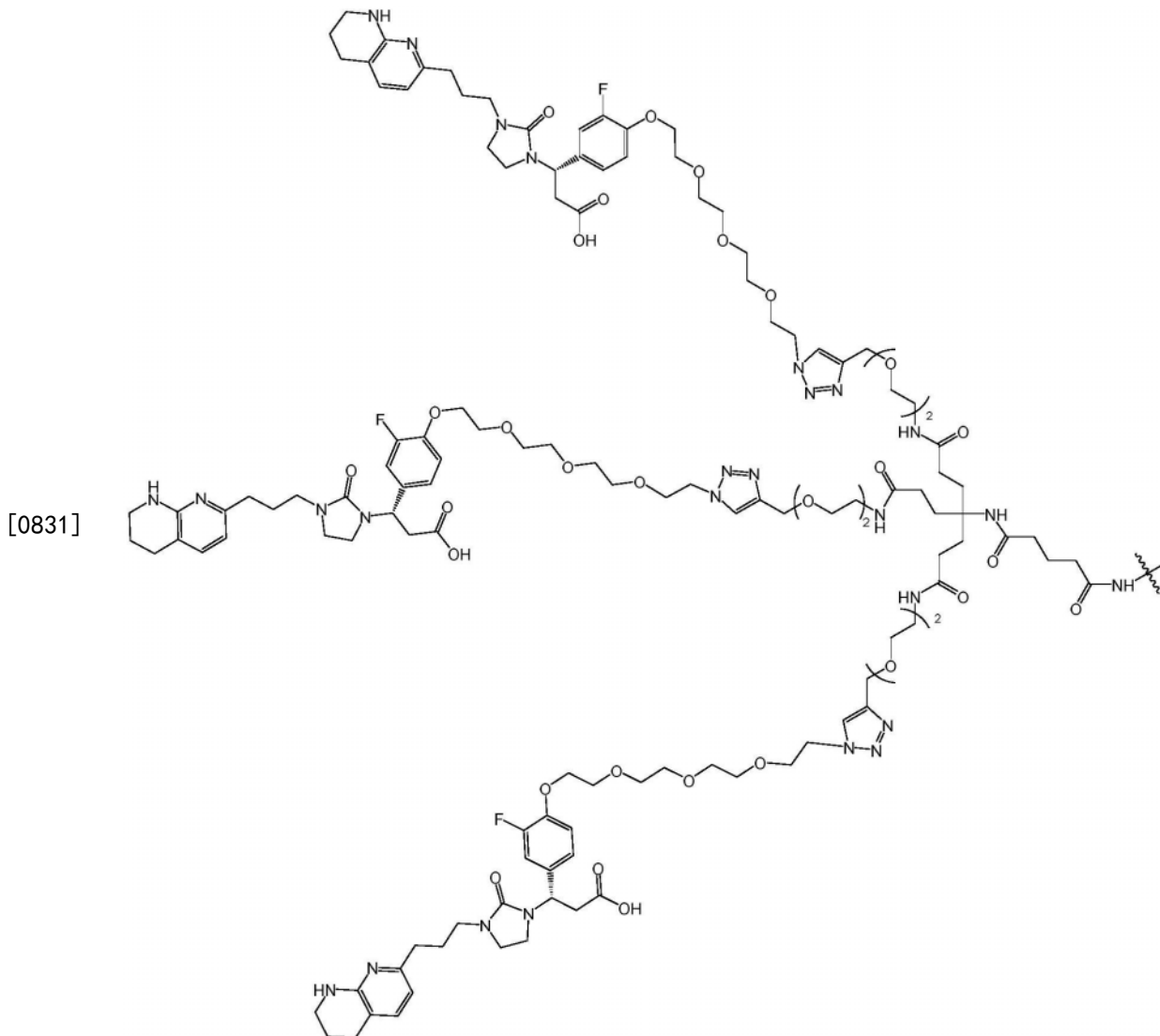
[0826] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$  (EPAS1)。

[0827] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0828] 表8. 实施例8中携带肾肿瘤的小鼠的给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水)) (无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
2	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
3	10 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
4	20 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
5	30 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0829] 合成具有针对靶向人 Hif2 $\alpha$  基因的核苷酸序列的 RNAi 剂, 并且其包括在有义链的 5' 末端的官能化的胺反应性基团 ( $\text{NH}_2\text{-C}_6$ ) 以促进缀合至整联蛋白靶向配体。每个组具有结构 2a 的三齿整联蛋白配体, 如以下结构所示:



[0832] 在每个组中三 (3) 只携带肿瘤的小鼠被给药 ( $n=3$ )。在注射后研究第 8 天处死小



鼠,和根据实施例4中所示的程序从肾肿瘤分离总RNA。相对人HIF2 $\alpha$ mRNA表达然后通过基于探针的定量PCR (RT-qPCR) 定量,对人亲环蛋白A (PPIA) 表达标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值, +/- 95% 置信区间),如实施例4中解释的。

[0833] 表9. 实施例8中处死时的平均相对人Hif2 $\alpha$ mRNA表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	Low (误差)	High (误差)
组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.131	0.150
[0834] 组 2 (7.5 mg/kg RNAi 剂)	0.313	0.027	0.030
组 3 (10 mg/kg RNAi 剂)	0.349	0.033	0.036
组 4 (20 mg/kg RNAi 剂)	0.216	0.040	0.050
组 5 (30 mg/kg RNAi 剂)	0.203	0.035	0.042

[0835] 如上表9所示,本文公开的与结构2a的整联蛋白靶向配体缀合的Hif2 $\alpha$ RNAi剂显示在所有剂量水平中,与对照相比小鼠中mRNA表达降低。

[0836] 实施例9. 在携带肾肿瘤的小鼠中与整联蛋白靶向配体缀合的靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂的敲减持续时间

[0837] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$  (EPAS1)。

[0838] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药。

[0839] 表10. 实施例9中的小鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂); 小鼠在第 5 天安乐死。	在第 1 天单次注射
1A	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂); 小鼠在第 22 天安乐死。	在第 1 天单次注射
2	20 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制; 小鼠在第 5 天安乐死。	在第 1 天单次注射
[0840] 3	20 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制; 小鼠在第 8 天安乐死。	在第 1 天单次注射
4	20 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制; 小鼠在第 15 天安乐死。	在第 1 天单次注射
5	20 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制; 小鼠在第 22 天安乐死。	在第 1 天单次注射

[0841] 组1和2中的小鼠在注射后第5天安乐死;组3中的小鼠在注射后第8天安乐死;组4中的小鼠在注射后第15天安乐死;和组1A和5中的小鼠在注射后第22天安乐死。

[0842] 对于媒介物对照组,两只小鼠在组1中给药和三只小鼠在组1A中给药。对于含有

RNAi剂-整联蛋白靶向配体的组(即组2、3、4和5),四(4)只携带肿瘤的小鼠在每个组中给药(n=4)。根据实施例4中所示的程序,从肾肿瘤分离总RNA。相对人HIF2 $\alpha$ mRNA表达然后通过基于探针的定量PCR(RT-qPCR)定量,对人亲环蛋白A(PPIA)表达标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值,+/-95%置信区间),如实施例4中解释的。

[0843] 表11. 实施例9中处死时的平均相对人Hif2 $\alpha$ mRNA表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低(误差)	高(误差)
组 1 (等渗葡萄糖; 第 5 天处死)	0.741	0.028	0.029
组 1A (等渗葡萄糖; 第 22 天处死)	1.000	0.066	0.070
组 2 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG; 第 5 天处死)	0.262	0.028	0.031
组 3 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG; 第 5 天处死)	0.202	0.021	0.023
组 4 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG; 第 8 天处死)	0.233	0.034	0.039
组 5 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG; 第 15 天处死)	0.299	0.017	0.018

[0844] 如上表11所示,在第22天Hif2 $\alpha$ RNAi剂继续显示与对照相比mRNA表达降低(在第22天大约70%敲减(0.299))。

[0845] 实施例10. 在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0846] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$ (EPAS1)。

[0847] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0848] 表12. 实施例10中的小鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
2	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
3	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2.6a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0849] 合成具有针对靶向人Hif2 $\alpha$ 基因的核苷酸序列的RNAi剂,并且其包括在有义链的5'末端的官能化的胺反应性基团(NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)以促进缀合至整联蛋白靶向配体。

[0850] 在每个组中三(3)只携带肿瘤的小鼠被给药(n=3)。在注射后研究第8天处死小鼠,和根据实施例4中所示的程序从肾肿瘤分离总RNA。相对人HIF2 $\alpha$ mRNA表达然后通过基于探针的定量PCR(RT-qPCR)定量,对人亲环蛋白A(PPIA)表达标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值,+/-95%置信区间),如实施例4中解释的。

[0851] 表13. 实施例10中处死时的平均相对Hif2 $\alpha$ mRNA表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
[0854] 组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.087	0.095
组 2 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.351	0.080	0.104
组 3 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2.6a 的三齿整联蛋白靶向配体, 40 kDa PEG)	0.441	0.040	0.043

[0855] 如上表13所示,各Hif2 $\alpha$ RNAi剂-整联蛋白靶向配体缀合物显示与对照相比在小鼠中mRNA表达降低。例如,组2,其包括剂量7.5mg/kg的与结构2a的三齿整联蛋白靶向配体缀合的RNAi剂,显示Hif2 $\alpha$ mRNA的大约65%敲减(0.351)。

[0856] 实施例11.在携带 $\alpha\beta$ 3K0A498肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0857] 透明细胞肾细胞癌(ccRCC)A498肿瘤细胞表达 $\alpha\beta$ 3和 $\alpha\beta$ 5整联蛋白二者,其中通过流式细胞术分析, $\alpha\beta$ 3表达是 $\alpha\beta$ 5的约4倍。为了评价在此模型中 $\alpha\beta$ 5的贡献, $\alpha\beta$ 3敲除(KO)A498细胞通过基因编辑技术合成。整联蛋白 $\alpha\beta$ 3的敲除通过基因组测序和 $\alpha\beta$ 3的免疫组织化学染色证实,其显示在 $\alpha\beta$ 3K0A498细胞中染色是阴性的。具有A498WT(具有 $\alpha\beta$ 3和 $\alpha\beta$ 5二者)和 $\alpha\beta$ 3K0A498细胞的携带肾肿瘤的小鼠如上文实施例4中所述制备。

[0858] 在研究第1天,携带肾肿瘤的小鼠通过尾静脉注射给药。三(3)只携带肿瘤的小鼠在下表13中所示的每个组中被给药(n=3)。在注射后研究第8天处死小鼠,和从肾肿瘤分离总RNA,如实施例4中所示。相对人HIF2 $\alpha$ mRNA表达通过基于探针的定量PCR(RT-qPCR)定量,对人亲环蛋白A(PPIA)表达标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值,+/-95%置信区间),如实施例4中所示。

[0859] 表14.实施例11中处死时的平均相对Hif2 $\alpha$ mRNA表达

组 ID	肿瘤	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低(误差)	高(误差)
[0860] 组 1 (等渗葡萄糖)	A498 WT	1.000	0.084	0.092
组 2 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分)	A498 WT	0.295	0.040	0.046
组 3 (等渗葡萄糖)	A498 $\alpha\beta$ 3 KO	1.000	0.232	0.302
组 4 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 并进一步包括与构建体连接的 40 kDa PEG 部分)	A498 $\alpha\beta$ 3 KO	0.621	0.068	0.077

[0861] 如上表14中所示,Hif2 $\alpha$ RNAi剂-整联蛋白配体缀合物显示与对照相比,在A498WT(野生型)肿瘤中Hif2 $\alpha$ mRNA表达降低(约71%(0.295)敲减)。相比之下,如所预期的,Hif2 $\alpha$ mRNA表达降低在A498 $\alpha\beta$ 3KO肿瘤中效率更低;然而,降低仍然是显著的,为38%(0.621)敲减。这表明整联蛋白 $\alpha\beta$ 3和整联蛋白 $\alpha\beta$ 5均有助于RNAi剂递送。

[0862] 实施例12.在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0863] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相

上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$  (EPAS1)。

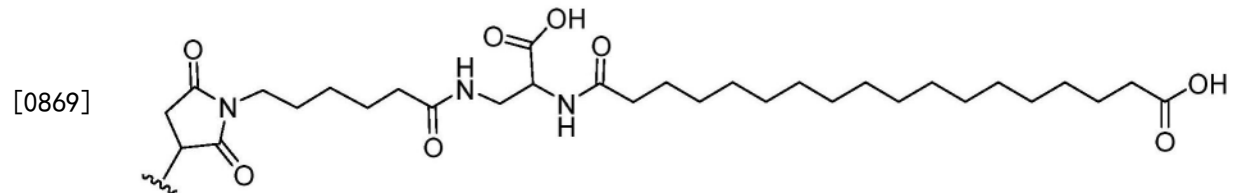
[0864] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:


[0865] 表15. 实施例12中的小鼠给药组

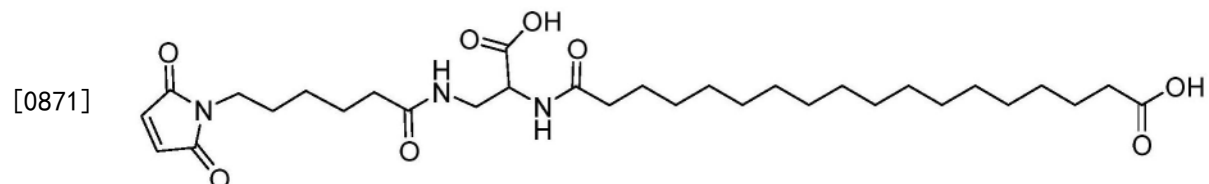
组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
2	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 C18-二酸部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
6	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 28a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 Mal-C18-二酸部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
7	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 29a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 Mal-C18-二酸部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
8	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 30a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 Mal-C18-二酸部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
9	7.5 mg/kg 的 Hif2 $\alpha$ RNAi 剂(AD04546), 其与结构 31a 的三齿整联蛋白靶向配体缀合, 并进一步包括与构建体连接的 Mal-C18-二酸部分, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0867] 合成具有针对靶向人Hif2 $\alpha$ 基因的核苷酸序列的RNAi剂,并且其包括在有义链的5'末端的官能化的胺反应性基团(NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)以促进缀合至整联蛋白靶向配体。

[0868] 合成具有PD调节剂的RNAi剂,所述PD调节剂称为“Mal-C18-二酸部分”,具有以下结构:



[0870] 其中表示在C6-S-基团处与RNAi剂的连接点,如AD05971(见实施例2)中指示的。PD调节剂通过还原C6-SS-C6基团缀合至有义链的3'末端,如表A中所示,其然后与以下化合物经历迈克尔加成:



[0872] 在每个组中三(3)只携带肿瘤的小鼠被给药(n=3)。在注射后研究第8天处死小鼠,和根据实施例4中所示的程序从肾肿瘤分离总RNA。相对人HIF2 $\alpha$ mRNA表达然后通过基于探针的定量PCR(RT-qPCR)定量,对人亲环蛋白A(PPIA)表达标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值,+/-95%置信区间),如实施例4中解释的。

[0873] 表16. 实施例12中处死时的平均相对Hif2 $\alpha$ mRNA表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.077	0.083
组 2 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, Mal-C18-二酸)	0.456	0.113	0.150
[0874] 组 6 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 28a 的三齿整联蛋白靶向配体, Mal-C18-二酸)	0.649	0.072	0.081
组 7 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 29a 的三齿整联蛋白靶向配体, Mal-C18-二酸)	0.426	0.054	0.062
组 8 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 30a 的三齿整联蛋白靶向配体, Mal-C18-二酸)	0.699	0.064	0.070
组 9 (7.5 mg/kg RNAi 剂-结构 31a 的三齿整联蛋白靶向配体, Mal-C18-二酸)	0.580	0.069	0.079

[0875] 如上表16所示,各Hif2 $\alpha$ RNAi剂-整联蛋白靶向配体缀合物显示与对照相比mRNA表达降低。

[0876] 实施例13. 在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0877] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$  (EPAS1)。

[0878] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0879] 表17. 实施例13中的小鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
[0880]		

1	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
4	5.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基因连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, 结构 2a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
5	5.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 32a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基因连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, 结构 32a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
6	5.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 33a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基因连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, 结构 33a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
7	5.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 34a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基因连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, 结构 34a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0881]

[0882] <sup>(i)</sup> avb3 靶向配体连接至 2'-O-炔丙基核苷酸 (在修饰的有义链序列中由 aA1k、gA1k 和 uA1k 表示), 其当在有义链序列上 5'→3' 阅读时位于有义链上的核苷酸 14、16、18 和 20 处。

[0883] 在每个组中三 (3) 只携带肿瘤的小鼠被给药 (n=3)。在注射后研究第 8 天处死小鼠, 和根据实施例 4 中所示的程序从肾肿瘤分离总 RNA。相对人 HIF2 $\alpha$  mRNA 表达然后通过基于探针的定量 PCR (RT-qPCR) 定量, 对人亲环蛋白 A (PPIA) 表达标准化和表示为媒介物对照组 (等渗葡萄糖) 的分数 (几何平均值, +/- 95% 置信区间), 如实施例 4 中解释的。

[0884] 表 18. 实施例 13 中处死时的平均相对 Hif2 $\alpha$  mRNA 表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
[0885] 组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.083	0.090
组 4 (5.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2a 的内部配体和 C-18-二酸 PD 调节剂)	0.245	0.048	0.059

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
[0886] 组 5 (5.0 mg/kg RNAi 剂-三齿结构 32a 的整联蛋白靶向配体, 三个结构 32a 的内部配体和 C-18-二酸 PD 调节剂)	0.213	0.065	0.094
组 6 (5.0 mg/kg RNAi 剂-三齿结构 33a 的整联蛋白靶向配体, 三个结构 33a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.603	0.117	0.146
组 7 (5.0 mg/kg RNAi 剂-三齿结构 34a 的整联蛋白靶向配体, 三个结构 34a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.528	0.067	0.077

[0887] 如上表18所示,各Hif2 $\alpha$ RNAi剂-整联蛋白靶向配体缀合物显示与对照相比在小鼠中mRNA表达降低,其中包括结构2a和结构32a的整联蛋白靶向配体的构建体显示最大的抑制活性。

[0888] 实施例14.在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0889] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$  (EPAS1)。

[0890] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0891] 表19.实施例14中的小鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
	1 等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
[0892]	2 2.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
	5 2.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 36a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, 结构 36a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
[0893]	6 2.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有整联蛋白靶向配体 SM37-avb3 的结构的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, SM37-avb3 靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0894] <sup>(i)</sup> Avb3靶向配体连接至2' -O-炔丙基核苷酸(在修饰的有义链序列中由aAlk、gAlk

和uA1k表示),其当在有义链序列上5' →3' 阅读时位于有义链上的核苷酸14、16、18和20处。

[0895] 在每个组中三(3)只携带肿瘤的小鼠被给药(n=3)。在注射后研究第8天处死小鼠,和根据实施例4中所示的程序从肾肿瘤分离总RNA。相对人HIF2 $\alpha$ mRNA表达然后通过基于探针的定量PCR(RT-qPCR)定量,对人亲环蛋白A(PPIA)表达标准化和表示为媒介物对照组(等渗葡萄糖)的分数(几何平均值, +/-95%置信区间),如实施例4中解释的。

[0896] 表20. 实施例14中处死时的平均相对Hif2 $\alpha$ mRNA表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.090	0.099
组 2 (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.362	0.021	0.022
组 5 (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 36a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 36a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.617	0.028	0.029
组 6 (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 37a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 37a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.375	0.081	0.103

[0898] 如上表20所示,各Hif2 $\alpha$ RNAi剂-整联蛋白靶向配体缀合物显示与对照相比mRNA表达降低。

[0899] 实施例15. 在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0900] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$ (EPAS1)。

[0901] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0902] 表21. 实施例15中的小鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
1	等渗葡萄糖(d5w (5%葡萄糖/水))(无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射



[0904]

2	2.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
3	4.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
6	2.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 38a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 38a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
7	4.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 38a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 38a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
8	2.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 39a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 39a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
9	4.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 39a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 39a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
10	2.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 40a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 40a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0905]	<p><b>11</b> 4.0 mg/kg 的 HIF-2 <math>\alpha</math> RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 40a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3' <math>\rightarrow</math> 5') 各自的 2' 位置, 结构 40a 的整联蛋白靶向配体内部连接<sup>(i)</sup>, 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。</p>	在第 1 天单次注射
	<p><b>12</b> 2.0 mg/kg 的 HIF-2 <math>\alpha</math> RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 41a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3' <math>\rightarrow</math> 5') 各自的 2' 位置, 结构 41a 的整联蛋白靶向配体内部连接<sup>(i)</sup>, 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。</p>	在第 1 天单次注射
	<p><b>13</b> 4.0 mg/kg 的 HIF-2 <math>\alpha</math> RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 41a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3' <math>\rightarrow</math> 5') 各自的 2' 位置, 结构 41a 的整联蛋白靶向配体内部连接<sup>(i)</sup>, 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。</p>	在第 1 天单次注射

[0906] <sup>(i)</sup> Avb3 靶向配体连接至 2' -O- 炔丙基核苷酸 (在修饰的有义链序列中由 aAlk、gAlk 和 uAlk 表示), 其当在有义链序列上 5'  $\rightarrow$  3' 阅读时位于有义链上的核苷酸 14、16、18 和 20 处。

[0907] 在每个组中三 (3) 只携带肿瘤的小鼠被给药 (n=3)。在注射后研究第 8 天处死小鼠, 并根据实施例 4 中所示的程序从肾肿瘤分离总 RNA。相对人 HIF2 $\alpha$  mRNA 表达然后通过基于探针的定量 PCR (RT-qPCR) 定量, 对人亲环蛋白 A (PPIA) 表达标准化和表示为媒介物对照组 (等渗葡萄糖) 的分数 (几何平均值, +/- 95% 置信区间), 如实施例 4 中解释的。

[0908] 表 22. 实施例 15 中处死时的平均相对 Hif2 $\alpha$  mRNA 表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.247	0.327
组 2 (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.286	0.037	0.043
组 3 (4.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.263	0.035	0.040
组 6 (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 38a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 38a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.655	0.050	0.054
组 7 (4.0 mg/kg RNAi 剂-结构 38a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 38a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.488	0.042	0.046

[0909]

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
<b>组 8</b> (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 39a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 39a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.609	0.065	0.073
<b>组 9</b> (4.0 mg/kg RNAi 剂-结构 39a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 39a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.518	0.050	0.055
<b>组 10</b> (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 40a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 40a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.805	0.113	0.132
<b>组 11</b> (4.0 mg/kg RNAi 剂-结构 40a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 40a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.738	0.091	0.104
<b>组 12</b> (2.0 mg/kg RNAi 剂-结构 41a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 41a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.978	0.082	0.090
<b>组 13</b> (4.0 mg/kg RNAi 剂-结构 41a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 41a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.779	0.106	0.123

[0911] 如上表22所示,各Hif2 $\alpha$ RNAi剂-整联蛋白靶向配体缀合物显示与对照相比在小鼠中mRNA表达降低。

[0912] 实施例16.在携带肾肿瘤的小鼠中体内施用与靶向HIF-2 $\alpha$ 的RNAi剂缀合的整联蛋白靶向配体

[0913] 根据本领域已知的和寡核苷酸合成中常用的一般程序,根据亚磷酰胺技术在固相上合成包括有义链和反义链的RNAi剂,如本文实施例2中所示。RNAi剂具有本文实施例2中所示的各自修饰的核苷酸序列和设计为靶向Hif2 $\alpha$  (EPAS1)。

[0914] 在研究第1天,根据以下给药组,携带肾肿瘤的小鼠(见实施例4)通过尾静脉注射给药:

[0915] 表23.实施例16中的小鼠给药组

组	RNAi 剂和剂量	给药方案
<b>1</b>	盐水(0.9%) (无 RNAi 剂)	在第 1 天单次注射
<b>2</b>	2.5 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5')各自的 2'位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3'末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0917]

3	5.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
4	10.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
5	2.5 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
6	5.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
7	10.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2.11a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
8	2.5 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
9	5.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射

[0918]	10.0 mg/kg 的 HIF-2 $\alpha$ RNAi 剂 AD05971, 其在有义链的 5' 末端与具有三个结构 2a 的整联蛋白靶向配体的三齿靶向基团连接, 其中在从与反义链形成碱基对的第一个核苷酸开始的核苷酸 2、4、6 和 8 (3'→5') 各自的 2' 位置, 结构 2a 的整联蛋白靶向配体内部连接 <sup>(i)</sup> , 并进一步在有义链的 3' 末端连接至 PD 调节剂 Mal-C18-二酸, 在等渗葡萄糖中配制。	在第 1 天单次注射
--------	--	------------

[0919] <sup>(i)</sup> Avb3 靶向配体连接至 2' -O- 炔丙基核苷酸 (在修饰的有义链序列中由 aA1k、gA1k 和 uA1k 表示), 其当在有义链序列上 5' → 3' 阅读时位于有义链上的核苷酸 14、16、18 和 20 处。

[0920] 四 (4) 只携带肿瘤的小鼠在每个组中给药 (n=4), 除了组 4 之外, 其仅具有三 (3) 只小鼠, 因为一只小鼠被认为具有缺陷注射。在注射后研究第 8 天处死小鼠, 和根据实施例 4 中所示的程序从肾肿瘤分离总 RNA。相对人 HIF2 $\alpha$  mRNA 表达然后通过基于探针的定量 PCR (RT-qPCR) 定量, 对人亲环蛋白 A (PPIA) 表达标准化和表示为媒介物对照组 (等渗葡萄糖) 的分数 (几何平均值, +/- 95% 置信区间), 如实施例 4 中解释的。

[0921] 表 24. 实施例 16 中处死时的平均相对 Hif2 $\alpha$  mRNA 表达

组 ID	平均相对 huHIF2 $\alpha$ mRNA 表达	低 (误差)	高 (误差)
[0922] 组 1 (等渗葡萄糖)	1.000	0.180	0.220
组 2 (2.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.278	0.068	0.091
组 3 (5.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.229	0.062	0.086
组 4 (10.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.202	0.014	0.015
组 5 (2.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.324	0.035	0.040
组 6 (5.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.308	0.018	0.019
组 7 (10.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2.11a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2.11a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.197	0.041	0.052
组 8 (2.5 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.218	0.048	0.062
组 9 (5.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.160	0.065	0.109
组 10 (10.0 mg/kg RNAi 剂-结构 2a 的三齿整联蛋白靶向配体, 三个结构 2a 的内部配体和 C-18-二酸)	0.276	0.053	0.066

[0923] 如上表 24 所示, 各 Hif2 $\alpha$  RNAi 剂-整联蛋白靶向配体缀合物显示与对照相比在小鼠中 mRNA 表达降低。

[0924] 其它实施方案

[0925] 应当理解,尽管已经结合本发明的详细描述对本发明进行了描述,但是前面的描述旨在举例说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其它方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

## 序列表

- <110> ARROWHEAD PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> 整联蛋白靶向配体和其用途
- <130> 30657-W01
- <150> 62/663, 763
- <151> 2018-04-27
- <150> 62/790, 372
- <151> 2019-01-09
- <160> 6
- <210> 1
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 智人
- [0001] <220>
- <223> RNAi 剂反义链修饰序列
- <400> 1
- uuucaugaaa ucguuacguu g 21
- <210> 2
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> RNAi 剂有义链修饰序列
- <400> 2
- caacguaacg auucaugaa a 21
- <210> 3
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> 人工序列

	<220>		
	<223>	RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400>	3	
		uuucaugaaa ucguuacguu g	21
	<210>	4	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400>	4	
		caacguaacg auucaugaa a	21
[0002]	<210>	5	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	RNAi 剂反义链修饰序列	
	<400>	5	
		uuucaugaaa ucguuacguu g	21
	<210>	6	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	RNAi 剂有义链修饰序列	
	<400>	6	
		caacguaacg auucaugaa a	21