

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年10月27日 (27.10.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/222993 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 47/54 (2017.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/088173
- (22) 国际申请日: 2022年4月21日 (21.04.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110442394.6 2021年4月23日 (23.04.2021) CN
- (71) 申请人: 南开大学 (NANKAI UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国天津市南开区卫津路94号, Tianjin 300071 (CN)。
- (72) 发明人: 席真 (XI, Zhen); 中国天津市南开区卫津路94号, Tianjin 300071 (CN)。 杨超 (YANG, Chao); 中国天津市南开区卫津路94号, Tianjin 300071 (CN)。
- (74) 代理人: 北京润平知识产权代理有限公司 (RUNPING & PARTNERS); 中国北京市海

淀区北四环西路9号银谷大厦515室, Beijing 100190 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) Title: CONJUGATE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 缀合物及其制备方法和用途

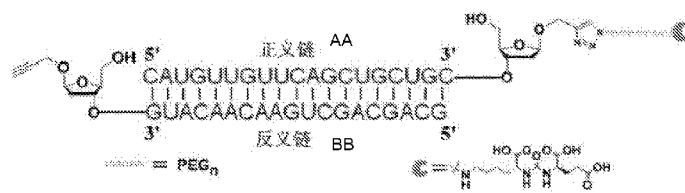


图1

AA Sense strand
BB Antisense strand

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biotechnology, and disclosed are a conjugate, a preparation method therefor and a use thereof. The conjugate is formed by covalently linking an azide-modified targeting ligand to a propargyl-modified small nucleic acid sequence. The conjugate provided in the present invention has broad application prospects in drug targeted delivery. In addition, the present invention also provides a preparation method for the conjugate and a use thereof. The method only relates to simple chemical reactions, can achieve the purpose of flexibly and efficiently synthesizing a nucleic acid conjugate, is suitable for constructing other multiple ligand-targeted nucleic acid conjugates, and has relatively good practicability.

(57) 摘要: 本发明涉及生物技术领域, 公开了一种缀合物及其制备方法和用途。该缀合物由叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列共价连接而成。本发明提供的缀合物在药物靶向递送中具有广阔的应用前景。另外本发明还提供了一种制备所述缀合物的方法和用途, 该方法仅涉及简单的化学反应, 能够实现灵活、高效合成核酸缀合物的目的, 并且适用于构建其他多种配体靶向核酸缀合物, 具有较好的实用性。

WO 2022/222993 A1

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列列表部分(细则5.2(a))。

缀合物及其制备方法和用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2021 年 04 月 23 日提交的中国专利申请 202110442394.6 的权益，该申请的内容通过引用被合并于本文。

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种缀合物及其制备方法和用途。

背景技术

前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 又称为叶酸水解酶 1 (FOLH1)、谷氨酸羧肽酶 II (GCP II)、N-乙酰化- α -连接酸性二肽酶 I (NAALAD1)，它属于肽酶 M28 家族中的 M28B 亚家族。PSMA 是一种结构为同型二聚体的 II 型跨膜蛋白，每个亚基能够结合 2 个锌离子。PSMA 既具有叶酸水解酶又具有 N-乙酰化- α -连接的酸性二肽酶 (NAALADase) 活性，其作用是调节 N-乙酰基聚 γ -谷氨酸及其衍生物的水解。相对于其他组织，PSMA 在神经系统、前列腺、胰腺、肾脏和小肠中表达较高，并且在大多数前列腺癌的上皮层以及其他实体瘤的新生血管中表达量远高出正常组织的表达量。这种组织特异性使得 PSMA 成为前列腺癌递送最有吸引力的靶标之一。

由于 PSMA 在前列腺癌细胞中的高度富集，特异性识别 PSMA 的抗体、适体和小分子配体被竞相研究开发。其中，由于合成的简单性以及较高的蛋白结合亲和力，PSMA 的小分子配体的研究一直备受关注。作为一种 PSMA 的小分子配体，赖氨酸和谷氨酸通过脲基连接而形成的二肽 (KUE) 已被成功地用于前列腺癌的成像及靶向治疗中。另外，RNA 干扰 (RNAi) 是一种使用 siRNA 等治疗性寡核苷酸治疗包括癌症在内的各种疾病的新型技术。受到美国食品药品监督管理局 (FDA) 对 Patisiran 和 Givosiran 的批准的鼓舞，RNAi 在治疗前列腺癌上也备受瞩目。而且，Givosiran 的获批使得配体与 siRNA 的直接连接形成的缀合物成为靶向治疗肿瘤的一种简单、有效的新途径。但是，如何将治疗性 siRNA 有效地递送到前列腺癌组织/细胞中继而实现癌症的治疗仍然是一个巨大的挑战。此外，如何突破 Givosiran 所采用的固相合成法的局限 (比如灵活性较差、操作繁琐、合成效率不理想、适用范围窄等) 也是 RNAi 疗法急需解决的关键问题。

发明内容

本发明的目的是为了克服现有技术存在的制备核酸缀合物灵活性差、操作繁琐、生产规模小等技术问题，提供一种缀合物及其制备方法，该缀合物兼具靶向性高与活性高的双重特点。并且，本发明提供的方法具有快速、高效、简便、适用范围广的优势。此外，本发明还提供本发明制备的核酸缀合物在制备用于治疗前列腺癌、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肾脏疾病和神经系统相关疾病中任意一种疾病的药物中的应用，特别是用于治疗前列腺癌的药物中的应用。

为了实现上述目的，本发明第一方面提供一种缀合物，该缀合物由叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列共价连接而成。

本发明第二方面提供一种制备前述缀合物的方法，该方法包括：在一价铜催化剂的存在下，使叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列进行接触。

本发明第三方面提供一种前述缀合物或前述方法制备的缀合物在制备用于治疗表达 PSMA 的组织出现异常导致的相关疾病的药物中的应用，所述疾病优选发生在腺体组织、结肠、肾脏和神经系统中；其中，所述腺体组织选自前列腺、胰腺、乳腺和胸腺中的一种。

本发明通过炔丙基修饰的寡核酸（特别是在 3'-末端修饰）以及叠氮修饰的靶向配体的巧妙设计，并且利用本发明的方法（即合成后修饰策略（铜催化的点击化学））高效、快速地构建本发明的核酸缀合物。通过细胞成像、基因沉默评价以及细胞凋亡实验，发现本发明提供的缀合物（核酸缀合物）具有较高的特异性识别性能、基因沉默性能、抑制肿瘤细胞生成性能。本发明提供的制备缀合物（核酸缀合物）的方法在 RNAi 治疗试剂的靶向递送及治疗中具有广阔的应用前景。另外，本发明提供的制备方法仅涉及简单的化学反应，能够实现灵活、高效合成核酸缀合物，并且也适用于构建其他多种配体靶向核酸缀合物，具有较好的实用性。

附图说明

图 1 是本发明中 KUE 缀合的小核酸示意图；

图 2 是本发明中 3'-末端炔丙基修饰的寡核酸 1 (ON1) 的高效液相色谱谱图及质谱图；

图 3 是本发明中 3'-末端炔丙基修饰的寡核酸 2 (ON2) 的高效液相色谱谱图及质谱图；

图 4 是本发明中 3'-末端炔丙基修饰的寡核酸 3 (ON3) 的高效液相色谱谱图及质谱图；

图 5 是本发明中不同的 KUE-PEG-siRNA 缀合物的聚丙烯酰胺凝胶电泳表征图；

图 6 是本发明中不同的 DUPA-PEG₅-siRNA 缀合物的聚丙烯酰胺凝胶电泳表征图；

图 7 是本发明实施例 1 中核酸缀合物 KUE-PEG₂-siRNA 质谱图；

图 8 是本发明实施例 21 中核酸缀合物 KUE-PEG₅-siRNA 质谱图；

图 9 是本发明实施例 22 中核酸缀合物 KUE-PEG₁₂-siRNA 质谱图；
图 10 是本发明实施例 23 中核酸缀合物 DUPA-PEG₅-siRNA 质谱图；
图 11 是本发明实施例 24 中核酸缀合物 DUPA-PEG₅-siRNA 质谱图；
图 12 是本发明一种具体实施方式中不同核酸缀合物的细胞成像效果图；
图 13 是本发明一种具体实施方式中不同核酸缀合物的细胞内平均荧光强度统计图；
图 14 是本发明一种具体实施方式中不同核酸缀合物的细胞内化方式评价效果图；
图 15 是本发明一种具体实施方式中不同核酸缀合物在前列腺癌细胞的摄入效率评价图；
图 16 是本发明一种具体实施方式中不同核酸缀合物的 mRNA 沉默效果图；
图 17 是本发明一种具体实施方式中不同核酸缀合物的蛋白表达抑制效果图；
图 18 是本发明中不同核酸缀合物促进细胞凋亡的效果图。

具体实施方式

在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值，这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说，各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间，以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围，这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

发明人经大量的研究发现，通过叠氮修饰的靶向配体（例如叠氮修饰的 KUE 配体、叠氮修饰的 DUPA 配体等）与 3'-末端的炔丙基修饰的小核酸（寡核酸）可灵活、高效地构建抗原（如 PSMA）靶向的 siRNA 缀合物。并且，为了验证 3'-末端炔丙基修饰小核酸是否能够保持热稳定性、整体构象以及 RNAi 活性，发明人对 3'-末端炔丙基修饰小核酸的相关性质进行了研究，例如融链温度、构象以及 RNAi 活性评价等方面的研究，发现在 siRNA 的 3'-末端进行炔丙基修饰的不但不会影响 RNA 固有性质，而且凸显了该 siRNA 在合成后修饰属性。

基于以上内容，本发明第一方面提供一种缀合物，该缀合物由叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列共价连接而成。

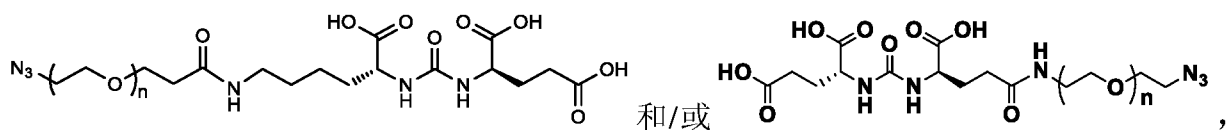
根据本发明的一些实施方式，所述叠氮修饰的靶向配体中叠氮基团与靶向配体通过至少一个聚乙二醇的片段共价连接。其中，聚乙二醇的片段中聚乙二醇单体数量没有特别的限定，例如可以为 1-100。其中，所述聚乙二醇的片段主要起连接作用。

根据本发明的一些实施方式，所述靶向配体为至少一种氨基酸为谷氨酸的两个氨基酸形成的二肽；优选地，所述氨基酸选自赖氨酸和谷氨酸、谷氨酸和谷氨酸以及谷氨酸和谷氨酸类似物；其中，所述靶向配体能够通过谷氨酸识别并结合靶细胞表面表达的抗原；所述抗原为 PSMA。

根据本发明的一些实施方式，所述靶向配体的末端含有羧基；所述靶向配体通过羧基与靶细胞表面的抗原相连。

根据本发明的一些实施方式，所述靶细胞可以选自前列腺癌细胞、神经元细胞、肾癌细胞和结肠癌细胞中的至少一种。

根据本发明的一些实施方式，所述叠氮修饰的靶向配体具有如下所示的结构：



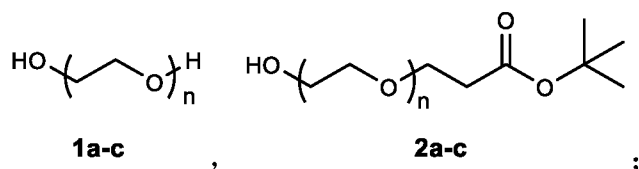
其中 n 为 1-100 的整数。优选 n 为 1-50 的整数，更优选为 1-20 的整数，进一步优选为 1-15 的整数。例如可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15。

本发明中，所述叠氮修饰的靶向配体可以通过如下方法制备：

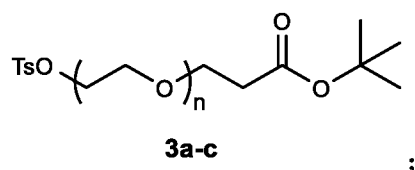
首先，先将叔丁酯、苄酯保护的赖氨酸与叔丁酯保护的谷氨酸通过三光气连接合成 KUE；之后乙二醇经过丙烯酸化、叠氮化得到叠氮基 PEG 丙酸；最后，两者（KUE 和叠氮基 PEG 丙酸）可以通过缩合反应得到所述靶向配体。

本发明中，优选地，所述叠氮修饰的靶向配体（**6a**($n=2$)、**6b**($n=5$)、**6c**($n=12$)）可以按照如下步骤制备：

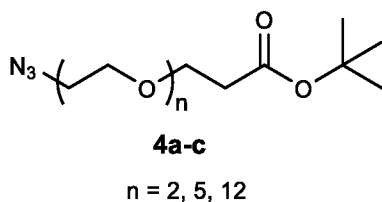
(1) 使聚乙二醇 **1a-c** 与金属钠接触，再与丙烯酸叔丁酯进行第一反应，得到 **2a-c** 所示的化合物；



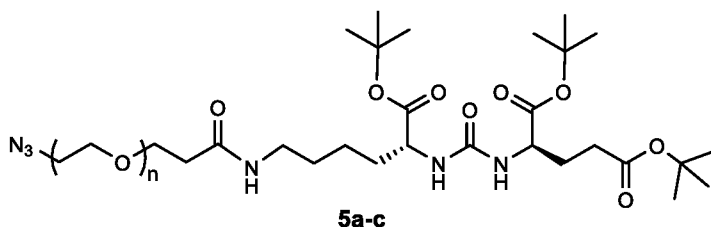
(2) 在三乙胺的存在下，使式 **2a-c** 所示的化合物与甲苯磺酰氯进行第二反应得到式 **3a-c** 所示的化合物；



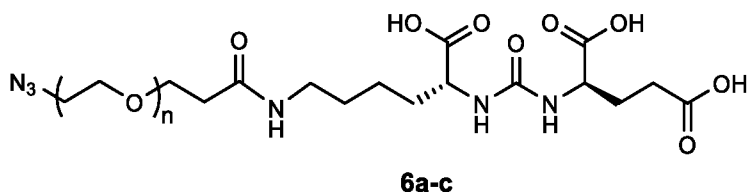
(3) 在第三溶剂的存在下，使式 **3a-c** 所示的化合物与叠氮化钠进行第三反应，得到式 **4a-c** 所示的化合物；



(4) 在 HATU (2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯) 与 DIPEA (N,N-二异丙基乙胺) 的存在下, 使 **4a-c** 所示的化合物与 KUE 进行第四反应, 得到式 **5a-c** 所示的化合物;



(5) 使式 **5a-c** 所示的化合物与三氟乙酸进行第五反应, 得到式 **6a-c** 所示的化合物;



在步骤 (1) 中, 所述第一反应的反应温度可以 20-40°C, 反应时间可以为 5-20 小时。其中, 相对于每毫米尔的聚乙二醇 (**1a-c**), 金属钠的用量可以为 0.05-2mmol, 丙烯酸叔丁酯的用量可以为 0.3-0.8mmol。所述第一反应在第一溶剂的存在下进行; 其中, 相对于每毫米尔的聚乙二醇, 所述第一溶剂的用量可以为 1-2mL; 所述第一溶剂可以为四氢呋喃。

步骤 (2) 中, 所述第二反应的反应温度可以为 -20°C 至 10°C, 反应时间可以为 5-20 小时。其中, 相对于每毫米尔的式 **2a-c** 所示的化合物, 三乙胺的用量为 0.5-1mL, 对甲苯磺酰氯的用量可以为 1.2-1.8mmol。所述第二反应在第二溶剂的存在下进行; 其中, 相对于每毫米尔的式 **2a-c** 所示的化合物, 所述第二溶剂的用量可以为 1-3mL。其中, 所述第二溶剂可以为二氯甲烷。所述第二反应优选在惰性气氛下进行, 所述惰性气氛可以由氩气提供。

步骤 (3) 中, 所述第三反应的反应温度可以为 60-90°C, 反应时间可以 5-24 小时。其中, 相对于每毫米尔的式 **3a-c** 所示的化合物, 叠氮化钠的用量可以为 1.2-1.8mmol。其中, 相对于每毫米尔的式 **3a-c** 所示的化合物, 所述第三溶剂的用量可以为 2-3mL。所述第三溶剂可以为 DMF (N,N 二甲基甲酰胺)。

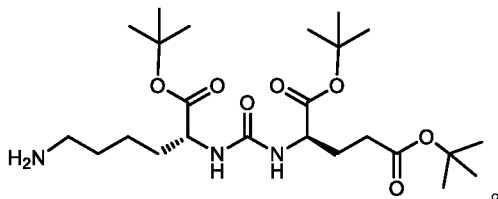
步骤 (4) 中, 所述第四反应的反应温度可以为 20-40°C, 反应时间可以为 5-24 小时。其中, 相对于每毫米尔的式 **4a-c** 所示的化合物, KUE 的用量可以为 0.9-1.5mmol。其中, 在

4a-c 所示的化合物与 KUE 进行第四反应之前，可以先在三氟乙酸（相对于 1mol 的 4a-c 所示的化合物，三氟乙酸的用量为 2-3mL）的存在下，使 4a-c 所示的化合物脱保护，其中，所述脱保护的温度可以为 20-30°C，时间为 10-24h；之后可以用 HATU 与 DIPEA 对 4a-c 所示的化合物的脱保护产物进行活化处理；其中，相对于每毫米尔的式 4a-c 所示的化合物，HATU 和 DIPEA 的用量可以分别为 1.2-1.8mmol 和 2-4mmol。所述第四反应在第四溶剂的存在下进行；其中，相对于每毫米尔的式 4a-c 所示的化合物，所述第四溶剂的用量可以为 0.8-1.5mL。所述第四溶剂可以为 DMF（N,N 二甲基甲酰胺）。

步骤（5）中，所述第五反应的反应温度可以为 20-40°C，反应时间可以为 5-24 小时。其中，相对于每毫米尔的式 5a-c 所示的化合物，三氟乙酸的用量可以为 20-30mL。

其中，对步骤（1）-（5）中的反应的后处理没有特别的限定，均可以通过柱层析分离得到纯化产物。

本发明中，KUE 的结构式如下所示：

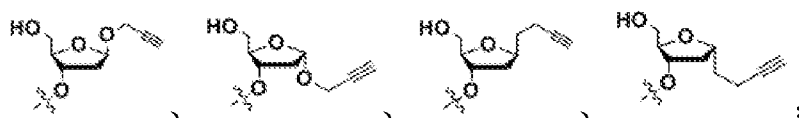


根据本发明的一些实施方式，所述小核酸序列可以选自靶向 STAT3、PHB1、Notch1、PLK1 和 BRD4 的小核酸中的至少一种。

根据本发明优选的实施方式，所述炔丙基修饰优选为 3'-末端炔丙基修饰。

根据本发明的一些实施方式，所述炔丙基修饰的小核酸序列采用亚磷酰胺法通过固相合成技术将炔丙基化合物修饰到小核酸序列的 3'-末端；其中，所述炔丙基化合物至少含有一个活性羟基。其中，所述炔丙基修饰可以为多个炔丙基修饰（1 个、2 个、3 个……）。本发明中，对于将炔丙基化合物修饰到小核酸序列的 3'-末端的方式不做特别的限定，可以通过如下方式进行：首先，基于现有技术（Bioorg. Med. Chem., 2013, 5583-5588），以商业化的霍夫氯糖为原料历经 4 步反应合成 1-O-炔丙基-2-脱氧-D-呋喃糖亚磷酰胺单体；然后，得到的亚磷酰胺单体与固相载体（CPG）连接后通过自动核酸合成仪将炔丙基单体 X 寡核苷酸的 3'-末端；最后，脱除 CPG 以及保护基得到 3'-末端炔丙基修饰的小核酸。

本发明中，优选地，所述炔丙基化合物具有如下所示的结构：



其中，“~”表示小核酸连接位点。

本发明第二方面提供一种制备前述缀合物的方法，该方法包括：在一价铜催化剂的存在下，使叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列进行接触。

根据本发明的一些实施方式，所述叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列的摩尔比可以为 (1.05-10) : 1，优选为 (2-4) : 1。

根据本发明的一些实施方式，所述一价铜催化剂可以选自 Cu(I)-TBTA、CuBr 和 CuCl 中的至少一种，优选为 Cu(I)-TBTA。

根据本发明的一些实施方式，相对于 1mol 的小核酸序列，所述一价铜催化剂的用量可以为 2-10mol，优选为 3-6mol。

根据本发明的一些实施方式，所述接触的条件包括：温度为 35.5-38.5°C，优选为 36.5-37.5°C；时间为 1-5h，优选为 2-4h。

本发明中，所述接触中，对转速没有特别的限定，只要能够满足本发明的需求即可，例如转速可以为 600-1000r/min，优选为 700-900r/min。

本发明中，所述接触优选在震荡的条件下进行，所述震荡的条件可以为：每隔 0.4-0.6h 震荡一次。

根据本发明的一些实施方式，所述接触在有机溶剂的存在下进行，所述有机溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、甲醇、乙醇和丙酮中的至少一种。

根据本发明的一些实施方式，所述有机溶剂的用量使得所述小核酸序列的浓度维持在 20-200 μ M，优选为 80-120 μ M。

本发明中，所述缀合物可以指单链核酸缀合物或双链核酸缀合物；当所述缀合物为双链核酸缀合物时，可以参照本领域常规的方式由正义链核酸和反义链核酸经退火形成双链核酸缀合物，例如将正义链核酸和反义链核酸以等摩尔的比例在退火缓冲液(含镁离子)中，90-100°C 下形成。

根据本发明的一些实施方式，所述小核酸序列为包括正义链和反义链的 siRNA 序列，所述方法包括：

- (1) 分别获得炔丙基修饰的正义链和炔丙基修饰的反义链；
- (2) 将叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的正义链或炔丙基修饰的反义链接触，得到单链缀合物；
- (3) 将单链缀合物与另一条链在退火缓冲液中 90-100°C 条件下孵育 1-5 分钟得到所述缀合物；

根据本发明优选的实施方式，所述退火缓冲液选自所述退火缓冲液选自 1.5-2.5mM 的醋酸镁溶液。

本发明第三方面提供一种前述缀合物或前述方法制备的缀合物在制备用于治疗表达 PSMA 的组织出现异常导致的相关疾病的药物中的应用，所述疾病优选发生在腺体组织、结肠、肾脏和神经系统中；其中，所述腺体组织选自前列腺、胰腺、乳腺和胸腺中的一种。其中，所述疾病优选为癌症。

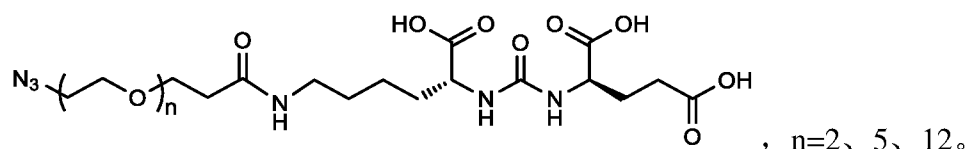
本发明中，“缀合物”指的是“KUE-PEG-siRNA 缀合物”或“DUPA-PEG-siRNA 缀合物”。

以下将通过实施例对本发明进行详细描述。

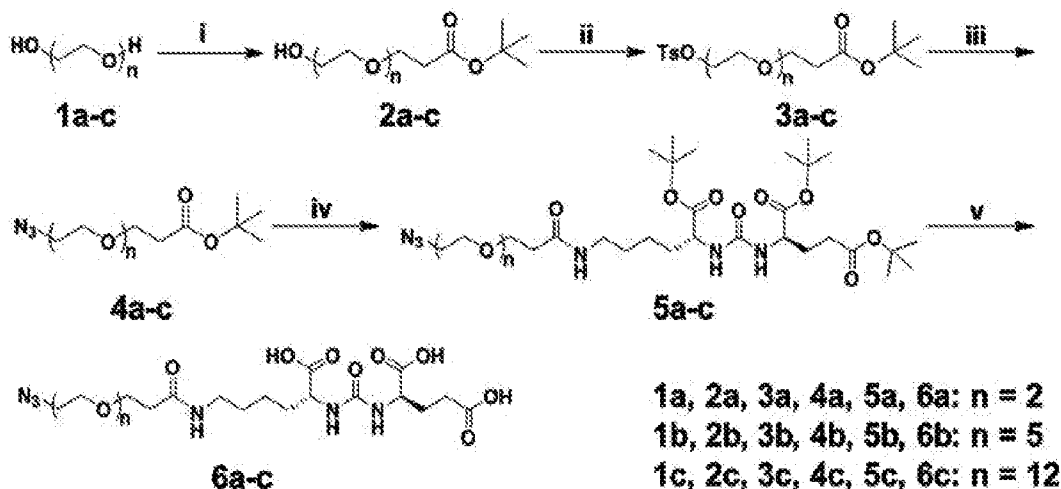
以下实施例中，所有的原料为市售品。

制备例 1

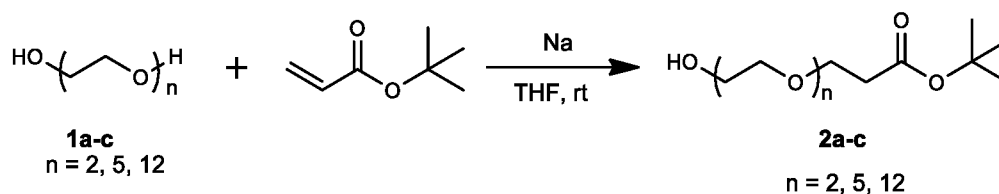
本制备例用于说明叠氮修饰的 KUE 配体 **6a-c** 的制备



合成路线一：

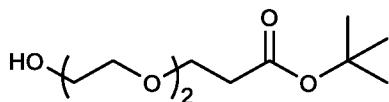


具体操作步骤：

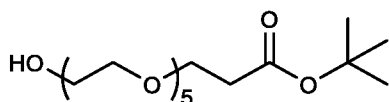


(i) 将聚乙二醇 **1a-c** (100mmol, 1eq) 溶解于干燥 THF (150mL) 中，向其中加入金属钠 (230mg, 10mmol, 0.1eq)，室温下搅拌直至钠完全溶解。随后，向混合液中缓慢滴加丙烯酸叔丁酯 (6.4g, 50mmol, 0.5eq)，并在室温下反应 12 小时。反应结束后，加入 8mL 的 1M 盐酸水溶液淬灭反应。搅拌 10 分钟后，将反应液倒进 200mL 饱和食盐水，用乙酸乙酯萃取 3

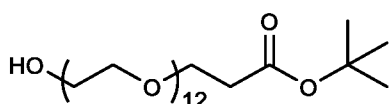
次,收集有机相,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,快速柱色谱分离纯化(PE/EA=10:1-1:1)得到微黄色单叔丁酯产物。



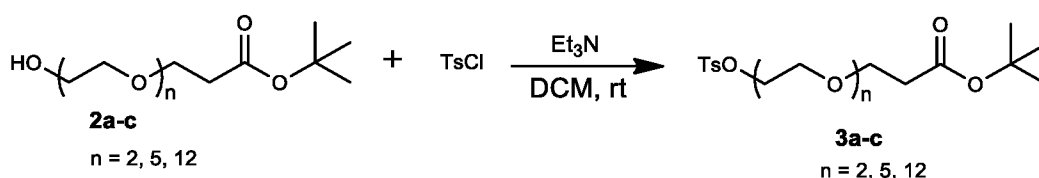
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.77 – 3.70 (m, 4H), 3.69 – 3.59 (m, 6H), 2.78 (s, 1H), 2.54 – 2.49 (m, 2H), 1.45 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 170.92, 80.63, 72.49, 70.33, 70.31, 66.81, 61.70, 36.14, 28.05. HRMS: calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 257.1365, found 257.1357.



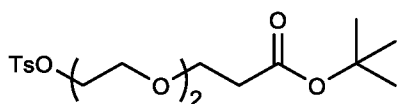
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.79 – 3.59 (m, 22H), 2.91 (s, 1H), 2.53 – 2.48 (m, 2H), 1.45 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 170.93, 80.51, 72.52, 70.61, 70.59, 70.56, 70.54, 70.48, 70.33, 66.88, 61.72, 36.24, 28.09. HRMS: calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{NaO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 389.2151, found 389.2146.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.76 – 3.54 (m, 49H), 2.77 (s, 2H), 2.53 – 2.48 (m, 2H), 1.45 (d, $J = 2.4$ Hz, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 170.94, 80.53, 72.58, 70.61, 70.57, 70.51, 70.37, 70.29, 66.90, 61.71, 36.26, 28.10. HRMS: calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{62}\text{NaO}_{15}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 697.3986, found 697.3981.

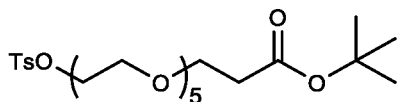


(ii) 合物 **2a-c** (12.3mmol, 1eq) 溶于 30mL 二氯甲烷和 10mL 三乙胺的混合物中,并在氩气氛围下,冰浴中搅拌。然后,分批加入 (3.53g, 18.5mmol, 1.5eq) 对甲苯磺酰氯。混合物在室温搅拌过夜,然后,加入 10g 少量硅胶 (100-200 目) 浓缩至干,并在硅胶 (300-400 目) 上进行色谱分离 (PE/EA=10:1-1:3), 产物为无色油状物。

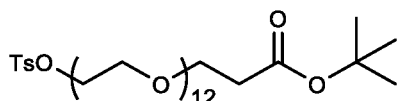


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.19 – 4.11 (m, 2H), 3.67 (dd, $J = 8.0, 4.8$ Hz, 4H), 3.55 (q, $J = 4.8$ Hz, 4H), 2.47 (dd, $J = 12.4, 6.0$ Hz, 5H), 1.44 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 170.81, 144.80, 132.99, 129.82, 127.95, 80.50, 70.60,

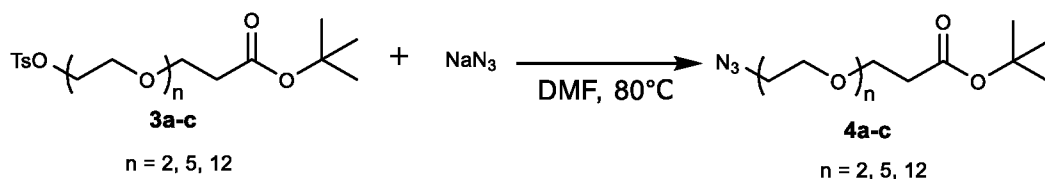
70.29, 69.26, 68.64, 66.88, 36.21, 28.07, 21.61. HRMS: calculated for $C_{18}H_{28}NaO_7S$ $[M+Na]^+$: 411.1453, found 411.1448.



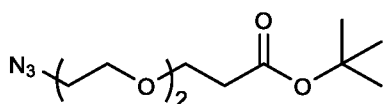
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85 – 7.74 (m, 2H), 7.37 – 7.33 (m, 2H), 4.24 – 4.08 (m, 2H), 3.83 – 3.51 (m, 20H), 2.59 – 2.36 (m, 5H), 1.45 (d, $J = 5.6$ Hz, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.89, 144.78, 133.02, 129.82, 127.98, 80.49, 70.74, 70.58, 70.51, 70.36, 69.24, 68.67, 66.89, 36.27, 28.09, 21.64. HRMS: calculated for $C_{24}H_{40}NaO_{10}S$ $[M+Na]^+$: 543.2240, found 543.2246.



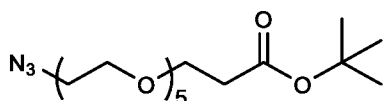
1H -NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.83 – 7.74 (m, 2H), 7.49 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 4.13 – 4.10 (m, 2H), 3.64 – 3.29 (m, 48H), 2.43 (s, 5H), 1.40 (s, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.87, 145.34, 132.88, 130.59, 128.10, 80.15, 70.44, 70.25, 70.17, 70.14, 68.35, 66.69, 36.29, 28.20, 21.55. HRMS: calculated for $C_{38}H_{68}NaO_{17}S$ $[M+Na]^+$: 851.4075, found 851.4071.



(iii) 将化合物 **3a-c** (2mmol, 1eq) 溶于 5mL 二甲基甲酰胺中, 并加入叠氮化钠 (195mg, 3mmol, 1.5eq)。混合物在 80°C 条件下反应过夜, 然后, 加入 2g 少量硅胶 (100-200 目) 浓缩至干, 并在硅胶 (300-400 目) 上进行色谱分离 (PE/EA=20:1-1:2), 产物为无色油状物。

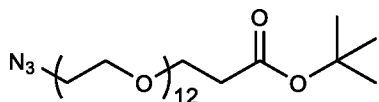


1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.76 – 3.60 (m, 8H), 3.42 – 3.35 (m, 2H), 2.51 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.45 (s, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.84, 80.45, 70.56, 70.38, 70.00, 66.92, 50.64, 36.22, 28.04. HRMS: calculated for $C_{11}H_{21}N_3NaO_4$ $[M+Na]^+$: 282.1430, found 282.1426.

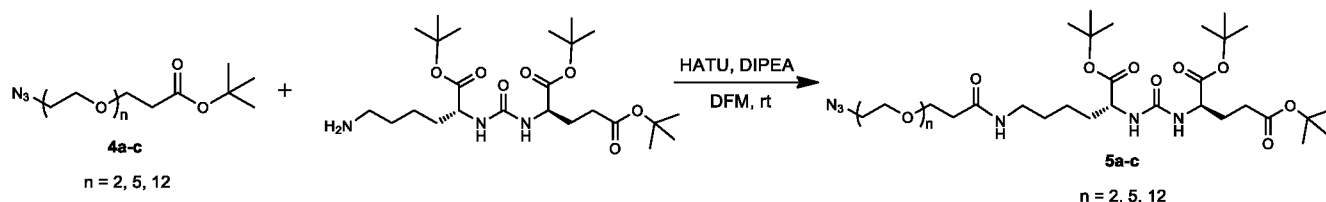


1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.77 – 3.58 (m, 20H), 3.47 – 3.30 (m, 2H), 2.50 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.45 (s, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.92, 80.51, 70.70, 70.67, 70.64, 70.59, 70.50,

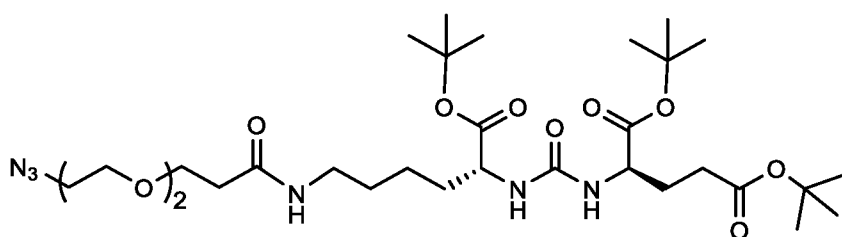
70.37, 70.04, 66.90, 50.68, 36.26, 28.09. HRMS: calculated for $C_{17}H_{33}N_3NaO_7$ $[M+Na]^+$: 414.2216, found 414.2211.



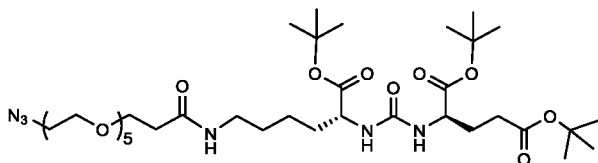
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.75 – 3.57 (m, 48H), 3.40 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.53 – 2.48 (m, 2H), 1.45 (d, $J = 2.4$ Hz, 9H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.91, 80.49, 70.69, 70.66, 70.63, 70.56, 70.49, 70.36, 70.04, 66.88, 50.67, 36.25, 28.09. HRMS: calculated for $C_{31}H_{61}N_3NaO_4$ $[M+Na]^+$: 722.4051, found 722.4048.



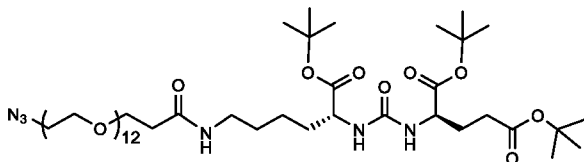
(iv) 将化合物 **4a-c** (2mmol, 1eq) 溶于 5mL 三氟乙酸中, 在室温下反应过夜, 然后, 浓缩除去剩余的三氟乙酸, 加入二氯甲烷和 2g 硅胶(100-200 目)浓缩至干, 并在硅胶(300-400 目)上进行色谱分离 (PE/EA=5:1-1:5), 产物为无色油状物, 并溶于 2mL 二甲基甲酰胺中。加入 HATU (1.15g, 3mmol, 1.5eq) 以及 DIPEA (775.5mg, 6mmol, 3eq) 进行活化。15min 后, 加入 KUE(1.17g, 2.4mmol, 1.2eq)。混合物在室温下反应过夜, 然后, 加入 3g 少量硅胶(100-200 目)浓缩至干, 并在硅胶 (300-400 目) 上进行色谱分离 (PE/EA=10:1-1:5), 产物为无色油状物。



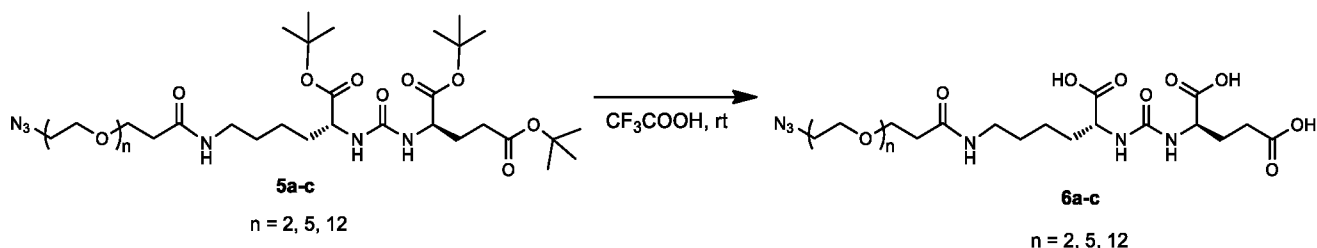
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.87 (s, 1H), 5.64 (dd, $J = 20.0, 6.4$ Hz, 2H), 4.38 – 4.17 (m, 2H), 3.71 (d, $J = 28.0$ Hz, 7H), 3.44 (s, 2H), 3.34 – 3.12 (m, 2H), 2.52 (s, 2H), 2.32 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.06 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 1.84 (dd, $J = 32.0, 25.2$ Hz, 2H), 1.67 – 1.23 (m, 33H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.58, 172.52, 157.40, 82.17, 81.66, 80.67, 70.19, 70.00, 69.76, 67.35, 53.35, 52.99, 50.56, 38.84, 36.42, 32.02, 31.55, 28.63, 28.04, 27.96, 22.23. HRMS: calculated for $C_{31}H_{56}N_6NaO_{10}$ $[M+Na]^+$: 695.3956, found 695.3953.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.05 (s, 1H), 5.78 (dd, $J = 16.4, 8.0$ Hz, 2H), 4.38 – 4.17 (m, 2H), 3.71 (d, $J = 29.2$ Hz, 15H), 3.41 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.26 (dd, $J = 23.2, 17.2$ Hz, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.50 (s, 1H), 2.32 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.05 (s, 1H), 1.91 – 1.70 (m, 2H), 1.69 – 1.17 (m, 36H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 172.21, 161.56, 157.58, 157.41, 81.74, 81.19, 80.34, 70.47, 70.45, 70.41, 70.37, 70.35, 70.28, 70.18, 70.01, 69.87, 67.24, 53.35, 52.83, 50.54, 45.11, 39.74, 38.74, 36.60, 32.17, 31.92, 31.47, 29.03, 28.70, 28.20, 27.97, 27.91, 22.55, 22.31. HRMS: calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{NaO}_{13}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 827.4742, found 827.4738.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (s, 1H), 5.57 (s, 2H), 4.26 (d, $J = 20.4$ Hz, 2H), 3.67 (s, 45H), 3.41 (s, 2H), 3.21 (d, $J = 16.8$ Hz, 2H), 2.99 (s, 1H), 2.53 (s, 1H), 2.32 (s, 2H), 2.05 (s, 1H), 1.80 (d, $J = 44.4$ Hz, 1H), 1.65 – 1.18 (m, 36H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 172.41, 157.42, 81.87, 81.44, 80.50, 70.37, 70.21, 70.05, 69.99, 69.82, 69.71, 69.62, 69.49, 69.37, 53.47, 53.02, 50.61, 38.87, 31.97, 31.55, 28.20, 28.06, 27.98, 22.31. HRMS: calculated for $\text{C}_{51}\text{H}_{96}\text{N}_6\text{NaO}_{20}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1135.6577, found 1135.6569.



(v) 将化合物 **5a-c** (0.2mmol, 1eq) 溶于 5mL 三氟乙酸中, 在室温下反应过夜, 然后, 浓缩除去剩余的三氟乙酸, 加入二氯甲烷和 1g 少量硅胶 (100-200 目) 浓缩至干, 并在硅胶 (300-400 目) 上进行色谱分离 ($\text{DCM}/\text{MeOH}=10:1-1:2$), 产物为无色油状物。对 **6a-c** 所示的化合物进行高分辨质谱确认。

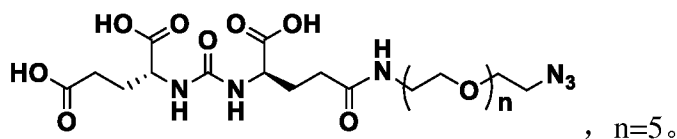
6a: 145mg, Yield 96%, HRMS: calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{10}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 503.2102; MALDI-TOF-MS: m/z 503.2105;

6b: 179mg, Yield 94%, HRMS: calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{13}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 635.2888; MALDI-TOF-MS: m/z 635.2892;

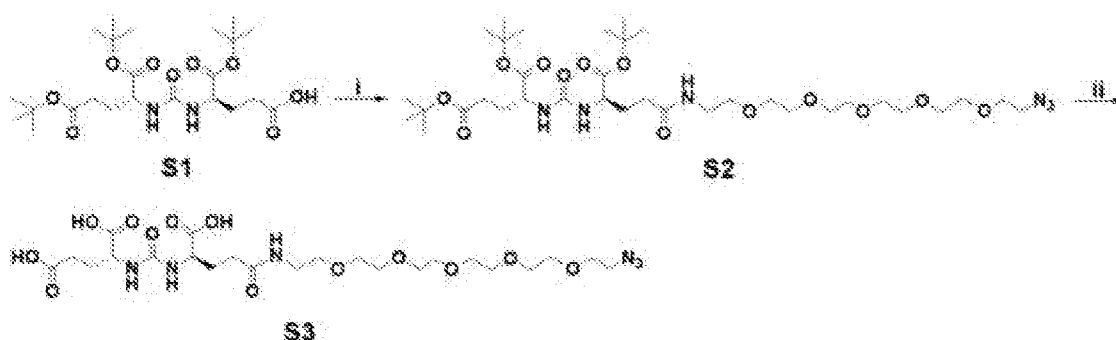
6c: 260mg, Yield 92%, HRMS: calcd. for $C_{39}H_{72}N_6O_{20}$ [M-H]⁻: 943.4723; MALDI-TOF-MS: m/z 943.5601。

制备例 2

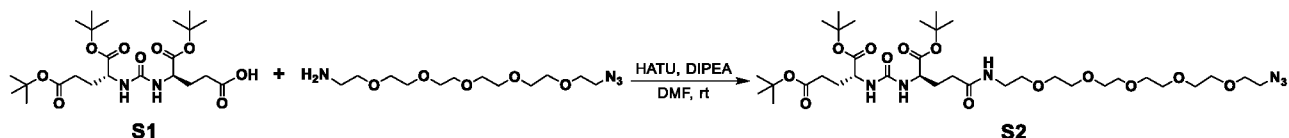
本制备例用于说明叠氮修饰的 DUPA 配体的制备



合成路线二:



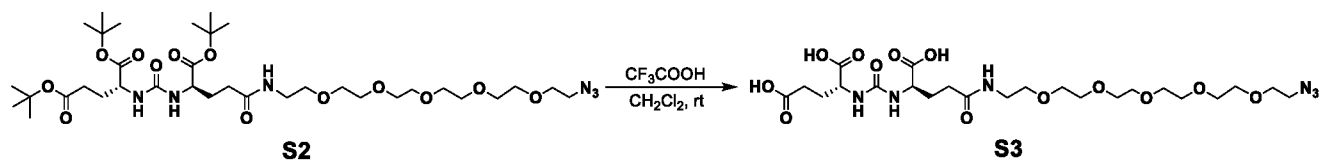
具体操作步骤:



(i) 将化合物 S1 (244 mg, 0.5 mmol) 和 2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HATU, 228 mg, 0.6 mmol) 一起加入到 5 mL 的二甲基甲酰胺中。搅拌条件下加入 N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA, 129 mg, 1 mmol) 后, 将混合物在室温下搅拌 15 分钟。立即将 17-叠氮基-3,6,9,12,15-五氧杂十七烷-1-胺 (182mg, 0.6mmol) 以喷雾的形式加入混合物中, 室温条件下继续反应 6 小时。反应结束后, 将反应混合物倒入 20 mL 水中, 乙酸乙酯萃取 (50 mL×3), 收集有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压除去溶剂得到橘黄色油状粗产物。残余物经柱色谱分离纯化 (乙酸乙酯/石油醚=1/5), 得到黄色油状化合物 S2 (338 mg, 产率: 87%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ6.93 (s, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.28 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 3.66-3.50 (m, 20H), 3.48-3.30 (m, 4H), 2.30-1.96 (m, 6H), 1.89-1.72 (m, 2H), 1.47-1.29 (m, 27H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ172.81, 172.56, 172.28, 171.95, 157.49, 81.89, 81.66, 80.44, 70.64, 70.62, 70.55, 70.52, 70.48, 70.43, 70.42, 70.05, 69.98, 69.49, 53.02, 50.63, 39.15, 32.54, 31.63, 29.19, 28.18, 28.05, 27.98. HRMS (ESI) : m/z [M+Na]⁺ calculated for C₃₅H₆₄N₆NaO₁₃⁺: 799.4424, found

799.4428.



(ii) 在冰浴条件下，将化合物 S2 (472 mg, 0.5 mmol) 溶解在二氯甲烷和三氟乙酸的等体积混合溶液 (5 mL) 中，反应液在室温下反应 6 小时。蒸发除去溶剂，所得残余物通过快速柱层析纯化 (MeOH/CH₂Cl₂=1/3) 纯化得到油状化合物 S3 (238mg, 98%)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ12.52 (s, 3H), 7.94 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.36 (dd, J = 7.9, 5.6 Hz, 2H), 4.16-3.98 (m, 2H), 3.63-3.58 (m, 2H), 3.57-3.50 (m, 14H), 3.42-3.35 (m, 5H), 3.18 (q, J = 5.9 Hz, 2H), 2.29-2.19 (m, 2H), 2.14-2.08 (m, 2H), 1.95-1.84 (m, 2H), 1.77-1.65 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ174.77, 174.67, 174.27, 171.83, 162.78, 157.73, 70.28, 70.24, 70.16, 70.14, 69.72, 55.40, 52.58, 52.15, 50.43, 38.97, 36.25, 32.00, 31.23, 30.42, 28.71, 28.09. HRMS (ESI) : m/z [M-H]⁻calculated for C₂₃H₃₉N₆O₁₃⁻: 607.2581; found: 607.2578.

制备例 3

本制备例用于说明 3'-末端炔丙基修饰小核酸的合成

1-O-炔丙基-2-脱氧-D-呋喃糖 (X, 即炔丙基单体), 作为一种通用的悬突修饰, 通过使用 ABI 394 DNA / RNA 合成仪 (ABI, USA) 连接到小核酸 (寡核酸) 的 3'-末端 (如图 1 所示)。

3'-末端炔丙基修饰小核酸的合成的具体步骤如下: 首先, 以商业化的霍夫氯糖为原料合成 1-O-炔丙基-2-脱氧-D-呋喃糖亚磷酰胺单体 (Bioorg. Med. Chem., 2013, 5583-5588); 然后, 得到的亚磷酰胺单体与固相载体 (CPG) 连接后通过前述自动核酸合成仪将炔丙基单体 X 寡核苷酸的 3'-末端; 最后, 脱除 CPG 以及保护基得到不同的 3'-末端炔丙基修饰单链小核酸, 本发明制备的所有炔丙基修饰的单链核酸的纯度经过高效液相色谱仪确认而且结构经过质谱仪确认 (图 2-4)。

表 1 不同的 3'-末端炔丙基修饰单链小核酸

ONs 编号	序列 (SS/AS)	
ON1	5'Cy5- CAUGUUGUUCAGCUGCUGCUUX -3'	SEQ ID NO: 1
ON2	5'- CAUGUUGUUCAGCUGCUGCUUX -3'	SEQ ID NO: 2
ON3	5'- GCAGCAGCUGAACACAUGUUX -3'	SEQ ID NO: 3
ON4	5'- GCGACGACCUUACAGAGCGUUX -3'	SEQ ID NO: 4
ON5	5'- CGCUCUGUAAGGUCGUCGCUUX -3'	SEQ ID NO: 5

实施例 1

本实施例用于说明 KUE-PEG-siRNA 缀合物的高效合成

KUE-PEG₂-siRNA 缀合物的合成：向 200 μ L 灭菌离心管中依次加入炔丙基修饰的小核酸序列（ON3）（10 nmol）、叠氮修饰的靶向配体 **6a**（30 nmol）、Cu(I)-TBTA（50nmol），使得 RNA 终浓度维持在 100 μ M 左右。向体系中加入 DMF（体积占反应液体积的占比为 25%）。反应体系经轻轻涡旋混匀后放置在金属反应器中，在 37 $^{\circ}$ C、900r/min 的条件下震荡反应 3h，用 15%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对反应结果进行监测。最后，产物经寡核酸提取试剂盒分离纯化得到，产物的纯度以及浓度经过 NanoDrop 2000 超微量分光光度计（Thermo, USA）确认，最终收率为 98%。

实施例 2-12

按照实施例 1 的方式进行，不同的是，改变加入有机溶剂的种类和/或用量。结果见表 2。

表 2

编号	有机溶剂	有机溶剂体积占反应液体积的占比 (%)	收率 (%)
1	DMF	25	98
2	DMF	5	58
3	DMF	50	90
4	甲醇	5	50
5	甲醇	25	78
6	甲醇	50	65
7	乙醇	5	48
8	乙醇	25	82
9	乙醇	50	62
10	丙酮	5	43
11	丙酮	25	68
12	丙酮	50	52

实施例 13-20

按照实施例 1 的方式进行，不同的是，改变催化剂的种类和/或用量。实验结果见表 3。

表 3

编号	铜催化剂	催化剂与小核酸序列的摩尔比	收率 (%)
13	Cu(I)-TBTA	1.5	62
14	Cu(I)-TBTA	3	88

15	CuCl	1.5	40
16	CuCl	3	75
17	CuCl	5	89
18	CuBr	1.5	42
19	CuBr	3	77
20	CuBr	5	86

实施例 21

按照实施例 1 的方式进行，不同的是，用等摩尔量的叠氮修饰的靶向配体 **6b** 代替 **6a**。最终收率为 96%。

实施例 22

按照实施例 1 的方式进行，不同的是，用等摩尔量的叠氮修饰的靶向配体 **6c** 代替 **6a**。最终收率为 95%。

实施例 23

本实施例用于说明靶向不同基因的 KUE-PEG-siRNA 缀合物的高效合成

按照实施例 1 的方式进行，不同的是，使用靶向 PHB-1 基因的 RNA (ON5) 代替靶向 STAT3 基因的 RNA (ON3)。最终收率为 97%。

实施例 24

本实施例用于说明 DUPA-PEG-siRNA 缀合物的高效合成

按照实施例 1 的方式进行，不同的是，用等摩尔量的叠氮修饰的 DUPA 配体代替 **6a**。最终收率为 98%。

实施例 25

将实施例 1-22 得到的单链缀合物和 Cy5 标记的互补链小核酸以摩尔比 1:1 的比例在退火缓冲液 (2mM 醋酸镁含镁离子) 中，95°C 下孵育 3 分钟形成不同的 KUE-PEG-siRNA 缀合物以及 DUPA-PEG-siRNA 缀合物。

实施例 1、实施例 21、实施例 22、实施例 23 和实施例 24 制备得到的核酸缀合物 KUE-PEG₂-siRNA、核酸缀合物 KUE-PEG₅-siRNA、核酸缀合物 KUE-PEG₁₂-siRNA 和 DUPA-PEG₅-siRNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳表征图见图 5 和图 6；质谱图分别见图 7、图 8、

图 9、图 10（实施例 23）和图 11（实施例 24）。

测试实施例 1

KUE-PEG-siRNA 缀合物在前列腺癌细胞摄入的选择性评价

细胞成像：选择 LNCaP 细胞（PSMA 阳性，购自中国科学院）和 PC3 细胞（PSMA 阴性，购自中国科学院）评价 KUE-PEG-siRNA 缀合物的细胞摄取。使用 Cy5 标记的 KUE-PEG-siRNA 缀合物以及 siRNA（50nM）与两种前列腺癌细胞共孵育，转染 6 小时后细胞在 649nm 激发光条件下进行荧光成像（图 12A（LNCaP 细胞的荧光成像）和图 12B（PC3 细胞的荧光成像））。从图 12A 可以发现只有在 lipofectamine 2000（牌号：Invitrogen，厂家：赛默飞）存在下才能在两种细胞中观察到来自 siRNA 组的红色荧光信号，而在 LNCaP 细胞中可以观察到来自 KUE-PEG-siRNA 缀合物组的红色荧光信号。此外，图 12B 中，在 PC-3 细胞中几乎无法观察到来自 KUE-PEG-siRNA 缀合物组的红色荧光信号。以上这些结果表明，KUE-PEG-siRNA 缀合物，与未缀合的 siRNA 不同，KUE-PEG-siRNA 缀合物能够选择性地进入前列腺癌细胞，并且这种内化不借助 lipofectamine 2000 也能高效率地完成。将图 12A 的细胞荧光成像进行平均荧光强度统计（见图 13），从图 13 的统计结果中发现在 LNCaP 细胞中 KUE-PEG-siRNA 缀合物组的平均荧光强度为 95%，而 lipofectamine 2000 转染的 siRNA 组的平均荧光强度为 82%；在 PC-3 细胞中 KUE-PEG-siRNA 缀合物的平均荧光强度小于为 5%。以上这些结果表明，siRNA 在不借助转染试剂时几乎无法进入任何细胞，而 KUE-PEG-siRNA 缀合物不借助转染试剂能够选择性地进入 LNCaP 细胞。

细胞内化方式：通过加入 PSMA 特异性抑制剂（ZJ43，参照 Eur. J. Neurosci., 2004, 483-494 制备得到）进一步确认 KUE-PEG-siRNA 缀合物进入 LNCaP 细胞的途径。其中，LNCaP 细胞提前与 ZJ43 一起孵育，然后再加入 Cy5 标记的 KUE-PEG-siRNA 缀合物。6 小时，LNCaP 细胞在 640nm 激发光条件下进行荧光成像（见图 14）。图 14 的结果表明相对于未加入 PSMA 特异性抑制剂的对照组而言，ZJ43 的加入使得 LNCaP 细胞几乎观察不到来自 KUE-PEG-siRNA 缀合物的红色荧光信号。这表明相对于未加入 ZJ43 组，ZJ43 的加入能明显地抑制 LNCaP 细胞对 KUE-PEG-siRNA 缀合物的摄入。

测试实施例 2

KUE-PEG-siRNA 缀合物在前列腺癌细胞的摄入效率评价

选择 PSMA 阳性表达的 LNCaP 细胞（购自中国科学院）评价 KUE-PEG-siRNA 缀合物的细胞摄取效率。Cy5 标记的 KUE-PEG-siRNA 缀合物（50nM）和 siRNA（50nM）与 LNCaP 细胞共孵育，其中 siRNA 与 lipofectamine 2000（牌号：Invitrogen，厂家：赛默飞）共同转染

作为对照组。4 小时后,按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(牌号: 556547, 厂家: 美国 BD 公司)的操作对细胞进行处理。制备好的细胞样品通过 FACS Calibur 流式细胞仪在 Cy5 相对应的检测通道下进行分析。实验过程中依次对空白独照组、siRNA 单独转染组、siRNA 与 lipofectamine 2000 共同转染组以及不同 KUE-PEG-siRNA 缀合物转染组进行分析, 并且每一组收集检测 10^4 个细胞。所有实验组的细胞检测完成后, 使用 FlowJo 软件对实验结果进行分析(图 15)。从图 15 可以发现未进行配体缀合的 siRNA (siSTAT3) 几乎无法进入 LNCaP 细胞中, 这与细胞成像的结果一致。此外, 相对于 lipofectamine 2000 转染组的细胞摄入效率 (74.2%), KUE-siRNA 偶联物 (KUE-PEG₂-siRNA, KUE-PEG₅-siRNA, KUE-PEG₁₂-siRNA) 在 LNCaP 细胞中展现出更高的细胞摄入效率 (>99%)。这些实验结果意味着配体 KUE 的缀合对于递送 siRNA 进入特定的前列腺癌细胞 (LNCaP 细胞) 是不可或缺的。

测试实施例 3

为了验证 KUE-PEG-siRNA 缀合物的 RNAi 活性, 本测试实施例用到靶向 STAT3 基因的治疗性小核酸, 其序列见表 4。

表 4

ONs 编号	序列 (SS/AS)	
ON2	5'- CAUGUUGUUCAGCUGCUGCUUX -3'	SEQ ID NO: 2

向 200 μ L 灭菌离心管中依次加入炔丙基修饰的小核酸序列 (ON2) (10nmol)、叠氮修饰的靶向配体(30nmol)、Cu(I)-TBTA (50nmol), 使得 RNA 终浓度维持在 100 μ M 左右。向体系中加入 DMF(体积为反应液体积的 25%)。反应体系经轻轻涡旋混匀后放置在金属反应器中, 在 37 $^{\circ}$ C、900r/min 的条件下震荡反应 3h。最后, 用 15%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对反应结果进行监测, 经寡核酸提取试剂盒分离纯化得到单链缀合物。当使用的靶向配体为 **6a 时**, 收率为 97.7%; 当使用靶向配体为 **6b 时**, 收率为 96.2%; 当使用靶向配体 **6c 时**, 收率为 95.6%。

之后将得到的单链缀合物和互补链小核酸以摩尔比 1:1 的比例在退火缓冲液 (2mM 醋酸镁) 中, 95 $^{\circ}$ C 下孵育 3 分钟形成 KUE-PEG-siSTAT3 缀合物。

1) KUE-PEG-siSTAT3 缀合物的基因沉默效果评价:

靶标基因沉默: 将靶向信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 的 KUE-PEG-siSTAT3 (KUE-PEG-siRNA) 缀合物 (100nM) 与 LNCaP 细胞共孵育。48 小时后, mRNA 的表达通过逆转录聚合酶链反应法 (RT-PCR) 进行检测。如图 16A 所示, 所有 KUE-PEG-siRNA 缀合物能够有效地降低 STAT3 的 mRNA 表达, 其中 KUE-PEG₅-siSTAT3 与借助 lipofectamine 2000 转染的 siRNA 具有相当的沉默活性。此外, 从图 16B 可以发现随着缀合物中的 PEG 长度增

加 mRNA 表达量逐渐降低。以上的结果说明 KUE-PEG-siSTAT3 缀合物被 LNCaP 细胞摄取后能够有效地降低靶基因的表达。并且，缀合物 KUE-PEG₁₂-siSTAT3 比 KUE-PEG₂-siSTAT3 和 KUE-PEG₅-siSTAT3 能诱导更强的 mRNA 下调效果。

蛋白质表达抑制：除了 mRNA 下调实验外，还通过蛋白质印迹法（Western Blot）探究了缀合物对于 STAT3 蛋白的表达的影响（见图 17A 和图 17B）。图 17A 中的结果表明所有的 KUE-PEG-siSTAT3 缀合物实验组对应的条带灰度，相对于未缀合的 siSTAT3 组，均呈现能不同程度地降低，这说明 KUE-PEG-siSTAT3 缀合物可以抑制 STAT3 蛋白的表达。图 17B 中定量实验结果表明 KUE-PEG₁₂-siSTAT3 缀合物下调 STAT3 蛋白表达的幅度最大。

2) KUE-PEG-siRNA 缀合物的前列腺癌细胞生长抑制效果评价

基于上述的生化测试评价，可以确定 KUE-PEG-siSTAT3（KUE-PEG-siRNA）缀合物能够被前列腺癌细胞 LNCaP 特异性摄取并促发 RNAi 机制从而导致 STAT3 的 mRNA 以及蛋白表达量显著降低。用流式细胞仪（厂家：美国 BD 公司，型号：FACS Calibur）检测 KUE-PEG-siSTAT3 缀合物对于 LNCaP 细胞生长状况影响（见图 18）。图 18 中，流式细胞结果表明靶向 STAT3 基因的 KUE-PEG-siSTAT3 缀合物均能不同程度地促进 LNCaP 细胞凋亡（25.01%-34.94%），并且缀合物 KUE-PEG₁₂-siSTAT3（KUE-PEG₁₂-siRNA）能促进 34.94% 的 LNCaP 细胞凋亡。

通过以上内容可知，本发明构建的 KUE-PEG-siSTAT3 缀合物能够被前列腺癌细胞（LNCaP 细胞）选择性地摄取，并且能够触发 LNCaP 细胞中的 RNAi 机制最终成功地抑制前列腺癌细胞的生长。

而且，进一步的研究表明，本发明的缀合物与常规方式（如脂质体）递送小核酸在降低靶基因的表达（或抑制癌细胞生长）方面的效果相当。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于此。在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容，均属于本发明的保护范围。

权利要求书

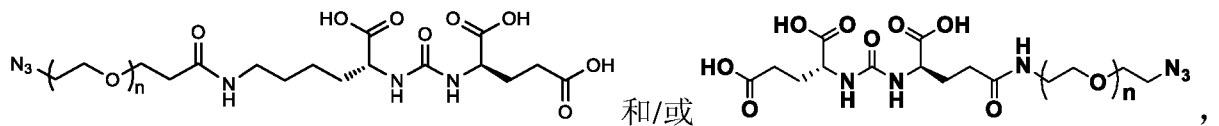
1、一种缀合物，其特征在于，该缀合物由叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列共价连接而成。

2、根据权利要求 1 所述的缀合物，其中，所述叠氮修饰的靶向配体中叠氮基团与靶向配体通过至少一个聚乙二醇的片段共价连接。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的缀合物，其中，所述靶向配体为至少一种氨基酸为谷氨酸的两个氨基酸形成的二肽；优选地，所述氨基酸选自赖氨酸和谷氨酸、谷氨酸和谷氨酸以及谷氨酸和谷氨酸类似物；其中，所述靶向配体能够通过谷氨酸识别并结合靶细胞表面表达的抗原；所述抗原为 PSMA；

和/或，所述靶细胞选自前列腺癌细胞、神经元细胞、肾癌细胞和结肠癌细胞中的至少一种。

4、根据权利要求 1-3 中任意一项所述的缀合物，其中，所述叠氮修饰的靶向配体具有如下所示的结构：



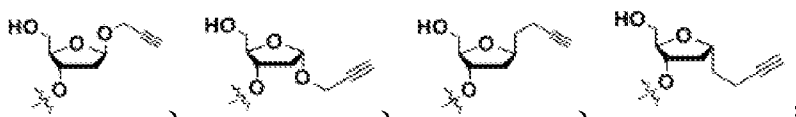
其中 n 为 1-100 的整数。

5、根据权利要求 1-4 中任意一项所述的缀合物，其中，所述小核酸序列选自靶向 STAT3、PHB1、Notch1、PLK1 和 BRD4 的小核酸中的至少一种；

和/或，所述炔丙基修饰为 3'-末端炔丙基修饰；

和/或，所述炔丙基修饰的小核酸序列采用亚磷酰胺法通过固相合成技术将炔丙基化合物修饰到小核酸序列的 3'-末端；其中，所述炔丙基化合物至少含有一个活性羟基；

优选地，所述炔丙基化合物具有如下所示的结构：



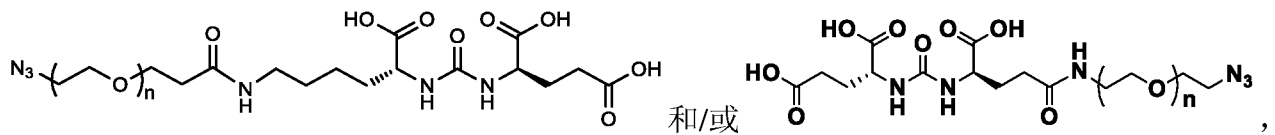
其中，“~”表示小核酸连接位点。

6、一种制备缀合物的方法，其特征在于，该方法包括：在一价铜催化剂的存在下，使叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列进行接触。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其中，所述叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的小核酸序列的摩尔比为 (1.05-10) : 1，优选为 (2-4) : 1；

和/或，靶向配体为至少一种氨基酸为谷氨酸的两个氨基酸形成的二肽；优选地，所述氨基酸选自赖氨酸和谷氨酸、谷氨酸和谷氨酸以及谷氨酸和谷氨酸类似物；

和/或，所述叠氮修饰的靶向配体具有如下所示的结构：



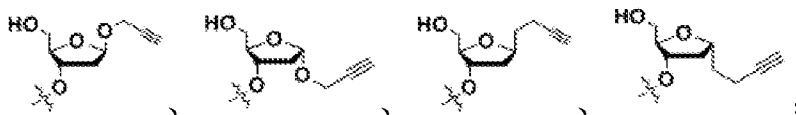
其中 n 为 1-100 的整数；

和/或，所述小核酸序列选自靶向 STAT3、PHB1、Notch1、PLK1 和 BRD4 的小核酸中的至少一种；

和/或，所述炔丙基修饰为 3'-末端炔丙基修饰；

和/或，所述炔丙基修饰的小核酸序列采用亚磷酰胺法通过固相合成技术将炔丙基化合物修饰到小核酸序列的 3'-末端；

优选地，所述炔丙基化合物具有如下所示的结构：



其中，“~”表示小核酸连接位点。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的方法，其中，所述一价铜催化剂选自 Cu(I)-TBTA、CuBr 和 CuCl 中的至少一种，优选为 Cu(I)-TBTA；

和/或，相对于 1mol 的小核酸序列，所述一价铜催化剂的用量为 2-10mol，优选为 3-6mol；

和/或，所述接触的条件包括：温度为 35.5-38.5°C，优选为 36.5-37.5°C；时间为 1-5h，优选为 2-4h。

9、根据权利要求 6-8 中任意一项所述的方法，其中，所述接触在有机溶剂的存在下进行，所述有机溶剂选自 N,N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇和丙酮中的至少一种。

10、根据权利要求 6-9 中任意一项所述的方法，其中，所述小核酸序列为包括正义链和反义链的 siRNA 序列，所述方法包括：

(1) 分别获得炔丙基修饰的正义链和炔丙基修饰的反义链；

(2) 将叠氮修饰的靶向配体与炔丙基修饰的正义链或炔丙基修饰的反义链接触，得到单链缀合物；

(3) 将单链缀合物与另一条链在退火缓冲液中 90-100°C 条件下孵育 1-5 分钟得到所述缀合物；

优选地，所述退火缓冲液选自 1.5-2.5mM 的醋酸镁溶液。

11、权利要求 1-5 中任意一项所述的缀合物或权利要求 6-10 中任意一项所述的方法制备的缀合物在制备用于治疗表达 PSMA 的组织出现异常导致的相关疾病的药物中的应用，所述疾病优选发生在腺体组织、结肠、肾脏和神经系统中；其中，所述腺体组织选自前列腺、胰腺、乳腺和胸腺中的一种。

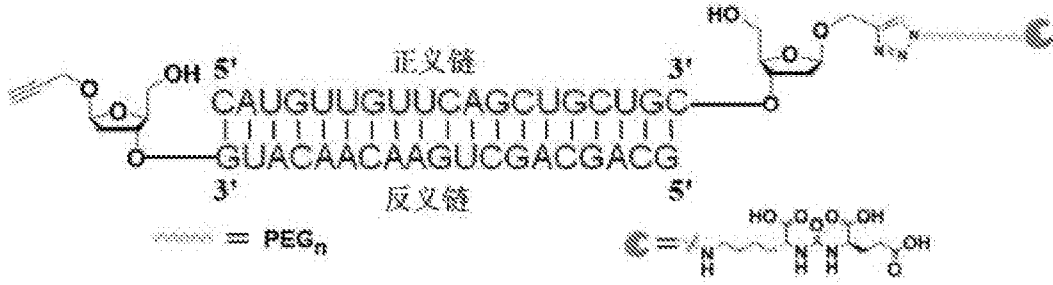


图 1

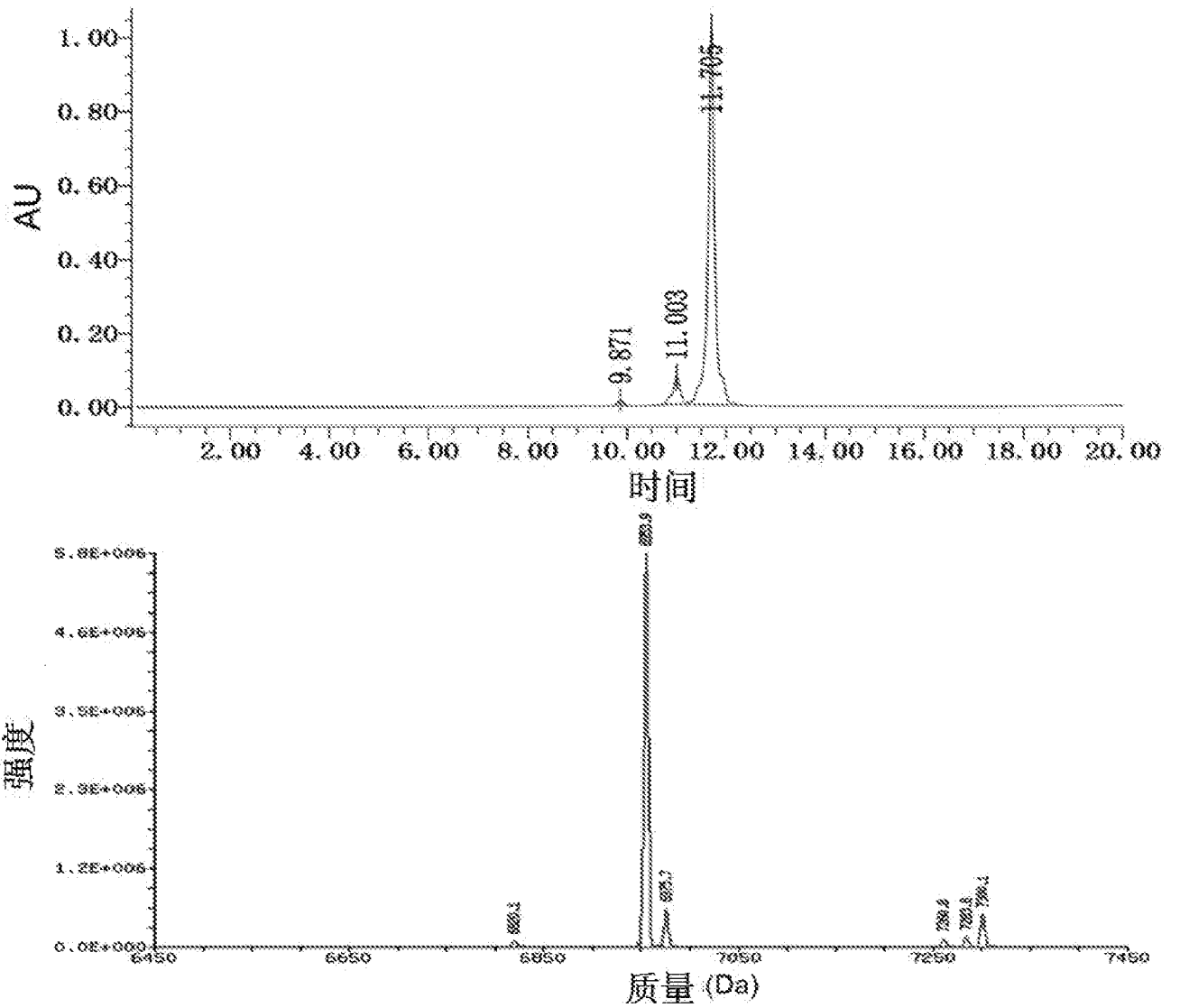


图 2

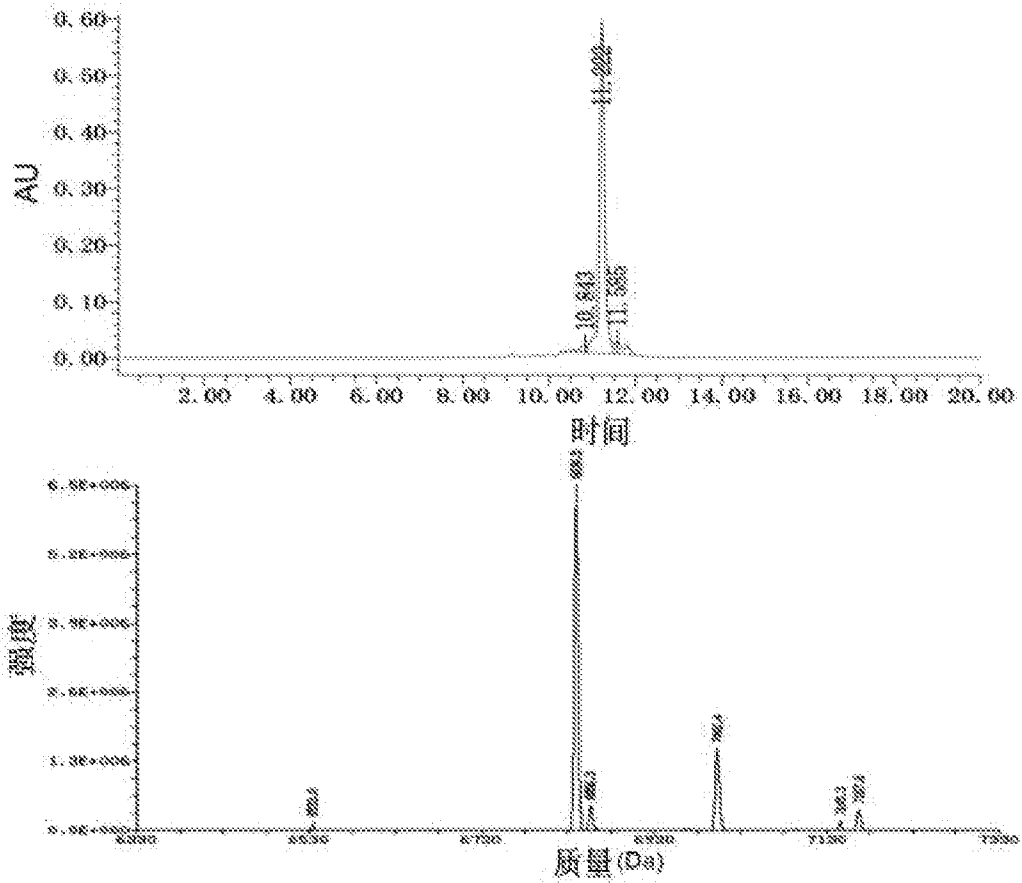


图 3

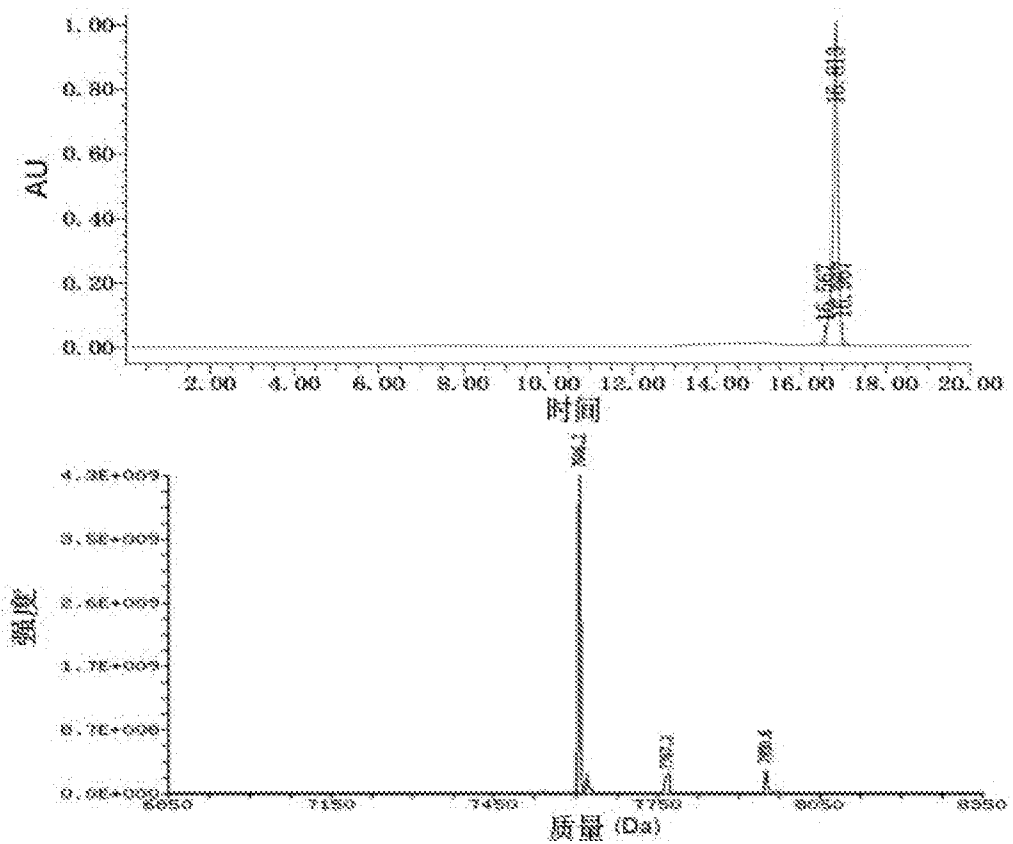


图 4

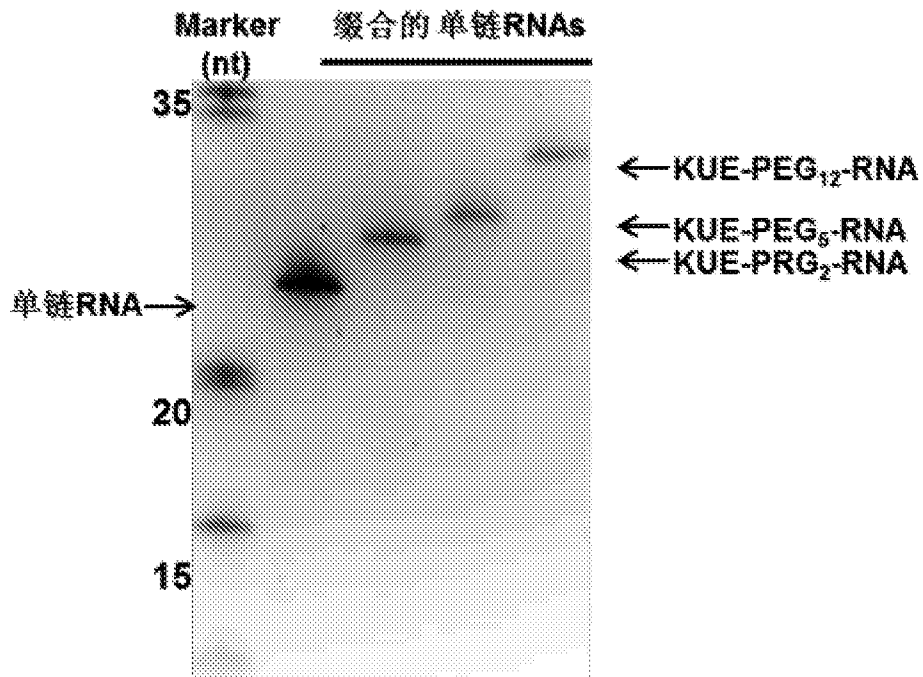


图 5

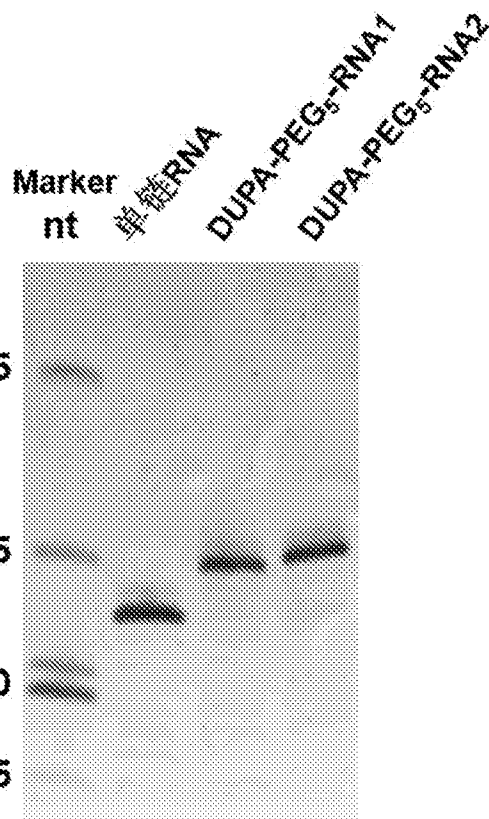


图 6

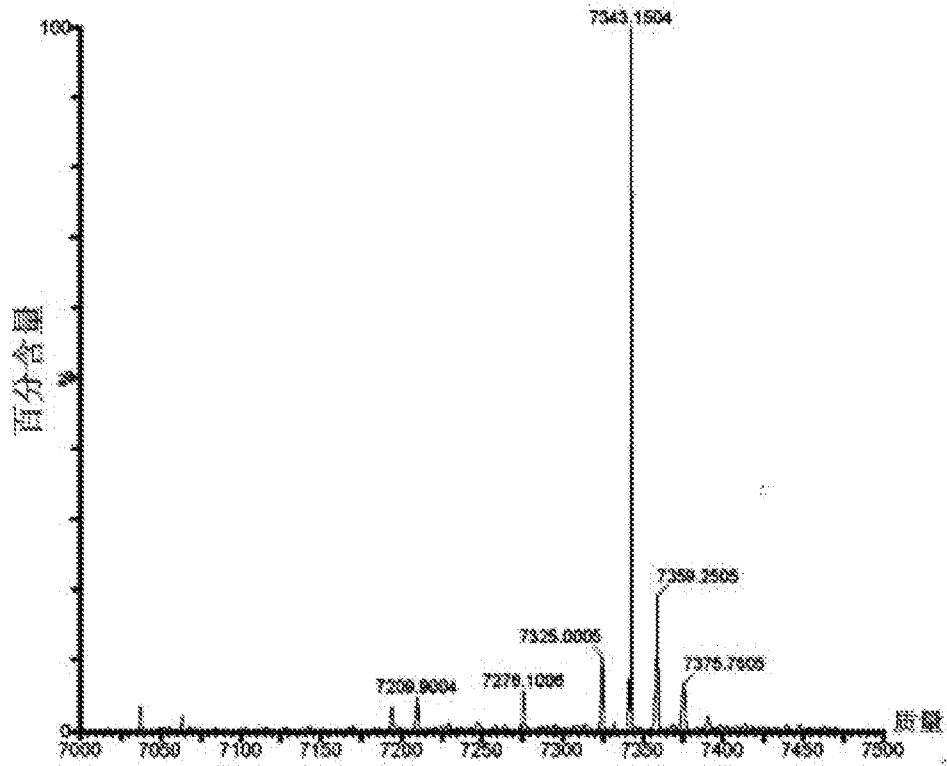


图 7

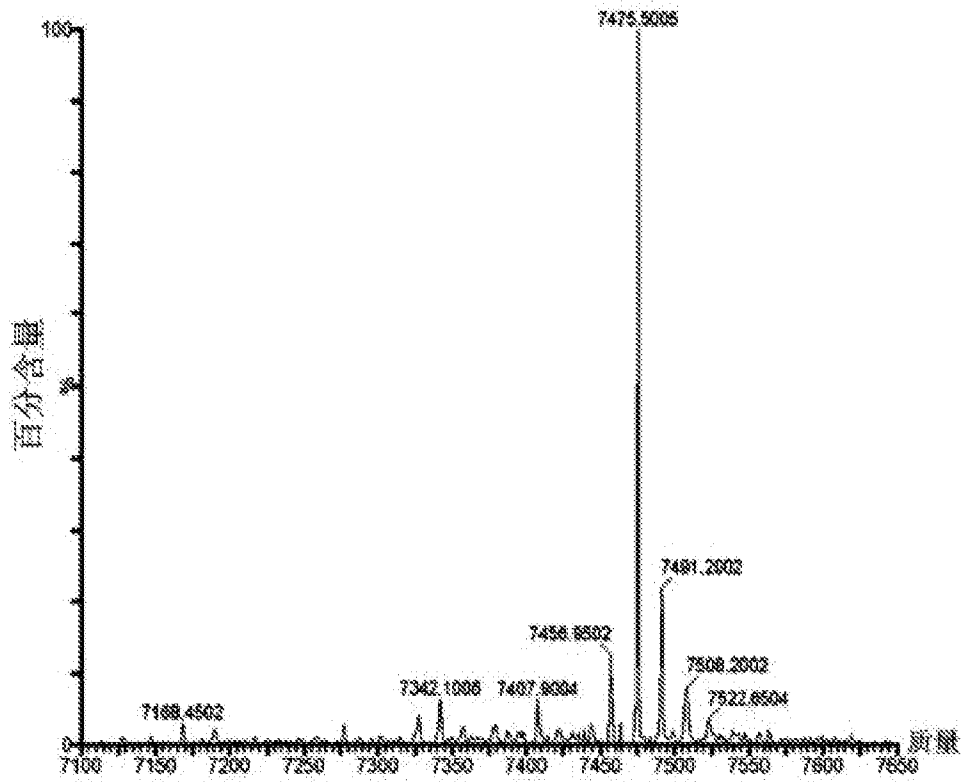


图 8

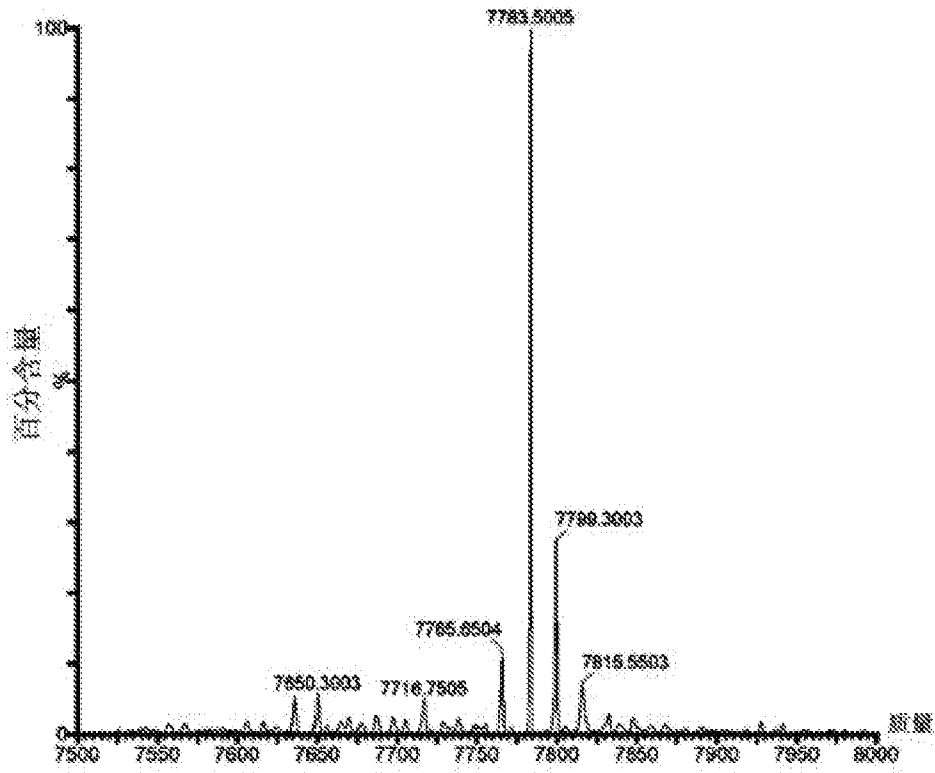


图 9

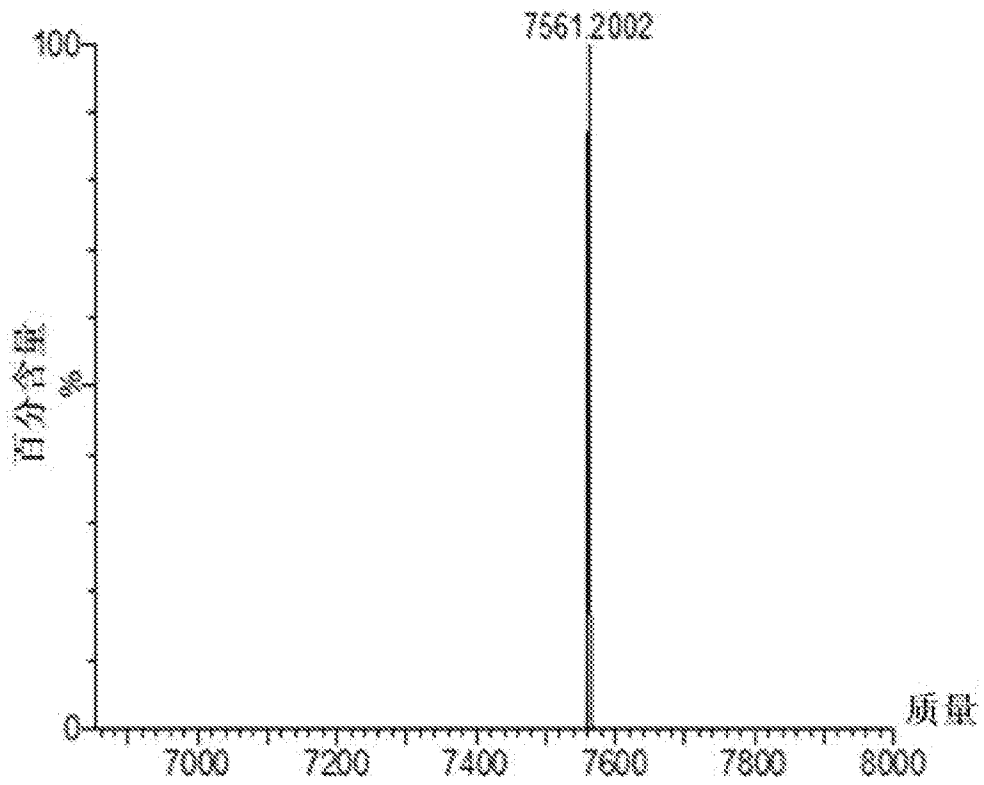


图 10

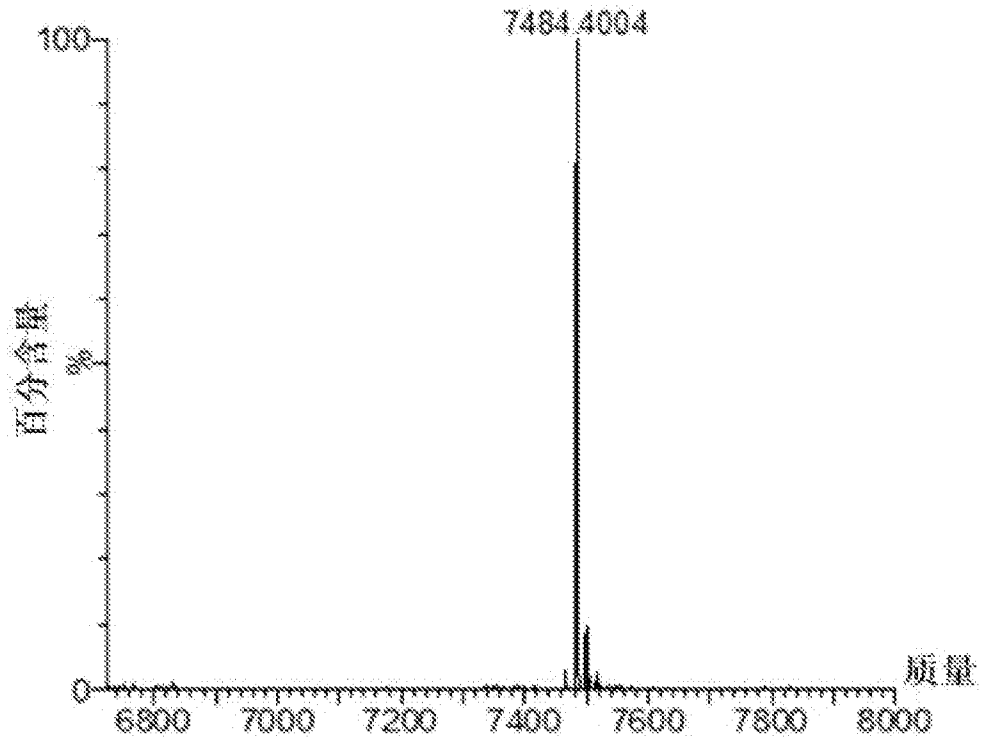


图 11

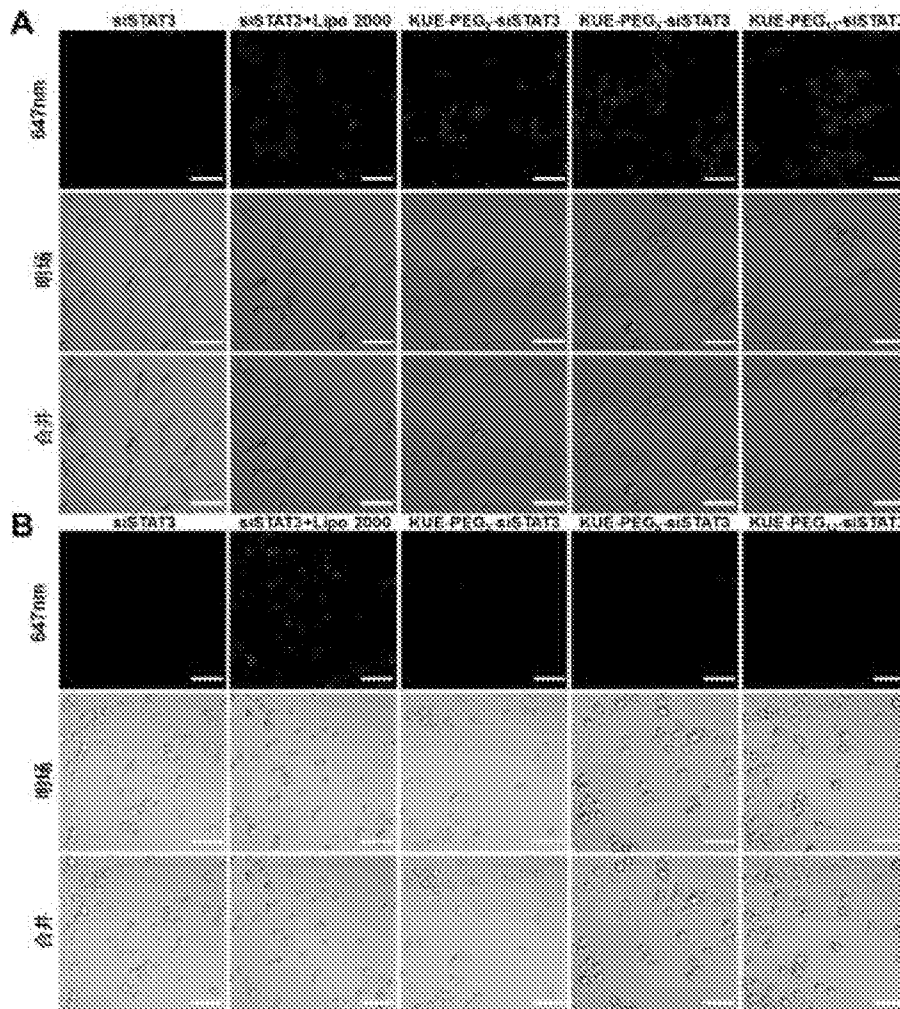


图 12

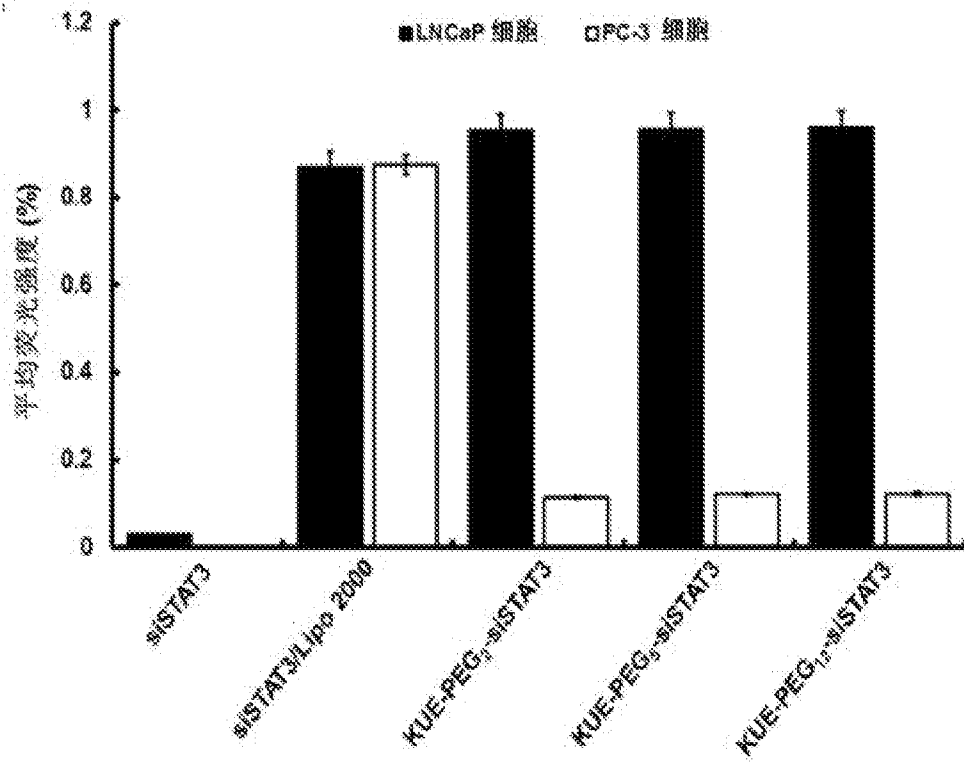


图 13

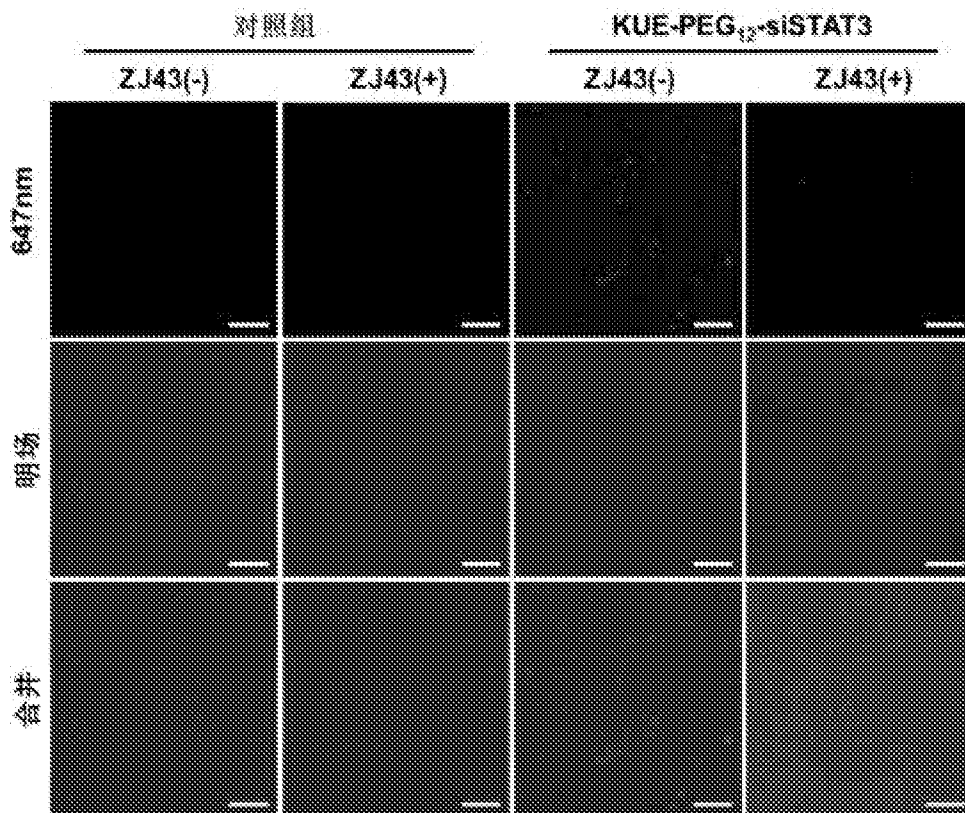
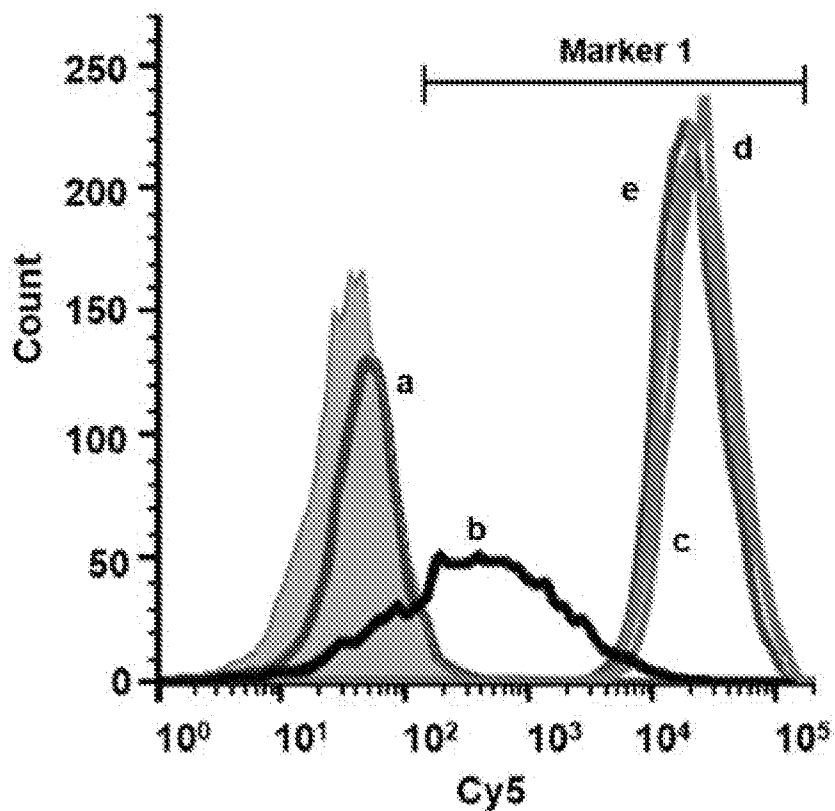


图 14



	<u>Marker 1</u>
Mock	1%
a siRNA	2.5%
b siRNA+lipofectamine 2000	74.2%
c KUE-PEG ₂ -siRNA	99.6%
d KUE-PEG ₅ -siRNA	99.8%
e KUE-PEG ₁₂ -siRNA	99.5%

图 15

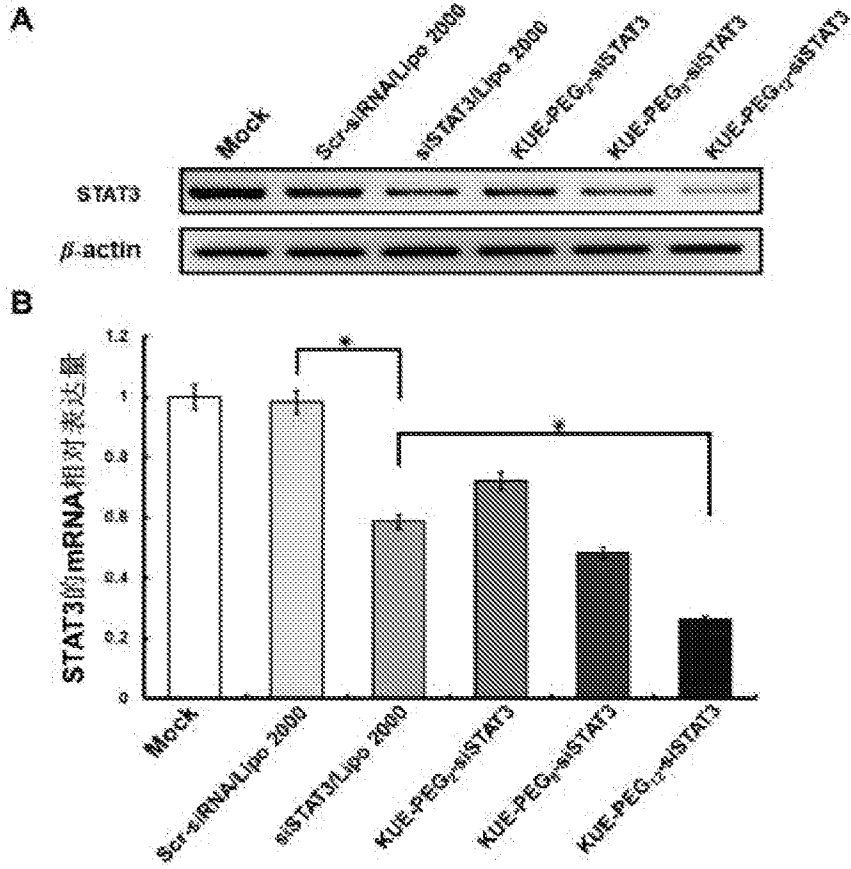


图 16

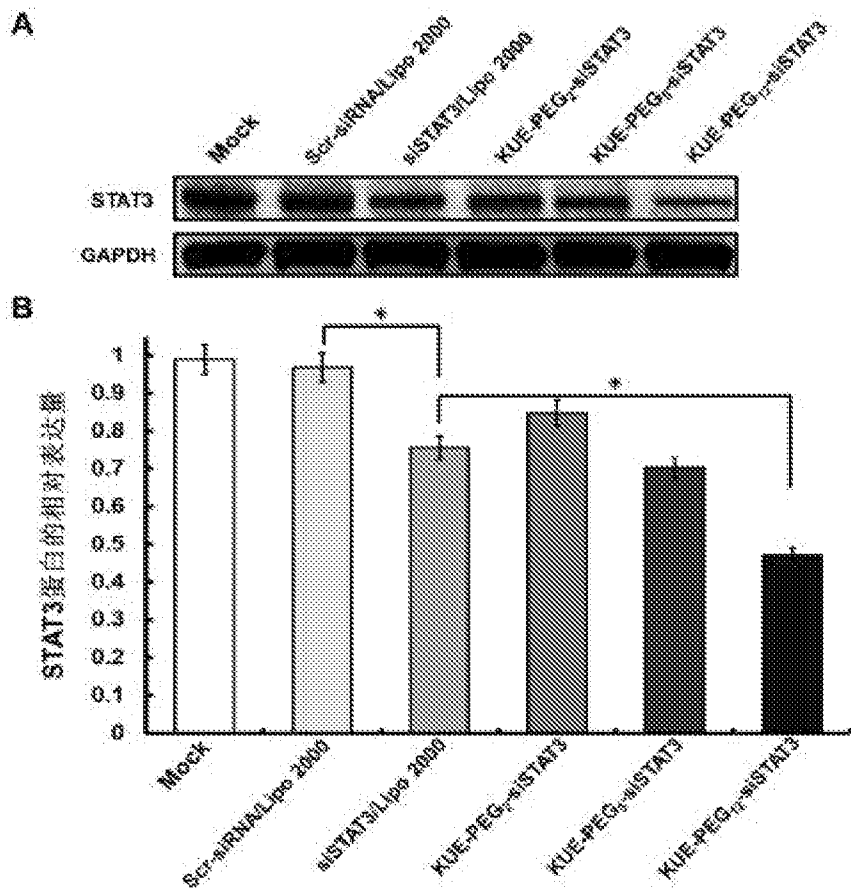


图 17

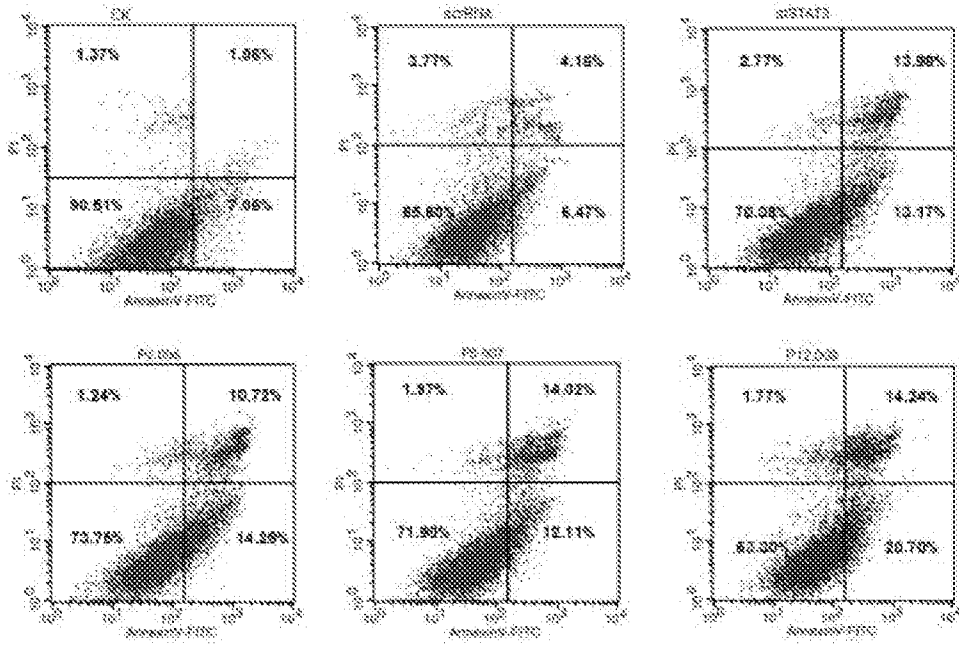


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/088173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 47/54(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNTXT; DWPI; ENTXTC; PUBMED; ELSEVIER; Patentics; STN: 缀合物, 叠氮, 靶向, 配体, 多肽, 二肽, 小核酸, 炔丙基, 谷氨酸, 赖氨酸, 权利要求4, 5, 7所涉及的结构式的结构检索, 催化, 铜, conjugates, azides, target, ligands, polypeptides, dipeptides, small nucleic acids, sRNA, siRNA, propargyl, glutamate, lysine, catalyze, cuprous, cu, PSMA, KUE, DUPA, STAT3, PHB1, Notch1, PLK1, BRD4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113304274 A (NANKAI UNIVERSITY) 27 August 2021 (2021-08-27) claims 1-11	1-11
X	US 2012130045 A1 (HAMMOND, N. L. et al.) 24 May 2012 (2012-05-24) claim 5, and description, paragraphs [0058], [0070] and [0072], and embodiment 8, and description, figure 3C	1, 2, 6
Y	US 2012130045 A1 (HAMMOND, N. L. et al.) 24 May 2012 (2012-05-24) claim 5, and description, paragraphs [0058], [0070] and [0072], and embodiment 8, and description, figure 3C	3-5, 7-11
Y	WO 2020146521 A2 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC.) 16 July 2020 (2020-07-16) claim 1	10
Y	TAI, Wanyi et al. "A Ribonucleoprotein Octamer for Targeted siRNA Delivery" <i>Nat Biomed Eng</i> , No. 2, 12 January 2019 (2019-01-12), pp. 326-337	3-5, 7-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
07 June 2022		23 June 2022
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/088173

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Derks, Y. H. W. et al. "PSMA-targeting Agents for Radio- and Fluorescenceguided Prostate Cancer Surgery" <i>Theranostics</i> , Vol. 9, No. 23, 20 September 2019 (2019-09-20), pp. 6824-6839	3-5, 7-11
.....		

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/088173

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113304274	A	27 August 2021	None			
US	2012130045	A1	24 May 2012	EP	2437789	A1	11 April 2012
				WO	2010141507	A1	09 December 2010
WO	2020146521	A2	16 July 2020	IL	284696	D0	31 August 2021
				CA	3120580	A1	16 July 2020
				UY	38539	A	31 July 2020
				JP	2022518384	A	15 March 2022
				AU	2020207050	A1	17 June 2021
				EP	3908288	A2	17 November 2021
				TW	202043470	A	01 December 2020
				KR	20210113273	A	15 September 2021
				CN	113613661	A	05 November 2021
				WO	2020146521	A3	20 August 2020
				SG	11202105577	A1	29 June 2021
				AR	117790	A1	25 August 2021
				IN	202117030133	A	10 December 2021

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 47/54(2017.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXTX;DWPI;ENTXTC;PUBMED;ELSEVIER;Patentics;STN:缀合物, 叠氮, 靶向, 配体, 多肽, 二肽, 小核酸, 炔丙基, 谷氨酸, 赖氨酸, 权利要求4、5、7所涉及的结构式的结构检索, 催化, 铜, conjugates, azides, target, ligands, polypeptides, dipeptides, small nucleic acids, sRNA, siRNA, propargyl, glutamate, lysine, catalyze, cuprous, cu, PSMA, KUE, DUPA, STAT3, PHB1, Notch1, PLK1, BRD4</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 113304274 A (南开大学) 2021年8月27日 (2021 - 08 - 27) 权利要求1-11</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2012130045 A1 (HAMMOND NICHOLAS LEE等) 2012年5月24日 (2012 - 05 - 24) 权利要求5, 说明书第[0058]、[0070]、[0072]段, 实施例8, 说明书附图3C</td> <td>1, 2, 6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2012130045 A1 (HAMMOND NICHOLAS LEE等) 2012年5月24日 (2012 - 05 - 24) 权利要求5, 说明书第[0058]、[0070]、[0072]段, 实施例8, 说明书附图3C</td> <td>3-5, 7-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020146521 A2 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC) 2020年7月16日 (2020 - 07 - 16) 权利要求1</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Wanyi Tai等. "A Ribonucleoprotein Octamer for Targeted SiRNA Delivery" Nat Biomed Eng, 第2期, 2019年1月12日 (2019 - 01 - 12), 第326-337页</td> <td>3-5, 7-11</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 113304274 A (南开大学) 2021年8月27日 (2021 - 08 - 27) 权利要求1-11	1-11	X	US 2012130045 A1 (HAMMOND NICHOLAS LEE等) 2012年5月24日 (2012 - 05 - 24) 权利要求5, 说明书第[0058]、[0070]、[0072]段, 实施例8, 说明书附图3C	1, 2, 6	Y	US 2012130045 A1 (HAMMOND NICHOLAS LEE等) 2012年5月24日 (2012 - 05 - 24) 权利要求5, 说明书第[0058]、[0070]、[0072]段, 实施例8, 说明书附图3C	3-5, 7-11	Y	WO 2020146521 A2 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC) 2020年7月16日 (2020 - 07 - 16) 权利要求1	10	Y	Wanyi Tai等. "A Ribonucleoprotein Octamer for Targeted SiRNA Delivery" Nat Biomed Eng, 第2期, 2019年1月12日 (2019 - 01 - 12), 第326-337页	3-5, 7-11
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 113304274 A (南开大学) 2021年8月27日 (2021 - 08 - 27) 权利要求1-11	1-11																		
X	US 2012130045 A1 (HAMMOND NICHOLAS LEE等) 2012年5月24日 (2012 - 05 - 24) 权利要求5, 说明书第[0058]、[0070]、[0072]段, 实施例8, 说明书附图3C	1, 2, 6																		
Y	US 2012130045 A1 (HAMMOND NICHOLAS LEE等) 2012年5月24日 (2012 - 05 - 24) 权利要求5, 说明书第[0058]、[0070]、[0072]段, 实施例8, 说明书附图3C	3-5, 7-11																		
Y	WO 2020146521 A2 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC) 2020年7月16日 (2020 - 07 - 16) 权利要求1	10																		
Y	Wanyi Tai等. "A Ribonucleoprotein Octamer for Targeted SiRNA Delivery" Nat Biomed Eng, 第2期, 2019年1月12日 (2019 - 01 - 12), 第326-337页	3-5, 7-11																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年6月7日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年6月23日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>陈典</p> <p>电话号码 (86-512)88996499</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	Yvonne H. W. Derks等. "PSMA-targeting Agents for Radio- and Fluorescence-guided Prostate Cancer Surgery" Theranostics, 第9卷, 第23期, 2019年9月20日 (2019 - 09 - 20), 第6824-6839页	3-5, 7-11

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/088173

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113304274	A	2021年8月27日	无			
US	2012130045	A1	2012年5月24日	EP	2437789	A1	2012年4月11日
				WO	2010141507	A1	2010年12月9日
WO	2020146521	A2	2020年7月16日	IL	284696	D0	2021年8月31日
				CA	3120580	A1	2020年7月16日
				UY	38539	A	2020年7月31日
				JP	2022518384	A	2022年3月15日
				AU	2020207050	A1	2021年6月17日
				EP	3908288	A2	2021年11月17日
				TW	202043470	A	2020年12月1日
				KR	20210113273	A	2021年9月15日
				CN	113613661	A	2021年11月5日
				WO	2020146521	A3	2020年8月20日
				SG	11202105577	A1	2021年6月29日
				AR	117790	A1	2021年8月25日
				IN	202117030133	A	2021年12月10日