



(21)申請案號：111124830

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 07 月 01 日

(51)Int. Cl. : A61K47/54 (2017.01)

C12N15/113 (2010.01)

A61P1/16 (2006.01)

(30)優先權：2021/07/02

中國大陸

202110753225.4

(71)申請人：大陸商上海拓界生物醫藥科技有限公司(中國大陸) TUOJIE BIOTECH(SHANGHAI) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：黃金宇 HUANG, JINYU (CN)；羅敏 LUO, MIN (CN)；尹科 YIN, KE (CN)；侯哲 HOU, ZHE (CN)；李云飛 LI, YUNFEI (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

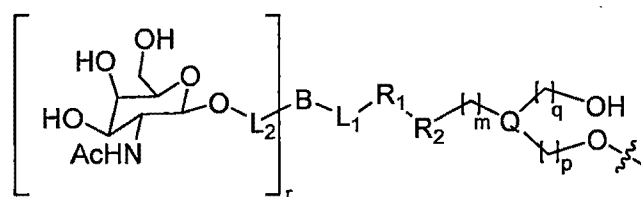
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：4 共 201 頁

(54)名稱

一種核酸配體及其綴合物、其製備方法和用途

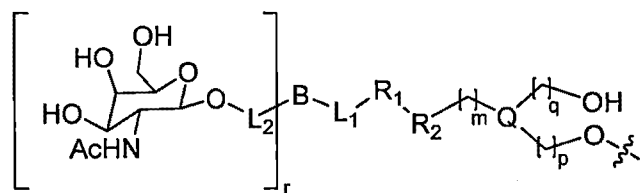
(57)摘要

本揭露提供了一種核酸配體及其綴合物、其製備方法和用途。具體而言，本揭露提供了一種配體，其具有如式(I)所示的結構，本揭露提供的配體藉由與核酸綴合達到了優異的表達抑制效果。



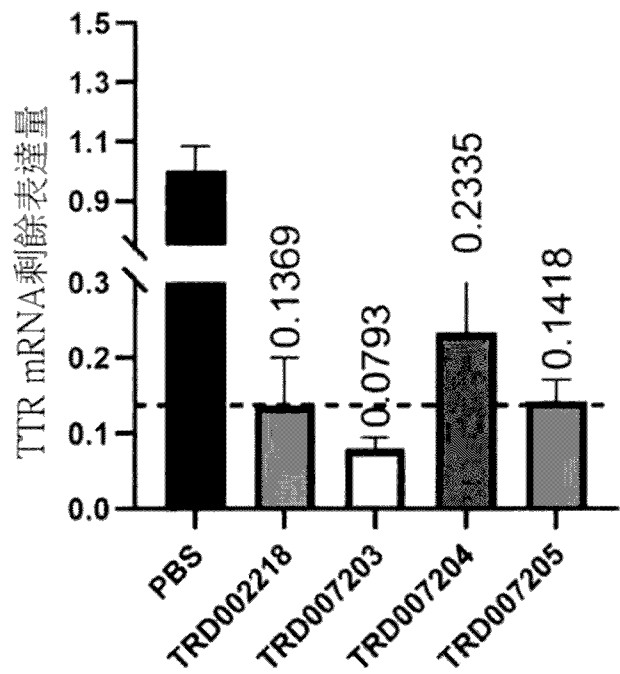
(I)

The present disclosure provides a nucleic acid ligand and its conjugate, preparation method and use thereof. Specifically, the present disclosure provides a ligand having a structure as shown in formula (I), and the ligand provided by the present disclosure achieves excellent expression inhibition effect by conjugating with nucleic acid.



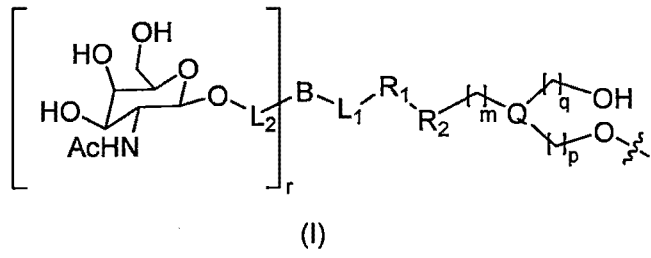
(I)

指定代表圖：



【圖1】

特徵化學式：



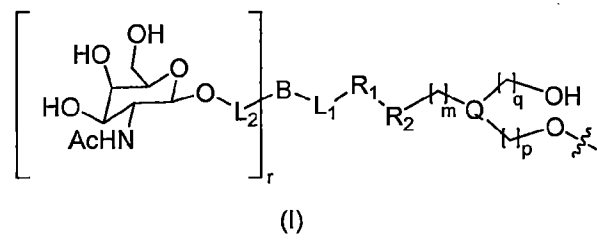
【發明摘要】

【中文發明名稱】 一種核酸配體及其綴合物、其製備方法和用途

【英文發明名稱】 A NUCLEIC ACID LIGAND AND ITS CONJUGATE,
PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

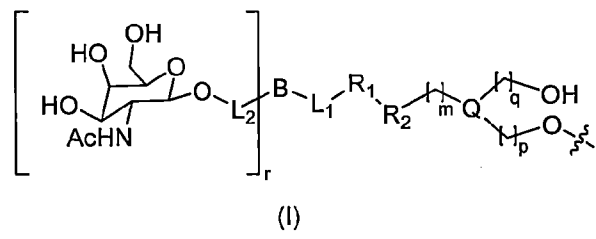
【中文】

本揭露提供了一種核酸配體及其綴合物、其製備方法和用途。具體而言，本揭露提供了一種配體，其具有如式 (I) 所示的結構，本揭露提供的配體藉由與核酸綴合達到了優異的表達抑制效果。



【英文】

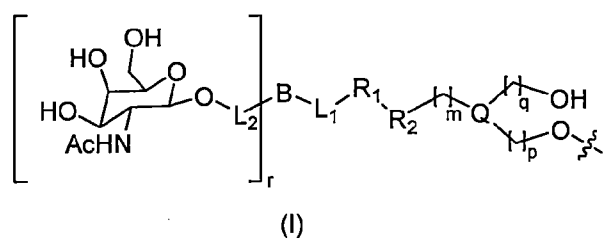
The present disclosure provides a nucleic acid ligand and its conjugate, preparation method and use thereof. Specifically, the present disclosure provides a ligand having a structure as shown in formula (I), and the ligand provided by the present disclosure achieves excellent expression inhibition effect by conjugating with nucleic acid.



【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 一種核酸配體及其綴合物、其製備方法和用途

【英文發明名稱】 A NUCLEIC ACID LIGAND AND ITS CONJUGATE,
PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本揭露關於一種配體及其製備方法。本揭露還關於配體與核酸藉由共價鍵連接形成的核酸配體綴合物，使得到的核酸配體綴合物可以被靶向遞送到肝細胞內，發揮 RNA 干擾的作用。

【先前技術】

【0002】 RNA 干擾是一種有效的沉默基因表達的方式。據統計，在人體內的疾病相關蛋白中，大約超過 80% 的蛋白質不能被目前常規的小分子藥物以及生物大分子製劑所靶向，屬於不可成藥蛋白。利用 RNA 干擾技術，可以根據編碼這些蛋白的 mRNA，設計合適的 siRNA，特異性靶向目標 mRNA 並降解目標 mRNA，從而達到抑制相關的蛋白生成。因此 siRNA 具有非常重要的藥物開發前景。然而要實現體內的治療目的 RNA 干擾效應，需要向體內特定的細胞遞送 siRNA 分子。

【0003】 採用靶向配體綴合 siRNA，利用靶向配體與細胞膜表面的受體分子結合，從而內吞進入到細胞內，是一種有效的藥物遞送方式。例如，去唾液酸糖蛋白受體（ASGPR）是肝細胞特異性表達的受體，在肝細胞表面具有高豐度、胞內外轉換快速的特點。半乳糖、半乳糖胺、N-乙醯半乳糖胺等單糖和多糖分子

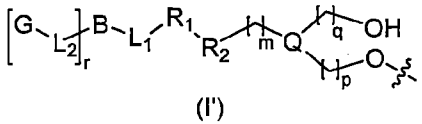
對 ASGPR 有高親和性。文獻報導 (Yuanyu H, LIANG Zicai L, Asialoglycoprotein Receptor and Its Application in Liver-targeted Drug Delivery, Prog. Biochem. Biophys. 2015; 42 (6)) 使用胺基半乳糖分子簇 (GalNAc) 可以有效遞送 RNA 到肝細胞, GalNAc 分子被設計成三價或四價的分子簇, 可以顯著提高單價或二價的 GalNAc 分子靶向肝細胞的能力。

【0004】不同分子簇結構, 和與 RNA 之間不同的連接方式會明顯的影響 siRNA 在體內的活性, 更高的活性意味著更好的治療效果, 或更低的給藥劑量, 在同等藥效下, 更低的給藥劑量也意味著更低的毒性反應。因此合理設計靶向配體和 siRNA 的共價連接方式具有重要意義。

【0005】本揭露提供了一種新的 GalNAc 分子與 RNA 連接的分子結構, 具有更簡潔的合成結構, 並且具有更優的遞送活性, 具有最佳的 RNA 干擾活性。

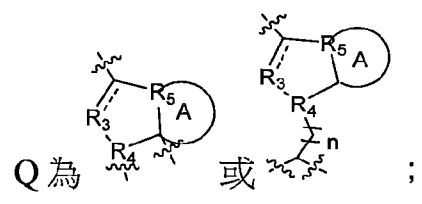
【發明內容】

【0006】第一方面, 本揭露提供了一種具有如式 (I') 所示結構的配體,



其中, L₁ 為 C₁-C₃₀ 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 C=O 間斷的 C₁-C₃₀ 烷基鏈;

R₁ 和 R₂ 獨立地為化學鍵、-NR₆-、-C(=O)-或-OC(=O)-;



↗為單鍵或雙鍵，且當↗為單鍵時， R_3 獨立地為 CR_7R_8 、 NR_6 、O 或 S，
當↗為雙鍵時， R_3 獨立地為 CR_9 或 N；

R_4 獨立地為 CR_9 或 N；

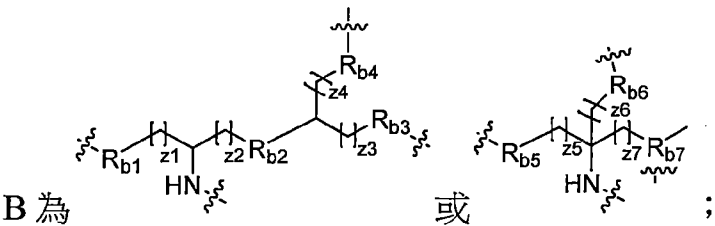
【0007】環 A 不存在，或為環烷基、雜環基、芳基或雜芳基，且當環 A 存在時， R_5 獨立地為 CR_9 或 N，當環 A 不存在時， R_5 獨立地為 CR_7R_8 、 NR_6 或 O；

【0008】 R_6 和 R_9 獨立地為氫、氖、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$ ，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 環烷基、3-12 員雜環基、5-12 員芳基、5-12 員雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基團所取代；

【0009】 R_7 和 R_8 獨立地為氫、氖、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$ ，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 環烷基、3-12 員雜環基、5-12 員芳基、5-12 員雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基團所取代；

【0010】 R' 和 R'' 獨立地為氫、氖、羥基、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基和氰基中的取代基所取代；

【0011】 m 、 n 、 p 和 q 獨立地為 0、1、2、3 或 4；



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

z₁、z₂、z₃、z₄、z₅、z₆、z₇、z₈和 z₉獨立地為 0-10 的整數；

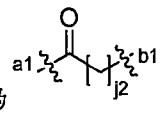
L₂ 為 C₁-C₃₀ 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 C=O 間斷的 C₁-C₃₀
烷基鏈；

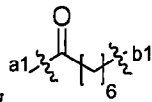
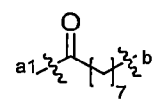
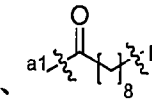
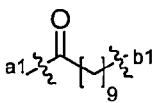
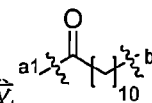
G 為與細胞受體結合的靶向部分；

r 為 1-10 的整數。

【0012】 在一些實施方案中，某些基團的定義如下，未定義的基團同前任
一方案所述（以下簡稱“在一些實施方案中”），L₁ 可為 L₃ 或 L₃-R₁₀-R₁₁-L₃，其
中，L₃ 獨立地為 C₁-C₁₂ 烷基鏈、-(CH₂)_{j1}-C(=O)-(CH₂)_{j2}-或-(CH₂)_{j3}-(CH₂CH₂O)₁₋₄-
(CH₂)_{j4}，R₁₀和 R₁₁獨立地為化學鍵、-NR₁₂-、-C(=O)-或-OC(=O)-，R₁₂為氫或 C₁-
C₁₂ 烷基，j₁、j₂、j₃和 j₄獨立地為 0-10 的整數，較佳 0-2 或 4-10 的整數，更佳
0、1、2、6、7、8、9 或 10。

【0013】 在一些實施方案中，L₁ 可為-(CH₂)_{j1}-C(=O)-(CH₂)_{j2}-，j₁和 j₂的定
義同前任一方案所述。

【0014】 在一些實施方案中，L₁ 可為 ，j₁和 j₂的定義同前任一
方案所述，其中，a₁端與 B 相連，b₁端與 R₁相連。

【0015】 在一些實施方案中， L_1 可為 、、、 或 ，其中，a1 端與 B 相連，b1 端與 R_1 相連。

【0016】 在一些實施方案中， R_1 可為化學鍵且 R_2 可為 $C=O$ 。

【0017】 在一些實施方案中， R_1 可為化學鍵且 R_2 可為 NR_6 ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0018】 在一些實施方案中， R_1 可為化學鍵且 R_2 可為 $-OC(=O)-$ 。

【0019】 在一些實施方案中， R_1 可為 NR_6 且 R_2 可為 $C=O$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0020】 在一些實施方案中， R_1 可為 NR_6 且 R_2 可為 $-OC(=O)-$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0021】 在一些實施方案中， R_2 可為 NR_6 且 R_1 可為 $C=O$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0022】 在一些實施方案中， R_2 可為 NR_6 且 R_1 可為 $-OC(=O)-$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0023】 在一些實施方案中， R_6 可為氫或 C_{1-6} 烷基。

【0024】 在一些實施方案中， R_6 可為氫、甲基、乙基、丙基或異丙基。

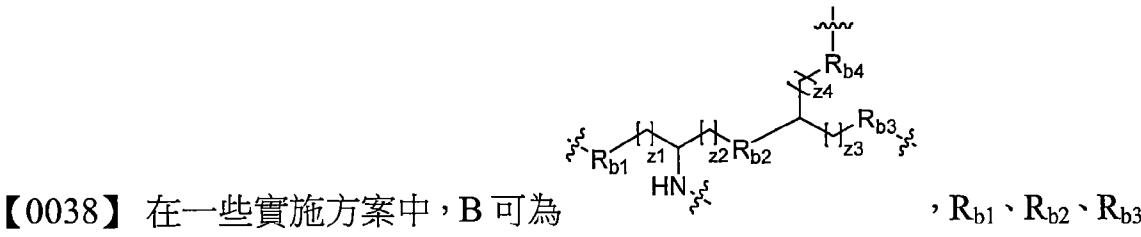
【0025】 在一些實施方案中， R_6 可為氫。

【0026】 在一些實施方案中， R_7 和 R_8 可為氫。

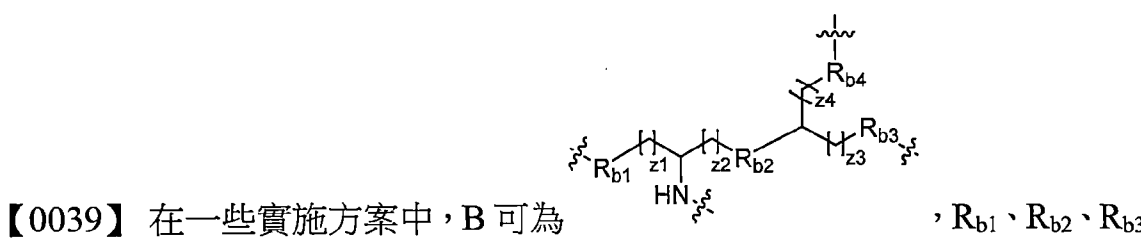
【0027】 在一些實施方案中， R_9 可為氫。

【0028】 在一些實施方案中，環 A 存在時，環 A 可為 C_{6-10} 芳基，較佳苯基。

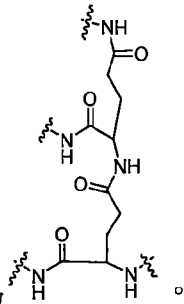
- 【0029】 在一些實施方案中，m 可為 0 或 1。
- 【0030】 在一些實施方案中，m 可為 3。
- 【0031】 在一些實施方案中，n 可為 0 或 1。
- 【0032】 在一些實施方案中，p 和 q 獨立地為 0 或 1。
- 【0033】 在一些實施方案中，p=1 且 q=1。
- 【0034】 在一些實施方案中，p=1 且 q=0。
- 【0035】 在一些實施方案中，p=0 且 q=1。
- 【0036】 在一些實施方案中，p=0 且 q=0。
- 【0037】 在一些實施方案中，z1、z2、z3、z4、z5、z6、z7、z8 和 z9 可獨立地為 0-4 的整數，較佳 0、1 或 2。



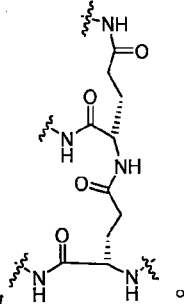
和 R_{b4}獨立地為-C(=O)-或-NHC(=O)-，N 原子與 L₁ 相連，z1、z2、z3 和 z4 的定義同前任一方案所述。



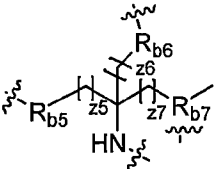
和 R_{b4}獨立地為-C(=O)-或-NHC(=O)-，N 原子與 L₁ 相連，R_{b1}、R_{b3}和 R_{b4}相同，z1、z2、z3 和 z4 的定義同前任一方案所述。



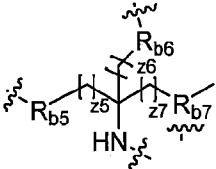
【0040】 在一些實施方案中，B 可為



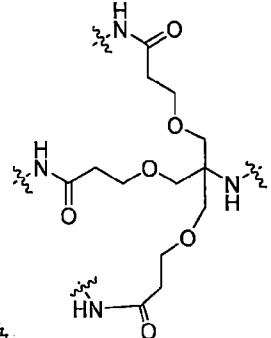
【0041】 在一些實施方案中，B 可為



【0042】 在一些實施方案中，B 可為，R_{b5}、R_{b6}和 R_{b7}獨立地為-C(=O)-(CH₂)_{z8}-O-或-NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-，N 原子與 L₁ 相連，z₅、z₆、z₇、z₈和 z₉ 的定義同前任一方案所述。



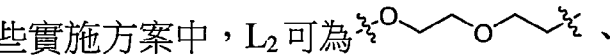
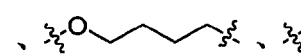
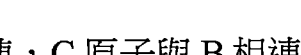
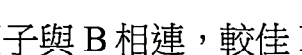
【0043】 在一些實施方案中，B 可為，R_{b5}、R_{b6}和 R_{b7}獨立地為-C(=O)-(CH₂)_{z8}-O-或-NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-，N 原子與 L₁ 相連，R_{b5}、R_{b6}和 R_{b7}相同，z₅、z₆、z₇、z₈和 z₉ 的定義同前任一方案所述。

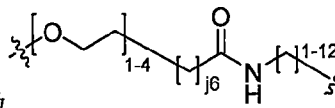


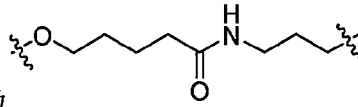
【0044】 在一些實施方案中，B 可為

【0045】 在一些實施方案中， L_2 可為 L_4 或 $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$ ，其中， L_4 獨立地為 C_1-C_{12} 烷基鏈或 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$ ， R_{13} 和 R_{14} 獨立地為化學鍵、 $-NR_{15}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ， R_{15} 獨立地為氫或 C_1-C_{12} 烷基， j_5 和 j_6 獨立地為 0-10 的整數，較佳 0-6 的整數，更佳 0、1、2、3 或 4。

【0046】 在一些實施方案中， L_2 可為 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$ ， j_5 和 j_6 的定義同前任一方案所述。

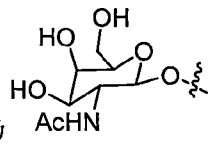
【0047】 在一些實施方案中， L_2 可為 、、或，其中，O 原子與 G 相連，C 原子與 B 相連，較佳 L_2 為或。

【0048】 在一些實施方案中， L_2 可為 ，其中， j_6 的定義同前任一方案所述，O 原子與 G 相連，C 原子與 B 相連。

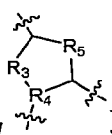
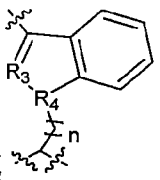
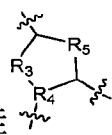
【0049】 在一些實施方案中， L_2 可為 ，其中，O 原子與 G 相連，C 原子與 B 相連。

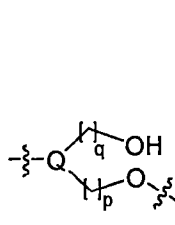
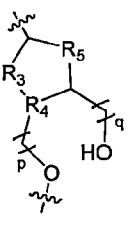
【0050】 在一些實施方案中，G 可為去唾液酸糖蛋白受體靶向部分。

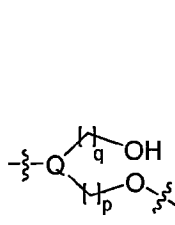
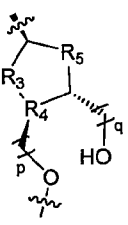
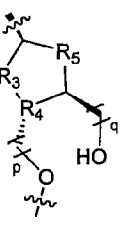
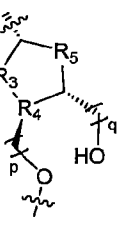
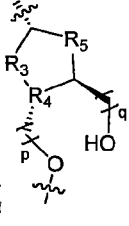
【0051】 在一些實施方案中，G 可為半乳糖、半乳糖胺、N-甲醯基半乳糖胺、N-乙醯基半乳糖胺、N-丙醯基半乳糖胺、N-正丁醯基半乳糖胺或 N-異丁醯基半乳糖胺。

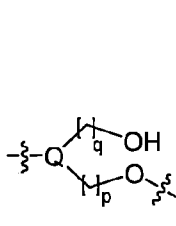
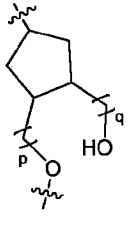
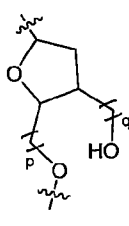
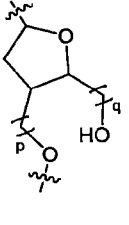
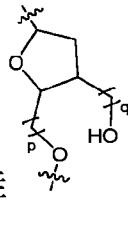
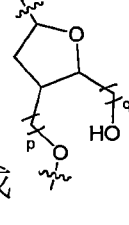
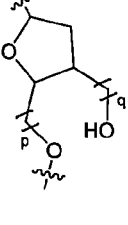
【0052】 在一些實施方案中，G 可為 。

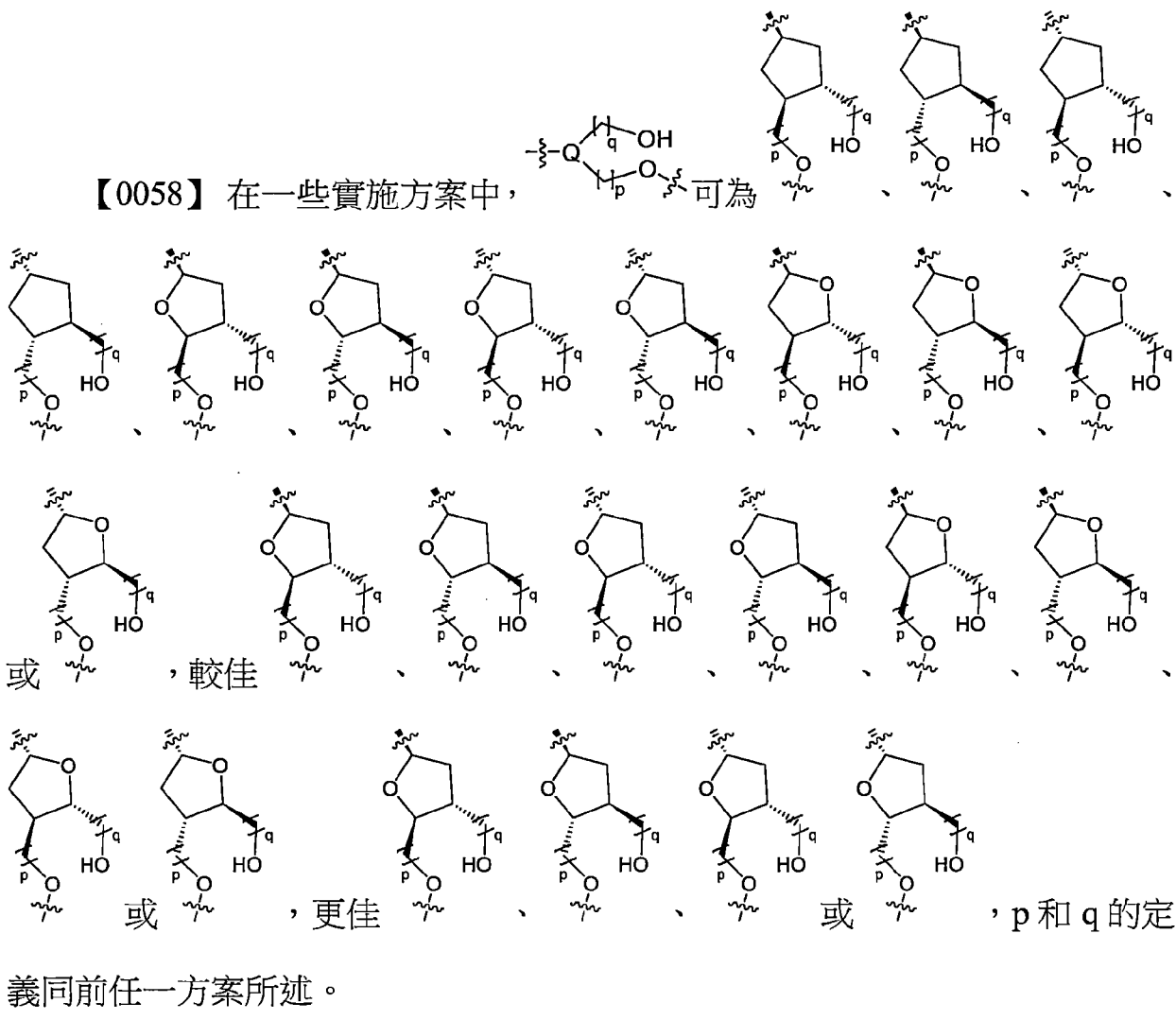
【0053】 在一些實施方案中，r 可為 3、4、5 或 6，例如 3。

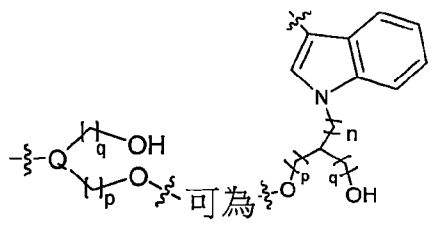
【0054】 在一些實施方案中，Q 可為  或 ，較佳 ，其中，R₃、R₄、R₅和 n 的定義同前任一方案所述。

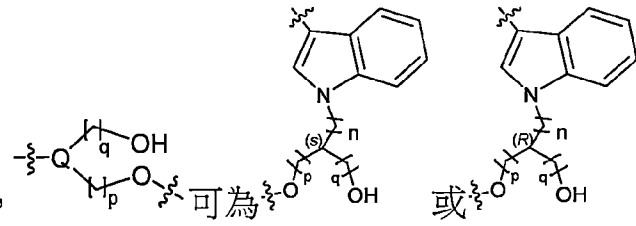
【0055】 在一些實施方案中， 可為 ，其中，R₃、R₄、R₅、p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0056】 在一些實施方案中， 可為 、、或 ，其中，R₃、R₄、R₅、p 和 q 的定義同前任一方案所述。

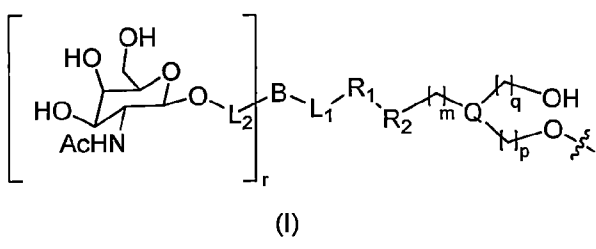
【0057】 在一些實施方案中， 可為 、 或 ，較佳  或 ，更佳 ，p 和 q 的定義同前任一方案所述。



【0061】 在一些實施方案中，， n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

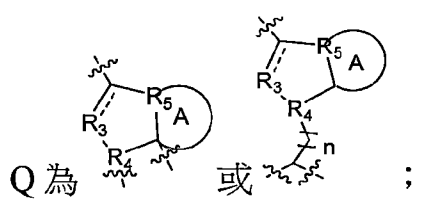
【0062】 在一些實施方案中，， n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0063】 本揭露提供了一種具有如式 (I) 所示結構的配體，



其中， L_1 為 C_1 - C_{30} 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 $C=O$ 間斷的 C_1 - C_{30} 烷基鏈；

R_1 和 R_2 獨立地為化學鍵、 $-NR_6-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ；



--- 為單鍵或雙鍵，且當 --- 為單鍵時， R_3 獨立地為 CR_7R_8 、 NR_6 、 O 或 S ，
當 = 為雙鍵時， R_3 獨立地為 CR_9 或 N ；
 R_4 獨立地為 CR_9 或 N ；

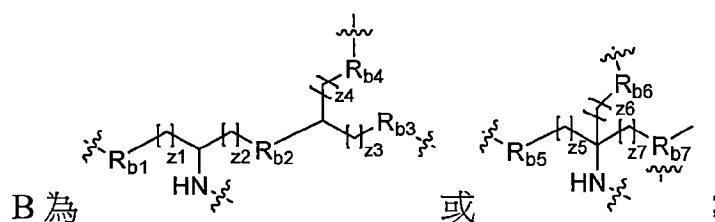
【0064】環 A 不存在，或為環烷基、雜環基、芳基或雜芳基，且當環 A 存在時， R_5 獨立地為 CR_9 或 N，當環 A 不存在時， R_5 獨立地為 CR_7R_8 、 NR_6 或 O；

【0065】 R_6 和 R_9 獨立地為氫、氖、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$ ，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 環烷基、3-12 員雜環基、5-12 員芳基、5-12 員雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基團所取代；

【0066】 R_7 和 R_8 獨立地為氫、氖、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$ ，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 環烷基、3-12 員雜環基、5-12 員芳基、5-12 員雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基團所取代；

【0067】 R' 和 R'' 獨立地為氫、氖、羥基、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基和氰基中的取代基所取代；

【0068】 m 、 n 、 p 和 q 獨立地為 0、1、2、3 或 4；



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

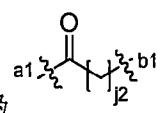
$z1$ 、 $z2$ 、 $z3$ 、 $z4$ 、 $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 獨立地為 0-10 的整數；

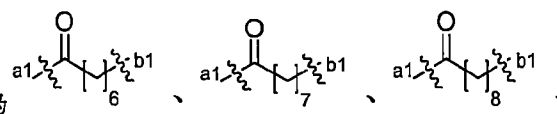
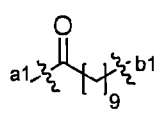
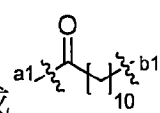
L_2 為 C_1-C_{30} 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 $C=O$ 間斷的 C_1-C_{30} 烷基鏈；

r 為 1-10 的整數。

【0069】 在一些實施方案中， L_1 可為 L_3 或 $L_3-R_{10}-R_{11}-L_3$ ，其中， L_3 獨立地為 C_1-C_{12} 烷基鏈、 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ 或 $-(CH_2)_{j3}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j4}-$ ； R_{10} 和 R_{11} 獨立地為化學鍵、 $-NR_{12}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ； R_{12} 為氫或 C_1-C_{12} 烷基； $j1$ 、 $j2$ 、 $j3$ 和 $j4$ 獨立地為 0-10 的整數，較佳 0-2 或 4-10 的整數，更佳 0、1、2、6、7、8、9 或 10。

【0070】 在一些實施方案中， L_1 可為 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ ， $j1$ 和 $j2$ 的定義同前任一方案所述。

【0071】 在一些實施方案中， L_1 可為 ， $j1$ 和 $j2$ 的定義同前任一方案所述，其中， $a1$ 端與 B 相連， $b1$ 端與 R_1 相連。

【0072】 在一些實施方案中， L_1 可為 、 或 ，其中， $a1$ 端與 B 相連， $b1$ 端與 R_1 相連。

【0073】 在一些實施方案中， R_1 可為化學鍵且 R_2 可為 $C=O$ 。

【0074】 在一些實施方案中， R_1 可為化學鍵且 R_2 可為 NR_6 ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0075】 在一些實施方案中， R_1 可為化學鍵且 R_2 可為 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 。

【0076】 在一些實施方案中， R_1 可為 NR_6 且 R_2 可為 $\text{C}=\text{O}$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0077】 在一些實施方案中， R_1 可為 NR_6 且 R_2 可為 $-\text{OC}(=\text{O})-$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0078】 在一些實施方案中， R_2 可為 NR_6 且 R_1 可為 $\text{C}=\text{O}$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0079】 在一些實施方案中， R_2 可為 NR_6 且 R_1 可為 $-\text{OC}(=\text{O})-$ ， R_6 的定義同前任一方案所述。

【0080】 在一些實施方案中， R_6 可為氫或 C_{1-6} 烷基。

【0081】 在一些實施方案中， R_6 可為氫、甲基、乙基、丙基或異丙基。

【0082】 在一些實施方案中， R_6 可為氫。

【0083】 在一些實施方案中， R_7 和 R_8 可為氫。

【0084】 在一些實施方案中， R_9 可為氫。

【0085】 在一些實施方案中，環 A 存在時，環 A 可為 C_{6-10} 芳基，較佳苯基。

【0086】 在一些實施方案中， m 可為 0 或 1。

【0087】 在一些實施方案中， m 可為 3。

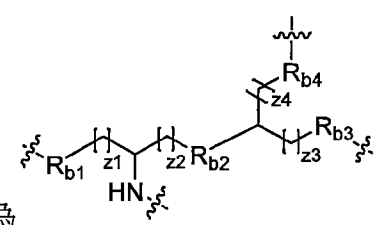
【0088】 在一些實施方案中， n 可為 0 或 1。

【0089】 在一些實施方案中， p 和 q 獨立地為 0 或 1。

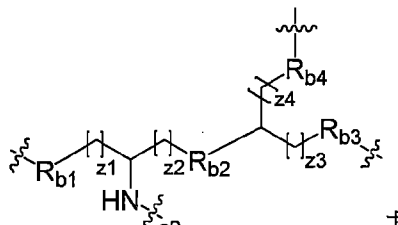
【0090】 在一些實施方案中， $p=1$ 且 $q=1$ 。

【0091】 在一些實施方案中， $p=1$ 且 $q=0$ 。

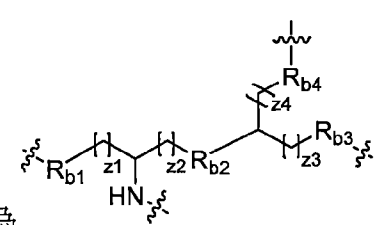
- 【0092】 在一些實施方案中， $p=0$ 且 $q=1$ 。
- 【0093】 在一些實施方案中， $p=0$ 且 $q=0$ 。
- 【0094】 在一些實施方案中， $z1$ 、 $z2$ 、 $z3$ 、 $z4$ 、 $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 可獨立地為 0-4 的整數，較佳 0、1 或 2。



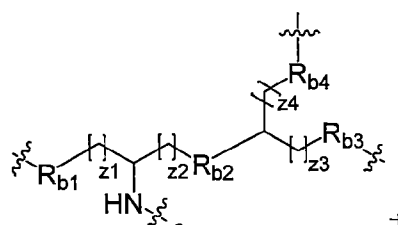
【0095】 在一些實施方案中，B 可為 R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 獨立地為 $-C(=O)-$ 或 $-NHC(=O)-$ ，N 原子與 L_1 相連， $z1$ 、 $z2$ 、 $z3$ 和 $z4$ 的定



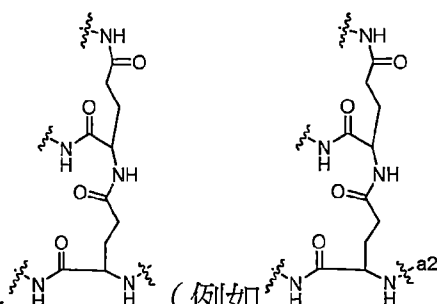
義同前任一方案所述（例如，其中 $a2$ 端的 N 原子與 L_1 相連）。

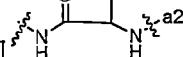


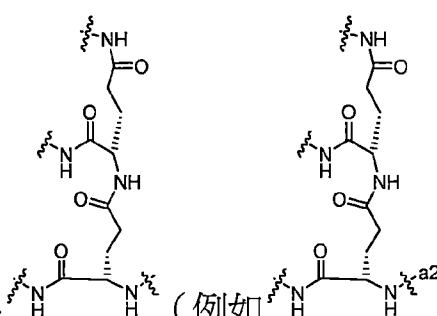
【0096】 在一些實施方案中，B 可為 R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 獨立地為 $-C(=O)-$ 或 $-NHC(=O)-$ ，N 原子與 L_1 相連， R_{b1} 、 R_{b3} 和 R_{b4} 相同，

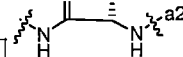


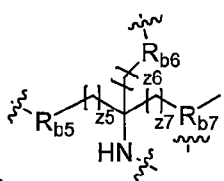
$z1$ 、 $z2$ 、 $z3$ 和 $z4$ 的定義同前任一方案所述（例如，其中 $a2$ 端的 N 原子與 L_1 相連）。

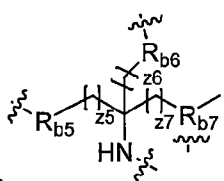


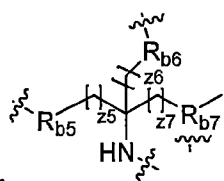
【0097】 在一些實施方案中，B 可為 (例如 , 其中 a2 端的 N 原子與 L₁ 相連)。

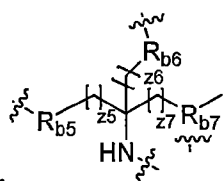


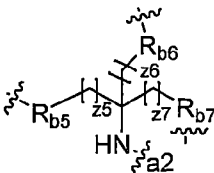
【0098】 在一些實施方案中，B 可為 (例如 , 其中 a2 端的 N 原子與 L₁ 相連)。

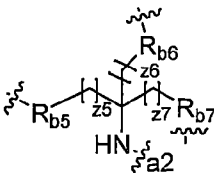


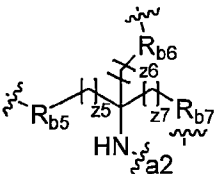
【0099】 在一些實施方案中，B 可為 , R_{b5}、R_{b6} 和 R_{b7} 獨立地為 -C(=O)-(CH₂)_{z8}-O- 或 -NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-，N 原子與 L₁ 相連，z5、z6、z7、z8 和 z9 的定義同前任一方案所述。

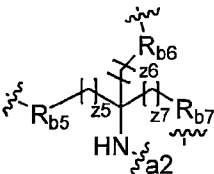


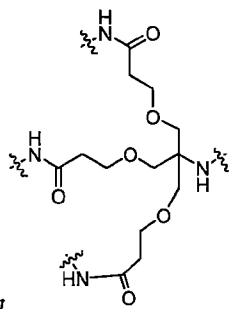
【0100】 在一些實施方案中，B 可為 , R_{b5}、R_{b6} 和 R_{b7} 獨立地為 -C(=O)-(CH₂)_{z8}-O- 或 -NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-，N 原子與 L₁ 相連，R_{b5}、R_{b6} 和 R_{b7} 相同，z5、z6、z7、z8 和 z9 的定義同前任一方案所述。

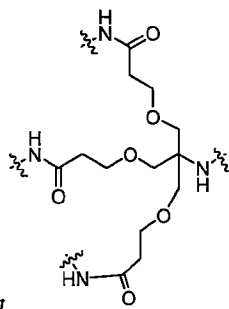
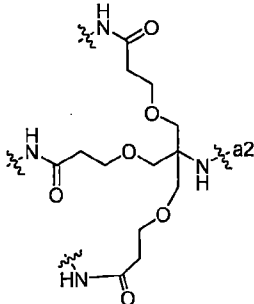


【0101】 在一些實施方案中，B 可為 ， R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 獨立地為 $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 或 $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ，a2 端的 N 原子與 L_1 相連，z5、z6、z7、z8 和 z9 的定義同前任一方案所述。



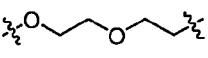
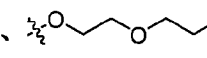
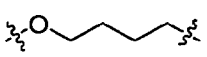
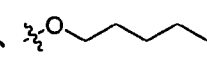
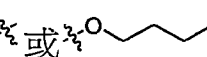
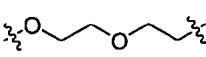
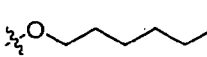
【0102】 在一些實施方案中，B 可為 ， R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 獨立地為 $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 或 $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ ，a2 端的 N 原子與 L_1 相連， R_{b5} 、 R_{b6} 和 R_{b7} 相同，z5、z6、z7、z8 和 z9 的定義同前任一方案所述。



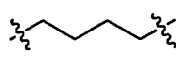
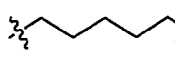
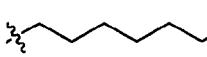
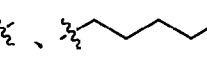
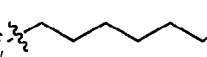
【0103】 在一些實施方案中，B 可為  (例如 ，其中 a2 端的 N 原子與 L_1 相連)。

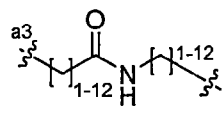
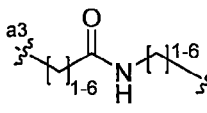
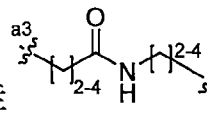
【0104】 在一些實施方案中， L_2 可為 L_4 或 $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$ ，其中， L_4 獨立地為 C_1-C_{12} 烷基鏈或 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$ ， R_{13} 和 R_{14} 獨立地為化學鍵、 $-NR_{15}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ， R_{15} 獨立地為氫或 C_1-C_{12} 烷基，j5 和 j6 獨立地為 0-10 的整數，較佳 0-6 的整數，更佳 0、1、2、3 或 4。

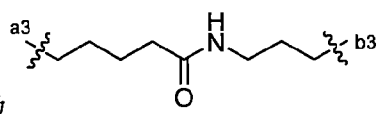
【0105】 在一些實施方案中， L_2 可為 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$ ， $j5$ 和 $j6$ 的定義同前任一方案所述。

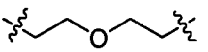
【0106】 在一些實施方案中， L_2 可為 、、、 或 ，較佳  或 ，其中，O 原子與 G 相連，C 原子與 B 相連。

【0107】 在一些實施方案中， L_2 可為 C_1 - C_{12} 烷基鏈。

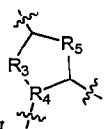
【0108】 在一些實施方案中， L_2 可為 、、、 或 。

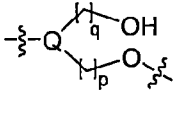
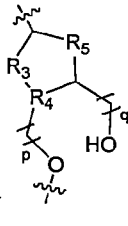
【0109】 在一些實施方案中， L_2 可為 ，較佳 ，更佳 ，其中， $a3$ 端與 O 相連， $b3$ 端與 B 相連。

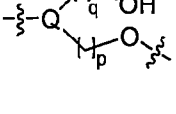
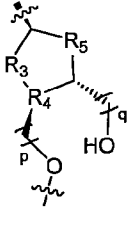
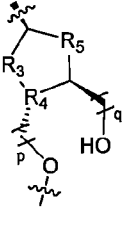
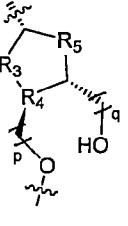
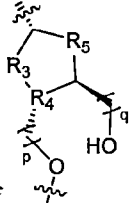
【0110】 在一些實施方案中， L_2 可為 ，其中， $a3$ 端與 O 相連， $b3$ 端與 B 相連。

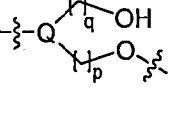
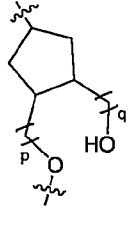
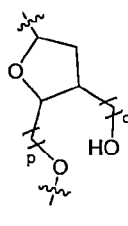
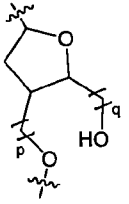
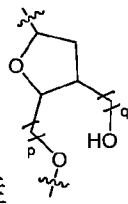
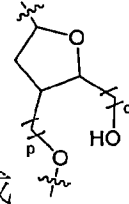
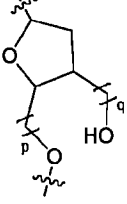
【0111】 在一些實施方案中， L_2 可為 。

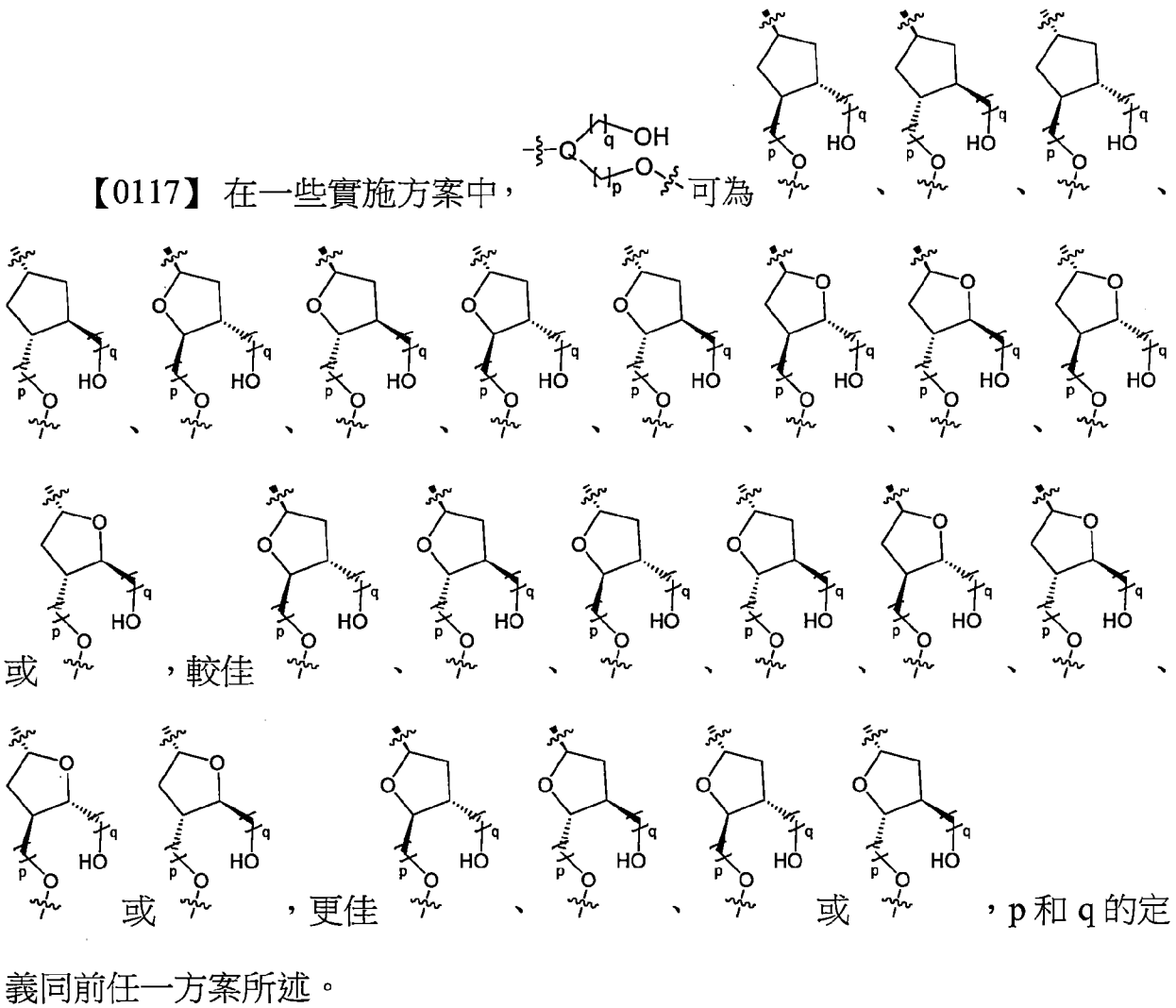
【0112】 在一些實施方案中， r 可為 3、4、5 或 6，較佳 3。

【0113】 在一些實施方案中， Q 可為 ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 的定義同前任一方案所述。

【0114】 在一些實施方案中， 可為 ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

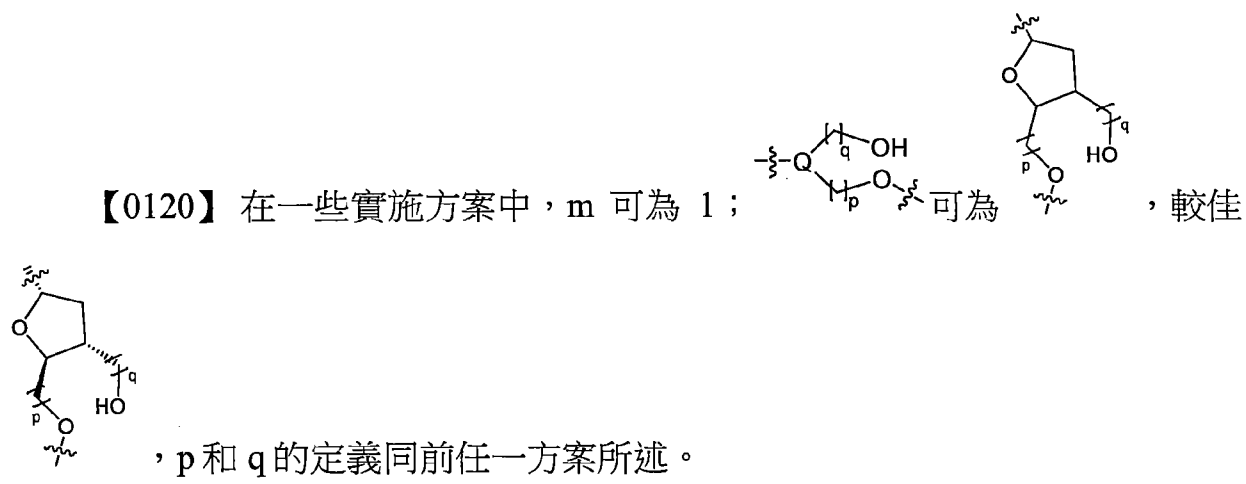
【0115】 在一些實施方案中， 可為 、、 或 ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0116】 在一些實施方案中， 可為 、 或 ，較佳  或 ，更佳 ， p 和 q 的定義同前任一方案所述。

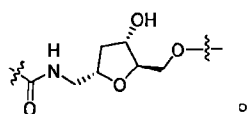


【0118】 在一些實施方案中，-R₁-R₂-可為-C(=O)-NR₆-，其中 C 原子較佳與 L₁相連，R₆的定義同前任一方案所述。

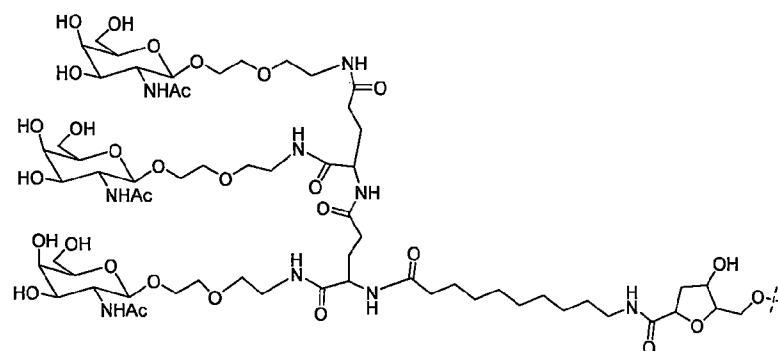
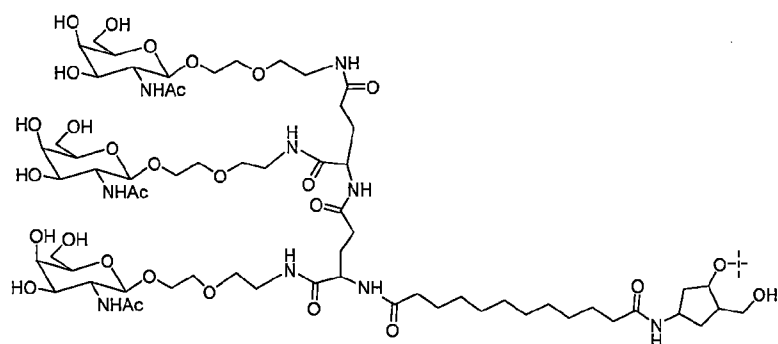
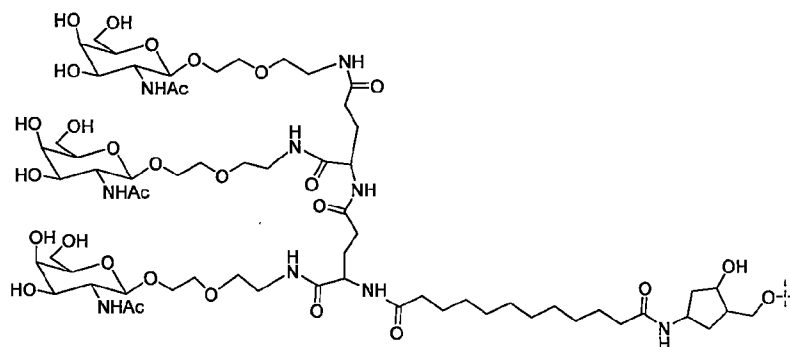
【0119】 在一些實施方案中，m 可為 1。

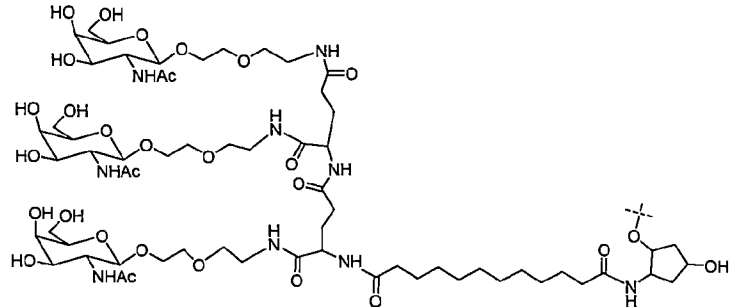
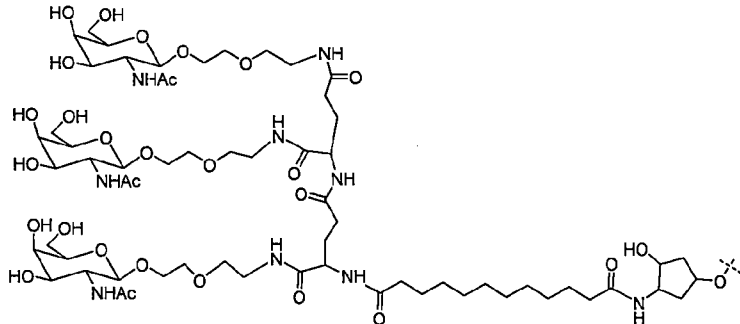
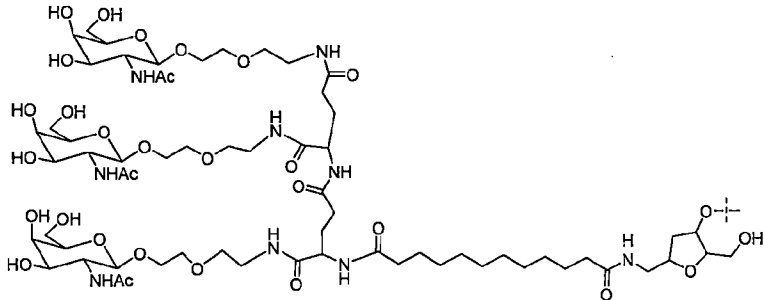
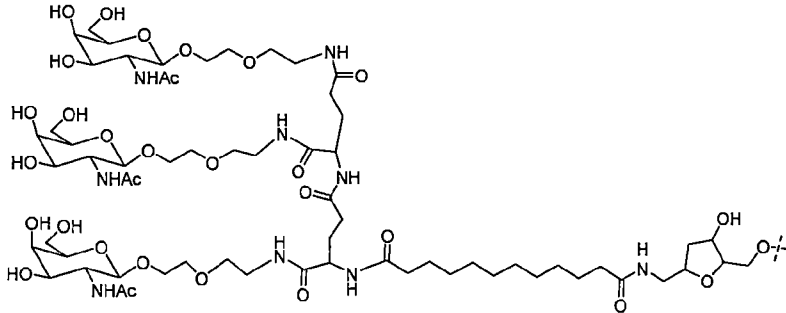
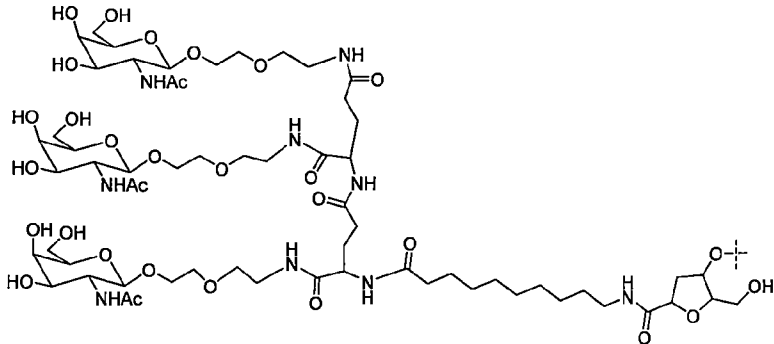


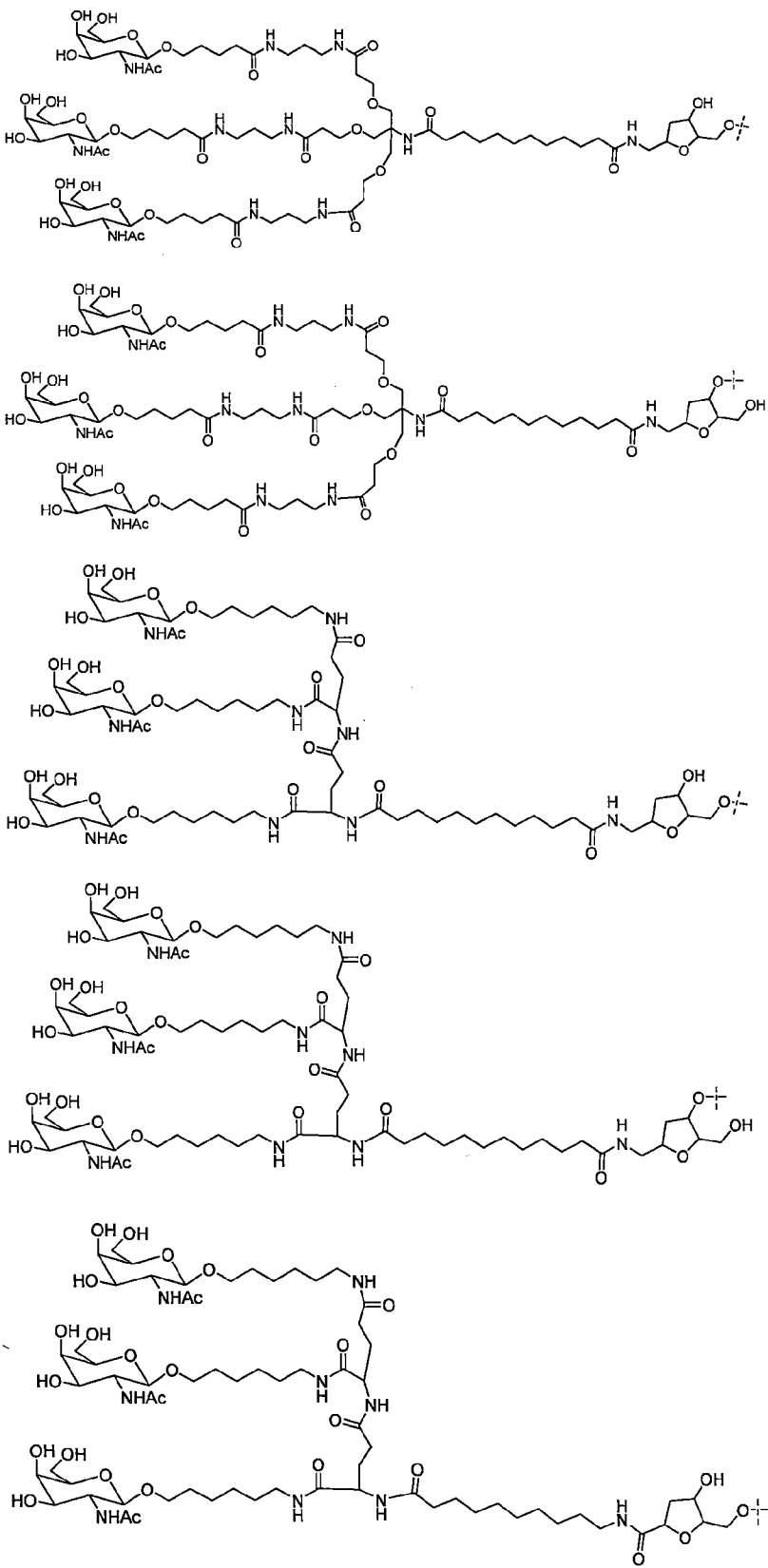
可為，較佳

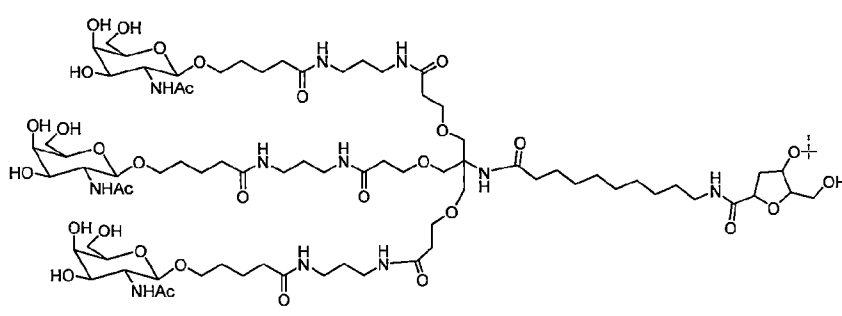
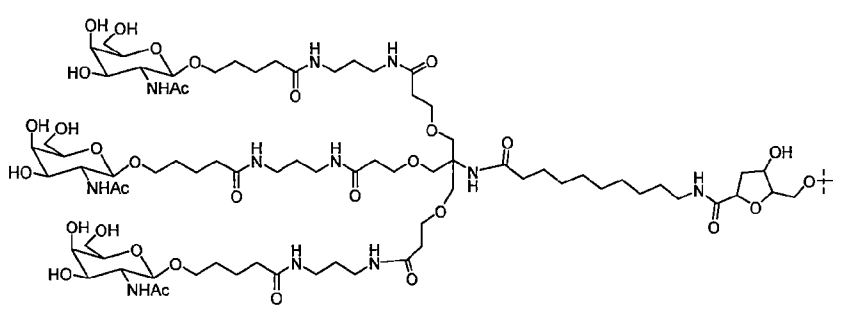
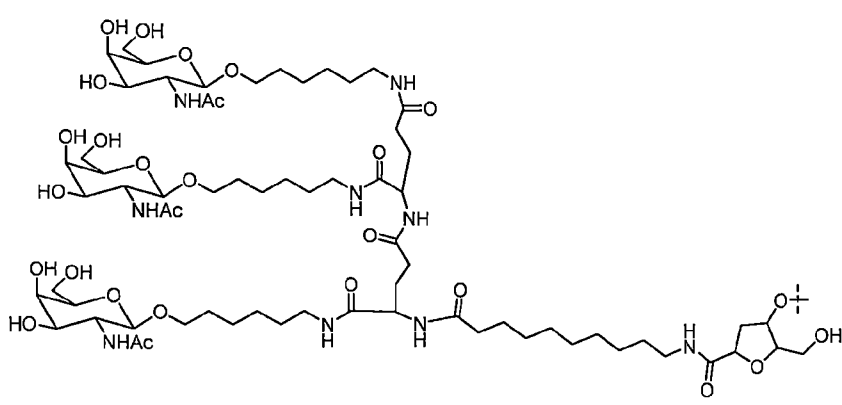


【0122】 在一些實施方案中，該配體可為以下任一結構，



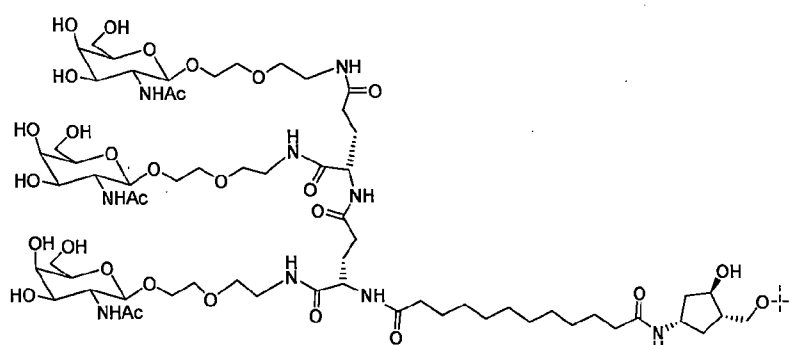
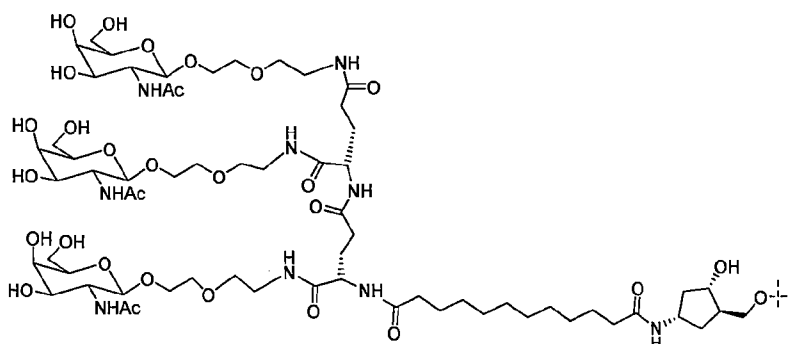
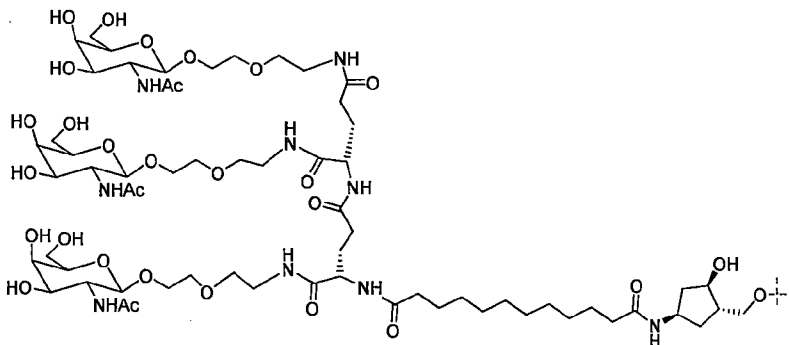
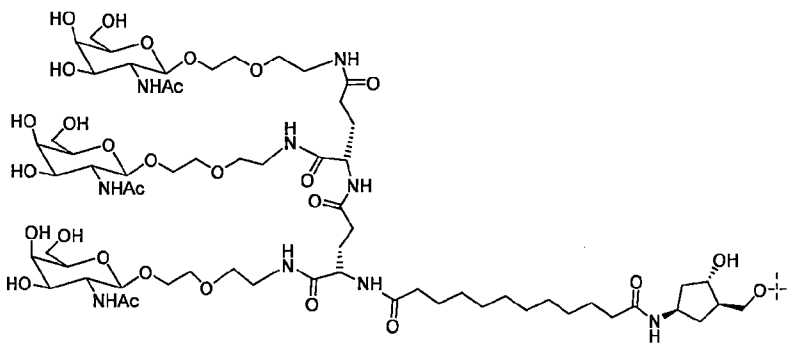


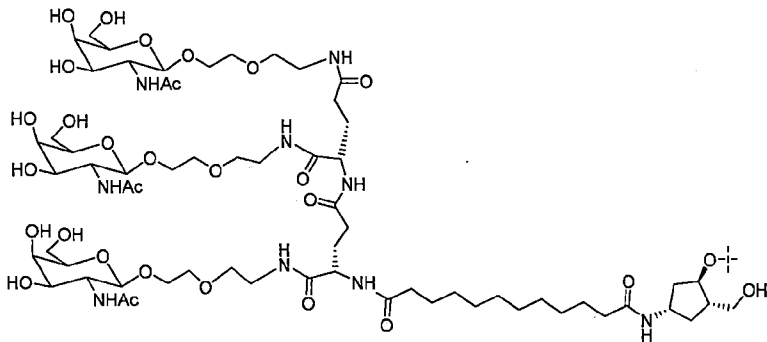
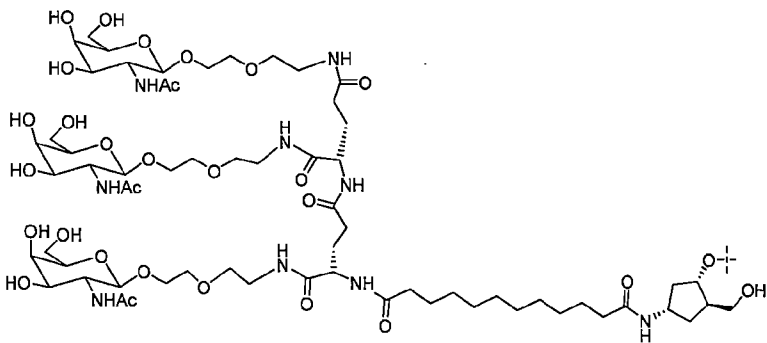
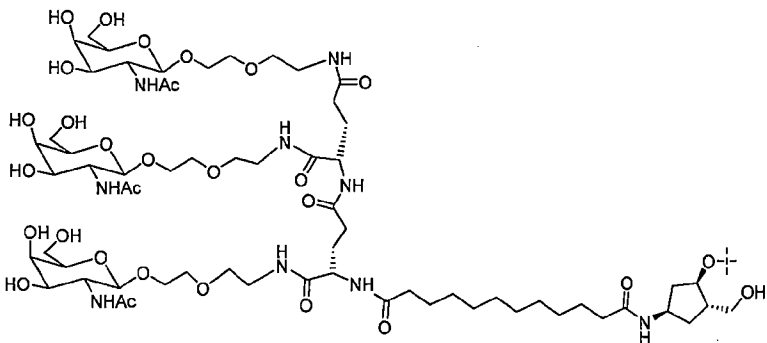
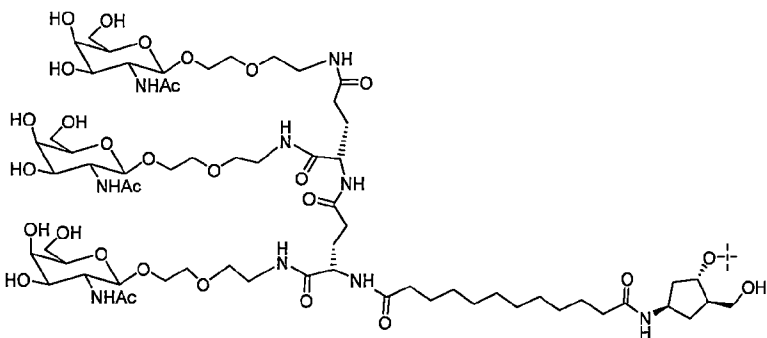


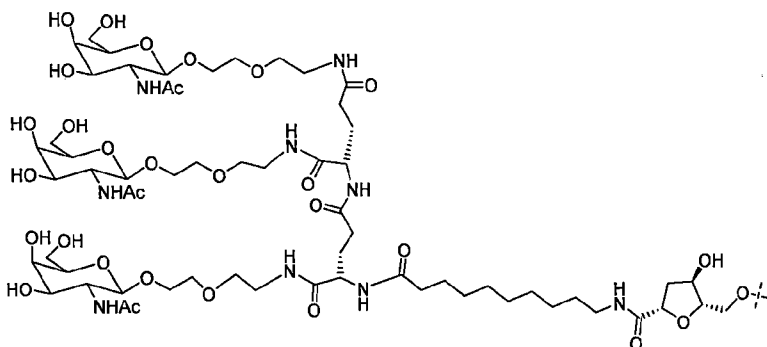
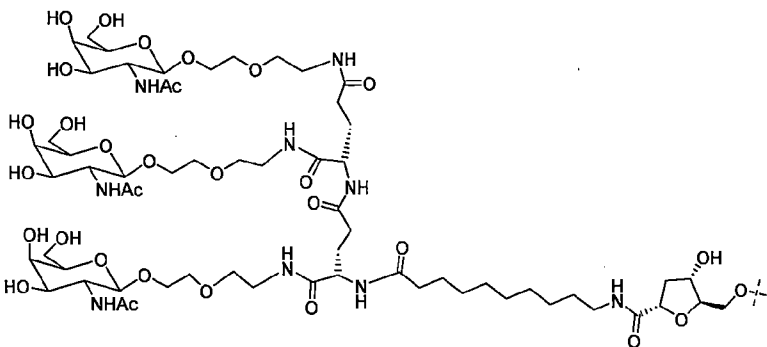
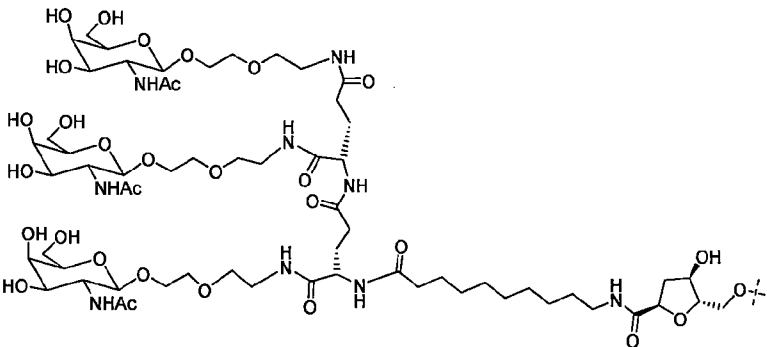
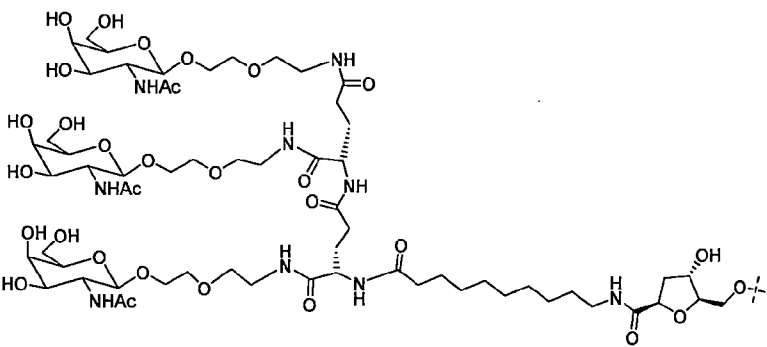


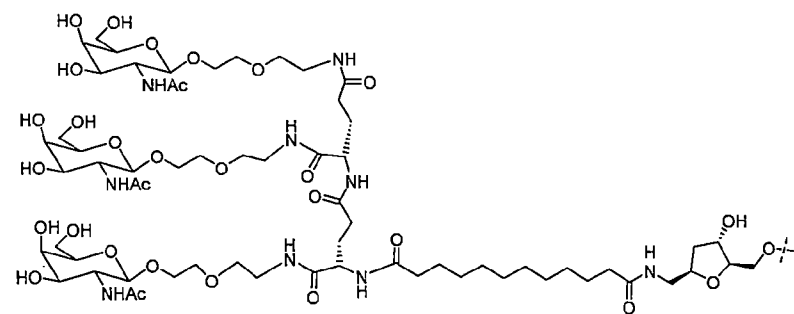
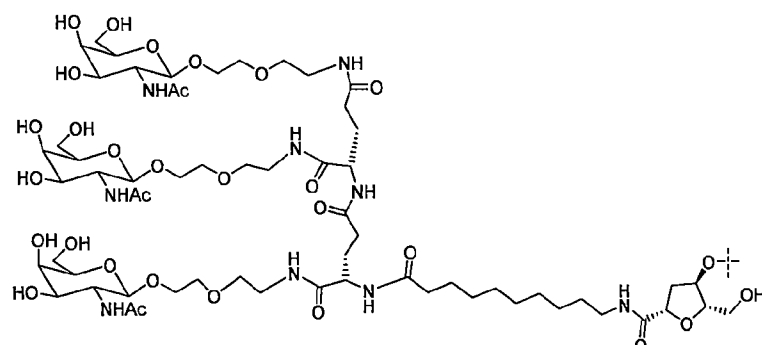
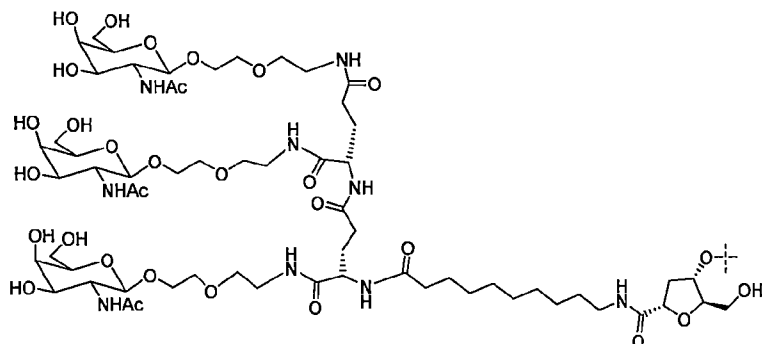
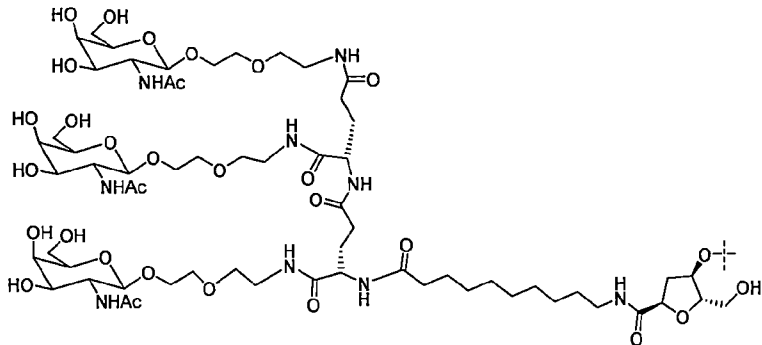
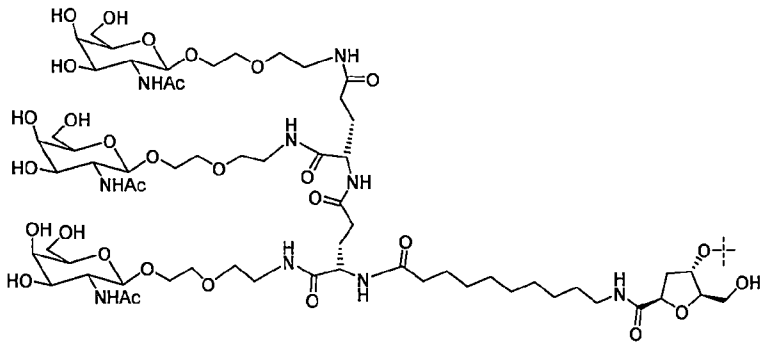
或

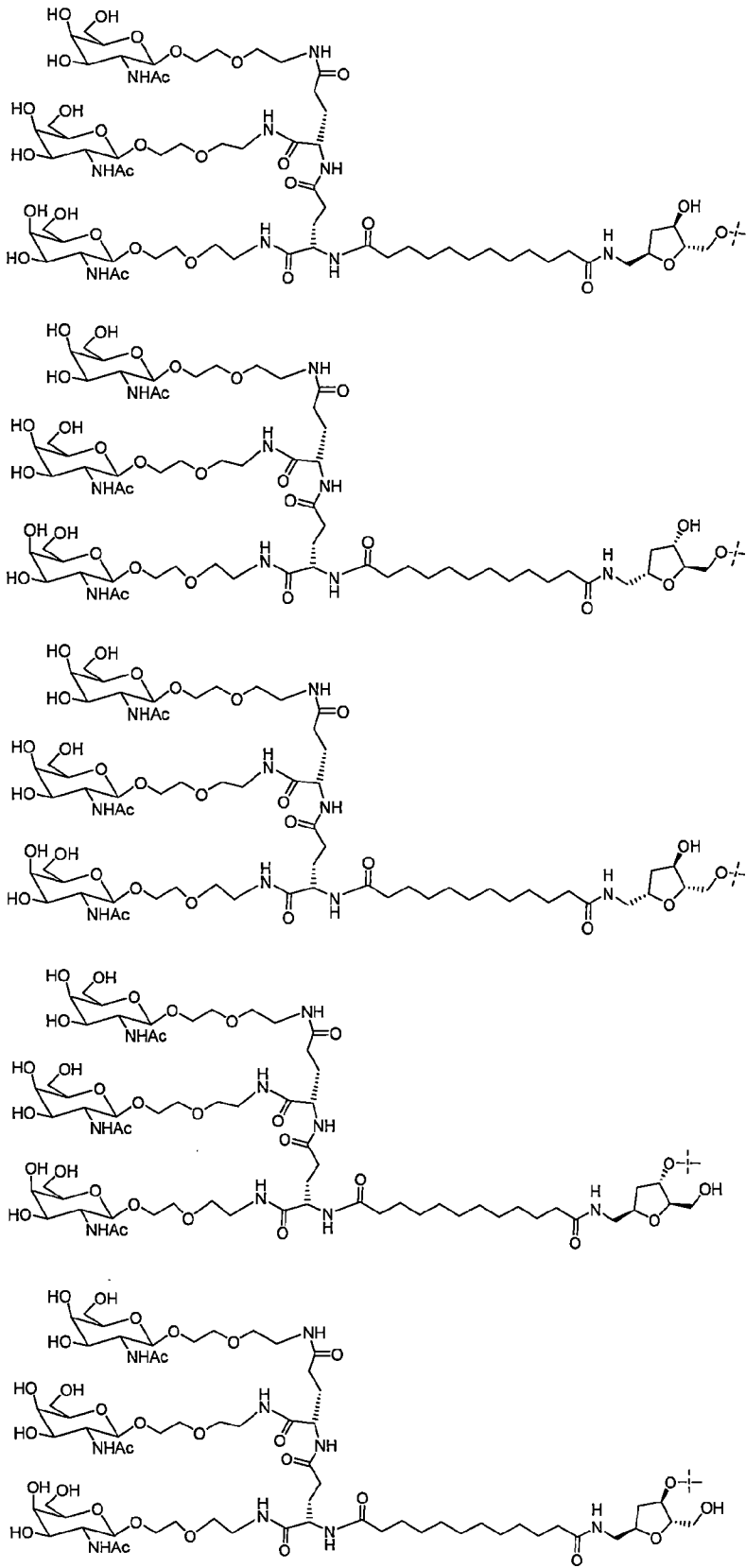
【0123】 在一些實施方案中，該配體可為以下任一結構，

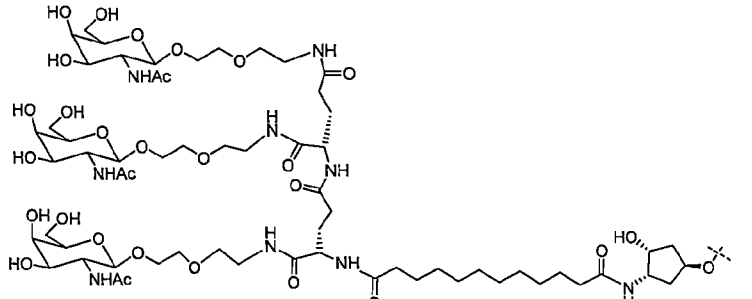
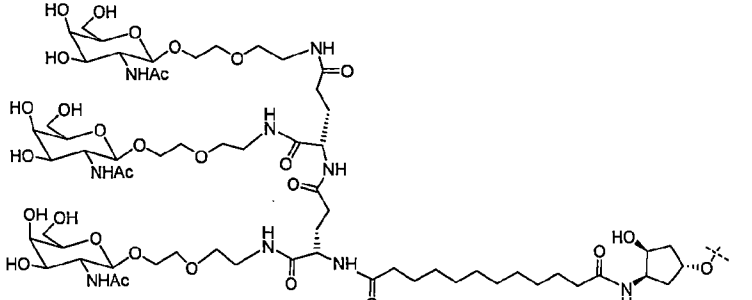
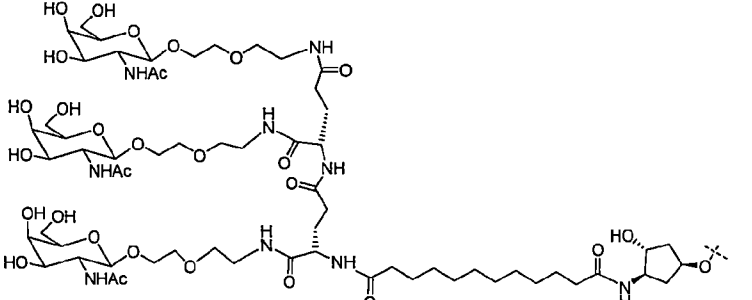
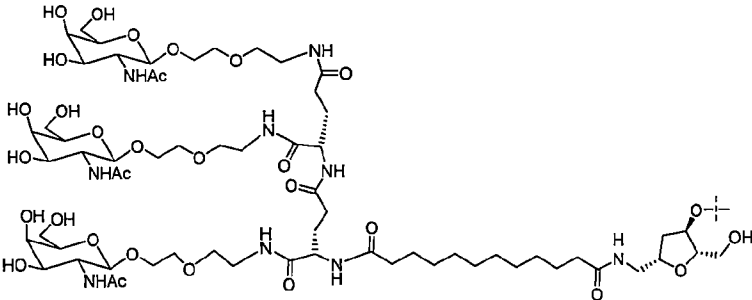
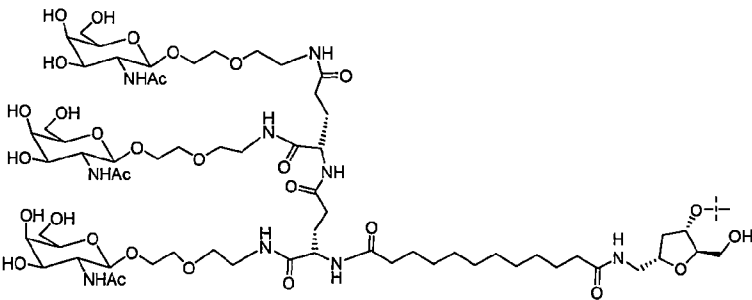


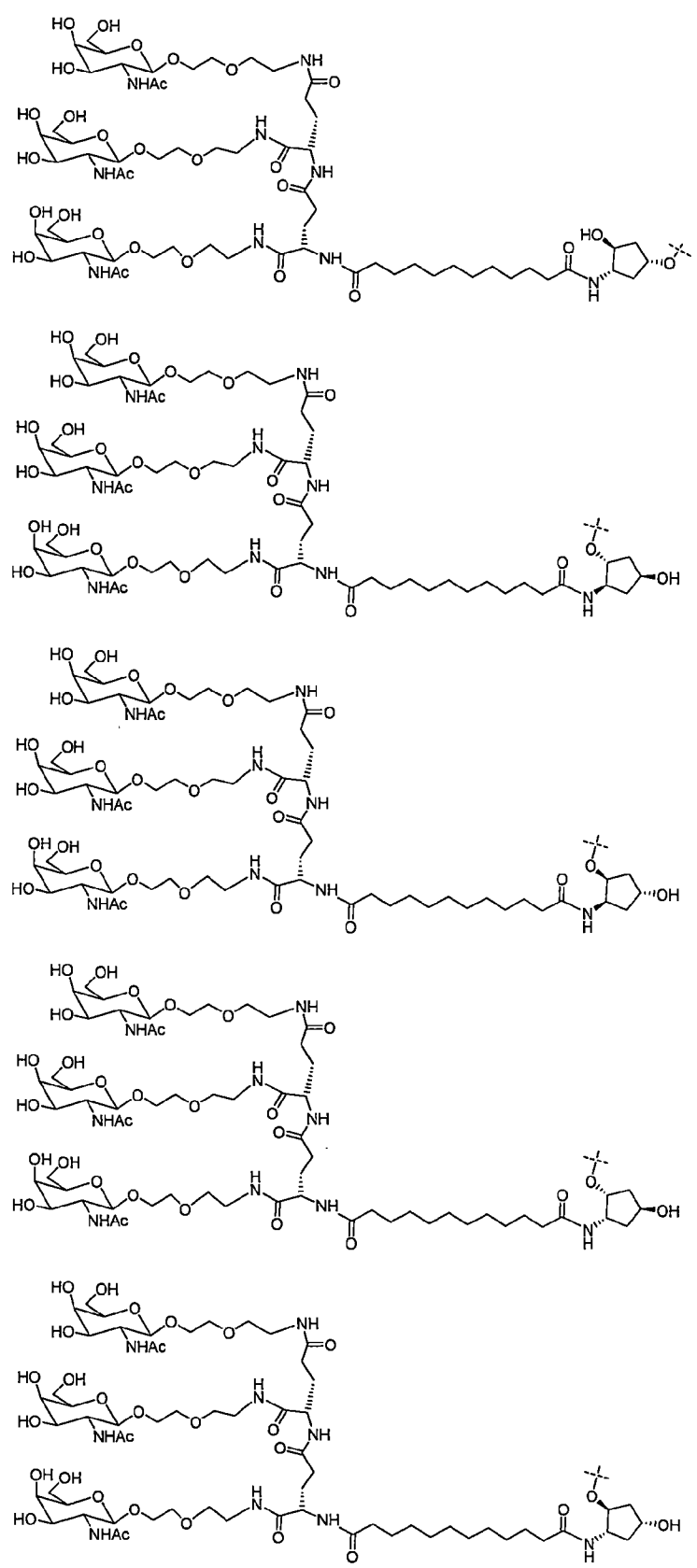


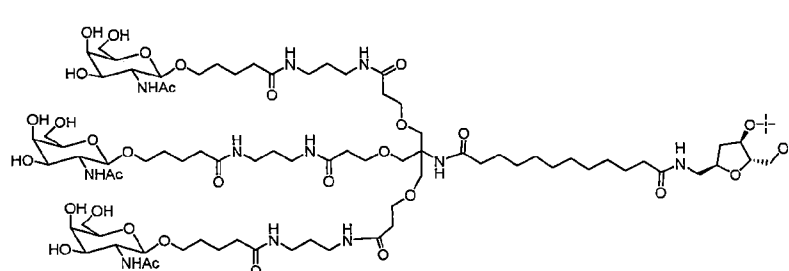
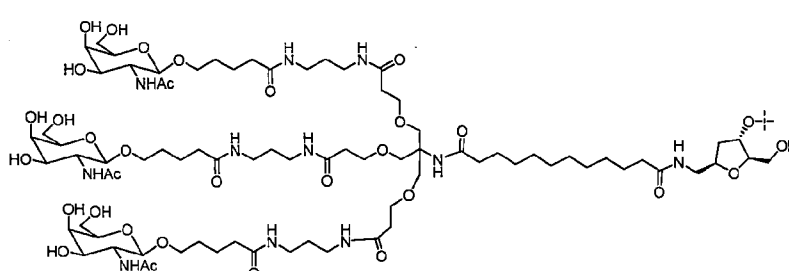
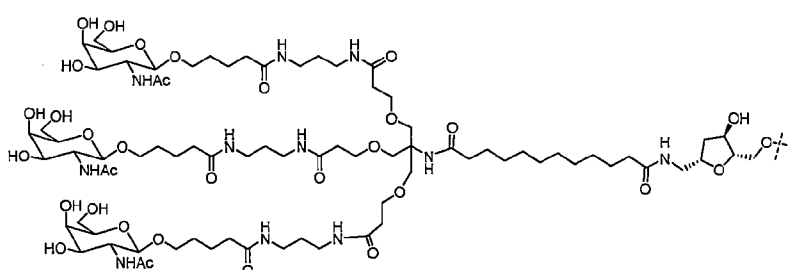
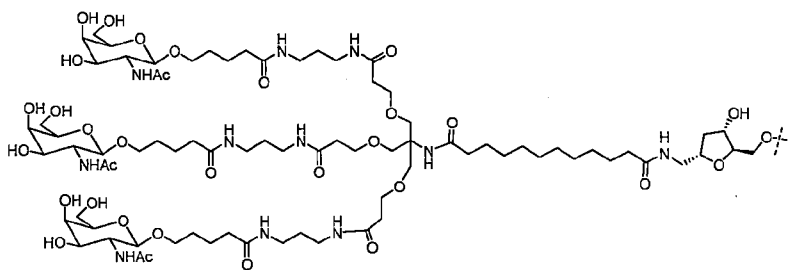
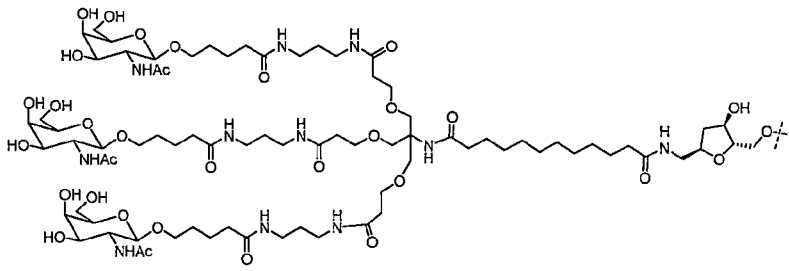
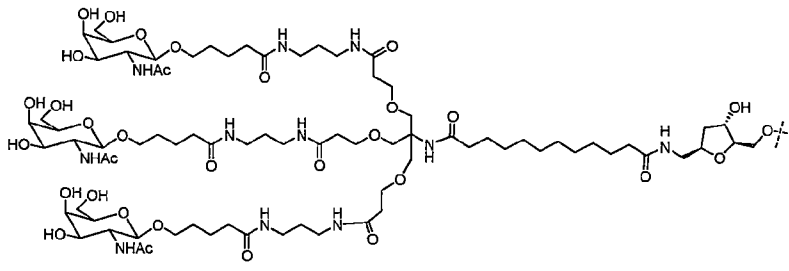


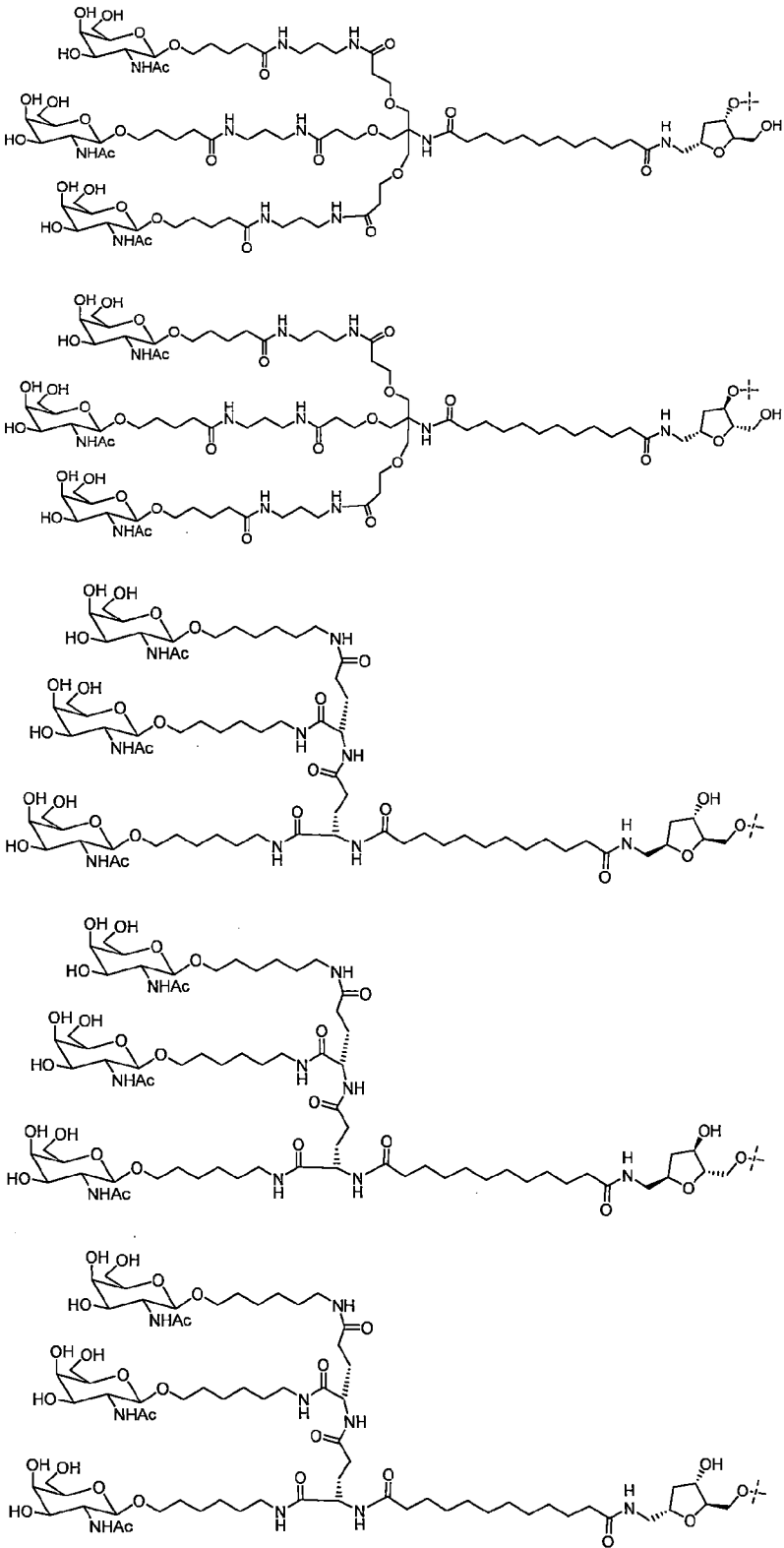


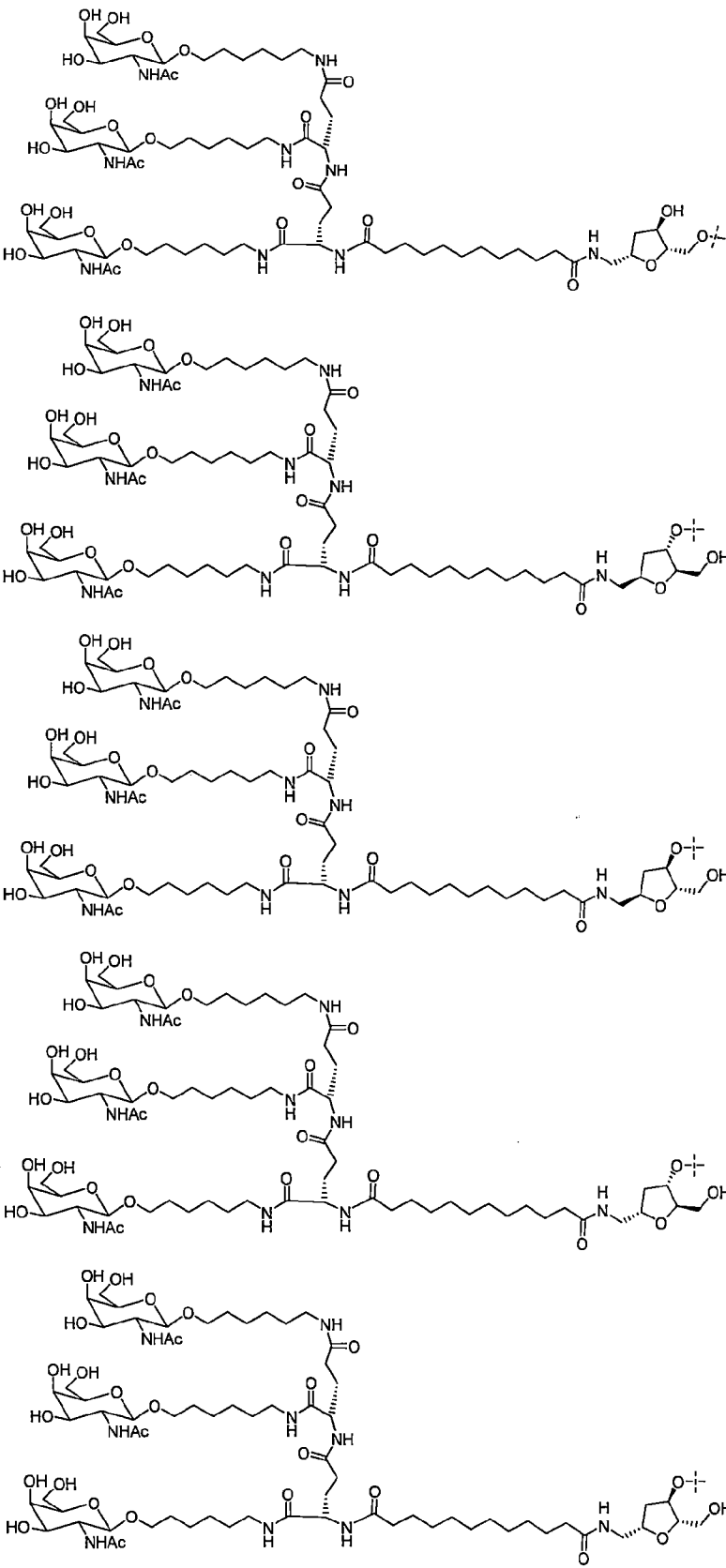


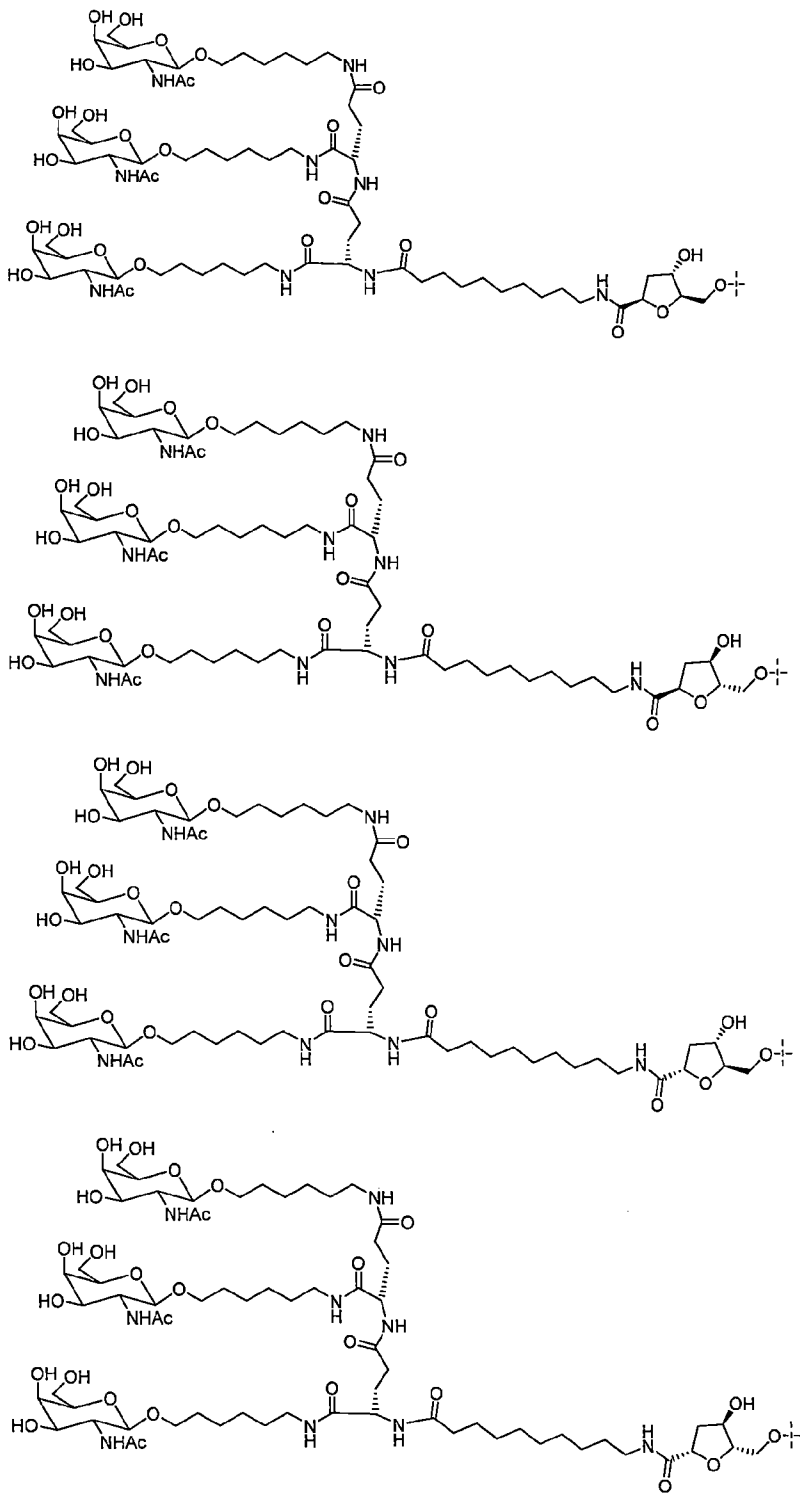


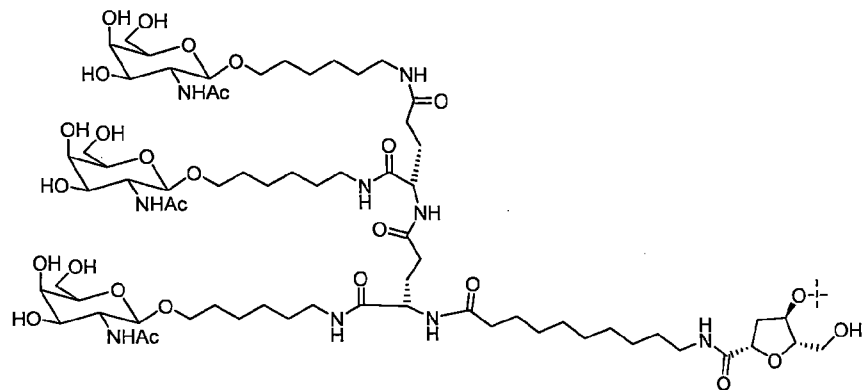
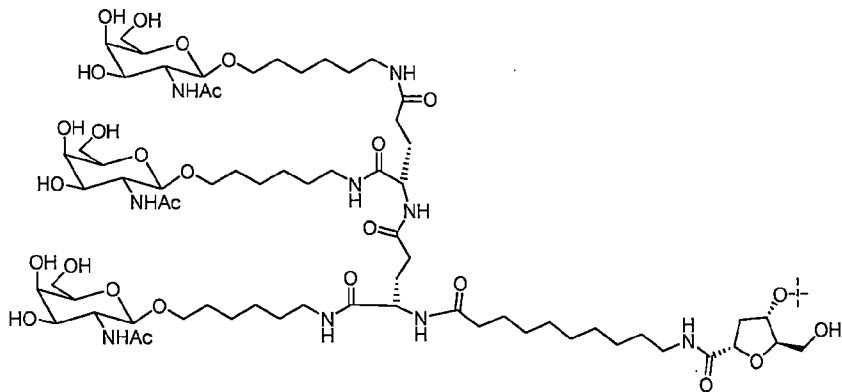
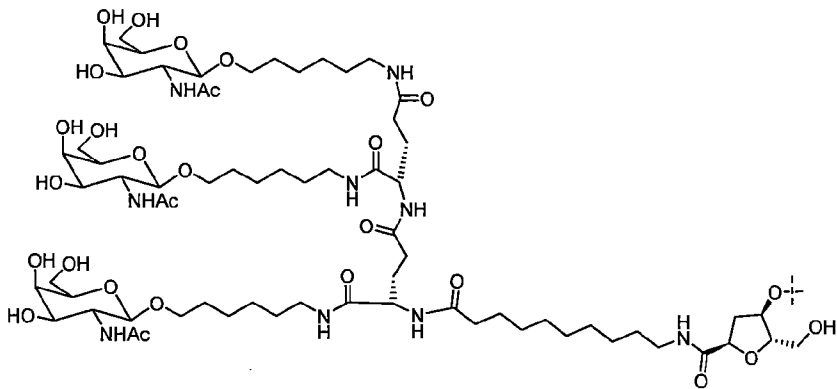
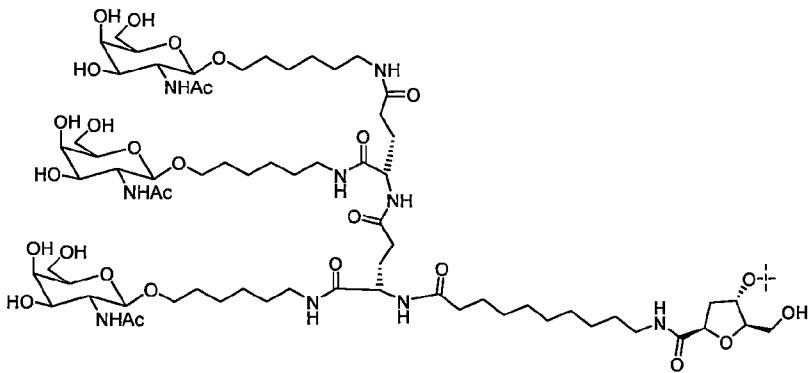


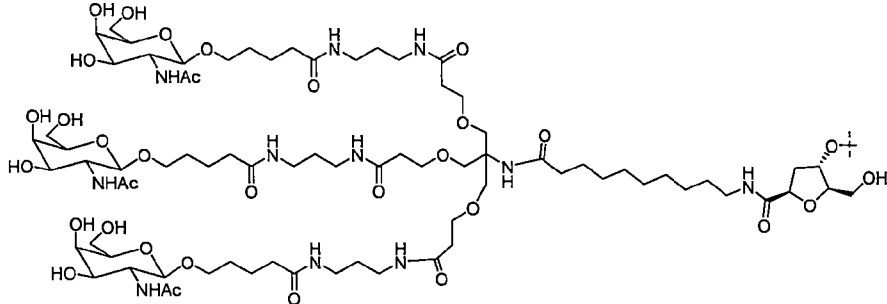
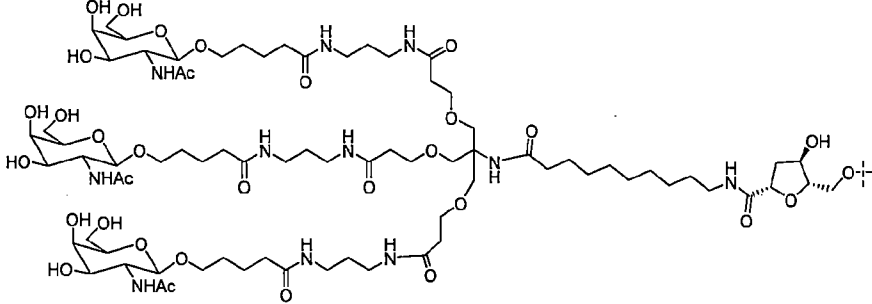
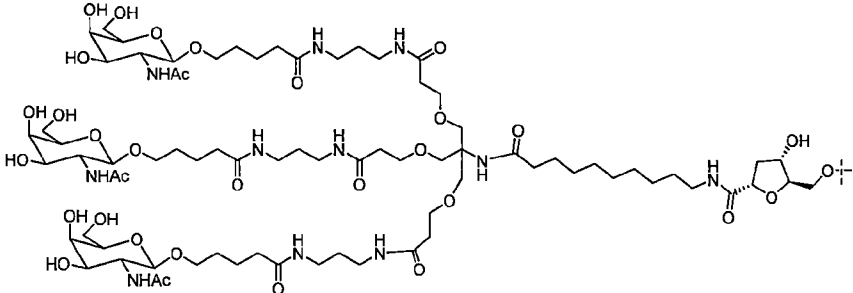
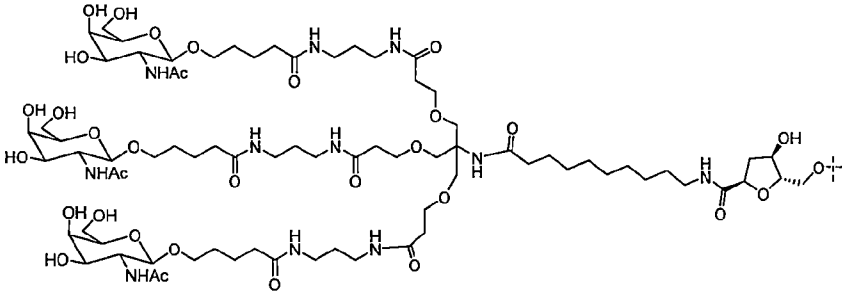
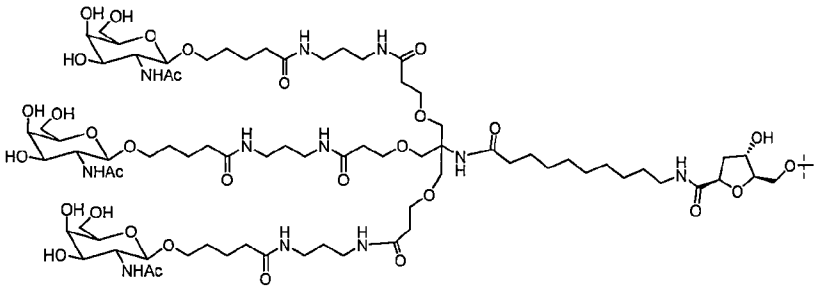


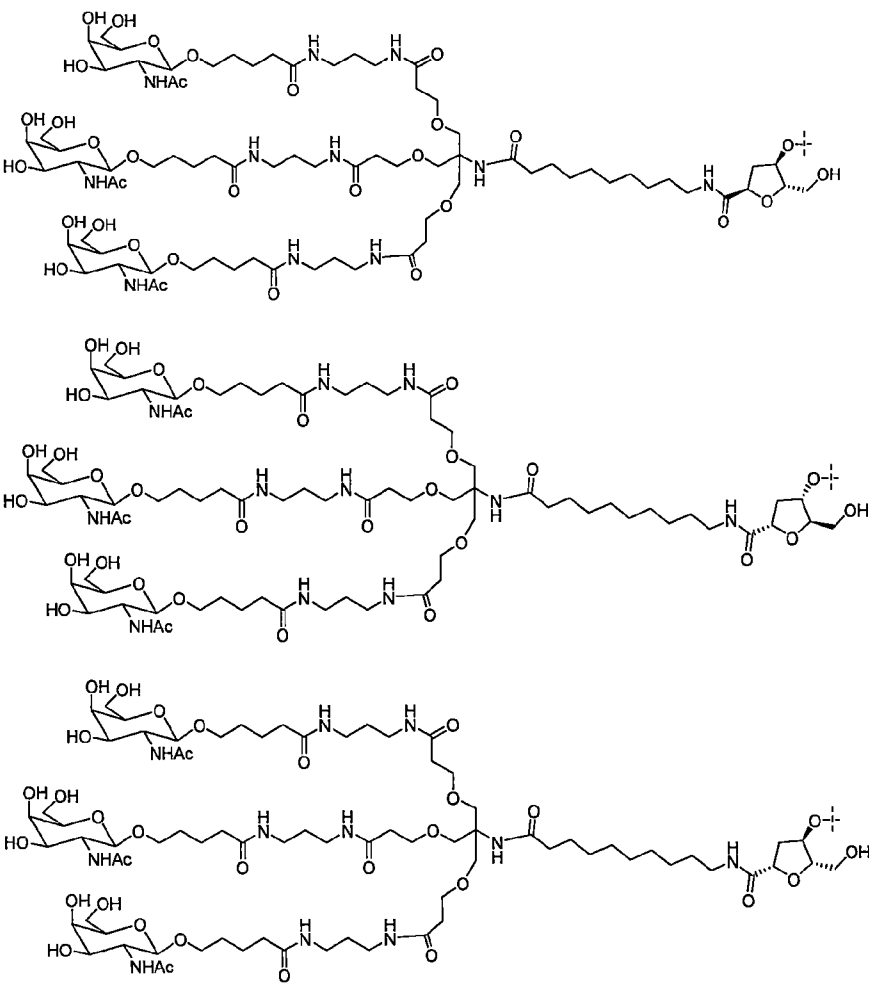








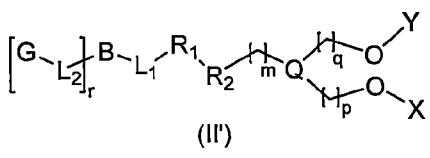


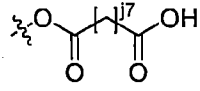
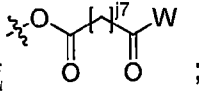


或

【0124】 在一些實施方案中，可以 N-三氟乙醯基半乳糖胺、N-丙醯基半乳糖胺、N-正丁醯基半乳糖胺或 N-異丁醯基半乳糖胺替換以上配體中的 N-乙醯基-半乳糖胺部分。

【0125】 第二方面，本揭露提供了一種如式 (II') 所示化合物，



其中，X 為羥基保護基；Y 為氫、氘、 或  ；
j7 為 1、2、3 或 4；
W 為高分子化合物；

G 為與細胞受體結合的靶向部分；

L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定義同具有如式 (I') 所示結構的配體中的任一方案所述。

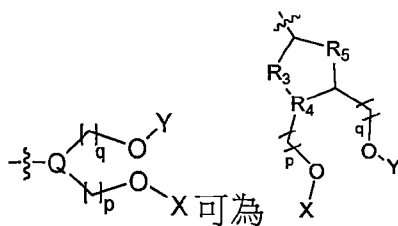
【0126】 在一些實施方案中，該經基保護基可為酯基保護基、烷氧基甲基保護基、烷基保護基、矽烷基保護基或芳基保護基，較佳芳基保護基，更佳 MMTr 和 DMTr，進一步佳 DMTr。

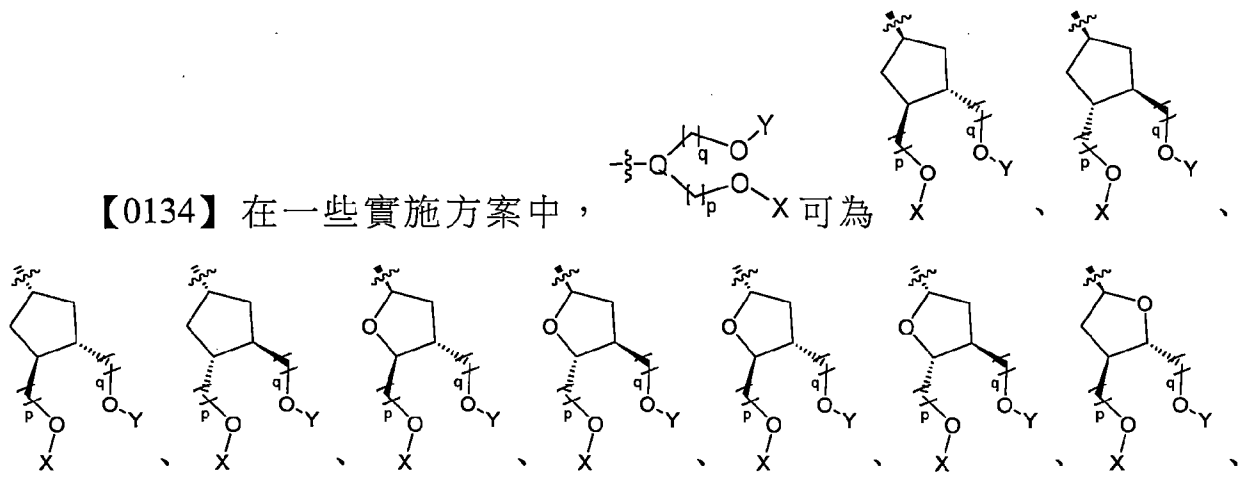
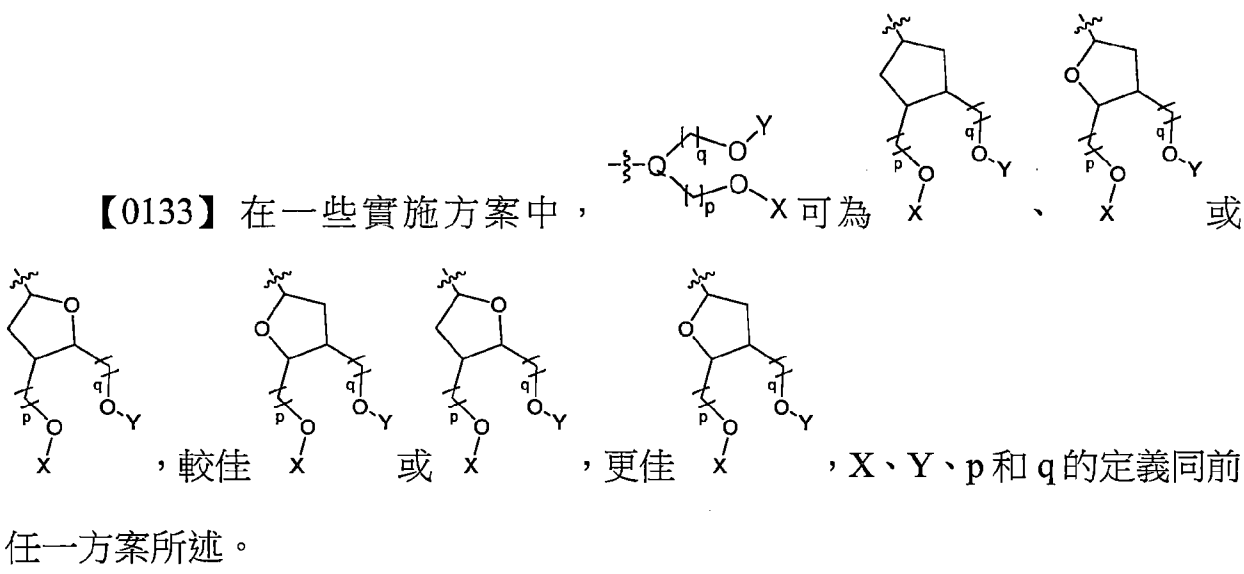
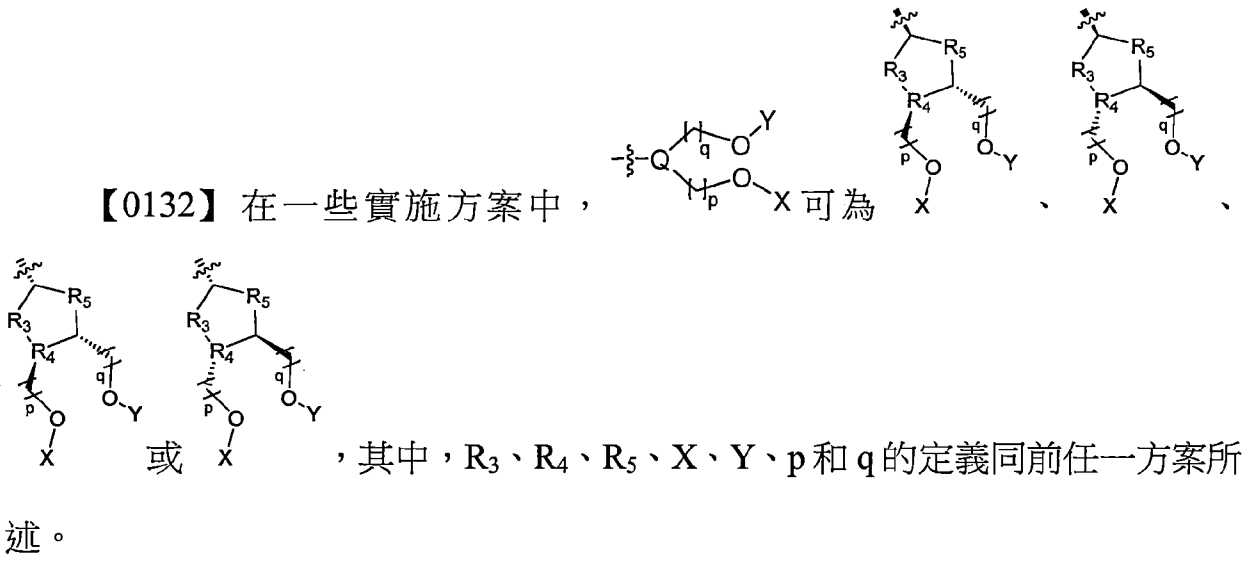
【0127】 在一些實施方案中， j 可為 2。

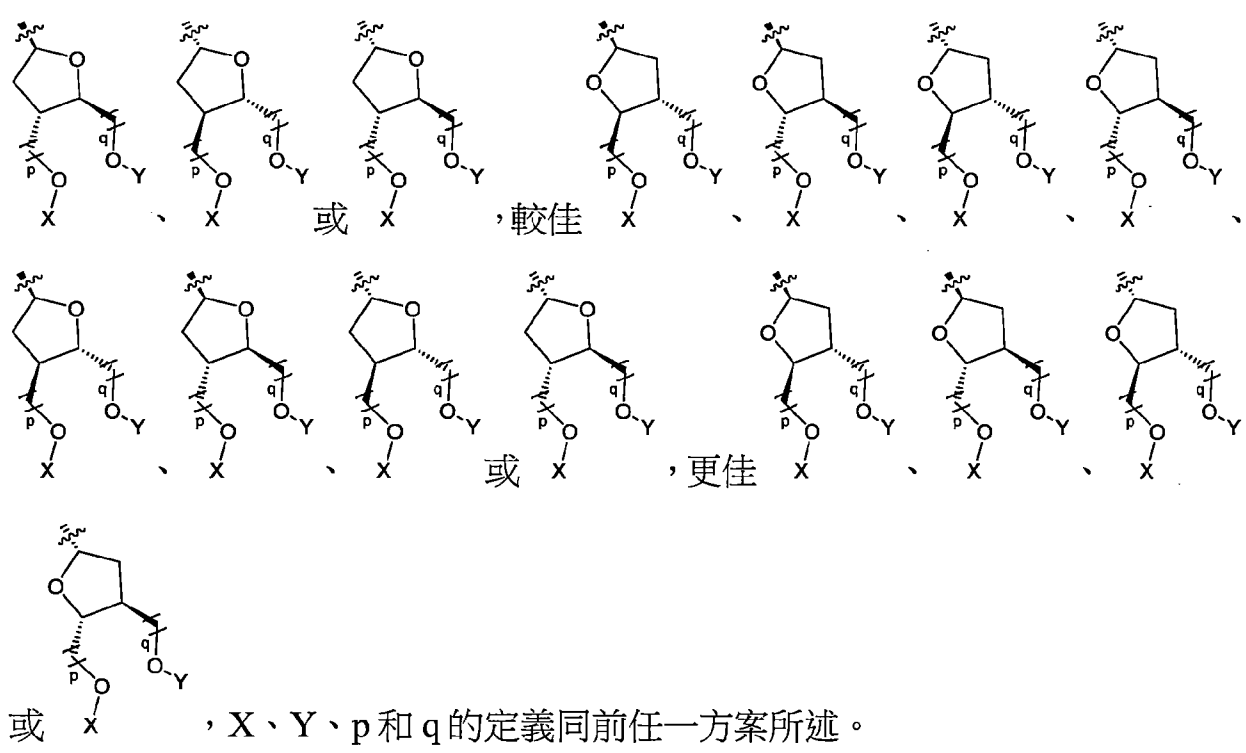
【0128】 在一些實施方案中，G 可為去唾液酸糖蛋白受體靶向部分。

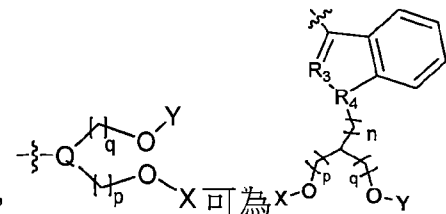
【0129】 在一些實施方案中，G 可為 N-乙醯基-半乳糖胺三乙酸酯、N-三氟乙醯基半乳糖胺三乙酸酯、N-丙醯基半乳糖胺三乙酸酯、N-正丁醯基半乳糖胺三乙酸酯或 N-異丁醯基半乳糖胺三乙酸酯，較佳 N-乙醯基-半乳糖胺三乙酸酯。

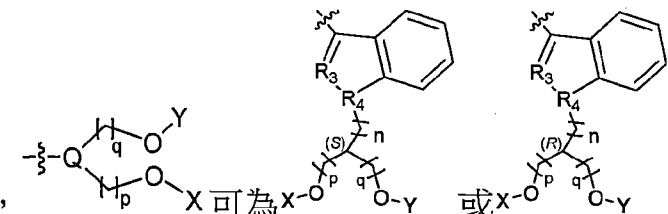
【0130】 在一些實施方案中，該高分子化合物可為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳為大孔胺甲基樹脂。

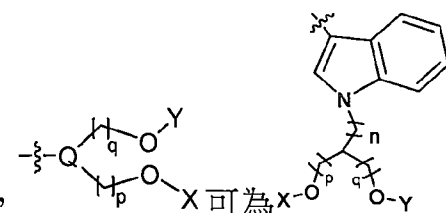
【0131】 在一些實施方案中，，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 X 、 Y 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

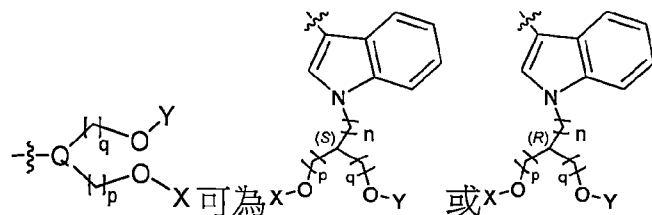




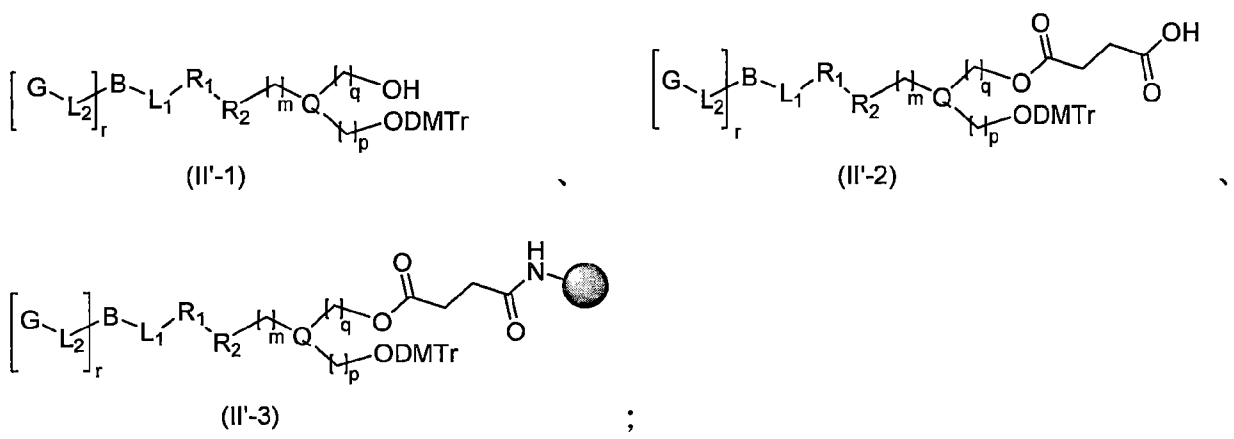
【0135】 在一些實施方案中，，其中， R_3 、 R_4 、 X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0136】 在一些實施方案中，，其中， R_3 、 R_4 、 X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0137】 在一些實施方案中，， X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

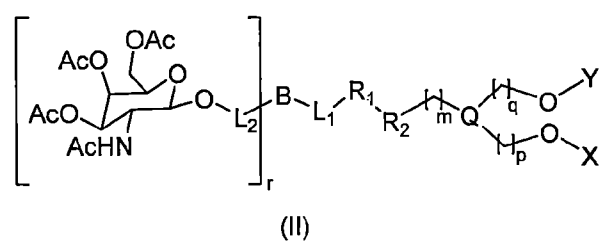
【0138】 在一些實施方案中，，
X、Y、n、p和q的定義同前任一方案所述。

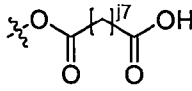
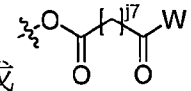
【0139】 在一些實施方案中，該化合物可為以下式(II'-1)、(II'-2)或(II'-3)所示化合物，



其中，為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂；L₁、R₁、R₂、Q、B、L₂、G、m、p、q和r的定義同式(II')所示化合物中的任一方案所述。

【0140】 本揭露提供了一種如式(II)所示化合物，



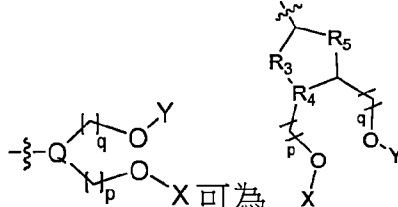
其中，X為羟基保護基；Y為氫、氘、或；
j7為1、2、3或4；
W為高分子化合物；

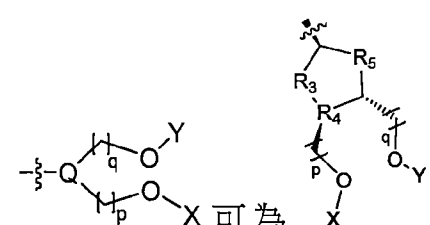
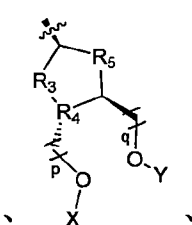
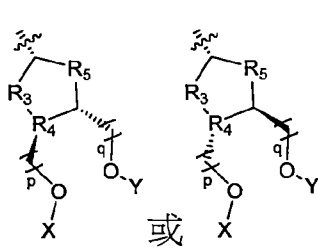
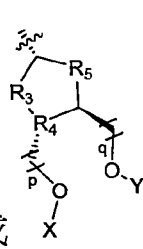
L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定義同具有如式 (I) 所示結構的配體中的任一方案所述。

【0141】 在一些實施方案中，該羥基保護基可為酯基保護基、烷氧基甲基保護基、烷基保護基、矽烷基保護基或芳基保護基，較佳芳基保護基，更佳 MMTr 和 DMTr，進一步佳 DMTr。

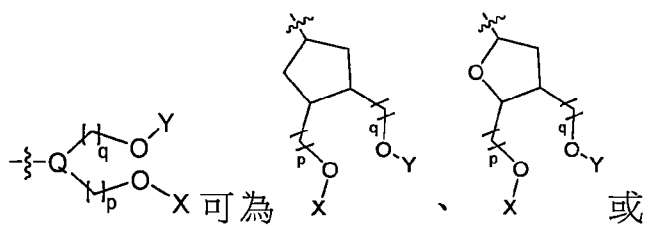
【0142】 在一些實施方案中， j 可為 2。

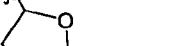
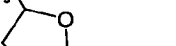
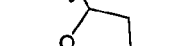
【0143】 在一些實施方案中，該高分子化合物可為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂。

【0144】 在一些實施方案中，，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 X 、 Y 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0145】 在一些實施方案中，、、 或 ，其中， R_3 、 R_4 、 R_5 、 X 、 Y 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

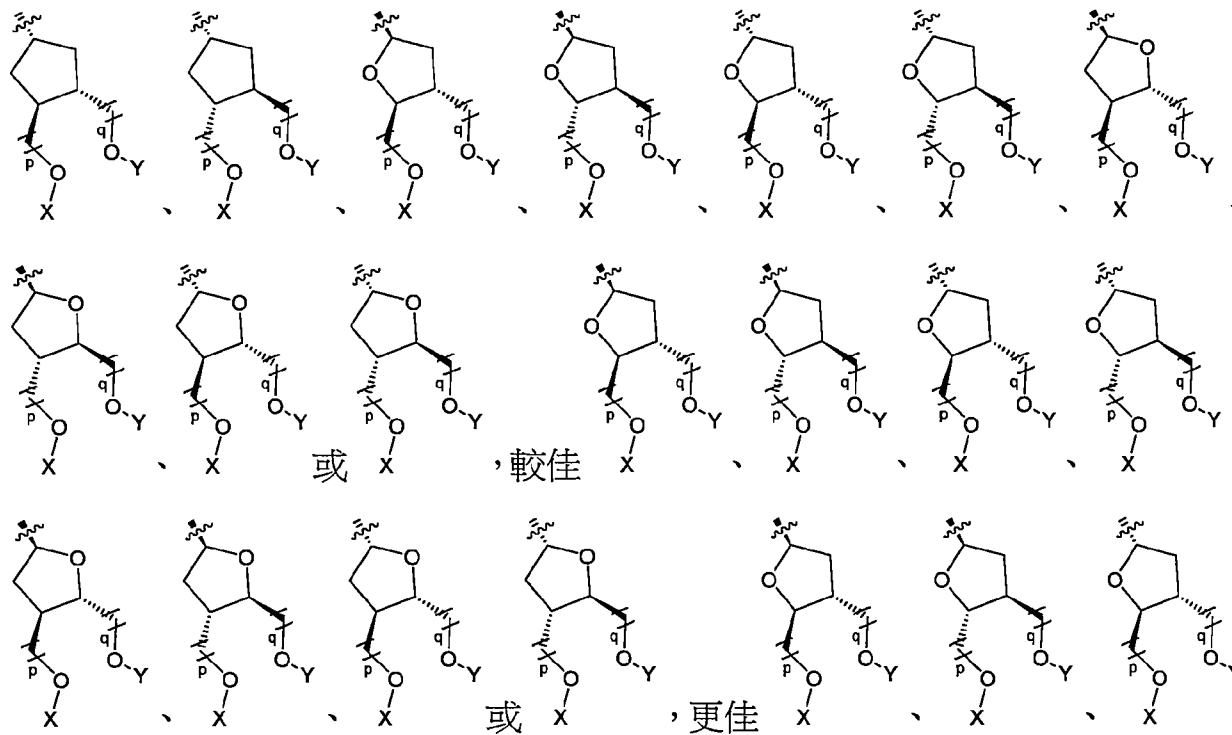
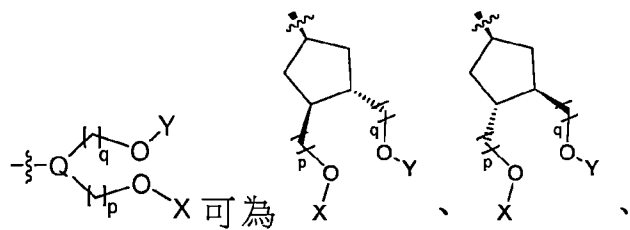
【0146】 在一些實施方案中，



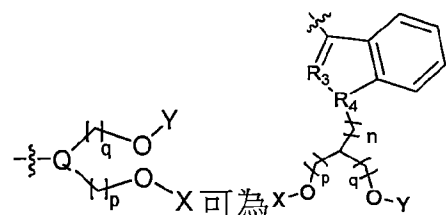

 , 較佳
 
 或
 
 , 更佳
 
 , X、Y、p 和 q 的定義同前

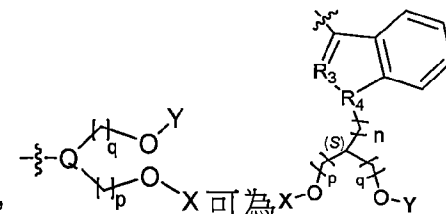
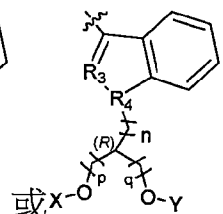
任一方案所述。

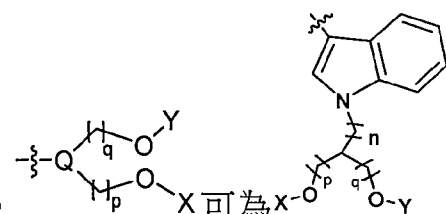
【0147】 在一些實施方案中，

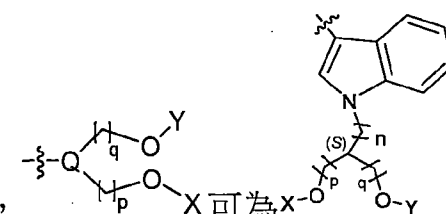
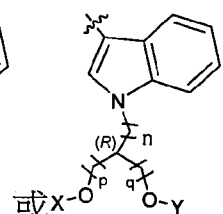


或  , X、Y、p 和 q 的定義同前任一方案所述。

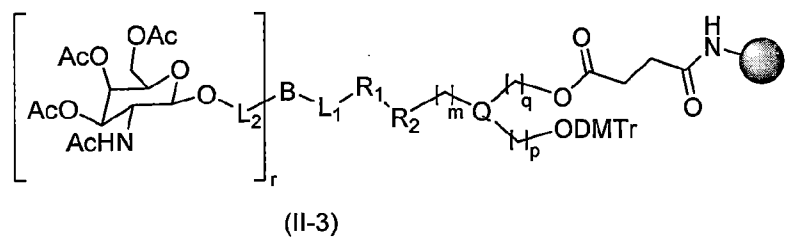
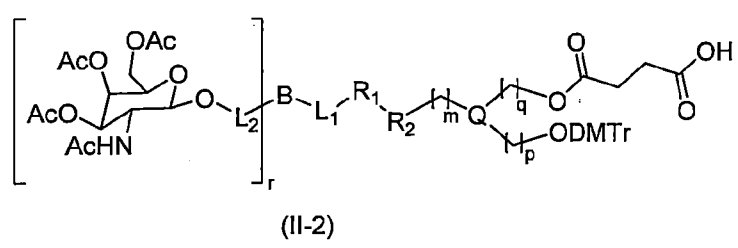
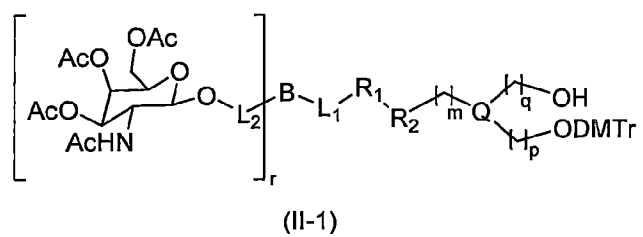
【0148】 在一些實施方案中，，其中， R_3 、 R_4 、 X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0149】 在一些實施方案中， 或 ，其中， R_3 、 R_4 、 X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

【0150】 在一些實施方案中，， X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

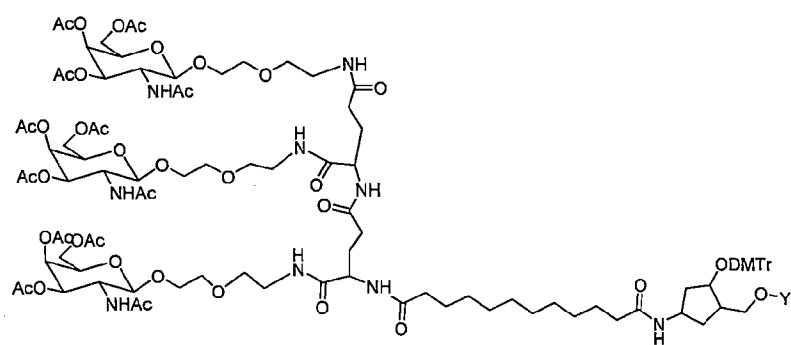
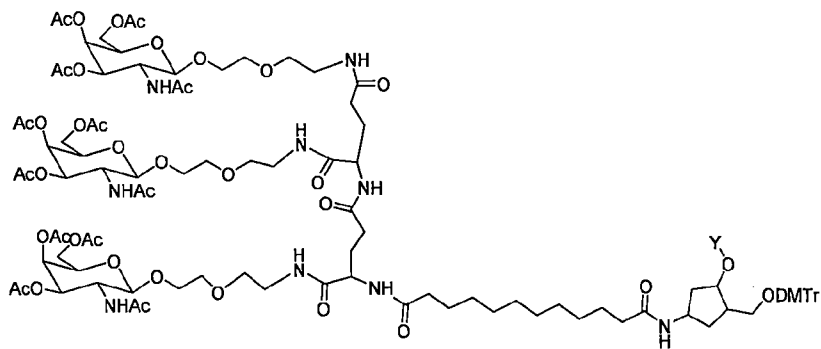
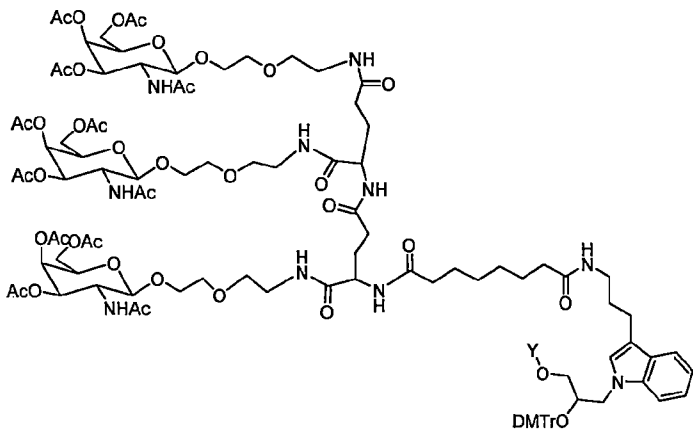
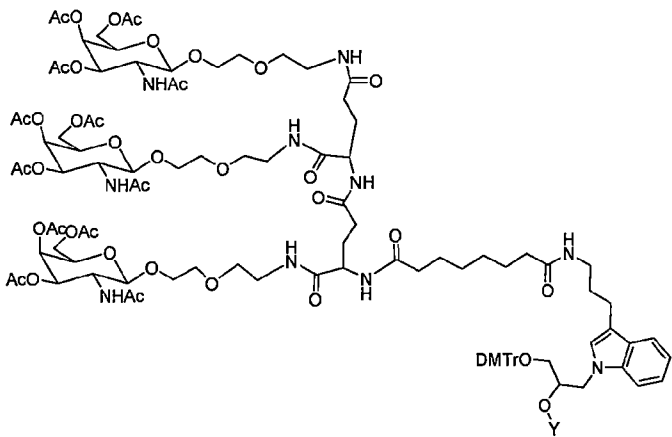
【0151】 在一些實施方案中， 或 ， X 、 Y 、 n 、 p 和 q 的定義同前任一方案所述。

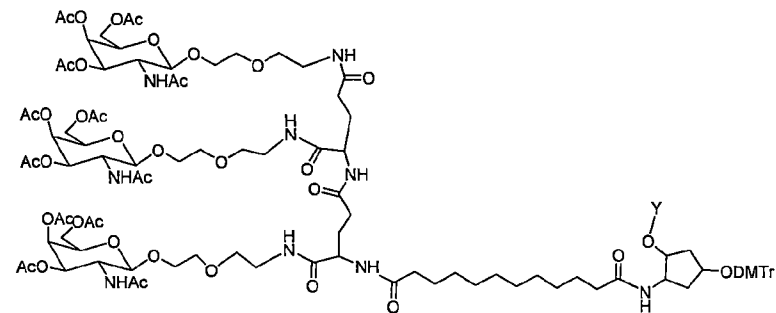
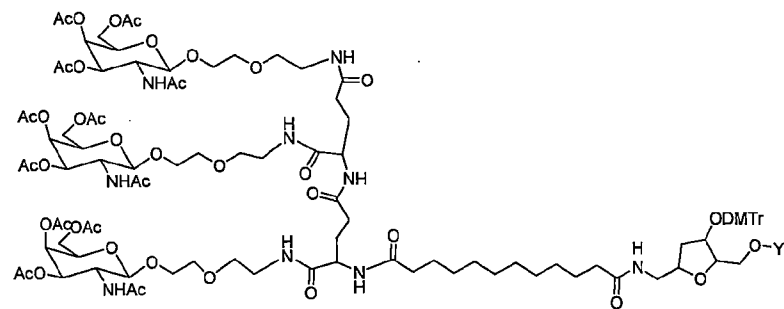
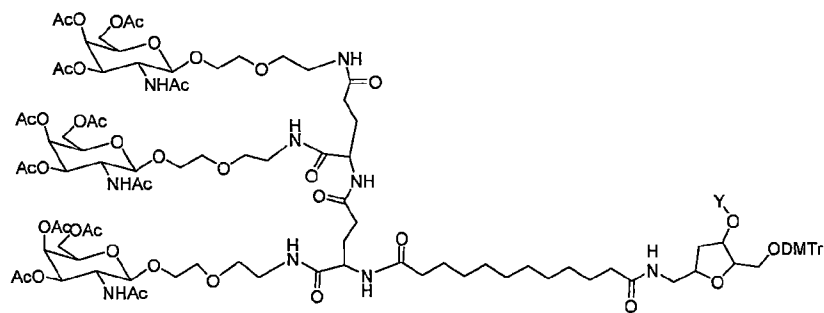
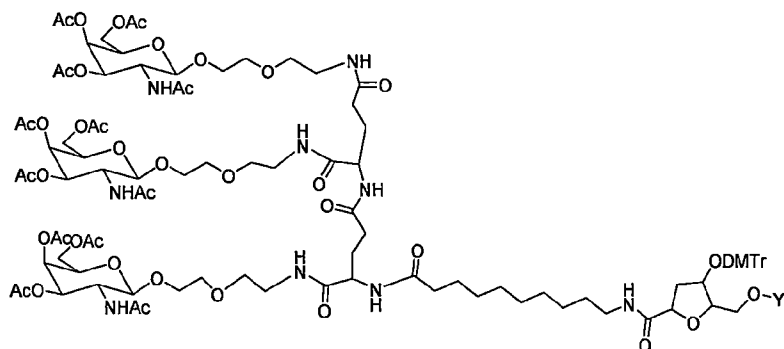
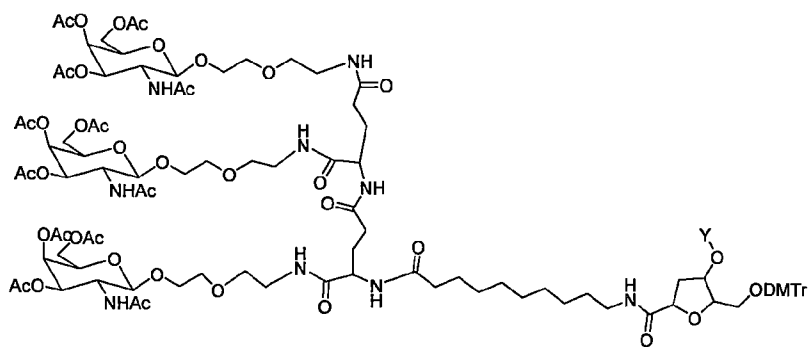
【0152】 在一些實施方案中，該化合物可為以下式 (II-1)、(II-2) 或 (II-3) 所示化合物，

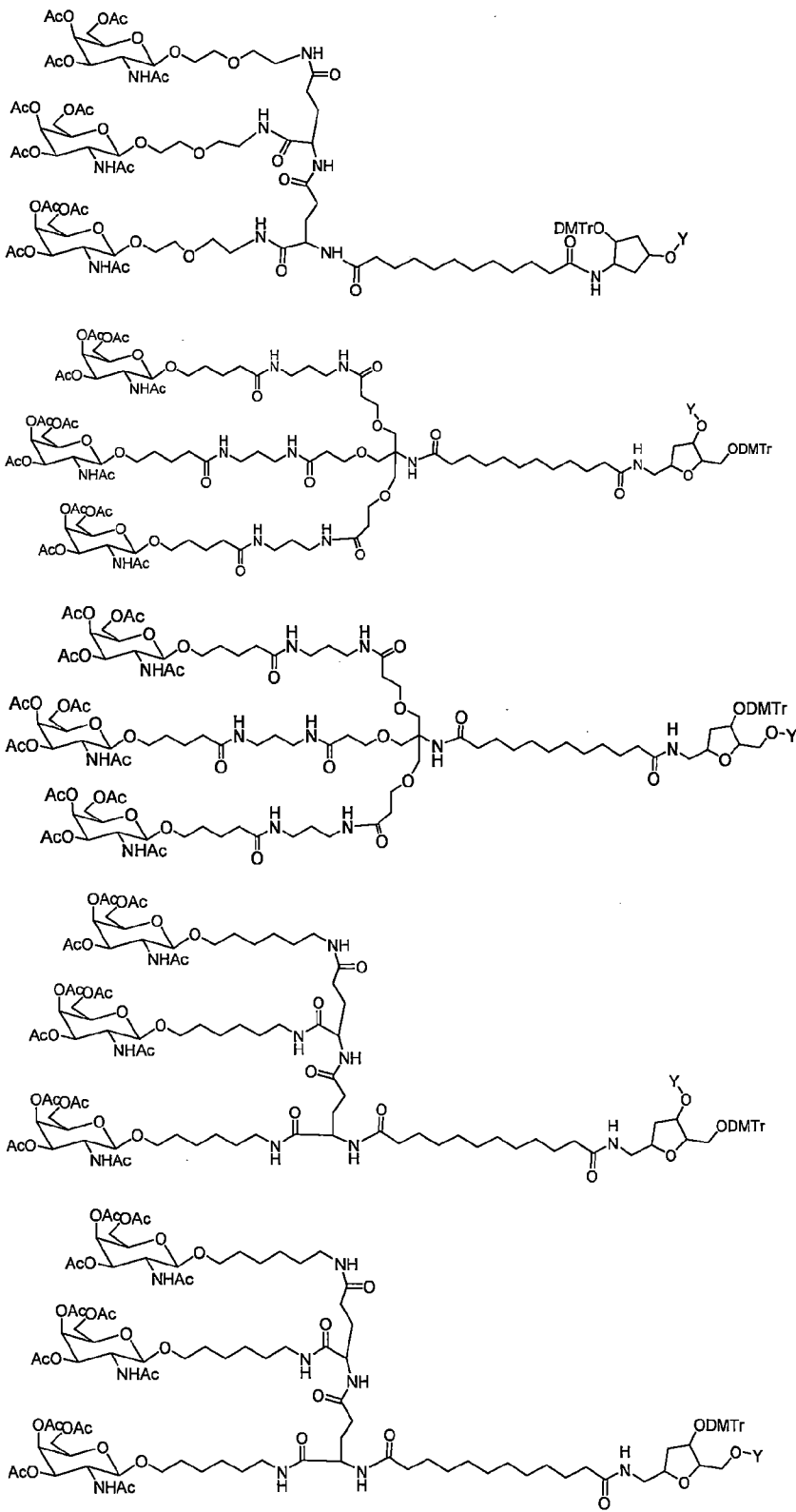


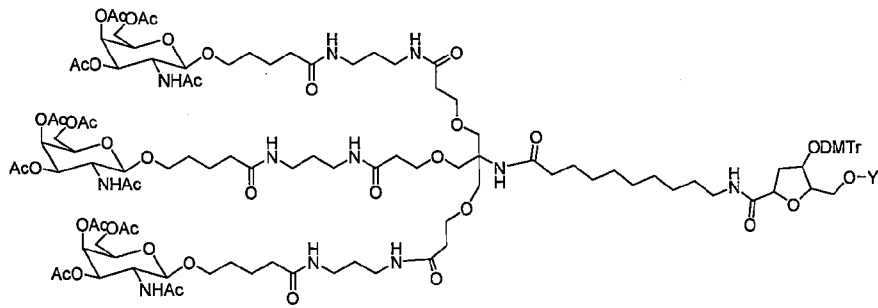
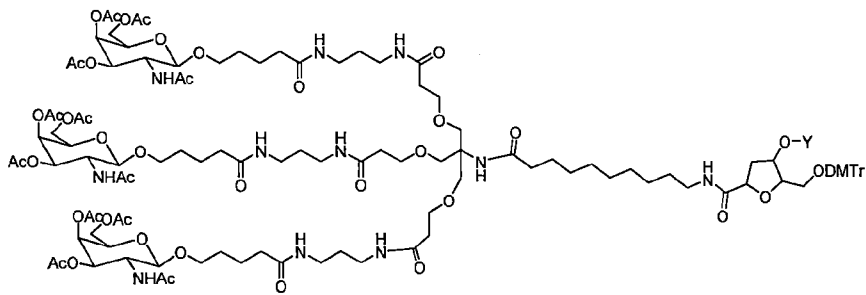
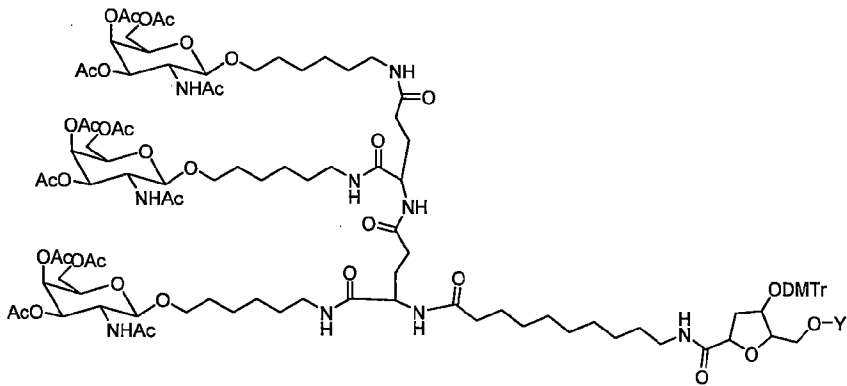
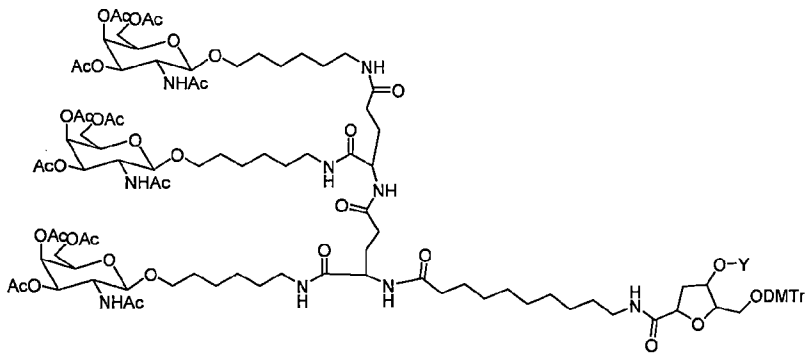
其中，為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂； L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 和 r 的定義同式(II)所示化合物中的任一方案所述。

【0153】 在一些實施方案中，該化合物可為以下任一結構，

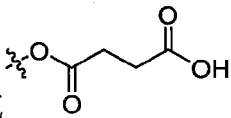


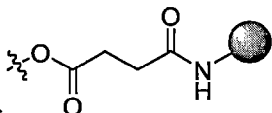




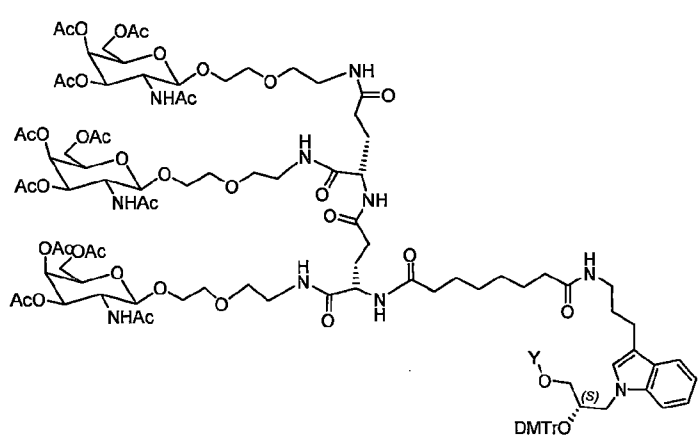
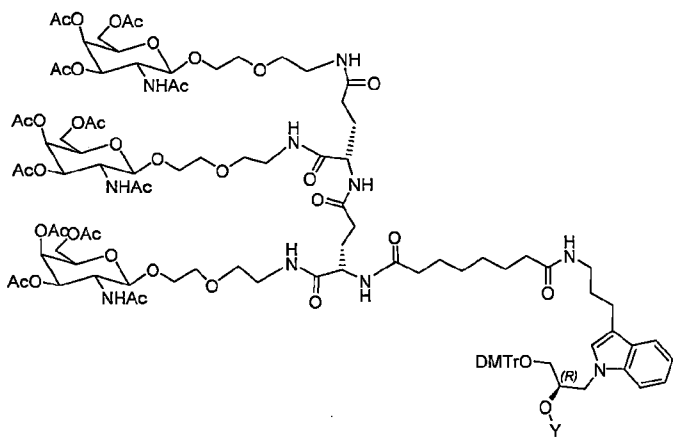
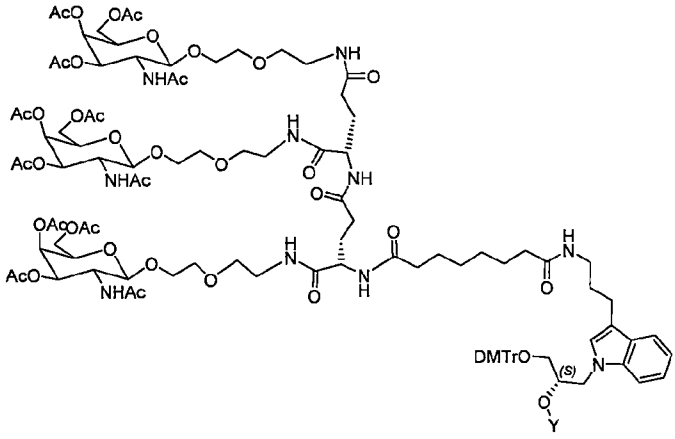


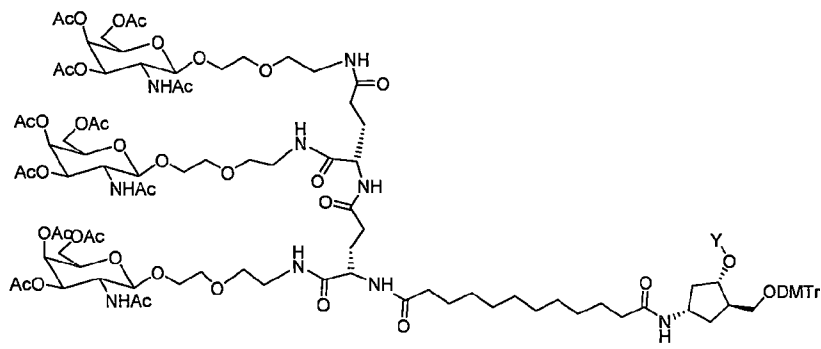
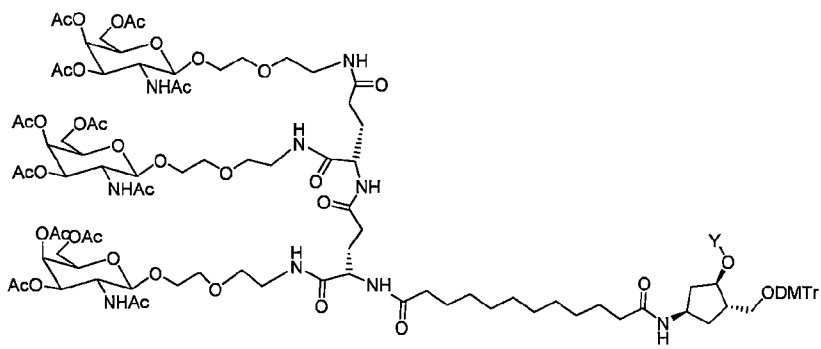
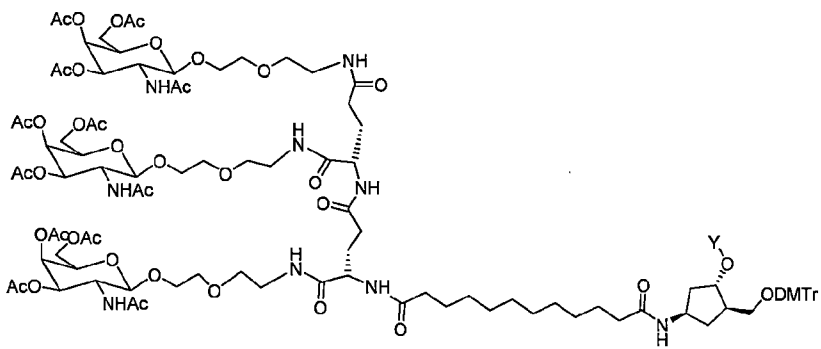
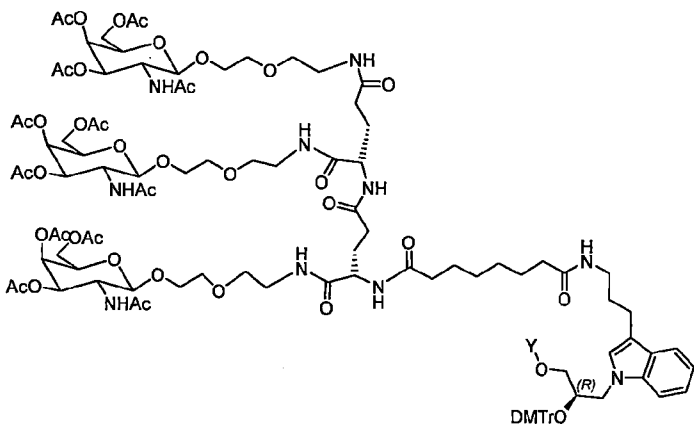
或

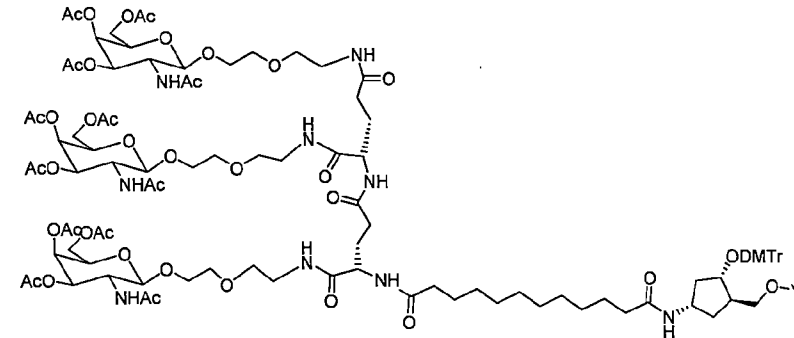
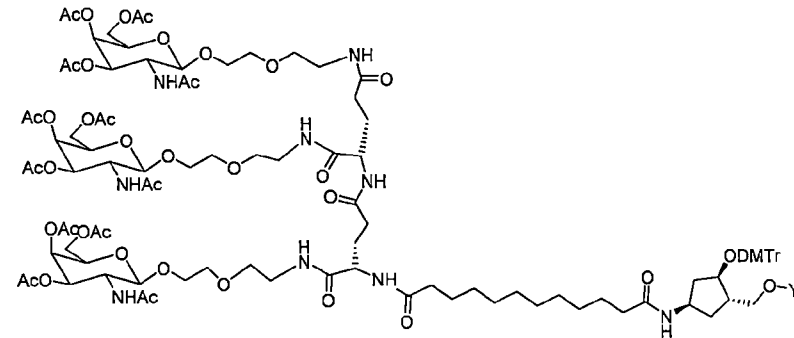
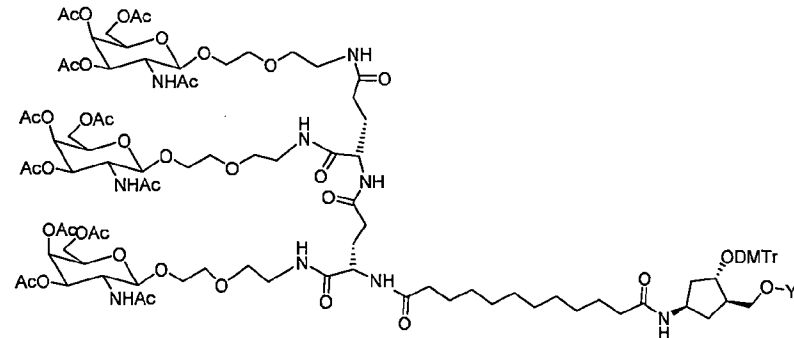
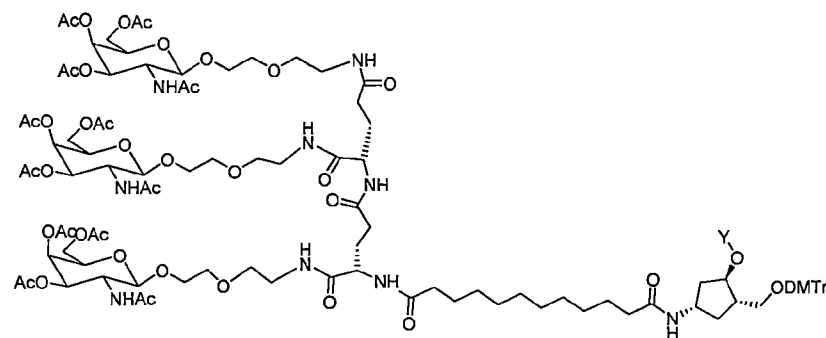
其中，Y 為氫或  ；

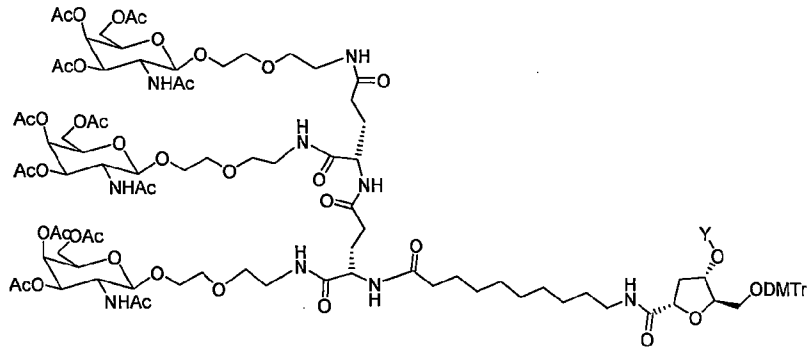
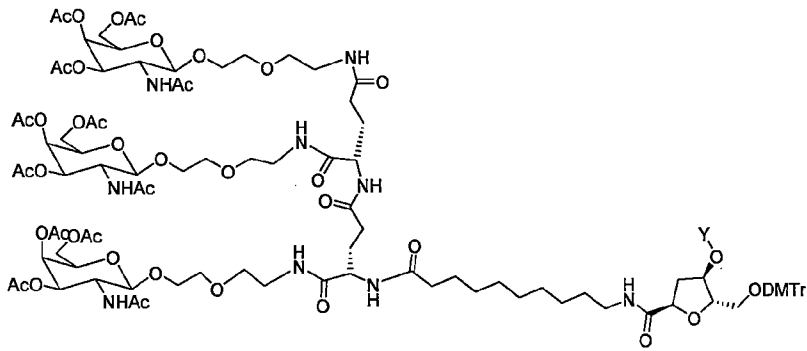
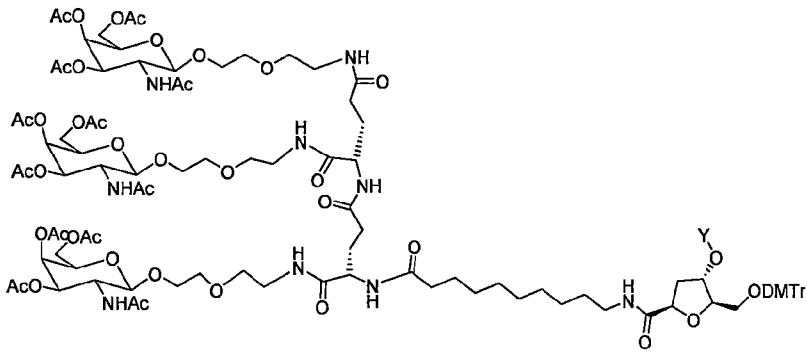
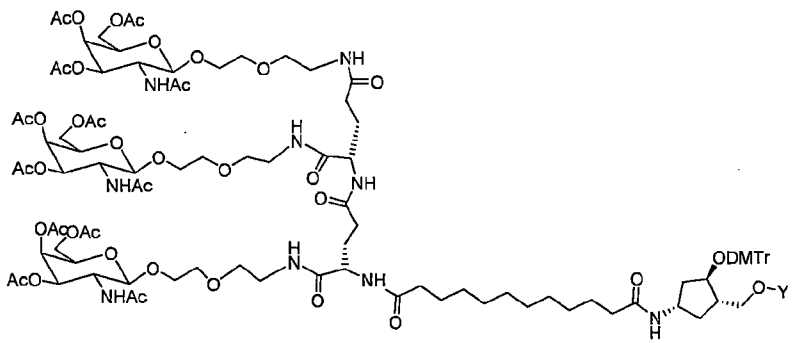
或者，Y 為 ， 為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂。

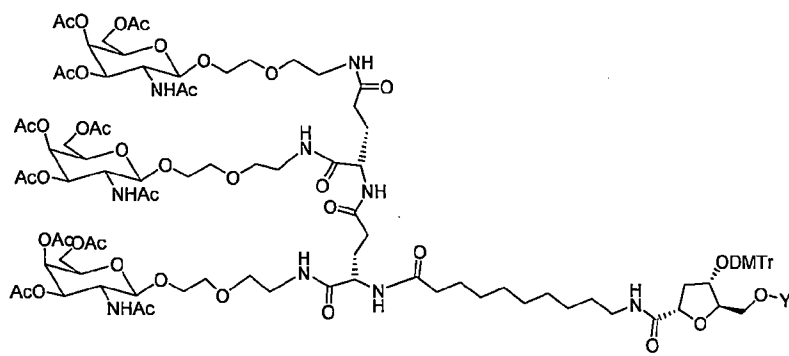
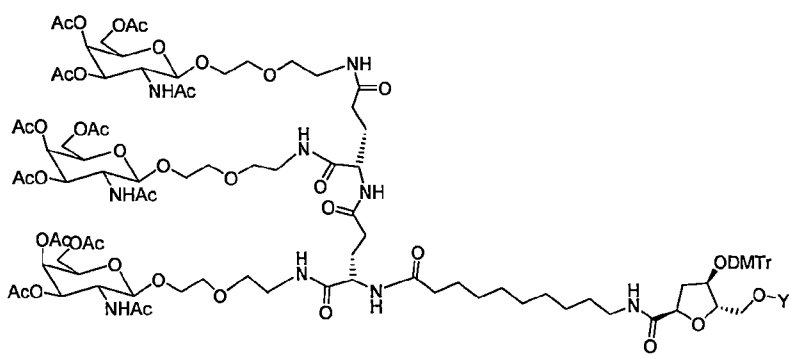
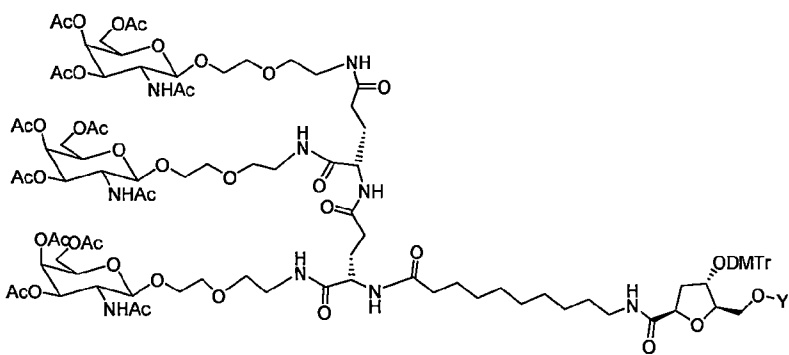
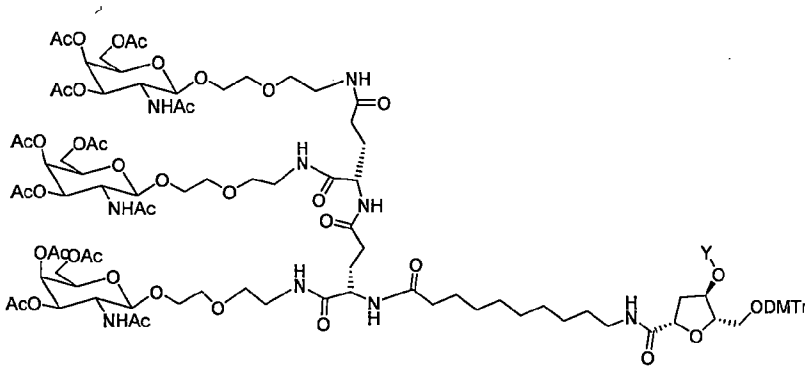
【0154】 在一些實施方案中，該化合物可為以下任一結構，

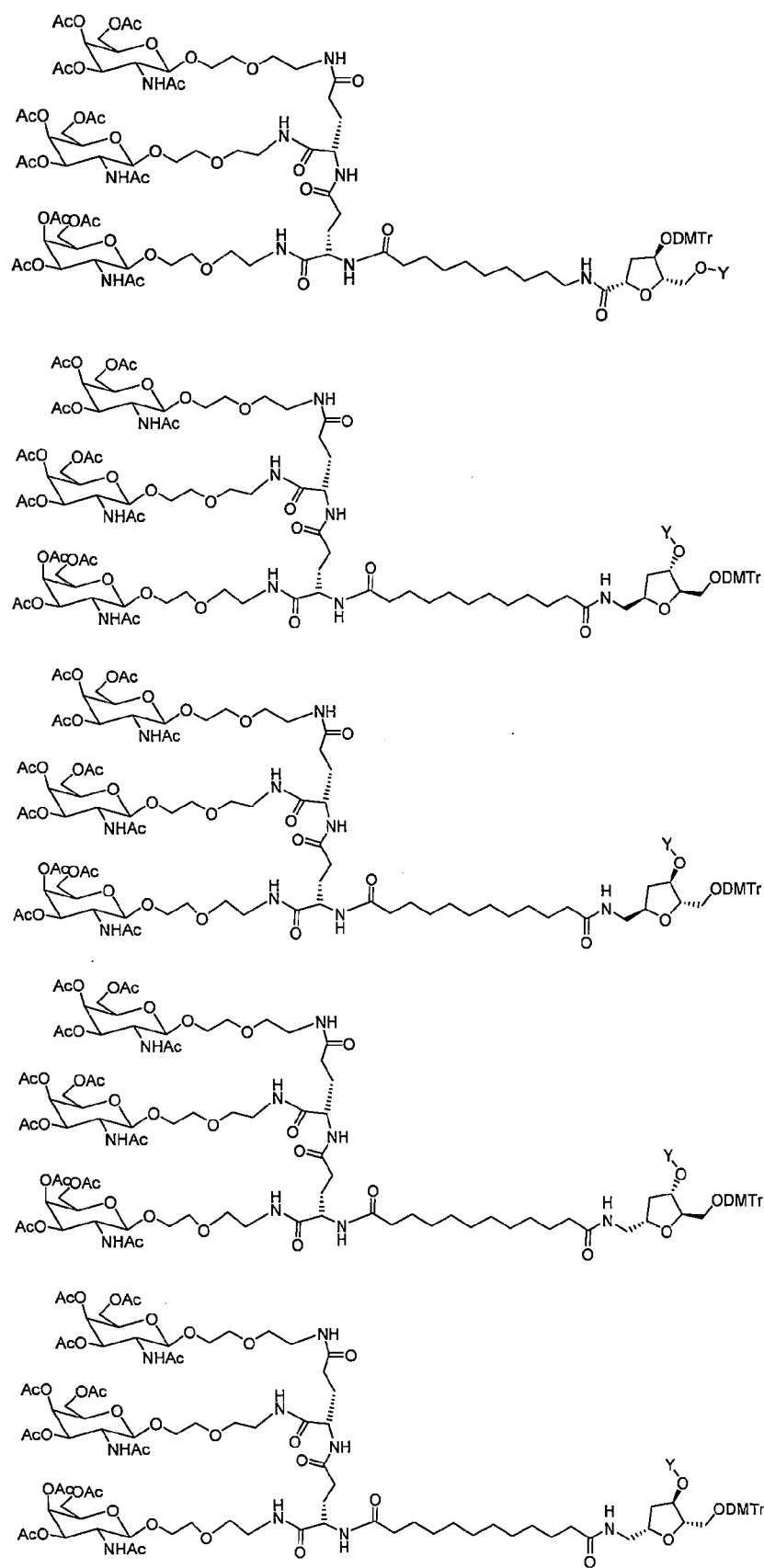


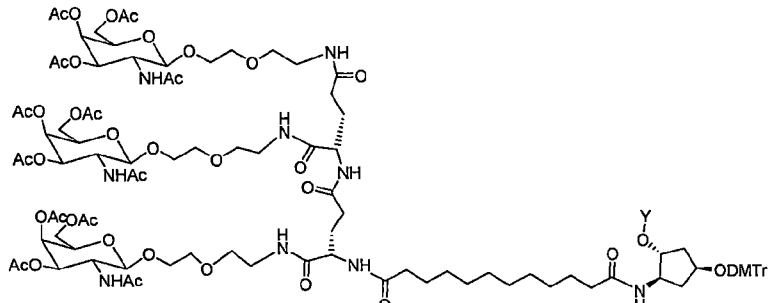
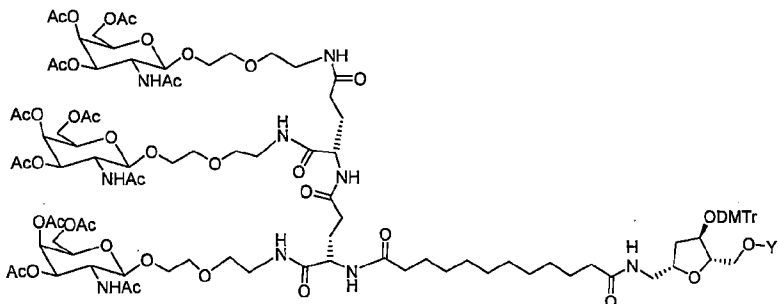
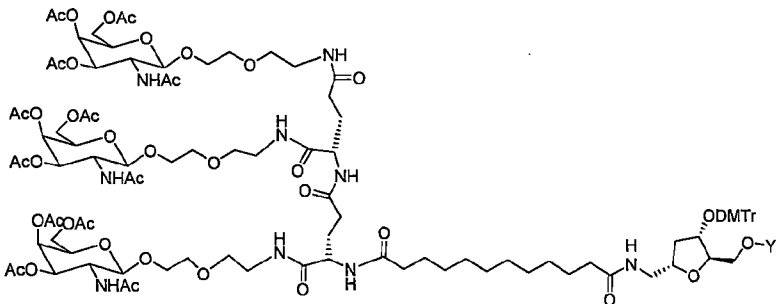
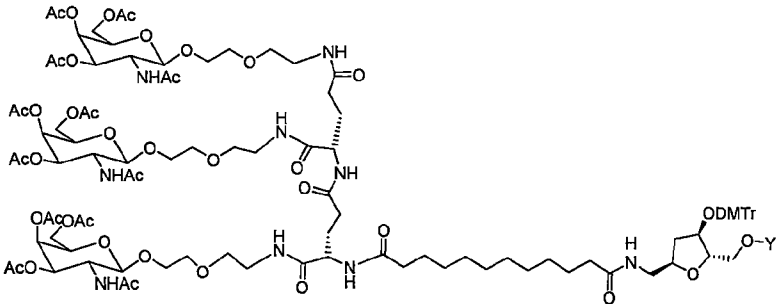
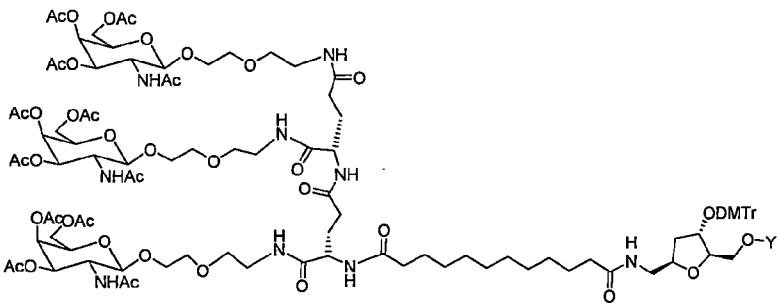


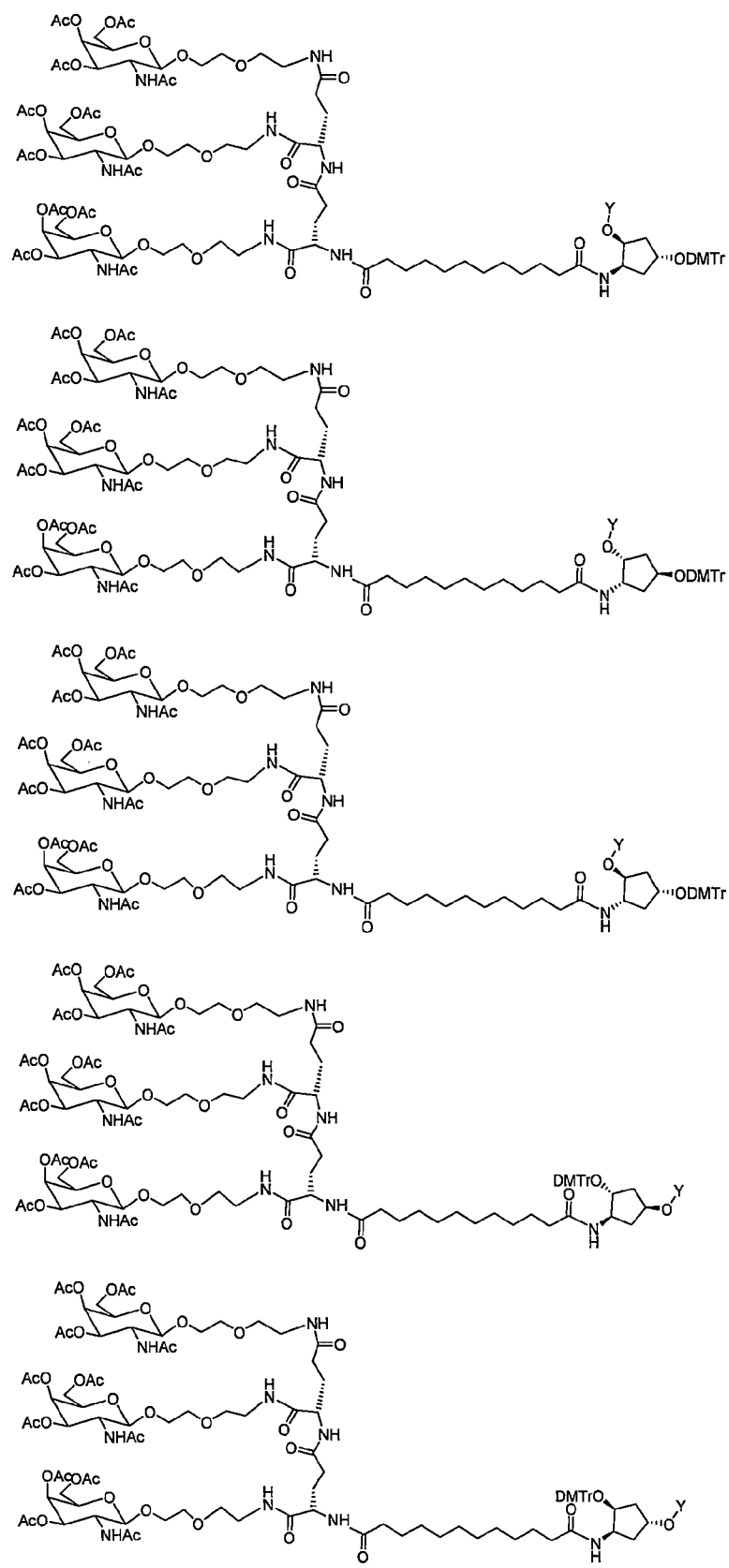


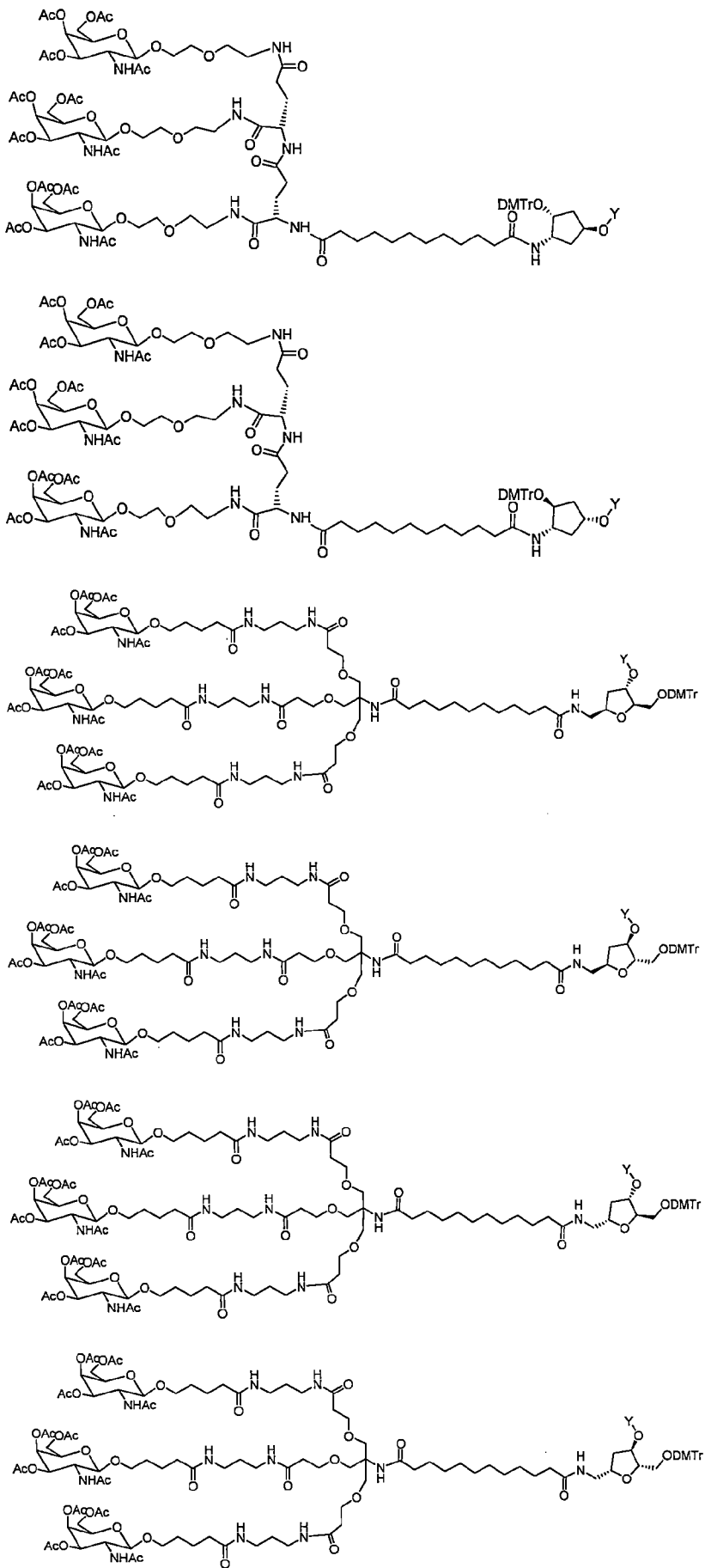


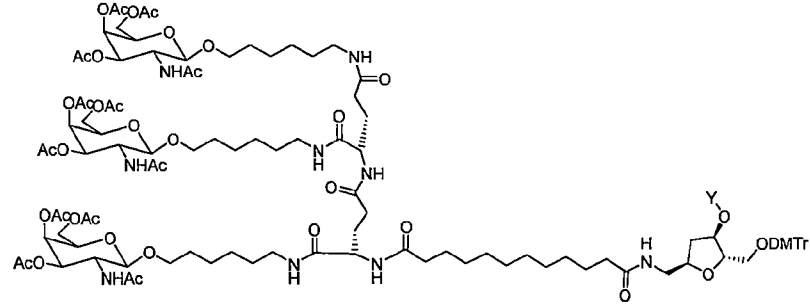
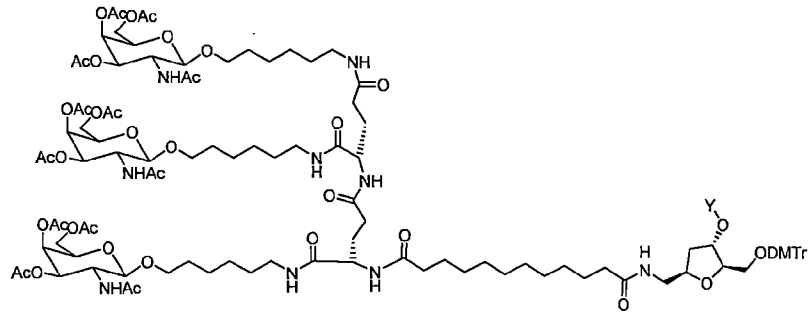
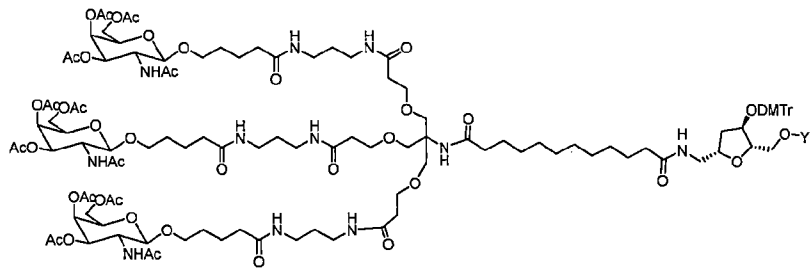
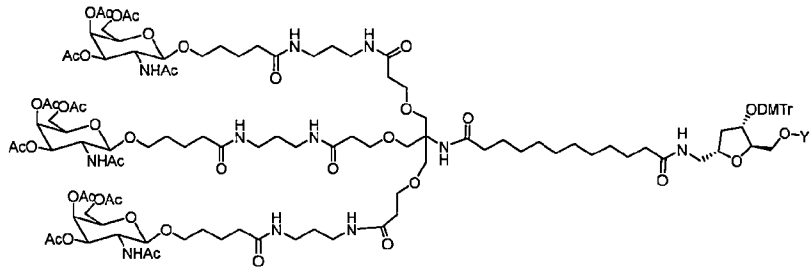
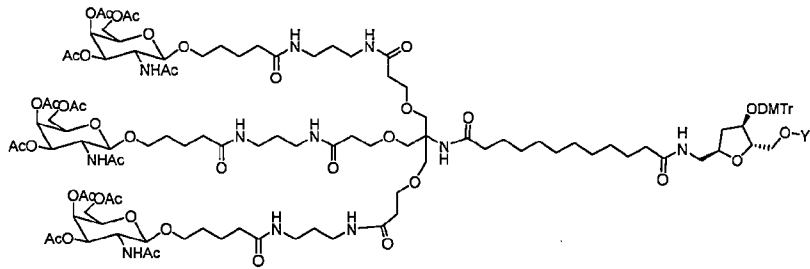
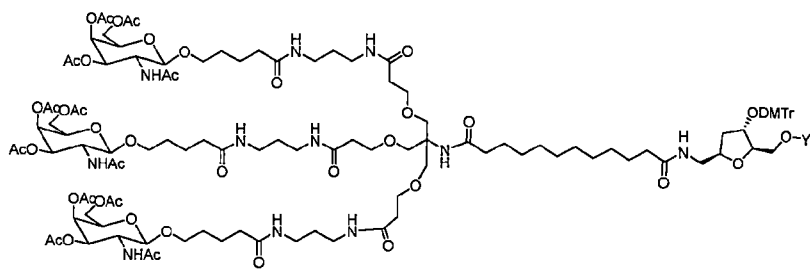


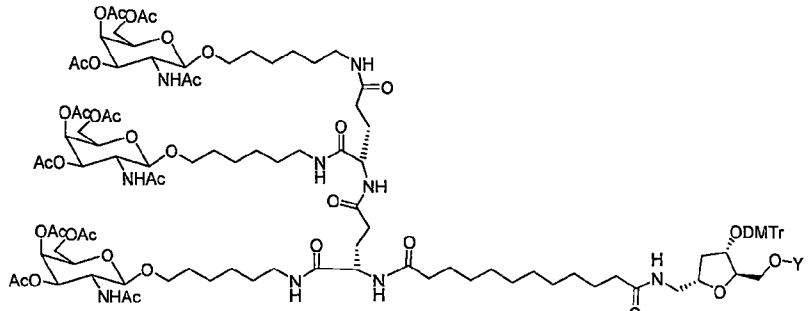
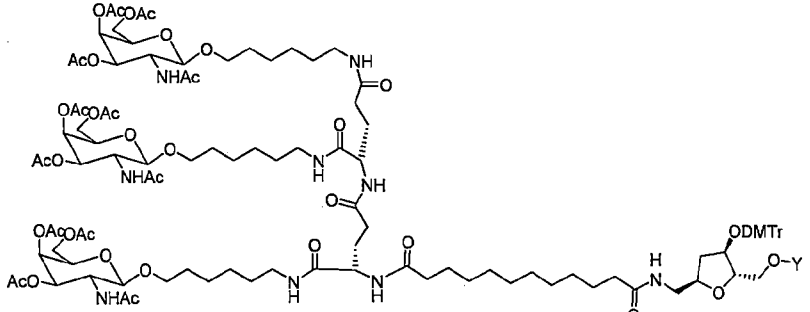
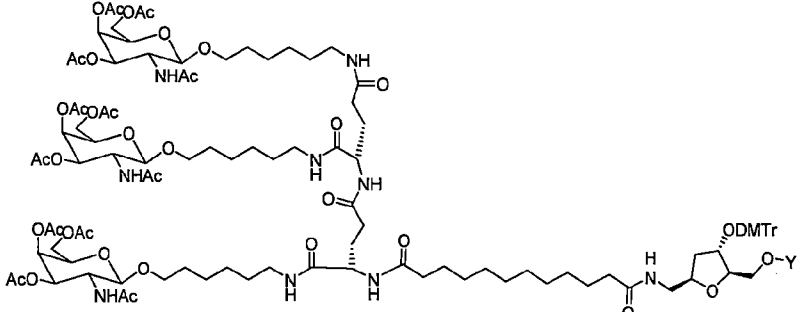
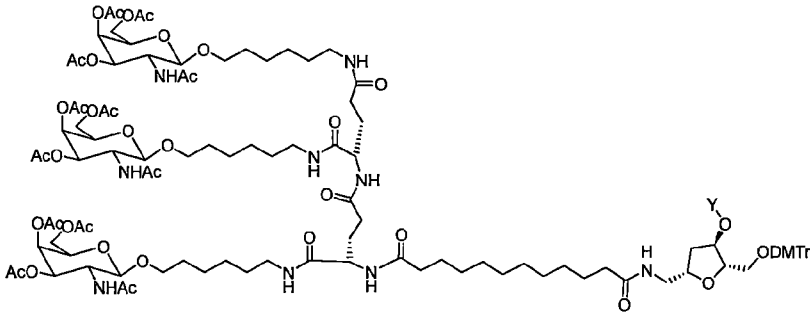
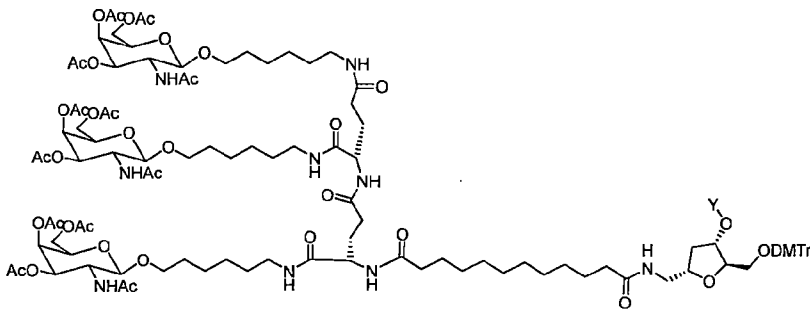


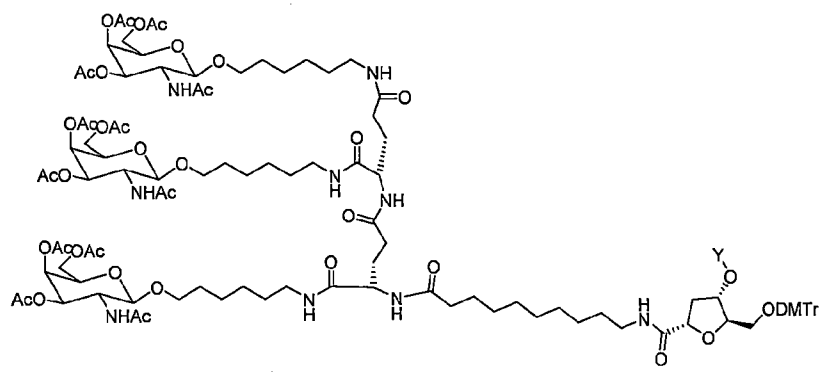
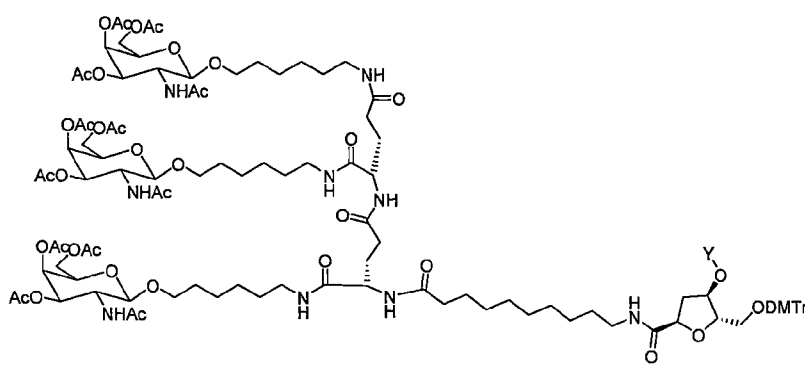
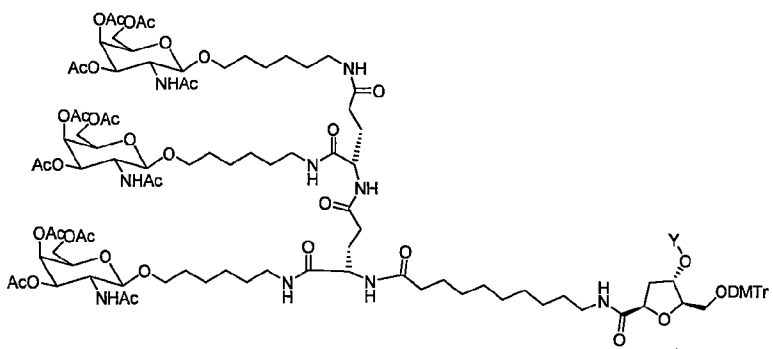
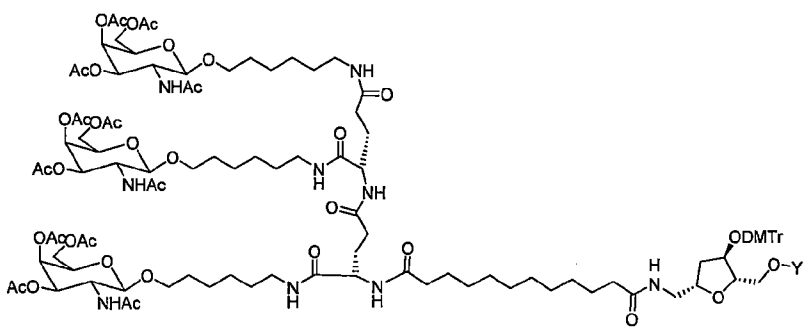


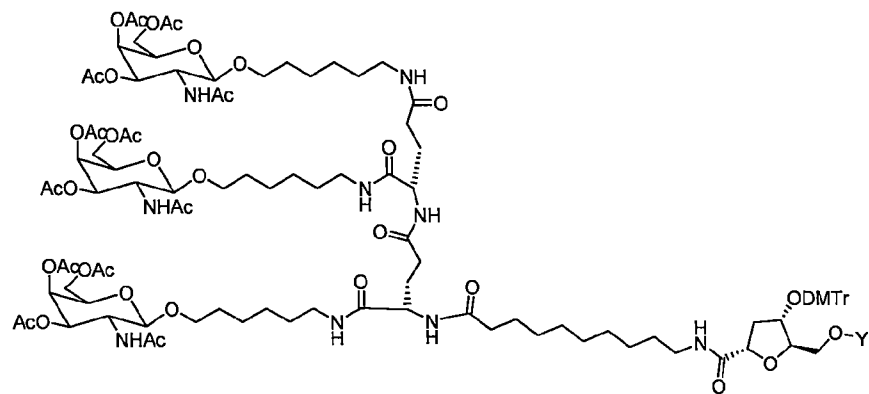
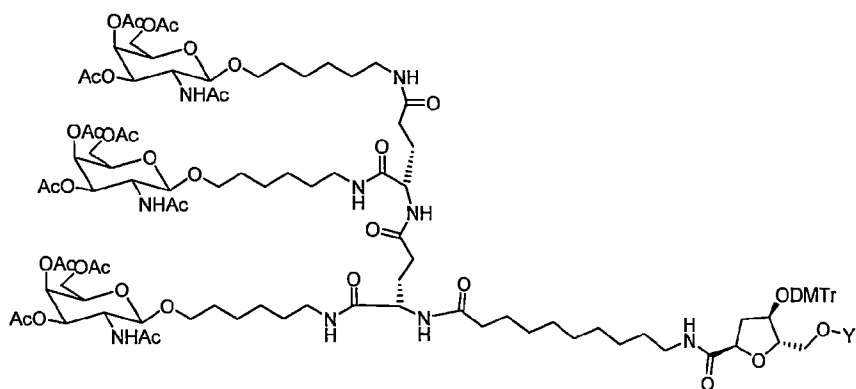
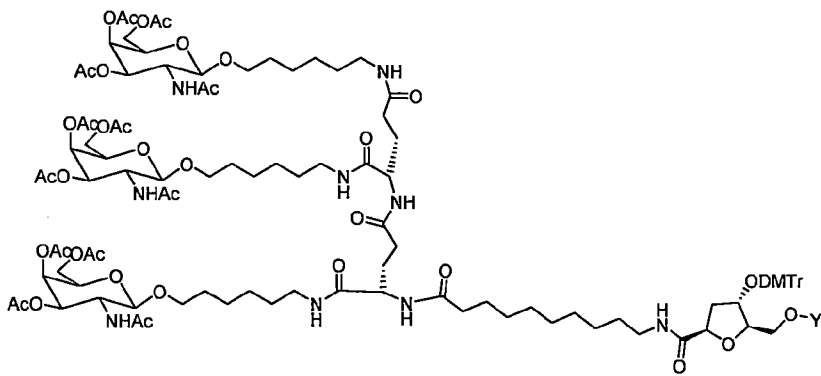
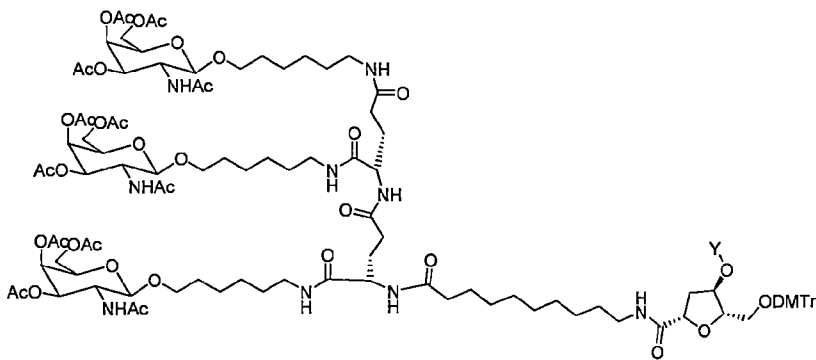


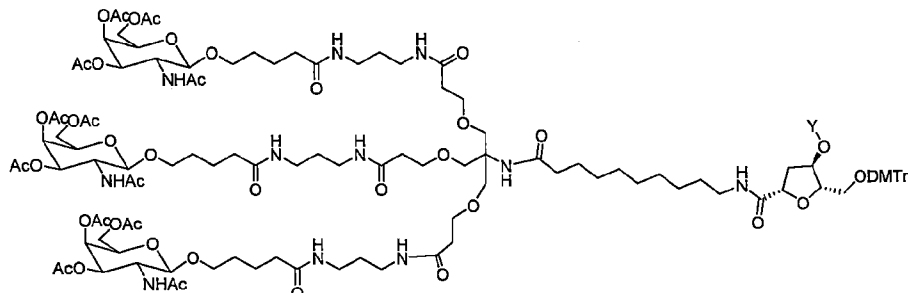
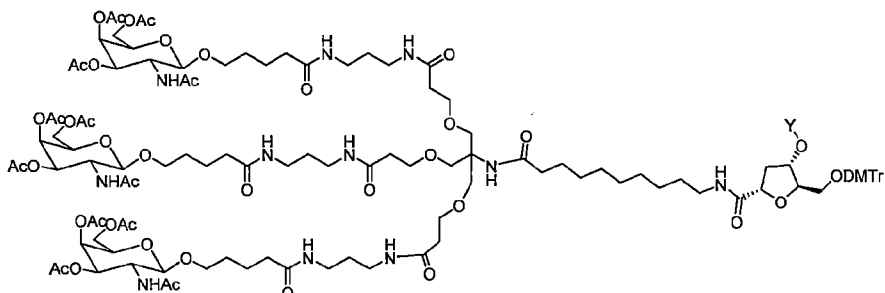
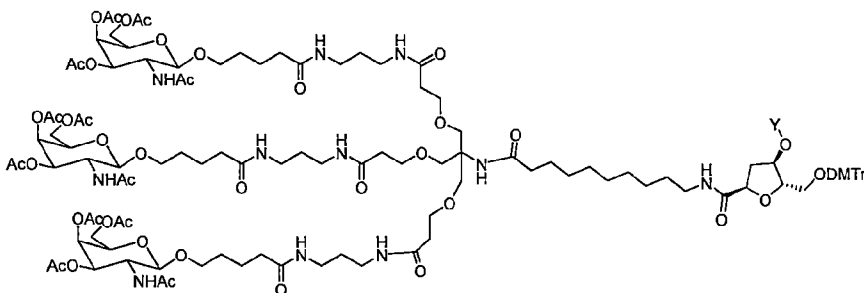
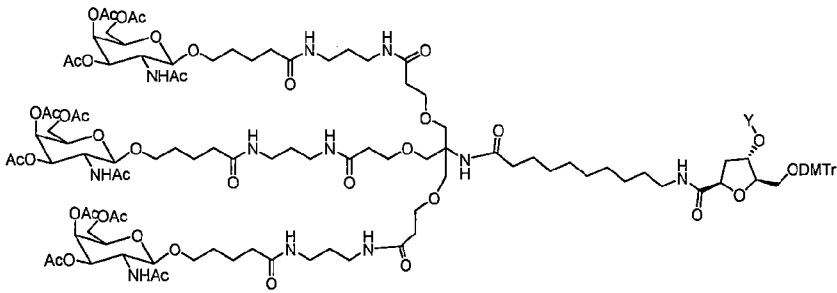
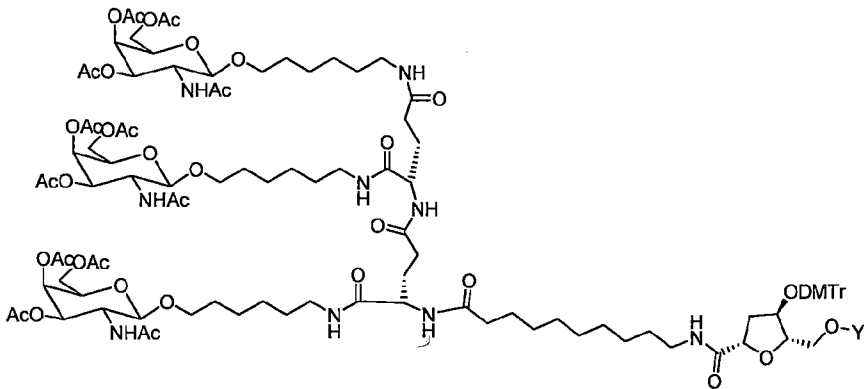


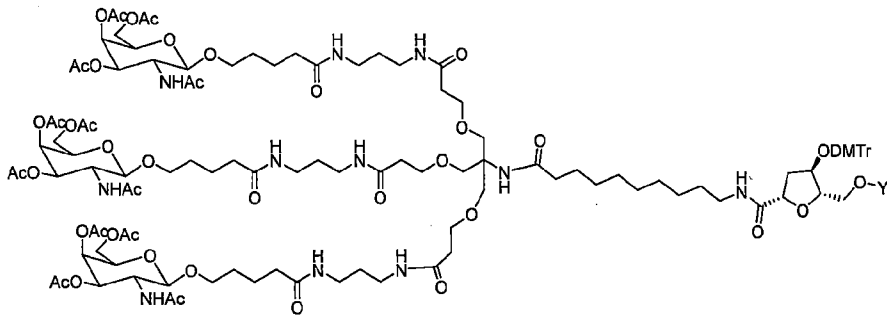
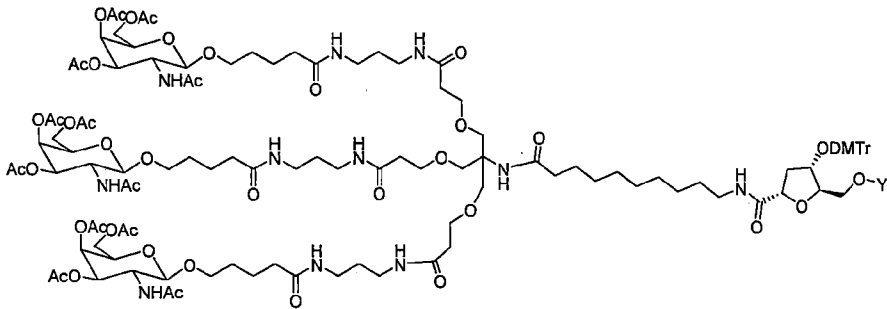
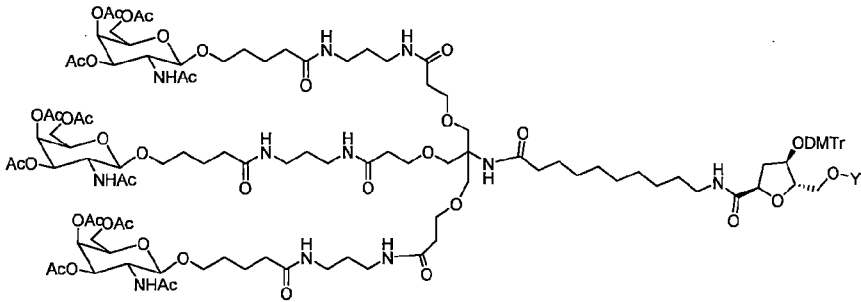
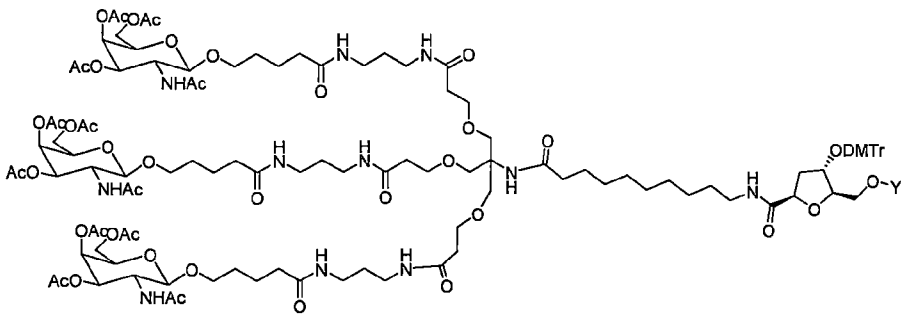




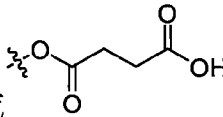


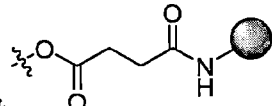






或

其中，Y 為氫或  ；

或者，Y 為  ，  為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂。

【0155】 在一些實施方案中，可以 N-三氟乙醯基半乳糖胺三乙酸酯、N-丙醯基半乳糖胺三乙酸酯、N-正丁醯基半乳糖胺三乙酸酯或 N-異丁醯基半乳糖胺三乙酸酯替換上述化合物中的 N-乙醯基-半乳糖胺三乙酸酯部分。

【0156】 本揭露提供了一種核酸配體綴合物，其包含核酸和一個或多個上述的配體，該配體與核酸末端綴合，該配體相同或不同。

【0157】 在一些實施方案中，該核酸與配體可藉由磷酸酯基團、硫代磷酸酯基團或膦酸基團連接。

【0158】 在一些實施方案中，該核酸可包括但不限於：寡核苷酸、單鏈寡核苷酸、單鏈反義寡核苷酸、短干擾 RNA(siRNA)、雙鏈 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、短髮夾 RNA(shRNA)、核糖酶、干擾 RNA 分子和 Dicer 酶受質。

【0159】 在一些實施方案中，該核酸的 3'端可與配體綴合。

【0160】 在一些實施方案中，該核酸可為單鏈核酸。

【0161】 在一些實施方案中，該單鏈核酸可為 siRNA 的正義鏈。

【0162】 在一些實施方案中，該單鏈核酸可為 siRNA 的反義鏈。

【0163】 在一些實施方案中，該核酸可為雙鏈核酸。該雙鏈核酸可包含至少一個雙鏈體區域，雙鏈體區域內第一鏈核酸與第二鏈核酸至少部分互補，其中，

(1) 第一鏈核酸兩個末端不與配體綴合；且第二鏈核酸 5'端與配體綴合，3'端不與配體綴合，或第二鏈核酸 3'端與配體綴合，5'端不與配體綴合，或第二鏈核酸 3'端和 5'端均與配體綴合；

(2) 第二鏈核酸兩個末端不與配體綴合；且第一鏈核酸 5'端與配體綴合，3'端不與配體綴合，或第一鏈核酸 3'端與配體綴合，5'端不與配體綴合，或第一鏈核酸 3'端和 5'端均與配體綴合；

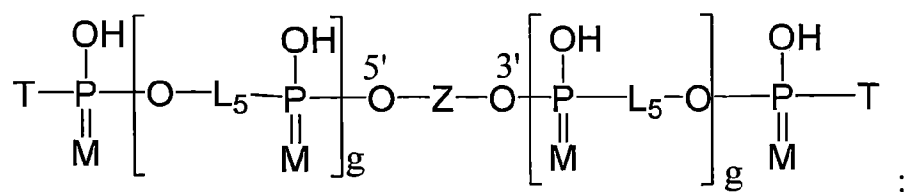
(3) 第一鏈核酸與第二鏈核酸 5'端均與配體綴合，3'端均不與配體綴合；或第一鏈核酸與第二鏈核酸 3'端均與配體綴合，5'端均不與配體綴合；或第一鏈核酸與第二鏈核酸 3'端和 5'端均與配體綴合；或第一鏈核酸 3'端與第二鏈核酸 5'端均與配體綴合，第一鏈核酸 5'端與第二鏈核酸 3'端均不與配體綴合；或第一鏈核酸 5'端與第二鏈核酸 3'端均與配體綴合，第一鏈核酸 3'端與第二鏈核酸 5'端均不與配體綴合；

(4) 第一鏈核酸 3'端和 5'端均與配體綴合，第二鏈核酸 5'端或 3'端之一與配體綴合；或第二鏈核酸 3'端和 5'端均與配體綴合，第一鏈核酸 5'端或 3'端之一與配體綴合。

【0164】 在一些實施方案中，該雙鏈核酸可為 siRNA。

【0165】 在一些實施方案中，該核酸可包括一個或多個修飾的核苷酸。

【0166】 在一些實施方案中，該核酸配體綴合物可為以下結構或其藥學上可接受的鹽：

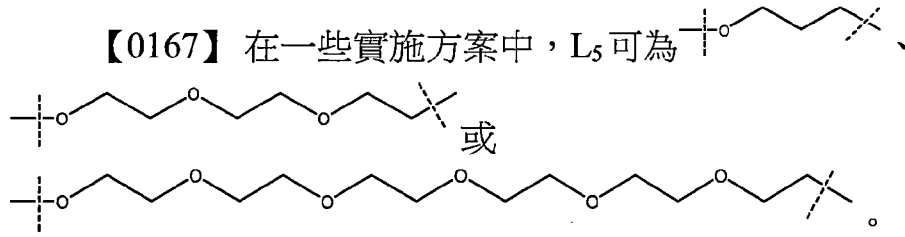
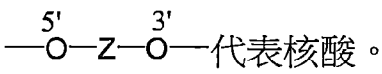


其中，T 為上述配體，T 各自相同或不同；

L₅ 獨立地為 C₁-C₃₀ 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 C=O 間斷的 C₁-C₃₀ 烷基鏈；

M獨立地為 O 或 S；

g 獨立地為 0-4 的整數；

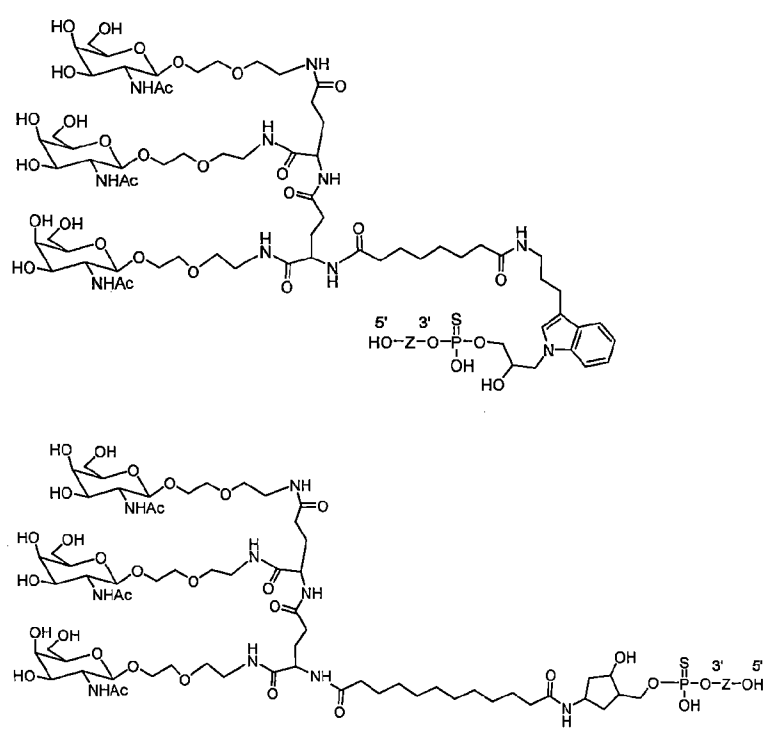


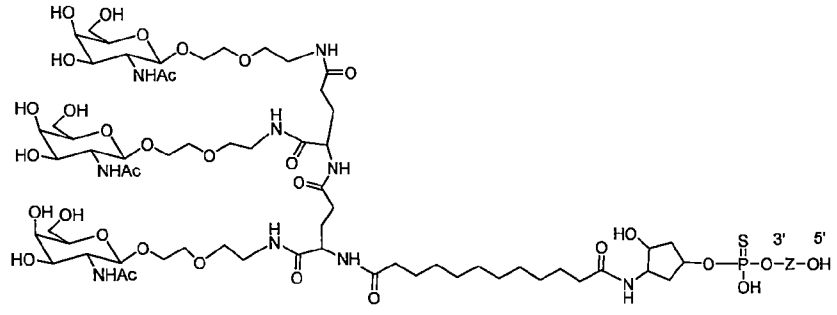
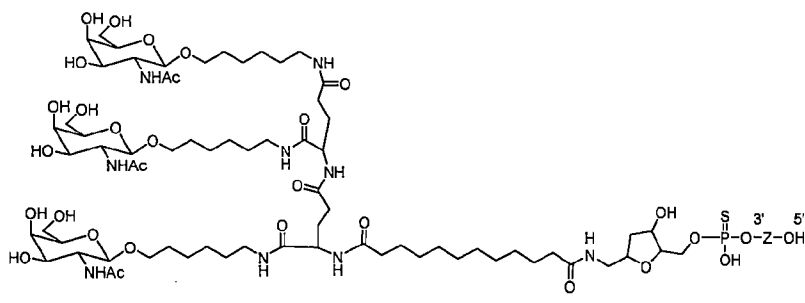
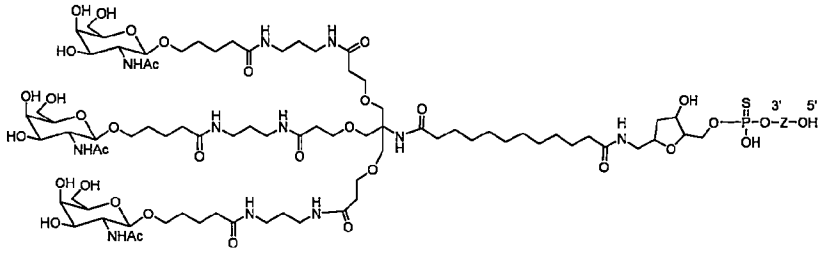
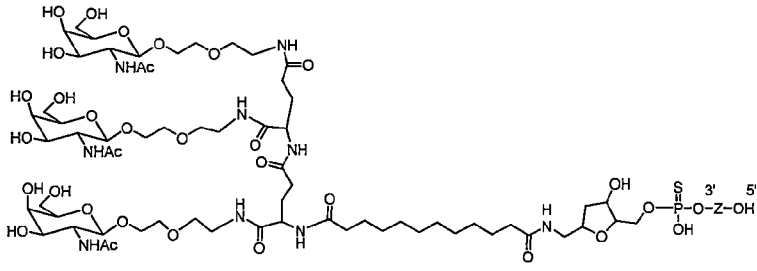
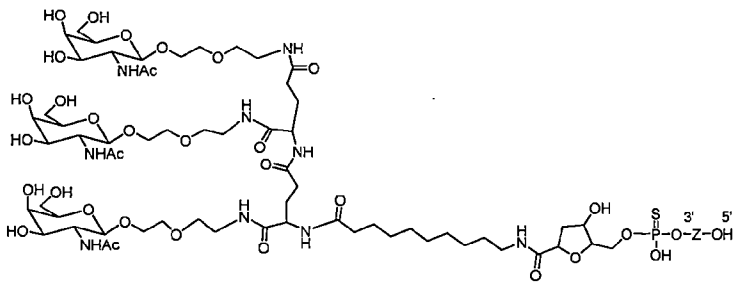
【0168】 在一些實施方案中，g 可為 0 或 1。

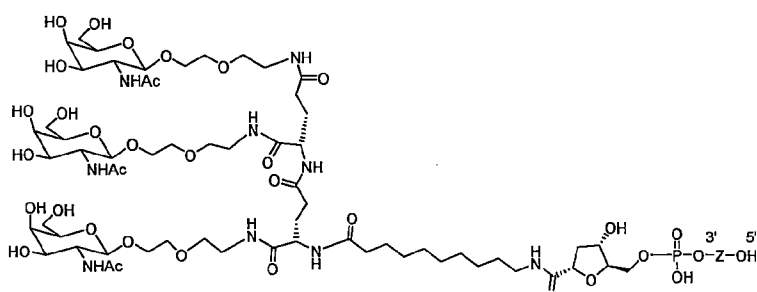
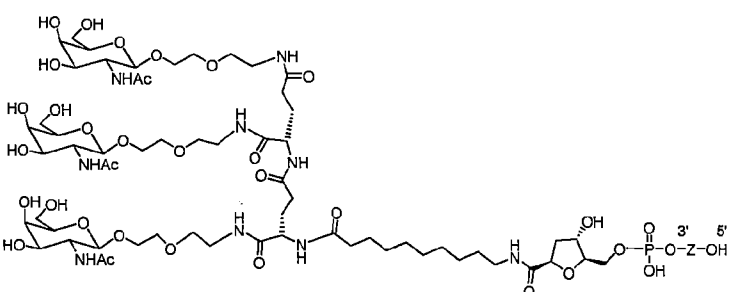
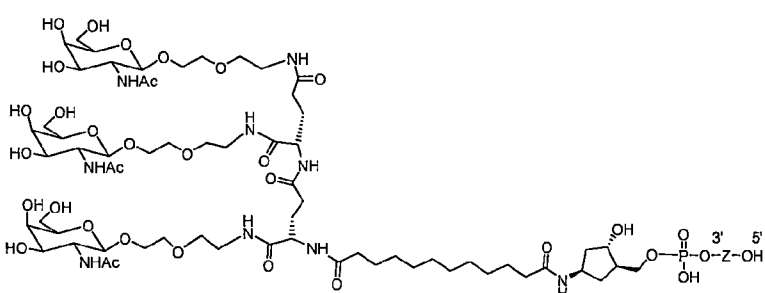
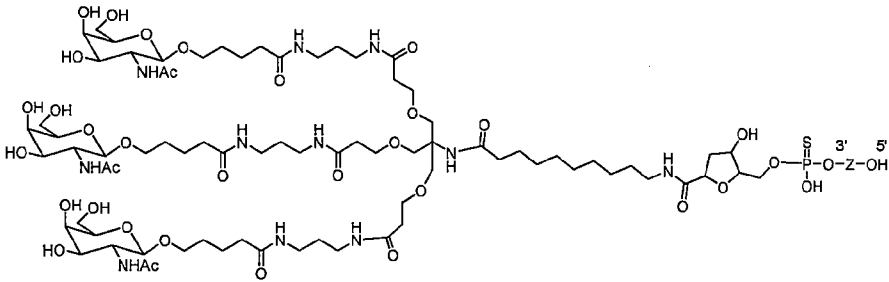
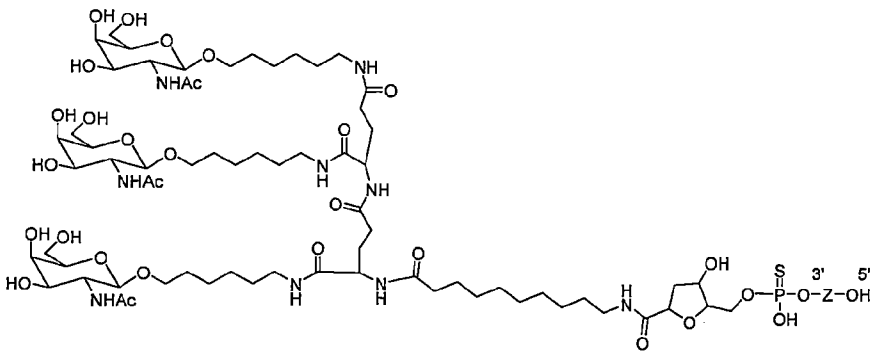
【0169】 在一些實施方案中，g 可為 0。

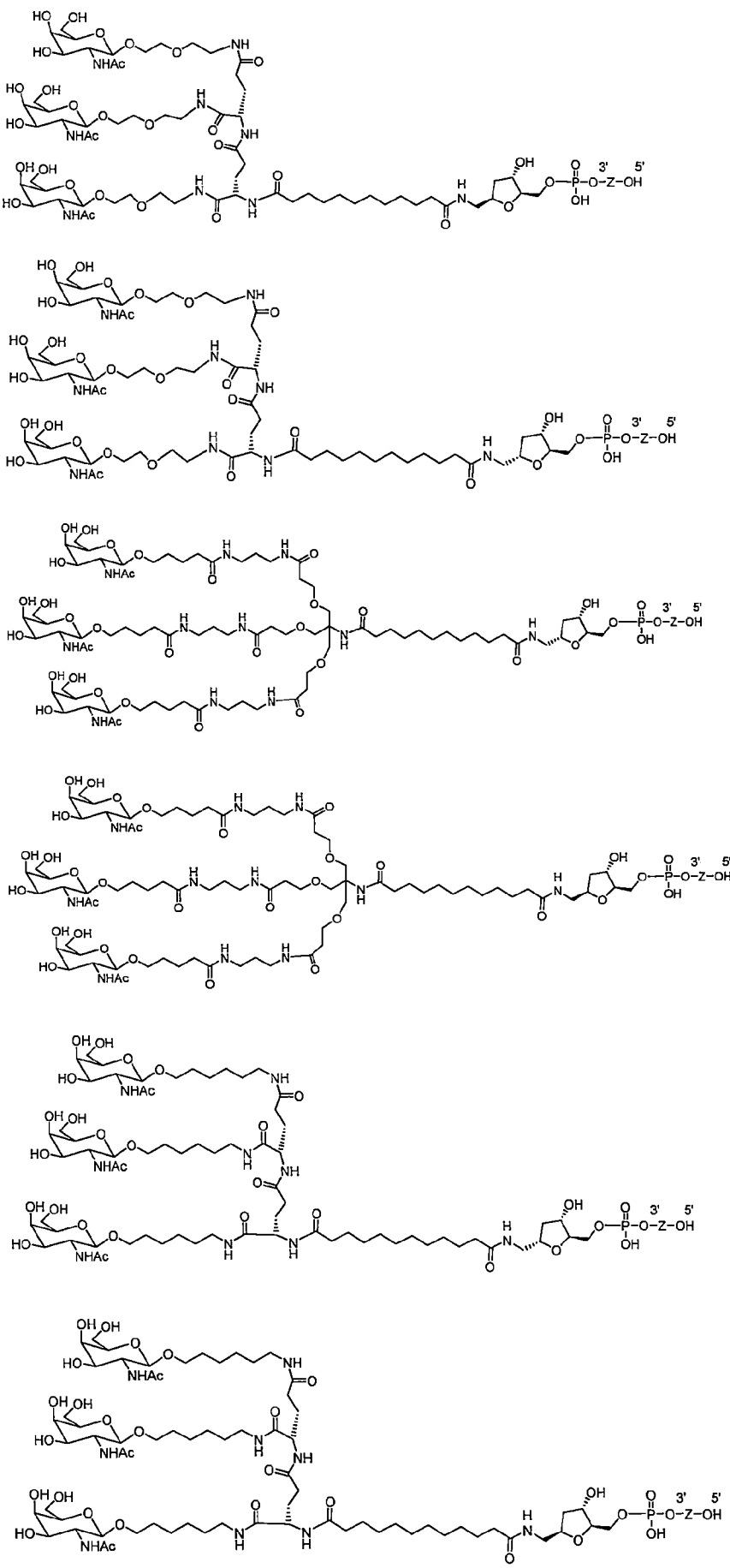
【0170】 在一些實施方案中，M 可為 S。

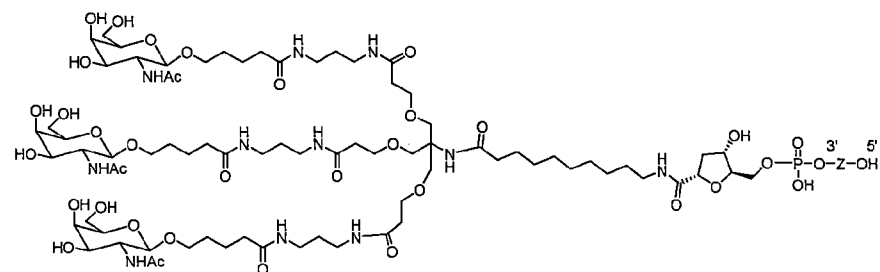
【0171】 在一些實施方案中，該核酸配體綴合物可為以下任一結構或其藥學上可接受的鹽，





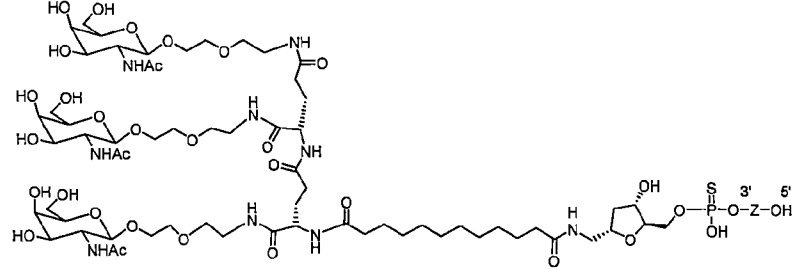
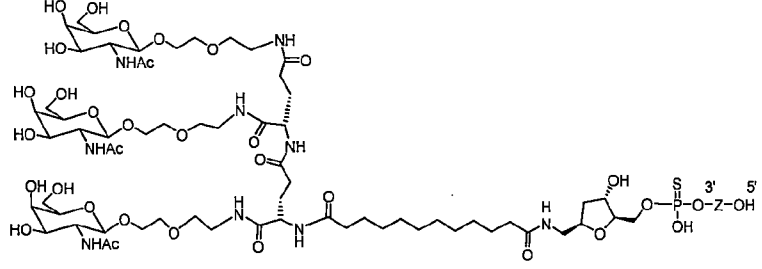
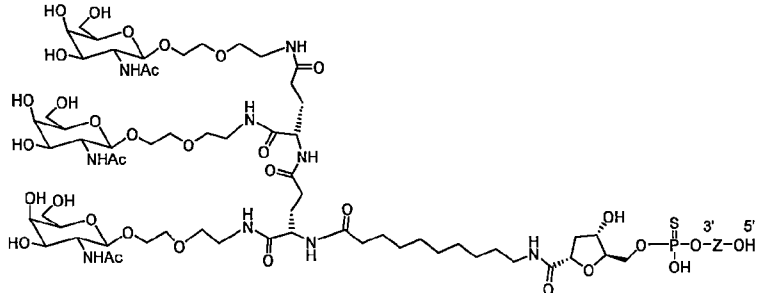
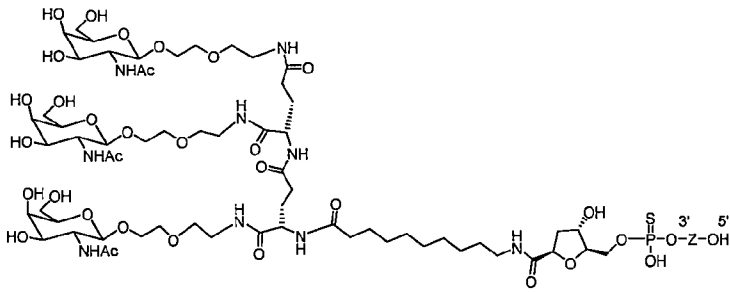
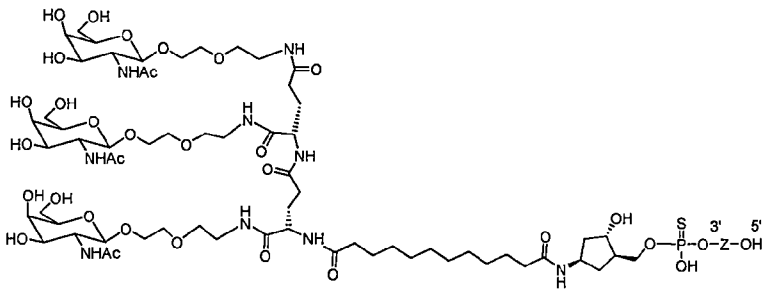


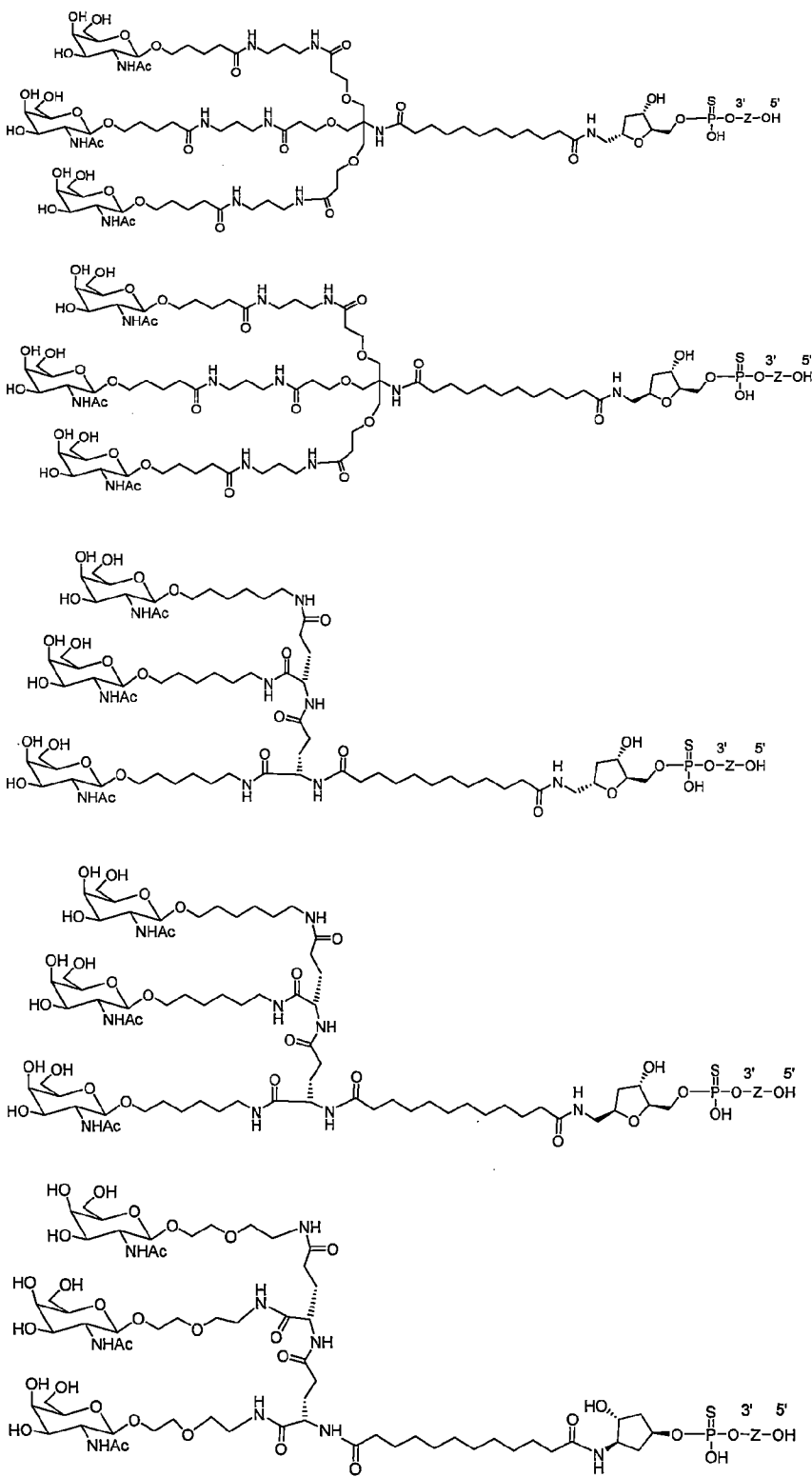


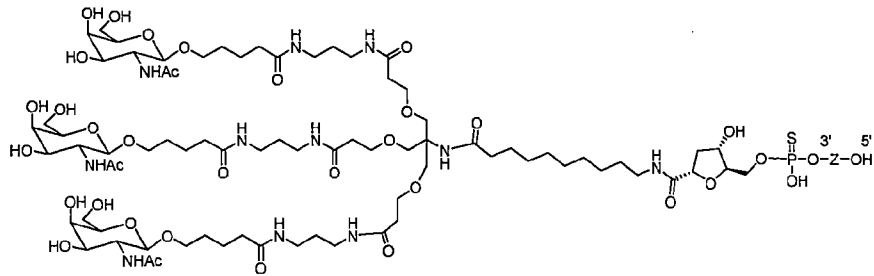
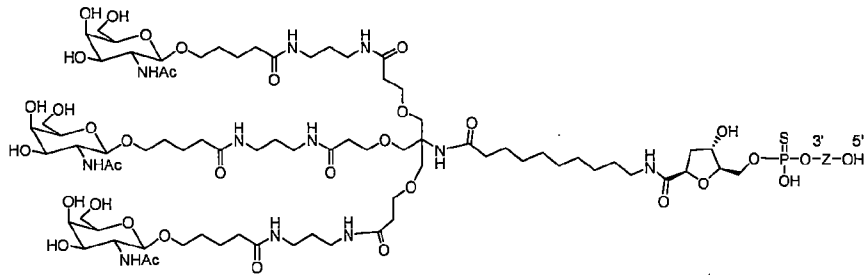
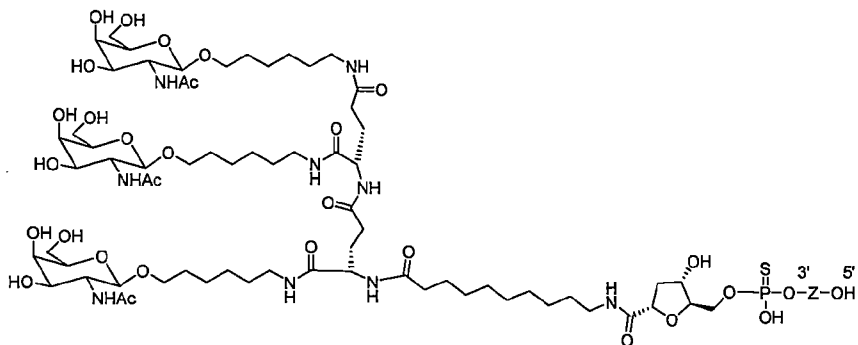
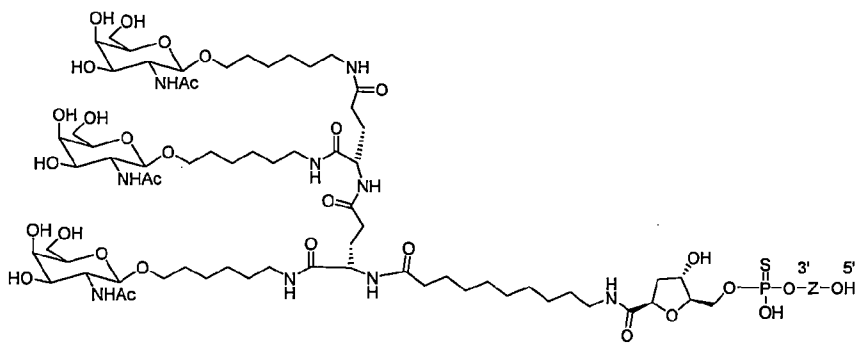


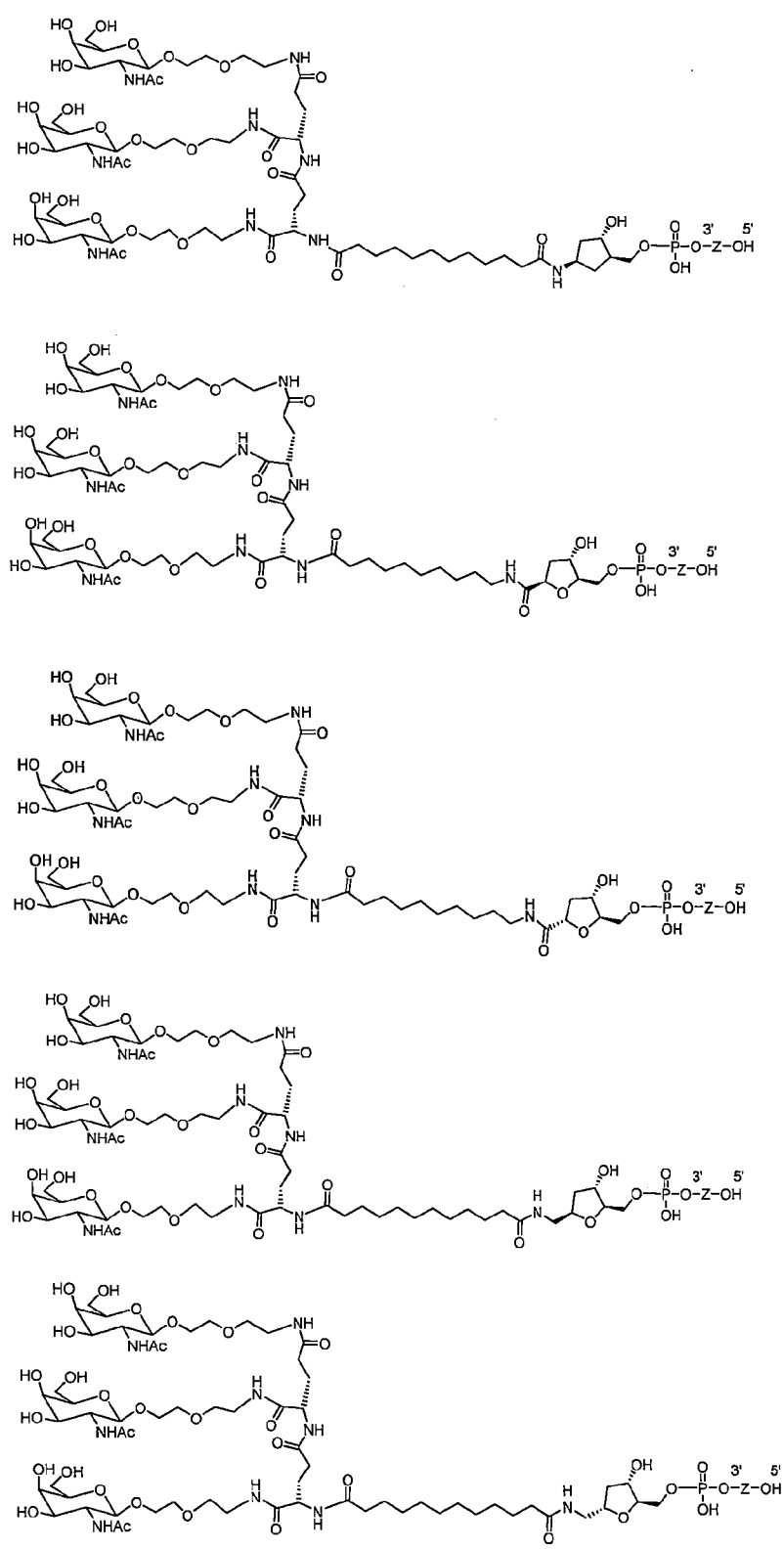
或

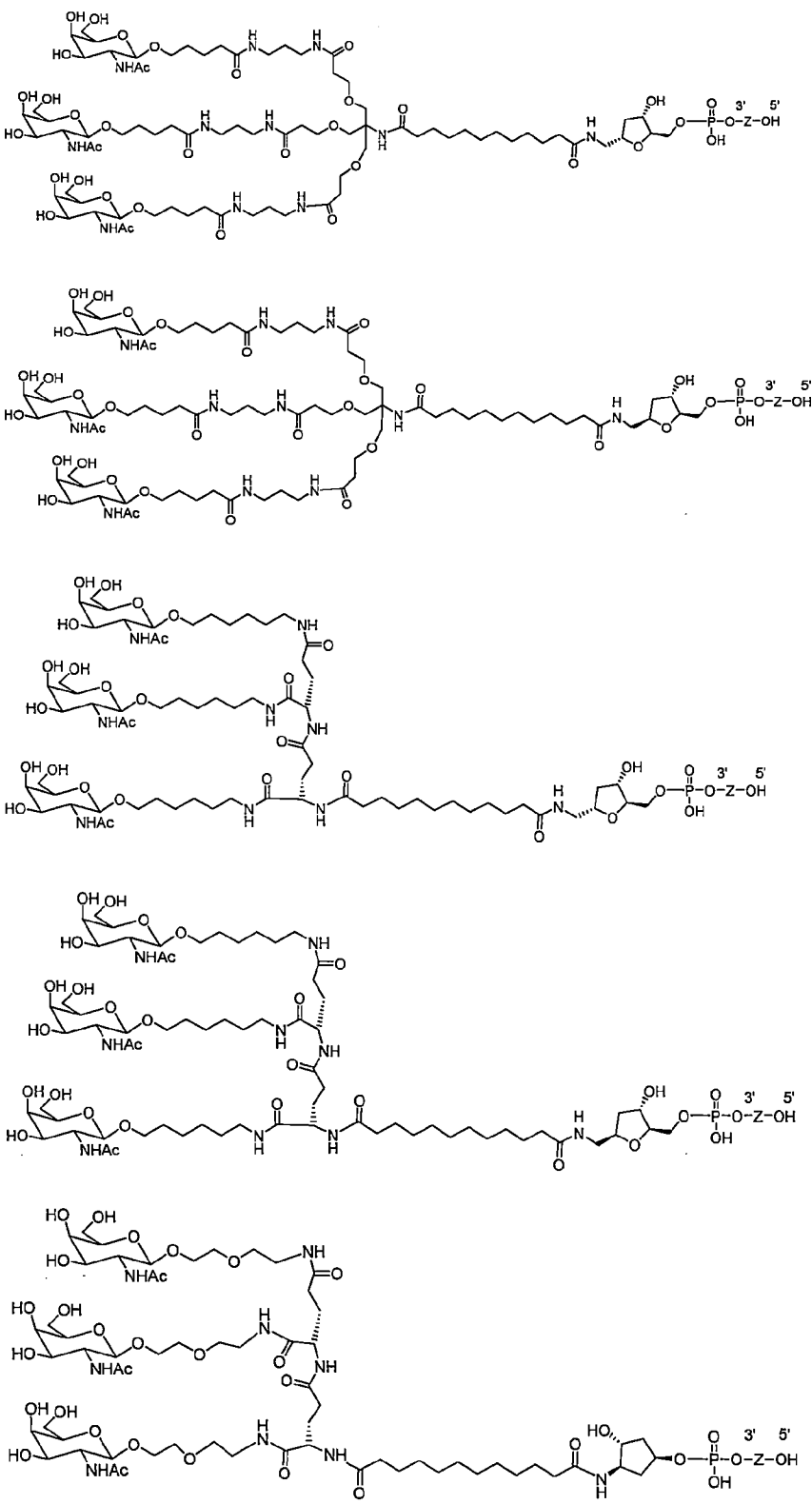
學上可接受的鹽，

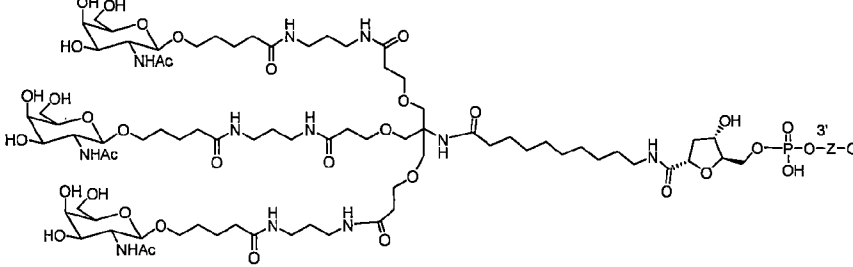
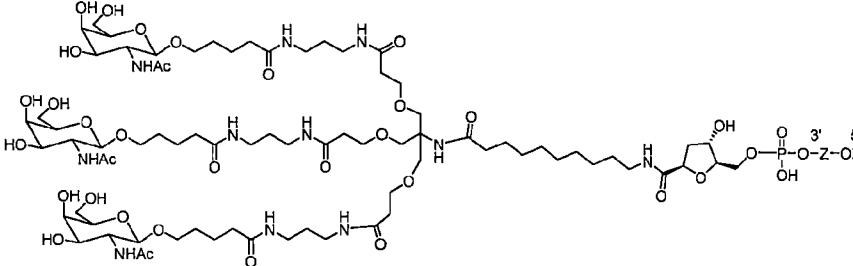
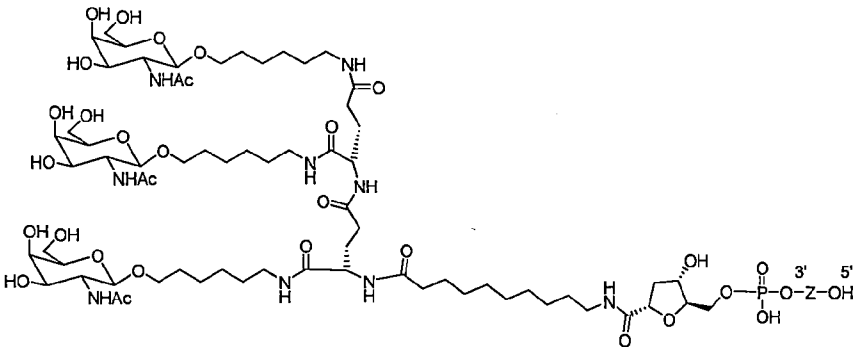
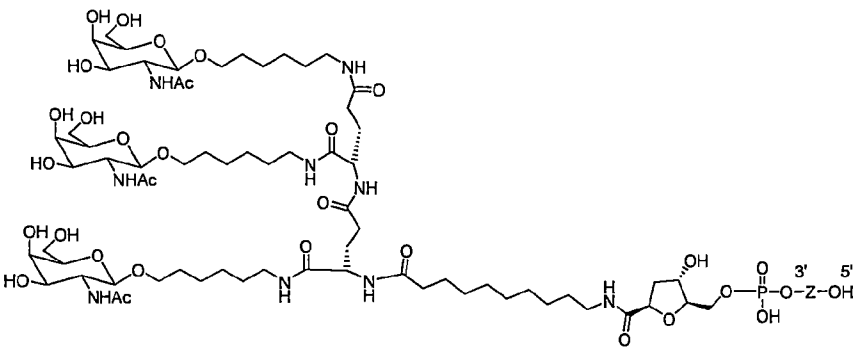












或

【0173】 在一些實施方案中，該藥學上可接受的鹽可為本領域常規的鹽，包括但不限於：鈉鹽、鉀鹽、銨鹽、胺鹽等。

【0174】 另一方面，本揭露提供了一種 RNAi 試劑，其包含上述的核酸配體綴合物。

【0175】 在一些實施方案中，該 RNAi 試劑可包括但不限於：單鏈寡核苷酸、單鏈反義寡核苷酸、短干擾 RNA(siRNA)、雙鏈 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、短髮夾 RNA(shRNA)和 Dicer 受質。

【0176】 在一些實施方案中，該 RNAi 試劑可為 siRNA。

【0177】 另一方面，本揭露提供了一種組成物，其包含上述的核酸配體綴合物或上述的 RNAi 試劑，和一種或多種藥學上可接受的賦形劑。

【0178】 在一些實施方案中，該藥學上可接受的賦形劑可為例如載劑、運載體、稀釋劑、和/或遞送聚合物。

【0179】 在一些實施方案中，該核酸配體綴合物或 RNAi 試劑可為治療有效量。

【0180】 在一些實施方案中，該組成物的單位劑量可為 0.001mg-1000mg。

【0181】 在一些實施方案中，基於組成物的總重量，該核酸配體綴合物或 RNAi 試劑的含量可為 0.01-99.99%，又可為 0.1-99.9%，還可為 0.5%-99.5%，進一步可為 1%-99%，更進一步可為 2%-98%。

【0182】 在一些實施方案中，基於組成物的總重量，該藥學上可接受的賦形劑的含量可為 0.01-99.99%，又可為 0.1-99.9%，還可為 0.5%-99.5%，進一步可為 1%-99%，更進一步可為 2%-98%。

【0183】 在一些實施方案中，本揭露所述的核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物，當接觸到表達靶基因的細胞時，由例如：psiCHECK 活性篩選和螢光素酶報告基因檢測法，其他如 PCR 或基於分支 DNA(bDNA)的方法、或基於蛋白質的方法，如免疫螢光分析法，例如 Western Blot 或流式細胞術測定的，上述核酸配體綴合物或 RNAi 試劑會抑制靶基因的表達至少 5%、至少 10%、至少 15

%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%。

【0184】 在一些實施方案中，上述綴合物或 RNAi 試劑或組成物當接觸到表達靶基因的細胞時，由例如：psiCHECK 活性篩選和螢光素酶報告基因檢測法，其他如 PCR 或基於分支 DNA(bDNA)的方法、或基於蛋白質的方法，如免疫螢光分析法，例如 Western Blot 或流式細胞術測定的，上述 siRNA 引起的靶基因 mRNA 剩餘表達百分比為不高於 99%、不高於 95%、不高於 90%、不高於 85%、不高於 80%、不高於 75%、不高於 70%、不高於 65%、不高於 60%、不高於 55%、不高於 50%、不高於 45%、不高於 40%、不高於 35%、不高於 30%、不高於 25%、不高於 20%、不高於 15%、或不高於 10%。

【0185】 另一方面，本揭露提供了一種上述核酸配體綴合物或上述 RNAi 試劑或上述組成物在製備治療患者疾病的藥物中的用途。該疾病較佳肝源性疾病。

【0186】 本揭露提供了一種用於治療患者疾病的核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物，該核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物同前所述。該疾病較佳肝源性疾病。

【0187】 本揭露提供了一種用於抑制患者體內 mRNA 表達的核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物，該核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物同前所述。

【0188】本揭露提供了一種用於將表達抑制性寡聚化合物體內遞送至肝臟的配體、核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物，該配體、核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物同前所述。

【0189】另一方面，本揭露提供了一種治療患者疾病的方法，其包括向患者給予上述核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物。該疾病較佳肝源性疾病。該核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物可為治療有效量。

【0190】另一方面，本揭露提供了一種抑制患者體內 mRNA 表達的方法，其包括向患者給予上述核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物。該核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物可為治療有效量。

【0191】另一方面，本揭露提供了一種將表達抑制性寡聚化合物體內遞送至肝臟的方法，其包括向患者給予上述核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物。該核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物可為治療有效量。

【0192】本文所公開的核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物和方法可以在細胞、細胞群、組織或受試者中降低靶 mRNA 的水平，包括：向該受試者給予治療有效量的本文所述的表達抑制性寡聚化合物，該表達抑制性寡聚化合物與配體連接，從而抑制靶 mRNA 在受試者中的表達，該配體同前所述。

【0193】在一些實施方案中，該受試者已在先前被鑑定為在靶向的細胞或組織中具有靶基因的病原性上調。

【0194】本揭露所述的患者是指患有將會受益於靶 mRNA 表達之減少或抑制的疾病或病症的受試者。

【0195】遞送可以是藉由局部給藥（例如，直接注射或植入）或全身給藥，也可藉由口服、直腸或胃腸外途徑進行給藥，該腸胃外途徑包括但不限於皮下注

射、靜脈注射、肌肉注射、腹腔注射、透皮給藥、吸入給藥（如氣溶膠）、黏膜給藥（如舌下、鼻內給藥）、顱內給藥等。

【0196】 在一些實施方案中，本揭露提供的核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物可以藉由注射給予，例如，靜脈內、肌內、皮內、皮下、十二指腸內或腹膜內注射。

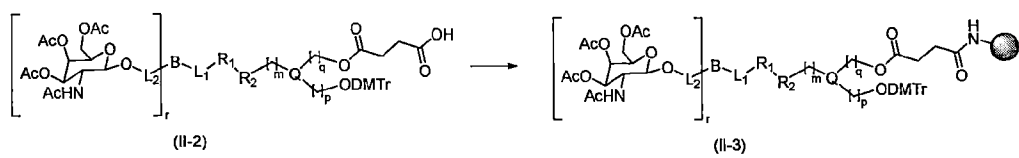
【0197】 在一些實施方案中，本揭露提供的核酸配體綴合物或 RNAi 試劑或組成物可被包裝在試劑盒中。

【0198】 在一些實施方案中，本揭露還提供了一種細胞，其包含上述的核酸配體綴合物或 RNAi 試劑。

【0199】 本揭露提供了一種核酸配體綴合物的製備方法，其包括以下步驟：以上述如式（II-3）或式（II'-3）作為起始，按照核苷酸排布順序自 3'-5' 方向逐一連接核苷單體。

【0200】 在一些實施方案中，每連接一個單體都包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化四步反應，待最後一個單體連接完成後，依次對固相載體上連接的核酸序列進行切割、脫保護、純化、脫鹽，隨後凍乾獲得核酸配體綴合物。

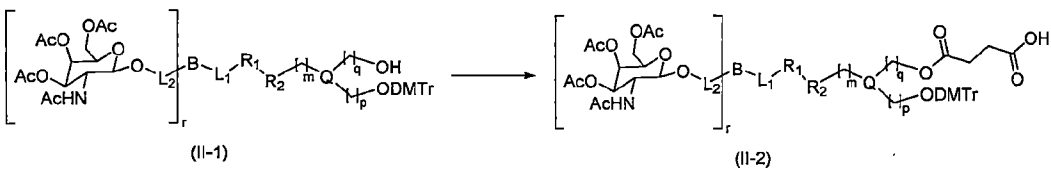
【0201】 本揭露提供了一種上述如式（II-3）所示化合物的製備方法，其包括以下步驟：將上述如式（II-2）所示化合物與高分子化合物進行綴合，得該如式（II-3）所示化合物，



其中， L_1 、 R_1 、 R_2 、 Q 、 B 、 L_2 、 m 、 p 、 q 、 r 和的定義同前所述。

【0202】 在一些實施方案中，該綴合的條件和操作可為本領域常規的條件和操作。

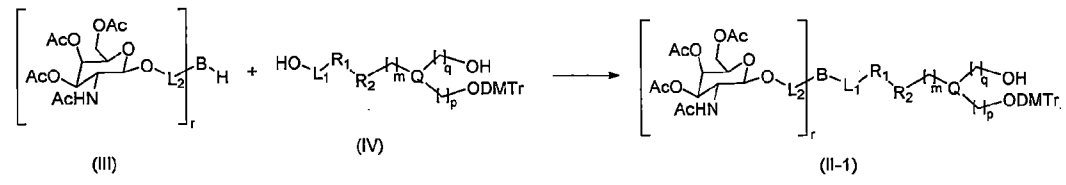
【0203】 在一些實施方案中，該如式 (II-2) 所示化合物可藉由以下步驟製得：溶劑中，在鹼的作用下，將上述如式 (II-1) 所示化合物與丁二酸酐進行如下所示反應，得該如式 (II-2) 所示化合物；



L₁、R₁、R₂、Q、B、L₂、m、p、q 和 r 的定義同前所述。

【0204】 在一些實施方案中，該反應的條件和操作可為本領域該類反應常規的條件和操作。

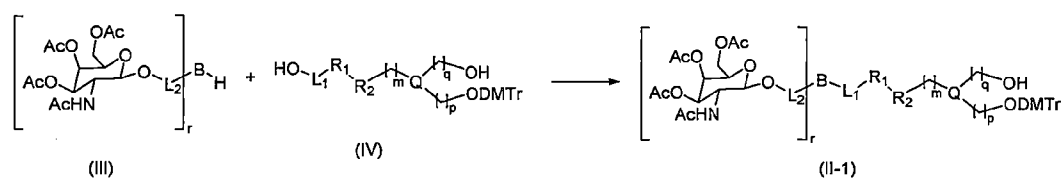
【0205】 在一些實施方案中，該如式 (II-1) 所示化合物可藉由以下步驟製得：將如式 (III) 所示化合物與如式 (IV) 所示化合物進行如下所示的反應，得該如式 (II-1) 所示化合物；



L₁、R₁、R₂、Q、B、L₂、m、p、q 和 r 的定義同前所述。

【0206】 在一些實施方案中，該反應的條件和操作可為本領域該類反應常規的條件和操作。

【0207】 本揭露提供了一種上述如式 (II-1) 所示化合物的製備方法，其包括以下步驟：將如式 (III) 所示化合物與如式 (IV) 所示化合物進行如下所示的反應，得該如式 (II-1) 所示化合物；



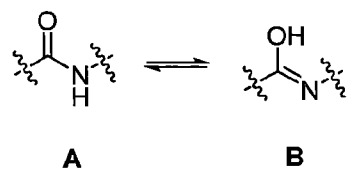
L₁、R₁、R₂、Q、B、L₂、m、p、q 和 r 的定義同前所述。

【0208】 在一些實施方案中，該反應的條件和操作可為本領域該類反應常規的條件和操作。

術語定義

【0209】 另一方面，在本揭露未限定特定構型的情況下，本揭露化合物可以存在特定的幾何或立體異構體形式。本揭露設想所有的這類化合物，包括順式和反式異構體、(-)-和(+)-對對映體、(R)-和(S)-對映體、非對映異構體、(D)-異構體、(L)-異構體，及其外消旋混合物和其他混合物，例如對映異構體或非對映異構體富集的混合物，所有這些混合物都屬本揭露的範圍之內。烷基等取代基中可存在另外的不對稱碳原子。所有這些異構體以及它們的混合物，均包括在本揭露的範圍之內。

【0210】 另外，本揭露的化合物和中間體還可以以不同的互變異構體形式存在，並且所有這樣的形式包含於本揭露的範圍內。術語“互變異構體”或“互變異構體形式”是指可經由低能壘互變的不同能量的結構異構體。例如，質子互變異構體(也稱為質子轉移互變異構體)包括經由質子遷移的互變，如酮-烯醇及亞胺-烯胺、內醯胺-內醯亞胺異構化。內醯胺-內醯亞胺平衡實例是在如下所示的 A 和 B 之間。



【0211】 本揭露中的所有化合物可以被畫成 A 型或 B 型。所有的互變異構形式在本揭露的範圍內。化合物的命名不排除任何互變異構體。

【0212】 本揭露化合物可以是不對稱的，例如，具有一個或多個立體異構體。除非另有說明，所有立體異構體都包括，如對映異構體和非對映異構體。本揭露的含有不對稱碳原子的化合物可以以光學活性純的形式或外消旋形式被分離出來。光學活性純的形式可以從外消旋混合物拆分，或藉由使用手性原料或手性試劑合成。

【0213】 可以藉由手性合成或手性試劑或者其他常規技術製備光學活性的(R)-和(S)-異構體以及 D 和 L 異構體。如果想得到本揭露某化合物的一種對映體，可以藉由不對稱合成或者具有手性助劑的衍生作用來製備，其中將所得非對映體混合物分離，並且輔助基團裂開以提供純的所需對映異構體。或者，當分子中含有鹼性官能團(如胺基)或酸性官能團(如羧基)時，與適當的光學活性的酸或鹼形成非對映異構體的鹽，然後藉由本領域所公知的常規方法進行非對映異構體拆分，然後回收得到純的對映體。此外，對映異構體和非對映異構體的分離通常是藉由使用色譜法完成的，該色譜法採用手性固定相，並視需要地與化學衍生法相結合(例如由胺生成胺基甲酸鹽)。

【0214】 本揭露還包括一些與本文中記載的那些相同的，但一個或多個原子被原子量或質量數不同於自然中通常發現的原子量或質量數的原子置換的同位素標記的本揭露化合物。可結合到本揭露化合物的同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，諸如分別為 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

【0215】除另有說明，當一個位置被特別地指定為氘(D)時，該位置應理解為具有大於氘的天然豐度(其為 0.015%)至少 1000 倍的豐度的氘(即，至少 10%的氘摻入)。示例中化合物的具有大於氘的天然豐度可以是至少 1000 倍的豐度的氘、至少 2000 倍的豐度的氘、至少 3000 倍的豐度的氘、至少 4000 倍的豐度的氘、至少 5000 倍的豐度的氘、至少 6000 倍的豐度的氘或更高豐度的氘。本揭露還包括各種氘化形式的式(I)化合物。與碳原子連接的各個可用的氫原子可獨立地被氘原子替換。所屬技術領域具有通常知識者能夠參考相關文獻合成氘化形式的式(I)化合物。在製備氘化形式的式(I)化合物時可使用市售的氘代起始物質，或可使用常規技術採用氘代試劑合成，氘代試劑包括但不限於氘代硼烷、三氘代硼烷四氫呋喃溶液、氘代氫化鋰鋁、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

【0216】“視需要地”或“視需要”意味著隨後所描述的事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如“視需要的被鹵素或者氰基取代的 C₁₋₆烷基”是指鹵素或者氰基可以但不必須存在，該說明包括烷基被鹵素或者氰基取代的情形和烷基不被鹵素和氰基取代的情形。

【0217】本揭露所述化合物的化學結構中，鍵“/”表示未指定構型，即如果化學結構中存在手性異構體，鍵“/”可以為“”或“”，或者同時包含“”和“”兩種構型。雖然為簡便起見將全部上述結構式畫成某些異構體形式，但是本揭露可以包括所有的異構體，如互變異構體、旋轉異構體、幾何異構體、非對映異構體、外消旋體和對映異構體。本揭露所述化合物的化學結構中，鍵“”並未指定構型，即鍵“”的構型可以為 E 型或 Z 型，或者同時包含 E 和 Z 兩種構型。

【0218】術語“組成物”表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上可藥用的鹽或前體的藥物與其他化學組分的混合物，以及其他組分例如生理學可藥用的載體和賦形劑。組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【0219】術語“可藥用賦形劑”或“藥學上可接受的賦形劑”包括但不限於任何已經被美國食品和藥物管理局批准對於人類或家畜動物使用可接受的任何助劑、載體、賦形劑、助流劑、甜味劑、稀釋劑、防腐劑、染料/著色劑、增香劑、表面活性劑、潤濕劑、分散劑、助懸劑、穩定劑、等滲劑、溶劑或乳化劑。

【0220】如無特殊說明，本揭露的“化合物”、“配體”、“核酸配體綴合物”、“核酸”均可獨立地以鹽、混合鹽或非鹽（例如游離酸或游離鹼）的形式存在。當以鹽或混合鹽的形式存在時，其可為藥學上可接受的鹽。

【0221】術語“藥學上可接受的鹽”包括藥學上可接受的酸加成鹽和藥學上可接受的鹼加成鹽。

【0222】“藥學上可接受的酸加成鹽”是指能夠保留游離鹼的生物有效性而無其它副作用的，與無機酸或有機酸所形成的鹽。無機酸鹽包括但不限於鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、硝酸鹽、磷酸鹽等；有機酸鹽包括但不限於甲酸鹽、乙酸鹽、2,2-二氯乙酸鹽、三氟乙酸鹽、丙酸鹽、己酸鹽、辛酸鹽、癸酸鹽、十一碳烯酸鹽、乙醇酸鹽、葡糖酸鹽、乳酸鹽、癸二酸鹽、己二酸鹽、戊二酸鹽、丙二酸鹽、草酸鹽、馬來酸鹽、琥珀酸鹽、富馬酸鹽、酒石酸鹽、檸檬酸鹽、棕櫚酸鹽、硬脂酸鹽、油酸鹽、肉桂酸鹽、月桂酸鹽、蘋果酸鹽、谷胺酸鹽、焦谷胺酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、甲磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、海藻酸鹽、

抗壞血酸鹽、水楊酸鹽、4-胺基水楊酸鹽、萘二磺酸鹽等。這些鹽可藉由本領域已知的方法製備。

【0223】“藥學上可接受的鹼加成鹽”是指能夠保持游離酸的生物有效性而無其它副作用的、與無機鹼或有機鹼所形成的鹽。衍生自無機鹼的鹽包括但不限於鈉鹽、鉀鹽、鋰鹽、銨鹽、鈣鹽、鎂鹽、鐵鹽、鋅鹽、銅鹽、錳鹽、鋁鹽等。較佳的無機鹽為銨鹽、鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽及鎂鹽，較佳鈉鹽。衍生自有機鹼的鹽包括但不限於以下的鹽：一級胺類、二級胺類及三級胺類，被取代的胺類，包括天然的被取代胺類、環狀胺類及鹼性離子交換樹脂，例如胺、異丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二甲基乙醇胺、2-二甲胺基乙醇、2-二乙胺基乙醇、二環己胺、賴胺酸、精胺酸、組胺酸、咖啡因、普魯卡因、膽鹼、甜菜鹼、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可鹼、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺樹脂等。較佳的有機鹼包括異丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二環己基胺、膽鹼及咖啡因。這些鹽可藉由本領域已知的方法製備。

【0224】術語“烷基”指飽和脂肪族烴基團，其為包含 1 至 30 個碳原子的直鏈或支鏈基團，較佳含有 1 至 12 個碳原子的烷基，更佳 1 至 10 個碳原子的烷基，更佳 1 至 6 個碳原子的烷基，進一步佳 1 至 4 個碳原子的烷基。非限制性實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第三丁基、第二丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲

基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各種支鏈異構體等。更佳的是含有 1 至 6 個碳原子的烷基，非限制性實施例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第三丁基、第二丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的，當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，該取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基、側氧基、羧基或羧酸酯基。

【0225】術語“亞(伸)烷基”表示烷烴分子中去除 2 個氫原子後餘下的部分，包括 1 至 20 個碳原子的直鏈和支鏈亞基團。含有 1 至 6 個碳原子的亞(伸)烷基，非限制性實施例包括亞甲基(-CH₂-)、亞(伸)乙基(如-CH₂CH₂-或-CH(CH₃)-)、亞(伸)丙基(如-CH₂CH₂CH₂-或-CH(CH₂CH₃)-)、伸丁基(如-CH₂CH₂CH₂CH₂-)。如無特殊說明，亞(伸)烷基可以是取代的或未取代的，當被取代時，取代基可以

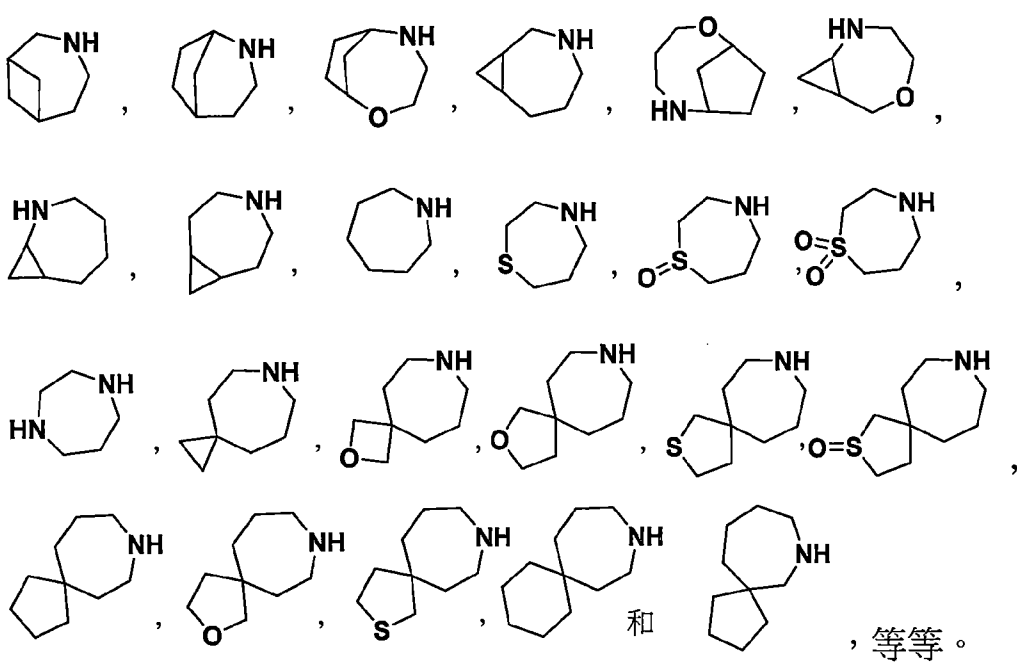
在任何可使用的連接點上被取代，較佳一個或多個以下基團，獨立地選自氬、芳基、雜芳基、鹵素所取代。

【0226】術語“環烷基”或“碳環”指飽和或部分不飽和單環或多環環狀烴取代基，環烷基環包含 3 至 20 個碳原子，較佳包含 3 至 7 個碳原子。單環環烷基的非限制性實例包括環丙基、環丁基、環戊基、環戊烯基、環己基、環己烯基、環己二烯基等；多環環烷基包括螺環、稠環和橋環的環烷基。環烷基可以是取代的或未取代的，當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，較佳一個或多個以下基團，獨立地選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基，該 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基所取代。

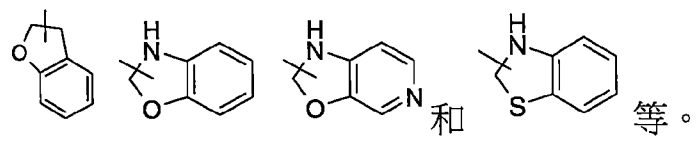
【0227】該環烷基環可以稠合於芳基或雜芳基環上，其中與母體結構連接在一起的環為環烷基，非限制性實例包括茚滿基、四氫萘基、苯并環庚烷基等。環烷基可以是視需要取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基，該 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基所取代。

【0228】術語“雜環烷基”或“雜環”指飽和或部分不飽和單環或多環環狀烴取代基，其包含 3 至 20 個環原子，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 S(O)_m (其

中 m 是整數 0 至 2) 的雜原子，但不包括 -O-O-、-O-S- 或 -S-S- 的環部分，其餘環原子為碳。較佳包含 3 至 12 個環原子，其中 1~4 個是雜原子；更佳包含 3 至 7 個環原子。單環雜環烷基的非限制性實例包括吡咯烷基、咪唑烷基、四氫呋喃基、四氫噻吩基、二氫咪唑基、二氫呋喃基、二氫吡唑基、二氫吡咯基、哌啶基、哌嗪基、嗎啉基、硫嗎啉基、高哌嗪基等。多環雜環烷基包括螺環、稠環和橋環的雜環烷基。“雜環烷基”非限制性實例包括：



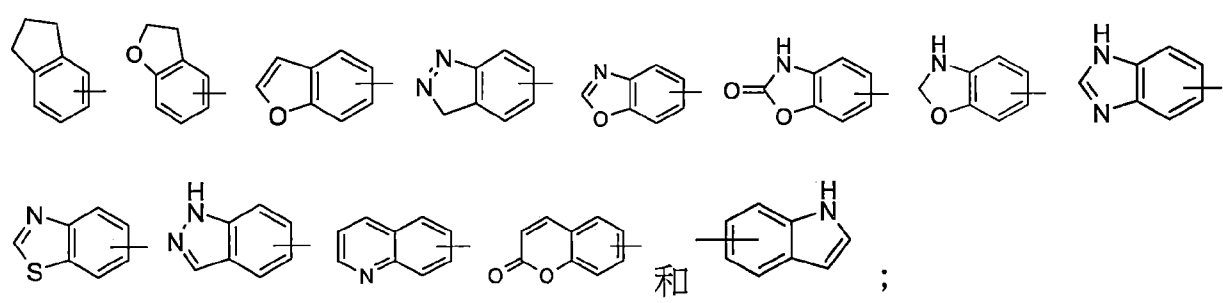
【0229】該雜環烷基環可以稠合於芳基或雜芳基環上，其中與母體結構連接在一起的環為雜環烷基，其非限制性實例包括：



【0230】雜環烷基可以是視需要取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自鹵素、氘、氫基、側氧、硝基、氰基、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯氧基、C₂₋₆ 炔氧基、C₃₋₆ 環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈ 環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基，該 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯

氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基所取代。

【0231】術語“芳基”指具有共軛的 π 電子體系的 6 至 14 員全碳單環或稠合多環(也就是共享毗鄰碳原子對的環)基團，較佳為 6 至 12 員，例如苯基和萘基。該芳基環可以稠合於雜芳基、雜環烷基或環烷基環上，其中與母體結構連接在一起的環為芳基環，其非限制性實例包括：



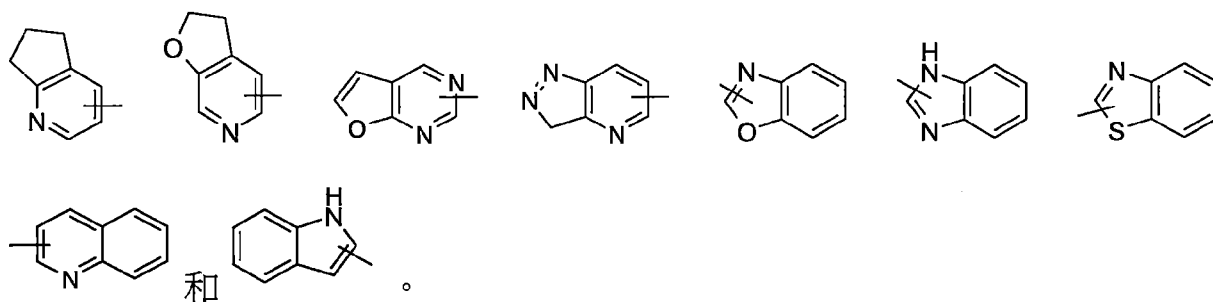
【0232】芳基可以是取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基，該 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₂₋₆炔氧基、C₃₋₆環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基所取代。

【0233】術語“雜芳基”指包含 1 至 4 個雜原子、5 至 14 個環原子的雜芳族體系，其中雜原子選自氧、硫和氮。雜芳基較佳為 5 至 12 員，更佳為 5 員或 6 員。例如。其非限制性實例包括：咪唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡唑基、

噁唑基(oxazolyl)、異噁唑基(isoxazolyl)、吡咯基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、噻

二唑、吡嗪基、三唑基、呋唑基、苯并咪唑基、、、等。

【0234】該雜芳基環可以稠合於芳基、雜環烷基或環烷基環上，其中與母體結構連接在一起的環為雜芳基環，其非限制性實例包括：

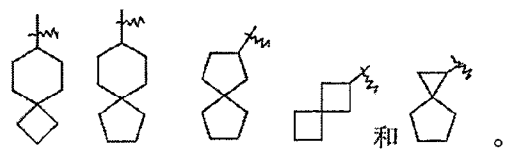


【0235】雜芳基可以是視需要取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自鹵素、氖、羥基、側氧、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 環烷氧基、3至6員雜環烷氧基、 C_{3-8} 環烯氧基、5至6員芳基或雜芳基，該 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 C_{2-6} 炔氧基、 C_{3-6} 環烷氧基、3至6員雜環烷氧基、 C_{3-8} 環烯氧基、5至6員芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、氖、羥基、側氧、硝基、氰基所取代。

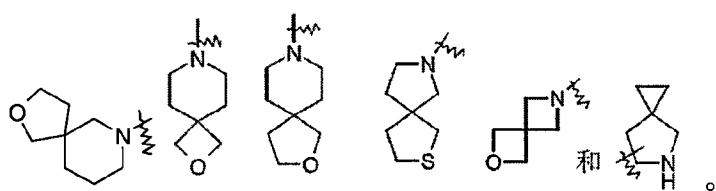
【0236】術語“螺環”指兩環共用一個原子的化合物。

【0237】術語“螺環烷基”指5至20員的單環之間共用一個碳原子(稱螺原子)的多環基團，其可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統。較佳為6至14員，更佳為7至10員。根據環與環之間共用螺原子的數目將螺環烷基分為單螺環烷基、雙螺環烷基或多螺環烷基，較佳為單螺環烷基

和雙螺環烷基。更佳為 4 員/4 員、4 員/5 員、4 員/6 員、5 員/5 員或 5 員/6 員單螺環烷基。“螺碳環”指的是螺環烷基中的環系。螺環烷基的非限制性實例包括：



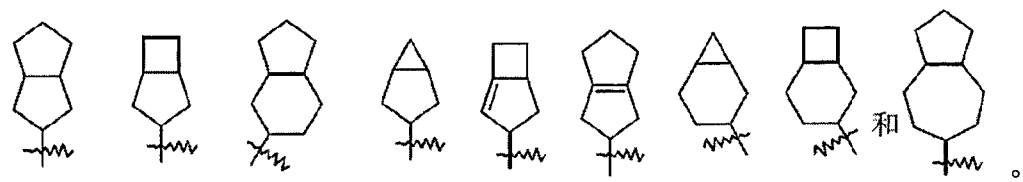
【0238】術語“螺雜環基”指 5 至 20 員的單環之間共用一個原子(稱螺原子)的多環雜環基團，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整數 0 至 2)的雜原子，其餘環原子為碳。其可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統。較佳為 6 至 14 員，更佳為 7 至 10 員。根據環與環之間共用螺原子的數目將螺雜環基分為單螺雜環基、雙螺雜環基或多螺雜環基，較佳為單螺雜環基和雙螺雜環基。更佳為 4 員/4 員、4 員/5 員、4 員/6 員、5 員/5 員或 5 員/6 員單螺雜環基。“螺雜環”指的是螺雜環基中的環系。螺雜環基的非限制性實例包括：



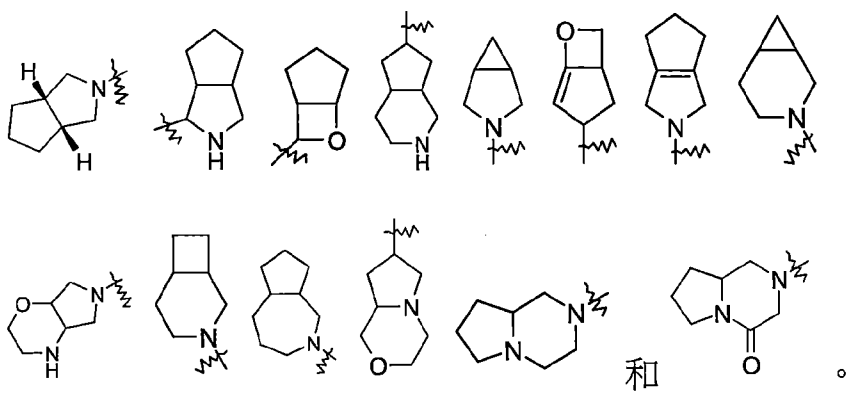
【0239】術語“稠環”指兩個或兩個以上環藉由共用兩個相鄰的原子稠合而成的化合物。

【0240】術語“稠環烷基”指 5 至 20 員，系統中的每個環與體系中的其他環共享毗鄰的一對碳原子的全碳多環基團，其中一個或多個環可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統。較佳為 6 至 14 員，更佳為 7 至 10 員。根據組成環的數目可以分為雙環、三環、四環或多環稠環烷基，較

佳為雙環或三環，更佳為 5 員/5 員或 5 員/6 員雙環烷基。稠環烷基的非限制性實例包括：



【0241】術語“稠雜環基”指 5 至 20 員，系統中的每個環與體系中的其他環共享毗鄰的一對原子的多環雜環基團，一個或多個環可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整數 0 至 2) 的雜原子，其餘環原子為碳。較佳為 6 至 14 員，更佳為 7 至 10 員。根據組成環的數目可以分為雙環、三環、四環或多環稠雜環基，較佳為雙環或三環，更佳為 5 員/5 員或 5 員/6 員雙環稠雜環基。“稠雜環”指的是稠雜環基中的環系。稠雜環基的非限制性實例包括：



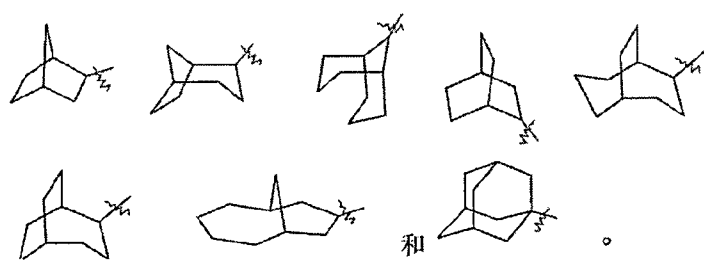
【0242】術語“稠雜芳基”可以是含有 5-14 個環原子(其中至少含有一個雜原子)，由兩個或兩個以上環狀結構彼此共用兩個相鄰的原子連接起來形成的不飽和的具有芳香性的稠環結構，同時包括碳原子、氮原子和硫原子可以被氧化的情況，較佳“5-12 員稠雜芳基”、“7-12 員稠雜芳基”、“9-12 員稠雜芳基”等，例如苯并呋喃基、苯并異呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、異吲哚基、苯并噁唑基、苯

并咪唑基、呋唑基、苯并三唑基、喹啉基、2-喹啉酮基、4-喹啉酮基、1-異喹啉酮基、異喹啉基、吡啶基、菲啶基、苯并噻嗪基、酞嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、酞嗪基、喋啶基、嘌呤基、萘啶基、吩嗪基、吩噻嗪基等。“稠雜芳環”指的是稠雜芳基中的環系。

【0243】稠雜芳基可以是視需要取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巯基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基、羧基或羧酸酯基。

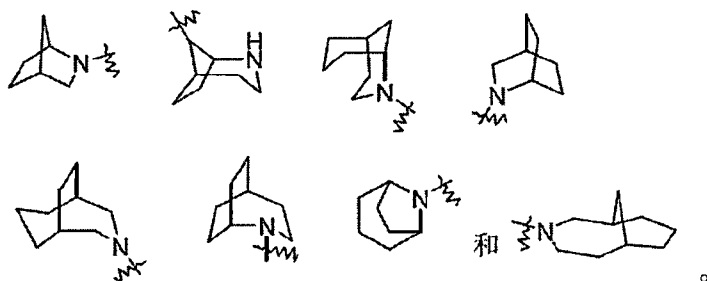
【0244】術語“橋環”指兩個或兩個以上環狀結構彼此共用兩個非相鄰的環原子所形成的結構。

【0245】術語“橋環烷基”指 5 至 20 員，任意兩個環共用兩個不直接連接的碳原子的全碳多環基團，其可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統。較佳為 6 至 14 員，更佳為 7 至 10 員。根據組成環的數目可以分為雙環、三環、四環或多環橋環烷基，較佳為雙環、三環或四環，更佳為雙環或三環。橋環烷基的非限制性實例包括：



【0246】術語“橋雜環基”指 5 至 14 員，任意兩個環共用兩個不直接連接的原子，其可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整數 0

至 2) 的雜原子，其餘環原子為碳。較佳為 6 至 14 員，更佳為 7 至 10 員。根據組成環的數目可以分為雙環、三環、四環或多環橋雜環基，較佳為雙環、三環或四環，更佳為雙環或三環。橋雜環基的非限制性實例包括：



【0247】術語“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(非取代的環烷基)，其中烷基的定義如上所述。烷氧基的非限制性實例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、環丙氧基、環丁氧基、環戊氧基、環己氧基。烷氧基可以是視需要取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯氧基、C₂₋₆ 炔氧基、C₃₋₆ 環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈ 環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基，該 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯氧基、C₂₋₆ 炔氧基、C₃₋₆ 環烷氧基、3 至 6 員雜環烷氧基、C₃₋₈ 環烯氧基、5 至 6 員芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、氬、羥基、側氧、硝基、氰基所取代。同理，“炔氧基”、“烯氧基”、“環烷氧基”、“雜環烷氧基”、“環烯氧基”的定義如上述“烷氧基”定義。

【0248】術語“取代的”指基團中的一個或多個氫原子，較佳為最多 5 個，更佳為 1~3 個氫原子彼此獨立地被相應數目的取代基取代。不言而喻，取代基僅處在它們的可能的化學位置，所屬技術領域具有通常知識者能夠在不付出過多努力的情況下(藉由實驗或理論)確定可能或不可能的取代。

【0249】“被一個或多個……取代”是指可以被單個或多個取代基取代。當被多個取代基取代時，可以是複數個相同取代基，也可以是一個或複數個不同取代基的組合。

【0250】術語“連接”，當表示兩個分子之間的聯繫時，指兩個分子藉由共價鍵連接或者兩個分子經由非共價鍵(例如，氫鍵或離子鍵)關聯，包括直接連接和間接連接。

【0251】術語“直接連接”指第一化合物或基團與第二化合物或基團在沒有任何間插原子或原子基團的情況下連接。術語“間接連接”指第一化合物或基團與第二化合物或基團藉由中間基團、化合物或分子(例如，連接基團)連接。

【0252】術語“羥基”指-OH。

【0253】術語“鹵素”指氟、氯、溴或碘。

【0254】術語“鹵烷基”指被鹵素取代的烷基，其中烷基如上所定義。

【0255】術語“氰基”指-CN。

【0256】術語“硝基”指-NO₂。

【0257】術語“側氧”指=O基團。例如，碳原子與氧原子藉由雙鍵連接，其中形成酮或醛基。

【0258】術語“胺基”指-NH₂。

【0259】術語“氰基”指-CN。

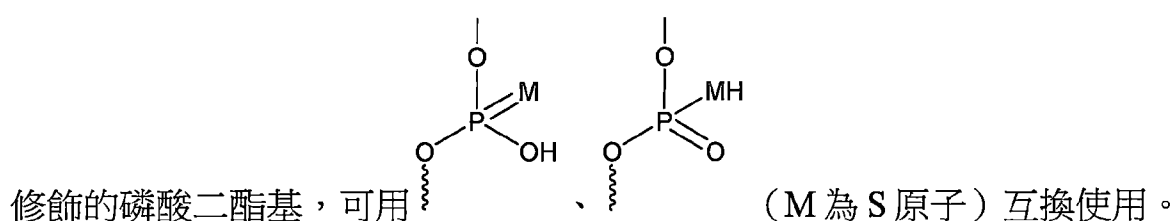
【0260】術語“羧基”指-C(O)OH。

【0261】術語“醛基”指-CHO。

【0262】本揭露中，術語“包含”、“包括”可替換為“由……組成”。

【0263】本揭露中，“磷酸酯基團”、“磷酸酯基”、“磷酸酯鍵”可互換使用，包括磷酸一酯、磷酸二酯或磷酸三酯。“硫代磷酸酯基團”中的“磷酸酯基團”也具有同樣的含義。若無特別說明，天然核苷酸間磷酸酯基為磷酸二酯基。

【0264】本揭露中，硫代磷酸酯基是指一個非橋接氧原子被硫原子替代而



【0265】如本文所使用的，在 RNA 介導的基因沉默的情形中，siRNA 的正義鏈（又稱 SS、SS 鏈或有義鏈）是指包含與靶 mRNA 序列相同或基本上相同的序列的鏈；siRNA 的反義鏈（又稱 AS 或 AS 鏈）是指具有與靶 mRNA 序列互補的序列的鏈。

【0266】本揭露中，正義鏈或反義鏈的“5’區域”也即“5’端”、“5’末端”，可替換使用。例如反義鏈 5’區域的第 2 位至第 8 位的核苷酸，也可替換為反義鏈 5’端的第 2 位至第 8 位的核苷酸。同理，正義鏈或反義鏈的“3’區域”、“3’末端”和“3’端”也可替換使用。

【0267】如本文所使用的，術語“互補”或“反向互補”一詞可互相替代使用，並具有所屬技術領域具有通常知識者周知的含義，即，在雙鏈核酸分子中，一條鏈的鹼基與另一條鏈上的鹼基以互補的方式相配對。在 DNA 中，嘌呤鹼基腺嘌呤(A)始終與嘧啶鹼基胸腺嘧啶(T)(或者在 RNA 中為尿嘧啶(U))相配對；嘌呤鹼基鳥嘌呤(C)始終與嘧啶鹼基胞嘧啶(G)相配對。每個鹼基對都包括一個嘌呤和一個嘧啶。當一條鏈上的腺嘌呤始終與另一條鏈上的胸腺嘧啶(或尿嘧啶)配對，以及鳥嘌呤始終與胞嘧啶配對時，兩條鏈被認為是彼此相互補的，以及從其互補鏈

的序列中可以推斷出該鏈的序列。與此相應地，“錯配”在本領域中意指在雙鏈核酸中，對應位置上的鹼基並未以互補的形式配對存在。

【0268】如本文所使用，“化學修飾”或“修飾”意指當與天然存在的對應物相比時具有化學差異的結構，包括經化學手段的所有改變，例如化學部分的添加或去除，或以一個化學部分取代另一個化學部分。

【0269】在本揭露上下文中，Bz 表示苯甲醯基；MMTr 表示甲氧基苯基二苯甲基；DMTr 表示二甲氧三苯甲基。

【0270】如本文所使用，術語“鹼基”包含任何已知的 DNA 和 RNA 鹼基、鹼基類似物，例如嘌呤或嘧啶，其還包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鳥嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、次黃苷和天然類似物。

【0271】如無特別說明，在本揭露上下文中，大寫字母 C、G、U、A、T 表示核苷酸的鹼基組成；小寫字母 d 表示該字母 d 右側相鄰的一個核苷酸為脫氧核糖核苷酸；小寫字母 m 表示該字母 m 左側相鄰的一個核苷酸為甲氧基修飾的核苷酸；小寫字母 f 表示該字母 f 左側相鄰的一個核苷酸為氟代修飾的核苷酸；小寫字母 s 表示與該字母 s 左右相鄰的兩個核苷酸之間為硫代磷酸酯基連接。

【0272】如本文所使用的，術語“氟修飾的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2' 位的羟基被氟取代形成的核苷酸；該甲氧基修飾的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

【0273】如本文所使用的，術語“抑制”，可以與“減少”、“沉默”、“下調”、“阻抑”和其他類似術語交替使用，並且包括任何水平的抑制。抑制可藉由這些變量中的一個或多個與對照水平相比的絕對或相對水平的減少來評估。該對照水平可以是本領域中使用的任何類型的對照水平，例如給藥前基線水平或從類似

的未經處理或經對照(例如僅緩衝液對照或惰性劑對照)處理的受試者、細胞、或樣品確定的水平。例如，可以採用 mRNA 剩餘表達量來表徵 siRNA 對靶基因表達的抑制程度，如 mRNA 剩餘表達量為不高於 99%、不高於 95%、不高於 90%、不高於 85%、不高於 80%、不高於 75%、不高於 70%、不高於 65%、不高於 60%、不高於 55%、不高於 50%、不高於 45%、不高於 40%、不高於 35%、不高於 30%、不高於 25%、不高於 20%、不高於 15%、或不高於 10%。靶基因表達的抑制率可以採用 Dual-Glo® Luciferase Assay System 檢測，分別讀取螢火蟲 (Firefly) 化學發光值和海腎 (Renilla) 化學發光值，計算相對值 $\text{Ratio} = \text{Ren}/\text{Fir}$ ；本揭露中，剩餘 mRNA 表達量比例 (或剩餘活性%) = $\text{Ratio} (\text{siRNA 處理組}) / \text{Ratio} (\text{無 siRNA 對照組})$ ，抑制率 (%) = $100\% - \text{剩餘 mRNA 表達量} (\%)$ 。

【0274】“有效量”、“有效劑量”、“有效治療量”或“治療有效量”指獲得任一種或多種有益的或所需的治療結果所必需的藥物、化合物或藥物組成物的量。對於預防用途，有益的或所需的結果包括消除或降低風險、減輕嚴重性或延遲病症的發作，包括病症、其併發症和在病症的發展過程中呈現的中間病理表型的生物化學、組織學和/或行為症狀。對於治療應用，有益的或所需的結果包括臨床結果，諸如減少各種本揭露靶基因、靶 mRNA 或靶蛋白相關病症的發病率或改善該病症的一個或更多個症狀，減少治療病症所需的其它藥劑的劑量，增強另一種藥劑的療效，和/或延緩患者的本揭露靶基因、靶 mRNA 或靶蛋白相關病症的進展。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定患者或獸醫學受試者的有效量可依據例如以下因素而變化：待治療的病症、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

【0275】如本文所使用的，“對象”、“患者”、“受試者”或“個體”可互換使用，包括人類或者非人類動物，例如哺乳動物，例如人或猴。

【0276】在一些實施方式中，在將寡聚化合物遞送至表達基因的細胞後，寡聚化合物能夠抑制潛在基因的表達，並且在本文中被稱為“表達抑制性寡聚化合物”，可以體外或體內抑制基因表達。“寡聚化合物”包括但不限於：寡核苷酸、單鏈寡核苷酸、單鏈反義寡核苷酸、短干擾 RNA(siRNA)、雙鏈 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、短髮夾 RNA(shRNA)、核糖酶、干擾 RNA 分子和 Dicer 酶受質。

【0277】除非另外指出，本文所使用符號 $\sim$ 表示其可以根據本文所述公開範圍連接一個或多個任何基團。

【0278】如本文所用，第一鏈可被稱為反義鏈，第二鏈可被稱為正義鏈。術語第一鏈和反義鏈或第二鏈和正義鏈應視為可互換的。

【0279】本揭露中所述“RNAi 試劑”指含有能夠以序列特異性方式降解或抑制靶信使 RNA(mRNA)轉錄並翻譯的 RNA 或 RNA 樣(例如，化學修飾的 RNA)寡核苷酸分子的試劑。本揭露中 RNAi 試劑可以藉由 RNA 干擾機制(即，藉由與哺乳動物細胞的 RNA 干擾通路構成機制(RNA 誘導的沉默複合物或 RISC)相互作用誘導 RNA 干擾)操縱，或藉由任何其它機制或途徑起作用。RNAi 試劑包括但不限於：單鏈寡核苷酸、單鏈反義寡核苷酸、短干擾 RNA(siRNA)、雙鏈 RNA(dsRNA)、微 RNA(miRNA)、短髮夾 RNA(shRNA)和 Dicer 受質。

【0280】本文所述的 RNAi 試劑包括寡核苷酸，該寡核苷酸具有與靶向的 mRNA 至少部分互補的鏈。

【圖式簡單說明】**【0281】**

圖 1 為綴合物 TRD002218、TRD007203、TRD007204 和 TRD007205 在給藥後 7 天 TTR 中 mRNA 的表達量。

圖 2 為綴合物 TRD002218、TRD007203、TRD007204 和 TRD007205 在給藥後 28 天 TTR 中 mRNA 的表達量。

圖 3 為試驗例 6 中 GalNAc 綴合 siRNA 對於鼠原代肝細胞 mTTR 基因表達抑制活性。

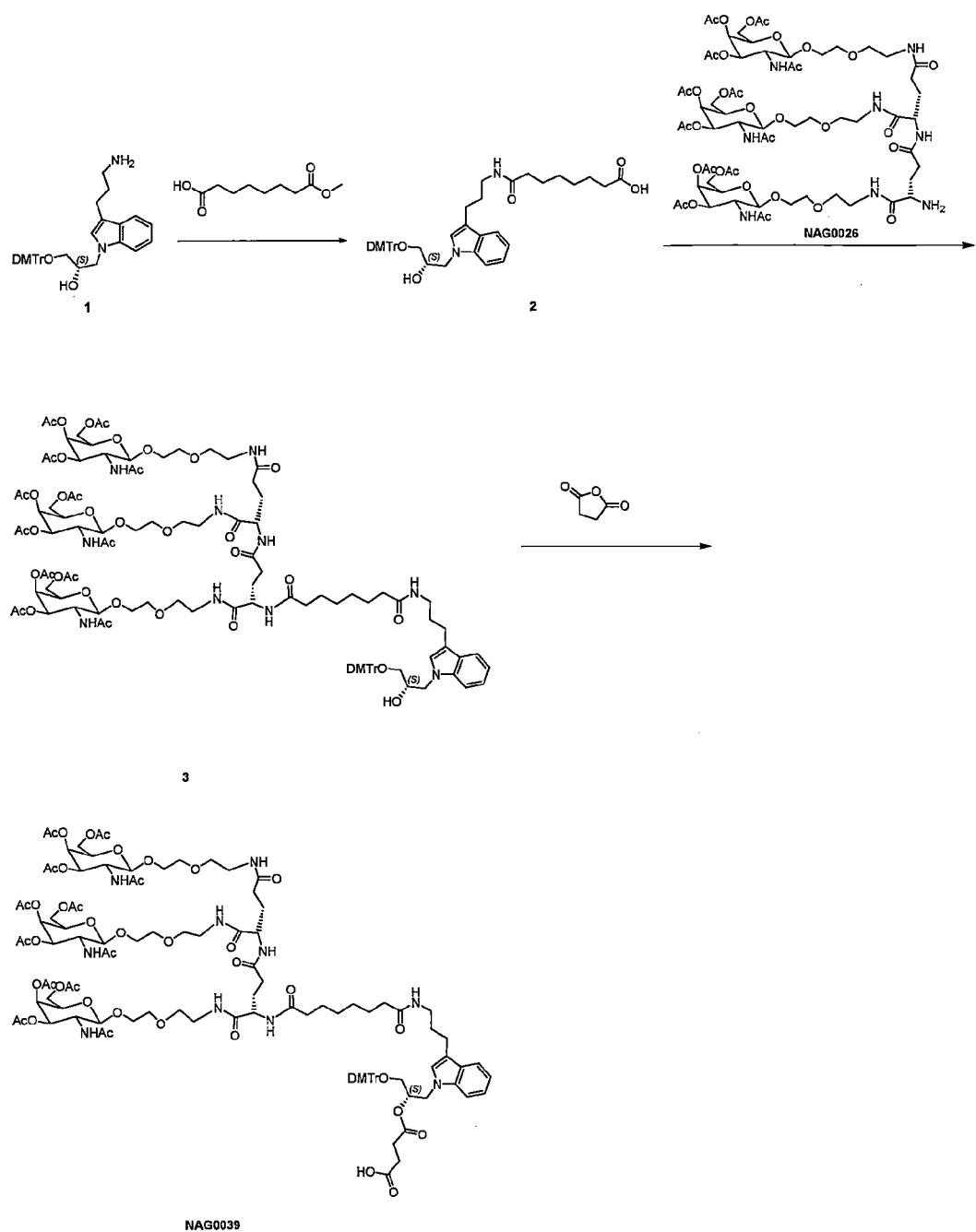
圖 4 為試驗例 7 中 GalNAc 綴合 siRNA 對於小鼠 mTTR 基因的體內抑制活性。

【實施方式】

【0282】 以下結合實施例進一步描述本揭露，但這些實施例並非限制著本揭露的範圍。本揭露實施例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未註明具體來源的試劑，則該試劑可自任意分子生物學試劑的供應商以用於分子生物學應用的質量/純度而獲得。

【0283】 化合物 **NAG0024**、**NAG0026** 購買自天津藥明康德新藥開發有限公司。除非特別說明，以下實施例中所用的試劑均為市售商品。

【0284】 製備例 1：化合物 **NAG0039** 的合成



【0285】 化合物 2

室溫，氮氣氛下，在化合物 1（1.00 g，1.82 mmol）的乾燥 THF（20 mL）溶液中依次加入 DIEA（469 mg，3.63 mmol）、3A 分子篩、辛二酸單甲酯（342 mg，1.82 mmol）、DCC（487 mg，2.36 mmol）和 HOBt（319 mg，2.36 mmol）。在 40℃反應過夜。反應液過濾濃縮，藉由反相管柱色譜法（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O）純化，凍乾得到中間體（1.14 g，1.58 mmol，產率 87%）。

【0286】將此中間體（1.14 g，1.58 mmol）溶於 THF（3 mL）和 MeOH（3 mL），然後滴加 NaOH（126 mg，3.16 mmol）的水（3 mL）溶液。反應液室溫攪拌 4 h。減壓除去大部分的有機溶劑，然後藉由反相管柱色譜法（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O）純化，得到化合物 **2**（851 mg，1.17 mmol，鈉鹽，產率 74%）。

【0287】化合物 **3**

室溫，氮氣氛下，在化合物 **NAG0026**（863 mg，0.566 mmol）的乾燥 THF（15 mL）溶液中依次加入 DIEA（146 mg，1.13 mmol）、3A 分子篩、化合物 **2**（400 mg，0.566 mmol）、DCC（140 mg，0.679 mmol）和 HOBt（92 mg，0.679 mmol）。在 45°C 反應過夜。反應液過濾濃縮，藉由反相管柱色譜法（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O）純化，凍乾得到化合物 **3**（918 mg，0.415 mmol，產率 73%）。

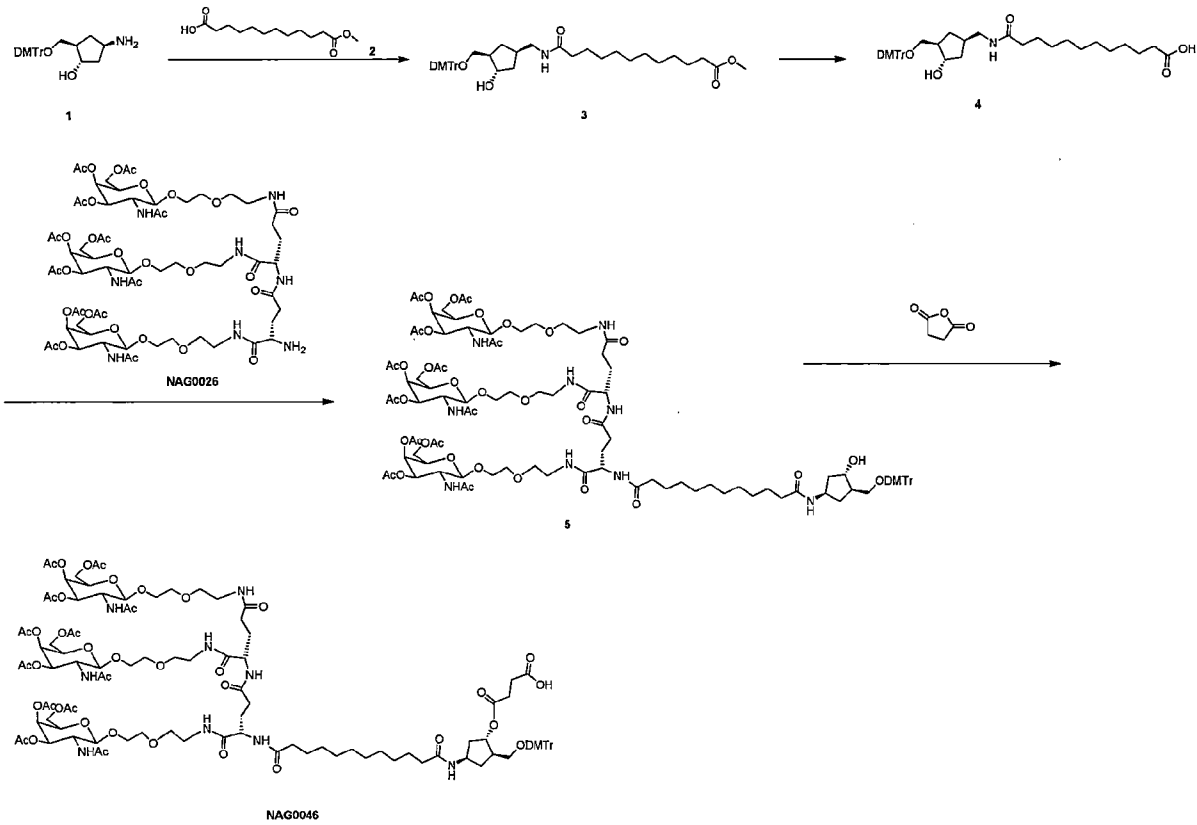
【0288】化合物 **NAG0039**

室溫，向化合物 **3**（400 mg，0.181 mmol）的吡啶溶液中加入 3A 分子篩、丁二酸酐（36 mg，0.361 mmol）、DMAP（22 mg，0.181 mmol），氮氣氛下，45°C 反應過夜。反應液過濾，減壓濃縮，藉由反相管柱色譜法（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O）分離純化，得到 248 mg 粗產物，兩批次此粗產物合併後經過 HPLC 製備色譜法（色譜管柱: Xbridge 150x50mm，5 μm；流動相：A: 0.1% NH₃H₂O+0.005% FA 水溶液 B: MeCN；梯度：20% B-95% B 9 min 內）分離，得到化合物 **NAG0039**（240 mg，0.104 mmol，產率 33%）。

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

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

【0289】製備例 2：化合物 NAG0046 的合成



【0290】化合物 3

氮氣氛下，在溶劑 DCM (5 mL) 中加入化合物 2 (203 mg, 0.830 mmol)、DIEA (0.206 mL, 1.246 mmol)、HATU (237mg, 0.623 mmol)。於 20℃ 攪拌，再將化合物 1 (200 mg, 0.415 mmol) 加上述體系中。加畢，在氮氣氛下，20℃ 反應 1 h。反應液中加入 H₂O (10 mL) 用 DCM (3 x 20 mL) 萃取，無水 Na₂SO₄ 乾燥，過濾，濃縮，殘餘物用管柱層析色譜法純化 (DCM: MeOH (100:0-90:10))，得到化合物 3 (250 mg, 收率 82%)。

LCMS：色譜條件 10-80AB_2min，保留時間 1.534 min；MS (ESI) $m/z = 682.6$ [M+Na]⁺。

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

【0291】 化合物 4

化合物 3(250 mg, 0.348 mmol) 溶於 MeOH (1 mL)和 H₂O (0.5 mL)中，然後加入 LiOH (146 mg, 3.48 mmol)，室溫反應 12 h。反應液過反相管柱得到化合物 4 (166 mg, 收率 71%)。

LCMS：色譜條件 10-80CD_3min，保留時間 1.353 min；MS (ESI) $m/z = 668.6$ [M+Na]⁺。

HPLC：色譜條件 10-80CD_6min，保留時間 1.897 min。

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

【0292】 化合物 5

將化合物 NAG0026 (120 mg, 0.079 mmol)溶於無水 THF(2 mL)和無水 DMF(2 mL)，加入 3A 分子篩(50 mg)，再依次加入化合物 4 (54 mg, 0.084 mmol)、HOBt(28 mg, 0.205 mmol)、DCC(39 mg, 0.189 mmol)和 DIEA(0.08 mL, 0.472 mmol)。反應

液 40°C 反應 20 h。LC-MS 顯示反應完全後，加水淬滅，過濾。濾液減壓濃縮後，經反相管柱色譜法純化（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O），得到化合物 **5** (90 mg，收率 53%)。

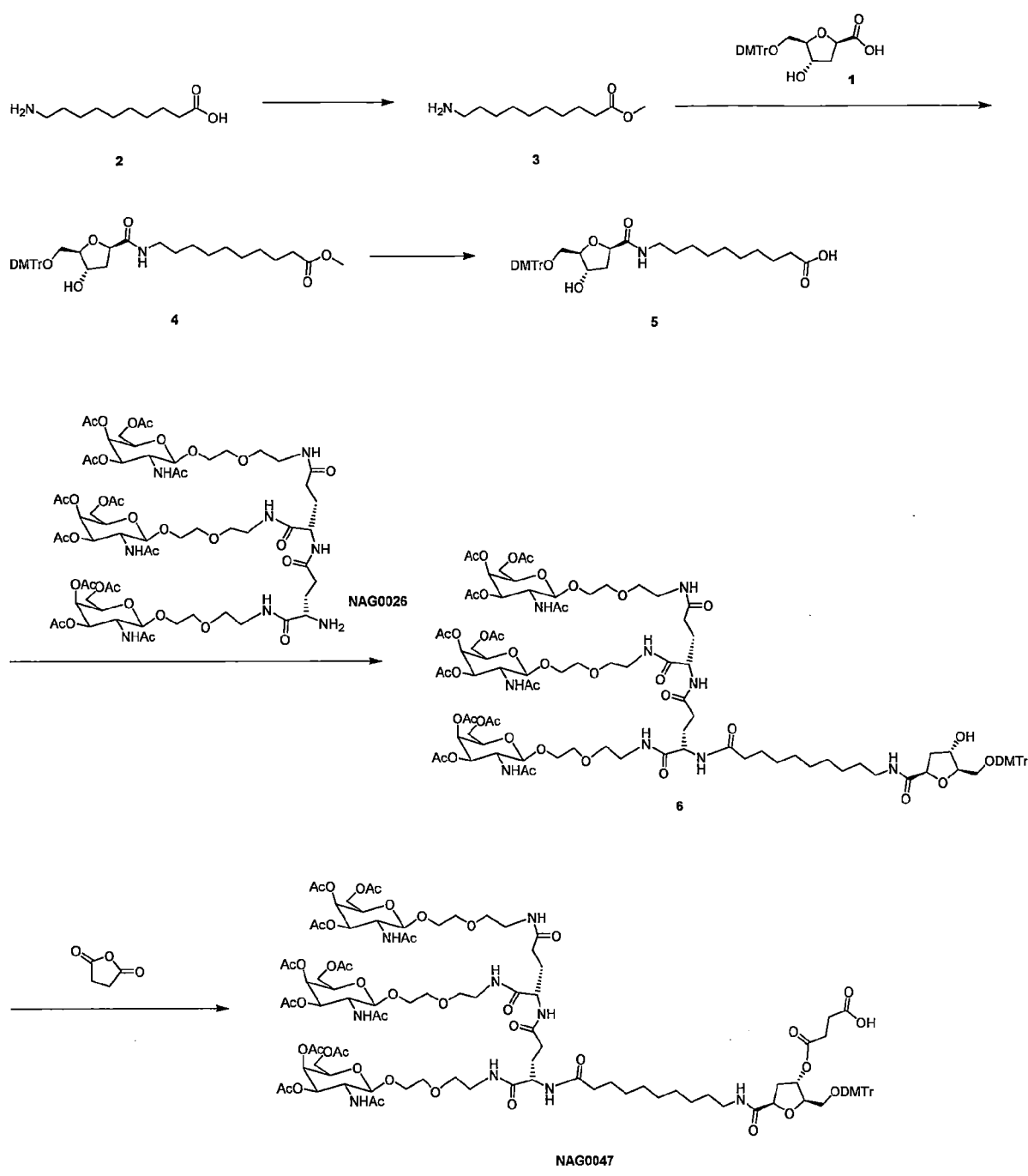
【0293】 化合物 NAG0046

將化合物 **5** (90 mg, 0.042 mmol) 溶於無水吡啶 (3 mL) 中，加入 3A 分子篩 (50 mg)、DMAP (26 mg, 0.209 mmol) 和丁二酸酐 (42 mg, 0.364 mmol)。反應液 50°C 攪拌 48 h。LC-MS 顯示原料反應約 50%，反應液過濾，濃縮，經反相管柱色譜法 (Boston C18 管柱，H₂O/MeCN，從 5% 到 70% 沖提) 純化，得到 **NAG0046** (30 mg)。

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

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

【0294】 製備例 3：化合物 NAG0047 的合成



【0295】 化合物 3

在 0℃ 以及氮氣氛下，向化合物 2 (300 mg, 1.60 mmol) 的 MeOH (10 mL) 溶液中逐滴加入 SOCl₂ (0.581 mL, 8.009 mmol)。該混合物在 60℃ 攪拌 3 小時。將該反應液濃縮後得到化合物 3 (0.32 g, 1.510 mmol, 產率 95%)。

^1H NMR : (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 3.75-3.59 (m, 3H), 2.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.64 (td, $J = 7.0, 14.4$ Hz, 4H), 1.48-1.27 (m, 10H)。

【0296】 化合物 4

在 0°C 以及氮氣氛下，向化合物 **1** (250 mg, 0.538 mmol) 的 THF (25 mL) 溶液中分別加入 DIEA (0.267 mL, 1.61 mmol)、4A 分子篩(500 mg)、化合物 **3** (271 mg, 1.08 mmol)、DCC (333 mg, 1.61 mmol) 和 HOBT (218 mg, 1.61 mmol)。該反應液在 50°C 攪拌 5 小時。反應結束之後用 H_2O (50 mL) 淬滅，並且用 EtOAc (100 mL x 3) 萃取，將合併的有機相用飽和食鹽水 (50 mL) 洗滌， Na_2SO_4 乾燥，過濾，濃縮後藉由矽膠管柱層析色譜法 (0-80% EtOAc/PE) 得到化合物 **4** (420 mg, 0.486 mmol, 產率 90%)。

LCMS : 色譜條件 10-80CD_7min, 保留時間 5.586 min ; MS (ESI) $m/z = 670.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

^1H NMR : (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.44 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.36-7.29 (m, 6H), 7.28-7.22 (m, 1H), 6.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 4.53 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.35-4.27 (m, 1H), 4.02 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.86-3.74 (m, 6H), 3.66 (s, 3H), 3.52-3.42 (m, 1H), 3.33-3.30 (m, 1H), 3.29-3.23 (m, 1H), 3.18 (td, $J = 7.0, 13.5$ Hz, 1H), 3.00 (td, $J = 7.0, 13.5$ Hz, 1H), 2.33-2.22 (m, 3H), 2.14 (ddd, $J = 5.8, 7.8, 13.3$ Hz, 1H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.73 (td, $J = 3.6, 13.2$ Hz, 2H), 1.66-1.53 (m, 3H), 1.43-1.26 (m, 7H)。

【0297】 化合物 5

在 20°C ，向化合物 **4** (420 mg, 0.486 mmol) 的 THF (5 mL) 和 H_2O (2 mL) 溶液中加入 LiOH (82 mg, 1.95 mmol)。該反應液在 20°C 攪拌 15 小時。反應結束後

濃縮，藉由反相管柱色譜法（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O）純化，得到化合物 **5** (236 mg, 0.155 mmol，產率 32%，銻鹽)。

LCMS：色譜條件 0-60CD_7min，保留時間 3.950 min；MS (ESI) $m/z = 656.4$ [M+Na]⁺。

【0298】 化合物 **6**

將化合物 **NAG0026** (236 mg, 0.155 mmol) 溶解於無水 THF(3 mL)，加入 3A 分子篩 (100 mg)，再依次加入化合物 **5** (98 mg, 0.155 mmol)、HOBt(25 mg, 0.186 mmol)、DCC(41 mg, 0.201 mmol)和 DIEA(0.08 mL, 0.464 mmol)。反應液 40℃ 反應 16 h。LC-MS 顯示反應完全後，加水淬滅，過濾。濾液濃縮後，經反相管柱色譜法（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O）純化，得到化合物 **6** (160 mg，0.075 mmol, 產率 48%)。

【0299】 化合物 **NAG0047**

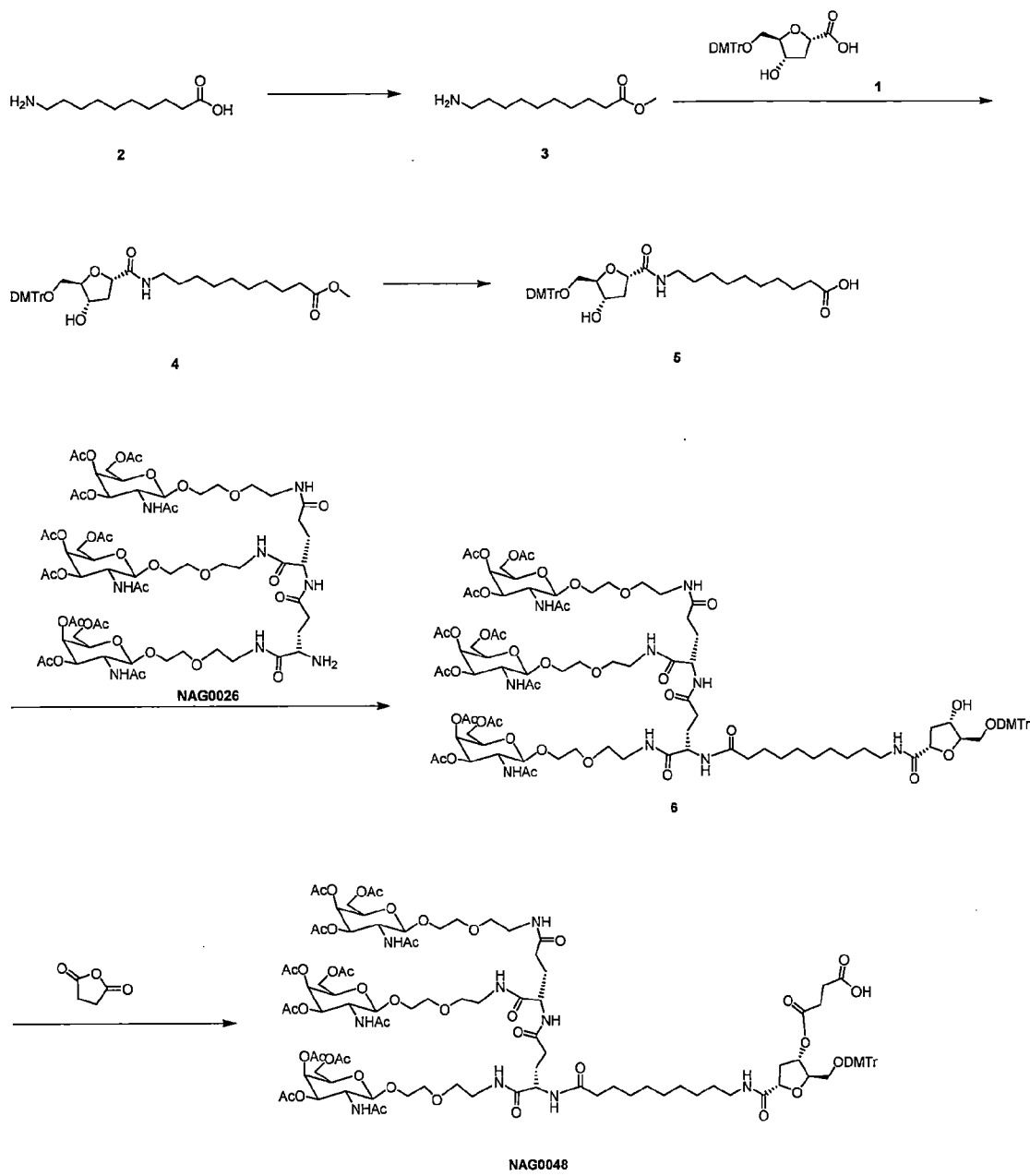
將化合物 **6** (160 mg, 0.075 mmol) 溶解於無水吡啶(3 mL)中，依次加入 3A 分子篩(100 mg)、DMAP (46 mg, 0.374 mmol)和丁二酸酐(75 mg, 0.747 mmol)。反應液 50℃ 攪拌 48 h，反應液過濾，濃縮，經反相管柱色譜法（Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O）純化，得到 **NAG0047**(80 mg)。

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

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

(m, 7H), 2.24-2.16 (m, 4H), 2.11 (s, 3H), 2.01-1.96 (m, 22H), 1.88 (q, $J = 2.9, 2.2$ Hz, 8H), 1.56 (s, 2H), 1.24 (d, $J = 17.7$ Hz, 13H)。

【0300】製備例 4：化合物 NAG0048 的合成



【0301】化合物 3

在 0℃ 以及氮氣氛下，向化合物 2 (500 mg, 2.67 mmol) 的 MeOH (10 mL) 溶液中逐滴加入 SOCl_2 (0.968 mL, 13.3 mmol)。該混合物在 60℃ 攪拌 12 小時。將該反應液濃縮後得到化合物 3 (550 mg, 2.46 mmol, 92%)。

^1H NMR: (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 3.69-3.62 (m, 3H), 2.94 (s, 2H), 2.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.73-1.57 (m, 4H), 1.46-1.31 (m, 10H)。

【0302】 化合物 4

在 0°C 以及氮氣氛下，向化合物 **1** (250 mg, 0.538 mmol) 的 THF (25 mL) 溶液中分別加入 DIEA (0.267 mL, 1.614 mmol)、4A 分子篩 (500 mg)、化合物 **3** (271 mg, 1.08 mmol)、DCC (333 mg, 1.61 mmol) 和 HOBt (218 mg, 1.61 mmol)。該反應液在 50°C 攪拌 5 小時。反應結束之後用 H_2O (50 mL) 淬滅，並且用 EtOAc (100 mL x 3) 萃取，將合併的有機相用飽和食鹽水 (50 mL) 洗滌，無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾，濃縮後藉由矽膠管柱層析色譜法 (0-80% EtOAc/PE) 純化，得到化合物 **4** (350 mg, 0.486 mmol, 產率 90%)。

LCMS: 色譜條件 10-80CD_7min, 保留時間 5.670 min; MS (ESI) $m/z = 670.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

^1H NMR: (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.45 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.36-7.27 (m, 6H), 7.25-7.19 (m, 1H), 6.90-6.85 (m, 4H), 4.50 (dd, $J = 4.6, 9.0$ Hz, 1H), 4.27 (td, $J = 3.0, 5.6$ Hz, 1H), 4.20-4.14 (m, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.68-3.62 (m, 3H), 3.53-3.43 (m, 1H), 3.27-3.18 (m, 3H), 3.16-3.09 (m, 1H), 2.54 (ddd, $J = 5.8, 8.8, 13.2$ Hz, 1H), 2.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.08 (td, $J = 4.0, 13.2$ Hz, 1H), 1.91-1.82 (m, 2H), 1.73 (td, $J = 3.6, 13.2$ Hz, 2H), 1.67-1.50 (m, 5H), 1.39-1.32 (m, 2H), 1.27-1.12 (m, 3H)。

【0303】 化合物 5

在 20°C 時，向化合物 **4** (350 mg, 0.486 mmol) 的 THF (5 mL) 和 H_2O (2 mL) 溶液中加入 LiOH (82 mg, 1.95 mmol)。該反應液在 20°C 攪拌 15 小時。反應結束之後直接濃縮得到化合物 **5** (300 mg, 0.469 mmol, 產率 96%)。

LCMS: 色譜條件 0-60CD_7min, 保留時間 4.081min; MS (ESI) $m/z = 656.4$ $[M+Na]^+$ 。

【0304】 化合物 6

將化合物 **NAG0026** (300 mg, 0.197 mmol) 溶解於無水 THF (5 mL), 加入 3A 分子篩 (100 mg), 再依次加入化合物 **5** (125 mg, 0.197 mmol)、HOBt (32 mg, 0.236 mmol)、DCC (53 mg, 0.256 mmol) 和 DIEA (0.10 mL, 0.590 mmol)。反應液 40°C 反應 16 h。LC-MS 顯示反應完全後, 加水淬滅, 過濾。濾液減壓濃縮後, 經反相管柱色譜法 (Boston C18 管柱, 0-100% MeCN/H₂O) 純化, 得到化合物 **6** (260 mg, 產率 62%)。

【0305】 化合物 **NAG0048**

將化合物 **6** (260 mg, 0.121 mmol) 溶解於無水吡啶 (4 mL) 中, 依次加入 3A 分子篩 (100 mg)、DMAP (30 mg, 0.242 mmol) 和丁二酸酐 (73 mg, 0.726 mmol)。反應液 50°C 攪拌 48 h。LC-MS 顯示原料反應約 70%, 反應液過濾, 濃縮, 經反相管柱色譜法 (Boston C18 管柱, 0-100% MeCN/H₂O) 純化, 得到 **NAG0048** (170 mg, 產率 62%)。

MS (ESI) $m/z = 2239.1$ $[M-1]^-$, 理論: 2240.0。

¹H NMR (400 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 7.68 (s, 3H), 7.51-7.17 (m, 12H), 7.11-6.85 (m, 7H), 5.31 (dt, $J = 2.5, 1.3$ Hz, 3H), 5.18-5.04 (m, 4H), 4.74-4.53 (m, 4H), 4.30 (d, $J = 4.9$ Hz, 3H), 4.21-3.93 (m, 12H), 3.79 (s, 9H), 3.69 (dt, $J = 10.4, 4.7$ Hz, 3H), 3.62-3.14 (m, 22H), 3.09 (dd, $J = 10.1, 4.4$ Hz, 2H), 2.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.46 (s, 6H), 2.28 (ddt, $J = 28.8, 20.0, 7.2$ Hz, 8H), 2.11 (s, 3H), 2.01-1.96 (m, 18H), 1.90-1.87 (m, 8H), 1.54 (d, $J = 25.2$ Hz, 4H), 1.37-1.18 (m, 16H)。

將化合物 **3** (300 mg, 0.444 mmol) 溶於 THF (3 mL) 和 H₂O (1 mL)，加入 LiOH·H₂O (75 mg, 1.78 mmol)，20°C 反應 12 小時。將反應液減壓濃縮，用水 (5 mL) 和甲醇 (5 mL) 溶解，用反向管柱色譜法純化 (Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O)，得到化合物 **4** (212 mg, 收率 100%)。

LCMS：色譜條件 10-80CD_3min, 保留時間 1.333 min；MS (ESI) m/z = 684.3 [M+Na]⁺。

HPLC：色譜條件 10-80CD_6min，保留時間 1.853min。

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

【0309】 化合物 **5**

將化合物 **NAG0026** (300 mg, 0.197 mmol) 溶解於無水 DMF (3 mL)，加入 3A 分子篩 (100 mg)，再依次加入化合物 **4** (143 mg, 0.216 mmol)、HOBt (32 mg, 0.236 mmol)、DCC (53 mg, 0.256 mmol) 和 DIEA (0.1 mL, 0.590 mmol)。反應液 40°C 反應 16 h。LC-MS 顯示反應完全後，加水淬滅，過濾。濾液濃縮後，經反相管柱色譜法純化 (Boston C18 管柱，H₂O/MeCN，從 5% 到 80% 沖提)，得到化合物 **5** (110 mg，產率 28%)。

【0310】 化合物 **NAG0049**

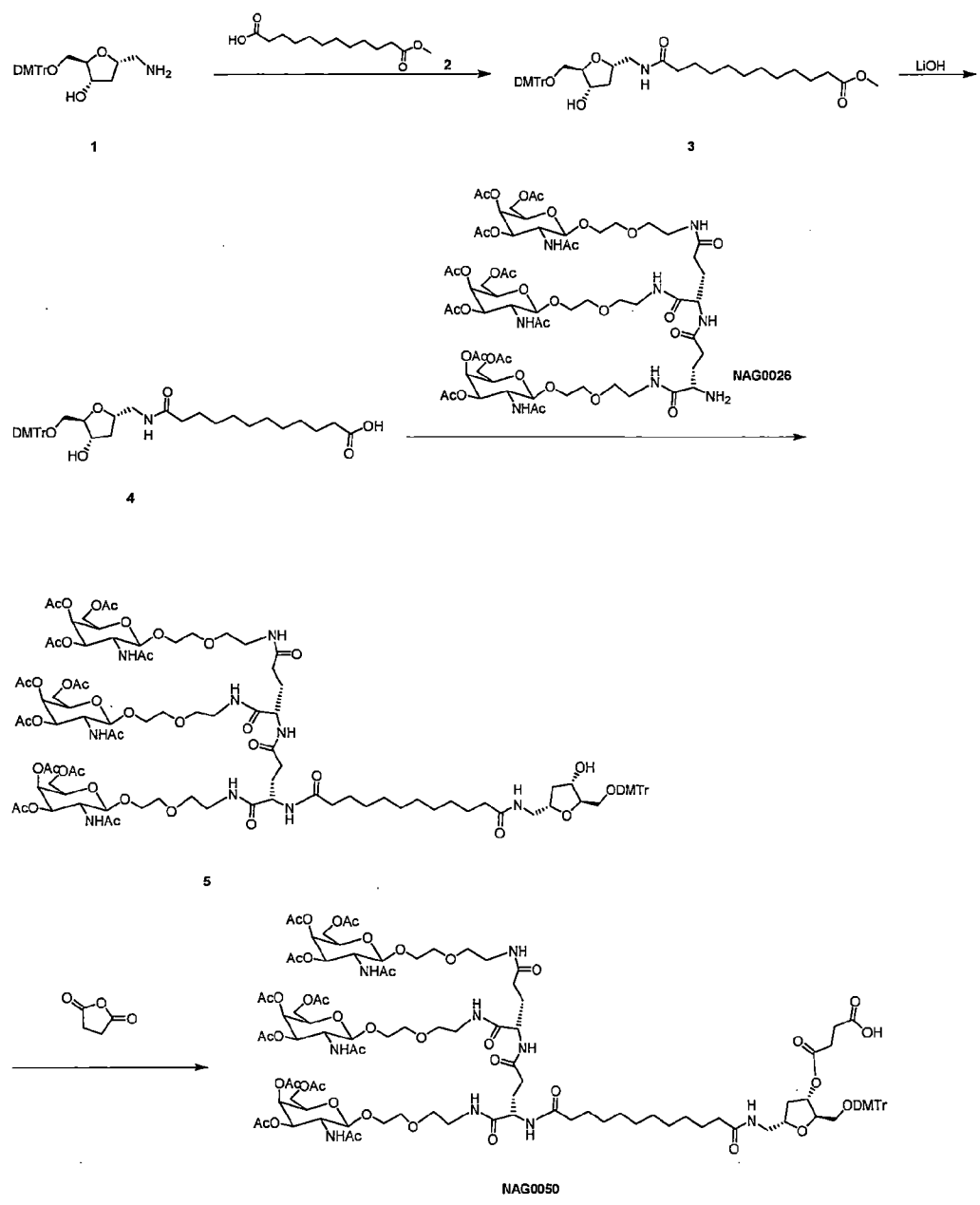
將化合物 **5** (110 mg, 0.051 mmol) 溶解於無水吡啶 (3 mL) 中，依次加入 3A 分子篩 (100 mg)、DMAP (31 mg, 0.255 mmol) 和丁二酸酐 (51 mg, 0.510 mmol)。反應液 50°C 攪拌 48 h。LC-MS 顯示原料反應約 50%，反應液過濾，濃縮，經反相管

柱色譜法純化(Boston C18 管柱，H₂O/MeCN，從 5%到 70%沖提)，得到 **NAG0049**(45 mg，產率 39%)。

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

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

【0311】製備例 6：化合物 **NAG0050** 的合成



【0312】 化合物 3

將化合物 2(435 mg, 1.780 mmol)溶於 DCM (10 mL)，加入 DIEA (0.441 mL, 2.67 mmol)和 HATU (677 mg, 1.78 mmol)後，再加入化合物 1 (400 mg, 0.890 mmol，來源於製備例 8)，20℃反應 1 小時。將反應液加入二氯甲烷 (60 mL)和水 (60 mL)萃取，有機相用水 (60 mL x 3) 洗滌三次，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，殘餘物用管柱層析色譜法純化 (PE:EtOAc=0:1)，得到化合物 3 (600 mg, 產率 90%)。

LCMS：色譜條件 30-90CD_3min，保留時間 2.745 min；MS (ESI) m/z = 698.4
[M+Na]⁺。

¹H NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.46-7.38 (m, 2H), 7.35-7.24 (m, 6H), 7.22-7.16 (m, 1H), 6.90-6.78 (m, 4H), 4.29-4.21 (m, 2H), 4.02-3.95 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.66-3.62 (m, 3H), 3.41 (s, 1H), 3.18-3.04 (m, 2H), 2.36-2.17 (m, 5H), 1.71-1.50 (m, 5H), 1.39-1.25 (m, 14H)。

【0313】 化合物 4

將化合物 3 (600 mg, 0.799 mmol) 溶於 THF (3 mL) 和 H₂O (1 mL)，加入 LiOH.H₂O (134 mg, 3.20 mmol)，20°C 反應 12 小時。將反應液減壓濃縮，用水(5 mL)和甲醇(5 mL)溶解，用反向管柱色譜法純化 (Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O)，得到化合物 4 (460 mg, 產率 100%，鋰鹽)。

LCMS：色譜條件 10-80CD_3min，保留時間 1.346 min；MS (ESI) m/z = 684.3
[M+Na]⁺。

HPLC：色譜條件 10-80CD_6min，保留時間 1.879 min。

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

【0314】 化合物 5

將化合物 NAG0026 (300 mg, 0.197 mmol) 溶解於無水 DMF (3 mL)，加入 3A 分子篩 (100 mg)，再依次加入化合物 4 (143 mg, 0.216 mmol)、HOBt (32 mg, 0.236 mmol)、DCC (53 mg, 0.256 mmol) 和 DIEA (0.1 mL, 0.590 mmol)。反應液 40°C 反

應 16 h。LC-MS 顯示反應完全後，加水淬滅，過濾。濾液濃縮後，經反相管柱色譜法純化(Boston C18 管柱，H₂O/MeCN，從 5%到 80%沖提)，得到化合物 **5**(300 mg，產率 73%)。

【0315】化合物 NAG0050

將化合物 **5** (310 mg, 0.143 mmol)溶解於無水吡啶(5 mL)中，依次加入 3A 分子篩(100 mg)、DMAP(87 mg, 0.714 mmol)和丁二酸酐(143 mg, 1.429 mmol)。反應液 50°C 攪拌 48 h。LC-MS 顯示原料反應約 50%，反應液過濾，濃縮，經反相管柱色譜法純化(Boston C18 管柱，H₂O/MeCN，從 5%到 70%沖提)，得到 **NAG0050**(140 mg，產率 43%)。

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

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

【0316】製備例 7：化合物 NAG0051

在溶劑二氯甲烷(100 mL)中加入化合物 **1** (5.00 g, 21.4 mmol)和 TEA (8.04 mL, 57.9 mmol)。於 0°C 攪拌，將 DMTrCl (9.08 g, 26.8 mmol)緩慢加入上述體系中。加畢升溫至 25°C 反應 12 h。將飽和碳酸氫鈉溶液 (100 mL) 加入到反應液，DCM (100 x 3) 萃取，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮，殘餘物藉由管柱層析色譜法純化 (PE: EtOAc 100: 0-70 : 30)，得到化合物 **2** (12 g，收率 94%)。

LCMS: 色譜條件 5-95AB_1.5min，保留時間 1.166 min; MS (ESI) m/z = 558.1 $[M+Na]^+$ 。

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

【0318】 化合物 3

在溶劑 THF (100 mL)中加入化合物 **2** (6.00 g, 10.1 mmol)，在 0°C 將 BH_3THF (1M, 20.2 mL, 20.2 mmol) 加入上述體系中。加畢，20°C 反應 12 h。然後再降至 0°C，先後在 0°C 緩慢加入 EtOH (6 mL)、NaOH (20 mL, 60.0 mmol)，最後在 0°C 將 H_2O_2 (20 mL, 33.4 mmol) 慢慢滴加到該反應液中，然後慢慢升至 20°C 反應 12 h。將反應液過濾，加入 H_2O (200 mL) 和 EtOAc (200 mL)，用 EtOAc (3 x 200 mL) 萃取，用飽和 Na_2SO_3 (100 mL) 溶液洗滌，無水 Na_2SO_4 乾燥，過濾，減壓濃縮。得到的殘留物管柱層析色譜法純化 (DCM/MeOH)，得到粗品 3.5 g，產物藉由鹼性製備分離 (色譜管柱: Xbridge 150x50mm, 5 μ m; 流動相: A: 0.1% NH_3H_2O +0.005% FA 水溶液 B: MeCN; 梯度: 20% B-95% B in 9 min) 得到化合物 **3** (850 mg，收率 15%) 和化合物 **4** (800 mg，收率 14%)。

【0319】 化合物 3

LCMS：色譜條件 10-80AB_7min，保留時間 4.214 min；MS (ESI) $m/z = 576.3$

$[M+Na]^+$ 。

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

【0320】 化合物 4

LCMS：色譜條件 10-80AB_7min，保留時間 4.305 min；MS (ESI) $m/z = 576.3$

$[M+Na]^+$ 。

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

【0321】 化合物 5

將 Pd/C 5% (300 mg, 0.141 mmol) 加入到化合物 3 (600 mg, 1.030 mmol) 的 EtOAc (10 mL) 溶液中。該反應液在氫氣氛圍下 (15 psi)，20°C 反應 2 h。過濾，濃縮得粗品，粗品藉由鹼性製備分離（色譜管柱: Xbridge 150x50mm, 5 μ m；流動相: A: 0.1% NH_3H_2O +0.005% FA 水溶液 B: MeCN；梯度：20% B-95% B in 9 min）得到化合物 5 (301 mg，收率 70%)。

LCMS：色譜條件 10-80CD_3min，保留時間 2.444 min；MS (ESI) $m/z = 839.5$

$[2M+H]^+$ 。

HPLC：色譜條件 10-80CD_7min，保留時間 4.100 min。

^1H NMR: (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.49-7.44 (m, 2H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.32-7.26 (m, 2H), 7.24-7.18 (m, 1H), 6.91-6.82 (m, 4H), 4.22-4.11 (m, 1H), 3.85-3.81 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 2.78-2.68 (m, 1H), 1.90-1.83 (m, 1H), 1.73-1.65 (m, 1H), 1.41-1.33 (m, 1H), 1.29-1.25 (m, 1H)。

【0322】 化合物 7

化合物 6 (233 mg, 0.953 mmol)、HATU (272 mg, 0.715 mmol)、DIEA (0.236 mL, 1.430 mmol) 溶於 DCM (10 mL)，加入化合物 5 (200 mg, 0.477 mmol)， 25°C 反應 1 小時。加 H_2O (20 mL)，用 DCM (20 mL x 3) 萃取，合併有機相，用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮，殘餘物藉由管柱層析色譜法分離 (PE/ EtOAc = 1 / 1 ~ 1 / 2)，得到化合物 7 (290 mg)。

LCMS：色譜條件 10-80CD_3min，保留時間 2.834 min；MS (ESI) $m/z = 668.4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

^1H NMR: (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.49-7.44 (m, 2H), 7.41-7.30 (m, 6H), 7.25-7.18 (m, 1H), 6.89-6.79 (m, 4H), 4.30-4.07 (m, 2H), 3.87-3.79 (m, 7H), 3.73-3.64 (m, 4H), 2.8-2.80 (m, 7H), 2.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.24-2.13 (m, 2H), 2.01-1.89 (m, 1H), 1.80-1.75 (m, 1H), 1.65-1.60 (m, 5H), 1.58 (s, 4H), 1.20-1.10 (m, 1H)。

【0323】 化合物 8

化合物 7 (290 mg, 0.404 mmol) 溶於 THF (10 mL) 和 H_2O (5 mL)，加入 LiOH (51 mg, 1.212 mmol)， 25°C 反應 3 小時。TLC (DCM/ MeOH = 10 / 1) 顯示約 20% 原料沒有反應完成，補加 LiOH (50 mg)， 25°C 反應 12 小時，TLC (DCM/ MeOH = 10 / 1) 顯示原料反應完成。反應液濃縮，殘餘物藉由反相色譜法分離 ($\text{H}_2\text{O}/ \text{CH}_3\text{CN} = 5 / 1 \sim 3 / 1$)，得到化合物 8 (217 mg)。

LCMS：色譜條件 5-95CDN_1.5min，保留時間 0.879 min；MS (ESI) m/z = 630.3 $[M-H]^+$ 。

HPLC：色譜條件 10-80CD_7min，保留時間 2.677 min。

^1H NMR: (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.50-7.44 (m, 2H), 7.38-7.32 (m, 4H), 7.32-7.27 (m, 2H), 7.24-7.19 (m, 1H), 6.91-6.85 (m, 4H), 4.25-4.14 (m, 1H), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.73-3.65 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 4H), 1.97-1.86 (m, 1H), 1.75-1.70 (m, 1H), 1.66-1.53 (m, 4H), 1.51-1.41 (m, 1H), 1.37-1.26 (m, 13H)。

【0324】化合物 9

將化合物 **NAG0026**(300 mg, 0.197 mmol)溶解於無水 DMF(4 mL)，加入 3A 分子篩(100 mg)，再依次加入化合物 **8**(137 mg, 0.217 mmol)、HOBt(32 mg, 0.236 mmol)、DCC(53 mg, 0.256 mmol)和 DIEA(0.10 mL, 0.591 mmol)。反應液 40°C 反應 16 h。加水淬滅，過濾。濾液濃縮後，經反相管柱色譜法純化(Boston C18 管柱， $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ，從 5%到 80%沖提)，得到化合物 **9**(330 mg)。

【0325】化合物 **NAG0051**

將化合物 **9**(330 mg, 0.154 mmol)溶解於無水吡啶(5 mL)中，依次加入 3A 分子篩(100 mg)、DMAP(94 mg, 0.771 mmol)和丁二酸酐(154 mg, 1.543 mmol)。反應液 50°C 攪拌 48 h。LC-MS 顯示原料反應約 60%，反應液過濾，濃縮，經反相管柱色譜純化(Boston C18 管柱， $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ，從 5%到 70%沖提)，得到 **NAG0051**(190 mg)。

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

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

【0326】製備例 8：NAG0052 的合成



【0327】化合物 3

室溫，氮氣氛下，將化合物 NAG0024(271 mg, 0.151 mmol)溶解於無水 THF(2 mL)和無水 DMF(4 mL)，加入 3A 分子篩，再依次加入化合物 2(100 mg, 0.151 mmol)、HOBt(25 mg, 0.181 mmol)、DCC(38 mg, 0.181 mmol)和 DIEA(39 mg, 0.302 mmol)。反應液 45°C 反應 16 h。LC-MS 顯示反應完全後，加水淬滅，過濾。濾

液濃縮後，經反相管柱色譜法純化(Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O)，得到化合物 **3**(210 mg，產率 57%)。

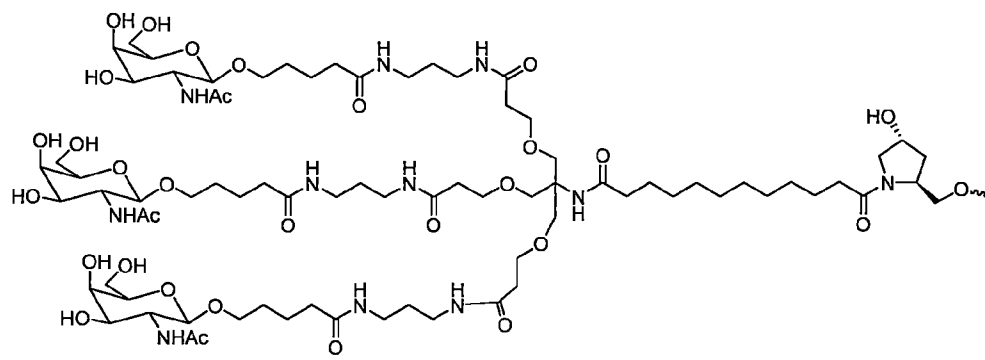
【0328】 化合物 NAG0052

室溫，化合物 **3** (230 mg，0.094 mmol) 溶於吡啶(5 mL)，加入分子篩，加入 DMAP(12 mg，0.283 mmol)、丁二酸酐(28 mg，0.283 mmol)。氮氣氛下，50 °C 攪拌 16 小時。LCMS 檢測反應完全，過濾，減壓濃縮。殘餘物經反相管柱色譜法純化 (Boston C18 管柱，0-100% MeCN/H₂O) 後，由製備 HPLC 色譜法 (色譜管柱: Xbridge 150x50mm, 5 μ m；流動相: A: 0.1% NH₃H₂O+0.005% FA 水溶液 B: MeCN；梯度：20% B-95% B in 9 min) 二次純化，得到化合物 **NAG0052** (123 mg，0.048 mmol，產率 51%)。

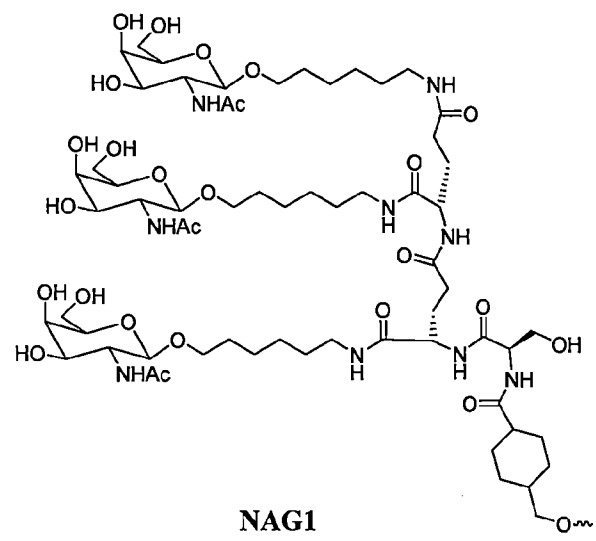
MS (ESI) m/z = 2535.3 [M-1]⁻，理論：2536.2。

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

【0329】 製備例 9：L96 和 NAG1 的合成



L96



NAG1

【0330】 L96 按照專利申請 WO2014025805A1 記載的方法製備獲得，NAG1 按照專利申請 WO2021254360A1 記載的方法製備獲得，上述專利申請(全文)藉由援引的方式併入本文。

【0331】 製備例 10：核酸配體綴合物的合成

1、製備帶有載體的樹脂

將含有羧酸基團的化合物 **NAG0050** (140 mg, 0.062 mmol)溶於無水 DMF (3 mL)，待受質完全溶解後，依次加入無水乙腈(4 mL)、DIEA(0.03 mL, 0.154mmol，2.5 eq)和 HBTU(35 mg, 0.093 mmol，1.5 eq)。反應液混合均勻後，再加入大孔胺甲基樹脂(476 mg，空白載量為 0.41 mmol/g，目標載量為 0.1 mmol/g)。將反應液

放入搖床上(溫度：25℃，轉速：200 rpm)振搖過夜。反應液過濾，濾餅依次分別用 DCM、無水乙腈洗滌，收集固體，真空乾燥過夜。

【0332】將上步固體分散於無水乙腈(5 mL)，依次加入吡啶(0.18 mL)、DMAP(3 mg)、NMI(0.12 mL)和 CapB1(2.68 mL)。將反應液放入搖床上(溫度：25℃，轉速：200 rpm)振搖 2 h。反應液過濾，濾餅用無水乙腈洗滌，收集固體，真空乾燥過夜，得到帶有載體的樹脂。載量經過測定為 0.1 mmol/g。

【0333】化合物 NAG0051 和 NAG0052 用相同的反應條件得到帶有載體的樹脂。

【0334】2、對於已經連接在樹脂上的 NAG0050-NAG0052，使用該樹脂作為起始，按照核苷酸排布順序自 3'-5'方向逐一連接核苷單體。每連接一個核苷單體都包括脫保護、偶聯、蓋帽、氧化或硫化四步反應。

儀器設備型號：Biolytic Dr. Oligo 48 固相合成儀，逗點生物 Embed™ CPG Frits 通用合成管柱 DS0200，逗點生物 96 孔板脫鹽管柱 DC189650(80mg)。

【0335】表 1 合成 siRNA 綴合物使用的試劑

試劑名稱	試劑組成	規格	用途	廠家
ACT	0.6M ETT 在 ACN 中	4L	催化劑	柯樂馬
Cap A	N-甲基咪唑：乙腈 2:8	4L	蓋帽試劑	柯樂馬
Cap B1	乙酸酐：乙腈 40:60	4L		柯樂馬
Cap B2	吡啶：乙腈 60:40	4L		柯樂馬
OXD	50 nM 碘的吡啶溶液：水 90:10	4L	氧化劑	柯樂馬
DCA	二氯乙酸的二氯甲烷溶液(3% v/v)	1kg	脫 DMT 保護試劑	柯樂馬
乙腈	水含量小於 20ppm(實際 10ppm 左右)	4L	溶劑	柯樂馬
PADS(二 硫化二苯乙醯)	將三甲基吡啶和乙腈等體積混合後，配製 0.05M PADS 溶液		硫化試劑	柯樂馬
三甲基吡啶				柯樂馬

【0336】合成條件如下：

核苷單體以 0.05M 濃度的乙腈溶液提供，每一步的脫保護反應的條件相同，即溫度為 25°C，反應時間為 3 分鐘，脫保護試劑為 DCA，進樣體積 180 μ L。

【0337】 每一步偶聯反應條件均相同，包括溫度為 25°C，反應時間為 3 分鐘。核苷單體進樣體積 90 μ L，催化劑 ACT 進樣體積 110 μ L。

【0338】 每一步蓋帽條件均相同，包括溫度為 25°C，反應時間為 2 分鐘。蓋帽試劑溶液的莫耳比為 1:1 的 CapA 和 CapB（CapB1：CapB2=1:1）的混合溶液。蓋帽試劑進樣體積 180 μ L。

【0339】 每一步氧化反應條件均相同，包括溫度為 25°C，反應時間為 3 分鐘，氧化試劑 OXD 進樣體積為 180 μ L。

【0340】 每一步硫化反應條件均相同，包括溫度為 25°C，反應時間為 4 分鐘，硫化試劑為 0.05 M PADS 的吡啶乙腈溶液。硫化試劑進樣體積 180 μ L。

【0341】 3、待最後一個核苷單體連接完成後，依次對固相載體上連接的核酸序列進行切割、脫保護、純化、脫鹽，隨後凍乾獲得正義鏈和反義鏈，其中，

3-1 切割和脫保護條件如下：將合成的連接有載體的核苷酸序列加入氨水：乙醇=3:1 的混合溶液至體積為 0.8 mL。在 50°C 反應 15h，過濾除去剩餘載體，將上清液真空濃縮至乾。

【0342】 3-2 純化和脫鹽條件如下：利用逗點生物 96 孔板脫鹽管柱 DC189650（80mg）進行脫鹽。具體條件包括：

3-2-1 樣品的準備

向寡核苷酸樣品中加入 0.1M 的 TEAA（三乙胺醋酸鹽）至體積為 0.8 mL。

【0343】 3-2-2 96 孔板的活化

活化：0.8 mL 乙腈藉由 96 孔板的每個孔中進行活化。

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

【0344】 3-2-3 純化過程依次按照如下操作：

將 0.8 mL 包含寡核苷酸的溶液藉由脫鹽管柱；用 0.8 mL 6.5%氨水洗滌 96 孔板 2 次，去除失敗的序列；用 0.8 mL 去離子水沖洗 96 孔板 2 次，去除鹽分；用 0.8 mL 3%三氟乙酸沖洗 96 孔板 3 次，去除 DMT，觀察到吸附層變橙紅色；用 0.8 mL 0.1 M TEAA 沖洗 96 孔板；用 0.8 mL 去離子水沖洗 96 孔板 2 次，去除三氟乙酸和殘餘的鹽分；用 0.6 mL 20%乙腈進行沖提，並收集凍乾。

【0345】 檢測方法如下：使用 Waters Acquity UPLC-SQD2 LCMS (管柱：ACQUITY UPLC BEH C18) 檢測上述正義鏈和反義鏈純度並分析分子量。實測值與理論值相符，表明所合成的是 3'末端綴合了綴合分子的正義鏈以及反義鏈。

【0346】 4、退火操作如下：

將步驟 3 合成的正義鏈和反義鏈分別溶於注射用水中，得到 1000 ng/ μ L 的溶液，在 QPCR 儀 (Applied Biosystems QuantStudio 6&7 Pro) 上以等莫耳比混合，90°C 加熱 10 分鐘，每降 5°C 保持 3 分鐘，最後 25°C 保持 10 分鐘，使它們藉由氫鍵形成雙鏈結構。實測值與理論值相符，說明所合成的 siRNA 綴合物是目標設計的帶有綴合分子的雙鏈核酸序列。該 siRNA 具有表 2 和表 3 中所示的正義鏈和反義鏈。

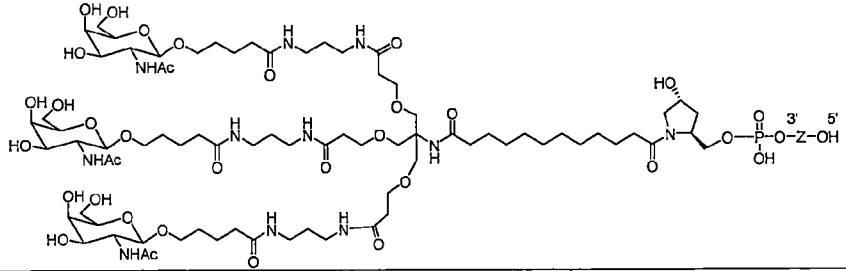
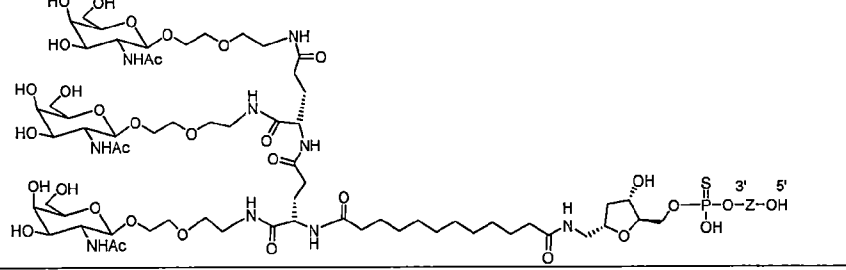
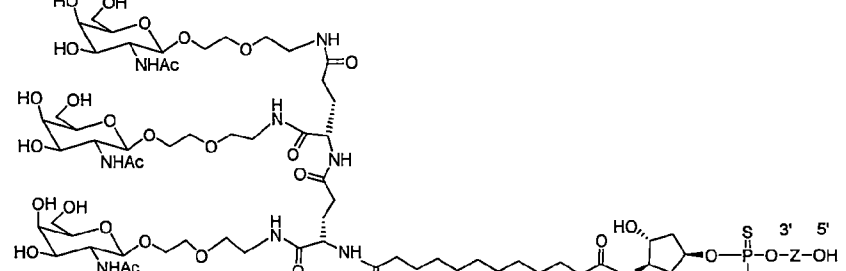
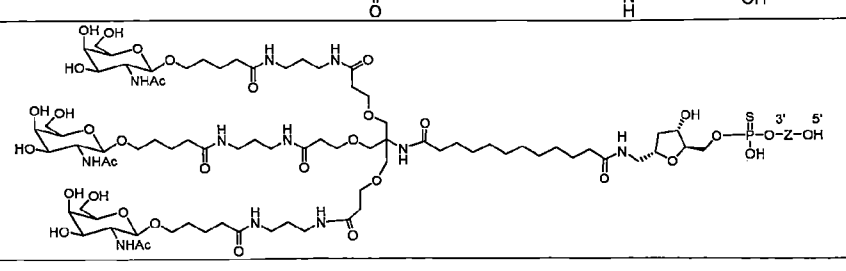
【0347】 表 2

核酸配體綴合物編號	siRNA 綴合物正義鏈編號	siRNA 綴合物反義鏈編號
TRD002218	TJR4373-SS	TJR0414-AS
TRD007203	TJR013483S	TJR0414-AS
TRD007204	TJR013484S	TJR0414-AS
TRD007205	TJR013485S	TJR0414-AS

【0348】 表 3 正義鏈和反義鏈的核酸序列

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

【0349】 以上綴合物的結構如下：

siRNA 綴合物正義鏈 編號	結構
TJR4373-SS	
TJR013483S	
TJR013484S	
TJR013485S	

其中，綴合物 TRD002218 作為參比陽性化合物。

【0350】 試驗例 1

本實驗考察本揭露的綴合不同結構的 siRNA 綴合物在體內對靶基因 mRNA 表達量的抑制效率。

【0351】 將雄性 6-8 週齡 C57BL/6 小鼠隨機分組，每組共 6 隻，每個時間點各 3，分別向每組小鼠給予本揭露的綴合物（3 個，TRD007203、TRD007204、TRD007205）、參比陽性核酸配體綴合物 TRD002218 以及 PBS。

【0352】 所有動物依據體重計算給藥量，採用皮下注射方式單次給藥，siRNA 綴合物給藥劑量（以 siRNA 的量計）為 1 mg/kg，給藥體積為 5mL/kg。給藥 7 天、28 天後處死小鼠，收集肝臟，用 RNA later(Sigma Aldrich 公司)保存；隨後用組織勻漿儀勻漿肝組織，再用組織 RNA 提取試劑盒（凡知醫療科技，FG0412）根據操作說明書標注的操作步驟提取得到肝組織總 RNA。將總 RNA 反轉錄成 cDNA 並採用實時螢光定量 PCR 方法檢測肝組織中的 TTR mRNA 的表達量。在該螢光定量 PCR 法中，以甘油醛 3-磷酸脫氫酶（GAPDH）基因作為內參基因，使用針對 TTR 和 GAPDH 的 Taqman 探針引子分別檢測 TTR 和 GAPDH 的 mRNA 表達量。

【0353】 表 4 小鼠體內試驗化合物分組信息

化合物編號	劑量	mRNA 定量	動物數目	備註
PBS	-	D7, 28	6	每個時間點各 3 隻
TRD002218	1mpk s.c.	D7, 28	6	每個時間點各 3 隻
TRD007203	1mpk s.c.	D7, 28	6	每個時間點各 3 隻
TRD007204	1mpk s.c.	D7, 28	6	每個時間點各 3 隻
TRD007205	1mpk s.c.	D7, 28	6	每個時間點各 3 隻

【0354】 表 5 檢測引子的序列參見表

引子名稱	正向引子
mTTR-F	GGGAAGACCGCGGAGTCT
mTTR-R	CAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACAAA
mTTR-P	5'6-FAM-CTGCACGGGCTCACCACAGATGA-3'BHQ1
mGAPDH-F	CGGCAAATTCAACGGGCACAG
mGAPDH-R	CCACGACATACTCAGCACCG
mGAPDH-P	5'TET-ACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACT-3'BHQ2

【0355】 TTR mRNA 表達量按照如下等式計算：

$$\text{TTR mRNA 表達量} = [(\text{測試組 TTR mRNA 表達量} / \text{測試組 GAPDH mRNA 表達量}) / (\text{對照組 TTR mRNA 表達量} / \text{對照組 GAPDH mRNA 表達量})] \times 100\%$$

【0356】 給藥 7 天、28 天後，本揭露的綴合不同結構的 siRNA 綴合物在體內對靶基因 mRNA 表達量的抑制效率分別見圖 1 和圖 2。由圖 1 的結果可知，NAG0050 的綴合物 TRD007203 和 NAG0052 的 TRD007205 在給藥後 7 天對於 TTR mRNA 的表達抑制均具有良好的效果，其中，NAG0050 的 TRD007203 明顯優於 L96 的綴合物 TRD002218，說明其能夠介導更高效的 siRNA 遞送效率。由圖 2 可知，給藥 28 天後，NAG0050 的綴合物 TRD007203、NAG0051 的綴合物 TRD007204 和 NAG0052 的綴合物 TRD007205 對靶基因 mRNA 表達量的抑制作用均優於 L96 的綴合物 TRD002218，其中，NAG0050 的綴合物 TRD007203 優勢最為明顯。

【0357】 製備例 11：核酸配體綴合物的合成

參考製備例 10 的步驟合成以下 siRNA 綴合物，該 siRNA 具有表 6 和 7 中所示的正義鏈和反義鏈。

【0358】 表 6 核酸化合物列表

基因	siRNA 綴合物編號	siRNA 綴合物正義鏈編號	siRNA 綴合物反義鏈編號
FXI	TRD008002	TJR014937S	TJR013318A
	TRD008003	TJR014938S	TJR013314A
ANGPTL3	TRD008004	TJR014939S	TJR013287A
	TRD008005	TJR014940S	TJR013288A
	TRD008006	TJR014941S	TJR013289A
MARC1	TRD008024	TJR014963S	TJR014959A
	TRD008025	TJR014964S	TJR014960A
	TRD008026	TJR014965S	TJR014961A
	TRD008027	TJR014966S	TJR014962A
	TRD6233	TJR12296-SS	TJR12338-AS
	TRD6238	TJR12301-SS	TJR12343-AS
	TRD6253	TJR12316-SS	TJR12358-AS

其中，綴合物 TRD6233、TRD6238、TRD6253 作為參比陽性化合物。

【0359】 表 7 正義鏈和反義鏈的核酸序列

	編號	序列方向 5'-3'
正義鏈	TJR014937S	CmsUmsUm GmCfAm AfCfAf AmAmGm AmCmAm UmUmUm Am-NAG0052'
	TJR014938S	UmsCmsAm GmGfAm UfGfAf UmUmUm UmCmUm UmAmUm Um-NAG0052'
	TJR014939S	GmsAmsAm GmAfGm CfAfAf CmUmAm AmCmUm AmAmCm Um-NAG0052'
	TJR014940S	AmsGmsGm UmAfAm AfGfAf AmUmAm UmGmUm CmAmCm Um-NAG0052'
	TJR014941S	AmsGmsUm GmAfAm GfCfAf AmUmCm UmAmAm UmUmAm Um-NAG0052'
	TJR014963S	GmsUmsAm UmGfUm CfCfUf GmGmAm AmUmAm UmUmAm Am-NAG0052'
	TJR014964S	AmsCmsAm AmGfAm CfAfGf GmAmUm UmCmUm GmAmAm Am-NAG0052'
	TJR014965S	CmsUmsCm UmAfAm GfAfUf CmUmGm AmUmGm AmAmGm Um-NAG0052'
	TJR014966S	AmsGmsUm UmGfAm CfUfAf AmAmCm UmUmGm AmAmAm Am-NAG0052'
	TJR12296-SS	GmsUmsAm UmGfUm CfCfUf GmGmAm AmUmAm UmUmAm Am-NAG1
	TJR12301-SS	AmsCmsAm AmGfAm CfAfGf GmAmUm UmCmUm GmAmAm Am-NAG1
	TJR12316-SS	CmsUmsCm UmAfAm GfAfUf CmUmGm AmUmGm AmAmGm Um-NAG1
反義鏈	TJR013318A	UmsAfsAm AfUmGf U(036)CmUm UfUmGf UmUfGm CfAmAf GmsCmsGm

TJR013314A	UmsAfsUm AfAmGf A(036)AmAm AfUmCf AmUfCm CfUmGf AmsAmsAm
TJR013287A	AmsGfsUm UfAmGf U(036)UmAm GfUmUf GmCfUm CfUmUf CmsUmsAm
TJR013288A	AmsGfsUm GfAmCf A(036)UmAm UfUmCf UmUfUm AfCmCf UmsCmsUm
TJR013289A	AmsUfsAm AfUmUf A(036)GmAm UfUmGf CmUfUm CfAmCf UmsAmsUm
TJR014959A	UmsUfsAm AfUmAf U(036)UmCm CfAmGf GmAfCm AfUmAf CmsGmsGm
TJR014960A	UmsUfsUm CfAmGf A(036)AmUm CfCmUf GmUfCm UfUmGf UmsCmsAm
TJR014961A	AmsCfsUm UfCmAf U(036)CmAm GfAmUf CmUfUm AfGmAf GmsUmsUm
TJR014962A	UmsUfsUm UfCmAf A(036)GmUm UfUmAf GmUfCm AfAmCf UmsUmsCm
TJR12338-AS	UmsUfsAm AfUmAf U(036)UmCf CmAmGf GmAfCm AfUmAf CmsGmsGm
TJR12343-AS	UmsUfsUm CfAmGf A(036)AmUf CmCmUf GmUfCm UfUmGf UmsCmsAm
TJR12358-AS	AmsCfsUm UfCmAf U(036)CmAf GmAmUf CmUfUm AfGmAf GmsUmsUm

其中，036 代表 WO2022028462A1 中公開的(-)hmpNA(A)修飾（鹼基隨序列改變）。

【0360】 試驗例 2 siRNA 序列 psiCHECK 11 濃度點在靶活性

在 HEK293A 細胞（南京科佰）中採用 11 個濃度梯度對表 6 中的 siRNA 序列進行體外分子水平模擬在靶活性篩選。

【0361】 以人 FXI、ANGPTL3、MARC1 基因構建 siRNA 對應的在靶序列，插入到 psiCHECK-2 質粒中（生工生物工程股份有限公司）。該質粒包含海腎螢光素酶基因及螢火蟲螢光素酶基因。作為雙報告基因系統，siRNA 的靶序列插入到海腎螢光素酶基因的 3'UTR 區域，siRNA 對於靶標序列的活性可以藉由經螢火蟲螢光素酶校準後的海腎螢光素酶表達情況的檢測來反映，檢測使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega，E2940）。

【0362】 HEK293A 細胞培養於含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培養基中，在 37℃，5% CO₂ 條件下培養。轉染前 24 h，將 HEK293A 細胞接種於 96 孔板，接種密度為每孔 8×10³ 個細胞，每孔 100 μL 培養基。

【0363】 使用 Lipofectamine2000 (ThermoFisher，11668019) 對細胞共轉染 siRNA 及對應質粒，每孔使用 0.2 μL Lipofectamine2000 和 20 ng 質粒。對於在靶序列質粒，siRNA 共設置 11 個濃度點，最高濃度點終濃度為 20nM，3 倍梯度稀釋。轉染後 24h，採用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega，E2940) 檢測在靶水平。數據使用 GraphPad Prism5 進行分析，結果如表 8 所示。

【0364】 表 8 siRNA 序列 psi-CHECK 在靶活性篩選結果

siRNA 綴合物編號	不同 siRNA 濃度下靶基因 mRNA(GSCM)表達剩餘百分比(平均值)					
	20 nM	6.6667nM	2.2222 nM	0.7407 nM	0.2469 nM	0.0823 nM
TRD008002	6.4%	5.9%	6.5%	7.8%	9.7%	15.0%
TRD008003	3.9%	3.4%	3.8%	4.1%	5.1%	9.2%
TRD008004	5.4%	4.9%	4.0%	5.6%	6.8%	17.5%
TRD008005	5.5%	3.7%	3.7%	5.0%	5.5%	12.7%
TRD008006	4.2%	3.1%	3.3%	3.8%	5.7%	10.6%
TRD008024	26.91%	20.16%	18.02%	16.21%	17.50%	25.18%
TRD008025	24.41%	21.09%	22.07%	18.86%	20.28%	29.57%
TRD008026	10.66%	10.26%	9.51%	11.47%	15.20%	24.28%
TRD008027	20.33%	15.44%	15.61%	14.39%	15.31%	27.01%
siRNA 綴合物編號	不同 siRNA 濃度下靶基因 mRNA(GSCM)表達剩餘百分比(平均值)					GSCM IC ₅₀ 值(nM)
	0.0274 nM	0.0091nM	0.0030 nM	0.0010 nM	0.0003 nM	
TRD008002	34.7%	74.2%	93.6%	98.7%	93.7%	0.0179
TRD008003	20.2%	54.0%	77.3%	96.3%	88.0%	0.0099
TRD008004	38.0%	73.3%	97.3%	102.2%	84.5%	0.0196
TRD008005	33.6%	69.4%	112.9%	124.6%	103.1%	0.0157
TRD008006	23.5%	51.2%	75.9%	89.2%	88.7%	0.0093
TRD008024	44.20%	71.85%	99.14%	95.71%	100.03%	0.0204
TRD008025	48.80%	88.00%	100.83%	98.83%	100.45%	0.0267
TRD008026	49.72%	99.29%	103.55%	104.57%	100.83%	0.0288
TRD008027	47.05%	81.86%	114.93%	122.14%	100.28%	0.0238

【0365】結果表明，本揭露的配體 NAG0052 綴合不同結構序列的 siRNA 在細胞上均能有效地抑制靶基因 mRNA 的表達。

【0366】試驗例 3 siRNA 對人原代肝細胞 (PHH) 中人 FXI、ANGPTL3、MACR1 的抑制

在人原代肝細胞 (PHH, Novabiosis) 中採用 5 個或 7 個濃度梯度對表 6 中 siRNA 進行人原代肝細胞 (PHH) 活性篩選。

【0367】人原代肝細胞 (PHH) 凍存於液氮中，轉染前 24 h，將人原代肝細胞 (PHH) 復蘇後接種於 96 孔板，接種密度為每孔 3×10^4 個細胞，每孔 80 μ L 培養基。使用 Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150) 轉染 siRNA。7 個濃度點實驗的 siRNA 轉染梯度終濃度為 10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0.016 nM、0.0032 nM 和 0.00064 nM。5 個濃度點實驗 siRNA 轉染梯度終濃度為 5nM、0.625nM、0.0781nM、0.00977nM 和 0.00122nM。在處理 24 小時後，使用高通量細胞 RNA 提取試劑盒 (凡知, FG0417) 進行細胞總 RNA 提取，使用 RNA 逆轉錄試劑盒 (Takara, 6210A) 逆轉錄，和使用 Taqman 探針 Q-PCR 試劑盒 (ThermoFisher, 4444964) 測定人 FXI、ANGPTL3、MACR1 的 mRNA 水平。根據 GAPDH 內參基因水平對人 FXI、ANGPTL3、MACR1 的 mRNA 水平進行校正。Taqman 探針引子信息見表 9。數據處理採用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法，結果以相對於經過對照 siRNA 處理的細胞的人 FXI、ANGPTL3、MACR1 mRNA 表達剩餘百分比來表示，抑制率的 IC₅₀ 結果見表 10 和表 11。

$\Delta\Delta C_t = [(C_t \text{ 實驗組目的基因} - C_t \text{ 實驗組內參}) - (C_t \text{ 對照組目的基因} - C_t \text{ 對照組內參})]$ 。

抑制率(%) = $(1 - \text{目的基因表達剩餘量}) \times 100\%$ 。

【0368】 表 9 Taqman 引子信息表

引子名稱	引子序列
hFXI-PF	TTTGCTGGGAGAGGGGTGTTG
hFXI-PR	TACAAACACCAAGCCCCTTCA
hFXI-P	CCAGCATGCTTCCTCCACAGTAACACG
hANG3-PF1-MGB	TTACTGGCAATGTCCCCAATG
hANG3-PR1-MGB	TGAAGTGTCTTTTGCTTTGTGA
hANG3-P1-MGB	ACAAAGATTTGGTGTTTTC
hMARC1-PF	GCTCAGGAGGATGGTTGTGTAGT
hMARC1-PR	GAAGGAGCACTCCGTCATTAGC
hMARC1-P	CCCTGGATCCTTGCCATTCCCCTC
hGAPDH-PF1-MGB	GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC
hGAPDH-PR1-MGB	TTGACGGTGCCATGGAATTT
hGAPDH-P1-MGB	TTACATGTTCCAATATGATTCC

【0369】 表 10 siRNA 在 PHH 細胞中多劑量抑制活性

siRNA 綴合 物編號	不同 siRNA 濃度下靶基因 mRNA (PHH) 表達剩餘百分比 (平均值)							IC ₅₀ 值 (nM)
	10nM	2nM	0.4nM	0.08nM	0.016nM	0.0032nM	0.00064nM	
TRD008002	16.61%	23.16%	34.70%	38.35%	52.77%	91.37%	105.17%	0.0295
TRD008003	19.15%	25.65%	39.67%	42.81%	55.62%	80.31%	91.47%	0.0465
TRD008004	4.27%	6.24%	7.34%	15.42%	41.23%	68.30%	81.65%	0.0098
TRD008005	5.85%	5.66%	8.71%	24.52%	47.34%	88.18%	84.60%	0.0176
TRD008006	6.52%	5.99%	8.44%	10.76%	33.06%	58.39%	63.74%	0.0066
TRD008024	12.72%	8.30%	8.86%	9.68%	19.98%	36.58%	65.77%	0.0015
TRD008025	9.63%	9.62%	9.93%	20.08%	28.44%	38.41%	55.92%	0.0011
TRD008026	7.44%	9.15%	10.37%	15.59%	33.72%	53.33%	68.26%	0.0044

【0370】 表 11 siRNA 在 PHH 細胞中多劑量抑制活性

siRNA 綴合 物編號	不同 siRNA 濃度下 MARC1 mRNA(PHH)表達剩餘百分比 (平均值)					IC ₅₀ 值 (nM)
	5nM	0.63nM	0.078nM	0.0098nM	0.0012nM	
TRD6233	5.70%	6.45%	ND	44.32%	76.77%	0.0074
TRD6238	6.46%	12.07%	29.28%	63.63%	118.05%	0.0186
TRD6253	7.90%	12.13%	33.85%	56.02%	65.52%	0.0206

【0371】 結果表明，本揭露的配體 NAG0052 綴合不同結構序列的 siRNA 在人原代肝細胞上均能有效地抑制靶基因 mRNA 的表達。綴合 NAG0052 的綴合物 TRD008024、TRD008025、TRD008026 在 PHH 細胞上體現出比綴合 NAG1 的綴合物 TRD6233、TRD6238、TRD6253 更優的抑制活性。

【0372】 試驗例 4 siRNA 對食蟹猴原代肝細胞 (PCH) 中 FXI 的抑制-7 個濃度點抑制活性

在猴原代肝細胞 (PCH, 妙順生物) 中採用 7 個濃度梯度對表 6 中 FXI 的 2 條 siRNA 進行反向轉染活性篩選。各個 siRNA 樣品轉染起始終濃度為 10 nM, 5 倍梯度稀釋和 7 個濃度點。

【0373】 猴原代肝細胞 (PCH) 凍存於液氮中, 轉染前將猴原代肝細胞 (PCH) 復蘇後接種於 96 孔板, 接種密度為每孔 3×10^4 個細胞, 每孔 90 uL 培養基。使用 Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150) 轉染 siRNA, siRNA 轉染的梯度終濃度為 10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0.016 nM、0.0032 nM 和 0.00064 nM。在處理 24 小時後, 使用高通量細胞 RNA 提取試劑盒 (凡知, FG0417) 進行細胞總 RNA 提取, 使用 RNA 逆轉錄試劑盒 (Takara, 6210A) 逆轉錄, 和使用 Taqman 探針 Q-PCR 試劑盒 (ThermoFisher, 4444964) 測定猴 FXI 的 mRNA 水平。根據 GAPDH 內參基因水平對猴 FXI 的 mRNA 水平進行校正。Taqman 探針引子信息見表 12。數據處理採用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 結果以相對於經過對照 siRNA 處理的細胞的猴 FXI mRNA 表達剩餘百分比來表示, 抑制率的 IC₅₀ 結果見表 13。

$\Delta\Delta C_t = [(C_t \text{ 實驗組目的基因} - C_t \text{ 實驗組內參}) - (C_t \text{ 對照組目的基因} - C_t \text{ 對照組內參})]$ 。

抑制率(%) = $(1 - \text{目的基因表達剩餘量}) \times 100\%$ 。

【0374】 表 12 猴 Taqman 探針引子信息表

引子名稱	引子序列
mkFXI-V1-PF1	CTGGATATTGTTGCTGTGAAAGGT
mkFXI-V1-PR1	CCTTCGTTGCAAGATGCTTGA
mkFXI-V1-P1	CTGTGCACCAATGCCGTCCGC
mkGAPDH-PF1-MGB	AGTCAGCCGCATTTTCTCTTG
mkGAPDH-PR1-MGB	AAATCCGTTGACTCCGACCTT
mkGAPDH-P1-MGB	ATCGCCAGCGCATC

表 13 siRNA 在 PCH 中多劑量抑制活性

siRNA 綴合 物編號	不同 siRNA 濃度下靶基因 mRNA (HCH) 表達剩餘百分比 (平均值)							IC ₅₀ 值 (nM)
	10nM	2nM	0.4nM	0.08nM	0.016nM	0.0032nM	0.00064nM	
TRD008002	11.69%	29.29%	48.51%	49.83%	42.10%	47.34%	76.09%	0.0398
TRD008003	6.83%	9.29%	51.01%	33.91%	55.43%	65.33%	71.83%	0.0369

【0375】 結果表明，綴合 NAG0052 的 TRD008002、TRD008003 綴合物在 PCH 細胞針對 FXI 有很好的抑制活性。

【0376】 試驗例 5 siRNA 對 Huh7 細胞中人 ANGPTL3 的抑制-7 個濃度點抑制活性

在 Huh7 細胞（南京科佰）中採用 7 個濃度梯度對表 6 中 siRNA 進行 Huh7 細胞活性篩選。各個 siRNA 樣品轉染起始終濃度為 10 nM，5 倍梯度稀釋，7 個濃度點。

【0377】 Huh7 細胞培養於含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培養基中，在 37℃，5% CO₂ 條件下培養。轉染前 24 h，將 Huh7 細胞接種於 96 孔板，接種密度為每孔 1 萬個細胞，每孔 100 μL 培養基。使用 Lipofectamine RNAi MAX（ThermoFisher，13778150）轉染 siRNA，siRNA 轉染的終濃度為 10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0.016 nM、0.0032 nM 和 0.00064 nM。在處理 24 小時後，使用高通量細胞 RNA 提取試劑盒（凡知，FG0417）進行細胞總 RNA 提取，使用 RNA 逆轉錄試劑盒（Takara，6210A）逆轉錄，和使用 Taqman 探針 Q-PCR 試劑

盒（ThermoFisher，4444964）測定人 ANGPTL3 的 mRNA 水平。根據 GAPDH 內參基因水平對人 ANGPTL3 的 mRNA 水平進行校正。數據處理採用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法，結果以相對於經過對照 siRNA 處理的細胞的人 ANGPTL3 mRNA 表達剩餘百分比來表示。抑制率的 IC₅₀ 結果見表 14。

$$\Delta\Delta C_t = [(C_t \text{ 實驗組目的基因} - C_t \text{ 實驗組內參}) - (C_t \text{ 對照組目的基因} - C_t \text{ 對照組內參})]$$

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{目的基因表達剩餘量}) \times 100\%$$

【0378】表 14 siRNA 在 Huh7 中對人 ANGPTL3 多劑量抑制活性

siRNA 綴合物編號	不同 siRNA 濃度下靶基因 mRNA(Huh7)表達剩餘百分比(平均值)							IC ₅₀ 值 (nM)
	10nM	2nM	0.4nM	0.08nM	0.016nM	0.0032nM	0.00064nM	
TRD008004	20.41%	29.83%	38.24%	66.52%	91.40%	100.41%	102.12%	0.1995
TRD008005	18.80%	25.78%	28.90%	57.12%	77.19%	93.56%	95.33%	0.1047
TRD008006	19.14%	30.21%	37.88%	61.27%	83.49%	98.09%	99.08%	0.1738

【0379】結果表明，在 Huh7 細胞中，綴合 NAG0052 的 TRD008004、TRD008005、TRD008006 綴合物對 ANGPTL3 表現出有效的抑制活性。

【0380】製備例 12：核酸配體綴合物的合成

參考製備例 10 的步驟合成以下 siRNA 綴合物用於試驗例 6 和 7，該 siRNA 具有表 15 所示的正義鏈和反義鏈。

【0381】表 15

siRNA 綴合物編號	SS 鏈 (5'-3')	AS 鏈 (5'-3')
S-1	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am -NAG1	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm
S-L96	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am -L96	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm

【0382】試驗例 6 胺基半乳糖分子簇綴合的 siRNA 在肝原代細胞中對 mRNA 表達的抑制

參照 Severgini 等報導的方法 (Cytotechnology. 2012;64(2):187–195.) 分離獲得新鮮小鼠原代肝細胞。

【0383】原代肝細胞分離後，按照 10 萬每孔接種於 24 孔板中，按照終濃度為 50nM、10nM、2nM、0.4nM、0.08nM、0.016nM、0.0032nM、0.00064nM 分別加入待測 siRNA 化合物。隨後，將原代肝細胞置於 37°C，5% CO₂ 的環境中培養 24 小時。24h 後，採用 qPCR 方法檢測 mTTR 的 mRNA 表達水平。

【0384】圖 3 顯示了不同濃度的 siRNA 綴合物 S-1 (NAG1 綴合) 和 S-L96 (L96 綴合) 對 mRNA 的抑制率。如圖 3 所示，S-1 表現了優秀的 mTTR 基因表達抑制效率。與對照組 S-L96 的 IC₅₀ 值 0.280nM 相比，S-1 的 IC₅₀ 值為 0.131nM，表明 NAG1 綴合的 siRNA 體外被原代肝細胞自由攝取的效率優於對照組，綴合 NAG1 能更高效介導 siRNA 進入原代肝細胞。由於在試驗例 3 中，NAG0052 綴合的 siRNA 顯示出比 NAG1 綴合的 siRNA 更強的抑制靶基因表達的活性，綜合數據表明 NAG0052 綴合物具有比 L96 綴合物更優的抑制活性。

【0385】試驗例 7 胺基半乳糖分子簇綴合的 siRNA 在體內對 mRNA 表達的抑制

使用 8 週齡的 C57BL/6 小鼠 (昭衍生物，SPF 級，雌性)，採用上述的胺基半乳糖分子簇綴合的 siRNA 經皮下注射遞送。在第 1 天，在小鼠肩頸部的鬆弛皮膚上，給予 100 μ l 溶液的皮下注射，其含有 PBS (稱為 Mock 組，即空白對照組) 或 PBS 配製的 1mg/kg(mpk)、0.2mpk 劑量的對應的胺基半乳糖分子簇綴合的 siRNA (S-L96 或 S-1)。各個組別注射 6 隻小鼠。

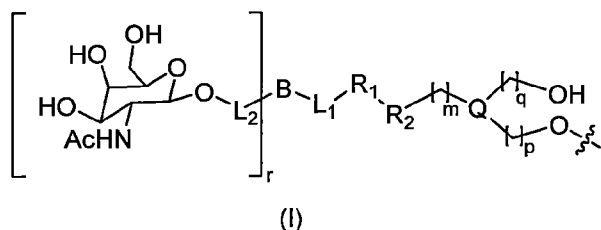
【0386】在給藥 3 天後，斷頸處死小鼠，使用 qPCR 檢測小鼠肝組織 mTTR 的 mRNA 表達水平。

【0387】圖 4 顯示了分別給藥不同劑量的 S-1 和 S-L96 後，小鼠肝組織中 mRNA 的表達水平。如圖 4 所示，S-1 表現了優異的 mTTR 基因表達抑制效率。S-1 在 1mpk 及 0.2mpk 的活性水平優於對照組 S-L96。由於在試驗例 3 中，NAG0052 綴合的 siRNA 顯示出比 NAG1 綴合的 siRNA 更強的抑制靶基因表達的活性，綜合數據表明 NAG0052 綴合物具有比 L96 綴合物更優的抑制活性。

【符號說明】無

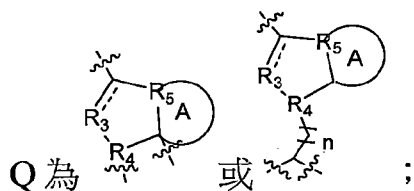
【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種具有如式 (I) 所示結構的配體，



其中， L_1 為 C_1 - C_{30} 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 $C=O$ 間斷的 C_1 - C_{30} 烷基鏈；

R_1 和 R_2 獨立地為化學鍵、 $-NR_6-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ；



--- 為單鍵或雙鍵，且當 --- 為單鍵時， R_3 獨立地為 CR_7R_8 、 NR_6 、O 或 S，當 --- 為雙鍵時， R_3 獨立地為 CR_9 或 N；

R_4 獨立地為 CR_9 或 N；

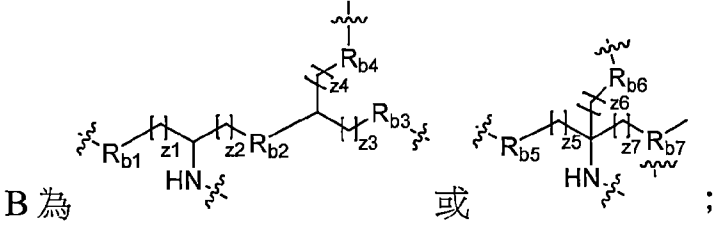
環 A 不存在，或為環烷基、雜環基、芳基或雜芳基，且當環 A 存在時， R_5 獨立地為 CR_9 或 N，當環 A 不存在時， R_5 獨立地為 CR_7R_8 、 NR_6 或 O；

R_6 和 R_9 獨立地為氫、氖、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$ ，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 環烷基、3-12 員雜環基、5-12 員芳基、5-12 員雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基團所取代；

R_7 和 R_8 獨立地為氫、氖、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 或 $C(=O)NR'(R'')$ ，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 環烷基、3-12 員雜環基、5-12 員芳基、5-12 員雜芳基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 和 $C(=O)NR'(R'')$ 中的基團所取代；

R' 和 R'' 獨立地為氫、氖、羥基、烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基，該烷基、烷氧基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基視需要被一個或多個選自鹵素、羥基、側氧、硝基和氰基中的取代基所取代；

m 、 n 、 p 和 q 獨立地為 0、1、2、3 或 4；



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

$z1$ 、 $z2$ 、 $z3$ 、 $z4$ 、 $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 和 $z9$ 獨立地為 0-10 的整數；

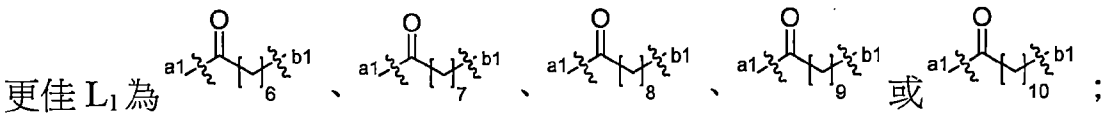
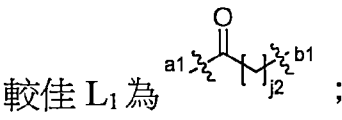
L_2 為 C_1 - C_{30} 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 $C=O$ 間斷的 C_1 - C_{30} 烷基鏈；

r 為 1-10 的整數。

【請求項2】 如請求項 1 所述的配體，其中， L_1 為 L_3 或 $L_3-R_{10}-R_{11}-L_3$ ，其中， L_3 獨立地為 C_1 - C_{12} 烷基鏈、 $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ 或 $-(CH_2)_{j3}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j4}-$ ； R_{10} 和 R_{11} 獨立地為化學鍵、 $-NR_{12}-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-OC(=O)-$ ； R_{12} 為氫或 C_1 -

C₁₂ 烷基；j₁、j₂、j₃ 和 j₄ 獨立地為 0-10 的整數，較佳 0-2 或 4-10 的整數，更佳 0、1、2、6、7、8、9 或 10。

【請求項3】 如請求項 2 所述的配體，其中，L₁ 為-(CH₂)_{j₁}-C(=O)-(CH₂)_{j₂}-，



其中，a₁ 端與 B 相連，b₁ 端與 R₁ 相連。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項所述的配體，其中，R₁ 和 R₂ 為以下任一組合，

組合 1：R₁ 為化學鍵且 R₂ 為 C=O；

組合 2：R₁ 為化學鍵且 R₂ 為 NR₆；

組合 3：R₁ 為化學鍵且 R₂ 為-OC(=O)-；

組合 4：R₁ 為 NR₆ 且 R₂ 為 C=O；

組合 5：R₁ 為 NR₆ 且 R₂ 為-OC(=O)-；

組合 6：R₂ 為 NR₆ 且 R₁ 為 C=O；

組合 7：R₂ 為 NR₆ 且 R₁ 為-OC(=O)-。

【請求項5】 如請求項 1 至 4 中任一項所述的配體，其中，R₆ 為氫或 C₁₋₆ 烷基，較佳氫、氘、甲基、乙基、丙基或異丙基，更佳氫；

和/或，R₇ 和 R₈ 為氫；

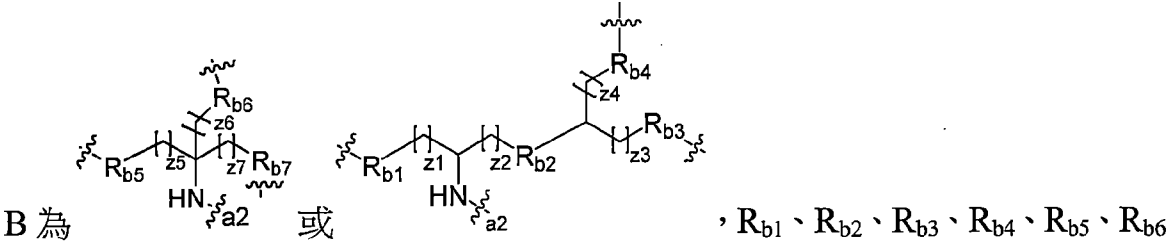
和/或，R₉ 為氫。

【請求項6】 如請求項 1 至 5 中任一項所述的配體，其中，m 為 0 或 1。

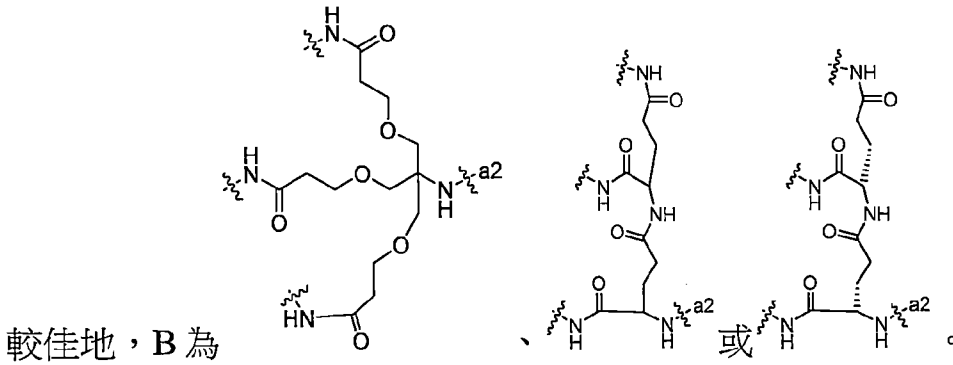
【請求項7】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的配體，其中，p 和 q 可為以下任一組合，

- 組合 1：p=1 且 q=1；
- 組合 2：p=1 且 q=0；
- 組合 3：p=0 且 q=1；
- 組合 4：p=0 且 q=0。

【請求項8】 如請求項 1 至 7 中任一項所述的配體，其中，

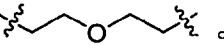


和 R_{b7} 獨立地為 -C(=O)- 或 -NHC(=O)-，a2 端的 N 原子與 L₁ 相連；

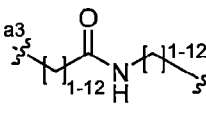
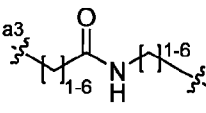
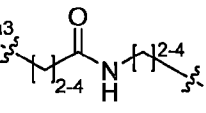
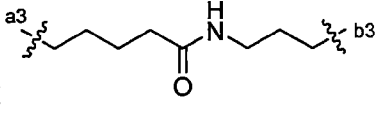


【請求項9】 如請求項 1 至 8 中任一項所述的配體，其中，

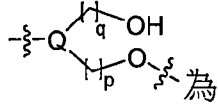
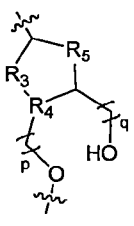
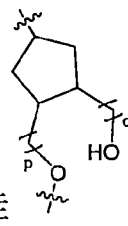
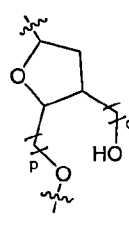
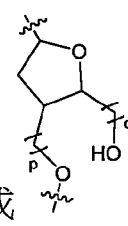
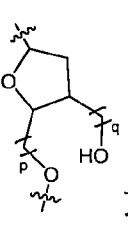
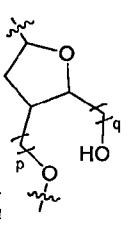
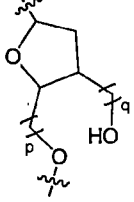
L₂ 為 L 或 L₄-R₁₃-R₁₄-L₄，其中，L₄ 獨立地為 C₁-C₁₂ 烷基鏈或 -(CH₂)_{j5}- (OCH₂CH₂)₁₋₄-(CH₂)_{j6}-，R₁₃ 和 R₁₄ 獨立地為化學鍵、-NR₁₅-、-C(=O)- 或 -OC(=O)-，R₁₅ 獨立地為氫或 C₁-C₁₂ 烷基，j₅ 和 j₆ 獨立地為 0-10 的整數，較佳 0-6 的整數，更佳 0、1、2、3 或 4。

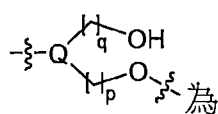
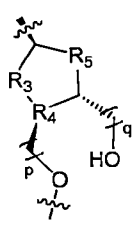
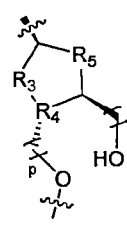
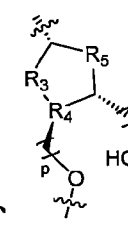
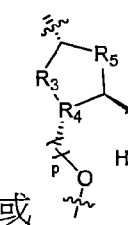
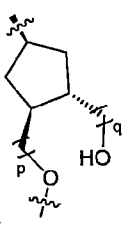
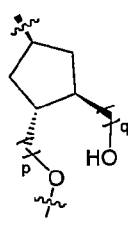
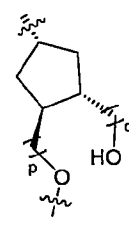
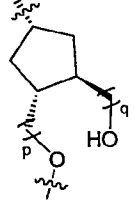
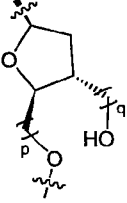
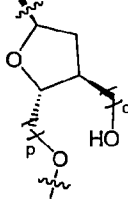
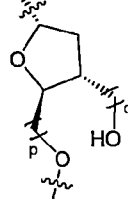
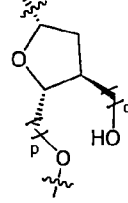
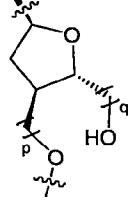
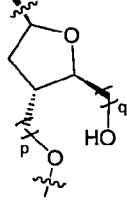
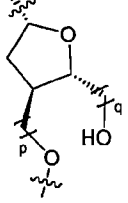
【請求項10】 如請求項 9 所述的配體，其中， L_2 為 $-(CH_2)_{j5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j6}-$ ，較佳.

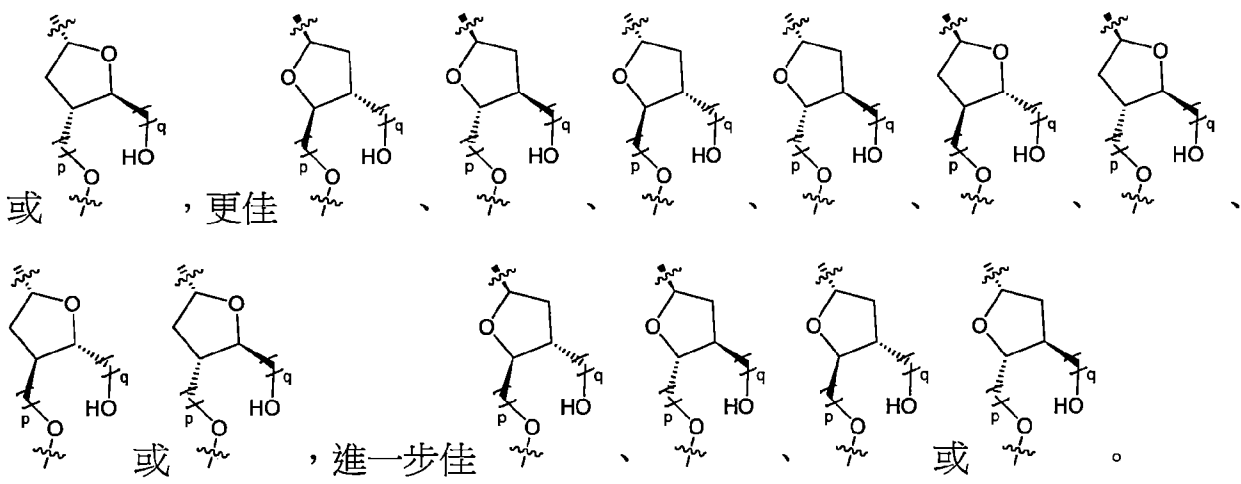
【請求項11】 如請求項 9 所述的配體，其中，

L_2 為，較佳，更佳，進一步佳，其中，a3 端與 O 相連，b3 端與 B 相連。

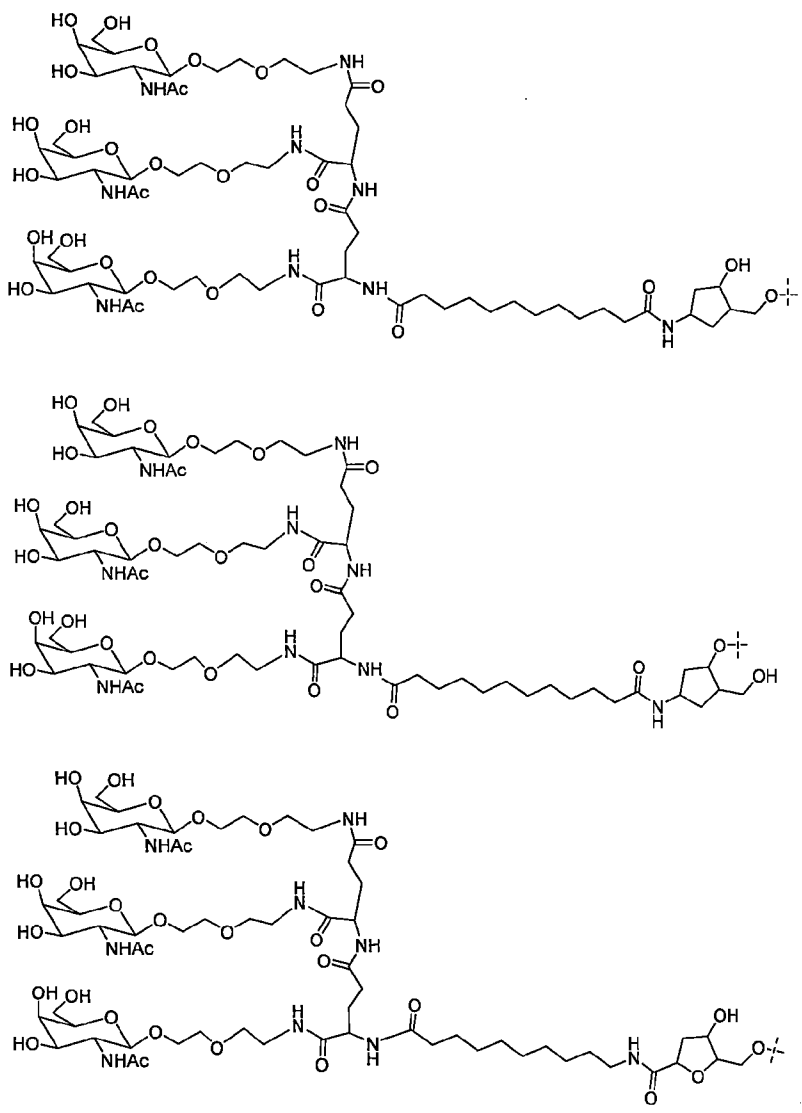
【請求項12】 如請求項 1 至 11 中任一項所述的配體，其中，r 為 3。

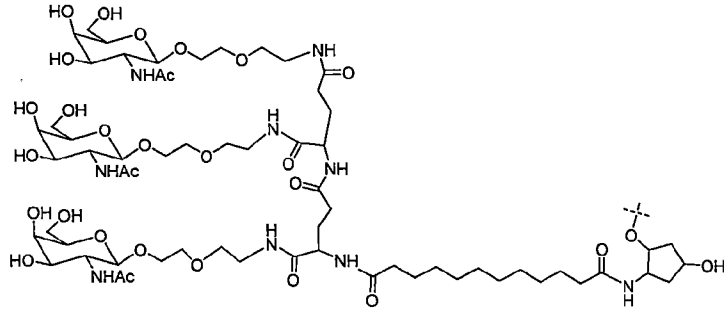
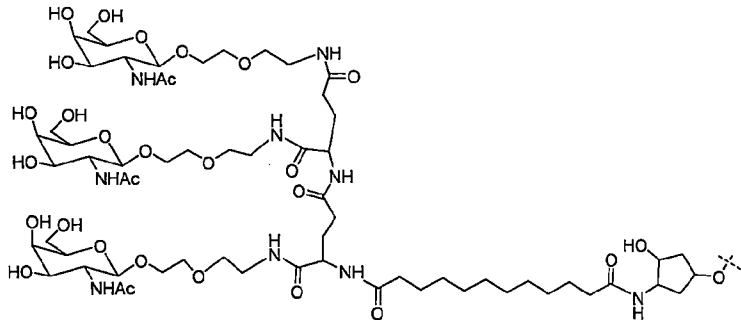
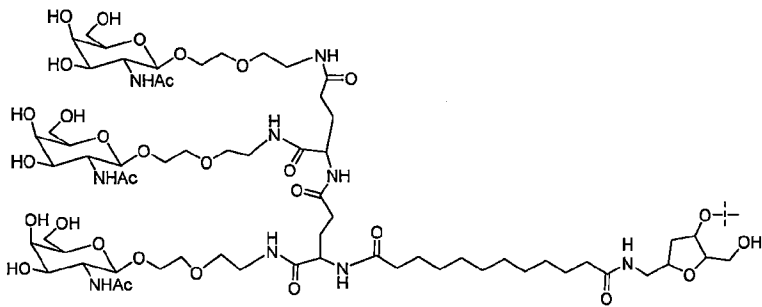
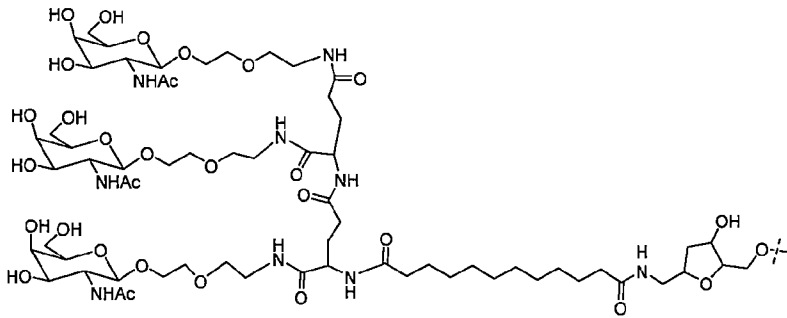
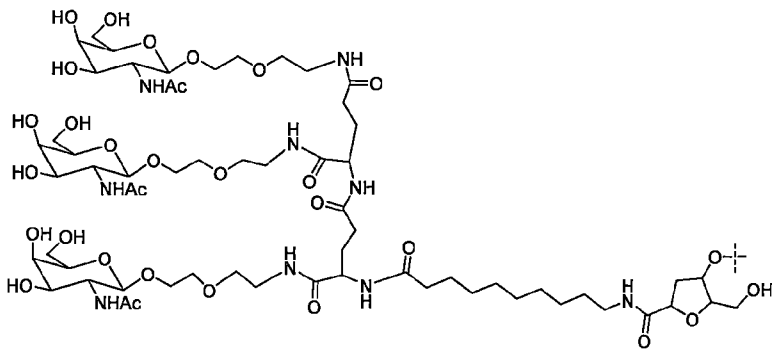
【請求項13】 如請求項 1 至 12 中任一項所述的配體，其中，為，較佳、或，更佳或，進一步佳。

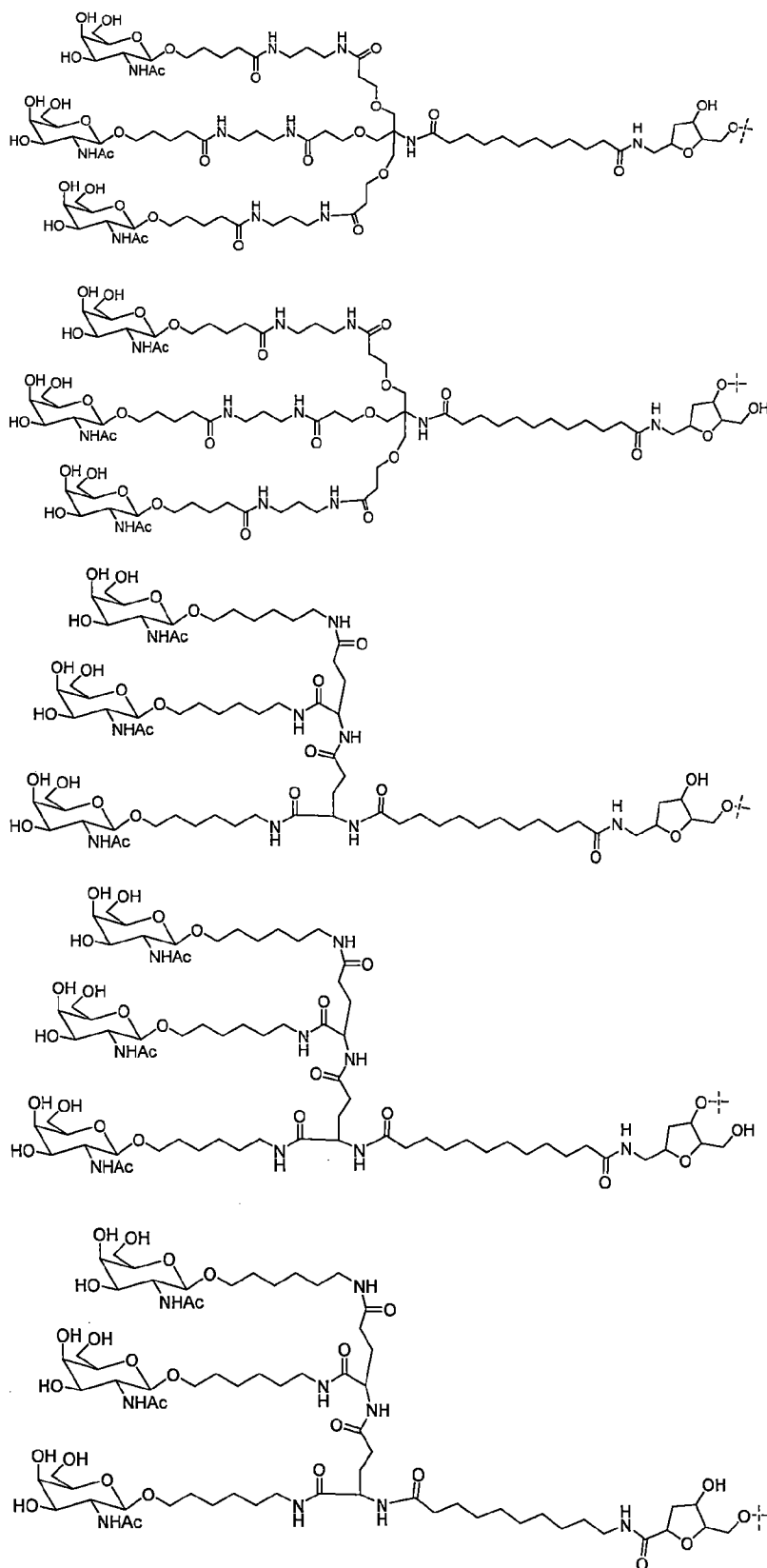
【請求項14】 如請求項 1 至 13 中任一項所述的配體，其中，為、、或，較佳、、、、、、、、、、。

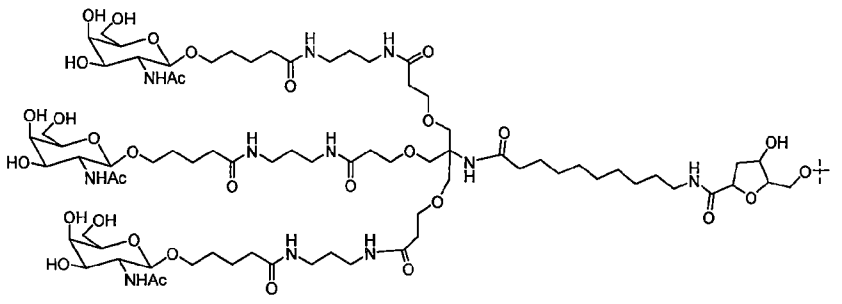
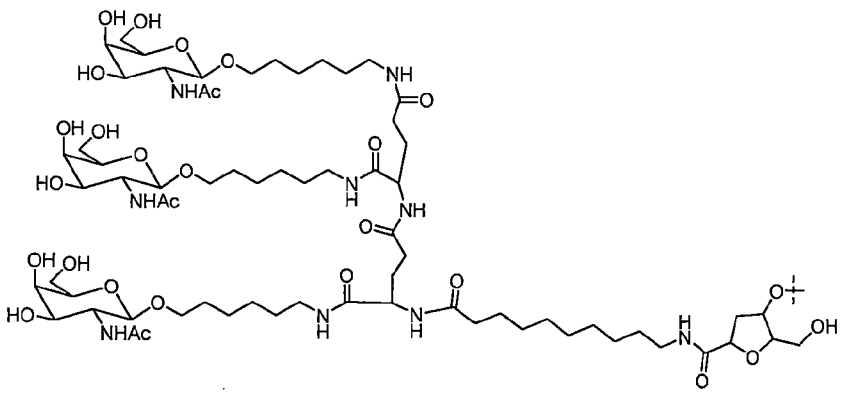


【請求項15】 如請求項 1 至 14 中任一項所述的配體，其中，該配體為以下任一結構，

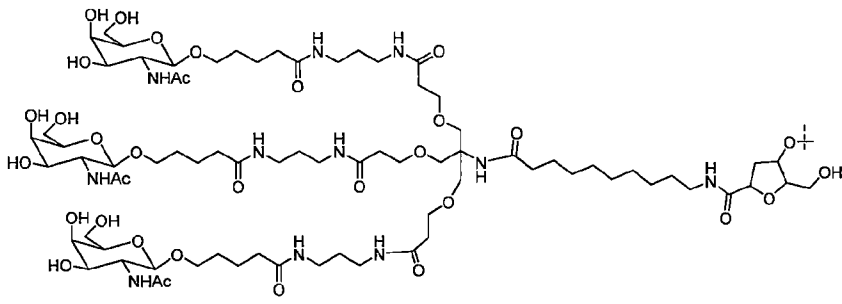




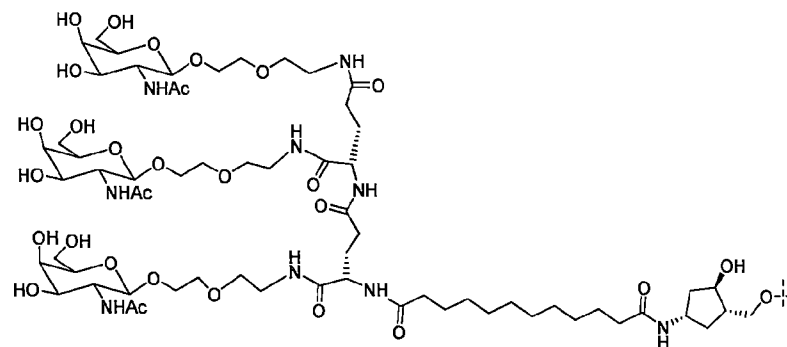


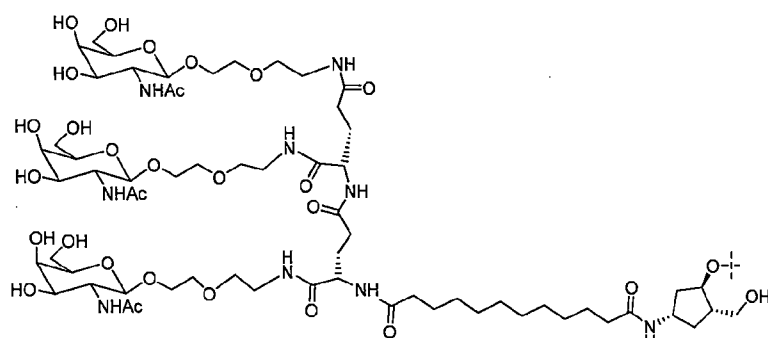
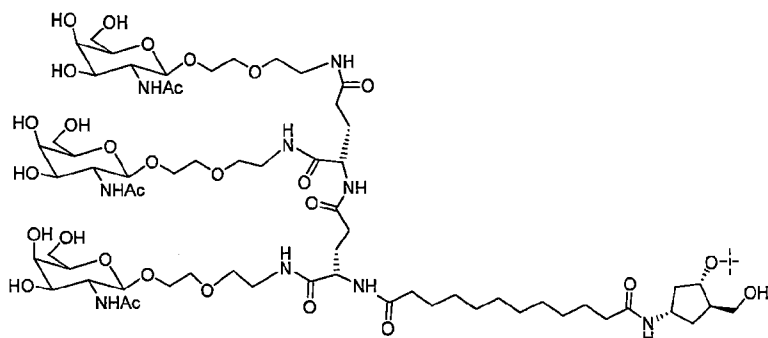
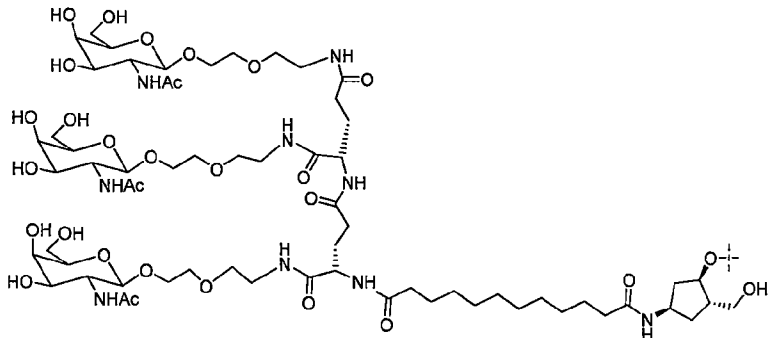
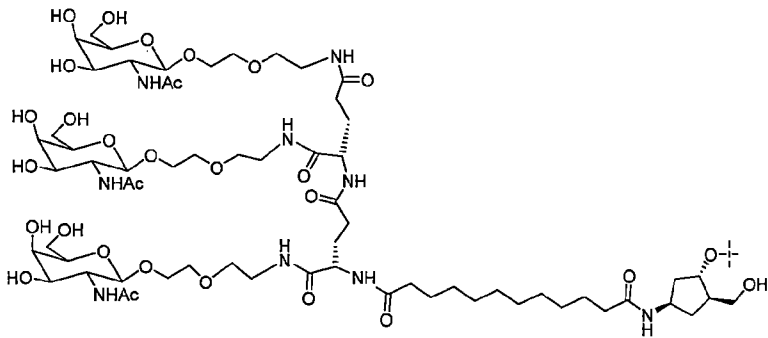


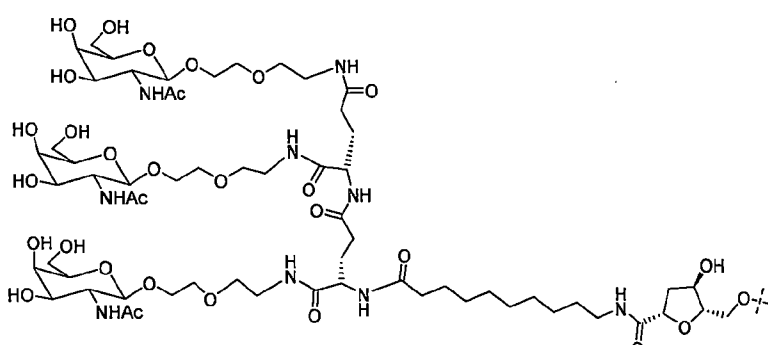
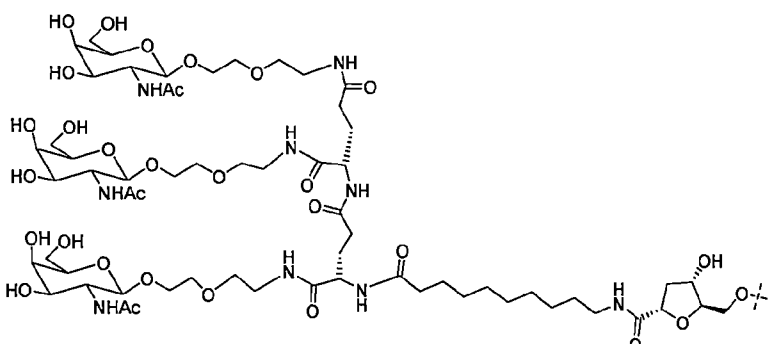
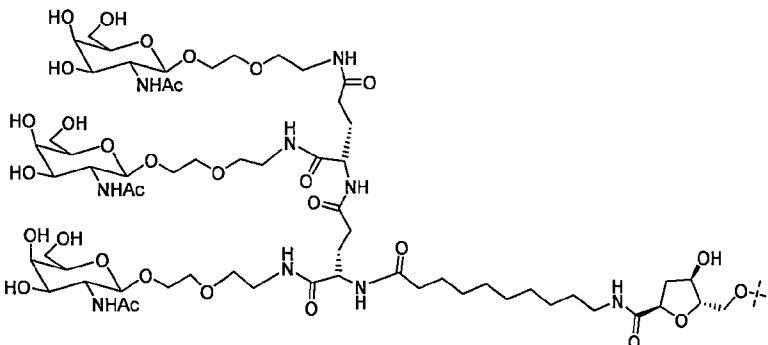
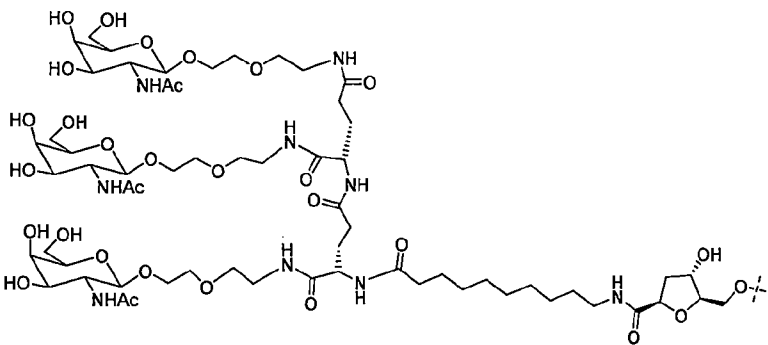
或

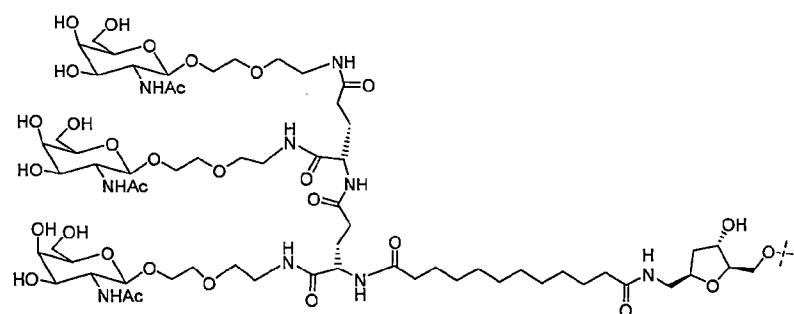
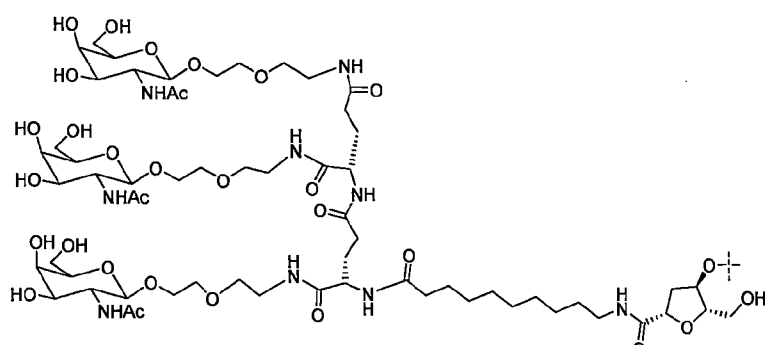
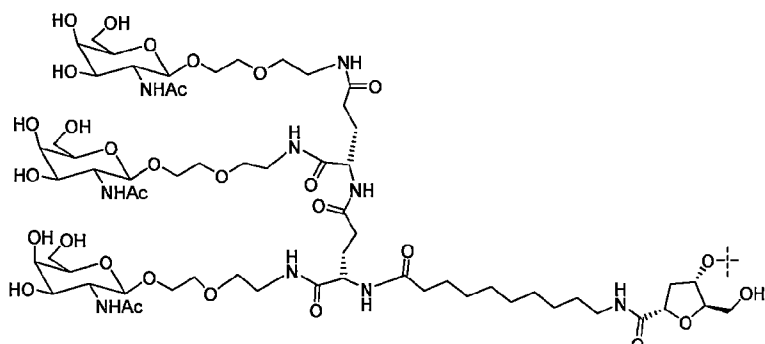
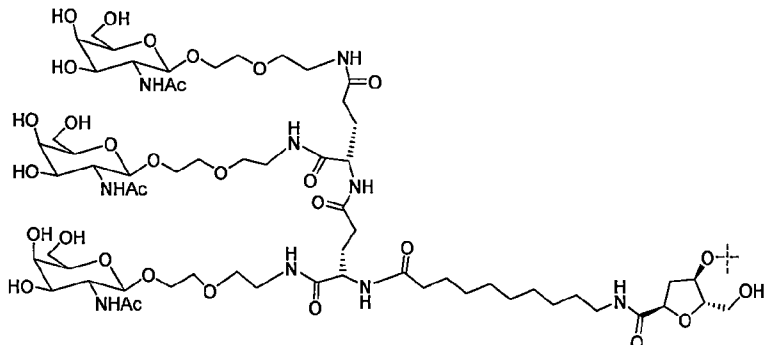
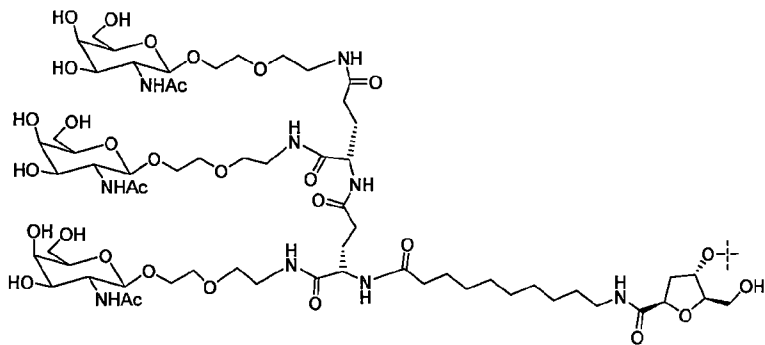


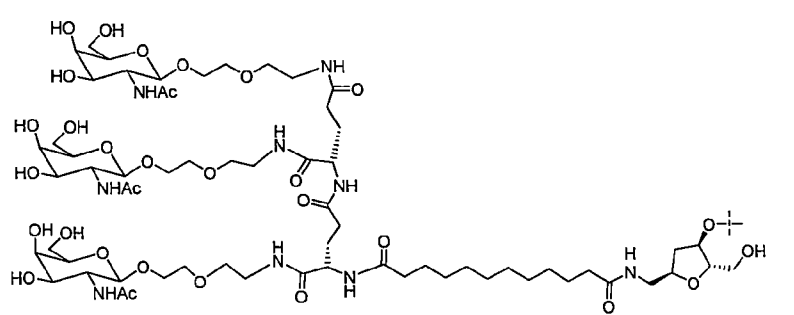
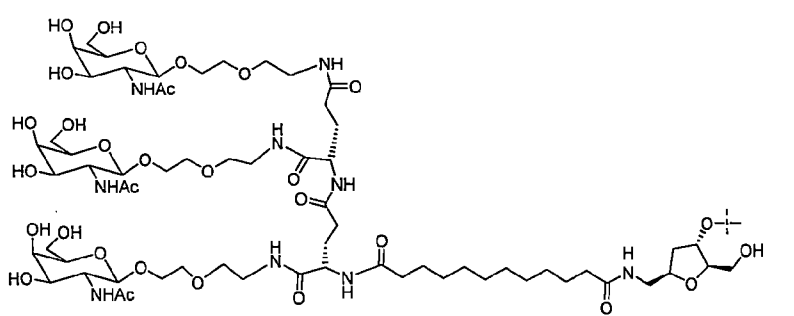
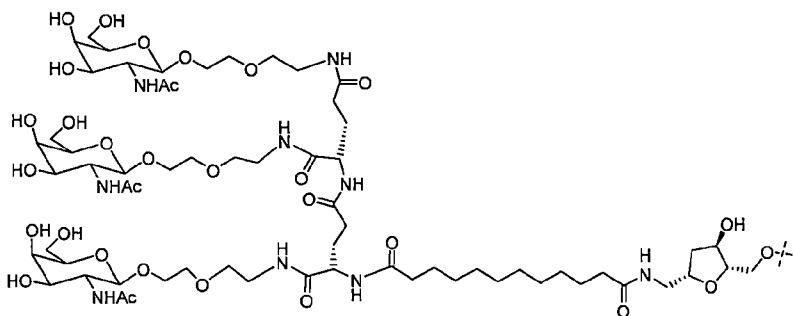
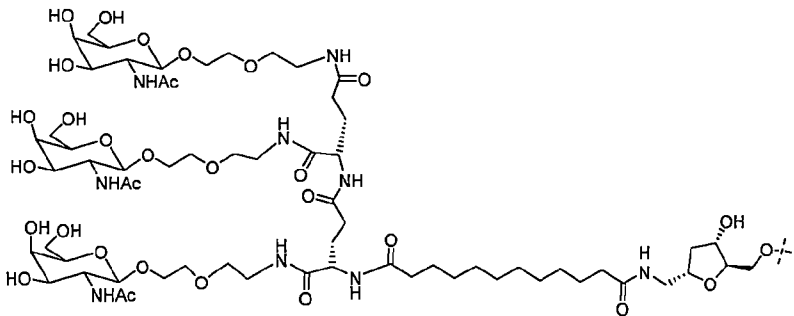
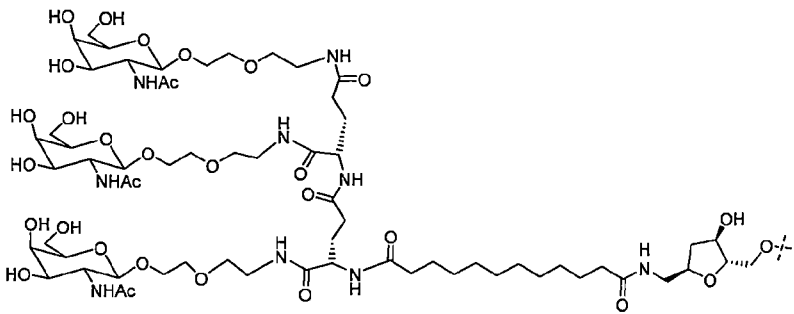
【請求項16】 如請求項 1 至 15 中任一項所述的配體，其中，該配體為以下任一結構，

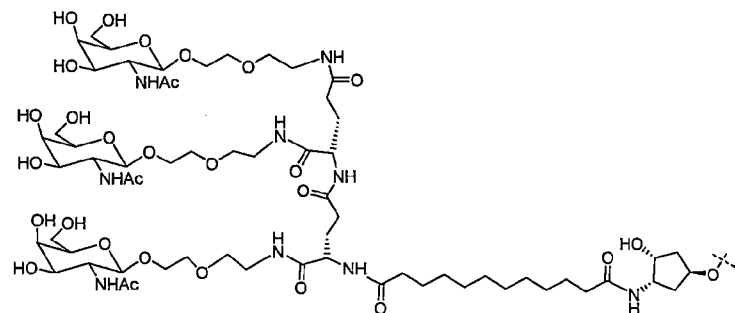


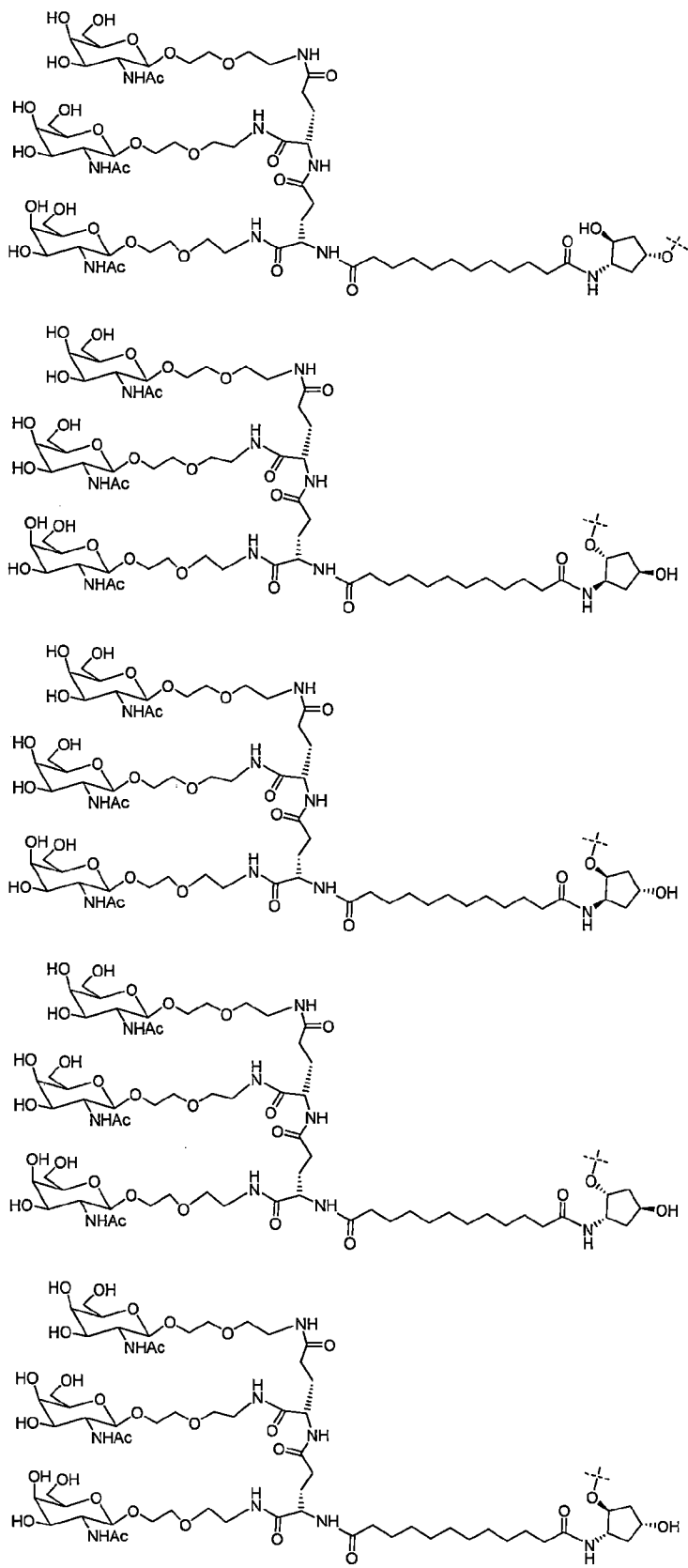


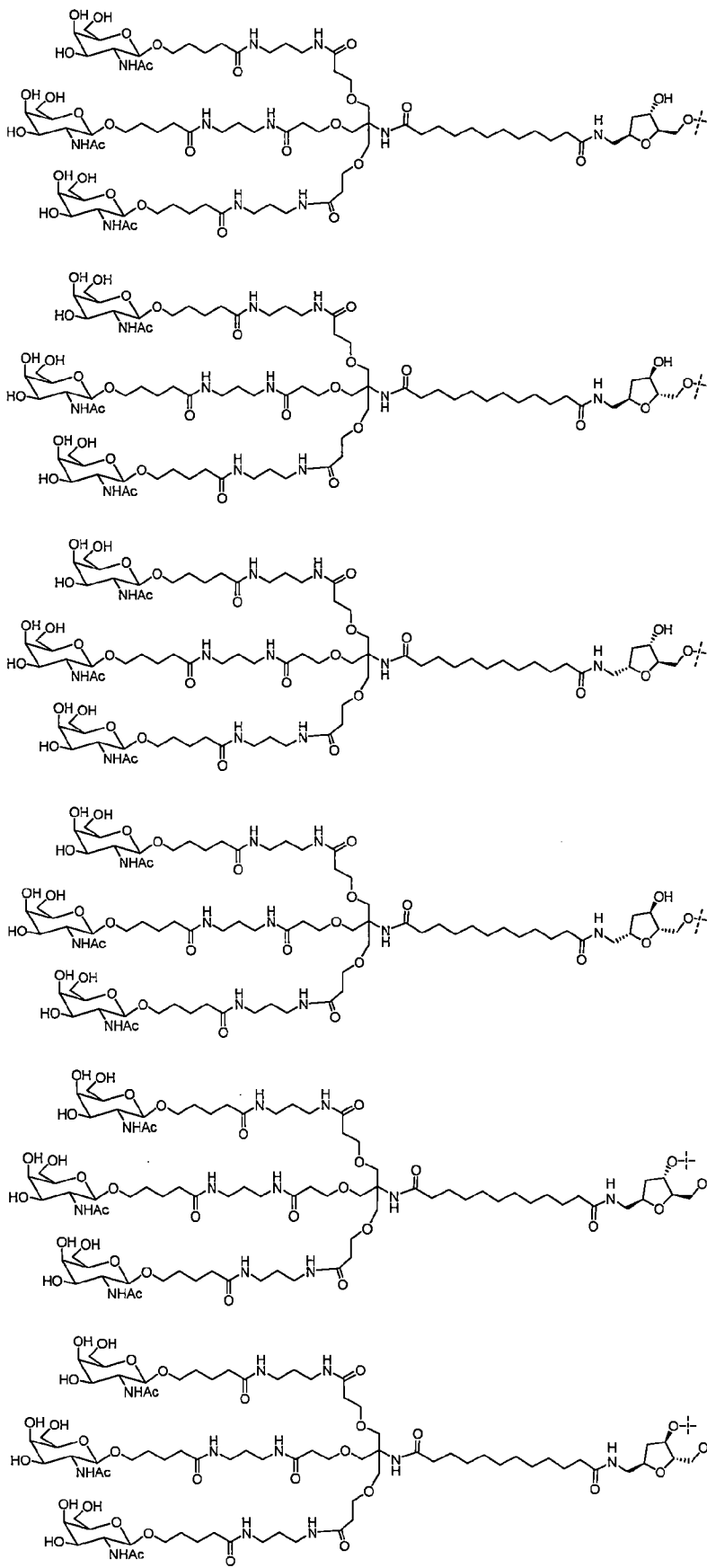


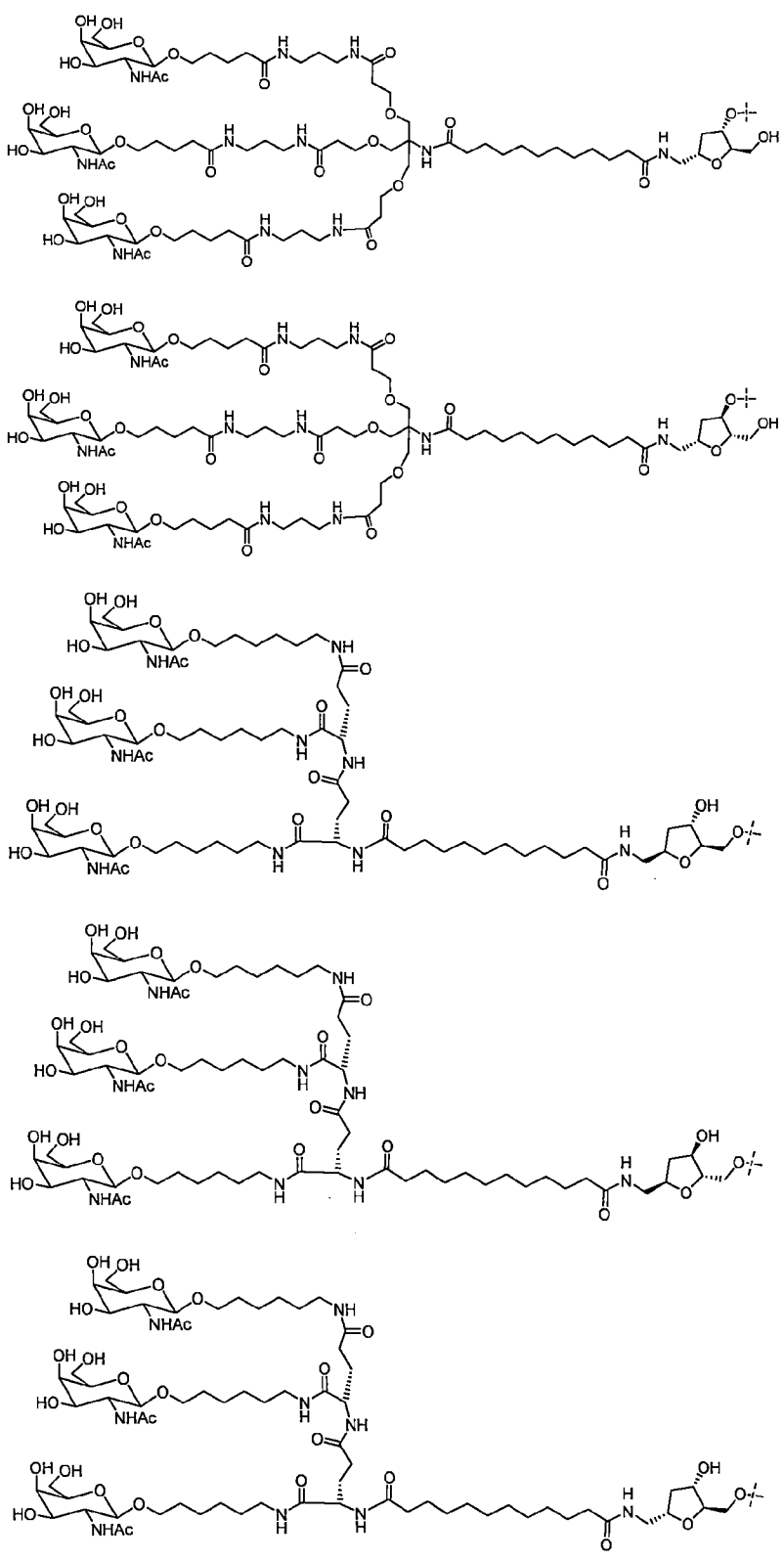


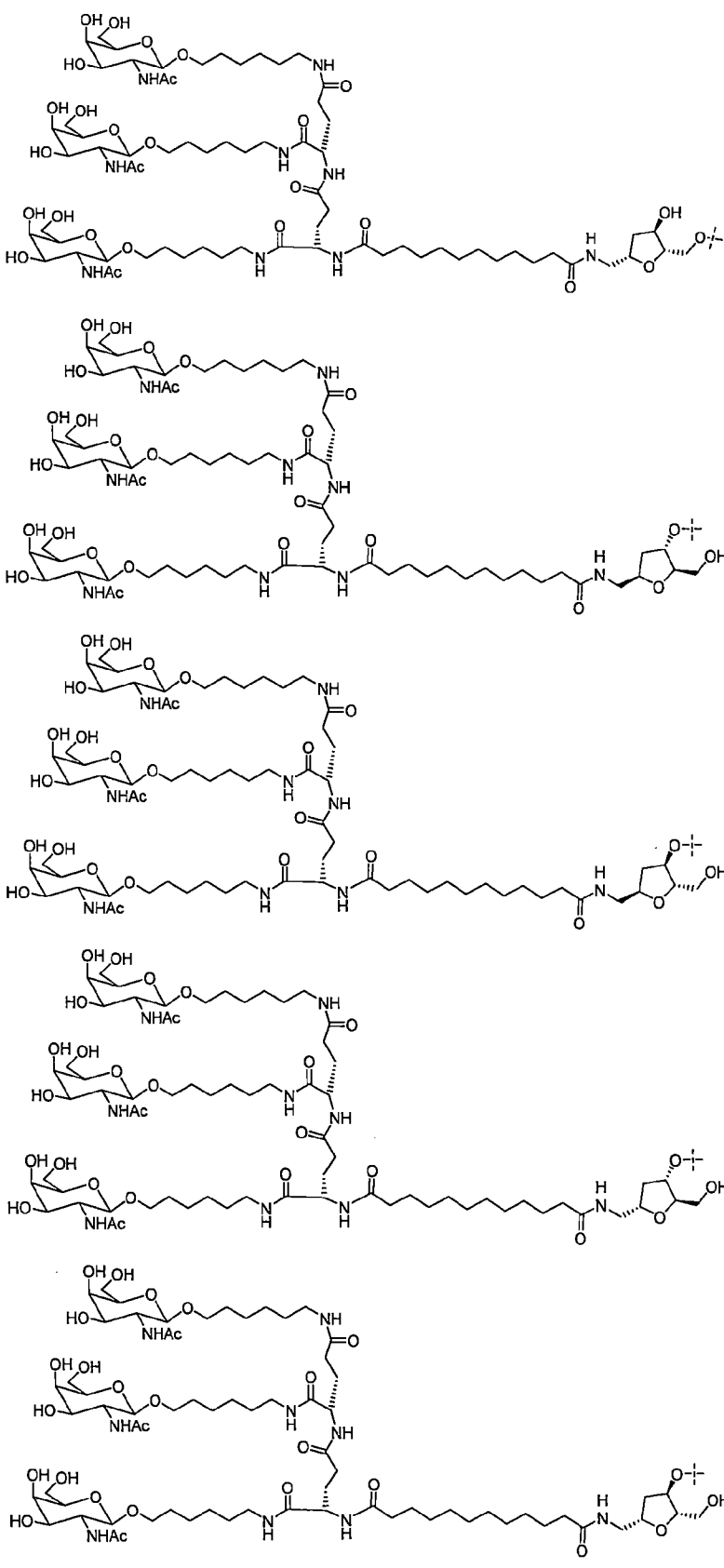


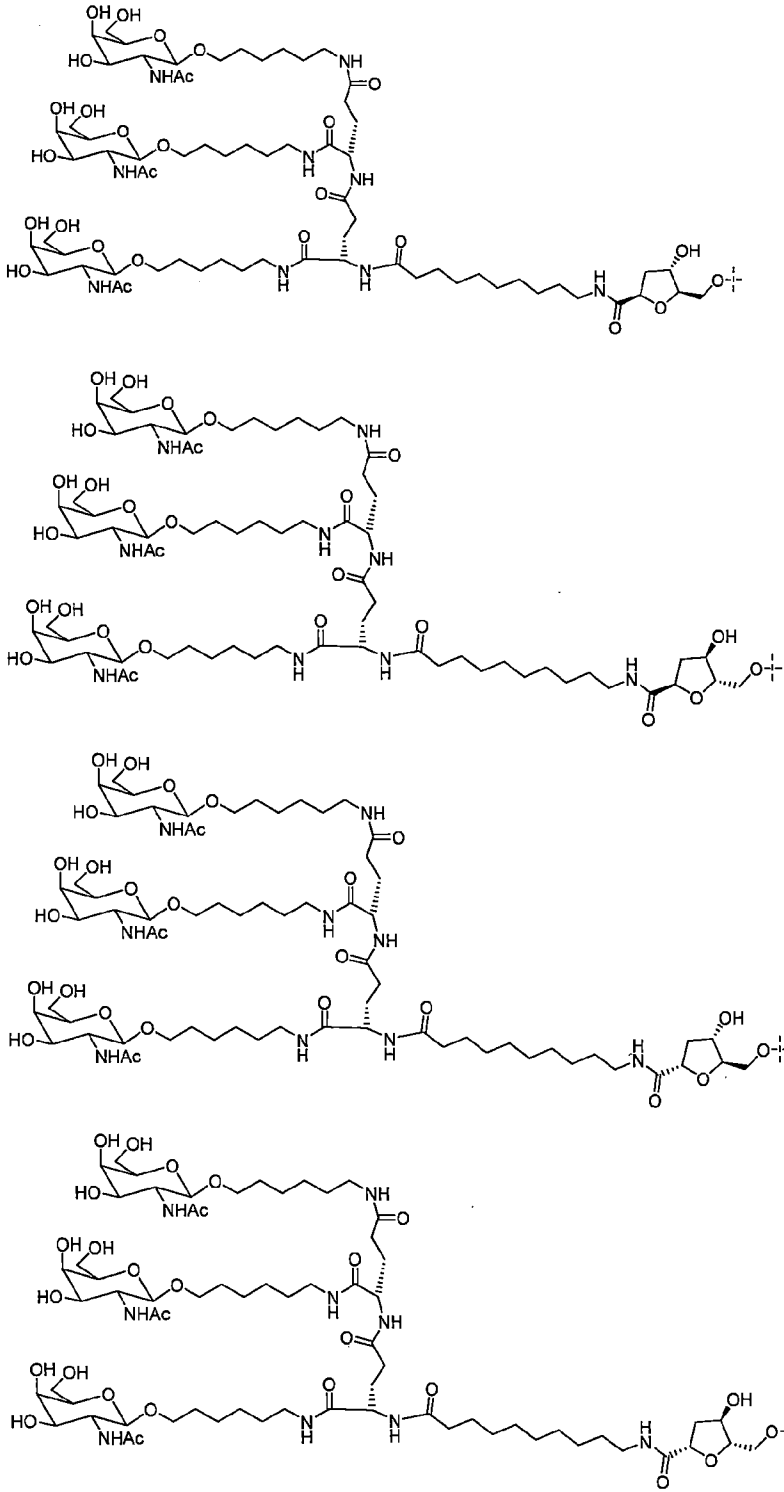


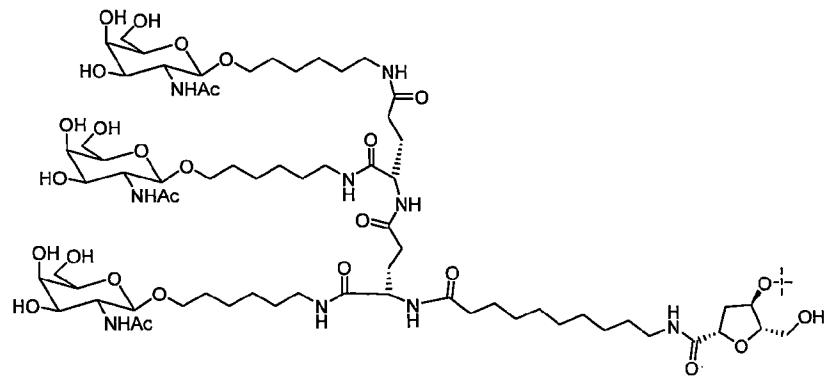
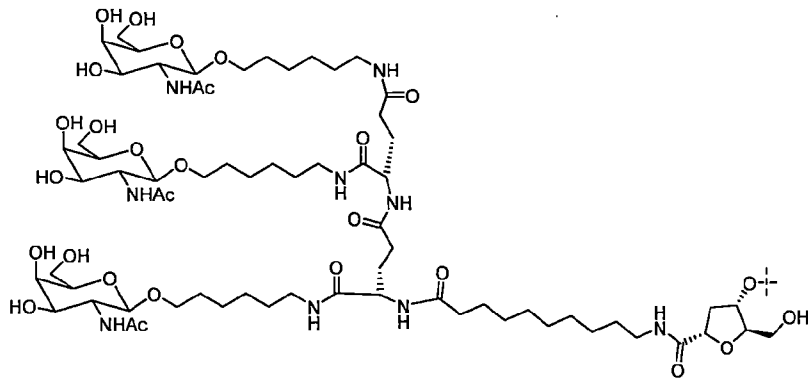
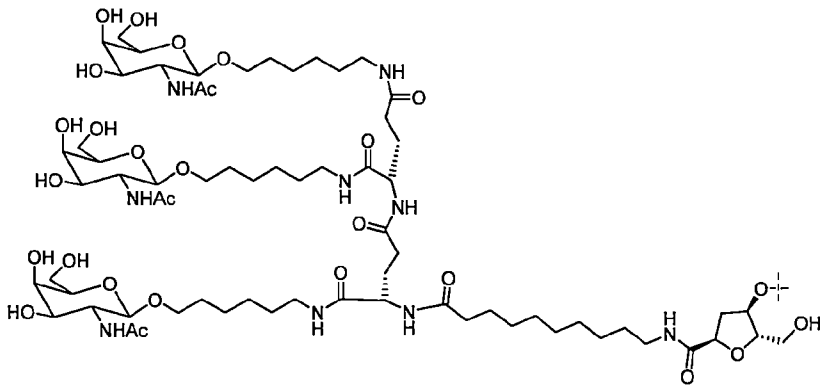
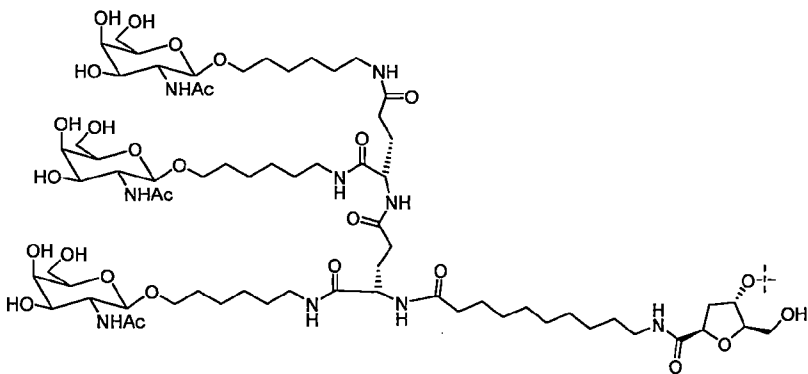


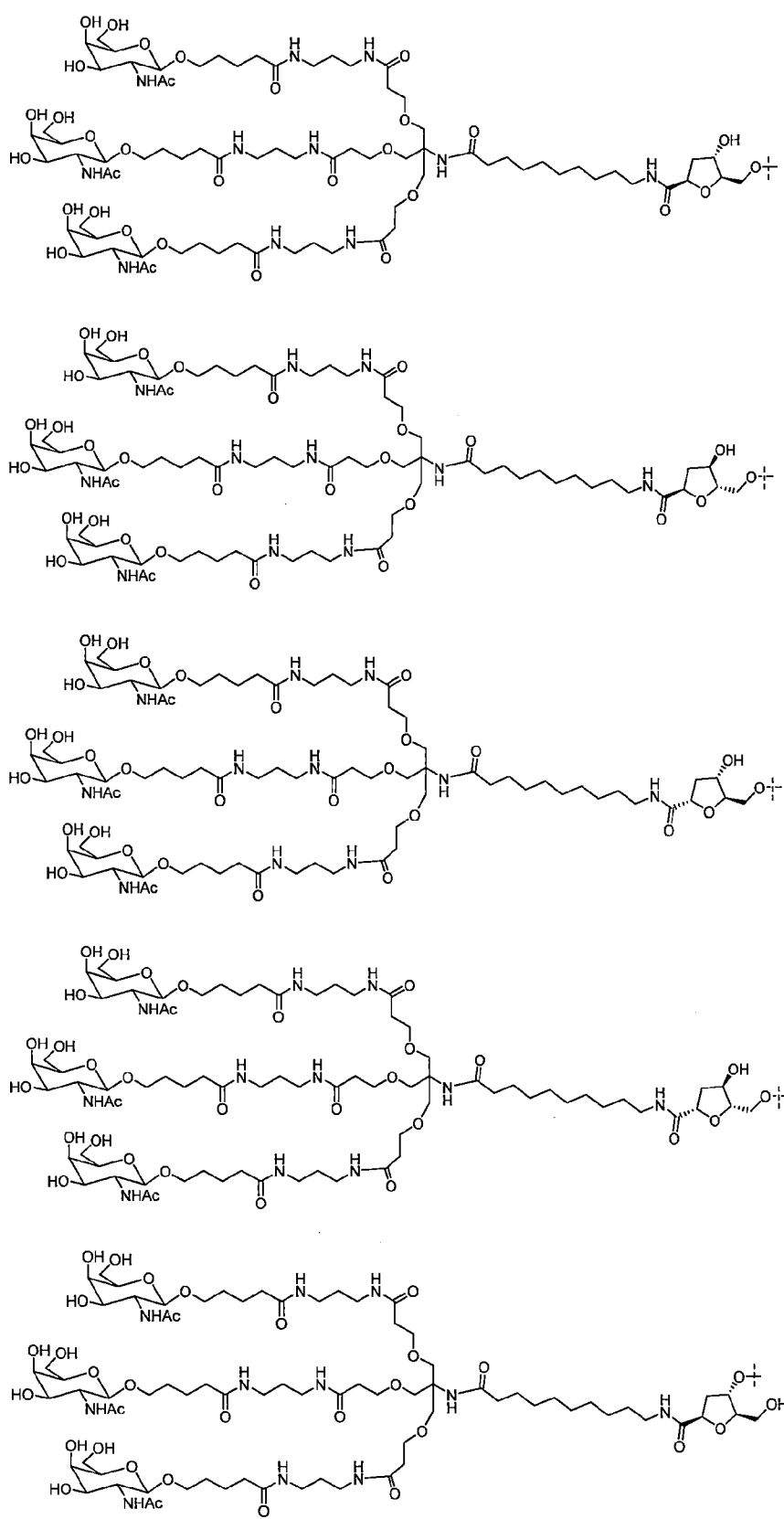


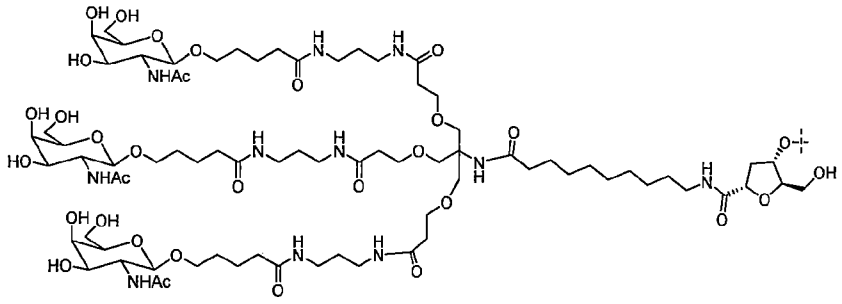
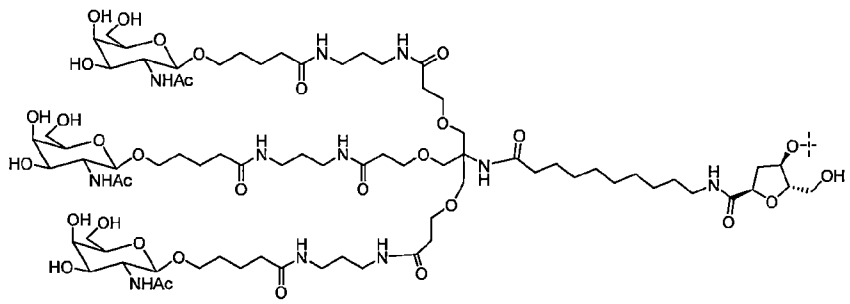




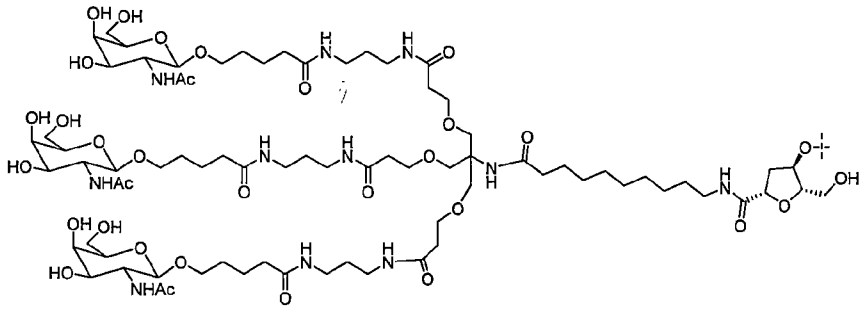




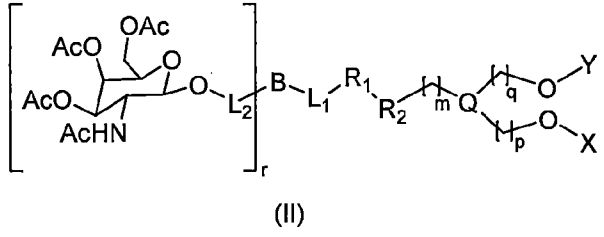




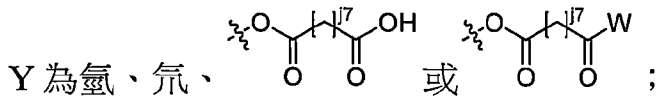
或



【請求項17】 一種如式 (II) 所示化合物，



其中，X 為羟基保護基，該羟基保護基較佳為酯基保護基、烷氧基甲基保護基、烷基保護基、矽烷基保護基或芳基保護基，更佳 MMTTr 和 DMTr，進一步佳 DMTr；

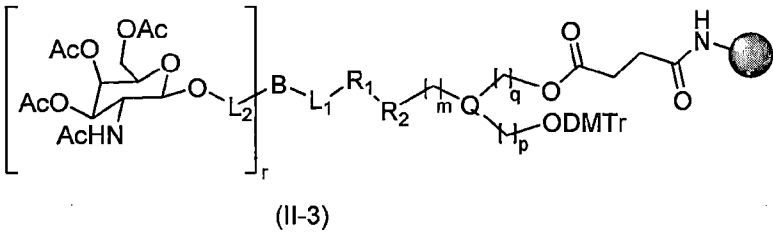
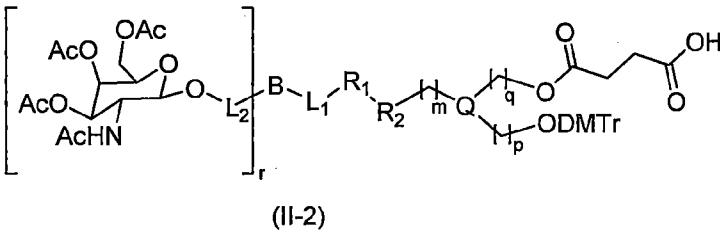
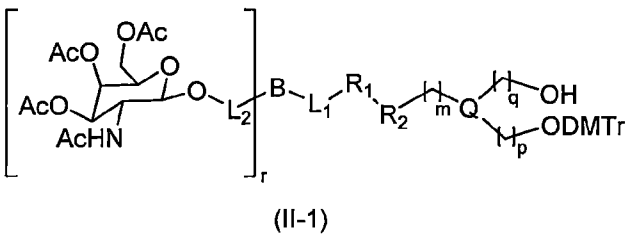


j7 為 1、2、3 或 4，較佳為 2；

W 為高分子化合物，較佳為樹脂，更佳大孔樹脂，進一步佳大孔胺甲基樹脂；

L₁、R₁、R₂、Q、B、L₂、m、p、q 和 r 的定義如請求項 1 至 16 中任一項所述。

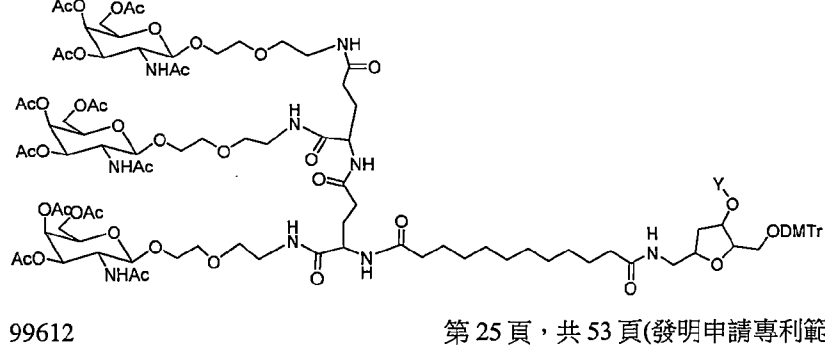
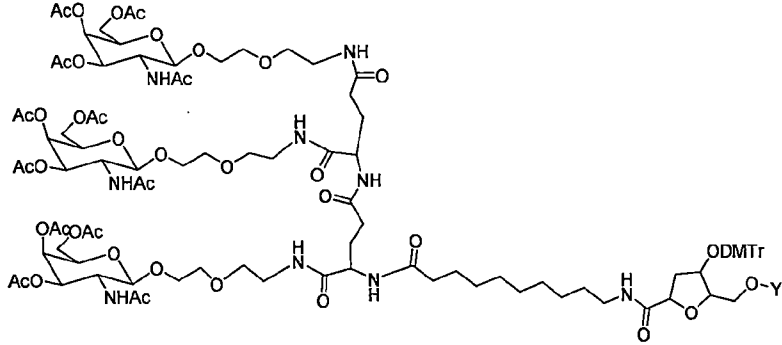
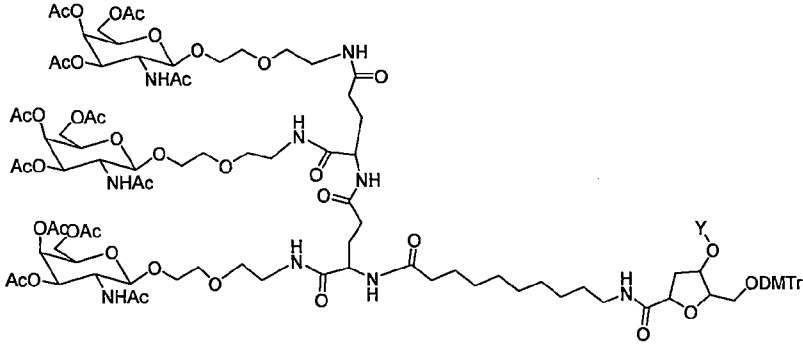
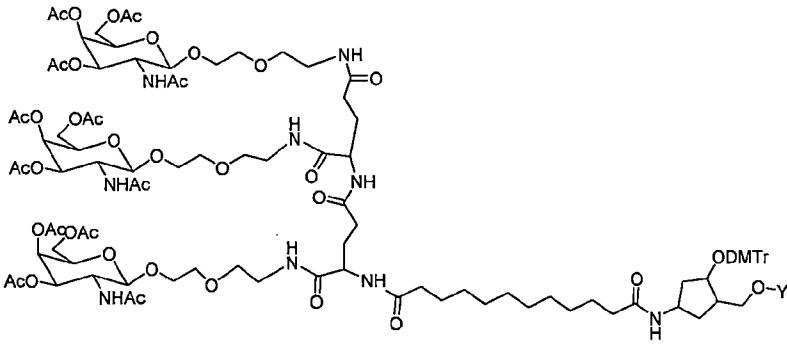
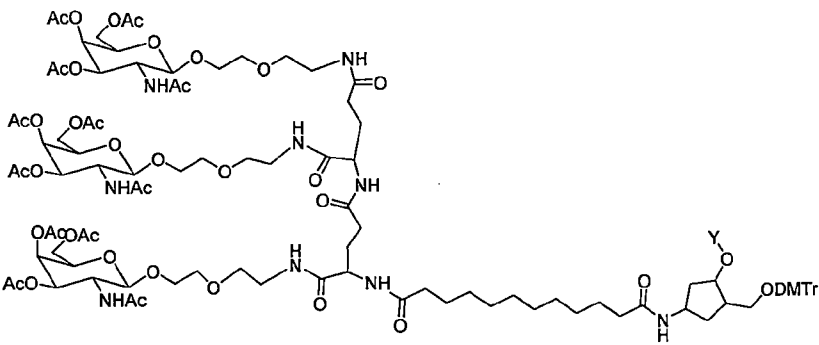
【請求項18】 如請求項 17 所述的化合物，其為以下式 (II-1)、(II-2) 或 (II-3) 所示化合物，

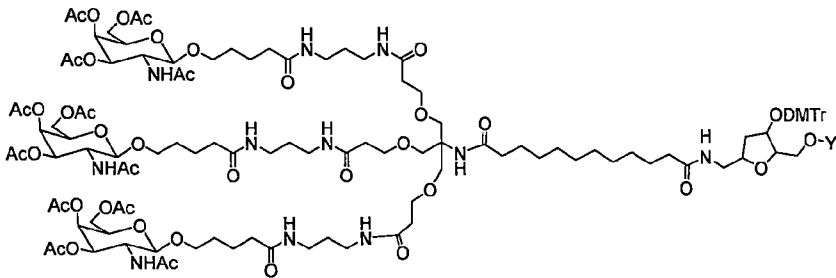
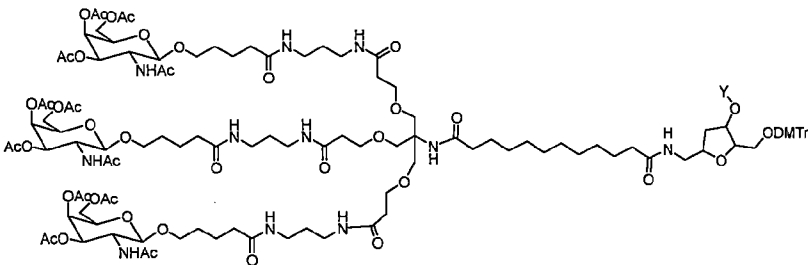
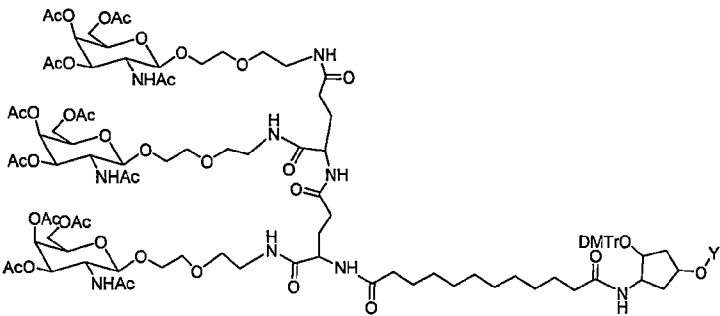
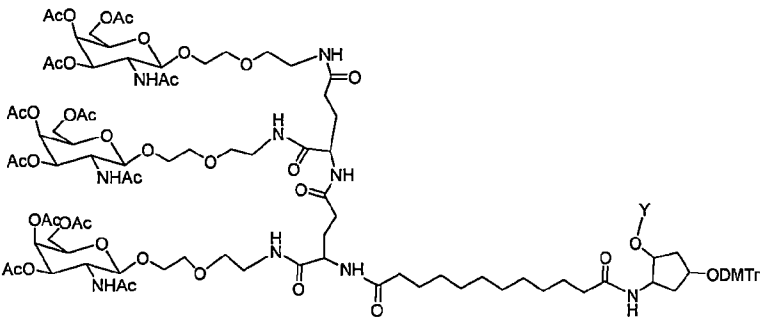
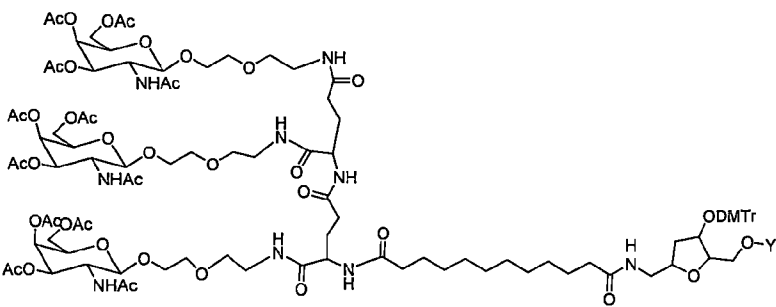


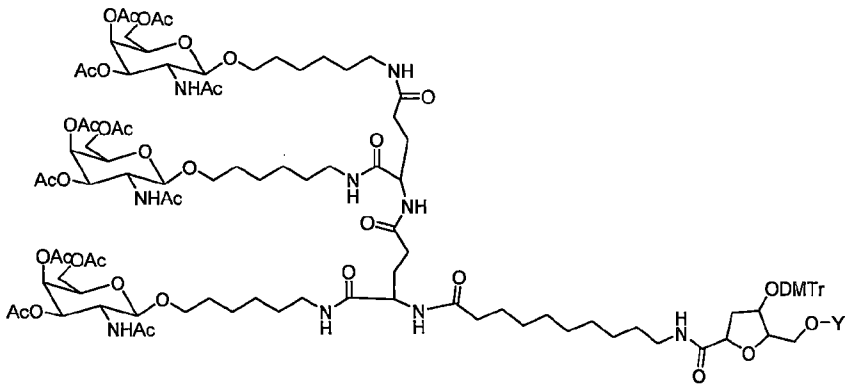
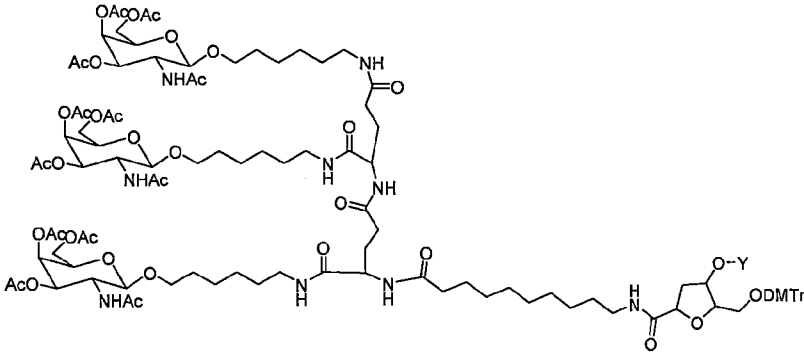
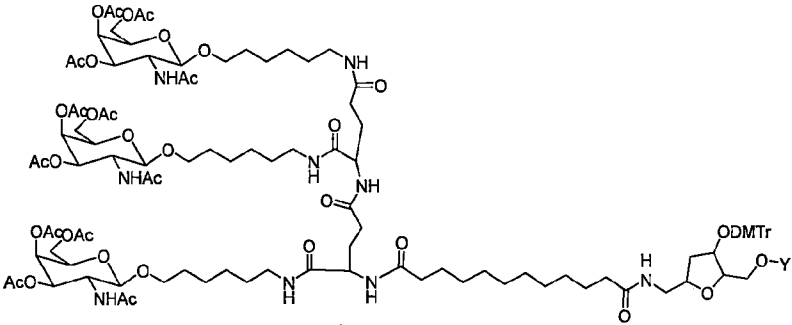
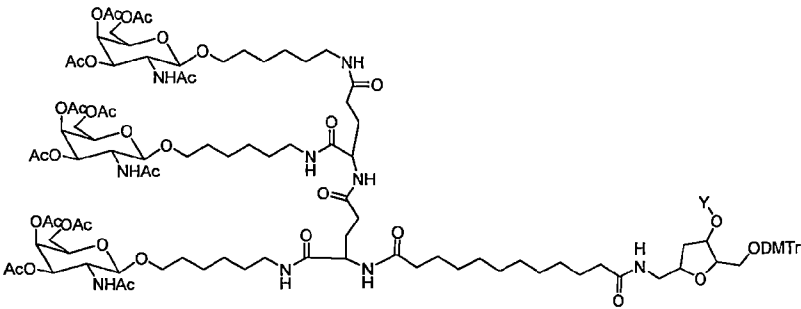
其中，●為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂，

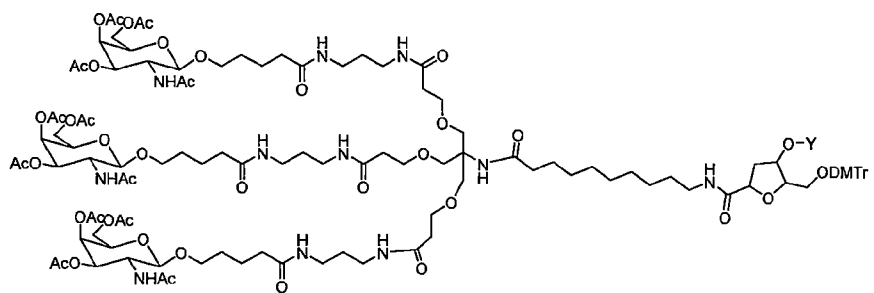
L₁、R₁、R₂、B、L₂、m、p、q 和 r 的定義如請求項 1 至 16 中任一項所述。

【請求項19】 如請求項 17 或 18 所述的化合物，其為以下任一結構，

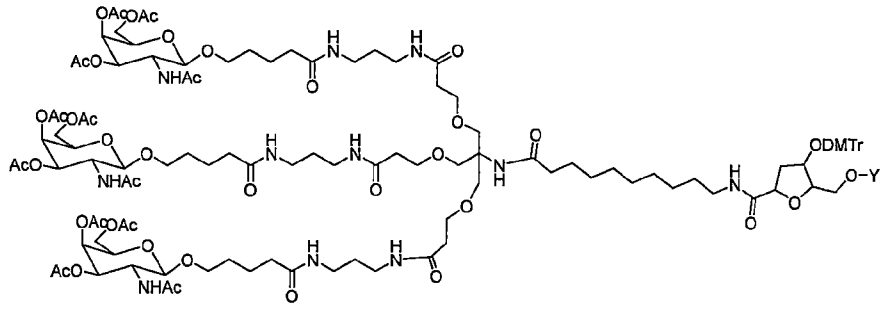








或

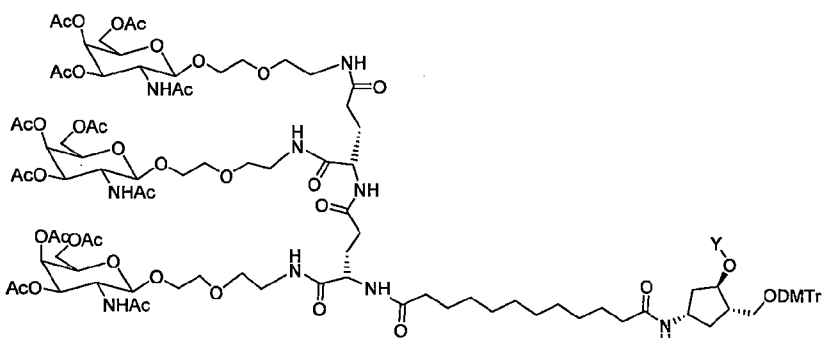
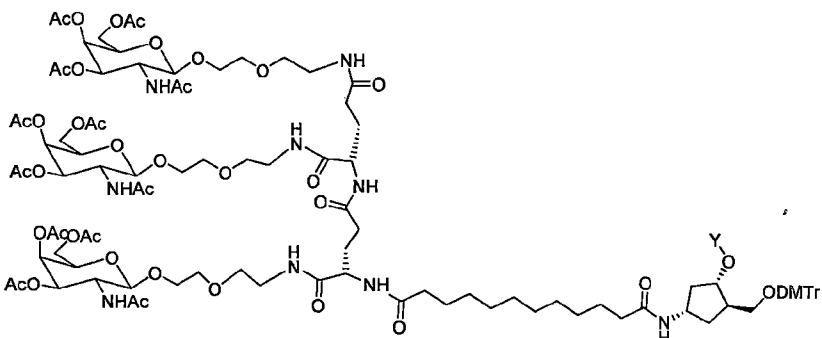
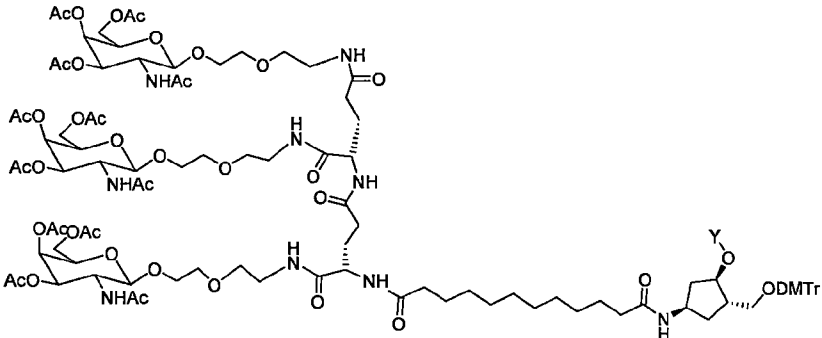
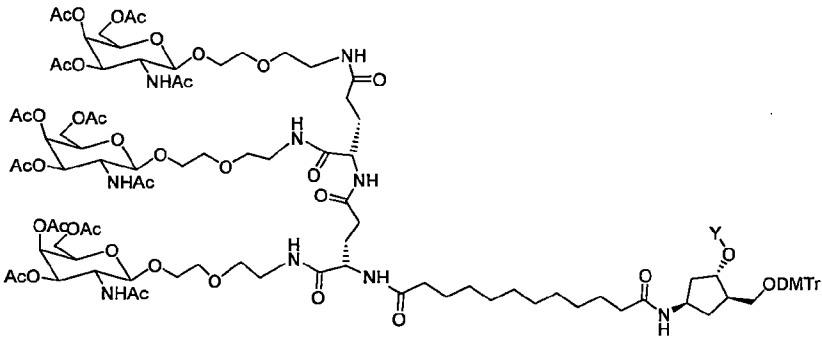


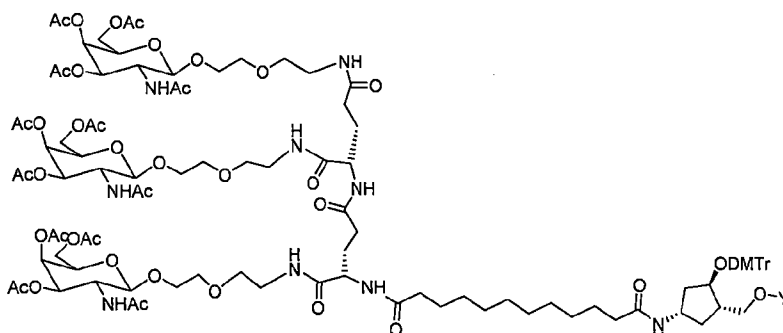
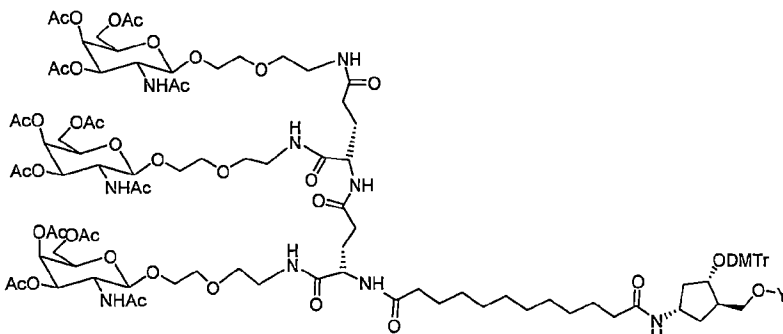
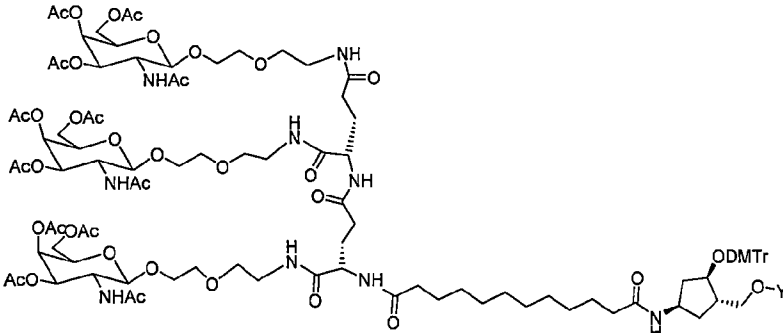
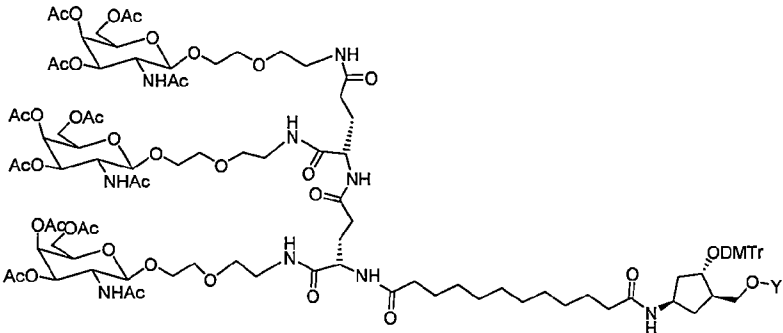
;

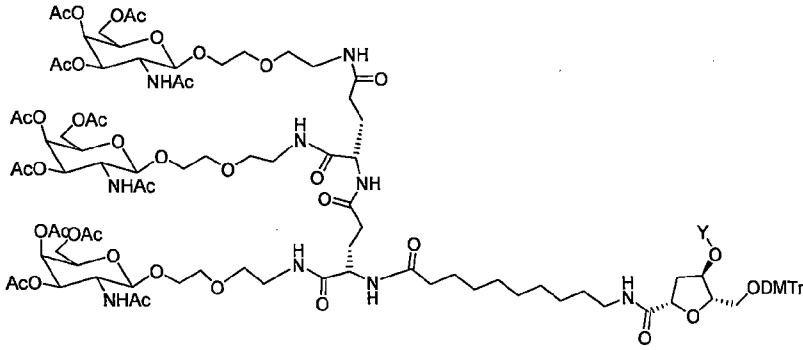
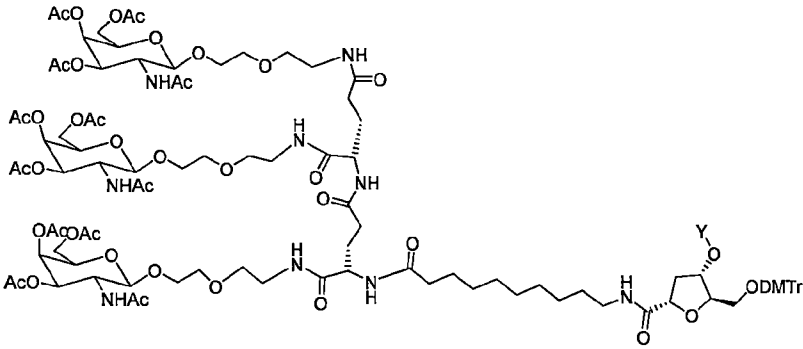
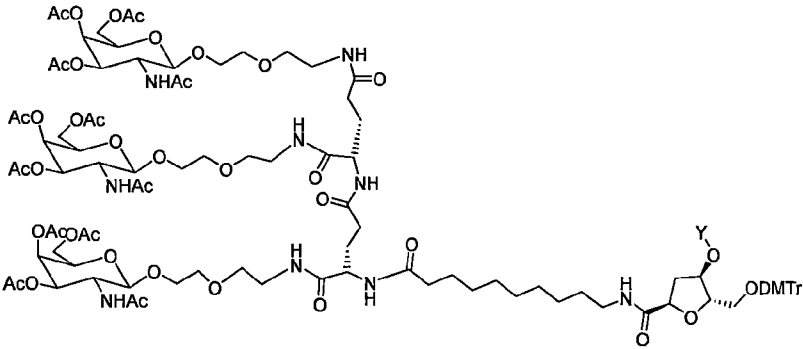
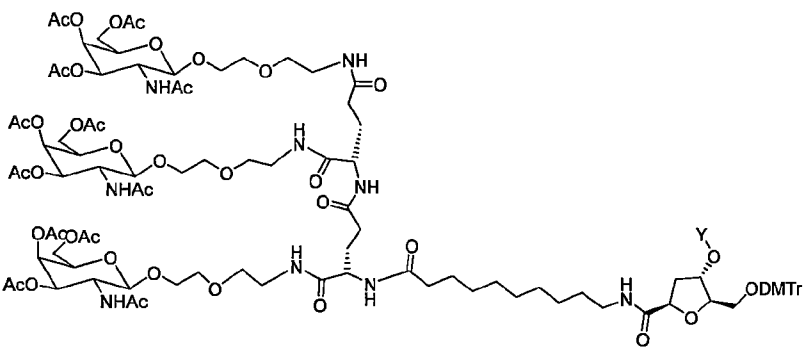
其中，Y 為氫或 ;

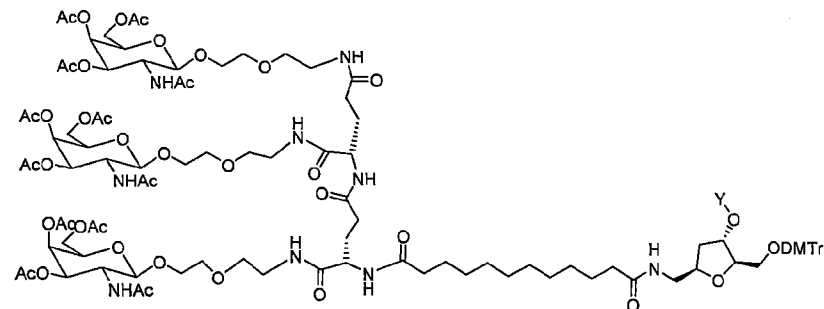
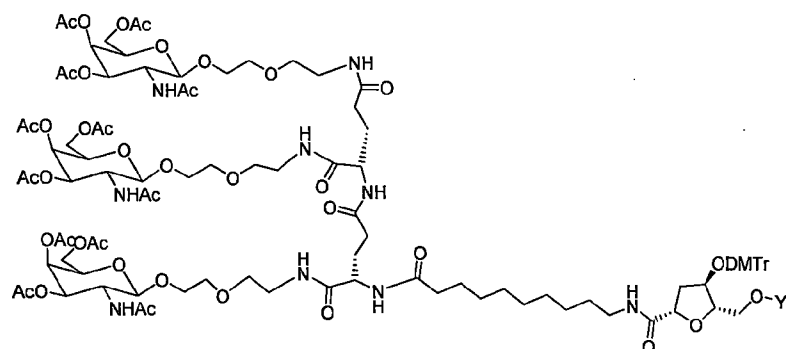
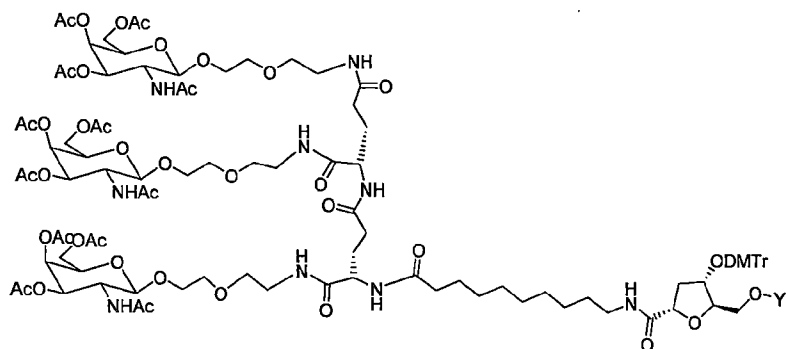
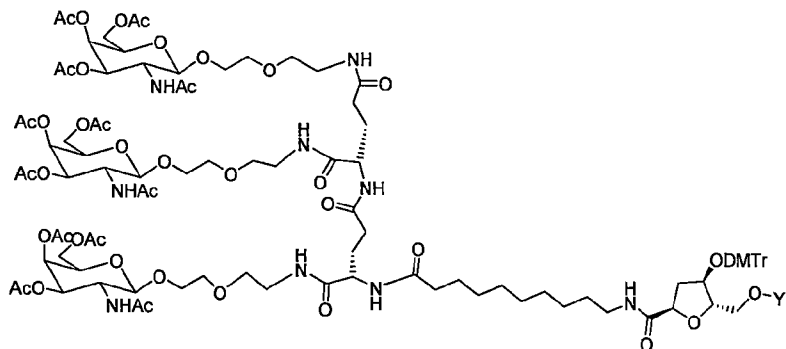
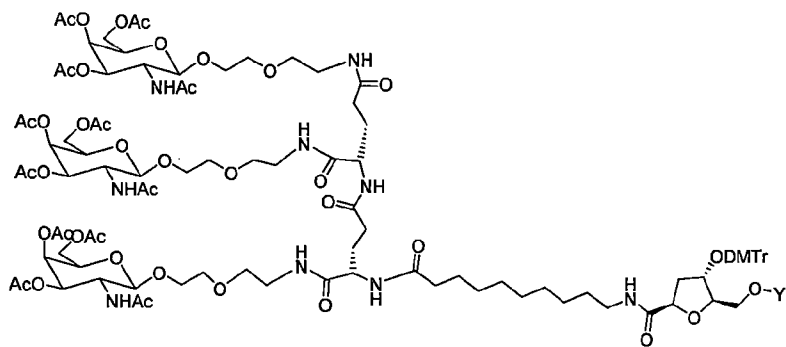
或者，Y 為 , 為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂。

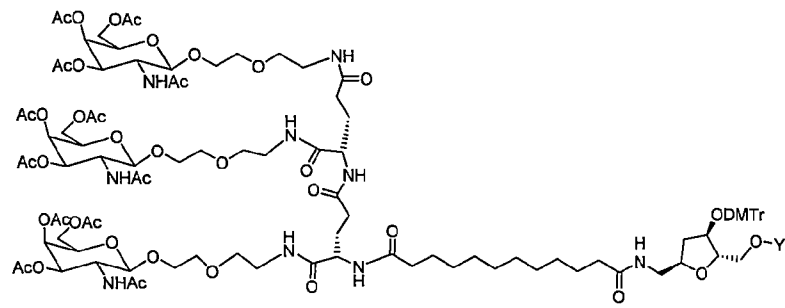
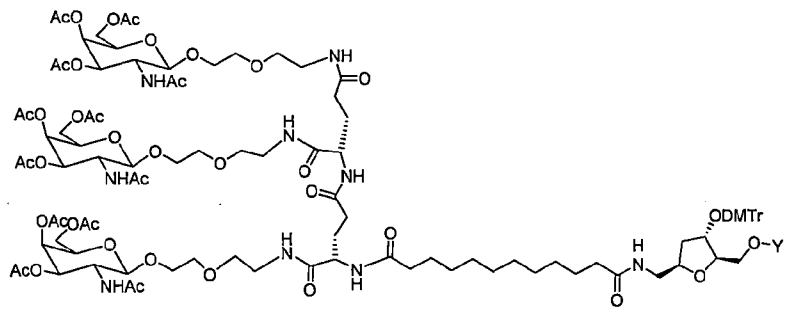
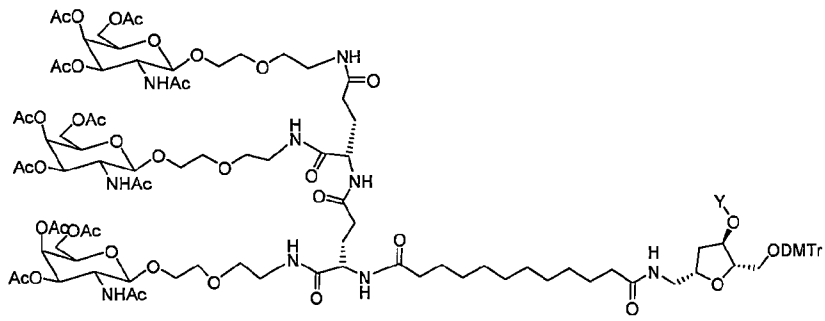
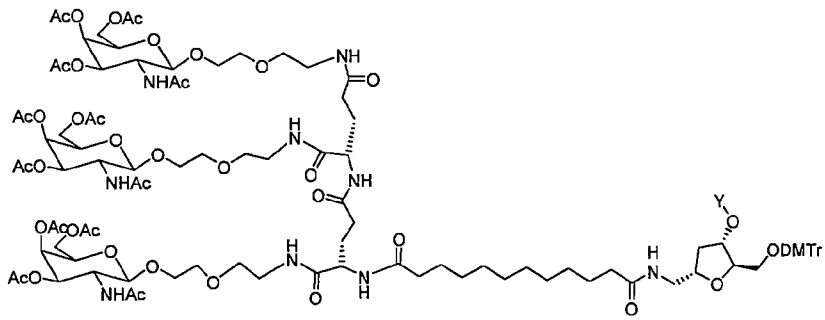
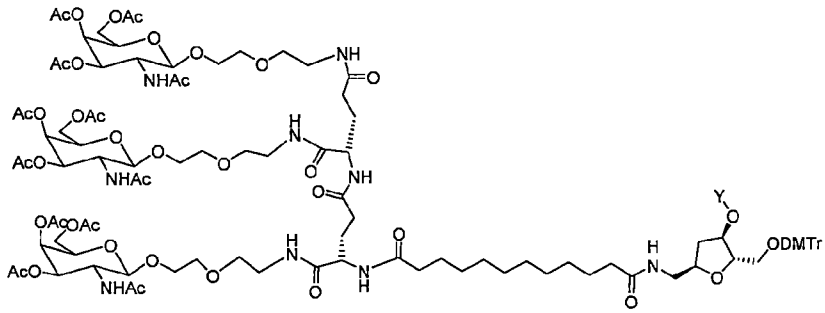
【請求項20】 如請求項 17 至 19 中任一項所述的化合物，其為以下任一結構，

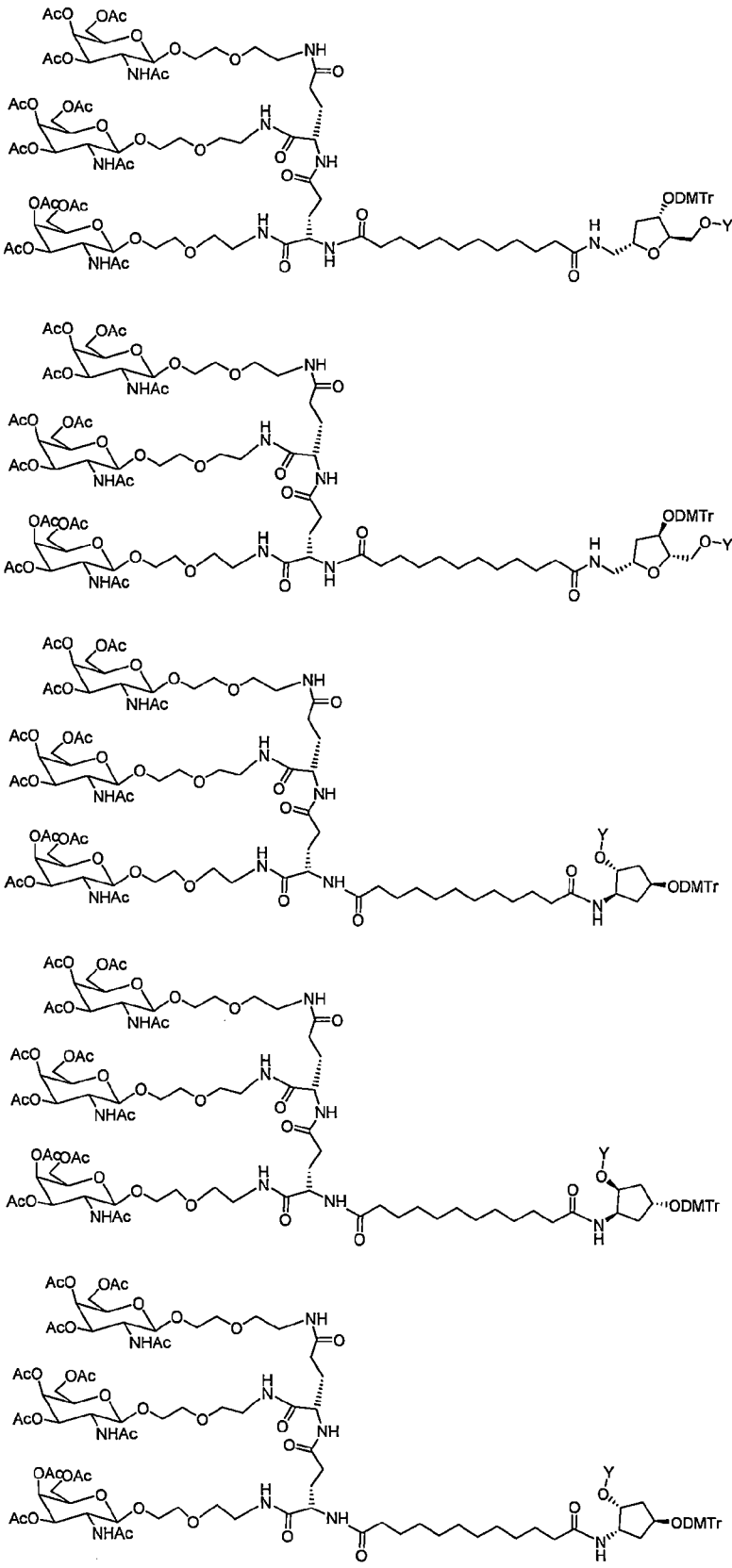


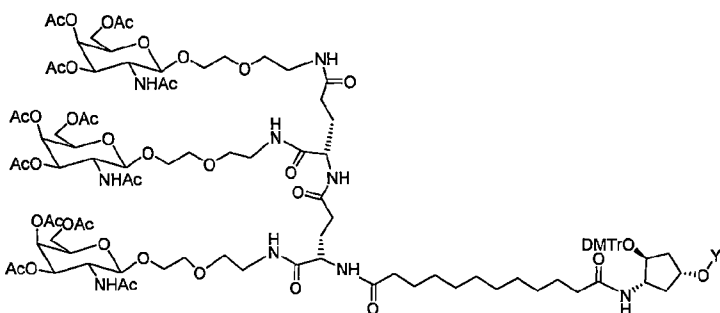
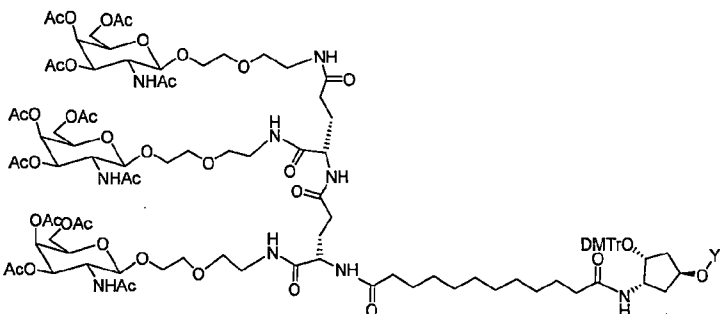
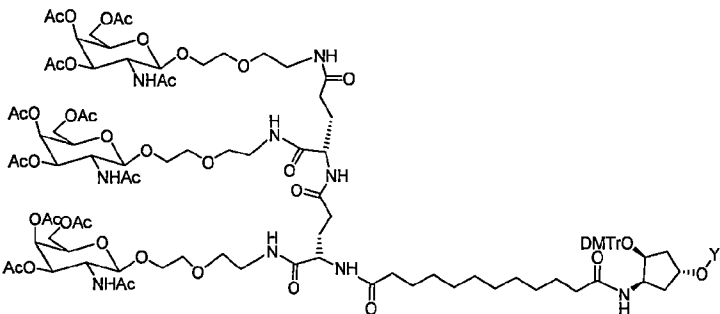
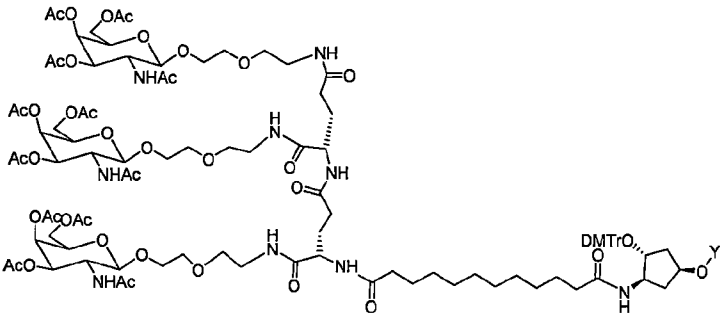
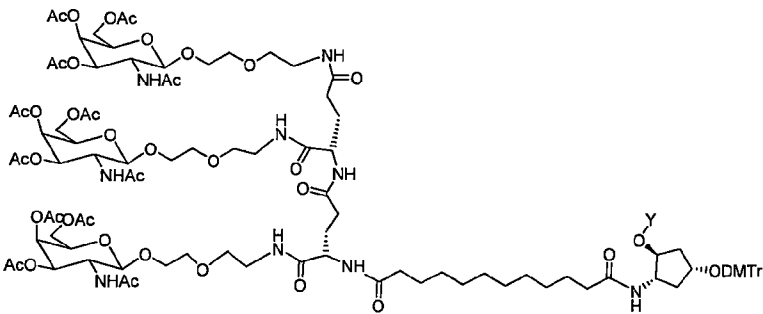


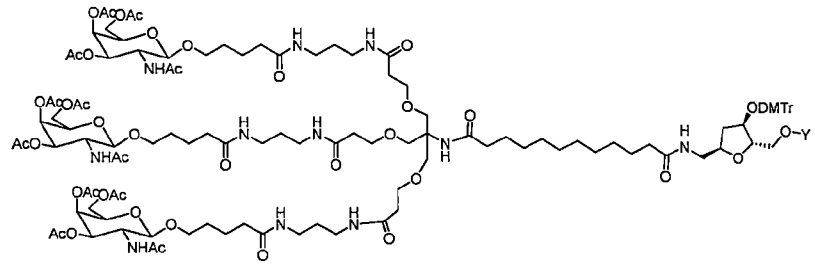


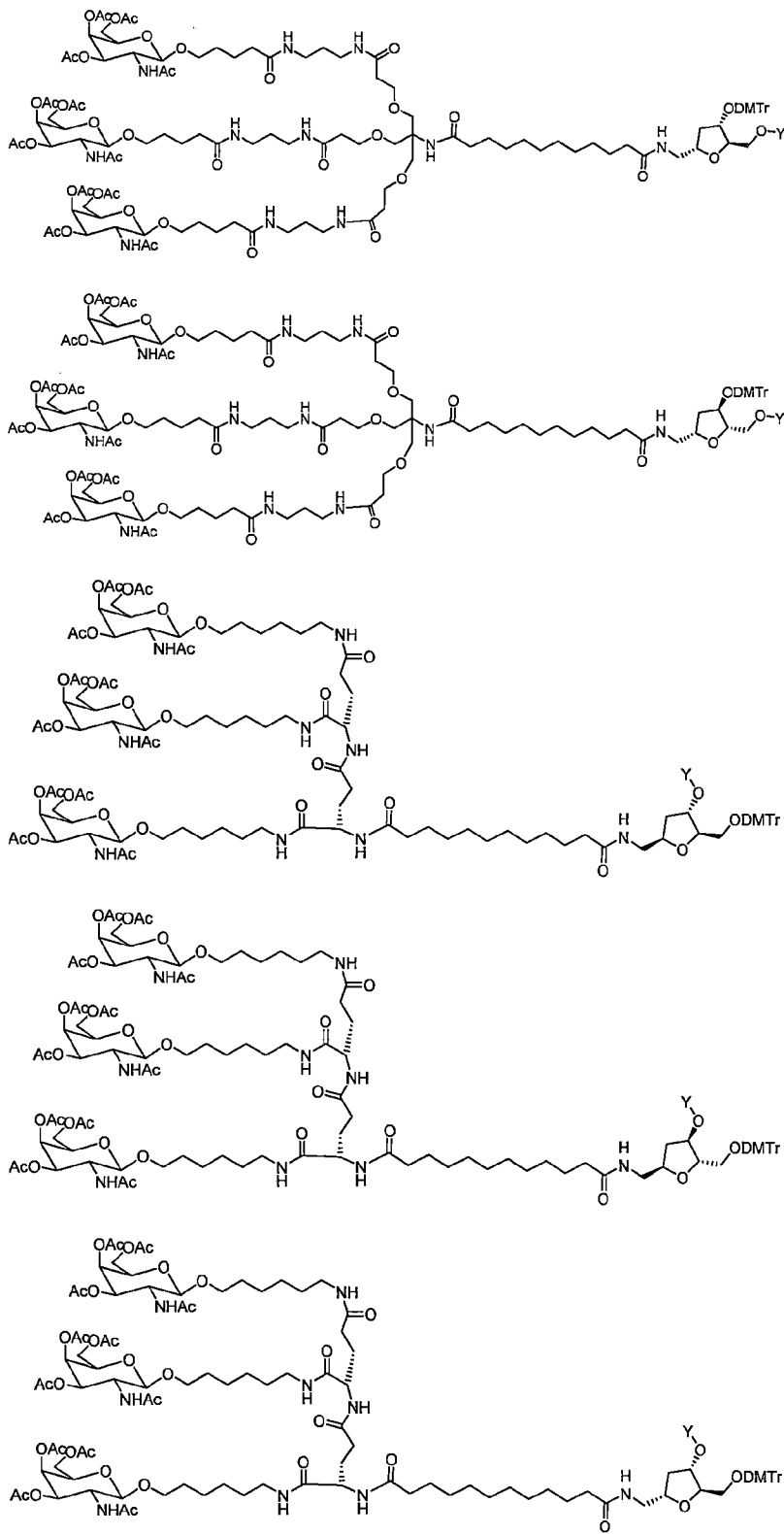


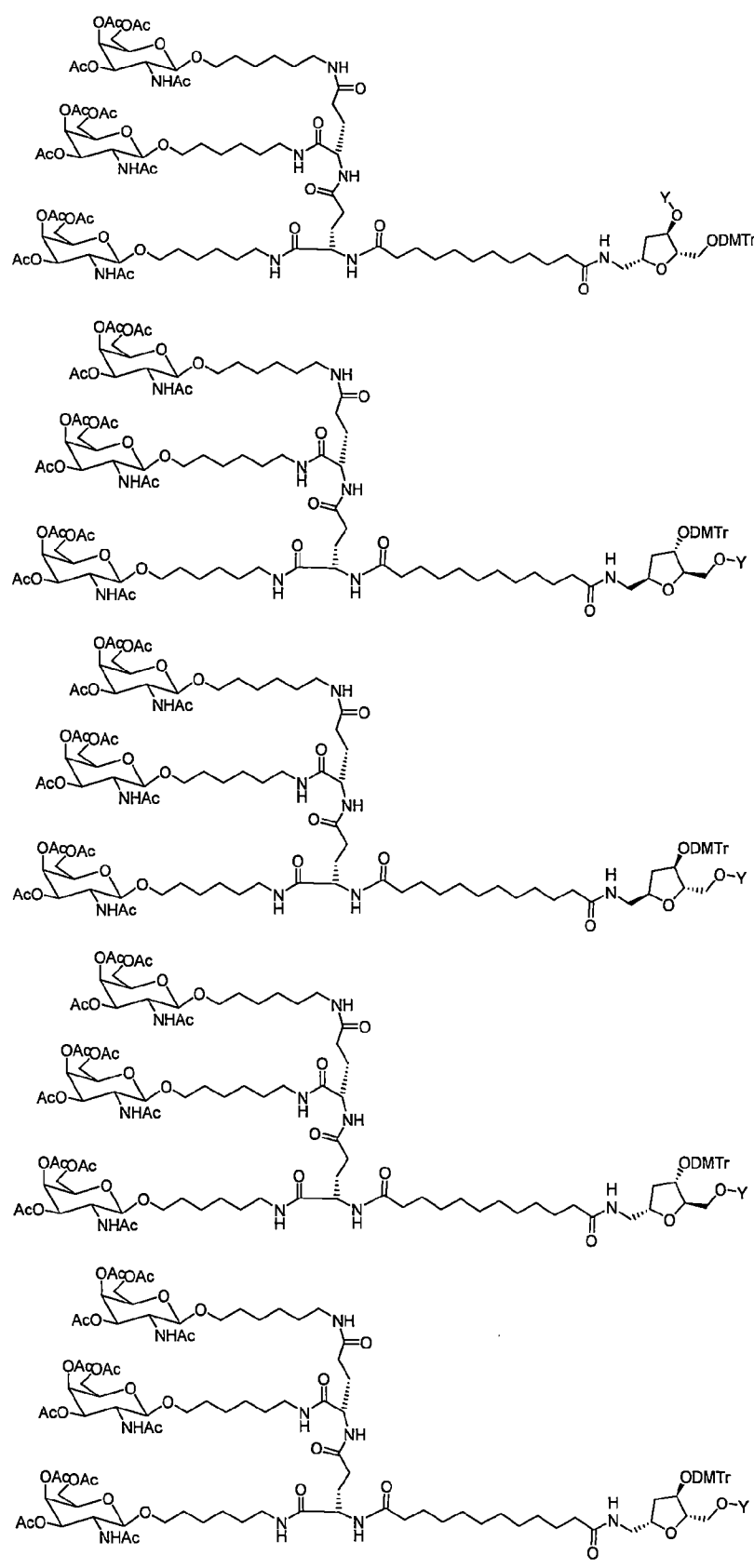


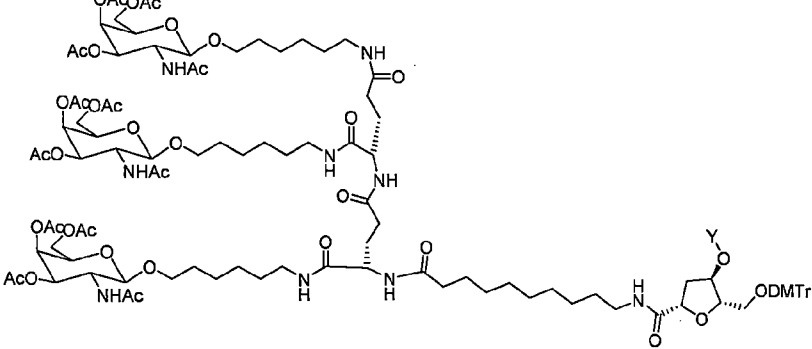
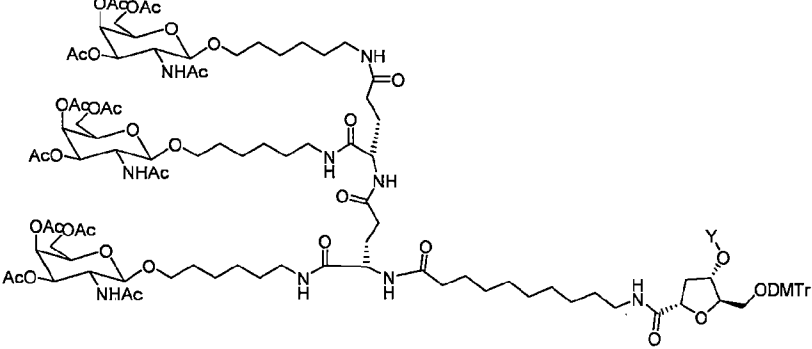
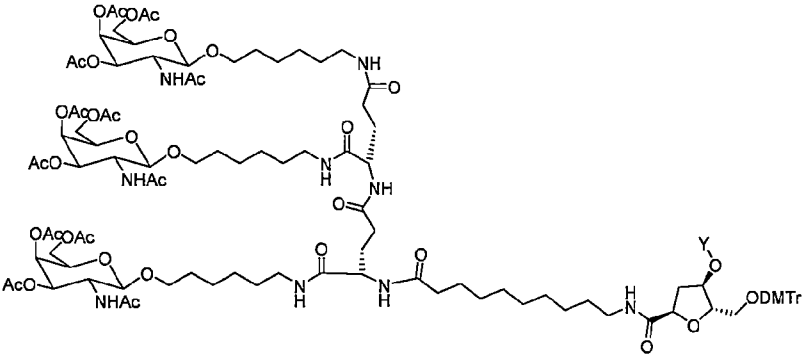
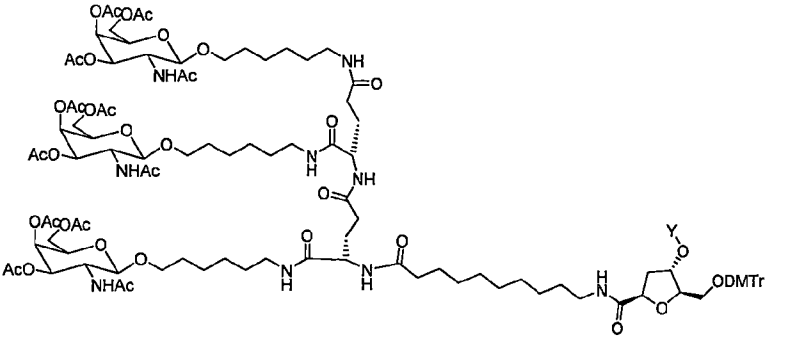


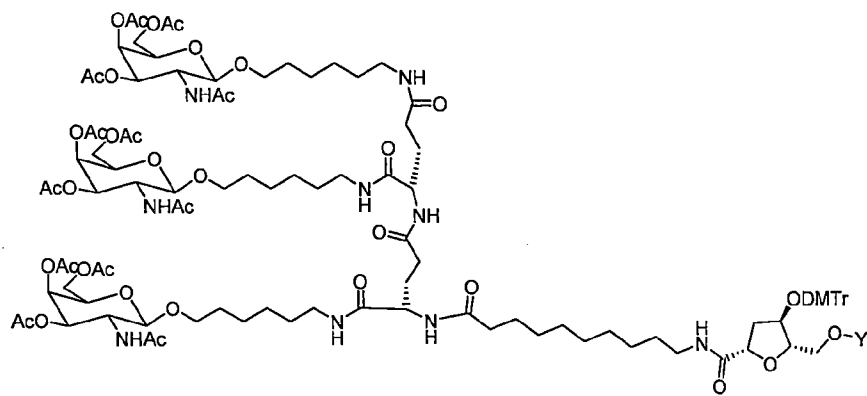
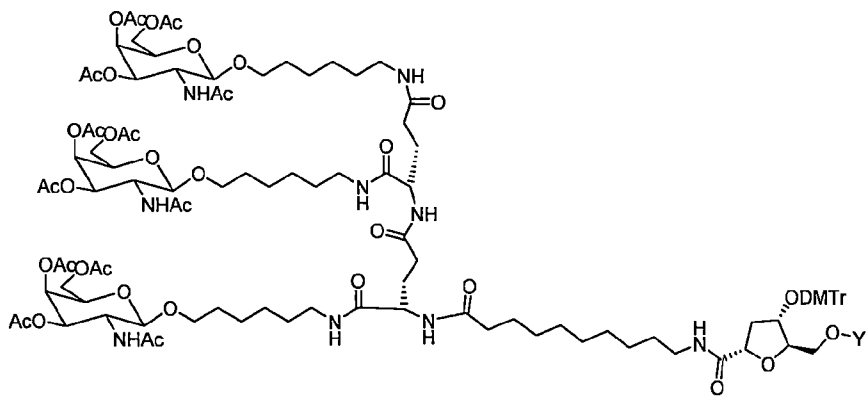
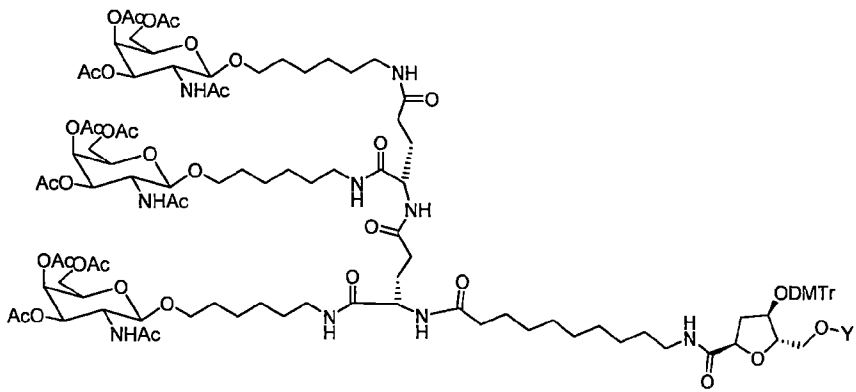
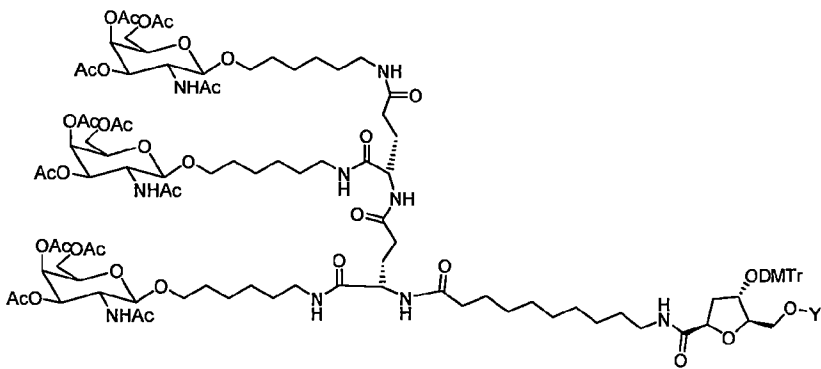


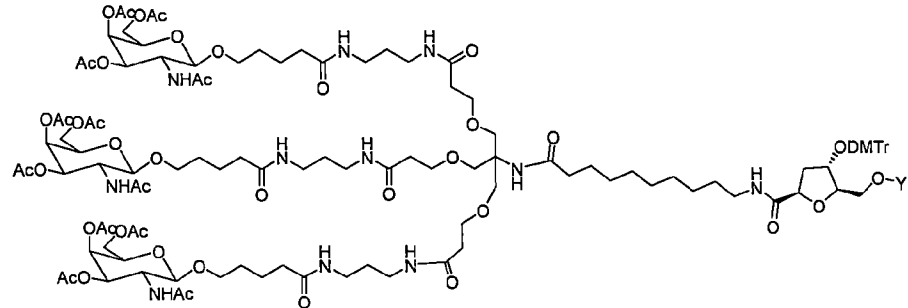
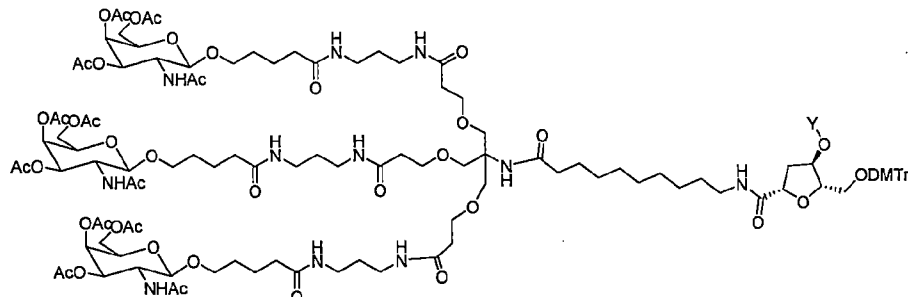
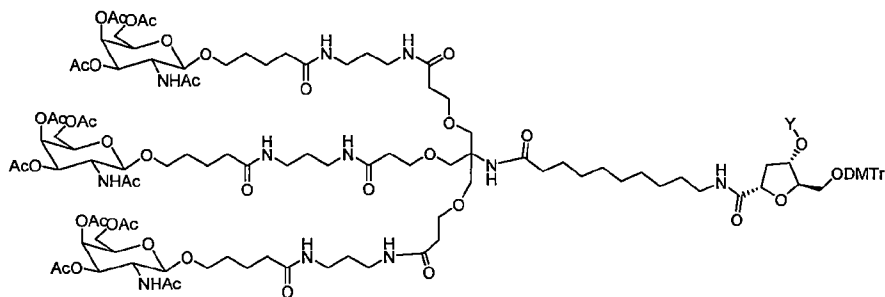
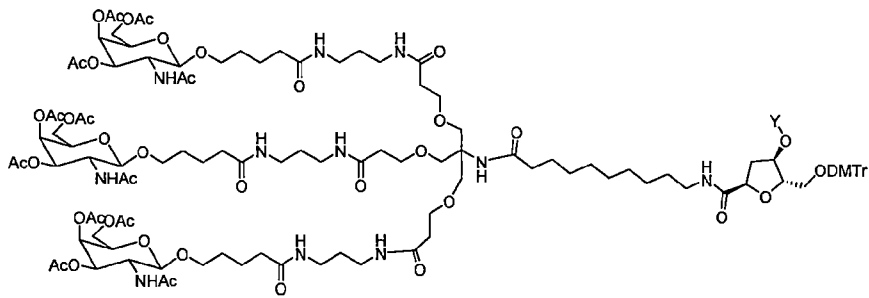
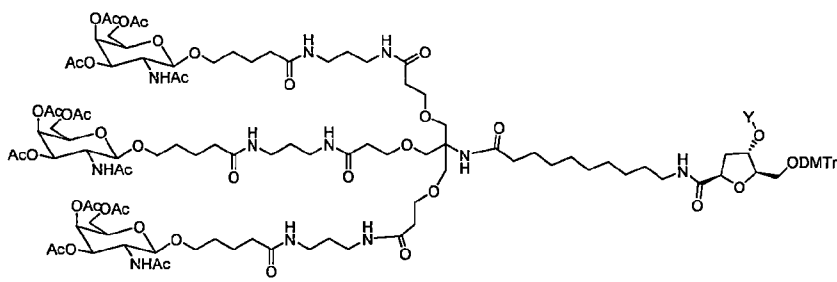


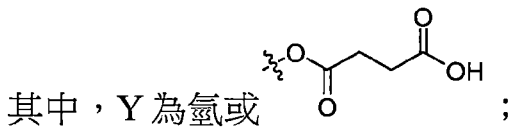
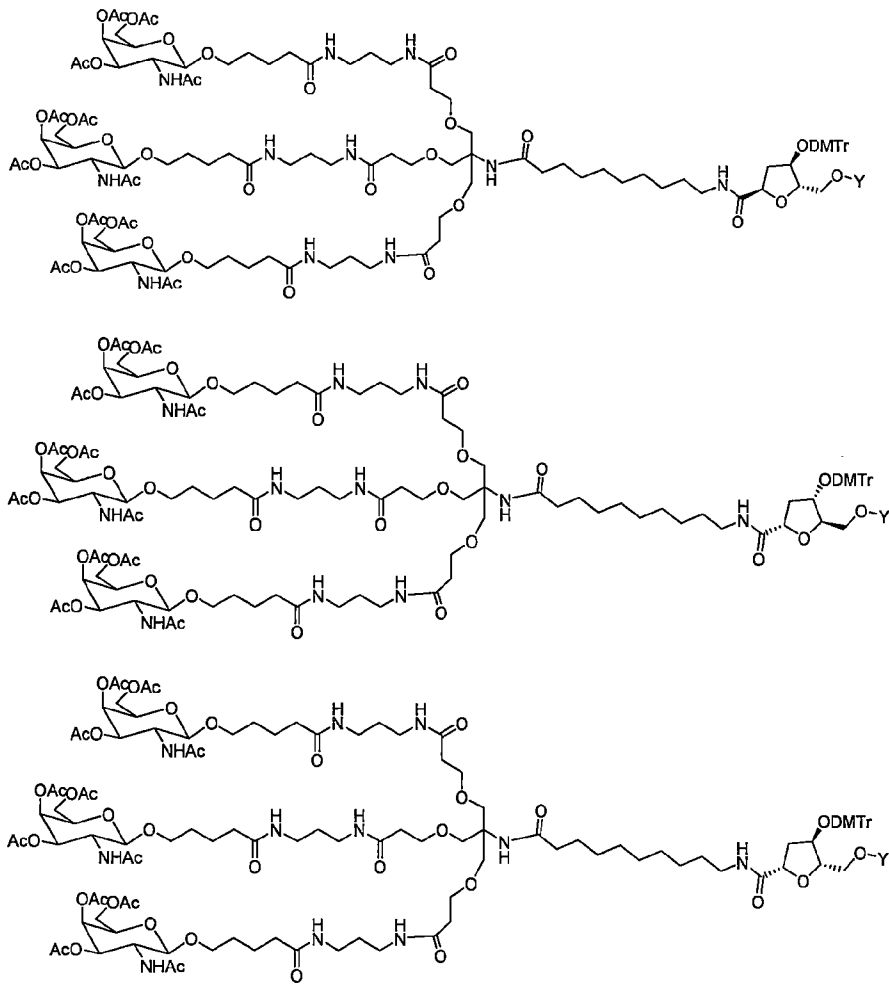












或者，Y 為 ， 為樹脂，較佳大孔樹脂，更佳大孔胺甲基樹脂。

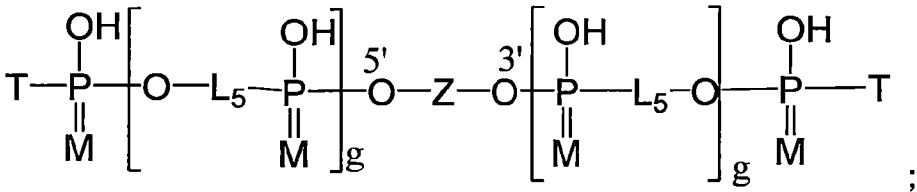
【請求項21】 一種核酸配體綴合物，其包含核酸和一個或多個如請求項 1 至 16 中任一項所述的配體，該配體與核酸末端綴合，該配體相同或不同。

【請求項22】 如請求項 21 所述的核酸配體綴合物，其中，該核酸與該配體藉由磷酸酯基團、硫代磷酸酯基團或磷酸基團連接；

和/或，該核酸的 3'端與配體綴合；

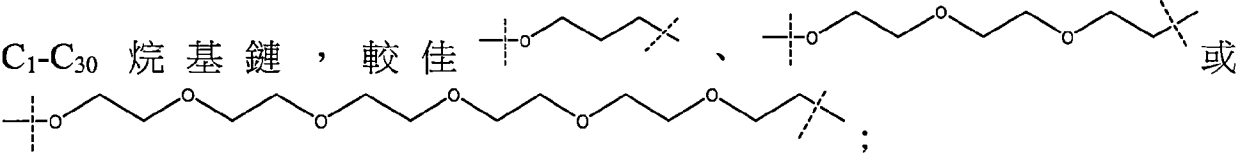
和/或，該核酸為單鏈核酸，較佳 siRNA 的正義鏈。

【請求項23】 如請求項 21 或 22 所述的核酸配體綴合物，其中，該核酸配體綴合物為以下結構或其藥學上可接受的鹽：



其中，T 為如請求項 1 至 16 中任一項所述的配體，T 各自相同或不同；

L₅ 獨立地為 C₁-C₃₀ 烷基鏈、或被一個或多個氧、硫、氮原子或 C=O 間斷的

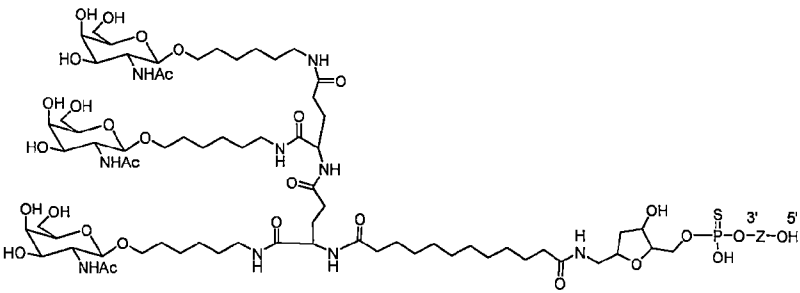
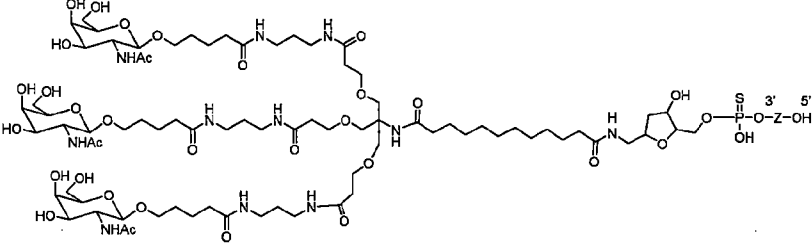
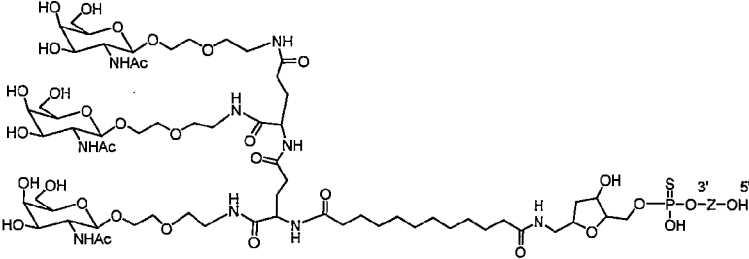
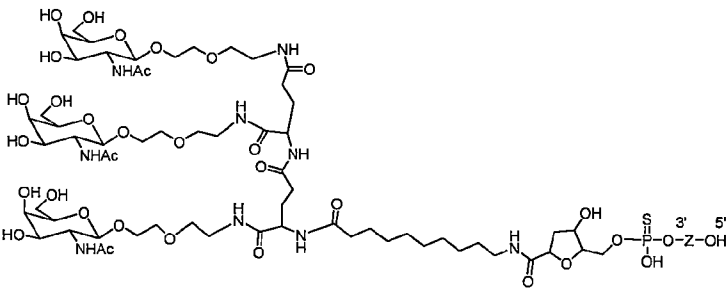
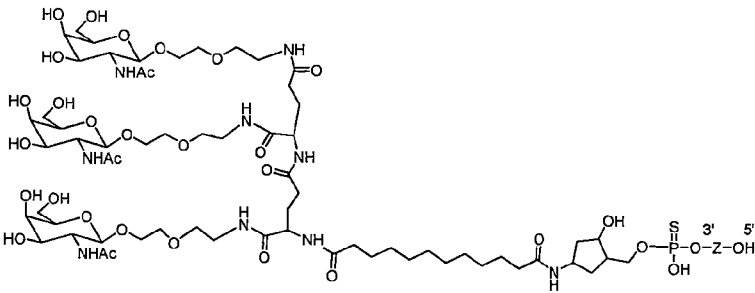


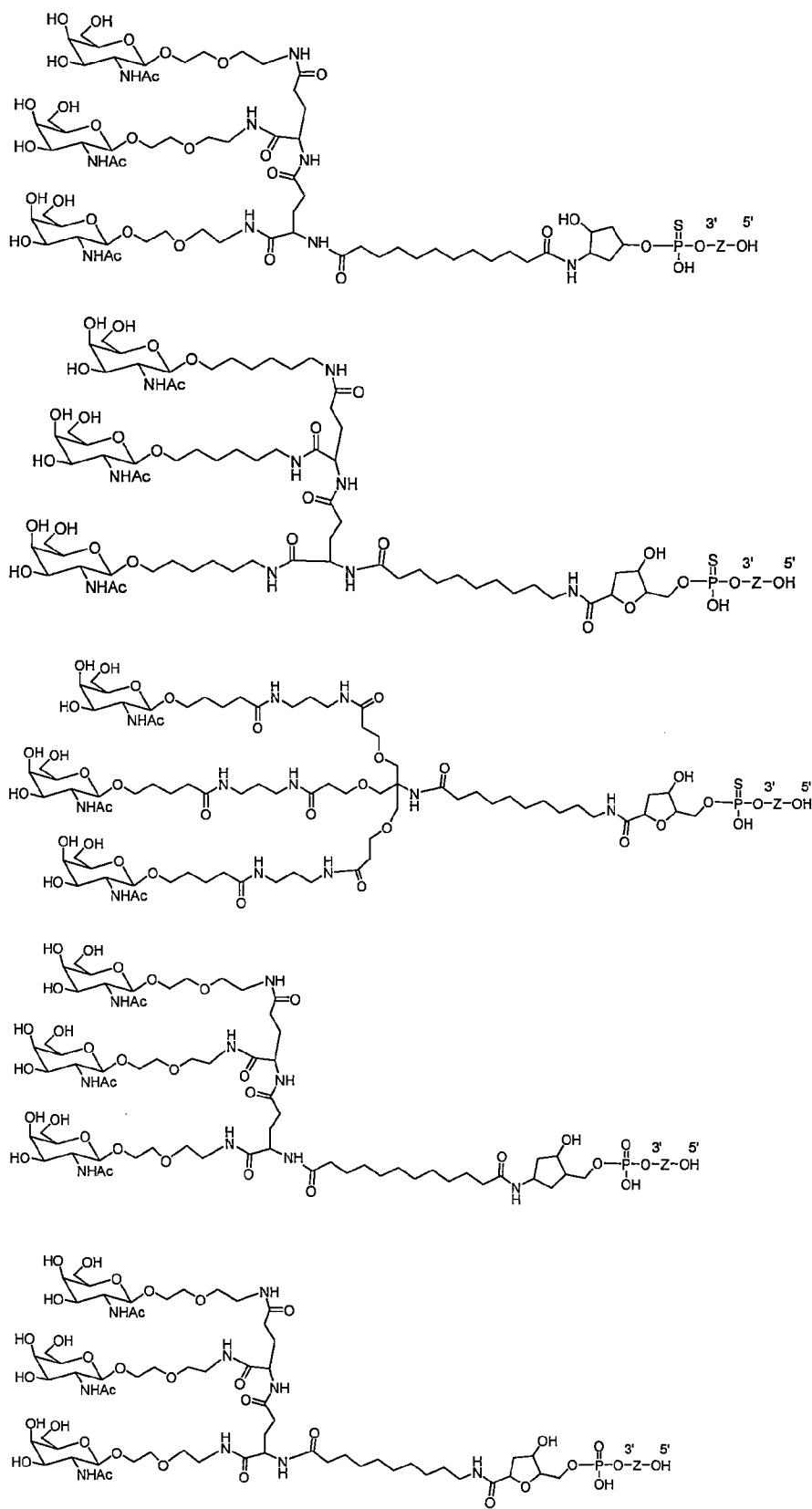
M 獨立地為 O 或 S；

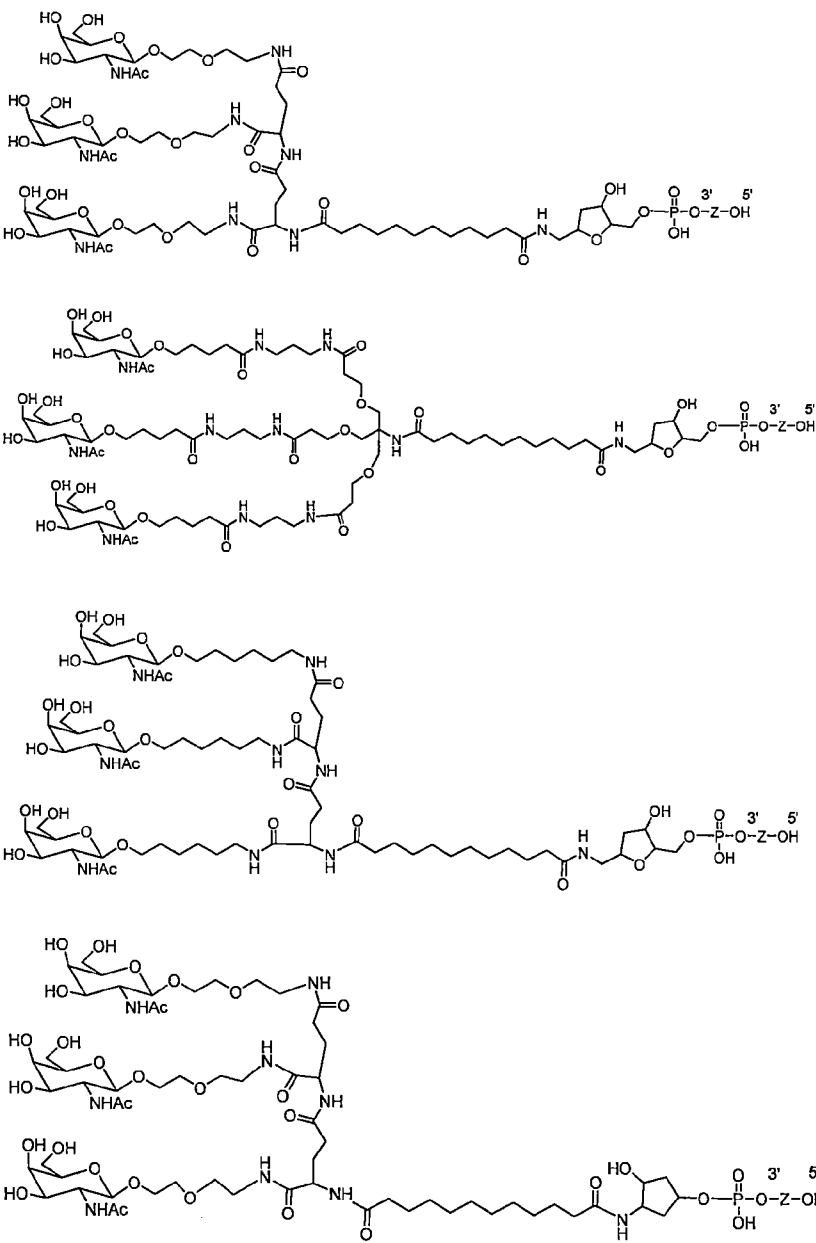
g 獨立地為 0-4 的整數，較佳 0 或 1，更佳 0；

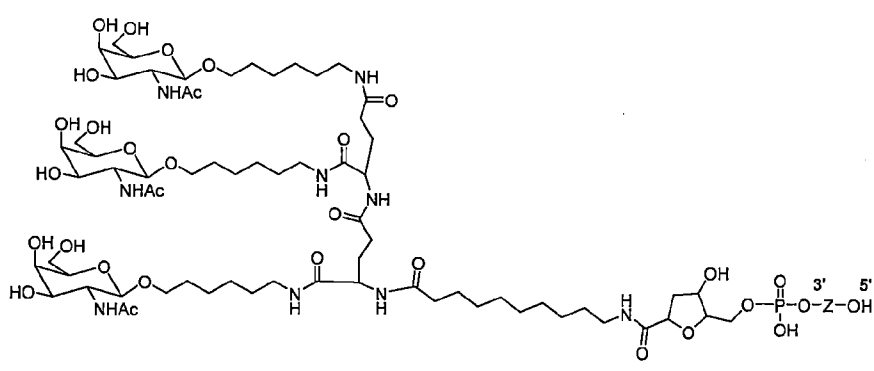
$\overset{5'}{\text{O}}-\text{Z}-\overset{3'}{\text{O}}$ 代表核酸。

【請求項24】 如請求項 21 至 23 中任一項所述的核酸配體綴合物，其中，該核酸配體綴合物為以下任一結構或其藥學上可接受的鹽，

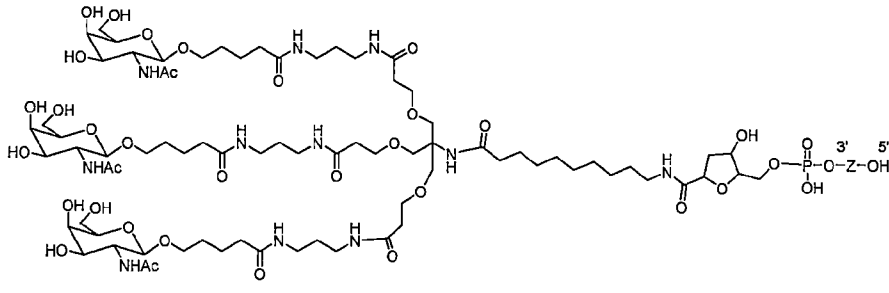




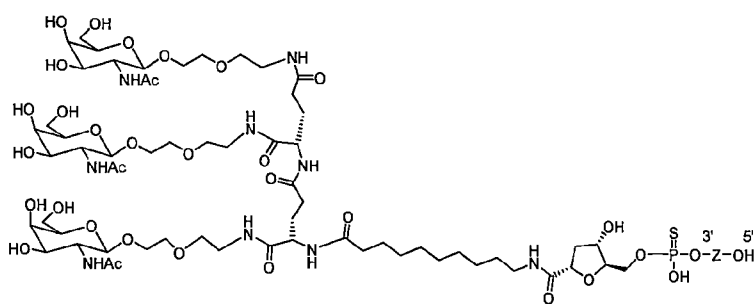
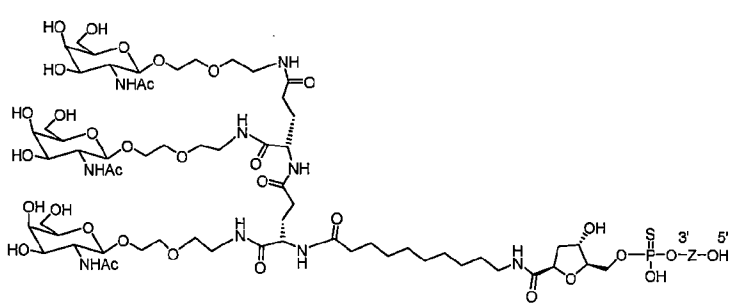
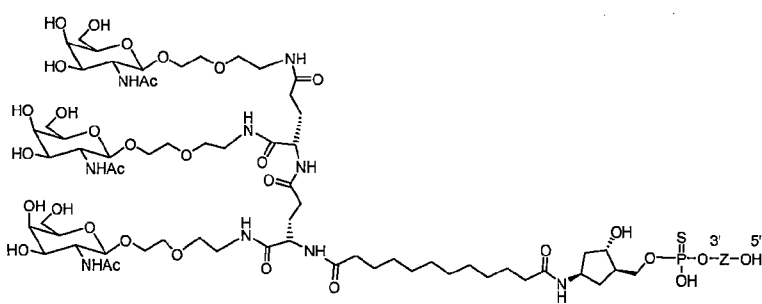


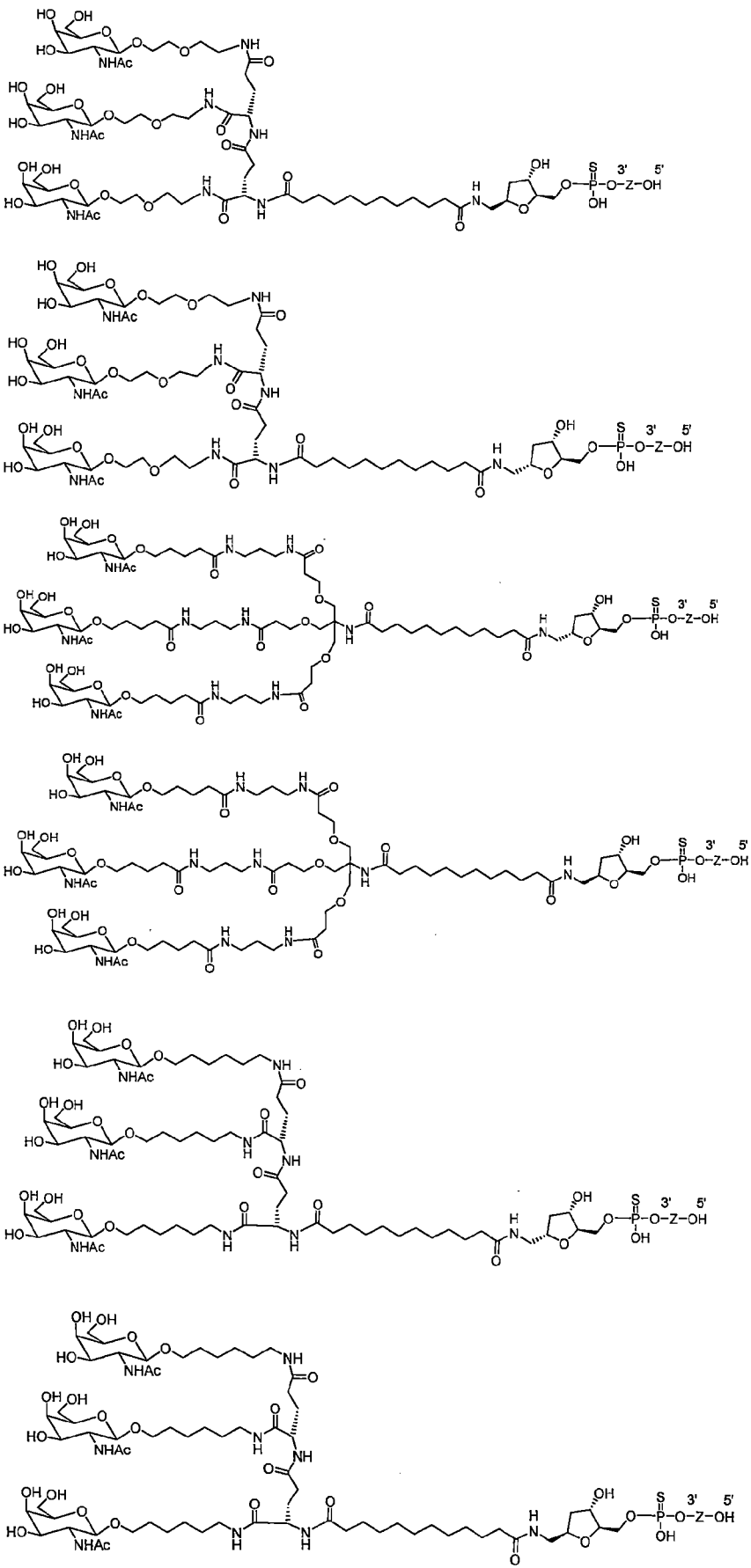


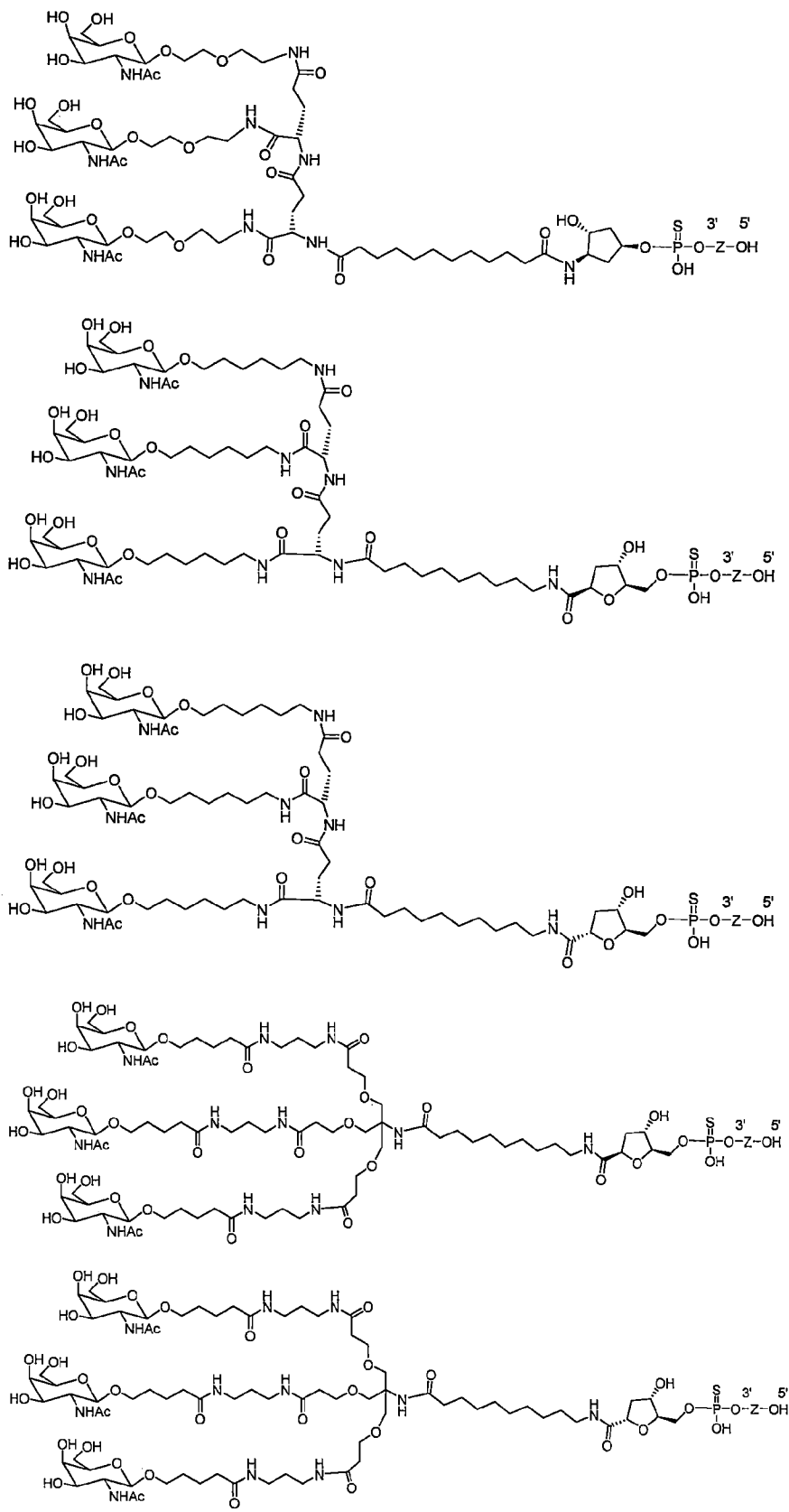
或

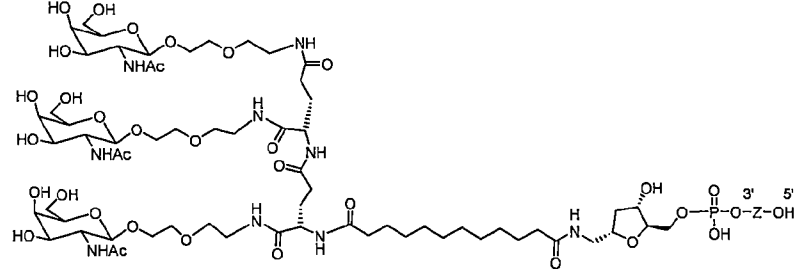
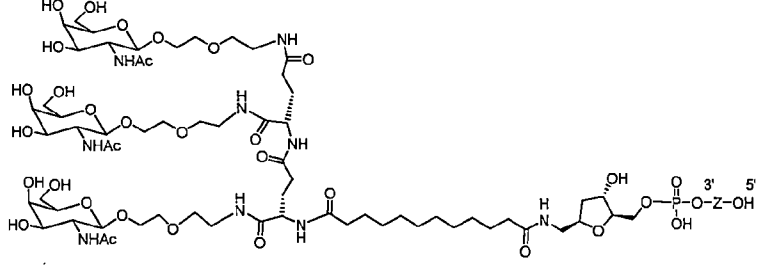
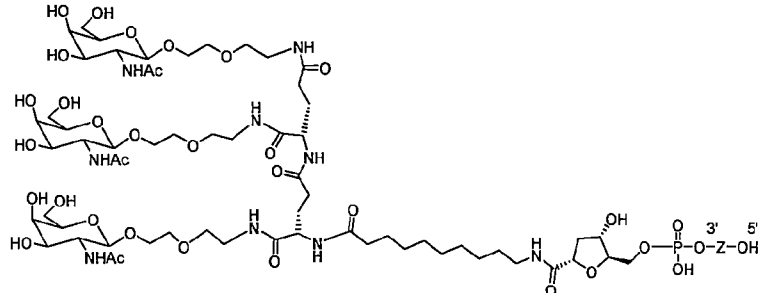
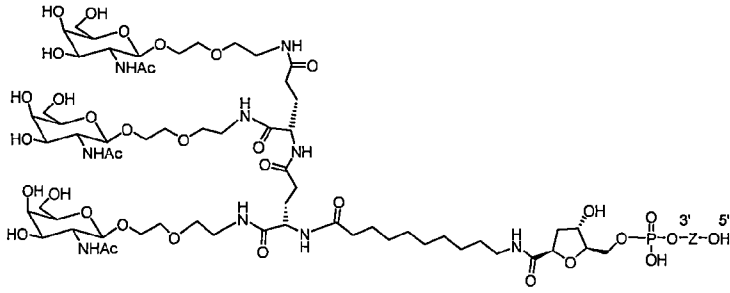
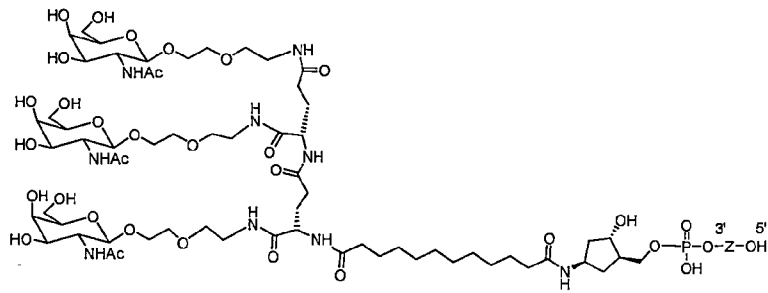


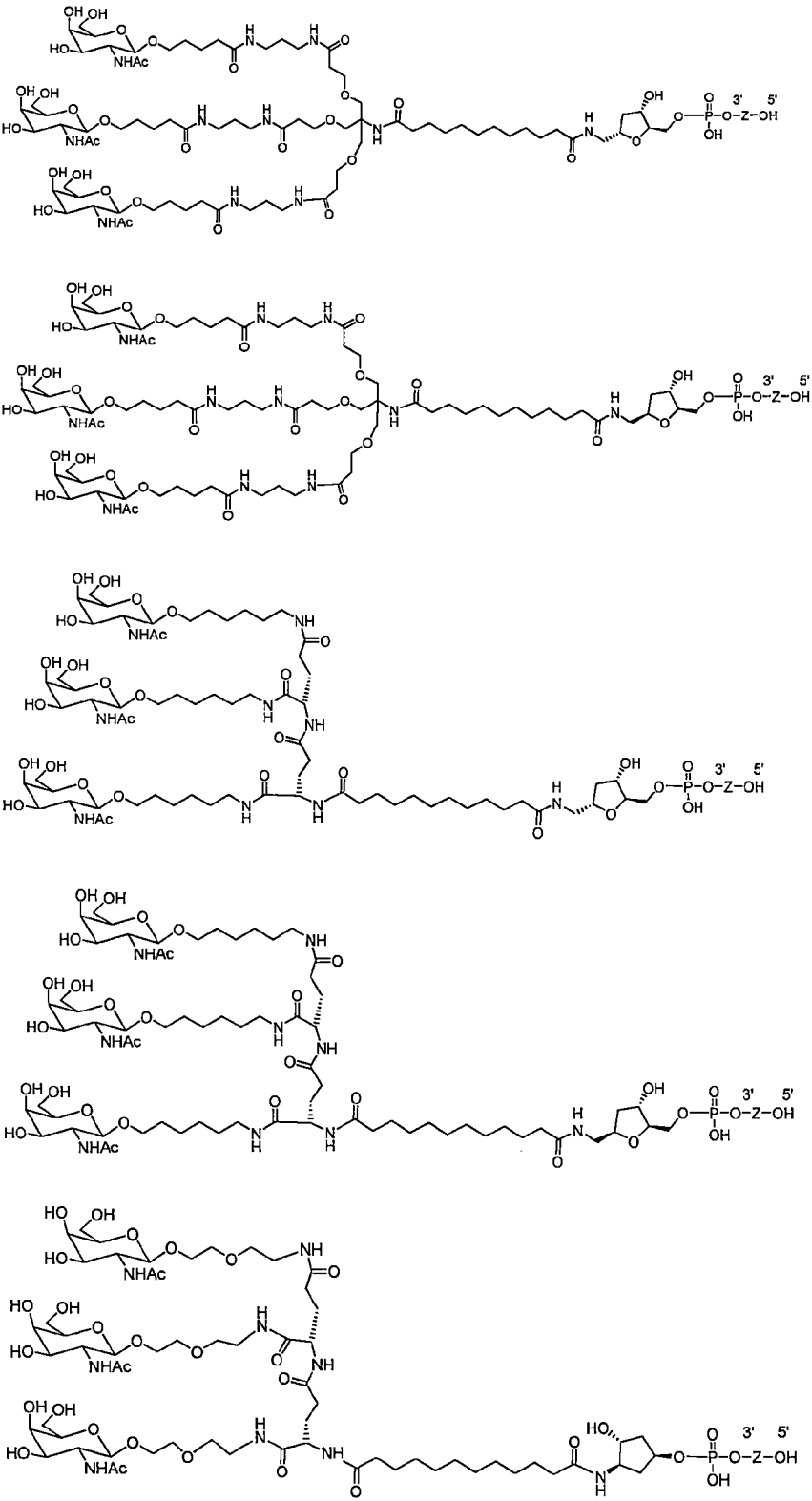
【請求項25】 如請求項 21 至 24 中任一項所述的核酸配體綴合物，其中，該核酸配體綴合物為以下任一結構或其藥學上可接受的鹽，

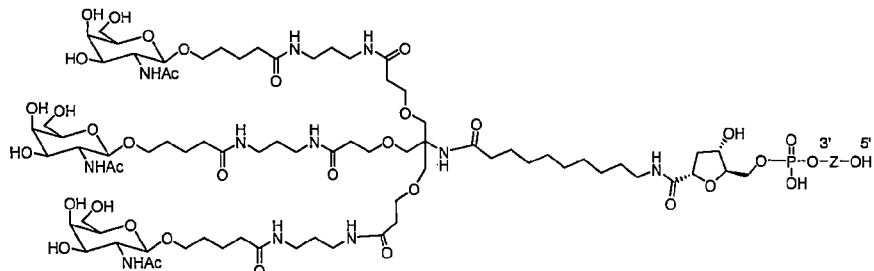
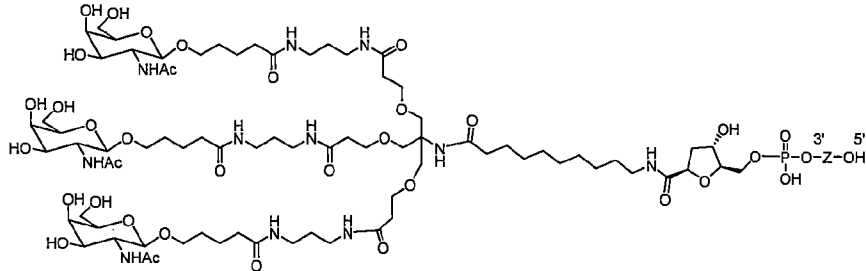
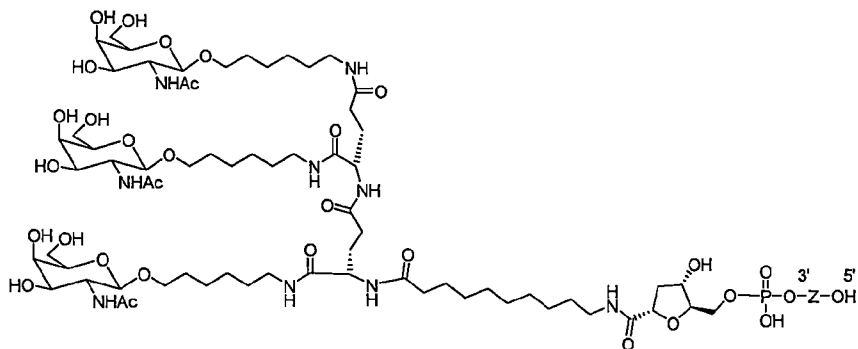
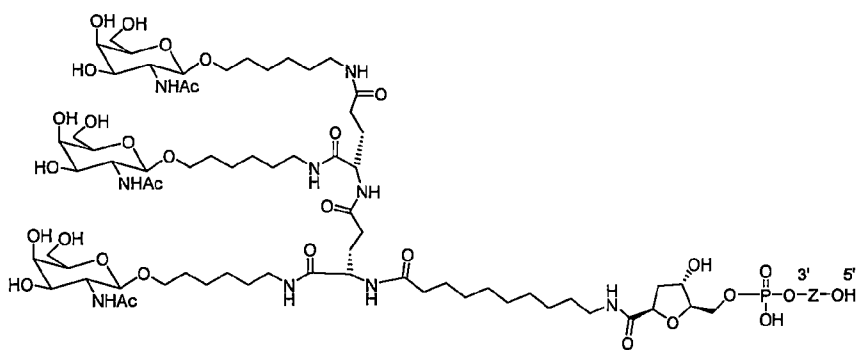












或

【請求項26】 一種 RNAi 試劑，其包含如請求項 21 至 25 中任一項所述的核酸配體綴合物，其中，該 RNAi 試劑較佳為 siRNA。

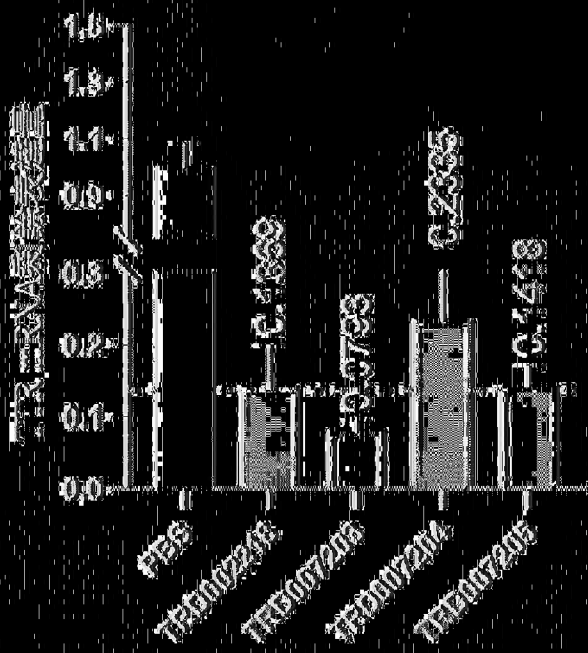
【請求項27】 一種組成物，其包含如請求項 21 至 25 中任一項所述的核酸配體綴合物或如請求項 26 所述的 RNAi 試劑，和一種或多種藥學上可接受的賦形劑。

【請求項28】 一種如請求項 21 至 25 中任一項所述的核酸配體綴合物或如請求項 26 所述的 RNAi 試劑或如請求項 27 所述的組成物在製備治療患者疾病的藥物中的用途，其中，該疾病較佳肝源性疾病。

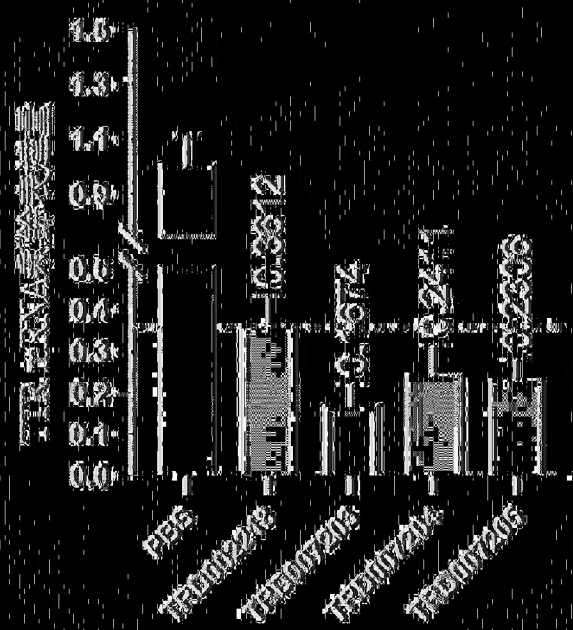
【請求項29】 一種抑制患者體內 mRNA 表達或將表達抑制性寡聚化合物體內遞送至肝臟的方法，其包括向患者給予如請求項 21 至 25 中任一項所述的核酸配體綴合物或如請求項 26 所述的 RNAi 試劑或如請求項 27 所述的組成物。

【請求項30】 一種如請求項 21 至 25 中任一項所述的核酸配體綴合物的製備方法，其包括以下步驟：以如請求項 17 至 20 中任一項所述的化合物作為起始，按照核苷酸排布順序自 3'-5'方向逐一連接核苷單體。

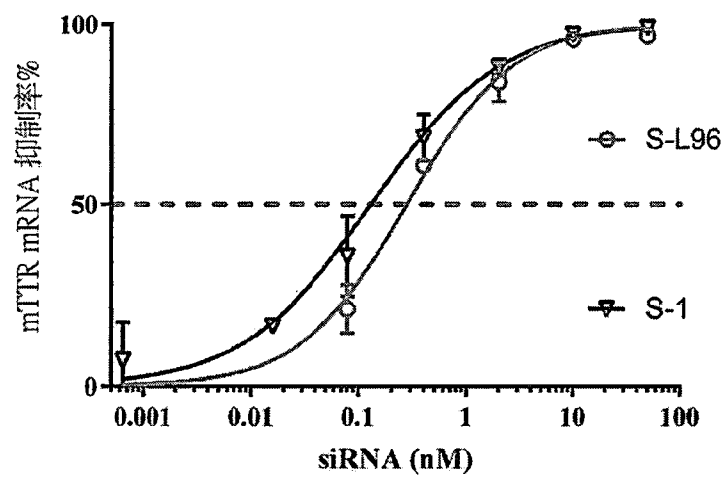
【發明具體式(1)】



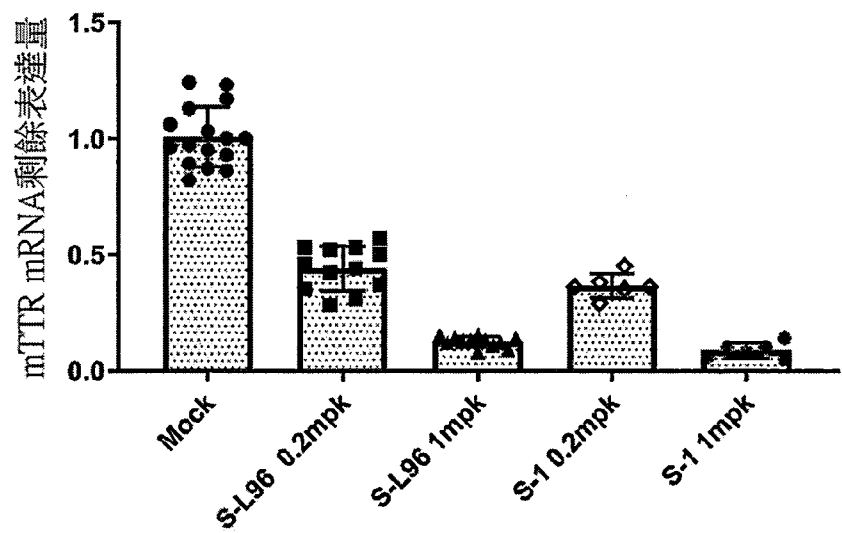
【例1】



【例2】



【圖3】



【圖4】