(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2025 年 2 月 13 日 (13.02.2025)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2025/031479 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 19/073 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/110992

(22) 国际申请日: 2024 年 8 月 9 日 (09.08.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202311011321.7 2023年8月10日 (10.08.2023) CN

(71) 申请人(对除*CN* 外的所有指定国):大睿生物(**RONA BIOSCIENCE, LIMITED**) [CN/CN]; 中国香港特别行政区金钟道89号力宝中心2栋4楼417室, Hong Kong (CN)。

(71) 申请人 (仅对*CN*):大睿生物医药科技(上海)有限公司 (**SHANGHAI RONA THERAPEUTICS CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区自由贸易试验区张江路665号三层, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人:黄金宇(**HUANG, Jinyu**); 中国上海市浦东新区康威路795弄3号楼, Shanghai 201315 (CN)。
邹昊(**ZOU, Hao**); 中国上海市浦东新区康威路795弄3号楼, Shanghai 201315 (CN)。

(74) 代理人:北京市柳沈律师事务所(**LIU , SHEN & ASSOCIATES**); 中国北京市海淀区彩和坊路10号1号楼10层, Beijing 100080 (CN)。

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

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

根据细则4.17的声明:
— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

WO 2025/031479 A1

(54) **Title:** DOUBLE-STRANDED RNA CONTAINING NUCLEOTIDE ANALOGUE

(54) 发明名称: 含有核苷酸类似物的双链RNA

(57) **Abstract:** The present invention provides a double-stranded RNA containing a nucleotide analogue. The double-stranded RNA of the present invention shows reduced off-target toxicity.

(57) 摘要: 本发明提供具有核苷酸类似物的双链RNA。本发明的双链RNA显示降低的脱靶毒性。

含有核苷酸类似物的双链 RNA

本发明要求提交于 2023 年 8 月 10 日的中国专利申请 CN202311011321.7 的优先权，将其整体引用并入本文，作为本发明披露的一部分。

发明领域

本发明属于医药领域，具体涉及具有核苷酸类似物的双链 RNA。

背景技术

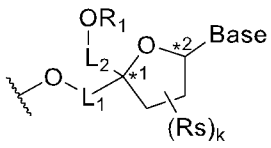
RNA 干扰是一种由双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）诱发的靶标 mRNA 高效特异性降解的现象。在双链 RNA 的反义链种子区掺入热不稳定的核苷酸（例如甘油核酸(GNA)）有助于提高干扰效率和降低脱靶毒性，参见例如 PCT 公开号 WO2018098328A1。

本领域需要对 siRNA 分子进行修饰以提高 siRNA 分子在体内的稳定性和有效性。经过长期实践，目前绝大部分 siRNA 药物均使用全修饰模式，即对 siRNA 双链的所有核苷酸都进行修饰。常用的修饰是 2'-F 和 2'-OCH_3 修饰。本领域需要开发更多的修饰的核苷酸。

发明内容

本发明通过提供一种新的核苷酸类似物解决了上述问题。

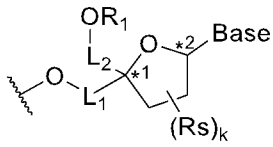
在一个方面中，本发明提供了寡核苷酸，其包含一个或多个式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：：



(I)

其中各变量如下文所定义。

在另一个方面中，本发明提供了双链 RNA，其具有正义链和反义链，各链具有 14 至 30 个核苷酸，所述反义链包含与所述正义链和靶标 mRNA 充分互补的序列，其中所述正义链和/或反义链包含一个或多个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:



(I)

其中，

各变量如下文所定义。

在另一个方面中，本发明提供了载体，其包含编码如本文所述的双链 RNA 的核苷酸序列。

在另一个方面中，本发明提供了细胞，其含有如本文所述的双链 RNA 或如本文所述的载体。

在另一个方面中，本发明涉及一种药物组合物，其包含如本文所述的双链 RNA 分子，和药学上可接受的载体或赋形剂。

在另一个方面中，本发明涉及一种试剂盒，其包含如本文所述的双链 RNA 分子。

在另一个方面中，本发明涉及一种用于抑制细胞中靶基因的表达的方法，包括将如本文所述的双链 RNA 分子引入该细胞的步骤。

在另一个方面中，本发明涉及一种用于抑制细胞中靶基因的表达的方法，包括在所述细胞中表达如本文所述的双链 RNA 分子。

在另一个方面中，本发明涉及一种用于降低细胞中脱靶毒性的方法，包括将本文所述的双链 RNA 分子引入该细胞的步骤。

在另一个方面中，本发明涉及一种用于降低细胞中脱靶毒性的方法，包括在所述细胞中表达本文所述的双链 RNA 分子。

本发明的核苷酸类似物可用于代替常规的 2'-F 和 2'-OCH_3 修饰。此外，在掺入 dsRNA 的反义链后，还可以使得所得双链 RNA 显示降低的脱靶毒性。

发明详述

定义

化学定义

下面更详细地描述具体官能团和化学术语的定义。

当列出数值范围时，既定包括每个值和在所述范围内的子范围。例如"C_{1-6} 烷基"包括 C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6、C_{1-6}、C_{1-5}、C_{1-4}、C_{1-3}、C_{1-2}、C_{2-6}、C_{2-5}、C_{2-4}、C_{2-3}、C_{3-6}、C_{3-5}、C_{3-4}、C_{4-6}、C_{4-5} 和 C_{5-6} 烷基。

"C_{1-10} 烷基"是指具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链饱和烃基团。"C_{1-6} 烷基"是指具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链饱和烃基团。在一些实施方案中，C_{1-6} 烷基、C_{1-4} 烷基和 C_{1-2} 烷基是优选的。C_{1-6} 烷基的例子包括：甲基(C_1)、乙基(C_2)、正丙基(C_3)、异丙基(C_3)、正丁基(C_4)、叔丁基(C_4)、仲丁基(C_4)、异丁基(C_4)、正戊基(C_5)、3-戊基(C_5)、戊基(C_5)、新戊基(C_5)、3-甲基-2-丁基(C_5)、叔戊基(C_5)和正己基(C_6)。术语"C_{1-6} 烷基"还包括杂烷基，其中一或多个(例如，1、2、3 或 4 个)碳原子被杂原子(例如，氧、硫、氮、硼、硅、磷)替代。烷基基团可以被一或多个取代基任选取代，例如，被 1 至 5 个取代基、1 至 3 个取代基或 1 个取代基取代。常规烷基缩写包括：Me(-CH_3)、Et(-CH_2CH_3)、iPr(-$CH(CH_3)_2$)、nPr(-$CH_2CH_2CH_3$)、n-Bu(-$CH_2CH_2CH_2CH_3$)或 i-Bu(-$CH_2CH(CH_3)_2$)。

"C_{2-10} 烯基"是指具有 2 至 10 个碳原子和至少一个碳碳双键的直链或支链烃基团。"C_{2-6} 烯基"是指具有 2 至 6 个碳原子和至少一个碳碳双键的直链或支链烃基团。在一些实施方案中，C_{2-6} 烯基和 C_{2-4} 烯基是优选的。C_{2-6} 烯基的例子包括：乙烯基(C_2)、1-丙烯基(C_3)、2-丙烯基(C_3)、1-丁烯基(C_4)、2-丁烯基(C_4)、丁二烯基(C_4)、戊烯基(C_5)、戊二烯基(C_5)、己烯基(C_6)，等等。术语"C_{2-6} 烯基"还包括杂烯基，其中一或多个(例如，1、2、3 或 4 个)碳原子被杂原子(例如，氧、硫、氮、硼、硅、磷)替代。烯基基团可以被一或多个取代基任选取代，例如，被 1 至 5 个取代基、1 至 3 个取代基或 1 个取代基取代。

"C_{2-10} 炔基"是指具有 2 至 10 个碳原子、至少一个碳-碳叁键以及任选地一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃基团。"C_{2-6} 炔基"是指具有 2 至 6 个碳原子、至少一个碳-碳叁键以及任选地一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃基团。在一些实施方案中，C_{2-6} 炔基和 C_{2-4} 炔基是优选的。C_{2-6} 炔基的例子包括但不限于：乙炔基(C_2)、1-丙炔基(C_3)、2-丙炔基(C_3)、1-丁炔基(C_4)、2-丁炔基(C_4)，戊炔基(C_5)、己炔基(C_6)，等等。术语"C_{2-6} 炔基"还包括杂炔基，其中一或多个(例如，1、2、3 或 4 个)碳原子被杂原子(例如，氧、硫、氮、硼、硅、磷)替代。炔基基团可以被一或多个取代基任选取代，例如，被 1 至 5 个取代基、1 至 3 个取代基或 1 个取代基取代。

“卤代”或“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)和碘(I)。

因此，“C_{1-6} 卤代烷基”是指上述“C_{1-6} 烷基”，其被一个或多个卤素基团取代。在一些实施方案中，C_{1-4} 卤代烷基是特别优选的，更优选 C_{1-2} 卤代烷基。示例性的所述卤代烷基包括但不限于：$-CF_3$、$-CH_2F$、$-CHF_2$、$-CHFCH_2F$、$-CH_2CHF_2$、$-CF_2CF_3$、$-CCl_3$、$-CH_2Cl$、$-CHCl_2$、2,2,2-三氟-1,1-二甲基-乙基，等等。卤代烷基基团可以在任何可用的连接点上被取代，例如，1 至 5 个取代基、1 至 3 个取代基或 1 个取代基。

“C_{1-6} 烷氧基”是指-O-R 基团，其中 R 如上文的“C_{1-6} 烷基”和“C_{1-6} 卤代烷基”所定义。

“C_{1-10} 亚烷基”分别是指除去 C_{1-10} 烷基的另一个氢而形成的二价基团，并且可以是取代或未取代的。在一些实施方案中，C_{2-8} 亚烷基、C_{3-7} 亚烷基、C_{1-6} 亚烷基、C_{4-6} 亚烷基、C_{1-4} 亚烷基、C_{2-4} 亚烷基和 C_{1-3} 亚烷基是优选的。未取代的所述亚烷基包括但不限于：亚甲基($-CH_2-$)、亚乙基($-CH_2CH_2-$)、亚丙基($-CH_2CH_2CH_2-$)、亚丁基($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$)、亚戊基($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$)、亚己基($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$)，等等。示例性的取代的所述亚烷基，例如，被一个或多个烷基(甲基)取代的所述亚烷基，包括但不限于：取代的亚甲基($-CH(CH_3)-$、$-C(CH_3)_2-$)、取代的亚乙基($-CH(CH_3)CH_2-$、$-CH_2CH(CH_3)-$、$-C(CH_3)_2CH_2-$、$-CH_2C(CH_3)_2-$)、取代的亚丙基($-CH(CH_3)CH_2CH_2-$、$-CH_2CH(CH_3)CH_2-$、$-CH_2CH_2CH(CH_3)-$、$-C(CH_3)_2CH_2CH_2-$、$-CH_2C(CH_3)_2CH_2-$、$-CH_2CH_2C(CH_3)_2-$)，等等。

“C_{2-10} 亚烯基”分别是指除去 C_{2-10} 烯基的另一个氢而形成的二价基团，并且可以是取代或未取代的。在一些实施方案中，C_{2-8} 亚烯基、C_{3-7} 亚烯基、C_{2-6} 亚烯基、C_{4-6} 亚烯基、C_{1-4} 亚烯基、C_{2-4} 亚烯基是优选的。

“C_{2-10} 亚炔基”分别是指除去 C_{2-10} 炔基的另一个氢而形成的二价基团，并且可以是取代或未取代的。在一些实施方案中，C_{2-8} 亚炔基、C_{3-7} 亚炔基、C_{2-6} 亚炔基、C_{4-6} 亚炔基、C_{1-4} 亚炔基、C_{2-4} 亚炔基是优选的。

本文定义的烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基等为任选取代的基团。

示例性的碳原子上的取代基包括但不局限于：卤素、$-CN$、$-NO_2$、$-N_3$、$-SO_2H$、$-SO_3H$、$-OH$、$-OR^{aa}$、$-ON(R^{bb})_2$、$-N(R^{bb})_2$、$-N(R^{bb})_3^+X^-$、$-N(OR^{cc})R^{bb}$、$-SH$、$-SR^{aa}$、$-SSR^{cc}$、$-C(=O)R^{aa}$、$-CO_2H$、$-CHO$、$-C(OR^{cc})_2$、$-CO_2R^{aa}$、$-OC(=O)R^{aa}$、$-OCO_2R^{aa}$、$-C(=O)N(R^{bb})_2$、$-OC(=O)N(R^{bb})_2$、$-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$、$-NR^{bb}CO_2R^{aa}$、$-NR^{bb}C(=O)N(R^{bb})_2$、$-C(=NR^{bb})R^{aa}$、$-C(=NR^{bb})OR^{aa}$、$-OC(=NR^{bb})R^{aa}$、$-OC(=NR^{bb})OR^{aa}$、$-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$、$-OC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$、$-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$、$-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$、$-NR^{bb}SO_2R^{aa}$、$-SO_2N(R^{bb})_2$、$-SO_2R^{aa}$、$-SO_2OR^{aa}$、$-OSO_2R^{aa}$、$-S(=O)R^{aa}$、$-OS(=O)R^{aa}$、$-Si(R^{aa})_3$、$-OSi(R^{aa})_3$、$-C(=S)N(R^{bb})_2$、$-C(=O)SR^{aa}$、$-C(=S)SR^{aa}$、$-SC(=S)SR^{aa}$、$-SC(=O)SR^{aa}$、$-OC(=O)SR^{aa}$、$-SC(=O)OR^{aa}$、$-SC(=O)R^{aa}$、$-P(=O)_2R^{aa}$、$-OP(=O)_2R^{aa}$、$-P(=O)(R^{aa})_2$、$-OP(=O)(R^{aa})_2$、$-OP(=O)(OR^{cc})_2$、$-P(=O)_2N(R^{bb})_2$、$-OP(=O)_2N(R^{bb})_2$、$-P(=O)(NR^{bb})_2$、$-OP(=O)(NR^{bb})_2$、$-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$、$-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$、$-P(R^{cc})_2$、$-P(R^{cc})_3$、$-OP(R^{cc})_2$、$-OP(R^{cc})_3$、$-B(R^{aa})_2$、$-B(OR^{cc})_2$、$-BR^{aa}(OR^{cc})$、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代；

或者在碳原子上的两个偕氢被基团=O、=S、$=NN(R^{bb})_2$、$=NNR^{bb}C(=O)R^{aa}$、$=NNR^{bb}C(=O)OR^{aa}$、$=NNR^{bb}S(=O)_2R^{aa}$、$=NR^{bb}$ 或$=NOR^{cc}$ 取代；

R^{aa} 的每个独立地选自烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基，或者两个 R^{aa} 基团结合以形成杂环基或杂芳基环，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代；

R^{bb}的每个独立地选自：氢、-OH、-OR^{aa}、-$N(R^{cc})_2$、-CN、-$C(=O)R^{aa}$、-$C(=O)N(R^{cc})_2$、-CO_2R^{aa}、-SO_2R^{aa}、-$C(=NR^{cc})OR^{aa}$、-$C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$、-$SO_2N(R^{cc})_2$、-SO_2R^{cc}、-SO_2OR^{cc}、-SOR^{aa}、-$C(=S)N(R^{cc})_2$、-$C(=O)SR^{cc}$、-$C(=S)SR^{cc}$、-$P(=O)_2R^{aa}$、-$P(=O)(R^{aa})_2$、-$P(=O)_2N(R^{cc})_2$、-$P(=O)(NR^{cc})_2$、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基，或者两个R^{bb}基团结合以形成杂环基或杂芳基环，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被0、1、2、3、4或5个R^{dd}基团取代；

R^{cc}的每个独立地选自氢、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基，或者两个R^{cc}基团结合以形成杂环基或杂芳基环，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被0、1、2、3、4或5个R^{dd}基团取代；

R^{dd}的每个独立地选自：卤素、-CN、-NO_2、-N_3、-SO_2H、-SO_3H、-OH、-OR^{ee}、-$ON(R^{ff})_2$、-$N(R^{ff})_2$，、-$N(R^{ff})_3{}^+X^-$、-$N(OR^{ee})R^{ff}$、-SH、-SR^{ee}、-SSR^{ee}、-$C(=O)R^{ee}$、-CO_2H、-CO_2R^{ee}、-$OC(=O)R^{ee}$、-OCO_2R^{ee}、-$C(=O)N(R^{ff})_2$、-$OC(=O)N(R^{ff})_2$、-$NR^{ff}C(=O)R^{cc}$、-$NR^{ff}CO_2R^{cc}$、-$NR^{ff}C(=O)N(R^{ff})_2$、-$C(=NR^{ff})OR^{cc}$、-$OC(=NR^{ff})R^{cc}$、-$OC(=NR^{ff})OR^{cc}$、-$C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$、-$OC(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$、-$NR^{ff}C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$、-$NR^{ff}SO_2R^{cc}$、-$SO_2N(R^{ff})_2$、-$SO_2R^{cc}$、-$SO_2OR^{cc}$、-$OSO_2R^{cc}$、-$S(=O)R^{cc}$、-$Si(R^{cc})_3$、-$OSi(R^{cc})_3$、-$C(=S)N(R^{ff})_2$、-$C(=O)SR^{cc}$、-$C(=S)SR^{cc}$、-$SC(=S)SR^{cc}$、-$P(=O)_2R^{cc}$、-$P(=O)(R^{cc})_2$、-$OP(=O)(R^{cc})_2$、-$OP(=O)(OR^{cc})_2$、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被0、1、2、3、4或5个R^{gg}基团取代，或者两个偕R^{dd}取代基可结合以形成=O或=S；

R^{ee}的每个独立地选自烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂环基和杂芳基，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被0、1、2、3、4或5个R^{gg}基团取代；

R^{ff}的每个独立地选自氢、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基，或者两个R^{ff}基团结合形成杂环基或杂芳基环，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被0、1、2、3、4或5个R^{gg}基团取代；

R^{gg}的每个独立地是：卤素、-CN、-NO_2、-N_3、-SO_2H、-SO_3H、-OH、-OC_{1-6}烷基、-$ON(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$N(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$N(C_{1-6}$烷基$)_3{}^+X^-$、-$NH(C_{1-6}$烷基$)_2{}^+X^-$、-$NH_2(C_{1-6}$烷基$)^+X^-$、-$NH_3{}^+X^-$、-$N(OC_{1-6}$烷基$)(C_{1-6}$烷基$)$、-$N(OH)(C_{1-6}$烷基$)$、-NH(OH)、-SH、-SC_{1-6}烷基、-$SS(C_{1-6}$烷基$)$、-$C(=O)(C_{1-6}$烷基$)$、-CO_2H、-$CO_2(C_{1-6}$烷基$)$、-$OC(=O)(C_{1-6}$烷基$)$、-$OCO_2(C_{1-6}$烷基$)$、-$C(=O)NH_2$、-$C(=O)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$OC(=O)NH(C_{1-6}$烷基$)$、-$NHC(=O)(C_{1-6}$烷基$)$、-$N(C_{1-6}$烷基$)C(=O)(C_{1-6}$烷基$)$、-$NHCO_2(C_{1-6}$烷基$)$、-$NHC(=O)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$NHC(=O)NH(C_{1-6}$烷基$)$、-$NHC(=O)NH_2$、-$C(=NH)O(C_{1-6}$烷基$)$、-$OC(=NH)(C_{1-6}$烷基$)$、-$OC(=NH)OC_{1-6}$烷基、-$C(=NH)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$C(=NH)NH(C_{1-6}$烷基$)$、-$C(=NH)NH_2$、-$OC(=NH)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$OC(NH)NH(C_{1-6}$烷基$)$、-$OC(NH)NH_2$、-$NHC(NH)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$NHC(=NH)NH_2$、-$NHSO_2(C_{1-6}$烷基$)$、-$SO_2N(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$SO_2NH(C_{1-6}$烷基$)$、-SO_2NH_2、-SO_2C_{1-6}烷基、-SO_2OC_{1-6}烷基、-OSO_2C_{1-6}烷基、-SOC_{1-6}烷基、-$Si(C_{1-6}$烷基$)_3$、-$OSi(C_{1-6}$烷基$)_3$、-$C(=S)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$C(=S)NH(C_{1-6}$烷基$)$、$C(=S)NH_2$、-$C(=O)S(C_{1-6}$烷基$)$、-$C(=S)SC_{1-6}$烷基、-$SC(=S)SC_{1-6}$烷基、-$P(=O)_2(C_{1-6}$烷基$)$、-$P(=O)(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$OP(=O)(C_{1-6}$烷基$)_2$、-$OP(=O)(OC_{1-6}$烷基$)_2$、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_3-C_7环烷基、C_6-C_{10}芳基、C_3-C_7杂环基、C_5-C_{10}杂芳基；或者两个偕R^{gg}取代基可结合形成=O或=S；其中，X^-为反离子。

示例性的氮原子上取代基包括但不局限于：氢、-OH、-OR^{aa}、-$N(R^{cc})_2$、-CN、-$C(=O)R^{aa}$、

-C(=O)N(R^{cc})$_2$、-CO_2R^{aa}、-SO_2R^{aa}、-C(=NR^{bb})R^{aa}、-C(=NR^{cc})OR^{aa}、-C(=NR^{cc})N(R^{cc})$_2$、-SO_2N(R^{cc})$_2$、-SO_2R^{cc}、-SO_2OR^{cc}、-SOR^{aa}、-C(=S)N(R^{cc})$_2$、-C(=O)SR^{cc}、-C(=S)SR^{cc}、-P(=O)$_2R^{aa}$、-P(=O)(R^{aa})$_2$、-P(=O)$_2$N(R^{cc})$_2$、-P(=O)(NR^{cc})$_2$、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基，或者连接至氮原子的两个 R^{cc} 基团结合形成杂环基或杂芳基环，其中，每个烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基独立地被 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代，且其中 R^{aa}、R^{bb}、R^{cc} 和 R^{dd} 如上所述。

其他定义

本文术语“siRNA”是一类双链 RNA 分子，其可以介导与其互补的靶 RNA (例如 mRNA，例如，编码蛋白质的基因的转录物)的沉默。siRNA 通常是双链的，包括与靶 RNA 互补的反义链，和与该反义链互补的正义链。为方便起见，这样的 mRNA 在此也被称为有待被沉默的 mRNA。这样的基因也称为靶基因。通常，有待被沉默的 RNA 是内源基因或病原体基因。另外，除了 mRNA 以外的 RNA (例如 tRNA)以及病毒 RNA 也可以被靶向。

术语“反义链”是指 siRNA 的这样一条链，所述链包含与靶序列完全、充分或基本互补的区域。术语“正义链”是指 siRNA 的这样一条链，所述链包括与作为在此定义的术语反义链的区域完全、充分或基本互补的区域。

术语“互补区域”是指反义链上与靶 mRNA 序列完全、充分或基本互补的区域。在互补区域与靶序列不完全互补的情况下，错配可以位于分子的内部或末端区域中。通常，最耐受的错配位于末端区域中，例如，在 5’和/或 3’端的 5、4、3、2 或 1 个核苷酸内。对错配最敏感的反义链部分被称为“种子区”。例如，在包含 19nt 的链的 siRNA 中，第 19 个位置(从 5’向 3’)可以耐受一些错配。

术语“互补”是指第一多核苷酸在某些条件例如严格条件下与第二多核苷酸杂交的能力。例如，严格条件可包括 400mM NaCl、40mM PIPES pH 6.4、1mM EDTA 在 50°C或 70°C下持续 12-16 小时。就满足以上相对于它们杂交的能力而言的要求来说，“互补”序列还可以包括或完全形成自非沃森-克里克碱基对和/或从非天然的以及经修饰的核苷酸形成的碱基对。此类非沃森-克里克碱基对包括但不限于 G:U 摇摆碱基配对或 Hoogstein 碱基配对。

与信使 RNA(mRNA)的“至少部分互补”、“充分互补”或“基本上互补”的多核苷酸是指与感兴趣的 mRNA 的连续部分基本互补的多核苷酸。例如，如果序列与编码 PCSK9 的 mRNA 的非中断部分基本上互补，则多核苷酸与 PCSK9 mRNA 的至少部分互补。在此的术语“互补”、“完全互补”、“充分互补”和“基本上互补”可以相对于 siRNA 的正义链与反义链之间，或 siRNA 试剂的反义链与靶序列之间的碱基配对使用。

“充分互补”是指为了维持分子的整体双链特征，正义链仅需要与反义链互补的程度。换言之，虽然通常需要完美的互补性，但在一些情况下，特别是在反义链中，可以包括一个或多个，例如 6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个的错配(相对于靶标 mRNA)，但是正义链与反义链仍可以维持分子的整体双链特征。

“shRNA”是指短发夹 RNA。shRNA 包括两个短反向重复序列。克隆到 shRNA 表达载体中的 shRNA 包括两个短反向重复序列，中间由一茎环（loop）序列分隔的，组成发夹结构，由 polIII启动子控制。随后再连上 5-6 个 T 作为 RNA 聚合酶III的转录终止子。

“核苷”是由嘌呤碱或嘧啶碱、以及核糖或脱氧核糖两种物质组成的化合物，“核苷酸”则是由嘌呤碱或嘧啶碱、核糖或脱氧核糖以及磷酸三种物质组成的化合物，“寡核苷酸”是指例如具有少于 100、200、300 或 400 个核苷酸长度的核酸分子(RNA 或 DNA)。

“碱基”是合成核苷、核苷酸和核酸的基本组成单位，其组成元素中含有氮，也称“含氮碱基”。本文中，如无特别说明，大写字母 A、U、T、G 和 C 表示核苷酸的碱基组成，分别为腺嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶。

本文中所述核苷酸的“修饰”包括但不限于甲氧基修饰、氟代修饰、硫代磷酸酯基连接或常规保护基保护等。例如，所述氟代修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2’位的羟基被氟取代形成的核苷酸，所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2’-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

本文中“修饰的核苷酸”包括但不限于 2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟代修饰的核苷酸、2'-脱氧-修饰的核苷酸、肌苷核糖核苷酸、脱碱基核苷酸、反向无碱基脱氧核糖核苷酸、包含硫代磷酸酯基团的核苷酸、乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸、锁核苷酸、2'-氨基-修饰的核苷酸、2'-烷基-修饰的核苷酸、吗啉代核苷酸、氨基磷酸酯、包含核苷酸的非天然碱基、以及连接到胆固醇基衍生物或十二烷酸二癸酰胺基团上的末端核苷酸、脱氧核糖核苷酸或常规保护基保护等。例如，所述 2'-氟代修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2’位的羟基被氟取代形成的核苷酸。所述 2'-脱氧-修饰的核苷酸指核糖基的 2’-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

“反应性磷基团”是指包含在核苷酸单元中或核苷酸类似物单元中的含磷基团，其可以通过亲核攻击反应，与包含在另一个分子中、尤其是另一个核苷酸单元中或另一个核苷酸类似物中的羟基或胺基反应。通常，这样的反应产生将所述第一核苷酸单元或所述第一核苷酸类似物单元与所述第二核苷酸单元或所述第二核苷酸类似物单元连接的酯型核苷间键。反应性磷基团可选自亚磷酰胺, H-膦酸酯，烷基-膦酸酯，磷酸酯或磷酸酯模拟物，包括但不限于：天然磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷硫代磷酸酯、膦酸酯、卤素取代的膦酸酯和磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、二磷酸酯和三磷酸酯，优选-$P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)$。

“保护基”又称“保护基团”，是指被添加到分子中以防止分子中现有基团进行不期望的化学反应的任何原子或原子团。“保护基”可为本领域已知的不稳定的化学部分，其用于保护反应性基团，例如羟基、氨基和硫醇基团，以防止在化学合成过程中发生不期望的或不合时宜的反应。保护基通常在其它反应性位点的反应期间选择性地和/或正交地用于保护位点，然后可以被去除以留下未受保护的基团保持原样或可用于进一步的反应。

保护基团的非限制性列表包括苄基；取代的苄基；烷基羰基和烷氧基羰基(例如，叔丁氧基羰基(BOC)、乙酰基或异丁酰基)；芳基烷基羰基和芳基烷氧基羰基(例如，苄基氧基羰基)；取代的甲基醚(例如甲氧基甲基醚)；取代的乙醚；取代的苄基醚；四氢吡喃基醚；甲硅烷基(例如，三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三-异丙基甲硅烷基氧基甲基、[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基或叔丁基二苯基甲硅烷基)；酯类(例如苯甲酸酯)；碳酸酯类(例如碳酸甲氧基甲基酯)；磺酸酯类(例如甲苯磺酸酯或甲磺酸酯)；非环缩酮(例如二甲基乙缩醛)；环缩酮(例如，1,3-二噁烷、1,3-二氧戊环以及本文所述的那些)；非环乙缩醛；环乙缩醛(例如，本文所述的那些)；非环半缩醛；环半缩醛；环二硫缩酮(例如，1,3-二噻烷或 1,3-二硫戊环)；原酸酯(例如，本文所述的那些)以及三芳基甲基基团(例如，三苯甲基；单甲氧基三苯甲基(MMTr)；4,4′-二甲氧基三苯甲基(DMTr)；4,4′,4″-三甲氧基三苯甲基(TMTr)；以及本文所述的那些)。优选的保护基团选自乙酰基(Ac)、苯甲酰基(Bzl)、苄基(Bn)、异丁酰基(iBu)、苯基乙酰基、苄基氧基甲基乙缩醛(BOM)、β-甲氧基乙氧基甲基醚(MEM)、甲氧基甲基醚(MOM)、对-甲氧基苄基醚(PMB)、甲基硫代甲基醚、新戊酰基(Piv)、四氢吡喃基(THP)、三苯基甲基(Trt)、甲氧基三苯甲基[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基](MMT)、二甲氧基三苯甲基、[双-(4-甲氧基苯基)苯基甲基(DMT)、三甲基甲硅烷基醚(TMS)、叔丁基二甲基甲硅烷基醚

(TBDMS)、三-异-丙基甲硅烷基氧基甲基醚(TOM)、三-异丙基甲硅烷基醚(TIPS)、甲基醚、乙氧基乙醚(EE)N,N-二甲基甲脒和2-氰基乙基(CE)。

“羟基保护基”是指能够避免羟基遭受化学反应，又可以在特定条件下脱除以恢复羟基的基团。主要包括硅烷型保护基、酰基型保护基或醚型保护基，优选以下：

三甲基硅基(TMS)、三乙基硅基(TES)、二甲基异丙基硅基(DMIPS)、二乙基异丙基硅基(DEIPS)、叔丁基二甲基硅基(TBDMS)、叔丁基二苯基硅基(TBDPS)、三异丙基硅基(TIPS)、乙酰基(Ac)、氯乙酰基、二氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基(TFA)、苯甲酰基、对甲氧基苯甲酰基、9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)、烯丙氧羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、苯甲基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)、烯丙基、三苯基甲基(Tr)、双对甲氧基三苯甲基(DMTr)、甲氧基甲基(MOM)、苯氧基甲基(BOM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、甲硫基甲基(MTM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、$-C(O)CH_2CH_2C(O)OH$ 或 4,4'-二甲氧基三苯甲基，优选$-C(O)CH_2CH_2C(O)OH$ 或4,4'-二甲氧基三苯甲基，更优选$-C(O)CH_2CH_2C(O)OH$。

本文所用的术语“药学上可接受的盐”表示本发明化合物的那些羧酸盐、氨基酸加成盐，它们在可靠的医学判断范围内适用于与患者组织接触，不会产生不恰当的毒性、刺激作用、变态反应等，与合理的益处/风险比相称，就它们的预期应用而言是有效的，包括(可能的话)本发明化合物的两性离子形式。

本发明包括互变异构体，其为分子中某一原子在两个位置迅速移动而产生的官能团异构体。在不同的互变异构形式存在的化合物，一个所述化合物并不局限于任何特定的互变异构体，而是旨在涵盖所有的互变异构形式。

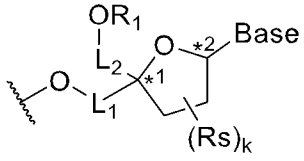
本发明化合物可包括一个或多个不对称中心，且因此可以存在多种立体异构体形式，例如，对映异构体和/或非对映异构体形式。例如，本发明化合物可为单独的对映异构体、非对映异构体或几何异构体(例如顺式和反式异构体)，或者可为立体异构体的混合物的形式，包括外消旋体混合物和富含一种或多种立体异构体的混合物。异构体可通过本领域技术人员已知的方法从混合物中分离，所述方法包括：手性高压液相色谱法(HPLC)以及手性盐的形成和结晶；或者优选的异构体可通过不对称合成来制备。

本发明还包括同位素标记的化合物(同位素变体)，它们等同于式(I)所述的那些，但一个或多个原子被原子质量或质量数不同于自然界常见的原子质量或质量数的原子所代替。可以引入本发明化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟和氯的同位素，分别例如^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{11}C、^{14}C、^{15}N、^{18}O、^{17}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F 和 ^{36}Cl。含有上述同位素和/或其它原子的其它同位素的本发明化合物、其前体药物和所述化合物或所述前体药物的药学上可接受的盐都属于本发明的范围。某些同位素标记的本发明化合物，例如引入放射性同位素(例如^{3}H和^{14}C)的那些可用于药物和/或底物组织分布测定。氚、即^{3}H和碳-14、即^{14}C同位素是特别优选的，因为它们容易制备和检测。进而，被更重的同位素取代，例如氘、即^{2}H，由于代谢稳定性更高可以提供治疗上的益处，例如延长体内半衰期或减少剂量需求，因而在有些情况下可能是优选的。同位素标记的本发明式(I)化合物及其前体药物一般可以这样制备，在进行下述流程和/或实施例与制备例所公开的工艺时，用容易得到的同位素标记的试剂代替非同位素标记的试剂。

本发明化合物

本发明具体涉及寡核苷酸，其包含一个或多个式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体

或立体异构体:



(I)

其中,

*1 和*2 表示手性中心,独立地选自(S)构型或(R)构型;

 表示 H,或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置;

R_1 表示 H,或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置;

 和 R_1 不同时为 H;

L_1 和 L_2 独立地选自 C_{1-10} 亚烷基、C_{2-10} 亚烯基或 C_{2-10} 亚炔基,其中所述基团中不相邻的 1、2、3、4 或 5 个碳原子可以被选自 O、S 和 N 的杂原子替换,优选为 C_{1-10} 亚烷基;

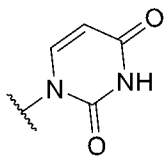
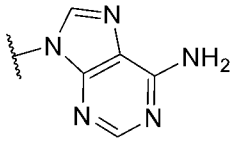
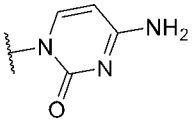
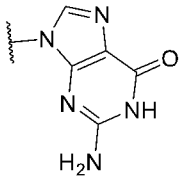
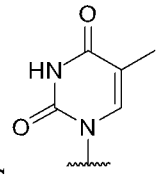
所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个 R 取代;

Rs 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基;

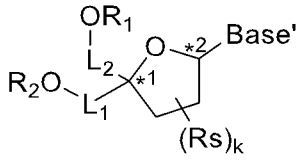
R 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基;

k 为 1、2、3、4 或 5;

Base 选自 H、修饰或未修饰的碱基或离去基,优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C;优选地,

Base 选自 、、、或。

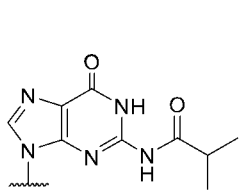
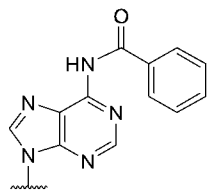
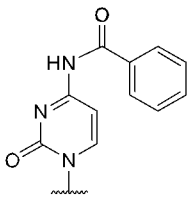
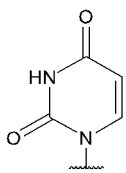
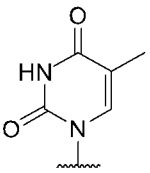
本发明还涉及式(I')化合物,或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:



(I')

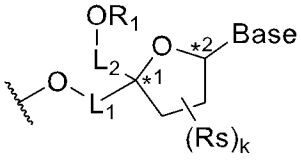
其中,R_1 和 R_2 独立地选自 H、反应性磷基团、羟基保护基或固相载体;

Base'选自 H、修饰或未修饰的碱基或离去基,优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C;优选地,

Base'选自 、、、或;

*1、*2、L_1、L_2、Rs 和 k 如本文所定义。

本发明还涉及双链 RNA,其具有正义链和反义链,各链具有 14 至 30 个核苷酸,所述反义链包含与所述正义链和靶标 mRNA 充分互补的序列,其中所述正义链和/或反义链包含一个或多个如本文所述的式(I)化合物,或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:



(I)

其中，各变量如本文所定义。

*1 和*2

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型。

在一个实施方案中，*1 为(S)构型；在另一个实施方案中，*1 为(R)构型；在另一个方案中，*1 为(S)构型和(R)构型的混合物。

在一个实施方案中，*2 为(S)构型；在另一个实施方案中，*2 为(R)构型；在另一个方案中，*2 为(S)构型和(R)构型的混合物。

、R_1 和 R_2

在一个实施方案中，表示 H；在另一个实施方案中，表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置。

在一个实施方案中，R_1 表示 H；在另一个实施方案中，R_1 表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置。

在一个实施方案中，和 R_1 不同时为 H。

在一个实施方案中，R_1 表示反应性磷基团，例如亚磷酰胺、H-膦酸酯、烷基-膦酸酯、磷酸酯或磷酸酯模拟物，例如天然磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷硫代磷酸酯、膦酸酯、卤素取代的膦酸酯和磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、二磷酸酯或三磷酸酯，优选-$P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)$；

在另一个实施方案中，R_1 表示羟基保护基，例如三甲基硅基(TMS)、三乙基硅基(TES)、二甲基异丙基硅基(DMIPS)、二乙基异丙基硅基(DEIPS)、叔丁基二甲基硅基(TBDMS)、叔丁基二苯基硅基(TBDPS)、三异丙基硅基(TIPS)、乙酰基(Ac)、氯乙酰基、二氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基(TFA)、苯甲酰基、对甲氧基苯甲酰基、9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)、烯丙氧羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、苯甲基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)、烯丙基、三苯基甲基(Tr)、双对甲氧基三苯甲基(DMTr)、甲氧基甲基(MOM)、苯氧基甲基(BOM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、甲硫基甲基(MTM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、4,4'-二甲氧基三苯甲基、-$P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)$或-$C(O)CH_2CH_2C(O)OH$，优选 DMTr；

在另一个实施方案中，R_1 表示固相载体。

在一个实施方案中，R_2 表示 H；

在另一个实施方案中，R_2 表示反应性磷基团，例如亚磷酰胺、H-膦酸酯、烷基-膦酸酯、磷酸酯或磷酸酯模拟物，例如天然磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷硫代磷酸酯、膦酸酯、卤素取代的膦酸酯和磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、二磷酸酯或三磷酸酯，优选-$P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)$；

在另一个实施方案中，R_2 表示羟基保护基，例如三甲基硅基(TMS)、三乙基硅基(TES)、二甲基异丙基硅基(DMIPS)、二乙基异丙基硅基(DEIPS)、叔丁基二甲基硅基(TBDMS)、叔丁基二苯基硅基

(TBDPS)、三异丙基硅基(TIPS)、乙酰基(Ac)、氯乙酰基、二氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基(TFA)、苯甲酰基、对甲氧基苯甲酰基、9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)、烯丙氧羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、苯甲基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)、烯丙基、三苯基甲基(Tr)、双对甲氧基三苯甲基(DMTr)、甲氧基甲基(MOM)、苯氧基甲基(BOM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、甲硫基甲基(MTM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、4,4'-二甲氧基三苯甲基、$-P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)$或$-C(O)CH_2CH_2C(O)OH$，优选 DMTr；

在另一个实施方案中，R_1表示固相载体。

L_1和L_2

在一个实施方案中，L_1为C_{1-10}亚烷基；在另一个实施方案中，L_1为C_{1-6}亚烷基；在另一个实施方案中，L_1为C_{1-4}亚烷基，优选为$-CH_2-$或$-CH_2CH_2-$；在另一个实施方案中，L_1为C_{2-10}亚烯基；在另一个实施方案中，L_1为C_{2-10}亚炔基；在另一个实施方案中，前述C_{1-10}亚烷基、C_{1-6}亚烷基、C_{1-4}亚烷基、$-CH_2-$、$-CH_2CH_2-$、C_{2-10}亚烯基或C_{2-10}亚炔基中不相邻的 1、2、3、4 或 5 个碳原子可以被选自 O、S 和 N 的杂原子替换。

在一个实施方案中，L_1未被取代；在另一个实施方案中，L_1被 1 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_1被 2 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_1被 3 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_1被 4 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_1被 5 个 R 取代。

在一个实施方案中，L_2为C_{1-10}亚烷基；在另一个实施方案中，L_2为C_{1-6}亚烷基；在另一个实施方案中，L_2为C_{1-4}亚烷基，优选为$-CH_2-$或$-CH_2CH_2-$；在另一个实施方案中，L_2为C_{2-10}亚烯基；在另一个实施方案中，L_2为C_{2-10}亚炔基；在另一个实施方案中，前述C_{1-10}亚烷基、C_{1-6}亚烷基、C_{1-4}亚烷基、$-CH_2-$、$-CH_2CH_2-$、C_{2-10}亚烯基或C_{2-10}亚炔基中不相邻的 1、2、3、4 或 5 个碳原子可以被选自 O、S 和 N 的杂原子替换。

在一个实施方案中，L_2未被取代；在另一个实施方案中，L_2被 1 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_2被 2 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_2被 3 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_2被 4 个 R 取代；在另一个实施方案中，L_2被 5 个 R 取代。

R

在一个实施方案中，R 为 H；在另一个实施方案中，R 为 D；在另一个实施方案中，R 为卤素；在另一个实施方案中，R 为C_{1-6}烷基；在另一个实施方案中，R 为C_{1-4}烷基，例如甲基；在另一个实施方案中，R 为C_{1-6}卤代烷基；在另一个实施方案中，R 为C_{1-4}卤代烷基。

Rs

在一个实施方案中，Rs 为 H；在另一个实施方案中，Rs 为 D；在另一个实施方案中，Rs 为卤素；在另一个实施方案中，Rs 为C_{1-6}烷基；在另一个实施方案中，Rs 为C_{1-4}烷基，例如甲基；在另一个实施方案中，Rs 为C_{1-6}卤代烷基；在另一个实施方案中，Rs 为C_{1-4}卤代烷基。

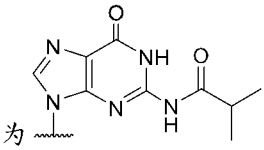
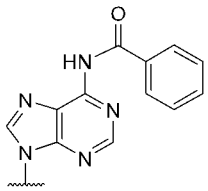
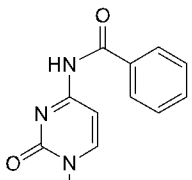
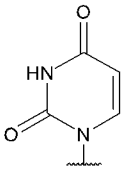
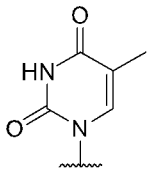
k

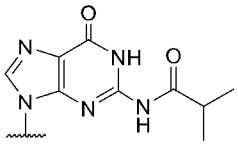
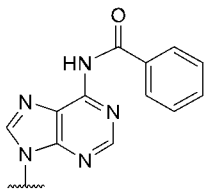
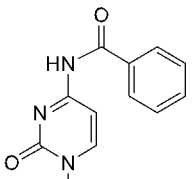
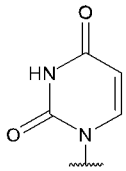
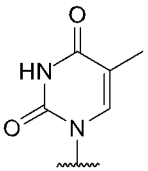
在一个实施方案中，k 为 1、2、3、4 或 5。

Base 和 Base'

在一个实施方案中，Base 为 H；在另一个实施方案中，Base 为修饰或未修饰的碱基或离去基，例如优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C。

在一个实施方案中，Base'为 H；在另一个实施方案中，Base'为修饰或未修饰的碱基或离去基，例如优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C。

在一个更具体的实施方案中，Base 为；在另一个更具体的实施方案中，Base 为；在另一个更具体的实施方案中，Base 为；在另一个更具体的实施方案中，Base 为；在另一个更具体的实施方案中，Base 为。

在一个更具体的实施方案中，Base'为；在另一个更具体的实施方案中，Base'为；在另一个更具体的实施方案中，Base'为；在另一个更具体的实施方案中，Base'为；在另一个更具体的实施方案中，Base'为。

以上任一具体实施方案中的任一技术方案或其任意组合，可以与其它具体实施方案中的任一技术方案或其任意组合进行组合。例如，R_1 的任一技术方案或其任意组合，可以与 R_2、、*1、*2、L_1、L_2、R、Rs、k、Base 和 Base'等的任一技术方案或其任意组合进行组合。本发明旨在包括所有这些技术方案的组合，限于篇幅，不再一一列出。

本发明还提供了载体，其包含编码本发明所述的 siRNA 的核苷酸序列。本发明的载体能够扩增或表达与其连接的编码本发明所述的 siRNA 的核苷酸。

例如，靶向 PCSK9 基因的 siRNA 可以从插入 DNA 或 RNA 载体中的转录单位表达。表达可以是短暂的(数小时至数星期内)或持续的(数星期至数个月或更久)，取决于所使用的特定建构体及靶组织或细胞类型。可以将 siRNA 的编码核苷酸引入线性建构体、环状质体或病毒载体中。siRNA 的核

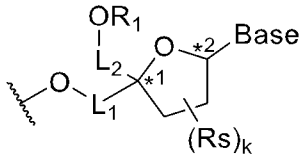
苷酸可以被整合到细胞基因组中稳定表达，或者在染色体外稳定遗传而表达。一般来说，siRNA 表达载体通常是 DNA 质粒或病毒载体。

包含 siRNA 的编码序列的病毒载体系统包括但不局限于：(a)腺病毒载体；(b)逆转录病毒载体；(c)腺伴随病毒载体；(d)单纯疱疹病毒载体；(e)SV40 载体；(f)多瘤病毒载体；(g)乳头瘤病毒载体；(h)微小核糖核酸病毒载体；(i)痘病毒载体；以及(j)辅助病毒依赖性腺病毒或无肠腺病毒。

本发明还提供了细胞，其含有本发明所述的 siRNA 或载体，其中本发明所述的 siRNA 或载体能够在细胞中转录。

本发明具体涉及以下技术方案：

在一些实施方案中，本发明涉及寡核苷酸，其包含一个或多个式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：



(I)

其中，

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

 表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

 和 R_1 不同时为 H；

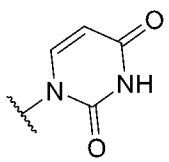
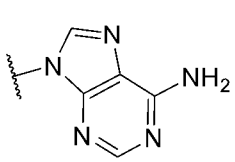
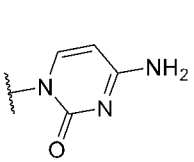
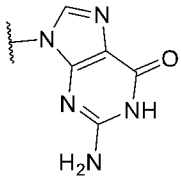
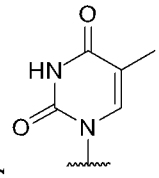
L_1 和 L_2 独立地选自 C_{1-10} 亚烷基、C_{2-10} 亚烯基或 C_{2-10} 亚炔基，其中所述基团中不相邻的 1、2、3、4 或 5 个碳原子可以被选自 O、S 和 N 的杂原子替换，优选为 C_{1-10} 亚烷基；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个 R 取代；

Rs 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

R 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

k 为 1、2、3、4 或 5；

Base 选自 H、修饰或未修饰的碱基或离去基，优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C；优选地，Base 选自  、  、  、  或  。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其中，L_1 和 L_2 独立地选自 C_{1-6} 亚烷基、C_{2-6} 亚烯基或 C_{2-6} 亚炔基，优选为 C_{1-6} 亚烷基；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个 R 取代；

R 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

优选地，L_1 和 L_2 独立地为 C_{1-4} 亚烷基，优选为-CH_2-或-CH_2CH_2-；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个或 3 个 R 取代；

R 选自 H、D、卤素或 C_{1-4} 烷基。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其中：

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H；

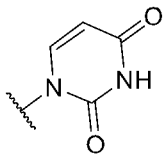
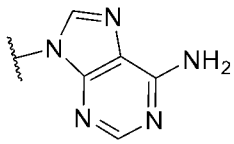
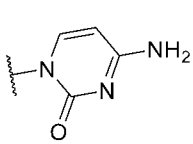
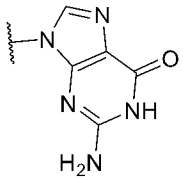
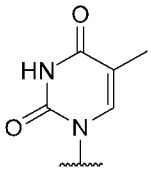
L_1 和 L_2 独立地选自 C_{1-6} 亚烷基、C_{2-6} 亚烯基或 C_{2-6} 亚炔基，优选为 C_{1-6} 亚烷基；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个 R 取代；

Rs 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

R 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

k 为 1、2 或 3；

Base 选自 、、、或。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其中：

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H；

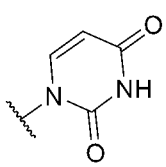
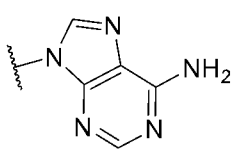
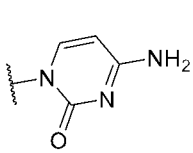
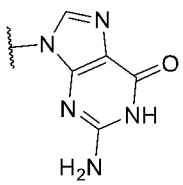
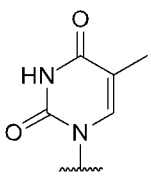
L_1 和 L_2 独立地为 C_{1-4} 亚烷基，优选为-CH_2-；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个或 3 个 R 取代；

Rs 选自 H、D、卤素或 C_{1-4} 烷基；

R 选自 H、D、卤素或 C_{1-4} 烷基；

k 为 1、2 或 3；

Base 选自 、、、或。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其中：

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

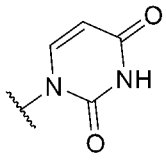
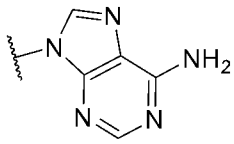
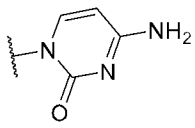
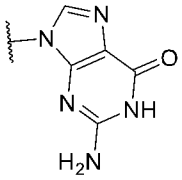
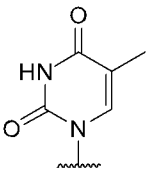
R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H；

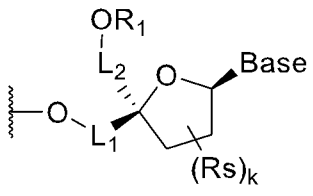
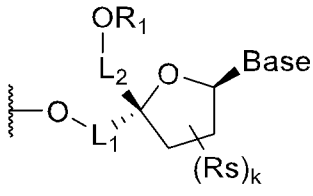
L_1 和 L_2 独立地为 C_{1-4} 亚烷基，优选为-CH_2-；

Rs 为 H 或 C_{1-4} 烷基，优选为 H；

k 为 1、2 或 3；

Base 选自 、、、或。

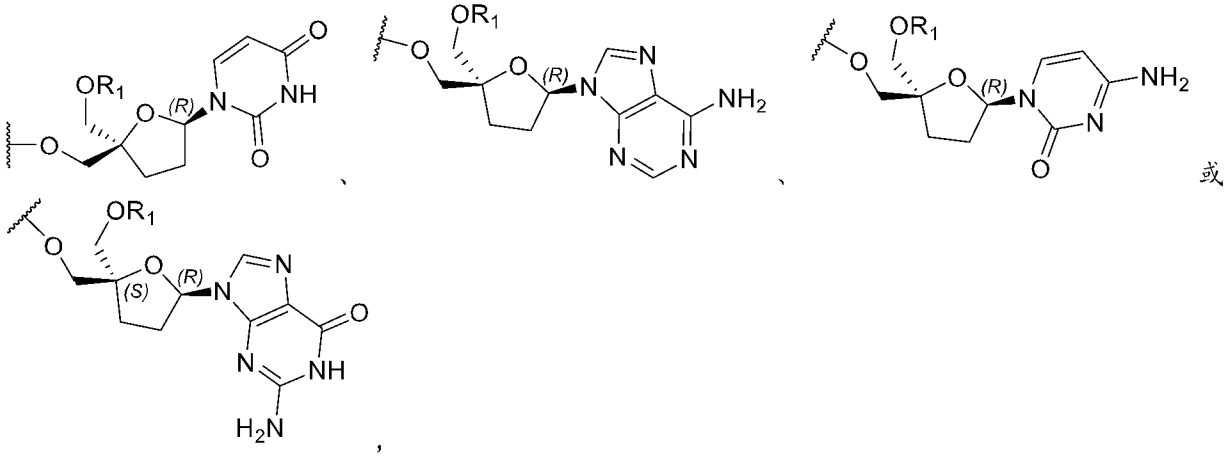
在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其中，所述式(I)化合物选自式(II)或(III)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：


(II)

(III)

其中，

各变量如上文所定义；

在一些具体的实施方案中，所述式(I)化合物选自以下化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：



 表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

 和 R_1 不同时为 H。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其具有 14 至 30 个核苷酸。

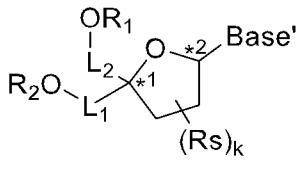
在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其在 5’端包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其在 3’端包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其在 5’端和 3’端分别包含如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，本发明涉及上述寡核苷酸，其在寡核苷酸内部包含一个或多个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

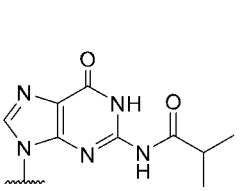
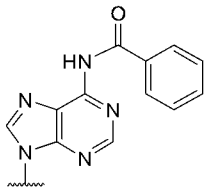
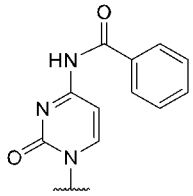
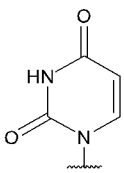
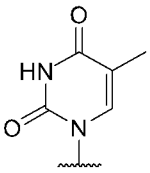
在一些实施方案中，本发明涉及式(I')化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:



(I')

其中，R_1和R_2独立地选自 H、反应性磷基团、羟基保护基或固相载体;

Base'选自 H、修饰或未修饰的碱基或离去基，优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C；优选地，

Base'选自 、、、或;

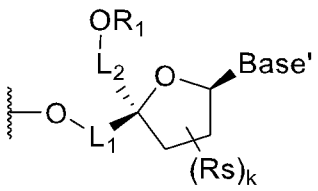
*1、*2、L_1、L_2、Rs 和 k 如前述所定义。

在一些实施方案中，本发明涉及上述式(I')化合物，其中，R_1和R_2为 H。

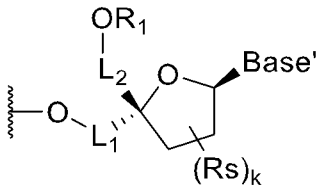
在一些实施方案中，本发明涉及上述式(I')化合物，其中，R_1和R_2选自反应性磷基团，优选亚磷酰胺、H-膦酸酯、烷基-膦酸酯、磷酸酯或磷酸酯模拟物，例如天然磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷硫代磷酸酯、膦酸酯、卤素取代的膦酸酯和磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、二磷酸酯或三磷酸酯，优选-$P(OCH_2CH_2CN)(N(iPr)_2)$。

在一些实施方案中，本发明涉及上述式(I')化合物，其中，R_1和R_2选自保护基，优选羟基保护基，例如三甲基硅基(TMS)、三乙基硅基(TES)、二甲基异丙基硅基(DMIPS)、二乙基异丙基硅基(DEIPS)、叔丁基二甲基硅基(TBDMS)、叔丁基二苯基硅基(TBDPS)、三异丙基硅基(TIPS)、乙酰基(Ac)、氯乙酰基、二氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基(TFA)、苯甲酰基、对甲氧基苯甲酰基、9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)、烯丙氧羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、苯甲基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)、烯丙基、三苯基甲基(Tr)、双对甲氧基三苯甲基(DMTr)、甲氧基甲基(MOM)、苯氧基甲基(BOM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、甲硫基甲基(MTM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、-$C(O)CH_2CH_2C(O)OH$ 或 4,4'-二甲氧基三苯甲基，优选 DMTr。

在一些实施方案中，上述式(I')化合物选自式(II')或(III')化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:

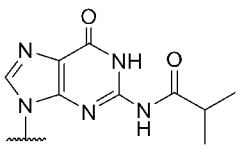
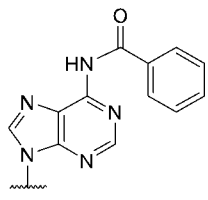
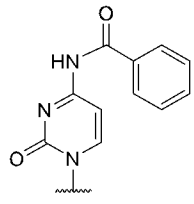
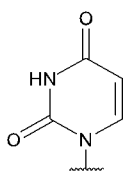
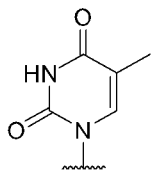


(II')



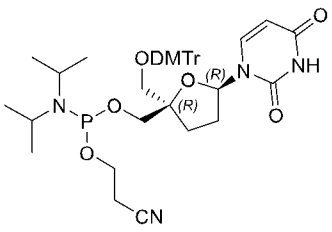
(III')

其中，

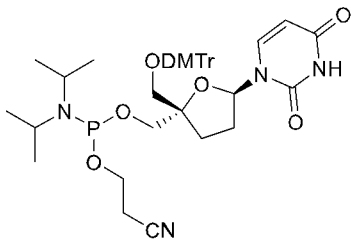
Base'选自 、、、或;

其他各变量如上文所定义。

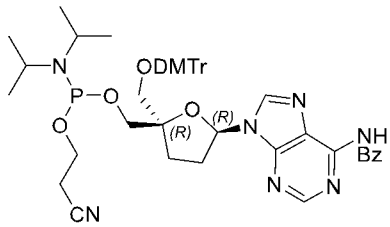
在一些具体的实施方案中，上述式(II')或(III')化合物选自以下化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:



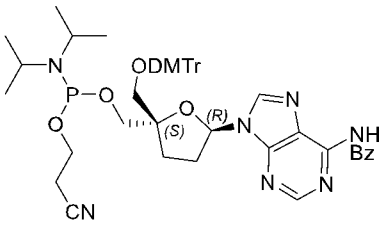
CE1-P1、



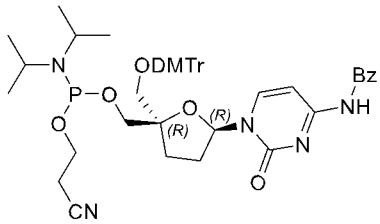
CE1-P2、



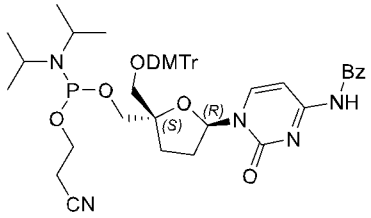
CE2-P1、



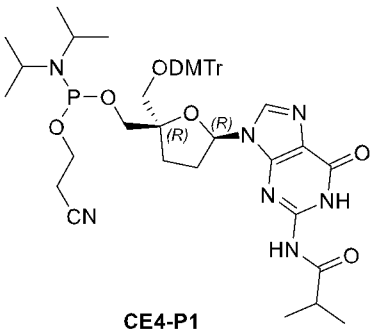
CE2-P2、



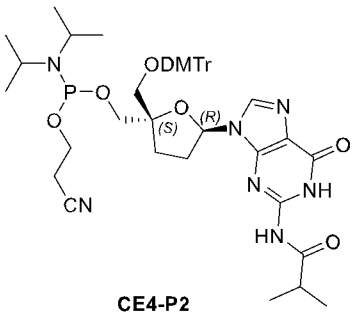
CE3-P1、



CE3-P2、

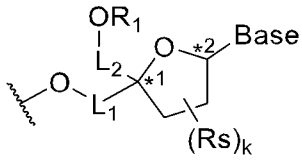


CE4-P1 或



CE4-P2。

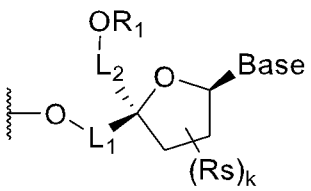
在一些实施方案中，本发明涉及双链 RNA，其具有正义链和反义链，各链具有 14 至 30 个核苷酸，所述反义链包含与所述正义链和靶标 mRNA 充分互补的序列，其中所述正义链和/或反义链包含一个或多个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:



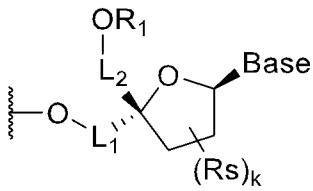
(I)

其中，各变量如本文所定义。

在一些实施方案中，所述式(I)化合物选自式(II)或式(III)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体:



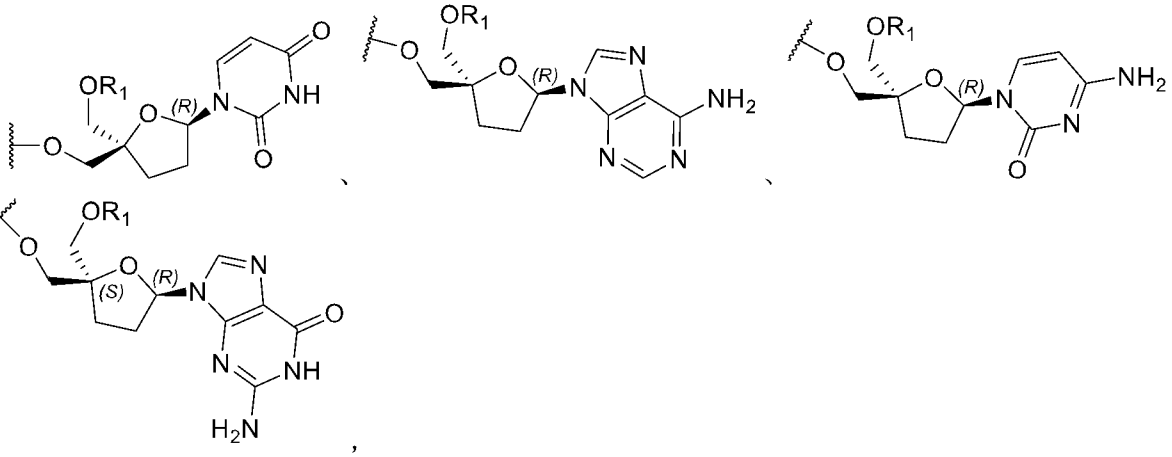
(II)



(III)

其中，各变量如本文所定义;

在一些具体的实施方案中，所述式(I)化合物选自以下化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：

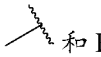


或

，

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的正义链在 5’端包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的正义链在 3’端包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的正义链在 5’端和 3’端分别包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的正义链在寡核苷酸内部包含一个或多个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的反义链在 5’端包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的反义链在 3’端包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的反义链在 5’端和 3’端分别包含一个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的反义链在寡核苷酸内部包含一个或多个如本文所述的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 的正义链和反义链各具有 20 至 25 个核苷酸。

在一些实施方案中，所述双链 RNA 任意位点中的一个或多个可为式(I)化合物，例如：

正义链 5’端第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 位核苷酸；

反义链 5’端第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 位核苷酸。

在一些实施方案中，本发明涉及双链RNA，其中所述反义链5’端第2位和第14位核苷酸不为式(I)化合物。

在一些具体的实施方案中，所述双链RNA的以下位点中的一个或多个为式(I)化合物：

正义链5’端第4、6、7、9、10、13、15、17位核苷酸；

反义链5’端第1、4、5、6、7、12、16、18、20、21位核苷酸。

在一些具体的实施方案中，所述双链RNA的以下位点中的一个或多个为式(I)化合物：

正义链5’端第4、6、7、9、10、13、15、17位核苷酸；

反义链5’端第1、4、6、7、16、18、20、21位核苷酸。

在一些实施方案中，本发明涉及双链RNA，其中所述式(I)化合物位于该反义链5’端的第2-8位，例如第2、3、4、5、6、7或8位。

在一些具体的实施方案中，所述式(I)化合物位于该反义链5’端的第5-7位，例如第5位、第6位或第7位。

在一些具体的实施方案中，所述式(I)化合物位于该反义链5’端的第5位。

在一些具体的实施方案中，所述式(I)化合物位于该反义链5’端的第7位。

在一些实施方案中，所述双链RNA相比于具有相同序列但不包含如本文所述的式(I)化合物，显示降低的脱靶毒性。

在一些实施方案中，所述双链RNA的反义链具有与所述正义链和靶标mRNA充分互补的序列，并具有诱导靶标mRNA降解的能力。

在一些实施方案中，本发明涉及药物组合物，其包含如本文所述的双链RNA分子，和药学上可接受的载体或赋形剂。

在一些实施方案中，本发明涉及试剂盒，其包含如本文所述的双链RNA分子。

在一些实施方案中，本发明涉及细胞，其含有如本文所述的双链RNA分子。

在一些实施方案中，本发明涉及一种用于抑制细胞中靶基因的表达的方法，包括将如本文所述的双链RNA分子引入该细胞的步骤。

在一些实施方案中，本发明涉及一种用于抑制细胞中靶基因的表达的方法，包括在所述细胞中表达如本文所述的双链RNA分子。

在一些实施方案中，本发明涉及一种用于降低细胞中脱靶毒性的方法，包括将如本文所述的双链RNA分子引入该细胞的步骤。

在一些实施方案中，本发明涉及一种用于降低细胞中脱靶毒性的方法，包括在所述细胞中表达如本文所述的双链RNA分子。

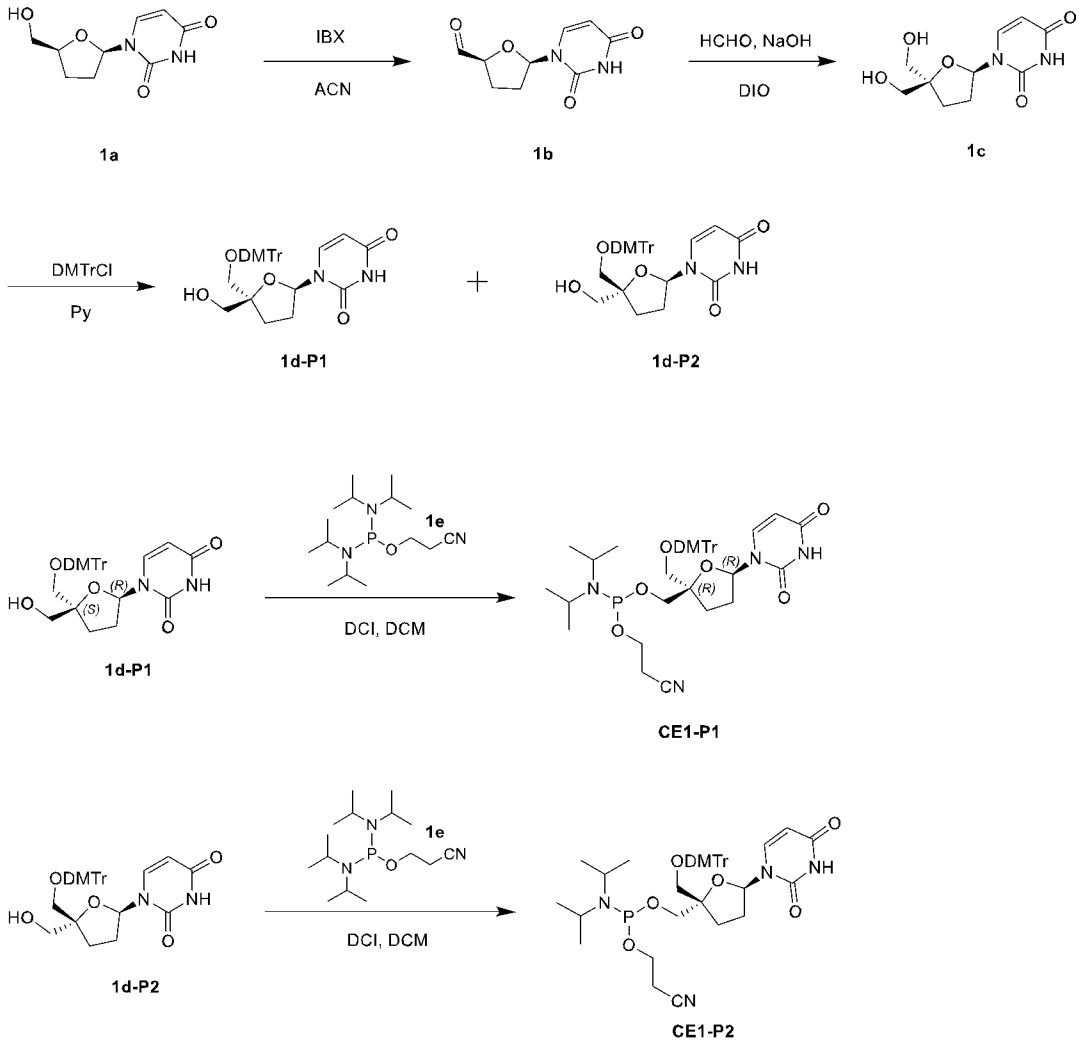
实施例

以下实施例用于例示本发明而非限制本发明的范围。

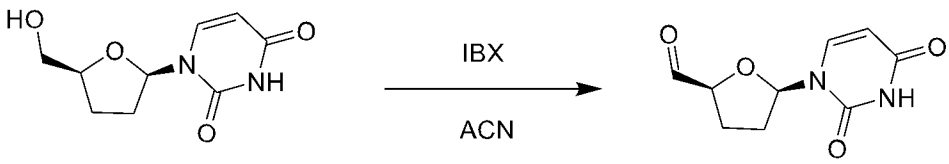
缩写	全称
IBX	2-碘酰基苯甲酸

Py	吡啶
DCI	4,5-二氰基咪唑
DCM	二氯甲烷
DIO	1,4-二氧六环
DMTrCl	4,4'-二甲氧基三苯基氯甲烷

实施例 1. 化合物 CE1 的制备

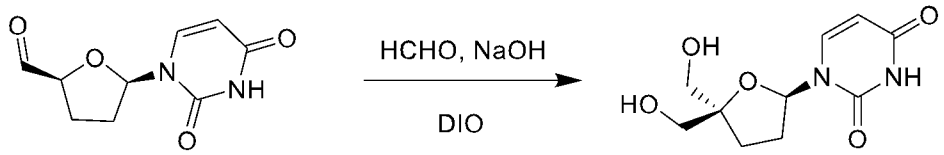


1. 化合物 **1b** 的制备



将化合物 **1a** (3.00 g, 14.1 mmol)溶于乙腈(60 mL)中，在 80 ℃ 加入 IBX (5.94 g, 21.2 mmol)。80 ℃ 搅拌一小时后，将反应液直接过滤，滤液减压浓缩，得到粗品化合物 **1b** (2.97 g, 14.1 mmol, 99.9%)，直接用于下一步反应。

2. 化合物 **1c** 的制备

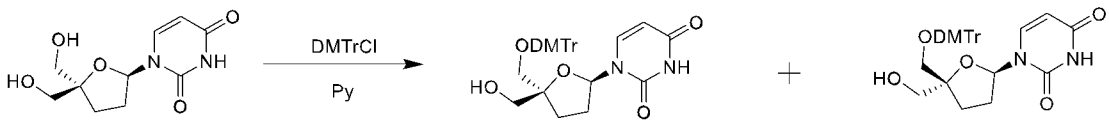


1b **1c**

将化合物 **1b** (2.97 g, 14.1 mmol)溶于 1,4-二氧六环 (57.0 mL)中，在 0 ºC 加入甲醛水溶液（4.16 mL, 113 mmol）和 NaOH 水溶液（26.8 mL, 53.6）。25 ºC搅拌一小时后，用 10%醋酸水溶液将反应液 pH 值调至 5-7 后减压浓缩，所得残留物反相柱层析分离纯化（NH_4HCO_3 水溶液/乙腈）得到化合物 **1c**（570 mg,16.7%）。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.05-6.02 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 5.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.03-5.01 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.84-4.81 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 3.49-4.47 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.33-3.28 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 2.32-2.34 (m, 1H), 1.93-1.86 (m, 3H).

3. 化合物 **1d-P1** 和 **1d-P2** 的制备



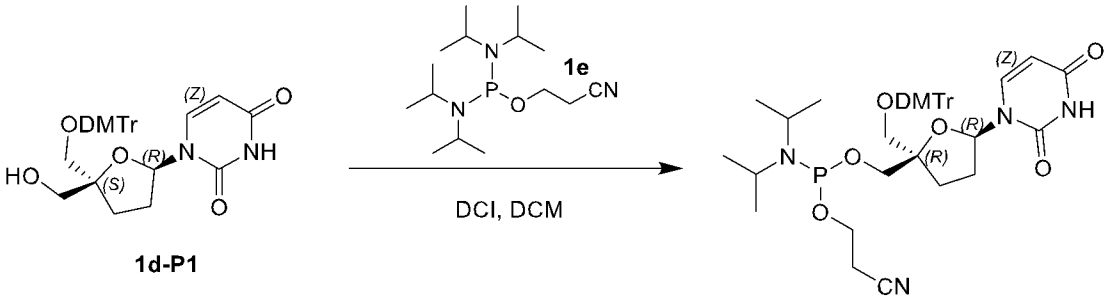
1c **1d-P1** **1d-P2**

将化合物 **1c** (2.5 g, 10.3 mmol)溶于吡啶(16.5 mL)中，在 0 ºC 加入 DMTrCl (3.7 g, 10.8 mmol)。0 ºC搅拌一小时后，反应液用乙酸乙酯(50.0 mL*2)萃取，饱和氯化钠水溶液(50.0 mL)洗涤，有机相 Na_2SO_4 干燥，过滤后减压浓缩，所得残留物反相柱层析分离纯化（NH_4HCO_3 水溶液/乙腈）得到化合物 **1d-P1** (1.90 g, 33.8%)和化合物 **1d-P2** (710 mg, 12.6%)。

化合物 **1d-P1**：**^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.55 (s, 1H), 7.66 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.27 - 7.05 (m, 7H), 6.85 - 6.73 (m, 4H), 6.04 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.66 (dd, J = 2.0, 8.0 Hz, 1H), 3.78 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.64 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.10 - 2.94 (m, 2H), 2.45 - 2.28 (m, 1H), 2.10 - 1.95 (m, 2H), 1.91 - 1.82 (m, 1H).

化合物 **1d-P2**：**^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.07 (br s, 1H), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.24-7.14 (m, 7H), 6.76 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.14 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.54-3.42 (m, 2H), 3.25 (q, J = 10.0 Hz, 2H), 2.50-2.40 (m, 1H), 2.30 (br s, 1H), 2.13-2.05 (m, 1H), 2.00-1.93 (m, 1H).

4. 化合物 **CE1-P1** 的制备

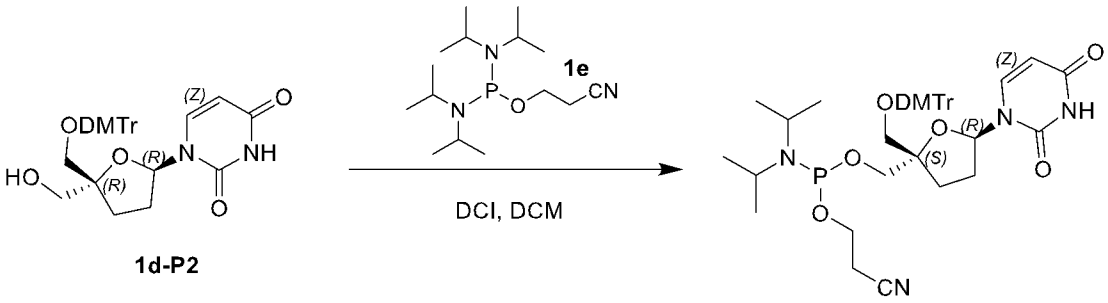


1d-P1 **CE1-P1**

将化合物 **1d-P1** (600 mg, 1.10 mmol)溶于二氯甲烷(4.20 mL)中，在 0 ºC 加入化合物 **1e** (0.70 mL, 2.20 mmol)和 DCI (143 mg, 1.21 mmol)。0 ºC 搅拌两小时后，将反应液直接用硅胶柱纯化（石油醚/乙酸乙酯/三乙胺），得到化合物 **CE1-P1** (650 mg，收率：79.2%)。

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.3 (brs, 1H), 7.82-7.72 (m, 1H), 7.38-7.24 (m, 9H), 6.88 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 6.14 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.62 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.85-3.68 (m, 10H), 3.50 (d, J = 1.2 Hz, 2H), 3.02 (s, 2H), 2.73-2.70 (m, 2H), 2.28-2.26(m, 1H), 2.07-1.92 (m, 3H), 1.12-1.04 (m, 12H).

5. 化合物 **CE1-P2** 的制备



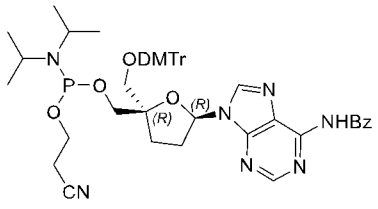
1d-P2 **CE1-P2**

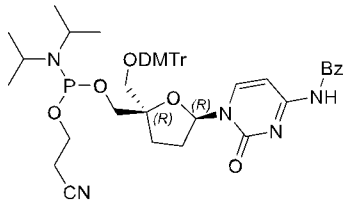
除起始化合物外，化合物 **CE1-P2** 的合成步骤与化合物 **CE1-P1 相同**

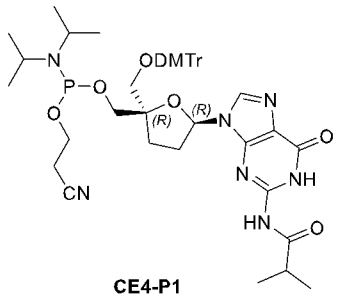
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ11.3 (brs, 1H), 7.60 (d, J = 5.60 Hz, 1H), 7.36-7.24 (m, 9H), 6.88 (brs, 4H), 6.12 (brs, 1H), 5.30 (brs, 1H), 3.73-3.51 (m, 12H), 3.24-3.16 (m, 2H), 2.70 (m, 2H), 2.50 (s, 1H), 2.06-2.01 (m, 3H), 1.11-1.04 (m, 12H).

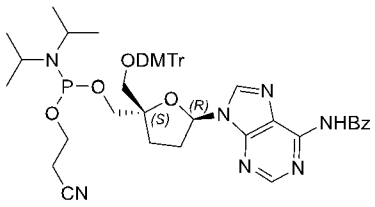
实施例 2. 化合物 CE2-CE4 的制备

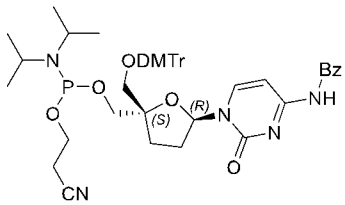
根据上文实施例 1 的方法，使用相应碱基替换实施例 1 中化合物 1a 的尿嘧啶碱基作为起始化合物，制备如下化合物 CE2-P1、CE2-P2、CE3-P1、CE3-P2、CE4-P1 和 CE4-P2。

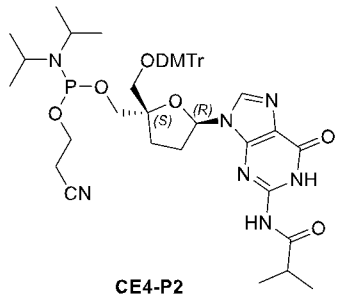

CE2-P1


CE3-P1


CE4-P1


CE2-P2

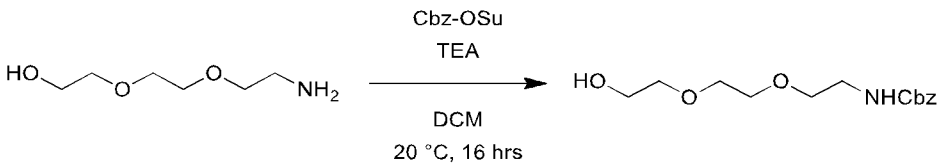

CE3-P2


CE4-P2

实施例 3. 化合物 E7 的制备

1. 中间体 3-4 的制备

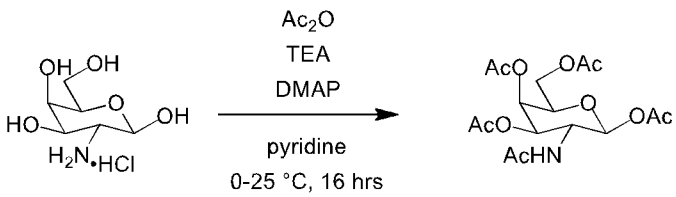
1.1 化合物 2 的制备



1 2

在 15 ℃下向化合物 1 (300 g, 2.01 mol)的 DCM (1.80 L)中缓慢加入苄基(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)碳酸酯 (600g, 2.40 mol) 并逐滴加入 TEA (203 g, 2.01 mol, 280 mL)。加入后，将混合物在 25 ℃下搅拌 16 小时。TLC（二氯甲烷:甲醇=10:1）显示反应物 1 (R_f = 0.32)被保留且检测到一个重要新点(R_f = 0.52)。使用饱和碳酸氢钠溶液洗涤反应混合物(1.00 L x 2)，使用盐水(1.00 L)洗涤有机相，用无水 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。不经纯化，化合物 2 (约 385 g)为黄色油状。

1.2 化合物 2A 的制备

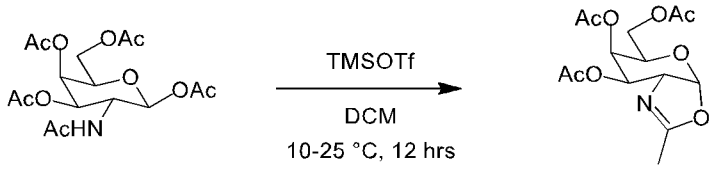


4 2A

在 0-15 ℃下向化合物 4 (350 g, 1.62 mol, HCl)和 Ac_2O (994 g, 9.74 mol, 912 mL)的吡啶(1.75 L)溶液中一次性加入 DMAP (19.8 g, 162 mmol)并逐滴加入 TEA (164 g, 1.62 mol, 226 mL)。将混合物在 25 ℃下搅拌 16 小时。LCMS (产物: RT = 0.687 min)显示起始反应物消耗完全。在 25 ℃下向混合物中添加 EtOAc (1.40 L)并搅拌 30 分钟，随后过滤混合物并使用 EtOAc (300 mL)清洗滤饼。在 25℃下用水(1.45 L)磨碎滤饼 30 分钟。过滤混合物并使用水(175 mL x 3)清洗滤饼，收集滤饼以获得白色固体

状的化合物 2A (约 580 g)。

1.3 化合物 2B 的制备

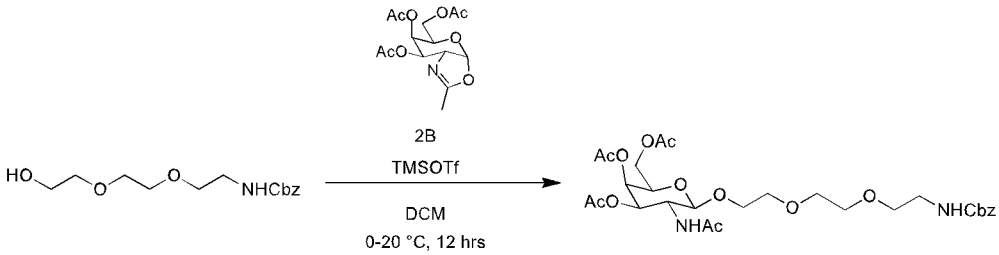


2A 2B

三次反应平行进行。

在 10-15 ℃ 下经 0.5 小时向化合物 2A (200 g, 514 mmol)的 DCM (800 mL)溶液中逐滴加入 TMSOTf (137 g, 616 mmol, 111 mL)。随后将混合物在 25 ℃ 下搅拌 3 小时。TLC（二氯甲烷:甲醇=20:1）显示化合物 2A (R_f = 0.54)消耗完全且新点(R_f = 0.24)形成。合并三次反应。将混合物冷却至 0-15 ℃，在 0-5 ℃ 下缓慢倒入 $NaHCO_3$ 的溶液（300 g 溶解在 3.00 L 水）中，分离有机相并用 DCM (1.00 L x 3)萃取水相，合并有机层，用 Na_2SO_4,干燥，过滤并真空浓缩。不经纯化，获得黄色油状的化合物 2B (约 507 g)用于下一步骤。

1.4 化合物 3 的制备



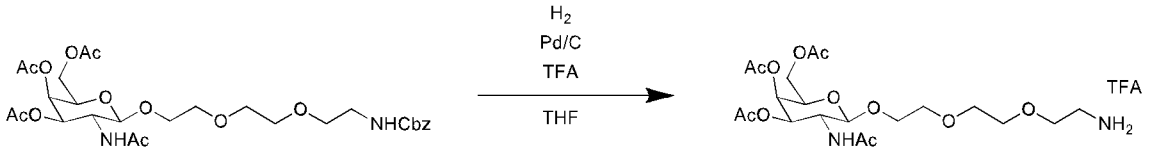
2 3

在 0-10 ℃ 下向在 DCM (1.00 L)中的化合物 2B (250 g, 759 mmol)和化合物 2 (151 g, 531 mmol)的混合物中逐滴加入 TMSOTf (84.4 g, 380 mmol, 69.0 mL)并将混合物在 20 ℃ 搅拌 12 小时。TLC（二氯甲烷:甲醇=20:1）显示化合物 2 (R_f = 0.33)消耗完全且形成新点(R_f = 0.03)。将合并的反应物冷却至 0-5 ℃，随后将反应物倒入 $NaHCO_3$（水溶液，100g 溶于 1L 水）中并在 5-10 ℃ 下搅拌 10 分钟，分离相。使用 DCM (500 mL x 2)萃取水相，合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥，过滤，真空浓缩滤液。不经纯化，化合物 3 (约 360 g)为黄色油状。

^{1}H NMR : (400 MHz, DMSO).

δ=7.79-7.37 (m, 1H), 7.35-7.26 (m, 5H), 5.21-5.20 (m, 1H), 5.00-4.95 (m, 3H), 4.55-4.53 (m, 1H), 4.03-3.86 (m, 3H), 3.61-3.59 (m, 1H), 3.59-3.57 (m, 1H), 3.48-3.40 (m, 6H), 3.39-3.31 (m, 2H), 3.14-3.13 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.76-1.74 (m, 3H).

1.5 中间体 3-4 (TEA 盐)的制备



3 中间体 3-4 (TFA salt)

三次反应平行进行。

在氩气气氛下向在 THF (1.80 L)中的 Pd/C (18.0 g, 16.3 mmol, 10%含量)的混合物中加入化合物

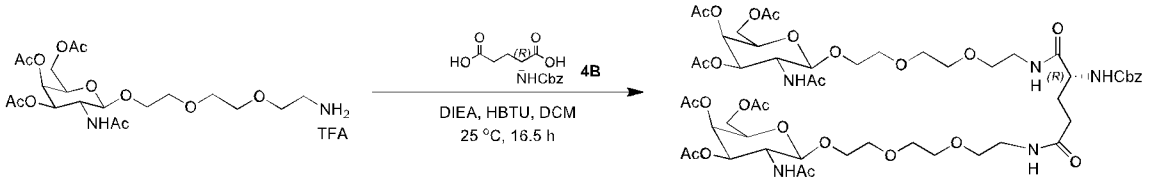
3 (180 g, 293 mmol)和 TFA (33.5 g, 293 mmol, 21.8 mL)。对混悬液排气并使用氢气通气三次。在 H_2 (50 Psi)和 30 ℃ 下将混合物搅拌 2 小时。LCMS (产物: RT = 0.697 min)显示化合物 3 消耗且检测到产物峰。合并三次反应。通过 celite 过滤混合物，减压浓缩滤液以除去溶剂。不经纯化，获得黄色固体状的中间体 3-4（TFA 盐）(393 g, 660 mmol, 74.8%产率, 99.6%纯度, TFA)。

^{1}H NMR : (400 MHz, DMSO-d6)

δ = 7.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 4H), 5.27-5.17 (m, 1H), 5.03-4.91 (m, 1H), 4.60-4.50 (m, 1H), 4.09-3.97 (m, 4H), 3.85 (s, 2H), 3.65-3.46 (m, 10H), 3.04-2.92 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.94-1.86 (m, 3H), 1.82-1.71 (m, 4H).

2. 中间体 3-5 的制备

2.1 化合物 5 的制备

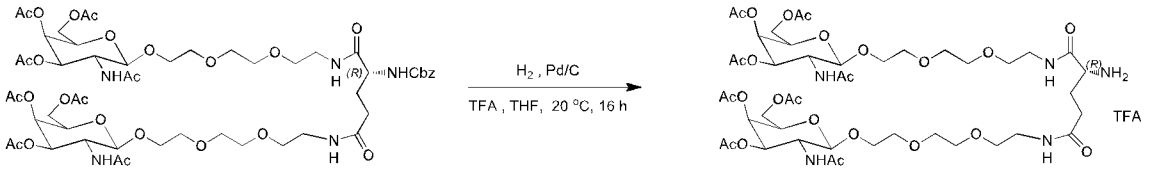


3-4 5

在 25 ºC 下向化合物 4B (10.0 g, 35.5 mmol, 1.00 *eq*)和以上制备的化合物 3-4 (46.3 g, 78.2 mmol, 2.20 *eq*, TFA)的 DCM (1.00 L)溶液中一次性加入 DIEA (30.3 g, 234 mmol, 40.8 mL, 6.60 *eq*)。25 ºC 搅拌半小时。向混合物中加入 HBTU (30.3 g, 234 mmol, 40.8 mL, 6.60 *eq*)。25 ºC 搅拌 16 小时。LCMS (产物: RT = 0.681 mins)显示反应完成，真空浓缩混合物。在 20 ºC 下向混合物中加入 0.50 N HCl (200 mL x 2)，并用 DCM (3 x 500 mL)萃取，合并有机层并用饱和 $NaHCO_3$ (3 x 800 mL)清洗直至 pH = 8，用盐水(3 x 500 mL)清洗，用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩纯化。通过柱色谱(SiO_2, DCM: MeOH = 50:1 - 15:1)纯化残留物。在 40 ºC 下真空浓缩残留物并通过制备型- MPLC (柱: 800 g Agela C18; 流动相: [水 - ACN]; 15-45% 25min; 45% 10min)纯化。真空干燥以获得黄色固体状的化合物 5 (约 180 g + 75.0 g + 87.0 g + 40.0 g + 38.0 g)。

417.0 g 的化合物 3-4 通过 9 批次被转换为化合物 5。

2.2 中间体 3-3 的制备



5 3-3

在氩气气氛下向 Pd/C (3.00 g, 10%含量)的 THF (300 mL)中加入化合物 5 (73.0 g, 61.7 mmol, 1.00 *eq*)和 TFA (7.04 g, 61.7 mmol, 4.57 mL, 1.00 *eq*)。对悬浮液脱气并使用氢气通气三次。在 H_2 (20 Psi)和 20 ℃ 下搅拌 16 小时。TLC（二氯甲烷:甲醇= 8: 1, R_f = 0.0）显示反应完成。通过 celite 过滤混合物，加压浓缩滤液以除去溶剂以获得白色固体状的化合物 3-3 (约 33.4 g + 129 g + 75.0 g)。

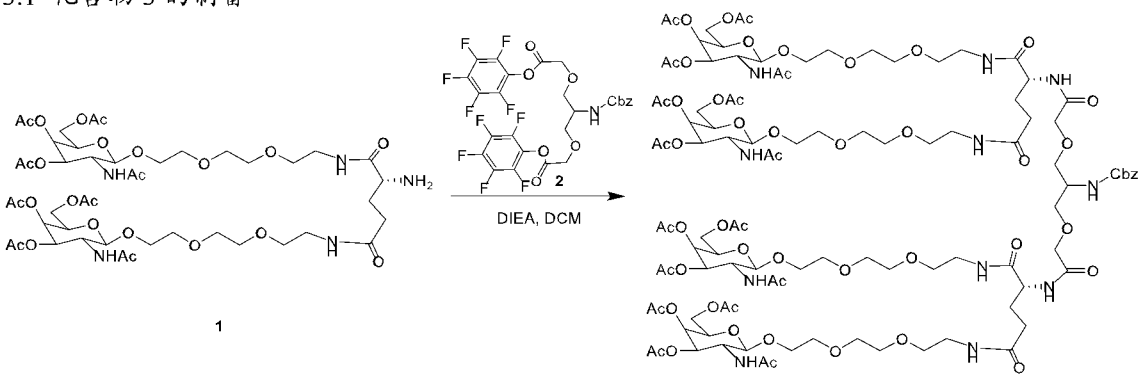
^{1}H NMR: (400 MHz, DMSO)

δ=8.53 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 3H), 8.03 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 3.6 Hz, 2H), 5.22 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 4.96 (dd, *J* = 3.2 Hz, 2H), 4.55 (d, *J* =8.4 Hz, 2H), 4.02 (t, *J* =8.8 Hz, 6H),

3.77-3.59 (m, 5H), 3.58-3.45 (m, 21H), 3.40-3.20 (m, 4H), 2.18 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.17 (d, J =8.0 Hz, 6H), 2.10 (s, 6H), 1.99 (s, 6H), 1.90-1.80 (m, 8H), 1.77 (s, 6H).

3. 化合物 E7 的制备

3.1 化合物 3 的制备



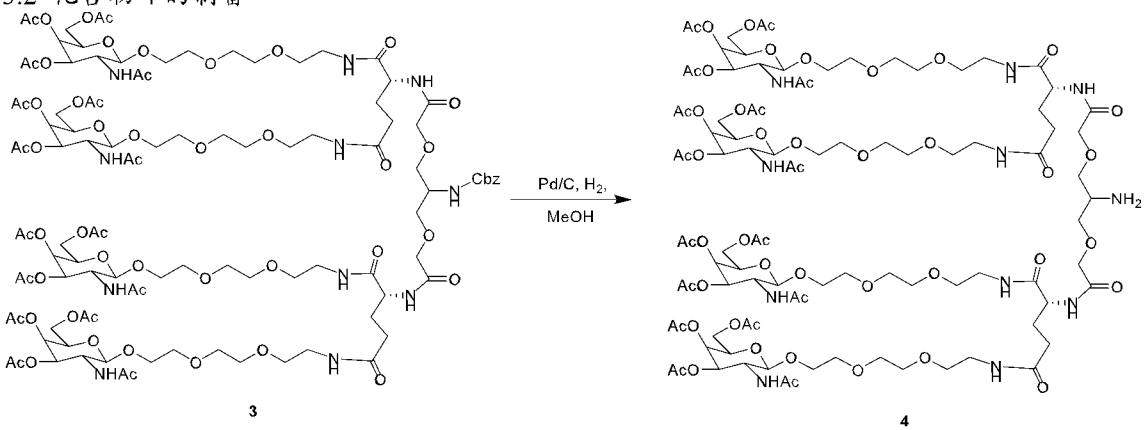
1 2 3

在室温下将化合物 1 (2.00 g, 1.87 mmol, 根据上述中间体 3-3 的方法制备)溶解到 DCM (20.0 mL)中，向溶液中依次加入 DIEA (0.135 mL, 0.814 mmol)，化合物 2 (0.550 g, 0.814 mmol)，置换 3 次氮气。反应混合物在 25°C下搅拌 16 小时。液质联用检测到产物的 MS 响应，薄层色谱（二氯甲烷/甲醇 = 5/1）显示原料消失且有新点生成。反应液在减压下浓缩，所得的粗产品经柱层析纯化（二氯甲烷/甲醇 = 5/1）得到白色固体化合物 3 (约 780 mg)。

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD)

δ=7.28-7.42 (m, 5H), 5.30-5.34 (m, 4H), 5.04-5.14 (m, 6H), 4.63-4.67 (m, 4H), 4.36-4.44 (m, 2H), 4.00-4.20 (m, 23H), 3.91-3.95 (m, 4H), 3.69-3.77 (m, 9H), 3.52-3.67 (m, 32H), 3.34-3.43 (m, 9H), 2.29-2.31 (m, 4H), 2.14 (s, 12H), 2.03 (s, 12H), 1.92-1.96 (m, 24H). LCMS: m/z = 1221.6 $(M/2+H)^+$.

3.2 化合物 4 的制备



3 4

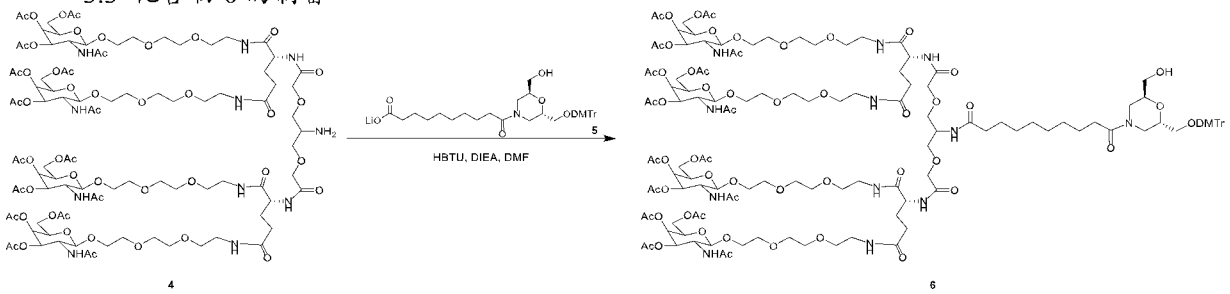
在室温下将化合物 3 (1.10 g, 0.451 mmol)溶解到 MeOH (10.0 mL)中，向该溶液中加入质量分数为 10%的湿 Pd/C (0.050 g, 0.451 mmol)，置换 3 次氢气，反应混合物在氢气氛围下(14.696 psi)、25°C下搅拌 18 小时。液质联用检测到产物的 MS 响应，薄层色谱（二氯甲烷/甲醇 = 10/1，磷钼酸显色）显示原料已完全消耗且有新点生成。反应液过滤，滤液在减压下浓缩得到白色固体化合物 4 (约 840 mg)。

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD)

δ=5.32-5.34 (m 4H), 5.06-5.10 (m, 4H), 4.63-4.65 (m, 4H), 4.38-4.40 (m, 2H), 3.99-4.20 (m, 20H),

3.90-3.97 (m, 4H), 3.69-3.76 (m, 6H), 3.50-3.68 (m, 36H), 3.35-3.44 (m, 11H), 2.28-2.38 (m, 4H), 2.15 (s, 12H), 2.03 (s, 12H), 1.90-1.94 (m, 24H). LCMS: m/z = 1154.7 $(M/2+H)^+$.

3.3 化合物 6 的制备

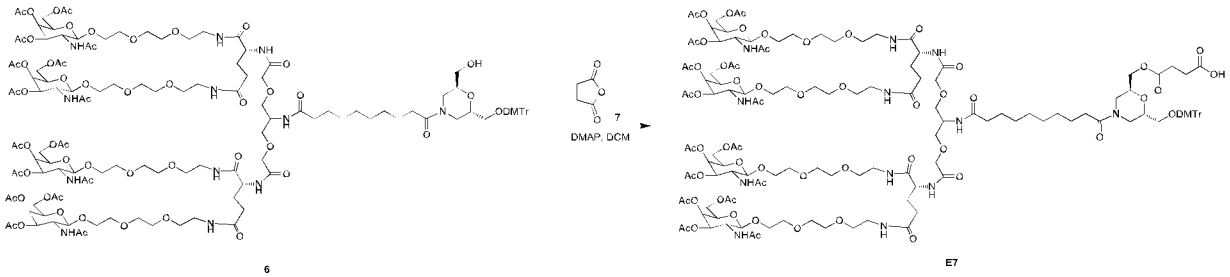


在室温下将化合物 5 (232 mg, 0.364 mmol)溶解到 DCM (10.0 mL)中，向溶液中依次加入 HBTU (207 mg, 0.546 mmol)，DIEA (0.181 mL, 1.09 mmol)）和化合物 4 (840 mg, 0.364 mmol)，置换 3 次氮气。反应混合物在 25℃下搅拌 1 小时。液质联用检测到原料消失，薄层色谱（二氯甲烷/甲醇 = 5/1）显示原料消失且有新点生成。反应液在减压下浓缩，所得的粗产品经柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇 = 8/1~5/1）得到白色固体化合物 6 (约 620 mg)。

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD)

δ=7.41-7.43 (m, 2H), 7.23-7.34 (m, 7H), 6.83-6.90 (m, 4H), 5.31-5.35 (m, 4H), 5.01-5.12 (m, 4H), 4.63-4.65 (m, 4H), 4.41-4.45 (m, 2H), 4.31-4.33 (m, 1H), 3.99-4.22 (m, 22H), 3.87-3.97 (m, 6H), 3.58-3.81 (m, 45H), 3.34-3.43 (m, 10H), 2.19-2.40 (m, 10H), 2.14 (s, 12H), 2.02 (s, 12H), 1.92-1.96 (mz, 24H), 1.48-1.63 (m, 4H), 1.28-1.38 (m, 8H). LCMS: m/z = 1460.0 $(M/2+H)^+$.

4. 化合物 E7 的制备



在室温下将化合物 6 (300 mg, 0.103 mmol)溶解到 DCM (10.0 mL)中，向溶液中依次加入 DIEA (0.102 mL, 0.618 mmol)，化合物 7 (10.3 mg, 0.103 mmol)和 DMAP (12.6 mg, 0.103 mmol)，置换 3 次氮气。反应混合物在 25℃下搅拌 2 小时。液质联用检测到原料消失。反应液在减压下浓缩，所得的粗产品经制备型高效液相色谱制备（制备型-HPLC，柱：Waters Xbridge BEH C18 100*30mm*10um；流动相：水-ACN；B%: 17%-57%,5min）分离得到白色固体化合物 E7 (53.0 mg, 收率 17.08%, 纯度 78.94%)。

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD)

δ=7.41-7.45 (m, 2H), 7.17-7.34 (m, 7H), 6.85-6.89 (m, 4H), 5.32-5.36 (m, 4H), 5.03-5.13 (m, 4H), 4.63-4.67 (m, 4H), 4.38-4.47 (m, 2H), 4.32-4.34 (m, 1H), 4.01-4.26 (m, 22H), 3.88-4.00 (m, 6H), 3.77-3.81 (m, 7H), 3.49-3.76 (m, 45H), 3.33-3.47 (m, 10H), 2.56-2.62 (m, 2H), 2.45-2.55 (m, 3H), 2.21-2.38 (m, 7H), 2.14 (s, 12H), 2.05-2.11 (m, 2H), 2.02 (s, 12H), 1.92-1.96 (m, 24H), 1.47-1.68 (m, 4H), 1.28-1.34 (m, 8H)

MS: m/z = 3022.36 $(M+H)^+$.

实施例 4　　siRNA 的制备

使用本领域熟知的固相亚磷酰胺法制备本发明的 siRNA。具体方法可参见例如 PCT 公开号 WO2016081444 和 WO2019105419，并简述如下。

1. 正义链与配体连接的 siRNA 的制备

1.1 配体与 CPG 载体的连接

1.1.1 化合物 E7 与 CPG 载体的连接

将化合物 E7（53 mg，0.018 mmol）和 HBTU（13.3 mg，0.035 mmol）混合后加入乙腈（5 mL）震荡溶解，随后加入 DIEA（9.0 mg，0.07 mmol）和 DMAP（2.1 mg，0.018 mmol）震荡溶解直至变得清澈。称取空白载体 Resin（550mg，CPG 孔径 1000Å）加入到反应液中，控温 20°C，摇床反应过夜。取样并监测，进行薄层色谱 TLC，结果显示反应完全，其中展开剂为 DCM/甲醇=4/1，用磷钼酸显色。使用砂芯漏斗进行过滤，滤饼用无水乙腈洗涤（20mL*5），取滤饼，使用油泵减压抽滤 6h，得到类白色固体 530mg。

将上述缩合后的产品 530mg 放于 50mL 的圆底瓶中，依次加入 CapC（DMAP/乙腈），CapB（N-甲基咪唑/吡啶/乙腈），CapA（醋酐/乙腈），室温下摇床过夜。过滤，滤饼用乙腈洗涤，20mL*4），取滤饼，油泵减压抽滤 8 h 后得到类白色固体 200mg，用于固相合成。

1.1.2 配体 L96 与 CPG 载体的连接

采用本领域公知的方法将配体 L96 与 CPG 载体连接。

1.2 正义链（SS 链）的合成

通过固相亚磷酰胺合成法，利用上述制备的固相载体做为起始循环，按照正义链核苷酸排布顺序自 3’-5’方向逐一连接核苷单体或核苷酸类似物单体（包括本发明式(I)化合物）。每连接一个核苷单体都包含了脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫代四步反应，合成规模为 5umol 的寡核酸合成条件如下：

核苷单体提供的是 0.05mol/L 的乙腈溶液，每一步反应的条件相同，即温度为 25 度，脱保护使用 3% 的三氯乙酸-二氯甲烷溶液，脱保护 3 次；偶联反应使用的活化剂为 0.25mol/L 的 ETT-乙腈溶液，偶联 2 次；盖帽使用 10%醋酐-乙腈和吡啶/N-甲基咪唑/乙腈（10:14:76, v/v/v），盖帽 2 次；氧化使用 0.05mol/L 的碘/四氢呋喃/吡啶/水（70/20/10, v/v/v），氧化 2 次；硫代使用 0.2mol/L PADS 的乙腈/3-甲基吡啶（1/1,v/v），硫代 2 次。

1.3 反义链（AS 链）的合成

通过固相亚磷酰胺合成法，利用空白的 CPG 固相载体做为起始循环，按照反义链核苷酸排布顺序自 3‘-5’方向逐一连接核苷单体或核苷酸类似物单体（包括本发明式(I)化合物）。每连接一个核苷单体都包含了脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫代四步反应，反义链的 5umol 的寡核酸合成条件和正义链的相同。

1.4 寡核苷酸的纯化与退火

1.4.1 氨解

将合成好的固相载体（正义链或者反义链）加入到 5 mL 的离心管中，加入 3%的二乙胺/氨水

（v/v），35 度（或者 55 度）恒温水浴下反应 16 小时（或者 8 小时），过滤，固相载体用乙醇/水洗涤三次，每次 1 mL，滤液离心浓缩后粗品进行纯化。

1.4.2 纯化

纯化和脱盐的方法是本领域人员所熟知的。例如，可采用强阴离子填料装柱，氯化钠-氢氧化钠体系进行洗脱纯化，产品收集并管，采用凝胶填料纯化柱进行脱盐，洗脱体系是纯水。

1.4.3 退火

根据表 6 将正义链（SS 链）链与反义链（AS 链）以摩尔比（SS 链/AS 链=1/1.05）混合，水浴锅加热至 70-95 度，保持 3-5 min，自然冷却至室温，将体系冻干得到产品。

以相似的方法获得缀合有 L96 的 siRNA。

表 1. 本发明使用的 siRNA 序列

双 链 编号	**序列 (5’ -> 3’)** **第一条为 SS 链序列，第二条为 AS 链序列**
DR007919	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsdGsAmAmdTAmdCUmGmUmCmdCCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 2)
DR007924	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsGfsAmAmdTAmdCUmGmUmCmCfCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 3)
DR007925	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsdGsAmAmdTAmdCUmGmUmCmCfCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 4)
DR007926	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	Ums(ROR15-G)sAmAmdTAmdCUmGmUmCmdCCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 5)
DR007927	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsdGsAmAm(ROR15-U)AmdCUmGmUmCmdCCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 6)
DR007928	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsdGsAmAmdTAm(ROR15-C)UmGmUmCmdCCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 7)
DR007929	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsdGsAmAmdTAmdCUmGmUmCm(ROR15-C)CmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 8)
DR007930	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsdGsAmAmdTAmdCUmGmUmCmdCCm(ROR15-U)UmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 9)
DR007931	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsGfsAmAmUmAfCmUmGmUmCmCfCm(ROR15-U)UmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 10)
DR00	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)

7932	UmsGfsAmAmUm(ROR15-A)CmUmGmUmCmdCCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 11)
DR00 7933	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmsAms-GL6 (SEQ ID NO: 1)
	UmsGfsAmAmUmAfCmUmGmUmCmCfCmUfUmUmUmAmAmsUmsUm (SEQ ID NO: 12)
DR00 2220	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR00 7133	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	(ROR15-U)sUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 15)
DR00 7134	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	Ums(ROR15-U)sAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 16)
DR00 7135	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAm(ROR15-U)AmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 17)
DR00 7136	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCm(ROR15-U)GmsUmsUm (SEQ ID NO: 18)
DR00 7137	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGms(ROR15-U)sUm (SEQ ID NO: 19)
DR00 7138	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUms(ROR15-U) (SEQ ID NO: 20)
DR00 7139	CmsAmsGm(ROR15-U)GfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 21)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR00 7140	CmsAmsGmUmGf(ROR15-U)UfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 22)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR00 7141	CmsAmsGmUmGfUm(ROR15-U)CfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 23)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR00 7142	CmsAmsGmUmGfUmUfCf(ROR15-U)UmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 24)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR00 7143	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUf(ROR15-U)GmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 25)

	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR007144	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCm(ROR15-U)CmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 26)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR007145	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCm(ROR15-U)AmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 27)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR007146	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAm(ROR15-U)AmAm-L96 (SEQ ID NO: 28)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 14)
DR007147	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAm(ROR15-A)CmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 29)
DR007148	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAmUmAmGfAmGmCmAmAmGmAmAfCm(ROR15-A)CmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 30)
DR007149	CmsAmsGmUmGfUmUfCfUfUmGmCmUmCmUmAmUmAmAm-L96 (SEQ ID NO: 13)
	UmsUfsAmUmAmGf(ROR15-A)GmCmAmAmGmAmAfCmAfCmUmGmsUmsUm (SEQ ID NO: 31)

本文中，各缩写的意义如下：

A、U、G 和 C 分布表示天然的腺嘌呤核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸和胞嘧啶核糖核苷酸。

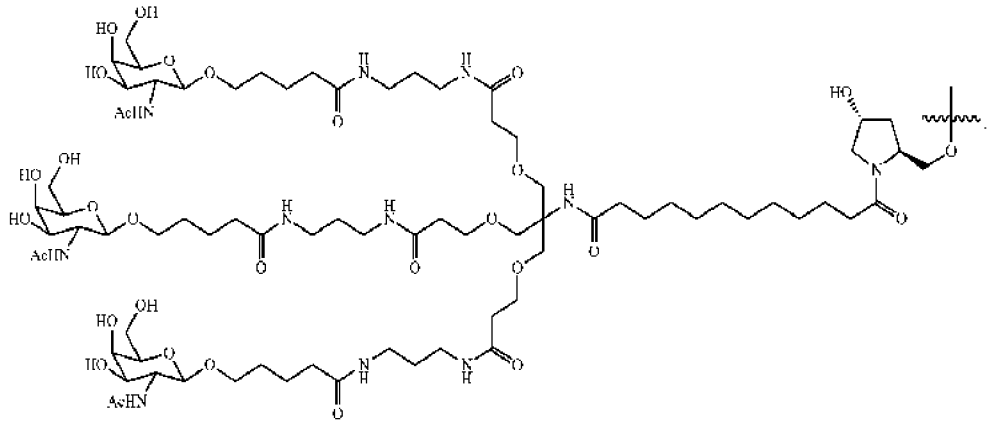
m 表示其左侧相邻的核苷酸是 2'-OCH_3 修饰的核苷酸。例如，Am、Um、Gm 和 Cm 表示 2'-OCH_3 修饰的 A、U、G 和 C。

f 表示其左侧相邻的核苷酸是 2'-F 修饰的核苷酸。例如，Af、Uf、Gf 和 Cf 分别表示 2'-F 修饰的 A、U、G 和 C。

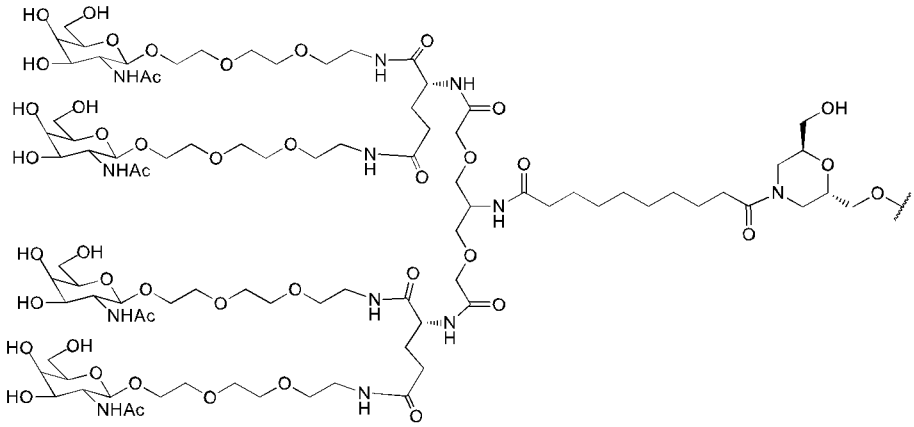
d 表示其右侧相邻的核苷酸是 2'-脱氧核糖核苷酸（即天然 DNA）。例如，dA、dT、dG 和 dC 表示腺嘌呤脱氧核糖核苷酸、胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸、鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸和胞嘧啶脱氧核糖核苷酸。

"s"或"s-"表示其左右相邻的两个核苷酸和/或递送载体通过硫代磷酸酯连接。

L96 表示本领域熟知的以下结构的 GalNAc 递送载体，其中  表示通过磷酸酯基团或硫代磷酸酯基团与 siRNA 连接的位置，可参见例如 PCT 公开号 WO2009073809 和 WO2009082607。



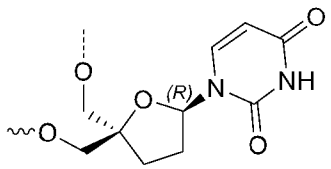
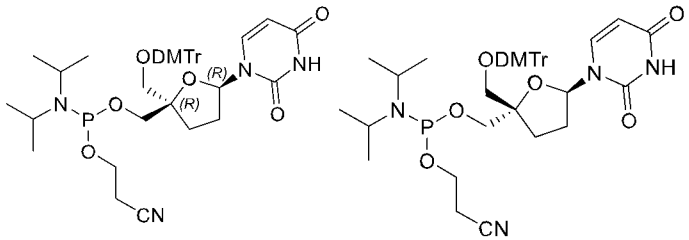
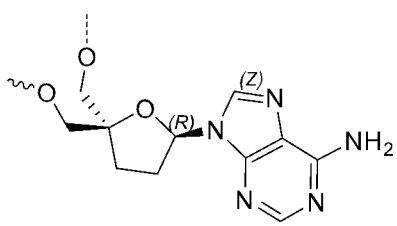
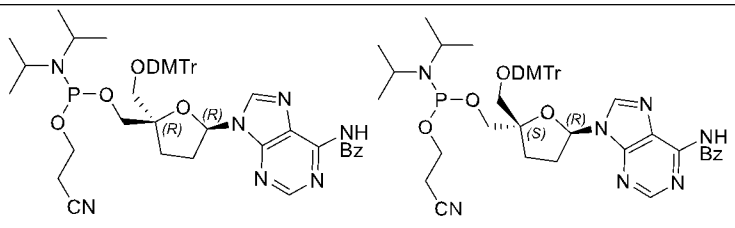
GL6 表示以下结构的 GalNAc 递送载体，其中  表示磷酸酯基团或硫代磷酸酯基团与 siRNA 连接的位置

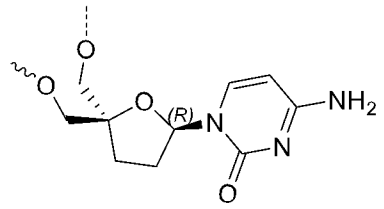
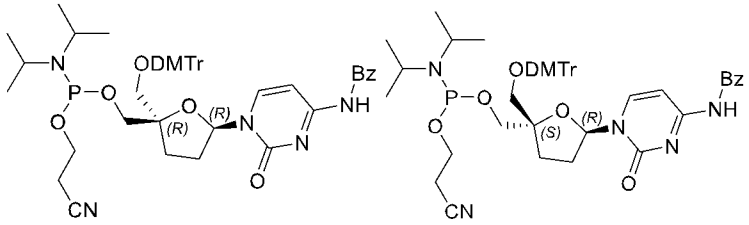
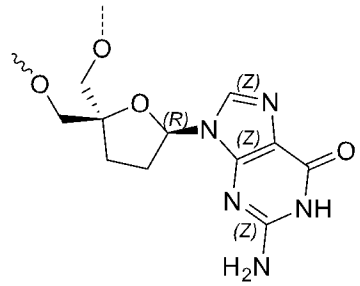
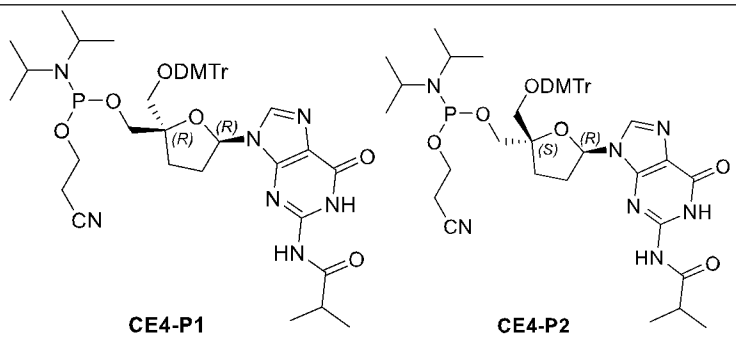


本发明的核苷酸类似物单体如表 2 所示。

以 5’ –> 3’的寡核苷酸链顺序：----- 表示通过骨架基团（例如磷酸酯基团或硫代磷酸酯基团）与寡核苷酸链的上一个核苷酸的 3’碳原子相连，〰 表示通过骨架基团与寡核苷酸链的下一个核苷酸的 5’碳原子与下一个核苷酸连接。

表 2. 本发明的核苷酸类似物单体

编号	结构	对应的中间体
ROR15-U		 CE1-P1 CE1-P2
ROR15-A		 CE2-P1 CE2-P2

ROR15-C		 CE3-P1 CE3-P2
ROR15-G		 CE4-P1 CE4-P2

实施例 5. C57BL/6 野生型小鼠原代肝细胞（PMH）活性筛选实验

1. 自由摄取

分离 C57BL/6 野生型小鼠肝原代细胞，计数，24 孔板铺板，900μL/孔，8×10^4 cells/孔；96 孔板铺板，100μL/孔，1×10^4 cells/孔。之后选择自由摄取。

将 10 μL 稀释化合物加入 90μL Opti-MEM 中混匀，加入对应孔中，37℃、5%CO_2 培养箱中培养 24 小时。对照组不加 siRNA。

2. 荧光定量 PCR

使用高通量核酸提取仪-磁珠法（凡知医疗，FG0412；杭州奥盛，Auto-pure96）提取总 RNA，反转录（PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara，6210B））后进行荧光定量 PCR 检测（TaqMan™ Fast Advanced Master Mix（ABI，4444965））。

引物名称	序列信息（5'-3'）	荧光基团
mTTR-PF	GGGAAGACCGCGGAGTCT (SEQ ID NO: 32)	/
mTTR-PR	CAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACAAA (SEQ ID NO: 33)	/
mTTR-P	CTGCACGGGCTCACCACAGATGA (SEQ ID NO: 34)	5`6-FAM，3`MGB
mGAPDH-PF	CGGCAAATTCAACGGCACAG (SEQ ID NO: 35)	/
mGAPDH-PR	CCACGACATACTCAGCACCG (SEQ ID NO: 36)	/
mGAPDH-P	ACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACT (SEQ ID NO: 37)	5`TET，3`BHQ2

3. 数据统计

计算 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 值并换算成百分比以得到剩余抑制率；

△△Ct=[(Ct 实验组目的基因-Ct 实验组内参)-(Ct 对照组目的基因-Ct 对照组内参)]。

其中目的基因为 mTTR，对照基因为 mGAPDH。

4. mTTR 基因实验结果

本次实验选取 C57BL/6 野生型小鼠原代肝细胞，96 孔板铺板细胞后选择化合物起始浓度为

10nM，10 倍稀释 5 个浓度点（10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、0.001nM）进行 C57BL/6 野生型小鼠原代肝细胞 5 点 IC50 活性筛选-自由摄取，实验结果见表 4。

表 4. 携带本发明的核苷酸的靶向 mTTR 基因的 siRNA 化合物 PMH 5 点 IC50 活性筛选实验结果-自由摄取：

双链代码	10nM	1nM	0.1nM	0.01nM	0.001nM	IC50(nM)
DR002220	1.5%	1.2%	7.8%	42.0%	69.1%	0.0128
DR007133	5.8%	17.4%	47.2%	74.7%	74.7%	0.1569
DR007134	86.3%	78.9%	82.1%	80.3%	74.4%	>10
DR007135	2.0%	3.6%	22.2%	60.9%	75.6%	0.0367
DR007136	2.3%	2.3%	19.8%	61.0%	74.1%	0.0364
DR007137	2.0%	1.8%	8.0%	46.6%	71.9%	0.0147
DR007138	2.0%	6.5%	37.6%	67.4%	75.9%	0.0927
DR007139	1.7%	1.8%	8.1%	46.6%	67.8%	0.0171
DR007140	1.6%	1.8%	12.3%	62.9%	91.6%	0.0176
DR007141	1.9%	6.3%	41.2%	83.4%	92.9%	0.0769
DR007142	8.9%	27.0%	69.6%	94.8%	95.7%	0.2558
DR007143	27.6%	54.5%	90.2%	96.6%	96.1%	0.7535
DR007144	2.4%	2.7%	20.3%	70.1%	89.8%	0.0287
DR007145	2.1%	2.4%	14.9%	62.9%	92.0%	0.0178
DR007146	2.0%	2.1%	11.4%	55.5%	87.3%	0.0143
DR007147	2.0%	5.0%	37.6%	78.1%	92.9%	0.0604
DR007148	1.6%	2.1%	15.8%	62.9%	87.8%	0.0210
DR007149	1.8%	2.1%	16.9%	65.1%	91.4%	0.0207

实施例 6. Huh7 细胞系活性筛选

细胞转染

第一天，消化 Huh7 细胞系后重悬，计数。将细胞重悬液铺板到 96 孔板，100μL/孔，1×10^4 个细胞/孔，18h 后进行转染操作。

第二天，20μM 的 siRNA 母液用 Opti-MEM 进行稀释，取 198μL Opti-MEM 加入 2μLsiRNA 母液，siRNA 终浓度见下文，吹吸混匀，待用。

第二天，取 14.1μL Opti-MEM 稀释 0.9 μL RNAiMAX (Thermo, 13778150)，轻轻吹吸混匀，室温下静置 5 min。然后将配置好的 RNAi-MAX 混合液取 15 μL、稀释好的 siRNA15μL 轻轻吹吸混匀，不要带入气泡，室温静置 10 分钟，加入 96 孔板，10 μL /孔。37°C、5% CO_2 培养箱培养 24 小时(对照组不加 siRNA)。

RNA 提取

按照高通量细胞 RNA 提取试剂盒(凡知医疗，FG0417-L)的操作说明书使用核酸提取仪(杭州奥盛，Auto-pure96)进行细胞 RNA 提取。

RNA 反转录

变性反应混合液配制参考 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara，6210B),，单孔

配制体积：Oligo dT Primer 1μL，dNTP Mixture 1μL，模板 RNA 12.5μL，常规 PCR 仪中 65℃，5 分钟后，冰上迅速冷却 2 分钟。

反转录反应液配制参考 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara，6210B)。每孔中含有 5×Prime Script II Buffer 4μL，RNase Inhibitor 0.5μL，PrimeScript II RTase 1μL。

将变性后的反应液 14.5μL 与反转录反应液缓慢混匀，常规 PCR 仪 42 ℃ 孵育 45 分钟进行反转录，95 ℃ 孵育 5 分钟使酶失活，4℃将反转录产物(cDNA)冷却。

反转结束后，向每个孔的 cDNA 样品中加入不含 DNA 酶和 RNA 酶的蒸馏水 30 μL。

荧光定量 PCR

参考 TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (ABI，4444965)的操作流程，以 20μL 体系进行荧光定量 PCR 反应(ABI，QuantStudio3)。反应程序为： (50℃，2 分钟)×1 Cycle；(95℃，20 秒) ×1 Cycle；(95℃，1 秒；60℃，24 秒)×40 Cycles。

引物名称	序列信息（5'-3'）	荧光基团
hACTB-PF	ACGTGGACATCCGCAAAGAC (SEQ ID NO: 38)	/
hACTB-PR	TCTTCATTGTGCTGGGTGCC (SEQ ID NO: 39)	/
hACTB-P	AACACAGTGCTGTCTGGCGGCACCA (SEQ ID NO: 40)	5`TET，3`BHQ2
hApoc3-PF	TGCCTCCCTTCTCAGCTTCA (SEQ ID NO: 41)	/
hApoc3-PR	GGGAACTGAAGCCATCGGTC (SEQ ID NO: 42)	/
hApoc3-P	ATGAAGCACGCCACCAAGACCGCCA (SEQ ID NO: 43)	5`6-FAM，3`BHQ1

数据统计

计算 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 值并换算成百分比以得到剩余抑制率；

△△Ct=[(Ct 实验组目的基因-Ct 实验组内参)-(Ct 对照组目的基因-Ct 对照组内参)]。

目的基因为 hApoc3，内参为 hACTB。

本次实验选取 Huh7 细胞系，选择化合物起始浓度为 10nM，3 倍梯度稀释 11 浓度点（10nM，3.33nM，1.11nM，0.37nM，0.123nM，0.041nM，0.0136nM，0.0045nM，0.00152nM，0.000508nM，0.000169nM）进行本发明化合物细胞系活性筛选，实验筛选结果见表 6。

实施例 7. siRNA 化合物 psi-CHECK2 脱靶活性检测

1. 质粒制备：

脱靶质粒：根据化合物序列设计相应的反义链脱靶质粒，由生工生物工程(上海)股份有限公司制备 psiCHECK2 GSSM-5Hits 重组质粒并将重组质粒稀释至 1000 ng/μL 备用。

2. 细胞转染：

用 HEK293A 细胞（南京科佰，货号 CBP60436），96 孔板 100 μL 细胞重悬液铺板，细胞量：8×10^3 cells/孔。

第二天，首先将孔中的完全培养基吸弃，换成 Opti-MEM 培养基 80 μL/孔，饥饿处理 1.5 h 左右。

质粒混合物：单孔配制量：质粒 0.01 μL/孔，Opti-MEM 8.99 μL/孔。

Lipo 混合：用 Opti-MEM 稀释 Lipo 2000（Lipofectamine™ 2000 转染试剂 ，Thermo，11668019），室温静置 5 分钟，Lipo 混合物具体配制量：Lipo 0.2 μL/孔，Opti-MEM 9.8 μL/孔。

将已配制好的 Lipo 混合物 22μL、化合物 2.2μL、质粒混合物 19.8μL，分别分装到对应的同一

孔中：命名 Well A，吹打混匀后室温孵育 20 分钟后进行共转染。最后将 well A mixture 加入每孔细胞中，20 μL/孔，加上原有 80 μL Opti-MEM，每孔终体积为 100 μL。37°C 5% CO_2 培养箱培养 4 h 后，每孔补加 100 μL 含 20%胎牛血清的 DMEM 培养基。37°C 5% CO_2 培养箱培养 24 h 后检测。

3. 结果检测：

在实验前先将混合好的 Dual-Glo®Luciferase（Dual-Glo® Luciferase Assay System，Promega，E2940）进行复融，等平衡到室温后每管按 1:1 加入 DMEM 配制成底物 I，现配现用。将 Dual-Glo® Stop & Glo® Buffer 进行复融，等平衡到室温后与 Dual-Glo® Stop & Glo®Substrate 100:1 配制成底物 II，现配现用。

真空泵吸去 96 孔培养板中原有的培养基；

每孔加入 150 μL 底物 I，在摇床上室温孵育 10 min；

取 120 μL 底物 I，转移到 96 孔酶标板上，在酶标仪（Tecan，Infinite 200）上读取 Firefly 化学发光值；

再向每孔加入 60 μL 底物 II，在摇床上室温孵育 10 min，在酶标仪上读取 Renilla 化学发光值。

4. 数据分析处理

荧光活性由酶标仪测定，收集得到的 Renilla 信号由 Firefly 信号标准均一化，siRNA 的抑制效果由未经过处理的结果比较得出（剩余抑制活性），其计算过程见下：

均一化 Ren/Fir 比值：Ratio= Renilla（海肾荧光素酶）/Firefly（萤火虫荧光素酶）。

剩余抑制率：2 个复孔（$Ratio_{siRNA}$/ $Ratio_{control}$）*100%的均值：其中 $Ratio_{control}$ 为对照孔（不含 siNRA）2 个复孔 Ratio 的均值，分别计算 2 个复孔的 $Ratio_{siRNA}$/ $Ratio_{control}$，然后取均值即为剩余抑制率；

作图：利用 Graphpad Prism 作图

半数抑制浓度（Half maximal inhibitory concentration，IC50）：本次实验以 Top 和 Bottom 作图，IC50 值根据公式 Y=Bottom+ (Top-Bottom) / (1+10^((LogIC50-X)*HillSlope))求得，其中 Y=50，X=log（浓度）。

本次实验选取 HEK293A 细胞系，选择化合物起始浓度为 40nM，3 倍梯度稀释 11 浓度点（40nM，13.3nM，4.44nM，1.48nM，0.493nM，0.164nM，0.0548nM，0.0182nM，0.00609nM，0.00203nM，0.000677nM）进行本发明化合物 psiCHECK2 GSSM-5Hits 脱靶活性筛选，实验筛选结果见表 7。

表 6. Huh7 细胞系活性 11 点 IC50 筛选实验结果

双链代码	10nM	3.3333nM	1.1111nM	0.37037nM	0.12346nM	0.04115nM	0.01372nM	0.00457nM	0.00152nM	0.00051nM	0.00017nM	IC50 值 (nM)
DR007919	6.6%	8.5%	9.6%	12.0%	22.9%	29.6%	55.7%	84.1%	95.8%	104.7%	113.0%	0.0179
DR007924	14.8%	11.3%	11.8%	21.6%	33.0%	56.1%	93.1%	110.9%	106.8%	105.3%	93.2%	0.0561
DR007925	12.1%	11.8%	11.0%	19.1%	28.0%	48.4%	81.4%	109.2%	116.1%	112.0%	95.9%	0.0409
DR007926	69.6%	86.3%	106.2%	118.6%	121.2%	130.9%	128.1%	125.7%	124.7%	109.5%	96.1%	>10
DR007927	47.6%	46.9%	59.1%	77.8%	102.7%	113.8%	104.0%	111.8%	120.4%	107.5%	97.6%	2.3378
DR007928	23.1%	24.1%	29.0%	37.9%	66.8%	97.8%	130.2%	137.6%	130.9%	124.3%	123.4%	0.1996
DR007929	40.3%	41.4%	55.0%	86.1%	119.7%	137.7%	137.8%	139.6%	134.0%	123.3%	116.2%	1.2865
DR007930	41.2%	47.4%	62.3%	94.3%	118.2%	139.0%	141.1%	136.6%	132.3%	119.2%	106.6%	2.1043
DR007931	47.9%	57.1%	95.0%	126.9%	137.9%	118.3%	110.4%	117.0%	111.0%	108.6%	104.1%	>10
DR007932	24.5%	18.4%	24.9%	35.7%	62.2%	81.7%	109.6%	126.6%	128.7%	129.5%	115.5%	0.1688
DR007933	23.4%	15.4%	16.9%	36.2%	53.7%	71.7%	97.4%	111.2%	141.2%	125.0%	118.8%	0.1210

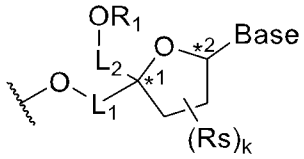
表 7. psiCHECK2 GSSM-5Hits 脱靶活性筛选实验结果

双链代码	40nM	13.3nM	4.44nM	1.48nM	0.493nM	0.164nM	0.0548nM	0.0182nM	0.00609nM	0.00203nM	0.000677nM	脱靶 IC50 值（nM）
DR007919	5.7%	3.4%	3.1%	3.0%	4.4%	10.7%	39.8%	89.0%	106.5%	102.1%	94.1%	0.0458
DR007933	7.9%	5.9%	4.2%	4.1%	6.3%	18.5%	47.7%	86.0%	100.3%	98.9%	103.5%	0.0530
DR007927	72.7%	91.9%	92.9%	88.6%	93.5%	90.1%	94.8%	96.8%	93.4%	96.2%	91.5%	>40
DR007928	57.5%	59.7%	67.8%	68.3%	84.8%	96.4%	100.1%	104.5%	103.3%	97.9%	86.6%	>40

以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 寡核苷酸，其包含一个或多个式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：



(I)

其中，

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H；

L_1 和 L_2 独立地选自 C_{1-10} 亚烷基、C_{2-10} 亚烯基或 C_{2-10} 亚炔基，其中所述基团中不相邻的 1、2、3、4 或 5 个碳原子可以被选自 O、S 和 N 的杂原子替换，优选为 C_{1-10} 亚烷基；

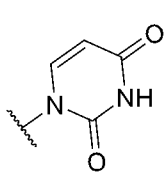
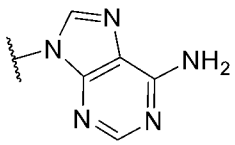
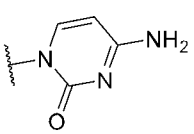
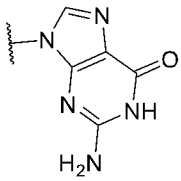
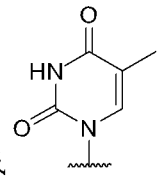
所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个 R 取代；

Rs 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

R 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

k 为 1、2、3、4 或 5；

Base 选自 H、修饰或未修饰的碱基或离去基，优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C；优选地，

Base 选自 、、、、或。

2. 权利要求 1 的寡核苷酸，其中，L_1 和 L_2 独立地选自 C_{1-6} 亚烷基、C_{2-6} 亚烯基或 C_{2-6} 亚炔基，优选为 C_{1-6} 亚烷基；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个 R 取代；

R 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

优选地，L_1 和 L_2 独立地为 C_{1-4} 亚烷基，优选为-CH_2-或-CH_2CH_2-；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个或 3 个 R 取代；

R 选自 H、D、卤素或 C_{1-4} 烷基。

3. 权利要求 1 或 2 的寡核苷酸，其中：

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H；

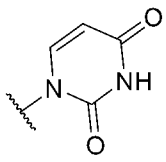
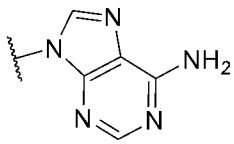
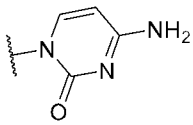
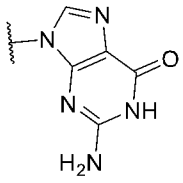
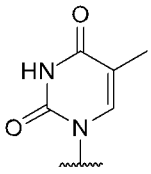
L_1 和 L_2 独立地选自 C_{1-6} 亚烷基、C_{2-6} 亚烯基或 C_{2-6} 亚炔基，优选为 C_{1-6} 亚烷基；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个 R 取代；

Rs 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

R 选自 H、D、卤素、C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基；

k 为 1、2 或 3；

Base 选自 、、、、或。

4. 权利要求 1-3 中任一项的寡核苷酸，其中：

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H；

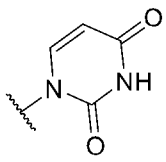
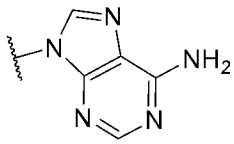
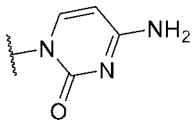
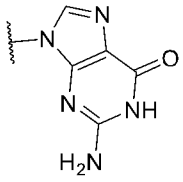
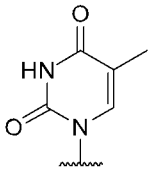
L_1 和 L_2 独立地为 C_{1-4} 亚烷基，优选为-CH_2-；

所述 L_1 和 L_2 任选地被 1 个、2 个或 3 个 R 取代；

Rs 选自 H、D、卤素或 C_{1-4} 烷基；

R 选自 H、D、卤素或 C_{1-4} 烷基；

k 为 1、2 或 3；

Base 选自 、、、、或。

5. 权利要求 1-4 中任一项的寡核苷酸，其中：

*1 和*2 表示手性中心，独立地选自(S)构型或(R)构型；

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

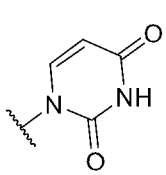
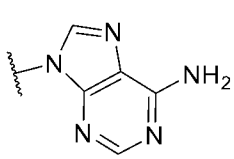
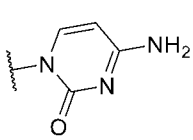
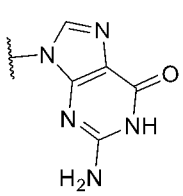
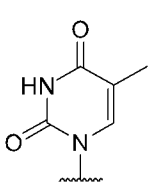
R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H；

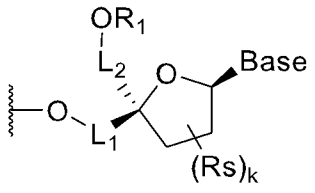
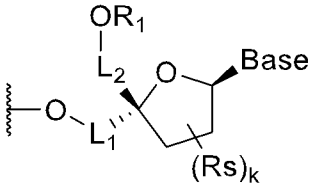
L_1 和 L_2 独立地为 C_{1-4} 亚烷基，优选为-CH_2-；

Rs 为 H 或 C_{1-4} 烷基，优选为 H；

k 为 1、2 或 3；

Base 选自 、、、、或。

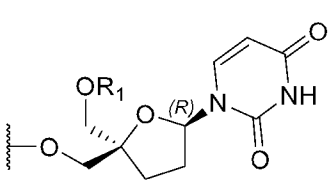
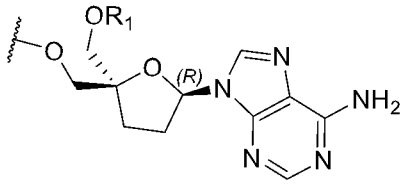
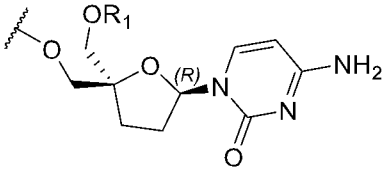
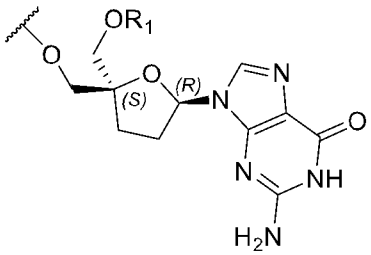
6. 权利要求 1-5 中任一项的寡核苷酸，其中，所述式(I)化合物选自式(II)或(III)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：


(II)

(III)

其中，

各变量如权利要求 1-5 中任一项所定义；

优选地，所述式(I)化合物选自以下化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：


、

、

或

，


表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；


和 R_1 不同时为 H。

7. 权利要求 1-6 中任一项的寡核苷酸，其具有 14 至 30 个核苷酸。

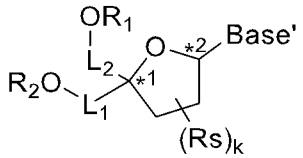
8. 权利要求 1-7 中任一项的寡核苷酸，其在 5’端包含一个权利要求 1-6 中任一项的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

9. 权利要求 1-8 中任一项的寡核苷酸，其在 3’端包含一个权利要求 1-6 中任一项的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

10. 权利要求 1-9 中任一项的寡核苷酸，其在 5’端和 3’端分别包含一个权利要求 1-6 中任一项的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

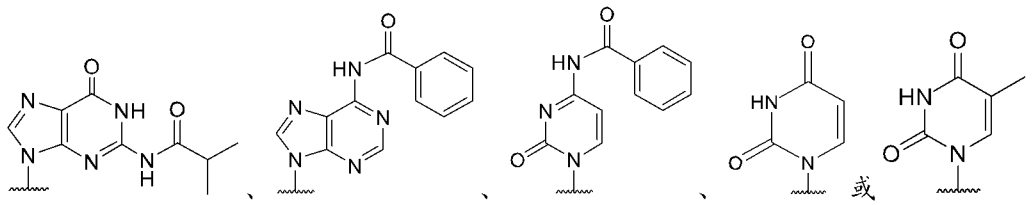
11. 权利要求 1-10 中任一项的寡核苷酸，其在寡核苷酸内部包含一个或多个权利要求 1-6 中任一项的式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

12. 式(I’)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：


(I’)

其中，R_1 和 R_2 独立地选自 H、反应性磷基团、羟基保护基或固相载体；

Base’选自 H、修饰或未修饰的碱基或离去基，优选修饰或未修饰的 A、U、T、G 和 C；优选地，

Base'选自  或 ；

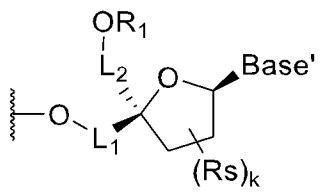
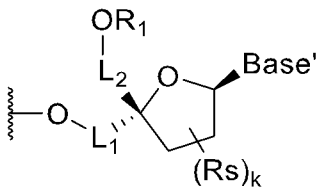
*1、*2、L_1、L_2、Rs 和 k 如权利要求 1-5 中任一项所定义。

13. 权利要求 12 的化合物，其中，R_1 和 R_2 为 H。

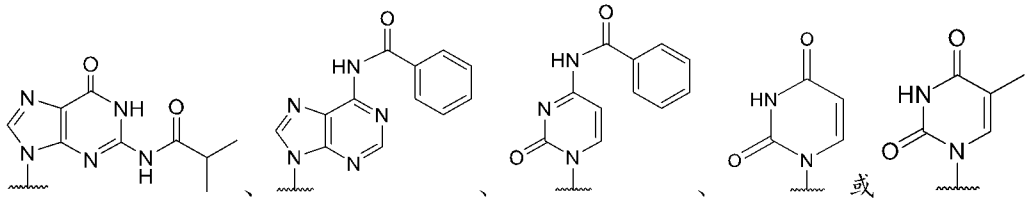
14. 权利要求 12 或 13 的化合物，其中，R_1 和 R_2 选自反应性磷基团，优选亚磷酰胺、H-膦酸酯、烷基-膦酸酯、磷酸酯或磷酸酯模拟物，例如天然磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯、硼烷硫代磷酸酯、膦酸酯、卤素取代的膦酸酯和磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、硫代磷酸二酯、硫代磷酸三酯、二磷酸酯或三磷酸酯，优选-P(OCH_2CH_2CN)($N(iPr)_2$)。

15. 权利要求 12-14 中任一项的化合物，其中，R_1 和 R_2 选自保护基，优选羟基保护基，例如三甲基硅基(TMS)、三乙基硅基(TES)、二甲基异丙基硅基(DMIPS)、二乙基异丙基硅基(DEIPS)、叔丁基二甲基硅基(TBDMS)、叔丁基二苯基硅基(TBDPS)、三异丙基硅基(TIPS)、乙酰基(Ac)、氯乙酰基、二氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基(TFA)、苯甲酰基、对甲氧基苯甲酰基、9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)、烯丙氧羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、苄氧羰基(Cbz)、叔丁氧羰基(Boc)、苯甲基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)、烯丙基、三苯基甲基(Tr)、双对甲氧基三苯甲基(DMTr)、甲氧基甲基(MOM)、苯氧基甲基(BOM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、甲硫基甲基(MTM)、对甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、-C(O)CH_2CH_2C(O)OH 或 4,4'-二甲氧基三苯甲基，优选 DMTr。

16. 权利要求 12-15 中任一项的化合物，其中所述式(I')化合物选自式(II')或(III')化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：

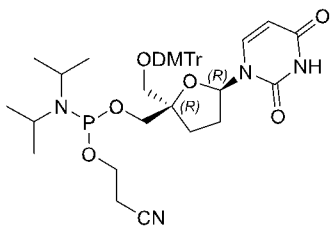
 (II')  (III')

其中，

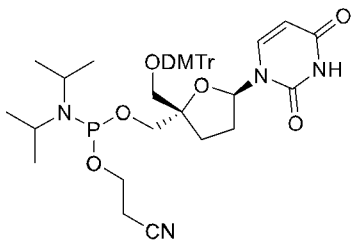
Base'选自  或 ；

其他各变量如权利要求 12-15 中任一项所定义。

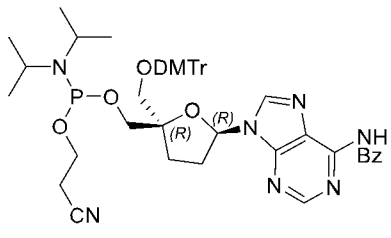
优选地，其中所述式(II')或(III')化合物选自以下化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：



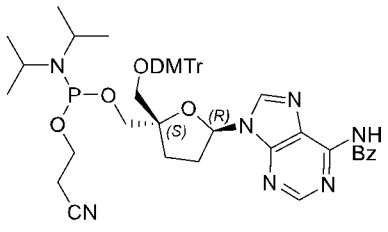
CE1-P1 、

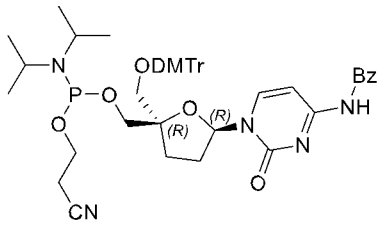


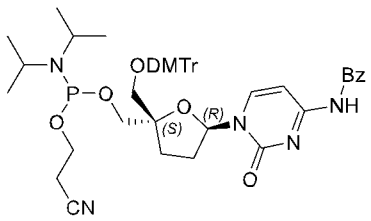
CE1-P2 、

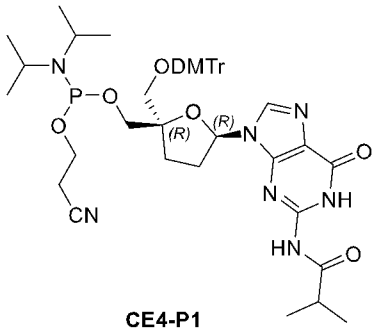


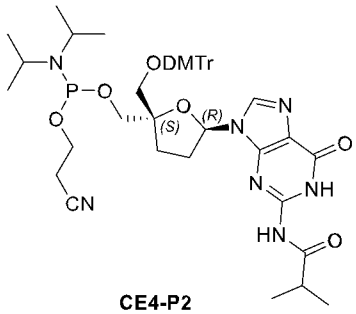
CE2-P1 、


CE2-P2、

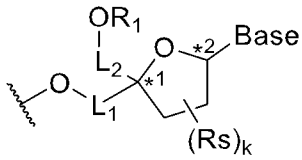

CE3-P1、


CE3-P2、


CE4-P1 或

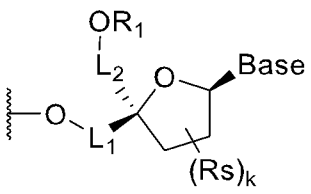

CE4-P2。

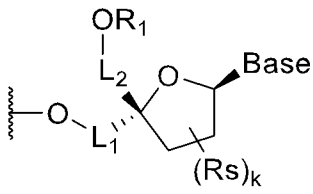
17. 双链 RNA，其具有正义链和反义链，各链具有 14 至 30 个核苷酸，所述反义链包含与所述正义链和靶标 mRNA 充分互补的序列，其中所述正义链和/或反义链包含一个或多个如权利要求 1-6 中任一项所述式(I)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：


(I)

其中，各变量如权利要求 1-5 中任一项所定义。

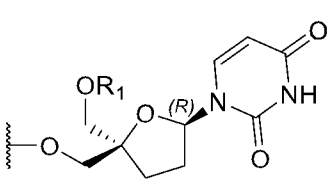
18. 权利要求 17 的双链 RNA，其中所述式(I)化合物选自式(II)或式(III)化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：

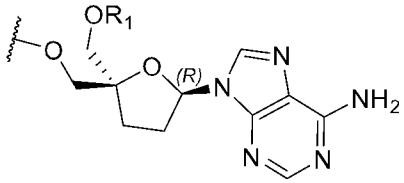

(II)

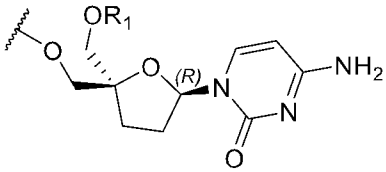

(III)

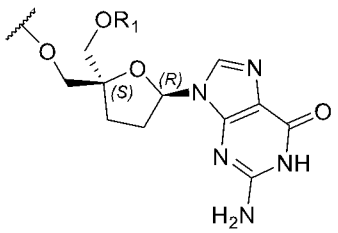
其中，各变量如权利要求 1-5 中任一项所定义；

优选地，所述式(I)化合物选自以下化合物，或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体：


、


、


、


或 ，

表示 H，或表示与相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

R_1 表示 H，或表示与另一相邻核苷酸的磷酸酯或硫代磷酸酯连接的位置；

和 R_1 不同时为 H。

19. 权利要求 17 或 18 的双链 RNA 分子，其中所述反义链 5'端第 2 位和第 14 位核苷酸不为式(I)化合物；

优选地，

以下位点中的一个或多个为式(I)化合物：

正义链 5'端第 4、6、7、9、10、13、15、17 位核苷酸；

反义链 5'端第 1、4、5、6、7、12、16、18、20、21 位核苷酸；

优选地，

以下位点中的一个或多个为式(I)化合物：

正义链 5'端第 4、6、7、9、10、13、15、17 位核苷酸；

反义链 5'端第 1、4、6、7、16、18、20、21 位核苷酸。

20. 权利要求 17-19 中任一项的双链 RNA 分子，其中所述式(I)化合物位于该反义链 5'端的第 2-8 位，优选为第 5-7 位，例如第 5 位、第 6 位或第 7 位，更优选为第 5 位或第 7 位。

21. 权利要求 17-20 中任一项的双链 RNA 分子，其中所述双链 RNA 相比于具有相同序列但不包含权利要求 1-7 中任一项所述的式(I)化合物，显示降低的脱靶毒性。

22. 权利要求 17-21 中任一项的双链 RNA 分子，其中所述反义链具有与所述正义链和靶标 mRNA 充分互补的序列，并具有诱导靶标 mRNA 降解的能力。

23. 药物组合物，其包含如权利要求 17-22 中任一项所述的双链 RNA 分子，和药学上可接受的载体或赋形剂。

24. 试剂盒，其包含如权利要求 17-22 中任一项所述的双链 RNA 分子。

25. 细胞，其含有如权利要求 17-22 中任一项所述的双链 RNA 分子。

26. 一种用于抑制细胞中靶基因的表达的方法，包括将权利要求 17-22 中任一项所述的双链 RNA 分子引入该细胞的步骤。

27. 一种用于抑制细胞中靶基因的表达的方法，包括在所述细胞中表达权利要求 17-22 中任一项所述的双链 RNA 分子。

28. 一种用于降低细胞中脱靶毒性的方法，包括将权利要求 17-22 中任一项所述的双链 RNA 分子引入该细胞的步骤。

29. 一种用于降低细胞中脱靶毒性的方法，包括在所述细胞中表达权利要求 17-22 中任一项所述的双链 RNA 分子。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2024/110992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H19/073(2006.01)i; A61K31/713(2006.01)i; A61P1/16(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07H, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNTXT, CNKI, DWPI, WPABS, REGISTRY (STN), CAPLUS (STN): 核苷酸, 寡核苷酸, 双链, 干扰, nucleotide, oligonucleotide, double-stranded, RNA, siRNA, 结构式检索, structural formula search

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAMAMOTO, Yuji et al. "Oligodeoxynucleotides Having a Loop Consisting of 3'-Deoxy-4'-C-(2-hydroxyethyl)thymidines Form Stable Hairpins" *Biochemistry,* Vol. 43, No. (27), 18 June 2004 (2004-06-18), pages 8690-8699 page 8690, abstract, page 8691, figure 1, page 8694, figures 3-4, and solution 1	1-29
X	SHUTO, Satoshi et al. "Stable Hairpins Having a Loop Consisting of 3'-deoxy-4'-C-(2-hydroxyethyl)thymidines" *Nucleic Acids Symposium Series,* No. no. 48, 31 December 2004 (2004-12-31), pp. 67-68 page 67, left-hand column, introduction, paragraph 1, figure 1, and page 68, solution 1	1-29
A	CN 114728999 A (SANOFI SA) 08 July 2022 (2022-07-08) entire document	1-29
A	WO 2011005860 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 13 January 2011 (2011-01-13) entire document	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 October 2024	**01 November 2024**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2024/110992

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2024/110992

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **26-29**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The method of claims 26-29 is a method for treatment of a disease; however, the present search report is provided on the basis of the corresponding pharmaceutical use.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/110992

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114728999	A	08 July 2022	EP	4025582	A1	13 July 2022
				JP	2022547888	A	16 November 2022
				US	2022372063	A1	24 November 2022
				WO	2021044004	A1	11 March 2021
WO	2011005860	A2	13 January 2011		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2024/110992

A. 主题的分类

C07H19/073(2006.01)i；A61K31/713(2006.01)i；A61P1/16(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07H, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CNTXT, CNKI, DWPI, WPABS, REGISTRY(STN), CAPLUS(STN)：核苷酸，寡核苷酸，双链，干扰，nucleotide, oligonucleotide, double-stranded, RNA, siRNA，结构式检索

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	YAMAMOTO, Yuji等. "Oligodeoxynucleotides Having a Loop Consisting of 3'-Deoxy-4'-C-(2-hydroxyethyl)thymidines Form Stable Hairpins" Biochemistry, 第43卷，第27期，2004年6月18日 (2004 - 06 - 18)，第8690-8699页 第8690页摘要，第8691页图1，第8694页图3-4、方案1	1-29
X	SHUTO, Satoshi等. "Stable hairpins having a loop consisting of 3'-deoxy-4'-C-(2-hydroxyethyl)thymidines" Nucleic Acids Symposium Series, 第48期，2004年12月31日 (2004 - 12 - 31)，第67-68页 第67页左栏引言第1段、图1，第68页方案1	1-29
A	CN 114728999 A (赛诺菲) 2022年7月8日 (2022 - 07 - 08) 全文	1-29
A	WO 2011005860 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.等) 2011年1月13日 (2011 - 01 - 13) 全文	1-29

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2024年10月29日	2024年11月1日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 刘广宇 电话号码 (+86) 010-53962142

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2024/110992

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2024/110992

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求：26−29
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求26−29的方法属于疾病的治疗方法，然而，本检索报告是基于相应的制药用途作出的。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/110992

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114728999	A	2022年7月8日	EP	4025582	A1	2022年7月13日
				JP	2022547888	A	2022年11月16日
				US	2022372063	A1	2022年11月24日
				WO	2021044004	A1	2021年3月11日
WO	2011005860	A2	2011年1月13日		无		