



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109526222 B

(45) 授权公告日 2022.04.29

(21) 申请号 201780034726.9

(72) 发明人 李珍 裴涛 M·劳勒

(22) 申请日 2017.06.06

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109526222 A

代理人 张佳鑫 张静

(43) 申请公布日 2019.03.26

(51) Int.CI.

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/346,304 2016.06.06 US

(56) 对比文件

US 2016046939 A1, 2016.02.18

US 2011196141 A1, 2011.08.11

US 5567811 A, 1996.10.22

审查员 王少华

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/036108 2017.06.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/214112 EN 2017.12.14

(73) 专利权人 箭头药业股份有限公司

权利要求书5页 说明书60页

地址 美国加利福尼亚州

序列表4页 附图1页

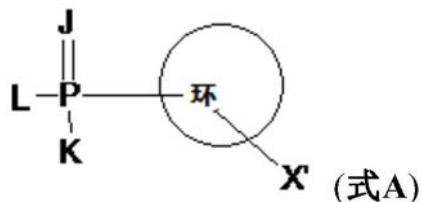
(54) 发明名称

5' -环磷酸酯修饰核苷酸

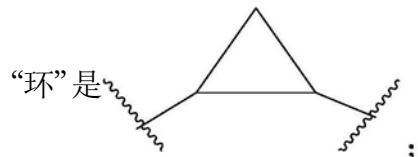
(57) 摘要

本文描述了一种5' -环磷酸酯修饰核苷酸以及包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNA干扰(RNAi)药剂之类的寡核苷酸。本文所述的具有包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的双链或单链寡核苷酸的RNAi药剂可用于调节基因表达以及治疗、诊断、靶标确认、基因组开发应用。包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂和单链反义寡核苷酸可用于治疗对细胞、组织或生物体内的基因表达或活性的抑制作出响应的疾病或病症。

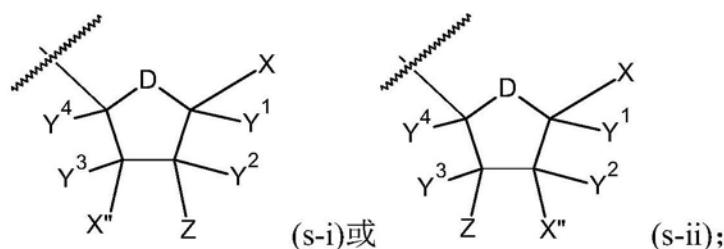
1. 一种式A的化合物：



其中：



X'是



X''包含衍生自RNAi药剂的磷酸酯部分或硫代磷酸酯部分的取代基；

D是O或S；

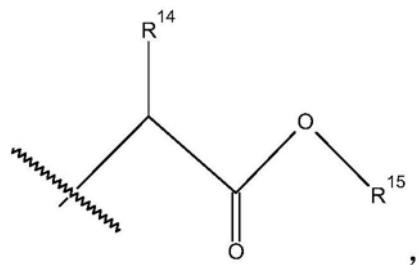
X是9-嘌呤碱基或1-嘧啶碱基；

Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃或卤素；

Y¹、Y²、Y³和Y⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基；

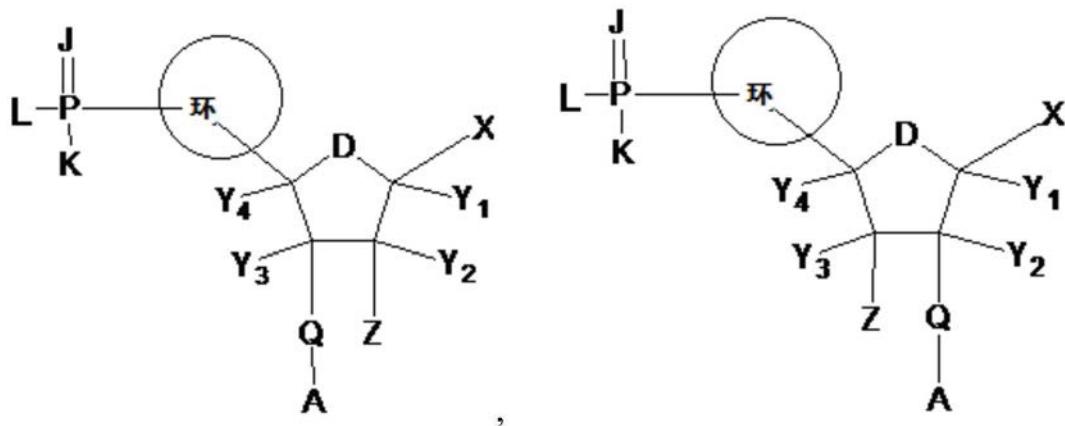
J是O或S；且

K和L各自独立地选自OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、氨基、羟基、氧或-NH-C=(NH)NH₂，且R¹⁵选自H或C₁-C₁₈烷基。

2. 如权利要求1所述的化合物，其具有式I或式II：



(式I)

(式II)

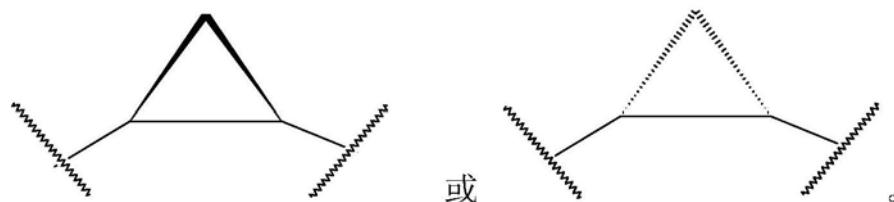
其中，

Q是选自O、S、N(R³⁰)或C(R³¹)(R³²)的二价部分，其中R³⁰是H、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基，且R³¹和R³²各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基；且

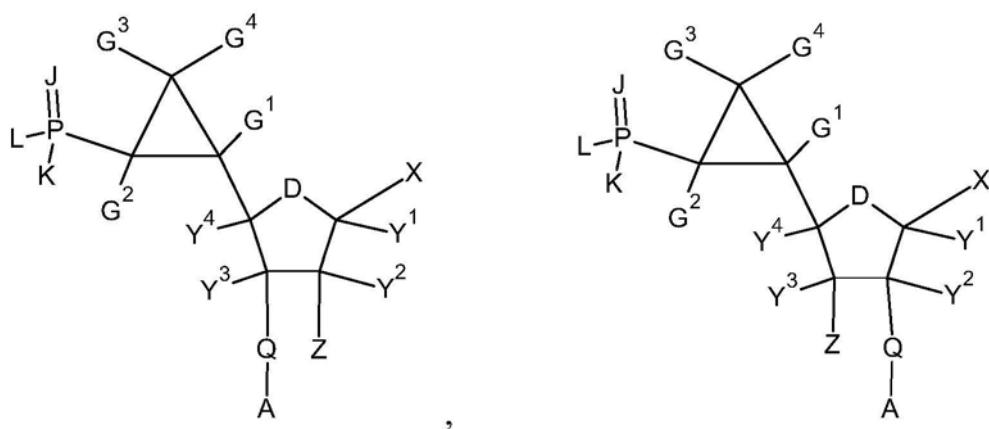
A是衍生自RNAi药剂的磷酸酯部分或硫代磷酸酯部分的取代基。

3. 如权利要求2所述的化合物，其特征在于，Q是O。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的化合物，其特征在于，“环”是：



5. 如权利要求2所述的化合物，其特征在于，所述化合物具有式I-b或式II-b：



(式I-b)

(式II-b)

其中，

D是O或S；

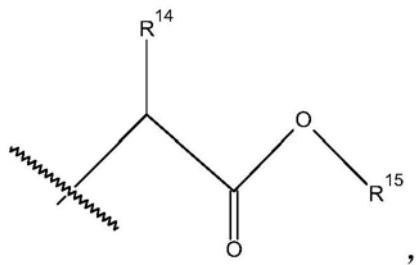
X是9-嘌呤碱基或1-嘧啶碱基；

Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃或卤素；

Y¹、Y²、Y³和Y⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基；

J是O或S；

K和L各自独立地选自0R¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或



其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C=(NH)NH₂，且R¹⁵选自H或C₁-C₁₈烷基；

Q是选自0、S、N(R³⁰)或C(R³¹)(R³²)的二价部分，其中R³⁰是H、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基，且R³¹和R³²各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基；且

A是衍生自RNAi药剂的磷酸酯部分或硫代磷酸酯部分的取代基；且

G¹、G²、G³和G⁴各自是H。

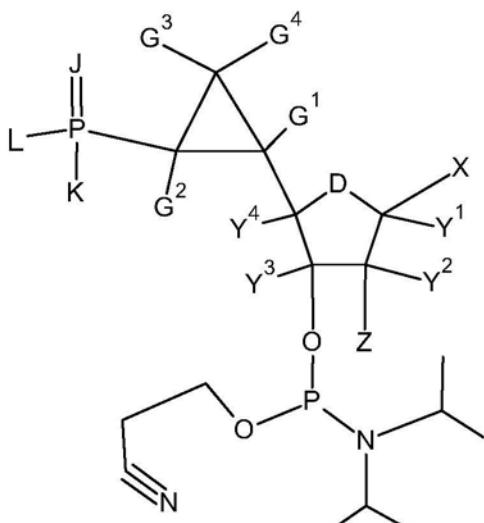
6. 如权利要求5所述的化合物，其特征在于，Q是0。

7. 如权利要求1~3中任一项所述的化合物，其特征在于，D是0。

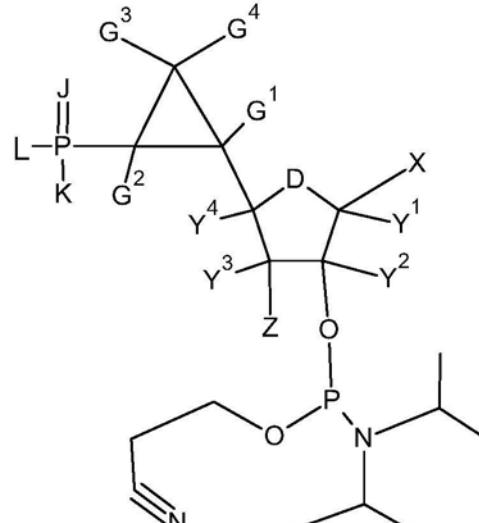
8. 如权利要求1所述的化合物，其特征在于，所述RNAi药剂是双链的。

9. 如权利要求1所述的化合物，其特征在于，X是1-尿嘧啶、1-胸腺嘧啶、1-胞嘧啶、5-甲基-1-胞嘧啶、1-腺嘌呤、9-鸟嘌呤或9-次黄嘌呤。

10. 一种式I-b-5或式II-b-5的化合物：



(式I-b-5)



或

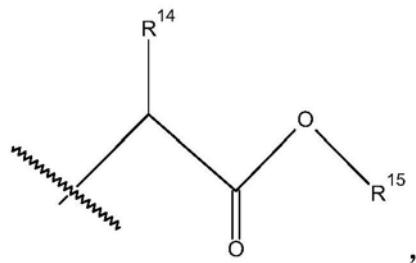
(式II-b-5)

其中，

D是0或S；

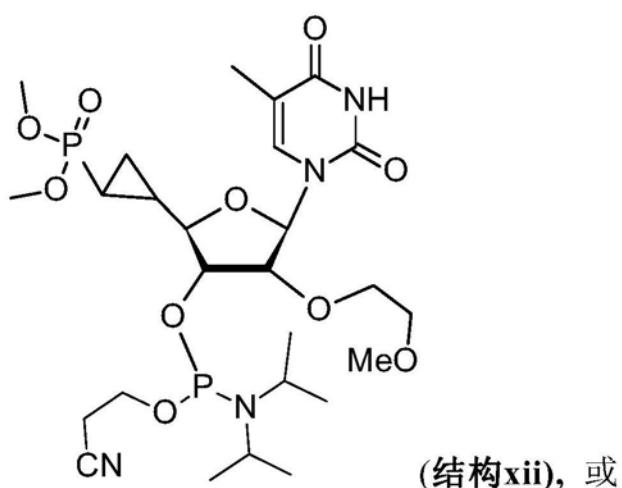
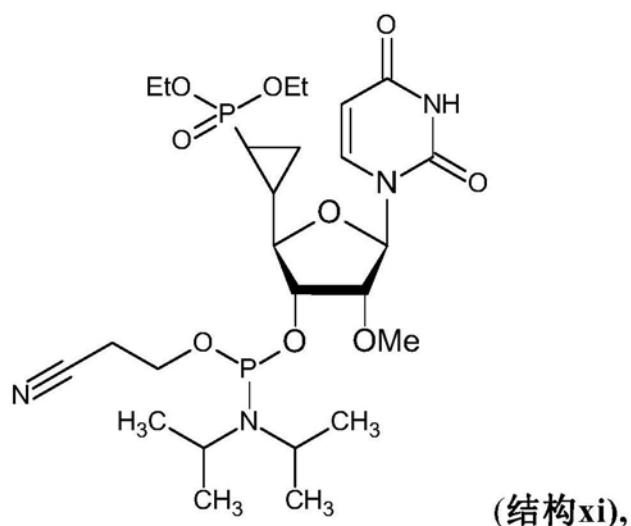
X是9-嘌呤碱基或1-嘧啶碱基；

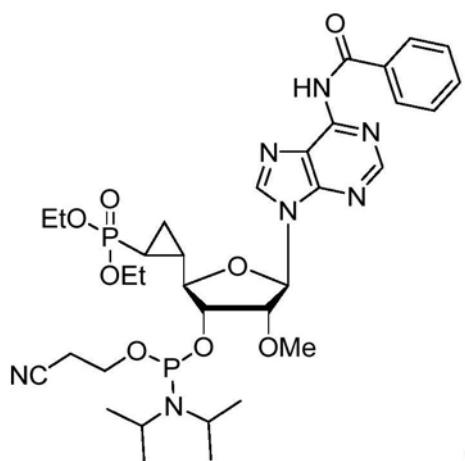
Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃或卤素；
 Y¹、Y²、Y³和Y⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基；
 J是O或S；
 K和L各自独立地选自OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、氨基、羟基、氧或-NH-C=(NH)NH₂，且R¹⁵选自H或C₁-C₁₈烷基；且G¹、G²、G³和G⁴各自是H。

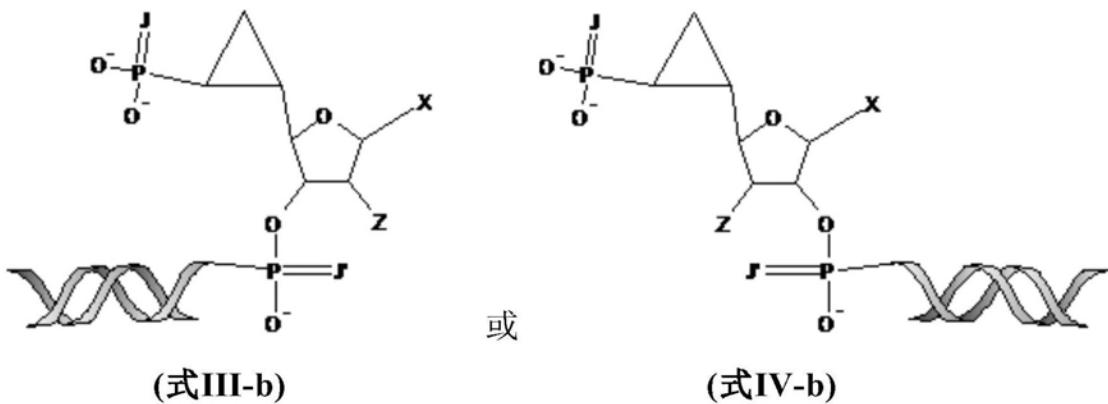
11. 如权利要求10所述的化合物，其特征在于，所述化合物具有如下结构：





(结构xiii)。

12. 一种式III-b或式IV-b的RNAi药剂：



其中：

X是9-嘌呤碱基或1-嘧啶碱基；

Z是H、-OH、F、 OCH_3 、 $-\text{O}-\text{(CH}_2\text{)}_2-\text{OCH}_3$ 或卤素；

J和J'各自独立地是0或S;且



包含衍生自所述RNAi药剂的取代基。

13. 一种组合物，其包含一种或多种权利要求1~9中任一项所述的化合物。

14. 一种组合物，其包含RNAi药剂，其特征在于，所述RNAi药剂包含一种或多种权利要求1~9中任一项所述的化合物。

15. 如权利要求14所述的组合物，其特征在于，所述RNAi药剂是双链的。

16. 一种组合物，其包含权利要求12所述的RNAi药剂。

17. 权利要求1~9中任一项所述的化合物、权利要求12所述的RNAi药剂、或权利要求13~16中任一项所述的组合物在制备抑制对象中的靶核酸表达的药物中的应用。

18. 权利要求13~16中任一项所述的组合物在制备治疗对象中的疾病或失调的药物中的应用。

5' - 环膦酸酯修饰核苷酸

[0001] 相关申请交叉参考

[0002] 本申请要求2016年6月6日提交的美国临时申请专利序列第62/346,304号的优先权,通过引用将该申请的内容全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本文公开了一种可用于结合到RNAi药剂之类的低聚化合物中的5' - 环膦酸酯修饰核苷酸。

背景技术

[0004] 已证明,包含与靶核酸至少部分互补的核苷酸序列的低聚化合物在体外和体内均可改变所述靶标的功能和活性。已证明,当被递送至含有靶核酸(例如信使RNA(mRNA))的细胞时,低聚化合物可调节所述靶标的表达,这会导致所述靶核酸的转录或翻译的改变。在某些情况下,低聚化合物可通过抑制核酸靶标和/或引发靶核酸的降解来减少基因的表达。

[0005] 如果靶核苷酸是mRNA,则表达抑制性低聚化合物可调节mRNA靶标的表达的一种机制是通过RNA干扰(RNAi)。RNAi是RNA或RNA样分子(例如化学修饰的RNA分子)得以通过降解使基因表达沉默的一种生物过程。认为转录后基因沉默的过程是用来防止外源基因表达的一种进化保守性细胞防御机制。

[0006] 据信, RNAi响应机制以一种核酸内切酶复合物为特征,该核酸内切酶复合物通常称为RNA诱导沉默复合物(RISC),在其结构中结合有与其靶标互补的RNA或RNA样分子的单链。认为RISC凭借结合在RISC中的单链RNA或RNA样分子与mRNA的互补性来介导单链RNA(如mRNA)的切割。

[0007] 已证明,合成RNA和RNA样分子在体外和体内引发RNA干扰。例如,Elbashir等(Nature 2000, 411, 494-98)描述了通过在培养哺乳动物细胞内导入合成的21个核苷酸的RNA分子的双链体来诱导RNAi。能与RISC相互作用并引发RNAi响应机制的合成RNA或RNA样分子的类型可以由修饰核苷酸和/或一个或多个非磷酸二酯连接构成。

[0008] 另外,单链RNA和RNA样分子(其也可以包含修饰核苷酸并具有一个或多个非磷酸二酯连接)也可以改变靶mRNA的表达。

[0009] 已证明,在体内给药时,某些已知的修饰核苷酸在结合到低聚化合物中时会提高表达抑制性低聚化合物的持续时间和/或活性。

发明内容

[0010] 需要能为RNAi药剂之类的低聚化合物提供改善或提高的稳定性和/或效力的新型修饰核苷酸。例如,需要能为RNAi药剂的5' 末端处的末端核苷酸上的磷酸酯部分提供提高的稳定性的新型修饰核苷酸。

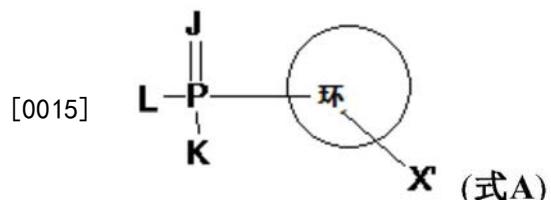
[0011] 本文描述了一种新型5' - 环膦酸酯修饰核苷酸以及包含5' - 环膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂之类的低聚化合物。所述5' - 环膦酸酯修饰核苷酸可以结合到双链寡核苷酸(例

如短干扰RNA)或单链寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)中。包含一个或多个5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂之类的低聚化合物也可以具有与RNAi药剂连接的n-乙酰基半乳糖胺簇或肽之类的靶向性配体。包含一个或多个5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂之类的低聚化合物也可以具有与RNAi药剂连接的聚乙二醇(PEG)部分或脂质之类的药代动力学调节剂。

[0012] 本文所述的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸能为RNAi药剂提供改善的稳定性和/或效力。在一些实施方式中,本文所述的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸提供针对可以在体内切割寡核苷酸链的磷酸二酯键的核酸内切酶和核酸外切酶的更高的稳定性和抗性。另外,不希望被理论所限制,据信, RNAi药剂的末端的5' - 磷酸化状态是链结合到RISC中的一个因素。因此,位于反义链的5' 末端的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸可提高寡核苷酸的5' 末端被磷酸化并且维持磷酸化的可能性。这可提高将特定的链载入RISC的可能性,从而让RNAi药剂进入RNAi通路,带来改善和提高的基因敲减和基因沉默活性。

[0013] 本文所述的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸具有位于核苷酸的糖的5' 碳(或位于糖替代性取代部分的相应位置)上的环状基团或环状部分。本文所述的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸在寡核苷酸的5' 端形成磷酸酯基(或者如本文所述,通过引入例如5' - C-丙二酰基而形成磷酸酯模拟物基团)。

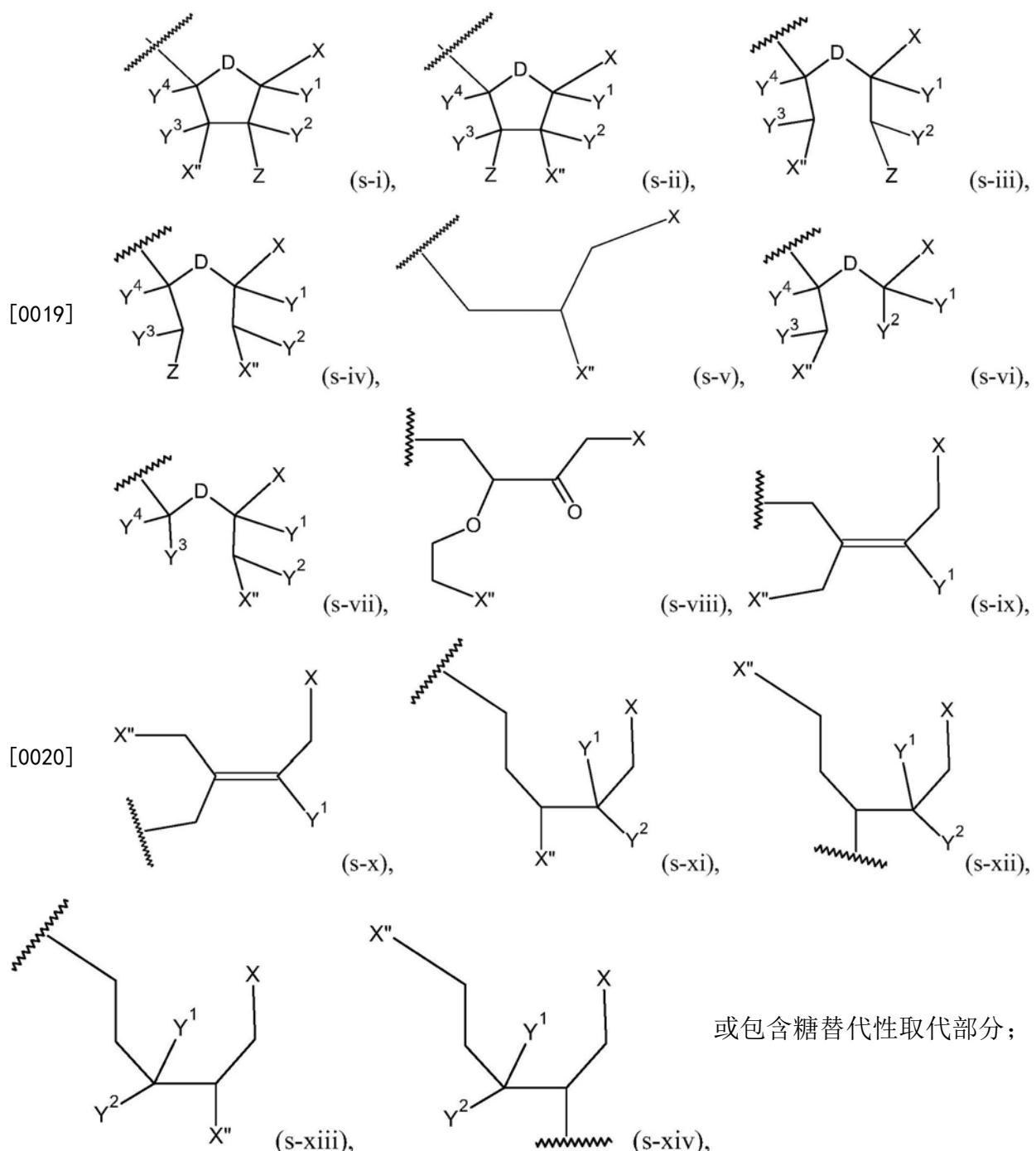
[0014] 在一些实施方式中,所述5' - 环磷酸酯修饰核苷酸化合物具有式A表示的结构:



[0016] 其中:

[0017] “环”是任选取代的具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子的二价环状部分,例如环烷基(如环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基)、环烯基(如环戊烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基或环庚烯基)、芳基(如苯基)、杂芳基(如吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡咯、吡唑、咪唑、噻吩、苯并噻吩、噻唑、苯并噻唑、呋喃、噁唑、异噁唑、苯并呋喃、吲哚、吲唑、苯并咪唑、噁二唑、1,2,3-三唑、1,2,4-三唑、四唑、喹啉基、异喹啉基或喹喔啉基)或杂环基(如四氢呋喃、四氢吡喃、哌啶、吡咯烷、二噁烷或二氧戊环);

[0018] X'是



[0021] X'' 是(i)将5'-环膦酸酯修饰核苷酸与RNAi药剂的其余部分连接的核苷间连接、或(ii)亚磷酰胺基(phosphoramidite group)；

[0022] D是0、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^2)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)=\text{C}(\text{R}^4)$ 、 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{OC}(\text{H})(\text{X}^3)$ 或 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{X}^3)$ ；

[0023] R^1 是H、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基；

[0024] R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基；

[0025] 当D是0、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^2)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)=\text{C}(\text{R}^4)$ 、 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{OC}(\text{H})(\text{X}^3)$ 或 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{X}^3)$ ；

(R⁴)、OC(R²)(R³)时,X是杂环碱基部分;

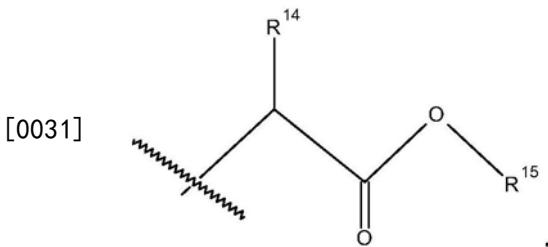
[0026] 当D是OC(H)(X³)或OC(R²)(X³)时,X是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基,且X³是杂环碱基部分;

[0027] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃;卤素; -OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=O)-NH₂、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=O)-N(R⁸)[N(R⁵)(R⁶)],任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基,其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基;

[0028] Y¹、Y²、Y³和Y⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;或者,Y⁴与Y¹或Y²之一连接,其中所述连接包含选自O、S、NR⁹、C(R¹⁰)(R¹¹)、C(R¹⁰)=C(R¹¹)、C[=C(R¹⁰)(R¹¹)]和C(=O)的二价基团,且Y¹、Y²和Y³中的另两个各自独立地是H、卤素、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基,其中R⁹、R¹⁰和R¹¹各自独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基;

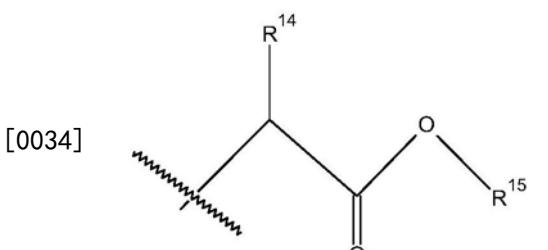
[0029] J是O、S、NR¹²、N-N(R¹³)₂或N-OR¹³,其中:

[0030] R¹²是H、OH、卤素、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



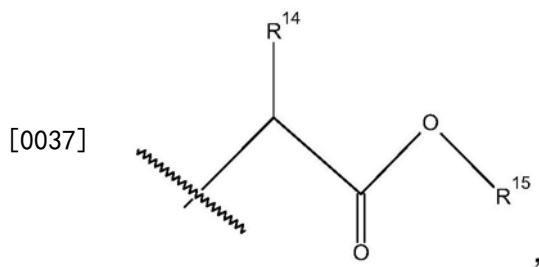
[0032] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂,其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基;

[0033] 其中R¹³是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



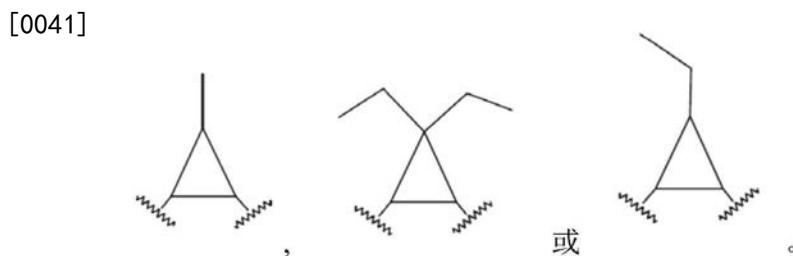
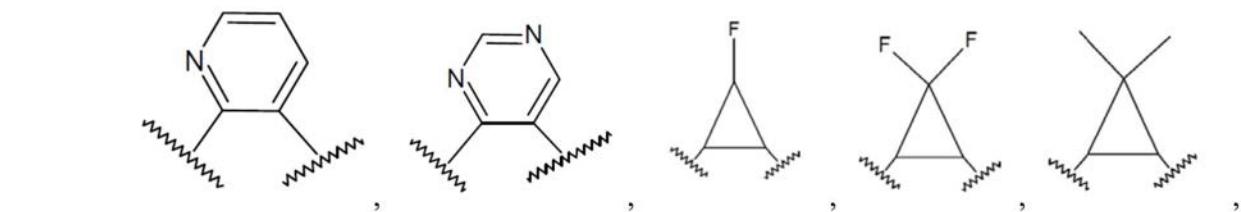
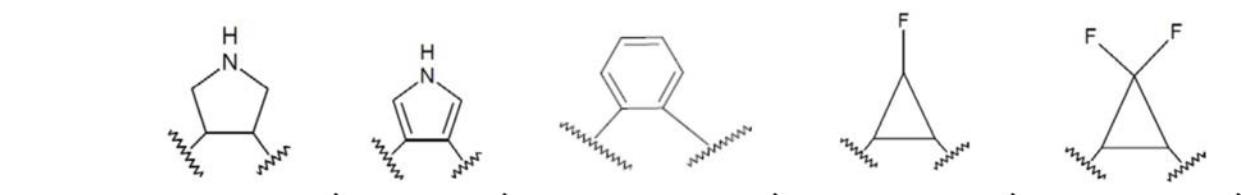
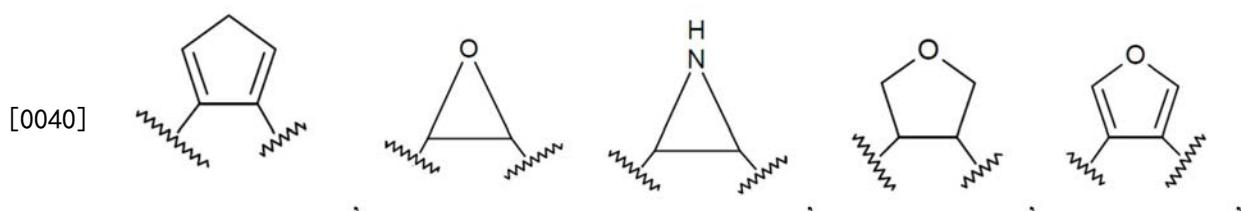
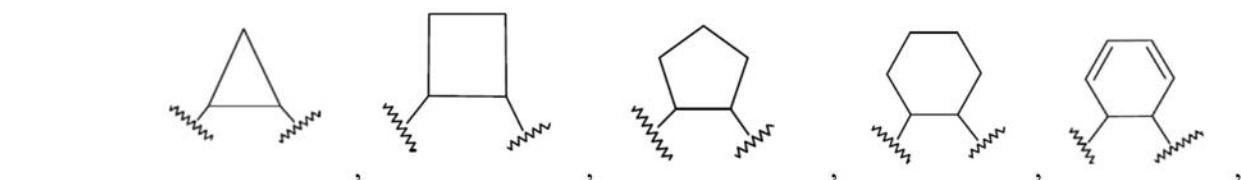
[0035] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂,且其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基;且

[0036] K和L各自独立地选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶,其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0038] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S- (C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C= (NH) NH₂,且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基。

[0039] 在一些实施方式中,式A的结构中的“环”选自下组:



[0042] 在一些实施方式中,式A的结构中的“环”是环状官能团,其中,所述环状官能团在所述环状官能团的用标准IUPAC命名法表示的下述位置与式A的膦酸酯部分和X'连接:1,2;

1,3;1,4;1,5;1,6;1,7;2,3;2,4;2,5;2,6;2,7;3,4;3,5;3,6;3,7;4,5;4,6;4,7;5,6;5,7或6,7。

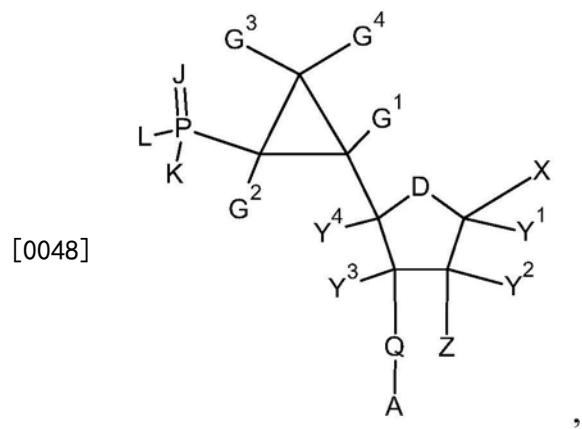
[0043] 在一些实施方式中,式A的结构中的“环”被取代。在一些实施方式中,式A的结构中的“环”是取代的环状部分,所述取代的环状部分在取代的环状官能团的用标准IUPAC命名法表示的下述位置与式A的磷酸酯部分和X'连接:1,2;1,3;1,4;1,5;1,6;1,7;2,3;2,4;2,5;2,6;2,7;3,4;3,5;3,6;3,7;4,5;4,6;4,7;5,6;5,7或6,7。

[0044] 在一些实施方式中,式A的X'是或包含糖替代性取代部分。在一些实施方式中,式A的X'是或包含糖替代性取代部分,其中,所述糖替代性取代部分是吗啉基。在一些实施方式中,式A的X'是或包含糖替代性取代部分,其中,所述糖替代性取代部分是环己烯基。在一些实施方式中,式A的X'是或包含糖替代性取代部分,其中,所述糖替代性取代部分是环己六醇。

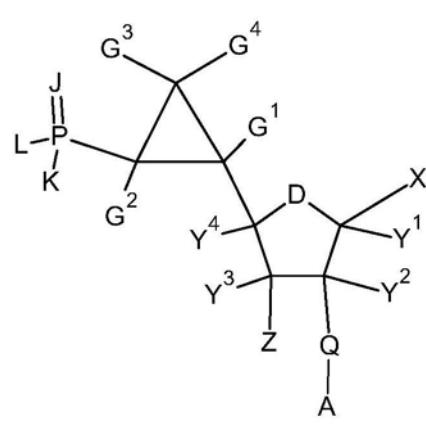
[0045] 在一些实施方式中,式A的X'是或包含糖替代性取代部分,其中,所述糖替代性取代部分是无环的。在一些实施方式中,式A的X'是或包含非锁核碱基类似物(UNA)作为糖替代性取代部分(参见例如美国专利第8,314,227号)。在一些实施方式中,式A的X'是或包含甘油核酸结构作为糖替代性取代部分(参见例如WO 2016/028649)。

[0046] 在一些实施方式中,式A的X'是或包含锁核酸。

[0047] 在一些实施方式中,本文所述的化合物具有式I-b或式II-b的5' - 环丙基磷酸酯基:



(式I-b)



(式II-b)

[0049] 其中,

[0050] D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、N(R^1)、C(R^2)(R^3)、C(R^2)(R^3)C(R^4)(R^2)、C(R^2)= C (R^4)、OC(R^2)(R^3)、OC(H)(X^3)或OC(R^2)(X^3);

[0051] R^1 是H、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基;

[0052] R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基;

[0053] 当D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、N(R^1)、C(R^2)(R^3)、C(R^2)(R^3)C(R^4)(R^2)、C(R^2)= C (R^4)、OC(R^2)(R^3)时,X是杂环碱基部分;

[0054] 当D是OC(H)(X^3)或OC(R^2)(X^3)时,X是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷

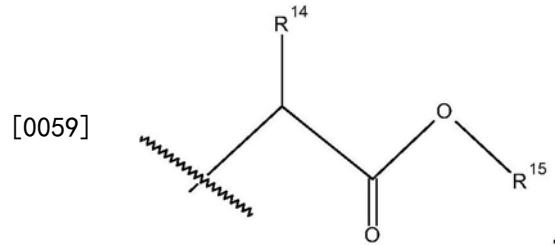
氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基，且X³是杂环碱基部分；

[0055] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃；卤素；-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、-OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=NH)(NH₂)、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=R⁸)[N(R⁵)(R⁶)]、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基；

[0056] Y¹、Y²、Y³和Y⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；或者，Y⁴与Y¹或Y²之一连接，其中所述连接包含选自O、S、NR⁹、C(R¹⁰)(R¹¹)、C(R¹⁰)=C(R¹¹)、C[=C(R¹⁰)(R¹¹)]和C(=O)的二价基团，且Y¹、Y²和Y³中的另两个各自独立地是H、卤素、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁹、R¹⁰和R¹¹各自独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

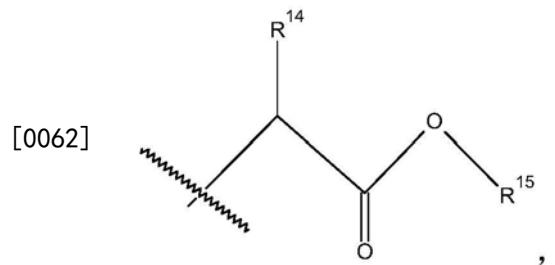
[0057] J是O、S、NR¹²、N-N(R¹³)₂或N-OR¹³，其中：

[0058] R¹²是H、OH、卤素、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



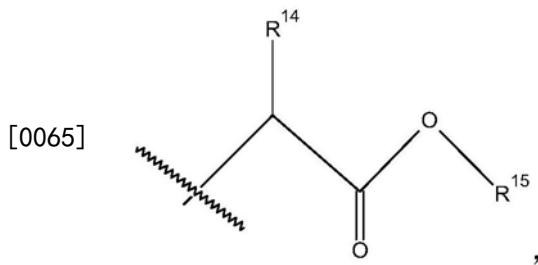
[0060] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂，其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

[0061] 其中R¹³是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0063] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂，且其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

[0064] K和L各自独立地选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



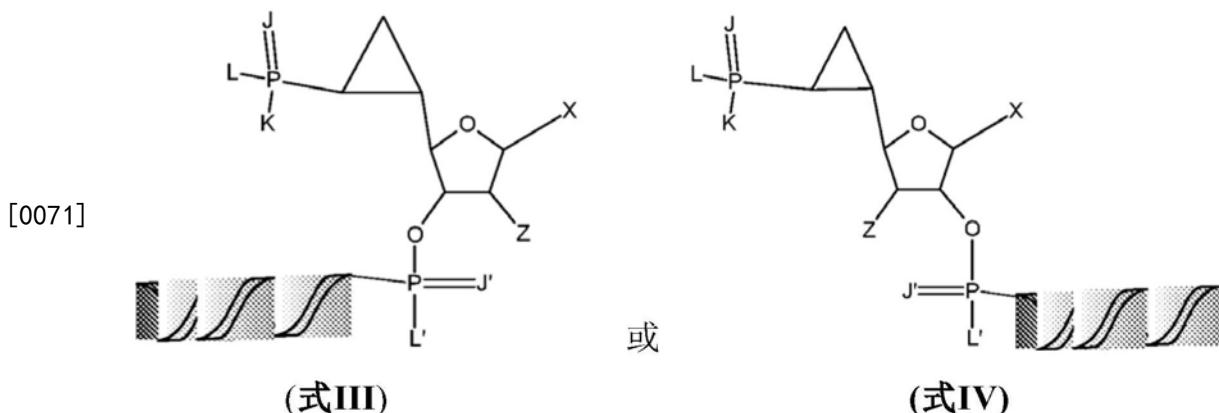
[0066] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S- (C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C= (NH) NH₂,且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基;

[0067] Q是选自O、S、N(R³⁰)或C(R³¹)(R³²)的二价部分,其中R³⁰是H、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基,且R³¹和R³²各自独立地是H、卤素、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基;且

[0068] A是(i)将式I的5'-环磷酸酯修饰核苷酸与RNAi药剂的其余部分连接的核苷间连接,或(ii)亚磷酸酰胺基;且

[0069] G^1 、 G^2 、 G^3 和 G^4 各自独立地选自下组: H、F、卤素、 C_1 - C_6 烷基、CN、 $CH_2(R^{33})$ 、 $CH_2-O-(R^{33})$ 、 $C(=O)(R^{33})$ 、 $C(=S)(R^{33})$ 或 $(R^{34})(R^{33})$ ，其中 R^{33} 是O($R^{35})$ 、S($R^{35})$ 、N($R^{35})(R^{36})$ ，其中 R^{34} 、 R^{35} 和 R^{36} 各自独立地选自H、卤素或 C_1 - C_6 烷基。

[0070] 在一些实施方式中,本文所述的化合物包含5-环丙基膦酸酯基且与RNAi药剂连接,具有如下式III或式IV:



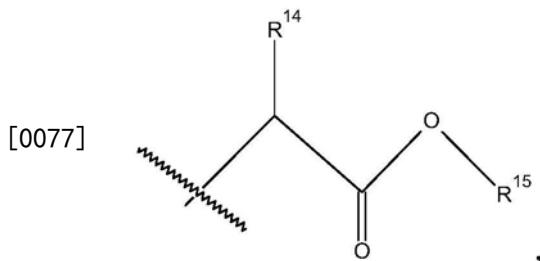
[0072] 其中：

[0073] X是杂环碱基部分；

[0074] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃；卤素；-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、-OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=NH)(NH₂)、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=R⁸)[N(R⁵)(R⁶)]、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基；

[0075] J和J'各自独立地是0或S:

[0076] L、L'和K各自独立地选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或

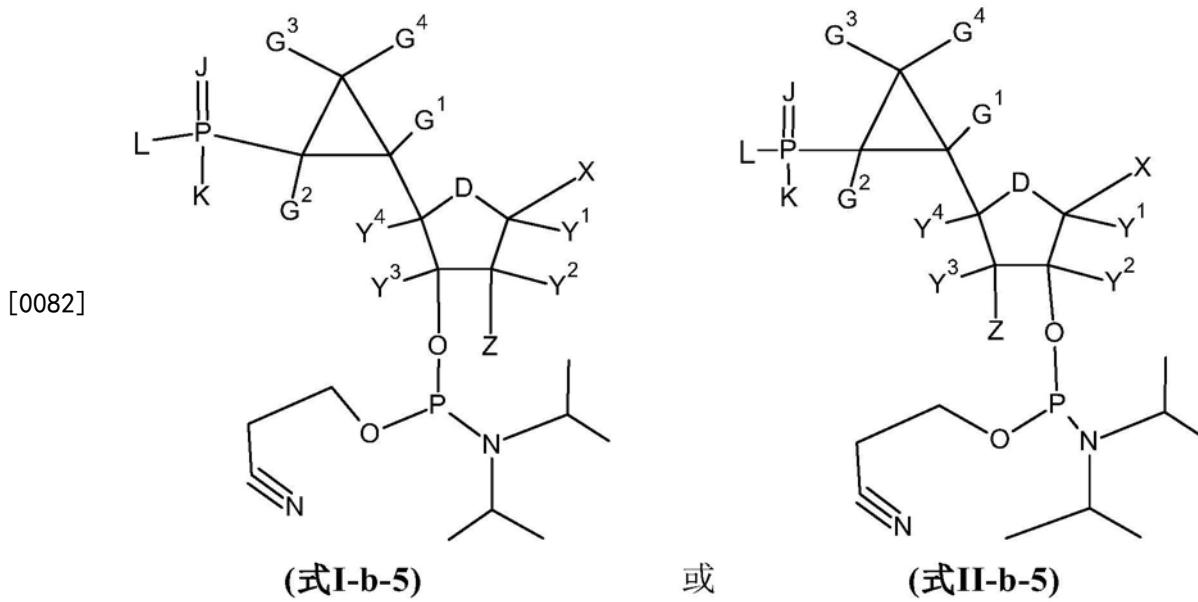


[0078] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S- (C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C≡(NH)NH₂,且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基;且

[0079]  包含所述RNAi药剂的其余部分。

[0080] 在一些实施方式中，所述5-环膦酸酯修饰核苷酸化合物是亚磷酰胺化合物。

[0081] 在一些实施方式中,所述5-环膦酸酯修饰核苷酸化合物是式I-b-5或式II-b-5的亚磷酰胺化合物:



[0083] 其中，

[0084] D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^2)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)=\text{C}(\text{R}^4)$ 、 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{OC}(\text{H})(\text{X}^3)$ 或 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{X}^3)$ ；

[0085] R^1 是H、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基；

[0086] R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或取代的 C_2 - C_6 炔基；

[0087] 当D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^2)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)=\text{C}(\text{R}^4)$ 、 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 时，X是杂环碱基部分：

[0088] 当D是OC(H)(X³)或OC(R²)(X³)时,X是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷

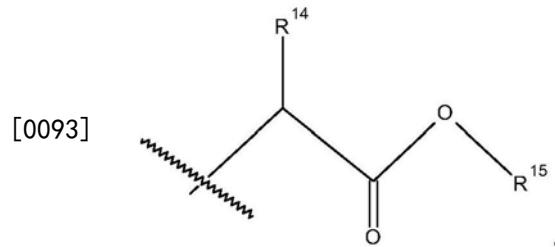
氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基，且X³是杂环碱基部分；

[0089] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃；卤素；-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、-OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=NH)(NH₂)、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=R⁸)[N(R⁵)(R⁶)]、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基；

[0090] Y¹、Y²、Y³和Y⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；或者，Y⁴与Y¹或Y²之一连接，其中所述连接包含选自O、S、NR⁹、C(R¹⁰)(R¹¹)、C(R¹⁰)=C(R¹¹)、C[=C(R¹⁰)(R¹¹)]和C(=O)的二价基团，且Y¹、Y²和Y³中的另两个各自独立地是H、卤素、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁹、R¹⁰和R¹¹各自独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

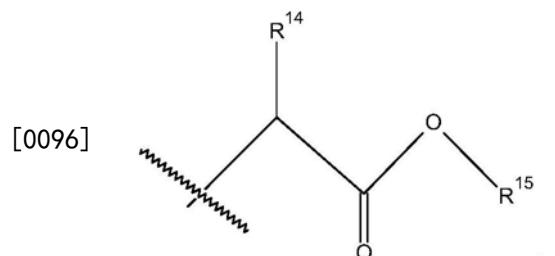
[0091] J是O、S、NR¹²、N-N(R¹³)₂或N-OR¹³，其中：

[0092] R¹²是H、OH、卤素、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



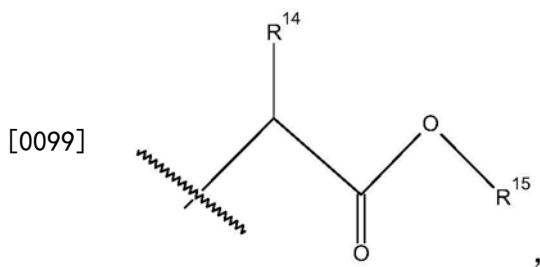
[0094] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂，其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

[0095] 其中R¹³是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0097] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂，且其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

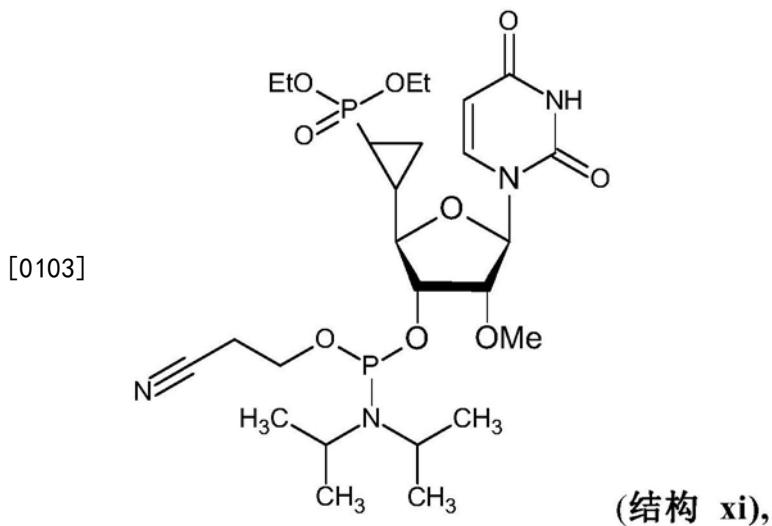
[0098] K和L各自独立地选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或

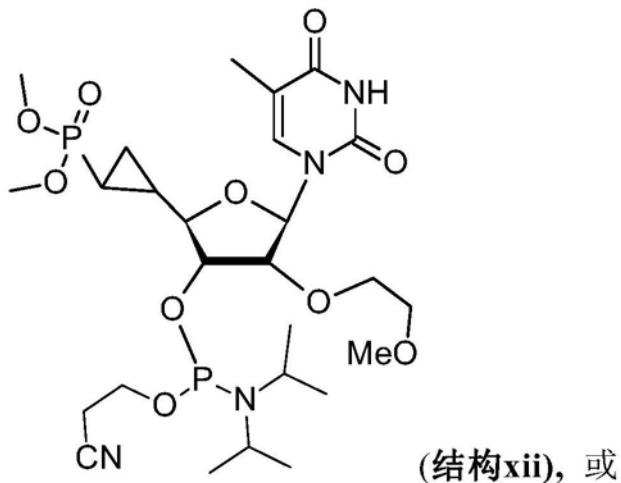


[0100] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S- (C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C= (NH) NH₂,且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基;且

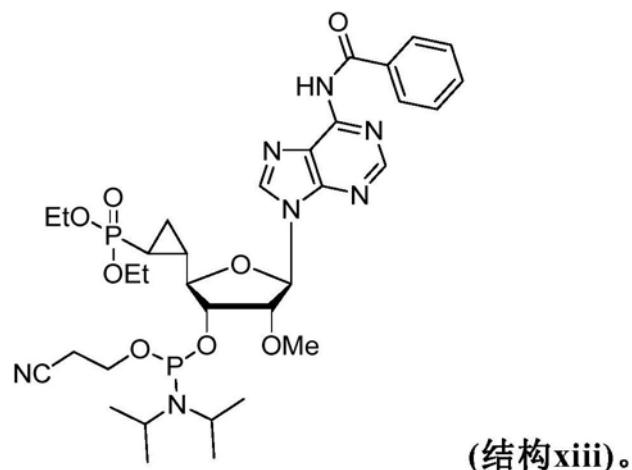
[0101] G^1 、 G^2 、 G^3 和 G^4 各自独立地选自下组: H、F、卤素、 C_1 - C_6 烷基、CN、 $CH_2(R^{33})$ 、 $CH_2-O-(R^{33})$ 、C(=O)(R^{33})、C(=S)(R^{33})或(R^{34})(R^{33})，其中 R^{33} 是O(R^{35})、S(R^{35})、N(R^{35})(R^{36})，其中 R^{34} 、 R^{35} 和 R^{36} 各自独立地选自H、卤素或 C_1 - C_6 烷基。

[0102] 在一些实施方式中,包含5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸的含亚磷酰胺化合物具有如下结构:

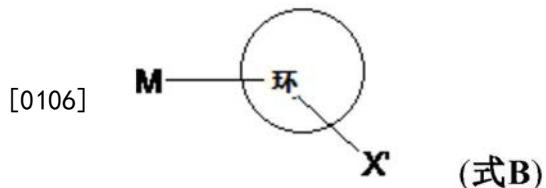




[0104]



[0105] 在一些实施方式中,所述5' -环磷酸酯修饰核苷酸化合物具有式B表示的结构:

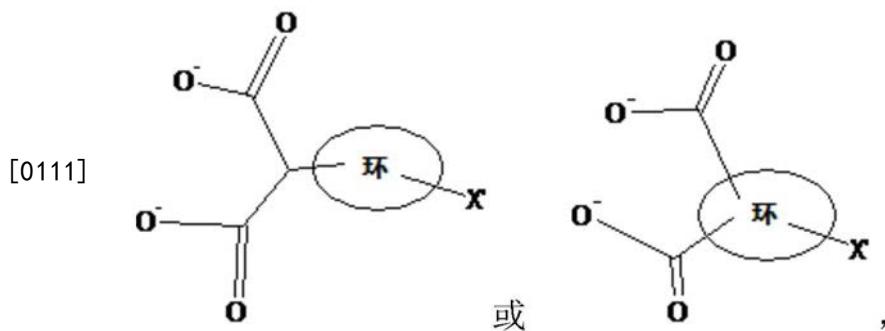


[0107] 其中:

[0108] “环”和X'各自如上文的式A中所定义;且

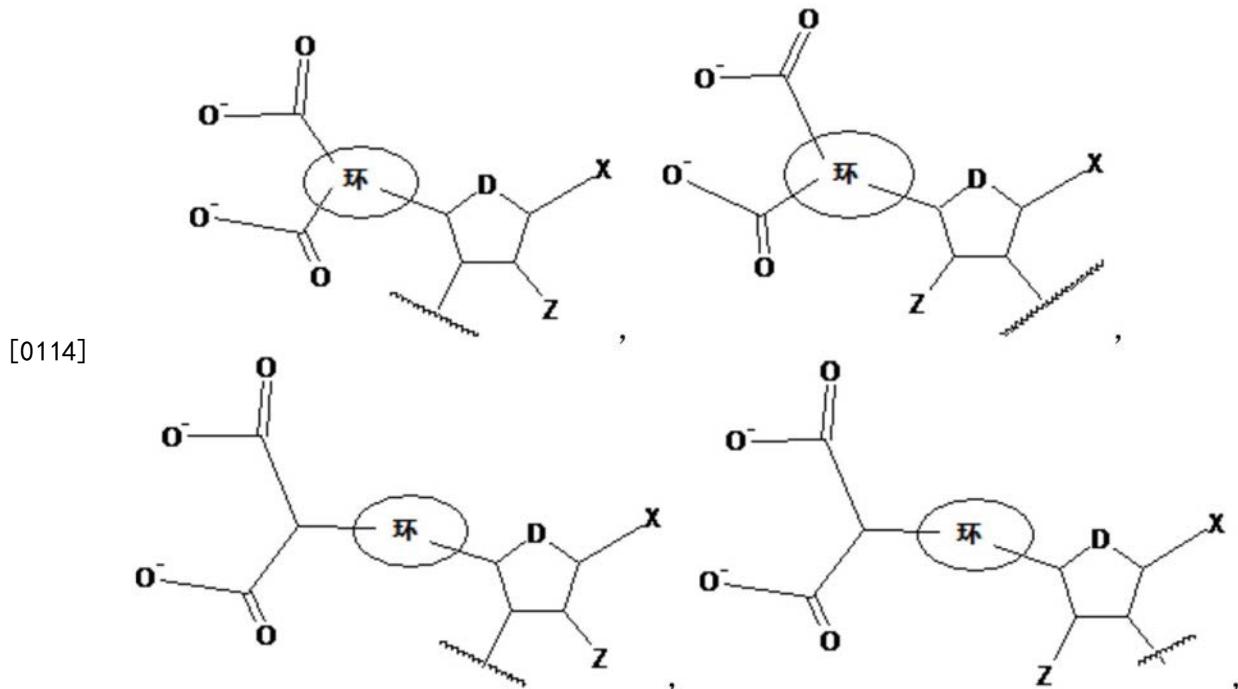
[0109] 式B的M是或包含5' -磷酸酯模拟物基团。在一些实施方式中,式B的M是5' -C-丙二酰基。在一些实施方式中,式B的M是羧酸、磺酸或硼酸。在一些实施方式中,式B的M是二羧酸、二磺酸或二硼酸。在一些实施方式中,式B的M是选自羧酸、磺酸、硼酸和磷酸的混合物的二元酸。在一些实施方式中,磷酸酯模拟物基团(如式B的M)通过单键与式B的“环”连接。在一些实施方式中,磷酸酯模拟物基团通过不止一根键与式B的“环”连接。

[0110] 在一些实施方式中,所述式B的化合物具有由如下结构表示的结构:



[0112] 其中“环”和X'各自如上文的式A中所定义。

[0113] 在一些实施方式中,所述式B的化合物具有由如下结构表示的结构:



[0115] 其中“环”、D、X和Z各自如上文的式A中所定义。

[0116] 如本文所用,术语“连接”在指代两个分子之间的连接时,是指这两个分子通过共价键连接,或者是指这两个分子通过分子间作用力(例如氢键、范德华力或离子键)相关联。在一些实施方式中,术语“连接”指代两个分子之间通过分子间作用力相关联的情况下,这两个不同分子之间的关联在生理学上可接受的缓冲液(例如磷酸盐缓冲盐水)中具有小于 $1 \times 10^{-4} M$ (例如小于 $1 \times 10^{-5} M$ 、小于 $1 \times 10^{-6} M$ 或小于 $1 \times 10^{-7} M$)的 K_D 。

[0117] 如本文所用,术语“直接连接”是指第一化合物或基团不通过任何间隔原子或原子团与第二化合物或基团连接。如本文所用,术语“间接连接”是指第一化合物通过中间原子、基团、化合物或分子(例如连接基团)与第二化合物或基团连接。除非另外说明,本文所用的术语“连接”包括本文所定义的“直接连接”和“间接连接”。

[0118] 如本文所用,“低聚化合物”是含有约10~50个核苷酸或核苷酸碱基对的核苷酸序列。在一些实施方式中,低聚化合物具有与细胞内表达的靶核酸或靶基因中的核心序列至少部分互补的核碱基序列。在一些实施方式中,低聚化合物在递送至表达基因的细胞后,能抑制相应基因的表达,在本文中称为“表达抑制性低聚化合物”。基因表达可以在体外或体内被抑制。“低聚化合物”包括但不限于:寡核苷酸、单链寡核苷酸、单链反义寡核苷酸、短干

扰RNA (siRNA)、双链RNA (dsRNA)、微小RNA (miRNA)、短发夹RNA (shRNA)、核酶、干扰性RNA分子和dicer酶底物。

[0119] 如本文所用,术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”是指连接的核苷的聚合物,其中每一个核苷可独立地被修饰或不被修饰。

[0120] 如本文所用,术语“单链寡核苷酸”是指具有与靶mRNA至少部分互补的序列、在哺乳动物生理条件下(或类似的体外条件下)能够通过氢键与靶mRNA杂交的单链低聚化合物。在一些实施方式中,单链寡核苷酸是单链反义寡核苷酸。本文所述的5' -环磷酸酯修饰核苷酸可以结合到单链反义寡核苷酸上。在一些实施方式中,5' -环磷酸酯修饰核苷酸的位置是单链寡核苷酸的5' 端上的末端核苷酸。

[0121] 如本文所用,“RNAi药剂”是指含有能够以序列特异性方式降低或抑制靶信使RNA (mRNA) 的mRNA转录物的翻译的RNA或RNA样(例如化学修饰的RNA)寡核苷酸分子的药剂。如本文所用, RNAi药剂可以通过RNA干扰机制(例如通过与哺乳动物细胞的RNA干扰通路机制(RNA诱导沉默复合物或RISC)的相互作用来诱导RNA干扰)或其它任意机制或通路发挥作用。虽然认为本文所用的术语RNAi药剂主要通过RNA干扰机制发挥作用,但所述RNAi药剂并不受限于或局限于任何特定的作用通路或机制。RNAi药剂包括但不限于:单链寡核苷酸、单链反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、双链RNA (dsRNA)、微小RNA (miRNA)、短发夹RNA (shRNA) 和dicer酶底物。本文所述的RNAi药剂由具有与作为靶标的mRNA至少部分互补的链的寡核苷酸构成。在一些实施方式中,本文所述的RNAi药剂是双链的,且由反义链和与该反义链至少部分互补的正义链构成。RNAi药剂可以由修饰核苷酸和/或一个或多个非磷酸二酯连接构成。在一些实施方式中,本文所述的RNAi药剂是单链的。

[0122] 如本文所用,术语“沉默”、“减少”、“抑制”、“下调”或“敲减”在指代给定基因的表达时,是指当用本文所述的RNAi药剂之类的低聚化合物处理细胞、细胞团、组织、器官或对象时,与未经如此处理的第二细胞、细胞团、组织、器官或对象相比,基因的表达有所减少,所述基因的表达通过由该基因转录而来的RNA的水平或由发生了该基因的转录的细胞、细胞团、组织、器官或对象内的mRNA翻译而来的多肽、蛋白质或蛋白质亚基的水平来测定。

[0123] 如本文所用,术语“序列”或“核苷酸序列”是指核碱基或核苷酸的顺序或次序,使用标准核苷酸命名法以字母顺序表示。

[0124] 如本文所用,“核苷酸碱基”或“核碱基”是杂环嘧啶或嘌呤化合物,其是所有核酸的标准组分,包括形成腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)核苷酸的碱基。核碱基可以进一步被修饰,从而包括但不限于通用碱基、疏水性碱基、混杂碱基、尺寸扩展碱基和氟化碱基。

[0125] 如本文所用,术语“杂环碱基部分”是本文所定义的核碱基或修饰核碱基。在一些实施方式中,杂环碱基部分是嘧啶、取代的嘧啶、嘌呤或取代的嘌呤。在一些实施方式中,杂环碱基部分是天然存在的嘌呤或取代的嘌呤。在一些实施方式中,杂环碱基部分是非天然存在的嘌呤或取代的嘌呤。在一些实施方式中,杂环碱基部分是天然存在的嘧啶或取代的嘧啶。在一些实施方式中,杂环碱基部分是非天然存在的嘧啶或取代的嘧啶。在一些实施方式中,尤其是当本文所述的5' -环磷酸酯修饰核苷酸是亚磷酸酰胺化合物时,杂环碱基部分包含一个或多个保护基。

[0126] 如本文所用,“糖替代性取代部分”是指能够取代天然存在的核糖核苷酸的5元呋

喃糖环的结构。

[0127] 如本文所用,并且除非另外说明,术语“互补”在用于描述第一核苷酸序列(例如RNAi药剂正义链或靶标mRNA)和第二核苷酸序列(例如单链反义寡核苷酸或双链RNAi药剂反义链)之间的关系时,是指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多寡核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多寡核苷酸在某些条件下杂交(在哺乳动物生理条件下(或类似的体外条件下)形成碱基配对氢键)并形成双链体或双螺旋结构的能力。互补序列包含沃森克里克碱基配对或非沃森克里克碱基配对,且包含天然或修饰的核苷酸或核苷酸模拟物,其程度至少能满足上述杂交的要求。序列相同性或互补性与修饰无关。例如,就确定相同性或互补性的目的而言,a和Af与U(或T)互补,并且等同于A。

[0128] 如本文所用,“完美互补”或“完全互补”是指第一多核苷酸的连续序列中的所有(100%)碱基与第二多核苷酸的连续序列中的相同数量的碱基杂交。连续序列可以包含第一或第二核苷酸序列的全部或一部分。

[0129] 如本文所用,“部分互补”是指在核碱基序列的发生杂交的配对中,第一多核苷酸的连续序列中的至少70%、但不是所有的碱基与第二多核苷酸的连续序列中的相同数量的碱基杂交。

[0130] 如本文所用,“基本互补”是指在核碱基序列的发生杂交的配对中,第一多核苷酸的连续序列中的至少85%、但不是所有的碱基与第二多核苷酸的连续序列中的相同数量的碱基杂交。本文的术语“互补”、“完全互补”和“基本互补”可以根据双链RNAi药剂的正义链和反义链之间、双链RNAi药剂的反义链和靶mRNA的序列之间、或者单链反义寡核苷酸和靶mRNA的序列之间的碱基匹配情况来使用。

[0131] 如本文所用,术语“治疗”及类似术语是指为使对象中的疾病或病症的一个或多个症状的数量、严重程度和/或频率缓解或减轻而采用的方法或步骤。

[0132] 如本文所用,短语“导入细胞内”在指代包含5'-环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂时,是指将RNAi药剂功能性递送至细胞内。短语“功能性递送”是指以让RNAi药剂能够具有预期的生物活性、例如基因表达的序列特异性抑制的方式将RNAi药剂递送至细胞。

[0133] 除非另外说明,本文所用的符号的使用是指根据本文所述的发明的范围,此处可以连接任意的基团。

[0134] 如本文所用,术语“异构体”是指具有相同的分子式、但在性质或其原子的结合顺序或其原子的空间排布上不同的化合物。在其原子的空间排布上不同的异构体称为“立体异构体”。不互为镜像的立体异构体称为“非对映异构体”,为非可叠加镜像的立体异构体称为“对映异构体”,或者有时称为光学异构体。与四种不同的取代基键合的碳原子称为“手性中心”。

[0135] 如本文所用,除非在结构上特别标明具有特定的构象,针对存在不对称中心因而导致产生对映异构体、非对映异构体或其它立体异构构型的各个结构,本文所述的各个结构旨在表示所有这些可能的异构体,包括它们的光学纯形式和外消旋形式。例如,本文所述的结构旨在涵盖非对映异构体的混合物以及单个立体异构体。本文所述的5'-环磷酸酯修饰核苷酸含有一个或多个不对称中心,因而导致产生对映异构体、非对映异构体及其它立体异构构型,其可以用绝对立体化学的术语定义为(R)或(S)、 α 或 β (例如针对糖端基异构

体)、或者(D)或(L)(例如针对氨基酸)。本文所述的5'-环磷酸酯修饰核苷酸包含所有这些可能的异构体,包括它们的外消旋形式和光学纯形式。除非另外说明,当本文所述的化合物(例如在烯烃或亚胺)含有双键时,旨在表示该化合物同时包含E和Z几何异构体或者顺式和反式异构体。同样地,也旨在包括所有互变异构形式。本文中出现的任何键的构型只是出于方便而选择的,不旨在限制特定的构型,除非文中另有说明。

[0136] 如本文所用,术语“取代的”是指指定的原子(通常是碳、氧或氮原子)上的任意一个或多个氢被本文所定义的任意基团取代,只要未超过该指定的原子的常规价态、且该取代得到稳定的化合物。当取代基是酮或氧(例如=O)时,原子上有两(2)个氢被取代。如本文所用,环双键是在两个相邻的环原子之间形成的双键(例如C=C、C=N、N=N等)。在一些实施方式中,环状官能团的取代基是另一个环状基团或芳基。如本文所用,双环基团被视作取代的环状官能团。有机官能团的例子包括但不限于:氢;卤素(例如F、Cl、Br、I);氰基; -CO₂R^a; -CONR^aR^a; 被1~2个独立地选择的R^a任选取代的C₁₋₆烷基; C₁₋₄卤代烷基; C₁₋₄烷氧基; C₁₋₄卤代烷氧基; 环烷基,其中该环烷基被1~4个独立地选择的R^a任选取代,包含5~8个环原子的杂环基,其中1~3个环原子各自独立地选自N(R^a)、O和S且其中该杂环基被1~4个独立地选择的R^a任选取代; 被1~4个R^a任选取代的C₆₋₁₀芳基; 包含5~10个环原子的杂芳基,其中1~4个环原子各自独立地选自N、N(R^a)、O和S且其中该杂芳基被1~3个R^a任选取代; -N₃; -CO₂H; -OH; -SO₁₋₂(R^a); -NR^aR^a; -SO₁₋₂(NR^aR^a); 以及硫代烷氧基; 其中各R^a独立地选自C₁₋₆烷基、-OH、-卤素、-NH₂、-N(C₁₋₄烷基)₂、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄卤代烷氧基、-C(=O)O(C₁₋₄烷基)、-C(=O)(C₁₋₄烷基)、-C(=O)OH、-CON(C₁₋₄烷基)₂、-S(O)₁₋₂(C₁₋₄烷基)₂和氰基。

[0137] 本发明的一些化合物可以互变异构形式存在,这也旨在落在本发明的范围内。“互变异构体”是其结构在原子的排布上明显不同、但存在容易且迅速的平衡的化合物。应理解,本发明的化合物可以描述为不同的互变异构体。也应理解,当化合物具有互变异构形式时,所有互变异构形式均旨在落在本发明的范围内,且化合物的命名不排除任何互变异构形式。

[0138] 本发明的化合物和药学上可接受的盐可以存在一种或多种互变异构形式,包括酮-烯醇、酰胺-腈、内酰胺-内酰亚胺、酰胺-亚胺酸(例如在核碱基鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶)、胺-烯胺和烯胺-烯胺以及它们的几何异构体和混合物。由葡萄糖和其它糖产生的环-链互变异构现象是如下现象带来的结果:糖链分子中的醛基(-CHO)与同一分子中的一个羟基(-OH)反应而导致其成为环(环状)形式。所有这些互变异构形式均包括在本发明的范围内。互变异构体在溶液中作为互变异构体组的混合物存在。在固体形式中,通常以一种互变异构体为主。虽然可以描述一种互变异构体,但本发明包括本文所述的化合物的所有互变异构体。可通过互变异构而相互转化的互变异构体的概念称为互变异构现象。在互变异构现象中,发生电子和氢原子的同时迁移。

[0139] 互变异构由通过如下方式产生的碱催化:1) 脱质子;2) 离域阴离子(例如烯醇化物)的形成;以及3) 在阴离子的不同位置质子化。互变异构由通过如下方式产生的酸催化:1) 质子化;2) 离域阳离子的形成;以及3) 在与阳离子相邻的不同位置脱质子。

[0140] 如本文所用,“保护基”是指本领域已知的用于防止反应性基团(例如羟基、氨基、羧基和巯基)在合成过程中发生不希望的反应的不稳定的化学部分。保护基通常选择性和/或正交地用于在反应中在其它反应性位点保护位点,并且随后被除去而释放出未保护的基

团,使其能够用于进一步反应。在一些实施方式中,“取代的”基团或取代基包含保护基。

[0141] 如本文所用,术语“烷基”是指直链或支链的、具有1至10个碳原子的饱和脂肪族烃基,除非另有具体说明。例如,“C₁-C₆烷基”包括具有以直链或支链排列的1、2、3、4、5或6个碳原子的烷基。如本文所用,术语“氨基烷基”是指在常规价态允许的条件下在任意位置被一个或多个氨基取代的如上定义的烷基。氨基可以是未取代的、单取代的或双取代的。

[0142] 如本文所用,术语“环状官能团”旨在指代形成环结构的官能团。环状官能团包括但不限于:环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、杂芳基和芳基。

[0143] 如本文所用,术语“环烷基”是指具有3至14个碳原子的饱和或不饱和非芳香族烃环基团,除非另有具体说明。环烷基的例子包括但不限于:环丙基、甲基环丙基、2,2-二甲基环丁基、2-乙基环戊基或环己基。环烷基可以包含多个螺环或稠环。环烷基在常规价态允许的条件下在任意位置被任选地单、双、三、四或五取代。

[0144] 如本文所用,术语“烯基”是指直链或支链的、含有至少一个碳-碳双键、且具有2至10个碳原子的非芳香族烃基团,除非另有具体说明。这种基团中可以存在至多5个碳-碳双键。例如,“C₂-C₆”烯基定义为具有2至6个碳原子的烯基基团。烯基的例子包括但不限于:乙烯基、丙烯基、丁烯基和环己烯基。烯基的直链、支链或环状部分可以含有双键,并且在常规价态允许的条件下在任意位置被任选地单、双、三、四或五取代。术语“环烯基”是指具有特定数量的碳原子和至少一个碳-碳双键的单环烃基。

[0145] 如本文所用,术语“炔基”是指直链或支链的、具有2至10个碳原子、且含有至少一个碳-碳三键的烃基团,除非另有具体说明。可以存在至多5个碳-碳三键。因此,“C₂-C₆炔基”是指具有2至6个碳原子的炔基基团。炔基的例子包括但不限于:乙炔基、2-丙炔基和2-丁炔基。炔基的直链或支链部分可以在常规价态允许的条件下含有三键,并且可以在常规价态允许的条件下在任意位置被任选地单、双或三取代。

[0146] 如本文所用,“烷氧基”是指通过氧桥连接的具有指定数量的碳原子的如上定义的烷基。例如,C₁₋₆烷氧基旨在包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅和C₆烷氧基。例如,C₁₋₈烷氧基旨在包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇和C₈烷氧基。烷氧基的例子包括但不限于:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、仲戊氧基、正己氧基和正辛氧基。

[0147] 如本文所用,“酮”是指通过羰基桥连接的本文所定义的任意烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环基、杂芳基或芳基。酮基团的例子包括但不限于:烷酰基(例如乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基)、烯酰基(例如丙烯酰基)、炔酰基(例如乙炔酰基、丙炔酰基、丁炔酰基、戊炔酰基、己炔酰基)、芳酰基(例如苯甲酰基)、杂芳酰基(例如吡咯酰基、咪唑酰基、喹啉酰基、吡啶酰基)。

[0148] 如本文所用,“烷氧基羰基”是指通过羰基桥连接的如上定义的任意烷氧基(例如-C(0)O-烷基)。烷氧基羰基的例子包括但不限于:甲氧基羰基、乙氧基羰基、异丙氧基羰基、正丁氧基羰基、叔丁氧基羰基、苄氧基羰基或正戊氧基羰基。

[0149] 如本文所用,“芳氧基羰基”是指通过氧基羰基桥连接的如上定义的任意芳基(例如-C(0)O-芳基)。芳氧基羰基的例子包括但不限于:苯氧基羰基和萘氧基羰基。

[0150] 如本文所用,“杂芳氧基羰基”是指通过氧基羰基桥连接的如上定义的任意杂芳基(例如-C(0)O-杂芳基)。杂芳氧基羰基的例子包括但不限于:2-吡啶氧基羰基、2-噁唑氧基羰基、4-噻唑氧基羰基或嘧啶氧基羰基。

[0151] 如本文所用,术语“芳基”是指任意稳定的单环或多环碳环,每个环上至多有7个原子,其中至少一个环是芳香族的。芳基的例子包括但不限于:苯基、萘基、蒽基、四氢萘基、茚满基和联苯基。芳基取代基是双环的且一个环是非芳香族的情况下,应理解,连接是经由芳香族环的。芳基在常规价态允许的条件下在任意位置被任选地单、双、三、四或五取代。

[0152] 如本文所用,术语“杂芳基”表示稳定的单环或多环的环系统,每个环上至多有7个原子,其中至少一个环是芳香族的且含有1至4个选自O、N和S的杂原子。杂芳基的例子包括但不限于:吖啶基、咔唑基、噌啉基、喹喔啉基、吡唑基、吲哚基、苯并三唑基、呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑酮基、苯并噁唑酮基、喹啉基、异喹啉基、二氢异吲哚酮基、咪唑并吡啶基、异吲哚酮基、吲唑基、噁唑基、异噁唑基、吲哚基、吡嗪基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、四氢喹啉。“杂芳基”也理解为包括任意含氮杂芳基的N-氧化物衍生物。杂芳基取代基是双环且一个环是非芳香族或不含杂原子的情况下,应理解,连接是经由芳香族环或经由含杂原子的环。杂芳基在常规价态允许的条件下在任意位置被任选地单或双取代。

[0153] 如本文所用,术语“杂环”、“杂环状”或“杂环基”是指含有1至4个选自O、N和S的杂原子的3至14元芳香族或非芳香族杂环,包括多环基。如本文所用,术语“杂环状”也视作与术语“杂环”和“杂环基”同义,并且被理解为也具有与本文所述相同的定义。“杂环基”包括上述的杂芳基以及其二氢和四氢类似物。杂环基的例子包括但不限于:氮杂环丁烷基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并呋吖基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、咔唑基、咔啉基、噌啉基、呋喃基、咪唑基、二氢吲哚基、吲哚基、吲嗪基(indolazinyl)、吲唑基、异苯并呋喃基、异吲哚基、异喹啉基、异噁唑基、异噁唑基、萘并吡啶基、噁二唑基、氧代噁唑烷基、噁唑基、噁唑啉、氧代哌嗪基、氧代吡咯烷基、氧代吗啉基、异噁唑啉基、氧杂环丁烷基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并吡啶基、哒嗪基、吡啶基、吡啶酮基、嘧啶基、嘧啶酮基、吡咯基、喹唑啉基、喹啉基、喹喔啉基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、四氢噻喃基、四氢异喹啉基、四唑基、四唑并吡啶基、噁二唑基、噁唑基、噁吩基、三唑基、1,4-二噁烷基、六氢氮杂䓬基、哌嗪基、哌啶基、吡啶-2-酮基、吡咯烷基、吗啉基、硫代吗啉基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并噻吩基、二氢苯并噁唑基、二氢呋喃基、二氢咪唑基、二氢吲哚基、二氢异噁唑基、二氢异噁唑基、二氢噁二唑基、二氢噁二唑基、二氢吡嗪基、二氢吡唑基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢吡咯基、二氢喹啉基、二氢四唑基、二氢噁二唑基、二氢噁二唑基、二氢噁吩基、二氢三唑基、二氢氮杂环丁烷基、二氧化硫代吗啉基、亚甲二氧基苯甲酰基、四氢呋喃基和四氢噁吩基,以及它们的N-氧化物。杂环基取代基的连接可通过碳原子或杂原子实现。杂环基在常规价态允许的条件下在任意位置被任选地单、双、三、四或五取代。

[0154] 如本文的权利要求中所用,短语“由……组成”排除权利要求中未指明的任何元素、步骤或成分。在本文的权利要求中使用时,短语“主要由……组成”将权利要求的范围限制到特定的材料或步骤,以及不会对所要求保护的发明的基本和新颖特征造成显著影响的那些。

[0155] 本领域普通技术人员应当能够容易地理解和了解,本文所述的化合物和组合物可以具有处于质子化或脱质子化状态的某些原子(例如N、O或S原子),这取决于该化合物或组

合物所处的环境。因此,如本文所用,本文所述的结构考虑到某些官能团、例如OH、SH或NH可以质子化或脱质子化。本文的公开内容旨在涵盖上述的化合物和组合物,而无论它们的基于环境pH的质子化状态如何,这是本领域普通技术人员容易理解的。

[0156] 除非另外定义,本文中所使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的同样含义。虽然在本发明的实施或测试中可以采用类似于或等同于本文所述的那些方法和材料,但是,下面描述了合适的方法和材料。本文中述及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用全文纳入本文。在抵触的情况下,以本说明书(包括定义在内)为准。此外,材料、方法和实施例都仅是说明性,并不旨在构成限制。

[0157] 从下述发明详述和所附权利要求书很容易了解本发明的其他特征和优点。

附图说明

[0158] 图1是表示具有针对12因子的序列的RNAi药剂给药后的食蟹猴中的相对cF12表达的图。只有AD04443包含5' - 环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其位于反义链的5' 末端。

[0159] 图2是表示具有针对HBV的序列的RNAi药剂给药后的pHBV模型小鼠中的平均HBsAg的图,其相对于治疗前和盐水对照标准化。只有AD04580包含5' - 环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其位于反义链的5' 末端。

具体实施方式

[0160] 本文描述了一种5' - 环膦酸酯修饰核苷酸以及包含5' - 环膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂(也称为RNAi引发剂)。在一些实施方式中,一个或多个5' - 环膦酸酯修饰核苷酸连接在RNAi药剂的末端,并形成RNAi药剂的末端核苷酸。在一些实施方式中,5' - 环膦酸酯修饰核苷酸连接在RNAi药剂的5' 端或5' 末端,并形成RNAi药剂的5' 端上的末端核苷酸。在一些实施方式中,5' - 环膦酸酯修饰核苷酸连接在双链RNAi药剂的反义链的5' 末端,并形成双链RNAi药剂的反义链的5' 端上的末端核苷酸。

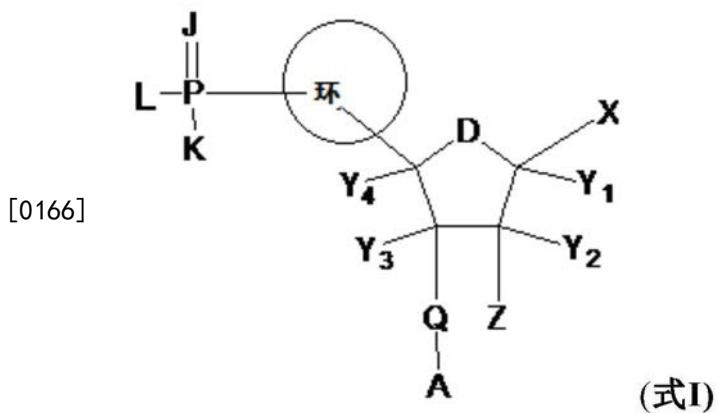
[0161] 本文所述的5' - 环膦酸酯修饰核苷酸具有位于核苷酸的糖的5' 碳(或位于糖替代性取代部分的相应位置)上的环状基团或环状部分。

[0162] 在一些实施方式中, RNAi药剂的5' 末端核苷酸包含或是5' - 环膦酸酯修饰核苷酸。在一些实施方式中, 双链RNAi药剂的反义链的5' 末端核苷酸包含或是5' - 环膦酸酯修饰核苷酸。在一些实施方式中, 5' - 环膦酸酯修饰核苷酸位于单链RNAi药剂或双链RNAi药剂的反义链之类的低聚化合物的5' 末端, 促进该低聚化合物载入RISC而走向RNAi机制。

[0163] 在一些实施方式中, 一个或多个5' - 环膦酸酯修饰核苷酸连接在单链反义寡核苷酸的末端, 并形成单链反义寡核苷酸的末端核苷酸。在一些实施方式中, 5' - 环膦酸酯修饰核苷酸连接在单链反义寡核苷酸的5' 末端, 并形成单链反义寡核苷酸的5' 端上的末端核苷酸。

[0164] 在一些实施方式中, 所述化合物具有上述发明内容部分中所述的式A表示的结构。

[0165] 在一些实施方式中, 所述式A的化合物具有式I表示的5' - 环膦酸酯结构:



[0167] 其中：

[0168] “环”是任选取代的具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子的二价环状部分,例如环烷基(如环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基)、环烯基(如环戊烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基或环庚烯基)、芳基(如苯基)、杂芳基(如吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡咯、吡唑、咪唑、噻吩、苯并噻吩、噻唑、苯并噻唑、呋喃、噁唑、异噁唑、苯并呋喃、吲哚、吲唑、苯并咪唑、噁二唑、1,2,3-三唑、1,2,4-三唑、四唑、喹啉基、异喹啉基或喹喔啉基)或杂环基(如四氢呋喃、四氢吡喃、哌啶、吡咯烷、二噁烷或二氧戊环)；

[0169] D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)$ (R^3)、 $\text{C}(\text{R}^2)$ (R^3) $\text{C}(\text{R}^4)$ (R^2)、 $\text{C}(\text{R}^2)$ (R^4)、 $\text{OC}(\text{R}^2)$ (R^3)、 $\text{OC}(\text{H})$ (X^3) 或 $\text{OC}(\text{R}^2)$ (X^3)；

[0170] R^1 是H、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基；

[0171] R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基；

[0172] 当D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)$ (R^3)、 $\text{C}(\text{R}^2)$ (R^3) $\text{C}(\text{R}^4)$ (R^2)、 $\text{C}(\text{R}^2)$ (R^4)、 $\text{OC}(\text{R}^2)$ (R^3) 时,X是杂环碱基部分；

[0173] 当D是 $\text{OC}(\text{H})$ (X^3) 或 $\text{OC}(\text{R}^2)$ (X^3) 时,X是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基,且 X^3 是杂环碱基部分；

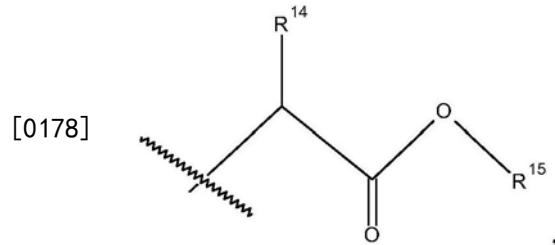
[0174] Z是H、-OH、F、 OCH_3 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ ；卤素； $-\text{OCH}_2\text{F}$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{F}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{SCH}_3$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{R}^5)$ (R^6)、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{ON}(\text{R}^5)$ (R^6)、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{R}^5)$ (R^6)、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{R}^7)-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{R}^5)$ (R^6)、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{R}^7)-\text{C}(=\text{R}^8)$ [$\text{N}(\text{R}^5)$ (R^6)]、任选取代的 C_1-C_6 烷基、任选取代的 C_1-C_6 烷氧基、任选取代的 C_2-C_6 烯基或任选取代的 C_2-C_6 炔基,其中 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自独立地是H或 C_1-C_6 烷基；

[0175] Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 各自独立地是H、卤素、 C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基或取代的 C_2-C_6 炔基；或者, Y^4 与 Y^1 或 Y^2 之一连接,其中所述连接包含选自O、S、 NR^9 、 $\text{C}(\text{R}^{10})$ (R^{11})、 $\text{C}(\text{R}^{10})=\text{C}(\text{R}^{11})$ 、 $\text{C}=[\text{C}(\text{R}^{10})$ (R^{11})]和 $\text{C}(=\text{O})$ 的二价基团,且 Y^1 、 Y^2 和 Y^3 中的另两个各自独立地是H、卤素、任选取代的 C_1-C_6 烷基、任选取代的 C_1-C_6 烷氧基、任选取代的 C_2-C_6 烯基或任选取代的 C_2-C_6 炔基,其中 R^9 、 R^{10}

和R¹¹各自独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

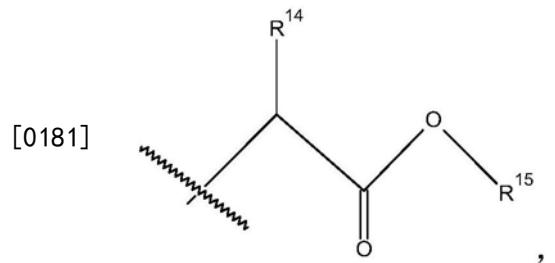
[0176] J是O、S、NR¹²、N-N(R¹³)₂或N-OR¹³，其中：

[0177] R¹²是H、OH、卤素、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



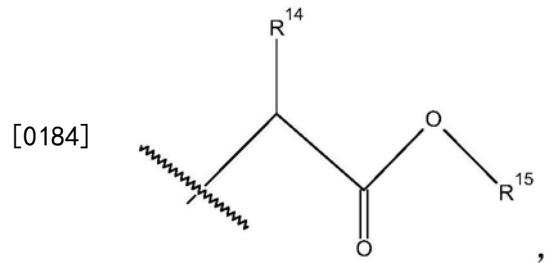
[0179] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C=(NH)NH₂，其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

[0180] 其中R¹³是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0182] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C=(NH)NH₂，且其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；且

[0183] K和L各自独立地选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0185] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C=(NH)NH₂，且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

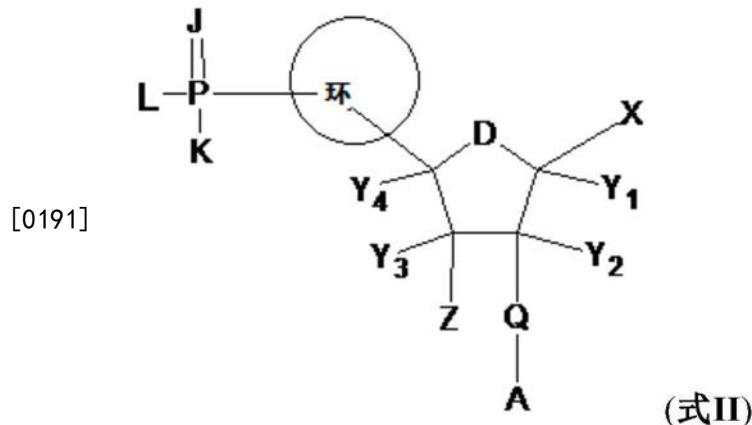
[0186] Q是选自O、S、N(R³⁰)或C(R³¹)(R³²)的二价部分，其中R³⁰是H、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，且R³¹和R³²各自独立地是H、卤素、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基；且

[0187] A是(i)将式I的5'-环磷酸酯修饰核苷酸与RNAi药剂的其余部分连接的核苷间连接、或(ii)亚磷酰胺基。

[0188] 在一些实施方式中,当A是亚磷酰胺基时,A通过亚磷酰胺形成剂与Q偶联而连接在式I中的Q上,从而形成亚磷酰胺化合物。

[0189] 在一些实施方式中,式I中的Q是O。

[0190] 在一些实施方式中,所述化合物具有式II表示的5'-环磷酸酯结构:



[0192] 其中,“环”、D、X、Z、Y¹、Y²、Y³、Y⁴、J、K、L、Q和A各自如上文的式I中所定义。

[0193] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的Y¹、Y²、Y³和Y⁴均为H。

[0194] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是包含3、4、5、6或7个碳原子的环烷基。

[0195] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是包含4、5、6或7个碳原子的环烯基。

[0196] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是包含5、6或7个碳原子的环炔基。

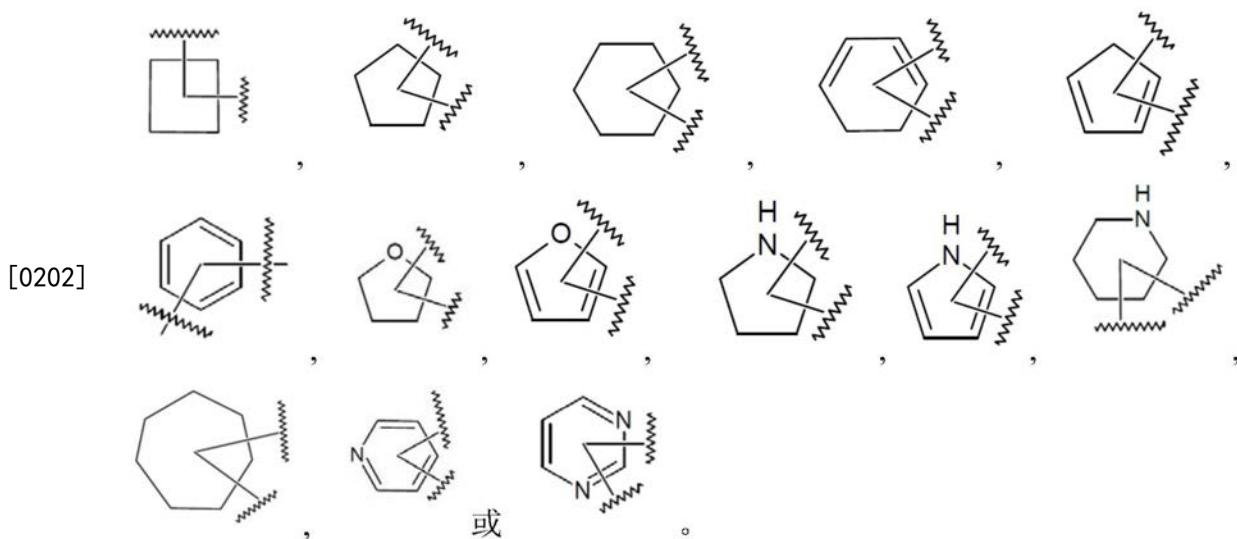
[0197] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是包含3、4、5、6或7个碳原子的芳基。

[0198] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是包含2、3、4、5或6个碳原子以及一个或多个非碳原子的杂环基。

[0199] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是包含2、3、4、5或6个碳原子以及一个或多个非碳原子的芳基或杂环基。

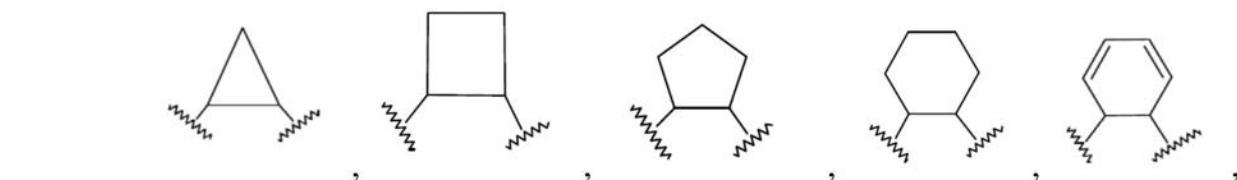
[0200] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是双环基团。

[0201] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”选自下组:

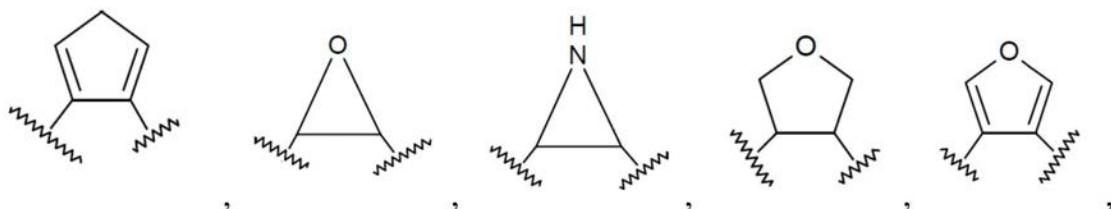


[0203] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是环状官能团,其中,所述环状官能团在所述环状官能团的用标准IUPAC命名法表示的下述位置与式I和式II的磷酸酯部分和糖环连接:1,2;1,3;1,4;1,5;1,6;1,7;2,3;2,4;2,5;2,6;2,7;3,4;3,5;3,6;3,7;4,5;4,6;4,7;5,6;5,7或6,7。

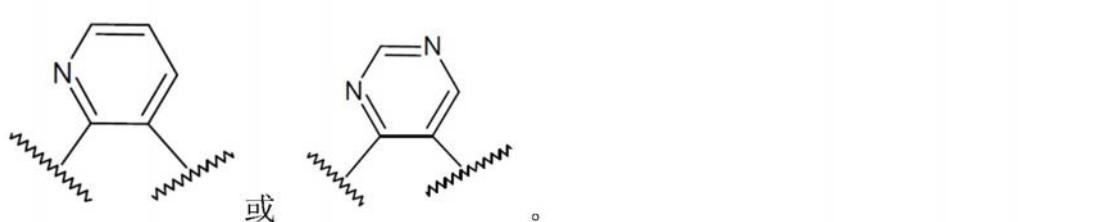
[0204] 在一些实施方式中，式I和式II的结构中的“环”选自下组：



〔0205〕



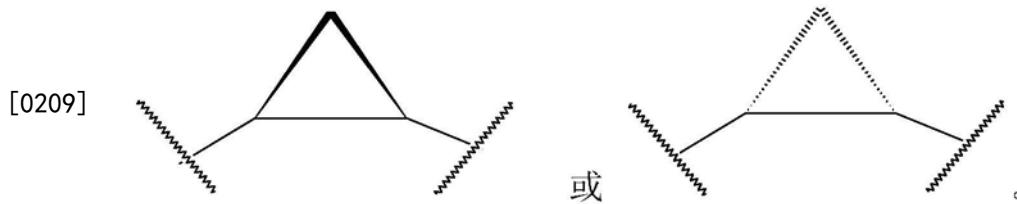
〔0206〕



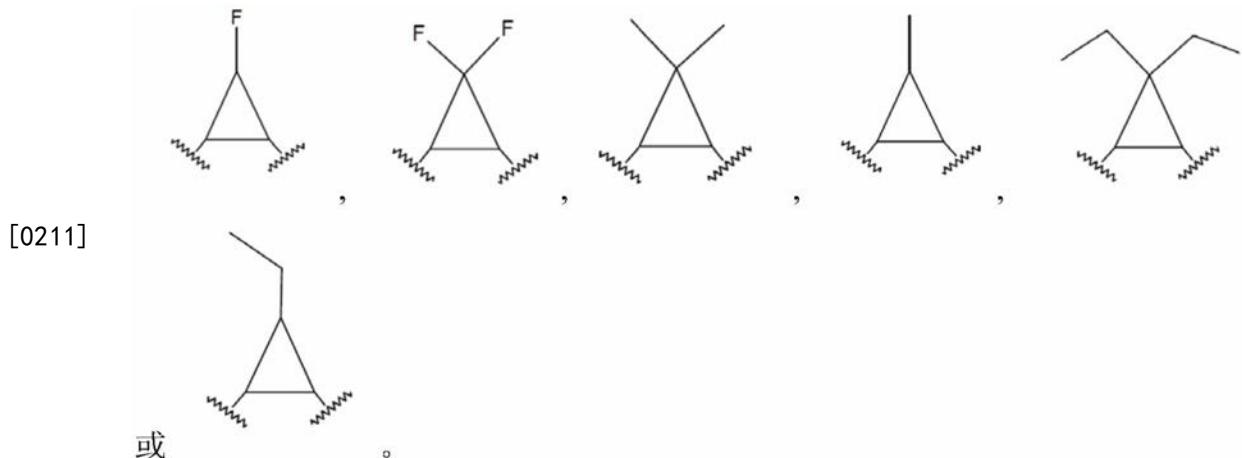
[0207] 在一些实施方式中，式I和式II的结构中的“环”是取代的。在一些实施方式中，式I和式II的结构中的“环”是取代的环状部分，所述取代的环状部分在取代的环状官能团的用标准IUPAC命名法表示的下述位置与式I和式II的磷酸酯部分和糖环连接：1,2;1,3;1,4;1,

5;1,6;1,7;2,3;2,4;2,5;2,6;2,7;3,4;3,5;3,6;3,7;4,5;4,6;4,7;5,6;5,7或6,7。

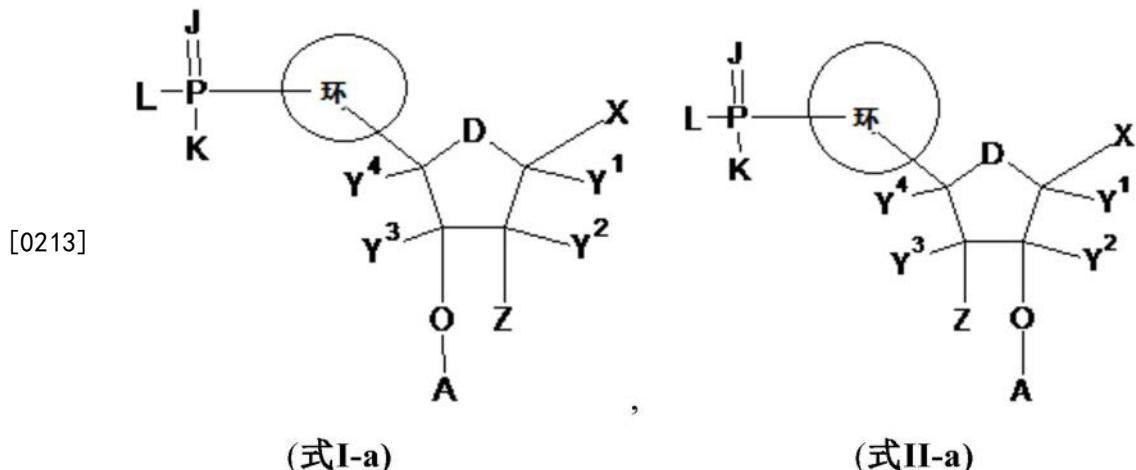
[0208] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是具有特定的立体化学的环丙基,例如:



[0210] 在一些实施方式中,式I和式II的结构中的“环”是选自下组的取代的环丙基官能团:



[0212] 在一些实施方式中,所述化合物具有式I-a或式II-a表示的结构:



[0214] 其中,“环”、D、X、Z、Y¹、Y²、Y³、Y⁴、J、K、L和A各自如上文的式I和式II中所定义。

[0215] 如本文所用,除非另外标明,提及式I时包括式I-a和式I-b,并且提及式II时包括式II-a和式II-b,只要从本文的公开内容来看,这种提及应当被本领域普通技术人员理解为可以适用。

[0216] 在一些实施方式中,杂环碱基部分(例如式I~VIII(包括所有式的亚组或种类(如式I-b-5)中任一者的结构中的X)是嘧啶、取代的嘧啶、嘌呤或取代的嘌呤。在一些实施方式中,杂环碱基部分是天然存在的嘌呤或取代的嘌呤。在一些实施方式中,杂环碱基部分是非天然存在的嘌呤或取代的嘌呤。在一些实施方式中,杂环碱基部分是天然存在的嘧啶或取

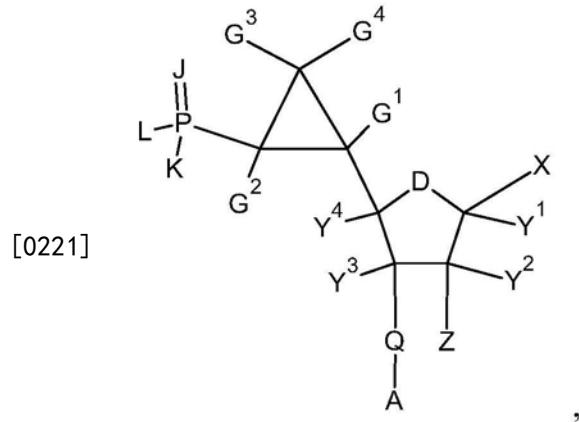
代的嘧啶。在一些实施方式中,杂环碱基部分是非天然存在的嘧啶或取代的嘧啶。

[0217] 在一些实施方式中,杂环碱基部分(例如式I~VIII(包括所有式的亚组或种类(如式I-b-5)中任一者的结构中的X)是尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤或肌苷。

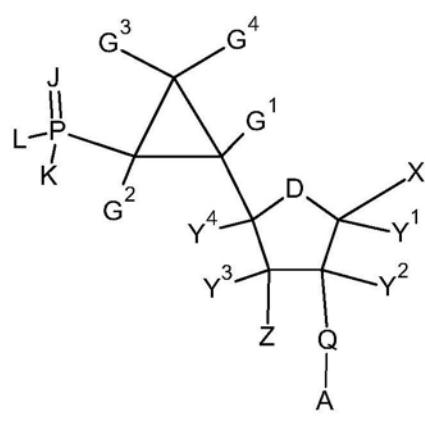
[0218] 在一些实施方式中,杂环碱基部分(例如式I~VIII(包括所有式的亚组或种类(如式I-b-5)中任一者的结构中的X)是取代的尿嘧啶、取代的胸腺嘧啶、取代的胞嘧啶、取代的5-甲基胞嘧啶、取代的腺嘌呤、取代的鸟嘌呤或取代的肌苷。在一些实施方式中,取代的基团是保护基。

[0219] 在一些实施方式中,氘和氚之类的氢同位素可以结合在有氢存在的一一个或多个位置。在一些实施方式中,存在其它原子(例如C、N、O或F)的同位素。

[0220] 在一些实施方式中,所述化合物具有式I-b或式II-b表示的5' -环丙基磷酸酯结构:



(式I-b)



(式II-b)

[0222] 其中:

[0223] D是O、S、CH₂-CH₂、CH=CH、OCH₂、N(R¹)、C(R²)(R³)、C(R²)(R³)C(R⁴)(R²)、C(R²)=C(R⁴)、OC(R²)(R³)、OC(H)(X³)或OC(R²)(X³)；

[0224] R¹是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

[0225] R²、R³和R⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

[0226] 当D是O、S、CH₂-CH₂、CH=CH、OCH₂、N(R¹)、C(R²)(R³)、C(R²)(R³)C(R⁴)(R²)、C(R²)=C(R⁴)、OC(R²)(R³)时,X是杂环碱基部分；

[0227] 当D是OC(H)(X³)或OC(R²)(X³)时,X是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基,且X³是杂环碱基部分；

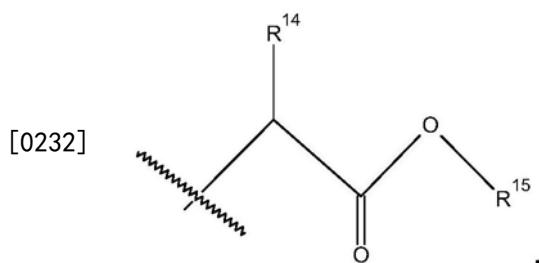
[0228] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃;卤素;-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、-OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=NH)(NH₂)、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N

(R⁵) (R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵) (R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵) (R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=R⁸)[N(R⁵) (R⁶)]、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基；

[0229] Y¹、Y²、Y³和Y⁴各自独立地是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；或者，Y⁴与Y¹或Y²之一连接，其中所述连接包含选自O、S、NR⁹、C(R¹⁰)(R¹¹)、C(R¹⁰)=C(R¹¹)、C[=C(R¹⁰)(R¹¹)]和C(=O)的二价基团，且Y¹、Y²和Y³中的另两个各自独立地是H、卤素、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁹、R¹⁰和R¹¹各自独立地是H、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基；

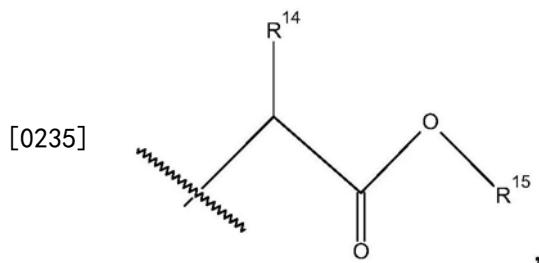
[0230] J是O、S、NR¹²、N-N(R¹³)₂或N-OR¹³，其中：

[0231] R¹²是H、OH、卤素、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



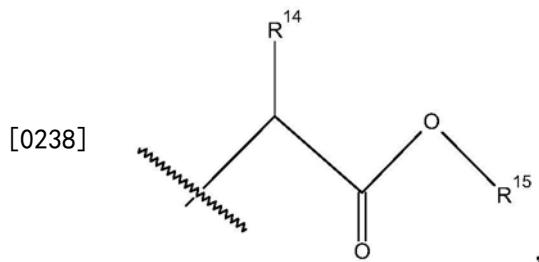
[0233] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂，其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

[0234] 其中R¹³是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0236] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或NH-C(=NH)NH₂，且其中R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；

[0237] K和L各自独立地选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0239] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S- (C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C≡(NH) NH₂,且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基;

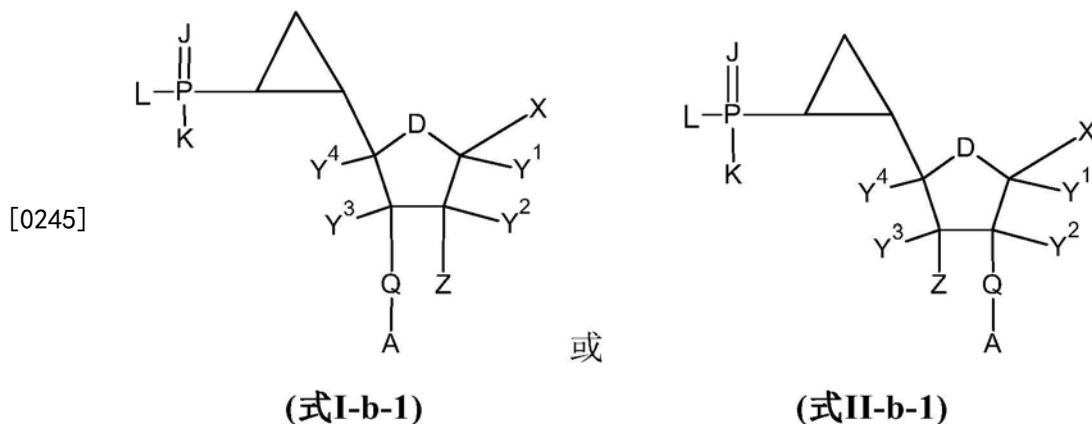
[0240] Q是选自O、S、N(R³⁰)或C(R³¹)(R³²)的二价部分,其中R³⁰是H、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基,且R³¹和R³²各自独立地是H、卤素、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基;

[0241] G^1 、 G^2 、 G^3 和 G^4 各自独立地选自下组: H、F、卤素、 C_1 - C_6 烷基、CN、 $CH_2(R^{33})$ 、 $CH_2-O-(R^{33})$ 、 $C(=O)(R^{33})$ 、 $C(=S)(R^{33})$ 或 $(R^{34})(R^{33})$ ，其中 R^{33} 是O($R^{35})$ 、S($R^{35})$ 、N($R^{35})(R^{36})$ ，其中 R^{34} 、 R^{35} 和 R^{36} 各自独立地选自H、卤素或 C_1 - C_6 烷基；且

[0242] A是(i)将式I-b或式II-b的5'-环磷酸酯修饰核苷酸与RNAi药剂的其余部分连接的核苷间连接、或(ii)亚磷酰胺基。

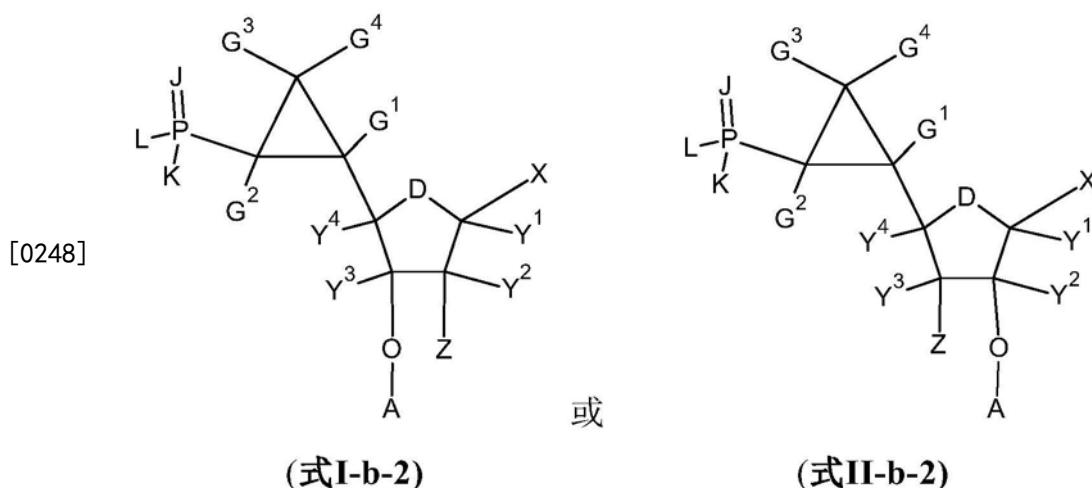
[0243] 如本文所用,除非另外标明,提及式I-b时包括式I-b-1、式I-b-2、式I-b-3、式I-b-4、式I-b-5,并且提及式II-b时包括式II-b-1、式II-b-2、式II-b-3、式II-b-4和式II-b-5,只要从本文的公开内容来看,这种提及应当被本领域普通技术人员理解为可以适用。

[0244] 在一些实施方式中,所述化合物具有式I-b-1或式II-b-1表示的5' -环丙基膦酸酯结构:



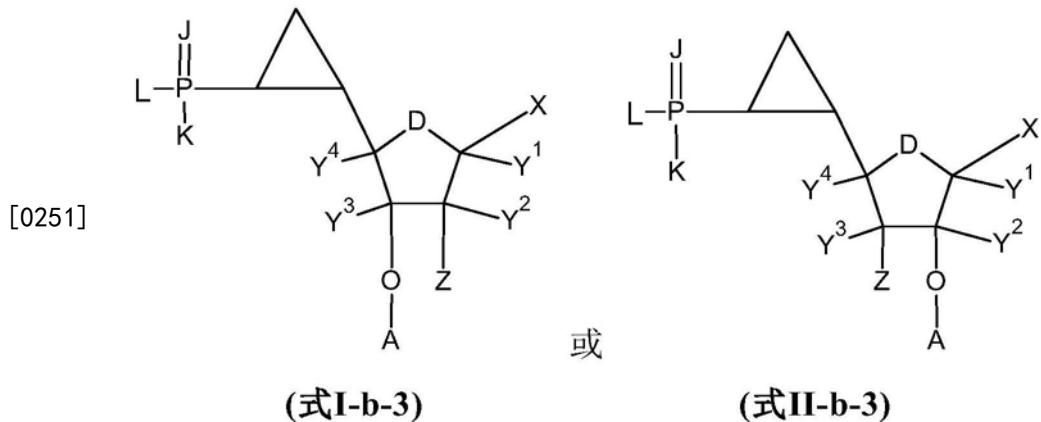
[0246] 其中, $D, X, Z, Y^1, Y^2, Y^3, Y^4, I, K, L, A$ 和 Q 各自如上文的式 I- b 和式 II- b 中所定义。

[0247] 在一些实施方式中,所述化合物具有式I-b-2或式II-b-2表示的结构:



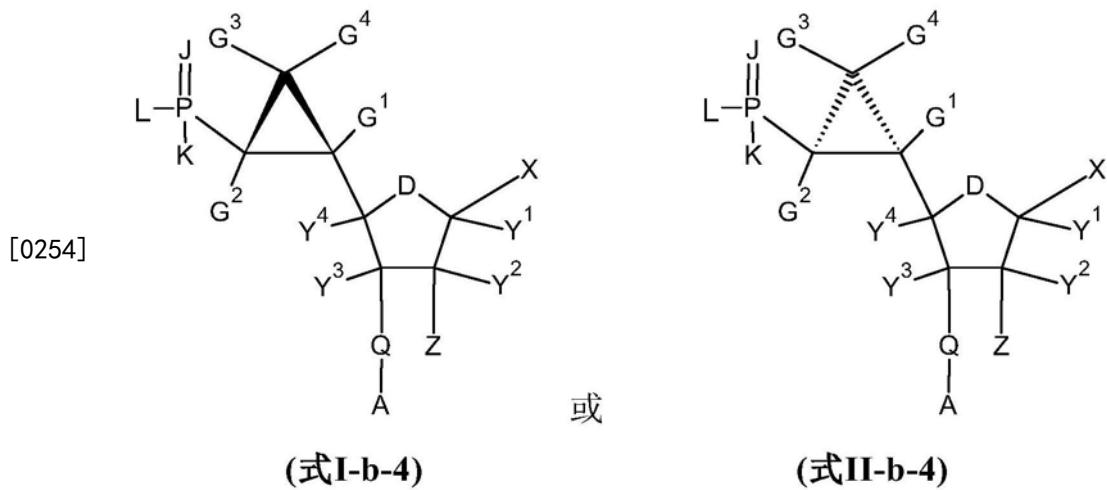
[0249] 其中, D、X、Z、Y¹、Y²、Y³、Y⁴、J、K、L、G¹、G²、G³、G⁴和A各自如上文的式I-b和式II-b中所定义。

[0250] 在一些实施方式中,所述化合物具有式I-b-3或式II-b-3表示的结构:



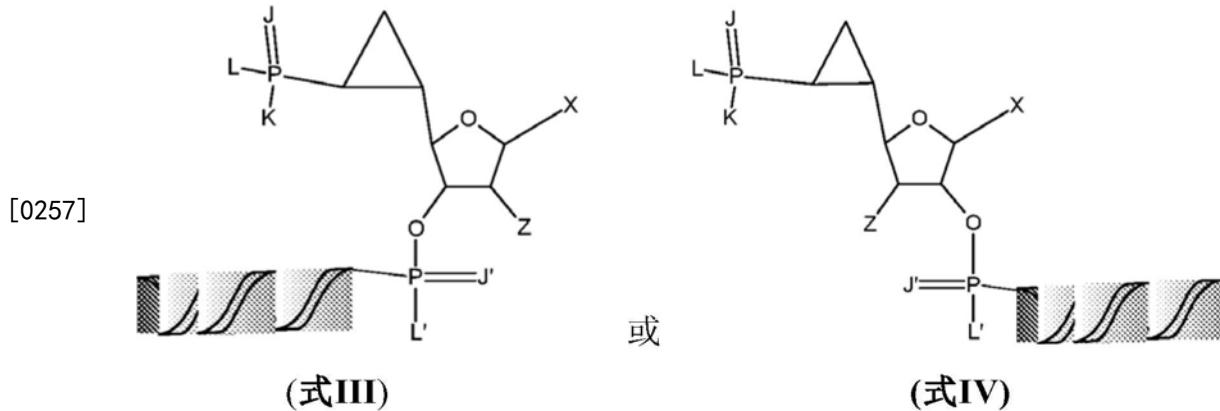
[0252] 其中, D、X、Z、Y¹、Y²、Y³、Y⁴、J、K、L和A各自如上文的式I-b和式II-b中所定义。

[0253] 在一些实施方式中,所述化合物具有式I-b-4或式II-b-4表示的结构:



[0255] 其中, D 、 X 、 Z 、 Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 J 、 K 、 L 、 Q 、 A 、 G^1 、 G^2 、 G^3 和 G^4 各自如上文的式 I-b 和式 II-b 中所定义。

[0256] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是下述式III或式IV表示的5' -环丙基膦酸酯修饰核苷酸:



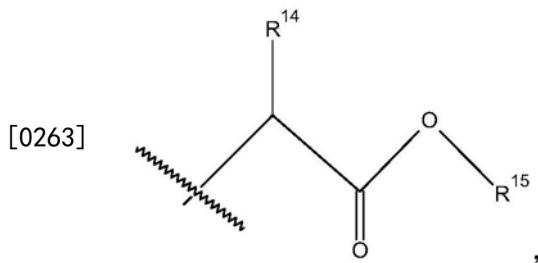
[0258] 其中：

[0259] X是杂环碱基部分；

[0260] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃；卤素；-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、-OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=NH)(NH₂)、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=R⁸)[N(R⁵)(R⁶)]、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基；

[0261] J和J'各自独立地是0或S;

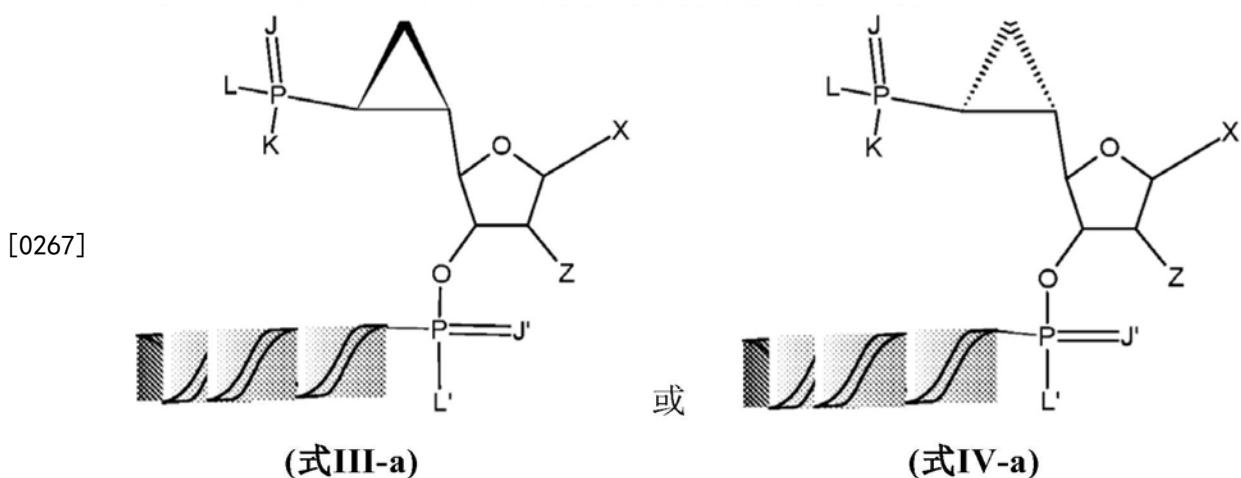
[0262] L、L'和K各自独立地选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



[0264] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基,所述取代基独立地选自SH、S- (C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C= (NH) NH₂,且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基;且

[0265] 包含所述RNAi药剂的其余部分。

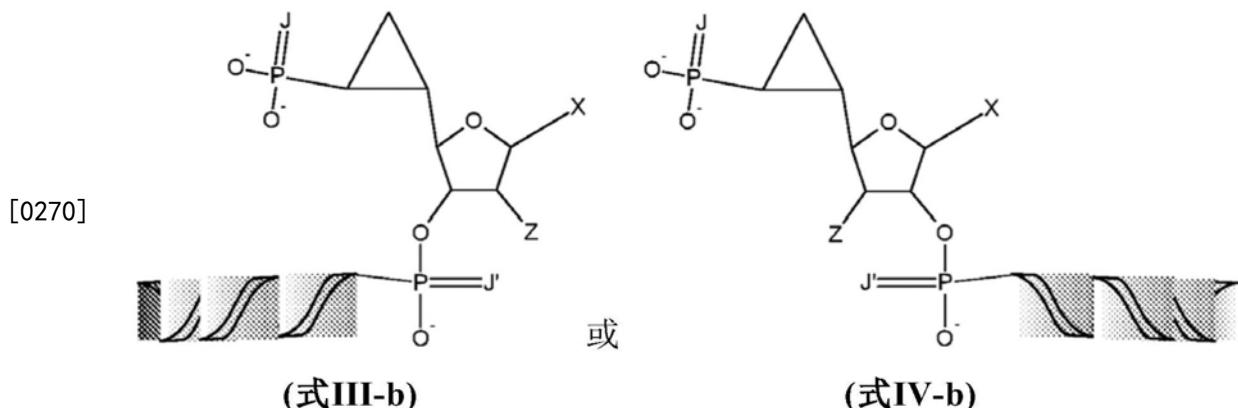
[0266] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是下述式III-a或式IV-a表示的5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸:

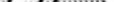


[0268] 其中, X, Z, J, K, L, J', L' 和  各自如上文的式III和式IV中所定义。

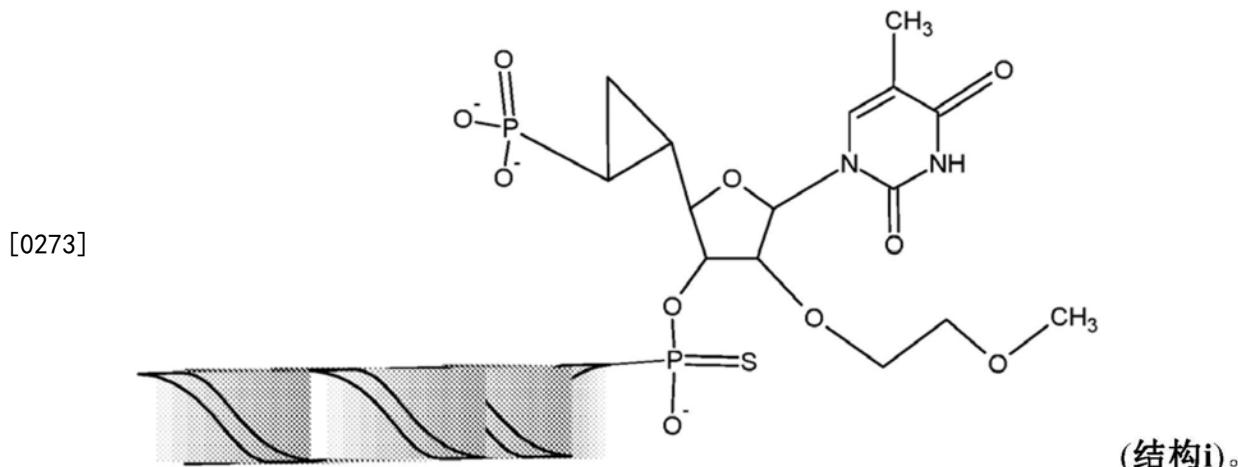
[0269] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是下述式

III-b和式IV-b表示的5'-环丙基膦酸酯修饰核昔酸：

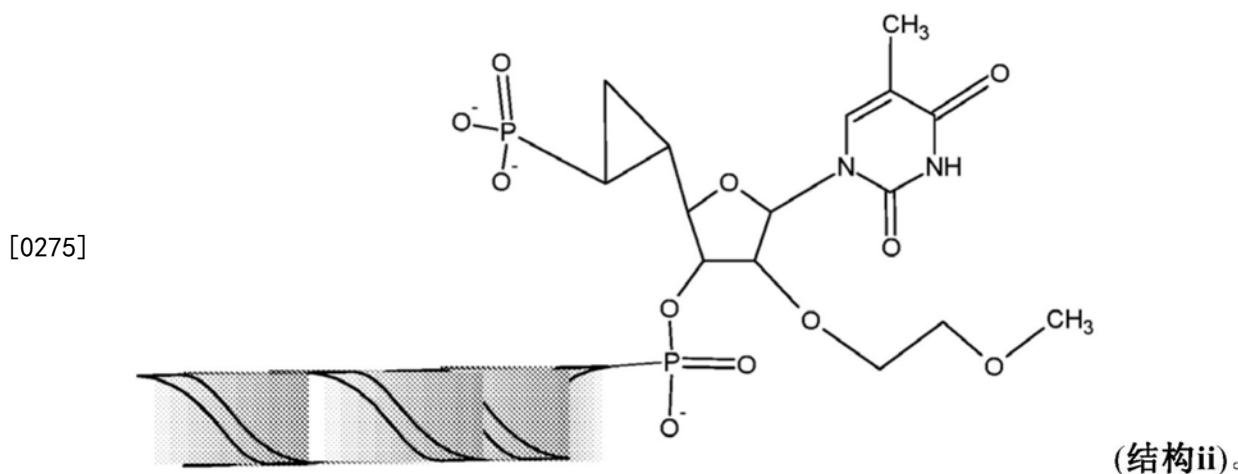


[0271] 其中, X, Z, J, J' 和  各自如上文的式III和式IV中所定义。

[0272] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5' - 环丙基磷酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含胸腺嘧啶杂环碱基部分和2' - 甲氧基乙基(2' - O-2-甲氧基乙基或“2' - MOE”)修饰(cPrpTMs),如下述结构i所示:

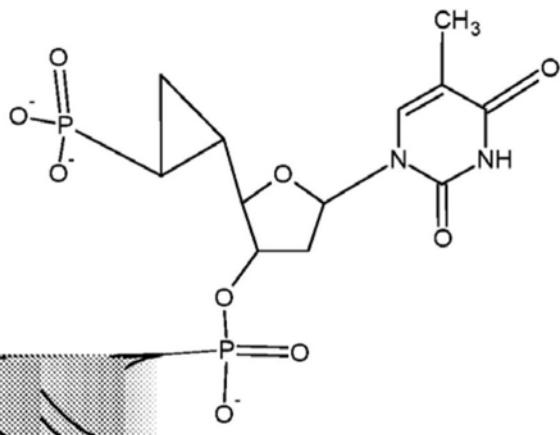


[0274] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5' - 环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含胸腺嘧啶杂环碱基部分和2' - 甲氧基乙基(2' - O - 2 - 甲氧基乙基或“2 - MOE”)修饰(cPrpTM),如下述结构ii所示:



[0276] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含胸腺嘧啶杂环碱基部分和2'-H修饰(cPrpdT),如下述结构iii所示:

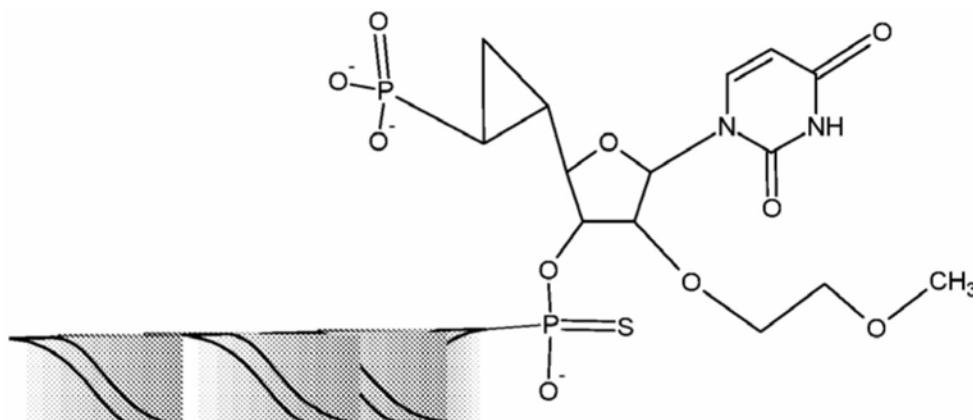
[0277]



(结构iii)。

[0278] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含尿嘧啶杂环碱基部分和2'-甲氧基乙基(2'-0-2-甲氧基乙基或“2'-MOE”)修饰(cPrpUMs),如下述结构iv所示:

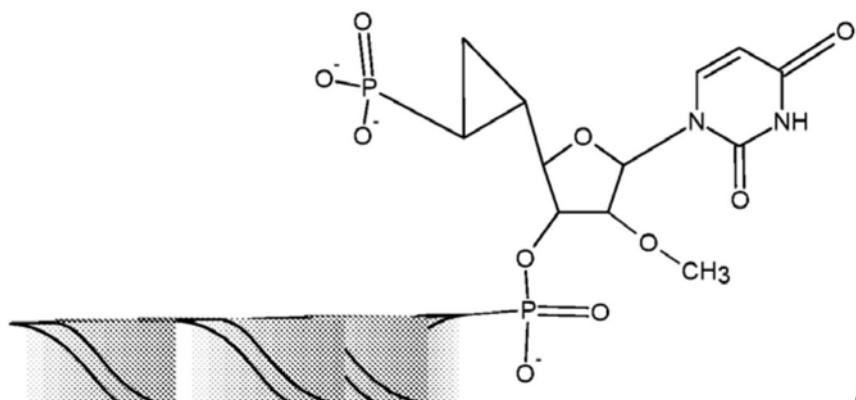
[0279]



(结构iv)。

[0280] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含尿嘧啶杂环碱基部分和2'-0-甲基修饰(cPrpu),如下述结构v所示:

[0281]

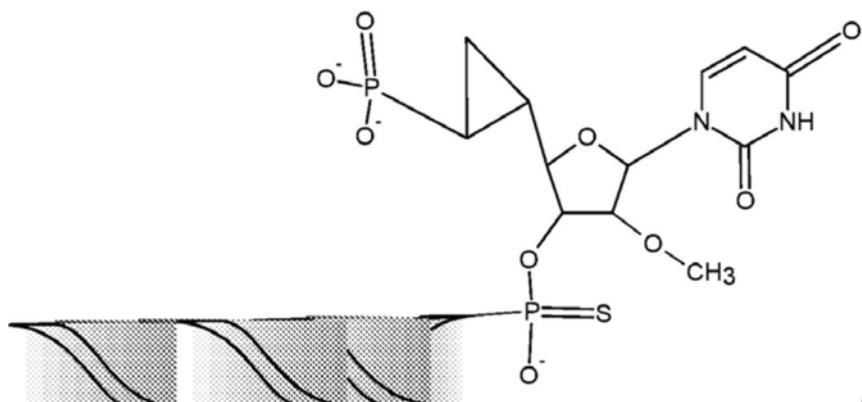


(结构v)。

[0282] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含尿嘧啶杂环碱基部分和2'-0-甲基修饰

(cPrpus), 如下述结构vi所示:

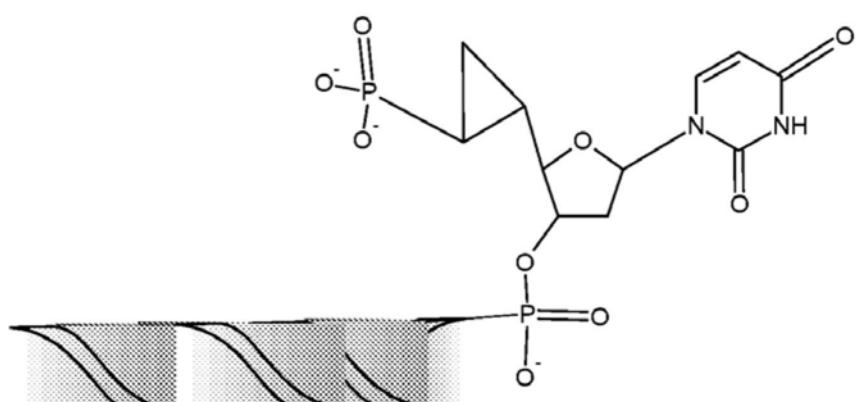
[0283]



(结构vi)。

[0284] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含尿嘧啶杂环碱基部分和2'-脱氧修饰(cPrpdU),如下述结构vii所示:

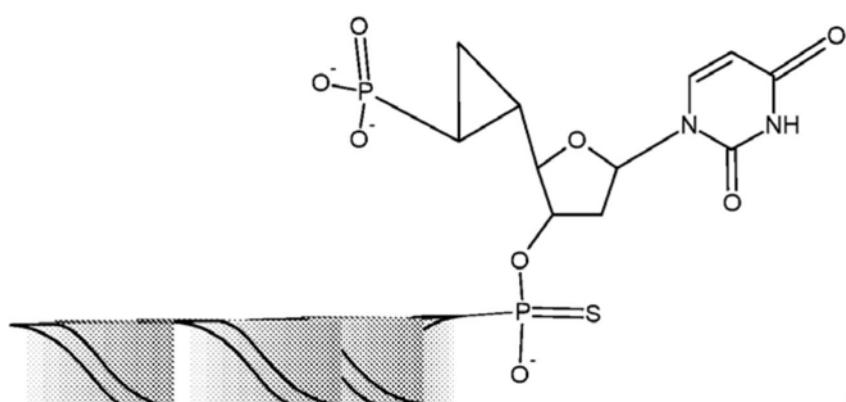
[0285]



(结构vii)。

[0286] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含尿嘧啶杂环碱基部分和2'-0-甲基修饰(cPrpdUs),如下述结构viii所示:

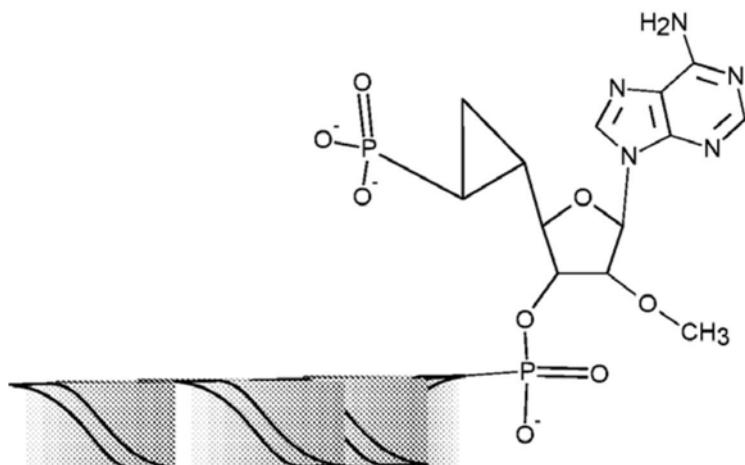
[0287]



(结构viii)。

[0288] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含腺嘌呤杂环碱基部分和2'-0-甲基修饰(cPrpa),如下述结构ix所示:

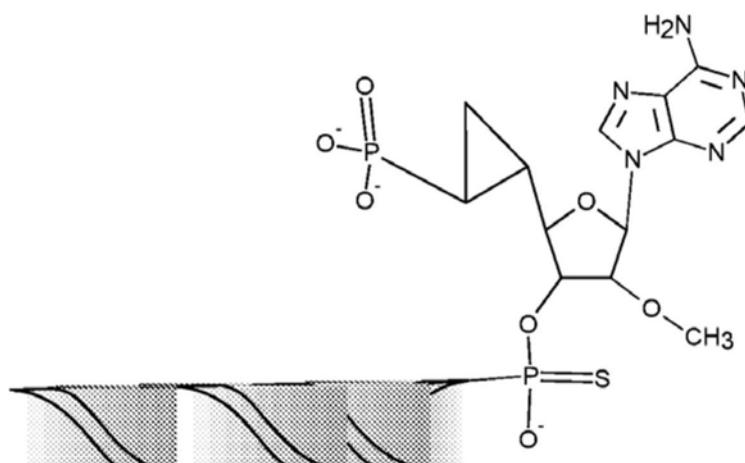
[0289]



(结构ix)。

[0290] 在一些实施方式中,双链RNAi药剂的反义链的5'末端(或末端核苷酸)是5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸,其中该修饰核苷酸包含腺嘌呤杂环碱基部分和2'-O-甲基修饰(cPrpas),如下述结构x所示:

[0291]



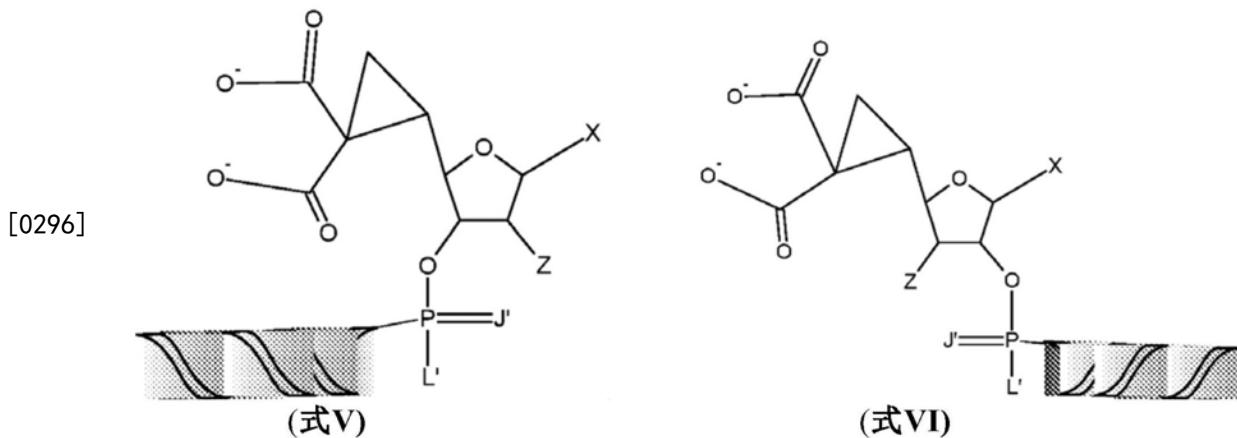
(结构x)。

[0292] 在一些实施方式中,结构i、ii、iii、iv、v、vi、vii、viii、ix或x可以位于双链RNAi药剂的反义链的5'末端(末端核苷酸)。

[0293] 在一些实施方式中,结构i、ii、iii、iv、v、vi、vii、viii、ix或x可以位于单链反义寡核苷酸的5'末端(末端核苷酸)。

[0294] 结构i~x本质上只是示例性的。如本文他处所讨论,例如,糖替代性取代部分可以与上述结构联合使用,以将5元呋喃糖环改变成能够取代5元呋喃糖环的不同结构,例如吗啉基、环己烯基、环己六醇或无环结构。这样的改变是可以考虑到的,并且落在本文所述的发明范围内。

[0295] 在一些实施方式中,5'-膦酸酯模拟物、例如5'-C-丙二酰基是与环丙基连接的,并且RNAi药剂的反义链的末端(或末端核苷酸)是下述式V和VI表示的5'-环丙基-C-丙二酰基修饰核苷酸:



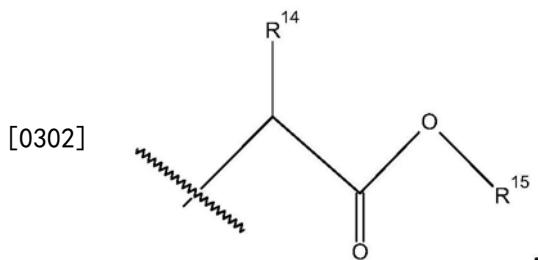
[0297] 其中：

[0298] X是杂环碱基部分；

[0299] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃；卤素；-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、-OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=NH)(NH₂)、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=R⁸)[N(R⁵)(R⁶)]、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基；

[0300] J和J'各自独立地是O或S；且

[0301] L'选自OH、OR¹⁶、SR¹⁶或NR¹⁶，其中R¹⁶选自H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、芳基或



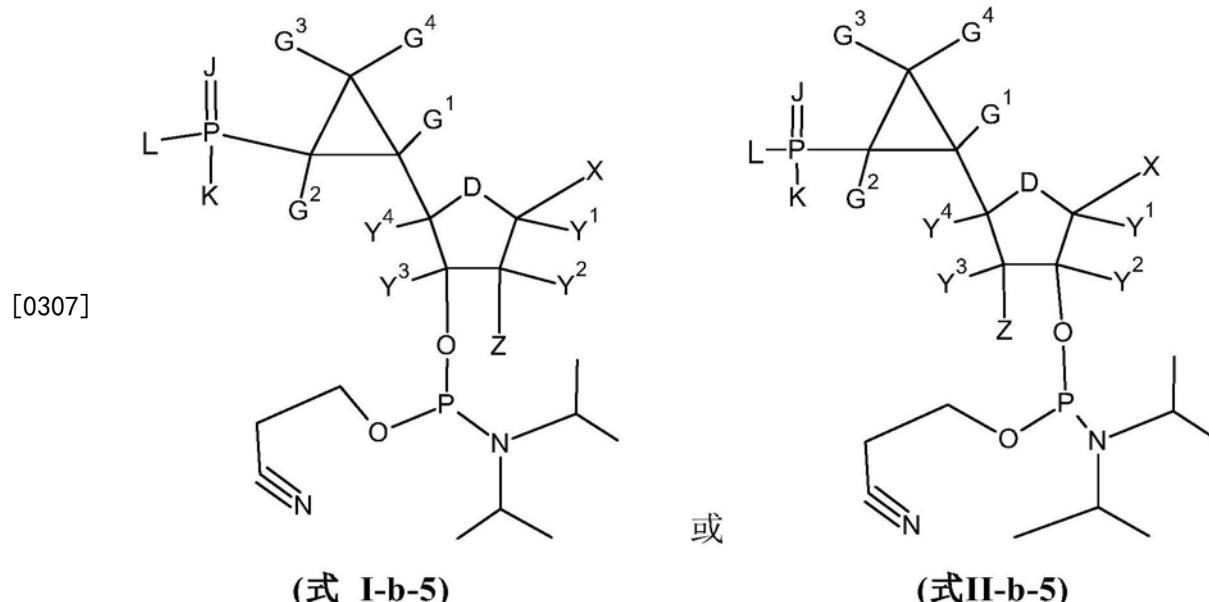
[0303] 其中R¹⁴选自H或被1至3个取代基任选取代的C₁-C₄烷基，所述取代基独立地选自SH、S-(C₁-C₄烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或-NH-C(=NH)NH₂，且R¹⁵选自H、C₁-C₁₈烷基或芳基；且

[0304]  包含所述RNAi药剂的其余部分。

[0305] 本领域普通技术人员应当容易理解和了解，在足够碱性的条件下，式I、II、III、IV、V、VI、VII和/或VIII(包括式的亚组或种类(如式I-b-5))和/或结构i、ii、iii、iv、v、vi、vii、viii、ix、x、xi、xii和/或xiii的质子性基团以部分或完全脱质子化状态存在。同样地，在足够酸性的条件下，包含碱性位点的基团或原子被质子化。本文所述的基团的所有这些质子化或脱质子化形式均落在本发明的范围内。例如，当羧基落在本发明或权利要求的范围内的情况下，相应的羧酸酯/盐也落在本发明或权利要求的范围内。例如，当氨基落在本

发明或权利要求的范围内的情况下，相应的铵基也落在本发明或权利要求的范围内。

[0306] 在一些实施方式中,所述化合物是具有式I-b-5或式II-b-5表示的结构的亚磷酰胺化合物:



[0308] 其中：

[0309] D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^2)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)=\text{C}(\text{R}^4)$ 、 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{OC}(\text{H})(\text{X}^3)$ 或 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{X}^3)$ ；

[0310] R^1 是H、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或取代的 C_2 - C_6 炔基；

[0311] R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或取代的 C_2 - C_6 炔基；

[0312] 当D是O、S、 CH_2-CH_2 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 OCH_2 、 $\text{N}(\text{R}^1)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^2)$ 、 $\text{C}(\text{R}^2)=\text{C}(\text{R}^4)$ 、 $\text{OC}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 时，X是杂环碱基部分；

[0313] 当D是OC(H)(X³)或OC(R²)(X³)时,X是H、卤素、C₁-C₆烷基、取代的C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、取代的C₁-C₆烷氧基、C₂-C₆烯基、取代的C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基或取代的C₂-C₆炔基,且X³是杂环碱基部分:

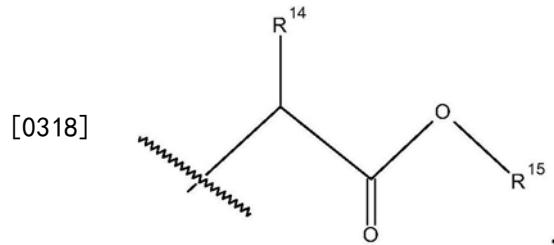
[0314] Z是H、-OH、F、OCH₃、-O-(CH₂)₂-OCH₃；卤素；-OCH₂F、-OCHF₂、-OCF₃、-OCH₂CH₃、-O(CH₂)₂F、-OCH₂CHF₂、-OCH₂CF₃、-OCH₂-CH=CH₂、-O(CH₂)₂-OCH₃、-O(CH₂)₂-SCH₃、-O(CH₂)₂-OCF₃、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、-OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂、-O(CH₂)₂-N(H)-C(=NH)(NH₂)、-O(CH₂)₃-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-ON(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁵)(R⁶)、-OCH₂C(=O)-N(R⁷)-(CH₂)₂-N(R⁵)(R⁶)、-O(CH₂)₂-N(R⁷)-C(=R⁸)[N(R⁵)(R⁶)]、任选取代的C₁-C₆烷基、任选取代的C₁-C₆烷氧基、任选取代的C₂-C₆烯基或任选取代的C₂-C₆炔基，其中R⁵、R⁶、R⁷和R⁸各自独立地是H或C₁-C₆烷基；

[0315] Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 各自独立地是H、卤素、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或取代的 C_2 - C_6 炔基；或者， Y^4 与 Y^1 或 Y^2 之一连接，其中所述连接包含选自O、S、 NR^9 、 $C(R^{10})$ (R^{11})、 $C(R^{10})=C(R^{11})$ 、 $C[=C(R^{10})$ (R^{11})]和 $C(=O)$ 的二价基团，且 Y^1 、 Y^2 和 Y^3 中的另两个各自独立地是H、卤素、任选取代的 C_1 -

C_6 烷基、任选取代的 C_1 - C_6 烷氧基、任选取代的 C_2 - C_6 烯基或任选取代的 C_2 - C_6 炔基，其中 R^9 、 R^{10} 和 R^{11} 各自独立地是H、 C_1 - C_6 烷基、取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_2 - C_6 烯基、取代的 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基或取代的 C_2 - C_6 炔基；

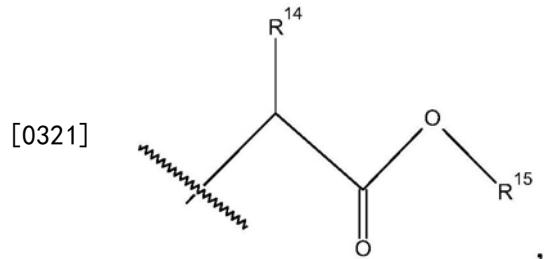
[0316] J 是0、S、 NR^{12} 、 $N-N(R^{13})_2$ 或 $N-OR^{13}$ ，其中：

[0317] R^{12} 是H、OH、卤素、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、芳基或



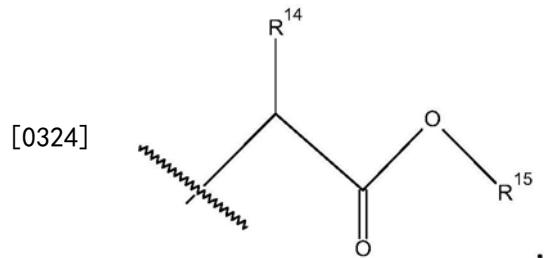
[0319] 其中 R^{14} 选自H或被1至3个取代基任选取代的 C_1 - C_4 烷基，所述取代基独立地选自SH、 $S-(C_1-C_4$ 烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或 $NH-C=(NH)NH_2$ ，其中 R^{15} 选自H、 C_1-C_{18} 烷基或芳基；

[0320] 其中 R^{13} 是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、芳基或



[0322] 其中 R^{14} 选自H或被1至3个取代基任选取代的 C_1 - C_4 烷基，所述取代基独立地选自SH、 $S-(C_1-C_4$ 烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或 $NH-C=(NH)NH_2$ ，且其中 R^{15} 选自H、 C_1-C_{18} 烷基或芳基；

[0323] K和L各自独立地选自OH、 OR^{16} 、 SR^{16} 或 NR^{16} ，其中 R^{16} 选自H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、芳基或

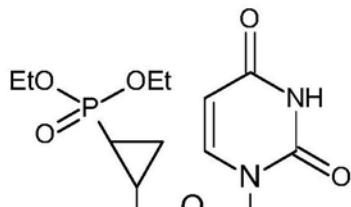


[0325] 其中 R^{14} 选自H或被1至3个取代基任选取代的 C_1 - C_4 烷基，所述取代基独立地选自SH、 $S-(C_1-C_4$ 烷基)、被羟基任选取代的芳基、被羟基任选取代的杂芳基、氨基、羟基、氧或 $NH-C=(NH)NH_2$ ，且 R^{15} 选自H、 C_1-C_{18} 烷基或芳基；且

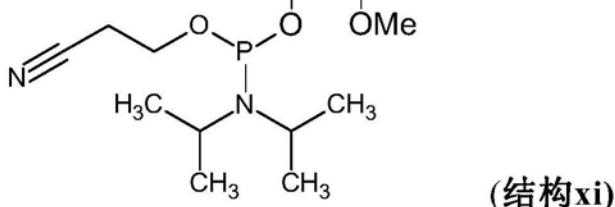
[0326] G^1 、 G^2 、 G^3 和 G^4 各自独立地选自下组：H、F、卤素、 C_1-C_6 烷基、CN、 $CH_2(R^{33})$ 、 $CH_2-O-(R^{33})$ 、 $C(=O)(R^{33})$ 、 $C(=S)(R^{33})$ 或 $(R^{34})(R^{33})$ ，其中 R^{33} 是O(R^{35})、S(R^{35})、N(R^{35})(R^{36})，其中 R^{34} 、 R^{35} 和 R^{36} 各自独立地选自H、卤素或 C_1-C_6 烷基。

[0327] 在一些实施方式中，式I-b-5和式II-b-5中的X包含一个或多个保护基。

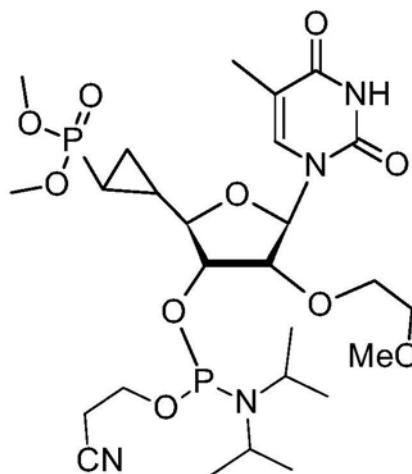
[0328] 在一些实施方式中,式I-b-5或式II-b-5表示的所述化合物具有下述结构:



[0329]



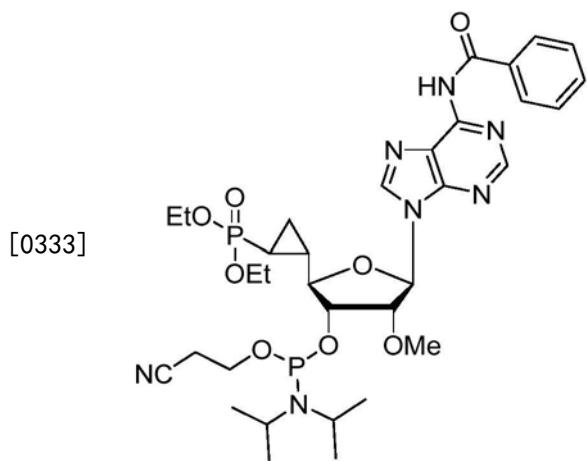
[0330] (2-氰基乙基 ((2R,3R,4R,5R)-2-(2-(二乙氧基磷酰基)环丙基)-5-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基四氢呋喃-3-基)二异丙基亚磷酰胺) ;



[0331]

(结构xii)

[0332] ([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-([(双(丙烷-2-基)氨基](2-氰基乙氧基)膦基]氧基)-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯) ;或



(结构xiii)

[0334] (2R,3R,4R,5R)-5-(6-苯甲酰氨基-9H-嘌呤-9-基)-2-(2-(二乙氧基磷酰基)环丙

基)-4-甲氧基四氢呋喃-3-基(2-氰基乙基)二异丙基亚磷酰胺)。

[0335] 在一些实施方式中,结构xi、xii或xiii可以加在双链RNAi药剂的反义链的5'末端(末端核苷酸)上。

[0336] 在一些实施方式中,结构xi、xii或xiii可以加在单链反义寡核苷酸的5'末端(末端核苷酸)上。

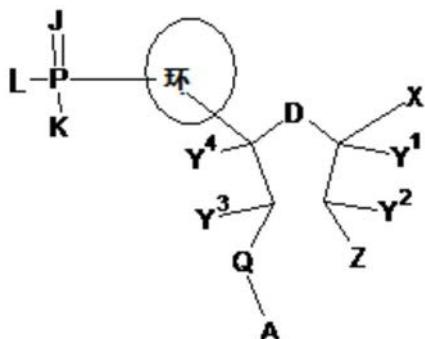
[0337] 结构xi、xii和xiii本质上只是示例性的。如本文他处所讨论,例如,糖替代性取代部分可以与上述结构联合使用,以将5元呋喃糖环改变成能够取代5元呋喃糖环的不同结构,例如吗啉基、环己烯基、环己六醇或无环结构。另外,如本文他处所讨论,修饰核苷酸的2'或3'位置上的修饰可以改变成本领域已知的各种修饰,并且/或者杂环碱基部分可以由本文描述的特定结构修饰。这样的改变是可以考虑到的,并且落在本文所述的发明范围内。

[0338] 当5'-环磷酸酯修饰核苷酸是本文所述的亚磷酰胺化合物的形式时,可以采用本领域公知的核苷酸的亚磷酰胺合成方法将其用于连接5'-环磷酸酯修饰核苷酸。5'-环磷酸酯修饰核苷酸可以通过如下方式制备成亚磷酰胺化合物:将亚磷酰胺形成剂的磷原子通过偶联(例如磷酸化)反应进行连接,从而形成亚磷酰胺化合物。

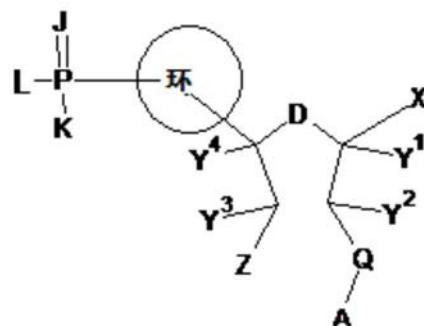
[0339] 在一些实施方式中,5' - 环磷酸酯修饰核苷酸-亚磷酰胺化合物用于将5' - 环磷酸酯修饰核苷酸与双链RNAi药剂的反义链的5' 末端连接。在一些实施方式中,5' - 环磷酸酯修饰核苷酸-亚磷酰胺化合物用于将5' - 环磷酸酯修饰核苷酸与单链RNAi药剂的5' 末端连接。

[0340] 如本文所用,包含本文所述的5' -环丙基膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂和单链反义寡核苷酸含有一个或多个不对称中心,因而导致产生对映异构体、非对映异构体及其它立体异构构型。本文中出现的任何键的构型只是出于方便而选择的,不旨在限制特定的构型,除非文中另有说明。

[0341] 在一些实施方式中,所述化合物具有式IX或式X表示的式B的结构:



(式VII)



(式VIII)

[0343] 其中,“环”、D、X、Z、Y¹、Y²、Y³、Y⁴、J、K、L、Q和A各自如上文的式I和式II中所定义。

[0344] RNAi药剂、靶向性配体和递送聚合物

[0345] 已证明,具有与靶核酸至少部分互补的序列的低聚化合物(例如RNAi药剂)在体外和体内均可改变所述靶核酸的功能和活性。如本文所用, RNAi药剂可以包含一个或多个5'-环磷酸酯修饰核苷酸。

[0346] 在一些实施方式中,包含本文所述的5'-环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂是双链的。就双链RNAi药剂而言,所述RNAi药剂的正义和反义链的长度独立地为16~30个核苷酸。

在一些实施方式中,双链RNAi药剂包含彼此至少部分互补(至少70%互补)的正义链和反义链。反义链包含具有与靶mRNA中的序列完美互补(100%互补)或至少部分互补(至少85%互补)的序列的区域。双链RNAi药剂的正义链和反义链的长度各自可以为16~30个核苷酸。正义和反义链可以是相同长度也可以是不同长度。在一些实施方式中,正义和反义链的长度各自独立地为17~26个核苷酸。在一些实施方式中,正义和反义链的长度各自独立地为17~21个核苷酸。在一些实施方式中,正义和反义链的长度均为21~26个核苷酸。在一些实施方式中,正义链的长度为约19个核苷酸,而反义链的长度为约21个核苷酸。在一些实施方式中,正义链的长度为约21个核苷酸,而反义链的长度为约23个核苷酸。在一些实施方式中,正义和反义链的长度均为26个核苷酸。在一些实施方式中,RNAi药剂的正义和反义链的长度各自独立地为17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个核苷酸。在一些实施方式中,双链RNAi药剂具有约16、17、18、19、20、21、22、23或24个核苷酸的双链体长度。正义链和反义链之间的完美或部分互补的该区域通常为15~25(例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25)个核苷酸的长度,且位于反义链的5'端或附近(例如该区域距离反义链的5'端1、2、3或4个核苷酸,其不完美或部分互补)。在一些实施方式中,5' -环磷酸酯修饰核苷酸是双链RNAi药剂的反义链的5'端上的末端核苷酸。

[0347] 在一些实施方式中,包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂是单链反义寡核苷酸。在一些实施方式中,单链反义寡核苷酸的长度各自独立地为约8至约40个核苷酸。

[0348] 在一些实施方式中,包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂是具有正义链和反义链的双链分子。在一些实施方式中,包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂是单链反义寡核苷酸。

[0349] 在一些实施方式中,5' -环磷酸酯修饰核苷酸连接在RNAi药剂的末端,并提高RNAi药剂的核酸酶稳定性。在一些实施方式中,本文所述的在末端包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂通过递送至细胞,能够在体外或体内通过RNA干扰(RNAi)的生物过程抑制或敲减靶基因的表达。

[0350] 就双链RNAi药剂而言,正义链和/或反义链可以任选且独立地在核心序列的3'末端、5'末端或者同时在3'和5'末端含有其它的1、2、3、4、5或6个核苷酸(延伸序列)。如果存在其它的正义链核苷酸,则其可以与靶mRNA中的相应序列相同或不相同。如果存在其它的反义链核苷酸,则其可以与相应的正义链的其它核苷酸(如果存在的话)互补或不互补。就单链RNAi药剂而言,如果存在其它核苷酸,则其可以与靶mRNA中的相应序列互补或不互补。

[0351] 在一些实施方式中,本文所述的包含末端5' -环磷酸酯修饰核苷酸的双链RNAi药剂的正义链和反义链含有相同数量的核苷酸。在一些实施方式中,本文所述的RNAi药剂的正义和反义链含有不同数量的核苷酸。在一些实施方式中,RNAi药剂的正义链5'端和反义链3'端形成钝末端。在一些实施方式中,RNAi药剂的正义链3'端和反义链5'端形成钝末端。在一些实施方式中,RNAi药剂的两个末端均形成钝末端。在一些实施方式中,RNAi药剂的两个末端均不是钝末端。如本文所用,术语“钝末端”是指两条退火链的末端核苷酸互补(形成互补碱基配对)的双链RNAi药剂的末端。

[0352] 在一些实施方式中,RNAi药剂的正义链5'末端和反义链3'末端形成缺损末端。在一些实施方式中,RNAi药剂的正义链3'末端和反义链5'末端形成缺损末端。在一些实施方式中,RNAi药剂的两个末端均形成缺损末端。在一些实施方式中,RNAi药剂的两个末端均不

是缺损末端。如本文所用,缺损末端是指两条退火链的末端核苷酸形成配对(即不形成突出)但不互补(即形成非互补配对)的双链引发剂分子的末端。如本文所用,突出是指双链RNAi药剂的一条链的末端上的一个或多个未配对核苷酸的延伸。未配对核苷酸可位于正义链或反义链上,生成3'或5'突出。在一些实施方式中,RNAi药剂含有:一个钝末端和一个缺损末端、一个钝末端和一个5'突出末端、一个钝末端和一个3'突出末端、一个缺损末端和一个5'突出末端、一个缺损末端和一个3'突出末端、两个5'突出末端、两个3'突出末端、一个5'突出末端和一个3'突出末端、两个缺损末端、或两个钝末端。

[0353] 在一些实施方式中,RNAi药剂含有至少一个具有修饰骨架(本文也称为核苷间连接)的核苷酸。在一些实施方式中,修饰骨架或核苷间连接是一个或多个硫代磷酸酯连接。

[0354] 在一些实施方式中,RNAi药剂的正义链含有1至4个硫代磷酸酯连接。在另一些实施方式中,所述RNAi药剂的反义链含有1至4个硫代磷酸酯连接。在一些实施方式中,正义链和反义链均含有1至4个硫代磷酸酯连接。

[0355] 在一些RNAi药剂为单链的实施方式中,RNAi药剂的分子的核苷酸或修饰核苷酸的所有或几乎所有连接均含有硫代磷酸酯连接。

[0356] 在一些实施方式中,包含具有式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII(包括所有式的亚组或种类(如式I-b-5))和/或结构i、结构ii、结构iii、结构iv、结构v、结构vi、结构vii、结构viii、结构ix、结构x、结构xi、结构xii和/或结构xiii的结构的5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂是双链的。双链RNAi药剂可通过将反义链和正义链一起退火而形成。在一些实施方式中,包含具有式I、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII(包括所有式的亚组或种类(如式I-b-5))和/或结构i、结构ii、结构iii、结构iv、结构v、结构vi、结构vii、结构viii、结构ix、结构x、结构xi、结构xii和/或结构xiii的结构的5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂是单链寡核苷酸。本文所述的RNAi药剂用本领域常用的方法合成。

[0357] 在一些实施方式中,RNAi药剂包含一个或多个修饰核苷酸。如本文所用,“修饰核苷酸”是除核糖核苷酸(2' -羟基核苷酸)以外的核苷酸。如本文所用,脱氧核糖核苷酸视作修饰核苷酸的一类。在一些实施方式中,RNAi药剂的核苷酸的至少50%、例如至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或100%被修饰。如本文所用,修饰核苷酸包括但不限于:脱氧核糖核苷酸、核苷酸模拟物、脱碱基核苷酸(本文表示为X、Ab)、2' -修饰核苷酸、3' -3'连接(倒转)核苷酸(本文表示为invdN、invN、invn、invX、invAb)、含非天然碱基的核苷酸、桥接核苷酸、肽核酸(PNAs)、2' ,3' -开环核苷酸模拟物(非锁核碱基类似物、本文表示为N_{UNA}或NUNA)、锁核苷酸(本文表示为N_{LNA}或NLNA)、3' -0-甲氧基(2' 核苷间连接的)核苷酸(本文表示为3' -OMen)、2' -F-阿拉伯糖基核苷酸(本文表示为NfANA或Nf_{ANA})、5' -Me,2' -氟核苷酸(本文表示为5Me-Nf)、吗啉基核苷酸、膦酸乙烯酯脱氧核糖核苷酸(本文表示为vpdN)、含膦酸乙烯酯的核苷酸、以及含膦酸环丙酯的核苷酸(cPrpN)。2' -修饰核苷酸(即在五元糖环的2' 位置具有除羟基以外的基团的核苷酸)包括但不限于:2' -0-甲基核苷酸(本文表示为核苷酸序列中的小写字母“n”)、2' -脱氧-2' -氟核苷酸(本文表示为Nf,也表示为2' -氟核苷酸)、2' -脱氧核苷酸(本文表示为dN)、2' -甲氧基乙基(2' -0-2-甲氧基乙基)核苷酸(本文表示为NM或2' -MOE)、2' -氨基核苷酸和2' -烷基核苷酸。不需要对给定化合物的所有位置进行统一的修饰。相反地,可将多于一个的修饰引入单

一个RNAi药剂或者甚至是其单个核苷酸中。RNAi药剂可以通过本领域已知的方法来合成和/或修饰。一个核苷酸上的修饰与另一个核苷酸上的修饰无关。

[0358] 修饰核碱基包括合成的和天然的核碱基,例如5-取代嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代嘌呤、(例如2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶或5-丙炔基胞嘧啶)、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-烷基(例如6-甲基、6-乙基、6-异丙基或6-正丁基)衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-烷基(例如2-甲基、2-乙基、2-异丙基或2-正丁基)及其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶、胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫代烷基、8-羟基及其它8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(例如5-溴)、5-三氟甲基及其它5-取代尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0359] 在一些实施方式中, RNAi药剂的所有或基本上所有的核苷酸都是修饰核苷酸。

[0360] 在一些实施方式中, RNAi药剂的一个或多个核苷酸是核糖核苷酸。如本文所用,核糖核苷酸在本文中表示为“N”(没有其它符号的大写字母)。

[0361] 本文所述的RNAi药剂的核苷酸可以通过含磷酸酯或不含磷酸酯的共价核苷间连接而连接。修饰核苷间连接或骨架包括但不限于:5' -硫代磷酸酯基(本文用核苷酸前的小写的“s”表示,如sN、sn、sNf或sdN)、手性硫代磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、膦酸烷基酯(例如膦酸甲酯或3' -亚烷基膦酸酯)、手性膦酸酯、次膦酸酯、氨基磷酸酯(例如3' -氨基氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯或硫烷基氨基磷酸酯)、硫烷基烷基膦酸酯、硫烷基烷基磷酸三酯、吗啉基连接、具有普通3' -5' 连接的硼烷磷酸酯、硼烷磷酸酯的2' -5' 连接类似物、或者相邻的一对核苷单元由3' -5' 转为5' -5' 或由2' -5' 转为5' -2' 而具有相反极性的硼烷磷酸酯。在一些实施方式中,修饰核苷间连接或骨架没有磷原子。没有磷原子的修饰核苷间连接包括但不限于:短链烷基或环烷基糖间连接、混合杂原子和烷基或环烷基糖间连接、或者一个或多个短链杂原子或杂环糖间连接。在一些实施方式中,修饰核苷间骨架包括但不限于:硅氧烷骨架,硫化物骨架、亚砜骨架、砜骨架,甲酰基和硫代甲酰基骨架,亚甲基甲酰基和硫代甲酰基骨架,含链烯骨架,氨基磺酸酯骨架,亚甲基亚氨基和亚甲基肼基骨架,磺酸酯和磺酰胺骨架,酰胺骨架及其它具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的骨架。

[0362] 在一些实施方式中,包含5' -环膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂抑制细胞、细胞团、组织或对象中的靶mRNA的表达。在一些实施方式中,将治疗有效量的本文所述的包含5' -环膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂给予对象,从而抑制对象中的靶mRNA的表达。

[0363] 在一些实施方式中,所述RNAi药剂用于治疗、预防或控制与靶mRNA的表达有关的临床表现。在一些实施方式中,将治疗或预防有效量的一种或多种RNAi药剂给予需要这种治疗、预防或控制的对象。

[0364] 包含5' -环膦酸酯修饰核苷酸的所述RNAi药剂和方法可用于治疗或预防对象中的至少一种症状,所述对象患有会从靶mRNA表达的减少或抑制中获益的疾病或失调。在一些实施方式中,给予对象治疗有效量的一种或多种RNAi药剂,从而治疗至少一种症状。在另一些实施方式中,给予对象预防有效量的一种或多种RNAi药剂,从而预防至少一种症状。

[0365] 在一些实施方式中,相对于给予所述靶向性配体偶联物前的对象或未接受所述靶向性配体偶联物的对象,给予了与表达抑制性低聚化合物偶联的所述靶向性配体的对象中的靶标的基因表达水平和/或mRNA水平下降了至少约5%,例如至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。对象中的基因表达水平和/或mRNA水平可在对象的细胞、细胞群和/或组织中下降。在一些实施方式中,相对于给予所述靶向性配体偶联物前的对象或未接受所述靶向性配体偶联物的对象,给予了与表达抑制性低聚化合物偶联的所述靶向性配体的对象中的蛋白质水平下降了至少约5%,例如至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。对象中的蛋白质水平可在对象的细胞、细胞群、组织、血液和/或其它液体中下降。基因表达、mRNA或蛋白质水平的下降可以通过本领域已知的任意方法来评价。mRNA水平和/或蛋白质水平的下降或减少在本文中统称为靶基因表达的抑制、减少或下降。

[0366] 本文所述的包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂以及包含本文所述的RNAi药剂的组合物可以使用本领域已知的寡核苷酸递送技术递送至细胞、细胞团、肿瘤、组织或对象。一般来说,可以将本领域知晓的适合于(在体外或体内)递送核酸分子的任意方法应用于本文所述的包含一个或多个5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂。例如,递送可通过局部给药(例如直接注射、植入或外用给药)、全身给药、或者通过皮下、静脉内、口服、腹膜内或胃肠道外途径、包括颅内(例如心室内、软组织内和鞘内)、肌内、透皮、气道(气溶胶)、鼻内、直肠或外用(包括口颊和舌下)给药来进行。在某些实施方式中,所述组合物通过皮下或静脉内输液或注射来给药。

[0367] 在一些RNAi药剂为双链的实施方式中, RNAi药剂可以含有与正义链或反义链中的一者的3' 或5' 端连接的非核苷酸基团。在一些实施方式中,靶向性配体或靶向性基团、连接基团或递送载体与正义链共价连接。在一些实施方式中,靶向性配体、连接基团和/或递送载体与正义链的3' 端和/或5' 端连接。在一些实施方式中,靶向性配体、连接基团和/或递送载体与正义链的5' 端连接。在一些实施方式中,靶向性配体、连接基团和/或递送载体直接地或通过接头间接地与正义链的3' 或5' 端连接。在一些实施方式中,靶向性配体通过不稳定的、可切割的或可逆的键或接头/间隔基与RNAi药剂连接。

[0368] 在一些RNAi药剂为单链的实施方式中, RNAi药剂可以含有连接在不存在末端5' -环磷酸酯修饰核苷酸的末端上的靶向性配体或靶向性基团、连接基团或递送载体。在一些RNAi药剂为单链的实施方式中,5' -环磷酸酯修饰核苷酸连接在RNAi药剂的5' 末端,且靶向性配体、连接基团或递送载体连接在RNAi药剂的3' 末端。

[0369] 在一些实施方式中,可以使用递送载体将RNAi药剂递送至细胞或组织。递送载体是促进RNAi药剂向细胞或组织的递送的化合物。递送载体可以包括或由以下物质构成、但不限于:聚合物如两亲性聚合物、膜活性聚合物、肽、蜂毒肽、蜂毒肽类似物、脂质、可逆修饰的聚合物或肽、或可逆修饰的膜活性多胺。

[0370] 包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂可以与脂质、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束、动态多偶联物(DPC)或本领域可获得的其它递送系统组合。RNAi药剂也可以与靶向性基团或靶向性部分、脂质(包括但不限于胆固醇和胆固醇基衍生物)、纳米颗粒、聚合物、脂质体、胶束、DPC(参见例如WO 2000/053722、WO 2008/0022309、WO 2011/104169和WO 2012/

083185、WO 2013/032829、WO 2013/158141,它们各自通过引用纳入本文)或本领域可获得的其它递送系统化学偶联。

[0371] 在一些实施方式中,与RNAi药剂连接的一个或多个5' - 环磷酸酯修饰核苷酸包含在用于在体内递送至细胞的药物组合物中。这样的药物组合物可以包括但不限于:包含与递送聚合物偶联的一个或多个5' - 环磷酸酯修饰核苷酸而形成RNAi引发剂—递送聚合物偶联物的RNAi药剂。在一些实施方式中,该递送聚合物是膜活性多胺。在一些实施方式中,该递送聚合物是可逆修饰的膜活性多胺。

[0372] 在一些实施方式中,靶向性配体或靶向性基团是半乳糖簇,其与包含一个或多个5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂连接。在一些实施方式中,本文所述的RNAi药剂与半乳糖簇连接。如本文所用,半乳糖簇包括具有两个至四个末端半乳糖衍生物的分子。如本文所用,术语半乳糖衍生物包括半乳糖和对去唾液酸糖蛋白(asialeglycoprotein)受体的亲和性等于或超过半乳糖的半乳糖衍生物。末端半乳糖衍生物通常通过其C-1碳连接分子。在一些实施方式中,半乳糖簇具有各自对去唾液酸糖蛋白受体有亲和性的三个末端半乳糖胺或半乳糖胺衍生物(例如N-乙酰基半乳糖胺)。在一些实施方式中,半乳糖簇具有三个末端N-乙酰基半乳糖胺。本领域常用的其它术语包括三触角型半乳糖、三价半乳糖和半乳糖三聚体。已知三触角型半乳糖衍生物簇结合ASGPr的亲和性大于二触角型或单触角型半乳糖衍生物结构(Baenziger和Fiete,Cell,1980,22,611-620;Connolly等,J.Biol.Chem.,1982,257,939-945)。

[0373] 在一些实施方式中,半乳糖簇含有三个半乳糖衍生物,其各自与中央分支点连接。在一些实施方式中,半乳糖簇含有四个半乳糖衍生物,其各自与中央分支点连接。半乳糖衍生物通过糖的C-1碳与中央分支点连接。在一些实施方式中,半乳糖衍生物通过接头或间隔基连接于中央分支点。

[0374] 在一些实施方式中,半乳糖衍生物包含N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc或NAG)。其它对去唾液酸糖蛋白受体有亲和性的糖类选自下组:半乳糖、半乳糖胺、N-甲酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺和N-异丁酰基半乳糖胺。多种半乳糖衍生物对去唾液酸糖蛋白受体的亲和性已经过研究(例如参见:Iobst,S.T.和Drickamer,K.J.B.C.1996,271,6686)或已经用本领域公知和常用的方法测定过。

[0375] 已知的适合用于包含5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的靶向性RNAi药剂的靶向性配体是本领域已知的,例如参见美国专利申请序列号14/452,626、15/452,324、15/452,423和62/415,752,其全部内容都通过引用全文纳入本文。

[0376] 药物组合物和制剂

[0377] 包含本文所述的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂之类的低聚化合物可用于治疗患有会从所述化合物的给药中获益的疾病或失调的对象(例如人或动物,如哺乳动物,例如猿、猴、猪、绵羊、山羊、牛、马、狗、猫、兔、大鼠或小鼠)。在一些实施方式中,使用至少一种包含5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的所述RNAi药剂来制备用于会从基因表达的减少或抑制中获益的对象的治疗的药物组合物(即药品)。这些药物组合物用于在细胞、组织或生物体中抑制基因的表达。在一些实施方式中,所述药物组合物用于治疗患有会从基因表达的减少或抑制中获益的疾病或失调的对象。

[0378] 在一些实施方式中,包含5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂可用于治疗患有会

从靶mRNA表达的减少或抑制中获益的疾病或失调的对象(如人)。给予对象治疗有效量的任意一种或多种RNAi药剂。对象可以是人、患者或人患者。对象可以是承认、青少年、儿童或婴儿。包含与表达抑制性低聚化合物连接的靶向性配体的所述药物组合物可用于提供疾病的治疗性治疗方法。这种方法包括将本文所述的药物组合物给予人类或动物。

[0379] 因此,在一些实施方式中,本文所述的药物组合物可以包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,本文所述的药物组合物可以配制用于对象的给药。

[0380] 如本文所用,药物组合物或药品包含药理学有效量的至少一种本文所述的RNAi药剂和/或RNAi药剂偶联物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂(赋形剂)是除活性药物成分(API,治疗性产物,例如RNAi药剂或RNAi引发剂)以外的、已经适当地评价过安全性、且有意地包含在药物递送系统内的物质。赋形剂在计划剂量下不产生或不倾向于产生治疗效果。赋形剂可起到如下作用:a)在制造过程中辅助药物递送系统的加工;b)保护、支持或提高API的稳定性、生物利用度或患者可接受性;c)帮助产品识别;和/或d)在储存或使用过程中提高API递送的总体安全性、有效性中的一项或多项。药学上可接受的赋形剂可以是也可以不是惰性物质。

[0381] 赋形剂包括但不限于:吸收促进剂、抗粘附剂、消泡剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲剂、载体、包衣剂、色素、递送促进剂、右旋糖酐、右旋糖、稀释剂、崩解剂、乳化剂、增量剂、填充剂、香料、助流剂、保湿剂、润滑剂、油、聚合物、防腐剂、盐水、盐类、溶剂、糖类、悬浮剂、缓释基质、甜味剂、增稠剂、等张剂、载体、斥水化剂和润湿剂。

[0382] 药物组合物可以含有药物组合物中常见的其它组分。该其它组分包括但不限于:止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂、抗炎药或抗组胺药(例如苯海拉明、多西拉敏、阿伐斯汀或西替利嗪)。也考虑到表达或包含本文所定义的包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi引发剂的细胞、组织或分离的器官可以被用作“药物组合物”。如本文所用,“药理学有效量”、“治疗有效量”或简单的“有效量”是指产生预期的药理学、治疗或预防性结果的RNAi药剂的量。

[0383] 在一些实施方式中,所述RNAi引发剂与一种或多种其它疗法或治疗组合,所述疗法或治疗包括但不限于:第二RNAi引发剂或其它RNAi药剂、小分子药物、抗体、抗体片段和/或疫苗。

[0384] 包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的所述RNAi引发剂和包含本文所述的RNAi引发剂的药物组合物可以包装或包括在试剂盒、容器、包装或分配器中。所述RNAi引发剂和包含所述RNAi引发剂的药物组合物可以包装在预填充注射器或药瓶中。

[0385] 包含至少一种本文所述的包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi引发剂的细胞、组织和非人生物体是可以考虑到的。所述细胞、组织或非人生物体通过将所述RNAi引发剂以本领域可用的任意手段递送至所述细胞、组织或非人生物体而制得。在一些实施方式中,所述细胞是哺乳动物细胞,包括但不限于人细胞。所述细胞、组织或非人生物体可用于研究或用作研究工具(例如药物试验或诊断)。

[0386] 在一些实施方式中,本文所述的包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂可用于治疗患有会从靶基因表达的减少或抑制中获益的疾病或失调的对象。在一些实施方式中,所述RNAi药剂用于治疗或预防患有会从靶基因表达的减少或抑制中获益的疾病或失调的对象中的至少一种症状。给予对象治疗有效量的任意一种或多种本文所述的RNAi药剂,从而治疗所述症状。

[0387] 在一些实施方式中,包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂用于治疗或控制临床表现,其中,给予需要这种治疗、预防或控制的对象治疗或预防有效量的一种或多种本文所述的RNAi药剂。在一些实施方式中,所述方法包括给予欲治疗的哺乳动物(如人)包含本文所述的RNAi引发剂分子的组合物。

[0388] 在一些实施方式中,包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi引发剂可用于抑制对象中的细胞、细胞团或组织中的靶基因的表达。在一些实施方式中, RNAi引发剂可用于配制用于抑制例如对象中的细胞、细胞团或组织中的靶基因的表达的组合物。在一些实施方式中,将治疗有效量的本文所述的一类(或多种不同种类)的RNAi药剂给予对象,从而抑制对象中的靶基因的表达(例如有效地抑制对象中的靶基因的表达的量)。

[0389] 在一些实施方式中,相对于给予所述RNAi引发剂前的对象或未接受所述RNAi引发剂的对象,给予了包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的所述RNAi引发剂的对象中的靶标的基因表达水平和/或mRNA水平下降了至少约5%,例如至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。对象中的基因表达水平和/或mRNA水平可在对象的细胞、细胞群和/或组织中下降。在一些实施方式中,相对于给予所述RNAi引发剂前的对象或未接受所述RNAi引发剂的对象,给予了包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的所述RNAi引发剂的对象中的蛋白质水平下降了至少约5%,例如至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%。对象中的蛋白质水平可在对象的细胞、细胞群、组织、血液和/或其它液体中下降。基因表达、mRNA或蛋白质水平的下降可以通过本领域已知的任意方法来评价。mRNA水平和/或蛋白质水平的下降或减少在本文中统称为靶基因或靶mRNA表达的抑制、减少或下降。

[0390] 给药途径是使得包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi引发剂与身体接触的路径。一般来说,用于治疗对象的药物和核苷酸的给药方法是本领域公知的,并且可以应用于本文所述的组合物的给药。本文所述的化合物可以通过任意合适的途径以适合于该特定途径的制剂的形式给药。因此,本文所述的化合物可以通过注射、例如静脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内注射来给药。

[0391] 在一些实施方式中,本文所述的RNAi引发剂分子或组合物可采用本领域已知的寡核苷酸递送技术递送至细胞、细胞团、组织或对象。一般来说,可以将本领域知晓的适合于(在体外或体内)递送核酸分子的任意方法应用于本文所述的包含5' -环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi引发剂。例如,递送可通过局部给药(例如直接注射、植入或外用给药)、全身给药、或者通过皮下、静脉内、口服、腹膜内或胃肠道外途径、包括颅内(例如心室内、软组织内和鞘内)、肌内、透皮、气道(例如气溶胶)、鼻内、直肠或外用(包括口颊和舌下)给药来进行。在某些实施方式中,所述组合物通过皮下或静脉内输液或注射来给药。

[0392] 一般来说,活性化合物的有效量在约0.1至约100mg/kg体重/天、例如约1.0至约50mg/kg体重/天的范围内。在一些实施方式中,活性化合物的有效量在约0.25至约5mg/kg体重每剂的范围内。在一些实施方式中,活性成分的有效量在约0.5至约3mg/kg体重每剂的范围内。给药量也可能取决于患者的总体健康状况、所递送的化合物的相对生物学功效、药物的剂型、制剂中的赋形剂的存在和种类、以及给药途径等变量。也应理解,初始给药剂量可以增加到超出上述上限,以期迅速达到所需的血液水平或组织水平,或者初始剂量可以

小于最佳值。

[0393] 就疾病的治疗或药物的制剂化或用于治疗疾病的组合物而言,包含含有一个或多个5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂之类的表达抑制性低聚化合物的本文所述的药物组合物可以与赋形剂或第二治疗剂或治疗组合,所述第二治疗剂或治疗包括但不限于:第二或其它表达抑制性低聚化合物、小分子药物、抗体、抗体片段和/或疫苗。

[0394] 包含一个或多个5' - 环磷酸酯修饰核苷酸的所述RNAi药剂在加入到药学上可接受的赋形剂或佐剂中时,可以包装在试剂盒、容器、包装或分配器中。本文所述的药物组合物可以包装在预填充注射器或药瓶中。

[0395] 上述提供的实施方式和项目现在用下面的非限制性实施例说明。

[0396] 实施例

[0397] 以下实施例不限于且不旨在说明本文所述的某些实施方式。

[0398] 实施例的合成的以下实验细节中使用的一些缩写如下定义:H或hr=小时;min=分钟;mol=摩尔;mmol=毫摩尔;M=摩尔浓度; μ M=微摩尔浓度;g=克; μ g=微克;rt或RT=室温;L=升;mL=毫升;wt=重量; Et_2O =乙醚;THF=四氢呋喃;DMSO=二甲亚砜; EtOAc =乙酸乙酯; Et_3N 或TEA=三乙胺; $i\text{-Pr}_2\text{N}$ 或DIPEA或DIEA=二异丙基乙胺; CH_2Cl_2 或DCM=二氯甲烷; CHCl_3 =氯仿; CDCl_3 =氘代氯仿; CCl_4 =四氯化碳;MeOH=甲醇; EtOH =乙醇;DMF=二甲基甲酰胺;BOC=叔丁氧基羰基;CBZ=苄氧基羰基;TBS=叔丁基二甲基硅烷基;TBSCl或TBDMSCl=叔丁基二甲基氯硅烷;TFA=三氟乙酸;DMAP=4-二甲氨基吡啶; NaN_3 =叠氮化钠; Na_2SO_4 =硫酸钠; NaHCO_3 =碳酸氢钠; NaOH =氢氧化钠; MgSO_4 =硫酸镁; K_2CO_3 =碳酸钾; KOH =氢氧化钾; NH_4OH =氢氧化铵; NH_4Cl =氯化铵; SiO_2 =二氧化硅; Pd-C =钯碳; HCl =氯化氢或盐酸;NMM=N-甲基吗啉; H_2 =氢气;KF=氟化钾;EDC-HCl=N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐;MTBE=甲基叔丁基醚;MeOH=甲醇;Ar=基团; N_2 =氮; SiO_2 =二氧化硅; R_t =保留时间。

[0399] 另外,适合与本文所述的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸一起使用的RNAi药剂的例子列于下文的实施例中的多个表格中。

[0400] 下述符号用于表示本文所述的表格中列出的序列中的修饰核苷酸。作为本领域普通技术人员应当容易理解,当存在于寡核苷酸中时,除非另外说明,单体通过5' - 3' - 磷酸二酯键相互连接:

[0401] N=2' -OH(未修饰)核糖核苷酸(没有f或d标注的大写字母)

[0402] n=2' -OMe修饰核苷酸

[0403] Nf=2' -氟修饰核苷酸

[0404] dN=2' -脱氧核苷酸

[0405] $\text{N}_{\text{UNA}}=2',3'-\text{开环核苷酸模拟物(非锁核碱基类似物)}$

[0406] $\text{N}_{\text{LNA}}=$ 锁核苷酸

[0407] $\text{Nf}_{\text{ANA}}=2'-\text{F-阿拉伯糖基核苷酸}$

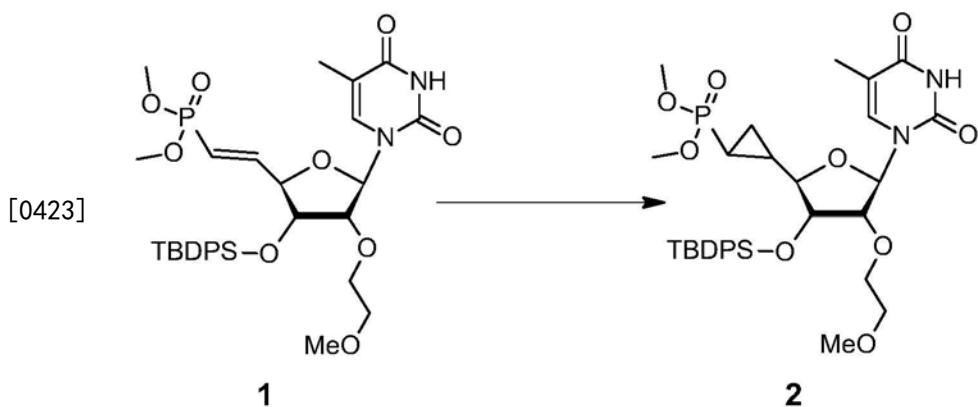
[0408] NM=2' -甲氧基乙基核苷酸

[0409] X或Ab=脱碱基核糖

[0410] R=核糖醇

[0411] (invdN)=反转脱氧核糖核苷酸(3' -3' 连接核苷酸)

- [0412] (invAb) = 反转脱碱基核苷酸
[0413] (invX) = 反转脱碱基核苷酸
[0414] (invn) = 反转2' -OMe核苷酸
[0415] s = 硫代磷酸酯连接核苷酸
[0416] vpdN = 腺酸乙烯酯脱氧核糖核苷酸
[0417] (3'OMen) = 3' -OMe核苷酸
[0418] (5Me-Nf) = 5' -Me, 2' -氟核苷酸
[0419] cPrp = 腺酸环丙酯
[0420] 本发明的化合物可以采用本领域技术人员已知且如上所述的合成化学技术来制备。
[0421] 实施例1. 化合物4 ([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-([[(双(丙烷-2-基)氨基](2-氯基乙氧基)膦基]氧基)-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯) 的合成
[0422] A. 化合物2 ([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-[(叔丁基二苯基硅烷基)氧基]-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯) 的合成。



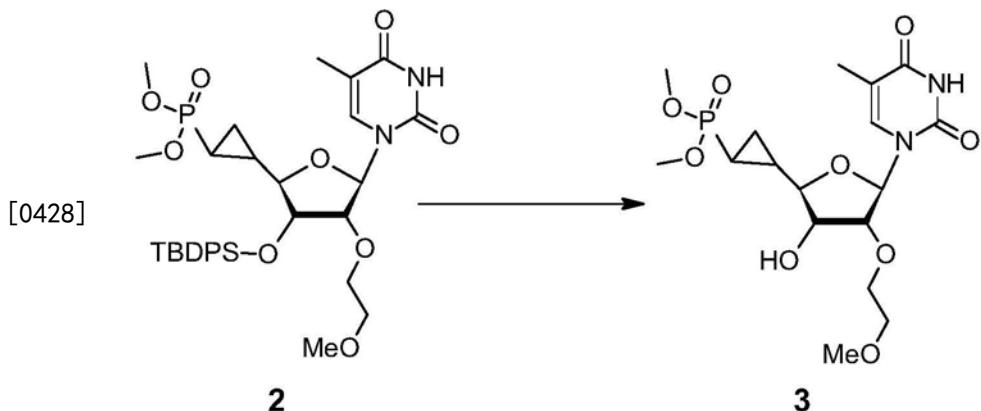
- [0424] 按照与Whittaker,B.等,Tetrahedron Lett.49,6984-6987 (2008) 和Abbas,S.等,Org.Lett.,3 (21),3365-3367 (2001) 类似的过程合成化合物1 ([(E)-2-[(2R,3R,4R,5R)-3-[(叔丁基二苯基硅烷基) 氧基]-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基) 氧杂环戊烷-2-基]乙烯基] 酰酸二甲酯)。

[0425] 将氢化钠(8.2g, 341.67mmol, 3.00当量)的二甲亚砜(500mL)溶液加入用氮惰性气氛吹扫和维持的1000-mL 3颈圆底烧瓶中。然后加入三甲基碘代氧化锍(45g, 204.48mmol, 3.00当量)的溶液。所得溶液于25℃搅拌0.5h。接着, 在25℃搅拌下滴加化合物1(45g, 68.31mmol, 1.00当量)的二甲亚砜(50mL)溶液。所得溶液于25℃搅拌20h。接着, 通过加入50mL的饱和氯化铵水溶液来猝灭反应。

[0426] 所得溶液用3x 1000mL的二氯甲烷萃取并合并有机层。合并的有机层用1x 2000mL的饱和氯化钠水溶液洗涤。有机层用无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。残余物过硅胶快速色谱,并用二氯甲烷/甲醇(100:1-10:1)洗脱。产生4.4g(10%)白色固体状的化合物2([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-[(叔丁基二苯基硅烷基)氧基]-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯)。(H-NMR:

(CDCl₃, 400MHz, ppm) : 88.55 (s, 1H), 7.71 (t, J=6.4Hz, 2H), 7.66 (d, J=6.8Hz, 2H), 7.38-7.64 (m, 6H), 7.03 (s, 1H), 5.86 (d, 3.6Hz, 1H), 4.11 (t, J=5.2Hz, 1H), 3.70-3.77 (m, 6H), 3.55-3.61 (m, 2H), 3.34-3.47 (m, 4H), 3.30 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.40-1.50 (m, 1H), 1.10 (s, 9H), 0.98-1.05 (m, 1H), 0.80-0.90 (m, 1H), 0.61-0.71 (m, 1H)).

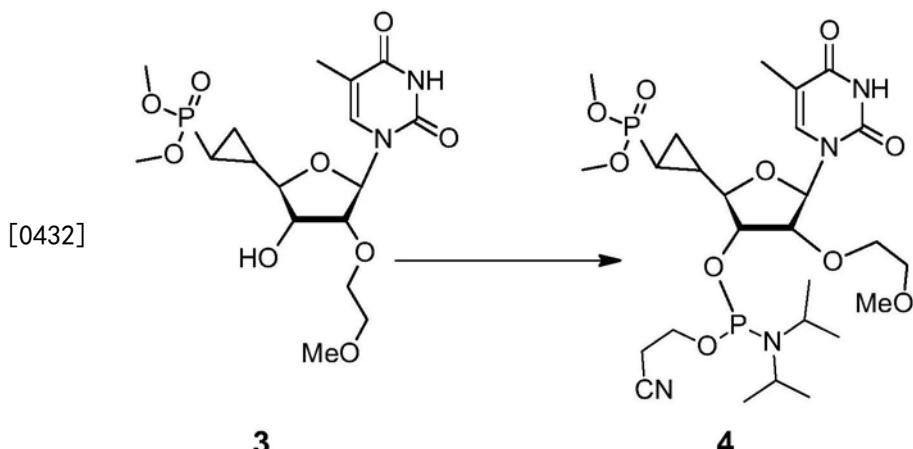
[0427] B. 化合物3 ([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-羟基-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯) 的合成。



[0429] 将化合物2([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-[(叔丁基二苯基硅烷基)氧基]-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯)(6.0g,8.92mmol,1.00当量)的四氢呋喃(60mL)溶液和三乙胺(4.18g,41.31mmol,3.00当量)加入用氮惰性气氛吹扫和维持的100-mL 3颈圆底烧瓶中。然后在0℃搅拌下滴加三乙胺三盐酸盐(13.34g,82.86mmol,6.00当量)。所得溶液于25℃搅拌18h。所得混合物真空浓缩并用60mL二氯甲烷稀释。

[0430] 所得溶液用100mL的饱和碳酸氢钠水溶液和100mL的饱和氯化钠水溶液洗涤。有机溶液用硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。残余物过硅胶快速色谱,并用二氯甲烷/甲醇(100:1-10:1)洗脱。产生3g(77%)白色固体状的化合物3([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-羟基-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧化-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯)。(LC-MS: (ES, m/z) : [M+H]⁺ = 435. H-NMR: (CDCl₃, 300MHz, ppm) : 89.53 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 5.75 (s, 1H), 3.95-4.10 (m, 3H), 3.61-3.85 (m, 7H), 3.51-3.58 (m, 2H), 3.41 (s, 4H), 1.93 (s, 3H), 1.67-1.78 (m, 1H), 1.19-1.28 (m, 1H), 1.03-1.05 (m, 2H)).

[0431] C. 化合物4([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-([[双(丙烷-2-基)氨基](2-氰基乙氧基)膦基]氧基)-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸三甲酯)的合成。



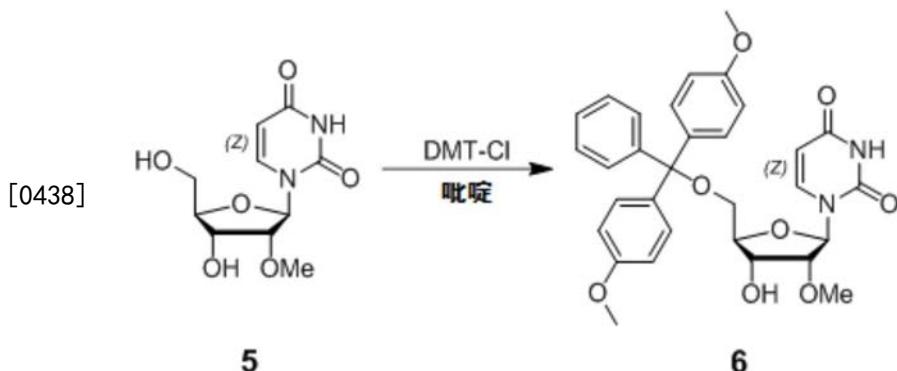
[0433] 将化合物3([2-[(2R,3R,4R,5R)-3-羟基-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基)氧杂环戊烷-2-基]环丙基]膦酸二甲酯)(2.5g, 5.76mmol, 1.00当量)的二氯甲烷(50mL)溶液和4,5-二氰基咪唑(810mg, 6.86mmol, 1.20当量)加入用氮惰性气氛吹扫和维持的50-mL 3颈圆底烧瓶中。然后在0℃搅拌下滴加3-(双(二异丙基氨基)膦氧基)丙腈(2.25g, 7.46mmol, 1.30当量)。所得溶液于25℃搅拌3h。所得溶液用25mL二氯甲烷稀释。

[0434] 所得溶液用2x 50mL的饱和碳酸氢钠水溶液和50mL的饱和氯化钠水溶液洗涤。有机溶液用硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩。残余物过硅胶快速色谱,并用二氯甲烷/乙酸乙酯(5:1-1:5) (含0.5%三乙胺)洗脱。产生2.1g (57%) 白色固体状的化合物4 ([2- [(2R,3R,4R,5R)-3- ([[双(丙烷-2-基)氨基](2-氰基乙氧基)膦基] 氧基)-4-(2-甲氧基乙氧基)-5-(5-甲基-2,4-二氧代-1,2,3,4-四氢嘧啶-1-基) 氧杂环戊烷-2-基] 环丙基] 脲酸二甲酯)。(LC-MS: (ES, m/z) : [M+H]⁺ = 635. H-NMR: (CD₃COCD₃, 400MHz, ppm) : δ 10.11 (s, 1H), 7.55-7.58 (m, 1H), 5.94-5.99 (m, 1H), 4.42-4.48 (m, 2H), 3.77-3.86 (m, 3H), 3.69-3.76 (m, 9H), 3.51-3.56 (m, 3H), 3.30 (d, J=2.8Hz, 3H), 2.81-2.86 (m, 2H), 1.86 (s, 3H), 1.60-1.80 (m, 1H), 1.21-1.27 (m, 12H), 1.04-1.09 (m, 3H). P-NMR: (CD₃COCD₃, 161MHz, ppm) : δ 149.67, 149.51, 149.21, 31.59, 31.55, 31.41, 31.29.)

[0435] 上述化合物4是亚磷酰胺化合物,可以用于添加5' - 环丙基膦酸酯-2' - MOE修饰核苷酸以形成双链RNAi药剂和/或单链反义寡核苷酸的末端。一般来说,可以采用类似的合成过程来制备可以用于添加本文所述的5' - 环膦酸酯修饰核苷酸以形成所述双链RNAi药剂和/或单链反义寡核苷酸的末端的亚磷酰胺。例如,本领域普通技术人员应当了解和理解,实施例1的化合物1可以在2' 位置用不同的基团、例如2' - F、2' - H或2' - O- 甲基来合成。类似地,作为一个非限制性的例子,本领域普通技术人员应当了解,可以使用不同的杂环碱基部分来代替胸腺嘧啶(例如尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基胞嘧啶等),如实施例1所示。

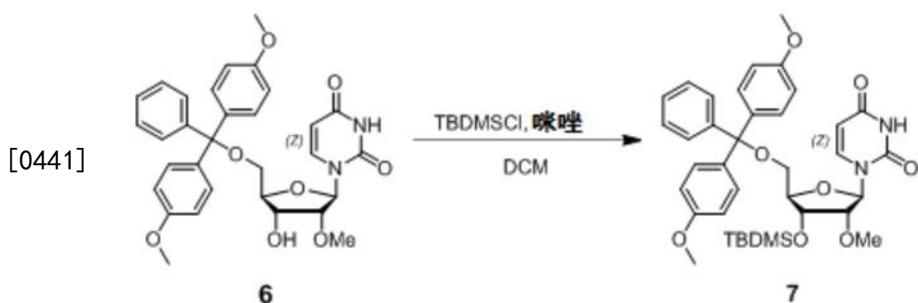
[0436] 实施例2. 化合物15 (2-氰基乙基 ((2R,3R,4R,5R)-2-(2-(二乙氧基磷酰基)环丙基)-5-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基四氢呋喃-3-基)二异丙基亚磷酰胺) 的合成。

[0437] A. 化合物6 (1-((2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-羟基-3-甲氧基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮) 的合成。



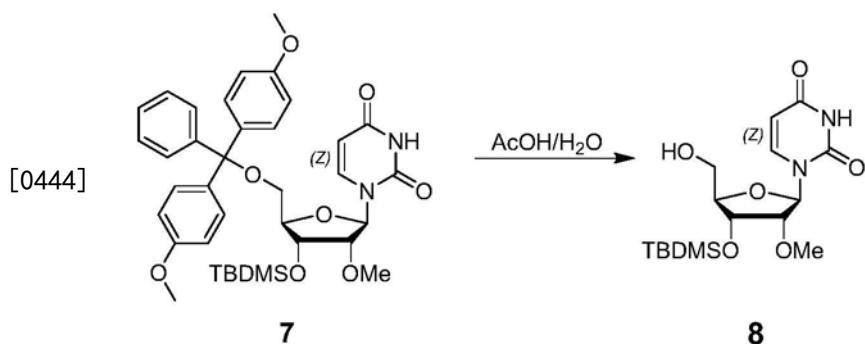
[0439] 化合物5通过市售渠道购买。在化合物5(200g, 775mmol)的吡啶(1.5L)溶液中加入DMT-C1(276g, 813mol)。反应混合物在N₂气氛下于25℃搅拌8h。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1/1, R_f=0.2)显示该反应已完成。减压去除溶剂。残余物用EtOAc(4L)稀释,用水(1L x 2)和盐水(1L)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并减压浓缩。最终残余物通过柱色谱(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=5:1到乙酸乙酯)纯化而得到浅黄色胶状的化合物6(448g, 包含于EtOAc)。(¹H NMR: 400MHz CDCl₃. 9.01 (br s, 1H), 8.05 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.36-7.42 (m, 2H), 7.27-7.34 (m, 6H), 7.22-7.27 (m, 1H), 6.81-6.89 (m, 4H), 5.98 (d, J=1.3Hz, 1H), 5.28 (dd, J=1.9, 8.2Hz, 1H), 4.48 (dt, J=5.3, 8.5Hz, 1H), 4.00 (br d, J=8.0Hz, 1H), 3.81 (d, J=0.8Hz, 7H), 3.65 (s, 3H), 3.50-3.61 (m, 2H), 2.64 (br d, J=9.0Hz, 1H)).

[0440] B. 化合物7 (1-((2R,3R,4R,5R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(叔丁基二甲基硅烷基)氨基)-3-甲氧基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮) 的合成。



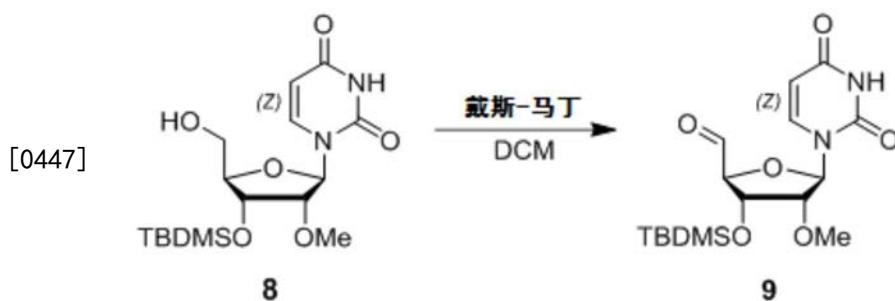
[0442] 在化合物6(448g, 799mmol)的DCM(2.8L)溶液中加入咪唑(163g, 2.4mol)和TBSCl(241g, 1.6mol)。反应混合物于25℃搅拌8h。TLC(石油醚/乙酸乙酯=1/1, R_f=0.8)显示该反应已完成。所得混合物用水(4.5L)稀释，并用DCM(5L × 3)萃取。合并的有机层用盐水(5L)洗涤，用Na₂SO₄干燥，过滤并减压浓缩而得到无色胶状的化合物7(620g, 粗品)。该粗产物无需进一步纯化即可用于下一步骤。

[0443] C. 化合物8 (1-((2R,3R,4R,5R)-4-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)-5-(羟甲基)-3-甲氨基四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮) 的合成。



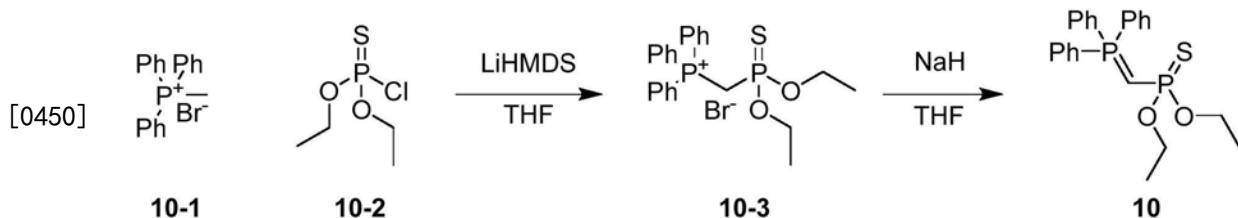
[0445] 将化合物7 (620g, 919mmol) 和AcOH (4L) 在H₂O (1L) 中的混合物脱气并用N₂吹扫三次, 接着将混合物在N₂气流下于25℃搅拌16h。TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/1, R_f=0.2) 显示该反应已完成。通过加入MeOH (50mL) 和Et₃SiH (25mL) 来猝灭反应混合物。在所得混合物中加入NaHCO₃直至pH=7~8, 接着用EtOAc (5L x 3) 萃取。合并的有机层用盐水 (5L) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥, 过滤并减压浓缩。残余物通过柱色谱 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=5:1到1:1) 纯化而得到白色固体状的化合物8 (296g, 产率87%)。(¹H NMR: 400MHz CDCl₃. 9.27 (s, 1H), 7.72 (d, J=8.0Hz, 1H), 5.74 (dd, J=1.3, 8.0Hz, 1H), 5.69 (d, J=4.0Hz, 1H), 4.36 (t, J=5.3Hz, 1H), 4.04-4.09 (m, 1H), 3.93-4.03 (m, 2H), 3.75-3.76 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 2.85 (dd, J=3.5, 6.5Hz, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.11 (d, J=5.3Hz, 6H)).

[0446] D. 化合物9 ((2S,3S,4R,5R)-3-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)-5-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基四氢呋喃-2-甲醛) 的合成。



[0448] 在化合物8 (60g, 161mmol) 的DCM (3L) 溶液中于0℃加入戴斯-马丁氧化剂 (95.7g, 226mmol) 和NaHCO₃ (1.35g 16.1mmol)。反应混合物于0℃搅拌1h, 接着于25℃搅拌3h。TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/1, R_f=0.16) 显示该反应已完成。所得混合物用4L的饱和Na₂S₂O₃和饱和NaHCO₃ (1:1) 溶液猝灭, 并用EtOAc (5L x 3) 萃取。合并的有机层用盐水 (5L) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥, 过滤并减压浓缩而得到橙色油状的化合物9 (48g, 粗品)。该粗产物无需进一步纯化即可用于下一步骤。

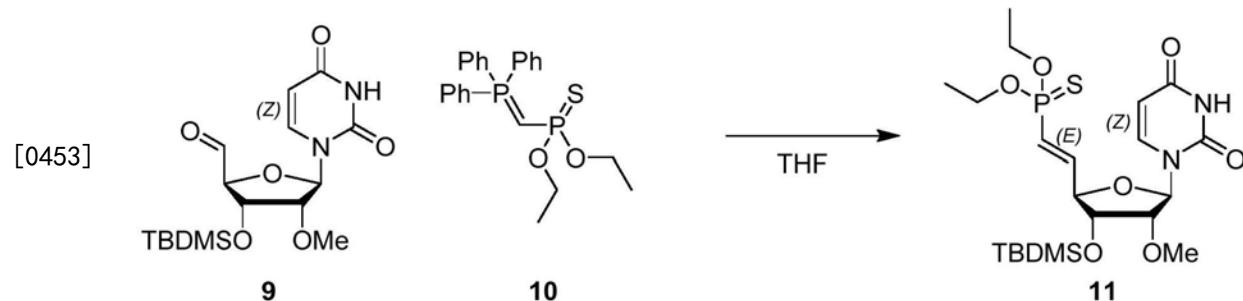
[0449] E. 化合物10的合成。



[0451] 在化合物10-1 (231g, 647mmol) 的THF (2.4L) 浆料中加入LiHMDS (1M的THF溶液, 723mL)。黄色溶液于25℃搅拌15min, 接着冷却至5℃。溶液用化合物10-2 (110g, 583mmol) 处

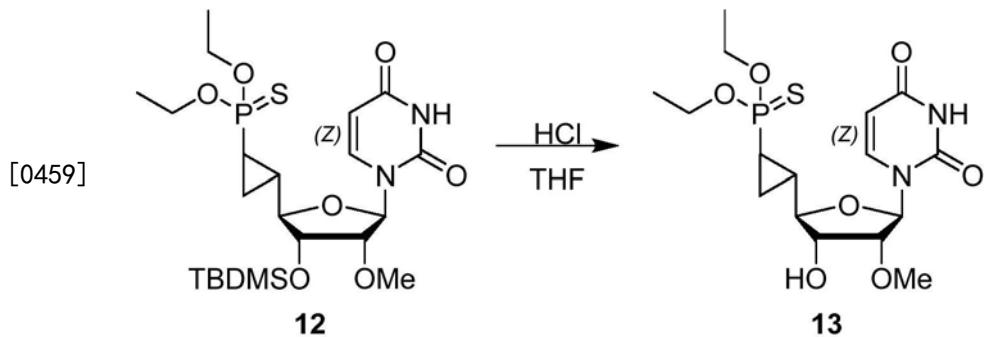
理,并使其升温至25℃,将其保持在该温度下。接着,将溶液冷却至5℃,并通过加入LiHMDS (1M的THF溶液,723mL)进行处理,并且使其升温至2℃。溶液通过于5℃加入H₂O (50mL)而猝灭,并用EtOAc (1.5L)稀释。分离有机层,用Na₂SO₄干燥,并减压浓缩而得到油状的化合物10-3。将粗油溶解于THF (2.4L)并冷却至5℃。接着,将溶液用NaH (57g, 1.43mol, 矿物油中的60%分散体)处理并使其升温至25℃。浆料于25℃搅拌18h。TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/1, R_f = 0.3) 显示该反应已完成。通过硅藻土垫去除NaH, 滤饼用THF (600mL x 2) 淋洗。浓缩滤液而得到黄色油状的化合物10 (250g, 粗品)。

[0452] F. 化合物11 ((E)-2-((2R,3R,4R,5R)-3-((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)-5-(2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基四氢呋喃-2-基)乙烯基)硫代磷酸0,0-二乙酯的合成。



液搅拌2小时,接着加热至50℃保持2小时。LCMS显示该反应已完成。将反应混合物冷却至5℃并用冰猝灭,将内部温度保持在30℃。产物用乙酸乙酯(3L)萃取,有机层用水(5x 1L)洗涤。有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并减压浓缩而得到白色固体状的化合物12(206g,粗品)(杂质为Ph₃P=O;该粗产物无需进一步纯化即可用于下一步骤)。

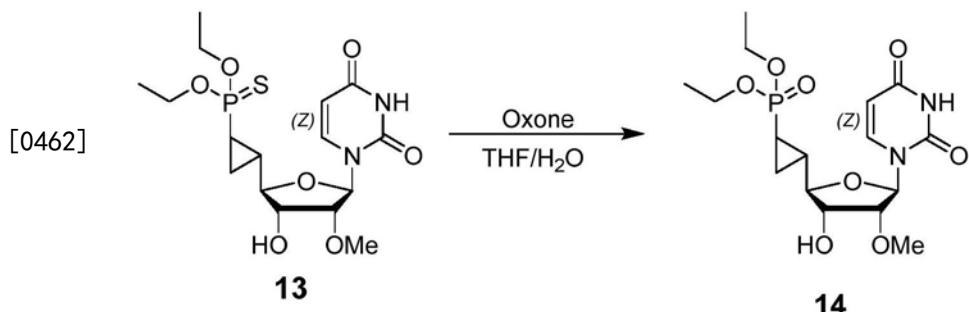
[0458] H. 化合物13((2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-3-羟基-4-甲氧基四氢呋喃-2-基)环丙基)硫代磷酸0,0-二乙酯)的合成。



[0460] 在化合物12(206g,385mmol)的THF(1.3L)的搅拌的溶液中滴加12MHC1(340mL,4.1mol)。所得混合物于25℃搅拌1.5h。TLC(DCM/乙酸乙酯=1/1,R_f=0.2)显示该反应已完成。将反应混合物用冰浴冷却,并用碳酸氢钠的饱和溶液猝灭,直至pH=8。产物用EtOAc(3.9L x 2)萃取,接着将合并的有机层用盐水(1.3L)洗涤。有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。残余物通过柱色谱(SiO₂,DCM/乙酸乙酯=DCM到1:1)纯化而得到白色固体状的化合物13(76g,产率47%)。¹H NMR:400MHz CDCl₃. 8.37(br.s.,1H), 7.41(d,J=8.0Hz,1H), 5.75-5.86(m,2H), 4.00-4.18(m,5H), 3.79-3.85(m,1H), 3.56-3.64(m,3H), 3.41-3.53(m,1H), 2.65-2.74(m,1H), 1.49-1.62(m,1H), 1.24-1.34(m,8H), 0.97-1.09(m,1H))。

[0461] I. 化合物14((2-((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-3-羟基-4-甲氧基四氢呋喃-2-基)环丙基)膦酸二乙酯)的合成。

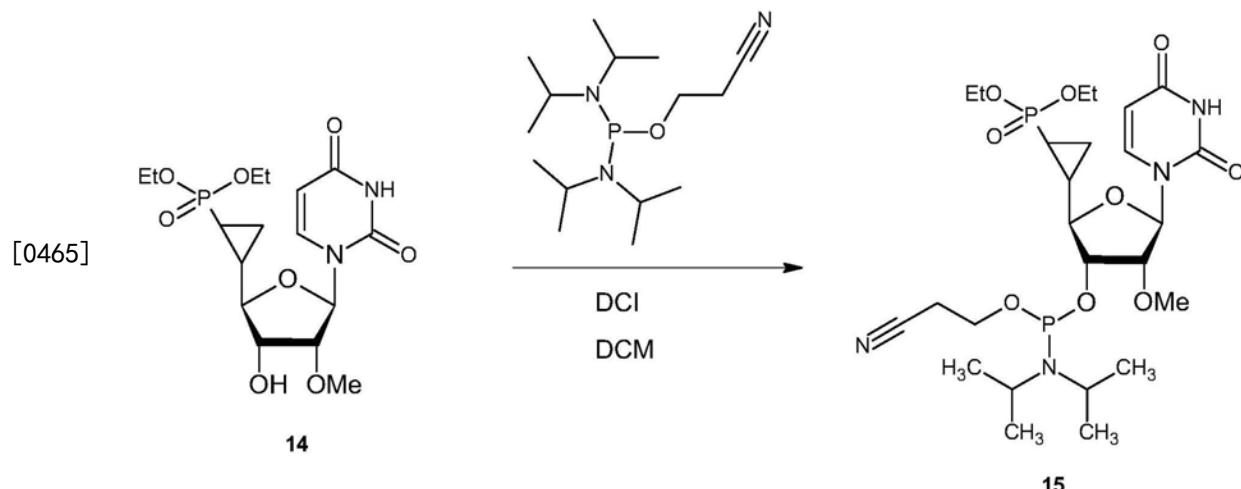
Cy3P-U-OMe-3-OH



[0463] 在冷却至5℃的化合物13(76g,181mmol)的1.4L THF:H₂O(1:1)溶液中加入Oxone[®](194g,316mmol)。反应混合物于5℃搅拌2h。LCMS显示该反应已完成。反应混合物用200mL H₂O稀释,并用2.5L DCM萃取。收集有机层,并且用DCM(2.5L x 4)再萃取水层。合并有机层,接着用Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。残余物通过柱色谱(SiO₂,DCM/MeOH=DCM到10:1)纯化而得到白色固体状的化合物14(Cy3P-U-OMe-3-OH)(40g,粗品)。最后,粗产物通过制备级HPLC(Gemini150*4.6mm(Luna200*25mm(C18,10μm,100Å)+Gemini150*30(c18,5μm,110Å),0.1%TFA/CH3CN/H2O,20mL/Min)纯化而得到澄清固体状的化合物14(20.02g,纯度

99%,产率27%)。¹H NMR:400MHz CDCl₃.9.54 (br.s.,1H),7.40-7.48 (m,1H),5.75-5.89 (m,2H),3.98-4.23 (m,5H),3.84 (dd,J=2.5,5.3Hz,1H),3.56-3.64 (m,3H),3.40 (td,J=7.9,16.5Hz,1H),1.58-1.70 (m,1H),1.30-1.40 (m,6H),1.20-1.29 (m,1H),0.92-1.09 (m,2H).

[0464] J. 化合物15 (2-氰基乙基 ((2R,3R,4R,5R)-2-(2-(二乙氧基磷酰基)环丙基)-5-(2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基)-4-甲氧基四氢呋喃-3-基)二异丙基亚磷酰胺) 的合成。



[0466] 在化合物14 (463mg,1.1mmol) 的DCM (6mL) 溶液中加入4,5-二氰基咪唑 (54mg,0.46mmol),然后加入2-氰基乙基N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺 (518mg,1.7mmol,1.5eq) 的二氯甲烷 (3mL) 溶液。将反应混合物搅拌过夜。通过HPLC确认所有起始原料均已被消耗后,将反应混合物减压浓缩至~2mL的体积。粗溶液上硅胶柱,并用等度梯度 (DCM:EtOAc:三乙胺:甲醇 (6:4:0.1:0.05),Rf=0.25) 纯化。作为环丙基和亚磷酰胺非对映异构体(共4种)的混合物的产率:421mg (61%)。¹H NMR:400MHz DMSO-d6.11.41 (s,1H),7.82-7.72 (m,1H),5.73-5.64 (m,1H),5.82-5.76 (m,1H),4.49-4.18 (m,2H),4.11-3.91 (m,4H),3.88-3.50 (m,4H),3.42-3.32 (m,4H),2.79 (m,2H),1.73-1.53 (m,1H),1.30-1.11 (m,18H),1.10-0.79 (m,3H)).

[0467] 上述化合物15是亚磷酰胺化合物,可以用于添加5'-环丙基膦酸酯-2'-O-Me修饰核苷酸以形成双链RNAi药剂和/或单链反义寡核苷酸的末端。一般来说,可以采用类似的合成过程来制备可以用于添加本文所述的5'-环膦酸酯修饰核苷酸以形成所述双链RNAi药剂和/或单链反义寡核苷酸的末端的亚磷酰胺。例如,本领域普通技术人员应当了解和理解,实施例2的化合物5可以在2'位置用不同的基团、例如2'-F或2'脱氧基团来合成。类似地,作为一个非限制性的例子,本领域普通技术人员应当了解,可以使用不同的杂环碱基部分来代替尿嘧啶(例如胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基胞嘧啶等),如实施例2所示。

[0468] 实施例3.RNAi药剂合成。

[0469] RNAi药剂的合成从正义链和反义链的单独合成开始。首先在固体支持物树脂上合成两条互补链,接着实施切割和脱保护,然后用反相或离子交换色谱纯化,最后退火形成RNAi药剂。

[0470] A) 固相合成:按照寡核苷酸合成中采用的固相上的亚磷酰胺技术来合成RNAi药

剂。根据规模使用市售的自动寡核苷酸合成器 (oligosynthesizer) , 例如 MerMade96E® (生物自动化公司 (Bioautomation)) 、 MerMade12® (生物自动化公司) 或 AKTA Oligopilot (GE公司)。固相合成从序列的3' 端开始, 在每个合成循环中按照所需的顺序依次加入亚磷酰胺结构模块, 以使低聚物生长。每个合成循环包括四个化学步骤: 1) 解封或脱三苯甲基; 2) 偶联; 3) 氧化; 4) 封端。亚磷酰胺衍生自天然存在或化学修饰的核苷酸、或者N-乙酰基半乳糖胺靶向性配体之类的小分子。在可控多孔玻璃 (CPG, 500Å 或 600Å , 获自美国宾夕法尼亚州阿斯顿的引物合成公司 (Prime Synthesis)) 制成的固体支持物上进行合成。所有RNA和2' - 修饰RNA亚磷酰胺均购自赛默飞世尔科学公司 (Thermo Fisher Scientific) (美国威斯康辛州密尔沃基)。具体而言, 使用了如下2' -0- 甲基亚磷酰胺: (5' -0- 二甲氧基三苯甲基- N⁶- (苯甲酰基) -2' -0- 甲基- 腺苷- 3' -0- (2- 氯基乙基- N,N- 二异丙基氨基) 亚磷酰胺、5' -0- 二甲氧基三苯甲基- N⁴- (乙酰基) -2' -0- 甲基- 胞苷- 3' -0- (2- 氯基乙基- N,N- 二异丙基氨基) 亚磷酰胺、(5' -0- 二甲氧基三苯甲基- N²- (异丁酰基) -2' -0- 甲基- 鸟苷- 3' -0- (2- 氯基乙基- N,N- 二异丙基氨基) 亚磷酰胺和5' -0- 二甲氧基三苯甲基- 2' -0- 甲基- 尿苷- 3' -0- (2- 氯基乙基- N,N- 二异丙基氨基) 亚磷酰胺。2' - 脱氧- 2' - 氟亚磷酰胺携带与2' -0- 甲基RNA亚酰胺相同的保护基。将含有亚磷酰胺的靶向性配体溶解于无水二氯甲烷或无水乙腈 (50mM) , 而将所有其它亚酰胺溶解于无水乙腈 (50mM) , 并加入分子筛 (3Å)。使用5- 苯硫基- 1H- 四唑 (BTT, 250mM乙腈溶液) 或5- 乙硫基- 1H- 四唑 (ETT, 250mM乙腈溶液) 作为激活剂溶液。偶联时间为10min (RNA) 、15min (靶向性配体) 、90sec (2' OMe) 和60sec (2' F)。为了引入硫代磷酸酯连接, 采用了100mM的3- 苯基- 1,2,4- 二噻唑啉- 5- 酮 (POS, 获自美国马萨诸塞州莱明斯特PolyOrg公司) 的无水乙腈溶液。

[0471] B) 5' - 环丙基膦酸酯修饰核苷酸的水解。

[0472] 结合于支持物的5' - 环丙基膦酸酯寡核苷酸的水解在AKTA Oligopilot (GE公司) 合成器中实施。三甲基碘硅烷/吡啶/乙腈 (1:13:40v/v) 的混合物以2mL/min的流速通过反应柱, 时间为30分钟至90分钟, 取决于反应规模。接着, 将柱用乙腈洗涤并从合成器上取下, 并将结合于支持物的寡核苷酸转移至漏斗中, 用乙腈/水 (1:1v/v) 洗涤。

[0473] C) 结合于支持物的寡核苷酸的切割和脱保护。结合于支持物的5' - 环丙基膦酸酯寡核苷酸的固相合成和脱保护终止后, 将干燥的固体支持物用1:1体积的40wt% 甲胺水溶液和28wt% 氢氧化铵水溶液 (奥德里奇公司 (Aldrich)) 于30°C 处理两小时。蒸发溶液, 并将固体残余物重溶在水 (见下文) 中。

[0474] D) 纯化。通过反相HPLC或离子交换色谱纯化粗寡核苷酸。收集含产物的组分, 通过LCMS确认各个单链的纯度和相同性。通过UV (260nm) 用理论推导消光系数评价寡核苷酸的浓度和产率。

[0475] E) 退火。通过将等摩尔的正义链和反义链的溶液合并来将互补链混合。将这些溶液保持在常温, 或者置于70°C 的热混合器中, 加热至95°C , 于95°C 保持5min, 并缓慢冷却至室温。将一些RNAi药剂冻干, 并保存在-15~ -25°C。通过在UV-Vis光谱仪中测定溶液在260nm的吸收来确定双链体浓度。除非另外说明, 所有转换因子均为0.037mg/ (mL • cm)。在一些实验中, 从实验测定消光系数计算转换因子。

[0476] 实施例4. 包含5' - 环膦酸酯修饰核苷酸的、靶向LP (a) (人Apo (a) 基因) 的示例性

RNAi药剂序列。

[0477] 列于下表1的以下序列只是示例性的。本文所述的5' - 环磷酸酯修饰核苷酸可以结合到靶向任意基因的任意RNAi药剂或单链反义寡核苷酸上。

[0478] 表1. 靶向LP (a) (人Apo (a) 基因) 的修饰RNAi药剂序列

双链体ID	序 列 标 识 号	SEQ ID NO:	序列信息(5'至3')
AD03158	正义链: AM-053 24-SS	1	(NAG)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invAb)
	反义链: AM-054 78-AS	2	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu
AD03541	正义链: AM-053 24-SS	3	(NAG)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invAb)
	反义链: AM-056 41-AS	4	cPrpTMscfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu

[0479] [0480] 上表1中的RNAi药剂按照实施例3所述的合成来制备。如本文的表中所用,在核苷酸序列中,2' -0-甲基核苷酸用小写字母“n”表示;2' -脱氧-2' -氟核苷酸用Nf表示;2' -脱氧核苷酸在文中用dN表示;2' -甲氧基乙基(2' -0-2-甲氧基乙基)核苷酸在文中用NM表示;3' -3' 连接(倒转)核苷酸在文中用invdN、invN、invn、invX或invAb表示;5' -环丙基磷酸至在文中用核苷酸前的cPrp表示,如cPrpN、cPrpn、cPrpNf、cPrpdN或cPrpNM;脱碱基核苷酸(在文中用Ab表示);n-乙酰基半乳糖胺靶向性配体用NAG表示;5' -硫代磷酸酯基在文中用核苷酸前的小写的“s”表示,如sN、sn、sNf或sdN)。

[0481] 实施例5.转基因小鼠中的靶向LP (a) (人Apo (a) 基因) 的RNAi药剂的体内分析。

[0482] A) 为了评价LP (a) RNAi药剂在体内的功效,使用apo (a) 转基因小鼠(Frazer KA等, Nature Genetics 9:424-431 (1995))。该小鼠由含有全长LPA基因(编码apo (a) 蛋白质)以及5' 和3' 处的其它序列的YAC表达人apo (a)。在第1天给予小鼠RNAi药剂,该RNAi药剂与连接在正义链5' 末端的N-乙酰基半乳糖胺靶向性配体偶联。各小鼠接受盐水(n=4)或各种治疗组(所有治疗组均为n=3)的单次皮下(SC)注射。在第-1天从注射前的小鼠获取对照血清(治疗前)样品。在第8、15、22、29和36天从小鼠获取注射后的血清样品。

[0483] B) Apo (a) 蛋白质水平。通过采用针对apo (a) 的ELISA(艾博抗公司(Abcam))对来自小鼠的血清进行试验,来监测血清中的人apo (a) 蛋白质水平。为了标准化,将一个时间点上的各动物的apo (a) 水平根据该动物中的治疗前表达水平(在这种情况下是第-1天)分组,以确定“标准化为第-1天”的表达水平比。接着,通过将一个动物的“标准化为第-1天”的比除以盐水对照组中的所有小鼠的平均“标准化为第-1天”的比,从而将一个特定时间点上的表达标准化为盐水对照组。这使得各时间点上的表达被标准化为对照组中的表达,如表2所

示。

[0484] 表2. 在第1天给药的单剂0.5mg/kg RNAi药剂在转基因小鼠中的Apo (a) 敲减 (KD)。

RNAi药剂	第8天 Apo(a) KD%	第15天 Apo(a) KD%	第22天 Apo(a) KD%	第29天 Apo(a) KD%	第36天 Apo(a) KD%
AD03158	56%	78%	82%	66%	41%
AD03158(Std. Dev.)	0.249	0.154	0.067	0.127	0.292
AD03541 (含5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸)	90%	90%	85%	84%	58%
AD03541(Std. Dev.)	0.064	0.063	0.013	0.006	0.044

[0486] 如上表2所示,AD03541的最低值在第8天达到,而AD03158的最低值直至第22天才达到。此外,AD03541在所有时间点上均实现了更大幅度的敲减。

[0487] 实施例6. 食蟹猴中的12因子敲减 (KD)。

[0488] 合成了具有针对12因子 (F12) 的序列且在正义链5' 末端与N-乙酰基半乳糖胺靶向性配体连接的RNAi药剂,并与本领域已知的皮下 (SC) 注射用的药学上可接受的缓冲液组合。

[0489] 在第1天,对灵长类食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 皮下注射3mg/kg的F12RNAi药剂AD04254或AD04443。两 (2) 只猴子用治疗组AD04443给药,三 (3) 只猴子用治疗组AD04254给药。

[0490] 表3. 实施例6的F12RNAi药剂。

双链体 ID	序列标识号	SEQ ID NO:	序列信息(5'至3')
AD04254	正义链: AM-05324-SS	5	(NAG)sascucaauaAfAfGfugcuuugaaas(invAb)
	反义链: AM-05478-AS	6	usUfsusCfaAfaGfcAfcUfuUfaUfuGfaGfsu
AD04443	正义链: AM-05324-SS	7	(NAG)sascucaauaAfAfGfugcuuugaaas(invAb)
	反义链:	8	cPrpusUfsusCfaAfaGfcAfcUfuUfaUfuGfaGfsu
[0492]	AM-05641-AS		

[0493] 如上表3所示,AD04254和AD04443由相同的正义链构成, RNAi药剂之间的不同之处仅在于反义链的5' 末端包含2' -0- 甲基u修饰核苷酸 (AD04254) 或5' -环丙基膦酸酯修饰核苷酸 (其也包含2' -0- 甲基u修饰) (AD04443)。

[0494] 在第-29、-7和第1天 (给药前)、以及第8、15、22和29天从接受治疗的食蟹猴获取血清样品,以监测敲减。通过用人F12ELISA试剂盒 (分子创新公司 (Molecular Innovations)) 对在血清中循环的猴F12蛋白质 (cF12) 水平进行定量,从而测定敲减。将各时间点上的各动物的cF12水平根据该动物中的治疗前表达水平 (第-29天、第-7天和第1天的平均值) 分组,

以确定“标准化为给药前”的表达水平比。

[0495] cF12的平均标准化相对表达示于图1。如图1所示,基于单剂给药,与不包含5' - 环丙基膦酸酯修饰核苷酸的同样的F12RNAi药剂相比,在该序列的反义链的5' 末端包含本发明的5' - 环丙基膦酸酯修饰核苷酸的F12RNAi药剂提供了在数值上有所增加的效力和略微更快的敲减。

[0496] 实施例7. 野生型小鼠中的12因子敲减 (KD)。

[0497] 制备了在正义链5' 末端与N-乙酰基半乳糖胺靶向性配体偶联的F12双链RNAi药剂。各双链RNAi药剂针对F12,并与本领域已知的皮下 (SC) 注射用的药学上可接受的缓冲液组合。

[0498] 将该F12RNAi药剂 (AD04162和AD04649) 通过SC注射递送至野生型小鼠。在第1天,在肩膀间的背部的松弛皮肤内实施200μl溶液/20g小鼠的SC注射,所述溶液含有盐水、缓冲盐水中的0.5mg/kg (mpk) 剂量的一种RNAi药剂、或缓冲盐水中的1.0mg/kg (mpk) 剂量的一种RNAi药剂。五个治疗组中各有四 (4) 只野生型小鼠。

[0499] 表4. 实施例7的F12RNAi药剂。

双链体 ID	序列标识号	SEQ ID NO:	序列信息(5'至3')
AD04162	正义链: AM-05321-SS	9	(NAG)sasacucaauAfAfAfgugcuuugaas(invAb)
	反义链: AM-05331-AS	10	usUfscsAfaAfgCfaCfuUfuAfuUfgAfgUfsu
AD04649	正义链: AM-05321-SS	11	(NAG)sasacucaauAfAfAfgugcuuugaas(invAb)
	反义链: AM-05950-AS	12	cPrpdUsUfscsAfaAfgCfaCfuUfuAfuUfgAfgUfsu

[0500] [0501] 如上表4所示,AD04162和AD04649由相同的正义链构成,RNAi药剂之间的不同之处仅在于反义链的5' 末端包含2' -0-甲基尿嘧啶修饰核苷酸 (AD04162) 或5' -环丙基膦酸酯尿嘧啶修饰核苷酸 (其包含2' -脱氧修饰) (AD04649)。

[0502] 在第-1 (给药前)、8、15、22和29天从接受治疗的小鼠获取血清样品,以监测敲减。通过用内部开发的mF12 alphaLISA® (珀金埃尔默公司 (Perkin Elmer)) 对在血清中循环的小鼠F12蛋白质 (mF12) 水平进行定量,从而测定敲减。将各时间点上的各动物的mF12水平根据该动物中的治疗前表达水平分组,以确定“标准化为给药前”的表达水平比。接着,通过将一个动物的“标准化为给药前”的比除以盐水对照组中的所有小鼠的平均“标准化为给药前”的比,从而将一个特定时间点上的表达标准化为盐水对照组。这使得各时间点上的表达被标准化为对照组中的表达实验误差以标准偏差表示,如表5所示:

[0503] 表5. 在第1天给药的单剂RNAi药剂在野生型小鼠中的mF12敲减 (KD) 百分数。

RNAi药剂	第8天 mF12 KD%	第15天 Apo(a) KD%	第22天 Apo(a) KD%	第29天 Apo(a) KD%
AD04162 (0.5 mg/kg) (Std. Dev.)	76.7%	71.1%	59.3%	52.5%
	0.109	0.126	0.167	0.117
AD04162 (1.0 mg/kg) (Std. Dev.)	90.2%	82.6%	73.8%	65.1%
	0.058	0.078	0.143	0.144
[0504] AD04649 (0.5 mg/kg) (含5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸) (Std. Dev.)	83.9%	69.1%	70.9%	46.0%
	0.019	0.049	0.023	0.065
AD04649 (1.0 mg/kg) (含5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸) (Std. Dev.)	93.1%	90.0%	89.9%	84.0%
	0.013	0.037	0.058	0.172

[0505] 如上表5所示,这些数据支持:本发明的5' -环膦酸酯修饰核苷酸的加入可以在野生型小鼠中为这些F12RNAi药剂提供更高的效力,尤其是在1.0mg/kg的剂量下。

[0506] 实施例8.pHBV模型小鼠中的HBsAg减少。

[0507] 使用pHBV模型小鼠来评价HBV表面抗原(HBsAg)的减少。在HBV RNAi药剂或对照的给药前30至45天,6~8周龄雌性NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl (NOD-SCID) 小鼠通过高压尾静脉注射在体内瞬时转染MC-HBV1.3 (Yang PL等“*Hydrodynamic injection of viral DNA:a mouse model of acute hepatitis B virus infection.*”PNAS USA 2002第99卷:第13825-13830页)。MC-HBV1.3是来源于质粒的小环,含有与HBV1.3.32转基因小鼠相同的末端冗余人乙型肝炎病毒序列HBV1.3 (GenBank登录号#V01460) (Guidotti LG等,“*High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice.*”J Virol 1995第69卷,第6158-6169页)。将溶于林格溶液的5 μ g MC-HBV1.3以动物体重的10%的总量通过尾静脉给小鼠注射,以产生慢性HBV感染的pHBV模型。如上所述通过27号针在5~7秒内注射该溶液 (Zhang G等,“*High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injection of naked plasmid DNA.*”人类基因疗法(Human Gene Therapy)1999第10卷,第1735-1737页)。在第-1天,通过ELISA测定血清内的乙型肝炎表面抗原(HBsAg) HBsAg 表达水平,并根据平均HBsAg表达水平将小鼠分组。

[0508] i) 血清采集:用2~3%异氟烷麻醉小鼠,从颌下区域采集血样至血清分离管(莎斯特两合公司(Sarstedt AG&Co.),德国纽布瑞赫特)。让血液在常温下凝结20分钟。将该管以8,000 \times g离心3min,以分离血清并保存在4℃。

[0509] ii) 血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)水平:采集血清并用含5%脱脂奶粉的PBS稀释10~2000倍。由ICR小鼠(HSD公司(Harlan Sprague Dawley))的血清制备用脱脂奶粉溶液稀释的第二HBsAg标准物,该ICR小鼠用10 μ g HBsAg表达质粒pRc/CMV-HBs (爱德闻公司(Aldevron),北达科他州法戈)转染。用GS HBsAg EIA 3.0试剂盒(伯乐实验室公司(Bio-

Rad Laboratories, Inc.) , 华盛顿州雷德蒙德) 按照生产商的说明测定HBsAg水平。使用重组HBsAg蛋白质、ayw亚型作为第一标准物(爱德闻公司(Aldevron)) , 其也用溶于PBS的脱脂奶粉稀释。

[0510] 为了将非治疗原因导致的MC-HBV1.3的表达下降考虑在内,各动物的HbsAg表达标准化为注射盐水的小鼠对照组。首先,为了测定“标准化为治疗前”的表达水平比,将一个时间点上的各动物的HbsAg水平根据该动物中的治疗前表达水平(第-1天)分组。然后,将一个动物的“标准化为治疗前”的比除以生理盐水对照组中的所有小鼠的平均“标准化为治疗前”的比,从而将一个特定时间点上的表达标准化为对照组。

[0511] 在第1天,对各小鼠实施200 μ l的含有2mg/kg (mpk) 的在正义链5' 末端与N-乙酰基半乳糖胺靶向性配体连接的HBV双链RNAi药剂、或200 μ l的用作对照的不含HBV RNAi药剂的磷酸盐缓冲盐水的单次皮下给药。给药的HBV RNAi药剂包括AD04580(其包含具有2'-0-甲基修饰的5' -环丙基膦酸酯尿嘧啶修饰核苷酸,位于反义链的5' 末端) 和AD04178(其包含位于反义链的5' 末端的2' -0-甲基尿嘧啶修饰核苷酸),配制在磷酸盐缓冲盐水中。RNAi药剂AD04580和AD04178是相同的;但这两种RNAi药剂之间的不同之处仅在于AD04580在反义链的5' 末端包含5' -环丙基膦酸酯部分,而AD04178和标准核苷酸一样在反义链的5' 末端具有磷酸酯基。

[0512] 在皮肤和肌肉之间(即皮下注射)向松弛皮肤内在整个肩颈区域实施注射。每组有三(3)只小鼠进行试验(n=3)。在第8天、第15天、第22天和第29天收集血清,并测定血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)水平。

[0513] 来自实验的数据示于图2,用平均HBsAg体现HBsAg的标准化的平均值。如图2所示,在pHBV模型小鼠中,包含5' -环丙基膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂(AD04580)明显地胜过无修饰的RNAi药剂(AD04178)。

[0514] 其他实施方式

[0515] 应理解,虽然结合具体说明描述了本发明,但上述说明旨在阐释而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书所限定。其他方面、优点和改进也在下述权利要求书的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 箭头药业股份有限公司(Arrowhead Pharmaceuticals, Inc.)
- [0003] 李珍(Zhen Li)
- [0004] 裴涛(Tao Pei)
- [0005] M·劳勒(Michael Lawler)
- [0006] <120> 5'-环磷酸酯修饰核苷酸
- [0007] <130> 30644-W01
- [0008] <150> US 62/346,304
- [0009] <151> 2016-06-06
- [0010] <160> 12
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 21
- [0013] <212> RNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> RNAi药剂正义链
- [0017] <400> 1
- [0018] gccccuuauu guuauacgau u 21
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> RNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <220>
- [0024] <223> RNAi药剂反义链
- [0025] <400> 2
- [0026] ucguauaaca auaggggcu u 21
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 21
- [0029] <212> RNA
- [0030] <213> 人工序列
- [0031] <220>
- [0032] <223> RNAi药剂正义链
- [0033] <400> 3
- [0034] gccccuuauu guuauacgau u 21
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 21
- [0037] <212> DNA
- [0038] <213> 人工序列

- [0039] <220>
- [0040] <223> 包含5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂反义链
- [0041] <220>
- [0042] <221> 修饰碱基
- [0043] <222> 1
- [0044] <223> /修饰碱基 = "2'-MOE-5'-环丙基膦酸酯核苷"
- [0045] <400> 4
- [0046] tcguauaaca auaggggcu u 21
- [0047] <210> 5
- [0048] <211> 21
- [0049] <212> RNA
- [0050] <213> 人工序列
- [0051] <220>
- [0052] <223> RNAi药剂正义链
- [0053] <400> 5
- [0054] acucaauaaaa gugcuuugaa a 21
- [0055] <210> 6
- [0056] <211> 21
- [0057] <212> RNA
- [0058] <213> 人工序列
- [0059] <220>
- [0060] <223> RNAi药剂反义链
- [0061] <400> 6
- [0062] uuucaaagca cuuuauugag u 21
- [0063] <210> 7
- [0064] <211> 21
- [0065] <212> RNA
- [0066] <213> 人工序列
- [0067] <220>
- [0068] <223> RNAi药剂正义链
- [0069] <400> 7
- [0070] acucaauaaaa gugcuuugaa a 21
- [0071] <210> 8
- [0072] <211> 21
- [0073] <212> RNA
- [0074] <213> 人工序列
- [0075] <220>
- [0076] <223> 包含5'-环丙基膦酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂反义链
- [0077] <220>

- [0078] <221> 修饰碱基
- [0079] <222> 1
- [0080] <223> /修饰碱基 = "2'-0-甲基-5'-环丙基磷酸酯核苷"
- [0081] <400> 8
- [0082] uuucaaagca cuuuauugag u 21
- [0083] <210> 9
- [0084] <211> 21
- [0085] <212> RNA
- [0086] <213> 人工序列
- [0087] <220>
- [0088] <223> RNAi药剂正义链
- [0089] <400> 9
- [0090] aacucaauaa agugcuuuga a 21
- [0091] <210> 10
- [0092] <211> 21
- [0093] <212> RNA
- [0094] <213> 人工序列
- [0095] <220>
- [0096] <223> RNAi药剂反义链
- [0097] <400> 10
- [0098] uucaaagcac uuuauugagu u 21
- [0099] <210> 11
- [0100] <211> 21
- [0101] <212> RNA
- [0102] <213> 人工序列
- [0103] <220>
- [0104] <223> RNAi药剂正义链
- [0105] <400> 11
- [0106] aacucaauaa agugcuuuga a 21
- [0107] <210> 12
- [0108] <211> 21
- [0109] <212> RNA
- [0110] <213> 人工序列
- [0111] <220>
- [0112] <223> 包含5'-环丙基磷酸酯修饰核苷酸的RNAi药剂反义链
- [0113] <220>
- [0114] <221> 修饰碱基
- [0115] <222> 1
- [0116] <223> /修饰碱基 = "2'-脱氧-5'-环丙基磷酸酯核苷"

[0117] <400> 12

[0118] uucaaagcac uuuauugagu u 21

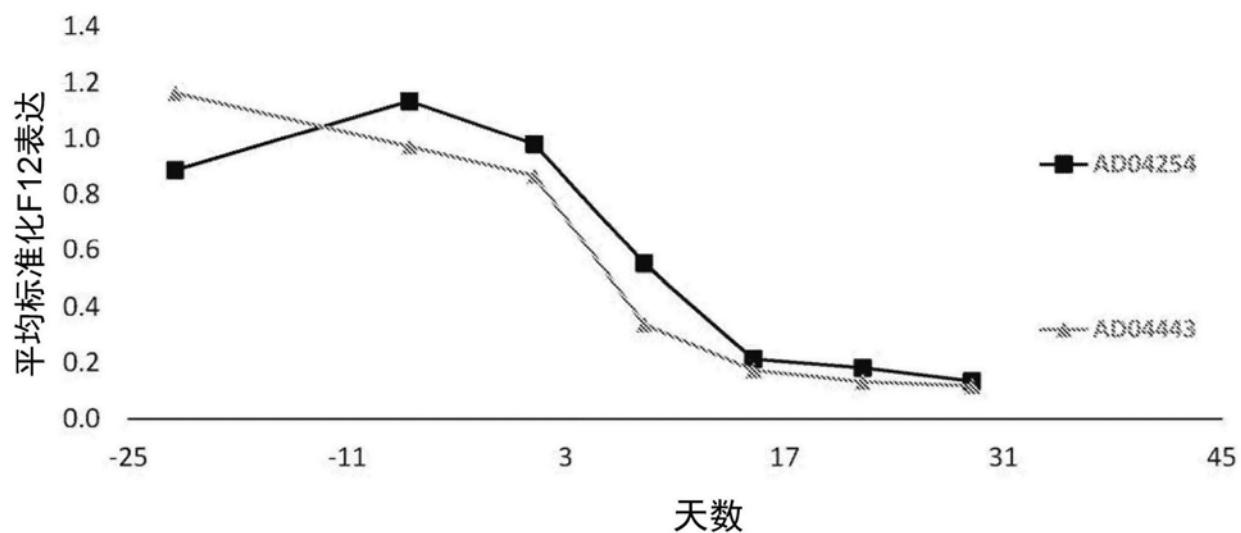


图1

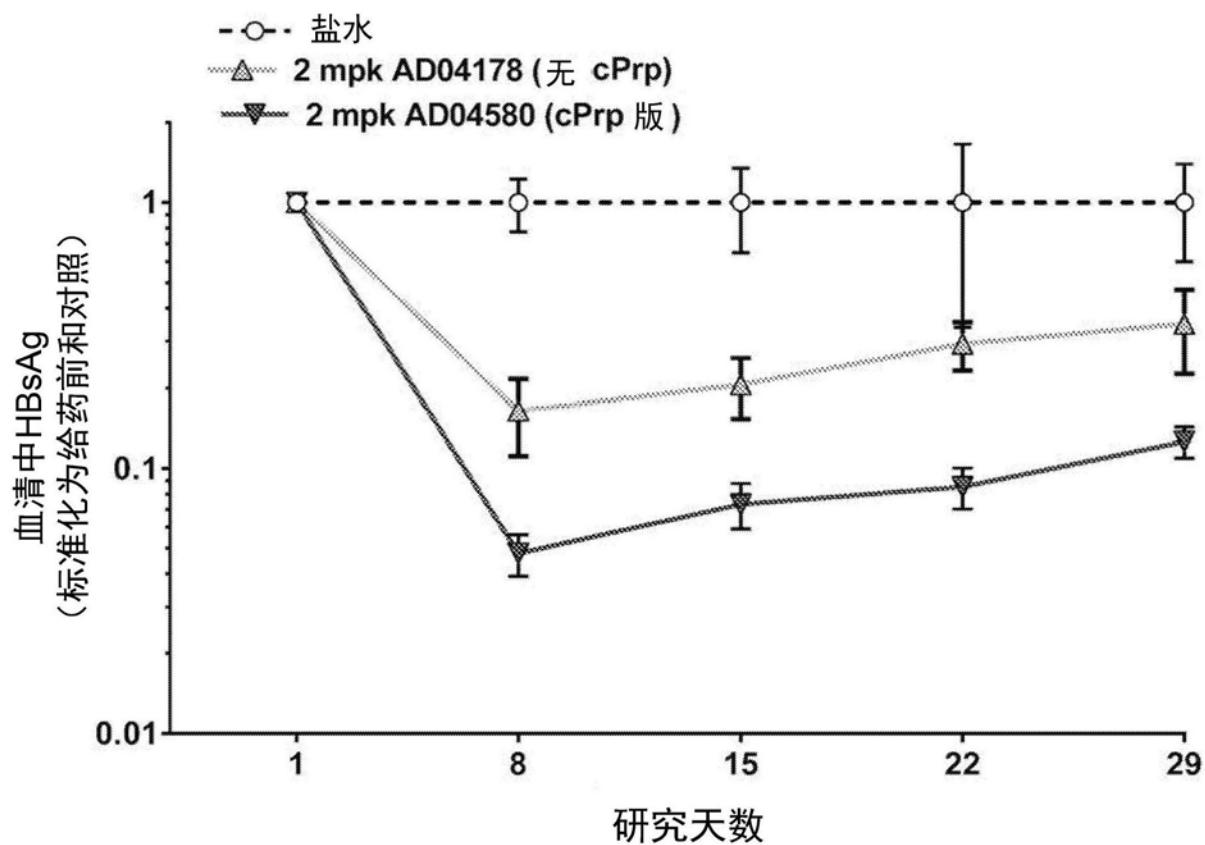


图2