(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 3 月 4 日 (04.03.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/037205 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 15/04 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 1/16* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/112105

(22) 国际申请日: 2020 年 8 月 28 日 (28.08.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910820597.7 2019年8月29日 (29.08.2019) CN
201910820620.2 2019年8月29日 (29.08.2019) CN

(71) 申请人: 苏州瑞博生物技术股份有限公司(SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。

(72) 发明人: 张鸿雁 (ZHANG, Hongyan); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 杨志伟 (YANG, Zhiwei); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 高山 (GAO, Shan); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 曹力强 (CAO, Liqiang); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 刘国成 (LIU, Guocheng); 中国江苏省昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。

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

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

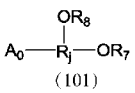
根据细则4.17的声明:
— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

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

WO 2021/037205 A1

(54) **Title:** COMPOUND AND DRUG CONJUGATE, AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 化合物和药物缀合物及其制备方法和用途



(101)

(57) **Abstract:** Disclosed is a compound with a structure as shown in formula (101) and a corresponding drug conjugate, wherein the drug conjugate can be specifically targeted at cells and has a low toxicity and an excellent delivery efficiency.

(57) 摘要: 一种具有如式(101)所示的结构的化合物及相应的药物缀合物，该药物缀合物能够特异性地靶向细胞，毒性低，并具有优异的递送效率。

化合物和药物缀合物及其制备方法和用途

技术领域

本公开涉及一种用于与活性药物缀合的化合物、相应的药物缀合物及其制备方法以及用途。本公开还涉及使用该药物缀合物预防和/或治疗病理状况或疾病的方法。

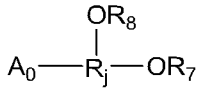
背景技术

递送系统是小核酸药物开发中的核心关键技术之一，目前全球范围内对小核酸递送系统研究最广泛的一类递送系统是靶向缀合递送技术。开发一种新的具有较高活性药物体内递送效率、较低的毒性、较高活性的药物缀合物，在本领域中仍存在迫切需求。

发明内容

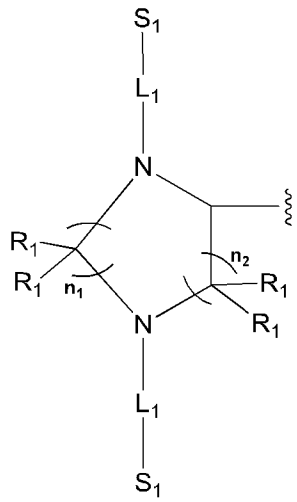
针对上述需求，发明人发明了一种具有较高体内递送效率、较低的毒性和/或较好的稳定性的用于与活性药物缀合的化合物、相应的活性药物缀合物、其制备方法及应用。

在一些实施方式中，本公开提供了一种化合物，该化合物具有式（101）所示的结构：



式（101）

其中，A_0 具有如式（312）所示的结构：



式（312）

式中，n_1 为 1-4 的整数，n_2 为 0-3 的整数；

每个 L_1 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、C_2-C_{10} 亚烯基、C_2-C_{10} 亚炔基、C_6-C_{10} 亚芳基、C_3-C_{18} 亚杂环基和 C_5-C_{10} 亚杂芳基；并且其中，L_1 任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C_1-C_{10} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、C_5-C_{10} 杂芳基、C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC_1-C_{10} 烷基、-OC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-OH、-OC_1-C_{10} 卤代烷基、-SC_1-C_{10} 烷基、-SC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-SH、-SC_1-C_{10} 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH_2、-C_1-C_{10} 烷基-NH_2、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基苯基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO_2H、-C(O)O(C_1-C_{10} 烷基)、-CON(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-CONH(C_1-C_{10} 烷基)、-$CONH_2$，-NHC(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C_1-C_{10} 烷基、-C(O)C_1-C_{10} 烷基苯基、-C(O)C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC(O)C_1-C_{10} 烷基、-SO_2(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2(苯基)、-SO_2(C_1-C_{10} 卤代烷基)、-SO_2NH_2、-SO_2NH(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2NH(苯基)、-NHSO_2(C_1-C_{10} 烷基)、-NHSO_2(苯基)和-NHSO_2(C_1-C_{10} 卤代烷基)。

每个 S_1 独立地为 M_1，其中任何活性羟基和/或氨基，如果有的话，都被保护基团保护；

每个 M_1 独立地选自能够和细胞表面受体结合的配体；

每个 R_1 各自独立地选自 H、取代或未取代的 C_1-C_4 烃基或卤素；

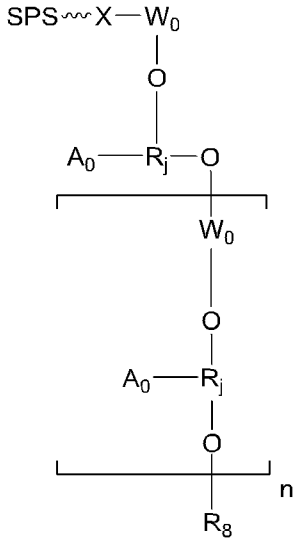
R_j 为连接基团；

R_7 是任何能经过反应与羟基形成磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接、硼代磷酸酯连接或羧酸酯连接、

或者任何能经过反应与氨基形成酰胺键连接的官能团；

R_8 是羟基保护基团。

在一些实施方式中，本公开提供了一种化合物，该化合物具有式（111）所示的结构：

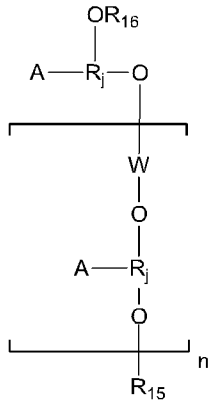


式（111）

其中，每个 A_0、每个 R_j 和 R_8 各自的定义与选择范围与上述相同；W_0 为连接基团；X 选自 O 或 NH；SPS 表示固相载体；n 为 0-7 的整数。

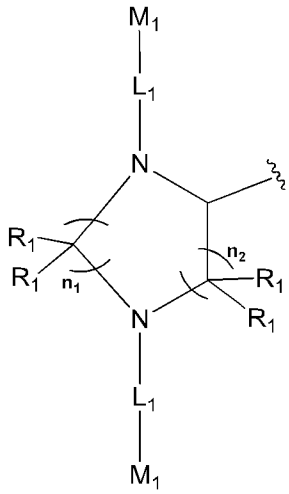
在一些实施方式中，X 是 O，W_0 与 X 共同形成磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接或硼代磷酸酯连接。

在一些实施方式中，本公开提供了一种药物缀合物，该缀合物具有式（301）所示的结构：



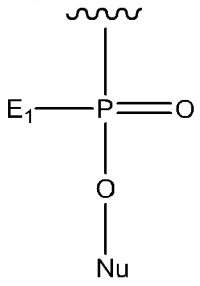
式（301）

其中，A 具有如式（302）所示的结构，式中，Rj、R_1、L_1、M_1、n、n_1 和 n_2 各自的定义和可选择的范围如前所述。

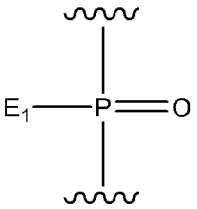


式（302）

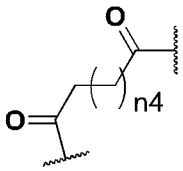
R_{16}和R_{15}各自为H或活性药物基团，并且R_{16}和R_{15}中的至少一个为活性药物基团。在一些实施方式中，所述活性药物基团具有式A60所示的结构。W为连接基团。在一些实施方式中，W具有如式（A61）或式(C1')所示的结构。



式（A60）



式（A61）



式(C1')；

其中，E_1为OH、SH或BH_2，n4选自1-4的整数。～～～表示基团连接的位点，Nu为功能性寡核苷酸。

在一些实施方式中，本公开提供了本公开的药物缀合物在制备用于治疗和/或预防由靶细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的药物中的用途。

在一些实施方式中，本公开提供了一种治疗由靶细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的方法，所述方法包括向患有该疾病的患者给予本公开的药物缀合物。

在一些实施方式中，本公开提供了一种调控细胞中基因表达的方法，所述调控包括抑制或增强所述基因的表达，该方法包括将本公开的药物缀合物与所述细胞接触。

在一些实施方式中，本公开提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含本公开的药物缀合物。

有益效果

本公开提供的式（101）所示化合物或式（111）所示化合物可以和各种活性药物基团，例如小分子药物、单抗或功能性寡核苷酸缀合，得到本公开的药物酸缀合物。该药物缀合物可以特异性地将上述活性药物递送至目标器官或组织，与特定的靶点结合，调控蛋白质的的体内含量或功能，或者抑制或者加强需要抑制或加强的基因对应的mRNA的表达，对细胞相关基因的表达进行调节，从而对相关病理状况或疾病进行预防和/或治疗。在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物中活性药物为寡核苷酸，该药物缀合物为寡核苷酸缀合物，该药物缀合物具有较高的体内递送效率、较低的毒性、较好的稳定性和/或较高的活性。

根据本公开的一些实施方式，当所述活性药物为一种抑制乙型肝炎病毒(hepatitis B virus，HBV)基因表达的siRNA时，本公开提供的药物缀合物能够有效地靶向肝脏，在1 mg/kg的剂量下，抑制乙肝模型小鼠肝脏中至少65.77%的HBV基因表达；1mg/kg剂量下，HBV基因表达量抑制率可高达91.96%；同时，本公开的药物缀合物还能够有效地降低乙肝模型小鼠中的HBV表面抗原表达，在3 mg/kg的剂量下最高可以达到97.80%的HBV表面抗原表达抑制率和85.7%的HBV DNA抑制率。并且，在给药剂量为3 mg/kg的剂量下，在高达140天的实验时间内持续显示出优异的HBV表达抑制作用。

根据本公开的一些实施方式，当所述活性药物为一种抑制乙型肝炎病毒基因表达的siRNA时，本公开提供的药物缀合物能够有效地将siRNA递送到肝脏，并表现出优异的抑制HBV基因表达的特性。能够在1mg/kg的剂量下抑制乙肝模型小鼠肝脏中至少68.3%、甚至78.7-88.5%的HBV基因表达。同时，本公开的药物缀合物还能够有效地降低乙肝模型小鼠中的HBV表面抗原表达，在3mg/kg的剂量下可以达到98.1%的HBV表面抗原表达抑制率和93.5%的HBV DNA抑制率，并且，在给药剂量为3 mg/kg的剂量下，在高达84天的实验时间内持续显示出优异的HBV表达抑制作用。

根据本公开的一些实施方式，当所述活性药物为一种抑制乙型肝炎病毒基因表达的siRNA时，本公开提供的药物缀合物能够有效地将siRNA递送到肝脏，并表现出优异的抑制HBV基因表达的特性。能够在1mg/kg的剂量下抑制乙肝模型小鼠肝脏中至少50.4%、在一些实施方式中为76.2-84.6%的HBV基因表达。同时，本公开的药物缀合物还能够有效地降低乙肝模型小鼠中的HBV表面抗原表达，甚至在3mg/kg的剂量下可以达到82.5%的HBV表面抗原表达抑制率和83.9%的HBV DNA抑制率，并且，在给药剂量为3 mg/kg的剂量下，在21天的实验时间内持续显示出较高的HBV表达抑制作用。

根据本公开的一些实施方式，当所述活性药物为一种抑制乙型肝炎病毒基因表达的siRNA时，本公开提供的药物缀合物能够有效地将siRNA递送到肝脏，并表现出优异的抑制HBV基因表达的特性。能够在1 mg/kg的剂量下抑制乙肝模型小鼠肝脏中至少65.8%、甚至76.3-84.1%的HBV基因表达。

同时，本公开的药物缀合物还能够有效地降低乙肝模型小鼠中的HBV表面抗原表达，甚至在3 mg/kg的剂量下可以达到95.6%的HBV表面抗原表达抑制率和93.1%的HBV DNA抑制率，并且，在给药剂量为3 mg/kg的剂量下，在长达56天的实验时间内持续显示出优异的HBV表达抑制效果。

根据本公开的一些实施方式，当所述活性药物为一种抑制乙型肝炎病毒基因表达的siRNA时，本公开提供的药物缀合物能够有效地将siRNA递送到肝脏，并表现出优异的抑制HBV基因表达的特性。能够在1 mg/kg的剂量下抑制乙肝模型小鼠肝脏中80%以上的HBV基因表达。同时，本公开的药物缀合物还能够有效地降低乙肝模型小鼠中的HBV表面抗原表达，甚至在3 mg/kg的剂量下可以达到最高99%以上的HBV表面抗原表达抑制率和90%以上的HBV DNA抑制率，并且，在给药剂量为3 mg/kg的剂量下，在长达112天的实验时间内持续显示出优异的HBV表达抑制效果。

根据本公开的一些实施方式，当所述活性药物为一种抑制血管生成素样蛋白3（ANGPTL3）基因表达的siRNA时，本公开提供的药物缀合物能够有效地将siRNA递送到肝脏，并表现出优异的抑制ANGPTL3基因表达的特性。在1mg/kg的剂量下抑制高脂模型小鼠肝脏中至少53.2%的ANGPTL3基因表达；3 mg/kg剂量下，ANGPTL3的mRNA抑制率高达86.4%，并且，在给药剂量为3 mg/kg的剂量下、单次给药的情况下，在长达49天的实验时间内持续显示出优异的ANGPTL3表达抑制及降血脂作用。

根据本公开的一些实施方式，当所述活性药物为一种抑制载脂蛋白C3(ApoC3)基因表达的siRNA时，本公开提供的药物缀合物能够有效地将siRNA递送到肝脏，并表现出优异的抑制APOC3基因表达的特性。在3 mg/kg的剂量下抑制高脂模型小鼠肝脏中至少71.4%的APOC3基因表达，并且，在给药剂量为3 mg/kg的剂量下、单次给药的情况下，在长达65天的实验时间内持续显示出优异的血脂抑制作用。

在某些实施方式中，本公开所述的药物缀合物还表现出低的动物水平毒性和良好的安全性，例如，在一些实施方式中，对于本公开的缀合物，即使在C57BL/6J小鼠中给予高达起效浓度的100倍（按起效浓度3 mg/kg计），也未观察到明显的毒性反应。

上述实例说明，本公开提供的药物缀合物能够有效地将功能性活性药物递送到目标器官或组织并在体内长时间保持活性，从而可有效治疗和/或预防由细胞中基因的表达而引起的病理状况和疾病。

本公开的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

以引用的方式并入本说明书中提及的所有出版物、专利以及专利申请均以引用的方式并入本文，其程度与每一单独的出版物、专利以及专利申请均专门并且单独地以引用的方式并入本文的程度相同。

附图说明

图1是药物缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果；

图2是药物缀合物在体外猴血浆中的稳定性半定量检测结果；

图3是给予1mg/kg和0.5mg/kg的药物缀合物后，在大鼠血浆中PK/TK浓度的经时代谢曲线；

图4是给予1mg/kg和0.5mg/kg的药物缀合物后，在大鼠肝脏中PK/TK浓度的经时代谢曲线；

图5是给予C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J小鼠1mg/kg和0.1mg/kg的药物缀合物后，在小鼠体内（*in vivo*）中HBV mRNA的抑制率；

图6是给予3mg/kg和1mg/kg的药物缀合物后，在M-Tg HBV转基因小鼠体内（*in vivo*）对血清HbsAg水平影响的时间相关性曲线；

图7A是给予1mg/kg和0.1mg/kg的药物缀合物后，在C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J小鼠体内（*in vivo*）中HBV mRNA的抑制率；

图7B是给予1mg/kg和0.1mg/kg的不同的药物缀合物后，在C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J小鼠体内（*in vivo*）中HBV mRNA的抑制率；

图8A是给予3mg/kg和1mg/kg的药物缀合物后，在M-Tg HBV转基因小鼠体内（*in vivo*）对血清HbsAg水平影响的时间相关性曲线；

图8B是给予3mg/kg和1mg/kg的药物缀合物后，在M-Tg HBV转基因小鼠体内（*in vivo*）对血清HBV DNA水平影响的时间相关性曲线；

图9是给予1mg/kg和3mg/kg的药物缀合物后第70天时，在M-Tg HBV转基因小鼠中HBV mRNA的抑制率。

具体实施方式

以下对本公开的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本公开，并不用于限制本公开。

在上文及下文中，如无特别说明，大写字母C、G、U、A或T表示核苷酸的碱基组成；小写字母d表示该字母d右侧相邻的一个核苷酸为脱氧核糖核苷酸；小写字母m表示该字母m左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；小写字母f表示该字母f左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核

苷酸；小写字母 s 表示与该字母 s 左右相邻的两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接；P1 表示该 P1 右侧相邻的一个核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸，尤指乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸（以下实施例中以 VP 表示）、5'-磷酸核苷酸（以下实施例中以 P 表示）或 5'-硫代磷酸酯修饰的核苷酸（以下实施例中以 Ps 表示）。

在上文及下文中，“氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被氟取代形成的核苷酸，“非氟代修饰的核苷酸”指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物，“核苷酸类似物”指能够在核酸中代替核苷酸，但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的基团。如异核苷酸、桥联的核苷酸（bridged nucleic acid，简称 BNA）或无环核苷酸。所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

在本文的上下文中，“互补”或“反向互补”一词可互相替代使用，并具有本领域技术人员周知的含义，即，在双链核酸分子中，一条链的碱基与另一条链上的碱基以互补的方式相配对。在 DNA 中，嘌呤碱基腺嘌呤（A）始终与嘧啶碱基胸腺嘧啶（T）（或者在 RNA 中为尿嘧啶（U））相配对；嘌呤碱基鸟嘌呤（C）始终与嘧啶碱基胞嘧啶（G）相配对。每个碱基对都包括一个嘌呤和一个嘧啶。当一条链上的腺嘌呤始终与另一条链上的胸腺嘧啶(或尿嘧啶)配对，以及鸟嘌呤始终与胞嘧啶配对时，两条链被认为是彼此相互补的，以及从其互补链的序列中可以推断出链的序列。与此相应地，“错配”在本领域中意指在双链核酸中，对应位置上的碱基并未以互补的形式配对存在。

在上文及下文中，如无特别说明，“基本上反向互补”是指所涉及的两段核苷酸序列之间存在不多于 3 个的碱基错配；“基本上完全反向互补”或者“实质上反向互补”是指两段核苷酸序列之间存在不多于 1 个的碱基错配；“完全互补”指两段核苷酸序列之间不存在碱基错配。

在上文及下文中，一个核苷酸序列与另外一个核苷酸序列存在核苷酸差异，指前者与后者相比，相同位置的核苷酸的碱基种类发生了改变，例如，在后者中一个核苷酸碱基为 A 时，在前者的相同位置处的对应核苷酸碱基为 U、C、G 或者 T 的情况下，认定为两个核苷酸序列之间在该位置处存在核苷酸差异。在一些实施方式中，以无碱基核苷酸或其等同物代替原位置的核苷酸时，也可认为在该位置处产生了核苷酸差异。

在上文及下文中，特别是在描述本公开的式（101）所示的化合物、式（111）所示的化合物或式（301）所示的药物缀合物的制备方法或用途时，有时会涉及核苷单体（nucleoside monomer）的使用。除非特别说明，所述核苷单体指，根据欲制备的功能性寡核苷酸或药物缀合物中核苷酸的种类和顺序，亚磷酰胺固相合成中使用的修饰或未修饰的核苷亚磷酰胺单体（unmodified or modified RNA phosphoramidites，有时 RNA phosphoramidites 也称为 Nucleoside phosphoramidites）。亚磷酰胺固相合成为本领域技术人员所公知的 RNA 合成中所用的方法。本公开所用的核苷单体均可商购得到。

在本公开的上下文中，除非另有说明，“缀合”是指两个或多个各自具有特定功能的化学部分之间以共价连接的方式彼此连接；相应地，“缀合物”是指该各个化学部分之间通过共价连接而形成的化合物。进一步地，“药物缀合物”表示一个或多个具有特定功能的化学部分共价连接至活性药物上而形成的化合物。在下文中，有时，特别是在实施例中，也将本公开的药物缀合物简称为“缀合物”。药物缀合物应根据上下文，理解为药物缀合物的总称或由特定结构式表示的具体药物缀合物。

如本文所使用的，不介于两个字母之间或两个符号之间的短横（“-”）是用于指示取代基连接点的位置。例如：-C_1-C_{10} 烷基-NH_2 通过 C_1-C_{10} 烷基而连接。

如本文所使用的，“任选的”或“任选地”是指其后描述的事件或状况可以发生或不发生，并且所述描述包括事件或状况发生的情况和其中不发生的情况。例如，“任选地取代”的“烷基”包括下面定义的“烷基”和“取代烷基”。本领域技术人员将理解的是，对于包含一个或多个取代基的任何基团，这些基团不打算引入空间上不切实际、合成上不可行和/或本身不稳定的任何取代或取代模式。

如本文所使用的，“烷基”是指具有指定数量的碳原子的直链和支链，所述数量通常为 1 到 20 个碳原子，例如 1 至 10 个碳原子，如 1 至 8 个或 1 至 6 个碳原子。例如，C_1-C_6 烷基包含 1 至 6 个碳原子的直链和支链烷基。当对具有特定数量的碳的烷基残基进行命名时，旨在涵盖所有具有该数量的碳的支链和直链形式；因此，例如，“丁基”意味着包括正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基；“丙基”包括正丙基和异丙基。亚烷基是烷基的子集，指与烷基相同、但具有两个附着点的残基。

如本文所使用的，“烯基”是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和支链或直链烷基，所述碳-碳双键是通过从母体烷基的相邻碳原子中除去一分子氢而获得的。该基团可以处于双键的顺式或反式构型。典型的烯基基团包括但不限于：乙烯基；丙烯基，如丙-1-烯-1-基、丙-1-烯-2-基、丙-2-烯-1-基（烯丙基）、丙-2-烯-2-基；丁烯基，例如丁-1-烯-1-基、丁-1-烯-2-基、2-甲基丙-1-烯-1-基、丁-2-烯-1-基、丁-2-烯-2-基、丁-1,3-二烯-1-基、丁-1,3-二烯-2-基等等。在某些实施方式中，烯基基团具有 2 到 20 个碳原子，而在其他实施方式中，具有 2 至 10 个、2 至 8 个或 2 至 6 个碳原子。亚烯基是烯基的一个子

集，指与烯基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“炔基”是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和支链或直链烷基，所述碳-碳三键是通过从母体烷基的相邻碳原子中除去两个氢分子而获得的。典型的炔基基团包括但不限于：乙炔基；丙炔基，如丙-1-炔-1-基，丙-2-炔-1-基；丁炔基，例如丁-1-炔-1-基，丁-1-炔-3-基，丁-3-炔-1-基等。在某些实施方式中，炔基具有 2 到 20 个碳原子，而在其他实施方式中，具有 2 至 10、2 至 8 或 2 至 6 个碳原子。亚炔基是炔基的子集，指的是与炔基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“烷氧基”是指通过氧桥连接的指定数量碳原子的烷基，例如，甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、2-戊氧基、异戊氧基、新戊氧基、己氧基、2-己氧基、3-己氧基、3-甲基戊氧基等。烷氧基通常具有 1 至 10 个、1 至 8 个、1 至 6 个，或 1 至 4 个通过氧桥连接的碳原子。

如本文所使用的，“芳基”是指通过从环碳原子中除去氢原子而衍生自芳香族单环或多环烃环系统的基团。所述芳香族单环或多环烃环系统仅含有氢和 6 至 18 个碳原子的碳，其中所述环系统中的至少一个环是完全不饱和的，即，包含根据 Hückel 理论的环状、离域的(4n+2)π-电子系统。芳基包括但不限于苯基、芴基和萘基等基团。亚芳基是芳基的子集，指与芳基相同、但具有两个连接点的残基。

如本文所使用的，“环烷基”是指非芳香族碳环，通常具有 3 至 7 个环碳原子。环可以是饱和的，或具有一个或多个碳-碳双键。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基和环己烯基，以及桥联和笼状环基团，如降冰片烷（norbornane）。

如本文所使用的，“卤素取代基”或“卤代”指氟代、氯代、溴代和碘代，术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

如本文所使用的，“卤代烷基”是指指定数量的碳原子被一个或多个、直至最大允许数量的卤素原子取代的如上述所定义的烷基。卤代烷基的实例包括但不限于三氟甲基、二氟甲基、2-氟乙基和五氟乙基。

“杂环基”是指稳定的 3 至 18 元非芳香族环基，包含 2-12 个碳原子和选自氮、氧和硫的 1-6 个杂原子。除非说明书中另有说明，否则杂环基是单环、双环、三环或四环系统，可包括稠环或桥环系统。杂环基中的杂原子可以任选地被氧化。一个或多个氮原子（如果存在的话）任选地被季铵化。杂环基是部分饱和或完全饱和的。杂环基可以通过任何环原子连接至分子的其余部分。此类杂环基的实例包括但不限于：二噁烷基、噻吩基[1,3]二硫酰基(thienyl[1,3]dithianyl)、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧杂哌嗪基、2-氧杂哌啶基、2-氧杂吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三硫酰基(trithianyl)、四氢吡喃基、硫代吗啉基（thiomorpholinyl）、硫杂吗啉基（thiamorpholinyl）、1-氧代硫吗啉基（1-oxo-thiomorpholinyl）和 1,1-二氧代硫吗啉基（1,1-dioxo-thiomorpholinyl）。

“杂芳基”指由 3 至 18 元芳香族环自由基衍生的基团，包含 2 个至 17 个碳原子和选自氮、氧和硫的 1 至 6 个杂原子。如本文所使用的，杂芳基可以是单环、双环、三环或四环系统，其中环系统中的至少一个环是完全不饱和的，即，所述环包含根据 Hückel 理论的环状离域(4n+2)π-电子体系。杂芳基包括稠环或桥环系统。杂芳基中的杂原子被任选地氧化。一个或多个氮原子（如果存在的话）任选地被季铵化。杂芳基通过任何环原子连接至分子的其余部分。杂芳基的实例包括但不限于：氮杂环庚三烯基、吖啶基、苯并咪唑基、苯并吲哚基、1,3-苯并二噁唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并[d]噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二噁庚英基(benzo[*b*][1,4]dioxepinyl)、苯并[b][1,4]噁嗪基（benzo[b][1,4]oxazinyl）、1,4-苯并二噁烷基（1,4-benzodioxanyl）、苯并萘并呋喃基、苯并噁唑基、苯并间二氧杂环戊烯基(benzodioxolyl)、苯并二噁英基(benzodioxinyl)、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基、苯并噻吩并[3,2-d]嘧啶基、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咔唑基、噌啉基（cinnolinyl）、环戊烷并[d]嘧啶基、6,7-二氢-5H-环戊烷并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6-二氢苯并[h]喹唑啉基（5,6-dihydrobenzo[h]quinazolinyl）、5,6-二氢苯并[h]噌啉基（5,6-dihydrobenzo[h]cinnolinyl）、6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚烷并[1,2-c]哒嗪基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、呋喃酮基、呋喃并[3,2-c]吡啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]嘧啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]哒嗪基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛烷并[d]吡啶基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基(indazolyl)、吲哚基、异吲哚基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、异喹啉基、吲哚嗪基（indolizinyl）、异噁唑基、5,8-甲醇-5,6,7,8-四氢喹唑啉基（5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl）、萘啶基（naphthyridinyl）、1,6-萘啶酮基（1,6-naphthyridinonyl）、噁二唑基、2-氧杂吖庚因基（2-oxoazepinyl）、噁唑基、氧杂环丙烷基（oxiranyl）、5,6,6a,7,8,9,10,10a-八氢苯并[H]喹唑啉基、1-苯基-1*H*-吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、酞嗪基（phthalazinyl）、蝶啶基（pteridinyl）、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡唑并[3,4-d]嘧啶基、吡啶基、吡啶并[3,2-d]嘧啶基、吡啶并[3,4-d]嘧啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡咯基、喹唑

啉基、喹喔啉基（quinoxalinyl）、喹啉基、四氢喹啉基、5,6,7,8-四氢喹唑啉基、5,6,7,8-四氢苯并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、6,7,8,9-四氢-5H-环庚烷并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6,7,8-四氢吡啶并[4,5-c]哒嗪基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基、噻吩并[2,3-d]嘧啶基、噻吩并[3,2-d]嘧啶基、噻吩并[2,3-c]吡啶基（thieno[2,3-c]pridinyl）和噻吩基（thiophenyl/thienyl）。

在本公开中可以使用各种保护基团。一般来说，保护基团使化学官能团对特定的反应条件不敏感，并且可以在分子中的该官能团上附加以及去除，而实质上不损害分子的其余部分。在一些实施方式中，本公开中使用的保护基团包括但不限于羟基保护基团和/或氨基保护基团。代表性的羟基保护基团公开于 Beaucage 等人，Tetrahedron 1992, 48, 2223-2311，以及 Greeneand Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis，Chapter 2, 2d ed，John Wiley & Sons，New York，1991 中，以引用的方式将上述文献整体并入本文。在一些实施方式中，羟基保护基团在碱性条件下稳定，但可以在酸性条件下脱除。在一些实施方式中，本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括二甲氧基三苯甲基（DMT）、单甲氧基三苯甲基、9-苯基黄嘌呤-9-基（Pixyl）和 9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基（Mox）。在一些实施方式中，本文可使用的羟基保护基的非排他性实例包括 Tr（三苯甲基）、MMTr（4-甲氧基三苯甲基）、DMTr（4,4'-二甲氧基三苯甲基）和 TMTr（4,4',4"-三甲氧基三苯甲基）。在一些实施方式中，本文可使用的氨基保护基的非排他性实例包括苄氧羰基（Cbz）、叔丁氧羰基（Boc）、芴甲氧羰基（Fmoc）、烯丙氧羰基（Alloc）、三甲基硅乙氧羰基（Teoc）、任选取代的卤代酰基（如乙酰基或三氟乙酰基）和苄基（Bn）。

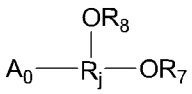
"受试者"一词，如本文所使用的，指任何动物，例如哺乳动物或有袋动物。本公开的受试者包括但不限于人类、非人灵长类（例如，恒河猴或其他类型的猕猴）、小鼠、猪、马、驴、牛、绵羊、大鼠和任何种类的家禽。

如本文所使用的，"治疗"、"减轻"、或"改善"可在此处互换使用。这些术语指的是获得有益的或期望的结果的方法，包括但不限于治疗益处。"治疗益处"意味着根除或改善被治疗的潜在障碍。此外，治疗益处通过根除或改善与潜在障碍相关的一个或多个生理症状，从而在受试者中观察到改善而获得，尽管受试者可能仍然受到潜在障碍的折磨。

如本文所使用的，"防止"和"预防"可互换使用。这些术语指获得有益或期望的结果的方法，包括但不限于预防性益处。为了获得"预防性益处"，可将缀合物或组合物给予有罹患特定疾病风险的受试者，或给予报告疾病的一种或多种生理症状的受试者，即便可能该疾病的诊断尚未作出。

第一种化合物

在一个方面，本公开提供了一种化合物，该化合物具有式（101）所示的结构：



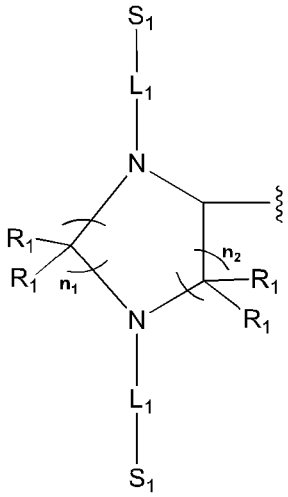
式（101）

其中，R_j 为连接基团；

R_7 是任何能经过反应与羟基形成磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接、硼代磷酸酯连接或羧酸酯连接、或者能经过反应与氨基形成酰胺键连接的官能团；

R_8 是羟基保护基团；

A_0 具有如式（312）所示的结构：

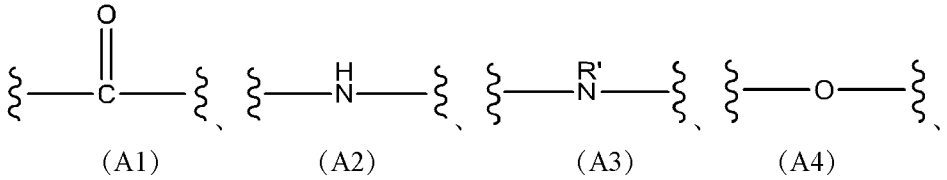


式（312）

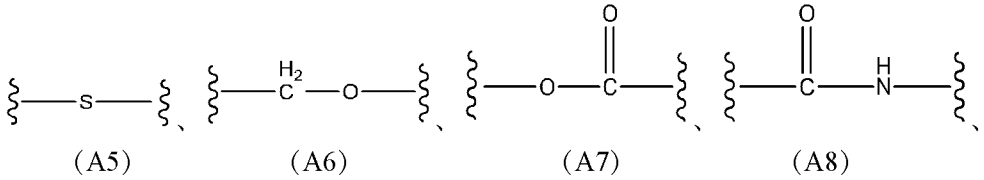
式（312）中，n_1 为 1-4 的整数，n_2 为 0-3 的整数；

每个 L_1 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、C_2-C_{10} 亚烯基、C_2-C_{10} 亚炔基、C_6-C_{10} 亚芳基、C_3-C_{18} 亚杂环基和 C_5-C_{10} 亚杂芳基，并且其中，L_1 可任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C_1-C_{10} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、C_5-C_{10} 杂芳基、C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC_1-C_{10} 烷基、-OC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-OH、-OC_1-C_{10} 卤代烷基、-SC_1-C_{10} 烷基、-SC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-SH、-SC_1-C_{10} 卤代烷基、-卤素取代基、-OH、-SH、-NH_2、-C_1-C_{10} 烷基-NH_2、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基苯基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO_2H、-C(O)O(C_1-C_{10} 烷基)、-CON(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-CONH(C_1-C_{10} 烷基)、-$CONH_2$，-NHC(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C_1-C_{10} 烷基、-C(O)C_1-C_{10} 烷基苯基、-C(O)C_1-C_{10} 卤烷基、-OC(O)C_1-C_{10} 烷基、-SO_2(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2(苯基)、-SO_2(C_1-C_{10} 卤代烷基)、-SO_2NH_2、-SO_2NH(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2NH(苯基)、-NHSO_2(C_1-C_{10} 烷基)、-NHSO_2(苯基)和-NHSO_2(C_1-C_{10} 卤代烷基)。

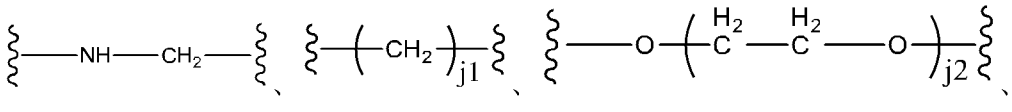
在一些实施方式中，L_1 可选自于由 A1-A26 基团或其任意组合所组成的组：



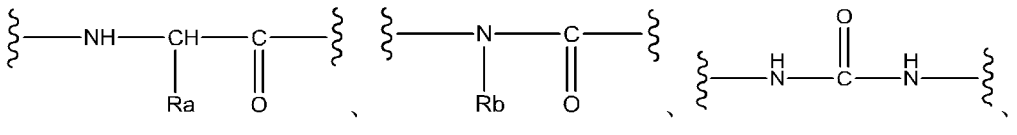
（A1） （A2） （A3） （A4）



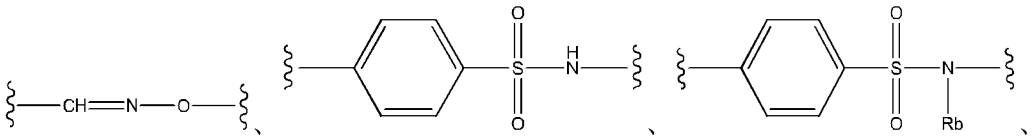
（A5） （A6） （A7） （A8）



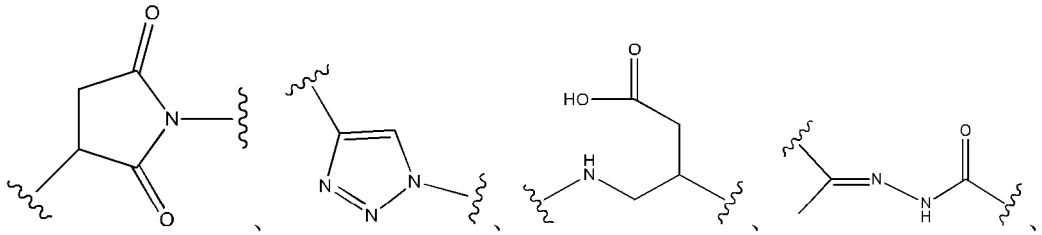
（A9） （A10） （A11）



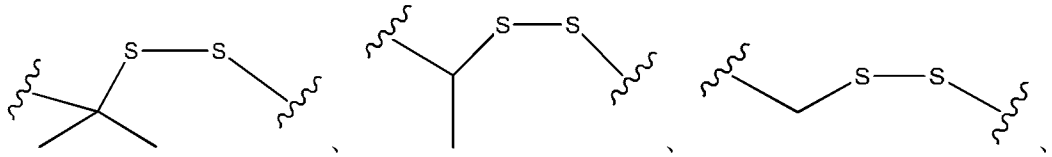
（A12） （A13） （A14）



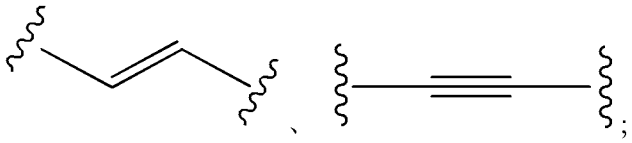
（A15） （A16） （A17）



（A18） （A19） （A20） （A21）

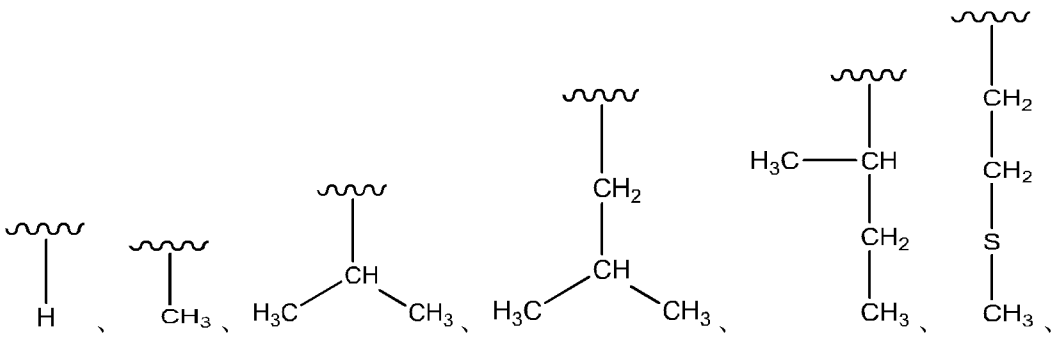


（A22） （A23） （A24）

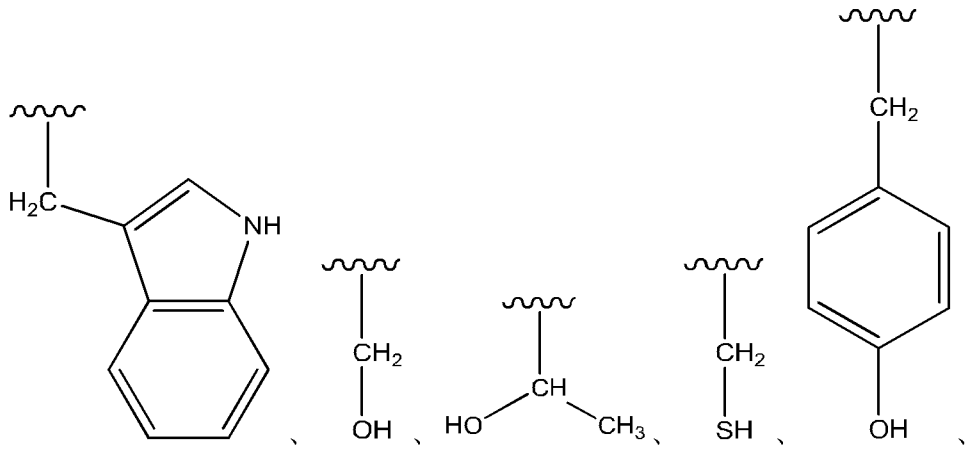


（A25） （A26）

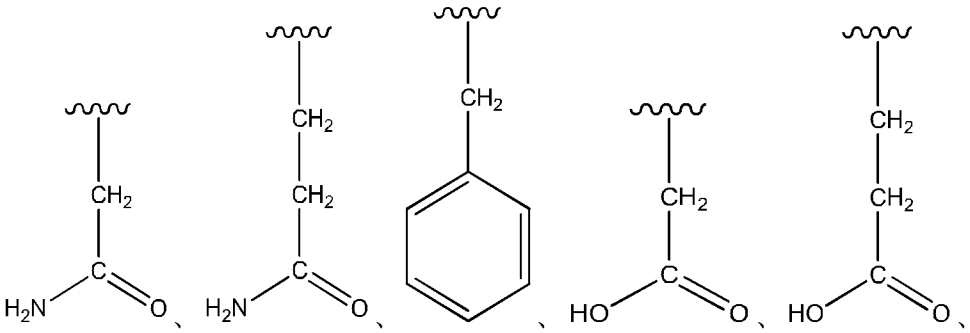
其中，j1 为 1-20 的整数；j2 为 1-20 的整数；R’为 C_1-C_{10} 烷基；Ra 选自式 A27-A45 基团中的一种：



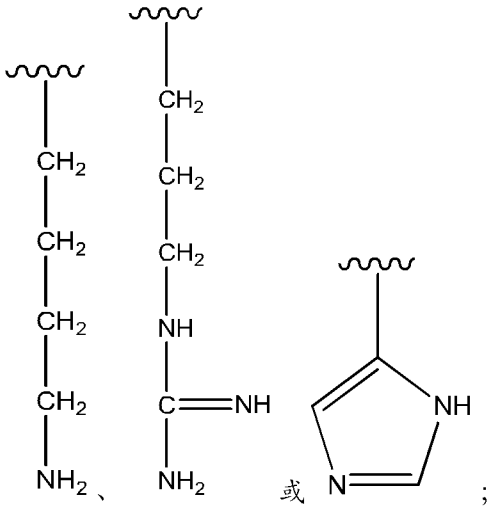
（A27） （A28） （A29） （A30） （A31） （A32）



（A33） （A34） （A35） （A36） （A37）



（A38） （A39） （A40） （A41） （A42）

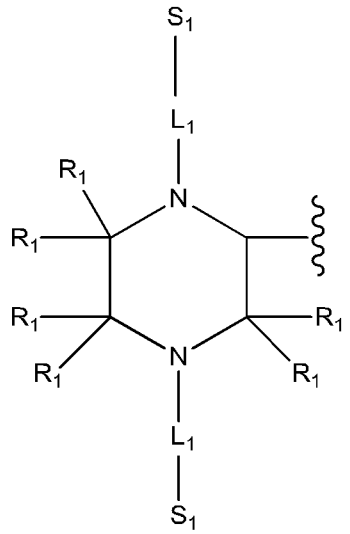


（A43） （A44） （A45）

Rb 为 C_1-C_{10} 烷基；～～～表示基团共价连接的位点。

技术人员会理解的是，尽管为了方便起见，L_1 被定义为线性烷基，但是它可能不是线性基团或者名称不同，例如由于上述置换和/或置换而产生的氨或烯基。为了本公开内容的目的，L_1 的长度是连接两个附着点的链中的原子数。为此目的，将替换所述直链亚烷基的碳原子而得到的环（如亚杂环基或亚杂芳基）计为一个原子。

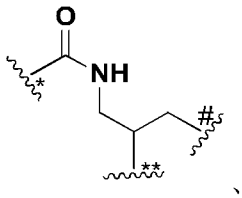
在一些实施方式中，式（312）中，每个 S_1 独立地为 M_1，其中任何活性羟基和/或氨基，如果有的话，都被保护基团保护；每个 M_1 独立地选自能够和细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中，式（312）中，每个 R_1 各自独立地选自 H、取代或未取代的 C_1-C_4 烃基或卤素；n_1 可以为 1-4 的整数，n_2 可以为 0-3 的整数；在一些实施方式中，n_1 为 1-2 的整数，n_2 为 1-2 的整数，这样可以使得药物缀合物结构更加稳定。从合成容易程度、结构/工艺成本和递送效率等多方面考虑，在一些实施方式中，n_1 为 2，n_2 为 1，此时，A_0 具有如式（120）所示的结构：



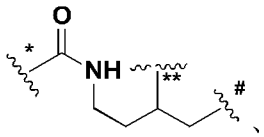
式（120）。

本领域技术人员可以理解，当每个 R_1 各自独立地选自 H、取代或未取代的 C_1-C_4 烃基或卤素中的一种时，不会改变式（101）所示的化合物的性质，均可以实现本公开的目的。但是，为了简化本公开提供的化合物，并且为了合成方便，在一些实施方式中，每个 R_1 均为 H。

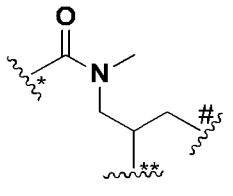
R_j 为含有三个共价连接位点的连接基团，起到在式（101）所示的化合物中连接式 A_0、提供适当的空间位置的作用。在一些实施方式中，R_j 为能够实现与 A_0、OR_7 和 OR_8 的连接的任意基团。基于便于合成的考虑，在一些实施方式中，R_j 中可具有酰胺键结构或者酯键结构。在一些实施方式中，R_j 选自式 A62-A67 基团中的一种：



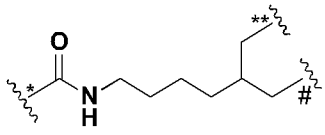
式（A62）



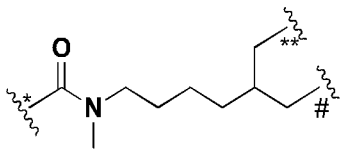
式（A63）



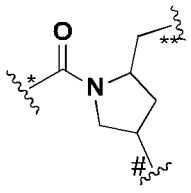
式（A64）



式（A65）



式（A66）

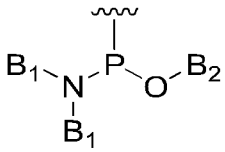


式（A67）。

其中，R_j 可以任意地与 A_0、OR_7 以及 OR_8 连接，在一些实施方式中，式 A62-A67 中的每个“*”表示连接到 A_0 的位点，式 A62-A67 中的每个“**”或“#”各自独立地表示连接到 OR_7 或 OR_8 的位点。在一些实施方式中，R_j 具有手性。在一些实施方式中，R_j 是外消旋的。在一些实施方式中，R_j 是手性纯的。

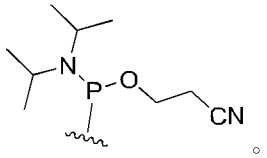
在一些实施方式中，期望与式（101）所示的化合物缀合的活性药物是功能性寡核苷酸。在一些实施方式中，R_7 是任何能经过反应与羟基形成磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接、硼代磷酸酯连接或羧酸酯连接、或者能经过反应与氨基形成酰胺键连接的官能团。从而，经上述磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接、羧酸酯连接或者酰胺键连接，可将式（101）所示的化合物连接至具有羟基的固相载体，从而为后续与核苷单体的连接提供合适的反应环境；或者，可通过上述磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接、羧酸酯连接或者酰胺键连接将式（101）所示的化合物与连接至固相载体的核苷酸序列上的羟基相连接，从而将式（101）所示的化合物缀合至活性药物、特别是功能性寡核苷酸。

在一些实施方式中，R_7 为具有式（A46）所示结构的含亚磷酰胺官能团的基团：



式（A46）

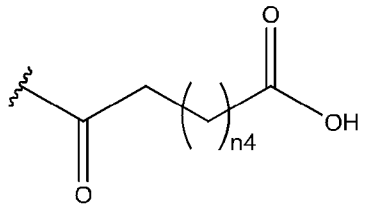
其中，B_1 选自取代或未取代的 C_1-C_5 烃基；B_2 选自 C_1-C_5 烷基、乙氰基、丙氰基和丁氰基中的一种。在一些实施方式中，所述含亚磷酰胺官能团的基团具有式（C3）所示的结构：



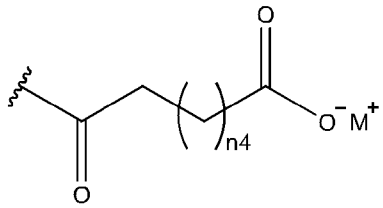
。

（C3）

在一些实施方式中，R_7 为具有式（C1）或式（C2）所示结构的包含羧基或羧酸盐官能团的基团。其中，n4 为 1-4 的整数，M^+ 为阳离子，～～～表示基团连接的位点。



（C1）



（C2）

羟基保护基团 R_8 的选择是为了取代羟基上的氢，形成不具有反应活性的基团，该保护基团 R_8 可在后续反应过程中脱除，从而重新释放出活性羟基参与后续反应。所述羟基保护基团的种类为本领域技术人员所公知，例如，可以是 Tr（三苯甲基）、MMTr（4-甲氧基三苯甲基）、DMTr（4,4’-双甲氧基三苯甲基）或 TMTr（4,4’,4”-三甲氧基苯甲基）。在一些实施方式中，R_8 可以是 DMTr，即 4,4’-

双甲氧基三苯甲基（4,4'-dimethoxytrityl）。

根据上述描述，本领域技术人员容易理解的是，相较于本领域公知的亚磷酰胺固相合成方法而言，可通过上述 R_7 以及 R_8，将式（101）所示的化合物连接至核苷酸序列的任意可能的位置，例如，式（101）所示的化合物连接至核苷酸序列的端部，式（101）所示的化合物连接至核苷酸序列的末端。相应地，除非另有说明，以下涉及式（101）所示的化合物的反应的描述中，当提及"脱保护"、"偶联"、"盖帽"、"氧化"、"硫化"等反应时，应当理解为本领域公知的亚磷酰胺核酸固相合成方法中所涉及的反应条件和试剂也同样适用于这些反应。示例性的反应条件和试剂将在后文详细描述。

L_1 的作用是将能够与细胞表面受体结合的 M_1 配体或 M_1 配体经保护后得到的 S_1 基团与式（312）中杂环结构上的 N 原子连接，从而为本公开的药物缀合物提供靶向功能。在一些实施方式中，选自式 A1-A26 基团中的一种或多种的连接组合均能够实现上述目的。为了使药物缀合物中，M_1 配体之间的空间位置更适合 M_1 配体与细胞表面受体结合，并节省成本，在一些实施方式中，L_1 选自 A1、A2、A4、A5、A6、A8、A10、A11 和 A13 中的一种或多种的连接组合，在一些实施方式中，L_1 选自 A1、A2、A4、A8、A10 和 A11 中至少 2 个的连接组合，在一些实施方式中，L_1 选自 A1、A2、A8、A10 中至少 2 个的连接组合。

为了实现 L_1 的上述功能，在一些实施方式中，L_1 的长度可以为 3-25 个原子，3-20 个原子、4-15 个原子或 5-12 个原子。除非另有说明，在本文的上文及下文中，所述 L_1 的长度是指与式（302）中杂环结构上的 N 原子连接的原子到与 S_1（或在后文所述缀合物中的 M_1）连接的原子形成的最长的原子链上的成链原子的个数。

式 A1-A26 中，j1、j2、R'、Ra、Rb 各自选择的范围，也是为了实现药物缀合物中，M_1 配体与 A 上的 N 原子连接，并使 M_1 配体之间的空间位置更适合 M_1 配体与细胞表面受体结合。因此，在一些实施方式中，j1 为 2-10 的整数，在一些实施方式中，j1 为 3-5 的整数。在一些实施方式中，j2 为 2-10 的整数，在一些实施方式中，j2 为 3-5 的整数。在一些实施方式中，R'为 C_1-C_4 烷基，在一些实施方式中，R'为甲基、乙基和异丙基中的一种。在一些实施方式中，Ra 为 A27、A28、A29、A30 和 A30 中的一种，在一些实施方式中，Ra 为 A27 或 A28。Rb 为 C_1-C_5 烷基，在一些实施方式中，Rb 为甲基、乙基、异丙基和丁基中的一种。

在一些实施方式中，所述药学上可接受的靶向基团可以选自以下靶向分子或其衍生物形成的配体中的一种或多种：亲脂类分子，例如胆固醇、胆汁酸、维生素（例如维生素 E）、不同链长的脂质分子；聚合物，例如聚乙二醇；多肽，例如透膜肽；适配体；抗体；量子点；糖类，例如乳糖、聚乳糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺（GalNAc）；内涵体裂解物质（endosomolytic component）；叶酸（folate）；肝实质细胞表达的受体配体，例如去唾液酸糖蛋白、去唾液酸糖残基、脂蛋白（如高密度脂蛋白、低密度脂蛋白等）、胰高血糖素、神经递质（如肾上腺素）、生长因子、转铁蛋白等。

在一些实施方式中，所述的每个配体独立地选自一个能够与细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中，至少一个配体是能够与肝细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中，至少一个配体是能够与哺乳动物肝细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中，至少一个配体是能够与人肝细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中，至少一个配体是能够与肝表面去唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）结合的配体。至少一个配体是能够与肺部细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中，至少一个配体是能够与肿瘤细胞表面受体结合的配体。这些配体的种类为本领域技术人员所公知，其作用一般是与细胞表面的特异性受体相结合，介导与配体连接的双链寡核苷酸递送至细胞。

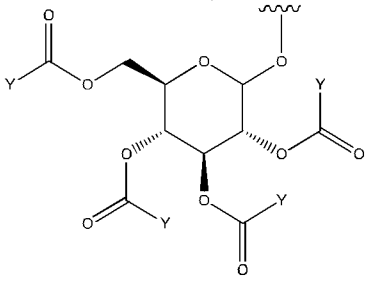
在一些实施方式中，所述药学上可接受的靶向基团可以是与哺乳动物肝细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)结合的任意一种配体。在一些实施方式中，每个配体独立地为去唾液酸糖蛋白，例如去唾液酸血清类粘蛋白（asialoorosomucoid，ASOR）或去唾液酸胎球蛋白（asialofetuin，ASF）。在一些实施方式所述配体为糖或糖的衍生物。在一些实施方式中，所述药学上可接受的靶向基团可以是肿瘤细胞表面受体结合的任意一种配体。在一些实施方式中，所述配体为叶酸或叶酸的衍生物。

在一些实施方式中，至少一个配体是糖。在一些实施方式中，每个配体均是糖。在一些实施方式中，至少一个配体是单糖、多糖、修饰的单糖、修饰的多糖或糖衍生物。在一些实施方式中，至少一个所述配体可以是单糖，双糖或三糖。在一些实施方式中，至少有一个配体是修饰的糖。在一些实施方式中，每一个配体均为修饰的糖。在一些实施方式中，每个配体均独立地选自多糖、修饰的多糖、单糖、修饰的单糖、多糖衍生物或单糖衍生物。在一些实施方式中，每一个或至少一个配体选自由葡萄糖及其衍生物组、甘露聚糖及其衍生物、半乳糖及其衍生物、木糖及其衍生物、核糖及其衍生物、岩藻糖及其衍生物、乳糖及其衍生物、麦芽糖及其衍生物，阿拉伯糖及其衍生物、果糖及其衍生物和唾液酸组成的组。在一些实施方式中，每个 M_1 可以独立地选自 D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃

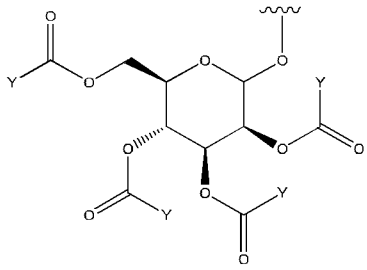
葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖或L-4-硫代核糖。在一些实施方式中，每个 M_1 均为N-乙酰基半乳糖胺（GalNAc）。配体的另外的选择可参见例如CN105378082A的记载，以引用的方式将其全部公开内容并入本文。

在一些实施方式中，每个 S_1 独立地是 M_1 中全部活性羟基被羟基保护基团保护而形成的基团，所述羟基保护基团在后续步骤中脱除，获得 M_1 配体。在一些实施方式中，所述羟基保护基团为具有YCO-结构的酰基基团。

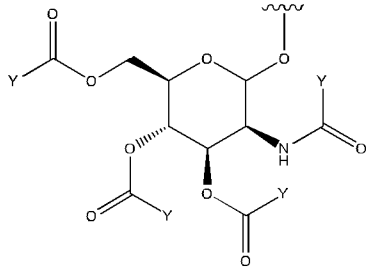
在一些实施方式中，每个 S_1 各自独立地选自式A51-A59基团中的一种：



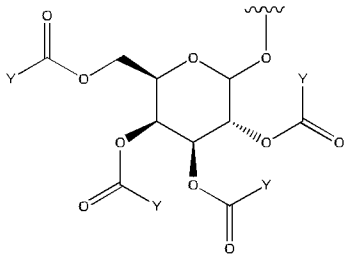
（A51）、



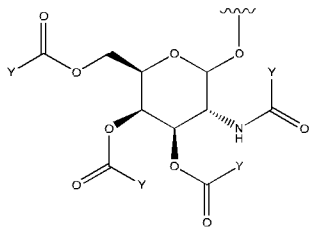
（A52）、



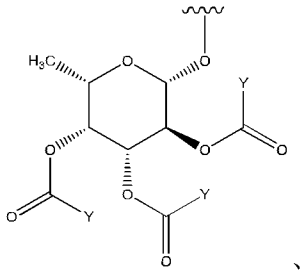
（A53）、



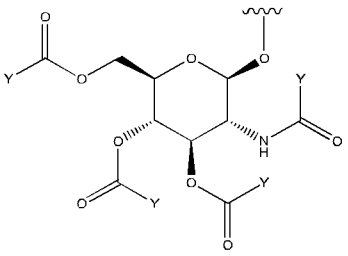
（A54）、



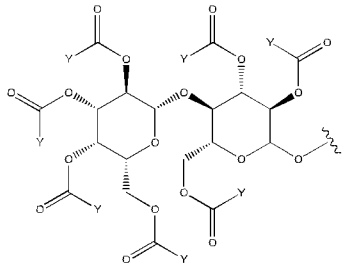
（A55）、



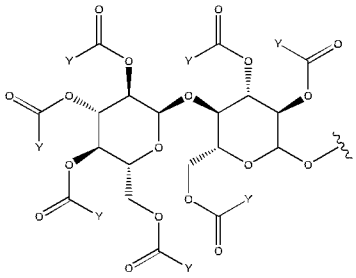
（A56）、



（A57）、



（A58）、



（A59）。

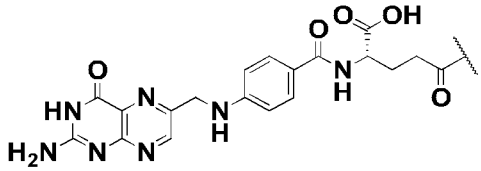
在一些实施方式中，S_1 为式A54或A55。

每个Y独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种；出于简化本公开的式（101）所示的化合物的目的，在一些实施方式中，Y为甲基。

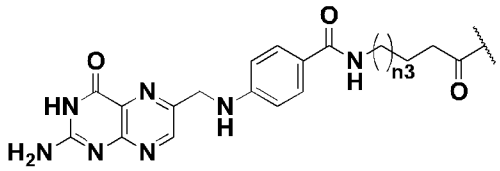
在一些实施方式中，每个 M_1 独立地选自亲脂类分子、糖类、维生素、多肽、内涵体裂解物质、类固醇化合物、萜烯化合物、整合素受体抑制剂和阳离子脂质分子中的分子或衍生物形成的配体中的一种。在一些实施方式中，每个 M_1 独立地选自胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O（十六烷基）甘油（1,3,-Bis-O(hexadecyl)glycerol）、六甘油、薄荷醇、薄荷脑、1,3-丙二醇、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-(油酰基)石胆酸、苯恶嗪、叶酸、叶酸的衍生物、维生素a、维生素B7(biotin)、吡哆醛、熊果醇、三萜烯、软木三萜酮、表木栓醇衍生石胆酸中的一种化合物所形成的配基。在一些实施方式中，每个 M_1 独立地选自香叶基氧基己基、十七烷基、二甲氧基三苯甲基、龙舌兰皂苷配基、薯蓣皂苷元、菝葜皂苷元中的一种。在一些实施方式中，每个 M_1 均独立地为叶酸及其衍生物所形成

的配基。叶酸的衍生物例如可以是叶酸类似物或叶酸模拟物。在一些实施方式中，每个 M_1 均独立地为由以下化合物中的一种形成的配基：叶酸、叶酸类似物或叶酸模拟物。在一些实施方式中，叶酸类似物为与主链结构与叶酸相似、并且叶酸在同一受体结合位点上具有类似官能团的基团。在一些实施方式中，叶酸模拟物为与叶酸具有相同的主要官能团、并且这些主要官能团与叶酸的对应官能团在空间构型方面也相似的基团。

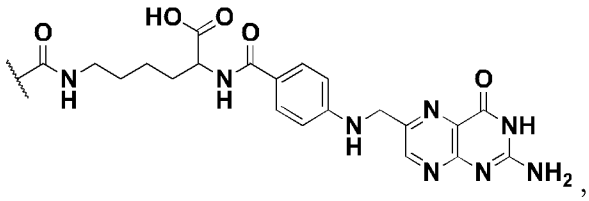
在一些实施方式中，每个 M_1 各自独立地选自式 H1-H5 基团中的一种：



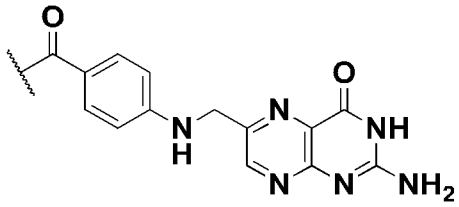
式（H1）



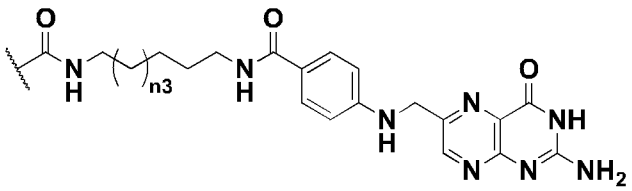
式（H2）



式（H3），



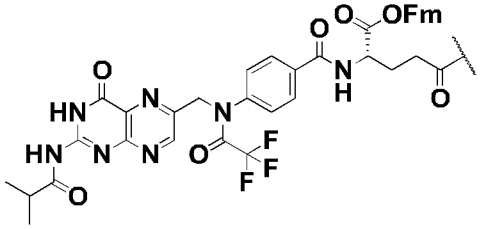
式（H4）



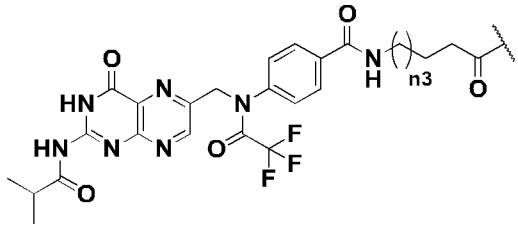
式（H5）

其中，n3 选自 1-5 的整数。在一些实施方式中，M_1 为式（H1）所示的基团。

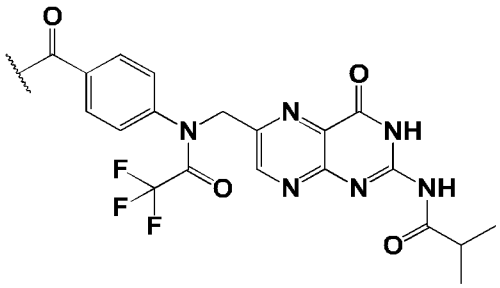
在一些实施方式中，每个 S_1 独立地选自式 A71-A75 基团中的一种：



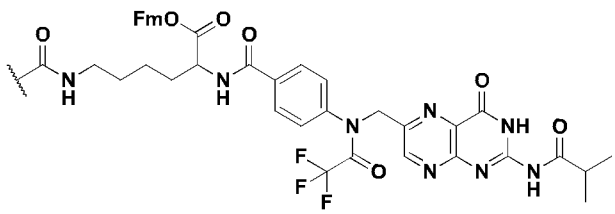
式（A71）



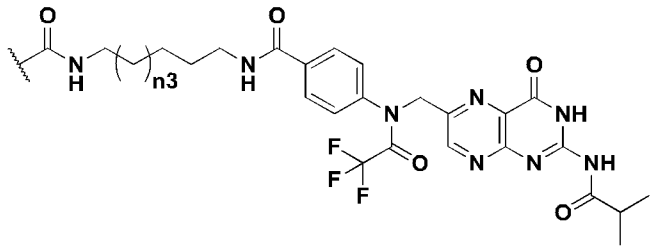
式（A72）



式（A73）



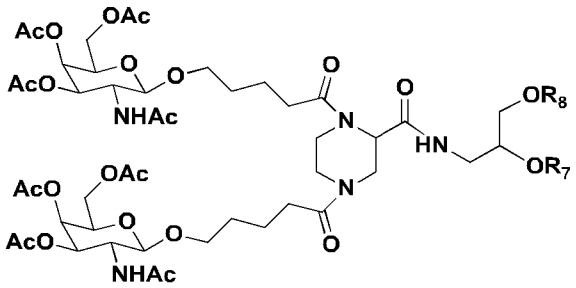
式（A74）



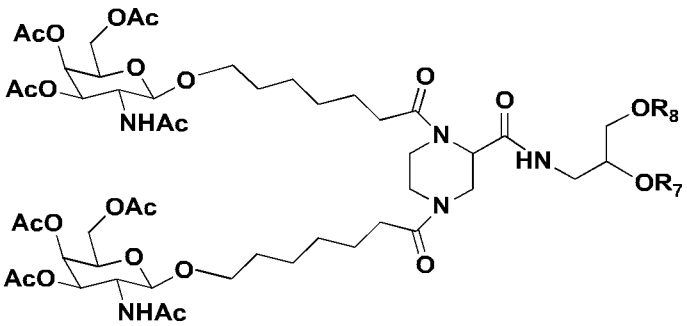
式（A75）

其中，n3 选自 1-5 的整数，Fm 是指 9-芴甲基。在一些实施方式中，S_1 为式（A71）所示的基团。

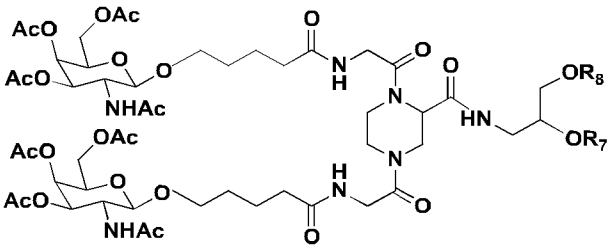
根据本公开的一些实施方式，式（101）所示化合物具有式（403）、（404）、（405）、（406）、（407）或（408）所示的结构：



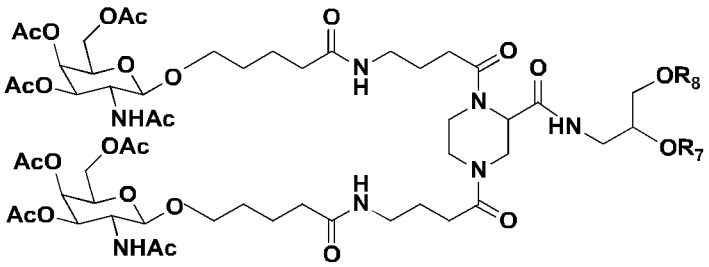
式（403）



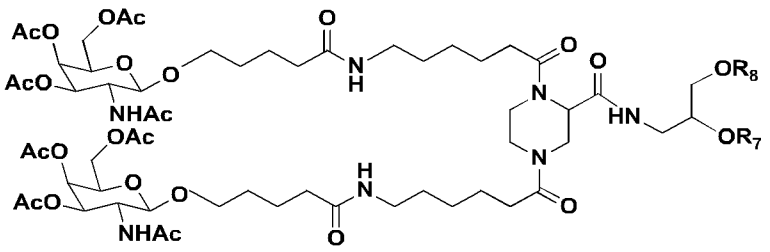
式（404）



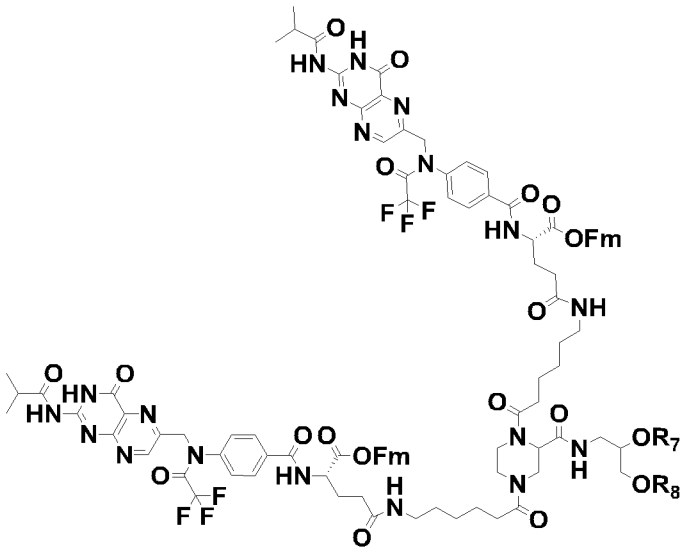
式（405）



式（406）



式（407）



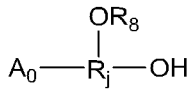
式（408）。

式（101）所示化合物的制备

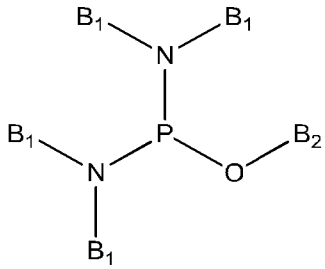
可以采用任意合理的合成路线制备本公开的式（101）所示化合物。

在一些实施方式中，式（101）所示化合物可以采用如下方法制备，该制备方法包括：

在有机溶剂中，在取代反应条件下，以及在活化剂和催化剂存在下，将式（102）所示化合物与式（103）所示的亚磷酰二胺接触，分离出式（101）所示化合物：



式（102）



式（103）

A_0、R_j、R_8 各自的定义和可选择的范围如前所述，每个 B_1 独立地为 C_1-C_5 烷基；B_2 选自 C_1-C_5 烷基、乙氰基、丙氰基和丁氰基中的一种。此时，所获得的式（101）化合物中，R_7 为式（C3）所示的含亚磷酰胺官能团的基团。

式（103）所示化合物可通过商购得到，或可由本领域技术人员通过公知的方法合成获得。在一些实施方式中，式（103）化合物为可通过商购得到的双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦。

所述取代反应条件包括反应温度为 0-100°C，反应时间为 1-20 小时，在一些实施方式中，所述取代反应条件包括反应温度为 10-40°C，反应时间为 2-8 小时。

所述有机溶剂可以是环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。所述环氧类溶剂例如可以为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂例如可以为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-

二氯乙烷中的一种或多种，在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于所述式（102）所示化合物，所述有机溶剂的用量可以是3-50L/mol，例如可以为5-20L/mol。

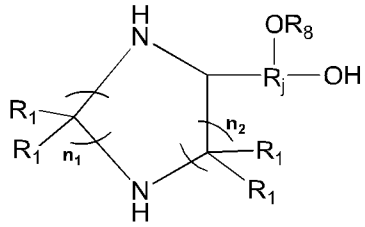
所述活化剂可以是三氟乙酸吡啶盐。相对于所述式（102）所示化合物，所述活化剂的用量可以是0.1:1-5:1，例如可以为0.5:1-3:1。

所述催化剂可以是N-甲基咪唑或N-甲基咪唑，例如可以为N-甲基咪唑。相对于所述式（102）所示化合物，所述催化剂的用量可以是0.1:1-5:1，例如可以为0.5:1-3:1。

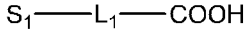
所述式(103)所示化合物与式(102)所示化合物的摩尔比可以是0.5:1-5:1,例如可以为0.5:1-3:1。

可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（101）化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（101）化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300目硅胶填料，使用石油醚:乙酸乙酯=2:1-1:2梯度洗脱；反相纯化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（101）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（102）所示化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括在有机溶剂中，在酰胺化反应条件下，以及活化剂和三级胺类有机碱存在下，将式（104）所示化合物与式（105）所示化合物接触，分离出式（102）所示化合物：



式（104）



式（105）

其中，n_1、n_2、R_1、R_8、R_j各自的定义和可选择的范围如前所述。

式（105）化合物可通过商购得到，或可由本领域技术人员通过各种方法制备，例如，可参照US8106022B2实施例1中所公开的方法制备某些式（105）化合物，以引用的方式将其全部内容整体并入本文。

所述酰胺化反应条件包括：反应温度为0-100°C，反应时间为8-48小时，在一些实施方式中，所述酰胺化反应条件为反应温度10-40°C，反应时间为8-20小时。

所述有机溶剂可以是环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。所述环氧类溶剂例如可以为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂例如可以为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一种或多种，在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式（104）化合物，有机溶剂用量可以为3-50L/mol，例如可以为5-20L/mol。

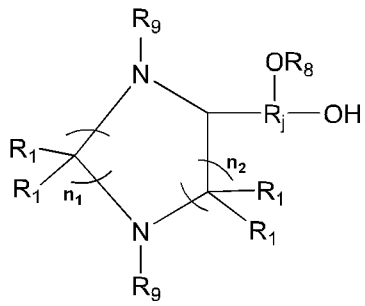
所述活化剂可以为3-二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐、2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐、二环己基碳二亚胺中的一种。例如可以为3-二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮（DEPBT）。相对于所述式（104）所示化合物，所述活化剂的用量可以为0.1:1-10:1，例如可以为1:1-5:1。

所述三级胺类有机碱可以为三乙胺、三丙胺、三丁胺、二异丙基乙胺中的一种，例如可以为二异丙基乙胺。相对于所述式（104）所示化合物，所述三级胺类有机碱的用量可以为0.5:1-20:1，例如可以为1:1-10:1。

所述式（105）所示化合物与所述式（104）所示化合物的摩尔比可以为0.5:1-100:1，例如可以为2:1-10:1。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（102）化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（102）化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300目硅胶填料，使用石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05~1:1:1:0.2梯度洗脱；反相纯化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（102）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

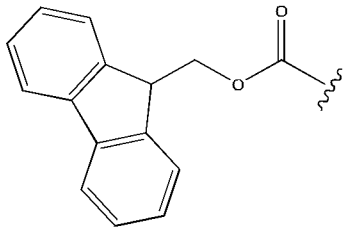
在一些实施方式中，式（104）所示化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括在有机溶剂中，在取代反应条件下，将式（106）所示化合物与碱性试剂接触反应，分离出式（104）所示化合物：

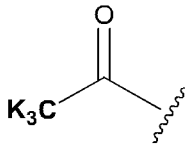


式（106）

其中，n_1、n_2、R_1、R_8、R_j 各自的定义和可选择的范围如前所述。

R_9 为氨基保护基团，可以选自式 A69 或 A70：





（A69） （A70）

其中，式 A70 中的 K 表示卤素，每个 K 选自 F、Cl、Br、I 中的一种；在一些实施方式中，K 为 F 或 Cl。

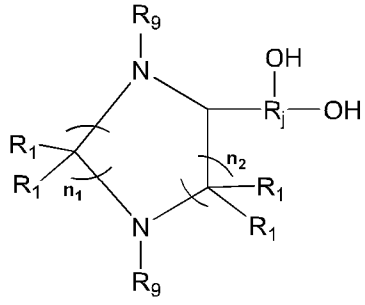
所述取代反应条件包括：反应温度为 0-100°C，反应时间为 5 分钟-5 小时，在一些实施方式中，所述取代反应条件为反应温度为 10-40°C，反应时间为 0.3-3 小时。

所述有机溶剂可以为环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。所述环氧类溶剂例如可以为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂例如可以为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷中的一种或多种，在一些实施方式中，所述有机溶剂为 N,N-二甲基甲酰胺。相对于式（106）化合物，有机溶剂用量可以为 1-50L/mol，例如可以为 1-20L/mol。

所述碱性试剂可以为哌啶、氨或甲胺中的一种或多种。在一些实施方式中，所述氨以 25-28wt% 水溶液的形式提供，所述甲胺以 30-40wt%水溶液的形式提供，在一些实施方式中，所述碱性试剂为哌啶，所述碱性试剂与式（106）所示化合物的摩尔比可以为 1:1-100:1，例如可以为 10:1-50:1。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（104）化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（104）化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300 目硅胶填料，使用乙酸乙酯:甲醇=1:1-1:10 梯度洗脱；反相纯化：C18、C8 反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（104）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（106）所示化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括在有机溶剂中，在取代反应条件下，将式（107）所示化合物与羟基保护试剂接触，分离出式（106）所示化合物：



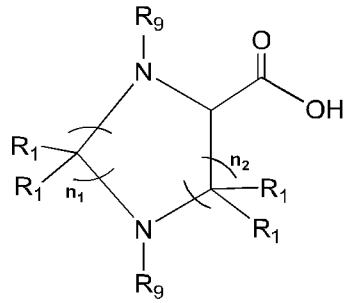
式（107）

其中，n_1、n_2、R_1、R_j、R_9 各自的定义和可选择的范围如前所述。

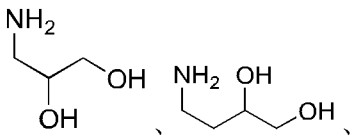
所述取代反应条件包括：反应温度为 0-100°C，反应时间为 8-48 小时，在一些实施方式中，所述取代反应条件为反应温度为 10-40°C，反应时间为 8-24 小时。所述有机溶剂可以为吡啶，相对于式（107）化合物，有机溶剂用量可以为 1-50L/mol，例如可以为 1-20L/mol。

所述羟基保护试剂可以是任何可以起到羟基保护作用的试剂，有些羟基保护试剂为本领域技术人员所公知。在一些实施方式中，与 R_j 连接的两个羟基具有相同的化学环境，此时，通过控制所述羟基保护剂与式（107）所示化合物的摩尔比，来控制反应程度，使得主要反应产物为仅有一个羟基被保护的产物；在一些实施方式中，与 R_j 连接的两个羟基中仅有一个为伯醇羟基，此时，通过对羟基保护试剂进行选择，使得主要反应产物为仅有一个羟基被保护的产物。在一些实施方式中，所述羟基保护试剂为三苯甲基氯、4-甲氧基三苯甲基氯、4,4'-双甲氧基三苯甲基氯和 4,4',4"-三甲氧基三苯甲基氯中的一种。在一些实施方式中，所述羟基保护试剂为 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯（DMTrCl）。所述羟基保护剂与式（107）所示化合物的摩尔比可以为 1:1-50:1，在一些实施方式中，为 1.2:1-2:1。与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（106）化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（106）化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300 目硅胶填料，使用石油醚:乙酸乙酯=1:1 混合液洗脱；反相纯化：C18、C8 反相填料,使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方式中,可以直接除去溶剂得到式(106)化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（107）所示化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括在有机溶剂中，在酰胺化反应条件下，将式（108）所示化合物与选自式 B62-B67 化合物中的一种的氨基二醇以及酰胺化活化剂接触，分离出式（107）所示化合物：

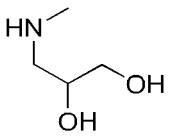


式（108）

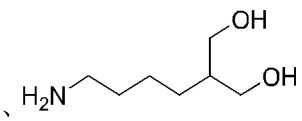


式（B62）

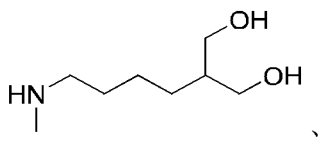
式（B63）



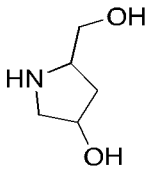
式（B64）



式（B65）



式（B66），



式（B67），

其中，n_1、n_2、R_1、R_9 各自的定义和可选择的范围如前所述。此时，所获得的式（107）化合物中，R_j 选自式 A62-A67 基团中的一种。

所述氨基二醇可通过商购获得，或者由本领域技术人员通过公知的方法合成获得。在一个具体的实施方式中，所述氨基二醇为式（B62）所示的 3-氨基-1,2-丙二醇。

所述酰胺化反应条件包括反应温度为 0-100°C，反应时间为 8-48 小时，在一些实施方式中，所述酰胺化反应条件包括：反应温度为 40-80°C，反应时间为 10-30 小时。

所述有机溶剂可以是酰胺类溶剂、醇类溶剂或醚类溶剂。在一些实施方式中，所述酰胺类溶剂为例如二甲基甲酰胺，所述醇类溶剂为甲醇和/或乙醇。相对于式（108）所示化合物，所述有机溶剂的用量可以为 1-50L/mol，例如 1-20L/mol。

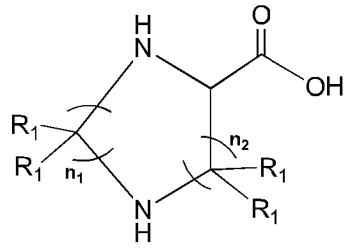
式 B62-B67 中的一种与式（108）所示化合物的摩尔比可以为 0.1:1-20:1，例如可以为 0.5:1-5:1；

在一些实施方式中，所述酰胺化活化剂可以为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉或 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐，例如可以为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDCl）或 2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉（EEDQ）。所

述酰胺化活化剂与式（108）所示化合物的摩尔比可以为 0.1:1-20:1，例如可以为 0.5:1-5:1。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（107）化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（107）化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300 目硅胶填料，使用石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.15 梯度洗脱；反相纯化：C18、C8 反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（107）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（108）所示化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括有机溶剂存在下，在取代反应条件下，将式（109）所示化合物与氨基保护剂接触，分离出式（108）所示化合物：



式（109）

其中，n_1、n_2、R_1 各自的定义和可选择的范围如前所述。

所述取代反应条件包括反应温度为 0-100°C，反应时间为 4-48 小时，在一些实施方式中，所述取代反应条件为反应温度为 10-40°C，反应时间为 8-30 小时。

所述氨基保护剂可以为芴甲氧羰酰氯、三氟乙酰氯或三氯乙酰氯。在一些实施方式中，所述氨基保护剂为芴甲氧羰酰氯（Fmoc-Cl）。氨基保护剂与式（109）所示化合物的物质的量的比例可以为 0.1:1-20:1，例如可以为 1:1-10:1。

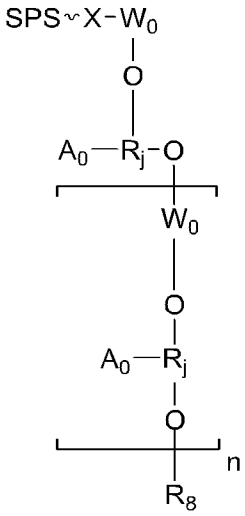
所述有机溶剂可以为环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和 N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。所述环氧类溶剂例如可以为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂例如可以为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷中的一种或多种，在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氧六环。在一些实施方式中，所述有机溶剂为水和二氧六环的混合物。在一些实施方式中，所述水和二氧六环的体积比可以为 5:1-1:5、在一些实施方式中为 3:1-1:3。相对于式（109）化合物，有机溶剂的总用量可以为 0.1-50L/mol，例如 0.5-10L/mol。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（108）化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（108）化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300 目硅胶填料，使用石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷=1:1:1 混合液洗脱；反相纯化：C18、C8 反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（108）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（109）所示化合物可通过各种方法制备得到，或者通过商购获得。在一些实施方式中，全部 R_1 为氢、n_1 为 2、n_2 为 1，此时，式（109）所示的化合物是容易商购获得的哌嗪-2-羧酸二盐酸盐。

第二种化合物

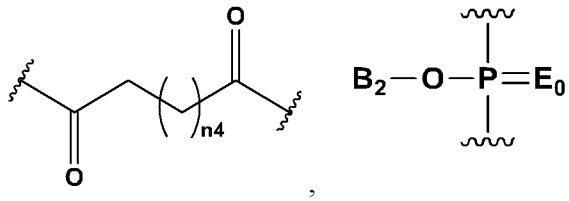
在一些实施方式中，本公开提供了一种化合物及其制备方法，该化合物具有式（111）所示的结构（111）所示化合物。



式（111）

式中，每个 A_0、每个 R_j、R_8 各自的定义和可选择的范围如前所述，W_0 为连接基团；X 选自 O 或 NH；SPS 表示固相载体，n 为 0-7 的整数。

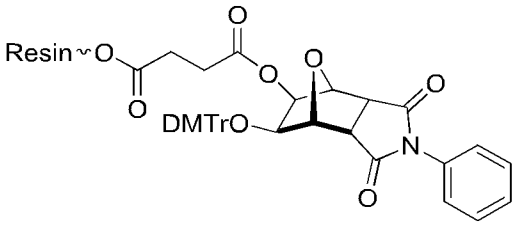
W_0 的作用是为式（111）所示化合物与固相载体之间、以及多个 R_j 基团之间提供共价连接，W_0 可以是任意的连接结构。在一些实施方式中，W_0 具有如式（C1'）或式（A81）所示的结构：



式(C1')　　式(A81)

其中，n4 为 1-4 的整数，每个 E_0 独立地为 O、S 或 BH，每个 B_2 独立地选自 C_1-C_5 烷基、乙氧基、丙氧基和丁氧基，～～～表示基团连接的位点。

式（111）所示化合物中的固相载体 SPS 可以基于本领域中公知的可用于核酸固相合成的固相载体，例如，可以是以 W_0 基团取代市售的通用固相载体(NittoPhase®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support，Kinovate Life Sciences 公司，结构如式 B80 所示）中的 DMTr 而获得的固相载体部分：



（B80）。

在一些实施方式中，W_0 是式（101）化合物中的 R_7 与固相载体上的羟基或其它式（101）化合物脱保护后产生的羟基反应形成亚磷酰胺连接，该亚磷酰胺连接再经过氧化、硫化或硼氢化反应后得到的连接基团。因此，B_2 的选择与式（101）中的对应基团相同，而 E_0 则可以是 O、S 或 BH。在后续反应中，B_2 基团可水解脱除形成羟基，形成的羟基随后与 E_0 经构型互变形成磷酰氧基和式（A60）和式（A61）中的 E_1，对应的 E_1 则分别为 OH、SH 或 BH_2。综合考虑成本与反应简便的需要，在一些实施方式中，B_2 为氰乙基，而 E_0 是 O。

在一些实施方式中，W_0 是式(101)化合物中的 R_7 与固相载体上的羟基或氨基、或者其它式(101)化合物脱保护后产生的羟基或氨基反应形成酯键或酰胺键而得到的连接基团。

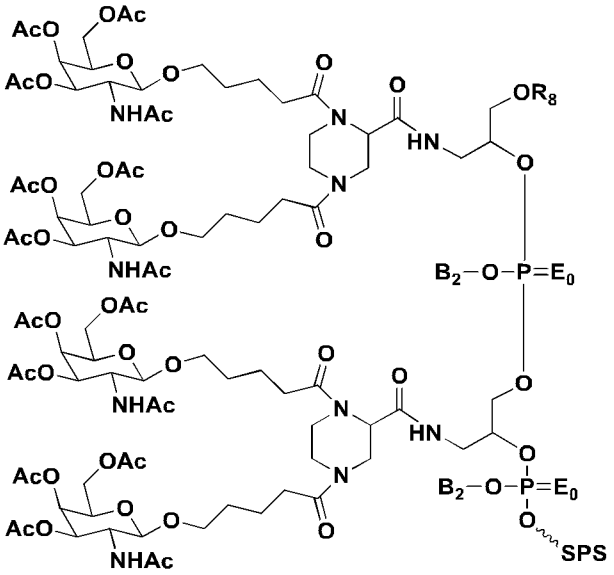
根据本公开，n 可以是 0-7 的整数，从而保证述式（111）所示化合物中 S_1 基团的个数至少为 2；在一些实施方式中，M_1 配体是独立地选自对哺乳动物肝脏细胞表面上的去唾液酸糖蛋白受体具有亲合力的配体中的一种，并且 n≥1，这样可以使得药物缀合物中，M_1 配体的个数至少为 4，从而使得 M_1 配体与肝表面去唾液酸糖蛋白受体更容易结合，进而促进药物缀合物通过内吞作用进入细胞。实验表明，当 M_1 配体的个数大于 4 个时，M_1 配体与肝表面去唾液酸糖蛋白受体结合的容易程度增加并

不明显，因此，从合成容易程度、结构/工艺成本和递送效率等多方面综合考虑，在一些实施方式中，n 为 1-4 的整数。在一些实施方式中，n 为 1-2 的整数。

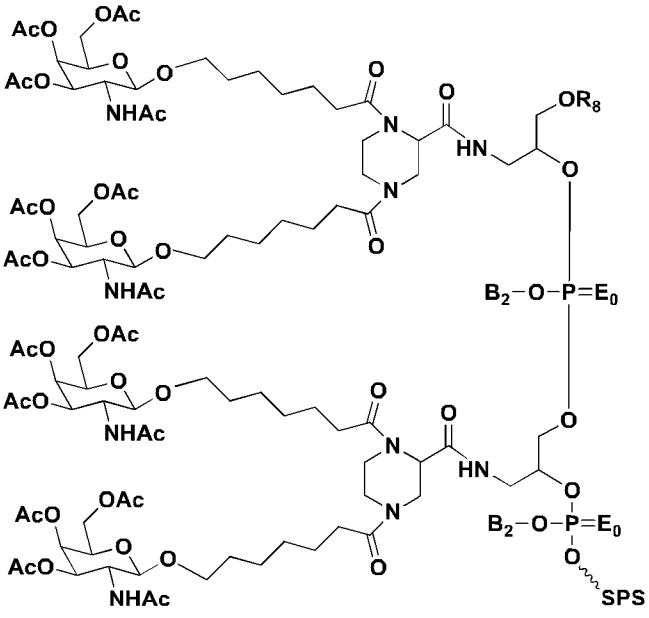
在一些实施方式中，M_1 配体是叶酸或其衍生物形成的配基，并且 n=0。

参见后述，当活性药物为功能性寡核苷酸时，式（111）所示化合物可用于代替常规亚磷酰胺核酸固相合成方法所使用的固相载体作为起始，按照亚磷酰胺固相合成方法依次连接核苷单体，从而将式（111）所示化合物缀合至核苷酸序列。在连接结束后，可将缀合至核苷酸序列的式（101）所示化合物从固相载体上切割下来，并随后经分离纯化等步骤，并且根据目标功能性寡核苷酸的结构，进行可选的退火步骤，最终获得本公开的药物缀合物。

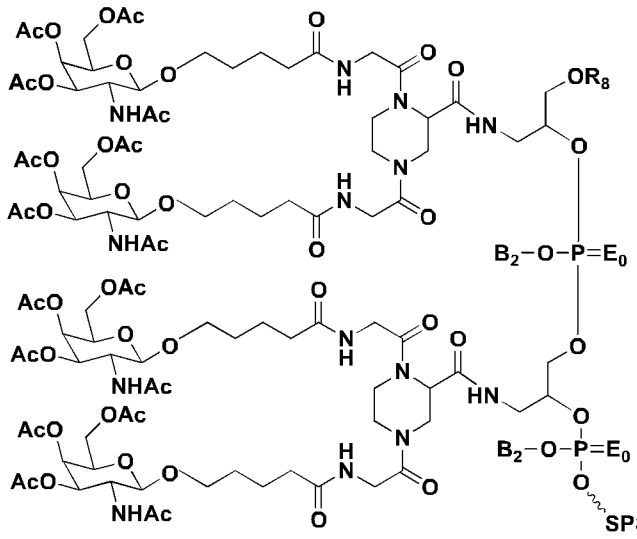
根据本公开的一些具体实施方式，式（111）所示化合物具有式（503）、（504）、（505）、（506）、（507）、（508）、（509）或（510）所示的结构：



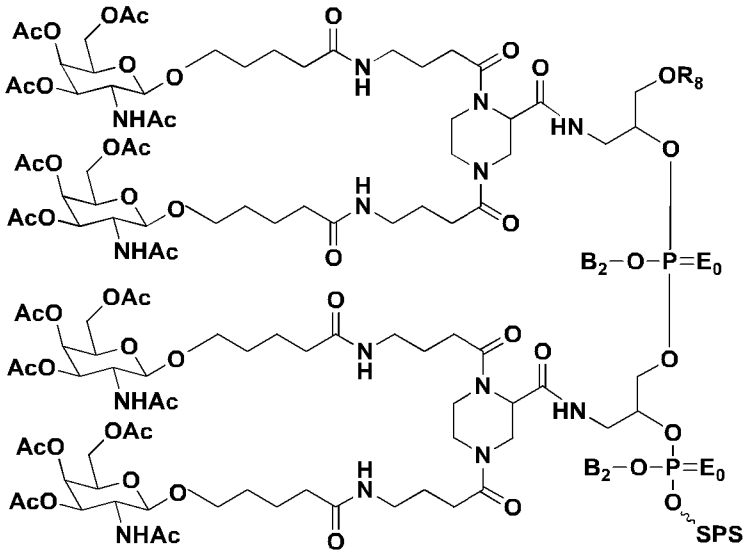
式（503）



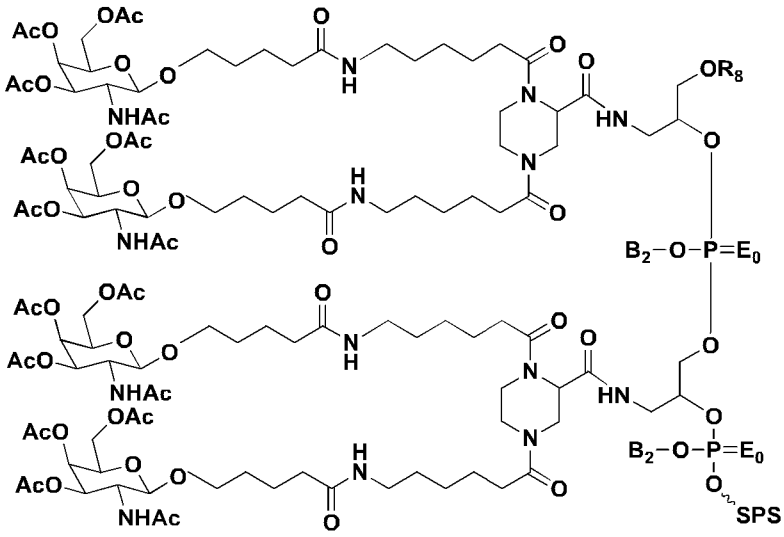
式（504）



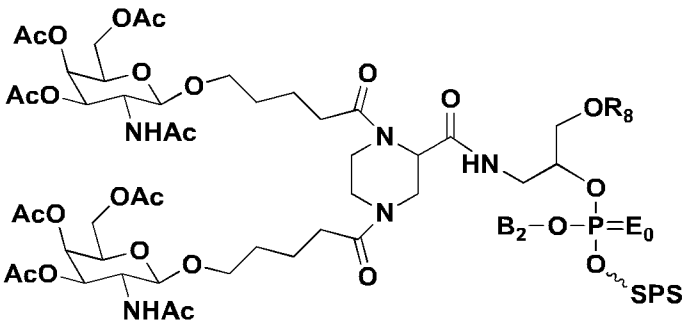
式（505）



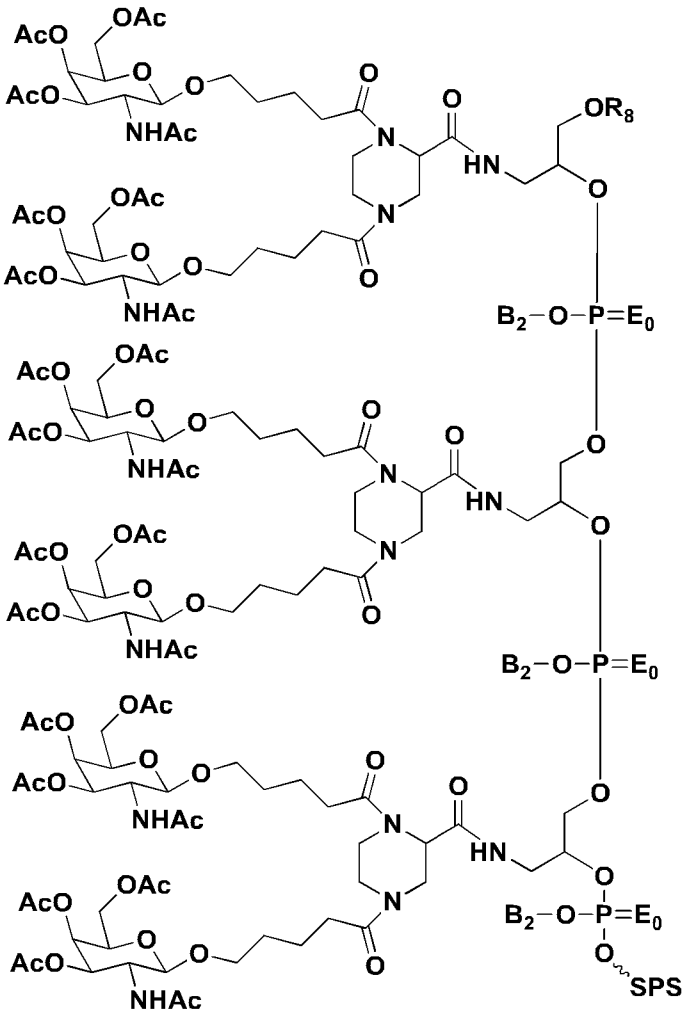
式（506）



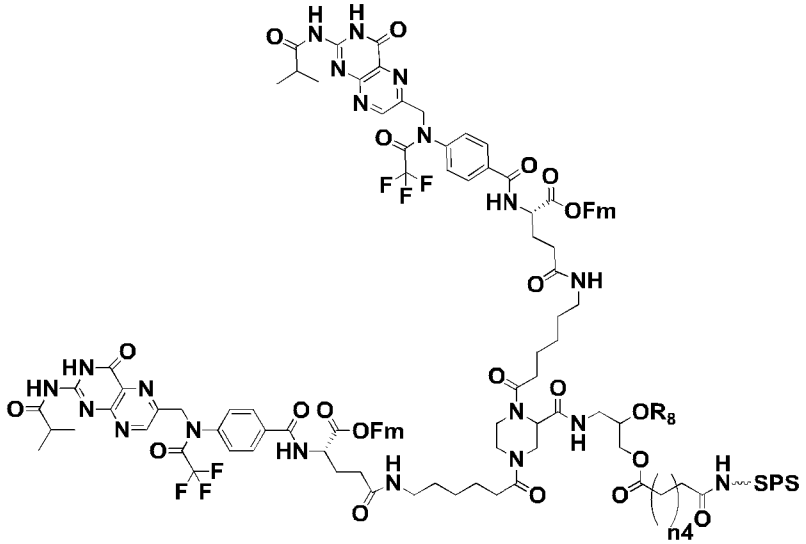
式（507）



式（508）



式（509）



式（510），

其中，n4 为选自 1-4 的整数。在一些实施方式中，上述式（503）-（510）化合物中的 R_8 为羟基保护基团为三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、4,4'-双甲氧基三苯甲基和 4,4',4"-三甲氧基苯甲基中的一种，每个 B_2 均为乙氰基，每个 E_0 均为 O。

在一种实施方式中，在一些实施方式中，X 是 O，W_0 与 X 共同形成磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接或硼代磷酸酯连接，式（111）所示化合物可以采用如下方法制备，该方法包括：

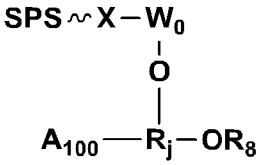
（Ia）脱除带有经保护的羟基的固相载体上的保护基团，在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式（101）所示的化合物与固相载体接触，随后，进行盖帽反应，再进行氧化、硫化或硼氢化反应。

式（111）所示化合物的制备方法还可以包括：（IIa）按照（Ia）的方法再进行 n 次（n 的定义与式（111）中相同）与式（101）所示的化合物的接触，每次均是对前一步骤得到的产物进行脱保护，随后与式（101）所示的化合物相接触，进行盖帽反应，并进行氧化、硫化或硼氢化反应。

所述脱保护、偶联、盖帽、氧化、硫化或硼氢化反应可使用与常规亚磷酰胺固相合成方法中相同的条件与试剂，部分典型的反应条件和试剂将在后文详细描述。

在一些实施方式中，X 是 O 或者 N，W_0 与 X 共同形成羧酸酯连接或者酰胺键连接，式（111）所示化合物可以采用如下方法制备，该方法包括：（Ib）脱除带有经保护的羟基或氨基的固相载体上的保护基团，在有机溶剂中，在缩合反应条件和缩合试剂存在下，使式（101）所示的化合物与该固相载体接触，分离获得含有经羧酸酯键或酰胺键式（111）所示化合物。

在一些实施方式中，由式 A_0 表示的基团中，每个 S_1 独立地选自式 A71-A75 所示基团中的一种，并且每个 S_1 经由羧酸酯键或酰胺键连接至 L_1 基团，式（111）所示化合物可以采用如下方法制备，该方法包括：（Ic）在有机溶剂中，在缩合反应条件下，以及在胺基盐酸盐、缩合剂和杂环有机碱的存在下，使式（121）所示的化合物和式（401）所示的化合物接触，分离获得式（111）所示化合物。

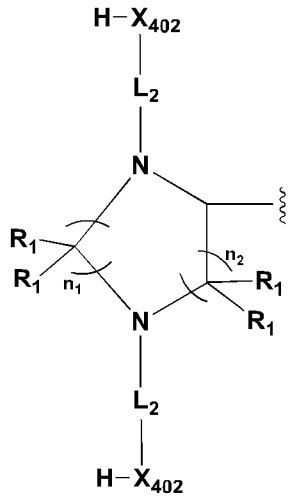


式（121）

S_1-X_{401}

式（401）

其中，A_{100} 具有如式（402）所示的结构：



式（402）

其中，X_{401} 为羟基、氨基、卤素或 O^-M^+，其中 M^+ 为阳离子；X_{402} 为 O 或 NH，并且 L_2 与 X_{402} 基团共同形成 L_1 连接基团；即 L_2 是 L_1 去掉 X_{402} 基团的部分。

SPS、X、W_0、R_j、n_1、n_2、R_8 和每个 R_1 的各自的定义与选择范围与上述相同。

式（401）所示化合物与式（121）所示化合物的用量比（摩尔比）可以是 1:1-5:1，例如可以为 2:1-3:1。所述有机溶剂可以为卤代烷类溶剂或有机腈化合物中的一种或多种。卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和 1,2-二氯乙烷，有机腈化合物例如可以为乙腈。在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于所述式（121）所示化合物，所述有机溶剂的用量可以为 3-100L/mol，例如可以为 5-80L/mol。

所述胺基盐酸盐例如可以为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐（EDCl）。相对于所述式（121）所示化合物，所述胺基盐酸盐的用量（摩尔比）可以为 1:1-5:1，例如可以为 2:1-4:1。

所述缩合剂例如可以为 1-羟基苯并三唑（HOBt）、4-二甲氨基吡啶、二环己基碳二亚胺，在一些实施方式中，所述缩合剂为 1-羟基苯并三唑（HOBt）。相对于所述式（121）所示化合物，所述缩合剂的用量（摩尔比）可以为 3:1-10:1，例如可以为 4:1-7:1。

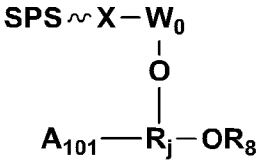
所述杂环有机碱例如可以为 N-甲基吗啉，相对于所述式（121）所示化合物，所述杂环有机碱的用量（摩尔比）可以为 1:1-5:1，例如可以为 2:1-4:1。

所述缩合反应条件包括反应温度为 0-100°C，反应时间为 10-30 小时，在一些实施方式中，所述缩合反应条件为反应温度为 10-40°C，反应时间为 15-20 小时。

可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（111）所示化合物。在一些实施方式中，可通过抽滤除去试剂得到式（111）所示化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

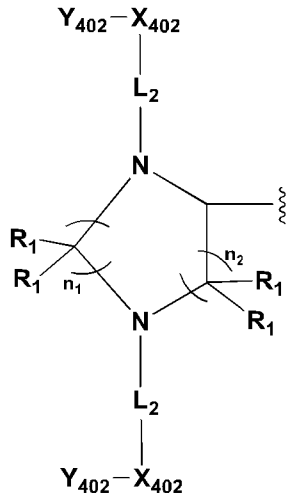
在一些实施方式中，式（401）所示的化合物可由本领域技术人员商购获得，或通过已知方法容易地制备获得。例如，在一些实施方式中，S_1 为式（A71）所示的基团，X_{401} 为羟基，此时，式（401）所示的化合物可参照 WO2009082607 说明书实施例 2 中，化合物 152 的制备方法制备获得。

在一些实施方式中，式（121）所示的化合物可通过商购获得，或者由本领域技术人员通过公知的方法合成获得。在一些实施方式中，式（121）所示的化合物可通过以下方法制备获得：该方法包括在有机溶剂中，在脱保护反应条件下，以及杂环有机碱存在下，使式（122）所示的化合物进行脱保护反应，分离出式（121）所示化合物：



式（122）

其中，A_{101} 具有如式（403）所示的结构：



式（403）

其中，Y_{402}是保护基团，在一些实施方式中，X_{402}是氨基，Y_{402}是氨基保护基团。在一些实施方式中，Y_{402}是苄氧羰基（Cbz）、叔丁氧羰基（Boc）、芴甲氧羰基（Fmoc）、烯丙氧羰基（Alloc）、三甲基硅乙氧羰基（Teoc）和苄基（Bn）中的一种。在一些实施方式中，Y_{402}是Fmoc保护基。

X_{402}、L_2、SPS、X、W_0、R_j、R_8、n_1、n_2和每个R_1的各自的定义与选择范围与上述相同。

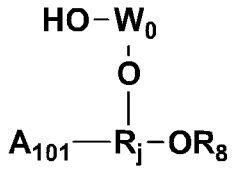
所述有机溶剂可以为卤代烷类溶剂。卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷。在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于所述式（122）所示化合物，所述有机溶剂的用量可以为10-80 L/mol，例如可以为20-40 L/mol。

所述杂环有机碱例如可以为吡啶或哌啶。在一些实施方式中，所述杂环有机碱可以为哌啶。相对于所述式（122）化合物，所述杂环有机碱的用量可以为2-20 L/mol，例如可以为5-10 L/mol。

所述脱保护反应条件包括：反应温度为0-100°C，反应时间为2-20小时，在一些实施方式中，所述脱保护反应条件为反应温度10-40°C，反应时间为3-10小时。

可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（121）化合物。在一些实施方式中，可通过抽滤除去溶剂得到式（121）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（122）所示的化合物可通过以下方法制备获得：该方法包括在有机溶剂中，在缩合反应条件下，以及缩合剂和三级胺的存在下，使式（123）所示的化合物和带有羟基或氨基的固相载体接触，分离出式（122）所示化合物：



式（123）

其中，A_{101}、R_j、R_8、W_0各自的定义和可选择的范围如前所述。

所述固相载体可以为固相合成siRNA中所用的载体中的一种，这固相载体为本领域技术人员所公知。例如，所述固相载体可以选自含有活性羟基或氨基官能团的固相载体，在一些实施方式中，所述固相载体为氨基树脂或羟基树脂。在一些实施方式中，所述氨基或羟基树脂具有如下参数：粒径100-400目（mesh），表面氨基或羟基载量可以为0.2-0.5mmol/g。所述式（123）所示化合物与固相载体的用量比可以为10-800 μmol化合物/每克固相载体（μmol/g）。在一些实施方式中，所述式（321）所示化合物与固相载体的用量比可以为100-600 μmol/g。

所述有机溶剂可以是本领域技术人员已知的任何合适的溶剂。在一些实施方式中，所述有机溶剂为卤代烷类溶剂或有机腈化合物中的一种或多种。卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷，有机腈化合物例如可以为乙腈。在一些实施方式中，所述有机溶剂为乙腈。相对于所述式（123）所示化合物，所述有机溶剂的用量可以为3-50 L/mol，例如可以为5-30 L/mol。

在一些实施方式中，所述缩合剂例如可以为苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐（benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate，PyBop）、3-二乙氧基磷酰基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮（3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one，DEPBT）和/或O-苯并三唑-四甲基脲六氟磷酸盐（O-benzotriazol-1-yl-tetramethyluronium hexafluorophosphate，HBTU），在一些实施方式中，所述缩合剂为O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐盐。相对于所述式(123)化合物，

所述缩合剂的用量（摩尔比）可以为1:1-20:1，例如可以为1:1-5:1。

所述三级胺例如可以为三乙胺和/或N,N-二异丙基乙胺(DIEA)，在一些实施方式中，为N,N-二异丙基乙胺。相对于所述式（123）化合物，所述三级胺的用量（摩尔比）可以为1:1-20:1，例如可以为1:1-5:1。

所述缩合反应条件包括反应温度为0-100°C，反应时间为10-30小时，在一些实施方式中，所述缩合反应条件为反应温度为10-40°C，反应时间为15-30小时。

可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（122）化合物。在一些实施方式中，可通过抽滤除去试剂得到式（122）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（122）化合物的制备方法还可以包括在盖帽反应条件下，在有机溶剂中，将得到的缩合产物与盖帽试剂和酰化催化剂接触，分离得到式（122）所示化合物。所述盖帽反应的作用在于除去任何尚未反应完全的活性反应官能团，以避免在后续反应中产生不必要的副产物。所述盖帽反应的条件包括反应温度为0-50°C，在一些实施方式中为15-35°C，反应的时间为1-10h，在一些实施方式中为3-6h。盖帽试剂可以使用siRNA固相合成中所使用的盖帽试剂，siRNA固相合成中所使用的盖帽试剂为本领域技术人员所公知。

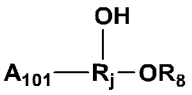
在一些实施方式中，所述盖帽试剂由盖帽试剂A（capA）和盖帽试剂B（capB）组成，其中，盖帽试剂A为N-甲基咪唑，在一些实施方式中以N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液形式提供，其中，吡啶与乙腈的体积比可以为1:10-1:1，在一些实施方式中为1:3-1:1，吡啶与乙腈的总体积与N-甲基咪唑的体积比可以为1:1-10:1，在一些实施方式中为3:1-7:1。所述盖帽试剂B为乙酸酐。在一些实施方式中，所述盖帽试剂B以乙酸酐的乙腈溶液形式提供，其中，乙酸酐和乙腈的体积比可以为1:1-1:10，在进一步的实施方式中为1:2-1:6。

在一些实施方式中，所述N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液的体积与式（122）化合物的质量之比可以为5ml/g-50ml/g，在一些实施方式中为15ml/g-30ml/g。所述乙酸酐的乙腈溶液的体积与式(122)化合物的质量之比可以为0.5ml/g-10ml/g，在一些实施方式中为1ml/g-5ml/g。

在一些实施方式中，盖帽试剂使用等摩尔量的乙酸酐与N-甲基咪唑。在一些实施方式中，所述有机溶剂可以为乙腈、环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。在一些实施方式中，所述有机溶剂为乙腈。相对于式（122）化合物，所述有机溶剂的用量可以为10-50L/mol，在一些实施方式中为5-30L/mol。

在一些实施方式中，所述酰化催化剂可以选自任何可用于酯化缩合或酰胺化缩合的催化剂，例如碱性杂环化合物。在一些实施方式中，所述酰化催化剂为4-二甲氨基吡啶。所述催化剂与式（122）所示化合物的质量之比可以为0.001:1-1:1，在一些实施方式中为0.01:1-0.1:1。

在一些实施方式中，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（122）化合物。在一些实施方式中，可通过以有机溶剂充分洗涤，并过滤，去除未反应的反应物、过量的盖帽试剂及其它杂质，得到式（122）化合物，所述有机溶剂选自乙腈、二氯甲烷、甲醇中的一种或多种。在一些实施方式中为乙腈。在一些实施方式中，W_0包含二酰基结构，式（123）所示的化合物可通过以下方法制备获得：该方法包括在有机溶剂中，在酯化反应条件下，以及在碱和酯化催化剂存在下，使式（125）所示的化合物与环状酸酐接触，分离得到式（123）所示化合物：



式（125）

其中，A_{101}、R_j、R_8各自的定义和可选择的范围如前所述。

在一些实施方式中，所述有机溶剂包含环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。在一些实施方式中，所述环氧类溶剂可以为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂可以为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂可以为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一种或多种。在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于所述式（125）所示化合物，所述有机溶剂的用量可以为3-50L/mol，例如可以为5-20L/mol。

在一些实施方式中，所述环状酸酐可以为丁二酸酐、戊二酸酐、己二酸酐或庚二酸酐中的一种，在一些实施方式中为丁二酸酐。相对于所述式（125）化合物，所述酸酐类化合物的用量（摩尔比）可以为1:1-10:1，例如可以为2:1-5:1。

所述酯化催化剂可以是任何对该酯化反应起到催化作用的催化剂，例如该催化剂可以是例如可以为1-羟基苯并三唑（HOBt）、4-二甲氨基吡啶、二环己基碳二亚胺。在一些实施方式中，所述缩合剂可以为4-二甲氨基吡啶。相对于所述式(125)所示化合物，所述缩合剂的用量(摩尔比)可以为1:1-10:1，例如可以为2:1-5:1。

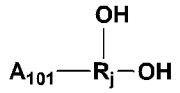
在一些实施方式中，所述碱可以是任意的无机碱，有机碱或者它们的结合。考虑溶解性和产物稳

定性，所述碱可以是例如三级胺。在一些实施方式中，所述三级胺可以为三乙胺或 N,N-二异丙基乙胺。所述三级胺与式（125）所示化合物的摩尔比可以为 1:1-20:1，例如可以为 3:1-10:1。

所述酯化反应条件包括反应温度为 0-100°C，反应时间为 8-48 小时，在一些实施方式中，所述酯化反应条件为反应温度为 10-40°C，反应时间为 20-30 小时。在上述反应完成后，还可根据需要，使所得到的式（123）所示的化合物进行任选的离子交换反应。所述离子交换作用是将式（123）所示的化合物转化为期望的羧酸或羧酸盐的形式，离子交换的方法为本领域技术人员所公知，可以使用合适的离子交换溶液和交换条件，得到具有 M^+ 阳离子的式（101）所示的化合物，在此不做详述。在一些实施方式中，所述离子交换反应使用三乙胺磷酸盐溶液进行，所述三乙胺磷酸盐溶液的浓度可以为 0.2-0.8M，在一些实施方式中，所述三乙胺磷酸盐溶液的浓度为 0.4-0.6M，相对于式（123）所示的化合物，所述三乙胺磷酸盐溶液的用量可以为 3-6L/mol，在进一步的实施方式中为 4-5L/mol。

可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（123）所示的化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（123）所示的化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300 目硅胶填料，先以含 0.1%三乙胺（v/v）的石油醚平衡柱子，随后以二氯甲烷:甲醇=20:1-10:1 梯度洗脱；反相纯化：C18、C8 反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（123）化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（125）所示的化合物可通过以下方法制备获得：该方法包括在有机溶剂中，在羟基保护反应条件下，以及缩合剂存在下，使式（126）所示的化合物与羟基保护剂接触，分离出式（125）所示的化合物：



式（126）

其中，A_{101}、R_j 各自的定义和可选择的范围如前所述。

所述缩合剂例如可以为 1-羟基苯并三唑（HOBt）、4-二甲氨基吡啶和/或二环己基碳二亚胺，在一些实施方式中，所述缩合剂为 4-二甲氨基吡啶。相对于所述式（126）所示化合物，所述缩合剂的用量可以为 0.01:1-1:1，例如可以为 0.1:1-0.5:1。

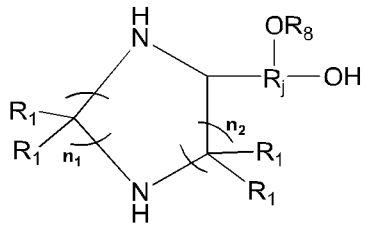
所述有机溶剂例如可以是有机碱溶剂。在一些实施方式中，所述有机碱溶剂可以为吡啶。相对于所述式（126）所示化合物，所述有机溶剂的用量可以为 2-20 L/mol，例如可以为 3-10 L/mol。

与前述类似地，所述羟基保护剂可以是本领域技术人员已知的各种羟基保护剂。在一些实施方式中，所述羟基保护试剂为三苯甲基氯、4-甲氧基三苯甲基氯、4,4'-双甲氧基三苯甲基氯和 4,4',4''-三甲氧基三苯甲基氯中的一种。在一些实施方式中，所述羟基保护剂例如可以为 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯（DMTrCl）。相对于所述式（126）化合物，所述羟基保护剂的用量（摩尔比）可以为 1:1-1.5:1，例如可以为 1.1:1-1.3:1。

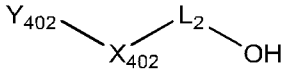
所述羟基保护反应条件包括反应温度为 0-100°C，反应时间为 5-30 小时，在一些实施方式中，所述羟基保护反应条件为反应温度为 0-40°C，反应时间为 8-20 小时。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（125）所示的化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（125）所示的化合物，例如，可使用如下色谱条件进行分离：正相纯化硅胶：200-300 目硅胶填料，先以含 0.1%三乙胺（v/v）的石油醚平衡柱子，随后以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.1-1:1:1:0.3 梯度洗脱；反相纯化：C18、C8 反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1 梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（125）所示的化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

在一些实施方式中，式（126）所示的化合物可以通过以下制备方法得到：该方法包括在有机溶剂中，在活化剂和三级胺存在下，在缩合反应条件下，将式（104）所示的化合物与式（127）所示的化合物接触，随后进行分离：



式（104）



式（127）

其中，R_j、R_8、R_1、n_1、n_2、Y_{402}、X_{402}、L_2各自的定义和可选择的范围如前所述。

所述有机溶剂可以为环氧类溶剂、醚类溶剂、卤代烷类溶剂、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二异丙基乙胺中的一种或多种。所述环氧类溶剂例如可以为二氧六环和/或四氢呋喃，所述醚类溶剂例如可以为乙醚和/或甲基叔丁基醚，所述卤代烷类溶剂例如可以为二氯甲烷、三氯甲烷和1,2-二氯乙烷中的一种或多种，在一些实施方式中，所述有机溶剂为二氯甲烷。相对于式（104）所示的化合物，有机溶剂用量可以为3-50L/mol，例如可以为5-20L/mol。

在一些实施方式中，L_2连接基团通过酰基与羟基相连接，此时，所述缩合反应为酰胺化反应，所述酰胺化反应条件包括：反应温度为0-100°C，反应时间为8-48小时，在一些实施方式中，所述酰胺化反应条件为反应温度10-40°C，反应时间为8-20小时。

在一些实施方式中，所述活化剂可以为3-二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐、2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐、二环己基碳二亚胺中的一种。例如可以为3-二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑4(3H)-酮（DEPBT）。所述活化剂与式（104）所示化合物的摩尔比可以可以为2:1-5:1，在一些实施方式中为2.1:1-3.5:1。

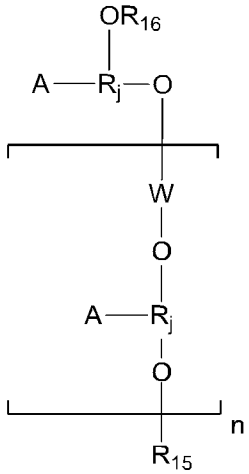
所述三级胺可以为N-甲基吗啉、三乙胺或N,N-二异丙基乙胺，在一些实施方式中为N,N-二异丙基乙胺（DIEA）；所述三级胺与式（104）所示化合物的摩尔比可以为2:1-10:1，在一些实施方式中为4:1-8:1。

本领域技术人员可通过已知的方法容易地制备获得式（127）所示的化合物，或者可商购获得特定结构的式（127）所示化合物。例如，当Y_{402}为Fmoc保护基、X402为NH、L_2为亚己酰基时，式（127）所示的化合物可以为可商购（例如购自北京偶合科技公司）获得的6-(((9H-芴-9-基）甲氧基）羰基）氨基）己酸。式（127）所示的化合物与式（104）所示的化合物的用量比可以为2:1-5:1，在一些实施方式中为2:1-3:1。获得式（104）化合物的方法与前述相同。

与上述类似地，可使用任何合适的分离方法从反应混合物中分离式（126）所示的化合物。在一些实施方式中，可通过蒸发除去溶剂、随后通过色谱方法分离式（126）所示的化合物。例如，可使用如下两种色谱条件进行分离：（1）正相纯化硅胶：200-300目硅胶填料，使用乙酸乙酯:石油醚:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.2至1:1:1:0.4梯度洗脱；以及（2）反相纯化：C18、C8反相填料，使用甲醇:乙腈=0.1:1-1:0.1梯度洗脱。在一些实施方式中，可以直接除去溶剂得到式（126）所示的化合物粗产品，该粗产品可以直接用于后续反应。

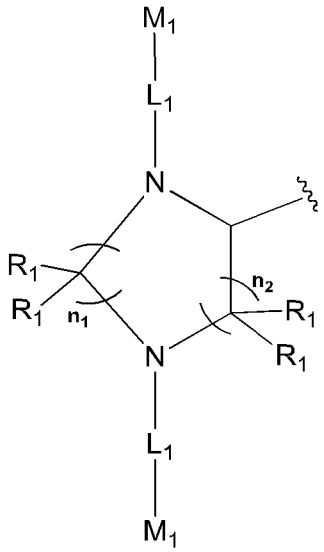
药物缀合物

在一些实施方式中，本公开提供了一种药物缀合物，该缀合物具有式（301）所示的结构：



式（301）

其中，式（301）中的A具有如式（302）所示的结构：



式（302）

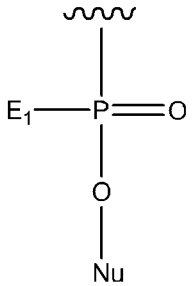
式中，R_j、R_1、L_1、M_1、n、n_1 和 n_2 各自的定义和可选择的范围如前所述，W 为连接基团。R_{16} 和 R_{15} 各自为 H 或活性药物基团，并且 R_{16} 和 R_{15} 中的至少一个为活性药物基团。

所述“活性药物基团”是指能够通过本文公开的化合物递送的活性药物分子形成的基团。在一些实施方式中，活性药物为期望递送到肝细胞的药物试剂或期望递送至肿瘤的药物试剂。

这些活性药物或者药物试剂可以是小分子药物、单抗类药物、核酸类药物。在一些实施方式中，所述活性药物为功能性寡核苷酸，特别是本文公开的那些，例如 siRNA。虽然，在本公开中活性药物大量使用了功能性寡核苷酸，如 siRNA，但是，本领域技术人员预知，其它活性药物，如小分子药物或者单抗药物也可以用与本公开提供的药物缀合物中作为药物活性成分。

所述活性药物可以是治疗和/或预防各种疾病的药物，例如，治疗和/或预防病毒感染引发的症状或疾病的药物，如治疗和/或预防病毒性肝炎如乙肝或丙肝的药物、治疗和/或预防埃博拉出血热的药物、治疗和/或预防冠状病毒病、特别是严重急性呼吸综合征（SARS）或 2019 冠状病毒病（COVID-19）的药物；治疗和/或预防代谢类疾病的药物，例如治疗和/或预防血脂代谢异常相关疾病的药物、治疗和/或预防非酒精性脂肪性肝炎的药物、治疗和/或预防激素代谢异常相关疾病的药物、治疗和/或预防糖代谢异常相关疾病的药物、治疗和/或预防尿酸代谢异常相关疾病的药物等；治疗和/或预防血液疾病的药物，例如治疗和/或预防凝血功能异常相关疾病的药物或治疗和/或预防血液组成异常相关疾病的药物；治疗和/或预防癌症或肿瘤的药物，例如治疗和/或预防上皮细胞癌（carcinoma）的药物、治疗和/或预防实体瘤（sarcoma）的药物、治疗和/或预防白血病的药物、治疗和/或预防淋巴瘤的药物、治疗和/或预防骨髓瘤的药物等；治疗和/或预防中枢神经系统相关疾病的药物，例如治疗和/或预防脊髓相关疾病的药物、治疗和/或预防脑相关疾病的药物等。

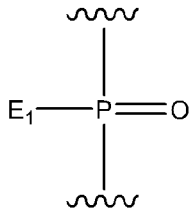
在一些实施方式中，R_{16} 和 R_{15} 中的至少一个具有式 A60 所示的结构。



式（A60）

其中，E_1 为 OH、SH 或 BH_2，Nu 为功能性寡核苷酸。

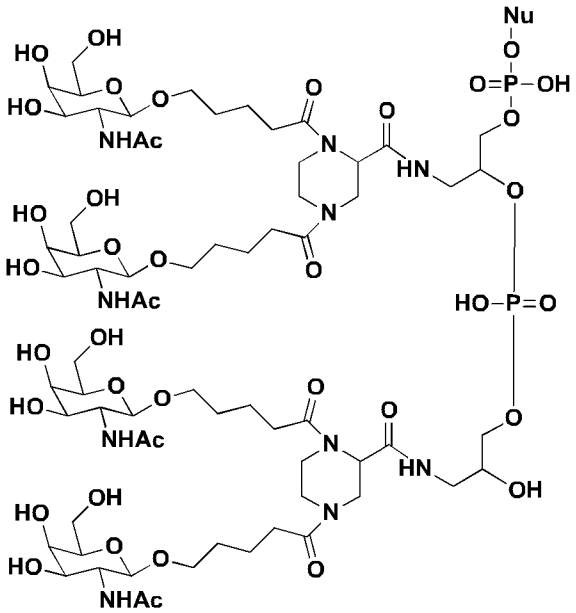
式（301）中，W 可以是任意的连接基团，只要能够起到连接作用。在一些实施方式中，W 可以是 W_0，例如，式（C1'）所示的基团。在一些实施方式中，W 可以是 W_0 水解得到的产物，如式（A61）所示的基团。



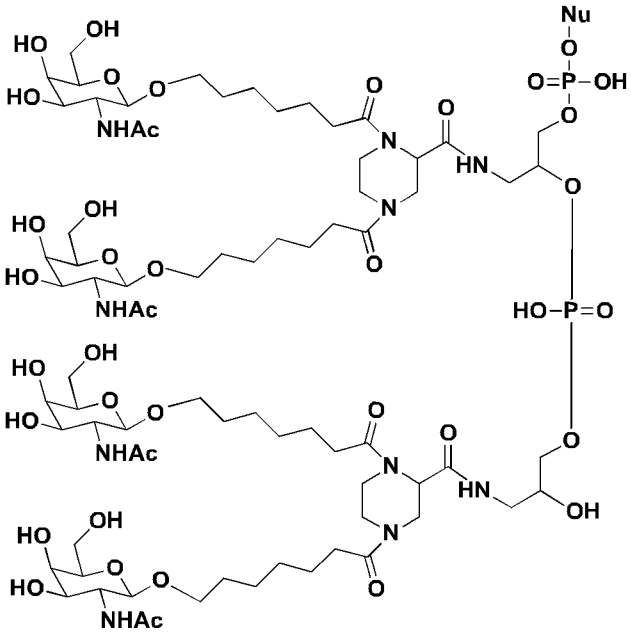
式（A61）

其中，E_1 为 OH、SH 或 BH_2，基于制备原料易获取性的考虑，可以为 OH 或 SH。

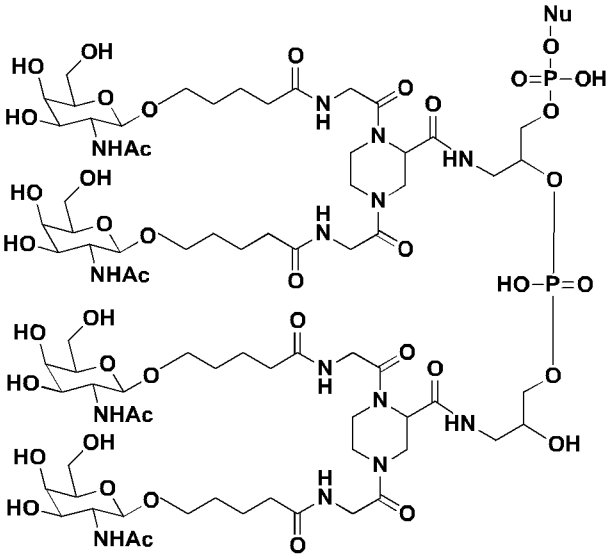
根据本公开的一些具体实施方式，式（101）所示的化合物具有式（303）、（304）、（305）、（306）、（307）、（308）、（309）、（310）或（311）所示的结构：



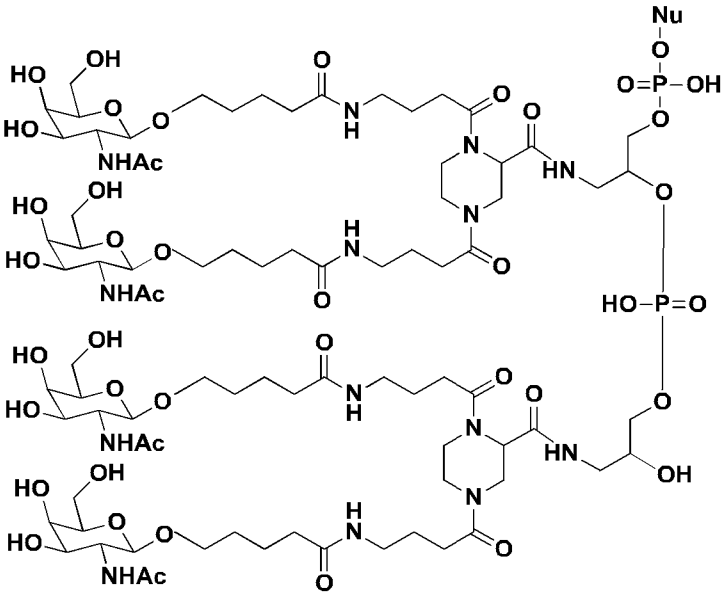
式（303）



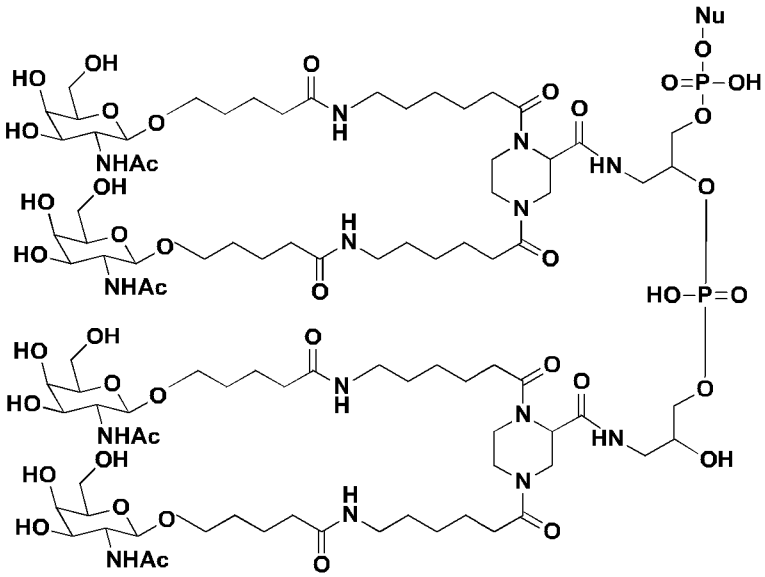
式（304）



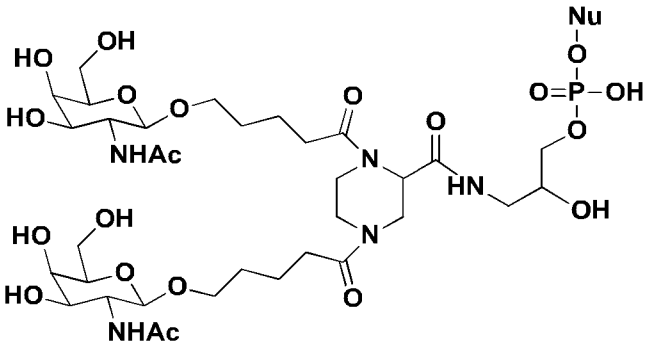
式（305）



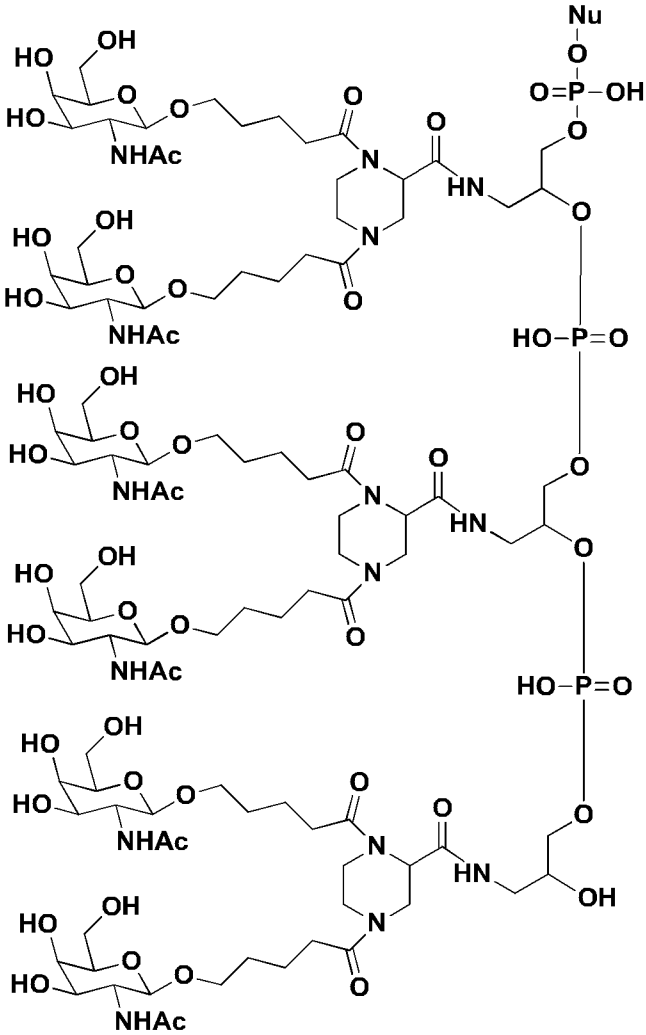
式（306）



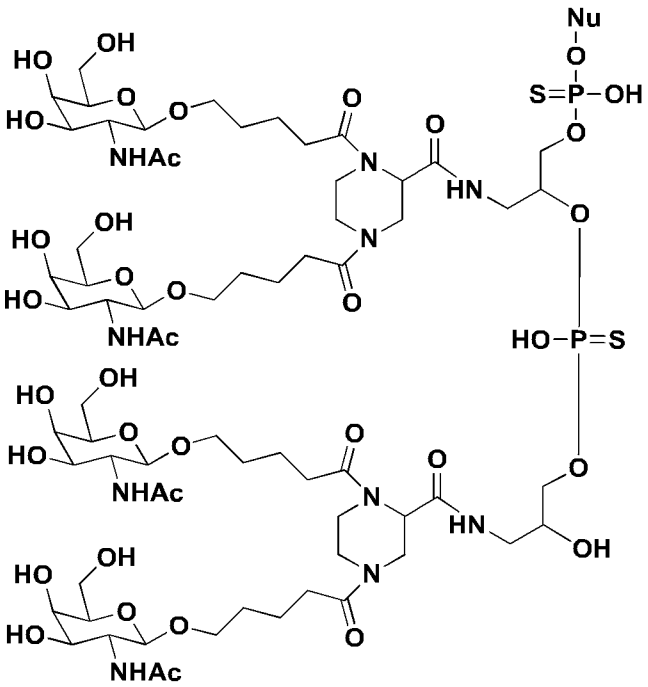
式（307）



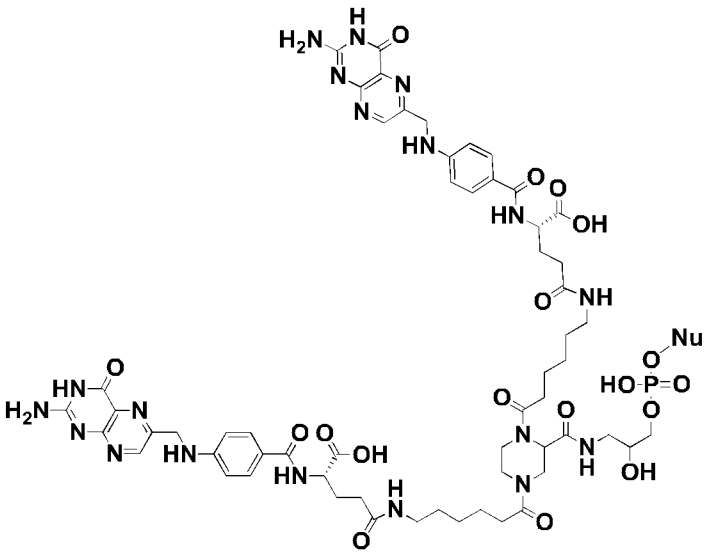
式（308）



式（309）



式（310）



式（311）

在一些实施方式中，本公开的药物缀合物中的活性药物是功能性寡核苷酸。功能性寡核苷酸是指这样的寡核苷酸：所述寡核苷酸能够通过与靶序列之间产生稳定且特异性的杂交，利用 RNA 激活（RNA activation，RNAa）、RNA 干扰（RNA interference，RNAi）、反义核酸技术、外显子跳跃（exon skipping）技术等原理，上调或下调靶基因的表达，或导致 mRNA 可变剪接。在一些方面，功能性寡核苷酸还可以是与靶蛋白之间产生稳定且特异性地结合的核酸结构。此外，本领域技术人员容易理解的是，多核苷酸（例如 mRNA 本身或其片段）也同样适用于与本公开提供的药物缀合物，实现肝靶向递送，从而调节 mRNA 转录出的蛋白质的表达。因此，在上下文中，“功能性寡核苷酸”的概念也可涵盖 mRNA 或其片段。

在一些实施方式中，所述功能性寡核苷酸能够与靶序列发生相互作用，从而影响靶序列分子的正常功能，如导致发生 mRNA 断裂或翻译阻遏或外显子跳跃引发 mRNA 可变剪接等。为了实现上述相互作用，所述功能性寡核苷酸可以大体上与靶序列的碱基互补。在一些实施方式中，所述功能性寡核苷酸可以与靶序列 80%以上的碱基互补，或者与靶序列 90%以上的碱基互补，也可以二者完全互补。在一些实施方式中，所述功能性寡核苷酸可以含有 1 个、2 个或 3 个不与靶序列互补的碱基。在一些实施方式中，所述功能性寡核苷酸包括脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、以及具有修饰的核苷酸。在一

些实施方式中，所述功能性寡核苷酸可以是单链的 DNA、RNA 或 DNA-RNA 嵌合体（chimera），或者是双链的 DNA、RNA 或 DNA-RNA 杂交体（hybrids）。

由此，适合的功能性寡核苷酸可以是小干扰 RNA（siRNA）、微小 RNA（microRNA）、抗微小 RNA（antimiR）、微小 RNA 拮抗剂（antagomir）、微小 RNA 模拟物（microRNA mimics）、诱饵寡核苷酸(decoy)、免疫刺激物(immune stimulatory)、G-四极子(G-quadruplex)、可变剪接体(splice altering)、单链 RNA（ssRNA）、反义核酸（antisense）、核酸适配体（Nucleic Acid Aptamer）、小激活 RNA（small activating RNA，saRNA）、茎环 RNA（stem-loop RNA）或 DNA 中的一种。在进一步的实施方式中，适合的功能性寡核苷酸可以是 WO2009082607A2、WO2009073809A2 或 WO2015006740A2 中公开的寡核苷酸，以引用的方式将其整体内容并入本文。

在一些实施方式中，所述活性药物为功能性寡核苷酸。本公开的药物缀合物可通过提高所述功能性寡核苷酸的靶向递送，进而通过所述功能性寡核苷酸在细胞中与靶序列发生相互作用，从而对细胞中基因的异常表达进行调控。在细胞中异常表达的基因可以是例如 ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV 等基因。在一些实施方式中，所述在肝细胞异常表达的基因是 HBV 基因、ANGPTL3 基因或 APOC3 基因。在本公开的上下文中，HBV 基因是指序列如 Genbank 注册号 NC_003977.1 所示的基因；ANGPTL3 基因是指 mRNA 序列如 Genbank 注册号 NM_014495.3 所示的基因；APOC3 基因是指 mRNA 序列如 Genbank 注册号 NM_000040.1 所示的基因。

在一些实施方式中，“靶序列”是靶 mRNA。在本公开的上下文中，“靶 mRNA”是指在细胞中异常表达的基因对应的 mRNA，它既可以是过量表达的基因对应的 mRNA，也可以是表达不足的基因对应的 mRNA，或者是外源性基因（如病毒基因）对应的 mRNA。由于大部分疾病源于 mRNA 的过量表达，因此，在本公开中，靶 mRNA 尤其指过量表达的基因对应的 mRNA。在一些实施方式中，靶 mRNA 也可以是自身虽然以正常水平表达，但需要调控其表达水平、以获得期望的其它治疗和/或预防效果的 mRNA。在本公开的一些实施方式中，相应于上述异常表达的基因，所述靶 mRNA 可以是 ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV、FXI、FXII、KNG、PNP、XO、PKK、PLG、C9、SARS、SARS-Cov-2、ACE-2 等基因对应的 mRNA。在一些实施方式中，所述靶 mRNA 可以是由对应 HBV 基因转录而得的 mRNA、或者 ANGPTL3 基因所对应的 mRNA、或者 APOC3 基因所对应的 mRNA。

式 A60 中的 P 原子可以通过磷酸酯键连接到寡核苷酸序列中任何可能的位置，例如，可以连接到寡核苷酸的任何一个核苷酸上。在一些实施方式中，本公开的药物缀合物中的功能性寡核苷酸是单链寡核苷酸（例如，单链 RNA 或者适配体），此时，式 A60 中的 P 原子可以连接到所述单链寡核苷酸的端部，所述单链寡核苷酸的端部指所述单链寡核苷酸中从一端起算的前 4 个核苷酸。在一些实施方式中，式 A60 中的 P 原子连接到所述单链寡核苷酸的末端。

在一些实施方式中，本公开的药物缀合物中的功能性寡核苷酸是双链寡核苷酸（例如，siRNA、microRNA 或者 DNA），所述双链寡核苷酸包含正义链和反义链，所述式 A59 中的 P 原子连接到所述双链寡核苷酸中正义链或反义链的端部，所述端部指所述正义链或所述反义链中从一端起算的前 4 个核苷酸，在一些实施方式中，式 A60 中的 P 原子连接到所述正义链或所述反义链的末端；更在一些实施方式中，式 A60 中的 P 原子连接到所述正义链的 3'末端。在式 A60 中的 P 原子连接至双链寡核苷酸的正义链的上述位置的情况下，本公开提供的药物缀合物进入细胞后，在解旋时，可以释放出单独的双链寡核苷酸反义链，以阻断靶 mRNA 翻译蛋白质的过程，抑制基因的表达。

式 A60 中的 P 原子可以连接到寡核苷酸序列中的核苷酸上任何可能的位置，例如，核苷酸的 5'位、核苷酸的 2'位、核苷酸的 3'位或核苷酸的碱基上。在一些实施方式中，式 A60 中的 P 原子可通过形成磷酸酯键而连接至所述寡核苷酸序列中的核苷酸的 2'位、3'位或 5'位。在一些具体实施方式中，式 A60 中的 P 原子连接在双链寡核苷酸序列中正义链 3'末端核苷酸的 3'羟基脱氢后形成的氧原子上（此时，可将该 P 原子及相应的磷酸酯基团视为归属于双链寡核苷酸中的 P 原子和磷酸酯基团），或者式 A60 中的 P 原子通过取代双链寡核苷酸序列中正义链中的一个核苷酸的 2'-羟基中的氢与核苷酸连接，或者式 A60 中的 P 原子通过取代双链寡核苷酸序列中正义链 5'末端核苷酸的 5'羟基中的氢与核苷酸连接。

下面的实施方式和实施例中，详细描述了本公开的药物缀合物中的活性药物为小干扰 RNA（siRNA）的情况。此时，本公开的药物缀合物为药物缀合物。在本文的上下文中，也将这些实施方式中的药物缀合物称为本公开的药物缀合物。但这仅是为了描述方便，本公开仅是以具体实施方式或实施例的形式说明本公开，而并不代表本公开的药物缀合物中的活性药物仅可以是寡核苷酸或者 siRNA。根据靶向位置和实际效果需要，用其它活性药物，例如，小分子药物，单抗或其它功能性寡核苷酸代替 siRNA 对于本领域技术人员而言是可以预知的。

本领域技术人员公知，siRNA 含有核苷酸基团作为基本结构单元，所述核苷酸基团具有磷酸基团、核糖基团和碱基，在此不再赘述。通常具有活性的，即功能性的 siRNA 的长度约为 12-40 个核苷酸，在一些实施方式中约为 15-30 个核苷酸，所述 siRNA 中的每个核苷酸可以独立地是修饰或未修饰的核苷酸，为了增加稳定性，所述 siRNA 中至少部分核苷酸是修饰的核苷酸。

本公开的发明人发现，下面的实施方式中所述的 siRNA 具有较高的活性和/或稳定性，因而可以作为本公开一些具体实施方式中的 siRNA。

按照本公开一些实施方式，本公开的药物缀合物中的 siRNA（以下，也称为本公开的 siRNA）中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，该 siRNA 含有正义链和反义链，其中，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 的长度均为 19 个核苷酸，并且至少部分地反向互补形成互补双链区，所述核苷酸序列 2 的至少一部分与第一段核苷酸序列互补，所述第一段核苷酸序列为靶 mRNA 中的一段核苷酸序列。

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 是指在 3mg/kg 的浓度下，能够抑制至少 50%乙型肝炎病毒基因表达、至少 50%血管生成素样蛋白 3 基因表达或者至少 50%载脂蛋白 C3 基因表达的 siRNA。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 与所述第一段核苷酸序列长度相等，且不超过 3 个核苷酸差异；所述核苷酸序列 2 与核苷酸序列 B 长度相等，且不超过 3 个核苷酸差异；所述核苷酸序列 B 为与所述第一段核苷酸序列完全反向互补的核苷酸序列。这些特定的核苷酸差异并不会显著降低药物缀合物的靶基因抑制能力，而这些包含特定核苷酸差异的药物缀合物也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 基本上反向互补、基本上完全反向互补或完全反向互补。

在本公开的一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 与所述第一段核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 2 与所述核苷酸序列 B 不多于 1 个核苷酸差异。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 2 与所述核苷酸序列 B 之间的核苷酸差异包括按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 2 上的第一个核苷酸 Z'位置上的差异。在一些实施方式中，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 上的最后一个核苷酸 Z 是与 Z'互补的核苷酸。

在一些实施方式中，所述正义链还含有核苷酸序列 3，所述反义链还含有核苷酸序列 4，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度各自独立地为 1-4 个核苷酸，并且所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的位置相对应。在一些实施方式中，核苷酸序列 4 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸至少部分互补，在一些实施方式中，核苷酸序列 4 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸完全互补。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 连接在所述核苷酸序列 1 的 5'末端，并且所述核苷酸序列 4 连接在所述核苷酸序列 2 的 3'末端。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 长度相等并且反向互补。因此，所述正义链和反义链的长度可以是 19-23 个核苷酸。在一个一些实施方式中，本公开的 siRNA 还含有核苷酸序列 5，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 至 3 个核苷酸，连接在所述反义链的 3'末端，从而构成所述反义链的 3'突出端；在一些实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 或 2 个核苷酸。这样，本公开的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比可以是 19/20、19/21、20/21、20/22、21/22、21/23、22/23、22/24、23/24 或 23/25。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 2 个核苷酸，并且按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 5 为连续的 2 个脱氧胸腺嘧啶核苷酸、连续的 2 个尿嘧啶核苷酸、或者与第三段核苷酸序列互补，所述第三段序列是指靶 mRNA 中与所述第一段核苷酸序列相邻、或者和所述第二段核苷酸序列相邻，并且长度与所述核苷酸序列 5 相等的核苷酸序列。在一些实施方式中，本公开的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比为 19/21 或 21/23，此时，本公开的 siRNA 具有更好的细胞 mRNA 沉默活性。

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 中的核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。在一些实施方式中，本公开的 siRNA 不含修饰的核苷酸；在一些实施方式中，本公开的 siRNA 具有修饰的核苷酸，含有这些修饰的核苷酸的 siRNA 具有较高的稳定性和靶 mRNA 沉默活性。

在一些实施方式中，缀合物中的 siRNA 至少含有 1 个修饰的核苷酸。在本公开的上下文中，所使用的术语“修饰的核苷酸”是指核苷酸的核糖基2'位羟基被其他基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物，或者核苷酸上的碱基是经修饰的碱基的核苷酸。含有这些修饰的核苷酸的药物缀合物具有较高的稳定性和靶 mRNA 沉默活性例如，可以选择 J.K. Watts, G.F. Deleavey, and M.J. Damha, Chemically modified siRNA: tools and applications. Drug Discov Today, 2008, 13(19-20): 842-55 中公开的修饰的核苷酸。在本公开的一些实施方式中，所述正义链或所述反义链中的至少一个核苷酸为修饰的核苷酸，和/或至少一个磷酸酯基为具有修饰基团的磷酸酯基。换句话说，所述正义链和所述反义链中至少一条单链的磷酸-糖骨架中的磷酸酯基和/或核糖基的至少一部分为具有修饰基团的磷酸酯基和/或具有修饰基团的核糖基。在本公开的一些实施方式中，所述正义链和/或所述反义链中的全部核苷酸均为修

饰的核苷酸。

在一些实施方式中，正义链和反义链中的每一个核苷酸独立地为氟代修饰的核苷酸或非氟代修饰的核苷酸。

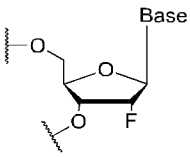
在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 中氟代修饰的核苷酸不多于 5 个；在一些实施方式中，所述核苷酸序列 2 中氟代修饰的核苷酸不多于 7 个。

在一些实施方式中，所述氟代修饰的核苷酸位于核苷酸序列 1 和核苷酸序列 2 中，所述核苷酸序列 1 中氟代修饰的核苷酸不多于 5 个，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 1 的第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸；所述核苷酸序列 2 中氟代修饰的核苷酸不多于 7 个，并且，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸。

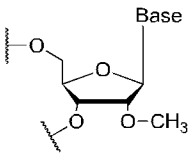
在一些具体的实施方式中，按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述正义链中，所述核苷酸序列 1 的第 7、8、9 位或者第 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14、16 位或者第 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为非氟代修饰的核苷酸。

氟代修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被氟取代形成的核苷酸，其具有以式（207）所示的结构。非氟代修饰的核苷酸指核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物。在一些实施方式中，每一个非氟代修饰的核苷酸独立地选自核苷酸的核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸或核苷酸类似物中的一种。核糖基 2'位的羟基被非氟基团取代形成的核苷酸是本领域技术人员所公知的，这些核苷酸可以选自 2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸中的一种。

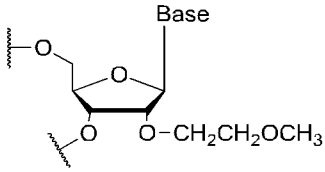
在一些实施方式中，2'-烷氧基修饰的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸（2'-OMe），如式（208）所示。2'-经取代的烷氧基修饰的核苷酸，例如可以是 2'-O-甲氧基乙基修饰的核苷酸（2'-MOE），如式（209）所示。2'-氨基修饰的核苷酸（2'-NH_2）如式（210）所示。2'-脱氧核苷酸（DNA）如式（211）所示。



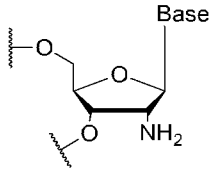
式（207）



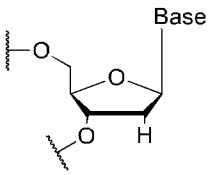
式（208）



式（209）



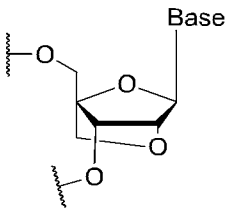
式（210）



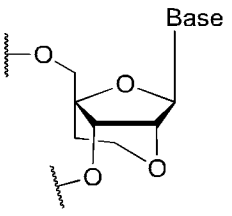
式（211）

核苷酸类似物指能够在核酸中代替核苷酸，但结构不同于腺嘌呤核糖核苷酸、鸟嘌呤核糖核苷酸、胞嘧啶核糖核苷酸、尿嘧啶核糖核苷酸或胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的基团，如异核苷酸、桥联的核苷酸（bridged nucleic acid，简称 BNA）或无环核苷酸。

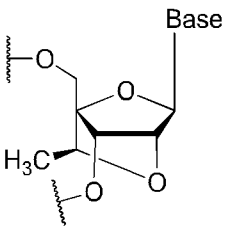
BNA 是指受约束的或不能接近的核苷酸。BNA 可以具有五元环、六元环、或七元环的具有"固定的"C3'-内切糖缩拢的桥联结构。通常将该桥掺入到该核糖的 2'-、4'-位处以提供一个 2', 4'-BNA 核苷酸，如 LNA、ENA、cET BNA 等，其中，LNA 如式（212）所示，ENA 如式（213）所示，cET BNA 如式（214）所示。



式（212）

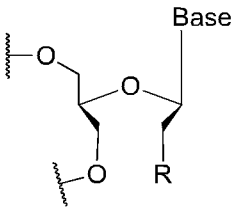


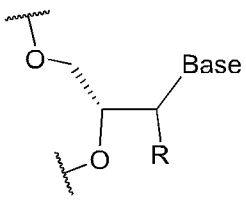
式（213）



式（214）

无环核苷酸是核苷酸的糖环被打开形成的一类核苷酸，如解锁核酸（UNA）或甘油核酸（GNA），其中，UNA 如式（215）所示，GNA 如式（216）所示。

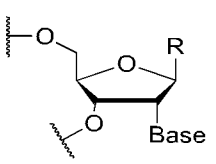


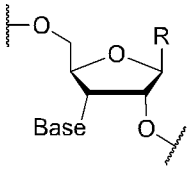


式（215） 式（216）

上述式（215）和式（216）中，R 选自 H、OH 或烷氧基（O-烷基）。

异核苷酸是指核苷酸中碱基在核糖环上的位置发生改变而形成的化合物，例如，碱基从核糖环的 1'-位移动至 2'-位或 3'-位而形成的化合物，如式（217）或（218）所示。





式（217） 式（218）

上述式（217）-式（218）化合物中，Base 表示碱基，例如 A、U、G、C 或 T；R 选自 H、OH、F 或者如上所述的非氟基团。

在一些实施方式中，核苷酸类似物选自异核苷酸、LNA、ENA、cET、UNA 和 GNA 中的一种。在一些实施方式中，每一个非氟代修饰的核苷酸均为甲氧基修饰的核苷酸，在上文和下文中，所述甲氧基修饰的核苷酸指核糖基的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的核苷酸。

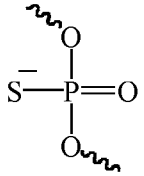
在上文及下文中，“氟代修饰的核苷酸”、“2'—氟修饰的核苷酸”、“核糖基团的 2'-羟基被氟取代的核苷酸”和“包含 2'-氟代核糖基的核苷酸”意义相同，均指核苷酸的 2'-羟基被氟取代而形成的具有如式（207）所示结构的化合物；“甲氧基修饰的核苷酸”、“2'-甲氧基修饰的核苷酸”、“核糖基团的 2'-羟基被甲氧基取代的核苷酸”和“包含 2'-甲氧基核糖基的核苷酸”意义相同，均指核苷酸核糖基团的 2'-羟基被甲氧基取代而形成的具有如式（208）所示结构的化合物。

在一些实施方式中，本公开的药物缀合物中的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA：按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述正义链中，所述核苷酸序列 1 的第 7、8、9 位或者第 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14、16 位或者第 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸。

在一些具体的实施方式中，本公开的 siRNA 是具有以下修饰的 siRNA：按照 5'末端到 3'末端的方向，所述 siRNA 的正义链中，所述核苷酸序列 1 的第 7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；或者按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述正义链中，所述核苷酸序列 1 的第 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、8、9、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；或者按照 5'末端到 3'末端的方向，在所述正义链中，所述核苷酸序列 1 的第 5、7、8、9 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述正义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；在所述反义链中，所述核苷酸序列 2 的第 2、6、14、16 位的核苷酸为氟代修饰的核苷酸，所述反义链中其余位置的核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸。

具有上述修饰的 siRNA 不仅成本低，而且可使血液中的核糖核酸酶不易切割核酸，由此增加核酸的稳定性，使核酸具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。

在一些实施方式中，所述核苷酸具有磷酸基团修饰。在本公开的上下文中，磷酸基团修饰可以是如式（201）所示的硫代磷酸（phosphorthioate）修饰，即，用一个硫原子取代作为相邻核苷酸间的键联的磷酸二酯键中的非桥接氧原子，从而以硫代磷酸二酯键替换磷酸二酯键。该修饰能稳定 siRNA 的结构，保持碱基配对的高特异性和高亲和力。



式（201）

在一些实施方式中，所述 siRNA 中，由以下核苷酸之间的连接所组成的组中的至少一个为硫代磷酸酯基连接：

所述正义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；

所述正义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；

所述正义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；

所述正义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；

所述反义链的 5'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；

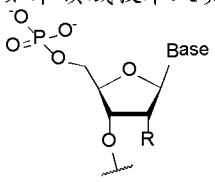
所述反义链的 5'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接；

所述反义链的 3'末端端部第 1 个核苷酸和第 2 个核苷酸之间的连接；以及

所述反义链的 3'末端端部第 2 个核苷酸和第 3 个核苷酸之间的连接。

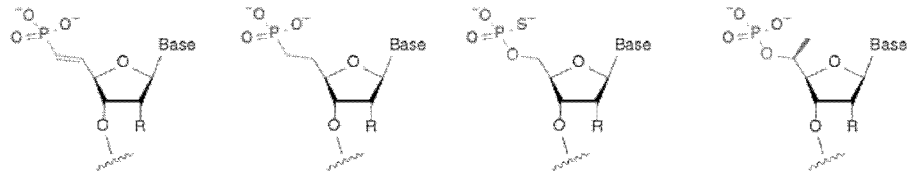
在一些实施方式中，所述 siRNA 分子的反义链序列 5'末端核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸。

如本领域技术人员所熟知的，5'-磷酸核苷酸可具有以式（202）所示的结构：



式（202）；

同时，常用的所述 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸的种类是本领域技术人员公知的，例如，Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48 中公开的如式（203）-（206）所示的 4 种核苷酸：



式（203） 式（204） 式（205） 式（206），

其中，R 表示选自于由 H、OH、F 和甲氧基所组成的组的基团；

Base 表示选自 A、U、C、G 或 T 的碱基。

在一些具体的实施方式中，5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸为式（203）所示的具有乙烯基磷酸酯（E-vinylphosphonate, E-VP）的核苷酸、式（202）所示的具有 5'-磷酸的核苷酸或式（205）所示的具有 5'-硫代磷酸修饰的核苷酸。

本公开的发明人意外发现，本公开所述药物缀合物在具有显著提高的血浆中稳定性的同时，还表现出并未明显降低的靶 mRNA 沉默活性以及优异的基因表达抑制效果。从而显示出，本公开的药物缀合物具有较高的体内递送效率。按照本公开的一些实施方式，本公开的药物缀合物为包含以下 siRNA 的药物缀合物，所述 siRNA 例如为表 1A-1H 中示出的 siRNA：

表 1 一些实施方式中的 siRNA 序列

表 1A

编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
siHBa1	S	CCUUGAGGCAUACUUCAAA	1
	AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU	2
siHBa2	S	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA	3
	AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG	4
siHBa1M1	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	5

	AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	6
siHBa1M2	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	7
	AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	8
siHBa2M1	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	9
	AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	10
siHBa2M2	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	11
	AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	12
siHBa1M1S	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	14
siHBa1M2S	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15
	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	16
siHBa2M1S	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	17
	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	18
siHBa2M2S	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	19
	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	20
siHBa1M1P1	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	21
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	22
siHBa1M2P1	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	23
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	24
siHBa2M1P1	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	25
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	26
siHBa2M2P1	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	27
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	28
siHBa1M1SP1	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	29
	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	30
siHBa1M2SP1	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	31
	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	32
siHBa2M1SP1	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	33
	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	34
siHBa2M2SP1	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	35
	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	36

表 1B

编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
siHBb1	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	37
	AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAGC	38
siHBb2	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	39
	AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAUU	40
siHBb1M1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	41
	AS	UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	42
siHBb2M1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	43
	AS	UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm	44
siHBb1M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	45

	AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	46
siHBb2M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	47
	AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm	48
siHBb1M1S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	49
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	50
siHBb2M1S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	51
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	52
siHBb1M2S	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	53
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	54
siHBb2M2S	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	55
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	56
siHBb1M1P1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	57
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	58
siHBb2M1P1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	59
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm	60
siHBb1M2P1	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	61
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	62
siHBb2M2P1	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	63
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm	64
siHBb1M1SP1	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	65
	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	66
siHBb2M1SP1	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	67
	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	68
siHBb1M2SP1	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	69
	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	70
siHBb2M2SP1	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	71
	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	72

表 1C

编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
siHBc1	S	UCUGUGCCUUCUCAUCUGA	73
	AS	UCAGAUGAGAAGGCACAGACG	74
siHBc1M1	S	UmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	75
	AS	UmCfAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	76
siHBc1M2	S	UmCmUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	77
	AS	UmCfAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	78
siHBc1M1S	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	79
	AS	UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	80
siHBc1M2S	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	81
	AS	UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	82
siHBc1M1P1	S	UmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	83
	AS	P1-UmCfAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	84
siHBc1M2P1	S	UmCmUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	85
	AS	P1-UmCfAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	86
siHBc1M1SP1	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	87
	AS	P1-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	88
siHBc1M2SP1	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	89
	AS	P1-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	90

表 1D

编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
siHBd1	S	CGUGUGCACUUCGCUUCAA	91
	AS	UUGAAGCGAAGUGCACACGGU	92
siHBd1M1	S	CmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	93
	AS	UmUfGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	94
siHBd1M2	S	CmGmUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	95
	AS	UmUfGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	96
siHBd1M1S	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	97
	AS	UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	98
siHBd1M2S	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	99
	AS	UmsUfsGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	100
siHBd1M1P1	S	CmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	101
	AS	P1-UmUfGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	102
siHBd1M2P1	S	CmGmUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	103
	AS	P1-UmUfGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	104
siHBd1M1SP1	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	105
	AS	P1-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	106
siHBd1M2SP1	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	107
	AS	P1-UmsUfsGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	108

表 1E

编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
siHBe1	S	GAAAGUAUGUCAACGAAUU	109
	AS	AAUUCGUUGACAUACUUUCUU	110
siHBe2	S	GAAAGUAUGUCAACGAAUU	111
	AS	AAUUCGUUGACAUACUUUCCA	112
siHBe3	S	GAAAGUAUGUCAACGAAUA	113
	AS	UAUUCGUUGACAUACUUUCUU	114
siHBe4	S	GAAAGUAUGUCAACGAAUA	115
	AS	UAUUCGUUGACAUACUUUCCA	116
siHBe5	S	UGGAAAGUAUGUCAACGAAUA	117
	AS	UAUUCGUUGACAUACUUUCCAUU	118
siHBe6	S	UGGAAAGUAUGUCAACGAAUA	119
	AS	UAUUCGUUGACAUACUUUCCAAU	120
siHBe7	S	UGGAAAGUAUGUCAACGAAUU	121
	AS	AAUUCGUUGACAUACUUUCCAUU	122
siHBe1M1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	123
	AS	AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	124
siHBe2M1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	125
	AS	AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	126
siHBe3M1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	127
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	128
siHBe4M1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	129
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	130
siHBe1M2	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	131

	AS	AmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	132
siHBe2M2	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	133
	AS	AmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	134
siHBe3M2	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	135
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	136
siHBe4M2	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	137
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	138
siHBe1M3	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	139
	AS	AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	140
siHBe2M3	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	141
	AS	AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	142
siHBe3M3	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	143
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	144
siHBe4M3	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	145
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	146
siHBe5M1	S	UmGmGmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	147
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmUmUm	148
siHBe6M2	S	UmGmGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	149
	AS	UmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmAmUm	150
SiHBe7M3	S	UmGmGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	151
	AS	AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmUmUm	152
siHBe1M1S	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	153
	AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	154
siHBe2M1S	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	155
	AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	156
siHBe3M1S	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	157
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	158
siHBe4M1S	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	159
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	160
siHBe1M2S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	161
	AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	162
siHBe2M2S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	163
	AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	164
siHBe3M2S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	165
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	166
siHBe4M2S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	167
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	168
siHBe1M3S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	169
	AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	170
siHBe2M3S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	171
	AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	172

siHBe3M3S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	173
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	174
siHBe4M3S	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	175
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	176
siHBe5M1S	S	UmsGmsGmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	177
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmUsmsUm	178
siHBe6M2S	S	UmsGmsGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	179
	AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmsAmsUm	180
SiHBe7M3S	S	UmsGmsGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	181
	AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmsUmsUm	182
siHBe1M1P1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	183
	AS	P1-AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	184
siHBe2M1P1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	185
	AS	P1-AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	186
siHBe3M1P1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	187
	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	188
siHBe4M1P1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	189
	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	190
siHBe1M2P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	191
	AS	P1-AmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	192
siHBe2M2P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	193
	AS	P1-AmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	194
siHBe3M2P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	195
	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	196
siHBe4M2P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	197
	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	198
siHBe1M3P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	199
	AS	P1-AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	200
siHBe2M3P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	201
	AS	P1-AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	202
siHBe3M3P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	203
	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	204
siHBe4M3P1	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	205
	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	206
siHBe5M1P1	S	UmGmGmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	207
	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmUmUm	208
siHBe6M2P1	S	UmGmGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	209

	AS	P1-UmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmAmUm	210
SiHBe7M3P1	S	UmGmGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	211
	AS	P1-AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmUmUm	212
siHBe1M1SP1	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	213
	AS	P1-AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	214
siHBe2M1SP1	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	215
	AS	P1-AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	216
siHBe3M1SP1	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	217
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	218
siHBe4M1SP1	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	219
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	220
siHBe1M2SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	221
	AS	P1-AmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	222
siHBe2M2SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	223
	AS	P1-AmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	224
siHBe3M2SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	225
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	226
siHBe4M2SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	227
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	228
siHBe1M3SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	229
	AS	P1-AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	230
siHBe2M3SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	231
	AS	P1-AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	232
siHBe3M3SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	233
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	234
siHBe4M3SP1	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	235
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	236
siHBe5M1SP1	S	UmsGmsGmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	237
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmsUmsUm	238
siHBe6M2SP1	S	UmsGmsGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	239
	AS	P1-UmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmsAmsUm	240
siHBe7M3SP1	S	UmsGmsGmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	241
	AS	P1-AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmsUmsUm	242

表 1F

编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
siAN1	S	CCAAGAGCACCAAGAACUA	243
	AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCU	244
siAN2	S	AGCCAAGAGCACCAAGAACUA	245
	AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCUUG	246
siAN1M1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	247
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	248
siAN2M1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	249
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	250
siAN1M2	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	251
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	252
siAN2M2	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	253
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	254
siAN1M3	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	255
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	256
siAN2M3	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	257
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	258
siAN1M1S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	259
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	260
siAN2M1S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	261
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	262
siAN1M2S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	263
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	264
siAN2M2S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	265
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	266
siAN1M3S	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	267
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	268
siAN2M3S	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	269
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	270
siAN1M1P1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	271
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	272
siAN2M1P1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	273
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	274
siAN1M2P1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	275
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	276
siAN2M2P1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	277
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	278
siAN1M3P1	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	279

	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmU m	280
siAN2M3P1	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	281
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmU mUmGm	282
siAN1M1SP 1	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	283
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCms Um	284
siAN2M1SP 1	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	285
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmU msUmsGm	286
siAN1M2SP 1	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	287
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsC msUm	288
siAN2M2SP 1	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	289
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCm UmsUmsGm	290
siAN1M3SP 1	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	291
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsC msUm	292
siAN2M3SP 1	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmA m	293
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCm UmsUmsGm	294

表 1G

编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
siAP1	S	CAAUAAAGCUGGACAAGAA	295
	AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG	296
siAP2	S	CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA	297
	AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG	298
siAP1M1	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	299
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	300
siAP2M1	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	301
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	302
siAP1M2	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	303
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	304
siAP2M2	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	305
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	306
siAP1M1S	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	307
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	308
siAP2M1S	S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	309
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	310
siAP1M2S	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	311
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	312
siAP2M2S	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	313
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	314
siAP1M1P1	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	315

	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	316
siAP2M1P1	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	317
	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	318
siAP1M2P1	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	319
	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	320
siAP2M2P1	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	321
	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	322
siAP1M1SP1	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	323
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	324
siAP2M1SP1	S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	325
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	326
siAP1M2SP1	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	327
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	328
siAP2M2SP1	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	329
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	330

表 1H

编号		序列方向 5' - 3'	SEQ ID NO
FC-siSTAT1	S	CmsUmsAmGmAmAmAfAfCfUmGmGmAmUmAmAmCmGmUm	719
	AS	AmsCfsGmUmUmAfUmCmCmAmGmUmUmUfUmCfUmAmGmsCmsCm	720

其中，S 表示正义链，AS 表示反义链；大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为 2'-氟修饰的核苷酸；小写字母 s 表示与该字母 s 左右相邻的两个核苷酸之间的连接为硫代磷酸酯基连接；P1 表示该 P1 右侧相邻的一个核苷酸为 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸类似物修饰的核苷酸，在一些实施方式中为乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸（以下实施例中以 VP 表示）、5'-磷酸修饰的核苷酸（以下实施例中以 P 表示）或硫代磷酸酯修饰的核苷酸（以下实施例中以 Ps 表示）。

本领域技术人员清楚知晓的是，可以通过使用具有相应修饰的核苷单体来将修饰的核苷酸基团引入本公开所述的 siRNA 中，制备具有相应修饰的核苷单体的方法及将修饰的核苷酸基团引入 siRNA 的方法也是本领域技术人员所熟知的。所有修饰的核苷单体均可以商购得到或者采用已知方法制备得到。

药物缀合物的制备

可以采用任意合理的合成路线制备本公开的药物缀合物。下面以活性药物为寡核苷酸为例，说明了本公开提供的药物缀合物的制备方法，本领域技术人员可以预知，其它活性药物也可以参照下述方法制备，只不过省去了核苷酸序列的制备过程，或者，可以根据具体的活性药物的结构特点，在下述方法的基础之上进行相应的改变。

在一些实施方式中，所述药物缀合物的制备方法包括：在亚磷酰胺固相合成的条件下，分别按照所述功能性寡核苷酸的核苷酸种类和顺序，按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接，每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应；所述方法还包括用式（111）所示化合物代替固相载体，将第一个核苷酸与式（111）所示化合物连接。或者，所述方法还包括形成连接在固相载体上的核苷酸序列后，在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式（101）所示的化合物与该连接在固相载体上的核苷酸序列接触，并进行盖帽反应，再进行氧化、硫化或硼氢化反应。可选地，再进行 n 次（n 的定义与式（301）中相同）与式（101）化合物的接触，每次均是对前一步骤得到的产物进行脱保护，随后与式（101）化合物相接触，进行盖帽反应，并进行氧化、硫化或硼氢化反应。

在一些实施方式中，该方法还包含脱除保护基并与固相载体切割的步骤、分离纯化步骤。

在一些实施方式中，所述寡核苷酸为双链寡核苷酸，所述药物缀合物的制备方法包括在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式（111）所示的化合物与正义链或反义链的 3'端的第一个核苷单体接触，使式（111）所示的化合物连接上序列中第一个核苷酸，在亚磷酰胺固相合成的条件下，按照期望的正义链或反义链核苷酸种类和顺序，按照 3'到 5'的方向将核苷单体依次连接，合成寡核苷酸的正义链或反义链；其中，与第一个核苷单体连接前，式（111）所示化合物经过脱保护；每个核苷单体的连

接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应，得到核酸的正义链或反义链；在亚磷酰胺固相合成的条件下，按照反义链或正义链核苷酸种类和顺序，按照3'到5'的方向将核苷单体依次连接，合成核酸的反义链或正义链；每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应；脱除保护基并与固相载体切割，分离纯化获得核酸的正义链和反义链，退火。

在一些实施方式中，所述寡核苷酸为双链寡核苷酸，所述药物缀合物的制备方法包括按照该双链寡核苷酸中正义链或反义链的核苷酸种类和顺序，按照3'到5'的方向将核苷单体依次连接，合成正义链和反义链，每个核苷单体的连接包括脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化四步反应，得到连接在固相载体上的正义链和连接在固相载体上的反义链；脱除连接在固相载体上的正义链和连接在固相载体上的反义链上末端核苷的羟基保护基团，在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将式（101）所示的化合物与连接在固相载体上的正义链或连接在固相载体上的反义链接触，从而将式（101）化合物连接至正义链或反义链；脱除保护基并与固相载体切割，分别分离纯化，获得寡核苷酸的反义链或正义链，退火。

在一个具体实施方式中，式A59中的P原子连接至siRNA中的正义链的3'末端，本公开的药物缀合物的制备方法包括：

（1）脱除式（111）所示化合物中的羟基保护基团R_8；在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将该化合物与核苷单体接触，得到通过本公开的化合物连接至固相载体的核苷单体；

（2）以该通过本公开的化合物连接至固相载体的核苷单体起始，按照3'-5'的方向通过亚磷酰胺固相合成方法合成siRNA的正义链；

（3）通过亚磷酰胺固相合成方法，合成siRNA的反义链；

（4）分离出siRNA的正义链和反义链并退火，获得本公开的药物缀合物。

其中，在步骤（1）中，脱除式（111）所示的化合物中的保护基团R_8的方法包括在脱保护条件下，将式（111）所示化合物与脱保护试剂接触。脱保护条件包括温度为0-50°C，在一些实施方式中为15-35°C，反应时间为30-300秒，在一些实施方式中为50-150秒，脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一种或多种，在一些实施方式中为二氯乙酸。脱保护试剂与式(111)所示化合物的摩尔比可以为10:1-1000:1，在一些实施方式中为50:1-500:1。

所述偶联反应条件和偶联试剂可使用任何能够实现上述偶联反应的条件和试剂。出于简化工艺的考虑，可在一些实施方式中使用与所采用的固相合成方法中的偶联反应相同的条件与试剂。

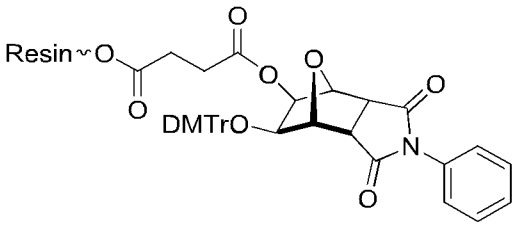
一般来说，所述偶联反应的条件包括反应温度为0-50°C，在一些实施方式中为15-35°C。式(321)化合物与核苷单体的摩尔比可以为1:1-1:50，在一些实施方式中为1:2-1:5；式（321）化合物和偶联试剂的摩尔比为1:1-1:50，在一些实施方式中为1:3-1:10。反应时间可以为200-3000秒，在一些实施方式中为500-1500秒。偶联试剂选自1H-四氮唑、5-乙硫基1H-四氮唑、5-苄硫基1H-四氮唑中的一种或多种，在一些实施方式中为5-乙硫基1H-四氮唑。所述偶联反应可在有机溶剂中进行，所述有机溶剂选自无水乙腈、无水DMF、无水二氯甲烷中的一种或多种，在一些实施方式中为无水乙腈。相对于式（321）化合物，所述有机溶剂的用量可以为3-50L/mol，在一些实施方式中为5-20L/mol。

在步骤（2）中，通过亚磷酰胺核酸固相合成的方法，利用上述步骤制备的通过本公开的化合物连接至固相载体的核苷单体起始，按照3'-5'的方向合成药物缀合物的正义链S。此时，式（101）所示的化合物连接至所得到的正义链的3'末端。

步骤（2）和（3）中所述固相合成的其它条件，包括核苷单体脱保护条件，脱保护试剂种类和用量，偶联反应条件，偶联试剂的种类和用量，盖帽反应的条件，盖帽试剂的种类和用量，氧化反应条件，氧化试剂种类和用量，硫化反应条件，硫化试剂和用量采用本领域中常规使用的各种试剂、用量和条件。

本领域技术人员容易理解的是，由于与亚磷酰胺固相合成方法中所使用的核苷单体类似地，由式（101）所示的化合物同样具有亚磷酰胺基团和羟基保护基团，因此可将式（101）化合物视为一个核苷单体，应用本领域公知的亚磷酰胺固相合成方法，通过脱保护、偶联、盖帽、氧化或硫化反应，将其连接至固定相，并可随后继续连接另一式（101）化合物或者另一核苷单体，直至获得目标产物的核苷酸序列。相应地，以下涉及式（101）所示的化合物的反应的描述中，当提及“脱保护”、“偶联”、“盖帽”、“氧化”、“硫化”等反应时，应当理解为本领域公知的亚磷酰胺核酸固相合成方法中所涉及的反应条件和试剂也同样适用于这些反应。示例性的反应条件和试剂如下所述。

上述方法中，固相载体可以是本领域中公知的可用于核酸固相合成的固相载体，例如，可以是市售的通用固相载体（NittoPhase®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support，Kinovate Life Sciences公司，结构如式B80所示）：



(B80)。

在一些实施方式中，上述方法中所述固相合成可使用如下条件:

脱保护条件包括温度为 0-50°C，例如为 15-35°C；反应时间为 30-300 秒，例如为 50-150 秒。脱保护试剂可以选自三氟乙酸、三氯乙酸、二氯乙酸、一氯乙酸中的一种或多种，在一些实施方式中，脱保护试剂为二氯乙酸。脱保护试剂与固定相上的 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基的的摩尔比可以为 2:1-100:1，例如为 3:1-50:1。通过进行所述脱保护，在所述固相载体表面上、连接在固相载体上的式（101）所示的化合物上或通过式（101）所示的化合物与固相载体连接的核酸序列的末端核苷上获得具有反应活性的游离羟基，从而便于进行下一步的偶联反应。

偶联反应条件包括温度为 0-50°C，例如为 15-35°C。固相载体上连接的核酸序列（在固相合成初期，列入计算的是上述脱保护步骤中形成的具有反应活性的游离羟基）与核苷单体或者式（101）化合物的摩尔比可以为 1:1-1:50，例如为 1:5-1:15。固相载体上连接的核酸序列和偶联试剂的摩尔比可以为 1:1-1:100，例如为 1:50-1:80。反应时间可以为 200-3000 秒，例如为 500-1500 秒。偶联试剂选自 1H-四氮唑、5-乙硫基 1H-四氮唑、5-苄硫基 1H-四氮唑中的一种或多种，例如为 5-乙硫基 1H-四氮唑。所述偶联反应可在有机溶剂中进行，所述有机溶剂选自无水乙腈、无水 DMF、无水二氯甲烷中的一种或多种，例如为无水乙腈。相对于式（101）化合物，所述有机溶剂的用量可以为 3-50L/mol，例如可以为 5-20L/mol。通过进行该偶联反应，脱保护反应中形成的游离羟基与核苷单体或式（101）化合物上的亚磷酰胺基团反应形成亚磷酸酯连接。

盖帽反应的作用在于，通过过量盖帽试剂将前述偶联反应中尚未反应完全的活性反应官能团钝化，以避免在后续反应中产生不必要的副产物。盖帽反应条件包括温度可以为 0-50°C，例如为 15-35°C，反应时间可以为 5-500 秒，例如为 10-100 秒，所述盖帽反应在盖帽试剂存在下进行。盖帽试剂可以使用 siRNA 固相合成中所使用的盖帽试剂，siRNA 固相合成中所使用的盖帽试剂为本领域技术人员所公知。在一些实施方式中，所述盖帽试剂例如可以为盖帽试剂 A（capA）和盖帽试剂 B（capB），其中，盖帽试剂 A 为 N-基甲基咪唑，在一些实施方式中，N-基甲基咪唑以 N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液形式提供，其中，吡啶与乙腈的体积比为 1:10-1:1，例如为 1:3-1:1，吡啶与乙腈的总体积与 N-甲基咪唑的体积为 1:1-10:1，例如为 3:1-7:1。所述盖帽试剂 B 为乙酸酐，在一些实施方式中，乙酸酐以乙酸酐的乙腈溶液形式提供，其中，乙酸酐和乙腈的体积为 1:1-1:10，例如为 1:2-1:6。在所述步骤（i）和（ii）中，所述 N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液的体积与式（101）化合物和固相载体的质量和之比可以为 5ml/g-50ml/g，例如为 15ml/g-30ml/g。所述乙酸酐的乙腈溶液的体积与式（101）化合物和固相载体的质量和之比可以为 0.5ml/g-10ml/g，例如为 1ml/g-5ml/g。在一些实施方式中，盖帽试剂使用等摩尔量的乙酸酐与 N-甲基咪唑。在所述步骤（iii）和（iv）中，盖帽试剂的总量与固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 1:100-100:1，例如为 1:10-10:1。在盖帽试剂使用等摩尔量的乙酸酐与 N-甲基咪唑的情况下，乙酸酐、N-甲基咪唑以及固相载体上连接的核酸序列的摩尔比可以为 1:1:10-10:10:1，例如为 1:1:2-2:2:1。

当序列中目标位置处的相邻核苷之间为磷酸酯键连接时，经偶联反应，连接上较后一个核苷单体之后，在氧化反应条件、氧化试剂存在下进行氧化反应。氧化反应条件包括温度为 0-50°C，例如可以为 15-35°C，反应时间可以为 1-100 秒，例如可以为 5-50 秒，氧化试剂例如可以为碘（在一些实施方式中，以碘水的形式提供）。氧化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比可以为 1:1-100:1，例如可以为 5:1-50:1。在一些具体的实施方式中，所述氧化反应在四氢呋喃:水:吡啶=3:1:1-1:1:3 的混合溶剂中进行。

当序列中目标位置处的相邻核苷之间为硫代磷酸酯键连接时，经偶联反应，连接上较后一个核苷单体之后，在硫化反应条件、硫化试剂存在下进行硫化反应。硫化反应条件包括温度为 0-50°C，例如可以为 15-35°C，反应时间可以为 50-2000 秒，例如可以为 100-1000 秒，硫化试剂例如可以为氢化黄原素。硫化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比可以为 10:1–1000:1，例如可以为 10:1-500:1。在一些具体的实施方式中，所述硫化反应在乙腈:吡啶=1:3-3:1 的混合溶剂中进行。通过所述氧化/硫化反应，将前述获得的亚磷酸酯连接氧化为稳定的磷酸酯或硫代磷酸酯连接，完成本次亚磷酰胺固相合成循环。

按照本公开提供的方法，在将所有核苷单体连接之后，退火之前，该方法还包括分离出 siRNA

的正义链和反义链。分离的方法为本领域技术人员所公知，一般包括将合成得到的核苷酸序列从固相载体上切割下来，脱除碱基上、磷酸基上和配体上的保护基团，纯化和脱盐。

将合成得到的核苷酸序列从固相载体上切割下来，并脱除碱基上、磷酸基上和配体上的保护基团可按照 siRNA 合成中常规的切割和脱保护方法进行。例如，将得到的连接有固相载体的核苷酸序列与浓氨水接触；在脱保护的过程中，A51-A59 基团中的保护基团被脱除，A_0 转化为 A，同时连接本公开化合物的核苷酸序列从固相载体上切割下来。其中，所述浓氨水是指 25-30 重量%的氨水，浓氨水的用量与目标 siRNA 序列相比为 0.2ml/μmol-0.8ml/μmol。

在所合成的核苷酸序列上存在至少一个 2'-O-TBDMS 保护时，所述方法还包括将脱除了固相载体的核苷酸序列与三乙胺三氢氟酸盐接触，以脱除该 2'-O-TBDMS 保护。此时，所得到的目标 siRNA 序列中具有游离的 2'-羟基的相应核苷。三乙胺三氢氟酸盐纯品的用量与目标 siRNA 序列相比可以为 0.4ml/μmol-1.0ml/μmol。

纯化和脱盐的方法是本领域技术人员熟知的。例如，可利用制备型离子色谱纯化柱，通过 NaBr 或 NaCl 的梯度洗脱，完成核酸的纯化；产品收集合并后，可采用反相色谱纯化柱进行脱盐。

在合成过程中，可随时对核酸序列的纯度和分子量进行检测，从而更好地把控合成质量，检测的方法为本领域技术人员所公知。例如，可通过离子交换色谱检测核酸纯度，并通过液质联用色谱测定分子量。

退火的方法也是本领域技术人员熟知的。例如，可将所合成的正义链（S 链）与反义链（AS 链）以等摩尔比混合在注射用水中加热至 70-95°C，随后室温冷却，使其通过氢键形成双链结构。这样即可得到本公开的药物缀合物。

在获得本公开的药物缀合物后，在一些实施方式中，还可利用例如液质联用色谱等方法，通过分子量检测等方式对所合成的药物缀合物进行表征，确定所合成的药物缀合物为目标设计的药物缀合物，且所合成的寡核苷酸的序列与欲合成的寡核苷酸的序列相符，例如与上述表 1 中所列的序列相符。

在一些实施方式中，本公开的药物缀合物中的 siRNA 可以是以下第一种 siRNA。

所述第一种 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，该 siRNA 含有正义链和反义链，其中，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 1 与 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异，且所述核苷酸序列 2 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列长度相等，且不多于 3 个核苷酸差异：

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3'（SEQ ID NO: 717）；

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3'（SEQ ID NO: 718）；

其中，Z 为 A，Z'为 U，所述核苷酸序列 1 中包含位置对应于 Z 的核苷酸 Z_A，所述核苷酸序列 2 中，包含位置对应于 Z'的核苷酸 Z'_B，所述 Z'_B 是所述反义链 5'末端的第一个核苷酸。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 与 SEQ ID NO: 717 所示的核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异，和/或所述核苷酸序列 2 与 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列不多于 1 个核苷酸差异。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 2 与 SEQ ID NO: 718 所示的核苷酸序列之间的核苷酸差异包括 Z'_B 位置处的差异，且 Z'_B 选自 A、C 或 G；在一些实施方式中，所述核苷酸差异为 Z'_B 位置处的差异，Z'_B 选自 A、C 或 G，并且 Z_A 是与 Z'_B 互补的核苷酸。这些核苷酸差异并不会显著降低药物缀合物的靶基因抑制能力，而这些包含特定核苷酸差异的药物缀合物也在本公开的保护范围之内。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 基本上反向互补、基本上完全反向互补或完全反向互补。

在一些实施方式中，所述正义链还含有核苷酸序列 3，所述反义链还含有核苷酸序列 4，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度各自独立地为 1-4 个核苷酸，并且所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的位置相对应。在一些实施方式中，核苷酸序列 4 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸至少部分互补，在一些实施方式中，核苷酸序列 4 与靶 mRNA 相应位置的核苷酸完全互补。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 连接在所述核苷酸序列 1 的 5'末端，并且所述核苷酸序列 4 连接在所述核苷酸序列 2 的 3'末端。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 长度相等并且反向互补。因此，所述正义链和反义链的长度可以是 19-23 个核苷酸。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 1 个核苷酸，所述核苷酸序列 3 的碱基为 A，此时，所述双链区的长度可以是 20 个核苷酸，即本公开的 siRNA 正义链和反义链的长度之比可以是 20/20；或者，

所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 2 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，核苷酸序列 3 的碱基依次为 G 和 A，此时，所述双链区的长度可以是 21 个核苷酸，即本公开的 siRNA 正义链和反义链的长度之比可以是 21/21；或者，

所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 3 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 C、G 和 A，此时，所述双链区的长度可以是 22 个核苷酸，即本公开的 siRNA 正义链和反义链的长度之比可以是 22/22；或者，

所述核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度均为 4 个核苷酸，按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 C、C、G 和 A，此时，所述双链区的长度可以是 23 个核苷酸，即本公开的 siRNA 正义链和反义链的长度之比可以是 23/23。

在一些具体的实施方式中，所述核苷酸序列 3 的长度为 2 个核苷酸，并且按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 3 的碱基依次为 G 和 A。

在一些具体的实施方式中，上述各组中，核苷酸序列 3 和所述核苷酸序列 4 的长度相同，并且完全反向互补，因此，给出了核苷酸序列 3 的碱基，核苷酸序列 4 的碱基也就确定了。

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 还含有核苷酸序列 5，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 至 3 个核苷酸，连接在所述反义链的 3'末端，从而构成所述反义链的 3'突出端。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 1 或 2 个核苷酸。这样，本公开的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比可以是 19/20、19/21、20/21、20/22、21/22、21/23、22/23、22/24、23/24 或 23/25。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 5 的长度为 2 个核苷酸，并且按照 5'末端到 3'末端的方向，所述核苷酸序列 5 为连续的 2 个胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸、连续的 2 个尿嘧啶核糖核苷酸、或者与靶 mRNA 互补的两个核苷酸。因此，在一些实施方式中，本公开的 siRNA 的正义链和反义链的长度之比为 19/21 或 21/23，此时，本公开的 siRNA 具有更好的 HBV mRNA 沉默活性和/或有效地降低表面抗原 HBsAg 表达的活性。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 1 含有如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，且所述核苷酸序列 2 含有如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列：

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3'（SEQ ID NO: 1），

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGGUU -3'（SEQ ID NO: 2）；

在一些实施方式中，本公开的 siRNA 为 siHBa1 或 siHBa2：

siHBa1

正义链：5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3'（SEQ ID NO: 1），

反义链：5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGGUU -3'（SEQ ID NO: 2），

siHBa2

正义链：5'- GACCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3'（SEQ ID NO: 3），

反义链：5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG -3'（SEQ ID NO: 4），

其中，Z 为 A，Z'为 U。

如前所述，所述第一种 siRNA 中的核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸。在一些实施方式中，所述第一种 siRNA 中的核苷酸为未经修饰的核苷酸；在一些实施方式中，所述第一种 siRNA 中的部分或全部核苷酸为修饰的核苷酸，核苷酸基团上的这些修饰不会导致本公开的药物缀合物抑制 HBV 基因表达的功能明显削弱或丧失。在一些实施方式中，如前所述地对所述第一种 siRNA 中的核苷酸进行修饰。在一些实施方式中，所述第一种 siRNA 可以是表 1A 中列出的任何一种 siRNA。

本公开的药物缀合物的应用

本公开的药物缀合物具有优异的靶向特异性，因此能够高效地将所缀合的功能性寡核苷酸递送至目标器官或组织，从而有效地对细胞内基因表达进行调控。从而，本公开的药物缀合物具有广泛的应用前景。

按照本公开一种实施方式，本公开提供了本公开的药物缀合物在制备用于治疗和/或预防由细胞中基因的表达引起的病理状况或疾病的药物中的用途。所述基因可以是细胞中表达的内源性基因，也可以是在细胞中繁殖的病原体基因。在一些实施方式中，所述基因选自 ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV 等基因。在一些实施方式中，所述基因选自乙型肝炎病毒基因、血管生成素样蛋白 3 基因或者载脂蛋白 C3 基因。相应地，所述疾病选自慢性肝病、肝炎、肝纤维化疾病、肝增生性疾病和血脂异常。在一些实施方式中，所述血脂异常为高胆固醇血症、高甘油三酯血症或动脉粥样硬化。在一些实施方式中，所述基因选自信号转导及转录激活蛋白 3（Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3）。

按照本公开的一种实施方式，本公开提供了一种治疗由细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的方法，该方法包括向患者给予本公开的药物缀合物。在一些实施方式中，所述基因选自 ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV 等基因。在一些实施方式中，所述基因选自乙型肝炎病毒基因、血管生成素样蛋白 3 基因、载脂蛋白 C3 基因或者信号转导及转录激活蛋白 3（STAT3）。相应地，所述疾病选自慢性肝病、肝炎、肝纤维化疾病、

肝增生性疾病、血脂异常和肿瘤。在一些实施方式中，所述血脂异常为高胆固醇血症、高甘油三酯血症或动脉粥样硬化。

按照本公开另外一种实施方式，本公开提供了一种调控细胞中基因表达的方法，所述调控包括抑制或增强所述基因的表达，该方法包括将本公开的药物缀合物与所述细胞接触。

通过将本公开的药物缀合物给予有需要的患者，可以通过对基因表达进行调控的机制达到预防和/或治疗由细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的目的。因此，本公开的药物缀合物可用于预防和/或治疗所述病理状况或疾病、或用于制备用于预防和/或治疗所述病理状况或疾病的药物。

本文所使用的术语“给药/给予”是指通过使得至少部分地将药物缀合物定位于期望的位点以产生期望效果的方法或途径，将药物缀合物放置入患者体内。适于本公开方法的给药途径包括局部给药和全身给药。一般而言，局部给药导致与患者整个身体相比将更多药物缀合物递送至特定位点；而全身给药导致将所述药物缀合物递送至患者的基本整个身体。一些实施方式

可通过本领域已知的任何合适途径向患者给药，所述途径包括但不仅限于：口服或胃肠外途径，包括静脉内给药、肌肉内给药、皮下给药、经皮给药、气道给药（气雾剂）、肺部给药、鼻部给药、直肠给药和局部给药（包括口腔含化给药和舌下给药）。给药频率可以是每天、每周、每个月或每年1次或多次。

本公开所述的药物缀合物的使用剂量可为本领域常规的剂量，所述剂量可以根据各种参数、尤其是患者的年龄、体重和性别来确定。可在细胞培养或实验动物中通过标准药学程序测定毒性和疗效，例如测定 LD50（使 50%的群体致死的剂量）和 ED50（在量反应中指能引起 50%最大反应强度的剂量，在质反应中，指引起 50%实验对象出现阳性反应时的剂量）。可基于由细胞培养分析和动物研究得到的数据得出人用剂量的范围。

在给予本公开所述的药物缀合物时，例如，对于雄性或雌性、6-12 周龄、体重 18-25g 的 C57BL/6J 或 C3H/HeNCrlVr 小鼠，以所述药物缀合物中的寡核苷酸的量计：对于功能性寡核苷酸与药学上可接受的式（101）所示的化合物形成的药物缀合物，其寡核苷酸用量可以为 0.001-100mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.01-50mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.05-20mg/kg 体重，在一个具体的实施方式中为 0.1-10mg/kg 体重。在给予本公开所述的药物缀合物时，可参考上述用量。

另外，通过将本公开的药物缀合物导入基因异常表达的细胞，还可以通过基因表达调控的机制达到调控细胞中该基因的表达这一目的。在一个一些实施方式中，所述细胞为肝炎细胞，在一些实施方式中为 HepG2.2.15 细胞。在一些实施方式中，所述细胞可以选自 Hep3B、HepG2、Huh7 等肝癌细胞系或分离的肝原代细胞，在一些实施方式中为 Huh7 肝癌细胞。

采用本公开提供的方法抑制基因在细胞中表达，所提供的药物缀合物中的功能性寡核苷酸的用量是本领域技术人员根据期望获得的效果容易确定的。例如，在一些实施方式中，所述药物缀合物是药物缀合物，所提供的药物缀合物中的 siRNA 用量是这样的量：其足以减少靶基因的表达，并导致在细胞表面处 1pM 至 1μM、或 0.01nM 至 100nM、或 0.05nM 至 50nM 或至约 5nM 的细胞外浓度。达到该局部浓度所需的量将随各种因素而变化，所述因素包括递送方法、递送部位、在递送部位和细胞或组织之间的细胞层的数目、递送是局部还是全身等。在递送部位处的浓度可以显著高于在细胞或组织的表面处的浓度。

试剂盒

本公开提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含如前所述的药物缀合物。

在本公开的试剂盒的一些实施方式中，可将药物缀合物保存于一个容器中；可以有或没有至少另一个容器，用于提供或不提供药学上可接受的辅料。除了药物缀合物和任选的药学上可接受的辅料外，所述试剂盒中还可包含其它成分，如稳定剂或防腐剂等。所述其它成分可包含于所述试剂盒中，但存在于与提供药物缀合物和任选的药学上可接受的辅料的容器均不同的容器中。在这些实施方式中，所述试剂盒可包含用于将药物缀合物与药学上可接受的辅料(对于有辅料而言)或其它成分进行混合的说明书。

在本公开的试剂盒中，所述药物缀合物和任选的药学上可接受的辅料可以任何形式提供，例如液体形式、干燥形式或冻干形式。在一些实施方式中，所述药物缀合物和任选的药学上可接受的辅料基本上纯净和/或无菌。可任选地在本公开的试剂盒中提供无菌水。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物可在体内具有更高的稳定性、更低的毒性和/或更高的活性。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或药物缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的靶基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或药物缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的肝内靶基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的 siRNA、siRNA 组合物或药物缀合物在体内显示出至少 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或 95%的动

物模型中肝内靶基因表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的siRNA、siRNA组合物或药物缀合物在体内显示出至少20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%或95%的靶表面抗原表达抑制率。在一些实施方式中，本公开提供的siRNA、组合物或药物缀合物未显示出明显脱靶效应。脱靶效应可以是例如抑制非靶基因的基因正常表达。据认为，如果脱靶基因表达的结合/抑制与在靶基因效果相比低于50%、40%、30%、20%或10%时，该脱靶效应就是不显著的。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物具有较低的动物水平毒性。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物在人血浆中直至72h时仍未降解，显示出优异的在人血浆中的稳定性。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物在食蟹猴血浆中直至72h仍未降解，显示出优异的在猴血浆中的稳定性。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物无论在人源溶酶体裂解液还是在鼠源溶酶体裂解液中，都表现出令人满意的稳定性，至少能够维持24小时不降解。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物能够特异性地在肝脏中显著富集并保持稳定，具有高度的靶向性。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物在测试时间点不同的多次试验中，均显示出了高的小鼠体内靶mRNA抑制活性。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物在不同动物模型中均显示出持久高效的靶mRNA抑制效率，并呈现出较规律的剂量依赖性。

在一些实施方式中，本公开提供的药物缀合物在体外具有较高活性的同时，还具有低脱靶效应。

下面通过制备例和实施例来进一步说明本公开，但是本公开并不因此而受任何限制。

实施例

以下通过实施例对本公开进行详细描述。除非特别说明，以下实施例中所用到的试剂、培养基均为市售商品，所用到的核酸电泳、real-time PCR等操作均按本领域技术人员熟知的方案进行。例如，可按*Molecular Cloning*（Cold Spring Harbor LBboratory Press(1989)）所记载的方法进行。

HepG2.2.15细胞购自ATCC，用含有10%的胎牛血清（FBS，Gibco）、2mM L-谷氨酰胺（Gibco）和380μg/ml G418的DMEM完全培养基（Gibco）培养细胞，于37°C在含5% CO_2/95%空气的培养箱中培养。

Huh7细胞购自ATCC，用含有10%的胎牛血清（FBS，Gibco）、2mM L-谷氨酰胺（Gibco）和380μg/ml G418的DMEM完全培养基（Gibco）培养细胞，于37°C在含5% CO2/95%空气的培养箱中培养。

HBV转基因小鼠C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J：购自北京大学医学部实验动物科学部。于实验前选择S/COV＞10的小鼠，以下有时也简称为44Bri模型小鼠；

HBV转基因小鼠：命名为M-Tg HBV，购自上海市公共卫生中心动物部，转基因小鼠的制备方法如Ren J.等，J. Medical Virology. 2006, 78: 551-560所述，以下有时也简称为M-Tg模型；

AAV-HBV转基因小鼠：按照文献方法（董小岩等，Chin J Biotech 2010, May 25; 26(5): 679−686）制备AAV-HBV模型小鼠。将rAAV8-1.3HBV，D型（ayw）病毒（购于北京五加和分子医学研究所有限公司，1×10^{12} viral genome （v.g.）/mL，批号2016123011）用无菌PBS稀释至5×10^{11} v.g./mL，每只小鼠注射200 μL稀释后的rAAV8-1.3HBV，（即每只小鼠注射1×10^{10} v.g.）。病毒注射后第28天，所有小鼠通过眼眶采血（约100 μL）用于收集血清检测HBsAg和HBV DNA，以下有时也简称为AAV-HBV模型小鼠；

低浓度AAV-HBV转基因小鼠：采用与上述基本相同的造模方法，区别之处在于，病毒在实验前用无菌PBS稀释至1×10^{11}（v.g.）/mL，每只小鼠注射100 μL病毒，即每只小鼠注射1×10^{10} v.g.，以下有时也简称为AAV-HBV低浓度小鼠模型；

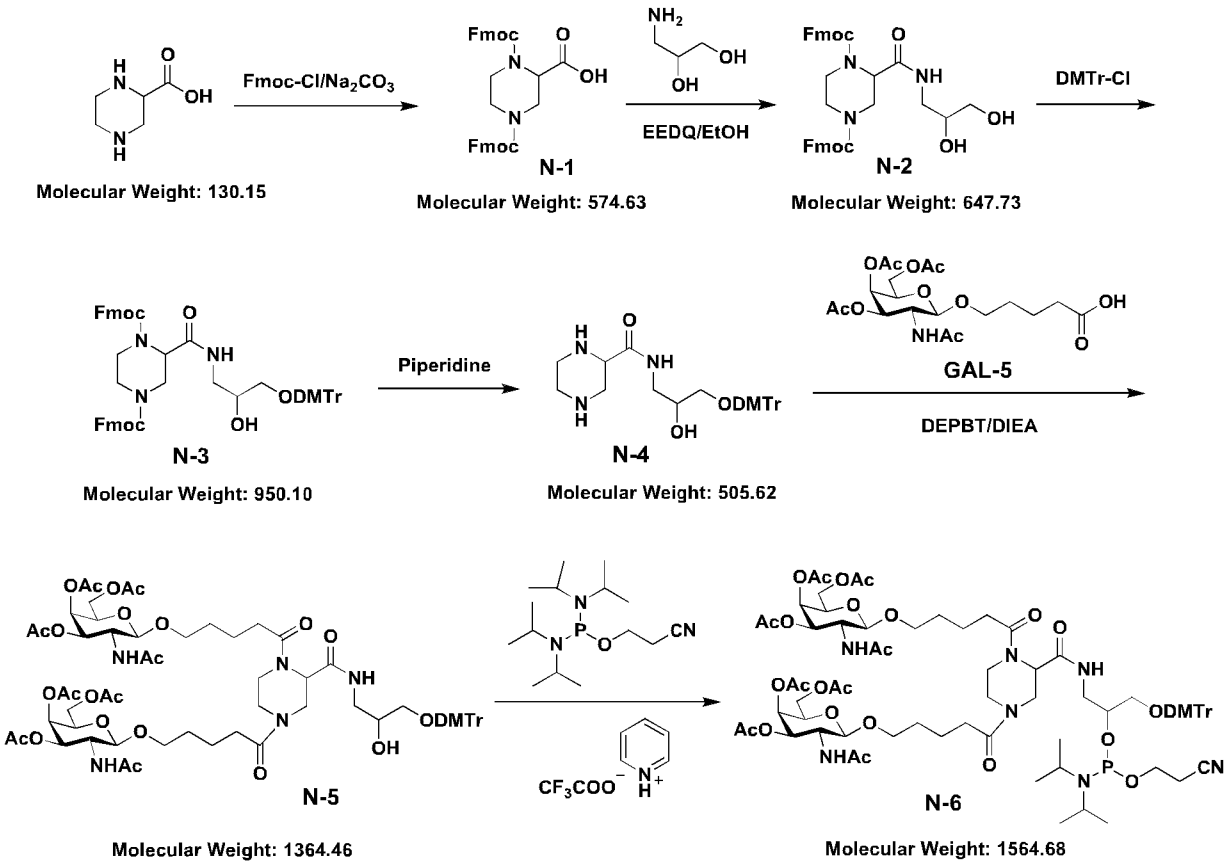
HBV转基因小鼠C57BL/6-HBV：品系名：B6-Tg HBV/Vst (1.28 copy, genotype A)，购自北京维通达生物技术有限公司。于实验前选择COI＞10^4的小鼠，以下有时也简称为1.28copy模型。

用以下制备例7-制备例8中合成的药物缀合物转染细胞时，使用Lipofectamine™2000（Invitrogen）作为转染试剂，具体操作参照制造商提供的说明书。

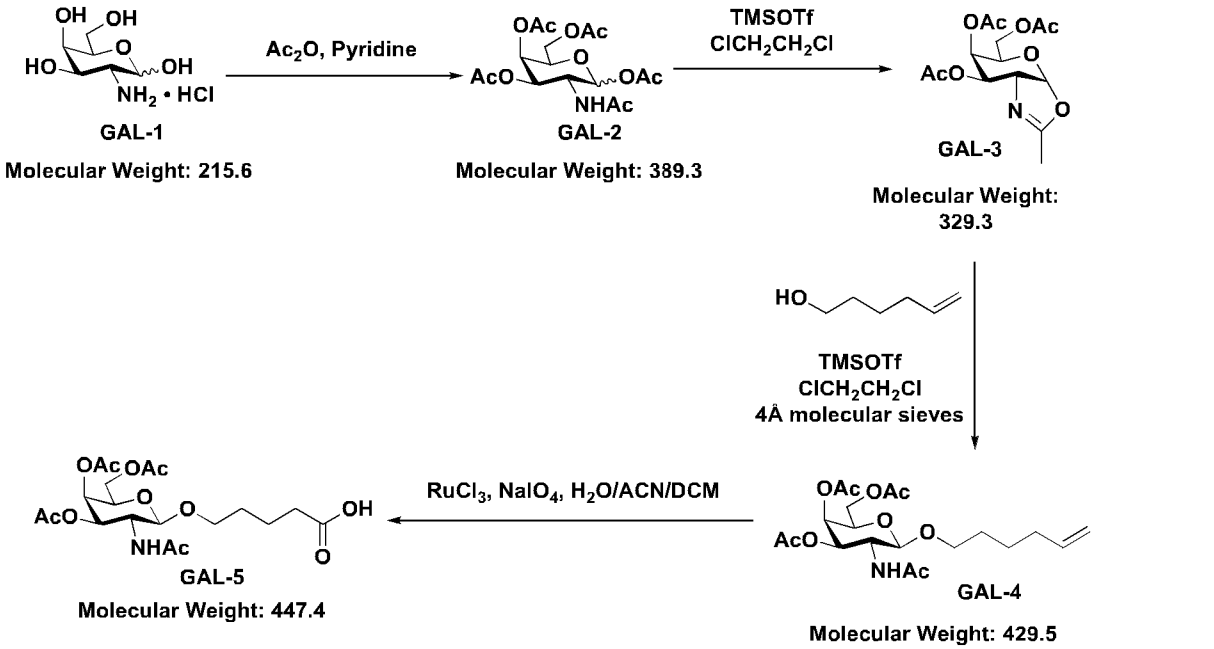
若无其它说明，以下提供的试剂比例均按体积比（v/v）计算。

制备例1 N-6所示的化合物的合成

本制备例中，按照以下方法，合成了式（N-6）所示的化合物：



（1-1）缀合末端段 GAL-5 的合成



（1-1a）GAL-2 的合成

将 20.0g GAL-1（N-乙酰-D-半乳糖胺盐酸盐，CAS 号：1772-03-8，购自宁波弘翔生化公司，92.8 mmol）溶于 200ml 无水吡啶，冰水浴下加入 108ml 乙酸酐（购自 Enox 公司，1113mmol），室温搅拌反应 24 小时。将反应液倒入 2L 冰水中，减压抽滤，滤饼用 500ml 冰水洗涤后，加乙腈/甲苯混合溶剂（体积比乙腈:甲苯=1:1）至完全溶解，蒸干溶剂，得到白色固体产品 GAL-2 30.6g。^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 5.72 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.40 (m, 2H), 5.11 (dd, J = 11.3, 3.3 Hz, 1H), 4.47 (q, J = 10.7, 10.0 Hz, 1H), 4.24 – 4.10 (m, 2H), 4.04 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.97 (s, 3H).

（1-1b）GAL-3 的合成

将步骤（1-1a）中获得的 GAL-2（11.5g，29.5mmol）溶解于 70ml 无水 1,2-二氯乙烷中，在冰水浴且氮气保护条件下，加入 6.4ml 三氟甲基磺酸三甲基硅酯（TMSOTf，CAS 号：27607-77-8，购自麦克林公司，35.5mmol），室温反应过夜。

在反应液中加入 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液，搅拌 10 分钟，分出有机相，水相用二氯乙烷萃取两次，每次 100ml，合并有机相，分别用 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液和 100ml 饱和食盐水洗涤，分出有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸干溶剂，得到浅黄色粘稠糖稀状产品 GAL-3 10.2g。^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 5.99 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.46 (t, J = 3.0 Hz, 1H), 4.90 (dd, J = 7.5, 3.3 Hz, 1H), 4.30 – 4.15 (m, 2H), 4.10 (m, 1H), 4.02 – 3.94 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.07 (d, J = 0.9 Hz, 6H), 2.05 (d, J = 1.2 Hz, 3H).

（1-1c）GAL-4 的合成

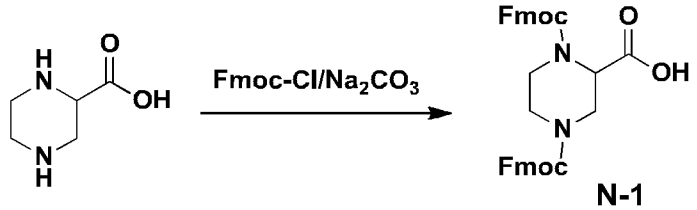
将步骤（1-1b）中获得的 GAL-3（9.5g，28.8mmol）溶于 50ml 无水 1,2-二氯乙烷中，加入干燥的 4Å 分子筛粉末 10g，再加入 3.2g 5-己烯-1-醇（CAS 号：821-41-0，购自 Adamas-beta 公司，31.7mmol），室温下搅拌 30 分钟，冰浴和氮气保护下加入 2.9ml TMSOTf（14.4mmol），室温下搅拌反应过夜。过滤除去 4 Å 分子筛粉末，滤液中加入 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液搅拌 10 分钟，分出有机相，水相用 100ml 二氯乙烷萃取一次，合并有机相并分别用 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液和 100ml 饱和食盐水洗涤，分出有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸干溶剂，得到黄色糖稀状产品 GAL-4 13.3g，不进行纯化直接进行下一步氧化反应。

（1-1d）GAL-5 的合成

将按照步骤（1-1c）中描述的方法得到的 GAL-4（17.5g，40.7mmol，由两批次产物合并而得）溶于 80ml 二氯甲烷和 80ml 乙腈的混合溶剂中，分别加入 130ml 去离子水和 34.8g 高碘酸钠（CAS 号：7790-28-5，购自阿拉丁公司，163mmol），冰水浴下搅拌 10 分钟，加入三氯化钌（CAS 号：14898-67-0，购自安耐吉公司，278mg，1.34mmol），控制体系温度不超过 30°C，室温反应过夜。反应液加入 300ml 水稀释搅拌，加饱和碳酸氢钠调 pH 约为 7.5，分出并弃去有机相，水相用二氯甲烷萃取三次，每次 200ml，弃去有机相。水相用柠檬酸固体调节 pH 约为 3，用二氯甲烷萃取三次，每次 200ml，合并有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸干溶剂，得到白色泡沫状固体产品 GAL-5 6.5g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.01 (s, 1H), 7.82 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.95 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.87 (dt, J = 11.3, 8.9 Hz, 1H), 3.75 – 3.66 (m, 1H), 3.46 – 3.36 (m, 1H), 2.19 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.55 – 1.43 (m, 4H).

以下，使用按照上述方法得到的 GAL-5 化合物，通过以下工艺路线合成了式（N-6）所示的化合物：

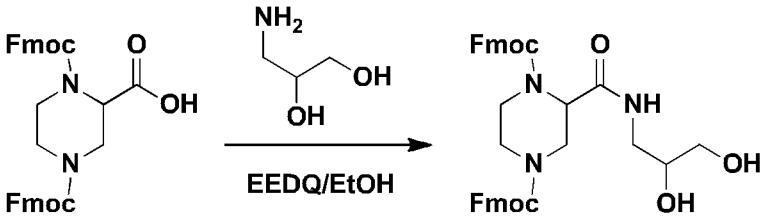
（1-2）N-1 的合成



N-1

将哌嗪-2-羧酸（33.2g，163.3mmol，购自阿法埃莎（中国）化学有限公司，CAS 号：2762-32-5）溶于 200ml 二氧六环和 50ml 10%碳酸钠水溶液中，冰水浴下加入用 50ml 二氧六环溶解的芴甲氧羰酰氯（100.0g，391.9mmol），室温搅拌反应 24 小时。将反应液倒入水中，减压抽滤，滤饼用酸性水溶液酸化后用二氯甲烷提取一次。有机相用饱和食盐水水洗一次后干燥并蒸发溶剂至干。柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷=1:1:1 混合液洗脱）纯化收集目标产物浓缩，用二氯甲烷溶解后用酸性水溶液水洗至水相 pH=5，再用饱和食盐水水洗一次后干燥并蒸发溶剂至干（水相 pH=6）。得产品 N-1 计 83.0g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.85 – 7.72 (m, 6H), 7.60 – 7.39 (m, 10H), 5.09 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 5.7 Hz, 4H), 4.23 (td, J = 12.1, 11.5, 6.3 Hz, 3H), 4.16 – 4.04 (m, 1H), 4.04 – 3.95 (m, 1H), 3.82 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.58 (dt, J = 12.0, 6.8 Hz, 1H), 3.48 (dt, J = 12.1, 6.8 Hz, 1H). MS m/z：$C_{35}H_{29}N_2O_6$，[M-H]-，理论：573.20，实测：573.32。

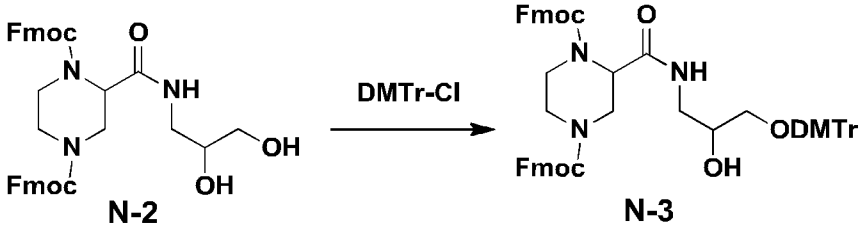
（1-3）N-2 的合成



N-1 N-2

将步骤（1-2）得到的N-1（13.9g，24.28mmol），3-氨基-1,2-丙二醇（2.5g，27.4mmol）和2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉（7.3g，29.6mmol）加入到120ml乙醇中，室温搅拌反应5分钟。再转油浴60°C搅拌反应18小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.15梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得到产品N-2 9.4g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.15 (s, 2H), 7.87 – 7.76 (m, 7H), 7.75 (dd, J = 7.5, 1.6 Hz, 3H), 7.66 (ddd, J = 24.6, 7.4, 1.7 Hz, 4H), 7.59 (d, J = 1.8 Hz, 0H), 7.55 (tdd, J = 7.5, 5.4, 1.6 Hz, 10H), 7.46 (dddd, J = 9.2, 7.6, 4.8, 2.0 Hz, 8H), 5.35 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 5.16 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 5.07 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 4.70 (dd, J = 3.7, 1.9 Hz, 8H), 4.46 (t, J = 1.9 Hz, 2H), 4.26 – 4.14 (m, 4H), 3.95 (dt, J = 12.3, 7.0 Hz, 2H), 3.84 – 3.61 (m, 6H), 3.53 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 2H), 3.47 – 3.20 (m, 10H). MS m/z: $C_{38}H_{38}N_3O_7$，[M+H]+，理论：648.27，实测：648.35。

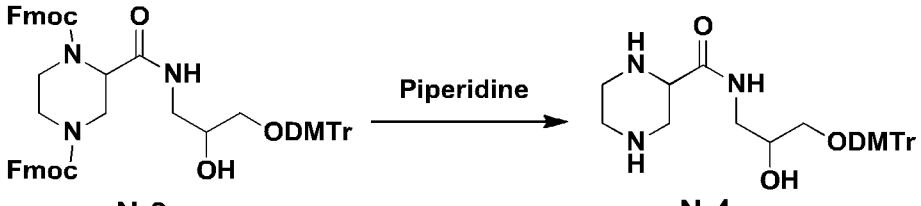
（1-4）N-3的合成



N-2 N-3

将步骤（1-3）得到的N-2（8.27g，12.8mmol）用60ml无水吡啶溶解，再加入4,4'-双甲氧基三苯甲基氯（5.2g，15.4mmol）室温下搅拌反应18小时。加50ml甲醇淬灭，蒸发溶剂至干。柱层析（200~300目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯=1:1混合液洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得到产物N-3 12.7g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.95 (dd, J = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.87 – 7.71 (m, 5H), 7.67 – 7.41 (m, 12H), 7.36 – 7.25 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 5.16 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.70 (dd, J = 5.1, 1.1 Hz, 4H), 4.41 (pd, J = 7.0, 5.0 Hz, 1H), 4.27 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.13 – 3.93 (m, 3H), 3.89 – 3.72 (m, 2H), 3.79 (s, 7H), 3.67 – 3.36 (m, 6H), 3.21 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H). MS m/z: $C_{59}H_{56}N_3O_9$，[M+H]+，理论：950.40，实测：950.32。

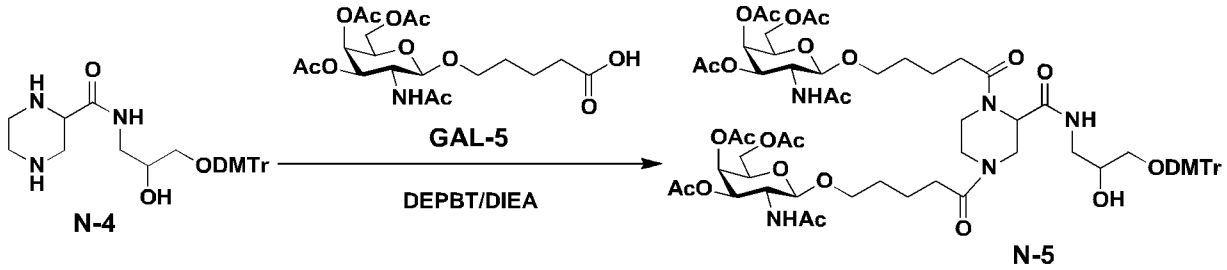
（1-5）N-4的合成



N-3 N-4

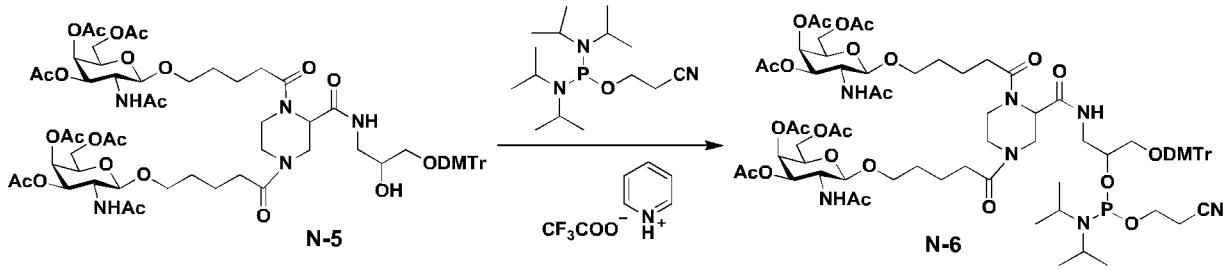
用70ml二甲基甲酰胺溶解步骤（1-4）得到的N-3（12.7g，13.4mmol）后加入哌啶（34.2g，401.5mmol），向反应液中加入500ml水稀释搅拌，乙酸乙酯提取三次，合并有机相，饱和食盐水水洗一次后干燥并蒸发溶剂至干。柱层析（200~300目正相硅胶，乙酸乙酯:甲醇=1:1-1:10梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物N-4 5.77g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.15 (s, 1H), 7.50 – 7.42 (m, 2H), 7.36 – 7.25 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 4.68 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.41 (pd, J = 7.0, 5.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.62 (ddd, J = 10.1, 7.0, 2.8 Hz, 2H), 3.50 (dd, J = 12.3, 7.0 Hz, 1H), 3.28 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.06 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 2.92 – 2.81 (m, 2H), 2.85 – 2.74 (m, 2H), 2.78 – 2.68 (m, 2H), 2.09 (s, 1H), 1.83 (s, 1H). MS m/z: $C_{29}H_{36}N_3O_5$，[M+H]+，理论：506.27，实测：506.35。

（1-6）N-5的合成



向 10ml 二氯甲烷中加入 GAL-5（1.074g，2.4mmol）、3-二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（0.897g，3.0mmol）、二异丙基乙胺（0.775g，6.0mmol），室温反应 1 小时。再加入 N-4（0.505g，1.0mmol）25°C 搅拌反应 18 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05~1:1:1:0.2 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 N-5 1.2g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.15 (s, 1H), 7.85 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.46 (s, 3H), 7.50 – 7.41 (m, 1H), 7.36 – 7.25 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 6.05 – 5.94 (m, 4H), 5.16 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.98 (dt, J = 9.4, 6.8 Hz, 2H), 4.65 – 4.34 (m, 7H), 4.02 – 3.88 (m, 3H), 3.79 (s, 6H), 3.75 – 3.31 (m, 7H), 3.22 – 2.92 (m, 5H), 2.13 – 1.87 (m, 28H), 1.63 – 1.51 (m, 2H), 1.55 – 1.39 (m, 2H). MS m/z: $C_{67}H_{90}N_5O_{25}$，[M+H]+，理论：1364.59，实测：1364.52。

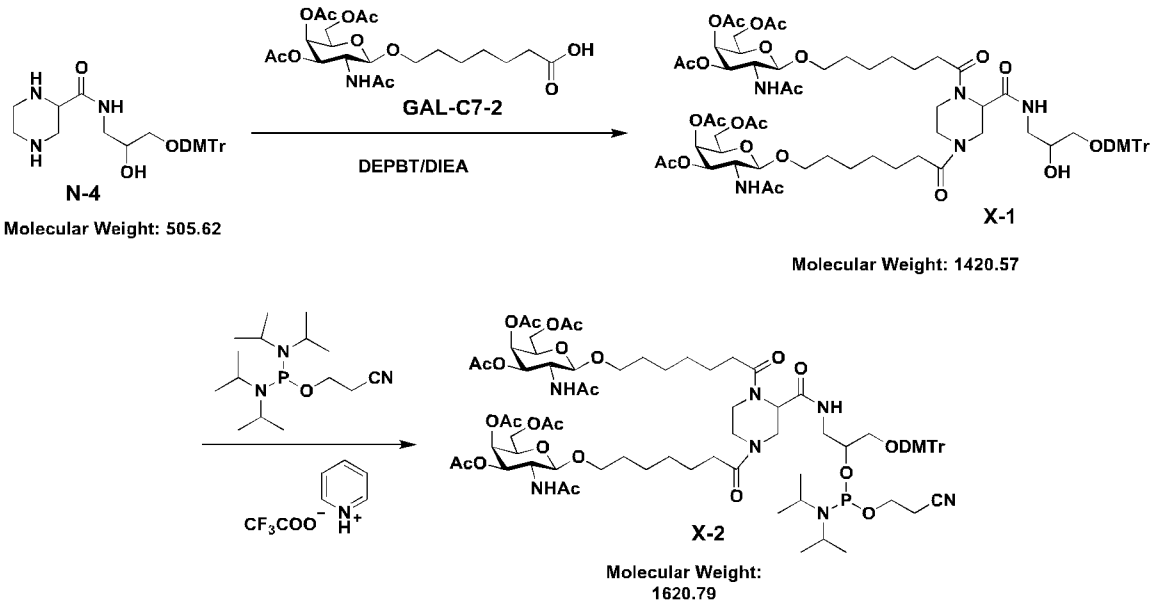
（1-7）N-6 的合成



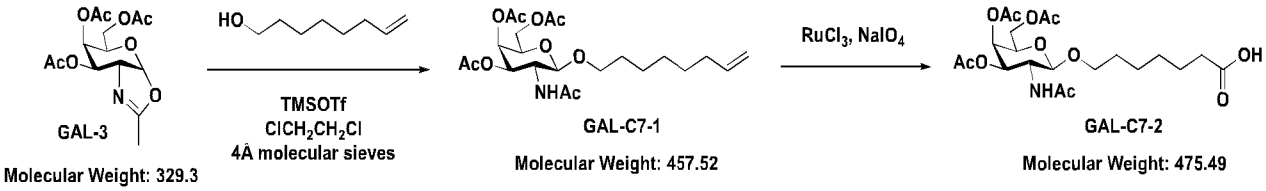
在氩气保护条件下向 10ml 无水二氯甲烷中加入按照步骤（1-6）合成的 N-5（1.365g，1.0mmol，由两批次产物合并而得）、三氟乙酸吡啶盐（0.232g，1.2mmol）、N-甲基咪唑（0.099g，1.2mmol），双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦（0.452g，1.5mmol，购自 ACROS 试剂，CAS 号：102691-36-1），室温搅拌反应 5 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯=2:1-1:2 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 N-6 1.346g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.46 (s, 1H), 7.36 – 7.25 (m, 3H), 6.88 – 6.82 (m, 2H), 6.05 – 5.94 (m, 1H), 5.20 – 4.98 (m, 2H), 4.49 – 3.91 (m, 5H), 3.79 (s, 3H), 3.94 – 3.67 (m, 2H), 3.67 – 3.27 (m, 3H), 3.26 – 2.88 (m, 2H), 2.91 – 2.75 (m, 1H), 2.29 – 2.16 (m, 1H), 2.15 – 1.95 (m, 11H), 1.76 – 1.49 (m, 1H), 1.36 – 1.11 (m, 1H), 1.11 – 0.99 (m, 4H), 0.61 (d, J = 6.9 Hz, 1H). 31P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 149.23-148.06. MS m/z: $C_{76}H_{107}N_7O_{26}P$，[M+H]+，理论：1564.70，实测：1564.62。所得到的式（N-6）化合物具有符合式（403）所示的结构。

制备例 2 式（X-2）所示的化合物的合成

本制备例中，按照以下方法，合成了式（X-2）所示的化合物：



（2-1）GAL-C7-2 的合成



（2-1a）GAL-C7-1 的合成

将 GAL-3（9.5g，28.8mmol）溶于 50ml 无水 1，2-二氯乙烷中，加入活化的 4 Å 分子筛粉末 10g，再加入 7-辛烯-1-醇（4.1g，31.7mmol），室温下搅拌反应 30 分钟，在冰浴和氮气保护下加入三氟甲基磺酸三甲基硅酯（TMSOTf，2.9ml，14.4mmol），在室温下搅拌反应 16 小时。通过硅藻土过滤除掉 4 Å 分子筛粉末，在滤液中加入 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液搅拌反应 10 分钟，分出有机相，水相用 100ml 二氯乙烷萃取一次，合并有机相并分别用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水洗涤一次，分出有机相，用无水硫酸钠干燥，减压蒸出溶剂并用油泵抽干得到 GAL-C7-1 13.1g，不进行纯化直接进行下一步氧化反应。

（2-1b）GAL-C7-2 合成

将按照步骤（2-1a）合成的 GAL-C7-1（18.6g，40.7mmol，由两批次产物合并而得）溶于 80ml 二氯甲烷和 80ml 乙腈的混合溶剂中，分别加入 130ml 水和高碘酸钠固体（34.8g，163mmol），冰水浴下搅拌反应 10 分钟，再加入催化剂三氯化钌（278mg，1.34mmol），室温下搅拌反应 16 小时。向反应液中加入 300ml 水，再加入饱和碳酸氢钠调节 pH 为 7.5，分掉有机相，水相再用二氯甲烷萃取三次，弃去有机相，水相用柠檬酸固体调节 pH 为 3，用 200ml 二氯甲烷萃取三次，合并有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸出溶剂后柱层析（200~300 目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=10:1-3:1 梯度洗脱）纯化得到产品 GAL-C7-2 14.2g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.46 (s, 1H), 6.05 – 5.94 (m, 2H), 5.18 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.52 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.98 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.85 (dd, J = 12.4, 6.9 Hz, 1H), 3.35 – 3.23 (m, 1H), 2.88 (td, J = 12.3, 3.1 Hz, 1H), 2.69 – 2.58 (m, 1H), 2.30 – 2.14 (m, 2H), 2.13 – 1.95 (m, 13H), 1.80 (dddt, J = 13.7, 12.5, 9.5, 1.2 Hz, 1H), 1.52 (dt, J = 12.2, 9.2 Hz, 1H), 1.41 – 1.24 (m, 1H), 1.28 – 1.14 (m, 1H). MS m/z: $C_{21}H_{32}NO_{11}$，[M-H]-，理论：474.20，实测：474.31。

（2-2）X-1 的合成

向 10ml 二氯甲烷中加入 GAL-C7-2（1.141g，2.4mmol）、3 -二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（0.897g，3.0mmol）、二异丙基乙胺（0.775g，6.0mmol），室温下反应 1 小时。再加入 N-4（0.505g，1.0mmol）在 25°C 搅拌反应 18 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.2 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 X-1 1.196g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.15 (s, 1H), 7.46 (s, 3H), 7.35 – 7.29 (m, 4H), 7.33 – 7.20 (m, 4H), 6.89 – 6.82 (m, 4H), 6.05 – 5.94 (m, 4H), 5.12 (dt, J = 31.6, 7.0 Hz, 2H), 4.58 – 4.27 (m, 7H), 4.18 – 3.99 (m, 2H), 4.01 – 3.88 (m, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.81 – 3.64 (m, 2H), 3.59 – 3.30 (m, 4H), 3.19 – 3.00 (m, 2H), 2.96 – 2.81 (m, 2H), 2.09 – 1.92 (m, 24H), 1.62 – 1.16 (m, 8H), 1.18 – 0.99 (m, 2H), 1.03 – 0.87 (m, 2H). MS m/z:

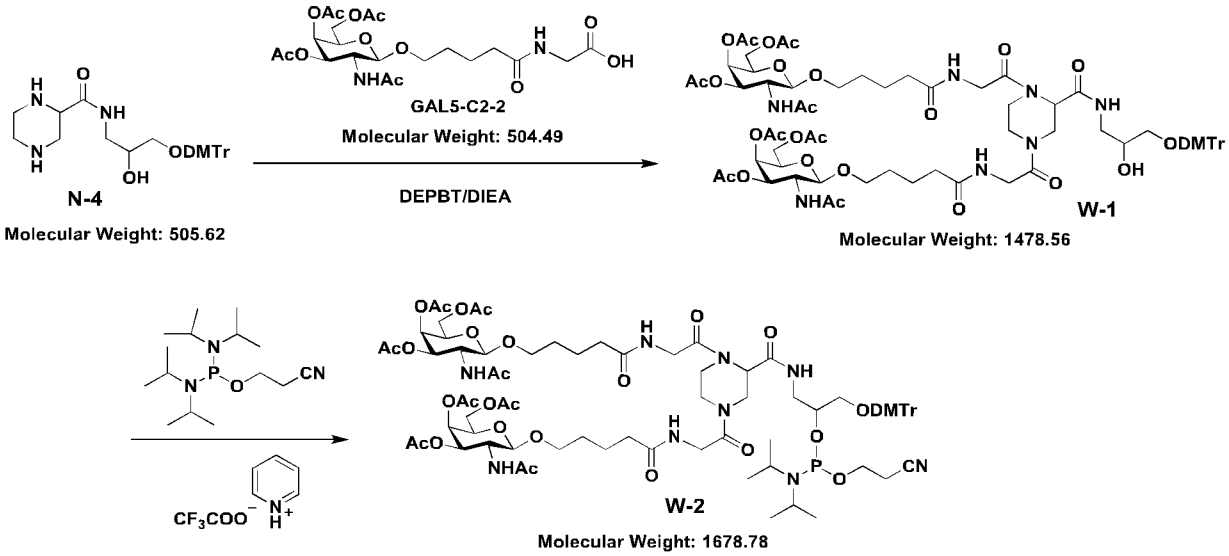
$C_{71}H_{98}N_5O_{25}$，[M+H]+，理论：1420.66，实测：1420.74。

（2-3）X-2 的合成

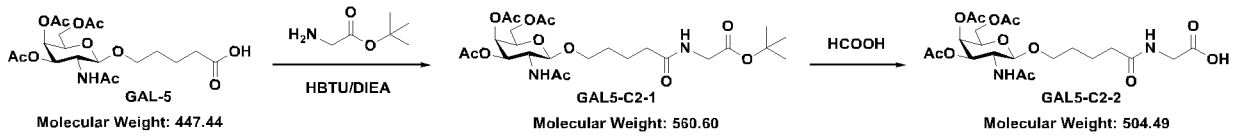
在氩气保护条件下向 10ml 无水二氯甲烷中加入按照步骤（2-2）合成的 X-1（1.421g，1.0mmol，由两批次产物合并而得）、三氟乙酸吡啶盐（0.232g，1.2mmol）、N-甲基咪唑（0.099g，1.2mmol），双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦（0.452g，1.5mmol），室温搅拌反应 5 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯=2:1-1:2 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 X-2 1.446g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.46 (s, 1H), 7.36 – 7.25 (m, 3H), 6.89 – 6.82 (m, 2H), 6.05 – 5.94 (m, 1H), 5.12 (dt, J = 30.4, 7.0 Hz, 1H), 4.77 (dq, J = 27.5, 7.0 Hz, 1H), 4.52 – 4.35 (m, 1H), 4.35 – 4.15 (m, 1H), 3.96 – 3.78 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.74 – 3.56 (m, 2H), 3.55 – 3.03 (m, 3H), 2.90 – 2.75 (m, 1H), 2.74 – 2.34 (m, 2H), 2.23 – 1.95 (m, 11H), 1.85 – 1.17 (m, 4H), 1.11 – 0.90 (m, 6H), 0.66 – 0.45 (m, 1H). 31P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 148.83-147.65. MS m/z: $C_{80}H_{115}N_7O_{26}P$, [M+H]+, 理论: 1620.76, 实测：1620.82。所得到的式（X-2）化合物具有符合式（404）所示的结构。

制备例 3 式（W-2）所示的化合物的制备

本制备例中，按照以下方法，合成了式（W-2）所示的化合物：



（3-1）GAL5-C2-2 的合成



（3-1a）GAL-C2-1 的合成

向 40ml N,N-二甲基甲酰胺中加入 GAL-5(4.5g,10.0mmol)、甘氨酸叔丁酯盐酸盐(2.0g,12.0mmol)、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐（5.7g，15.0mmol）、二异丙基乙胺（3.9g，30.0mmol），室温搅拌反应 4 小时。向反应液中加入 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液，用 100ml 乙酸乙酯萃取 3 次，合并有机相，用 100ml 饱和食盐水洗涤一次，分出有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸出溶剂并用油泵抽干得到 10.1g GAL-C2-1 粗品直接进行下一步反应。

（3-1b）GAL-C2-2 的合成

将 GAL-C2-1 粗品（10.1g，10mmol）溶于 60ml 甲酸中，室温搅拌反应 16 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=10:1-3:1 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 GAL-C2-2 5.0g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.49 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.05 – 5.94 (m, 2H), 5.01 – 4.90 (m, 1H), 4.52 – 4.33 (m, 3H), 3.79 – 3.61 (m, 3H), 3.14 (td, J = 12.2, 3.2 Hz, 1H), 2.68 (td, J = 12.2, 3.3 Hz, 1H), 2.27 (td, J = 12.6, 2.8 Hz, 1H), 2.15 (td, J = 12.6, 2.9 Hz, 1H), 2.07 – 1.95 (m, 12H), 1.82 (qt, J = 12.9, 2.8 Hz, 1H), 1.54 (qt, J = 12.6, 2.6 Hz, 1H), 1.15 – 0.99 (m, 1H), 0.97 – 0.81 (m, 1H). MS m/z: $C_{21}H_{31}N_2O_{12}$，[M-H]-，理论：503.19，实测：503.26。

（3-2）W-1 的合成

向 10ml 二氯甲烷中加入 GAL5-C2-2（1.211g，2.4mmol）、3 -二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑 4(3H)-

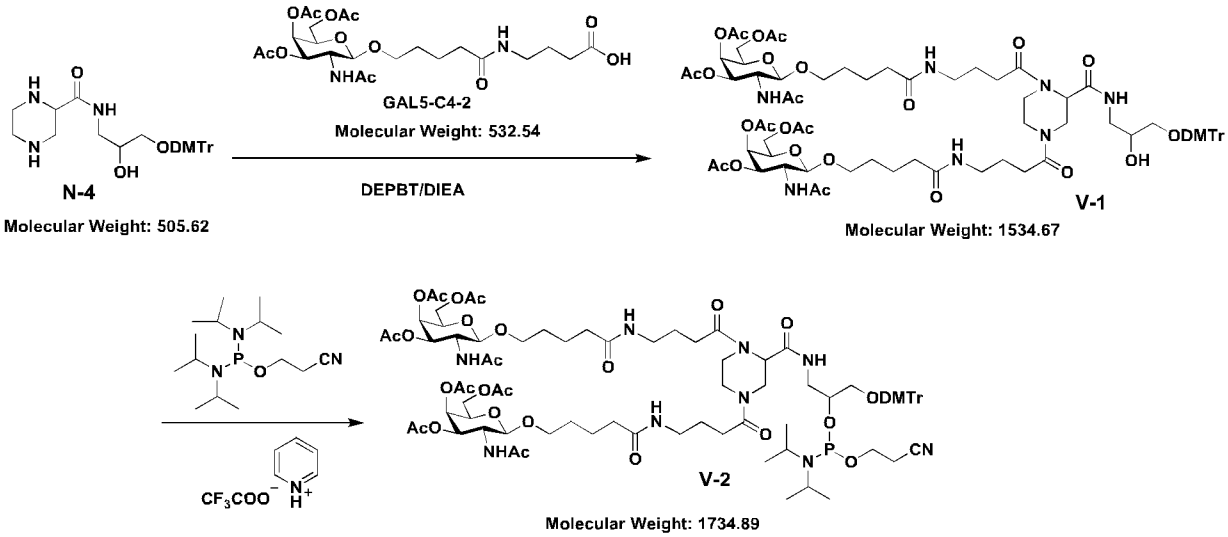
酮（0.897g，3.0mmol）、二异丙基乙胺（0.775g，6.0mmol），室温下反应 1 小时。再加入 N-4（0.505g，1.0mmol）25°C 搅拌反应 18 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.1-1:1:1:0.4 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 W-1 1.291g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.49 (s, 1H), 7.46 (s, 2H), 7.36 – 7.25 (m, 4H), 6.88 – 6.82 (m, 2H), 6.05 – 5.94 (m, 1H), 5.60 – 5.38 (m, 2H), 5.14 (dt, J = 13.7, 6.9 Hz, 1H), 4.83 – 4.67 (m, 1H), 4.53 – 4.09 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.75 – 3.24 (m, 6H), 3.22 – 3.09 (m, 1H), 3.09 – 2.76 (m, 2H), 2.28 – 2.07 (m, 2H), 2.09 – 1.95 (m, 13H), 1.80 – 1.44 (m, 2H), 1.43 – 1.31 (m, 1H). MS m/z: $C_{71}H_{96}N_7O_{27}$，[M+H]+，理论：1478.64，实测：1478.56。

（3-3）W-2 的合成

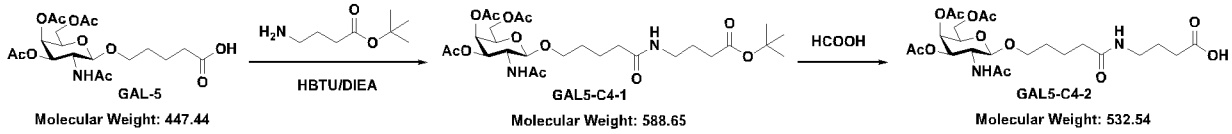
在氩气保护条件下向 10ml 无水二氯甲烷中加入按照步骤（3-2）合成的 W-1（1.479g，1.0mmol，由两批次产物合并而得）、三氟乙酸吡啶盐（0.232g，1.2mmol）、N-甲基咪唑（0.099g，1.2mmol），双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦（0.452g，1.5mmol），室温下搅拌反应 5 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯=3:1-1:3 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 W-2 1.534g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.49 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.36 – 7.25 (m, 3H), 6.89 – 6.82 (m, 2H), 6.05 – 5.94 (m, 1H), 5.20 – 5.05 (m, 1H), 4.81 – 4.57 (m, 2H), 4.47 – 4.24 (m, 2H), 4.05 – 3.66 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.67 – 3.45 (m, 2H), 3.40 – 3.26 (m, 1H), 3.16 – 2.93 (m, 2H), 2.92 – 2.66 (m, 3H), 2.39 – 2.22 (m, 1H), 2.10 – 1.93 (m, 11H), 1.77 – 1.53 (m, 1H), 1.56 – 1.32 (m, 1H), 1.09 – 1.01 (m, 4H), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 1H). 31P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 149.15-147.72. MS m/z: $C_{80}H_{113}N_9O_{28}P$，[M+H]+，理论：1678.74，实测：1678.66。所得到的式（W-2）化合物具有符合式（405）所示的结构。

制备例 4 式（V-2）所示的化合物的制备

本制备例中，按照以下方法，合成了式（V-2）所示的化合物：



（4-1）GAL5-C4-2 的合成



（4-1a）GAL-C4-1 的合成

向 40ml N,N-二甲基甲酰胺中加入 GAL-5（4.5g，10.0mmol）、4-氨基酸叔丁酯盐酸盐（1.9g，12.0mmol）、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐（5.7g，15.0mmol）、二异丙基乙胺（3.9g，30.0mmol），溶解均一后室温搅拌 4 小时反应完全。反应液中缓慢加入 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液，100ml×3 乙酸乙酯萃取，合并有机相，100ml 饱和食盐水洗涤一次，分出有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸出溶剂并用油泵抽干得到 10.3g GAL-C4-1 粗品直接进行下一步反应。

（4-1b）GAL-C4-2 合成

将 GAL-C4-1 粗品（10.3g，10mmol）溶于 60ml 甲酸中，室温搅拌反应 16 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=10:1-2:1 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 5.1g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.89 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.05 – 5.94 (m, 2H), 5.25 (t, J = 7.0

Hz, 1H), 4.53 – 4.35 (m, 2H), 4.14 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 12.1, 6.8 Hz, 1H), 3.46 (td, J = 12.1, 3.3 Hz, 1H), 3.30 (td, J = 12.4, 3.0 Hz, 1H), 3.01 (td, J = 12.1, 2.8 Hz, 1H), 2.75 (td, J = 12.4, 3.0 Hz, 1H), 2.45 – 2.08 (m, 6H), 2.07 – 1.95 (m, 12H), 1.81 – 1.49 (m, 3H), 1.35 – 1.20 (m, 1H). MS m/z: $C_{23}H_{35}N_2O_{12}$, [M-H]-，理论：531.22，实测：531.15。

（4-2）V-1 的合成

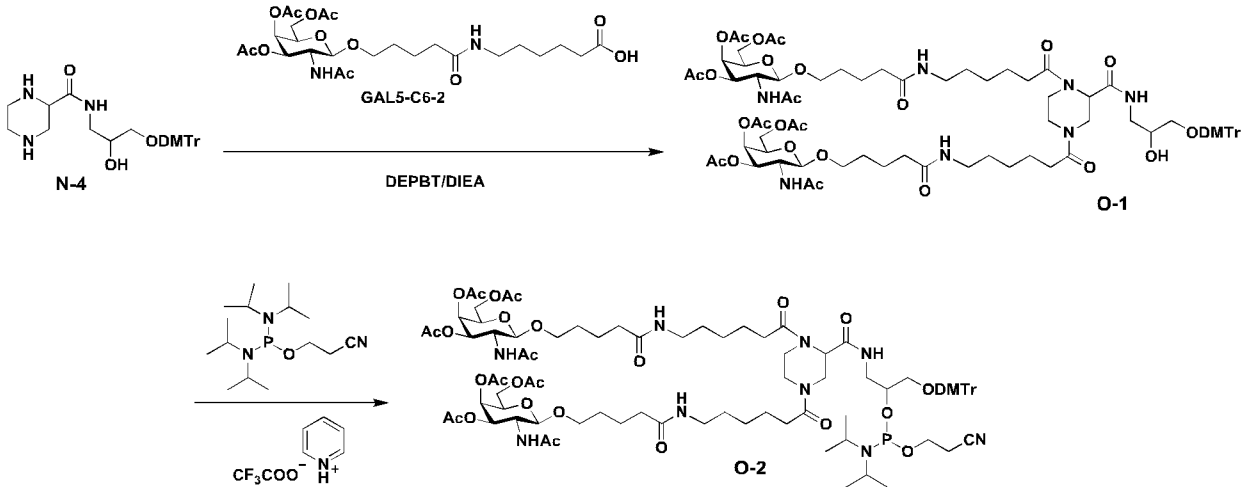
向 10ml 二氯甲烷中加入 GAL5-C4-2（1.278g，2.4mmol）、3 -二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（0.897g，3.0mmol）、二异丙基乙胺（0.775g，6.0mmol），室温下反应 1 小时。再加入 N-4（0.505g，1.0mmol），在 25°C 搅拌反应 18 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.1-1:1:1:0.5 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 V-1 1.315g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.83 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.46 (s, 3H), 7.50 – 7.41 (m, 1H), 7.36 – 7.25 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 6.08 – 5.94 (m, 3H), 5.60 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 5.18 (dt, J = 19.2, 7.0 Hz, 2H), 4.64 – 4.47 (m, 2H), 4.46 – 4.27 (m, 2H), 4.29 – 4.07 (m, 4H), 3.98 – 3.73 (m, 3H), 3.79 (s, 6H), 3.67 – 3.50 (m, 2H), 3.54 – 3.45 (m, 2H), 3.37 (ddd, J = 25.2, 12.5, 7.0 Hz, 2H), 3.32 – 3.15 (m, 2H), 3.20 – 3.11 (m, 2H), 3.03 – 2.83 (m, 3H), 2.80 – 2.48 (m, 5H), 2.42 – 2.25 (m, 3H), 2.15 – 1.89 (m, 28H), 1.86 – 1.68 (m, 2H), 1.70 – 1.48 (m, 2H). MS m/z: $C_{75}H_{104}N_7O_{27}$, [M+H]+，理论：1534.70，实测：1534.63。

（4-3）V-2 的合成

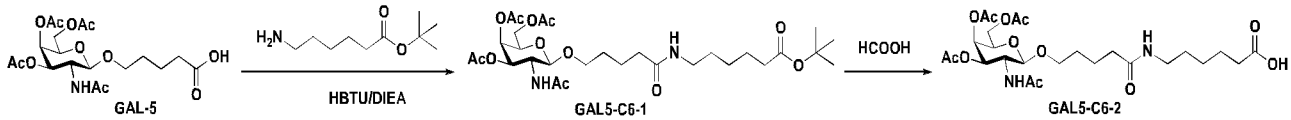
在氩气保护条件下向 10ml 无水二氯甲烷中加入按照步骤（4-2）合成的多批产物合并得到的 V-1（1.535g，1.0mmol）、三氟乙酸吡啶盐（0.232g，1.2mmol）、N-甲基咪唑（0.099g，1.2mmol），双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦（0.452g，1.5mmol），室温搅拌反应 5 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯=2:1-1:3 梯度洗脱梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 1.490g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.15 (s, 0H), 8.07 (s, 0H), 7.86 (s, 0H), 7.46 (s, 0H), 7.50 – 7.41 (m, 0H), 7.36 – 7.25 (m, 0H), 6.89 – 6.81 (m, 0H), 5.55 (dd, J = 22.4, 7.0 Hz, 0H), 4.49 – 4.35 (m, 0H), 4.31 – 4.19 (m, 0H), 4.23 – 4.09 (m, 0H), 4.13 – 3.99 (m, 0H), 4.01 – 3.88 (m, 0H), 3.79 (s, 0H), 3.82 – 3.21 (m, 1H), 3.10 (ddd, J = 12.5, 6.1, 3.2 Hz, 0H), 2.98 – 2.75 (m, 0H), 2.74 – 2.52 (m, 0H), 2.54 – 2.38 (m, 0H), 2.41 – 2.25 (m, 0H), 2.29 – 2.21 (m, 0H), 2.20 – 1.93 (m, 1H), 1.83 – 1.66 (m, 0H), 1.70 – 1.50 (m, 0H), 1.39 – 1.21 (m, 0H), 1.18 – 1.02 (m, 0H), 0.95 – 0.79 (m, 0H), 0.70 (d, J = 6.8 Hz, 0H). ^{31}P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 148.79-147.75. MS m/z: $C_{84}H_{121}N_9O_{28}P$, [M+H]+，理论：1734.81，实测：1734.89。所得到的式（V-2）化合物具有符合式（406）所示的结构。

制备例 5 式（O-2）所示的化合物的合成

本制备例中，按照以下方法，合成了式（O-2）所示的化合物：



（5-1）GAL5-C6-2 的合成



（5-1a）GAL-C6-1 的合成

向 40ml N,N-二甲基甲酰胺中加入 GAL-5（4.5g，10.0mmol）、6-氨基己酸叔丁酯盐酸盐（2.2g，12.0mmol）、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐（5.7g，15.0mmol）、二异丙基乙胺（3.9g，30.0mmol），

室温搅拌反应 4 小时。向反应液中加入 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液，用 100ml 乙酸乙酯萃取 3 次，合并有机相，100ml 饱和食盐水洗涤一次，分出有机相，无水硫酸钠干燥，减压蒸出溶剂并用油泵抽干得到 10.5g GAL-C6-1 粗品直接进行下一步反应。

（5-1b）GAL-C6-2 的合成

将 GAL-C6-1 粗品（10.5g，10mmol）溶于 60ml 甲酸中，室温搅拌反应 16 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，二氯甲烷:甲醇=10:1-3:1 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 5.2g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.87 (s, 0H), 7.46 (s, 0H), 6.05 – 5.94 (m, 0H), 5.17 (t, J = 7.0 Hz, 0H), 4.54 (dd, J = 12.4, 6.9 Hz, 0H), 4.33 (q, J = 7.0 Hz, 0H), 3.88 (t, J = 7.0 Hz, 0H), 3.75 – 3.58 (m, 0H), 3.38 (td, J = 12.3, 2.1 Hz, 0H), 3.17 – 3.07 (m, 0H), 2.57 – 2.46 (m, 0H), 2.50 – 2.35 (m, 0H), 2.28 (ddd, J = 12.3, 4.5, 2.1 Hz, 0H), 2.27 – 2.08 (m, 0H), 2.09 – 1.90 (m, 1H), 1.76 – 1.63 (m, 0H), 1.62 – 1.37 (m, 0H), 1.05 – 0.92 (m, 0H). MS m/z：$C_{25}H_{39}N_2O_{12}$，[M-H]-，理论：559.25，实测：559.32。

（5-2）O-1 的合成

向 10ml 二氯甲烷中加入 GAL5-C6-2（1.345g，2.4mmol）、3 -二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（0.897g，3.0mmol）、二异丙基乙胺（0.775g，6.0mmol），室温反应 1 小时。再加入 N-4（0.505g，1.0mmol），在 25°C 搅拌反应 18 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.1-1:1:1:0.3 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 1.298g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.46 (s, 3H), 7.50 – 7.41 (m, 1H), 7.36 – 7.25 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 6.05 – 5.94 (m, 2H), 5.39 – 5.28 (m, 2H), 5.16 (td, J = 7.0, 2.9 Hz, 2H), 4.57 (ddd, J = 32.7, 12.3, 6.9 Hz, 2H), 4.46 – 4.25 (m, 2H), 4.29 – 4.16 (m, 2H), 4.10 – 3.83 (m, 3H), 3.82 – 3.66 (m, 8H), 3.71 – 3.57 (m, 2H), 3.55 – 3.34 (m, 3H), 3.33 – 2.80 (m, 13H), 2.28 – 2.07 (m, 4H), 2.03 (d, J = 12.0 Hz, 19H), 1.97 (s, 6H), 1.98 – 1.72 (m, 3H), 1.73 – 1.57 (m, 1H), 1.44 – 0.84 (m, 8H). MS m/z: $C_{79}H_{112}N_7O_{27}$, [M+H]+, 理论: 1590.76, 实测：1590.83。

（5-3）O-2 的合成

在氩气保护条件下向 10ml 无水二氯甲烷中加入按照步骤（5-2）合成的 O-1（1.591g，1.0mmol，由两批次产物合并而得）、三氟乙酸吡啶盐（0.232g，1.2mmol）、N-甲基咪唑（0.099g，1.2mmol），双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦（0.452g，1.5mmol），室温搅拌反应 5 小时。蒸发溶剂至干，柱层析（200~300 目正相硅胶，石油醚:乙酸乙酯=2:1-1:2 梯度洗脱梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得目标产物 1.501g。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.70 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.36 – 7.25 (m, 3H), 6.89 – 6.81 (m, 2H), 6.05 – 5.94 (m, 2H), 4.53 – 4.35 (m, 3H), 4.18 (ddd, J = 12.0, 9.2, 7.0 Hz, 1H), 3.97 – 3.78 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.67 – 3.45 (m, 1H), 3.45 – 3.22 (m, 2H), 3.15 (dt, J = 12.3, 7.1 Hz, 1H), 3.00 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.83 (hept, J = 6.8 Hz, 1H), 2.27 (td, J = 7.1, 3.1 Hz, 1H), 2.17 – 2.09 (m, 2H), 2.14 – 1.95 (m, 12H), 1.63 – 1.45 (m, 5H), 1.34 (dtd, J = 9.0, 7.0, 2.4 Hz, 4H), 1.05 (dd, J = 20.0, 6.8 Hz, 5H). ^{31}P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 148.66-147.93. MS m/z: $C_{88}H_{129}N_9O_{28}P$, [M+H]+, 理论: 1790.87, 实测: 1790.81。所合成的式（O-2）化合物具有符合式（407）所示的结构。

制备例 6 连接至固相载体的式（101）所示的化合物的制备

本制备例中，以式（N-6）、（W-2）、（V-2）、（X-2）、（O-2）所示的化合物出发，按照以下方法制备了连接至固相载体的的化合物。

（6-1）连接至固相载体的 N-6_2 化合物的合成

此步骤中，通过将两个式（N-6）所示的化合物依次连接至固相载体，制备了 N-6_2 化合物。

由通用固相载体（NittoPhase®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support, Kinovate Life Sciences 公司，结构如式（B80）所示，载量 300μmol/g）起始，脱除固相载体上的保护基团，在偶联反应条件和偶联试剂存在下，将制备例 1 获得的式（N-6）所示的化合物与该固相载体接触，随后，进行盖帽反应，再进行氧化反应。随后，对得到的产物进行脱保护，随后与式（N-6）所示的化合物再接触一次，进行盖帽反应，并进行氧化反应，得到两个式（N-6）所示的化合物依次连接至固相载体的化合物，即，连接至固相载体的 N-6_2 化合物。该化合物具有式（503）所示的结构。

（6-2）连接至固相载体的化合物的合成

采用与（6-1）相同的方法制备了本公开的连接至固相载体的化合物，不同之处在于，分别以两个式（W-2）、（V-2）、（X-2）或（O-2）所示的化合物代替（6-1）中的式（N-6）所示的化合物依次连接至固相载体。所得到的连接至固相载体的 X-2_2 化合物、连接至固相载体的 W-2_2 化合物、连接至固相载体的 V-2_2 化合物、连接至固相载体的 O-2_2 化合物依次具有式（504）、（505）、（506）或（507）所示的结构。

（6-3）连接至固相载体的化合物的合成

采用与（6-1）相同的方法制备了连接至固相载体的化合物，不同的是：由通用固相载体起始，

仅进行一次与式(N-6)所示的化合物的接触，随后进行盖帽反应和氧化反应，得到仅有一个式(N-6)所示的化合物连接至固相载体的 N-6_1 化合物；或者，脱除连接至固相载体的 N-6_2 化合物上的羟基保护基团，随后再接触一次式（N-6）所示的化合物，随后进行盖帽和氧化反应，得到三个式（N-6）所示的化合物依次连接至固相载体的 N-6_3 化合物。上述连接至固相载体的 N-6_1 化合物和连接至固相载体的 N-6_3 化合物依次具有式（508）或（509）所示的结构。

制备例 7 N6-siHBa1 缀合物（缀合物 13）的合成

本制备例中，以上述制备的连接至固相载体的 N-6_2 化合物出发，按照以下方法制备了 N6-siHBa1 缀合物（缀合物 13）：

本步骤中，药物缀合物的 siRNA 为编号为 siHBa1 的序列：

正义链：5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAA-3'（SEQ ID NO: 331），

反义链：5'- UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU -3'（SEQ ID NO: 332）；

（7-1）合成正义链

通过亚磷酰胺核酸固相合成的方法，利用上述制备的连接至固相载体的 N-6_2 化合物起始循环，按照上述序列顺序按照 3'-5'的方向逐一连接核苷单体。每连接一个核苷单体都包括脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应。合成条件给定如下：

核苷单体以 0.1M 浓度的乙腈溶液提供，每一步的脱保护反应的条件相同，即温度为 25°C，反应时间为 70 秒，脱保护试剂为二氯乙酸的二氯甲烷溶液（3%v/v），二氯乙酸与固相载体上 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基的摩尔比为 5:1。

每一步偶联反应条件均相同，包括温度为 25°C，固相载体上连接的核酸序列与核苷单体的摩尔比为 1:10，固相载体上连接的核酸序列和偶联试剂的摩尔比为 1:65，反应时间为 600 秒，偶联试剂为 5-乙硫基-1H-四氮唑的 0.5M 乙腈溶液。

每一步盖帽条件均相同，包括温度为 25°C，反应时间为 15 秒。盖帽试剂溶液为摩尔比为 1:1 的 CapA 和 CapB 的混合溶液，CapA 为 20 体积%N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液，吡啶与乙腈的体积比为 3:5；CapB 为 20 体积%乙酸酐的乙腈溶液；盖帽试剂与固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为乙酸酐:N-甲基咪唑:固相载体上连接的核酸序列=1:1:1。

每一步氧化反应条件相同，包括温度为 25°C，反应时间为 15 秒，氧化试剂为浓度为 0.05M 的碘水。碘与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 30:1。反应在四氢呋喃:水:吡啶=3:1:1 的混合溶剂中进行。

切割和脱保护条件如下：将合成的连接有载体的核苷酸序列加入浓度为 25wt%的氨水中，氨水用量为 0.5ml/μmol，在 55°C 反应 16h，除去液体，真空浓缩至干。在氨水处理后，相对于单链核酸的量，用 0.4ml/μmol N-甲基吡咯烷酮溶解产品，随后加入 0.3ml/μmol 三乙胺和 0.6ml/μmol 三乙胺三氢氟酸盐，脱除核糖上的 2'-O-TBDMS 保护。纯化与脱盐：利用制备型离子色谱纯化柱（Source 15Q），通过 NaCl 的梯度洗脱，完成核酸的纯化。具体而言为：洗脱剂 A：20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱剂 B：1.5M 氯化钠，20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱梯度：洗脱剂 A:洗脱剂 B=100:0-50:50 梯度洗脱。收集产品洗脱液后合并，采用反相色谱纯化柱进行脱盐，具体条件包括采用葡聚糖凝胶柱进行脱盐，填料为葡聚糖凝胶 G25，以去离子水洗脱。

检测：使用离子交换色谱（IEX-HPLC）进行检测，纯度为 92.4%；采用液质联用（LC-MS）分析分子量，理论值 7748.37，实测值 7747.50。

从而，该步骤中将 N-6_2 化合物连接至所得到的正义链的 3'末端，得到 N-6_2 化合物缀合在 siRNA 3'末端的 siRNA 正义链 S。

（7-2）合成反义链

本步骤中，利用通用固相载体（UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports，Kinovate Life Sciences 公司），合成了 N6-siHBa1 缀合物的反义链 AS。固相合成方法中的脱保护、偶联、盖帽、氧化反应条件，脱保护和切割，分离条件与合成正义链相同，得到反义链 AS。

检测：纯度采用离子交换色谱（IEX-HPLC）进行检测，其结果，纯度 93.2%；分子量采用液质联用（LC-MS）进行分析。理论值 6675.04，实测值：6674.18。

（7-3）合成 N6-siHBa1 缀合物

将步骤（7-1）中合成的正义链与（7-2）中合成的反义链以等摩尔比混合，溶于注射用水中并加热至 95°C，室温冷却后，使它们通过氢键形成双链结构。

在上述合成完成后，利用液质联用仪（LC-MS，Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，购于 Waters 公司，型号：LCT Premier）进行分子量检测。其结果，理论值 S：7748.37，AS：6675.04，实测值 S：7747.82，AS：6674.43，实测值与理论值一致，从而确定所合成的药物缀合物是目标设计的

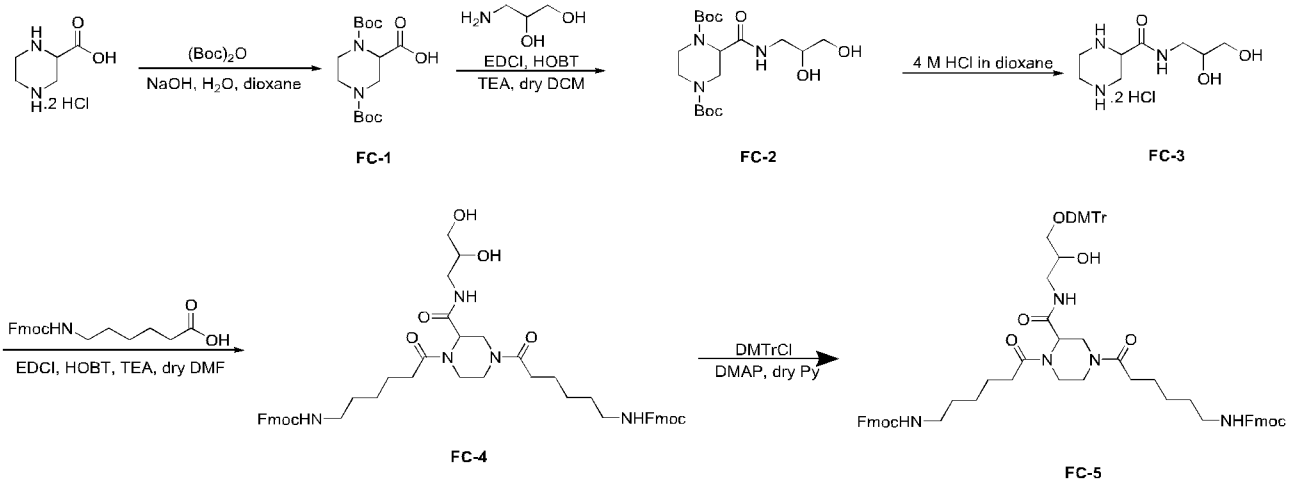
缀合有连续两个式（N-6）所示的化合物的双链核酸序列。N6-siHBa1 缀合物（缀合物 13）的结构如式（303）所示。

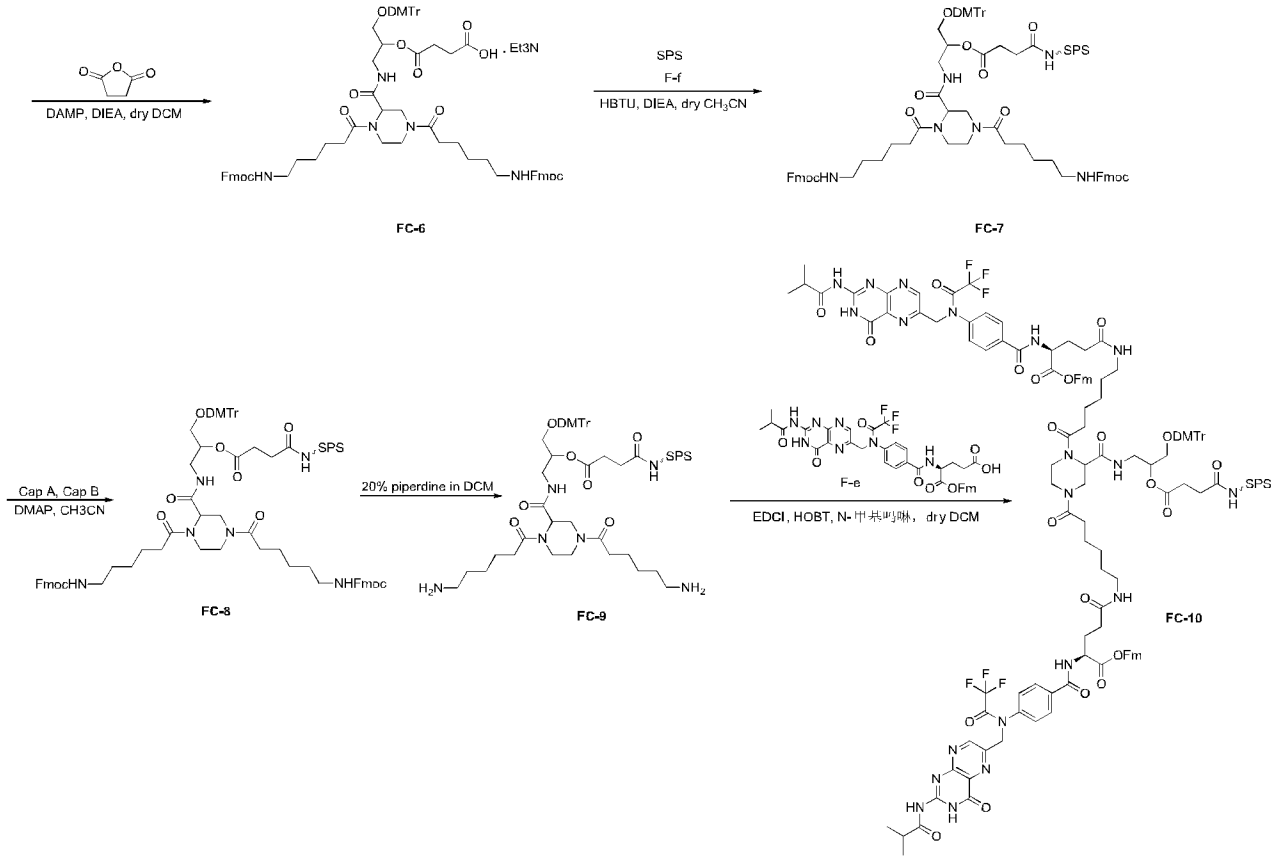
制备例 8 缀合物 14-184 以及对比缀合物 1 的制备

采用与制备例 7 相同的方法制备题述各药物缀合物，不同的是：1）缀合的 siRNA 具有表 2A-表 2G 中所示的对应于缀合物 14-184 以及对比缀合物 1 的序列；2）对于缀合物 38-42、60-64、77-81、94-98、116-120、154-158 以及 179-184，分别以上述制备例 6 获得的连接至固相载体的 X-2_2 化合物、连接至固相载体的 W-2_2 化合物、连接至固相载体的 V-2_2 化合物或连接至固相载体的 O-2_2 化合物代替连接至固相载体的 N-6_2 化合物 6（例如，以连接至固相载体的 X-2_2 化合物代替连接至固相载体的 N-6_2 化合物时，获得的是缀合物 38、60、77、94、116 和 154，以连接至固相载体的 W-2_2 化合物代替连接至固相载体的 N-6_2 化合物时，获得的是缀合物 39、61、78、95、117 和 155，以此类推）；3）当目标序列中两个核苷酸之间为硫代磷酸酯连接时，用以下硫化反应步骤代替该两个核苷酸中后一个核苷酸的连接中的氧化反应步骤；每一步硫化反应的条件相同，包括温度为 25°C，反应时间为 300 秒，硫化试剂为氢化黄原素。硫化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 120:1。反应在乙腈:吡啶=1:1 的混合溶剂中进行；并且 4）当目标序列中的全部核苷酸的 2'-位均为修饰的羟基基团时，切割与脱保护条件中，不包括脱除核糖上的 2'-O-TBDMS 保护的步骤。从而，制备得到本公开的药物缀合物 14-183 以及对比缀合物 1，按照表 2A-2G 对其分别进行编号。通过液质联用仪检测分子量，确认上述缀合物分别具有如式（303）、（304）、（305）、（306）、（307）或（308）所示的结构。

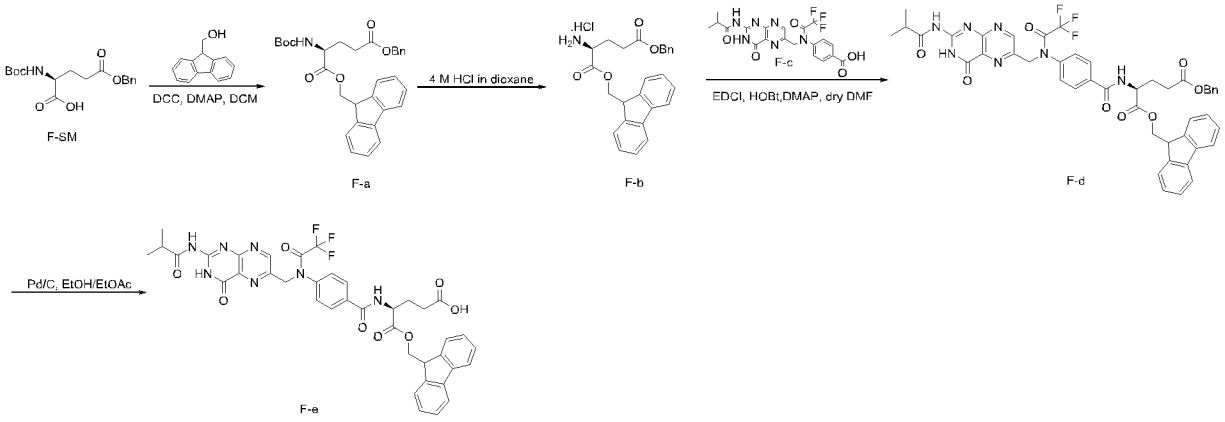
制备例 1B（FC-10 化合物的合成）

本制备例中，按照以下方法，合成了 FC-10 化合物：

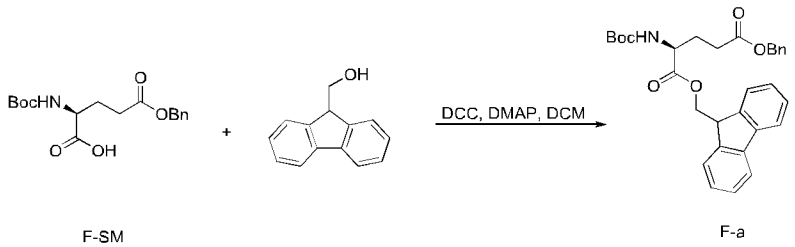




（1B-1）缀合末端段 F-e 的合成



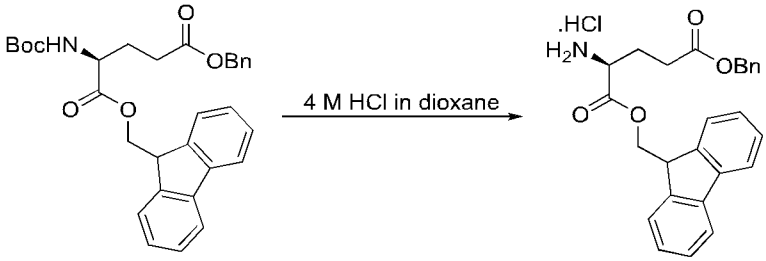
（1B-1-1a）F-a 的合成



将式 F-SM 所示的化合物（购自北京偶合科技有限公司，CAS 号：5793-73-8，5.0 g）、(9H-芴-9-基)甲醇（购自北京偶合科技有限公司，CAS 号 24324-17-2，3.2 g）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP， CAS 号 1122-58-3，购自北京偶合科技有限公司，0.4 g）溶于 80 mL 无水二氯甲烷中，在 0°C 且氮气保护条件下，加入二环己基碳二亚胺（DCC，3.7 g，购自北京偶合科技有限公司，CAS 号 538-75-0）。加

入后，将混合物加热至室温并搅拌 4 小时。过滤除去形成的固体，并在减压条件下浓缩滤液。柱层析（200~300 目正相硅胶，乙酸乙酯：石油醚=1:10-1:6 梯度洗脱）纯化收集目标产物浓缩，得到无色油状产物 F-a 4.6g。MS m/z:[M+H]+ 理论：516.2，实际：[M+H-Boc]：515.9。

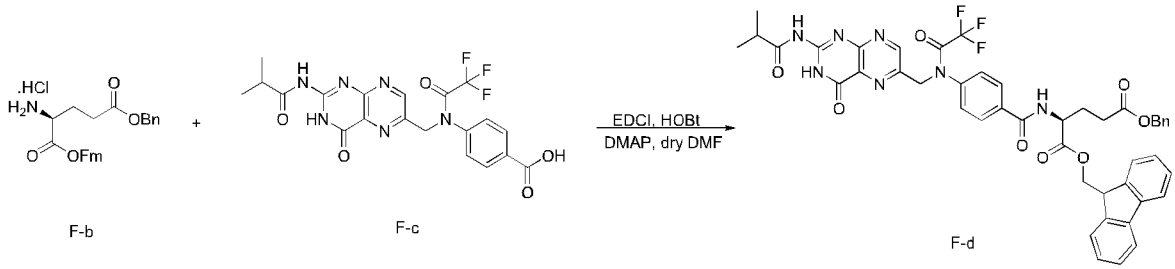
（1B-1-1b）F-b 的合成



F-a F-b

将步骤（1B-1-1a）得到的化合物 F-a（4.6 g）溶解于 40 ml 4 mol/L 氯化氢的二氧六环溶液中。将混合物在室温下搅拌 2 小时。减压条件下浓缩混合物，得到白色胶状产物 F-b 4.3g。理论分子量：MS m/z:[M+H]+：451.2，实测分子量：[M-HCl+H]+：415.9。

（1B-1-1c）F-d 的合成

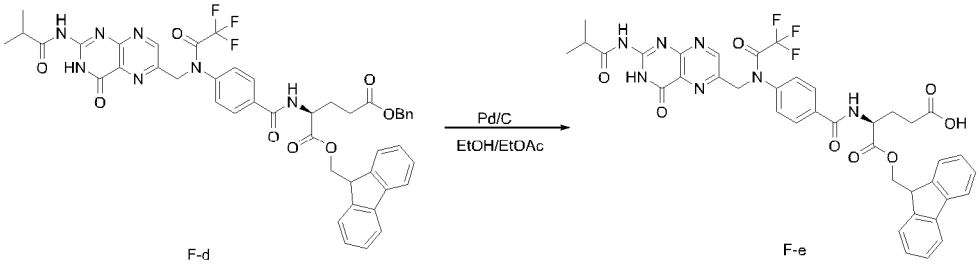


F-b F-c F-d

其中，式 F-b 中 Fm 表示 9-芴甲基。

将步骤（1B-1-1b）中得到的 F-b（3.8 g）、化合物 F-c（4.0 g，CAS 号 252847-30-6，参照 WO2009082607 中第 113 页中化合物 151 至化合物 152 记载的制备方法制备）、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDCI，CAS 号 25952-53-8，购自北京偶合科技有限公司，1.9 g）和 1-羟基苯并三唑（HOBt，CAS 号 2592-95-2，购自北京偶合科技有限公司，1.4 g）溶于 40 ml 无水二甲基甲酰胺（DMF）中，在 0°C 且氮气保护条件下，向混合液中加入 N,N-二异丙基乙胺（DIEA，4.3 g）。添加完毕，将混合物加热至室温并搅拌 2 小时，然后用 100 ml 饱和食盐水淬火，用乙酸乙酯萃取 2 次，每次 100ml。将合并的有机层用饱和食盐水洗涤 2 次，每次 100ml，后用无水硫酸钠干燥，过滤获得有机层并减压浓缩。残余物经硅胶层析（乙酸乙酯：石油醚=1:1 至 1:0 梯度洗脱）纯化，得到浅白色固体产物 F-d 1.0g。^{1}H NMR（300MHz，DMSO，PPm）12.26（s，1H），11.95（s，1H），9.04–8.76（m，2H），7.99–7.87（m，3H），7.82（dd，J=7.5，4.1Hz，2H），7.72（d，J=8.2Hz，2H），7.66–7.57（m，2H），7.58–7.29（m，8H），7.14（d d，J=8.4，6.1H z，2H），5.25（s，2H），5.07（d，J=5.1hz，2H），4.41（d t，J=16.1，11.6hz，3H），4.23（t，J=6.7hz，1H），2.89（s，2H），2.83-2.74（m，1H），2.73（s，2H），1.13（d，J=6.8hz，6H），MS m/z: [M+H]+ 理论：876.3，实测：875.7。

（1B-1-1d）F-e 的合成



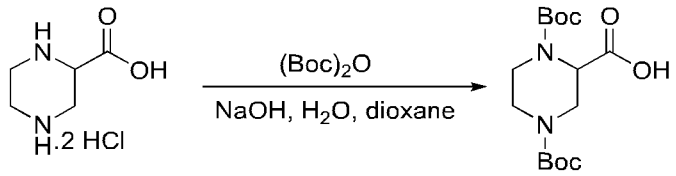
F-d F-e

将步骤（1B-1-1c）中得到的 F-d（1.0g）溶于 30 ml 乙醇和 10 ml 乙酸乙酯中，然后向混合液中加入 Pd/C（200 mg，10 %w/w）。将混合物在氢气保护条件下室温搅拌 4 小时，然后再在开放空气中于室温下搅拌 8 小时。过滤混合物并在减压条件下浓缩滤液。残余物经反相 C18 柱纯化（水:乙腈=0:1-4:6 的梯度洗脱），冷冻蒸发除去溶剂，得到黄色固体产物 F-e 400 mg。1H NMR（300 MHz，DMSO）δ12.15（d，J=124.0 Hz，5H），9.02~8.95（m，1H），8.90（d，J=6.1 Hz，1H），8.01~7.55（m，10H），

7.45~7.51（m，3H），7.25~7.12（m，2H），5.29–5.20（s，2H），4.60–4.45（m，1H），4.42–4.31（m，2H），4.29–4.20（m，1H），2.84–2.73（m，1H），2.40–2.25（m，3H），2.15–2.00（m，2H），2.00–1.85（m，1H），1.13（d，J=6.8Hz，6H），MS m/z: [M+H]+ 理论：786.2，实测：785.7。

以下，使用按照上述方法得到的 F-e 化合物，通过以下工艺路线合成了 FC-10 化合物：

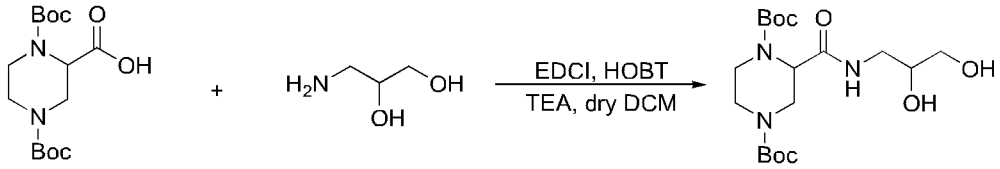
（1B-2）FC-1 的合成



FC-1

在 0°C-5°C 的温度下，将氢氧化钠（15.76 g）溶于 300 ml 水中，再向溶液中添加哌嗪-2-羧酸二盐酸盐（CAS 号 3022-15-9，购自北京偶合科技有限公司，20.00 g），得到反应混合物。将二碳酸二叔丁基甲酯（$(Boc)_2O$，CAS 号 24424-99-5，购自北京偶合科技有限公司，47.30g）溶解在 200ml 二氧六环溶液中，再加入至反应混合物。将混合物在室温下搅拌 15 小时。减压去除有机溶剂，将剩余水相冷却至 0°C-5°C，使用 3N 盐酸酸化至 pH=3，用乙酸乙酯萃取 2 次，每次 300ml。将合并的有机层用 300 ml 水洗涤 1 次，使用无水硫酸钠干燥，过滤并减压浓缩。得到白色固体状产物 FC-1 29.0 g。1H NMR（300 MHz，DMSO）δ12.88（s，1H），4.54–4.16（m，2H），3.79（d，J=10.3 Hz，1H），3.62（d，J=12.7 Hz，1H），3.16–2.87（m，2H），2.85–2.65（m，1H），1.38–1.28（m，18H），MS m/z: [M+H]+ 理论：330.2，实测：$[2M+H^+ +Na^+]$=682.9。

（1B-3）FC-2 的合成

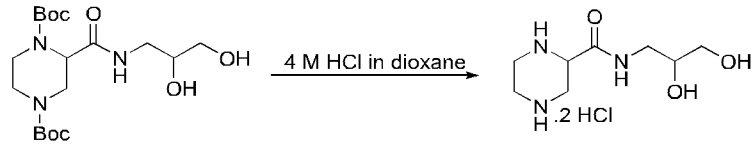


FC-1 FC-2

将步骤（1B-2）中得到的 FC-1（27.70 g）、1-羟基苯并三唑（HOBt，13.60 g）和三乙胺（TEA，34.00 g，北京偶合科技有限公司，CAS 号 121-44-8）溶于 150 ml 无水二甲基甲酰胺中，持续搅拌，在温度为 0°C 时，向搅拌的混合液中分部分加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDCl，19.30 g），然后加入 3-氨基丙烷-1,2-二醇（8.40 g，北京偶合科技有限公司，Cas 号 616-30-8）。加入后，将混合物在室温下搅拌 5 小时。加入 150 ml 饱和食盐水冷却反应，用乙酸乙酯萃取 2 次，每次 150ml。将合并的有机层用饱和食盐水洗涤 2 次，每次 150ml，后用无水硫酸钠干燥，过滤并减压浓缩。浓缩物经硅胶层析（乙酸乙酯:石油醚:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0 至 1:1:1:0.2 梯度洗脱）纯化，得到白色固体状产物 FC-2 21.0g。

^{1}HNMR（300 MHz，CDCl3）δ6.67–6.51（m，1H），4.56（s，1H），4.44（d，J=13.3 Hz，1H），3.95–3.66（m，J=43.2，7.2 Hz，3H），3.65–2.81（m，9H），1.43（d，J=5.5 Hz，18H），MS m/z: [M+H]+ 理论：404.2，实测：404.0。

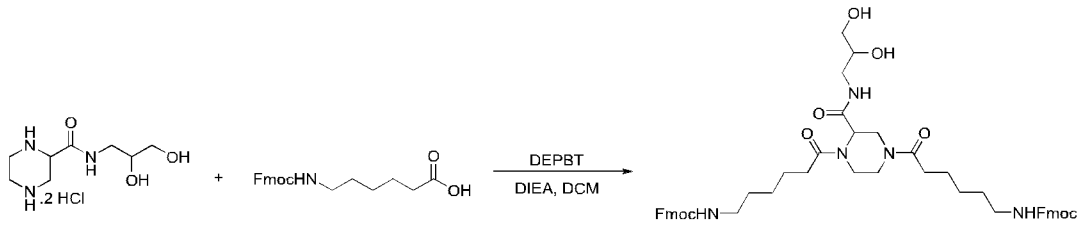
（1B-4）FC-3 的合成



FC-2 FC-3

将步骤（1B-3）中得到的 FC-2（17.00 g）溶解在 100 ml 4mol/L 氯化氢的二氧六环溶液中。在室温下搅拌 1 小时。在减压条件下浓缩混合物，得到白色固体状产物 FC-3 12.0 g。MS m/z: [M+H]+ 理论：204.1，实测：204.1。

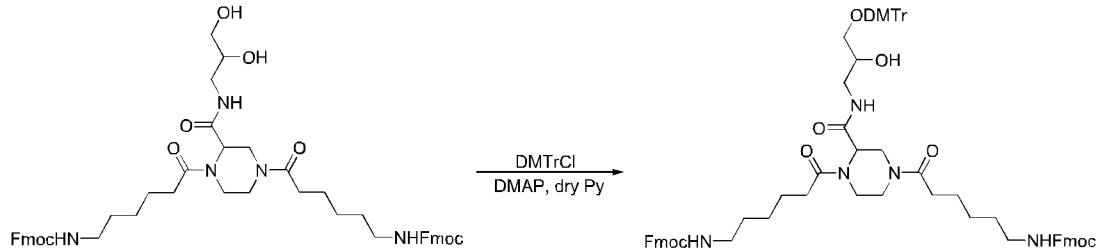
（1B-5）FC-4 的合成



FC-3 FC-4

在室温下向 250 ml 无水二氯甲烷中加入 3-二乙氧基磷酰氧基-1,2,3-苯唑 4(3H)-酮（DEPBT, 25.40 g，购自北京偶合科技有限公司，CAS 号 165534-43-0），持续搅拌，然后将 6-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)己酸（6-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbo nyl)amino)hexanoic acid，CAS 号 88574-06-5，购自北京偶合科技有限公司，24.00 g）和 N,N-二异丙基乙胺（DIEA, 22.00 g）加入至混合液中，将混合物在室温下搅拌 30 分钟。在温度为 0°C 时，加入步骤（1B-4）获得的的 FC-3（7.80 g）。添加完毕后，将混合物在室温下搅拌 18 小时。用 150 ml 饱和食盐水淬火，用二氯甲烷萃取 2 次，每次 150 ml。将合并的有机层用饱和食盐水洗涤 2 次，每次 150 ml，使用无水硫酸钠干燥，过滤并减压浓缩。柱层析（200~300 目正相硅胶，乙酸乙酯:石油醚:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.2 至 1:1:1:0.4 梯度洗脱）纯化，得到淡黄色固体状产物 FC-4 14.7g。MS m/z:[M+H]+ 理论：874.4，实测：873.8。

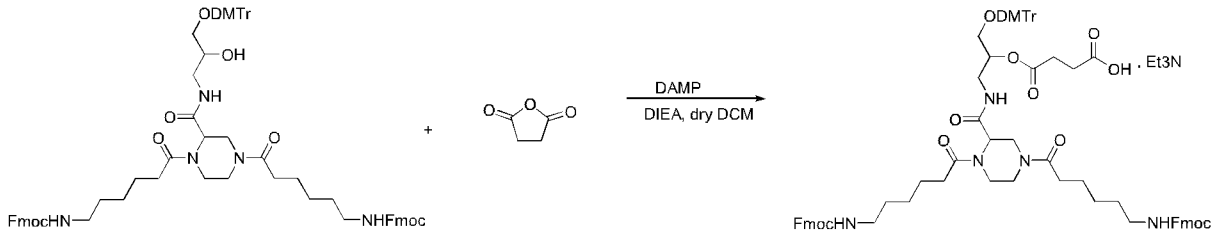
（1B-6）FC-5 的合成



FC-4 FC-5

在 0°C 时持续搅拌下向 40 ml 无水吡啶中加入 4,4'-双甲氧基三苯甲基氯（DMTrCl, 3.70 g），然后将 1B-5 中所得产物 FC-4 （8.00 g）和 4-二甲氨基吡啶（0.22 g）加入至混合液中，然后在室温且氮气保护条件下将混合物搅拌过夜。减压条件下浓缩混合物，柱层析(200~300 目正相硅胶，先以含 0.1%三乙胺（v/v）的石油醚平衡柱子，随后以乙酸乙酯:石油醚:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.1 至 1:1:1:0.3 梯度洗脱）纯化，得到白色固体状产物 FC-5 7.5g。MS m/z:[m+Na]+ 理论：1198.6，实测：1198.6。

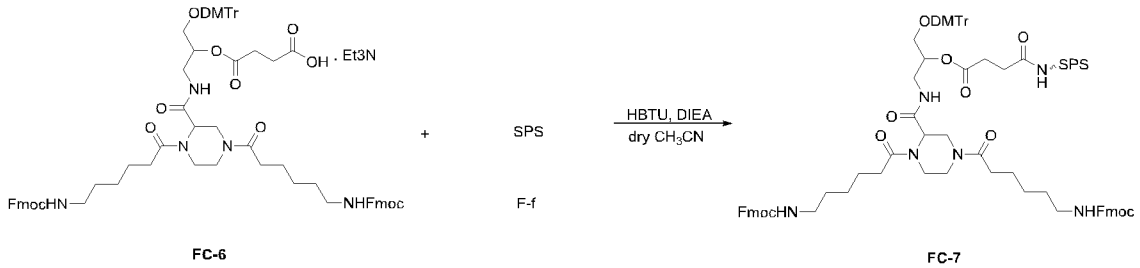
（1B-7）FC-6 的合成



FC-5 FC-6

在室温下，向 60 ml 无水二氯甲烷中加入丁二酸酐（CAS 号 108-30-5，购自北京偶合科技有限公司，0.43 g），将步骤（1B-6）得到的 FC-5（3.60 g）、N,N-二异丙基乙胺（DIEA1.97 g）和 4-二甲氨基吡啶（DMAP37.30 mg）加入至混合液中，然后在室温下在氮气保护条件下将混合物搅拌过夜。然后用硅胶层析法（先以含 0.1%三乙胺（v/v）的石油醚平衡柱子，随后以二氯甲烷:甲醇=20:1 至 10:1 梯度洗脱）纯化，得到白色固体状产物 FC-6 4.0g。MS m/z:[m+Na]+ 理论：1399.7，实测：[m-Et3N+Na]:1298.6。

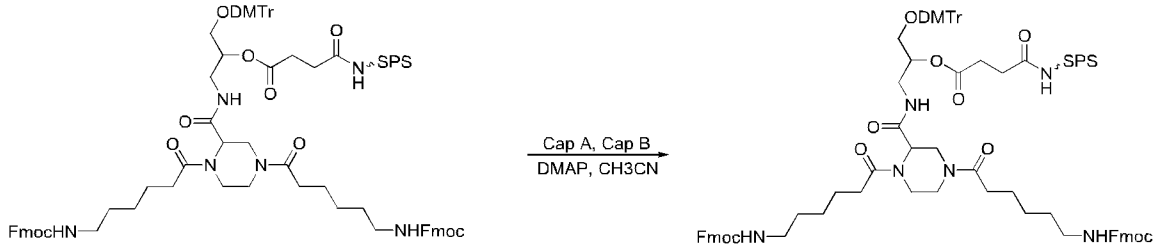
（1B-8）FC-7 的合成



FC-6 FC-7

在室温下向 40 ml 无水乙腈中加入苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐（HBTU，CAS 号 94790-37-1，购自北京偶合科技有限公司，0.83 g），持续搅拌，加入步骤（1B-7）得到的 FC-6（2.0 g）和 N,N-二异丙基乙胺（DIEA，0.40 g）。然后在氮气保护条件下在室温下将混合物搅拌 30 分钟。然后将氨基树脂（4.1g，400 μmol/g，购自天津南开和成科技有限公司，产品型号：HC4025）加入混合物中，通过震荡反应器将混合物旋转反应 21 小时。过滤混合物，用 50 ml 二氯甲烷、50 ml 乙腈各洗涤 1 次，减压条件下干燥滤饼，得到黄色固体状产物 FC-7 5.4 g，载样量：269μmol/g。

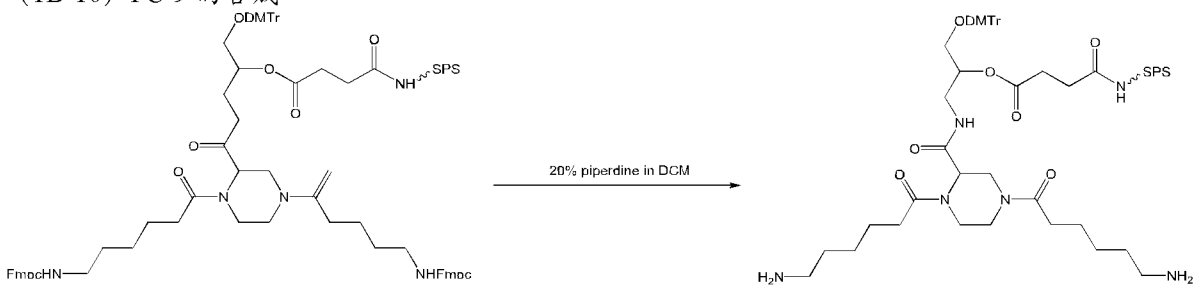
（1B-9）FC-8 的合成



FC-7 FC-8

将盖帽试剂 A（CapA，121.5 ml，22.5 ml/g）和盖帽试剂 B（CapB，13.5 ml，2.5 ml/g）均匀混合，CapA 为 20 体积%N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液，吡啶与乙腈的体积比为 3:5；CapB 为 20 体积%乙酸酐的乙腈溶液；然后将其添加到 4-二甲氨基吡啶（DMAP，67.5 mg，0.0125 g/g）和乙腈（13.5 ml，2.5 ml/g）的混合物中。将上述混合物充分混合，然后添加步骤（1B-8）中所得的 FC-7（5.4 g，1.0 g/g）。在室温下通过震荡反应器将得到的混合物旋转反应 5 小时。过滤分离反应混合物，用 50 ml 乙腈洗涤滤饼一次，减压条件下干燥滤饼，得到淡黄色固体状产物 FC-8 5.6g。

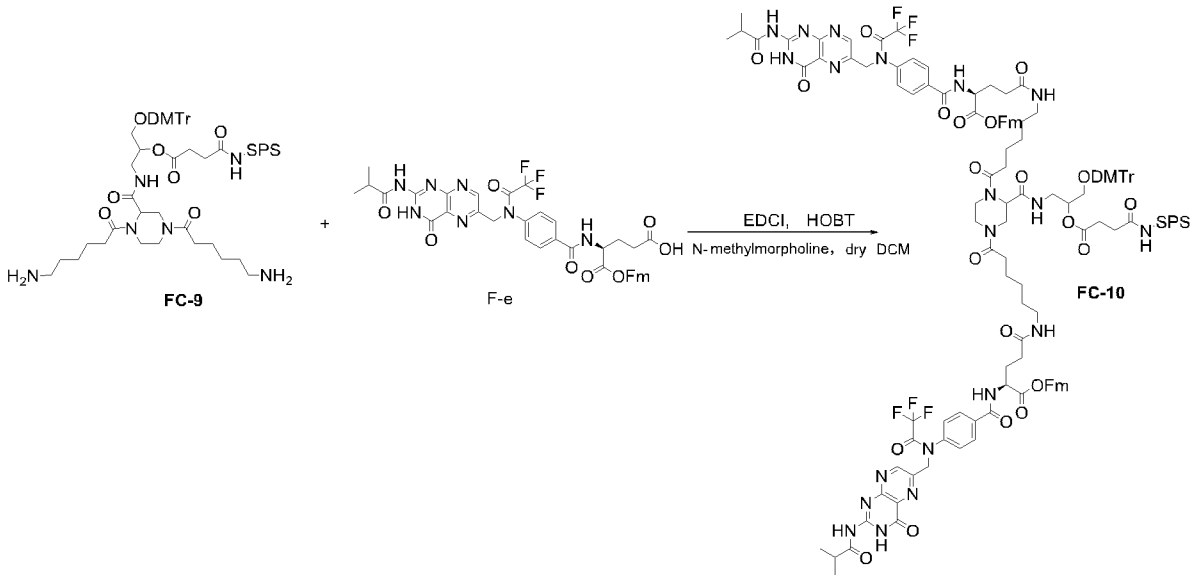
（1B-10）FC-9 的合成



FC-8 FC-9

将步骤（1B-9）中所得的 5.6g FC-8 加入 44 ml 哌啶的二氯甲烷溶液（20% v/v）中，通过震荡反应器将所得混合物旋转反应 5 小时。过滤混合物，用 150 ml 乙腈洗涤 1 次，减压条件下干燥滤饼，得到黄色固体状产物 FC-9 5.0g。

（1B-11）FC-10 的合成



将步骤（1B-10）所得的 FC-9（0.86 g）、步骤（1B-1-1d）获得的化合物 F-e（400 mg）、1-羟基苯并三唑(HOBt, 78 mg)、N-甲基吗啉(151 mg)和 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCl, 112 mg)溶解于 12 ml 无水 1,2-二氯乙烷中。在室温下，通过震荡反应器将得到的混合物旋转 18 小时。过滤混合物，用 30 ml 乙腈、30 ml 二氯甲烷洗涤，减压条件下干燥滤饼，得到黄色固体状产物 FC-10 800mg，载样量：269μmol/g。

制备例 2B 缀合物 185 的合成

（2B-1）合成 FC-siSTAT1 缀合物正义链

本步骤中，药物缀合物的 siRNA 为编号为 siSTAT1 的序列：

siSTAT1

正义链：

5'- CmsUmsAmGmAmAmAfAfCfUmGmGmAmUmAmAmCmGmUm -3'（SEQ ID NO: 723），

反义链：

5'- AmsCfsGmUmUmAfUmCmCmAmGmUmUmUfUmCfUmAmGmsCmsCm -3'（SEQ ID NO: 724）；

其中，正义链 3'末端缀合有 FC-10 化合物，反义链 5'末端连接有 Cy5 荧光基团。

通过亚磷酰胺固相合成的方法，由上述步骤制备的 FC-10 化合物代替固相合成方法中的固相载体起始，按照上述序列顺序按照 3'-5'的方向逐一连接核苷单体。每连接一个核苷单体都包括脱保护、偶联、盖帽、和氧化四步反应。其中，两个核苷酸之间采用磷酸酯连接时，连接后一个核苷单体时，包括脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应。两个核苷酸之间采用硫代磷酸酯连接时，连接后一个核苷单体时，包括保护、偶联、盖帽、硫化四步反应。合成条件给定如下：

核苷单体以 0.1M 浓度的乙腈溶液提供，每一步的脱保护反应的条件相同，即温度为 25°C，反应时间为 70 秒，脱保护试剂为二氯乙酸的二氯甲烷溶液(3%v/v)，二氯乙酸与固相载体上 4,4'-二甲氧基三苯甲基保护基的摩尔比为 5:1。

每一步偶联反应条件均相同，包括温度为 25°C，固相载体上连接的核酸序列与核苷单体的摩尔比为 1:10，固相载体上连接的核酸序列和偶联试剂的摩尔比为 1:65，反应时间为 600 秒，偶联试剂为 5-乙硫基-1H-四氮唑（5-(Ethylthio)-1H-tetrazole，ETT）的 0.5M 乙腈溶液。

每一步盖帽条件均相同，包括温度为 25°C，反应时间为 15 秒。盖帽试剂溶液为摩尔比为 1:1 的 CapA 和 CapB 的混合溶液，CapA 为 20 体积%N-甲基咪唑的吡啶/乙腈混合溶液，吡啶与乙腈的体积比为 3:5；CapB 为 20 体积%乙酸酐的乙腈溶液；盖帽试剂与固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为乙酸酐:N-甲基咪唑:固相载体上连接的核酸序列=1:1:1。

每一步氧化反应条件相同，包括温度为 25°C，反应时间为 15 秒，氧化试剂为浓度为 0.05M 的碘水。碘与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 30:1。反应在四氢呋喃:水:吡啶=3:1:1 的混合溶剂中进行。

每一步硫化反应的条件相同，包括温度为 25°C，反应时间为 300 秒，硫化试剂为氢化黄原素。硫化试剂与偶联步骤中固相载体上连接的核酸序列的摩尔比为 120:1。反应在乙腈:吡啶=1:1 的混合溶剂中进行。

待最后一个核苷单体连接完成后，依次对固相载体上连接的核酸序列进行切割、脱保护、

纯化、脱盐，随后冻干获得正义链，其中，切割和脱保护条件如下：将合成的连接有载体的核苷酸序列加入浓度为 25wt%的氨水中，氨水用量为 0.5ml/μmol，在 55°C 反应 16h，过滤去除剩余载体，将上清液真空浓缩至干，随后加入至过量的 20%哌啶的二氯甲烷溶液，室温孵育 4h 脱除 Fm 基团后，真空浓缩至干。

纯化与脱盐条件如下：利用制备型离子色谱纯化柱（Source 15Q），通过 NaCl 的梯度洗脱，实现核酸的纯化。具体而言为：洗脱剂 A：20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱剂 B：1.5M 氯化钠，20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱梯度：洗脱剂 A:洗脱剂 B=100:0-50:50 梯度洗脱。收集产品洗脱液后合并，采用反相色谱纯化柱进行脱盐，具体条件包括采用葡聚糖凝胶柱进行脱盐，填料为葡聚糖凝胶 G25（Sephadex G25），以去离子水洗脱。

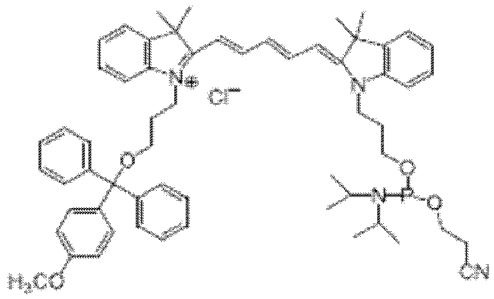
检测：使用离子交换色谱（IEX-HPLC）检测的纯度为 92.4%；采用液质联用仪（LC-MS）分析分子量，理论值 7253.96，实测值 7253.12。

从而，该步骤中将 FC-10 化合物连接至所得到的正义链的 3'末端，得到 FC-10 化合物缀合在 siRNA 3'末端的 siRNA 正义链 S。

（2B-2）合成 FC-siSTAT1 缀合物的反义链

采用与缀合物 29 中制备反义链相同方法制备 FC-siSTAT1 缀合物的反义链，不同的是：（1）在连接反义链最后一个核苷单体后，再额外将 Cy5 荧光基团连接到反义链上；（2）反义链的切割与脱保护条件不同。

具体来说：在（1）中，在按照制备例 1 中步骤（7-2）中所描述的固相亚磷酰胺法制备反义链过程中，连接反义链最后一个核苷单体后，再经脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应将式（901）所示的 Cy5 亚磷酰胺单体（购自上海兆维科技发展有限公司，货号为 OP-057）连接至反义链 5'末端。其中，使用的脱保护、偶联、盖帽、氧化反应条件与步骤（7-2）合成反义链相同，不同在于：1）脱保护反应时间延长至 300 秒；2）Cy5 偶联反应时间延长至 900 秒。



式（901）

在（2）中，切割和脱保护条件如下：将合成的连接有载体的核苷酸序列加入 AMA 溶液（40wt%甲胺水溶液与 25wt%氨水体积比为 1：1 的混合溶液）中，AMA 溶液用量为 0.5ml/μmol，在 25°C 水浴条件下反应 2h，过滤去除剩余载体，将上清液真空浓缩至干。反义链的纯化和脱盐条件与步骤(7-2)中合成反义链时的纯化和脱盐相同。随后冻干，得到 FC-siSTAT1 缀合物的反义链 AS。

从而，得到药物缀合物 FC-siSTAT1 缀合物，该药物缀合物的 siRNA 反义链的 5'末端共价连接有 Cy5 荧光基团，具有表 2H 所示的对应于药物缀合物 FC-siSTAT1 缀合物的正义链和反义链序列。

检测：采用离子交换色谱(IEX-HPLC)进行检测的纯度为 93.2%；分子量采用液质联用仪(LC-MS)进行分析。理论值 6675.04，实测值 6674.50。

（2B-3）合成 FC-siSTAT1 缀合物

将步骤(2B-1)中获得的正义链和(2B-2)中获得的反义链分别溶于注射用水溶液中，得到 40 mg/ml 的溶液。将它们以等摩尔比混合，在 50°C 下加热 15 分钟，冷却至室温以使其通过氢键形成双链结构。

在上述合成完成后，用超纯水(Milli-Q 超纯水仪自制，电阻率 18.2MΩ*cm(25°C))将缀合物稀释至 0.2mg/mL 的浓度。利用液质联用仪（LC-MS，Liquid Chromatography-Mass Spectrometry，购于 Waters 公司，型号：LCT Premier）进行分子量检测。其结果，分子量理论值 S：7253.96，AS：6675.04；分子量实测值 S：7253.24，AS：6674.61，实测值与理论值一致，从而确定所合成的缀合物是目标设计的带有 FC-10 化合物的双链核酸序列。FC-siSTAT1 缀合物（缀合物 185）的结构如式（311）所示。

表 2 药物缀合物

表 2A

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5' - 3'	SEQ ID NO

缀合物 14	N6-siHBa1	S	CCUUGAGGCAUACUUCAAA	331
		AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU	332
缀合物 15	N6-siHBa2	S	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA	333
		AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG	334
缀合物 16	N6-siHBa1M1	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	335
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	336
缀合物 17	N6-siHBa2M2	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	337
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	338
缀合物 18	N6-siHBa2M1	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	339
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	340
缀合物 19	N6-siHBa2M2	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	341
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	342
缀合物 20	N6-siHBa1M1S	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	343
		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	344
缀合物 21	N6-siHBa1M2S	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	345
		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	346
缀合物 22	N6-siHBa2M1S	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	347
		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	348
缀合物 23	N6-siHBa2M2S	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	349
		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	350
缀合物 24	N6-siHBa1M1VP	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	351
		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	352
缀合物 25	N6-siHBa1M2VP	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	353
		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	354
缀合物 26	N6-siHBa2M1VP	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	355
		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	356
缀合物 27	N6-siHBa2M2VP	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	357
		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	358
缀合物 28	N6-siHBa1M1SVP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	359
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	360

缀合物 29	N6-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	361
		AS	P-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	362
缀合物 30	N6-siHBa1M1SPs	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	363
		AS	Ps-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	364
缀合物 31	N6-siHBa3M1S	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmUm	365
		AS	AmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	366
缀合物 32	N6-siHBa1M2SVP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	367
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	368
缀合物 33	N6-siHBa2M1SVP	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	369
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	370
缀合物 34	N6-siHBa2M2SVP	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	371
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	372
缀合物 35	N6-siHBa1M5SVP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	373
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	374
缀合物 36	N6-siHBa1M3SVP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGmCfAmUfAmCmUmUmCmAmAmAm	375
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	376
缀合物 37	N6-siHBa1M4SVP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	377
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	378
缀合物 38	X2-siHBa1M2SVP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	379
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	380
缀合物 39	W2-siHBa1M2SVP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	381
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	382
缀合物 40	V2-siHBa1M2SVP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	383
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	384
缀合物 41	O2-siHBa1M1SVP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	385
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	386
缀合物 42	P2-siHBa1M1SVP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	387
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	388

对比缀合物1	N6-NC	S	UUCUCCGAACGUGUCACGU	389
		AS	ACGUGACACGUUCGGAGAAUU	390

表 2B

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5‘-3’		SEQ ID NO
缀合物 43	N6-siHBb1M1S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	391
		AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	392
缀合物 44	N6-siHBb2M1S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	393
		AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	394
缀合物 45	N6-siHBb1M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	395
		AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	396
缀合物 46	N6-siHBb2M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	397
		AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm	398
缀合物 47	N6-siHBb1M1SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	399
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	400
缀合物 48	N6-siHBb2M1SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	401
		AS	P-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	402
缀合物 49	N6-siHBb2M1SPs	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	403
		AS	Ps-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	404
缀合物 50	N6-siHBb3M1S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmUm	405
		AS	AmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	406
缀合物 51	N6-siHBb2M1SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	407
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	408
缀合物 52	N6-siHBb1M2SVP	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	409
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	410
缀合物 53	N6-siHBb2M2SVP	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	411
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	412
缀合物 54	N6-siHBb1M5SVP	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	413
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	414
缀合物 55	N6-siHBb1M3SVP	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCmCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	415

		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	416
缀合物56	N6-siHBb1M4SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	417
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	418
缀合物57	N6-siHBb4M1SVP	S	GmsCmsUmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	419
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCmsGmsCm	420
缀合物58	N6-siHBb1	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	421
		AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAGC	422
缀合物59	N6-siHBb2	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	423
		AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAUU	424
缀合物60	X2-siHBb2M1SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	425
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	426
缀合物61	W2-siHBb2M1SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	427
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	428
缀合物62	V2-siHBb2M1SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	429
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	430
缀合物63	O2-siHBb2M1SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	431
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	432
缀合物64	P2-siHBb2M1SVP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	433
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	434

表 2C

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
缀合物 65	N6-siHBc1	S	UCUGUGCCUUCUCAUCUGA	435
		AS	UCAGAUGAGAAGGCACAGACG	436
缀合物 66	N6-siHBc1M1	S	UmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	437
		AS	UmCfAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	438
缀合物 67	N6-siHBc1M2	S	UmCmUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	439
		AS	UmCfAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	440
缀合物 68	N6-siHBc1M1SVP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	441
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	442

缀合物 69	N6-siHBc1M2SVP	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	443
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	444
缀合物 70	N6-siHBc1M3SVP	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCmUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	445
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	446
缀合物 71	N6-siHBc1M4SVP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	447
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	448
缀合物 72	N6-siHBc1M5SVP	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	449
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	450
缀合物 73	N6-siHBc2M1SVP	S	CmsGmsUmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	451
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGmGmGm	452
缀合物 74	N6-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	453
		AS	P-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	454
缀合物 75	N6-siHBc1M1SPs	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	455
		AS	Ps-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	456
缀合物 76	N6-siHBc4M1S	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmUm	457
		AS	AmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	458
缀合物 77	X2-siHBc1M1SVP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	459
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	460
缀合物 78	W2-siHBc1M1SVP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	461
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	462
缀合物 79	V2-siHBc1M1SVP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	463
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	464
缀合物 80	O2-siHBc1M1SVP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	465
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	466
缀合物 81	P2-siHBc1M1SVP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	467
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	468

表 2D

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5' - 3'	SEQ ID NO

缀合物 82	N6-siHBd1	S	CGUGUGCACUUCGCUUCAA	469
		AS	UUGAAGCGAAGUGCACACGGU	470
缀合物 83	N6-siHBd1M1	S	CmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	471
		AS	UmUfGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	472
缀合物 84	N6-siHBd1M2	S	CmGmUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	473
		AS	UmUfGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	474
缀合物 85	N6-siHBd1M1SVP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	475
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	476
缀合物 86	N6-siHBd1M2SVP	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	477
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	478
缀合物 87	N6-siHBd1M3SVP	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAmCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	479
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	480
缀合物 88	N6-siHBd1M4SVP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	481
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGfAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	482
缀合物 89	N6-siHBd1M5SVP	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	483
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	484
缀合物 90	N6-siHBd2M1SVP	S	AmsCmsCmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	485
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUmsCmsCm	486
缀合物 91	N6-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	487
		AS	P-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	488
缀合物 92	N6-siHBd1M1SPs	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	489
		AS	Ps-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	490
缀合物 93	N6-siHBd4M1S	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmUm	491
		AS	AmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	492
缀合物 94	X2-siHBd1M1SVP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	493
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	494
缀合物 95	W2-siHBd1M1SVP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	495
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	496
缀合物 96	V2-siHBd1M1SVP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	497

		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	498
缀合物 97	O2-siHBd1M1SVP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	499
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	500
缀合物 98	P2-siHBd1M1SVP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	501
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	502

表 2E

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
缀合物 99	N6-siHBe3M1S	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	503
		AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	504
缀合物 100	N6-siHBe4M1S	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	505
		AS	UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsCmsAm	506
缀合物 101	N6-siHBe3M1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	507
		AS	UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	508
缀合物 102	N6-siHBe4M1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	509
		AS	UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAm	510
缀合物 103	N6-siHBe3M1SVP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	511
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	512
缀合物 104	N6-siHBe3M1SPs	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	513
		AS	Ps-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	514
缀合物 105	N6-siHBe3M1SP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	515
		AS	P-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	516
缀合物 106	N6-siHBe3M1VP	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	517
		AS	VP-UmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	518
缀合物 107	N6-siHBe3M2	S	GmAmAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	519
		AS	UmAfUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmUmUm	520
缀合物 108	N6-siHBe3M2SVP	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	521
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUfGfAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	522
缀合物	N6-siHBe3M3SVP	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	523

109		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	524
缀合物110	N6-siHBe3M4SVP	S	GmsAmsAmAmGfUmAfUmGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	525
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	526
缀合物111	N6-siHBe3M5SVP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	527
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUfGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	528
缀合物112	N6-siHBe1M1S	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	529
		AS	AmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	530
缀合物113	N6-siHBe5M1SVP	S	UmsGmsGmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	531
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmCmAmsUmsUm	532
缀合物114	N6-siHBe0M1	S	GmAmAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmUm	533
		AS	AmAfUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCm	534
缀合物115	N6-siHBe2	S	GAAAGUAUGUCAACGAAUU	535
		AS	AAUUCGUUGACAUACUUUCCA	536
缀合物116	X2-siHBe3M1SVP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	537
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	538
缀合物117	W2-siHBe3M1SVP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	539
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	540
缀合物118	V2-siHBe3M1SVP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	541
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	542
缀合物119	O2-siHBe3M1SVP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	543
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	544
缀合物120	P2-siHBe3M1SVP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	545
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	546

表 2F

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
缀合物121	N6-siAN1	S	CCAAGAGCACCAAGAACUA	547
		AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCU	548
缀合物122	N6-siAN2	S	AGCCAAGAGCACCAAGAACUA	549
		AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCUUG	550
缀合物	N6-siAN1-M1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGm	551

123			AmAmCmUmAm	
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	552
缀合物124	N6-siAN2-M1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	553
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	554
缀合物125	N6-siAN1-M2	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	555
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	556
缀合物126	N6-siAN2-M2	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	557
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	558
缀合物127	N6-siAN1-M3	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	559
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	560
缀合物128	N6-siAN2-M3	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	561
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	562
缀合物129	N6-siAN1-M1VP	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	563
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	564
缀合物130	N6-siAN2-M1VP	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	565
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	566
缀合物131	N6-siAN1-M2VP	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	567
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	568
缀合物132	N6-siAN2-M2VP	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	569
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	570
缀合物133	N6-siAN1-M3VP	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	571
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	572
缀合物134	N6-siAN2-M3VP	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	573
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	574
缀合物135	N6-siAN1-M1S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	575
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	576
缀合物136	N6-siAN2-M1S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	577
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	578
缀合物	N6-siAN1-M2S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmG	579

137			mAmAmCmUmAm	
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	580
缀合物138	N6-siAN2-M2S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	581
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	582
缀合物139	N6-siAN1-M3S	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	583
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	584
缀合物140	N6-siAN2-M3S	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	585
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	586
缀合物141	N6-siAN1-M1SVP	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	587
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	588
缀合物142	N6-siAN2-M1SVP	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	589
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	590
缀合物143	N6-siAN1-M2SVP	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	591
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	592
缀合物144	N6-siAN2-M2SVP	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	593
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	594
缀合物145	N6-siAN1-M3SVP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	595
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	596
缀合物146	N6-siAN1-M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	597
		AS	P-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	598
缀合物147	N6-siAN1-M3SPs	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	599
		AS	Ps-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	600
缀合物148	N6-siAN4-M3S	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmUm	601
		AS	AmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	602
缀合物149	N6-siAN2-M3SVP	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	603
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	604
缀合物150	N6-siAN1-M4S	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	605
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	606
缀合物	N6-siAN1-M4SVP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAm	607

151			GmAmAmCmUmAm	
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	608
缀合物152	N6-siAN1-M5S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCmAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	609
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	610
缀合物153	N6-siAN1-M5SVP	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCmAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	611
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	612
缀合物154	X2-siAN1-M3SVP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	613
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	614
缀合物155	W2-siAN1-M3SVP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	615
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	616
缀合物156	V2-siAN1-M3SVP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	617
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	618
缀合物157	O2-siAN1-M3SVP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	619
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	620
缀合物158	P2-siAN1-M3SVP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	621
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	622

表 2G

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
缀合物159	N6-siAP1	S	CAAUAAAGCUGGACAAGAA	623
		AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG	624
缀合物160	N6-siAP2	S	CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA	625
		AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG	626
缀合物161	N6-siAP1-M1	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	627
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	628
缀合物162	N6-siAP2-M1	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	629
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	630
缀合物163	N6-siAP1-M2	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	631
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	632
缀合物164	N6-siAP2-M2	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	633
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	634

缀合物165	N6-siAP1-M1VP	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	635
		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	636
缀合物166	N6-siAP2-M1VP	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	637
		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	638
缀合物167	N6-siAP1-M2VP	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	639
		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	640
缀合物168	N6-siAP2-M2VP	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	641
		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	642
缀合物169	N6-siAP1-M1S	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	643
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	644
缀合物170	N6-siAP2-M1S	S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	645
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	646
缀合物171	N6-siAP1-M2S	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	647
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	648
缀合物172	N6-siAP2-M2S	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	649
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	650
缀合物173	N6-siAP1-M1SVP	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	651
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	652
缀合物174	N6-siAP2-M1SVP	S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	653
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	654
缀合物175	N6-siAP1-M2SVP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	655
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	656
缀合物176	N6-siAP1-M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	657
		AS	P-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	658
缀合物177	N6-siAP1-M2SPs	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	659
		AS	Ps-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	660
缀合物178	N6-siAP4-M2S	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmUm	661
		AS	AmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	662

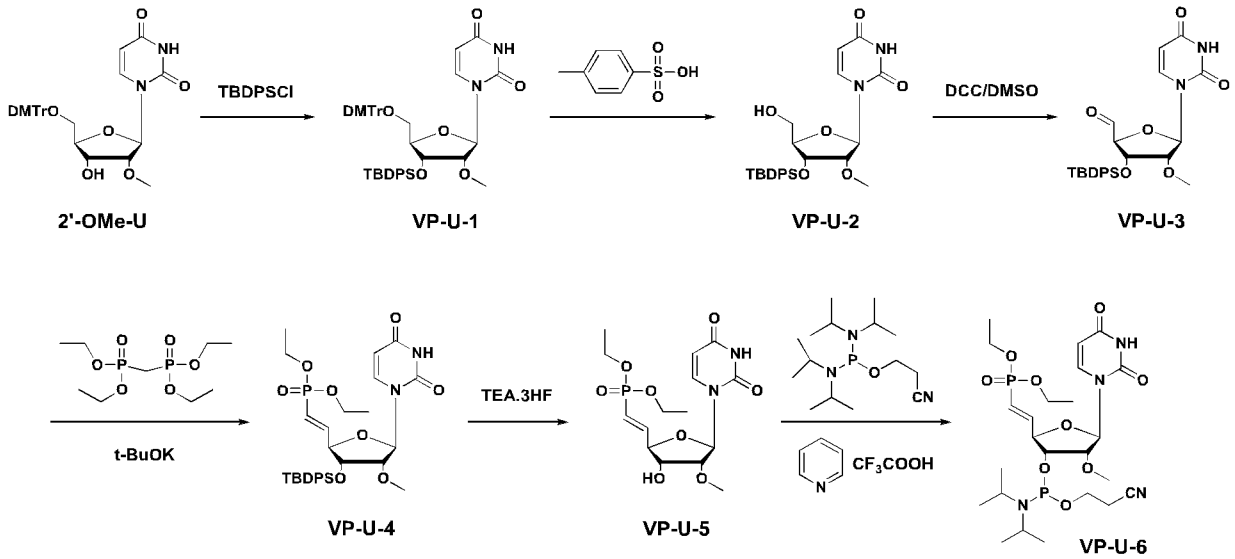
缀合物179	X2-siAP1-M2SVP	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	663
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	664
缀合物180	W2-siAP1-M2SVP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	665
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	666
缀合物181	V2-siAP1-M2SVP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	667
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	668
缀合物182	O2-siAP1-M2SVP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	669
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	670
缀合物183	P2-siAP1-M2SVP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	671
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	672
缀合物184	N6-siTTR-M2SVP	S	AfsAmsCfAmGfUmGfUmUfCfUfUmGfCmUfCmUfAmUfAmAf	673
		AS	VP-UmsUfsAmUfAmGfAmGfCmAfAmGmAmAfCmAfCmUfGmUfUmsUmsUm	674

表 2H

缀合物序号	缀合物编号	序列方向 5' - 3'		SEQ ID NO
缀合物185	FC-siSTAT1	S	CmsUmsAmGmAmAmAfAfCfUmGmGmAmUmAmAmCmGmUm	675
		AS	AmsCfsGmUmUmAfUmCmCmAmGmUmUmUfUmCfUmAmGmsCmsCm	676

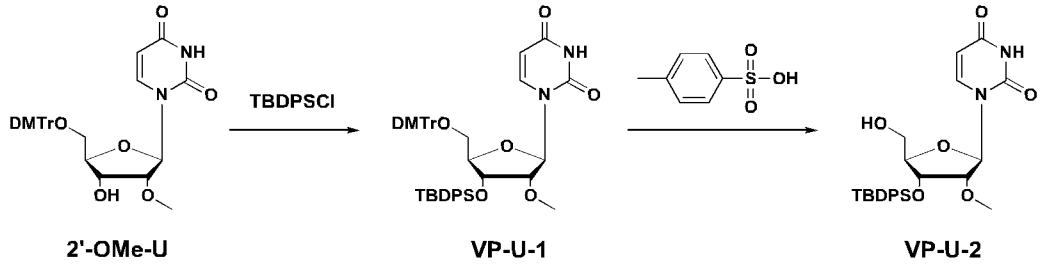
其中，S 表示正义链，AS 表示反义链；大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为 2'-甲氧基修饰的核苷酸；小写字母 f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为 2'-氟修饰的核苷酸；小写字母 s 表示与该字母 s 左右相邻的两个核苷酸之间的连接为硫代磷酸酯基连接；VP 表示该 VP 右侧的一个核苷酸为乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸；P 表示该字母 P 右侧的一个核苷酸为磷酸酯修饰的核苷酸；Ps 表示该 Ps 右侧的一个核苷酸为硫代磷酸酯修饰的核苷酸。

上述制备例 7 和 8 中，当 AS 链 5'位末端为 VP-Um 表示的乙烯基磷酸酯修饰的 2'-甲氧基修饰尿嘧啶核苷酸时，对应的乙烯基磷酸酯修饰的 2'-甲氧基修饰尿嘧啶核苷单体（VP-U-6 化合物）按照以下方法合成：



（13-1）VP-U-2 的合成

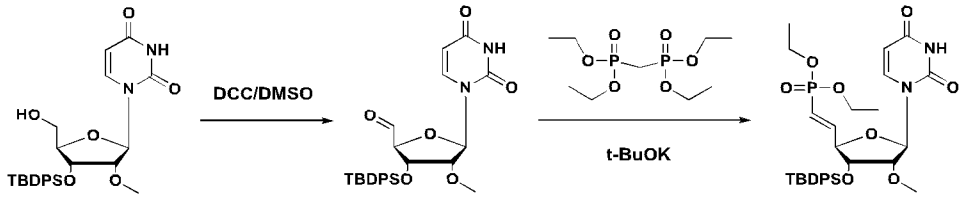
按照以下方法，合成了 VP-U-2 分子：



将 2'-甲氧基修饰的尿嘧啶核苷酸(2'-OMe-U,51.30g,91.6mmol),叔丁基二苯基氯硅烷(TBDPSCl,50.35g，183.2mmol)，咪唑（12.47g，183.2mmol）混合溶于 450ml N,N-二甲基甲酰胺（DMF），室温下搅拌反应 20h。蒸除 DMF，用 600ml 二氯甲烷溶解后加 300ml 饱和碳酸氢钠洗涤，水相再用二氯甲烷（DCM）萃取 3 次，每次 300ml，合并有机相，用 5%草酸洗涤至水相 pH<5，蒸发溶剂至干后获得 VP-U-1 粗品直接用于随后 VP-U-2 的合成。

将 VP-U-1 粗品用 100ml 二氯甲烷溶解后，外加冰浴搅拌 10 分钟，再加入预先在 4°C 冰箱冷藏好的 450ml 2%对甲苯磺酸溶液（溶剂为体积比 3:7 的甲醇-二氯甲烷混合溶剂），反应 10 分钟。再加入 200ml 饱和碳酸氢钠淬灭反应，有机相加入饱和碳酸氢钠水溶液洗涤至 pH=8。合并水相，用二氯甲烷萃取 2 次，每次 200ml，合并有机相，再用 200ml 饱和食盐水洗涤一次，蒸发溶剂至干。200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.25 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 VP-U-2 共 40.00g。1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41–7.30 (m, 6H), 6.79 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.94 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.12 (td, J = 4.6, 3.9 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 4.8, 4.0 Hz, 1H), 3.96 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 3.68 (ddd, J = 11.8, 7.0, 4.6 Hz, 1H), 3.57 – 3.46 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.05 (s, 8H). MS m/z: $C_{26}H_{33}N_2O_6Si$，[M+H]+，理论：497.21，实测：497.45。

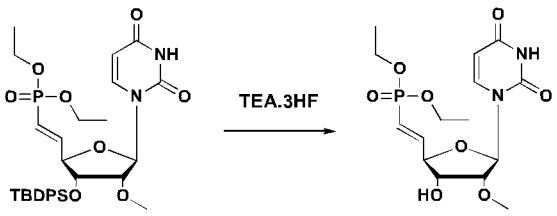
（13-2）VP-U-4 的合成：



将 VP-U-2（19.84g，40.0mmol），二环己基碳二亚胺（DCC，16.48g，80.0mmol），吡啶（4.20g，53.2mmol），三氟乙酸（6.61g，53.2mmol）混合溶于 200ml 二甲基亚砜（DMSO），室温下搅拌反应 20h。另取亚甲基二磷酸四乙酯（21.44g，74.4mmol）溶于 120ml THF，冰浴降温，在冰浴温度下加入 t-BuOK（11.36g，101.2mmol），先在冰浴温度下反应 10min，再升至室温反应 0.5h，然后加入至前

述反应液中，约 1h 加完，冰浴温度下反应 1h，再升至室温反应 18h。加水淬灭反应，水相以二氯甲烷提取 3 次，每次 200ml。合并有机相，用 200ml 饱和食盐水水洗一次后蒸发溶剂至干。用 200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以石油醚:乙酸乙酯=1:1-1:4 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 VP-U-4 共 14.00g。1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41 – 7.30 (m, 6H), 6.82 – 6.71 (m, 2H), 5.90 (ddd, J = 25.9, 15.0, 1.0 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.36 – 4.21 (m, 3H), 4.18 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.05 (ddq, J = 9.7, 8.5, 6.9 Hz, 2H), 3.87 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.32 (td, J = 6.9, 0.7 Hz, 6H), 1.05 (s, 8H). MS m/z: $C_{31}H_{42}N_2O_8PSi$，[M+H]+，理论：629.24，实测：629.51。

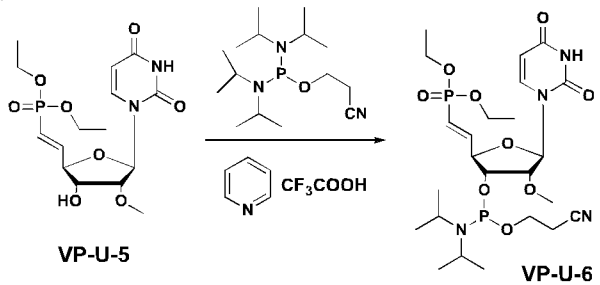
（13-3）VP-U-5 的合成：



VP-U-4 VP-U-5

将VP-U-4(14.00g,22.29mmol)溶于100ml四氢呋喃,加入三乙胺三氢氟酸(17.96g,111.45mmol)，室温搅拌 20h 反应完全。直接蒸发溶剂至干，再用二氯甲烷溶解随后蒸干 2 次，每次使用 50ml 二氯甲烷，得到粗品。用 200-300 目正相硅胶柱纯化，石油醚装柱，以石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷:甲醇=1:1:1:0.05-1:1:1:0.25 梯度洗脱，收集产物洗脱液，减压蒸干溶剂，真空油泵发泡干燥得到纯品 VP-U-5 共 6.70g。1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 15.0, 6.2 Hz, 1H), 5.99 – 5.82 (m, 2H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.10 (dd, J = 5.3, 4.7 Hz, 1H), 4.29 (ddq, J = 9.8, 8.6, 7.0 Hz, 2H), 4.17 (ddd, J = 6.2, 5.2, 1.0 Hz, 1H), 4.12 – 3.98 (m, 3H), 3.39 (s, 2H), 1.32 (td, J = 6.9, 0.6 Hz, 6H). MS m/z: $C_{15}H_{24}N_2O_8P$，[M+H]+，理论：391.13，实测：391.38。

（13-4）VP-U-6 的合成：

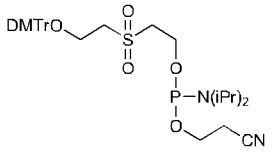


VP-U-5 VP-U-6

在氩气保护条件下向 10ml 无水二氯甲烷中加入 VP-U-5（391mg，1.0mmol）、三氟乙酸吡啶盐（0.232g，1.2mmol）、N-甲基咪唑（0.099g，1.2mmol），双(二异丙基氨基)(2-氰基乙氧基)膦（0.452g，1.5mmol），室温搅拌反应 5 小时。蒸除溶剂至干，柱层析纯化（200-300 目正相硅胶，二氯甲烷:乙腈（含 0.5wt%三乙胺）=3:1-1:3 梯度洗脱），收集产物洗脱液，浓缩除去溶剂，得到目标产物 VP-U-6 共 508mg。31P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 150.34, 150.29, 17.07, 15.50. MS m/z: $C_{24}H_{41}N_4O_9P_2$，[M+H]+，理论：591.23，实测：591.55。表明 VP-U-6 是目标产物 VP-Um，作为核苷单体参与 RNA 链合成。

使用如下方法将 5'-磷酸酯修饰连接至反义链 5'端：

原料为具有如式 CPR-I 结构的磷酸化结构单体，由苏州吉玛提供，货号 Cat#13-2601-XX：



（CPR-I）

在反义链全部核苷单体连接完毕后，按照亚磷酰胺核酸固相合成的方法，经脱保护、偶联、盖帽、氧化四步反应将CPR-I单体连接至反义链5'末端。随后按照如下条件进行切割与脱保护，获得反义链：

将合成的连接有载体的核苷酸序列加入浓度为 25wt%的氨水中，氨水用量为 0.5ml/μmol，在 55°C 反应 16h，除去液体，真空浓缩至干。在氨水处理后，相对于单链核酸的量，用 0.4ml/μmol N-甲基吡咯烷酮溶解产品，随后加入 0.3ml/μmol 三乙胺和 0.6ml/μmol 三乙胺三氢氟酸盐，脱除核糖上的

2'-O-TBDMS 保护。纯化与脱盐：利用制备型离子色谱纯化柱（Source 15Q），通过 NaCl 的梯度洗脱，完成核酸的纯化。具体而言为：洗脱剂 A：20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱剂 B：1.5M 氯化钠，20mM 磷酸钠（pH 8.1），溶剂为水/乙腈=9:1（体积比）；洗脱梯度：洗脱剂 A:洗脱剂 B=100:0-50:50 梯度洗脱。收集产品洗脱液后合并，采用反相色谱纯化柱进行脱盐，具体条件包括采用葡聚糖凝胶柱进行脱盐，填料为葡聚糖凝胶 G25，以去离子水洗脱。

对于目标产物具有 5'-硫代磷酸酯修饰的情况，使用与上述同样的步骤，区别在于在连接时，以硫化反应条件代替上述氧化反应条件，进行硫化反应。

对于上述合成的正义链和反义链，使用离子交换色谱（IEX-HPLC）检测纯度，并以液质联用色谱（LC-MS）分析分子量，确认所合成的核酸序列是对应于表 2 中各缀合物与对比缀合物的 siRNA。

实验例 1 本实验说明本公开的药物缀合物的动物水平毒性。

在 C57BL/6J 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司）上，分别向每只小鼠皮下单次给予 300mg/kg（以 siRNA 计）的缀合物 28-30、38-42、47-49、68-70、90-92、145-147 和 175-177，连续观察 14 天，未出现动物死亡，也未观察到与药物不良反应相关的临床症状，在观察结束后，对各小鼠进行大体解剖，也均未发现异常。从而，上述结果表明本公开的药物缀合物具有较低的动物水平毒性。

以下实验例 2-实验例 8 中，按照 siRNA 靶点位置和序列关联性，对表 2A-表 2G 的药物缀合物的性质和效果分别进行实验验证。

实验例 2 表 2A 的药物缀合物的效果实验

实验例 2-1 本公开缀合物在人血浆中的体外稳定性

将缀合物 32（以 siRNA 浓度为 20μM 的 0.9%氯化钠水溶液形式提供，每组 12μl）与 108 μL 90%人血浆（Human plasma，购自江苏省血液研究所，以 1×PBS（pH7.4）稀释）混匀，获得混合液，并在 37°C 恒温孵育。在孵育过程中，分别在 0、2、4、6、8、24、48、72 小时中的每个时间点取出 10 μL 混合液，立即进行液氮速冻，于-80°C 冰箱中冻存。其中，0 小时是指缀合物溶液与 90%人血浆混匀后，立即取出 10μL 混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用 1×PBS（pH7.4）将各混合液稀释 5 倍后，取每一稀释混合液 10 μL 准备电泳。同时，取等摩尔量的药物缀合物 32 溶液（siRNA 浓度为 2μM）2μl，与 8μl 1×PBS（pH7.4）混匀，制备成 10μL 未经人血浆处理的样品（记为 Con）。

配制 20 重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将每一组的准备电泳的样品分别与 4 μL 上样缓冲液（20mM EDTA，36 重量%甘油，0.06 重量%溴酚蓝的水溶液）混合，然后上样至各凝胶孔，在 80mA 恒流条件下电泳 60 分钟。电泳结束后，取出凝胶，用 1×Sybr Gold 染料（Invitrogen，Cat.11494）染色 15 分钟后成相，结果如图 1 所示。所述对比序列 1 如下：

正义链：5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAA - 3'（SEQ ID NO: 1）

反义链：5'- UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU -3'（SEQ ID NO: 2）

由图 1 显示了测试的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果。结果显示，本公开的缀合物在人血浆中最高 72h 时仍未降解，显示出优异的在人血浆中的稳定性。

实验例 2-2 本公开缀合物在猴血浆中的体外稳定性

将缀合物 32 和对比序列 1（分别以 siRNA 浓度为 20μM 的 0.9wt%氯化钠水溶液形式提供，每组 12μL）分别与 108 μL 90%食蟹猴血浆（Monkey plasma，购自鸿泉生物，HQ70082，以 1×PBS 稀释）混匀，获得混合液并在 37°C 恒温孵育。在孵育过程中，分别在 0、2、4、6、8、24、48、72 小时中的每个时间点取出 10 μL 样本，立即进行液氮速冻于-80°C 冰箱中冻存。其中，0 小时是指缀合物溶液与 90%食蟹猴血浆混匀后，立即取出 10μL 混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用 1×PBS(pH7.4)将各混合液稀释 5 倍后，取每一稀释混合液 10 μL 准备电泳。同时，取等摩尔量的缀合物 32（以 siRNA 计的浓度为 2μM）2μl 与 8μl 1×PBS（pH7.4）混匀获得 10μL 未经猴血浆处理的样品(记为 Con)。

配制 20 重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将上述稀释后的样品中每一组的准备电泳样品与 4 μL 上样缓冲液（20mM EDTA，36 重量%甘油，0.06 重量%溴酚蓝的水溶液）混合，然后上样至各凝胶孔，在 80mA 恒流条件下电泳 60 分钟。电泳结束后，凝胶用 1×Sybr Gold 染料（Invitrogen，Cat.11494）染色 15 分钟后成相，结果如图 2 所示。

图 2 示出了所测试药物缀合物在体外猴血浆中的稳定性半定量检测结果。可以看出，本公开的缀合物 32 在食蟹猕猴血浆中最高为 72h 仍未降解，显示出优异的在猴血浆中的稳定性。

实验例 2-3 本实验说明缀合物 32 在大鼠体内的药代动力学

在本实验例中，分别向各实验组的大鼠（每组 10 只大鼠，雌雄各半）皮下注射给予缀合物 32，单次给药剂量按照 1mg/kg 和 0.5mg/kg 大鼠体重实施。随后检测各时间点的大鼠血浆药物浓度和肝脏组织药物浓度。

首先，将 SD 大鼠采用 PRISTIMA 7.2.0 版数据系统根据大鼠体重分性别随机分组，随后按照设计的剂量分别给予缀合物。所有动物根据体重计算药量，皮下单次给药，剂量为 1 和 0.5mg/kg，以 1mg/ml 和 5mg/ml 的 0.9%氯化钠水溶液的形式，体积为 10ml/kg。给药前及给药后 5 分钟（±30 秒）、30 分钟（±1 分钟）、1 小时（±2 分钟）、2 小时（±2 分钟）、6 小时（±5 分钟）、24 小时（±10 分钟）、48 小时（±20 分钟）、72 小时（±20 分钟）、120 小时（±30 分钟）、168 小时（±30 分钟）分别从颈静脉采集大鼠全血。之后全血样品于 2~8°C 在离心力 1800×g 下离心 10 分钟分离血浆，血浆样品在一管中放置约 70 μL，剩余的同一样品放置于另一管中，二者均在-70~-86°C 冻存待检。分别在给药后约 24、48、72、120、168 小时采集大鼠肝脏组织，采集方法包括根据大鼠体重以戊巴比妥钠麻醉（腹腔注射 60 mg/kg），腹主动脉采血使大鼠安乐死，对其进行大体解剖。对各大鼠肝脏取样，并保存在 1mL 冻存管中，-68°C 以下保存至检测分析。

采用 HPLC-FLD（高效液相荧光色谱法）定量检测大鼠血浆及肝脏组织中的缀合物 32 的浓度，具体依据以下步骤：

（1）研磨组织至组织块不大于 80mg，随后加入组织和细胞裂解液（Tissue and Cell Lysis Solution，供应商：Epicentre，货号：MTC096H）配制成 66.7 mg/mL 的组织匀浆；

（2）对组织匀浆进行超声（150W，30s）以破碎细胞；

（3）对于每组组织样品，各取 75μL 组织样品加至 96 孔 PCR 板的不同培养孔中，向每一培养孔中加入 5 μL 蛋白酶 K（供应商：Invitrogen，货号：25530-015）和 10 μL 的 10wt%乙腈和 0.01wt%吐温 20 混合水溶液；

对于每组血浆样品，各取 20 μL 血浆加至 96 孔 PCR 板的不同培养孔中，向每一培养孔中加入 45 μL 组织和细胞裂解液，5 μL 蛋白酶 K 和 20 μL 的 10wt%乙腈和 0.01wt%吐温 20 混合液；

（4）封板，置于 PCR 仪（供应商：Applied Biosystems，型号：GeneAmp® PCR system 9700）中，在 65°C 下孵育 45 分钟；

（5）孵育结束后，向每一培养孔中加入 10μL 3M KCl 水溶液（供应商：Sigma-aldrich，货号：60135-250ML），摇匀，在 4°C，3200 rcf 离心 15 分钟，将上清液保存备用；

（6）对于每组组织样品，取 80 μL 前述上清液加入到 120 μL 杂交混合物中（配方：0.5 mL 6 μM PNA 探针（供应商：杭州泰禾生物科技有限公司），1 mL 200 mM 的 Trizma/pH=8，5mL 8 M 尿素水溶液，3.5 mL H_2O，2 mL 乙腈）；

对于每组血浆样品，取 40 μL 上清液加入到 160 μL 杂交混合物中（配方：0.5 mL 6 μM PNA 探针，1 mL 200 mM 的 Trizma/pH=8，5mL 8 M 尿素水溶液，7.5 mL H_2O，2 mL 乙腈）；

（7）封板，置于 PCR 仪中，95°C 孵育 15 分钟；立即置于冰上 5 分钟，获得孵育样品；

（8）将各孵育样品转移至新的锥形底 96 孔板的不同培养孔中，摇匀，以 3200 rcf 离心 1 分钟；

（9）进样检测，使用 HPLC-FLD 定量分析（液相系统供应商：Thermo Fisher，色谱仪型号：ultimate 3000）。

分析结果参见图 3 和图 4。图 3 和图 4 分别示出了缀合物 32 在大鼠血浆中 PK/TK 血浆浓度的经时代谢曲线以及在大鼠肝脏中 PK/TK 组织浓度的经时代谢曲线。

具体而言，

图 3 是给药量为 1mg/kg 和 0.5mg/kg 时，缀合物 32 在大鼠血浆中 PK/TK 血浆浓度的经时代谢曲线。

图 4 是给药量为 1mg/kg 和 0.5mg/kg 时，缀合物 32 在大鼠肝脏中 PK/TK 组织浓度的经时代谢曲线。

由图 3 和图 4 的结果可以看出，无论是在低剂量（0.5mg/kg）还是在相对更高剂量（1mg/kg）下，缀合物 32 在大鼠血浆中的浓度均迅速在数小时内降低至检测限以下；而在肝脏组织中则均在至少 150h 维持了较高稳定水平的浓度。由此表明，通过缀合 N-6_2 化合物，所得到的药物缀合物能够特异性地在肝脏中显著富集并保持稳定，具有高度的靶向性。

实验例 2-4 本实验说明本公开的药物缀合物在体内（*in vivo*）对 HBV mRNA 表达量的抑制效率

在本实验例中，对缀合物 32 在 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率进行了考察。

本实验例中所使用的 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 购自北京大学医学部实验动物科学部。

首先，将 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠（以下也简称为 44Bri 小鼠）按血清 HBsAg 含量随机分组（均为雌性），每组 4 只小鼠，给予不同剂量的缀合物 32 并增加 PBS 对照组。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 2 mg/ml 或 0.2 mg/ml（均以 siRNA 计）的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量（以 siRNA

计）为 1mg/kg 和 0.1mg/kg。给药后第 14 天将动物处死，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol 根据总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠，分别取 1μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 HBV mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 HBV 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别对 HBV 和 β-肌动蛋白进行检测。检测引物的序列参见表 3A。

表 3A 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
HBV	5'- CCGTCTGTGCCTTCTCATCT -3'（SEQ ID NO：677）	5'- TAATCTCCTCCCCCAACTCC -3'（SEQ ID NO：678）
β-肌动蛋白	5'-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG -3'（SEQ ID NO：679）	5'-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA -3'（SEQ ID NO：680）

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组中目标基因的表达水平和抑制率进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 4 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义空白对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$(测试组) × 100%

测试组 HBV mRNA 抑制率 = (1-测试组 HBV mRNA 相对表达水平) × 100%

图 5 为对照组和分别给予 1mg/kg 和 0.1mg/kg 的药物缀合物 32 后，小鼠肝组织中 HBV mRNA 表达水平的散点图。由图 5 结果可见，缀合物 32 在体内实验中显示出优异的的对 44Bri 小鼠肝组织中 HBV 基因 mRNA 的抑制率，该抑制率显示出明显的剂量依赖性，并且在给药后第 14 天时，在 1mg/kg 的剂量下抑制率可高达 89.86%。

实验例 2-5 本实验说明本公开的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠中 siRNA 对血清 HBsAg 表达量以及 HBV DNA 表达量的抑制效率的时间相关性测试

使用 M-Tg HBV 小鼠，购自上海市公共卫生中心动物部，转基因小鼠的制备方法如 Ren J.等，J. Medical Virology. 2006, 78: 551-560 所述；所使用的 AAV 病毒为 rAAV8-1.3HBV，D 型（ayw），购于北京五加和分子医学研究所有限公司，1×10^{12} viral genome （v.g.）/mL，批号 2016123011。实验前将 AAV 病毒用无菌 PBS 稀释至 5×10^{11} v.g./mL。每只小鼠注射 200 μL，即每只小鼠注射 1×10^{11} v.g.。病毒注射后第 28 天，所有小鼠通过眼眶采血（约 100 μL）用于收集血清检测 HBsAg。动物造模成功后，按血清 HBsAg 含量随机分组（每组 5 只），给予缀合物 32 以及 PBS 空白对照。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.2 mg/ml 或 0.6 mg/ml（均以 siRNA 计）的 0.9% 氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量（以 siRNA 计）为 1mg/kg 和 3mg/kg。空白对照组给予 5 ml/kg 的 1×PBS。在给药前与给药后第 7、14、21、28、35、42、49、63、70 天对小鼠眼眶静脉丛取血，在各时间点检测血清 HBsAg 水平。

眼眶取血每次约 0.1ml，离心后血清不少于 20μl。利用 HBsAg CLIA 试剂盒（安图生物，CL0310）按照制造商提供的说明书检测血清中 HBsAg 的表达水平；

HBsAg 抑制率按如下等式计算：

HBsAg 抑制率＝(1-给药后 HBsAg 含量/给药前 HBsAg 含量)×100%。

其中，HBsAg 含量用每毫升（ml）血清含多少当量（UI）HBsAg 表示。

图 6 是给药后不同时间点，给予了不同剂量的缀合物 32 的转基因小鼠和空白对照组的转基因小鼠中血清中 HbsAg 水平的经时曲线图。由图 6 可以看出，在给药后不同时间点，PBS 阴性对照组未显示出任何抑制作用；与之相比，不同剂量（3mg/kg、1mg/kg）的缀合物 32 对 HBsAg 均体现出了优秀的 HBsAg 抑制效果。特别是 3mg/kg 剂量下，在长达 70 天的时间内均显示出高的血清 HBsAg 抑制率，最高可达 97.80%，表明其能够在长时间内稳定高效地抑制 HBV 转基因小鼠体内 HBV 基因的表达。

实验例 2-6 本实验说明本公开的缀合物在小鼠体内对 HBV mRNA 表达的抑制效果

在本实验例中，关于不同浓度的缀合物 32 在 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 中对 HBV mRNA 表达的抑制效率进行了考察。

首先，将 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠按血清 HbsAg 含量随机分组（均为雌性，每组 5 只小鼠），分别进行编号，并增加 NS 组作为对照组。所有动物根据体重计算药量。分别以 1mg/kg 以及 0.1ml/kg 的剂量皮下给予缀合物 32，以 0.2mg/ml 以及 0.02mg/ml（浓度均以 siRNA 计）的缀合物的 0.9%氯化钠水溶液的形式给药，给药体积为 5ml/kg。给药后第 7 天将动物处死，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA Later（Sigma Aldrich）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织。然后用 Trizol 根据总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到总 RNA。

采用实时荧光定量 PCR 检测每只小鼠肝组织中 HBV mRNA 的表达水平，具体地：使用 ImProm-II™ 反转录试剂盒（Promega）按其说明书将由每只小鼠肝脏组织中提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 HBV mRNA 表达量并计算抑制效率。在该荧光定量 PCR 法中，以 GAPDH 基因作为内参基因，使用针对 HBV 的引物和针对 GAPDH 的引物分别对 HBV 和 GAPDH 进行检测。

检测引物的序列参见表 4A。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 5 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})} \times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度三个培养孔的相对表达水平的算术平均值。

其中，对照组为本实验中施以 PBS 的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同药物缀合物的给药组小鼠。结果示于图 7A 中：

表 4A 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
HBV	5’- CGTTTCTCCTGGCTCAGTTTA -3’ (SEQ ID NO: 729)	5’- CAGCGGTAAAAAGGGACTCAA -3’ (SEQ ID NO: 730)
GAPDH	5'- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG- 3' (SEQ ID NO: 731)	5'- AGGGGCCATCCACAGTCTTC -3' (SEQ ID NO: 1732)

图 7A 为给予空白对照和不同剂量的缀合物 32 后，第 7 天时小鼠肝组织中 HBV mRNA 的相对表达水平的散点图。由图 7A 的结果可见，缀合物 32 在体内实验中显示出优异的的对 44Bri 小鼠肝组织中 HBV 基因 mRNA 的抑制率，在给药第 7 天时，在 1mg/kg 的剂量下抑制率可高达 91.96%；并且，浓度相对较高的缀合物 32 在体内实验中显示出与低浓度缀合物剂量相比明显更高的对 44Bri 乙肝小鼠肝组织中 HBV 基因 mRNA 的抑制率。

使用同样的步骤，对剂量为 1mg/kg 和 0.1mg/kg 的缀合物 38、39 和 40（X2-siHBa1M2SVP、W2-siHBa1M2SVP 和 V2-siHBa1M2SVP）进行了测试，区别仅在于，所使用的缀合物分别为缀合物 38、39 和 40。结果示于图 7B 中。

图 7B 为给予空白对照和不同剂量的缀合物 38、39 和 40 后，第 7 天时小鼠肝组织中 HBV mRNA 的相对表达水平的散点图。由图 7B 的结果可见，本公开的不同缀合物在体内实验中均显示出优异的的对 44Bri 小鼠肝组织中 HBV 基因 mRNA 的抑制率，在给药第 7 天时，在 1mg/kg 的剂量下抑制率可高达 90.37-95.03%。

实验例 2-7 本实验说明缀合物 32 在 HBV 转基因小鼠血清中对 HBsAg 表达和 HBV DNA 的抑制效率的时间相关性测试

使用 AAV-HBV 低浓度模型小鼠。成功建立动物模型之后，按血清 HBsAg 含量随机分组（每组 5 只小鼠）。每组分别给予两组不同剂量的缀合物 32，PBS 用作空白对照。所有动物根据体重计算药量。采用皮下注射的方式单次给药，给药剂量为 3mg/kg 或 1mg/kg 两个组别，使用浓度分别为 0.6mg/ml

或 0.2mg/ml 的缀合物的 0.9%氯化钠水溶液，给药体积为 5ml/kg。空白组仅给予 5ml/kg 的 1×PBS。在给药前与给药后第 14、28、42、56、70、84、98、112、126、140、154、168、182、196 天对小鼠眼眶静脉丛取血，在各时间点检测血清 HBsAg 水平。

眼眶取血每次约 100 μl，离心后血清不少于 20μl。利用 HBsAg CLIA 试剂盒（安图生物，CL0310）按照制造商提供的说明书检测血清中 HBsAg 的含量；参照 QIAamp 96 DNA Blood Kit 说明书提取血清中 DNA，进行定量 PCR，检测 HBV DNA 的表达水平。

标准化的 HBsAg 的表达水平=（给药后 HBsAg 含量/给药前 HBsAg 含量）×100%。

HBsAg 抑制率＝(1-给药后 HBsAg 含量/给药前 HBsAg 含量)×100%。其中，HBsAg 含量用每毫升（ml）血清含多少当量（UI）HBsAg 表示。

标准化的 HBV DNA 的表达水平=(给药后 HBV DNA 含量/给药前 HBV DNA 含量)×100%。

HBV DNA 抑制率＝(1-给药后 HBV DNA 含量/给药前 HBV DNA 含量)×100%。

其中，HBV DNA 含量用每毫升（ml）血清含多少拷贝 HBV DNA 表示。

图 8A 和图 8B 分别是示出了给予不同剂量的缀合物 32 或 PBS 后，HBV 转基因小鼠体内 HBsAg 和 HBV DNA 相对水平的曲线图。由图 8A 和图 8B 的结果可以看出，在给药后不同时间点，NS 阴性对照组未显示出抑制作用；与之相比，浓度为 3mg/kg 缀合物 32 在给药后长达 100 天的期间内，在不同时间点均体现出了高的 HBsAg 抑制率和优异的 HBV DNA 抑制效果，给药剂量为 3mg/kg 的缀合物 32 对血清 HBsAg 的抑制率最高可达 90.9%、HBV DNA 抑制率最高可达 85.7%，且其抑制效果在不同时间点均高于较低浓度 1mg/kg 的缀合物 32 的抑制效果，表明其能够在较长时间内稳定高效地抑制 HBV 基因的表达。

在进一步的实验中，按照上述实施例 6 的检测方法，对第 70 天时的 HBV mRNA 抑制效果进行了检验，结果示于图 9 中。

由图 9 可知，在给药后第 70 天，不同浓度的缀合物 32 仍然能够在一定程度上抑制 HBV mRNA 的表达量，因此显示出在长期起效方面的特殊应用前景。

实验例 3 表 2B 的药物缀合物的效果实验

实验例 3-1 本实验说明表 2B 的药物缀合物在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率。

用 H-DMEM 完全培养基将 HepG2.2.15 细胞以 7×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中，16h 后细胞生长密度达到 70-80%时，吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基，每孔加入 500μl Opti-MEM 培养基（GIBCO 公司）继续培养 1.5h。

用 DEPC 化水将缀合物 43-64 和对比缀合物 1 中的每一个分别配制成 50 μM、5 μM 和 0.5 μM（浓度均以 siRNA 计算）的共 3 种不同浓度的药物缀合物工作液。对于每一个药物缀合物，分别配制 3A1-3A3 溶液，每份 3A1-3A3 溶液依次含有上述 3 个浓度的药物缀合物工作液 0.6 μl 和 Opti-MEM 培养基 50 μl。

配制 3B 溶液，每份 3B 溶液含有 1 μl Lipofectamine™ 2000 和 50 μl Opti-MEM 培养基。

分别将一份 3B 溶液与得到的每个药物缀合物的 3A1、3A2 或 3A3 溶液混合，分别室温下孵育 20min，得到每个 siRNA 的转染复合物 3X1、3X2 或 3X3。

将一份 3B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50 μl 混合，室温下孵育 20min，得到转染复合物 3X4。

在培养孔中，分别加入每一个药物缀合物的转染复合物 3X1、3X2 或 3X3，均匀混合，加入量为 100 μl/孔，得到每个 siRNA 终浓度分别约为 50 nM、5 nM 或 0.5 nM 的转染复合物，每个转染复合物分别转染 3 个培养孔，得到含药物缀合物的转染混合物，记为测试组。

在另外 3 个培养孔中，分别加入转染复合物 3X4，加入量为 100 μl/孔，得到不含 siRNA 的转染混合物，记为空白对照组。

将含药物缀合物的转染混合物和不含药物缀合物的转染混合物在培养孔中培养 4h 后，每孔补加 1ml 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO_2 培养箱继续培养 24h。

随后，使用 RNeasy Mini Kit（QIAGEN 公司，货号 Cat.74106）试剂盒，根据说明书描述的详细步骤提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞，分别取 1 μg 总 RNA，使用反转录试剂盒 GoldenstarTM RT6 cDNA Synthesis Kit（购自北京擎科新业生物技术有限公司，货号 TSK301M）提供的试剂，其中选取 GoldenstarTM Oligo (dT)17 作为引物，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20 μl，对细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：将反转录反应体系置于 50°C 孵育 50min，然后 85°C 孵育 5min，最后 4°C 孵育 30s，反应结束后，向反转录反应体系中加入 DEPC 水 80 μl，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，分别取上述含 cDNA 的溶液 5μl 做模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒（购自近岸蛋白质科技有限公司，货号 E096-01B）提供的试剂配置 qPCR 反应

体系 20μl，其中，用于扩增目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列如表 3B 所示，每条引物的终浓度为 0.25μM。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95℃ 预变性 10min，然后 95℃ 变性 30s，60℃ 退火 30s，72℃ 延伸 30s，重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的产物 W1。产物 W1 随即依次经过 95℃ 15s，60℃ 1min，95℃ 15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W1 中目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线，得到目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

表 3B 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
HBV	5'- CGTTTCTCCTGGCTCAGTTTA - 3'（SEQ ID NO: 681）	5'- CAGCGGTAAAAAGGGACTCAA -3'（SEQ ID NO: 682）
GAPDH	5'- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG- 3'（SEQ ID NO: 683）	5'- AGGGGCCATCCACAGTCTTC -3'（SEQ ID NO: 684）

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组三个培养孔各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每一培养孔均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})}\times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度三个培养孔的相对表达水平的算术平均值。

其中，各测试组为分别经表 2B 中所列的药物缀合物处理的 HepG2.2.15 细胞，所述药物缀合物包括缀合物 43-64 的药物缀合物和对比缀合物 1 的对照药物缀合物。

以下表 4B 示出了表 2B 中所列的测试药物缀合物与对照药物缀合物在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达抑制活性的检测结果。

表 4B 不同浓度药物缀合物的体外 HBV mRNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	mRNA 抑制率（%）		
		50nM	10nM	1nM
缀合物 43	N6-siHBb1M1S	54.1	40.2	24.9
缀合物 44	N6-siHBb2M1S	53.9	37.5	29.2
缀合物 45	N6-siHBb1M2	54.3	35.5	26.5
缀合物 46	N6-siHBb2M2	52.2	38.5	27.1
缀合物 47	N6-siHBb1M1SVP	55.2	48.2	28.7
缀合物 48	N6-siHBb2M1SP	55.0	48.0	28.6
缀合物 49	N6-siHBb2M1SPs	54.9	47.8	28.4
缀合物 50	N6-siHBb3M1S	54.0	47.5	28.0
缀合物 51	N6-siHBb2M1SVP	54.1	48.3	30.8
缀合物 52	N6-siHBb1M2SVP	52.0	38.2	29.2
缀合物 53	N6-siHBb2M2SVP	53.2	37.3	27.2
缀合物 54	N6-siHBb1M5SVP	52.2	36.4	25.6
缀合物 55	N6-siHBb1M3SVP	43.0	28.4	21.1
缀合物 56	N6-siHBb1M4SVP	39.4	25.2	17.1
缀合物 57	N6-siHBb4M1SVP	53.5	36.4	24.2
缀合物 58	N6-siHBb1	57.4	45.1	32.3

缀合物 59	N6-siHBb2	56.5	49.9	29.3
缀合物 60	X2-siHBb2M1SVP	54.5	49.2	30.6
缀合物 61	W2-siHBb2M1SVP	54.4	48.6	30.4
缀合物 62	V2-siHBb2M1SVP	54.2	48.5	30.2
缀合物 63	O2-siHBb2M1SVP	54.2	48.8	30.4
缀合物 64	P2-siHBb2M1SVP	54.1	48.5	30.2
对比缀合物 1	N6-NC	2.1	1.5	-2.8

从表 4B 的结果可以看出，表 2B 中的各个药物缀合物在体外 HepG2.2.15 细胞中具有很高的 HBV mRNA 抑制活性，在 siRNA 浓度为 50 nM 时最高可达到 57.4%的 HBV mRNA 抑制率。

实验例 3-2 本实验说明表 2B 的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性

将缀合物 43-57、60-64 的药物缀合物（以 siRNA 浓度为 20 μM 的 0.9 wt%氯化钠水溶液形式提供，每组 12μl）分别与 108 μL 90%人血浆（Human plasma，购自江苏省血液研究所，以 1×PBS（pH7.4）稀释）混匀，获得混合液，在 37℃ 恒温孵育。分别在 0、8、24、48 小时取出 10 μL 混合液，立即进行液氮速冻于-80℃ 冰箱中冻存。其中，0 小时是指缀合物溶液与 90%人血浆混匀后，立即取出 10μL 混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用 1×PBS（pH7.4）将各混合液稀释 5 倍后，取每一稀释混合液 10 μL 准备电泳。同时，分别将等摩尔量的上述缀合物溶液（以 siRNA 计的浓度为 2 μM）2 μl 与 8 μl 1×PBS（pH7.4）混匀，制备成 10 μL 未经人血浆处理的样品，记为未处理，准备电泳。

配制 20 重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将每一组的上述准备电泳的样品分别与 4 μL 上样缓冲液（20mM EDTA，36 重量%甘油，0.06 重量%溴酚蓝）混合，然后上样至各凝胶孔，在 80mA 恒流条件下电泳 60 分钟左右。电泳结束后，取出凝胶，用 1×Sybr Gold 染料（Invitrogen，Cat.11494）染色 15 分钟后成像并计算稳定性结果，结果如表 5B 所示。

表 5B 示出了表 2B 中所列的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果。该结果以药物缀合物与人血浆孵育后残留的最长片段与未经处理的 siRNA 最长片段的比例（RL）表示。

表 5B 不同药物缀合物随时间的血浆稳定性

缀合物序号	缀合物编号	RL（%）				
		未处理	0h	8h	24h	48h
缀合物 43	N6-siHBb1M1S	100	100	99.6	96.0	94.7
缀合物 44	N6-siHBb2M1S	100	100	99.7	96.2	94.7
缀合物 45	N6-siHBb1M2	100	100	99.6	96.1	94.8
缀合物 46	N6-siHBb2M2	100	100	99.4	96.7	95.3
缀合物 47	N6-siHBb1M1SVP	100	100	99.3	96.5	95.5
缀合物 48	N6-siHBb2M1SP	100	100	99.2	96.2	95.1
缀合物 49	N6-siHBb2M1SPs	100	100	99.5	96.1	95.2
缀合物 50	N6-siHBb3M1S	100	100	99.2	96.0	94.9
缀合物 51	N6-siHBb2M1SVP	100	100	99.7	96.7	95.8
缀合物 52	N6-siHBb1M2SVP	100	100	99.7	97.1	95.1
缀合物 53	N6-siHBb2M2SVP	100	100	99.4	96.4	95.5
缀合物 54	N6-siHBb1M5SVP	100	100	99.7	95.5	94.6
缀合物 55	N6-siHBb1M3SVP	100	100	99.7	96.4	96.3
缀合物 56	N6-siHBb1M4SVP	100	100	99.5	97.3	94.4
缀合物 57	N6-siHBb4M1SVP	100	100	99.6	97.1	94.3
缀合物 60	X2-siHBb2M1SVP	100	100	99.8	96.3	94.4
缀合物 61	W2-siHBb2M1SVP	100	100	99.5	96.6	94.5
缀合物 62	V2-siHBb2M1SVP	100	100	99.4	97.1	94.8
缀合物 63	O2-siHBb2M1SVP	100	100	99.6	96.1	95.2
缀合物 64	P2-siHBb2M1SVP	100	100	99.7	95.7	95.0

由表 5B 的结果可以看出，各个药物缀合物在人血浆中均显示出优异的稳定性。

实验例 3-3 本实验说明表 2B 的药物缀合物在体内（in vivo）对 HBV mRNA 表达量的抑制效率

在本实验例中，对缀合物 43-57 和 60-64 的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率进行了考察。

本实验例中所使用的 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 购自北京大学医学部实验动物科学部。

首先，将 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠按血清 HbsAg 含量随机分组（均为雌性），每组 5 只小鼠，按照表 2B 中的药物缀合物进行编号，并增加 PBS 对照组。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.2 mg/ml（均以 siRNA 计）的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量（以 siRNA 计）为 1mg/kg。对于对照组的每只小鼠，仅给予 5 ml/kg 的 1×PBS。给药后第 14 天将动物处死，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol 根据总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠的肝脏组织，分别取 1μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 HBV mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 HBV 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别对 HBV 和 β-肌动蛋白进行检测。检测引物的序列参见表 6B。

表 6B 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
HBV	5’- CGTTTCTCCTGGCTCAGTTTA -3’（SEQ ID NO: 685）	5’- CAGCGGTAAAAAGGGACTCAA -3’（SEQ ID NO: 686）
β-actin	5'- AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG -3'（SEQ ID NO: 687）	5'- TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3'（SEQ ID NO: 688）

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组中目标基因的表达水平和抑制率进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 4 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义空白对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $= 2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})} \times 100\%$

测试组 HBV mRNA 抑制率 = (1-测试组 HBV mRNA 相对表达水平) × 100%

表 7B 示出了对照组和分别给予 1mg/kg 的药物缀合物 43-64 后，小鼠肝组织中 HBV mRNA 的抑制率。

表 7B 药物缀合物在小鼠肝脏中 HBV mRNA 表达的抑制

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	肝脏 HBV mRNA 抑制率（%）
缀合物 43	N6-siHBb1M1S	1	79.4
缀合物 44	N6-siHBb2M1S	1	84.2
缀合物 45	N6-siHBb1M2	1	80.0
缀合物 46	N6-siHBb2M2	1	84.5
缀合物 47	N6-siHBb1M1SVP	1	82.2
缀合物 48	N6-siHBb2M1SP	1	88.5
缀合物 49	N6-siHBb2M1SPs	1	82.0
缀合物 50	N6-siHBb3M1S	1	79.0
缀合物 51	N6-siHBb2M1SVP	1	88.2
缀合物 52	N6-siHBb1M2SVP	1	78.7

缀合物 53	N6-siHBb2M2SVP	1	85.4
缀合物 54	N6-siHBb1M5SVP	1	76.1
缀合物 55	N6-siHBb1M3SVP	1	68.3
缀合物 56	N6-siHBb1M4SVP	1	68.6
缀合物 57	N6-siHBb4M1SVP	1	86.0
缀合物 60	X2-siHBb2M1SVP	1	86.1
缀合物 61	W2-siHBb2M1SVP	1	86.4
缀合物 62	V2-siHBb2M1SVP	1	86.5
缀合物 63	O2-siHBb2M1SVP	1	86.8
缀合物 64	P2-siHBb2M1SVP	1	86.2
PBS	-	NA	NA

由上述结果可见，本公开各个实施例的缀合物均显示出了高的小鼠体内 HBV mRNA 抑制活性，在 1 mg/kg 的剂量下， HBV mRNA 抑制率最高可达 88.5%。

实验例 3-4 本实验说明表 2B 的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠中 siRNA 对血清 HBsAg 表达量和 HBV DNA 的抑制效率的时间相关性测试

按照文献方法（董小岩等，Chin J Biotech 2010, May 25; 26(5): 679−686）制备 AAV-HBV 模型，rAAV8-1.3HBV，D 型（ayw），购于北京五加和分子医学研究所有限公司，1×10^{12} viral genome （v.g.）/mL，批号 2016123011。实验前将 AAV 病毒用无菌 PBS 稀释至 5×10^{11} v.g./mL。每只小鼠注射 200 μL，即每只小鼠注射 1×10^{11} v.g.。病毒注射后第 28 天，所有小鼠通过眼眶采血（约 100 μL）用于收集血清检测 HBsAg 和 HBV DNA。动物造模成功后，按血清 HBsAg 含量随机分组（每组 5 只），分别给予缀合物 43-49、52-53、57 和 60-64 的药物缀合物，以及 PBS 空白对照。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.6 mg/ml（均以 siRNA 计）的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量（以 siRNA 计）为 3mg/kg。空白对照组的每只小鼠仅给予 5 ml/kg 小鼠体重的 1×PBS。在给药前与给药后第 7、14、21、28、56、84 天对小鼠眼眶静脉丛取血，在各时间点检测血清 HBsAg 水平。

眼眶取血每次约 100 μl，离心后血清不少于 20μl。利用 HBsAg CLIA 试剂盒（安图生物，CL0310）按照制造商提供的说明书检测血清中 HBsAg 的表达水平；参照 QIAamp 96 DNA Blood Kit 说明书提取血清中 DNA，进行定量 PCR，检测 HBV DNA 的表达水平。

HBsAg 抑制率按如下等式计算：

HBsAg 抑制率＝(1-给药后 HBsAg 含量/给药前 HBsAg 含量)×100%。其中，HBsAg 含量用每毫升（ml）血清含多少当量（UI）HBsAg 表示。

HBV DNA 抑制率按如下等式计算：

HBV DNA 抑制率＝(1-给药后 HBV DNA 含量/给药前 HBV DNA 含量)×100%。

其中，HBV DNA 含量用每毫升（ml）血清含多少拷贝 HBV DNA 表示。

表 8B 和 9B 分别示出了给予不同剂量的各药物缀合物或 PBS 后，HBV 转基因小鼠体内 HBsAg 和 HBV DNA 抑制率。表 8B 药物缀合物在小鼠血清中 HBsAg 表达的抑制

缀合物序号	缀合物编号	血清 HBsAg 抑制率（%）					
		D7	D14	D21	D28	D56	D84
缀合物 43	N6-siHBb1M1S	93.1	93.2	92.6	88.3	81.4	73.4
缀合物 44	N6-siHBb2M1S	93.8	94.6	93.6	90.1	82.6	79.4
缀合物 45	N6-siHBb1M2	93.5	94.3	93.1	85.7	78.8	71.7
缀合物 46	N6-siHBb2M2	94.4	94.9	94.2	87.6	79.2	76.1
缀合物 47	N6-siHBb1M1SVP	95.3	95.6	95.1	94.8	91.9	85.6
缀合物 48	N6-siHBb2M1SP	95.3	96.8	98.1	96.3	94.7	89.2
缀合物 49	N6-siHBb2M1SPs	95.4	95.6	95.2	94.9	89.6	82.5
缀合物 52	N6-siHBb1M2SVP	94.5	95.8	94.9	93.6	89.2	83.5
缀合物 53	N6-siHBb2M2SVP	95.7	96.5	96.8	95.3	91.4	84.8
缀合物 57	N6-siHBb4M1SVP	94.7	95.0	94.2	93.1	90.3	84.2
缀合物 60	X2-siHBb2M1SVP	93.2	94.0	93.4	92.9	87.5	80.1

缀合物 61	W2-siHBb2M1SVP	93.7	94.1	93.3	91.9	86.4	79.8
缀合物 62	V2-siHBb2M1SVP	93.6	94.3	93.5	91.7	86.8	80.6
缀合物 63	O2-siHBb2M1SVP	93.8	94.8	93.1	92.1	87.1	79.8
缀合物 64	P2-siHBb2M1SVP	93.6	94.5	93.0	91.8	86.2	79.9
-	PBS	1.8	-9.3	-11.5	-8.9	-42.1	-103.5

由表 8B 的结果可以看出，在给药后不同时间点，PBS 阴性对照组未显示出任何抑制作用；与之相比，各药物缀合物在给药后不同时间点对 HBsAg 均体现出了优异的 HBsAg 抑制效果。特别是缀合物 47-53 和 57 的药物缀合物在长达 84 天的时间内持续显示出高的血清 HBsAg 抑制率，抑制率最高可达 98.1%，表明其能够在较长时间内稳定高效地抑制 HBV 基因的表达。

表 9B 药物缀合物在小鼠血清中 HBV DNA 表达的抑制

缀合物序号	缀合物编号	血清 HBV DNA 抑制率（%）					
		D7	D14	D21	D28	D56	D84
缀合物 43	N6-siHBb1M1S	74.3	91.2	90.2	82.4	75.2	67.2
缀合物 44	N6-siHBb2M1S	74.2	90.8	90.4	83.5	73.2	67.3.3
缀合物 45	N6-siHBb1M2	75.5	91.3	90.5	79.4	72.5	63.8
缀合物 46	N6-siHBb2M2	74.6	91.4	90.6	81.6	73.8	65.4
缀合物 47	N6-siHBb1M1SVP	76.2	92.6	90.8	85.6	78.4	70.1
缀合物 48	N6-siHBb2M1SP	76.6	92.1	90.1	86.4	82.1	75.3
缀合物 49	N6-siHBb2M1SPs	76.0	92.3	90.3	82.5	78.6	69.1
缀合物 52	N6-siHBb1M2SVP	75.7	91.9	89.9	82.1	79.5	69.4
缀合物 53	N6-siHBb2M2SVP	76.2	93.2	90.1	82.6	79.8	70.2
缀合物 57	N6-siHBb4M1SVP	76.4	93.5	90.3	81.8	81.2	73.1
缀合物 60	X2-siHBb2M1SVP	76.5	92.4	90.1	82.5	79.4	69.5
缀合物 61	W2-siHBb2M1SVP	76.3	92.4	90.6	85.1	82.1	73.4
缀合物 62	V2-siHBb2M1SVP	76.2	91.8	90.1	85.3	81.6	73.4
缀合物 63	O2-siHBb2M1SVP	76.1	92.1	90.2	84.2	81.7	73.9
缀合物 64	P2-siHBb2M1SVP	76.8	91.0	89.7	83.4	81.9	72.1
-	PBS	1.7	-8.5	-11.4	-18.4	-42.1	-80.5

由表 9B 可以看出，与 HBsAg 抑制效果类似地，各实施例的药物缀合物同样显示出高效的 HBV DNA 表达抑制，抑制率最高可达 93.5%，并且在长达 84 天的时间内抑制率保持基本稳定。

实验例 4 表 2C 的药物缀合物的效果试验

实验例 4-1 本公开提供的药物缀合物在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率检测。

用 H-DMEM 完全培养基将 HepG2.2.15 细胞以 7×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中，16h 后细胞生长密度达到 70-80%时，吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基，每孔加入 500μl Opti-MEM 培养基（GIBCO 公司）继续培养 1.5h。

用 DEPC 化水将下面的药物缀合物中的每一个药物缀合物分别配制成 50 μM、5 μM 和 0.5 μM 的共 3 种不同浓度的药物缀合物工作液，所用药物缀合物分别为表 4C 中列出的各缀合物。

对于每一个 siRNA,分别配制 4A1、4A2 和 4A3 溶液，每份 4A1-4A3 溶液依次含有上述 3 个浓度的 siRNA 工作液 0.6 μl 和 Opti-MEM 培养基 50 μl。

配制 4B 溶液，每份 4B 溶液含有 1 μl Lipofectamine™ 2000 和 50μl Opti-MEM 培养基。

分别将一份 4B 溶液与得到的一份每个 siRNA 的 4A1、4A2 或 4A3 溶液混合，分别在室温下孵育 20min，得到每个 siRNA 的转染复合物 4X1、4X2 和 4X3。

将一份 4B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50μl 混合，室温下孵育 20min，得到转染复合物 4X4。

在培养孔中，分别加入每一个药物缀合物的转染复合物 4X1、4X2 或 4X3，均匀混合，加入量为 100 μl/孔，得到每个药物缀合物终浓度分别约为 50 nM、5 nM 和 0.5 nM 的转染化混合物，每个转染复合物分别转染 3 个培养孔，得到含药物缀合物的转染混合物，记为测试组。

在另外 3 个培养孔中，分别加入转染复合物 4X4，加入量为 100 μl/孔，得到不含药物缀合物的转染混合物，记为对照组。

将含药物缀合物的转染混合物和不含药物缀合物的转染混合物在培养孔中培养 4h 后，每孔补加

1ml 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO_2 培养箱继续培养 24h。

随后，使用 RNeasy Mini Kit（QIAGEN 公司，货号 Cat.74106）试剂盒，根据说明书描述的详细步骤提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞，分别取 1μg 总 RNA，使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit（购自北京擎科新业生物技术有限公司，货号 TSK301M）提供的试剂，其中选取 Goldenstar™ Oligo $(dT)_{17}$ 作为引物，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20μl，对细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：将反转录反应体系置于 50℃ 孵育 50min，然后 85℃ 孵育 5min，最后 4℃ 孵育 30s，反应结束后，向反转录反应体系中加入 DEPC 水 80μl，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，分别取上述含 cDNA 的溶液 5μl 做模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒（购自近岸蛋白质科技有限公司，货号 E096-01B）提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μl，其中，用于扩增目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列如表 3A 所示，每条引物的终浓度为 0.25μM。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95℃ 预变性 10min，然后 95℃ 变性 30s，60℃ 退火 30s，72℃ 延伸 30s，重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的产物 W1。产物 W1 随即依次经过 95℃ 15s，60℃ 1min，95℃ 15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W1 中目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线，得到目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组三个培养孔各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每一培养孔均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $= 2^{-\Delta\Delta Ct(测试组)} \times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度三个培养孔的相对表达水平的算术平均值。

其中，各测试组为分别经表 2C 中所列的药物缀合物处理的 HepG2.2.15 细胞，所述药物缀合物包括缀合物 65-81 和对比缀合物 1。

以下表 4C 示出了表 2C 中所列的缀合物药物缀合物与对比缀合物 1 在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达抑制活性的检测结果。

表 4C 不同浓度药物缀合物的体外 HBV mRNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	mRNA 抑制率（%）		
		50nM	10nM	1nM
缀合物 65	N6-siHBc1	53.5	39.2	22.3
缀合物 66	N6-siHBc1M1	53.3	38.1	27.5
缀合物 67	N6-siHBc1M2	53.8	36.2	24.6
缀合物 68	N6-siHBc1M1SVP	53.1	37.6	25.8
缀合物 69	N6-siHBc1M2SVP	54.2	47.1	27.1
缀合物 70	N6-siHBc1M3SVP	54.6	26.5	18.3
缀合物 71	N6-siHBc1M4SVP	55.2	25.8	18.0
缀合物 72	N6-siHBc1M5SVP	54.3	42.1	26.2
缀合物 73	N6-siHBc2M1SVP	53.6	43.2	27.1
缀合物 74	N6-siHBc1M1SP	52.8	44.1	28.0
缀合物 75	N6-siHBc1M1SPs	53.3	44.6	26.6
缀合物 76	N6-siHBc4M1S	52.9	44.2	26.9
缀合物 77	X2-siHBc1M1SVP	55.2	42.6	27.3

缀合物 78	W2-siHBc1M1SVP	54.9	41.2	28.3
缀合物 79	V2-siHBc1M1SVP	54.9	41.6	26.4
缀合物 80	O2-siHBc1M1SVP	54.1	45.2	25.9
缀合物 81	P2-siHBc1M1SVP	53.8	46.3	28.1
对比缀合物 1	N6-NC	2.0	1.7	-2.6

从表 4C 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在体外 HepG2.2.15 细胞中具有很高的 HBV mRNA 抑制活性，在 siRNA 浓度为 50 nM 时可达到 55.2%的 HBV mRNA 抑制率。

实验例 4-2 本公开提供的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性

将药物缀合物中的每一个药物缀合物（以 siRNA 计算的浓度均为 20μM 的 0.9 wt%氯化钠水溶液提供，每组 12μl）分别与 108 μL 90%人血浆（Human plasma，购自江苏省血液研究所，以 1×PBS（pH7.4）稀释）混匀，获得混合液，所用药物缀合物分别为表 5C 中列出的各缀合物。在 37°C 恒温孵育。分别在 0、8、24、48 小时取出 10 μL 样本，立即进行液氮速冻于-80°C 冰箱中冻存。其中，0 小时是指缀合物溶液与 90%人血浆混匀后，立即取出 10μL 混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用 1×PBS（pH7.4）将各混合液稀释 5 倍后，每一混合液各取 10 μL 准备电泳。分别将等摩尔量的上述缀合物溶液（以 siRNA 计的浓度为 2 μM）2 μl 与 8 μl 1×PBS（pH7.4）混匀，制备成 10 μL 未经人血浆处理的样品，记为未处理，准备电泳。

配制 20 重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将每一组的上述准备电泳的样品分别与 4 μL 上样缓冲液（20mM EDTA，36 重量%甘油，0.06 重量%溴酚蓝）混合，然后上样至各凝胶孔，在 80mA 恒流条件下电泳 60 分钟左右。电泳结束后，取出凝胶，用 1×Sybr Gold 染料（Invitrogen，Cat.11494）染色 15 分钟后成像并计算稳定性结果，结果如表 5C 所示。

表 5C 示出了表 2C 中所列的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果。该结果以药物缀合物与人血浆孵育后残留的最长片段与未经处理的 siRNA 最长片段的比例（RL）表示。

表 5C 不同药物缀合物随时间的血浆稳定性

缀合物序号	缀合物编号	RL（%）				
		未处理	0h	8h	24h	48h
缀合物 66	N6-siHBc1M1	100	100	99.5	96.2	94.2
缀合物 67	N6-siHBc1M2	100	100	99.5	96.4	94.1
缀合物 68	N6-siHBc1M1SVP	100	100	99.2	96.0	94.0
缀合物 69	N6-siHBc1M2SVP	100	100	99.1	96.2	95.0
缀合物 70	N6-siHBc1M3SVP	100	100	99.5	96.7	95.2
缀合物 71	N6-siHBc1M4SVP	100	100	99.4	96.0	94.8
缀合物 72	N6-siHBc1M5SVP	100	100	99.2	95.8	95.1
缀合物 73	N6-siHBc2M1SVP	100	100	99.0	96.3	94.5
缀合物 74	N6-siHBc1M1SP	100	100	99.6	96.2	95.2
缀合物 75	N6-siHBc1M1SPs	100	100	99.5	96.1	94.6
缀合物 76	N6-siHBc4M1S	100	100	99.1	95.4	95.1
缀合物 77	X2-siHBc1M1SVP	100	100	99.5	95.3	94.2
缀合物 78	W2-siHBc1M1SVP	100	100	99.4	96.0	94.1
缀合物 79	V2-siHBc1M1SVP	100	100	99.1	96.1	94.2
缀合物 80	O2-siHBc1M1SVP	100	100	99.2	95.1	95.0
缀合物 81	P2-siHBc1M1SVP	100	100	99.5	95.2	94.5

由表 5C 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在血浆中均显示出优异的稳定性，在 48h 仍均具有高于 94%的 siRNA 片段长度比例。

实验例 4-3 本公开提供的药物缀合物在体内（in vivo）中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率检测。

本实验例中所使用的 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 购自北京大学医学部实验动物科学部，将 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠按血清 HbsAg 含量随机分组（均为雌性），每组 5 只小鼠，按照表 2C 中的药物缀合物对每组小鼠进行编号，然后分别向每组小鼠给予表 7C 中的各待测缀合物。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.2 mg/ml 的 0.9%

氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量为 1 mg/kg。

对另外一组小鼠中的每只给予 1×PBS，给药体积均为 5ml/kg，作为对照组。

给药后第 14 天处死动物，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据说明书描述的操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠的肝脏组织，分别取 1μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 HBV mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 HBV 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别对 HBV 和 β-肌动蛋白进行检测。检测引物的序列参见表 6A 所示。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组三个培养孔各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(测试组)} \times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度 5 只小鼠的相对表达水平的算术平均值。

其中，对照组为本实验中施以 PBS 的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同药物缀合物的给药组小鼠。结果示于以下表 7C 中。

表 7C 不同药物缀合物在小鼠肝脏中的 HBV mRNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	肝脏 HBV mRNA 抑制率（%）
缀合物 66	N6-siHBc1M1	1	78.2
缀合物 67	N6-siHBc1M2	1	82.3
缀合物 68	N6-siHBc1M1SVP	1	79.6
缀合物 69	N6-siHBc1M2SVP	1	82.1
缀合物 70	N6-siHBc1M3SVP	1	58.2
缀合物 71	N6-siHBc1M4SVP	1	50.4
缀合物 72	N6-siHBc1M5SVP	1	81.3
缀合物 73	N6-siHBc2M1SVP	1	77.9
缀合物 74	N6-siHBc1M1SP	1	82.1
缀合物 75	N6-siHBc1M1SPs	1	83.5
缀合物 76	N6-siHBc4M1S	1	76.2
缀合物 77	X2-siHBc1M1SVP	1	83.2
缀合物 78	W2-siHBc1M1SVP	1	84.2
缀合物 79	V2-siHBc1M1SVP	1	83.6
缀合物 80	O2-siHBc1M1SVP	1	82.9
缀合物 81	P2-siHBc1M1SVP	1	84.6
PBS	-	-	NA

由表 7C 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在 1 mg/kg 的 siRNA 给药剂量下，在 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠体内对肝脏 HBV mRNA 显示出了很高的抑制活性，在 1 mg/kg 的剂量下，最高可达到 84.6%的 HBV mRNA 抑制率。

实验例 4-4 本实验提供的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠中 siRNA 对血清 HBsAg 表达量和 HBV DNA 的抑制效率的时间相关性测试

按照文献方法（董小岩等，Chin J Biotech 2010, May 25; 26(5): 679−686）制备 AAV-HBV 模型，rAAV8-1.3HBV，D 型（ayw），购于北京五加和分子医学研究所有限公司，1×10^{12} viral genome （v.g.）/mL，批号 2016123011。实验前将 AAV 病毒用无菌 PBS 稀释至 5×10^{11} v.g./mL。每只小鼠注射 200 μL，即每只小鼠注射 1×10^{11} v.g.。病毒注射后第 28 天，所有小鼠通过眼眶采血（约 100 μL）用于收集血清检测 HBsAg 和 HBV DNA。

动物造模成功后，按血清 HBsAg 含量随机分组（每组 5 只），分别进行编号，然后分别向每组小鼠给予表 8C 中的各待测缀合物，所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.6 mg/ml 的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量为 3 mg/kg。对另外一组小鼠中的每一只给予 1×PBS，给药体积均为 5ml/kg，作为对照组。在给药前与给药后第 7、14、21 天对小鼠眼眶静脉丛取血，在各时间点检测血清 HBsAg 水平。

眼眶取血每次约 100 μl，离心后取血清不少于 20μl。使用 HBsAg CLIA 试剂盒（安图生物，CL0310），按照试剂盒中提供的说明书检测血清中 HBsAg 的表达水平；参照 QIAamp 96 DNA Blood Kit 说明书提取血清中 DNA，对其进行定量 PCR，检测 HBV DNA 的表达水平。

HBsAg 抑制率按如下等式计算：

HBsAg 抑制率＝(1-给药后 HBsAg 含量/给药前 HBsAg 含量)×100%。其中，HBsAg 含量用每毫升（ml）血清含多少当量（UI）HBsAg 表示。

HBV DNA 抑制率按如下等式计算：

HBV DNA 抑制率＝(1-给药后 HBV DNA 含量/给药前 HBV DNA 含量)×100%。

其中，HBV DNA 含量用每毫升（ml）血清含多少拷贝 HBV DNA 表示。

表 8C 和 9C 分别示出了给予不同剂量的药物缀合物或 PBS 后，HBV 转基因小鼠体内 HBsAg 和 HBV DNA 抑制率。

表 8C 不同药物缀合物在小鼠血清中 HBsAg 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	血清 HBsAg 抑制率（%）		
		D7	D14	D21
缀合物 68	N6-siHBc1M1SVP	81.2	82.3	74.8
缀合物 69	N6-siHBc1M2SVP	81.5	82.5	73.8
缀合物 73	N6-siHBc2M1SVP	80.1	82.1	74.6
缀合物 74	N6-siHBc1M1SP	79.8	81.8	74.1
缀合物 75	N6-siHBc1M1SPs	78.2	81.6	73.5
缀合物 77	X2-siHBc1M1SVP	80.3	81.3	72.0
缀合物 78	W2-siHBc1M1SVP	81.6	81.2	71.5
缀合物 79	V2-siHBc1M1SVP	81.0	80.1	71.6
缀合物 80	O2-siHBc1M1SVP	81.3	79.2	71.4
缀合物 81	P2-siHBc1M1SVP	81.2	81.3	71.5
-	PBS	2.2	-19.3	-31.8

由表 8C 的结果可见，在给药后不同时间点，PBS 阴性对照组未显示出任何抑制作用；与之相比，本公开提供的药物缀合物在给药后不同时间点对 HBsAg 均体现出了优异的 HBsAg 抑制效果。特别是在 21 天的时间内持续显示出高的血清 HBsAg 抑制率，抑制率最高可达 81.8%，表明其能够在较长时间内稳定高效地抑制 HBV mRNA 的表达。

表 9C 不同药物缀合物在小鼠血清中 HBV DNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	血清 HBV DNA 抑制率（%）		
		D7	D14	D21
缀合物 68	N6-siHBc1M1SVP	75.2	82.3	71.3
缀合物 69	N6-siHBc1M2SVP	74.3	82.4	70.2
缀合物 73	N6-siHBc2M1SVP	76.1	81.9	73.2
缀合物 74	N6-siHBc1M1SP	75.3	82.6	71.2
缀合物 75	N6-siHBc1M1SPs	74.2	83.2	70.8
缀合物 77	X2-siHBc1M1SVP	75.3	82.7	73.2
缀合物 78	W2-siHBc1M1SVP	76.4	82.1	72.4

缀合物 79	V2-siHBc1M1SVP	75.1	80.9	72.1
缀合物 80	O2-siHBc1M1SVP	74.6	83.9	71.9
缀合物 81	P2-siHBc1M1SVP	75.0	82.1	71.6
-	PBS	1.2	3.5	-3.8

由表 9C 的结果可见，本公开提供的药物缀合物同样显示出优秀的 HBV DNA 的抑制效果，并且在 21 天的时间内均保持了较高的抑制率，最高可达到 83.9%。

实验例 5 本公开提供的药物缀合物的效果试验

实验例 5-1 本公开提供的药物缀合物在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率检测。

用 H-DMEM 完全培养基将 HepG2.2.15 细胞以 7×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中，16h 后细胞生长密度达到 70-80%时，吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基，每孔加入 500μl Opti-MEM 培养基（GIBCO 公司）继续培养 1.5h。

用 DEPC 化水将下面的药物缀合物中的每一个药物缀合物分别配制成 50 μM、5 μM 和 0.5 μM 的共 3 种不同浓度的药物缀合物工作液，所用药物缀合物分别为表 4D 中的各待测缀合物。

对于每一个 siRNA,分别配制 5A1、5A2 和 5A3 溶液，每份 53A1-3A3 溶液依次含有上述 3 个浓度的 siRNA 工作液 0.6 μl 和 Opti-MEM 培养基 50 μl。

配制 5B 溶液，每份 5B 溶液含有 1 μl Lipofectamine™ 2000 和 50 μl Opti-MEM 培养基。

分别将一份 5B 溶液与得到的一份每个 siRNA 的 5A1、5A2 或 5A3 溶液混合，分别在室温下孵育 20min，得到每个 siRNA 的转染复合物 5X1、5X2 和 5X3。

将一份 5B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50μl 混合，室温下孵育 20min，得到转染复合物 5X4。

在培养孔中，分别加入每一个药物缀合物的转染复合物 5X1-5X3，均匀混合，加入量为 100μl/孔，得到每个药物缀合物终浓度分别约为 50 nM、5 nM 和 0.5 nM 的转染混合物，每个转染复合物分别转染 3 个培养孔，得到含药物缀合物的转染混合物，记为测试组。

在另外 3 个培养孔中，分别加入转染复合物 5X4，加入量为 100 μl/孔，得到不含 siRNA 的转染混合物，记为对照组。

将含药物缀合物的转染混合物和不含药物缀合物的转染混合物在培养孔中培养 4h 后，每孔补加 1ml 添加了 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO_2 培养箱继续培养 24h。

随后，使用 RNeasy Mini Kit（QIAGEN 公司，货号 Cat.74106）试剂盒，根据说明书描述的详细步骤提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞，分别取 1μg 总 RNA，使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit（购自北京擎科新业生物技术有限公司，货号 TSK301M）提供的试剂，其中选取 Goldenstar™ Oligo $(dT)_{17}$ 作为引物，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20μl，对细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：将反转录反应体系置于 50℃ 孵育 50min，然后 85℃ 孵育 5min，最后 4℃ 孵育 30s，反应结束后，向反转录反应体系中加入 DEPC 水 80μl，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，分别取上述含 cDNA 的溶液 5μl 做模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒（购自近岸蛋白质科技有限公司，货号 E096-01B）提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μl，其中，用于扩增目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列如表 3A 所示，每条引物的终浓度为 0.25μM。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95℃ 预变性 10min，然后 95℃ 变性 30s，60℃ 退火 30s，72℃ 延伸 30s，重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的产物 W2。产物 W2 随即依次经过 95℃ 15s，60℃ 1min，95℃ 15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W2 中目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线，得到目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组三个培养孔各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每一培养孔均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $= 2^{-\Delta\Delta Ct(测试组)} \times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度三个培养孔的相对表达水平的算术平均值。

其中，各测试组为分别经表 2D 中所列的药物缀合物处理的 HepG2.2.15 细胞，所述药物缀合物包括缀合物 82-98 对比缀合物 1。

以下表 4D 示出了表 2D 中所列的缀合物药物缀合物与对比缀合物在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达抑制活性的检测结果。

表 4D 不同浓度药物缀合物的体外 HBV mRNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	HBV mRNA 抑制率（%）		
		50nM	10nM	1nM
缀合物 82	N6-siHBd1	53.2	39.6	22.6
缀合物 83	N6-siHBd1M1	52.8	38.8	26.8
缀合物 84	N6-siHBd1M2	52.7	36.5	23.9
缀合物 85	N6-siHBd1M1SVP	52.7	36.9	24.9
缀合物 86	N6-siHBd1M2SVP	53.8	45.2	26.5
缀合物 87	N6-siHBd1M3SVP	53.9	24.5	17.8
缀合物 88	N6-siHBd1M4SVP	53.9	23.6	17.5
缀合物 89	N6-siHBd1M5SVP	52.7	41.6	25.9
缀合物 90	N6-siHBd2M1SVP	51.9	43.1	26.5
缀合物 91	N6-siHBd1M1SP	52.6	43.5	27.6
缀合物 92	N6-siHBd1M1SPs	53.1	43.8	26.9
缀合物 93	N6-siHBd4M1S	52.1	53.2	25.8
缀合物 94	X2-siHBd1M1SVP	53.8	41.8	26.7
缀合物 95	W2-siHBd1M1SVP	53.2	41.6	27.4
缀合物 96	V2-siHBd1M1SVP	52.9	41.2	25.9
缀合物 97	O2-siHBd1M1SVP	52.4	44.2	25.7
缀合物 98	P2-siHBd1M1SVP	52.9	45.3	27.5
对比缀合物 1	N6-NC	1.3	1.3	-2.3

从表 4D 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在体外 HepG2.2.15 细胞中具有很高的 HBV mRNA 抑制活性，在 siRNA 浓度为 50nM 时可达到 53.9%的 HBV mRNA 抑制率。

实验例 5-2 本公开提供的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性

将药物缀合物中的每一个药物缀合物（以 siRNA 计算的浓度均为 20μM 的 0.9 wt%氯化钠水溶液提供，每组 12μl）分别与 108 μL 90%人血浆（Human plasma，购自江苏省血液研究所，以 1×PBS（pH7.4）稀释）混匀，获得混合液，所用药物缀合物分别为表 5D 中的各待测缀合物。在 37°C 恒温孵育。分别在 0、8、24、48 小时取出 10 μL 样本，立即进行液氮速冻于-80°C 冰箱中冻存。其中，0 小时是指缀合物溶液与 90%人血浆混匀后，立即取出 10μL 混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用 1×PBS（pH7.4）将各混合液稀释 5 倍后，每一混合液各取 10 μL 准备电泳。分别将等摩尔量的上述缀合物溶液（以 siRNA 计的浓度为 2μM）2 μl 与 8 μl 1×PBS（pH7.4）混匀，制备成 10 μL 未经人血浆处理的样品，记为未处理，准备电泳。

配制 20 重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将每一组的上述准备电泳的样品分别与 4 μL 上样缓冲液（20mM EDTA，36 重量%甘油，0.06 重量%溴酚蓝）混合，然后上样至各凝胶孔，在 80mA 恒流条件下电泳 60 分钟左右。电泳结束后，取出凝胶，用 1×Sybr Gold 染料（Invitrogen，Cat.11494）染色 15 分钟后成像并计算稳定性结果，结果如表 5D 所示。

表 5D 示出了表 2D 中所列的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果。该结果以药物缀合物与人血浆孵育后残留的最长片段与未经处理的 siRNA 最长片段的比例（RL）表示。

表 5D 不同药物缀合物随时间的血浆稳定性

缀合物序号	缀合物编号	RL（%）				
		未处理	0h	8h	24h	48h
缀合物 83	N6-siHBd1M1	100	100	99.2	96.3	94.2

缀合物 84	N6-siHBd1M2	100	100	99.8	96.0	94.1
缀合物 85	N6-siHBd1M1SVP	100	100	99.5	96.0	94.0
缀合物 86	N6-siHBd1M2SVP	100	100	99.1	96.2	95.0
缀合物 87	N6-siHBd1M3SVP	100	100	99.3	96.1	95.2
缀合物 88	N6-siHBd1M4SVP	100	100	99.6	96.0	95.0
缀合物 89	N6-siHBd1M5SVP	100	100	99.2	96.0	95.1
缀合物 90	N6-siHBd2M1SVP	100	100	99.1	96.3	94.5
缀合物 91	N6-siHBd1M1SP	100	100	99.5	96.5	95.2
缀合物 92	N6-siHBd1M1SPs	100	100	99.4	97.3	94.5
缀合物 93	N6-siHBd4M1S	100	100	99.2	96.2	94.1
缀合物 94	X2-siHBd1M1SVP	100	100	99.1	95.1	94.0
缀合物 95	W2-siHBd1M1SVP	100	100	99.5	96.0	94.3
缀合物 96	V2-siHBd1M1SVP	100	100	99.6	97.0	94.2
缀合物 97	O2-siHBd1M1SVP	100	100	99.4	96.8	94.0
缀合物 98	P2-siHBd1M1SVP	100	100	99.2	96.1	94.1

由表 5D 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在血浆中均显示出优异的稳定性，在 48h 仍均具有高于 94%的 siRNA 片段长度比例。

实验例 5-3 本公开提供的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率检测。

本实验例中所使用的 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 购自北京大学医学部实验动物科学部。

首先，将 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠按血清 HbsAg 含量随机分组（均为雌性），每组 5 只小鼠，按照表 2D 中的药物缀合物对每组小鼠进行编号，然后分别向每组小鼠给予表 7D 中的各待测缀合物。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各药物缀合物以 0.2 mg/ml 的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量为 1 mg/kg。

对另外一组小鼠中的每只给予 1×PBS，给药体积均为 5ml/kg，作为对照组。

给药后第 14 天处死动物，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据说明书描述的操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠的肝脏组织，分别取 1 μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 HBV mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 HBV 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别对 HBV 和 β-肌动蛋白进行检测。检测引物的序列参见表 6A 所示。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 5 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})}\times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度 5 只小鼠的相对表达水平的算术平均值。其中，对照组为本实验中施以 PBS 的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同药物缀合物的给药组小鼠。结果示于以下表 7D 中。

表 7D 不同药物缀合物在小鼠肝脏中的 HBV mRNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	肝脏 HBV mRNA

			抑制率（%）
缀合物 83	N6-siHBd1M1	1	76.3
缀合物 84	N6-siHBd1M2	1	82.1
缀合物 85	N6-siHBd1M1SVP	1	79.8
缀合物 86	N6-siHBd1M2SVP	1	83.2
缀合物 87	N6-siHBd1M3SVP	1	66.3
缀合物 88	N6-siHBd1M4SVP	1	65.8
缀合物 89	N6-siHBd1M5SVP	1	81.0
缀合物 90	N6-siHBd2M1SVP	1	77.9
缀合物 91	N6-siHBd1M1SP	1	79.6
缀合物 92	N6-siHBd1M1SPs	1	79.2
缀合物 93	N6-siHBd4M1S	1	83.1
缀合物 94	X2-siHBd1M1SVP	1	81.6
缀合物 95	W2-siHBd1M1SVP	1	80.8
缀合物 96	V2-siHBd1M1SVP	1	84.1
缀合物 97	O2-siHBd1M1SVP	1	83.4
缀合物 98	P2-siHBd1M1SVP	1	82.9
PBS	-	-	NA

由表 7D 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在 1 mg/kg 的 siRNA 给药剂量下，在 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠体内对肝脏 HBV mRNA 显示出了很高的抑制活性，在 1 mg/kg 的剂量下，最高可达到 83.4%的 HBV mRNA 抑制率。

实验例 5-4 本公开提供的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠中 siRNA 对血清 HBsAg 表达量和 HBV DNA 的抑制效率的时间相关性测试

按照文献方法（董小岩等，Chin J Biotech 2010, May 25; 26(5): 679−686）制备 AAV-HBV 模型，rAAV8-1.3HBV，D 型（ayw），购于北京五加和分子医学研究所有限公司，1×10^{12} viral genome （v.g.）/mL，批号 2016123011。实验前将 AAV 病毒用无菌 PBS 稀释至 5×10^{11} v.g./mL。每只小鼠注射 200 μL，即每只小鼠注射 1×10^{11} v.g.。病毒注射后第 28 天，所有小鼠通过眼眶采血（约 100 μL）用于收集血清检测 HBsAg 和 HBV DNA。

动物造模成功后，按血清 HBsAg 含量随机分组（每组 5 只），分别进行编号，然后分别向每组小鼠给予表 8D 中的各待测缀合物，所有动物根据体重计算药量，皮下单次给药，给药剂量为 3mg/kg，体积为 5ml/kg。对另外一组小鼠中的每只给予 1×PBS，给药体积均为 5ml/kg，作为对照组。在给药前与给药后第 7、14、21、28、56 天对小鼠眼眶静脉丛取血，在各时间点检测血清 HBsAg 水平。

眼眶取血每次约 100 μl，离心后取血清不少于 20μl。使用 HBsAg CLIA 试剂盒（安图生物，CL0310），按照试剂盒中提供的说明书检测血清中 HBsAg 的表达水平；参照 QIAamp 96 DNA Blood Kit 说明书提取血清中 DNA，对其进行定量 PCR，检测 HBV DNA 的表达水平。

HBsAg 抑制率按如下等式计算：

HBsAg 抑制率＝(1-给药后 HBsAg 含量/给药前 HBsAg 含量)×100%。其中，HBsAg 含量用每毫升（ml）血清含多少当量（UI）HBsAg 表示。

HBV DNA 抑制率按如下等式计算：

HBV DNA 抑制率＝(1-给药后 HBV DNA 含量/给药前 HBV DNA 含量)×100%。

其中，HBV DNA 含量用每毫升（ml）血清含多少拷贝 HBV DNA 表示。

表 8D 和 9D 分别示出了给予不同剂量的药物缀合物或 PBS 后，HBV 转基因小鼠体内 HBsAg 和 HBV DNA 抑制率。

表 8D 不同药物缀合物在小鼠血清中 HBsAg 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	血清 HBsAg 抑制率（%）				
		D7	D14	D21	D28	D56
缀合物 85	N6-siHBd1M1SVP	91.8	91.2	91.2	86.1	79.2
缀合物 86	N6-siHBd1M2SVP	91.2	92.8	91.3	88.2	79.1

缀合物 90	N6-siHBd2M1SVP	91.6	92.9	91.6	86.1	77.6
缀合物 91	N6-siHBd1M1SP	92.4	92.9	92.8	86.2	77.2
缀合物 92	N6-siHBd1M1SPs	93.8	93.4	93.4	93.1	85.3
缀合物 94	X2-siHBd1M1SVP	93.7	93.1	94.2	92.4	83.4
缀合物 95	W2-siHBd1M1SVP	95.1	95.2	95.6	94.8	84.2
缀合物 96	V2-siHBd1M1SVP	94.2	94.2	94.0	92.6	83.8
缀合物 97	O2-siHBd1M1SVP	92.1	92.9	93.8	92.2	84.1
缀合物 98	P2-siHBd1M1SVP	91.8	92.8	93.5	91.1	82.1
-	PBS	1.8	-9.3	-12.4	-8.8	-44.2

由表 8D 的结果可见，在给药后不同时间点，PBS 阴性对照组未显示出任何抑制作用；与之相比，本公开提供的药物缀合物在给药后不同时间点对 HBsAg 均体现出了优异的 HBsAg 抑制效果。特别是在 21 天的时间内持续显示出高的血清 HBsAg 抑制率，抑制率最高可达 95.6%，表明其能够在较长时间内稳定高效地抑制 HBV mRNA 的表达。

表 9D 不同药物缀合物在小鼠血清中的 HBV DNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	血清 HBV DNA 抑制率（%）				
		D7	D14	D21	D28	D56
缀合物 85	N6-siHBd1M1SVP	76.5	91.3	90.2	87.3	85.6
缀合物 86	N6-siHBd1M2SVP	75.2	90.5	89.5	84.8	82.1
缀合物 90	N6-siHBd2M1SVP	75.8	91.6	90.2	85.3	80.3
缀合物 91	N6-siHBd1M1SP	76.3	92.2	91.1	86.2	83.5
缀合物 92	N6-siHBd1M1SPs	76.5	91.6	90.3	85.4	83.2
缀合物 94	X2-siHBd1M1SVP	75.8	92.6	91.2	83.2	81.6
缀合物 95	W2-siHBd1M1SVP	76.4	93.1	91.3	82.9	80.2
缀合物 96	V2-siHBd1M1SVP	76.6	92.4	91.5	84.3	82.1
缀合物 97	O2-siHBd1M1SVP	75.2	92.6	91.6	84.2	82.1
缀合物 98	P2-siHBd1M1SVP	75.1	91.8	90.0	83.8	83.1
-	PBS	0.4	3.5	-1.8	-1.8	-8

由表 9D 的结果可见，本公开提供的药物缀合物同样显示出优秀的 HBV DNA 的抑制效果，并且在长达 56 天的时间内均保持了较高的抑制率，最高可达到 93.1%。

实验例 6 本公开提供的药物缀合物的效果实验

实验例 6-1 本公开提供的药物缀合物在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率检测。

用 H-DMEM 完全培养基将 HepG2.2.15 细胞以 7×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中，16h 后细胞生长密度达到 70-80%时，吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基，每孔加入 500 μl Opti-MEM 培养基（GIBCO 公司）继续培养 1.5h。

用 DEPC 化水将下面的药物缀合物中的每一个药物缀合物分别配制成 50 μM、5 μM 和 0.5 μM 的共 3 种不同浓度的药物缀合物工作液，所用药物缀合物分别为表 4E 中的各待测缀合物。

对于每一个 siRNA,分别配制 6A1、6A2 和 6A3 溶液，每份 6A163A3 溶液依次含有上述 3 个浓度的 siRNA 工作液 0.6 μl 和 Opti-MEM 培养基 50μl。

配制 6B 溶液，每份 6B 溶液含有 1 μl Lipofectamine™ 2000 和 50μl Opti-MEM 培养基。

分别将一份 6B 溶液与得到的一份每个 siRNA 的 6A1、6A2 或 6A3 的溶液混合，分别在室温下孵育 20min，得到每个 siRNA 的转染复合物 6X1、6X2 和 6X3。

将一份 6B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50μl 混合，室温下孵育 20min，得到转染复合物 6X4。

在培养孔中，分别加入每一个药物缀合物的转染复合物 6X1、6X2 或 6X3，均匀混合，加入量为 100μl/孔，得到每个药物缀合物终浓度分别约为 50 nM、5 nM 和 0.5 nM 的转染混合物，每个转染复合物分别转染 3 个培养孔，得到含药物缀合物的转染混合物，记为测试组。

在另外 3 个培养孔中，分别加入转染复合物 6X4，加入量为 100 μl/孔，得到不含 siRNA 的转染

混合物，记为对照组。

将含药物缀合物的转染混合物和不含药物缀合物的转染混合物在培养孔中培养 4h 后，每孔补加 1ml 添加了 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO_2 培养箱继续培养 24h。

随后，使用 RNeasy Mini Kit（QIAGEN 公司，货号 Cat.74106）试剂盒，根据说明书描述的详细步骤提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞，分别取 1μg 总 RNA，使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit（购自北京擎科新业生物技术有限公司，货号 TSK301M）提供的试剂，其中选取 Goldenstar™ Oligo $(dT)_{17}$ 作为引物，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20μl，对细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：将反转录反应体系置于 50℃ 孵育 50min，然后 85℃ 孵育 5min，最后 4℃ 孵育 30s，反应结束后，向反转录反应体系中加入 DEPC 水 80μl，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，分别取上述含 cDNA 的溶液 5μl 做模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒（购自近岸蛋白质科技有限公司，货号 E096-01B）提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μl，其中，用于扩增目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 PCR 引物序列如表 3E 所示，每条引物的终浓度为 0.25μM。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95℃ 预变性 10min，然后 95℃ 变性 30s，60℃ 退火 30s，72℃ 延伸 30s，重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的产物 W。产物 W 随即依次经过 95℃ 15s，60℃ 1min，95℃ 15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W 中目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的溶解曲线，得到目标基因 HBV 和内参基因 GAPDH 的 Ct 值。

表 3E 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
HBV	5'-GTCTTTTGGGTTTTGCTGCC -3'（SEQ ID NO: 689）	5'- GCAACGGGGTAAAGGTTCAG -3'（SEQ ID NO: 690）
GAPDH	5'- GGTCGGAGTCAACGGATTT - 3'（SEQ ID NO: 691）	5'- CCAGCATCGCCCCACTTGA -3'（SEQ ID NO: 692）

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组三个培养孔各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每一培养孔均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $= 2^{-\Delta\Delta Ct(测试组)} \times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度三个培养孔的相对表达水平的算术平均值。

以下表 4E 示出了表 2E 中所列的药物缀合物与对比缀合物 1 的药物缀合物在 HepG2.2.15 细胞中对 HBV mRNA 表达抑制活性的检测结果。

表 4E 不同浓度药物缀合物 HBV mRNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	HBV mRNA 抑制率（%）		
		50nM	10nM	1nM
缀合物 99	N6-siHBe3M1S	78.1	44.4	28.9
缀合物 100	N6-siHBe4M1S	78.9	49.5	29.2
缀合物 101	N6-siHBe3M1	78.8	47.5	26.5
缀合物 102	N6-siHBe4M1	79.9	45.5	27.1
缀合物 103	N6-siHBe3M1SVP	79.9	50.4	28.7
缀合物 104	N6-siHBe3M1SPs	79.0	50.0	28.6
缀合物 105	N6-siHBe3M1SP	78.9	49.8	28.3
缀合物 106	N6-siHBe3M1VP	78.2	49.5	28.0

缀合物 107	N6-siHBe3M2	78.1	48.4	30.8
缀合物 108	N6-siHBe3M2SVP	79.0	49.4	29.2
缀合物 109	N6-siHBe3M3SVP	78.9	49.4	27.2
缀合物 110	N6-siHBe3M4SVP	52.9	35.4	15.6
缀合物 111	N6-siHBe3M5SVP	55.2	30.4	11.1
缀合物 112	N6-siHBe1M1S	79.8	47.4	27.1
缀合物 113	N6-siHBe5M1SVP	70.7	45.4	23.2
缀合物 114	N6-siHBe0M1	65.8	42.1	23.3
缀合物 115	N6-siHBe2	68.7	45.9	25.3
缀合物 116	X2-siHBe3M1SVP	78.7	51.3	30.6
缀合物 117	W2-siHBe3M1SVP	75.8	50.6	30.3
缀合物 118	V2-siHBe3M1SVP	78.9	50.5	30.2
缀合物 119	O2-siHBe3M1SVP	73.9	50.8	30.3
缀合物 120	P2-siHBe3M1SVP	78.1	50.5	30.2
对比缀合物 1	N6-NC	3.1	1.8	-4.8

从表 4E 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在体外 HepG2.2.15 细胞中具有很高 HBV mRNA 的抑制活性，在 siRNA 浓度为 50Nm 时可达到 79.9%的 HBV mRNA 抑制率。

实验例 6-2 本公开提供的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性

将药物缀合物中的每一个药物缀合物以及对比缀合物 1 的药物缀合物（以 siRNA 计的浓度均为 20μM 的 0.9 wt%氯化钠水溶液提供，每组 12μl）分别与 108 μL 90%人血浆（Human plasma，购自江苏省血液研究所，以 1×PBS（pH7.4）稀释）混匀，获得混合液，所用药物缀合物分别为表 5E 中的各待测缀合物。在 37°C 恒温孵育。分别在 0、8、24、48 小时取出 10 μL 样本，立即进行液氮速冻于-80°C 冰箱中冻存。其中，0 小时是指缀合物溶液与 90%人血浆混匀后，立即取出 10μL 混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用 1×PBS（pH7.4）将各混合液稀释 5 倍后，每一混合液各取 10 μL 准备电泳。

配制 20 重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将每一组的上述准备电泳的样品分别与 4 μL 上样缓冲液（20mM EDTA，36 重量%甘油，0.06 重量%溴酚蓝）混合，然后上样至各凝胶孔，在 80mA 恒流条件下电泳 60 分钟左右。电泳结束后，取出凝胶，用 1×Sybr Gold 染料（Invitrogen，Cat.11494）染色 15 分钟后成像并计算稳定性结果，结果如表 5E 所示。

表 5E 示出了表 2E 中所列的测试药物缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果。该结果以测试药物缀合物与人血浆孵育后残留的最长片段与未经处理的 siRNA 最长片段的比例（RL）表示。

表 5E 不同药物缀合物随时间的血浆稳定性

缀合物序号	缀合物编号	RL（%）				
		未处理	0h	8h	24h	48h
缀合物 99	N6-siHBe3M1S	100	100	99.6	96.0	94.7
缀合物 100	N6-siHBe4M1S	100	100	99.7	96.4	94.7
缀合物 101	N6-siHBe3M1	100	100	99.6	96.1	94.8
缀合物 102	N6-siHBe4M1	100	100	99.4	96.7	95.4
缀合物 103	N6-siHBe3M1SVP	100	100	99.4	96.5	95.5
缀合物 104	N6-siHBe3M1SPs	100	100	99.4	96.4	95.1
缀合物 105	N6-siHBe3M1SP	100	100	99.5	96.1	95.4
缀合物 106	N6-siHBe3M1VP	100	100	99.4	96.0	94.9
缀合物 107	N6-siHBe3M2	100	100	99.6	96.7	95.8
缀合物 108	N6-siHBe3M2SVP	100	100	99.1	97.1	95.1
缀合物 109	N6-siHBe3M3SVP	100	100	99.4	96.4	95.5
缀合物 110	N6-siHBe3M4SVP	100	100	99.6	95.5	94.6
缀合物 111	N6-siHBe3M5SVP	100	100	99.7	96.4	96.4
缀合物 112	N6-siHBe1M1S	100	100	99.5	97.4	94.4

缀合物 113	N6-siHBe5M1SVP	100	100	99.6	97.1	94.4
缀合物 114	N6-siHBe0M1	100	100	99.8	94.4	93.4
缀合物 115	N6-siHBe2	100	100	95.5	93.6	92.5
缀合物 116	X2-siHBe3M1SVP	100	100	99.4	97.1	94.8
缀合物 117	W2-siHBe3M1SVP	100	100	99.6	96.1	95.4
缀合物 118	V2-siHBe3M1SVP	100	100	99.3	95.7	95.0
缀合物 119	O2-siHBe3M1SVP	100	100	99.6	96.4	96.4
缀合物 120	P2-siHBe3M1SVP	100	100	99.2	96.0	94.7
对比缀合物 1	N6-NC	100	0	0	0	0

由表 5E 的结果可见，本公开提供的药物缀合物在血浆中均显示出优异的稳定性，在 48h 仍均具有高于 92.5%的 siRNA 片段长度比例。

实验例 6-3 本公开提供的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 中对 HBV mRNA 表达量的抑制效率检测。

本实验例中所使用的 HBV 转基因小鼠 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 购自北京大学医学部实验动物科学部，将 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠按血清 HbsAg 含量随机分组（均为雌性），每组 5 只小鼠，按照表 2C 中的药物缀合物对每组小鼠进行编号，然后分别向每组小鼠给予表 7E 中所列的各待测缀合物。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.2 mg/ml 的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量为 1 mg/kg。

对另外一组小鼠中的每只给予 1×PBS，给药体积均为 5ml/kg，作为对照组。

给药后第 14 天处死动物，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据说明书描述的操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠的肝脏组织，分别取 1μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 HBV mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 HBV 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别对 HBV 和 β-肌动蛋白进行检测。检测引物的序列参见下表 6E 所示。

表 6E 检测引物的序列

基因	上游引物	下游引物
HBV	5’-GTCTTTTGGGTTTTGCTGCC -3’（SEQ ID NO: 693）	5’- GCAACGGGGTAAAGGTTCAG-3’（SEQ ID NO: 694）
β-actin	5’-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG -3’（SEQ ID NO: 695）	5’-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA -3’（SEQ ID NO: 696）

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 HBV 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 5 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 HBV mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 HBV mRNA 表达水平为 100%，

测试组 HBV mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})}\times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 HBV mRNA 相对表达水平平均值为该浓度 5 只小鼠的相对表达水平的算术平均值。

其中，对照组为本实验中施以 PBS 的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同药物缀合物的给药组小鼠。结果示于以下表 7E 中。

表 7E 不同药物缀合物在小鼠肝脏中 HBV mRNA 抑制率

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	肝脏 HBV mRNA

			抑制率（%）
缀合物 99	N6-siHBe3M1S	1	86.4
缀合物 100	N6-siHBe4M1S	1	84.2
缀合物 101	N6-siHBe3M1	1	84.0
缀合物 102	N6-siHBe4M1	1	82.5
缀合物 103	N6-siHBe3M1SVP	1	88.5
缀合物 104	N6-siHBe3M1SPs	1	88.2
缀合物 105	N6-siHBe3M1SP	1	88.0
缀合物 106	N6-siHBe3M1VP	1	84.0
缀合物 107	N6-siHBe3M2	1	84.2
缀合物 108	N6-siHBe3M2SVP	1	88.7
缀合物 109	N6-siHBe3M3SVP	1	88.6
缀合物 112	N6-siHBe1M1S	1	85.3
缀合物 113	N6-siHBe5M1SVP	1	80.5
缀合物 116	X2-siHBe3M1SVP	1	88.1
缀合物 117	W2-siHBe3M1SVP	1	88.4
缀合物 118	V2-siHBe3M1SVP	1	88.5
缀合物 119	O2-siHBe3M1SVP	1	88.6
缀合物 120	P2-siHBe3M1SVP	1	88.3
PBS	-	NA	2.0

由上述结果可见，本公开提供的药物缀合物在 1 mg/kg 的 siRNA 给药剂量下，在 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠体内对肝脏 HBV mRNA 显示出了很高的抑制活性。尤其是缀合物 103-106、108-109 以及 116-120，这些药物缀合物 C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J 小鼠体内实验中显示出很高的乙肝小鼠肝组织 HBV mRNA 的抑制活性，在 1 mg/kg 的剂量下最高可达到 88.6%的 HBV mRNA 抑制率。

实验例 6-4 本公开提供的药物缀合物在 HBV 转基因小鼠中 siRNA 对血清 HBsAg 表达量和 HBV DNA 的抑制效率的时间相关性测试

按照文献方法（董小岩等，Chin J Biotech 2010, May 25; 26(5): 679−686）制备 AAV-HBV 模型，rAAV8-1.3HBV，D 型（ayw），购于北京五加和分子医学研究所有限公司，1×10^{12} viral genome （v.g.）/mL，批号 2016123011。实验前将 AAV 病毒用无菌 PBS 稀释至 5×10^{11} v.g./mL。每只小鼠注射 200 μL，即每只小鼠注射 1×10^{11} v.g.。病毒注射后第 28 天，所有小鼠通过眼眶采血（约 100 μL）用于收集血清检测 HBsAg 和 HBV DNA。

动物造模成功后，按血清 HBsAg 含量随机分组（每组 5 只），分别向每组小鼠给予表 8E 中所列的各待测药物缀合物。所有动物根据体重计算药量，皮下单次给药，给药剂量为 3mg/kg，体积为 5ml/kg。对另外一组小鼠中的每只给予 1×PBS，给药体积均为 5ml/kg，作为对照组。在给药前与给药后第 7、14、21、28、56、84、98、112 天对小鼠眼眶静脉丛取血，在各时间点检测血清 HBsAg 水平和 DNA 水平。

眼眶取血每次约 100 μl，离心后血清不少于 20μl。利用 HBsAg CLIA 试剂盒（安图生物，CL0310），按照试剂盒中提供的说明书检测血清中 HBsAg 的表达水平；参照 QIAamp 96 DNA Blood Kit 说明书提取血清中 DNA，进行定量 PCR，检测 HBV DNA 的表达水平。

HBsAg 抑制率按如下等式计算：

HBsAg 抑制率＝(1-给药后 HBsAg 含量/给药前 HBsAg 含量)×100%。其中，HBsAg 含量用每毫升（ml）血清含多少当量（UI）HBsAg 表示。

HBV DNA 抑制率按如下等式计算：

HBV DNA 抑制率＝(1-给药后 HBV DNA 含量/给药前 HBV DNA 含量)×100%。

其中，HBV DNA 含量用每毫升（ml）血清含多少拷贝 HBV DNA 表示。

表 8E 和 9E 分别示出了给予不同剂量的药物缀合物或 PBS 后，HBV 转基因小鼠体内 HBsAg 和 HBV DNA 抑制率。

表 8E 不同药物缀合物在不同时间点在小鼠血清中 HBsAg 表达的抑制

缀合物序号	缀合物编号	血清 HBsAg 抑制率（%）									
		D7	D14	D21	D28	D40	D56	D70	D84	D98	D112
缀合物 99	N6-siHBe3M1S	99.6	99.5	99.6	99.4	98.8	96.5	95.6	93.1	84.2	80.9
缀合物 112	N6-siHBe1M1S	99.5	99.4	99.7	99.2	98.8	96.4	94.5	92.0	85.6	80.8
缀合物 101	N6-siHBe3M1	99.4	99.1	99.1	99.0	98.6	96.9	94.7	92.8	84.9	78.2
缀合物 103	N6-siHBe3M1SVP	99.5	99.8	99.7	99.5	99.0	97.4	95.5	93.2	87.0	82.5
缀合物 104	N6-siHBe3M1SPs	99.6	99.6	99.6	99.4	99.0	96.0	94.0	91.6	80.0	75.6
缀合物 105	N6-siHBe3M1SP	99.3	99.7	99.6	99.4	98.8	97.5	95.0	92.6	84.8	78.6
缀合物 108	N6-siHBe3M2SVP	99.4	99.4	99.3	99.3	99.3	97.5	95.4	92.8	85.0	82.2
缀合物 109	N6-siHBe3M3SVP	99.0	99.6	99.2	99.2	99.4	97.6	94.9	93.8	81.6	79.0
缀合物 116	X2-siHBe3M1SVP	99.4	99.6	99.3	99.5	99.0	97.2	95.8	93.1	86.5	82.3
缀合物 117	W2-siHBe3M1SVP	99.5	99.7	99.7	99.4	99.1	97.8	95.1	93.2	86.7	82.4
缀合物 118	V2-siHBe3M1SVP	99.4	99.7	99.6	99.3	99.2	97.7	95.3	92.9	87.2	84.4
缀合物 119	O2-siHBe3M1SVP	99.0	99.8	99.5	99.5	99.2	97.7	95.3	92.8	87.2	82.0
缀合物 120	P2-siHBe3M1SVP	99.7	99.9	99.8	99.6	99.3	97.6	95.2	93.0	86.9	81.9
-	PBS	1.9	2.4	-10.5	-6.5	-2.8	5.6	3.6	9.0	-1.0	-5.9

由表 8E 的结果可见，在给药后不同时间点，PBS 阴性对照组未显示出任何抑制作用；与之相比，本公开提供的药物缀合物在给药后不同时间点对 HBsAg 均体现出了优异的 HBsAg 抑制效果。特别是在长达 140 天的时间内持续显示出高的血清 HBsAg 抑制效果，抑制率最高可达 99.9%，表明其能够在较长时间内稳定高效地抑制 HBV mRNA 的表达。

表 9E 不同药物缀合物在小鼠血清中在不同时间点 HBV DNA 抑制率

siRNA 缀合物	编号	血清 HBsAg 抑制率（%）									
		D7	D14	D21	D28	D40	D56	D70	D84	D98	D112
缀合物 99	N6-siHBe3M1S	97.6	99.0	98.0	96.6	96.3	93.2	90.0	88.7	80.1	78.3
缀合物 112	N6-siHBe1M1S	96.9	99.0	98.9	96.8	96.2	92.2	91.0	89.6	80.5	76.5
缀合物 101	N6-siHBe3M1	97.0	99.1	97.7	95.8	96.0	90.1	90.5	88.6	82.0	77.6
缀合物 103	N6-siHBe3M1SVP	97.6	99.2	98.3	97.0	96.6	93.8	92.6	90.1	84.2	79.8
缀合物 104	N6-siHBe3M1SPs	97.6	99.4	98.6	96.4	96.1	93.7	92.2	90.0	78.9	73.2
缀合物 105	N6-siHBe3M1SP	97.5	99.3	98.1	96.4	96.4	93.9	92.1	89.8	80.6	76.9
缀合物 108	N6-siHBe3M2SVP	96.8	99.0	98.0	96.2	96.0	92.7	91.9	88.7	78.9	75.4
缀合物 109	N6-siHBe3M3SVP	96.9	99.1	97.9	96.6	95.9	92.5	91.0	88.9	78.3	76.2
缀合物 116	X2-siHBe3M1SVP	97.8	99.1	98.5	96.1	96.2	93.6	92.5	90.1	80.2	80.9
缀合物 117	W2-siHBe3M1SVP	97.5	99.2	98.6	96.4	96.1	93.7	92.7	90.0	82.9	78.5
缀合物 118	V2-siHBe3M1SVP	97.6	99.2	98.9	96.7	96.3	93.2	92.2	90.8	80.9	77.7
缀合物 119	O2-siHBe3M1SVP	87.2	99.3	97.6	96.7	96.5	93.6	92.0	89.9	81.6	76.6
缀合物 120	P2-siHBe3M1SVP	97.1	99.6	97.4	97.2	96.7	93.1	92.7	89.8	83.3	79.9
-	PBS	2.6	2.9	-0.5	-5.6	-12.8	-8.7	-3.8	6.0	-1.0	-4.9

由表 9E 的结果可见，本公开提供的药物缀合物同样显示出优秀的 HBV DNA 的抑制效果，并且在长达 112 天的时间内均保持了较高的抑制率，最高可达到 99.6%。

实验例 7 表 2F 的药物缀合物的效果试验

实验例 7-1 本实验说明表 2F 的药物缀合物在 Huh7 细胞中对 ANGPTL3 mRNA 表达量的抑制效率检测。

用 H-DMEM 完全培养基将 Huh7 细胞以 7.5×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中，16h 后细胞生长密度达到 70-80%时，吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基，每孔加入 500 μl Opti-MEM 培养基（GIBCO 公司）继续培养 1.5h。

用 DEPC 化水将下面的药物缀合物分别配制成 5 μM、0.5 μM 和 0.05 μM 的共 3 种不同浓度的药物缀合物工作液（以 siRNA 计），所述药物缀合物为表 2F 中的缀合物 121-158 和表 2A 中的对比缀合物 1，对比缀合物 1 为阴性对照。

对于每一个药物缀合物，分别配制 7A1、7A2 和 7A3 溶液，每份 7A1-7A3 溶液依次含有上述 3 个浓度的药物缀合物工作液 0.6 μl 和 Opti-MEM 培养基 50 μl。

配制 7B 溶液，每份 7B 溶液含有 1 μl Lipofectamine™ 2000 和 50 μl Opti-MEM 培养基。

分别将一份 7B 溶液与得到的每个药物缀合物的 7A1、7A2 或 7A3 溶液混合，分别室温下孵育 20min，得到每个 siRNAUI 合物的转染复合物 7X1-7X3。

将一份 7B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50 μl 混合，室温下孵育 20min，得到转染复合物 7X4。

在培养孔中，分别加入每一个药物缀合物的转染复合物 7X1-7X3，均匀混合，加入量为 100 μl/孔，得到每个药物缀合物的终浓度分别约为 5 nM、0.5 nM 和 0.05 nM 的转染复合物，每个药物缀合物的转染复合物 7X1-7X3 分别转染 3 个培养孔，得到含药物缀合物的转染混合物，记为测试组。

在另外 3 个培养孔中，分别加入转染复合物 7X4，加入量为 100μl/孔，得到不含 siRNA 的转染混合物，记为空白对照组。

将含药物缀合物的转染混合物和不含药物缀合物的转染混合物在培养孔中培养 4h 后，每孔补加 1ml 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO_2 培养箱中继续培养 24h。

随后，使用 RNAVzol（购自威格拉斯生物技术（北京）有限公司，货号 N002）根据说明书记载的方法提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞，分别取 1μg 总 RNA，使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit（购自北京擎科新业生物技术有限公司，货号 TSK301M）提供的试剂，其中选取 Goldenstar™ Oligo $(dT)_{17}$ 作为引物，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20μl，对各孔细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：对于每一反转录反应体系，将反转录反应体系置于 50°C 孵育 50min，然后 85°C 孵育 5min，最后 4°C 孵育 30s，反应结束后，向反转录反应体系中加入 DEPC 水 80μl，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，分别取上述含 cDNA 的溶液 5μl 做模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒（购自近岸蛋白质科技有限公司，货号 E096-01B）提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μl，其中，用于扩增目标基因 ANGPTL3 和内参基因 β-actin 的 PCR 引物序列如表 3F 所示，每条引物的终浓度为 0.25μM。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95°C 预变性 10min，然后 95°C 变性 30s，60°C 退火 30s，72°C 延伸 30s，重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 ANGPTL3 和内参基因 β-actin 的产物 W。产物 W 随即依次经过 95°C 15s，60°C 1min，95°C 15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W 中目标基因 ANGPTL3 和内参基因 β-actin 的溶解曲线，得到目标基因 ANGPTL3 和内参基因 β-actin 的 Ct 值。

表 3F 引物信息

基因	上游引物	下游引物
人 ANGPTL3	5'- ACCAACTATACGCTACAT -3' (SEQ ID NO: 697)	5'- CCTCCTGAATAACCCTCT -3' (SEQ ID NO: 698)
人 β-actin	5'- CCAACCGCGAGAAGATGA - 3' (SEQ ID NO: 699)	5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3' (SEQ ID NO: 700)

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组中目标基因 ANGPTL3 进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 3 个培养孔各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每一培养孔均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 ANGPTL3 mRNA 的表达水平进行归一化，定义空白对照组 ANGPTL3 mRNA 表达水平为 100%，

测试组 ANGPTL3 mRNA 相对表达水平 $= 2^{-\Delta\Delta Ct(测试组)} \times 100\%$

测试组 ANGPTL3 mRNA 抑制率 = (1-测试组 ANGPTL3 mRNA 相对表达水平) × 100%

各 siRNA 对 ANGPTL3 mRNA 的抑制率总结于表 4F 中。对于同一测试组 siRNA，mRNA

抑制率是3个培养孔测定的测试组ANGPTL3 mRNA抑制率的算术平均值。

表4F 不同浓度药物缀合物在Huh7细胞中对ANGPTL3 mRNA的抑制率

缀合物序号	缀合物编号	mRNA抑制率（%）		
		0.05nM	0.5nM	5nM
缀合物121	N6-siAN1	42.4	64.5	73.8
缀合物122	N6-siAN2	39.8	64.2	70.1
缀合物123	N6-siAN1-M1	42.1	62.6	75.4
缀合物124	N6-siAN2-M1	42.3	64.1	71.4
缀合物125	N6-siAN1-M2	44.5	60.3	75.6
缀合物126	N6-siAN2-M2	49.2	60.5	74.2
缀合物127	N6-siAN1-M3	51.3	57.3	78.1
缀合物128	N6-siAN2-M3	52.5	65.9	72.5
缀合物129	N6-siAN1-M1VP	43.8	59.8	72.3
缀合物130	N6-siAN2-M1VP	49.4	57.5	76.2
缀合物131	N6-siAN1-M2VP	45.3	66.6	76.3
缀合物132	N6-siAN2-M2VP	42.9	72.6	81.4
缀合物133	N6-siAN1-M3VP	47.4	65.9	76.4
缀合物134	N6-siAN2-M3VP	50.2	62.4	82.1
缀合物135	N6-siAN1-M1S	42.9	62.1	71.5
缀合物136	N6-siAN2-M1S	43.1	61.3	71.3
缀合物137	N6-siAN1-M2S	45.8	70.1	67.2
缀合物138	N6-siAN2-M2S	44.9	62.4	75.8
缀合物139	N6-siAN1-M3S	48.4	71.0	78.3
缀合物140	N6-siAN2-M3S	41.2	65.8	75.2
缀合物141	N6-siAN1-M1SVP	52.5	68.8	80.1
缀合物142	N6-siAN2-M1SVP	55.3	68.1	74.2
缀合物143	N6-siAN1-M2SVP	52.3	67.5	76.4
缀合物144	N6-siAN2-M2SVP	49.6	72.3	80.2
缀合物145	N6-siAN1-M3SVP	49.3	72.4	76.4
缀合物146	N6-siAN1-M3SP	48.8	70.3	76.5
缀合物147	N6-siAN1-M3SPs	48.2	69.8	76.8
缀合物148	N6-siAN4-M3S	42.5	67.4	75.4
缀合物149	N6-siAN2-M3SVP	50.8	78.1	80.8
缀合物150	N6-siAN1-M4S	35.1	48.5	62.3
缀合物151	N6-siAN1-M4SVP	32.4	47.6	62.1
缀合物152	N6-siAN1-M5S	33.1	52.3	60.8
缀合物153	N6-siAN1-M5SVP	32.5	51.8	63.4
缀合物154	X2-siAN1-M3SVP	49.6	67.4	75.6
缀合物155	W2-siAN1-M3SVP	48.6	68.2	74.8
缀合物156	V2-siAN1-M3SVP	50.2	70.1	74.9
缀合物157	O2-siAN1-M3SVP	53.6	67.2	75.2
缀合物158	P2-siAN1-M3SVP	54.1	69.3	76.2
对比缀合物1	N6-NC	3.6	8.2	17.1

从表4F的结果可以看出，在各个浓度下，本公开提供的药物缀合物在细胞水平上均显示出了优异的ANGPTL3 mRNA表达抑制活性，5nM浓度下，药物缀合物抑制率达到60%以上，有些缀合物

可达到80%以上的抑制率。

实验例7-2 本实验说明表2F的药物缀合物在人血浆中的稳定性检测

用DEPC化水将缀合物123-158和对比缀合物1分别配制成20μM（以siRNA计）的溶液。分别取上述浓度为20μM的缀合物123-158、对比缀合物1中的每一个，每组12μl溶液分别与108 μL 90%人血浆（来自江苏省血液研究所，用1×PBS（pH7.4）稀释）快速混合均匀，获得混合液，在37°C恒温孵育。在孵育过程中，分别在0、8、24、48小时取出10 μL混合液，立即进行液氮速冻，于-80°C冰箱中冻存。其中，0小时是指缀合物溶液与90%人血浆混匀后，立即取出10μL混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用1×PBS（pH7.4）将各混合液稀释5倍后，每一稀释混合液各取10 μL准备电泳。分别将等摩尔量的缀合物123-158溶液（以siRNA计的浓度为2 μM）2 μl与8 μl 1×PBS（pH7.4）混匀，制备成10 μL未经人血浆处理的样品，记为未处理，准备电泳。

配制20重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将每一组的上述准备电泳的样品分别与4 μl上样缓冲液（20mM EDTA，36重量%甘油，0.06重量%溴酚蓝）混匀，依次上样至各凝胶孔，在80mA恒流条件下电泳60分钟。电泳结束后，取出凝胶，用1×Sybr Gold染料（Invitrogen，Cat.11494）染色15分钟，成像并计算稳定性结果。

表5F示出了表2F中所列的药物缀合物与对比缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果。该结果以药物缀合物和对比缀合物与人血浆孵育后残留的最长片段与未经处理的siRNA最长片段的比例（RL）表示。

表5F 不同药物缀合物随时间的血浆稳定性

缀合物序号	缀合物编号	RL（%）				
		未处理	0h	8h	24h	48h
缀合物123	N6-siAN1-M1	100	100	97.1	95.4	95.1
缀合物124	N6-siAN2-M1	100	100	97.3	95.2	96.3
缀合物125	N6-siAN1-M2	100	100	97.4	95.3	95.2
缀合物126	N6-siAN2-M2	100	100	97.6	96.4	95.1
缀合物127	N6-siAN1-M3	100	100	95.1	94.3	95.3
缀合物128	N6-siAN2-M3	100	100	96.3	98.0	95.3
缀合物129	N6-siAN1-M1VP	100	100	95.2	96.1	94.8
缀合物130	N6-siAN2-M1VP	100	100	96.3	95.2	95.9
缀合物131	N6-siAN1-M2VP	100	100	95.8	95.3	95.2
缀合物132	N6-siAN2-M2VP	100	100	97.4	95.1	95.1
缀合物133	N6-siAN1-M3VP	100	100	95.5	95.1	96.2
缀合物134	N6-siAN2-M3VP	100	100	95.6	95.2	95.6
缀合物135	N6-siAN1-M1S	100	100	97.1	94.3	95.1
缀合物136	N6-siAN2-M1S	100	100	98.2	95.2	96.1
缀合物137	N6-siAN1-M2S	100	100	98.1	98.4	95.0
缀合物138	N6-siAN2-M2S	100	100	997.3	95.1	95.1
缀合物139	N6-siAN1-M3S	100	100	95.4	94.2	95.3
缀合物140	N6-siAN2-M3S	100	100	94.5	96.3	95.4
缀合物141	N6-siAN1-M1SVP	100	100	98.1	96.1	97.2
缀合物142	N6-siAN2-M1SVP	100	100	98.3	96.2	98.1
缀合物143	N6-siAN1-M2SVP	100	100	98.4	96.4	97.1
缀合物144	N6-siAN2-M2SVP	100	100	97.8	95.5	98.1
缀合物145	N6-siAN1-M3SVP	100	100	97.1	96.5	97.4
缀合物146	N6-siAN1-M3SP	100	100	96.5	96.2	98.3
缀合物147	N6-siAN1-M3SPs	100	100	97.2	97.3	98.5
缀合物148	N6-siAN4-M3S	100	100	97.5	95.8	99.1

缀合物 149	N6-siAN2-M3SVP	100	100	98.7	97.2	99.1
缀合物 150	N6-siAN1-M4S	100	100	98.4	98.3	99.2
缀合物 151	N6-siAN1-M4SVP	100	100	98.3	98.2	98.5
缀合物 152	N6-siAN1-M5S	100	100	99.1	98.1	98.1
缀合物 153	N6-siAN1-M5SVP	100	100	98.6	98.2	94.1
缀合物 154	X2-siAN1-M3SVP	100	100	95.9	98.2	98.2
缀合物 155	W2-siAN1-M3SVP	100	100	98.2	97.6	95.3
缀合物 156	V2-siAN1-M3SVP	100	100	97.9	94.4	95.2
缀合物 157	O2-siAN1-M3SVP	100	100	98.3	95.4	95.6
缀合物 158	P2-siAN1-M3SVP	100	100	98.5	95.2	96.8
对比缀合物 1	N6-NC	100	0	0	0	0

由表 5F 的结果可以看出，本公开提供的药物缀合物在血浆中均显示出优异的稳定性，在 48 小时仍均具有高于 94%的 siRNA 片段长度比例。

实验例 7-3 本实验说明表 2F 的药物缀合物在体内（*in vivo*）对 ANGPTL3 mRNA 表达量的抑制效

在本实验例中，考察缀合物 141、144、145-147 及 154-158 在 BALB/c 小鼠体内对肝脏组织中 ANGPTL3 表达水平的抑制。

将 6-8 周龄 BALB/c 小鼠（购于北京维通利华实验动物技术有限公司）按照体重随机分组，每组 6 只，雌雄各半，按照表 2F 中的药物缀合物对每组小鼠编号，然后分别向每组小鼠给予待测缀合物 141、144、145-147 和 154-158。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.3 mg/ml 的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 10 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量为 3 mg/kg。

对另外一组小鼠中的每只给予 1×PBS，给药体积均为 10 ml/kg，作为对照组。

给药后 14 天处死动物，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据说明书描述的操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠的肝脏组织，分别取 1 μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 ANGPTL3 mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 ANGPTL3 的引物和针对β-肌动蛋白的引物分别对 ANGPTL3 和β-肌动蛋白进行检测。检测引物的序列参见表 6F 所示。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 ANGPTL3 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 6 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 ANGPTL3 mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 ANGPTL3 mRNA 表达水平为 100%，

测试组 ANGPTL3 mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})} \times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 ANGPTL3 mRNA 相对表达水平平均值为该浓度 6 只小鼠的相对表达水平的算术平均值。

其中，对照组为本实验中施以 PBS 的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同药物缀合物的给药组小鼠。结果示于以下表 7F 中。

表 6F 引物的序列

基因	上游引物	下游引物
小鼠 ANGPTL3	5’-GAGGAGCAGCTAACCAACTTAAT-3’ （SEQ ID NO: 701）	5’-TCTGCATGTGCTGTTGACTTAAT-3’ （SEQ ID NO: 702）

小鼠 β-actin	5'-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG-3' (SEQ ID NO: 703)	5'-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3' (SEQ ID NO: 704)

表 7F 药物缀合物在小鼠肝脏中的 ANGPTL3 mRNA 表达抑制率

缀合物序号	缀合物编号	肝脏 ANGPTL3 mRNA 抑制率 (%)
--	PBS	0
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	93.4
缀合物 144	N6-siAN2-M2SVP	93.1
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	92.5
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	92.9
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	93.6
缀合物 154	X2-siAN1-M3SVP	92.1
缀合物 155	W2-siAN1-M3SVP	92.7
缀合物 156	V2-siAN1-M3SVP	93.3
缀合物 157	O2-siAN1-M3SVP	91.8
缀合物 158	P2-siAN1-M3SVP	92.5

由表 7F 的结果可见，与 PBS 相比，本公开提供的药物缀合物均显示出较高的 ANGPTL3 mRNA 的抑制活性，可达到至少 91.8%、最高 93.6%的 ANGPTL3 mRNA 抑制率。

实验例 7-4 本实验说明表 2F 的药物缀合物在体内（*in vivo*）对 ANGPTL3 mRNA 表达量的抑制效率及对血脂的影响

在本实验例中，考察缀合物 141（N6-siAN1M1SVP）及缀合物 145-147（N6-siAN1-M3SVP、N6-siAN1-M3SP、N6-siAN1-M3SPs）的药物缀合物在 ob/ob 模型小鼠体内对肝脏组织中 ANGPTL3 表达水平的抑制率和对血清中总胆固醇（CHO）、甘油三酯（TG）和低密度脂蛋白（LDL-c）含量的影响。

将 6-8 周龄 ob/ob 雌性小鼠（购于常州卡文斯实验动物有限公司）随机分成 9 组，每组 5 只，分组如下：（1）PBS 对照组；（2）N6-siAN1-M1SVP 3mg/kg 组；（3）N6-siAN1-M3SVP 3mg/kg 组；（4）N6-siAN1-M3SP 3mg/kg 组；（5）N6-siAN1-M3SPs 3mg/kg 组；（6）N6-siAN1-M1SVP 1mg/kg 组；（7）N6-siAN1-M3SVP 1mg/kg 组；（8）N6-siAN1-M3SP 1mg/kg 组；（9）N6-siAN1-M3SPs 1mg/kg 组。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，给药体积均为 10mL/kg。

分别于给药前 2 天（记为-2 天），及给药后第 7、14、21、28、35、42、49 天眼眶采血（约 100 μL）用于检测血脂水平。

第 49 天处死小鼠，收集肝脏，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到总 RNA。

采用与实验例 7-3 相同的方法，进行实时荧光定量 PCR 检测肝组织中 ANGPTL3 mRNA 的表达水平。结果示于以下表 8F 中。

表 8F 药物缀合物对小鼠肝脏中 ANGPTL3 mRNA 的表达抑制率

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	肝脏 ANGPTL3 mRNA 抑制率 (%)
--	PBS	--	0
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	3	86.4
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	3	77.6
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	3	76.9
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	3	77.2
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	1	53.2
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	1	56.4
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	1	56.2

缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	1	56.0

将眼眶采集的血液进行离心得到血清，进一步使用 PM1P000/3 全自动血清生化仪（SABA，意大利）检测血清中总胆固醇（CHO）、甘油三酯（TG）和低密度脂蛋白（LDL-c）的含量，血脂结果进行标准化处理，血脂水平的抑制率按如下等式计算：抑制率＝（1-给药后测试组血脂含量/给药前测试组血脂含量）×100%。血脂指总胆固醇、甘油三酯或低密度脂蛋白。检测结果示于以下表 9F、10F 和 11F 中。

表 9F 药物缀合物对小鼠血清中总胆固醇表达水平的影响

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	CHO （标准化，以-2 天数据为 1）							
			-2 天	7 天	14 天	21 天	28 天	35 天	42 天	49 天
--	PBS	--	1.00	1.07	1.41	1.06	0.97	0.97	1.07	1.05
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	3	1.00	0.22	0.24	0.22	0.28	0.33	0.41	0.49
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	3	1.00	0.21	0.23	0.24	0.30	0.36	0.42	0.50
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	3	1.00	0.22	0.22	0.23	0.31	0.37	0.43	0.49
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	3	1.00	0.21	0.22	0.24	0.31	0.36	0.43	0.50
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	1	1.00	0.27	0.33	0.32	0.38	0.42	0.52	0.58
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	1	1.00	0.31	0.35	0.36	0.42	0.44	0.54	0.52
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	1	1.00	0.30	0.36	0.35	0.41	0.43	0.53	0.53
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	1	1.00	0.31	0.35	0.35	0.42	0.43	0.52	0.51

表 10F 药物缀合物对小鼠血清中甘油三酯表达水平的影响

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	TG （标准化，以-2 天数据为 1）							
			-2 天	7 天	14 天	21 天	28 天	35 天	42 天	49 天
--	PBS	--	1.00	1.04	1.23	0.94	0.95	1.04	0.98	1.01
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	3	1.00	0.17	0.21	0.19	0.26	0.25	0.28	0.38
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	3	1.00	0.20	0.18	0.23	0.24	0.28	0.31	0.37
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	3	1.00	0.21	0.17	0.24	0.23	0.27	0.30	0.38
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	3	1.00	0.20	0.18	0.25	0.24	0.28	0.29	0.37
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	1	1.00	0.25	0.26	0.28	0.33	0.31	0.45	0.47
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	1	1.00	0.25	0.27	0.32	0.39	0.40	0.41	0.49
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	1	1.00	0.26	0.28	0.33	0.40	0.41	0.40	0.50
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	1	1.00	0.24	0.29	0.34	0.39	0.42	0.40	0.49

表 11F 药物缀合物对小鼠血清中低密度脂蛋白表达水平的影响

缀合物序号	缀合物编号	给药剂量（mg/kg）	LDL-c （标准化，以-2 天数据为 1）							
			-2 天	7 天	14 天	21 天	28 天	35 天	42 天	49 天
--	PBS	--	1.00	1.04	1.02	0.97	1.08	1.04	1.02	1.03
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	3	1.00	0.24	0.26	0.24	0.33	0.35	0.34	0.44
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	3	1.00	0.25	0.27	0.28	0.31	0.35	0.36	0.44
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	3	1.00	0.24	0.27	0.29	0.32	0.35	0.36	0.45
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	3	1.00	0.25	0.25	0.29	0.31	0.36	0.36	0.46
缀合物 141	N6-siAN1-M1SVP	1	1.00	0.34	0.36	0.34	0.44	0.48	0.48	0.54
缀合物 145	N6-siAN1-M3SVP	1	1.00	0.37	0.37	0.38	0.41	0.47	0.46	0.56
缀合物 146	N6-siAN1-M3SP	1	1.00	0.38	0.38	0.36	0.42	0.48	0.47	0.55
缀合物 147	N6-siAN1-M3SPs	1	1.00	0.37	0.37	0.37	0.43	0.48	0.46	0.55

由上述表 9F、表 10F 和表 11F 的结果可见，不同剂量下的缀合物 141、缀合物 145、缀合物 146 或缀合物 147 的药物缀合物均能显著抑制小鼠肝脏组织中 ANGPTL3 的表达，且存在明显的剂量依赖响应；缀合物 141 的药物缀合物（N6-siAN1-M1SP）在 1mg/kg 的低剂量下，对 ANGPTL3 基因表达的抑制率为 53.2%；在 3mg/kg 的高剂量下，对 ANGPTL3 基因表达的抑制率高达 86.4%；同时对小鼠血清中 CHO、TG 和 LDL-c 的含量进行了监测，结果显示经缀合物 141 或 145-147 的药物缀合物治疗后的小鼠血清中的 CHO、TG 和 LDL-c 的含量明显下降，并且至少在 49 天时仍显示出较高的血脂降低效果。

实验例 8 表 2G 的药物缀合物的效果试验

实验例 8-1 本实验说明表 2G 的药物缀合物在 Huh7 细胞中对 APOC3 mRNA 表达量的抑制效率检测。

用 H-DMEM 完全培养基将 Huh7 细胞以 7.5×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中，16h 后细胞生长密度达到 70-80%时，吸尽培养孔中 H-DMEM 完全培养基，每孔加入 500 μl Opti-MEM 培养基（GIBCO 公司）继续培养 1.5h。

用 DEPC 化水将下面的药物缀合物分别配制成 5 μM、0.5 μM 和 0.05 μM 的共 3 种不同浓度的药物缀合物工作液（以 siRNA 计），所述药物缀合物为表 2G 中的缀合物 159-183 和表 2A 中的对比缀合物 1，对比缀合物 1 为阴性对照。

配制 8A1-8A3 溶液，对于每一个药物缀合物，分别配制 8A1、8A2 和 8A3 溶液，每份 8A1-8A3 溶液依次含有上述 3 个浓度的药物缀合物工作液 0.6 μl 和 Opti-MEM 培养基 50μl。

配制 8B 溶液，每份 8B 溶液含有 1 μl Lipofectamine™ 2000 和 50μl Opti-MEM 培养基。

分别将一份 8B 溶液与得到的每个药物缀合物的 8A1-8A3 溶液混合，分别室温下孵育 20min，得到每个药物缀合物的转染复合物 8X1-8X3。

将一份 8B 溶液与 Opti-MEM 培养基 50μl 混合，室温下孵育 20min，得到转染复合物 8X4。

在培养孔中，分别加入每一个药物缀合物的转染复合物 8X1-8X3，均匀混合，加入量为 100μl/孔，得到每个药物缀合物的终浓度（以 siRNA 计）分别约为 5 nM、0.5 nM 和 0.05 nM 的转染复合物，每个药物缀合物的转染复合物 8X1-8X3 分别转染 3 个培养孔，得到含 siRNA 的转染混合物，记为测试组。

在另外三个培养孔中，分别加入转染复合物 8X4，加入量为 100μl/孔，得到不含药物缀合物的转染混合物，记为空白对照组。

将含药物缀合物的转染混合物和不含药物缀合物的转染混合物在培养孔中转染 4 h 后，每孔补加 1 ml 含 20% FBS 的 H-DMEM 完全培养基。将 24 孔板置于 CO_2 培养箱继续培养 24h。

随后，使用 RNAVzol（购自威格拉斯生物技术（北京）有限公司，货号 N002）根据说明书记载的方法提取各孔细胞中的总 RNA。

对于每孔细胞，分别取 1μg 总 RNA，使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit（购自北京擎科新业生物技术有限公司，货号 TSK301M）提供的试剂，其中选取 Goldenstar™ Oligo $(dT)_{17}$ 作为引物，按试剂盒说明书中反转录操作步骤配置反转录反应体系 20μl，对各孔细胞的总 RNA 进行反转录。反转录的条件为：对于每一反转录反应体系，将反转录反应体系置于 50°C 孵育 50min，然后 85°C 孵育 5min，最后 4°C 孵育 30s，反应结束后，向反转录反应体系中加入 DEPC 水 80μl，得到含 cDNA 的溶液。

对于每一反转录反应体系，分别取上述含 cDNA 的溶液 5μl 做模板，使用 NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒（购自近岸蛋白质科技有限公司，货号 E096-01B）提供的试剂配置 qPCR 反应体系 20μl，其中，用于扩增目标基因 APOC3 和内参基因 β-actin 的 PCR 引物序列如表 3G 所示，每条引物的终浓度为 0.25μM。将各 qPCR 反应体系置于 ABI StepOnePlus Real-Time PCR 仪上，使用三步法进行扩增，扩增程序为 95°C 预变性 10min，然后 95°C 变性 30s，60°C 退火 30s，72°C 延伸 30s，重复上述变性、退火、延伸的过程共 40 次后，得到含有扩增了目标基因 APOC3 和内参基因 β-actin 的产物 W。产物 W 随即依次经过 95°C 15s，60°C 1min，95°C 15s 的孵育，实时荧光定量 PCR 仪分别收集产物 W 中目标基因 APOC3 和内参基因 β-actin 的溶解曲线，得到目标基因 APOC3 和内参基因 β-actin 的 Ct 值。

表 3G 引物信息

基因	上游引物	下游引物
人 APOC3	5'- GTGACCGATGGCTTCAGTTC -3'（SEQ ID NO: 705）	5'- ATGGATAGGCAGGTGGACTT -3'（SEQ ID NO: 706）
人 β-actin	5'- CCAACCGCGAGAAGATGA - 3'（SEQ ID NO: 707）	5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'（SEQ ID NO: 708）

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组中目标基因 APOC3 进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组三个培养孔各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每一培养孔均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 APOC3 mRNA 的表达水平进行归一化，定义空白对照组 APOC3 mRNA 表达水平为 100%，

测试组 APOC3 mRNA 相对表达水平 $= 2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})} \times 100\%$

测试组 APOC3 mRNA 抑制率 =(1-测试组 APOC3 mRNA 相对表达水平) × 100%

各药物缀合物对 APOC3 mRNA 的抑制率总结于表 4G 中。对于同一测试组的药物缀合物，mRNA 抑制率是两个培养孔测定的测试组 APOC3 mRNA 抑制率的算术平均值。

表 4G 不同浓度药物缀合物在 Huh7 细胞中对 APOC3 mRNA 的抑制率

缀合物序号	缀合物编号	mRNA 抑制率（%）		
		5nM	0.5nM	0.05nM
缀合物 159	N6-siAP1	53.3	33.3	12.5
缀合物 160	N6-siAP2	54.1	35.4	13.6
缀合物 161	N6-siAP1-M1	53.5	35.2	13.7
缀合物 162	N6-siAP2-M1	55.2	33.1	12.8
缀合物 163	N6-siAP1-M2	55.1	34.5	14.4
缀合物 164	N6-siAP2-M2	57.6	34.2	15.1
缀合物 165	N6-siAP1-M1VP	53.2	34.3	15.0
缀合物 166	N6-siAP2-M1VP	57.4	32.8	14.6
缀合物 167	N6-siAP1-M2VP	56.2	33.4	16.3
缀合物 168	N6-siAP2-M2VP	58.3	32.7	13.4
缀合物 169	N6-siAP1-M1S	57.1	41.2	16.8

缀合物 170	N6-siAP2-M1S	57.3	38.7	16.1
缀合物 171	N6-siAP1-M2S	60.2	43.1	17.4
缀合物 172	N6-siAP2-M2S	57.5	37.6	15.4
缀合物 173	N6-siAP1-M1SVP	57.8	41.2	15.2
缀合物 174	N6-siAP2-M1SVP	58.2	42.6	17.3
缀合物 175	N6-siAP1-M2SVP	59.5	43.2	20.1
缀合物 176	N6-siAP1-M2SP	59.1	42.2	20.5
缀合物 177	N6-siAP1-M2SPs	57.4	41.3	20.8
缀合物 178	N6-siAP4-M2S	57.1	38.5	21.9
缀合物 179	X2-siAP1-M2SVP	57.8	39.8	18.3
缀合物 180	W2-siAP1-M2SVP	56.4	40.2	21.1
缀合物 181	V2-siAP1-M2SVP	61.3	41.5	18.9
缀合物 182	O2-siAP1-M2SVP	59.4	40.3	18.4
缀合物 183	P2-siAP1-M2SVP	57.7	44.1	19.6
对比缀合物 1	N6-NC	7.8	3.1	0.2

从表 4G 的结果可以看出，在各个浓度下，本公开提供的药物缀合物在细胞水平上均显示出了优异的 APOC3 mRNA 表达抑制活性，5nM 浓度下，药物缀合物抑制率达到 53.2%以上，有些缀合物可达到 61%以上的抑制率。

实验例 8-2 本实验说明表 2G 的药物缀合物在体外人血浆中的稳定性

用 DEPC 化水将缀合物 161-183 和对比缀合物 1 分别配制成 20μM（以 siRNA 计）的溶液。

分别取上述浓度为 20μM 的缀合物 161-183、对比缀合物 1 中的每一个，每组 12μl 溶液，分别与 108 μL 90%人血浆（来自江苏省血液研究所，用 1×PBS（pH7.4）稀释）快速混合均匀，获得混合液，在 37°C 恒温孵育。在孵育过程中，分别在 0、8、24、48 小时取出 10 μL 混合液，立即进行液氮速冻，于-80°C 冰箱中冻存。其中，0 小时是指缀合物溶液与 90%人血浆混匀后，立即取出 10μL 混合液的时刻。待各时间点取样完毕后，用 1×PBS（pH7.4）将各混合液稀释 5 倍后，每一稀释混合液 10 μL 准备电泳。分别将等摩尔量的缀合物 161-183 溶液（2μM，2μl）与 8μl 1×PBS（pH7.4）混匀，制备成 10μL 未经人血浆处理的样品，记为未处理，准备电泳。

配制 20 重量%的非变性聚丙烯酰胺凝胶，将每一组的上述准备电泳的样品与 4μl 上样缓冲液（20mM EDTA，36 重量%甘油，0.06 重量%溴酚蓝）混匀，依次上样至各凝胶孔，在 80mA 恒流条件下电泳 60 分钟。电泳结束后，取出凝胶，用 1×Sybr Gold 染料（Invitrogen，Cat.11494）染色 15 分钟，成像并计算稳定性结果。

表 5G 示出了表 2G 中所列的药物缀合物与对比缀合物在体外人血浆中的稳定性半定量检测结果。该结果以药物缀合物和对比缀合物与人血浆孵育后残留的最长片段与未经处理的 siRNA 最长片段的比例（RL）表示。

表 5G 不同药物缀合物随时间的血浆稳定性

缀合物序号	缀合物编号	RL（%）				
		未处理	0h	8h	24h	48h
缀合物 161	N6-siAP1-M1	100	100	99.4	98.0	95.1
缀合物 162	N6-siAP2-M1	100	100	99.4	96.2	96.2
缀合物 163	N6-siAP1-M2	100	100	99.6	96.1	98.3
缀合物 164	N6-siAP2-M2	100	100	99.7	96.2	98.4
缀合物 165	N6-siAP1-M1VP	100	100	99.6	98.3	93.1
缀合物 166	N6-siAP2-M1VP	100	100	99.5	95.1	95.2
缀合物 167	N6-siAP1-M2VP	100	100	99.5	96.2	96.7
缀合物 168	N6-siAP2-M2VP	100	100	99.1	97.0	98.4
缀合物 169	N6-siAP1-M1S	100	100	99.4	93.1	98.8
缀合物 170	N6-siAP2-M1S	100	100	99.3	95.4	94.4

缀合物 171	N6-siAP1-M2S	100	100	98.5	98.3	98.2
缀合物 172	N6-siAP2-M2S	100	100	99.2	96.1	99.3
缀合物 173	N6-siAP1-M1SVP	100	100	99.1	98.4	99.1
缀合物 174	N6-siAP2-M1SVP	100	100	99.1	96.5	96.9
缀合物 175	N6-siAP1-M2SVP	100	100	99.1	98.3	98.2
缀合物 176	N6-siAP1-M2SP	100	100	99.3	95.8	94.4
缀合物 177	N6-siAP1-M2SPs	100	100	99.2	98.1	95.1
缀合物 178	N6-siAP4-M2S	100	100	99.1	96.1	98.2
缀合物 179	X2-siAP1-M2SVP	100	100	99.0	97.2	99.0
缀合物 180	W2-siAP1-M2SVP	100	100	99.1	98.0	95.1
缀合物 181	V2-siAP1-M2SVP	100	100	99.1	95.4	94.2
缀合物 182	O2-siAP1-M2SVP	100	100	99.2	96.2	95.3
实施例 183	P2-siAP1-M2SVP	100	100	99.3	98.1	96.2
对比缀合物 1	N6-NC	100	100	99.1	98.3	98.2

由表 5G 的结果可以看出，本公开提供的药物缀合物在血浆中均显示出优异的稳定性，在 48 小时仍具有高于 93%的 siRNA 片段长度比例。

实验例 8-3 本实验说明表 2G 的药物缀合物在体内（*in vivo*）对 APOC3 mRNA 表达量的抑制效率

在本实验例中，考察缀合物 172、173、175-177 和 179-183 在人 APOC3 转基因小鼠（B6；CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J，购于 Jackson Lab）体内对肝脏组织中 APOC3 表达水平的抑制。

将 6-8 周龄人 APOC3 转基因小鼠随机分组，每组 6 只，雌雄各半，按照表 2G 中的药物缀合物对每组小鼠编号，然后分别向每组小鼠给予缀合物 172、173、175-177 和 179-183 的药物缀合物。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物以 0.3 mg/ml 的 0.9%氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 10 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量为 3 mg/kg。对另外一组小鼠中的每只给予 1×PBS，给药体积均为 10ml/kg，作为对照组。

给药后 28 天处死小鼠，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据总 RNA 提取的标准操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠的肝脏组织，分别取 1 μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 APOC3 mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 β-肌动蛋白（β-actin）基因作为内参基因，使用针对 APOC3 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别对 APOC3 和 β-肌动蛋白进行检测。检测引物的序列参见表 6G 所示。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 APOC3 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 6 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 APOC3 mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 APOC3 mRNA 表达水平为 100%，

测试组 APOC3 mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})}\times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 APOC3 mRNA 相对表达水平平均值为该浓度 6 只小鼠的相对表达水平的算术平均值。

其中，对照组为本实验中施以 PBS 的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同药物缀合物的给药组小鼠。结果示于以下表 7G 中。

表 6G 引物的序列

基因	上游引物	下游引物
人 APOC3	5'- GTGACCGATGGCTTCAGTTC -3'（SEQ ID NO: 709）	5'- ATGGATAGGCAGGTGGACTT -3'（SEQ ID NO: 710）
小鼠 β-actin	5'-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG-3'（SEQ ID NO: 711）	5'-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3'（SEQ ID NO: 712）

表 7G 药物缀合物在小鼠肝脏中的 APOC3 Mrna 的表达抑制率

缀合物序号	缀合物编号	剂量 mg/kg	肝脏 APOC3 mRNA 抑制率（%）
--	PBS	--	0
缀合物 172	N6-siAP2-M2S	3	71.4
缀合物 173	N6-siAP1-M1SVP	3	81.2
缀合物 175	N6-siAP1-M2SVP	3	82.5
缀合物 176	N6-siAP1-M2SP	3	81.5
缀合物 177	N6-siAP1-M2SPs	3	81.9
缀合物 179	X2-siAP1-M2SVP	3	80.6
缀合物 180	W2-siAP1-M2SVP	3	78.2
缀合物 181	V2-siAP1-M2SVP	3	79.4
缀合物 182	O2-siAP1-M2SVP	3	80.8
缀合物 183	P2-siAP1-M2SVP	3	77.5

由表 7G 的结果可见，与 PBS 相比，本公开的药物缀合物均显示出优异的 APOC3 mRNA 的抑制活性，可达到至少 71.4%、最高 82.5%的 APOC3 mRNA 抑制率。

实验例 8-4 本实验说明缀合物 175-177 的药物缀合物在体内（*in vivo*）对血脂含量的影响

在本实验例中，考察缀合物 175-177 的药物缀合物（N6-siAP1-M2SVP、N6-siAP1-M2SP 和 N6-siAP1-M2SPs）在人 APOC3 转基因小鼠（B6；CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J，购于 Jackson Lab）体内对血清中总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）含量的影响。

将 6-8 周龄人 APOC3 转基因小鼠随机分为 3 组，每组 6 只（雌雄各半），分组如下：（1）PBS 对照组；（(2）缀合物 175 3mg/kg 组；（3）缀合物 175 1mg/kg 组；（4）缀合物 176 3mg/kg 组；（5）缀合物 176 1mg/kg 组；（6）缀合物 177 3mg/kg 组；（7）缀合物 177 1mg/kg 组。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，药物缀合物给药体积为 10mL/kg。

分别于给药前 1 天（记为-1 天），及给药后第 7、14、21、28、35、42、49、65 天进行眼眶采血（约 100 μL），离心得到血清，进一步使用 PM1P000/3 全自动血清生化仪（SABA，意大利）检测血清中总胆固醇（CHO）和甘油三酯（TG）的含量，血脂结果进行标准化处理，血脂水平的抑制率按如下等式计算：抑制率＝（1-给药后测试组血脂含量/给药前测试组血脂含量）×100%。血脂指总胆固醇或甘油三酯。检测结果示于以下表 8G 中。

表 8G 药物缀合物对小鼠血清中总胆固醇和甘油三酯表达水平的影响

检测点	抑制率%											
	缀合物 175 3mg/kg		缀合物 175 1mg/kg		缀合物 176 3mg/kg		缀合物 176 1mg/kg		缀合物 177 3mg/kg		缀合物 177 1mg/kg	
	CHO	TG	CHO	TG	CHO	TG	CHO	TG	CHO	TG	CHO	TG
7 天	54.2	84.3	57.3	85.1	53.8	83.9	56.8	85.3	53.7	83.8	57.0	84.7
14 天	53.1	82.6	51.2	80.0	53.2	82.4	51.0	79.6	52.9	81.9	50.8	80.2
21 天	46.5	83.6	44.5	83.2	46.1	83.2	44.3	82.8	46.4	83.2	44.6	83.1
28 天	55.1	88.1	53.5	82.5	54.8	87.5	53.4	82.1	54.5	87.2	53.2	82.7
35 天	53.6	85.3	50.1	79.6	53.2	85.1	49.5	79.8	53.8	84.6	50.5	79.1

42 天	55.2	85.1	55.2	77.4	54.8	85.0	55.1	77.6	54.9	84.8	54.2	77.1
49 天	52.9	79.3	40.5	71.4	52.5	78.8	40.2	72.1	52.8	79.8	41.3	71.2
65 天	58.4	75.2	49.3	66.7	57.5	75.0	75.3	66.5	56.9	75.4	48.8	66.2

由表 8G 可见，缀合物 175-177 所示的药物缀合物对小鼠血清中总胆固醇和甘油三酯的含量有明显下调作用，并且至少在 65 天时仍显示出较高的血脂降低效果。

实验例 8-5 本实验说明药物缀合物在 C57BL/6J 小鼠中的靶 mRNA 抑制效率。

在本实验例中，考察缀合物 184 在 C57BL/6J 小鼠体内对肝脏组织中 APOC3 表达水平的抑制。

将 6-8 周龄 C57BL/6J 小鼠（购于购自北京大学医学部实验动物科学部）按照体重随机分组，每组 5 只，均为雌性，以缀合物 184 对每组小鼠编号，然后分别向每组小鼠给予待测缀合物 184。所有动物根据体重计算药量，采用皮下注射方式单次给药，各缀合物分别以 0.2 mg/ml 和 0.02mg/ml 的 0.9% 氯化钠水溶液形式给予，给药体积为 5 ml/kg 小鼠体重，即，每一缀合物的给药剂量分别为 1 mg/kg 和 0.1mg/kg。

对其中一组小鼠给予 1×PBS，给药体积均为 5ml/kg，作为对照组。

给药后 72h 处死动物，分别收集每只小鼠的肝脏组织，用 RNA later（Sigma Aldrich 公司）保存；用组织匀浆仪匀浆肝组织，再用 Trizol（Thermo Fisher 公司）根据说明书描述的操作步骤提取得到总 RNA。

对于每只小鼠的肝脏组织，分别取 1μg 总 RNA，使用 ImProm-IITM 反转录试剂盒（Promega 公司）按其说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA，得到含 cDNA 的溶液，接着用荧光定量 PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）检测肝组织中的 TTr mRNA 的表达量。在该荧光定量 PCR 法中，以 GAPDH 基因作为内参基因，使用针对 TTr 的引物和针对 β-肌动蛋白的引物分别对 TTr 和 GAPDH 进行检测。检测引物的序列参见表 9G 所示。

采用比较 Ct（ΔΔCt）法，对各测试组和对照组中目标基因 TTr 的表达量进行相对定量计算，计算方法如下：

ΔCt(测试组) = Ct(测试组目标基因) – Ct(测试组内参基因)

ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) – Ct(对照组内参基因)

ΔΔCt(测试组) = ΔCt(测试组) - ΔCt(对照组平均)

ΔΔCt(对照组) = ΔCt(对照组) - ΔCt(对照组平均)

其中，ΔCt(对照组平均)是对照组 5 只小鼠各自的 ΔCt(对照组)的算术平均值。从而，测试组和对照组的每只小鼠均对应一个 ΔΔCt 值。

以对照组为基准，对测试组 TTr mRNA 的表达水平进行归一化，定义对照组 TTr mRNA 表达水平为 100%，

测试组 TTr mRNA 相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta Ct(\text{测试组})} \times 100\%$。

对于同一测试组 siRNA，每一浓度下的测试组 TTr mRNA 相对表达水平平均值为该浓度 5 只小鼠的相对表达水平的算术平均值。

其中，对照组为本实验中施以 PBS 的对照组小鼠，各测试组为分别施以不同药物缀合物的给药组小鼠。结果示于以下表 10G 中。

表 9G 引物的序列

基因	上游引物	下游引物
mTTR	5'- CCGTCTGTGCCTTCTCATCT -3'（SEQ ID NO: 715）	5'- TAATCTCCTCCCCCAACTCC -3'（SEQ ID NO: 716）
GAPDH	5'- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG- 3'（SEQ ID NO: 717）	5'- AGGGGCCATCCACAGTCTTC -3'（SEQ ID NO: 718）

表 10G 小鼠中 mTTR mRNA 抑制效果

缀合物序号	缀合物编号	mRNA 抑制率（%）	
		1mg/kg	0.1mg/kg
缀合物 184	N6-siTTR-M2SVP	90	38

根据结果可见，缀合物 184 对小鼠体内靶 mRNA（TTR mRNA）具有优异的抑制效果，最高可达 90%。

以上详细描述了本公开的具体实施方式，但是，本公开并不限于上述实施方式中的具体细节，在

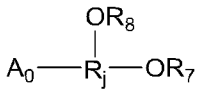
本公开的技术构思范围内，可以对本公开的技术方案进行多种简单变型，这些简单变型均属于本公开的保护范围。

另外需要说明的是，在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征，在不矛盾的情况下，可以通过任何合适的方式进行组合，为了避免不必要的重复，本公开对各种可能的组合方式不再另行说明。

此外，本公开的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合，只要其不违背本公开的思想，其同样应当视为本公开所公开的内容。

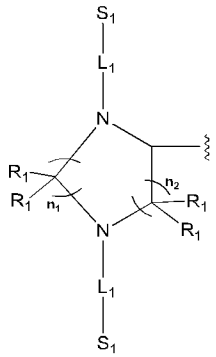
权 利 要 求 书

1、一种化合物，该化合物具有式（101）所示的结构：



式（101）

其中， A_0 具有式（312）所示的结构，



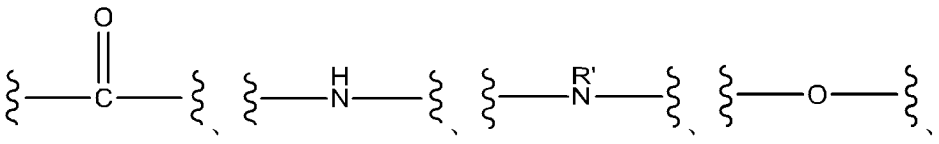
式（312）

其中，n_1 为 1-4 的整数，n_2 为 0-3 的整数；每个 R_1 各自独立地选自 H、取代或未取代的 C_1-C_4 烃基和卤素中的一种；

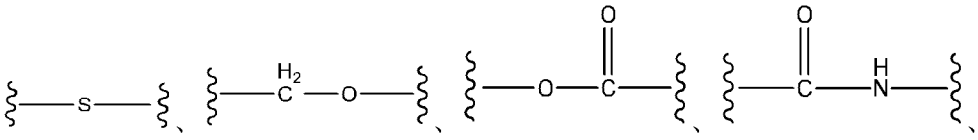
每个 L_1 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、C_2-C_{10} 亚烯基、C_2-C_{10} 亚炔基、C_6-C_{10} 亚芳基、C_3-C_{18} 亚杂环基和 C_5-C_{10} 亚杂芳基；并且其中，L_1 任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C_1-C_{10} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、C_5-C_{10} 杂芳基、C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC_1-C_{10} 烷基、-OC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-OH、-OC_1-C_{10} 卤代烷基、-SC_1-C_{10} 烷基、-SC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-SH、-SC_1-C_{10} 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH_2、-C_1-C_{10} 烷基-NH_2、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基苯基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO_2H、-C(O)O(C_1-C_{10} 烷基)、-CON(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-CONH(C_1-C_{10} 烷基)、-$CONH_2$，-NHC(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C_1-C_{10} 烷基、-C(O)C_1-C_{10} 烷基苯基、-C(O)C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC(O)C_1-C_{10} 烷基、-SO_2(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2(苯基)、-SO_2(C_1-C_{10} 卤代烷基)、-SO_2NH_2、-SO_2NH(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2NH(苯基)、-$NHSO_2$(C_1-C_{10} 烷基)、-$NHSO_2$(苯基)和-$NHSO_2$(C_1-C_{10} 卤代烷基)；

～～～表示基团共价连接的位点；每个 S_1 独立地为 M_1，其中任何活性羟基和/或氨基，如果有的话，都被保护基团保护；每个 M_1 独立地选自能够和细胞表面受体结合的配体；R_j 为连接基团；R_7 是任何能经过反应与羟基形成磷酸酯连接、硫代磷酸酯连接、硼代磷酸酯连接或羧酸酯连接、或者能经过反应与氨基形成酰胺键连接的官能团；R_8 是羟基保护基团。

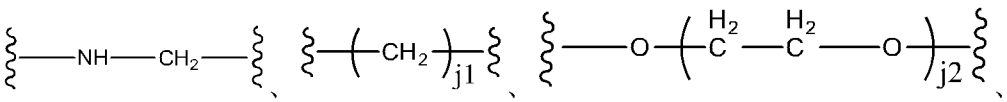
2、根据权利要求 1 所述的化合物，其中，每个 L_1 独立地选自式 A1-A26 基团中的一种或多种的连接组合；



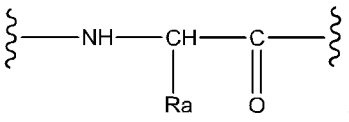
（A1） （A2） （A3） （A4）



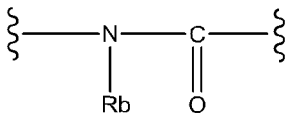
（A5） （A6） （A7） （A8）



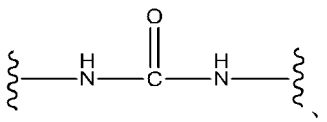
（A9） （A10） （A11）



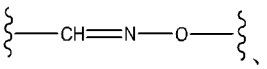
(A12)



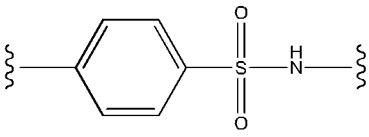
(A13)



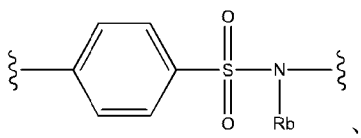
(A14)



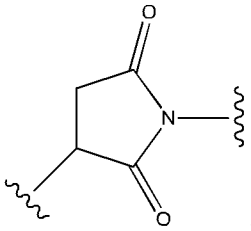
(A15)



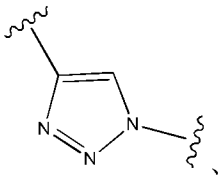
(A16)



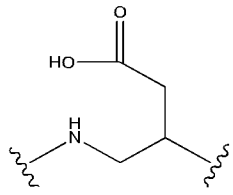
(A17)



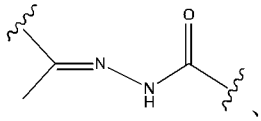
(A18)



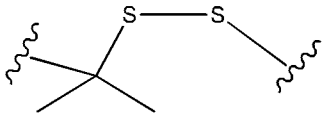
(A19)



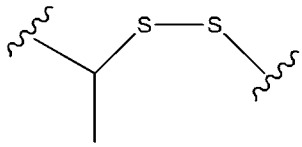
(A20)



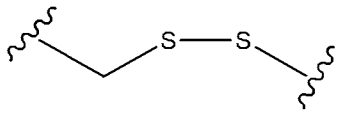
(A21)



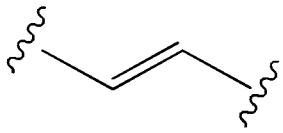
(A22)



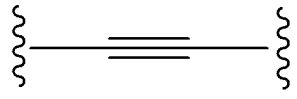
(A23)



(A24)

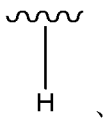


(A25)

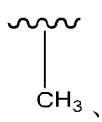


(A26)

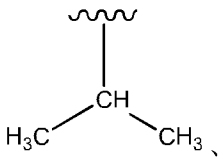
其中，j1 为 1-20 的整数；j2 为 1-20 的整数；R’为 C_1-C_{10} 烷基；Ra 选自式 A27-A45 所示基团中的一种；Rb 为 C_1-C_{10} 烷基；



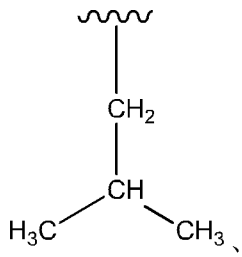
(A27)



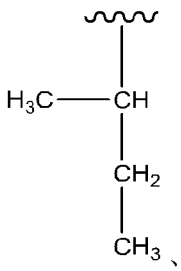
(A28)



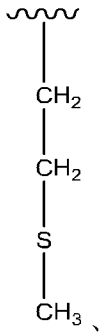
(A29)



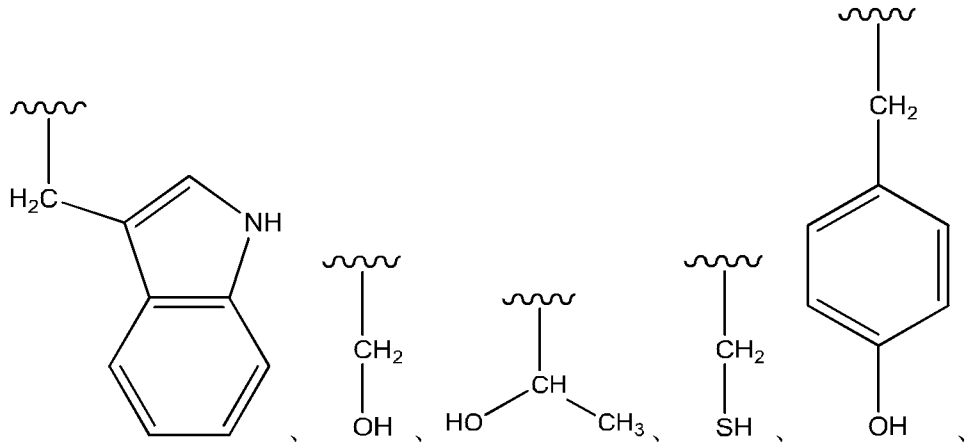
(A30)



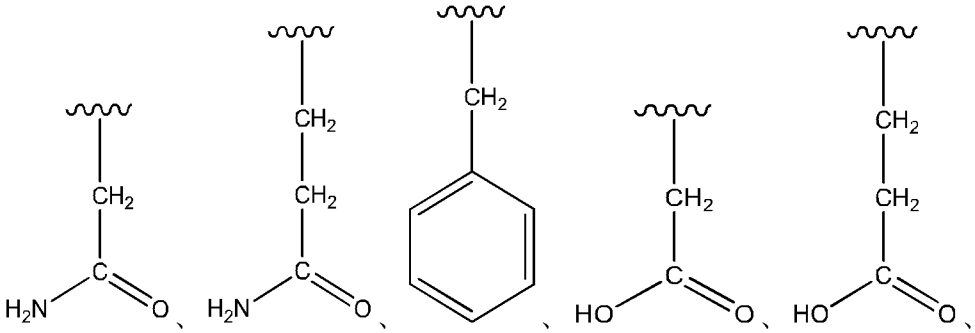
(A31)



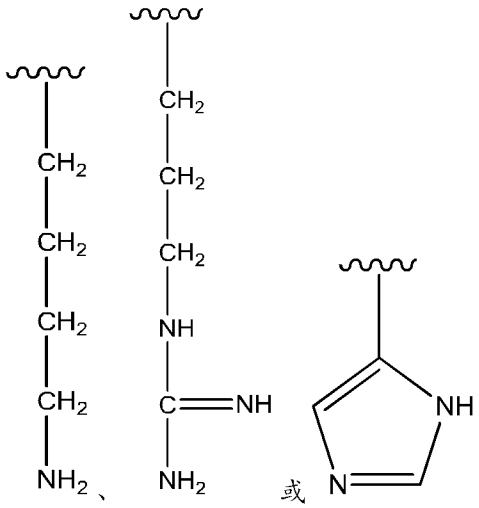
(A32)



（A33） （A34） （A35） （A36） （A37）



（A38） （A39） （A40） （A41） （A42）



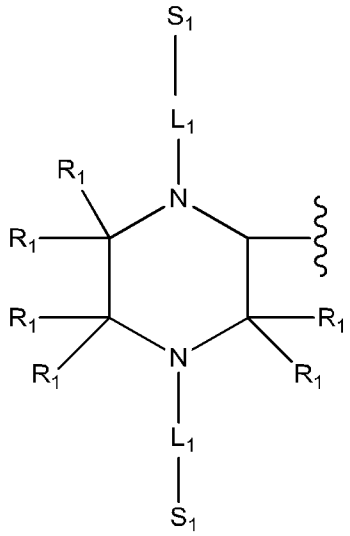
（A43） （A44） （A45）

3、根据权利要求 2 所述的化合物，其中，L_1 选自 A1、A2、A4、A5、A6、A8、A10、A11、A13 中的一种或多种的连接组合。

4、根据权利要求 1、2 或 3 所述的化合物，其中，L_1 的长度为 3-25 个原子，所述 L_1 的长度是指与 A 中的 N 原子连接的原子到与 S_1 连接的原子形成的最长的原子链上的成链原子的个数。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，n_1 为 1 或 2，n_2 为 1 或 2。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，A_0 具有如式（120）所示的结构。

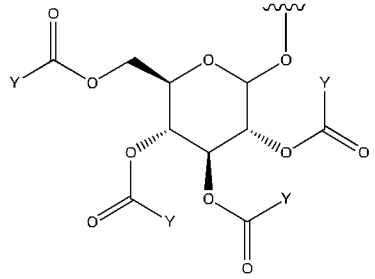


式（120）

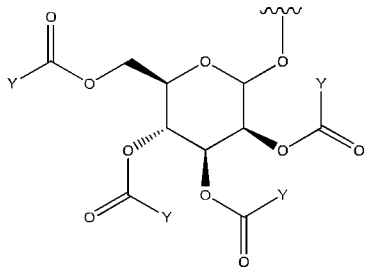
7、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，每个 M_1 独立地选自亲脂类分子、糖类、维生素、多肽、内涵体裂解物质、类固醇化合物、萜烯化合物、整合素受体抑制剂和阳离子脂质分子及它们的衍生物形成的配体中的一种。

8、根据权利要求 7 所述的化合物，其中，每个 M_1 独立地选自 D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种。

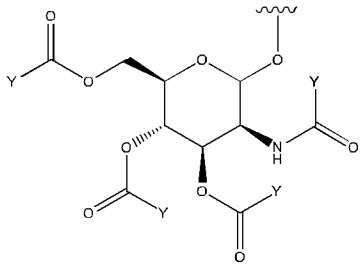
9、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，每个 S_1 独立地选自式 A51-A59 基团中的一种：



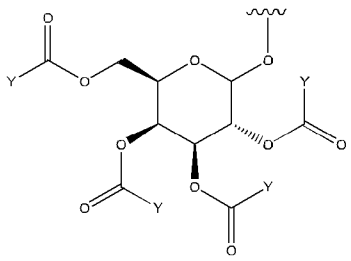
（A51）、



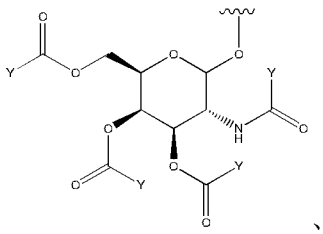
（A52）、



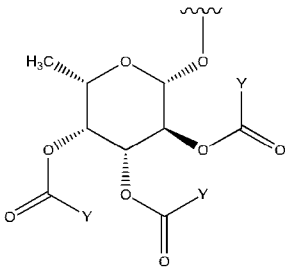
（A53）、



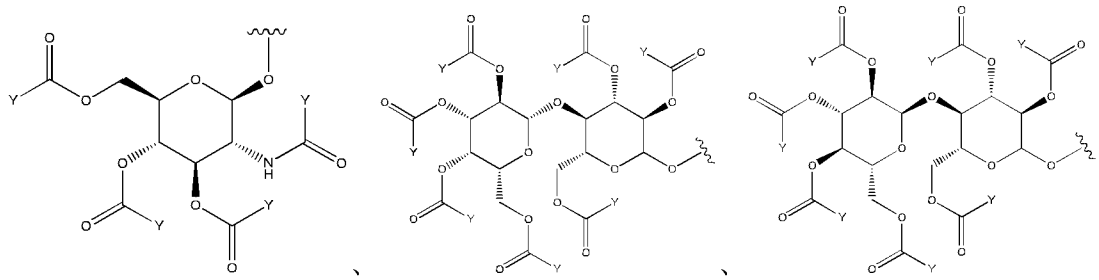
（A54）、



（A55）、



（A56）、

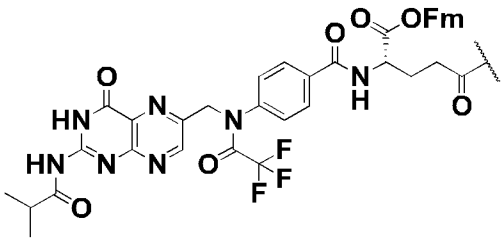


（A57） （A58） （A59）

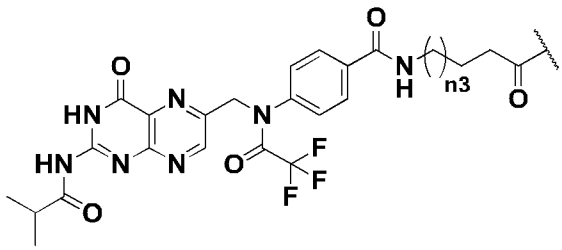
其中，每个 Y 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种。

10、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，每个 M_1 独立地选自以下基团中的一种：胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O（十六烷基）甘油（1,3,-Bis-O(hexadecyl)glycerol）、六甘油、薄荷醇、薄荷脑、1,3-丙二醇、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-（油酰基）石胆酸、苯恶嗪、叶酸、叶酸的衍生物、维生素 a、维生素 B7（biotin）、吡哆醛、熊果醇、三萜烯、软木三萜酮、表木栓醇衍生石胆酸中的一种化合物所形成的配基，或者香叶基氧基己基、十七烷基、二甲氧基三苯甲基、龙舌兰皂苷配基、薯蓣皂苷元或菠萝皂苷元。

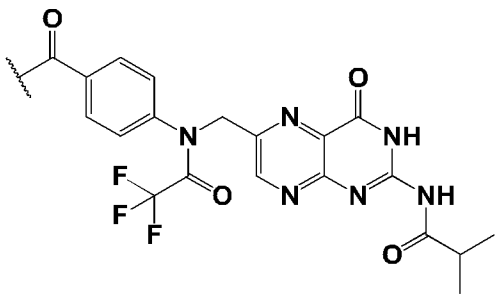
11、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，每个 S_1 独立地选自式 A71-A75 基团中的一种，其中，n3 选自 1-5 的整数。



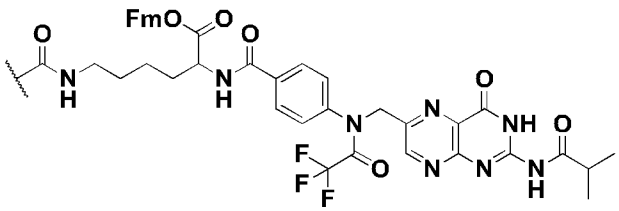
式（A71）



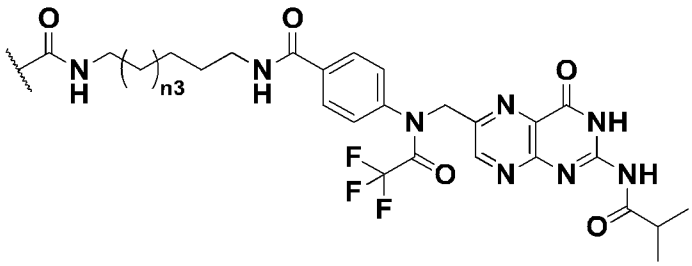
式（A72）



式（A73）

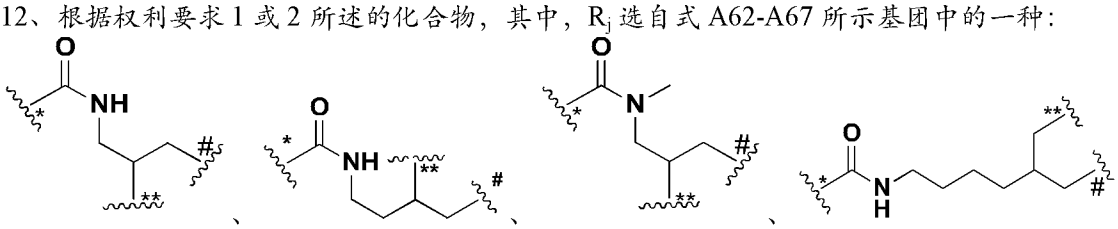


式（A74）

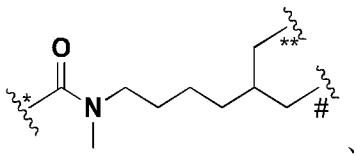


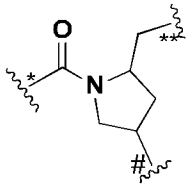
式（A75）

12、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，R_j 选自式 A62-A67 所示基团中的一种：



式（A62） 式（A63） 式（A64） 式（A65）

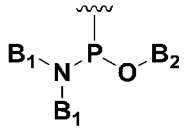




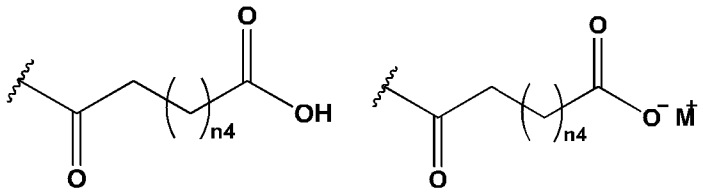
式（A66） 式（A67）。

13、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中，R_7 为包含亚磷酰胺、羧基或羧酸盐官能团的基团。

14、根据权利要求 13 所述的化合物，其中，R_7 具有式（A46）、式（C1）或式（C2）所示的结构，



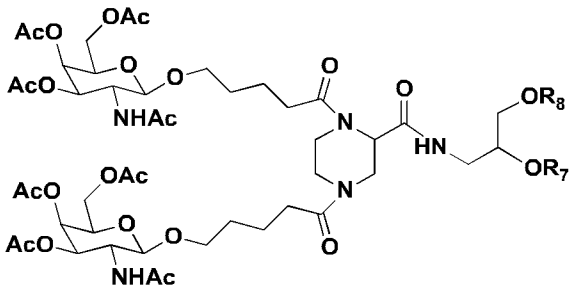
式（A46）



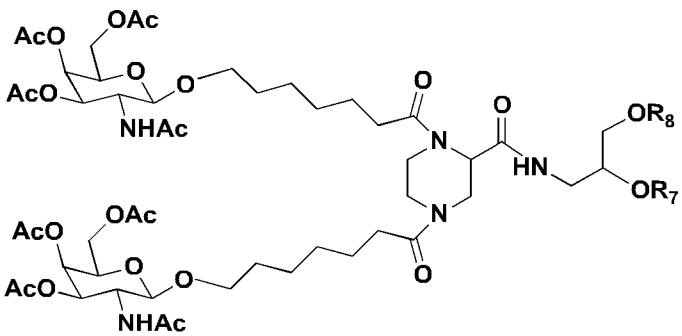
（C1） （C2）

其中，每个 B_1 相同或不同，选自取代或未取代的 C_1-C_5 烃基；B_2 选自 C_1-C_5 烷基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的一种；n4 为 1-4 的整数，M^+ 为阳离子，～～～表示基团共价连接的位点。

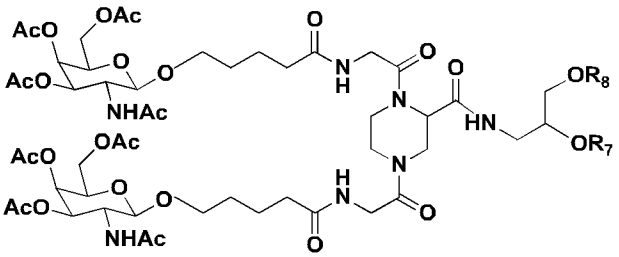
15、根据权利要求 1、2、13 或 14 所述的化合物，其中，该化合物具有式（403）-（408）中任意一个所示的结构。



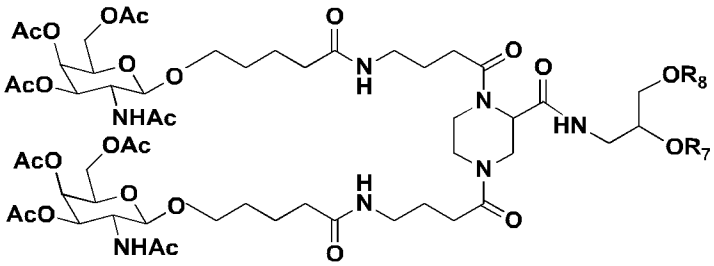
式（403）



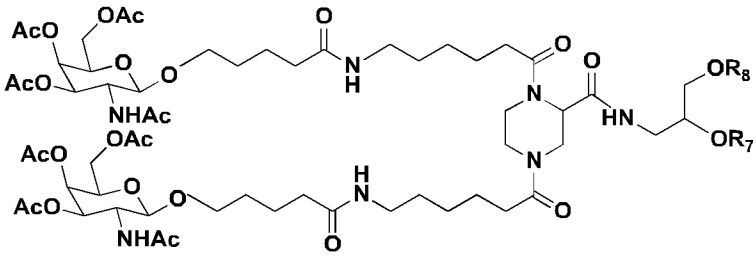
式（404）



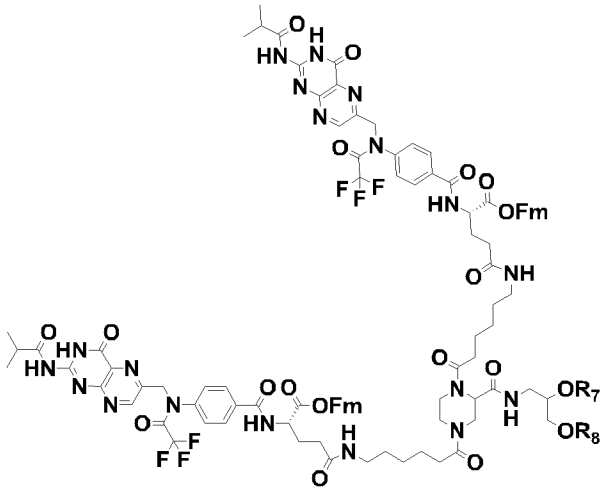
式（405）



式（406）

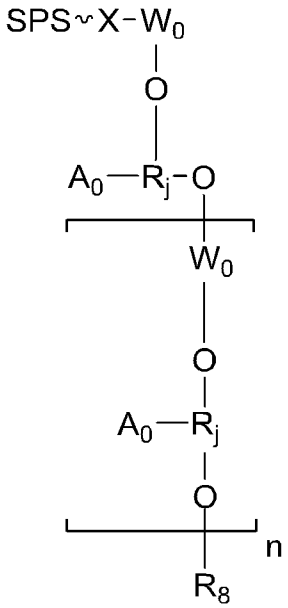


式（407），



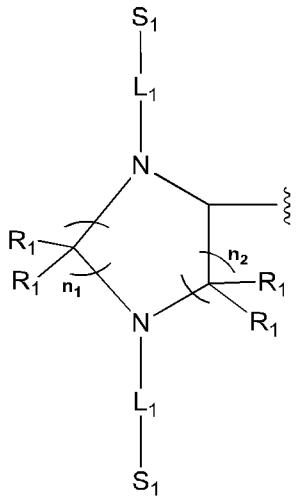
式（408）

16、一种化合物，该化合物具有式（111）所示的结构：



式（111）

其中，A_0 具有如式（312）所示的结构；



式（312）

式中，n_1 为 1-4 的整数，n_2 为 0-3 的整数；每个 R_1 各自独立地选自 H、取代或未取代的 C_1-C_4 烃基或卤素；

每个 L_1 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、C_2-C_{10} 亚烯基、C_2-C_{10} 亚炔基、C_6-C_{10} 亚芳基、C_3-C_{18} 亚杂环基和 C_5-C_{10} 亚杂芳基；并且其中，L_1 任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C_1-C_{10} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、C_5-C_{10} 杂芳基、C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC_1-C_{10} 烷基、-OC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-OH、-OC_1-C_{10} 卤代烷基、-SC_1-C_{10} 烷基、-SC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-SH、-SC_1-C_{10} 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH_2、-C_1-C_{10} 烷基-NH_2、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基苯基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO_2H、-C(O)O(C_1-C_{10} 烷基)、-CON(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-CONH(C_1-C_{10} 烷基)、-$CONH_2$，-NHC(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C_1-C_{10} 烷基、-C(O)C_1-C_{10} 烷基苯基、-C(O)C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC(O)C_1-C_{10} 烷基、-SO_2(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2(苯基)、-SO_2(C_1-C_{10} 卤代烷基)、-SO_2NH_2、-SO_2NH(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2NH(苯基)、-$NHSO_2$(C_1-C_{10} 烷基)、-$NHSO_2$(苯基)和-$NHSO_2$(C_1-C_{10} 卤代烷基)；

每个 S_1 独立地为 M_1，其中任何活性羟基和/或氨基，如果有的话，都被保护基团保护；

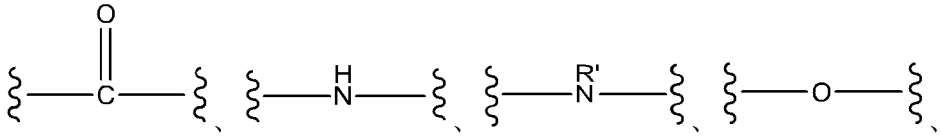
每个 M_1 独立地选自能够和细胞表面受体结合的配体；

W_0 为连接基团；

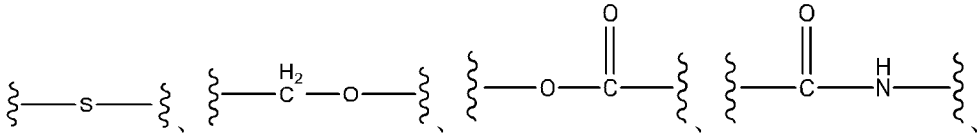
X 选自 O 或 NH；

R_j 为连接基团；SPS 表示固相载体；R_8 是羟基保护基团；n 为 0-7 的整数。

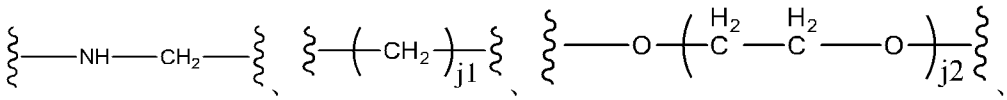
17、根据权利要求 16 所述的化合物，每个 L_1 独立地选自式 A1-A26 基团中的一种或多种的连接组合；



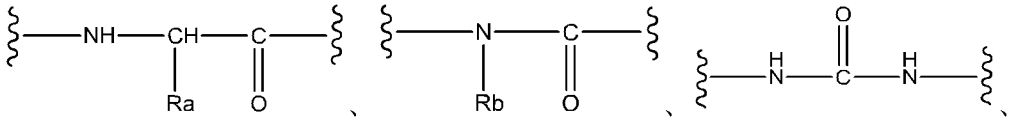
(A1) (A2) (A3) (A4)



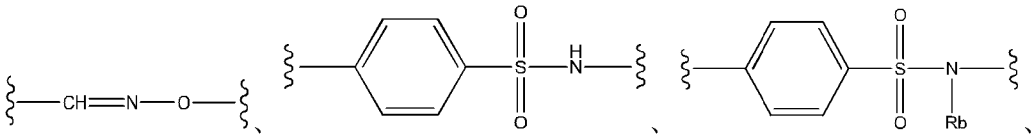
(A5) (A6) (A7) (A8)



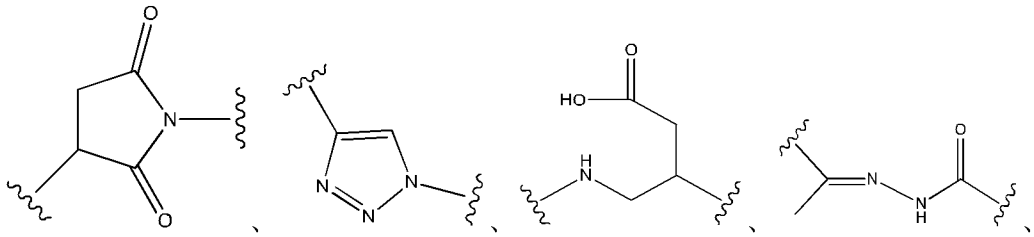
(A9) (A10) (A11)



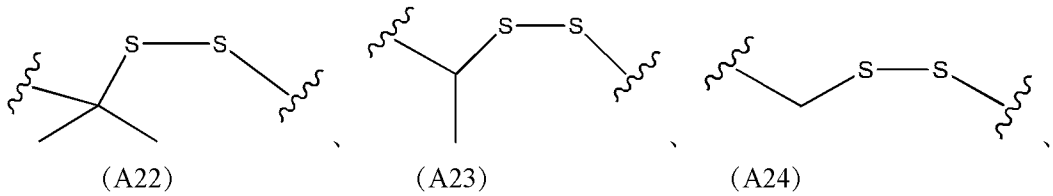
(A12) (A13) (A14)



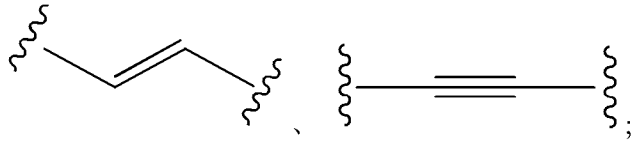
(A15) (A16) (A17)



(A18) (A19) (A20) (A21)

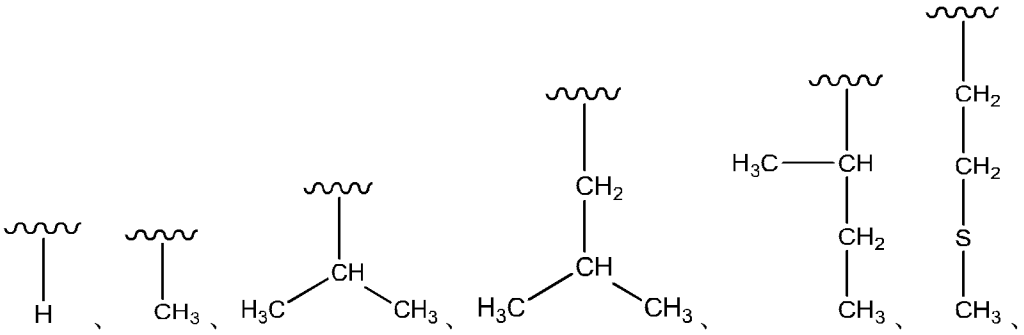


(A22) (A23) (A24)

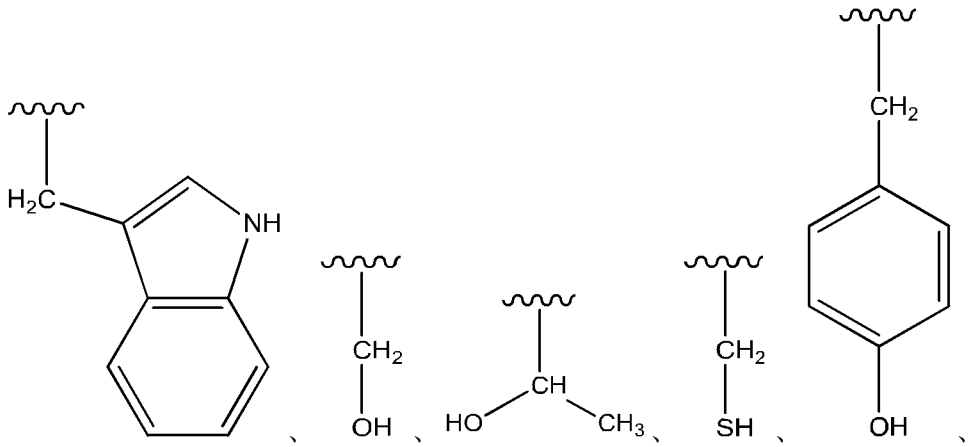


(A25) (A26)

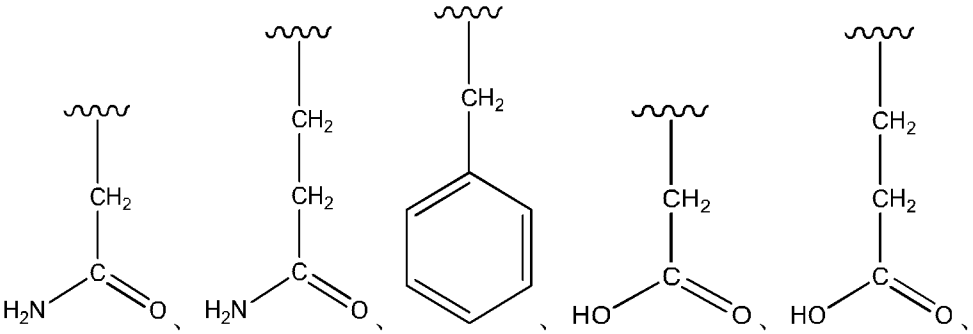
其中，j1 为 1-20 的整数；j2 为 1-20 的整数；R'为 C_1-C_{10} 烷基；Ra 选自式 A27-A45 基团中的一种；Rb 为 C_1-C_{10} 烷基；～～～表示基团共价连接的位点；



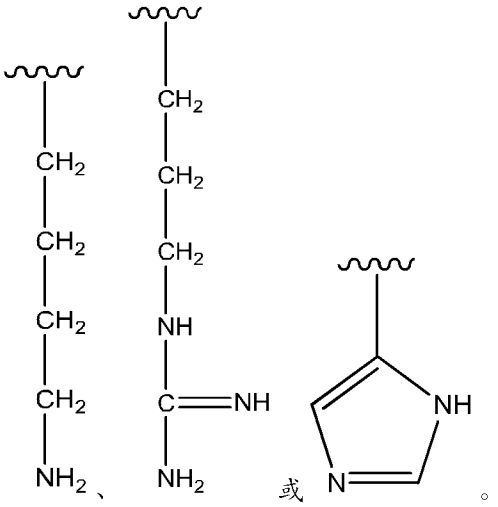
（A27） （A28） （A29） （A30） （A31） （A32）



（A33） （A34） （A35） （A36） （A37）



（A38） （A39） （A40） （A41） （A42）



（A43） （A44） （A45）

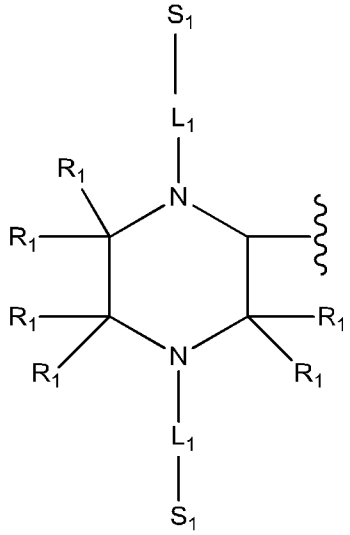
18、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，L_1 选自 A1、A2、A4、A5、A6、A8、A10、A11、

A13 中的一种或多种的连接组合。

19、根据权利要 16 或 17 所述的化合物，其中，L_1 的长度为 3-25 个原子，所述 L_1 的长度是指与 A 中的 N 原子连接的原子到与 M_1 连接的原子形成的最长的原子链上的成链原子的个数。

20、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，n_1 为 1 或 2，n_2 为 1 或 2。

21、根据权利要求 20 所述的化合物，其中，A_0 具有如式（120）所示的结构：

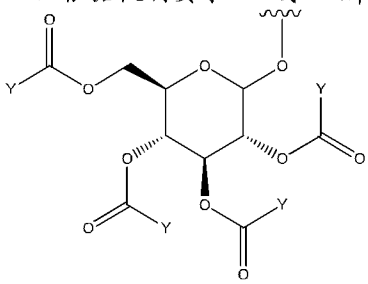


式（120）。

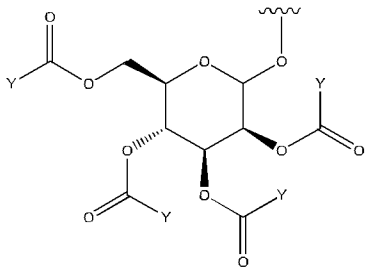
22、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，每个 M_1 独立地选自亲脂类分子、糖类、维生素、多肽、内吞体裂解物质、类固醇化合物、萜烯化合物、整合素受体抑制剂和阳离子脂质分子中的分子或衍生物形成的配基中的一种。

23、根据权利要求 22 所述的化合物，其中，每个 M_1 独立地选自 D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种。

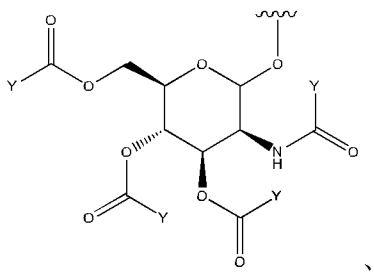
24、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，每个 S_1 独立地选自式 A51-A59 基团中的一种：



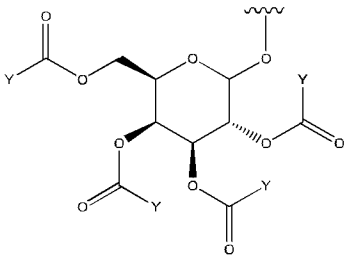
（A51）、



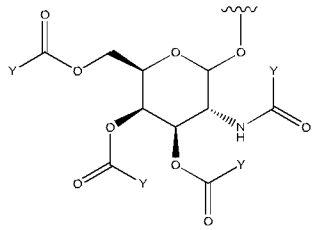
（A52）、



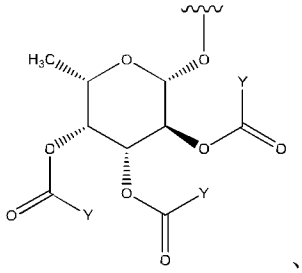
（A53）、



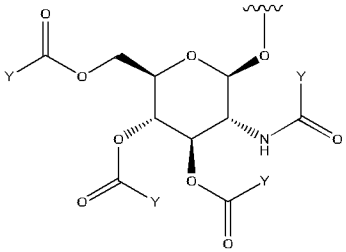
(A54)、



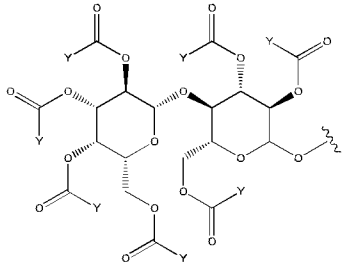
(A55)、



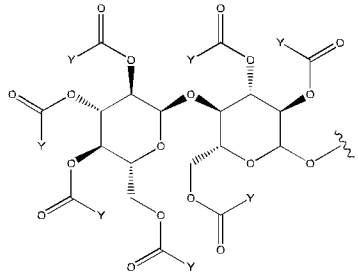
(A56)、



(A57)、



(A58)、

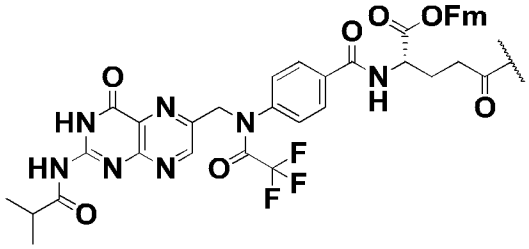


(A59)

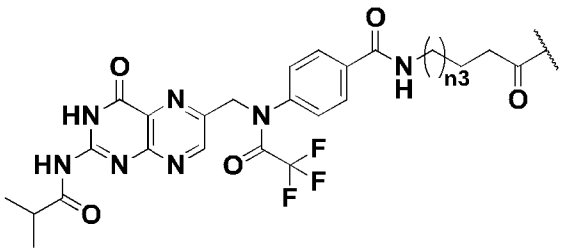
其中，每个 Y 独立地选自甲基、三氟甲基、二氟甲基、一氟甲基、三氯甲基、二氯甲基、一氯甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基、卤代苯基以及烷基苯基中的一种。

25、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，每个 M_1 独立地选自以下基团中的一种：胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O（十六 烷基）甘油（1,3,-Bis-O(hexadecyl)glycerol)、香叶基氧基己基、六甘油、薄荷醇、薄荷脑、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-（油酰基）石胆酸、二甲氧基三苯甲基、苯恶嗪、叶酸、叶酸的衍生物、维生素 a、维生素 B7（biotin）生物素、吡哆醛、熊果醇、龙舌兰皂苷配基、薯蓣皂苷元、三萜烯、萨洒皂草配基、软木三萜酮、表木栓醇衍生石胆酸中的一种化合物所形成的的配基，或者香叶基氧基己基、十七烷基、二甲氧基三苯甲基、龙舌兰皂苷配基、薯蓣皂苷元或菝葜皂苷元。

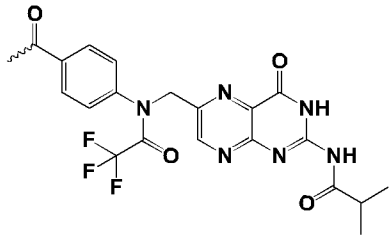
26、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，每个 S_1 独立地选自式 A71-A75 所示基团中的一种：



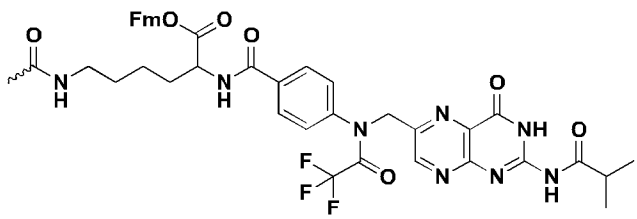
式（A71）



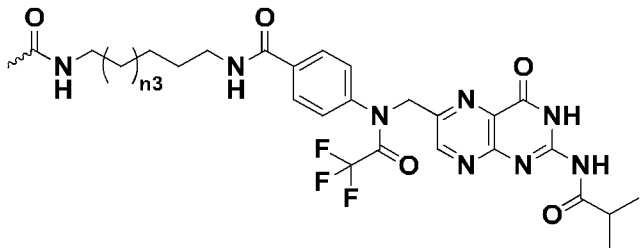
式（A72）



式（A73）



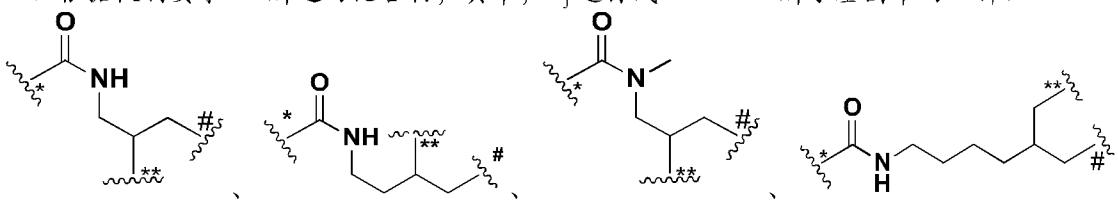
式（A74）



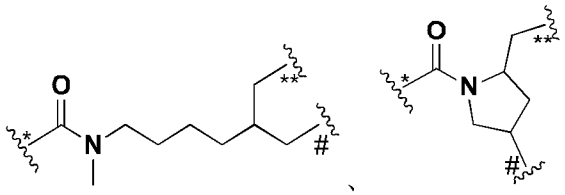
式（A75）

其中，n3 选自 1-5 的整数，～～～表示基团共价连接的位点。

27、根据权利要求 31 所述的化合物，其中，R_j 选自式 A62-A67 所示基团中的一种：

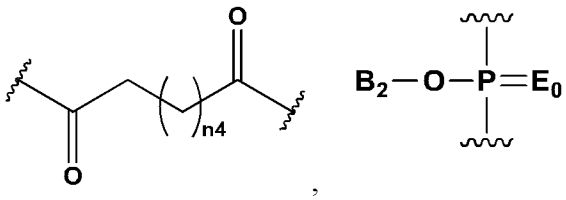


式（A62） 式（A63） 式（A64） 式（A65）



式（A66） 式（A67）。

28、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，每个 W_0 独立地具有如式（C1'）或式（A81）所示的结构：

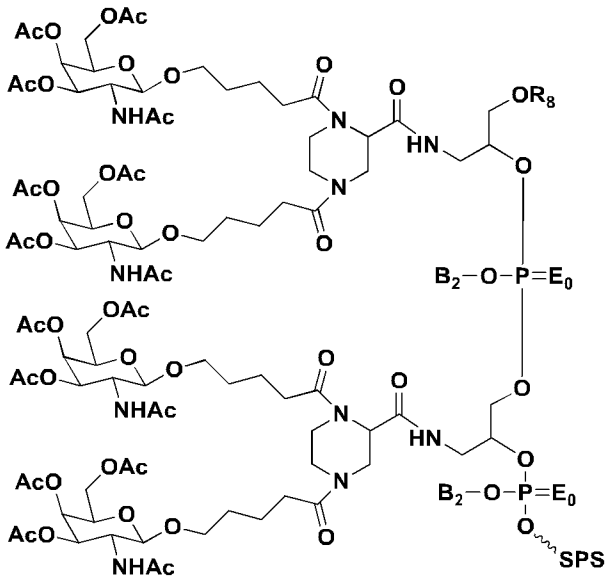


式(C1') 式(A81)

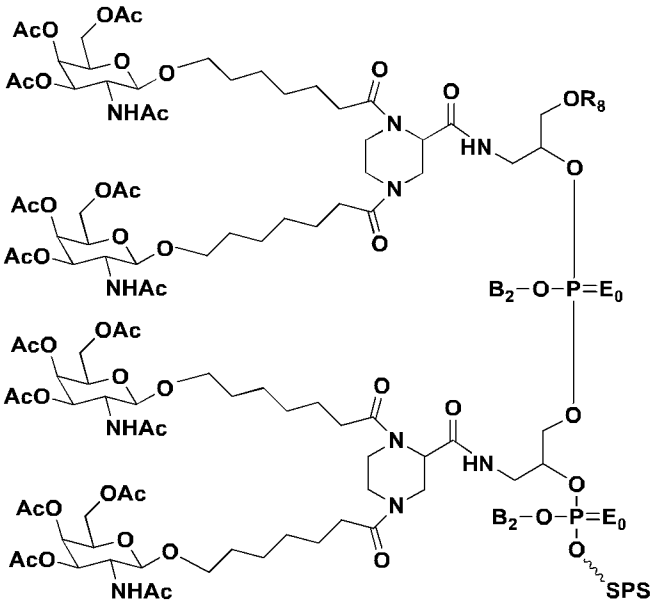
其中，n4 为 1-4 的整数，每个 E_0 独立地为 O、S 或 BH，每个 B_2 独立地选自 C_1-C_5 烷基、乙氰基、丙氰基和丁氰基，～～～表示基团连接的位点。

29、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，n 为 1-4 的整数。

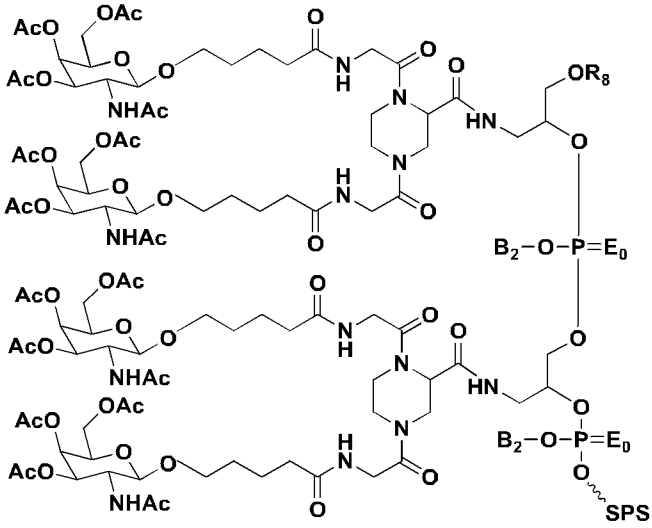
30、根据权利要求 16 或 17 所述的化合物，其中，该化合物具有式（503）-（510）中任意一个所示的结构。



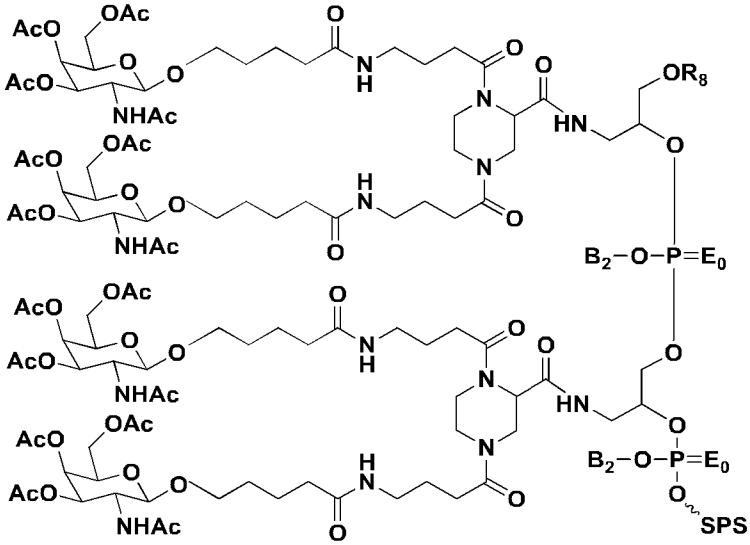
式（503）



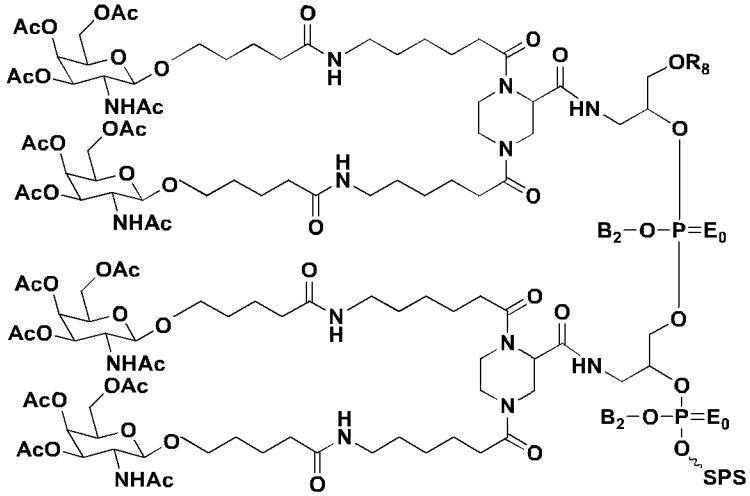
式（504）



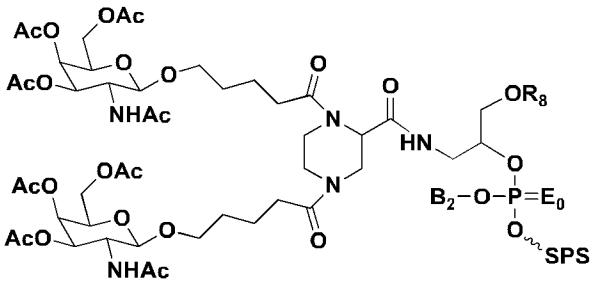
式（505）



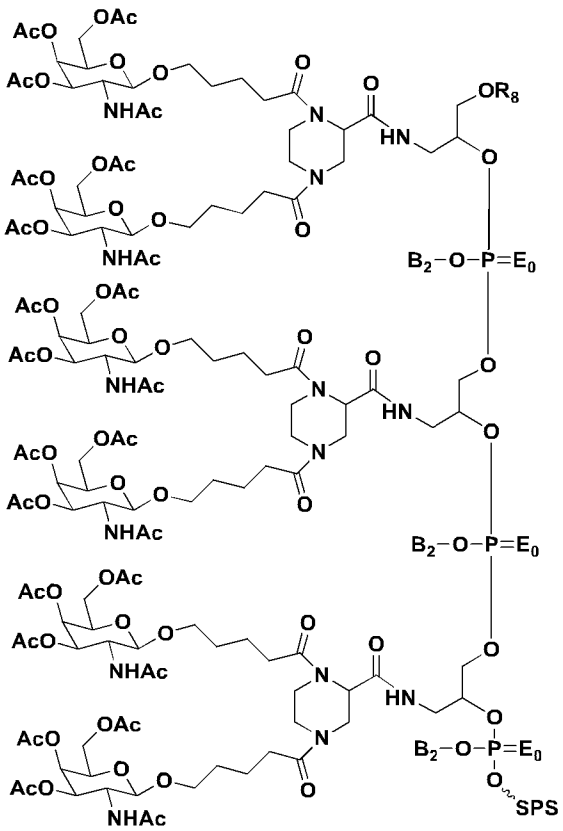
式（506）



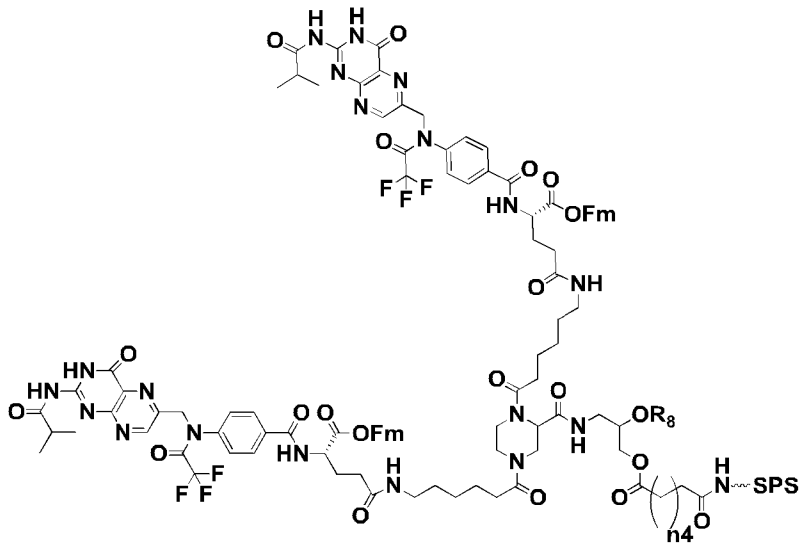
式（507）



式（508）



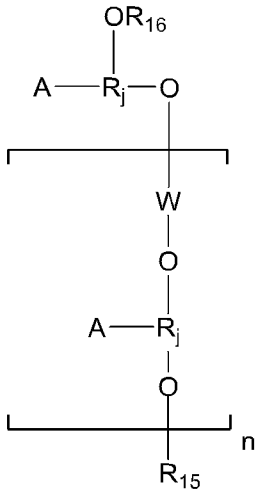
式（509），



式（510）

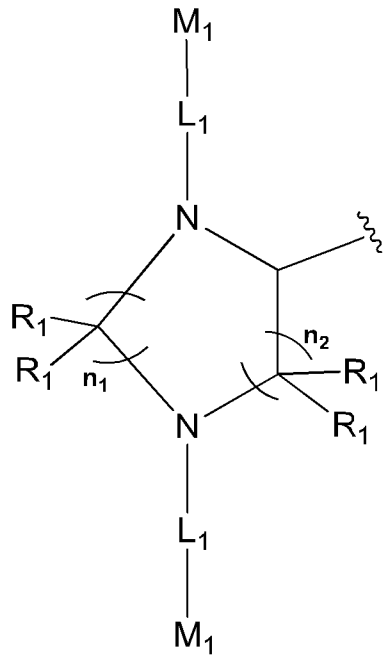
其中，n4 为 1-4 的整数，每个 B_2 独立地选自 C_1-C_5 烷基、乙氧基、丙氧基和丁氧基中的一种，每个 E_0 独立地为 O、S 或 BH，SPS 表示固相载体。

31、一种药物缀合物，该药物缀合物具有式（301）所示的结构：



式（301）

其中，A 具有如式（302）所示的结构：



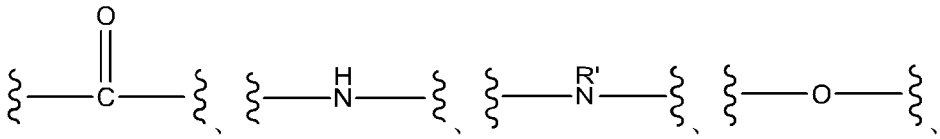
式（302）

n_1 为 1-4 的整数，n_2 为 0-3 的整数，n 为 0-7 的整数；每个 R_1 各自独立地选自 H、取代或未取代的 C_1-C_4 烃基或卤素；

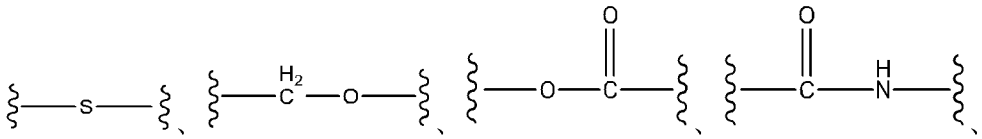
每个 L_1 是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，其中一个或多个碳原子任选地被选自于以下基团所组成的组中的任何一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、$S(O)_2$、C_2-C_{10} 亚烯基、C_2-C_{10} 亚炔基、C_6-C_{10} 亚芳基、C_3-C_{18} 亚杂环基和 C_5-C_{10} 亚杂芳基；并且其中，L_1 任选地具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C_1-C_{10} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、C_5-C_{10} 杂芳基、C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC_1-C_{10} 烷基、-OC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-OH、-OC_1-C_{10} 卤代烷基、-SC_1-C_{10} 烷基、-SC_1-C_{10} 烷基苯基、-C_1-C_{10} 烷基-SH、-SC_1-C_{10} 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH_2、-C_1-C_{10} 烷基-NH_2、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基苯基)、-NH(C_1-C_{10} 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO_2H、-C(O)O(C_1-C_{10} 烷基)、-CON(C_1-C_{10} 烷基)(C_1-C_{10} 烷基)、-CONH(C_1-C_{10} 烷基)、-$CONH_2$，-NHC(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(C_1-C_{10} 烷基)、-N(C_1-C_{10} 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C_1-C_{10} 烷基、-C(O)C_1-C_{10} 烷基苯基、-C(O)C_1-C_{10} 卤代烷基、-OC(O)C_1-C_{10} 烷基、-SO_2(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2(苯基)、-SO_2(C_1-C_{10} 卤代烷基)、-SO_2NH_2、-SO_2NH(C_1-C_{10} 烷基)、-SO_2NH(苯基)、-$NHSO_2$(C_1-C_{10} 烷基)、-$NHSO_2$(苯基)和-$NHSO_2$(C_1-C_{10} 卤代烷基）；〰 表示基团共价连接的位点；每个 M_1 独立地选自能够和细胞表面受体结合的配体；R_j 为连接基团；R_{16} 和 R_{15} 各自为 H 或活性药物基团，并且 R_{16} 和 R_{15} 中的至少一个为活性药物基团；W 为连接基团。

32、根据权利要求 31 所述的药物缀合物，其中，每个 L_1 独立地选自式 A1-A26 基团中的一种或多种

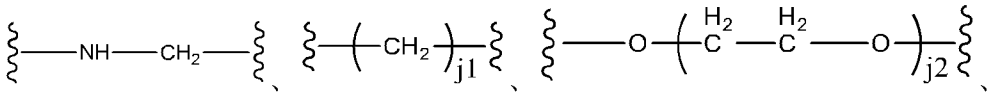
的连接组合；其中，Rb 为 C_1-C_{10} 烷基；j1 为 1-20 的整数；j2 为 1-20 的整数；R'为 C_1-C_{10} 烷基；Ra 选自式 A27-A45 基团中的一种；



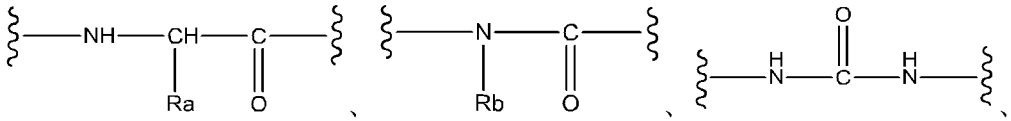
(A1) (A2) (A3) (A4)



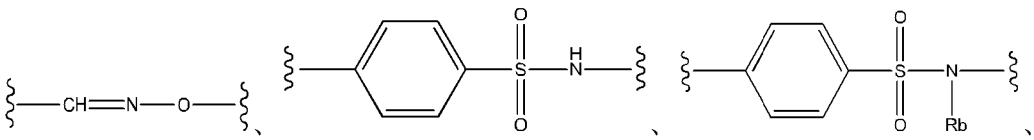
(A5) (A6) (A7) (A8)



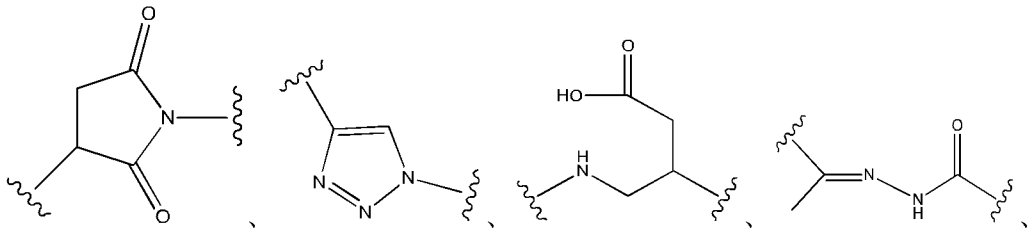
(A9) (A10) (A11)



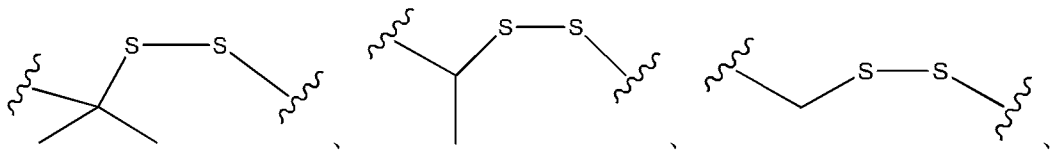
(A12) (A13) (A14)



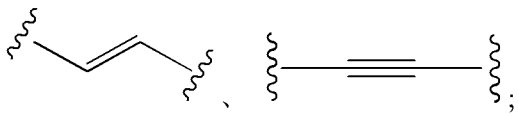
(A15) (A16) (A17)



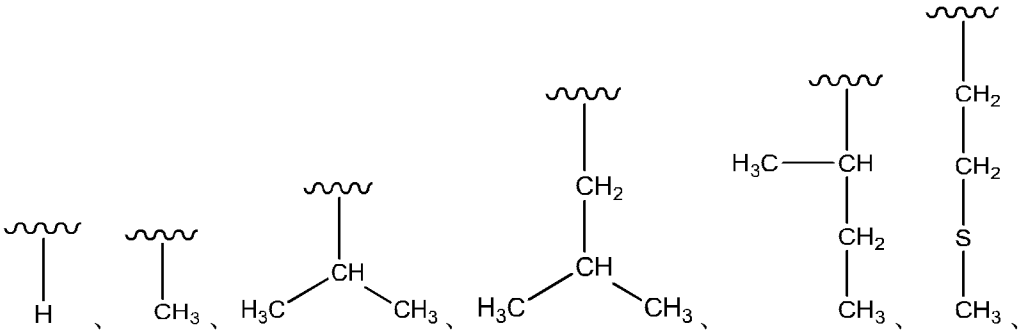
(A18) (A19) (A20) (A21)



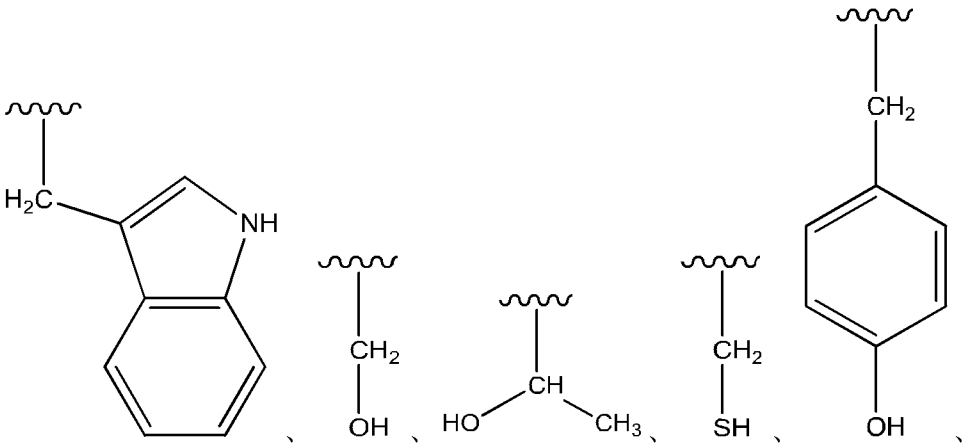
(A22) (A23) (A24)



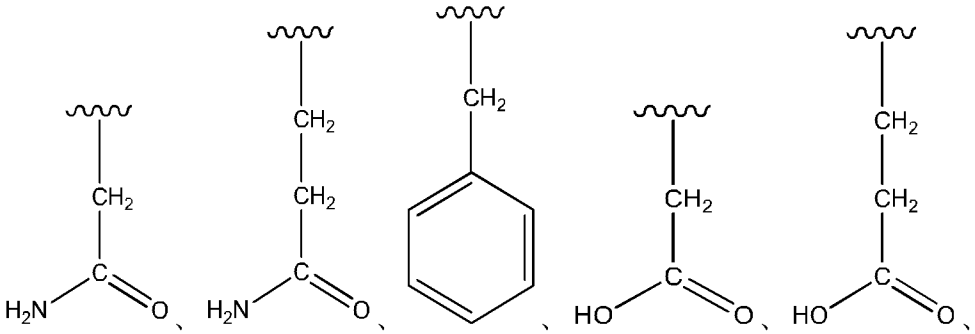
(A25) (A26);



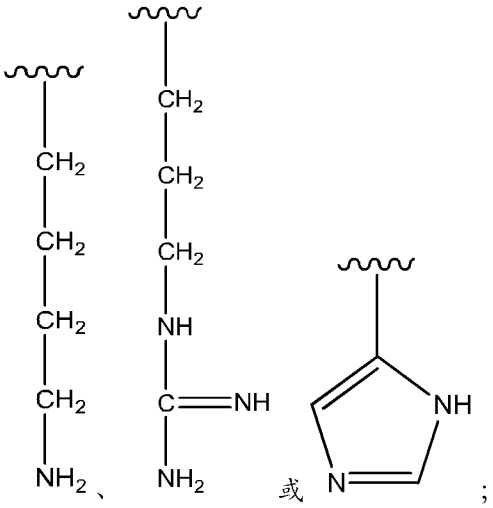
（A27） （A28） （A29） （A30） （A31） （A32）



（A33） （A34） （A35） （A36） （A37）



（A38） （A39） （A40） （A41） （A42）



（A43） （A44） （A45）

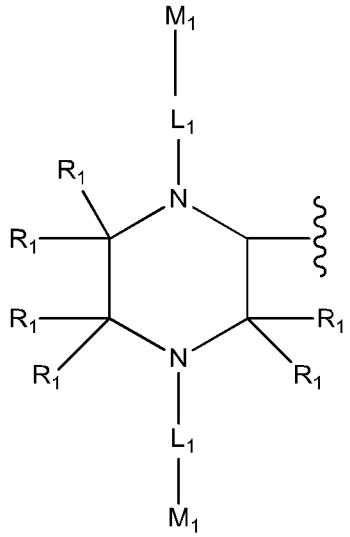
33、根据权利要求 32 所述的药物缀合物，其中，L_1 选自 A1、A2、A4、A5、A6、A8、A10、A11、

A13 中的一种或多种的连接组合。

34、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中，L_1 的长度为 3-25 个原子，所述 L_1 的长度是指与 A 中的 N 原子连接的原子到与 M_1 连接的原子形成的最长的原子链上的成链原子的个数。

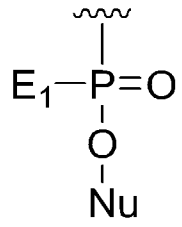
35、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中，n_1 为 1 或 2，n_2 为 1 或 2。

36、根据权利要求 35 所述的药物缀合物，其中，A 的结构如式（320）所示：



式（320）。

37、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，该药物缀合物为寡核苷酸缀合物，其中，所述活性药物基团具有式 A60 所示的结构；其中，E_1 为 OH、SH 或 BH_2，～～～表示基团连接的位点，Nu 为功能性寡核苷酸。



式（A60）

38、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中，每个 M_1 独立地选自亲脂类分子、糖类、维生素、多肽、内涵体裂解物质、类固醇化合物、萜烯化合物、整合素受体抑制剂和阳离子脂质分子中的分子或衍生物形成的配体中的一种。

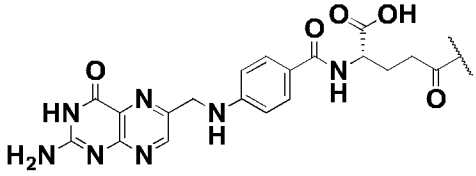
39、根据权利要求 38 所述的药物缀合物，其中，每个 M_1 独立地选自 D-吡喃甘露糖、L-吡喃甘露糖、D-阿拉伯糖、D-呋喃木糖、L-呋喃木糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-半乳糖、L-半乳糖、α-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃甘露糖、α-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃葡萄糖、α-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃果糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃半乳糖、α-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃半乳糖、葡糖胺、唾液酸、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、N-三氟乙酰基半乳糖胺、N-丙酰基半乳糖胺、N-正丁酰基半乳糖胺、N-异丁酰基半乳糖胺、2-氨基-3-O-[(R)-1-羧乙基]-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖、2-脱氧-2-甲基氨基-L-吡喃葡萄糖、4,6-二脱氧-4-甲酰胺基-2,3-二-O-甲基-D-吡喃甘露糖、2-脱氧-2-磺氨基-D-吡喃葡萄糖、N-乙醇酰基-α-神经氨酸、5-硫代-β-D-吡喃葡萄糖、2,3,4-三-O-乙酰基-1-硫代-6-O-三苯甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷甲酯、4-硫代-β-D-吡喃半乳糖、3,4,6,7-四-O-乙酰基-2-脱氧-1,5-二硫代-α-D-吡喃葡庚糖苷乙酯、2,5-脱水-D-阿洛糖腈、核糖、D-核糖、D-4-硫代核糖、L-核糖、L-4-硫代核糖中的一种。

40、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中，每个 M_1 独立地选自以下基团中的一种：由胆固醇、胆酸、金刚烷乙酸、1-芘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O（十六烷基）甘油（1,3,-Bis-O(hexadecyl)glycerol）、六甘油、薄荷醇、薄荷脑、1,3-丙二醇、棕榈酸、肉豆蔻酸、O3-（油酰基）石胆酸、苯恶嗪、叶酸、叶酸的衍生物、维生素 a、维生素 B7（biotin）、吡哆醛、熊果醇、三萜烯、软木三萜酮或表木栓醇衍生石胆酸形成的配基；或者香叶基氧基己基、十七烷基、二甲氧基三苯甲基、龙舌兰皂苷配基、薯蓣皂苷元或菝葜皂苷元。

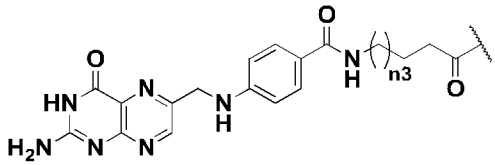
41、根据权利要求 40 所述的化合物，其中，每个 M_1 均独立地为由以下化合物中的一种形成的配基：

叶酸、叶酸类似物或叶酸模拟物。

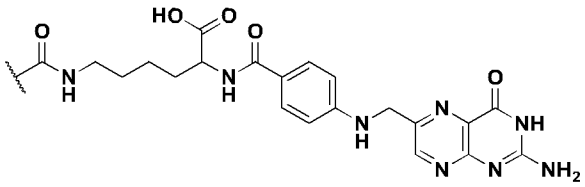
42、根据权利要求 41 所述的药物缀合物，其中，每个 M_1 独立地选自式 H1-H5 基团中的一种：



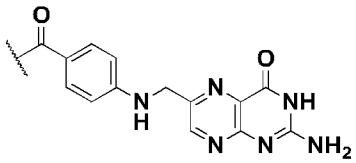
式（H1）



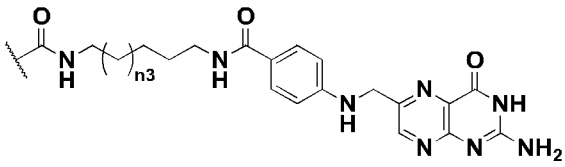
式（H2）



式（H3）



式（H4）

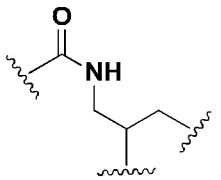


式（H5）

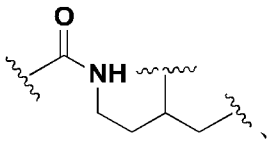
其中，n3 选自 1-5 的整数，～～～表示基团共价连接的位点。

43、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中，n 为 0-4 的整数。

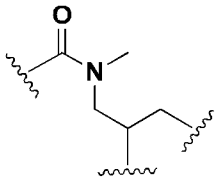
44、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中 R_j 选自式 A62-A67 所示基团中的一种：



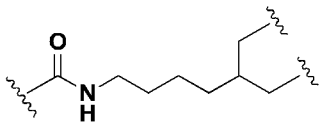
式（A62）



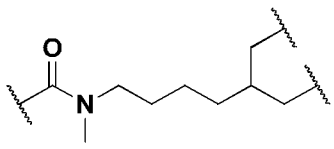
式（A63）



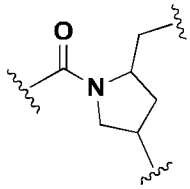
式（A64）



式（A65）

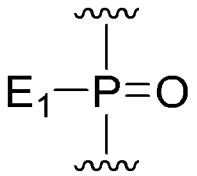


式（A66）

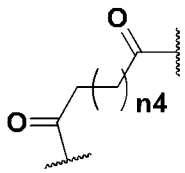


式（A67）。

45、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中，W 为式（A61）或式（C1'）所示的基团：



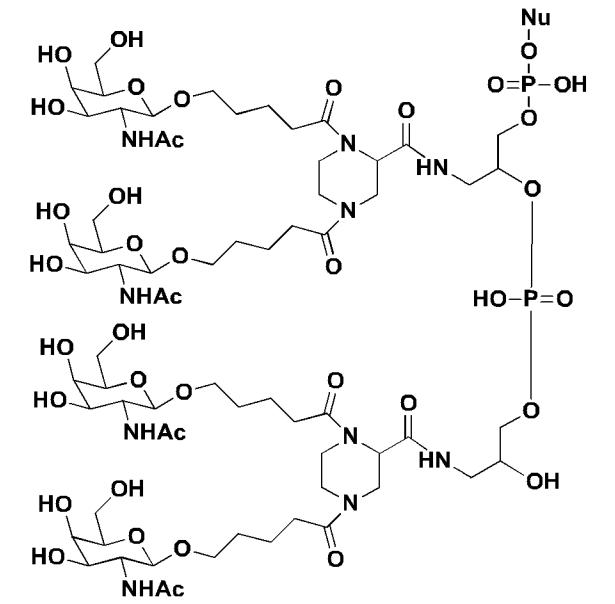
式（A61）



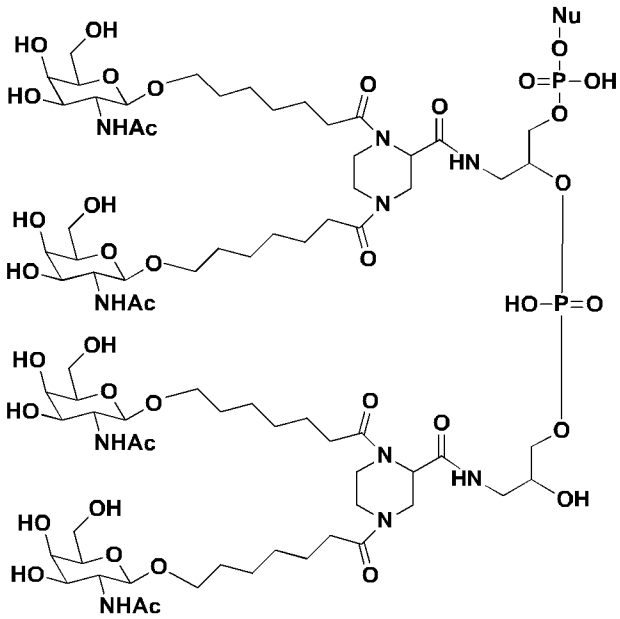
式（C1'）

其中，E_1 为 OH、SH 或 BH_2，n4 选自 1-4 的整数，

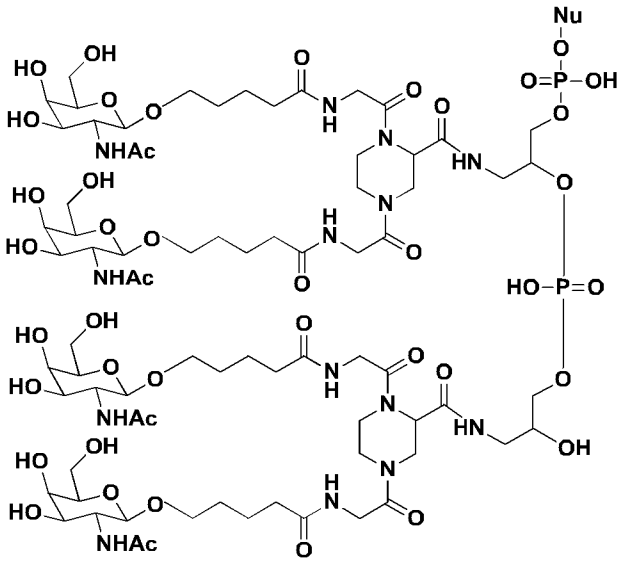
46、根据权利要求 31 或 32 所述的药物缀合物，其中，该缀合物具有式（303）、（304）、（305）、（306）、（307）、（308）、（309）、式（310）或式（311）所示的结构：



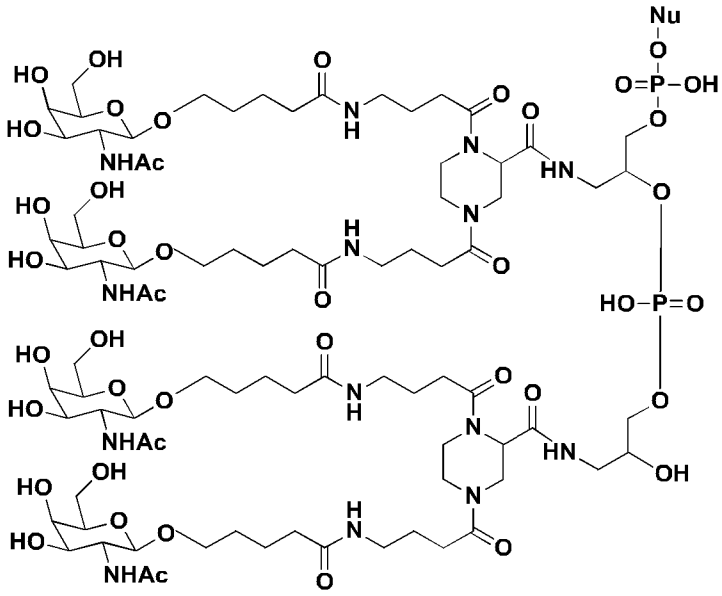
式（303）



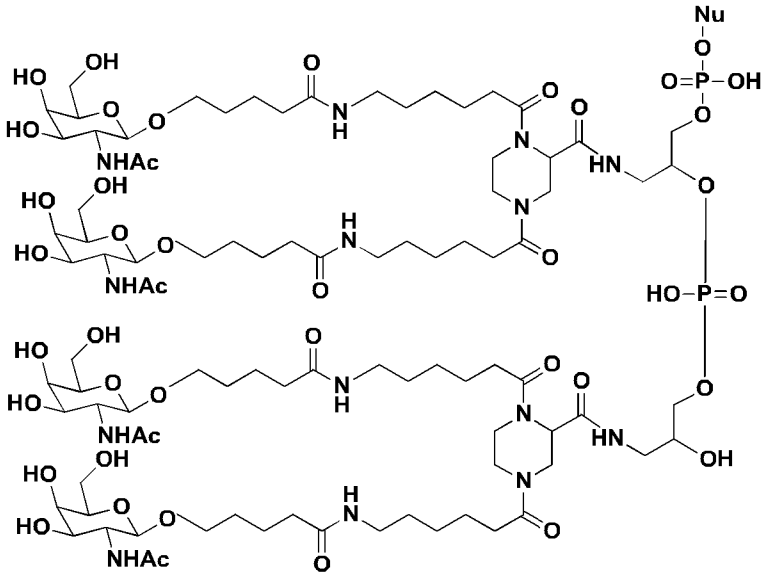
式（304）



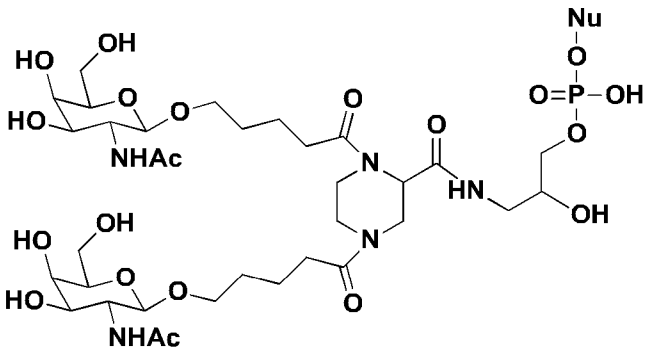
式（305）



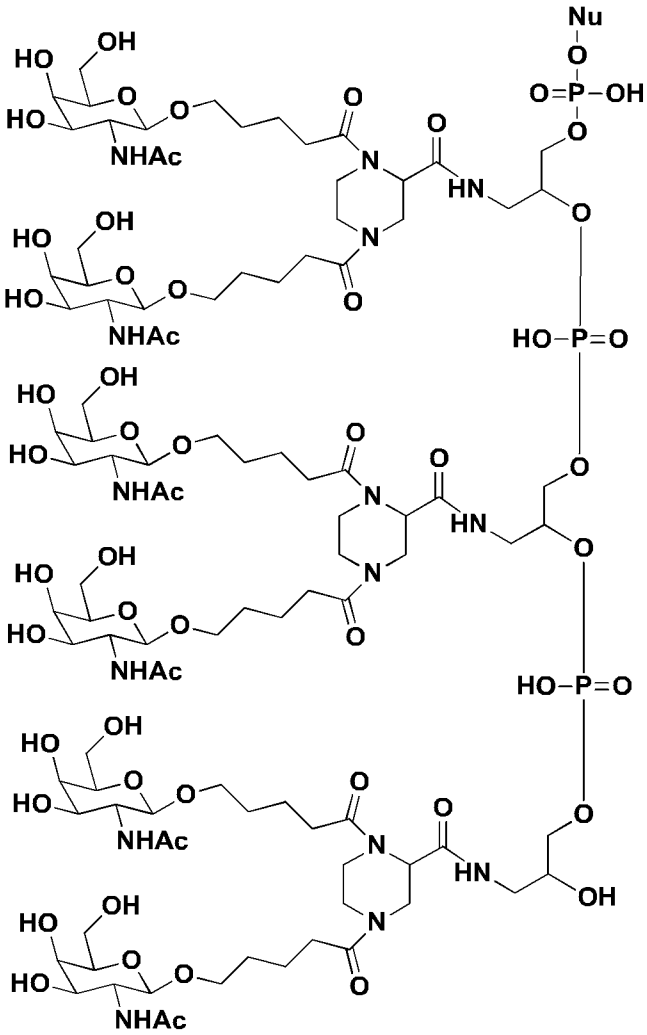
式（306）



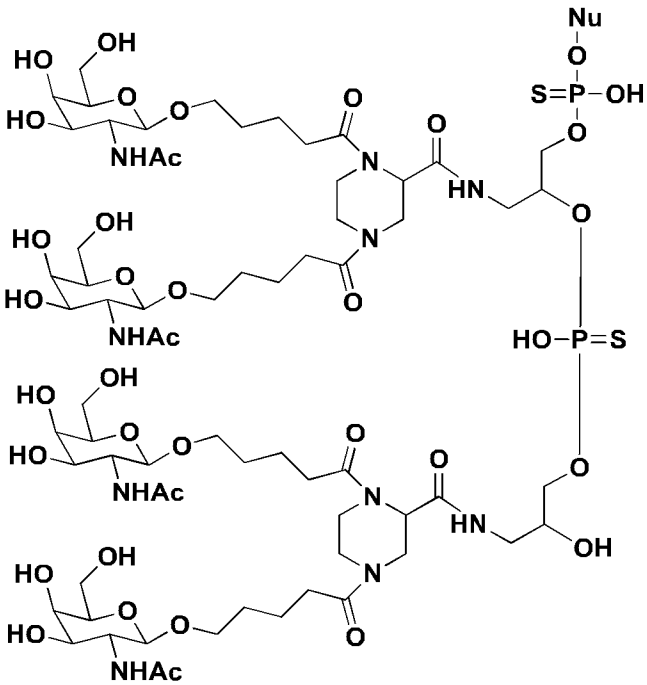
式（307）



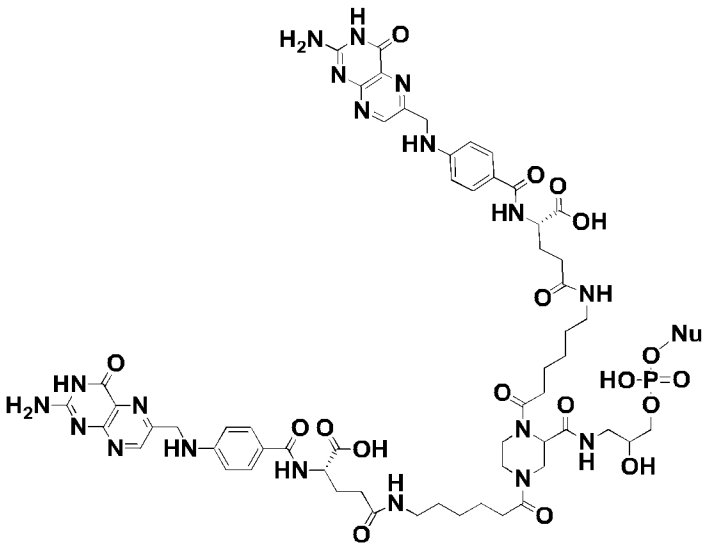
式（308）



式（309）



式（310）



式（311）

式中，Nu 表示功能性寡核苷酸。

47、根据权利要求 37 或 46 所述的药物缀合物，其中，所述功能性寡核苷酸选自小干扰 RNA、微小 RNA、抗微小 RNA、微小 RNA 拮抗剂、微小 RNA 模拟物、诱饵寡核苷酸、免疫刺激物、G-四极子、可变剪接体、单链 RNA、反义核酸、核酸适配体、茎环 RNA、mRNA 片段、激活 RNA 或 DNA 中的一种。

48、根据权利要求 47 所述的药物缀合物，其中，所述功能性寡核苷酸为单链寡核苷酸或者双链寡核苷酸。

49、根据权利要 48 所述的药物缀合物，其中，所述功能性寡核苷酸为 siRNA。

50、根据权利要求 49 所述的药物缀合物，其中，所述 siRNA 中的每个核苷酸各自独立地为修饰或未修饰的核苷酸，所述 siRNA 含有正义链和反义链，其中，所述正义链包含核苷酸序列 1，所述反义链包含核苷酸序列 2，所述核苷酸序列 1 和所述核苷酸序列 2 的长度均为 19 个核苷酸，并且至少部分地反向互补形成双链区，所述核苷酸序列 2 与第一段核苷酸序列至少部分互补，所述第一段核苷酸序列为靶 mRNA 中的一段核苷酸序列，所述靶 mRNA 是指在细胞中异常表达的基因对应的 mRNA。

51、根据权利要求 50 所述的药物缀合物，其中，所述细胞为肝细胞、肺部细胞或肿瘤细胞。

52、根据权利要求 50 所述的药物缀合物，其中，所述靶 mRNA 选自以下基因对应的 mRNA 中的一种：ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV。

53、权利要求 31-52 中任意一项所述的药物缀合物在制备用于治疗和/或预防由细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的药物中的用途。

54、根据权利要求 53 所述的用途，其中，所述基因选自乙型肝炎病毒基因、血管生成素样蛋白 3 基因、载脂蛋白 C3 基因或者信号转导及转录激活蛋白 3 基因。

55、根据权利要求 53 所述的用途，其中，所述疾病选自慢性肝病、肝炎、肝纤维化疾病、肝增生性疾病、血脂异常或肿瘤导致的疾病。

56、一种治疗由细胞中基因的表达而引起的病理状况或疾病的方法，该方法包括向患有该疾病的患者给予权利要求 31-52 中任意一项所述的药物缀合物。

57、根据权利要求 56 所述的方法，其中，所述基因选自乙型肝炎病毒基因、血管生成素样蛋白 3 基因、载脂蛋白 C3 基因或者信号转导及转录激活蛋白 3 基因。

58、根据权利要求 56 所述的方法，其中，所述疾病选自慢性肝病、肝炎、肝纤维化疾病、肝增生性疾病、血脂异常导致的疾病或肿瘤。

59、一种调控细胞中基因表达的方法，其中，所述调控包括抑制所述基因表达或者增强所述基因表达，所述方法包括将权利要求 31-52 中任意一个所述的药物缀合物与所述细胞接触。

60、根据权利要求 59 所述的方法，其中，所述基因选自以下基因中的一种：ApoB、ApoC、ANGPTL3、PCSK9、SCD1、TIMP-1、Col1A1、FVII、STAT3、p53、HBV、HCV。

61、一种试剂盒，该试剂盒包含权利要求 31-52 中任意一项所述的药物缀合物。

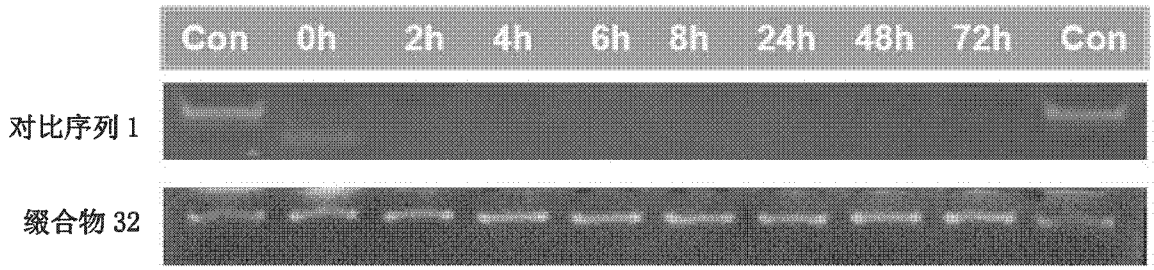

Con
0h
2h
4h
6h
8h
24h
48h
72h
Con
对比序列 1
缀合物 32

图 1

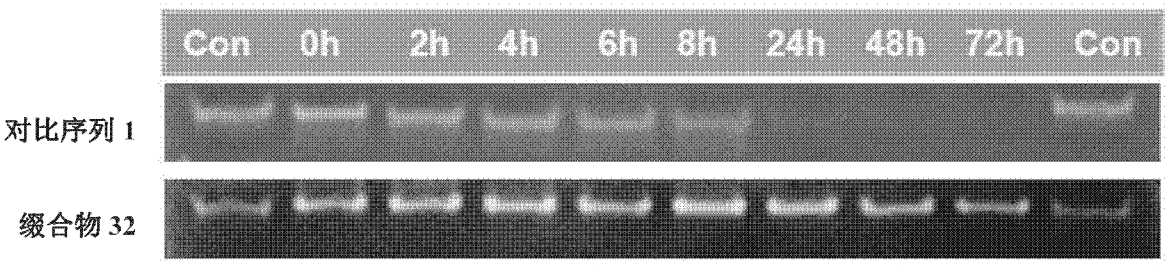

Con
0h
2h
4h
6h
8h
24h
48h
72h
Con
对比序列 1
缀合物 32

图 2

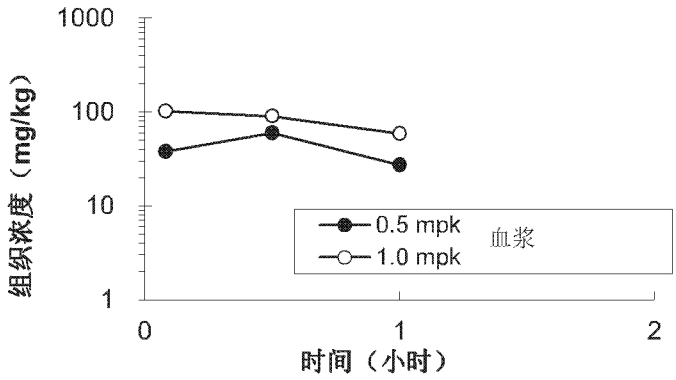

1000
100
10
1
组织浓度（mg/kg）
0
1
2
时间（小时）
0.5 mpk
1.0 mpk
血浆

图 3

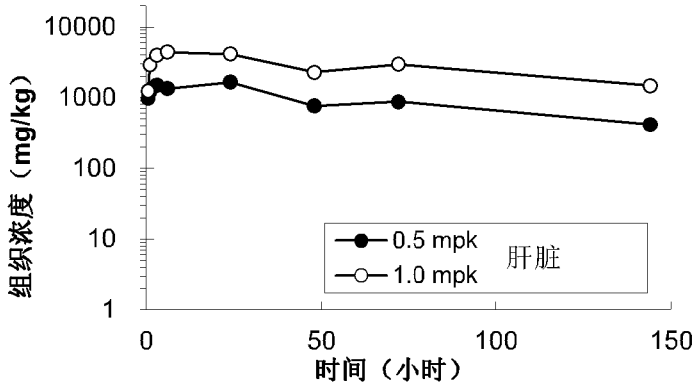

10000
1000
100
10
1
组织浓度（mg/kg）
0.5 mpk
1.0 mpk
肝脏
0
50
100
150
时间（小时）

图 4

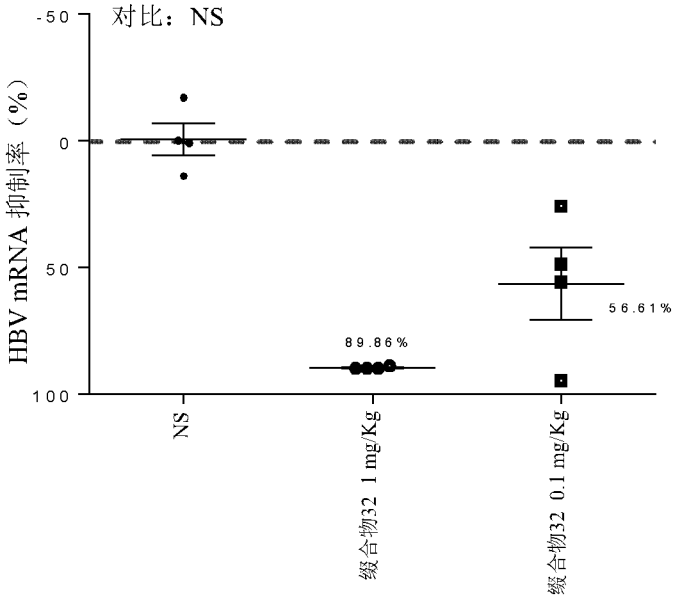

-50
对比：NS
0
50
100
HBV mRNA 抑制率（%）
89.86%
56.61%
NS
缀合物32 1 mg/Kg
缀合物32 0.1 mg/Kg

图 5

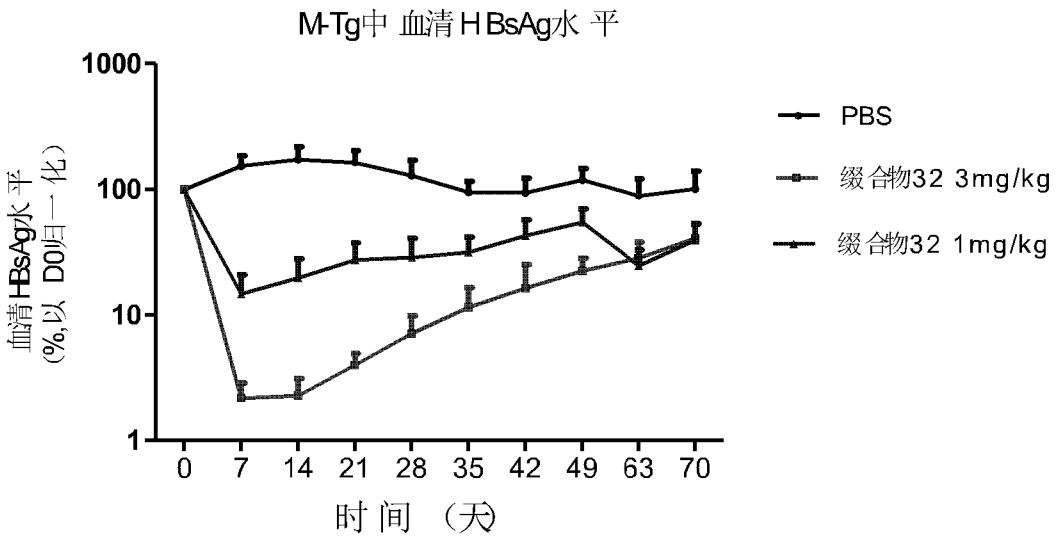

M-Tg中 血清 HBsAg水 平
血清HBsAg水 平
(%,以 D0归一化)
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
35
42
49
63
70
时 间 （天）
PBS
缀合物32 3mg/kg
缀合物32 1mg/kg

图 6

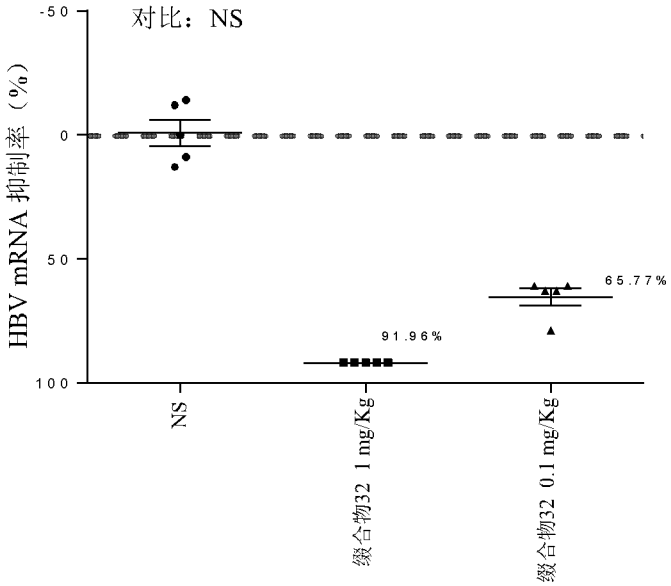

对比：NS
HBV mRNA 抑制率（%）
-50
0
50
100
91.96%
65.77%
NS
缀合物32 1 mg/Kg
缀合物32 0.1 mg/Kg

图 7A

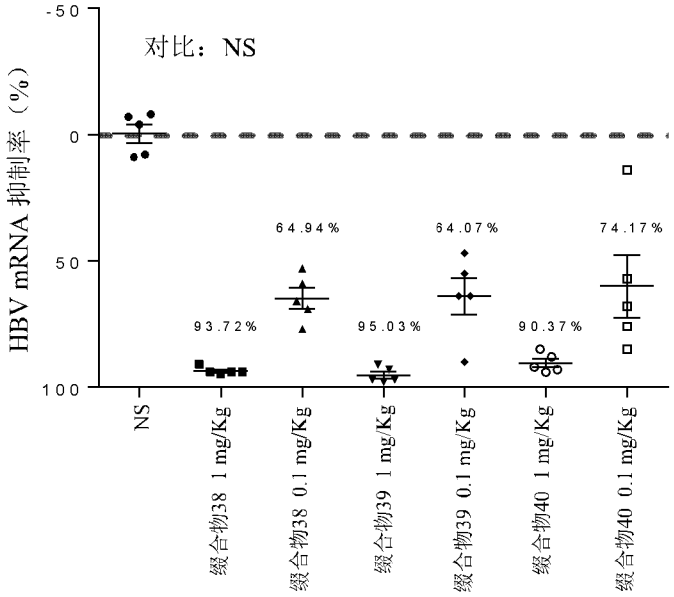

-50
0
50
100
HBV mRNA 抑制率（%）
对比：NS
93.72%
64.94%
95.03%
64.07%
90.37%
74.17%
NS
缀合物38 1 mg/Kg
缀合物38 0.1 mg/Kg
缀合物39 1 mg/Kg
缀合物39 0.1 mg/Kg
缀合物40 1 mg/Kg
缀合物40 0.1 mg/Kg

图 7B

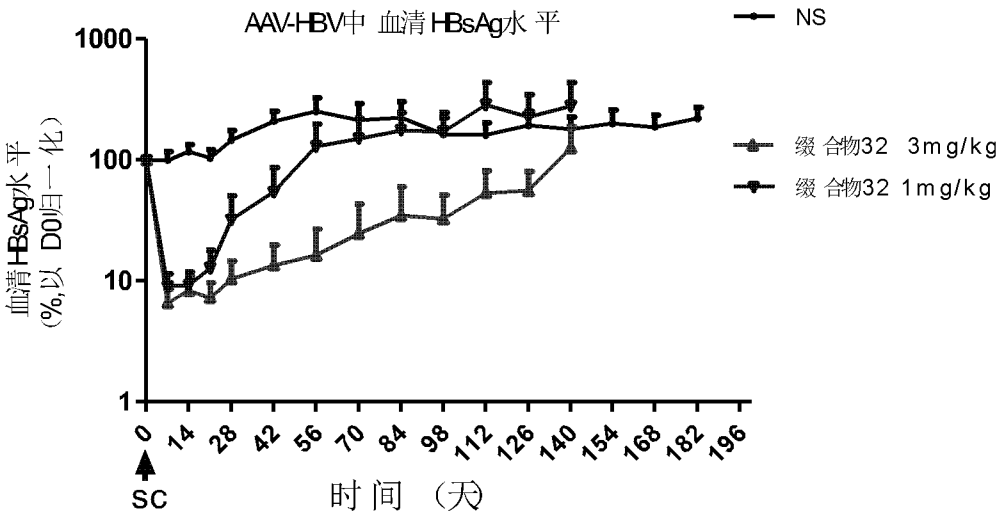

AAV-HBV中 血清HBsAg水平
NS
缀合物32 3mg/kg
缀合物32 1mg/kg
血清HBsAg水平
(%,以 D0归一化)
1000
100
10
1
0
14
28
42
56
70
84
98
112
126
140
154
168
182
196
SC
时间（天）

图 8A

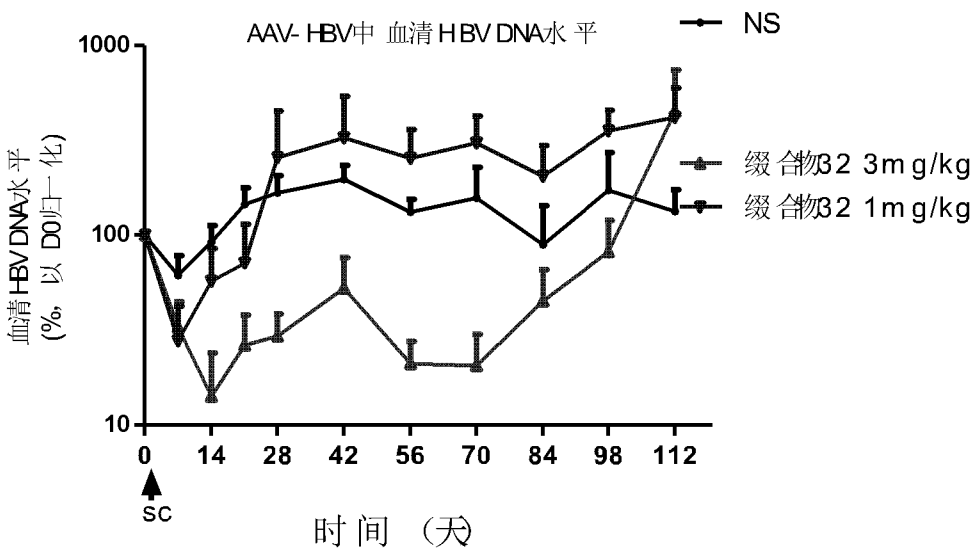

AAV-HBV中 血清HBV DNA水平
NS
缀合物32 3mg/kg
缀合物32 1mg/kg
血清HBV DNA水平
(%，以D0归一化)
1000
100
10
0
14
28
42
56
70
84
98
112
SC
时间 (天)

图 8B

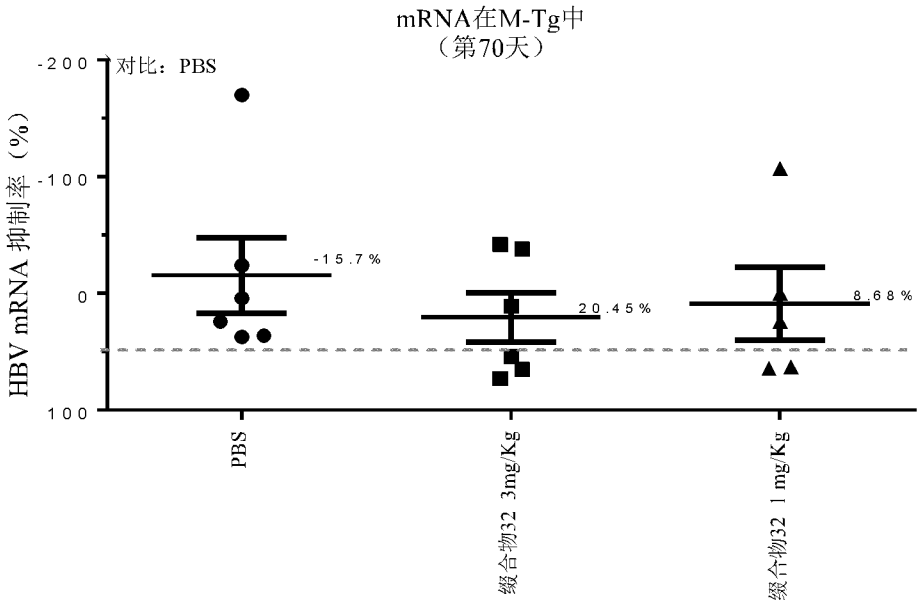

mRNA在M-Tg中
（第70天）
对比：PBS
HBV mRNA 抑制率（%）
-200
-100
0
100
-15.7%
20.45%
8.68%
PBS
缀合物32 3mg/Kg
缀合物32 1mg/Kg

图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/112105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 15/04(2006.01)i; C07H 21/02(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/00(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61P 1/16(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H; C12N; A61K; A61P

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

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

CNKI; CNABS; CNTXT; CJFD; VEN; USTXT; EPTXT; WOTXT; STN; PATENTICS; 谷歌学术: 瑞博生物, 张鸿雁, 杨志伟, 高山, 曹力强, 刘国成, 缀合物, 递送, 拼接物, 寡核苷酸, conjugate?, diliver+, oligonucleotide, structural formula (I)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019128611 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 04 July 2019 (2019-07-04) claims 1-114, description paragraphs [0346]-[0518]	1-55, 59-61
A	WO 2016206626 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 29 December 2016 (2016-12-29) entire document	1-55, 59-61
A	WO 2018223056 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD. et al.) 06 December 2018 (2018-12-06) entire document	1-55, 59-61
A	WO 2018223073 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD. et al.) 06 December 2018 (2018-12-06) entire document	1-55, 59-61
A	WO 2018223081 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD. et al.) 06 December 2018 (2018-12-06) entire document	1-55, 59-61
A	WO 2011154331 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.) 15 December 2011 (2011-12-15) entire document	1-55, 59-61

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 October 2020	**27 November 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010012244 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD. et al.) 04 February 2010 (2010-02-04) entire document	1-55, 59-61
A	CN 107109405 A (SOLSTICE BIOLOG LTD.) 29 August 2017 (2017-08-29) entire document	1-55, 59-61
A	CN 105452465 A (QBI ENTERPRISES LTD. et al.) 30 March 2016 (2016-03-30) entire document	1-55, 59-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/112105

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/112105

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **56-60**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 56-58 set forth a method for treating pathological conditions caused by gene expression in cells, and claims 59 and 60 set forth a method for regulating gene expression in a cell, said subject matter falling within the scope of methods for treatment of the living human or animal body, and thus belonging to subject matter for which an international search is not required under PCT Rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been carried out on the basis of claims 59 and 60 setting forth the subject matter of a use of the drug conjugate in any one of claims 31-52 in preparing a drug for regulating gene expression.

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/112105

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019128611	A1	04 July 2019	AU	2018394875	A1	09 April 2020
				IN	202047017398	A	12 June 2020
				CN	110959011	A	03 April 2020
				CA	3087106	A1	04 July 2019
				KR	2020105812	A	09 September 2020
				TW	201929905	A	01 August 2019
WO	2016206626	A1	29 December 2016	US	2019062749	A1	28 February 2019
				EP	3315608	B1	16 September 2020
				CN	107849567	A	27 March 2018
				EP	3315608	A4	12 December 2018
				EP	3315608	A1	02 May 2018
				JP	6715325	B2	01 July 2020
				JP	2018518201	A	12 July 2018
WO	2018223056	A1	06 December 2018	EP	3630199	A1	08 April 2020
				CN	111050806	A	21 April 2020
				JP	2020522510	W	30 July 2020
				US	2020157545	A1	21 May 2020
WO	2018223073	A1	06 December 2018	JP	2020522265	W	30 July 2020
				EP	3630788	A1	08 April 2020
				CN	111164091	A	15 May 2020
				AR	112063	A1	18 September 2019
				TW	201908483	A	01 March 2019
WO	2018223081	A1	06 December 2018	CA	3065523	A1	06 December 2018
				EP	3630789	A1	08 April 2020
				JP	2020524485	W	20 August 2020
				AR	112064	A1	18 September 2019
				US	2020190515	A1	18 June 2020
				CN	110997692	A	10 April 2020
				TW	201904587	A	01 February 2019
WO	2011154331	A1	15 December 2011		None		
WO	2010012244	A1	04 February 2010	CN	102083983	A	01 June 2011
				CN	102083983	B	16 April 2014
CN	107109405	A	29 August 2017	WO	2015188197	A2	10 December 2015
				AU	2015269053	A1	22 December 2016
				EP	3152308	A4	27 December 2017
				WO	2015188197	A3	25 February 2016
				CA	2950960	A1	10 December 2015
				EP	3152308	A2	12 April 2017
				US	2017114341	A1	27 April 2017
				JP	2017522046	A	10 August 2017
CN	105452465	A	30 March 2016	WO	2015015496	A1	05 February 2015
				EP	3027222	A1	08 June 2016
				US	2016175452	A1	23 June 2016
				US	9889200	B2	13 February 2018
				CN	105452465	B	21 June 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/112105

A. 主题的分类

C07H 15/04(2006.01)i; C07H 21/02(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/00(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61P 1/16(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07H; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNKI;CNABS;CNTXT;CJFD;VEN;USTXT;EPTXT;WOTXT;STN;PATENTICS;谷歌学术:瑞博生物，张鸿雁，杨志伟，高山，曹力强，刘国成，缀合物，递送，拼接物，寡核苷酸，conjugate?，diliver+，oligonucleotide，结构式I

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2019128611 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 2019年 7月 4日 (2019-07-04) 权利要求1-114，说明书第[0346]-[0518]段	1-55、59-61
A	WO 2016206626 A1 (苏州瑞博生物技术有限公司) 2016年 12月 29日 (2016-12-29) 全文	1-55、59-61
A	WO 2018223056 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD. 等) 2018年 12月 6日 (2018-12-06) 全文	1-55、59-61
A	WO 2018223073 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD. 等) 2018年 12月 6日 (2018-12-06) 全文	1-55、59-61
A	WO 2018223081 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD. 等) 2018年 12月 6日 (2018-12-06) 全文	1-55、59-61
A	WO 2011154331 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG 等) 2011年 12月 15日 (2011-12-15) 全文	1-55、59-61
A	WO 2010012244 A1 (苏州瑞博生物技术有限公司 等) 2010年 2月 4日 (2010-02-04) 全文	1-55、59-61

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 10月 15日	2020年 11月 27日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 吴姗姗 电话号码 （86-512）88996534

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/112105

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107109405 A (索尔斯蒂斯生物有限公司) 2017年 8月 29日 (2017 - 08 - 29) 全文	1-55、59-61
A	CN 105452465 A (奇比艾企业有限公司 等) 2016年 3月 30日 (2016 - 03 - 30) 全文	1-55、59-61

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/112105

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/112105

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 56-60
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求56-58请求保护一种治疗由细胞中基因表达而引起的病理状况或疾病的方法，权利要求59、60请求保护一种调控细胞中基因表达的方法，上述主题属于对有生命的人体或动物体的治疗方法范畴，属于PCT细则39.1(iv)中所列无需进行国际检索的情形。尽管如此，基于权利要求59、60请求保护权利要求31-52任意一项所述的药物缀合物在制备用于调控基因表达的药物中的用途的主题进行检索。

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

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/112105

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2019128611	A1	2019年 7月 4日	AU	2018394875	A1	2020年 4月 9日
				IN	202047017398	A	2020年 6月 12日
				CN	110959011	A	2020年 4月 3日
				CA	3087106	A1	2019年 7月 4日
				KR	2020105812	A	2020年 9月 9日
				TW	201929905	A	2019年 8月 1日
WO	2016206626	A1	2016年 12月 29日	US	2019062749	A1	2019年 2月 28日
				EP	3315608	B1	2020年 9月 16日
				CN	107849567	A	2018年 3月 27日
				EP	3315608	A4	2018年 12月 12日
				EP	3315608	A1	2018年 5月 2日
				JP	6715325	B2	2020年 7月 1日
				JP	2018518201	A	2018年 7月 12日
WO	2018223056	A1	2018年 12月 6日	EP	3630199	A1	2020年 4月 8日
				CN	111050806	A	2020年 4月 21日
				JP	2020522510	W	2020年 7月 30日
				US	2020157545	A1	2020年 5月 21日
WO	2018223073	A1	2018年 12月 6日	JP	2020522265	W	2020年 7月 30日
				EP	3630788	A1	2020年 4月 8日
				CN	111164091	A	2020年 5月 15日
				AR	112063	A1	2019年 9月 18日
				TW	201908483	A	2019年 3月 1日
WO	2018223081	A1	2018年 12月 6日	CA	3065523	A1	2018年 12月 6日
				EP	3630789	A1	2020年 4月 8日
				JP	2020524485	W	2020年 8月 20日
				AR	112064	A1	2019年 9月 18日
				US	2020190515	A1	2020年 6月 18日
				CN	110997692	A	2020年 4月 10日
				TW	201904587	A	2019年 2月 1日
WO	2011154331	A1	2011年 12月 15日		无		
WO	2010012244	A1	2010年 2月 4日	CN	102083983	A	2011年 6月 1日
				CN	102083983	B	2014年 4月 16日
CN	107109405	A	2017年 8月 29日	WO	2015188197	A2	2015年 12月 10日
				AU	2015269053	A1	2016年 12月 22日
				EP	3152308	A4	2017年 12月 27日
				WO	2015188197	A3	2016年 2月 25日
				CA	2950960	A1	2015年 12月 10日
				EP	3152308	A2	2017年 4月 12日
				US	2017114341	A1	2017年 4月 27日
				JP	2017522046	A	2017年 8月 10日
CN	105452465	A	2016年 3月 30日	WO	2015015496	A1	2015年 2月 5日
				EP	3027222	A1	2016年 6月 8日
				US	2016175452	A1	2016年 6月 23日
				US	9889200	B2	2018年 2月 13日
				CN	105452465	B	2019年 6月 21日