



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201808342 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：106117248

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 30 日

(51)Int. Cl. : A61K47/50 (2017.01)

A61K31/7088(2006.01)

(30)優先權：2012/05/02 美國

61/641,761

(71)申請人：喜納製藥公司(美國) SIRNA THERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：泰勒 大衛 TELLERS, DAVID (US)；克萊提 史蒂芬 L COLLETTI, STEVEN L. (US)；杜德金 瓦丁 DUDKIN, VADIM (RU)；伊凱模托 諾里諾 IKEMOTO, NORIHIRO (US)；廖宏表 LIAO, HONGBIAO (US)；派利斯 克雷格 PARISH, CRAIG (US)；裴濤 PEI, TAO (US)；邵 安東尼 SHAW, ANTHONY (US)；楚昂 鄭 TRUONG, QUANG (US)；王利軍 WANG, LIJUN (CN)；袁宇 YUAN, YU (CN)；朱曼 ZHU, MAN (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：1 項 圖式數：0 共 90 頁

(54)名稱

包含四 G A L N A C 之新穎結合物及傳送寡核苷酸之方法

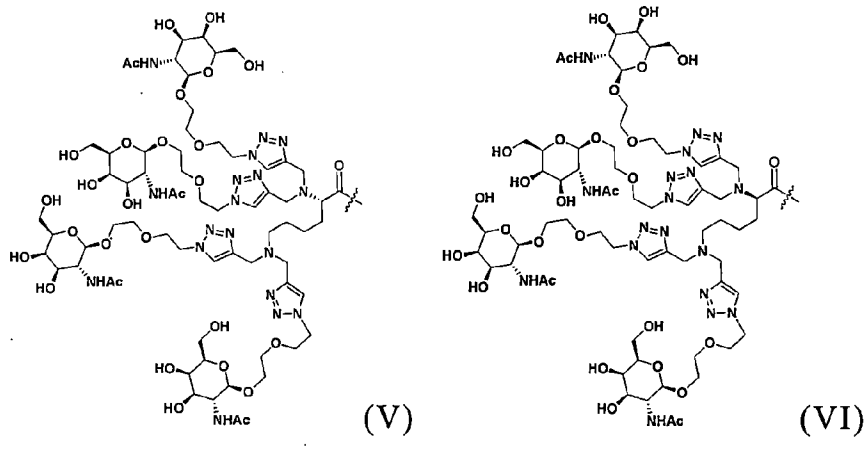
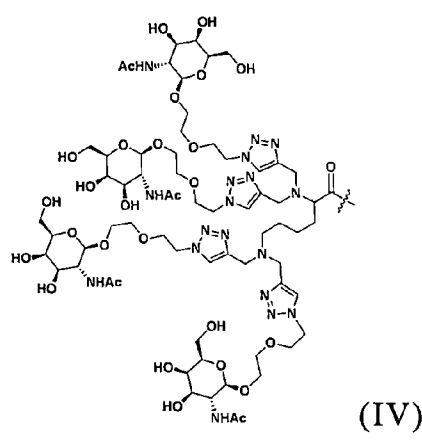
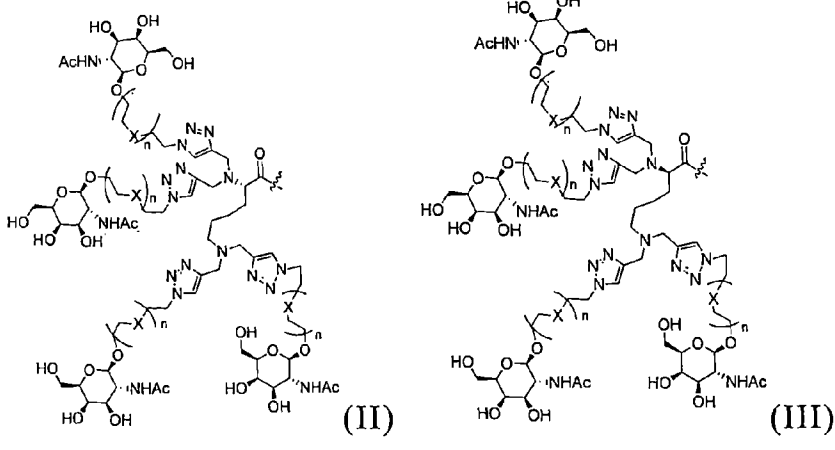
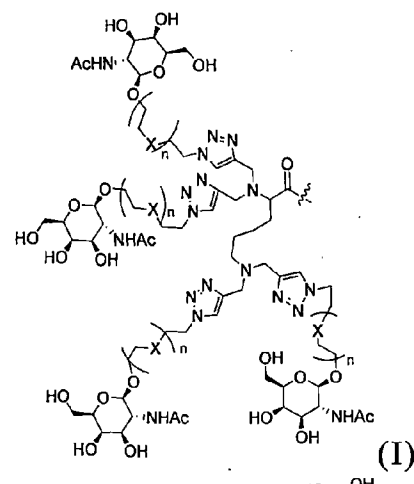
NOVEL TETRAGALNAC CONTAINING CONJUGATES AND METHODS FOR DELIVERY OF OLIGONUCLEOTIDES

(57)摘要

本發明揭示包含以下之模組化組合物：1)寡核苷酸；2)一或多個式(I)之四 GalNAc 配體，其可相同或不同；視情況，3)一或多個連接體，其可相同或不同；及視情況，4)一或多個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

Disclosed herein is a modular composition comprising 1) an oligonucleotide; 2) one or more tetraGalNAc ligands of Formula (I), which may be the same or different; optionally, 3) one or more linkers, which may be the same or different; and optionally, 4) one or more targeting ligands, solubilizing agents, pharmacokinetics enhancing agents, lipids, and/or masking agents.

特徵化學式：



發明摘要

※ 申請案號：106117248 (由102115516分割)

※ 申請日：102/04/30

※IPC 分類：A61K 47/50 (2017.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

【發明名稱】

包含四GALNAC之新穎結合物及傳送寡核苷酸之方法

NOVEL TETRAGALNAC CONTAINING CONJUGATES AND
METHODS FOR DELIVERY OF OLIGONUCLEOTIDES

【中文】

本發明揭示包含以下之模組化組合物：1) 寡核苷酸；2) 一或多個式(I)之四GalNAc配體，其可相同或不同；視情況，3) 一或多個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 一或多個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

【英文】

Disclosed herein is a modular composition comprising 1) an oligonucleotide; 2) one or more tetraGalNAc ligands of Formula (I), which may be the same or different; optionally, 3) one or more linkers, which may be the same or different; and optionally, 4) one or more targeting ligands, solubilizing agents, pharmacokinetics enhancing agents, lipids, and/or masking agents.

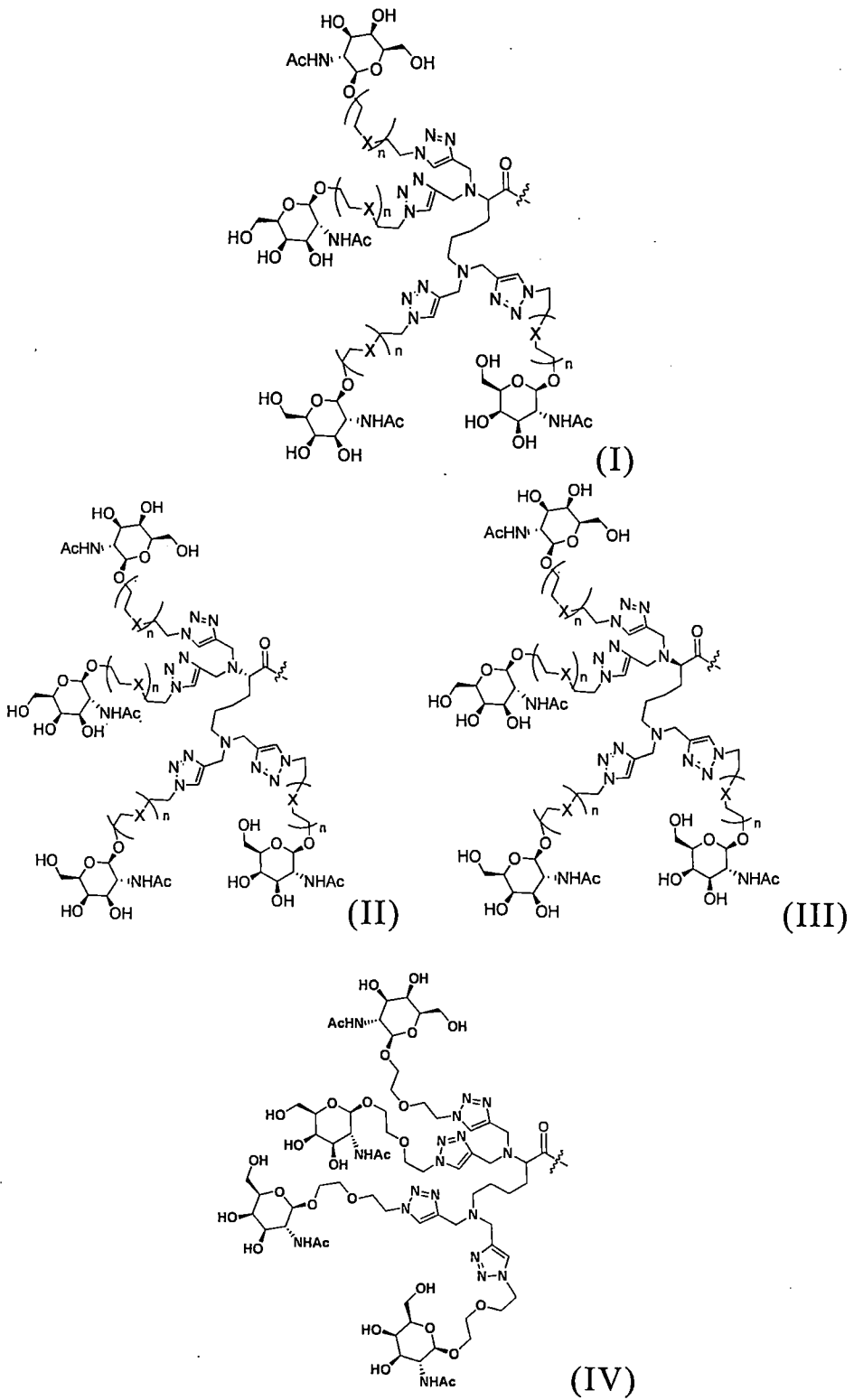
【代表圖】

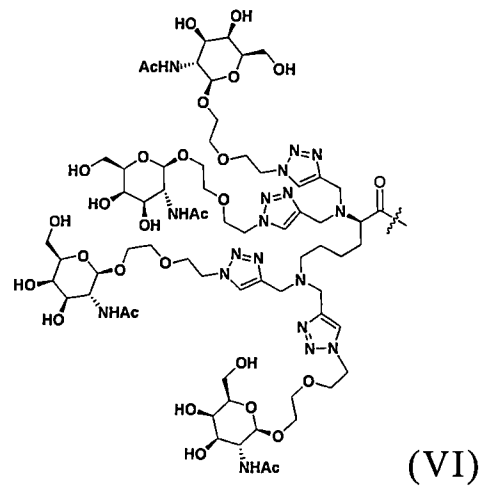
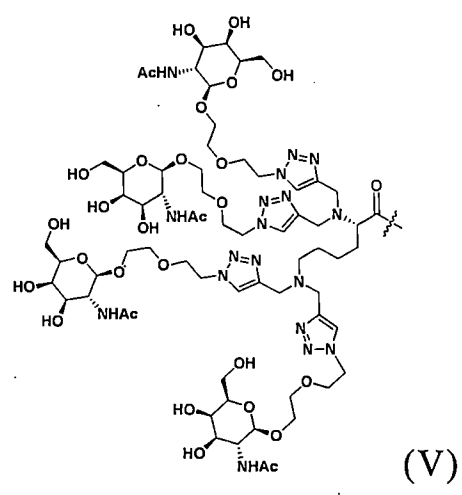
【本案指定代表圖】：（無）

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：





發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

包含四GALNAC之新穎結合物及傳送寡核苷酸之方法

NOVEL TETRAGALNAC CONTAINING CONJUGATES AND
METHODS FOR DELIVERY OF OLIGONUCLEOTIDES

【先前技術】

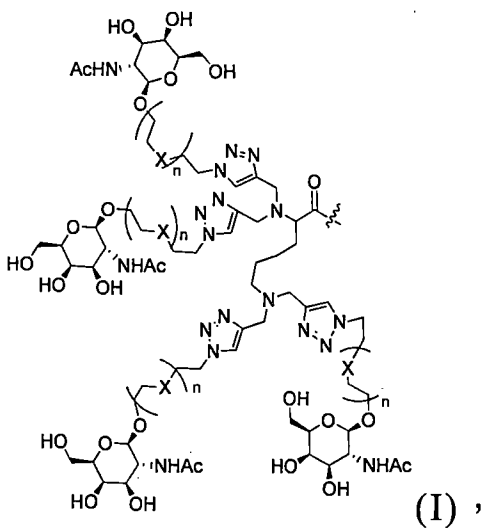
正在進行集中於出於治療目的以全身性方式傳送寡核苷酸之科學努力。三種用以寡核苷酸傳送之突出方法包括1) 脂質奈米粒子(LNP)囊封、2) 聚合物結合及3) 單一化學結合。單一化學結合通常採用連接至寡核苷酸之靶向配體或脂質或增溶基團或內體裂解肽或細胞穿透肽及/或兩種或所有四種之組合。連接體可存於結合物以及其他官能基中。已知單一化學結合物且寡核苷酸連接發生於寡核苷酸之5'-或3'-端、兩端或內部。參見WO2005/041859、WO2008/036825及WO2009/126933。

大量文獻證據支持以下假說：寡核苷酸傳送之主要障礙係細胞攝取及內體逃逸。業內仍需要可提供有效傳送效率、細胞攝取及/或內體逃逸之額外單一化學結合物。

【發明內容】

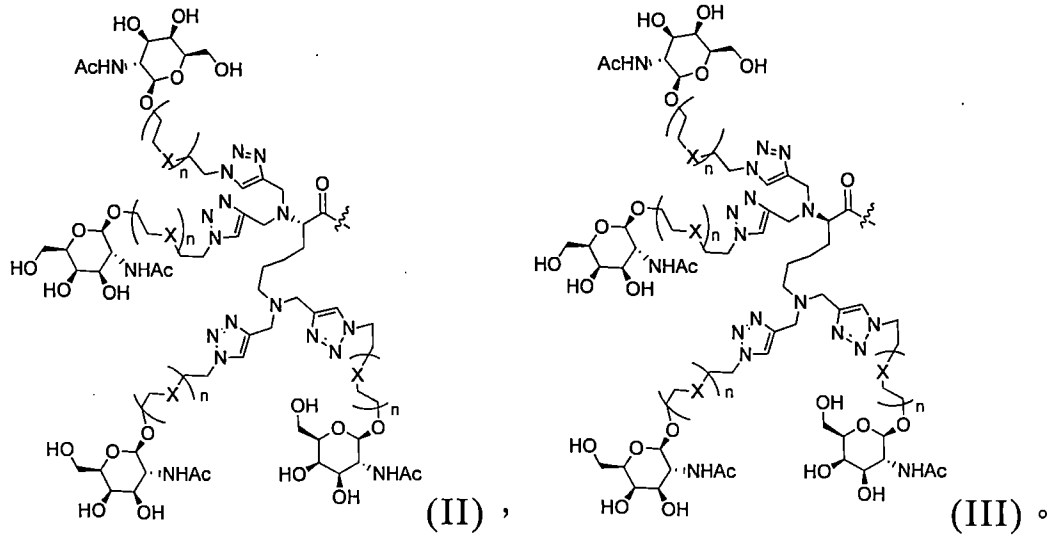
包含本文所揭示四GalNAc配體之單一化學結合物具有改良傳送效率、細胞攝取及/或內體逃逸之驚人性質。

在一個實施例中，本文所揭示模組化組合物包含：1) 單股或雙股寡核苷酸；2) 一或多個式(I)之四GalNAc配體，其可相同或不同：



其中X係-O-、-S-、-CR¹R²-或-NR¹-，其中R¹及R²各自獨立地選自由氫及C1-C6烷基組成之群；n係1、2、3或4；且具有「~」之鍵指示連接點；視情況，3) 一或多個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 一或多個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。在一個實施例中，R¹及R²各自獨立地選自由氫、甲基及乙基組成之群。在另一實施例中，R¹及R²各自係氫。

在一個實施例中，四GalNAc配體具有式(II)，其中X、R¹、R²及n係如上文所定義。在另一實施例中，四GalNAc配體具有式(III)，其中X、R¹、R²及n係如上文所定義：



在另一實施例中，模組化組合物包含：1) 單股或雙股寡核苷酸；2) 1-8個式(I)、(II)或(III)之四GalNAc配體，其可相同或不同，其

中X係-O-、-S-、-CH₂-或-NH-；且n係1、2、3或4；3) 1-24個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-8個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

在另一實施例中，模組化組合物包含：1) 單股或雙股siRNA；2) 1-8個式(I)、(II)或(III)之四GalNAc配體，其可相同或不同，其中X係-O-、-S-、-CH₂-或-NH-；且n係1、2、3或4；3) 1-16個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-8個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

在上述實施例之一個子集中，連接體在寡核苷酸或siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在寡核苷酸或siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸或siRNA。

在上述實施例之另一子集中，四GalNAc配體視情況經由連接體連接至寡核苷酸或siRNA。

在上述實施例之另一子集中，四GalNAc配體在寡核苷酸或siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在寡核苷酸或siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸或siRNA；且四GalNAc配體視情況經由連接體連接至寡核苷酸或siRNA。

在上述實施例之另一子集中，式(I)、(II)或(III)之X係-O-、-S-或-CH₂-；且n係1、2或3。

在上述實施例之另一子集中，式(I)、(II)或(III)之X係-O-或-CH₂-且n係1或2。

在上述實施例之另一子集中，式(I)、(II)或(III)之X係-O-且n係1或2。

在上述實施例之另一子集中，式(I)、(II)或(III)之X係-CH₂-且n係1或2。

在上述實施例之另一子集中，組合物包含1-6個四GalNAc配體，

或更特定而言1-4個四GalNAc配體，其可相同或不同。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股；且四GalNAc配體在核糖環之不同2'位置連接至寡核苷酸或siRNA之導向股或過客股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股；且四GalNAc配體在不同末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸或siRNA之導向股或過客股。

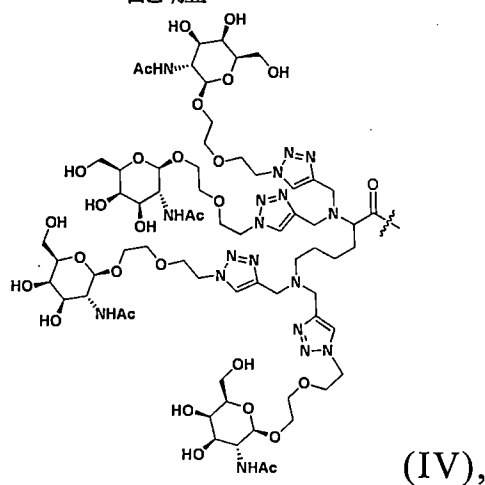
在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股；且兩個或更多個四GalNAc配體在核糖環之不同2'位置及/或在不同末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸或siRNA之導向股及過客股。

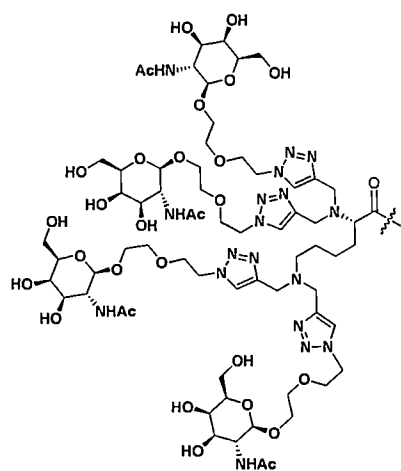
在上述實施例之另一子集中，每一連接體獨立地選自表1。

在上述實施例之另一子集中，每一連接體獨立地選自表2。

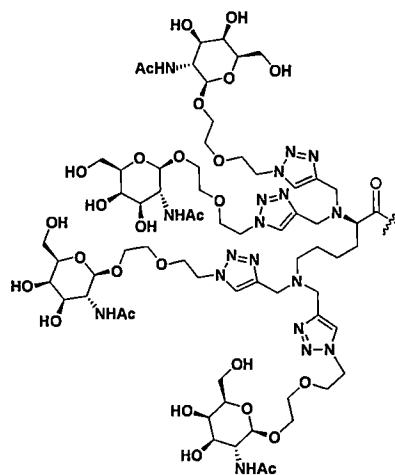
在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股；且可選靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑連接至寡核苷酸或siRNA之同一或不同股。

在一個實施例中，模組化組合物包含1) 雙股siRNA；2) 1-8個式(IV)、(V)或(VI)之四GalNAc配體：





(V)，或



(VI)；

3) 1-16個獨立地選自表1之連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-8個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

在另一實施例中，模組化組合物包含1) 雙股siRNA；2) 1-4個式(IV)、(V)或(VI)之四GalNAc配體；3) 1-8個獨立地選自表1之連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-4個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；其中四GalNAc配體在siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至siRNA；且其中四GalNAc配體視情況經由連接體連接至siRNA。

在上述實施例之一個子集中，四GalNAc配體經由連接體連接至siRNA之同一股。

在一個實施例中，模組化組合物包含1) 雙股siRNA；2) 1-4個式(V)之四GalNAc配體；3) 1-8個獨立地選自表2之連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-4個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；其中四GalNAc配體在siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至siRNA；且其中四GalNAc配體經由連接體連接至siRNA。

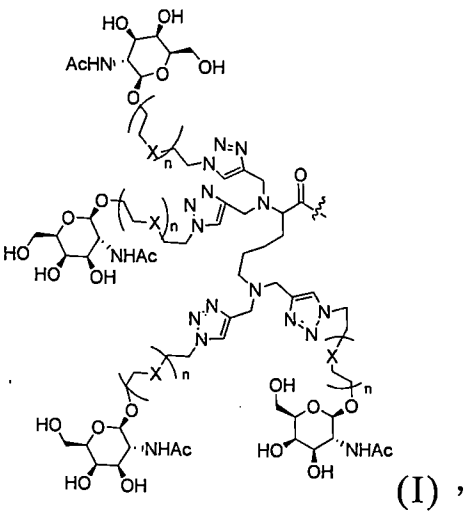
在上述實施例之一個子集中，四GalNAc配體經由連接體連接至siRNA之同一股。

【圖式簡單說明】

無

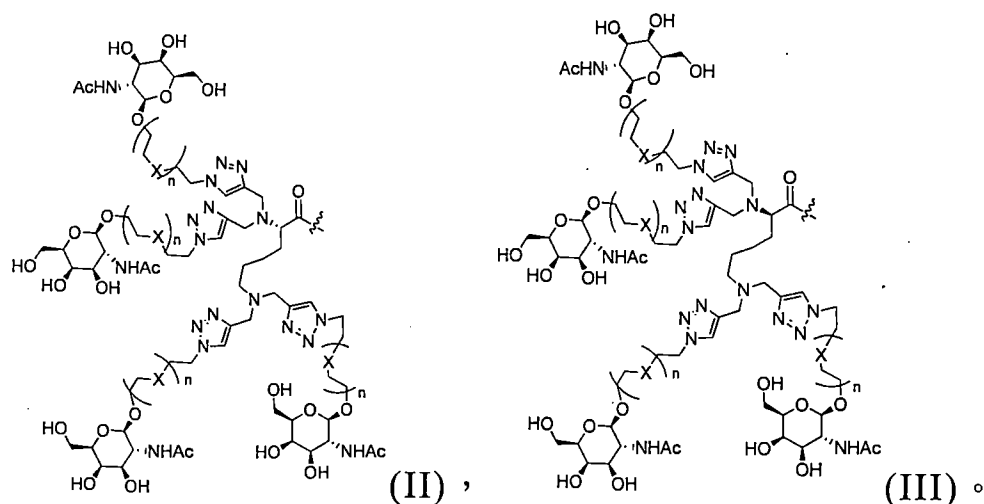
【實施方式】

本文揭示包含以下之單一化學結合物：單股或雙股寡核苷酸；及一或多個式(I)之四GalNAc配體，其可相同或不同：



其中X係-O-、-S-、-CR¹R²-或-NR¹-，其中R¹及R²各自獨立地選自由氫及C1-C6烷基組成之群；n係1、2、3或4；且具有「~」之鍵指示連接點。視情況存在其他官能基，例如靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。在一個實施例中，R¹及R²各自獨立地選自由氫、甲基及乙基組成之群。在另一實施例中，R¹及R²各自係氫。

在一個實施例中，四GalNAc配體具有式(II)，其中X、R¹、R²及n係如上文所定義。在另一實施例中，四GalNAc配體具有式(III)，其中X、R¹、R²及n係如上文所定義：



在一個實施例中，寡核苷酸係短干擾RNA (siRNA)。在另一實施例中，siRNA係單股siRNA。在另一實施例中，siRNA係雙股siRNA。

使用本文所揭示四GalNAc可藉由將模組化組合物引導至特定細胞提供寡核苷酸或siRNA之有效傳送。舉例而言，靶向配體可在靶細胞表面上與分子特異性或非特異性結合且有利於配體-siRNA結合之攝取。

連接體可存於每一四GalNAc與寡核苷酸之間。連接體在寡核苷酸之核糖環之不同2'位置及/或末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸。

在一個實施例中，模組化組合物包含1) 單股或雙股寡核苷酸；2) 一或多個式(I)之四GalNAc配體，其可相同或不同，其中X係-O-、-S-、-CH₂-或-NH-；n係1、2、3或4；且具有「 $\sim$ 」之鍵指示連接點；視情況，3) 一或多個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 一或多個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

在另一實施例中，模組化組合物包含：1) 單股或雙股寡核苷酸；2) 1-8個式(I)、(II)或(III)之四GalNAc配體，其可相同或不同，其中X係-O-、-S-、-CH₂-或-NH-；n係1、2、3或4；3) 1-16個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-8個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

在另一實施例中，模組化組合物包含：1) 單股或雙股 siRNA；2) 1-8個式(I)、(II)或(III)之四 GalNAc配體，其可相同或不同，其中X係-O-、-S-、-CH₂-或-NH-；n係1、2、3或4；3) 1-16個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-8個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

在上述實施例之一個子集中，四 GalNAc配體在寡核苷酸或 siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在寡核苷酸或 siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸或 siRNA。

在上述實施例之另一子集中，四 GalNAc配體視情況經由連接體連接至寡核苷酸或 siRNA。在一個實施例中，存在連接體。

在上述實施例之另一子集中，四 GalNAc配體在寡核苷酸或 siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在寡核苷酸或 siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸或 siRNA；且四 GalNAc配體經由連接體連接至寡核苷酸或 siRNA。

在上述實施例之另一子集中，四 GalNAc配體經由連接體連接至寡核苷酸或 siRNA且連接體在核糖環之不同2'位置連接至寡核苷酸或 siRNA。

在上述實施例之另一子集中，四 GalNAc配體經由連接體連接至寡核苷酸或 siRNA，且連接體在寡核苷酸之不同末端3'及/或5'位置連接至寡核苷酸或 siRNA。

在上述實施例之另一子集中，X係-O-、-S-或-CH₂-。在另一實施例中，X係-O-或-CH₂-。在另一實施例中，n係1、2或3。在另一實施例中，X係-O-且n係1或2。在另一實施例中，X係-CH₂-且n係1或2。在另一實施例中，X係-O-且n係1。在又一實施例中，X係-CH₂-且n係1。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或 siRNA係單股。在另一

實施例中，寡核苷酸或siRNA係雙股。

在上述實施例之另一子集中，組合物包含1-6個四GalNAc配體。在另一實施例中，組合物包含1-4個四GalNAc配體。在另一實施例中，組合物包含1-2個四GalNAc配體。在又一實施例中，組合物包含1個四GalNAc配體。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且四GalNAc配體在核糖環之不同2'位置連接至導向股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且四GalNAc配體在不同末端3'及/或5'位置連接至導向股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且四GalNAc配體在核糖環之不同2'位置連接至過客股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且四GalNAc配體在不同末端3'及/或5'位置連接至過客股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且四GalNAc配體在核糖環之不同2'位置及/或不同末端3'及/或5'位置連接至導向股及過客股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且四GalNAc配體連接至同一股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且四GalNAc配體連接至不同股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且可選靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑連接至同一或不同股。

在上述實施例之另一子集中，寡核苷酸或siRNA係雙股且可選靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑經由連接體連接至同一或不同股。在一個實施例中，每一連接體獨立地選自表

1。在另一實施例中，每一連接體獨立地選自表2。

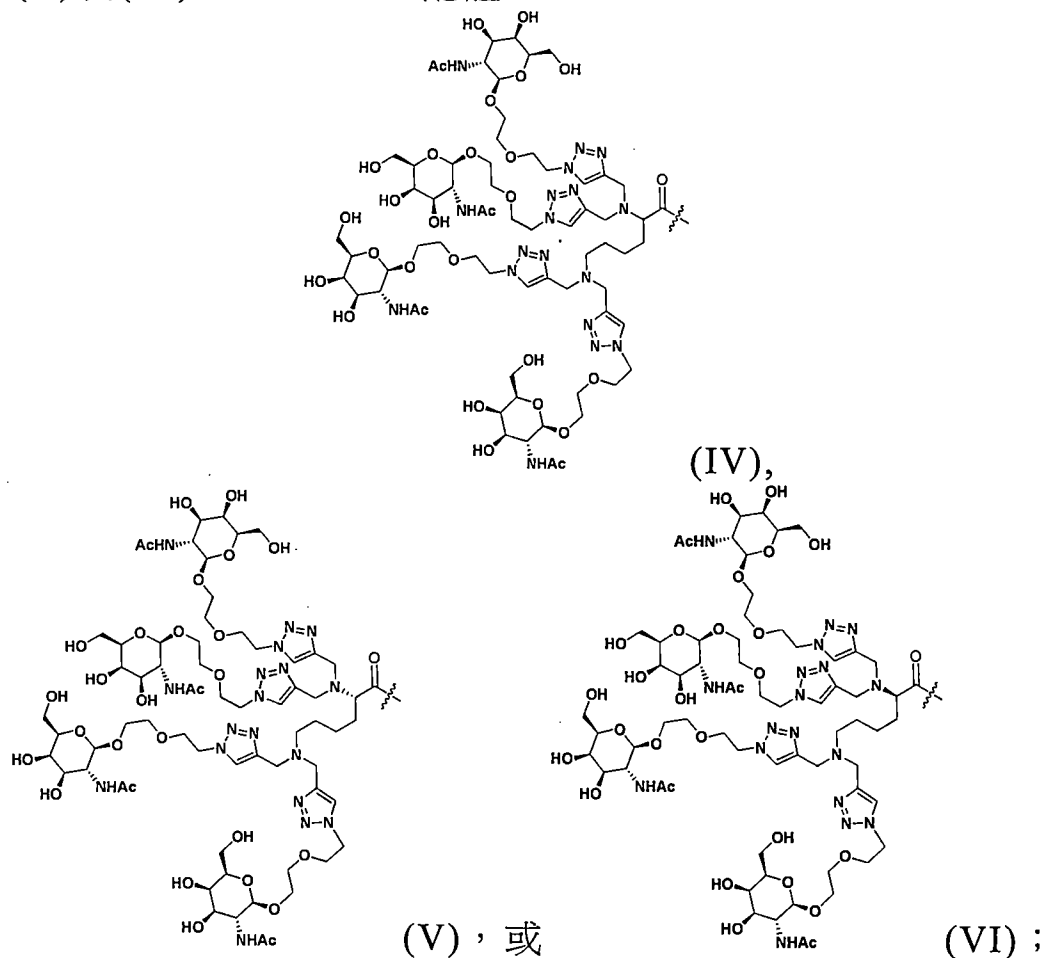
在一個實施例中，模組化組合物包含1) 單股或雙股siRNA；2) 1-8個式(I)、(II)或(III)之四GalNAc配體，其可相同或不同；其中X係-O-、-S-、-CH₂-或-NH-；且n係1、2、3或4；3) 1-16個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-8個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；其中四GalNAc配體在siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至siRNA；且其中四GalNAc配體視情況經由連接體連接至siRNA。在一個實施例中，存在連接體。在另一實施例中，X係-O-、-S-或-CH₂-，且n係1、2或3。在另一實施例中，X係-O-或-CH₂-，且n係1或2。

在另一實施例中，模組化組合物包含1) 雙股siRNA；2) 1-6個式(I)之四GalNAc配體，其可相同或不同；其中X係-O-、-S-或-CH₂-；且n係1、2或3；3) 1-18個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-6個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；其中四GalNAc配體在siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至siRNA；且其中四GalNAc配體視情況經由連接體連接至siRNA。在一個實施例中，存在連接體。在另一實施例中，X係-O-、-S-或-CH₂-且n係1或2。在另一實施例中，連接體獨立地選自表1。在另一實施例中，連接體獨立地選自表2。

在另一實施例中，模組化組合物包含1) 雙股siRNA；2) 1-4個式(I)之四GalNAc配體，其可相同或不同；其中X係-O-、-S-或-CH₂-；且n係1或2；3) 1-8個連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-4個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；其中四GalNAc配體在siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至siRNA；且其中四GalNAc配體經由連接體連接至siRNA。在一個實施例中，X係-O-或-CH₂-且n係1或2。在另一實施例

中，連接體獨立地選自表1。在另一實施例中，連接體獨立地選自表2。

在另一實施例中，模組化組合物包含1) 雙股siRNA；2) 1-4個式(IV)、(V)或(VI)之四GalNAc配體：



3) 1-8個獨立地選自表1之連接體，其可相同或不同；及視情況，
4) 1-4個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；
其中四GalNAc配體在siRNA之核糖環之不同2'位置及/或在siRNA之不同末端3'及/或5'位置連接至siRNA；且其中四GalNAc配體經由連接體連接至siRNA。

在另一實施例中，模組化組合物包含1) 雙股siRNA；2) 1-4個式(V)之四GalNAc配體；3) 1-8個獨立地選自表2之連接體，其可相同或不同；及視情況，4) 1-4個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；其中四GalNAc配體在siRNA之核糖環之不同2'位

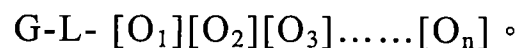
置及/或在 siRNA 之不同末端 3' 及/或 5' 位置連接至 siRNA；且其中四 GalNAc 配體經由連接體連接至 siRNA。

在上述實施例之一個子集中，四 GalNAc 配體經由連接體連接至 siRNA；且其中四 GalNAc 配體連接至同一股。

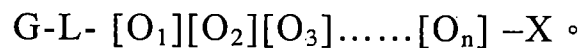
在上述實施例之另一子集中，四 GalNAc 配體經由連接體連接至 siRNA；且其中四 GalNAc 配體連接至不同股。

為經由草圖(cartoon)闡釋本發明，本發明之特徵在於模組化組合物，該模組化組合物包含寡核苷酸([O₁][O₂][O₃].....[O_n])、一或多個連接體(L)、一或多個四 GalNAc 配體(G)、及一或多個可選脂質(X)、靶向配體(X)及/或增溶基團(X)。

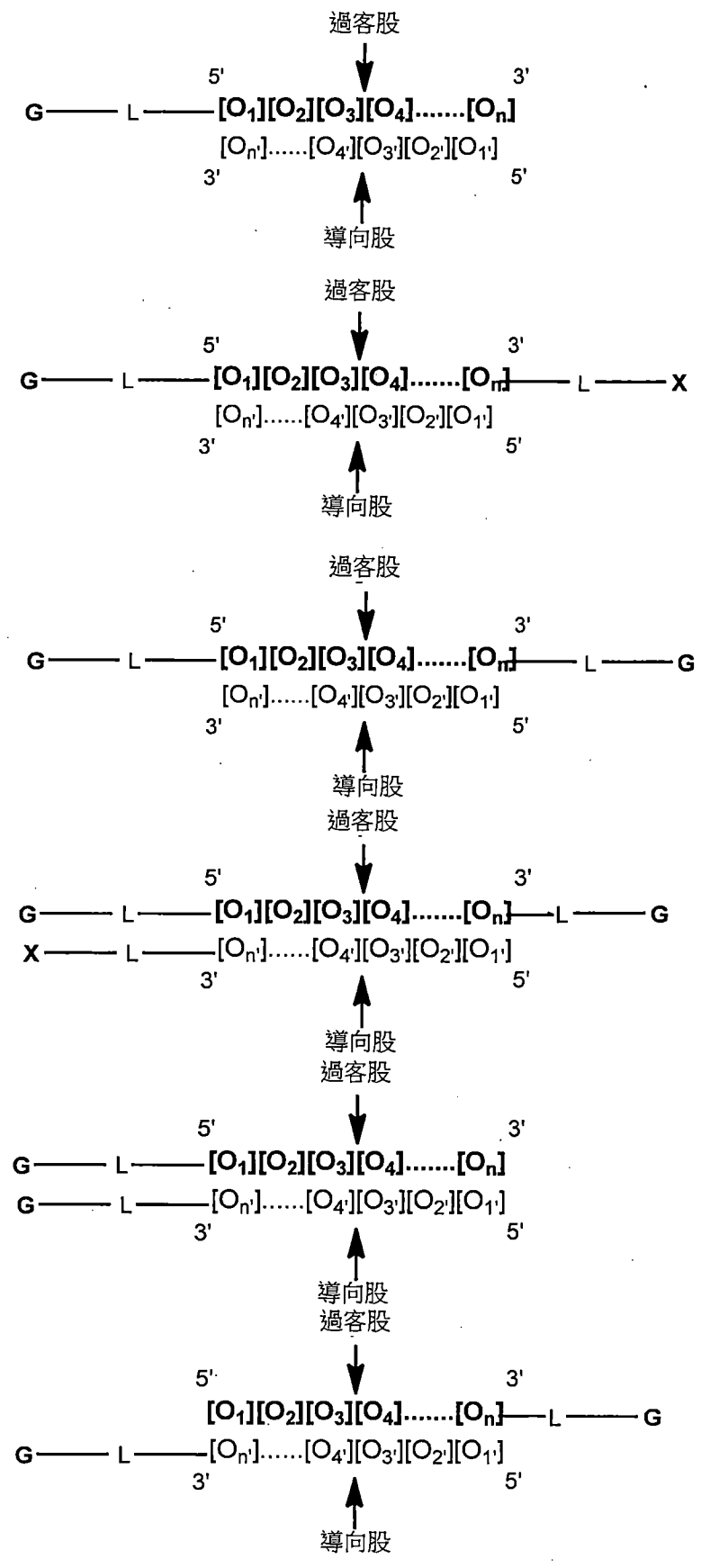
在實施例中，模組化組合物可具有下式：

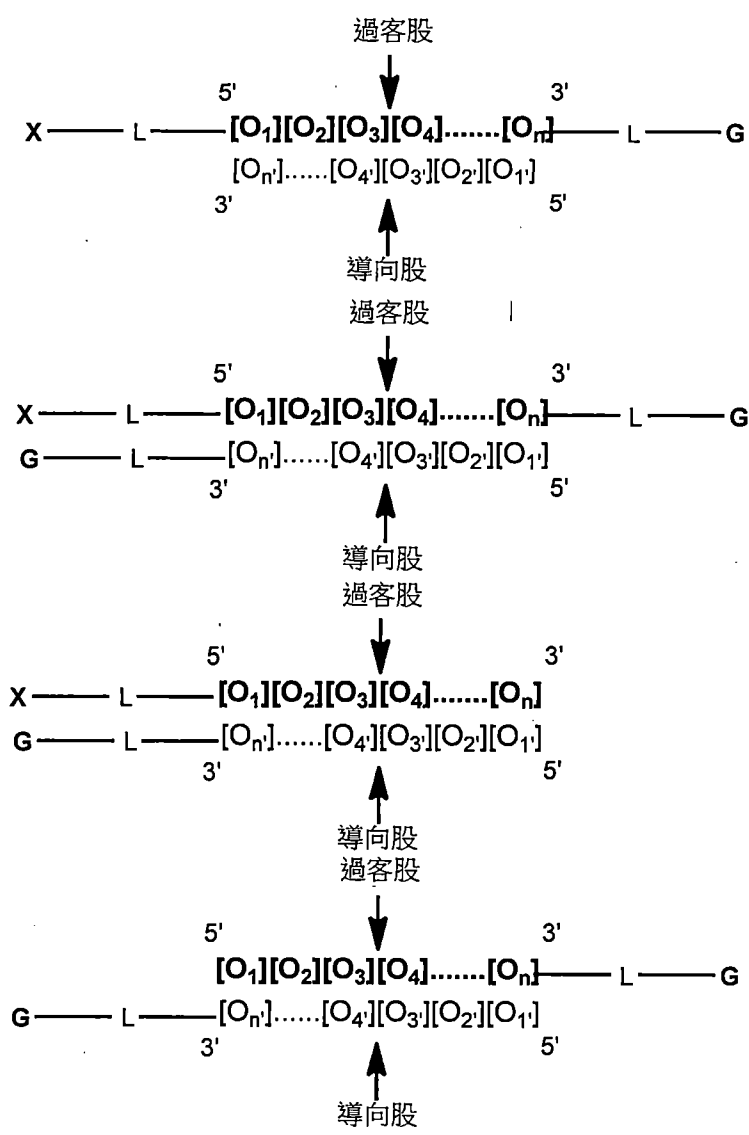


在另一實施例中，模組化組合物可具有下式：

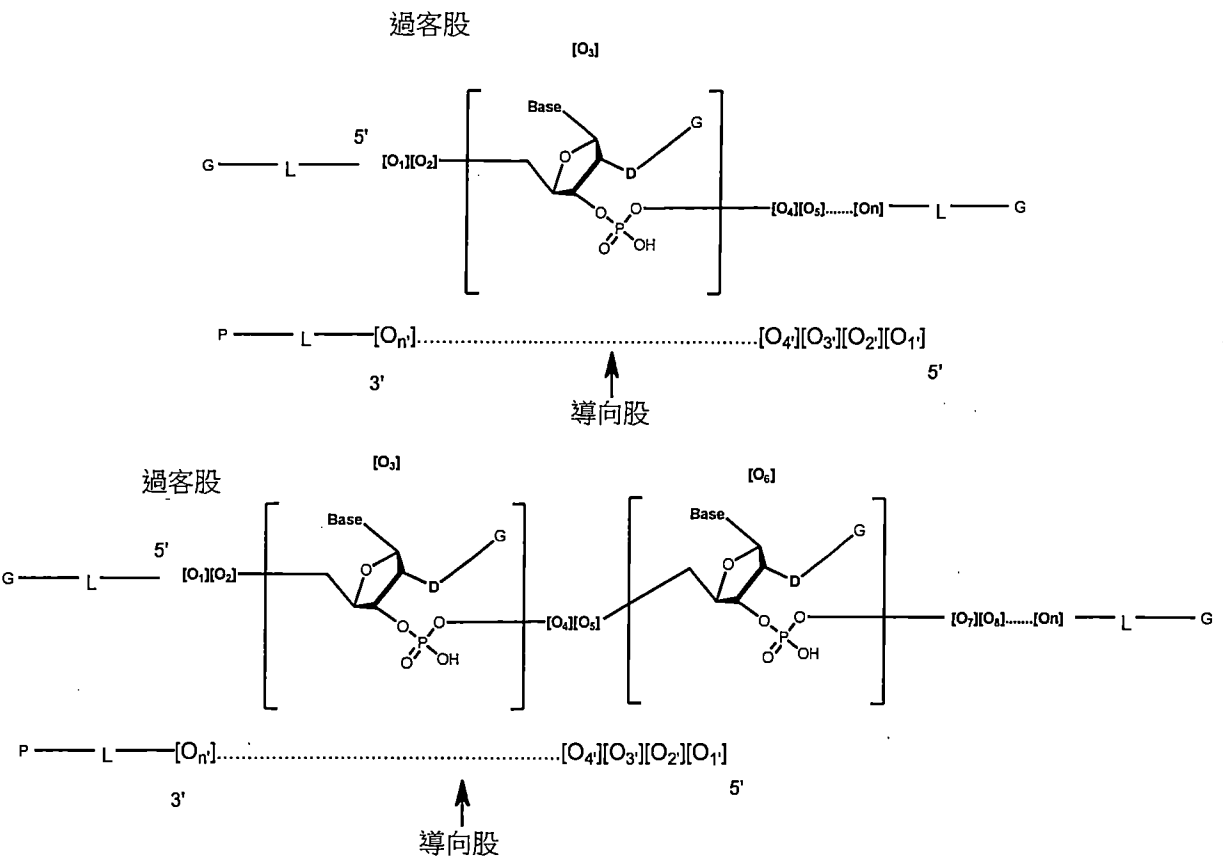


包含末端結合之雙股寡核苷酸的模組化組合物之非限制性實例係：





包含內部結合之雙股寡核苷酸的模組化組合物之非限制性實例係：

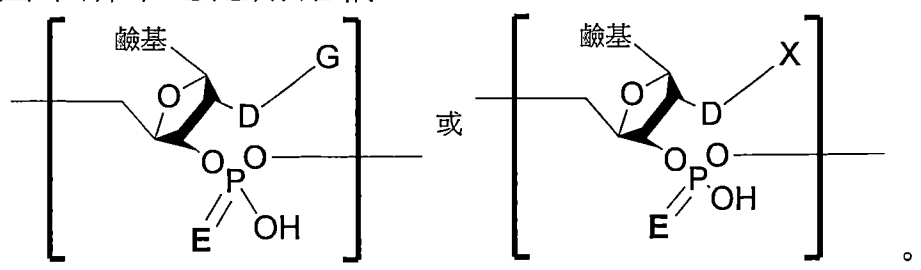


該等實例僅用作闡釋。熟習此項技術者將認識到，存在在過客股及導向股上放置期望組份之多種變更。

任何數目之連接體、且因此任何數目之四GalNAc配體可連接至寡核苷酸。連接體之較佳數目範圍係1-16。連接體之更佳數目範圍係1-8，或更特定而言1-4。四GalNAc配體之較佳數目範圍係1-8。肽之更佳數目範圍係1-8，或更特定而言1-4。

兩股分別含有n及n'個核苷酸。數目n及n'可相等或不同。數目係8至50範圍內之整數。較佳地，數目係12-28範圍內之整數。更佳地，數目係19-21範圍內之整數。

作為實例，含有連接體(L-G及/或L-X)之每一核苷酸[O_n]或[O_{n'}]具有以下草圖中所示之通用結構：



對於每一核苷酸而言，1) E = 氧(O)或硫(S)；2) 鹼基 = A、U、G或C，其可經修飾或未經修飾；3) D係核糖環與連接體L之間之連接點，D = 氧(O)、硫(S、S(O)或S(O)₂)、氮(N-R，其中R = H、烷基、L-P或L-X)、碳(CH-R，其中R = H、烷基、L-P或L-X)或磷(P(O)R或P(O)(OR)，其中R = 烷基、L-G或L-X)。較佳地，D = 氧(O)。

兩個核苷酸[O_{n-1}]及[O_n]或[O_{n'-1}]及[O_{n'}]經由磷酸二酯鍵或硫代-磷酸二酯鍵連接。

在寡核苷酸係雙股寡核苷酸時，「G-L」及脂質、靶向配體及/或增溶基團可位於同一股或不同股上。

在一些實施例中，「G-L」及脂質、靶向配體及/或增溶基團在同一股上。

在一些實施例中，「G-L」及脂質、靶向配體及/或增溶基團在過客股上。

在一些實施例中，「G-L」及脂質、靶向配體、及/或增溶基團在導向股上。

在一些實施例中，「G-L」及脂質、靶向配體及/或增溶基團位於不同股上。

在一些實施例中，「G-L」在過客股上，而脂質、靶向配體及/或增溶基團在導向股上。

在一些實施例中，脂質、靶向配體及/或增溶基團之「G-L」在不同股上，但在雙股寡核苷酸之相同末端上。

在一些實施例中，「G-L」及脂質、靶向配體及/或增溶基團在不同股上且在雙股寡核苷酸之相反末端上。

在一些實施例中，可使用相同或不同性質之其他「G-L」替代上述實施例中提及之脂質、靶向配體及/或增溶基團。

在一些實施例中，「G-L」可位於過客股或導向股之多個末端上

且脂質、靶向配體及/或增溶基團可位於過客股及導向股之其餘末端上。

在一些實施例中，一個「G-L」及兩個或更多個脂質、靶向配體及/或增溶基團存在於寡核苷酸中。

在一些實施例中，兩個或更多個「G-L」及兩個或更多個脂質、靶向配體及/或增溶基團存在於寡核苷酸中。

在一些實施例中，當寡核苷酸係雙股寡核苷酸且存在多個「G-L」組份及/或脂質、靶向配體及/或增溶基團時，該等多個「G-L」組份及/或脂質、靶向配體及/或增溶基團可均存在於雙股寡核苷酸之一股或兩股中。

當存在多個「G-L」組份及/或脂質、靶向配體及/或增溶基團時，其可均相同或不同。

在一些實施例中，「G-L」僅在內部核苷酸上(即排除寡核苷酸之3'及5'端)。

在另一態樣中，本發明包括傳送寡核苷酸或siRNA至細胞之方法。該方法包括(a) 提供或獲得本文所揭示之模組化組合物；(b) 使細胞與模組化組合物接觸；及(c) 允許細胞內化模組化組合物。

該方法可在活體外(in vitro)、離體(ex vivo)或在活體內實施以例如治療鑑別為需要寡核苷酸或siRNA之個體。需要該寡核苷酸之個體係需要一或多種基因(例如與病症有關之基因)之表現下調或沉默的個體，例如人類。

在一個態樣中，本發明提供抑制一或多種基因表現之方法。該方法包含使一或多個細胞與有效量之本發明寡核苷酸接觸，其中有效量係抑制一或多種基因表現之量。該方法可在活體外、離體或在活體內實施。

本發明之方法及組合物(例如本文所述之模組化組合物)可與業內

已知之任何寡核苷酸或siRNAs一起使用。另外，本發明之方法及組合物可用於治療業內已知之任何疾病或病症，且用於治療任何個體，例如任何動物，任何哺乳動物，例如任何人類。熟習此項技術者亦將認知，本發明之方法及組合物可用於治療任何將受益於基因下調或沉默之疾病。

本發明之方法及組合物(例如本文所述模組化組合物)可與本文所述之任何劑量及/或調配物或業內已知之任何劑量或調配物一起使用。除本文所述投與路徑外，熟習此項技術者亦應瞭解，可使用其他投與路徑以投與本發明模組化組合物。

寡核苷酸

如本文所用「寡核苷酸」係雙股或單股、未經修飾或經修飾RNA或DNA。經修飾RNA之實例包括彼等對核酸酶降解之抗性比未經修飾RNA大者。其他實例包括彼等具有2'糖修飾、鹼基修飾、單股懸垂部分(例如3'單股懸垂部分)之修飾，或尤其若係單股，則為包括一或多個磷酸酯基團或一或多個磷酸酯基團類似物的5'修飾。寡核苷酸之實例及進一步說明可參見WO2009/126933，其以引用方式併入本文中。

在實施例中，寡核苷酸係反義、miRNA、肽核酸(PNA)、聚-嗎啉基(PMO)或siRNA。較佳寡核苷酸係siRNA。另一較佳寡核苷酸係siRNA之過客股。另一較佳寡核苷酸係siRNA之導向股。

siRNA

siRNA經由稱作RNA干擾(RNAi)之製程引導mRNA之序列特異性沉默。該製程發生於多種有機體(包括哺乳動物及其他脊椎動物)中。已知製備及投與siRNA之方法及其用於使基因功能特異性不活化之用途。siRNA包括經修飾及未經修飾之siRNA。siRNA之實例及進一步說明可參見WO2009/126933，其以引用方式併入本文中。

已知多種可用於向個體投與siRNA之例示性傳送路徑。另外，siRNA可根據業內已知之任何例示性方法調配。siRNA調配及投與之實例及進一步說明可參見WO2009/126933，其以引用方式併入本文中。

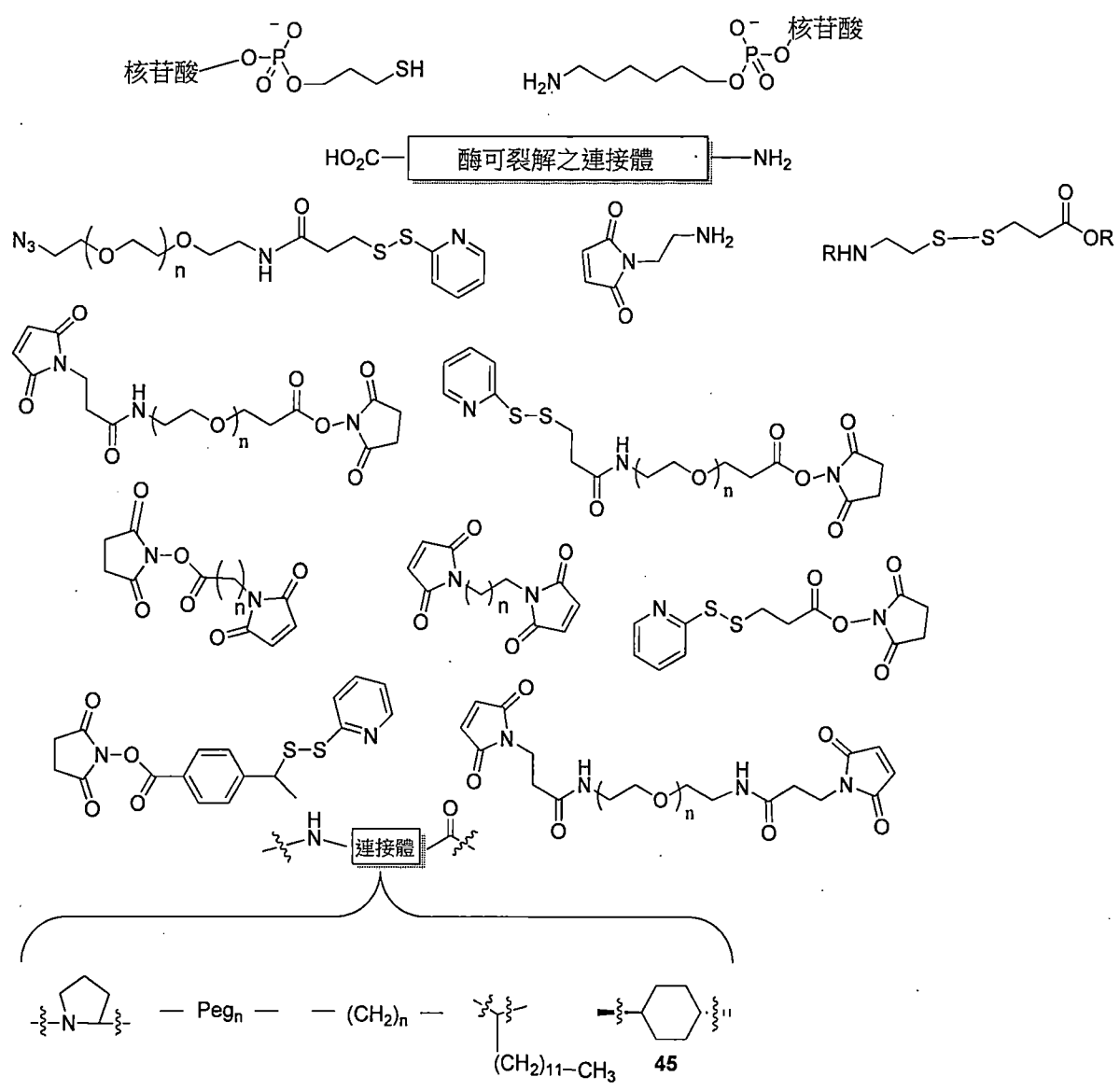
片語「短干擾核酸」、「siNA」、「短干擾RNA」、「siRNA」、「短干擾核酸分子」、「寡核苷酸」、「短干擾寡核苷酸分子」或「經化學修飾短干擾核酸分子」係指任何能夠藉由調介RNA干擾(「RNAi」)或以序列特異性方式使基因沉默抑制或下調基因表現或病毒複製之核酸分子。該等術語可指個別核酸分子、複數種該核酸分子或該等核酸分子池。siNA可為雙股核酸分子包含自互補有義及反義股，其中反義股包含與靶核酸分子或其一部分中之核苷酸序列互補之核苷酸序列且有義股包含對應於靶核酸序列或其一部分之核苷酸序列。siNA可為具有雙螺旋、不對稱雙螺旋、髮夾或不對稱髮夾二級結構之多核苷酸，該結構自互補有義及反義區，其中反義區包含與單獨靶核酸分子或其一部分中之核苷酸序列互補之核苷酸序列且有義區包含對應於靶核酸序列或其一部分之核苷酸序列。siNA可為具有兩個或更多個環結構及包含自互補有義及反義區之桿的環形單股多核苷酸，其中反義區包含與靶核酸分子或其一部分中之核苷酸序列互補之核苷酸序列且有義區包含對應於靶核酸序列或其一部分之核苷酸序列，且其中環形多核苷酸可在活體內或活體外處理以產生能夠調介RNAi之活性siNA分子。siNA亦可包含具有與靶核酸分子或其一部分中之核苷酸序列互補之核苷酸序列的單股多核苷酸(例如，其中該siNA分子無需在對應於靶核酸序列或其一部分之核苷酸序列之siNA分子內存在)，其中單股多核苷酸可進一步包含末端磷酸酯基團(例如5'-磷酸酯(例如，參見Martinez等人，2002, *Cell*, 110, 563-574及Schwarz等人，2002, *Molecular Cell*, 10, 537-568))或5',3'-二磷酸酯。

連接體

模組化組合物之四GalNAc與寡核苷酸或siRNA之間之共價連接可由連接體調介。端視應用而定，此連接體可裂解或不可裂解。在某些實施例中，可使用可裂解連接體以在自內體運輸至細胞質後釋放寡核苷酸。結合或偶合相互作用之預期性質或期望生物效應可決定連接體基團之選擇。連接體基團可經組合或具支鏈以提供更複雜架構。適宜連接體包括彼等如WO2009/126933中所述者，其以引用方式併入本文中。

在一個實施例中，本發明之連接體示於表1中：

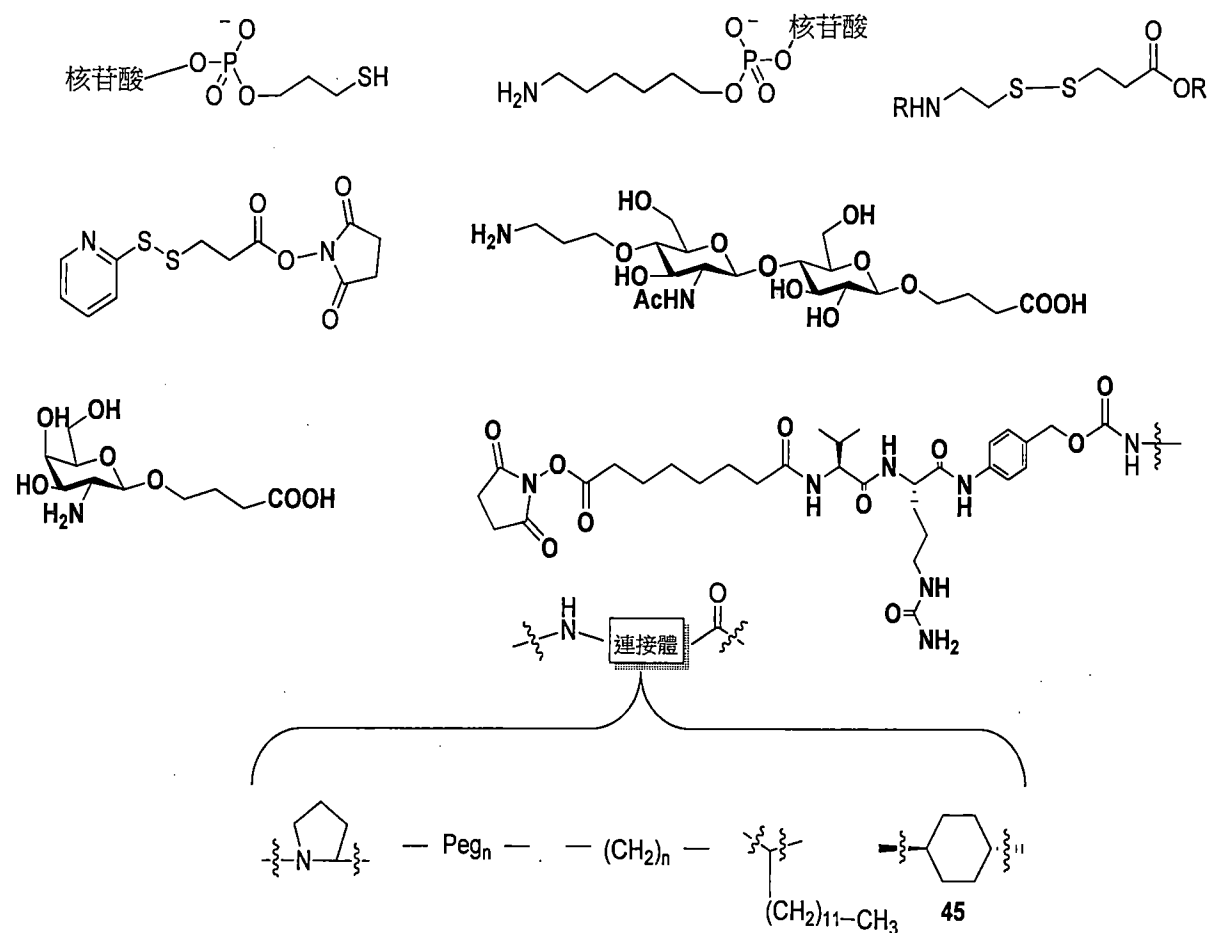
表1



R = H、Boc、Cbz、Ac、PEG、
脂質、靶向配體、連接體及/或
肽
n = 0 至 750
「核苷酸」可經非核苷酸部分
(例如無鹼基或連接體)取代，如
業內通常所知。

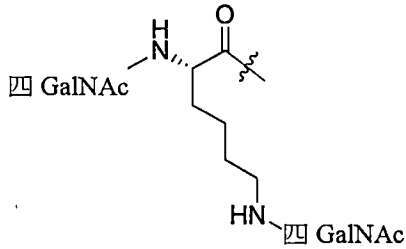
在另一實施例中，較佳連接體示於表2中：

表2



R = H、Boc、Cbz、Ac、PEG、
脂質、靶向配體、連接體及/或
肽
n = 0 至 750
「核苷酸」可經非核苷酸部分
(例如無鹼基或連接體)取代，
如業內通常所知。

市售連接體可自多個供應商(例如Pierce或Quanta Biodesign)購得，包括該等連接體之組合。另外，經由磷酸酯鍵連接之市售連接體可獨立地用作連接體或與該連接體組合使用。連接體亦可經組合以產生容納1至8個四GalNAc配體之更複雜具支鏈架構，如以下一個該實例中所闡釋：



靶向配體

本發明模組化組合物可包含靶向配體。在一些實施例中，此靶向配體可將模組化組合物引導至特定細胞。舉例而言，靶向配體可在靶細胞表面上與分子特異性或非特異性結合。靶向部分可為對於靶細胞具有特異性親和力之分子。靶向部分可包括抵抗靶細胞表面上發現之蛋白質之抗體或靶細胞表面上發現之分子之配體或配體之受體結合部分。靶向配體之實例及進一步說明可參見WO2009/126933，其以引用方式併入本文中。

靶向配體係選自由以下組成之群：抗體、受體之配體結合部分、受體之配體、適體、D-半乳糖、N-乙醯基-D-半乳糖(GalNAc)、多價N-乙醯基-D-半乳糖、D-甘露糖、膽固醇、脂肪酸、脂蛋白、葉酸鹽、促甲狀腺素、促黑色素細胞素、表面活性劑蛋白A、黏蛋白、碳水化合物、多價乳糖、多價半乳糖、N-乙醯基-半乳糖胺、N-乙醯基-葡萄糖胺、多價甘露糖、多價果糖、糖基化聚胺基酸、鐵傳遞蛋白、雙膦酸酯、多麩胺酸鹽、聚天冬胺酸鹽、增強血漿蛋白結合之親脂性部分、類固醇、膽酸、維生素B12、生物素、RGD肽、RGD肽模擬物、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、阿司匹林(aspirin)、葉酸鹽及其類似物及衍生物。

較佳靶向配體係選自由以下組成之群：D-半乳糖、N-乙醯基-D-半乳糖(GalNAc)、GalNAc₂及GalNAc₃、膽固醇、葉酸鹽及其類似物及衍生物。

脂質

親脂性部分(例如膽固醇或脂肪酸)在連接至高親水性分子(例如核酸)時可實質上增強血漿蛋白結合且因此增強循環半衰期。另外，親脂性基團可增加細胞攝取。舉例而言，脂質可結合至某些血漿蛋白，例如脂蛋白，其因此顯示可增加表現相應脂蛋白受體(例如，

LDL-受體或清除劑受體SR-B1)之特定組織中之攝取。亦可將親脂性結合物視為靶向傳送方法且可藉由與內體裂解試劑組合進一步潛在地改良其細胞內運輸。

增強血漿蛋白結合之例示性親脂性部分包括(但不限於)固醇、膽固醇、脂肪酸、膽酸、石膽酸、二烷基甘油酯、二醯基甘油酯、磷脂、鞘脂、金剛烷乙酸、1-萘丁酸、二氫甾固酮、1,3-雙-O(十六烷基)甘油、香葉基氧基己基、十六烷基甘油、苡醇、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油醯基)石膽酸、O3-(油醯基)膽烯酸、二甲氧基三苯甲基、吩噻嗪、阿司匹林、萘普生、布洛芬、維生素E及生物素等。脂質之實例及進一步說明可參見WO2009/126933，其以引用方式併入本文中。

較佳脂質係膽固醇。

增溶劑

模組化組合物可包含一或多個可增強水溶解性、循環半衰期及/或細胞攝取之其他部分/配體。該等部分/配體包括天然物質，例如蛋白質(例如，人類血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)或球蛋白)；或碳水化合物(例如，葡聚糖、支鏈澱粉、殼多糖、殼聚糖、菊粉、環糊精或透明質酸)。該等部分亦可為重組或合成分子，例如合成聚合物或合成聚胺基酸。實例包括聚離胺酸(PLL)、聚L-天冬胺酸、聚L-麩胺酸、苯乙烯-馬來酸酐共聚物、聚(交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-馬來酸酐共聚物、N-(2-羥基丙基)甲基丙烯醯胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG，例如PEG-0.5K、PEG-2K、PEG-5K、PEG-10K、PEG-12K、PEG-15K、PEG-20K、PEG-40K)、甲基-PEG(mPEG)、[mPEG]₂、聚乙烯醇(PVA)、聚胺基甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-異丙基丙烯醯胺聚合物或聚磷嗪。增溶劑之實例及進一步說明可參見WO2009/126933，其以引用方式併入本文

中。

較佳增溶基團係0.5K至30K之PEG。

治療方法

在一個態樣中，本發明之特徵在於治療處於可受益於投與本發明模組化組合物之疾病風險或患有該疾病的個體之方法。該方法包含向有需要之個體投與本發明模組化組合物，藉此治療該個體。所投與寡核苷酸將端視所治療疾病而定。對於關於特定適應症之治療之方法的其他詳細內容，參見WO2009/126933。

調配物

存在多種製備寡核苷酸化合物之結合物的方法。彼等熟習此項技術者應熟悉該等技術。該等反應之有用參考文獻係Bioconjugate Techniques, Hermanson, G. T., Academic Press, San Diego, CA, 1996。其他參考文獻包括WO2005/041859、WO2008/036825及WO2009/126933。

實例

藉由以下實例進一步闡述本發明，但其不應視為進一步限制本發明。貫穿本申請案引用之所有參考文獻、待決專利申請案及已公開專利之內容皆係以引用方式明確併入本文中。本文所述siRNA經設計以靶向普遍表現之基因SSB (Sjogren症候群抗原B；NM_009278.4)。

連接體基團可在鍵聯連接點(LAP)處連接至寡核苷酸或siRNA股且可包括任何含碳部分，在一些實施例中其具有至少1個氧原子、至少1個磷原子及/或至少1個氮原子。在一些實施例中，磷原子構成連接體基團上之末端磷酸酯或硫代磷酸酯基團之部分，其可用作寡核苷酸股之連接點。在某些實施例中，氮原子構成連接體基團上之末端醚、酯、胺基或醯胺基(NHC(O)-)之部分，其可用作目標連接體、內體裂解單元、細胞穿透肽、增溶基團、脂質、靶向基團或其他目標連

接體之連接點。該等末端連接體基團包括(但不限於) C₆己基、C₅二級-羥基、C₃硫醇或C₆硫醇部分。下述RNA序列之實例係C6己基：[(CH₂)₆ NH₂]。

四GalNAc配體及四GalNAc-siRNA結合物之製備闡述於下文實例及合成反應圖中。用於下述化合物及/或結合物之特定siRNA序列示於表3中。

項目	基因靶	鏈	序列	雙螺旋編碼
1	ApoB	過客	{6amiL}[iB][omeC][omeU][omeU][flUA][flUA][omeC][flUA][flUA][omeU][omeC][omeC][omeU][flUG][flUA][flUA][flUA][omeU][dT{s}[dT][iB]	51
	ApoB	導向	[rAs][rUs][rUs][omeU][omeC][flUA][flUG][flUG][flUA][flUA][omeU][omeU][flUG][flUA][omeU][flUA][flUA][flUA][flUG][omeUs][omeU]	
2	ApoB	過客	{6amiL}[iB][omeC][omeU][omeU][omeU][flUA][flUA][omeC][flUA][flUA][omeU][omeC][omeC][omeU][flUG][flUA][flUA][flUA][omeU][dT{s}dT[iB][6amiL]	52
	ApoB	導向	[rAs][rUs][rUs][omeU][omeC][flUA][flUG][flUG][flUA][flUA][omeU][omeU][flUG][flUA][omeU][flUA][flUA][flUA][flUG][omeUs][omeU]	
3	ApoB	過客	{6amiL}[iB][omeC][omeU][clickU][omeU][flUA][flUA][omeC][flUA][flUA][omeU][omeC][omeC][omeU][flUG][flUA][flUA][clickA][flUA][omeU][dT{s}dT[iB]	53
	ApoB	導向	[rAs][rUs][rUs][omeU][omeC][flUA][flUG][flUG][flUA][flUA][omeU][omeU][flUG][flUA][omeU][flUA][flUA][flUA][flUG][omeUs][omeU]	
4	ApoB	過客	[iB][omeC][omeU][omeU][omeU][flUA][flUA][omeC][flUA][flUA][omeU][omeC][omeC][omeU][flUG][flUA][flUA][flUA][omeU][dT{s}dT[iB][6amiL]	54
	ApoB	導向	[rAs][rUs][rUs][omeU][omeC][flUA][flUG][flUG][flUA][flUA][omeU][omeU][flUG][flUA][omeU][flUA][flUA][flUA][flUG][omeUs][omeU]	
5	ApoB	過客	{6amiL}[iB][omeC][omeU][omeU][omeU][flUA][flUA][omeC][flUA][flUA][omeU][omeC][omeC][omeU][flUG][flUA][flUA][flUA][omeU][dT{s}dT[iB]	55
	ApoB	導向	[rAs][rUs][rUs][omeU][omeC][flUA][flUG][flUG][flUA][flUA][omeU][omeU][flUG][flUA][propargylU][flUA][flUA][flUA][flUG][omeUs][omeU]	
6	SSB	過客	{6amiL}[iB][flUA][omeC][flUA][flUA][omeC][flUA][flUG][flUA][omeC][omeU][omeU][flUA][flUA][omeU][flUG][omeU][flUA][flUA][dT{s}dT[iB]	56
	SSB	導向	[rUs][rUs][rAs][omeC][flUA][omeU][omeU][flUA][flUA][flUA][flUG][omeU][omeC][flUA][flUG][omeU][omeU][flUG][omeU][omeUs][omeU]	
7	CTNNB1	過客	{6amiL}[iB][omeC][omeU][clickG][omeU][omeU][flUG][flUG][flUA][omeU][omeU][flUG][flUA][omeU][omeU][omeC][flUG][clickA][flUA][flUA][omeUs][omeU][iB]	57
	CTNNB1	導向	[omeUs][flUs][omeUs][flUC][omeG][flUA][omeA][flUA][omeC][flUA][omeA][flUA][omeC][flUC][omeA][flUA][omeC][flUA][omeG][omeUs][omeU]	
8	CTNNB1	過客	{6amiL}[iB][omeC][omeU][clickG][omeU][omeU][flUG][flUG][flUA][omeU][omeU][flUG][flUA][omeU][omeU][omeC][flUG][clickA][flUA][flUA][omeUs][omeU][iB]	58
	CTNNB1	導向	[omeUs][flUs][omeUs][flUC][omeG][flUA][omeA][flUA][omeC][flUA][omeA][flUA][omeC][flUC][clickA][flUA][omeC][flUA][omeG][omeUs][omeU]	

如本文所用，ome = 2'甲氧基；flu = 2'氟；click = 2'炔丙基；iB = 反向無鹼基；「s」下標 = 硫代磷酸酯；且r = 2'核糖；6amil = 正

己基胺基。

活體外及活體內活性數據

使用稍後闡述之方法，在表4中提供活體內及活體外數據。

表4. 活體外及活體內活性

項目	化合物	起始 siRNA 序列 編碼	劑量(mpk) 投與路徑	活體內 KD% : (72 h)	HEK-Luc 中之 IC50 , w/ LF2K [pM]	ASGR 結合 IC50 nM
1	10a-1	51	5, 15 SC	33.6; 69.5	15.44	36.7
2	10b-1	54	SC 5, 15; IV 15	42, 49, 13	19.64	18.1
3	10-2	56	5, 50 SC	40, 56 (24 h)	23.4	
4	10-3	57	1, 2.5, 5 SC	20, 45, 60	52 (HepG2)	
5	17a-1	51	5 SC; 15 IV	11, 5	20.16	49.1
6	17b-1	54	5 SC; 15 IV	12, 22	43.96	33.3
7	19-1	52	5; 15 SC	32; 68	24.04	3.6
8	29	53	15 SC; 15 IV	43, 0	17.83	22
9	36	58	1, 2.5, 5 SC	16, 43, 56		
10	37	58	1, 2.5, 5 SC	16, 32, 40		
11	38	51	5 SC, 15 IV	36, 33	71	17
12	39	51	5 SC, 15 IV	19, 31	46.8	44
13	40	51	5, 15 SC	33, 62	76.8	77
14	41	51	5, 15 SC	28, 74	98.6	134
15	42	51	5, 15 SC	19, 73	309.7	135
16	43	51	5, 15 SC	8, 73	64.8	45
17	44	51	5, 15 SC	31, 73	67.1	66
18	45	51	5 SC, 15 IV	20, 4	73.4	11
19	48a-1	51	5, 15 SC	10.24; 59.93	23.43	
20	48b-1	53	5, 15 SC	19.87; 42.08	57.96	
21	51	55	5; 15	40; 45	1838.47	94.8

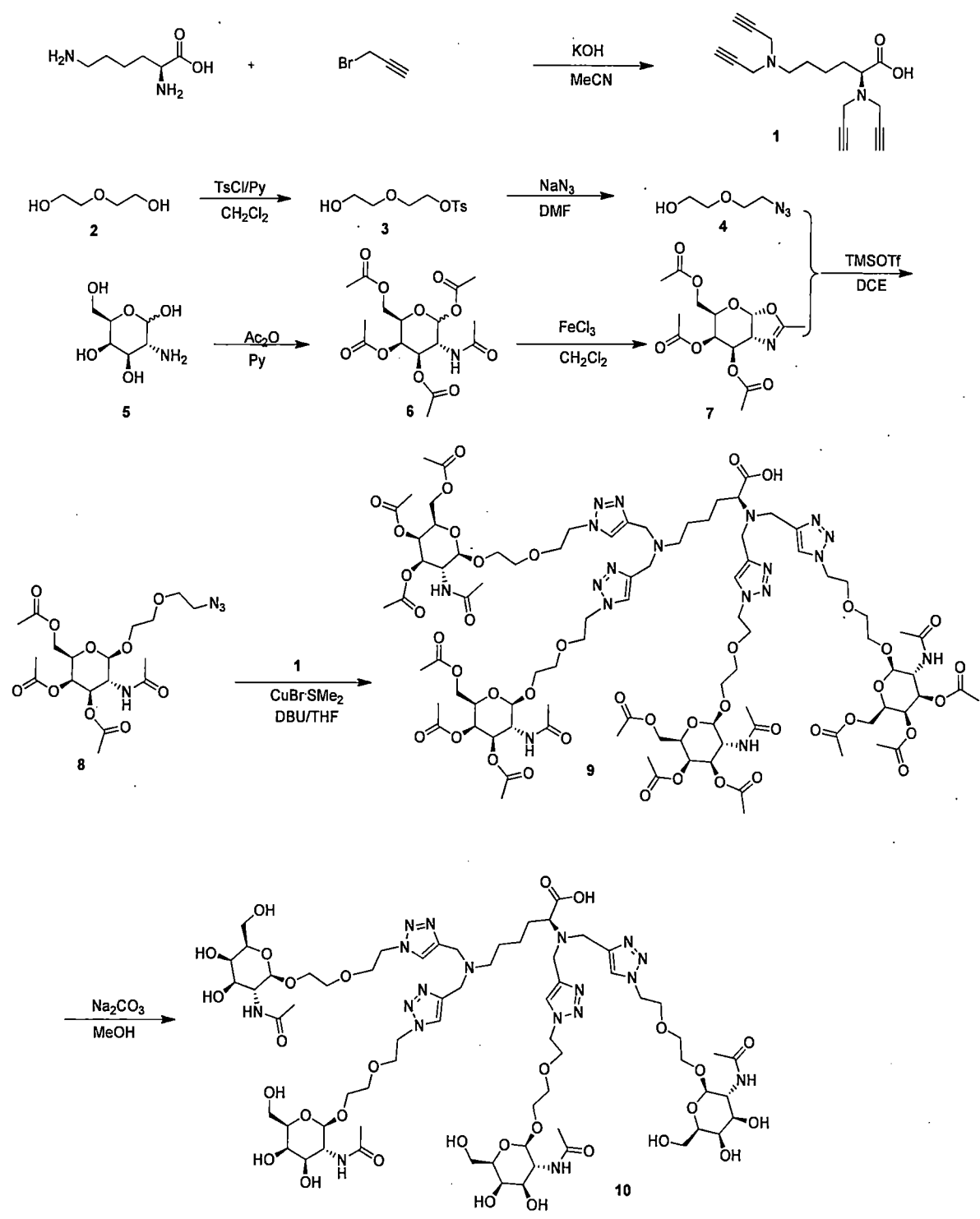
應注意，下文siRNA繪示係出於闡釋目的。特定序列資訊可參見表3。

實例1-2

四GalNAc配體化合物9及10之合成

使用以下反應圖1製備四GalNAc化合物9及10。

反應圖1



(2S)-2,6-雙[雙(丙-2-炔-1-基)氨基]己酸(化合物1)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之2000-mL 3頸圓底燒瓶中放入 (2S)-2,6-二氨基己酸(50 g, 342.03 mmol, 1.00當量)存於乙腈(1000 mL) 中之溶液並加熱至50℃。向此中添加氫氧化鉀(22.6 g, 0.4025 mol, 1.00當量, 85%)。將所得溶液攪拌30 min。隨後添加3-溴丙-1-炔(29.5 mL, 1.00當量)。將所得溶液於50℃下攪拌1小時。向溶液中添加其他

氫氧化鉀(22.6 g, 0.4025 mol, 1.00當量)並於50℃下攪拌30 min。向此中添加3-溴丙-1-炔(29.5 mL, 1.00當量)。將所得溶液攪拌1小時。向此中再次添加氫氧化鉀(22.6 g, 0.4025 mol, 1.00當量)。將所得溶液於50℃下攪拌30 min, 之後添加更多3-溴丙-1-炔(29.5 mL, 1.00當量)。將所得溶液攪拌1小時。向此中添加氫氧化鉀(22.6 g, 0.4025 mol, 1.00當量)。將所得溶液攪拌30 min。向此中添加3-溴丙-1-炔(29.5 mL, 1.00當量)。將所得溶液攪拌3小時。將反應混合物用水/冰浴冷卻至25℃。濾出固體。用HCl (6M)將濾液調節至pH 4。濾出固體。在真空下濃縮濾液。將殘餘物施加至矽膠管柱上並用二氯甲烷/甲醇(100:1-25:1)洗脫。此產生淺黃色油狀(2S)-2,6-雙[雙(丙-2-炔-1-基)胺基]己酸(化合物1)。

MS (ES, m/z): 297.2, $[M-H]^-$ $^1\text{HNMR}$ (CDCl_3 , 500MHz, ppm): 3.62 (d, $J = 2.0$ Hz, 4H), 3.52-3.49 (m, 1H), 3.50 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H), 2.62 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.30 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.27 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H), 1.88-1.79 (m, 2H), 1.60-1.53 (m, 2H), 1.52-1.43 (m, 2H)。

4-甲基苯磺酸2-(2-羥基乙氧基)乙基酯(化合物3)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之2000-mL 3頸圓底燒瓶中放入2-(2-羥基乙氧基)乙-1-醇(化合物2, 42.4 g, 399.55 mmol, 1.00當量)存於二氯甲烷(1000 mL)及三乙胺(27.9 g, 275.72 mmol, 0.25當量)中之溶液。向上述物質中添加對甲苯磺醯氯(19.1 g, 100.18 mmol, 0.50當量)。在25℃下攪拌1 h後, 分別用1×500 mL硫酸氫鉀水溶液(1M)及1×500 mL碳酸氫鈉水溶液(5%)洗滌所得混合物。經無水硫酸鈉乾燥有機層並在真空下濃縮。將殘餘物施加至矽膠管柱上並用二氯甲烷/甲醇(100:1)洗脫。此產生無色油狀4-甲基苯磺酸2-(2-羥基乙氧基)乙基酯(化合物3)。

2-(2-疊氮基乙氧基)乙-1-醇(化合物4)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之500-mL圓底燒瓶中放入4-甲基苯磺酸2-(2-[(4-2-(2-羥基乙氧基)乙基酯(化合物3, 50 g, 192.08 mmol, 1.00當量)存於N,N-二甲基甲醯胺(250 mL)中之溶液。之後於25°C下添加疊氮化鈉(18.79 g, 289.03 mmol, 1.50當量)。將所得溶液於100°C下在油浴中攪拌5 h。冷卻並過濾反應混合物。在真空下濃縮濾液。將殘餘溶液用1000 mL二氯甲烷稀釋並用1×500 mL水洗滌。經無水硫酸鈉乾燥有機層並在真空下濃縮。將殘餘物施加至矽膠管柱上並用二氯甲烷/甲醇(80:1)洗脫。此產生無色油狀2-(2-疊氮基乙氧基)乙-1-醇(化合物4)。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm): 3.42-3.45 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 2H), 3.63-3.65 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 2H), 3.71-3.74 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 2H), 3.71-3.79 (m, 2H)。

(3R,4R,5R,6R)-三乙酸3-乙醯胺基-6-(乙醯氧基甲基)四氫-2H-吡喃-2,4,5-三基酯(化合物6)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之2000-mL 3頸圓底燒瓶中放入(3R,4R,5R,6R)-3-胺基-6-(羥基甲基)四氫-2H-吡喃-2,4,5-三醇鹽酸鹽(化合物5, 120 g, 556.50 mmol, 1.00當量)存於吡啶(1200 mL)中之溶液。之後於0°C下在攪拌下逐滴添加乙酸酐(341.6 g, 3.35 mol, 6.00當量)。將所得溶液於25°C下攪拌過夜。隨後藉由添加8000 mL水/冰驟冷反應。藉由過濾收集固體。此產生白色固體狀(3R,4R,5R,6R)-三乙酸3-乙醯胺基-6-(乙醯氧基甲基)四氫-2H-吡喃-2,4,5-三基酯(化合物6)。

(3aR,5R,6R,7R,7aR)-二乙酸5-(乙醯氧基甲基)-2-甲基-5,6,7,7a-四氫-3aH-吡喃并[3,2-d]噁唑-6,7-二基酯(化合物7)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之2000-mL圓底燒瓶中放入(3R,4R,5R,6R)-三乙酸3-乙醯胺基-6-(乙醯氧基甲基)四氫-2H-吡喃-

2,4,5-三基酯(化合物6, 30 g, 77.05 mmol, 1.00當量)存於二氯甲烷(1500 mL)中之溶液, 隨後添加氯化鐵(III) (30 g, 184.95 mmol, 2.40當量)。將所得混合物於25℃下攪拌2 h。隨後藉由添加1000 mL水/冰驟冷反應。將有機層用1×1000 mL碳酸氫鈉水溶液及1×1000 mL水洗滌, 經無水硫酸鈉乾燥並在真空下濃縮。此產生黃色油狀(3aR,5R,6R,7R,7aR)-二乙酸5-(乙醯氧基甲基)-2-甲基-5,6,7,7a-四氫-3aH-吡喃并[3,2-d]噁唑-6,7-二基酯(化合物7)。

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, ppm): 2.03 (s, 9H), 2.12 (s, 3H), 3.97-4.27 (m, 4H), 4.90-4.93 (m, $J = 3.3\text{Hz}$, 1H), 5.45-5.47 (t, $J = 3.0\text{Hz}$, 1H), 5.98-6.00 (d, $J = 6.6\text{Hz}$, 1H)。

(2R,3R,4R,5R,6R)-二乙酸5-乙醯胺基-2-(乙醯氧基甲基)-6-[2-(2-疊氮基乙氧基)乙氧基]四氫-2H-吡喃-3,4-二基酯(化合物8)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之500-mL圓底燒瓶中放入(3aR,5R,6R,7R,7aR)-二乙酸5-(乙醯氧基甲基)-2-甲基-5,6,7,7a-四氫-3aH-吡喃并[3,2-d]噁唑-6,7-二基酯(化合物7, 40 g, 121.47 mmol, 1.00當量)存於1,2-二氯乙烷(200 mL)、2-(2-疊氮基乙氧基)乙-1-醇(化合物4, 23.89 g, 182.18 mmol, 1.50當量)中之溶液。向上述中添加若干4A沸石。將所得混合物於25℃下攪拌1 h。隨後添加三氟甲烷磺酸三甲基矽基酯(10.8 mL, 0.50當量)。於25℃下攪拌過夜後, 將反應混合物用500 mL二氯甲烷稀釋並用1×500 mL水、1×500 mL碳酸氫鈉水溶液及1×500 mL水洗滌。經無水硫酸鈉乾燥有機層並在真空下濃縮。將殘餘物施加至矽膠管柱上並用二氯甲烷/甲醇(100:1)洗脫。此產生無色油狀(2R,3R,4R,5R,6R)-二乙酸5-乙醯胺基-2-(乙醯氧基甲基)-6-[2-(2-疊氮基乙氧基)乙氧基]四氫-2H-吡喃-3,4-二基酯(化合物8)。

MS(m/z): 461.1, $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (CDCl_3 , 500MHz, ppm) 5.78 (d, $J = 8.90\text{ Hz}$, 1H), 5.36

(d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 5.22 (dd, $J = 11.2, 3.6$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.19-4.12 (m, 2H), 4.11-4.05 (m, 1H), 3.98-3.92 (m, 2H), 3.82-3.78 (m, 1H), 3.71-3.63 (m, 4H), 3.49-3.38 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.97 (s, 3H)。

(S)-2,6-雙(雙((1-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺基-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺基)己酸(化合物9，四GalNAc乙酸酯)(實例1)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之250-mL圓底燒瓶中以各別次序裝入(2S)-2,6-雙[雙(丙-2-炔-1-基)胺基]己酸(化合物1，1.0 g，1.0當量)、(2R,3R,4R,5R,6R)-二乙酸5-乙醯胺基-2-(乙醯氧基甲基)-6-[2-(2-疊氨基乙氧基)乙氧基]四氫-2H-吡喃-3,4-二基酯(化合物8，9.26 g，6.0當量)、50 mL無水THF、CuBr·SMe₂ (0.138 g，0.20當量)及無水DBU (1.5 mL，3.0當量)。將所得溶液於室溫下攪拌16 h，用乙酸(0.75 mL，4.0當量)驟冷，用MP-TMT樹脂(型號：801472，來自Biotage) (9 g)處理，於室溫下老化16 h，過濾並將濾液濃縮成發泡固體。隨後將固體溶解於CH₂Cl₂ (140 mL)中，且用AcOH / NaCl溶液(140 mL)洗滌。利用1 mL AcOH及100 mL 20% NaCl溶液製備AcOH / NaCl溶液。濃縮底部有機層，並在SiO₂管柱(220 g)上用CH₂Cl₂ / MeOH洗脫來純化。此產生白色固體狀(S)-2,6-雙(雙((1-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺基-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺基)己酸(化合物9)。

MS(m/z): 2139.5, [M+H]⁺

(S)-2,6-雙(雙((1-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺基-4,5-二羥基-6-(羥基甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺基)己酸(化合物10，四GalNAc)(實例2)之合成

向吹入並維持有氮氣之惰性氣氛之250-mL圓底燒瓶中以各別次序裝入(S)-2,6-雙(雙((1-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺基-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺基)己酸(化合物9, 6.9 g, 1.0當量)、 Na_2CO_3 (6.83 g, 20當量)、水(56 mL)及MeOH (32 mL)。將反應物於室溫下老化16 h, 濃縮成殘餘物, 重新溶解於水(50 mL)中, 並在Combiflash C18金反相管柱(415 g)上用水/ MeCN洗脫來純化。在真空下濃縮後, 將產物溶解於最少量之水中, 並凍乾以獲得白色固體狀(S)-2,6-雙(雙((1-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺基-4,5-二羥基-6-(羥基甲基)四氫-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺基)己酸(化合物10)。

MS(m/z): 1657 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

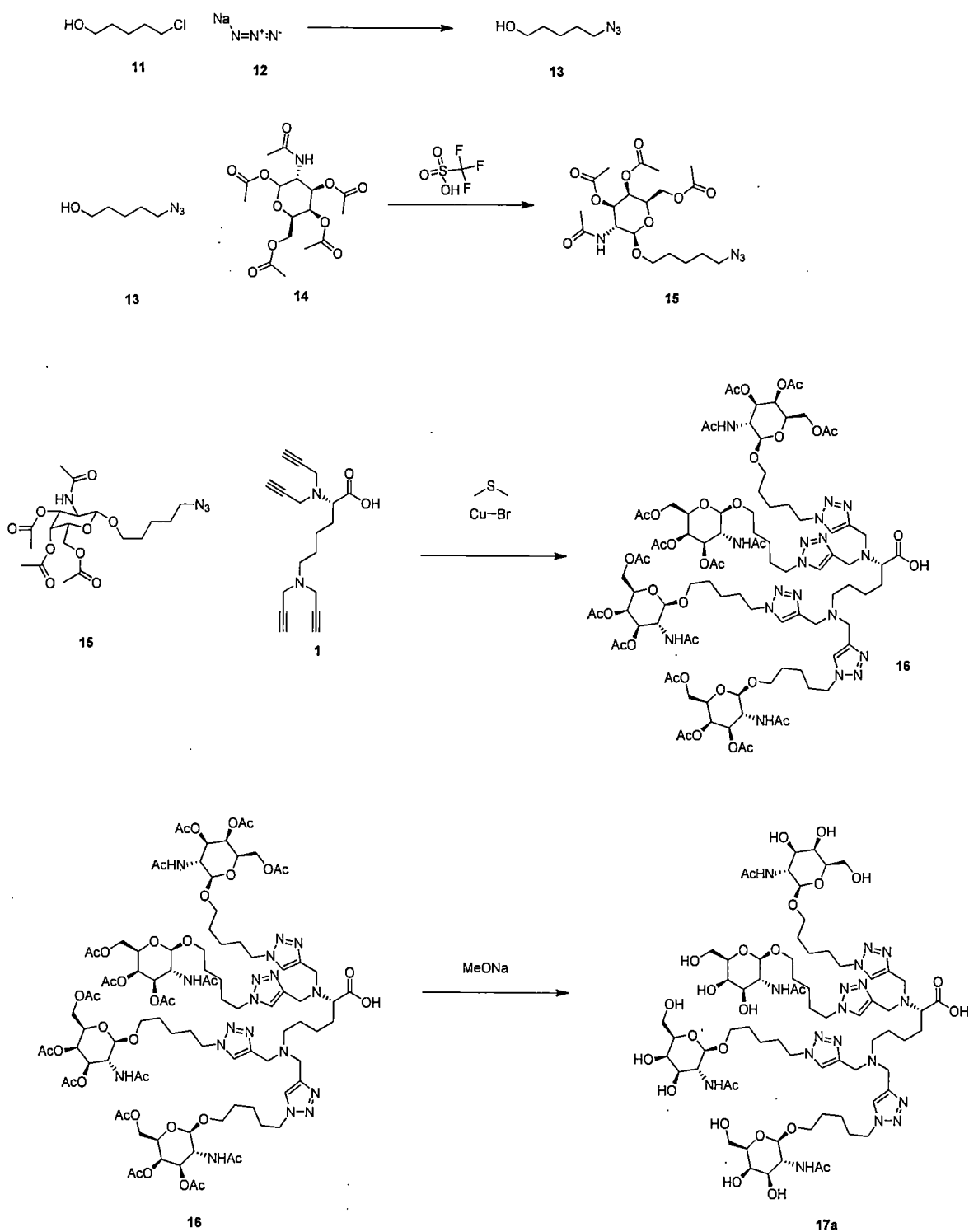
^1H NMR(D_2O , 500 MHz, ppm): 8.05 (s, 2H), 7.91 (s, 2H), 4.62 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 4.57 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 4.45-4.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), 3.99-3.82 (m, 28H), 3.80-3.61 (m, 28H), 3.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.52 (broad s, 2H), 1.99 (s, 6H), 1.98 (s, 6H), 1.73 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.29 (m, 2H)。

實例3-5

四GalNAc配體化合物17a、17b及17c之合成

使用以下反應圖2製備四GalNAc化合物17a、17b及17c。

反應圖2



化合物13之合成

向5-氯-1-戊醇(3.0 g, 24.47 mmol)化合物11存於DMF (20 mL)中之溶液中添加疊氮化鈉(1.909 g, 29.4 mmol)化合物12。於60℃下攪拌過夜後，在真空中濃縮反應混合物。藉由矽膠層析(EtOAc/己烷1:3)純化殘餘物，從而得到澄清液體狀產物化合物13。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.62 (m, 2H), 3.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.63-1.53 (m, 4H),

1.45-1.40 (m, 2H)。

化合物15之合成

將化合物13 (0.796 g, 6.16 mmol)及D-半乳糖胺五乙酸酯(2.00 g, 5.14 mmol)化合物14懸浮於20 mL DCM中，之後添加三氟甲烷磺酸(0.154 g, 1.027 mmol)。使所得混合物回流過夜。LC-MS指示SM完全轉化，將反應混合物用EtOAc稀釋並用碳酸氫鈉洗滌並經硫酸鈉乾燥。移除溶劑並藉由ISCO DCM/MeOH經30 min自100/0至90/10純化殘餘物，從而獲得白色固體狀化合物15。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.97 (6 H, s), 2.02 (6 H, s), 2.06 (6 H, s), 2.15 (6 H, s), 3.28 (6 H, t, J = 6.89 Hz), 3.50 (3 H, dt, J = 9.63, 6.66 Hz), 3.68 (1 H, q, J = 5.98 Hz), 3.94-3.92 (7 H, m), 4.16-4.15 (5 H, m), 4.73 (2 H, d, J = 8.34 Hz), 5.31 (2 H, dd, J = 11.16, 3.48 Hz), 5.40-5.38 (5 H, m)。計算質量：[M+H]⁺: C₁₉H₃₁N₄O₉, 459.2；觀察值：459.4。

化合物16之合成

將Lys-炔烴化合物1 (130 mg, 0.436 mmol)及GalNAc疊氮化物6 (999 mg, 2.178 mmol)溶解於THF (5 mL，脫氣)中。向反應混合物中一次性添加溴化銅(I)-二甲硫醚複合物(17.91 mg, 0.087 mmol)並將THF溶液於40℃下攪拌過夜。反應物顏色變為藍色/綠色，指示出現Cu²⁺，向反應混合物中添加存於0.2 mL水中之37 mg新鮮抗壞血酸鈉並使其反應過夜。濃縮反應物並藉由RP HPLC 5-60 MeCN(0.5% TFA)/水(0.5% TFA)經20 min純化。合併並凍乾所收集部分，從而獲得白色固體狀化合物8。計算質量：[M+3H]³⁺: C₉₄H₁₄₅N₁₈O₃₈, 2134.0, m/z = 711.3；觀察值：711.9。

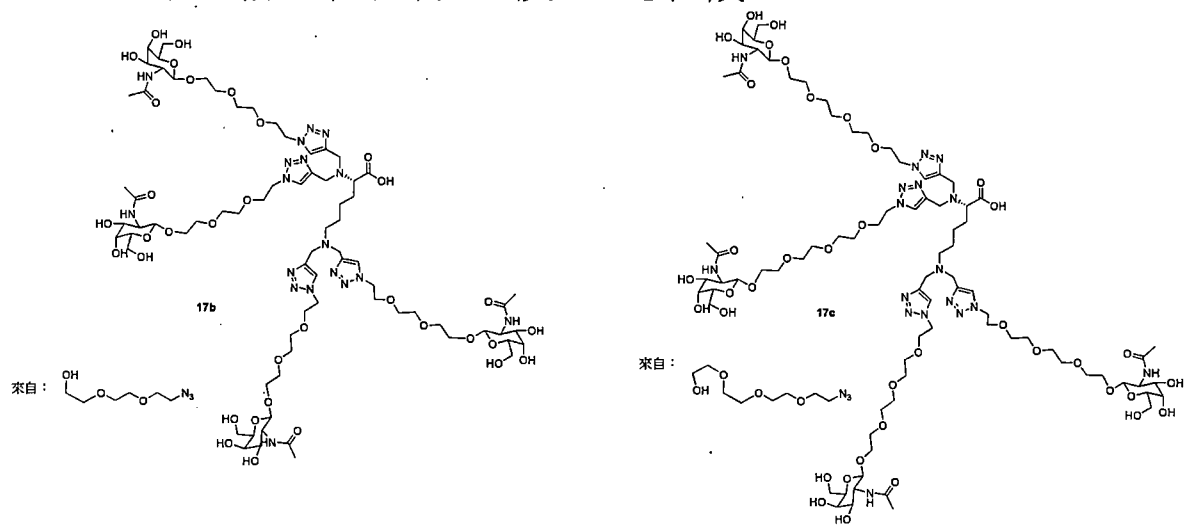
化合物17a (實例3)之合成

於0℃下向存於5 mL DCM/MeOH=1/1中之經保護四GalNAc化合物8 (300 mg, 0.141 mmol)中添加甲醇鈉(91 mg, 1.688 mmol)。將反應

物攪拌1 h並藉由添加2 mL水驟冷。移除揮發性溶劑，並藉由P4生物凝膠利用水純化反應混合物，且合併且凍乾所收集部分，從而獲得白色固體狀化合物9。計算質量： $[M+3H]^{3+}$: $C_{70}H_{121}N_{18}O_{26}$, 1629.9, m/z =543.3；觀察值：543.8； $[M+2H]^{2+}$: $C_{70}H_{120}N_{18}O_{26}$, 1628.9, m/z =814.5；觀察值：814.9。

化合物17b及17c (實例4及實例5)之合成

以類似於用於化合物17a之方式之方式使用適當疊氮化物來源完成具有以下結構之化合物17b及17c之合成。

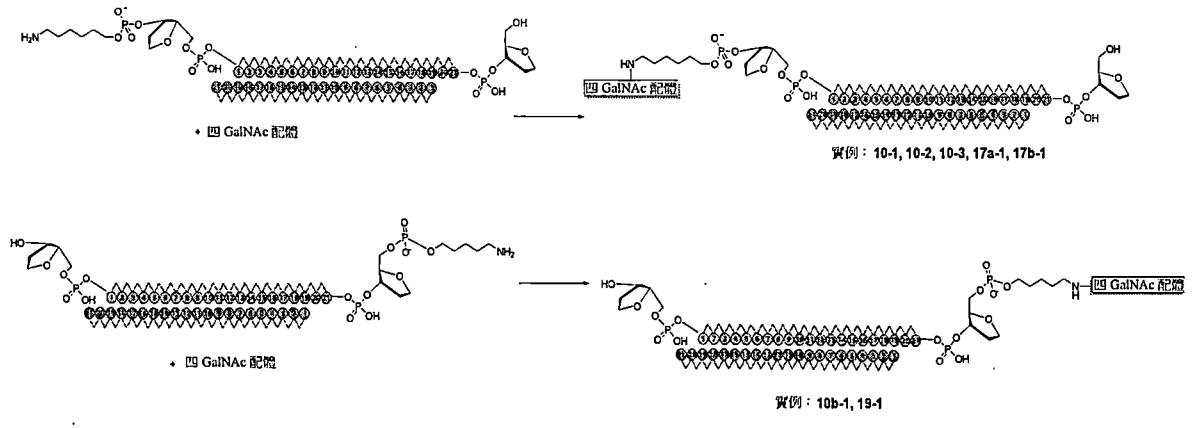


實例6

四GalNAc配體之結合之反應圖

以下反應圖3顯示可用於製備四GalNAc-siRNA結合物之通用反應圖。

反應圖3



使用通用反應圖3可獲得結合物10-1、10-2、10-3、10a-1、17a-1、17b-1、17c-1。可在預形成siRNA雙螺旋或上或在單股上實施偶合程序，之後退火。或者，可利用 *Bioconjug Chem.* 2011, 22, 第1723-8 頁中所概述之方案。

實例7

經由四GalNAc乙酸酯化合物9之四GalNAc-siRNA結合物10-1之合成

向四GalNAc乙酸酯(化合物9, 58.7 mg, 0.027 mmol)存於乙腈(1.5 ml)中之溶液中添加DIPEA (2.2 mg, 0.055 mmol)及HATU (10.44 mg, 0.027 mmol)。將混合物於室溫下攪拌30 min, 經20 min經由注射器幫浦轉移至siRNA (51) (0.014 mmol)存於水(1.5 ml)及乙腈(1.5 ml)中之溶液中, 並攪拌30 min, 之後在真空下將其濃縮至1.5 mL。隨後添加碳酸鈉(218 mg, 2.059 mmol), 之後添加MeOH (0.50 ml)。將所得溶液於室溫下攪拌16 h, 濃縮, 經由透析純化, 並凍乾, 從而產生四GalNAc-siRNA結合物10-1。

實例8

3'5'雙四GalNAc-siRNA結合物單股18之合成

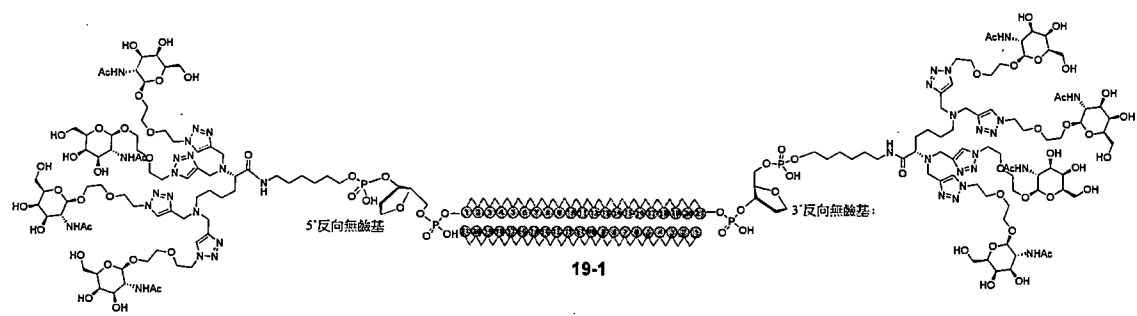
向四GalNAc酸化合物10 (41.2 mg, 0.025 mmol)存於DMSO (200 μ L)中之溶液中添加HATU (9.6mg, 0.025 mmol)及DIPEA (17.6 μ L, 0.126 mmol)。將混合物於室溫下攪拌15 min, 轉移至二胺基-siRNA (18.8 mg, 2.52 μ mol)存於水(40 μ L)及DMSO (360 μ L)中之溶液中並攪拌30 min。將混合物用水(1.5 mL)稀釋並在XBridge製備型苯基管柱(5 μ M, 19 $\times$ 250 mm)上使用0 - 30% CH₃CN/水(含有100 mM TEAA)之梯度純化。經由透析濃縮各部分並凍乾, 從而產生化合物18。

實例9

3'5'雙四GalNAc-siRNA雙螺旋結合物19-1之合成

使用以下反應圖4製備四GalNAc-siRNA結合物19-1。

反應圖4



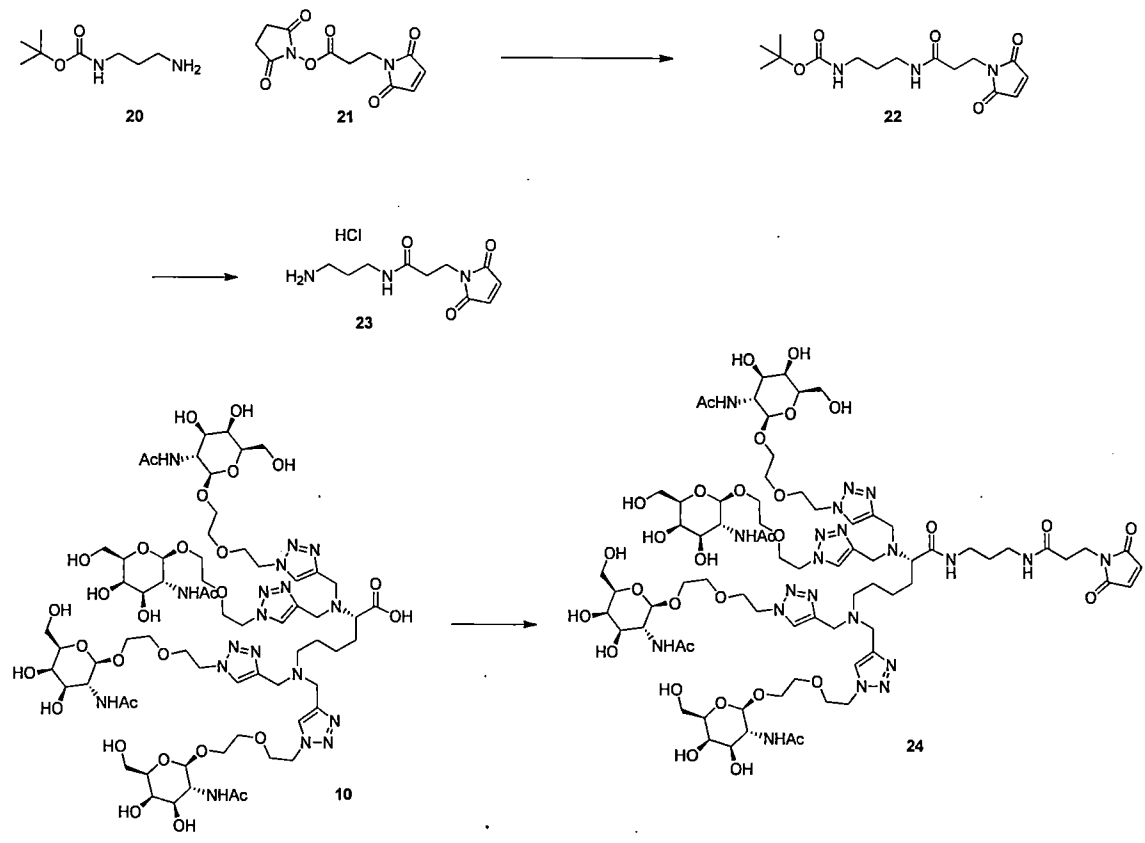
嚮導向siRNA (9.3 mg, 1.35 μmol)溶解於水(100 μL)中之溶液中添加3'5'雙四GalNAc-siRNA結合物18 (13.7 mg, 1.29 μmol)存於水(200 μL)中之溶液並於90 $^{\circ}\text{C}$ 下加熱1分鐘。冷卻並凍乾所得溶液，從而產生雙螺旋19-1。

實例10

四GalNAc配體化合物24之合成

使用以下反應圖5製備四GalNAc化合物24。

反應圖5



化合物22之合成

於0℃下向N-BOC-1,3-二氨基丙烷(化合物20, 115 mg, 0.660 mmol)存於1:1 CH₂Cl₂ /CH₃CN (1 mL)中之溶液中添加3-馬來醯亞胺丙酸N-羥基琥珀醯亞胺酯(化合物21, 185 mg, 0.695 mmol)溶解於乙腈(4 mL)及CH₂Cl₂ (1 mL)中之溶液。將混合物攪拌1 h並在真空下濃縮。藉由矽膠層析(0 - 5% MeOH/ CH₂Cl₂)純化殘餘物, 從而得到產物化合物22。計算質量: [M+H]⁺: C₁₅H₂₄N₃O₅, 326.2; 觀察值: 326.3。

化合物23之合成

向馬來醯亞胺化合物22 (56 mg, 0.172 mmol)存於CH₂Cl₂ (1 ml)中之溶液中添加4M HCl (1 ml, 4.00 mmol)存於二噁烷中之溶液。將混合物攪拌1 h並在真空下濃縮。將殘餘物與CH₂Cl₂ (2×)共沸並在真空下乾燥, 從而得到產物化合物23。計算質量: [M+H]⁺: C₁₀H₁₆N₃O₃, 226.1; 觀察值: 226.3。

四GalNAc馬來醯亞胺化合物24 (實例10)之合成

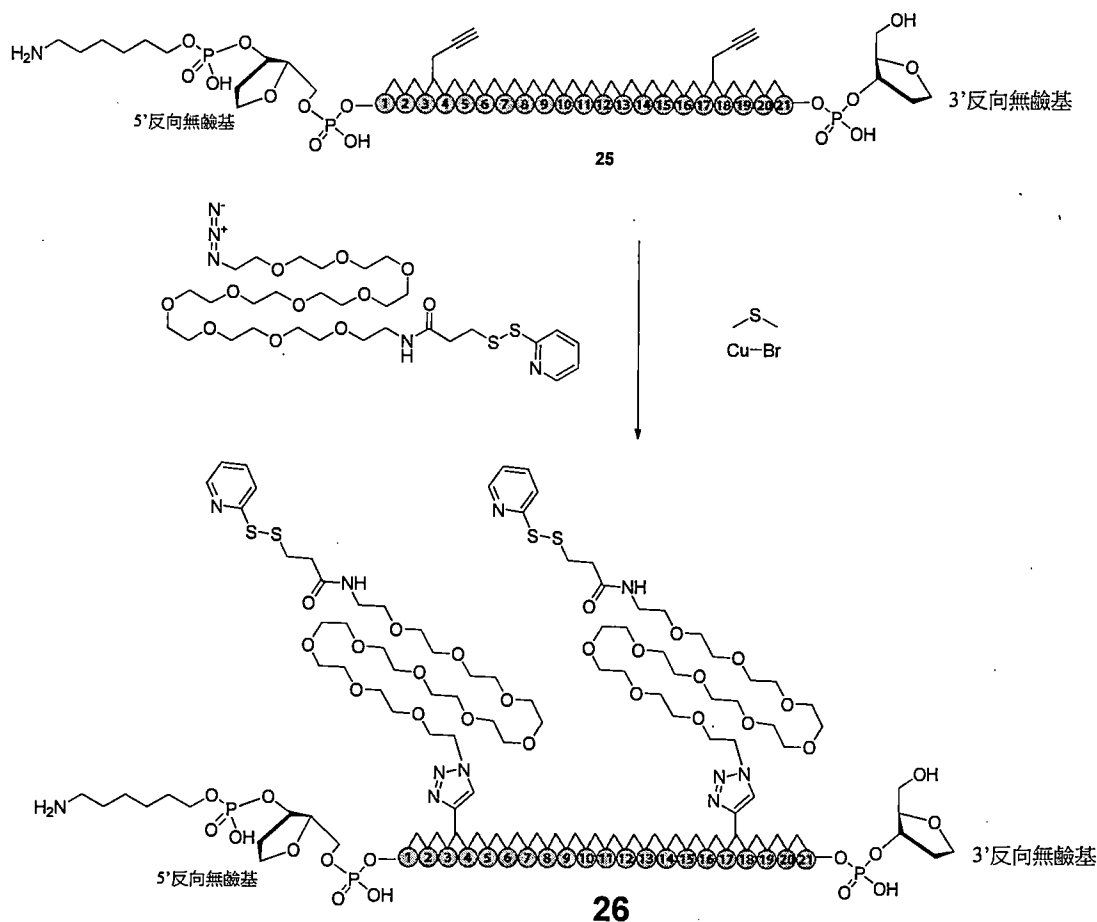
向四GalNAc酸化合物10 (100 mg, 0.061 mmol)存於DMF (500 μL)中之溶液中添加HATU (34.9 mg, 0.092 mmol)、Et₃N (42.6 μL, 0.306 mmol)及N-(3-氨基丙基)-3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺鹽酸鹽(16.0 mg, 0.061 mmol)。將混合物於室溫下攪拌1.5 h, 用TFA酸化並藉由反相0 - 50% CH₃CN/水(含有0.1% TFA)純化。凍乾各部分, 從而產生化合物24。計算質量: [M+2H]²⁺: C₇₆H₁₂₅N₂₁O₃₂, 1843.8, *m/z* = 921.9; 觀察值: 922.7。

實例11

化合物26之合成

使用以下反應圖6製備化合物26。

反應圖6



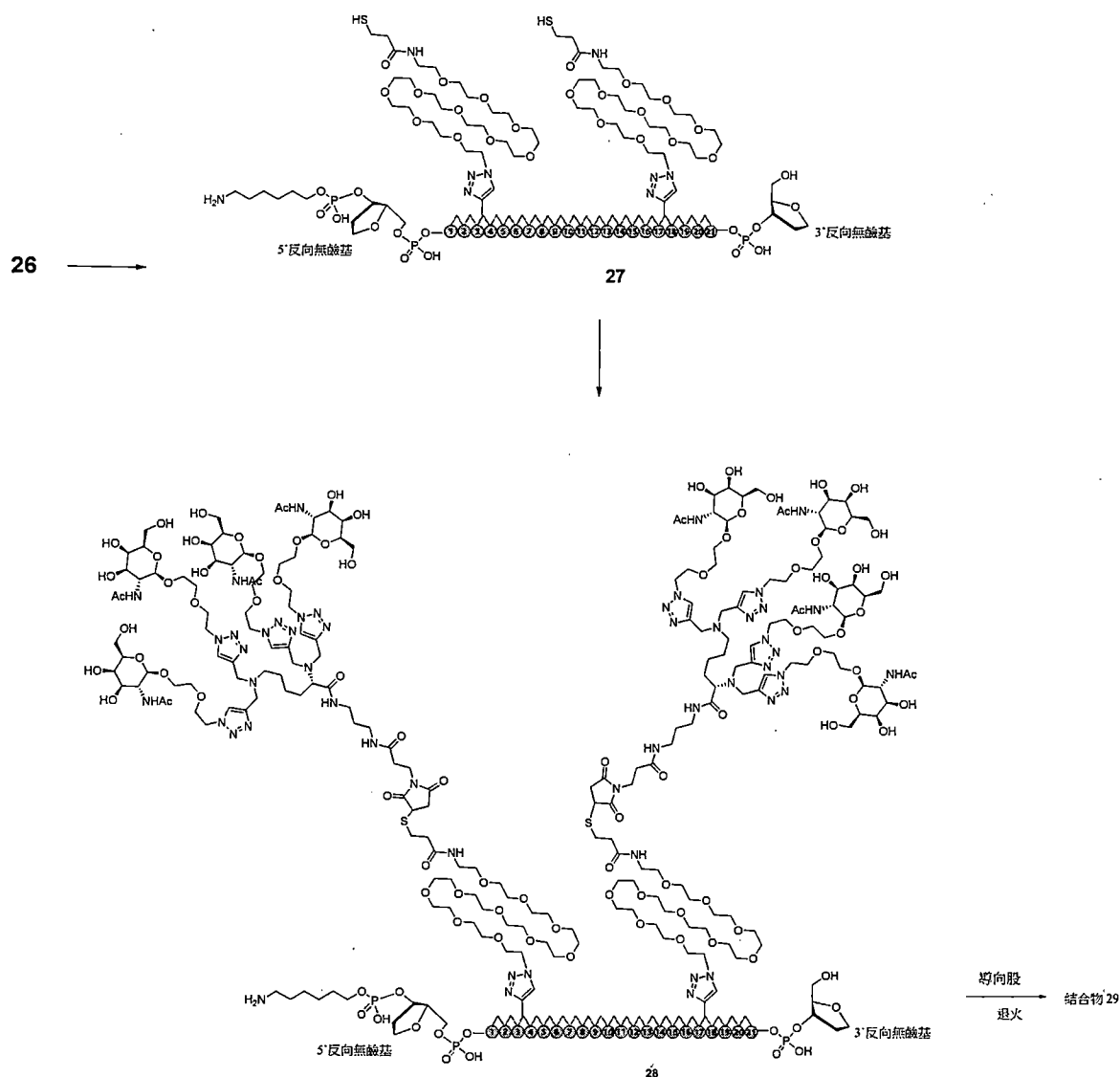
向2'-3,17炔丙基siRNA (RNA 25, 33 mg, 4.49 μmol)及PEG9 SPDP疊氮化物(26 mg, 36 μmol , 自市售PEG-疊氮化物及吡啶基二硫化物試劑製備)存於3:1 DMA/水(1 mL)中之脫氣溶液中添加溴化銅(I)-二甲硫醚複合物之脫氣溶液(1.8 mg, 9.0 μmol)。將混合物於室溫下攪拌72 h, 用水(2 mL)稀釋, 使用0.45 μM 注射式過濾器過濾並藉由透析濃縮。在XBridge製備型苯基管柱(5 μM , 19 $\times$ 250 mm)上使用0 - 50% CH_3CN /水(含有100 mM TEAA)之梯度純化濃縮混合物。經由透析濃縮各部分並凍乾, 從而產生化合物26。

實例12-13

化合物27及28之合成

使用以下反應圖7製備化合物27及28。

反應圖7



化合物27 (實例12)之合成

向2'-3,17click PEG9 SPDP結合物26 (13.2 mg, 1.50 μmol)存於水 (1 mL)中之溶液中添加TCEP鹽酸鹽(9.15 mg, 32.2 μmol)溶解於水(0.5 mL)中之溶液。將混合物於RT下攪拌30 min，隨後在XBridge製備型苯基管柱(5 μM ，19 $\times$ 250 mm)上使用5-40% CH_3CN /水(含有100 mM TEAA)之梯度純化。經由透析濃縮各部分並凍乾，從而產生化合物27。

化合物28 (實例13)之合成

向2'-3,17-click PEG9SH 27 (3 mg, 0.35 μmol)存於pH 6.0乙酸鹽緩衝液(100 μL)中之溶液中添加四GalNAc馬來醯亞胺(5.1 mg, 2.77 μmol)溶解於pH 6.0乙酸鹽緩衝液(100 μL)中之溶液。將混合物於室溫

下攪拌30 min，隨後在XBridge製備型苯基管柱(5 μ M，19 $\times$ 250 mm)上使用5-40% CH₃CN/水(含有100 mM TEAA)之梯度純化。經由透析濃縮各部分並凍乾，從而產生化合物28。

實例14

2'-3,17雙四GalNAc-siRNA雙螺旋結合物29之合成

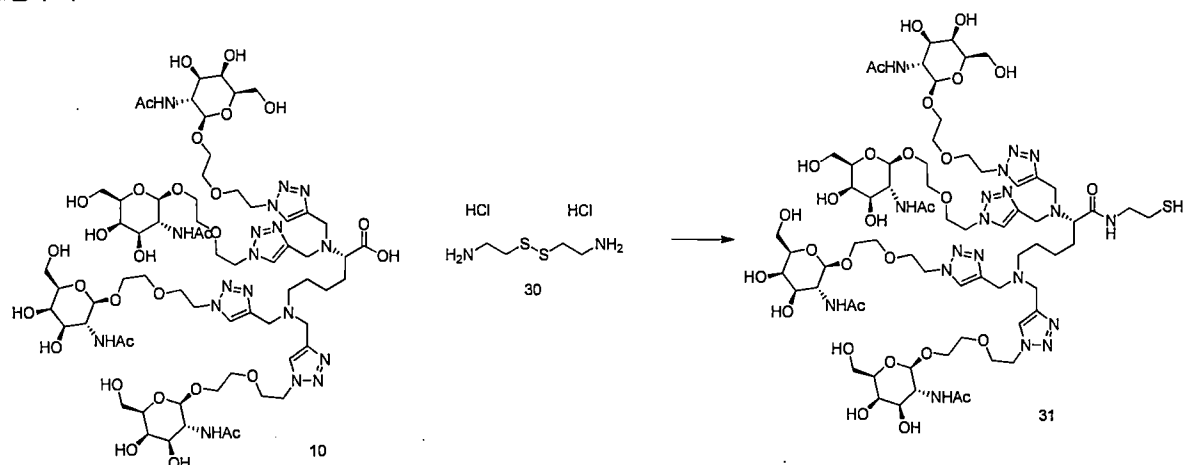
對於結合物19詳述之程序用於雙螺旋28以製造結合物29。

實例15

四GalNAc硫醇化合物31之合成

使用以下反應圖8製備化合物31。

反應圖8



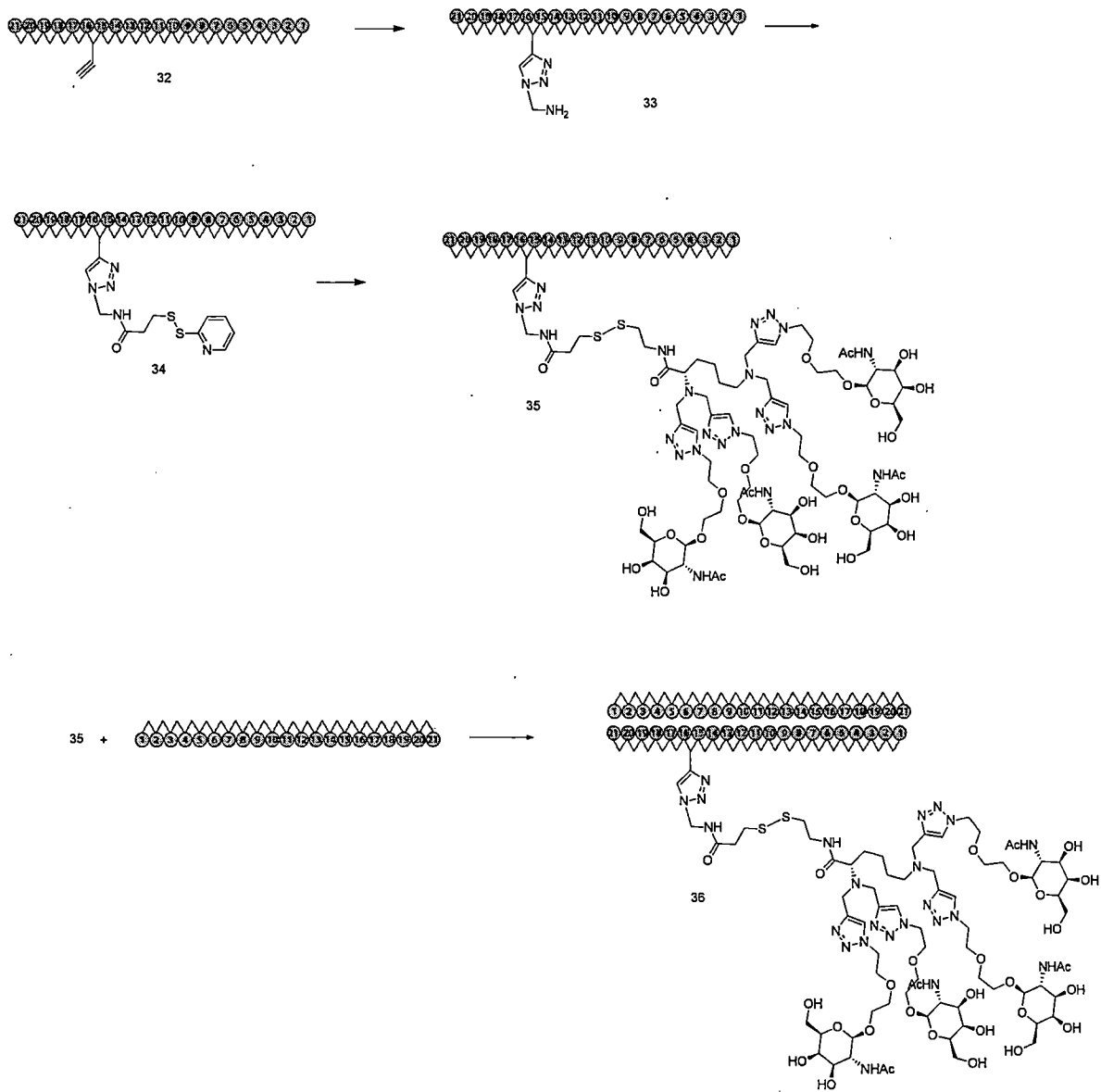
向四GalNAc酸化化合物10 (54 mg, 0.033 mmol)存於N,N-二甲基乙醯胺(500 μ l)中之溶液中添加胱胺二鹽酸鹽30 (14.9 mg, 0.066 mmol)、EDC (12.7 mg, 0.066 mmol)、HOAT (10.2 mg, 0.066 mmol)及DIPEA (57.7 μ l, 0.330 mmol)。將混合物於室溫下攪拌18 h，隨後添加DTT (50.9 mg, 0.330 mmol)存於N,N-二甲基乙醯胺(100 μ l)中之溶液。將混合物於室溫下攪拌0.5 h，用TFA酸化並藉由反相0 - 30% CH₃CN/水(含有0.1% TFA)純化。凍乾各部分，從而產生化合物31。計算質量：
[M+2H]²⁺: C₆₈H₁₁₅N₁₉O₂₉S, 1695.8, *m/z* = 847.9；觀察值：848.0。

實例16-18

結合物35-37之合成

使用以下反應圖9製備結合物35-37。

反應圖9



化合物33之合成

向2'-click 15 GS化合物32 (130 mg, 0.019 mmol)及(2-疊氮基乙基)胺基甲酸(9H-蒽-9-基)甲基酯(29.1 mg, 0.095 mmol)存於3:1 DMA/ 水 (2 mL)中之脫氣溶液中添加溴化銅(I)-二甲硫醚複合物(9.72 mg, 0.042 mmol)溶解於脫氣DMSO (0.32 mL)中之溶液。將混合物於45°C下攪拌 2 h，冷卻至室溫，並添加pH 8 EDTA (0.5 M, 2 mL)以驟冷反應。攪拌 15 min並在XBridge製備型苯基管柱(5 μ M, 30 $\times$ 150 mm)上使用0 -

45% CH₃CN/水(含有100 mM TEAA)之梯度純化。經由透析濃縮各部分。向存於水(3 mL)中之合併物質中添加六氫吡啶之溶液(936 μL, 1.891 mmol)。將混合物於4℃下儲存18 h，用水(10 mL)稀釋並經由注射式過濾器過濾固體。添加pH 8 EDTA (0.5 M, 2 mL)，經由透析濃縮並凍乾，從而產生化合物33。

化合物34之合成

向2'-15 click C2 NH₂ GS化合物33 (43.6 mg, 6.26 μmol)存於200 mM NaHCO₃溶液(2000 μl)及甲醯胺(1000 μL)中之溶液中添加N-琥珀醯亞胺基-3-[2-吡啶基二硫基]丙酸酯(17.9 mg, 0.057 mmol)溶解於DMSO (298 μL)中之溶液。將混合物於10℃下攪拌15 min，用水(10 mL)及甲醯胺(1 mL)稀釋，並藉由透析濃縮。添加2M TEAA (200 μL)並在XBridge製備型苯基管柱(5 μM，19 × 250 mm)上使用5 - 40% CH₃CN/水(含有100 mM TEAA)之梯度純化。經由透析濃縮各部分並凍乾，從而產生化合物34。

2'-15四GalNAc-siRNA結合物35 (實例16)之合成

向2'-15 click C2 NH₂ NHS SPDP GS化合物34 (13 mg, 1.82 μmol)存於1:1甲醯胺/水(200 μl)中之溶液中添加四GalNAc SH (4.62 mg, 2.72 μmol)存於甲醯胺(200 μL)中之溶液。將混合物於室溫下攪拌3.5 h，添加2M TEAA (50 μL)且在XBridge製備型苯基管柱(5 μM，19 × 250 mm)上使用2 - 35% CH₃CN/水(含有100 mM TEAA)之梯度純化。經由透析濃縮各部分並凍乾。在Proteomix SAX-NP10管柱(22.1 × 50 mm)上使用2 - 30% (溶劑A：60:40 TFE/水與40 mM Et₃N，溶劑B：60:40 TFE/水與40 mM Et₃N，1M胍HCl)純化所得固體。經由透析濃縮各部分並凍乾，從而產生結合物35。

結合物36及37 (實例17及實例18)之合成

對於結合物19-1詳述之程序用於雙螺旋結合物35及適當過客股以

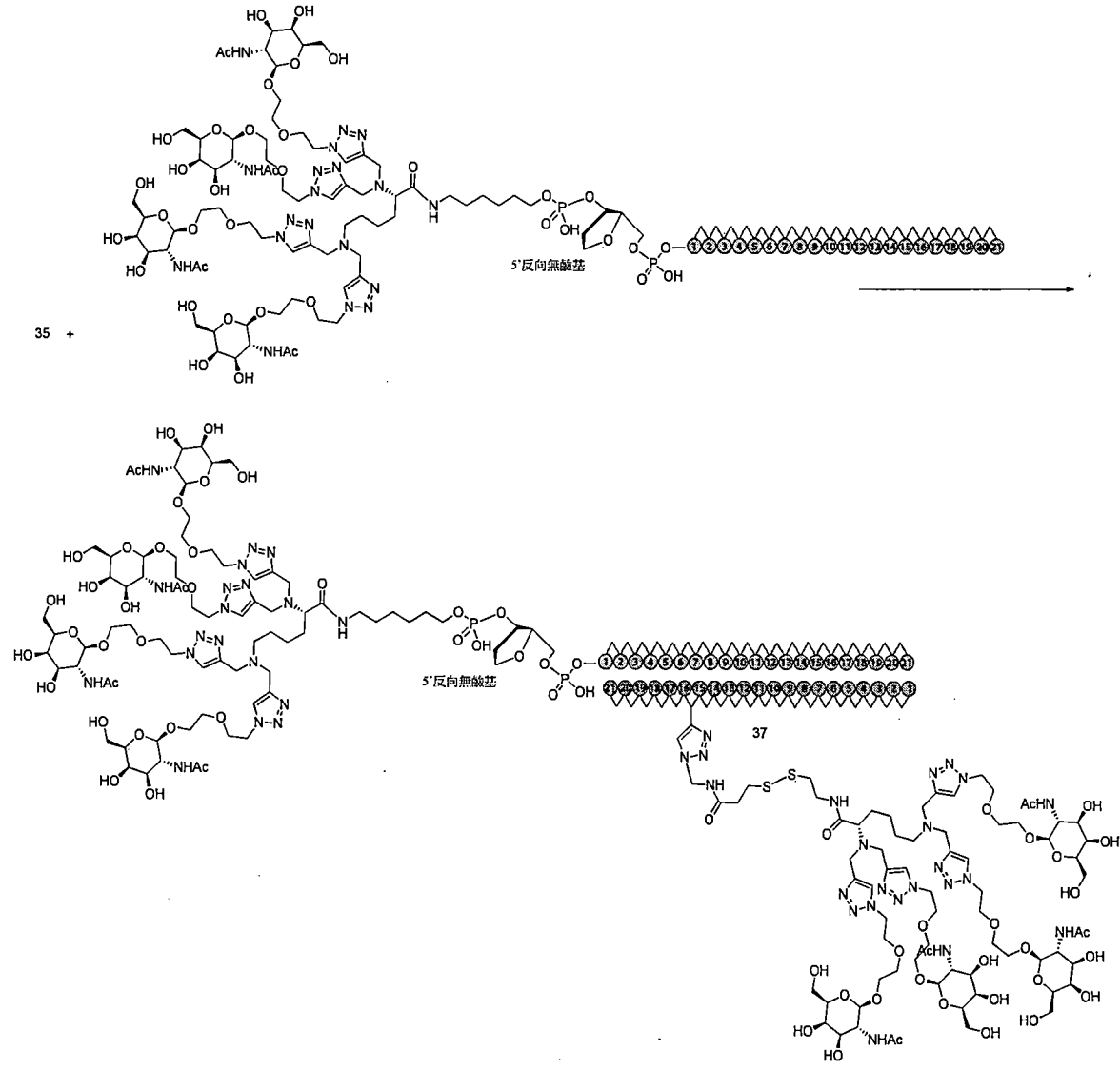
分別製備結合物36及37。

實例19-26

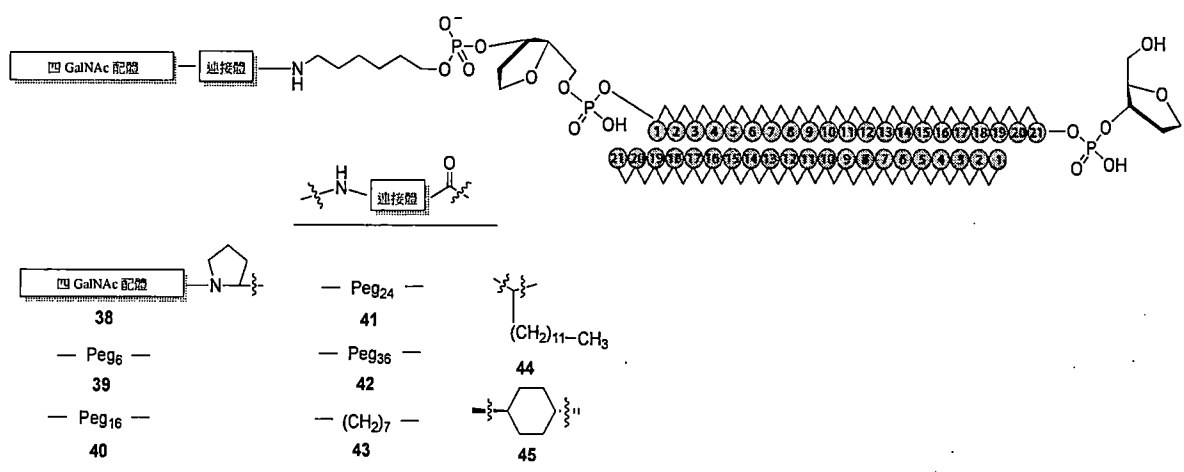
結合物38-45 (實例19-26)之合成

使用以下反應圖10及11製備結合物38-44。

反應圖10



反應圖11



反應圖 11. 來自表2之用於將四GalNAc結合至siRNA之不同連接體之實例。

步驟 1：過客-RNA及連接體，以脯胺酸之實例闡釋方案

向FMOC-PRO-OH (11.11 mg, 0.033 μ mol)存於120 μ L DMSO中之溶液中添加DIPEA (43.2 μ l, 0.247 μ mol)，之後添加HATU (10.96 mg, 0.029 μ mol)。將淺黃色混合物於室溫下攪拌30 min。隨後將混合物添加至寡核苷酸過客股TEAA鹽(60 mg, 8.24 μ mol)存於500 μ L (10% H₂O/DMSO)中之溶液中，且將混合物於室溫下繼續攪拌1小時。反應混合物經由LC-MS顯示期望產物。向反應混合物中添加二乙胺(43.0 μ l, 0.412 μ mol)且將混合物攪拌1小時，經由LC-MS確認期望產物。藉由離心透析使用3kDa截止膜純化反應混合物。該製程用水(每次14 mL)重複三次。將所得溶液濃縮，冷凍並凍乾過夜，從而產生白色鬆散固體狀產物。LC/MS確認產物[7384.9]

步驟 2：四GalNAc-連接體-過客RNA

向四GalNAc化合物10 (53.2 mg, 0.033 μ mol)存於532 μ L DMSO中之溶液中添加DIPEA (42.6 μ l, 0.244 μ mol)，之後添加HATU (12.36 mg, 0.033 μ mol)。將淺黃色混合物於RT下攪拌30 min。隨後將混合物添加至連接體-寡核苷酸過客股存於500 μ L DMSO中之溶液中，且將混合物於室溫下繼續攪拌2小時。LC/MS顯示期望產物。使反應混合

物經受使用3kDa截止膜之離心透析。該製程用水(每次14 mL)重複三次。藉由Gilson PLC 2020使用XBRIDGE PHENYL、10 - 27% CH₃CN與200 μM TEAA將所得溶液純化35分鐘。經由使用3kDa截止膜之離心透析濃縮收集溶液。將所得濃縮溶液用1.0 N NaCl處理並離心透析。該製程用水(每次14 mL)重複五次。將所得濃縮溶液(約1.5 mL)冷凍並凍乾過夜，從而產生白色鬆散固體狀產物。LC/MS確認產物[9002.5]。

步驟3：雙螺旋形成

使存於1.5 mL水中之四GalNAc-連接體-RNA (18.5 mg, 2.055 μmol)與存於1.5 mL水中之ApoB導向股(14.12 mg, 2.055 μmol)形成雙螺旋。將混合物於存在攪拌棒下於90°C下加熱5 min。冷卻雙螺旋並移除攪拌棒。經2天凍乾溶液，從而產生白色鬆散固體狀期望雙螺旋結合物38。LC/MS確認產物[16048]。

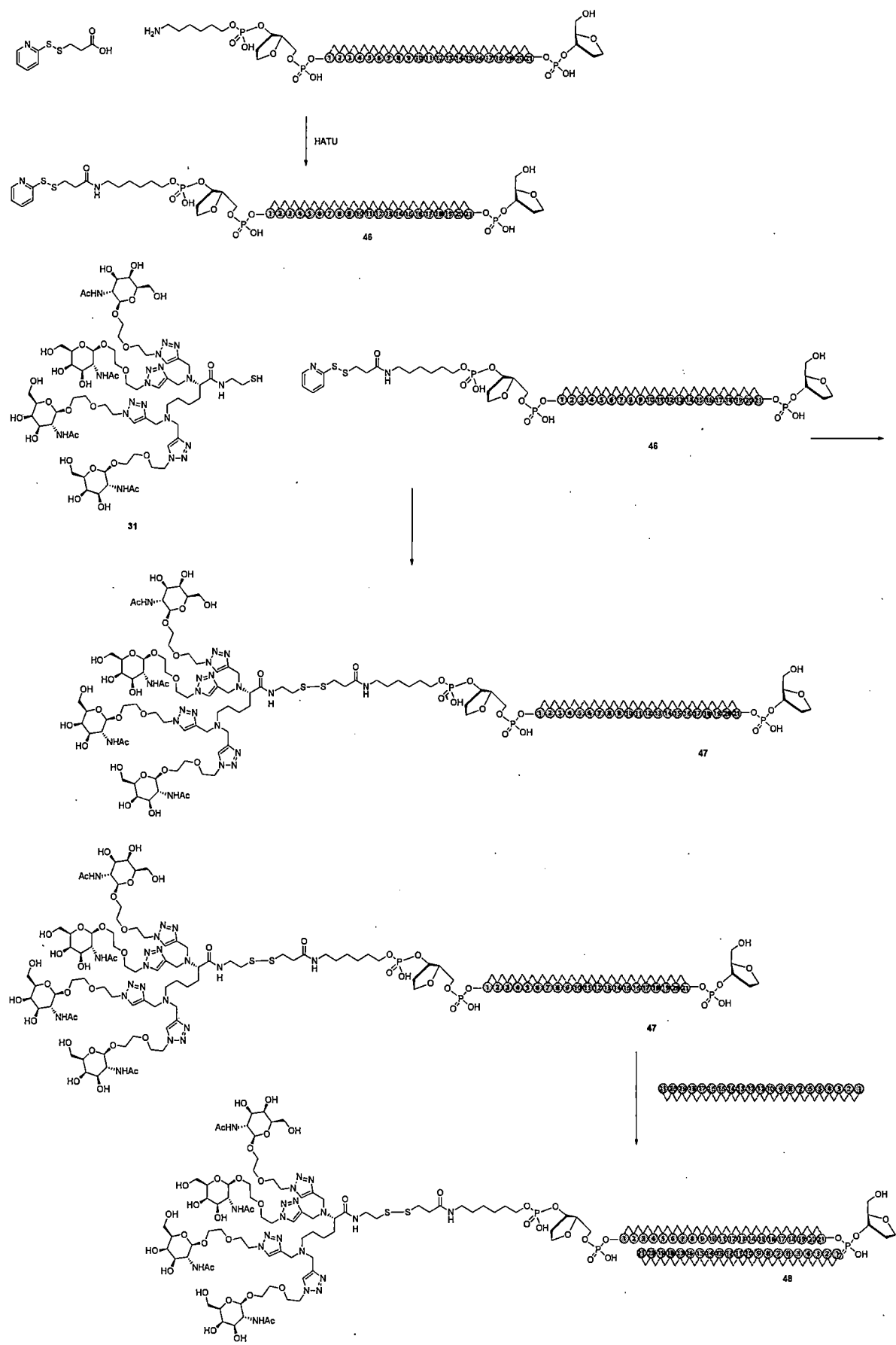
所有剩餘結合物皆係使用相同通用程序製備。

實例27-29

化合物/結合物46-48之合成

使用以下反應圖12製備化合物及/或結合物46-48。

反應圖12



RNA化合物46 (實例27)之合成

將SPDP酸(2.2 mg, 10.3 μmol)溶解於DMSO 100 μL中，且依序添

加N,N-二異丙基乙胺(14.0 μ l, 0.08 mmol)、HATU (19.6 mg, 0.051 mmol)。添加存於200 μ L DMSO:水(9:1)中之RNA (15 mg, 2.06 μ mol)且將所得反應混合物攪拌1 h, 藉由添加3 mL水驟冷反應且透析至500 μ L, 藉由甲醯胺稀釋至3 mL且藉由SAX (緩衝液A: 60%存於水中之TFE, 20 mM TEA, 緩衝液B: 60%存於水中之TFE, 20 mM TEA, 1 M CsCl, 梯度A/B自100/0至35/65, 經15 min)純化。合併所收集部分並針對水透析並凍乾, 從而獲得白色固體狀化合物46。計算質量: $[M-H]^-$: $C_{234}H_{300}F_8N_{72}O_{150}P_{23}S_3$, 7480.1; 觀察值: 7483.0。

結合物47 (實例28)之合成

將RNA化合物46 (22 mg, 2.9 μ mol)及四GalNAc硫醇化合物31 (10.0 mg, 5.9 μ mol)溶解於400 μ L甲醯胺:pH=6.8 Tris緩衝液(3:1)中並攪拌1 h。藉由SAX (緩衝液A: 60%存於水中之TFE, 20 mM TEA, 緩衝液B: 60%存於水中之TFE, 20 mM TEA, 1 M CsCl, 梯度A/B自100/0至35/65, 經15 min)純化反應混合物。合併所收集部分並針對水透析並凍乾, 從而獲得白色固體狀結合物47。計算質量: $[M-H]^-$: $C_{297}H_{410}F_8N_{90}O_{179}P_{23}S_3$, 9063.9; 觀察值: 9066.2。

結合物48 (實例29)之合成

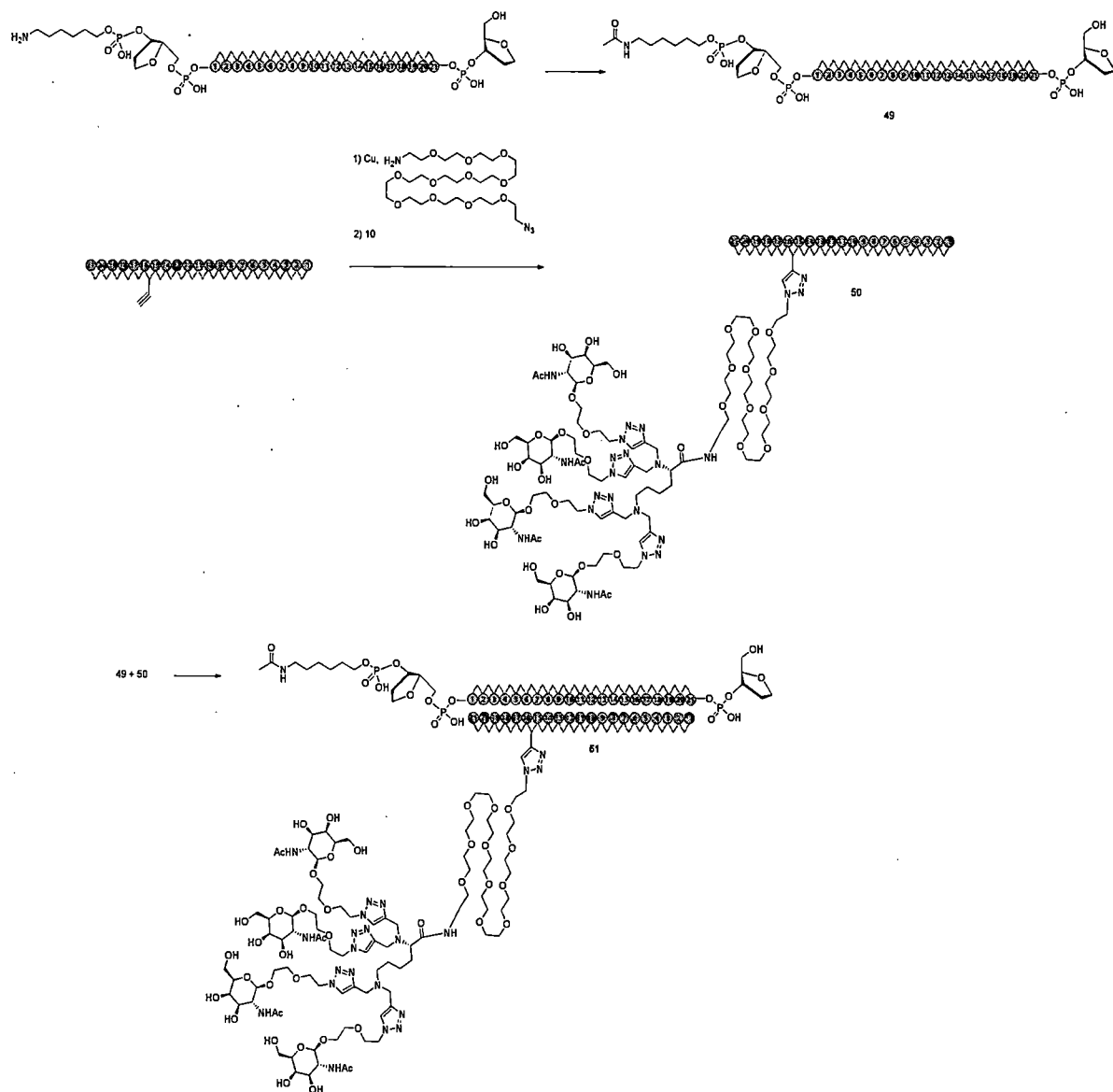
將結合物47 (10.9 mg, 1.20 μ mol)及導向股(7.81 mg, 1.14 μ mol)在1 mL無RNAse之水中混合2 h。凍乾反應混合物, 從而獲得定量產率之雙螺旋結合物48。

實例30-32

化合物/結合物49-51之合成

使用以下反應圖13製備化合物及/或結合物49-51。

反應圖13



RNA化合物49 (實例30)之合成

將33.3 mg siRNA過客股稱重至4 mL小瓶中，隨後添加1 mL 100 mM NaHCO₃以溶解。添加0.86 μL丙酸酐並於RT下攪拌。在老化約2 h後，針對水旋轉透析3×。經由玻璃料過濾並經由凍乾乾燥溶液，從而獲得30.8 mg RNA化合物49。

結合物50 (實例31)之合成

步驟1. 向40 mL小瓶中裝入2.8 mg疊氮化物、25.7 mg siRNA、25 mL充N₂之DMSO及4 mL水。充入N₂。裝入2.98 mL Cu/配體溶液(充入N₂，20/100 μmol，存於10 mL DMSO中)。在充N₂下於RT下攪動。

步驟2. 裝入化合物10及1 mL DMSO。裝入6 μL DIPEA並攪動2

min。裝入6 mg HBTU並攪動2 min。裝入步驟1之siRNA混合物。反應並不完全，因此裝入一半前述試劑進行重複。蒸發反應混合物，透析並HPLC純化(X-Bridge Phenyl，TEAA/ ACN梯度)。蒸發，透析並凍乾，從而獲得結合物50。

結合物51 (實例32)之合成

將10.65 mg GS (結合物50)溶解於1 ml水中並將10.20 mg PS (結合物49)溶解於1.17 ml水中。向所有結合物50中添加8.7 mg結合物49以形成1:1雙螺旋。加熱至90°C並保持1 min，經15 min冷卻至RT。過濾溶液並經由凍乾乾燥，從而獲得白色固體狀結合物51。

螢光素酶構築體中經Lipofectamine轉染之化合物之RNA沉默活性

產生經螢光素酶載體穩定轉染之HEK293細胞，該載體含有海腎螢光素酶(*renilla luciferase*)之3'UTR中之siRNA之靶位點。在96孔組織培養板(Corning：編號3903)上以7.5e3個細胞/孔之密度在DMEM 10%血清培養基中接種該等細胞。隨後將細胞板於37°C / 5% CO₂下培育24 hr。在培育後，將板用經轉染試劑Lipofectamine 2000 (invitrogen：編號11668-019)共轉染之測試化合物在Opti-MEM (Gibco：編號31985)中根據製造商之方案處理。處理濃度在10 nM至0.03 pM範圍內。隨後將處理板於37°C / 5% CO₂下培育24 hr。在處理培育後，使細胞裂解並根據Dual-Glo™螢光素酶分析(Promega: E2920)進行處理並在TECAN safire2板讀數器上進行讀數。

HepG2細胞中經Lipofectamine轉染之化合物之RNA沉默活性

在膠原塗佈之板(BioCoat: 356649)上以7.5e3個細胞/孔之密度在10% DMEM血清培養基中接種HepG2細胞(ATCC: HB-8065)。隨後將細胞板於37°C / 5% CO₂下培育24 hr。在培育後，將板用經轉染試劑Lipofectamine 2000 (invitrogen：編號11668-019)共轉染之測試化合物在Opti-MEM (Gibco：編號31985)中根據invitrogen之方案處理。處理

濃度在10 nM至0.03 pM範圍內。隨後將處理板於37°C / 5% CO₂下培育24 hr。在處理培育後，根據所供應方案將細胞用PLA緩衝液(AB: 4448542)裂解。使用高容量cDNA套組(AB: 4368813)將所得細胞裂解物反向轉錄至cDNA並使用Life Technology 7900運行qPCR。

RNAi活性之活體內評價

以200 µL體積藉由皮下注射投與CD1雌性小鼠。觀察動物之行為或生理變化。在投藥之後72 hr藉由CO₂窒息殺死動物，之後經由心臟穿刺進行驅血。肝試樣係作為自內葉之3 mm穿孔並將其放入RNAlater管中以分離總RNA。藉由Taqman分析使用標準程序實施mRNA敲除分析。

所選化合物/結合物之活體外及活體內數據之概述示於先前提出之表4中。

熟習此項技術者將易於瞭解，本發明極其適合實施該等目標並獲得所涉及及彼等存在於本文中之目的與優勢。目前代表較佳實施例之本文所述之方法及組合物係例示性的且並非意欲限制本發明之範疇。彼等熟習此項技術者將構想出本文之變化及其他用途，其涵蓋於本發明之精神中且藉由申請專利範圍之範疇界定。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商默沙東藥廠
 大衛 泰勒
 史蒂芬 L 克萊提
 瓦丁 杜德金
 諾里諾 伊凱模托
 宏表 廖
 克雷格 派利斯
 濤 裴
 安東尼 邵
 鄭 楚昂
 利軍 王
 宇 袁
 曼 朱

<120> 包含四 GALNAC 之新穎結合物及傳送寡核苷酸之方法

<130> 205661

<140>

<141> 2013-04-30

<150> US61/641,761

<151> 2012-05-02

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> 未經修飾或經如描述於此序列修飾之核糖核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(14)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(18)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> 反向無鹼基蓋

<400> 1

cuuuaacaau uccugaaaut t

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(10)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(19)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 2
auuucaggaa uuguuaaagu u

21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> 未經修飾或經如描述於此序列修飾之核糖核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(14)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(18)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<400> 3
cuuuaacaau uccugaaaut t

21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(10)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(19)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 4

auuucaggaa uuguuaaagu u

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> 未經修飾或經如描述於此序列修飾之核糖核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 2' propagyl

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(14)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> 2' propagyl

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 5
cuuuaacaau uccugaaaut t

21.

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(10)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(19)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 6
 auuucaggaa uuguuaaagu u

21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> 未經修飾或經如描述於此序列修飾之核糖核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 反向無鹼基蓋

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature

<222> (7)..(7)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(14)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(18)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<400> 7
cuuuaacaau uccugaaaut t

<210> 8
<211> 21
<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(10)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(19)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 8
auuucaggaa uuguuaaagu u

21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> 未經修飾或經如描述於此序列修飾之核糖核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)

<223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(14)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(18)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> 反向無鹼基蓋

<400> 9

cuuuaacaau uccugaaaut t

21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(10)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

- <221> misc_feature
- <222> (15)..(15)
- <223> 2' propagyl

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (16)..(19)
- <223> 2'-去氧-2'-氟

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (20)..(21)
- <223> 2'-O-甲基

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(2)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (2)..(3)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3)..(4)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (20)..(21)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 10
auuucaggaa uuguuaaagu u

- <210> 11
- <211> 21

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> 未經修飾或經如描述於此序列修飾之核糖核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(8)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(12)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> 反向無鹼基蓋

<400> 11
acaacagacu uuaauguaat t

21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(11)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature

- <222> (14)..(15)
- <223> 2'-去氧-2'-氟
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (16)..(17)
- <223> 2'-O-甲基
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (18)..(18)
- <223> 2'-去氧-2'-氟
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (19)..(21)
- <223> 2'-O-甲基
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(2)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (2)..(3)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3)..(4)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (20)..(21)
- <223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 12
uuacauaaa gucuguuguu u

<210> 13
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> 2' 炔丙基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(8)
 <223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> 2' 炔丙基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> 反向無鹼基蓋

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n-炔丙基硫醇

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 13
cuguuggauu gauucgaaau u

21

<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(21)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 14

uuucgaauca auccaacagu u

21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 胺基己基磷酸鹽反向無鹼基蓋

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 2' 炔丙基

<220>

<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(8)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> 2' 炔丙基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> 反向無鹼基蓋

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n-炔丙基硫醇

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<400> 15
cuguuggauu gauucgaaau u

21

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> 2' 炔丙基

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> 2'-O-甲基

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> 2'-去氧-2'-氟

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(21)
<223> 2'-O-甲基

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯核苷酸間連接

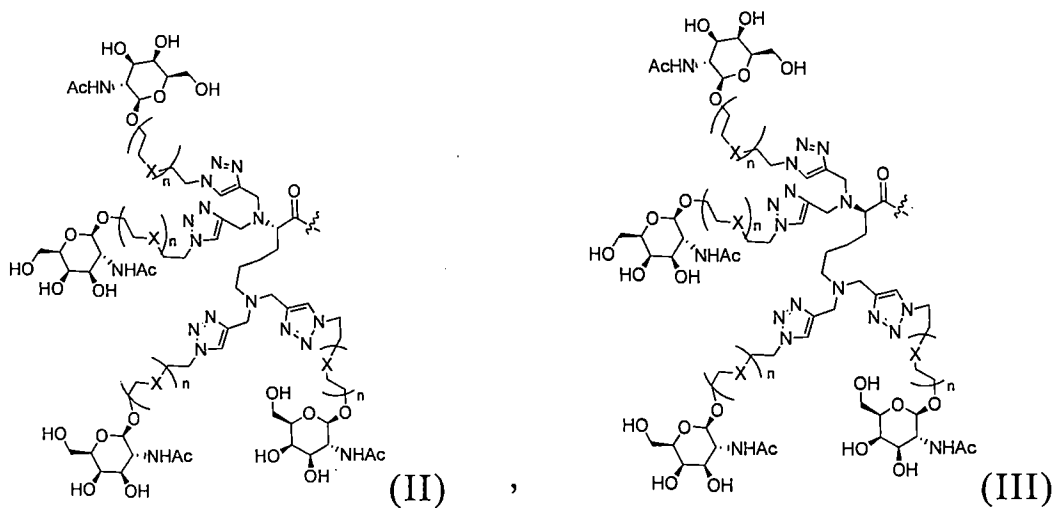
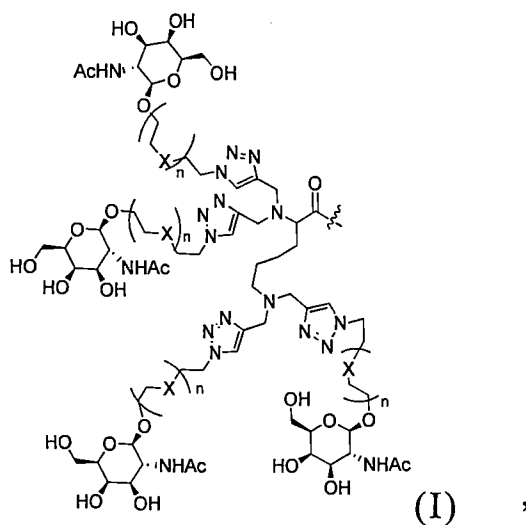
<400> 16
uuucgaauca auccaacagu u

申請專利範圍

1. 一種模組化組合物，其包含：

1) 單股或雙股寡核苷酸；

2) 一或多個式(I)、(II)或(III)之四GalNAc配體，其可相同或不同：



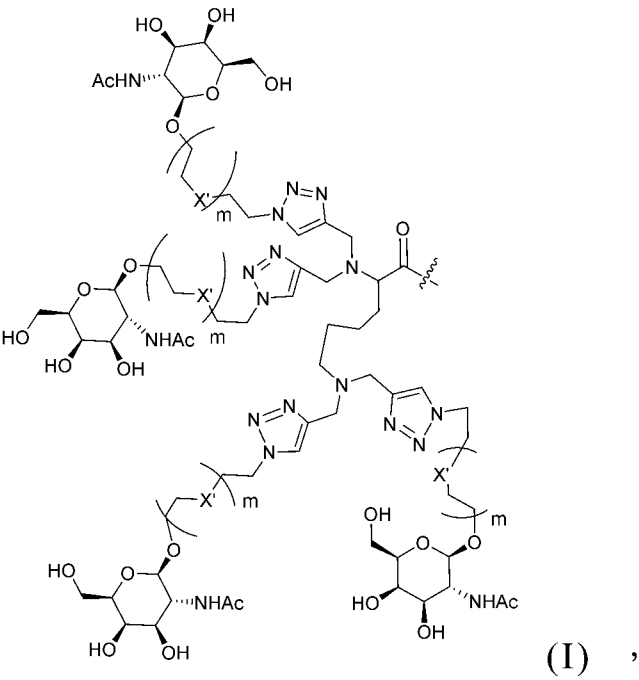
其中X係-O-、-S-、-CR¹R²-或-NR¹-，其中R¹及R²各獨立地選自由氫及C1-C6烷基組成之群；n係1、2、3或4；且具有「~」之鍵指示連接點；

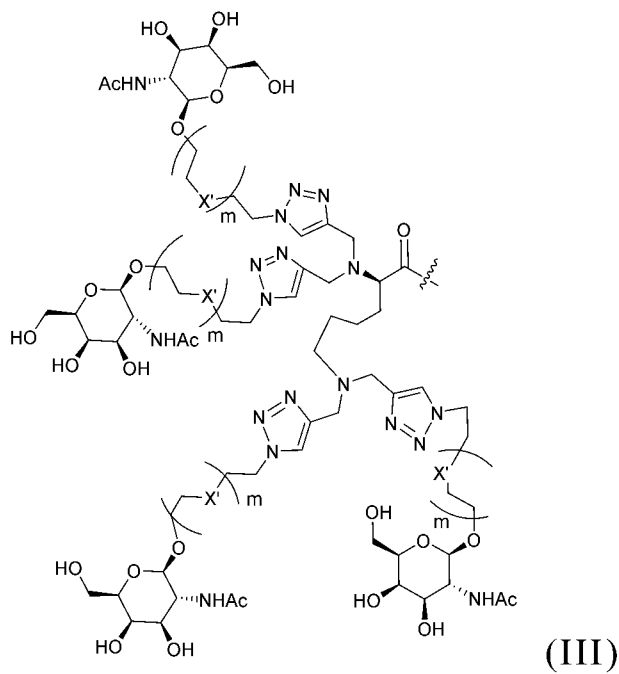
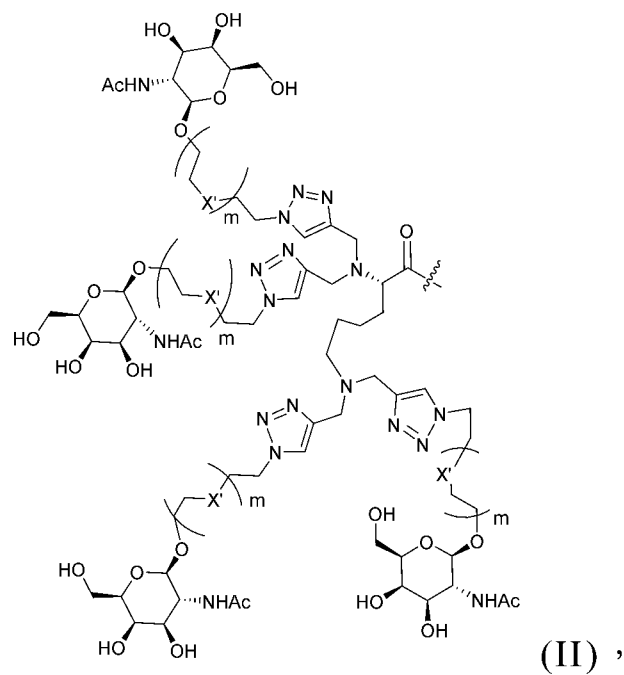
視情況，3) 一或多個連接體，其可相同或不同；及

視情況，4) 一或多個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑。

申請專利範圍

1. 一種模組化組合物，其包含：
- 1) 單股寡核苷酸，其包括n個核苷酸，其係如下所示：
- $[O_1][O_2][O_3].....[O_n]$ ，或
- 雙股寡核苷酸，其分別包括n及n'個核苷酸，其係如下所示：
- $[O_1][O_2][O_3].....[O_n]$
- $[O_{n'}].....[O_{3'}][O_{2'}][O_{1'}]$ ，
- 其中n及n'係8至50範圍內相等或不同之整數；
- 2) 由G表示之一或多個式(I)、(II)或(III)之四GalNAc配體，其可相同或不同：





其中：

X'係-O-、-S-、-CR¹R²-或-NR¹-，其中R¹及R²各獨立地選自由氫及C₁-C₆烷基組成之群；

m係1、2、3或4；且

具有「」之鍵指示該四GalNAc配體直接連接或藉由一或多個連接體連接至該寡核苷酸之連接點；及

視情況，3) 由X表示之一或多個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；及

4) 由L表示之一或多個連接體，其可相同或不同，其藉由該寡核苷酸之末端3'及/或5'位置及/或該寡核苷酸之內部2'位置將G或X連接至該寡核苷酸。

2. 如請求項1之模組化組合物，其包含：

1) n及n'係12-28範圍內之整數；

2) 該模組化組合物包含1至8個式(I)、(II)或(III)之四GalNAc配體，其中X'係-O-、-S-、-CH₂-或-NH-；且m係1、2、3或4；及

3) 該模組化組合物視情況包含1至8個靶向配體、增溶劑、藥物動力學增強劑、脂質及/或掩蔽劑；及

4) 該模組化組合物包含1至16個連接體。

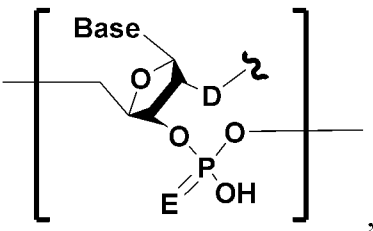
3. 如請求項2之模組化組合物，其中該兩個核苷酸[O_{n-1}]及[O_n]或[O_{n'-1}]及[O_{n'}]係經由磷酸二酯鍵或硫代-磷酸二酯鍵連接。

4. 如請求項2之模組化組合物，其中至少一個該核苷酸係為經修飾之核苷酸，該經修飾之核苷酸具有選自由下列所組成之群之修飾：2'糖修飾、鹼基修飾及單股懸垂部分之修飾。

5. 如請求項4之模組化組合物，其中至少一個該核苷酸具有反向鹼基修飾。

6. 如請求項5之模組化組合物，其中至少一個該核苷酸具有反向無鹼基修飾。

7. 如請求項2之模組化組合物，其中該寡核苷酸包括至少一個L，其將該G及/或X連接至該寡核苷酸之內部2'位置，其中該經連接之核苷酸[O_n]或[O_{n'}]具有下示之結構：



其中：

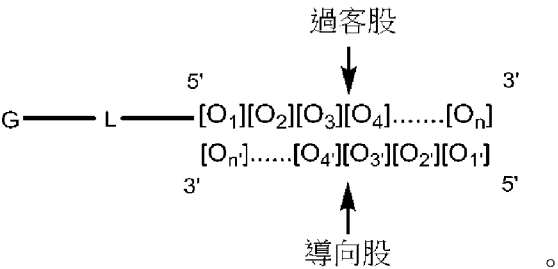
各E係獨立地為-O-或-S-；

各鹼基係獨立地為A、U、G或C，其可經修飾或未經修飾；

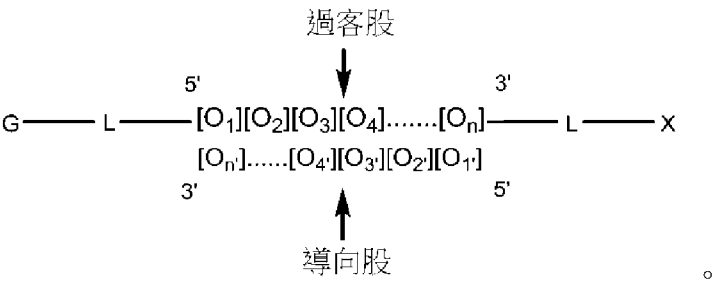
各D係獨立地為該核苷酸之核糖環與G及/或X間之連接點，其係選自由下列所組成之群：O、S、S(O)、S(O)₂、-N-R、-CHR-、-P(O)R-或-P(O)(OR)-；及

各R係獨立地為烷基或L。

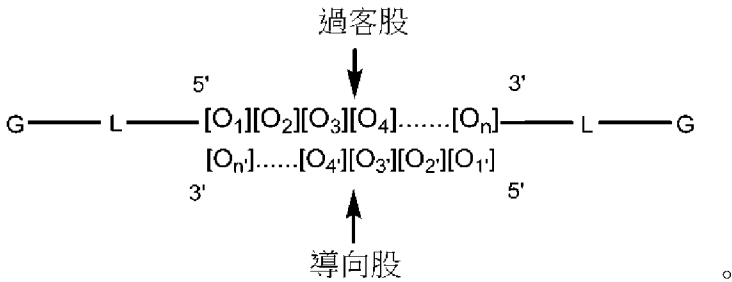
8. 如請求項2之模組化組合物，其中該寡核苷酸含有至少一個L，其將G或X連接至該寡核苷酸之末端3’及/或5’位置。
9. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：G-L-[O₁][O₂][O₃].....[O_n]。
10. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：G-L- [O₁][O₂][O₃].....[O_n] -X。
11. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



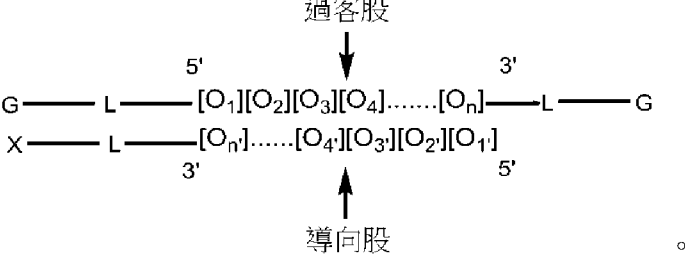
12. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



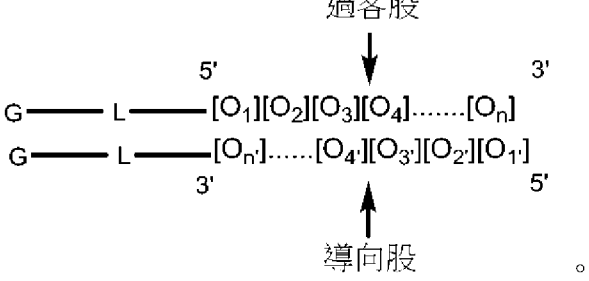
13. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



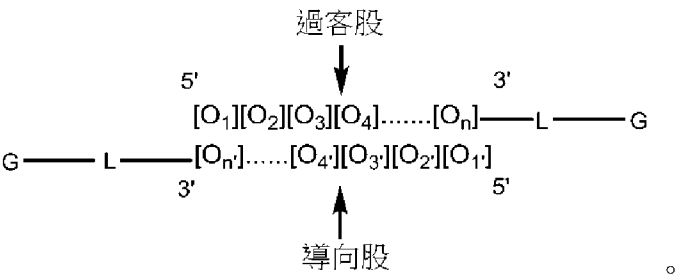
14. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



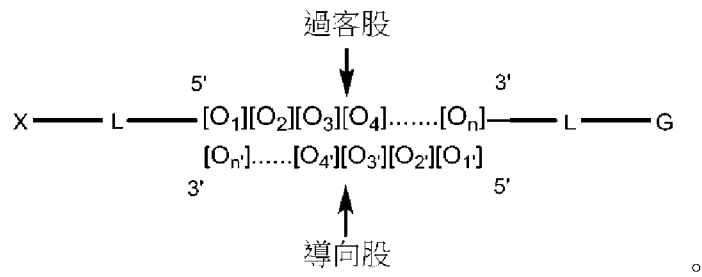
15. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



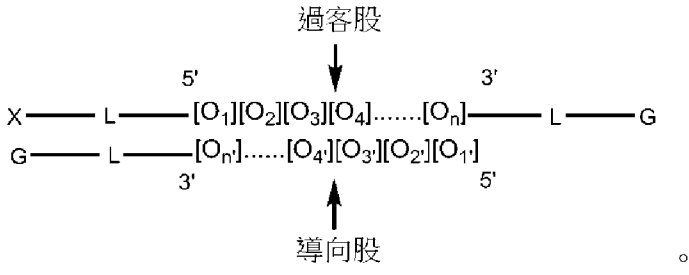
16. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



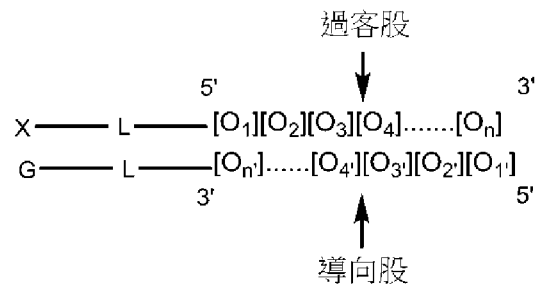
17. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



18. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



19. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：



20. 如請求項8之模組化組合物，其中該模組組合物具有下列之結構：

