



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118434451 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202380015839.X

(22) 申请日 2023.04.14

(66) 本国优先权数据

202210386579.4 2022.04.14 CN

202210377179.7 2022.04.14 CN

202210401035.0 2022.04.14 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/088459 2023.04.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/198200 ZH 2023.10.19

(71) 申请人 苏州瑞博生物技术股份有限公司

地址 215300 江苏省苏州市昆山市玉山镇
元丰路168号

(72) 发明人 梁子才 张鸿雁 高山

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

专利代理师 张拥 孙占华

(51) Int.Cl.

A61K 47/54 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C07C 237/06 (2006.01)

C07C 229/24 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

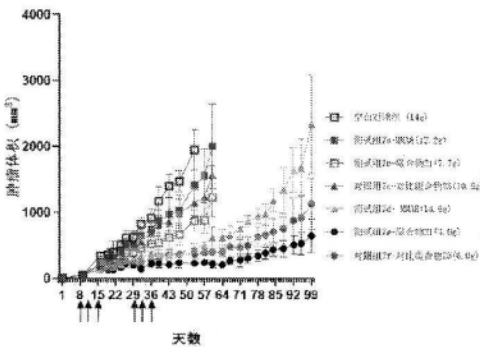
A61B 8/08 (2006.01)

(54) 发明名称

缀合物与组合物及制备方法和用途

(57) 摘要

本公开提供了一种缀合物,缀合物包含一个或多个递送基团和一个或多个功能性基团;每个所述递送基团独立地与所述功能性基团经共价键连接,或通过连接基团连接;每个所述功能性基团选自对肿瘤具有治疗作用的小分子治疗剂基团。本公开提供的缀合物可以高效地靶向递送至肿瘤组织,从而有效地对肿瘤及肿瘤相关疾病进行治疗。



(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
2023 年 10 月 19 日 (19.10.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/198200 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/54 (2017.01) C07C 229/24 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) A61P 19/06 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
C07C 237/06 (2006.01) A61B 8/08 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/088459

(22) 国际申请日: 2023 年 4 月 14 日 (14.04.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210386579.4 2022 年 4 月 14 日 (14.04.2022) CN
202210377179.7 2022 年 4 月 14 日 (14.04.2022) CN
202210401035.0 2022 年 4 月 14 日 (14.04.2022) 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]; 中国江苏省苏州市昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。

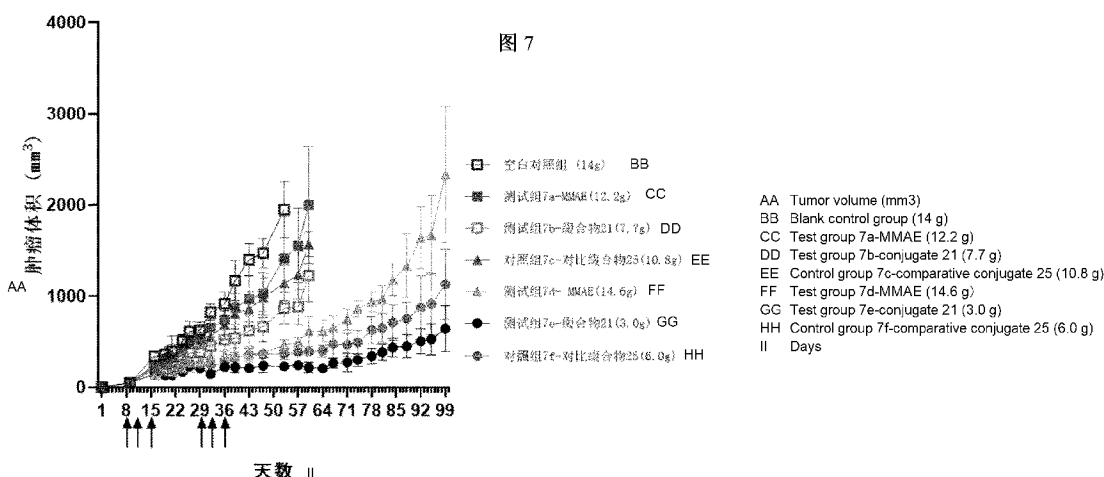
(72) 发明人: 梁子才 (LIANG, Zicai); 中国江苏省苏州市昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 张鸿雁 (ZHANG, Hongyan); 中国江苏省苏州市昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。 高山 (GAO, Shan); 中国江苏省苏州市昆山市玉山镇元丰路168号, Jiangsu 215300 (CN)。

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,

(54) Title: CONJUGATE AND COMPOSITION AS WELL AS PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 缀合物与组合物及制备方法和用途



(57) Abstract: The present disclosure provides a conjugate. The conjugate comprises one or more delivery groups and one or more functional groups. Each of the delivery groups is independently connected to the functional group by means of a covalent bond or by means of a linking group. Each of the functional groups is selected from a small molecule therapeutic group having a therapeutic effect on tumors. The conjugate provided by the present disclosure can be efficiently targeted for delivery to tumor tissues, thereby effectively treating tumors and tumor-related diseases.

(57) 摘要: 本公开提供了一种缀合物, 缀合物包含一个或多个递送基团和一个或多个功能性基团; 每个所述递送基团独立地与所述功能性基团经共价键连接, 或通过连接基团连接; 每个所述功能性基团选自对肿瘤具有治疗作用的小分子治疗剂基团。本公开提供的缀合物可以高效地靶向递送至肿瘤组织, 从而有效地对肿瘤及肿瘤相关疾病进行治疗。

[见续页]

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

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))。

缀合物与组合物及制备方法和用途

技术领域

本公开涉及一种包含基于适配体的递送基团和功能性基团的缀合物与药物组合物。本公开还涉及这些缀合物与药物组合物的制备方法和用途。

背景技术

肿瘤是指机体在各种致癌因子作用下，局部组织细胞增生所形成的新生物。其中，肿瘤细胞发生转移与侵入周遭组织的情形，称为恶性肿瘤。按照生成肿瘤的来源组织细胞分类，一般分为上皮细胞产生的恶性肿瘤（癌症）、间叶组织细胞产生的恶性肿瘤（肉瘤）、血液干细胞产生的恶性肿瘤（白血病等）、以及神经胶质细胞产生的恶性肿瘤（胶质瘤）等。其中，胶质瘤是最常见的颅内原发性恶性肿瘤，约占脑肿瘤的 40%-50%，全球年发病率为每 10 万人 3-8 例。按照 WHO 病理分型标准，胶质瘤属于神经上皮肿瘤，包括多种病理类型，包括但不限于毛细胞性星形细胞瘤、弥漫星形细胞瘤、间变星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、间变型少突胶质细胞瘤等。

目前，本领域中对肿瘤、特别是胶质瘤的治疗的重要问题之一是如何将治疗剂特异性地递送至肿瘤组织和细胞内，并在合适的时间、以合适的方式使这些治疗剂产生相应的治疗作用。

适配体或称核酸适体，是一种能够与多种的目标分子，像小分子化合物、蛋白质、核酸，甚至细胞、组织与器官等等结合的寡核苷酸分子。适配体能够提供“对特定分子辨识”这一重要特性，因此与抗体类似地常应用于生物技术与治疗等方面。适配体可以在试管中设计、并能够快速利用化学方法合成、同时具有易于保存、免疫原性较低或无免疫原性的优异性质，因此近年来逐渐得到本领域研究人员的重视。然而，适合用于肿瘤靶向递送的适配体在本领域中仍需要进一步开发与应用。

发明内容

本公开的发明人意外发现了一种能够特异性靶向肿瘤细胞、特别是胶质瘤细胞的缀合物，该缀合物对肿瘤细胞、特别是胶质瘤细胞显示出

高度特异性，从而可以在肿瘤细胞、特别是胶质瘤细胞中有效富集并对肿瘤进行有效靶向治疗。从而，发明人作出如下发明：

在一方面，本公开提供了一种缀合物，包含一个或多个递送基团和一个或多个功能性基团；所述递送基团由一种适配体去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成，所述适配体包含一段连续的核苷酸序列，连接相邻的两个核苷酸的基团独立地为磷酸酯基或者具有修饰基团的磷酸酯基，每个核苷酸选自修饰或未修饰 A、U、C 或 G 中的一种，所述连续的核苷酸序列具有式（1）所示的序列：



其中， T_1 是由 1-3 个核苷酸组成的基序， T_2 是由 0-15 个核苷酸组成的基序，并且 T_2 中不包含与 T_1 完全反向互补的基序；

S_1 和 S_4 各自是由 3-7 个核苷酸组成的基序， S_1 与 S_4 长度相同并且完全反向互补；

N_a 和 N_c 各自是由 1-4 个核苷酸组成的基序， N_a 中的每个核苷酸与 N_c 中的每个核苷酸均不互补，并且 N_a 和 N_c 中 U 的总个数占 N_a 和 N_c 中全部核苷酸总个数的 50% 以上；

S_2 和 S_3 各自是由 1-4 个核苷酸组成的基序， S_2 与 S_3 长度相同并且完全反向互补；

N_b 是由 3-6 个核苷酸组成的基序，并且 N_b 两端的核苷酸之间不形成 AU 或 GC 互补；

每个所述递送基团独立地与所述功能性基团经共价键连接，或通过连接基团连接；每个所述功能性基团选自对肿瘤具有治疗作用的小分子治疗剂基团。

在另一方面，本公开还提供了一种药物组合物，包含本公开所述的缀合物，以及药学上可接受的载体。

在又一方面，本公开还提供了本公开所述的缀合物和/或药物组合物在制备用于对肿瘤及肿瘤相关疾病或症状进行治疗的药物中的应用。

在又一方面，本公开还提供了一种对肿瘤及肿瘤相关疾病或症状进行治疗的方法，所述方法包括向有需要的受试者给予有效量的本公开所述的缀合物和/或药物组合物。

在又一方面，本公开还提供了一种试剂盒，包括本公开所述的缀合物和/或药物组合物。

以引用的方式并入

5 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公开，其程度与每一单独的出版物、专利或专利申请均专门并且单独地以引用的方式并入本公开的程度相同。

有益效果

10 本公开提供的缀合物和药物组合物具有优异的靶向肿瘤、特别是胶质瘤组织和细胞的能力，并且能够显著治疗或缓解肿瘤及肿瘤相关的疾病和/或症状。

在一方面，本公开提供的缀合物中的递送基团能够将各种小分子药物基团，如小分子毒素基团特异性地递送至肿瘤组织，并显示出优异的肿瘤抑制效果。例如，本公开的缀合物能够有效地将 MMAE 递送至不同的肿瘤组织，在显示出肿瘤靶向能力的同时，还降低了 MMAE 分子在其它组织分布带来的毒性风险，且各种给药方式均能够有效抑制肿瘤体积的增加速度和肿瘤重量，表明本公开的缀合物能够有效抑制肿瘤增殖。此外，进一步
15 提高给药剂量的缀合物可使肿瘤体积在测试期间几乎不增加，显示出更加优异的抗肿瘤效果。

进一步地，本公开的发明人意外地发现，本公开的缀合物和/或药物
20 组合物能够高效地通过血脑屏障，在全身给药的情况下就能够靶向至脑内的胶质瘤中，并显著抑制肿瘤体积的增加甚至降低至初始体积的 1/10 以下、甚至相比对对照组可降低至 1/100 以下，表明本公开的缀合物能够有效穿透血脑屏障并高效靶向进入脑胶质瘤，并具有良好的抑制肿瘤生长效果，显示出良好的治疗依从性和高效抑制肿瘤的高成药能力。。

25 由此说明，本公开的缀合物能够显著有效抑制肿瘤增殖，具有良好的应用前景。

附图说明

图 1A-1C 依次分别是示出了给予不同缀合物后 1h、24h 和 48h 时，小鼠体内的荧光成像结果的图。图 1D 是示出了 D5 时处死小鼠后，各组

小鼠肿瘤组织和肾脏的荧光信号成像的图。

图 2A-2C 依次分别是示出了给予不同缀合物后 1h、24h 和 48h 时，小鼠体内的荧光成像结果的图。图 2D 是示出了 D6 时处死小鼠后，各组小鼠肿瘤组织和肾脏的荧光信号成像的图。

5 图 3 是示出了给予本公开提供的缀合物或对照化合物后，各组小鼠中肿瘤体积随时间变化的折线图。

图 4 是示出了给药后 24h 和 48h 时，给予不同缀合物后建立 U118MG 原位瘤模型小鼠脑组织的荧光成像图。

10 图 5 是示出了给予本公开提供的缀合物或对照化合物后，U118MG 原位瘤模型小鼠肿瘤光强数值随时间变化的折线图。

图 6 是示出了给予本公开提供的缀合物或对照化合物后，U118MG 皮下瘤模型小鼠肿瘤体积随时间变化的折线图。

图 7 是示出了给予不同浓度本公开提供的缀合物或对照化合物后，U118MG 皮下瘤模型小鼠肿瘤体积随时间变化的折线图。

15 图 8 是示出了给予不同浓度本公开提供的缀合物或对照化合物后，U118MG 皮下瘤模型小鼠肿瘤体积随时间变化的折线图。

图 9 是示出了给予不同浓度本公开提供的缀合物或对照化合物后，A549 皮下瘤模型小鼠肿瘤体积随时间变化的折线图。具体实施方式

20 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。

定义

25 本公开中，如无特别说明，A、U、C、G 和 T 分别指腺嘌呤核苷酸、尿嘧啶核苷酸、胞嘧啶核苷酸、鸟嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸，2-甲基胞嘧啶核苷酸指胞嘧啶核苷酸中的胞嘧啶碱基上 2'位的氢被甲基取代得到的核苷酸。这些核苷酸的结构为本领域技术人员所公知。如本公开所使用的，“核酸基序”或“基序”是指寡核苷酸中的核酸序列片段，由 1 个或多个核苷酸组成。在一些实施方式中，基序是具有生物学功能的核酸序列片段。

如本公开所使用的，“烷基”是指具有指定数量的碳原子的直链和支

链饱和烷基，所述数量通常为 1 至 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，C₁-C₆ 烷基指包含 1 至 6 个碳原子的直链和支链烷基。当提及具有特定数量的碳的烷基残基时，旨在涵盖具有该数量的碳的所有支链和直链形式；因此，例如，“丁基”意味着包
5 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、但具有两个连接点的残基。

如本公开所使用的，“烯基”是指具有一个或多个碳-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
10 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
15 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。

如本公开所使用的，“炔基”是指具有一个或多个碳-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分子氢而获得的。典型的炔基基团包括但不限于：乙炔基；丙炔基，
20 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。亚炔基是炔基的一个子集，指的是与炔基相同、但有两个连接点的残基。

如本公开所使用的，“杂环基”是指稳定的 3-至 18-元非芳香族环基，
25 包含 2-12 个碳原子和 1-6 个杂原子，所述杂原子选自氮、氧和硫。除非说明书中另有说明，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是被氧化的杂原子。一个或多个氮原子（如果存在的话）可以是季铵化的氮原子。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
30 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、异噻唑烷基、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)。亚杂环基是杂环基的一个子集，指与杂环基相同、但具有两个附着点的残基。

如本公开所使用的，“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形成的基团。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一个或多个环是完全不饱和的，即，包含根据Hückel理论的环状、离域的 $(4n+2)\pi$ -电子体系。芳基包括但不限于苯基、苄基和萘基等基团。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。

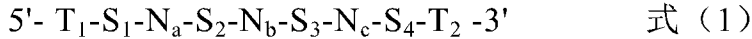
“杂芳基”指由3-至18-元芳香环自由基衍生而成的基团，包含2个至17个碳原子和选自氮、氧和硫的1至6个杂原子。如本公开所使用的，杂芳基可以是单环、双环、三环或四环系统，其中环系统中的一个或多个环是完全不饱和的，即，包含根据Hückel理论的环状离域 $(4n+2)\pi$ -电子体系。杂芳基包括稠环或桥环系统。杂芳基中的杂原子可以是被氧化的杂原子。一个或多个氮原子（如果存在的话）可以是季铵化的氮原子。杂芳基通过任何环原子附着至分子的其余部分。杂芳基的实例包括但不限于：氮杂环庚三烯基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并吲哚基、1,3-苯并二噁唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并[d]噻唑基、苯并噻二唑基、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、呋唑基、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]quinazoliny)、5,6-二氢苯并[h]喹唑啉基 (5,6 dihydrobenzo[h]cinnoliny)、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、吡唑基 (indazolyl)、吡啶基、异吡啶基、二氢吡啶基、异二氢吡啶基、异喹啉基、吡啶基 (indoliziny)、异噻唑基、5,8-甲醇-5,6,7,8-四氢喹唑啉基 (5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazoliny)、萘啶基 (naphthyridiny)、1,6-萘啶酮基 (1,6-naphthyridinony)、噻二唑基、2-氧杂吡啶基 (2-oxoazepiny)、噻唑基、氧杂环丙烷基 (oxirany)、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、吩噻嗪基、酞嗪基 (phthalaziny)、蝶啶基 (pteridiny)、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、喹啉基 (quinoxaliny)、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]pridiny) 和噻吩基 (thiophenyl/thienyl)。亚杂芳基是杂芳基的子集，指与杂芳基相同、但具有两个连接点的残基。

本公开提供的缀合物

在一方面，本公开提供了一种缀合物，包含一个或多个递送基团和一个或多个功能性基团；所述递送基团由前述适配体去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成；每个所述递送基团独立地与所述功能性基团经共价键连接，或通过连接基团连接；每个所述功能性基团选自对肿瘤具有治疗作用的小分子治疗剂基团。通过经共价键或连接基团连接功能性基团来形成缀合物，本公开的缀合物能够将功能性基团递送至肿瘤。本公开提供的缀合物中，递送基团由适配体去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成，所述适配体包含一段连续的核苷酸序列，连

接相邻的两个核苷酸的基团独立地为磷酸酯基或者具有修饰基团的磷酸酯基，每个核苷酸选自修饰或未修饰 A、U、C 或 G 中的一种，所述连续的核苷酸序列具有式 (1) 所示的序列：



其中， T_1 是由 1-3 个核苷酸组成的基序。发明人发现， T_1 的存在可使得本公开提供的缀合物显示出高效的肿瘤靶向作用。在一些实施方式中， T_1 由 2 个核苷酸组成，此时，本公开提供的缀合物具有更优异的肿瘤靶向能力。在一些实施方式中， T_1 由 2 个核苷酸组成并且含有至少一个 C。在一些实施方式中，按照 5'-3' 方向， T_1 为 CU、UC 或 AC。

T_2 是由 0-15 个核苷酸组成的基序。发明人发现，具有这些核苷酸数量和各种核苷酸序列的 T_2 均不会显著影响本公开提供的缀合物的肿瘤靶向能力。在一些实施方式中， T_2 由 0-10 个核苷酸组成。在一些实施方式中，按照 5'-3' 方向， T_2 由 U 起始的 1-9 个核苷酸组成，此时，适配体可能具有更优异的稳定性。

T_2 中不包含与 T_1 完全反向互补的基序。在本公开的上下文中，“反向互补”是指两段核苷酸序列或基序之间，按照核酸碱基配对的规律形成氢键连接，并且一段核苷酸序列或基序按照 5'-3' 方向的每一个核苷酸依次与另一端核苷酸序列或基序按照 3'-5' 方向的每一个核苷酸能够形成碱基配对。在一些实施方式中，“反向互补”包括 AU、GC 和 UG 互补中的一种或多种。

S_1 和 S_4 各自是由 3-7 个核苷酸组成的基序，且 S_1 与 S_4 长度相同并且完全反向互补。具有上述 S_1 和 S_4 基序的适配体具有较优的稳定性，能够较长时间地靶向肿瘤组织和细胞。在一些实施方式中， S_1 和 S_4 各自由 3-5 个核苷酸组成且长度相同。在一些实施方式中， S_1 和 S_4 形成的反向互补中，GC 互补占全部互补数量的 40% 以上，此时，本公开提供的缀合物具有进一步更优的稳定性和肿瘤靶向能力。在一些实施方式中，按照 5'-3' 方向， S_1 为 GCU 且 S_4 为 AGC，或 S_1 为 GAGU 且 S_4 为 GCUC，或 S_1 为 GGAGU 且 S_4 为 GCUCU，或 S_1 为 UAUGG 且 S_4 为 CCAUG。

N_a 和 N_c 各自是由 1-4 个核苷酸组成的基序， N_a 中的每个核苷酸与

N_c 中的每个核苷酸均不互补, 并且 N_a 和 N_c 中 U 的总个数占 N_a 和 N_c 中全部核苷酸总个数的 50% 以上。具有上述 N_a 和 N_c 基序的适配体显示出优异的肿瘤组织靶向能力。在一些实施方式中, N_a 和 N_c 中核苷酸的数量之和为 2-4 的整数。在一些实施方式中, N_a 和 N_c 中核苷酸的数量之和为 3 或 4, 并且所述 N_a 和 N_c 中 U 的数量之和为 2 或 3。在一些实施方式中, 按照 5'-3' 方向, N_a 和/或 N_c 为 U、UU、UC 或 CU。

S_2 和 S_3 各自是由 1-4 个核苷酸组成的基序, S_2 与 S_3 长度相同并且完全反向互补。通过包含 S_2 和 S_3 基序, 本公开提供的缀合物显示出好的稳定性和优异的肿瘤靶向能力。在一些实施方式中, S_2 和 S_3 各自由 2-3 个核苷酸组成且长度相同。在一些实施方式中, S_2 和 S_3 形成的反向互补中至少包含一个 GC 互补, 此时该反向互补具有更好的稳定性。在一些实施方式中, 按照 5'-3' 方向, S_2 为 CA 且 S_3 为 UG, 或 S_2 为 AC 且 S_3 为 GU, 或 S_2 为 GCC 且 S_3 为 GGU。

N_b 是由 3-6 个核苷酸组成的基序, 并且 N_b 两端的核苷酸不是 AU 或 GC 互补。不受理论限制地, 具有上述 N_b 基序的适配体能够在空间方面保持特定构型, 从而使本公开提供的缀合物稳定、高效地靶向肿瘤组织和细胞。在一些实施方式中, N_b 由 4-5 个核苷酸组成。在一些实施方式中, 按照 5'-3' 方向, N_b 为 GACG、GACGU、GACCG、UACU、GUUG 或 GAUCU。

本公开的发明人意外地发现, 由具有上述式 (1) 所示序列的适配体形成的递送基团能够有效地靶向肿瘤、特别是胶质瘤组织, 从而允许本公开提供的缀合物能够特异性地进入肿瘤细胞, 从而从细胞水平上更有效地递送治疗剂基团。

在一些实施方式中, 本公开提供的缀合物中, 所述连续的核苷酸序列的长度为 18-50 个核苷酸, 或者 20-40 个核苷酸, 或者 21-36 个核苷酸, 或者 24-32 个核苷酸。由具有这些连续核苷酸长度的适配体形成的递送基团以及包含该递送基团的本公开提供的缀合物能够更容易地靶向至肿瘤, 并且在合成成本和靶向效果方面具有良好的平衡。

在一些实施方式中, 本公开提供的缀合物中, 连续的核苷酸序列具

有以下 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所示的序列:

5'- CUGCUUCAGACGUGUUAGCUU -3' (SEQ ID NO: 1)

其中, 按照 5'-3'方向, T_1 为 CU, S_1 为 GCU, N_a 为 U, S_2 为 CA, N_b 为 GACG, S_3 为 UG, N_c 为 UU, S_4 为 AGC, T_2 为 UU;

5 5'- CUGAGUUCAGACGUGUUGCUCU -3' (SEQ ID NO: 2)

其中, 按照 5'-3'方向, T_1 为 CU, S_1 为 GAGU, N_a 为 U, S_2 为 CA, N_b 为 GACG, S_3 为 UG, N_c 为 UU, S_4 为 GCUC, T_2 为 U;

5'- UCUAUGGCUGCCGAUCUGGUCUCCAUGUACGU -3' (SEQ ID NO: 3),

10 其中, 按照 5'-3'方向, T_1 为 CU, S_1 为 GAGU, N_a 为 U, S_2 为 CA, N_b 为 GACG, S_3 为 UG, N_c 为 UU, S_4 为 GCUC, T_2 为 U。

在一些实施方式中, 所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列:

5'- N_6 GGAGUUCAN₁N₂N₃N₄UGN₅GCUCN₇ -3' (SEQ ID NO: 4),

15 其中, N_1 、 N_2 和 N_3 各自独立地为 A、U、C 和 G 中的一种, N_4 为 U、C 或 G 或者由 U、C 或 G 中的两个组成的基序; N_5 为 U、CU 或 UU; N_6 为 CU、UC 或 AC; N_7 为 U、UU 或 UUN₈, N_8 为由 1-15 个核苷酸组成的基序。

20 上述核苷酸序列中, 按照 5'-3'方向, T_1 为 N_6 所示的基序, S_1 为 GGAGU 表示的基序, N_a 为 U, S_2 为 CA, N_b 为 N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 组成的基序 $N_1N_2N_3N_4$, S_3 为 UG, N_c 为 N_5 表示的基序, S_4 为 GCUC 以及 N_7 中的第一个核苷酸组成的基序, T_2 为 N_7 中的其余核苷酸组成的基序。

包含上述 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列的适配体能够更有效地靶向肿瘤、特别是胶质瘤并在肿瘤组织中富集。

25 实验验证表明, SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列中, N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 的上述选择不会显著影响本公开提供的缀合物的肿瘤靶向能力。在一些实施方式中, N_1 、 N_2 、 N_3 和 N_4 组成的基序 $N_1N_2N_3N_4$ 为 GACG、GACGU、GACCG、UACU、GUUG 或 GAUCU 中的一种, 包含这些基序的适配体具有更高的肿瘤特异性靶向效果。

在一些实施方式中，SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列中，N₅ 为 U 或 UU。此时，本公开提供的缀合物对肿瘤均具有优异的靶向作用。

在一些实施方式中，所述适配体具有 SEQ ID NO: 5-11 中任意一项所示的核苷酸序列：

5 5'- CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUU -3' (SEQ ID NO: 5)
5'- CUGGAGUUCAGACGUUGUGCUCUU -3' (SEQ ID NO: 6)
5'- CUGGAGUUCAGACCGUGUGCUCUU -3' (SEQ ID NO: 7)
5'- CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCU -3' (SEQ ID NO: 8)
5'- ACGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUU -3' (SEQ ID NO: 9)
10 5'- CUGGAGUUCACUACUGUUGCUCUU -3' (SEQ ID NO: 10)
5'- CUGGAGUUCAGUUGUGUUGCUCUU -3' (SEQ ID NO: 11).

具有上述核苷酸序列的本公开提供的缀合物显示出对肿瘤的高度靶向作用。

15 在一些实施方式中，基序 N₈ 由 1-15 个核苷酸组成。在一些实施方式中，N₈ 由 1-8 个核苷酸组成。

20 在一些实施方式中，基序 N₈ 的存在使得本公开提供的缀合物对体内的核酸外切酶更加稳定，从而在体内能够更长时间地发挥肿瘤的靶向作用。在一些实施方式中，N₈ 能够增加或维持本公开提供的缀合物对肿瘤的靶向作用。从稳定性、靶向性和合成效率的平衡出发考虑，在一些实施方式中，基序 N₈ 由 8 个核苷酸组成。在一些实施方式中，按照 5'-3'方向，基序 N₈ 的核苷酸序列为 CCGAUCUC。在一些实施方式中，连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 12-14 中任意一项所示的核苷酸序列：

25 5'- CUGGAGUUCAGACGUGUUGCUCUUCCGAUCUC -3'
(SEQ ID NO: 12)

5'- CUGGAGUUCAGACGUUGUGCUCUUCCGAUCUC -3'
(SEQ ID NO: 13)

5'- CUGGAGUUCAGACCGUGUGCUCUUCCGAUCUC -3'
(SEQ ID NO: 14)

所述连续的核苷酸序列中，5'末端核苷酸的核糖 5'端以及 3'末端核苷

酸的核糖 3'端的末端基团独立地是羟基或磷酸基，这些末端基团的选择不会改变本公开提供的缀合物的靶向能力。在一些实施方式中，连续的核苷酸中，5'末端核苷酸的核糖 5'端以及 3'末端核苷酸的核糖 3'端的末端基团均为羟基。

5 本公开提供的缀合物中，每个核苷酸均可以是修饰或未修饰的核苷酸。一般而言，核苷酸的修饰可能会改变本公开提供的缀合物的稳定性和/或对肿瘤的靶向能力。在一些实施方式中，本公开提供的缀合物中的至少一个核苷酸为修饰的核苷酸。在一些实施方式中，本公开提供的缀合物中的至少一个连接相邻的两个核苷酸的基团具有修饰基团的磷酸酯基。

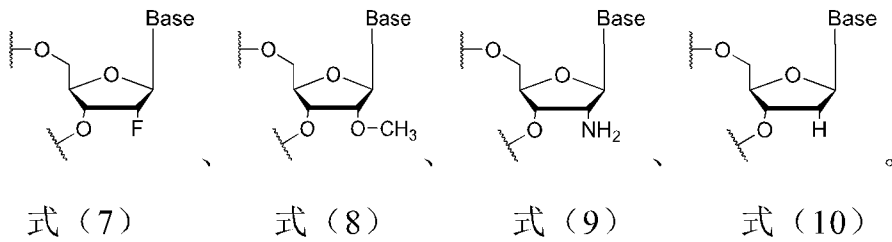
10 核苷酸的修饰包括但不限于对糖的修饰、对碱基的修饰和/或以核苷酸类似物代替核苷酸。在一些实施方式中，本公开提供的缀合物中，每个所述修饰的核苷酸独立地为 2'-卤素修饰的核苷酸、2'-烷氧基修饰的核苷酸、2'-烷基修饰的核苷酸、2'-经取代的烷基修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-经取代的氨基修饰的核苷酸、2'-脱氧核苷酸、碱基经修饰的核苷酸和核苷酸类似物中的一种。

20 在本公开的上下文中，“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，其具有以下式（7）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。

25 这些核糖基 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'-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（8）所示。在一些实施方式中，2'-氨基修饰的核苷酸（2'-NH₂）如式（9）所示。在一些实施方式中，2'-脱氧核苷酸（DNA）

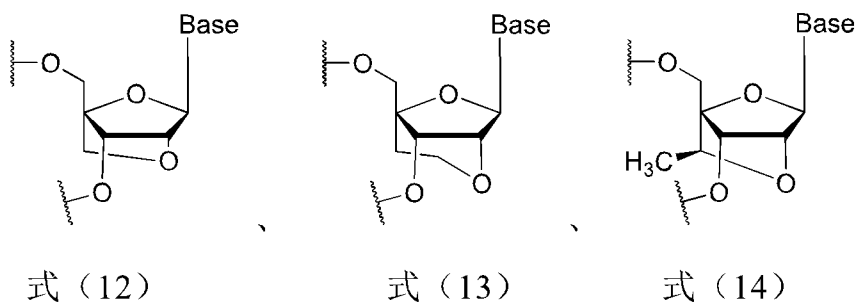
如式 (10) 所示:



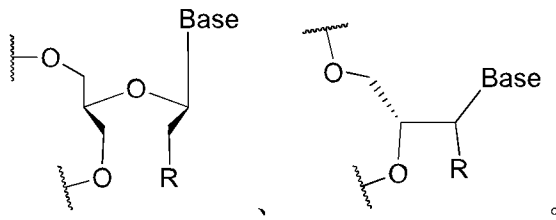
本领域技术人员知晓各种对核苷酸的碱基进行修饰的方式。在一些实施方式中, 碱基修饰包括但不限于在碱基上增加一个或多个甲基。在一些实施方式中, 将胸腺嘧啶 (T) 视为碱基经修饰的尿嘧啶 (U) 的一种。在一些实施方式中, 将 2-甲基胞嘧啶视为碱基经修饰的胞嘧啶 (C) 的一种。

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。在一些实施方式中, 核苷酸类似物可以是异核苷酸、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 可以含有五元环、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。在一些实施方式中, BNA 可以是 LNA、ENA、cET BNA 等, 其中, LNA 如式 (12) 所示, ENA 如式 (13) 所示, cET BNA 如式 (14) 所示:



无环核苷酸是核苷酸的糖环被打开形成的一类核苷酸。在一些实施方式中, 无环核苷酸可以是解锁核酸 (UNA)、甘油核酸 (GNA) 或肽核酸 (PNA), 其中, UNA 如式 (15) 所示, GNA 如式 (16) 所示:



式 (15)

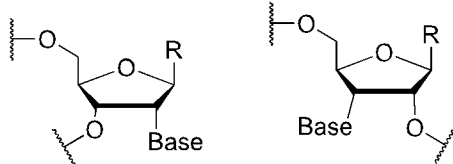
式 (16)

上述式 (15) 和式 (16) 中, R 选自 H、OH 或烷氧基 (O-烷基)。

肽核酸是多肽骨架取代糖苷-磷酸主链形成的一类核苷酸类似物。在一些实施方式中, 肽核酸可以是例如以 2-氨基乙基甘氨酸键取代糖苷-磷酸单元形成的核苷酸类似物。

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。在一些实施方式中, 异核苷酸可以是碱基从核糖环的 1'-位移动至 2'-位或 3'-位而形成的化合物, 如式 (17) 或 (18) 所示。

上述式 (17) -式 (18) 化合物中, Base 表示核酸碱基, 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。



式 (17)

式 (18)

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“具有 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 (7) 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“具有 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（8）所示结构的化合物。

在一些实施方式中，本公开提供的缀合物中的所述连续的核苷酸序列中的每个胞嘧啶核苷酸为氟代修饰的胞嘧啶核苷酸，和/或所述所述连续的核苷酸序列中的每个尿嘧啶核苷酸为氟代修饰的尿嘧啶核苷酸。在
5 一些实施方式中，本公开提供的缀合物中的所述连续的核苷酸序列中的每个核苷酸均为 2'-甲氧基修饰的核苷酸。在一些实施方式中，本公开提供的缀合物中的一个或多个尿嘧啶核苷酸具有修饰的碱基。在一些实施方式中，将胸腺嘧啶碱基（T）视为具有甲基修饰的尿嘧啶碱基（U）。

连接相邻的两个核苷酸的基团可以是磷酸酯基或修饰的磷酸酯基。
10 磷酸酯基的修饰例如将磷酸酯基中的至少一个非桥接氧原子替换为硫原子，形成硫代磷酸酯基或二硫代磷酸酯基。在一些实施方式中，本公开提供的缀合物中的至少一个连接相邻的两个核苷酸的基团为硫代磷酸酯基。在一些实施方式中，所述连续的核苷酸序列中的 5'末端前四个核苷酸之间的 3 个连接相邻的两个核苷酸的基团中至少 1 个为硫代磷酸酯基。在
15 一些实施方式中，所述连续的核苷酸序列中的 5'末端前四个核苷酸之间的 3 个连接相邻的两个核苷酸的基团中至少 2 个为硫代磷酸酯基。在一些实施方式中，所述连续的核苷酸序列中的 3'末端前四个核苷酸之间连接相邻的两个核苷酸的基团中至少 1 个为硫代磷酸酯基。在一些实施方式中，所述连续的核苷酸序列中的 3'末端前四个核苷酸之间的 3 个连接相邻的两个
20 核苷酸的基团中至少 2 个为硫代磷酸酯基。在一些实施方式中，所述连续的核苷酸序列中的每个连接相邻的两个核苷酸的基团均为硫代磷酸酯基。

具有上述修饰的本公开提供的缀合物不仅成本低，而且可使体内的核糖核酸酶不易切割连接基团，由此增加本公开提供的缀合物的稳定性，使其具有更强的抵抗核酸酶水解的性能。同时，包含上述修饰的递送基
25 团的本公开提供的缀合物具有较高的靶向肿瘤组织和/或细胞的活性。

在一些实施方式中，所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 15-39 中的一种所示的核苷酸序列：

5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf -3'（S
EQ ID NO: 15）

30 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUf -3'（SEQ ID NO: 16）

5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfUfGUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf -3' (S
EQ ID NO: 17)

5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfUfGUfGCfUfCfUfUf -3' (SEQ ID NO: 18)

5 5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfCfGUfGUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf -3' (S
EQ ID NO: 19)

5'- CfUfGGAGUfUfCfAGACfCfGUfGUfGCfUfCfUfUf -3' (SEQ ID NO: 20)

5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCm
UmUmCmCmGmAmUmCmUmCm -3' (SEQ ID NO: 21)

10 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCm
UmUm -3' (SEQ ID NO: 22)

5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCm
UmUmCmCmGmAmUmCmUmCm -3' (SEQ ID NO: 23)

5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCm
UmUm -3' (SEQ ID NO: 24)

15 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCm
UmUmCmCmGmAmUmCmUmCm -3' (SEQ ID NO: 25)

5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCm
UmUm -3' (SEQ ID NO: 26)

20 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCm
Um -3' (SEQ ID NO: 27)

5'- CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm
-3' (SEQ ID NO: 28)

5'- CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm -3'
(SEQ ID NO: 29)

25 5'- AmCmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCm
UmUm -3' (SEQ ID NO: 30)

5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmCmUmAmCmUmGmUmUmGmCmUmCm
UmUm -3' (SEQ ID NO: 31)

30 5'- CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmUmUmGmUmGmUmUmGmCmUmCm
UmUm -3' (SEQ ID NO: 32)

5'- UmCmUmAmUmGmGmCmUmGmCmCmGmAmUmCmUmGmGmUmCmUm

CmCmAmUmGmUmAmCmGmUm -3' (SEQ ID NO: 33)

5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmC
mUmUmCmCmGmAmUmCmsUmsCm -3' (SEQ ID NO: 34)

5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmC
msUmsUm -3' (SEQ ID NO: 35)

5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmC
mUmUmCmCmGmAmUmCmsUmsCm -3' (SEQ ID NO: 36)

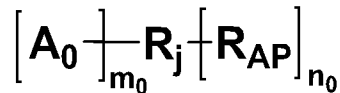
5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmC
msUmsUm -3' (SEQ ID NO: 37)

5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmC
mUmUmCmCmGmAmUmCmsUmsCm -3' (SEQ ID NO: 38)

5'- CmsUmsGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmC
msUmsUm -3' (SEQ ID NO: 39)

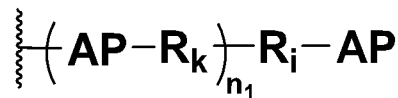
其中, 大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成; 小写字母 m
表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸; 小写字母
f 表示该字母 f 左侧相邻的一个核苷酸为氟代修饰的核苷酸; 小写字母 s
表示该字母 s 左右两个核苷酸之间为硫代磷酸酯基连接。

在一些实施方式中, 本公开提供的缀合物具有式 (101) 所示的结构:



(101)

其中, 每个 R_{AP} 基团独立地为具有如式 (2) 所示的结构的基团:



(102)

式中, 每个 AP 基团相同或不同, 独立地表示一个所述递送基团; 每
个 A_0 基团相同或不同, 独立地表示一个所述功能性基团; R_j 、每个 R_k 或
每个 R_i 相同或不同, 分别独立地表示共价键或者连接基团, 且 R_i 和 R_k 二
者不同时为共价键; m_0 为 1-6 的整数; n_0 为 1-6 的整数, 每个 n_1 各自独
立地表示 0-4 的整数; $\sim$ 表示基团共价连接的位点。

在一些实施方式中， m_0 为 1-6 的整数，即，式 (101) 所示的缀合物中包含 1-6 个所述功能性基团 A_0 。从递送效率和合成成本的角度考虑，在一些实施方式中， m_0 为 1-4 的整数，即，式 (101) 所示的缀合物中包含 1-4 个所述功能性基团 A_0 。在一些实施方式中， m_0 为 1，即，式 (101) 所示的缀合物中包含 1 个所述功能性基团 A_0 。

在一些实施方式中， n_0 为 1-6 的整数，即，式 (101) 所示的缀合物中包含 1-6 个 R_{AP} 基团。从递送效率和成本的角度考虑，在一些实施方式中， n_0 为 1-3 的整数，即，式 (101) 所示的缀合物中包含 1-3 个 R_{AP} 基团。在一些实施方式中， n_0 为 1，即，式 (101) 所示的缀合物中包含 1 个 R_{AP} 基团。

在一些实施方式中，每个 n_i 各自独立地表示 0-4 的整数，且 R_i 和 R_k 二者不同时为共价键，从而，每个 R_{AP} 基团中包含 1-5 个递送基团 AP。在一些实施方式中，每个 n_i 各自独立地表示 0-1 的整数，从而，每个 R_{AP} 基团中包含 1-2 个递送基团 AP。在一些实施方式中， n_0 为 1、且 n_i 为 0，此时，式 (101) 所示的缀合物中包含 1 个递送基团 AP。

R_{AP} 基团中， R_k 和 R_i 的作用是将递送基团 AP 共价连接至 R_j 基团，并经由 R_j 基团连接至功能性基团 A_0 。因此，只要是能够实现上述连接、并且不对递送基团 AP 和功能性基团 A_0 的作用产生负面影响的任何 R_k 或 R_i 均可用于本发明。在一些实施方式中，每个所述 R_k 或每个所述 R_i 独立地为长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，或者，所述直链亚烷基中的一个或多个碳原子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、OP(O)₂、OP(O)(S)、C₅-C₈ 亚糖苷基、C₂-C₁₀ 亚烯基、C₂-C₁₀ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₁₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基；并且其中，所述直链亚烷基可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：C₁-C₁₀ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-OH、-OC₁-C₁₀ 卤代烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-SH、-SC₁-C₁₀ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO₂H、-

C(O)O(C₁-C₁₀ 烷基)、-CON(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基苯基、-C(O)C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC(O)C₁-C₁₀ 烷基、-SO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)。从合成成本和难度以及缀合物的肿瘤靶向效果出发考虑, 在一些实施方式中, 每个 n₁ 均为 0, 每个 R_i 独立地为共价键, 或者为以下连接基团的一种或多种的连接组合: C₁-C₂₀ 亚烷基、磷酸酯键、硫代磷酸酯键、酰胺键、酯键、醚键、硫醚键、二硫键、1,2,3-三唑亚基、聚乙二醇亚基、吡咯烷亚基、2-氧代吡咯烷亚基、亚苯基、亚环己基、2-丁二酰亚胺亚基、2-硫代丁二酰亚胺亚基、氨基酸亚基、核苷酸亚基。

在一些实施方式中, 连接基团 R_j 包含本领域技术人员知晓能够用于抗体偶联药物的连接基团。连接基团 R_j 可以是可裂解的或不可裂解的。在一些实施方式中, 连接基团 R_j 可以是可裂解的。在上下文中, “可裂解”是指在本公开的缀合物靶向至肿瘤后, 连接基团 R_j 在肿瘤内环境下和/或肿瘤细胞内发生共价键断裂, 释放出单独的治疗剂基团产生治疗效果。在一些实施方式中, 连接基团 R_j 包含活化酶连接基团、硫酸酯酶-可切割连接基团、半乳糖可切割连接基团、对溶酶体蛋白酶敏感的连接基团、肽基连接基团、葡糖苷酸连接基团、酸敏可切割连接基团、或对谷胱甘肽敏感的二硫化物连接基团的一种或多种。在一些实施方式中, 连接基团 R_j 包含肽基连接基团。在一些实施方式中, 肽基连接基团选自缬氨酸-瓜氨酸二肽连接子 (Val - Cit)、丙氨酸-丙氨酸二肽连接子 (Ala - Ala)、缬氨酸-丙氨酸二肽连接子 (Val - Ala)、甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸的四肽连接子 (Gly-Gly-Phe-Gly) 中的一种或多种。在一些实施方式中, 连接基团 R_j 选自 N-琥珀酰亚基 4-(2-二硫吡啶)丁酸盐 (SPDB)、N-琥珀酰亚胺-4-(2-硫代吡啶亚基)戊酸盐 (SPP)、(S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺)-5-脲基戊酸 (Val-Cit-PAB-OH)、N-琥珀酰亚胺基-4- (N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸盐 (SMCC) 或者 2-(磷酸酯基-(CH₂)₆-S-)-马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲基亚基中的一种。在一些实施方式中,

连接基团 R_j 包含 Mckertish CM, Kayser V. Advances and Limitations of Antibody Drug Conjugates for Cancer. Biomedicines. 2021 Jul 23;9(8):872. 中列举的连接基团, 以引用的方式将该文献的全部内容整体并入本文。

在一些实施方式中, 连接基团 R_j 包含缬氨酸-瓜氨酸二肽连接子 (Val - Cit)、聚乙二醇亚基、亚氨基己基亚基、N-琥珀酰亚胺基、GAU 三核苷酸连接基团中的一种或多种。在一些实施方式中, 每个 R_i 独立地为共价键、二硫键、亚十二烷基、缬氨酸-瓜氨酸二肽连接子 (Val - Cit)、聚乙二醇亚基、亚氨基己基亚基、N-琥珀酰亚胺基或者 GAU 三核苷酸亚基中的一种或 2 种的连接组合。

R_j 基团的作用是将 R_{AP} 基团与功能性基团 A_0 相连接, 从而通过 R_{AP} 基团中递送基团 AP 的肿瘤靶向作用将功能性基团 A_0 特异性地递送至肿瘤组织和/或细胞。因此, 任何能够实现上述连接、且不会影响递送基团 AP 的肿瘤靶向作用和功能基团 A_0 的效果的 R_j 基团都能够实现本发明的目的、解决本发明所要解决的技术问题。在一些实施方式中, 在式 (1) 所示的缀合物到达肿瘤组织和/或进入肿瘤细胞后, 所述 R_j 发生裂解, 释放出单独的功能性基团 A_0 对应的药物活性分子。在一些实施方式中, 所述 R_j 在体内不发生裂解, 此时缀合物中 R_j 基团和 R_{AP} 基团的存在不会影响功能性基团 A_0 发挥治疗作用。

在一些实施方式中, R_j 为共价键, m_0 为 1, 此时, 式 (101) 所示的缀合物中包含 1 个功能性基团 A_0 和 1 个 R_{AP} 基团, 每个 R_{AP} 基团直接连接至该功能性基团 A_0 。在一些实施方式中, 每个 R_{AP} 基团连接至功能性基团 A_0 的同一原子。在一些实施方式中, 每个 R_{AP} 基团连接至功能性基团 A_0 的不同原子。

在一些实施方式中, R_j 为连接基团, 所述连接基团 R_j 包含主链部分、侧链部分和缀合连接部。

主链部分分别与缀合连接部和侧链部分连接。在一些实施方式中, 主链部分为长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基, 或者, 所述直链亚烷基中的一个或多个碳原子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、OP(O)₂、C₅-C₈ 亚糖苷基、C₂-

C₁₀ 亚烯基、C₂-C₁₀ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₁₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基；并且其中，所述直链亚烷基可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：C₁-C₁₀ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-OH、-OC₁-C₁₀ 卤代烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-SH、-SC₁-C₁₀ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO₂H、-C(O)O(C₁-C₁₀ 烷基)、-CON(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基苯基、-C(O)C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC(O)C₁-C₁₀ 烷基、-SO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHSO₂(苯基)和-NHSO₂(C₁-C₁₀ 卤代烷基)。

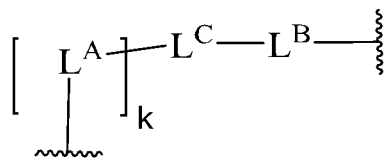
侧链部分分别与主链部分和 R_{AP} 基团连接。在一些实施方式中，每个侧链部分独立地是共价键，或者是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，或者，所述直链亚烷基中的一个或多个碳原子被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换：C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、OP(O)₂、C₅-C₈ 亚糖苷基、C₂-C₁₀ 亚烯基、C₂-C₁₀ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₁₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基；并且，所述直链亚烷基可具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基：C₁-C₁₀ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基、-OC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-OH、-OC₁-C₁₀ 卤代烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基、-SC₁-C₁₀ 烷基苯基、-C₁-C₁₀ 烷基-SH、-SC₁-C₁₀ 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₁₀ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、-NH(C₁-C₁₀ 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO₂H、-C(O)O(C₁-C₁₀ 烷基)、-CON(C₁-C₁₀ 烷基)(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH(C₁-C₁₀ 烷基)、-CONH₂、-NHC(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(C₁-C₁₀ 烷基)、-N(C₁-C₁₀ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基、-C(O)C₁-C₁₀ 烷基苯基、-C(O)C₁-C₁₀ 卤代烷基、-OC(O)C₁-C₁₀

烷基、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{苯基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ 卤代烷基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{苯基})$ 、 $-\text{NHSO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{NHSO}_2(\text{苯基})$ 和 $-\text{NHSO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10} \text{ 卤代烷基})$;

缀合连接部分别与主链部分和功能性基团 A_0 连接。在一些实施方式中，每个缀合连接部独立地为共价键或者以下连接结构的一种或多种的连接组合： C_1 - C_{10} 直链亚烷基、磷酸酯键、硫代磷酸酯键、酰胺键、酯键、醚键、二硫键、1,2,3-三唑亚基、聚乙二醇亚基、吡咯烷亚基、2-氧代吡咯烷亚基、亚苯基、亚环己基、2-丁二酰亚胺亚基、2-硫代丁二酰亚胺亚基、氨基酸亚基、核苷酸亚基。

在一些实施方式中，连接基团 R_j 中的每个所述缀合连接部分别与所述主链部分和一个所述功能性基团 A_0 连接；所述侧链部分为 n_0 个，每个侧链部分分别与所述主链部分和一个所述 R_{AP} 基团连接。从而，每个功能性基团 A_0 和 R_{AP} 基团各自独立地连接至连接基团 R_j 。在一些实施方式中，全部侧链部分连接至主链部分中的同一原子；或者，每个侧链部分连接至主链部分中的不同原子。

在一些实施方式中， m_0 为 1，所述连接基团 R_j 包含如式 (301) 所示的结构：



式 (301),

其中, k 为 1-3 的整数; L^C 为所述主链部分, L^A 为所述侧链部分, L^B 为所述缀合连接部, $\sim$ 表示基团共价连接的位点。

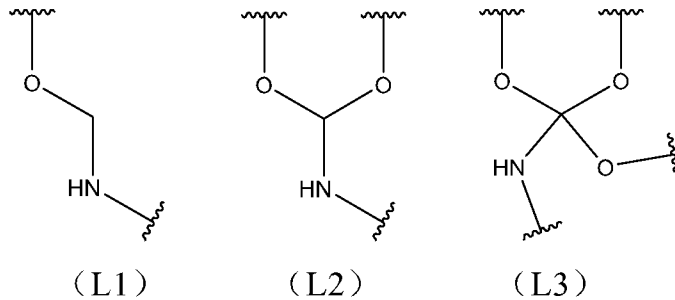
所述主链部分 L^C 为共价键或 2-4 价、直链或支链的 C_1 - C_{25} 饱和烃基, 或者, 所述饱和烃基中的一个或多个碳原子被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换: $C(O)$ 、 NH 、 O 、 S 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $OP(O)_2$ 、 C_5 - C_8 亚糖苷基、 C_2 - C_5 亚烯基、 C_2 - C_5 亚炔基、 C_6 - C_{10} 亚芳基、 C_3 - C_8 亚杂环基和 C_5 - C_{10} 亚杂芳基; 其中, 所述饱和烃基可具有由以下基团所组成的组中的任何一个或多个的取代基: C_1 - C_5 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 C_5 - C_{10} 杂芳基、 $-O-C_1-C_5$ 烷基、 $-OC_1-C_5$ 烷基苯基、 $-C_1-C_5$ 烷基- OH 、 $-SC_1-C_5$ 烷基、硝基、 $-C(O)O(C_1-C_5$ 烷基)、 $-CON(C_1-C_5$ 烷基) $(C_1-C_5$ 烷基)、 $-CONH(C_1-$

C₅ 烷基)、-CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₅ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₅ 烷基)C(O)(C₁-C₅ 烷基)、-N(C₁-C₅ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₅ 烷基、-C(O)C₁-C₅ 烷基苯基、-OC(O)C₁-C₅ 烷基、-SO₂(C₁-C₅ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₅ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₅ 烷基)和-NHSO₂(苯基)。在一些实施方式中, L^C 为 2-4 价的 C₅-C₂₀ 饱和烃基, 或者, 所述饱和烃基中的一个或多个碳原子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、OP(O)₂、C₅-C₈ 亚糖苷基、C₂-C₅ 亚烯基、C₂-C₅ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基; 其中, 所述饱和烃基可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: C₁-C₅ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、-O-C₁-C₅ 烷基、-OC₁-C₅ 烷基苯基、-C₁-C₅ 烷基-OH、-SC₁-C₅ 烷基、硝基、-CONH₂。在一些实施方式中, L^C 的长度为 5-30 个原子, 其中所述 L^C 的长度指 L^C 中与 L^A 直接连接的原子到与 L^B 直接连接的原子形成的最长的原子链上的成链原子的个数。为了简化结构, 在一些实施方式中, L^C 的长度为 8-25 个原子。

所述侧链部分 L^A 为共价键, 或者 C₁-C₂₀ 亚烷基, 或者, 所述亚烷基中的一个或多个碳原子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、OP(O)₂、C₅-C₈ 亚糖苷基、C₂-C₅ 亚烯基、C₂-C₅ 亚炔基、C₆-C₁₀ 亚芳基、C₃-C₈ 亚杂环基和 C₅-C₁₀ 亚杂芳基; 其中, 所述亚烷基可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: C₁-C₅ 烷基、C₆-C₁₀ 芳基、C₅-C₁₀ 杂芳基、-O-C₁-C₅ 烷基、-OC₁-C₅ 烷基苯基、-C₁-C₅ 烷基-OH-SC₁-C₅ 烷基、-SC₁-C₅ 烷基苯基、-C₁-C₅ 烷基-SH、-OH、-SH、-NH₂、-C₁-C₅ 烷基-NH₂、-N(C₁-C₅ 烷基)(C₁-C₅ 烷基)、-NH(C₁-C₅ 烷基)、-N(C₁-C₅ 烷基)(C₁-C₅ 烷基苯基)、-NH(C₁-C₅ 烷基苯基)、硝基、-C(O)O(C₁-C₅ 烷基)、-CON(C₁-C₅ 烷基)(C₁-C₅ 烷基)、-CONH(C₁-C₅ 烷基)、-CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₅ 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C₁-C₅ 烷基)C(O)(C₁-C₅ 烷基)、-N(C₁-C₅ 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C₁-C₅ 烷基、-C(O)C₁-C₅ 烷基苯基、-OC(O)C₁-C₅ 烷基、-SO₂(C₁-C₅ 烷基)、-SO₂(苯基)、-SO₂NH₂、-SO₂NH(C₁-C₅ 烷基)、-SO₂NH(苯基)、-NHSO₂(C₁-C₅ 烷基)和-NHSO₂(苯基)。

所述缀合连接部 L^B 为 1-5 个以下连接键中的一种或多种的连接组合：
磷酸酯键、硫代磷酸酯键、酰胺键、酯键、醚键、二硫键。

在一些实施方式中， k 为 1-3 的整数； L^C 含有如式 (L1) - (L3) 所示的基团中的任意一个，通过如式 (L1) - (L3) 所示的基团中的醚键与 L^A 部分连接：

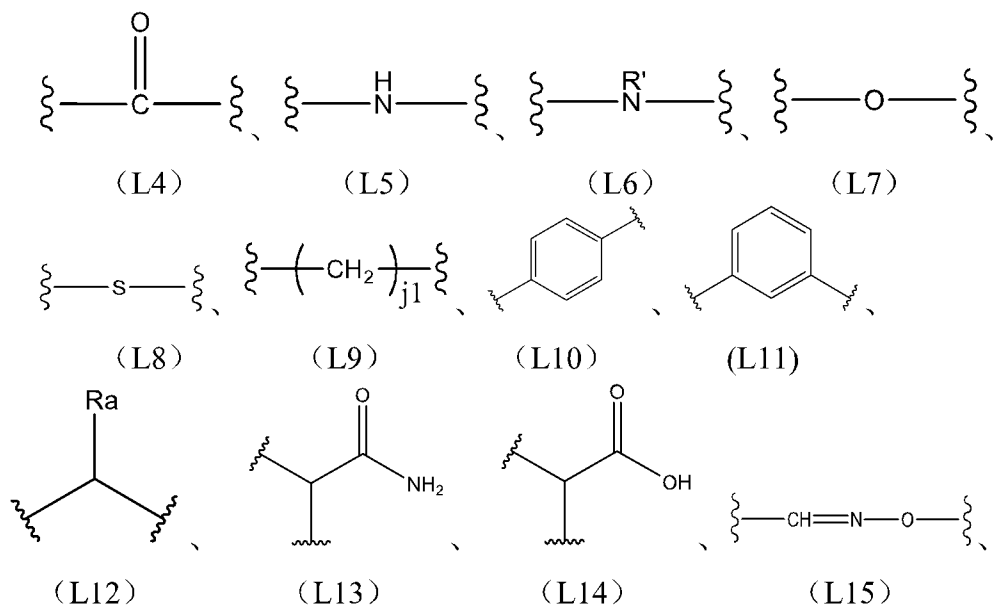


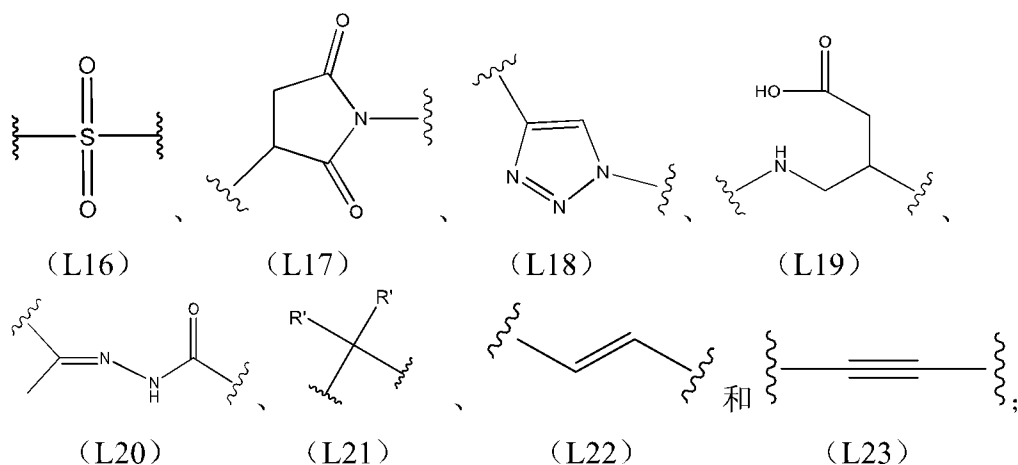
~~~~~表示基团连接至分子其余部分的位点；

在一些实施方式中， $k=1$ ， $L^C$  含有如式 (L1) 所示的基团，基团 (L1) 中的 O 原子和  $L^A$  直接相连。在一些实施方式中， $k=2$ ， $L^C$  含有如式 (L2) 所示的基团，基团 (L1) 中的 2 个 O 原子各自和 1 个  $L^A$  直接相连。在一些实施方式中， $k=4$ ， $L^C$  含有如式 (L3) 所示的基团，基团 (L3) 中的 3 个 O 原子各自和 1 个  $L^A$  直接相连。

$L^B$  为磷酸酯键或二硫键；

每个  $L^A$  为共价键，或者每个  $L^A$  选自于由基团 (L4) - (L23) 及其连接组合所组成的组：



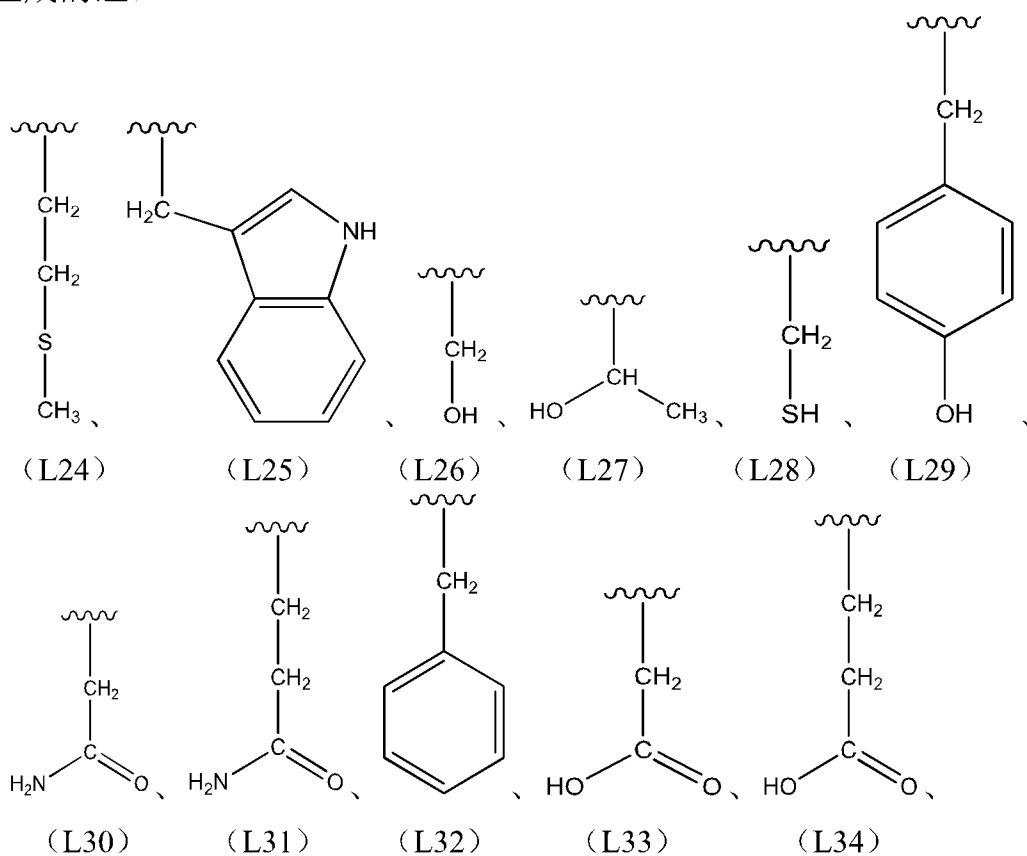


5

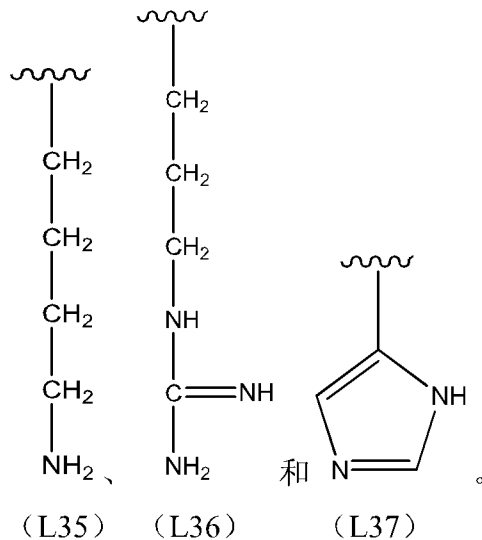
式中, 每个  $j_1$  为 1-10 的整数;

每个  $R'$  为  $C_1$ - $C_{10}$  烷基;

每个  $R_a$  为氢原子,  $C_1$ - $C_{10}$  烷基, 或者选自由基团 (L24) - (L37) 组成的组:

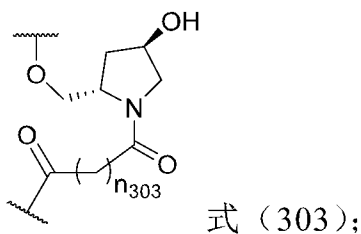
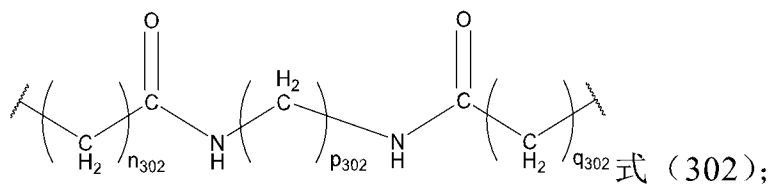


10



在一些实施方式中， $L^A$  的长度为 3-35 个原子，其中所述  $L^A$  的长度指  $L^A$  中与  $L^C$  直接连接的原子到与  $L^A$  中与  $R_{AP}$  直接连接的原子形成的最长的原子链上的成链原子的个数。在一些实施方式中，每个  $L^A$  为基团 (L4) - (L9)、(L13)、(L14)、(L18) 中至少 2 个的连接组合。在一些实施方式中，每个  $L^A$  为基团 (L4)、(L5)、(L7)、(L9)、(L13)、(L14)、(L18) 中至少 2 个的连接组合。

在一些实施方式中， $L^A$  具有如式 (302) 所示的包含酰胺键的结构， $L^B$  具有如式 (303) 所示的包含 N-酰基吡咯烷的结构，含有羰基和氧原子， $L^C$  为基于羟甲基氨基甲烷、二羟甲基氨基甲烷或三羟甲基氨基甲烷的连接基团：

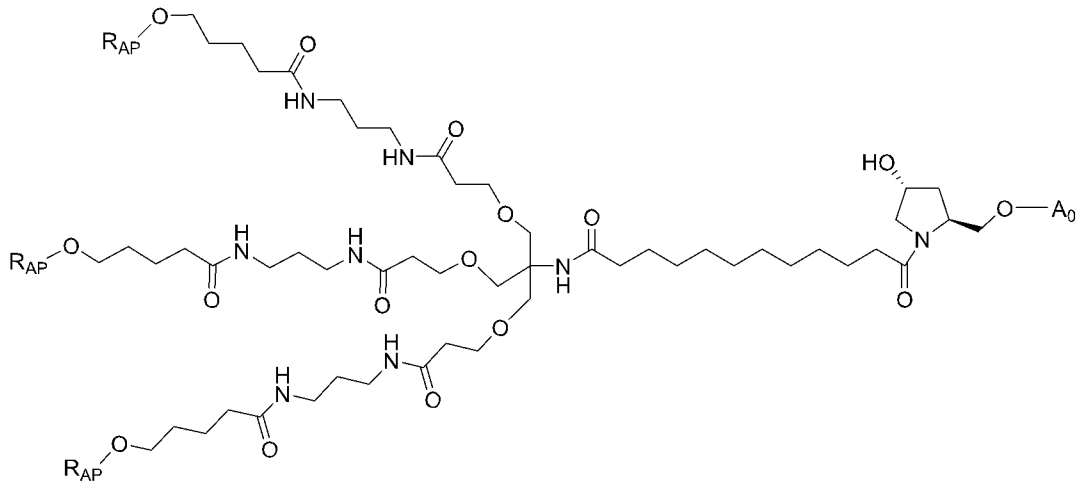


其中， $n_{302}$ 、 $q_{302}$  和  $p_{302}$  各自独立地为 2-6 的整数，可选地， $n_{302}$ 、 $q_{302}$  和  $p_{302}$  各自独立地为 2 或 3； $n_{303}$  为 4-16 的整数，可选地， $n_{303}$  为 8-12 的整数， $\sim$  表示基团共价连接的位点。

在一些实施方式中，每个所述侧链部分  $L^A$  分别与一个  $R_{AP}$  基团通过

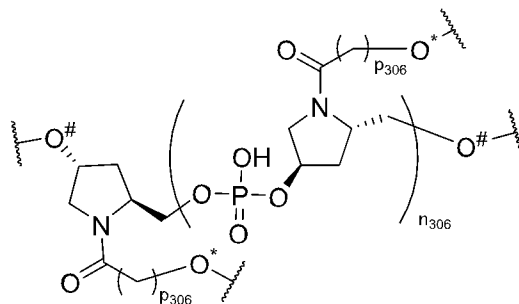
磷酸酯键、醚键或酯键而连接，并通过所述主链部分  $L^C$  中羟基的氧原子与所述主链部分  $L^C$  形成醚键而连接；所述缀合连接部  $L^B$  通过式 (303) 中的羰基与所述主链部分  $L^C$  中氨基的氮原子形成酰胺键而连接，并通过式 (303) 中的氧原子与所述功能性基团  $A_0$  形成磷酸酯键、醚键或酯键而连接。在一些实施方式中，主链部分  $L^C$  是基于羟甲基氨基甲烷、二羟甲基氨基甲烷或三羟甲基氨基甲烷的连接基团，所述主链部分  $L^C$  经由羟基的氧原子与各个所述侧链部分  $L^A$  通过醚键相连接，并且经由氨基的氮原子与所述缀合连接部  $L^B$  通过酰胺键相连接。从而，该连接基团  $R_j$  中 1-3 个侧链连接至同一氮甲基的碳原子上，并通过缀合连接部  $L^B$  连接至包含递送基团的  $R_{AP}$  基团。

在一些实施方式中，所述缀合物具有如式 (305) 所示的结构：



式 (305)。

在一些实施方式中，所述连接基团  $R_j$  包含如式 (306) 所示的结构：

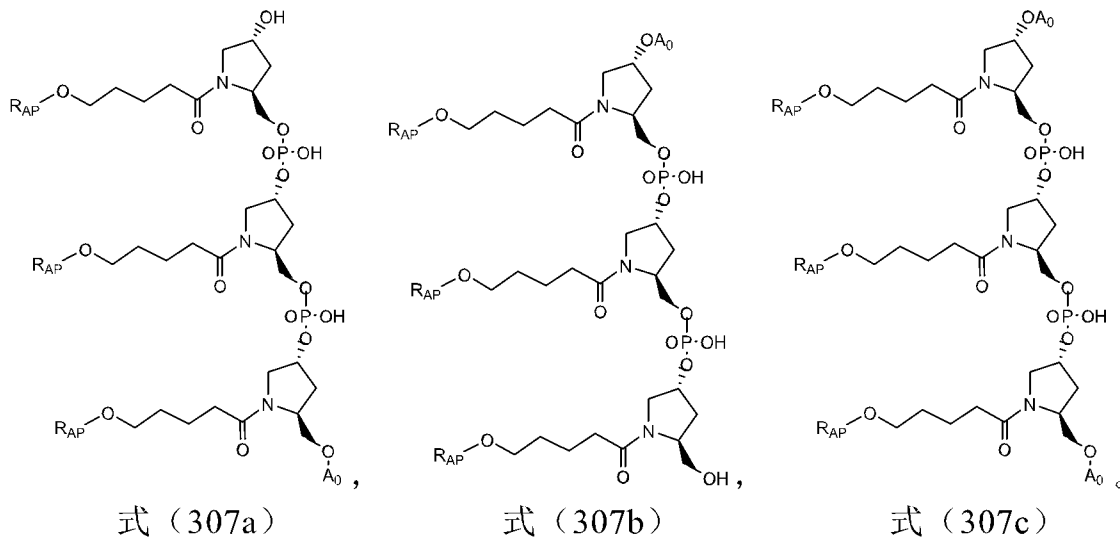


式 (306)，

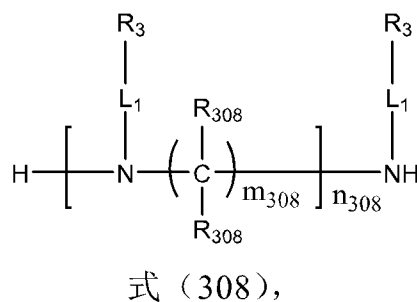
其中， $n_{306}$  为 0-3 的整数，每个  $p_{306}$  独立地为 1-6 的整数， $\sim$  表示基团共价连接的位点；由全部吡咯烷亚基和任何可能的磷酸二酯基团形成的连接组合构成主链部分，由连接至吡咯烷亚基上氮原子的羰基与由\*标

出的氧原子之间的原子链构成每个侧链部分，所述侧链部分通过由\*标出的氧原子与  $R_{AP}$  基团形成醚键连接；由#标出的氧原子中的至少一个为缀合链接部并与功能性基团  $A_0$  形成醚键、酯键或磷酸酯键而连接，其余由#标出的氧原子与氢原子连接形成羟基，或者与  $C_1-C_3$  烷基连接形成  $C_1-C_3$  烷氧基。从而，该连接基团  $R_j$  中 1-3 个侧链部分连接至主链部分中不同的碳原子上，并通过氧原子连接至包含递送基团的  $R_{AP}$  基团。

在一些实施方式中，本公开提供的缀合物具有如式 (307a)、(307b) 或 (307c) 所示的结构：



在一些实施方式中，本公开提供的缀合物具有如式 (308) 所示的结构：



其中， $n_{308}$  可为 1-10 的整数；在一些实施方式中，从合成容易程度、结构/工艺成本和肿瘤细胞特异性等多方面综合考虑， $n_{308}$  为 2-6 的整数。在一些实施方式中， $n_{308}$  为 3 或 4。

每个  $R_3$  独立地为功能性基团  $A_0$ ，或者包含递送基团 AP 的  $R_{AP}$  基团；。在一些实施方式中，至少一个  $R_3$  为功能性基团  $A_0$ ，且至少一个  $R_3$  为  $R_{AP}$ 。在一些实施方式中，一个  $R_3$  为功能性基团  $A_0$ ，其余  $R_3$  为  $R_{AP}$  基团。

在一些实施方式中，当每个  $m_{308}$  独立地选自 2-10 的整数时，认为可能使得该缀合物中，多个递送基团 AP 之间的空间位置更适合于与肿瘤细胞表面的相应受体发生相互作用，为了使式 (308) 表示的化合物更为简单，更容易合成和/或降低成本，根据本公开的一些实施方式，每个  $m_{308}$  独立地为 2-5 的整数，在一些实施方式中，每个  $m_{308}$  均相等。

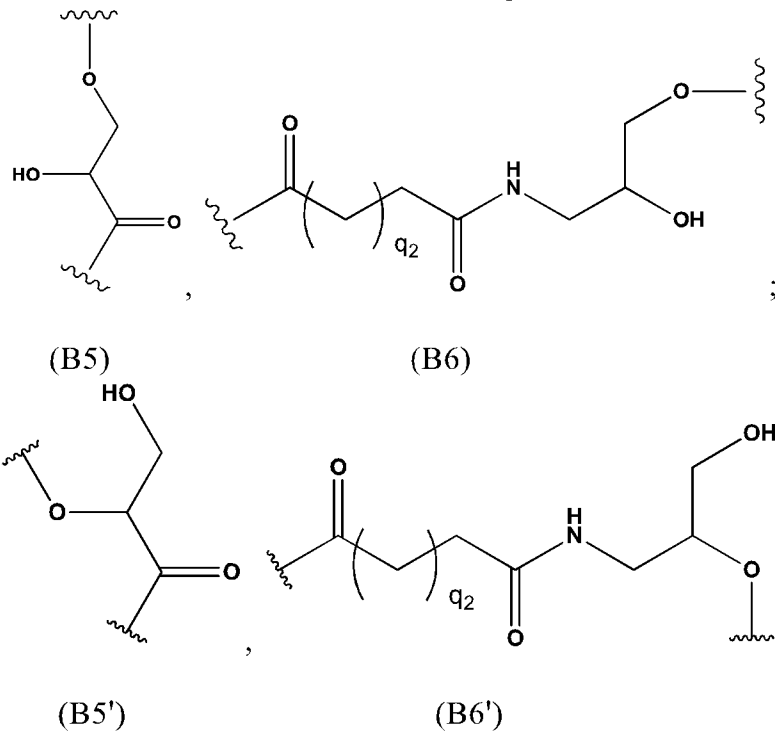
本领域技术人员可以理解，当每个  $R_{308}$  独立地选自 H、 $C_1$ - $C_{10}$  烷基、 $C_1$ - $C_{10}$  卤代烷基和  $C_1$ - $C_{10}$  烷氧基时，不改变式 (308) 表示的缀合物的性质，均可实现本公开的目的。在一些实施方式中，每个  $R_{308}$  独立地选自 H、甲基或乙基。在一些实施方式中，每个  $R_{308}$  均为 H。

连接至所述功能性基团  $A_0$  的每个  $L_1$  表示所述缀合连接部，并且连接至所述  $R_{AP}$  的每个  $L_1$  表示所述侧链部分。在一些实施方式中，一个  $R_3$  为所述功能性基团  $A_0$ ，其余  $R_3$  为所述  $R_{AP}$  基团。在一些实施方式中，一个或多个  $L_1$  作为所述侧链部分，将  $R_{AP}$  基团与含氮骨架上的 N 原子连接；并且另外的一个或多个  $L_1$  作为所述缀合连接部，将功能性基团  $A_0$  与含氮骨架上的 N 原子连接。所述含氮骨架共同组成连接基团  $R_j$  的主链部分。在本公开的上下文中，“含氮骨架”是指式 (308) 所示结构中的链结构，其中连接有  $R_{308}$  的碳原子与 N 原子互相连接。

从递送效率和合成成本的角度出发考虑，在一些实施方式中，每个  $L_1$  的长度独立地为 3-25 个原子。在一些实施方式中，每个  $L_1$  的长度独立地为 4-15 个原子。本领域技术人员会理解，尽管为了方便起见， $L_1$  被定义为线性亚烷基，但是它可能不是线性基团或者名称不同，例如由于上述替换和/或取代而产生的胺或烯基。为了本公开的目的， $L_1$  的长度是连接两个连接点的链中的原子数。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）按照环上连接点之间的最小原子数计算链中与该环相应部分的长度。

在一些实施方式中， $L_1$  选自上述式 L4-L23 所示基团及其任意连接组合所组成的组。在一些实施方式中，每个  $L_1$  独立地选自由基团 L4-L9、L13、L14、L18 中至少 2 个的连接组合所组成的组。在一些实施方式中，每个  $L_1$  独立地为基团 L4、L5、L7、L9、L13、L14、L18 中至少 2 个的连接组合。

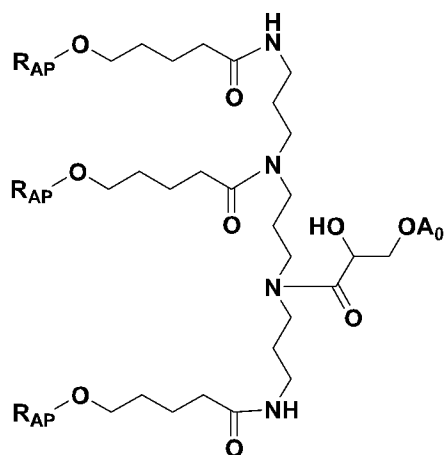
在一些实施方式中，式（308）所示的缀合物中，每个  $L_1$  上同时含有与含氮骨架上的 N 原子连接的连接位点和与功能性基团  $A_0$  或所述  $R_{AP}$  基团连接的连接位点，与含氮骨架上的 N 原子连接的位点与该 N 原子形成酰胺键。在一些实施方式中，一个或多个  $L_1$  选自 B5、B6、B5'或 B6'：



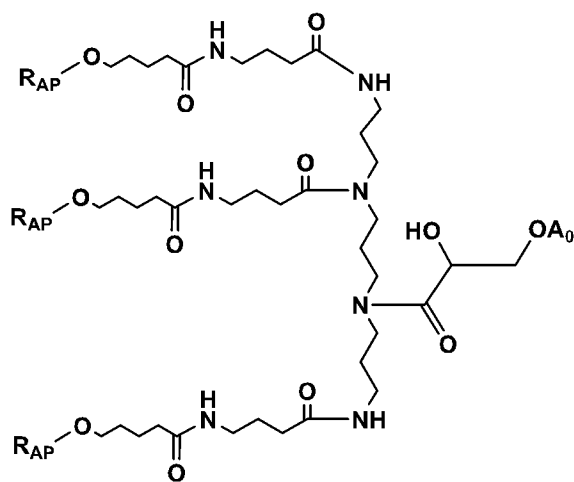
其中， $\sim$ 表示基团共价连接的位点， $q_2$  为 1-10 的整数。在一些实施方式中， $q_2$  为 1-5 的整数。

在一些实施方式中，每个  $R_{AP}$  基团中包含一个或多个递送基团。在一些实施方式中，式（308）所示的化合物中包含多个功能性基团。在一些实施方式中，式（308）化合物中每个功能性基团是相同的功能性基团。在一些实施方式中，式（308）化合物中每个功能性基团是用于同一目的和功能的基团。在一些实施方式中，式（308）化合物中含有不同种类的用于不同目的和功能的基团。

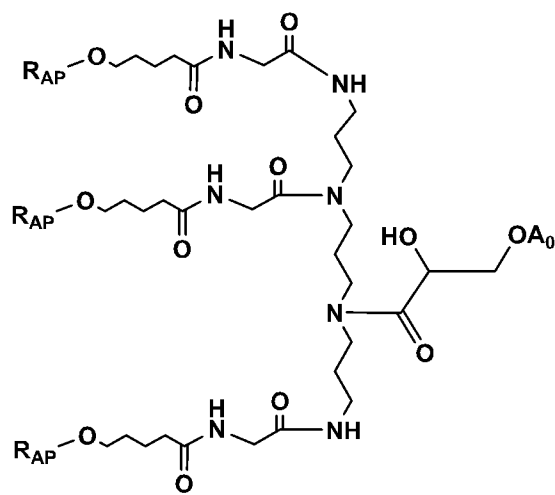
在一些实施方式中，所述式（308）所示的化合物具有式（403）、（404）、（405）、（406）、（407）、（408）、（409）、（410）、（411）、（412）、（413）、（414）、（415）、（416）、（417）、（418）、（419）、（420）、（421）、（422）、（423）、（424）、（425）、（426）或（427）所示的结构：



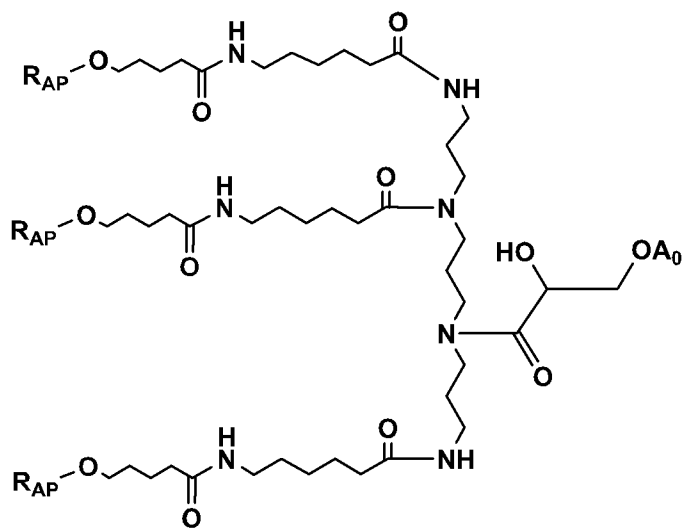
式 (403)



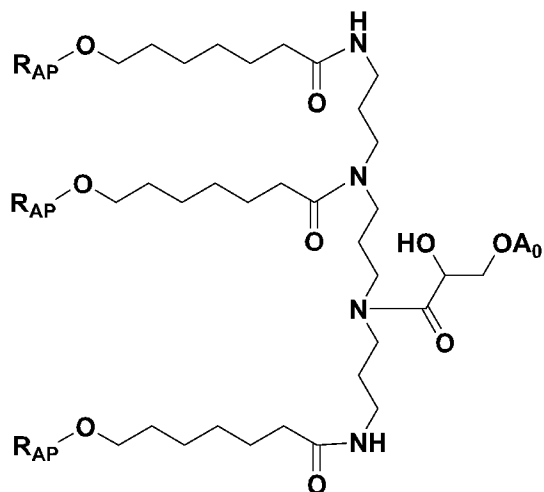
式 (404)



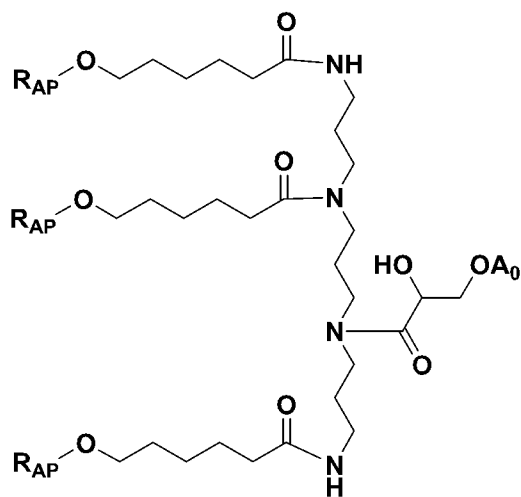
式 (405)



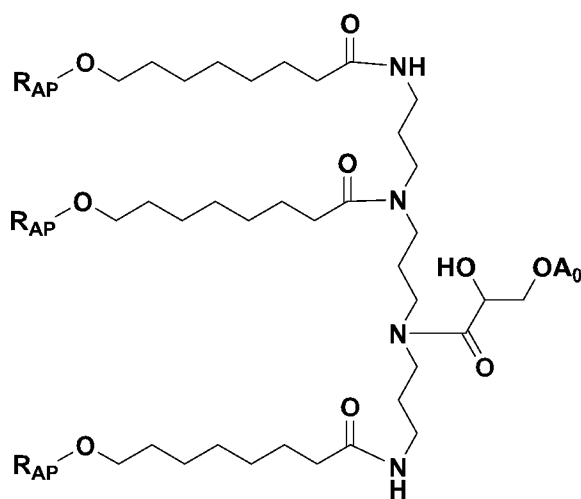
式 (406)



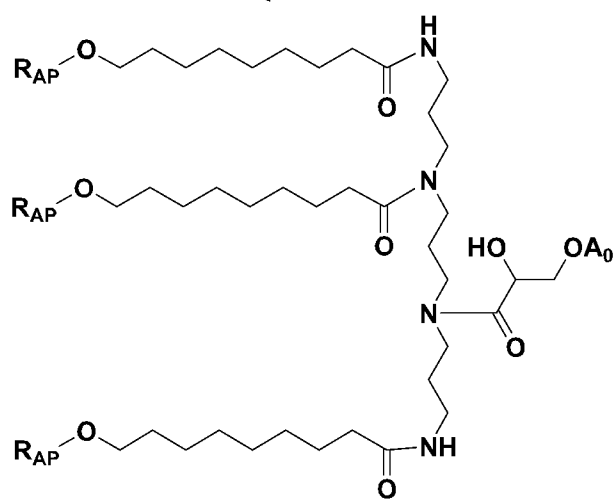
式 (407)



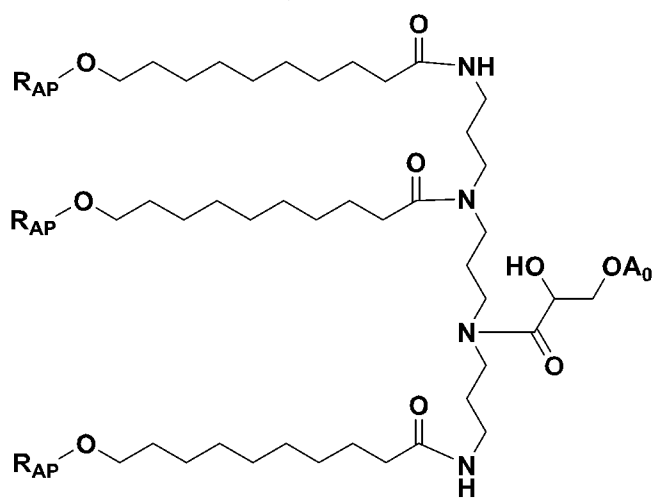
式 (408)



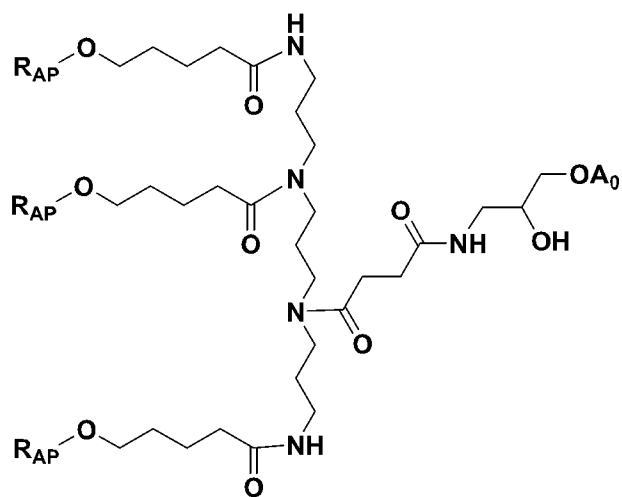
式 (409)



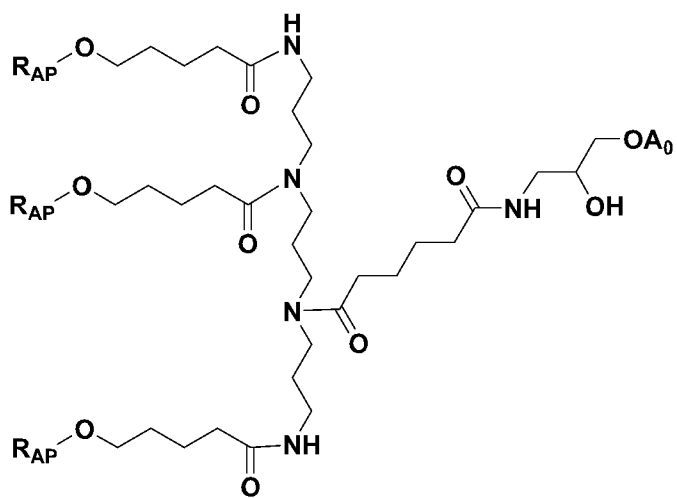
式 (410)



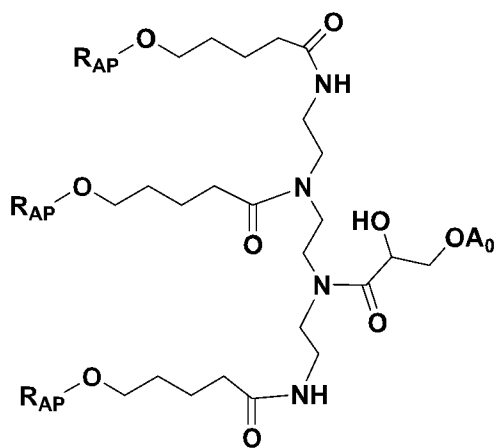
式 (411)



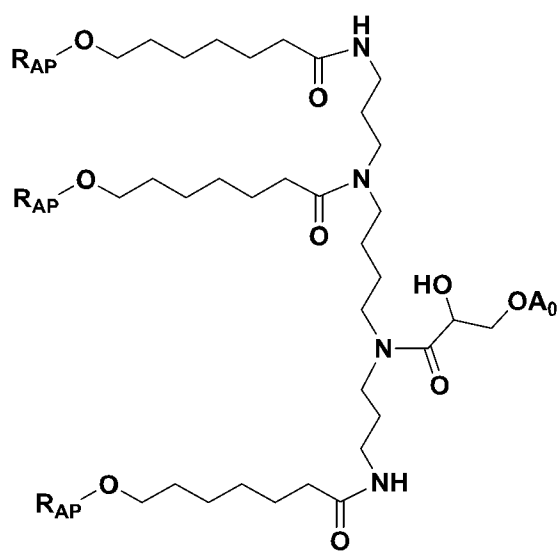
式 (412)



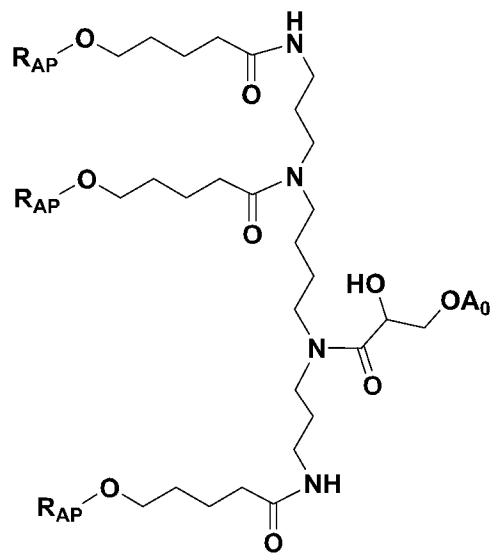
式 (413)



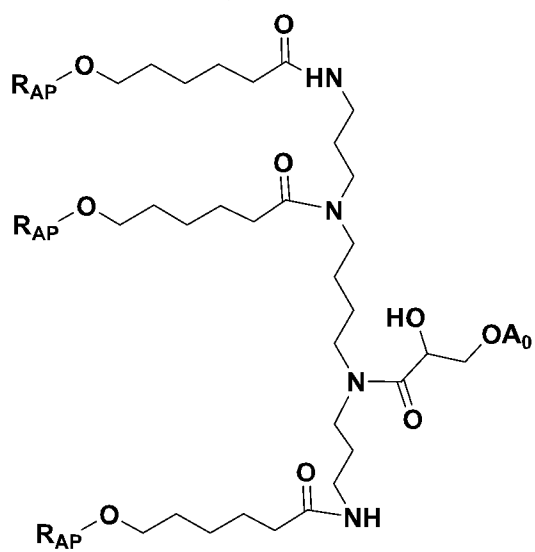
式 (414)



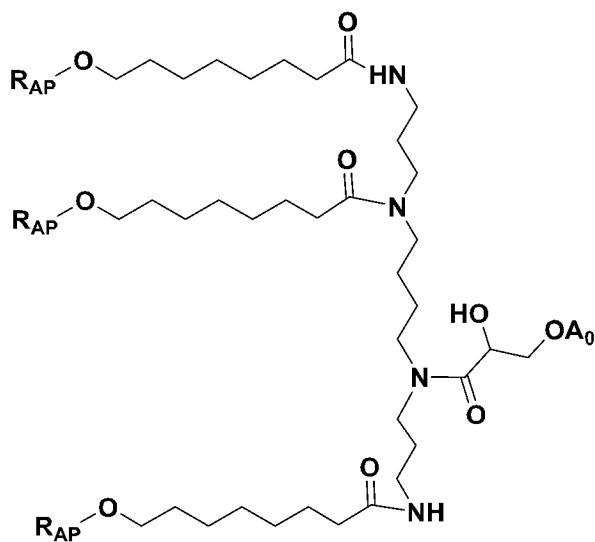
式 (415)



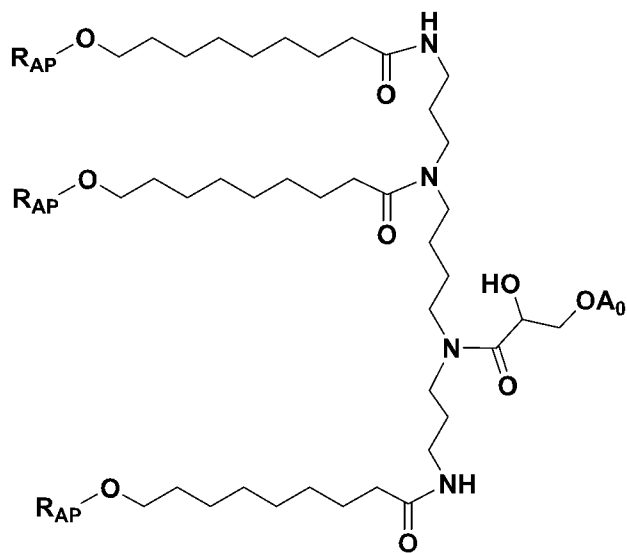
式 (416)



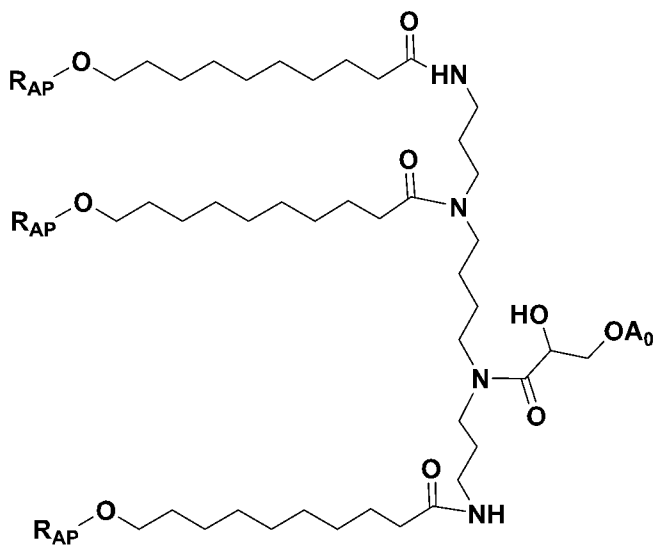
式 (417)



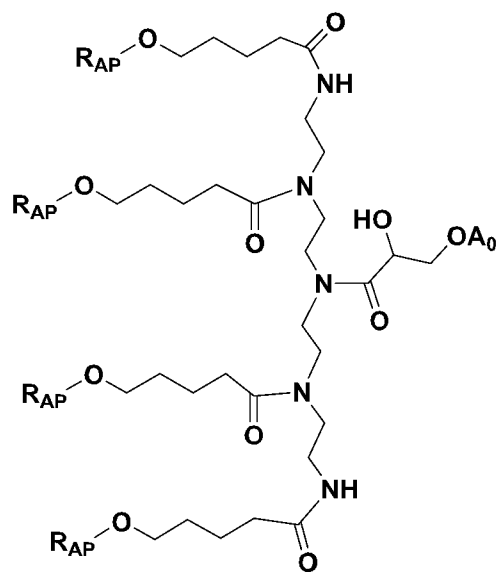
式 (418)



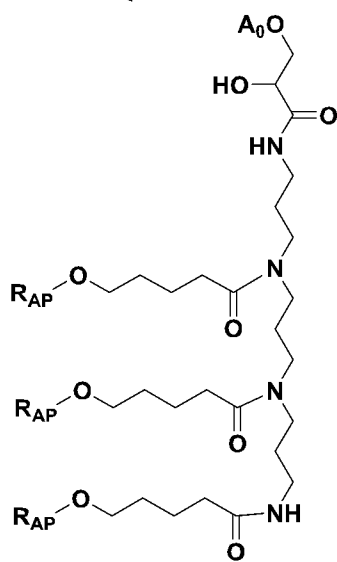
式 (419)



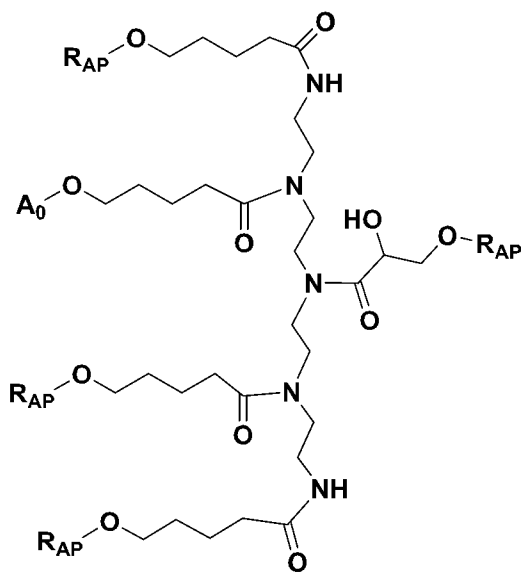
式 (420)



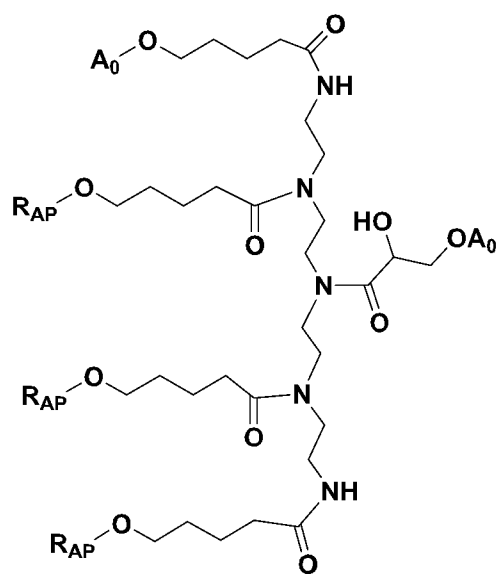
式 (421)



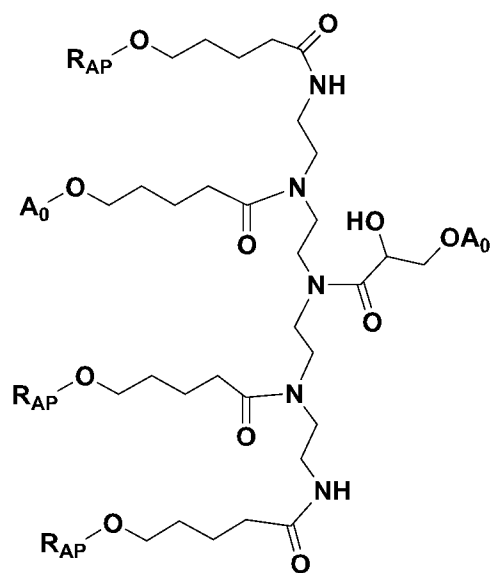
式 (422)



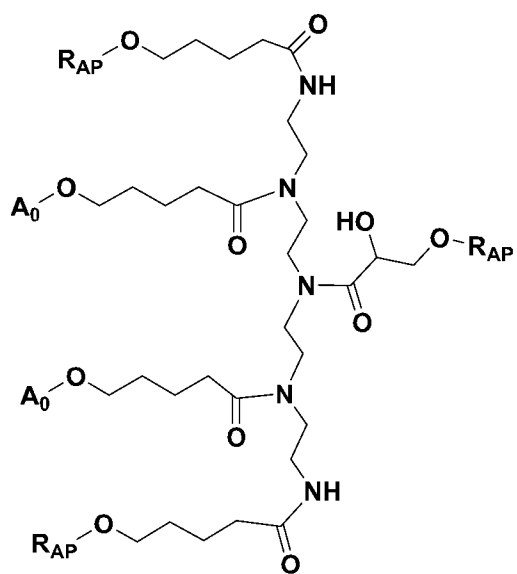
式 (423)

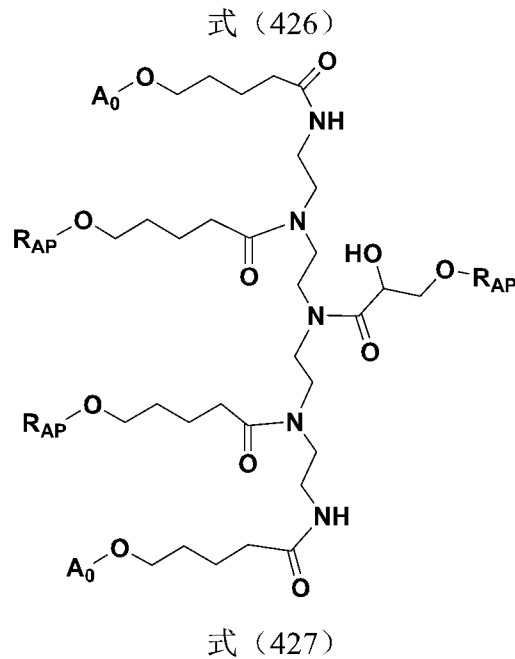


式 (424)



式 (425)





在一些实施方式中，连接基团  $R_j$  包含核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 各自包含 5-25 个修饰或未修饰的核苷酸，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补，所述递送基团连接至所述核苷酸序列 I，所述功能性基团连接至所述核苷酸序列 II，并且所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 在受试者体内不引发免疫反应或毒性反应。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 实质上反向互补或者完全反向互补；或者，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 的长度相等并且均为 10-20 个修饰或未修饰的核苷酸；或者，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 均由 17 个核苷酸组成并且完全反向互补。在一些实施方式中，所述递送基团 3' 末端经磷酸酯键连接至所述核苷酸序列 I 的 5' 末端核苷酸的核糖 5' 位，所述功能性基团连接至所述核苷酸序列 II 的 5' 末端核苷酸的核糖 5' 位；或者，所述功能性基团包含一段核苷酸序列，所述核苷酸序列的 3' 末端经磷酸酯键连接至所述核苷酸序列 I 的 5' 末端核苷酸的核糖 5' 位。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 分别具有 SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 41 所示的序列：

5'- GUACAUUCUAGAUAGCC -3' (SEQ ID NO: 40)

5'- GGCUAUCUAGAAUGUAC -3' (SEQ ID NO: 41)。

在一些实施方式中，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 分别具有

SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 43 所示的序列:

5'- GmUfAmCfAmUfUfCfUfAmGmAmUfAmGmCfCf -3'

(SEQ ID NO: 42)

5'- GmGmCfUfAmUfCfUfAmGmAmAmUfGmUfAmCf -3'

(SEQ ID NO: 43)。

在一些实施方式中, 所述功能性基团为对肿瘤具有治疗作用的小分子治疗剂基团, 每个小分子治疗剂基团独立地选自细胞毒素基团、抗生素基团或血管生成抑制剂。通过包含小分子治疗剂基团, 本公开的缀合物能够特异性地将该小分子治疗剂基团递送至肿瘤, 从而通过该小分子治疗剂基团的作用, 对肿瘤的疾病进程或症状进行治疗和/或缓解, 例如, 通过本公开的缀合物将细胞毒素基团特异性地递送至肿瘤, 使肿瘤中的癌细胞特异性地消亡, 从而在减少细胞毒素本身低靶向性带来的副作用的同时, 显著减少肿瘤中的癌细胞数量, 从而对肿瘤进行治疗。

在一些实施方式中, 所述小分子治疗剂基团由下述小分子治疗剂去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成: 所述小分子治疗剂选自甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱、溴瑞他汀 (包括 MMAE 和 MMAF)、卡利奇霉素、美登素、喜树碱、以及加利车霉素。在一些实施方式中, 所述小分子治疗剂基团是一甲基溴瑞他汀 E (MMAE) 去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成的基团。

所述功能性基团可通过任何合适的方式包含于本公开的缀合物中。例如, 可以通过前述的缀合连接部将功能性基团  $A_0$  与所述主链部分相连接。

在一些实施方式中, 本公开提供的缀合物还包含一个或多个递送助剂基团, 所述递送助剂基团选自于  $C_{10}$ - $C_{30}$  烃基、胆固醇基、磷脂基团中的一种或多种。通过包含该递送助剂基团, 本公开提供的缀合物能够更好地与中枢神经系统中的体内环境相容, 可能具有更好的生物利用度, 和/或使本公开提供的缀合物更有效地递送至肿瘤。在一些实施方式中, 所述递送助剂基团通过共价键或连接基团连接至所述递送基团或者所述连接基团。在一些实施方式中, 所述递送助剂基团连接至所述功能性基团。

本领域技术人员可以采用任意合理的合成路线制备本公开提供的缀合物。

在一些实施方式中，本公开提供的缀合物的合成方法包括在脱保护反应条件下，在溶剂中，将经保护的缀合物与脱保护试剂接触，分离获得本公开提供的缀合物。经保护的缀合物是本公开提供的缀合物中任意活性官能团均被保护基团保护而形成的化合物。在一些实施方式中，所述活性官能团包括但不限于羟基、氨基和/或磷酸基，所述保护基团相应地为羟基保护基、氨基保护基和/或磷酸羟基保护基（例如，氰乙基保护基）。根据保护基团的不同，对所使用的溶剂、脱保护反应条件和脱保护试剂进行选择 and 确定。在一些实施方式中，所述脱保护反应条件、溶剂和脱保护试剂是核酸固相合成中使用的脱保护反应条件、溶剂和试剂。在一些实施方式中，所述方法包括将经保护的缀合物加入甲胺水溶液和氨水的混合溶液中，所述脱保护反应条件包括在常温常压下反应 1-5h。在一些实施方式中，以等体积混合所述甲胺水溶液与饱和浓氨水得到所述混合溶液，所述溶液相对于经保护的缀合物的用量为 0.1-10 ml/ $\mu$ mol。在一些实施方式中，所述分离包括通过柱色谱分离进行纯化，收集产品洗脱液并除去溶剂。纯化条件可以是例如使用制备型离子色谱纯化柱，以氯化钠水溶液与磷酸钠水溶液的梯度洗脱剂进行洗脱。在一些实施方式中，以 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。

在一些实施方式中，本公开提供的缀合物具有式（101）所示的结构，所述经保护的缀合物的合成方法包括在有机溶剂中，在偶联反应条件下，将包含活性基团  $R_{x1}$  和递送基团的化合物与包含活性基团  $R_{x2}$  和功能性基团的化合物接触，反应获得所述经保护的缀合物，其中，所述递送基团由前述适配体去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成，每个所述功能性基团独立地为对肿瘤具有治疗作用的小分子治疗剂基团，其中所述递送基团和功能性基团中的任何活性基团均被保护基团保护，所述活性基团  $R_{x1}$  和所述活性基团  $R_{x2}$  是能够经反应形成共价键或者连接基团  $R_j$  的基团。在一些实施方式中，连接有活性基团  $R_{x1}$  的递送基团和连接有

活性基团  $R_{x2}$  的功能性基团的摩尔比为  $m_0 : n_0$ 。在一些实施方式中，所述递送基团和功能性基团中的活性基团包括但不限于羟基、氨基、磷酸基中的一种或多种，所述保护基团相应地为羟基保护基、氨基保护基、磷酸羟基保护基（例如，氰乙基保护基）中的一种或多种。

5           本领域的技术人员可以通过各种方法获得包含活性基团  $R_{x1}$  和递送基团的化合物。在一些实施方式中，所述包含活性基团  $R_{x1}$  和递送基团的化合物可以通过本领域技术人员熟知的核酸合成方法，例如亚磷酰胺固相合成或者磷酸二酯法/磷酸三酯法液相合成获得。在一些实施方式中，所述包含活性基团  $R_{x1}$  和递送基团的化合物采用亚磷酰胺固相合成法得到，  
10           该方法包括，在亚磷酰胺固相合成条件下，按照寡核苷酸单链中核苷酸的顺序，将核苷单体依次连接，其中，至少一个核苷单体为具有活性基团  $R_{x1}$  的核苷单体，或者，在连接全部核苷单体后，再按照亚磷酰胺固相合成法连接一个具有活性基团  $R_{x1}$  的亚磷酰胺单体或经保护的亚磷酰胺单体，随后再脱除该保护基团形成活性基团  $R_{x1}$ 。亚磷酰胺固相合成法为本  
15           领域技术人员所公知，其过程和条件在 *Methods in Molecular Biology*, vol. 288: *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, P17-P31 中详细公开，以引用的方式将其全部内容整体并入本文。

          在一些实施方式中，所述偶联反应条件是缩合反应条件或者巯基-二硫键交换反应的条件。

20           在一些实施方式中，所述偶联反应条件是缩合反应条件，所述缩合反应条件是酰基化缩合反应条件、脱水缩合反应条件或者点击化学反应的条件，活性基团  $R_{x1}$  与活性基团  $R_{x2}$  是能够发生前述缩合反应的基团。在一些实施方式中，所述缩合反应条件是酰基化缩合反应的条件，所述  
25           活性基团  $R_{x1}$  和  $R_{x2}$  是能够发生酰基化缩合反应形成  $R_1$  的基团。在一些实施方式中，所述缩合反应条件是脱水缩合反应的条件，所述活性基团  $R_{x1}$  和  $R_{x2}$  中的一个包含酰基或羧基的基团，另一个是包含氨基或羟基的基团。在一些实施方式中，所述缩合反应条件是点击化学的条件，所述活性基团  $R_{x1}$  和  $R_{x2}$  中的一个包含炔基的基团，另一个是包含叠氮基团的基团。在一些实施方式中，所述缩合反应条件是 Michael 加成反应的条件，所述活性基团  $R_{x1}$  和  $R_{x2}$  中的一个包含巯基的基团，另一个是包  
30           含

含琥珀酰亚胺基的基团。在一些实施方式中，所述缩合反应条件是 N-羟基琥珀酰亚胺-碳二亚胺（NHS-EDC）联用偶联反应的条件，所述活性基团  $R_{x1}$  和  $R_{x2}$  中的一个包含 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）的基团，另一个是包含碳二亚胺基（EDC）的基团。

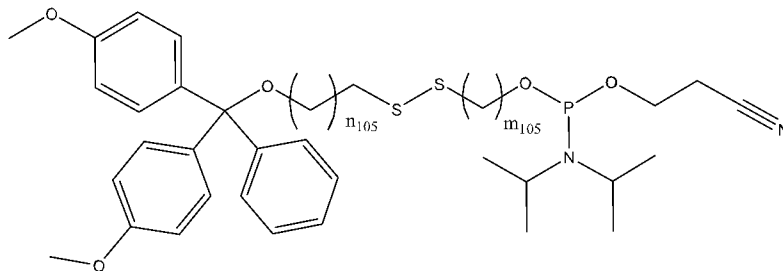
5 在一些实施方式中，所述包含活性基团  $R_{x1}$  和递送基团的化合物是通过在偶联反应条件下，将具有活性基团  $R_{x0}$  的适配体和交联剂接触制备得到的，所述交联剂含有点击化学活性基团和酰基化基团。所述活性基团  $R_{x0}$  与所述酰基化基团通过发生偶联反应而形成共价连接，使所述点击化学活性基团连接至本公开的适配体。

10 在一些实施方式中，活性基团  $R_{x1}$  是末端含有 1-3 个点击化学活性基团的活性基团，所述点击化学活性基团包含末端炔基。在一些实施方式中，所述酰基化基团是活性酯基团，例如可以是 NHS 酯基、亚氨酸酯基以及五氟苯酯基中的一种。本领域的技术人员可以通过各种方法获得所述交联剂，例如，当所述酰基化基团是五氟苯酯基，所述点击化学基团  
15 包含末端炔基时，所述交联剂可以按照如 Østergaard, Michael E., et al. "Efficient synthesis and biological evaluation of 5'-GalNAc conjugated antisense oligonucleotides." *Bioconjugate chemistry* 26.8 (2015): 1451-1455 中 Scheme 1a (A) 中描述的方法制备获得，以引用的方式将其全部内容整体并入本文。在一些实施方式中，所述活性基团  $R_{x0}$  是氨基。在一些实施方式中，所述偶联条件是碱性条件。在一些实施方式中，所述碱性条件是有弱碱水溶液存在的条件，例如有碳酸氢钠水溶液存在的条件。

本领域的技术人员可以通过各种方式获得所述具有活性基团  $R_{x0}$  的适配体，在一些实施方式中，所述具有活性基团  $R_{x0}$  的适配体是通过在合成适配体的过程中在相应位置使用含有活性基团的亚磷酰胺单体制备得到的。本领域的技术人员可以通过各种方式获得含有活性基团的亚磷酰胺  
25 单体。在一些实施方式中，所述活性基团  $R_{x0}$  是氨基，含有  $R_{x0}$  的亚磷酰胺单体可以通过本领域技术人员熟知的方法商购获得或制备获得，例如，含有  $R_{x0}$  的亚磷酰胺单体可以是容易商购获得的 6-(三氟乙酰氨基)-己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺单体，其中，活性基团  $R_{x0}$  为氨基，  
30 该活性基团  $R_{x0}$  可以通过亚磷酰胺固相合成法将所述亚磷酰胺单体连接

至寡核苷酸单链后，经本领域技术人员容易实现的脱保护反应（如浓氨水水解）脱除三氟乙酰基保护基而获得。

在一些实施方式中，所述偶联反应条件是巯基-二硫键交换反应中的一种，所述活性基团  $R_{x1}$  和  $R_{x2}$  中的一个包含巯基的基团，另一个包含经二硫键连接的离去基团。为了避免副反应发生，在一些实施方式中，上述含有活性基团  $R_{x1}$  的亚磷酰胺单体中的  $R_{x1}$  以被保护的  $R_{x1}'$  形式存在，所述制备方法还包含在脱保护反应条件下，通过将制备得到的包含被保护的活性基团  $R_{x1}'$  和递送基团的化合物与脱保护试剂接触，分离得到包含活性基团  $R_{x1}$  和递送基团的化合物的步骤。在一些实施方式中，所述  $R_{x1}'$  含有二硫键离去基团，所述脱保护反应条件是巯基-二硫键交换反应条件，所述脱保护试剂是二硫键活化剂。在一些实施方式中，所述二硫键活化剂是二硫二吡啶。本领域的技术人员可以通过各种方法获得上述含有活性基团  $R_{x1}$  或  $R_{x1}'$  的亚磷酰胺单体，在一些实施方式中，所述含有活性基团  $R_{x1}$  或  $R_{x1}'$  的亚磷酰胺单体是商购得到的，例如可以通过商购得到如式 (105) 所示的亚磷酰胺单体。



式 (105);

其中  $n_{105}$  和  $m_{105}$  各自独立地是 1-10 的整数。

本领域的技术人员可以通过各种方式获得所述包含活性基团  $R_{x2}$  和功能性基团的化合物。在一些实施方式中，所述偶联反应条件是巯基-二硫键交换反应条件，所述活性基团  $R_{x2}$  包含巯基，所述包含活性基团  $R_{x2}$  和功能性基团的化合物可以由本领域技术人员按照各种已知的方式获得，例如通过使用包含巯基的亚磷酰胺单体通过亚磷酰胺固相合成方法制备获得，或者商购获得。在一些实施方式中，所述偶联反应条件是亚磷酰胺固相合成反应条件，所述活性基团  $R_{x2}$  是亚磷酰胺基团，所述包含活性基团  $R_{x2}$  和功能性基团的化合物可以是例如容易商购获得的包含亚磷酰胺基团和小分子治疗剂基团的化合物。在一些实施方式中，在一些实施方

式中，所述偶联反应条件是 Michael 加成反应条件，所述活性基团  $R_{x2}$  是 N-琥珀酰亚胺基团，所述包含活性基团  $R_{x2}$  和功能性基团的化合物可以是例如容易商购获得的包含 N-琥珀酰亚胺基团和小分子治疗剂基团的化合物。在一些实施方式中，所述活性基团  $R_{x1}$  与活性基团  $R_{x2}$  分别是核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 各自包含 5-25 个修饰或未修饰的核苷酸，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补，所述递送基团连接至所述核苷酸序列 I，所述功能性基团连接至所述核苷酸序列 II，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 在受试者体内不引发免疫反应或毒性反应，所述偶联反应条件是退火形成核酸双链的反应条件。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 均由 17 个核苷酸组成并且完全反向互补。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 分别具有 SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 41 所示的序列。在一些实施方式中，所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 分别具有 SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 43 所示的序列。

递送基团由适配体去除一个或多个氢原子或官能团形成。在一些实施方式中，连续的核苷酸序列的 5'末端核苷酸的核糖 5'基团以及 3'末端核苷酸的核糖 3'基团均为羟基，递送基团由适配体在 5'末端核苷酸的 5'羟基中去除一个氢原子形成；在一些实施方式中，递送基团由适配体在 3'末端核苷酸的 3'羟基中去除一个氢原子形成；在一些实施方式中，递送基团由适配体在 5'末端核苷酸中去除 5'羟基形成；在一些实施方式中，递送基团由适配体在 3'末端核苷酸中去除 3'羟基形成。在一些实施方式中，递送基团由适配体在其包含的核苷酸中去除核糖 2'-羟基形成。所述适配体可以通过本领域常规的适配体制备方法（例如核酸固相合成和液相合成的方法）得到。其中，核酸固相合成已经有商业化订制服务。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提供的缀合物中，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适配体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。

在一些实施方式中，所述缀合物还可以其药学上可接受的盐或前体化合物的形式用于本公开。在本公开提供的上下文中，“药学上可接受的

盐”是指为了增加药物的稳定性、溶解性和/或生物利用度而将药物形成相应的在药学上不对人体产生额外副作用的盐，例如钾盐、钠盐、羧酸盐等。“前体化合物”是指尽管其本身与所述缀合物结构和功能上都不完全相同，但在进入体内之后或在体液环境下能够发生反应、形成所述包含本公开提供的缀合物、从而发挥效果、实现本公开提供的目的的化合物。某些情况下，这些前体化合物能够增加药物的稳定性、延长缓释时间、增加生物利用度等作用。在一些实施方式中，所述前体化合物包括可在人体内反应形成缀合物中全部功能性基团  $A_0$  的前体基团。在一些实施方式中，所述前体化合物包括缀合物中全部活性羟基被乙酰氧基取代形成的化合物。在一些实施方式中，所述前体化合物包括药物前体基团，所述药物前体基团是由缀合物中所述功能性基团对应的治疗剂的前体化合物形成的残基。在一些实施方式中，所述药物前体基团可以是例如所述功能性基团中羟基或氨基官能团中的活性氢被酰基、烷基、或者磷酰基取代而形成的基团。本领域技术人员可以理解，这些药学上可接受的盐以及前体化合物的应用同样处于本公开提供的范围之内。

### 药物组合物

在一方面，本公开还提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本公开提供的缀合物以及药学上可接受的载体。

所述药学上可接受的载体可以是本领域常规使用的载体，例如但不限于水、生理盐水、磁性纳米粒（magnetic nanoparticles，如基于  $Fe_3O_4$  或  $Fe_2O_3$  的纳米粒）、碳纳米管（carbon nanotubes）、介孔硅（mesoporous silicon）、磷酸钙纳米粒（calcium phosphate nanoparticles）、聚乙烯亚胺（polyethylenimine, PEI）、聚酰胺型树形高分子（polyamidoamine (PAMAM) dendrimer）、聚赖氨酸（poly(L-lysine), PLL）、壳聚糖（chitosan）、1,2-二油酰基-3-三甲铵丙烷（1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP）、聚 D 型或 L 型乳酸/羟基乙酸共聚物（poly(D&L-lactic/glycolic acid) copolymer, PLGA）、聚（氨乙基乙撑磷酸酯）（poly(2-aminoethyl ethylene phosphate), PPEEA）和聚（甲基丙烯酸-N,N-二甲氨基乙酯）（poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate), PDMAEMA）以及它们的衍生物中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述药学上可接受的载体含有生理学可接受的化合物，所述化合物起到例如稳定药物组合物或增加或减少缀合物和/或药物组合物的吸收的作用。所述生理学可接受的化合物选自如下化合物中的一种或多种：碳水化合物，例如葡萄糖、蔗糖和/或葡聚糖；抗氧化剂，例如抗坏血酸和/或谷胱甘肽；螯合剂；低分子量蛋白；降低任何共同给药的物质的清除或水解的组合物；赋形剂；稳定剂和缓冲剂。也可以将清洁剂用于稳定组合物或增加或减少药物组合物的吸收。所述生理学可接受的化合物还可以包括湿润剂、乳化剂、分散剂或特别用于防止微生物生长或作用的防腐剂中的一种或多种。所述生理学可接受的化合物是本领域技术人员已知的，本公开不再赘述。本领域技术人员容易理解的是，药学上可接受的载体以及生理学可接受的化合物的选择取决于例如给药途径和任何共同给药的物质的特定生理化学特性。

在一些实施方式中，药学上可接受的载体是无菌的并且通常不含不合需要的物质。本公开提供的药物组合物可根据需要进一步包含可药用的辅助物质以接近生理学条件，例如 pH 调节剂和缓冲剂，毒性调节剂等，例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等，药物组合物中的本公开提供的缀合物的浓度可以在大的区间内变化，并且主要依据流体体积、粘度、体重等按照特定的给药方式加以选择。

在一些实施方式中，所述药物组合物中，对缀合物和药学上可接受的载体的含量没有特别要求，在一些实施方式中，缀合物与药学上可接受的载体的重量比可以为 1 : (1-500)，在一些的实施方式中，上述重量比为 1 : (1-50)。

在一些实施方式中，所述药物组合物中，还可以包含药学上可接受的其它辅料，该辅料可以为本领域常规采用的各种制剂或化合物的一种或多种。例如，所述药学上可接受的其它辅料可以包括 pH 缓冲液、保护剂和渗透压调节剂中的至少一种。

所述 pH 缓冲液可以为 pH 值 7.5-8.5 的三羟甲基胺基甲烷盐酸盐缓冲液和/或 pH 值 5.5-8.5 的磷酸盐缓冲液，例如可以为 pH 值 5.5-8.5 的磷酸盐缓冲液。

所述保护剂可以为肌醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖和葡萄糖中的至少一种。以所述药物组合物的总重量为基准，所述保护剂的含量可以为 0.01-30 重量%。

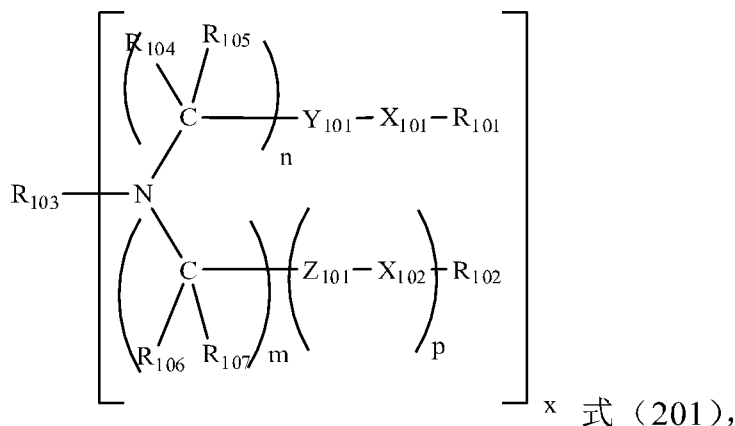
5 所述渗透压调节剂可以为氯化钠和/或氯化钾。所述渗透压调节剂的含量使所述药物组合物的渗透压为 200-700 毫渗摩尔/千克 (mOsm/kg)。根据所需渗透压，本领域技术人员可以容易地确定所述渗透压调节剂的含量。在一些实施方式中，所述药物组合物所制成的制剂在给药过程中的剂量会因给药方式的不同而发生调整。

10 在一些实施方式中，所述药物组合物可以为液体制剂，例如注射液；也可以为冻干粉针剂，实施给药时与液体辅料混合，配制成液体制剂。所述液体制剂可以但不限于用于皮下、肌肉或静脉注射给药，也可以但不限于通过穿刺注射、或通过口咽吸入、或鼻腔给药等方式递送所述药物组合物。在一些实施方式中，所述药物组合物用于皮下、肌肉、静脉或鞘内注射给药。

15 在一些实施方式中，所述药物组合物可以为脂质体制剂的形式。在一些实施方式中，所述脂质体制剂中使用的药学上可接受的载体包含含胺的转染化合物（下文也可将其称为有机胺）、辅助脂质和/或聚乙二醇化脂质。其中，所述有机胺、辅助脂质和聚乙二醇化脂质可分别选自于中国专利申请 CN103380113A（通过引用的方式将其整体并入本公开）中所描述的含胺的转染化合物或其药学上可接受的盐或衍生物、辅助脂质和聚乙二醇化脂质中的一种或多种。

20

在一些实施方式中，所述有机胺可为中国专利申请 CN103380113A 中描述的如式 (201) 所示的化合物或其药学上可接受的盐：



其中：

$X_{101}$  和  $X_{102}$  各自独立地是 O、S、N-A 或 C-A，其中 A 是氢或  $C_1$ - $C_{20}$  烃链；

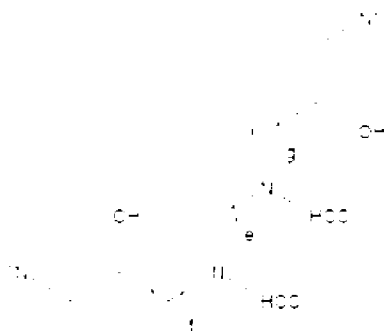
5  $Y_{101}$  和  $Z_{101}$  各自独立地是 C=O、C=S、S=O、CH-OH 或 SO<sub>2</sub>;

$R_{101}$ 、 $R_{102}$ 、 $R_{103}$ 、 $R_{104}$ 、 $R_{105}$ 、 $R_{106}$  和  $R_{107}$  各自独立地是氢，环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链脂族基团，环状或无环的、被取代的或未被取代的、支链或直链杂脂族基团，被取代的或未被取代的、支链或直链酰基，被取代的或未被取代的、支链或直链芳基，被取代的或未被取代的、支链或直链杂芳基；

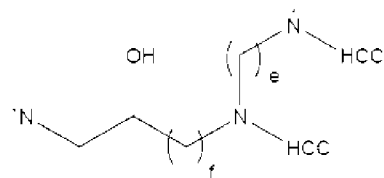
x 是 1-10 的整数:

n 是 1-3 的整数, m 是 0-20 的整数, p 是 0 或 1; 其中, 如果  $m=p=0$ , 则  $R_{102}$  是氢;

并且，如果  $n$  或  $m$  中的至少一个是 2，那么  $R_{103}$  和在式 (201) 中的  
 氮形成如式 (202) 或式 (203) 所示的结构：



式 (202),



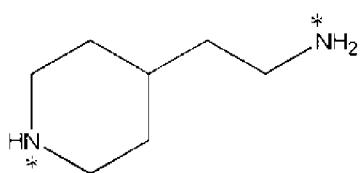
式

(203);

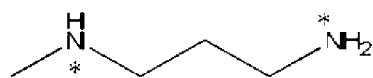
其中，g、e和f各自独立地是1-6的整数，“HCC”代表烃链，且每个\*N代表式(201)中的氮原子。

在一些实施方式中， $R_{103}$  是多胺。在其它实施方式中， $R_{103}$  是缩酮。  
 在一些实施方式中，在式 (201) 中的  $R_{101}$  和  $R_{102}$  中的每一个独立地是任意的被取代的或未被取代的、支链或直链烷基或烯基，所述烷基或烯基具有 3 至约 20 个碳原子，诸如 8 至约 18 个碳原子，和 0 至 4 个双键，诸如 0 至 2 个双键。

在一些实施方式中，如果  $n$  和  $m$  中的每一个独立地具有 1 或 3 的值，那么  $R_{103}$  可以是下述式 (204) - 式 (213) 中的任一个：

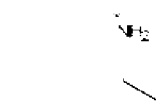


式 (204),

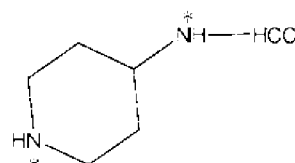


式

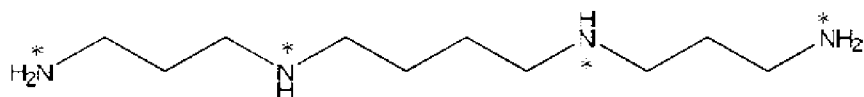
(205),



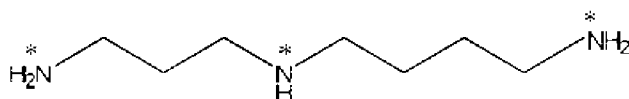
式 (206),



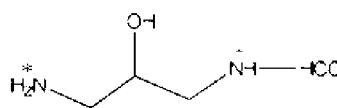
式 (207),



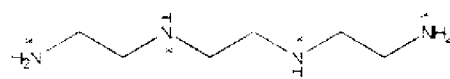
式 (208),



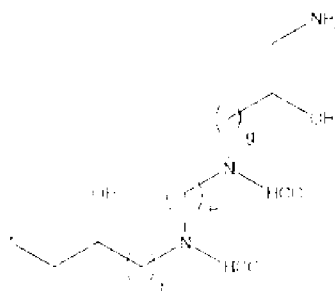
式 (209),



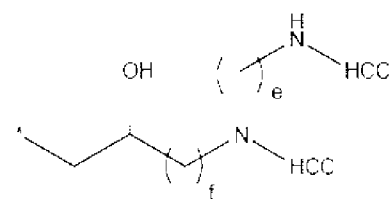
式 (210),



式 (211),



式 (212) 和



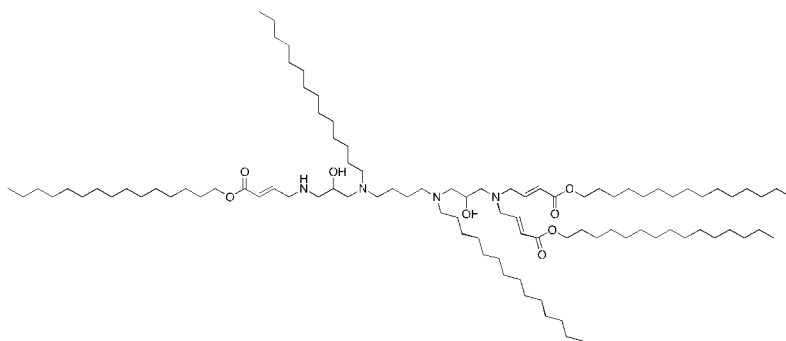
式

(213);

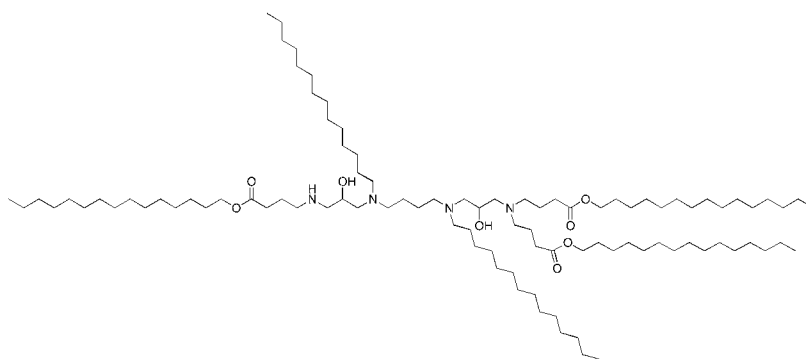
其中，式(204)-式(213)中，g、e和f各自独立地是1-6的整数，每个“HCC”代表烃链，且每个\*显示  $R_{103}$  与在式(201)中的氮原子的可能连接点，其中在任意\*位置上的每个H可以被替换以实现与在式(201)中的氮原子的连接。

5 本领域技术人员可以通过任何合理的方法获得式(201)所示的化合物。在一些实施方式中，式(201)所示化合物可以根据中国专利申请CN103380113A中的描述制备。

在一些实施方式中，所述有机胺为如式(214)所示的有机胺和/或如式(215)所示的有机胺：



式(214)，



式(215)；

所述辅助脂质为胆固醇、胆固醇的类似物和/或胆固醇的衍生物；

所述聚乙二醇化脂质为 1, 2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)]-2000。

15 在一些实施方式中，所述药物组合物中，所述有机胺、所述辅助脂质和所述聚乙二醇化脂质三者之间的摩尔比为(19.7-80) : (19.7-80) : (0.3-50)，例如可以为(50-70) : (20-40) : (3-20)。

在一些实施方式中，由本公开提供的缀合物与上述含胺的转染试剂形成的药物组合物颗粒具有约 30nm 至约 200nm 的平均直径，通常为约

40nm 至约 135nm，更通常地，该脂质体颗粒的平均直径是约 50nm 至约 120nm、约 50nm 至约 100nm、约 60nm 至约 90nm 或约 70nm 至约 90nm，例如，该脂质体颗粒的平均直径是约 30、40、50、60、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、150 或 160nm。

5 在一些实施方式中，由本公开提供的缀合物与上述含胺的转染试剂形成的药物组合物中，缀合物与全部脂质（例如有机胺、辅助脂质和/或聚乙二醇化脂质）的重量比（重量/重量比）在从约 1:1 至约 1:50、从约 1:1 至约 1:30、从约 1:3 至约 1:20、从约 1:4 至约 1:18、从约 1:5 至约 1:17、从约 1:5 至约 1:15、从约 1:5 至约 1:12、从约 1:6 至约 1:12 或从约 10 1:6 至约 1:10 的范围内，例如，本公开提供的缀合物与全部脂质的重量比为约 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17 或 1:18。

在一些实施方式中，所述药物组合物在销售时各组分可以独立存在，在使用时可以液体制剂的形式存在。在一些实施方式中，本公开提供的 15 缀合物与上述药学上可接受的载体形成的药物组合物可以按照已知的各种方法制备，只是用本公开提供的缀合物替代现有适配体或缀合物即可；在一些实施方式中，可以按照如下方法制备：

将有机胺、辅助脂质和聚乙二醇化脂质按照上述摩尔比悬浮于醇中并混匀得到脂质溶液；醇的用量使得到的脂质溶液的总质量浓度为 2- 20 25mg/mL，例如可以为 8-18mg/mL。所述醇选自药学上可接受的醇，诸如在室温附近为液体的醇，例如，乙醇、丙二醇、苯甲醇、甘油、聚乙二醇 200，聚乙二醇 300，聚乙二醇 400 中的一种或多种，例如可以为乙醇。

将本公开提供的缀合物溶解于缓冲盐溶液中，得到缀合物水溶液。 25 缓冲盐溶液的浓度为 0.05-0.5M，例如可以为 0.1-0.2M，调节缓冲盐溶液的 pH 至 4.0-5.5，例如可以为 5.0-5.2，缓冲盐溶液的用量使缀合物的浓度不超过 0.6mg/mL，例如可以为 0.2-0.4mg/mL。所述缓冲盐选自可溶性醋酸盐、可溶性柠檬酸盐中的一种或多种，例如可以为醋酸钠和/或醋酸钾。

将脂质溶液和缀合物水溶液混合，将混合后得到的产物在 40-60℃ 孵育至少 2 分钟，例如可以为 5-30 分钟，得到孵育后的脂质体制剂。脂质溶液和缀合物水溶液的体积比为 1 : (2-5)，例如可以为 1 : 4。

将孵育后的脂质体制剂浓缩或稀释，去除杂质，除菌，得到本公开提供的药物组合物，其理化参数为 pH 值为 6.5-8，包封率不低于 80%，粒径为 40-200nm，多分散指数不高于 0.30，渗透压为 250-400mOsm/kg；例如理化参数可以为 pH 值为 7.2-7.6，包封率不低于 90%，粒径为 60-100nm，多分散指数不高于 0.20，渗透压为 300-400mOsm/kg。

其中，浓缩或稀释可以在去除杂质之前、之后或同时进行。去除杂质的方法可以采用现有各种方法，例如可以使用切相流系统、中空纤维柱，在 100K Da 条件下超滤，超滤交换溶液为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS)。除菌的方法可以采用现有各种方法，例如可以在 0.22μm 滤器上过滤除菌。

#### 本公开的缀合物的应用

在又一方面，本公开还提供了本公开提供的缀合物和/或药物组合物在制备用于对肿瘤及肿瘤相关疾病或症状进行治疗的药物中的应用。

在又一方面，本公开还提供了一种对肿瘤及肿瘤相关疾病或症状进行治疗的方法，所述方法包括向有需要的受试者给予本公开所述的缀合物和/或药物组合物。

通过给予本公开提供的缀合物和/或药物组合物，本公开的方法能够有效治疗肿瘤及肿瘤相关疾病或症状；并且，在本公开提供的缀合物的高特异性靶向作用下，可以减少治疗剂在不期望的身体其它器官/组织处的分布，降低潜在的副反应。特别是对于肿瘤治疗领域中常用的、已知副反应明显的放疗和/或化疗药物而言，具有重要意义和显著价值。

本公开所使用的术语“给药/给予”是指通过使得至少部分地将缀合物和/或药物组合物定位于期望的位点以产生期望效果的方法或途径，将缀合物和/或药物组合物放置入受试者体内。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，局部给药导致与受试者整个身体相比将更多缀合物和/或药物组合物递送至特定位点；而全身给药导致将所

述缀合物和/或药物组合物递送至受试者的基本整个身体。

进一步地，本公开的发明人意外地发现，本公开的缀合物和/或药物组合物能够高效地通过血脑屏障，在全身给药的情况下就能够靶向至脑内的肿瘤中，从而进一步提高功能性基团的递送效率、节省成本并降低不期望的副反应。

可通过本领域已知的任何合适途径向受试者给药，所述途径包括但不限于：口服或胃肠外途径，如静脉内给药、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、每两周、每三周、每个月或每年 1 次或多次。

本公开所述的缀合物和/或药物组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、尤其是受试者的年龄、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理学程序测定毒性和疗效，例如测定 LD<sub>50</sub>（使 50% 的群体致死的剂量）和 ED<sub>50</sub>（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缀合物和/或药物组合物时，例如，对于雄性或雌性、6-12 周龄、体重 18-25g 的 C57BL/6J 或 C3H/HeNCrIVr 小鼠，以所述缀合物和/或药物组合物中的缀合物的量计：其缀合物用量可以为 0.001-100mg/kg 体重，在一些实施方式中为 0.01-50mg/kg 体重，在进一步的实施方式中为 0.05-20mg/kg 体重，在更进一步的实施方式中为 0.1-15mg/kg 体重，在又进一步的实施方式中为 0.1-10mg/kg 体重。在给予本公开所述的缀合物和/或药物组合物时，可优选上述用量。

### 试剂盒

本公开提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含本公开提供的缀合物和/或药物组合物。

在一些实施方式中，本公开所述的试剂盒可在一个容器中提供缀合物和/或药物组合物。在一些实施方式中，本公开所述的试剂盒可包含一

个提供药学上可接受的赋形剂的容器。在一些实施方式中，所述试剂盒中还可包含其它成分，如稳定剂或防腐剂等。在一些实施方式中，本公开所述的试剂盒可在不同于提供本公开所述缀合物和/或药物组合物的容器以外的其它容器中包含至少一种其它治疗剂。在一些实施方式中，所述试剂盒可包含用于将缀合物和/或药物组合物与药学上可接受的载体和/或辅料或其它成分（若有的话）进行混合的说明书。

在本公开的试剂盒中，所述缀合物和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述药物组合物，和/或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，所述缀合物和药学上可接受的载体和/或辅料以及所述药物组合物和任选的药学上可接受的辅料基本上纯净和/或无菌。在一些实施方式中，可在本公开的试剂盒中提供无菌水。

下面将通过实施例来进一步说明本公开，但是本公开并不因此而受到任何限制。

## 实施例

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 等操作均参照 Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)) 所记载的方法进行。

### 制备例 1-8 和 18 缀合物 AP1-AP8、AP18 的合成

通过固相合成方法分别合成了表 1 中编号为 AP1-AP8 和 AP18 的缀合物，并且，在分别按照表 1 中 AP1-AP8 和 AP18 对应的核苷酸序列从 3'-5'方向依次连接全部核苷单体后，再按照固相合成方法连接核苷亚磷酰胺单体的方式连接 Cy5 亚磷酰胺单体（购自苏州吉玛公司，批号 CY5P21H1B）。随后，将核苷酸序列加入甲胺水溶液与氨水等体积混合溶液中，溶液相对于寡核苷酸的用量为 0.5 ml/ $\mu$ mol，在 25℃下反应 2h，过滤除去固体，将上清液真空浓缩至干。

利用制备型离子色谱纯化柱 (Source 15Q)，通过 NaCl 水溶液的梯度洗脱，完成制备的缀合物的纯化。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。将获得的洗脱液浓缩除去溶剂并冻干, 分别获得了 5'末端核苷酸的核糖 5'位通过磷酸酯基连接基团连接荧光基团 Cy5 的缀合物 AP1-AP8 和 AP18。

在上述缀合物 AP1-AP8 和 AP18 合成完成后, 使用超纯水 (Milli-Q 超纯水仪自制, 电阻率  $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  (25 $^{\circ}\text{C}$ )) 将制备获得的缀合物稀释至浓度为  $0.2\text{mg/mL}$  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, 分子量实测值与理论值一致, 表明获得了目标缀合物。

缀合物的分子量和 MS 值如下表 1a:

表 1a 缀合物的质谱表征结果

| 编号   | MS 理论值   | MS 实测值                          |
|------|----------|---------------------------------|
| AP1  | 11113.51 | 分子离子峰: 1850.9(6 价); 1586.3(7 价) |
| AP2  | 11113.51 | 分子离子峰: 1850.9(6 价); 1586.3(7 价) |
| AP3  | 8173.61  | 8171.39                         |
| AP4  | 7814.38  | 7812.23                         |
| AP5  | 7455.14  | 7452.96                         |
| AP6  | 8516.85  | 8514.56                         |
| AP7  | 8414.74  | 分子离子峰: 2101.9(4 价); 1681.4(5 价) |
| AP8  | 8471.75  | 8469.53                         |
| AP18 | 10704.67 | 10703.27                        |

对比制备例 9-17 和 19 对照缀合物对比 AP9-对比 AP17、

对比 AP19 的合成

按照制备例 1 的方法, 分别合成了表 1 中编号为对比 AP9-对比 AP17、对比 AP19 的缀合物并检测分子量以对合成的缀合物进行确认, 区别仅在于, 分别按照表 1 中对应于对比 AP9-对比 AP17、对比 AP19 的序列, 依次连接核苷单体。从而, 分别获得了 5'末端核苷酸的核糖 5'位通过磷酸酯

基连接基团连接荧光基团 Cy5 的对照缀合物对比 AP9-对比 AP17、对比 AP19。

表 1 缀合物的核苷酸序列

| 制备例      | 缀合物     | 核苷酸序列 5'-3'                                                            | SEQ ID NO: |
|----------|---------|------------------------------------------------------------------------|------------|
| 制备例 1    | AP1     | CY5-UmCmUmAmUmGmGmCmUmGmCmCmGmAmUmCmUmGmGmUmCmUmCmCmAmUmGmUmAmCmGmUm   | 33         |
| 制备例 2    | AP2     | CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm   | 21         |
| 制备例 3    | AP3     | CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm                     | 27         |
| 制备例 4    | AP4     | CY5-CmUmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm                       | 28         |
| 制备例 5    | AP5     | CY5-CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm                         | 29         |
| 制备例 6    | AP6     | CY5-AmCmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm                   | 30         |
| 制备例 7    | AP7     | CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmCmUmAmCmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm                   | 31         |
| 制备例 8    | AP8     | CY5-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmUmUmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm                   | 32         |
| 对比制备例 9  | 对比 AP9  | CY5-GmGmAmCmAmUmGmGmAmUmUmCmUmUmGmUmCmUmGmUmGmUmCmCm                   | 45         |
| 对比制备例 10 | 对比 AP10 | CY5-GmAmUmCmUmGmUmGmUmCmUmUmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmCm                   | 46         |
| 对比制备例 11 | 对比 AP11 | CY5-GmAmUmCmGmUmGmAmCmGmAmCmUmCmUmUmGmUmCmUmGmCmUmGmUmCmCmUmGmAmUmCm   | 47         |
| 对比制备例 12 | 对比 AP12 | CY5-CmGmUmCmUmCmCmAmGmCmAmUmGmUmGmUmAmGmGmUmCmUmCmUmGmUmCmUmCmUmGmAm   | 48         |
| 对比制备例 13 | 对比 AP13 | CY5 GmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUm                         | 49         |
| 对比制备例 14 | 对比 AP14 | CY5 CmUmGmGmAmGmUmUmCmGmUmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm               | 50         |
| 对比制备例 15 | 对比 AP15 | CY5 CmUmGmGmAmCmAmGmAmCmGmUmGmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm                 | 51         |
| 对比制备例 16 | 对比 AP16 | CY5 CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmGmUmGmUmGmUmGmCmUmCmUm | 52         |
| 对比制备例 17 | 对比 AP17 | CY5 CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmAmGmCmUmCmGmUmGmUmGmAmUmCmUmCm   | 53         |
| 制备例 18   | AP18    | CY5-CfUfGGAGUfUfCfAGACfGUfGUfUfGCfUfCfUfUfCfCfGAUfCfUfCf               | 54         |
| 对比制备例 19 | 对比 AP19 | CY5-UfCfUfAUfGGCfUfGCfCfGAUfCfUfGGUfCfUfCfCfAUfGUfACfGUf               | 44         |

表 1 中，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；CY5 表示

荧光染料基团 Cy5（Cyanine 5）基团在适配体上的连接位点。

制备例 20 缀合物 20-的合成

表 2 缀合物中的核苷酸序列

| 制备例    | 缀合物      | 序列     | 核苷酸序列 5'-3'                                                           | SEQ ID NO: |
|--------|----------|--------|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| 制备例 20 | 缀合物 20   | 寡核苷酸单链 | MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUmCmCmGmAmUmCmUmCm | 21         |
| 制备例 21 | 缀合物 21   | 寡核苷酸单链 | MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmUmGmUmGmCmUmCmUmUm                 | 24         |
| 制备例 22 | 缀合物 22   | 寡核苷酸单链 | MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmGmCmUmCmUmUm                 | 22         |
| 制备例 23 | 缀合物 23   | 寡核苷酸单链 | MMAE-CmUmGmGmAmGmUmUmCmAmGmAmCmCmGmUmGmUmGmCmUmCmUmUm                 | 26         |
| 制备例 24 | 对比缀合物 24 | 寡核苷酸单链 | MMAE-GmGmAmCmAmUmGmGmAmUmUmCmUmUmGmUmCmUmGmUmGmUmCmCm                 | 45         |
| 制备例 25 | 对比缀合物 25 | 寡核苷酸单链 | MMAE-CmGmUmCmUmCmCmAmGmCmAmUmGmUmGmUmAmGmGmUmCmUmCmUmGmUmCmUmCmUmGmAm | 48         |
| 制备例 26 | 缀合物 26   | 寡核苷酸单链 | MMAE-CmUmGmCmUmUmCmAmGmAmCmGmUmGmUmUmAmGmCmUmUm                       | 29         |

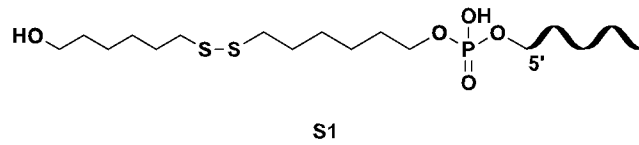
表 2 中，大写字母 C、G、U、A 表示核苷酸的碱基组成；小写字母 m 表示该字母 m 左侧相邻的一个核苷酸为甲氧基修饰的核苷酸；MMAE 表示小分子药物基团 MMAE（一甲基澳瑞他汀 E）基团在适配体上的连接位点。

本制备例中，按照以下步骤制备获得了缀合物 20，该缀合物 20 将缀合物 AP2 中的染料基团替换为小分子药物基团 MMAE，所述连接基团为 2-(磷酸酯基-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-S-)-马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲基亚基。

（20-1）寡核苷酸 S1 的制备

通过固相合成方法合成表 2 中缀合物 20 中的寡核苷酸序列，区别仅在于，按照表 2 中缀合物 20 对应的寡核苷酸序列，依次连接核苷单体；在固相合成的过程中，在连接完 5'端最后一个核苷单体之后，按照连接核苷亚磷酰胺单体的方法，另外连接含有 HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-基团的亚磷酰胺单体（购自 Hongene Biotech 公司），从固相载体上切割下寡核苷酸单链，得到如式（20-a）所示的寡核苷酸单链 S1（70.00mg，6.42

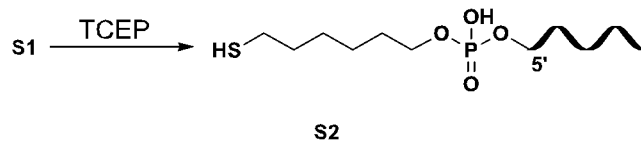
μmol):



式 (20-a) ;

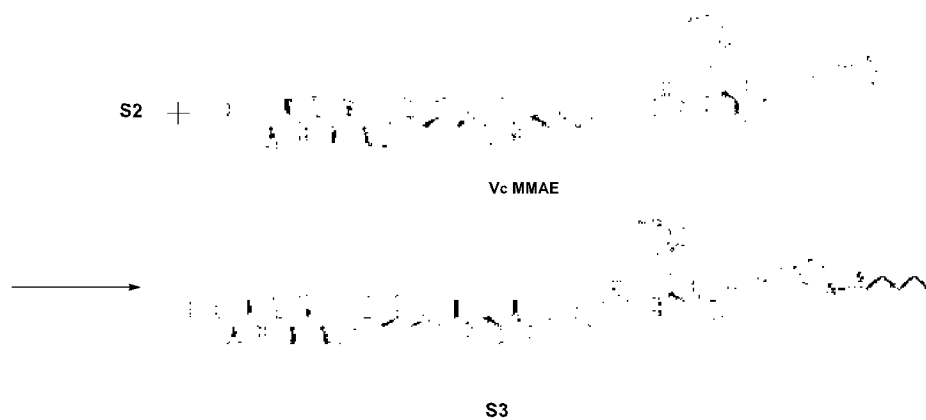
式中, 代表缀合物 20 对应的寡核苷酸序列。

(20-2) 寡核苷酸 S2 的合成:



用 10.0 ml 纯化水溶解 70.0 mg 步骤 (20-1) 中制备得到的 S1 (6.42 μmol) 后, 向所得溶液中加入 105 mg TCEP (三(2-氯乙基)磷酸酯, 0.37 mmol, 购自毕得医药, 批号: BD155793) 溶于 10.0 ml 纯化水得到的 TCEP 水溶液。混匀, 在室温下反应 2 小时, 将反应液用 10 mL 纯化水稀释并过滤, 得到反应液 28 mL, 将反应液转移至 3K 规格的超滤管中, 在 3900 rpm 的条件下离心 30min。再重复超滤和离心的步骤 2 次, 收集滤膜内产品, 获得寡核苷酸 S2 (67.0 mg, 产率: 95.7%)。

(20-3) 寡核苷酸 20 的合成:



将 24 mg Vc MMAE (18.56 μmol, 5eq, 购自 CSN 公司, 批号 CSN16143-005) 溶于 6.0 ml DMF 中, 并加入 60 μl 三乙胺, 获得 Vc MMAE 溶液。用 6.0 ml 纯化水溶解 40.0 mg 步骤 (20-2) 中制备得到的寡核苷酸 S2 (3.71 μmol, 1eq) 后, 向所得溶液中加入上述 Vc MMAE 溶液, 在室温下反应 2 小时后, 获得缀合物 20 粗品 (工艺图中表示为

S3)。

将所得到的缀合物 20 粗品加入 0.5 ml 纯化水稀释，并以 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤，滤液使用安捷伦半制备反相色谱纯化，所使用的色谱柱为 Kromasil 100-10-C18, 100Å, 10 $\mu\text{m}$ , 21.2\*250mm；以 100mM 三乙胺乙酸盐缓冲液（TEAA，PH=7.0-7.3）：乙腈 = 95:5 – 35:65 作为流动相进行梯度洗脱。收集产物峰洗脱液，蒸发除去溶剂，获得缀合物 20（55 mg，收率 56.7%）。经 LC-MS 检测分子量，理论值：12092.73，实测值：12091.39，实测值与理论值一致，表明该缀合物 20 具有 S3 所示的结构，该缀合物 20 将缀合物 AP2 中的染料基团替换为小分子药物基团 MMAE，并且连接基团为 2-(磷酸酯基-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-S-)-马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲基亚基（2-(磷酸酯基-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-S-)-MC-Val-Cit-PAB）。

#### 制备例 21-26 缀合物 21-23，26 和对比缀合物 24-25 的合成

按照制备例 20 的方法，分别合成了表 2 中编号为缀合物 21、缀合物 22、缀合物 23、对比缀合物 24、对比缀合物 25 和缀合物 26 并检测分子量以对合成的缀合物进行确认，区别仅在于，分别按照表 2 中对应于的缀合物 21、缀合物 22、缀合物 23、对比缀合物 24、对比缀合物 25 和缀合物 2 序列，依次连接核苷单体。

缀合物的分子量和 MS 值如下表 2a：

表 2a：缀合物的质谱表征结果

| 编号       | MS 理论值   | MS 实测值   |
|----------|----------|----------|
| 缀合物 20   | 12092.73 | 12091.39 |
| 缀合物 21   | 9473.03  | 9472.07  |
| 缀合物 22   | 9473.03  | 9471.76  |
| 缀合物 23   | 9472.05  | 9472.2   |
| 对比缀合物 24 | 9473.03  | 9471.41  |
| 对比缀合物 25 | 12092.73 | 12091.48 |
| 缀合物 26   | 8434.37  | 8434.09  |

#### 实验例 1 缀合物在小鼠体内的靶向性

本实验例考察了制备得到的缀合物 AP2、AP3-8 以及对比 AP9-对比 AP12 在小鼠体内的靶向性。

在添加有 10 %的胎牛血清（FBS，RMBIO 公司）的 DMEM 完全培养基（MACGENE 公司，货号 CM15019）中，于 37℃ 在含 5% CO<sub>2</sub>/95%空气的培养箱中培养 U118MG 人胶质瘤细胞（购自广州吉妮欧生物科技有限公司）。

5 取对数期生长的 U118MG 人胶质瘤细胞，以（0.25%的胰酶）消化，收集细胞，离心去上清，将细胞重悬于添加 10%FBS 的 DMEM 培养基中制成浓度为  $1 \times 10^8$  cells/mL 的细胞培养液。

10 实验动物 NOD-SCID 小鼠 24 只(购自斯贝福（北京）生物技术有限公司)，雌性，12 周龄。将上述细胞培养液接种于 NOD-SCID 小鼠右前肢皮下位置，接种体积为每只 100μL，即，每只小鼠接种  $1 \times 10^7$  个细胞。注射后继续饲养小鼠 20 天，获得接种 U118MG 皮下瘤的小鼠。

用 DMEM 培养基将上述制备的适配体 AP2、AP3-8 以及对比 AP9-对比 AP12 分别配制为 0.3mg/mL 的溶液。

15 U118MG 细胞接种后 14 天开始给药，给药当天记为 D1。实验采用尾静脉注射给药方式，每天给药一次，共三次给药。

将接种 U118MG 皮下瘤的 24 只小鼠随机分为 12 组，每组 2 只小鼠：

对于 7 组小鼠，分别向每组中的每只小鼠给予 AP2、AP3、AP4、AP5、AP6、AP7 或 AP8，单次给药容积为 10 μL/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 3 mg/kg，依次分别记为测试组 1A-1G；

20 对于另外 4 组小鼠，分别向每组中的每只小鼠给予对比 AP9、对比 AP10、对比 AP11 或对比 AP12，单次给药容积为 10 μL/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 3 mg/kg，依次分别记为对照组 1H-1K；

对于另外 1 组中的 2 只小鼠，向每只小鼠给予 DMEM 培养基，给药容积为 10 μL/g 小鼠体重，记为空白对照组 1Y。

25 于首次给药后 1h、24h 和 48h 时，使用小动物活体光学成像系统 IVIS Lumina Series III 对各小鼠进行活体成像。在 D5 时，处死各组小鼠并取肿瘤组织和肾脏进行荧光成像。

图 1A-1C 依次分别是示出了给予不同缀合物后 1h、24h 和 48h 时，

小鼠体内的荧光成像结果的图，其中每一小图内 3 只小鼠中最左侧的 1 只为空白对照组 1Y 的小鼠。由图 1A 可知，空白对照组不显示任何荧光信号；与其不同，在给药后 1h 时，各测试组和对照组的小鼠在皮下肿瘤处均显示出荧光信号；由图 1B 和 1C 可知，在给药后 24h 和 48h 时，仅测试组 1A-1G 的小鼠在皮下肿瘤处显示出较强的荧光信号，而对照组 1H-1K 的小鼠几乎不显示荧光信号或仅显示很弱的荧光信号。进一步地，图 1D 是示出了 D5 时处死小鼠后，各组小鼠肿瘤组织和肾脏的荧光信号成像的图，其中，Blank 表示空白对照组 15Y。由图 1D 可知，空白对照组 1Y 和对照组 1H-1K 的小鼠的肿瘤组织几乎不显示荧光信号或仅显示很弱的荧光信号；与此相对，给予本公开的缀合物的测试组 1A-1G 的小鼠的肿瘤组织均显示出强烈的荧光信号，同时在代谢器官肾脏处仅显示微弱的荧光信号，表明与对照缀合物相比，包含本公开提供的缀合物中的递送基团的缀合物能够更稳定、高效地靶向肿瘤组织。

## 实验例 2 缀合物在小鼠体内的靶向性

本实验例考察了制备得到的缀合物 AP2、AP1 以及对比 AP13-对比 AP17 在小鼠体内的靶向性。

在添加有 10 %的胎牛血清（FBS，RMBIO 公司）的 DMEM 完全培养基（MACGENE 公司，货号 CM15019）中，于 37℃ 在含 5% CO<sub>2</sub>/95%空气的培养箱中培养 U118MG 人胶质瘤细胞（购自广州吉妮欧生物科技有限公司）。

取对数期生长的 U118MG 人胶质瘤细胞，以（0.25%的胰酶）消化，收集细胞，离心去上清，将细胞重悬于添加 10%FBS 的 DMEM 培养基中制成浓度为  $1 \times 10^8$  cells/mL 的细胞培养液。

实验动物 NOD-SCID 小鼠 16 只(购自斯贝福（北京）生物技术有限公司)，雄性，12 周龄。将上述细胞培养液接种于 NOD-SCID 小鼠右前肢皮下位置，接种体积为每只 100μL，即，每只小鼠接种  $1 \times 10^7$  个细胞。注射后继续饲养小鼠 20 天，获得接种 U118MG 皮下瘤的小鼠。

用 DMEM 培养基将上述制备的适配体 AP2、AP1 以及对比 AP13-对比 AP17 分别配制为 0.3mg/mL 的溶液。

U118MG 细胞接种后 21 天开始给药，给药当天记为 D1。实验采用尾静脉注射给药方式，每天给药一次，共三次给药。

将接种 U118MG 皮下瘤的 16 只小鼠随机分为 8 组，每组 2 只小鼠：

5 对于 2 组小鼠，分别向每组中的每只小鼠给予 AP2 或 AP1，单次给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 3 mg/kg，依次分别记为测试组 2A-2B；

对于另外 5 组小鼠，分别向每组中的每只小鼠给予对比 AP13、对比 AP14、对比 AP15、对比 AP16 或对比 AP17，单次给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 3 mg/kg，依次分别记为对照组 2C-2G；

10 对于另外 1 组中的 2 只小鼠，向每只小鼠给予 DMEM 培养基，给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重，记为空白对照组 2Y。

于首次给药后 1h、24h 和 48h 时，使用小动物活体光学成像系统 IVIS Lumina Series III 对各小鼠进行活体成像。在 D6 时，处死各组小鼠并取肿瘤组织和肾脏进行荧光成像。

15 图 2A-2C 依次分别是示出了给予不同缀合物后 1h、24h 和 48h 时，小鼠体内的荧光成像结果的图，其中每一小图内 3 只小鼠中最左侧的 1 只为空白对照组 2Y 的小鼠。由图 2A 可知，空白对照组不显示任何荧光信号；与其不同，在给药后 1h 时，各测试组和对照组的小鼠在皮下肿瘤处均显示出荧光信号；由图 2B 和 2C 可知，在给药后 24h 和 48h 时，仅测试组 2A 和 2B 的小鼠在皮下肿瘤处显示出较强的荧光信号，而空白对照组 2Y 及对照组 2C-2G 的小鼠完全不显示荧光信号。进一步地，图 2D 是示出了 D6 时处死小鼠后，各组小鼠肿瘤组织和肾脏的荧光信号成像的图，其中，Blank 表示空白对照组 2Y。由图 2D 可知，空白对照组 2Y 和对照组 2C-2G 的小鼠的肿瘤组织完全不显示荧光信号；与此相对，给予本公  
20 开的缀合物的测试组 2A 或 2B 的小鼠的肿瘤组织均显示出强烈的荧光信号，同时在代谢器官肾脏处仅显示微弱的荧光信号，表明与对照适配体相比，具有各种式 (1) 所示序列的适配体均能够稳定、高效地靶向肿瘤组织，进而表明，包含由这些适配体形成的递送基团的本公开提供的缀合物能够有效地到达肿瘤组织。  
25

### 实验例 3 本公开的缀合物在小鼠体内的活性

本实验例考察了制备得到的缀合物 20 在小鼠体内的抗肿瘤活性。

本实验的小鼠购自斯贝福公司，种系为 NOD-SCID，等级为 SPF，性别均为雌性，周龄为 6-8 周龄；U118MG 神经胶质瘤细胞购自吉尼欧。

5 取对数期生长的 U118MG 细胞，消化重悬于添加有 10 % 的胎牛血清（FBS，GIBCO 公司）的 DMEM 完全培养基（MACGENE 公司，货号 CM15019）中进行培养，直至细胞密度为  $1 \times 10^8$  细胞/mL，获得含有 U118MG 细胞的培养液。将上述含有 U118MG 细胞的培养液接种于各小鼠右前肢皮下位置，注射体积 100 $\mu$ L。从而，每只小鼠接种  $1 \times 10^7$  个  
10 U118MG 胶质瘤细胞。

用 PBS 将上述制备的缀合物 AP2 配制为 1.94 mg/mL 的溶液。用 PBS 将缀合物 20 分别配制为 0.625 mg/mL、1.25 mg/mL 以及 2.06 mg/mL 的溶液（均以寡核苷酸的量计算）；用 10%DMSO+90%PBS（体积比）的混合溶液将 MMAE（购自上海麦克林公司，批号 C12886583）溶解为 0.038 mg/mL 的溶液。  
15

将细胞接种当天记为 D1，分别于 D8、D12、D16 和 D20 各给药一次。

将 36 只小鼠随机分为以下 6 组，每组 6 只小鼠：

对于空白对照组 3a，采用尾静脉注射方式给予 PBS，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g；

20 对于对照组 3b，采用尾静脉注射方式给予上述缀合物 AP2 溶液，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g，单次给药剂量为 15.5mg/kg；

对于对照组 3c，采用尾静脉注射方式给予上述 MMAE 溶液，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g，单次给药剂量为 0.3mg/kg；

25 对于测试组 3d，采用尾静脉注射方式给予上述浓度为 0.625 mg/mL 的缀合物 20 溶液，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g，单次给药剂量为 5mg/kg（以寡核苷酸质量计），其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg；

对于测试组 3e，采用尾静脉注射方式给予上述浓度为 2.06 mg/mL 的缀合物 20 溶液，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g，单次给药剂量为 16.5mg/kg

(以寡核苷酸质量计), 其中包含 MMAE 的剂量相当于 1 mg/kg;

对于测试组 3f, 采用皮下注射方式给予上述浓度为 1.25 mg/mL 的缀合物 20 溶液, 单次给药容积为 5 $\mu$ L/g, 单次给药剂量为 5mg/kg (以寡核苷酸质量计), 其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg。

### 5 [3]检测

通过体外测量的方式测定测量肿瘤的长径和短径。肿瘤体积根据公式  $1/2 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$  进行计算。在 D8 首次给药前, 测定各组肿瘤体积并记录平均肿瘤体积, D16 开始分别测量并记录各组肿瘤体积, 每周测量两次。

图 3 是示出了各组小鼠中肿瘤体积随时间变化的折线图。由图 3 结果可知, 在仅给予 PBS 与 AP2 的空白对照组 3a 和对照组 3b 中, 肿瘤体积迅速增加; 仅给予 MMAE 的对照组 3c 中肿瘤体积增加速度有所降低, 表明 MMAE 本身对肿瘤增殖显示出抑制效果。进一步地, MMAE 含量与对照组 3c 相当的测试组 3d 和 3f 在测试期间肿瘤体积均显著小于对照组 3c, 显示出比单独给予 MMAE 的对照组 3c 更加优异的抗肿瘤活性。这表明, 本公开提供的缀合物能够有效地将 MMAE 递送至肿瘤组织, 在显示出肿瘤靶向能力的同时, 还降低了 MMAE 分子在其它组织分布带来的毒性风险, 且各种给药方式均能够有效抑制肿瘤增殖。此外, 进一步提高给药剂量的测试组 3e 的肿瘤体积在测试期间几乎不增加, 显示出更加优异的抗肿瘤效果。

上述结果表明, 本公开提供的缀合物能够有效地将对肿瘤具有抑制作用的小分子药物基团靶向递送至肿瘤组织, 显示出良好的抗肿瘤活性和剂量依赖效应。

### 实验例 4 缀合物在 U118MG 细胞原位瘤模型小鼠体内分布

在添加有 10 %的胎牛血清 (FBS, RMBIO 公司) 的 DMEM 完全培养基 (MACGENE 公司, 货号 CM15019) 中, 于 37 $^{\circ}$ C 在含 5% CO<sub>2</sub>/95%空气的培养箱中培养 U118MG 人胶质瘤细胞 (购自广州吉妮欧生物科技有限公司)。

以 0.25wt%胰酶消化并收集细胞, 吸去上清并将细胞重悬于添加 10%FBS 的 DMEM 培养基中制成细胞密度为  $4 \times 10^7$  cells/mL 的细胞培养液。

实验动物 NOD-SCID 小鼠 6 只(购自斯贝福(北京)生物技术有限公司), 雄性, 12 周龄。将上述细胞培养液接种于 NOD-SCID 小鼠中, 采用小鼠侧脑室注射方式, 将细胞培养液注射于小鼠右侧纹状体, 位置为 AP (anteroposterior 前后/正位):1mm, ML (medial lateral 内侧):1.5mm, DV (dorsal ventral 背腹侧):3.5mm, 注射体积 10 $\mu$ L, 即, 每只小鼠接种 4 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞。注射后继续饲养小鼠 14 天。

用 1 $\times$ DMEM 培养基将 AP2 和对比 AP19 分别溶解成 0.3mg/mL 浓度 (以适配体计) 的缀合物溶液。取 4 只前述小鼠, 通过尾静脉注射给药, 分别注射 AP2 和对比 AP19 溶液, 所有动物根据体重计算给药剂量, 给药体积均为 10 $\mu$ L/g, 以适配体的量计, 每只动物给药量为 3mg/kg, 每组给予 2 只小鼠, 分别记为测试组 4a 和对照组 4b。

向 2 只小鼠中的每一只分别注射 10 $\mu$ L 的 DMEM 培养基, 记为空白对照组 4Y。

在给药后 24h 时, 分别杀死各组小鼠中的一只并取脑组织, 给药后 48h 时杀死剩余小鼠并取脑组织, 在 IVIS Lumina Series III 中对小鼠脑组织进行荧光成像。结果参见图 4 所示。

图 4 是示出了给药后 24h 和 48h 时, 给予空白对照组 4Y、测试组 4a 和对照组 4b 后建立 U118MG 原位瘤模型小鼠脑组织的荧光成像图。其中, Blank 表示空白对照组, Ith 表示鞘内注射, iv 表示尾静脉注射。从图 4 的结果可以看出, 空白对照组和给予对比 AP19 的对照组 4b 在脑内均未显示出任何荧光信号, 表明对原位脑胶质瘤没有显著靶向效果; 与此不同, 给予本公开提供的缀合物的测试组 4a 在 24h 和 48h 时在接种肿瘤位置均显示出明显的荧光信号, 表明缀合物 AP2 在尾静脉给药时仍能到达并有效靶向脑胶质瘤, 说明本公开提供的缀合物即使是系统给药的情况下, 也有望穿透血脑屏障 (Blood-Brain-Barrier, BBB) 进入脑胶质瘤, 显示出优异的靶向作用和成药能力。

#### 实验例 5 缀合物对 U118MG 原位瘤模型小鼠体内活性

按照实验例 4 的方法培养表达 Luciferase (*Photinus pyralis*) 报告基因的 U118MG 人胶质瘤细胞, 以下简称 U118MG-luc 人胶质瘤细胞 (购自南

京科佰生物科技有限公司)。取对数期生长的 U118MG-luc 人胶质瘤细胞, 以 0.25wt%胰酶消化并收集细胞, 离心后吸去上清液并将细胞重悬于无血清 DMEM 培养基中制成细胞密度为  $4 \times 10^7$  cells/mL 的细胞培养液。

实验动物 Balb/C-nude 裸鼠 24 只(购自斯贝福(北京)生物技术有限公司), 雄性, 12 周龄。将上述细胞培养液接种于 Balb/C-nude 裸鼠纹状体中, 采用小鼠纹状体注射方式, 将细胞培养液注射于小鼠右侧纹状体, 位置为 AP (anteroposterior 前后/正位):1mm, ML (medial lateral 内侧):1.5mm, DV (dorsal ventral 背腹侧):3.5mm, 注射体积 10 $\mu$ L, 即, 每只小鼠接种  $4 \times 10^5$  个细胞。原位瘤接种后继续饲养小鼠 14 天。

用 1 $\times$ DMEM (购自中科迈晨(北京)科技有限公司, 批号为 K1902200) 培养基将缀合物 20 溶解成 1mg/mL 浓度(以适配体计)的缀合物溶液。缀合物 21 和对比缀合物 24 分别溶解成 0.8mg/mL 浓度(以适配体计)的缀合物溶液。

接种原位瘤后第 15 天, 使用小动物活体光学成像系统 IVIS Lumina Series III 对各小鼠进行活体成像, 根据脑部荧光强度分组, 每组 6 只小鼠, 给药当天记为 D1 (即, 实验第 1 天, 以下 D4、D8 等相应表示实验第 4 天、第 8 天, 以此类推)。

活体成像方法: 每只小鼠腹腔注射 10 $\mu$ L/g 体重浓度 15mg/mL D-荧光素钾盐工作液(购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司), 注射后 10min 活体成像 (IVIS<sup>®</sup> Lumina III 小动物活体成像系统)。成像后圈选小鼠脑部荧光区域 (ROI), 软件测定荧光强度 (Radiance)。在此条件下, U118MG-luc 人胶质瘤细胞中表达的 Luciferase (*Photinus pyralis*) 报告基因能够产生荧光响应, 因此荧光强度能够反映胶质瘤细胞的增殖数量。荧光强度越高, 表明胶质瘤细胞的数量越大。

实验通过皮下注射给药方式, 每组小鼠分别于 D1、D4、D8 和 D12 给药。于给药前称重, 按重量给药。

对于测试组 5a, 分别向每只小鼠给予缀合物 20, 单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重, 计算可知单次给药剂量为 5mg/kg, 其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg。

对于测试组 5b，分别向每只小鼠给予缀合物 21，单次给药容积为 5  $\mu\text{L/g}$  小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 4mg/kg，其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg。

对于对照组 5c，分别向每只小鼠给予对比缀合物 24，单次给药容积为 5  $\mu\text{L/g}$  小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 4mg/kg，其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg。

对于空白对照组，分别向每只小鼠给予 DMEM 培养基，单次给药容积为 5  $\mu\text{L/g}$  小鼠体重。

按照上述方法，分别于 D1、D22、D31 和 D39 对每组小鼠进行活体成像分析，测定荧光强度。结果参见图 5 所示。

图 5 示出了给予本公开提供的缀合物或对照化合物后，U118MG 原位瘤模型小鼠肿瘤荧光强度随时间变化的折线图。从图 5 的结果可以看出，与给药后 D1 相比较，随着观察时间的延长，空白对照组和对照组肿瘤荧光强度（Radiance）明显升高，表明 U118MG 人胶质瘤细胞数量明显增加；与此不同，给予本公开提供的缀合物的测试组 5a 和 5b 肿瘤荧光强度显著降低，降低幅度最高可达 1 个数量级，与对照组相比可达 2 个数量级以上，表明 U118MG 人胶质瘤细胞数量明显减少，与实验开始时相比可能降至开始时的 1/10、甚至可能减少至对照组的 1%以下。可见，即使是仅通过皮下给药，本公开提供的缀合物也能够有效穿透血脑屏障并高效靶向进入脑胶质瘤，并具有良好的抑制肿瘤生长效果，显示出良好的治疗依从性和高效抑制肿瘤的高成药能力。

#### 实验例 6 缀合物在小鼠体内对 U118MG 皮下瘤的抑制活性

按照实验例 2 的方法培养 U118MG 人胶质瘤细胞（购自广州吉妮欧生物科技有限公司）。取对数期生长的 U118MG 人胶质瘤细胞，以（0.25%的胰酶）消化，收集细胞，离心去上清，将细胞重悬于无血清 DMEM 培养基中制成浓度为  $1 \times 10^8$  cells/mL 的细胞培养液。

实验动物 NOD-SCID 小鼠 36 只（购自斯贝福（北京）生物技术有限公司），雄性，12 周龄。将上述细胞培养液接种于 NOD-SCID 小鼠右侧背部皮下位置，接种体积为每只 100 $\mu\text{L}$ ，即，每只小鼠接种  $1 \times 10^7$  个细胞。注

射后继续饲养小鼠 7 天。

用无血清 DMEM 培养基将缀合物 20 溶解成 1mg/mL 浓度（以适配体计）的缀合物溶液。缀合物 21、缀合物 22 和缀合物 23 分别溶解成 0.8mg/mL 浓度（以适配体计）的缀合物溶液。用 10%DMSO+90%无血清 DMEM 培养基（体积比）将 MMAE 溶解成 0.06mg/mL 浓度的溶液。

U118MG 细胞接种后 7 天开始给药，给药当天记为 D8。实验采用腹部皮下给药方式，分别于 D8、D12、D16 和 D20 各给药一次，共 4 次给药。

对于空白对照组 6a，分别向每组小鼠给予 DMEM，单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重；

对于对照组 6b，分别向每组小鼠给予 MMAE，单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 0.3mg/kg；

对于测试组 6c，分别向每只小鼠给予缀合物 20，单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 5mg/kg，其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg；

对于 3 组小鼠，分别向每组小鼠给予缀合物 21、缀合物 22 或者缀合物 23，单次给药容积均为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 4mg/kg，其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg；依次分别记为测试组 6d、6e 和 6f；

于 D16、D20、D25、D29、D33、D36、D41、D48、D60 测量肿瘤体积。通过体外测量的方式测定测量肿瘤的长径和短径。肿瘤体积根据公式  $1/2 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$  进行计算。实验结束 D60 取肿瘤组织，称重。图 6 显示给予不同缀合物后，不同天数时小鼠肿瘤体积随时间变化的折线图的折线图。由图 6 可知，与对照组 6b 或者空白对照组相比，给予本公开缀合物的测试组 6c-6f 的小鼠的肿瘤体积和肿瘤重量均明显降低。上述结果表明，本公开的缀合物能够有效地到达肿瘤组织，显示出良好的抗肿瘤活性。

实验例 7 缀合物长间隔给药对 U118MG 皮下瘤模型小鼠体内活性

按照实验例 2 的方法获得接种 U118MG 皮下瘤的小鼠 42 只，注射后

继续饲养小鼠。

用 10%DMSO+90%无血清 DMEM 培养基（体积比）将 MMAE 溶解成 0.03mg/mL 和浓度 0.01mg/mL 的溶液；将缀合物 21 溶解成 0.5mg/mL 浓度和 0.165mg/mL 浓度（以适配体计）的溶液；对比缀合物 25 溶解成 0.5mg/mL 浓度和 0.165mg/mL 浓度（以适配体计）的溶液。

在接种 U118MG 细胞后 7 天，将全部小鼠随机分为 7 组，每组 6 只，并向各组小鼠给药，给药当天记为 D8。实验采用腹部皮下给药方式，于 D8、D11、D15、D29、D32 和 D36 各给药一次，共 6 次给药。于给药前称重，按重量计算给药容积。

对于空白对照组，分别向每只小鼠给予 DMEM 培养基，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g 小鼠体重。

对于测试组 7a，分别向每只小鼠给予浓度 0.01mg/mL 的 MMAE，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 0.1mg/kg。

对于测试组 7b，分别向每只小鼠给予浓度 0.165mg/mL 的缀合物 21，单次给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 1.65mg/kg（对应 MMAE 剂量为 0.1 mg/kg）。

对于对照组 7c，分别向每只小鼠给予浓度 0.165mg/mL 的对比缀合物 25，单次给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 1.65mg/kg（对应 MMAE 剂量为 0.1 mg/kg）。

对于测试组 7d，分别向每只小鼠给予浓度 0.03mg/mL 的 MMAE，单次给药容积为 10 $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 0.3mg/kg。

对于测试组 7e，分别向每只小鼠给予浓度 0.5mg/mL 的缀合物 21，单次给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 5mg/kg（对应 MMAE 剂量为 0.3 mg/kg）。

对于对照组 7f，分别向每只小鼠给予浓度 0.5mg/mL 的对比缀合物 25，单次给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 5mg/kg（对应 MMAE 剂量为 0.3 mg/kg）。

于 D1、D9、D16、D19、D21、D24、D26、D29、D32、D36、D39、

D43、D47、D53、D57、D60、D64、D67、D71、D74、D78、D81、  
D84、D88、D92、D95 和 D99 测量肿瘤体积，其中，空白对照组在 D53  
时、测试组 7a、7b 和对照组 7c 在 D60 时测量后中止实验。

通过体外测量的方式测定测量肿瘤的长径和短径。肿瘤体积根据公式  
1/2（长径×短径<sup>2</sup>）进行计算。实验中止后取各组肿瘤组织，称重并测定平  
均值。结果参见图 7 所示。

图 7 是示出了给予不同浓度本公开提供的缀合物或对照化合物后，  
U118MG 皮下瘤模型小鼠肿瘤体积随时间变化的折线图。

由图 7 结果可知，在空白对照组中，肿瘤体积迅速增加；仅给予 MMAE  
的测试组肿瘤体积增加速度有所降低，表明 MMAE 本身对肿瘤增殖显示  
出抑制效果。

进一步地，测试组 7b 在测试期间肿瘤体积均显著小于与 MMAE 含  
量相当的测试组 7a 和对照组 7c；测试组 7e 在测试期间肿瘤体积均显著  
小于与 MMAE 含量相当的测试组 7d 和对照组 7f，显示出比单独给予  
MMAE 测试组 7a 和 7d，以及给予对比缀合物 25 均更为优异的抗肿瘤活  
性。实验中止后，给予本公开的缀合物的小鼠中的肿瘤重量也显著低于  
MMAE 组和对照组。上述表明本公开提供的缀合物能够有效地将 MMAE  
递送至肿瘤组织，在显示出肿瘤靶向能力的同时，还降低了 MMAE 分子  
在其它组织分布带来的毒性风险，显示出剂量相关性和优异的抗肿瘤效  
果。

上述结果表明，本公开提供的缀合物能够有效地将对肿瘤具有抑制  
作用的小分子药物基团靶向递送至肿瘤组织，显示出良好的抗肿瘤活性  
和剂量依赖效应。

#### 实验例 8 缀合物对 U118MG 皮下瘤模型小鼠体内活性

按照实验例 2 的方法获得接种 U118MG 皮下瘤的小鼠 42 只，注射后  
继续饲养小鼠。

用 10%DMSO+90%无血清 DMEM 培养基（体积比）将 MMAE 溶解  
成 0.02mg/mL 浓度的溶液；将缀合物 20 和对比缀合物 25 溶解成  
0.33mg/mL 浓度（以适配体计）的溶液；将缀合物 21 和缀合物 23 溶解成

0.26mg/mL 浓度（以适配体计）的溶液；将缀合物 26 溶解成 0.23mg/mL 浓度（以适配体计）的溶液。

U118MG 细胞接种后 7 天，对上述接种的小鼠进行分组，每组 6 只，向各组小鼠给药，给药当天记为 D8。于给药前称重，按平均重量 2 每只  
5 20g 计算给药容积。

实验采用腹部皮下给药方式，分别于 D8、D12、D15 和 D19 各给药一次，共 4 次给药。

对于空白对照组，分别向每只小鼠给予 DMEM 培养基，单次给药容积为 100 $\mu$ L。

10 对于测试组 8a，分别向每只小鼠给予 MMAE，单次给药容积为 100 $\mu$ L，计算可知单次给药剂量为 0.1mg/kg。

对于测试组 8b，分别向每只小鼠给予缀合物 20，单次给药容积为 100 $\mu$ L，计算可知单次给药剂量为 1.65mg/kg。

15 对于对照组 8c，分别向每只小鼠给予对比缀合物 25，单次给药容积为 100  $\mu$ L，计算可知单次给药剂量为 1.65mg/kg。

对于测试组 8d，分别向每只小鼠给予缀合物 21，单次给药容积为 100 $\mu$ L，计算可知单次给药剂量为 1.32mg/kg。

对于测试组 8e，分别向每只小鼠给予缀合物 23，单次给药容积为 100 $\mu$ L，计算可知单次给药剂量为 1.32mg/kg。

20 对于测试组 8f，分别向每只小鼠给予缀合物 26，单次给药容积为 100 $\mu$ L，计算可知单次给药剂量为 1.17mg/kg。上述 8b-8f 组的给药剂量均相当于包含 0.1 mg/kg 的 MMAE。

25 于 D1、D9、D16、D19、D22、D26、D30、D36、D40、D43、D47、D50、D54、D57、D61、D64、D68 和 D71 测量肿瘤体积。其中，空白对照组在 D54 时，8a 组（仅给予 MMAE）在 D64 时测量后中止实验。

通过体外测量的方式测定测量肿瘤的长径和短径。肿瘤体积根据公式  $1/2 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$  进行计算。中止实验后对各组取肿瘤组织，称重。结果参见图 8 所示。

图 8 是示出了各组小鼠中肿瘤体积随时间变化的折线图和 D72 肿瘤重量。由图 8 结果可知，空白对照组的肿瘤体积迅速增加，其它各组的肿瘤体积增加速度均有降低；而与仅给予 MMAE 的测试组 8a 和对照组 8c 相比，给予本公开的缀合物的各测试组在相当于 MMAE 单次给药剂量为 0.1mg/kg 的情况下，肿瘤体积增加速度均显著进一步更为降低。此外，缀合物 20、缀合物 21、缀合物 23 和缀合物 26 在实验终点 D72 时，较测试组 8a 肿瘤重量至少减少了 58%，显示出更加优异的抗肿瘤效果。

#### 实验例 9 缀合物对 A549 皮下瘤模型小鼠体内活性

A549 人肺腺癌细胞（购自广州吉尼欧生物有限公司）培养条件为含 10% FBS（Gibco，货号 10099-141）的 DMEM 完全培养基（MACGENE 公司，货号 CM15019），于 37℃，5% CO<sub>2</sub>/95% 空气的培养箱中培养。以 0.25wt% 胰酶消化并收集细胞，吸去上清并将细胞重悬于无血清 DMEM 培养基中制成细胞密度为  $1 \times 10^8$  cells/mL 的细胞培养液。

按照实验例 2 的方法获得接种 A549 皮下瘤的小鼠 30 只，注射后继续饲养小鼠。

用无血清 DMEM 培养基将缀合物 20 和缀合物 21 溶解成 1mg/mL 浓度（以适配体计）的缀合物溶液。对比缀合物 24 溶解成 0.8mg/mL 浓度（以适配体计）的缀合物溶液。10%DMSO+90%无血清 DMEM 培养基（体积比）MMAE 溶解成 0.06mg/mL 浓度的溶液。

A549 人肺癌细胞接种后 7 天，对全部小鼠进行分组，每组 6 只，向每只小鼠给药，给药当天记为 D8。于给药前称重，按小鼠体重计算给药容积。

对于各组小鼠于 D8、D12、D15 和 D19 各给药一次，共给药 4 次。

对于空白对照组 9a，分别向每组小鼠给予 DMEM，单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重；

对于对照组 9b，分别向每组小鼠给予 MMAE，单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 0.3mg/kg；

对于测试组 9c，分别向每只小鼠给予缀合物 20，单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重，计算可知单次给药剂量为 5mg/kg，其中包含 MMAE 的

剂量相当于 0.3 mg/kg;

对于测试组 9d, 分别向每只小鼠给予缀合物 21, 单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重, 计算可知单次给药剂量为 5mg/kg, 其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg;

5 对于测试组 9e, 分别向每只小鼠给予对比缀合物 24, 单次给药容积为 5  $\mu$ L/g 小鼠体重, 计算可知单次给药剂量为 5mg/kg, 其中包含 MMAE 的剂量相当于 0.3 mg/kg;

10 对于各组小鼠于 D46、D50 和 D54 各给药一次, 单次给药容积为 10  $\mu$ L/g 小鼠体重, 计算可知单次给药剂量包含 MMAE 的剂量相当于 0.6 mg/kg。

于 D1、D9、D16、D19、D22、D26、D30、D36、D40、D43、D47、D50、D54 和 D57 测量肿瘤体积。空白对照组于 D50 测量后中止实验

通过体外测量的方式测定测量肿瘤的长径和短径。肿瘤体积根据公式  $1/2 \times (\text{长径} \times \text{短径}^2)$  进行计算。结果参见图 9 所示。

15 图 9 是示出了给予不同浓度本公开提供的缀合物或对照化合物后, A549 皮下瘤模型小鼠肿瘤体积随时间变化的折线图。从图 9 的结果可以看出, 空白对照组小鼠肿瘤体积迅速增加, 其余各组肿瘤体积增加速度均有所降低; 在各个时间段, 给予缀合物 20 和 21 的小鼠的肿瘤体积均小于对照组 9b 和 9e。上述结果表明, 本公开的缀合物能够有效地靶向到达  
20 A549 肺癌肿瘤组织, 并显示出良好的抗肿瘤活性。

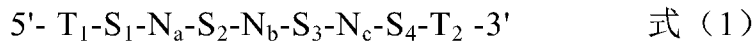
以上详细描述了本公开的一些实施方式, 但是, 本公开并不限于上述实施方式中的具体细节, 在本公开的技术构思范围内, 可以对本公开的技术方案进行多种简单变型, 这些简单变型均属于本公开的保护范围。

25 另外需要说明的是, 在上述一些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. 一种缀合物，包含一个或多个递送基团和一个或多个功能性基团；所述递送基团由一种适配体去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成，所述适配体包含一段连续的核苷酸序列，连接相邻的两个核苷酸的基团独立地为磷酸酯基或者具有修饰基团的磷酸酯基，每个核苷酸选自修饰或未修饰 A、U、C 或 G 中的一种，所述连续的核苷酸序列具有式 (1) 所示的序列：



其中， $T_1$  是由 1-3 个核苷酸组成的基序， $T_2$  是由 0-15 个核苷酸组成的基序，并且  $T_2$  中不包含与  $T_1$  完全反向互补的基序；

$S_1$  和  $S_4$  各自是由 3-7 个核苷酸组成的基序， $S_1$  与  $S_4$  长度相同并且完全反向互补；

$N_a$  和  $N_c$  各自是由 1-4 个核苷酸组成的基序， $N_a$  中的每个核苷酸与  $N_c$  中的每个核苷酸均不互补，并且  $N_a$  和  $N_c$  中 U 的总个数占  $N_a$  和  $N_c$  中全部核苷酸总个数的 50% 以上；

$S_2$  和  $S_3$  各自是由 1-4 个核苷酸组成的基序， $S_2$  与  $S_3$  长度相同并且完全反向互补；

$N_b$  是由 3-6 个核苷酸组成的基序，并且  $N_b$  两端的核苷酸之间不形成 AU 或 GC 互补；

每个所述递送基团独立地与所述功能性基团经共价键连接，或通过连接基团连接；每个所述功能性基团选自对肿瘤具有治疗作用的小分子治疗剂基团。

2. 如权利要求 1 所述的缀合物，其中，所述连续的核苷酸序列的长度为 18-50 个核苷酸，或者 20-40 个核苷酸，或者 21-36 个核苷酸，或者 24-32 个核苷酸。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的缀合物，其中， $T_1$  由 2 个核苷酸组成；或者， $T_1$  由 2 个核苷酸组成并且含有至少一个 C；或者，按照 5'-3' 方向， $T_1$  为 CU、UC 或 AC。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的缀合物, 其中,  $T_2$  由 0-10 个核苷酸组成; 或者, 按照 5'-3'方向,  $T_2$  由 U 起始的 1-9 个核苷酸组成。

5. 如权利要求 1 所述的缀合物, 其中,  $S_1$  和  $S_4$  各自由 3-5 个核苷酸组成且长度相同; 或者,  $S_1$  和  $S_4$  形成的反向互补中, GC 互补占全部互补数量的至少 40%; 或者, 按照 5'-3'方向,  $S_1$  为 GCU 且  $S_4$  为 AGC, 或  $S_1$  为 GAGU 且  $S_4$  为 GCUC, 或  $S_1$  为 GGAGU 且  $S_4$  为 GCUCU, 或  $S_1$  为 UAUGG 且  $S_4$  为 CCAUG。

6. 如权利要求 1 所述的缀合物, 其中, 所述  $N_a$  和  $N_c$  中核苷酸的数量之和为 2-4 的整数; 或者, 所述  $N_a$  和  $N_c$  中核苷酸的数量之和为 3 或 4, 并且所述  $N_a$  和  $N_c$  中 U 的数量之和为 2 或 3; 或者, 按照 5'-3'方向,  $N_a$  或  $N_c$  独立地为 U、UU、UC 或 CU。

7. 如权利要求 1 所述的缀合物, 其中,  $S_2$  和  $S_3$  各自由 2-3 个核苷酸组成且长度相同; 或者,  $S_2$  和  $S_3$  形成的反向互补中至少包含一个 GC 互补; 或者, 按照 5'-3'方向,  $S_2$  为 CA 且  $S_3$  为 UG, 或  $S_2$  为 AC 且  $S_3$  为 GU, 或  $S_2$  为 GCC 且  $S_3$  为 GGU。

8. 如权利要求 1 所述的缀合物, 其中,  $N_b$  由 4 个或 5 个核苷酸组成; 或者, 按照 5'-3'方向,  $N_b$  为 GACG、GACGU、GACCG、UACU、GUUG 或 GAUCU。

9. 如权利要求 1 所述的缀合物, 其中, 所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所示的序列。

10. 如权利要求 1 所述的缀合物, 所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列:

5'-  $N_6$ GGAGUUCAN<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>UGN<sub>5</sub>GCUCN<sub>7</sub>-3' (SEQ ID NO: 4),  
其中,  $N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_3$  各自独立地为 A、U、C 和 G 中的一种;  $N_4$  为 U、

C 或 G 或者由 U、C 或 G 中的两个组成的基序；N<sub>5</sub> 为 U、CU 或 UU；N<sub>6</sub> 为 CU、UC 或 AC；N<sub>7</sub> 为 U、UU 或 UUN<sub>8</sub>，N<sub>8</sub> 为由 1-15 个核苷酸组成的基序。

5           11. 如权利要求 10 所述的缀合物，其中，N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、N<sub>3</sub> 和 N<sub>4</sub> 组成的基序 N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 为 GACG、GACGU、GACCG、UACU、GUUG 或 GAUCU 中的一种。

10           12. 如权利要求 10 或 11 所述的缀合物，其中，所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 5-11 中任意一项所示的核苷酸序列。

15           13. 如权利要求 10 所述的缀合物，其中，N<sub>8</sub> 是由 1-8 个核苷酸组成的基序；或者，按照 5'-3'方向，N<sub>8</sub> 的核苷酸序列为 CCGAUCUC；或者，所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 12-14 中的一种所示的序列。

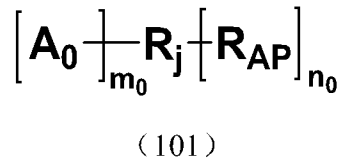
20           14. 如权利要求 1 所述的缀合物，其中，所述连续的核苷酸序列中的每个胞嘧啶核苷酸为氟代修饰的胞嘧啶核苷酸，和/或所述连续的核苷酸序列中的每个尿嘧啶核苷酸为氟代修饰的尿嘧啶核苷酸；或者，所述连续的核苷酸序列中的每个核苷酸均为 2'-甲氧基修饰的核苷酸；或者，所述连续的核苷酸序列中 N<sub>6</sub> 和 S<sub>3</sub> 基序中的一个或多个尿嘧啶核苷酸具有修饰的碱基。

25           15. 如权利要求 14 所述的缀合物，其中，所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 15-33 中的一种所示的核苷酸序列。

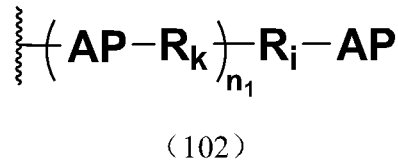
30           16. 如权利要求 1 所述的缀合物，所述连续的核苷酸序列中的至少一个连接相邻的两个核苷酸的基团为硫代磷酸酯基，或者每个连接相邻的两个核苷酸的基团均为硫代磷酸酯基。

30           17. 如权利要求 16 所述的缀合物，其中，所述连续的核苷酸序列具有 SEQ ID NO: 34-39 中的一种所示的核苷酸序列。

18. 如权利要求 17 所述的缀合物, 具有如式 (101) 所示的结构:



其中, 每个  $\text{R}_{\text{AP}}$  基团独立地为具有如式 (102) 所示的结构基团:



式中, 每个 AP 基团相同或不同, 独立地表示一个所述递送基团;  $\text{R}_j$ 、 $\text{R}_k$  或每个  $\text{R}_i$  相同或不同, 分别独立地表示共价键或者连接基团, 且  $\text{R}_i$  和  $\text{R}_k$  二者不同时为共价键; 每个  $n_1$  各自独立地表示 0-4 的整数;

每个  $\text{A}_0$  基团相同或不同, 独立地表示一个所述功能性基团;  $m_0$  为 1-6 的整数;  $n_0$  为 1-6 的整数,  $\sim$  表示基团共价连接的位点。

19. 如权利要求 18 所述的缀合物, 其中,  $m_0$  为 1-4 的整数, 和/或  $n_0$  为 1-3 的整数, 和/或每个  $n_1$  独立地为 0-1 的整数;

或者,  $m_0$  为 1, 和/或  $n_0$  为 1, 和/或至少一个或者每个  $n_1$  为 0。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的缀合物, 其中, 每个所述  $\text{R}_k$  或每个所述  $\text{R}_i$  独立地为共价键或者长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基, 或者, 所述直链亚烷基中的一个或多个碳原子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)<sub>2</sub>、OP(O)<sub>2</sub>、OP(O)(S)、C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> 亚糖苷基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基; 并且其中, 所述直链亚烷基可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<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰

基、硝基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{CON}(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{CONH}(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})(\text{苯基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})\text{C}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})\text{C}(\text{O})(\text{苯基})$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基苯基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_{10}$  卤代烷基、 $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基}$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{苯基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 卤代烷基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{苯基})$ 、 $-\text{NHSO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 烷基})$ 、 $-\text{NHSO}_2(\text{苯基})$ 和 $-\text{NHSO}_2(\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{ 卤代烷基})$ 。

21. 如权利要求 20 所述的缀合物，其中，每个  $n_i$  均为 0，每个  $R_i$  独立地为共价键，或者为以下连接基团的一种或多种的连接组合： $\text{C}_1\text{-C}_{20}$  亚烷基、磷酸酯键、硫代磷酸酯键、酰胺键、酯键、醚键、硫醚键、二硫键、1,2,3-三唑亚基、聚乙二醇亚基、吡咯烷亚基、2-氧代吡咯烷亚基、亚苯基、亚环己基、2-丁二酰亚胺亚基、2-硫代丁二酰亚胺亚基、氨基酸亚基、核苷酸亚基。

22. 如权利要求 21 所述的缀合物，其中，每个  $R_i$  独立地为共价键、二硫键、亚丙基磷酸酯基、2-硫代丁二酰亚胺亚基、氨基酸亚基、或者 GAU 三核苷酸亚基中的一种或 2 种的连接组合。

23. 如权利要求 18-22 中任意一项所述的缀合物，其中， $R_j$  为共价键， $m_0$  为 1。

24. 如权利要求 18-22 中任意一项所述的缀合物，其中， $R_j$  为连接基团，所述连接基团  $R_j$  包含主链部分、侧链部分和缀合连接部，所述主链部分分别与所述缀合连接部和所述侧链部分连接，每个所述侧链部分分别与所述主链部分和所述  $R_{AP}$  基团连接，每个所述缀合连接部分别与所述主链部分和所述功能性基团  $A_0$  连接，其中，

所述主链部分为长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，或者，所述直链亚烷基中的一个或多个碳原子被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换： $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{CH}=\text{N}$ 、 $\text{S}(\text{O})_2$ 、 $\text{OP}(\text{O})_2$ 、 $\text{C}_5\text{-C}_8$  亚糖苷基、 $\text{C}_2\text{-C}_{10}$  亚烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_{10}$  亚炔基、 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$  亚芳基、 $\text{C}_3\text{-C}_{18}$  亚杂环基和

C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基；并且其中，所述直链亚烷基可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<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>、-NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHSO<sub>2</sub>(苯基)和-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)；

每个所述侧链部分独立地是共价键，或者是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基，或者，所述直链亚烷基中的一个或多个碳原子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)<sub>2</sub>、OP(O)<sub>2</sub>、C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> 亚糖苷基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基；并且，所述直链亚烷基可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<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>、-NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-

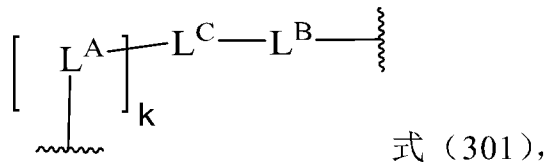
NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHSO<sub>2</sub>(苯基)和-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基);

每个所述缀合连接部独立地为共价键或者以下连接结构的一种或多种的连接组合: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 直链亚烷基、磷酸酯键、硫代磷酸酯键、酰胺键、酯键、醚键、二硫键、1,2,3-三唑亚基、聚乙二醇亚基、吡咯烷亚基、2-氧代吡咯烷亚基、亚苯基、亚环己基、2-丁二酰亚胺亚基、2-硫代丁二酰亚胺亚基、氨基酸亚基、核苷酸亚基。

25. 如权利要求 24 所述的缀合物, 其中, 所述连接基团 R<sub>j</sub> 中的每个所述缀合连接部分别与所述主链部分和一个所述功能性基团 A<sub>0</sub> 连接; 所述侧链部分为 n<sub>0</sub> 个, 每个侧链部分分别与所述主链部分和一个所述 R<sub>AP</sub> 基团连接。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的缀合物, 其中, 全部所述侧链部分连接至所述主链部分中的同一原子; 或者, 每个所述侧链部分连接至所述主链部分中的不同原子。

27. 如权利要求 26 所述的缀合物, 其中, m<sub>0</sub> 为 1, 所述连接基团 R<sub>j</sub> 包含如式 (301) 所示的结构:



其中, k 为 1-3 的整数; L<sup>C</sup> 为所述主链部分, L<sup>A</sup> 为所述侧链部分, L<sup>B</sup> 为所述缀合连接部, ~~~~ 表示基团共价连接的位点;

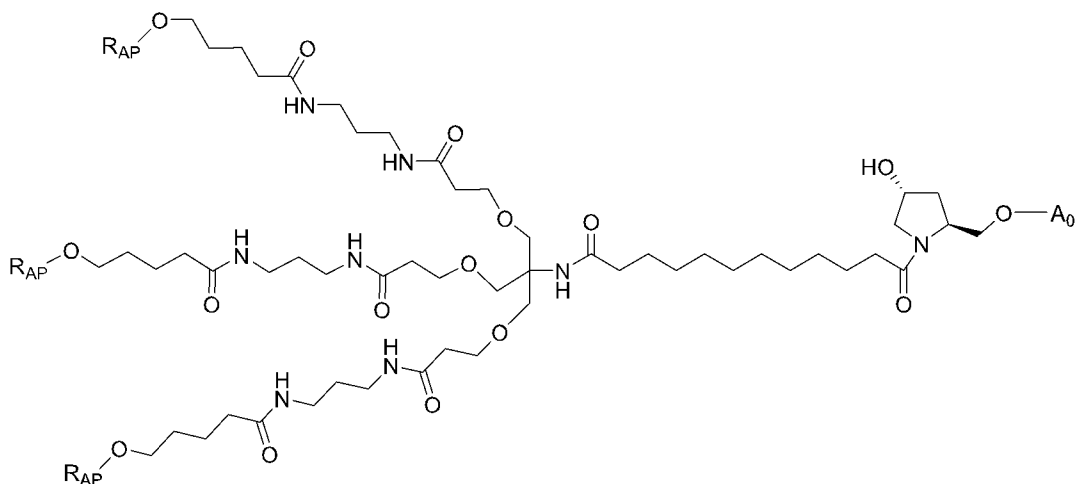
所述主链部分 L<sup>C</sup> 为共价键或 2-4 价、直链或支链的 C<sub>1</sub>-C<sub>25</sub> 饱和烃基, 或者, 所述饱和烃基中的一个或多个碳原子被选自于以下基团所组成的组中的一个或多个所替换: C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)<sub>2</sub>、OP(O)<sub>2</sub>、C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> 亚糖苷基、C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基; 其中, 所述饱和烃基可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<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、-O-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基-OH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基、硝基、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-

C<sub>5</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基苯基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 烷基)和-NHSO<sub>2</sub>(苯基);

每个所述侧链部分独立地是共价键, 或者是长度为 1-70 个碳原子的直链亚烷基, 或者, 所述直链亚烷基中的一个或多个碳原子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)<sub>2</sub>、OP(O)<sub>2</sub>、C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> 亚糖苷基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> 亚炔基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 亚芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> 亚杂环基和 C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 亚杂芳基; 并且, 所述直链亚烷基可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<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-OH、-OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-SH、-SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、卤素取代基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基-NH<sub>2</sub>、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基)、氰基、硝基、-CO<sub>2</sub>H、-C(O)O(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHC(O)(苯基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)C(O)(苯基)、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基苯基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基、-OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>(苯基)、-SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-SO<sub>2</sub>NH(苯基)、-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基)、-NHSO<sub>2</sub>(苯基)和-NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 卤代烷基);

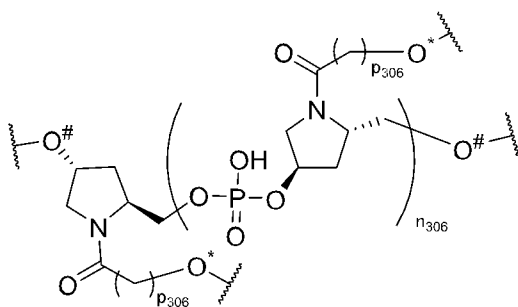
每个所述缀合连接部独立地为共价键或者以下连接结构的一种或多种的连接组合: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 直链亚烷基、磷酸酯键、硫代磷酸酯键、酰胺键、酯键、醚键、二硫键、1,2,3-三唑亚基、聚乙二醇亚基、吡咯烷亚基、2-氧代吡咯烷亚基、亚苯基、亚环己基、2-丁二酰亚胺亚基、2-硫代丁二酰亚胺亚基、氨基酸亚基、核苷酸亚基。

28. 如权利要求 27 所述的缀合物, 其中, 所述缀合物具有如式 (305) 所示的结构:



式 (305)。

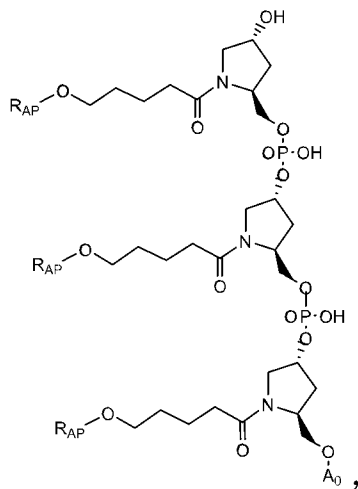
29. 如权利要求 27 所述的缀合物，其中，所述连接基团  $R_j$  具有式 (306) 所示的结构：



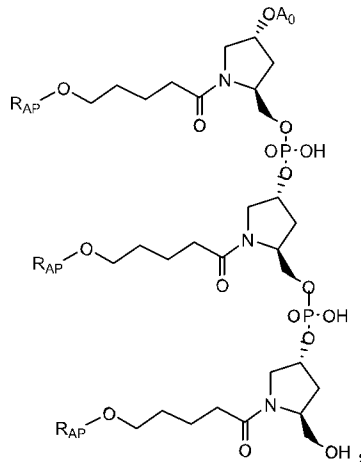
式 (306)，

其中， $n_{306}$  为 0-3 的整数，每个  $p_{306}$  独立地为 1-6 的整数， $\sim$  表示基团共价连接的位点；由\*标出的氧原子与所述  $R_{AP}$  基团形成磷酸酯键、醚键或酯键连接；由#标出的氧原子中的至少一个与所述功能性基团  $A_0$  形成醚键、酯键或磷酸酯键而连接，其余由#标出的氧原子与氢原子连接形成羟基，或者与  $C_1$ - $C_3$  烷基连接形成  $C_1$ - $C_3$  烷氧基。

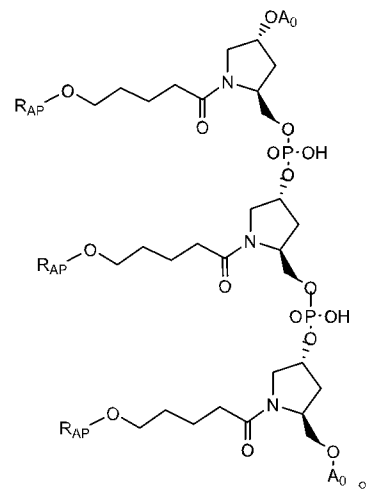
30. 如权利要求 29 所述的缀合物，其中，所述缀合物具有如式 (307a)、(307b) 或 (307c) 所示的结构：



式 (307a)

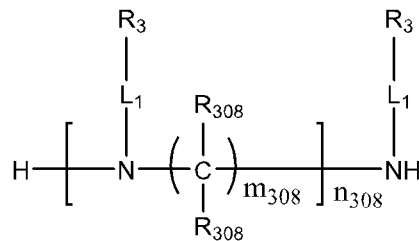


式 (307b)



式 (307c)

31. 如权利要求 27 所述的缀合物, 其中, 所述缀合物具有式 (308) 所示的结构:



式 (308),

其中,

$n_{308}$  为选自 1-10 的整数;

每个  $m_{308}$  独立地为选自 2-10 的整数;

每个  $R_{308}$  独立地为 H、 $C_1$ - $C_{10}$  烷基、 $C_1$ - $C_{10}$  卤代烷基或  $C_1$ - $C_{10}$  烷氧基;

每个  $R_3$  独立地为所述功能性基团  $A_0$ , 或者为所述  $R_{AP}$  基团, 并且至少一个  $R_3$  为所述功能性基团  $A_0$ , 且至少一个  $R_3$  为所述  $R_{AP}$  基团; 或者, 一个  $R_3$  为所述功能性基团  $A_0$ , 其余  $R_3$  为所述  $R_{AP}$  基团;

连接至所述功能性基团  $A_0$  的每个  $L_1$  表示所述缀合连接部, 并且连接至所述  $R_{AP}$  的每个  $L_1$  表示所述侧链部分。

32. 如权利要求 31 所述的缀合物, 其中, 每个  $L_1$  独立地选自由基团 L4-L23 及其任意连接组合所组成的组。

33. 如权利要求 32 所述的缀合物, 其中, 每个  $L_1$  独立地选自由基团 L4-L9、L13、L14、L18 中至少 2 个的连接组合所组成的组; 或者, 每个  $L_1$  独立地为基团 L4、L5、L7、L9、L13、L14、L18 中至少 2 个的连接组合。

5

34. 如权利要求 31-33 中任意一项所述的缀合物, 其中, 每个  $L_1$  的长度独立地为 3-25 个原子; 或者, 每个  $L_1$  的长度独立地为 4-15 个原子。

10

35. 如权利要求 31-34 中任意一项所述的缀合物, 其中,  $n_{308}$  为 2-6 的整数, 2-4 个  $R_3$  为所述  $R_{AP}$  基团, 其余的  $R_3$  为所述功能性基团。

36. 如权利要求 31-35 中任意一项所述的缀合物, 其中, 每个  $m_{308}$  各自独立地为 2-5 的整数, 和/或每个  $m_{308}$  均相等。

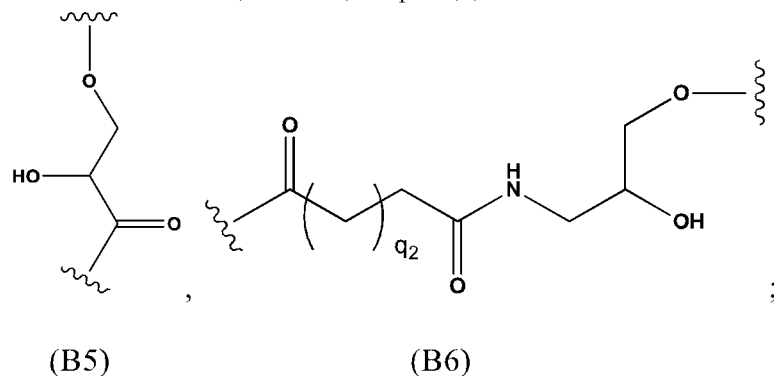
15

37. 如权利要求 31-36 中任意一项所述的缀合物, 其中,  $n_{308}$  为选自 2-4 的整数; 每个  $m_{308}$  独立地为选自 2-4 的整数; 每个  $R_{308}$  均为 H。

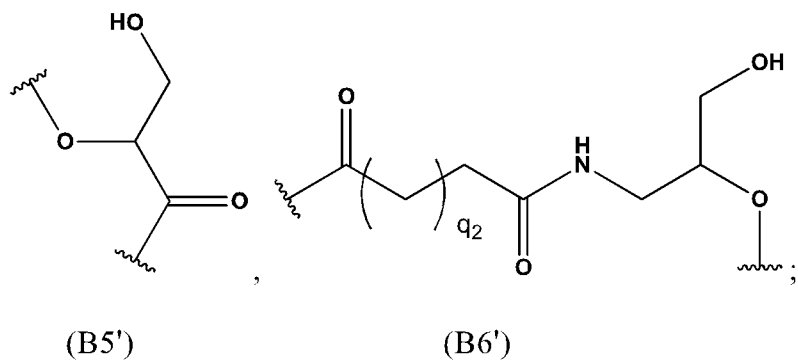
38. 如权利要求 37 所述的缀合物, 其中, 一个  $R_3$  为所述功能性基团  $A_0$ , 其余  $R_3$  为所述  $R_{AP}$  基团。

20

39. 如权利要求 37 或 38 所述的缀合物, 其中, 每个  $L_1$  上同时含有与含氮骨架上的 N 原子连接的连接位点和与所述功能性基团  $A_0$  或所述  $R_{AP}$  基团连接的连接位点, 所述与含氮骨架上的 N 原子连接的位点与该 N 原子形成酰胺键; 或者, 一个或多个  $L_1$  选自 B5、B6、B5' 或 B6':



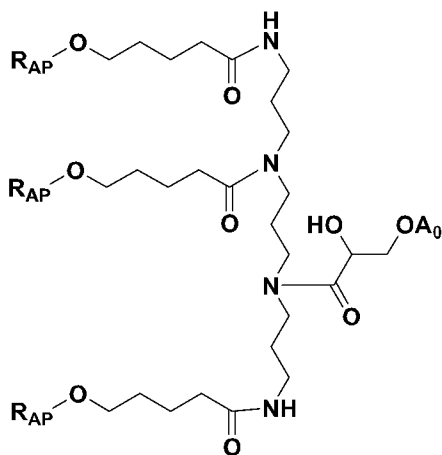
25



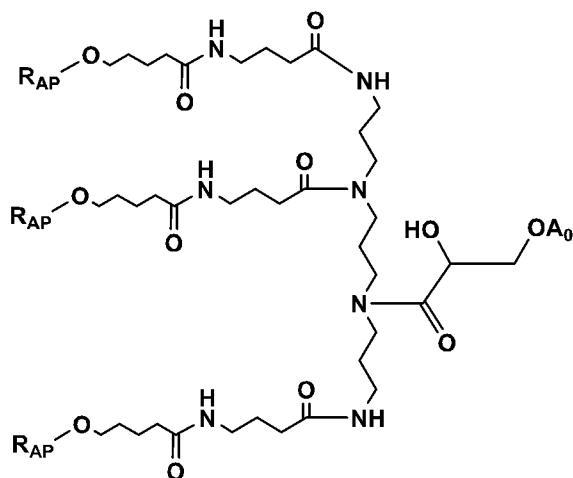
其中， $\sim$ 表示基团共价连接的位点， $q_2$  为 1-10 的整数；或者， $q_2$  为 1-5 的整数。

5

40. 如权利要求 31-39 中任一项所述的缀合物，具有式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421)、(422)、(423)、(424)、(425)、(426) 或 (427) 所示的结构：

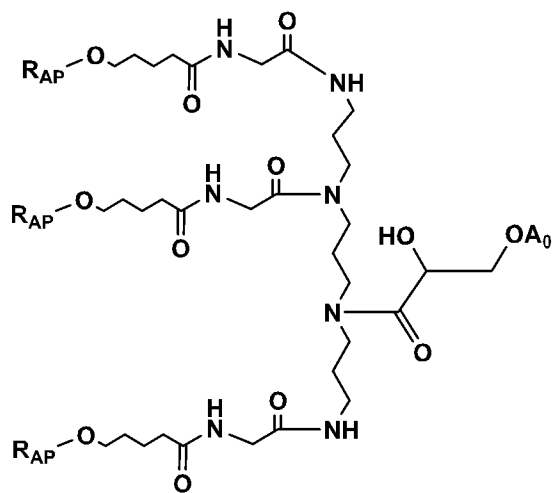


式 (403)

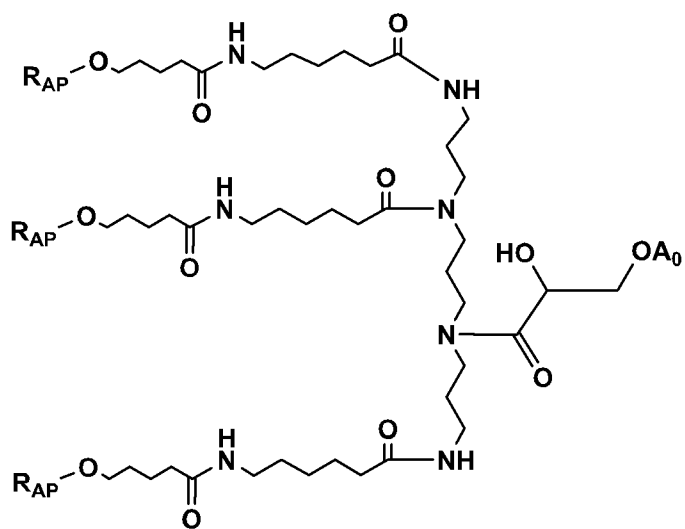


式 (404)

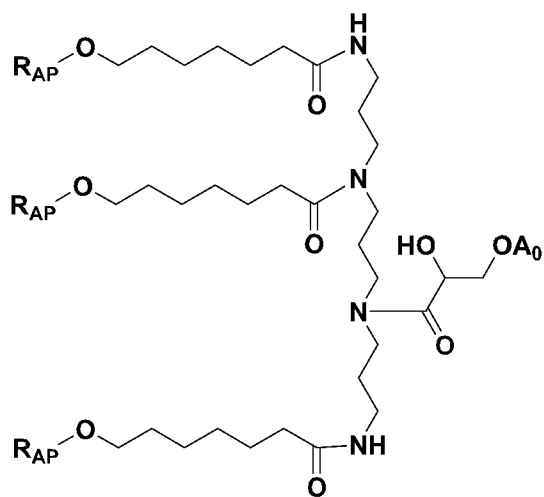
10



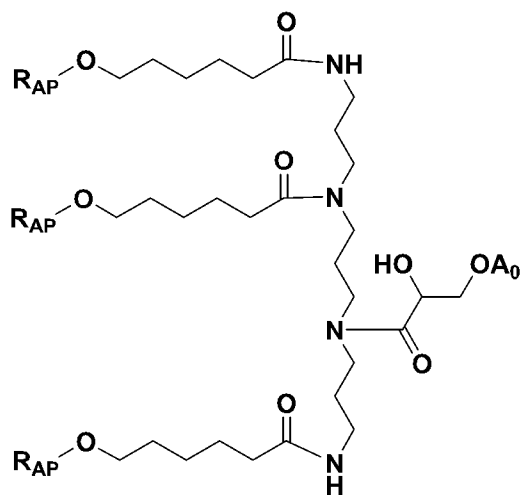
式 (405)



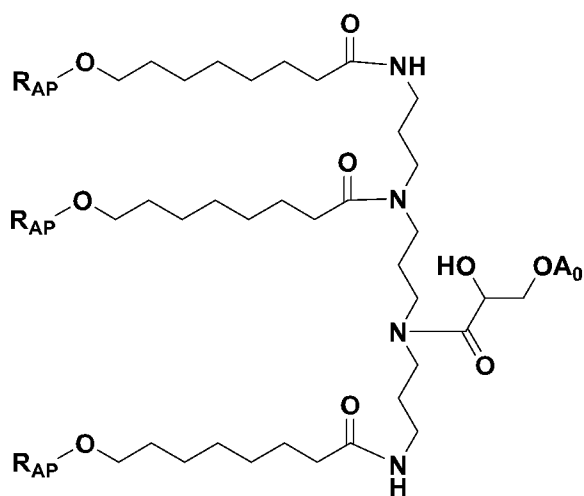
式 (406)



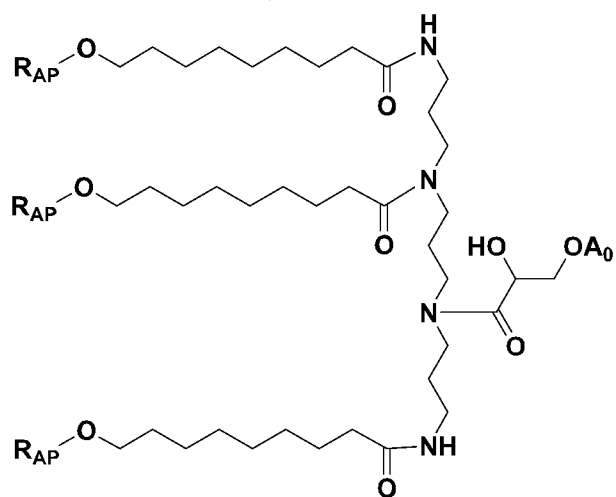
式 (407)



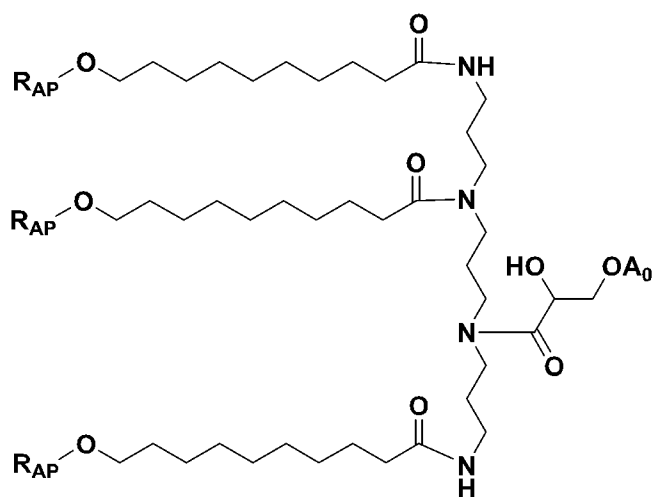
式 (408)



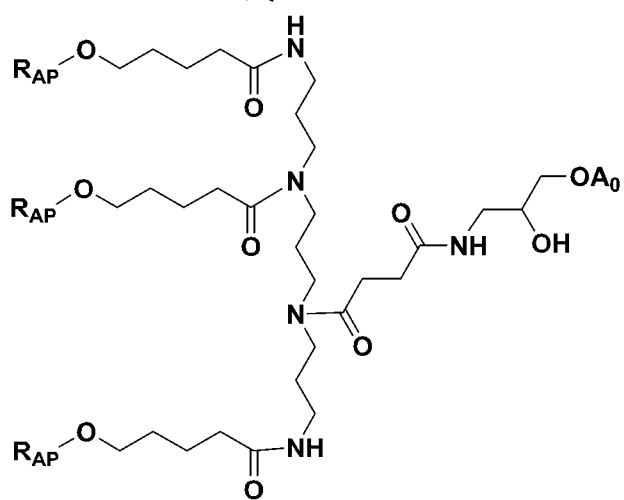
式 (409)



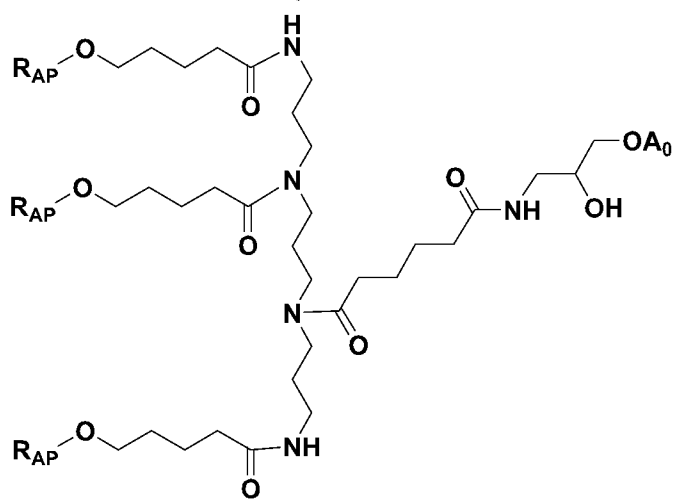
式 (410)



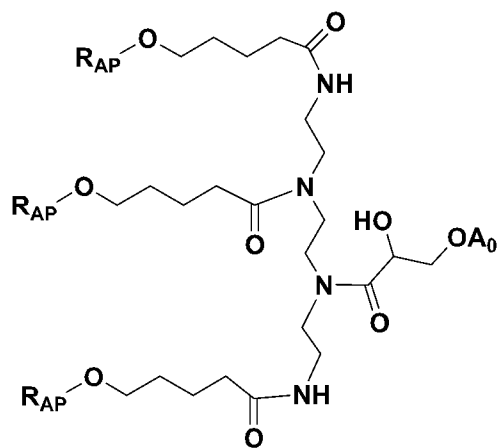
式 (411)



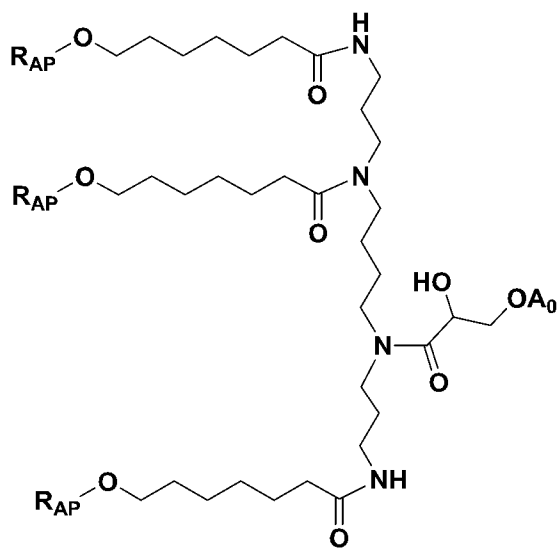
式 (412)



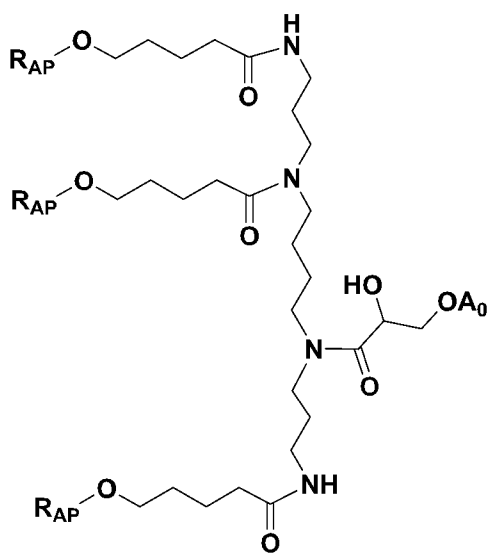
式 (413)



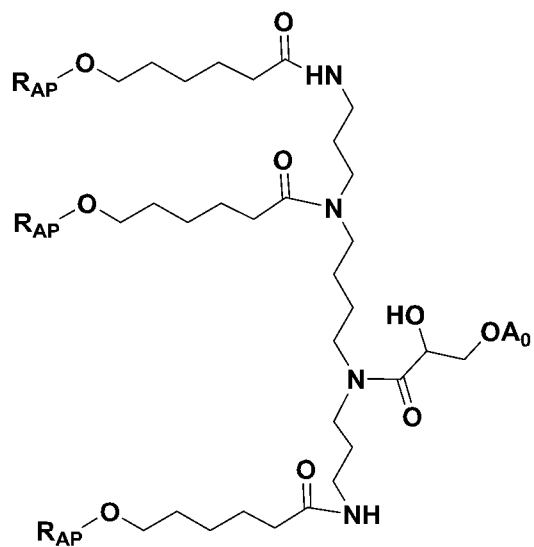
式 (414)



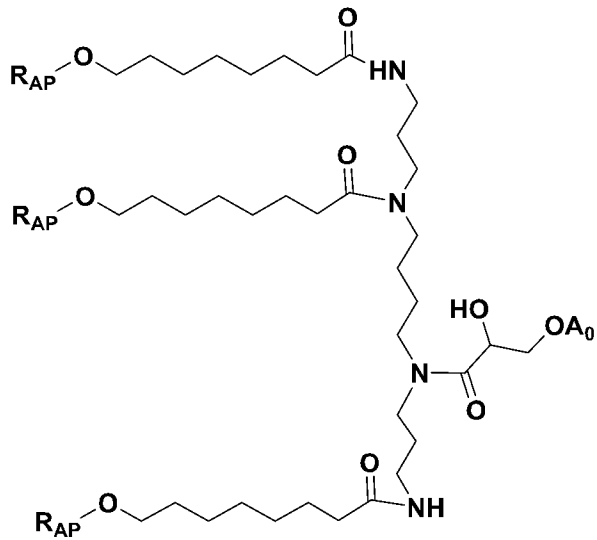
式 (415)



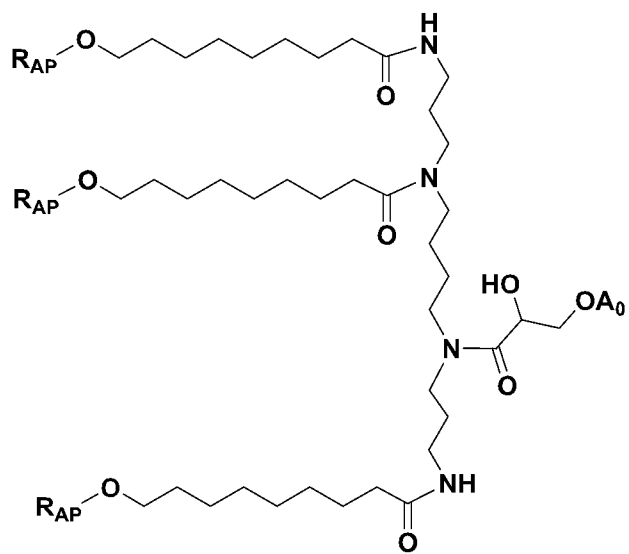
式 (416)



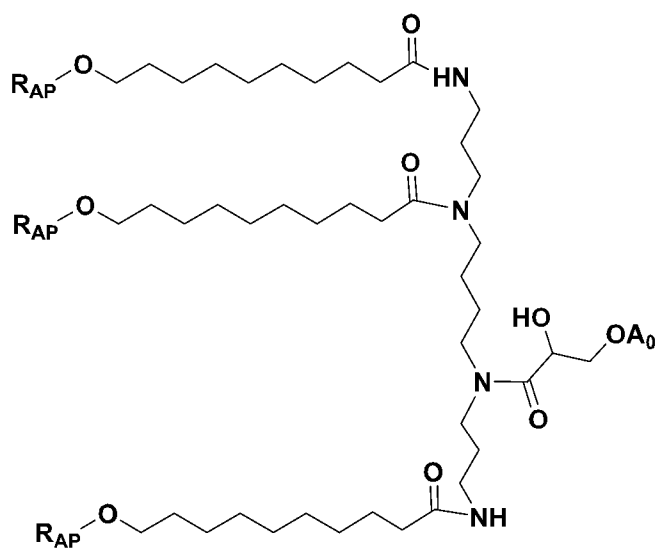
式 (417)



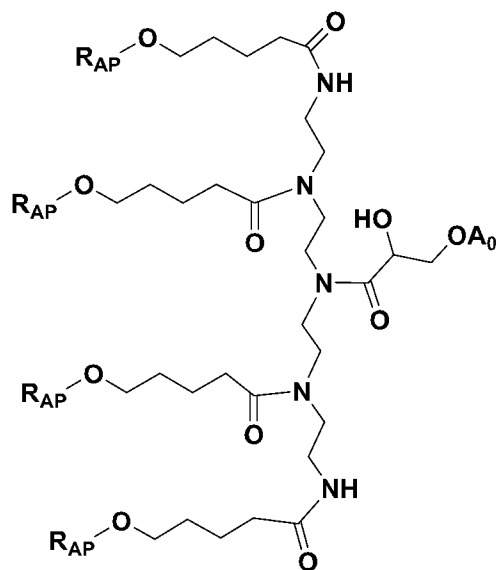
式 (418)



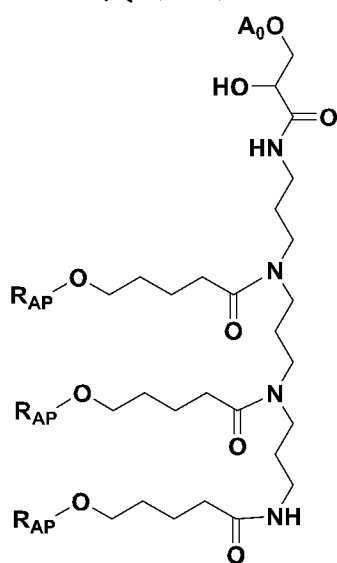
式 (419)



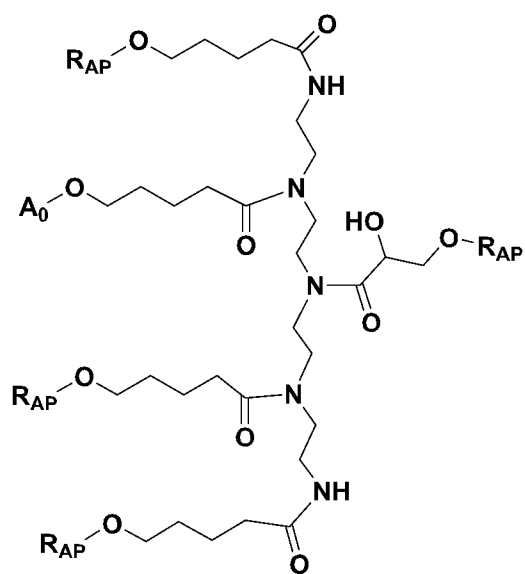
式 (420)



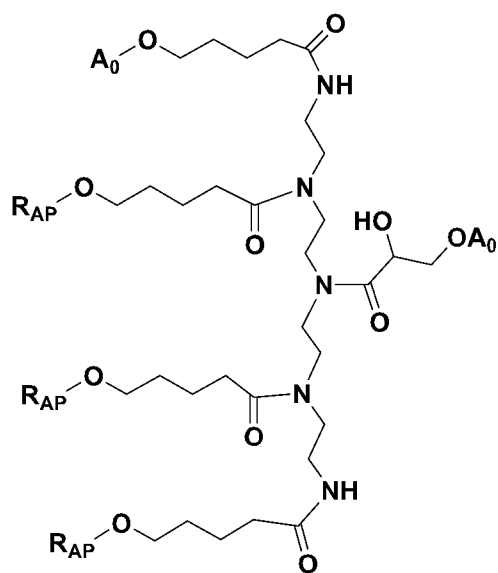
式 (421)



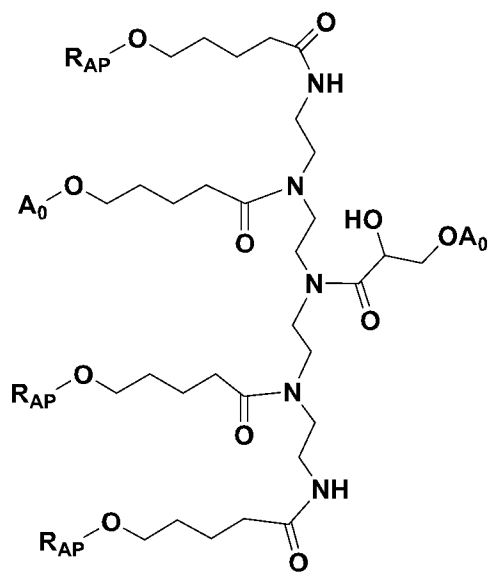
式 (422)

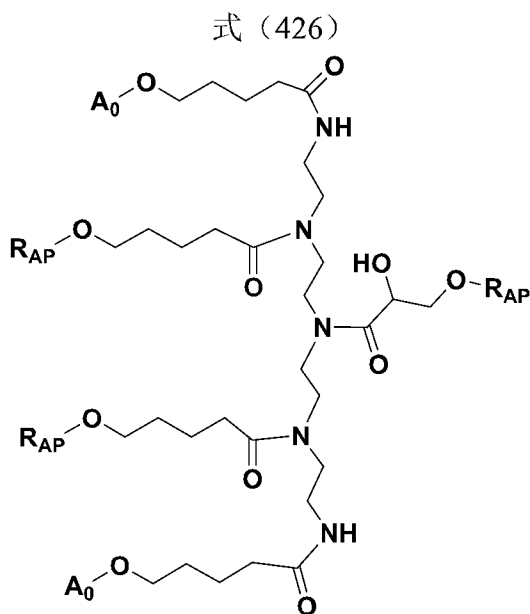
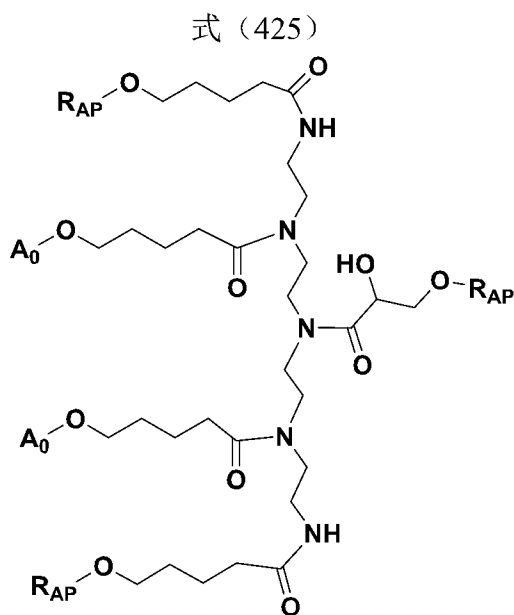


式 (423)



式 (424)





式 (427)

41. 如权利要求 18-22 中任意一项所述的缀合物, 其中,  $R_j$  包含核苷酸序列 I 和核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 各自包含 5-25 个修饰或未修饰的核苷酸, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 至少部分地反向互补, 所述递送基团连接至所述核苷酸序列 I, 所述功能性基团连接至所述核苷酸序列 II, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 在受试者体内不引发免疫反应或毒性反应。

42. 如权利要求 41 所述的缀合物, 其中, 所述递送基团的 3'末端经

磷酸酯键连接至所述核苷酸序列 I 的 5'末端核苷酸的核糖 5'位, 所述功能性基团连接至所述核苷酸序列 II 的 5'末端核苷酸的核糖 5'位; 或者, 所述功能性基团包含一段核苷酸序列, 所述核苷酸序列的 3'末端经磷酸酯键连接至所述核苷酸序列 II 的 5'末端核苷酸的核糖 5'位。

5

43. 如权利要求 42 所述的缀合物, 其中, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 实质上反向互补或者完全反向互补; 或者, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 的长度相等并且均为 10-20 个修饰或未修饰的核苷酸; 或者, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 均由 17 个核苷酸组成并且完全反向互补; 或者, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 分别具有 SEQ ID NO: 40 和 SEQ ID NO: 41 所示的序列:

10

5'- GUACAUUCUAGAUAGCC -3' (SEQ ID NO: 40)

5'- GGCUAUCUAGAAUGUAC -3' (SEQ ID NO: 41),

15

或者, 所述核苷酸序列 I 和所述核苷酸序列 II 分别具有 SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 43 所示的序列:

5'- GmUfAmCfAmUfUfCfUfAmGmAmUfAmGmCfCf -3'

(SEQ ID NO: 42)

5'- GmGmCfUfAmUfCfUfAmGmAmAmUfGmUfAmCf -3'

(SEQ ID NO: 43)。

20

44. 如权利要求 18-43 中任意一项所述的缀合物, 其中,  $R_j$  为可裂解的。

25

45. 如权利要求 1-44 中任意一项所述的缀合物, 其中, 每个所述小分子治疗剂基团独立地选自细胞毒素基团、抗生素基团或血管生成抑制剂。

30

46. 如权利要求 45 所述的缀合物, 其中, 所述小分子治疗剂基团由下述小分子治疗剂中的一种去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成: 甲氨蝶呤、阿霉素、长春花生物碱、溴瑞他汀、卡利奇霉素、美登素、喜树碱、以及加利车霉素。

47. 如权利要求 46 所述的缀合物，其中，所述小分子治疗剂基团是一甲基澳瑞他汀 E (MMAE) 去除一个或多个氢原子或一个或多个官能团形成的基团。

5           48. 一种药物组合物，包含权利要求 1-47 中任意一项所述的缀合物以及药学上可接受的载体。

49. 权利要求 1-47 中任意一项所述的缀合物和/或权利要求 48 所述的药物组合物在制备用于治疗肿瘤及肿瘤相关疾病或症状的药物中的应用。

10

50. 如权利要求 49 所述的应用，其中，所述肿瘤是胶质瘤、肾癌、肺癌中的一种或多种。

15           51. 一种肿瘤及肿瘤相关疾病或症状的治疗方法，包括向有需要的受试者给予有效量的权利要求 1-47 中任意一项所述的缀合物和/或权利要求 48 所述的药物组合物。

52. 如权利要求 51 所述的方法，其中，所述肿瘤是胶质瘤、肾癌、肺癌中的一种或多种。

20

53. 一种试剂盒，包括权利要求 1-47 中任意一项所述的缀合物和/或权利要求 48 所述的药物组合物。

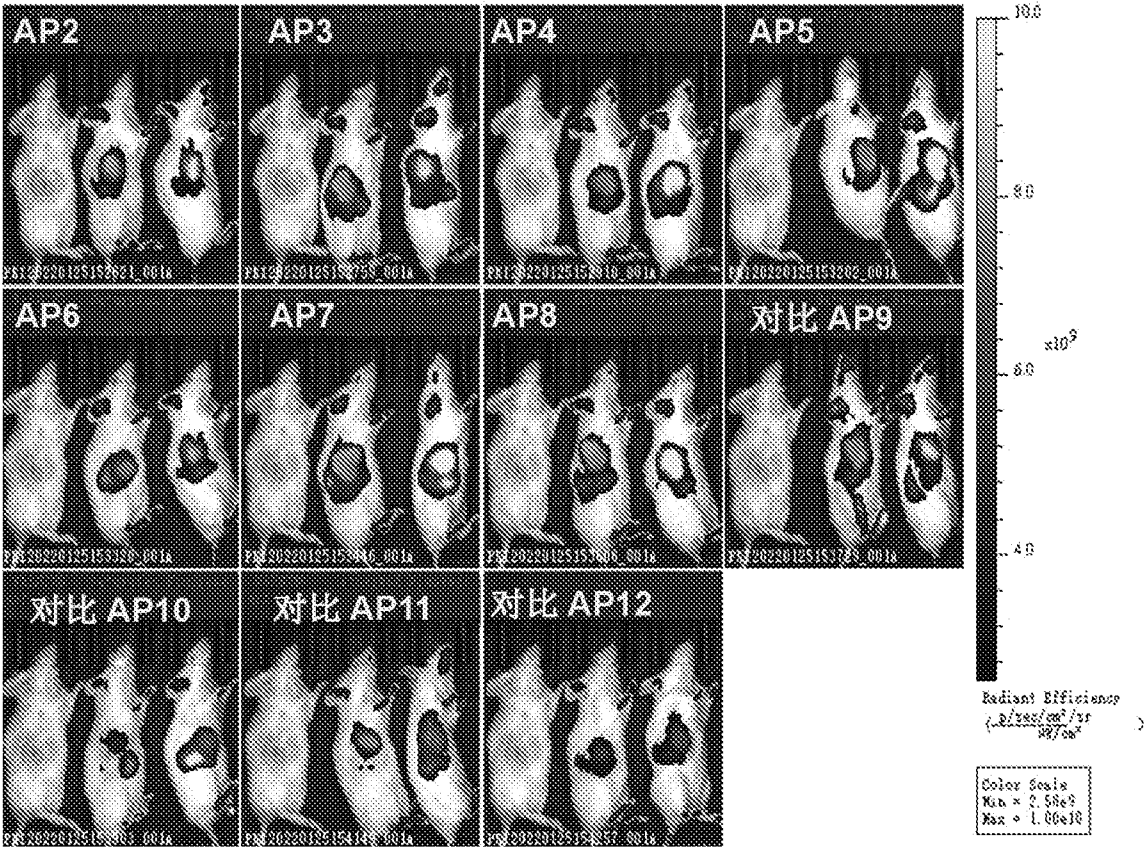


图 1A

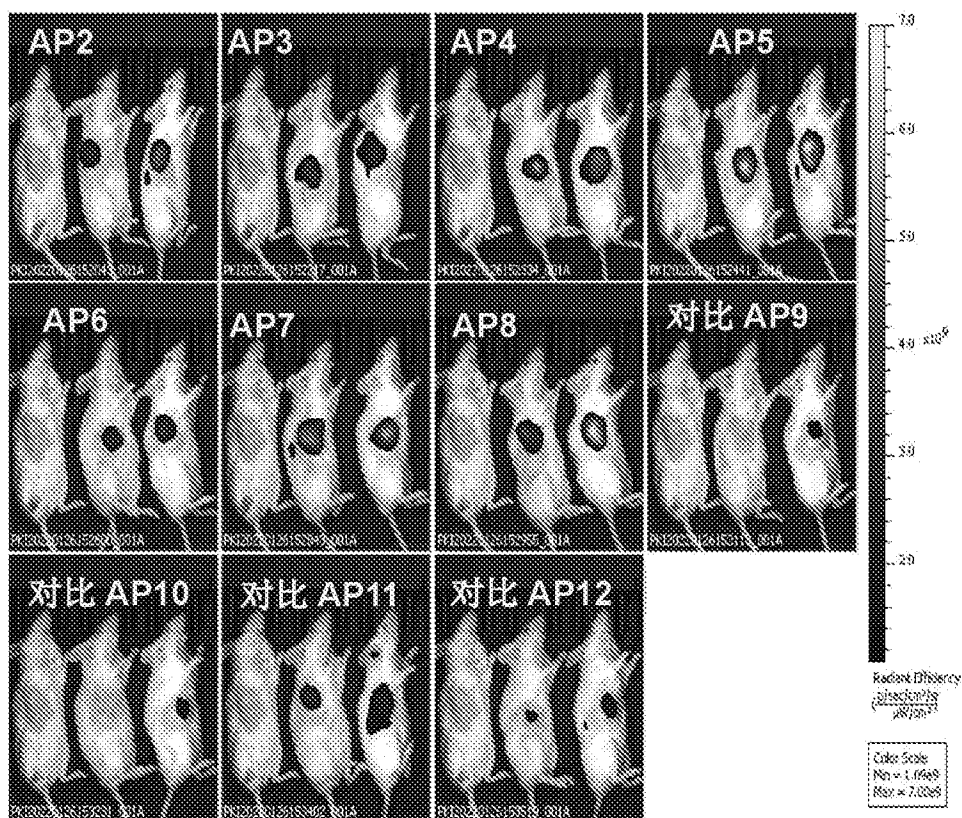


图 1B

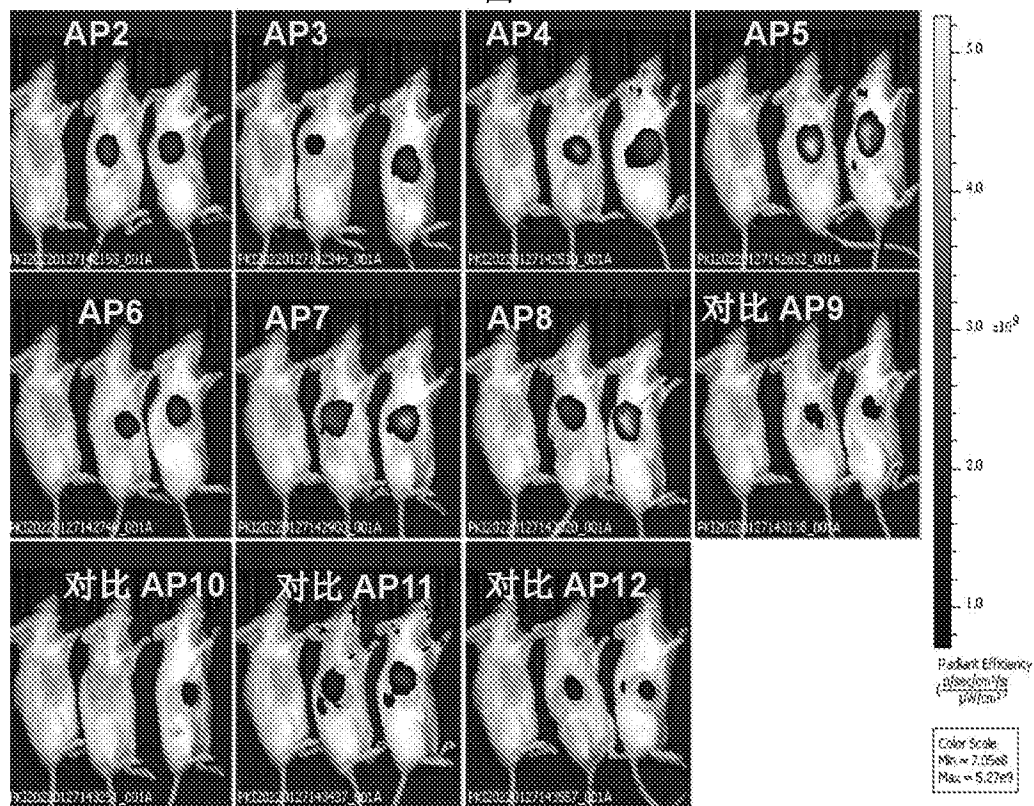


图 1C

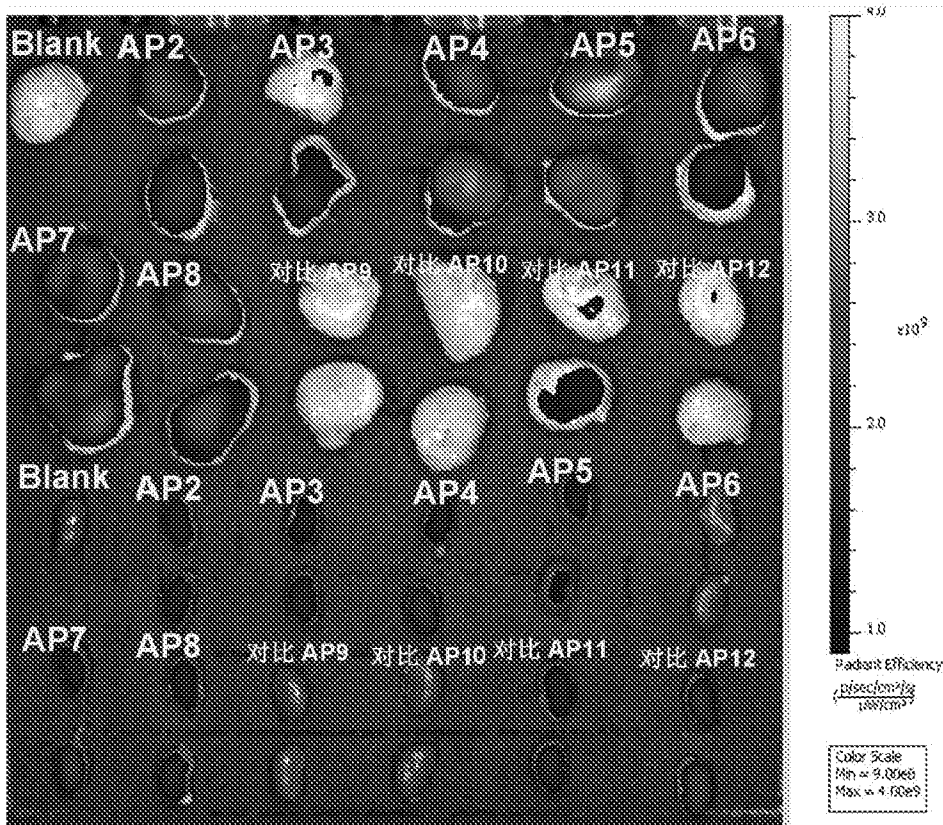


图 1D

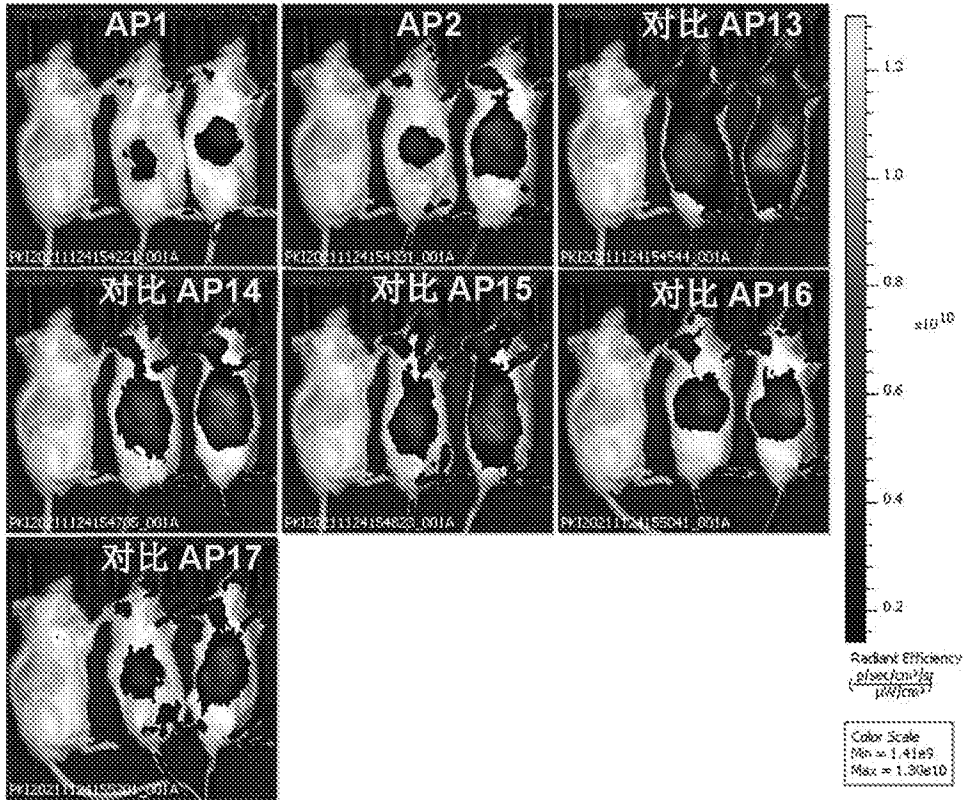


图 2A

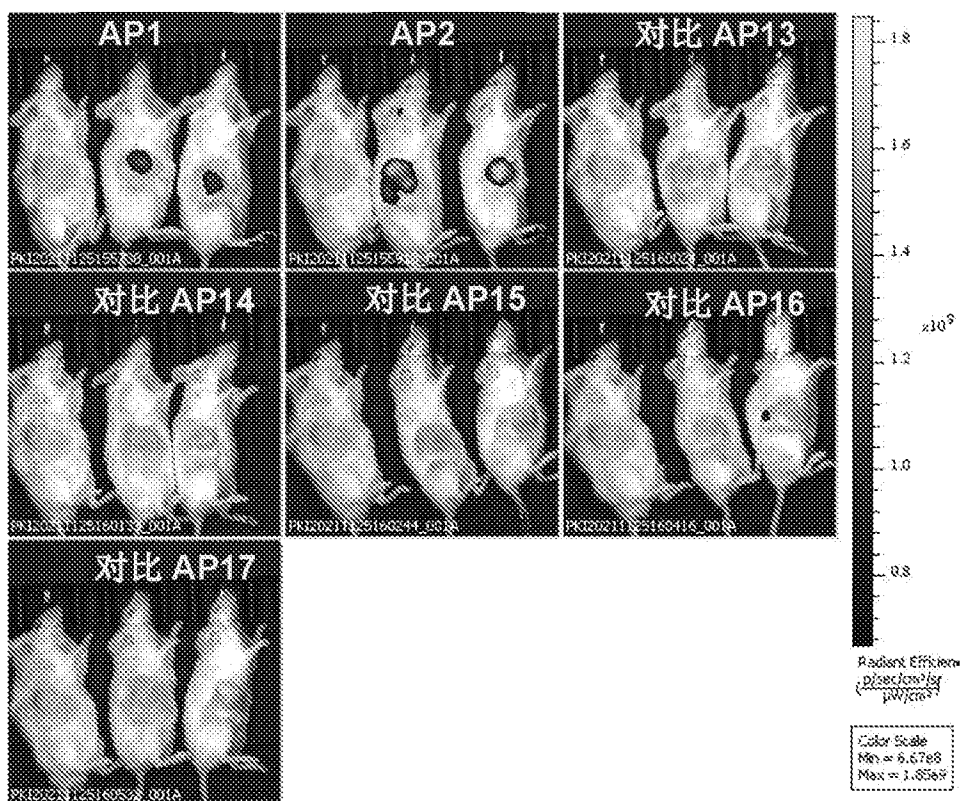


图 2B

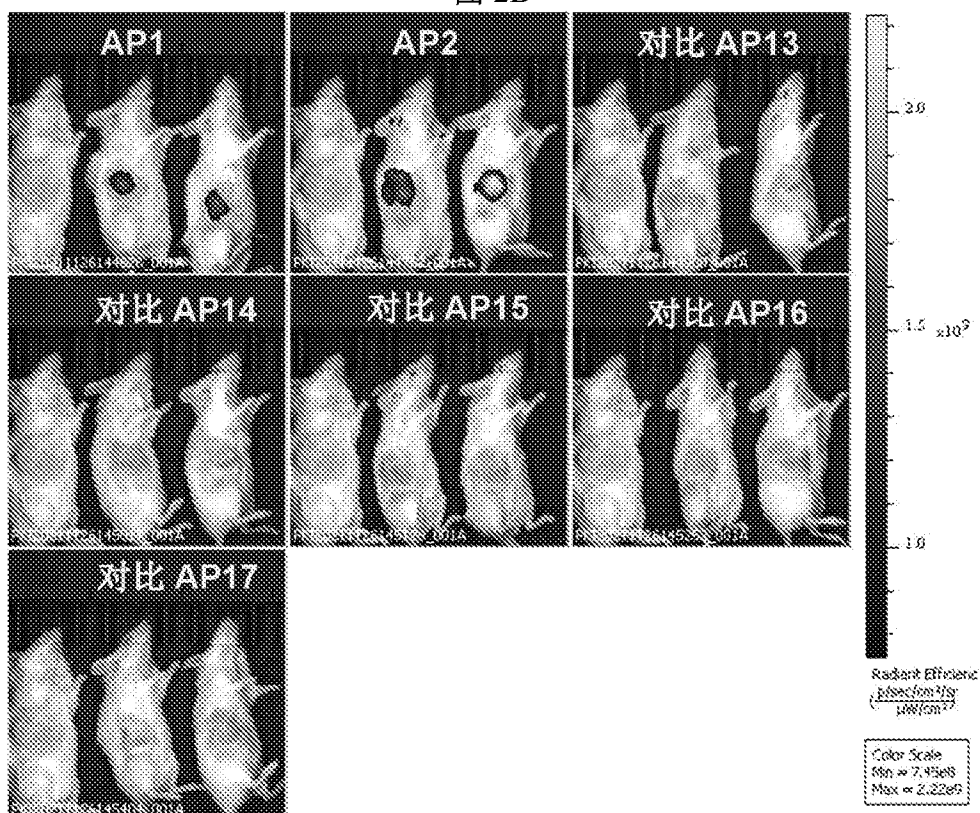


图 2C

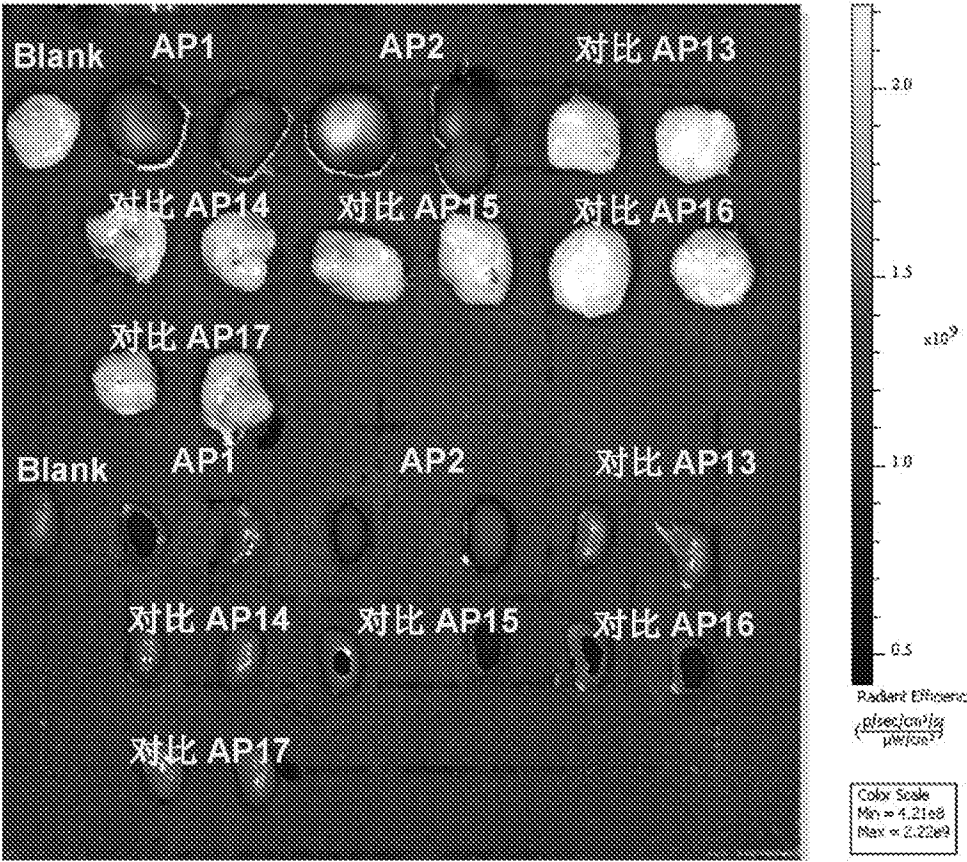


图 2D

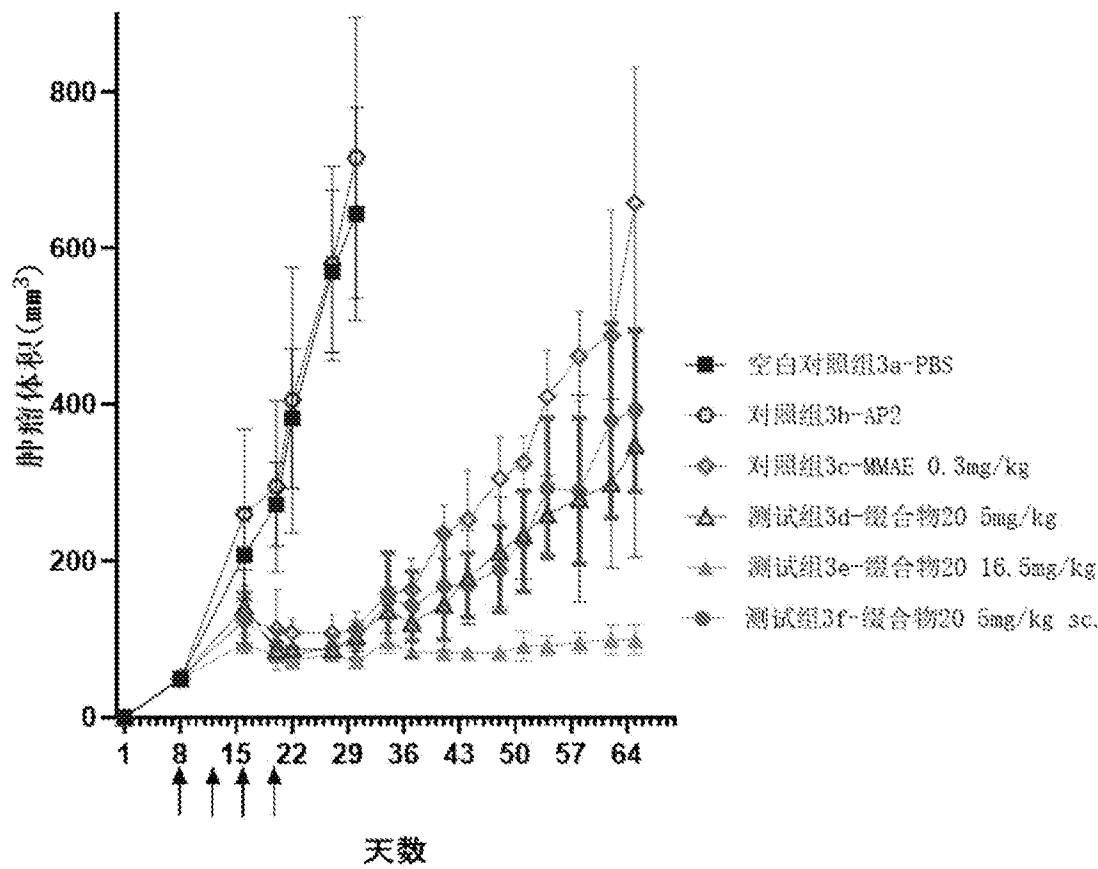


图 3

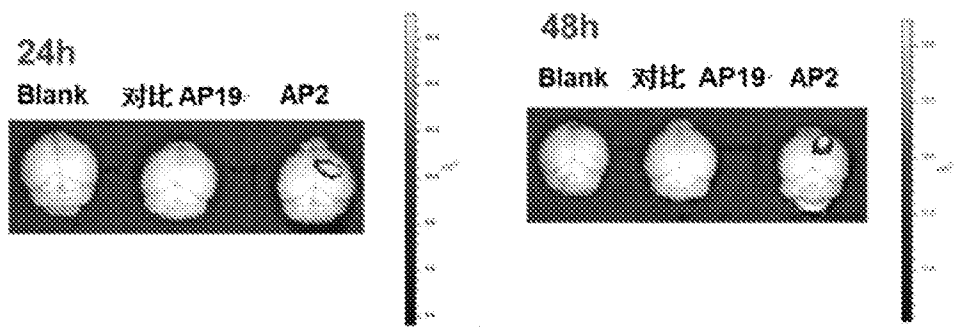


图 4

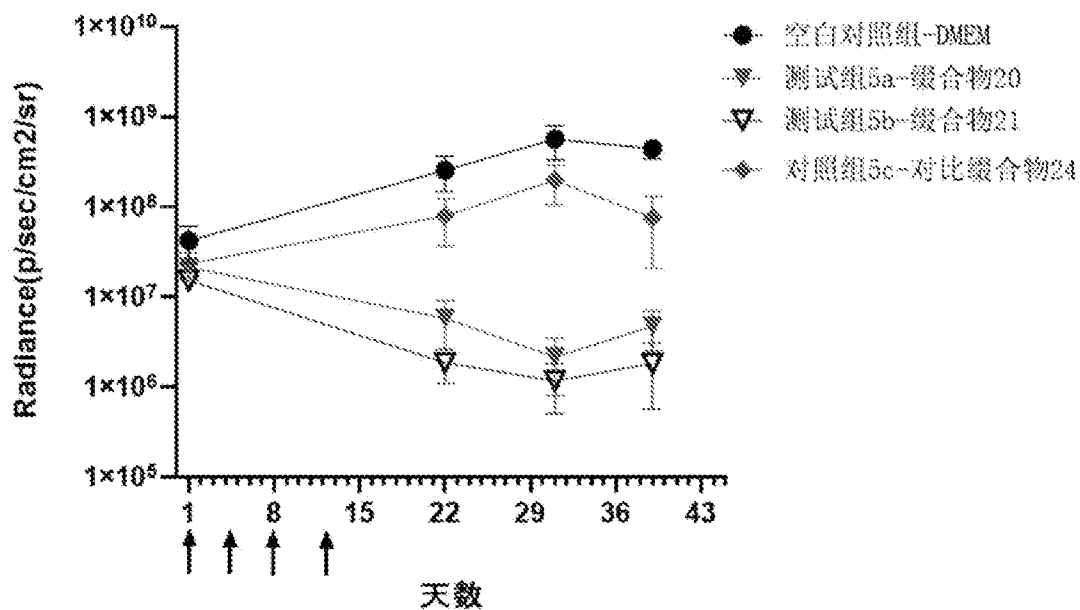


图 5

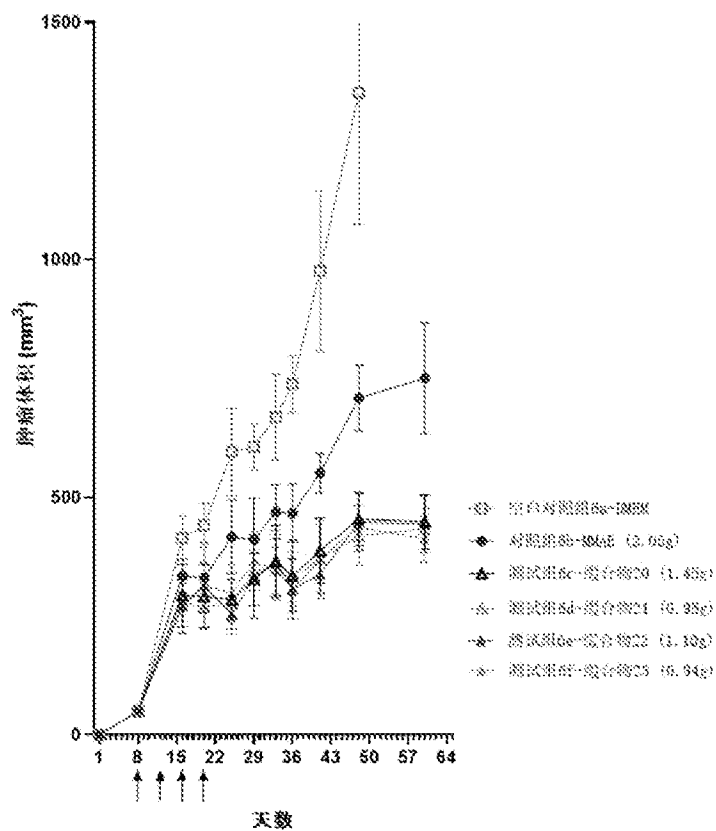


图 6

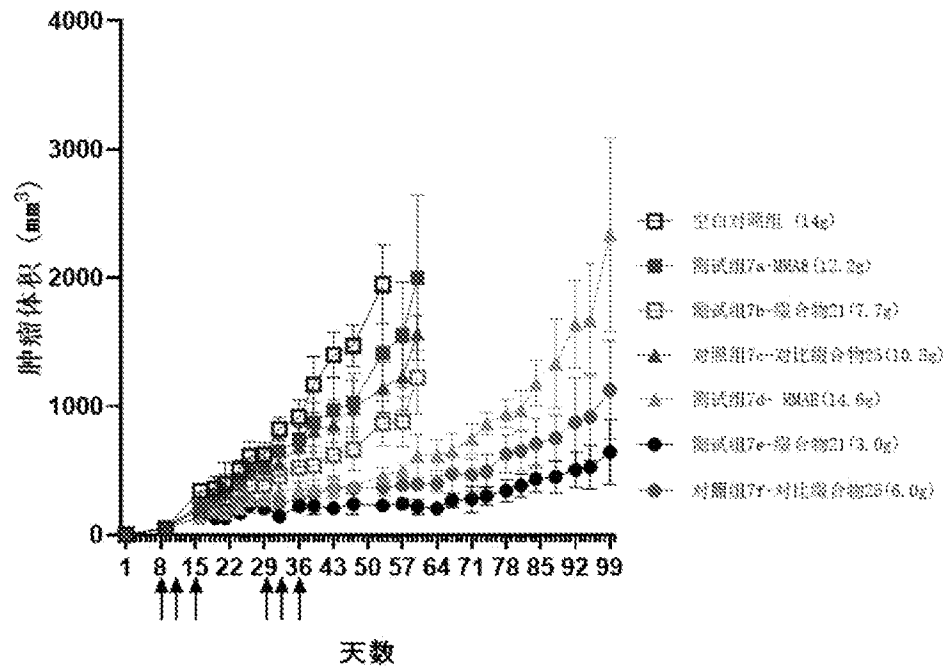


图 7

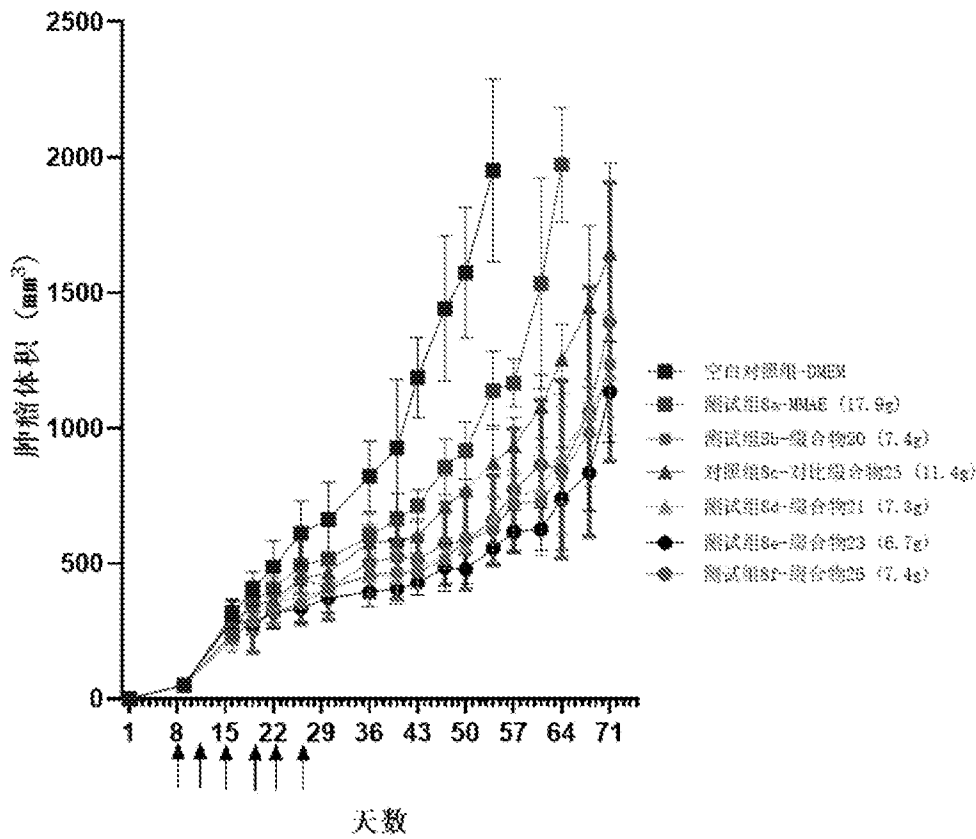


图 8

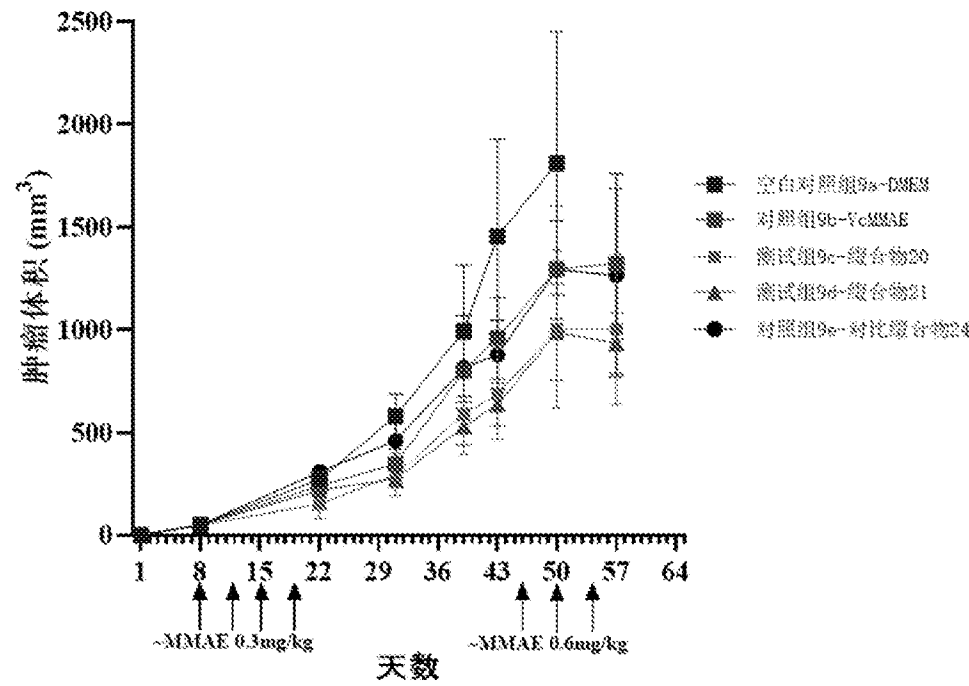


图 9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/088459

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 47/54(2017.01)i; C12N15/113(2010.01)i; A61K31/7088(2006.01)i; A61K31/713(2006.01)i;  
C07C237/06(2006.01)i; C07C229/24(2006.01)i; A61P19/06(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P35/04(2006.01)i;  
A61B8/08(2006.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K C12N C07C A61P A61B

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)

CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方, WANFANG; NCBI; EMBL; ISI Web of Science; 读秀学术, DUXIU ACADEMIC; Springer; STNext; 核苷酸, 诊断, 脑胶质瘤, 序列检索, sequence search, MMAE, Nucleotides, diagnostic, Glioma, Glioblastoma

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | CN 112390835 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 23 February 2021 (2021-02-23)<br>description paragraphs [0219]-[0224], [0359] | 1-50, 53              |
| A         | CN 110959011 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 03 April 2020 (2020-04-03)<br>claims 1-114                                    | 1-50, 53              |
| A         | CN 110075295 A (IMMUNOMEDICS INC.) 02 August 2019 (2019-08-02)<br>claims 1-24                                                     | 1-50, 53              |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
“D” document cited by the applicant in the international application  
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**20 July 2023**

Date of mailing of the international search report

**24 July 2023**

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,  
Beijing 100088**

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2023/088459**

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a. ☒ forming part of the international application as filed.
  - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2023/088459**

## 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.: **51, 52**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claims 51 and 52 relate to a method for treatment of tumors and tumor-related diseases or conditions, which is a disease diagnosis method practiced on a living human or animal body for the direct purpose of disease diagnosis, falls within diagnostic methods for treatment of the human or animal body, and falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which an international search is not required.
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/CN2023/088459**

| Patent document<br>cited in search report |           |   | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |             |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------|---|--------------------------------------|-------------------------|-------------|----|--------------------------------------|
| CN                                        | 112390835 | A | 23 February 2021                     | None                    |             |    |                                      |
| CN                                        | 110959011 | A | 03 April 2020                        | AU                      | 2018394875  | A1 | 09 April 2020                        |
|                                           |           |   |                                      | TW                      | 201929905   | A  | 01 August 2019                       |
|                                           |           |   |                                      | US                      | 2020338201  | A1 | 29 October 2020                      |
|                                           |           |   |                                      | US                      | 11633482    | B2 | 25 April 2023                        |
|                                           |           |   |                                      | JP                      | 2021509402  | A  | 25 March 2021                        |
|                                           |           |   |                                      | CA                      | 3087106     | A1 | 04 July 2019                         |
|                                           |           |   |                                      | ZA                      | 202003833   | B  | 26 January 2022                      |
|                                           |           |   |                                      | KR                      | 20200105812 | A  | 09 September 2020                    |
|                                           |           |   |                                      | EP                      | 3732185     | A1 | 04 November 2020                     |
|                                           |           |   |                                      | EP                      | 3732185     | A4 | 10 November 2021                     |
|                                           |           |   |                                      | RU                      | 2020121741  | A  | 01 February 2022                     |
|                                           |           |   |                                      | WO                      | 2019128611  | A1 | 04 July 2019                         |
| CN                                        | 110075295 | A | 02 August 2019                       | CA                      | 2914438     | A1 | 29 January 2015                      |
|                                           |           |   |                                      | CA                      | 2914438     | C  | 14 June 2022                         |
|                                           |           |   |                                      | AU                      | 2014293670  | A1 | 24 December 2015                     |
|                                           |           |   |                                      | AU                      | 2014293670  | B2 | 01 August 2019                       |
|                                           |           |   |                                      | EP                      | 3024460     | A2 | 01 June 2016                         |
|                                           |           |   |                                      | EP                      | 3024460     | A4 | 14 June 2017                         |
|                                           |           |   |                                      | EP                      | 3024460     | B1 | 22 July 2020                         |
|                                           |           |   |                                      | JP                      | 2016534092  | A  | 04 November 2016                     |
|                                           |           |   |                                      | JP                      | 6427789     | B2 | 28 November 2018                     |

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),  
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

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

3. 补充意见:

## 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： 51、52  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
权利要求51、52涉及一种肿瘤及肿瘤相关疾病或病症的治疗方法，是以有生命的人体或动物体为实施对象，以诊断疾病为直接目的的疾病的诊断方法，属于处置人体或动物体的诊断方法，属于PCT细则39.1(iv)中所列的无需进行国际检索的情形。
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

国际申请号

PCT/CN2023/088459

## A. 主题的分类

A61K 47/54(2017.01)i; C12N15/113(2010.01)i; A61K31/7088(2006.01)i; A61K31/713(2006.01)i;  
C07C237/06(2006.01)i; C07C229/24(2006.01)i; A61P19/06(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i;  
A61P35/04(2006.01)i; A61B8/08(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K C12N C07C A61P A61B

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))

CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方; NCBI; EMBL; ISI Web of Science; 读秀学术; Springer; STNext; 核苷酸, 诊断, 脑胶质瘤, 序列检索, MMAE, Nucleotides, diagnostic, Glioma, Glioblastoma

## 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 112390835 A (苏州瑞博生物技术股份有限公司) 2021年2月23日 (2021 - 02 - 23)  
说明书第[0219]-[0224]、[0359]段

1-50、53

A

CN 110959011 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2020年4月3日 (2020 - 04 - 03)  
权利要求1-114

1-50、53

A

CN 110075295 A (免疫医疗公司) 2019年8月2日 (2019 - 08 - 02)  
权利要求1-24

1-50、53

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2023年7月20日

国际检索报告邮寄日期

2023年7月24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

杨凤娇

电话号码 (+86) 0512-88995733

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/088459

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |             |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-----------|---|----------------|------|-------------|----|----------------|
| CN          | 112390835 | A | 2021年2月23日     | 无    |             |    |                |
| CN          | 110959011 | A | 2020年4月3日      | AU   | 2018394875  | A1 | 2020年4月9日      |
|             |           |   |                | TW   | 201929905   | A  | 2019年8月1日      |
|             |           |   |                | US   | 2020338201  | A1 | 2020年10月29日    |
|             |           |   |                | US   | 11633482    | B2 | 2023年4月25日     |
|             |           |   |                | JP   | 2021509402  | A  | 2021年3月25日     |
|             |           |   |                | CA   | 3087106     | A1 | 2019年7月4日      |
|             |           |   |                | ZA   | 202003833   | B  | 2022年1月26日     |
|             |           |   |                | KR   | 20200105812 | A  | 2020年9月9日      |
|             |           |   |                | EP   | 3732185     | A1 | 2020年11月4日     |
|             |           |   |                | EP   | 3732185     | A4 | 2021年11月10日    |
|             |           |   |                | RU   | 2020121741  | A  | 2022年2月1日      |
|             |           |   |                | WO   | 2019128611  | A1 | 2019年7月4日      |
| CN          | 110075295 | A | 2019年8月2日      | CA   | 2914438     | A1 | 2015年1月29日     |
|             |           |   |                | CA   | 2914438     | C  | 2022年6月14日     |
|             |           |   |                | AU   | 2014293670  | A1 | 2015年12月24日    |
|             |           |   |                | AU   | 2014293670  | B2 | 2019年8月1日      |
|             |           |   |                | EP   | 3024460     | A2 | 2016年6月1日      |
|             |           |   |                | EP   | 3024460     | A4 | 2017年6月14日     |
|             |           |   |                | EP   | 3024460     | B1 | 2020年7月22日     |
|             |           |   |                | JP   | 2016534092  | A  | 2016年11月4日     |
|             |           |   |                | JP   | 6427789     | B2 | 2018年11月28日    |