



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110741087 B

(45) 授权公告日 2024.05.14

(21) 申请号 201880038780.5

叶鑫

(22) 申请日 2018.04.10

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110741087 A

专利代理师 刘明海 周瑞

(43) 申请公布日 2020.01.31

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/484,247 2017.04.11 US

62/525,071 2017.06.26 US

(56) 对比文件

CN 101603042 A, 2009.12.16

CN 114340663 A, 2022.04.12

WO 2016077349 A1, 2016.05.19

WO 2018195165 A1, 2018.10.25

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/026918 2018.04.10

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/191278 EN 2018.10.18

张相宜 等. siRNA抗HBV感染领域中的化学修饰和体内传递研究进展.《药品评价》.2013,第9-13和41页.

Jayaprakash K. Nair 等. Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing.《Journal of the American Chemical Society》.2014,第16958 -16961页.

(73) 专利权人 阿布特斯生物制药公司
地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

审查员 吴颖

(72) 发明人 詹姆斯·海斯
理查德·J·霍兰德 亚当·贾奇
艾米·C·H·李 艾伦·D·马丁
尼古拉斯·迈克尔·斯尼德
埃米莉·P·悌 马克·伍德

权利要求书2页 说明书157页 附图1页

(54) 发明名称

靶向组合物

(57) 摘要

本发明提供某些核酸(例如,双链siRNA分子)以及包含靶向部分、双链siRNA和任意的连接基团的缀合物。某些实施方案还提供适用于制备所述缀合物的合成方法。所述缀合物可用于将治疗性双链siRNA靶向至肝脏并治疗包括肝炎(例如,乙型肝炎和丁型肝炎)的肝病。

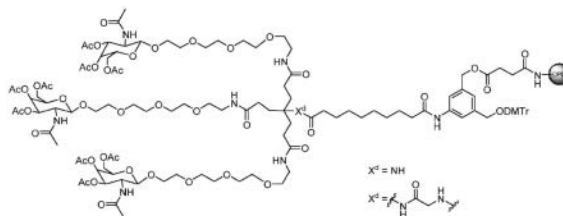
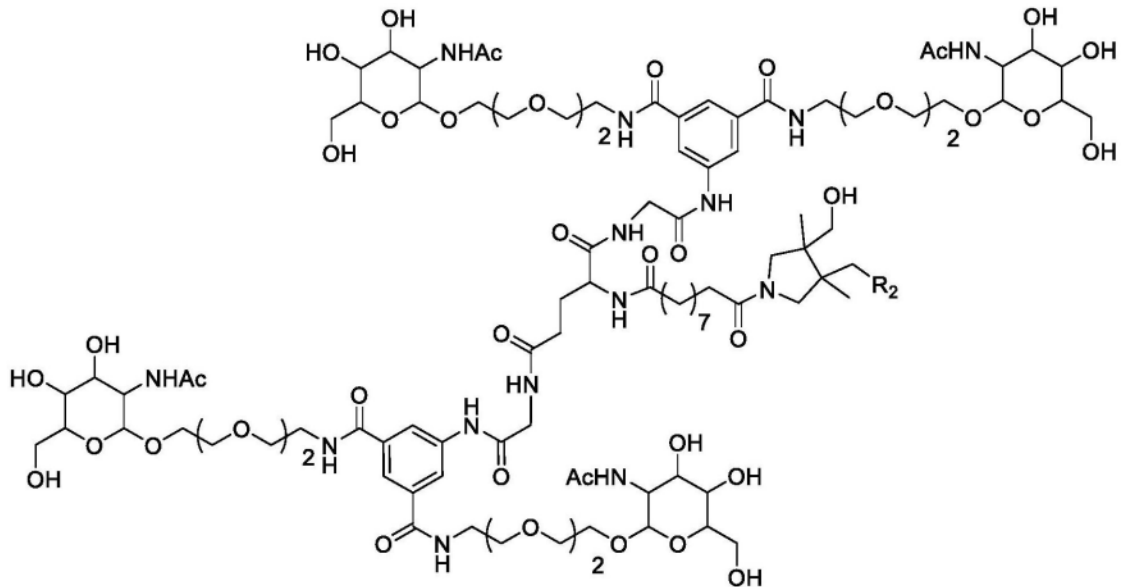


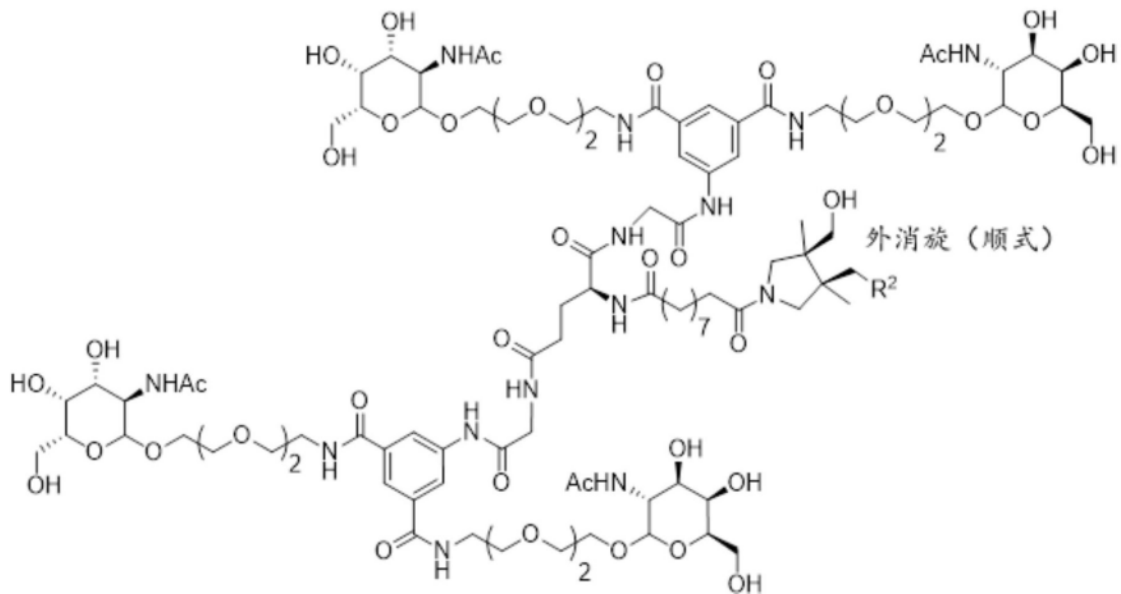
图 1: 式1e的中间体化合物, 其中靶向配体/接头结合至固相载体, 并且其中Pg¹是保护基团DMTr。

1. 一种化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物由下式表示:



其中 R^2 是双链siRNA分子。

2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物由下式表示:



其中 R^2 是双链siRNA分子。

3. 一种药物组合物,包含根据权利要求1或2所述的化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

4. 一种将siRNA递送到动物肝脏的组合物,包括根据权利要求1或2所述的化合物或其药学上可接受的盐。

5. 一种用于治疗动物乙型肝炎病毒感染的组合物,其包含根据权利要求1或2所述的化合物或其药学上可接受的盐。

6. 根据权利要求3-5中任一项的组合物,其中所述组合物经皮下施用。

7. 一种包含根据权利要求1或2所述的化合物或其药学上可接受的盐的组合物,用于动物的医学治疗。

8. 一种包含根据权利要求1或2所述的化合物或其药学上可接受的盐的组合物,用于动物乙型肝炎病毒感染的预防或治疗。

9. 根据权利要求1或2所述化合物或其药学上可接受的盐在制造用于治疗乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

靶向组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2017年6月26日提交的美国申请序列号62/525,071和2017年4月11日提交的美国申请序列号62/484,247的优先权权益,所述申请以引用的方式并入本文。

背景技术

[0003] 多种疾病是肝脏特异性的,例如乙型肝炎和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。因此,将有益的是具有可主要被靶向至活受试者的肝脏、肾脏、心脏、胰腺或其它器官的治疗性组合物。

[0004] 包括siRNA在内的核酸可用作治疗剂。

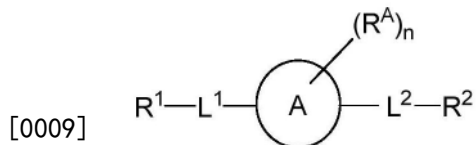
[0005] 当前需要可用于在活受试者中递送(例如,靶向)治疗性核酸(如双链siRNA)的组合物和方法。

发明内容

[0006] 本发明提供核酸分子(例如,治疗性双链siRNA分子)以及可用于将此类核酸靶向(例如至肝脏)的化合物、组合物和方法。

[0007] 因此,在一个方面,本发明提供了一种选自由以下组成的组的双链siRNA分子: siRNA1(SEQ ID NO:1和2)、2(SEQ ID NO:3和4)、3(SEQ ID NO:5和6)、4(SEQ ID NO:7和8)、5(SEQ ID NO:9和10)、6(SEQ ID NO:11和12)、7(SEQ ID NO:13和14)、8(SEQ ID NO:15和16)、9(SEQ ID NO:17和18)、10(SEQ ID NO:19和20)、11(SEQ ID NO:21和22)、12(SEQ ID NO:23和24)、13(SEQ ID NO:25和26)、14(SEQ ID NO:27和28)、15(SEQ ID NO:29和30)、16(SEQ ID NO:31和32)、17(SEQ ID NO:33和34)、18(SEQ ID NO:35和36)、19(SEQ ID NO:37和38)、20(SEQ ID NO:39和40)、21(SEQ ID NO:41和42)、22(SEQ ID NO:43和44)、23(SEQ ID NO:45和46)、24(SEQ ID NO:47和48)、25(SEQ ID NO:49和50)、26(SEQ ID NO:51和52)、27(SEQ ID NO:53和54)、28(SEQ ID NO:55和56)、29(SEQ ID NO:57和58)、30(SEQ ID NO:59和60)、31(SEQ ID NO:61和62)、32(SEQ ID NO:63和64)、33(SEQ ID NO:65和66)、34(SEQ ID NO:67和68)、35(SEQ ID NO:69和70)、36(SEQ ID NO:71和72)以及37(SEQ ID NO:73和74)。

[0008] 另一方面,本发明提供了一种式I的化合物



(I)

[0010] 或其盐,

[0011] 其中:

[0012] R¹是靶向配体;

- [0013] L^1 不存在或是连接基团；
- [0014] L^2 不存在或是连接基团；
- [0015] R^2 是选自表1的双链siRNA的双链siRNA分子；
- [0016] 环A不存在、是3-20元环烷基、5-20元芳基、5-20元杂芳基或3-20元杂环烷基；
- [0017] 每个 R^A 独立地选自自由以下组成的组：氢、羟基、CN、F、Cl、Br、I、 $-C_{1-2}$ 烷基-OR^B、 C_{1-10} 烷基 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基；其中 C_{1-10} 烷基 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代：卤基、羟基和 C_{1-3} 烷氧基；
- [0018] R^B 是氢、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键；并且
- [0019] n是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。
- [0020] 本发明的另一方面提供了包含本文所述的siRNA中的一种的GalNAc缀合物，所述缀合物不限于包含本文公开的配体-接头的缀合物。例如，本发明的一个方面提供了一种式X的GalNAc缀合物：
- [0021] A-B-C
- [0022] (X)
- [0023] 其中A是靶向配体；
- [0024] B是任选的接头；并且
- [0025] C是本文所述的siRNA分子。
- [0026] 本文所述的治疗性双链siRNA以及包含此类siRNA的化合物和组合物可用于治疗乙型肝炎病毒和乙型肝炎病毒/丁型肝炎病毒。
- [0027] 本发明还提供可用于制备式I的化合物的本文所公开的合成中间体和方案。
- [0028] 根据以下详述和附图，本发明的其它目的、特征和优点对于本领域的技术人员将是显而易见的。

附图说明

- [0029] 图1：说明式Ie的中间体化合物，其中靶向配体/接头键合至固相载体，并且其中 Pg^1 是保护基团DMTr。
- [0030] 图2：说明式Id的代表性化合物，其中靶向配体键合至固相载体，其共价键合有核酸。
- [0031] 图3：说明式Id的代表性化合物，其中靶向配体-核酸缀合物已从固相载体裂解并脱保护以提供式I的化合物。
- [0032] 在包括附图、实施例和方案在内的本申请中，应理解，寡核苷酸可为如表1所述的双链siRNA分子。

具体实施方式

- [0033] 除非另有说明，否则如本文所用，以下术语具有归于其的含义。
- [0034] 如本文所用的术语“缀合物”包括包含连接至靶向配体的寡核苷酸（例如，siRNA分子）的式(I)化合物。因此，术语化合物和缀合物在本文中可互换使用。
- [0035] 如本文所用的术语“小干扰RNA”或“siRNA”是指双链RNA（即双链体RNA），所述

siRNA当其与靶基因或序列在相同的细胞中时能够减少或抑制靶基因或序列的表达(例如,通过介导与siRNA序列互补的mRNA的降解或抑制所述mRNA的翻译)。siRNA与靶基因或序列可具有基本或完全的同源性,或者可包含错配区(即错配基序)。在某些实施方案中,siRNA可为约19-25(双链体)个核苷酸长,并且优选为约20-24、21-22或21-23(双链体)个核苷酸长。siRNA双链体可包含约1至约4个核苷酸或约2至约3个核苷酸的3'突出端和5'磷酸末端。siRNA的实例包括但不限于由两个单独的链分子组装的双链多核苷酸分子,其中一条链是有义链且另一条链是互补反义链。

[0036] 在某些实施方案中,siRNA的一条链或两条链上的5'和/或3'突出端包含与靶序列(例如,反义链中的3'突出端)或其互补链(例如,有义链中的3'突出端)具有互补性的1-4个(例如,1、2、3或4个)修饰和/或未修饰的脱氧胸苷(t或dT)核苷酸、1-4个(例如,1、2、3或4个)修饰(例如,2'OMe)和/或未修饰的尿苷(U)核糖核苷酸和/或1-4个(例如,1、2、3或4个)修饰(例如,2'OMe)和/或未修饰的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。

[0037] 优选地,siRNA是化学合成的。siRNA还可通过用大肠杆菌(*E. coli*) RNA酶III或Dicer裂解较长的dsRNA(例如,长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来产生。这些酶将dsRNA加工成生物活性siRNA(例如参见, Yang等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002); Calegari等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002); Byrom等人, *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki等人, *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003); Knight等人, *Science*, 293:2269-2271 (2001); 以及Robertson等人, *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968))。优选地, dsRNA为至少50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸长。dsRNA的长度可长至1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可编码完整的基因转录物或部分基因转录物。在某些情况下, siRNA可由质粒编码(例如, 转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列)。

[0038] 短语“抑制靶基因的表达”是指本发明的siRNA沉默、减少或抑制靶基因的表达的能力。为检查基因沉默的程度, 使测试样品(例如, 来自表达靶基因的目标生物体的生物样品或表达靶基因的培养细胞的样品)与沉默、减少或抑制靶基因的表达的siRNA接触。将靶基因在测试样品中的表达与靶基因在不与siRNA接触的对照样品(例如, 如来自表达靶基因的目标生物体的生物样品或表达靶基因的培养细胞的样品)中的表达进行比较。对照样品(例如, 表达靶基因的样品)可赋予值100%。在特定实施方案中, 当相对于对照样品(例如, 仅缓冲液, 靶向不同基因的siRNA序列、乱序siRNA序列等)测试样品的值为约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时, 可实现靶基因表达的沉默、抑制或减少。适合的测定包括但不限于使用本领域技术人员已知的技术来检查蛋白质或mRNA水平, 所述技术例如像本领域的技术人员已知的点印迹、RNA印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及表型测定。

[0039] 术语“合成活化基团”是指可连接至原子以活化所述原子从而允许其与另一反应性基团形成共价键的基团。应理解, 合成活化基团的性质可取决于其所活化的原子。例如, 当使合成活化基团连接至氧原子时, 合成活化基团是将活化所述氧原子以与另一反应性基团形成键(例如, 酯键、氨基甲酸酯键或醚键)的基团。此类合成活化基团是已知的。可连接

至氧原子的合成活化基团的实例包括但不限于乙酸根、琥珀酸根、三氟甲磺酸根和甲磺酸根。当合成活化基团连接至羧酸的氧原子时,合成活化基团可为可从已知的偶联试剂(例如,已知的酰胺偶联试剂)衍生的基团。此类偶联试剂是已知的。此类偶联试剂的实例包括但不限于N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、羟基苯并三唑(HOBt)、碳酸N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙酯(EDC)、六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷(BOP)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBOP)或六氟磷酸O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓(HBTU)。

[0040] 治疗性核酸(如siRNA)的“有效量”或“治疗有效量”是足以产生所需效应(例如与在不存在siRNA时检测到的正常表达水平相比,靶序列的表达的抑制)的量。在特定实施方案中,当相对于对照(例如,仅缓冲液,靶向不同基因的siRNA序列、乱序siRNA序列等)用siRNA获得的值为约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时,实现靶基因或靶序列表达的抑制。用于测量靶基因或靶序列的表达的适合的测定包括但不限于使用本领域的技术人员已知的技术来检查蛋白质或mRNA水平,所述技术例如像本领域的技术人员已知的点印迹、RNA印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及表型测定。

[0041] 如本文所用的术语“核酸”是指呈单链或双链形式的含有至少两个核苷酸(即脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合物,并且包括DNA和RNA。“核苷酸”含有糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基团。核苷酸通过磷酸酯基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,其还包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及包括但不限于放置新的反应性基团(如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯和烷基卤)的修饰的嘌呤和嘧啶的合成衍生物。核酸包括含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键联的核酸,其是合成的、天然存在的和非天然存在的,并且其具有与参考核酸类似的结合性质。此类类似物和/或修饰的残基的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性-磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。另外,核酸可包括一个或多个UNA部分。

[0042] 术语“核酸”包括任何寡核苷酸或多核苷酸,其中含有至多60个核苷酸的片段通常称为寡核苷酸,并且更长的片段称为多核苷酸。脱氧核糖寡核苷酸由以下组成:称为脱氧核糖的5-碳糖在此糖的5'和3'碳处与磷酸共价连结以形成交替的无支链聚合物。DNA可呈如反义分子、质粒DNA、预凝聚DNA、PCR产物、载体、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些基团的衍生物和组合的形式。核糖寡核苷酸由类似的重复结构组成,其中5-碳糖是核糖。RNA可呈(例如)小干扰RNA(siRNA)、Dicer-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)及其组合的形式。因此,在本发明的上下文中,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指由天然存在的碱基、糖和糖间(骨架)键联组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或寡聚物。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还包括包含非天然存在的单体或其部分的聚合物或寡聚物,其功能类似。此类修饰的或取代的寡核苷酸由于以下性质而通常优于天然形式,所述性质例如像增强的细胞摄取、降低的免疫原性和在核酸酶存在下增加的稳定性。

[0043] 除非另外指示,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密

码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指示的序列。具体而言,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.,260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8:91-98(1994))。

[0044] 术语“基因”是指包含产生多肽或前体多肽所必需的部分长度或全长编码序列的核酸(例如,DNA或RNA)序列。

[0045] 如本文所用的“基因产物”是指诸如RNA转录物或多肽的基因产物。

[0046] 除非另有说明,否则如本文所用的术语“烷基”本身或作为另一取代基的一部分意指具有指定碳原子数的直链或支链烃基团(即 C_{1-8} 意指1至8个碳)。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基等。术语“烯基”是指具有一个或多个双键的不饱和烷基。类似地,术语“炔基”是指具有一个或多个三键的不饱和烷基。此类不饱和烷基的实例包括乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-和3-丙炔基、3-丁炔基以及更高级的同系物和异构体。

[0047] 术语“亚烷基”本身或作为另一取代基的一部分意指衍生自烷烃(包括直链和支链烷烃)的二价基团,如通过 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 和 $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$ 所例示。

[0048] 术语“环烷基”、“碳环的”或“碳环”是指烃环体系,其具有3-20个环原子总数(例如,3-20元环烷基是具有3-20个环原子的环烷基,或 C_{3-20} 环烷基为具有3-20个碳环原子的环烷基),并且对于3-5元环烷基是完全饱和的或在环顶点之间具有不超过一个双键和对于6元环烷基或更大的是完全饱和的或在环顶点之间具有不超过两个双键。如本文所用,“环烷基”、“碳环的”或“碳环”还意指双环、多环和螺环烃环体系,例如像双环[2.2.1]庚烷、蒎烷、双环[2.2.2]辛烷、金刚烷、降冰片烯、螺环 C_{5-12} 烷烃等。如本文所用,术语“烯基”、“炔基”、“环烷基”、“碳环”和“碳环的”意指包括其单重和多重卤化变体。

[0049] 术语“杂环烷基”、“杂环的”或“杂环”是指含有1至10个选自N、O和S的杂原子且总共具有3-20个环原子的饱和或部分不饱和的环体系基团(例如,3-20元杂环烷基是具有3-20个环原子的杂环烷基, C_{2-19} 杂环烷基是具有3-10个环原子且2-19个环原子为碳的杂环烷基),其中氮和硫原子任选地被氧化,氮原子任选地被季铵化作为环原子。除非另有说明,否则“杂环烷基”、“杂环的”或“杂环”环可为单环、双环、螺环或多环体系。“杂环烷基”、“杂环的”或“杂环”环的非限制性实例包括吡咯烷、哌啶、N-甲基哌啶、咪唑烷、吡唑烷、丁内酰胺、戊内酰胺、咪唑烷酮、乙内酰脲、二氧戊环、邻苯二甲酰亚胺、哌啶、嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮、1,4-二噁烷、吗啉、硫代吗啉、硫代吗啉-S-氧化物、硫代吗啉-S,S-氧化物、哌嗪、吡喃、吡啶酮、3-吡咯啉、噻喃、吡喃酮、四氢呋喃、四氢噻吩、奎宁环、莨菪烷、2-氮杂螺[3.3]庚烷、(1R,5S)-3-氮杂双环[3.2.1]辛烷、(1s,4s)-2-氮杂双环[2.2.2]辛烷、(1R,4R)-2-氧杂-5-氮杂双环[2.2.2]辛烷等。“杂环烷基”、“杂环的”或“杂环”基团可通过一个或多个环碳或杂原子连接至分子的其余部分。“杂环烷基”、“杂环的”或“杂环”可包括其单重和多重卤化变体。

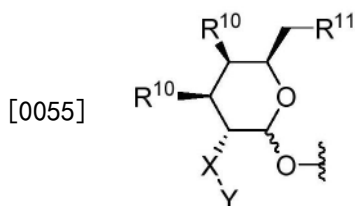
[0050] 术语“烷氧基”和“烷硫基”以其常规意义使用且是指经由氧原子(“氧基”)或硫基连接至分子其余部分的那些烷基,并且还包括其单重和多重卤化变体。

[0051] 除非另有说明,否则术语“卤基”或“卤素”本身或作为另一取代基的一部分意指氟、氯、溴或碘原子。术语“(卤代)烷基”意指包括“烷基”和“卤代烷基”取代基。另外,术语“卤代烷基”意指包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如,术语“C₁₋₄卤代烷基”意指包括三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基、二氟甲基等。

[0052] 术语“芳基”意指具有6-14个碳原子的碳环芳族基团,无论是否与一个或多个基团稠合。除非另有说明,否则芳基的实例包括苯基、萘基、联苯基等。

[0053] 术语“杂芳基”是指含有1至5个选自N、O和S的杂原子的芳基环,其中氮和硫原子任选地被氧化,并且氮原子任选地被季铵化。杂芳基可通过杂原子连接至分子的其余部分。杂芳基的实例包括吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基、喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、酞嗪基、苯并三嗪基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、异苯并呋喃基、异吡啶基、吡啶基、苯并三嗪基、噻吩并吡啶基、噻吩并嘧啶基、吡唑并嘧啶基、咪唑并吡啶、苯并噻唑基(benzothiazolyl)、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、异噻唑基、吡唑基、吡啶基、蝶啶基、咪唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、吡咯基、噻唑基、呋喃基、噻吩基等。

[0054] 术语糖包括单糖、二糖和三糖。所述术语包括葡萄糖、蔗糖果糖、半乳糖和核糖,以及脱氧糖(如脱氧核糖)和氨基糖(如半乳糖胺)。糖衍生物可方便地如国际专利申请公布号WO 96/34005和97/03995中所述来制备。糖可通过醚键、硫醚键(例如,S-糖苷)、胺氮(例如,N-糖苷)或碳-碳键(例如,C-糖苷)方便地连接至式I的化合物的剩余部分。在一个实施方案中,糖可通过醚键方便地连接至式I的化合物的其余部分。在一个实施方案中,术语糖包括下式的基团:



[0056] 其中:

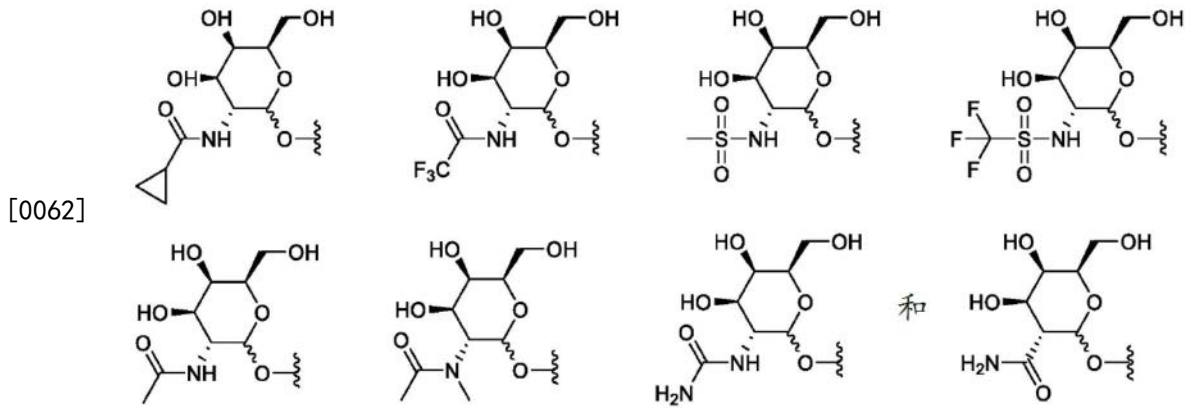
[0057] X是NR³并且Y选自-(C=O)R⁴、-SO₂R⁵和-(C=O)NR⁶R⁷;或者X是-(C=O)-并且Y是NR⁸R⁹;

[0058] R³是氢或(C₁-C₄)烷基;

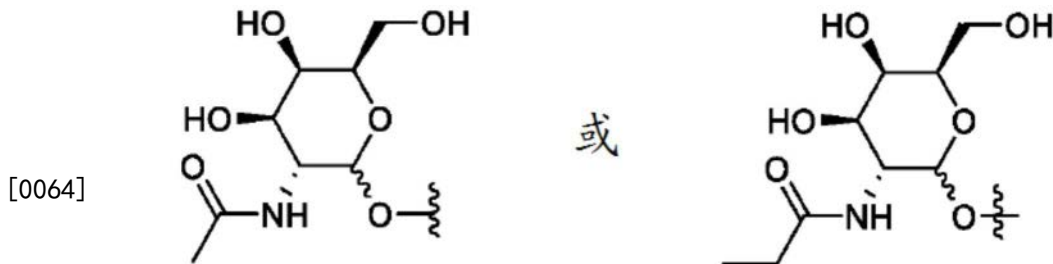
[0059] R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸和R⁹各自独立地选自由以下组成的组:氢、(C₁-C₈)烷基、(C₁-C₈)卤代烷基、(C₁-C₈)烷氧基和(C₃-C₆)环烷基,所述(C₃-C₆)环烷基任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组的基团取代:卤基、(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)卤代烷基、(C₁-C₄)烷氧基和(C₁-C₄)卤代烷氧基;

[0060] R¹⁰是-OH、-NR⁸R⁹或-F;并且

[0061] R¹¹是-OH、-NR⁸R⁹、-F或任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组的基团取代的5元杂环:卤基、羟基、羧基、氨基、(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)卤代烷基、(C₁-C₄)烷氧基和(C₁-C₄)卤代烷氧基。在另一实施方案中,糖可选自由以下组成的组:



[0063] 在另一个实施方案中,糖可为:



N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)

GalPro。

[0065] 术语“动物”包括哺乳动物物种,如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、牲畜等。

[0066] 术语“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯且特征在于不溶于水但可溶于许多有机溶剂中。它们通常分成至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“化合物脂质”,其包括磷脂和糖脂;和(3)“衍生的脂质”,如类固醇。

[0067] 术语“脂质粒子”包括可用于将治疗性核酸(例如,siRNA)递送至目标靶位点(例如,细胞、组织、器官等)的脂质制剂。在优选实施方案中,本发明的脂质粒子是核酸-脂质粒子,其通常由防止粒子聚集的阳离子脂质、非阳离子脂质(例如,磷脂)、缀合的脂质(例如,PEG-脂质)和任选的胆固醇形成。通常,治疗性核酸(例如,siRNA)可囊封在粒子的脂质部分中,从而保护其免受酶降解。

[0068] 术语“电子致密核心”当用于阐述本发明的脂质粒子时是指当使用低温透射电子显微术(“cryoTEM”)可视化时脂质粒子内部部分的黑色外观。本发明的一些脂质粒子具有电子致密核心并且缺乏脂质双层结构。本发明的一些脂质粒子具有电子致密核心,缺乏脂质双层结构,并且具有倒六角形或立方相结构。虽然不希望受理论束缚,但认为非双层脂质填充提供在内部具有水和核的脂质圆柱体的三维网络,即基本上与含有核酸的水性通道互相渗透的脂质液滴。

[0069] 如本文所用,术语“SNALP”是指稳定的核酸-脂质粒子。SNALP是由脂质(例如,防止粒子聚集的阳离子脂质、非阳离子脂质和缀合的脂质)制成的粒子,其中核酸(例如,siRNA)完全囊封在脂质内。在某些情况下,SNALP对于全身施加是极其有用的,因为其可在静脉内(i.v.)注射后展现延长的循环寿命,其可在远端位点(例如,与施用位点物理分离的位点)集聚并且其可介导在这些远端位点处的siRNA表达。核酸可与缩合剂复合并且囊封在如PCT公布号W0 00/03683中所述的SNALP内,所述公布的公开内容出于所有目的以引用的方式整

体并入本文。

[0070] 本发明的脂质粒子(例如,SNALP)通常具有如下的平均直径:约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm,或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm,并且基本上是无毒的。另外,核酸当存在于本发明的脂质粒子中时,在水溶液中对核酸酶的降解具有抗性。核酸-脂质粒子和其制备方法公开于例如美国专利公布号20040142025和20070042031中,所述公布的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0071] 如本文所用,“脂质囊封的”可指以完全囊封、部分囊封或二者提供治疗性核酸(如siRNA)的脂质粒子。在优选实施方案中,核酸(例如,siRNA)完全囊封于脂质粒子中(例如,以形成SNALP或其它核酸-脂质粒子)。

[0072] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质粒子聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物,例如,如偶联至二烷基氧基丙基的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、偶联至磷脂酰乙醇胺的PEG和偶联至神经酰胺的PEG(参见例如美国专利号5,885,613)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺寡聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)及其混合物。在PCT公布号WO 2010/006282中描述了POZ-脂质缀合物的其它实例。PEG或POZ可直接缀合至脂质,或可经由接头部分连接至脂质。可使用适于将PEG或POZ偶联至脂质的任何接头部分,包括例如含非酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选实施方案中,使用含非酯的接头部分,如酰胺或氨基甲酸酯。上述专利文件中的每一者的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0073] 术语“两亲性脂质”部分地指其中脂质材料的疏水性部分向疏水相定向,而亲水性部分朝水相定向的任何适合材料。亲水性特征源自极性 or 带电基团(如碳水化合物、磷酸根、羧酸根、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基和其它类似基团)的存在。疏水性可通过纳入非极性基团来赋予,所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂族烃基团和被一个或多个芳族、环脂族或杂环基团取代的此类基团。两亲性化合物的实例包括但不限于磷脂、氨脂质和鞘脂。

[0074] 磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱和二甲油酰磷脂酰胆碱。其它缺乏磷的化合物(如鞘脂、糖鞘脂家族、二酰甘油和 β -酰氧基酸)也在称为两亲性脂质的组内。另外,上述两亲性脂质可与其它脂质(包括甘油三酯和固醇)混合。

[0075] 术语“中性脂质”是指在所选pH下以不带电荷或中性两性离子形式存在的多种脂质物质中的任一者。在生理pH下,此类脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0076] 术语“非阳离子脂质”是指任何两亲性脂质以及任何其它中性脂质或阴离子脂质。

[0077] 术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N-琥

珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)和连结至中性脂质的其它阴离子修饰基团。

[0078] 术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物,所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂族烃基团和任选地被一个或多个芳族、环脂族或杂环基团取代的此类基团。适合的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰基氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0079] 术语“阳离子脂质”和“氨基脂质”在本文中可互换使用,以包括具有一个、两个、三个或更多个脂肪酸或脂肪烷基链和pH可滴定氨基头部基团(例如,烷基氨基或二烷基氨基头部基团)的那些脂质及其盐。阳离子脂质在低于阳离子脂质的 pK_a 的pH下通常被质子化(即带正电荷),并且在高于 pK_a 的pH下基本上是中性的。本发明的阳离子脂质还可称为可滴定的阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质包含:可质子化的叔胺(例如,pH可滴定的)头部基团; C_{18} 烷基链,其中每条烷基链独立地具有0至3个(例如,0、1、2或3个)双键;以及头部基团与烷基链之间的醚、酯或缩酮键联。此类阳离子脂质包括但不限于DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA(还称为DLin-C2K-DMA、XTC2和C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-C2K-DMA、 γ -DLin-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA(还称为MC2)、DLin-M-C3-DMA(还称为MC3)和(DLin-MP-DMA)(还称为1-B11)。

[0080] 术语“烷基氨基”包括式-N(H)R的基团,其中R是如本文所定义的烷基。

[0081] 术语“二烷基氨基”包括式-NR₂的基团,其中每个R独立地是如本文所定义的烷基。

[0082] 术语“盐”包括任何阴离子和阳离子复合物,如在阳离子脂质与一个或多个阴离子之间形成的复合物。阴离子的非限制性实例包括无机阴离子和有机阴离子,例如,氢离子、氟离子、氯离子、溴离子、碘离子、草酸根(例如,半草酸根)、磷酸根、磷酸根、磷酸氢根、磷酸二氢根、氧化物、碳酸根、碳酸氢根、硝酸根、亚硝酸根、氮化物、亚硫酸氢根、硫化物、亚硫酸根、硫酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根、硫酸氢根、硼酸根、甲酸根、乙酸根、苯甲酸根、柠檬酸根、酒石酸根、乳酸根、丙烯酸根、聚丙烯酸根、富马酸根、马来酸根、衣康酸根、乙醇酸根、葡萄糖酸根、苹果酸根、扁桃酸根、惕各酸根、抗坏血酸根、水杨酸根、聚甲基丙烯酸根、过氯酸根、氯酸根、亚氯酸根、次氯酸根、溴酸根、次溴酸根、碘酸根、烷基磺酸根、芳基磺酸根、砷酸根、亚砷酸根、铬酸根、重铬酸根、氰化物、氰酸根、硫代氰酸根、氢氧根、过氧根、高锰酸根及其混合物。在特定实施方案中,本文公开的阳离子脂质的盐是结晶盐。

[0083] 术语“酰基”包括任何烷基、烯基或炔基,其中连接点处的碳被氧代基取代,如下所定义。以下是酰基的非限制性实例:-C(=O)烷基、-C(=O)烯基和-C(=O)炔基。

[0084] 术语“促融的”是指脂质粒子(如SNALP)与细胞膜融合的能力。膜可为质膜或围绕细胞器(例如胞内体、细胞核等)的膜。

[0085] 如本文所用,术语“水溶液”是指全部或部分地包含水的组合物。

[0086] 如本文所用,术语“有机脂质溶液”是指全部或部分地包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0087] 如本文所用的“远端位点”是指物理上分离的位点,其不限于毗邻的微血管床,但包括广泛分布于整个生物体内的位点。

[0088] “血清稳定的”关于核酸-脂质粒子(如SNALP)意指在暴露于将显著降解游离DNA或RNA的血清或核酸酶测定之后,粒子不显著降解。适合的测定包括例如标准血清测定、DNA酶

测定或RNA酶测定。

[0089] 如本文所用的“全身递送”是指递送脂质粒子从而使得诸如siRNA的活性剂在生物体内的广泛生物分布。一些施用技术可引起某些剂而非其它剂的全身递送。全身递送意指有用量、优选治疗量的剂暴露于身体的大部分。为获得广泛的生物分布,通常需要一定的血液寿命,以使得剂在到达施用位点远端的疾病部位之前不会迅速降解或清除(如通过第一代代谢器官(first pass organ)(肝脏、肺等)或通过快速、非特异性细胞结合)。脂质粒子的全身递送可通过本领域中已知的任何方式进行,所述方式包括例如静脉内、皮下和腹膜内。在优选实施方案中,脂质粒子的全身递送是通过静脉内递送进行。

[0090] 如本文所用的“局部递送”是指将活性剂(如siRNA)直接递送至生物体内的靶位点。例如,剂可通过直接注射至疾病部位、其它靶位点或靶器官(如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等)来局部递送。

[0091] 当本文用于阐述脂质:siRNA的比率时,术语“脂质”是指粒子中的总脂质。

[0092] 本领域的技术人员将会了解,具有手性中心的本发明化合物可以光学活性和外消旋形式存在和分离。一些化合物可能展现多态性。应理解,本发明涵盖本发明化合物的任何外消旋、光学活性、多晶型或立体异构形式或其混合物,其具有本文所述的有用性质,本领域中众所周知如何制备光学活性形式(例如,通过重结晶技术拆分外消旋形式、通过从光学活性起始材料合成、通过手性合成或通过使用手性固定相的色谱分离)。

[0093] 当本文的化合物式中的键以非立体化学方式(例如,平面)绘制时,所述键所连接的原子包括所有立体化学可能性。除非另外特别指出,否则当本文的化合物式中的键以限定的立体化学方式(例如,粗体、粗体-楔形、虚线或虚线-楔形)绘制时,应理解,立体化学键所连接的原子在所描绘的绝对立体异构体中得以富集。在一个实施方案中,化合物可为至少51%所描绘的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可为至少60%所描绘的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可为至少80%所描绘的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可为至少90%所描绘的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可为至少95%所描绘的绝对立体异构体。在另一实施方案中,化合物可为至少99%所描绘的绝对立体异构体。

[0094] 除非本文另有说明,否则术语“约”在与数值或数值范围一起使用时意指所述数值或值范围的加或减5%。

[0095] 产生siRNA分子

[0096] siRNA可以若干种形式提供,包括例如以一个或多个分离的小干扰RNA(siRNA)双链体的形式、以较长双链RNA(dsRNA)的形式或以从DNA质粒中的转录盒转录的siRNA或dsRNA形式。在一些实施方案中,siRNA可以酶促方式产生或通过部分/全部有机合成产生,并且修饰的核糖核苷酸可通过体外酶促或有机合成引入。在某些情况下,每条链是以化学方式制备的。合成RNA分子的方法在本领域中是已知的,例如如Verma和Eckstein(1998)中所述或如本文所述的化学合成方法。

[0097] 用于分离RNA、合成RNA、使核酸杂交、制备和筛选cDNA文库以及实施PCR的方法在本领域中是众所周知的(参见例如Gubler和Hoffman, Gene, 25:263-269(1983); Sambrook等人,同上; Ausubel等人,同上), PCR方法也是众所周知的(参见,美国专利号4,683,195和4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人,编辑,

1990))。表达文库也是本领域的技术人员众所周知的。公开用于本发明的一般方法的另外基本文本包括Sambrook等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人, 编辑, 1994)。出于所有目的, 这些参考文献的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0098] 通常, siRNA以化学方式合成。包含本发明的siRNA分子的寡核苷酸可使用本领域中已知的多种技术中的任一种来合成, 如在Us man等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe等人, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott等人, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995) 和 Wincott等人, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997) 中所描述的那些。寡核苷酸的合成利用常见的核酸保护和偶联基团, 如5' -端处的二甲氧基三苯甲基和3' -端处的亚磷酰胺。作为非限制性实例, 可使用0.2 μ mol规模的方案在Applied Biosystems合成仪上实施小规模合成。或者, 可在来自Protogene (Palo Alto, CA) 的96孔板合成仪上实施0.2 μ mol规模的合成。然而, 更大或更小规模的合成也在本发明的范围内。用于寡核苷酸合成的适合试剂、用于RNA脱保护的方法和用于RNA纯化的方法为本领域的技术人员已知。

[0099] siRNA分子可由两种不同的寡核苷酸组装而成, 其中一种寡核苷酸包含siRNA的有义链且另一种包含反义链。例如, 每条链可分开合成并在合成和/或脱保护之后通过杂交或连接连结在一起。

[0100] 本发明的实施方案

[0101] 实施例25中的表1描述靶向乙型肝炎病毒(缩写为“HBV”)的一系列化学修饰的siRNA双链体(所显示的有义链和反义链)。如本文所述, 本发明的化合物可包含这种siRNA(即siRNA 1-37)。

[0102] 因此, 本发明的一个方面是选自由以下组成的组的核酸分子: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71以及SEQ ID NO:73。

[0103] 本发明的另一方面是选自由以下组成的组的核酸分子: SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:72以及SEQ ID NO:74。

[0104] 本发明的一个方面是包含本文所述的核酸分子或其组合的组合物。

[0105] 本发明的一个方面提供选自由以下组成的组的双链siRNA分子: siRNA 1 (SEQ ID NO:1和2)、2 (SEQ ID NO:3和4)、3 (SEQ ID NO:5和6)、4 (SEQ ID NO:7和8)、5 (SEQ ID NO:9

和10)、6 (SEQ ID NO:11和12)、7 (SEQ ID NO:13和14)、8 (SEQ ID NO:15和16)、9 (SEQ ID NO:17和18)、10 (SEQ ID NO:19和20)、11 (SEQ ID NO:21和22)、12 (SEQ ID NO:23和24)、13 (SEQ ID NO:25和26)、14 (SEQ ID NO:27和28)、15 (SEQ ID NO:29和30)、16 (SEQ ID NO:31和32)、17 (SEQ ID NO:33和34)、18 (SEQ ID NO:35和36)、19 (SEQ ID NO:37和38)、20 (SEQ ID NO:39和40)、21 (SEQ ID NO:41和42)、22 (SEQ ID NO:43和44)、23 (SEQ ID NO:45和46)、24 (SEQ ID NO:47和48)、25 (SEQ ID NO:49和50)、26 (SEQ ID NO:51和52)、27 (SEQ ID NO:53和54)、28 (SEQ ID NO:55和56)、29 (SEQ ID NO:57和58)、30 (SEQ ID NO:59和60)、31 (SEQ ID NO:61和62)、32 (SEQ ID NO:63和64)、33 (SEQ ID NO:65和66)、34 (SEQ ID NO:67和68)、35 (SEQ ID NO:69和70)、36 (SEQ ID NO:71和72) 和37 (SEQ ID NO:73和74)。

[0106] 本发明的另一方面提供包含本文所述的双链siRNA分子的组合物。

[0107] 在一个实施方案中,所述组合物是包含药学上可接受的载体的药物组合物。

[0108] 本发明的一个方面是如发明内容中所阐述的式I的化合物,或其盐。

[0109] 在式I的化合物的一个实施方案中, R^1 是靶向配体;

[0110] L^1 不存在或是连接基团;

[0111] L^2 不存在或是连接基团;

[0112] R^2 是选自表1的双链siRNA的双链siRNA分子;

[0113] 环A不存在、是3-20元环烷基、5-20元芳基、5-20元杂芳基或3-20元杂环烷基;

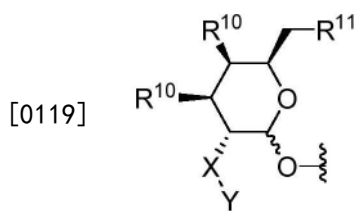
[0114] 每个 R^A 独立地选自由以下组成的组:氢、羟基、CN、F、Cl、Br、I、 $-C_{1-2}$ 烷基- OR^B 和 C_{1-8} 烷基,所述 C_{1-8} 烷基任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代:卤基、羟基和 C_{1-3} 烷氧基;

[0115] R^B 是氢、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键;并且

[0116] n是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0117] 在一个实施方案中, R^1 是 $-C(H)_{(3-p)}(L^3-糖)_p$,其中每个 L^3 独立地是连接基团;p是1、2或3;并且糖是单糖或二糖。

[0118] 在一个实施方案中,糖是:



[0120] 或其盐,

[0121] 其中:

[0122] X是 NR^3 ,并且Y选自 $-(C=O)R^4$ 、 $-SO_2R^5$ 和 $-(C=O)NR^6R^7$;或者X是 $-(C=O)-$ 并且Y是 NR^8R^9 ;

[0123] R^3 是氢或 (C_1-C_4) 烷基;

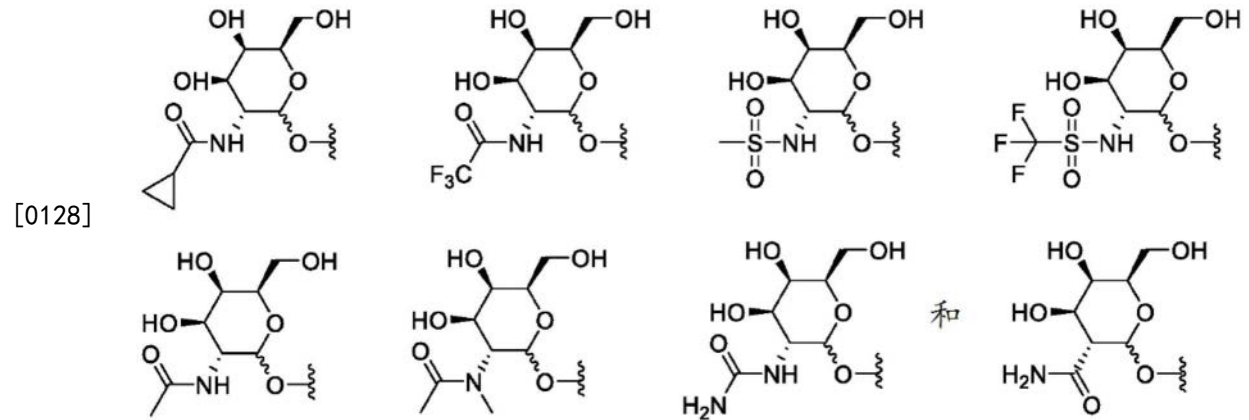
[0124] R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自独立地选自由以下组成的组:氢、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_1-C_8) 卤代烷基、 (C_1-C_8) 烷氧基和 (C_3-C_6) 环烷基,所述 (C_3-C_6) 环烷基任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组的基团取代:卤基、 (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 卤代烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基和 $(C_1-$

C₄) 卤代烷氧基;

[0125] R¹⁰是-OH、-NR⁸R⁹或-F;并且

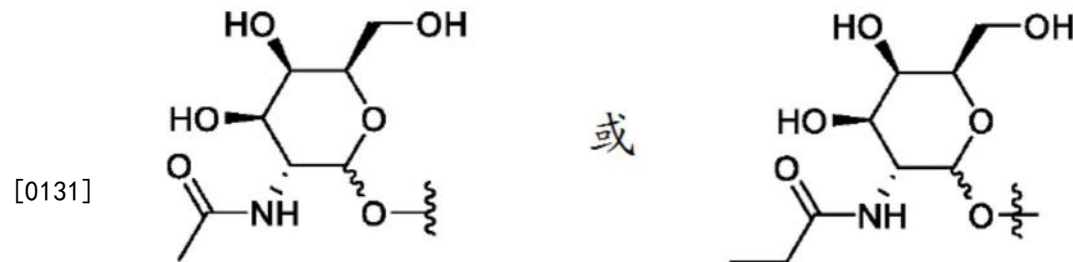
[0126] R¹¹是-OH、-NR⁸R⁹、-F或5元杂环,所述5元杂环任选地被一个或多个独立地选自自由以下组成的组的基团取代:卤基、羟基、羧基、氨基、(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)卤代烷基、(C₁-C₄)烷氧基和(C₁-C₄)卤代烷氧基。

[0127] 在一个实施方案中,糖选自自由以下组成的组:



[0129] 及其盐。

[0130] 在一个实施方案中,糖是:



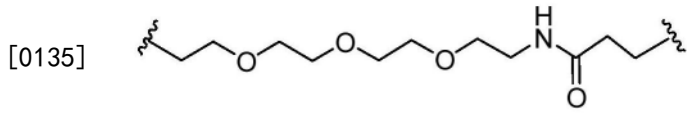
N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)

GalPro

[0132] 在一个实施方案中,每个L³独立地是具有0至50个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中烃链中的一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-、-NR^X-、-NR^X-C(=O)-、-C(=O)-NR^X-或-S-置换,并且其中R^X是氢或(C₁-C₆)烷基,并且其中烃链任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基取代:(C₁-C₆)烷氧基、(C₃-C₆)环烷基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷酰基氧基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

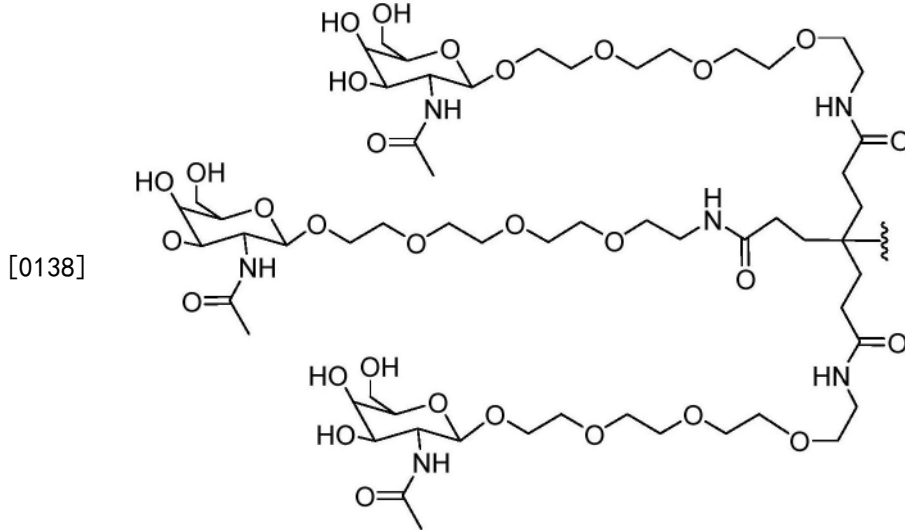
[0133] 在一个实施方案中,每个L³独立地是具有1至20个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中烃链中的一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-、-NR^X-、-NR^X-C(=O)-、-C(=O)-NR^X-或-S-置换,并且其中R^X是氢或(C₁-C₆)烷基,并且其中烃链任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基取代:(C₁-C₆)烷氧基、(C₃-C₆)环烷基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷酰基氧基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

[0134] 在一个实施方案中,L³是:



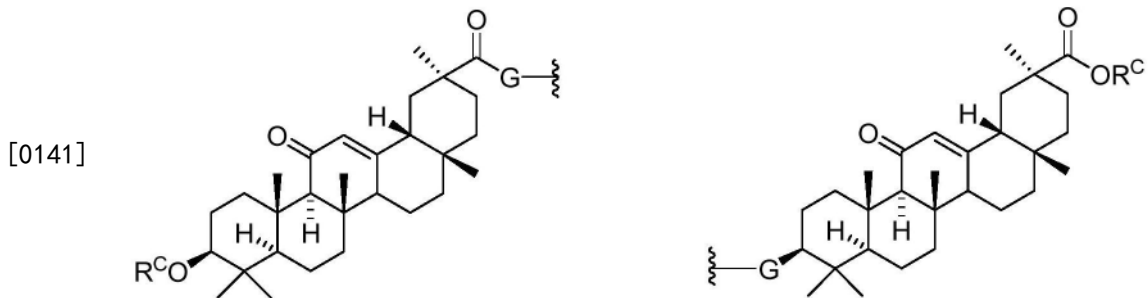
[0136] 或其盐。

[0137] 在一个实施方案中, R¹是:



[0139] 或其盐。

[0140] 在一个实施方案中, R¹是:

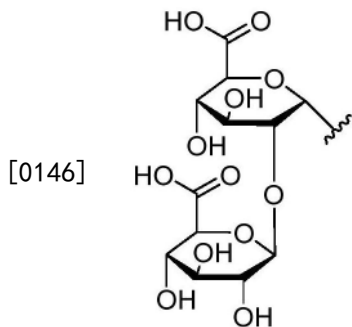


[0142] 或其盐,

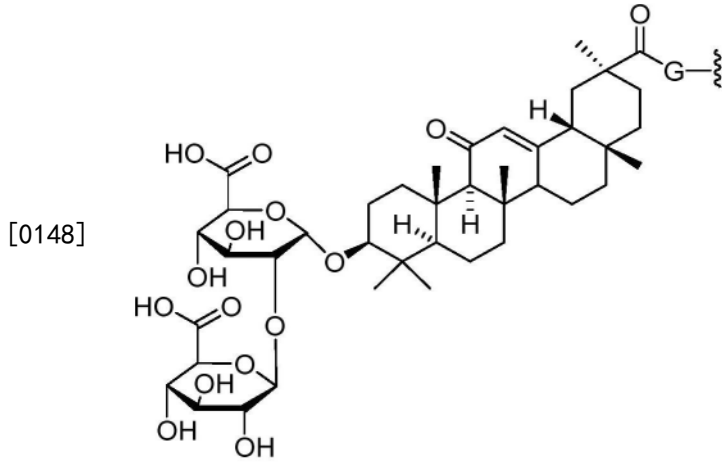
[0143] 其中G是-NH-或-O-;

[0144] R^C是氢、(C₁-C₈) 烷基、(C₁-C₈) 卤代烷基、(C₁-C₈) 烷氧基、(C₁-C₆) 烷酰基、(C₃-C₂₀) 环烷基、(C₃-C₂₀) 杂环、芳基、杂芳基、单糖、二糖或三糖;并且其中环烷基、杂环、芳基(ary)、杂芳基和糖任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组的基团取代: 卤基、羧基、羟基、氨基、(C₁-C₄) 烷基、(C₁-C₄) 卤代烷基、(C₁-C₄) 烷氧基和(C₁-C₄) 卤代烷氧基。

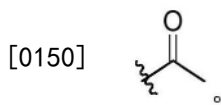
[0145] 在一个实施方案中, R^C是:



[0147] 在一个实施方案中, R^1 是:

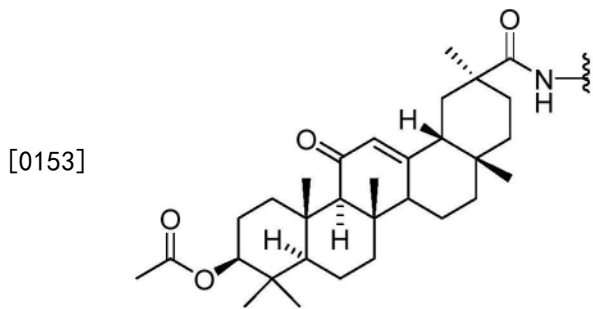


[0149] 在一个实施方案中, R^c 是:

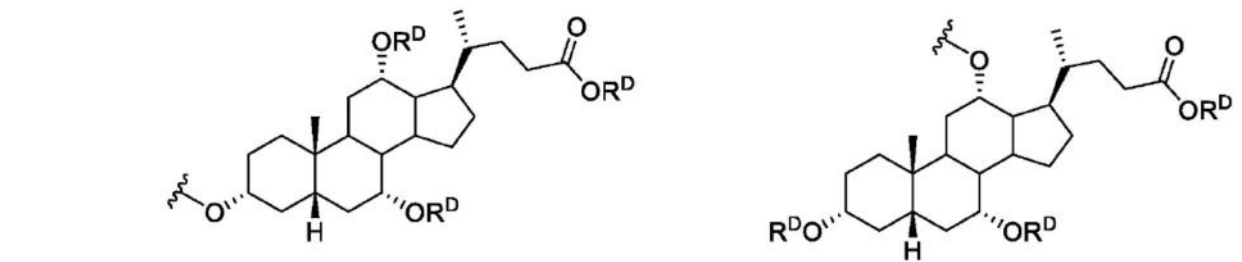


[0151] 在一个实施方案中, G 是 -NH-。

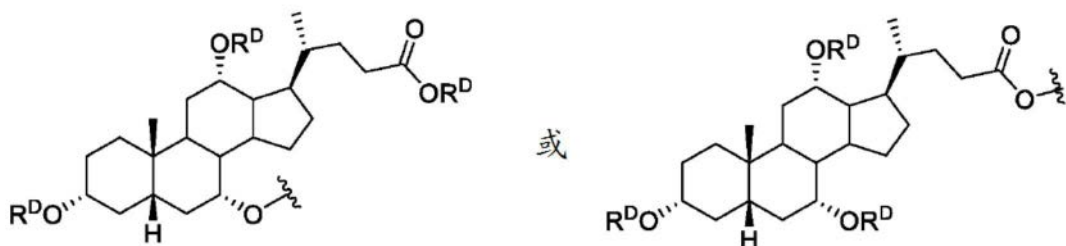
[0152] 在一个实施方案中, R^1 是:



[0154] 在一个实施方案中, R^1 是:



[0155]



[0156] 其中每个 R^D 独立地选自由以下组成的组: 氢、(C₁-C₆) 烷基、(C₉-C₂₀) 烷基甲硅烷基、(R^W)₃Si-、(C₂-C₆) 烯基、四氢吡喃基、(C₁-C₆) 烷基酰基、苯甲酰基、芳基 (C₁-C₃) 烷基、TMTTr (三甲

氧基三苯甲基)、DMTr(二甲氧基三苯甲基)、MMTr(单甲氧基三苯甲基)和Tr(三苯甲基);并且

[0157] 每个 R^W 独立地选自由以下组成的组:(C_1-C_4)烷基和芳基。

[0158] 在一个实施方案中,连接基团 L^1 和 L^2 独立地是具有1至50个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中烃链中的一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-、-NR^X-、-NR^X-C(=O)-、-C(=O)-NR^X-或-S-置换,并且其中R^X是氢或(C_1-C_6)烷基,并且其中烃链任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基取代:(C_1-C_6)烷氧基、(C_3-C_6)环烷基、(C_1-C_6)烷酰基、(C_1-C_6)烷酰基氧基、(C_1-C_6)烷氧基羰基、(C_1-C_6)烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

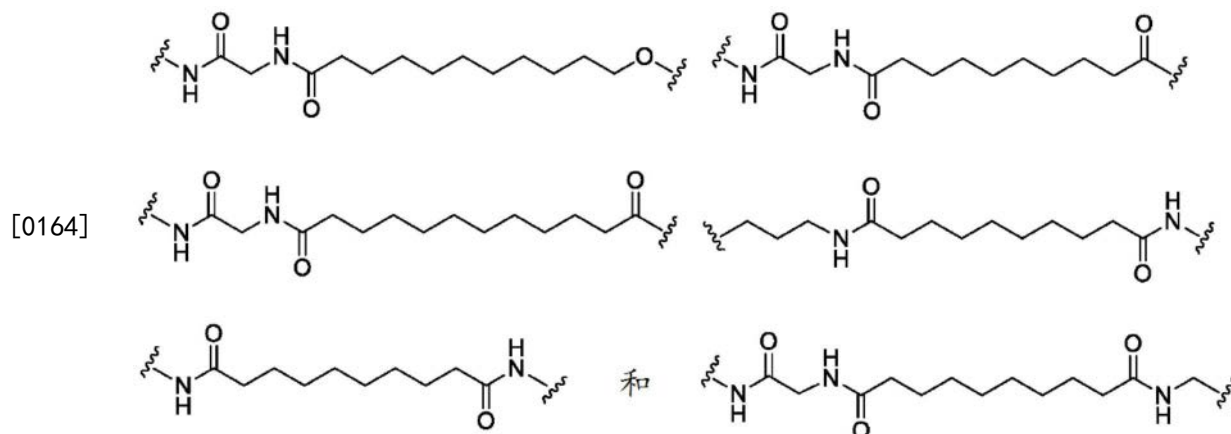
[0159] 在一个实施方案中, L^1 和 L^2 独立地是具有1至20个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中烃链中的一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-、-NR^X-、-NR^X-C(=O)-、-C(=O)-NR^X-或-S-置换,并且其中R^X是氢或(C_1-C_6)烷基,并且其中烃链任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基取代:(C_1-C_6)烷氧基、(C_3-C_6)环烷基、(C_1-C_6)烷酰基、(C_1-C_6)烷酰基氧基、(C_1-C_6)烷氧基羰基、(C_1-C_6)烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

[0160] 在一个实施方案中, L^1 和 L^2 独立地是具有1至14个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中烃链中的一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-、-NR^X-、-NR^X-C(=O)-、-C(=O)-NR^X-或-S-置换,并且其中R^X是氢或(C_1-C_6)烷基,并且其中烃链任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基取代:(C_1-C_6)烷氧基、(C_3-C_6)环烷基、(C_1-C_6)烷酰基、(C_1-C_6)烷酰基氧基、(C_1-C_6)烷氧基羰基、(C_1-C_6)烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

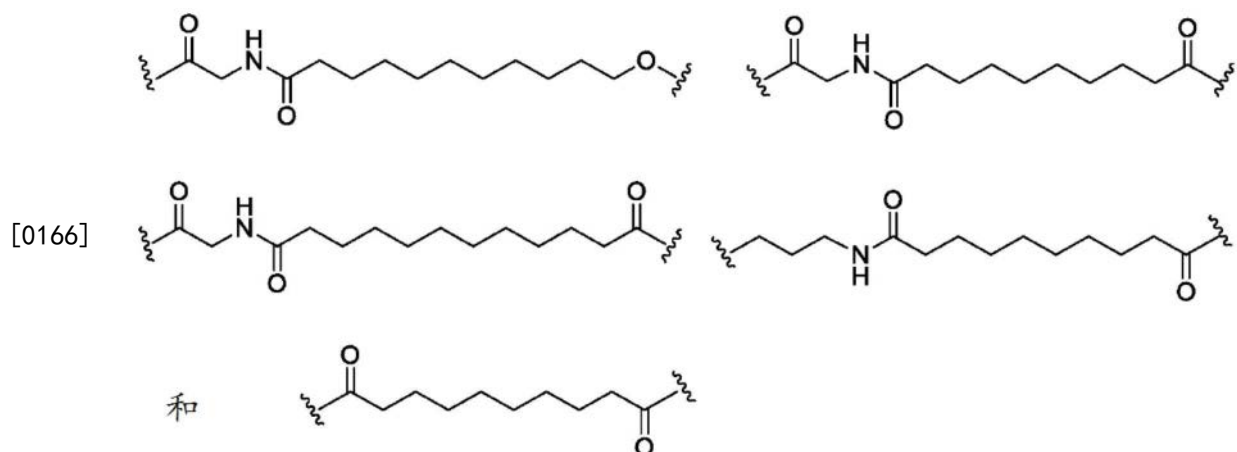
[0161] 在一个实施方案中, L^1 通过-NH-、-O-、-S-、-(C=O)-、-(C=O)-NH-、-NH-(C=O)-、-(C=O)-O-、-NH-(C=O)-NH-或-NH-(SO₂)-连接至R¹。

[0162] 在一个实施方案中, L^2 通过-O-连接至R²。

[0163] 在一个实施方案中, L^1 选自由以下组成的组:



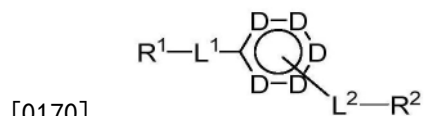
[0165] 在一个实施方案中, L^1 选自由以下组成的组:



[0167] 及其盐。

[0168] 在一个实施方案中, L^2 是 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 。

[0169] 在一个实施方案中, 式 I 的化合物具有以下式 Ia:



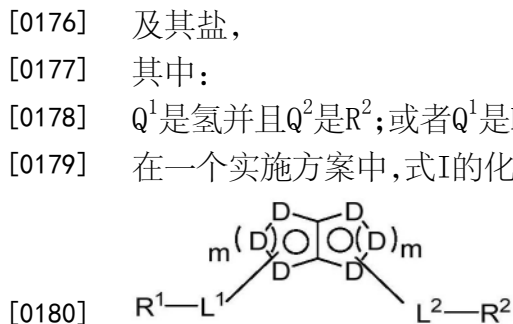
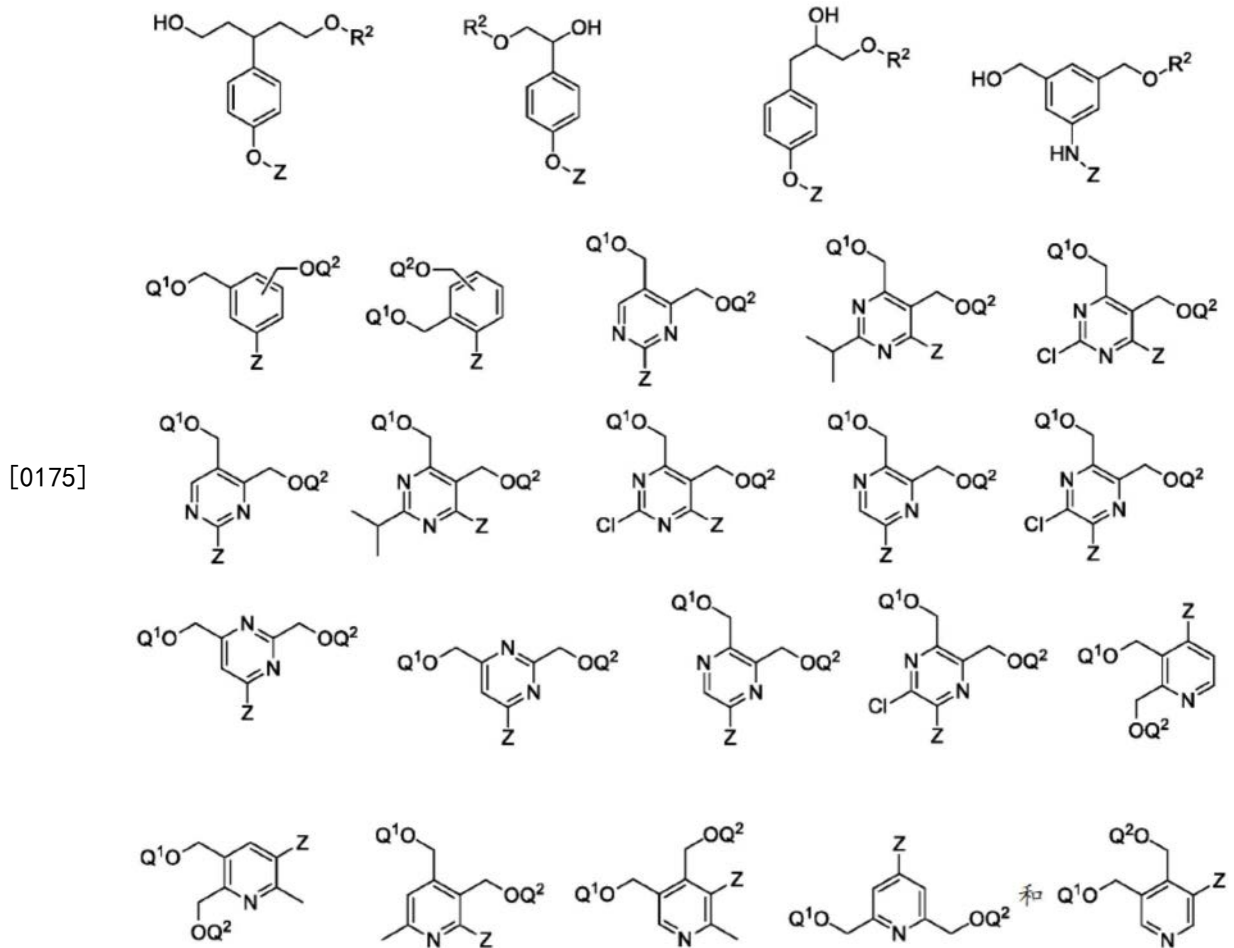
(Ia)

[0171] 或其盐,

[0172] 其中:

[0173] 每个 D 独立地选自由以下组成的组: $\begin{matrix} \text{R}^{\text{A}} \\ | \\ -\text{C}=\end{matrix}$ 和 $-\text{N}=\text{}$ 。

[0174] 在一个实施方案中, 式 Ia 的化合物选自由以下组成的组:



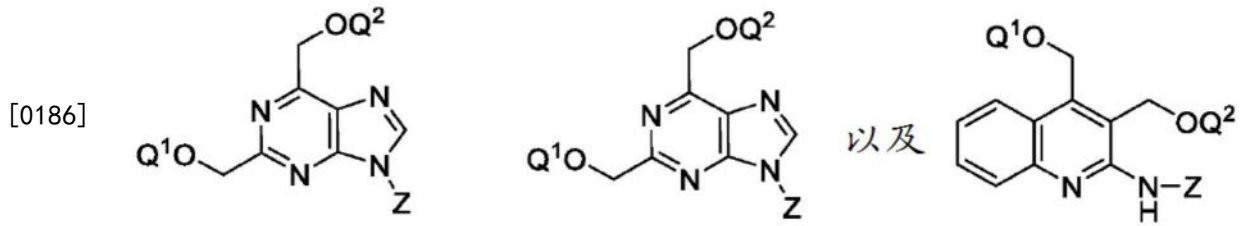
[0181] 或其盐,

[0182] 其中:

[0183] 每个D独立地选自由以下组成的组: $\begin{matrix} R^A \\ | \\ -C= \end{matrix}$ 和 $-N=$;

[0184] 每个m独立地是1或2。

[0185] 在一个实施方案中,式Ib的化合物选自由以下组成的组:



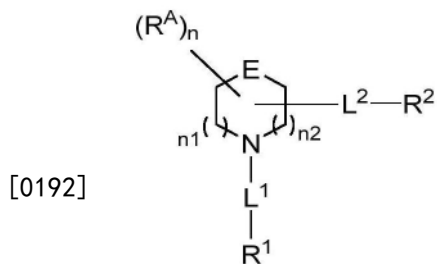
[0187] 及其盐,

[0188] 其中:

[0189] Q^1 是氢并且 Q^2 是 R^2 ;或者 Q^1 是 R^2 并且 Q^2 是氢;

[0190] Z 是 $-L^1-R^1$ 。

[0191] 在一个实施方案中,式I的化合物具有以下式(Ic):



(Ic)

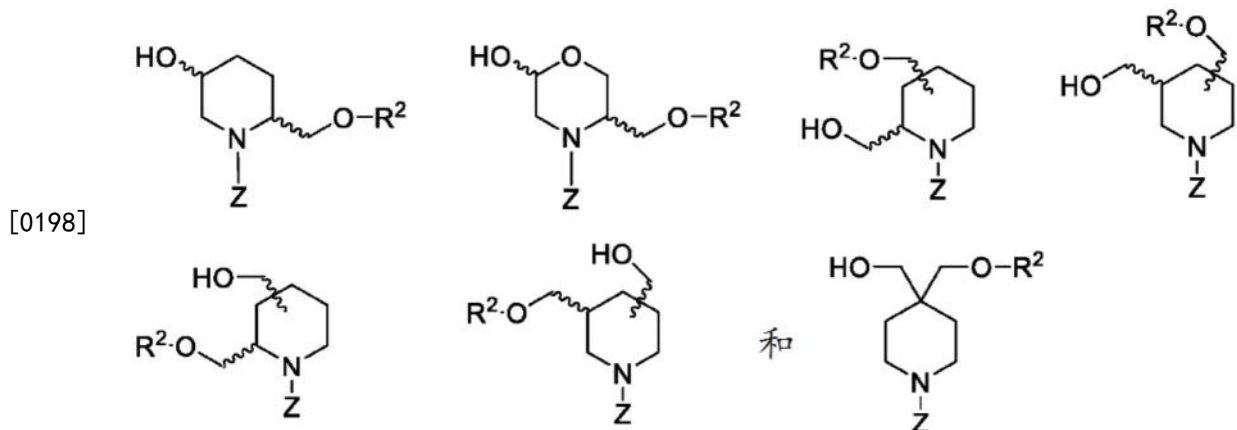
[0193] 或其盐,

[0194] 其中E是-O-或- CH_2 -;

[0195] n 选自由以下组成的组:0、1、2、3和4;并且

[0196] n_1 和 n_2 各自独立地选自由以下组成的组:0、1、2和3。

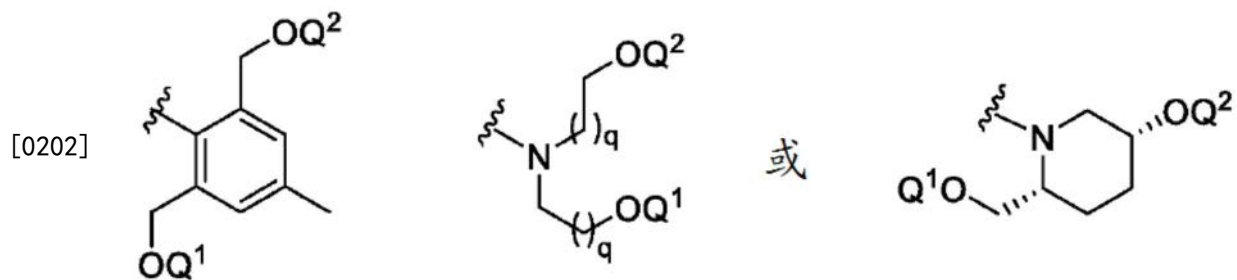
[0197] 在某些实施方案中,式(Ic)的化合物选自由以下组成的组:



[0199] 及其盐

[0200] 其中 Z 是 $-L^1-R^1$ 。

[0201] 在一个实施方案中,-A- L^2-R^2 部分是:



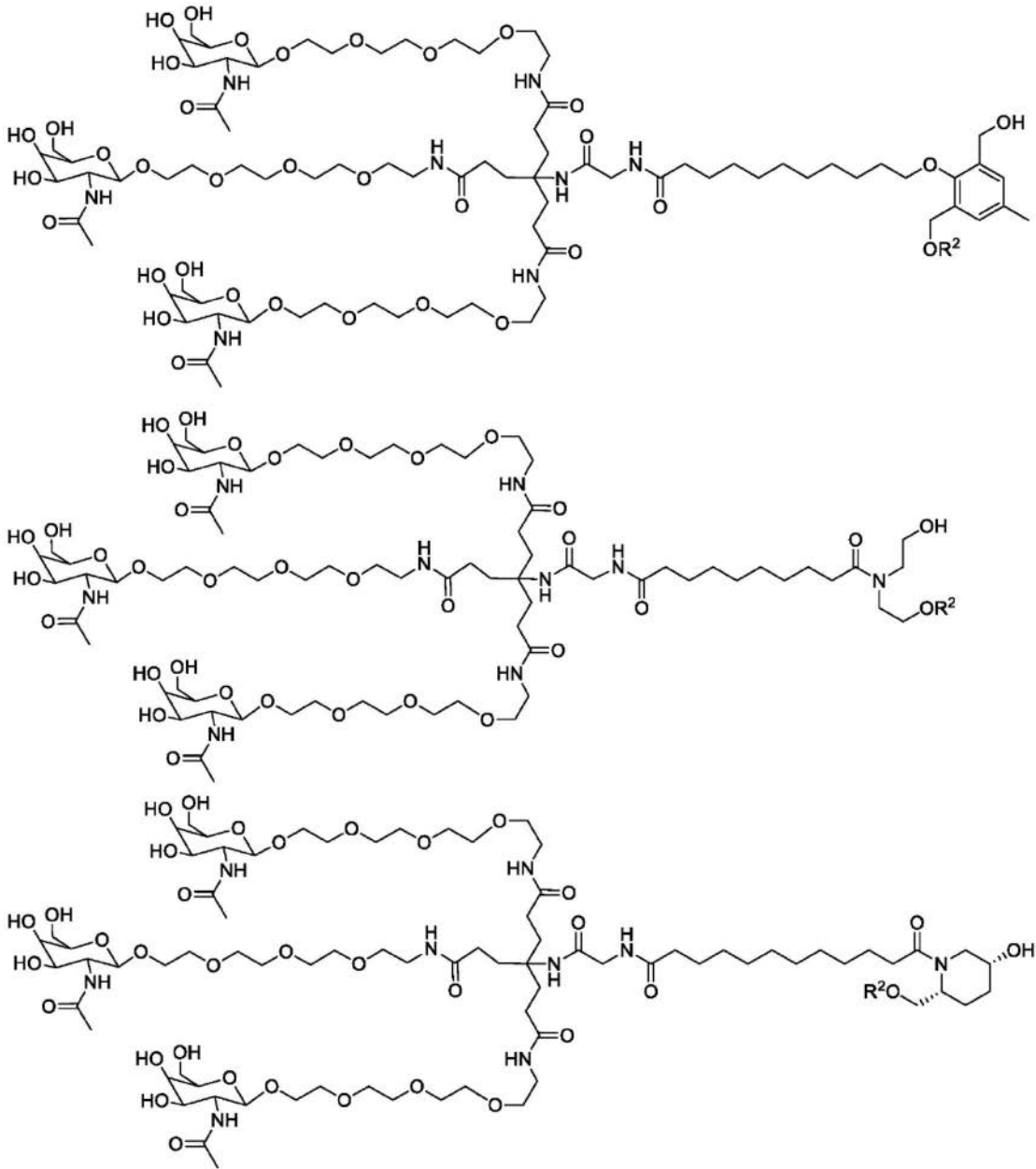
[0203] 或其盐,

[0204] 其中:

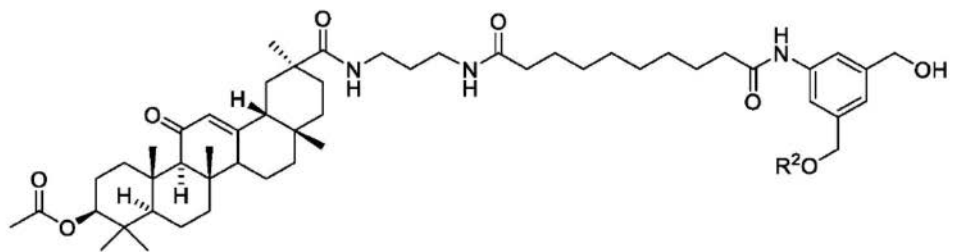
[0205] Q^1 是氢并且 Q^2 是 R^2 ;或者 Q^1 是 R^2 并且 Q^2 是氢;并且

[0206] 每个q独立地是0、1、2、3、4或5。

[0207] 在一个实施方案中,式(I)的化合物选自由以下组成的组:

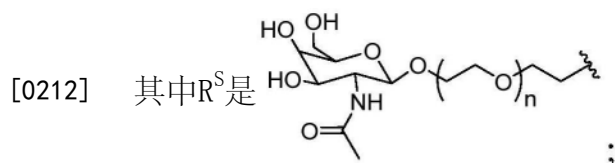
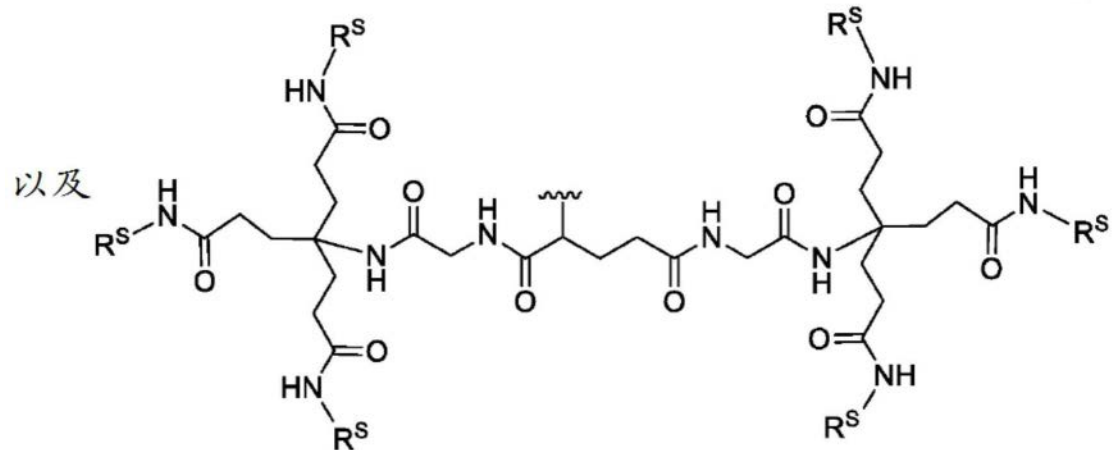
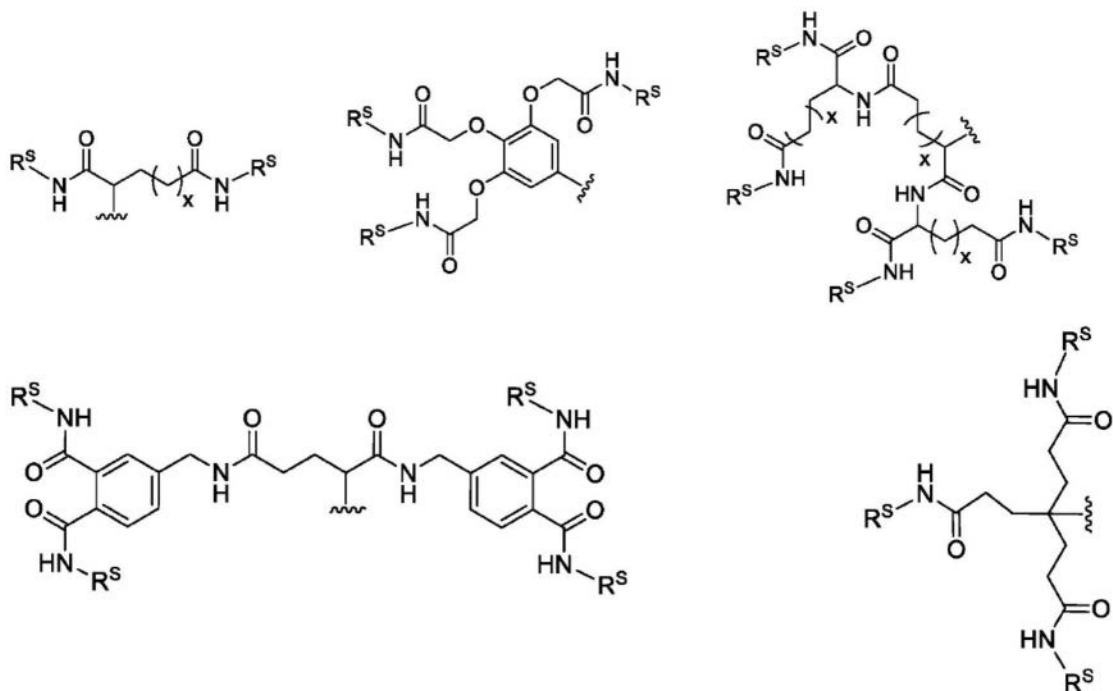


和



[0209] 及其盐。

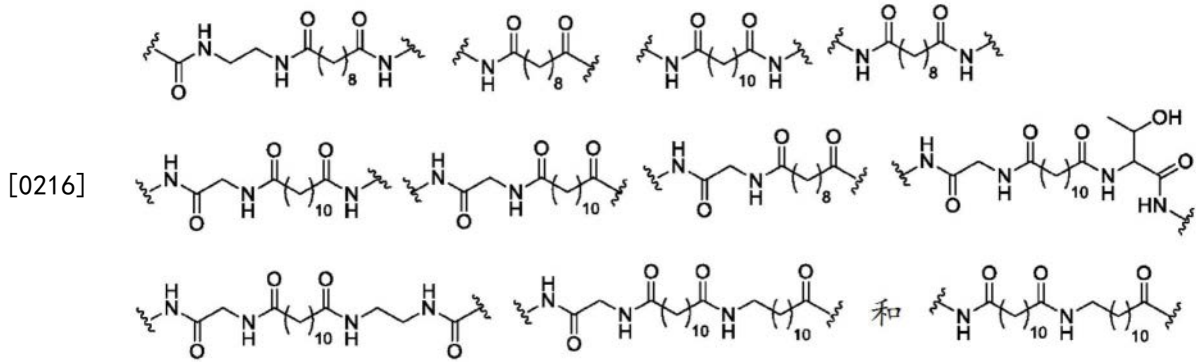
[0210] 在一个实施方案中, R¹选自由以下组成的组:



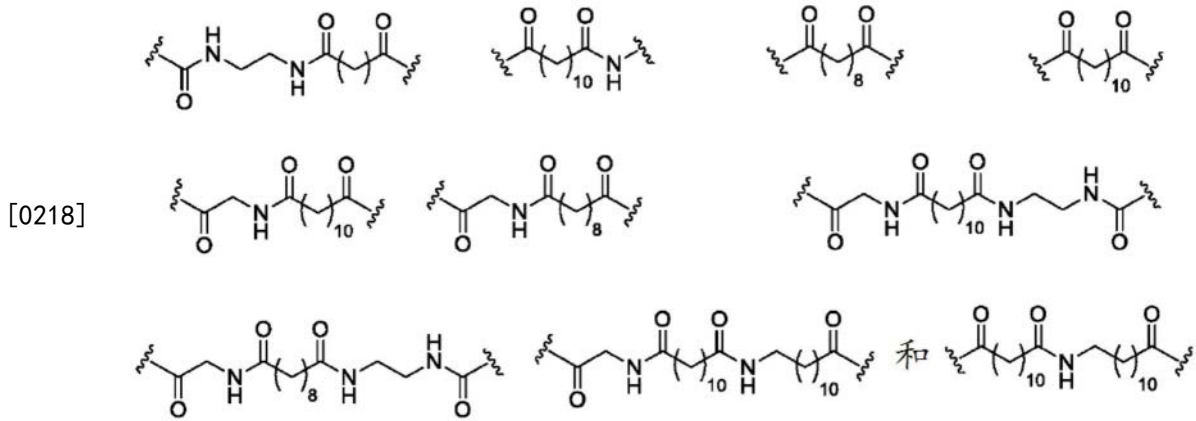
[0213] n 是2、3或4；

[0214] x 是1或2。

[0215] 在一个实施方案中, L^1 选自由以下组成的组：



[0217] 在一个实施方案中, L¹选自由以下组成的组:



[0219] 在一个实施方案中, A不存在、是苯基、吡咯烷基或环戊基。

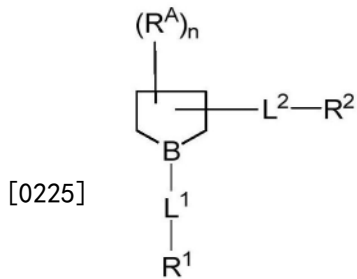
[0220] 在一个实施方案中, L²是任选地被羟基取代的C₁₋₄亚烷基-0-。

[0221] 在一个实施方案中, L²是-CH₂O-、-CH₂CH₂O-或-CH(OH)CH₂O-。

[0222] 在一个实施方案中, 每个R^A独立地是羟基或任选地被羟基取代的C₁₋₈烷基。

[0223] 在一个实施方案中, 每个R^A独立地选自由以下组成的组: 羟基、甲基和-CH₂OH。

[0224] 在一个实施方案中, 式I的化合物具有以下式 (Ig) :



(Ig)

[0226] 或其盐,

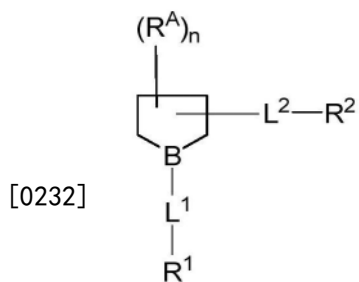
[0227] 其中B是-N-或-CH-;

[0228] L¹不存在或是-NH-;

[0229] L²是任选地被羟基或卤基取代的C₁₋₄亚烷基-0-;

[0230] n是0、1或2。

[0231] 在一个实施方案中, 式I的化合物具有以下式 (Ig) :



[0233] 或其盐,

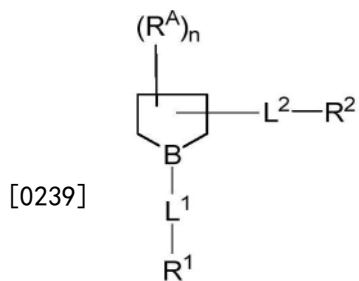
[0234] 其中B是-N-或-CH-;

[0235] L^1 不存在或是-NH-;

[0236] L^2 是任选地被羟基或卤基取代的 C_{1-4} 亚烷基-0-;

[0237] n是0、1、2、3、4、5、6或7。

[0238] 在一个实施方案中,式I的化合物具有以下式(Ig):



[0240] 或其盐,

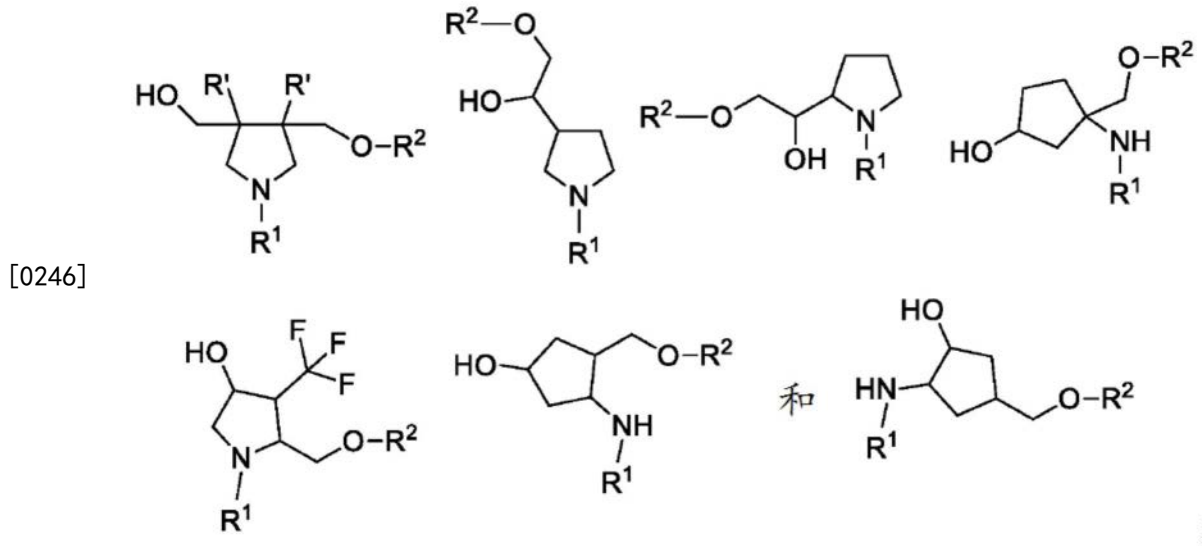
[0241] 其中B是-N-或-CH-;

[0242] L^1 不存在或是-NH-;

[0243] L^2 是任选地被羟基或卤基取代的 C_{1-4} 亚烷基-0-;

[0244] n是0、1、2、3或4。

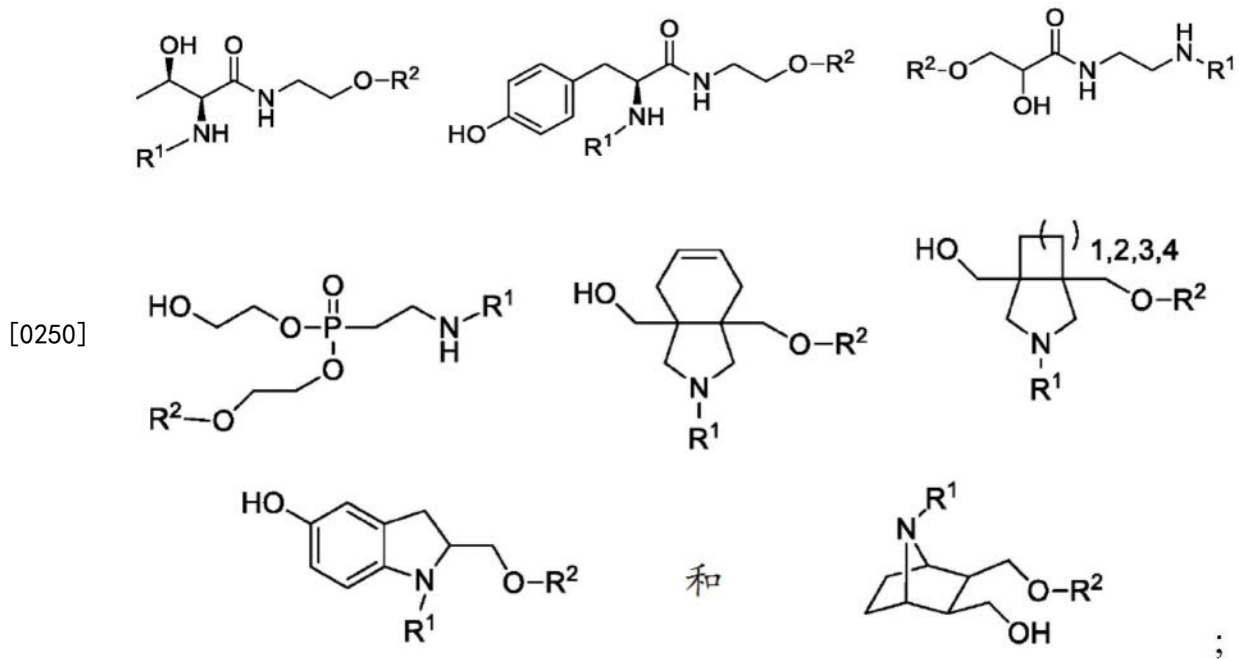
[0245] 在一个实施方案中,式Ig的化合物选自由以下组成的组:



[0247] 及其盐，

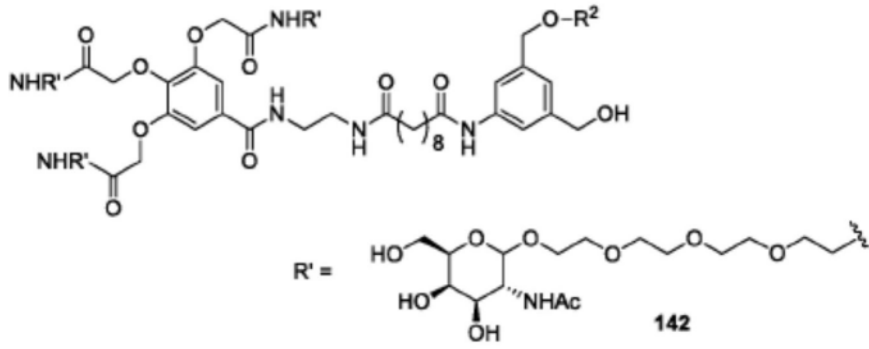
[0248] 其中R' 是C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基；其中C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基任选地被卤基或羟基取代。

[0249] 在一个实施方案中，式I的化合物选自由以下组成的组：

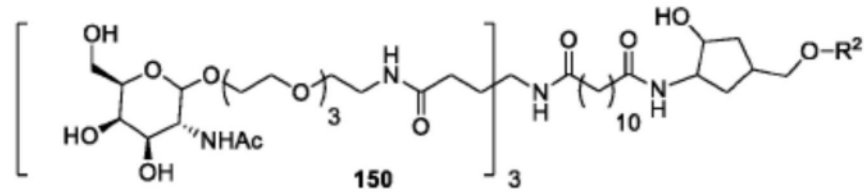
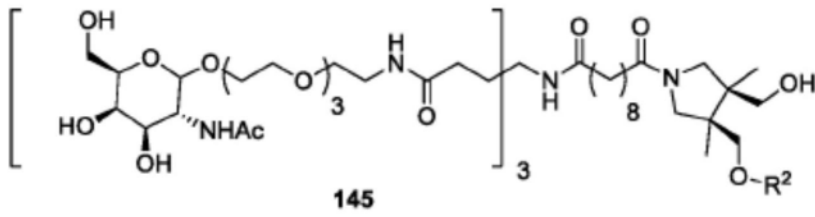


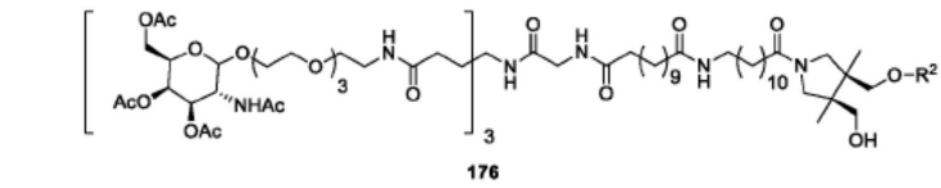
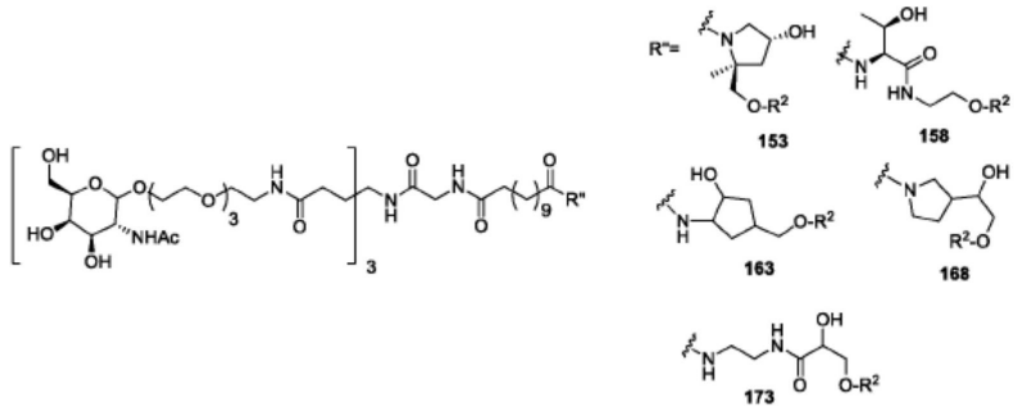
[0251] 及其盐。

[0252] 在一个实施方案中，式I的化合物或其盐选自由以下组成的组：

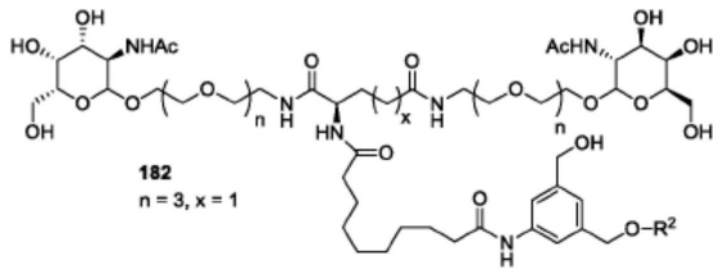
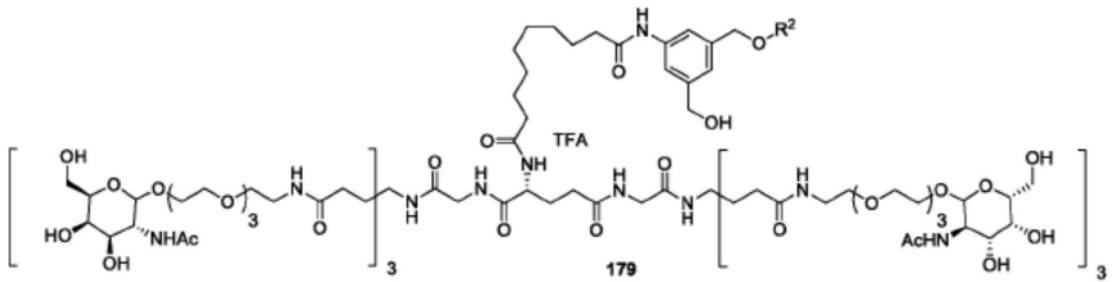


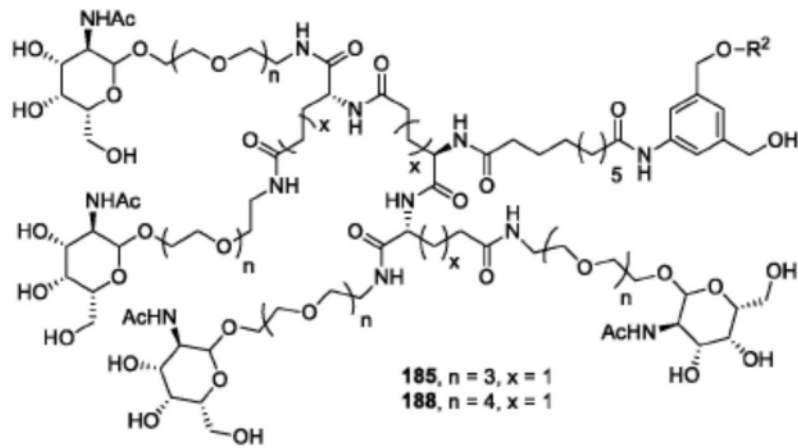
[0253]



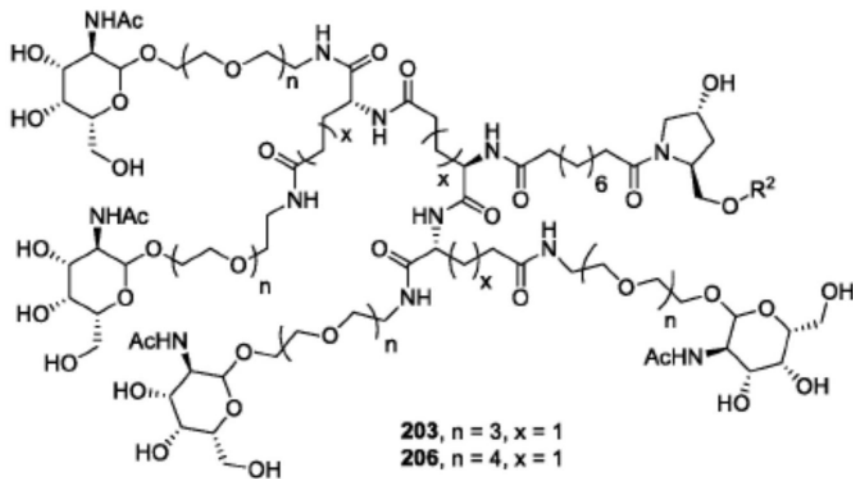
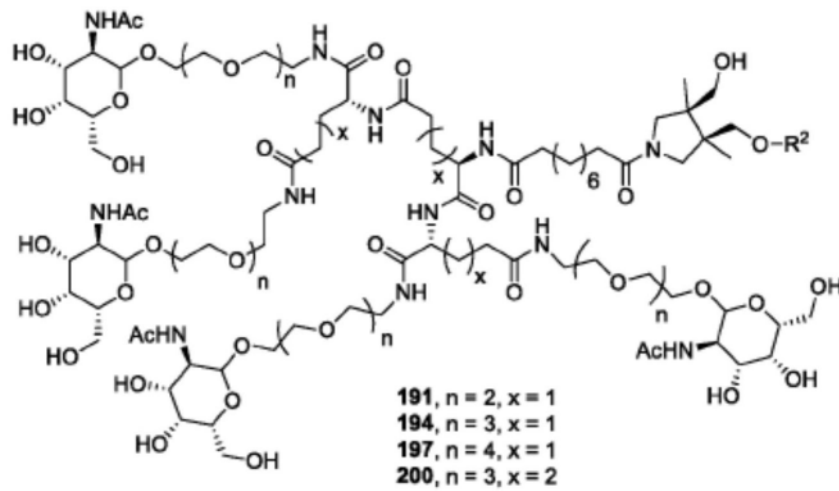


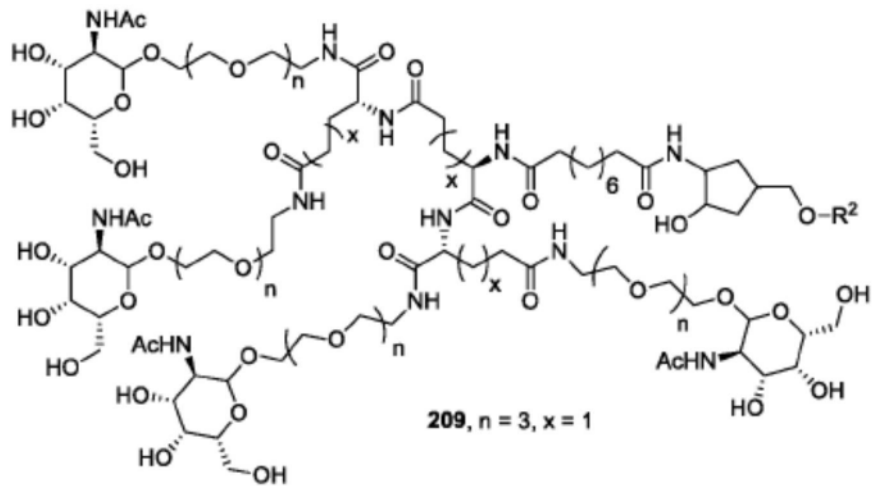
[0254]



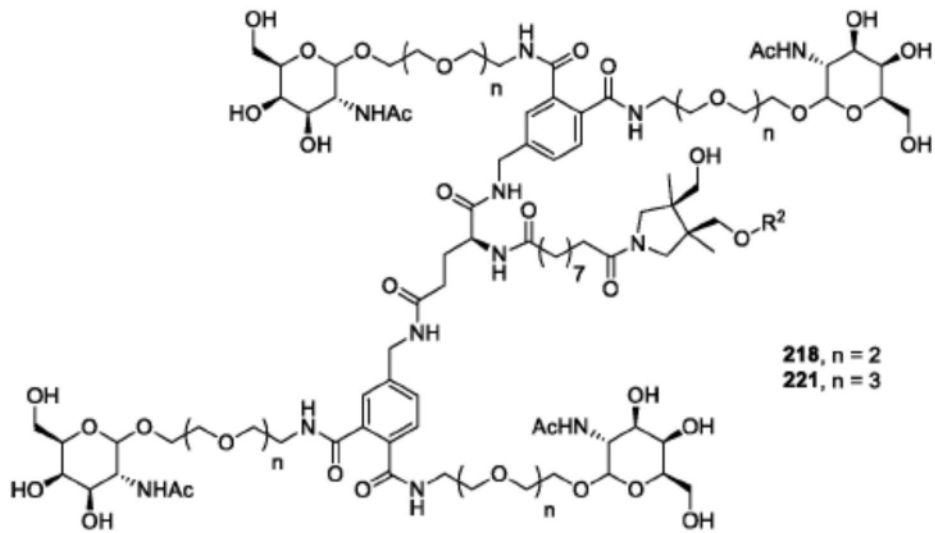
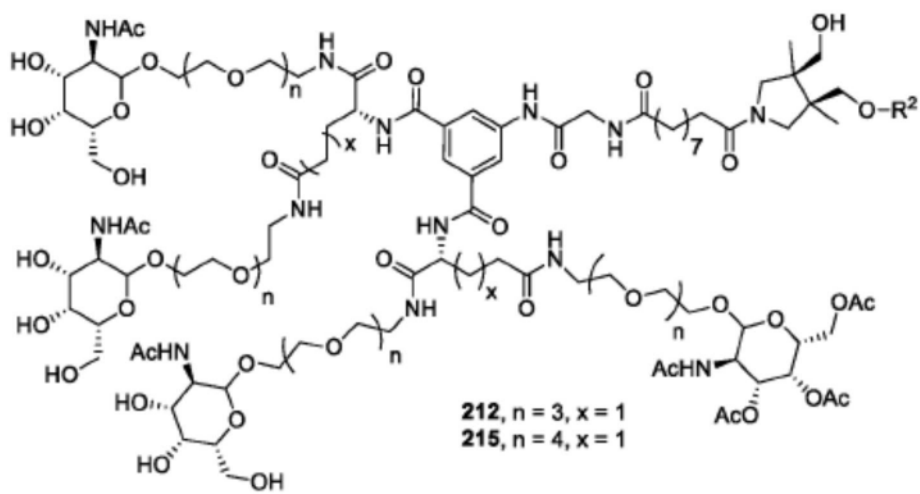


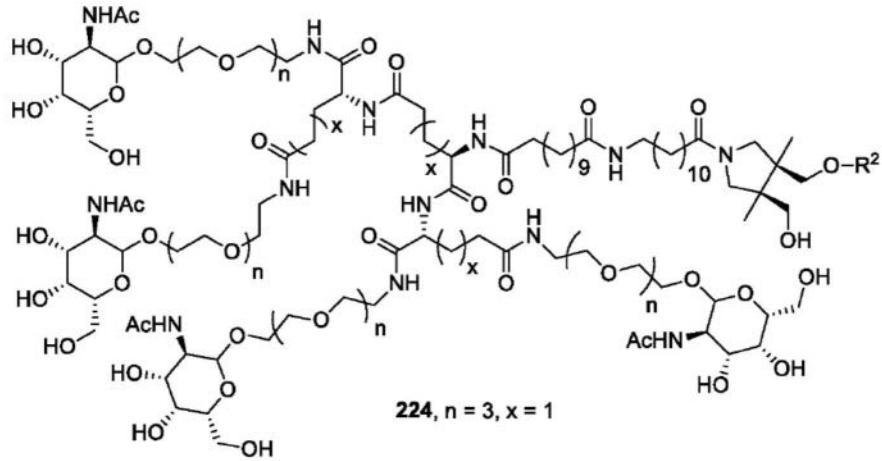
[0255]





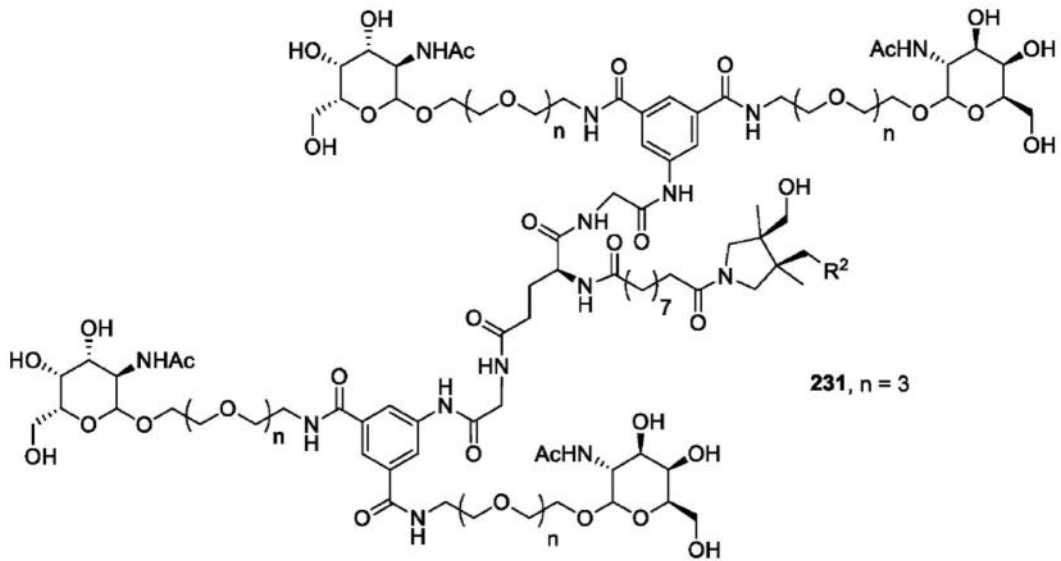
[0256]





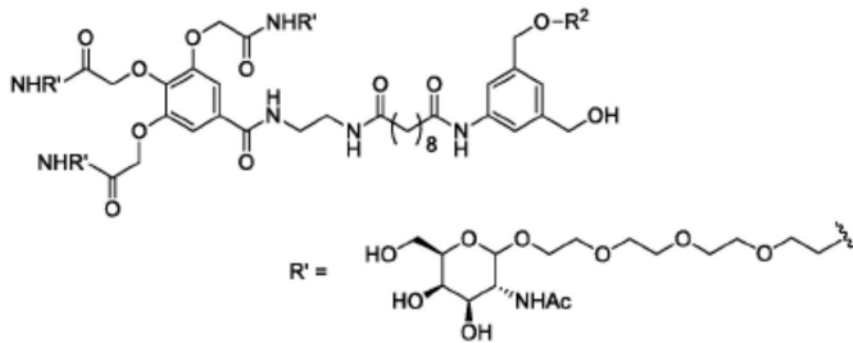
;以及

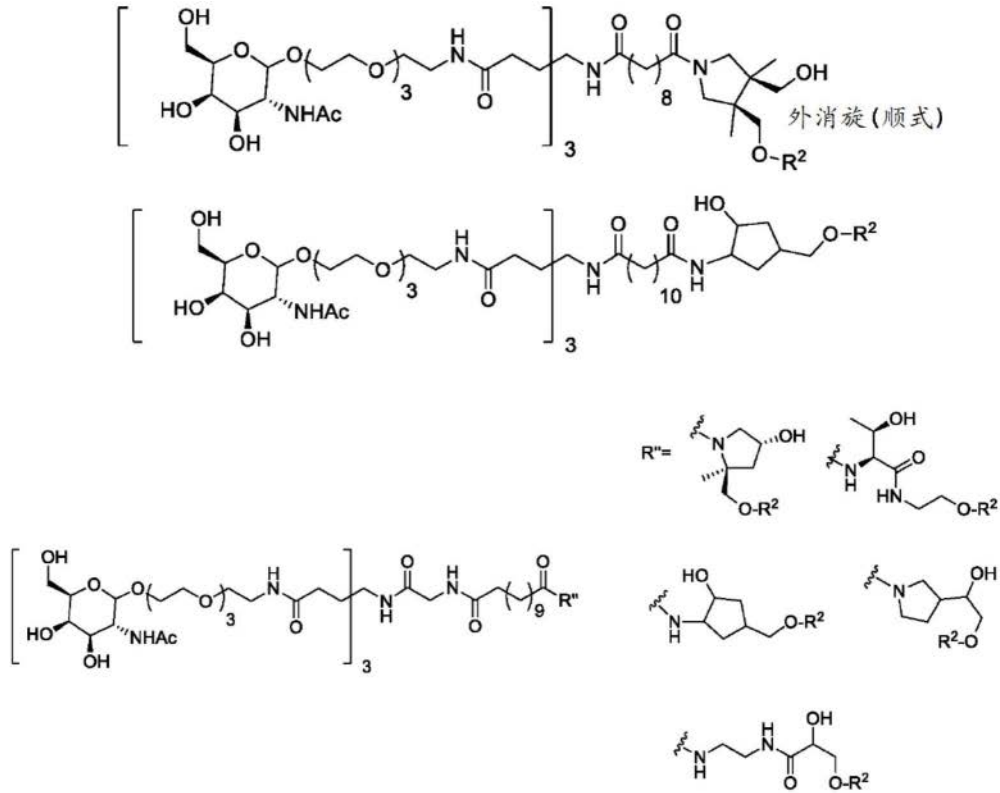
[0257]



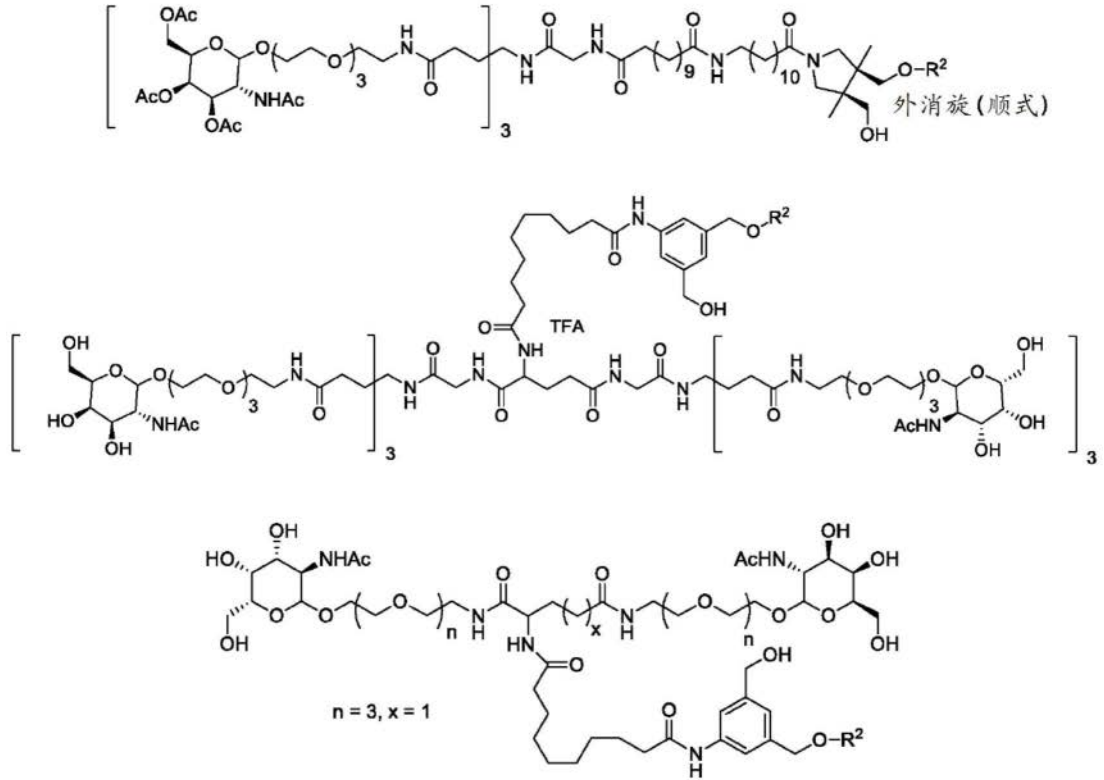
[0258] 在一个实施方案中,式I的化合物或其盐选自由以下组成的组:

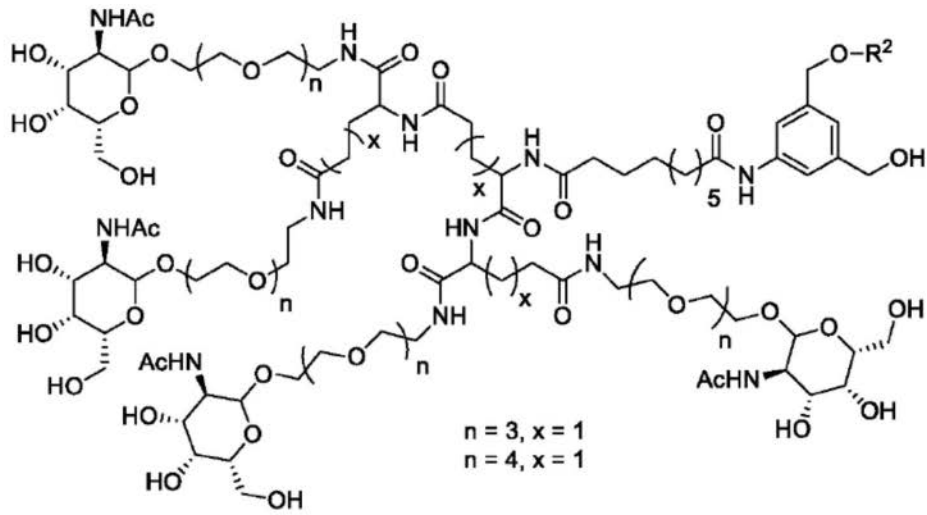
[0259]



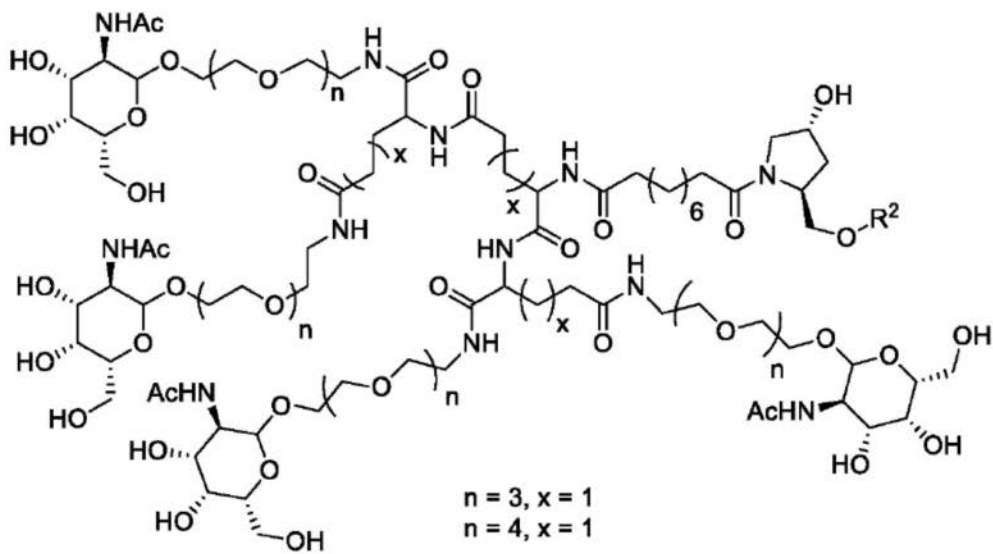
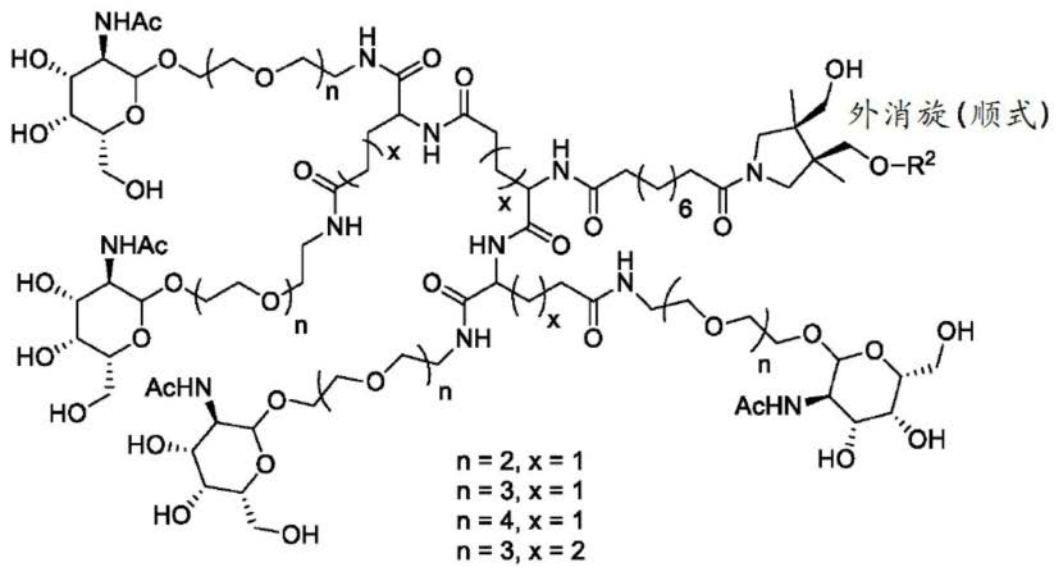


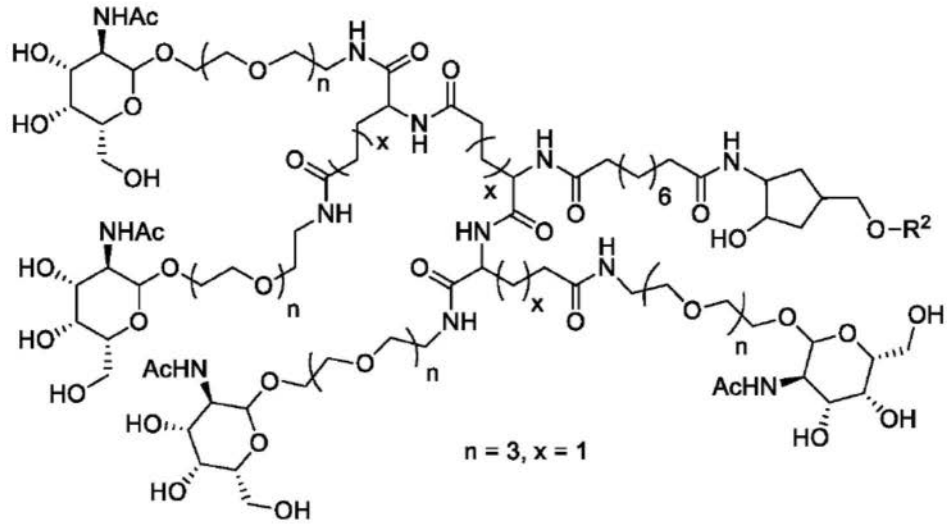
[0260]



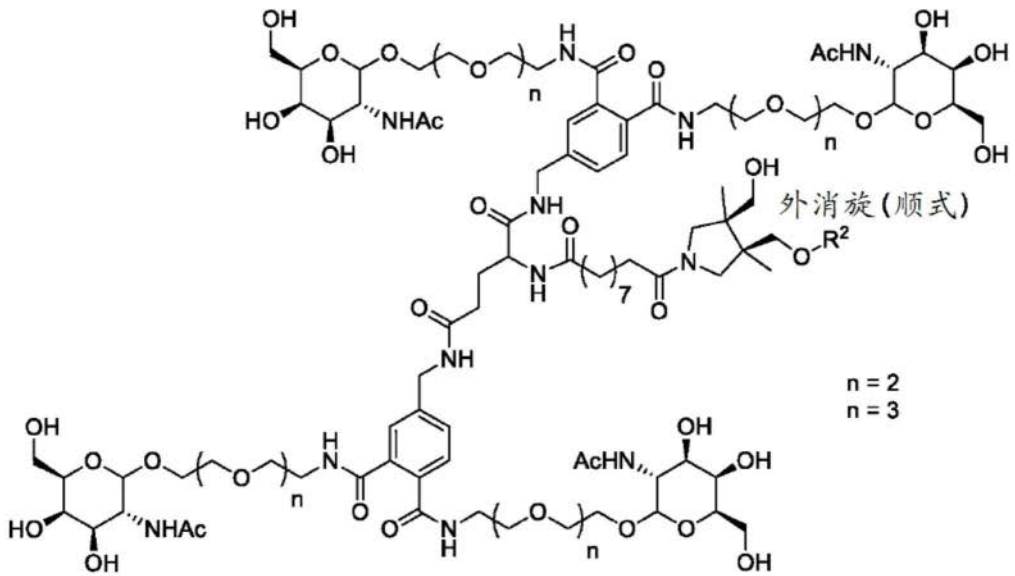
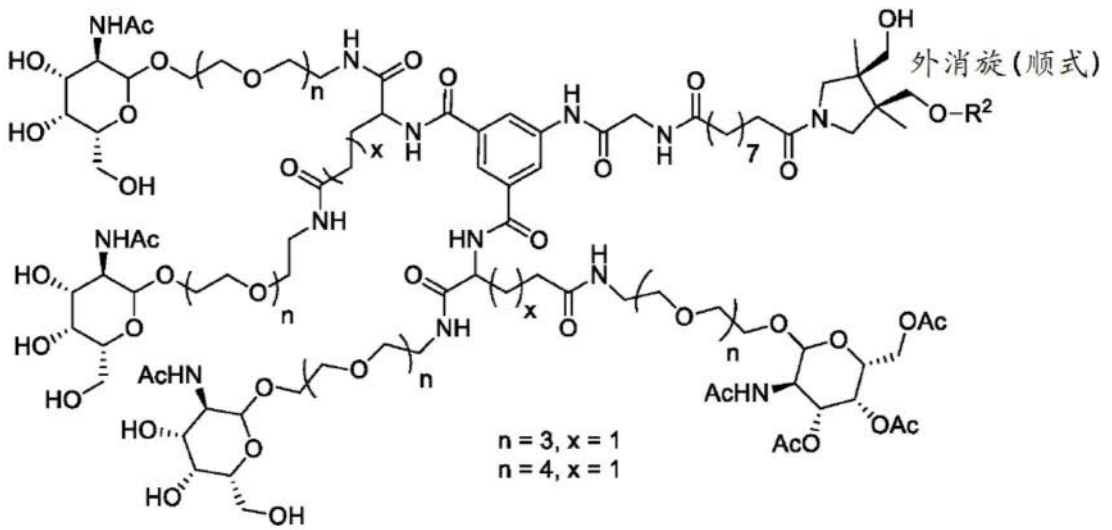


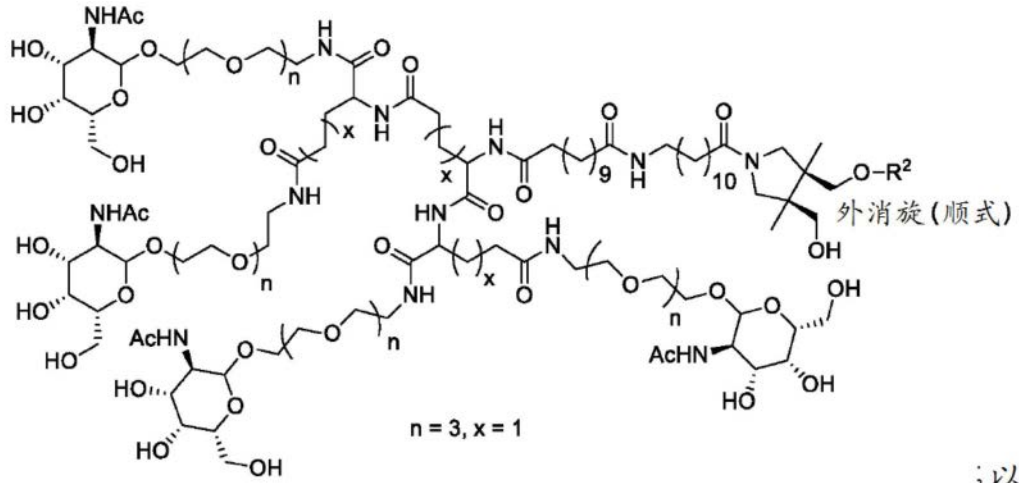
[0261]



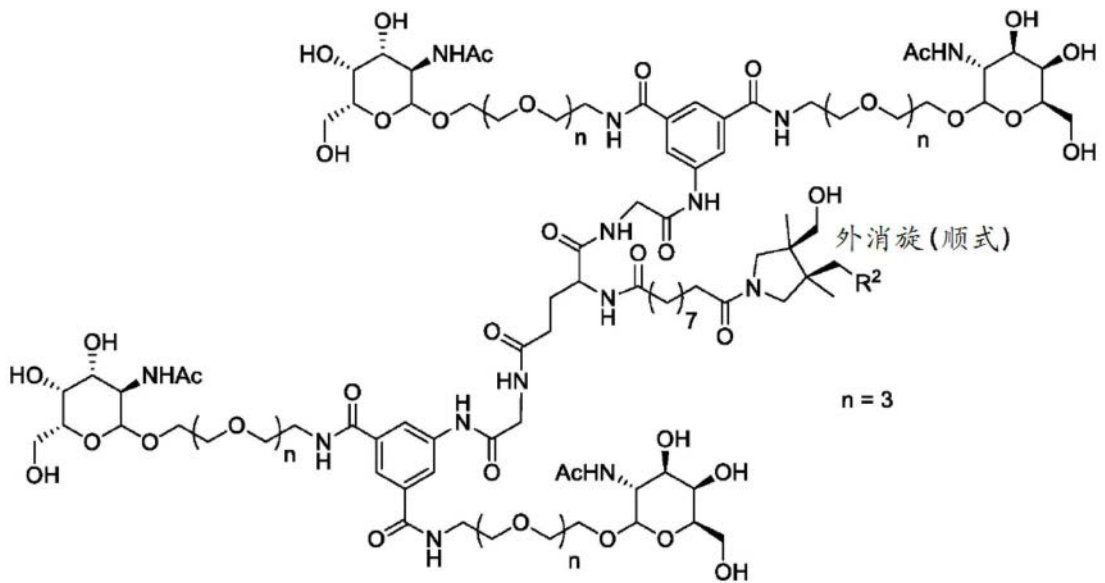


[0262]



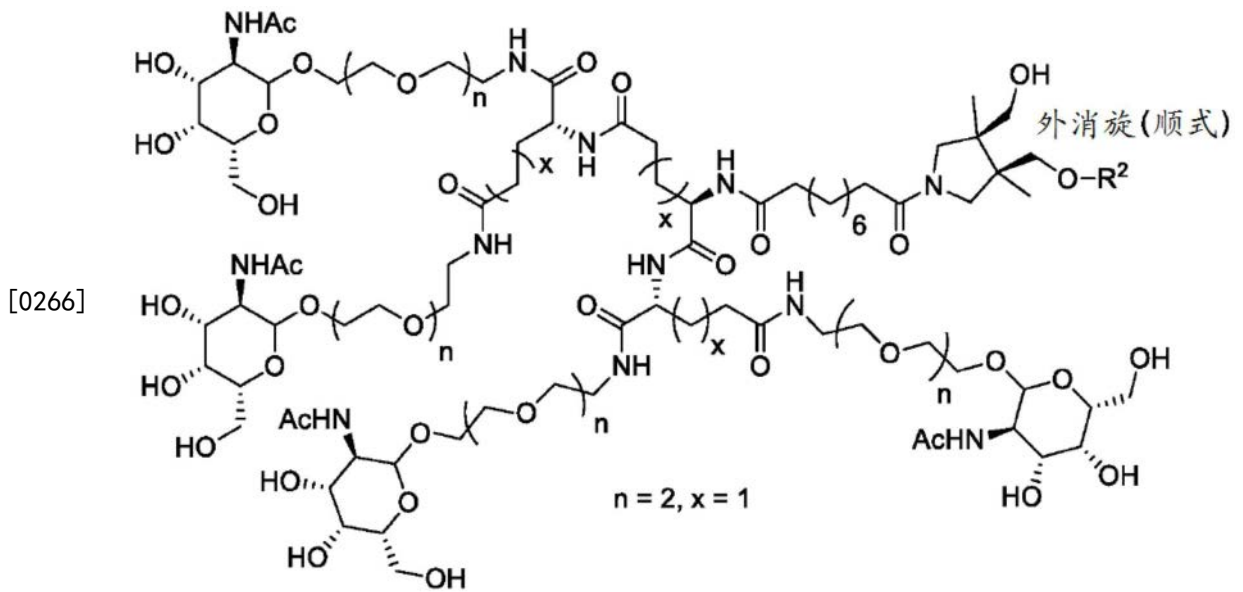


[0263]



[0264] 或其药学上可接受的盐,其中R²是选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子。

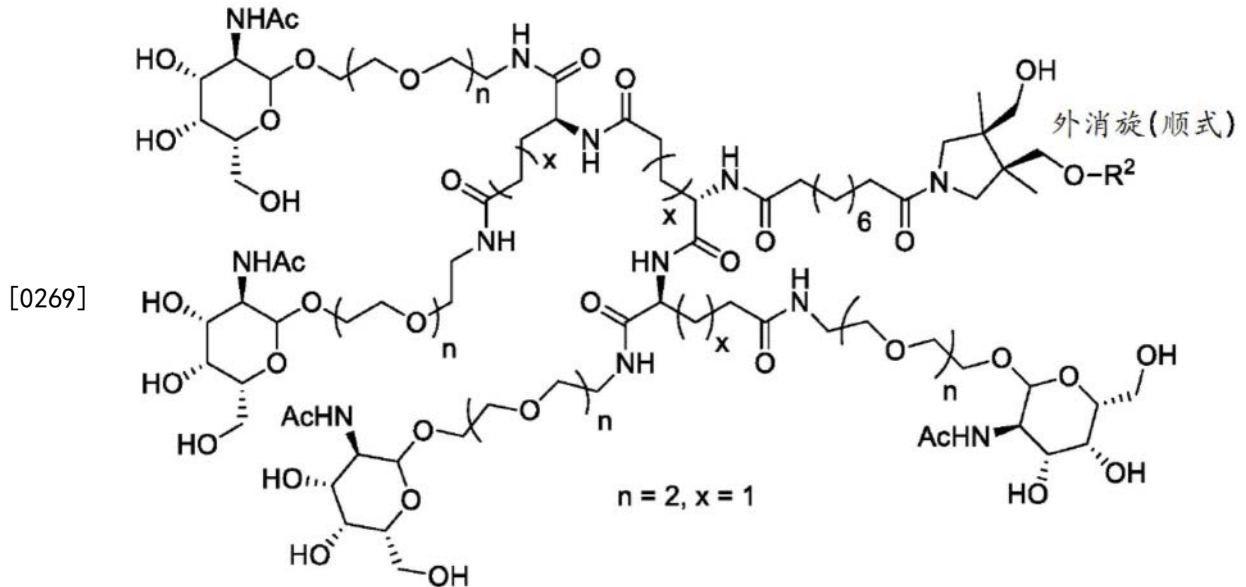
[0265] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



[0266]

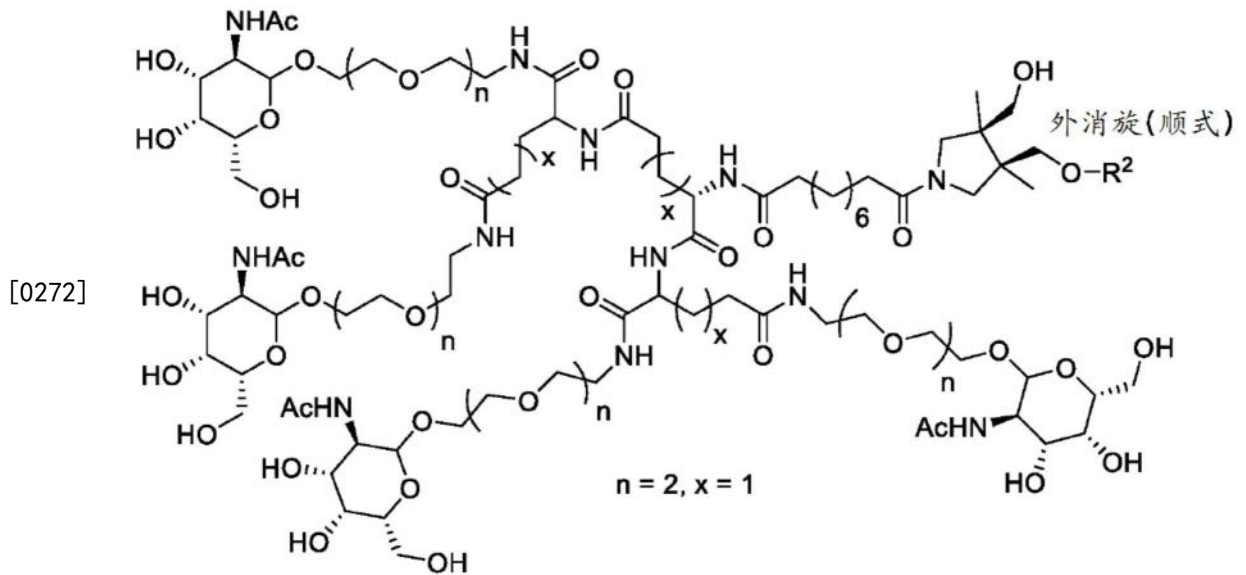
[0267] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0268] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



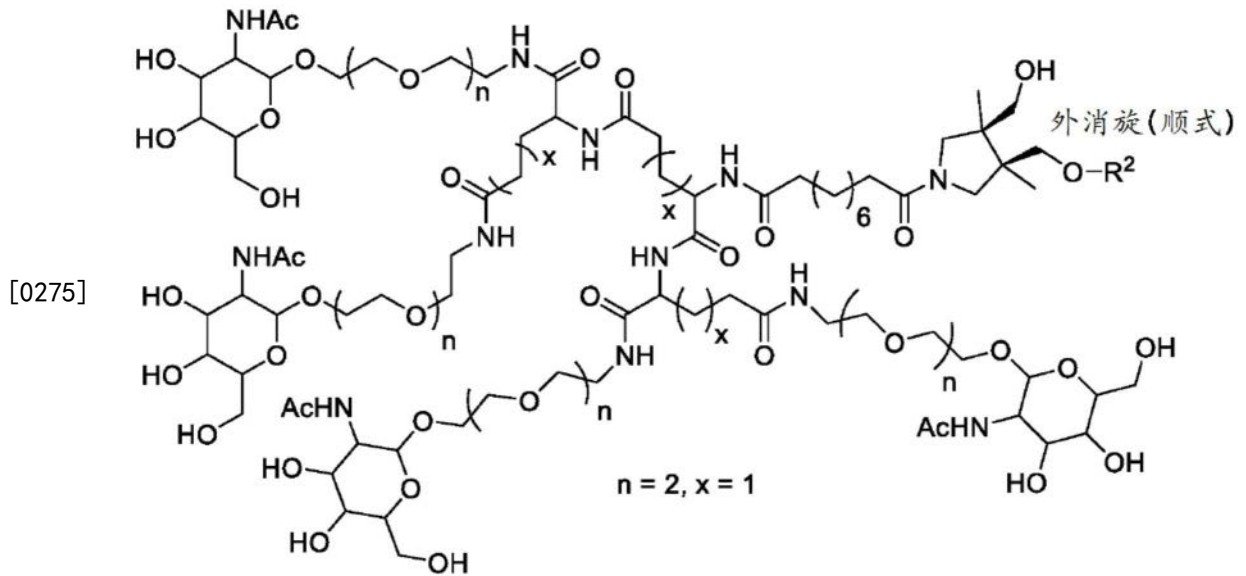
[0270] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0271] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



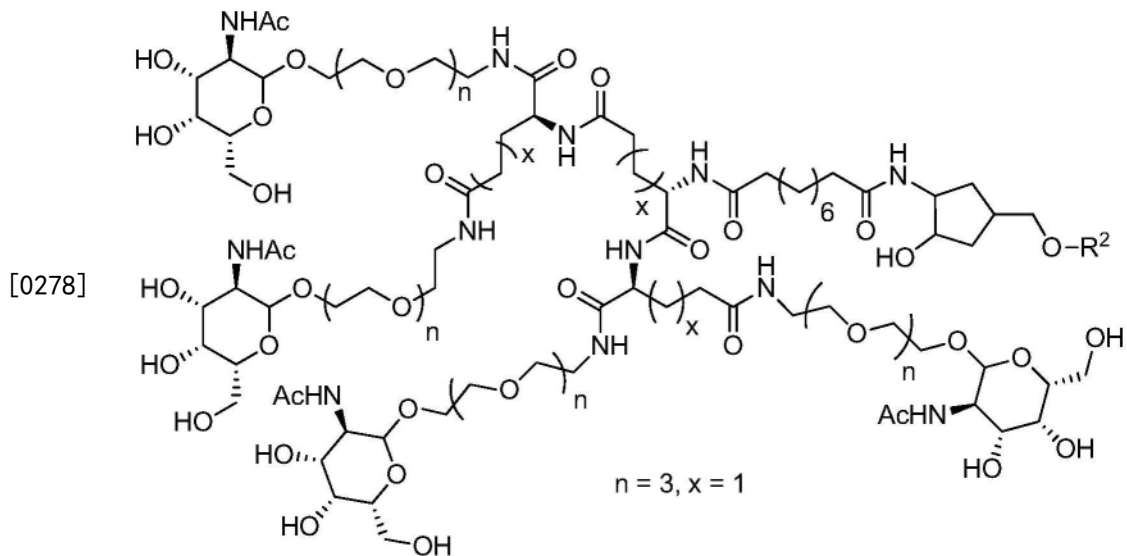
[0273] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0274] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



[0276] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

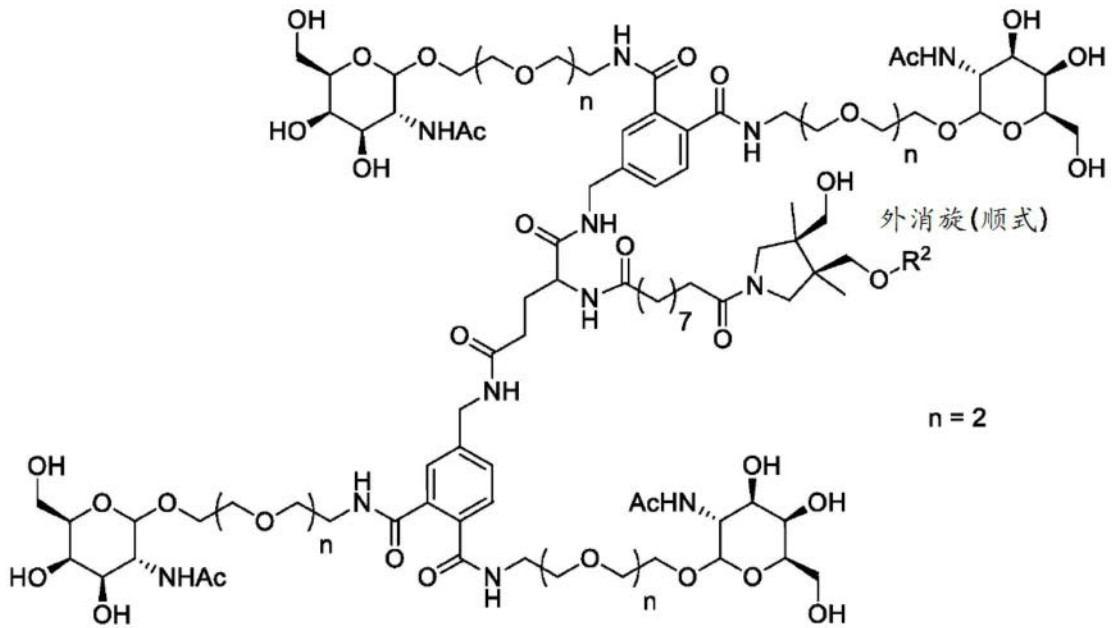
[0277] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



[0279] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0280] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

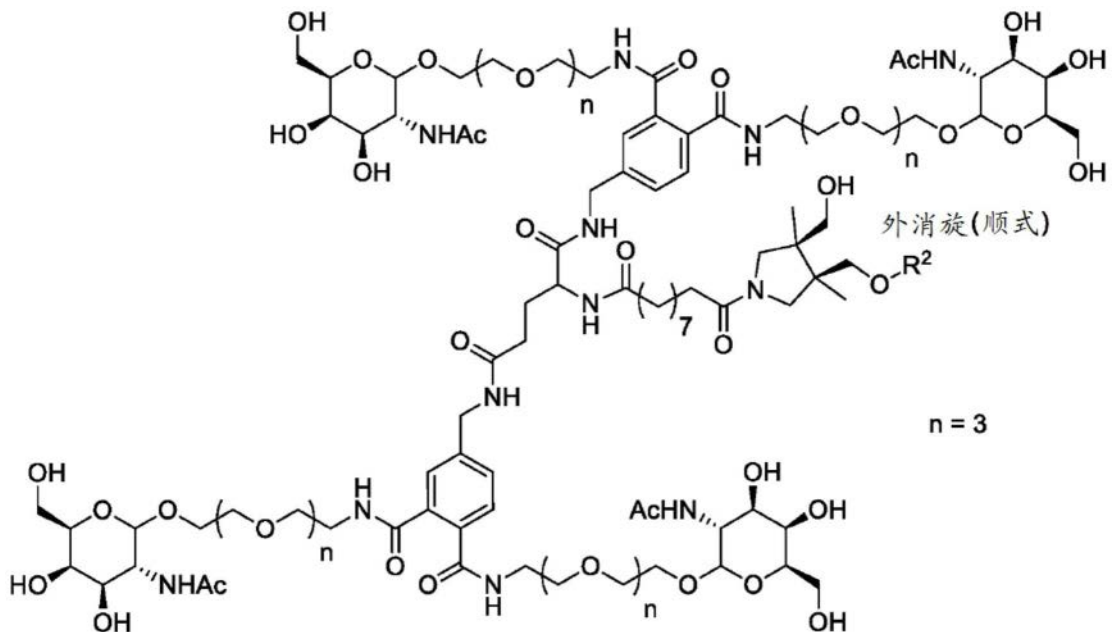
[0287]



[0288] 或其药学上可接受的盐,其中R²是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

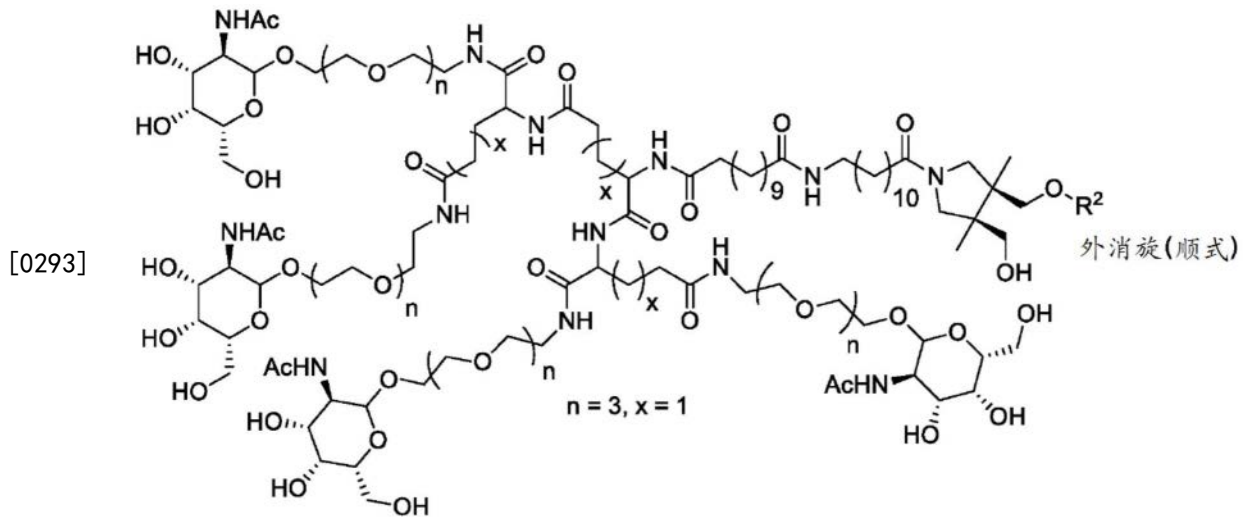
[0289] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

[0290]



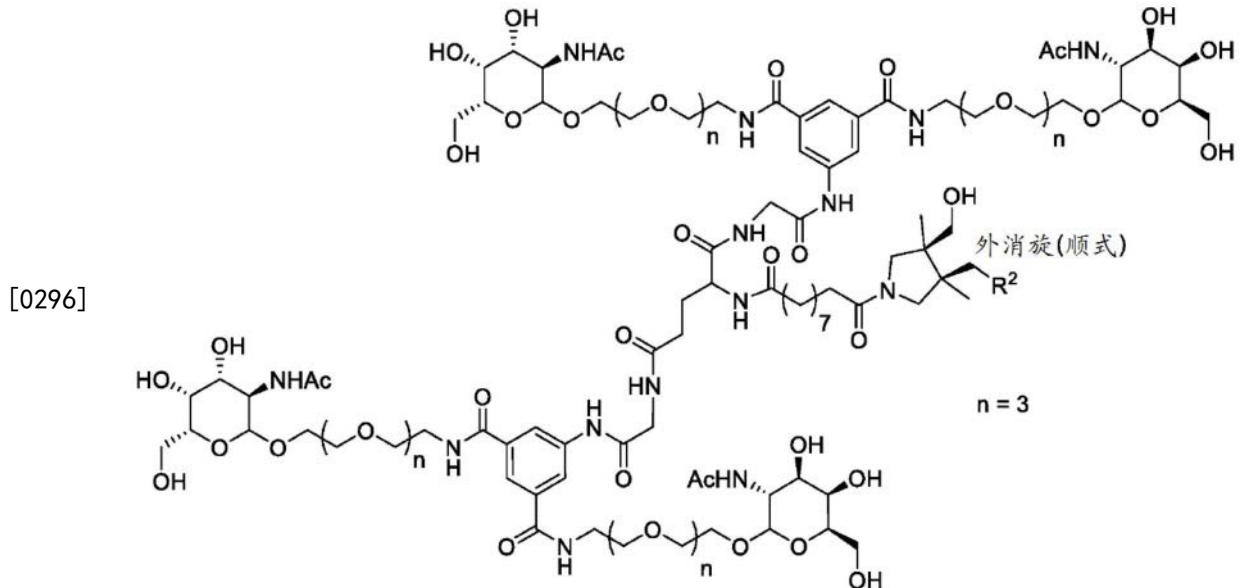
[0291] 或其药学上可接受的盐,其中R²是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0292] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



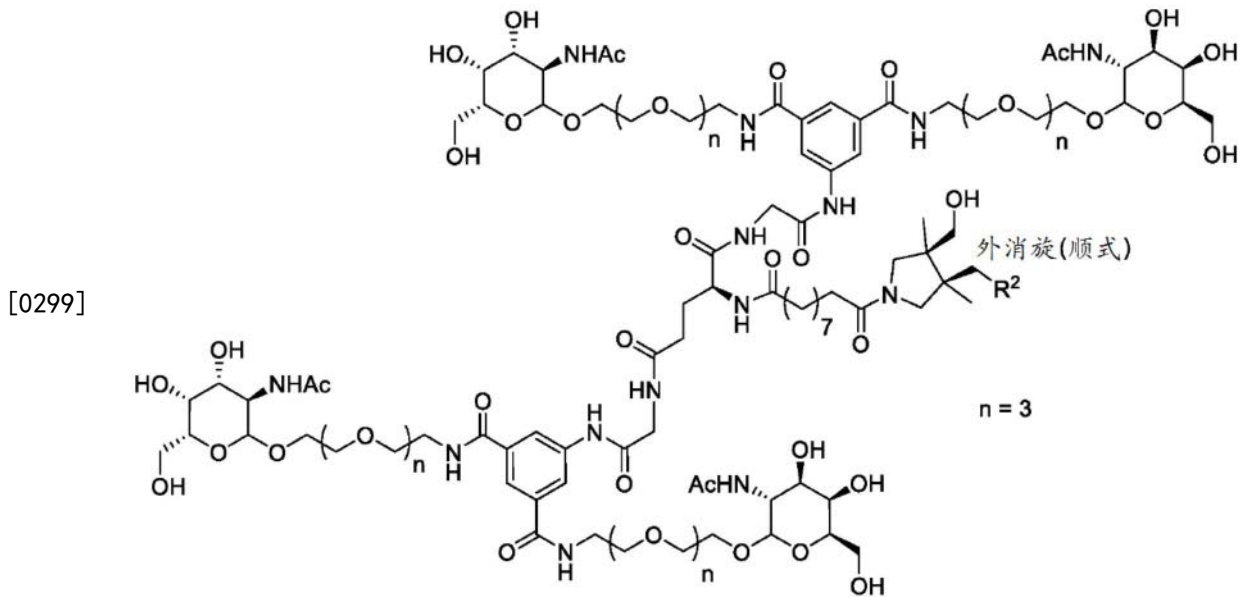
[0294] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0295] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



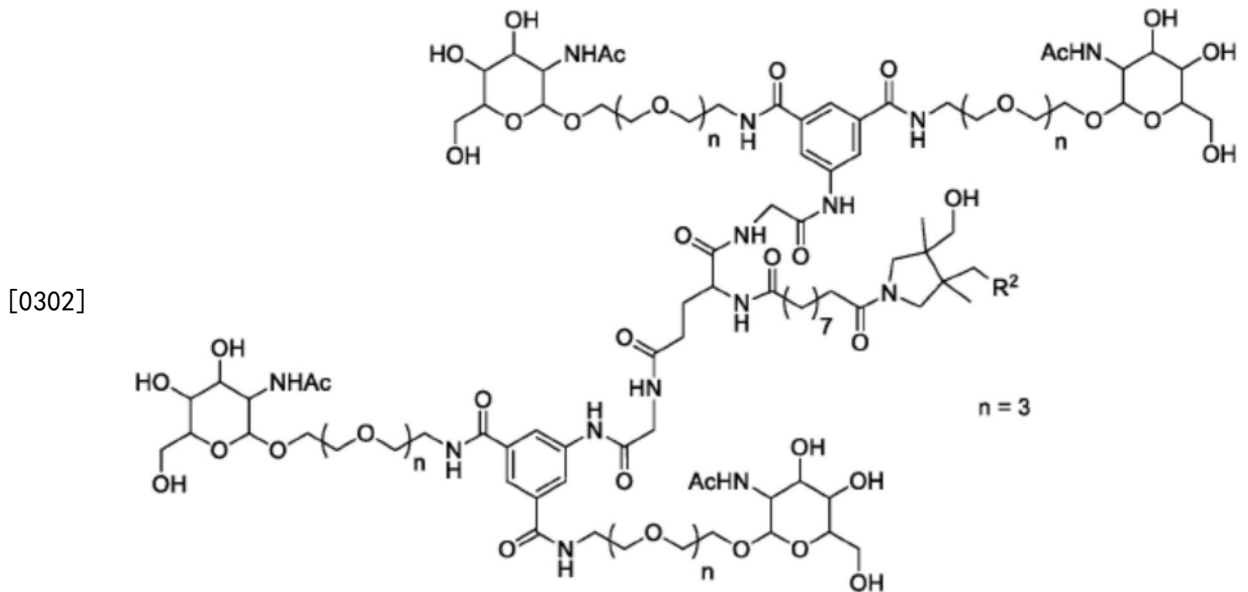
[0297] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0298] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



[0300] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

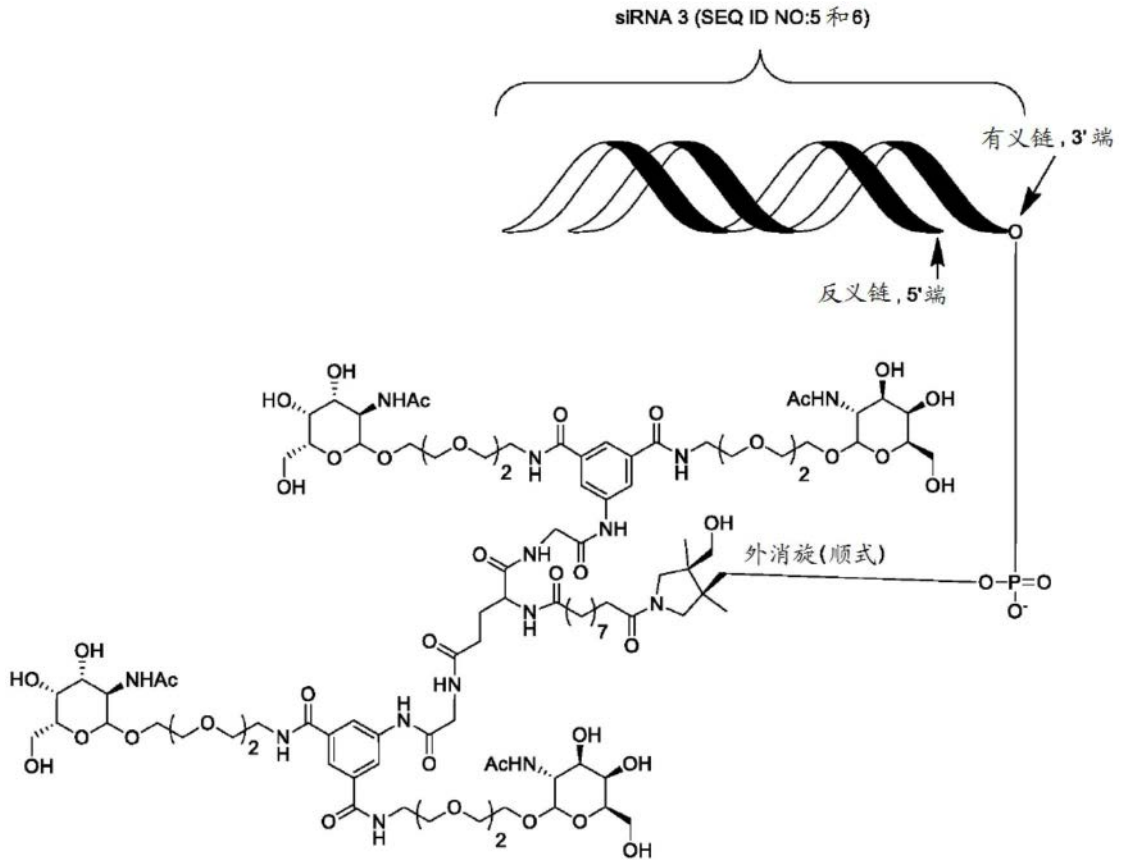
[0301] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



[0303] 或其药学上可接受的盐,其中 R^2 是双链siRNA分子(例如,选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子)。

[0304] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

[0305]



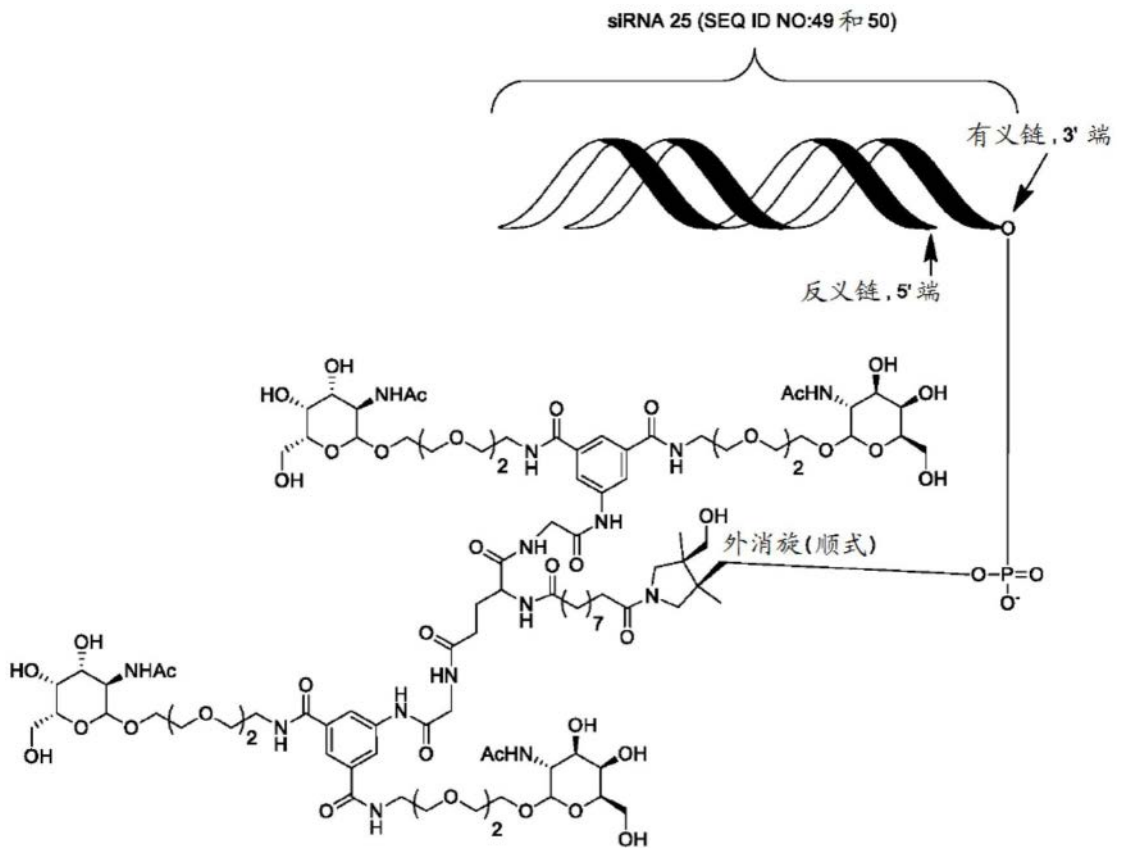
[0306]

或其药学上可接受的盐。

[0307]

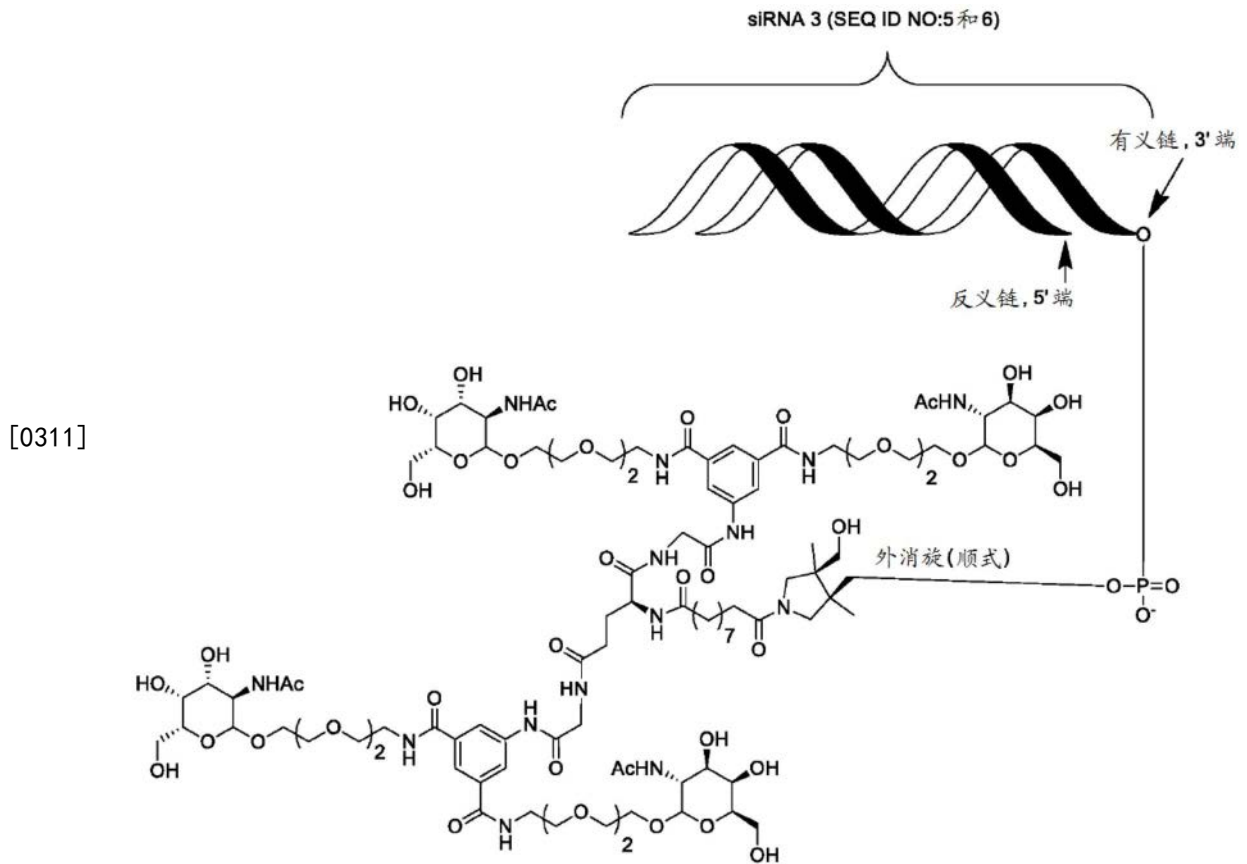
在一个实施方案中,式I的化合物是:

[0308]



[0309] 或其药学上可接受的盐。

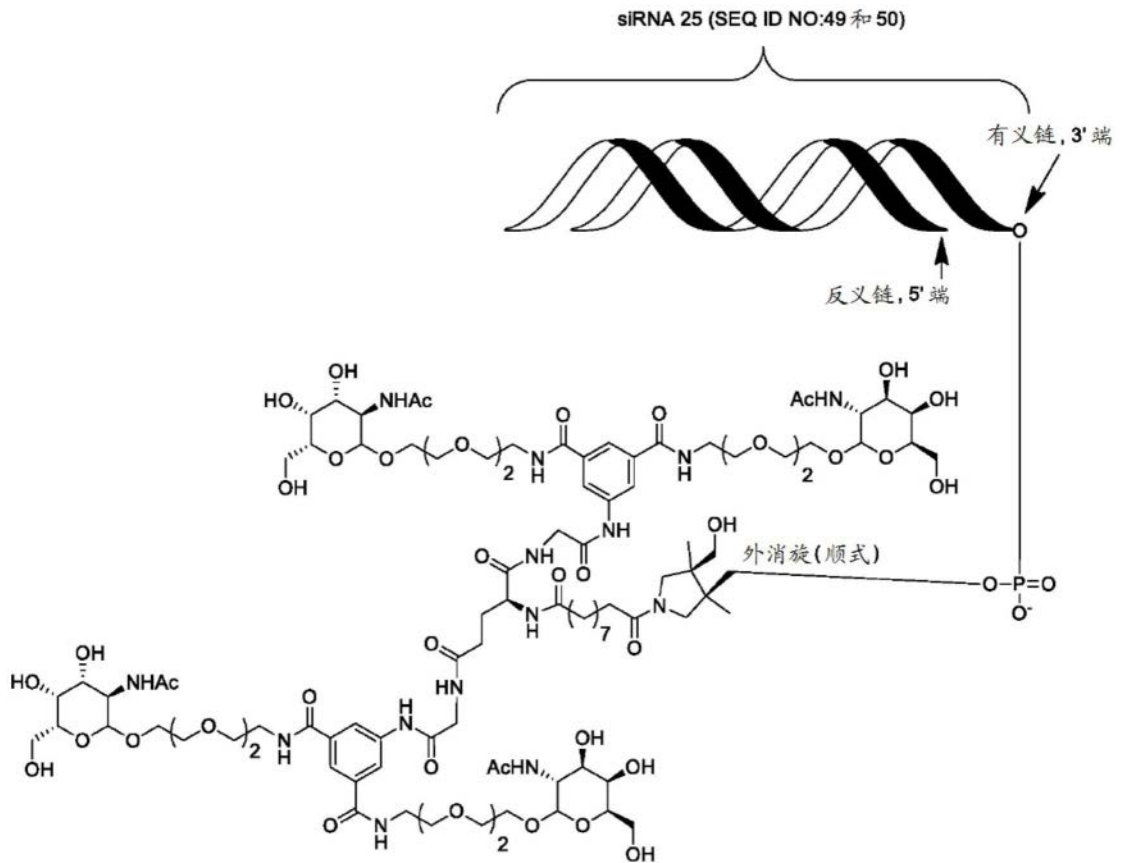
[0310] 在一个实施方案中,式I的化合物是:



[0312] 或其药学上可接受的盐。

[0313] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

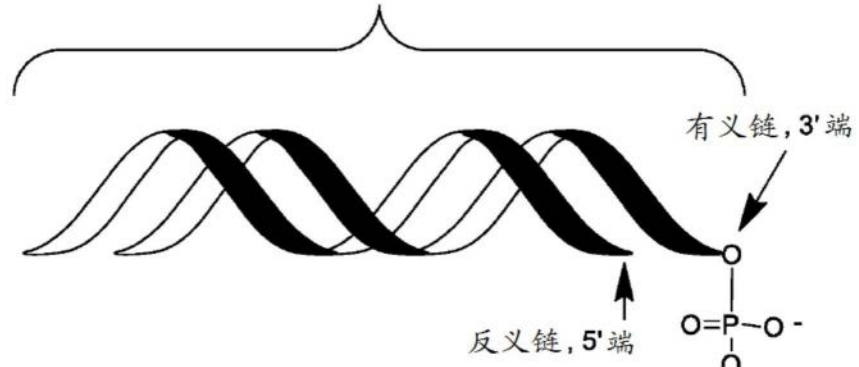
[0314]



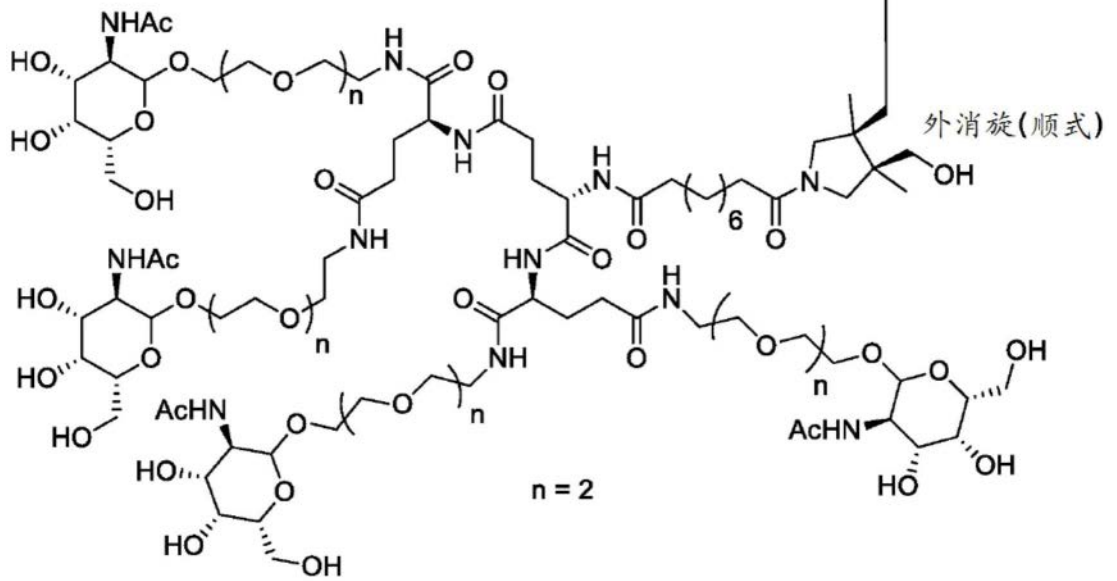
[0315] 或其药学上可接受的盐。

[0316] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

siRNA 3 (SEQ ID NO:5 和 6)



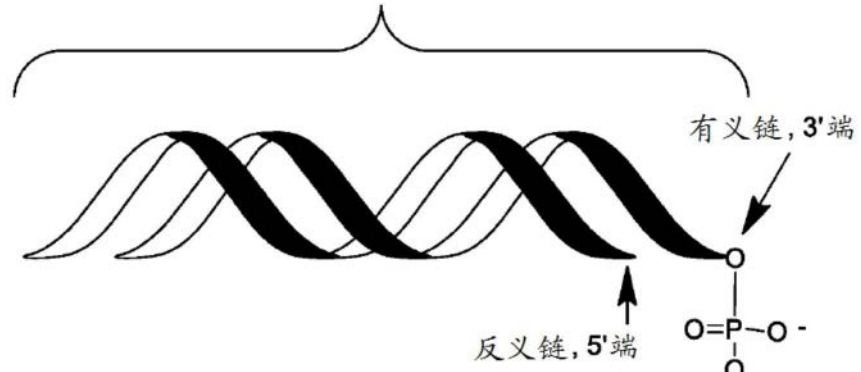
[0317]



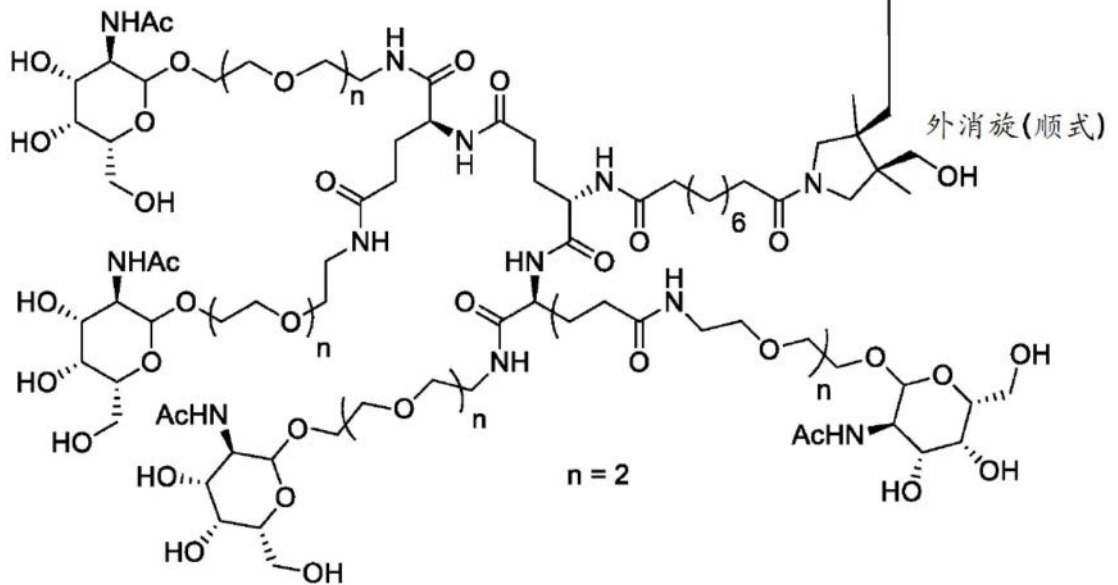
[0318] 或其药学上可接受的盐。

[0319] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

siRNA 25 (SEQ ID NO:49和50)



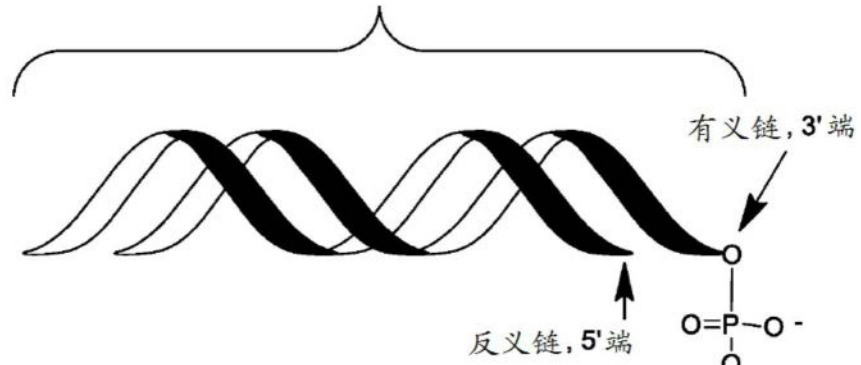
[0320]



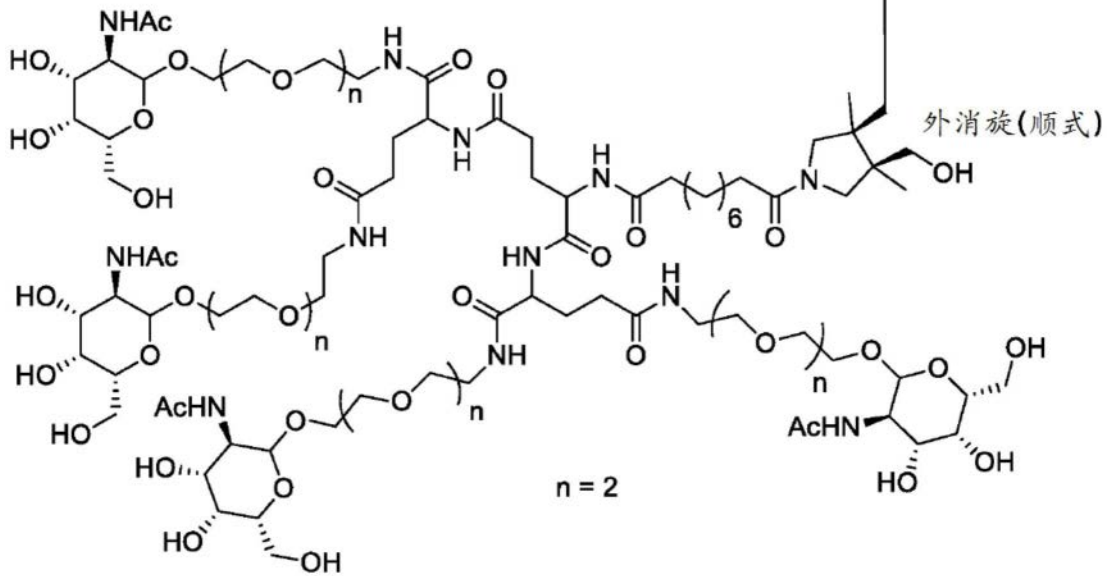
[0321] 或其药学上可接受的盐。

[0322] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

siRNA 3 (SEQ ID NO:5 和 6)



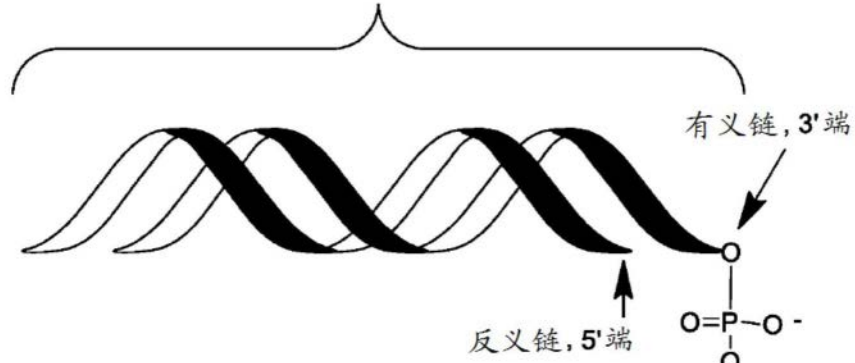
[0323]



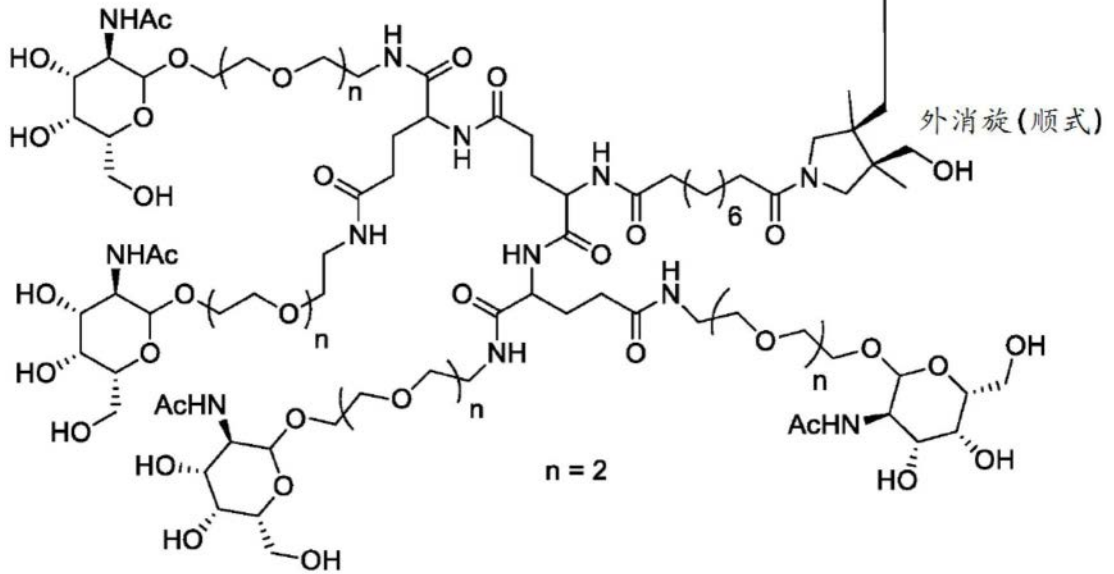
[0324] 或其药学上可接受的盐。

[0325] 在一个实施方案中,式I的化合物是:

siRNA 25 (SEQ ID NO:49 和 50)



[0326]



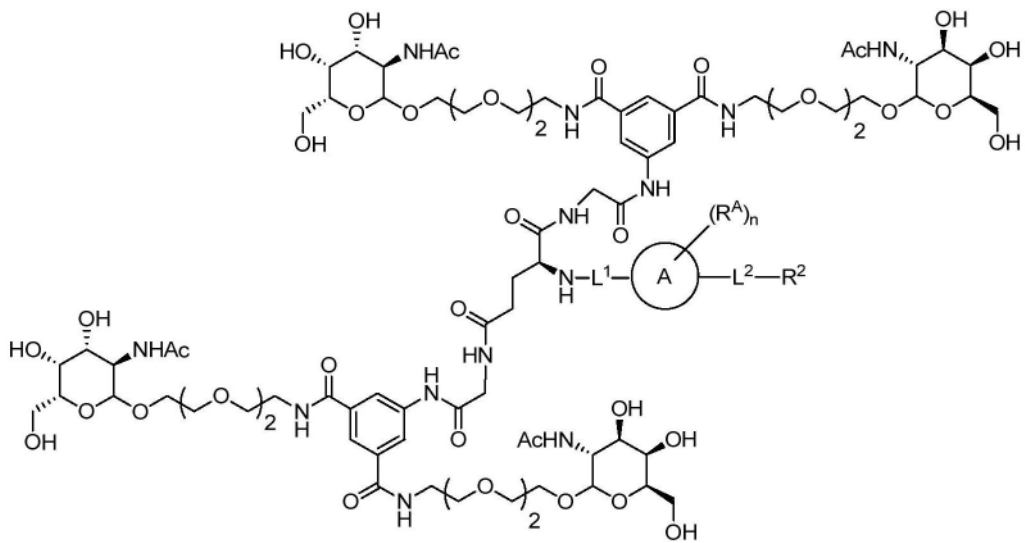
[0327]

或其药学上可接受的盐。

[0328]

在一个实施方案中,本发明提供式 (I) 的化合物:

[0329]



(I)

[0330] 或其盐,

[0331] 其中:

[0332] L^1 不存在或是连接基团;

[0333] L^2 不存在或是连接基团;

[0334] R^2 是核酸;

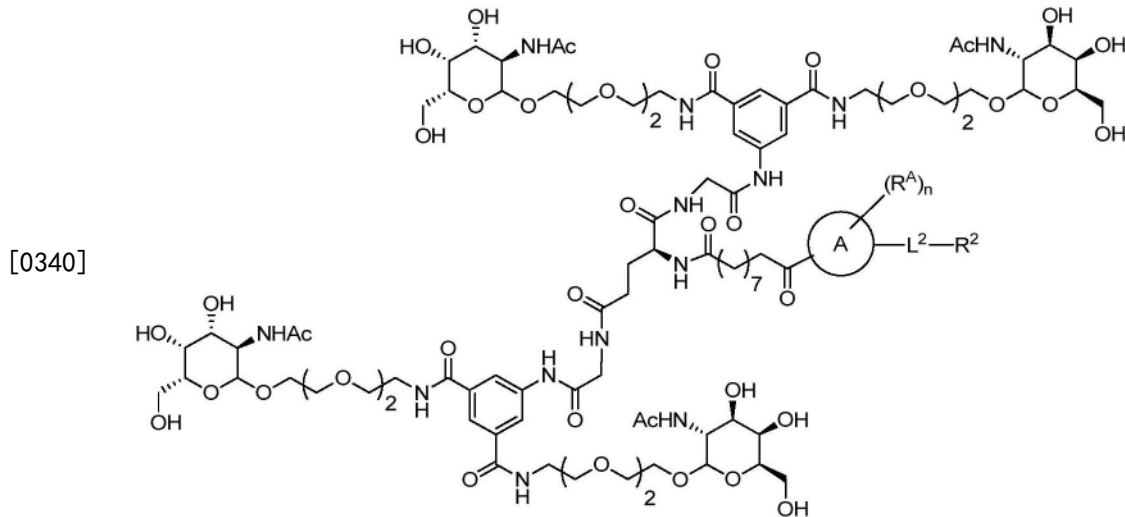
[0335] 环A不存在、是3-20元环烷基、5-20元芳基、5-20元杂芳基或3-20元杂环烷基;

[0336] 每个 R^A 独立地选自自由以下组成的组:氢、羟基、CN、F、Cl、Br、I、 $-C_{1-2}$ 烷基、 $-OR^B$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基;其中 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代:卤基、羟基和 C_{1-3} 烷氧基;

[0337] R^B 是氢、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键;并且

[0338] n是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0339] 在一个实施方案中,本发明提供下式的化合物:



[0341] 或其盐,

[0342] 其中:

[0343] L^2 不存在或是连接基团;

[0344] R^2 是核酸;

[0345] 环A不存在、是3-20元环烷基、5-20元芳基、5-20元杂芳基或3-20元杂环烷基;

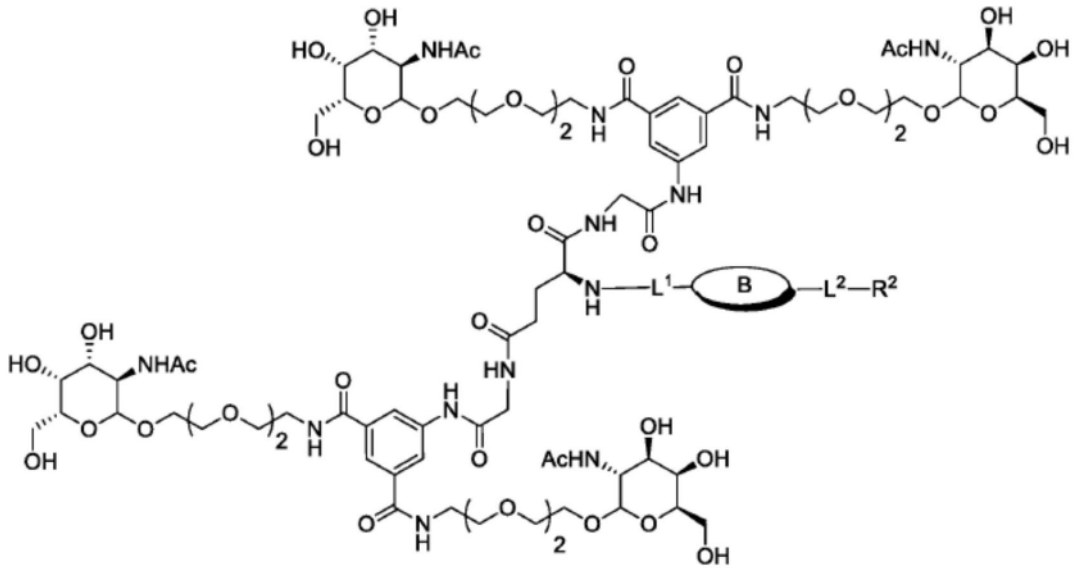
[0346] 每个 R^A 独立地选自自由以下组成的组:氢、羟基、CN、F、Cl、Br、I、 $-C_{1-2}$ 烷基、 $-OR^B$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基;其中 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代:卤基、羟基和 C_{1-3} 烷氧基;

[0347] R^B 是氢、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键;并且

[0348] n是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0349] 在一个实施方案中,本发明提供下式的化合物:

[0350]



[0351] 或其盐,

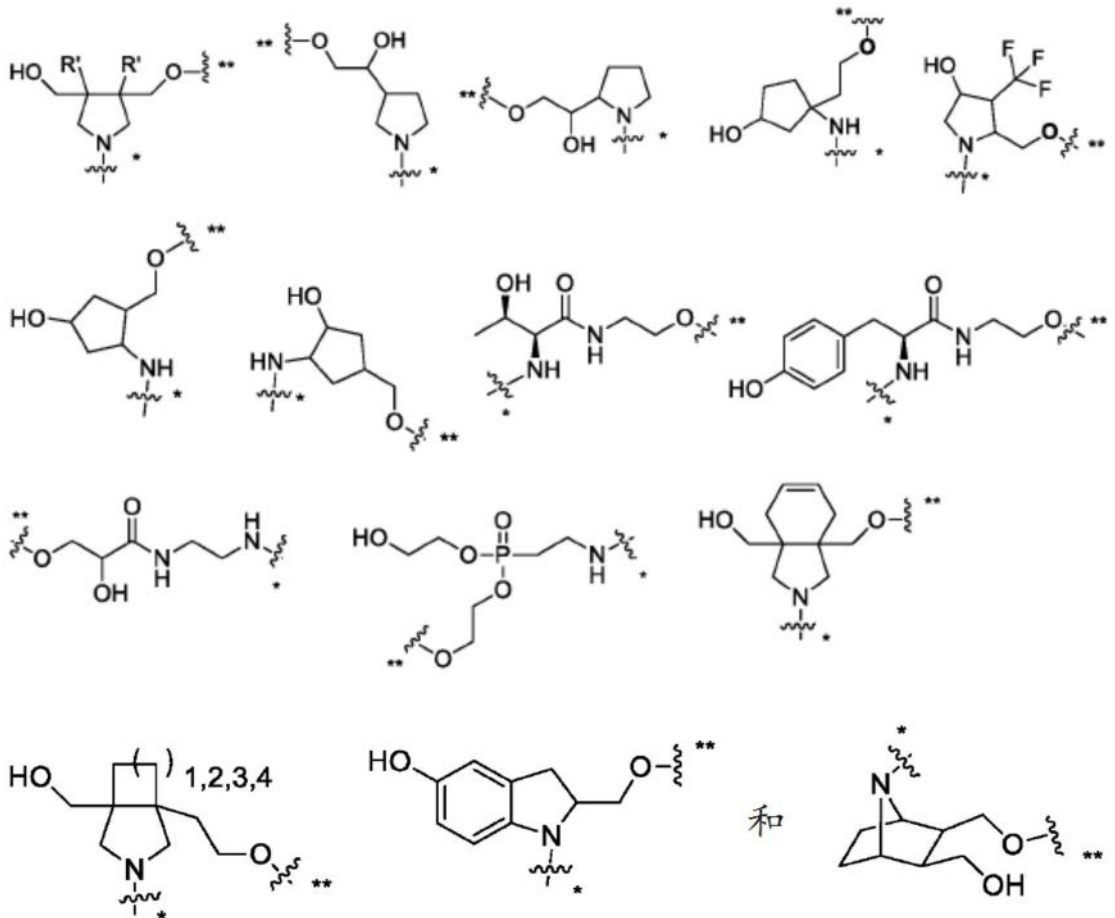
[0352] 其中:

[0353] L^1 不存在或是连接基团;

[0354] L^2 不存在或是连接基团;

[0355] R^2 是核酸;

[0356] B是二价的并且选自由以下组成的组:



[0357]

[0358] 其中:

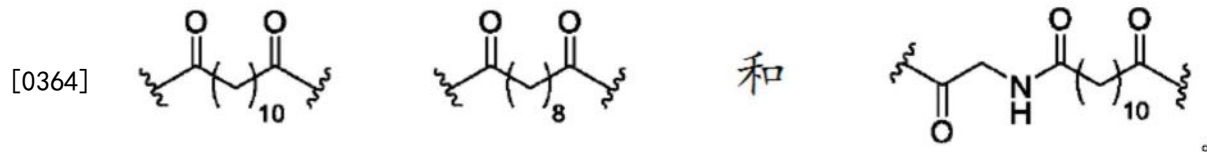
[0359] 每个R' 独立地是C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基；其中C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基任选地被卤基或羟基取代；

[0360] 以*标记的化合价连接至L¹或如果L¹不存在则连接至R¹；并且

[0361] 以**标记的化合价连接至L²或如果L²不存在则连接至R²。

[0362] 在一个实施方案中，L¹和L²独立地是具有1至50个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链，其中烃链中的一个或多个（例如，1、2、3或4个）碳原子任选地被-O-、-NR^X-、-NR^X-C(=O)-、-C(=O)-NR^X-或-S- 置换，并且其中R^X是氢或(C1-C6)烷基，并且其中烃链任选地被一个或多个选自以下的取代基取代：(C1-C6)烷氧基、(C3-C6)环烷基、(C1-C6)烷酰基、(C1-C6)烷酰基氧基、(C1-C6)烷氧基羰基、(C1-C6)烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

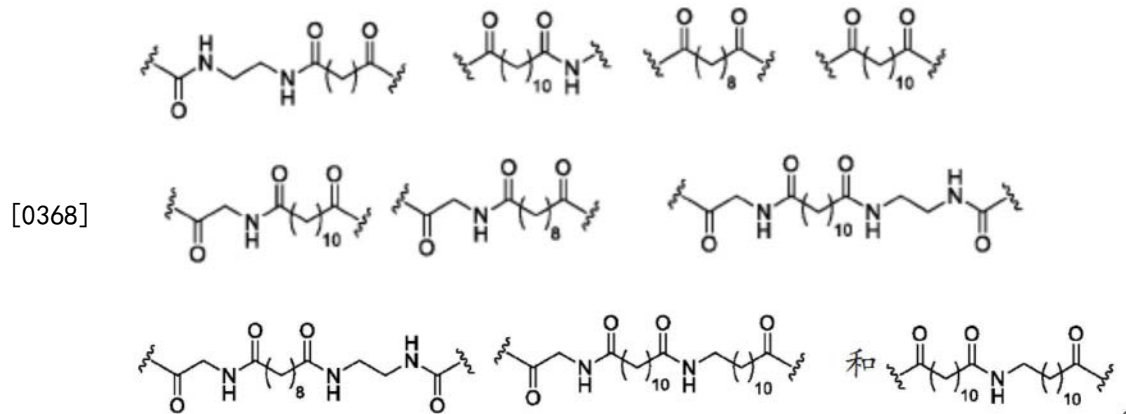
[0363] 在一个实施方案中，L¹选自由以下组成的组：



[0365] 或其盐。

[0366] 在一个实施方案中，L¹通过选自由以下组成的组的键联连接至B¹：-O-、-S-、-C(=O)-、-C(=O)-NH-、-NH-C(=O)-、-C(=O)-O-、-NH-C(=O)-NH-或-NH-(SO₂)-。

[0367] 在一个实施方案中，L¹选自由以下组成的组：

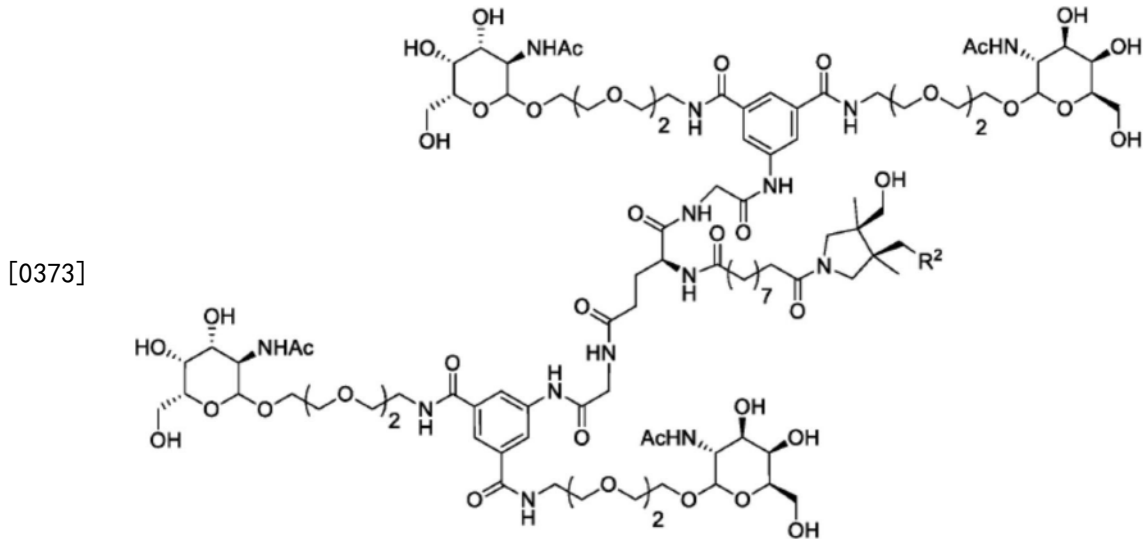


[0369] 在一个实施方案中，L²通过-O-连接至R²。

[0370] 在一个实施方案中，L²是任选地被羟基取代的C₁₋₄亚烷基-O-。

[0371] 在一个实施方案中，L²不存在。

[0372] 在一个实施方案中，本发明提供以下化合物，



[0374] 或其盐,其中 R^2 是核酸。

[0375] 本发明的一个方面是包含式I的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0376] 本发明的另一方面是将双链siRNA递送至动物肝脏的方法,所述方法包括向动物施用式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0377] 本发明的另一方面是治疗动物的疾病或病症(例如,肝病或病毒感染,如乙型肝炎病毒感染)的方法,所述方法包括向动物施用式I的化合物或其药学上可接受的盐。

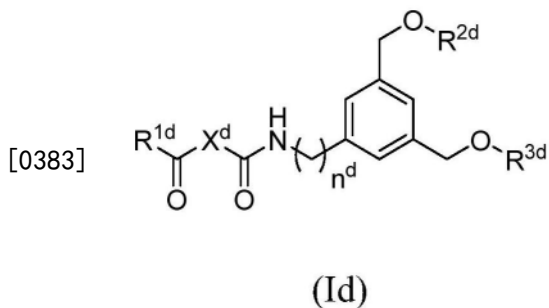
[0378] 本发明的某些实施方案提供式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其用于医学疗法中。

[0379] 本发明的某些实施方案提供式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其用于预防性或治疗性治疗动物的疾病或病症(例如,肝病或病毒感染,如乙型肝炎病毒感染)。

[0380] 本发明的某些实施方案提供式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于制备用以治疗动物的疾病或病症(例如,肝病或病毒感染,如乙型肝炎病毒感染)的药物的用途。

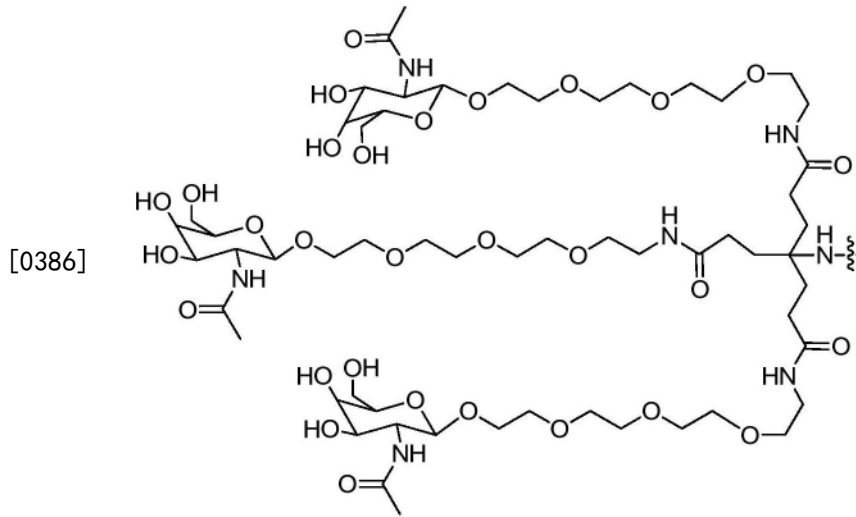
[0381] 在某些实施方案中,动物是哺乳动物,如人(例如,HBV感染的患者)。

[0382] 在一个实施方案中,式I的化合物具有以下式(Id):

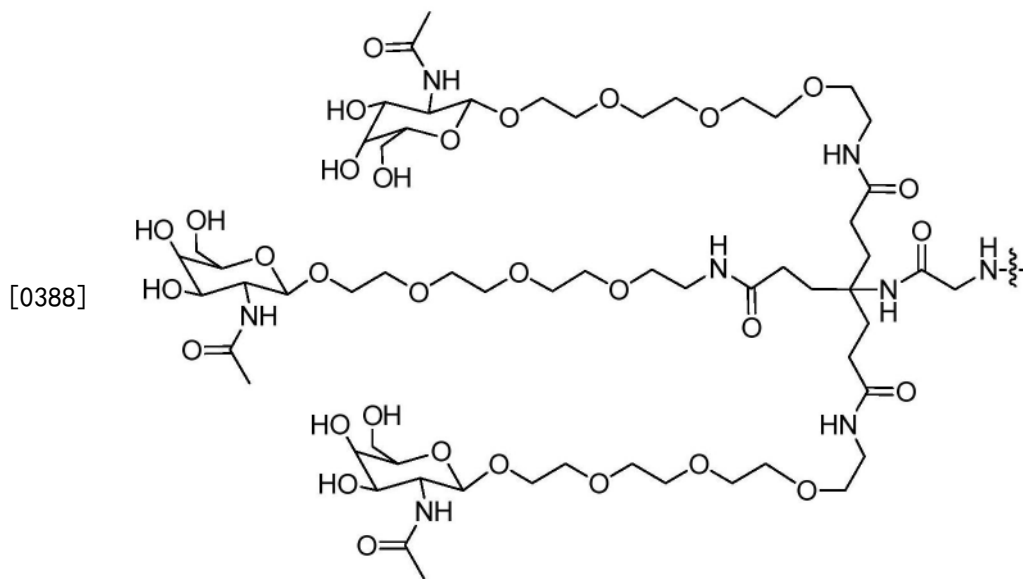


[0384] 其中:

[0385] R^{1d} 选自:



[0387] 和



[0389] X^d 是 C_{2-10} 亚烷基;

[0390] n^d 是0或1;

[0391] R^{2d} 是选自表1的双链siRNA的双链siRNA分子;并且

[0392] R^{3d} 是H、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键。

[0393] 在一个实施方案中, R^{3d} 包括将式Id化合物的剩余部分连结至固体载体的连接基团。连接基团的性质不关键,前提是所述化合物是适于制备式Id化合物的中间体,其中 R^{2d} 是选自表1的双链siRNA的双链siRNA分子。

[0394] 在一个实施方案中, R^{3d} 中的接头的分子量为约20道尔顿至约1,000道尔顿。

[0395] 在一个实施方案中, R^{3d} 中的接头的分子量为约20道尔顿至约500道尔顿。

[0396] 在一个实施方案中, R^{3d} 中的接头将固体载体与式I的化合物的剩余部分分开约5埃至约40埃(包括端值)长。

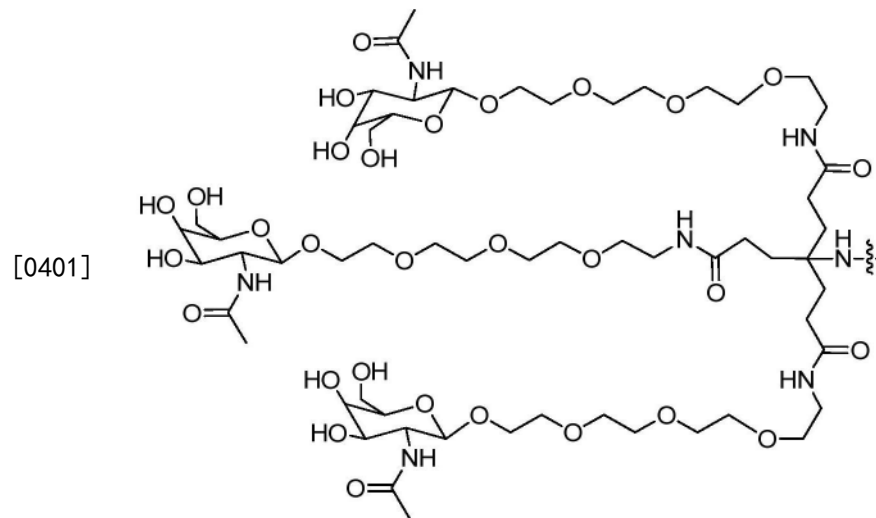
[0397] 在一个实施方案中, R^{3d} 中的接头是具有2至15个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被(-O-)或(-N(H)-)置换,并且其中所述链在碳上任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基

取代: (C₁-C₆) 烷氧基、(C₃-C₆) 环烷基、(C₁-C₆) 烷酰基、(C₁-C₆) 烷酰基氧基、(C₁-C₆) 烷氧基羰基、(C₁-C₆) 烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

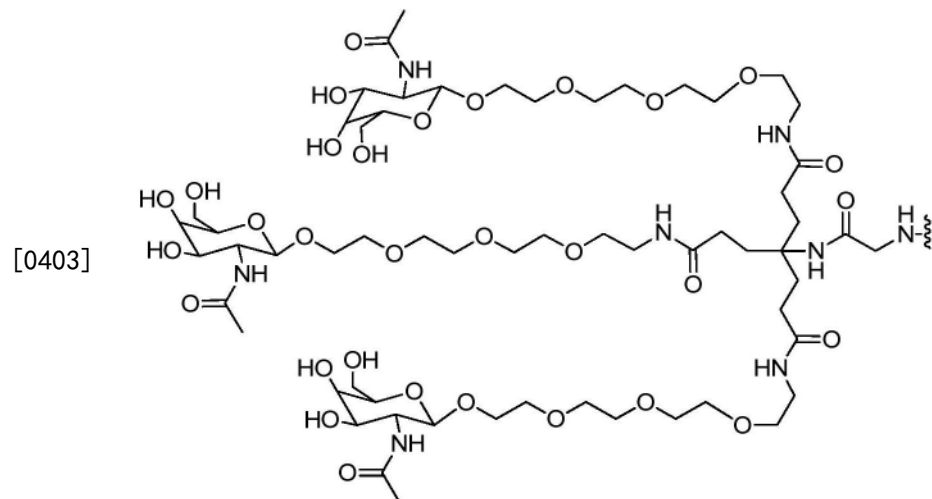
[0398] 在一个实施方案中, R^{3d}中的接头是具有2至10个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链, 其中一个或多个(例如, 1、2、3或4个)碳原子任选地被(-O-)或(-N(H)-)置换, 并且其中所述链在碳上任选地被一个或多个(例如, 1、2、3或4个)选自以下的取代基取代: (C₁-C₆) 烷氧基、(C₃-C₆) 环烷基、(C₁-C₆) 烷酰基、(C₁-C₆) 烷酰基氧基、(C₁-C₆) 烷氧基羰基、(C₁-C₆) 烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

[0399] 在一个实施方案中, R^{3d}中的接头是-C(=O)CH₂CH₂C(=O)N(H)-。

[0400] 在一个实施方案中, R^{1d}是:



[0402] 在一个实施方案中, R^{1d}是:



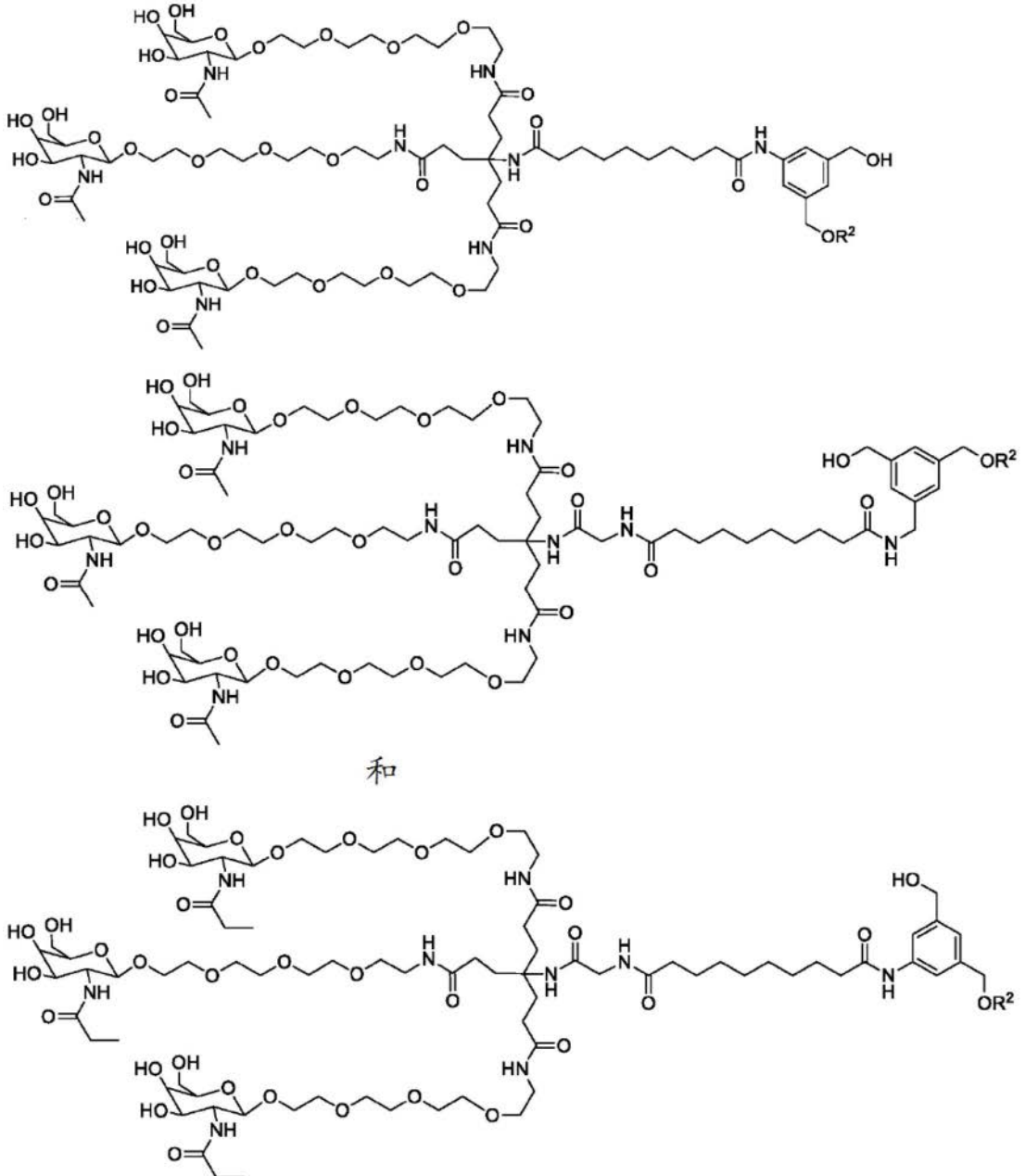
[0404] 在一个实施方案中, X^d是C₈亚烷基。

[0405] 在一个实施方案中, n^d是0。

[0406] 在一个实施方案中, R^{2d}是siRNA。

[0407] 在一个实施方案中, R^{3d}是H。

[0408] 在另一个实施方案中, (Id) 的化合物或其盐选自由以下组成的组:



[0410] 及其盐。

[0411] 本发明的一个方面是包含式 (Id) 化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0412] 本发明的一个方面是将双链 siRNA 递送至动物肝脏的方法, 所述方法包括向动物施用式 (Id) 化合物或其药学上可接受的盐。

[0413] 本发明的另一方面是治疗动物的疾病或病症 (例如, 病毒感染, 如乙型肝炎病毒感染) 的方法, 所述方法包括向动物施用式 (Id) 化合物或其药学上可接受的盐。

[0414] 本发明的某些实施方案提供式 (Id) 化合物或其药学上可接受的盐, 其用于医学疗法中。

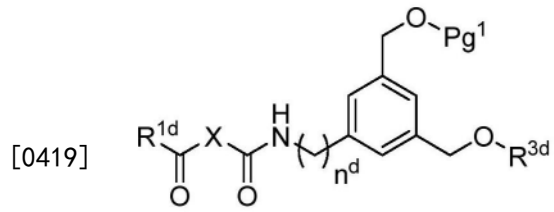
[0415] 本发明的某些实施方案提供式 (Id) 化合物或其药学上可接受的盐, 其用于预防性或治疗性治疗动物的疾病或病症 (例如, 病毒感染, 如乙型肝炎病毒感染)。

[0416] 本发明的某些实施方案提供式 (Id) 化合物或其药学上可接受的盐用于制备用以

治疗动物的疾病或病症(例如,病毒感染,如乙型肝炎病毒感染)的药物的用途。

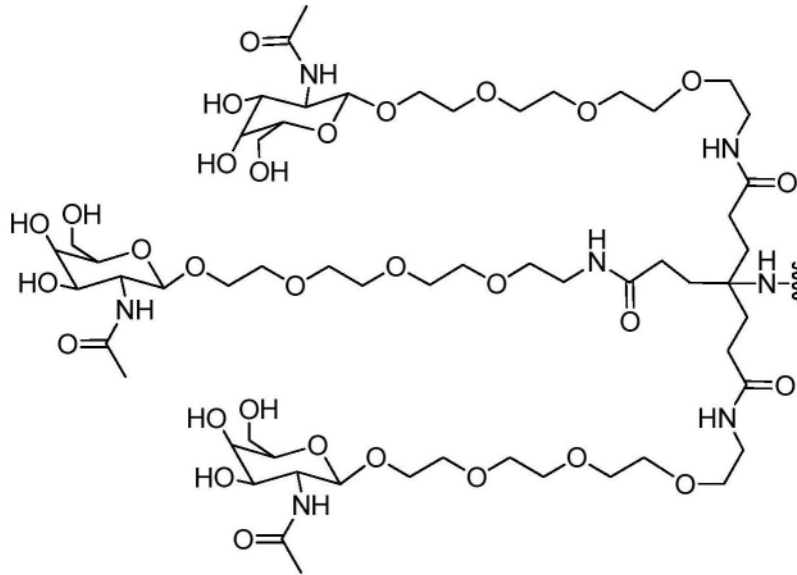
[0417] 在某些实施方案中,动物是哺乳动物,如人(例如,HBV感染的患者)。

[0418] 本发明还提供可用于制备式(I_d)化合物的本文公开的合成中间体和方案。例如,本发明包括式I_e的中间体化合物:

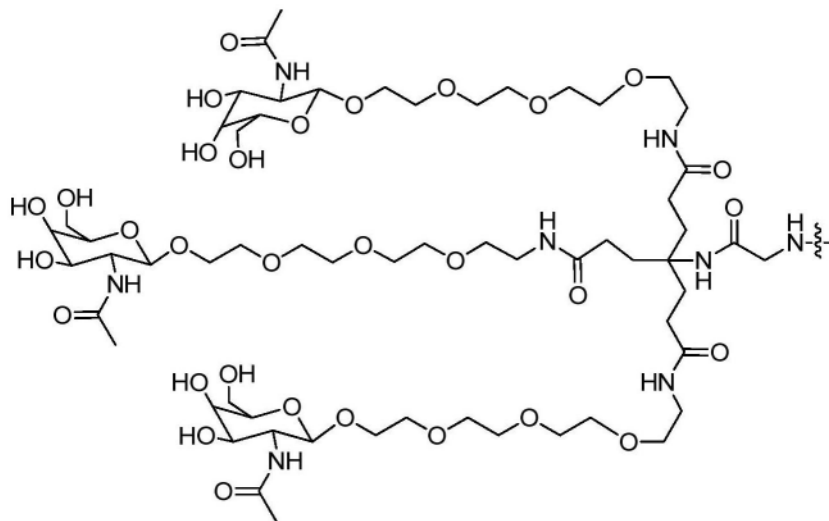
(I_e)

[0420] 或其盐,其中:

[0421] R^{1d}选自:



[0422] 和



[0423] X^d 是 C_{2-8} 亚烷基;

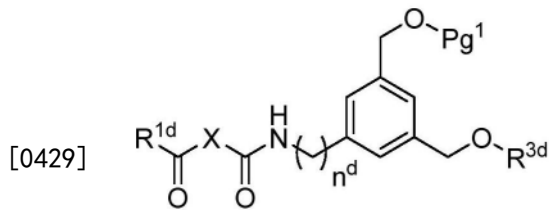
[0424] n^d 是0或1;

[0425] Pg^1 是H或适合的保护基团;并且

[0426] R^{3d} 是H、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键。图1说明式(Ie)的代表性中间体化合物,其中靶向配体/接头键合至固相载体,并且其中 Pg^1 是保护基团DMTr。

[0427] 在一个实施方案中, Pg^1 是TMTTr(三甲氧基三苯甲基)、DMTr(二甲氧基三苯甲基)、MMTr(单甲氧基三苯甲基)或Tr(三苯甲基)。

[0428] 本发明还提供制备如本文所述的式(Ie)化合物的方法,所述方法包括使相应的式(Ie)化合物经受固相核酸合成条件以提供相应的式(Ie)化合物:



(Ie)

[0430] 在所述式(Ie)中:

[0431] X^d 是 C_{2-8} 亚烷基;

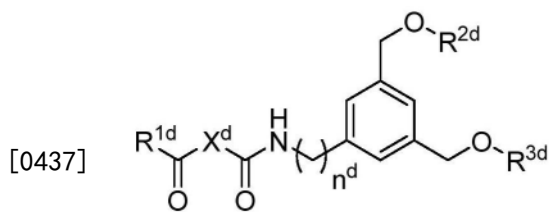
[0432] n^d 是0或1;

[0433] Pg^1 是H;并且

[0434] R^{3d} 是至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键;在所述式(Ie)中, R^{2d} 是选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子。

[0435] 在一个实施方案中,所述方法还包括从固体载体除去所述化合物以提供相应的式(Ie)化合物,其中 R^{3d} 是H。

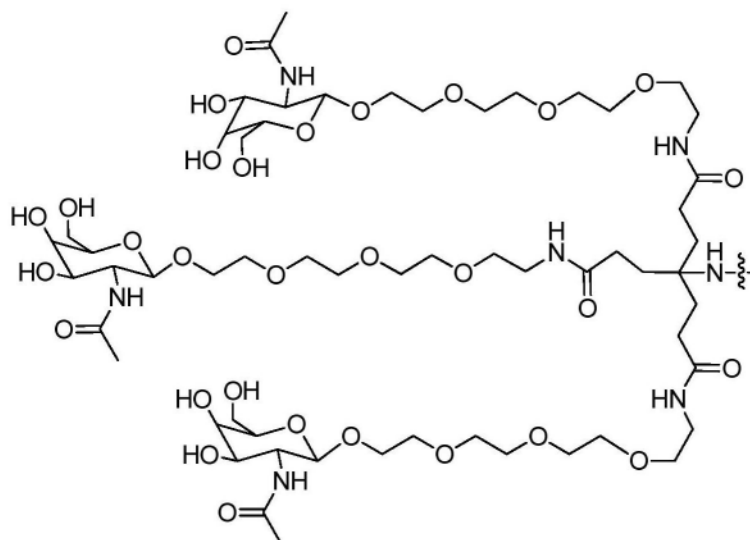
[0436] 在一个实施方案中,所述化合物不为式(Ie)化合物:



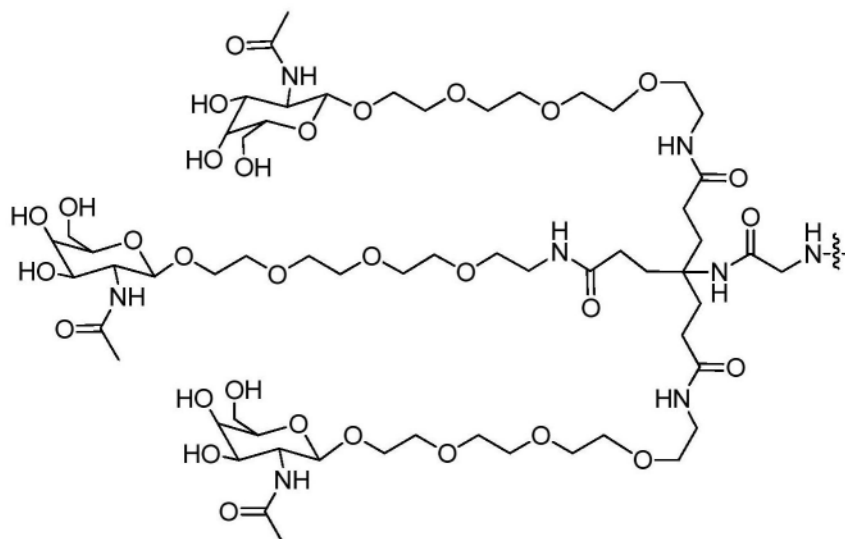
(Id)

[0438] 或其盐,其中:

[0439] R^{1d} 选自:



[0440] 和



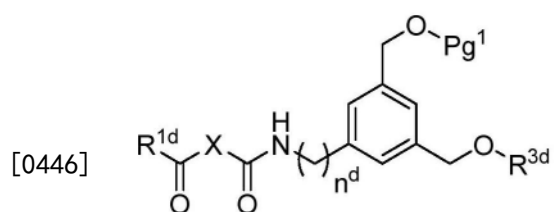
[0441] X^d 是 C_{2-10} 亚烷基;

[0442] N^d 是0或1;

[0443] R^{2d} 是选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子;并且

[0444] R^{3d} 是H、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键。

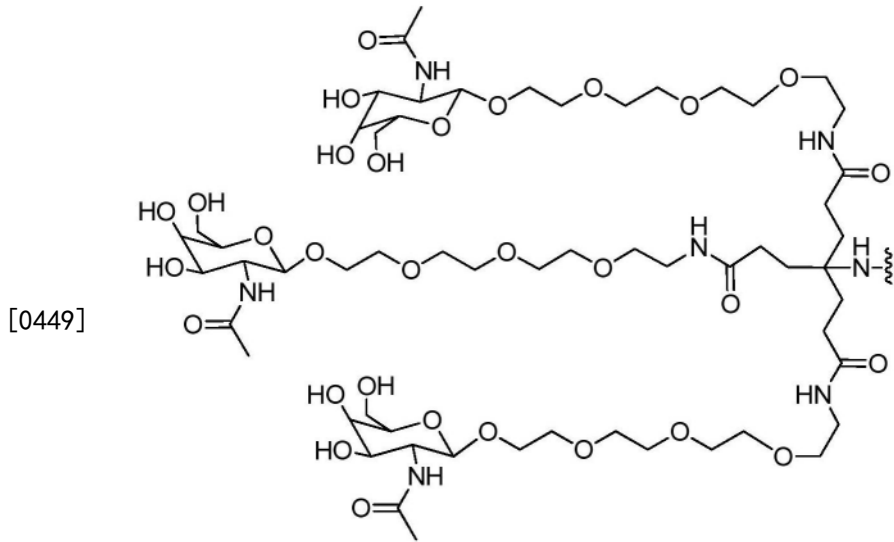
[0445] 在一个实施方案中,化合物不为化合物式Ie:



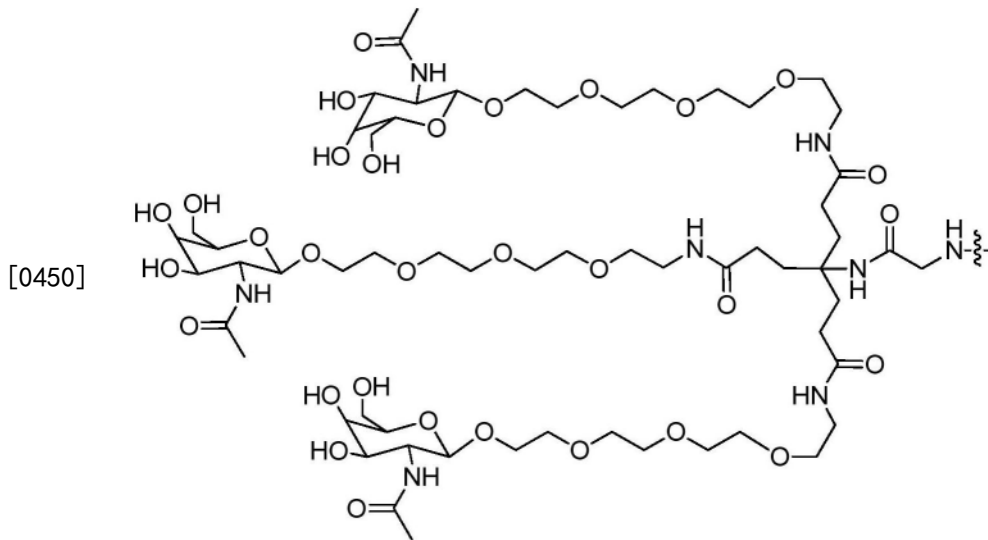
(Ie)

[0447] 或其盐,其中:

[0448] R^{1d} 选自:



和



[0451] X^d 是 C_{2-8} 亚烷基;

[0452] n^d 是0或1;

[0453] Pg^1 是H或适合的保护基团;并且

[0454] R^{3d} 是H、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键。

[0455] 在一个实施方案中, R^{3d} 是H。

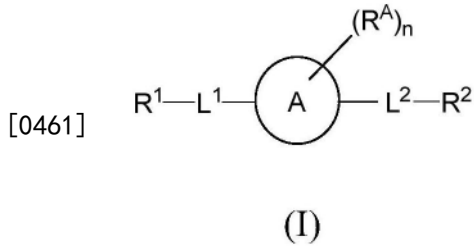
[0456] 在一个实施方案中, R^{3d} 是至固体载体的共价键。

[0457] 在一个实施方案中, R^{3d} 是至结合至固体载体的连接基团的键,其中连接基团是具有2至15个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被(-O-)或(-N(H)-)置换,并且其中所述链在碳上任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基取代:(C_1-C_6)烷氧基、(C_3-C_6)环烷基、(C_1-C_6)烷酰基、(C_1-C_6)烷酰基氧基、(C_1-C_6)烷氧基羰基、(C_1-C_6)烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

[0458] 在一个实施方案中, R^{3d} 是至结合至固体载体的连接基团的键, 其中连接基团是具有2至10个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链, 其中一个或多个(例如, 1、2、3或4个)碳原子任选地被(-O-)或(-N(H)-)置换, 并且其中所述链在碳上任选地被一个或多个(例如, 1、2、3或4个)选自以下的取代基取代: (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_3-C_6) 环烷基、 (C_1-C_6) 烷酰基、 (C_1-C_6) 烷酰基氧基、 (C_1-C_6) 烷氧基羰基、 (C_1-C_6) 烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

[0459] 在一个实施方案中, R^{3d} 是至结合至固体载体的连接基团的键, 其中连接基团是 $-C(=O)CH_2CH_2C(=O)N(H)-$ 。

[0460] 在一个实施方案中, 本发明提供式(I)化合物:



[0462] 或其盐,

[0463] 其中:

[0464] R^1 是H或合成活化基团;

[0465] L^1 不存在或是连接基团;

[0466] L^2 不存在或是连接基团;

[0467] R^2 是选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子;

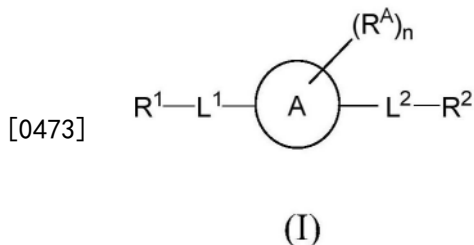
[0468] 环A不存在、是3-20元环烷基、5-20元芳基、5-20元杂芳基或3-20元杂环烷基;

[0469] 每个 R^A 独立地选自由以下组成的组: 氢、羟基、CN、F、Cl、Br、I、 $-C_{1-2}$ 烷基、 $-OR^B$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基; 其中 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代: 卤基、羟基和 C_{1-3} 烷氧基;

[0470] R^B 是氢、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键; 并且

[0471] n 是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0472] 在一个实施方案中, 本发明提供式(I)的化合物:



[0474] 或其盐,

[0475] 其中:

[0476] R^1 是靶向配体;

[0477] L^1 不存在或是连接基团;

[0478] L^2 不存在或是连接基团;

[0479] R^2 是H或合成活化基团；

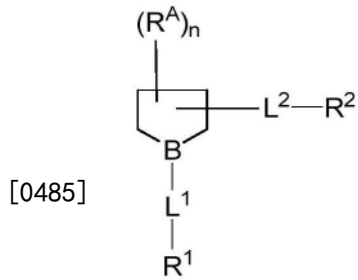
[0480] 环A不存在、是3-20元环烷基、5-20元芳基、5-20元杂芳基或3-20元杂环烷基；

[0481] 每个 R^A 独立地选自自由以下组成的组：氢、羟基、CN、F、Cl、Br、I、 $-C_{1-2}$ 烷基- OR^B 、 C_{1-10} 烷基 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基；其中 C_{1-10} 烷基 C_{2-10} 烯基和 C_{2-10} 炔基任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代：卤基、羟基和 C_{1-3} 烷氧基；

[0482] R^B 是氢、保护基团、至固体载体的共价键或至结合至固体载体的连接基团的键；并且

[0483] n是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0484] 在一个实施方案中，本发明提供式 (Ig) 的化合物：



[0486] 或其盐，

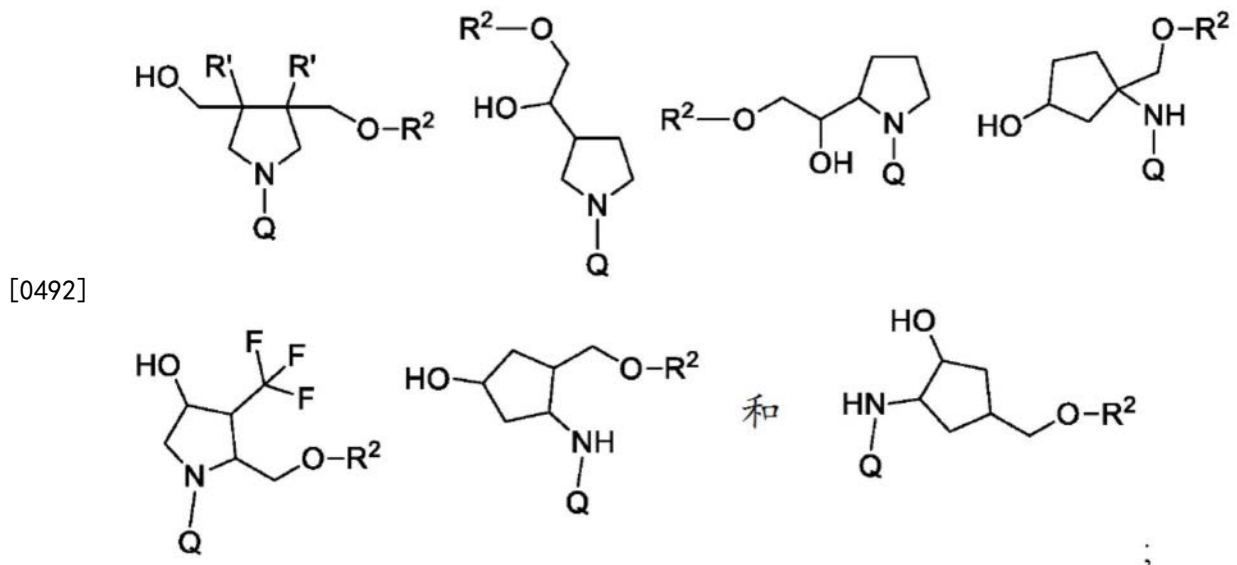
[0487] 其中：

[0488] B是-N-或-CH-；

[0489] L^2 是任选地被羟基或卤基取代的 C_{1-4} 亚烷基-0-；并且

[0490] n是0、1、2、3、4、5、6或7。

[0491] 在一个实施方案中，本发明提供选自自由以下组成的组的化合物：



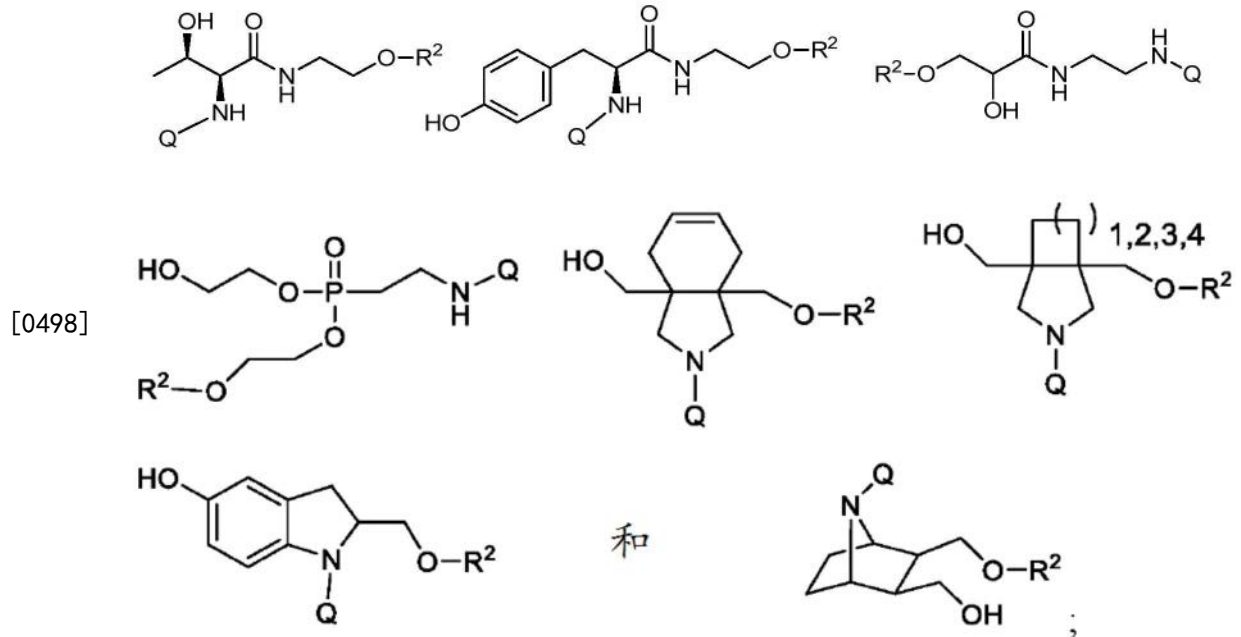
[0493] 及其盐，

[0494] 其中

[0495] Q是 $-L^1-R^1$ ；并且

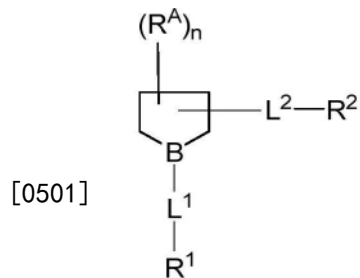
[0496] R' 是C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基；其中C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基任选地被卤基或羟基取代。

[0497] 在一个实施方案中，本发明提供选自以下组成的组的化合物：



[0499] 及其盐，其中：Q是-L¹-R¹。

[0500] 在一个实施方案中，本发明提供式 (Ig) 的化合物：



(Ig)

[0502] 或其盐，

[0503] 其中：

[0504] B是-N-或-CH-；

[0505] L¹不存在或是连接基团；

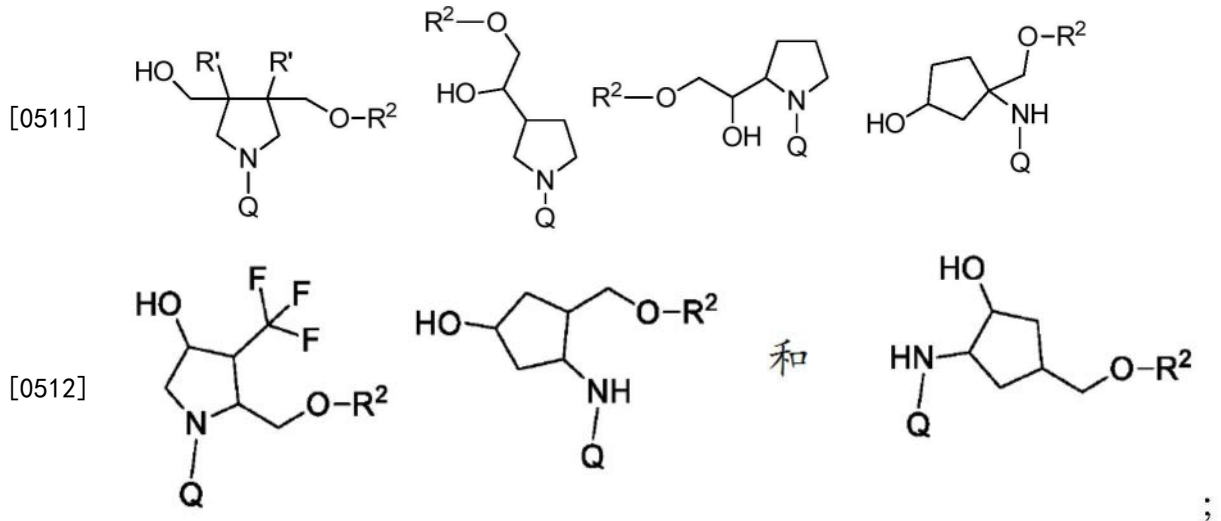
[0506] L²是任选地被羟基或卤基取代的C₁₋₄亚烷基-0-；

[0507] n是0、1、2、3、4、5、6或7；

[0508] R¹是H或合成活化基团；并且

[0509] R²是H或合成活化基团。

[0510] 在一个实施方案中，本发明提供选自以下组成的组的化合物：



[0513] 或其盐,

[0514] 其中Q是-L¹-R¹;

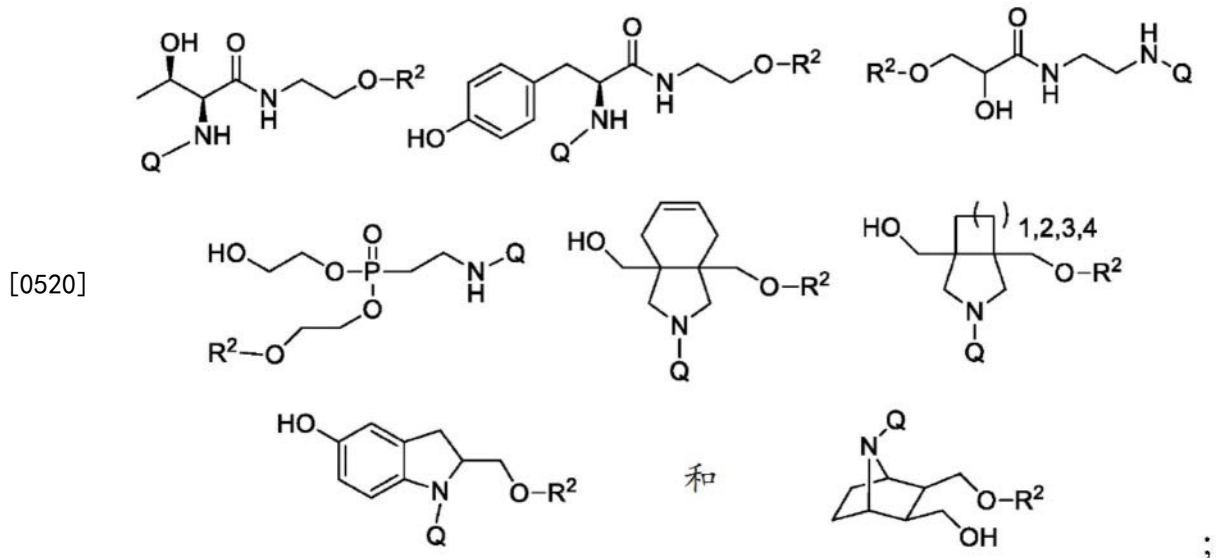
[0515] L¹不存在或是连接基团;

[0516] R' 是C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基;其中C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基任选地被卤基或羟基取代;

[0517] R¹是H或合成活化基团;并且

[0518] R²是H或合成活化基团。

[0519] 在一个实施方案中,本发明提供选自由以下组成的组的化合物:



[0521] 或其盐,

[0522] 其中:

[0523] Q是-L¹-R¹;

[0524] L¹不存在或是连接基团;

[0525] R¹是H或合成活化基团;并且

[0526] R²是H或合成活化基团。

[0527] 在一个实施方案中,R¹是H或可衍生自DCC、HOBt、EDC、BOP、PyBOP或HBTU的合成活

化基团。

[0528] 在一个实施方案中, R^2 是 H、乙酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯或琥珀酸酯。

[0529] 在一个实施方案中, R^1 是可衍生自 DCC、HOBT、EDC、BOP、PyBOP 或 HBTU 的合成活化基团。

[0530] 在一个实施方案中, R^2 是乙酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯或琥珀酸酯。

[0531] 在一个实施方案中, L^1 是具有 5 至 20 个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链, 其中烃链中的一个或多个 (例如, 1、2、3 或 4 个) 碳原子任选地被 -O-、-NH-、-NH-C(=O)-、-C(=O)-NH- 或 -S- 置换。

[0532] 在一个实施方案中, 本发明提供式 (XX) 的化合物:



[0533]

(XX)

[0534] 或其盐,

[0535] 其中:

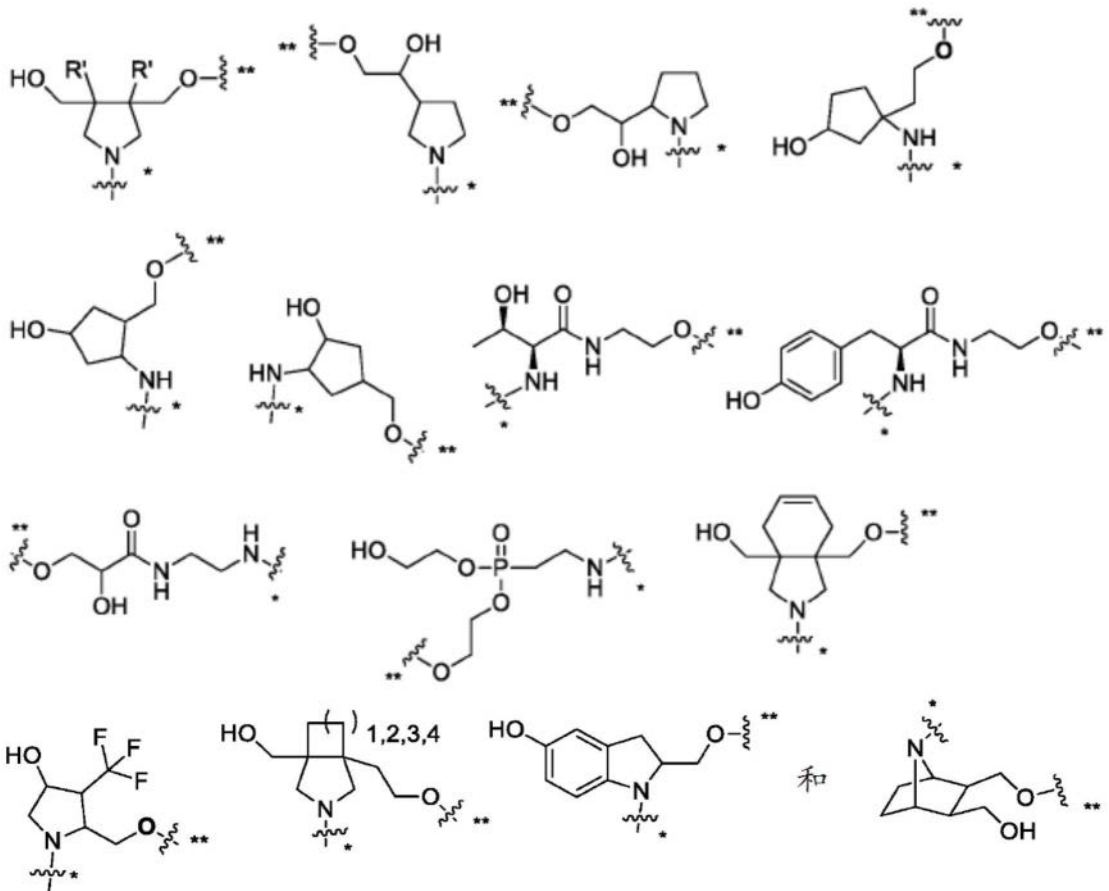
[0536] R^1 是靶向配体;

[0537] L^1 不存在或是连接基团;

[0538] L^2 不存在或是连接基团;

[0539] R^2 是选自表 1 的双链 siRNA 分子的双链 siRNA 分子;

[0540] B 是二价的并且选自由以下组成的组:



[0542] 其中：

[0543] 每个R' 独立地是C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基；其中C₁₋₉烷基、C₂₋₉烯基或C₂₋₉炔基任选地被卤基或羟基取代；

[0544] 以*标记的化合价连接至L¹或如果L¹不存在则连接至R¹；并且

[0545] 以**标记的化合价连接至L²或如果L²不存在则连接至R²。

[0546] 在一个实施方案中，R¹包含2-8个糖。

[0547] 在一个实施方案中，R¹包含2-6个糖。

[0548] 在一个实施方案中，R¹包含2-4个糖。

[0549] 在一个实施方案中，R¹包含3-8个糖。

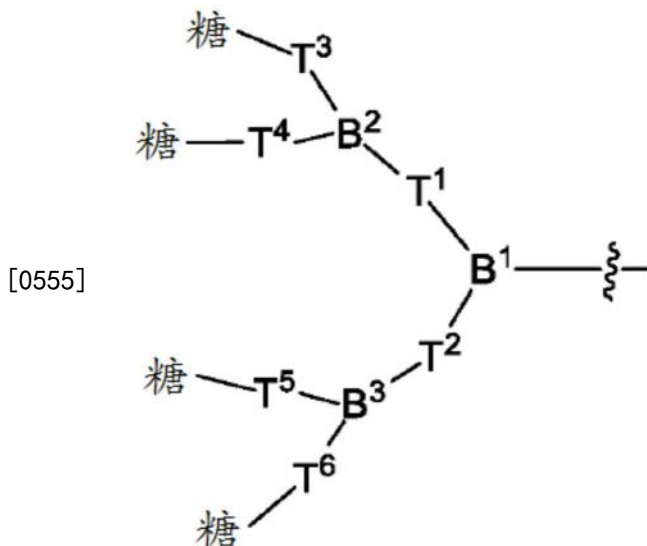
[0550] 在一个实施方案中，R¹包含3-6个糖。

[0551] 在一个实施方案中，R¹包含3-4个糖。

[0552] 在一个实施方案中，R¹包含3个糖。

[0553] 在一个实施方案中，R¹包含4个糖。

[0554] 在一个实施方案中，R¹具有下式：



[0556] 其中：

[0557] B¹是包含约1至约20个碳原子的三价基团并且共价键合至L¹、T¹和T²。

[0558] B²是包含约1至约20个碳原子的三价基团并且共价键合至T¹、T³和T⁴；

[0559] B³是包含约1至约20个碳原子的三价基团并且共价键合至T²、T⁵和T⁶；

[0560] T¹不存在或是连接基团；

[0561] T²不存在或是连接基团；

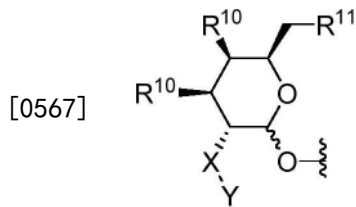
[0562] T³不存在或是连接基团；

[0563] T⁴不存在或是连接基团；

[0564] T⁵不存在或是连接基团；并且

[0565] T⁶不存在或是连接基团。

[0566] 在一个实施方案中，每个糖独立地选自：



[0568] 其中:

[0569] X是NR³且Y选自-(C=O)R⁴、-SO₂R⁵和-(C=O)NR⁶R⁷;或者X是-(C=O)-并且Y是NR⁸R⁹;

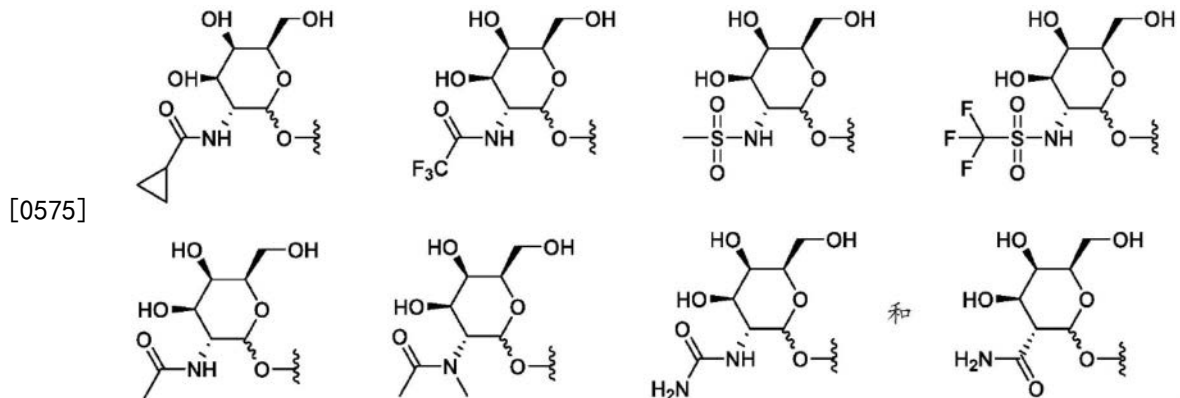
[0570] R³是氢或(C₁-C₄)烷基;

[0571] R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸和R⁹各自独立地选自由以下组成的组:氢、(C₁-C₈)烷基、(C₁-C₈)卤代烷基、(C₁-C₈)烷氧基和(C₃-C₆)环烷基,所述(C₃-C₆)环烷基任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组的基团取代:卤基、(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)卤代烷基、(C₁-C₄)烷氧基和(C₁-C₄)卤代烷氧基;

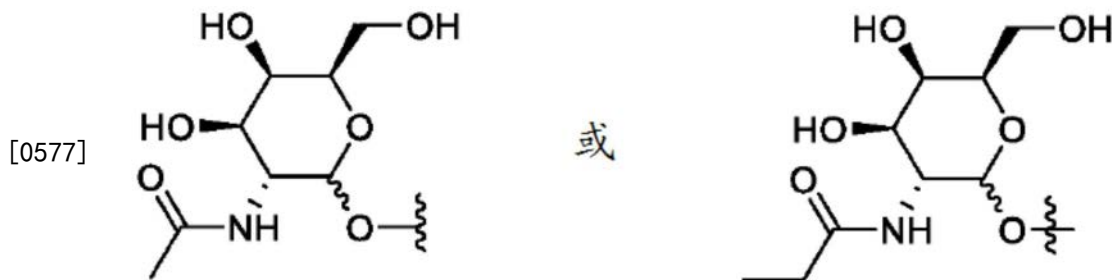
[0572] R¹⁰是-OH、-NR⁸R⁹或-F;并且

[0573] R¹¹是-OH、-NR⁸R⁹、-F或5元杂环,所述5元杂环任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组的基团取代:卤基、羟基、羧基、氨基、(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)卤代烷基、(C₁-C₄)烷氧基和(C₁-C₄)卤代烷氧基。

[0574] 在一个实施方案中,每个糖独立地选自由以下组成的组:



[0576] 在一个实施方案中,每个糖独立地是:



[0578] 在一个实施方案中,T¹和T²中的一者不存在。

[0579] 在一个实施方案中,T¹和T²两者不存在。

[0580] 在一个实施方案中,T¹、T²、T³、T⁴、T⁵和T⁶中的每一者独立地不存在或是具有1至50个碳原子的支链或无支链、饱和或不饱和的烃链,其中烃链中的一个或多个(例如,1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-、-NR^x-、-NR^x-C(=O)-、-C(=O)-NR^x-或-S-置换,并且其中R^x是氢或(C₁-C₆)烷基,并且其中烃链任选地被一个或多个(例如,1、2、3或4个)选自以下的取代基

取代：(C1-C6) 烷氧基、(C3-C6) 环烷基、(C1-C6) 烷酰基、(C1-C6) 烷酰基氧基、(C1-C6) 烷氧基羰基、(C1-C6) 烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

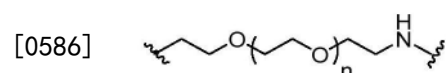
[0581] 在一个实施方案中， T^1 、 T^2 、 T^3 、 T^4 、 T^5 和 T^6 中的每一者独立地不存在或是具有1至20个碳原子的支链或无支链、饱和或不饱和的烃链，其中烃链中的一个或多个(例如，1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-、 $-NR^X$ -、 $-NR^X-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NR^X$ -或-S-置换，并且其中 R^X 是氢或(C1-C6)烷基，并且其中烃链任选地被一个或多个(例如，1、2、3或4个)选自以下的取代基取代：(C1-C6) 烷氧基、(C3-C6) 环烷基、(C1-C6) 烷酰基、(C1-C6) 烷酰基氧基、(C1-C6) 烷氧基羰基、(C1-C6) 烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基(=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

[0582] 在一个实施方案中， T^1 、 T^2 、 T^3 、 T^4 、 T^5 和 T^6 中的每一者独立地不存在或是具有1至50个碳原子的支链或无支链、饱和或不饱和的烃链，或其盐，其中烃链中的一个或多个(例如，1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-或 $-NR^X$ -置换，并且其中 R^X 是氢或(C1-C6)烷基，并且其中烃链任选地被一个或多个(例如，1、2、3或4个)选自以下的取代基取代：卤基、羟基和氧代基(=O)。

[0583] 在一个实施方案中， T^1 、 T^2 、 T^3 、 T^4 、 T^5 和 T^6 中的每一者独立地不存在或是具有1至20个碳原子的支链或无支链、饱和或不饱和的烃链，其中烃链中的一个或多个(例如，1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-置换，并且其中烃链任选地被一个或多个(例如，1、2、3或4个)选自以下的取代基取代：卤基、羟基和氧代基(=O)。

[0584] 在一个实施方案中， T^1 、 T^2 、 T^3 、 T^4 、 T^5 和 T^6 中的每一者独立地不存在或是具有1至20个碳原子的支链或无支链、饱和或不饱和的烃链，其中烃链中的一个或多个(例如，1、2、3或4个)碳原子任选地被-O-置换，并且其中烃链任选地被一个或多个(例如，1、2、3或4个)选自以下的取代基取代：卤基、羟基和氧代基(=O)。

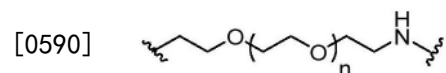
[0585] 在一个实施方案中， T^3 、 T^4 、 T^5 和 T^6 中的至少一者是：



[0587] 其中：

[0588] $n=1, 2, 3$ 。

[0589] 在一个实施方案中， T^3 、 T^4 、 T^5 和 T^6 中的每一者独立地选自由以下组成的组：



[0591] 其中：

[0592] $n=1, 2, 3$ 。

[0593] 在一个实施方案中， T^1 和 T^2 中的至少一者是甘氨酸

[0594] 在一个实施方案中， T^1 和 T^2 中的每一者是甘氨酸。

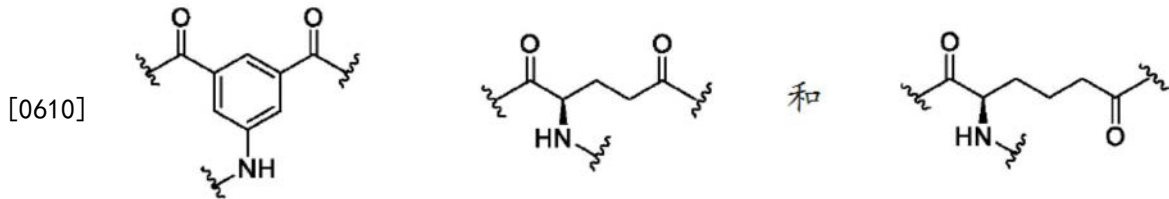
[0595] 在一个实施方案中， B^1 是包含1至15个原子的三价基团并且共价键合至 L^1 、 T^1 和 T^2 。

[0596] 在一个实施方案中， B^1 是包含1至10个原子的三价基团并且共价键合至 L^1 、 T^1 和 T^2 。

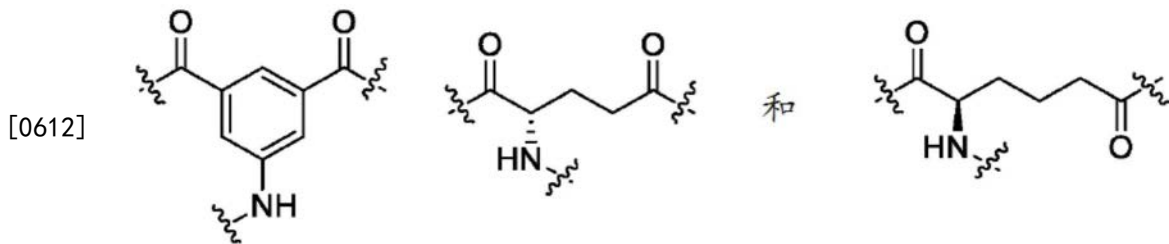
[0597] 在一个实施方案中， B^1 包含(C1-C6)烷基。

[0598] 在一个实施方案中， B^1 包含C₃₋₈环烷基。

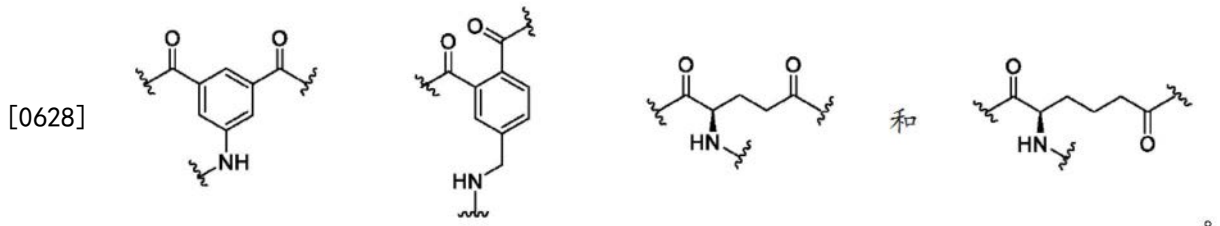
- [0599] 在一个实施方案中, B^1 包含甲硅烷基。
 [0600] 在一个实施方案中, B^1 包含D-氨基酸或L-氨基酸。
 [0601] 在一个实施方案中, B^1 包含糖。
 [0602] 在一个实施方案中, B^1 包含磷酸酯基团。
 [0603] 在一个实施方案中, B^1 包含磷酸酯基团。
 [0604] 在一个实施方案中, B^1 包含芳基。
 [0605] 在一个实施方案中, B^1 包含苯基环。
 [0606] 在一个实施方案中, B^1 是苯基环。
 [0607] 在一个实施方案中, B^1 是CH。
 [0608] 在一个实施方案中, B^1 包含杂芳基。
 [0609] 在一个实施方案中, B^1 选自由以下组成的组:



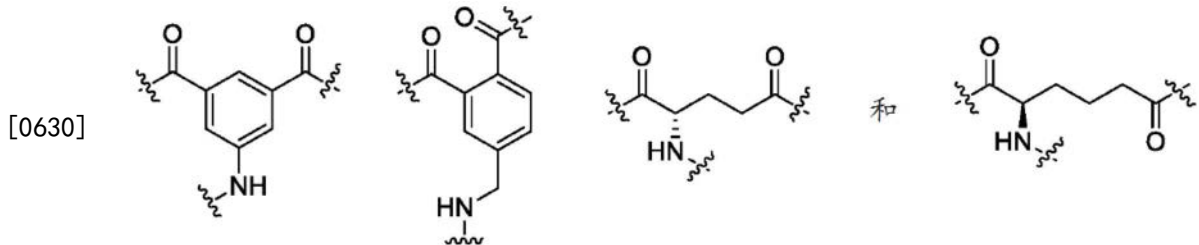
- [0611] 在一个实施方案中, B^1 选自由以下组成的组:



- [0613] 在一个实施方案中, B^2 是包含1至15个原子的三价基团并且共价键合至 L^1 、 T^1 和 T^2 。
 [0614] 在一个实施方案中, B^2 是包含1至10个原子的三价基团并且共价键合至 L^1 、 T^1 和 T^2 。
 [0615] 在一个实施方案中, B^2 包含 (C_1-C_6) 烷基
 [0616] 在一个实施方案中, B^2 包含 C_{3-8} 环烷基。
 [0617] 在一个实施方案中, B^2 包含甲硅烷基。
 [0618] 在一个实施方案中, B^2 包含D-氨基酸或L-氨基酸。
 [0619] 在一个实施方案中, B^2 包含糖。
 [0620] 在一个实施方案中, B^2 包含磷酸酯基团。
 [0621] 在一个实施方案中, B^2 包含磷酸酯基团。
 [0622] 在一个实施方案中, B^2 包含芳基。
 [0623] 在一个实施方案中, B^2 包含苯基环。
 [0624] 在一个实施方案中, B^2 是苯基环。
 [0625] 在一个实施方案中, B^2 是CH。
 [0626] 在一个实施方案中, B^2 包含杂芳基。
 [0627] 在一个实施方案中, B^2 选自由以下组成的组:



[0629] 在一个实施方案中, B^2 选自由以下组成的组:



[0631] 或其盐。

[0632] 在一个实施方案中, B^3 是包含1至15个原子的三价基团并且共价键合至 L^1 、 T^1 和 T^2 。

[0633] 在一个实施方案中, B^3 是包含1至10个原子的三价基团并且共价键合至 L^1 、 T^1 和 T^2 。

[0634] 在一个实施方案中, B^3 包含 (C_1-C_6) 烷基。

[0635] 在一个实施方案中, B^3 包含 C_{3-8} 环烷基。

[0636] 在一个实施方案中, B^3 包含甲硅烷基。

[0637] 在一个实施方案中, B^3 包含D-氨基酸或L-氨基酸。

[0638] 在一个实施方案中, B^3 含糖。

[0639] 在一个实施方案中, B^3 包含磷酸酯基团。

[0640] 在一个实施方案中, B^3 包含磷酸酯基团。

[0641] 在一个实施方案中, B^3 包含芳基。

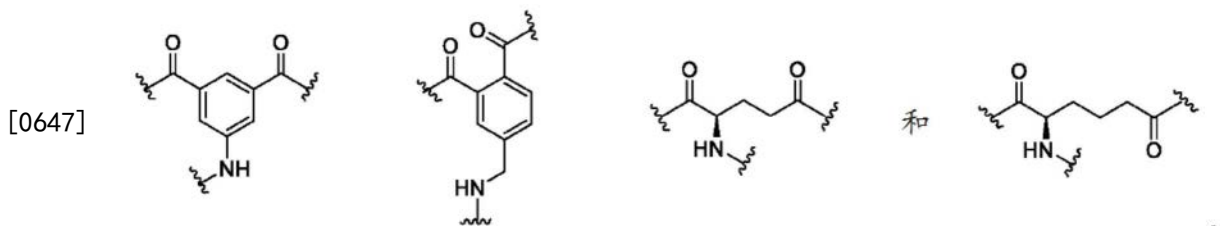
[0642] 在一个实施方案中, B^3 包含苯基环。

[0643] 在一个实施方案中, B^3 是苯基环。

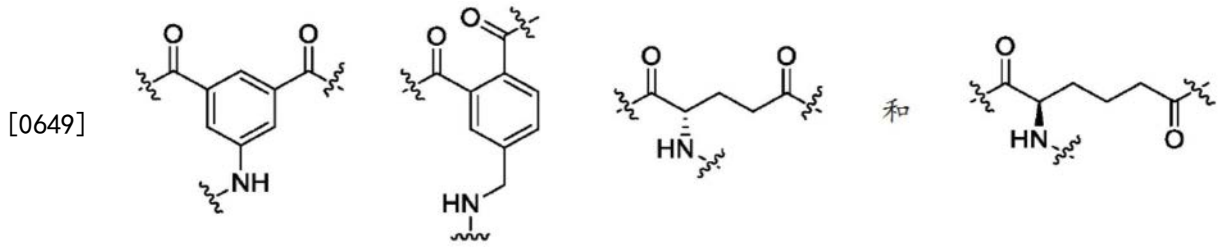
[0644] 在一个实施方案中, B^3 是CH。

[0645] 在一个实施方案中, B^3 包含杂芳基。

[0646] 在一个实施方案中, B^3 选自由以下组成的组:



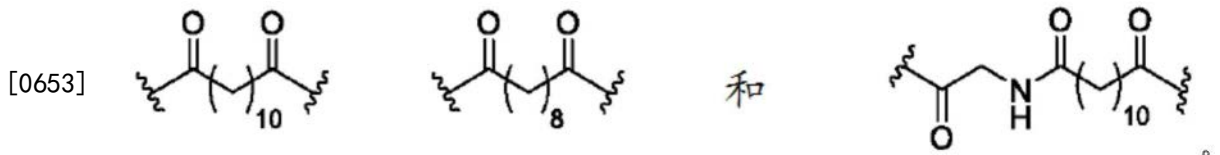
[0648] 在一个实施方案中, B^3 选自由以下组成的组:



[0650] 或其盐。

[0651] 在一个实施方案中, L^1 和 L^2 独立地是具有 1 至 50 个碳原子的二价、支链或无支链、饱和或不饱和的烃链, 其中烃链中的一个或多个 (例如, 1、2、3 或 4 个) 碳原子任选地被 -O-、-NR^X-、-NR^X-C(=O)-、-C(=O)-NR^X- 或 -S- 置换, 并且其中 R^X 是氢或 (C1-C6) 烷基, 并且其中烃链任选地被一个或多个 (例如, 1、2、3 或 4 个) 选自以下的取代基取代: (C1-C6) 烷氧基、(C3-C6) 环烷基、(C1-C6) 烷酰基、(C1-C6) 烷酰基氧基、(C1-C6) 烷氧基羰基、(C1-C6) 烷硫基、叠氮基、氰基、硝基、卤基、羟基、氧代基 (=O)、羧基、芳基、芳基氧基、杂芳基和杂芳基氧基。

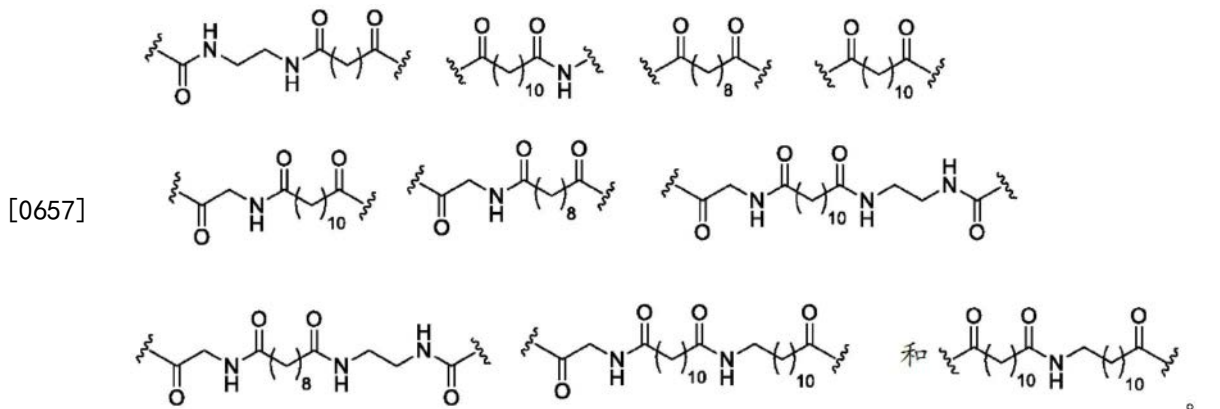
[0652] 在一个实施方案中, L^1 选自由以下组成的组:



[0654] 或其盐。

[0655] 在一个实施方案中, L^1 通过选自由以下组成的组的键联接至 B¹: -O-、-S-、-C(=O)-、-C(=O)-NH-、-NH-C(=O)-、-C(=O)-O-、-NH-C(=O)-NH- 或 -NH-(SO₂)-。

[0656] 在一个实施方案中, L^1 选自由以下组成的组:



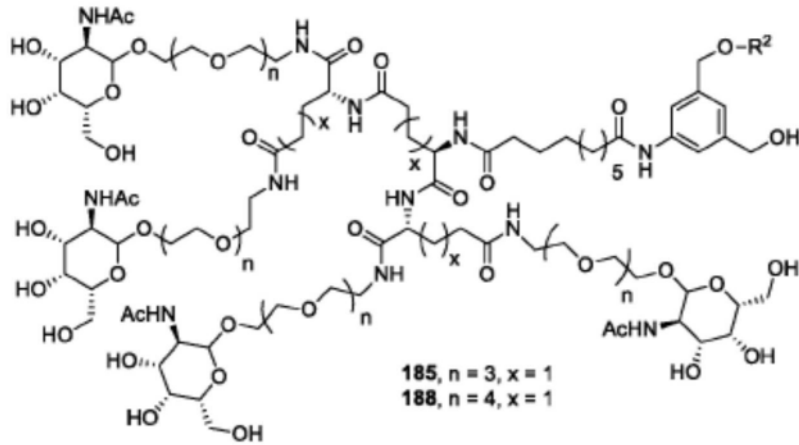
[0658] 在一个实施方案中, L^2 通过 -O- 连接至 R²。

[0659] 在一个实施方案中, L^2 是任选地被羟基取代的 C₁₋₄ 亚烷基 -O-。

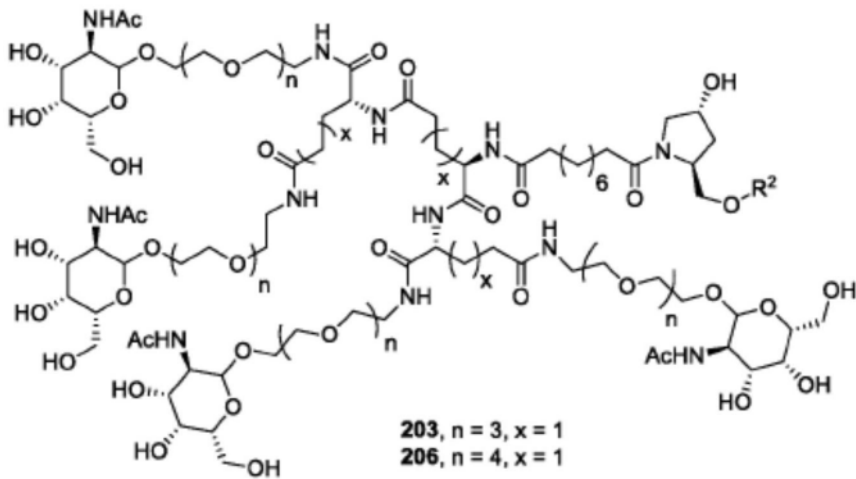
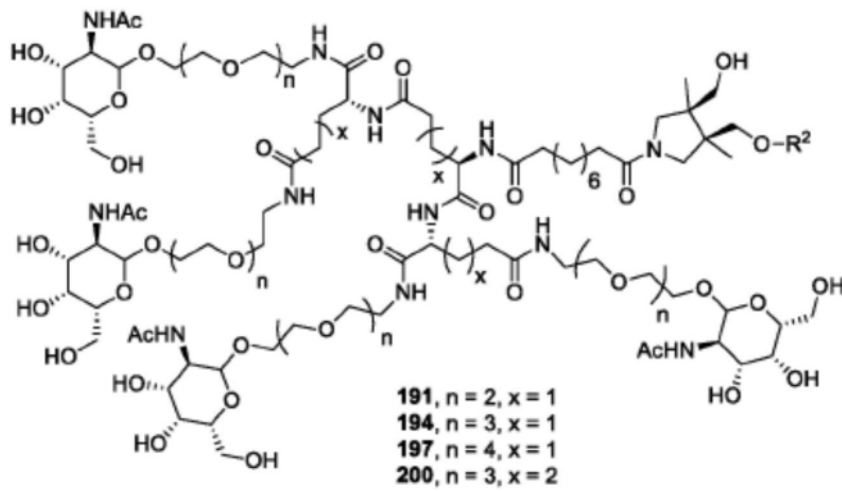
[0660] 在一个实施方案中, L^2 通过 -O- 连接至 R²。

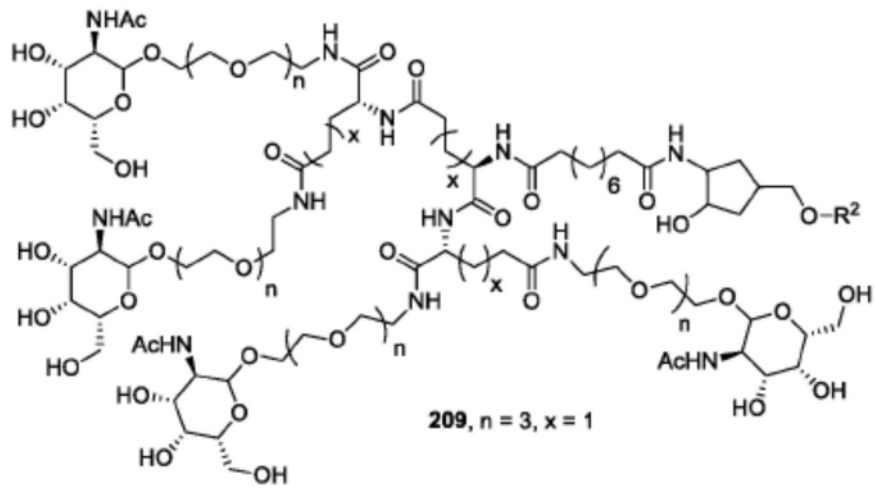
[0661] 在一个实施方案中, L^2 不存在。

[0662] 在一个实施方案中, 本发明提供选自由以下组成的组的化合物或盐:

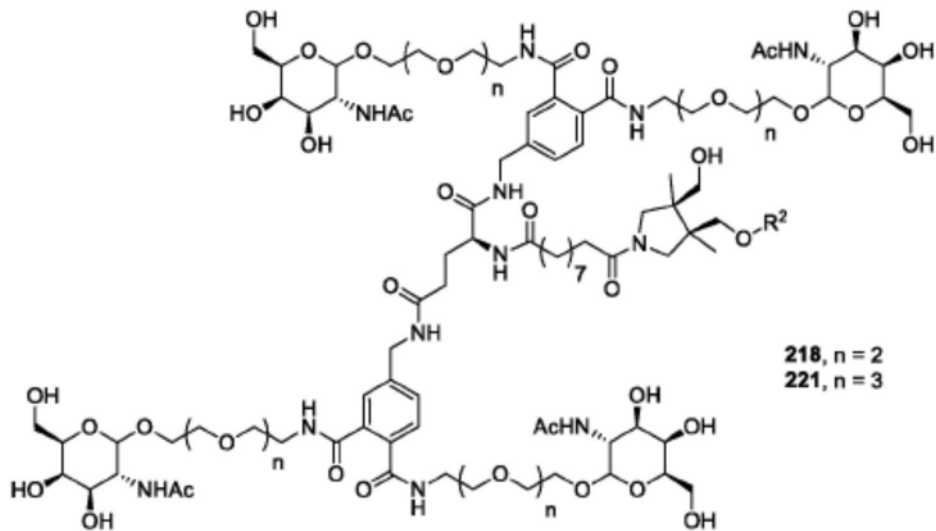
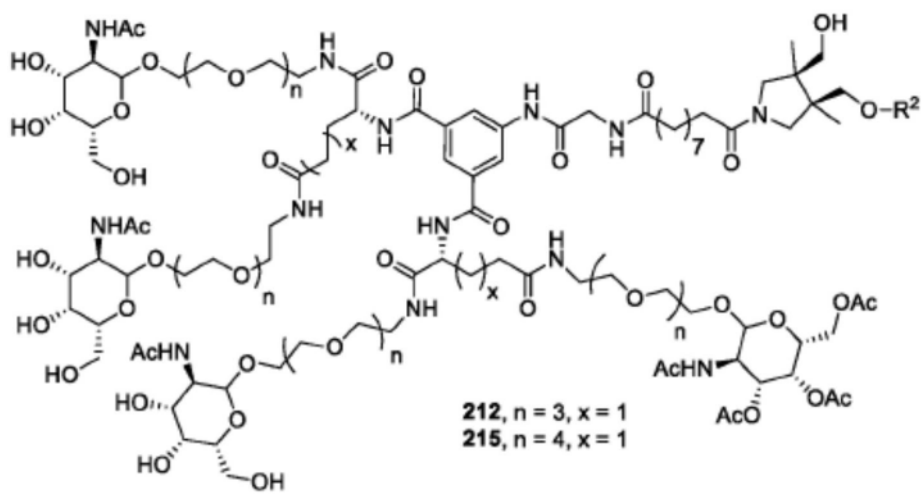


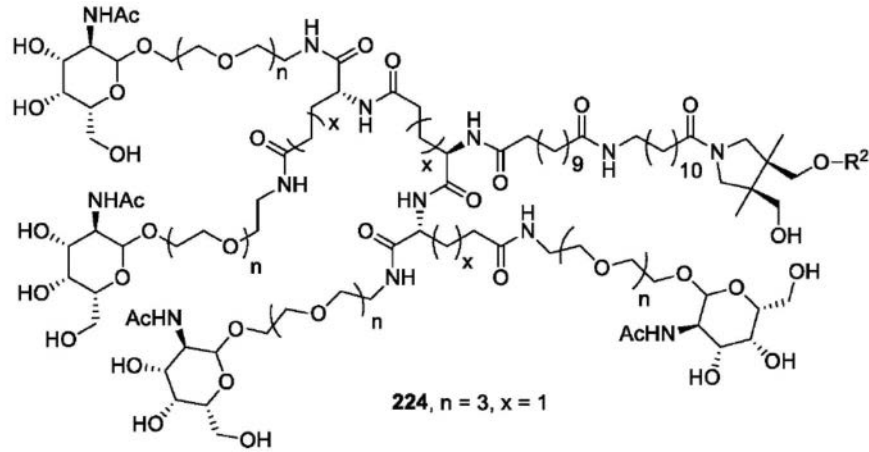
[0663]



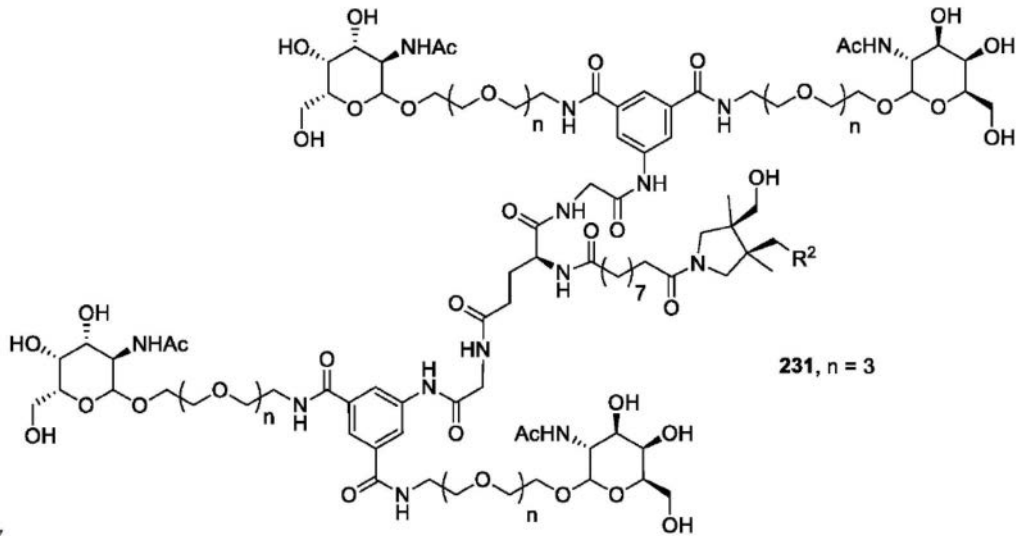


[0664]





[0665]



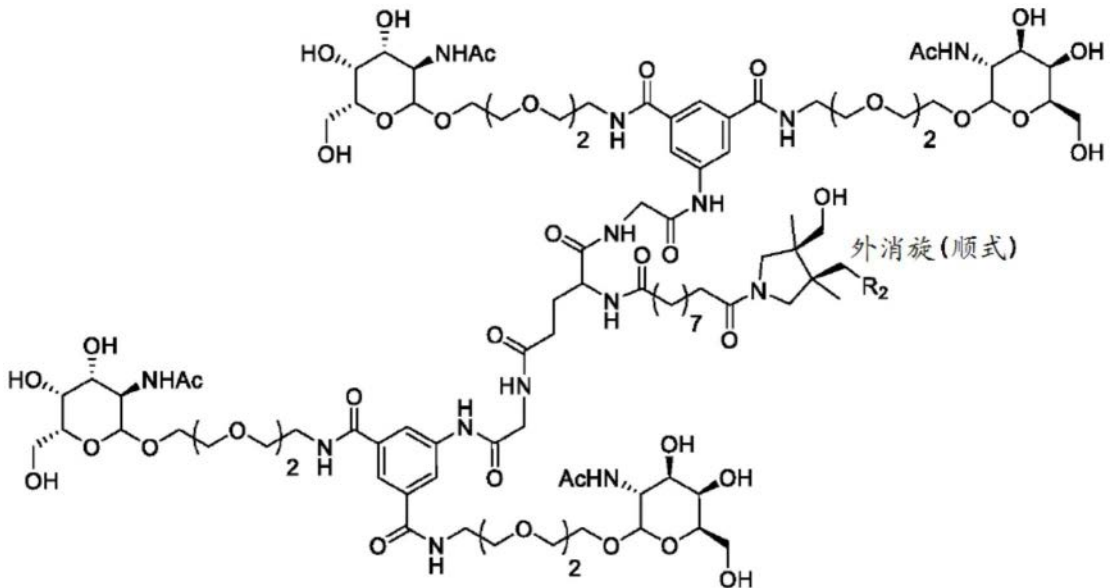
以及

;

[0666] 和其药学上可接受的盐,其中R²是选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子。

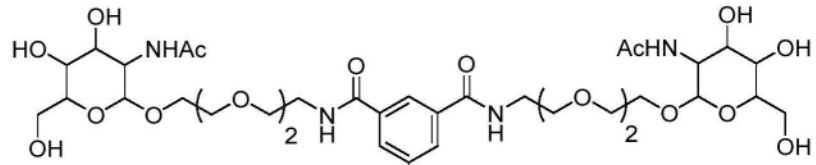
[0667] 在一个实施方案中,本发明提供下式的化合物:

[0668]

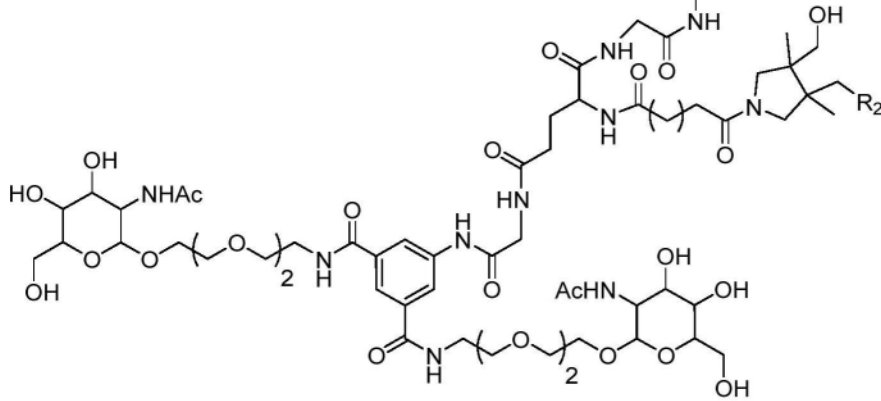


[0669] 或其盐,其中R²是核酸。

[0670] 在一个实施方案中,本发明提供下式的化合物:



[0671]

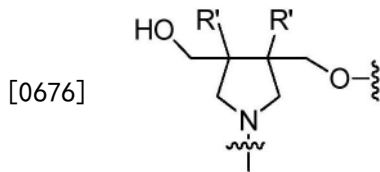


[0672] 或其盐,其中R²是核酸。

[0673] 在一个实施方案中,核酸分子(例如,siRNA)通过有义链3'-端处的磷酸酯的氧连接至化合物的剩余部分。

[0674] 在一个实施方案中,皮下施用所述化合物或盐。

[0675] 当化合物包含下式的基团时:



[0677] 环上存在四种可能的立体异构体(两种顺式和两种反式)。除非另有说明,否则本发明的化合物包括关于这种环的所有四种立体异构体。在一个实施方案中,两个R'基团呈顺式构象。在一个实施方案中,两个R'基团呈反式构象。

[0678] 本发明的一个方面是核酸-脂质粒子,其包含:

[0679] (a) 一个或多个选自表1的双链siRNA分子的双链siRNA分子;

[0680] (b) 阳离子脂质;和

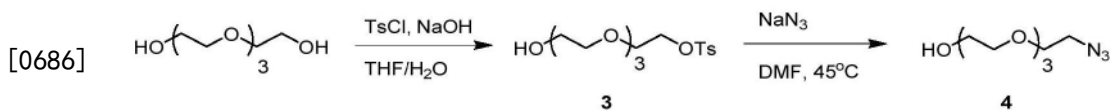
[0681] (c) 非阳离子脂质。

[0682] 实施例

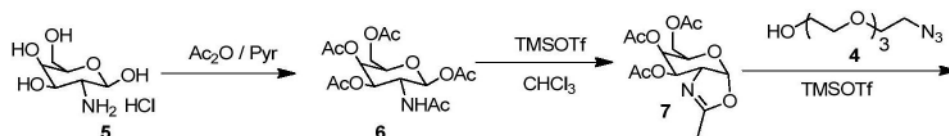
[0683] 将通过具体实施例更详细地描述本发明。以下实施例是出于阐释目的而提供的,并且并非意图以任何方式限制本发明。本领域的技术人员将容易地认识到可改变或修改各个非关键参数以产生基本上相同的结果。应理解在一个实施方案中,寡核苷酸是如表1所述的双链siRNA分子。

[0684] 实施例1. 缀合物1的合成

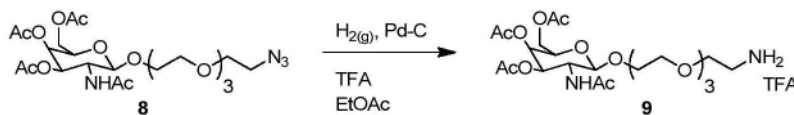
[0685] 方案1.



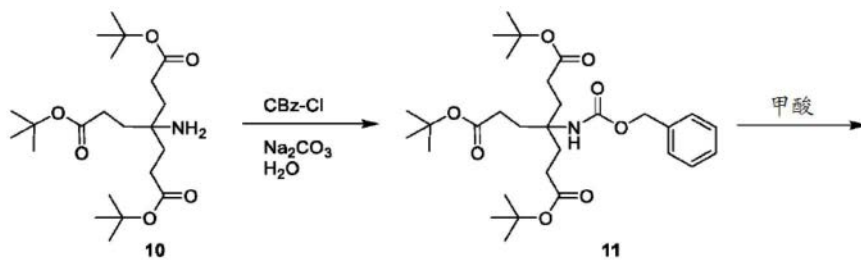
[0687] 方案2.



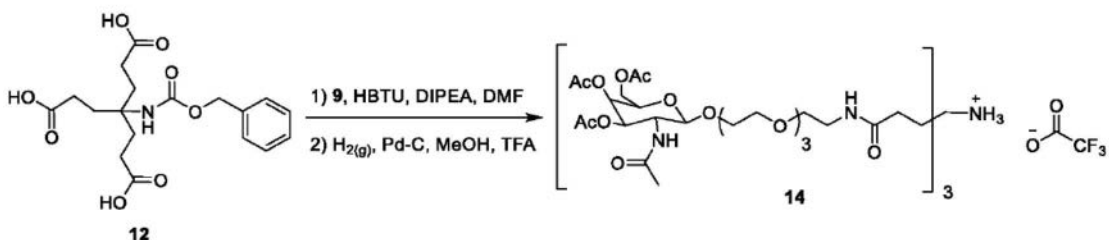
[0688]



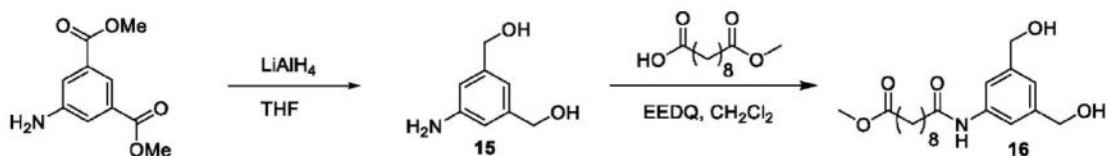
[0689] 方案3.



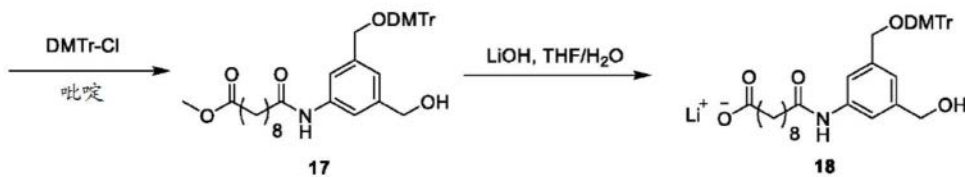
[0690]



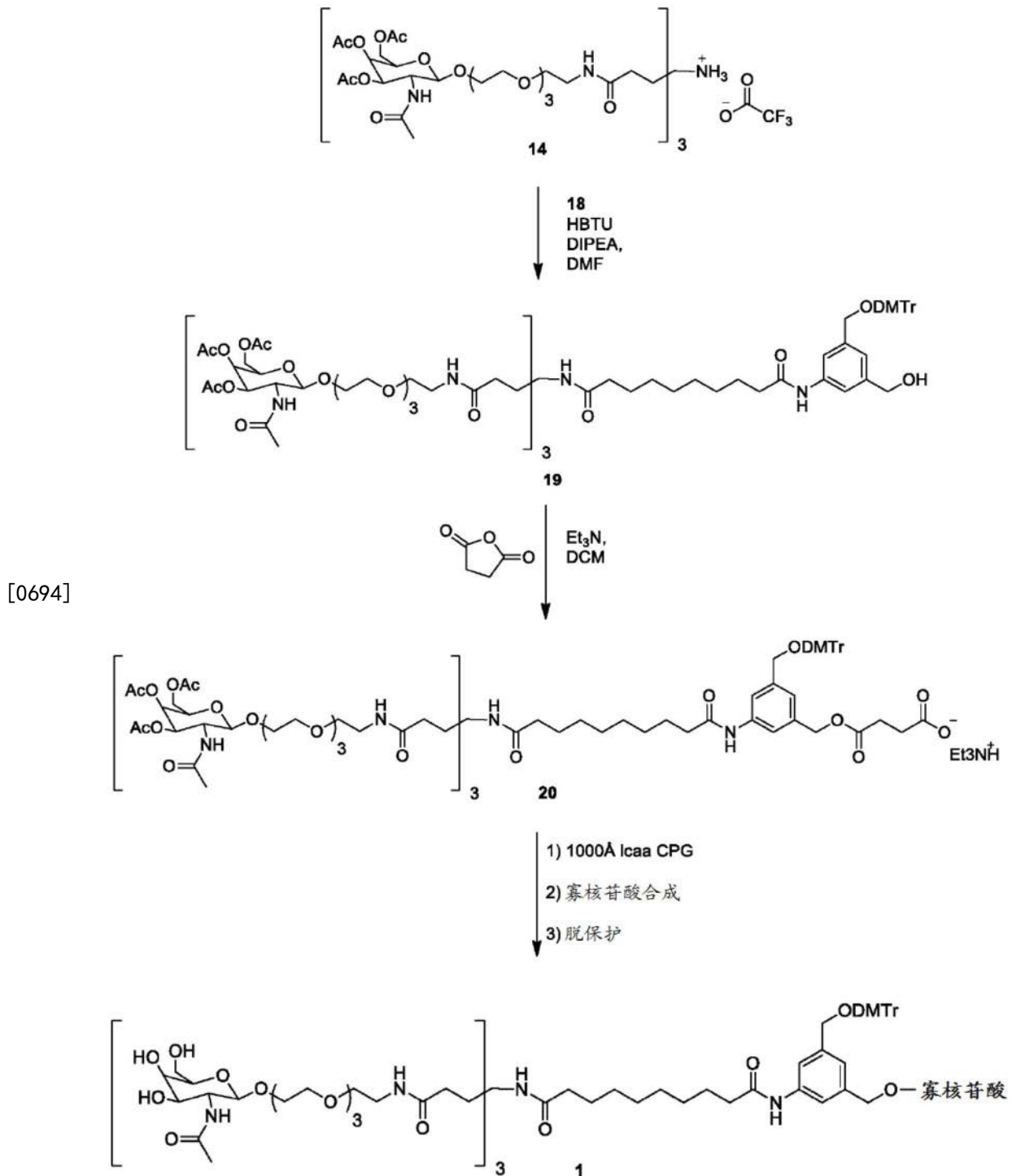
[0691] 方案4.



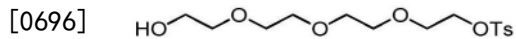
[0692]



[0693] 方案5.

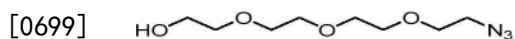


[0695] 步骤1. 4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-羟基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯3的制备



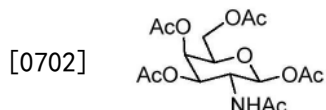
[0697] 将四甘醇(934g, 4.8mol)于THF(175mL)和NaOH水溶液(5M, 145mL)中的溶液冷却(0℃)并用溶解于THF(605mL)中的对甲苯磺酰氯(91.4g, 480mmol)处理, 并且然后搅拌2小时(0℃)。将反应混合物用水(3L)稀释并用CH₂Cl₂(3x 500mL)萃取。将合并的萃取物用水和盐水洗涤, 然后干燥(MgSO₄), 过滤并浓缩以得到呈浅黄色油状物的4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-羟基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯3(140g, 84%)。R_f(0.57, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0698] 步骤2. 2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇4的制备



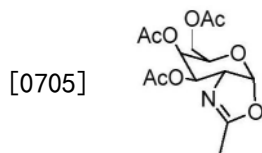
[0700] 将3 (140g, 403mmol) 于DMF (880mL) 中的溶液用叠氮化钠 (131g, 2.02mol) 处理并加热 (45°C) 过夜。在减压下除去大部分DMF, 并且将残余物溶解于CH₂Cl₂ (500mL) 中并用盐水 (3x 500mL) 洗涤, 然后干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩。使残余物穿过短二氧化硅床 (5% MeOH-CH₂Cl₂) 并浓缩以产生呈黄色油状物的2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇4 (65g, 74%)。R_f (0.56, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0701] 步骤3. 全乙酰化半乳糖胺6的制备



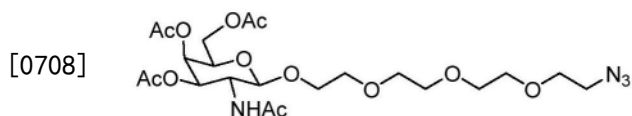
[0703] 用乙酸酐 (1.25L, 13.2mol) 将于吡啶 (1.5L) 中的D-半乳糖胺盐酸盐5 (250g, 1.16mol) 处理45分钟。在搅拌过夜后, 将反应混合物分为三个1L部分。将每一1L部分倾倒至3L冰水中, 并混合1小时。在混合后, 将固体滤掉, 合并, 经液氮冷冻, 并且然后冻干5天以产生呈白色固体的全乙酰化半乳糖胺6 (369.4g, 82%)。R_f (0.58, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0704] 步骤4. 二乙酸 (3aR, 5R, 6R, 7R, 7aR) -5-(乙酰氧基甲基)-2-甲基-3a, 6, 7, 7a-四氢-5H-吡喃并[3,2-d]噻唑-6,7-二基酯7的制备



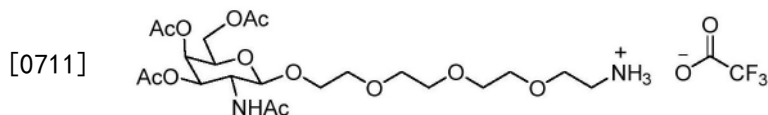
[0706] 将全乙酰化半乳糖胺6 (8.45g, 21.7mmol) 于CHCl₃ (320mL) 中的溶液用TMSOTf (4.32mL, 23.9mmol) 逐滴处理。在搅拌 (1.5小时, 40°C) 后, 将反应物通过添加三乙胺 (5mL) 淬灭并浓缩至干燥以得到呈浅黄色玻璃状物的化合物7 (7.2g, 定量)。所述产物不经过进一步纯化即使用。R_f (0.59, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0707] 步骤5. 二乙酸 (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -5-乙酰胺基-2-(乙酰氧基甲基)-6-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)四氢-2H-吡喃-3,4-二基酯8的制备



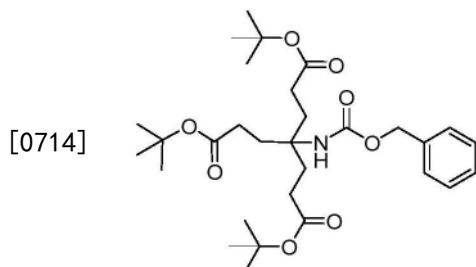
[0709] 将化合物7 (7.2g, 21.7mmol) 和2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇4 (2.65g, 15.2mmol) 从甲苯 (150mL) 共沸 (3x) 以除去痕量的水。将经干燥的材料溶解于1,2-二氯乙烷 (150mL) 中, 冷却 (约5°C) 并用TMSOTf (784μL, 4.34mmol) 处理。在搅拌过夜后, 将反应物通过添加三乙胺 (5mL) 淬灭并浓缩。将残余物通过色谱法 (1% → 5% MeOH-CH₂Cl₂) 纯化以得到呈褐色油状物的8 (7.12g, 85%)。R_f (0.3, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0710] 步骤6. 2,2,2-三氟乙酸2-(2-(2-(2-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-铵9的制备



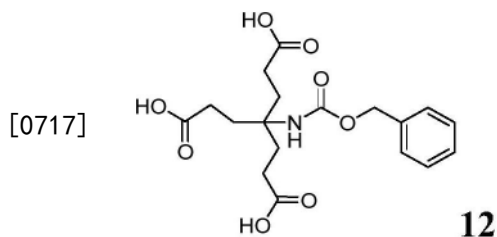
[0712] 将叠氮化物8 (7.12g, 13mmol) 于EtOAc (150mL) 和三氟乙酸 (2mL) 中的溶液用炭载钯 (1.5g, 10%w/w湿基) 处理。然后将反应混合物用氮吹扫并剧烈搅拌过夜。在用氮吹扫后, 通过Celite过滤混合物, 用MeOH冲洗。将滤液浓缩并经由色谱法 (5% → 10% → 20% MeOH-CH₂Cl₂) 纯化以得到呈褐色油状物的9 (5.8g, 72%)。Rf (0.34, 15% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0713] 步骤7. 4-(((苄氧基)羰基)氨基)-4-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)庚二酸二叔丁酯11的制备



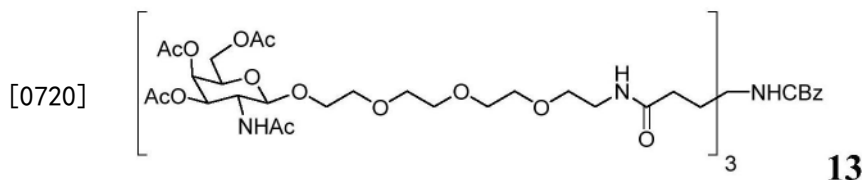
[0715] 向4-氨基-4-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)庚二酸二叔丁酯10 (13.5g, 33mmol)、25% Na₂CO₃ (水溶液) (150mL) 和二氯甲烷 (300mL) 的溶液中缓慢添加氯甲酸苄酯 (14mL, 98mmol)。将溶液在室温下剧烈搅拌过夜 (16小时)。完成后, 添加另外的二氯甲烷 (100mL) 并分离二氯甲烷层。将水层用二氯甲烷 (2x 100mL) 萃取。将合并的二氯甲烷萃取物在硫酸镁上干燥, 过滤并浓缩至干燥。分离出呈无色油状物的产物11, 其不需进一步纯化 (15.8g, 88%)。Rf (0.7, 1:1EtOAc-己烷)。

[0716] 步骤8. 4-(((苄氧基)羰基)氨基)-4-(2-羧基乙基)庚二酸12的制备



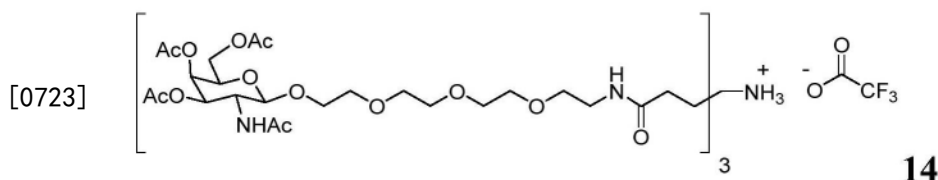
[0718] 将11 (15.6g, 28.8mmol) 于甲酸 (50mL) 中的溶液在室温下搅拌2小时。将溶液浓缩至干燥并溶解于乙酸乙酯 (约25mL) 中。静置后, 产物结晶为无色固体。将固体过滤, 用乙酸乙酯洗涤并风干以得到呈无色固体的12 (10.2g, 93%)。Rf (0.1, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0719] 步骤9. 化合物13的制备



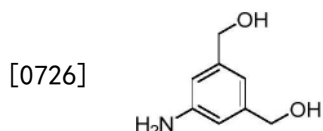
[0721] 将12 (793mg, 2.08mmol) 和9 (5.8g, 9.36mmol) 于DMF (50mL) 中的溶液用BOP (3.67g, 8.32mmol)、然后用N,N-二异丙基乙胺 (4.31mL, 25mmol) 处理。在搅拌过夜后, 将混合物浓缩至干燥并经由色谱法 (1% → 2% → 5% → 10% → 15% MeOH-CH₂Cl₂) 以得到13 (5.71g [粗制], > 100% - 含有不影响下一步骤的偶联副产物)。Rf (0.45, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0722] 步骤10. 化合物14的制备



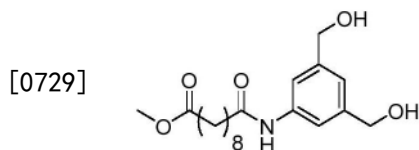
[0724] 将化合物13 (5.7g) 溶解于MeOH (150mL) 和TFA (1.5mL) 中,并用炭载钯 (1g, 10%w/w 湿基) 处理。然后将反应混合物用氮吹扫并剧烈搅拌过夜。在用氮吹扫后,通过Celite过滤混合物,用MeOH冲洗。将滤液浓缩并经由色谱法 (5% → 10% → 20% MeOH-CH₂Cl₂) 纯化以得到呈褐色油状物的14 (2.15g, 56%经两个步骤)。Rf (0.32, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0725] 步骤11. (5-氨基-1,3-亚苯基) 二甲醇15的制备



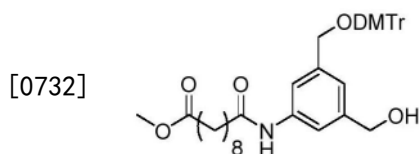
[0727] 经1小时将5-氨基间苯二甲酸二甲酯 (20.0g, 96mmol) 于THF (350mL) 中的溶液逐滴添加至3.75当量LiAlH₄ (13.6g, 358mmol) 于THF (440mL) 中的回流混合物中。将混合物在回流下再搅拌2小时,然后冷却至室温并通过小心地添加MeOH (27mL)、然后水 (40mL) 来淬灭。在将经淬灭混合物搅拌2小时后,将其过滤并浓缩至干燥。将残余物从EtOAc重结晶 (2X) 以得到呈褐黄色晶体的15 (10.2g, 70%)。

[0728] 步骤12. 10-((3,5-双(羟甲基)苯基)氨基)-10-氧代癸酸甲酯16的制备



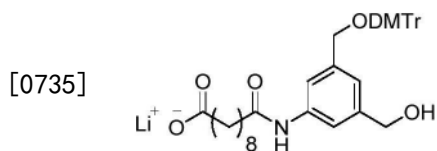
[0730] 将癸二酸甲酯 (3.8g, 17mmol)、15 (2.5g, 17mmol) 和EEDQ (8.1g, 33mmol) 于2:1二氯甲烷/甲醇 (200mL) 中的溶液在室温下搅拌2小时。完成后,将溶液浓缩至干燥。将所获得的固体用二氯甲烷 (50mL) 研磨并过滤。将固体用冷二氯甲烷冲洗并风干以得到呈无色固体的16 (4.3g, 72%)。Rf (0.33, EtOAc)。

[0731] 步骤13. 10-((3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(羟甲基)苯基)氨基)-10-氧代癸酸甲酯17的制备



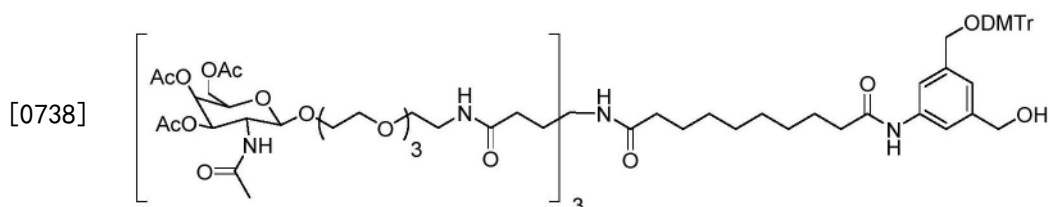
[0733] 向16 (4.3g, 12mmol) 于吡啶 (50mL) 中的溶液中添加4,4'-(氯(苯基)亚甲基)双(甲氧基苯) (4.1g, 12mmol)。将所述溶液在氮气下在室温下搅拌过夜。完成后,将溶液浓缩至干燥并将残余物通过柱色谱法 (0.5% → 0.75% → 1% → 1.5% MeOH-CH₂Cl₂) 纯化以得到呈黄色固体的17 (2.9g, 35%)。Rf (0.6, 10% MeOH-CH₂Cl₂)。

[0734] 步骤14. 10-((3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(羟甲基)苯基)氨基)-10-氧代癸酸锂18的制备



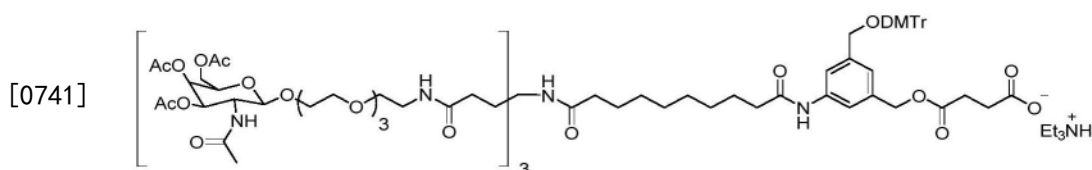
[0736] 向17 (2.9g, 4.3mmol) 于THF (60mL) 中的溶液中添加水 (15mL) 和氢氧化锂 (112mg, 4.7mmol)。将所述溶液在室温下搅拌过夜。完成后, 将溶液浓缩以除去THF。将剩余的水溶液在液氮上快速冷冻并冻干过夜以得到无色固体 (2.9g, 定量)。Rf (0.3, 10%MeOH-CH₂Cl₂)。

[0737] 步骤15. 化合物19的制备



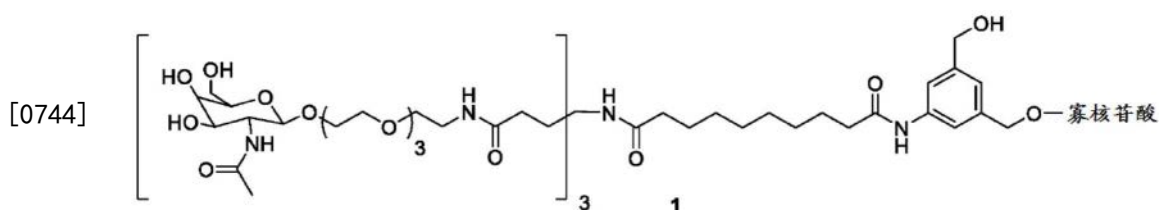
[0739] 向14 (454mg, 0.67mmol)、18 (1.25g, 0.67mmol) 和HBTU (381mg, 1.0mmol) 于无水DMF (25mL) 中的溶液中添加N,N-二异丙基乙胺 (0.35mL, 2.0mmol)。将所述溶液在室温下搅拌过夜。完成后, 将溶液倾倒入乙酸乙酯 (250mL) 中并用盐水 (3x 200mL) 洗涤。将乙酸乙酯层在硫酸镁上干燥, 过滤并浓缩至干燥。通过柱色谱法 (5% → 7.5% → 10% → 15% 于CH₂Cl₂ 中的MeOH) 纯化, 得到呈浅橙色泡沫的19 (1.5g, 94%)。Rf (0.25, 10%MeOH-CH₂Cl₂)。

[0740] 步骤16. 化合物20的制备



[0742] 将化合物19 (1.5g, 0.6mmol)、琥珀酸酐 (120mg, 1.2mmol)、DMAP (220mg, 1.8mmol) 和三甲胺 (250μL, 1.8mmol) 于无水CH₂Cl₂ (50mL) 中的溶液在室温下搅拌过夜。完成后, 将溶液浓缩至干燥并通过短二氧化硅塞 (100%CH₂Cl₂ → 15% 于CH₂Cl₂ 中的MeOH) 过滤以得到呈淡米色泡沫的产物20 (1.1g, 70%)。质量m/z (ES-TOF MS) 727.7 [M+3H-DMTr]⁺, 1091.1 [M+2H-DMTr]。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.92 (br s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.49-7.47 (m, 3H), 7.41 (br s, 1H), 7.38-7.34 (m, 5H), 7.32-7.26 (m, 4H), 7.24-7.08 (br s, 3H), 7.08 (s, 1H), 6.90-6.80 (m, 7H), 5.31 (d, 3H, J=2.7Hz), 5.12 (s, 2H), 5.06 (dd, 3H, J=11.2, 3.2Hz), 4.78 (d, 3H, J=8.5Hz), 4.24-4.08 (m, 12H), 3.95-3.88 (m, 7H), 3.85-3.76 (m, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.68-3.56 (m, 34H), 3.54-3.44 (m, 8H), 3.41-3.33 (m, 6H), 2.70-2.60 (m, 4H), 2.52-2.30 (m, 30H), 2.24-2.16 (m, 8H), 2.14 (s, 9H), 2.04 (s, 9H), 2.02-1.96 (m, 6H), 1.98 (s, 9H), 1.96 (s, 9H), 1.74-1.52 (m, 4H), 1.36-1.24 (m, 12H)。

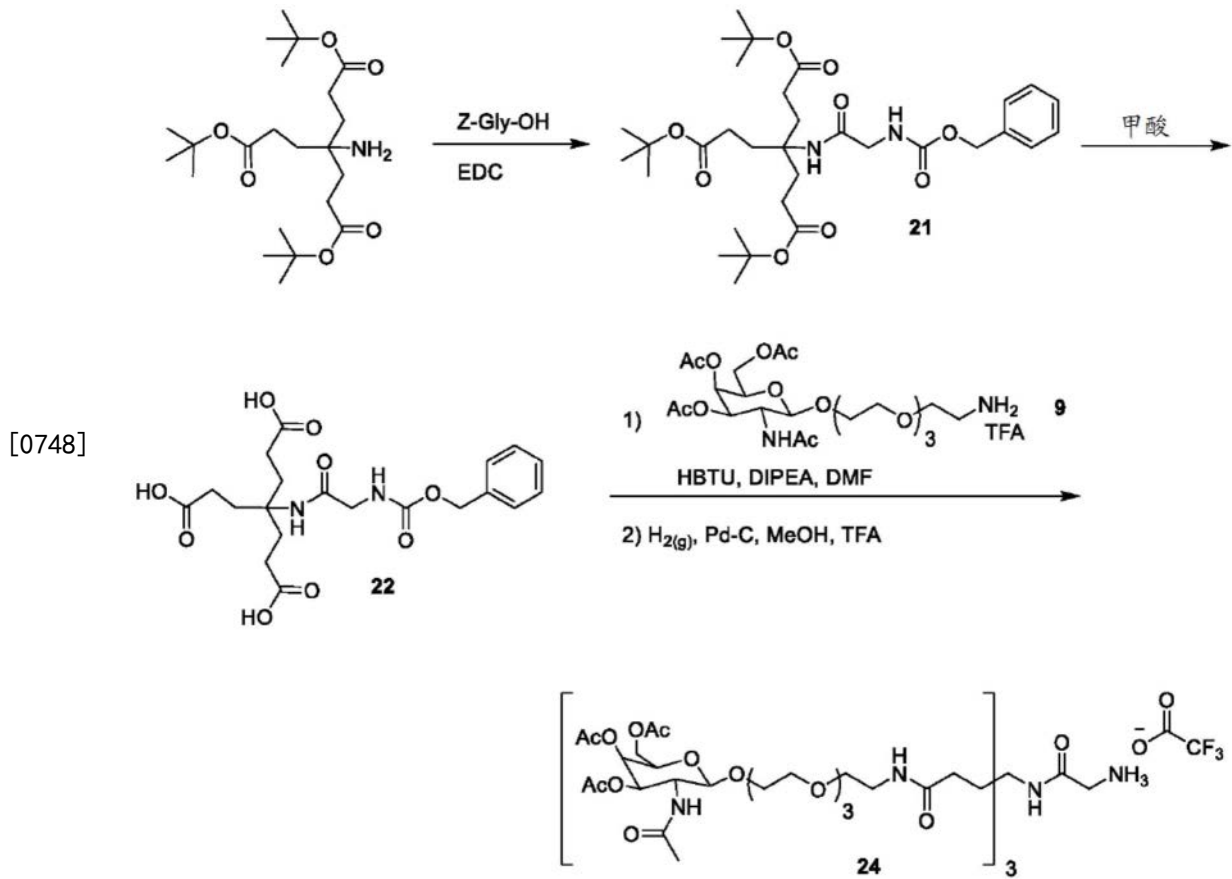
[0743] 步骤17. 缀合物1的制备



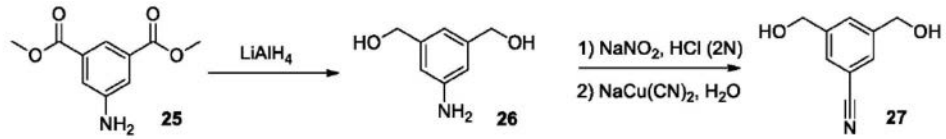
[0745] 使用标准酰胺偶联化学,将琥珀酸酯20负载至 1000\AA LCAA (长链氨基烷基) CPG (可控多孔玻璃) 上。将二异丙基碳二亚胺 ($52.6\mu\text{mol}$)、N-羟基琥珀酰亚胺 ($0.3\text{mg}, 2.6\mu\text{mol}$) 和吡啶 ($10\mu\text{L}$) 于无水乙腈 (0.3mL) 中的溶液中添加至于无水二氯甲烷 (0.2mL) 中的20 ($20.6\text{mg}, 8\mu\text{mol}$) 中。将此混合物添加至LCAA CPG (183mg) 中。将悬浮液在室温下轻轻混合物过夜。在20消失 (HPLC) 后,将反应混合物过滤并将CPG用各1mL的二氯甲烷、乙腈、5%乙酸酐/5%N-甲基咪唑/5%吡啶于THF中的溶液、然后用THF、乙腈和二氯甲烷洗涤。然后将CPG在高真空下干燥过夜。通过标准DMTr测定通过UV/Vis (504nm) 测定负载为 $25\mu\text{mol/g}$ 。将所得Ga1NAc负载的CPG固体载体用于使用标准程序的自动寡核苷酸合成中。进行核苷酸脱保护,随后从固体载体除去 (同时进行乙酸半乳糖胺脱保护) 得到Ga1NAc-寡核苷酸缀合物1作为代表性实施例。

[0746] 实施例2: 缀合物34的合成

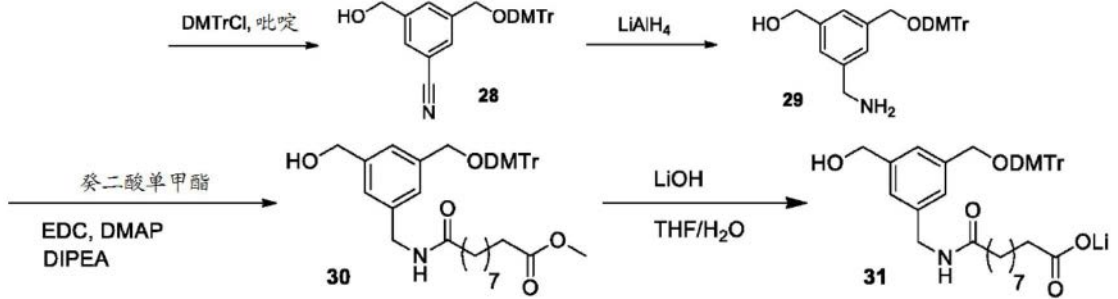
[0747] 方案6.



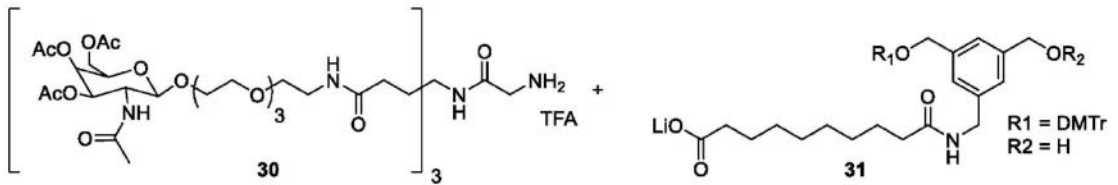
[0749] 方案7.



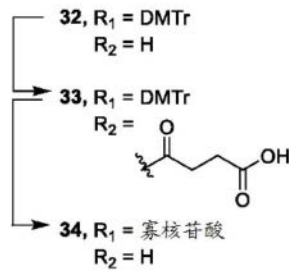
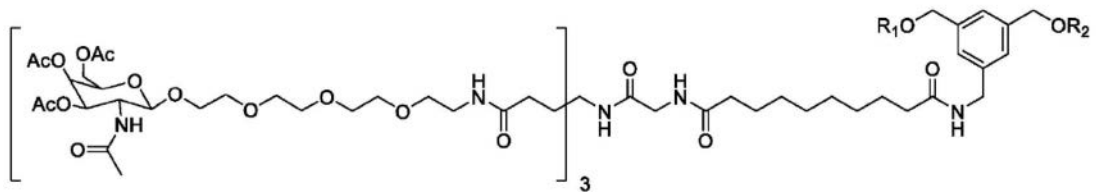
[0750]



[0751] 方案8.

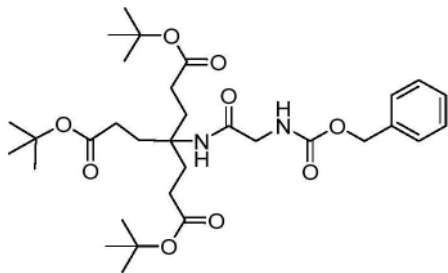


[0752]



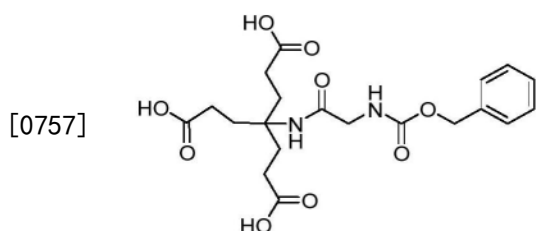
[0753] 步骤1. 4-(2-(((苄氧基)羰基)氨基)乙酰胺基)-4-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)庚二酸二叔丁酯21的制备

[0754]



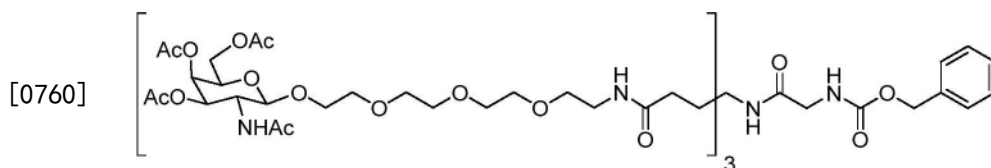
[0755] 将4-氨基-4-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)庚二酸二叔丁酯(25g,60mmol)和L-甘氨酸(18.9g,90.2mmol)于 CH_2Cl_2 (300mL)中的溶液用EDC(23g,120mmol)、二异丙基乙胺(32mL,180mmol)和DMAP(催化剂17mg)连续处理。搅拌(16小时)后,将反应混合物倾倒入 NaHCO_3 (饱和水溶液)中,用 CH_2Cl_2 萃取,用盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并浓缩以得到呈非晶形固体的4-(2-(((苄氧基)羰基)氨基)乙酰胺基)-4-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)庚二酸二叔丁酯21并且不经进一步加工即使用(36g,定量)。Rf(0.85,10%MeOH- CH_2Cl_2)。

[0756] 步骤2. 4-(2-(((苄氧基)羰基)氨基)乙酰胺基)-4-(2-羧基乙基)庚二酸22的制备



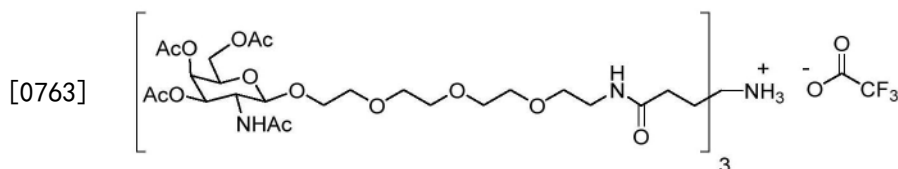
[0758] 将4-(2-(((苄氧基)羰基)氨基)乙酰胺基)-4-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙基)庚二酸二叔丁酯21(59.3mmol,36g)的溶液在纯净甲酸(150mL)中搅拌72小时。完成后,在减压下除去甲酸并将粗制固体在高真空下干燥过夜以产生呈无色固体的22(15.9g,61%)。Rf(0.15,10%MeOH- CH_2Cl_2)。

[0759] 步骤3. 化合物23的制备



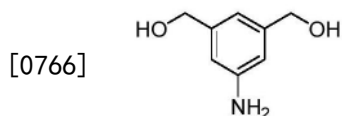
[0761] 将22(6.2g,14.1mmol)和2,2,2-三氟乙酸2-(2-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙酰胺基-4,5-二乙酰氧基-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-铵(35g,56.5mmol)于DMF(250mL)中的溶液用BOP(25g,56.5mmol)、然后N,N-二异丙基乙胺(29mL,170mmol)处理。在搅拌过夜后,将混合物浓缩至干燥并经受色谱法(100% CH_2Cl_2 至15%MeOH- CH_2Cl_2)以得到化合物23(24.6g,89%)。Rf(0.55,15%MeOH- CH_2Cl_2)。

[0762] 步骤4. 化合物24的制备



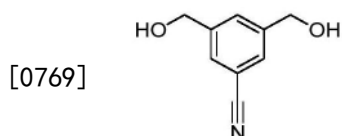
[0764] 将化合物23(24.6g)溶解于MeOH(200mL)和TFA(1.5mL)中,并用氮吹扫。添加炭载钯(1g,10%w/w湿基)且然后将反应混合物用氢吹扫并剧烈搅拌过夜。完成后,将反应物用氮吹扫,通过Celite过滤并用MeOH冲洗。将滤液浓缩并通过硅胶60上的柱色谱法(梯度:5%→10%→20%MeOH- CH_2Cl_2)纯化以得到成浅褐色粘性油状物的24(23g)。Rf(0.32,10%MeOH- CH_2Cl_2)。

[0765] 步骤5. (5-氨基-1,3-亚苯基)二甲醇26的制备



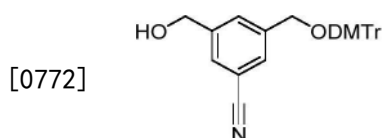
[0767] 使氢化铝锂 (13.6g, 358mmol) 于无水四氢呋喃 (450mL) 中的悬浮液在氮气氛下回流并用5-氨基间苯二酸二甲酯25 (20g, 96mmol) 于无水四氢呋喃 (350mL) 中的溶液逐滴处理。在完成添加后,将混合物加热至回流并再保持2小时。完成后,使溶液冷却至室温并通过缓慢添加MeOH (27mL)、然后水 (40mL) 来淬灭。在搅拌2小时后,将混合物过滤、浓缩并从EtOAc再结晶以产生呈灰白色晶体的(5-氨基-1,3-亚苯基)二甲醇26 (10.2g, 70%)。Rf 0.5 (15%MeOH-CH₂Cl₂)。

[0768] 步骤6. 3,5-双(羟甲基)苄腈27的制备



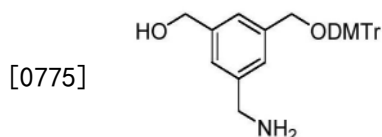
[0770] 使26 (5g, 33mmol) 于2N盐酸 (100mL) 中的溶液冷却至0℃并用硝酸钠 (3.53g, 36mmol) 于水 (50mL) 中的冷溶液处理。将反应混合物在≤5℃的温度下维持30分钟,然后用氰化铜(I) (3.19g, 35.6mmol) 和氰化钠 (3.53g, 72mmol) 于水 (50mL) 中的溶液一次性处理。在室温下搅拌过夜后,将混合物过滤,用二氯甲烷 (3x 100mL) 萃取,浓缩且不经进一步纯化即使用。获得呈黄色固体的二醇3,5-双(羟甲基)苄腈27 (2.19g, 41%)。Rf 0.75 (15%MeOH-CH₂Cl₂)。

[0771] 步骤7. 3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(羟甲基)苄腈28的制备



[0773] 将3,5-双(羟甲基)苄腈27 (538mg, 3.3mmol) 于吡啶 (14mL) 中的溶液用4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (1.17g, 3.46mmol) 处理,并在室温下搅拌过夜。一旦完成,将混合物浓缩且分散于乙醚 (25mL) 中,过滤并浓缩。将粗产物通过硅胶60的柱色谱法 (梯度:10%至50% EtOAc-己烷) 纯化以产生呈黄色固体的28 (725mg, 47%)。Rf 0.5 (1:1EtOAc-己烷)。

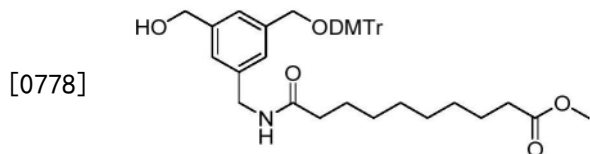
[0774] 步骤8. (3-(氨基甲基)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)苯基)甲醇29的制备



[0776] 使28 (100mg, 0.22mmol) 于甲基四氢呋喃 (5mL) 中的溶液冷却至0℃并用氢化铝锂 (0.64mmol = 0.28mL) 的2.3M于MeTHF中的溶液) 缓慢处理。在搅拌1小时后,将反应物通过添加甲醇 (1mL)、然后水 (0.3mL) 淬灭,并搅拌30分钟。将混合物过滤并浓缩以产生 (3-(氨基甲基)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)苯基)甲醇29 (78mg, 77%)。Rf 0.15 (10% MeOH-CH₂Cl₂)。

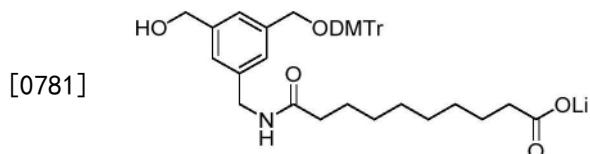
[0777] 步骤9. 10-((3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(羟甲基)苄基)氨

基)-10-氧代癸酸甲酯30的制备



[0779] 将(3-(氨基甲基)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-甲基)苄基)甲醇29(78mg, 0.17mmol)和癸二酸单甲酯(38mg, 0.17mmol)于二氯甲烷(5mL)中的溶液用EDC(48mg, 0.25mmol)、DMAP(催化剂, 5mg)和二异丙基乙胺(57 μ L, 0.33mmol)连续处理。在搅拌(3.5小时)后,将反应混合物倾倒至饱和碳酸氢钠溶液(50mL)中。将碳酸氢钠溶液用二氯甲烷(3x 50mL)萃取,用盐水(50mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥。将粗物质通过硅胶60上的柱色谱法(梯度:2%至5%MeOH-CH₂Cl₂)纯化以得到呈黄色油状物的10-(3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(羟甲基)苄基)氨基)-10-氧代癸酸甲酯30(57mg, 53%)。Rf 0.45(10%MeOH-CH₂Cl₂)。

[0780] 步骤10. 10-(3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(羟甲基)苄基)氨基)-10-氧代癸酸锂31的制备

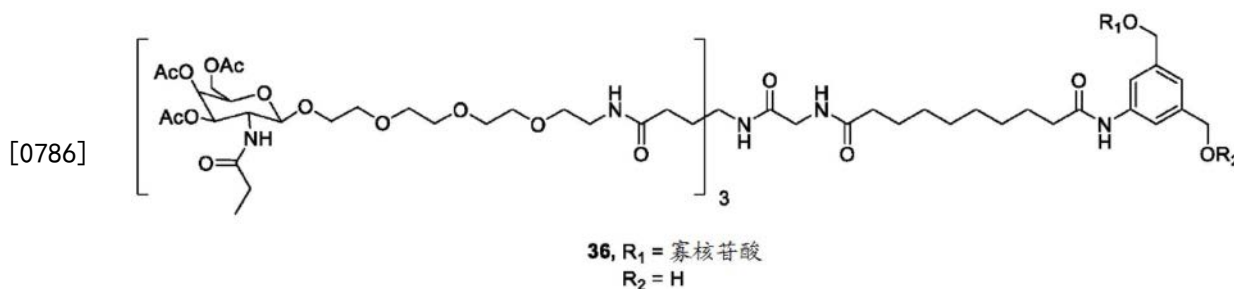


[0782] 将化合物30(188mg, 0.28mmol)溶解于四氢呋喃(5mL)中,并用LiOH(7mg, 0.30mmol)于水(1mL)中的溶液处理。完成后,在真空下除去四氢呋喃并将剩余的水性混合物冷冻并冻干以得到呈无色固体的10-(3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-(羟甲基)苄基)氨基)-10-氧代癸酸锂31(180mg, 99%)。Rf 0.45(10%MeOH-CH₂Cl₂)。

[0783] 步骤11. 化合物32、33和34的制备

[0784] 严格根据用于合成化合物19、20和1的相同程序来制备化合物32、33和34。

[0785] 实施例3. 缀合物36的合成

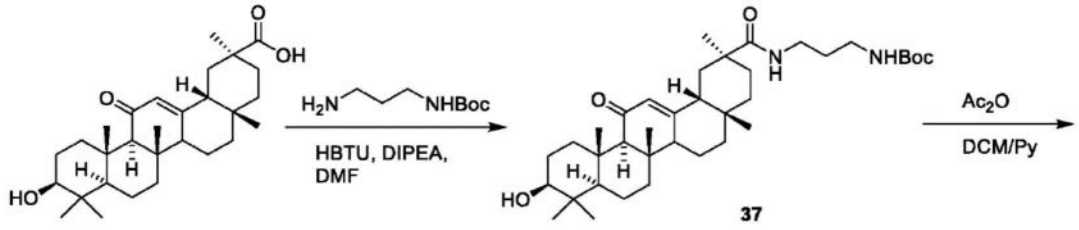


[0787] 步骤1. 缀合物36的制备

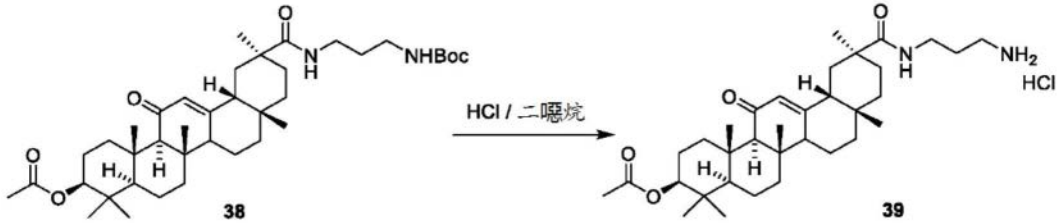
[0788] 使用与用于合成化合物34和所有相应中间体的相同程序来制备缀合物36。唯一的例外是其中使用丙酸酐代替乙酸酐的化合物6的合成。

[0789] 实施例4. 缀合物42的合成

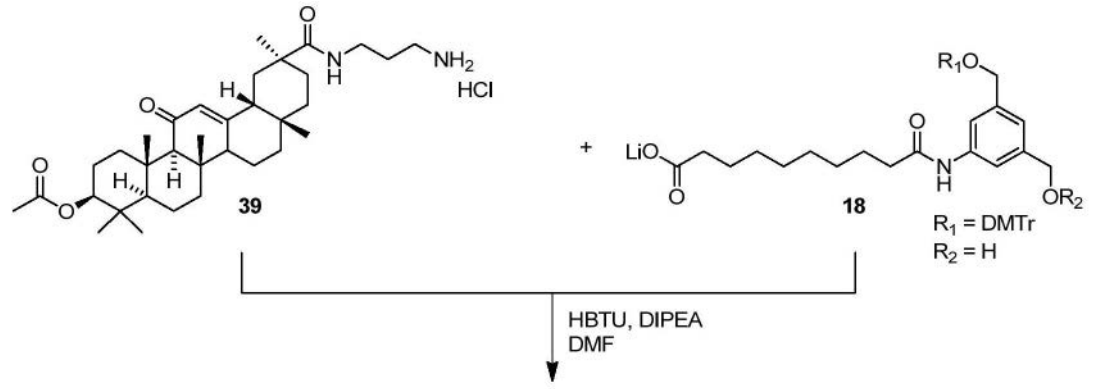
[0790] 方案9.



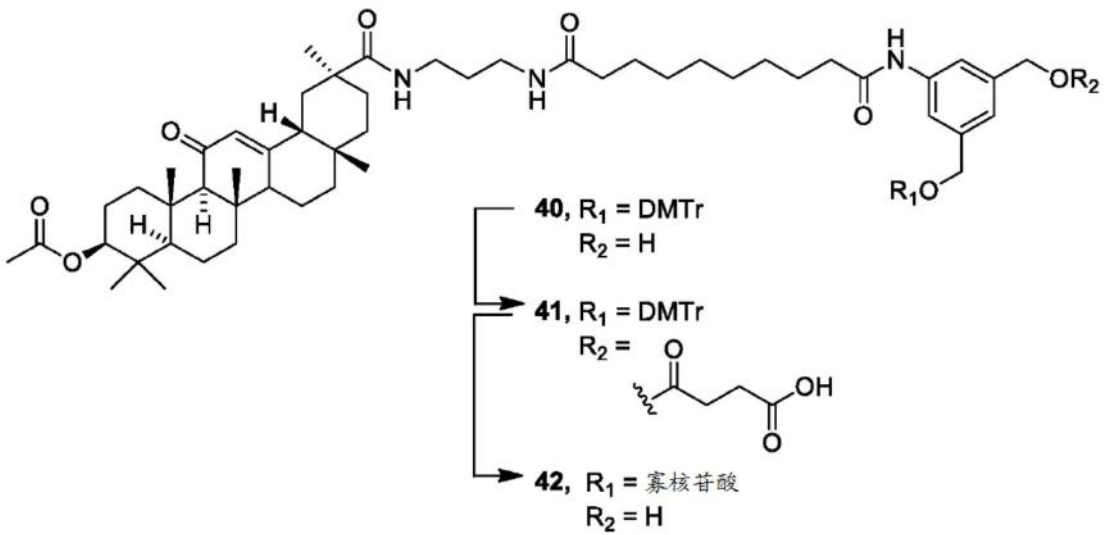
[0791]



[0792] 方案10.

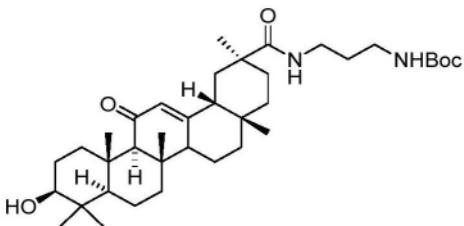


[0793]



[0794] 步骤1. 化合物37的制备

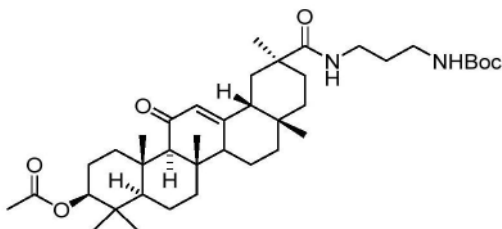
[0795]



[0796] 向18 β -甘草次酸(2.5g, 5.3mmol)、(3-氨基丙基)氨基甲酸叔丁酯(1.1g, 6.4mmol)和HBTU(3.0g, 8.0mmol)于N,N-二甲基甲酰胺(20mL)中的溶液中添加二异丙基乙胺(2.75mL, 15.9mmol)。将所述溶液在室温下搅拌过夜。完成后,将溶液在真空中浓缩至干燥。将残余物通过硅胶60上的柱色谱法(梯度:2%至5%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到呈无色固体的产物(2.1g, 63%)。

[0797] 步骤2. 化合物38的制备

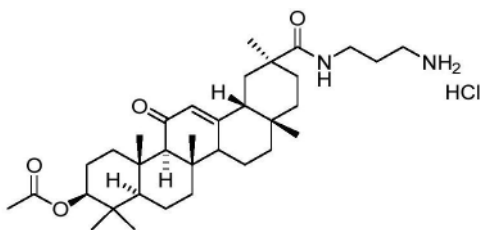
[0798]



[0799] 向37(2.1g, 3.3mmol)和三乙胺(3.5mL, 10mmol)于二氯甲烷(25mL)中的溶液中添加乙酸酐(850 μ L, 5.3mmol)和DMAP(5mg)。将溶液在室温下搅拌过夜。完成后,将溶液浓缩至干燥并溶解于乙酸乙酯(100mL)中,用水(100mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥以得到浅褐色泡沫(1.9g, 85%)。

[0800] 步骤3. 化合物39的制备

[0801]



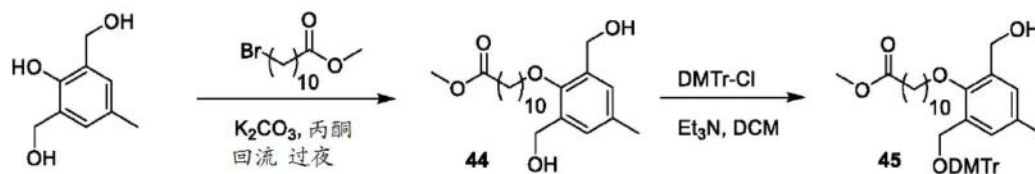
[0802] 向38(1.5g, 2.3mmol)于无水二噁烷(25mL)中的溶液中添加于二噁烷中的2M氯化氢(25mL)。将所述溶液在室温下搅拌过夜,然后在真空中浓缩至干燥以得到浅褐色固体(1.3g, 96%)。

[0803] 步骤4. 化合物40、41和42的制备

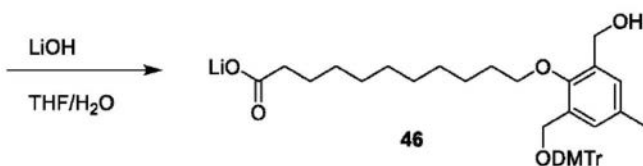
[0804] 严格根据用于合成化合物19、20和1的相同程序来制备化合物40、41和42。

[0805] 实施例5. 缀合物43的合成

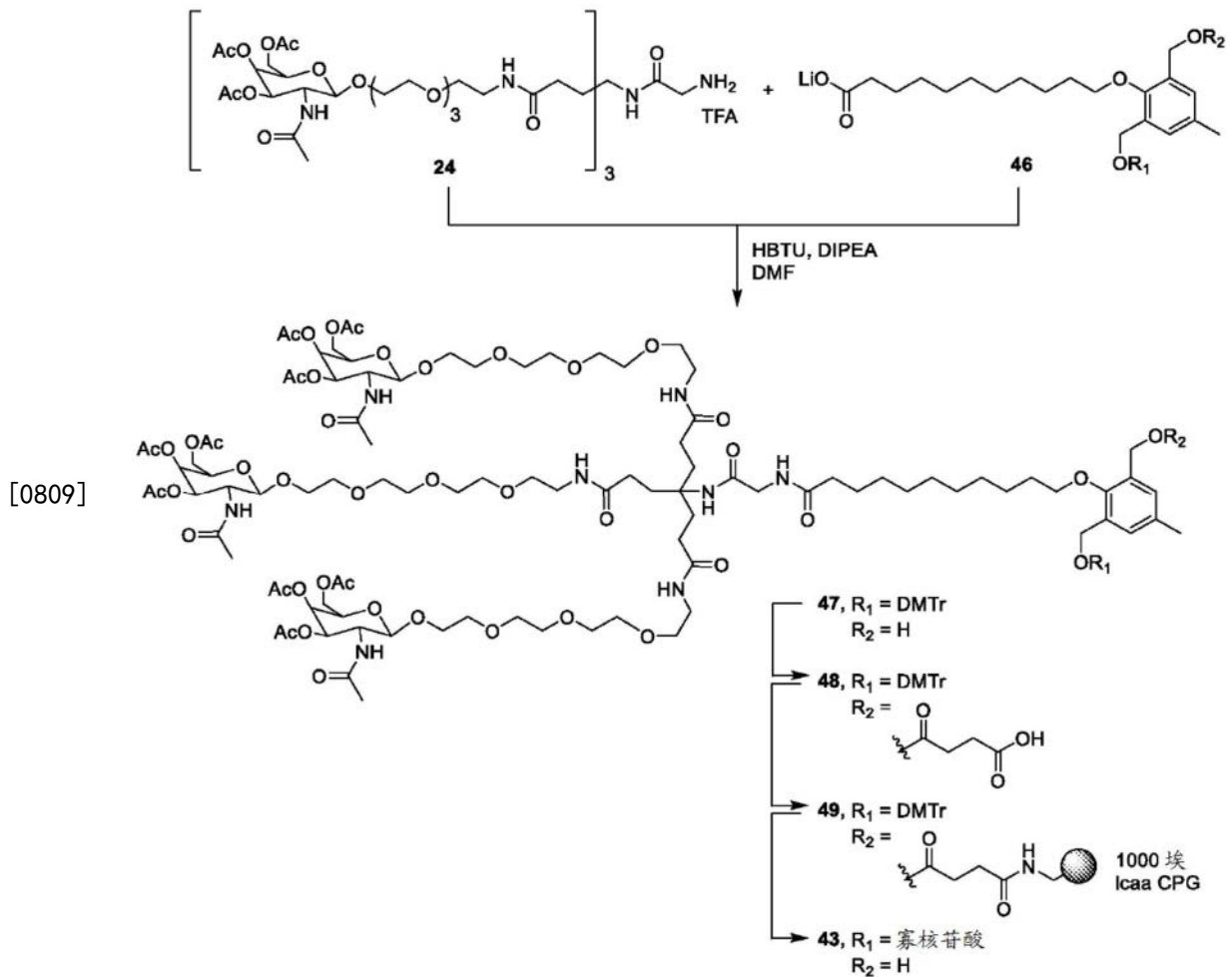
[0806] 方案11.



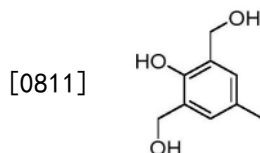
[0807]



[0808] 方案12.

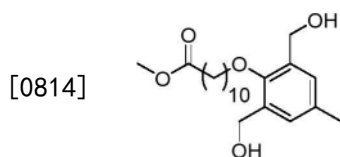


[0810] 步骤1. 11-(2,6-双(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸甲酯44的制备



[0812] 将2,6-双(羟甲基)-对甲酚(2.7g, 16.3mmol)、11-溴十一烷酸甲酯(5.0g, 17.9mmol)和碳酸钾(4.5g, 32.6mmol)于丙酮(100mL)中的溶液回流16小时。完成后,将所述溶液在真空中浓缩至干燥,悬浮于乙酸乙酯(150mL)中并用水(2x 100mL)和盐水(100mL)洗涤。将乙酸乙酯层在硫酸镁上干燥,过滤并在真空中浓缩至干燥。将残余物通过硅胶60上的柱色谱法(梯度100%Hex→50%EtOAc/Hex)纯化以得到呈无色油状物的11-(2,6-双(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸甲酯44(1.6g, 27%)。

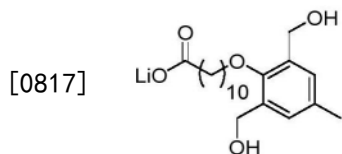
[0813] 步骤2. 11-(2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-6-(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸甲酯45的制备



[0815] 向11-(2,6-双(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸甲酯44(1.5g, 4.1mmol)于无水吡啶(20mL)中的溶液中添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(1.4g, 4.1mmol)。将所述溶液在室

温下搅拌过夜。完成后,将所述溶液在真空中浓缩至干燥并通过硅胶60上的柱色谱法(0.5至1%于 CH_2Cl_2 中的MeOH)纯化以得到呈浅黄色固体的11-(2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-6-(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸甲酯45(1.1g,40%)。

[0816] 步骤3. 11-(2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-6-(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸锂46的制备



[0818] 向11-(2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-6-(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸甲酯45(1.1g,1.7mmol)于无水四氢呋喃(40mL)和水(10mL)中的溶液中添加氢氧化锂(44mg,1.8mmol)。将所述溶液在真空中浓缩以除去所有四氢呋喃。将剩余的水溶液在液氮上快速冷冻,然后冻干过夜以得到呈浅粉色固体的11-(2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-6-(羟甲基)-4-甲基苯氧基)十一烷酸锂46(1.1g,94%)。

[0819] 步骤4. 化合物47的制备

[0820] 向10(1.33g,0.66mmol)、46(0.5g,0.73mmol)、HBTU(400mg,1mmol)于N,N-二甲基甲酰胺(25mL)中的溶液中添加二异丙基乙胺(0.35mL,2mmol)。将所述溶液在室温下搅拌过夜(18小时)。完成后,在真空中除去溶剂并将残余物通过硅胶上的柱色谱法(梯度:100% CH_2Cl_2 -5%-10%-15%于 CH_2Cl_2 中的MeOH)纯化以得到呈无色固体的47(710mg,41%)。

[0821] 步骤5. 化合物48的制备

[0822] 向47(0.71g,0.3mmol)、三乙胺(0.4mL,3.0mmol)和聚苯乙烯-DMAP(3mmol/g负载,200mg,0.6mmol)于二氯甲烷(15mL)中的溶液中添加琥珀酸酐(60mg,0.6mmol)。将溶液在室温下搅拌过夜并在完成后过滤并在真空中浓缩至干燥。将残余物通过硅胶60上的柱色谱法(梯度5%至20%于 CH_2Cl_2 中的MeOH)纯化以得到呈浅黄色固体的48(570mg,70%)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 ,400MHz) δ 7.91(m,1H),7.86-7.76(m,6H),7.45-7.40(m,2H),7.36-7.14(m,10H),7.10(s,1H),6.91(d,J=8.9Hz,4H),5.21(d,J=3.3Hz,3H),5.01(s,2H),4.97(dd,J=11.2,3.4Hz,3H),4.56(d,J=8.5Hz,3H),4.06-3.98(m,11H),3.93-3.84(m,3H),3.81-3.72(m,3H),3.74(s,6H),3.65-3.46(m,38H),3.40-3.35(m,6H),3.20-3.16(m,6H),2.56-2.44(m,4H),2.33(s,3H),2.15-2.08(m,2H),2.10(s,9H),2.04-1.96(m,6H),1.89(s,9H),1.82-1.76(m,4H),1.77(s,9H),1.54-1.34(m,4H),1.28-1.10(m,12H),

[0823] 步骤6. 化合物49的制备

[0824] 向48(100mg,40 μmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(30mg/mL于乙腈中的溶液,50 μL ,13 μmol)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(40 μL ,264 μmol)和吡啶(50 μL)于二氯甲烷(2mL)和乙腈(3mL)中的溶液中添加1000 Å lcaa CPG(prime synthesis,920mg)。将所述溶液在室温下在轨道式振荡器上搅拌过夜。反应溶液的TLC分析显示仅部分消耗活化的N-羟基琥珀酸酯,因此添加另外的CPG(500mg)。将溶液再次搅拌过夜。完成后,将CPG过滤并用二氯甲烷(25mL)、乙腈(25mL)和四氢呋喃(25mL)洗涤。将CPG上未反应的胺残余物通过添加乙酸酐于乙腈(3mL)中和10%N-甲基咪唑/10%吡啶于四氢呋喃(3mL)中的1:1溶液乙酰化(封端)。将悬浮液静置2小时,然后过滤并用等份的四氢呋喃(25mL)、乙腈(25mL)和二氯甲烷(25mL)冲

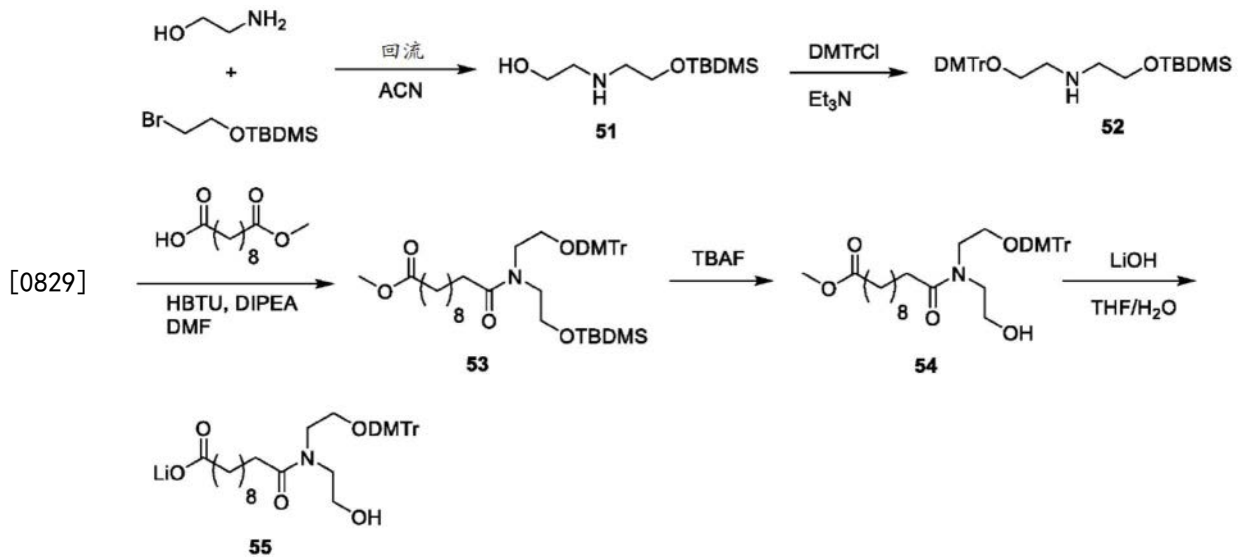
洗。将负载的CPG 49在高真空下干燥过夜。使用标准DMT负载测定(于 CH_2Cl_2 中的3%三氯乙酸,UV-VIS, A_{504}),测定配体负载效率为 $22\mu\text{mol/g}$ 。

[0825] 步骤7. 缀合物43的制备

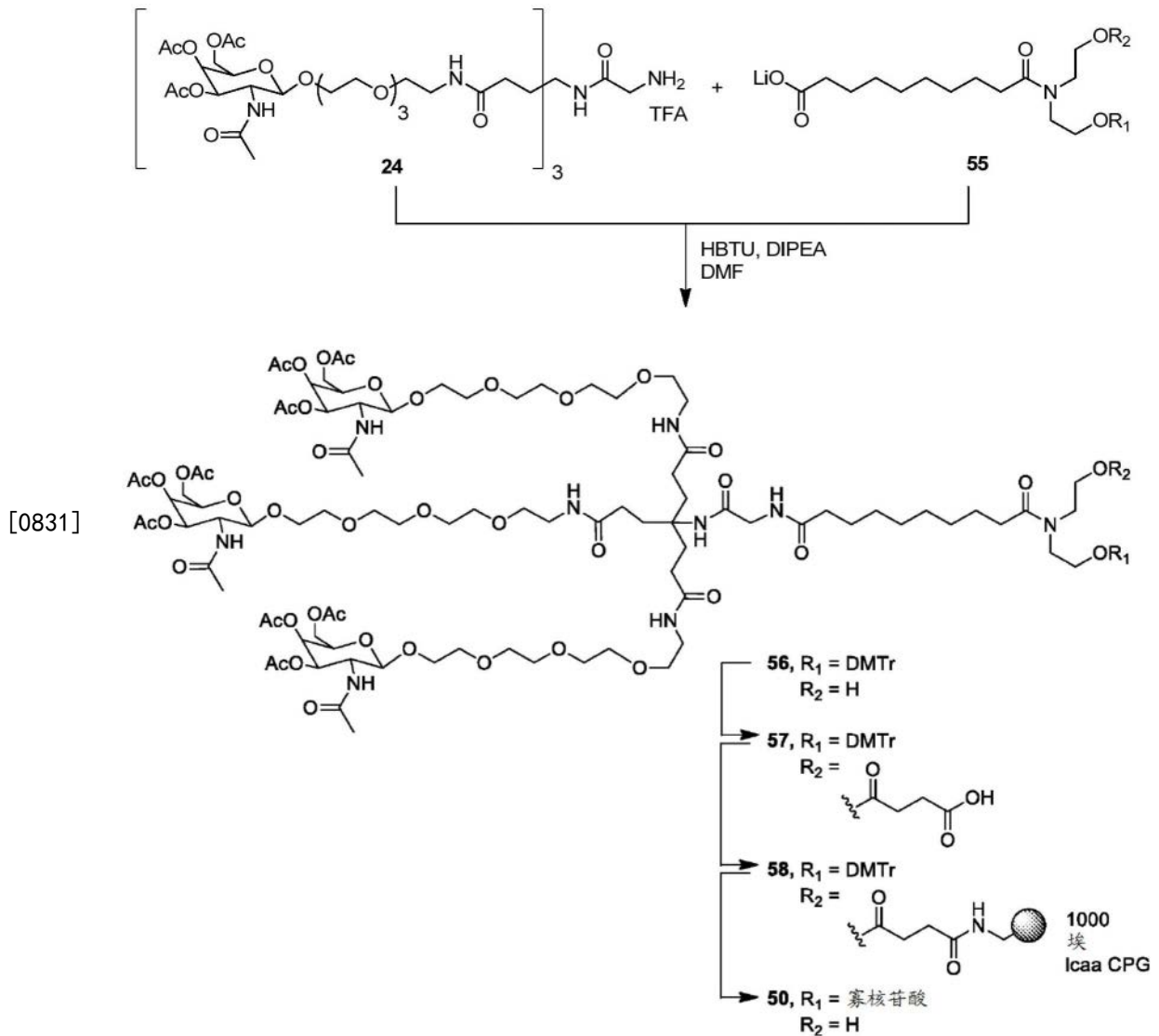
[0826] 将所得GalNAc负载的CPG固体载体49用于使用标准程序的自动寡核苷酸合成中。进行核苷酸脱保护,随后从固体载体除去(同时进行乙酸半乳糖胺脱保护)得到GalNAc-寡核苷酸缀合物43。

[0827] 实施例6. 缀合物50的合成

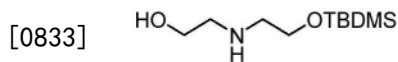
[0828] 方案13.



[0830] 方案14.

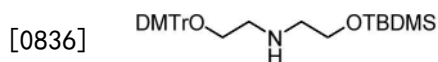


[0832] 步骤1. 2-((2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)氨基)乙-1-醇51的制备



[0834] 将乙醇胺 (77mL, 1.25mol) 和 (2-溴乙氧基)-叔丁基二甲基硅烷 (15g, 62.7mmol) 于无水乙腈 (200mL) 中的溶液回流3小时。完成后,使反应物冷却至室温,用水 (400mL) 稀释并用乙酸乙酯 (3x 150mL) 萃取。将合并的乙酸乙酯萃取物在硫酸镁上干燥,过滤并在真空中浓缩至干燥。通过二氧化硅垫首先用50%乙酸乙酯/己烷,然后用50%MeOH/EtOAc过滤来纯化残余物以得到呈浅黄色油状物的51 (14g, 100%)。

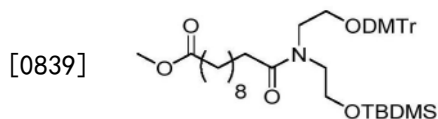
[0835] 步骤2. 2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)乙-1-胺52的制备



[0837] 向2-((2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)氨基)乙-1-醇51 (14g, 64mmol) 和三乙胺 (17.5mL, 128mmol) 于无水二氯甲烷 (250mL) 中的溶液中添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (24g, 70mmol)。将所述溶液在室温下搅拌过夜,然后在真空中浓缩至干燥。将残余物溶解于乙酸乙酯 (300mL) 中并用水 (250mL) 和盐水 (250mL) 洗涤。将乙酸乙酯在硫酸镁上干燥,

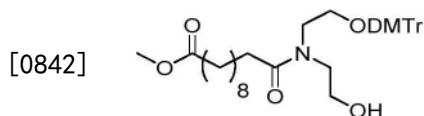
过滤并在真空中浓缩至干燥。通过硅胶60上的柱色谱法(1%至5%于CH₂Cl₂中的MeOH)纯化得到呈浅黄色粘性油状物的52(13g, 39%)。

[0838] 步骤3. 10-((2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基)(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)氨基)-10-氧代癸酸甲酯53的制备



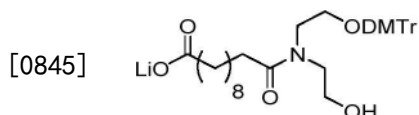
[0840] 将2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-N-(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)乙-1-胺52(5.4g, 10.3mmol)、癸二酸单甲酯(2.2g, 10.3g)、HBTU(4.9g, 12.9mmol)、DIPEA(5.3mL, 30.9mmol)于N,N-二甲基甲酰胺(100mL)中的溶液在室温下搅拌3小时。完成后,将溶液倾倒入水(400mL)中并用乙酸乙酯(1x 500mL)萃取。将乙酸乙酯萃取物用盐水(2x 250mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并在真空中浓缩至干燥。通过硅胶60上的柱色谱法(10%至25%于己烷中的乙酸乙酯)纯化得到呈粘性黄色油状物的53(6.5g, 87%)。

[0841] 步骤4. 10-((2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基)(2-羟基乙基)氨基)-10-氧代癸酸甲酯54的制备



[0843] 向10-((2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基)(2-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)氨基)-10-氧代癸酸甲酯53(2.0g, 2.8mmol)和三乙胺(1mL)于无水四氢呋喃(20mL)中的溶液中添加TBAF(1M于THF中, 3.4mL, 3.3mmol)。将溶液搅拌6小时,但通过TLC(5%于CH₂Cl₂中的MeOH)观察到只有一部分转化。添加另外1.7mL TBAF并将溶液在室温下搅拌过夜。完成后,将溶液在真空中浓缩并通过硅胶60上的柱色谱法(10%至50%于己烷中的EtOAc,然后100%EtOAc)纯化以得到呈粘性无色油状物的54(0.5g, 29%)。

[0844] 步骤5. 10-((2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基)(2-羟基乙基)氨基)-10-氧代癸酸锂55的制备



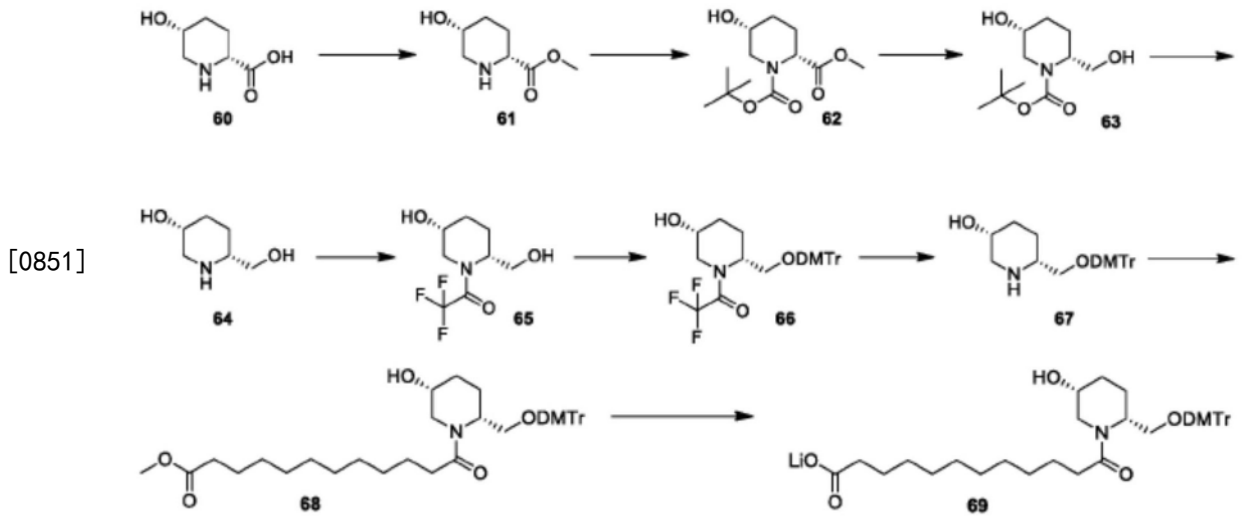
[0846] 向10-((2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基)(2-羟基乙基)氨基)-10-氧代癸酸甲酯54(0.5g, 0.83mmol)于THF(40mL)中的溶液中添加水(10mL)和氢氧化锂(24mg, 1.0mmol)。将所述溶液在室温下搅拌过夜,然后在真空中浓缩以除去THF。将剩余的水溶液在液氮上快速冷冻并冻干以得到呈无色固体的55(485mg, 95%)。

[0847] 步骤6. 化合物56、57、58和50的制备

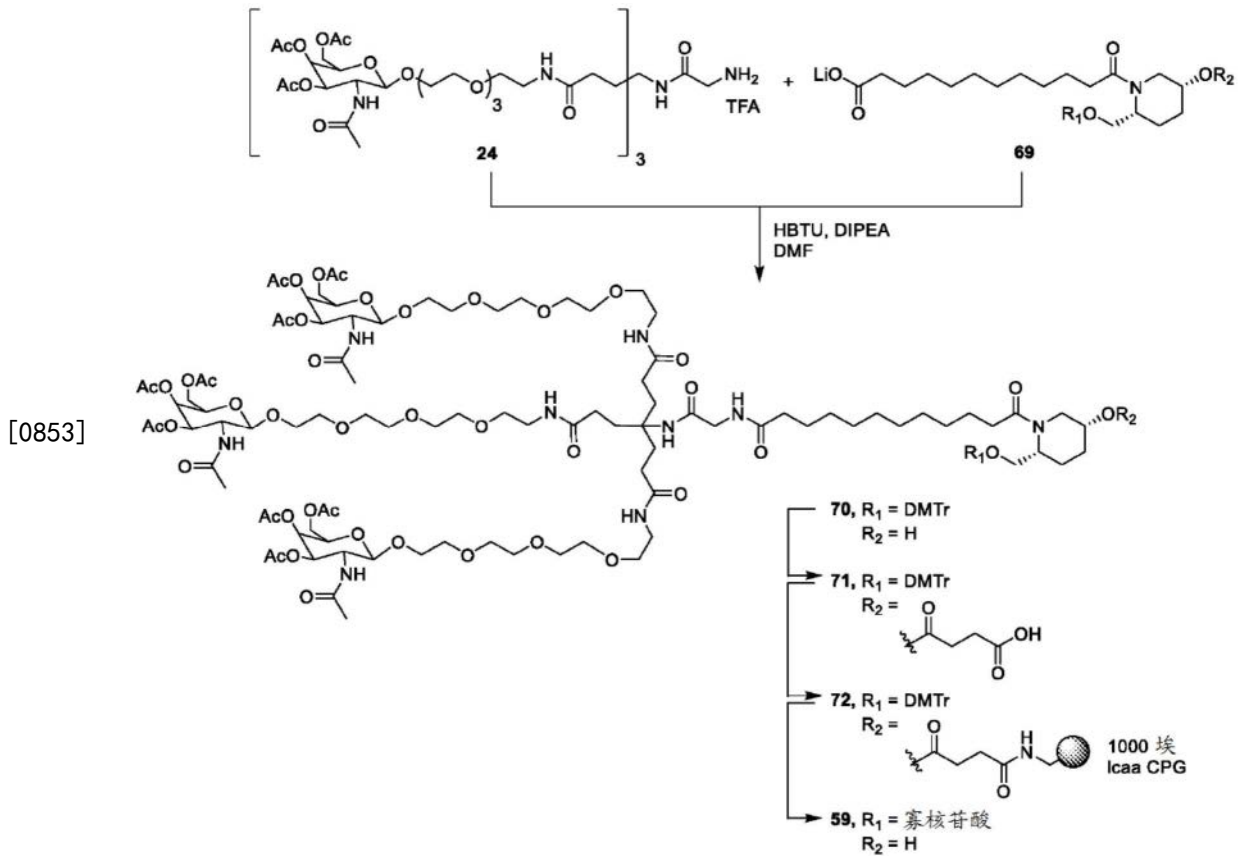
[0848] 严格使用与用于合成化合物47、48、49和43的那些程序相同的程序来制备化合物56、57、58和50。

[0849] 实施例7. 缀合物59的合成

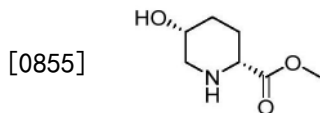
[0850] 方案15.



[0852] 方案16.

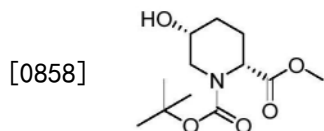


[0854] 步骤1. (2R,5R)-5-羟基哌啶-2-羧酸甲酯61的制备



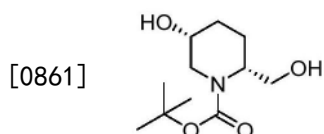
[0856] 将(2R,5R)-5-羟基哌啶-2-羧酸60 (3.5g, 24.1mmol) 在MeOH (50mL) 中搅拌。使HCl (g) 鼓泡穿过溶液2分钟, 并将反应物在回流下搅拌1.5小时。将反应物在真空中浓缩以定量产率得到(2R,5R)-5-羟基哌啶-2-羧酸甲酯61, 其不经进一步纯化即使用。

[0857] 步骤2. (2R,5R)-5-羟基哌啶-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯62的制备



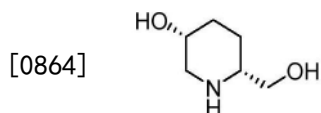
[0859] 将(2R,5R)-5-羟基哌啶-2-羧酸甲酯61(24.1mmol)和TEA(7.2mL,53.02mmol)在室温下在DCM(100mL)中搅拌。逐份添加二碳酸二叔丁酯(5.7g,26.5mmol)并将反应物搅拌2小时。将反应物用DCM(100mL)稀释并用1M HCl(2x 75mL)、饱和NaHCO₃(2x 75mL)、H₂O(2x 75mL)和饱和NaCl溶液(2x 75mL)依序洗涤。将有机物分离,干燥(Na₂SO₄)并在真空中浓缩以得到(2R,5R)-5-羟基哌啶-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯62(5.53g,88%),其不经进一步纯化即使用。

[0860] 步骤3. (2R,5R)-5-羟基-2-(羟甲基)哌啶-1-羧酸叔丁酯63的制备



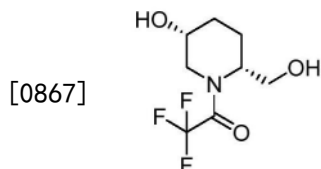
[0862] 将(2R,5R)-1-(叔丁氧基羰基)-5-羟基哌啶-2-甲酸62(5.53g,21.4mmol)在0℃下在THF中搅拌。经1小时逐滴添加LiBH₄(3.0M于THF中的溶液)(8.9mL,27.7mmol)。使反应物升温至室温并继续搅拌16小时。将反应物用1M NaOH淬灭,在真空中除去THF并用EtOAc(10x 100mL)将水溶液彻底萃取。将合并的有机物用H₂O(50mL)、饱和NaCl溶液(2x 50mL)洗涤,干燥(Na₂SO₄)并在真空中浓缩以得到(2R,5R)-5-羟基-2-(羟甲基)哌啶-1-羧酸叔丁酯63(2.4g,49.0%),其不经进一步纯化即使用。

[0863] 步骤4. (3R,6R)-6-(羟甲基)哌啶-3-醇64的制备



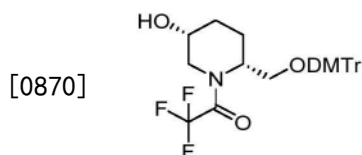
[0865] 将(2R,5R)-5-羟基-2-(羟甲基)哌啶-1-羧酸叔丁酯63(2.4g,10.4mmol)在室温下在Et₂O中搅拌。使HCl(g)鼓泡穿过达45秒,并将反应物在室温下搅拌45分钟。将反应物在真空中浓缩并在高真空下干燥以得到(3R,6R)-6-(羟甲基)哌啶-3-醇64。所述产物不经进一步纯化即使用。

[0866] 步骤5. 2,2,2-三氟-1-((2R,5R)-5-羟基-2-(羟甲基)哌啶-1-基)乙-1-酮65的制备



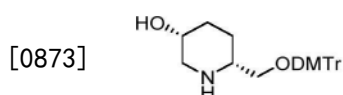
[0868] 将来自先前反应的粗制(3R,6R)-6-(羟甲基)哌啶-3-醇64在室温下在含有TEA(3.5mL,25.2mmol)的MeCN(50mL)中搅拌。添加三氟乙酸乙酯(3mL,25.2mmol)并将反应物在室温下搅拌16小时,然后在真空中浓缩以得到2,2,2-三氟-1-((2R,5R)-5-羟基-2-(羟甲基)哌啶-1-基)乙-1-酮65。所述产物不经进一步纯化即使用。

[0869] 步骤6. 1-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-2,2,2-三氟乙-1-酮66的制备



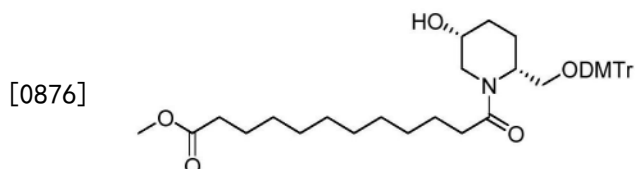
[0871] 将来自先前反应的粗制2,2,2-三氟-1-((2R,5R)-5-羟基-2-(羟甲基)哌啶-1-基)乙-1-酮65在室温下在含有TEA (50mL)的DCM中搅拌。一次性添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(DMTrCl) (3.87g, 11.44mmol), 并将反应物在室温下搅拌3小时。将反应物用DCM (50mL) 稀释,并用饱和NaHCO₃ (2x 75mL)、H₂O (2x 75mL) 和饱和NaCl溶液 (2x75mL) 依序洗涤。将有机物分离,干燥 (Na₂SO₄), 在真空中浓缩并通过柱色谱法 (100%己烷-60%EtOAc/己烷) (0.1% TEA) 纯化以得到1-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-2,2,2-三氟乙-1-酮66 (3.14g, 57%)

[0872] 步骤7. (3R,6R)-6-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-哌啶-3-醇67的制备



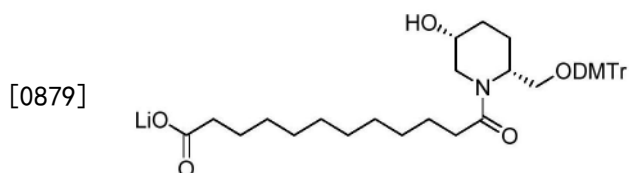
[0874] 将1-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-2,2,2-三氟乙-1-酮66 (3.14g, 6.0mmol) 在室温下在MeOH (50mL) 中搅拌。添加KOH (672mg, 12mmol), 并将反应物在室温下搅拌16小时。添加另外的KOH (300mg, 6mmol), 并继续再搅拌24小时。将反应物在真空中浓缩,吸收于DCM (150mL) 中,用H₂O (4x 50mL) 洗涤,干燥 (Na₂SO₄) 并在真空中浓缩以得到(3R,6R)-6-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)哌啶-3-醇67 (2.34g, 90%), 其不经进一步纯化即使用。

[0875] 步骤8. 12-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)-甲氧基)甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯68的制备



[0877] 将(3R,6R)-6-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)哌啶-3-醇67 (2.34g, 5.34mmol) 在室温下在DCM (75mL) 中搅拌。添加三乙胺 (2.2mL, 16.2mmol)、HATU (3.5g, 9.2mmol) 和12-甲氧基-12-氧代十二烷酸 (1.32g, 5.4mmol), 并将反应物在室温下搅拌3小时。将所得固体沉淀物通过过滤除去,将滤液在真空中浓缩并将残余物通过柱色谱法 (2.5%MeOH/DCM, 0.1% TEA) 纯化,从而以定量产率得到12-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯68。

[0878] 步骤9. 12-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-12-氧代十二烷酸锂69的制备



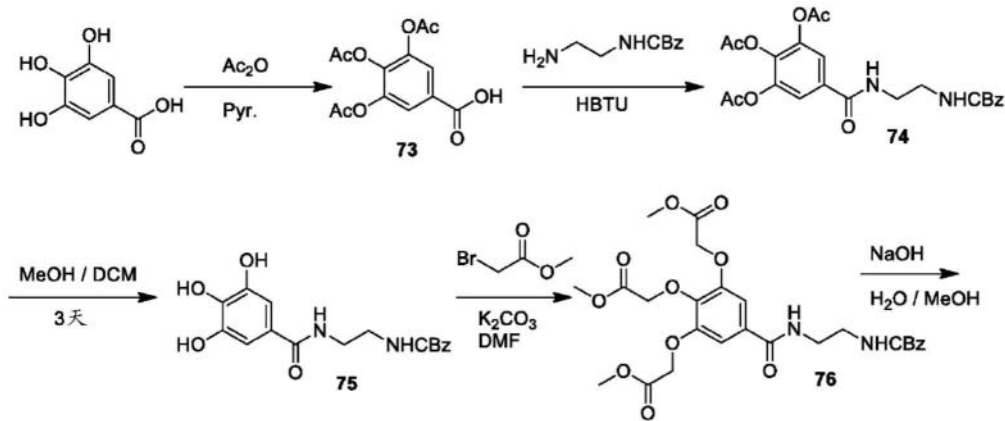
[0880] 将12-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯68(5.4mmol)和LiOH(140mg,5.94mmol)在室温下在THF:H₂O(1:1,100mL)中搅拌48小时。在真空中除去THF,将水溶液冷冻并冻干以得到12-((2R,5R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-5-羟基哌啶-1-基)-12-氧代十二烷酸锂69(3.2g,91%)。其不经另外的纯化即用于后续反应中。

[0881] 步骤10. 化合物70、71、72和59的制备

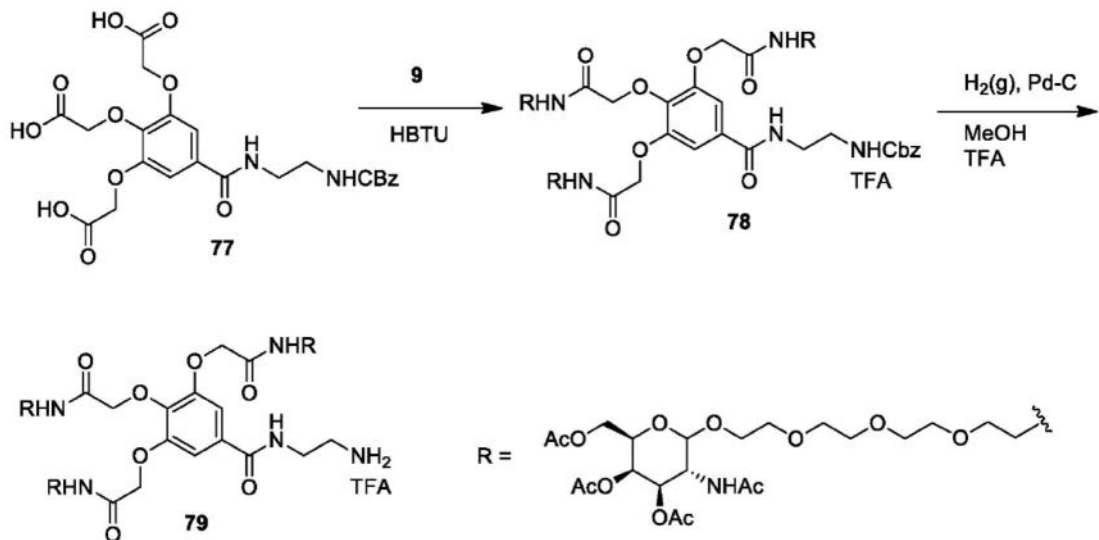
[0882] 严格使用与用于合成化合物47、48、49和43的那些程序相同的程序来制备化合物70、71、72和59。

[0883] 实施例8. 缀合物142的合成

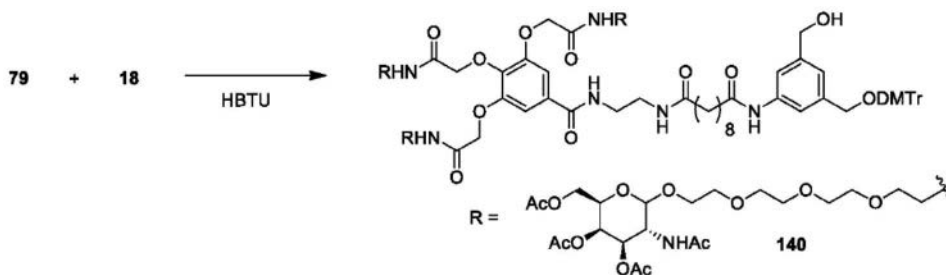
[0884] 方案17.



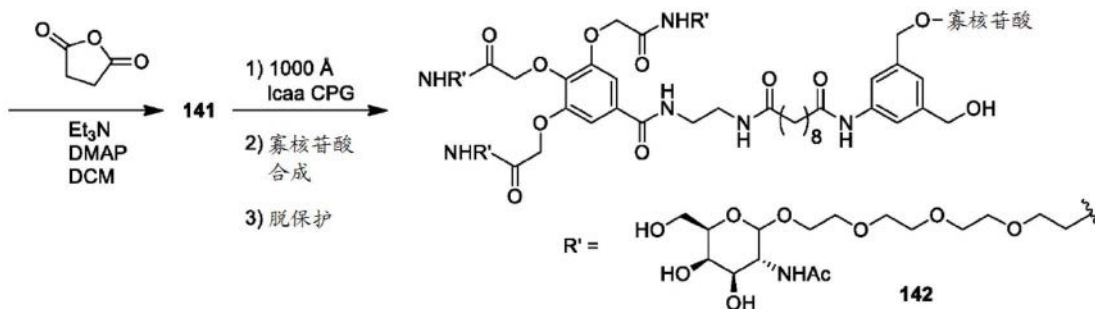
[0885]



[0886] 方案18.



[0887]



[0888] 步骤1. 3,4,5-三乙酰氧基苯甲酸73的制备

[0889] 向没食子酸(20g)于吡啶(50mL)和乙酸酐(50mL)中的溶液。将所述溶液在室温下搅拌过夜,然后倾倒入冰水(1L)中。用浓盐酸使溶液呈酸性,因此沉淀出无色固体。经由过滤收集固体并用水(5x 100mL)洗涤。将湿固体在液氮上冷冻并冷冻干燥以得到3,4,5-三乙酰氧基苯甲酸(26g,75%)。

[0890] 步骤2. 三乙酸5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨甲酰基)苯-1,2,3-三基酯74的制备

[0891] 向3,4,5-三乙酰氧基苯甲酸(10g,33.8mmol)、N-苄氧羰基-1,2-二氨基乙烷盐酸盐(5.3g,33.8mmol)和HBTU(13.5g,35.5mmol)于DMF(200mL)中的溶液中添加DIPEA(17.5mL,101mmol)。将所述溶液搅拌16小时,然后用乙酸乙酯(250mL)稀释,用盐水(3x 200mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并在真空中浓缩至干燥。将粗产物通过硅胶上的柱色谱法(梯度1%至5%于DCM中的MeOH)纯化以得到呈灰白色固体的三乙酸5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨甲酰基)苯-1,2,3-三基酯(5.5g)。

[0892] 步骤3. 3,4,5-三羟基-N-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)苯甲酰胺75的制备

[0893] 将三乙酸5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨甲酰基)苯-1,2,3-三基酯(5g,1.1mmol)于1:1MeOH/CH₂Cl₂(100mL)中的溶液在室温下搅拌3天。完成后,除去溶剂以得到呈无色固体的3,4,5-三羟基-N-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)苯甲酰胺(4g,定量)。

[0894] 步骤4. 2,2',2''-((5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨甲酰基)苯-1,2,3-三基)三(氧基))三乙酸三甲酯76的制备

[0895] 将3,4,5-三羟基-N-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)苯甲酰胺(4g,11.6mmol)、溴乙酸甲酯(7.7g,46.4mmol)和碳酸钾(9.6g,69.4mmol)于DMF(100mL)中的溶液在60℃下搅拌过夜。完成后,使所述溶液冷却至室温,用乙酸乙酯(200mL)稀释,用水(200mL)、盐水(3x 100mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并在真空中浓缩至干燥。将粗产物通

过硅胶上的柱色谱法(梯度2%至10%于DCM中的MeOH)纯化以得到呈米色固体的2,2',2''-((5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)苯-1,2,3-三基)三(氧基)-三乙酸三甲酯(5g,79%)

[0896] 步骤5. 2,2',2''-((5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)苯-1,2,3-三基)三(氧基)三乙酸77的制备

[0897] 将2,2',2''-((5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)苯-1,2,3-三基)三(氧基)三乙酸三甲酯(5g,9.2mmol)和1M NaOH(30mL)于甲醇(100mL)中的溶液在室温下搅拌2小时。完成后,将反应物浓缩以除去甲醇,并用水(75mL)稀释。使混合物冷却至0 $^{\circ}$ C,用2M HCl酸化并用乙酸乙酯(5x 150mL)萃取。将合并的乙酸乙酯萃取物在硫酸镁上干燥,过滤并在真空中浓缩至干燥以得到呈无色固体的2,2',2''-((5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)氨基)乙基)苯-1,2,3-三基)三(氧基)三乙酸(2.3g,50%)。

[0898] 步骤6. 化合物78的制备

[0899] 使用与用于化合物13的程序相同的程序,从化合物9(2.75g,4.3mmol)和77(0.5g,0.96mmol)制备化合物78。产率:600mg。

[0900] 步骤7. 化合物79的制备

[0901] 使用与用于化合物14的程序相同的程序,从化合物78(0.6g)制备化合物79。产率:500mg。

[0902] 步骤8. 化合物140的制备

[0903] 使用与用于化合物19的程序相同的程序,从化合物79(500mg,0.25mmol)和化合物18(175mg,0.25mmol)制备化合物140。产率:250mg,44%。

[0904] 步骤9. 化合物141的制备

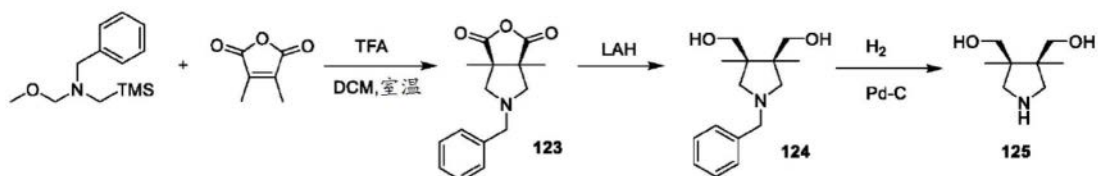
[0905] 使用与用于化合物20的程序相同的程序,从化合物140(250mg,0.11mmol)制备化合物141。产率:200mg。

[0906] 步骤10. 缀合物142的制备

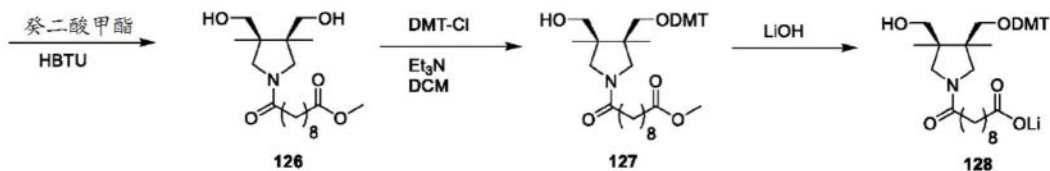
[0907] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物141(200mg)和1000A lcaa CPG(1.8g)制备缀合物142。产率:1.9g,22 μ mol/g CPG负载。将所得GalNAc负载的CPG固体载体用于使用标准程序的自动寡核苷酸合成中。进行核苷酸脱保护,随后从固体载体除去(同时进行乙酸半乳糖胺脱保护)得到GalNAc-寡核苷酸缀合物142。

[0908] 实施例9. 缀合物145的合成

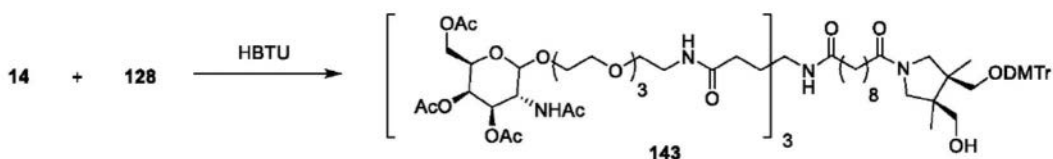
[0909] 方案19.



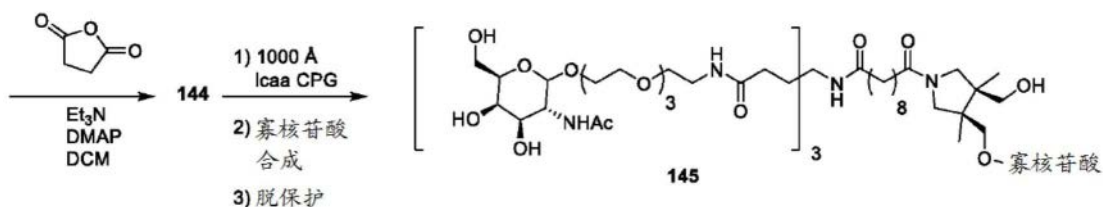
[0910]



[0911] 方案20.



[0912]



[0913] 步骤1.外消旋(顺式)5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮123的制备

[0914] 向3,4-二甲基咪喃-2,5-二酮(3g,24mmol)和N-苄基-1-甲氧基-N-(三甲基甲硅烷基)甲基)甲胺(7g,29.8mmol)于二氯甲烷(75mL)中的冷却溶液(0℃)中缓慢添加三氟乙酸(75μL)。搅拌过夜,随着冰浴融化使溶液缓慢升温至室温。将反应混合物浓缩至干燥,溶解于乙酸乙酯(100mL)中,用饱和碳酸氢钠(2x 100mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥。通过硅胶上的柱色谱法(梯度:20%于己烷中的乙酸乙酯至100%乙酸乙酯)纯化得到呈黄色油状物的外消旋(顺式)5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮(3.5g,56%)。

[0915] 步骤2.外消旋(顺式)1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇124的制备

[0916] 向(3aR,6aS)-5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮(3.5g,13.4mmol)于无水乙醚(50mL)中的冷却(0℃)溶液中分三部分缓慢添加氢化铝锂团粒(1.5g,40mmol)。将溶液搅拌过夜,随着冰水浴融化而升温至室温。完成后,使反应物冷却至0℃并用1.5mL 5M NaOH、然后1.5mL水极其缓慢地淬灭。搅拌30分钟,然后添加硫酸镁并过滤。将滤液浓缩以得到呈无色油状物的外消旋(顺式)1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇(2.7g)。

[0917] 步骤3.外消旋(顺式)3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇125的制备

[0918] 向((3R,4S)-1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇(10g,40mmol)于甲醇(10mL)中的溶液中添加湿的活性炭载10%钯(1g)。将溶液在氢气氛下剧烈搅拌16小时。完成后,将溶液通过Celite过滤,并浓缩至干燥以得到呈无色固体的外消旋(顺式)3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇(5.5g,86%)。

[0919] 步骤4.外消旋(顺式)10-(3,4-双(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸甲酯126的制备

[0920] 使用与用于化合物17的程序相同的程序从化合物125(1.3g,8.2mmol)和癸二酸单甲酯(1.8g,8.2mmol)制备化合物126。产率:1.8g,61%。

[0921] 步骤5.外消旋(顺式)10-(3-((双(4-甲氧基苯基)-(苯基)甲氧基)-甲基)-4-(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸甲酯127的制备

[0922] 使用与用于化合物18的程序相同的程序从126(1.8g,5.0mmol)和4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(1.7g,5.0mmol)制备化合物127。产率:1.4g,42%。

[0923] 步骤6.外消旋(顺式)10-(3-((双(4-甲氧基苯基)-(苯基)甲氧基)-甲基)-4-(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸锂128的制备

[0924] 向化合物127(3.0g,4.6mmol)于THF(50mL)和水(50mL)中的溶液中添加氢氧化锂(121mg,5.0mmol)。将所述溶液在室温下搅拌4小时,然后浓缩以除去THF。将剩余的水溶液冷冻干燥过夜以得到浅粉色固体(2.9g,定量)。

[0925] 步骤7.化合物143的制备

[0926] 使用与用于化合物19的程序相同的程序从128(270mg,0.42mmol)和化合物14(800mg,0.42mmol)制备化合物143。产率:900mg,87%。

[0927] 步骤8.化合物144的制备

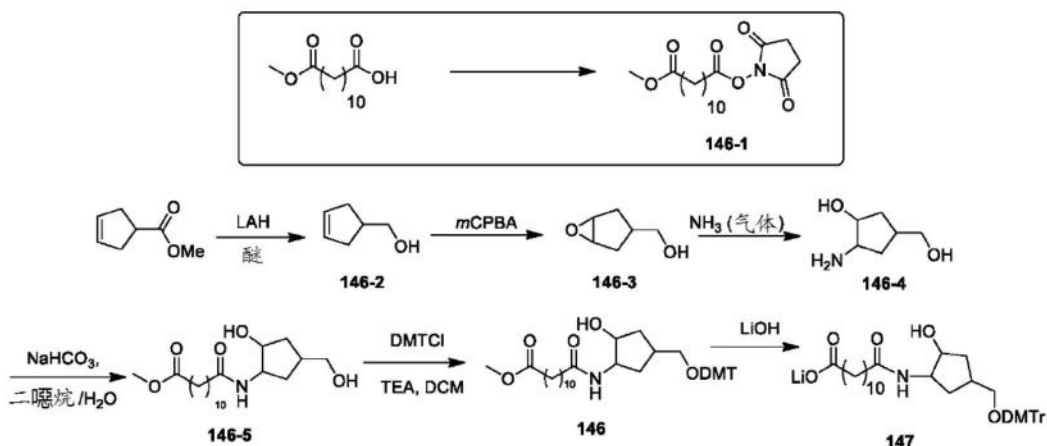
[0928] 使用与用于化合物20的程序相同的程序从化合物143(500mg,0.2mmol)制备化合物144。产率:200mg。

[0929] 步骤9.缀合物145的制备

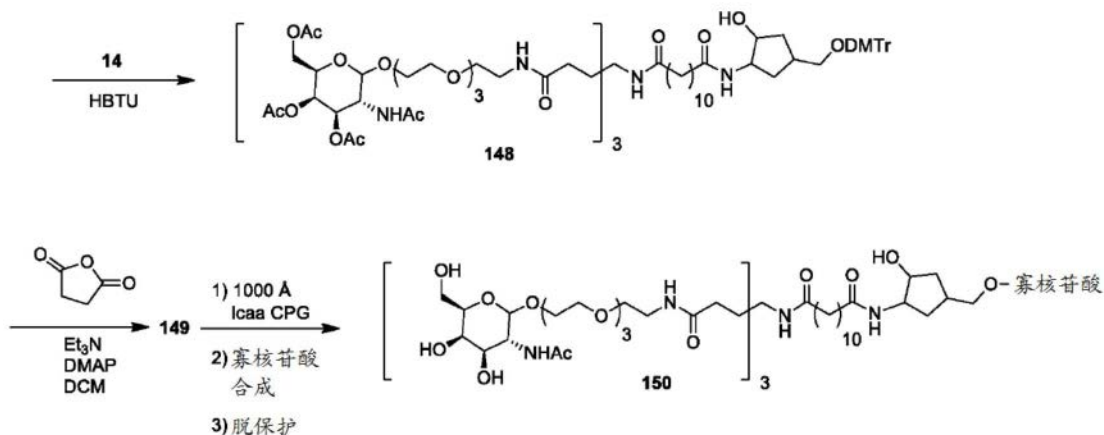
[0930] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物144(200mg)和1000A lcaa CPG(1.8g)制备缀合物145。产率:1.9g,20 μ mol/g CPG负载。使用标准程序,将所得GalNAc负载的CPG固体载体用于自动寡核苷酸合成中。进行核苷酸脱保护,随后从固体载体除去(同时进行乙酸半乳糖胺脱保护)得到GalNAc-寡核苷酸缀合物145。

[0931] 实施例10.缀合物150的合成

[0932] 方案21.



[0933]



[0934] 步骤1. 146-1的制备

[0935] 向十二烷二酸单甲酯(12.2g, 50.0mmol)于二氯甲烷(300mL)中的溶液中添加N-羧基琥珀酰亚胺(6.10g, 53.0mmol)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)(10.52g, 55.0mmol)。将混浊混合物在室温下搅拌过夜,并且反应物变成澄清溶液。TLC指示反应完成。将有机物用饱和NH₄Cl(300mL)和盐水(100mL)洗涤。将有机层分离、经MgSO₄干燥并浓缩至干燥以得到呈白色固体的纯净十二烷二酸1-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯12-甲酯146-1(16.7g, 97.8%)。

[0936] 步骤2. 环戊-3-烯-1-基甲醇146-2的制备

[0937] 经5小时在0℃下在氮气下向氢化铝锂(15.2g, 0.40mol)于无水乙醚(1L)中的悬浮液中逐滴添加环戊-3-烯甲酸甲酯(50g, 0.40mol)于乙醚(300mL)中的溶液。将悬浮液在室温下搅拌过夜。TLC指示反应完成。使反应物再冷却至0℃。逐滴添加Na₂SO₄(32mL)的饱和溶液以淬灭反应物。在完成添加后,将混合物再搅拌3小时,并通过celite垫过滤。蒸发溶剂得到呈无色液体的环戊-3-烯基甲醇146-2(37.3g, 95%)。

[0938] 步骤3. (6-氧杂双环[3.1.0]己烷-3-基)甲醇146-3的制备

[0939] 在0℃下向环戊-3-烯基甲醇146-2(4.0g, 41mmol)于二氯甲烷(150mL)中的溶液中逐份添加3-氯过苯甲酸(10g, 45mmol, 77%纯度)。将反应物搅拌过夜。添加二氯甲烷(150mL)。将有机物用硫代硫酸钠(12g于10mL水中)、随后饱和NaHCO₃(40mL)洗涤。重复此过程,直至洗掉所有剩余的3-氯过苯甲酸为止。将有机物经MgSO₄干燥。蒸发溶剂得到呈黄色油状物的顺式-和反式-6-氧杂双环[3.1.0]己烷-3-基甲醇的混合物146-3(2.6g, 57%)。

GC-MS:m/z 114(5) (M^+), 95(15), 88(100), 81(15)。

[0940] 步骤4. 2-氨基-4-(羟甲基)环戊-1-醇146-4的制备

[0941] 在0℃下向6-氧杂双环[3.1.0]己烷-3-基甲醇146-3 (2.0g, 17.6mmol) 于甲醇 (20mL) 中的溶液中吹扫氨气持续10分钟。将反应物在室温下搅拌过夜。TLC指示反应未完成。除去甲醇并添加 $NH_3 \cdot H_2O$ (50mL), 并将此在室温下搅拌一周。TLC证实反应完成。通过与乙醇共沸来除去水以得到呈黄色油状物的2-氨基-4-(羟甲基)环戊醇146-4 (2.1g, 91%)。

[0942] 步骤5. 12-(2-羟基-4-(羟甲基)环戊基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯146-5的制备

[0943] 使用与12-(2-(叔丁氧基羰基氨基)乙基氨基)-12-氧代十二烷酸酯(3-2)的合成中所阐述相同的程序从2-氨基-4-(羟甲基)环戊醇146-4和十二烷二酸1-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯12-甲酯146-1制备化合物146-5。以87.4%产率获得呈灰白色固体的12-(2-羟基-4-(羟甲基)环戊基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯146-5。

[0944] 步骤6. 化合物147的制备

[0945] 使用与用于化合物18的程序相同的程序从化合物146 (1.4g, 2.33mmol) 定量制备化合物147。

[0946] 步骤7. 化合物148的制备

[0947] 使用与用于化合物19的程序相同的程序从化合物147 (150mg, 0.23mmol) 和化合物14 (431mg, 0.23mmol) 制备化合物148。产率: 460mg, 84%。

[0948] 步骤8. 化合物149的制备

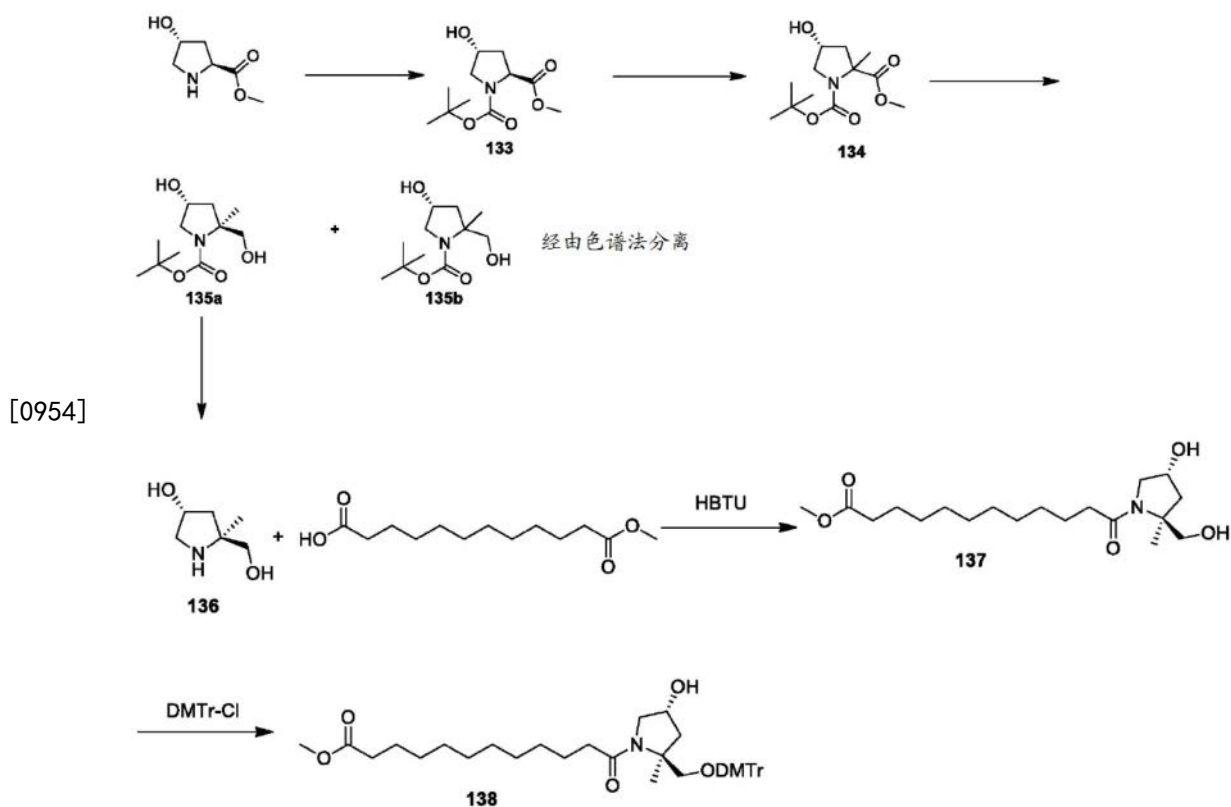
[0949] 使用与用于化合物20的程序相同的程序从化合物148 (460mg, 0.19mmol) 制备化合物149。产率: 436mg, 91%。

[0950] 步骤9. 缀合物150的制备

[0951] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物149 (436mg) 和1000A lcaa CPG (2.62g) 制备化合物150。产率: 2.7g, 21.3 μ mol/g CPG负载。将所得GalNAc负载的CPG固体载体用于使用标准程序的自动寡核苷酸合成中。进行核苷酸脱保护, 随后从固体载体除去 (同时进行乙酸半乳糖胺脱保护) 得到GalNAc-寡核苷酸缀合物150。

[0952] 实施例11. 缀合物153、158、163、168和173的合成

[0953] 方案22.



[0955] 步骤1. (2S,4R)-4-羟基吡咯烷-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯(133)的制备

[0956] 将(2S,4R)-4-羟基吡咯烷-2-羧酸甲酯(25.9g,46mmol)、BOC酸酐(65.9g,302.5mmol)和TEA(42ml,302.5mmol)在室温下在DCM中搅拌16小时。将有机物用1M HCl(x2)、饱和NaHCO₃(x2)、H₂O和盐水依序洗涤干燥并在真空中浓缩以得到(2S,4R)-4-羟基吡咯烷-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯(133)(58.1g,85%)。

[0957] 步骤2. (4R)-4-羟基-2-甲基吡咯烷-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯(134)的制备

[0958] 将(2S,4R)-4-羟基吡咯烷-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯(133)(5g,20.4mmol)和MeI(12g,84.5mmol)在-40℃下在无水THF中搅拌。逐滴添加LDA(2.0M于THF中的溶液)(37.5mL,75mmol)。使反应物升温至室温并搅拌4小时,然后用饱和NH₄Cl淬灭。将反应物用EtOAc萃取,用H₂O和盐水洗涤,干燥(Na₂SO₄)并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱50:50EtOAc//己烷纯化以得到呈外消旋混合物的(4R)-4-羟基-2-甲基吡咯烷-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯(134)(3.6g,68%)

[0959] 步骤3. (2S,4R)-4-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯(135a)的制备

[0960] 将(4R)-4-羟基-2-甲基吡咯烷-1,2-二羧酸1-(叔丁基)2-甲酯(134)(19g,73.5mmol)在无水THF中在N₂下搅拌。逐滴添加LiBH₄溶液(48mL,96mmol)并将反应物在室温下搅拌48小时。将反应物用1M NaOH淬灭,在真空中除去THF并将残余物用EtOAc(4x 100mL)萃取。将有机物用H₂O和盐水洗涤,干燥(Na₂SO₄)并在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法(5%MeOH/DCM)纯化以得到作为主要产物的(2S,4R)-4-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯(135a)(8g,47%)。根据文献参考指定结构。

[0961] 步骤4. (3R,5S)-5-(羟甲基)-5-甲基吡咯烷-3-醇盐酸盐(136)的制备

[0962] 将(2S,4R)-4-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯(135a)(8g,34.6mmol)在室温下在EtOAc中搅拌并施加气态HCl持续大约2分钟。将反应物搅拌1小时,然

后在真空中浓缩并在高真空下干燥,从而以定量方式得到(3R,5S)-5-(羟甲基)-5-甲基吡咯烷-3-醇盐酸盐(136)。

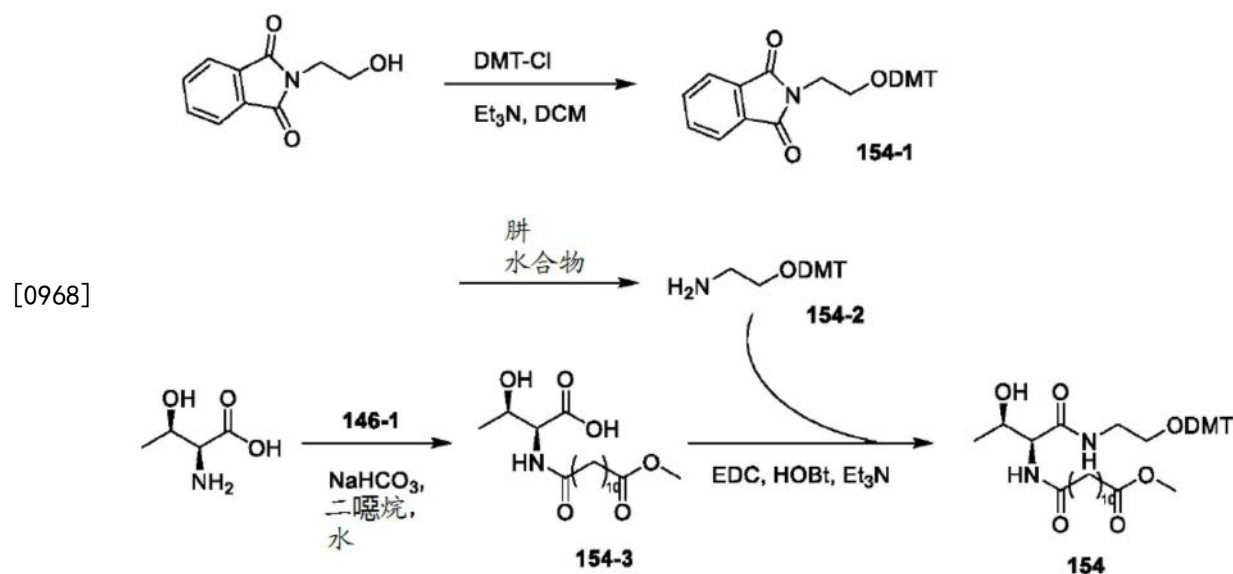
[0963] 步骤5. 12-((2S,4R)-4-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基吡咯烷-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯(137)的制备

[0964] 将(3R,5S)-5-(羟甲基)-5-甲基吡咯烷-3-醇盐酸盐(136)(7.9g,47.4mmol)、12-甲氧基-12-氧代十二烷酸(11.5g,47.4mmol)、HBTU(36g,76mmol)和TEA 20mL,142.2mmol)在室温下在DCM中搅拌16小时。将沉淀物通过过滤除去,并将有机物用1M HCl(x2)、饱和NaHCO₃(x2)、H₂O和盐水洗涤。在干燥后,将有机物在真空中浓缩并通过柱色谱法(5%MeOH/DCM)纯化以得到12-((2S,4R)-4-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基吡咯烷-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯(137)(3.1g,18.3%)。

[0965] 步骤6. 12-((2S,4R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-甲基)-4-羟基-2-甲基吡咯烷-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯(138)的制备

[0966] 将12-((2S,4R)-4-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基吡咯烷-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯(137)(3.1g,9.0mmol)、DMTr-Cl(2.8g,8.2mmol)和TEA(1.1ml,8.2mmol)在室温下在DCM中搅拌16小时。将反应物在真空中浓缩并将残余物通过柱色谱法(5%MeOH/DCM,0.1%TEA)纯化以得到12-((2S,4R)-2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-羟基-2-甲基吡咯烷-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯(138)(2.7g,45.5mmol)。

[0967] 方案23



[0969] 步骤7. 化合物154-1的制备

[0970] 在0℃下在氮气下向N-(2-羟基乙基)邻苯二甲酰亚胺(4.80g,25.0mmol)和4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(8.8g,26.0mmol)于二氯甲烷(200mL)中的溶液中逐滴添加三乙胺(10.4mL,74.6mmol)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。TLC指示反应完成。将有机层用盐水(100mL)洗涤,经MgSO₄干燥并浓缩至干燥。其不经纯化即直接用于下一反应。

[0971] 步骤8. 化合物154-2的制备

[0972] 将于乙醇(100mL)中的上文所获得的2-(2-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮(154-1)和肼一水合物(3.6mL,74mmol)在室温下搅拌过夜。TLC指示反应完成。滤出沉淀物。蒸发滤液。通过乙酸乙酯(100mL)吸收残余物。将有机溶液用10%

NaOH、水和盐水洗涤,并经MgSO₄干燥。蒸发溶剂得到呈黄色液体的2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙胺(154-2)(8.11g,89.3%产率,经两个步骤)。此不经进一步纯化即用于下一反应。

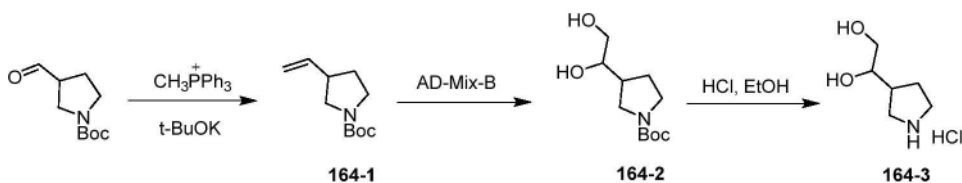
[0973] 步骤9.化合物154-3的制备

[0974] 向L-苏氨酸(1.19g,10.0mmol)和NaHCO₃(2.3g,27mmol)于水(20mL)和二噁烷(10mL)中的溶液中逐滴添加于二噁烷(10mL)中的十二烷二酸1-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)12-甲酯146-1(3.1g,9.1mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。添加4N HCl(10mL)。将沉淀物通过过滤收集并用水(3x 10mL)洗涤。将固体于干燥器中经P₂O₅干燥以得到呈灰白色固体的(2S,3R)-3-羟基-2-(12-甲氧基-12-氧代十二烷酰氨基)丁酸154-3(2.84g,82.2%)。LC-MS(ESI):m/z:346(100),(M+H⁺)。

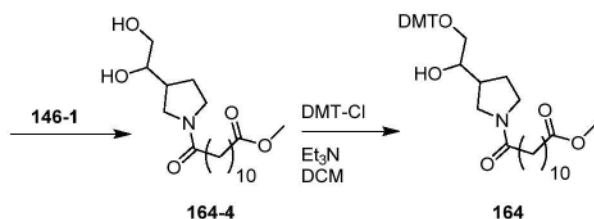
[0975] 步骤10.化合物154的制备

[0976] 将(2S,3R)-3-羟基-2-(12-甲氧基-12-氧代十二烷酰氨基)丁酸154-3(2.47g,7.15mmol)、2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙胺154-2(2.60g,7.15mmol)、EDC(1.64g,8.58mmol)、1-羟基苯并三唑(HOBt)(1.16g,8.58mmol)和TEA(2.4mL,17.2mmol)在室温下在二氯甲烷(72mL)中搅拌2小时。添加水(30mL)。将有机层分离并用盐水(2x30mL)洗涤。蒸发溶剂,随后进行柱色谱法(30%乙酸乙酯/己烷-50%乙酸乙酯/己烷)得到呈蜡状黄色半固体的12-((2S,3R)-1-(2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基氨基)-3-羟基-1-氧代丁烷-2-基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯154(2.60g,52.6%)。¹HNMR(400MHz,丙酮-d₆,ppm):δ7.51(t,J=5.5Hz,1H),7.45-7.49(m,2H),7.28-7.36(m,6H),7.21(tt,J=7.2,1.2Hz,1H),7.08(d,J=8.1Hz,1H),6.88(dt,J=8.9,2.5Hz,4H),4.39(dd,J=8.2,3.0Hz,1H),4.20-4.27(m,1H),3.78(s,6H),3.60(s,1H),3.35-3.52(m,2H),3.07-3.16(m,2H),2.23-2.37(m,4H),1.53-1.65(m,4H),1.23-1.36(m,12H),1.10(d,J=6.4Hz,3H)。

[0977] 方案24



[0978]



[0979] 步骤11.化合物164-1的制备

[0980] 向叔丁醇钾(14.6g,130mmol)于THF(120mL)/乙醚(360mL)中的悬浮液中添加甲基三苯基溴化磷(46.6g,130mmol)。将混合物回流2小时,并且然后冷却至0℃。逐滴添加于乙醚(50mL)中的2-甲酰基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯(13.0g,65.2mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌,并且然后通过添加水(250mL)淬灭。将有机层分离并将水溶液用乙醚(250mL)萃取。将合并的萃取物经MgSO₄干燥。蒸发溶剂,随后通过柱色谱法纯化(5%乙酸乙酯/己烷)得到呈无色液体的3-乙烯基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯164-1(11.5g,89.4%)。GC-MS:m/z:197(2)(M⁺),

141(40), 124(30), 57(100)。

[0981] 步骤12. 化合物164-2的制备

[0982] 向t-BuOH (140mL) 和水 (70mL) 的混合物中装填AD-mix- β (47.4g) 和甲磺酰胺 (2.89g, 30.4mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟, 并且然后冷却至0°C。添加3-乙烯基吡咯烷-1-羧酸叔丁酯164-1 (6.00g, 30.4mmol)。将反应物在室温下搅拌过夜。使反应混合物冷却至0°C。添加硫代硫酸钠五水合物 (96g, 387mmol) 并使温度升温至室温。添加水 (700mL) 并将混合物用乙酸乙酯 (500mL) 萃取。将萃取物用水 (2x 50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤, 并经MgSO₄干燥。蒸发溶剂, 随后进行柱色谱法 (2% 甲醇/二氯甲烷-7% 甲醇/二氯甲烷), 得到呈浅褐色油状物的3-(1,2-二羟基乙基) 吡咯烷-1-羧酸叔丁酯164-2 (5.4g, 77%)。

[0983] 步骤13. 化合物164-3的制备

[0984] 向3-(1,2-二羟基乙基) 吡咯烷-1-羧酸叔丁酯164-2 (3.1g, 13.4mmol) 于乙醇 (10mL) 中的溶液中添加3N HCl (30mL, 90mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。TLC指示反应完成。蒸发乙醇。添加甲苯并蒸发。将此过程重复三次以得到呈褐色油状物的1-(吡咯烷-3-基) 乙烷-1,2-二醇盐酸盐164-3 (2.0g, 89%)。LC-MS (ESI) : m/z: 132(100), (M+H⁺, 游离胺)。

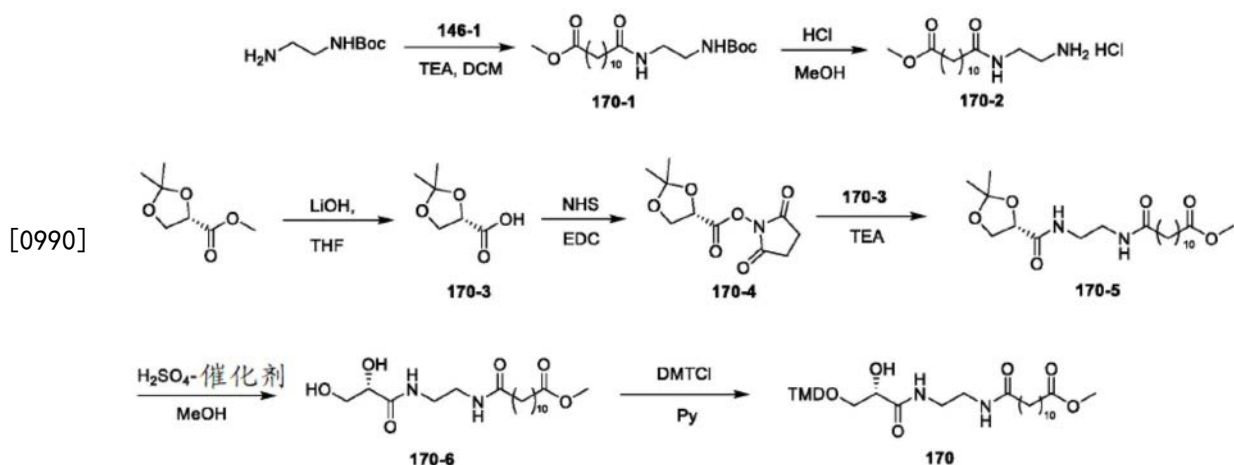
[0985] 步骤14: 化合物164-4的制备

[0986] 向1-(吡咯烷-3-基) 乙烷-1,2-二醇盐酸盐164-2 (2.0g, 12mmol) 于水 (30mL) 中的溶液逐份添加NaHCO₃ (3.7g, 44mmol)。然后添加二噁烷 (20mL)。向上文溶液中添加于二噁烷 (30mL) 中的十二烷二酸1-(2,5-二氧化代吡咯烷-1-基) 12-甲酯146-1 (3.7g, 11mmol)。将反应混合物搅拌过夜。将此混合物用乙酸乙酯 (3x100 mL) 萃取。将合并的萃取物用0.5N HCl (50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤, 并经MgSO₄干燥。

[0987] 步骤15. 化合物164的制备

[0988] 使用与合成2-(2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)乙基)异吲哚啉-1,3-二酮138中所阐述相同的程序, 从12-(3-(1,2-二羟基乙基) 吡咯烷-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯164-4和4,4-二甲氧基三苯甲基氯 (1当量) 制备这种物质。将产物通过柱色谱法 (1.5% 甲醇/二氯甲烷) 纯化。以51% 产率获得呈黄色油状物的12-(3-(2-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-1-羟基乙基) 吡咯烷-1-基)-12-氧代十二烷酸甲酯164。¹HNMR (400MHz, 丙酮-d₆, ppm) : δ 7.49-7.54 (m, 2H), 7.35-7.40 (m, 4H), 7.28-7.34 (m, 2H), 7.19-7.25 (m, 1H), 6.86-6.91 (m, 4H), 4.11-4.20 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.68-3.77 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.29-3.59 (m, 3H), 3.06-3.20 (m, 3H), 2.33-2.55 (m, 1H), 2.29 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.19 (t, J=7.6Hz, 2H), 1.65-2.0 (m, 2H), 1.51-1.62 (m, 4H), 1.26-1.35 (m, 12H)。

[0989] 方案25



[0991] 步骤16. 化合物170-1的制备

[0992] 在室温下,向2-氨基乙基氨基甲酸叔丁酯(2.88g, 18.0mmol)和三乙胺(2.98g, 29.4mmol)于二氯甲烷(100mL)中的溶液中逐滴添加于二氯甲烷(50mL)中的十二烷二酸1-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯12-甲酯(146-1)(5.09g, 14.9mmol)。将反应混合物搅拌过夜并且TLC指示反应完成。添加100mL盐水,并分离有机层。将有机层用0.5N HCl(150mL)、盐水(2x 100mL)洗涤,并经MgSO₄干燥。蒸发溶剂得到呈白色固体的纯净12-(2-(叔丁氧基羰基氨基)乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯170-1(5.85g 100%)。

[0993] 步骤17. 化合物170-2的制备

[0994] 在0℃下向12-(2-(叔丁氧基羰基氨基)乙基氨基)-12-氧代十二烷酸酯170-1(5.55g, 14.4mmol)于甲醇(100mL)中的溶液逐滴添加亚硫酸氯(3.3mL, 45.5mmol)。然后将反应物在室温下搅拌过夜。TLC指示反应完成。蒸发溶剂和挥发性有机物。然后将残余物与庚烷共蒸发两次,从而定量得到呈白色固体的12-(2-氨基乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯盐酸盐170-2。LC-MS (ESI): m/z: 287 (100), (M+H⁺, 游离胺)。

[0995] 步骤18. 化合物170-3的制备

[0996] 将于THF(50mL)和水(50mL)中的(-)-(S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-羧酸甲酯(5.01g, 31.2mmol)和LiOH·H₂O(2.55g, 60.8mmol)搅拌过夜。TLC指示反应完成。蒸发THF并将水溶液用1N HCl酸化至pH=1。将此溶液用乙酸乙酯(5x 50mL)萃取。将合并的萃取物经MgSO₄干燥。蒸发溶剂得到呈淡黄色液体的(S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-羧酸170-3(2.93g, 64.3%)。

[0997] 步骤19. 化合物170-4的制备

[0998] 使用与合成十二烷二酸1-(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)12-甲酯146-1中所阐述相同的程序从(S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-羧酸170-3和N-羟基琥珀酰亚胺以86%产率合成化合物170-4。以86%产率获得呈白色固体的(S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-羧酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯170-4。

[0999] 步骤20. 化合物170-5的制备

[1000] 在0℃下经4小时向12-(2-氨基乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯盐酸盐170-2(14.4mmol)和(S)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-羧酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯170-4(3.80g, 15.6mmol)于二氯甲烷(100mL)中的悬浮液中添加于二氯甲烷(25mL)中的三乙胺(6mL, 43.0mmol)。然后将反应混合物在室温下搅拌过夜。LC-MS指示起始材料170-2被完全

转化。将有机层用盐水(50mL)、1N HCl(50mL)、盐水(50mL)洗涤,经MgSO₄干燥并浓缩至干燥以得到呈白色固体的(S)-12-(2-(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲酰胺基)乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯170-5(5.93g,99.3%)。

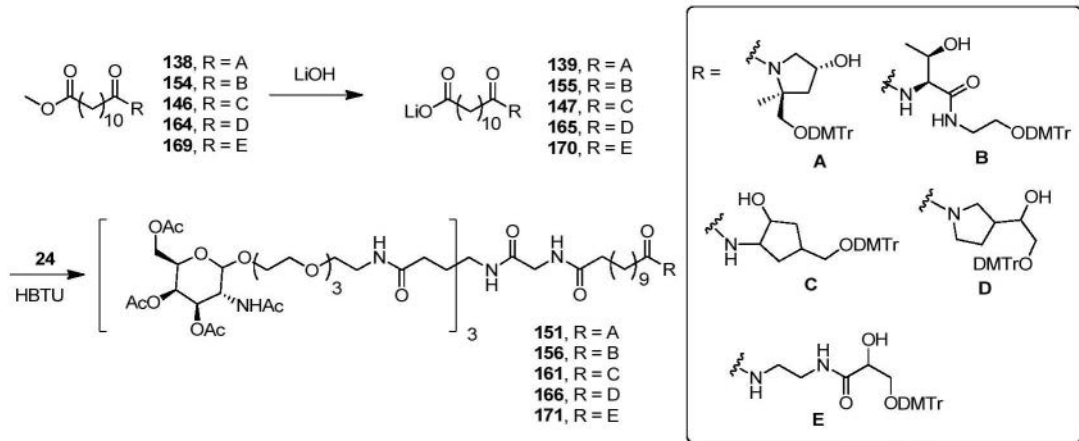
[1001] 步骤21. 170-6的制备的化合物

[1002] 向(S)-12-(2-(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲酰胺基)乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯170-5(5.93g,14.3mmol)的溶液中添加一滴浓硫酸。将此混合物回流6小时,并且然后冷却至室温。将固体通过过滤收集并用冷甲醇洗涤两次。将固体在空气中干燥(3.32g)。从母液获得第二批(0.42g)以得到呈白色晶体的(S)-12-(2-(2,3-二羟基丙酰胺基)乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯170-6(总计3.74g,69.4%)。LC-MS(ESI):m/z:375(100),(M+H⁺)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆,ppm): δ 7.79(br,2H),5.49(d,J=5.3Hz,1H),4.66(t,J=5.8Hz,1H),3.83-3.88(m,1H),3.55-3.61(m,4H),3.41-3.47(m,1H),3.05-3.15(m,4H),2.29(t,J=7.4Hz,2H),2.03(t,J=7.6Hz,2H),1.42-1.52(m,4H),1.18-1.29(m,12H)。

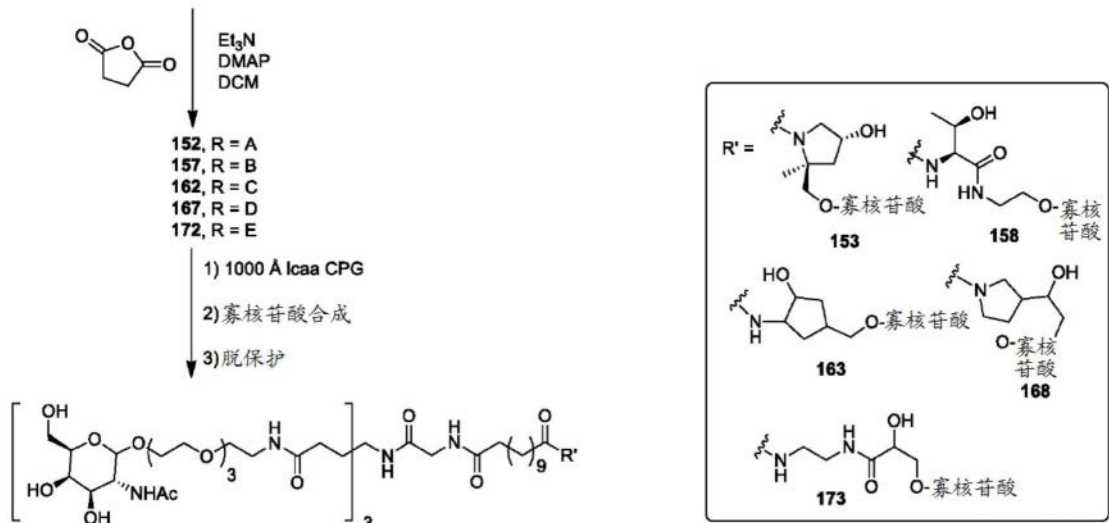
[1003] 步骤22. 化合物170的制备

[1004] 在氮气下向(S)-12-(2-(2,3-二羟基丙酰胺基)乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯170-6(2.99g,7.99mmol)于无水吡啶(57.5mL)中的溶液一次性添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(2.84g,8.38mmol)。将反应物在室温下搅拌2天。添加甲醇(5mL)以淬灭反应物。蒸发吡啶。添加甲苯,并且然后蒸发。将此过程重复三次。添加水(100mL)并将此混合物用乙酸乙酯(5x 250mL)萃取。将萃取物合并并且经MgSO₄干燥。蒸发溶剂,随后进行柱色谱法(1%甲醇/二氯甲烷-3%甲醇/二氯甲烷),得到呈粘性油状物的(S)-12-(2-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-羟基丙酰胺基)-乙基氨基)-12-氧代十二烷酸甲酯170(1.70g,31.4%)。¹HNMR(400MHz,丙酮-d₆,ppm): δ 7.64-7.70(br,1H),7.47-7.51(m,2H),7.33-7.37(m,4H),7.26-7.32(m,2H),7.20(dt,J=7.3,2.1Hz,1H),7.11(br,1H),6.86(d,J=8.7Hz,4H),4.84(br,1H),4.21(dd,J=5.1,3.8Hz,1H),3.78(s,6H),3.60(s,1H),3.25-3.42(m,6H),2.28(t,J=7.4Hz,2H),1.48-1.62(m,4H),1.21-1.34(m,12H)。

[1005] 方案26.



[1006]



[1007] 步骤23. 化合物139、155、160、165和170的制备

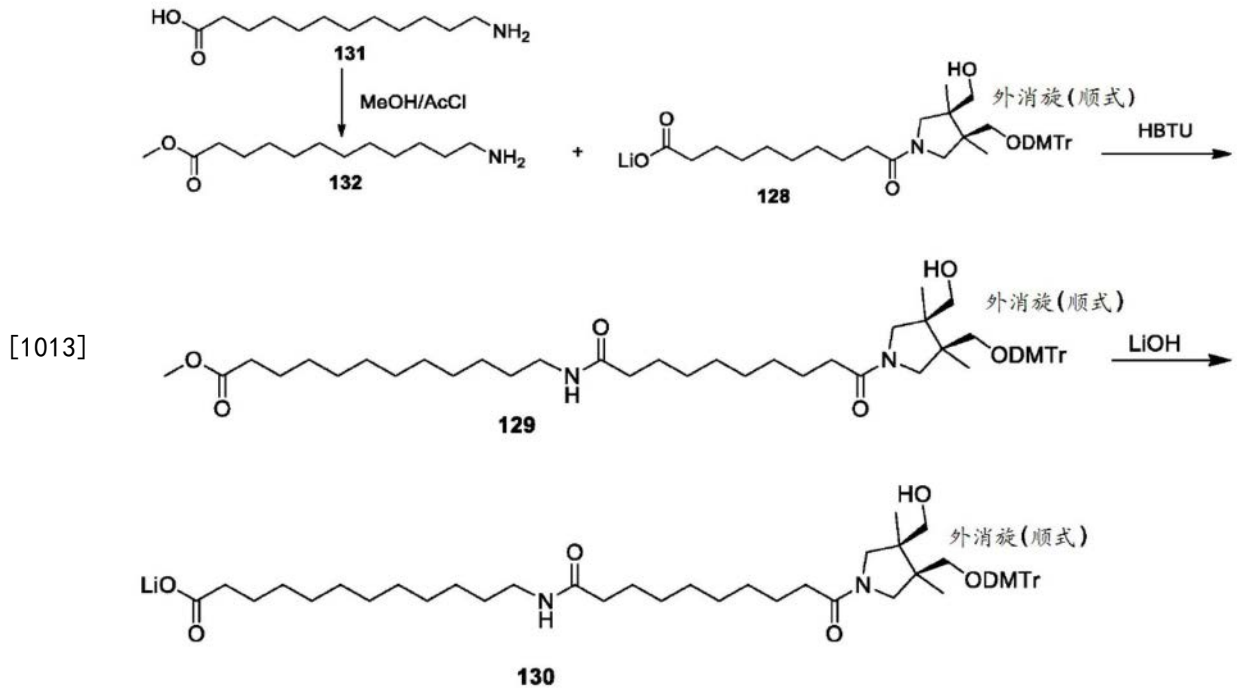
[1008] 使用与用于化合物18的程序相同的程序,从化合物138、154、159、164和169制备化合物139、155、160、165和170。

[1009] 步骤24. 缀合物153、158、163、168和173的制备

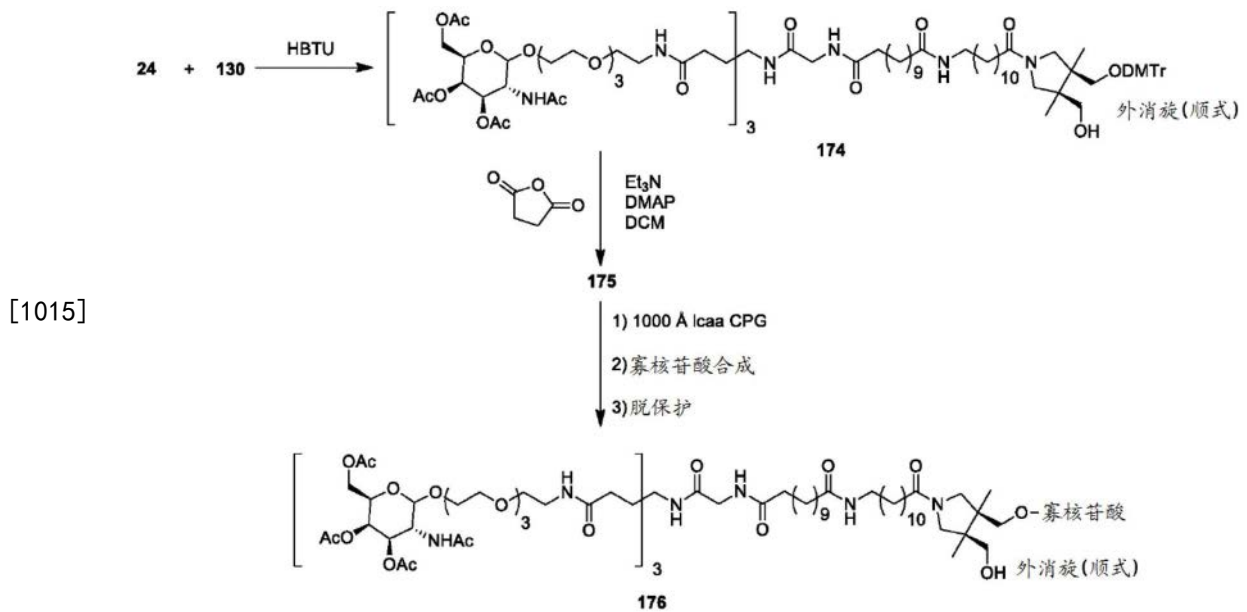
[1010] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物139、154、159、164和169制备缀合物153、158、163、168和173。

[1011] 实施例12. 缀合物176的合成

[1012] 方案27.



[1014] 方案28.

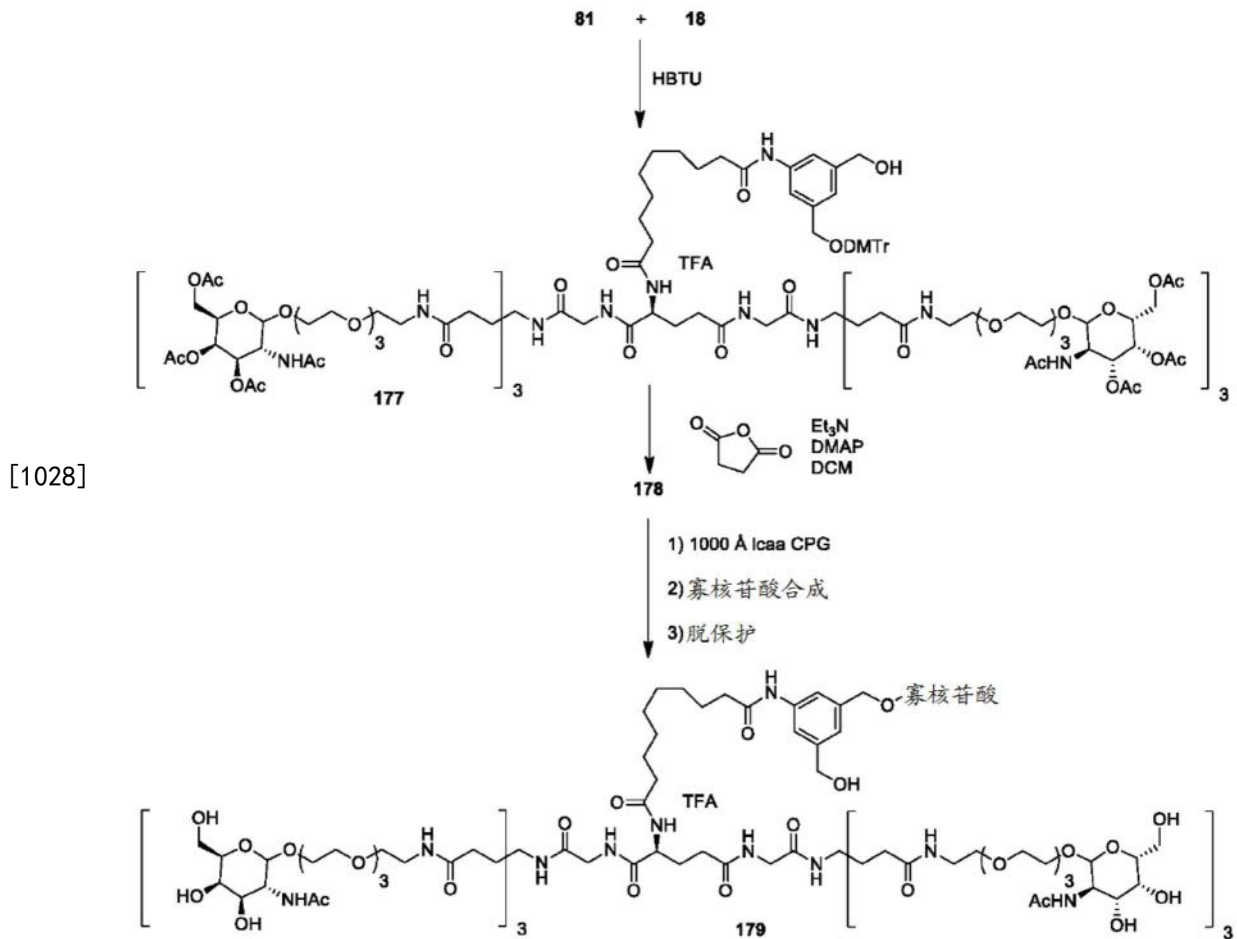


[1016] 步骤1. 12-氨基十二烷酸甲酯132的制备

[1017] 在室温下将12-氨基十一烷酸 (131) (10g, 4.64mmol) 在MeOH中搅拌。逐滴添加乙酰氯 (856 μ L, 12mmol), 并将反应物搅拌1.5小时。在真空中除去溶剂, 将残余物吸收于MTBE中并在冰箱中冷冻过夜。将所得沉淀物通过过滤收集, 用冰冷MTBE洗涤并在高真空下干燥以得到12-氨基十二烷酸甲酯132。

[1018] 步骤2. 外消旋(顺式) 12-(12-(10-(3-((双(4-甲氧基苯基)-(苯基)甲氧基)甲基)-4-(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酰胺基)十二烷酰氨基)十二烷酸甲酯129的制备

[1019] 在室温下将外消旋(顺式) 10-(3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-4-(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸锂(128) (2g, 3.1mmol)、12-氨基十二烷



[1029] 步骤1. 化合物80的制备

[1030] 在室温下将化合物24 (2g, 0.86mmol)、N-苄氧羰基-L-谷氨酸 (120mg, 0.43mmol)、HBTU (326mg, 0.86mmol) 和TEA (353 μ L, 2.6mmol) 在DCM中搅拌过夜。将混合物在真空中浓缩并通过柱色谱法纯化以得到化合物80 (2.88g, 83%)。

[1031] 步骤2. 化合物81的制备

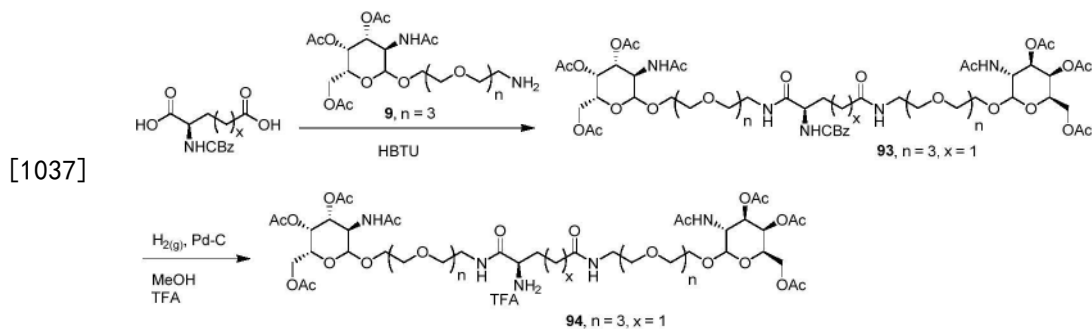
[1032] 使用与用于化合物14的程序相同的程序, 从化合物80 (670mg, 0.17mmol) 制备缀合物81。化合物以粗制形式用于后续反应中, 并将产率视为定量的。

[1033] 步骤3. 缀合物179的制备

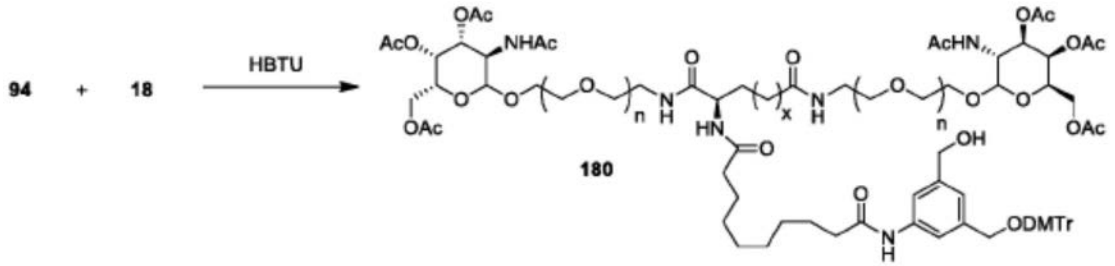
[1034] 使用与用于化合物1的程序相同的程序, 从化合物18和81制备缀合物179。

[1035] 实施例14. 缀合物182的合成

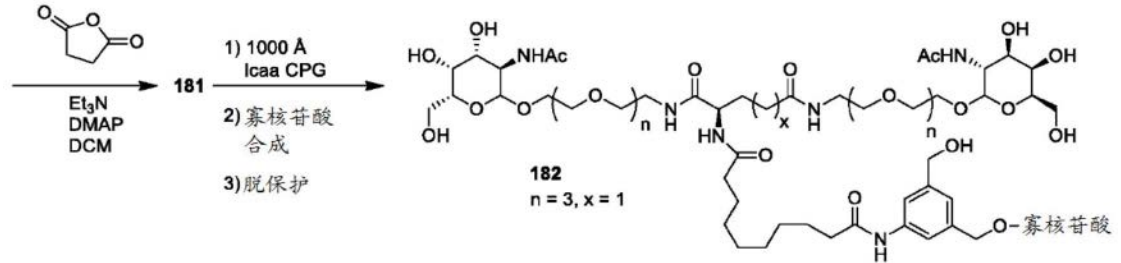
[1036] 方案31.



[1038] 方案32.



[1039]



[1040] 步骤1. 化合物93的制备

[1041] 使用与用于化合物89的程序相同的程序,从(2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)-D-谷氨酸(2.25g, 8.1mmol)和9(13g, 21mmol)制备化合物93. 产率: 11.2g.

[1042] 步骤2. 化合物94的制备

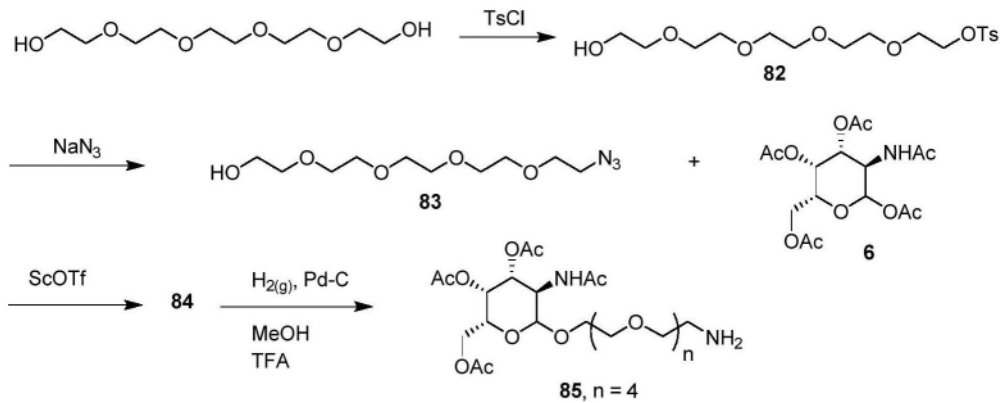
[1043] 使用与用于化合物90的程序相同的程序,从化合物93(11.1g)制备化合物94. 产率: 10.2g.

[1044] 步骤3. 缀合物182的制备

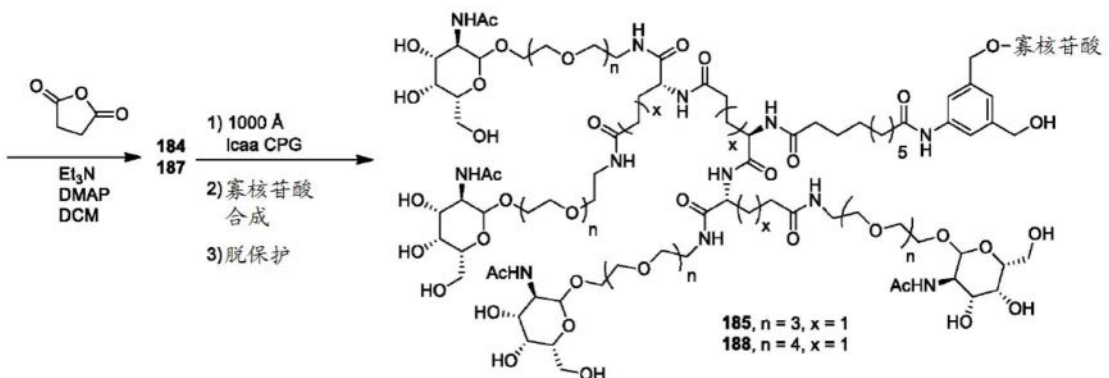
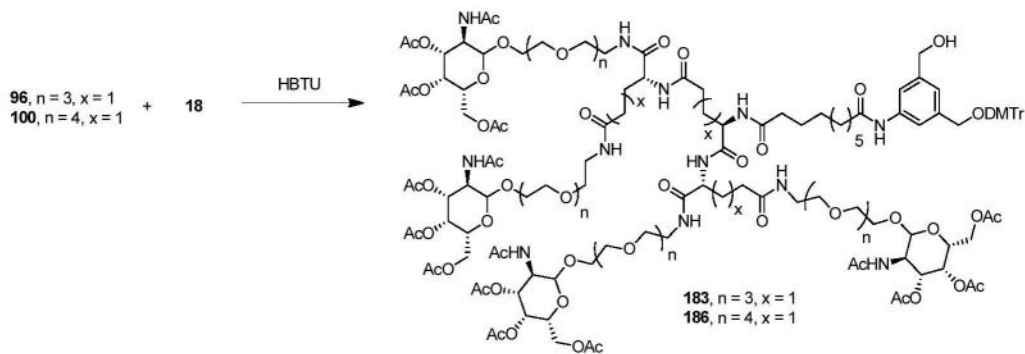
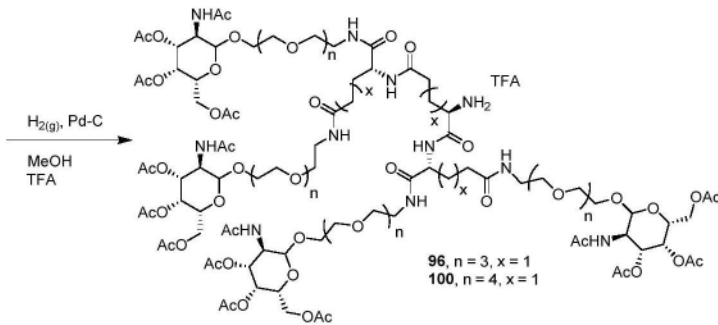
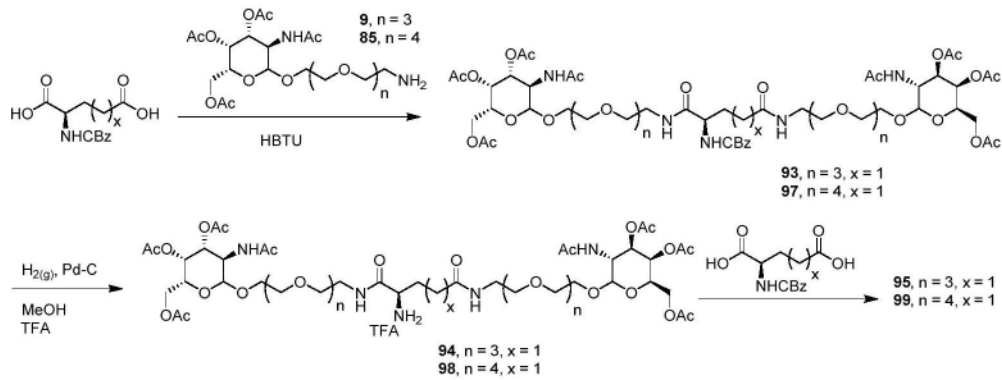
[1045] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物18和94制备缀合物182.

[1046] 实施例15. 缀合物185和188的合成

[1047] 方案33.



[1049] 方案34.



[1053] 步骤1. 4-甲基磺酸14-羟基-3,6,9,12-四氧杂十四烷基酯82的制备

[1054] 将戊乙二醇 (35g, 147mmol)、TEA(41mL, 294mmol) 和三甲胺-HCl (1.4g, 14.7mmol) 于CH₂Cl₂ (600mL) 中的溶液用甲苯磺酰氯 (29.4g, 154mmol) 处理。在搅拌 (18小时) 后, 将反应混合物用H₂O-盐水 (1:1) 洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤, 浓缩并经受色谱法以产生呈浅黄色油状物的82 (24.6g, 43%)。Rf 0.8 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1055] 步骤2. 14-叠氨基-3,6,9,12-四氧杂十四-1-醇83

[1056] 使用与用于化合物4的程序相同的程序,从82(24.6g,62.7mmol)和叠氮化钠(7.13g,110mmol)制备14-叠氮基-3,6,9,12-四氧杂十四-1-醇(83)。产率:14.8g,90%。

[1057] 步骤3.化合物84的制备

[1058] 将GalNAc 6(12.2g,31.4mmol)和HO-PEG-N₃ 83(9.2g,35mmol)于1,2-二氯乙烷(150mL)中的溶液用Sc(OTf)₃(771mg,1.6mmol)处理。在搅拌(85°C,2小时)后,使反应物冷却(室温),通过添加TEA(40mL)淬灭并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈浅黄色泡沫的84(11.16g,60%)。Rf 0.7(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1059] 步骤4.化合物85的制备

[1060] 将84(11.16g,18.8mmol)和Pd/C(1.1g,10%-湿载体)于EtOAc(120mL)中的溶液用TFA(4.32mL,56.5mmol)处理并用H₂吹扫。在剧烈搅拌(4.5小时)后,将反应物用N₂吹扫,通过Celite过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈无色泡沫的85(5.77g,45%)。Rf 0.5(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1061] 步骤5.化合物95的制备

[1062] 使用与用于化合物91的程序相同的程序,从(2-氧代基-2-苯基-1λ²-乙基)-D-谷氨酸(1.04g,3.7mmol)和化合物94(10.2g)制备化合物95。产率:7.2g。

[1063] 步骤6.化合物96的制备

[1064] 使用与用于化合物92的程序相同的程序,从化合物95(11.1g)制备化合物96。产率:6.5g。

[1065] 步骤7.化合物97的制备

[1066] 使用与用于化合物89的程序相同的程序,从(2-氧代基-2-苯基-1λ²-乙基)-D-谷氨酸(2g,7.1mmol)和85(12.1g,17.8mmol)制备化合物97。产率:10g,定量。

[1067] 步骤8.化合物98的制备

[1068] 使用与用于化合物90的程序相同的程序,从化合物97(10g,7.2mmol)制备化合物98。产率:3.5g,36%。

[1069] 步骤9.化合物99的制备

[1070] 使用与用于化合物91的程序相同的程序,从(2-氧代基-2-苯基-1λ²-乙基)-D-谷氨酸(350mg,1.25mmol)和化合物98(2.86mg,2.5mmol)制备化合物99。

[1071] 步骤10.化合物100的制备

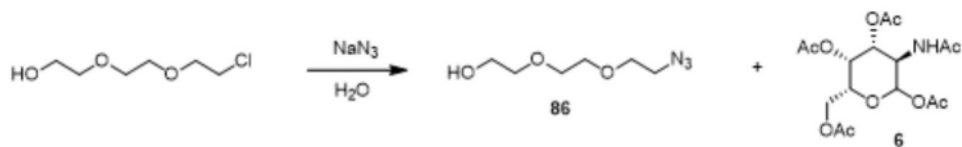
[1072] 使用与用于化合物92的程序相同的程序,从化合物99(3.2g,1.25mmol)定量制备化合物100。

[1073] 步骤11.缀合物185和188的制备

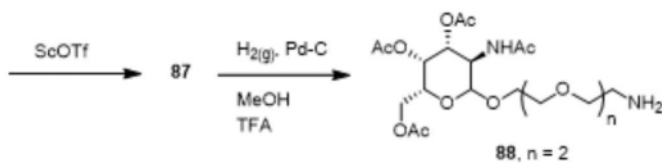
[1074] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物18和96或18和100制备缀合物185和188。

[1075] 实施例16.缀合物191、194、197和200的合成

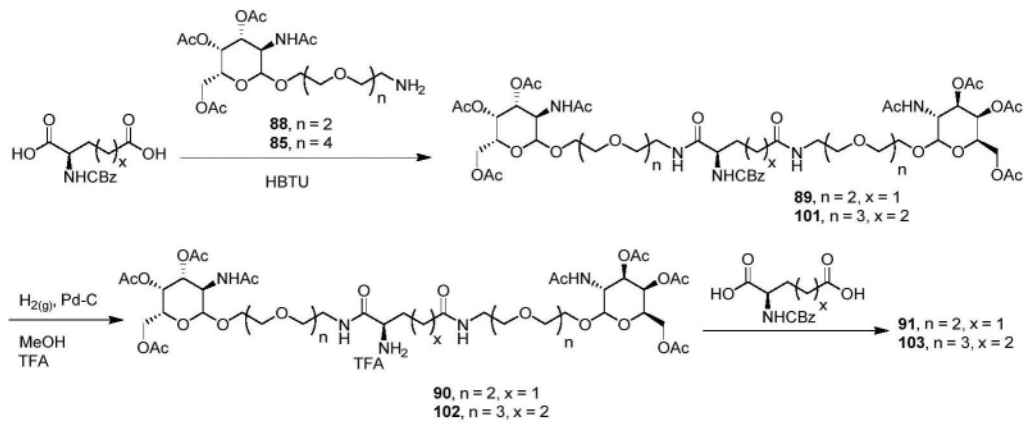
[1076] 方案36



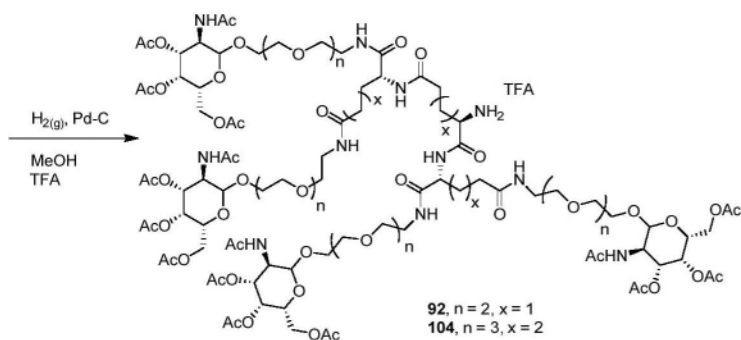
[1077]



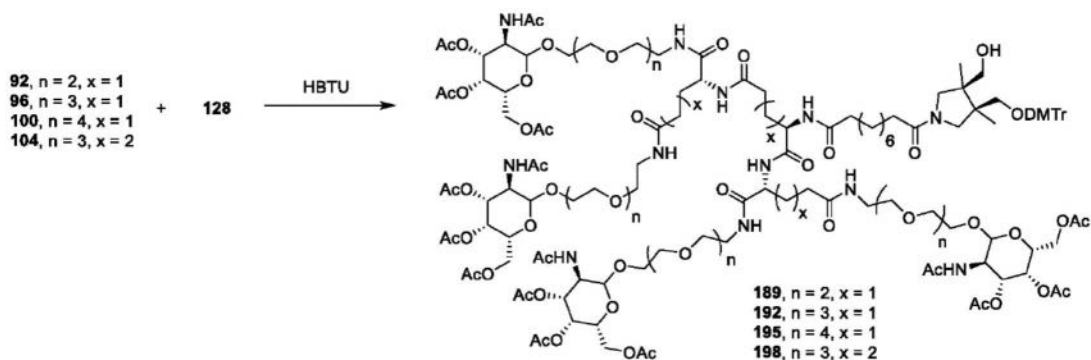
[1078] 方案37.



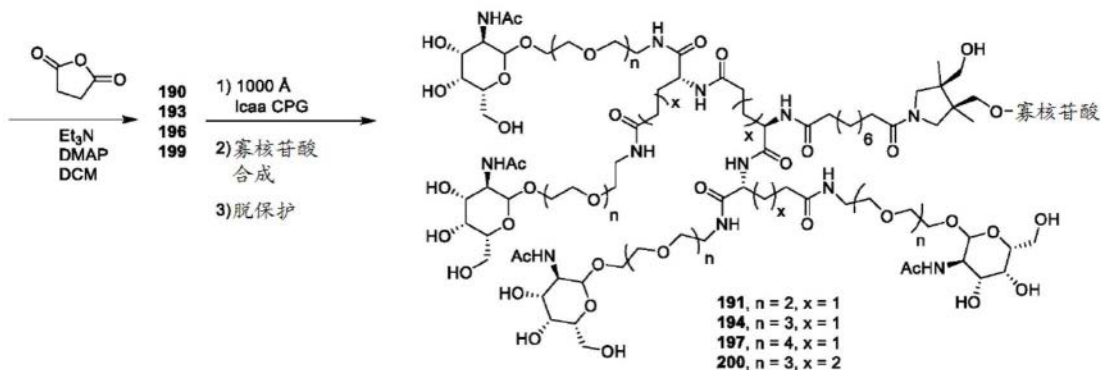
[1079]



[1080] 方案38.



[1081]



[1082] 步骤1. 2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-醇86的制备

[1083] 向2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙-1-醇(13g, 77mmol)于水(200mL)中的溶液中添加叠氮化钠(10g, 154mmol)。将反应物加热至100℃并保持18小时。使反应物冷却至室温,并倾倒入1L分液漏斗中,并用二氯甲烷(3x 200mL)萃取。将合并的二氯甲烷萃取物在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥,以得到呈无色油状物的2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-醇(11.7g)。

[1084] 步骤2. 化合物87的制备

[1085] 使用与用于化合物84的程序相同的程序,从86(4.95g, 28.3mmol)和6(10g, 25.7mmol)制备化合物87。产率:10g, 77%。

[1086] 步骤3. 化合物88的制备

[1087] 使用与用于化合物85的程序相同的程序,从87(10g, 19.8mmol)制备化合物88。产率:7.63g, 65%。

[1088] 步骤4. 化合物89的制备

[1089] 将88(2g, 3.38mmol)和Z-谷氨酸(427mg, 1.52mmol)于CH₂Cl₂(50mL)中的溶液用HBTU(1.41g, 3.7mmol)和休尼格碱(Hünig's base)(1.77mL, 10.1mmol)处理。在搅拌(18小时)后,将混合物浓缩并经受色谱法以产生呈无色泡沫的89(871mg, 48%)。Rf 0.5(10% CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1090] 步骤5. 化合物90的制备

[1091] 将89(870mg, 0.72mmol)和Pd/C(90mg, 10%-湿载体)于EtOAc(10mL)中的溶液用TFA(84μL, 1.1mmol)处理并用H₂吹扫。在剧烈搅拌(2小时)后,将反应物用N₂吹扫,通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用,并且产生呈无色泡沫的90(850mg, 定量)。Rf 0.25(10% CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1092] 步骤6. 化合物91的制备

[1093] 将90(850mg, 0.72mmol)和Z-谷氨酸(91mg, 0.32mmol)于CH₂Cl₂(10mL)中的溶液用HBTU(300mg, 0.79mmol)和依尼格碱(502μL, 2.9mmol)处理。搅拌(1.5小时)后,将混合物用CH₂Cl₂稀释,并用NaHCO₃(饱和水溶液)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈无色泡沫的91(590mg, 76%)。Rf 0.5(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1094] 步骤7. 化合物92的制备

[1095] 将91(590mg, 0.25mmol)和Pd/C(100mg, 10%-湿载体)于CH₃OH(30mL)中的溶液用TFA(29μL, 0.37mmol)处理并用H₂吹扫。在搅拌(3小时)后,将混合物用N₂吹扫,然后通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用,并产生呈无色泡沫的92(600mg, 定量)。Rf 0.1(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1096] 步骤8. 化合物101的制备

[1097] 使用与用于化合物89的程序相同的程序,从(R)-2-((2-氧代基-2-苯基-112-乙基)氨基)己二酸(2.51g, 8.6mmol)和9(11g, 17.2mmol)制备化合物101。产率:4.2g, 37%。

[1098] 步骤9. 化合物102的制备

[1099] 使用与用于化合物90的程序相同的程序,从化合物101(4.2g, 3.2mmol)制备化合物102。产率:2.1g, 47%。

[1100] 步骤10. 化合物103的制备

[1101] 使用与用于化合物91的程序相同的程序,从(R)-2-((2-氧代基-2-苯基-112-乙基)氨基)己二酸(265mg, 0.9mmol)和化合物102(2.1g, 1.8mmol)制备化合物103。产率:(560mg, 24%)。

[1102] 步骤11. 化合物104的制备

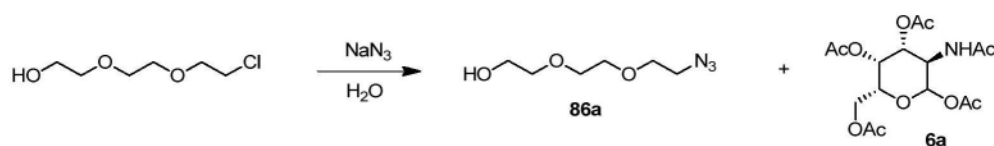
[1103] 使用与用于化合物92的程序相同的程序,从化合物103(560mg)定量制备化合物104。所述化合物不经纯化即使用。

[1104] 步骤12. 缀合物191、194和197的制备

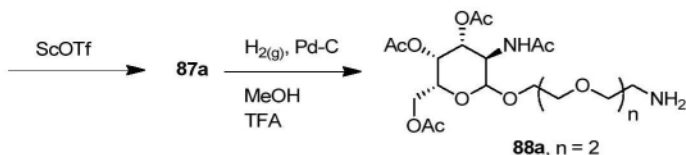
[1105] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物128和92、96和100制备缀合物191、194和197。

[1106] 实施例16a. 缀合物191a的合成

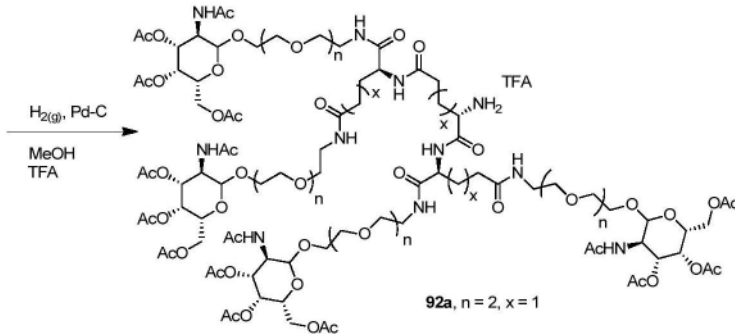
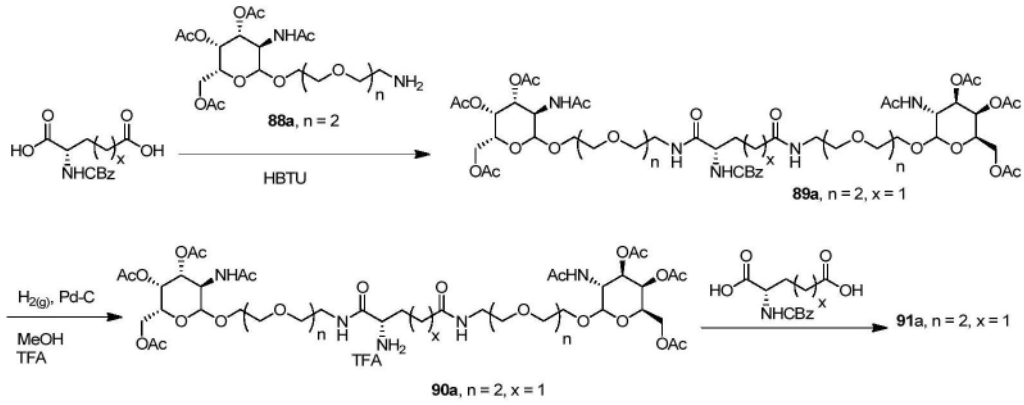
[1107] 方案36a



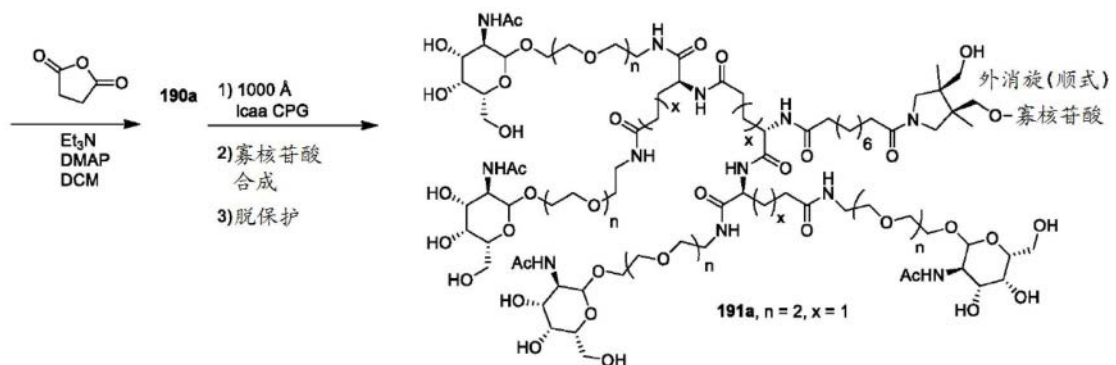
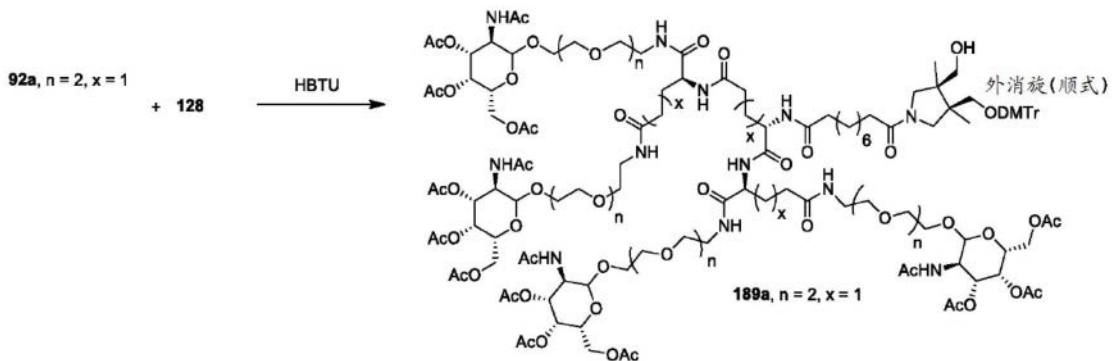
[1108]



[1109] 方案37a.



[1111] 方案38a.



[1113] 步骤1. 2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-醇86a的制备

[1114] 向2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙-1-醇(13g, 77mmol)于水(200mL)中的溶液中添加叠氮化钠(10g, 154mmol)。将反应物加热至100℃并保持18小时。使反应物冷却至室温,并倾倒入1L分液漏斗中,并用二氯甲烷(3x 200mL)萃取。将合并的二氯甲烷萃取物在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥,以得到呈无色油状物的2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-

醇(11.7g)。

[1115] 步骤2.化合物87a的制备

[1116] 使用与用于化合物84的程序相同的程序,从86a(4.95g,28.3mmol)和6a(10g,25.7mmol)制备化合物87a。产率:10g,77%。

[1117] 步骤3.化合物88a的制备

[1118] 使用与用于化合物85的程序相同的程序,从87a(10g,19.8mmol)制备化合物88a。产率:7.63g,65%。

[1119] 步骤4.化合物89a的制备

[1120] 将88a(2g,3.38mmol)和Z-L-谷氨酸(427mg,1.52mmol)于 CH_2Cl_2 (50mL)中的溶液用HBTU(1.41g,3.7mmol)和依尼格碱(1.77mL,10.1mmol)处理。搅拌(18小时)后,将混合物浓缩并经受色谱法以产生呈无色泡沫的89a(871mg,48%)。Rf 0.5(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1121] 步骤5.化合物90a的制备

[1122] 将89a(870mg,0.72mmol)和Pd/C(90mg,10%-湿载体)于EtOAc(10mL)中的溶液用TFA(84 μL ,1.1mmol)处理并用 H_2 吹扫。剧烈搅拌(2小时)后,将反应物用 N_2 吹扫,通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用并产生呈无色泡沫的90a(850mg,定量)。Rf 0.25(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1123] 步骤6.化合物91a的制备

[1124] 将90a(850mg,0.72mmol)和Z-谷氨酸(91mg,0.32mmol)于 CH_2Cl_2 (10mL)中的溶液用HBTU(300mg,0.79mmol)和依尼格碱(502 μL ,2.9mmol)处理。搅拌(1.5小时)后,将混合物用 CH_2Cl_2 稀释,并用 NaHCO_3 (饱和水溶液)洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈无色泡沫的91a(590mg,76%)。Rf 0.5(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1125] 步骤7.化合物92a的制备

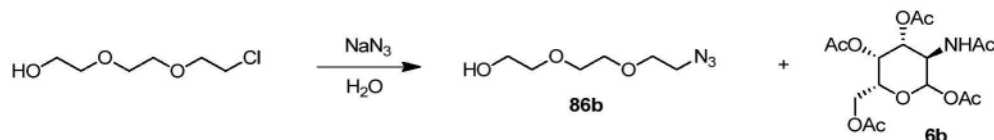
[1126] 将91a(590mg,0.25mmol)和Pd/C(100mg,10%-湿载体)于 CH_3OH (30mL)中的溶液用TFA(29 μL ,0.37mmol)处理并用 H_2 吹扫。搅拌(3小时)后,将混合物用 N_2 吹扫,然后通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用并产生呈无色泡沫的92a(600mg,定量)。Rf 0.1(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1127] 步骤8.缀合物191a的制备,

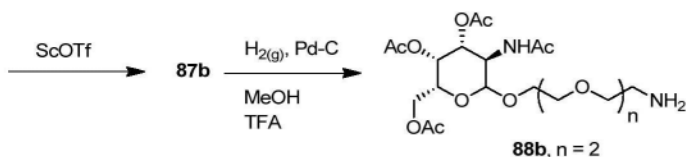
[1128] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物128和化合物92a制备缀合物191a。

[1129] 实施例16b.缀合物191b的合成

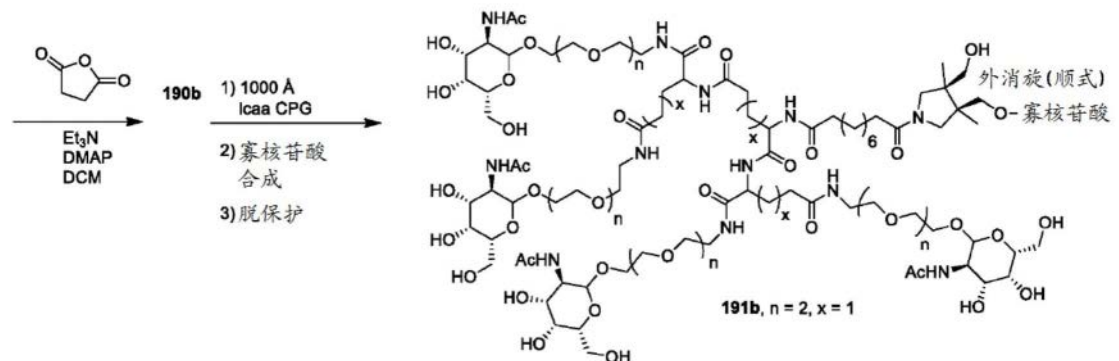
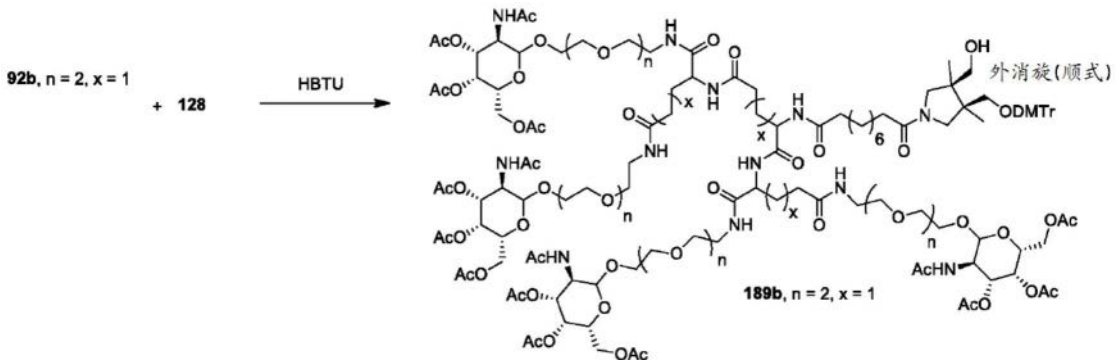
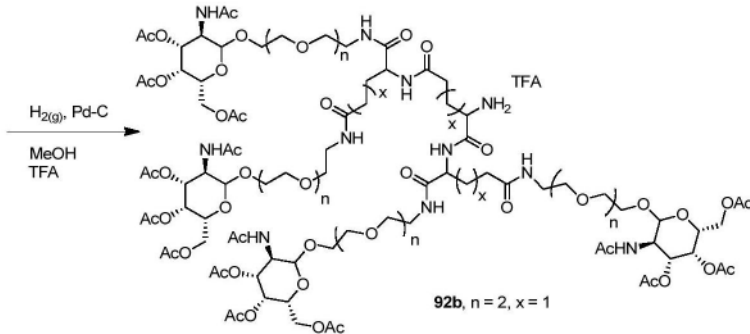
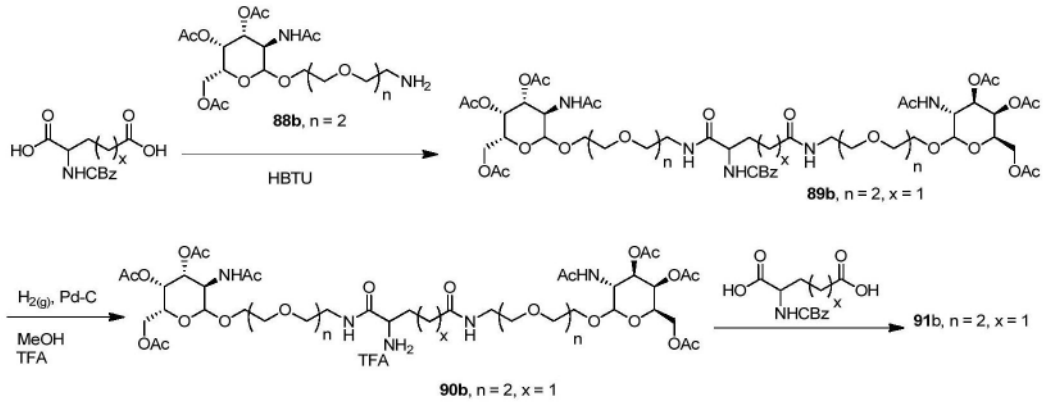
[1130] 方案36b



[1131]



[1132] 方案37b.



[1136] 步骤1. 2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-醇86b的制备

[1137] 向2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙-1-醇(13g, 77mmol)于水(200mL)中的溶液中添加叠氮化钠(10g, 154mmol)。将反应物加热至100℃并保持18小时。使反应物冷却至室温并倾倒入1L分液漏斗中,并用二氯甲烷(3x 200mL)萃取。将合并的二氯甲烷萃取物在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥,以得到呈无色油状物的2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-

醇(11.7g)。

[1138] 步骤2. 化合物87b的制备

[1139] 使用与用于化合物84的程序相同的程序,从86b(4.95g, 28.3mmol)和6b(10g, 25.7mmol)制备化合物87a。产率:10g, 77%。

[1140] 步骤3. 化合物88b的制备

[1141] 使用与用于化合物85的程序相同的程序,从87b(10g, 19.8mmol)制备化合物88a。产率:7.63g, 65%。

[1142] 步骤4. 化合物89b的制备

[1143] 将88b(2g, 3.38mmol)和外消旋Z-谷氨酸(427mg, 1.52mmol)于CH₂Cl₂(50mL)中的溶液用HBTU(1.41g, 3.7mmol)和依尼格碱(1.77mL, 10.1mmol)处理。在搅拌(18小时)后,将混合物浓缩并经受色谱法以产生呈无色泡沫的89b(871mg, 48%)。Rf 0.5(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1144] 步骤5. 化合物90b的制备

[1145] 将89b(870mg, 0.72mmol)和Pd/C(90mg, 10%-湿载体)于EtOAc(10mL)中的溶液用TFA(84μL, 1.1mmol)处理并用H₂吹扫。剧烈搅拌(2小时)后,将反应物用N₂吹扫,通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用并产生呈无色泡沫的90b(850mg, 定量)。Rf 0.25(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1146] 步骤6. 化合物91b的制备

[1147] 将90b(850mg, 0.72mmol)和Z-谷氨酸(91mg, 0.32mmol)于CH₂Cl₂(10mL)中的溶液用HBTU(300mg, 0.79mmol)和依尼格碱(502μL, 2.9mmol)处理。在搅拌(1.5小时)后,将混合物用CH₂Cl₂稀释,并用NaHCO₃(饱和水溶液)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生无色泡沫状91b(590mg, 76%)。Rf 0.5(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1148] 步骤7. 化合物92b的制备

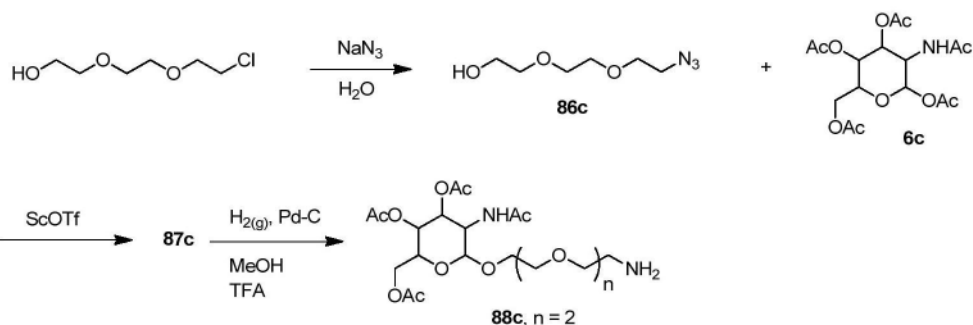
[1149] 将91b(590mg, 0.25mmol)和Pd/C(100mg, 10%-湿载体)于CH₃OH(30mL)中的溶液用TFA(29μL, 0.37mmol)处理,并用H₂吹扫。搅拌(3小时)后,将混合物用N₂吹扫,然后通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用并产生呈无色泡沫的92b(600mg, 定量)。Rf 0.1(10%CH₃OH-CH₂Cl₂)。

[1150] 步骤8. 缀合物191b的制备

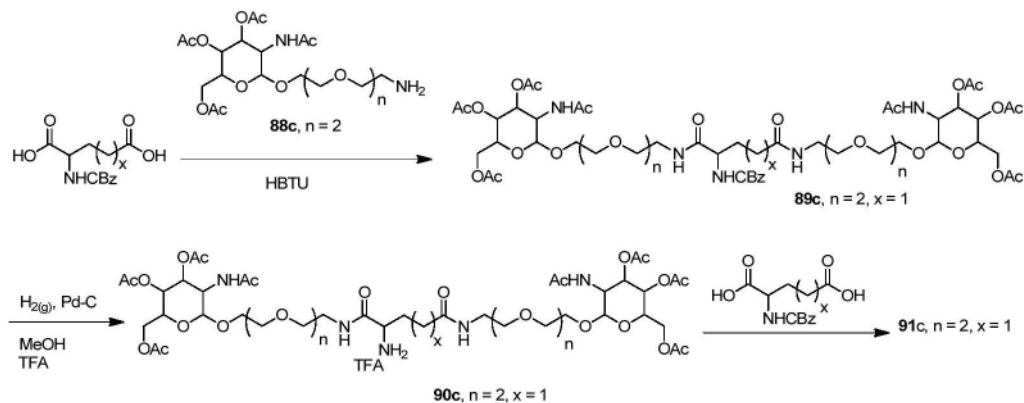
[1151] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物128和化合物92b制备缀合物191b。

[1152] 实施例16c. 缀合物191c的合成

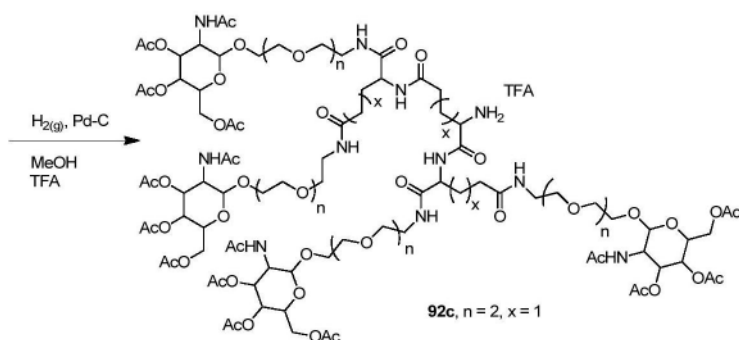
[1153] 方案36c



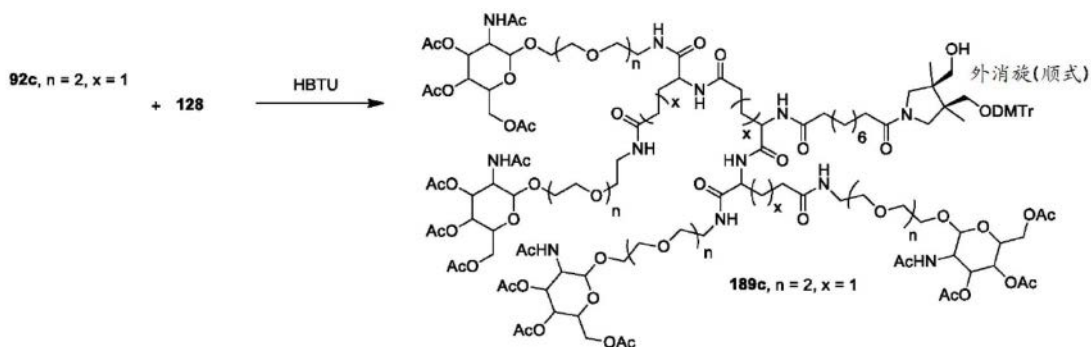
[1155] 方案37c.



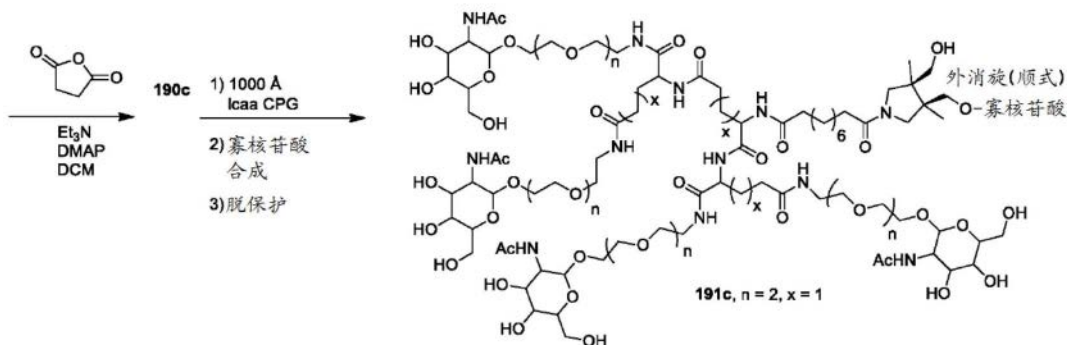
[1156]



[1157] 方案38c.



[1158]



[1159] 步骤1. 制备2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙-1-醇86c

[1160] 向2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙-1-醇(13g, 77mmol)于水(200mL)中的溶液中添加叠氮化钠(10g, 154mmol)。将反应物加热至100℃并保持18小时。使反应物冷却至室温并倾倒入1L分液漏斗中,并用二氯甲烷(3x 200mL)萃取。将合并的二氯甲烷萃取物在硫酸镁

上干燥,过滤并浓缩至干燥,以得到呈无色油状物的2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙-1-醇(11.7g)。

[1161] 步骤2.化合物87c的制备

[1162] 使用与用于化合物84的程序相同的程序从86c(4.95g,28.3mmol)和6c(10g,25.7mmol)制备化合物87c。产率:10g,77%。

[1163] 步骤3.化合物88c的制备

[1164] 使用与用于化合物85的程序相同的程序从87c(10g,19.8mmol)制备化合物88c。产率:7.63g,65%。

[1165] 步骤4.化合物89c的制备

[1166] 将88c(2g,3.38mmol)和外消旋Z-谷氨酸(427mg,1.52mmol)于 CH_2Cl_2 (50mL)中的溶液用HBTU(1.41g,3.7mmol)和依尼格碱(1.77mL,10.1mmol)处理。在搅拌(18小时)后,将混合物浓缩并经受色谱法以产生呈无色泡沫的89c(871mg,48%)。Rf 0.5(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1167] 步骤5.化合物90c的制备

[1168] 将89c(870mg,0.72mmol)和Pd/C(90mg,10%-湿载体)于EtOAc(10mL)中的溶液用TFA(84 μL ,1.1mmol)处理并用 H_2 吹扫。剧烈搅拌(2小时)后,将反应物用 N_2 吹扫,通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用并产生呈无色泡沫的90c(850mg,定量)。Rf 0.25(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1169] 步骤6.化合物91c的制备

[1170] 将90c(850mg,0.72mmol)和Z-谷氨酸(91mg,0.32mmol)于 CH_2Cl_2 (10mL)中的溶液用HBTU(300mg,0.79mmol)和依尼格碱(502 μL ,2.9mmol)处理。搅拌(1.5小时)后,将混合物用 CH_2Cl_2 稀释,并用 NaHCO_3 (饱和水溶液)洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈无色泡沫的91c(590mg,76%)。Rf 0.5(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1171] 步骤7.化合物92c的制备

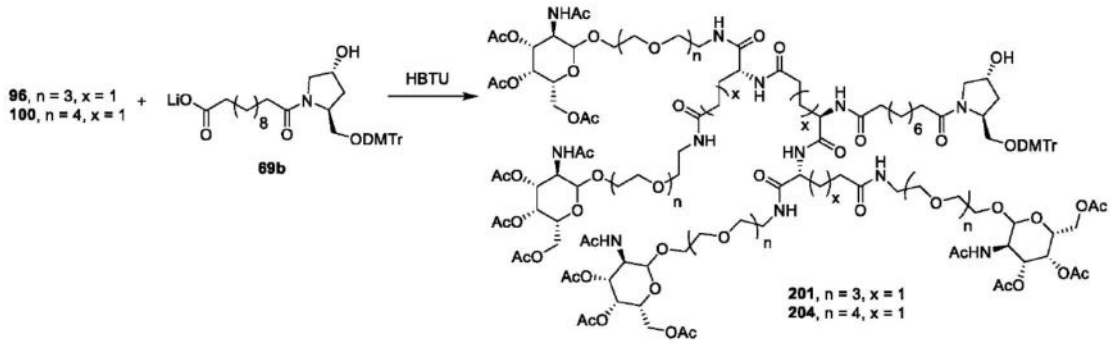
[1172] 将91c(590mg,0.25mmol)和Pd/C(100mg,10%-湿载体)于 CH_3OH (30mL)中的溶液用TFA(29 μL ,0.37mmol)处理并用 H_2 吹扫。搅拌(3小时)后,将混合物用 N_2 吹扫,然后通过Celite过滤并浓缩。粗物质不经进一步处理即使用并产生呈无色泡沫的92c(600mg,定量)。Rf 0.1(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1173] 步骤8.缀合物191c的制备

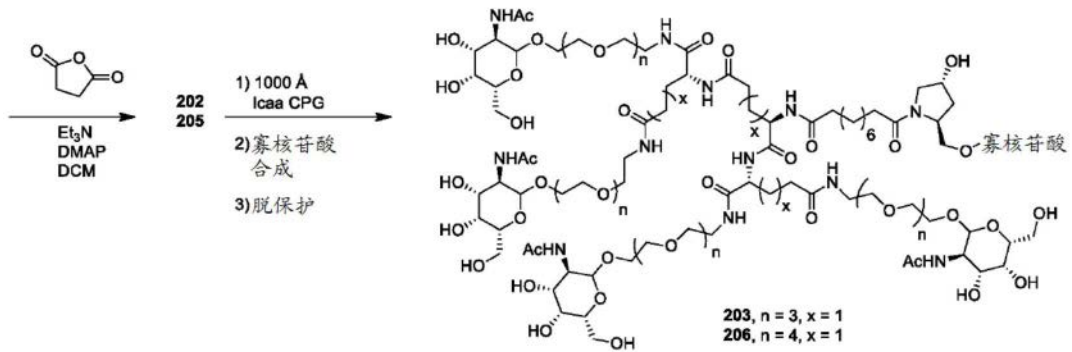
[1174] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物128和化合物92c制备缀合物191c。

[1175] 实施例17.缀合物203和206的合成

[1176] 方案39.



[1177]



[1178] 步骤1.化合物69b的制备

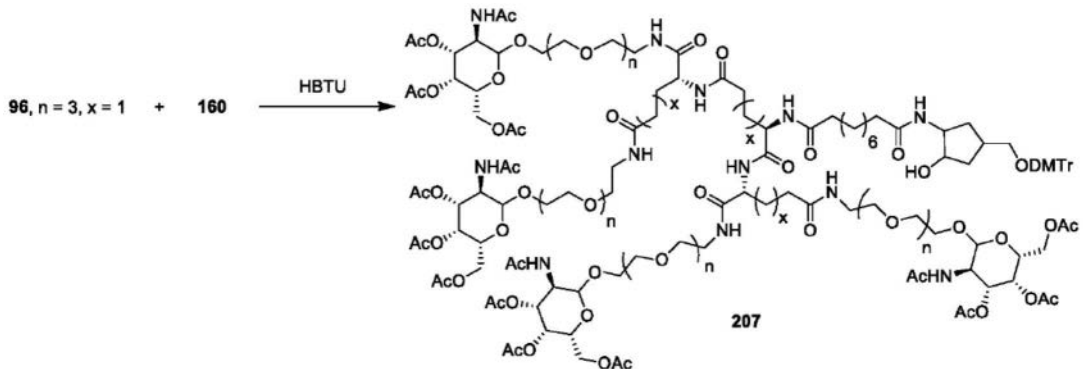
[1179] 使用与用于化合物69的程序相同的程序从(2S,4R)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸制备化合物69b。

[1180] 步骤2.缀合物203和206的制备

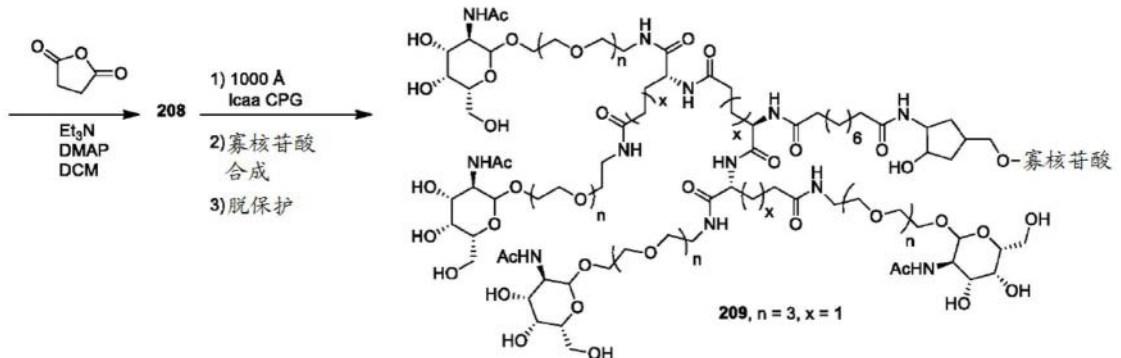
[1181] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物96和100制备缀合物203和206。

[1182] 实施例18.缀合物209的合成

[1183] 方案40.



[1184]

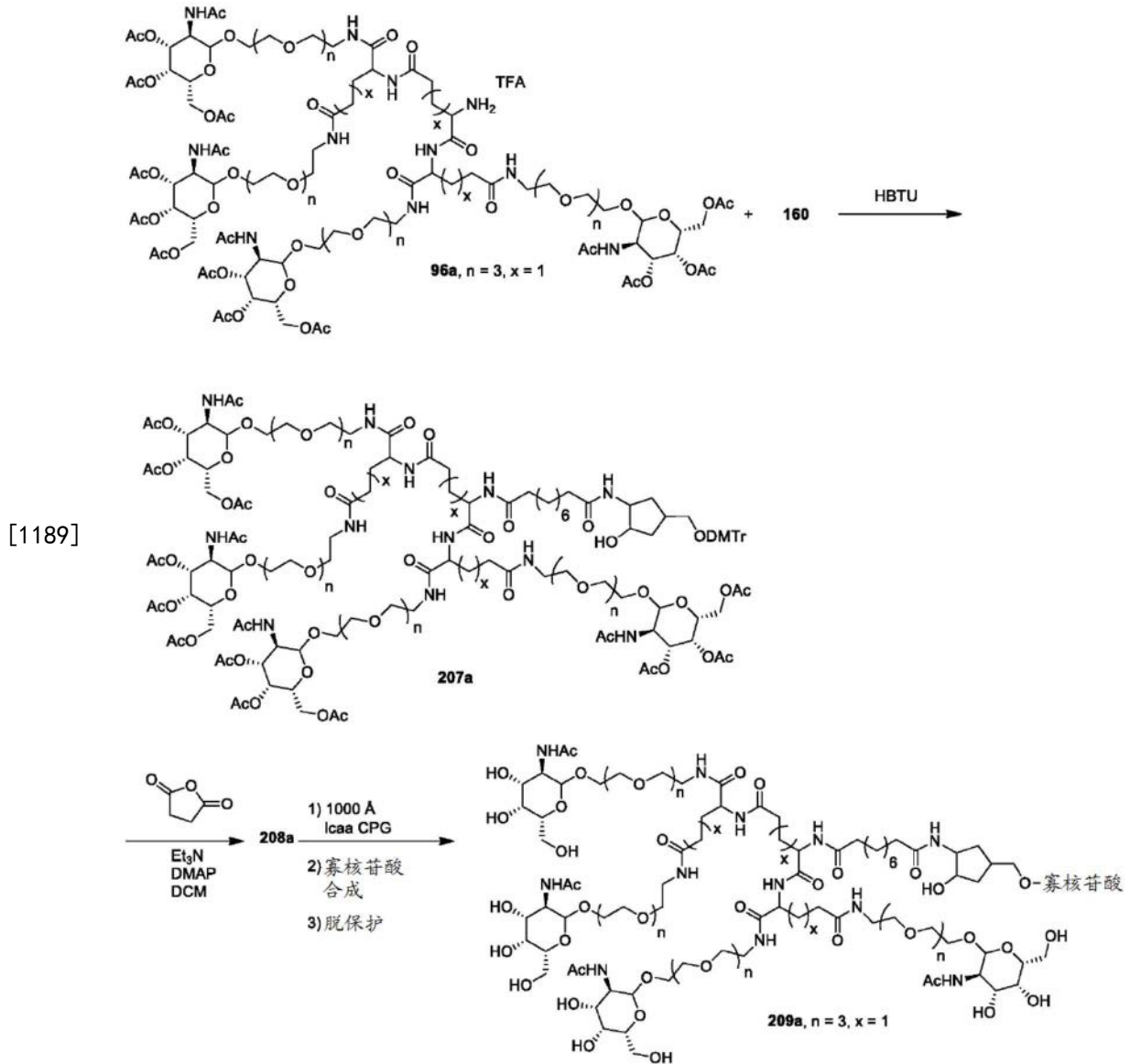


[1185] 步骤1.缀合物209的制备

[1186] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物96和160制备缀合物209。

[1187] 实施例18a. 缀合物209a的合成

[1188] 方案40a.

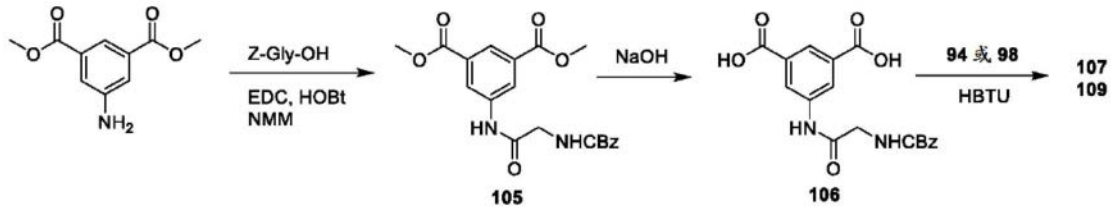


[1190] 步骤1. 缀合物209a的制备

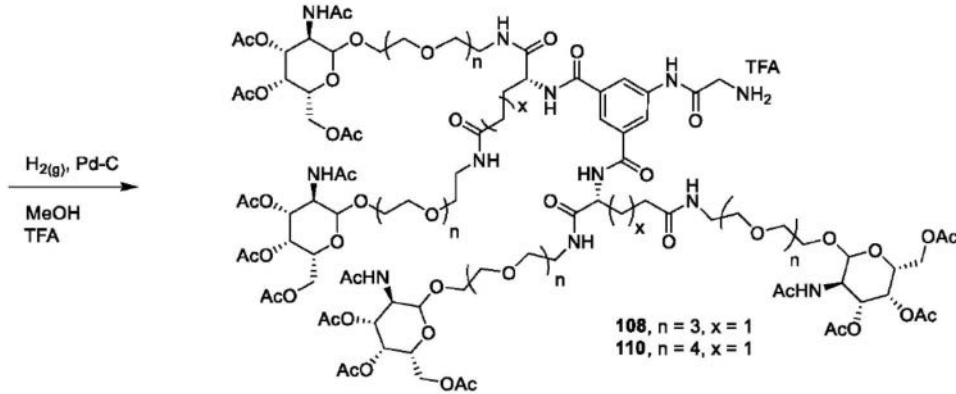
[1191] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物96a和160制备缀合物209a。

[1192] 实施例19. 缀合物212和215的合成

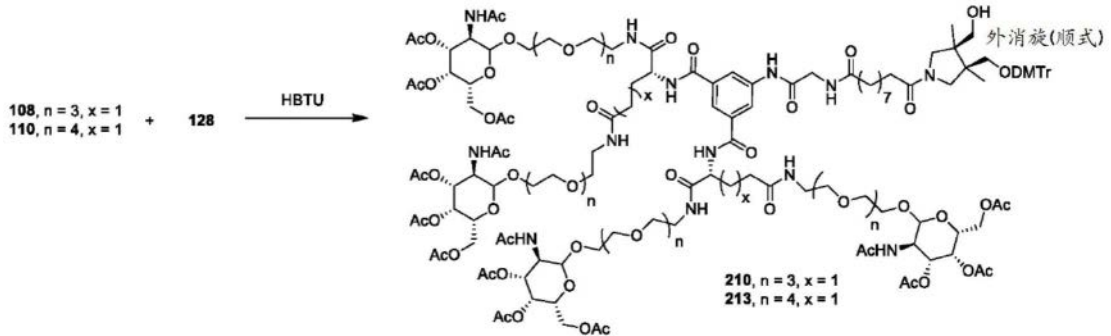
[1193] 方案41.



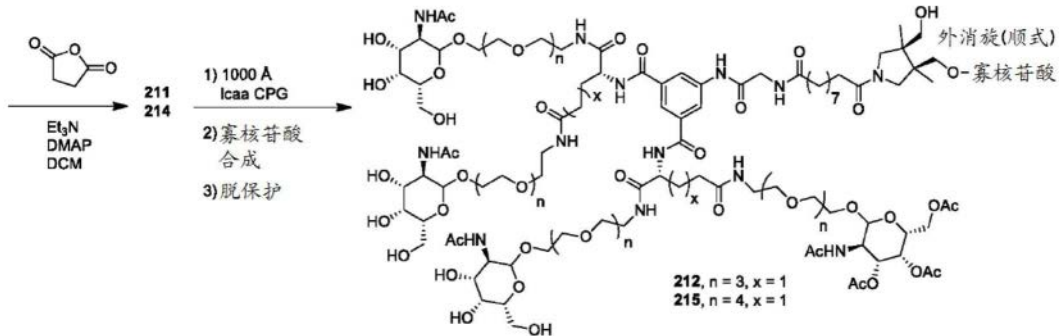
[1194]



[1195] 方案42.



[1196]



[1197] 步骤1. 5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸二甲酯105的制备

[1198] 将5-氨基间苯二甲酸二甲酯(5g, 24mmol)、Z-Gly-OH(5g, 24mmol)、EDC(5g, 26.3mmol)、HOBt(3.6g, 26.3mmol)、NMM(2.9mL, 26.3mmol)于DMF(50mL)中的溶液在室温下搅拌过夜。完成后,将反应混合物用乙酸乙酯(250mL)稀释并用各1M HCl(2x 100mL)、饱和碳酸氢钠(1x 100mL)和盐水(2x 100mL)洗涤。在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥以得到呈无色固体的5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸二甲酯(7.2g, 79%)。

[1199] 步骤2. 5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸106的

制备

[1200] 向5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸甲酯(7.2g)于甲醇(25mL)和THF(25mL)中的溶液中添加1M NaOH(25mL)。将溶液在室温下搅拌2小时,然后浓缩以除去THF和MeOH。将剩余的水溶液用水(75mL)稀释,在冰水浴上冷却并用6M HCl酸化至pH=1。将固体过滤并用水(3x 100mL)洗涤。将固体冷冻干燥以得到5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸(6.9g,定量)。

[1201] 步骤3. 化合物107的制备

[1202] 使用与用于化合物95的程序相同的程序从5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸106(200mg, 0.54mmol)和94(1.7g, 1.3mmol)制备化合物107。产率:600mg。

[1203] 步骤4. 化合物108的制备

[1204] 使用与用于化合物96的程序相同的程序从化合物107(600mg)制备化合物108。产率:650mg, 定量。

[1205] 步骤5. 化合物109的制备

[1206] 使用与用于化合物99的程序相同的程序,从5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸106(180mg, 0.48mmol)和98(1.5g, 1.1mmol)制备化合物109。产率:900mg。

[1207] 步骤6. 化合物110的制备

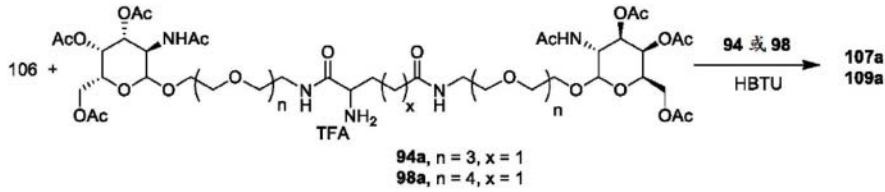
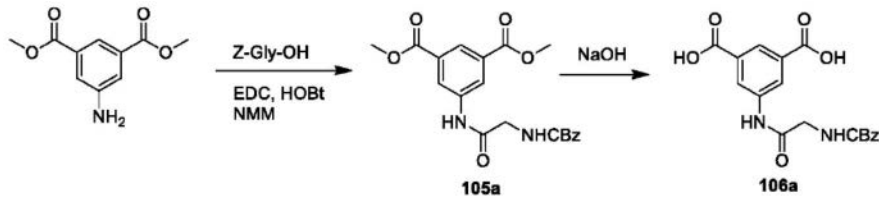
[1208] 使用与用于化合物100的程序相同的程序,从化合物109(900mg)制备化合物110。产率:920mg, 定量。

[1209] 步骤7. 缀合物212和215的制备

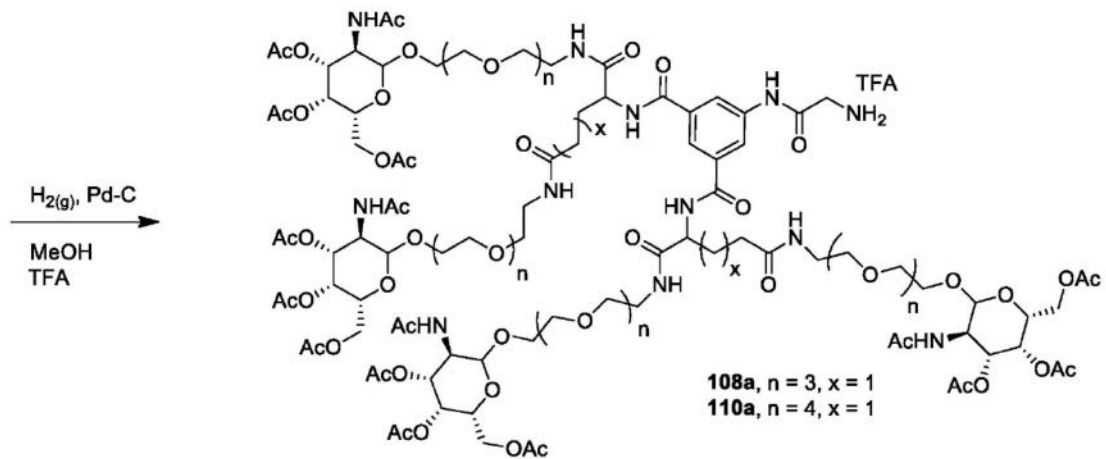
[1210] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物128和108或110制备缀合物212和215。

[1211] 实施例19a. 缀合物212a和215a的合成

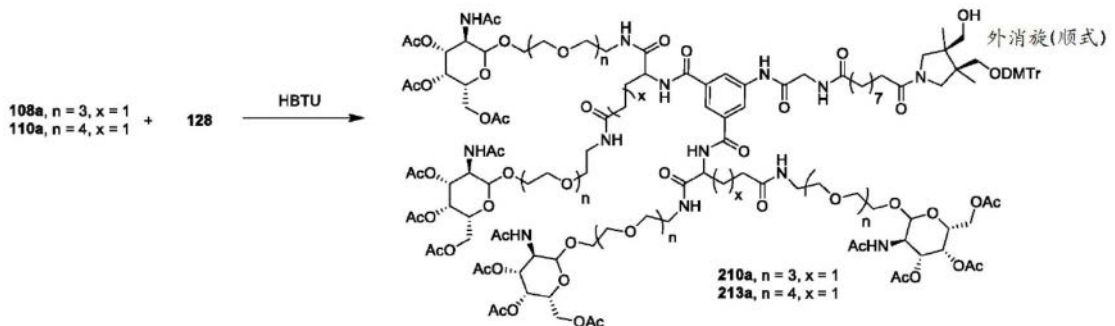
[1212] 方案41a.



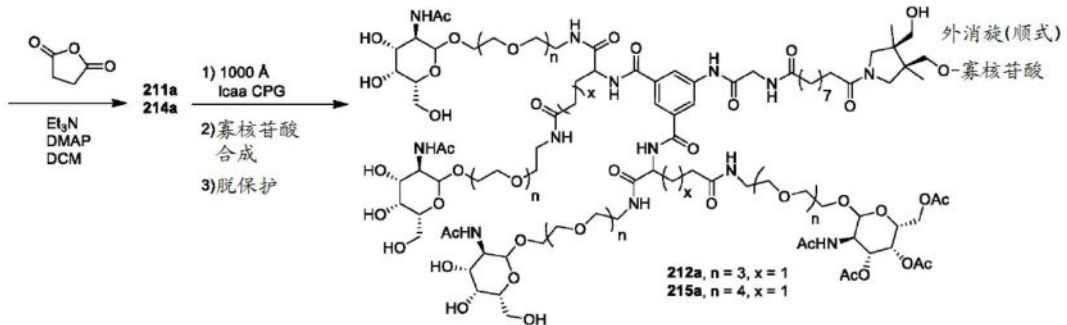
[1213]



[1214] 方案42a.



[1215]



[1216] 步骤1. 5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸二甲酯105a的制备

[1217] 将5-氨基间苯二甲酸二甲酯(5g, 24mmol)、Z-Gly-OH(5g, 24mmol)、EDC(5g, 26.3mmol)、HOBt(3.6g, 26.3mmol)、NMM(2.9mL, 26.3mmol)于DMF(50mL)中的溶液在室温下

搅拌过夜。完成后,将反应混合物用乙酸乙酯(250mL)稀释,并用各1M HCl(2x 100mL)、饱和碳酸氢钠(1x 100mL)和盐水(2x 100mL)洗涤。在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥以得到呈无色固体的5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸二甲酯(7.2g,79%)。

[1218] 步骤2. 5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸106a的制备

[1219] 向5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸甲酯(7.2g)于甲醇(25mL)和THF(25mL)中的溶液中添加1M NaOH(25mL)。将溶液在室温下搅拌2小时,然后浓缩以除去THF和MeOH。将剩余的水溶液用水(75mL)稀释,在冰水浴上冷却并用6M HCl酸化至pH=1。将固体过滤并用水(3x 100mL)洗涤。将固体冷冻干燥以得到5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸(6.9g,定量)。

[1220] 步骤3. 化合物107a的制备

[1221] 使用与用于化合物95的程序相同的程序,从5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸106a(200mg,0.54mmol)和94a(1.7g,1.3mmol)制备化合物107a。产率:600mg。

[1222] 步骤4. 化合物108a的制备

[1223] 使用与用于化合物96a的程序相同的程序,从化合物107a(600mg)制备化合物108a。产率:650mg,定量。

[1224] 步骤5. 化合物109a的制备

[1225] 使用与用于化合物99的程序相同的程序,从5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸106a(180mg,0.48mmol)和9a8(1.5g,1.1mmol)制备化合物109a。产率:900mg。

[1226] 步骤6. 化合物110a的制备

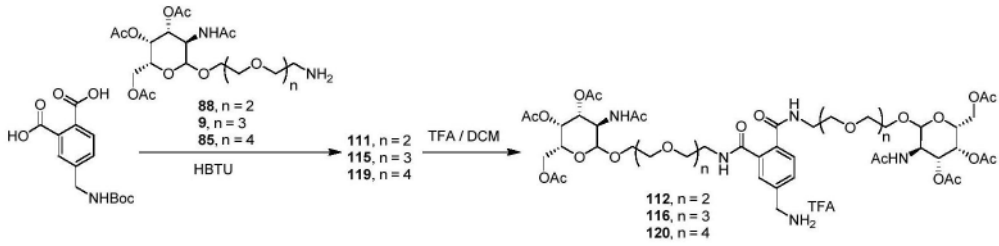
[1227] 使用与用于化合物100的程序相同的程序,从化合物109(900mg)制备化合物110a。产率:920mg,定量。

[1228] 步骤7. 缀合物212a和215a的制备

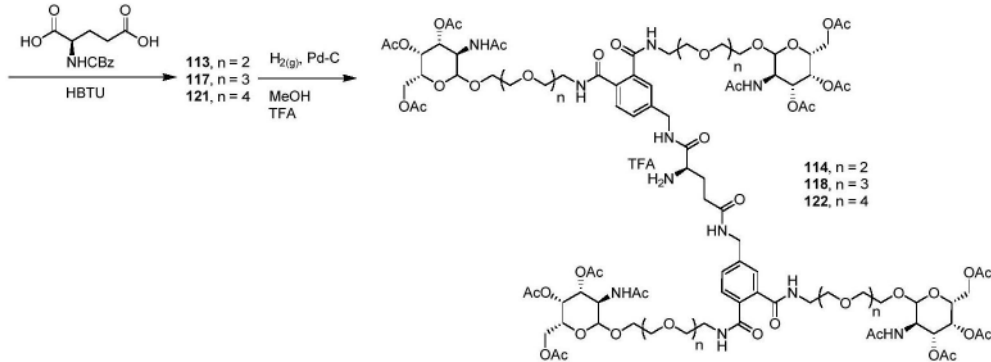
[1229] 使用与用于化合物1的程序相同的程序,从化合物128和108a或110a制备缀合物212a和21a5。

[1230] 实施例20. 缀合物218和221的合成

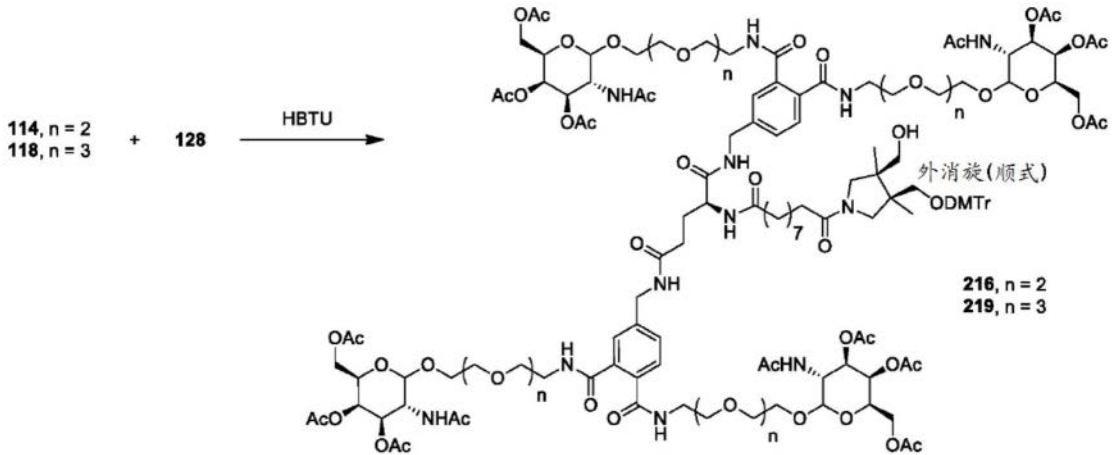
[1231] 方案43.



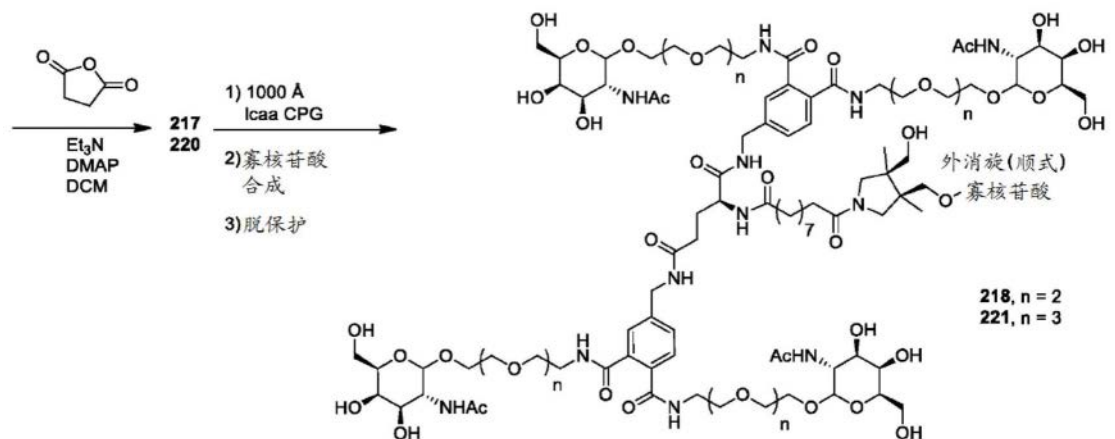
[1232]



[1233] 方案44.



[1234]



[1235] 步骤1. 化合物111的制备

[1236] 使用与用于化合物89的程序相同的程序,从4-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)邻苯二甲酸(1.13g, 3.84mmol)和88(5g, 8.44mmol)制备化合物111。产率: 2.21g, 49%。

[1237] 步骤2. 化合物112的制备

[1238] 将111 (2.21g, 1.87mmol) 于 CH_2Cl_2 (40mL) 中的溶液用TFA (5mL) 缓慢处理。在搅拌 (2 小时) 后, 将混合物浓缩并经受色谱法以产生呈无色泡沫的112 (1.08g, 47%)。Rf 0.1 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1239] 步骤3. 化合物113的制备

[1240] 使用与用于化合物91的程序相同的程序, 从化合物112 (1.08g, 0.88mmol) 和 (2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)-D-谷氨酸 (112mg, 0.39mmol) 制备化合物113。产率: 600mg, 62%。

[1241] 步骤4. 化合物114的制备

[1242] 使用与用于化合物92的程序相同的程序, 从化合物113制备化合物114。

[1243] 步骤5. 化合物115的制备

[1244] 使用与用于化合物93的程序相同的程序, 从4-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)邻苯二甲酸 (3.94g, 13.3mmol) 和9 (18.2g, 29.4mmol) 制备化合物115。产率: 9.02g, 53%。

[1245] 步骤6. 化合物116的制备

[1246] 使用与用于化合物112的程序相同的程序, 从化合物115 (8g, 6.3mmol) 制备化合物116。产率: 3.23g, 39%。

[1247] 步骤7. 化合物117的制备

[1248] 使用与用于化合物95的程序相同的程序, 从化合物116 (3.23g, 2.45mmol) 和 (2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)-D-谷氨酸 (192mg, 1.1mmol) 制备化合物117。产率: 2.22g, 34%。

[1249] 步骤8. 化合物118的制备

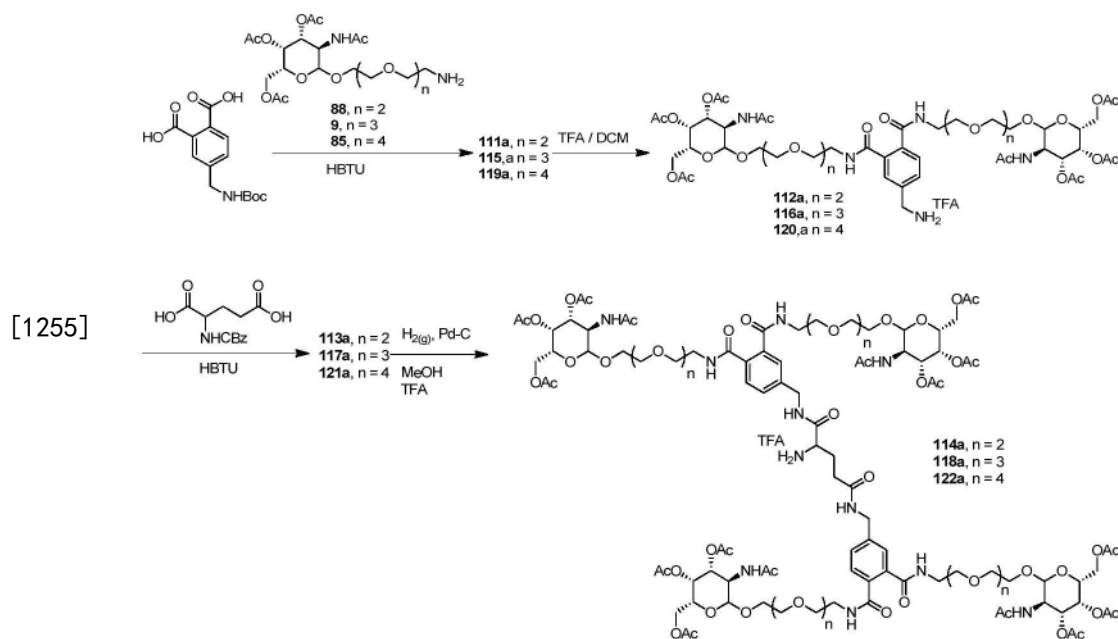
[1250] 使用与用于化合物96的程序相同的程序, 从化合物117 (2.22g, 0.84mmol) 制备化合物118。产率: 2.02g, 91%。

[1251] 步骤9. 缀合物218和221的制备

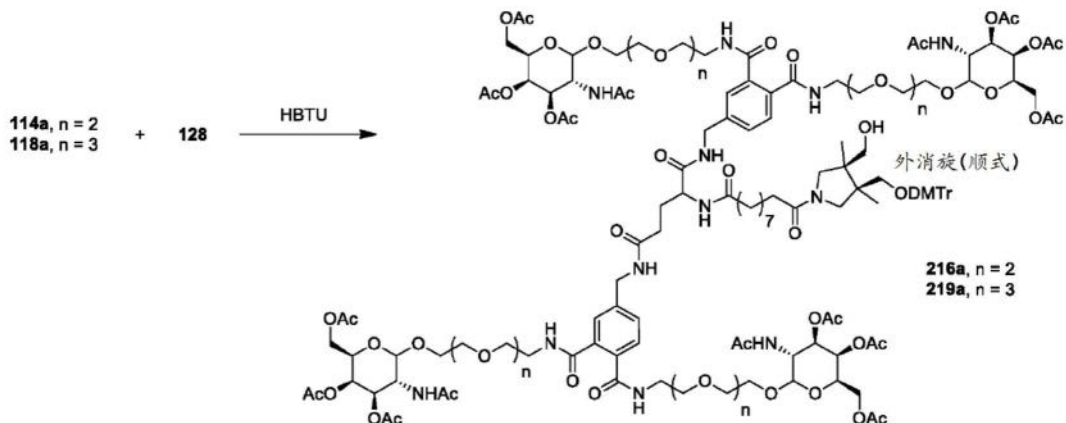
[1252] 使用与用于化合物1的程序相同的程序, 从化合物128和114或118制备缀合物218和221。

[1253] 实施例20a. 缀合物218a和221a的合成

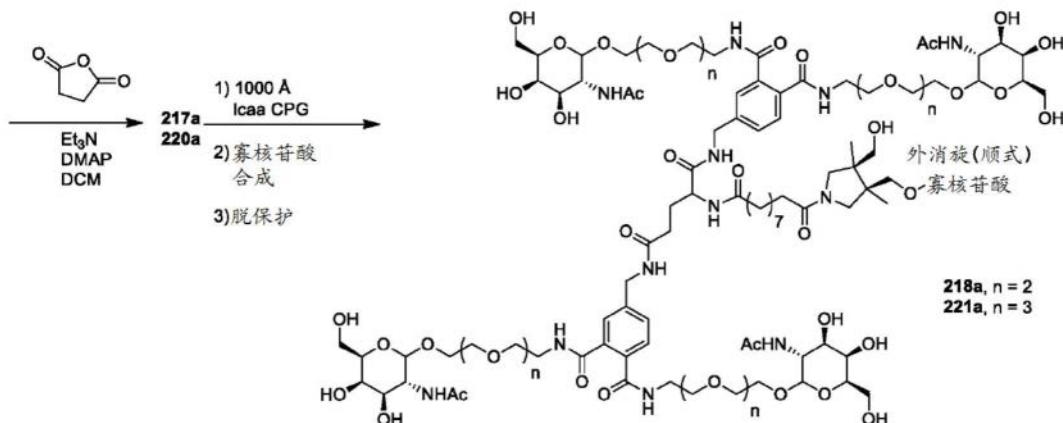
[1254] 方案43a.



[1256] 方案44a.



[1257]



[1258] 步骤1. 化合物111a的制备

[1259] 使用与用于化合物89的程序相同的程序,从4-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)邻苯二甲酸(1.13g, 3.84mmol)和88(5g, 8.44mmol)制备化合物111a。产率: 2.21g, 49%。

[1260] 步骤2. 化合物112a的制备

[1261] 将111a(2.21g, 1.87mmol)于 CH_2Cl_2 (40mL)中的溶液用TFA(5mL)缓慢处理。搅拌(2小时)后,将混合物浓缩并经受色谱法以产生呈无色泡沫的112a(1.08g, 47%)。Rf 0.1(10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1262] 步骤3. 化合物113a的制备

[1263] 使用与用于化合物91的程序相同的程序,从化合物112a(1.08g, 0.88mmol)和(2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)-D-谷氨酸(112mg, 0.39mmol)制备化合物113a。产率: 600mg, 62%。

[1264] 步骤4. 化合物114a的制备

[1265] 使用与用于化合物92的程序相同的程序,从化合物113a制备化合物114a。

[1266] 步骤5. 化合物115a的制备

[1267] 使用与用于化合物93的程序相同的程序,从4-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)邻苯二甲酸(3.94g, 13.3mmol)和9(18.2g, 29.4mmol)制备化合物115a。产率: 9.02g, 53%。

[1268] 步骤6. 化合物116a的制备

[1269] 使用与用于化合物11a的程序相同的程序,从化合物115a(8g, 6.3mmol)制备化合物116a。产率: 3.23g, 39%。

[1270] 步骤7. 化合物117a的制备

[1271] 使用与用于化合物95的程序相同的程序, 从化合物116a (3.23g, 2.45mmol) 和(2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基) 谷氨酸 (192mg, 1.1mmol) 制备化合物117a。产率: 2.22g, 34%。

[1272] 步骤8. 化合物118a的制备

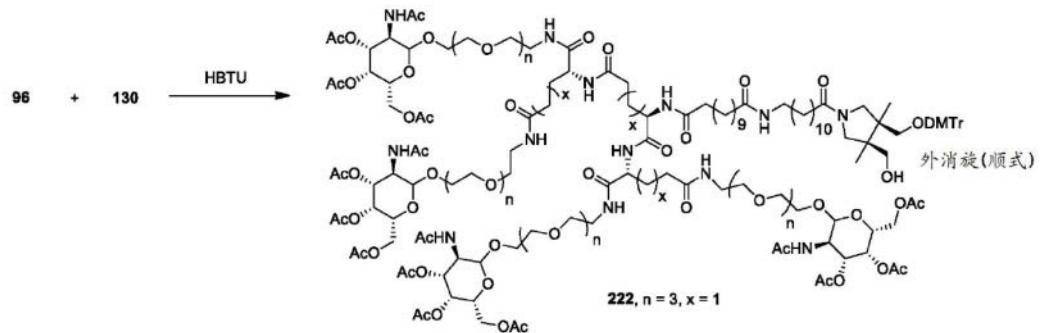
[1273] 使用与用于化合物96的程序相同的程序, 从化合物117a (2.22g, 0.84mmol) 制备化合物118a。产率: 2.02g, 91%。

[1274] 步骤9. 缀合物21a8和221a的制备

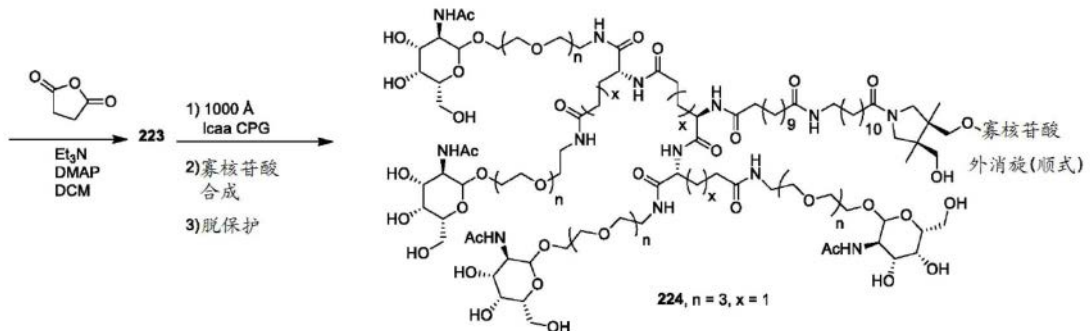
[1275] 使用与用于化合物1的程序相同的程序, 从化合物128和114a或118a制备缀合物218a和22a1。

[1276] 实施例21. 缀合物224的合成

[1277] 方案45.



[1278]

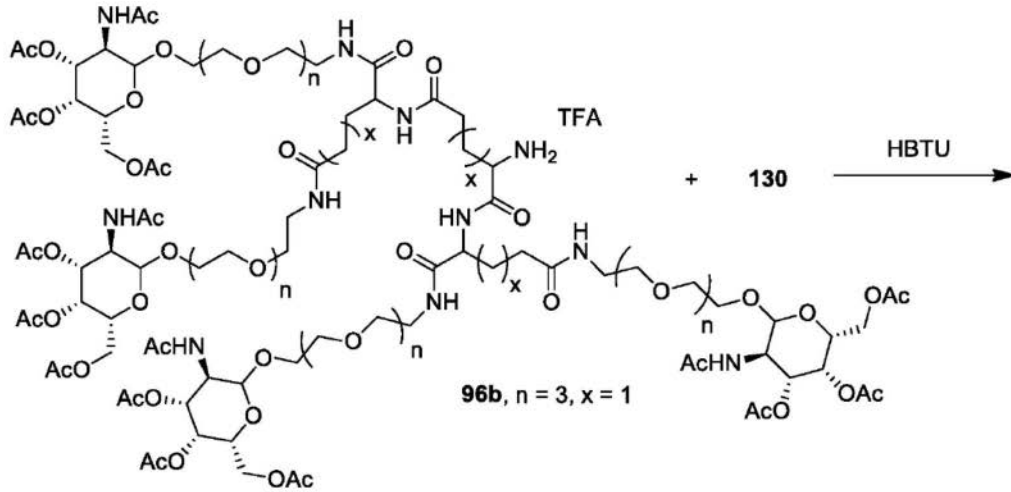


[1279] 步骤1. 化合物224的制备

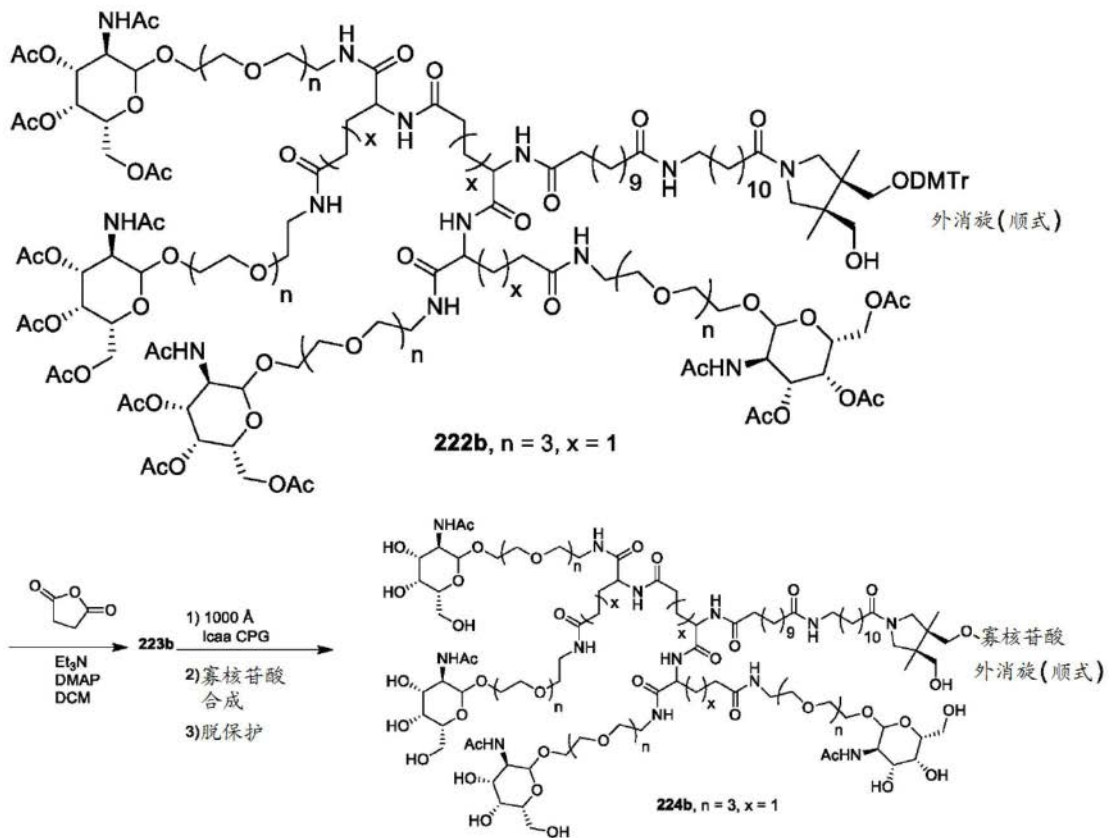
[1280] 使用与用于化合物1的程序相同的程序, 从化合物96和130制备缀合物224。

[1281] 实施例21a. 缀合物224b的合成

[1282] 方案45a.



[1283]

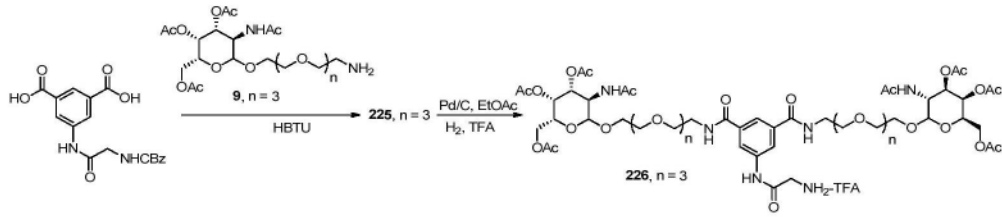


[1284] 步骤1. 化合物224b的制备

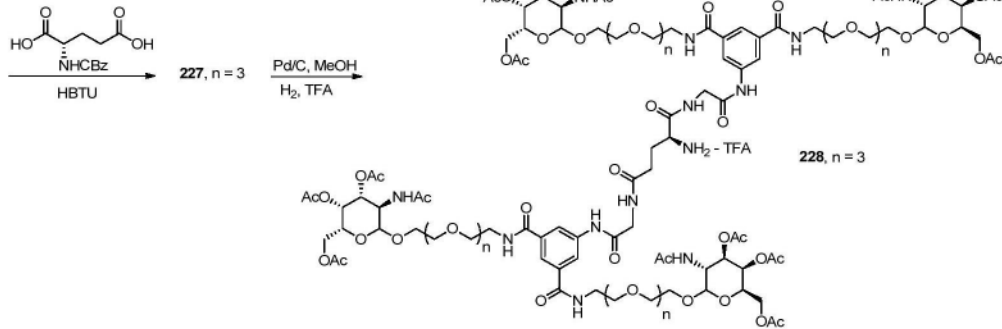
[1285] 使用与用于化合物1的程序相同的程序, 从化合物96b和130制备缀合物224b。

[1286] 实施例22缀合物231的合成

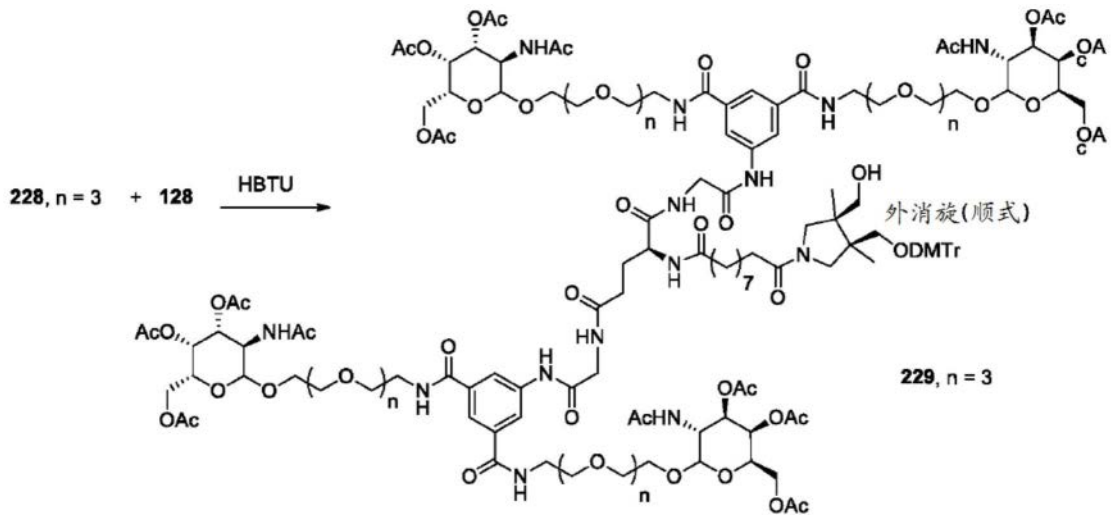
[1287] 方案46



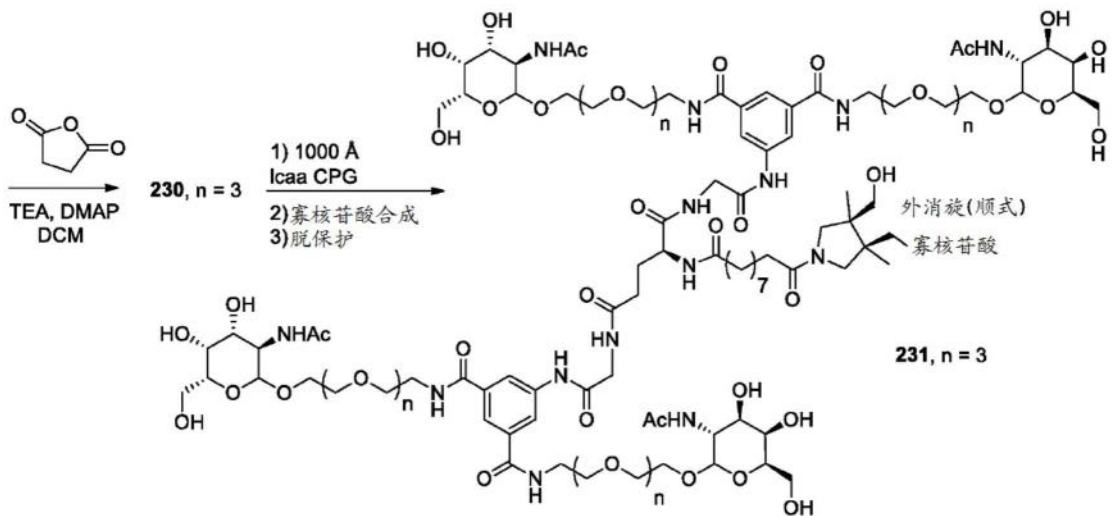
[1288]



[1289] 方案47



[1290]



[1291] 步骤1化合物225的制备

[1292] 使用与用于化合物89的程序相同的程序,从5-(2-氨基乙酰胺基)间苯二甲酸106

(560mg, 1.5mmol) 和 9 (2.24g, 3.6mmol) 制备化合物 225。产率 1.6g, 80%。

[1293] 步骤 2 化合物 226 的制备

[1294] 以与 14 相同的方式制备化合物 226。产率 1.22g, 78%。

[1295] 步骤 3 化合物 227 的制备

[1296] 以与 89 相同的方式自 Z-谷氨酸 (108mg, 0.38mmol) 和 226 (1.22g, 0.92mmol) 制备化合物 227。产率 471mg, 45%。

[1297] 步骤 4 化合物 228 的制备

[1298] 以与 14 相同的方式制备化合物 228。产率 460mg, 定量

[1299] 步骤 5 化合物 229 的制备

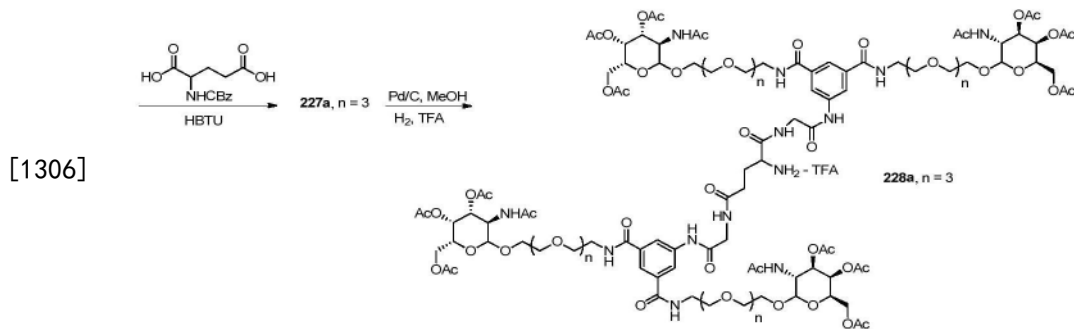
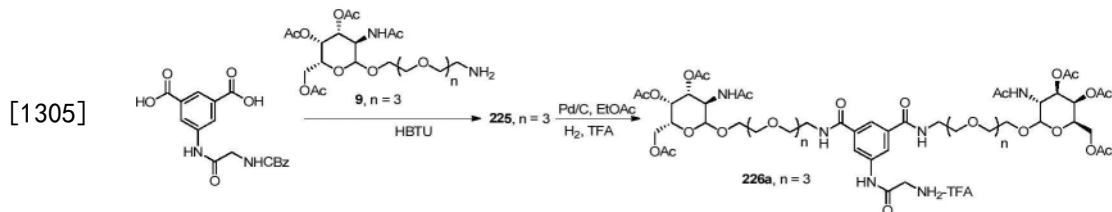
[1300] 以与 89 相同的方式从 228 (460mg, 0.17mmol) 和 128 (125mg, 0.19mmol) 制备化合物 229。产率 365mg, 66%。

[1301] 步骤 6 化合物 231 的制备

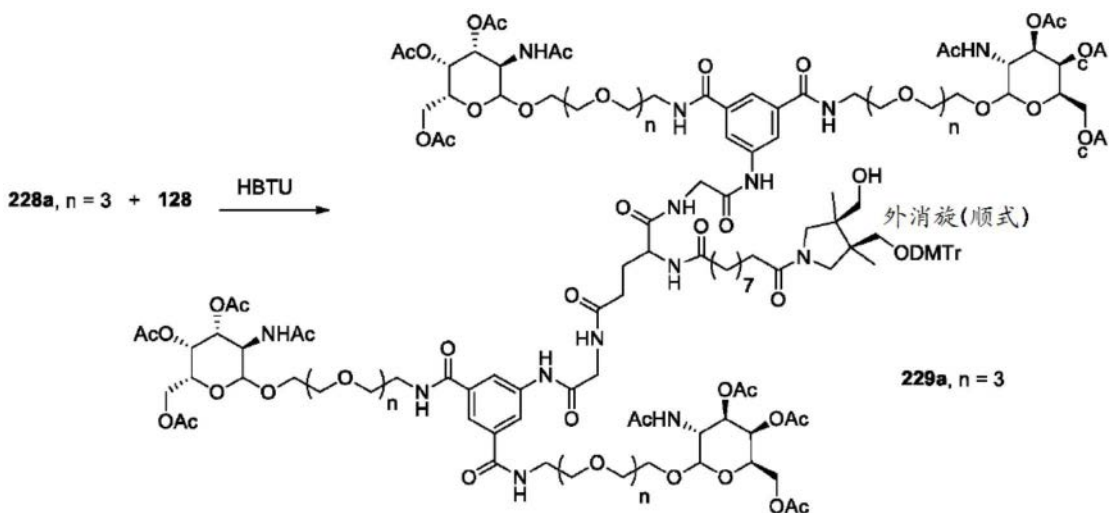
[1302] 使用与用于化合物 1 的程序相同的程序制备缀合物 231。

[1303] 实施例 22a 缀合物 231a 的合成

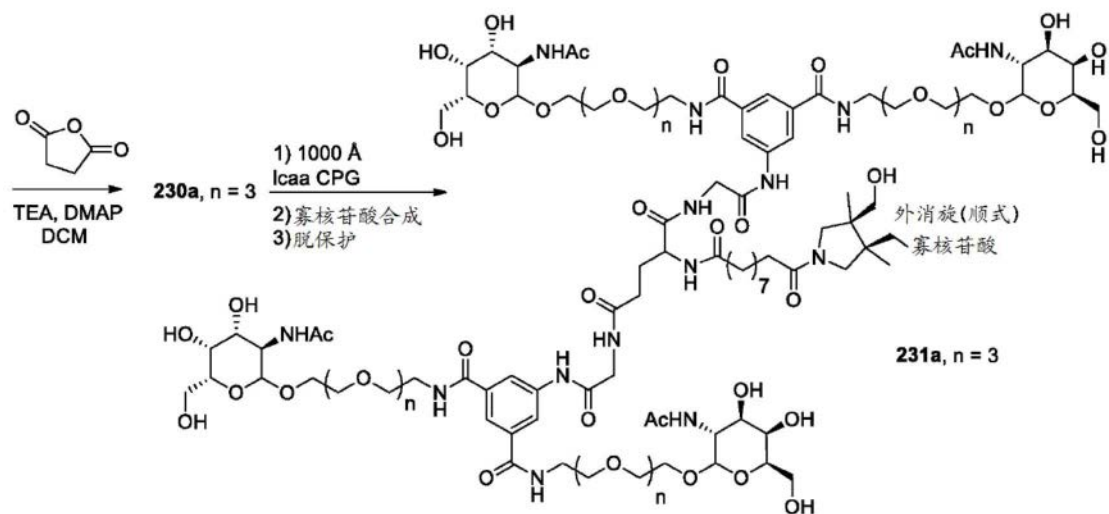
[1304] 方案 46a



[1307] 方案 47a



[1308]



[1309] 步骤1化合物225a的制备

[1310] 使用与用于89的程序相同的程序,从5-(2-氨基乙酰胺基)间苯二甲酸106(560mg, 1.5mmol)和9(2.24g, 3.6mmol)制备化合物225a。产率1.6g, 80%。

[1311] 步骤2化合物226a的制备

[1312] 以与14相同的方式制备化合物226a。产率1.22g, 78%。

[1313] 步骤3化合物227a的制备

[1314] 以与89相同的方式从Z-谷氨酸(108mg, 0.38mmol)和226a(1.22g, 0.92mmol)制备化合物227a。产率471mg, 45%。

[1315] 步骤4化合物228a的制备

[1316] 以与14相同的方式制备化合物228a。产率460mg, 定量

[1317] 步骤5化合物229a的制备

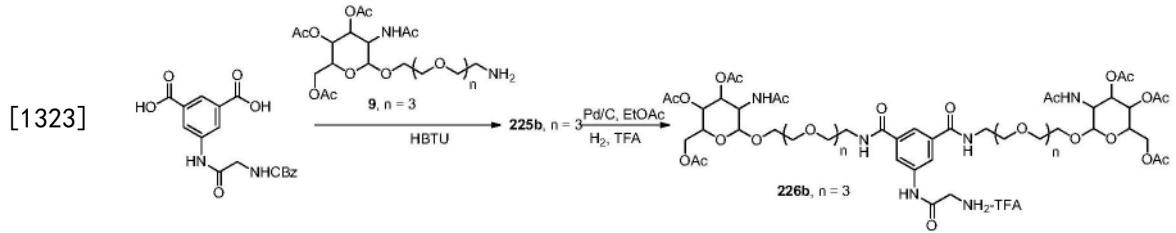
[1318] 以与89相同的方式从228a(460mg, 0.17mmol)和128(125mg, 0.19mmol)制备化合物229a。产率365mg, 66%。

[1319] 步骤6化合物231a的制备

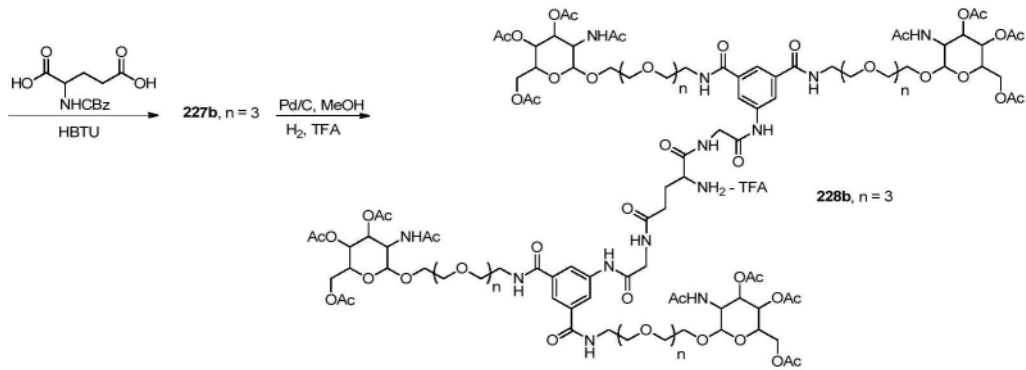
[1320] 使用与用于化合物1的程序相同的程序制备缀合物231a。

[1321] 实施例22b缀合物231b的合成

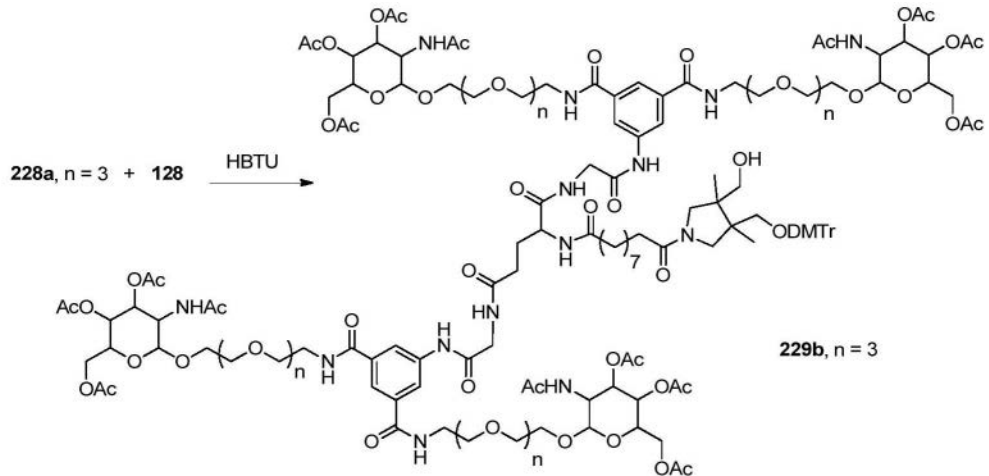
[1322] 方案46b



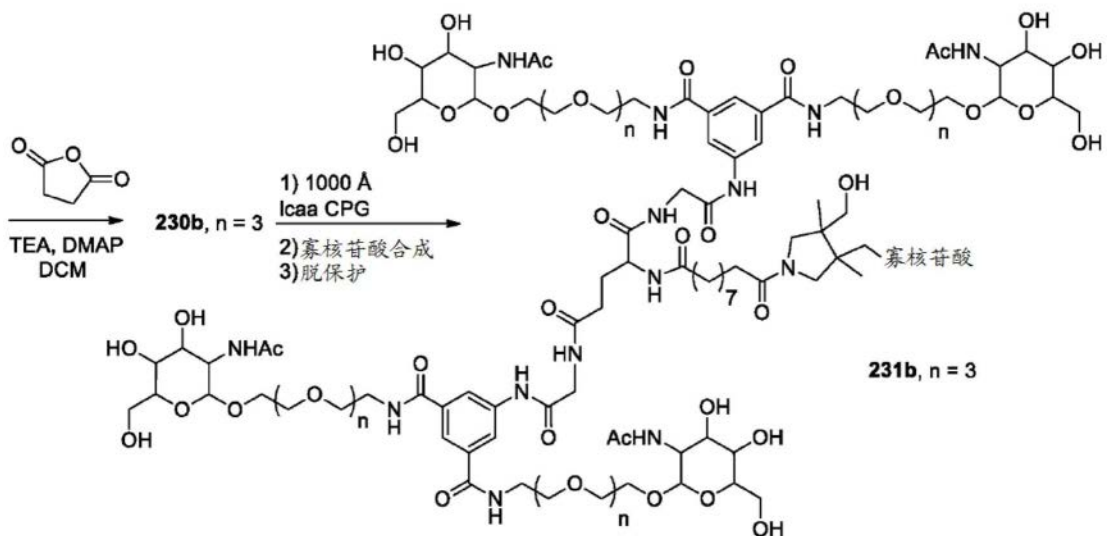
[1324]



[1325] 方案47b

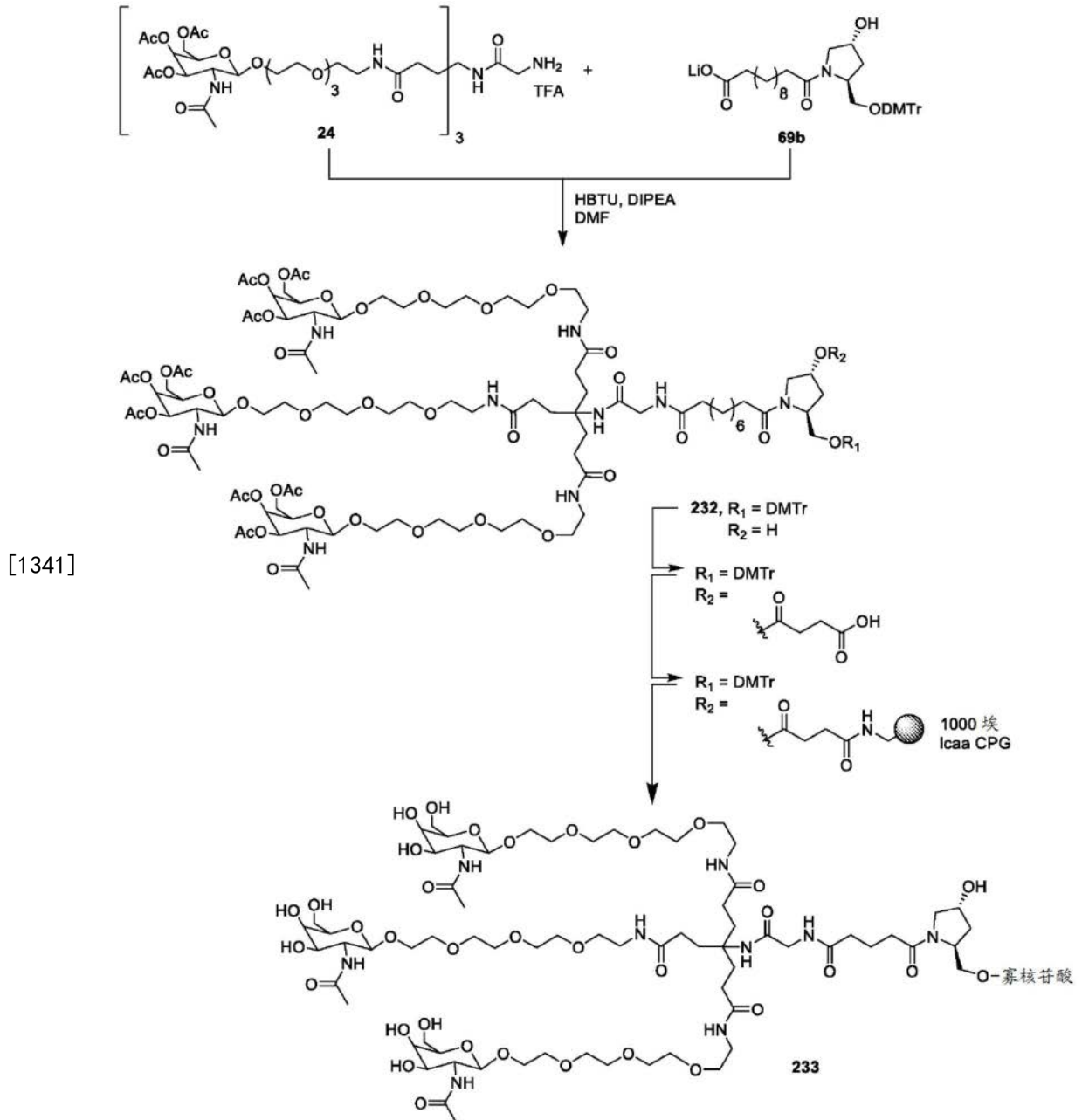


[1326]



[1327] 步骤1化合物225b的制备

- [1328] 使用与用于化合物89的程序相同的程序从5-(2-氨基乙酰胺基)间苯二甲酸106 (560mg, 1.5mmol) 和9 (2.24g, 3.6mmol) 制备化合物225b。产率1.6g, 80%。
- [1329] 步骤2化合物226b的制备
- [1330] 以与14相同的方式制备化合物226b。产率1.22g, 78%。
- [1331] 步骤3化合物227b的制备
- [1332] 以与89相同的方式从Z-谷氨酸 (108mg, 0.38mmol) 和226b (1.22g, 0.92mmol) 制备化合物227b。产率471mg, 45%。
- [1333] 步骤4化合物228b的制备
- [1334] 以与14相同的方式制备化合物228b。产率460mg, 定量
- [1335] 步骤5化合物229b的制备
- [1336] 以与89相同的方式从228b (460mg, 0.17mmol) 和128 (125mg, 0.19mmol) 制备化合物229b。产率365mg, 66%。
- [1337] 步骤6化合物231b的制备
- [1338] 使用与用于化合物1的程序相同的程序制备缀合物231b。
- [1339] 实施例23. 缀合物233的合成
- [1340] 方案48



[1342] 步骤1. 化合物232的制备

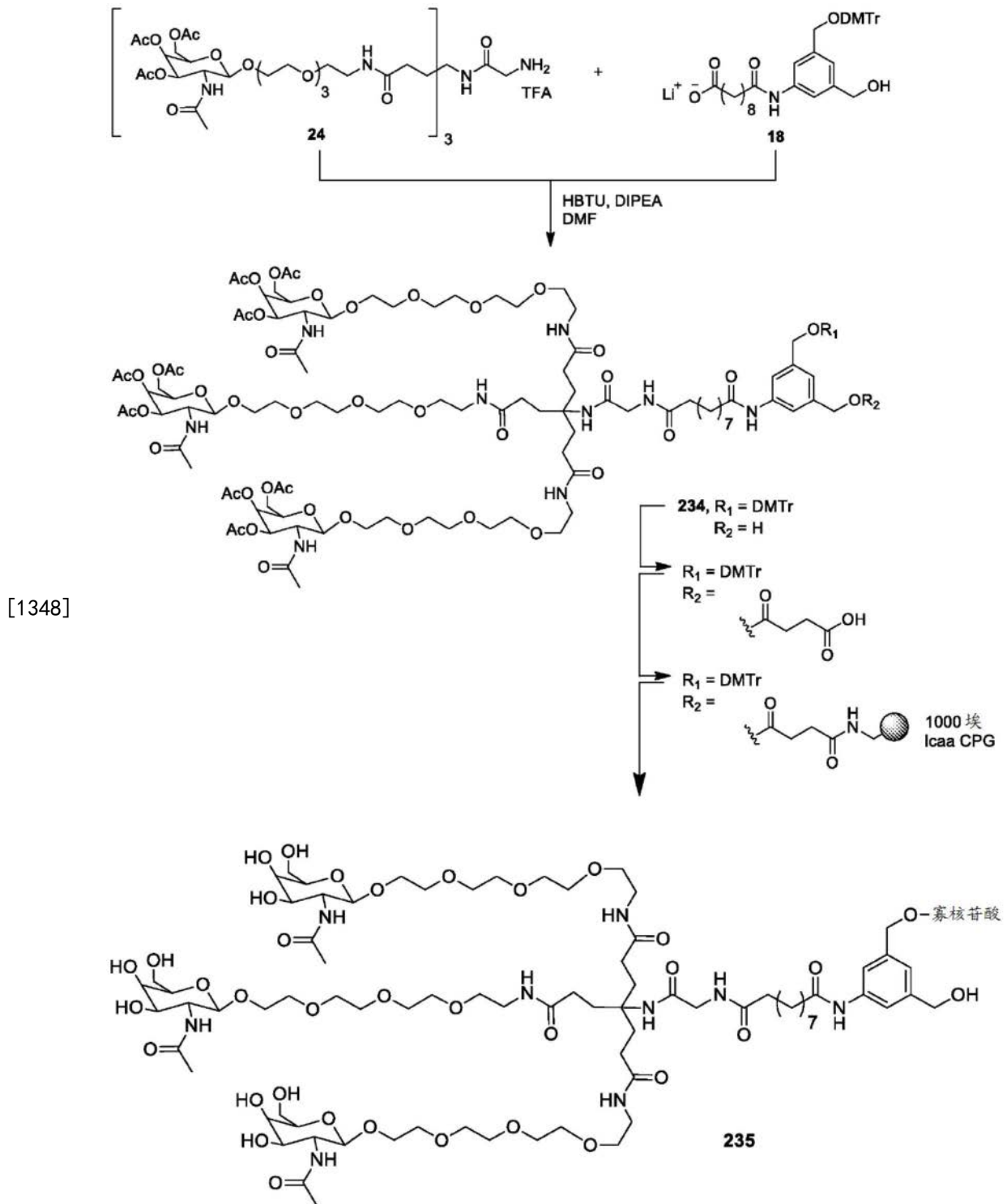
[1343] 使用与用于化合物19的程序相同的程序从化合物24 (650mg, 0.33mmol) 和化合物69b (175mg, 0.33mmol) 制备化合物232。产率: 380mg, 47%。

[1344] 步骤2. 化合物233的制备

[1345] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物232制备化合物233。

[1346] 实施例24. 缀合物235的合成

[1347] 方案49



[1349] 步骤1. 化合物234的制备

[1350] 使用与用于化合物19的程序相同的程序从化合物24 (1.1g, 0.55mmol) 和化合物18 (175mg, 0.33mmol) 制备化合物234。产率: 685mg, 51%。

[1351] 步骤2. 化合物235的制备

[1352] 使用与用于化合物1的程序相同的程序从化合物234制备化合物235。

[1353] 实施例25. HBV siRNA缀合物的体内测试

[1354] 慢性HBV感染是对肝脏具有进行性损害的全球性疾病。目前可用的治疗可减少病

毒DNA,但对极大促进疾病进展的病毒抗原几乎没有效应。因此,设计了靶向HBV以减少病毒抗原的siRNA。

[1355] 在所确立的HBV感染小鼠模型中测试缀合至GalNAc配体的描述于表1中的化学修饰的HBV siRNA的体内活性。在AAV-HBV1.2C57BL/6小鼠模型中,在注射编码HBV的超基因组长度序列的腺相关病毒(AAV)载体后实现稳定且持久的HBV表达,从而导致肝脏表达HBV RNA和蛋白质以及将病毒和亚病毒粒子分泌至血液中。

[1356] 用于这些研究中的AAV-HBV1.2构建体是基于Dion, S.等人, Journal of Virology, 2013, 87(10):5554-5563中所提供的细节。所有动物相关的程序都是根据书面操作程序、根据加拿大动物保护委员会(CCAC)的良好动物实践指南(Canadian Council on Animal Care(CCAC) Guidelines on Good Animal Practices)实施且由地方机构动物照护和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准。

[1357] 用AAV-HBV1.2载体的1E11载体基因组(VG)对每只动物进行接种。在治疗之前,对所有动物进行放血测试并测定个别动物的血清HBsAg水平,以证实所确立的HBV表达。

[1358] siRNA处理:在第0天经由在肩胛区中进行皮下注射,向小鼠(通常n=5只)的组一次施用单次3mg/kg剂量的HBV siRNA缀合物(每只动物1个剂量)。一组仅施用媒介物(盐水)的动物用作对照。

[1359] 收集:在第0天、治疗前和测试物品施用后的确定时间点(例如在研究第7、14、21、28、35、42、49、56、63和70天)对所有小鼠进行放血测试,以测定血清HBsAg水平的最大降低和药理学活性的持续时间。

[1360] 分析:使用Biorad EIA GS HBsAg 3.0试剂盒(BioRad, 目录号32591)根据制造商的说明书测定血清样品中的HBsAg水平。使用来自每个处理组的汇集血清来测定个别时间点的组平均HBsAg水平。分析数据并将其表示为相对于治疗前基线的HBsAg水平(相对于第0天的%)。

[1361] 结果:测试表1中所述的每一化学修饰的HBV siRNA的结果呈现于表2中。数值代表治疗后第7、14、21、28、42、49、56和70天的HBsAg水平%(相对于第0天基线)。

[1362] 表1. 化学修饰的HBV siRNA双链体

siRNA 编号	有义链 SEQ ID NO	有义链 5'-3'	反义链 SEQ ID NO	反义链 5'-3'
1	SEQ ID NO:1	csgsugugCaCUUcgcuucaccu	SEQ ID NO:2	asGsgugAaGCgaagUgCacacsgsuUU
2	SEQ ID NO:3	usgsCaCUUcgcuucaccu	SEQ ID NO:4	asGsgugAaGCgaagUgCacascsgU
3	SEQ ID NO:5	usgscaCUUcgcuucaccu	SEQ ID NO:6	asGsgugaagcgaagUgCacascsgU
4	SEQ ID NO:7	usgscaCUUCgcuucaccu	SEQ ID NO:8	asGsgugAagcgaagUgCacascsgU
5	SEQ ID NO:9	CscsGuGuGcACUucGcuuCacc	SEQ ID NO:10	gsGsUgAaGcgAaguGcAcAcGgsusc
6	SEQ ID NO:11	cscsguguGcACUucgcuucacc	SEQ ID NO:12	gsGsugaAgCGaaguGcAcacggsusc
7	SEQ ID NO:13	cscsguGuGcAcUucgcuucacc	SEQ ID NO:14	gsGsugaAgCGaaguGcAcacggsusc
8	SEQ ID NO:15	cscsguguGcACUucgcuuCacc	SEQ ID NO:16	gsGsugaAgCGaaguGcAcacGgsusc
9	SEQ ID NO:17	cscsgugugcACUucgcuucacc	SEQ ID NO:18	gsGsugaagcgaaguGcAcacggsusc

[1363]

[1364]

siRNA 编号	有义链 SEQ ID NO	有义链 5'-3'	反义链 SEQ ID NO	反义链 5'-3'
10	SEQ ID NO:19	cscsguguGc <u>ca</u> cuuc <u>gc</u> uucacc	SEQ ID NO:20	gsgsuga <u>AgCG</u> aagugcacacggsusc
11	SEQ ID NO:21	<u>C</u> scs <u>G</u> u <u>G</u> u <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>G</u> cuu <u>C</u> acc	SEQ ID NO:22	gs <u>G</u> s <u>U</u> g <u>A</u> a <u>G</u> cg <u>A</u> agu <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>Ac</u> <u>G</u> gsuscUU
12	SEQ ID NO:23	cscsguguGc <u>ACU</u> uc <u>gc</u> uucacc	SEQ ID NO:24	gs <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acggsuscUU
13	SEQ ID NO:25	cscsgu <u>G</u> u <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>U</u> uc <u>gc</u> uucacc	SEQ ID NO:26	gs <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acggsuscUU
14	SEQ ID NO:27	cscsguguGc <u>ACU</u> uc <u>gc</u> uu <u>C</u> acc	SEQ ID NO:28	gs <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> ac <u>G</u> gsuscUU
15	SEQ ID NO:29	<u>G</u> sus <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>G</u> cuu <u>C</u> acc	SEQ ID NO:30	gs <u>G</u> s <u>U</u> g <u>A</u> a <u>G</u> cg <u>A</u> agu <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>Ac</u> s <u>G</u> sgU
16	SEQ ID NO:31	<u>G</u> sus <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>G</u> cuu <u>C</u> acc	SEQ ID NO:32	gs <u>G</u> s <u>U</u> g <u>A</u> a <u>G</u> cg <u>A</u> agu <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>Ac</u> s <u>G</u> sg
17	SEQ ID NO:33	<u>G</u> sus <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>G</u> cuu <u>C</u> acc	SEQ ID NO:34	gs <u>G</u> s <u>U</u> g <u>A</u> a <u>G</u> cg <u>A</u> agu <u>Gc</u> <u>Ac</u> s <u>Ac</u> s <u>G</u> sg
18	SEQ ID NO:35	<u>C</u> scs <u>G</u> u <u>G</u> u <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>G</u> cuu <u>C</u> aca	SEQ ID NO:36	us <u>G</u> s <u>U</u> g <u>A</u> a <u>G</u> cg <u>A</u> agu <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>Ac</u> <u>G</u> gsusc
19	SEQ ID NO:37	<u>C</u> scs <u>G</u> u <u>G</u> u <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>G</u> cuu <u>C</u> aca	SEQ ID NO:38	us <u>G</u> s <u>U</u> g <u>A</u> a <u>G</u> cg <u>A</u> agu <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>Ac</u> <u>G</u> gsuscUU
20	SEQ ID NO:39	cscsguguGc <u>ACU</u> uc <u>gc</u> uucaca	SEQ ID NO:40	us <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acggsuscUU
21	SEQ ID NO:41	cscsgu <u>G</u> u <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>U</u> uc <u>gc</u> uucaca	SEQ ID NO:42	us <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acggsuscUU
22	SEQ ID NO:43	cscsguguGc <u>ACU</u> uc <u>gc</u> uu <u>C</u> aca	SEQ ID NO:44	us <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> ac <u>G</u> gsuscUU
23	SEQ ID NO:45	cscsgugugc <u>ACU</u> uc <u>gc</u> uucaca	SEQ ID NO:46	us <u>G</u> sugaagcgaagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acggsuscUU
24	SEQ ID NO:47	gsus <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>gc</u> uucaca	SEQ ID NO:48	us <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acsgsgU
25	SEQ ID NO:49	gsusgc <u>ACU</u> uc <u>gc</u> uucaca	SEQ ID NO:50	us <u>G</u> sugaagcgaagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acsgsgU
26	SEQ ID NO:51	gsus <u>Gc</u> a <u>C</u> <u>U</u> uc <u>gc</u> uucaca	SEQ ID NO:52	us <u>G</u> sugaagcgaagu <u>Gc</u> <u>Ac</u> acsgsgU
27	SEQ ID NO:53	<u>G</u> sus <u>Gc</u> <u>ACU</u> uc <u>G</u> cuu <u>C</u> aca	SEQ ID NO:54	us <u>G</u> s <u>U</u> g <u>A</u> a <u>G</u> cg <u>A</u> agu <u>Gc</u> <u>Ac</u> <u>Ac</u> s <u>G</u> sg
28	SEQ ID NO:55	uscsgcuu <u>Ca</u> <u>CCU</u> cugcagcugc	SEQ ID NO:56	cs <u>G</u> sacg <u>Ug</u> <u>C</u> <u>A</u> gagg <u>Ug</u> <u>A</u> agcgasagUU
29	SEQ ID NO:57	uscsgcuu <u>Ca</u> <u>CCU</u> cugcagcugca	SEQ ID NO:58	us <u>G</u> sacg <u>Ug</u> <u>C</u> <u>A</u> gagg <u>Ug</u> <u>A</u> agcgasagUU
30	SEQ ID NO:59	uscsg <u>U</u> u <u>Ca</u> <u>Cc</u> <u>U</u> cugcagcugca	SEQ ID NO:60	us <u>G</u> sacg <u>Ug</u> <u>C</u> <u>A</u> gagg <u>Ug</u> <u>A</u> agcgasagUU
31	SEQ ID NO:61	us <u>u</u> s <u>Ca</u> <u>CCU</u> cugcagcugca	SEQ ID NO:62	us <u>G</u> sacg <u>Ug</u> <u>C</u> <u>A</u> gagg <u>Ug</u> <u>A</u> agcsgsaU
32	SEQ ID NO:63	us <u>u</u> s <u>Ca</u> <u>CCU</u> cugcagcugca	SEQ ID NO:64	us <u>G</u> sacgugcagagg <u>Ug</u> <u>A</u> agcsgsaU
33	SEQ ID NO:65	us <u>u</u> s <u>Ca</u> <u>CCU</u> cugcagcugca	SEQ ID NO:66	us <u>G</u> sacg <u>Ug</u> cagagg <u>Ug</u> <u>A</u> agcsgsaU
34	SEQ ID NO:67	us <u>u</u> sua <u>Cu</u> <u>Ag</u> <u>UGC</u> ca <u>U</u> uuguuca	SEQ ID NO:68	us <u>G</u> s <u>A</u> a <u>Ca</u> <u>A</u> u <u>G</u> gca <u>Cu</u> <u>Ag</u> <u>U</u> a <u>A</u> ascsu
35	SEQ ID NO:69	us <u>u</u> sua <u>Cu</u> <u>Ag</u> <u>UGC</u> ca <u>U</u> uuguuca	SEQ ID NO:70	us <u>G</u> s <u>A</u> a <u>Ca</u> <u>A</u> u <u>G</u> gca <u>Cu</u> <u>Ag</u> <u>U</u> a <u>A</u> ascsuUU
36	SEQ ID NO:71	us <u>u</u> sua <u>cu</u> <u>Ag</u> <u>UGC</u> ca <u>U</u> uuguuca	SEQ ID NO:72	us <u>G</u> saa <u>Ca</u> <u>A</u> <u>U</u> ggca <u>Cu</u> <u>Ag</u> aaascsuUU
37	SEQ ID NO:73	us <u>u</u> sua <u>Cu</u> <u>Ag</u> <u>Ug</u> <u>C</u> ca <u>U</u> uuguuca	SEQ ID NO:74	us <u>G</u> saa <u>Ca</u> <u>A</u> <u>U</u> ggca <u>Cu</u> <u>Ag</u> aaascsuUU

[1365] 2'-O-甲基核苷酸=小写字母;2'-氟核苷酸=大写字母;硫代磷酸酯接头=s;未修饰的=大写字母

[1366] 表2. 单次皮下施用 (3mg/kg) 来自表1的GalNAc缀合的siRNA之后小鼠中的血清HBsAg水平。

[1367] HBsAg数据表示为基线(第0天)值的百分比

[1368]

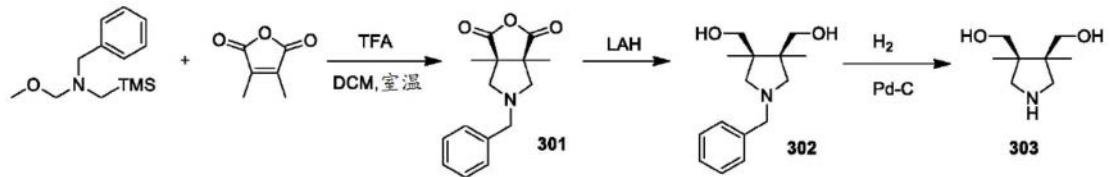
siRNA 编号	配体化 合物编 号	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 42 天	第 49 天	第 56 天	第 70 天
盐水		95.7	118.6	101.0	111.4	115.3		112.2	106.5
1	145	3.1	1.0	22.8	1.3		3.2		7.3
2	145	1.3	0.5	0.4	0.7		3.4		6.5
5	235	12.7	7.0	9.6	21.3	59.7		74.6	98.8
5	233	16.6	8.2	11.0	12.6	24.4		32.2	60.3
5	145	4.3	1.2	1.7	2.4		11.9		24.5
6	233	20.1	10.4	10.9	13.5	30.8		46.0	67.5
7	233	20.7	12.4	10.5	13.6	24.9		46.2	77.0
8	233	18.1	10.5	11.5	12.1	26.0		37.6	64.9
9	145	10.0	2.7	2.0	3.6		6.8		17.0
10	145	16.7	16.7	16.0	16.7		74.4		97.3
11	233	20.5	14.8	16.0	23.9	65.2		80.2	
12	233	18.4	11.6	12.2	14.1	23.6		67.1	72.6
12	145	5.1	1.1	1.2	1.0	2.2		4.5	8.2
13	233	20.7	10.1	11.6	13.2	21.1		39.9	72.3
14	233	16.5	8.0	11.0	11.8	28.8		48.0	90.0
15	145	6.3	3.5	8.4	11.4		89.7		83.1
16	145	4.0	3.4	9.7	14.8		85.1		88.9
17	145	2.4	0.6	0.7	1.1		6.3		15.1
18	233	2.5	1.0	1.3	2.6	11.2		24.5	55.6
19	233	1.9	0.8	1.5	2.6	6.5		12.9	23.4
19	145	1.7	0.6	0.7	1.4	3.8		7.3	15.0
19	200	1.8	0.9	1.4	2.2	5.4		10.2	27.5
19	197	2.0	0.8	1.4	2.1	3.1		8.4	14.2
19	194	2.8	1.8	2.2	4.0	10.7		26.0	37.3
20	145	2.7	0.5	0.7	1.0	4.7		9.3	11.3
20	215	3.4	1.5	1.7	1.7	1.9		4.5	6.2
20	194	1.4	0.5	0.3	0.7	1.2		3.0	6.0
20	197	3.4	0.6	1.0	1.3	2.1		4.9	8.2
20	212	3.2	0.8	1.0	1.9	2.4		4.9	7.5
20	191	3.3	1.4	1.4	2.1	1.9		1.2	3.4
21	215	2.5	1.1	1.9	2.6	3.8		7.8	9.8
22	233	2.5	2.0	3.1	6.1	12.2		30.4	61.9

siRNA 编号	配体化合物编号	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 42 天	第 49 天	第 56 天	第 70 天
23	215	1.6	0.3	0.3	0.3	0.4		1.0	1.7
24	197	1.9	0.4	0.4	0.4	0.8		1.7	3.2
25	197	2.1	2.2	0.9	0.5	0.9		2.0	2.2
27	145	0.3	0.3	1.6	7.4		71.1		100.1
28	145	11.4	6.7	7.1	9.6	20.8		27.1	36.7
29	145	2.9	1.7	2.1	3.3	7.9		21.4	18.2
30	145	10.0	3.8	3.5	5.9	13.7		19.0	28.8
34	233	13.2	7.4	8.9	16.8	55.2		60.5	
35	233	11.6	8.5	14.0	19.5	58.4		82.0	
36	145	11.3	8.5	11.6	12.5	36.6		49.7	64.7
37	145	27.8	21.6	25.9	31.1	49.9		43.3	64.5

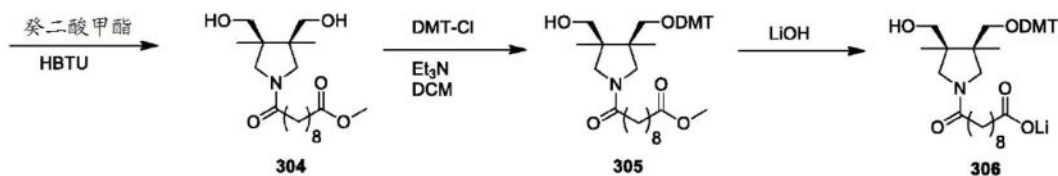
[1370] 表2鉴定了所测试的HBV siRNA缀合物的化合物编号(第2列)和相应的寡核苷酸(第1列)。

[1371] 实施例26缀合物320的合成

[1372] 方案50活化的接头的制备



[1373]



[1374] 步骤1.外消旋(顺式)5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮301的制备

[1375] 向3,4-二甲基咪喃-2,5-二酮(3g,24mmol)和N-苄基-N-(三甲基甲硅烷基)甲基甲胺(7g,29.8mmol)于二氯甲烷(75mL)中的冷却溶液(0℃)中缓慢添加三氟乙酸(75μL)。搅拌过夜,从而随着冰浴融化,使溶液缓慢升温至室温。将反应混合物浓缩至干燥,溶解于乙酸乙酯(100mL)中,用饱和碳酸氢钠(2x 100mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥。通过在硅胶上柱色谱法(梯度:于己烷中的20%乙酸乙酯至100%乙酸乙酯)纯化,得到呈黄色油状物的(3aR,6aS)-5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮(3.5g,56%)。

[1376] 步骤2.外消旋(顺式)(1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇302的制备

[1377] 向(3aR,6aS)-5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮(3.5g,13.4mmol)于无水乙醚(50mL)中的冷却(0℃)溶液中分三部分缓慢添加氢化铝

锂团粒 (1.5g, 40mmol)。将溶液搅拌过夜, 从而随着冰浴融化而升温至室温。完成后, 使反应物冷却至 0°C 并用 1.5mL 5M NaOH、随后 1.5mL 水极其缓慢地淬灭。搅拌 30 分钟, 然后添加硫酸镁并过滤。将滤液浓缩以得到呈无色油状物的 ((3R, 4S)-1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基) 二甲醇 (2.7g)。

[1378] 步骤3. 外消旋 (顺式) (3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基) 二甲醇 303 的制备

[1379] 向 ((3R, 4S)-1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基) 二甲醇 (10g, 40mmol) 于甲醇 (10mL) 中的溶液中添加湿的活性炭载 10% 钯 (1g)。将溶液在氢气氛下剧烈搅拌 16 小时。在完成, 将溶液通过 Celite 过滤并浓缩至干燥以得到呈无色固体的 ((3R, 4S)-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基) 二甲醇 (5.5g, 86%)。

[1380] 步骤4. 外消旋 (顺式) 10-(3,4-双(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸甲酯 304 的制备

[1381] 将 3 (1.3g, 8.2mmol) 和癸二酸单甲酯 (1.8g, 8.2mmol) 于 CH_2Cl_2 (100mL) 中的溶液用 HBTU (3.41g, 9.02mmol) 和 休尼格碱 (5.71mL, 32.8mmol) 处理。在搅拌过夜后, 将混合物用 NaHCO_3 (饱和水溶液)、水和盐水洗涤, 然后干燥 (MgSO_4), 过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法 (梯度: 0% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 至 20%) 以产生 4 (1.8g, 61%)。

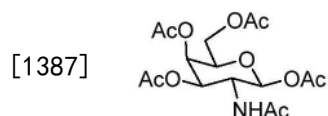
[1382] 步骤5. 外消旋 (顺式) 10-(3-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)-甲氧基)甲基)-4-(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸甲酯 305 的制备

[1383] 将 304 (1.8g, 5.0mmol) 和 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (1.7g, 5.0mmol) 于吡啶 (180mL) 中的溶液搅拌过夜。然后在减压下除去吡啶并使粗物质经受色谱法 (梯度: 0% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 至 10%) 以得到呈黄色油状物的 5 (1.4g, 42%)。

[1384] 步骤6. 外消旋 (顺式) 10-(3-((双(4-甲氧基苯基)-(苯基)甲氧基)甲基)-4-(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸锂 306 的制备

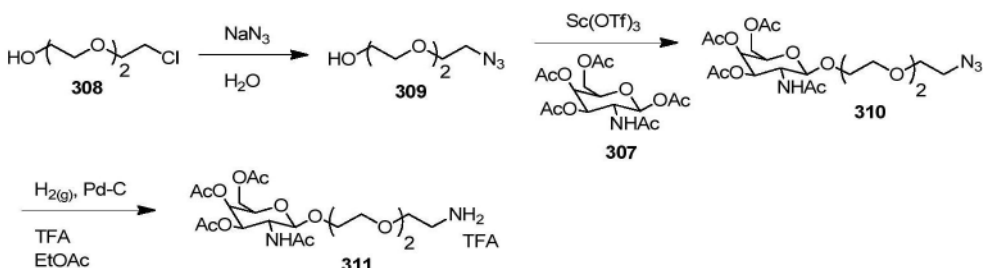
[1385] 向化合物 305 (3.0g, 4.6mmol) 于 THF (50mL) 和水 (50mL) 中的溶液中添加氢氧化锂 (121mg, 5.0mmol)。将溶液在室温下搅拌 4 小时, 然后浓缩以除去 THF。将剩余的水溶液冷冻干燥过夜以得到浅粉色固体 (2.9g, 定量)。将化合物 306 制备为两种顺式-非对映异构体的混合物。

[1386] 方案 51 全乙酰化半乳糖胺 307 的合成



[1388] 用乙酸酐 (1.25L, 13.2mol) 将于吡啶 (1.5L) 中的 D-半乳糖胺盐酸盐 (250g, 1.16mol) 处理 45 分钟。搅拌过夜后, 将反应混合物分成三个 1L 部分。将每个 1L 部分倾倒入 3L 冰水中并混合 1 小时。在混合后, 将固体滤掉, 合并, 经液氮冷冻, 并且然后冻干 5 天以产生呈白色固体的全乙酰化半乳糖胺 7 (369.4g, 82%)。Rf (0.58, 10% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1389] 方案 52 GalNAc 单体的合成



[1390]

[1391] 步骤1化合物309的制备

[1392] 将2-[2-(2-氯乙氧基)]乙醇308(100g, 593mmol)于水(1L)中的溶液用NaN₃(77g, 1.19mol)处理并加热(90℃)。搅拌(72小时)后,使溶液冷却(室温)并用CH₂Cl₂萃取(4x)。将合并的有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤,浓缩且不经进一步处理即使用。获得呈浅黄色油状物的化合物9(88.9g, 86%)。

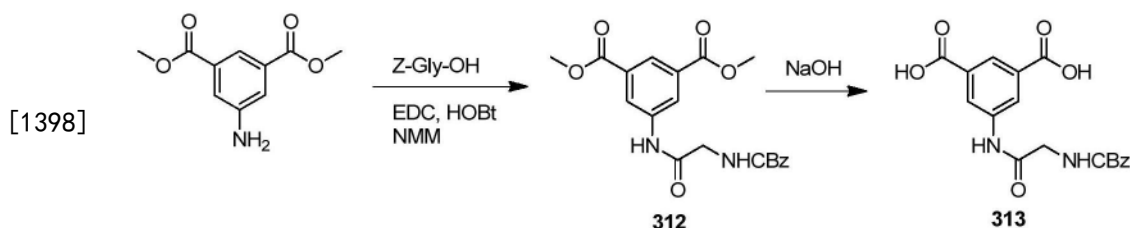
[1393] 步骤2化合物310的制备

[1394] 将7(2.76g, 7.1mmol)和309(1.37g, 7.8mmol)于1,2-二氯乙烷(40mL)中的溶液用Sc(OTf)₃(174mg, 0.36mmol)处理并加热(85℃)。搅拌(2小时)后,使混合物冷却(室温)并通过添加TEA(4mL)淬灭并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈浅黄色泡沫的310(3.03g, 85%)。

[1395] 步骤3化合物311的制备

[1396] 将310(3.02g, 5.99mmol)和Pd/C(300mg, 10%Pd负载-湿载体)于EtOAc(30mL)中的溶液用TFA(576μL, 7.5mmol)处理。将反应混合物用氢气吹扫(45分钟),然后用氮气吹扫(10分钟),然后通过celite过滤。将滤液浓缩,并且然后使其经受色谱法以产生呈褐色泡沫的311(2.67g, 75%)。

[1397] 方案53芳族核心的合成



[1398]

[1399] 步骤1. 5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1λ²-乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸二甲酯312的制备

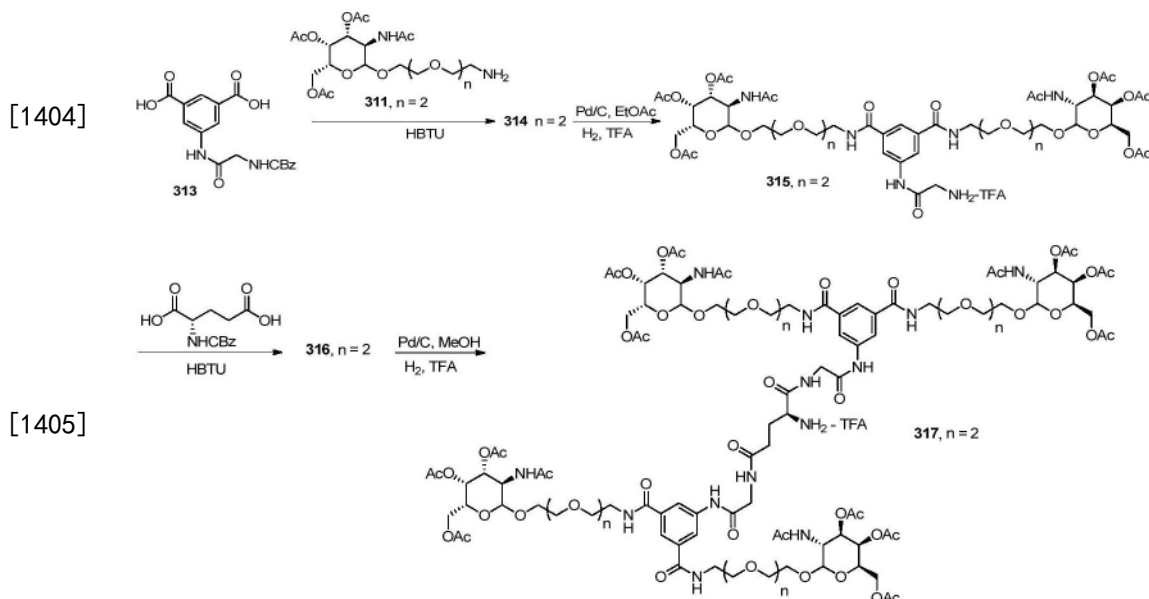
[1400] 将5-氨基间苯二甲酸二甲酯(5g, 24mmol)、Z-Gly-OH(5g, 24mmol)、EDC(5g, 26.3mmol)、HOBt(3.6g, 26.3mmol)、NMM(2.9mL, 26.3mmol)于DMF(50mL)中的溶液在室温下搅拌过夜。完成后,将反应混合物用乙酸乙酯(250mL)稀释并用各1M HCl(2x 100mL)、饱和碳酸氢钠(1x 100mL)和盐水(2x 100mL)洗涤。在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥以得到呈无色固体的5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1λ²-乙基)氨基)-乙酰胺基)间苯二甲酸二甲酯(7.2g, 79%)。

[1401] 步骤2. 5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1λ²-乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸313的制备

[1402] 向5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1λ²-乙基)氨基)乙酰胺基)间苯二甲酸甲酯(7.2g)于甲醇(25mL)和THF(25mL)中的溶液中添加1M NaOH(25mL)。将溶液在室温下搅拌2小时,然

后浓缩以除去THF和MeOH。将剩余的水溶液用水(75mL)稀释,在冰水浴上冷却,并用6M HCl酸化至pH=1。将固体过滤并用水(3x 100mL)洗涤。将固体冷冻干燥以得到5-(2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸(6.9g,定量)。

[1403] 方案54:四聚体的制备



[1406] 步骤1化合物314的制备

[1407] 将313(2.09g, 5.6mmol)和311(8.34g, 14.07mmol)于 CH_2Cl_2 (150mL)中的溶液用HBTU(6.4g, 16.9mmol)和依尼格碱(7.35mL, 42.2mmol)处理。搅拌(过夜)后,将反应混合物倾倒入 NaHCO_3 (饱和水溶液)中,然后用水和盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法(梯度1-12% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)以产生呈浅黄色泡沫的6(3.97g, 55%)。

[1408] 步骤2化合物315的制备

[1409] 将化合物314(3.92g, 3.07mmol)、Pd/C(400mg, 10%负载-湿载体)和三氟乙酸(308 μL , 4mmol)用 H_2 吹扫。在 H_2 下搅拌(过夜)后,将混合物用 N_2 (15-20分钟)吹扫,然后通过celite过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈白色至奶油色泡沫的7(3.36g, 86%)。

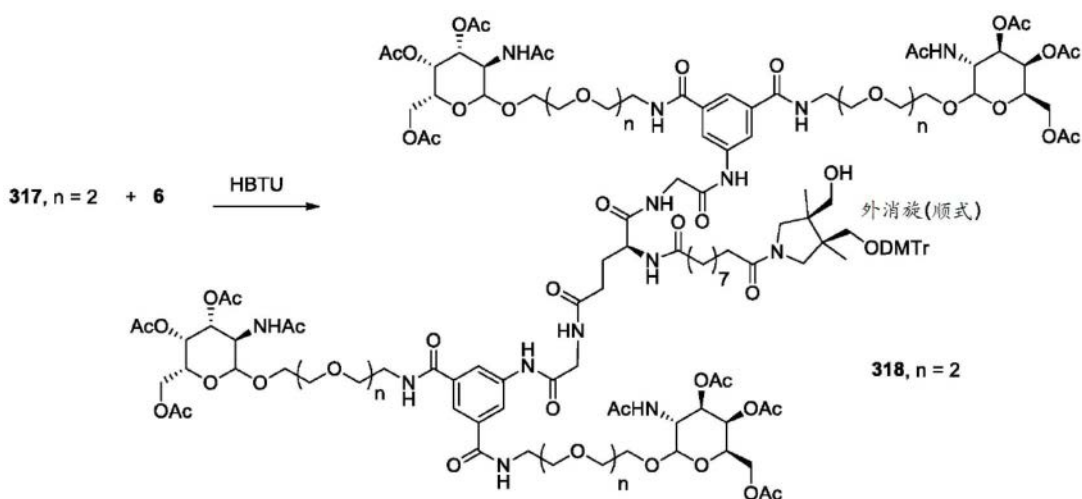
[1410] 步骤3化合物316的制备

[1411] 以与314相同的方式从Z-谷氨酸(306mg, 1.09mmol)和315(3.3g, 2.6mmol)制备化合物316。产率1.66g, 60%。

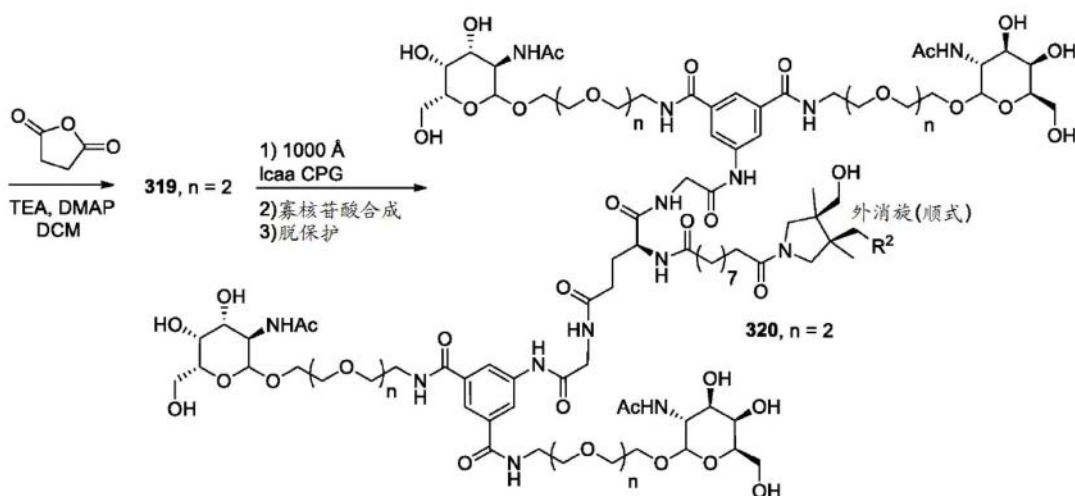
[1412] 步骤4化合物317的制备

[1413] 以与315相同的方式制备化合物317。产率1.65g, 定量。

[1414] 方案55完全缀合物的制备



[1415]



[1416] 步骤1化合物318的制备

[1417] 将317 (1.91g, 0.75mmol) 于 CH_2Cl_2 (100mL) 中的溶液首先用依尼格碱 (392 μL , 2.25mmol)、然后用6 (两种顺式-非对映异构体的混合物, 509mg, 0.79mmol)、随后用HBTU (356mg, 0.94mmol) 处理。搅拌 (过夜) 后, 将溶液倾倒至 NaHCO_3 (饱和水溶液) 中, 然后用水和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈白色泡沫的318 (1.19g, 52%)。

[1418] 步骤2化合物319的制备

[1419] 将318 (1.19g, 0.39mmol) 于1,2-二氯乙烷 (100mL) 中的溶液用TEA (542 μL , 3.9mmol)、DMAP (238mg, 1.95mmol) 和琥珀酸酐 (195mg, 1.95mmol) 处理并加热 (85 $^\circ\text{C}$)。搅拌 (2.5小时) 后, 将溶液自热移除, 并且用 CH_3OH (10mL) 处理并使其搅拌 (1小时)。搅拌后, 将混合物倾倒至 NaHCO_3 (饱和水溶液) 中, 然后用盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并浓缩。所获得的残余物不经进一步处理即使用。产率=1.4g, 定量

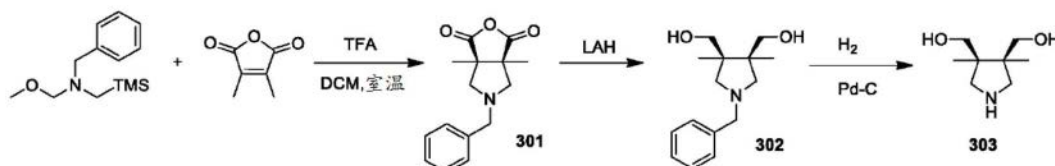
[1420] 步骤3缀合物320的制备

[1421] 使用标准酰胺偶联化学, 将琥珀酸酯319负载至1000Å LCAA (长链氨基烷基) CPG (可控多孔玻璃) 上。将二异丙基碳二亚胺 (52.6 μmol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (0.3mg, 2.6 μmol) 和吡啶 (10 μL) 于无水乙腈 (0.3mL) 中的溶液添加至于无水二氯甲烷 (0.2mL) 中的319

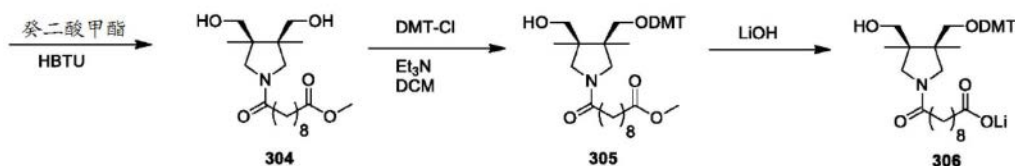
(20.6mg, 8 μ mol)中。将此混合物添加至LCAA CPG(183mg)中。将悬浮液在室温下轻轻混合过夜。在319消失(HPLC)后,过滤反应混合物并将CPG用各1mL二氯甲烷、乙腈、5%乙酸酐/5% N-甲基咪唑/5%吡啶于THF中的溶液、然后THF、乙腈和二氯甲烷洗涤。然后将CPG在高真空下干燥过夜。通过标准DMTr测定通过UV/Vis(504nm),测定负载为19 μ mol/g。将所得GalNAc负载的CPG固体载体用于使用标准程序的自动寡核苷酸合成中。进行核苷酸脱保护,随后从固体载体除去(同时进行乙酸半乳糖胺脱保护)得到GalNAc-寡核苷酸缀合物320。

[1422] 实施例27缀合物520的合成

[1423] 方案56活化的接头的制备



[1424]



[1425] 步骤1.外消旋(顺式)5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮301的制备

[1426] 向3,4-二甲基咪喃-2,5-二酮(3g,24mmol)和N-苄基-1-甲氧基-N-(三甲基甲硅烷基)甲基)甲胺(7g,29.8mmol)于二氯甲烷(75mL)中的冷却溶液(0 $^{\circ}$ C)中缓慢添加三氟乙酸(75 μ L)。搅拌过夜,从而随着冰浴融化,使溶液缓慢升温至室温。将反应混合物浓缩至干燥,溶解于乙酸乙酯(100mL)中,用饱和碳酸氢钠(2x 100mL)洗涤,在硫酸镁上干燥,过滤并浓缩至干燥。通过硅胶上的柱色谱法纯化(梯度:20%于己烷中的乙酸乙酯至100%乙酸乙酯)得到呈黄色油状物的(3aR,6aS)-5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮(3.5g,56%)。

[1427] 步骤2.外消旋(顺式)(1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇302的制备

[1428] 向(3aR,6aS)-5-苄基-3a,6a-二甲基四氢-1H-咪喃并[3,4-c]吡咯-1,3(3a小时)-二酮(3.5g,13.4mmol)于无水乙醚(50mL)中的冷却(0 $^{\circ}$ C)溶液中分三部分缓慢添加氢化铝锂团粒(1.5g,40mmol)。将溶液搅拌过夜,随着冰浴融化而升温至室温。完成后,使反应物冷却至0 $^{\circ}$ C并用1.5mL 5M NaOH、随后1.5mL水极其缓慢地淬灭。搅拌30分钟,然后添加硫酸镁并过滤。将滤液浓缩以得到呈无色油状物的((3R,4S)-1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇(2.7g)。

[1429] 步骤3.外消旋(顺式)(3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇303的制备

[1430] 向((3R,4S)-1-苄基-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇(10g,40mmol)于甲醇(10mL)中的溶液中添加湿的活性炭载10%钯(1g)。将溶液在氢气氛下剧烈搅拌16小时。完成后,将溶液通过Celite过滤并浓缩至干燥以得到呈无色固体的((3R,4S)-3,4-二甲基吡咯烷-3,4-二基)二甲醇(5.5g,86%)。

[1431] 步骤4.外消旋(顺式)10-(3,4-双(羟甲基)-3,4-二甲基吡咯烷-1-基)-10-氧代癸酸甲酯304的制备

[1432] 将3 (1.3g, 8.2mmol) 和癸二酸单甲酯 (1.8g, 8.2mmol) 于 CH_2Cl_2 (100mL) 中的溶液用HBTU (3.41g, 9.02mmol) 和休尼格碱 (5.71mL, 32.8mmol) 处理。搅拌过夜后, 将混合物用 NaHCO_3 (饱和水溶液)、水和盐水洗涤, 然后干燥 (MgSO_4)、过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法 (梯度: 0% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 至20%) 以产生4 (1.8g, 61%)。

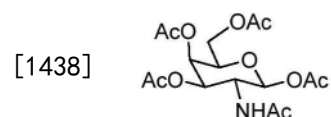
[1433] 步骤5. 外消旋 (顺式) 10- (3- ((双 (4-甲氧基苯基) (苯基) -甲氧基) 甲基) -4- (羟甲基) -3,4-二甲基吡咯烷-1-基) -10-氧代癸酸甲酯305的制备

[1434] 将304 (1.8g, 5.0mmol) 和4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (1.7g, 5.0mmol) 于吡啶 (180mL) 中的溶液搅拌过夜。然后在减压下除去吡啶并使粗物质经受色谱法 (梯度: 0% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 至10%) 以产生呈黄色油状物的5 (1.4g, 42%)。

[1435] 步骤6. 外消旋 (顺式) 10- (3- ((双 (4-甲氧基苯基) - (苯基) 甲氧基) 甲基) -4- (羟甲基) -3,4-二甲基吡咯烷-1-基) -10-氧代癸酸锂306的制备

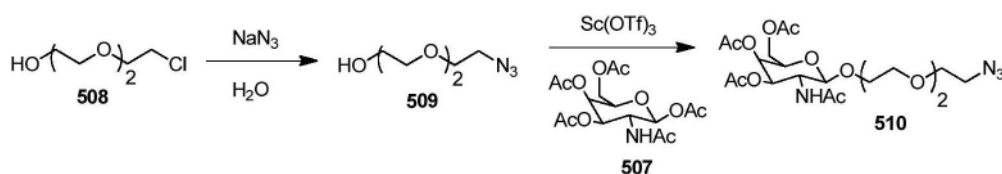
[1436] 向化合物305 (3.0g, 4.6mmol) 于THF (50mL) 和水 (50mL) 中的溶液中添加氢氧化锂 (121mg, 5.0mmol)。将溶液在室温下搅拌4小时, 然后浓缩以除去THF。将剩余的水溶液冷冻干燥过夜以得到浅粉色固体 (2.9g, 定量)。将化合物306制备为两种顺式-非对映异构体的混合物。

[1437] 方案57全乙酰化半乳糖胺507的合成

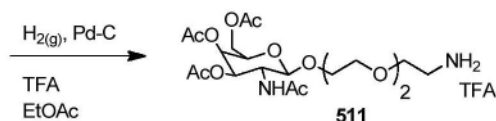


[1439] 用乙酸酐 (1.25L, 13.2mol) 将于吡啶 (1.5L) 中的半乳糖胺盐酸盐 (250g, 1.16mol) 处理45分钟。搅拌过夜后, 将反应混合物分成三个1L部分。将每个1L部分倾倒至3L冰水中并混合1小时。混合后, 将固体滤掉, 合并, 经液氮冷冻, 并且然后冻干5天以产生呈白色固体的全乙酰化半乳糖胺507 (369.4g, 82%)。Rf (0.58, 10% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。

[1440] 方案58Gal1NAc单体的合成



[1441]



[1442] 步骤1化合物509的制备

[1443] 将2-[2-(2-氯乙氧基)]乙醇508 (100g, 593mmol) 于水 (1L) 中的溶液用 NaN_3 (77g, 1.19mol) 处理并加热 (90°C)。搅拌 (72小时) 后, 使溶液冷却 (室温) 并用 CH_2Cl_2 萃取 (4x)。将合并的有机物用盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4)、过滤, 浓缩且不经进一步处理即使用。获得呈浅黄色油状物的化合物509 (88.9g, 86%)。

[1444] 步骤2化合物510的制备

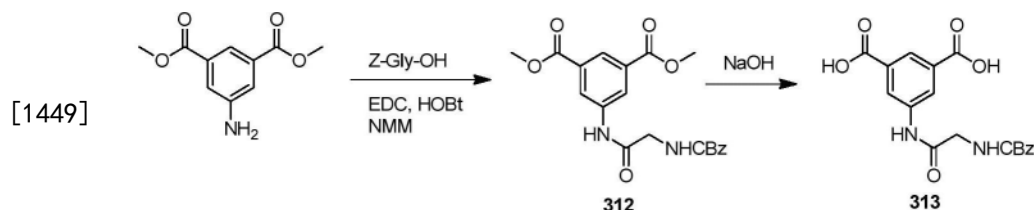
[1445] 将507 (2.76g, 7.1mmol) 和509 (1.37g, 7.8mmol) 于1,2-二氯乙烷 (40mL) 中的溶液用 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (174mg, 0.36mmol) 处理并加热 (85°C)。搅拌 (2小时) 后, 使混合物冷却 (室温) 并通过添加TEA (4mL) 淬灭并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈浅黄色泡沫的510 (3.03g,

85%)。

[1446] 步骤3化合物511的制备

[1447] 将510 (3.02g, 5.99mmol) 和Pd/C (300mg, 10%Pd负载-湿载体) 于EtOAc (30mL) 中的溶液用TFA (576 μ L, 7.5mmol) 处理。将反应混合物用氢气吹扫 (45分钟), 然后用氮气吹扫 (10分钟), 然后通过celite过滤。将滤液浓缩, 并且然后使其经受色谱法以产生呈褐色泡沫的511 (2.67g, 75%)。

[1448] 方案59芳族核心的合成



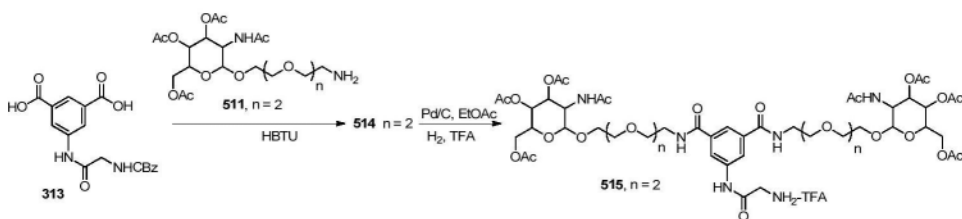
[1450] 步骤1. 5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸二甲酯312的制备

[1451] 将5-氨基间苯二甲酸二甲酯 (5g, 24mmol)、Z-Gly-OH (5g, 24mmol)、EDC (5g, 26.3mmol)、HOBT (3.6g, 26.3mmol)、NMM (2.9mL, 26.3mmol) 于DMF (50mL) 中的溶液在室温下搅拌过夜。完成后, 将反应混合物用乙酸乙酯 (250mL) 稀释并用各1M HCl (2x 100mL)、饱和碳酸氢钠 (1x 100mL) 和盐水 (2x 100mL) 洗涤。在硫酸镁上干燥, 过滤并浓缩至干燥以得到呈无色固体的5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)-乙酰胺基)-间苯二甲酸二甲酯 (7.2g, 79%)。

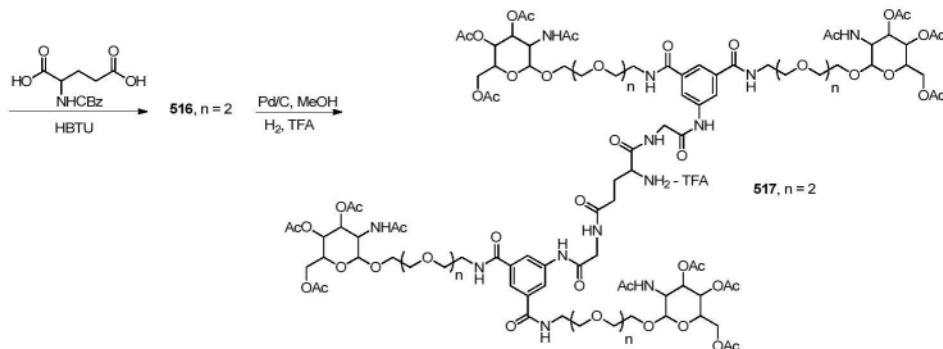
[1452] 步骤2. 5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸313的制备

[1453] 向5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸二甲酯 (7.2g) 于甲醇 (25mL) 和THF (25mL) 中的溶液中添加1M NaOH (25mL)。将溶液在室温下搅拌2小时, 然后浓缩以除去THF和MeOH。将剩余的水溶液用水 (75mL) 稀释, 在冰水浴上冷却, 并用6M HCl 酸化至pH=1。将固体过滤并用水 (3x 100mL) 洗涤。将固体冷冻干燥以得到5-((2-((2-氧代基-2-苯基-1 λ^2 -乙基)氨基)乙酰胺基)-间苯二甲酸 (6.9g, 定量)。

[1454] 方案60: 四聚体的制备



[1455]



[1456] 步骤1化合物514的制备

[1457] 将313 (2.09g, 5.6mmol) 和511 (8.34g, 14.07mmol) 于 CH_2Cl_2 (150mL) 中的溶液用HBTU (6.4g, 16.9mmol) 和依尼格碱 (7.35mL, 42.2mmol) 处理。搅拌(过夜)后,将反应混合物倾倒入 NaHCO_3 (饱和水溶液) 中,然后用水和盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法(梯度1-12% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$) 以产生呈浅黄色泡沫的6 (3.97g, 55%)。

[1458] 步骤2化合物515的制备

[1459] 将化合物514 (3.92g, 3.07mmol)、Pd/C (400mg, 10% 负载-湿载体) 和三氟乙酸 (308 μL , 4mmol) 用 H_2 吹扫。在 H_2 下搅拌(过夜)后,将混合物用 N_2 吹扫(15-20分钟),然后通过celite过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈白色至奶油色泡沫的7 (3.36g, 86%)。

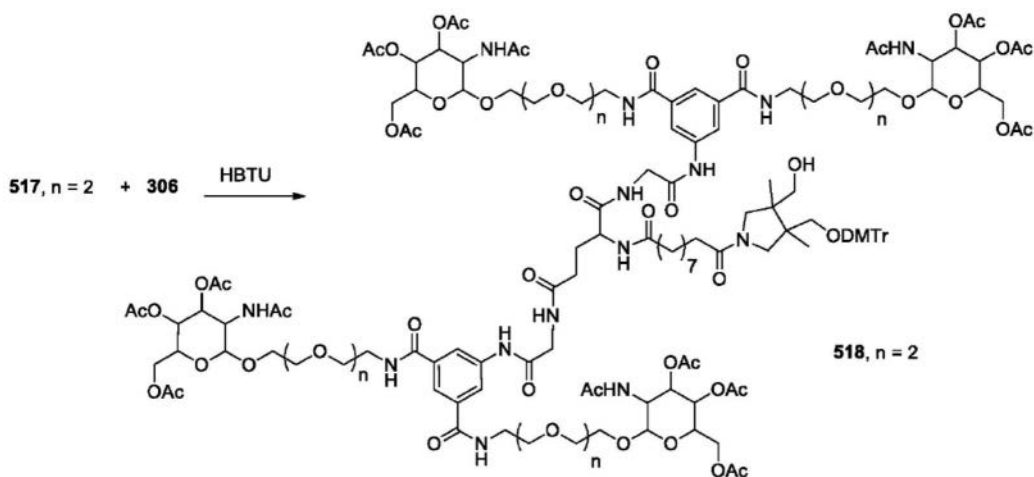
[1460] 步骤3化合物516的制备

[1461] 以与514相同的方式从Z-谷氨酸 (306mg, 1.09mmol) 和515 (3.3g, 2.6mmol) 制备化合物516。产率1.66g, 60%。

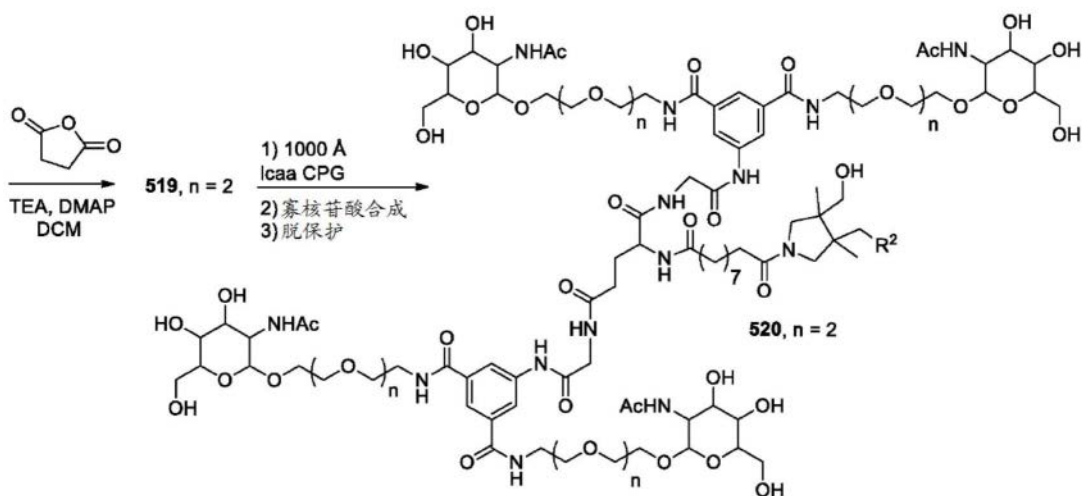
[1462] 步骤4化合物517的制备

[1463] 以与515相同的方式制备化合物517。产率1.65g, 定量。

[1464] 方案61完全缀合物的制备



[1465]



[1466] 步骤1化合物518的制备

[1467] 将517 (1.91g, 0.75mmol) 于 CH_2Cl_2 (100mL) 中的溶液首先用休尼格碱 (392 μL , 2.25mmol)、然后306 (两种顺式-非对映异构体的混合物, 509mg, 0.79mmol)、随后HBTU (356mg, 0.94mmol) 处理。搅拌 (过夜) 后, 将溶液倾倒至 NaHCO_3 (饱和水溶液) 中, 然后用水和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并浓缩。使粗物质经受色谱法以产生呈白色泡沫的518 (1.19g, 52%)。

[1468] 步骤2化合物519的制备

[1469] 将518 (1.19g, 0.39mmol) 于1,2-二氯乙烷 (100mL) 中的溶液用TEA (542 μL , 3.9mmol)、DMAP (238mg, 1.95mmol) 和琥珀酸酐 (195mg, 1.95mmol) 处理并加热 (85 $^\circ\text{C}$)。搅拌 (2.5小时) 后, 将溶液自热移除, 并且用 CH_3OH (10mL) 处理且使其搅拌 (1小时)。搅拌后, 将混合物倾倒至 NaHCO_3 (饱和水溶液) 中, 然后用盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并浓缩。所获得的残余物不经进一步处理即使用。产率=1.4g, 定量

[1470] 步骤3缀合物520的制备

[1471] 使用标准酰胺偶联化学, 将琥珀酸酯519负载至 1000Å LCAA (长链氨基烷基) CPG (可控多孔玻璃) 上。将二异丙基碳二亚胺 (52.6 μmol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (0.3mg, 2.6 μmol) 和吡啶 (10 μL) 于无水乙腈 (0.3mL) 中的溶液添加至于无水二氯甲烷 (0.2mL) 中的519 (20.6mg, 8 μmol) 中。将此混合物添加至LCAA CPG (183mg) 中。将悬浮液在室温下轻轻混合过

夜。519消失 (HPLC) 后,将反应混合物过滤并将CPG用各1mL二氯甲烷、乙腈、5%乙酸酐/5% N-甲基咪唑/5%吡啶于THF中的溶液、然后THF、乙腈和二氯甲烷洗涤。然后将CPG在高真空下干燥过夜。通过标准DMTr测定通过UV/Vis (504nm) 测得负载为19 μ mol/g。将所得GalNAc负载的CPG固体载体用于使用标准程序的自动寡核苷酸合成中。进行核苷酸脱保护,随后从固体载体除去(同时进行乙酸半乳糖胺脱保护)得到GalNAc-寡核苷酸缀合物520。

[1472] 实施例28.TTR siRNA缀合物的体内测试

[1473] 在TTR敲低的野生型小鼠模型中测试化合物320 (其中R²包含表3中所述的修饰的TTR siRNA) 的体内活性。在本实施例中,证明化合物320 (其中R²包含修饰的TTR siRNA) 是用于TTR (甲状腺素运载蛋白) 淀粉样变性的罕见疾病的可能治疗。在罹患这种疾病的那些患者中,甲状腺素运载蛋白的错误折叠和聚集与疾病进展相关。通过使用这种siRNA-GalNAc缀合物,可减少患者中错误折叠/聚集的蛋白质的量,其中可能的结果是疾病进展停止。因此,某些实施方案提供化合物320 (其中R²包含修饰的TTR siRNA) 及其用于治疗甲状腺素运载蛋白淀粉样变性的用途。

[1474] 表3.化学修饰的TTR siRNA双链体

siRNA 编号	有义链 SEQ ID NO	有义链 5' - 3'	反义链 SEQ ID NO	反义链 5' - 3'
[1475] 40	SEQ ID NO:75	<u>As</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>C</u> <u>a</u> <u>G</u> <u>u</u> <u>G</u> <u>u</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>u</u> <u>G</u> <u>c</u> <u>U</u> <u>c</u> <u>U</u> <u>a</u> <u>U</u> <u>a</u> <u>A</u>	SEQ ID NO:76	<u>u</u> <u>s</u> <u>U</u> <u>s</u> <u>a</u> <u>U</u> <u>a</u> <u>G</u> <u>a</u> <u>G</u> <u>c</u> <u>A</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>a</u> <u>A</u> <u>c</u> <u>A</u> <u>c</u> <u>U</u> <u>g</u> <u>U</u> <u>u</u> <u>s</u> <u>u</u>

[1476] 2'-O-甲基核苷酸=小写字母;2'-氟核苷酸=大写字母;硫代磷酸酯接头=s;未修饰的=大写字母

[1477] TTR siRNA序列和动物模型两者是如Nair等人,J.Am.Chem.Soc.,36(49),16958-16961(2014)所描述。所有动物相关的程序都是根据书面操作程序、根据加拿大动物保护委员会(CCAC)的良好动物实践指南实施且由地方机构动物照护和使用委员会(IACUC)批准。

[1478] siRNA处理:在第0天经由在肩胛区中进行皮下注射,向雌性C57BL/6小鼠(n=4只)一次施用单次2mg/kg剂量的化合物320 (R²包含修饰的TTR siRNA) (每只动物1个剂量)。一组仅施用媒介物(PBS)的动物用作对照。

[1479] 收集:在测试物品施用后的确定时间点(在第2、4、7、9、14和21天)对所有动物进行放血测试以测定血浆TTR水平的最大降低和药理学活性的持续时间。

[1480] 分析:使用Abnova Prealbumin(Mouse)ELISA试剂盒(Cedar Lane,目录号KA2070)根据制造商的说明书,测定血浆样品中的TTR蛋白质水平。计算个别血浆样品的TTR血浆蛋白值并测定每一组的平均值。根据所述平均值,确定相对于对照的TTR蛋白质水平(相对于PBS处理的动物的%)。

[1481] 结果:测试结果呈现于表4中。值代表治疗后第2、4、7、9、14和21天的TTR蛋白质水平%(相对于PBS对照)。

[1482] 表4.单次皮下施用(2mg/kg)来自表3的GalNAc缀合的siRNA之后小鼠中的血浆TTR蛋白质水平。TTR蛋白质数据表示为PBS处理的小鼠值的百分比

[1483]	siRNA 编号	配体化合 物编号	第 2 天	第 4 天	第 7 天	第 9 天	第 14 天	第 21 天
	40	320	36.6	15.7	17.2	17.7	36.9	59.2

[1484] 结论:用化合物320(其中R²包含表3中所述的修饰的TTR siRNA)处理的动物展现靶mRNA和蛋白质的显著敲低,其中在皮下注射后第4天与第9天之间出现TTR蛋白质的最大敲低。

[1485] 实施例.29.HBV siRNA缀合物的体内测试

[1486] 在所确立的HBV感染小鼠模型中测试缀合至GalNAc配体的描述于实施例25中表1中的化学修饰的HBV siRNA的体内活性。在AAV-HBV1.2 C57BL/6小鼠模型中,在注射编码HBV的超基因组长度序列的腺相关病毒(AAV)载体后实现稳定且持久的HBV表达,从而导致肝脏表达HBV RNA和蛋白质以及将病毒和亚病毒粒子分泌至血液中。

[1487] 用于这些研究中的AAV-HBV1.2构建体是基于Dion等人,Journal of Virology,87(10),5554-5563(2013)中提供的细节。所有动物相关的程序都是根据书面操作程序、根据加拿大动物保护委员会(CCAC)的良好动物实践指南实施且由地方机构动物照护和使用委员会(IACUC)批准。

[1488] 利用AAV-HBV1.2载体的1E11载体基因组(VG)对每只动物进行接种。在处理之前,对所有动物进行放血测试并测定个别动物的血清HBsAg水平,以证实所确立的HBV表达。

[1489] siRNA处理:在第0天经由在肩胛区中进行皮下注射,向小鼠(通常n=5只)的组一次施用单次3mg/kg剂量的HBV siRNA缀合物(每只动物1个剂量)。一组仅施用媒介物(盐水)的动物用作对照。

[1490] 收集:在第0天、治疗前和测试品施用后的确定时间点(例如在研究第7、14、21、28、42、56和70天)对所有小鼠进行放血测试以测定血清HBsAg水平的最大降低和药理学活性的持续时间。

[1491] 分析:使用Biorad EIA GS HBsAg 3.0试剂盒(BioRad,目录号32591)根据制造商的说明书,测定血清样品中的HBsAg水平。使用来自每一处理组的汇集血清来测定个别时间点的组平均HBsAg水平。分析数据并将其表示为相对于治疗前基线的HBsAg水平(相对于第0天的%)。

[1492] 结果:测试表1中所述的每一化学修饰的HBV siRNA的结果呈现于表5中。值代表治疗后第7、14、21、28、42、56和70天的HBsAg水平%(相对于第0天基线)。

[1493] 表5.单次皮下施用(3mg/kg)来自实施例25中表1的GalNAc缀合的siRNA之后小鼠中的血清HBsAg水平。HBsAg数据表示为基线(第0天)值的百分比

siRNA 编号	配体 化合物编 号	第7天	第14 天	第21 天	第28 天	第42 天	第56 天	第70 天	
[1494]	2	194	7.0	4.1	4.2	5.6	10.1	17.2	29.5
	3	194	5.8	2.4	1.8	2.3	4.6	10.6	12.9
	3	191a	1.7	0.3	0.3	0.3	0.5	0.9	2.3
	3	320	3.1	0.5	0.5	0.5	0.8	1.6	3.6
	4	194	5.5	3.1	3.2	4.4	6.0	9.5	16.2
	20	231	5.3	2.2	1.9	3.4	4.8	9.8	17.4
	20	320	2.6	1.0	1.1	1.3	3.1	6.4	
	25	191a	1.9	0.2	0.2	0.3	0.5	1.1	1.8
	25	320	1.1	0.1	0.3	0.4	1.4	2.9	3.5
	[1495]	26	194	10.4	3.2	2.7	3.0	4.0	6.3
31		194	13.3	7.0	8.0	11.7	17.7	25.6	36.7
32		194	13.7	5.7	8.2	11.6	16.6	25.0	46.5
33		194	14.4	8.0	10.8	14.4	24.3	41.8	65.2

[1496] 所测试的13种化合物中的每一种在单次剂量的皮下施用的处理后引起血清HBV表面抗原减少,其中在第14天或21天获得最大效应。显示最大减少的四种化合物是化合物191a(其中寡核苷酸包含siRNA 3或25)和化合物320(其中R²包含siRNA 3或25)。这四种化合物由于在第一时间点(第7天)更快速地减少($\geq 97\%$)、更大的最大减少($\geq 99\%$)和更持久的减少效应(在治疗后8周第56天,仍然 $\geq 97\%$)而显著。

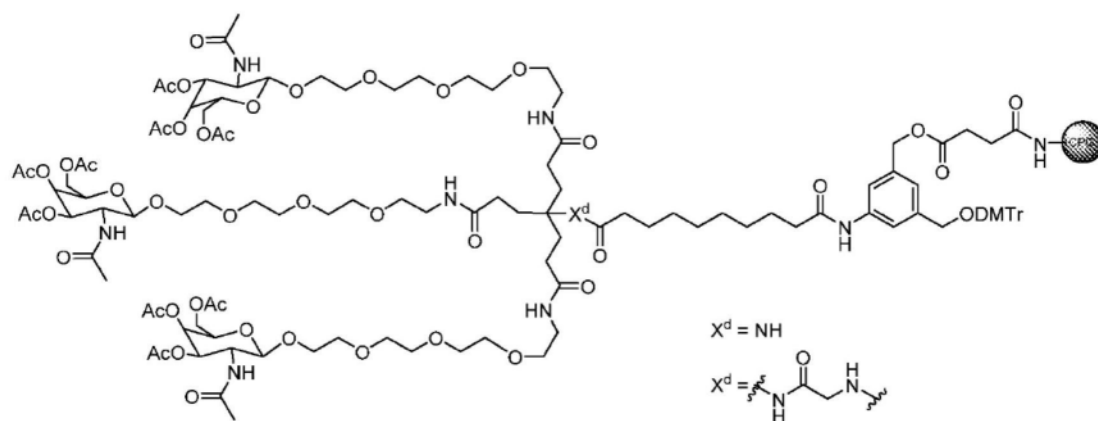


图1:式Ie的中间体化合物,其中靶向配体/接头结合至固相载体,并且其中Pg1是保护基团DMTr。

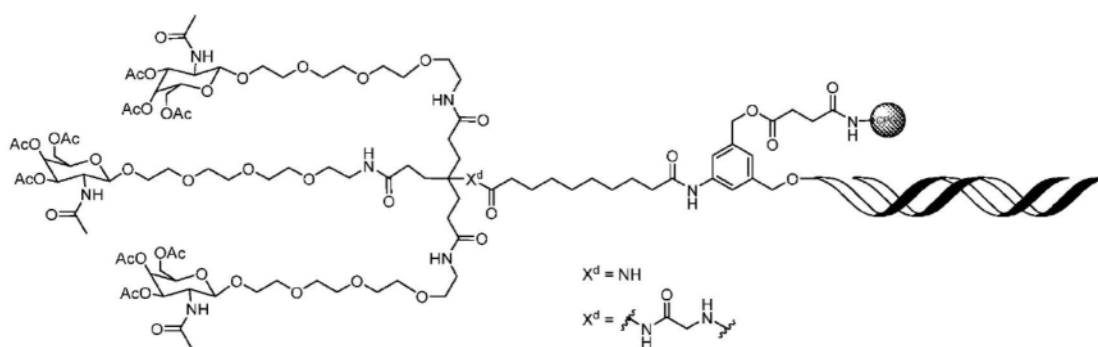


图2:式Id的代表性化合物,其中靶向配体结合至固相载体,其共价结合有寡核苷酸。

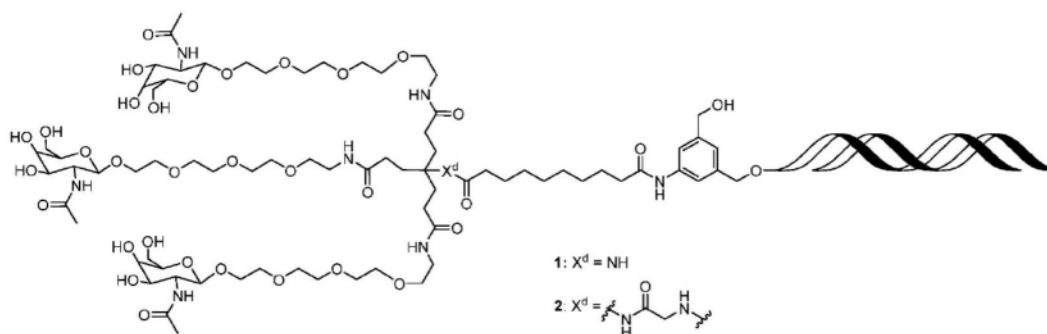


图3:式Id的代表性化合物,其中靶向配体-寡核苷酸缀合物已从固相载体裂解并且脱保护。