

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991661 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2018.01.09

(51) Int. Cl. *A61K 47/55* (2017.01)
C07J 1/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛ

(31) 62/443,822

(32) 2017.01.09

(33) US

(86) PCT/IL2018/050031

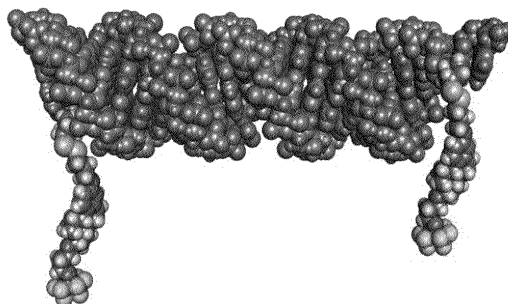
(87) WO 2018/127927 2018.07.12

(71) Заявитель:
АПОСЕНС ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
Цив Илан, Дубровски Йозеф,
Гримберг Хадит (IL)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Предложена система для доставки лекарственных средств и особенно генетических лекарственных средств, таких как миРНК или антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), через биологические мембраны. Она содержит группировку трансмембранной доставки, снабжаемую энергией внутреннего мембранного электрического поля, и редокс-чувствительную дисульфидную группировку, предназначенную для восстановления в цитоплазме, таким образом, высвобождая лекарственное средство-груз для оказания его фармацевтических эффектов в его сайтах-мишенях.



A1

201991661

201991661

A1

СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Данное изобретение относится к соединениям, системе доставки и способам доставки молекул и макромолекул через биологические мембраны в клетки, предназначенным для применений *in vitro* и *in vivo*; среди прочих – в клинических условиях.

10 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

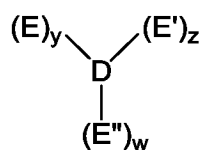
Одним из главных научных успехов последних лет является завершение картирования человеческого генома, которое дало многочисленные новые мишени для лекарственной терапии. Многие из данных мишеней являются
15 внутриклеточными, и потребность должна удовлетворяться макромолекулярными лекарственными средствами, такими как генетические материалы или белки. В частности, интригующей в данной сфере является недавно открытая способность осуществлять сайленсинг экспрессии специфических генов посредством РНК-интерференции с использованием малой интерферирующей РНК (миРНК). РНК-интерференция основывается на использовании коротких (примерно 19-27 пар оснований) последовательностей двухцепочечных РНК (обозначенных миРНК), способных действовать, совместно с клеточными биологическими системами [среди прочих, с комплексом белка дайсер, который расщепляет более длинные двухцепочечные РНК с образованием миРНК; и с комплексом РНК-индуцированного сайленсинга (RISC)], ингибируя трансляцию и маркируя деградацию специфических последовательностей мРНК, таким образом, ингибируя экспрессию генов на стадии трансляции. Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), представляющие собой короткие последовательности (обычно 13-25 нуклеотидов) немодифицированных или химически модифицированных молекул ДНК, комплементарных специфической
25 матричной РНК (мРНК), также использовали для ингибирования экспрессии и блокировки продукции специфических связанных с заболеванием белков-мишеней. Другими макромолекулярными лекарственными средствами, которые служат для нацеливания на новые внутриклеточные мишени, являются белковые лекарственные средства. Однако, несмотря на огромную потенциальную пользу таких подходов для медицинской помощи, доставка таких макромолекул в клетки
30 остается значительным вызовом из-за относительно больших и высокозаряженных

структур олигонуклеотидов. Например, миРНК имеет среднюю молекулярную массу 13 кДа, и она несет 40-50 отрицательно заряженных фосфатных групп. В самом деле, трансмембранная доставка олигонуклеотидов требует преодоления очень большого энергетического барьера. Следовательно, имеется неудовлетворенная
 5 потребность в новых средствах доставки макромолекулярных лекарственных средств через биологические мембраны: как *in vitro*, так и *in vivo*.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Данное изобретение сосредоточено на конъюгатах и их предшественниках, содержащих макромолекулярные лекарственные средства, такие как миРНК, связанные с новой системой молекулярной доставки. Эта новая система, в частности, перспективна для доставки генетических лекарственных средств, таких как миРНК или антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), через биологические
 15 барьеры, такие как фосфолипидные клеточные мембраны. Эта новая система доставки содержит трансмембранную группировку для доставки, снабжаемую энергией внутреннего мембранного электрического поля, и редокс-чувствительную дисульфидную группировку, сконструированную для восстановления в цитоплазме, таким образом, высвобождая груз лекарственного средства для оказания его
 20 фармацевтических эффектов в его сайтах-мишенях. Она работает как в присутствии, так и в отсутствие белков плазмы.

В одном воплощении данного изобретения предложены конъюгаты, имеющие структуры, заданные **Формулой (I)**:



25

Формула (I)

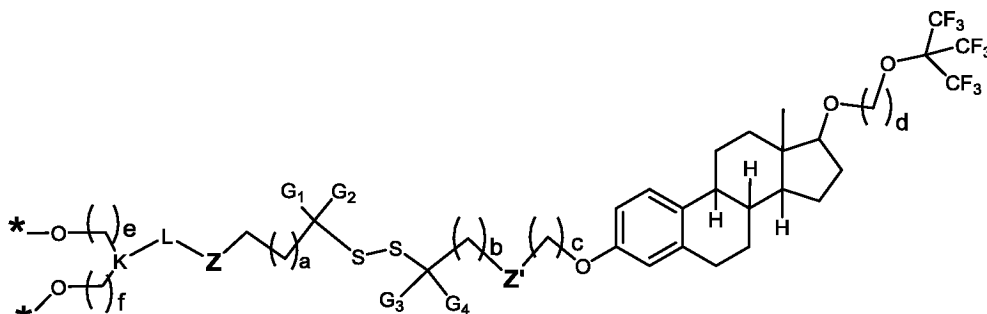
включающей фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (I)**, сольваты и гидраты данных солей, где

D представляет собой лекарственное средство, подлежащее доставке через
 30 биологические мембраны, выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного средства, пептида, белка и нативной или модифицированной, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК или АСО;

каждый из *y*, *z* и *w* представляет собой целое число, независимо выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где каждый раз, когда целое число равно 0, это означает, что

соответствующая группировка E отсутствует; по меньшей мере один из y, z и w отличен от 0:

Е, Е' или Е'' могут быть одинаковыми или разными, причем каждая независимо имеет структуру, заданную общей **Формулой (II)**:



(Формула II)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (II)**, сольваты и гидраты данных солей, где:

10 G_1, G_2, G_3 и G_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, метила или этила; по меньшей мере две группы G представляют собой водород;

Z и **Z'** каждый независимо выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы; $-\text{CH}_2-$; $-\text{NH}-$; $-\text{N}(\text{R}')-$; $-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_2)_n[\text{N}(\text{R}'')(\text{R}''')]-$; $-\text{N}(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-$ **15** $\text{C}(\text{H})(\text{CH}_2)_n[\text{N}(\text{R}'')(\text{R}''')]-$; где каждый из **R'**, **R''** и **R'''** независимо выбран из группы, состоящей из водорода, C_1 , C_2 , C_3 , C_4 алкила; или C_1 , C_2 , C_3 , C_4 алкиламина, где данный амин представляет собой первичный, вторичный или третичный амин; **n** обозначает целое число 0, 1, 2, 3, 4; где **n**, равный 0, означает отсутствие; по меньшей мере один из **Z** или **Z'** представляет собой амин;

20 L представляет собой линкер, выбранный из отсутствующего линкера; простого эфира, амида; сложного эфира; карботата; карбаматной группы(групп); одной или двух углеводородных цепей, причем каждая содержит 1-4 атома углерода, являющихся возможно замещенными гидроксильной или аминогруппой(группами); или любой их комбинации;

25 К выбран из отсутствующей группы, -CH- и -N-;

a представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

b представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

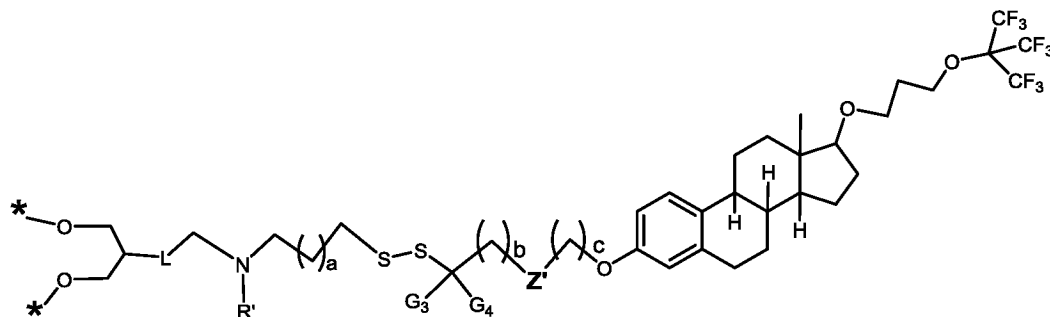
c представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3 и 4;

d представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2, 3 и 4;

5 каждый из **e**, **f** представляет собой целое число, независимо выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2 и 3;

* выбран из группы, состоящей из водорода; точки связывания с **D**; точки связывания с защитной группой спирта; точки связывания с фосфатом, сульфатом или карбоксильной группой и точки связывания с твердой подложкой.

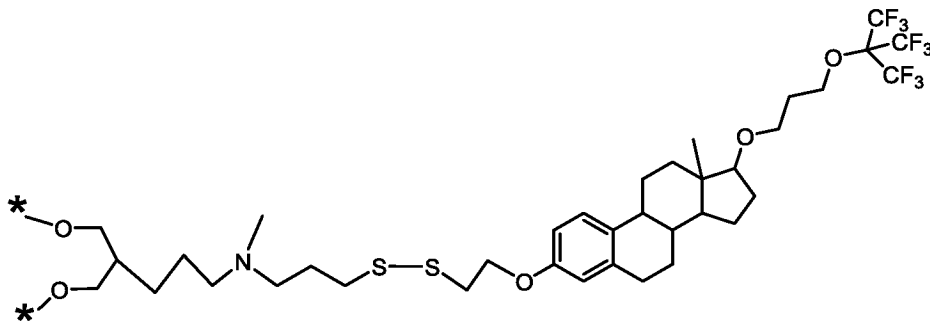
10 В другом воплощении предложен конъюгат согласно **Формуле (I)**, в котором по меньшей мере одна из **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, заданную **Формулой (III)**:



Формула (III)

15 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (III)**, сольваты и гидраты данных солей, где каждый из **Z'**, **R'**, **L**, **G₃**, **G₄**, **a**, **b**, **c** и * является таким, как определено в **Формуле (II)**.

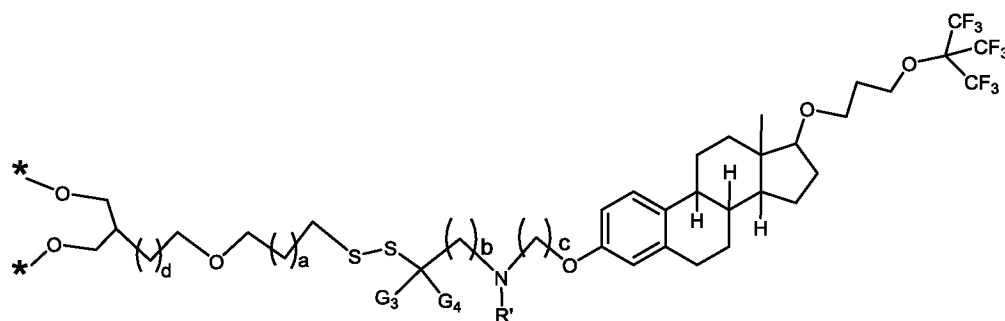
20 В другом воплощении предложен конъюгат согласно **Формуле (III)**, в котором по меньшей мере одна из **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, заданную **Формулой (V)**:



(Формула V)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (V)**, сольваты и гидраты данных солей.

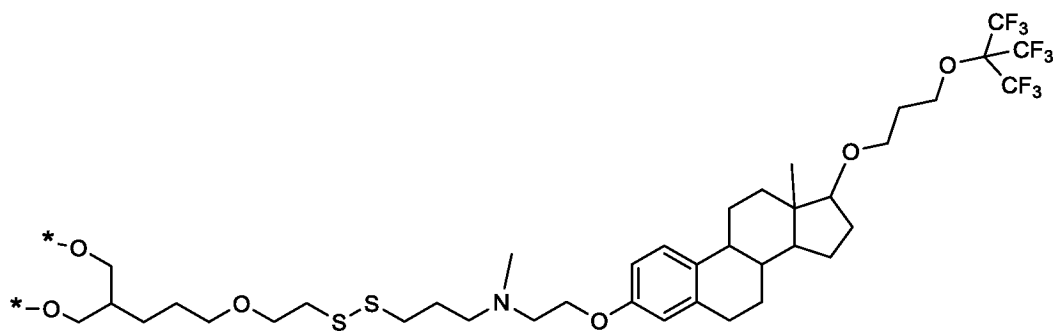
В еще одном другом воплощении изобретения предложен конъюгат согласно **Формуле (I)**, в котором по меньшей мере одна из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулой (VI)**:



Формула (VI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (VI)**, сольваты и гидраты данных солей, где каждый из R' , G_3 , G_4 , a , b , c , d и * является таким, как определено в **Формуле (II)**.

В более конкретных воплощениях предложен конъюгат согласно **Формуле (VI)**, в котором по меньшей мере одна из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулами (VII) или (VIIa)**:



(Формула VII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты
5 металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (VII)** или
(VIIa), сольваты и гидраты данных солей, группировка **E** согласно **Формуле (VII)**
обозначена **Apo-Si-K-93-A**.

COc1ccc2c(c1)C3CC4C(C2)C(C3)OC4C(C)(C)OCCOC(F)(F)FCOCCN(C)CCCCSSCCCCCOCC(CO*)CCO*

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (VIII)** или **(VIIIa)**, сольваты и гидраты данных солей. Группировка **Е** согласно **Формуле (VIIIa)** обозначена **Apo-Si-K-63-A**.

Некоторые воплощения данного изобретения относятся к способу доставки лекарственного средства через биологическую мембрану в клетки, либо *in vitro*, либо *in vivo*, причем данный способ включает приведение клеток в контакт с конъюгатом, как описано в данном документе.

5 Другое воплощение относится к способу лечения медицинского расстройства у нуждающегося пациента; причем данный способ включает введение нуждающемуся пациенту, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат, как описано в данном документе.

10 Другое воплощение данного изобретения относится к конъюгату, как описано в данном документе, для применения в медицинской практике, например, в человеческой или ветеринарной медицине.

Другое воплощение данного изобретения относится к применению одной или более группировок E, E' или E'', заданных **Формулами (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)** и лекарственного средства для получения конъюгата, как описано в данном документе, для лечения медицинского расстройства у пациента, нуждающегося в этом. Другое воплощение данного изобретения относится к применению конъюгата, как описано в данном документе, в получении лекарственного средства для лечения медицинского расстройства у

15 (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa) и лекарственного средства для получения конъюгата, как описано в данном документе, для лечения медицинского расстройства у пациента, нуждающегося в этом. Другое воплощение данного изобретения относится к применению конъюгата, как описано в данном документе, в получении лекарственного средства для лечения медицинского расстройства у

20 пациента, нуждающегося в этом. В некоторых воплощениях данного изобретения медицинское расстройство представляет собой рак. В других воплощениях конъюгат будет иметь противoinфекционные свойства и, таким образом, будет полезным для лечения инфекционных заболеваний, таких как бактериальные или вирусные инфекции.

25

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1a, 1b и 1c демонстрируют следующее: на **Фиг. (1a)** показан конъюгат по изобретению, содержащий две группировки E, причем каждая расположена на 5'-

30 конце нити дуплекса миРНК; на **Фиг. (1b)** показан конъюгат при его взаимодействии с мембраной, с миРНК, находящейся параллельно поверхности мембраны, в положении для индукции деформации и структурных пертурбаций наружного листка мембраны; на **Фиг. (1c)** показан эндоцитоз, индуцированный конъюгатом, как следствие деформации и структурных пертурбаций. Стрелки демонстрируют

35 примеры эндоцитозных везикул.

Фиг. 2a, 2b, 2c и 2d демонстрируют примеры структуры конъюгата миРНК по изобретению, содержащего три группировки E. На **Фиг. (2a)** показан интактный конъюгат во внеклеточном пространстве; на **Фиг. (2b)** продемонстрировано расщепление группировок E при восстановительных условиях в цитоплазме; на **Фиг. (2c)** продемонстрировано расщепление дуплекса РНК с превращением в 21/23-нуклеотидный дуплекс, также удаляя, посредством этого остаточную группировку проводника; на **Фиг. (2г)** продемонстрировано удаление сопровождающей цепи хеликазой с двумя остаточными обрубками группировок E, с высвобождением цепи-проводника, готовой для доставки в интактном состоянии в комплекс RISC.

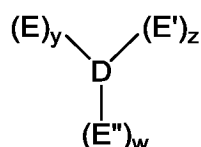
На **Фиг. 3** продемонстрированы связанные с белком и не содержащие белка фракции (стрелка) при инкубации конъюгатов по изобретению с 10% BSA. Обработка протеиназой K (PK) удаляла все конъюгаты, связанные с белком.

На **Фиг. 4** продемонстрировано восстановительное расщепление конъюгатов по изобретению (стрелка) при инкубации с восстановленным глутатионом (1 mM в течение 2 часов).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение сосредоточено на конъюгатах и их предшественниках, содержащих макромолекулярные лекарственные средства, такие как, без ограничения, олигонуклеотиды, которые в некоторых воплощениях могут представлять собой миРНК, связанную с системой молекулярной доставки, сконструированной для доставки лекарственных средств через биологические мембраны и биологические барьеры. Эта новая система доставки содержит группировку для трансмембранной доставки, снабжаемую энергией внутреннего мембранного электрического поля, и редокс-чувствительную дисульфидную группировку, сконструированную для восстановления в цитоплазме, таким образом, высвобождая груз лекарственного средства для оказания его фармацевтических эффектов в его сайтах-мишенях. Она работает как в присутствии, так и в отсутствие белков плазмы.

В одном воплощении изобретения предложены конъюгаты, имеющие структуру, заданную **Формулой (I)**:



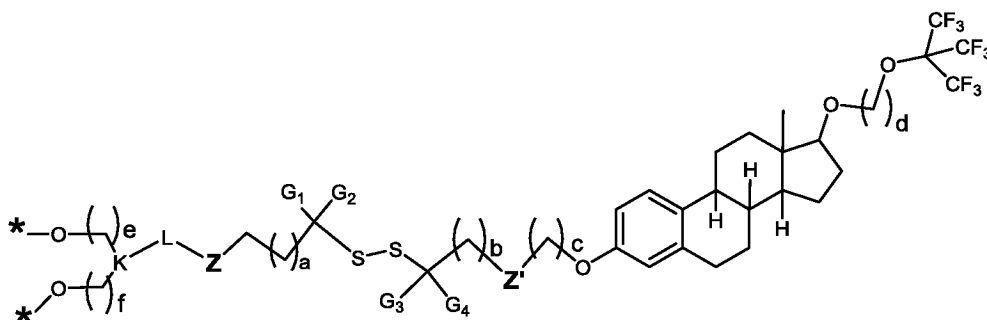
Формула (I)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (I)**, сольваты и гидраты данных солей, где

5 **D** представляет собой лекарственное средство, подлежащее доставке через биологические мембраны, выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного средства, пептида, белка и нативной или модифицированной, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК или АСО;

каждый из **y**, **z** и **w** представляет собой целое число, независимо выбранное
10 из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где каждый раз, когда целое число равно 0, это означает то, что соответствующая группировка **E** отсутствует; по меньшей мере один из **y**, **z** и **w** отличен от 0;

E, **E'** или **E''** могут быть одинаковыми или разными, причем каждая независимо имеет структуру, заданную общей **Формулой (II)**:



15

(Формула II)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (II)**, сольваты и гидраты данных солей, где:

20 **G**₁, **G**₂, **G**₃ и **G**₄ каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, метила или этила; по меньшей мере две группы **G** представляют собой водород;

Z и **Z'** каждый независимо выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы; -CH₂-; -NH-; -N(R')-; -C(H)(CH₂)_n[N(R'')(R''')]-; -N(R')-C(O)-
25 C(H)(CH₂)_n[N(R'')(R''')]-; где каждый из **R'**, **R''** и **R'''** независимо выбран из группы, состоящей из водорода, C₁, C₂, C₃, C₄алкила; или C₁, C₂, C₃, C₄алкиламина, где данный амин представляет собой первичный, вторичный или третичный амин; **n** обозначает целое число 0, 1, 2, 3, 4; где **n**, равный 0, означает отсутствие; по меньшей мере один из **Z** или **Z'** представляет собой амин;

L представляет собой линкер, выбранный из отсутствующего линкера; простого эфира, амида; сложного эфира; карботата; карбаматной(ных) группы(групп); одной или двух углеводородных цепей, причем каждая содержит 1-4 атома углерода, являющихся возможно замещенными гидроксильной(ными) или

5 аминокгруппой(группами); или любой их комбинации;

K выбран из отсутствующей группы, -CH- и -N-;

a представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

b представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

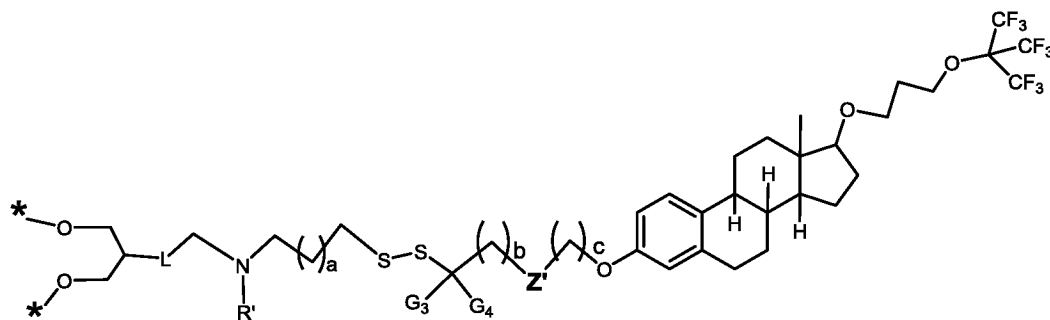
c представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3 и 4;

d представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2, 3 и 4;

15 каждый из e, f представляет собой целое число, независимо выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2 и 3;

* выбран из группы, состоящей из водорода; точки связывания с D; точки связывания с защитной группой спирта; точки связывания с фосфатом, сульфатом или карбоксильной группой и точки связывания с твердой подложкой.

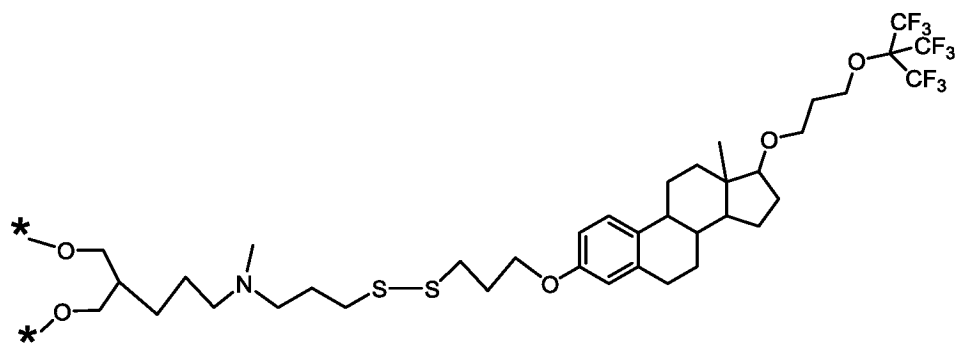
20 В другом воплощении предложен конъюгат согласно **Формуле (I)**, в котором по меньшей мере одна из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулой (III)**:



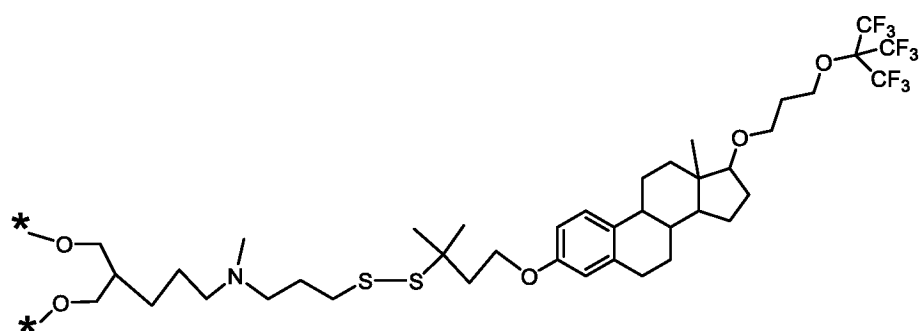
Формула (III)

25 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (III)**, сольваты и гидраты данных солей, где каждый из Z', R', L, G₃, G₄, a, b, c и * является таким, как определено в **Формуле (II)**.

30 В другом воплощении предложен конъюгат согласно **Формуле (III)**, где по меньшей мере одна из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулой (IV)** или **(IVa)**:



(Формула IV)



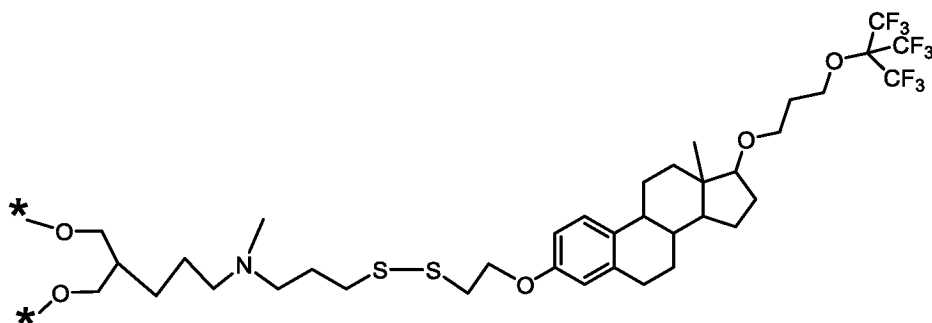
(Формула IVa)

5

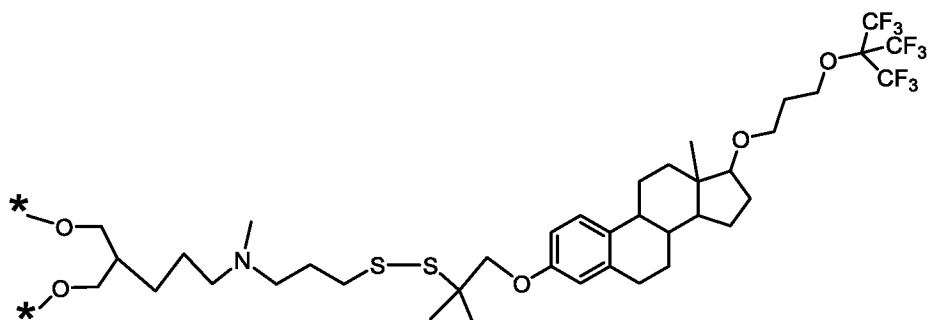
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (IV) или (IVa)**, сольваты и гидраты данных солей.

В другом воплощении предложен конъюгат согласно **Формуле (III)**, где по меньшей мере одна из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулой (V) или (Va)**:

10



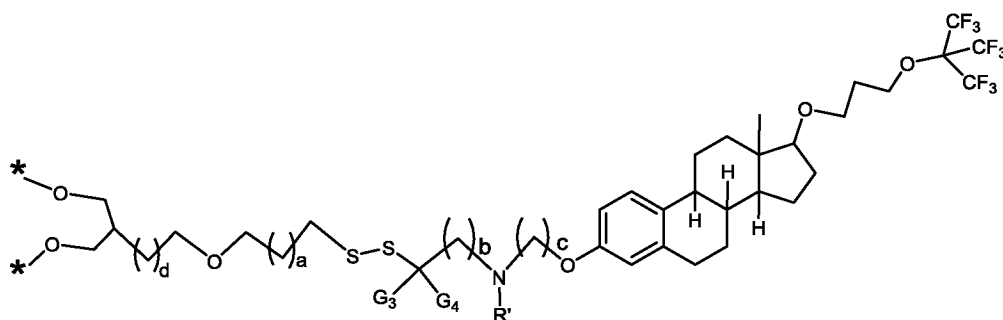
(Формула V)



(Формула Va)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (V)** или **(Va)**, сольваты и гидраты данных солей.

В еще одном другом воплощении изобретения предложен конъюгат согласно **Формуле (I)**, в котором по меньшей мере один из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулой (VI)**:

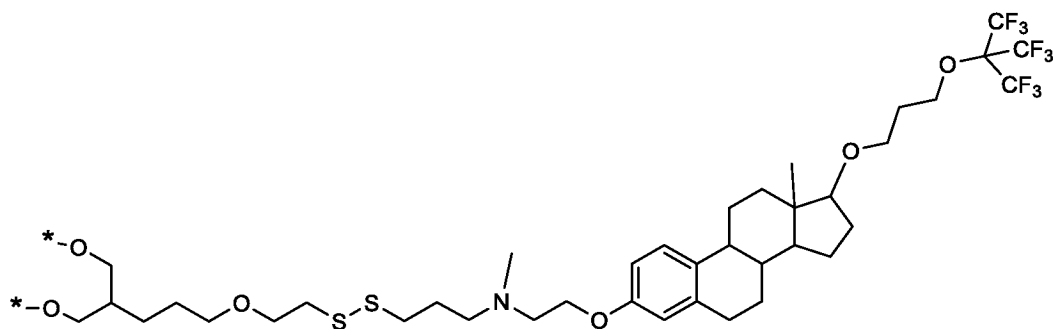


Формула (VI)

10

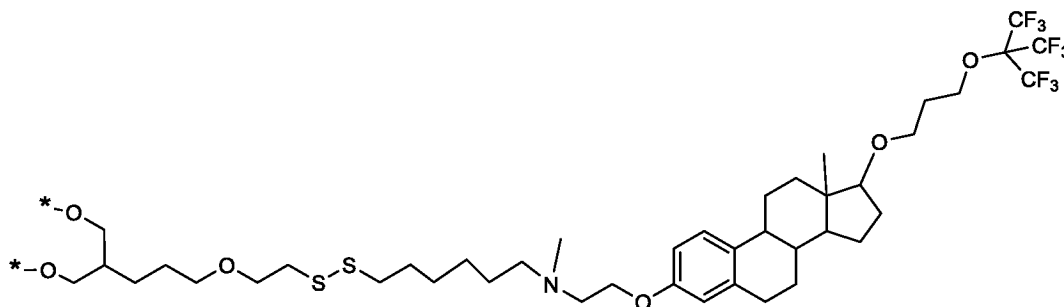
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (VI)**, сольваты и гидраты данных солей, где каждый из R', G₃, G₄, a, b, c, d и * является таким, как определено в **Формуле (II)**.

В более конкретных воплощениях предложен конъюгат согласно **Формуле (VI)**, в котором по меньшей мере один из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулами (VII)** или **(VIIa)**:



15

(Формула VII)



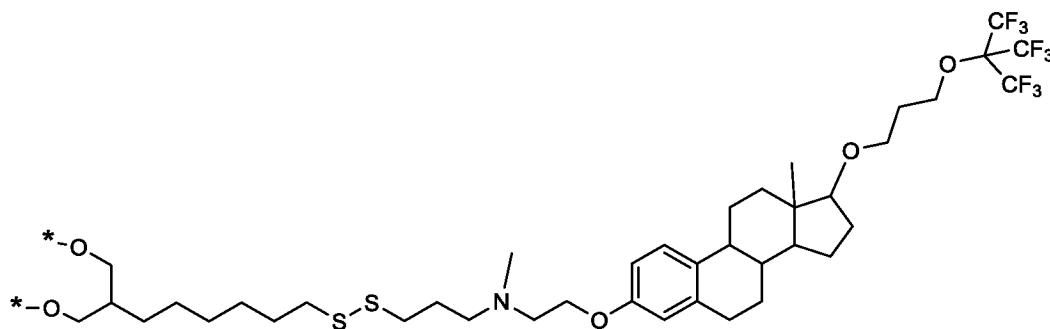
5

(Формула VIIa)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (VII)** или **(VIIa)**, сольваты и гидраты данных солей. Группировка **E** согласно **Формуле (VII)** обозначена **Apo-Si-K-93-A**.

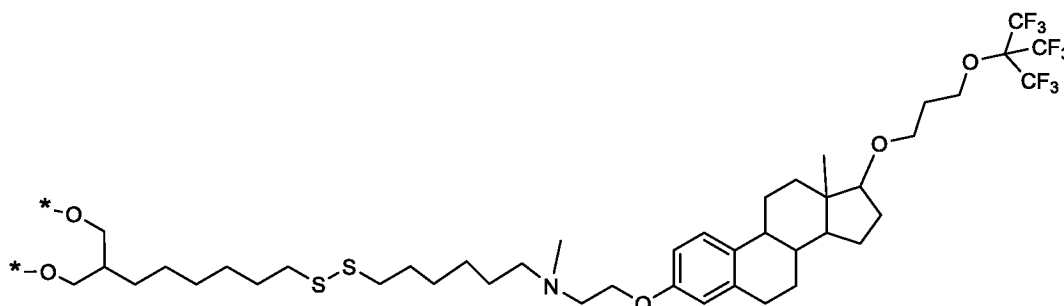
10

В другом воплощении согласно изобретению предложен конъюгат согласно **Формуле (II)**, в котором по меньшей мере одна из **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, заданную **Формулами (VIII)** или **(VIIIa)**:



Формула (VIII)

15



Формула (VIIIa)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (VIII)**

20

или (VIIIa), сольваты и гидраты данных солей. Группировка E согласно **Формуле (VIIIa)** обозначена **Apo-Si-K-63-A**.

Лекарственные средства, подлежащие доставке конъюгатами по изобретению (т.е. группировки D), могут представлять собой либо
 5 низкомолекулярные лекарственные средства, либо макромолекулы, такие как пептиды, белки или олигонуклеотиды (например, одноцепочечные или двухцепочечные, РНК или ДНК). В одном воплощении изобретения макромолекулы, подлежащие доставке, включают нити РНК для сайленсинга генов, т.е. миРНК (малая интерферирующая РНК), микроРНК или последовательности ДНК,
 10 сконструированные для того, чтобы служить в качестве антисмысловых олигонуклеотидов (АСО).

Воплощения настоящего изобретения относятся к новым конъюгатам, содержащим систему доставки для лекарственных средств через биологические мембраны в цитоплазму или через биологические барьеры, такие как
 15 гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), гематоофтальмический барьер (ГОб) или гематофетальный барьер (гематоплацентарный барьер).

Термин «**защитная группа для спирта**» в контексте данного изобретения относится к химической группе, присоединенной к гидроксильной группе для того, чтобы «маскировать» ее во время определенных химических реакций и
 20 потенциально удалять ее позднее, как известно в данной области. Примерами таких защитных групп являются ацетил (Ac), бензоил (Bz), бензил (Bn), β-метоксиэтоксипропиловый эфир (MEM), диметокситритил, [бис-(4-метоксифенил)фенилметил] (DMT), простой метоксиметилловый эфир (MOM), метокситритил [(4-метоксифенил)дифенилметил] (MMT), простой *p*-метоксибензиловый эфир (PMB), пивалоил (Piv), тетрагидропиранил (THP), тетрагидрофуран (THF), тритил (трифенилметил, Tr), простой силиловый эфир [например, простые триметилсилиловый (TMS), *трет*-бутилдиметилсилиловый (TBDMS), три-*изо*-пропилсилилоксиметилловый (TOM) и триизопропилсилиловый (TIPS) эфиры], простые этоксиэтиловые эфиры (EE), фосфорамидит, *N*-
 25 гидроксисукцинимид (NHS).

Термин «**предшественник**» в контексте данного изобретения относится к E, E' или E'' по изобретению, присоединенным к химической(ким) группе(пам), которые предназначены для удаления или модификации во время синтеза конъюгата. Такое удаление или модификация могут происходить на разных стадиях синтеза;
 35 например, без ограничения, во время присоединения указанных группировок E, E'

или Е" к макромолекулярному лекарственному средству, такому как олигонуклеотидное лекарственное средство.

Воплощения данного изобретения дополнительно относятся к применению конъюгатов по изобретению, содержащих терапевтически полезные лекарственные средства, такие как белки или олигонуклеотиды (например, миРНК или АСО), для 5 лечения медицинских расстройств у субъектов, нуждающихся в этом. Данные медицинские расстройства могут представлять собой, без ограничения, дегенеративные расстройства, рак, травматические, токсические или ишемические инсульты, инфекции или иммуноопосредованные расстройства; в которых 10 специфический(кие) белок(лки) играет(ют) роль либо в этиологии, либо в патогенезе заболевания, и где модуляция экспрессии соответствующего(щих) гена(нов) через миРНК или антисмысловые механизмы, или модуляция активности соответствующего белка терапевтическим белком, таким как антитело, или посредством белковой заместительной терапии может иметь полезные эффекты в 15 ингибировании процессов, связанных с заболеванием, или в лечении лежащей в основе причины заболевания.

Например, конъюгаты согласно воплощениям изобретения можно использовать в качестве **терапии антисмысловыми олигонуклеотидами или миРНК**, которая представляет собой вид медицинского лечения, которое включает 20 введение одноцепочечных или двухцепочечных нитей нуклеиновых кислот (ДНК, РНК или химический аналог), которые связываются с последовательностью ДНК, которая кодирует специфический белок, или с соответствующей матричной РНК (мРНК), через которую происходит трансляция до белка. Данное лечение может действовать, ингибируя экспрессию соответствующего гена, посредством этого 25 предотвращая продукцию соответствующего связанного с заболеванием белка, который может играть роль в этиологии или патогенезе заболевания. В качестве альтернативы, конъюгаты по изобретению могут содержать терапевтические белки или комплексы белок/нуклеиновая кислота, такие как белок Cas9.

Термины «**лекарственное средство**» или «**медикамент**» в контексте 30 настоящего изобретения относятся к химическому веществу, которое, при введении пациенту, страдающему от заболевания, способно оказывать полезное влияние на данного пациента. Данным полезным влиянием может быть уменьшение интенсивности симптомов или противодействие эффектам агента или вещества, которое(рые) играет(ют) роль в процессе заболевания. Данное лекарственное 35 средство может включать маленькую молекулу или макромолекулу, такую как белок, или одно- или двухцепочечную РНК или ДНК, вводимые для ингибирования

экспрессии гена. Среди прочих, данное лекарственное средство может содержать миРНК или АСО. В некоторых воплощениях лекарственное средство нацелено на лечение дегенеративных расстройств, рака, ишемических, инфекционных, токсических инсультов или иммуно-опосредованных расстройств.

5 Термин «**биологическая мембрана**» согласно данному изобретению относится к любой фосфолипидной мембране, относящейся к биологической системе. Примерами таких фосфолипидных мембран являются плазматическая мембрана клеток, внутриклеточные мембраны или биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), гематоофтальмический барьер (ГОб) или
10 гематоплацентарный барьер.

Согласно воплощениям данного изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый(мые) носитель(ли) или соль(ли). Согласно некоторым воплощениям данные конъюгаты и фармацевтические
15 композиции по изобретению можно использовать *in vivo* в клинических условиях.

Другие воплощения данного изобретения включают конъюгаты по изобретению или фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты по изобретению, для применения для лечения медицинских расстройств у пациента, нуждающегося в этом. Другие воплощения данного изобретения включают
20 применение конъюгатов по изобретению в приготовлении фармацевтических композиций для лечения медицинских расстройств у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых воплощениях медицинское расстройство представляет собой рак.

Конъюгат согласно воплощениям данного изобретения может быть
25 полезным в улучшении доставки миРНК, АСО, терапевтического белка, такого как антитело, через клеточные мембраны или через биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), таким образом, улучшая эффективность макромолекулярного лекарственного средства в одном или более чем одном аспекте, таком как, например, эффективность, токсичность или фармакокинетика.

30 Важные аспекты, посредством которых конъюгаты по изобретению конструируются так, чтобы иметь преимущество над другими системами доставки лекарственного средства, могут относиться к оптимизированной благоприятной аффинности связывания с альбумином, которая, с одной стороны, делает возможным пролонгированное время нахождения в организме, при предоставлении
35 широкого распространения по всему организму и обеспечении защиты от деградации литическими ферментами плазмы; тогда как, с другой стороны, делая

возможным эффективным высвобождение конъюгата от альбумина для предпочтительного связывания с фосфолипидными клеточными мембранами, с последующей доставкой через мембраны в клетки.

Другой важный аспект, посредством которого конъюгаты по изобретению 5 конструируются так, чтобы иметь преимущество над другими системами доставки лекарственного средства, может относиться к содержанию в них редокс-чувствительной группировки, т.е. дисульфидной группы, которая обеспечивает селективное расщепление конструкции в цитоплазме с высвобождением макромолекулярного лекарственного средства для оказания его 10 фармакологических эффектов в его сайтах-мишенях.

В одном воплощении изобретения лекарственное средство представляет собой макромолекулу, выбранную из группы, состоящей из миРНК, АСО или терапевтического белка.

В одном воплощении изобретения согласно ему предложена 15 фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по изобретению, имеющий структуру, заданную любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**, и фармацевтически приемлемую соль или носитель.

В одном воплощении изобретения согласно ему предложен способ доставки лекарственного средства в биологические клетки, где указанные клетки 20 находятся в культуре или в живом животном, или в человеке; причем данный способ включает приведение клеток в контакт с конъюгатом по изобретению.

В одном воплощении изобретения согласно ему предложен способ, в котором биологическая мембрана выбрана из группы, состоящей из клеточных мембран и биологических барьеров, где указанные биологические барьеры 25 выбраны из гематоэнцефалического барьера, гематоофтальмического барьера или гематофетального барьера.

В одном воплощении изобретения согласно ему предложен конъюгат, где каждый из E, E' или E'' независимо имеет структуру, заданную любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**, присоединенный к 30 лекарственному средству.

Как упомянуто выше, объем данного изобретения также включает молекулы, именуемые **«предшественниками»**. **«Предшественник»** в контексте данного изобретения представляет собой молекулу, которая содержит любую из группировок E, E' или E'' согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**, связанную с химической группой, которая 35 предназначена для удаления или модификации во время синтеза конъюгата, а

именно, удаляется или модифицируется на стадиях присоединения группировки **D** к группировке **E**, **E'** или **E''**. Примерами таких химических групп являются фосфорамидитная, азидная, ацетиленовая, [диметокситритил-бис-(4-метоксифенил)фенилметил] (DMT) или *N*-гидроксисукцинимидная (NHS) группы.

5 В более конкретном воплощении изобретения, где **D** представляет собой олигонуклеотидное лекарственное средство (например, миРНК), согласно данному изобретению предложен предшественник, где химические группировки, предназначенные для удаления или модификации во время конъюгирования **E**, **E'** или **E''** с **D**, включают фосфорамидитную и/или DMT.

10 Еще один другой предшественник служит для присоединения **E**, **E'** или **E''** к **D**, который представляет собой белковое лекарственное средство.

В указанном предшественнике группировка **E**, **E'** или **E''** связывается с одной из следующих структур: **A** или **B**:



15 где **W** выбран из **E**, **E'** или **E''** согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**. Указанный предшественник нацелен на связывание, через его *N*-гидроксисукцинимидную (NHS) группировку, с аминокеттами боковых цепей лизина белка.

20 Воплощения данного изобретения могут дополнительно включать фармацевтические композиции, содержащие конъюгат по любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)** и фармацевтически приемлемую соль или носитель.

25 Данное изобретение также включает способы специфического ингибирования экспрессии генов *in vitro* или *in vivo*. В одном воплощении данный способ может включать применение конъюгата по любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**, или соответствующей фармацевтической композиции, где **D** представляет собой миРНК или АСО, разработанные для сайленсинга экспрессии конкретного гена. В некоторых воплощениях данный ген кодирует патогенный белок, который играет роль в этиологии или патогенезе

30 заболевания. В некоторых воплощениях **D** представляет собой терапевтический белок.

В одном воплощении изобретения предложен конъюгат, содержащий миРНК, связанную на каждом из ее концов с группировкой E, E' или E'' согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa).**

В другом воплощении изобретения предложен конъюгат, содержащий
5 миРНК, связанную на каждом из ее концов и также во внутреннем положении в пределах дуплекса миРНК с группировкой E, E' или E'' согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa).**

В еще одном другом воплощении изобретения предложен способ индуцирования деформации и очаговых структурных пертурбаций в наружном
10 листке фосфолипидной мембраны; причем указанный способ включает взаимодействие конъюгата по изобретению с фосфолипидной мембраной, где данный конъюгат содержит дуплекс миРНК, связанный на каждом из его концов и потенциально также во внутреннем положении в пределах дуплекса миРНК с группировками E, E' или E'' (т.е. всего с 2-3 группировками), причем каждая имеет
15 структуру согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa).**

Из-за данной структуры конъюгата по изобретению миРНК подходит к мембране параллельно ее поверхности с группировками E, E' или E'', ориентированными к сердцевине мембраны, перпендикулярно поверхности
20 мембраны (продемонстрировано на **Фиг. 1a, 1b и 1c**). Возникающая в результате близость сильно отрицательно заряженной миРНК к поверхности мембраны индуцирует, посредством этого, деформацию и очаговые структурные пертурбации наружного листка фосфолипидной мембраны. Такая индукция деформации и структурных пертурбаций наружной мембраны может быть полезной, среди
25 прочего, для инициации эндоцитоза или для индукции прохождения конъюгата, содержащего миРНК, с одного листка мембраны на другой (флип-флоп). Оба процесса являются потенциально очень полезными для инициации и/или продолжения трансмембранной доставки миРНК. Указанная фосфолипидная мембрана может представлять собой любую фосфолипидную мембрану,
30 включающую, без ограничения, липосомы или клеточные мембраны, либо *in vitro*, либо *in vivo*.

Конъюгаты согласно воплощениям изобретения можно использовать для лечения медицинского расстройства. Воплощения данного изобретения включают способы медицинского лечения, включающие введение нуждающемуся пациенту
35 терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат согласно любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va),**

(VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa); где **D** представляет собой лекарственное средство, полезное для лечения соответствующего медицинского расстройства.

В одном воплощении данный способ предназначен для генетического лечения с использованием миРНК или АСО, причем указанный способ включает
 5 введение нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по изобретению согласно любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**; где **D** представляет собой миРНК или АСО, или терапевтический белок, полезный в ингибировании экспрессии гена, который играет роль в заболевании конкретного
 10 пациента.

В другом воплощении изобретения данное изобретение включает способ медицинского лечения заболевания терапевтическим белком, где **D** представляет собой белок, подлежащий доставке в клетки через биологические фосфолипидные мембраны или через биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический
 15 барьер. Указанные клетки либо находятся в клеточной культуре *in vitro*, либо в живом животном, либо человеку *in vivo*. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку новообразования. В некоторых воплощениях клетка новообразования представляет собой клетку опухоли. В некоторых воплощениях клетка новообразования представляет собой клетку в пределах метастаза. Данная
 20 клетка может быть эукариотической клеткой, эукариотической клеткой, трансфицированной онкогенным агентом, человеческой клеткой, клеткой, которая является предраковой клеткой, или любой их комбинацией. Данная клетка может находиться *in vitro*, т.е. в пределах клеточной культуры, *ex vivo* или *in vivo*, а именно: в пределах живого животного или человеческого субъекта.

В еще одном другом воплощении данного изобретения **D** представляет собой белок, вводимый в виде заместительной терапии, например, для замены мутировавшего, неправильно функционирующего белка, таким образом, удовлетворяя физиологическую потребность. В другом воплощении **D** представляет собой белок, который играет роль в генной регуляции, включая,
 30 среди прочих, белки, которые играют роль в редактировании ДНК или РНК (добавление, разрыв или изменение последовательности конкретных генов). В одном воплощении указанный белок может быть членом белков, связанных с CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы разделенные регулярными промежутками). В частности, указанный белок может представлять собой или
 35 может содержать белок **Cas9** (CRISPR ассоциированный белок 9) – фермент ДНК-

нуклеазу, направляемую РНК, или его аналог, потенциально загруженный его направляющей олигонуклеотидной последовательностью.

В одном из воплощений данного изобретения описан способ генетического лечения медицинского расстройства, где указанный способ включает введение
5 нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**; где **D** представляет собой белок CRISPR, такой как **Cas9**, который вводится совместно с подходящим направляющим олигонуклеотидом, таким образом, добиваясь доставки белка,
10 загруженного соответствующим направляющим олигонуклеотидом, в клетки, где белок CRISPR может проявлять его активность редактирования генома. Направляющий олигонуклеотид в данном контексте представляет собой последовательность РНК или ДНК, которая направляет белок **Cas9** к специфическому локусу (месту) на ДНК для того, чтобы индуцировать расщепление
15 двухцепочечной ДНК в данном сайте, таким образом, обеспечивая репарацию местного дефекта в генетическом материале. В случае **Cas9** направляющий олигонуклеотид представляет собой короткий отрезок РНК, последовательность которого является комплементарной последовательности локуса ДНК-мишени.

Следовательно, конъюгаты по воплощениям данного изобретения и
20 соответствующие фармацевтические композиции, а также соответствующие способы могут быть полезными, среди прочего, в лечении медицинских расстройств, выбранных, среди прочих, из рака, токсических инсультов, ишемического заболевания, инфекционного заболевания, болезни белкового накопления, травмы, иммуноопосредованного заболевания или дегенеративного
25 заболевания.

Следовательно, одним воплощением данного изобретения является способ лечения медицинского расстройства, включающий введение нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат по любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)**; где **D** представляет собой полезное лекарственное
30 средство для лечения указанного медицинского расстройства.

Согласно некоторым воплощениям данное медицинское расстройство представляет собой рак. Термин «рак» в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к присутствию клеток, которые проявляют
35 характеристики, которые являются типичными для клеток, вызывающих рак, такие как неконтролируемая пролиферация, потеря специализированных функций,

бессмертие, значительный метастатический потенциал, значительное увеличение противоапоптозной активности, быстрый рост и высокая скорость пролиферации или некоторые характеристики морфологии и клеточных маркеров. Типично раковые клетки находятся в виде опухоли, существующей либо локально в животном, либо циркулирующей в кровотоке в виде независимых клеток, как, например, лейкозные клетки.

В области неврологических расстройств конъюгаты согласно воплощениям данного изобретения могут быть полезными, среди прочего, в лечении нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь моторных нейронов, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, рассеянный склероз и болезнь Крейтцфельда-Якоба.

В области инфекционных расстройств конъюгаты согласно воплощениям данного изобретения могут быть полезными, среди прочего, для доставки антибиотиков или противовирусных агентов в соответствующие бактерии или вирусные патогены. Соответственно, конъюгаты по изобретению могут иметь противoinфекционные свойства, таким образом, являясь полезными для лечения инфекционных заболеваний, таких как бактериальные или вирусные инфекции.

В других воплощениях данное изобретение относится к применению соединений по изобретению для усиления доставки химического соединения в клетки через фосфолипидные мембраны. В зависимости от присоединенного химического соединения и желательного показания, такая доставка может иметь разные полезные применения. Например, у растений такая доставка может способствовать улучшению качества и увеличению количества сельскохозяйственных культур; среди прочих, посредством улучшения генетики растения или посредством искоренения разных насекомых, бактерий или грибов.

Такая доставка также может быть полезной для доставки антибиотиков или противовирусных агентов в соответствующие бактерии или вирусные патогены. Соответственно, конъюгаты по изобретению могут обладать противoinфекционными свойствами, таким образом, являясь полезными для лечения инфекционных заболеваний, таких как бактериальные или вирусные инфекции. Следовательно, одним воплощением данного изобретения является E, E' или E'', связанная с противовирусным или антибактериальным лекарственным средством. Такое лекарственное средство может быть, среди прочих, генетической(кими) последовательностью(тями), нацеленной(ными) на взаимодействие с генетическим материалом инфекционного агента, таким образом, препятствуя его репликации или метаболизму или воздействуя на его выживание.

Конъюгаты по изобретению посредством их свойств при доставке через биологическую мембрану также могут быть полезными для лечения целого ряда медицинских расстройств, таких как расстройства, индуцированные ишемическими, токсическими, травматическими инсультами, или медицинские расстройства генетической этиологии патогенеза.

ПРИМЕРЫ

Теперь будут описаны некоторые примеры для того, чтобы дополнительно проиллюстрировать данное изобретение и для того, чтобы продемонстрировать то, как воплощения данного изобретения могут осуществляться на практике.

Пример 1: общий способ синтеза конъюгатов согласно воплощениям данного изобретения, где группировки D представляют собой олигонуклеотиды

Исходно выбирают ген, подлежащий сайленсингу, на основе его роли в этиологии или патогенезе заболевания. Затем, на основе биоинформационных методологий, известных в данной области, разрабатывают и определяют нуклеотидные последовательности, подлежащие включению в конъюгат (типично 19-21 пар оснований двухцепочечной РНК для субстрата RISC или 25-29 пар оснований двухцепочечной РНК для субстрата Дайсера).

Синтез проводится в направлении от 3' до 5'. Применяется твердофазный синтез с использованием фосфорамидитных строительных блоков, полученных из защищенных 2'-дезоксинуклеозидов (dA, dC, dG и T), рибонуклеозидов (A, C, G и U) или химически модифицированных нуклеозидов, например LNA (запертые нуклеиновые кислоты) или BNA (мостиковые нуклеиновые кислоты). Данные строительные блоки последовательно связываются с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, определяемом последовательностью желательной миРНК.

После построения олигонуклеотида один или более чем один тип E по изобретению добавляют как часть строительных блоков олигонуклеотида. Исходно группировку E добавляют в виде ее предшественника, как описано выше. Главным преимуществом соединений по изобретению является то, что они предоставляют унифицированную связывающую группировку, как описано в **Формулах (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) или (VIIIa)** для связывания группировок E, E' или E'' либо с 5'-концом олигонуклеотида, с 3'-концом олигонуклеотида, либо во внутреннем положении вдоль олигонуклеотида. Среди прочих, такие группировки-

предшественники могут содержать любую защитную группу для гидроксила, известную в данной области, фосфорамидитную, азидную, ацетиленовую, [диметокситритил-бис-(4-метоксифенил)фенилметильную] (DMT), *N*-гидроксисукцинимидную (NHS) группы. При завершении сборки цепи продукт высвобождается от твердой подложки в раствор, с него снимается защита, и его собирают. Желательный конъюгат затем выделяют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с получением желательного конъюгированного олигонуклеотида с высокой чистотой. В случае мРНК каждая из комплементарных нитей РНК синтезируется отдельно, и затем проводится отжиг двух нитей в стандартных условиях, как известно в данной области, с получением желательной двухцепочечной мРНК.

Пример 2: способ синтеза стерола 1; общие строительные блоки группировок Е по изобретению

Исходное вещество – перфтор-*трет*-бутанол – имеется в продаже. Синтез начинается с эстрадиола и осуществляется согласно **Схеме 1**:

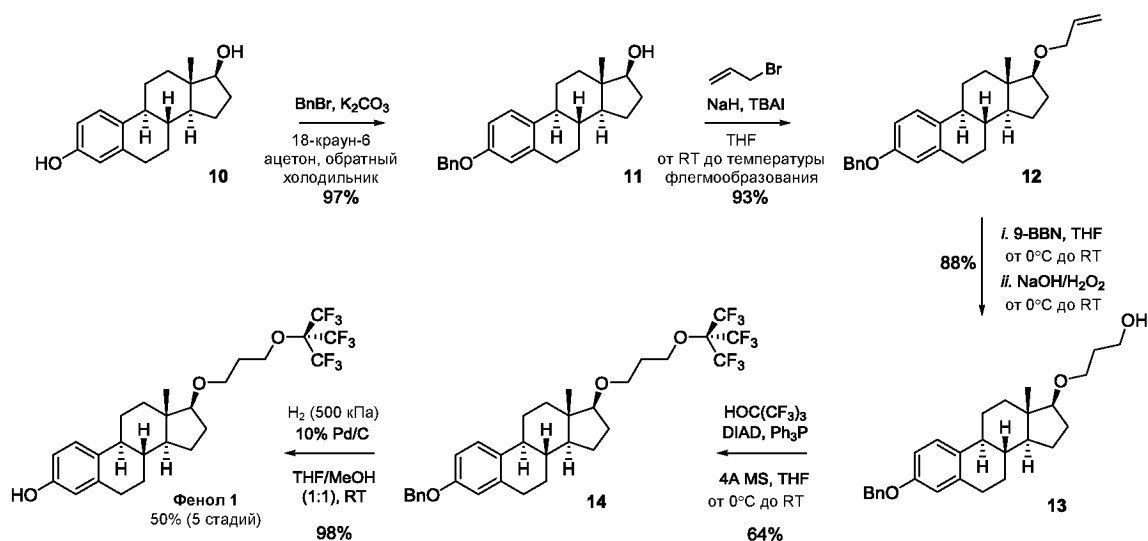


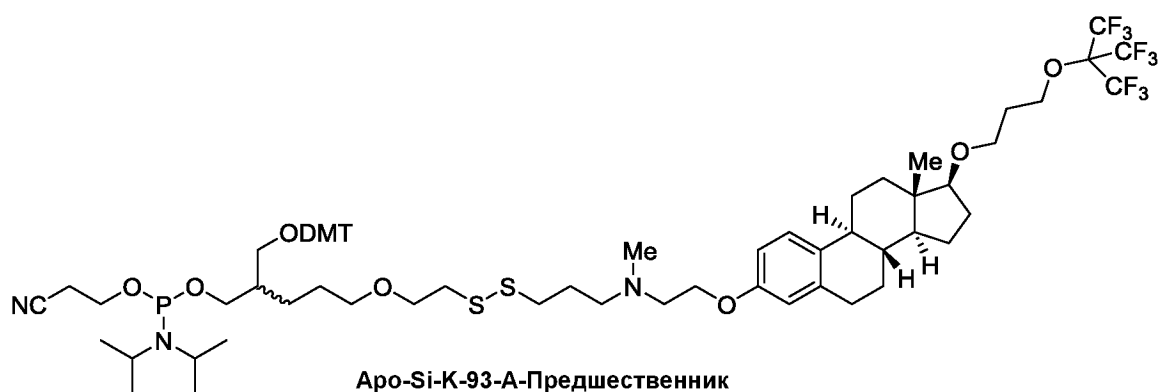
Схема 1:

Эстрадиол защищали бензильной группой с получением соединения 11. Аллирование спирта 11 (25,6 г) при оптимизированных условиях реакции (аллилбромид, NaH, *кат.* тетра-*n*-бутиламмония бромид (TBAI), тетрагидрофур (THF), температура флегмообразования, 16 ч) давало простой аллиловый эфир 12 (21,85 г, 77%) в виде белого твердого вещества (очищали последовательным растиранием в гептане и MeOH). Региоселективное гидроборирование концевого алкена (21,8 г) с использованием 9-борбицикло[3.3.1]нона (9-BBN) при

стандартной окислительной обработке ($\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}_2$) давало спирт **13**. Реакция Митсунобу спирта **13** (13,6 г) с избытком перфтор-*трет*-бутанола при оптимизированных условиях реакции [диизопропилазодикарбоксилат (DIAD), PPh_3 , молекулярное сито (MS) 4A, THF, RT (комнатная температура), 16 ч] давала желательный простой эфир **14**. Соединение **14** подвергали каталитической гидрогенизации (10% Pd/C, RT) с использованием смеси (1:1) THF и 2,2,2-трифторэтанола в качестве растворителя (500 кПа, реактор Парра), с получением (после примерно 18 ч) фенола **1** в виде беловатого твердого вещества.

10

Пример 2: способ синтеза Аро-Si-K-93-А-предшественник



Синтез амина 7:

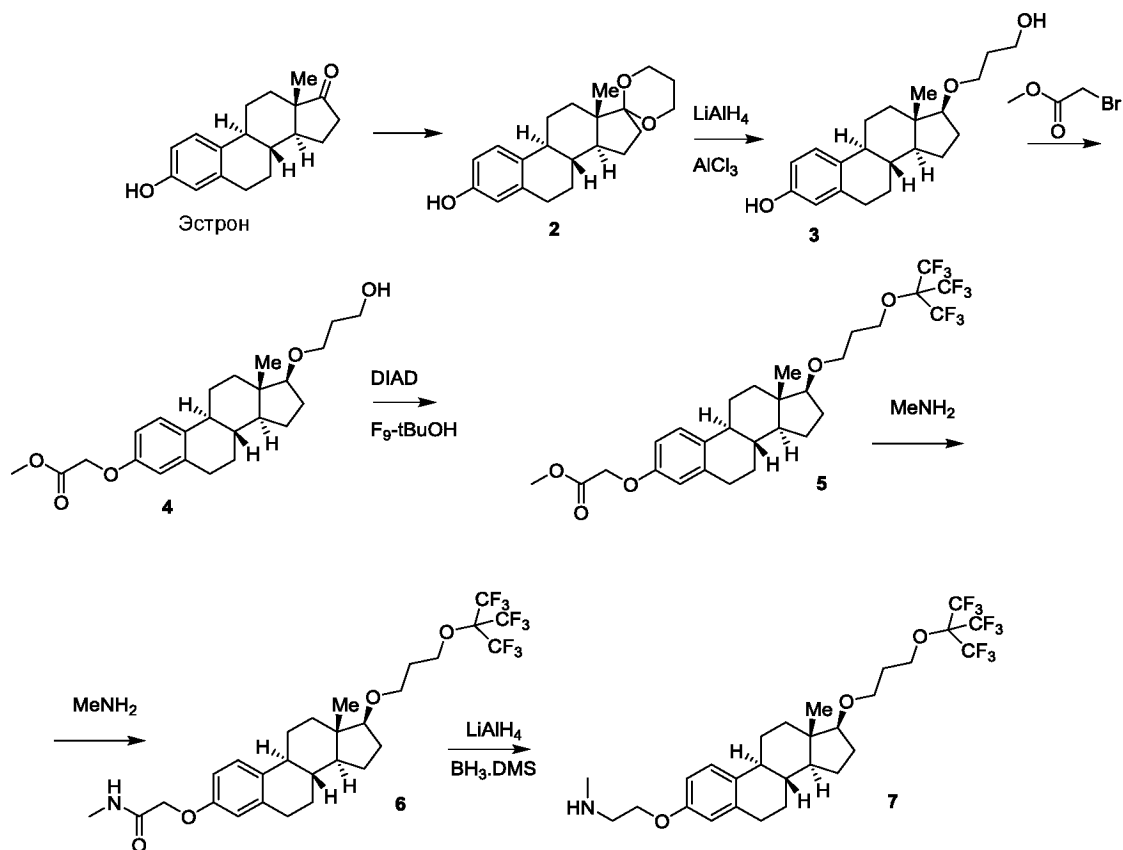


Схема 1. Синтез амина 7

Эстрон обрабатывали пропандиолом и триметилортоформиатом с
 5 получением соединения 2. Обработка LiAlH_4 и AlCl_3 давала продукт 3 с открытым
 кольцом. Данный фенол алкилировали метилбромацетатом, и получали
 соединение 4. Перфтор-трет-бутанольную группировку вводили с использованием
 условий Митсунобу (соединение 5). Соединение 5 обрабатывали метиламином, с
 получением амида 6. Восстановление амида с использованием $\text{BH}_3\cdot\text{DMS}$ давало
 10 амин 7.

Синтез тиотозилата 14:

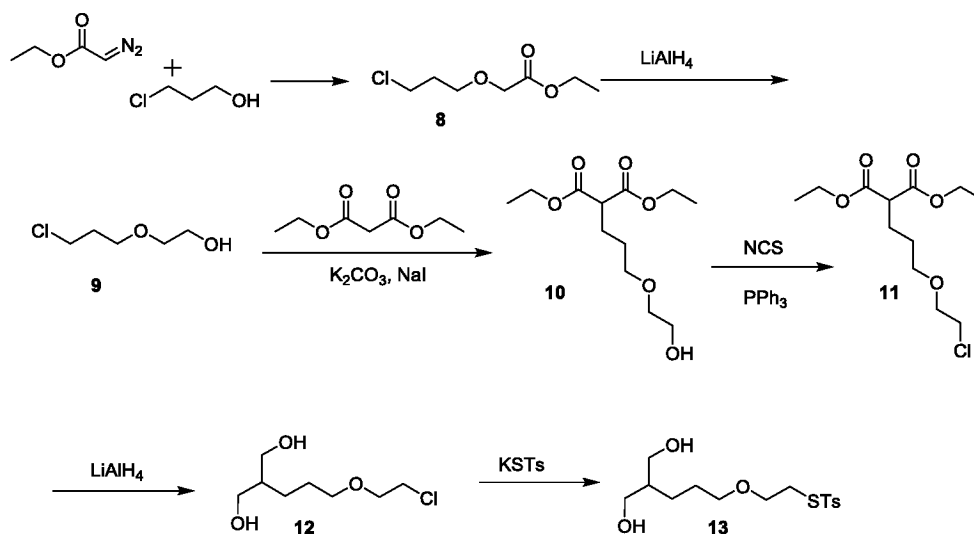


Схема 2. Синтез тиотозилата 14

Синтез тиотозилата 13 начинался со связывания этилдиазоацетата с 3-хлорпропан-1-олом с получением простого эфира 8. Последующее восстановление сложного эфира давало спирт 9. Диэтилмалонат алкилировали хлоридом 9 с получением соединения 10. Спирт затем хлорировали с использованием NCS и PPh_3 с получением хлорида 11. Восстановление сложных эфиров с использованием LiAlH_4 давало диол 12. Наконец, хлорид замещали тиотозилатом калия с получением желательного строительного блока тиотозилата 13.

Синтез Apo-Si-K-93-A

Синтез проводили согласно следующей схеме синтеза:

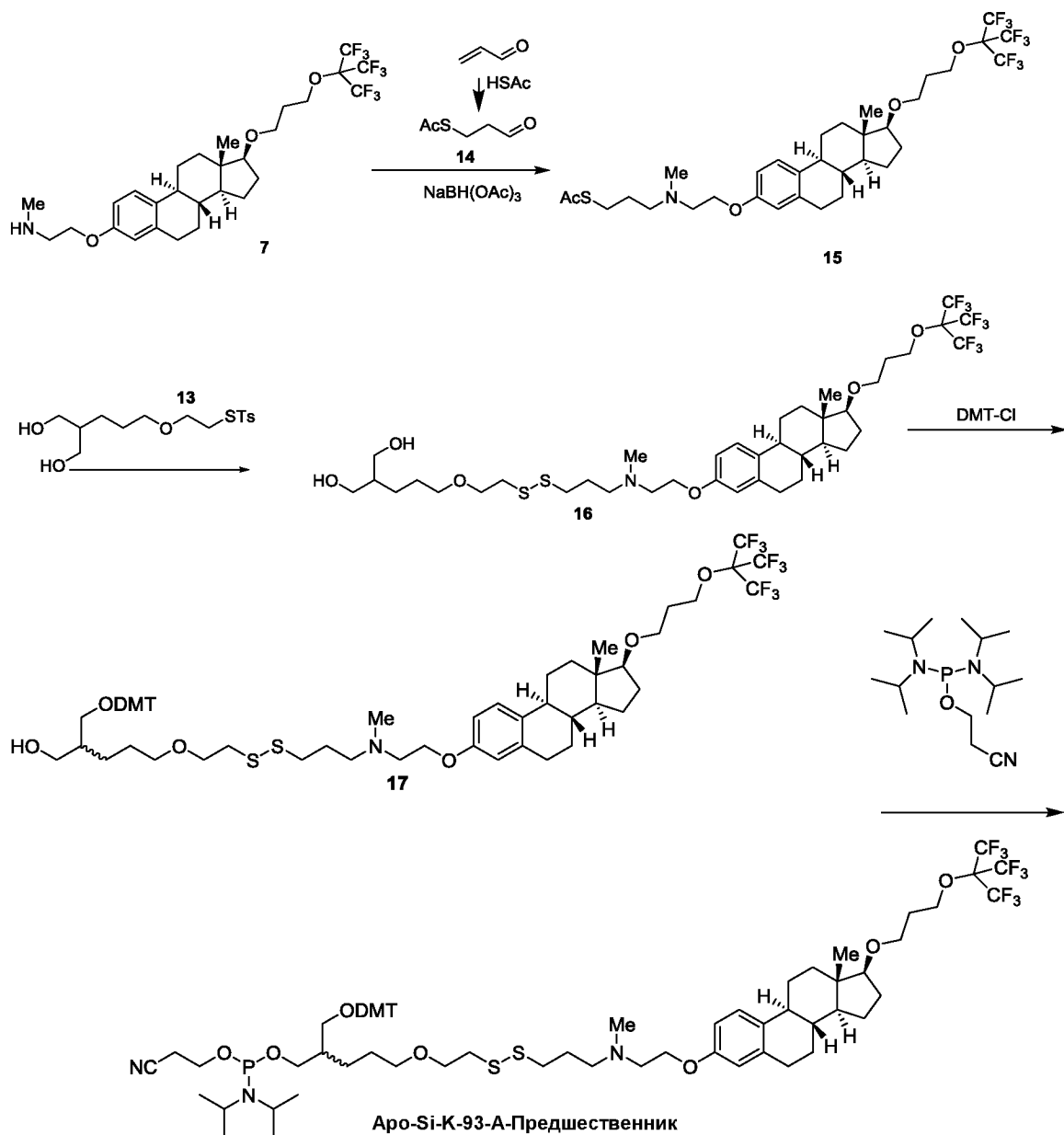


Схема 3. Синтез Apo-Si-K-93-A-Предшественника

5

Амин **7** алкилировали 1-бром-3-хлорпропаном, но авторы изобретения обнаружили то, что данные условия приводили скорее к плохим выходам. Однако при выполнении авторами изобретения восстановительного аминирования с использованием тиаляльдегида **14**, полученного из акролеина, были получены значительно лучшие выходы, и также из общего синтеза была устранена необходимость тиацетатного обмена. Акролеин обрабатывали тиауксусной кислотой в присутствии основания с получением хорошего превращения. Желательное вещество выделяли с использованием флэш-хроматографии с

10

выходом 55%. Последующее восстановительное аминирование альдегидом **14** давало соединение **15** с выходом 59%.

К раствору тиацетата **15** и тиотозилата **13** добавляли метоксид натрия в метаноле, что удаляло ацетат из **15**, обеспечивая реакцию образующегося тиола с **13** с образованием желательного асимметричного дисульфида (**16**). Соединение **16** подвергали взаимодействию с DMT-Cl с получением монозащищенного диола **17**. Реакция с подходящим фосфорамидитным агентом давала **Apo-Si-K-93-A**. Очистку кислотолабильного фосфорамидитного продукта осуществляли с использованием флэш-хроматографии с диоксидом кремния, который предобарбатывали Et₃N. В конечном счете получали 4 × 220 мг.

Экспериментальный раздел

(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Метил-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-декагидроспиро[циклопента[а]фенантрен-17,2'-[1,3]диоксан]-3-ол (2)

В суспензию эстрона (67,9 грамм, 0,251 моль) в толуоле (300 мл) добавляли 1,3-пропандиол (70 мл) и триметилортоформиат (100 мл). Данную суспензию обрабатывали pTsOH (1 грамм, 5 ммоль) и нагревали до 60°C в течение 16 ч. После охлаждения до комнатной температуры добавляли триэтиламин (10 мл) и воду (100 мл), и перемешивание продолжали в течение 30 мин. Фазы разделялись, и органическую фазу промывали водой (2 × 100 мл) и рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество растворяли в толуоле (150 мл) и дополнительно разбавляли посредством медленного добавления гептана (750 мл), вызывая образование белого осадка. Твердые вещества отфильтровывали и сушили под вакуумом. Соединение **2** (71,1 грамма, 217 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с выходом 86%.

(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-гидроксипропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ол (3)

К раствору соединения **2** (71,4 грамм, 217 ммоль) в THF (1,5 л) аккуратно добавляли LiAlH₄ (10 грамм, 263 ммоль) и AlCl₃ (116 грамм, 872 ммоль) при 0°C. Давали протекать экзотермической реакции при перемешивании в течение дополнительных 30 мин при 0°C, затем твердые вещества нагревали до 50°C при механическом перемешивании (с использованием роторного вакуумного испарителя) в течение 3 ч. Данную смесь охлаждали до 0°C, и добавляли по каплям водный насыщенный хлорид аммония (150 мл). Данную смесь перемешивали в течение еще 30 мин, затем фильтровали через тонкий слой диоксида кремния,

твердые вещества промывали этилацетатом. Органические слои собирали и промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенное вещество (89,2) преимущественно представляло собой соединение **3**, но очистку проводили после следующей стадии.

5

Метил-2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-гидроксипропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)ацетат (4**)**

Неочищенное вещество **3** (89,4 грамма) растворяли в ацетоне (1,25 л) и
 10 MeOH (0,2 л) и обрабатывали карбонатом калия (60 грамм, 435 ммоль) и метилбромацетатом (50 мл, 435 ммоль). Данную суспензию нагревали до 60°C , и перемешивание продолжали в течение 16 ч. На основе ТСХ (тонкослойная хроматография) все фенольные группировки были алкилированными. Данную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат
 15 концентрировали и дополнительно очищали с использованием флэш-хроматографии (элюент – от 20% до 30% EtOAc в гептане, удаляющий все примеси, 100% EtOAc – для получения желательного вещества).

Соединение **4** (56,7 грамм, 140,3 ммоль) выделяли в виде желтого масла с выходом 65%.

20

Метил-2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)ацетат (5**)**

К раствору соединения **4** (56,7 грамм, 140,3 ммоль) в THF (1 л) добавляли
 25 трифенилфосфин (55,4 грамм, 211 ммоль), нонафтор-*трет*-бутиловый спирт (30 мл) и ди-*трет*-бутилазодикарбоксилат (38,5 грамм, 167 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 30 мин, когда ТСХ показала полное превращение. Добавляли гептан (500 мл), и данную смесь частично концентрировали до ~500 мл. Добавляли дополнительное количество гептана (1 л), и данную смесь
 30 перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Образовались осадки, и их отфильтровывали, фильтрат концентрировали с получением соединения **5** в виде желтого сиропа, хотя оно и было загрязнено следами DBAD и трифенилфосфина.

2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-(((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-*N*-метилацетамид (6)

Неочищенный сироп соединения **5** разводили MeOH (250 мл), и добавляли
 5 40%-ный водный метиламин (350 мл). Белый осадок перемешивали в течение 1 ч, когда ТСХ показала полное превращение. Добавляли воду (1 л), и твердые вещества отфильтровывали. Остаток промывали водой и отбирали в дихлорметан (1 л). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Дополнительную очистку проводили с использованием примерно
 10 7 см диоксида кремния и исходной элюции 15% EtOAc в гептане. При удалении из колонки всех примесей соединение **6** элюировали с использованием 100% EtOAc. Соединение **6** (82,0 грамма, 132 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с выходом 94%, хотя и оставались в наличии следы трифенилфосфооксида.

2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-(((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-*N*-метилэтан-1-амин (7).

К раствору соединения **6** (56,0 грамм, 90,5 ммоль) в THF (500 мл) добавляли по каплям BN₃.DMS (56 мл, 590 ммоль) при 65°. Нагревание с обратным
 20 холодильником продолжалось в течение дополнительных 5 ч, затем данную смесь охлаждали до комнатной температуры. Смесь тщательно растворяли в MeOH (300 мл), и добавляли 4 М диоксан в HCl (50 мл). Данный раствор нагревали с обратным холодильником в течение 30 мин, затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Данную смесь растворяли в MeOH (300 мл) и нагревали с
 25 обратным холодильником в течение 30 мин. После охлаждения и концентрирования сироп отбирали в CH₂Cl₂ (1 л) и промывали насыщенным водным бикарбонатом натрия (2×). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Соединение **7** (50,0 грамм, 82,6 ммоль) выделяли в виде прозрачного масла, которое медленно отверждалось с выходом 91%. Профиль примесей со следами
 30 трифенилфосфооксида был аналогичным соединению **6**.

Синтез тиотозилата 13:

Этил-2-(3-хлорпропокси)ацетат (8)

К раствору 3-хлорпропан-1-ола (20 мл, 239 ммоль) в CH₂Cl₂ (250 мл)
 35 добавляли этилдиазоацетат (25 мл, 239 ммоль) при 0°C. Затем добавляли BF₃·OEt₂ (0,30 мл, 2,39 ммоль, 0,01 экв.), после чего баню со льдом удаляли, нагревали

данную смесь до 37°C и перемешивали при этой температуре, пока не прекращалось образование газа (2 часа). Данную смесь промывали H₂O (250 мл) и рассолом (250 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением простого эфира **8** (44 г, 240 ммоль, количеству) в виде желтого масла.

5

2-(3-хлорпропокси)этан-1-ол (9)

К ледяной суспензии LiAlH₄ (12 г, 316 ммоль) в Et₂O (750 мл) медленно добавляли раствор сложного эфира **8** (57 г, 316 ммоль), и образующуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию гасили медленным добавлением KOH (20%-ный водн., 51 мл) при 0°C. Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего ее фильтровали через целит. Фильтрат сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением спирта **9** (33 г, 240 ммоль, 76%) в виде прозрачного масла.

15

Диэтил-2-(3-(2-гидроксиэтокси)пропил)малонат (10)

К раствору диэтилмалоната (25 мл, 166 ммоль) и спирта **9** (23 г, 166 мл) в DMF (500 мл) добавляли K₂CO₃ (34 г, 249 ммоль) и NaI (25 г, 166 ммоль), и образующуюся смесь перемешивали при 90°C в течение 64 часов. Добавляли H₂O (1,5 л), и данную смесь экстрагировали EtOAc (3× 500 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (EtOAc:гептан 1:1), с получением продукта **10** (17 г, 65 ммоль, 39%) в виде прозрачного желтоватого масла.

25

Диэтил-2-(3-(2-хлорэтокси)пропил)малонат (11)

К раствору спирта **10** (17 г, 65 ммоль) в CH₂Cl₂ (500 мл) добавляли PPh₃ (26 г, 98 ммоль) и N-хлорсукцинимид (11 г, 78 ммоль), и образующуюся смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Добавляли гептан (300 мл), и данную смесь частично концентрировали. Образующиеся твердые вещества отфильтровывали, и фильтрат концентрировали. Неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (20% EtOAc в гептане), с получением хлорида **11** (14 г, 49 ммоль, 75%) в виде прозрачного масла.

35

2-(3-(2-хлорэтокси)пропил)пропан-1,3-диол (12)

К ледяной суспензии LiAlH₄ (7,3 г, 192 ммоль) в Et₂O (500 мл) медленно добавляли раствор сложного диэтилового эфира **11** (27 г, 96 ммоль), и

образующуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию гасили медленным добавлением KOH (20%-ный водн., 31 мл) при 0°C. Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего ее фильтровали через целит. Фильтрат сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением диола **12** (14 г, 73 ммоль, 76%) в виде прозрачного масла.

S-(2-((5-гидрокси-4-(гидроксиметил)пентил)окси)этил)-4-метилбензол-сульфонотиоат (13)

К раствору диола **12** (14 г, 73 ммоль) добавляли тиотозилат калия (25 г, 110 ммоль) и TBAI (2,7 г, 7,3 ммоль), и образующуюся смесь перемешивали при 80°C в течение 64 ч. Данную смесь концентрировали, и неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (40% ацетона в гептане), с получением тиотозилата **13** (5,0 г, 14 ммоль, 20%) в виде желтого масла.

Синтез Apo-Si-K-93-A

S-(3-Оксопропил)этанттиоат (14)

К раствору акролеина (11 грамм, 196 ммоль) в дихлорметане (250 мл) добавляли триэтиламин (6,9 мл, 49 ммоль) и тиоуксусную кислоту (13,8 мл, 195 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем концентрировали. Дополнительная очистка с использованием флэш-хроматографии (15% EtOAc в гептане) давала соединение **14** (14,4 грамма, 109 ммоль) в виде коричневого масла с 55%-ным выходом.

S-(6-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)гексил)этанттиоат (15)

К раствору **7** (20,6 грамм, 34 ммоль) в 1,2-дихлорэтане (500 мл) добавляли уксусную кислоту (8,2 мл, 136 ммоль), альдегид **14** (5,4 грамма, 41 ммоль), а через 1 мин – триацетоксиборгидрид натрия (30 грамм, 141 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре, затем добавляли дихлорметан, и смесь промывали 1 М NaOH, водой и рассолом. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Дополнительная очистка с использованием флэш-хроматографии (градиент от 15% до 25% ацетона и 0,1% Et₃N в гептане) давала соединение **15** (14,4 грамма, 20 ммоль), которое выделяли в виде прозрачного масла с выходом 59%.

2-(3-(2-((3-((2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-

ил)окси)этил)(метил)амино)пропил)дисульфанил)этокси)пропил)пропан-1,3-диол (16)

Раствор тиацетата **15** (1,9 г, 2,6 ммоль) и тиотозилата **13** (1,8 г, 5,1 ммоль, 2 экв.) в CH₂Cl₂ (200 мл) и метаноле (20 мл) обрабатывали 5,4 М NaOMe в MeOH (1,42 мл, 7,7 ммоль, 3 экв.). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Данную смесь промывали NaHCO₃ (200 мл) и рассолом (200 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дополнительная очистка с использованием флэш-хроматографии (30% ацетона плюс 1% Et₃N в гептанах) давала соединение **16** (1,2 г, 1,4 ммоль, 53%) в виде желтоватого масла.

15

2-((бис(4-Метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(2-((3-((2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)

пропил)дисульфанил)этокси)пентан-1-ол (17)

К раствору **16** (1,2 г, 1,4 ммоль) добавляли Et₃N (0,14 мл, 1,4 ммоль, 1 экв.) и DMAP (16 мг, 0,14 ммоль, 0,1 экв.). В образующуюся смесь добавляли DMT-Cl (0,47 г, 1,4 ммоль, 1 экв.). Образующуюся желтую смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего ее концентрировали. Очистка колоночной хроматографией (20% ацетона и 1% Et₃N в гептане) давала монозащищенный спирт **17** (1,0 г, 0,87 ммоль, 63%) в виде прозрачного желтоватого масла.

25

2-((бис(4-Метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(2-((3-((2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)пропил)дисульфанил)этокси)пентил(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (Apo-Si-K-93-A).

30

К раствору монозащищенного диола **17** (1,0 г, 0,87 ммоль) в дихлорметане (40 мл) добавляли 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидит (0,4 мл, 1,25 ммоль, 1,3 экв.) и 0,5 М раствор *N*-метилморфолина и 0,25 М трифторуксусной кислоты в дихлорметане (2,5 мл, 1 эквивалент *N*-

35

метилморфолина по отношению к фосфорамидитному агенту). Данный желтоватый раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. ТСХ показывала неполное превращение, таким образом, добавляли дополнительные 0,2 мл 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидита. Через 1 ч данную смесь

5 гасили водным насыщенным бикарбонатом натрия и перемешивали в течение дополнительных 10 минут. Органический слой разделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дополнительная очистка с использованием флэш-хроматографии (15% ацетона и 1% Et₃N в гептане) давала соединение **Apo-Si-K-93-A** (880 мг, 0,64 ммоль, 74%) в виде бесцветного масла.

10

Пример 4: способ связывания группировки **E** по изобретению во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи

Исходно группировка **E** находится в виде ее предшественника, в котором каждая из ее двух гидроксильных групп защищена DMT [диметокситритил-бис-(4-метоксифенил)фенилметил]; и фосфорамидита. Традиционно синтез олигонуклеотида проводится последовательным добавлением защищенных нуклеотидов в направлении от 3' до 5'. Фосфорамидит используется для связывания с гидроксильной группой на 5'-конце олигонуклеотидной цепи; затем DMT удаляется, и соответствующая гидроксильная группа связывается с

15 фосфорамидитной группировкой, связанной с 3'-гидроксильной группой следующего нуклеотида, подлежащего включению в цепь. После завершения синтеза и **смысловой (сопровождающей), и направляющей (антисмысловой)** нитей миРНК происходит процедура отжига, как известно в данной области, с получением конечного конъюгата дуплекса РНК по изобретению. Для оптимизации

20 эффективности миРНК группировку **E** во внутреннем положении связывают со **смысловой (сопровождающей)** нитью, так как данная нить удаляется в пределах комплекса RISC, таким образом, обеспечивая непрерывную работу **направляющей (антисмысловой)** нити в аппарате сайленсинга генов RISC.

25

Пример 5: редоксопосредованное отделение и удаление группировки **E** в цитоплазме с высвобождением лекарственного средства-груза (например, миРНК)

В то время как группировки **E**, **E'** или **E''** по изобретению являются обязательными для трансмембранного прохождения конъюгатов миРНК, данные группировки желательно удалять, как только конъюгат достигнет цитоплазмы, и

35 выводить их из организма. В случае когда лекарственное средство-груз

представляет собой миРНК, это может быть полезным для избегания стерического препятствия во взаимодействии миРНК с комплексами белков сайленсинга генов (дайсер и RISC). Кроме того, такое отделение лекарственного средства-груза от группировок Е минимизировало бы нагрузку конъюгатов на клеточные фосфолипидные мембраны, таким образом, будучи потенциально полезным с точки зрения перспективы безопасности. С этой целью все группировки Е по изобретению содержат дисульфидную группировку. В окислительных условиях, таких как условия, которые преобладают во внеклеточной среде, данная дисульфидная группировка проявляет стабильность, таким образом, обеспечивая ее системное введение *in vivo*, распределение конъюгата в организме и поступление через клеточные фосфолипидные мембраны в клетки. В отличие от этого, цитоплазма представляет собой сильно восстановительную среду, главным образом, из-за высоких концентраций в ней глутатиона, который демонстрирует концентрационный градиент цитоплазма / внеклеточное пространство, составляющий примерно 4 порядка. Из-за этих примечательных восстановительных условий в цитоплазме дисульфидные группы группировок Е подвергаются восстановлению в цитоплазматической среде. Соответственно, имеется высвобождение лекарственного средства-груза (например, миРНК) с оказанием его фармакологических активностей в его сайтах-мишенях в цитоплазме (например, в белковых комплексах дайсер или RISC для сайленсинга генов). Сопутствующе группировки Е по изобретению, имеющие стерольный остов, выводятся из организма посредством желчи и/или мочи, аналогично другим молекулам на основе стеролов (например, эстрогены), либо непосредственно, либо после метаболизма (например, опосредованный цитохромом P450 метаболизм в печени).

25

Пример 6: типичная структура конъюгата миРНК по изобретению, содержащего три группировки Е, каждая из которых имеет структуру, заданную Формулой (IVa), и его соответствующий способ действия

Данный конъюгат описывается на Фиг. 2a, 2b, 2c и 2d. Исходно конъюгат находится в окислительных условиях и, таким образом, содержит дисульфидные группировки. В качестве примера приводится субстрат Дайсера, в котором нити РНК имеют длину 25 и 27 нуклеотидов. Более длинная нить (проводник, антисмысловая нить) имеет 2-нуклеотидный липкий конец на ее 3'-конце, требующийся для ее связывания с ферментом. Кроме того, смысловая (сопровождающая) нить имеет свободный фосфат на ее 5'-конце для того, чтобы занимать соответствующий пакет связывания в ферменте, который выслан

положительно заряженными аминокислотами. Две из группировок **E** связываются с сопровождающей нитью: одна на его 5'-конце и вторая – примерно в середине нити. Третья группировка **E** связывается с 5'-концом проводника. Исходно конъюгат находится в окислительных условиях, характерных для внеклеточного пространства, и, таким образом, дисульфидные группы группировок **E** сохраняются. При поступлении в цитоплазму, из-за окружающих восстановительных условий, дисульфидные связи восстанавливаются, и группировки **E** отщепляются от РНК, подлежащей выведению из организма, причем каждая оставляет маленький остаточный обрубок (**Фиг. 2b**). Фермент дайсер затем расщепляет дуплекс РНК, генерируя дуплекс длиной 21/23 нуклеотида, посредством этого также удаляя обрубок на направляющей нити (**Фиг. 2c**). Дуплекс РНК затем готов к поступлению в цитоплазматический белковый комплекс РНК-индуцированного сайленсинга (RISC). Сначала работает фермент хеликаза, которая осуществляет удаление сопровождающей нити, включая два остаточных обрубка, которые присоединяются к ней. Затем (**Фиг. 2d**) доставляется интактная направляющая нить в комплекс RISC с взаимодействием с мРНК, кодирующей белок-мишень, таким образом, приводя к ее деградации и, таким образом, индуцируя сайленсинг желательного гена.

20 **Пример 7: биологическая эффективность Apo-Si-K-93-A:**

Биологическую эффективность **Apo-Si-K-93-A** оценивали в следующих аспектах, которые все являются важными для запланированного применения конъюгатов, которые содержат данную группировку **E** *in vivo*, в клинических условиях. Для данных экспериментов использовали два дуплекса мРНК, причем каждый является субстратом Дайсера, сконструированных для сайленсинга гена EGFR (усиленный зеленый флуоресцентный белок). В одном из дуплексов группировка **Apo-Si-K-93-A** была присоединена к каждой нити РНК на ее 5'-конце (данный дуплекс был обозначен **K-93-A**). Во втором дуплексе группировка **Apo-Si-K-93-A** была присоединена на 5'-конце каждой нити РНК, тогда как третья группировка **Apo-Si-K-93-A** была присоединена во внутреннем положении вдоль сопровождающей (направляющей) нити в месте 14-го нуклеотида. Данный дуплекс был, следовательно, обозначен **K-93-A-del-14**. Нуклеотидные последовательности для каждой из этих конструкций были следующими:

1. Конструкция K-93-A:

35 **Смысловая:** 5'-фос/i**Apo-Si-K93-A**/mAmCrCmCrUmGrArArG rUrUmCrA
mUrCmUrG mC rArC rCrArCmCG rUrCrA.

Антисмысловая: /5'-фос/iApo-SiK-93-

A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rG mGrGmUmCmA.

2. K-93-A-del-14:**Смысловая: /5фос/iApo-Si-K-93-A/mAmCrCmCrUmGrArArGrUrUmCrA/iApo-**

5 **SiK93-A/** rCmUrG mCrArCrCrArCmCG.

Антисмысловая:**/5фос/iApo-Si-K-93-**

A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rUrCrArG mGrGmUmCmA. *r*
означает рибозу; *m* означает метилирование.

Оба конъюгата затем подвергали следующим оценкам:

10 **1. Фракция, не содержащая белок, при инкубации с альбумином:**

Для эффективной работы при введении в кровь для лекарственного средства является ценным наличие и фракции, которая связывается с белками крови, и свободной фракции, способной свободно мигрировать через внеклеточное пространство в клетки. Для того чтобы проверить данный аспект в отношении **Apo-Si-K-93-A**, применяли гель-электрофорез: 20 пмоль образцов РНК разводили в буфере Tris, pH 7,4, и добавляли бычий сывороточный альбумин (BSA) до конечной концентрации 2 мг/мл. Все образцы инкубировали в течение ночи при 25°C. Данные образцы РНК затем загружали на 12%-ный нативный полиакриламидный гель, и они мигрировали в течение 1 часа в электрическом поле 5 В/см (Mini protean от Bio-
20 rad). Контрольные образцы включали образцы РНК, разведенные в воде, а не в BSA, и реакционные смеси, которые обрабатывали протеиназой K (Sigma) в течение 2 ч при 37°C, целью которых было высвобождение конъюгата, связанного с белком, через протеолиз альбумина. **Apo-Si-S1** – конъюгат Apo-Si, который прочно связывается с альбумином – использовали в качестве позитивного контроля.

25

2. Расщепление дисульфидной группировки Apo-Si-K-93 при инкубации с восстановленным глутатионом:

Одной отличительной чертой конструкции **Apo-Si-K-93-A** было включение дисульфидной группы в пределы группировки **Apo-Si-K-93-A** с целью селективного
30 расщепления при восстановительных условиях, которые преобладают в цитоплазме, таким образом, высвобождая генетическое лекарственное средство-груз для взаимодействия с цитоплазматическими комплексами сайленсинга генов: дайсер и RISC. Для того чтобы продемонстрировать данную характеристику **Apo-Si-K-93-A**, 20 пмоль образцов РНК разводили в 30 мМ буфере Tris, pH 7,4,
35 дополненном 1 мМ глутатионом (Sigma). Все образцы инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Контрольные образцы разводили в воде. Образцы РНК затем

загружали на 12%-ный нативный полиакриламидный гель, и они мигрировали в электрическом поле в течение 1 часа при 5 В/см (Mini protean от Bio-rad).

3. Доставка в клетки и сайленсинг генов *in vitro*:

5 Линию клеток HeLa-EGFP, полученную от Cell Biolabs, выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (Gibco), дополненной 10% FBS (фетальная телячья сыворотка) (Gibco), 100 У/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицина. Клетки поддерживали в инкубаторе при 37°C с увлажненным воздухом с 5% CO₂. За одни сутки до трансфекции клетки (40000 клеток/лунку) высаживали на 24-луночные черные планшеты со стеклянным дном с полной средой без дополнения антибиотиками. На следующие сутки клетки подвергали воздействию конъюгатов MNM: либо 600 нМ конъюгата, инкубируемого с 10% BSA в течение 72 часов; либо при инкубации с 10, 40 и 150 нМ конъюгата при бессывороточных условиях в течение 24 часов, с последующим добавлением полной среды в течение дополнительных 48 часов инкубации. Понижающую регуляцию белка, следовательно, измеряли в 72 часа после трансфекции при отсасывании среды и промывке клеток HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнка). Интенсивность флуоресценции EGFP количественно измеряли посредством многорежимного ридера Infinite M200- Pro (Tecan), при длине волны возбуждения 488 нм, длине волны испускания 535 нм.

Результаты:

На **Фиг. 3** продемонстрирована не содержащая белка фракция при инкубации с BSA. В отличие от **Apo-Si-S1**, который полностью взаимодействовал с BSA, **K-93-A** и **K-93-A-del-14** демонстрировали только слабое взаимодействие с BSA и проявляли главную свободную фракцию, которая, что интересно, значимо не устранялась присутствием дополнительной группировки **K-93-A**, в **K-93-A-del-14** (**Apo93-del-14**) (стрелка). Обработка протеиназой К (ПК) извлекала весь **Apo-Si-S1**, связанный с белком, и также высвобождала маленькую фракцию **K-93-A**, которая присоединяется к BSA в обоих конъюгатах: **K-93-A** и **K-93-A-del-14**.

На **Фиг. 4** продемонстрировано то, что инкубация обоих конъюгатов: **K-93-A** и **K-93-A-del-14** с восстановленным глутатионом (1 мМ в течение 2 часов) приводила к надежному расщеплению обоих конъюгатов: **K-93-A** и **K-93-A-del-14** (стрелка). Важно то, что присоединение третьей группировки **E** не замедляло реакцию восстановления. Данная реакция происходила в условиях относительно мягкого воздействия в отношении восстановителя (1 мМ, 2 часа). Данные

положительные результаты согласовались с наблюдаемыми влияниями на сайленсинг генов: **K-93-A** и **K-93-A-del-14**, присоединенные к одинаковым последовательностям миРНК EGFP, индуцировали заметный нокдаун экспрессии EGFP как в бессывороточных условиях, так и в условиях присутствия сыворотки, 5 дозозависимым образом. С сывороткой (10% BSA) 600 нМ **K-93-A** индуцировала понижающую регуляцию гена EGFP на **24,1 плюс/минус 5,0%**, тогда как добавление третьей, внутренней группировки **E** было ассоциировано с заметным усилением наблюдаемого сайленсинга гена до **50,3% плюс/минус 5,0%**. Эффективный сайленсинг гена также наблюдали в бессывороточных условиях, где 10 **K-93-A** индуцировала сайленсинг гена **63,5%, 79,3% и 86,3%** при инкубации с 10 нМ, 40 нМ и 150 нМ конъюгата соответственно. **K-93-A-del-14** индуцировала **50,3%-ный, 76,6%-ный и 84,7%-ный** сайленсинг гена при обработке 10 нМ, 40 нМ и 150 нМ соответственно.

15 **Заключения:**

Как оценивалось в клетках HeLa *in vitro*, **Apo-Si-K-93-A** проявляла благоприятный профиль эффективности, который заслуживает его продолжающейся разработки в качестве средства доставки миРНК в клетки через биологические мембраны. Данная группировка **E** демонстрировала большую 20 свободную фракцию при инкубации с альбумином, надежное уменьшение и расщепление дисульфидной группировки при уровнях глутатиона, которые соответствуют физиологическим уровням в цитоплазме живых клеток, завершающееся эффективным сайленсингом гена как в присутствии, так и в отсутствие белков плазмы. Важно то, что **Apo-Si-K-93-A** проявлялась совокупно по 25 его активности, что отражалось присоединением трех группировок, которые, как было обнаружено, явно превосходят присоединение двух группировок в желательной индукции сайленсинга гена.

Пример 7: биологическая эффективность Apo-Si-K-63-A:

30 Использовали два дуплекса миРНК, каждый представляющий субстрат Дайсера, сконструированные для сайленсинга гена EGFP. В одном из дуплексов группировка **Apo-Si-K-63-A** была присоединена к каждой нити РНК на ее 5'-конце. Данный дуплекс был обозначен **K-63-A**. Во втором дуплексе группировка **Apo-Si-K-63-A** была присоединена на 5'-конце каждой нити РНК, тогда как третья группировка 35 **Apo-Si-K-63-A** была присоединена во внутреннем положении вдоль сопровождающей (направляющей) нити в месте 14-го нуклеотида. Данный дуплекс

был, следовательно, обозначен **K-63-A-del-14**. Нуклеотидные последовательности для каждой из данных конструкций были следующими:

1. Конструкция K-63-A:

Смысловая: 5'-фос/iApo-Si-K63-A/mAmCrCmCrUmGrArArG rUrUmCrA

5 mUrCmUrG mC rArC rCrArCmCG rUrCrA

Антисмысловая: /5'-фос/iApo-SiK-63-

A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rG mGrGmUmCmA

2. Конструкция K-63-A-del-14:

Смысловая: /5фос/iApo-Si-K-63-A/mAmCrCmCrUmGrArArGrUrUmCrA/iApo-

10 SiK63-A/ rCmUrG mCrArCrCrArCmCG

Антисмысловая:

/5фос/iApo-Si-K-63-

A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrU rUrCrArG mGrGmUmCmA

Цели исследования:

15 Оценка эффективности обеих конструкций в осуществлении сайленсинга экспрессии гена EGFP:

Способы:

Линии клеток HeLa-GFP получали от Cell Biolabs. Клетки выращивали в
20 среде Игла, модифицированной по Дульбекко (Gibco), дополненной 10% FBS (Gibco), 100 U/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицина. Клетки поддерживали в инкубаторе при 37°C с увлажненным воздухом с 5% CO₂. За сутки до трансфекции клетки (40000 клеток/лунку) высаживали на 24-луночные черные планшеты со стеклянным дном.
25 На следующие сутки клетки подвергали воздействию **K-63-A** или **K-63-A-del-14** в присутствии 10% сыворотки. Для бессывороточных трансфекций среду отсасывали, клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS), и среду затем заменяли бессывороточной Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) на 24 часа, с последующим добавлением сыворотки для инкубации в течение дополнительных
30 48 часов. Понижающую регуляцию экспрессии белка измеряли через 72 часа после трансфекции. Для этой цели среду отсасывали, и клетки промывали HBSS. Интенсивность флуоресценции EGFP количественно измеряли посредством многорежимного ридера Infinite M200- Pro (Tecan) при длине волны возбуждения 488 нм, длине волны испускания 535 нм.

35

Результаты:

И **K-63-A**, имеющая две группировки **E**, и **K-63-A-del-14**, имеющая три группировки **E**, индуцировали эффективный нокдаун экспрессии RGFP.

В присутствии сыворотки 600 нМ **K-63-A** снижала экспрессию EGFP до **77,6% плюс/минус 1,3** (среднее плюс/минус SD (стандартное отклонение)). Более
5 сильный эффект наблюдали с **K-63-A-del-14**, где 600 нМ снижала экспрессию EGFP до **60,2% плюс/минус 1,0**.

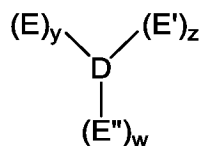
В бессывороточных условиях конъюгаты по изобретению индуцировали надежный нокдаун GFP: **K-63-A** снижала экспрессию EGFP до **75,6% плюс/минус 2,6%, 44,1% плюс/минус 0,05% и 23,7% плюс/минус 0,62%**, когда клетки
10 подвергались воздействию 10, 40 и 150 нМ соответственно. **K-63-A-del-14** снижала экспрессию GFP до **83,2% плюс/минус 4,0%, 51,4% плюс/минус 0,07% и 18,9% плюс/минус 1,3%**, когда клетки подвергались воздействию 10, 40 и 150 нМ соответственно.

15 **Заключения:**

K-63-A является эффективной группировкой для доставки макромолекулярных миРНК через фосфолипидные мембраны. Установка дополнительной группировки **K-63-A** демонстрирует кооперативность и синергию в процессе трансмембранной доставки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, имеющий структуру, заданную **Формулой (I)**:



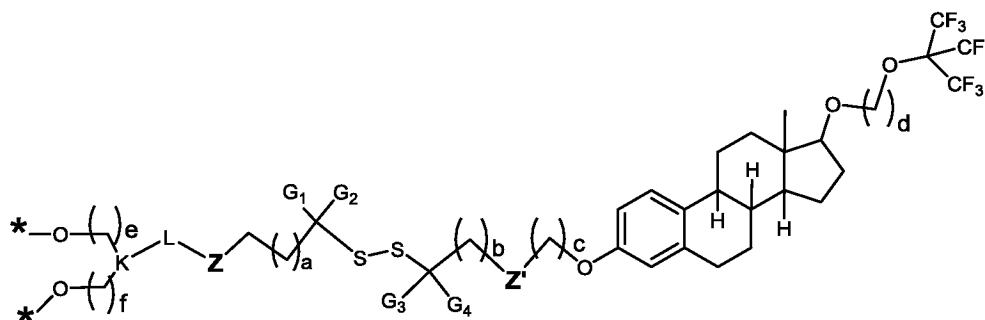
Формула (I)

включающий фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (I)**, сольваты и гидраты данных солей, где

D представляет собой лекарственное средство, подлежащее доставке через биологические мембраны, выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного средства, пептида, белка и нативной или модифицированной, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК (малая интерферирующая РНК) или АСО (антисмысловый олигонуклеотид);

каждый из **y**, **z** и **w** представляет собой целое число, независимо выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где каждый раз, когда целое число равно 0, это означает, что соответствующая группировка **E** отсутствует; по меньшей мере один из **y**, **z** и **w** отличен от 0;

E, **E'** или **E''** могут быть одинаковыми или разными, причем каждая независимо имеет структуру, заданную общей **Формулой (II)**:



(Форула II)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (II)**, сольваты и гидраты данных солей, где:

G₁, **G₂**, **G₃** и **G₄** каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, метила или этила; по меньшей мере две группы **G** представляют собой водород;

Z и **Z'** каждый независимо выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы; -CH₂-; -NH-; -N(R')-; -C(H)(CH₂)_n[N(R'')(R''')]-; -N(R')-C(O)-C(H)(CH₂)_n[N(R'')(R''')]-; где каждый из **R'**, **R''** и **R'''** независимо выбран из группы, состоящей из водорода, C₁, C₂, C₃, C₄алкила; или C₁, C₂, C₃, C₄алкиламина, где данный амин представляет собой первичный,

вторичный или третичный амин; n обозначает целое число 0, 1, 2, 3, 4; где n , равный 0, означает отсутствие; по меньшей мере один из Z или Z' представляет собой амин;

L представляет собой линкер, выбранный из отсутствующего линкера; простого эфира, амида; сложного эфира; карбоната; карбаматной группы(групп); одной или двух углеводородных цепей, причем каждая содержит 1-4 атома углерода, являющихся возможно замещенными гидроксильной(ными) или аминогруппой(группами); или любой их комбинации;

K выбран из отсутствующей группы, $-CH-$ и $-N-$;

a представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

b представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

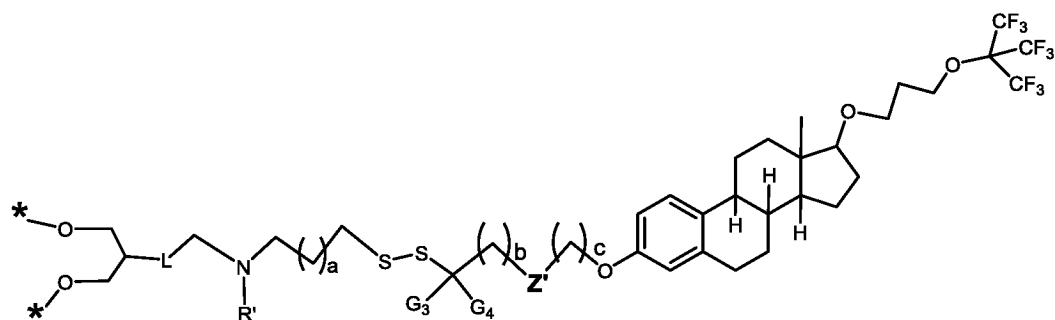
c представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3 и 4;

d представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2, 3 и 4;

каждый из e , f представляет собой целое число, независимо выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2 и 3;

$*$ выбран из группы, состоящей из водорода; точки связывания с D ; точки связывания с защитной группой спирта; точки связывания с фосфатом, сульфатом или карбоксильной группой и точки связывания с твердой подложкой.

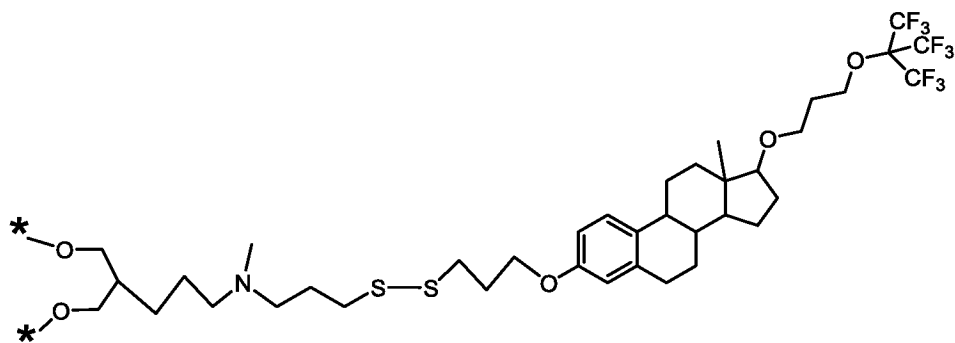
2. Конъюгат по п. 1, в котором по меньшей мере одна из E , E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулой (III)**:



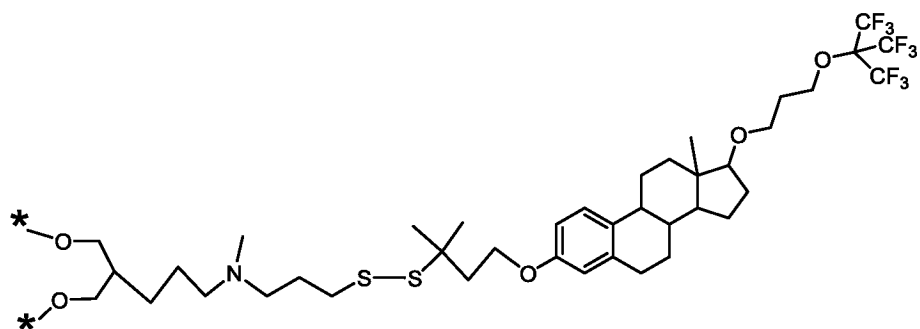
Формула (III)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулой (III)**, сольваты и гидраты данных солей, где каждый из Z' , R' , L , G_3 , G_4 , a , b , c и $*$ является таким, как определено в **Формуле (II)**.

3. Конъюгат по п. 2, где по меньшей мере одна из E , E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулами (IV)** или **(IVa)**:



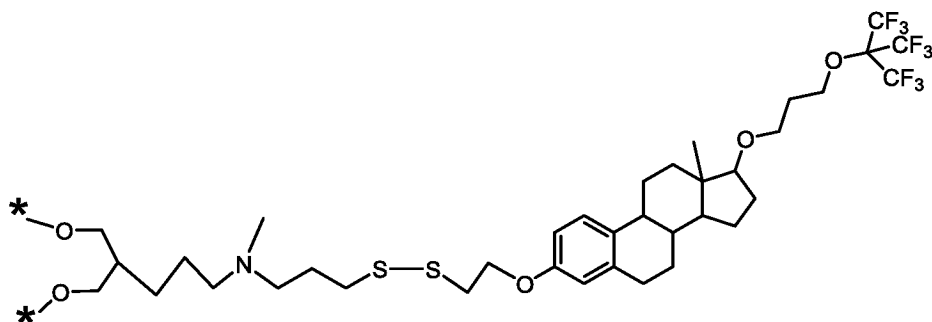
(Формула IV)



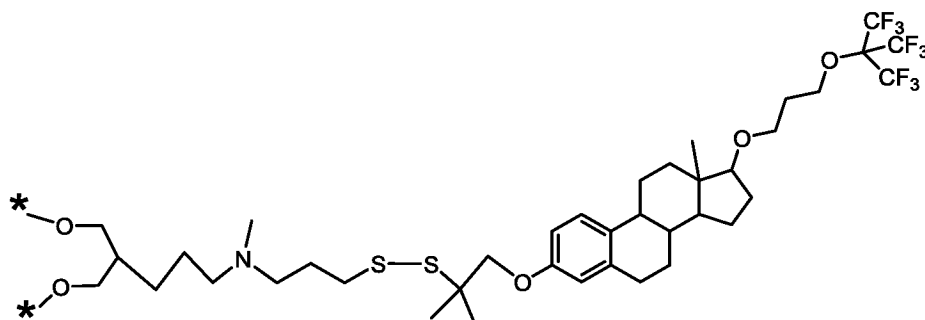
(Формула IVa)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (IV) или (IVa)**, сольваты и гидраты данных солей.

4. Конъюгат по п. 2, в котором по меньшей мере одна из E, E' или E'' имеет структуру, заданную **Формулами (V) или (Va)**:



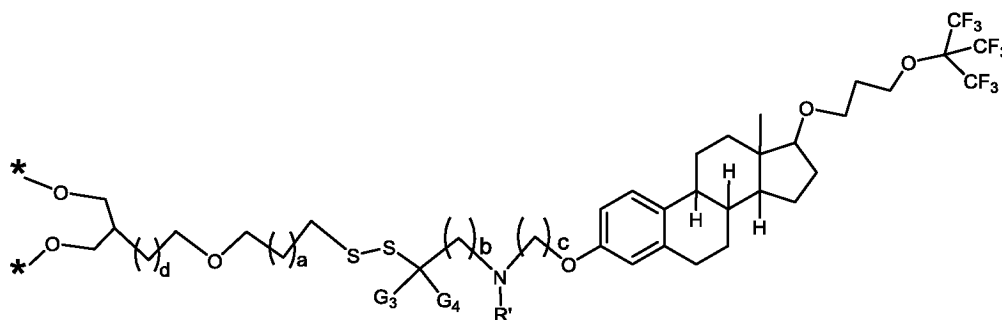
(Формула V)



(Формула Va)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (V) или (Va)**, сольваты и гидраты данных солей.

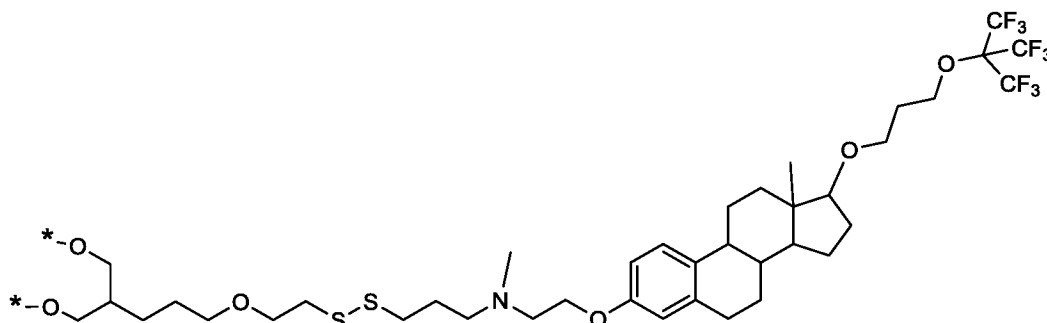
5. Конъюгат по п. 1, в котором по меньшей мере одна из **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, заданную **Формулой (VI)**:



Формула (VI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (V) или (Va)**, сольваты и гидраты данных солей., где каждый из **R'**, **G₃**, **G₄**, **a**, **b**, **c**, **d** и ***** является таким, как определено в **Формуле (II)**.

6. Конъюгат по п. 5, в котором по меньшей мере одна из **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, заданную **Формулами (VII) или (VIIa)**:



(Формула VII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (VII)** или **(VIIa)**, сольваты и гидраты данных солей.

OCC(COC)CCCCCCCCSSCCCN(C)CCOc1ccc2c(c1)[C@H]3[C@@H](COCCOC(F)(F)F)CCC4=C3C=CC(=C2)C4COc1ccc2c3c4c1ccc5c2c(c3)C(C)C5OC(C)COCCOC(C)(C)F(F)F

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, заданной **Формулами (VIII)** или **(VIIIa)**, сольваты и гидраты данных солей.

9. Конъюгат по п. 8, в котором лекарственное средство представляет собой макромолекулярное лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из мРНК, АСО и терапевтического белка.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по п. 8 и фармацевтически приемлемую соль или носитель.

11. Способ доставки лекарственного средства в биологические клетки, где указанные клетки находятся в культуре или в живом животном или человеке, причем данный способ включает приведение клеток в контакт с конъюгатом по п. 8 или с фармацевтической композицией по п. 10.

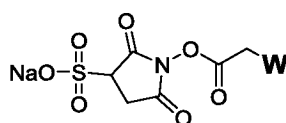
12. Способ лечения медицинского расстройства, включающий введение нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции по п. 10.

13. Способ доставки лекарственного средства через биологические барьеры, выбранные из гематоэнцефалического барьера, гематоофтальмического барьера или гематоплацентарного барьера; причем данный способ включает введение субъекту *in vivo* фармацевтической композиции по п. 10.

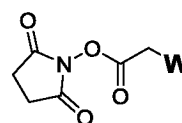
14. Молекула-предшественник, содержащая группировку E, E' или E'', заданную любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) и (VIIIa)**, и химическую группировку, предназначенную для удаления или модификации во время образования конъюгата по изобретению.

15. Молекула-предшественник по п. 14, в которой химическая группировка, предназначенная для удаления или модификации, выбрана из группы, состоящей из защитной группы для гидроксила, диметокситритил-бис-(4-метоксифенил)фенилметил] (DMT) и фосфорамидата.

16. Предшественник по п. 14 для присоединения E, E' или E'' к D, где D представляет собой белковое лекарственное средство; причем указанный предшественник содержит структуру, заданную **Формулами A или B**:



A



B

где W выбран из E, E' или E'' согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VII), (VIIa), (VIII) и (VIIIa)**; где указанный предшественник нацелен на связывание, через его N-гидроксисукцинимидную (NHS) группировку, с аминокеттами боковых цепей лизина белка.

17. Конъюгат, содержащий дуплекс миРНК, связанный на каждом из его 5'-концов с группировкой E, E' или E'' согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VIIa), (VIII) и (VIIIa)**.

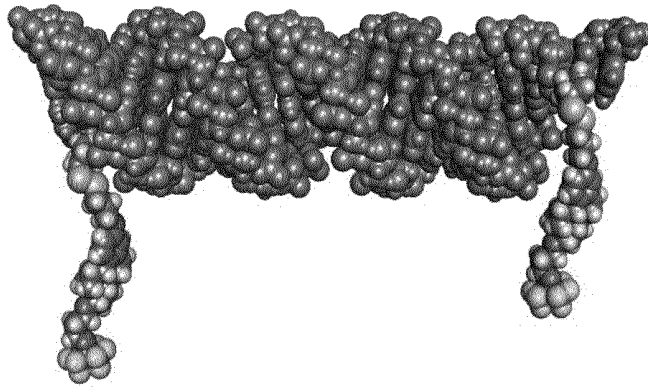
18. Конъюгат, содержащий дуплекс миРНК, связанный на каждом из его 5'-концов и также во внутреннем положении в пределах данного дуплекса миРНК с группировкой E,

Е' или Е'' согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VIIa), (VIII) и (VIIIa).**

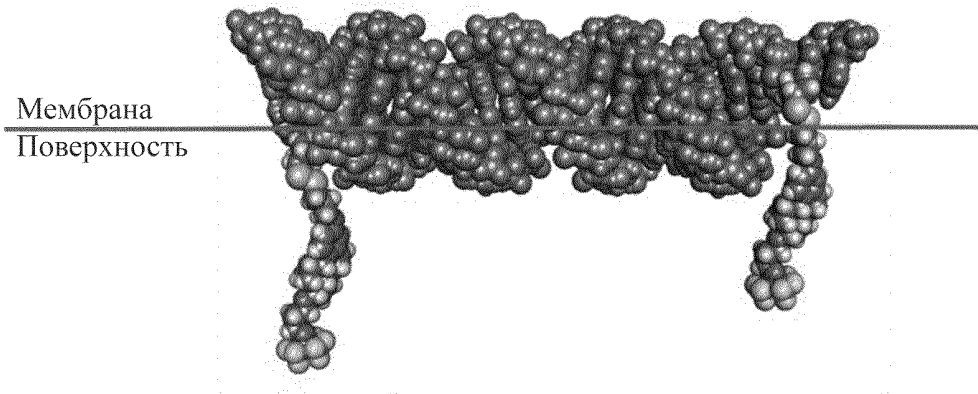
19. Способ индуцирования деформации и очаговых структурных пертурбаций в наружном листке фосфолипидной мембраны липосом или биологических клеток, *in vitro* или *in vivo*; причем указанный способ включает взаимодействие конъюгата по изобретению с фосфолипидной мембраной, где данный конъюгат содержит дуплекс миРНК, связанный на каждом из его концов и возможно также во внутреннем положении в пределах дуплекса миРНК с группировками Е, Е' или Е'', причем каждая имеет структуру согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VIIa), (VIII) и (VIIIa).**

20. Способ по п. 19 для индукции эндоцитоза и/или флип-флоп в фосфолипидной мембране.

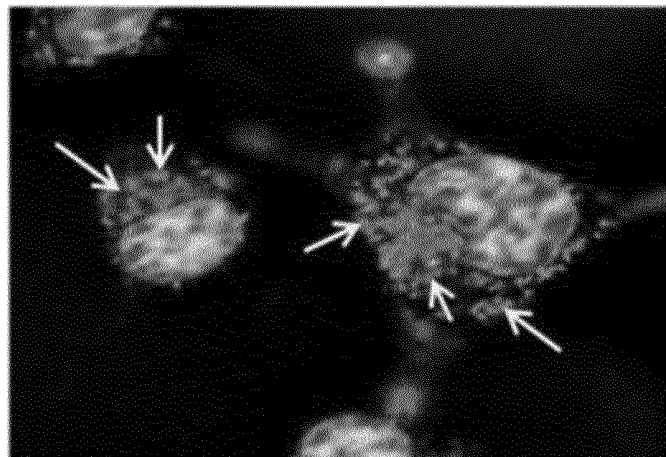
1



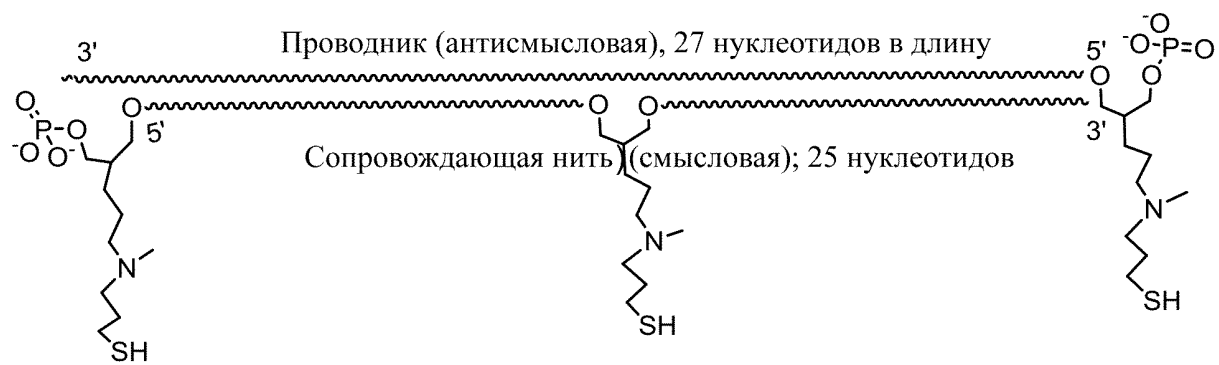
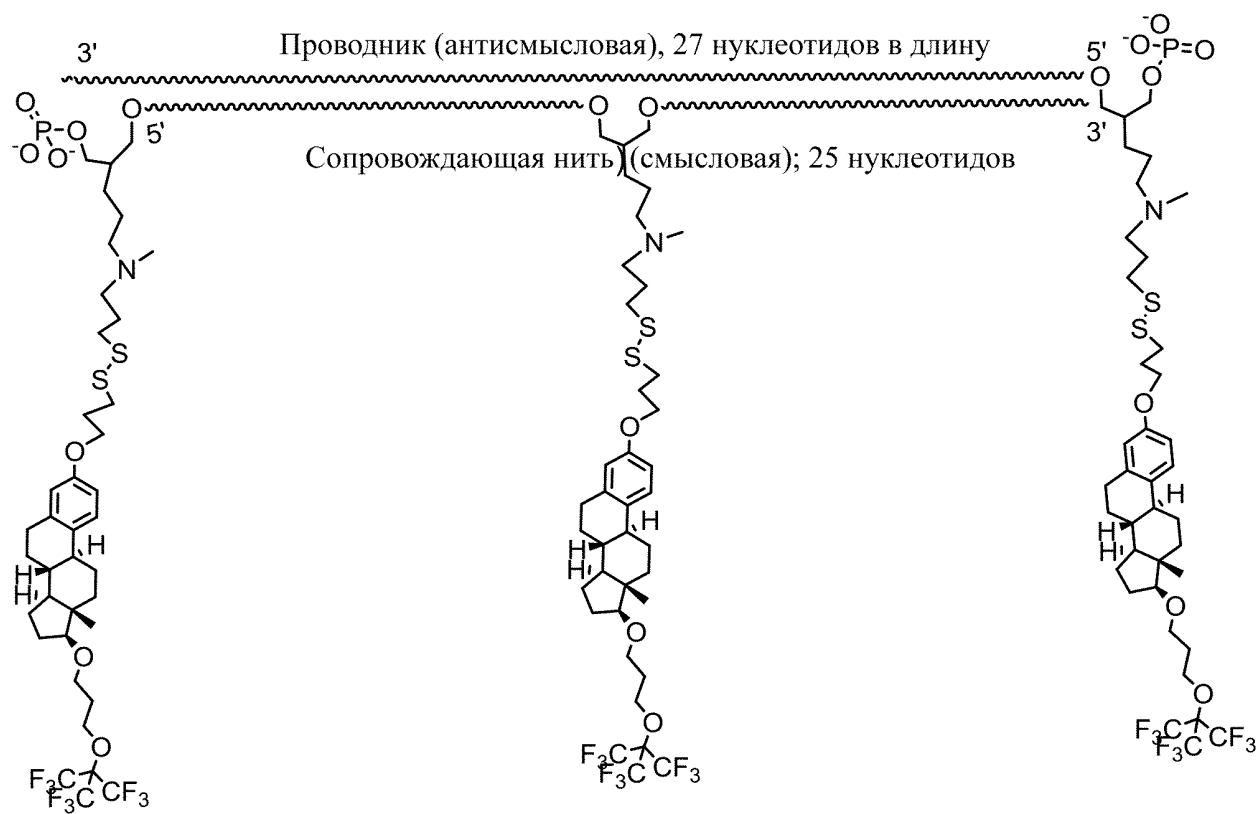
ФИГ. 1a

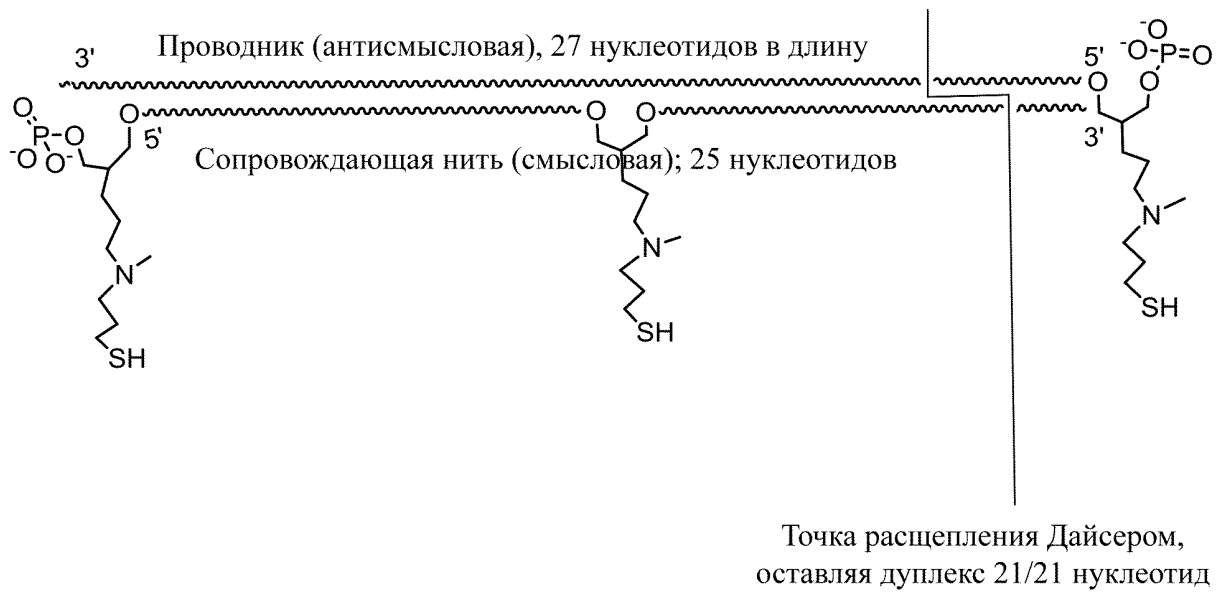


ФИГ. 1b

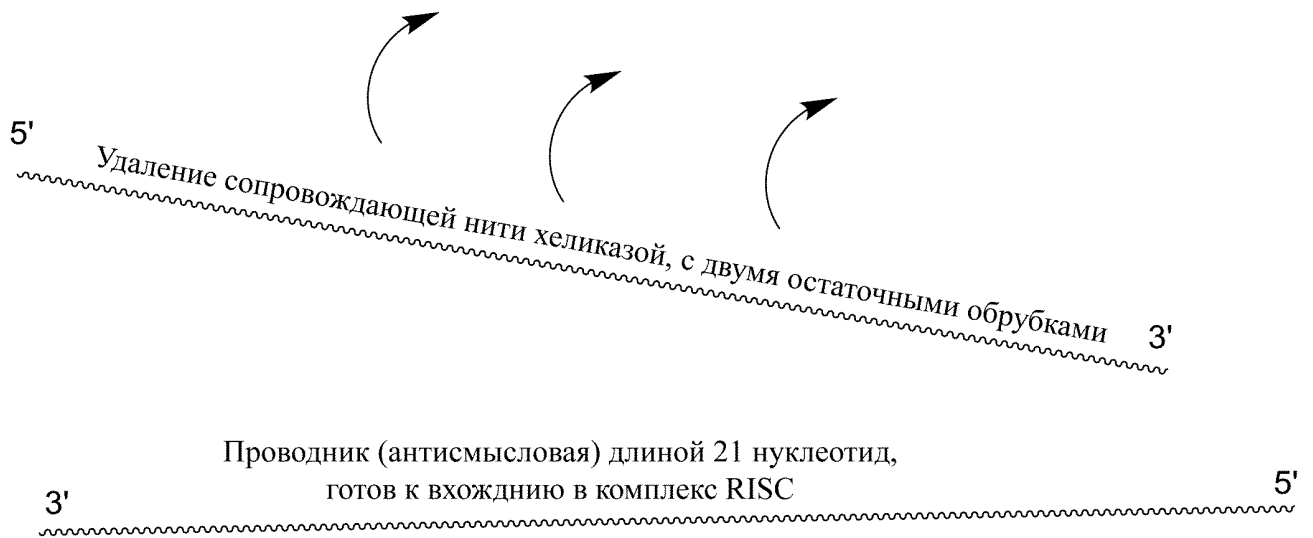


ФИГ. 1c

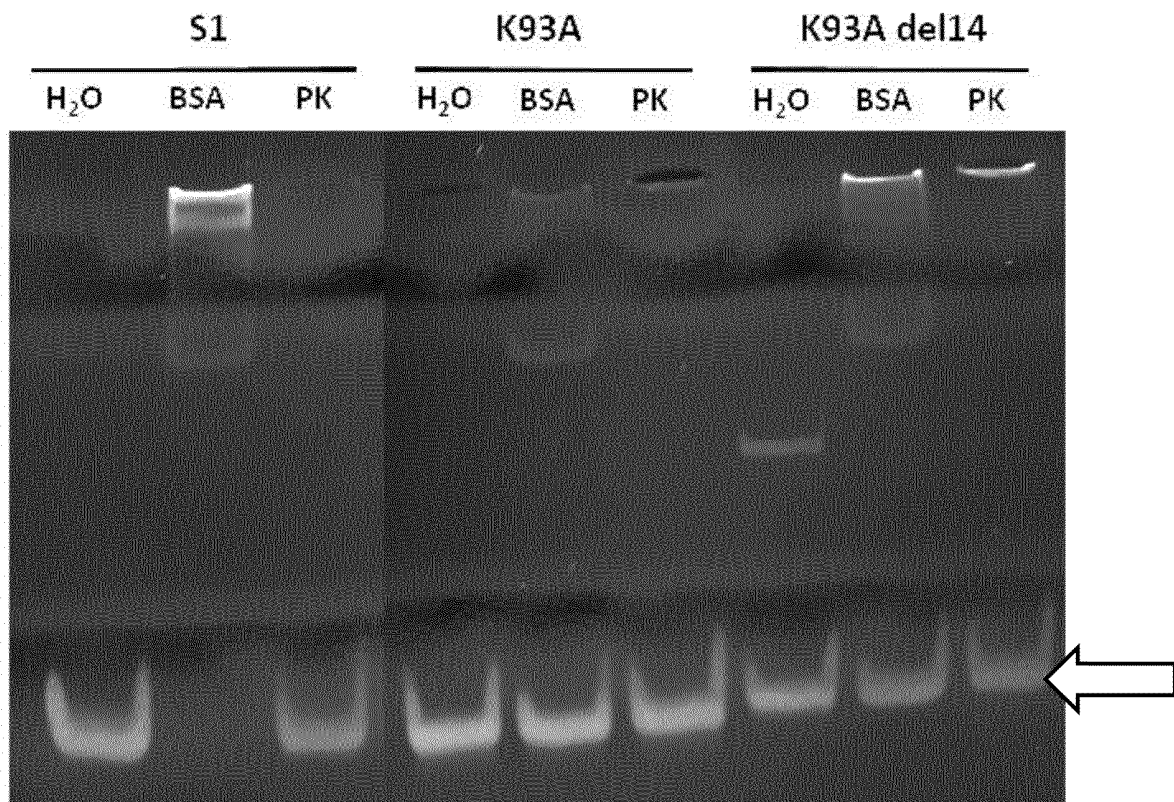




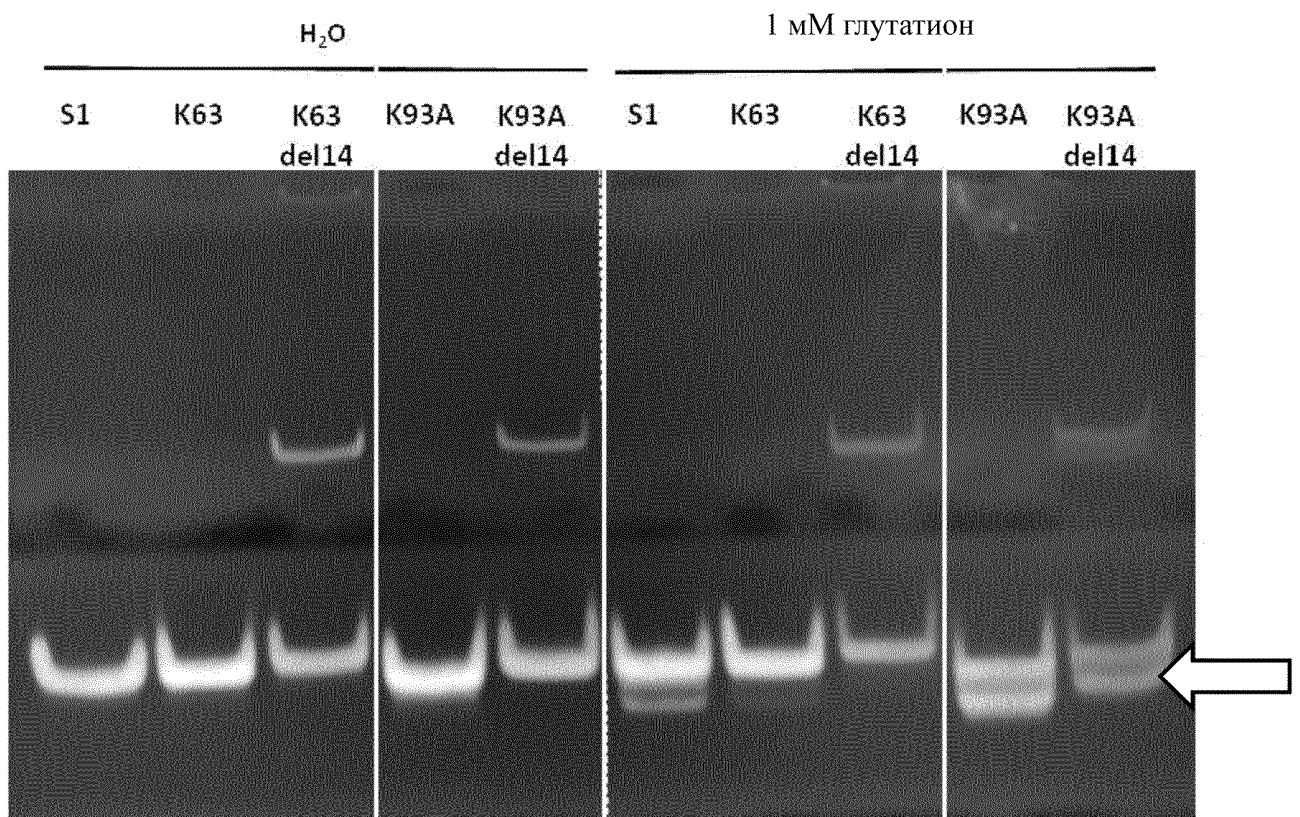
ФИГ. 2с



ФИГ. 2d



ФИГ. 3



ФИГ. 4