

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992411 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.26(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.04.10

(54) НАПРАВЛЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 62/484,247; 62/525,071

(32) 2017.04.11; 2017.06.26

(33) US

(86) PCT/US2018/026918

(87) WO 2018/191278 2018.10.18

(88) 2018.11.22

(71) Заявитель:
АРБУТУС БИОФАРМА
КОРПОРЭЙШН (СА)

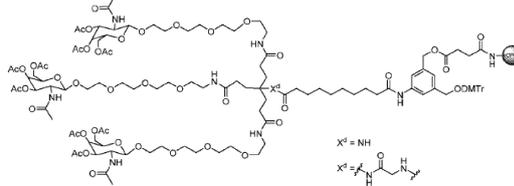
(72) Изобретатель:

Хейес Джеймс, Холланд Ричард Дж.,
Джадж Адам, Ли Эми С.Х., Мартин
Алан Д., Снед Николас Майкл, Тхи
Эмили П., Вуд Марк, Е Синь (СА)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложены определенные нуклеиновые кислоты (например, двухцепочечной молекулы двухцепочечной миРНК), а также конъюгаты, которые включают направляющий фрагмент, двухцепочечную миРНК и необязательно связывающие группы. В определенных вариантах осуществления также предложены синтетические способы, пригодные для получения конъюгатов. Данные конъюгаты пригодны для нацеливания терапевтических двухцепочечных миРНК на печень и для лечения заболеваний печени, включающих гепатит (например, гепатит В или гепатит D).



Промежуточное соединение формулы Ie, в котором направляющий лиганд/линкер связан с твердофазной подложкой и в котором Rg¹ представляет собой защитную группу ДМТ.

A1

201992411

201992411

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559386EA/042

НАПРАВЛЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка на патент испрашивает преимущество приоритета по заявке на патент США с серийным № 62/525071, поданной 26 июня 2017 г. и заявке на патент США серийным № 62/484247, поданной 11 апреля 2017 г., которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Для печени характерен ряд болезней, например гепатит В и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). Соответственно, было бы целесообразно иметь терапевтические композиции, действие которых направлено преимущественно на печень, почки, сердце, поджелудочную железу или другие органы живых субъектов.

Нуклеиновые кислоты, включая малую интерферирующую РНК (миРНК), пригодны в качестве терапевтических средств.

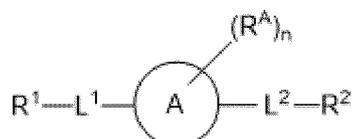
В настоящее время существует потребность в композициях и способах, которые могут применяться для доставки (например, целенаправленной) терапевтических нуклеиновых кислот, таких как двухцепочечная миРНК, в организмы живых субъектов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении предложены молекулы нуклеиновой кислоты (например, терапевтические молекулы двухцепочечной миРНК), а также соединения, композиции и способы, которые можно применять для нацеливания таких нуклеиновых кислот (например, на печень).

Соответственно, в одном аспекте изобретения предложена двухцепочечная молекула миРНК, выбранная из группы, включающей миРНК 1 (SEQ ID NO:1 и 2), 2 (SEQ ID NO:3 и 4), 3 (SEQ ID NO:5 и 6), 4 (SEQ ID NO:7 и 8), 5 (SEQ ID NO:9 и 10), 6 (SEQ ID NO:11 и 12), 7 (SEQ ID NO:13 и 14), 8 (SEQ ID NO:15 и 16), 9 (SEQ ID NO:17 и 18), 10 (SEQ ID NO:19 и 20), 11 (SEQ ID NO:21 и 22), 12 (SEQ ID NO:23 и 24), 13 (SEQ ID NO:25 и 26), 14 (SEQ ID NO:27 и 28), 15 (SEQ ID NO:29 и 30), 16 (SEQ ID NO:31 и 32), 17 (SEQ ID NO:33 и 34), 18 (SEQ ID NO:35 и 36), 19 (SEQ ID NO:37 и 38), 20 (SEQ ID NO:39 и 40), 21 (SEQ ID NO:41 и 42), 22 (SEQ ID NO:43 и 44), 23 (SEQ ID NO:45 и 46), 24 (SEQ ID NO:47 и 48), 25 (SEQ ID NO:49 и 50), 26 (SEQ ID NO:51 и 52), 27 (SEQ ID NO:53 и 54), 28 (SEQ ID NO:55 и 56), 29 (SEQ ID NO:57 и 58), 30 (SEQ ID NO:59 и 60), 31 (SEQ ID NO:61 и 62), 32 (SEQ ID NO:63 и 64), 33 (SEQ ID NO:65 и 66), 34 (SEQ ID NO:67 и 68), 35 (SEQ ID NO:69 и 70), 36 (SEQ ID NO:71 и 72) и 37 (SEQ ID NO:73 и 74).

В другом аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы I



(I)

где:

 R^1 представляет собой направляющий лиганд; L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу; L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечной миРНК Таблицы 1;

кольцо А отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксильную группу, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил-OR^B, C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил; где C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксильной группы и C_{1-3} алкокси;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его соль.

В другом аспекте в данном изобретении предложены конъюгаты GalNAc, которые содержат одну из миРНК, описанных в данном документе, причем данные конъюгаты не ограничиваются конъюгатами, которые содержат лиганд–линкеры, раскрытые в данном документе. Например, в одном аспекте изобретения предложен конъюгат GalNAc формулы X:

$$A-B-C$$

(X)

где А представляет собой направляющий лиганд;

В представляет собой необязательный линкер; а также

С представляет собой молекулу миРНК, описанную в данном документе.

Терапевтическая двухцепочечная миРНК, описанная в данном документе, а также соединения и композиции, содержащие такую миРНК, могут применяться для лечения вируса гепатита В и вируса гепатита В/вируса гепатита D.

Настоящее изобретение также предусматривает синтетические промежуточные соединения и способы, раскрытые в настоящем документе, которые пригодны для получения соединений формулы I.

Другие объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны специалисту в данной области из приведенных ниже детального описания и фигур.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1: Демонстрирует промежуточное соединение формулы Ie, где направляющий лиганд/линкер связан с твердой подложкой и в котором Pg^1 представляет собой защитную группу ДМТ (диметокситритил).

Фигура 2: Демонстрирует типичное соединение формулы Id, где направляющий лиганд связан с твердой подложкой, ковалентно связанной с нуклеиновой кислотой.

Фигура 3: Демонстрирует типичное соединение формулы Id, где направляющий конъюгат – лиганд–нуклеиновая кислота – отщеплен от твердой подложки и лишен защитной группы, для получения соединения формулы I.

В данной заявке, включая фигуры, примеры и схемы, следует понимать, что олигонуклеотид может представлять собой двухцепочечную молекулу миРНК, описанную в Таблице 1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В контексте данного документа, следующие термины имеют присвоенные им значения, если не указано иное.

В контексте данного документа термин «конъюгат» включает соединения формулы (I), которые содержат олигонуклеотид (например, молекулу миРНК), связанный с нацеливающим лигандом. Таким образом, термины соединение и конъюгат могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

Термин «малая интерферирующая РНК» или «миРНК» в контексте данного документа относится к двухцепочечной РНК (*например*, дуплексной РНК), которая способна снижать или подавлять экспрессию направляющего гена или последовательности (*например*, способствуя деградации или подавляя трансляцию матричных РНК, которые комплементарны к данной последовательности миРНК), если миРНК находится в той же самой клетке, что и целевой ген или последовательность. Данная миРНК может иметь высокую степень сходства или быть полностью тождественной целевому гену или последовательности, или может включать область некомплементарности (*m.e.*, некомплементарный мотив). В некоторых вариантах осуществления, миРНК могут включать около 19–25 (дуплексные) нуклеотидов в длину и, предпочтительно, около 20–24, 21–22 или 21–23 (дуплексные) нуклеотидов в длину. Дуплексы миРНК могут содержать 3' «липкие» концы от около 1 до около 4 нуклеотидов или от около 2 до около 3 нуклеотидов и 5' фосфатные терминальные сайты. Примеры миРНК включают, без ограничений, двухцепочечные полинуклеотидные молекулы, сформированные из двух отдельных цепочечных молекул, где одна из цепей представляет собой смысловую нить, а другая представляет собой комплементарную антисмысловую нить.

В некоторых вариантах осуществления, 5' и/или 3' «липкий» конец на одной или обоих цепях миРНК содержит 1–4 (*например*, 1, 2, 3 или 4) модифицированных и/или немодифицированных дезокситимидиновых (t или dT) нуклеотида, 1–4 (*например*, 1, 2, 3 или 4) модифицированных (*например*, 2'OMe) и/или немодифицированных уридиновых (U) рибонуклеотида и/или 1–4 (*например*, 1, 2, 3 или 4) модифицированных (*например*, 2'OMe) и/или немодифицированных рибонуклеотида или дезоксирибонуклеотида, обладающих комплементарностью к целевой последовательности (*например*, 3' конец в антисмысловой цепи) или ее комплементарной цепи (*например*, 3' конец в смысловой

цепи).

Предпочтительно, миРНК синтезированы химическим путем. миРНК также могут быть созданы путем расщепления более длинных двухцепочечных РНК (*например*, двухцепочечных РНК, более крупных, чем около 25 нуклеотидов в длину) *E. Coli* РНКазой III или дайсером. Данные ферменты перерабатывают двухцепочечную РНК в биологически активную миРНК (*см.*, *например*, Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942–9947 (2002); Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14236 (2002); Byrom et al., Ambion TechNotes, 10(1):4–6 (2003); Kawasaki et al., Nucleic Acids Res., 31:981–987 (2003); Knight et al., Science, 293:2269–2271 (2001); и Robertson et al., J. Biol. Chem., 243:82 (1968)). Предпочтительно, двухцепочечные РНК имеют длину как минимум от 50 нуклеотидов до около 100, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов. Двухцепочечная РНК может иметь длину 1000, 1500, 2000, 5000 нуклеотидов, или более. Данная двухцепочечная РНК может кодировать полный транскрипт гена или частичный транскрипт гена. В некоторых случаях, миРНК может кодироваться плазмидой (*например*, транскрибироваться в виде последовательностей, которые автоматически складываются в дуплексы с петлями типа «шпилька»).

Фраза «подавляющий экспрессию целевого гена» относится к способности миРНК настоящего изобретения отключать, снижать или подавлять экспрессию целевого гена. Для исследования степени отключения гена, испытуемый образец (*например*, биологический образец исследуемого организма, экспрессирующего целевой ген, или образец культуры клеток, экспрессирующей целевой ген) приводят в контакт с миРНК, которая отключает, снижает или подавляет экспрессию целевого гена. Экспрессию целевого гена в испытуемом образце сравнивают с экспрессией целевого гена в контрольном образце (*например*, биологический образец организма, экспрессирующего целевой ген, или образец культуры клеток, экспрессирующей целевой ген), который не приводят в контакт с миРНК. Контрольным образцам (*например*, образцам, экспрессирующим целевой ген) может быть присвоено значение 100%. В некоторых вариантах осуществления, отключение, подавление или снижение экспрессии целевого гена достигается, когда значение испытуемого образца по отношению к контрольному образцу (*например*, холостой буферный раствор, последовательность миРНК, которая направлена на другой ген, рандомизированная последовательность миРНК *и т.д.*) составляет около 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 0%. Подходящие виды анализа включают, без ограничения, исследование уровней белка или мРНК с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как, *например*, дот–блоттинг, нозерн–блоттинг, гибридизация *in situ*, ИФА, иммунопреципитация, исследования ферментативной активности, а также методы фенотипирования, известные специалистам в данной области.

Термин «синтетическая активирующая группа» относится к группе, которая может

присоединяться к атому и активировать этот атом для образования ковалентной связи с другой реакционноспособной группой. Подразумевается, что природа синтетической активирующей группы может зависеть от атома, который она активирует. Например, когда синтетическая активирующая группа соединена с атомом кислорода, синтетическая активирующая группа представляет собой группу, которая будет активировать этот атом кислорода для образования связи (например, сложноэфирной, карбаматной или эфирной связи) с другой реакционноспособной группой. Такие синтетические активирующие группы известны. Примеры синтетических активирующих групп, которые могут присоединяться к атому кислорода, включают, без ограничений, ацетат, сукцинат, трифлат и мезилат. Когда синтетическая активирующая группа присоединена к атому кислорода карбоновой кислоты, данная синтетическая активирующая группа может представлять собой группу, получаемую из известного связующего реагента (например, известный амидный связующий реагент). Такие связующие реагенты известны. Примеры таких связующих реагентов включают, без ограничений, N, N'-дициклогексилкарбодиимид (ДЦК), гидроксibenзотриазол (ГОБт), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбонат (ЭДК), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (БОФ), бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (ПиБОФ) или O-бензотриазол-1-ил-N, N, N'-тетраметилурония гексафторфосфат (ГБТУ).

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» терапевтической нуклеиновой кислоты, такой как миРНК, означает количество, достаточное для создания желаемого эффекта, *например*, ингибирования экспрессии целевой последовательности в сравнении с нормальным уровнем экспрессии, выявленным при отсутствии миРНК. В некоторых вариантах осуществления, ингибирование экспрессии целевого гена или целевой последовательности достигается когда значение, полученное с миРНК, по отношению к контрольному образцу (*например*, холостой буферный раствор, последовательность миРНК, которая направлена на другой ген, рандомизированная последовательность миРНК и т.д.) составляет около 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 0%. Подходящие виды анализа для измерения экспрессии гена-мишени или последовательности-мишени включают, без ограничения, исследование уровней белка или матричной РНК с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как, *например*, дот-блоттинг, нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ*, ИФА, иммунопреципитация, исследования ферментативной активности, а также методы фенотипирования, известные специалистам в данной области.

Термин «нуклеиновая кислота», в контексте данного документа, относится к полимеру, содержащему не менее двух нуклеотидов (*т.е.*, дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды), в одно- или двухцепочечной форме, и включает ДНК и РНК. «Нуклеотиды» содержат сахар дезоксирибозу (ДНК) или рибозу (РНК), основание и

фосфатную группу. Нуклеотиды соединяются друг с другом фосфатными группами. «Основания» включают пурины и пиримидины, которые дополнительно включают природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и натуральные аналоги, а также синтетические производные пуринов и пиримидинов, которые включают, без ограничений, модификации, которые приводят к появлению новых реакционноспособных групп, таких как, без ограничений, амины, спирты, тиолы, карбоксилаты и алкилгалогениды. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные каркасные остатки, или звенья, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе; и которые имеют сходные связывающие свойства, как и рассматриваемая нуклеиновая кислота. Примеры таких аналогов и/или модифицированных остатков включают, без ограничений, тиофосфаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды и пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК). Дополнительно, нуклеиновые кислоты могут включать один или более фрагментов ННК (незапертая нуклеиновая кислота).

Термин «нуклеиновая кислота» включает любой олигонуклеотид или полинуклеотид, с фрагментами, содержащими до 60 нуклеотидов, которые обычно называют олигонуклеотидами, и более длинные фрагменты, называемые полинуклеотидами. Дезоксирибонуклеотид состоит из пятиатомного сахара, называемого дезоксирибозой, ковалентно соединенного с фосфатом у атомов углерода 5' и 3' данного сахара, с образованием чередующегося неразветвленного полимера. ДНК может быть представлена в форме, *например*, антисмысловых молекул, плазмидной ДНК, преконденсированной ДНК, продукта ПЦР, векторов, экспрессионных кассет, химерных последовательностей, хромосомной ДНК или производных и комбинаций данных групп. Рибоолигонуклеотид состоит из сходной повторяющейся структуры, где пятиатомный сахар представляет собой рибозу. РНК может быть представлена в форме, *например*, малой интерферирующей РНК (миРНК), дайсер-субстрата двухцепочечной РНК, малой шпилечной РНК (мшРНК), асимметричной интерферирующей РНК (аиРНК), микроРНК, мРНК, тРНК, рРНК, тРНК, вирусной РНК (вРНК) и их комбинаций. Соответственно, в контексте настоящего изобретения, термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» относятся к полимеру или олигомеру нуклеотида, или к мономерам нуклеозидов, состоящему из встречающихся в природе оснований, сахаров и межсахарных (каркасных) звеньев. Термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» также включают полимеры или олигомеры, содержащие не встречающиеся в природе мономеры или их фрагменты, которые действуют аналогичным образом. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды зачастую являются предпочтительными в сравнении с натуральными формами благодаря своим свойствам, таким как, *например*, усиленный клеточный захват, пониженная иммуногенность и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновых кислот также неявно включает их консервативно модифицированные варианты (*например*,

вырожденные замещения кодонов), аллели, ортологи, ОНП (однонуклеотидный полиморфизм) и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явно. Конкретно, вырожденные замещения кодонов могут достигаться путем создания последовательностей, в которых третья позиция одного или большего числа выбранных (или всех) кодонов замещена на остатки смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605–2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91–98 (1994)).

Термин «ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты (*например*, ДНК или РНК), которая включает часть длины или всю длину кодирующих последовательностей, необходимых для создания полипептида или полипептида–предшественника.

«Продукт гена», в контексте данного документа, относится к продукту гена, такому как РНК–транскрипт или полипептид.

В контексте данного документа, термин «алкил», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, углеводородный радикал с линейной или разветвленной цепью, имеющей заданное число атомов углерода (т.е., C_{1–8}, что означает от одного до восьми атомов углерода). Примеры алкильных групп включают метил, этил, н–пропил, изопропил, н–бутил, трет–бутил, втор–бутил, н–пентил, н–гексил, н–гептил, н–октил и т.п. Термин «алкенил» относится к ненасыщенному алкильному радикалу, имеющему одну или более двойных связей. Аналогично, термин «алкинил» относится к ненасыщенному алкильному радикалу, имеющему одну или более тройных связей. Примеры таких ненасыщенных алкильных групп включают винил, 2–пропенил, кротил, 2–изопентил, 2–(бутадиенил), 2,4–пентадиенил, 3–(1,4–пентадиенил), этинил, 1– и 3–пропинил, 3–бутинил и более высшие гомологи и изомеры.

Термин «алкилен», сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, производный алкана (включая линейные и разветвленные алканы), примерами которых являются CH₂CH₂CH₂CH₂ и CH(CH₃)CH₂CH₂–.

Термин «циклоалкил», «карбоциклический» или «карбоцикл» относится к кольцевой углеводородной системе, имеющей от 3 до 20 кольцевых атомов (например, 3–20–членный циклоалкил представляет собой циклоалкил с 3–20 кольцевыми атомами, или C_{3–20}–циклоалкил представляет собой циклоалкил с 3–20 кольцевыми атомами углерода) и к 3–5–членному циклоалкилу, полностью насыщенному или имеющему не более одной двойной связи между вершинами кольца, и к 6–членному или более крупному циклоалкилу, полностью насыщенному или имеющему не более одной двойной связи между вершинами кольца. В контексте данного документа, «циклоалкил», «карбоциклический» или «карбоцикл» также относится к бициклическим, полициклическим и спироциклическим кольцевым углеводородным системам, таким как, например, бицикло[2.2.1]гептан, пинан, бицикло[2.2.2]октан, адамантан, норборнен, спироциклический C_{5–12} алкан и т.д. В контексте данного документа, термины «алкенил», «алкинил», «циклоалкил», «карбоцикл» и «карбоциклический» должны включать их

моно- и полигалогенированные варианты.

Термин «гетероциклоалкил», «гетероциклический» или «гетероцикл» относится к насыщенной или частично ненасыщенной радикальной кольцевой системе, имеющей 3–20 кольцевых атомов (например, 3–20-членный гетероциклоалкил представляет собой гетероциклоалкильный радикал с 3–20 кольцевыми атомами, C_{2-19} -гетероциклоалкил представляет собой гетероциклоалкил, имеющий 3–10 кольцевых атомов, где 2–19 кольцевых атомов являются атомами углерода), которая содержит от одного до десяти гетероатомов, выбранных из N, O и S, где атомы азота и серы, необязательно, окислены, атом(–ы) азота, необязательно, кватернизированы, как кольцевые атомы. Если не указано иное, «гетероциклоалкильное» или «гетероциклическое» кольцо может представлять собой моноциклическую, бициклическую, спироциклическую или полициклическую кольцевую систему. Неограничивающие примеры «гетероциклоалкильных» или «гетероциклических» колец включают пирролидин, пиперидин, N-метилпиперидин, имидазолидин, пиразолидин, бутиролактамы, валеролактамы, имидазолидинон, гидантоин, диоксолан, фталимид, пиперидин, пиримидин-2,4(1H,3H)-дион, 1,4-диоксан, морфолин, тиоморфолин, тиоморфолин-S-оксид, тиоморфолин-S, S-оксид, пиперазин, пиран, пиридон, 3-пирролин, тиопиран, пирон, тетрагидрофуран, тетрагидротиофен, хинуклидин, тропан, 2-азаспиро[3.3]гептан, (1R,5S)-3-азабицикло[3.2.1]октан, (1s,4s)-2-азабицикло[2.2.2]октан, (1R,4R)-2-окса-5-азабицикло[2.2.2]октан и т.п. «Гетероциклоалкильная» или «гетероциклическая» или «гетероцикл» группа может присоединяться к остатку молекулы посредством одного или большего числа кольцевых атомов углерода или гетероатомов. «Гетероциклоалкил», «гетероциклический» или «гетероцикл» может включать их моно- и полигалогенированные варианты.

Термины «алкокси» и «алкитио» используются в их традиционном смысле и относятся к алкильным группам, присоединенным к остатку молекулы с помощью атома кислорода («окси») или тио-группы и дополнительно включающим их моно- и полигалогенированные варианты.

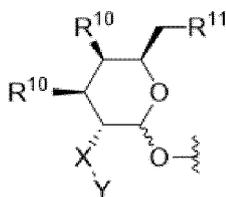
Термины «галоген», сам по себе или как часть другого заместителя, означают, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или йода. Термин «(галоген)алкил» должен включать как «алкильные», так и «галогеналкильные» заместители. Дополнительно, термин «галогеналкил» должен включать моногалогеналкил и полигалогеналкил. Например, термин « C_{1-4} -галогеналкил» должен включать трифторметил, 2,2,2-трифторметил, 4-хлорбутил, 3-бромпропил, дифторметил и т.п.

Термин «арил» означает карбоциклическую ароматическую группу, имеющую 6–14 атомов углерода, конденсированную или не конденсированную с одной или более группами. Примеры арильных групп включают фенил, нафтил, бифенил и т.п., если не указано иное.

Термин «гетероарил» относится к арильному кольцу (кольцам), которые содержат от одного до пяти гетероатомов, выбранных из N, O и S, где атомы азота и серы, необязательно, окислены, и атом(–ы) азота, необязательно, кватернизированы.

Гетероарильная группа может быть соединена с остатком молекулы посредством гетероатома. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиридазинил, пиризинил, пиримидинил, триазинил, хинолинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, фталазинил, бензотриазинил, пуринил, бензимидазолил, бензопиразолил, бензотриазолил, бензизоксазолил, изобензофурил, изоиндолил, индолизинил, бензотриазинил, тиенопиридинил, тиенопиримидинил, пиразолопиримидинил, имидизопиридины, бензотиаксолил, бензофуранил, бензотиенил, индолил, хинолил, изохинолил, изотиазолил, пиразолил, индазолил, птеридинил, имидазолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, тиадиазолил, пирролил, тиазолил, фурил, тиенил и т.п.

Термин «сахарид» включает моносахариды, дисахариды и трисахариды. Данный термин включает глюкозу, сахарозу, фруктозу, галактозу и рибозу, а также дезоксисахара, такие как дезоксирибоза, и аминсахара, такие как галактозамин. Производные сахаридов можно легко получить как описано в публикациях Международных заявок на получение патента №№ WO 96/34005 и 97/03995. Сахариды могут легко присоединяться к остатку соединения формулы I с помощью эфирной связи, тиоэфирной связи (например, S-гликозид), аминного атома азота (например, N-гликозид) или углерод-углеродной связи (например, C-гликозид). В одном из вариантов осуществления, сахарид может легко присоединяться к остатку соединения формулы I с помощью эфирной связи. В другом варианте осуществления, термин «сахарид» включает группу соединений формулы:



где:

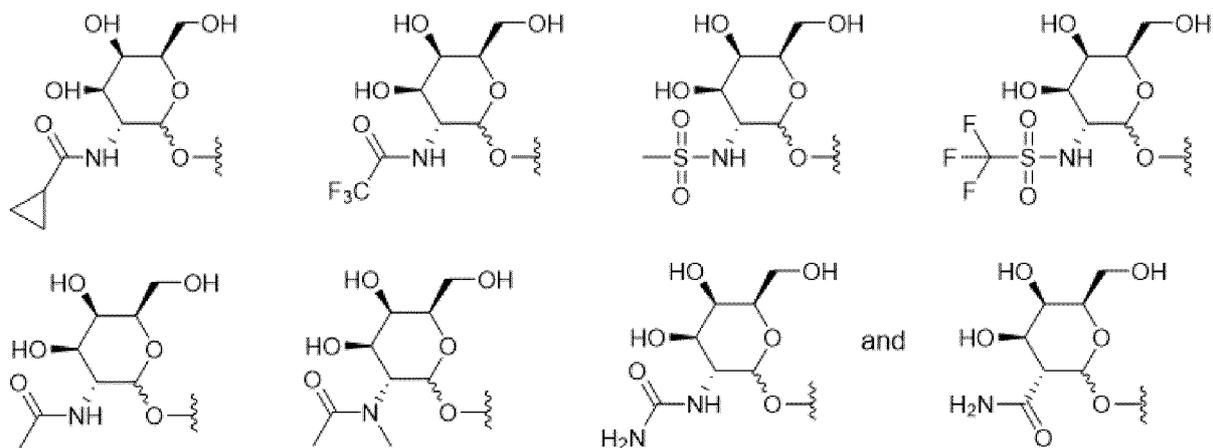
X представляет собой NR^3 , и Y выбран из $(\text{C}=\text{O})\text{R}^4$, $-\text{SO}_2\text{R}^5$ и $(\text{C}=\text{O})\text{NR}^6\text{R}^7$; или X представляет собой $(\text{C}=\text{O})$, и Y представляет собой NR^8R^9 ;

R^3 представляет собой водород или (C_1-C_4) алкил;

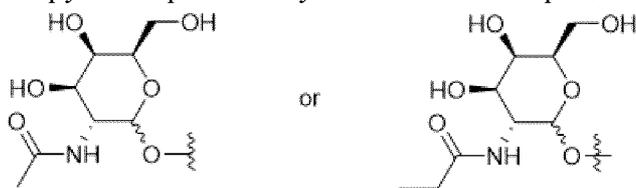
каждый из R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 независимо выбран из группы, включающей водород, (C_1-C_8) алкил, (C_1-C_8) галогеналкил, (C_1-C_8) алкокси и (C_3-C_6) циклоалкил, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

R^{10} представляет собой $-\text{OH}$, $-\text{NR}^8\text{R}^9$ или $-\text{F}$; и

R^{11} представляет собой $-\text{OH}$, $-\text{NR}^8\text{R}^9$, $-\text{F}$ или 5-членный гетероцикл, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, гидроксил, карбоксил, амино, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси. В другом варианте осуществления сахарид может быть выбран из группы, включающей:



В другом варианте осуществления сахарид может представлять собой:



N-Ацетилгалактозамин (GalNAc) GalPro.

Термин «животное» включает виды млекопитающих, такие как человек, мышь, крыса, собака, кошка, хомяк, морская свинка, кролик, домашний скот и т.п.

Термин «липид» относится к группе органических соединений, которые включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры жирных кислот и характеризуются тем, что они нерастворимы в воде, но растворимы во многих органических растворителях. Их обычно делят на три класса: (1) «простые липиды», которые включают жиры и масла, а также воски; (2) «сложные липиды», которые включают фосфолипиды и гликолипиды; и (3) «производные липидов», такие как стероиды.

Термин «липидная частица» включает липидный препарат, который может быть использован для доставки терапевтической нуклеиновой кислоты (*например*, миРНК) к интересующему сайту-мишени (*например*, клетке, ткани, органу и т.п.). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения липидная частица по данному изобретению представляет собой частицу на основе нуклеиновой кислоты и липида, которая обычно образуется из катионного липида, некаатионного липида (*например*, фосфолипид), конъюгированного липида, который предотвращает агрегацию частицы (*например*, ПЭГ-липид) и, необязательно, холестерина. Обычно терапевтическая нуклеиновая кислота (*например*, миРНК) может быть инкапсулирована в липидную часть данной частицы, тем самым защищая ее от ферментативного расщепления.

Термин «электроплотное ядро», когда он используется для описания липидной частицы по данному изобретению, относится к темному внешнему виду внутренней части липидной частицы, когда она визуализируется с помощью просвечивающей электронной криомикроскопии («cryoTEM»). Некоторые липидные частицы по данному изобретению имеют электроплотное ядро и не имеют липидной двухслойной структуры. Некоторые липидные частицы по данному изобретению имеют электроплотное ядро, не имеют

липидной двухслойной структуры и имеют структуру с обращенной гексагональной или кубической фазой. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что недвухслойной липидная упаковка обеспечивает 3-мерную сеть липидных цилиндров с водой и нуклеином внутри, то есть, по существу, капля липида, пронизана водными каналами, связывающимися с нуклеиновой кислотой.

В контексте данного документа термин «SNALP» относится к стабильной частице на основе нуклеиновой кислоты и липида. SNALP представляет собой частицу, изготовленную из липидов (например, катионного липида, некатионного липида и конъюгированного липида, который предотвращает агрегацию частицы), причем нуклеиновая кислота (например, миРНК) полностью инкапсулирована в липид. В некоторых случаях SNALP чрезвычайно пригодны для случаев системного применения, так как они могут демонстрировать увеличенное время жизни в кровообращении после внутривенной (в/в) инъекции, они могут накапливаться в дистальных участках (например, сайтах, физически отделенных от участка введения), и они могут опосредовать экспрессию миРНК на этих дистальных участках. Нуклеиновая кислота может образовывать комплекс с конденсирующим агентом и инкапсулироваться в SNALP, как изложено в публикации PCT № WO 00/03683, раскрытие которой включено в полном объеме в данный документ посредством ссылки во всех случаях.

Липидные частицы по данному изобретению (например, SNALP) обычно имеют средний диаметр, равный от около 30 нм до около 150 нм, от около 40 нм до около 150 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 60 нм до около 130 нм, от около 70 нм до около 110 нм, от около 70 нм до около 100 нм, от около 80 нм до около 100 нм, от около 90 нм до около 100 нм, от около 70 до около 90 нм, от около 80 нм до около 90 нм, от около 70 нм до около 80 нм или около 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм и по существу нетоксичны. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда они присутствуют в липидных частицах по данному изобретению, устойчивы в водном растворе к деградации нуклеазой. Частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида и способ их получения раскрыты, например, в публикациях патентов США №№ 20040142025 и 20070042031, описания которых в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки во всех отношениях.

В контексте данного документа, термин «инкапсулированный липид» может относиться к липидной частице, которая обеспечивает терапевтическую нуклеиновую кислоту, такую как миРНК, с полной инкапсуляцией, частичной инкапсуляцией или ими обеими. В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота (например, миРНК) полностью инкапсулирована в липидную частицу (например, с образованием SNALP или другой частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида).

Термин «липидный конъюгат» относится к конъюгированному липиду, который ингибирует агрегацию липидных частиц. Такие липидные конъюгаты включают, но не ограничиваются ими, конъюгаты ПЭГ-липид, такие как, например, ПЭГ, связанный с

диалкилоксипропилами (например, конъюгаты ПЭГ–DAA), ПЭГ, связанный с диацилглицеринами (например, конъюгаты ПЭГ–DAG), ПЭГ, связанный с холестерином. ПЭГ, связанный с фосфатидилэтаноламинами, и ПЭГ, конъюгированный с церамидами (см., например, патент США № 5885613), катионные ПЭГ–липиды, конъюгаты полиоксазолин (POZ)–липид, полиамидные олигомеры (например, конъюгаты АТТА–липид) и их смеси. Дополнительные примеры POZ–липидных конъюгатов описаны в публикации РСТ № WO 2010/006282. ПЭГ или POZ могут быть конъюгированы непосредственно с липидом или могут быть связаны с липидом через линкерный фрагмент. Может быть использован любой линкерный фрагмент, подходящий для связывания ПЭГ или POZ с липидом, включая, например, не содержащие сложный эфир линкерные фрагменты и содержащие сложный эфир линкерные фрагменты. В определенных предпочтительных вариантах осуществления используют не содержащие сложный эфир линкерные фрагменты, такие как амиды или карбаматы. Раскрытия каждого из указанных выше патентных документов включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и во всех отношениях.

Термин «амфипатический липид» относится, в частности, к любому подходящему материалу, в котором гидрофобная часть липидного материала ориентируется в гидрофобную фазу, тогда как гидрофильная часть ориентируется в водную фазу. Гидрофильные характеристики обусловлены присутствием полярных или заряженных групп, таких как углеводные, фосфатные, карбоксильные, сульфатные, аминокислотные, сульфгидрильные, нитро, гидроксильные и другие подобные группы. Гидрофобность может быть обеспечена путем включения неполярных групп, которые включают, но не ограничиваются ими, длинноцепочечные насыщенные и ненасыщенные алифатические углеводородные группы и такие группы, которые замещены одной или более ароматическими, циклоалифатическими или гетероциклическими группами. Примеры амфипатических соединений включают, но не ограничиваются ими, фосфолипиды, аминокислоты и сфинголипиды.

Типичные примеры фосфолипидов включают, но не ограничиваются ими, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидную кислоту, фосфатидилхолин, пальмитоилолеоилфосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилхолин, диолеоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин и дилинолеоилфосфатидилхолин. Другие соединения, в которых отсутствует фосфор, такие как сфинголипид, семейства гликофинголипидов, диацилглицерины и β -ацилоксикислоты, также находятся в группе, обозначенной как амфипатические липиды. Кроме того, амфипатические липиды, описанные выше, могут быть смешаны с другими липидами, включая триглицериды и стеринны.

Термин «нейтральный липид» относится к любому числу видов липидов, которые существуют в незаряженной или нейтральной цвиттерионной форме при выбранном pH. При физиологическом pH такие липиды включают, например, диацилфосфатидилхолин,

диацилфосфатидилэтаноламин, церамид, сфингомиелин, цефалин, холестерин, цереброзиды и диацилглицерины.

Термин «некатионный липид» относится к любому амфипатическому липиду, а также к любому другому нейтральному липиду или анионному липиду.

Термин «анионный липид» относится к любому липиду, который отрицательно заряжен при физиологическом pH. Эти липиды включают, но не ограничиваются ими, фосфатидилглицерины, кардиолипины, диацилфосфатидилсерины, диацилфосфатиновые кислоты, N-додеканоилфосфатидилэтаноламины, N-сукцинилфосфатидилэтаноламины, N-глутарилфосфатидилэтаноламины, лизилфосфатидилглицерины, пальмитоилолеоилфосфатидилглицерины (POPG) и другие анионные модификации групп, соединенные с нейтральными липидами.

Термин «гидрофобный липид» относится к соединениям, имеющим неполярные группы, которые включают, но не ограничиваются ими, длинноцепочечные насыщенные и ненасыщенные алифатические углеводородные группы и такие группы, которые, необязательно, замещены одной или более ароматическими, циклоалифатическими или гетероциклическими группами. Подходящие примеры включают, но не ограничиваются ими, диацилглицерин, диалкилглицерин, N-N-диалкиламино, 1,2-диацилокси-3-аминопропан и 1,2-диалкил-3-аминопропан.

Термины «катионный липид» и «аминолипид» используются в данном документе взаимозаменяемо, чтобы включать те липиды и их соли, которые имеют одну, две, три или более жирных кислот или жирные алкильные цепи и pH-титруемую аминогруппу (например, алкиламино или диалкиламино концевую группу). Катионный липид обычно протонируется (*то есть* имеет положительный заряд) при pH ниже pK_a катионного липида и является по существу нейтральным при pH выше pK_a . Катионные липиды по данному изобретению также могут быть названы титруемыми катионными липидами. В конкретных вариантах осуществления катионные липиды дополнительно содержат: протонируемый третичный амин (*например*, pH-титруемый) концевой группы; C_{18} алкильные цепи, где каждая алкильная цепь независимо имеет от 0 до 3 (например, 0, 1, 2 или 3) двойных связей; и эфирные, сложноэфирные или кетальные связи между концевой группой и алкильными цепями. Такие катионные липиды включают, но не ограничиваются ими, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (также известен как DLin-C2K-DMA, XTC2 и C2K), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (также известен как MC2), DLin-M-C3-DMA (также известен как MC3) и (DLin-MP-DMA)(также известен как 1-B11).

Термин «алкиламино» включает группу формулы $-N(H)R$, где R представляет собой алкил, как определено в данном документе.

Термин «диалкиламино» включает группу формулы $-NR_2$, где каждый R представляет собой алкил, как определено в данном документе.

Термин «соли» включает любой анионный и катионный комплекс, такой как

комплекс, образованный между катионным липидом и одним или более анионами. Неограничивающие примеры анионов включают неорганические и органические анионы, например гидрид, фторид, хлорид, бромид, йодид, оксалат (например, гемиоксалат), фосфат, фосфонат, гидрофосфат, дигидрофосфат, оксид, карбонат, гидрокарбонат, нитрат, нитрит, нитрид, бисульфит, сульфид, сульфит, бисульфат, сульфат, тиосульфат, гидросульфат, борат, формиат, ацетат, бензоат, цитрат, тартрат, лактат, акрилат, полиакрилат, фумарат, малеат, итаконат, гликолят, глюконат, малат, манделат, тиглат, аскорбат, салицилат, полиметакрилат, перхлорат, хлорат, хлорит, гипохлорит, бромат, гипобромит, йодат, алкилсульфонат, арилсульфонат, арсенат, арсенит, хромат, дихромат, цианид, цианат, тиоцианат, гидроксид, пероксид, перманганат и их смеси. В конкретных вариантах осуществления соли катионных липидов, раскрытых в данном документе, представляют собой кристаллические соли.

Термин «ацил» включает любой алкил, алкенил или алкинил, причем углерод в точке присоединения замещен оксогруппой, как определено ниже. Ниже приведены неограничивающие примеры таких ацильных групп: $-C(=O)$ алкил, $-C(=O)$ алкенил и $-C(=O)$ алкинил.

Термин «фузогенный» относится к способности липидной частицы, такой как SNALP, сливаться с мембранами клетки. Мембраны могут представлять собой либо плазматическую мембрану, либо мембраны, окружающие органеллы, например эндосому, ядро и т. д.

В контексте данного документа термин «водный раствор» относится к композиции, содержащей полностью или частично воду.

В контексте данного документа термин «органический раствор липида» относится к композиции, содержащей полностью или частично органический растворитель, имеющий липид.

«Дистальный участок», в контексте данного документа, относится к физически отделенному участку, который не ограничен прилегающим капиллярным ложем, но включает участки, широко распределенные по всему организму.

«Сывороточно-стабильный» по отношению к частицам на основе нуклеиновой кислоты и липида, таким как SNALP, означает, что частица не подвергается значительному разложению после воздействия анализа сывороткой или нуклеазой, который значительно разлагает свободную ДНК или РНК. Подходящие анализы включают, например, стандартный сывороточный анализ, анализ ДНКазы или анализ РНКазы.

«Системная доставка», в контексте данного документа, относится к доставке липидных частиц, которая приводит к широкому биораспределению активного агента, такого как мРНК, в организме. Некоторые методы введения могут привести к системной доставке определенных агентов, но не других. Системная доставка означает, что пригодное, предпочтительно терапевтическое, количество агента воздействует на большинство частей тела. Для получения широкого биораспределения обычно требуется

время жизни в крови, чтобы агент не быстро разлагался или не выводился (например, с помощью органов первого прохождения (печень, легкие и т. д.) или путем быстрого, неспецифического связывания клеток) до достижения участка заболевания, дистального по отношению к месту введения. Системная доставка липидных частиц может осуществляться любыми способами, известными в данной области техники, включая, например, внутривенную, подкожную и внутрибрюшинную. В предпочтительном варианте осуществления изобретения системная доставка липидных частиц осуществляется посредством внутривенной доставки.

«Местная доставка», в контексте данного документа, относится к доставке активного агента, такого как миРНК, непосредственно в сайт-мишень в организме. Например, агент может быть доставлен местно путем прямой инъекции в место заболевания, другой сайт-мишень или орган-мишень, такой как печень, сердце, поджелудочная железа, почка и тому подобное

При использовании в данном документе для описания соотношения липид:миРНК термин «липид» относится к суммарному содержанию липида в частице.

Специалистам в данной области будет понятно, что соединения по данному изобретению, имеющие хиральный центр, могут существовать и быть выделенными в оптически активной и рацемической формах. Некоторые соединения могут проявлять полиморфизм. Следует понимать, что данное изобретение охватывает любую рацемическую, оптически активную, полиморфную или стереоизомерную форму или их смеси, соединения по изобретению, которые обладают подходящими свойствами, описанные в данном документе, в данной области техники хорошо известно, как получать оптически активные формы (например, путем разделения рацемической формы методами перекристаллизации, путем синтеза из оптически активных исходных веществ, хиральным синтезом или хроматографическим разделением с использованием хиральной стационарной фазы.

Когда связь в формуле соединения в данном документе изображена нестереохимическим образом (например, плоская), атом, к которому присоединена связь, включает все стереохимические возможности. Если специально не указано иное, когда связь в формуле соединения в данном документе изображена определенным стереохимическим образом (например, жирная, жирная клиновидная, пунктирная или штрихообразная связь), следует понимать, что атомом, к которому присоединена стереохимическая связь, обогащен изображенный абсолютный стереоизомер. В одном варианте осуществления изобретения соединение может составлять 51% изображенного абсолютного стереоизомера. В другом варианте осуществления изобретения соединение может составлять 60% изображенного абсолютного стереоизомера. В другом варианте осуществления изобретения соединение может составлять 80% изображенного абсолютного стереоизомера. В другом варианте осуществления изобретения соединение может составлять 90% изображенного абсолютного стереоизомера. В другом варианте осуществления изобретения соединение может составлять 95% изображенного абсолютного

стереоизомера. В другом варианте осуществления изобретения соединение может составлять 99% изображенного абсолютного стереоизомера.

Если здесь не указано иное, термин «около» при использовании в связи со значением или диапазоном значений означает плюс или минус 5% от указанного значения или диапазона значений.

Получение молекул миРНК

миРНК может быть представлена в нескольких формах, включая, *например*, в виде одного или большего числа изолированных дуплексов малых интерферирующих РНК (миРНК), в виде удлинённых двухцепочечных РНК (дсРНК) или в виде миРНК, или дсРНК, транскрибированной из транскрипционной кассеты в плазмидной ДНК. В некоторых вариантах осуществления миРНК может быть получена ферментативным путем или с помощью частичного/полного органического синтеза, и модифицированные рибонуклеотиды могут быть введены с помощью ферментативного или органического синтеза *in vitro*. В некоторых случаях, каждая из цепей получена химическим путем. Способы синтеза молекул РНК известны в данной области техники, *например*, способы химического синтеза, описанные в Verma and Eckstein (1998) или описанные в настоящем документе.

Способы выделения РНК, синтеза РНК, гибридизации нуклеиновых кислот, создания и скринирования библиотек кДНК, а также осуществления ПЦР, хорошо известны в данной области техники (*см.*, *например*, Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263–269 (1983); Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*), также как и способы ПЦР (*см.*, патенты США №№. 4,683,195 и 4,683,202; *протоколы ПЦР: A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., eds, 1990)). Экспрессионные библиотеки также хорошо известны специалистам в данной области техники. Дополнительные основные тексты, раскрывающие общие способы применения настоящего изобретения, включают Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); и *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994). Сведения, сообщаемые по данным ссылкам, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и во всех отношениях.

Как правило, миРНК являются химически синтезированными. Олигонуклеотиды, которые содержат молекулы миРНК настоящего изобретения, можно синтезировать с применением любого из способов, известных в данной области техники, таких как описанные в Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677–2684 (1995); и Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). В синтезе олигонуклеотидов применяются обычные защитные и соединяющие группы нуклеиновых кислот, такие как диметокситритил на 5'-конце и фосфорамидиты на 3'-конце. В качестве неограничивающего примера, можно осуществить маломасштабный процесс синтеза с помощью синтезатора производства компании Applied Biosystems, с применением протокола масштабирования 0,2 мкмоль. В альтернативном варианте, синтез в масштабе 0,2 мкмоль можно осуществить с помощью

96-луночного планшетного синтезатора производства компании Protogene (Пало-Алто, Калифорния). Однако, синтезы большего или меньшего масштаба также относятся к объему настоящего изобретения. Подходящие реагенты для синтеза олигонуклеотидов, способы снятия защитной группы с РНК и способы очистки РНК известны специалистам в данной области техники.

Молекулы миРНК могут быть составлены из двух различных олигонуклеотидов, один из которых содержит смысловую цепь, а другой содержит антисмысловую цепь миРНК. Например, каждую цепь можно синтезировать по отдельности и соединить друг с другом путем гибридизации или лигирования, после синтеза и/или снятия защитной группы.

Варианты осуществления настоящего изобретения

Таблица 1 в Примере 25 описывает серию химически модифицированных дуплексов миРНК (проиллюстрированы смысловые и антисмысловые цепи), которые нацелены на вирус гепатита В (сокращенно обозначенный как «HBV»). Как описано в данном документе, соединение по данному изобретению может содержать такую миРНК (т.е. миРНК 1–37).

Соответственно, один аспект данного изобретения представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71 и SEQ ID NO:73.

Другой аспект данного изобретения представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72 и SEQ ID NO:74.

Один аспект данного изобретения представляет собой композицию, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, или их комбинацию.

Один аспект изобретения относится к двухцепочечной молекуле миРНК, выбранной из группы, включающей миРНК 1 (SEQ ID NO:1 и 2), 2 (SEQ ID NO:3 и 4), 3 (SEQ ID NO:5 и 6), 4 (SEQ ID NO:7 и 8), 5 (SEQ ID NO:9 и 10), 6 (SEQ ID NO:11 и 12), 7 (SEQ ID NO:13 и 14), 8 (SEQ ID NO:15 и 16), 9 (SEQ ID NO:17 и 18), 10 (SEQ ID NO:19 и 20), 11 (SEQ ID NO:21 и 22), 12 (SEQ ID NO:23 и 24), 13 (SEQ ID NO:25 и 26), 14 (SEQ ID

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

В другом аспекте данного изобретения предложена композиция, содержащая двухцепочечную молекулу миРНК, описанную в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

Одним из аспектов настоящего изобретения является соединение формулы I, как изложено в кратком описании сущности изобретения, или его соль.

В одном из вариантов осуществления соединения формулы I, R^1 представляет собой направляющий лиганд;

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечной миРНК Таблицы 1;

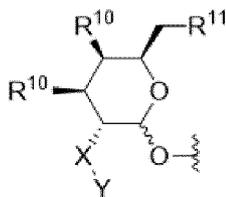
кольцо А отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидрокси, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил- OR^B и C_{1-8} алкил, который необязательно замещен одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидрокси и C_{1-3} алкокси;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и n равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В одном из вариантов осуществления, R^1 представляет собой $-C(H)_{(3-p)}(L^3-$ сахарид) $_p$, где каждый из L^3 независимо представляет собой связывающую группу; p равняется 1, 2 или 3; и сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид.

В одном из вариантов осуществления сахарид представляет собой:



где:

X представляет собой NR^3 , и Y выбран из $(C=O)R^4$, $-SO_2R^5$ и $(C=O)NR^6R^7$; или X представляет собой $(C=O)$, и Y представляет собой NR^8R^9 ;

R^3 представляет собой водород или (C_1-C_4) алкил;

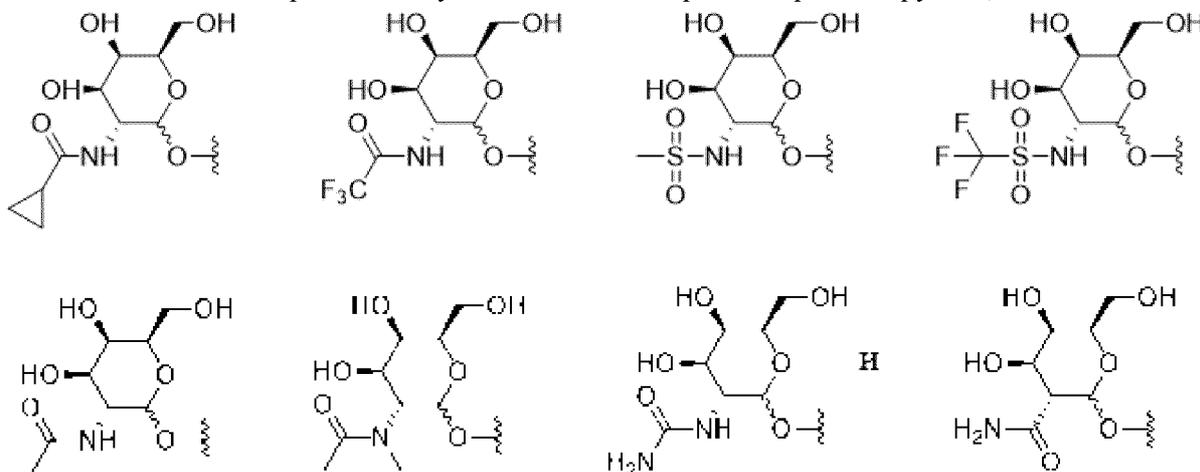
каждый из R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 независимо выбран из группы, включающей водород, (C_1-C_8) алкил, (C_1-C_8) галогеналкил, (C_1-C_8) алкокси и (C_3-C_6) циклоалкил, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

R^{10} представляет собой $-OH$, $-NR^8R^9$ или $-F$; и

R^{11} представляет собой $-OH$, $-NR^8R^9$, $-F$ или 5-членный гетероцикл, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, гидроксил, карбоксил, амина, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления сахарид выбран из группы, включающей:



и его соли.

В одном из вариантов осуществления сахарид представляет собой:



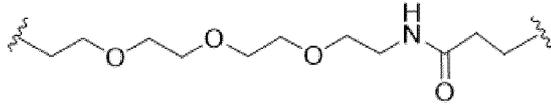
N-ацетилгалактозамин (GalNAc) GalPro

В одном из вариантов осуществления, каждый из L^3 независимо представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 0 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, $(C_1-$

C_6)алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

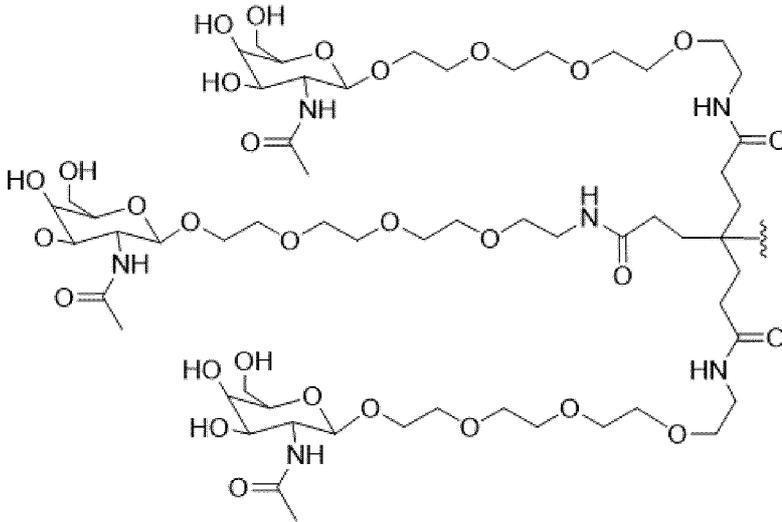
В одном из вариантов осуществления, каждый из L^3 независимо представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления L^3 представляет собой:



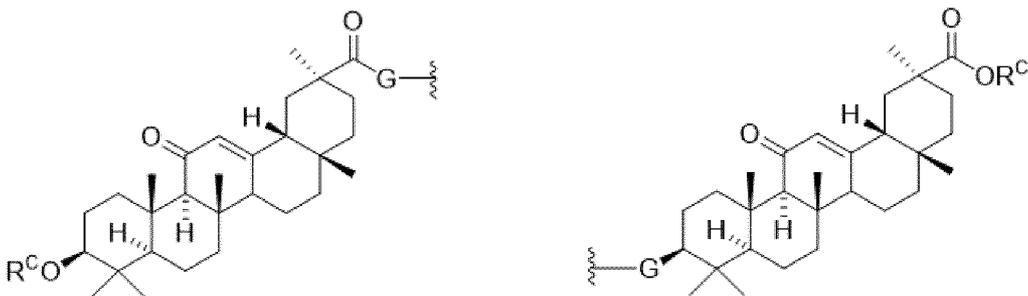
или его соль.

В одном из вариантов осуществления R^1 представляет собой:



или его соль.

В одном из вариантов осуществления R^1 представляет собой:



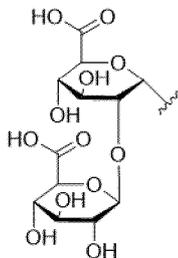
где G представляет собой $-NH-$ или $-O-$;

R^C представляет собой водород, (C_1-C_8) алкил, (C_1-C_8) галогеналкил, $(C_1-$

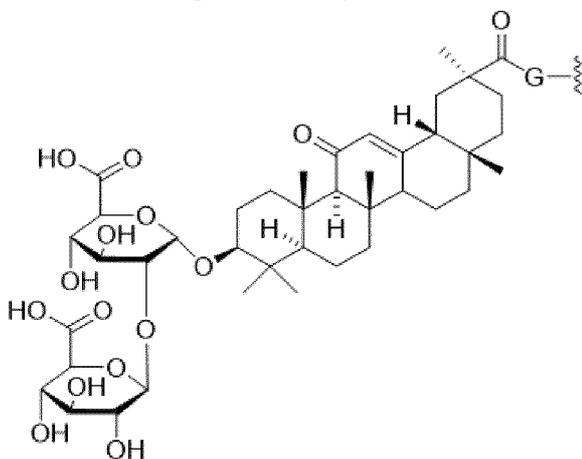
C_8)алкокси, (C_1-C_6) алканоил, (C_3-C_{20}) циклоалкил, (C_3-C_{20}) гетероцикл, арил, гетероарил, моносахарид, дисахарид или трисахарид; и где циклоалкил, гетероцикл, арил, гетероарил и сахарид, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, карбоксил, гидроксил, amino, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления R^C представляет собой;



В одном из вариантов осуществления R^1 представляет собой:

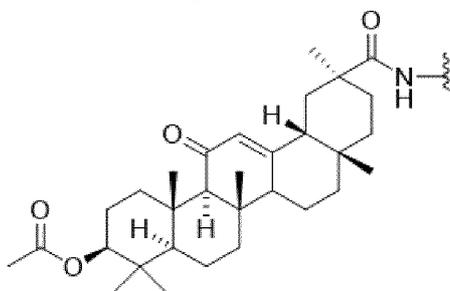


В одном из вариантов осуществления R^C представляет собой;

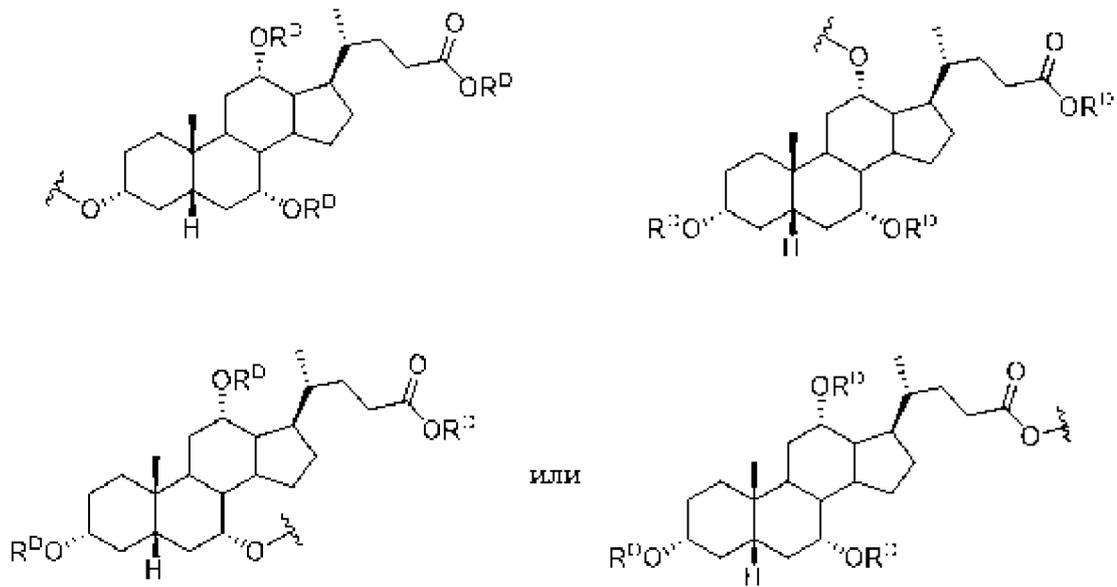


В одном из вариантов осуществления G представляет собой $-NH-$.

В одном из вариантов осуществления R^1 представляет собой:



В одном из вариантов осуществления R^1 представляет собой:



где каждый из R^D независимо выбран из группы, включающей водород, (C_1-C_6) алкил, (C_9-C_{20}) алкилсилил, $(R^W)_3Si-$, (C_2-C_6) алкенил, тетрагидропиранил, (C_1-C_6) алканоил, бензоил, арил (C_1-C_3) алкил, ТМТ (триметокситритил), ДМТ (диметокситритил), ММТ (монометокситритил) и Т (тритил); и

каждый из R^W независимо выбран из группы, включающей (C_1-C_4) алкил и арил.

В одном из вариантов осуществления, каждая из связывающих групп L^1 и L^2 независимо представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления, каждый из L^1 и L^2 независимо представляют собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

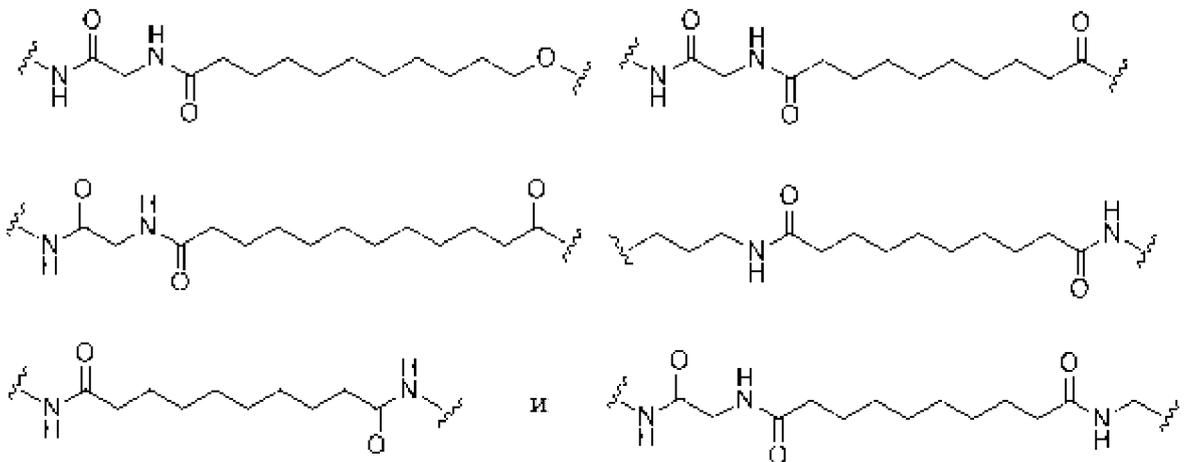
В одном из вариантов осуществления L^1 и L^2 независимо представляют собой

двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 14 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азида, циано, нитро, галогено, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

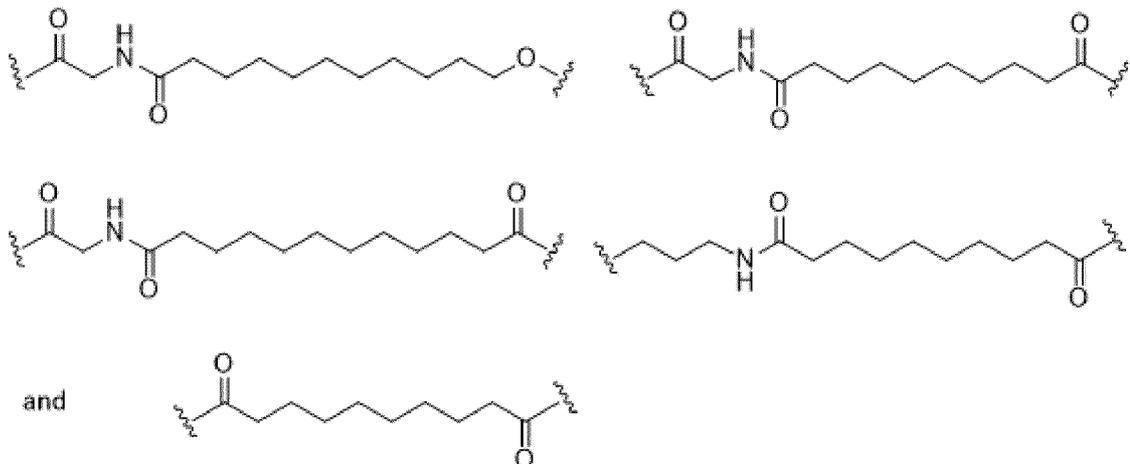
В одном из вариантов осуществления L^1 соединен с R^1 при помощи $-NH-$, $O-$, $-S-$, $-(C=O)-$, $-(C=O)-NH-$, $-NH-(C=O)-$, $-(C=O)-O-$, $-NH-(C=O)-NH-$ или $-NH-(SO_2)-$.

В одном из вариантов осуществления L^2 соединен с R^2 при помощи $-O-$.

В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:



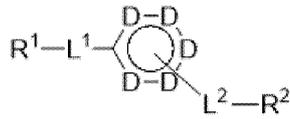
В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:



и его соли.

В одном из вариантов осуществления L^2 представляет собой $-CH_2-O-$ или $-CH_2-CH_2-O-$.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы I имеет формулу Ia:



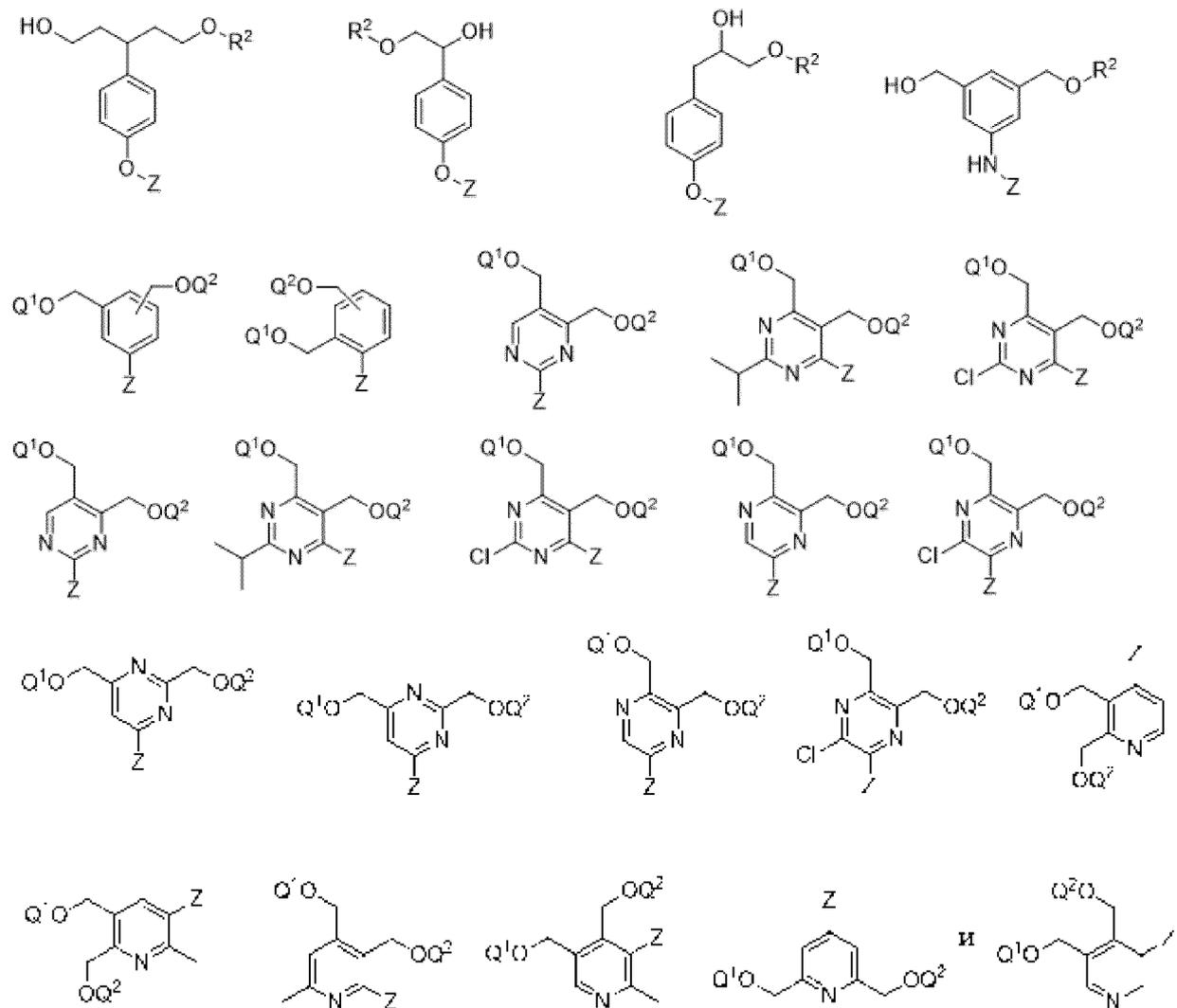
(Ia)

где:

каждый из D независимо выбран из группы, включающей $-\overset{\text{R}^A}{\text{C}}=$ и $-\text{N}=\text{}$;

или его соль.

В одном варианте осуществления соединение формулы Ia выбрано из группы, включающей:



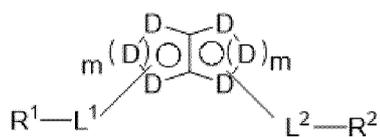
где:

Q^1 представляет собой водород, и Q^2 представляет собой R^2 ; или Q^1 представляет собой R^2 , и Q^2 представляет собой водород;

Z представляет собой $-\text{L}^1-\text{R}^1$;

и его соли.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы I имеет формулу Ib:



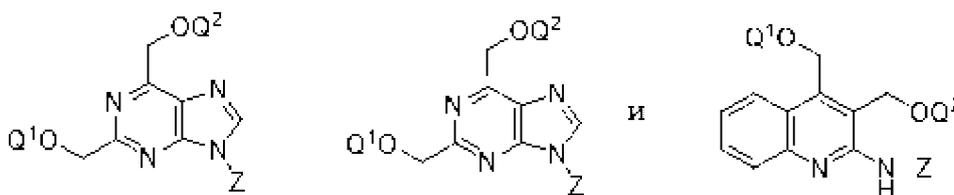
(Ib)

где:

каждый из D независимо выбран из группы, включающей $-\overset{R^A}{C}=\overset{\cdot}{\cdot}$ и $-N=\overset{\cdot}{\cdot}$;

каждый m независимо равен 1 или 2; или его соль.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы Ib выбрано из группы, включающей:



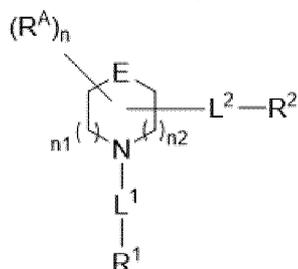
где:

Q^1 представляет собой водород, и Q^2 представляет собой R^2 ; или Q^1 представляет собой R^2 , и Q^2 представляет собой водород;

Z представляет собой $-L^1-R^1$;

и его соли.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы I имеет формулу (Ic):



(Ic)

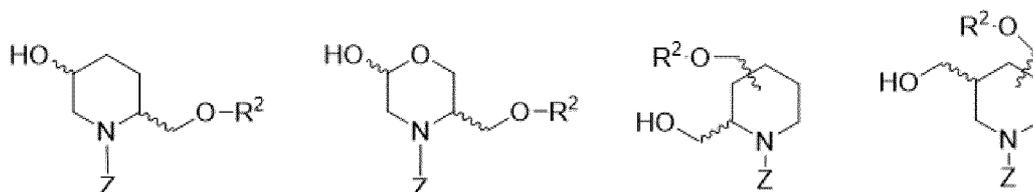
где E представляет собой $-O-$ или $-CH_2-$;

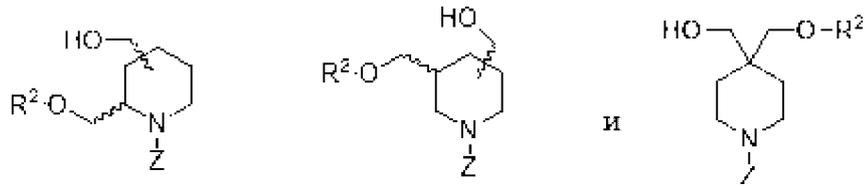
n выбран из группы, включающей 0, 1, 2, 3 и 4; и

каждый из n1 и n2 независимо выбраны из группы, включающей 0, 1, 2 и 3;

или его соль.

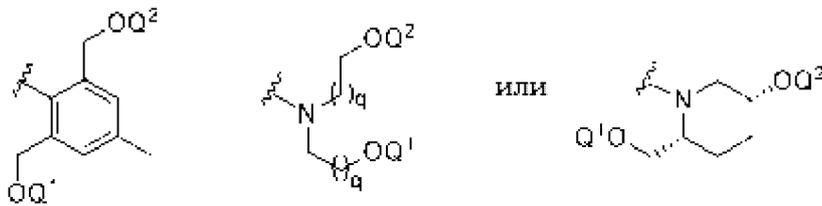
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Ic) выбрано из группы, включающей:





где Z представляет собой $-L^1-R^1$;
и его соли.

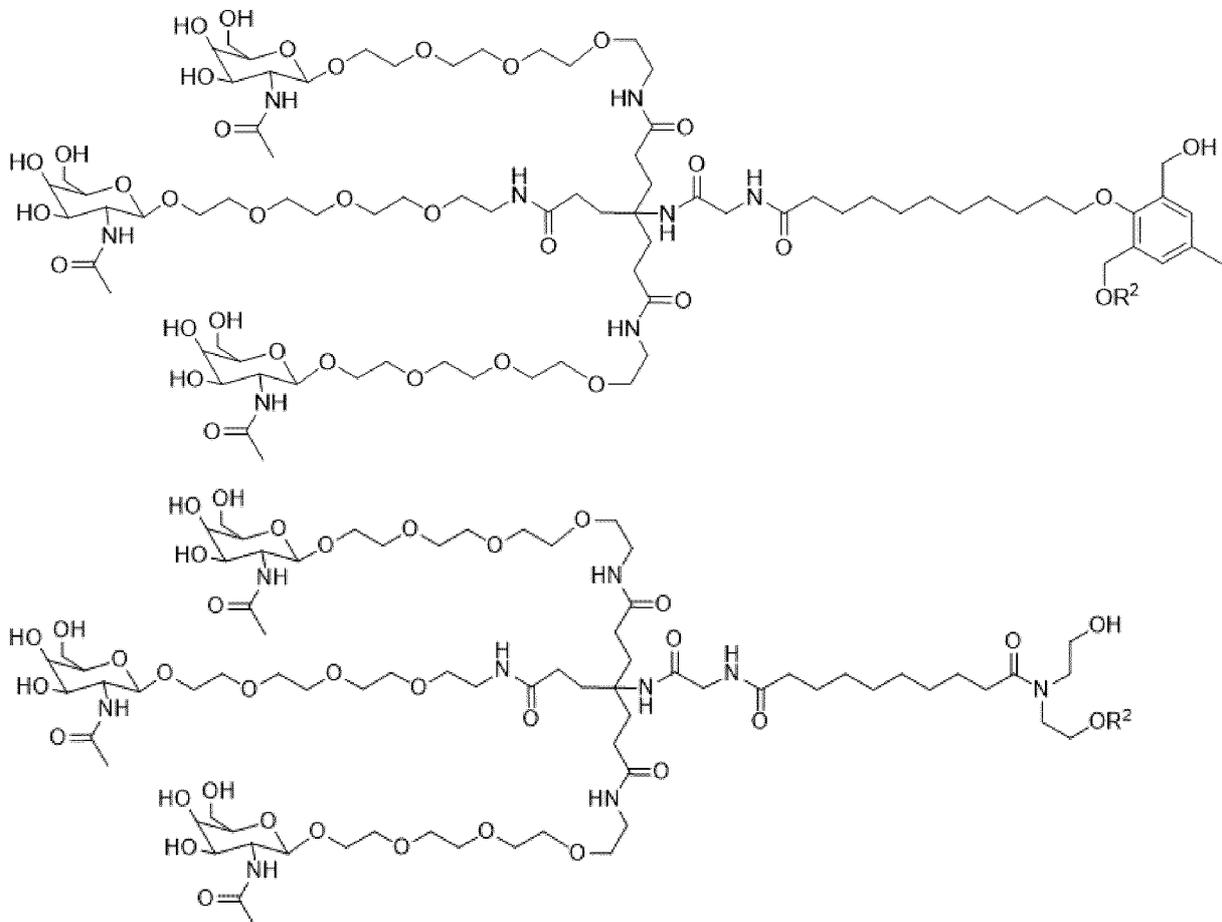
В одном из вариантов осуществления фрагмент $-A-L^2-R^2$ представляет собой:

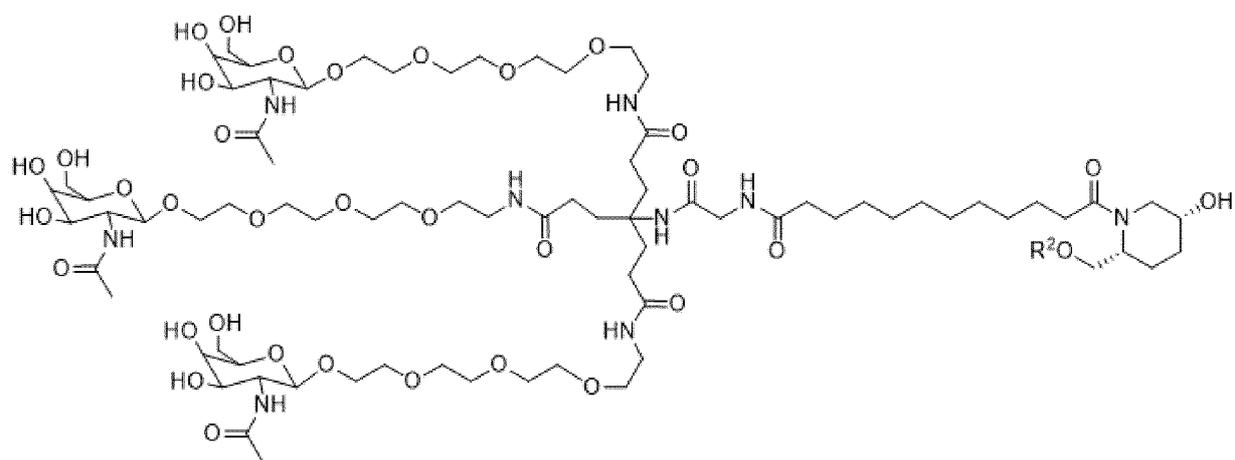


где:

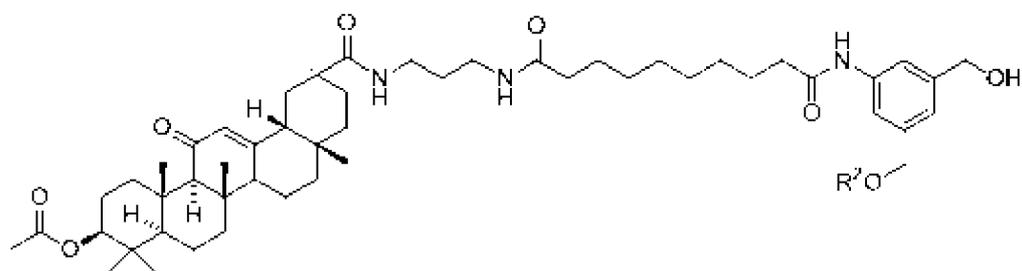
Q^1 представляет собой водород, и Q^2 представляет собой R^2 ; или Q^1 представляет собой R^2 , и Q^2 представляет собой водород; и
каждый из q независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5;
или его соль.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы (I) выбрано из группы, включающей:

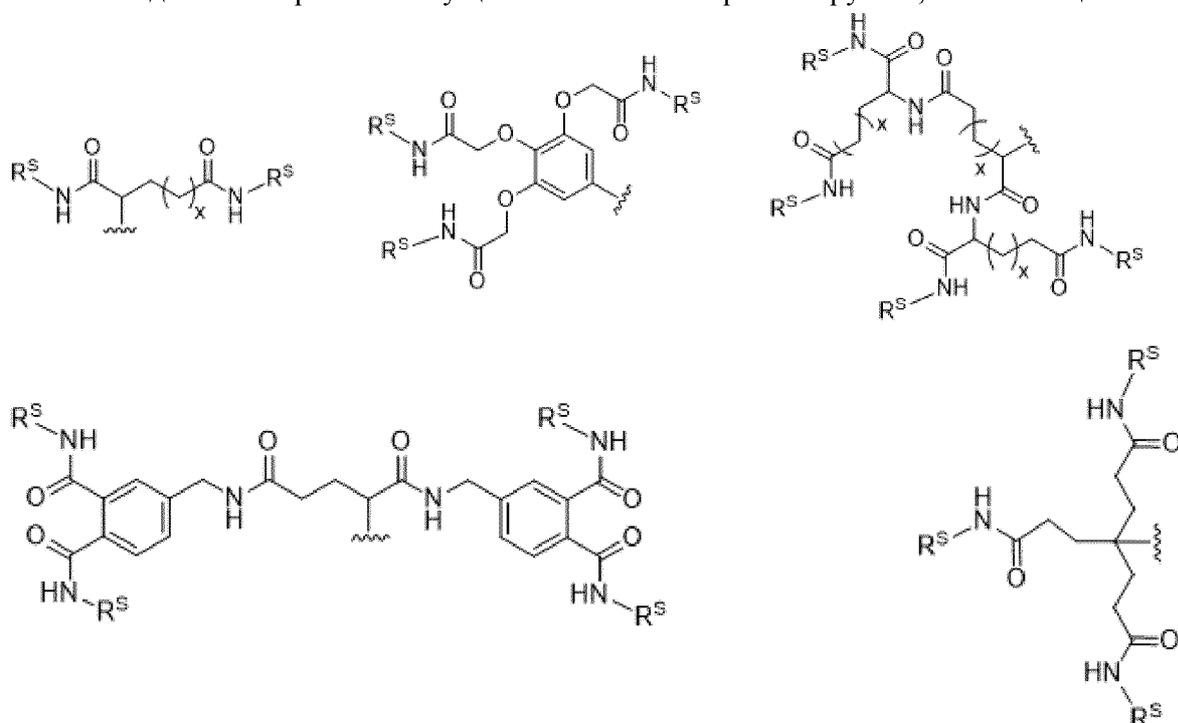


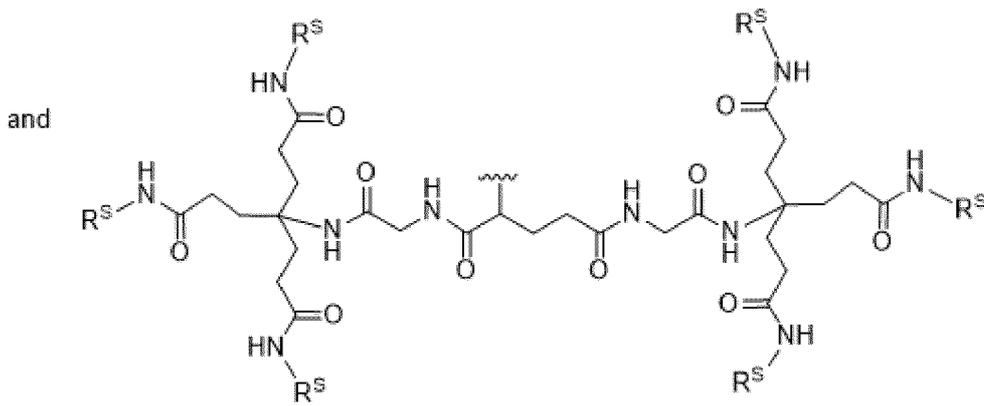


и

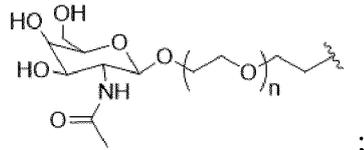


и его соли.

В одном из вариантов осуществления R^1 выбран из группы, включающей:



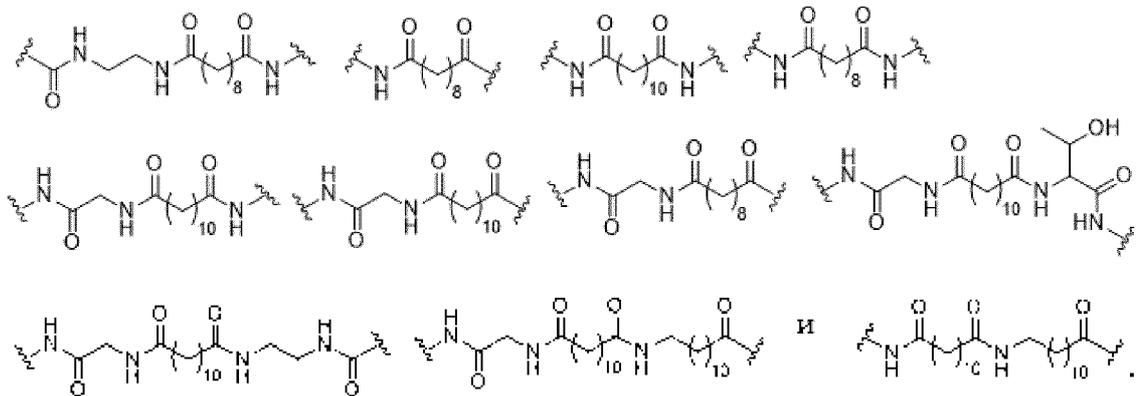
где R^S представляет собой



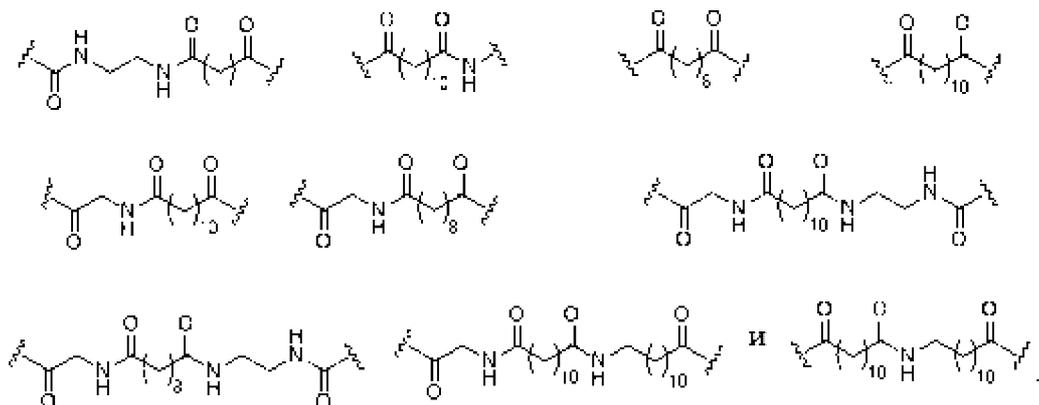
n равно 2, 3 или 4;

x равен 1 или 2.

В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:



В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:



В одном из вариантов осуществления A отсутствует, представляет собой фенил, пирролидинил или циклопентил.

В одном из вариантов осуществления L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен- O -, который, необязательно, замещен гидрокси.

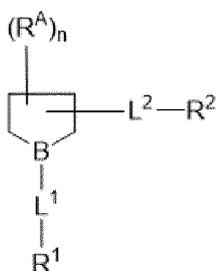
В одном из вариантов осуществления L^2 представляет собой $-CH_2O-$, $-CH_2CH_2O-$

или $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-$.

В одном из вариантов осуществления каждый из R^{A} независимо представляет собой гидроксильную или C_{1-8} алкил, который, необязательно, замещен гидроксильной группой.

В одном из вариантов осуществления каждый из R^{A} независимо выбран из группы, включающей гидроксильную, метильную и $-\text{CH}_2\text{OH}$.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы I имеет следующую формулу (Ig):



(Ig)

где B представляет собой $-\text{N}-$ или $-\text{CH}-$;

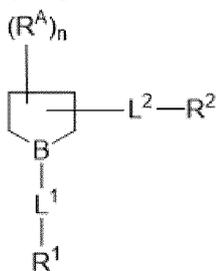
L^1 отсутствует или представляет собой $-\text{NH}-$;

L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен- $\text{O}-$, который, необязательно, замещен гидроксильной группой или галогеном;

n равно 0, 1 или 2;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы I имеет следующую формулу (Ig):



(Ig)

где B представляет собой $-\text{N}-$ или $-\text{CH}-$;

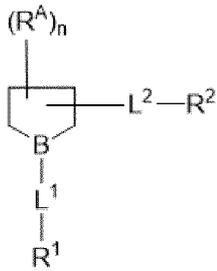
L^1 отсутствует или представляет собой $-\text{NH}-$;

L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен- $\text{O}-$, который, необязательно, замещен гидроксильной группой или галогеном;

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы I имеет следующую формулу (Ig):



(Ig)

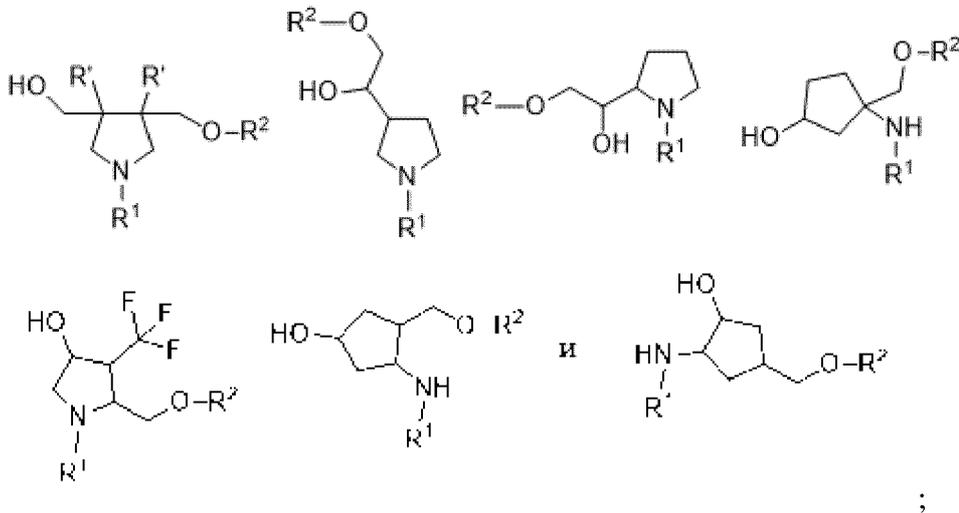
где В представляет собой –N– или –CH–;

L¹ отсутствует или представляет собой –NH–;L² представляет собой C₁₋₄ алкилен–O–, который, необязательно, замещен гидроксилом или галогеном;

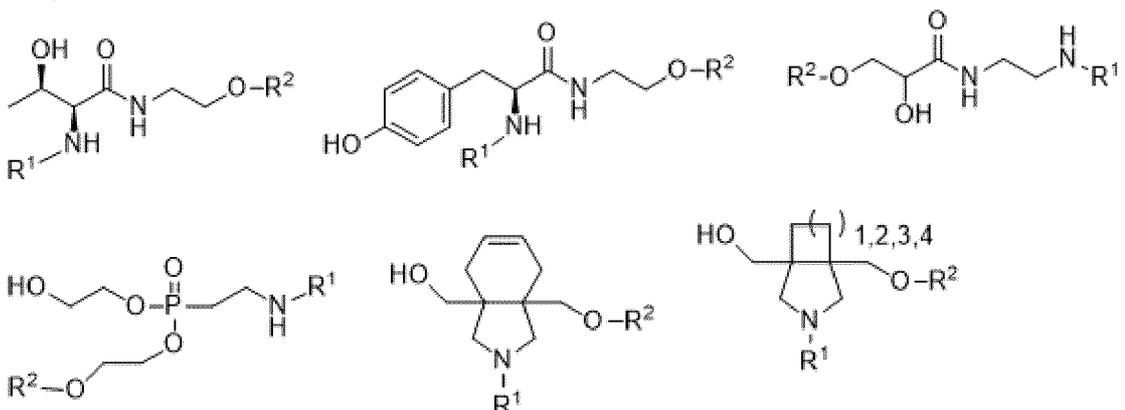
n равен 0, 1, 2, 3 или 4;

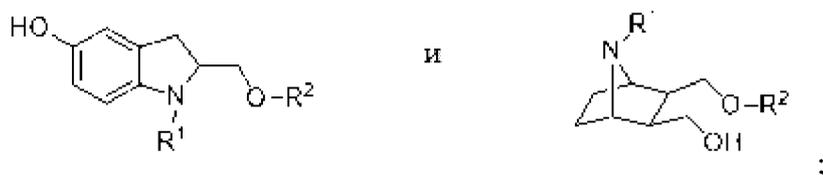
или его соль.

В одном из вариантов осуществления соединения формулы Ig выбрано из группы, включающей:

где R² представляет собой C₁₋₉ алкил, C₂₋₉ алкенил или C₂₋₉ алкинил; где C₁₋₉ алкил, C₂₋₉ алкенил или C₂₋₉ алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксилом; и его соли.

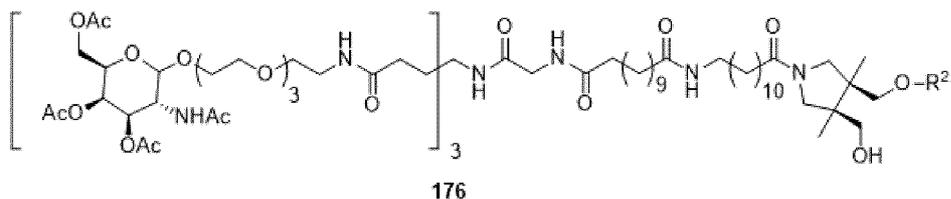
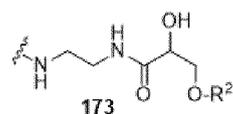
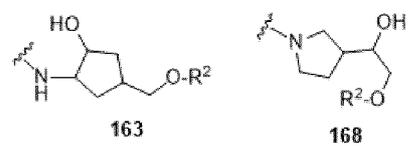
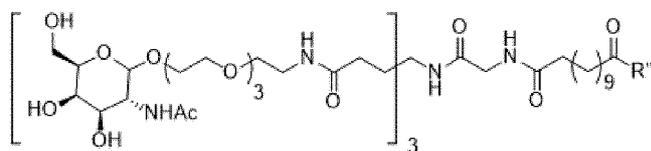
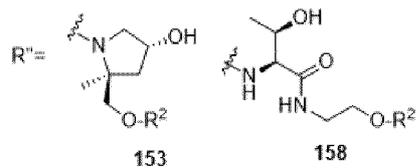
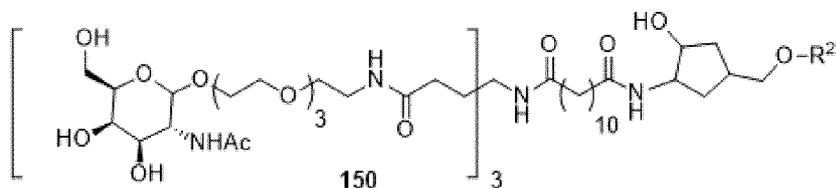
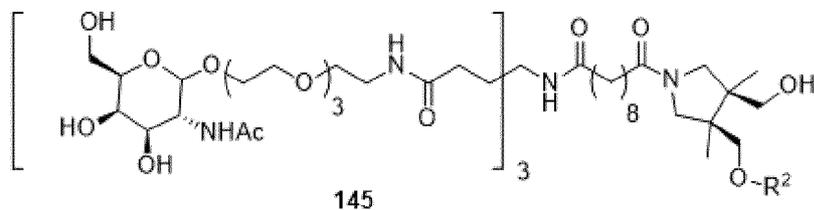
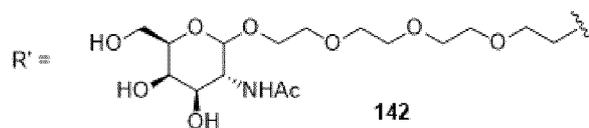
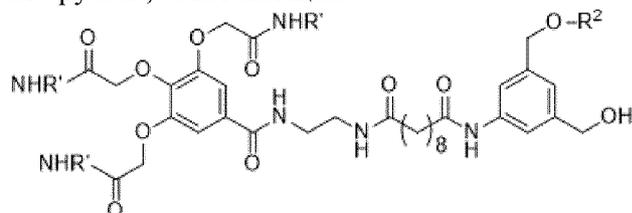
В одном из вариантов осуществления соединения формулы I выбрано из группы, включающей:

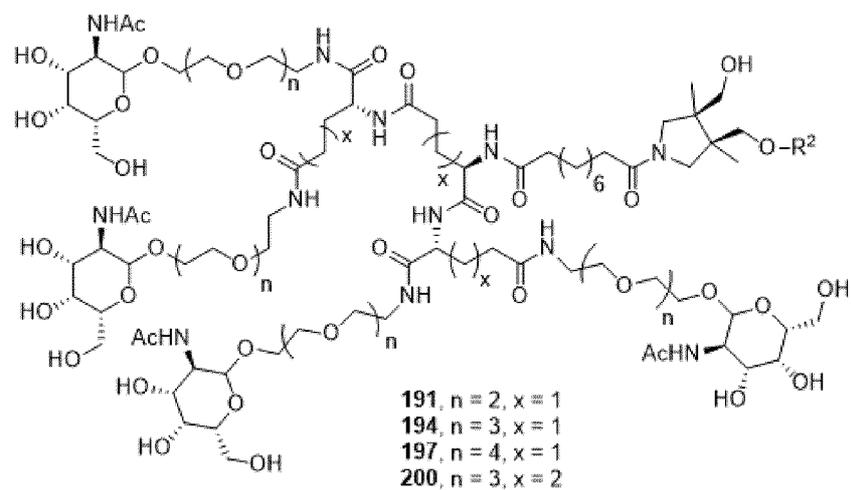
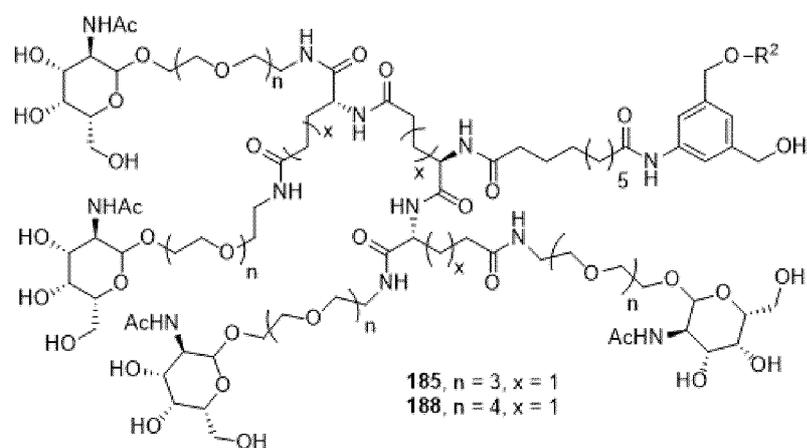
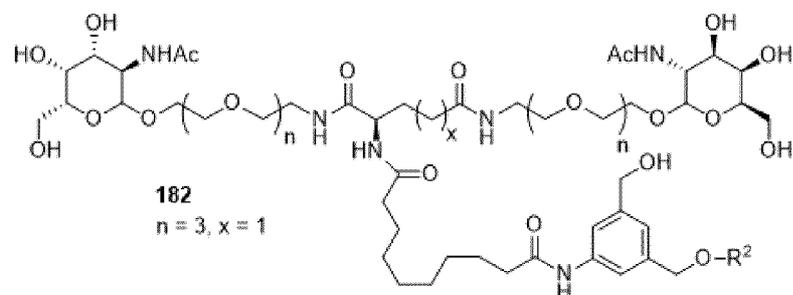
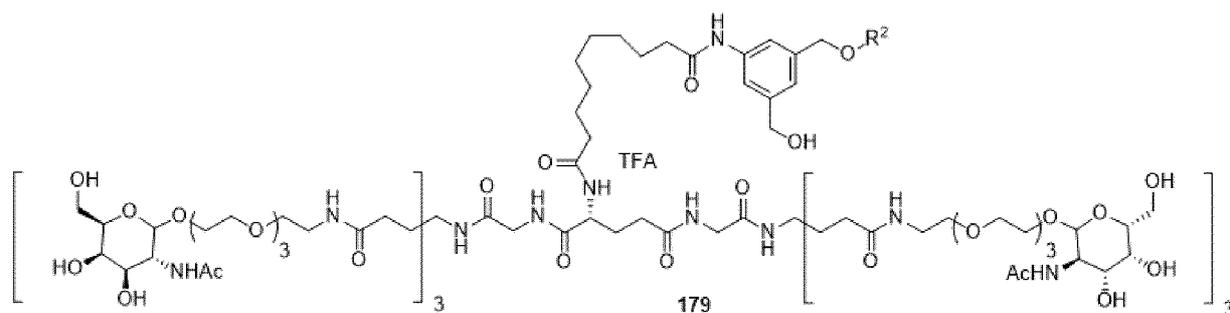


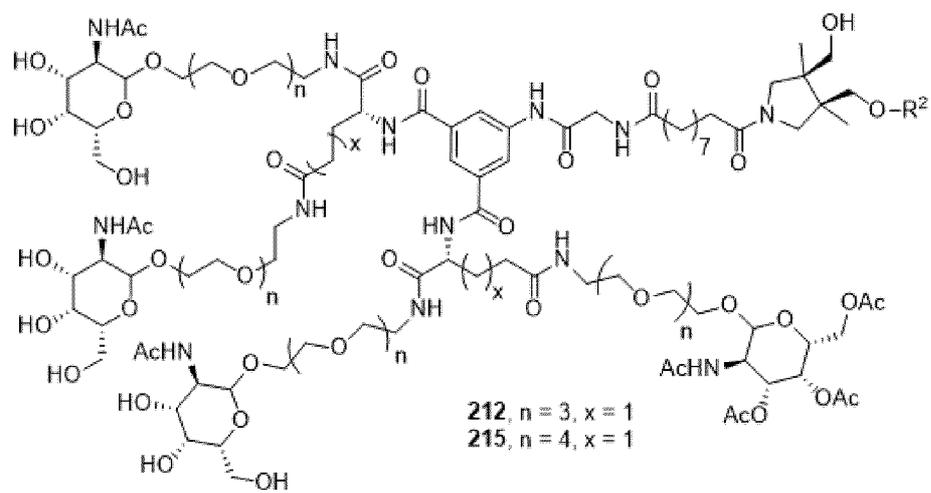
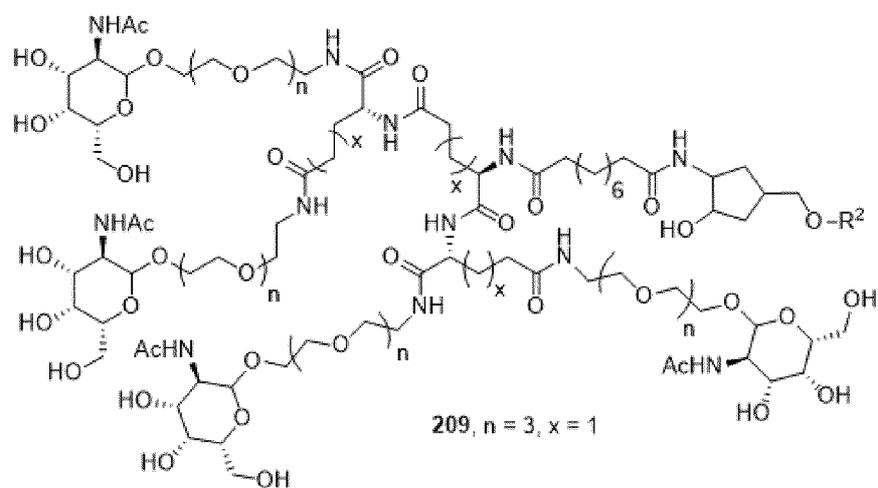
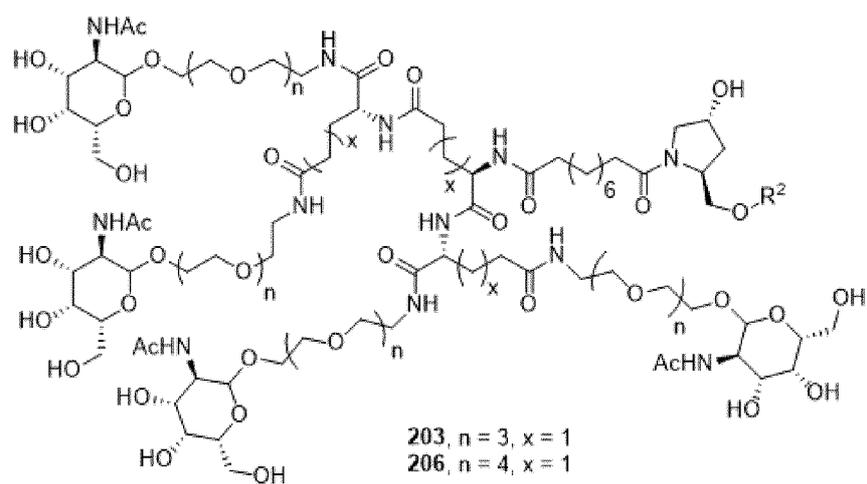


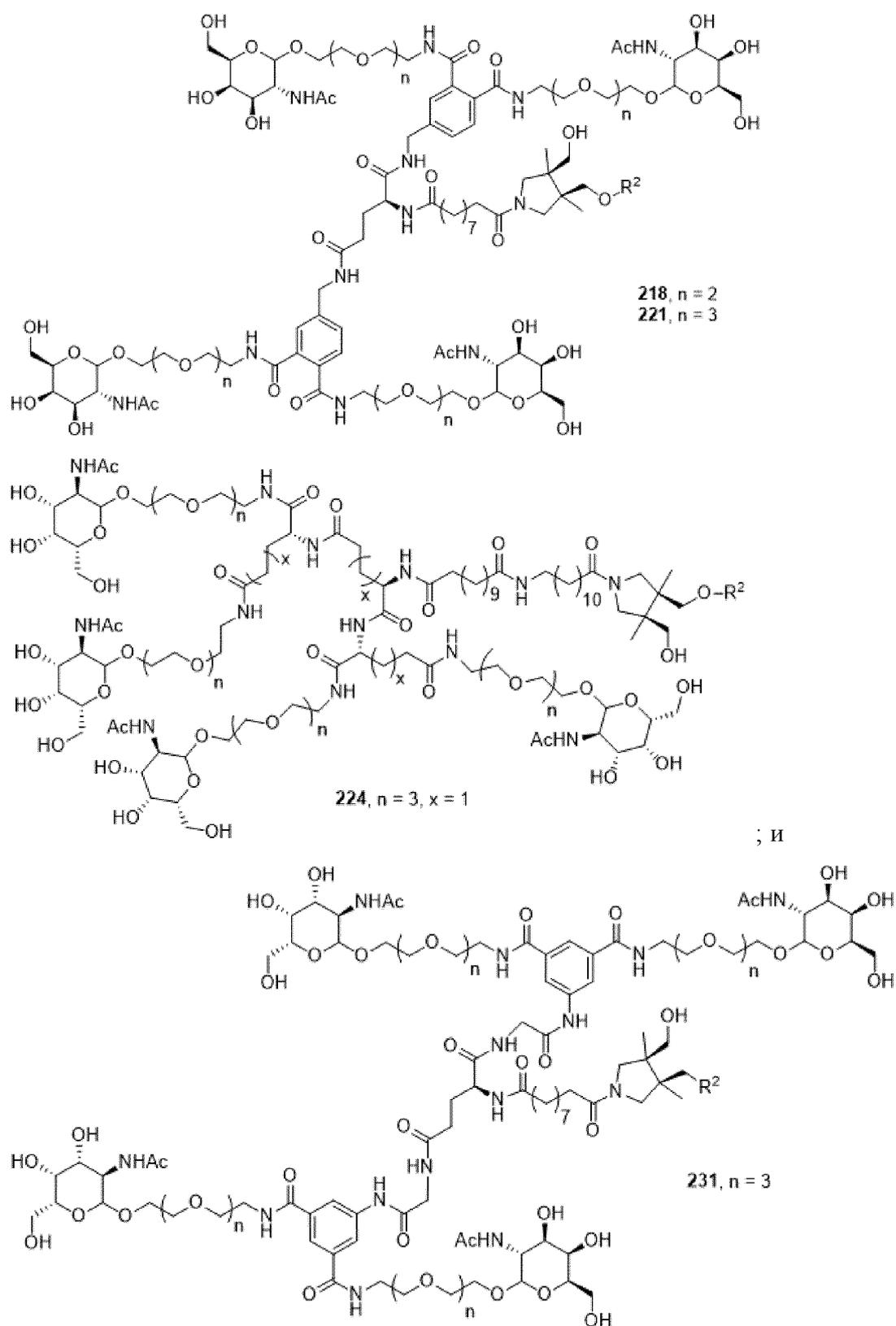
и его соли.

В одном из вариантов осуществления соединение формулы I или его соль выбрано из группы, включающей:

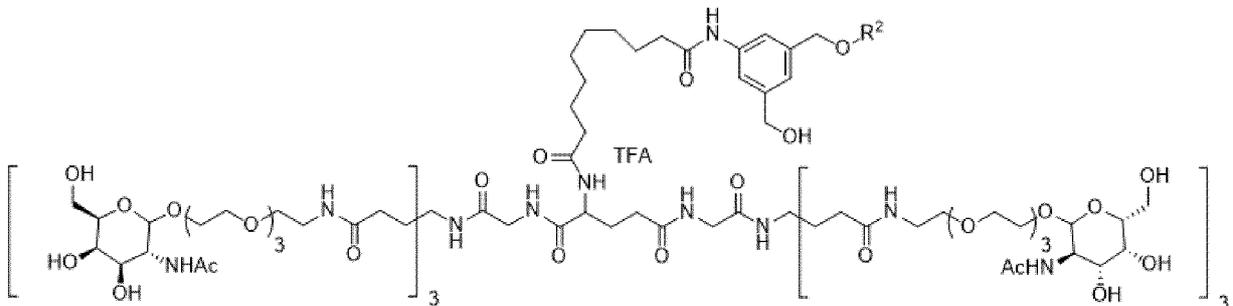
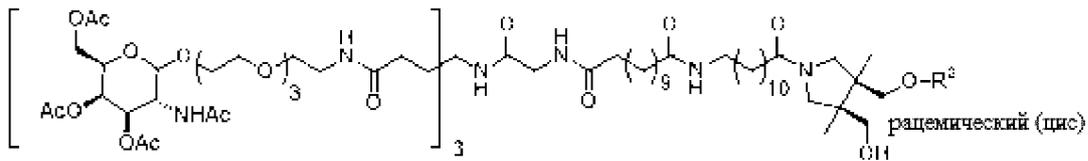
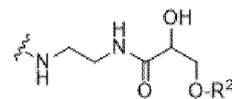
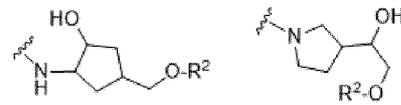
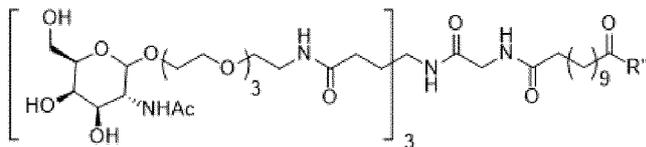
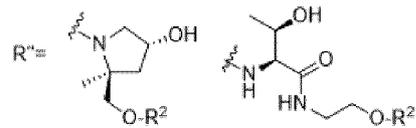
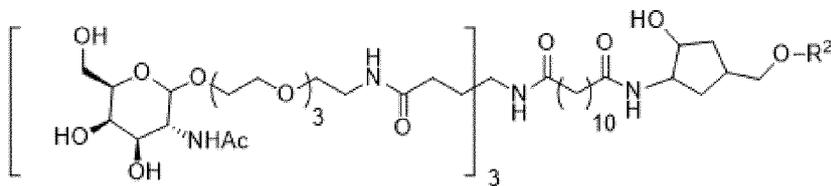
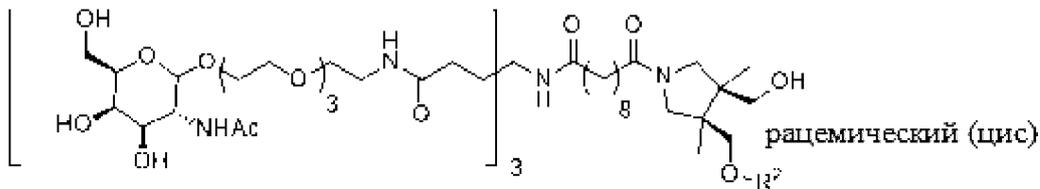
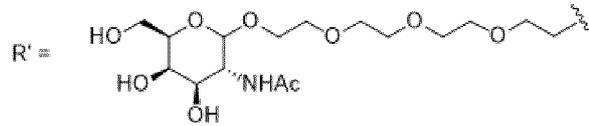
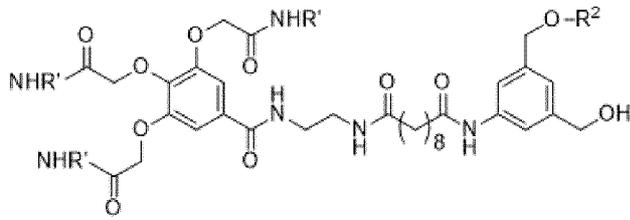


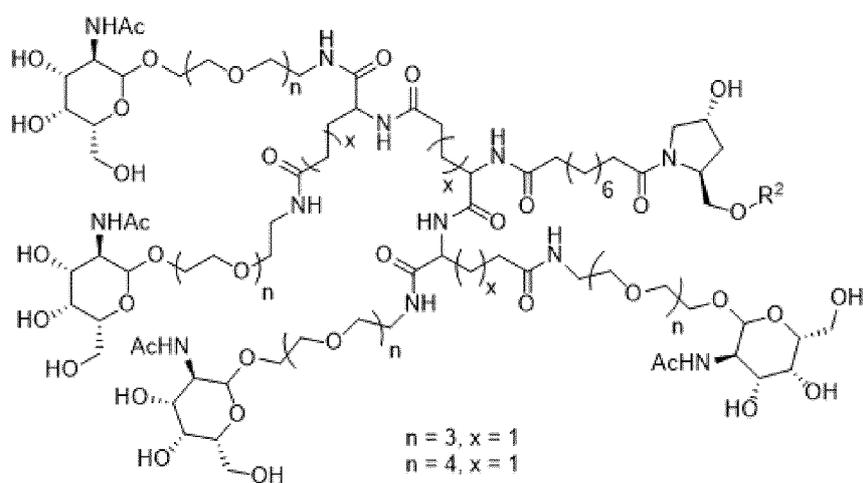
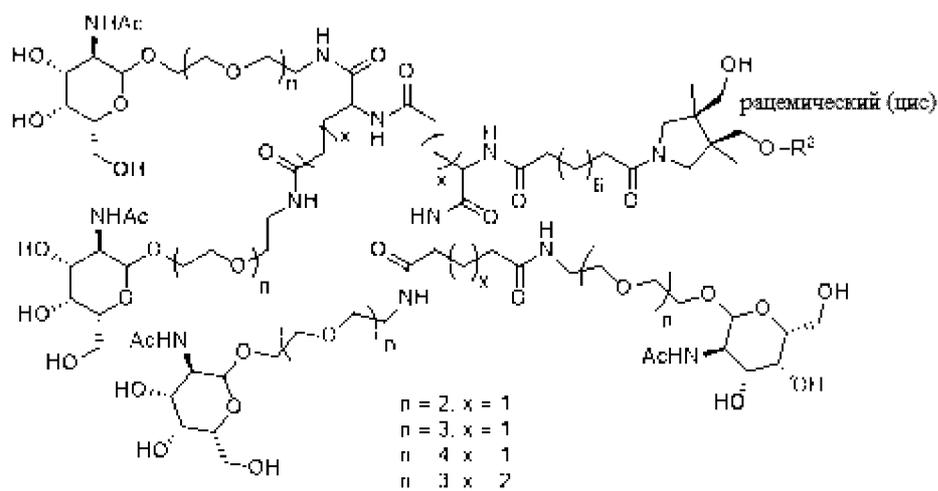
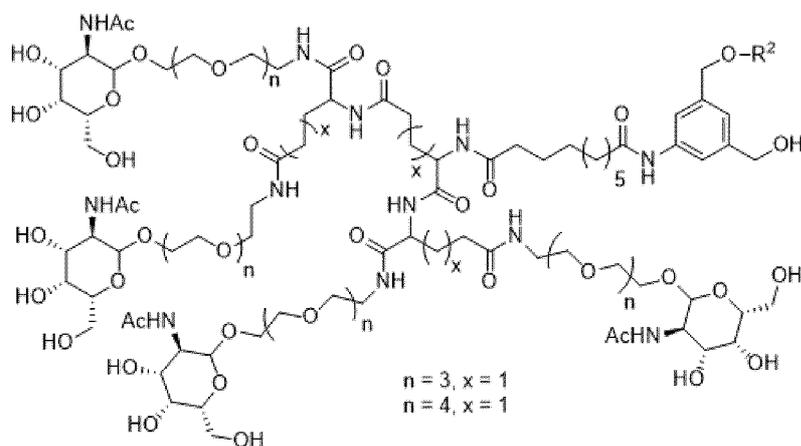
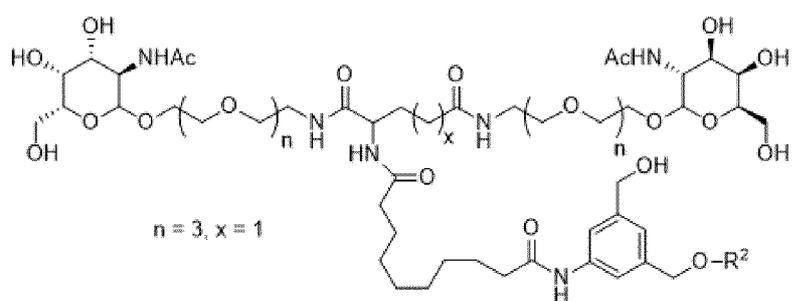


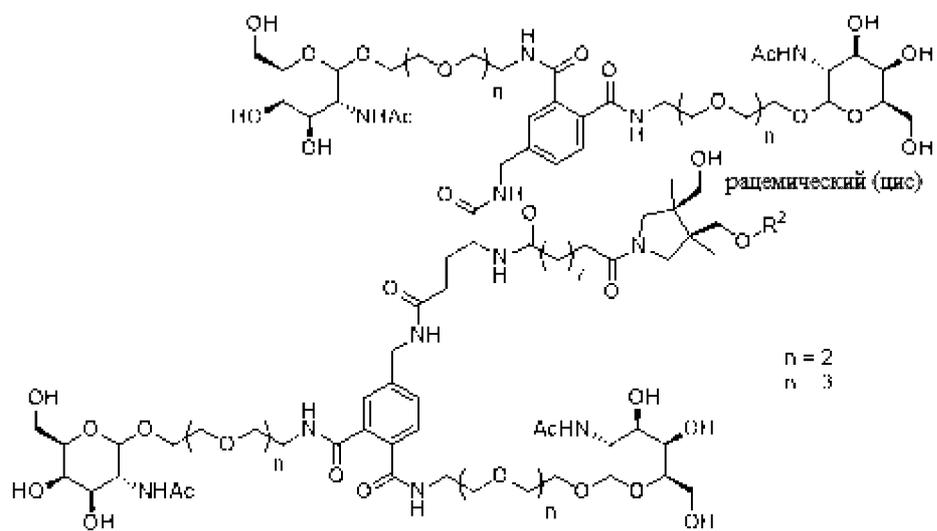
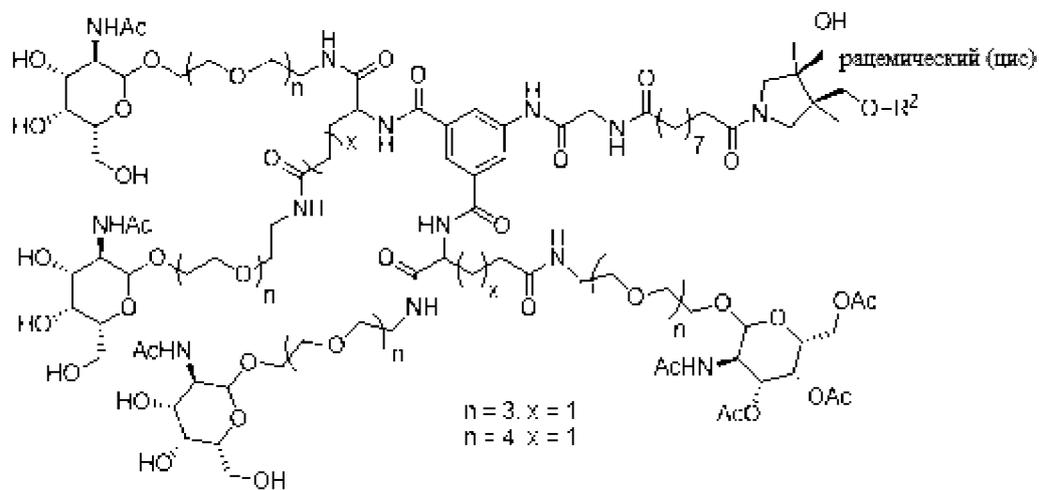
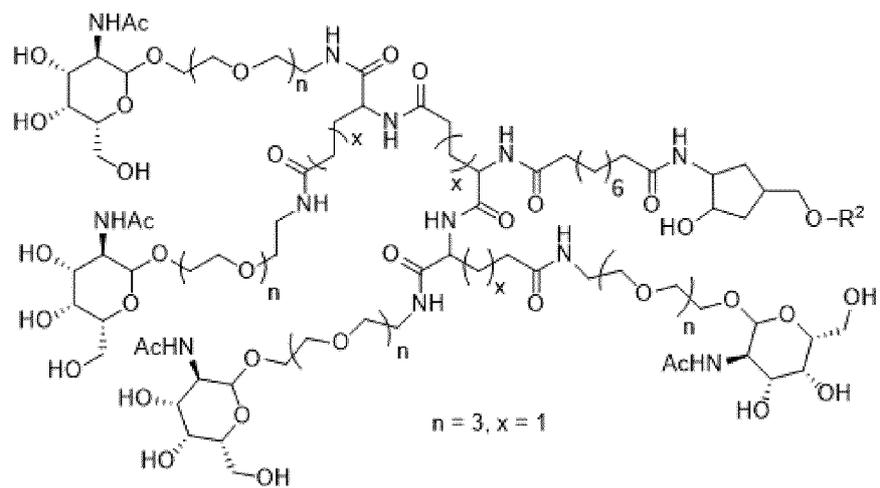


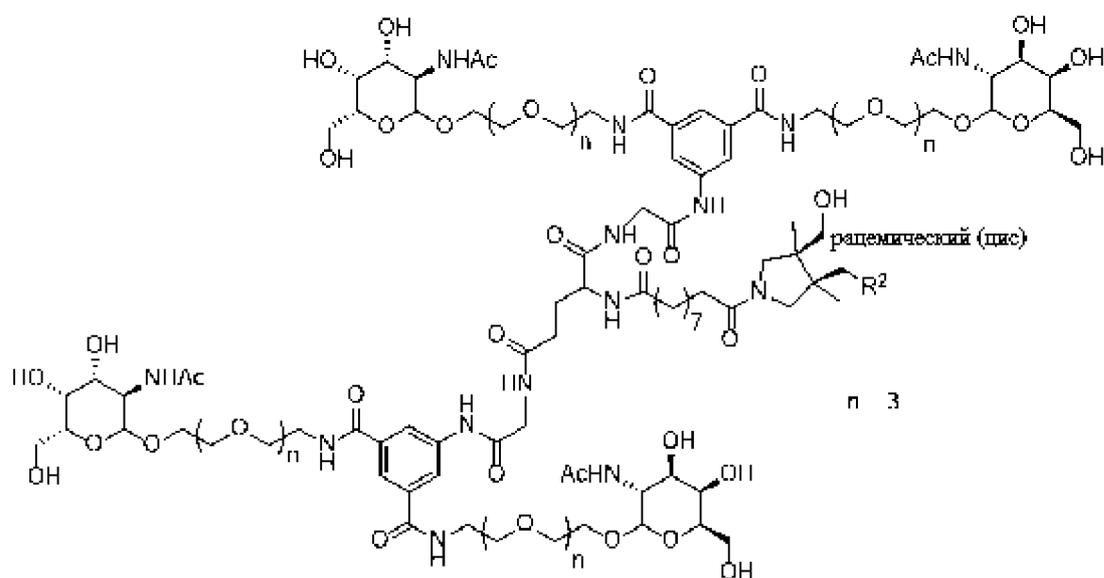
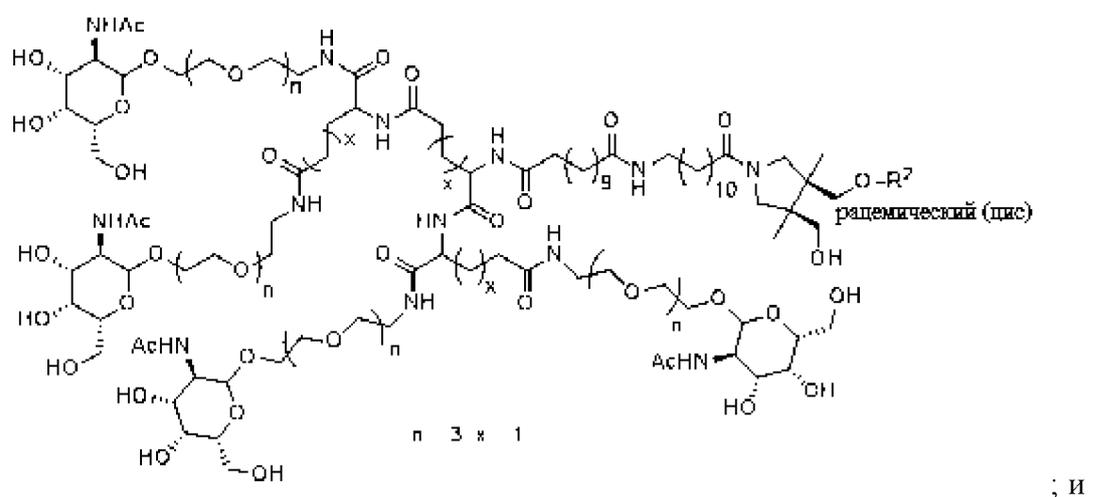


В одном из вариантов осуществления соединение формулы I или его соль выбрано из группы, включающей:



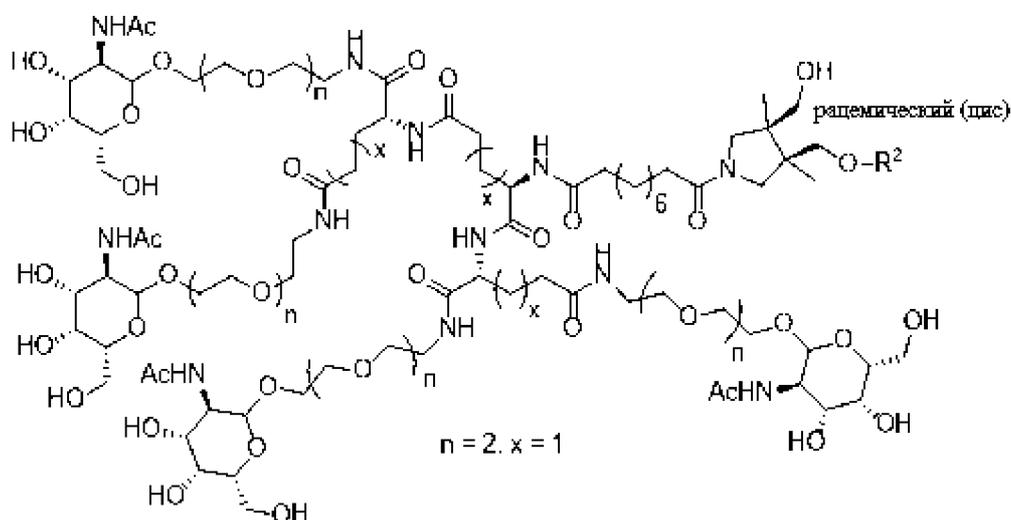






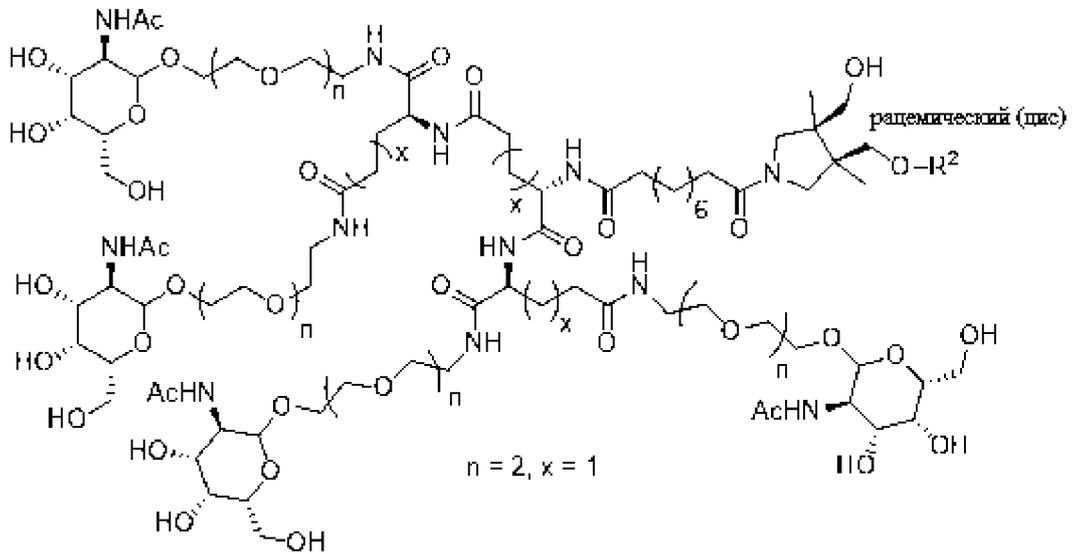
или его фармацевтически приемлемых солей, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК Таблицы 1.

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



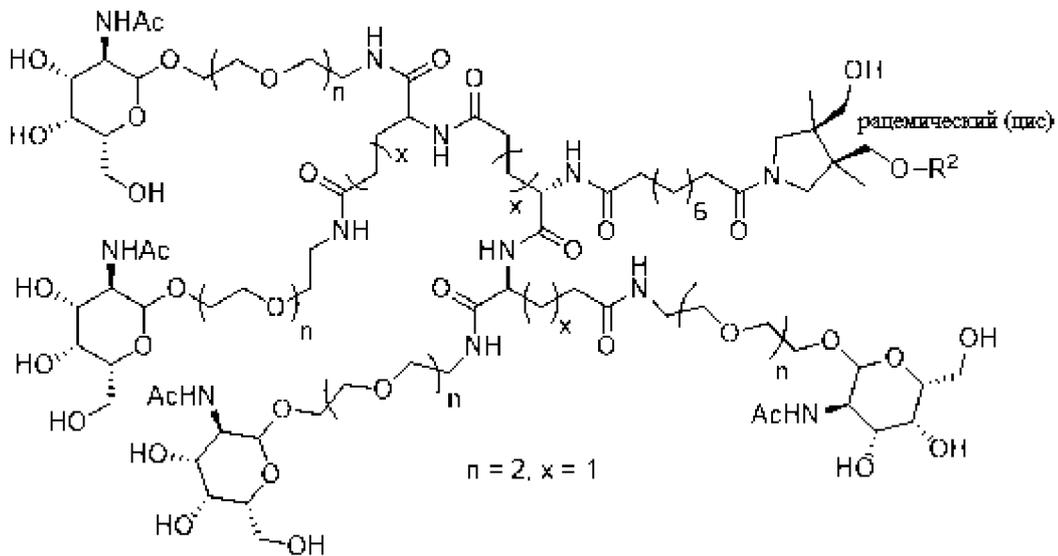
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



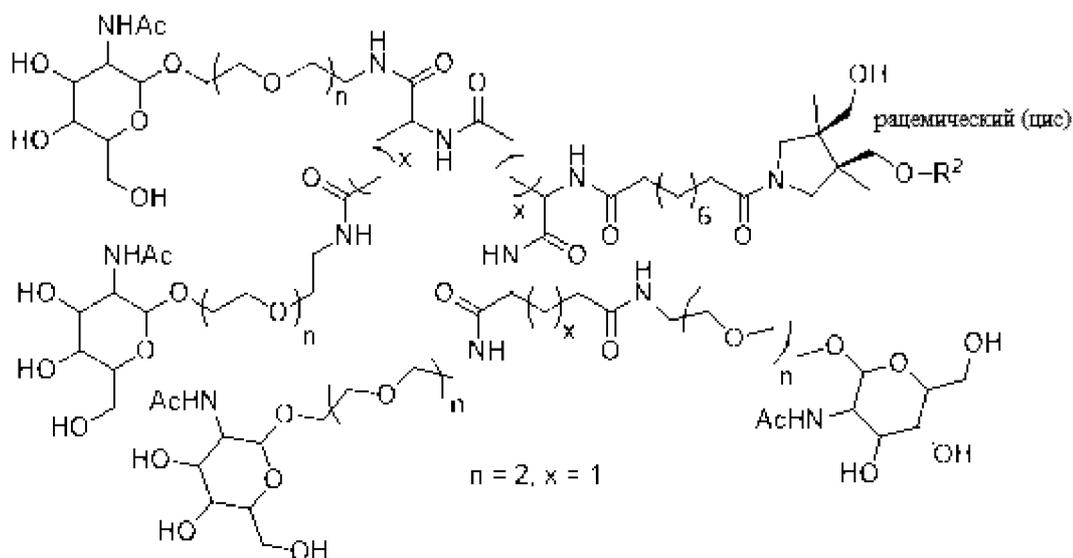
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



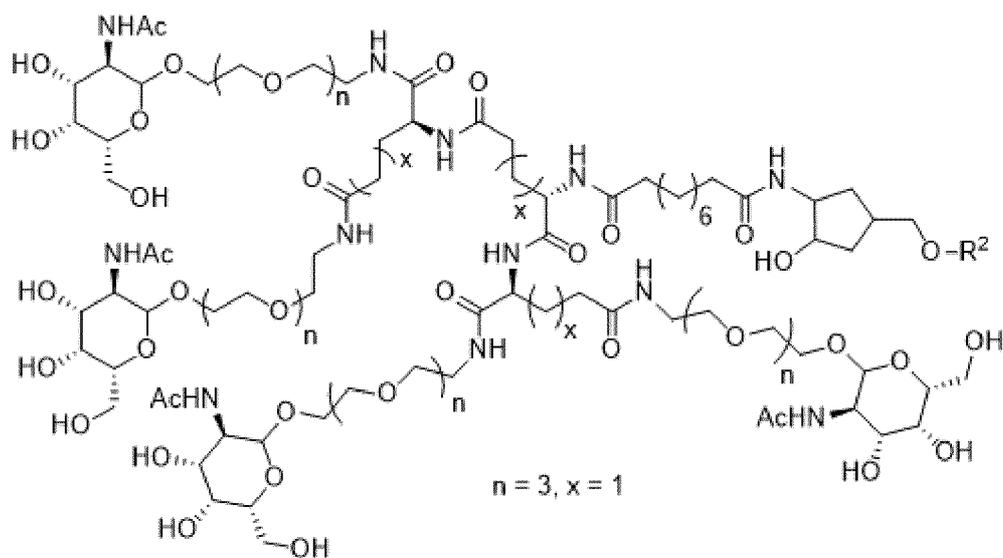
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



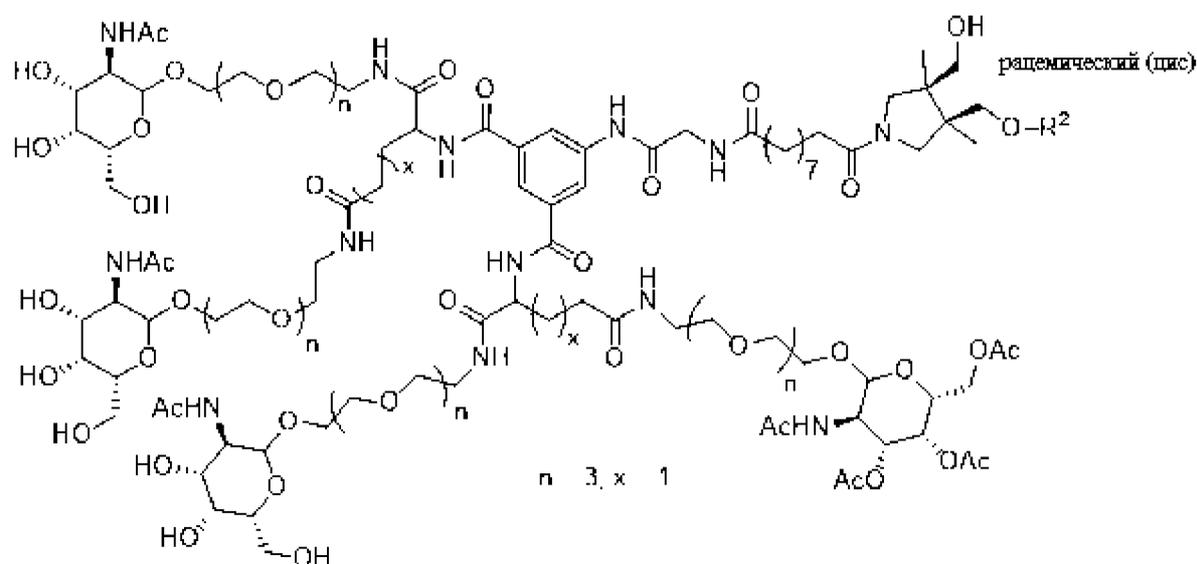
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



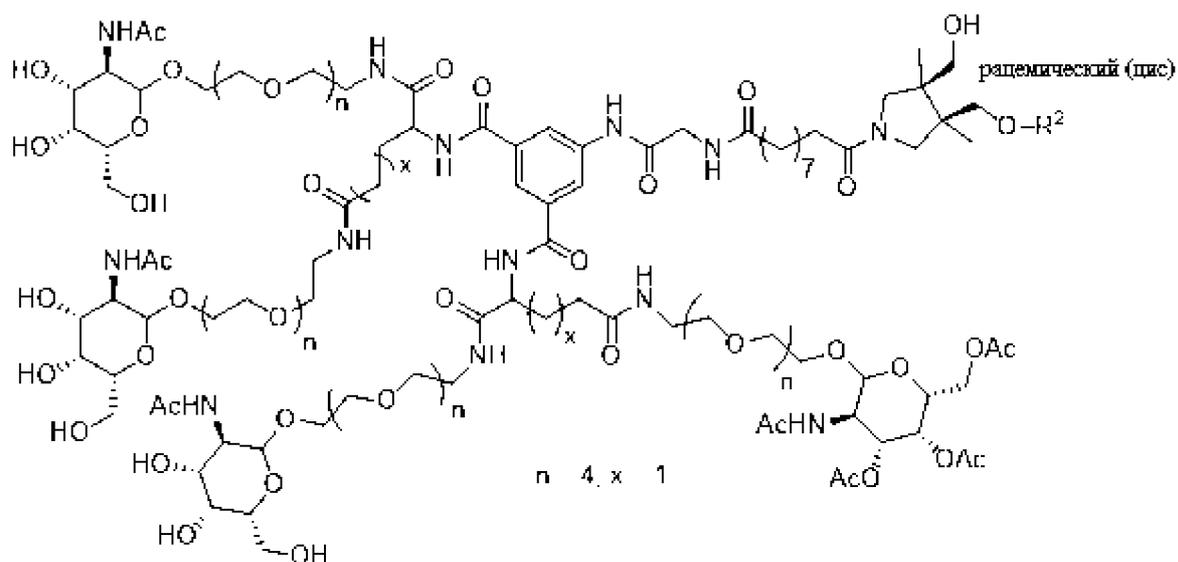
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



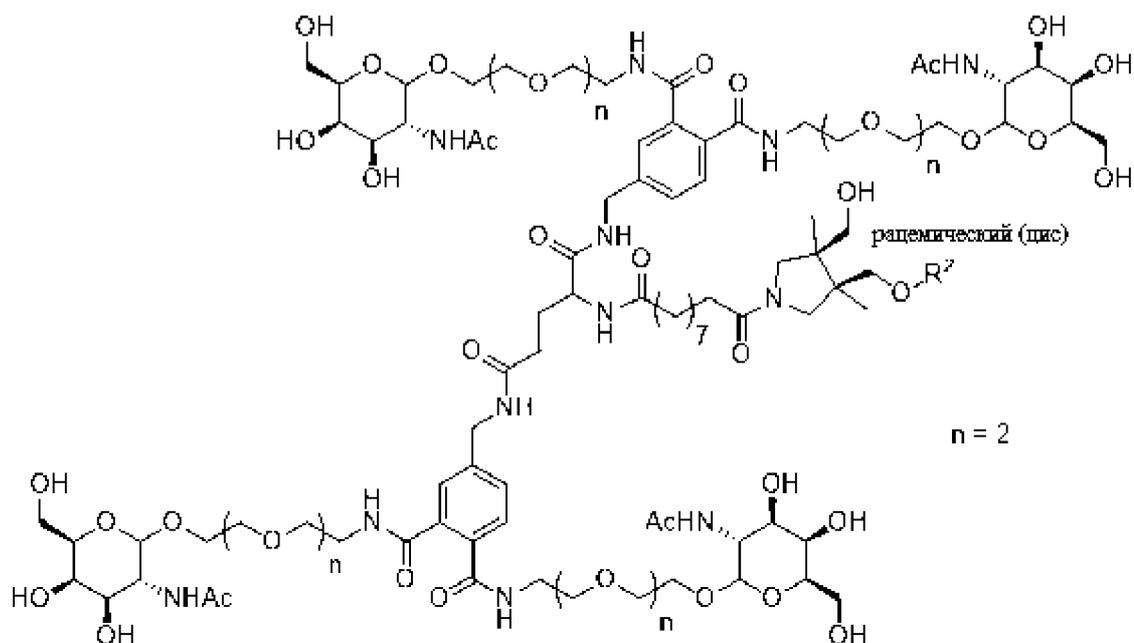
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



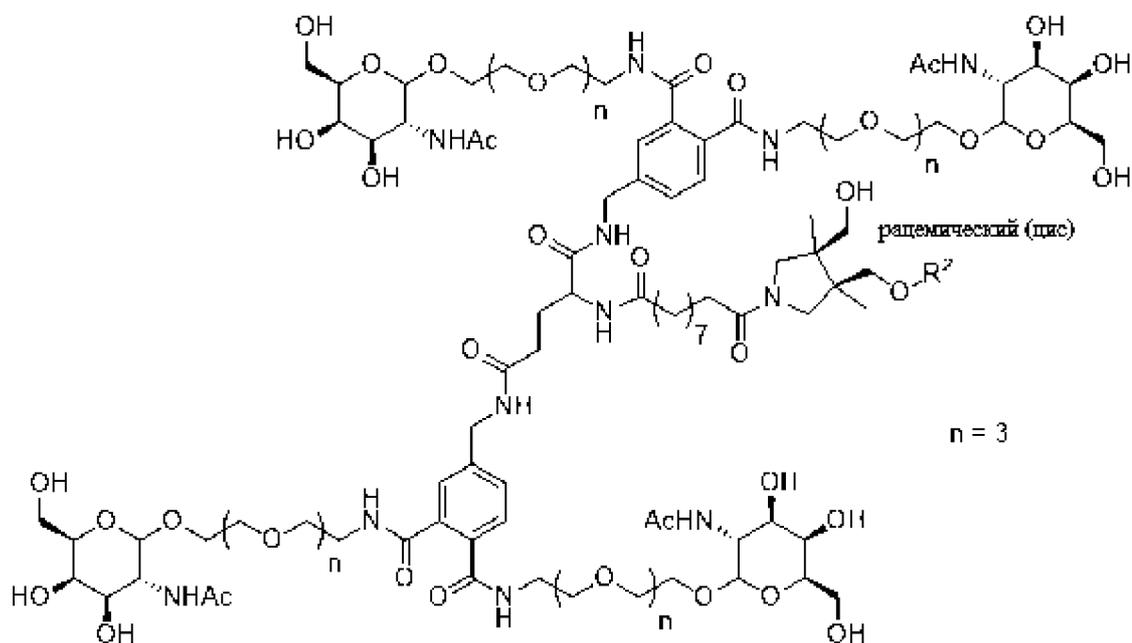
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



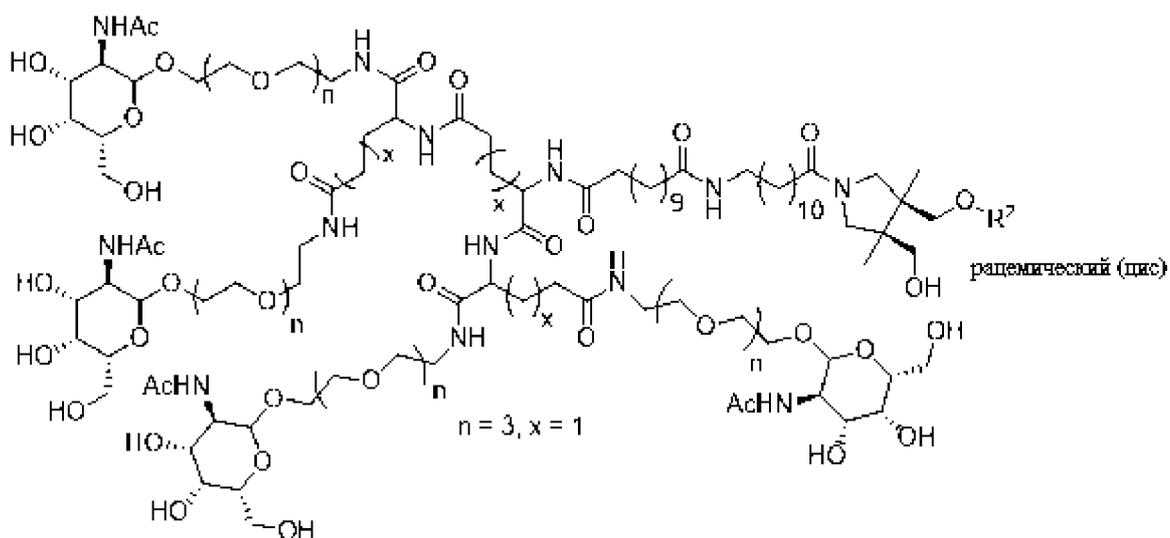
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



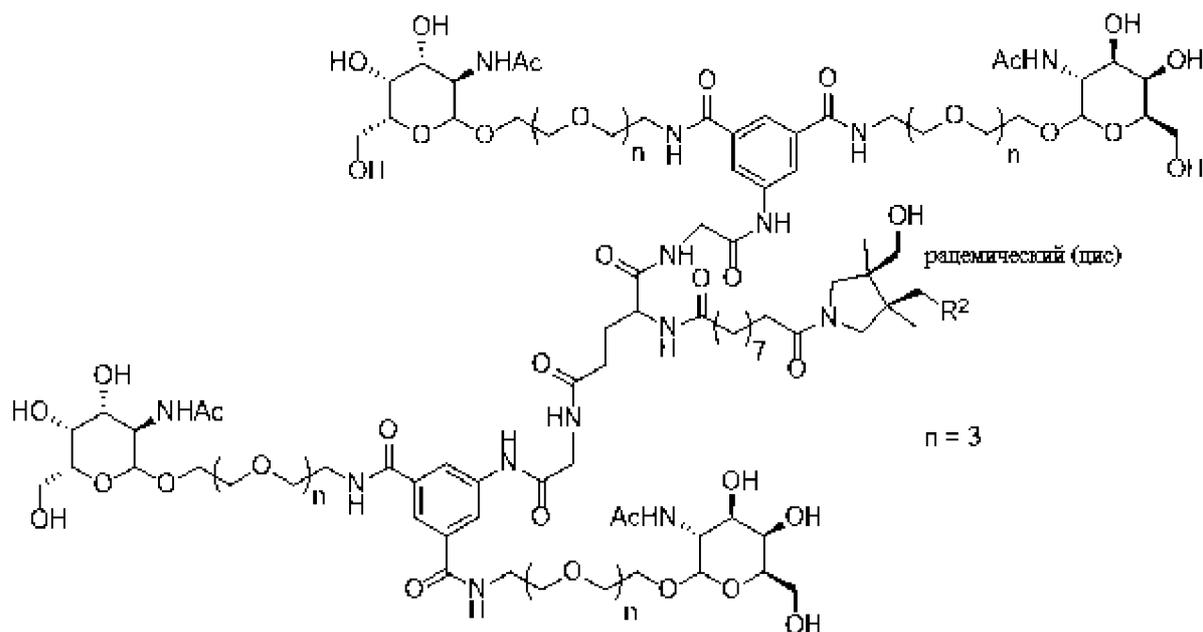
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



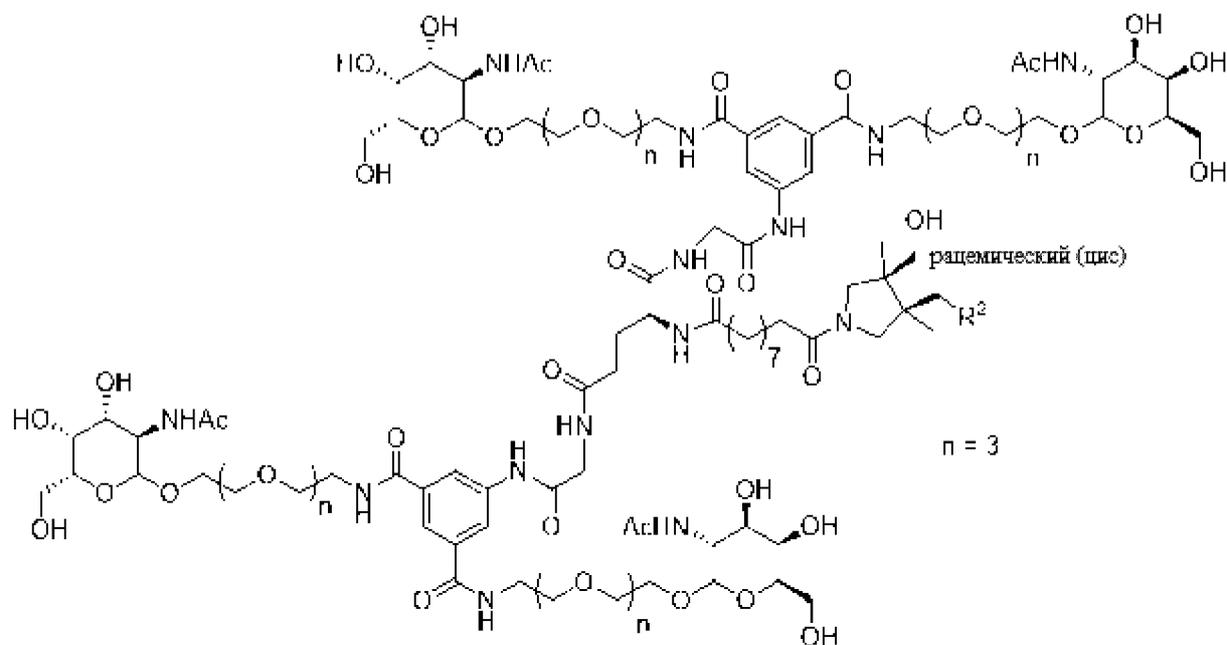
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



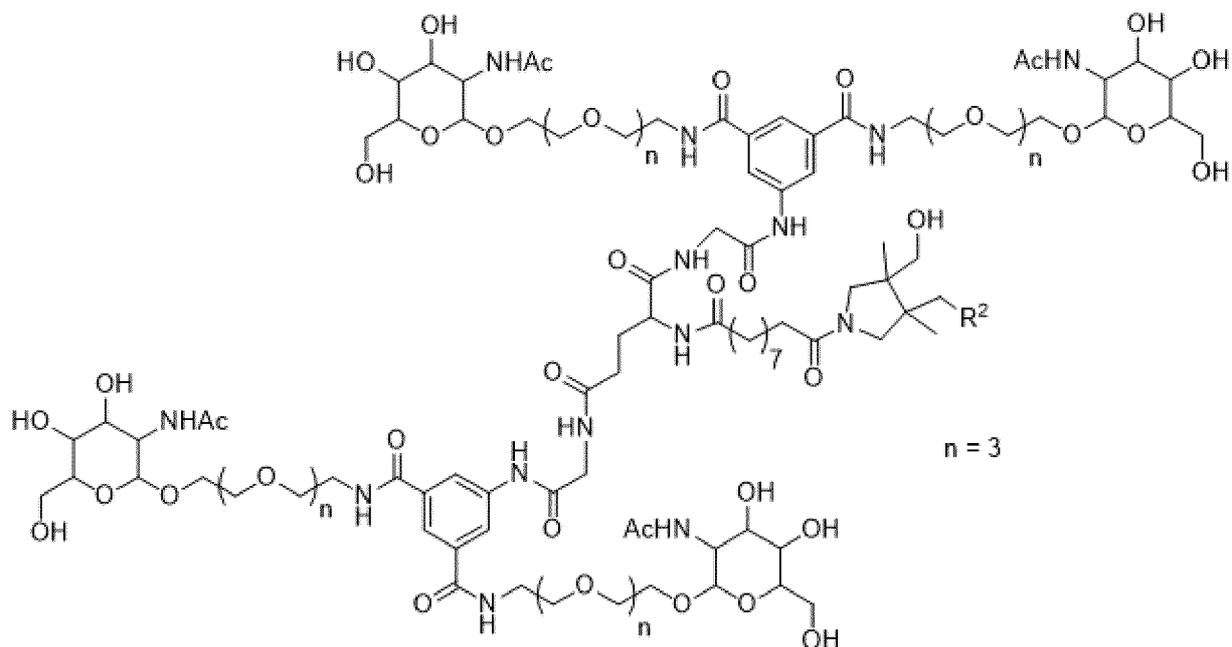
или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

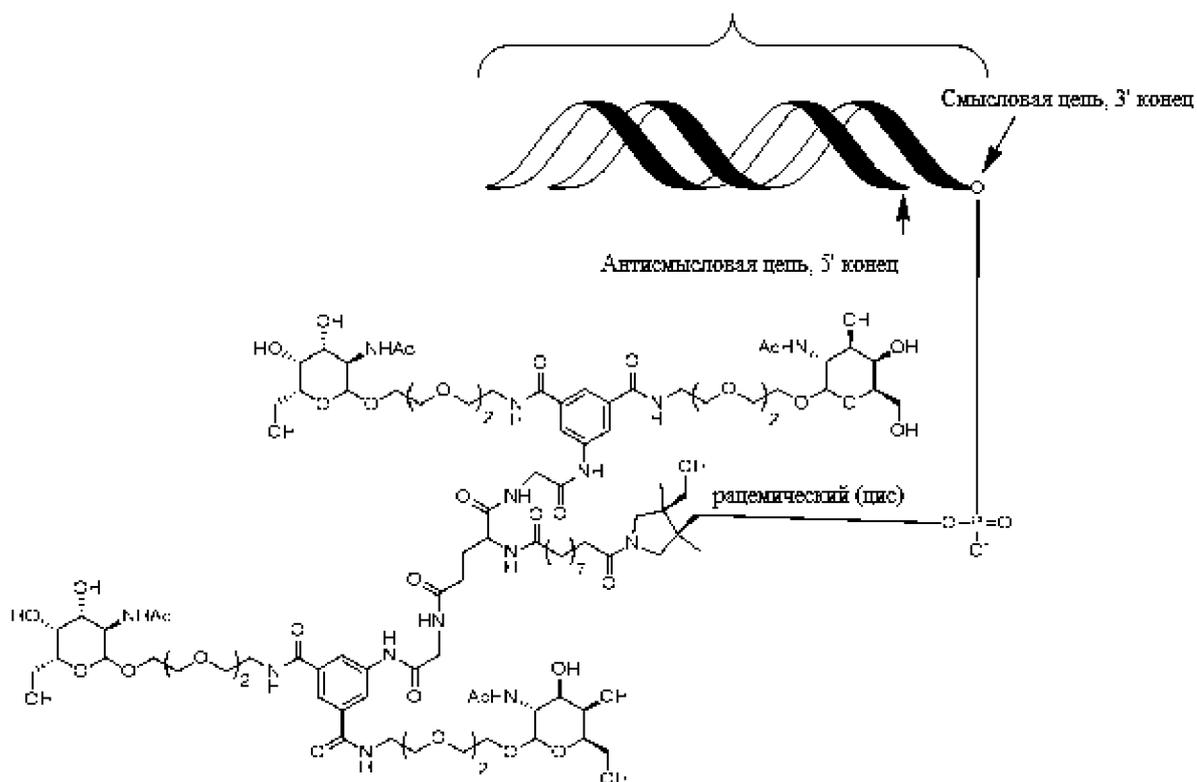
В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК (например, двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК в Таблице 1).

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:

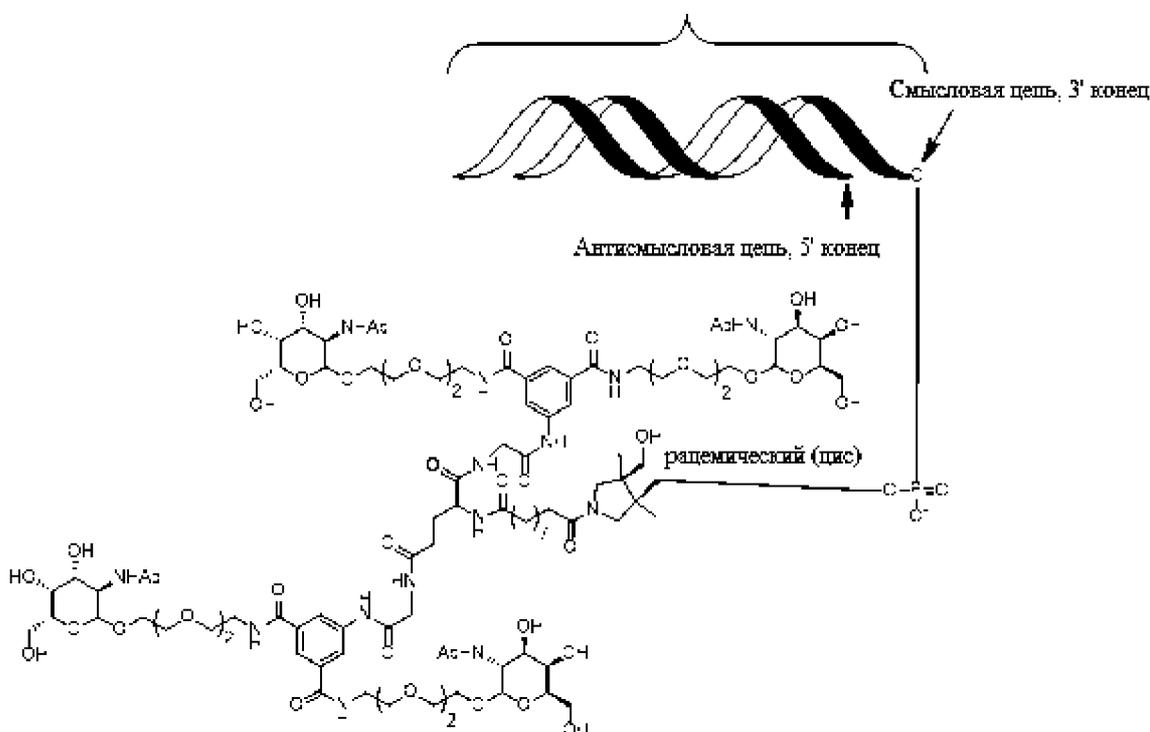
схРНК 3 (SEQ ID NO:5 и 6)



или его фармацевтически приемлемую соль;

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:

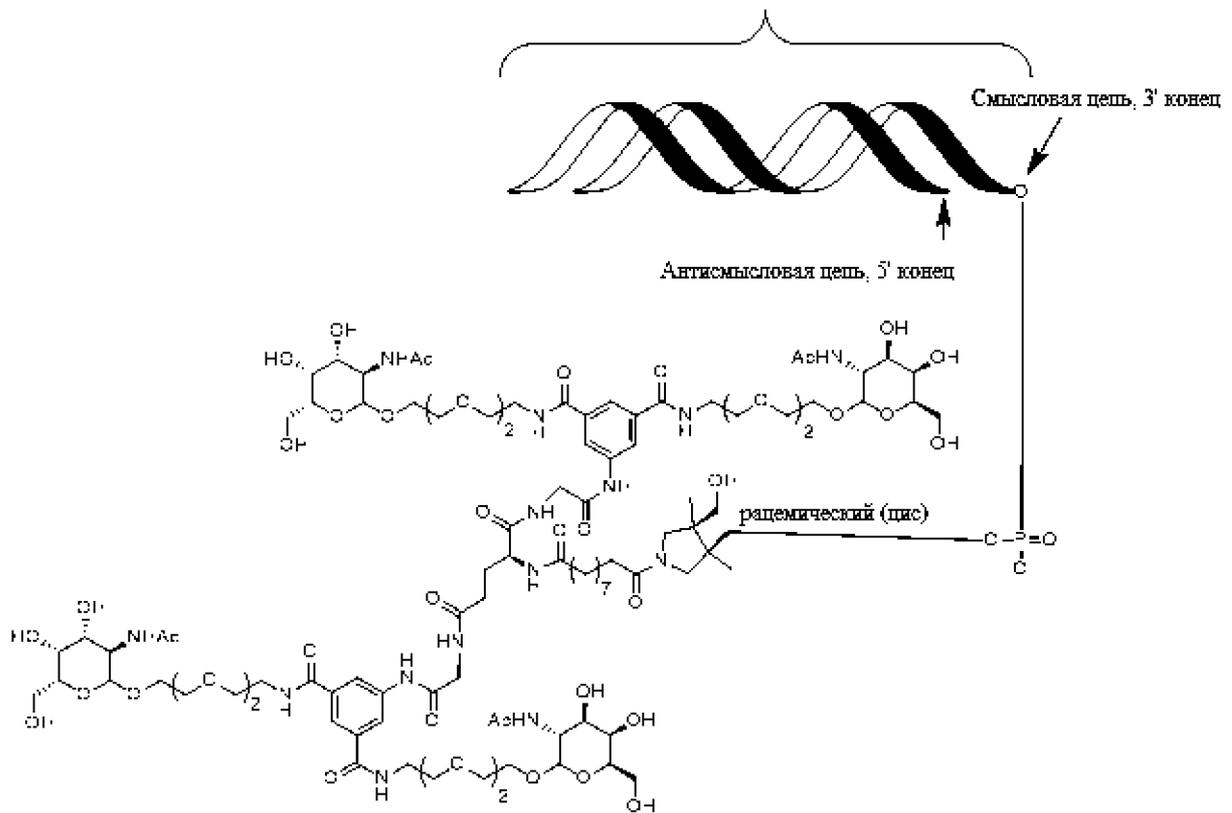
схРНК 25 (SEQ ID NO 49 и 50)



или его фармацевтически приемлемую соль;

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:

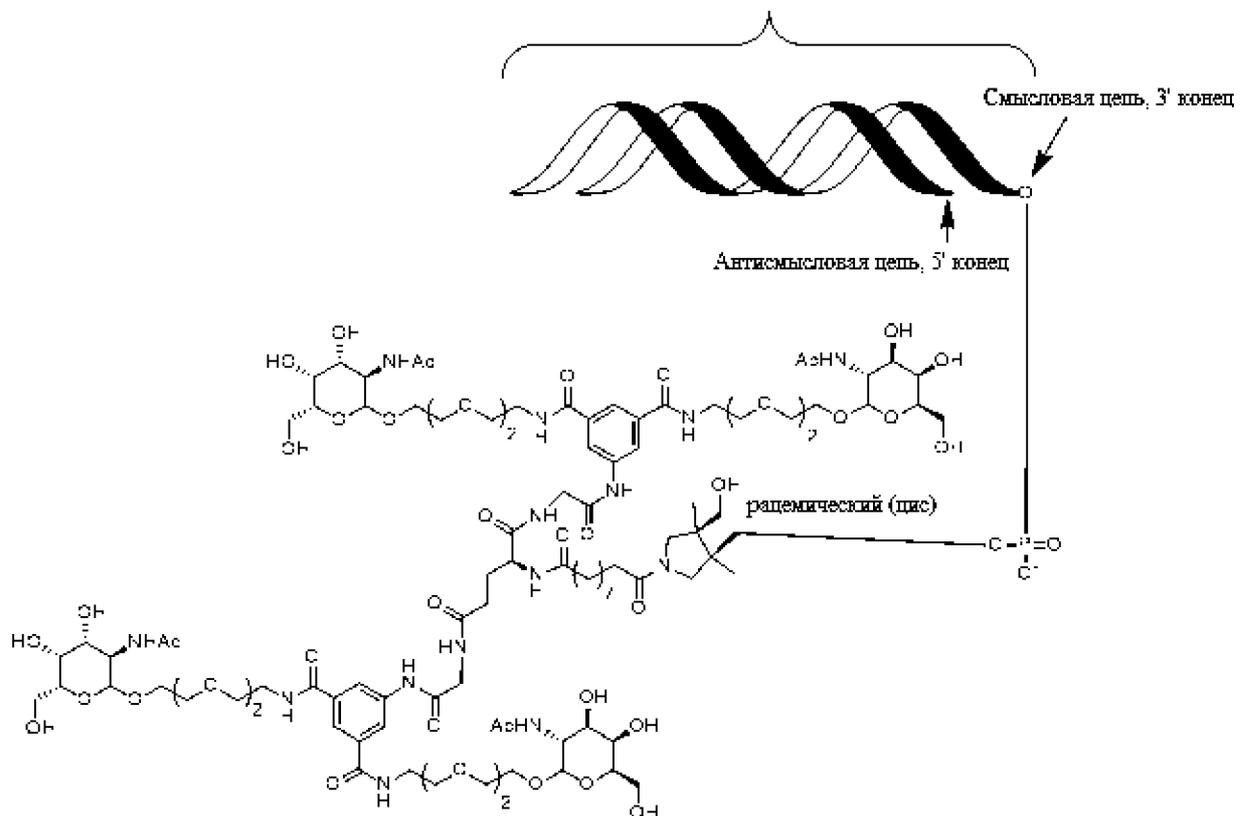
схРНК 3 (SI Q 13 NO 5 И E)



или его фармацевтически приемлемую соль;

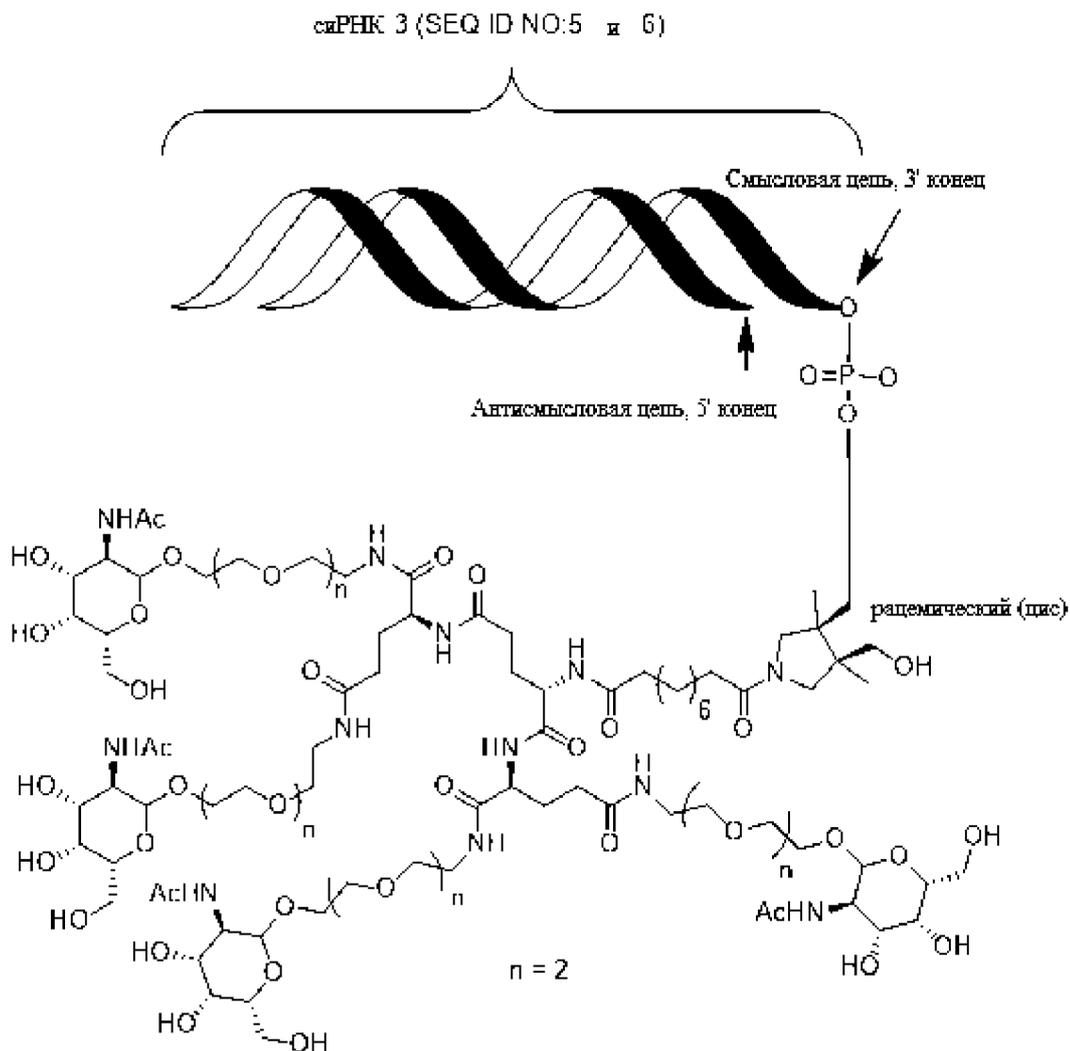
В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:

схРНК 25 (SI Q 13 NO 43 И 50)



или его фармацевтически приемлемую соль;

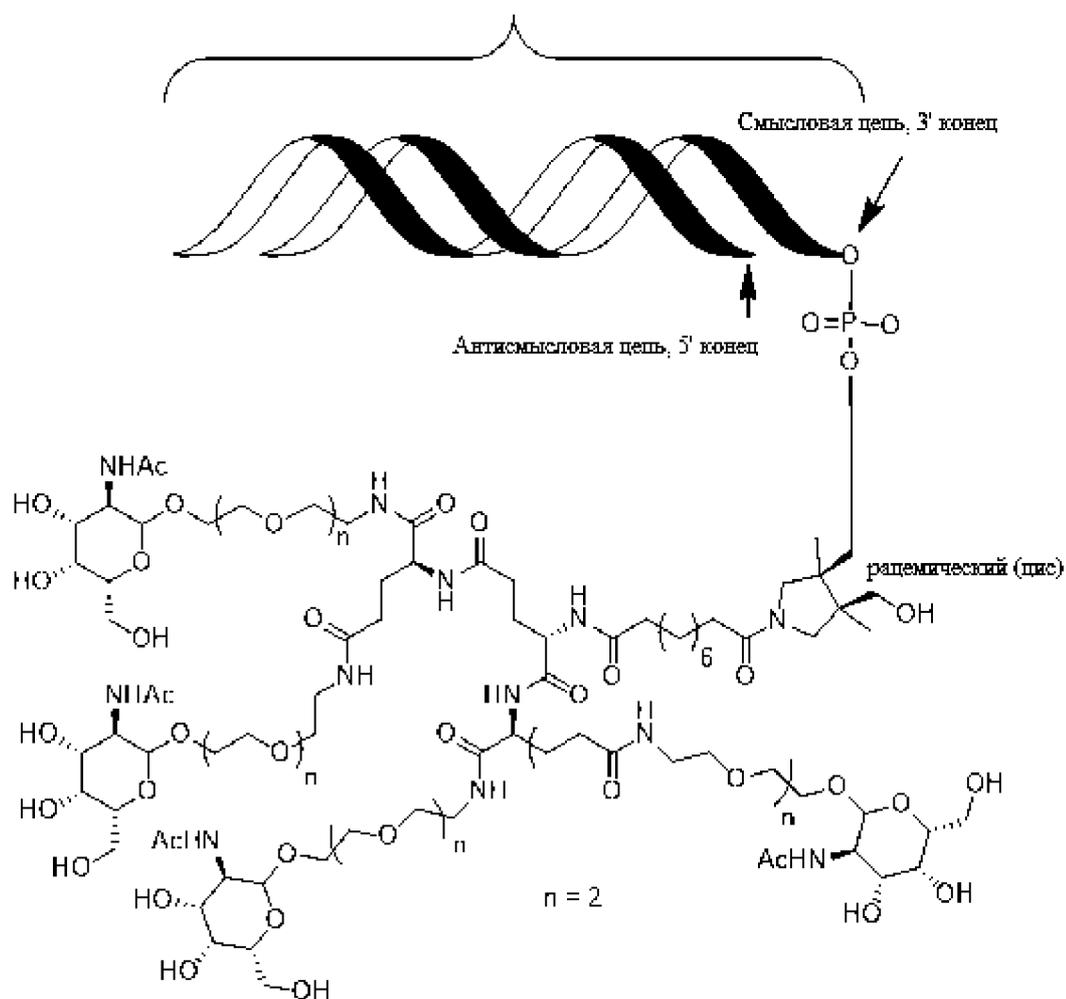
В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль;

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:

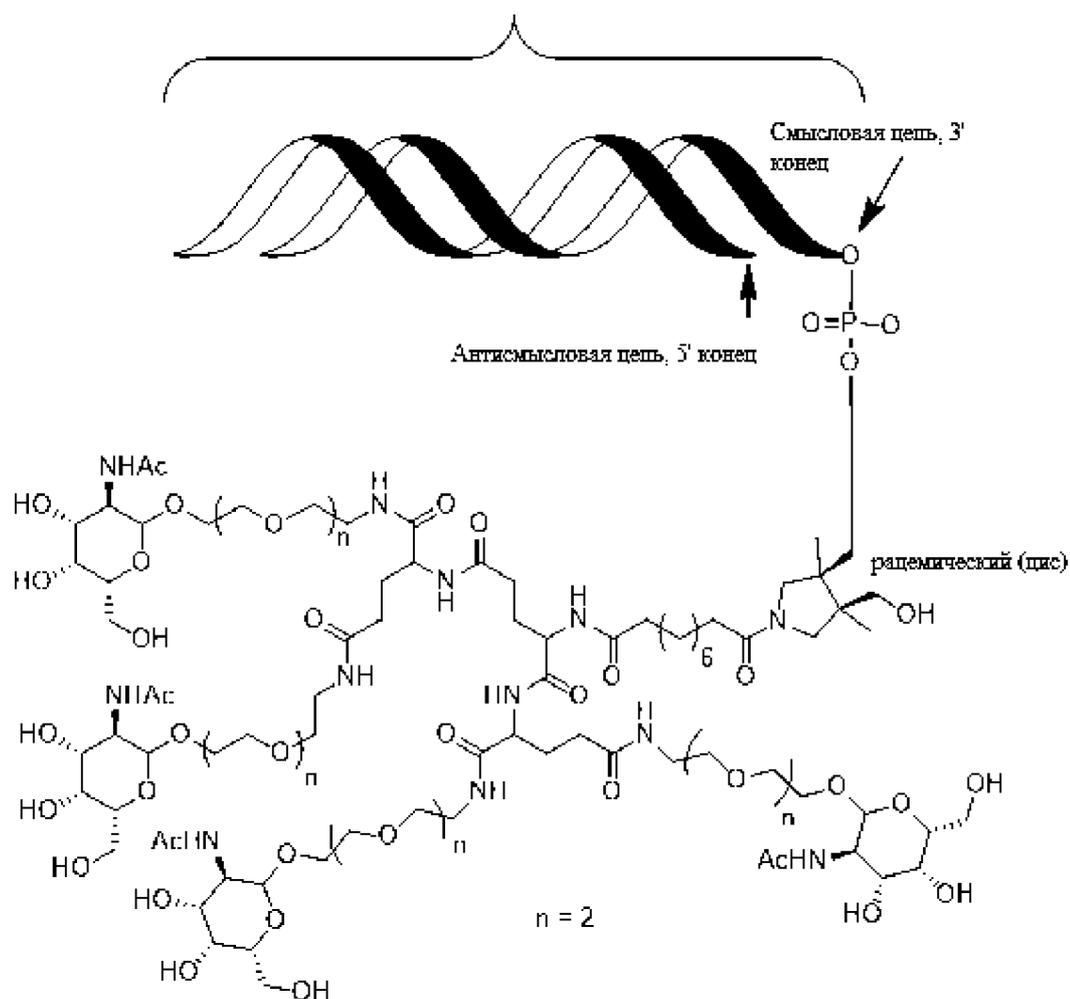
схРНК 25 (SEQ ID NO:49 и 50)



или его фармацевтически приемлемую соль;

В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:

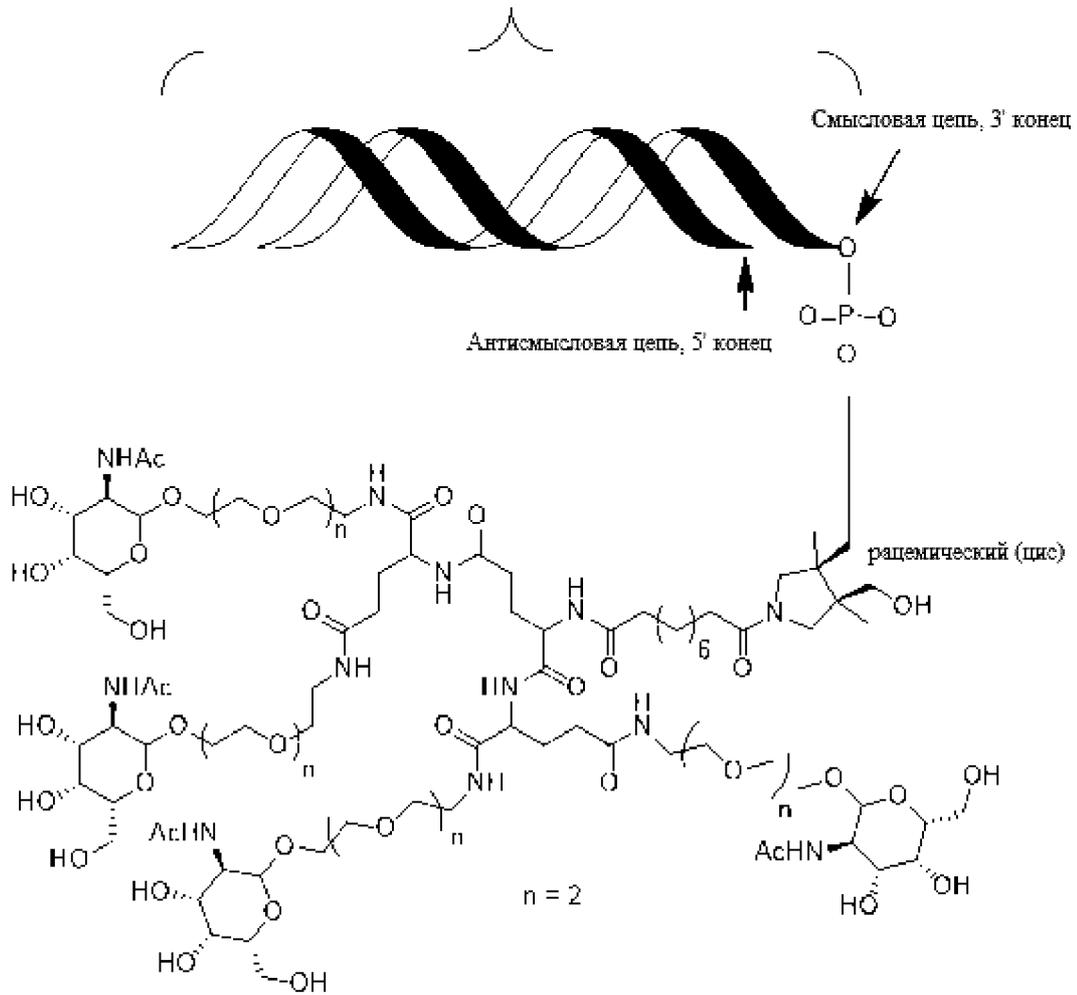
схРНК 3 (SEQ ID NO:5 и 6)



или его фармацевтически приемлемую соль;

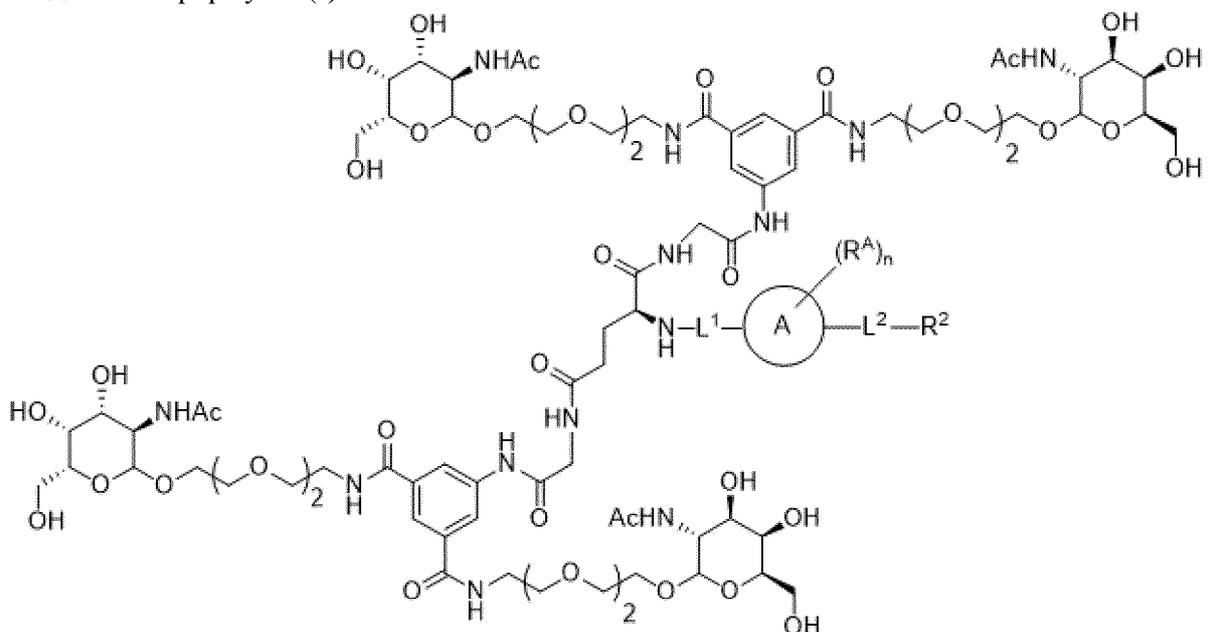
В одном варианте осуществления изобретения соединение формулы I представляет собой:

сирНК 25 (SEQ ID NO:49 и 50)



или его фармацевтически приемлемую соль;

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы (I):



(I),

где:

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту;

кольцо A отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

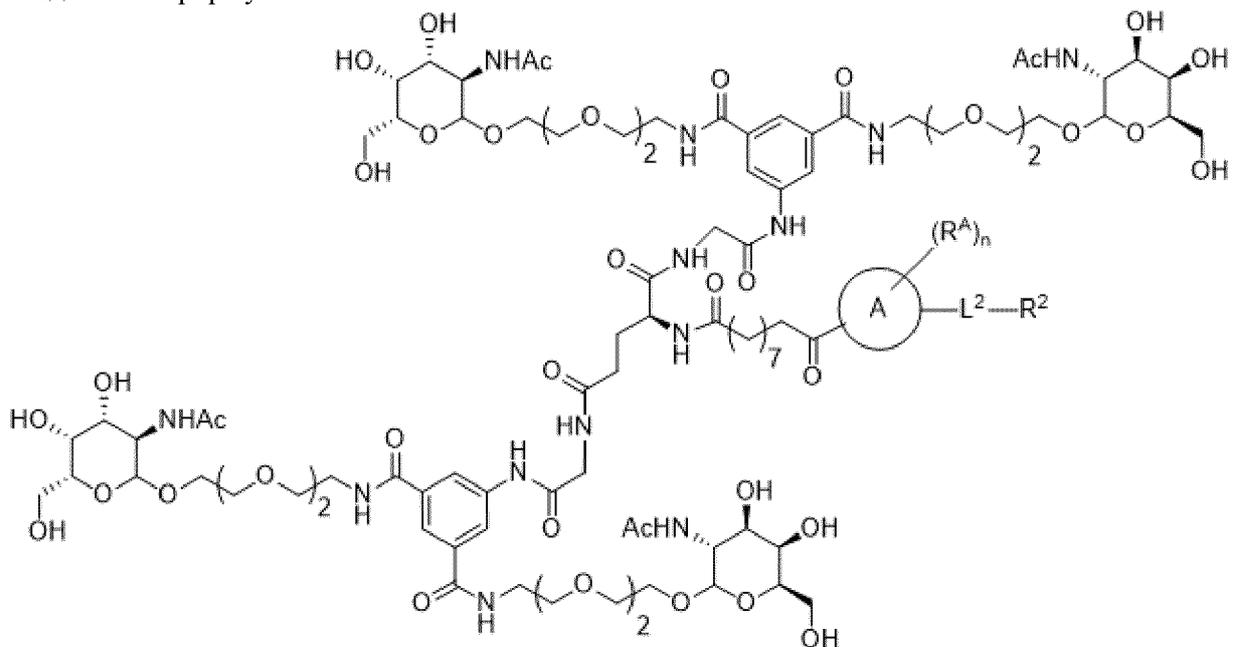
каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксид, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил- OR^B , C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил; где C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксид и C_{1-3} алкокси;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы:



где:

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту;

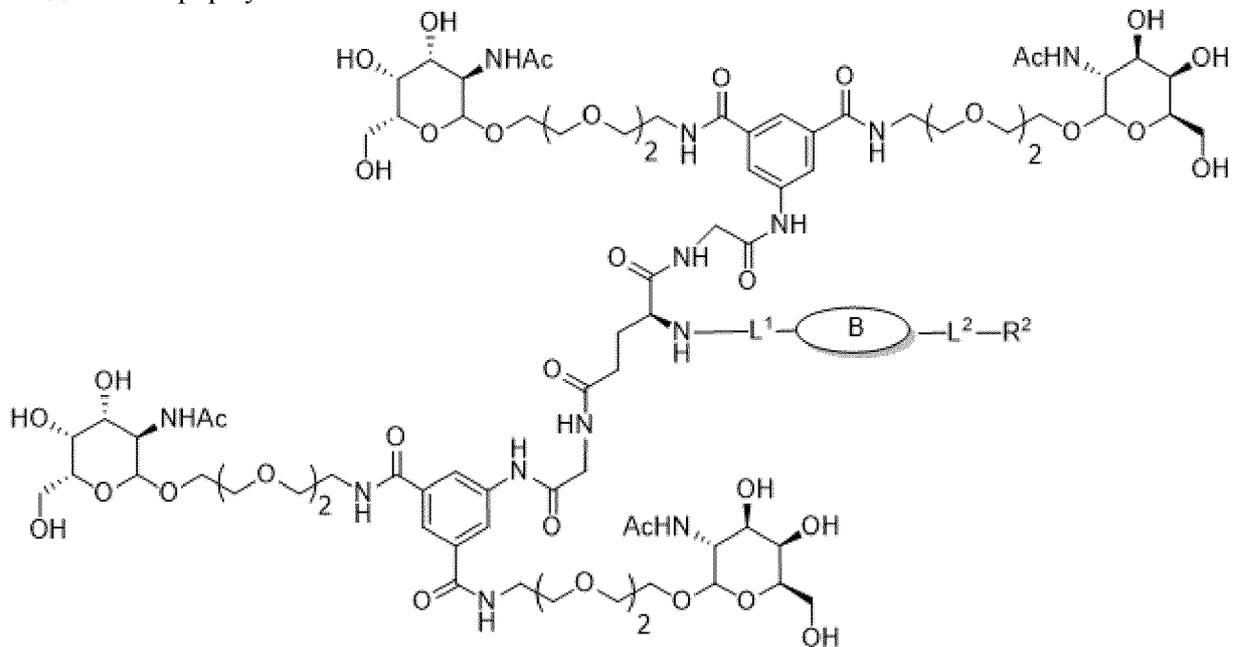
кольцо A отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксид, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил- OR^B , C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил; где C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксид и C_{1-3} алкокси;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой

подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; или его соль.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы:



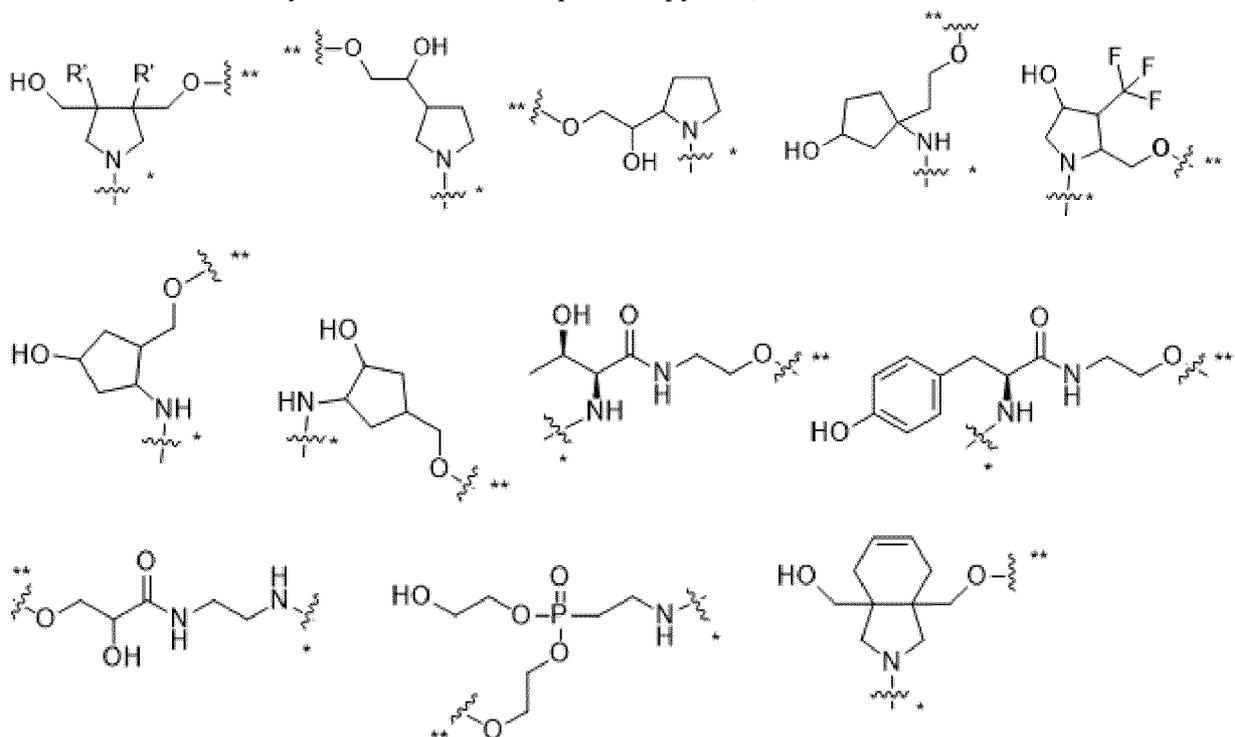
где:

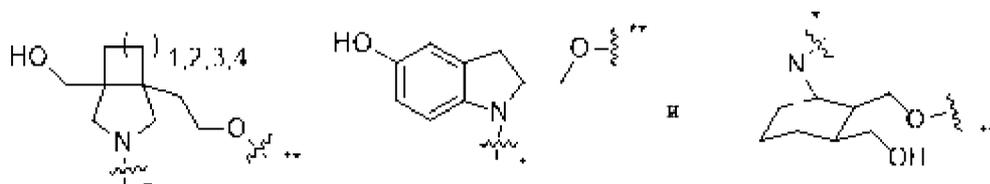
L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту;

B является двухвалентным и выбран из группы, включающей:





где:

каждый из R' представляет собой C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил; где C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксилком;

валентность, отмеченная *, соединена с L^1 или соединена с R^1 , если L^1 отсутствует;

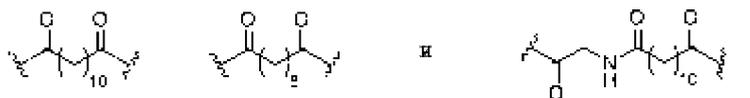
и

валентность, отмеченная **, соединена с L^2 или соединена с R^2 , если L^2 отсутствует;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления L^1 и L^2 независимо представляют собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменены на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или $(C1-C6)$ алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более заместителями, выбранными из $(C1-C6)$ алкокси, $(C3-C6)$ циклоалкила, $(C1-C6)$ алканоила, $(C1-C6)$ алканоилокси, $(C1-C6)$ алкоксикарбонила, $(C1-C6)$ алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

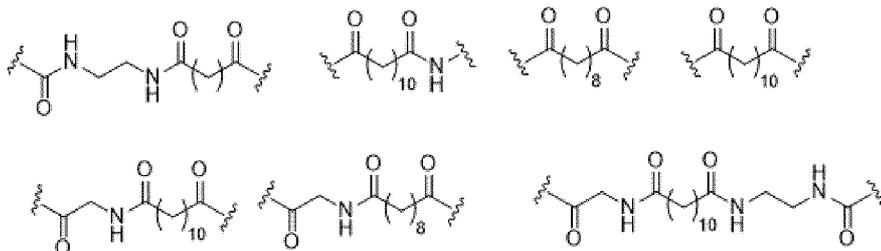
В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:

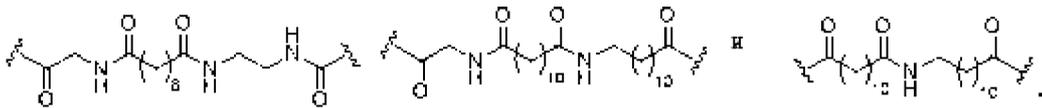


или его соль.

В одном из вариантов осуществления L^1 соединен с V^1 с помощью звена, выбранного из группы: $-O-$, $-S-$, $-(C=O)-$, $-(C=O)-NH-$, $-NH-(C=O)$, $(C=O)-O-$, $-NH-(C=O)-NH-$ или $-NH-(SO_2)-$.

В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:



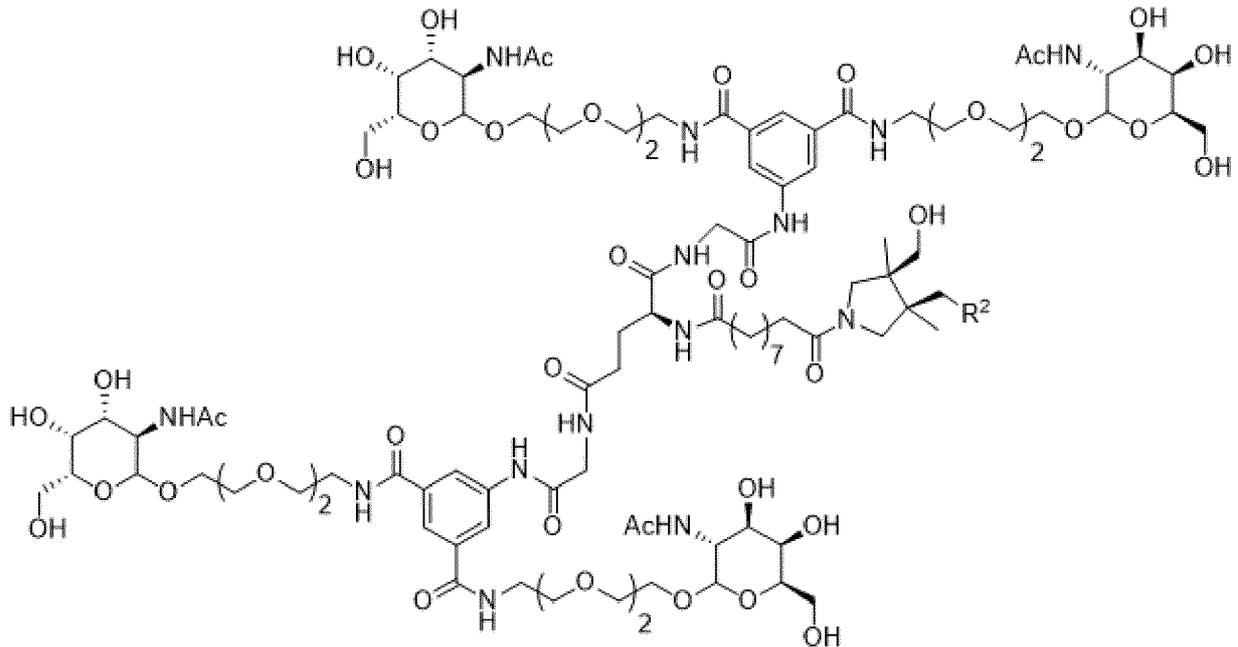


В одном из вариантов осуществления L^2 соединен с R^2 при помощи $-O-$.

В одном из вариантов осуществления L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен- $O-$, который, необязательно, замещен гидроксильной группой.

В одном варианте осуществления L^2 отсутствует.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение,



или его соль, где R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту.

Один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы I и фармацевтически приемлемый носитель.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ доставки двухцепочечной миРНК в печень животного, включающий введение животному соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

Другим аспектом данного изобретения является способ лечения заболевания или расстройства (например, заболевания печени или вирусной инфекции, такой как вирусная инфекция гепатита В) у животного, включающий введение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли животному.

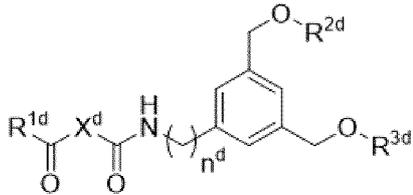
В определенных вариантах осуществления изобретения предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в медикаментозной терапии.

В определенных вариантах осуществления изобретения предложено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для профилактического или терапевтического лечения заболевания или расстройства (например, заболевания печени или вирусной инфекции, такой как вирусная инфекция гепатита В) у животного.

В определенных вариантах осуществления изобретения предложено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства (например, заболевания печени или вирусной инфекции, такой как вирусная инфекция гепатита В) у животного.

В определенных вариантах осуществления животное представляет собой млекопитающее, такое как человек (например, пациент, инфицированный HBV).

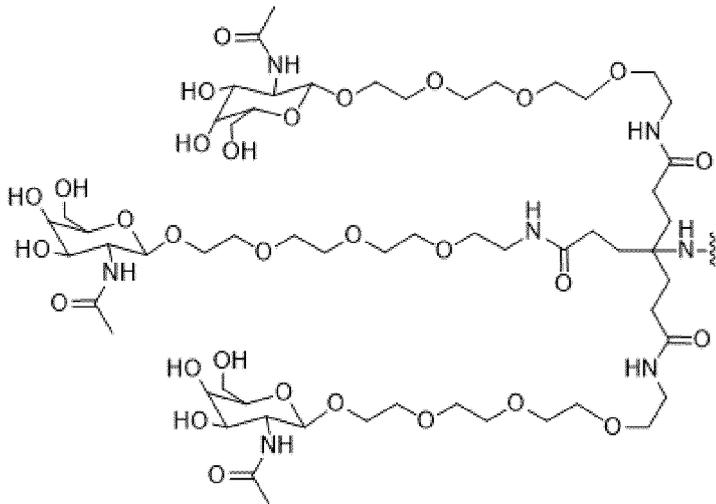
В одном из вариантов осуществления соединение формулы I имеет следующую формулу (Id):



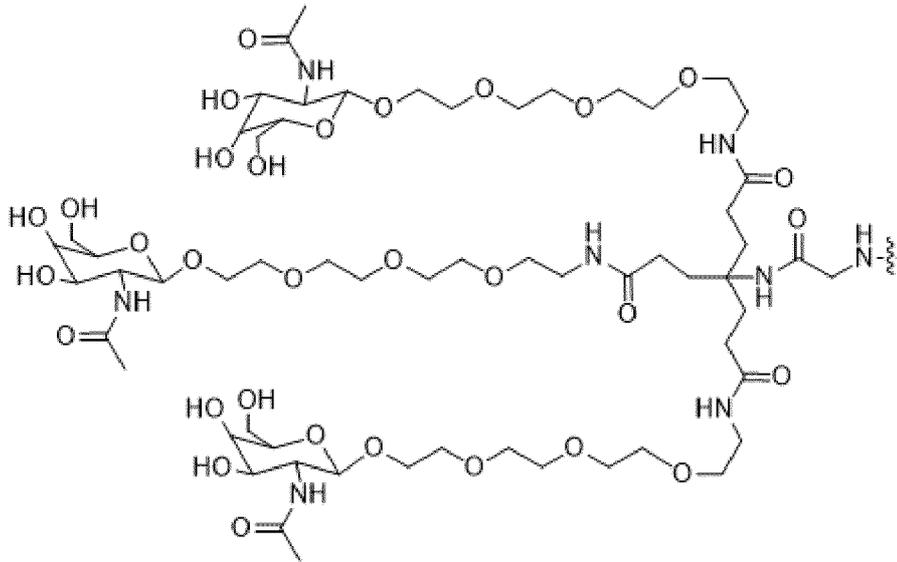
(Id)

где:

R^{1d} выбран из:



и



X^d представляет собой C_{2-10} алкилен;

n^d равен 0 или 1;

R^{2d} представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных миРНК Таблицы 1; и

R^{3d} представляет собой H, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой.

В одном из вариантов осуществления R^{3d} включает связывающую группу, которая соединяет остаток соединения формулы Id с твердой подложкой. Природа связывающей группы не критична, при условии что соединение является подходящим промежуточным соединением для получения соединения формулы Id, где R^{2d} представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечной миРНК Таблицы 1.

В одном из вариантов осуществления линкер у R^{3d} имеет молекулярную массу от около 20 дальтонов до около 1000 дальтонов.

В одном из вариантов осуществления линкер у R^{3d} имеет молекулярную массу от около 20 дальтонов до около 500 дальтонов.

В одном из вариантов осуществления линкер у R^{3d} отделяет твердую подложку от остатка соединения формулы I на расстояние от около 5 ангстремов до около 40 ангстремов, включительно.

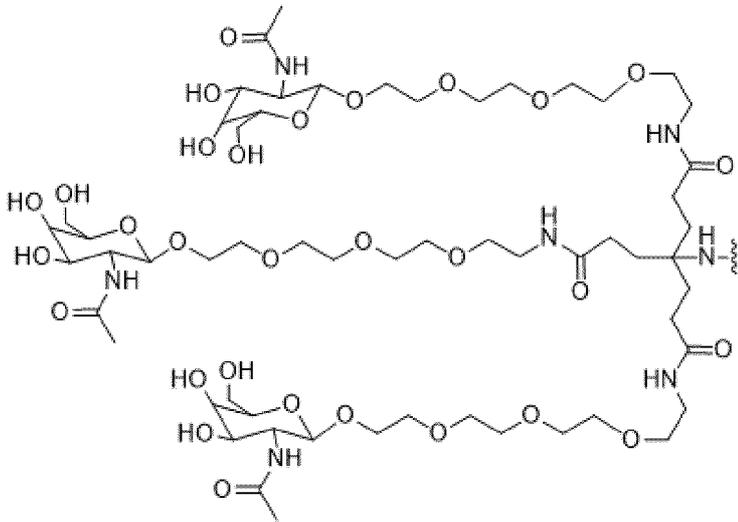
В одном из вариантов осуществления, линкер у R^{3d} представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 15 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменены на (O) или (-N(H)-), и где цепь, необязательно, замещена у атома углерода одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6)алкокси, (C_3-C_6)циклоалкила, (C_1-C_6)алканоила, (C_1-C_6)алканоилокси, (C_1-C_6)алкоксикарбонила, (C_1-C_6)алкилтио, азида, циано, нитро, галогено, гидроксид, оксо (=O), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления, линкер у R^{3d} представляет собой

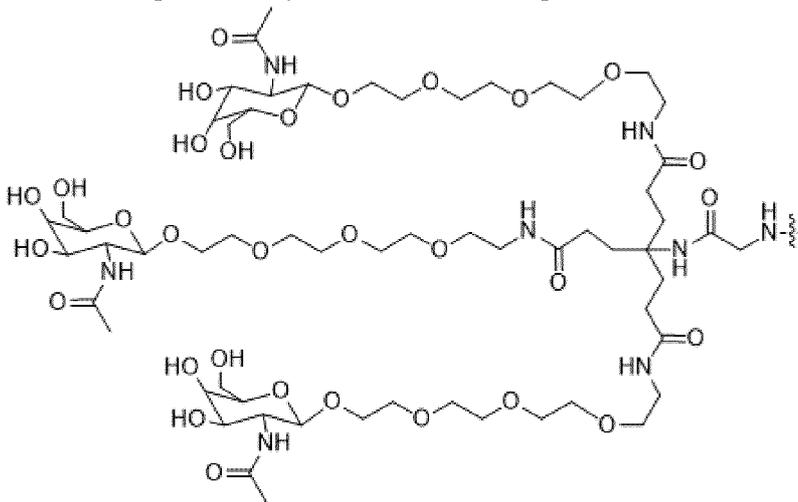
двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменены на (O) или (-N(H)-), и где цепь, необязательно, замещена у атома углерода одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидрокси, оксо (=O), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления линкер у R^{3d} представляет собой -C(=O)CH₂CH₂C(=O)N(H)-.

В одном варианте осуществления R^{1d} представляет собой:



В одном варианте осуществления R^{1d} представляет собой:



В одном из вариантов осуществления X^d представляет собой C₈алкилен.

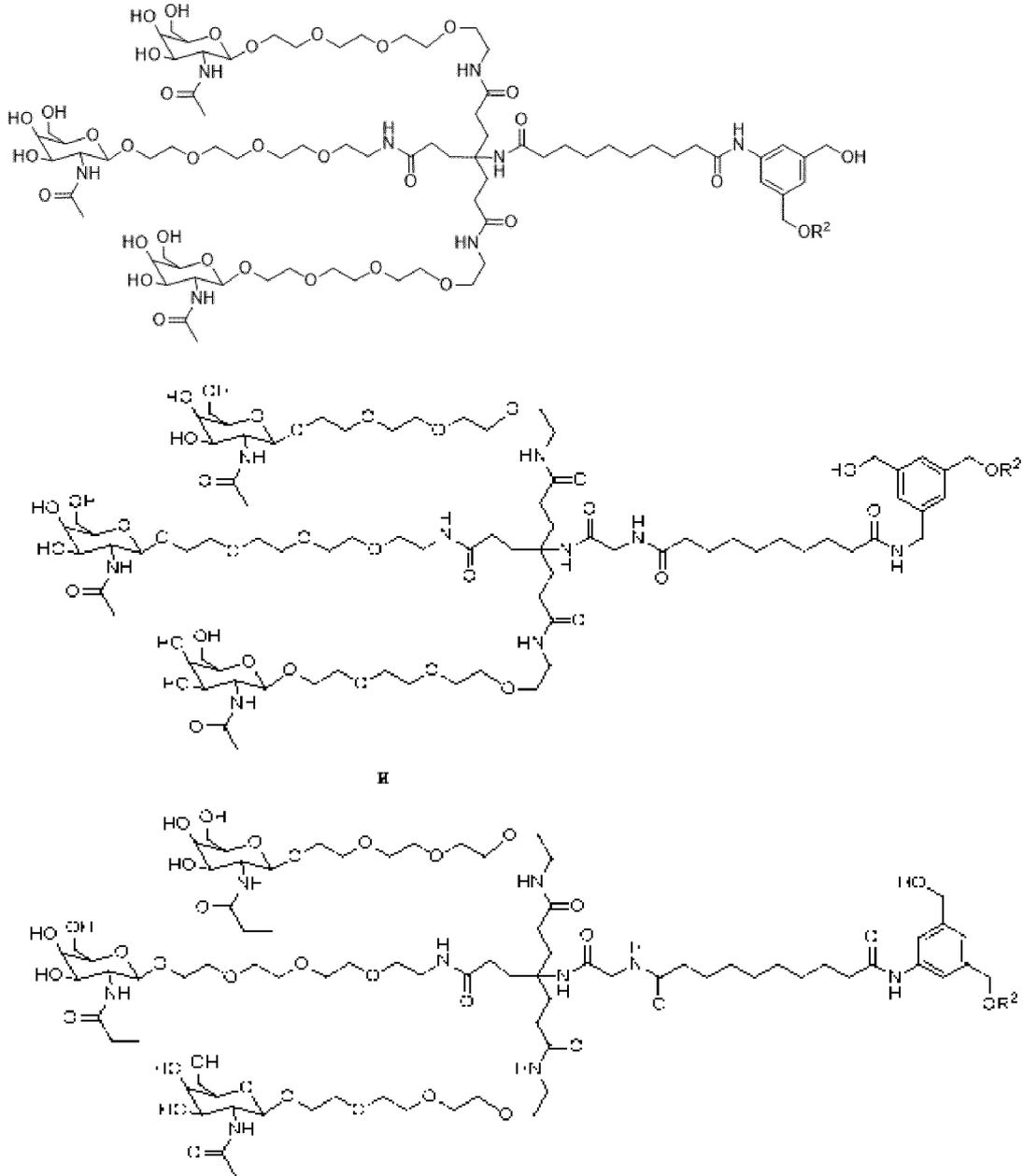
В одном из вариантов осуществления n^d равен 0.

В одном из вариантов осуществления R^{2d} представляет собой миРНК.

В одном из вариантов осуществления R^{3d} представляет собой H.

В другом варианте осуществления соединение формулы (Id) или его соль выбрано

из группы, включающей:



и его соли.

Один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (Id) и фармацевтически приемлемый носитель.

Одним аспектом настоящего изобретения является способ доставки двухцепочечной миРНК в печень животного, включающий введение животному соединения формулы (Id) или его фармацевтически приемлемой соли.

Другим аспектом данного изобретения является способ лечения заболевания или расстройства (например, вирусной инфекции, такой как вирусная инфекция гепатита В) у животного, включающий введение животному соединения формулы (Id) или его фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах осуществления изобретения предложено соединение формулы (Id) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в

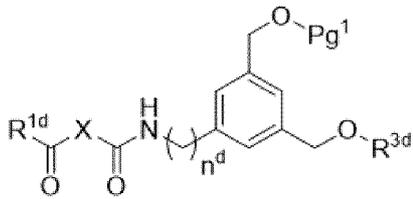
медикаментозной терапии.

В определенных вариантах осуществления изобретения предложено соединение формулы (Id) или его фармацевтически приемлемая соль для профилактического или терапевтического лечения заболевания или расстройства (например, вирусной инфекции, такой как вирусная инфекция гепатита В) у животного.

В определенных вариантах осуществления изобретения предложено применение соединения формулы (Id) или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства (например, вирусной инфекции, такой как вирусная инфекция гепатита В) у животного.

В определенных вариантах осуществления изобретения животное представляет собой млекопитающее, такое как человек (например, пациент, инфицированный HBV).

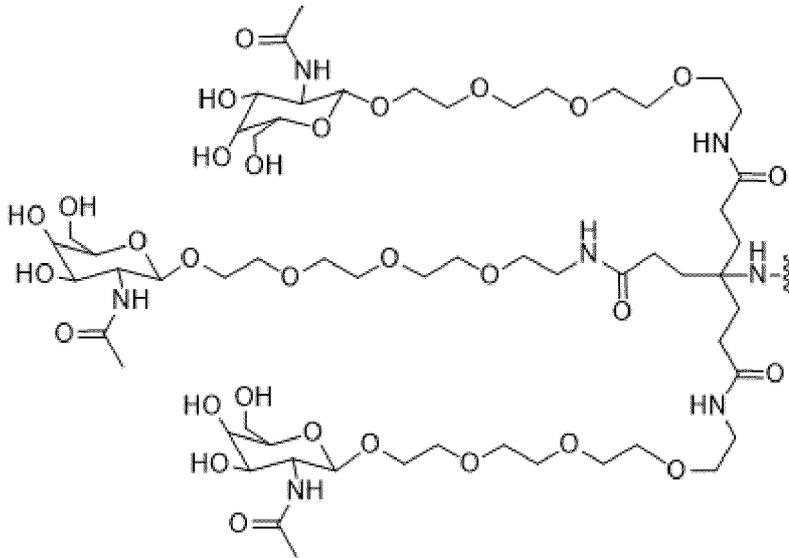
Настоящее изобретение также предусматривает синтетические промежуточные соединения и способы, раскрытые в настоящем документе, которые пригодны для получения соединений формулы (Id). Например, настоящее изобретение включает промежуточное соединение формулы Ie:



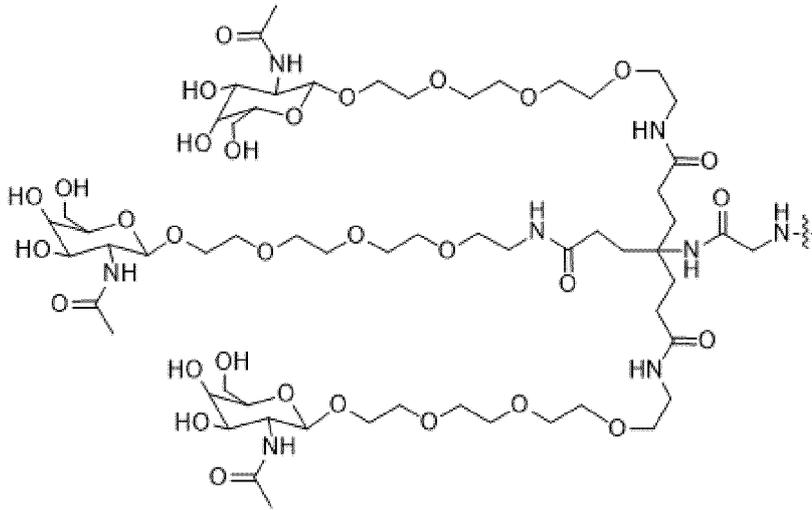
(Ie)

или его соль, где:

R^{1d} выбран из:



и



X^d представляет собой C_{2-8} алкилен;

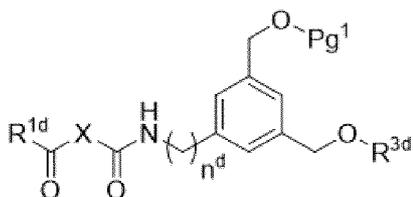
n^d равен 0 или 1;

Pg^1 представляет собой H или подходящую защитную группу; и

R^{3d} представляет собой H, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой. Фигура 1 демонстрирует типичное промежуточное соединение формулы (Ie), где направляющий лиганд/линкер связан с твердой подложкой и в котором Pg^1 представляет собой защитную группу ДМТ.

В одном из вариантов осуществления Pg^1 представляет собой ТМТ (триметокситритил), ДМТ (диметокситритил), ММТ (монометокситритил) или Т (Тритил).

Настоящее изобретение также предусматривает способ получения соединения формулы (Id), как описано в настоящем документе, включающий оказание воздействия на соответствующее соединение формулы (Ie):



(Ie)

где:

X^d представляет собой C_{2-8} алкилен;

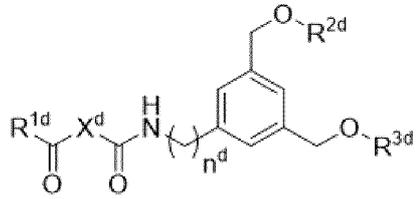
n^d равен 0 или 1;

Pg^1 представляет собой H; и

R^{3d} представляет собой ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, в условиях твердофазного синтеза нуклеиновых кислот, для получения соответствующего соединения формулы Id, где R^{2d} представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК Таблицы 1.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает удаление соединения с твердой подложки с целью получения соответствующего соединения формулы Id, где R^{3d} представляет собой H.

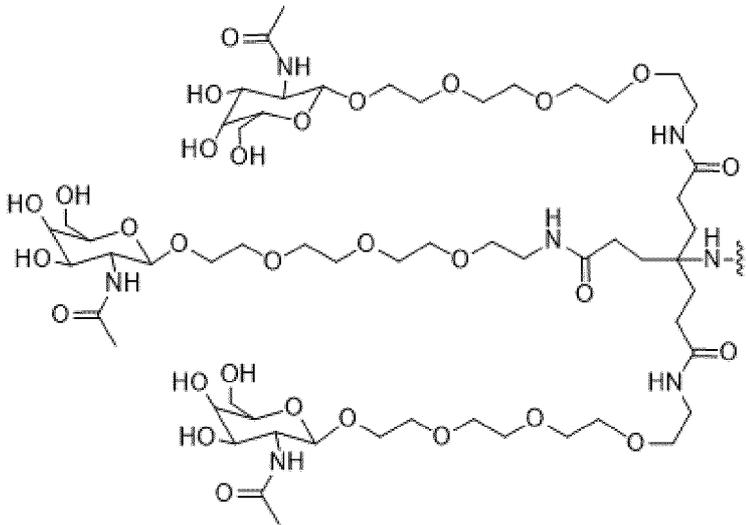
В одном из вариантов осуществления данное соединение не является соединением формулы Id:



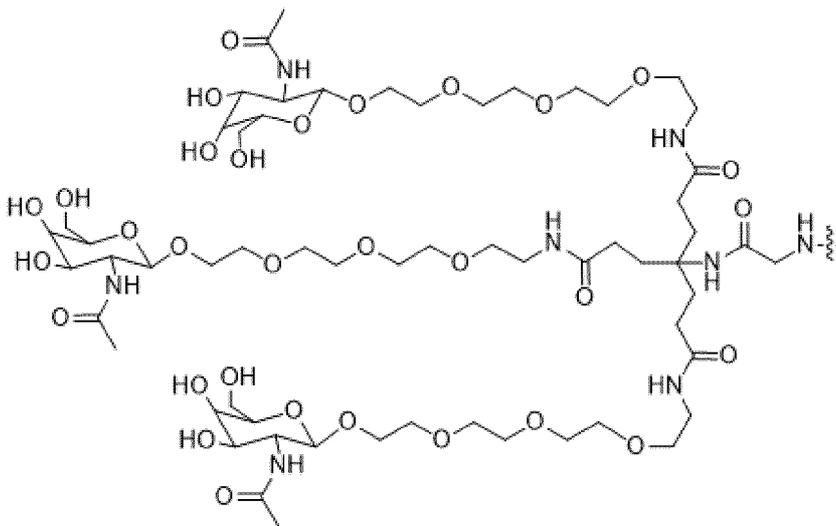
(Id)

или его соль, где:

R^{1d} выбран из:



и



X^d представляет собой C_{2-10} алкилен;

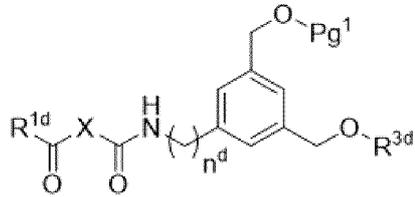
N^d равен 0 или 1.

R^{2d} представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул

двухцепочечной миРНК Таблицы 1; и

R^{3d} представляет собой H, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой.

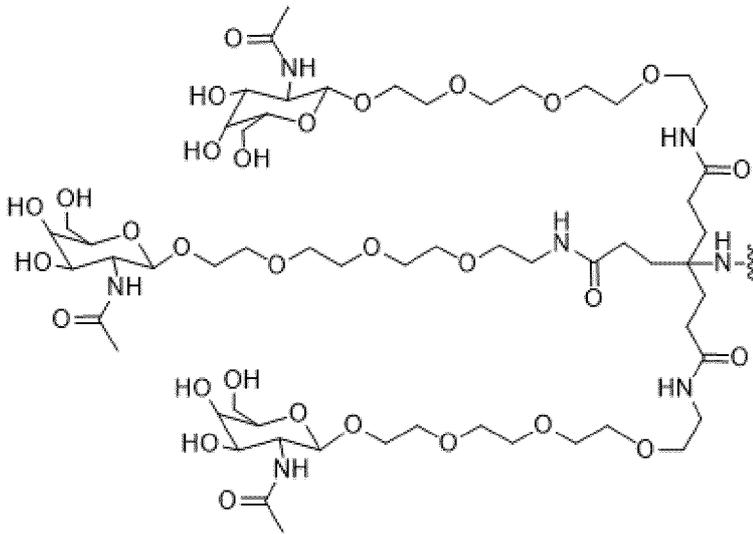
В одном из вариантов осуществления данное соединение не является соединением формулы Ie:



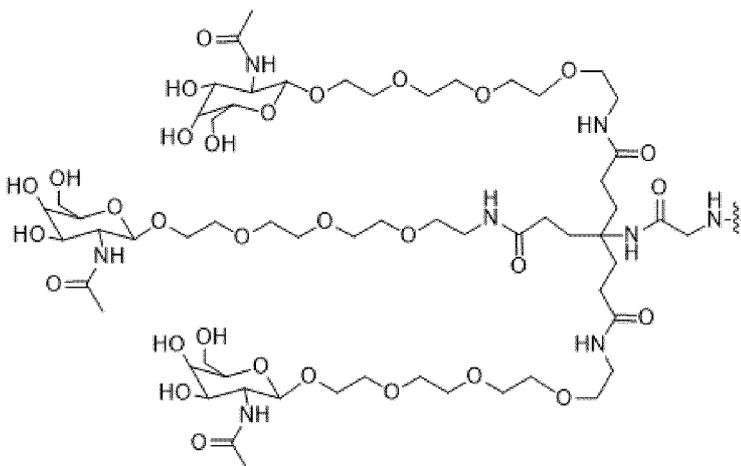
(Ie)

или его соль, где:

R^{1d} выбран из:



и



X^d представляет собой C_{2-8} алкилен;

n^d равен 0 или 1;

Pg^1 представляет собой H или подходящую защитную группу; и

R^{3d} представляет собой H, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой.

В одном из вариантов осуществления R^{3d} представляет собой H.

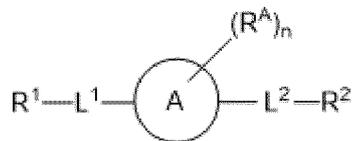
В одном из вариантов осуществления R^{3d} представляет собой ковалентную связь с твердой подложкой.

В одном из вариантов осуществления R^{3d} представляет собой связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, где связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 15 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменены на (O) или $(-N(H)-)$, и где цепь, необязательно, замещена у атома углерода одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления R^{3d} представляет собой связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, где связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменены на (O) или $(-N(H)-)$, и где цепь, необязательно, замещена у атома углерода одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогено, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления R^{3d} представляет собой связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, где связывающая группа представляет собой $-C(=O)CH_2CH_2C(=O)N(H)-$.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы (I):



(I)

где:

R^1 представляет собой H или синтетическую активирующую группу;

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК Таблицы 1;

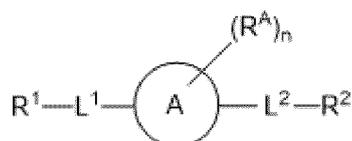
кольцо A отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–

членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксид, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил-OR^B, C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил; где C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксид и C_{1-3} алкокси;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; или его соль.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы (I):



(I)

где:

R^1 представляет собой направляющий лиганд;

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

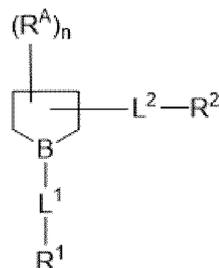
R^2 представляет собой H или синтетическую активирующую группу;

кольцо A отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксид, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил-OR^B, C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил; где C_{1-10} алкил C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксид и C_{1-3} алкокси;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; или его соль.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы (Ig):



(Ig)

где:

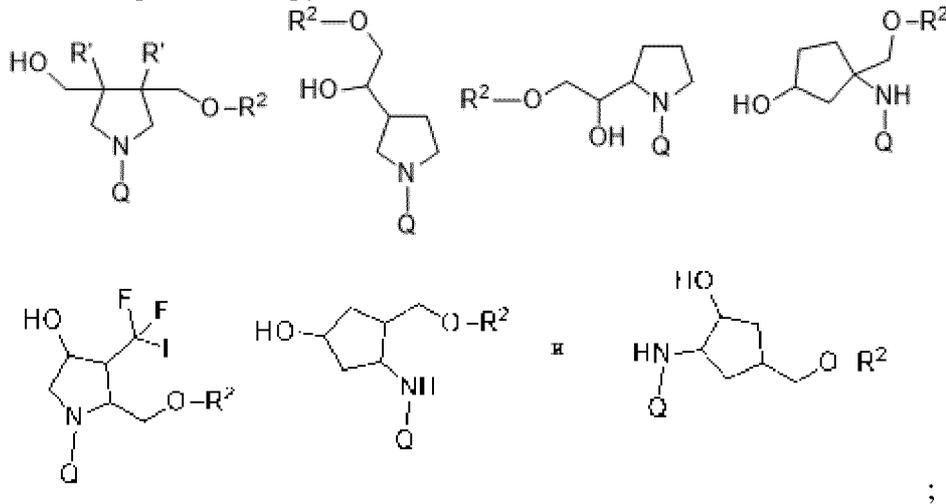
V представляет собой $-N-$ или $-CH-$;

L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен- $O-$, который, необязательно, замещен гидроксилом или галогеном; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение, выбранное из группы, включающей:

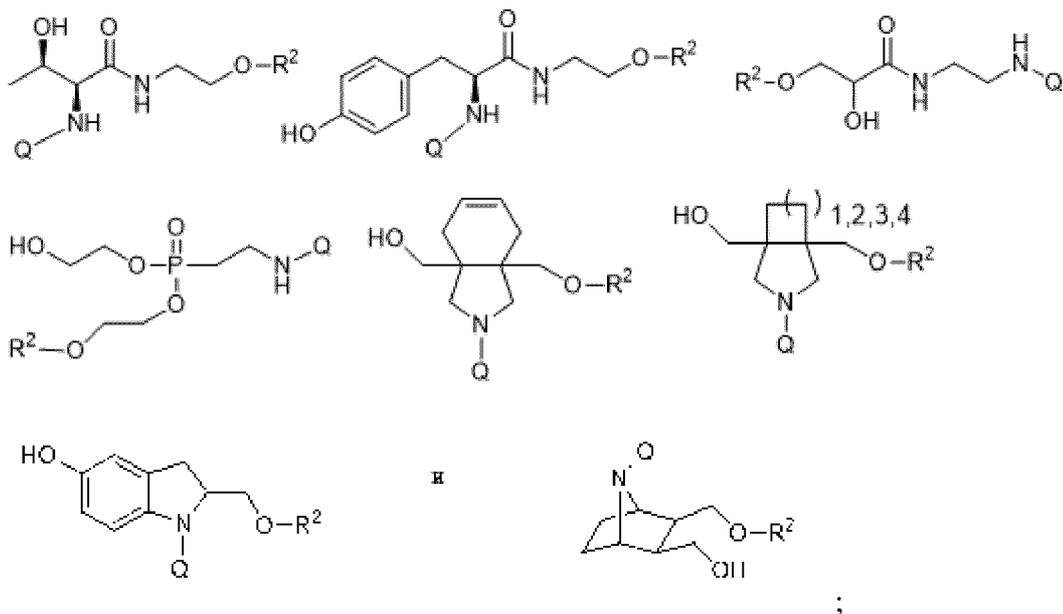


где:

Q представляет собой $-L^1-R^1$; и

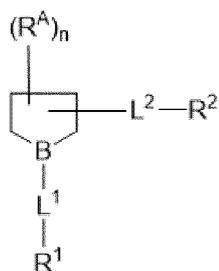
R^1 представляет собой C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил; где C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксилом; и его соли.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение, выбранное из группы, включающей:



где: Q представляет собой $-L^1-R^1$; и его соли.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы (Ig):



(Ig)

где:

B представляет собой –N– или –CH–;

L¹ отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L² представляет собой C₁₋₄ алкилен–O–, который, необязательно, замещен гидроксилем или галогеном;

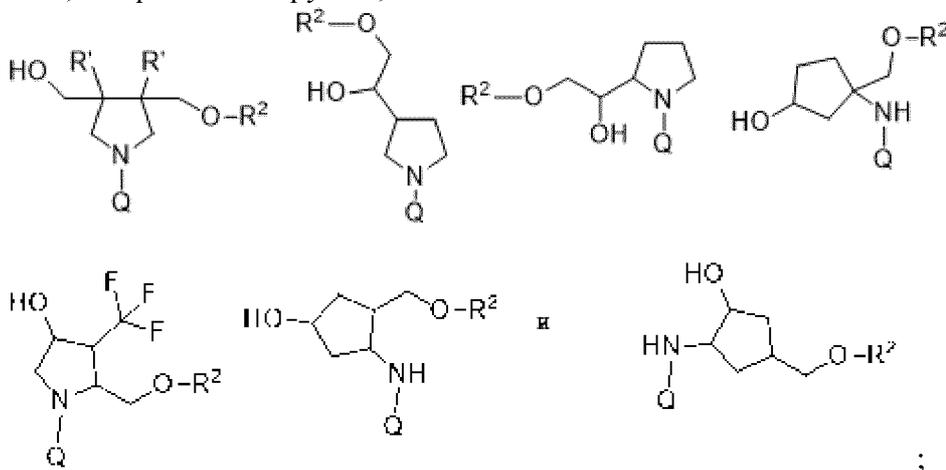
n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7;

R¹ представляет собой H или синтетическую активирующую группу; и

R² представляет собой H или синтетическую активирующую группу;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение, выбранное из группы, включающей:



где Q представляет собой –L¹–R¹;

L¹ отсутствует или представляет собой связывающую группу;

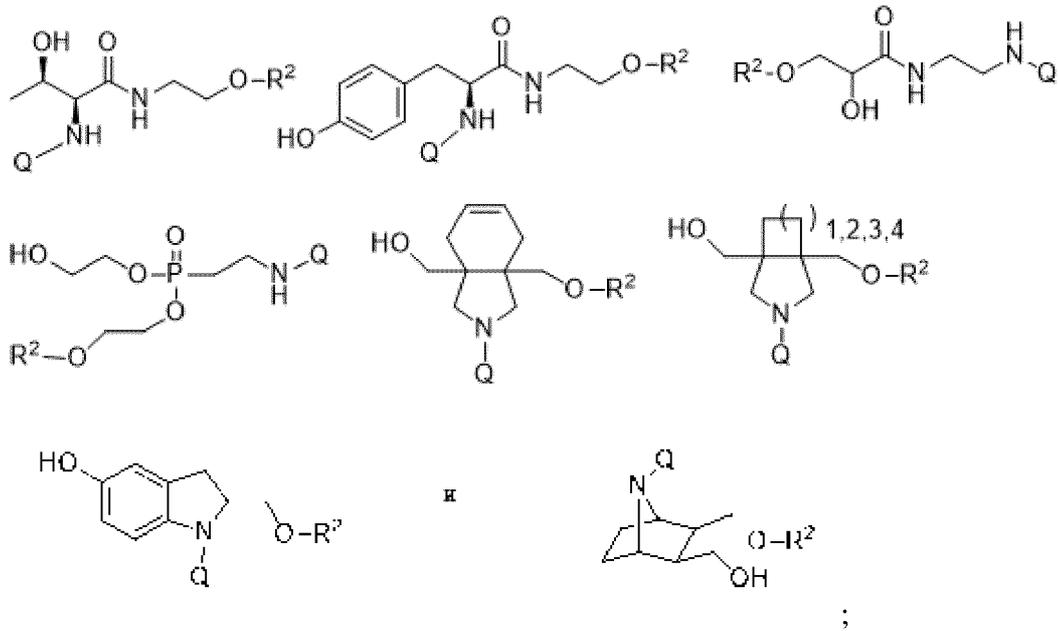
R' представляет собой C₁₋₉ алкил, C₂₋₉ алкенил или C₂₋₉ алкинил; где C₁₋₉ алкил, C₂₋₉ алкенил или C₂₋₉ алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксилем;

R¹ представляет собой H или синтетическую активирующую группу; и

R² представляет собой H или синтетическую активирующую группу;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение, выбранное из группы, включающей:



где:

Q представляет собой $-L^1-R^1$;

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^1 представляет собой H или синтетическую активирующую группу; и

R^2 представляет собой H или синтетическую активирующую группу;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления R^1 представляет собой H или синтетическую активирующую группу, получаемую из ДЦК, ГОБт, ЭДК, БОФ, ПиБОФ или ГБТУ.

В одном из вариантов осуществления R^2 представляет собой H, ацетат, трифлат, мезилат или сукцинат.

В одном из вариантов осуществления R^1 представляет собой синтетическую активирующую группу, получаемую из ДЦК, ГОБт, ЭДК, БОФ, ПиБОФ или ГБТУ.

В одном из вариантов осуществления R^2 представляет собой ацетат, трифлат, мезилат или сукцинат.

В одном из вариантов осуществления L^1 представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 5 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NH-$, $-NH-C(=O)-$, $-C(=O)-NH-$ или $-S-$.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы (XX):



(XX)

где:

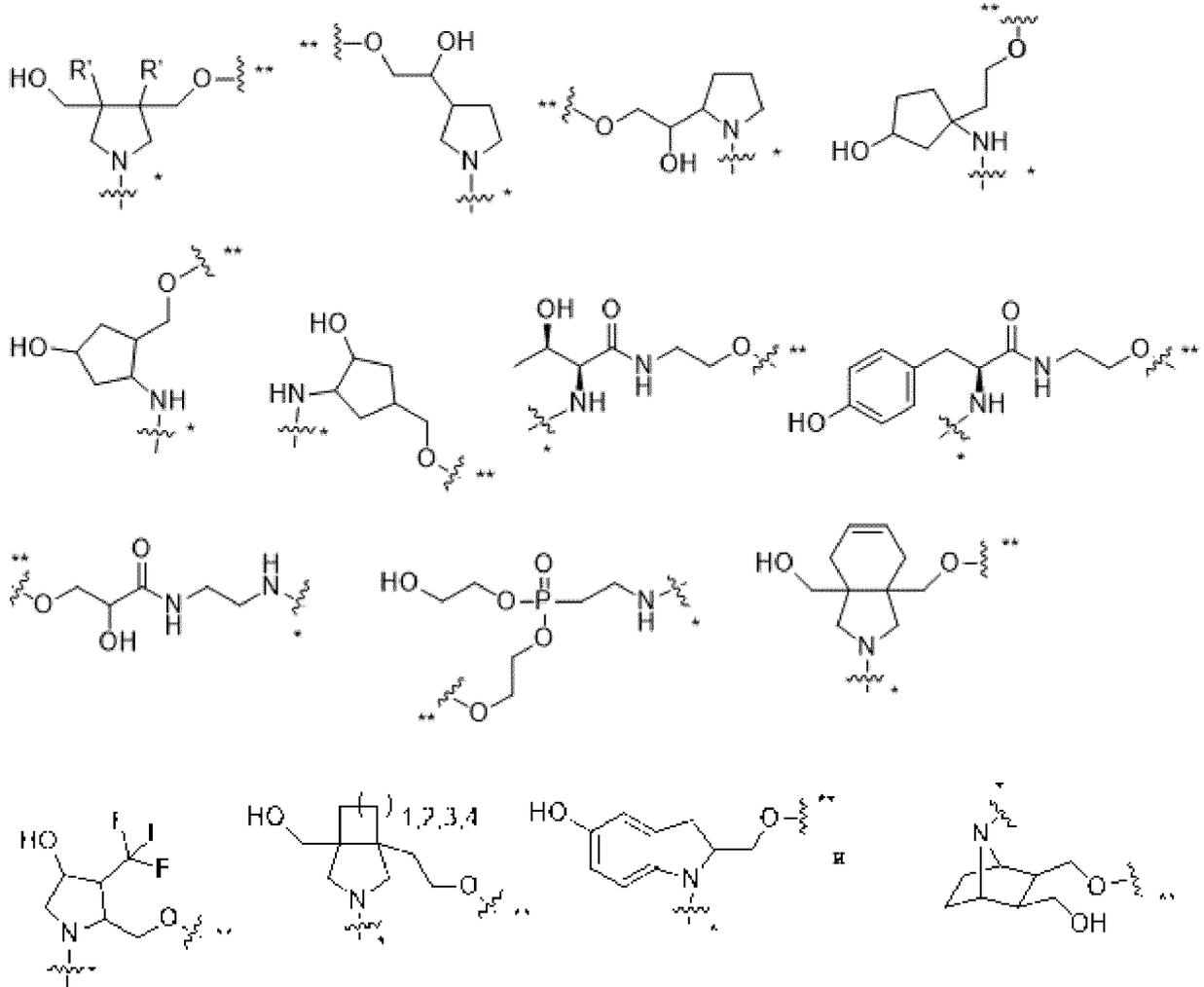
R^1 представляет собой направляющий лиганд;

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК Таблицы 1;

V является двухвалентным и выбран из группы, включающей:



где:

каждый из R' представляет собой C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил; где C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксиллом;

валентность, отмеченная *, соединена с L^1 или соединена с R^1 , если L^1 отсутствует;

и

валентность, отмеченная **, соединена с L^2 или соединена с R^2 , если L^2 отсутствует;

или его соль.

В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 2–8 сахаридов.

В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 2–6 сахаридов.

В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 2–4 сахаридов.

В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 3–8 сахаридов.

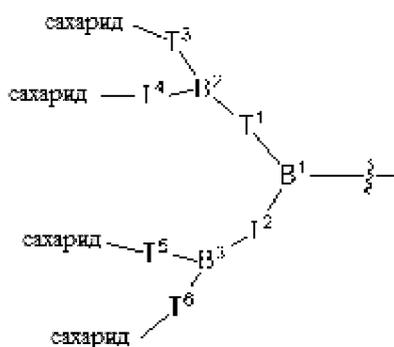
В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 3–6 сахаридов.

В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 3–4 сахараидов.

В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 3 сахараида.

В одном из вариантов осуществления R^1 содержит 4 сахараида.

В одном из вариантов осуществления R^1 имеет следующую формулу:



где:

B^1 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от около 1 до около 20 атомов и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

B^2 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от около 1 до около 20 атомов, и которая ковалентно связана с T^1 , T^3 и T^4 .

B^3 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от около 1 до около 20 атомов, и которая ковалентно связана с T^2 , T^5 и T^6 .

T^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

T^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

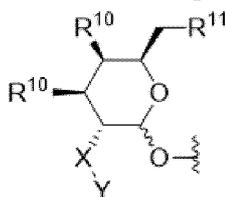
T^3 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

T^4 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

T^5 отсутствует или представляет собой связывающую группу; и

T^6 отсутствует или представляет собой связывающую группу

В одном из вариантов осуществления каждый сахараид независимо выбран из:



где:

X представляет собой NR^3 , и Y выбран из $(C=O)R^4$, $-SO_2R^5$ и $(C=O)NR^6R^7$; или X представляет собой $(C=O)$, и Y представляет собой NR^8R^9 ;

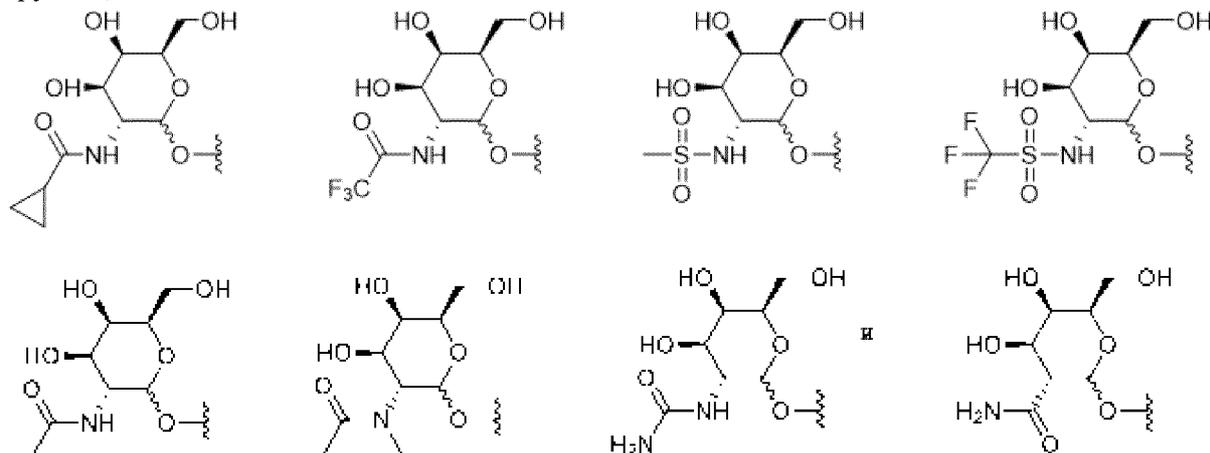
R^3 представляет собой водород или (C_1-C_4) алкил;

каждый из R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 независимо выбран из группы, включающей водород, (C_1-C_8) алкил, (C_1-C_8) галогеналкил, (C_1-C_8) алкокси и (C_3-C_6) циклоалкил, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

R^{10} представляет собой $-\text{OH}$, $-\text{NR}^8\text{R}^9$ или $-\text{F}$; и

R^{11} представляет собой $-\text{OH}$, $-\text{NR}^8\text{R}^9$, $-\text{F}$ или 5-членный гетероцикл, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, гидроксил, карбоксил, амина, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси.

В одном из вариантов осуществления каждый сахарид независимо выбран из группы, включающей:



В одном из вариантов осуществления каждый сахарид независимо:



В одном из вариантов осуществления один из T^1 и T^2 отсутствует.

В одном из вариантов осуществления как T^1 , так и T^2 отсутствуют.

В одном из вариантов осуществления, каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-\text{O}-$, $-\text{NR}^X-$, $-\text{NR}^X-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}^X-$ или $-\text{S}-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=\text{O}$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления, каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной

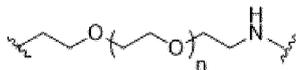
цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C1–C6)алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C1–C6)алкокси, (C3–C6)циклоалкила, (C1–C6)алканоила, (C1–C6)алканоилокси, (C1–C6)алкоксикарбонила, (C1–C6)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

В одном из вариантов осуществления, каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, или ее соль, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$ или $-NR^X-$, и где R^X представляет собой водород или (C1–C6)алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными галогена, гидроксид и оксо ($=O$).

В одном из вариантов осуществления, каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными галогена, гидроксид и оксо ($=O$).

В одном из вариантов осуществления, каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными галогена, гидроксид и оксо ($=O$).

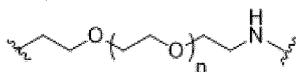
В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один из T^3 , T^4 , T^5 и T^6 представляет собой:



где:

n равен 1, 2, 3.

В одном из вариантов осуществления каждый из T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо выбран из группы, включающей:



где:

n равен 1, 2, 3.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один из T^1 и T^2 представляет собой глицин.

В одном из вариантов осуществления каждый из T^1 и T^2 представляет собой глицин.

В одном из вариантов осуществления V^1 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 15 атомов, и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

В одном из вариантов осуществления V^1 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 10 атомов, и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит (C_1-C_6) алкил.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит C_{3-8} циклоалкил.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит силильную группу.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит D- или L-аминокислоту.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит сахарид.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит фосфатную группу.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит фосфонатную группу.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит арил.

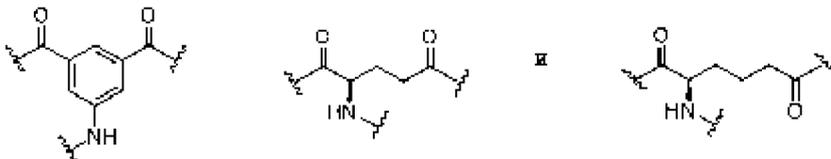
В одном из вариантов осуществления V^1 содержит фенильное кольцо.

В одном из вариантов осуществления V^1 представляет собой фенильное кольцо.

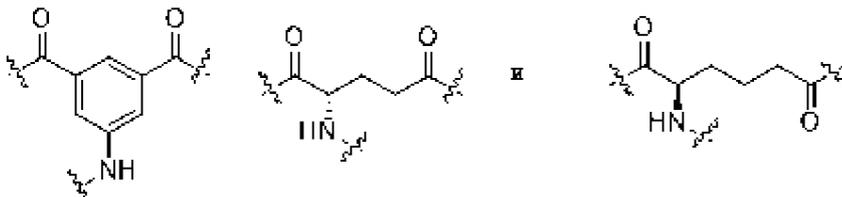
В одном варианте осуществления V^1 представляет собой СН.

В одном из вариантов осуществления V^1 содержит гетероарил.

В одном из вариантов осуществления V^1 выбран из группы, включающей:



В одном из вариантов осуществления V^1 выбран из группы, включающей:



В одном из вариантов осуществления V^2 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 15 атомов, и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

В одном из вариантов осуществления V^2 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 10 атомов, и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

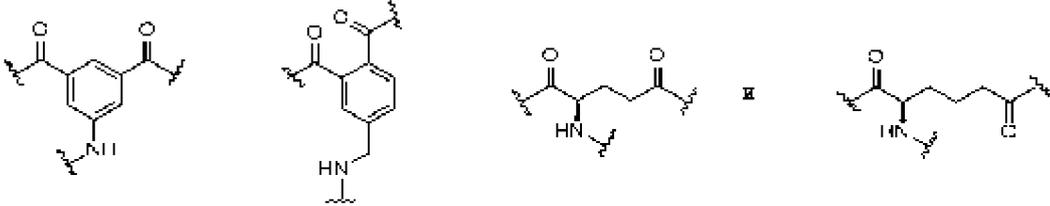
В одном из вариантов осуществления V^2 содержит (C_1-C_6) алкил

В одном из вариантов осуществления V^2 содержит C_{3-8} циклоалкил.

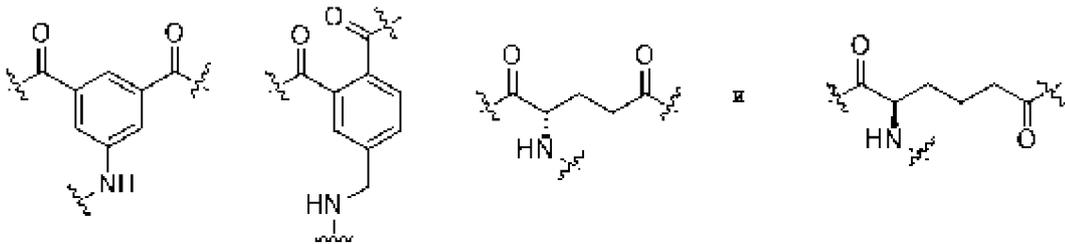
В одном из вариантов осуществления V^2 содержит силильную группу.

В одном из вариантов осуществления V^2 содержит D- или L-аминокислоту.

- В одном из вариантов осуществления V^2 содержит сахарид.
- В одном из вариантов осуществления V^2 содержит фосфатную группу.
- В одном из вариантов осуществления V^2 содержит фосфонатную группу.
- В одном из вариантов осуществления V^2 содержит арил.
- В одном из вариантов осуществления V^2 содержит фенильное кольцо.
- В одном из вариантов осуществления V^2 представляет собой фенильное кольцо.
- В одном варианте осуществления V^2 представляет собой СН.
- В одном из вариантов осуществления V^2 содержит гетероарил.
- В одном из вариантов осуществления V^2 выбран из группы, включающей:



- В одном из вариантов осуществления V^2 выбран из группы, включающей:

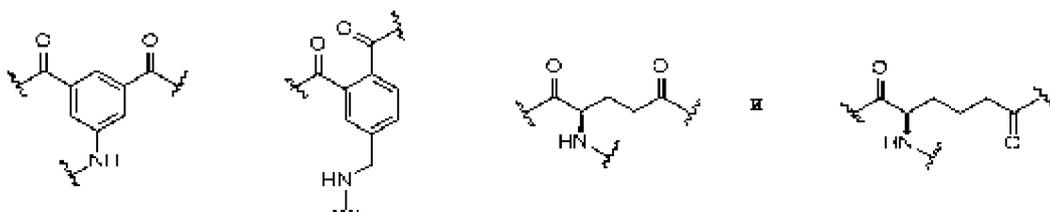


или его соль.

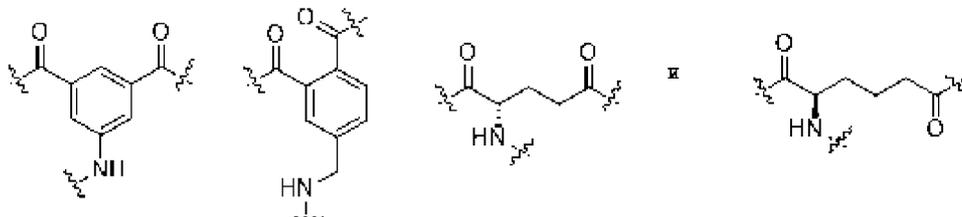
В одном из вариантов осуществления V^3 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 15 атомов, и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

В одном из вариантов осуществления V^3 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 10 атомов, и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит (C_1-C_6) алкил.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит C_{3-8} циклоалкил.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит силильную группу.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит D- или L-аминокислоту.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит сахарид.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит фосфатную группу.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит фосфонатную группу.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит арил.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит фенильное кольцо.
- В одном из вариантов осуществления V^3 представляет собой фенильное кольцо.
- В одном варианте осуществления V^3 представляет собой СН.
- В одном из вариантов осуществления V^3 содержит гетероарил.
- В одном из вариантов осуществления V^3 выбран из группы, включающей:



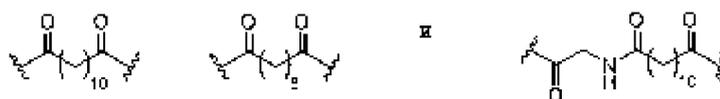
В одном из вариантов осуществления V^3 выбран из группы, включающей:



или его соль.

В одном из вариантов осуществления L^1 и L^2 независимо представляют собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C1–C6)алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C1–C6)алкокси, (C3–C6)циклоалкила, (C1–C6)алканоила, (C1–C6)алканоилокси, (C1–C6)алкоксикарбонила, (C1–C6)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

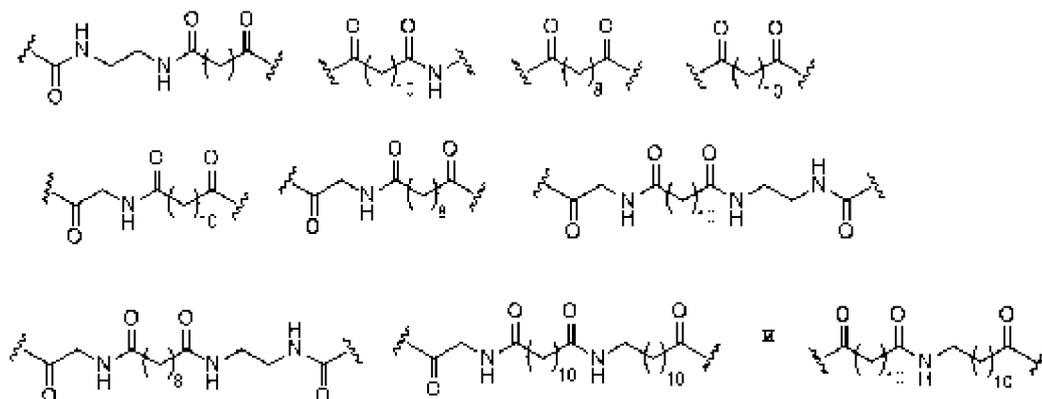
В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:



или его соль.

В одном из вариантов осуществления L^1 соединен с V^1 с помощью звена, выбранного из группы: $-O-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)-NH-$, $-NH-C(=O)-$, $(C=O)-O-$, $-NH-C(=O)-NH-$ или $-NH-(SO_2)-$.

В одном из вариантов осуществления L^1 выбран из группы, включающей:



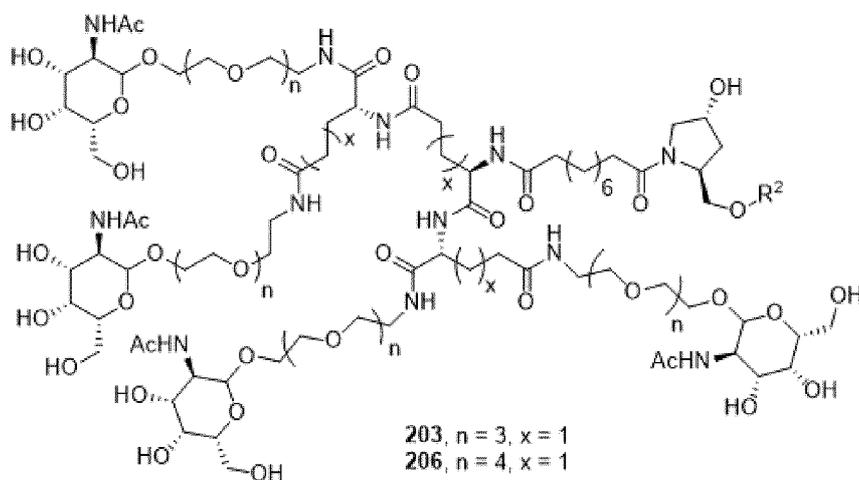
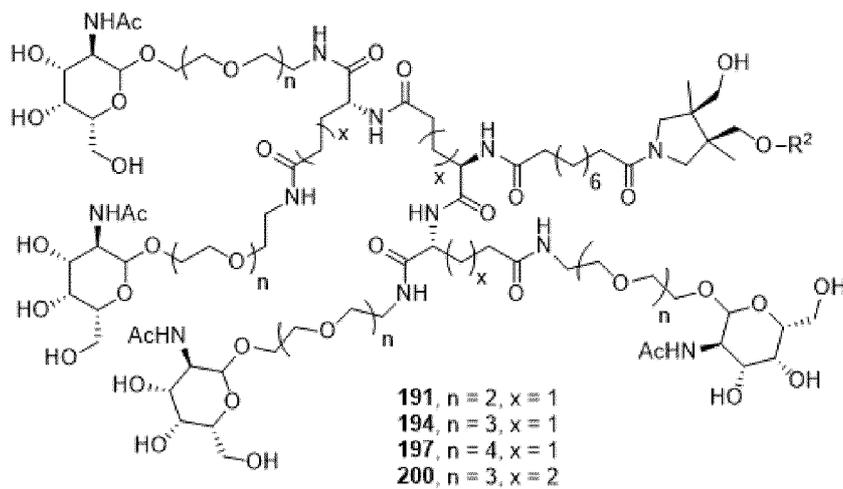
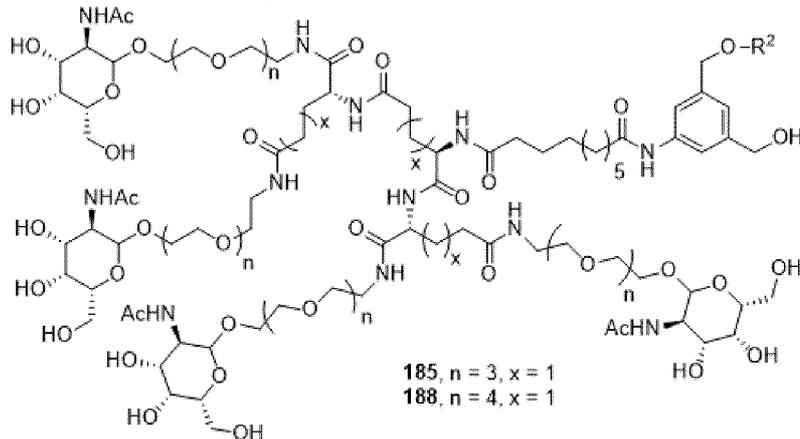
В одном из вариантов осуществления L^2 соединен с R^2 при помощи $-O-$.

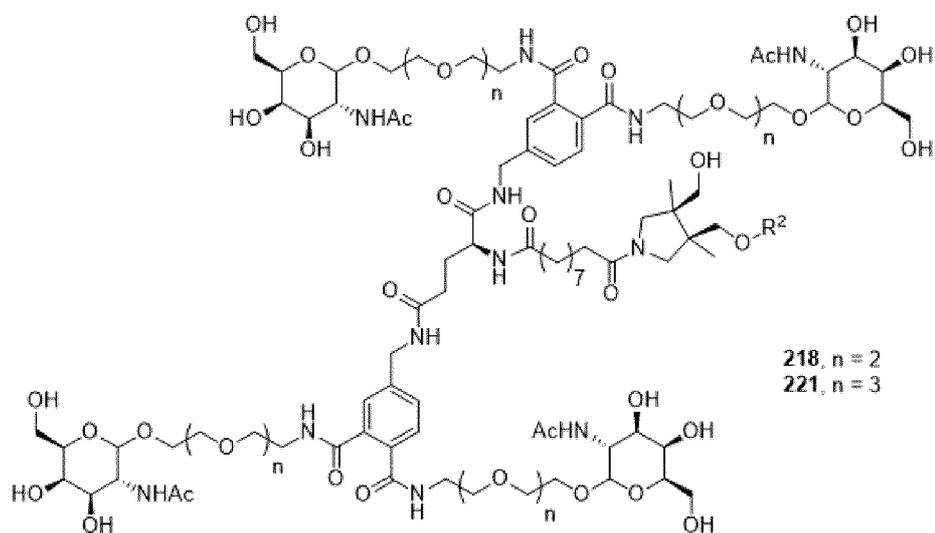
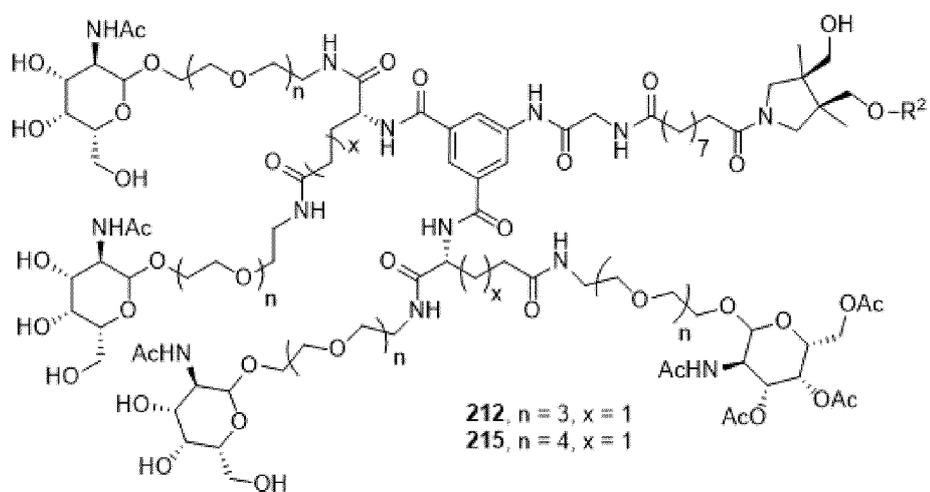
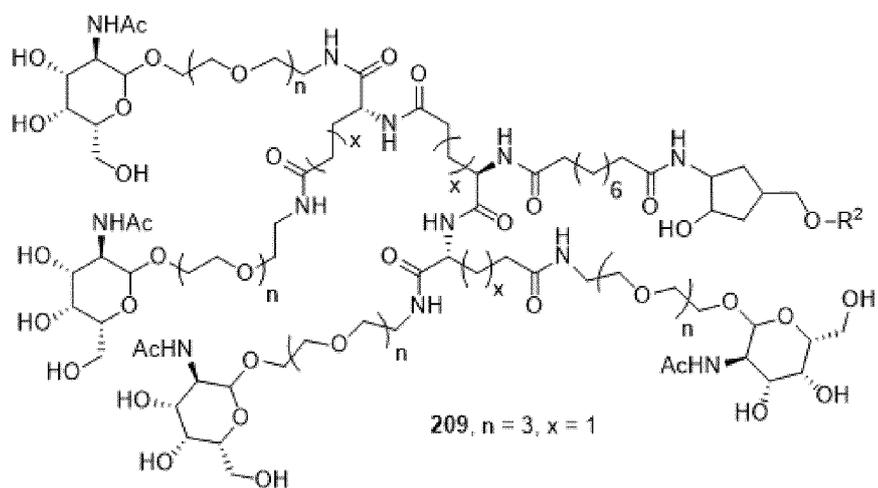
В одном из вариантов осуществления L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен- $O-$, который, необязательно, замещен гидрокси.

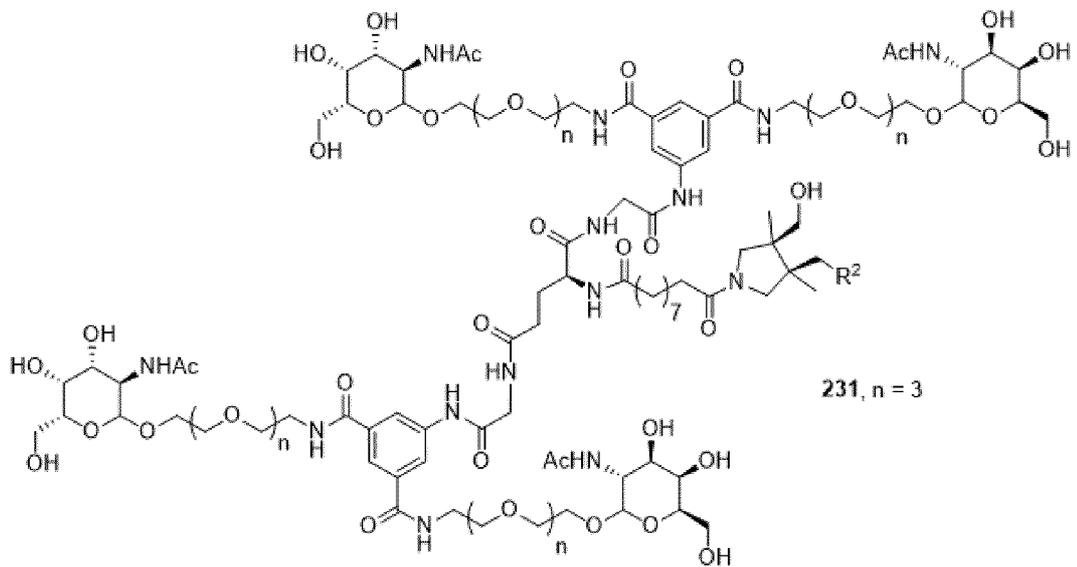
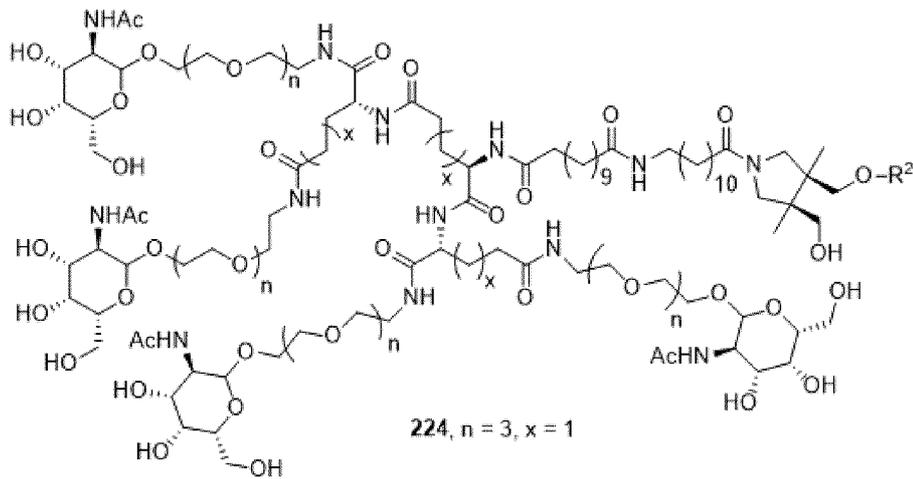
В одном из вариантов осуществления L^2 соединен с R^2 при помощи $-O-$.

В одном варианте осуществления L^2 отсутствует.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение или соль, выбранные из группы, включающей:





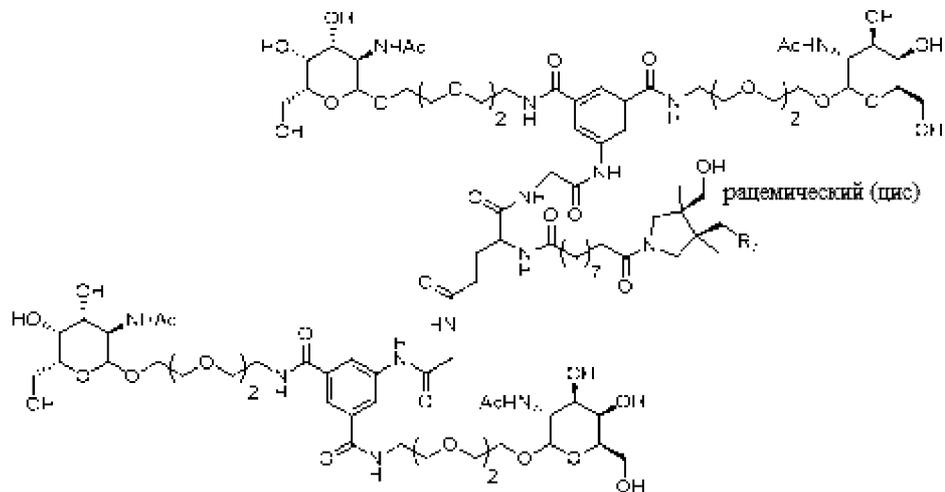


и

;

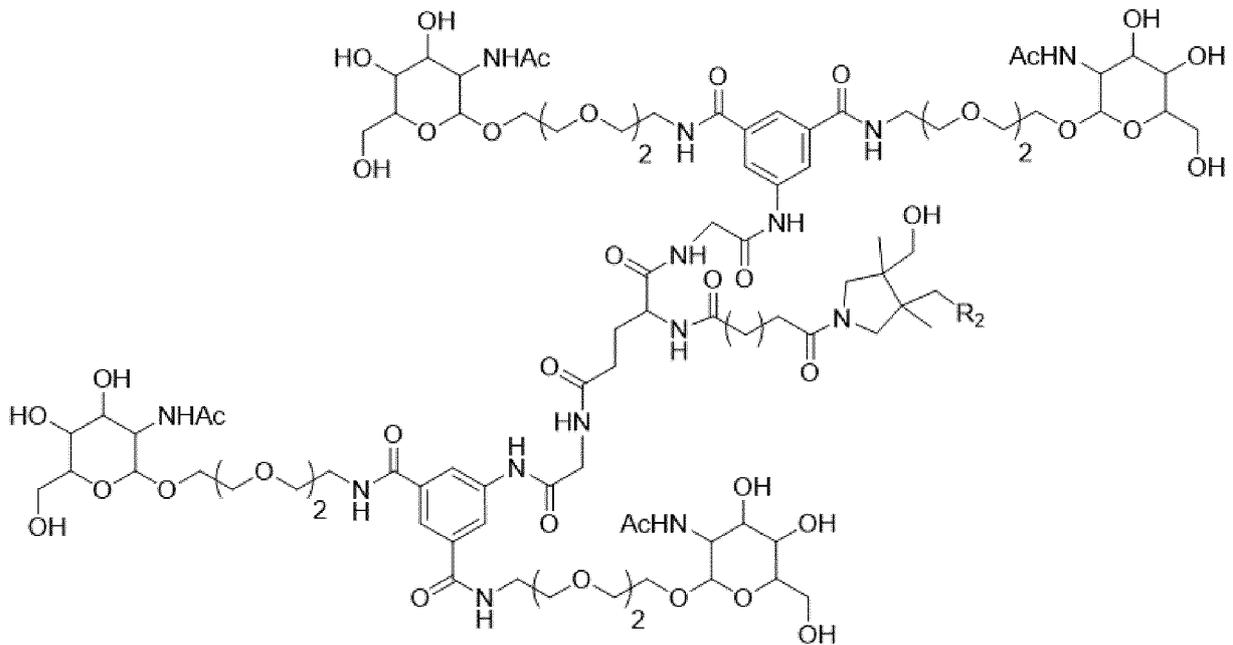
и его фармацевтически приемлемые соли, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК Таблицы 1.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы:



или его соль, где R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту.

В одном из вариантов осуществления в данном изобретении предложено соединение формулы:

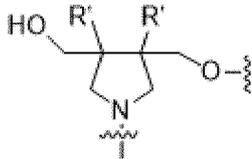


или его соль, где R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту.

В одном варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты (например, миРНК) присоединяется к похожему соединению через кислород фосфата на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления изобретения соединение или соль вводят подкожно.

Когда соединение включает группу следующей формулы:



В кольце возможно существование четырех стереоизомеров, двух *цис* и двух *транс*. Если не указано иное, соединения по данному изобретению включают все четыре стереоизомера относительно такого кольца. В одном варианте осуществления изобретения две группы R' находятся в *цис* конформации. В одном варианте осуществления изобретения две группы R' находятся в *транс* конформации.

Одним из аспектов данного изобретения является частица на основе нуклеиновой кислоты и липида, содержащая:

- (a) одну или более двухцепочечных молекул миРНК, выбранных из двухцепочечных молекул миРНК Таблицы 1;
- (b) катионный липид; а также
- (c) некаатионный липид.

Примеры

Настоящее изобретение будет более подробно описано с помощью конкретных

примеров. Следующие примеры предложены для пояснительных целей и не направлены на ограничение данного изобретения каким-либо образом. Специалисты в данной области техники легко распознают ряд некритических параметров, которые можно изменить или модифицировать с получением практически идентичных результатов. Понятно, что в одном варианте осуществления олигонуклеотид представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, как описано в Таблице 1.

Пример 1. Синтез конъюгата 1

Схема 1

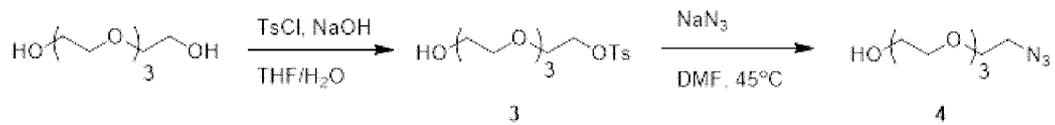


Схема 2

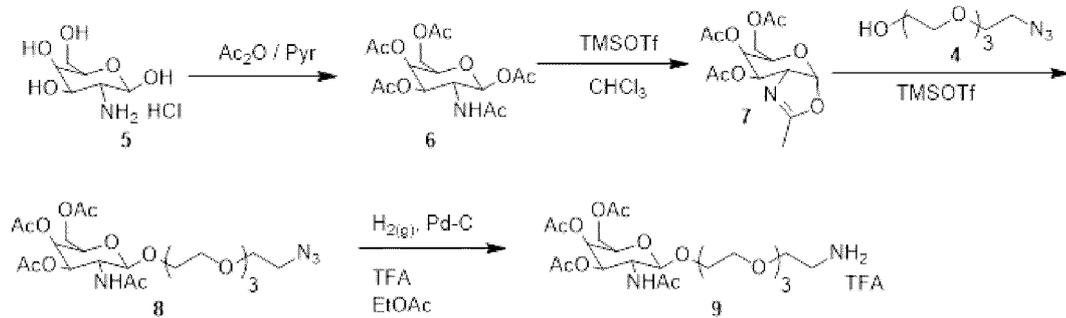


Схема 3

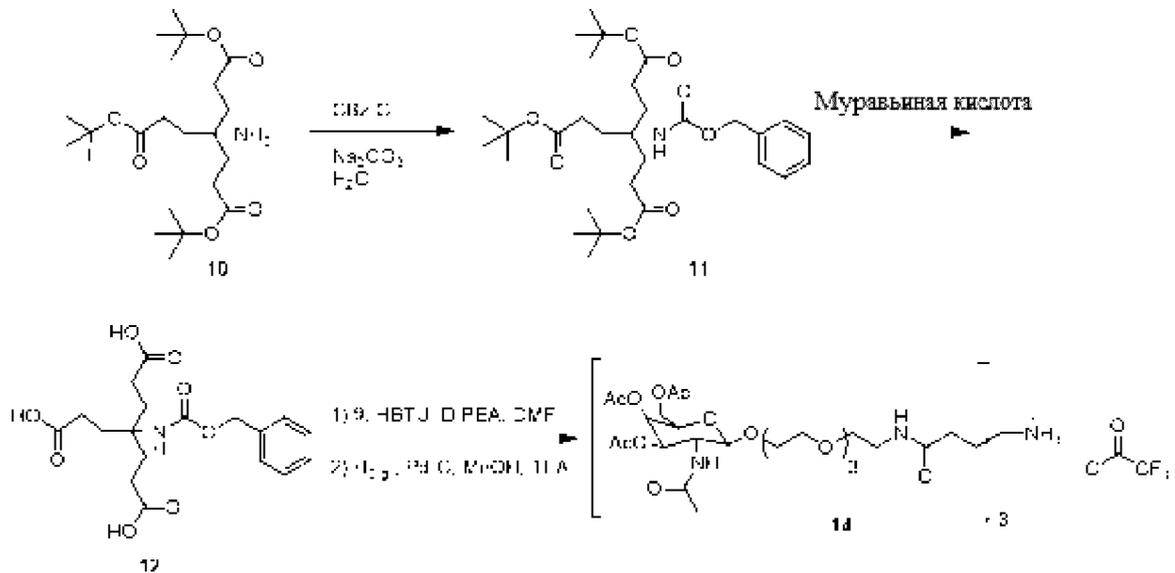


Схема 4

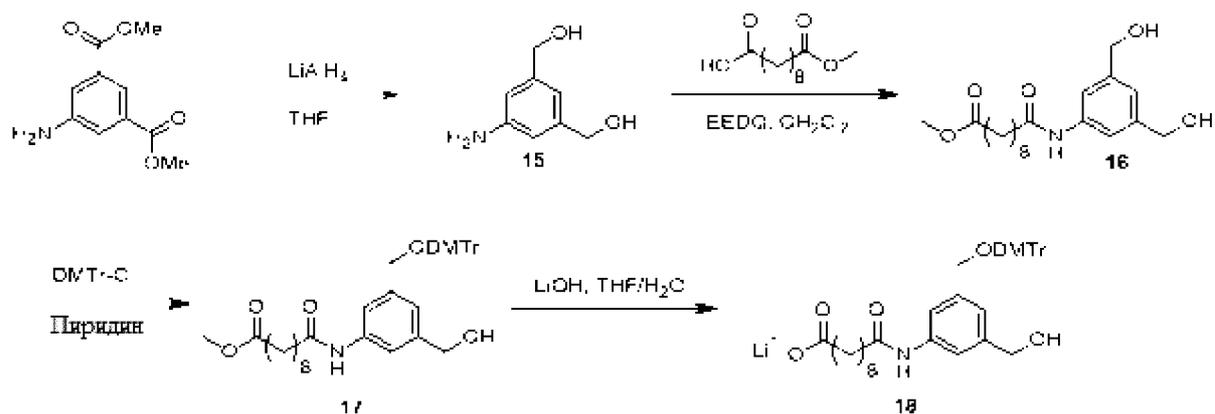
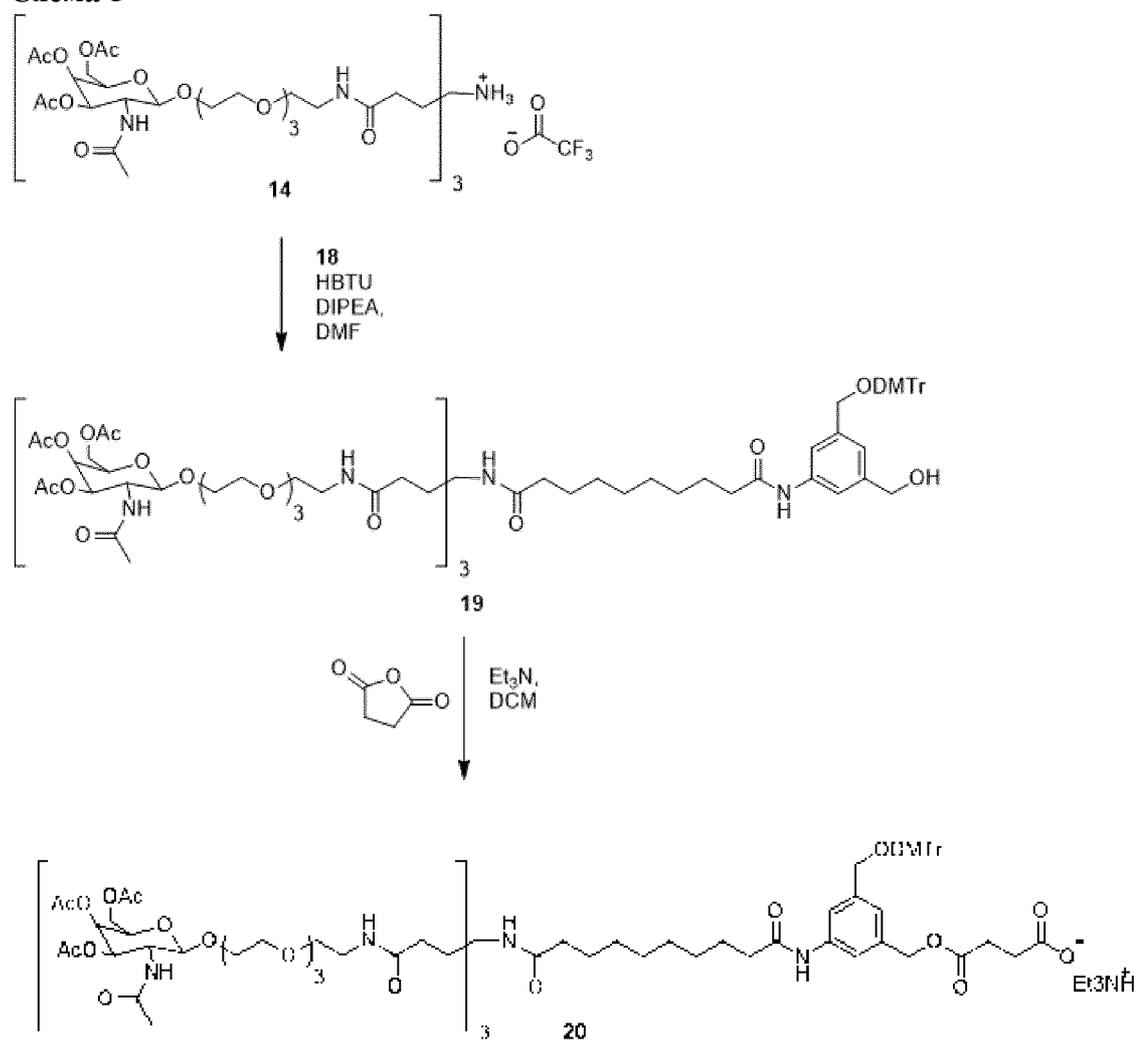
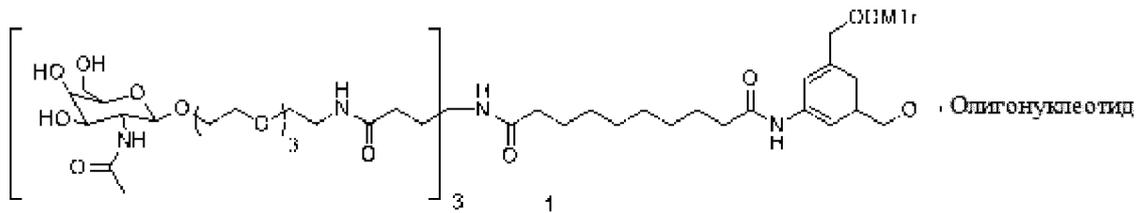


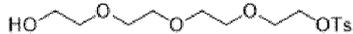
Схема 5



- 1: 1000Å Iona SPG
- 2: Синтез олигонуклеотида
- 3: Удаление защитной группы



Этап 1. Получение 2-(2-(2-(2-гидроксиэтоксид)этоксид)этил 4-метилбензолсульфонат 3



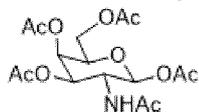
Раствор тетраэтиленгликоля (934 г, 4,8 моль) в ТГФ (175 мл) и водный NaOH (5M, 145 мл) охладил (0°C) и обработали *n*-толуолсульфонилхлоридом (91,4 г, 480 ммоль), растворили в ТГФ (605 мл) и затем перемешивали в течение двух часов (0°C). Реакционную смесь разбавили водой (3 л) и экстрагировали (3x 500 мл) с помощью CH₂Cl₂. Объединенные экстракты промыли водой и солевым раствором, после чего сушили (MgSO₄), отфильтровали и концентрировали с получением 2-(2-(2-(2-гидроксиэтоксид)этоксид)этил 4-метилбензолсульфоната 3 (140 г, 84%) в виде масла бледно-желтого цвета. R_f (0,57, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 2. Получение 2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этан-1-ола 4



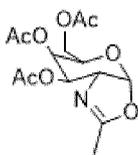
Раствор 3 (140 г, 403 ммоль) в ДМФА (880 мл) обработали натрия азидом (131 г, 2,02 моль) и нагревали (45°C) в течение ночи. Большую часть ДМФА удалили при пониженном давлении, и остаток растворили в CH₂Cl₂ (500 мл) и промыли (3x 500 мл) солевым раствором, после чего сушили (MgSO₄), отфильтровали и концентрировали. Остаток пропустили через тонкий слой диоксида кремния (5% MeOH-CH₂Cl₂) и концентрировали с получением 2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этан-1-ола 4 (65 г, 74%) в виде масла желтого цвета. R_f (0,56, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 3. Получение перацетилированного галактозамина 6



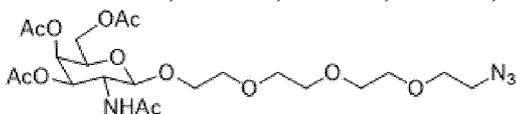
D-галактозамина гидрохлорид 5 (250 г, 1,16 моль) в пиридине (1,5 л) обрабатывали уксусным ангидридом (1,25 л, 13,2 моль) в течение 45 минут. После перемешивания в течение ночи реакционную смесь разделили на три порции объемом по 1 л. Каждую порцию объемом 1 л вылили в 3 л ледяной воды и перемешивали в течение одного часа. После перемешивания отфильтровали твердые частицы, объединили, заморозили над жидким азотом и затем лиофилизировали в течение пяти дней с получением перацетилированного галактозамина 6 (369,4 г, 82%) в виде твердого вещества белого цвета. R_f (0,58, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 4. Получение (3aR,5R,6R,7R,7aR)-5-(ацетоксиметил)-2-метил-3a,6,7,7a-тетрагидро-5H-пирано[3,2-d]оксазол-6,7-диилдиацетата 7



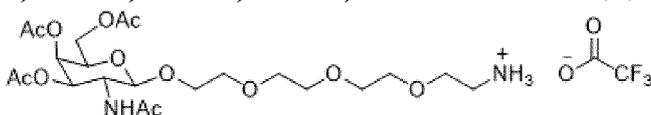
Раствор перацетилированного галактозамина **6** (8,45 г, 21,7 ммоль) в CHCl_3 (320 мл) по каплям обрабатывали с помощью триметилсилилтрифторметансульфоната (TMSOTf) (4,32 мл, 23,9 ммоль). После перемешивания (1,5 ч, 40°C) реакцию погасили путем добавления триэтиламина (5 мл) и концентрировали досуха с получением соединения **7** в виде стекловидной субстанции желтого цвета (7,2 г, колич.). Данный продукт использовали без дополнительной очистки. Rf (0,59, 10% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 5. Получение (2R,3R,4R,5R,6R)-5-ацетиламино-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)тетрагидро-2H-пиран-3,4-диилацетата **8**



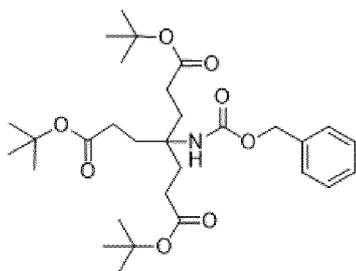
Соединение **7** (7,2 г, 21,7 ммоль) и 2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этан-1-ол **4** (2,65 г, 15,2 ммоль) перегоняли (3х) из толуола (150 мл) с помощью азеотропной перегонки для удаления следов воды. Осушенный материал растворили в 1,2-дихлорэтане (150 мл), охладили ($\sim 5^\circ\text{C}$) и обрабатывали триметилсилилтрифторметансульфонатом (TMSOTf) (784 мкл, 4,34 ммоль). После перемешивания в течение ночи реакцию погасили путем добавления триэтиламина (5 мл) и концентрировали. Остаток очистили хроматографическим способом (1% \rightarrow 5% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением **8** (7,12 г, 85%) в виде масла коричневого цвета. Rf (0,3, 10% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 6. Получение 2-(2-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этоксид)этоксид)этоксид)этан-1-аминия 2,2,2-трифторацетата **9**



Раствор азида **8** (7,12 г, 13 ммоль) в EtOAc (150 мл) и трифторуксусной кислоте (2 мл) обрабатывали палладием на угле (1,5 г, 10% масс./масс. во влажном состоянии). Затем реакционную смесь продували водородом и интенсивно перемешивали в течение ночи. После продувания азотом реакционную смесь отфильтровали через целит, промывая с помощью MeOH . Остаток концентрировали и очистили хроматографическим способом (5% \rightarrow 10% \rightarrow 20% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением **9** (5,8 г, 72%) в виде масла коричневого цвета. Rf (0,34, 15% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

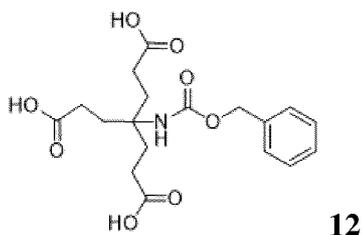
Этап 7. Получение ди-трет-бутил-4-(((бензилокси)карбонил)амино)-4-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)гептандиоата **11**



К раствору ди-tert-бутил-4-амино-4-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)гептандиоата **10** (13,5 г, 33 ммоль), 25% Na_2CO_3 (aq) (150 мл) и дихлорметана (300 мл) медленно добавили бензилхлорформиат (14 мл, 98 ммоль). Раствор интенсивно перемешивали в течение ночи (16 ч) при комнатной температуре. После завершения добавили дополнительное количество (100 мл) дихлорметана и отделили слой дихлорметана. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (2 x 100 мл). Объединенные экстракты дихлорметана сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха. Продукт **11** выделили в виде бесцветного масла, которое не требовало дополнительной очистки (15,8 г, 88%). Rf (0,7, 1:1 EtOAc–гексан).

Этап 8. Получение 4-(((бензилокси)карбонил)амино)-4-(2-карбоксиэтил)гептандиовой

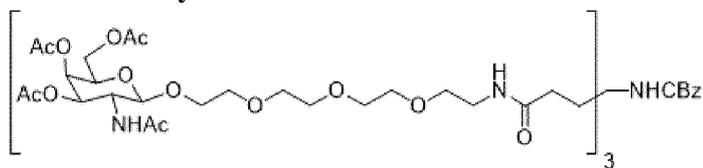
кислоты 12



12

Раствор **11** (15,6 г, 28,8 ммоль) в муравьиной кислоте (50 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Раствор концентрировали досуха и растворили в этилацетате (~25 мл). После отстаивания продукт кристаллизовали в виде бесцветного твердого вещества. Данное твердое вещество отфильтровали, промыли этилацетатом и высушили на воздухе с получением **12** в виде бесцветного твердого вещества (10,2 г, 93%). Rf (0,1, 10% MeOH– CH_2Cl_2).

Этап 9. Получение соединения 13

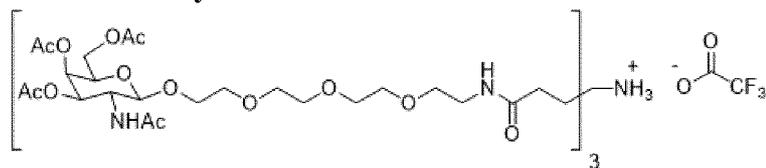


13

Раствор **12** (793 мг, 2,08 ммоль) и **9** (5,8 г, 9,36 ммоль) в ДМФА (50 мл) обработали БОФ (3,67 г, 8,32 ммоль), затем N, N-диизопропилэтиламино (4,31 мл, 25 ммоль). После перемешивания в течение ночи реакционную смесь концентрировали досуха и подвергли хроматографической очистке (1% → 2% → 5% → 10% → 15% MeOH– CH_2Cl_2) с получением **13** (5,71 г [неочищенный продукт], >100% – содержал побочные продукты

связывания, которые не оказывали воздействия на следующую стадию). Rf (0,45, 10% MeOH–CH₂Cl₂).

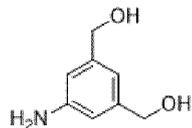
Этап 10. Получение соединения 14



14

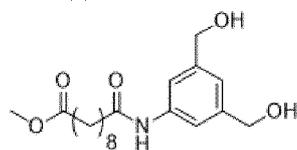
Соединение **13** (5,7 г) растворили в MeOH (150 мл) и ТФУ (1,5 мл) и обработали палладием на угле (1 г, 10% масс./масс. во влажном состоянии). Затем реакционную смесь продували водородом и интенсивно перемешивали в течение ночи. После продувания азотом реакционную смесь отфильтровали через целит, промывая с помощью MeOH. Фильтрат концентрировали и очистили хроматографическим способом (5% → 10% → 20% MeOH–CH₂Cl₂) с получением **14** в виде масла коричневого цвета (2,15 г, 56% за две стадии). Rf (0,32, 10% MeOH–CH₂Cl₂).

Этап 11. Получение (5-амино-1,3-фенилен)диметанола 15



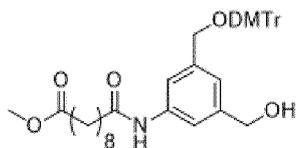
Раствор диметил-5-аминоизофталата (20,0 г, 96 ммоль) в ТГФ (350 мл) в течение одного часа по каплям добавляли к смеси 3,75 экв. LiAlH₄ (13,6 г, 358 ммоль) в ТГФ (440 мл), кипящей с обратным холодильником. Смесь перемешивали с обратным холодильником в течение следующих двух часов, затем охладили до комнатной температуры и погасили путем осторожного добавления MeOH (27 мл), а затем воды (40 мл). После перемешивания погашенной смеси в течение двух часов, ее отфильтровали и концентрировали досуха. Остаток перекристаллизовали (2X) из EtOAc с получением **15** в виде кристаллов коричневатого-желтого цвета (10,2 г, 70%).

Этап 12. Получение метил-10-((3,5-бис(гидроксиметил)фенил)амино)-10-оксодеcanoата 16



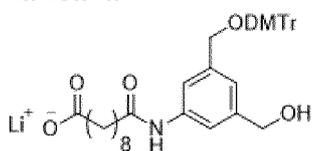
Раствор метилсебацата (3,8 г, 17 ммоль), **15** (2,5 г, 17 ммоль) и ЭЭДХ (8,1 г, 33 ммоль) в смеси дихлорметан/метанол 2:1 (200 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После завершения раствор концентрировали досуха. Полученное твердое вещество растерли с дихлорметаном (50 мл) и отфильтровали. Данное твердое вещество промыли дихлорметаном и высушили на воздухе с получением **16** в виде бесцветного твердого вещества (4,3 г, 72%). Rf (0,33, EtOAc).

Этап 13. Получение метил-10-((3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(гидроксиметил)фенил)амино)-10-

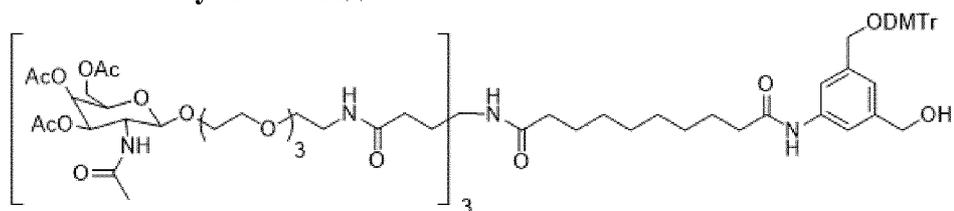
оксодеcanoата 17

К раствору **16** (4,3 г, 12 ммоль) в пиридине (50 мл) добавили 4,4'-(хлоро(фенил)метил)ен)бис(метоксибензол) (4,1 г, 12 ммоль). Данный раствор перемешивали в атмосфере азота в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор концентрировали досуха и остаток очистили с помощью колоночной хроматографии (0,5% → 0,75% → 1% → 1,5% MeOH–CH₂Cl₂) с получением **17** в виде твердого вещества желтого цвета (2,9 г, 35%). R_f (0,6, 10% MeOH–CH₂Cl₂).

Этап 14. Получение лития 10-((3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(гидроксиметил)фенил)амино)-10-оксодеcanoата 18

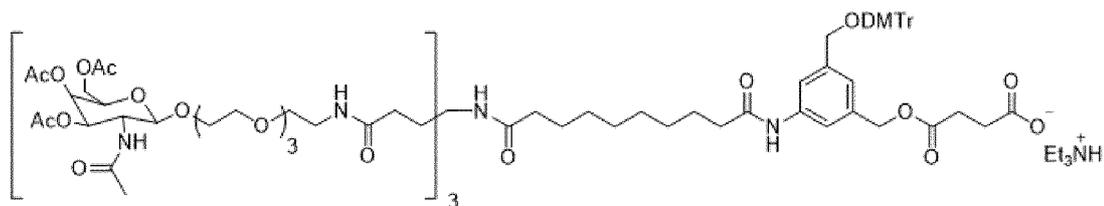


К раствору **17** (2,9 г, 4,3 ммоль) в ТГФ (60 мл) добавили воду (15 мл) и гидроксид лития (112 мг, 4,7 ммоль). Данный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор концентрировали для удаления ТГФ. Оставшийся водный раствор мгновенно заморозили на жидком азоте и лиофилизировали в течение ночи с получением бесцветного твердого вещества (2,9 г, колич.). R_f (0,3, 10% MeOH–CH₂Cl₂).

Этап 15. Получение соединения 19

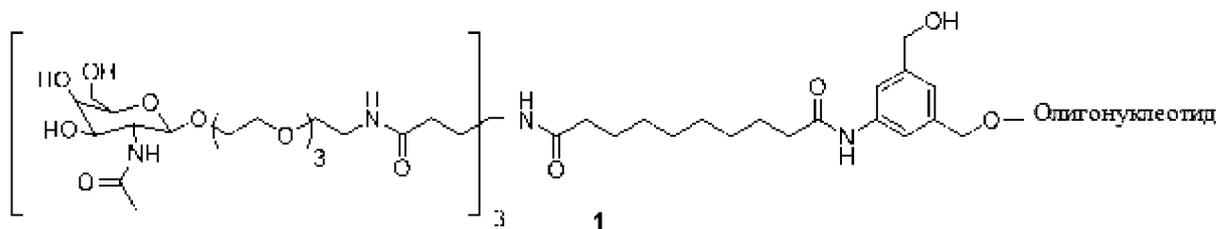
К раствору **14** (454 мг, 0,67 ммоль), **18** (1,25 г, 0,67 ммоль) и ГБТУ (381 мг, 1,0 ммоль) в безводном ДМФА (25 мл) добавили N, N-диизопропилэтиламин (0,35 мл, 2,0 ммоль). Данный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор прилили к этилацетату (250 мл) и промыли солевым раствором (3×200 мл). Слой этилацетата сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали досуха. Путем очистки с помощью колоночной хроматографии (5% → 7,5% → 10% → 15% MeOH в CH₂Cl₂) получили **19** в виде пены бледно-оранжевого цвета (1,5 г, 94%). R_f (0,25, 10% MeOH–CH₂Cl₂).

Этап 16. Получение соединения 20



Раствор соединения **19** (1,5 г, 0,6 ммоль), янтарного ангидрида (120 мг, 1,2 ммоль), ДМАП (220 мг, 1,8 ммоль) и триметиламина (250 мкл, 1,8 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (50 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор концентрировали досуха и отфильтровали через короткую пробку из диоксида кремния (100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 15\% \text{MeOH}$ в CH_2Cl_2) с получением продукта **20** в виде пены светло-бежевого цвета (1,1 г, 70%). Масса m/z (Времяпролетная масс-спектрометрия с электрораспылением) 727,7 $[\text{M}+3\text{H} - \text{DMT}]^+$, 1091,1 $[\text{M}+2\text{H} - \text{DMC}]$. Спектр ЯМР на ядрах ^1H : (400 МГц, CDCl_3) δ 8,92 (br s, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,49–7,47 (m, 3H), 7,41 (br s, 1H), 7,38–7,34 (m, 5H), 7,32–7,26 (m, 4H), 7,24–7,08 (br s, 3H), 7,08 (s, 1H), 6,90–6,80 (m, 7H), 5,31 (d, 3H, $J=2,7$ Гц), 5,12 (s, 2H), 5,06 (dd, 3H, $J=11,2, 3,2$ Гц), 4,78 (d, 3H, $J=8,5$ Гц), 4,24–4,08 (m, 12H), 3,95–3,88 (m, 7H), 3,85–3,76 (m, 4H), 3,78 (s, 6H), 3,68–3,56 (m, 34H), 3,54–3,44 (m, 8H), 3,41–3,33 (m, 6H), 2,70–2,60 (m, 4H), 2,52–2,30 (m, 30H), 2,24–2,16 (m, 8H), 2,14 (s, 9H), 2,04 (s, 9H), 2,02–1,96 (m, 6H), 1,98 (s, 9H), 1,96 (s, 9H), 1,74–1,52 (m, 4H), 1,36–1,24 (m, 12H).

Этап 17. Получение конъюгата 1



Сукцинат **20** нанесли на 1000Å CPG (стекло с контролируемой пористостью) из LCAA (длинноцепочечный аминоалкил) с использованием стандартного реагента, связывающего амиды. Раствор диизопропилкарбодиимида (52,6 ммоль), N -гидроксисукцинимид (0,3 мг, 2,6 ммоль) и пиридина (10 мкл) в безводном ацетонитриле (0,3 мл) добавили к **20** (20,6 мг, 8 ммоль) в безводном дихлорметане (0,2 мл). Данную смесь добавили к LCAA CPG (183 мг). Смесь аккуратно перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После исчезновения **20** (ВЭЖХ), реакционную смесь отфильтровали и CPG промыли по 1 мл каждого из дихлорметана, ацетонитрила, раствором 5% уксусного ангидрида/5% N -метилимидазола/5% пиридина в ТГФ, затем ТГФ, ацетонитрила и дихлорметана. Затем CPG высушивали в течение ночи при глубоком вакууме. Стандартным анализом ДМТ с помощью метода спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области (504 нм), нанесение определили равным 25 мкмоль/г. Полученную твердую подложку в виде CPG с нанесенным GalNAc использовали в автоматизированном синтезе олигонуклеотида с использованием

стандартных методик. Путем снятия защитной группы с нуклеотида с последующим удалением его с твердой подложки (с попутным снятием защитной группы с галактозамина ацетата) получили конъюгат **1** GalNAc–олигонуклеотид в качестве типичного примера.

Пример 2: Синтез конъюгата **34**

Схема 6

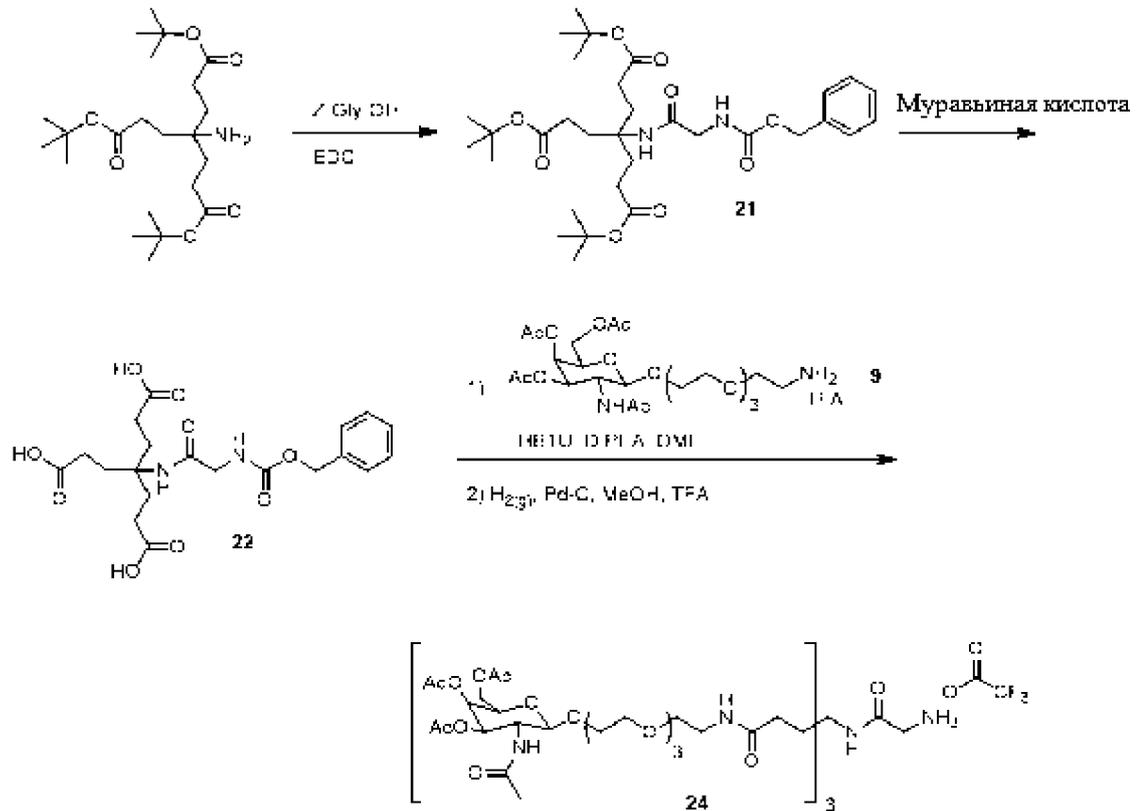


Схема 7

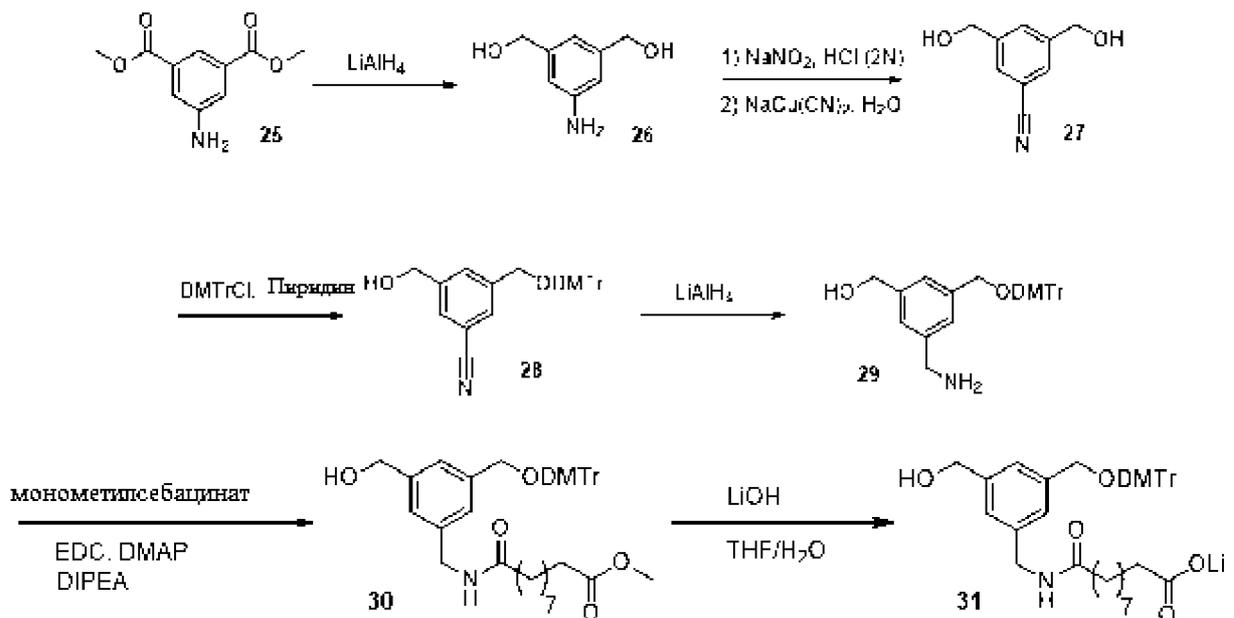
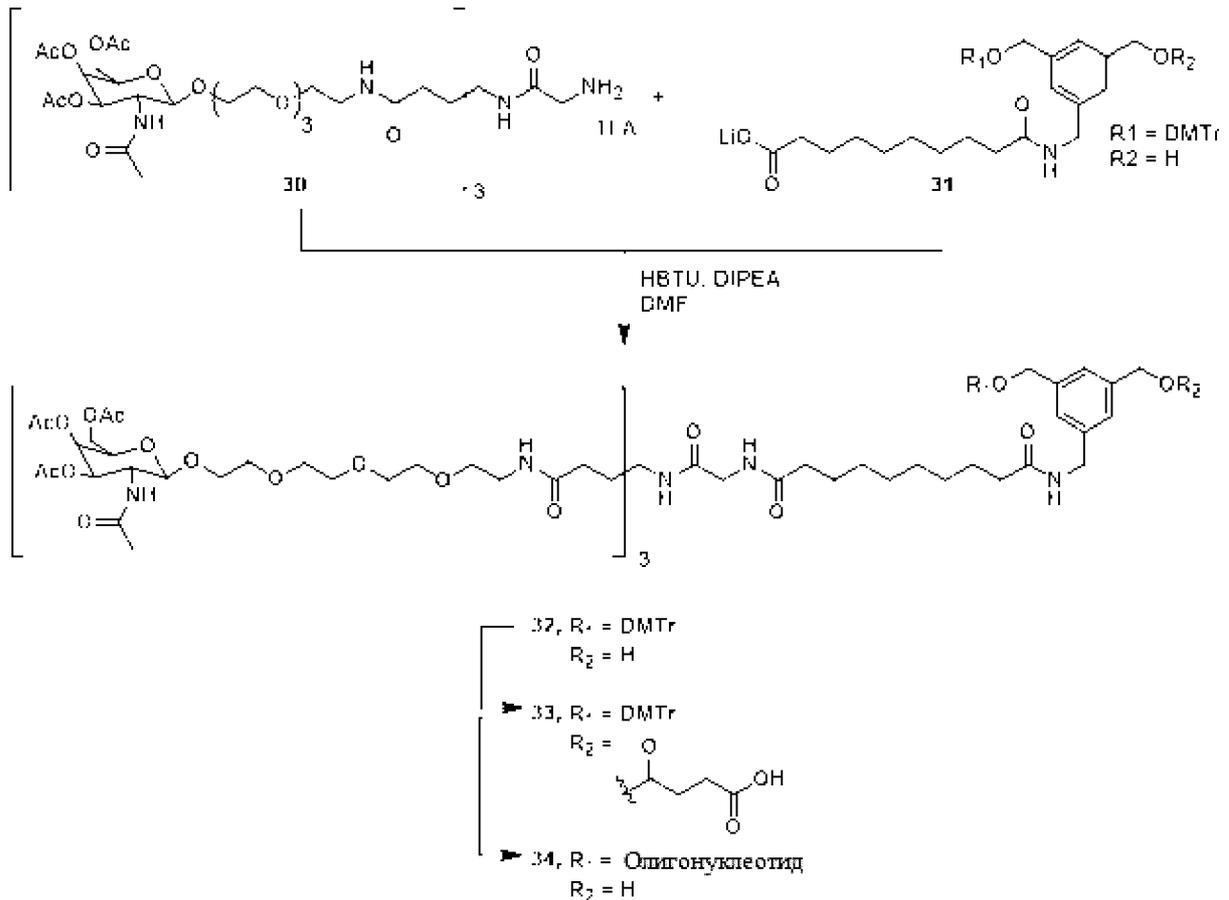
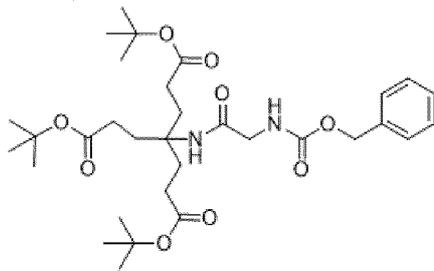


Схема 8



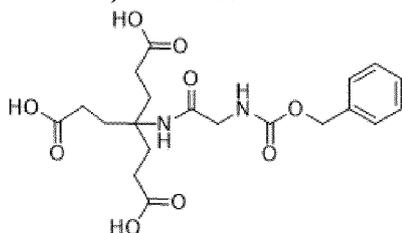
Этап 1. Получение ди-трет-бутил 4-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)ацетида)-4-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)гептандиоата 21



Раствор ди-трет-бутил-4-амино-4-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)гептандиоата (25 г, 60 ммоль) и Z-глицина (18,9 г, 90,2 ммоль) в CH₂Cl₂ (300 мл) последовательно обрабатывали ЭДК (23 г, 120 ммоль), диизопропилэтиламино (32 мл, 180 ммоль) и ДМАП (кат. 17 мг). После перемешивания (16 ч) реакционную смесь прилили к NaHCO₃ (насыщенный водный раствор), экстрагировали с помощью CH₂Cl₂, промыли солевым раствором, сушили (MgSO₄), отфильтровали и концентрировали с получением ди-трет-бутил-4-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)ацетида)-4-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)гептандиоата **21** в виде аморфного твердого вещества, который использовали без дальнейшей обработки (36 г, колич.). R_f (0,85, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

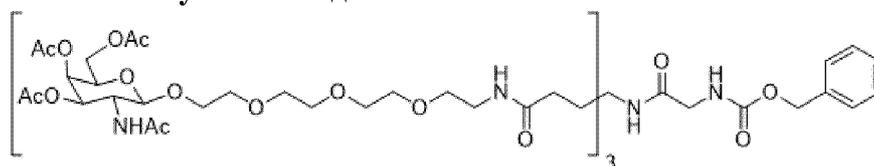
Этап 2. Получение 4-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)ацетида)-4-(2-

карбоксиэтил)гептандиовой кислоты **22**



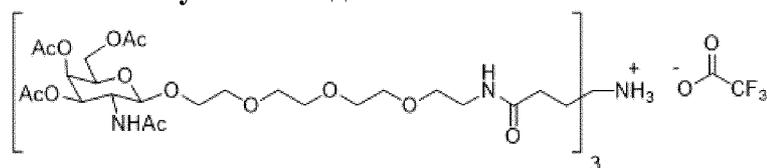
Раствор ди-трет-бутил-4-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)ацетамидо)-4-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)гептандиоата **21** (59,3 ммоль, 36 г) перемешивали в неразбавленной муравьиной кислоте (150 мл) в течение 72 часов. После завершения муравьиную кислоту удалили при пониженном давлении и неочищенное твердое вещество высушивали в течение ночи при глубоком вакууме с получением **22** в виде бесцветного твердого вещества (15,9 г, 61%). Rf (0,15, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 3. Получение соединения **23**



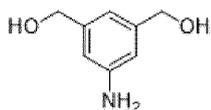
Раствор **22** (6,2 г, 14,1 ммоль) и 2-(2-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-ацетамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этокси)этан-1-аминия 2,2,2-трифторацетата (35 г, 56,5 ммоль) в ДМФА (250 мл) обработали БОФ (25 г, 56,5 ммоль), а затем N, N-диизопропилэтиламином (29 мл, 170 ммоль). После перемешивания в течение ночи смесь концентрировали досуха и подвергли хроматографической очистке (от 100% CH₂Cl₂ до 15% MeOH-CH₂Cl₂) с получением соединения **23** (24,6 г, 89%). Rf (0,55, 15% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 4. Получение соединения **24**



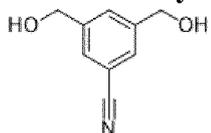
Соединение **23** (24,6 г) растворили в MeOH (200 мл) и ТФУ (1,5 мл), после чего продували азотом. Добавили палладиевую чернь (1 г, 10% масс./масс. во влажном состоянии), после чего реакцию смесь продували водородом и интенсивно перемешивали в течение ночи. После завершения реакцию смесь продули азотом, отфильтровали через целит и промыли MeOH. Фильтрат концентрировали и очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (градиент: 5% → 10% → 20% MeOH-CH₂Cl₂) с получением **24** в виде вязкого масла бледно-коричневого цвета (23 г). Rf (0,32, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 5. Получение (5-амино-1,3-фенилен)диметанола **26**



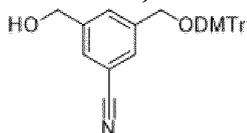
Суспензию литийалюминийгидрида (13,6 г, 358 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (450 мл) поместили под обратный холодильник в атмосфере азота и обрабатывали, по каплям, раствором диметил-5-аминоизофталата **25** (20 г, 96 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (350 мл). После завершения добавления смесь нагревали с обратным холодильником в течение дополнительных 2 часов. По завершении раствор охладил до комнатной температуры и погасил медленным добавлением MeOH (27 мл), а затем воды (40 мл). После перемешивания в течение 2 часов смесь отфильтровали, концентрировали и перекристаллизовали из EtOAc с получением (5-амино-1,3-фенилен)диметанол **26** в виде кристаллов почти белого цвета (10,2 г, 70%). Rf (0,5, 15% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 6. Получение 3,5-бис(гидроксиметил)бензонитрила **27**



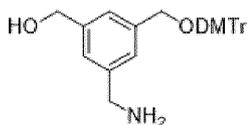
Раствор **26** (5 г, 33 ммоль) в 2N соляной кислоте (100 мл) охладил до 0 °C и обработали холодным раствором нитрита натрия (3,53 г, 36 ммоль) в воде (50 мл). Реакционную смесь поддерживали при температуре ≤ 5 °C в течение 30 минут, после чего обработали раствором меди (I) цианида (3,19 г, 35,6 ммоль) и натрия цианида (3,53 г, 72 ммоль) в воде (50 мл) (одной порцией). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре смесь отфильтровали, экстрагировали дихлорметаном (3×100 мл), концентрировали и использовали без дополнительной очистки. Диол, 3,5-бис(гидроксиметил)бензонитрил **27**, получили в виде твердого вещества желтого цвета (2,19 г, 41%). Rf (0,75, 15% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 7. Получение 3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(гидроксиметил)бензонитрила **28**



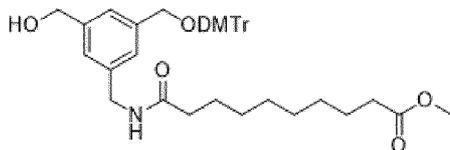
Раствор 3,5-бис(гидроксиметил)бензонитрила **27** (538 мг, 3,3 ммоль) в пиридине (14 мл) обработали 4,4'-диметокситритилхлоридом (1,17 г, 3,46 ммоль) и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. По завершении, смесь концентрировали и диспергировали в диэтиловом эфире (25 мл), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (градиент: от 10% до 50% EtOAc-гексан) с получением **28** в виде твердого вещества желтого цвета (725 мг, 47%). Rf (0,5, 1:1 EtOAc-гексан).

Этап 8. Получение 3-(аминометил)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)фенил)метанола **29**



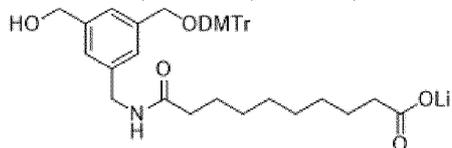
Раствор **28** (100 мг, 0,22 ммоль) в метилтетрагидрофуране (5 мл) охладили до 0 °С и медленно обработали литийалюминийгидридом (0,64 ммоль=0,28 мл 2,3М раствора в МеТГФ). После перемешивания в течение одного часа реакцию погасили путем добавления метанола (1 мл), а затем воды (0,3 мл) и перемешивали в течение 30 мин. Смесь отфильтровали и концентрировали с получением (3-(аминометил)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)фенил)метанола **29** (78 мг, 77%). Rf (0,15, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 9. Получение метил-10-((3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(гидроксиметил)бензил)амино)-10-оксодеcanoата 30



Раствор (3-(аминометил)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)-метил)фенил)метанола **29** (78 мг, 0,17 ммоль) и монометилсебацината (38 мг, 0,17 ммоль,) в дихлорметане (5 мл) последовательно обработали ЭДК (48 мг, 0,25 ммоль), ДМАП (кат., 5 мг) и диизопропилэтиламино (57 мкл, 0,33 ммоль). После перемешивания (3,5 ч) реакционную смесь прилили к насыщенному раствору гидрокарбоната натрия (50 мл). Раствор гидрокарбоната натрия экстрагировали дихлорметаном (3×50 мл), промыли солевым раствором (50 мл), сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали досуха. Неочищенный материал очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (градиент: от 2% до 5% MeOH-CH₂Cl₂) с получением метил-10-((3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(гидроксиметил)бензил)амино)-10-оксодеcanoата **30** в виде масла желтого цвета (57 мг, 53%). Rf (0,45, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 10. Получение 10-((3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(гидроксиметил)бензил)амино)-10-оксодеcanoата лития 31



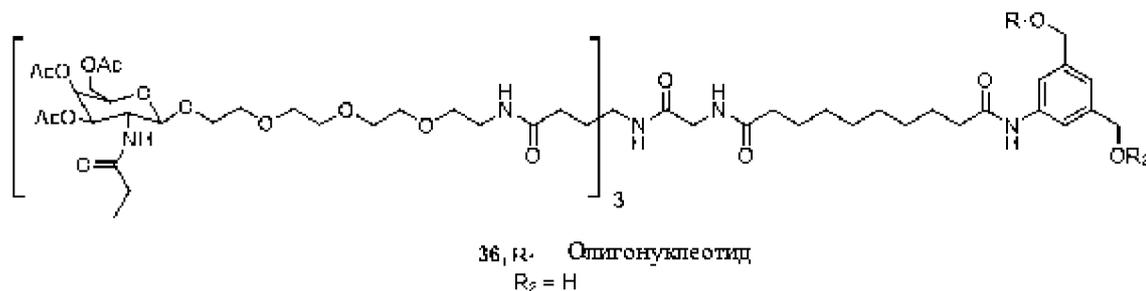
Соединение **30** (188 мг, 0,28 ммоль) растворили в тетрагидрофуране (5 мл) и обработали раствором LiOH (7 мг, 0,30 ммоль) в воде (1 мл). После завершения тетрагидрофуран удалили *в вакууме*, а оставшуюся водную смесь заморозили и лиофилизировали с получением лития 10-((3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(гидроксиметил)бензил)амино)-10-оксодеcanoата **31** в виде бесцветного твердого вещества (180 мг, 99%). Rf (0,45, 10%

MeOH-CH₂Cl₂).

Этап 11. Получение соединений 32, 33 и 34

Соединения 32, 33 и 34 получили в соответствии с методикой, идентичной той, которая использовалась для синтеза соединений 19, 20 и 1 соответственно.

Пример 3. Синтез конъюгата 36



Этап 1. Получение конъюгата 36

Конъюгат 36 получили с использованием методик, идентичных тем, которые использовались для синтеза соединения 34 и всех соответствующих промежуточных соединений. Единственным исключением является синтез соединения 6, где вместо уксусного ангидрида использовали пропионовый ангидрид.

Пример 4. Синтез конъюгата 42

Схема 9

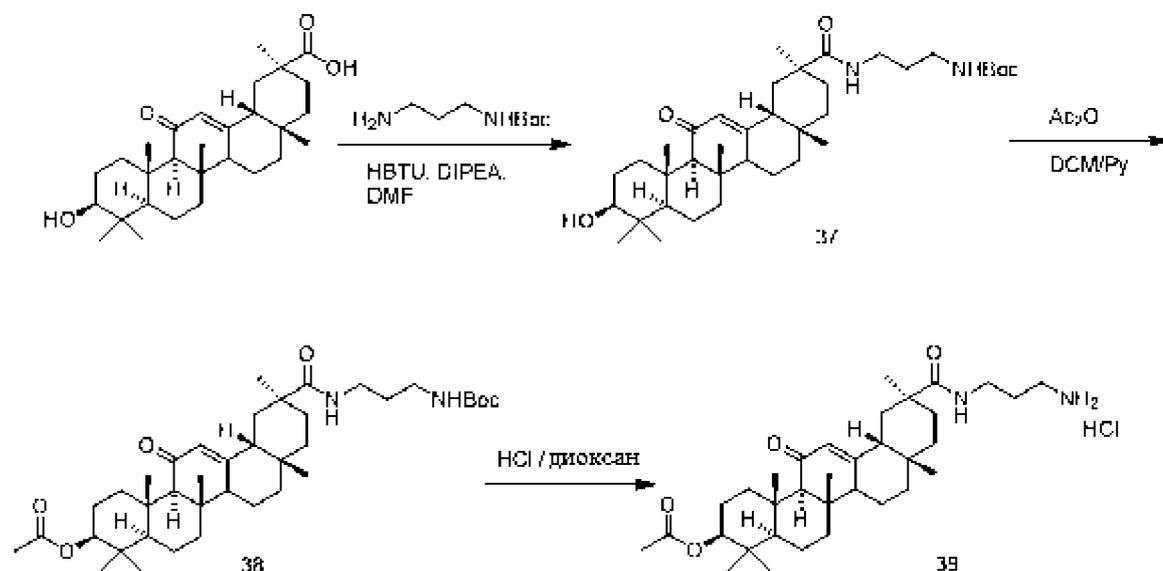
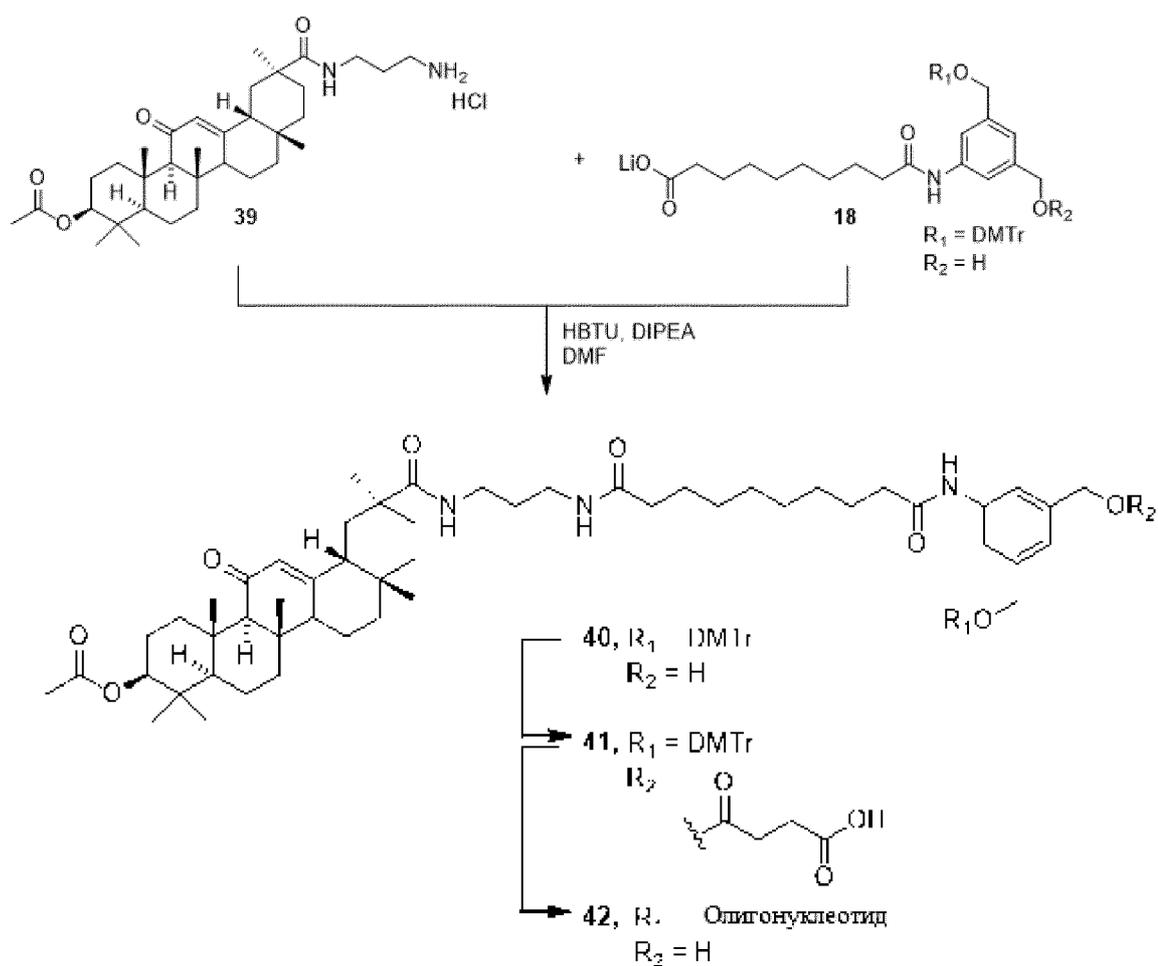
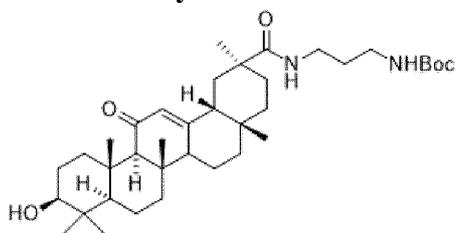


Схема 10

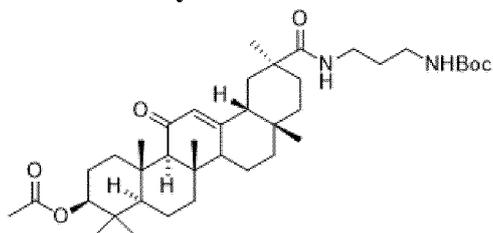


Этап 1. Получение соединения 37



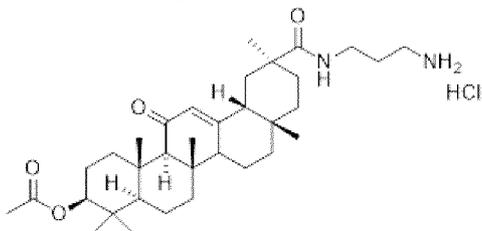
Раствор 18 β -глициретиновой кислоты (2,5 г, 5,3 ммоль), трет-бутил-(3-аминопропил)карбамата (1,1 г, 6,4 ммоль) и ГБТУ (3,0 г, 8,0 ммоль) в N, N-диметилформамиде (20 мл) добавили к диизопропилэтиламину (2,75 мл, 15,9 ммоль). Данный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор концентрировали *in vacuo* досуха. Остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (градиент: от 2% до 5% MeOH/CH₂Cl₂) с получением продукта в виде бесцветного твердого вещества (2,1 г, 63%).

Этап 2. Получение соединения 38



К раствору **37** (2,1 г, 3,3 ммоль) и триэтиламина (3,5 мл, 10 ммоль) в дихлорметане (25 мл) добавили уксусный ангидрид (850 мкл, 5,3 ммоль) и ДМАП (5 мг). Данный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор концентрировали досуха и растворили в этилацетате (100 мл), промыли водой (100 мл), сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением пены бледно-коричневого цвета (1,9 г, 85%).

Этап 3. Получение соединения **39**



К раствору **38** (1,5 г, 2,3 ммоль) в безводном диоксане (25 мл) добавили 2М раствор хлороводорода в диоксане (25 мл). Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего концентрировали *in vacuo* досуха с получением твердого вещества светло-коричневого цвета (1,3 г, 96%).

Этап 4. Получение соединений **40**, **41** и **42**

Соединения **40**, **41** и **42** получили в соответствии с методикой, идентичной той, которая использовалась для синтеза соединений **19**, **20** и **1**, соответственно.

Пример 5. Синтез конъюгата **43**

Схема 11

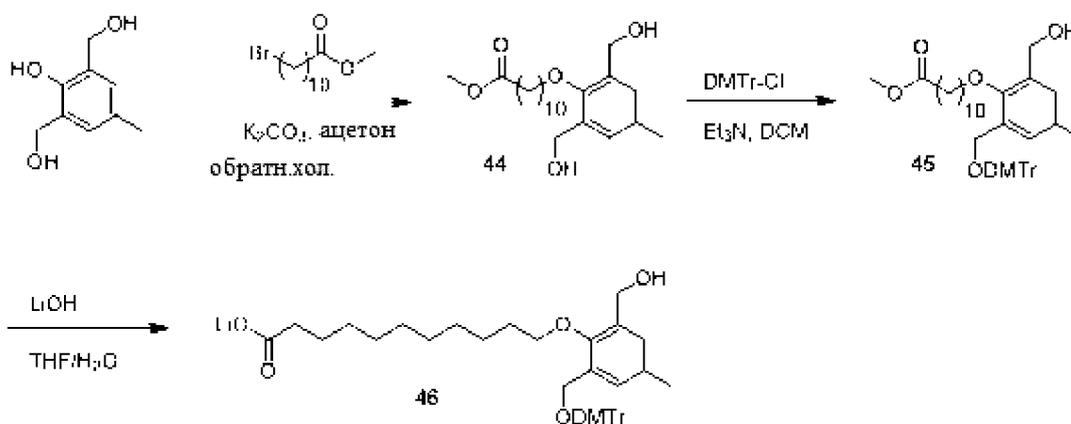
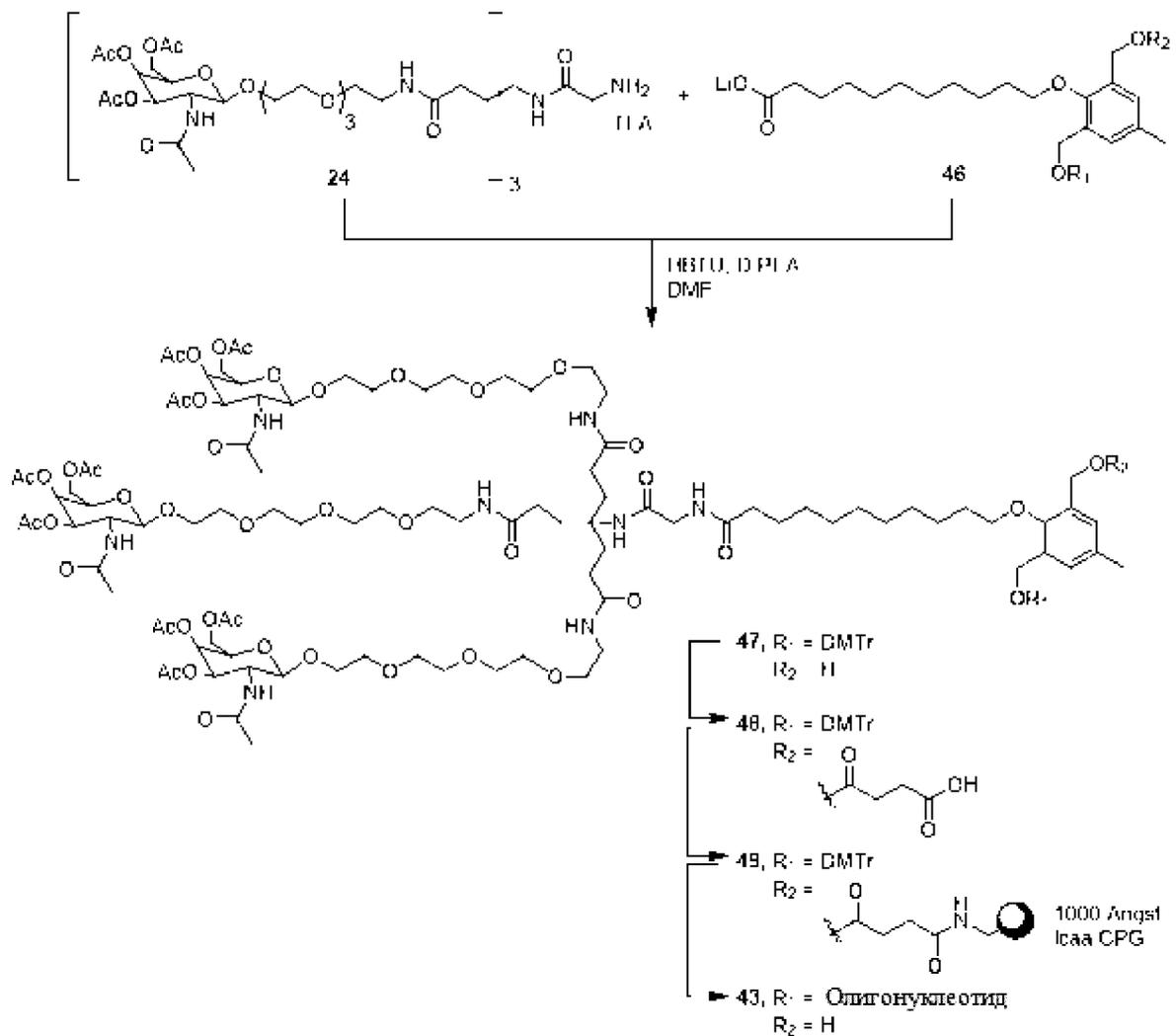
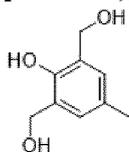


Схема 12

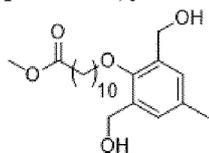


Этап 1. Получение метил-11-(2,6-бис(гидроксиметил)-4-метилфенокси)ундеcanoата 44

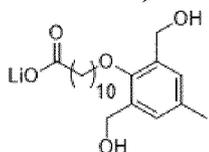


Раствор 2,6-бис(гидроксиметил)-*p*-крезола (2,7 г, 16,3 ммоль), метил-11-бромундеcanoата (5,0 г, 17,9 ммоль) и карбоната калия (4,5 г, 32,6 ммоль) в ацетоне (100 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 16 часов. После завершения раствор концентрировали *in vacuo* досуха, суспендировали в этилацетате (150 мл) и промыли водой (2×100 мл), и соевым раствором (100 мл). Слой этилацетата сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали *in vacuo* досуха. Остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (градиент 100% гекс 50% EtOAc/гекс) с получением метил-11-(2,6-бис(гидроксиметил)-4-метилфенокси)ундеcanoата **44** в виде бесцветного масла (1,6 г, 27%).

Этап 2. Получение метил-11-(2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-6-(гидроксиметил)-4-

метилфенокси)ундеcanoата 45

К раствору метил-11-(2,6-бис(гидроксиметил)-4-метилфенокси)ундеcanoата **44** (1,5 г, 4,1 ммоль) в безводном пиридине (20 мл) добавили 4,4'-диметокситритилхлорид (1,4 г, 4,1 ммоль). Данный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор концентрировали *в вакууме* досуха и очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (от 0,5 до 1% MeOH в CH₂Cl₂) с получением метил-11-(2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-6-(гидроксиметил)-4-метилфенокси)ундеcanoата **45** в виде твердого вещества бледно-желтого цвета (1,1 г, 40%).

Этап 3. Получение 11-(2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-6-(гидроксиметил)-4-метилфенокси)ундеcanoата лития 46

К раствору метил-11-(2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-6-(гидроксиметил)-4-метилфенокси)ундеcanoата **45** (1,1 г, 1,7 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (40 мл) и воде (10 мл) добавили гидроксид лития (44 мг, 1,8 ммоль). Данный раствор концентрировали *в вакууме* с удалением тетрагидрофурана. Оставшийся водный раствор мгновенно заморозили на жидком азоте, после чего лиофилизировали в течение ночи с получением лития-11-(2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-6-(гидроксиметил)-4-метилфенокси)ундеcanoата **46** в виде твердого вещества бледно-розового цвета (1,1 г, 94%).

Этап 4. Получение соединения 47

К раствору **10** (1,33 г, 0,66 ммоль), **46** (0,5 г, 0,73 ммоль), ГБТУ (400 мг, 1 ммоль) в N, N-диметилформамиде (25 мл) добавили диизопропилэтиламин (0,35 мл, 2 ммоль). Данный раствор перемешивали в течение ночи (18 часов) при комнатной температуре. После завершения удалили растворитель *в вакууме*, а остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: 100% CH₂Cl₂-5% - 10% - 15% MeOH в CH₂Cl₂) с получением **47** в виде бесцветного твердого вещества (710 мг, 41%).

Этап 5. Получение соединения 48

К раствору **47** (0,71 г, 0,3 ммоль), триэтиламина (0,4 мл, 3,0 ммоль) и полистирен-ДМАП (нанесение 3 моль/г, 200 мг, 0,6 ммоль) в дихлорметане (15 мл) добавили янтарный ангидрид (60 мг, 0,6 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и после завершения отфильтровали и концентрировали *в вакууме* досуха. Остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (градиент: от 5% до 20% MeOH в CH₂Cl₂) с получением **48** в виде твердого вещества бледно-желтого

цвета (570 мг, 70%). Спектр ЯМР на ядрах ^1H : (DMSO-d_6 , 400 МГц) δ 7,91 (m, 1H), 7,86–7,76 (m, 6H), 7,45–7,40 (m, 2H), 7,36–7,14 (m, 10H), 7,10 (s, 1H), 6,91 (d, $J=8,9$ Гц, 4H), 5,21 (d, $J=3,3$ Гц, 3H), 5,01 (s, 2H), 4,97 (dd, $J=11,2, 3,4$ Гц, 3H), 4,56 (d, $J=8,5$ Гц, 3H), 4,06–3,98 (m, 11H), 3,93–3,84 (m, 3H), 3,81–3,72 (m, 3H), 3,74 (s, 6H), 3,65–3,46 (m, 38H), 3,40–3,35 (m, 6H), 3,20–3,16 (m, 6H), 2,56–2,44 (m, 4H), 2,33 (s, 3H), 2,15–2,08 (m, 2H), 2,10 (s, 9H), 2,04–1,96 (m, 6H), 1,89 (s, 9H), 1,82–1,76 (m, 4H), 1,77 (s, 9H), 1,54–1,34 (m, 4H), 1,28–1,10 (m, 12H),

Этап 6. Получение соединения 49

К раствору **48** (100 мг, 40 мкмоль), *N*-гидроксисукцинимид (30 мг/мл в ацетонитриле, 50 мкл, 13 мкмоль), *N, N'*-диизопропилкарбодиимида (40 мкл, 264 мкмоль) и пиридина (50 мкмоль) в дихлорметане (2 мл) и ацетонитриле (3 мл) добавили 1000 Å LCAA CPG (первичный синтез, 920 мг). Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре на орбитальном шейкере. ТСХ-анализ реакционной смеси продемонстрировал лишь частичное израсходование *N*-гидроксисукцинатного эфира, в связи с чем добавили дополнительное количество CPG (500 мг). Раствор снова перемешивали в течение ночи. После завершения CPG отфильтровали и промыли дихлорметаном (25 мл), ацетонитрилом (25 мл) и тетрагидрофураном (25 мл). Непрореагировавшие остатки амина на CPG ацетилировали (кэпировали) добавлением 1:1 раствора уксусного ангидрида в ацетонитриле (3 мл) и 10% раствора *N*-метилимидазола/10% пиридина в тетрагидрофуране (3 мл). Суспензию оставили на 2 часа, затем отфильтровали и промыли равными частями тетрагидрофурана (25 мл), ацетонитрила (25 мл) и дихлорметана (25 мл). CPG с нанесенным субстратом **49** высушивали при глубоком вакууме в течение ночи. Эффективность нанесения лигандов определили равной 22 мкмоль/г с использованием стандартного анализа нанесения ДМТ (3% трихлоруксусной кислоты в CH_2Cl_2 , спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях, A_{504}).

Этап 7. Получение конъюгата 43

Полученную твердую подложку в виде CPG с нанесенным GalNAc **49** использовали в автоматизированном синтезе олигонуклеотида с использованием стандартных методик. Путем снятия защитной группы с нуклеотида с последующим удалением его с твердой подложки (с попутным снятием защитной группы с галактозамина ацетата) получили конъюгат GalNAc-олигонуклеотид **43**.

Пример 6. Синтез конъюгата 50

Схема 13

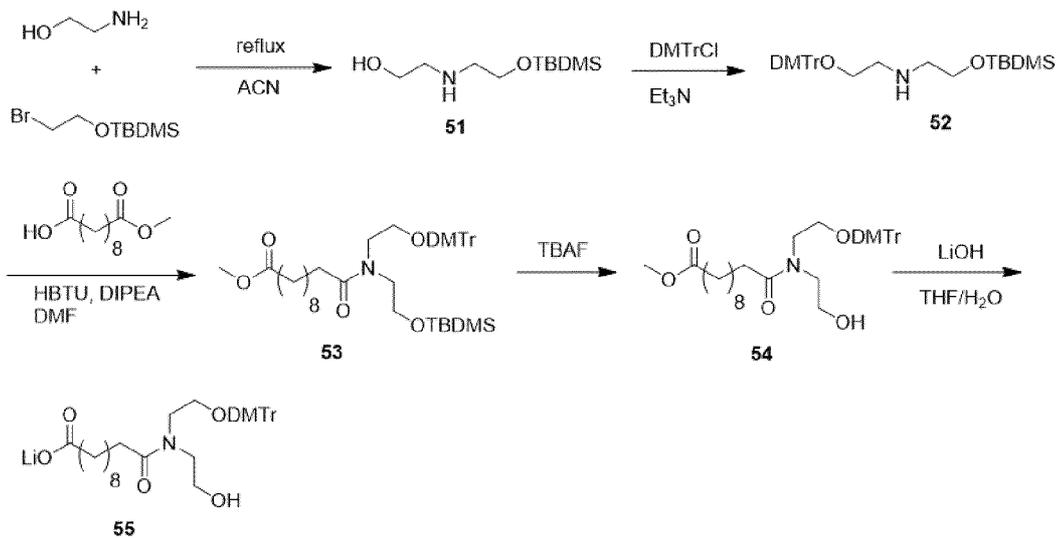
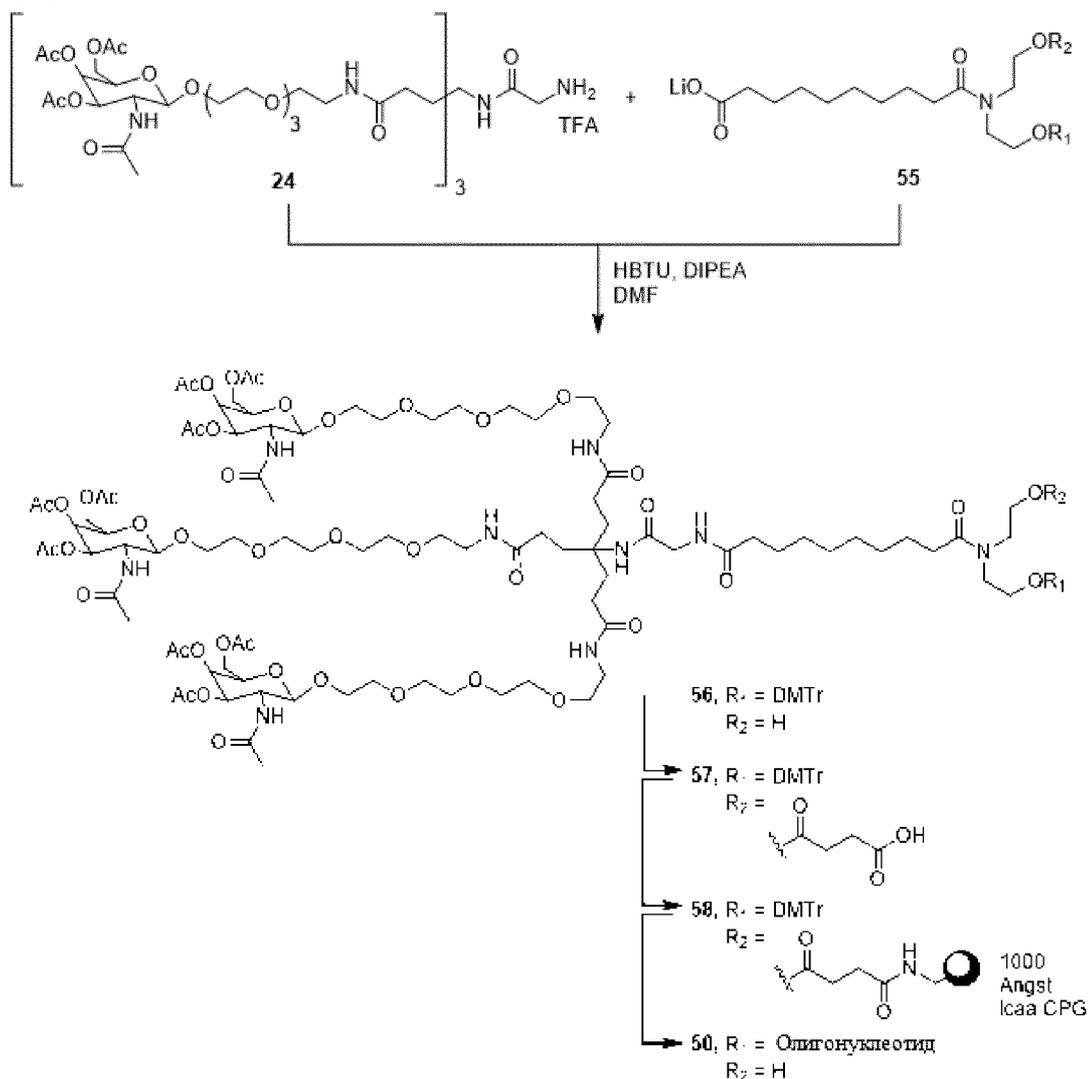
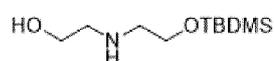


Схема 14



Этап 1. Получение 2-((2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)этил)амино)этан-1-ола 51



Раствор этаноламина (77 мл, 1,25 моль) и (2-бромэтокси)-*трет*-

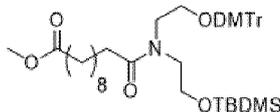
бутилдиметилсилана (15 г, 62,7 ммоль) в безводном ацетонитриле (200 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 3 часов. После завершения реакцию смесь охладил до комнатной температуры, разбавили водой (400 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×150 мл). Объединенные экстракты этилацетата сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали *в вакууме* досуха. Остаток очистили путем фильтрации через тампон из диоксида кремния и промывания, сперва раствором 50% этилацетата/смесь гексанов, затем 50% MeOH/EtOAc с получением **51** в виде масла бледно-желтого цвета (14 г, 100%).

Этап 2. Получение 2-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)-N-(2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)этил)этан-1-амин 52



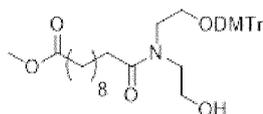
К раствору 2-((2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)этил)амино)этан-1-ола **51** (14 г, 64 ммоль) и триэтиламина (17,5 мл, 128 ммоль) в безводном дихлорметане (250 мл) добавили 4,4'-диметокситритилхлорид (24 г, 70 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем концентрировали *в вакууме* досуха. Остаток растворили в этилацетате (300 мл) и промыли водой (250 мл) и соевым раствором (250 мл). Слой этилацетата сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали *в вакууме* досуха. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (от 1% до 5% MeOH в CH₂Cl₂) привела к получению **52** в виде вязкого масла бледно-желтого цвета (13 г, 39%).

Этап 3. Получение метил-10-((2-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этил)(2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)этил)амино)-10-оксодеcanoата 53



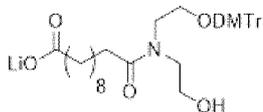
Раствор 2-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)-N-(2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)этил)этан-1-амин **52** (5,4 г, 10,3 ммоль), монометилсебацата (2,2 г, 10,3 г), ГБТУ (4,9 г, 12,9 ммоль), диизопропилэтиламина (5,3 мл, 30,9 ммоль) в N, N-диметилформамиде (100 мл) перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. После завершения раствор прилили к воде (400 мл) и экстрагировали этилацетатом (1×500 мл). Экстракт этилацетата промыли соевым раствором (2×250 мл), сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали *в вакууме* досуха. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (от 10% до 25% этилацетата в смеси гексанов) привела к получению **53** в виде вязкого масла бледно-желтого цвета (6,5 г, 87%).

Этап 4. Получение метил-10-((2-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этил)(2-гидроксиэтил)амино)-10-оксодеcanoата 54



К раствору метил-10-((2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этил)(2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)этил)амино)-10-оксодеcanoата **53** (2,0 г, 2,8 ммоль) и триэтиламина (1 мл) в безводном тетрагидрофуране (20 мл) добавили тетрабутиламмония фторид (ТВАФ) (1М в ТГФ, 3,4 мл, 3,3 ммоль). Раствор перемешивали в течение 6 ч, однако, по результатам ТСХ-анализа наблюдалась лишь частичная конверсия (5% MeOH в CH₂Cl₂). Добавили дополнительные 1,7 мл тетрабутиламмония фторида и перемешивали раствор в течение ночи при комнатной температуре. После завершения раствор концентрировали *in vacuo* и очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле 60 (от 10% до 50% EtOAc в смеси гексанов, затем 100% EtOAc) с получением **54** в виде вязкого бесцветного масла (0,5 г, 29%).

Этап 5. Получение лития 10-((2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этил)(2-гидроксиэтил)амино)-10-оксодеcanoата **55**



К раствору метил-10-((2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этил)(2-гидроксиэтил)амино)-10-оксодеcanoата **54** (0,5 г, 0,83 ммоль) в ТГФ (40 мл) добавили воду (10 мл) и гидроксид лития (24 мг, 1,0 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем концентрировали *in vacuo* для удаления ТГФ. Оставшийся водный раствор мгновенно заморозили на жидком азоте и лиофилизировали с получением **55** в виде бесцветного твердого вещества (485 мг, 95%).

Этап 6. Получение соединений **56**, **57**, **58** и **50**

Соединения **56**, **57**, **58** и **50** получили с использованием методик, идентичных тем, которые использовались для синтеза соединений **47**, **48**, **49** и **43** соответственно.

Пример 7. Синтез конъюгата **59**

Схема 15

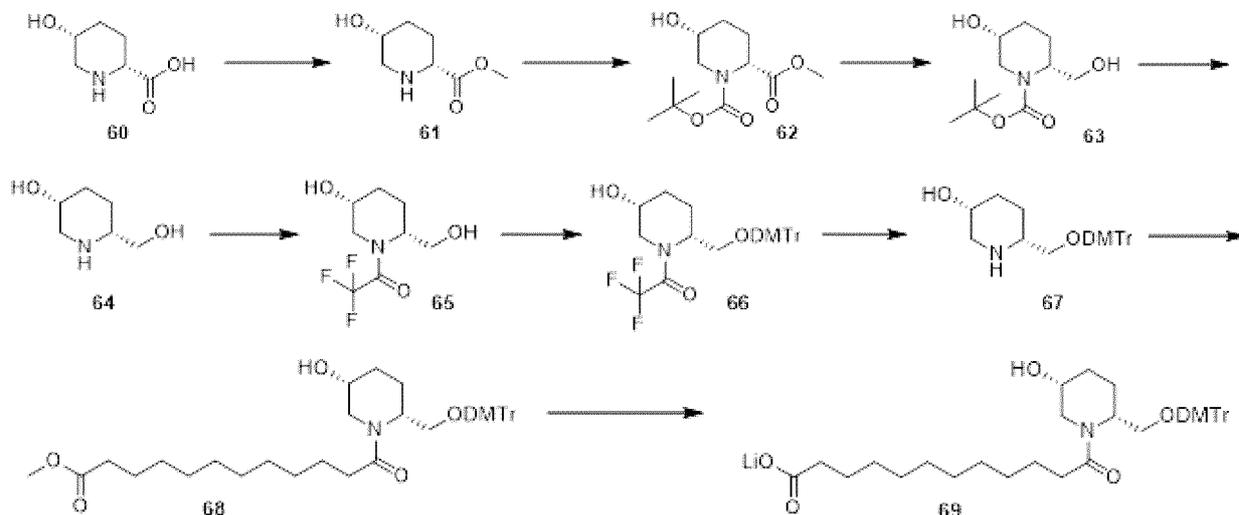
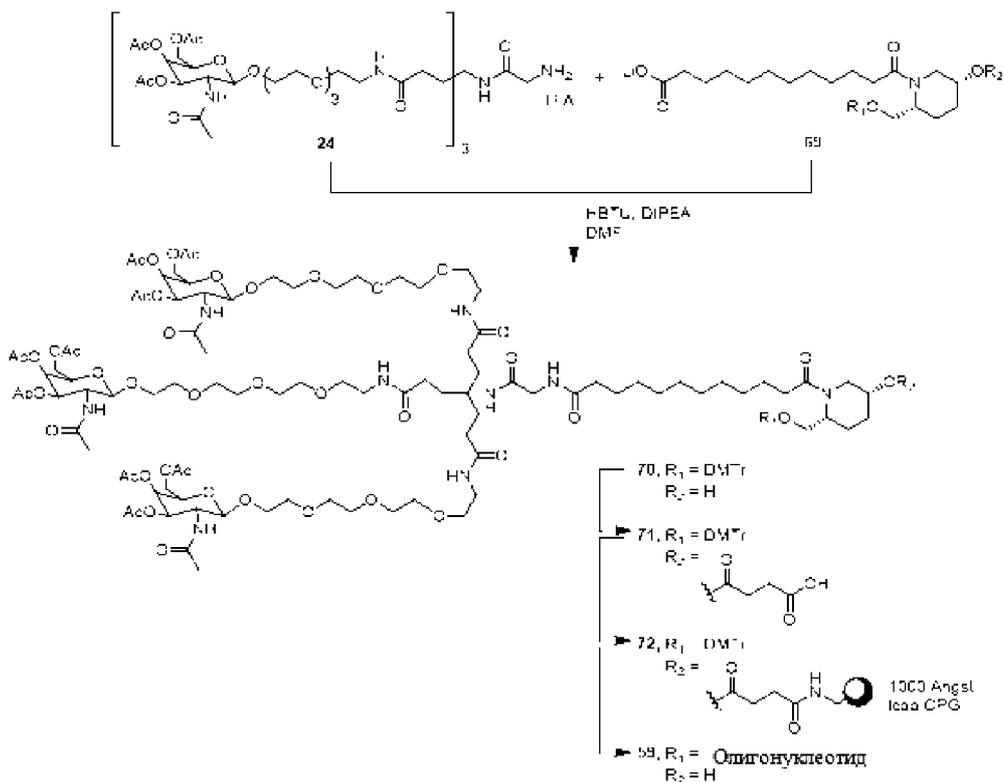
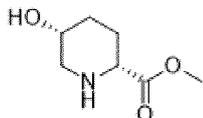
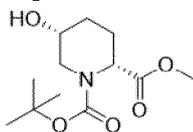


Схема 16

Этап 1. Получение метил-(2R,5R)-5-гидроксипиперидин-2-карбоксилата **61**

(2R,5R)-5-гидроксипиперидин-2-карбоновую кислоту **60** (3,5 г, 24,1 ммоль) перемешивали в MeOH (50 мл). HCl (г) барботировали через раствор в течение 2 минут, после чего реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1.5 ч. Реакционную смесь концентрировали *в вакууме* с получением (2R,5R)-5-гидроксипиперидин-2-карбоксилата **61** с количественным выходом, который использовали без дополнительной очистки.

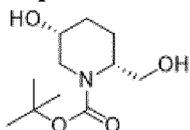
Этап 2. Получение 1-(трет-бутил) 2-метил (2R,5R)-5-гидроксипиперидин-1,2-дикарбоксилата **62**

Метил (2R,5R)-5-гидроксипиперидин-2-карбоксилат **61** (24,1 ммоль) и триэтиламин (TEA) (7,2 мл, 53,02 ммоль) перемешивали в дихлорметане (100 мл) при комнатной температуре. По порциям добавили ди-*трет*-бутил-ди-карбонат (5,7 г, 26,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавили дихлорметаном (100 мл) и последовательно промыли 1M HCl (2×75 мл), насыщенным NaHCO₃ (2×75 мл), H₂O (2×75 мл) и насыщенным раствором NaCl (2×75 мл). Отделили органический слой, сушили (Na₂SO₄) и концентрировали *в вакууме* с получением 1-(трет-

бутил) 2-метил (2R,5R)-5-гидроксипиперидин-1,2-дикарбоксилата **62** (5,53 г, 88%), который использовали без дополнительной очистки.

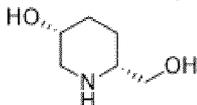
Этап 3. Получение трет-бутил-(2R,5R)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)пиперидин-1-

карбоксилата 63



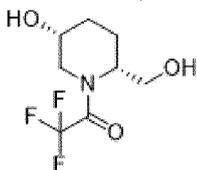
(2R,5R)-1-(трет-бутоксикарбонил)-5-гидроксипиперидин-2-карбоновую кислоту **62** (5,53 г, 21,4 ммоль) перемешивали в ТГФ при 0°C. В течение 1 ч по каплям добавляли LiBH₄ (3,0 М раствор в ТГФ) (8,9 мл, 27,7 ммоль). Дали реакционной смеси нагреться до комнатной температуры и продолжили перемешивание в течение 16 ч. Реакцию погасили с помощью 1М NaOH, ТГФ удалили *в вакууме*, а водный слой исчерпывающе экстрагировали с помощью EtOAc (10×100 мл). Объединенные органические слои промыли с помощью H₂O (50 мл) и насыщенного раствора NaCl (2×50 мл), сушили (Na₂SO₄) и концентрировали *в вакууме* с получением *трет*-бутил-(2R,5R)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)пиперидин-1-карбоксилата **63** (2,4 г, 49,0%), который использовали без дополнительной очистки.

Этап 4. Получение (3R,6R)-6-(гидроксиметил)пиперидин-3-ола 64



трет-Бутил(2R,5R)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)пиперидин-1-карбоксилат **63** (2,4 г, 10,4 ммоль) перемешивали в Et₂O при комнатной температуре. Через раствор барботировали HCl (г) в течение 45 секунд и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Реакционную смесь концентрировали при глубоком вакууме и высушили при глубоком вакууме с получением (3R,6R)-6-(гидроксиметил)пиперидин-3-ола **64**. Данный продукт использовали без дополнительной очистки.

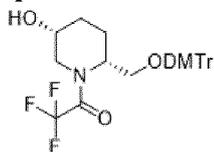
Этап 5. Получение 2,2,2-трифторо-1-((2R,5R)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)этан-1-она 65



Неочищенный (3R,6R)-6-(гидроксиметил)пиперидин-3-ол **64** из предыдущей реакции перемешивали в MeCN (50 мл) с триэтиламино (3,5 мл, 25,2 ммоль) при комнатной температуре. Добавили этилтрифторацетат (3 мл, 25,2 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, затем концентрировали в вакууме с получением 2,2,2-трифторо-1-((2R,5R)-5-гидрокси-2-

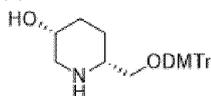
(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)этан-1-она **65**. Данный продукт использовали без дополнительной очистки.

Этап 6. Получение 1-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-2,2,2-трифторэтан-1-она **66**



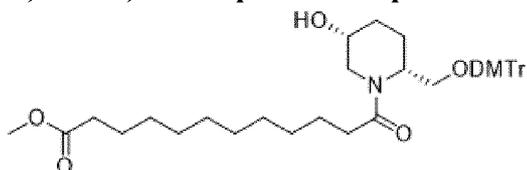
Неочищенный 2,2,2-трифторо-1-((2R,5R)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)пиперидин-1-ил)этан-1-он **65** из предыдущей реакции перемешивали в дихлорметане с триэтиламинем (50 мл) при комнатной температуре. Одной порцией добавили 4,4'-диметокситритилхлорид (DMTrCl) (3,87 г, 11,44 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавили дихлорметаном (50 мл) и последовательно промыли насыщенным NaHCO_3 (2×75 мл), H_2O (2×75 мл) и насыщенным раствором NaCl (2×75 мл). Отделили органический слой, сушили (Na_2SO_4), концентрировали *в вакууме* и очистили с помощью колоночной хроматографии (100% смеси гексанов – 60% EtOAc /смесь гексанов) (0,1% триэтиламин) с получением 1-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-2,2,2-трифторэтан-1-она **66** (3,14 г, 57%)

Этап 7. Получение (3R,6R)-6-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-пиперидин-3-ола **67**



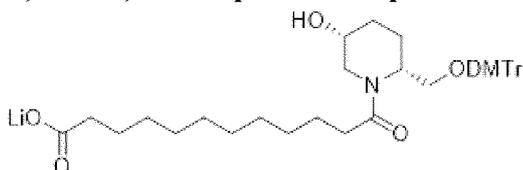
1-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-2,2,2-трифторэтан-1-он **66** (3,14 г, 6,0 ммоль) перемешивали в MeOH (50 мл) при комнатной температуре. Добавили KOH (672 мг, 12 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Добавили дополнительное количество KOH (300 мг, 6 ммоль) и продолжали перемешивание в течение дополнительных 24 ч. Реакционную смесь концентрировали *в вакууме*, растворили в дихлорметане (150 мл), промыли с помощью H_2O (4×50 мл), сушили (Na_2SO_4) и концентрировали *в вакууме* с получением (3R,6R)-6-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)пиперидин-3-ола **67** (2,34 г, 90%), который использовали без дополнительной очистки.

Этап 8. Получение метил-12-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-12-оксодеcanoата **68**



(3R,6R)-6-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)пиперидин-3-ол **67** (2,34 г, 5,34 ммоль) перемешивали в дихлорметане (75 мл) при комнатной температуре. Добавили триэтиламин (2,2 мл, 16,2 ммоль), ГАТУ (3,5 г, 9,2 ммоль) и 12-метокси-12-оксодекановую кислоту (1,32 г, 5,4 ммоль), и перемешивали реакцию смесь при комнатной температуре в течение 3 ч. Образовавшийся твердый осадок удалили фильтрацией, фильтрат концентрировали *in vacuo*, а остаток очистили с помощью колоночной хроматографии (2,5% MeOH/дихлорметан, 0,1% триэтиламин) с получением метил-12-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-12-оксодеканоата **68** с количественным выходом.

Этап 9. Получение лития 12-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-12-оксодеканоата **69**



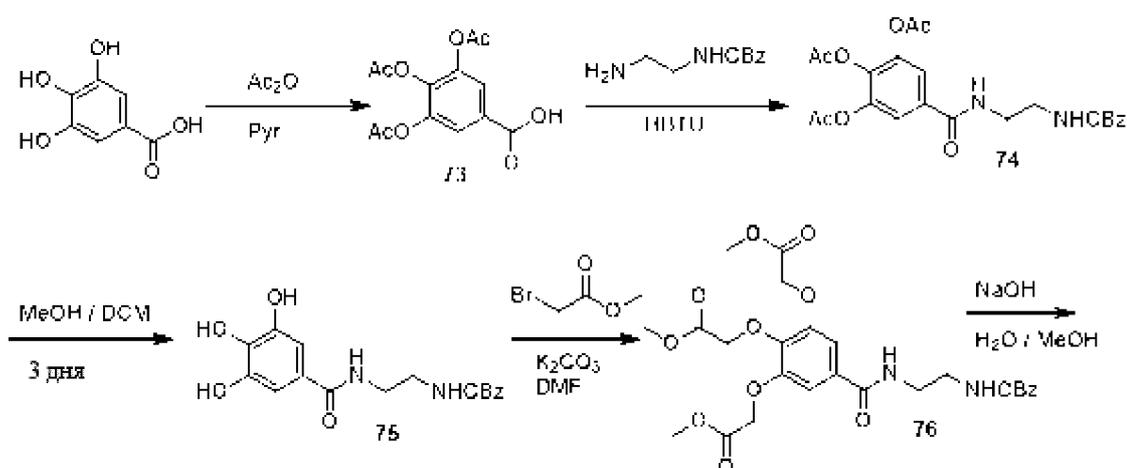
Метил-12-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-12-оксодеканоат **68** (5,4 ммоль) и LiOH (140 мг, 5,94 ммоль) перемешивали в ТГФ:H₂O (1:1, 100 мл) при комнатной температуре в течение 48 ч. Удалили ТГФ *in vacuo*, водный слой заморозили и лиофилизировали с получением лития 12-((2R,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-гидроксипиперидин-1-ил)-12-оксодеканоата **69** (3,2 г, 91%). Который использовали в дальнейших реакциях без дополнительной очистки.

Этап 10. Получение соединений 70, 71, 72 и 59

Соединения **70**, **71**, **72** и **59** получили с использованием методик, идентичных тем, которые использовались для синтеза соединений **47**, **48**, **49** и **43** соответственно.

Пример 8. Синтез конъюгата 142

Схема 17



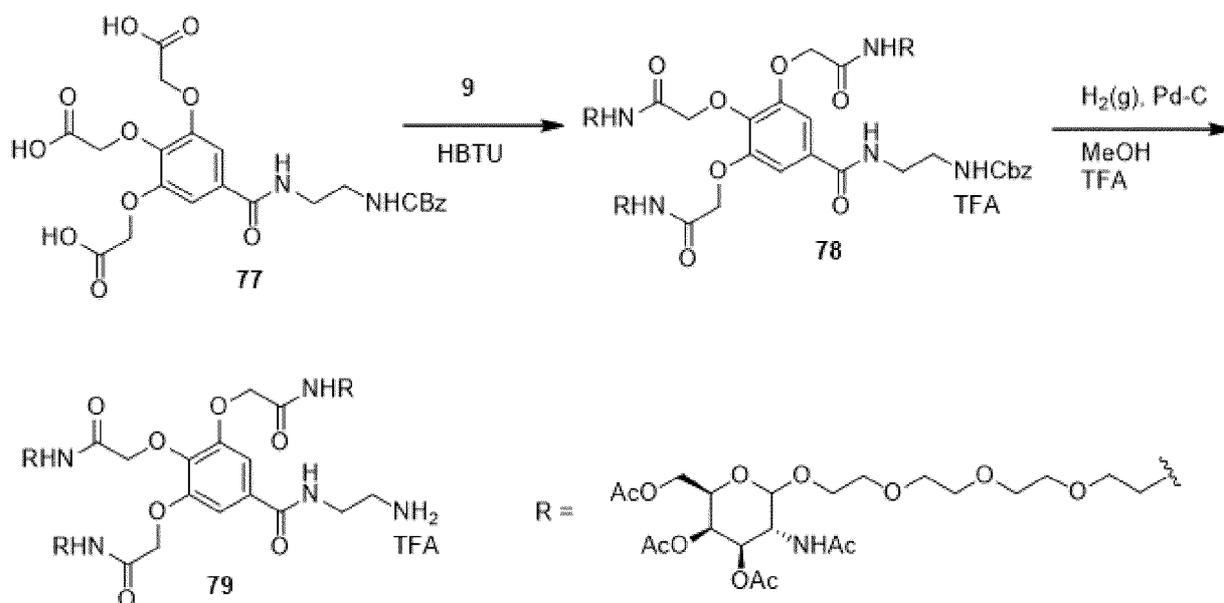
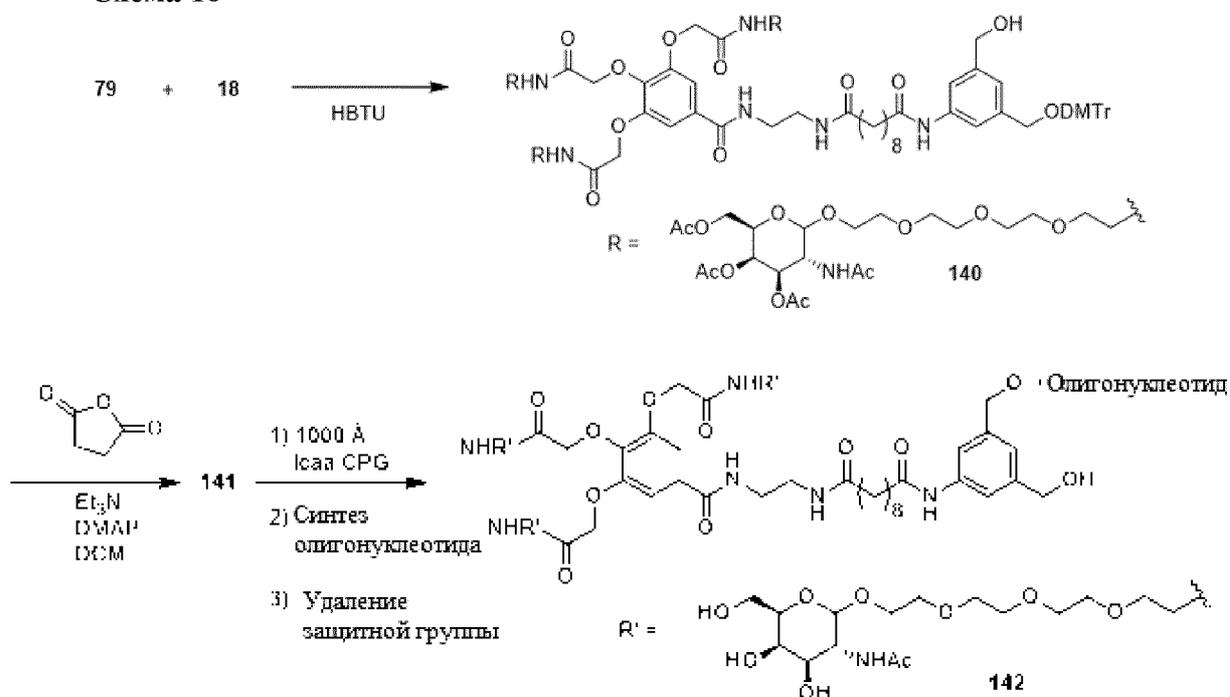


Схема 18



Этап 1. Получение 3,4,5-триацетоксибензойной кислоты 73

К раствору галловой кислоты (20 г) в пиридине (50 мл) добавили уксусный ангидрид (50 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем прилили к ледяной воде (1 л). Раствор подкислили с помощью концентрированной соляной кислоты, в котором после этого образовался бесцветный твердый осадок. Твердое вещество собрали с помощью фильтрации и промыли водой (5×100 мл). Влажное твердое вещество заморозили на жидком азоте и лиофилизировали с получением 3,4,5-триацетоксибензойной кислоты (26 г, 75%).

Этап 2. Получение 5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триил триацетата 74

К раствору 3,4,5-триацетоксибензойной кислоты (10 г, 33,8 ммоль), N-

карбобензоксид-1,2-диаминоэтана гидрохлорида (5,3 г, 33,8 ммоль) и ГБТУ (13,5 г, 35,5 ммоль) в ДМФА (200 мл) добавили диизопропилэтиламин (17,5 мл, 101 ммоль). Раствор перемешивали в течение 16 часов, затем разбавили этилацетатом (250 мл), промыли солевым раствором (3×200 мл), сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали в вакууме досуха. Неочищенный продукт очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: от 1% до 5% MeOH в дихлорметане) с получением 5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триила триацетата в виде твердого вещества почти белого цвета (5,5 г).

Этап 3. Получение 3,4,5-тригидрокси-N-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)бензамида 75

Раствор 5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триил триацетата (5 г, 1,1 ммоль) в 1:1 смеси MeOH/CH₂Cl₂ (100 мл) перемешивали в течение 3 дней при комнатной температуре. После завершения удалили растворитель с получением 3,4,5-тригидрокси-N-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)бензамида в виде бесцветного твердого вещества (4 г, количественно).

Этап 4. Получение триметил-2,2',2''-((5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триил)трис(окси))триацетата 76

Раствор 3,4,5-тригидрокси-N-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)бензамида (4 г, 11,6 ммоль), метилбромацетата (7,7 г, 46,4 ммоль) и карбоната калия (9,6 г, 69,4 ммоль) в ДМФА (100 мл) перемешивали в течение ночи при 60°C. После завершения раствор охладили до комнатной температуры, разбавили этилацетатом (200 мл), промыли водой (200 мл), солевым раствором (3×100 мл), сушили на сульфате магния, отфильтровали и сушили в вакууме досуха. Неочищенный продукт очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: от 2% до 10% MeOH в дихлорметане) с получением триметил-2,2',2''-((5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триил)трис(окси))триацетата в виде твердого вещества бежевого цвета (5 г, 79%).

Этап 5. Получение 2,2',2''-((5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триил)трис(окси))триуксусной кислоты 77

Раствор триметил-2,2',2''-((5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триил)трис(окси))триацетата (5 г, 9,2 ммоль) и 1M NaOH (30 мл) в метаноле (100 мл) перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. После завершения реакцию смесь концентрировали для удаления метанола и разбавили водой (75 мл). Смесь охладили до 0°C, подкислили 2M HCl и экстрагировали этилацетатом (5×150 мл). Объединенные экстракты этилацетата сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали в вакууме досуха с получением 2,2',2''-((5-((2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)этил)карбамоил)бензол-1,2,3-триил)трис(окси))триуксусной кислоты в виде бесцветного твердого вещества (2,3 г, 50%).

Этап 6. Получение соединения 78

Соединение 78 получили из соединений 9 (2,75 г, 4,3 ммоль) и 77 (0,5 г, 0,96

ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **13**. Выход: 600 мг.

Этап 7. Получение соединения **79**

Соединение **79** получили из соединения **78** (0,6 г) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **14**. Выход: 500 мг.

Этап 8. Получение соединения **140**

Соединение **140** получили из соединения **79** (500 мг, 0,25 ммоль) и соединения **18** (175 мг, 0,25 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **19**. Выход: 250 мг, 44%.

Этап 9. Получение соединения **141**

Соединение **141** получили из соединения **140** (250 мг, 0,11 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **20**. Выход: 200 мг.

Этап 10. Получение конъюгата **142**

Конъюгат **142** получили из соединения **141** (200 мг) и 1000A Icaа CPG (1,8 г) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**. Выход: 1,9 г, нанесение CPG 22 мкмоль/г. Полученную твердую подложку в виде CPG с нанесенным GalNAc использовали в автоматизированном синтезе олигонуклеотида с использованием стандартных методик. Путем снятия защитной группы с нуклеотида с последующим удалением его с твердой подложки (с попутным снятием защитной группы с галактозамина ацетата) получили конъюгат GalNAc–олигонуклеотид **142**.

Пример 9. Синтез конъюгата **145**

Схема 19

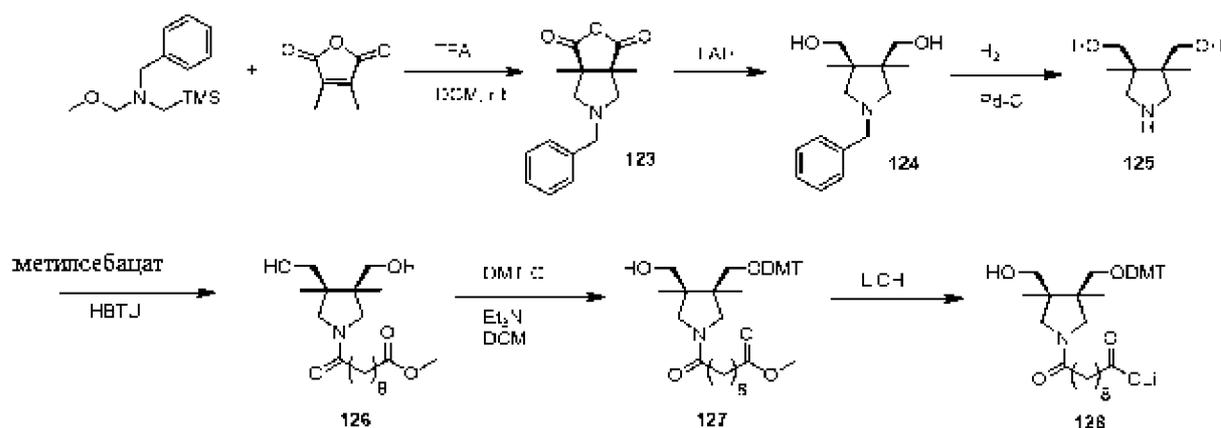
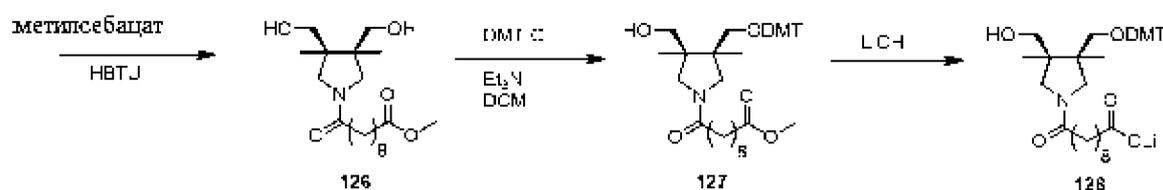
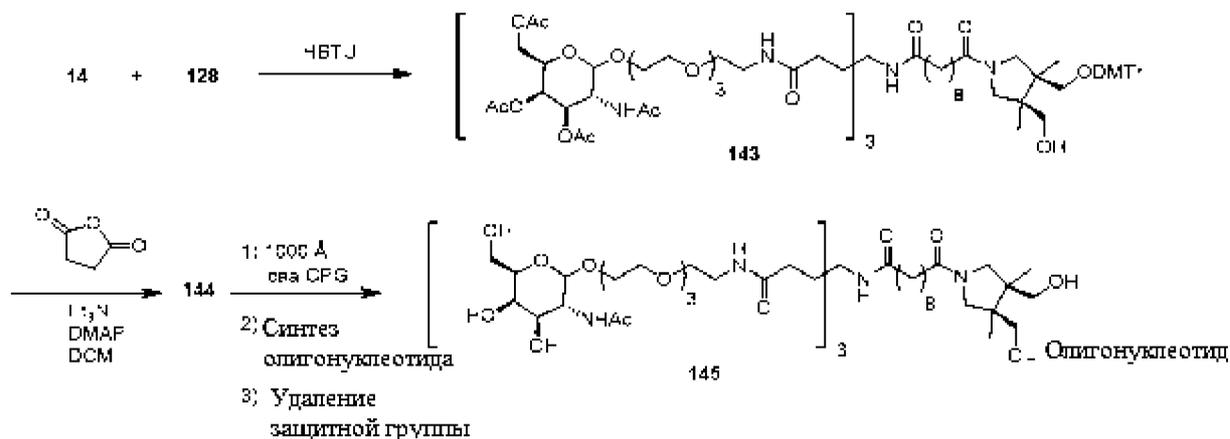


Схема 20





Этап 1. Получение рацемического (цис) 5-бензил-3а,6а-диметилтетрагидро-1Н-фуоро[3,4-с]пиррол-1,3(3аН)-диона 123

К охлажденному раствору (0°C) 3,4-диметилфуран-2,5-диона (3 г, 24 ммоль) и N-бензил-1-метокси-N-((триметилсилил)метил)метанамина (7 г, 29,8 ммоль) в дихлорметане (75 мл) медленно добавили трифторуксусную кислоту (75 мкл). Перемешивали в течение ночи, позволяя раствору медленно нагреться до комнатной температуры при расплавлении льда в водяной бане. Реакционную смесь концентрировали досуха, растворили в этилацетате (100 мл), промыли насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (2×100 мл), сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: от 20% этилацетата в смеси гексанов до 100% этилацетата) привела к получению рацемического (цис) 5-бензил-3а,6а-диметилтетрагидро-1Н-фуоро[3,4-с]пиррол-1,3(3аН)-диона в виде масла желтого цвета (3,5 г, 56%).

Этап 2. Получение рацемического (цис) 1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола 124

К охлажденному (0°C) раствору (3аR,6аS)-5-бензил-3а,6а-диметилтетрагидро-1Н-фуоро[3,4-с]пиррол-1,3(3аН)-диона (3,5 г, 13,4 ммоль) в безводном диэтиловом эфире (50 мл) медленно, тремя порциями, добавили гранулы литийалюминийгидрида (1,5 г, 40 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи, позволяя ему нагреться до комнатной температуры из-за расплавления льда в водяной бане. После завершения реакцию смесь охладили до 0°C и очень медленно погасили с помощью 1,5 мл 5М NaOH, а затем 1,5 мл воды. Перемешивали в течение 30 минут, затем добавили магния сульфат и отфильтровали. Фильтрат концентрировали с получением рацемического (цис) 1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола в виде бесцветного масла (2,7 г).

Этап 3. Получение рацемического (цис) 3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола 125

К раствору ((3R,4S)-1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола (10 г, 40 ммоль) в метаноле (10 мл) добавили 10% влажной палладиевой черни (1 г). Раствор интенсивно перемешивали в атмосфере водорода в течение 16 часов. После завершения реакции раствор отфильтровали через целит и концентрировали досуха с получением

рацемического (цис) 3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола в виде бесцветного твердого вещества (5,5 г, 86%).

Этап 4. Получение рацемического (цис) метил-10-(3,4-бис(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеcanoата 126

Соединение **126** получили из соединения **125** (1,3 г, 8,2 ммоль) и монометилсебацината (1,8 г, 8,2 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **17**. Выход: 1,8 г, 61%.

Этап 5. Получение рацемического (цис) метил-10-3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеcanoата 127

Соединение **127** получили из соединения **126** (1,8 г, 5,0 ммоль) и 4,4'-диметокситритилхлорида (1,7 г, 5,0 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **18**. Выход: 1,4 г, 42%.

Этап 6. Получение рацемического (цис) 10-3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеcanoата лития 128

К раствору соединения **127** (3,0 г, 4,6 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воды (50 мл) добавили гидроксид лития (121 мг, 5,0 ммоль). Раствор перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре, затем концентрировали для удаления ТГФ. Оставшийся водный раствор лиофилизировали в течение ночи с получением твердого вещества бледно-розового цвета (2,9 г, количественный выход).

Этап 7. Получение соединения 143

Соединение **143** получили из соединения **128** (270 мг, 0,42 ммоль) и соединения **14** (800 мг, 0,42 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **19**. Выход: 900 мг, 87%.

Этап 8. Получение соединения 144

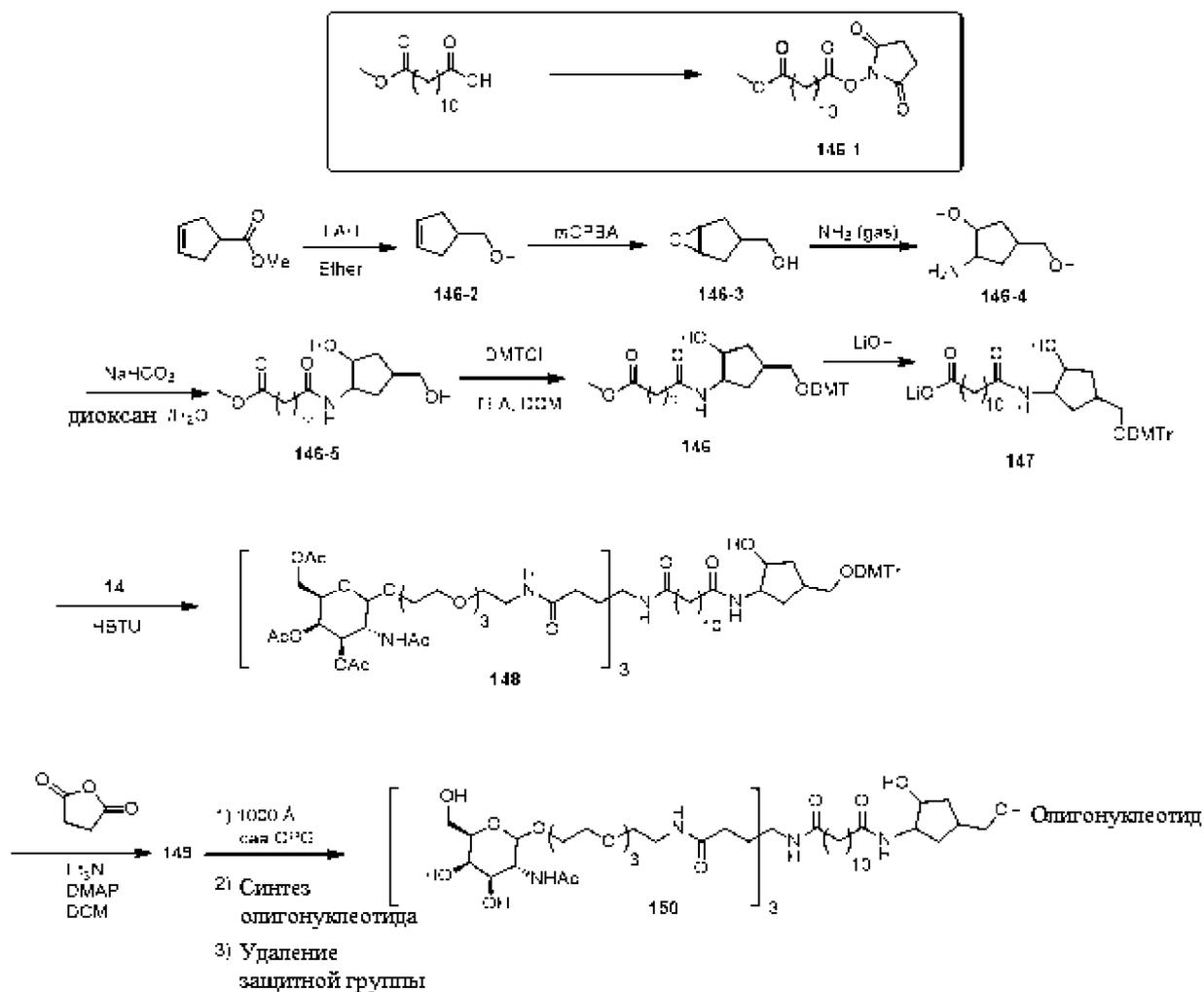
Соединение **144** получили из соединения **143** (500 мг, 0,2 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **20**. Выход: 200 мг.

Этап 9. Получение конъюгата 145

Конъюгат **145** получили из соединения **144** (200 мг) и 1000A Iсаа СРG (1,8 г) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**. Выход: 1,9 г, нанесение СРG 20 мкмоль/г. Полученную твердую подложку в виде СРG с нанесенным GalNAc использовали в автоматизированном синтезе олигонуклеотида с использованием стандартных методик. Путем снятия защитной группы с нуклеотида с последующим удалением его с твердой подложки (с попутным снятием защитной группы с галактозамина ацетата) получили конъюгат GalNAc-олигонуклеотид **145**.

Пример 10. Синтез конъюгата 150

Схема 21



Этап 1. Получение соединения 146–1

К раствору монометилового эфира додекандиовой кислоты (12,2 г, 50,0 ммоль) в дихлорметане (300 мл) добавили N–гидроксисукцинимид (6,10 г, 53,0 ммоль) и 1–этил–3–(3–диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (ЭДК) (10,52 г, 55,0 ммоль). Мутную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего реакционная смесь превратилась в прозрачный раствор. Результаты ТСХ–анализа продемонстрировали, что реакция завершена. Органический слой промыли насыщенным NH_4Cl (300 мл) и соевым раствором (100 мл). Органический слой отделили, сушили над MgSO_4 и концентрировали досуха с получением чистого 1–(2,5–диоксопирролидин–1–ил) 12–метилдодекандиоата **146–1** в виде твердого вещества белого цвета (16,7 г, 97,8%).

Этап 2. Получение циклопент–3–ен–1–илметанола 146–2

К суспензии литийалюминийгидрида (15,2 г, 0,40 моль) в безводном эфире (1 л) при 0°C в атмосфере азота, по каплям, в течение 5 часов добавляли раствор метилциклопент–3–енкарбоксилата (50 г, 0,40 моль) в эфире (300 мл). Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Результаты ТСХ–анализа продемонстрировали, что реакция завершена. Реакционную смесь повторно охладили до 0°C . По каплям добавили насыщенный раствор Na_2SO_4 (32 мл) для гашения реакции. После завершения добавления смесь перемешивали в течение дополнительных 3 часов и

отфильтровали через целитовый тампон. Выпаривание растворителя привело к получению циклопент-3-енилметанола **146-2** (37,3 г, 95%) в виде бесцветной жидкости.

Этап 3. Получение (6-оксабицикло[3.1.0]гексан-3-ил)метанола **146-3**

К раствору циклопент-3-енилметанола **146-2** (4,0 г, 41 ммоль) в дихлорметане (150 мл) при 0°C по порциям добавили 3-хлорпербензойную кислоту (10 г, 45 ммоль, 77% чистоты). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Добавили дихлорметан (150 мл). Органику промыли тиосульфатом натрия (12 г в 10 мл воды), а затем насыщенным NaHCO₃ (40 мл). Данную операцию повторяли до полного вымывания 3-хлорпербензойной кислоты. Органический слой сушили над MgSO₄. Выпаривание растворителя привело к получению смеси *цис*- и *транс*-6-оксабицикло[3.1.0]гексан-3-илметанола **146-3** (2,6 г, 57%) в виде масла желтого цвета. ГХ-МС: m/z 114 (5) (M⁺), 95 (15), 88 (100), 81 (15).

Этап 4. Получение 2-амино-4-(гидроксиметил)циклопентан-1-ола **146-4**

Раствор 6-оксабицикло[3.1.0]гексан-3-илметанола **146-3** (2,0 г, 17,6 ммоль) в метаноле (20 мл) при 0°C продували газообразным аммиаком в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Результаты ТСХ-анализа продемонстрировали, что реакция не завершена. Удалили метанол и добавили NH₃·H₂O (50 мл), после чего перемешивали полученный раствор в течение недели. Результаты ТСХ-анализа подтвердили завершение реакции. Удалили воду путем азеотропной перегонки с этанолом, с получением 2-амино-4-(гидроксиметил)циклопентанола **146-4** (2,1 г, 91%) в виде масла желтого цвета.

Этап 5. Получение метил-12-(2-гидрокси-4-(гидроксиметил)циклопентиламино)-12-оксодеканоеата **146-5**

Соединение **146-5** получили из 2-амино-4-(гидроксиметил)циклопентанола **146-4** и 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-12-метилдодекандиоата **146-1**, с использованием методики, идентичной той, которая дана в описании синтеза 12-(2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этиламино)-12-оксодеканоеата (3-2). Метил-12-(2-гидрокси-4-(гидроксиметил)циклопентиламино)-12-оксодеканоеат **146-5** получили с выходом 87,4% в виде твердого вещества почти белого цвета.

Этап 6. Получение соединения **147**

Соединение **147** количественно получили из соединения **146** (1,4 г, 2,33 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **18**.

Этап 7. Получение соединения **148**

Соединение **148** получили из соединения **147** (150 мг, 0,23 ммоль) и соединения **14** (431 мг, 0,23 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **19**. Выход: 460 мг, 84%.

Этап 8. Получение соединения **149**

Соединение **149** получили из соединения **148** (460 мг, 0,19 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения

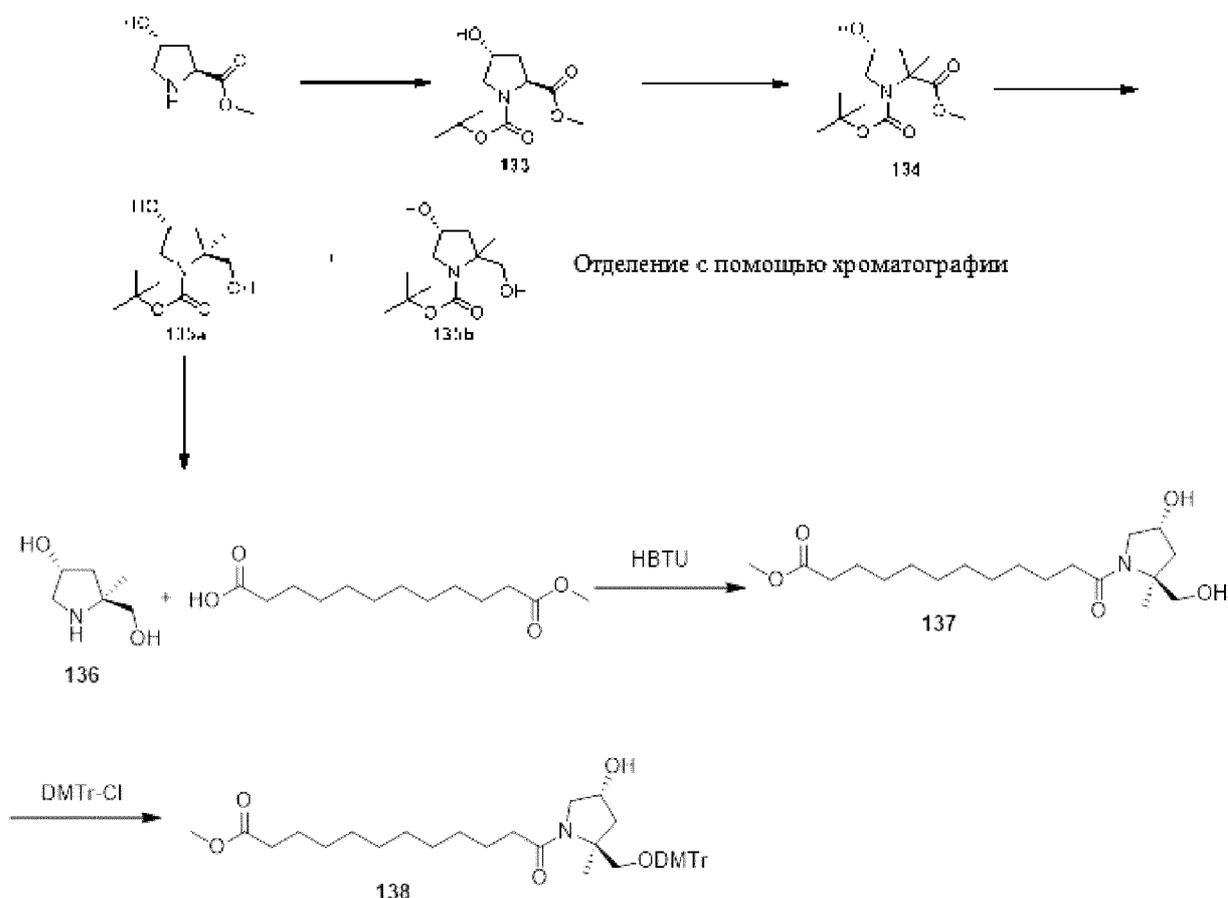
соединения **20**. Выход: 436 мг, 91%.

Этап 9. Получение конъюгата **150**

Соединение **150** получили из соединения **149** (436 мг) и 1000A Icaa CPG (2,62 г) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**. Выход: 2,7 г, нанесение CPG 21,3 мкмоль/г. Полученную твердую подложку в виде CPG с нанесенным GalNAc использовали в автоматизированном синтезе олигонуклеотида с использованием стандартных методик. Путем снятия защитной группы с нуклеотида с последующим удалением его с твердой подложки (с попутным снятием защитной группы с галактозамина ацетата) получили конъюгат GalNAc–олигонуклеотид **150**.

Пример 11. Синтез конъюгатов **153, 158, 163, 168 и 173**

Схема 22



Этап 1. Получение 1-(трет-бутил)-2-метил (2S,4R)-4-гидроксипирролидин-1,2-дикарбоксилата (**133**)

Метил-(2S,4R)-4-гидроксипирролидин-2-карбоксилат (25,9 г, 46 ммоль), ангидрид ди-трет-бутилдикарбоната (65,9 г, 302,5 ммоль) и ТЭА (триэтаноламин) (42 мл, 302,5 ммоль) перемешивали в дихлорметане в течение 16 ч. Органический слой последовательно промыли с помощью 1М HCl (x2), насыщенного NaHCO₃ (x2), H₂O и солевого раствора, высушили и концентрировали в вакууме с получением 1-(трет-бутил)-2-метил-(2S,4R)-4-гидроксипирролидин-1,2-дикарбоксилата (**133**) (58,1 г, 85%).

Этап 2. Получение 1-(трет-бутил)-2-метил (4R)-4-гидрокси-2-метилпирролидин-1,2-дикарбоксилата (134)

1-(трет-бутил)-2-метил-(2S,4R)-4-гидрокси-пирролидин-1,2-дикарбоксилат (**133**) (5 г, 20,4 ммоль) и MeI (12 г, 84,5 ммоль) перемешивали в безводном ТГФ при -40°C . По каплям добавили диизопропиламид лития (2,0М раствор в ТГФ) (37,5 мл, 75 ммоль). Реакционной смеси позволили нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 4 ч, затем погасили насыщенным NH_4Cl . Реакционную смесь экстрагировали с помощью EtOAc, промыли H_2O и соевым раствором, сушили (Na_2SO_4) и концентрировали *в вакууме*. Остаток очистили с помощью колоночной хроматографии (50:50 EtOAc//смесь гексанов) с получением 1-(трет-бутил)-2-метил-(4R)-4-гидрокси-2-метилпирролидин-1,2-дикарбоксилата (**134**) в виде рацемической смеси (3,6 г, 68%)

Этап 3. Получение трет-бутил-(2S,4R)-4-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпирролидин-1-карбоксилата (135a)

1-(трет-бутил)-2-метил-(4R)-4-гидрокси-2-метилпирролидин-1,2-дикарбоксилат (**134**) (19 г, 73,5 ммоль) перемешивали в безводном ТГФ в атмосфере N_2 . По каплям добавили раствор LiBH_4 (48 мл, 96 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Реакцию погасили с помощью 1М NaOH, удалили ТГФ *в вакууме*, а остаток экстрагировали с помощью EtOAc (4×100 мл). Органический слой промыли H_2O и соевым раствором, сушили (Na_2SO_4) и концентрировали *в вакууме*. Остаток очистили с помощью колоночной хроматографии (5% MeOH/дихлорметан) с получением трет-бутил-(2S,4R)-4-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпирролидин-1-карбоксилата (**135a**) в качестве основного продукта (8 г, 47%). Структуру присвоили на основании литературных данных.

Этап 4. Получение (3R,5S)-5-(гидроксиметил)-5-метилпирролидин-3-ола гидрохлорида (136)

трет-Бутил-(2S,4R)-4-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпирролидин-1-карбоксилат (**135a**) (8 г, 34,6 ммоль) перемешивали в EtOAc при комнатной температуре и продували газообразным HCl в течение приблизительно двух минут. Реакционную смесь перемешивали в течение одного часа, затем концентрировали *в вакууме* и высушили при глубоком вакууме с получением (3R,5S)-5-(гидроксиметил)-5-метилпирролидин-3-ола гидрохлорида (**136**) с количественным выходом.

Этап 5. Получение метил-12-((2S,4R)-4-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпирролидин-1-ил)-12-оксодеканата (137)

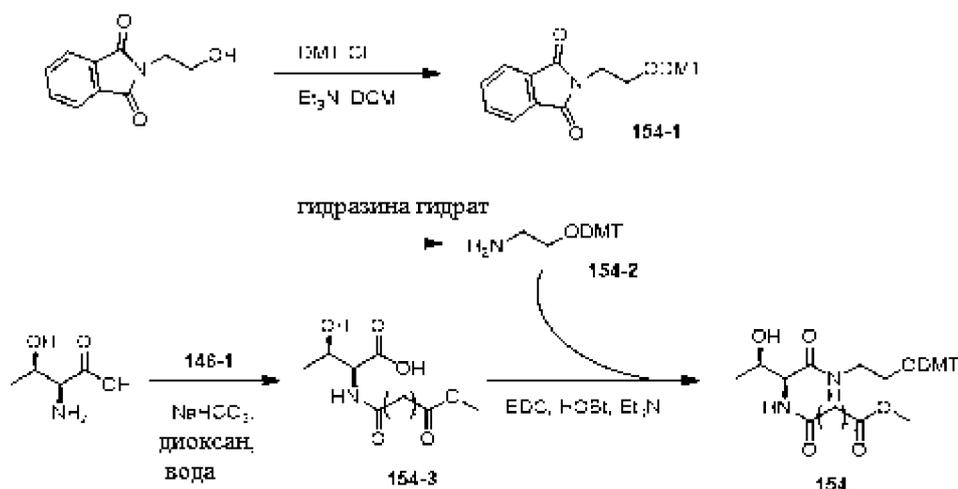
(3R,5S)-5-(гидроксиметил)-5-метилпирролидин-3-ола гидрохлорид (**136**) (7,9 г, 47,4 ммоль), 12-метокси-12-оксодекановую кислоту (11,5 г, 47,4 ммоль), ГБТУ (36 г, 76 ммоль) и ТЭА (20 мл, 142,2 ммоль) перемешивали в дихлорметане при комнатной температуре в течение 16 ч. Осадок удалили фильтрацией, а органический слой промыли с помощью 1М HCl (x2), насыщенного NaHCO_3 (x2), H_2O и солевого раствора. После осушения органический слой концентрировали *в вакууме* и очистили с помощью колоночной хроматографии (5%MeOH/дихлорметан) с получением метил-12-((2S,4R)-4-

гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпирролидин-1-ил)-12-оксодеcanoата (**137**) (3,1 г, 18,3%).

Этап 6. Получение метил-12-((2S,4R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокси-2-метилпирролидин-1-ил)-12-оксодеcanoата **138**

Метил-12-((2S,4R)-4-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпирролидин-1-ил)-12-оксодеcanoат (**137**) (3,1 г, 9,0 ммоль), DMTГ-Cl (2,8 г, 8,2 ммоль) и ТЭА (1,1 мл, 8,2 ммоль) перемешивали в дихлорметане при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очистили с помощью колоночной хроматографии (5% MeOH/ДХМ, 0,1% ТЭА) с получением метил-12-((2S,4R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокси-2-метилпирролидин-1-ил)-12-оксодеcanoата (**138**) (2,7 г, 45,5 ммоль).

Схема 23



Этап 7. Получение соединения **154-1**

К раствору N-(2-гидроксиэтил)фталимида (4,80 г, 25,0 ммоль) и 4,4'-диметокситритилхлорида (8,8 г, 26,0 ммоль) в дихлорметане (200 мл) при 0°C, в атмосфере азота, по каплям добавили триэтиламин (10,4 мл, 74,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Результаты ТСХ-анализа продемонстрировали завершение реакции. Органический экстракт промыли соевым раствором (100 мл), сушили над MgSO₄ и концентрировали досуха. Полученное вещество напрямую, без очистки, использовали в следующей реакции.

Этап 8. Получение соединения **154-2**

2-(2-(Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этил)изоиндолин-1,3-дион (**154-1**), полученный выше, и гидразина моногидрат (3,6 мл, 74 ммоль) в этаноле (100 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Результаты ТСХ-анализа продемонстрировали, что реакция завершена. Осадок отфильтровали. Фильтрат выпарили. Остаток растворили в этилацетате (100 мл). Органический раствор промыли 10% NaOH, водой и соевым раствором и сушили над MgSO₄. Выпарив растворитель, получили 2-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этанамин (**154-2**) в виде жидкости желтого цвета

(8,11 г, выход составил 89,3% в две стадии). Полученное вещество напрямую, без очистки, использовали в следующей реакции.

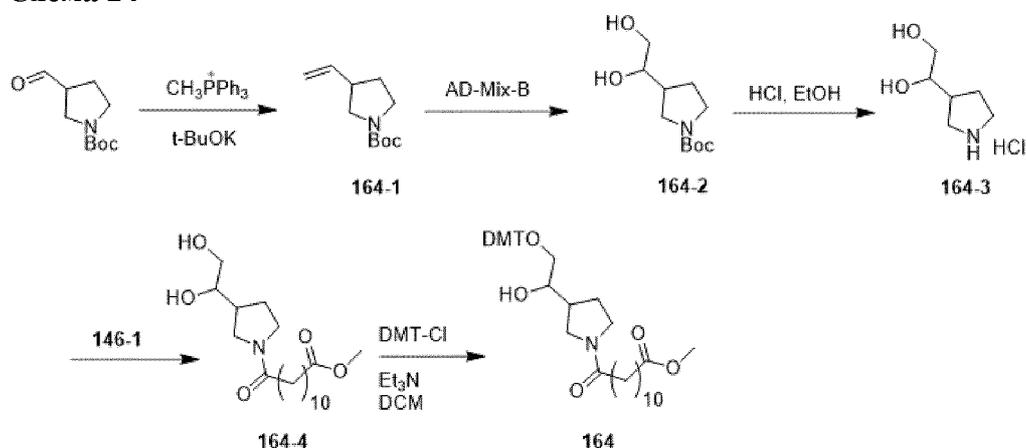
Этап 9. Получение соединения 154–3

К раствору L-треонина (1,19 г, 10,0 ммоль) и NaHCO_3 (2,3 г, 27 ммоль) в воде (20 мл) и диоксане (10 мл), добавили по каплям 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-12-метилдодекандиоат **146–1** (3,1 г, 9,1 ммоль) в диоксане (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавили 4N HCl (10 мл). Осадок собрали с помощью фильтрации и промыли водой (3×10 мл). Твердое вещество сушили в эксикаторе над P_2O_5 с получением (2S,3R)-3-гидрокси-2-(12-метокси-12-оксододеканамидо)бутановой кислоты **154–3** в виде твердого вещества почти белого цвета (2,84 г, 82,2%). ЖХ-МС (ионизация электрораспылением): m/z: 346 (100), $(\text{M}+\text{H}^+)$.

Этап 10. Получение соединения 154

(2S,3R)-3-гидрокси-2-(12-метокси-12-оксододеканамидо)бутановую кислоту **154–3** (2,47 г, 7,15 ммоль), 2-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этанамин **154–2** (2,60 г, 7,15 ммоль), ЭДК (1,64 г, 8,58 ммоль), 1-гидроксибензотриазол (ГОБт) (1,16 г, 8,58 ммоль) и ТЭА (2,4 мл, 17,2 ммоль) перемешивали в дихлорметане (72 мл) при комнатной температуре в течение 2 часов. Добавили воду (30 мл). Органический слой отделили и промыли солевым раствором (2×30 мл). После выпаривания растворителя выполнили очистку с помощью колоночной хроматографии (30% этилацетат/смесь гексанов – 50% этилацетат/смесь гексанов) с получением метил-12-((2S,3R)-1-(2-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)этиламино)-3-гидрокси-1-оксобутан-2-иламино)-12-оксододеканоата **154** в виде воскоподобного мягкого вещества желтого цвета (2,60 г, 52,6%). Спектр ЯМР на ядрах ^1H : (400 МГц, ацетон-d₆, ppm): δ 7,51 (t, J=5,5 Гц, 1H), 7,45–7,49 (m, 2H), 7,28–7,36 (m, 6H), 7,21 (tt, J=7,2, 1,2 Гц, 1H), 7,08 (d, J=8,1 Гц, 1H), 6,88 (dt, J=8,9, 2,5 Гц, 4H), 4,39 (dd, J=8,2, 3,0 Гц, 1H), 4,20–4,27 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,60 (s, 1H), 3,35–3,52 (m, 2H), 3,07–3,16 (m, 2H), 2,23–2,37 (m, 4H), 1,53–1,65 (m, 4H), 1,23–1,36 (m, 12H), 1,10 (d, J=6,4 Гц, 3H).

Схема 24



Этап 11. Получение соединения 164–1

К суспензии калия трет-бутоксиды (14,6 г, 130 ммоль) в ТГФ (120 мл)/эфир (360

мл) добавили метилтрифенилфосфония бромид (46,6 г, 130 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов, затем охладили до 0°C. По каплям добавили *трет*-бутил-2-формилпирролидин-1-карбоксилат (13,0 г, 65,2 ммоль) в эфире (50 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C и затем погасили добавлением воды (250 мл). Органический слой отделили, а водный слой экстрагировали эфиром (250 мл). Объединенный экстракт сушили над MgSO₄. Выпариванием растворителя с последующей очисткой с помощью колоночной хроматографии (5% этилацетат/смесь гексанов) получили *трет*-бутил-3-винилпирролидин-1-карбоксилат **164-1** (11,5 г, 89,4%) в виде бесцветной жидкости. ГХ-МС: m/z: m/z 197 (2) (M⁺), 141 (40), 124 (30), 57 (100).

Этап 12. Получение соединения 164-2

К смеси *t*-BuOH (140 мл) и воды (70 мл) добавили AD-mix-β (47,4 г) и метансульфонамид (2,89 г, 30,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и затем охладили до 0°C. Добавили *трет*-бутил-3-винилпирролидин-1-карбоксилат **164-1** (6,00 г, 30,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь охладили до 0°C. Добавили натрия тиосульфат пентагидрат (96 г, 387 ммоль) и позволили нагреться до комнатной температуры. Добавили воду (700 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (500 мл). Экстракт промыли водой (2×50 мл) и солевым раствором (50 мл), затем сушили над MgSO₄. Выпариванием растворителя с последующей очисткой с помощью колоночной хроматографии (2% метанол/дихлорметан – 7% метанол/дихлорметан) получили *трет*-бутил-3-(1,2-дигидроксиэтил)пирролидин-1-карбоксилат **164-2** (5,4 г, 77%) в виде масла светло-коричневого цвета.

Этап 13. Получение соединения 164-3

К раствору *трет*-бутил-3-(1,2-дигидроксиэтил)пирролидин-1-карбоксилата **164-2** (3,1 г, 13,4 ммоль) в этаноле (10 мл) добавили 3N HCl (30 мл, 90 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Результаты ТСХ-анализа продемонстрировали, что реакция завершена. Выпарили этанол. Добавили толуол и выпарили. Данную операцию повторили трижды с получением 1-(пирролидин-3-ил)этан-1,2-диола гидрохлорида **164-3** (2,0 г, 89%) в виде масла коричневого цвета. ЖХ-МС (ионизация электрораспылением): m/z: 132 (100), (M+H⁺, свободный амин).

Стадия 14 Получение соединения 164-4

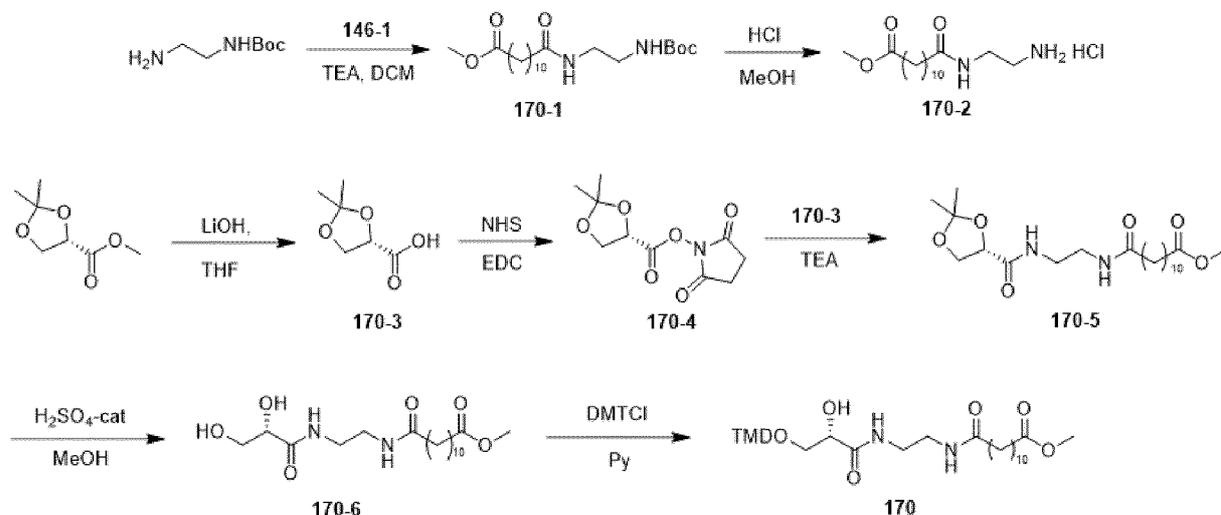
К раствору 1-(пирролидин-3-ил)этан-1,2-диола гидрохлорида **164-3** (2,0 г, 12 ммоль) в воде (30 мл) по порциям добавили NaHCO₃ (3,7 г, 44 ммоль). Добавили диоксан (20 мл). К вышеуказанному раствору добавили 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-12-метилдодекандиоат **146-1** (3,7 г, 11 ммоль) в диоксане (30 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Полученную в результате смесь экстрагировали этилацетатом (3×100 мл). Объединенный экстракт промыли с помощью 0,5N HCl (50 мл) и солевого раствора (50 мл), затем сушили над MgSO₄.

Этап 15. Получение соединения 164

Данное вещество получили из метил-12-(3-(1,2-дигидроксиэтил)пирролидин-1-

ил)–12–оксододеканоата **164–4** и 4,4–диметокситритилхлорида (1 экв.) с использованием методики, идентичной той, которая приведена в описании синтеза 2–(2–(бис(4–метоксифенил)(фенил)метокси)этил)изоиндолин–1,3–диона **138**. Продукт очистили с помощью колоночной хроматографии (1,5% метанол/дихлорметан). Получили метил–12–(3–(2–(бис(4–метоксифенил)(фенил)метокси)–1–гидроксиэтил)пирролидин–1–ил)–12–оксододеканоат **164** с выходом 51%, в виде масла желтого цвета. Спектр ЯМР на ядрах ^1H : (400 МГц, ацетон– d_6 , ppm): δ 7,49–7,54 (m, 2H), 7,35–7,40 (m, 4H), 7,28–7,34 (m, 2H), 7,19–7,25 (m, 1H), 6,86–6,91 (m, 4H), 4,11–4,20 (m, 1H), 3,79 (s, 6H), 3,68–3,77 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,29–3,59 (m, 3H), 3,06–3,20 (m, 3H), 2,33–2,55 (m, 1H), 2,29 (t, $J=7,4$ Гц, 2H), 2,19 (t, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,65–2,0 (m, 2H), 1,51–1,62 (m, 4H), 1,26–1,35 (m, 12H).

Схема 25



Этап 16. Получение соединения 170–1

К раствору *tert*-бутил–2–аминоэтилкарбамата (2,88 г, 18,0 ммоль) и триэтиламина (2,98 г, 29,4 ммоль) в дихлорметане (100 мл), по каплям, при комнатной температуре добавили 1–(2,5–диоксипирролидин–1–ил)–12–метилдодекандиоат (**146–1**) (5,09 г, 14,9 ммоль) в дихлорметане (50 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Результаты ТСХ–анализа продемонстрировали завершение реакции. Добавили 100 мл солевого раствора и отделили органический слой. Органический слой промыли с помощью 0,5н HCl (150 мл) и солевого раствора (2 x 100 мл), затем сушили над MgSO_4 . Выпариванием растворителя получили чистый метил–12–(2–(*tert*-бутоксикарбониламино)этиламино)–12–оксододеканоат **170–1** (5,85 г 100%) в виде твердого вещества белого цвета.

Этап 17. Получение соединения 170–2

К раствору 12–(2–(*tert*-бутоксикарбониламино)этиламино)–12–оксододеканоата **170–1** (5,55 г, 14,4 ммоль) в метаноле (100 мл) при 0°C по каплям добавили тионилхлорид (3,3 мл, 45,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Результаты ТСХ–анализа продемонстрировали, что реакция завершена. Выпарили растворитель и летучие органические вещества. Затем остаток дважды совместно выпаривали со смесью гептанов с получением метил–12–(2–аминоэтиламино)–

12-оксодедеканоата гидрохлорида **170-2** с количественным выходом, в виде твердого вещества белого цвета. ЖХ-МС (ионизация электрораспылением): m/z : 287 (100), ($M+H^+$, свободный амин).

Этап 18. Получение соединения 170-3

(-)-Метил-(S)-2,2-диметил-1,3-диоксан-4-карбоксилат (5,01 г, 31,2 ммоль) и $LiOH \cdot H_2O$ (2,55 г, 60,8 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воде (50 мл) перемешивали в течение ночи. Результаты ТСХ-анализа продемонстрировали, что реакция завершена. Выпарили ТГФ, а водный слой подкислили с помощью 1N HCl до pH=1. Полученный в результате раствор экстрагировали этилацетатом (5×50 мл). Объединенный экстракт сушили над $MgSO_4$. Выпариванием растворителя получили (S)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-карбоновую кислоту **170-3** (2,93 г, 64,3%) в виде жидкости светло-желтого цвета.

Этап 19. Получение соединения 170-4

Соединение **170-4** синтезировали из (S)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-карбоновой кислоты **170-3** и N-гидроксисукцинимидом с выходом 86%, с использованием методики, идентичной той, которая приведена в описании синтеза 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-12-метилдодекандиоата **146-1**. (S)-2,5-Диоксопирролидин-1-ил-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-карбоксилат **170-4** получили с выходом 86% в виде твердого вещества белого цвета.

Этап 20. Получение соединения 170-5

К суспензии метил-12-(2-аминоэтиламино)-12-оксодедеканоата гидрохлорида **170-2** (14,4 ммоль) и (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-карбоксилата **170-4** (3,80 г, 15,6 ммоль) в дихлорметане (100 мл) добавляли триэтиламин (6 мл, 43,0 ммоль) в дихлорметане (25 мл) в течение 4 часов при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Результаты анализа с помощью ЖХ-МС продемонстрировали полную конверсию исходного материала **170-2**. Органический слой промыли солевым раствором (50 мл), 1N HCl (50 мл), солевым раствором (50 мл), сушили над $MgSO_4$ и концентрировали досуха с получением (S)-метил-12-(2-(2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-карбоксамидо)этиламино)-12-оксодедеканоата **170-5** (5,93 г, 99,3%) в виде твердого вещества белого цвета.

Этап 21. Получение соединения 170-6

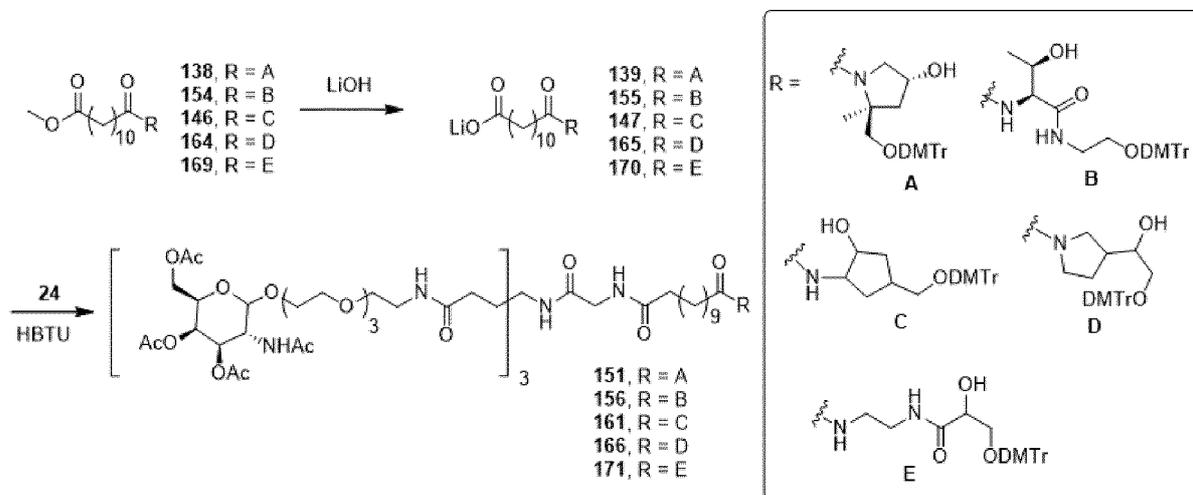
К раствору (S)-метил-12-(2-(2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-карбоксамидо)этиламино)-12-оксодедеканоата **170-5** (5,93 г, 14,3 ммоль) добавили одну каплю концентрированной серной кислоты. Полученный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 6 часов, после чего охладили до комнатной температуры. Твердое вещество собрали с помощью фильтрации и дважды промыли метанолом. Твердое вещество высушили на воздухе (3,32 г). Из маточного раствора получили вторую порцию вещества (0,42 г) с получением (S)-метил-12-(2-(2,3-дигидроксипропанамидо)этиламино)-12-оксодедеканоата **170-6** (3,74 г в целом, 69,4%) в виде кристаллов белого цвета. ЖХ-МС (ионизация электрораспылением): m/z : 375 (100), ($M+H^+$). Спектр ЯМР на ядрах 1H : (400 МГц, $DMSO-d_6$, ppm): δ 7,79 (br, 2H), 5,49 (d, J=5,3

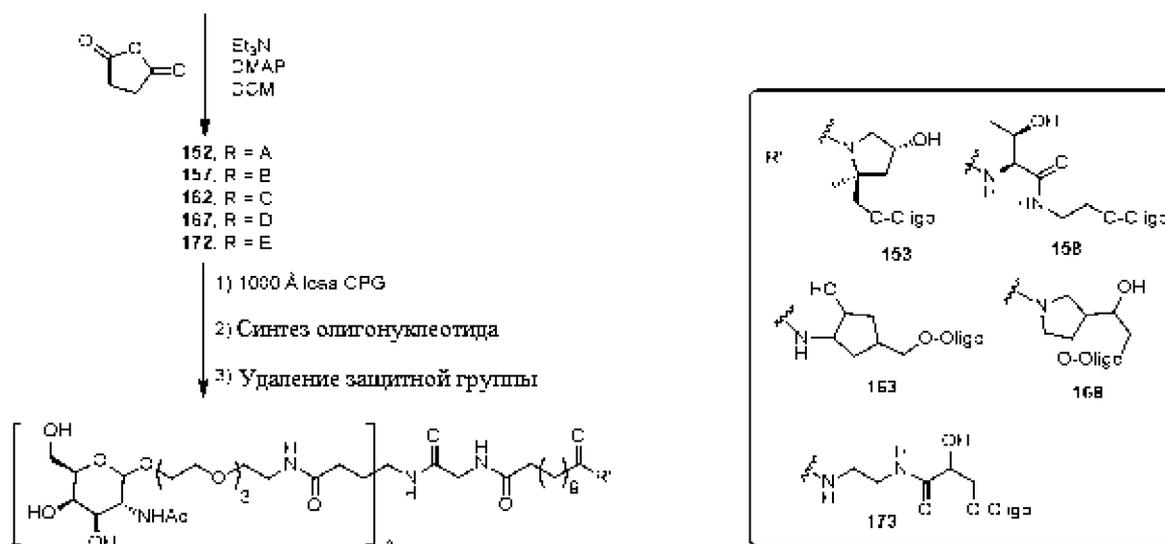
Гц, 1H), 4,66 (t, J=5,8 Гц, 1H), 3,83–3,88 (m, 1H), 3,55–3,61 (m, 4H), 3,41–3,47 (m, 1H), 3,05–3,15 (m, 4H), 2,29 (t, J=7,4 Гц, 2H), 2,03 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,42–1,52 (m, 4H), 1,18–1,29 (m, 12H).

Этап 22. Получение соединения 170

К раствору (S)-метил-12-(2-(2,3-дигидроксипропанамидо)этиламино)-12-оксододеканоата **170-6** (2,99 г, 7,99 ммоль) в сухом пиридине (57,5 мл), в атмосфере азота одной порцией добавили 4,4'-диметокситритилхлорид (2,84 г, 8,38 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение двух дней. Для погашения реакции добавили метанол (5 мл). Выпарили пиридин. Добавили толуол и выпарили. Данную операцию повторили трижды. Добавили воду (100 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (5 x 250 мл). Экстракты объединили и сушили над MgSO₄. Выпариванием растворителя с последующей очисткой с помощью колоночной хроматографии (1% метанол/дихлорметан – 3% метанол/дихлорметан) получили (S)-метил-12-(2-(3-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)-2-гидроксипропанамидо)этиламино)-12-оксододеканоат **170** (1,70 г, 31,4%) в виде вязкого масла. Спектр ЯМР на ядрах ¹H: (400 МГц, ацетон-d₆, ppm): δ 7,64–7,70 (br, 1H), 7,47–7,51 (m, 2H), 7,33–7,37 (m, 4H), 7,26–7,32 (m, 2H), 7,20 (dt, J=7,3, 2,1 Гц, 1H), 7,11 (br, 1H), 6,86 (d, J=8,7 Гц, 4H), 4,84 (br, 1H), 4,21 (dd, J=5,1, 3,8 Гц, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,60 (s, 1H), 3,25–3,42 (m, 6H), 2,28 (t, J=7,4 Гц, 2H), 1,48–1,62 (m, 4H), 1,21–1,34 (m, 12H).

Схема 26





Этап 23. Получение соединений 139, 155, 160, 165 и 170

Соединения **139, 155, 160, 165** и **170** получили из соединений **138, 154, 159, 164** и **169** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **18**.

Этап 24. Получение конъюгатов 153, 158, 163, 168 и 173

Конъюгаты **153, 158, 163, 168** и **173** получили из соединений **139, 154, 159, 164** и **169** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 12. Синтез конъюгата 176

Схема 27

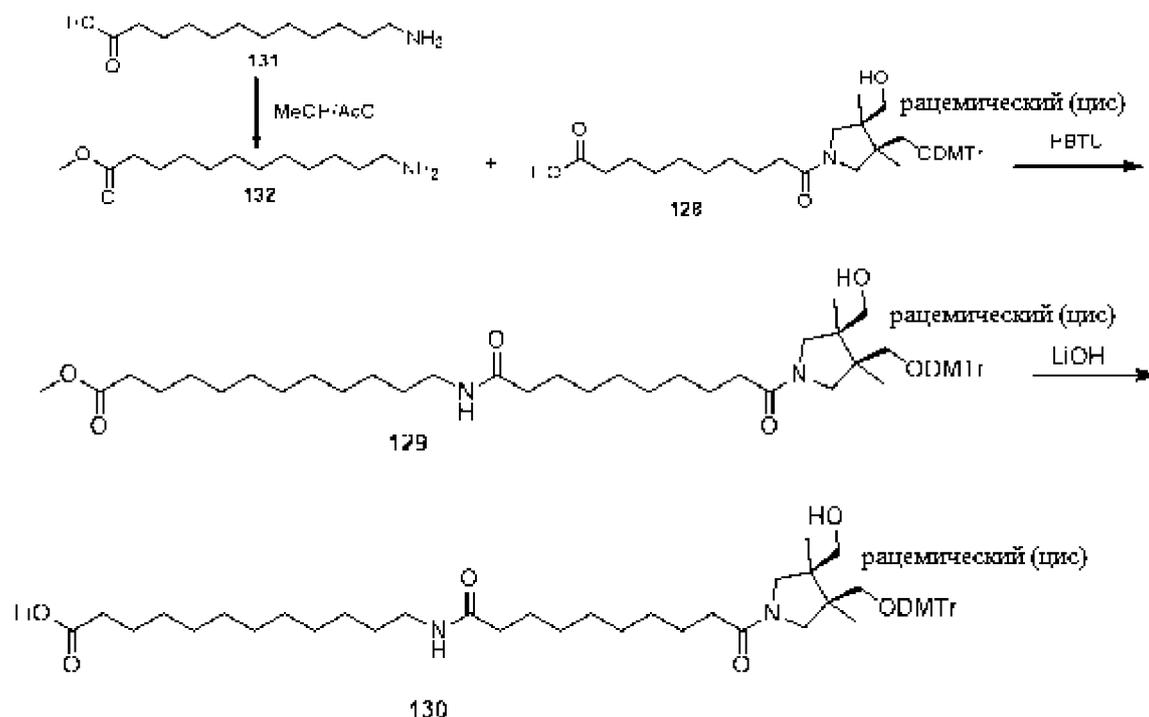
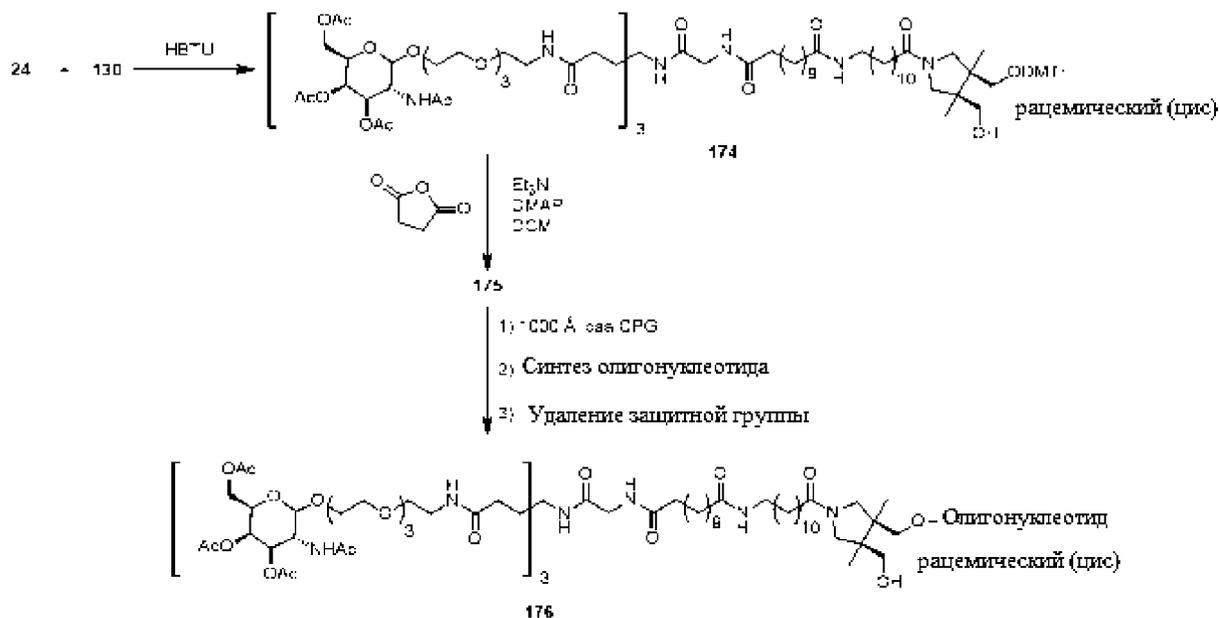


Схема 28



Этап. 1. Получение метил–12–аминододеканоата 132

12–аминоундекановую кислоту (**131**) (10 г, 4,64 ммоль) перемешали в MeOH при комнатной температуре. По каплям добавили ацетилхлорид (856 мкл, 12 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 ч. Удалили растворитель *in vacuo*, остаток растворили в МТБЭ (трет–бутилметилловый эфир) и охлаждали в холодильнике в течение ночи. Полученный осадок собрали с помощью фильтрации, промыли ледяным МТБЭ и высушили при глубоком вакууме с получением метил–12–аминододеканоата **132**.

Этап 2. Получение рацемического (цис) метил–12–(12–(10–(3–((бис(4–метоксифенил)–(фенил)метокси)метил)–4–(гидроксиметил)–3,4–диметилпирролидин–1–ил)–10–оксодеканоамидо)додеканоата 129

Рацемический (цис) 10–(3–((бис(4–метоксифенил)–(фенил)метокси)метил)–4–(гидроксиметил)–3,4–диметилпирролидин–1–ил)–10–оксодеканоат лития (**128**) (2 г, 3,1 ммоль), метил–12–аминододеканоат (**132**) (778 мг, 3,1 ммоль), ГБТУ (1,2 г, 3,1 ммоль) и ТЭА (1,4 мл, 10 ммоль) перемешивали в ДХМ (дихлорметан) при комнатной температуре в течение ночи. Остаток удалили с помощью фильтрации, фильтрат концентрировали *in vacuo*, а остаток очистили с помощью колоночной хроматографии (5% MeOH, ДХМ). ТСХ–анализ продемонстрировал два близких пятна с идентичной массой, которые отнесли к геометрическим изомерам и объединили вместе с получением метил–12–(12–(10–((3R,4S)–3–((бис(4–метоксифенил)–(фенил)метокси)метил)–4–(гидроксиметил)–3,4–диметилпирролидин–1–ил)–10–оксодеканоамидо)додеканоата (**129**) с количественным выходом.

Этап 3. Получение рацемического (цис) 12–(12–(10–(3–((бис(4–метоксифенил)–(фенил)метокси)метил)–4–(гидроксиметил)–3,4–диметилпирролидин–1–ил)–10–оксодеканоамидо)додеканоата лития 130

Рацемический (цис) метил–12–(12–(10–(3–((бис(4–метоксифенил)–(фенил)метокси)метил)–4–(гидроксиметил)–3,4–диметилпирролидин–1–

ил)–10–оксодеканамидо)додеканамидо)додеканоат (**129**) (3,1 ммоль) перемешивали в ТГФ:Н₂O (50:50) с LiOH (88 мг, 3,7 ммоль) при комнатной температуре в течение ночи. Завершение реакции подтвердили с помощью ТСХ, после чего удалили ТГФ *в вакууме*. Водный раствор заморозили в жидком N₂ и лиофилизировали в течение 48 часов с получением рацемического (цис) 12–(12–(10–(3–((бис(4–метоксифенил)(фенил)метокси)метил)–4–(гидроксиметил)–3,4–диметилпирролидин–1–ил)–10–оксодеканамидо)додеканамидо)додеканоата лития **130** с количественным выходом.

Этап 4. Получение конъюгата 176

Конъюгат **176** получили из соединений **24** и **130** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 13. Синтез конъюгата 179

Схема 29

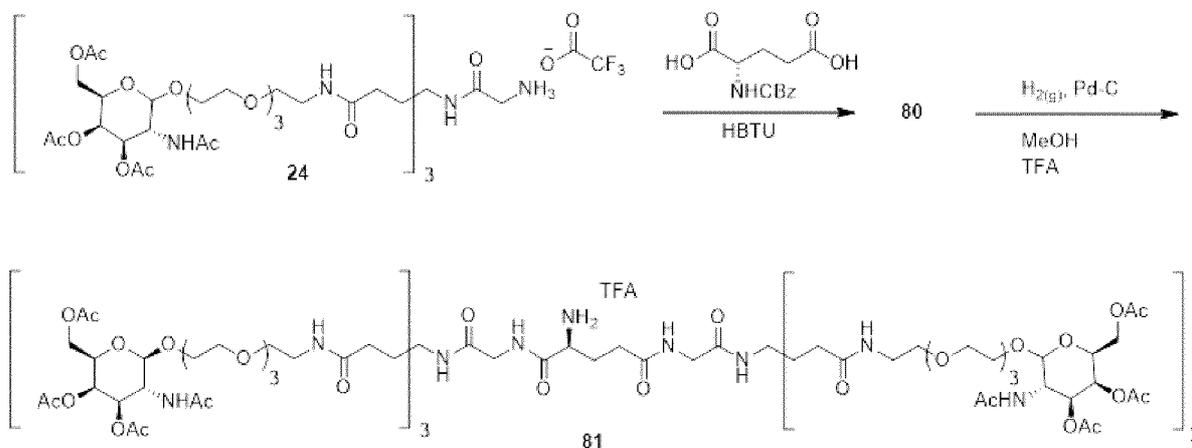
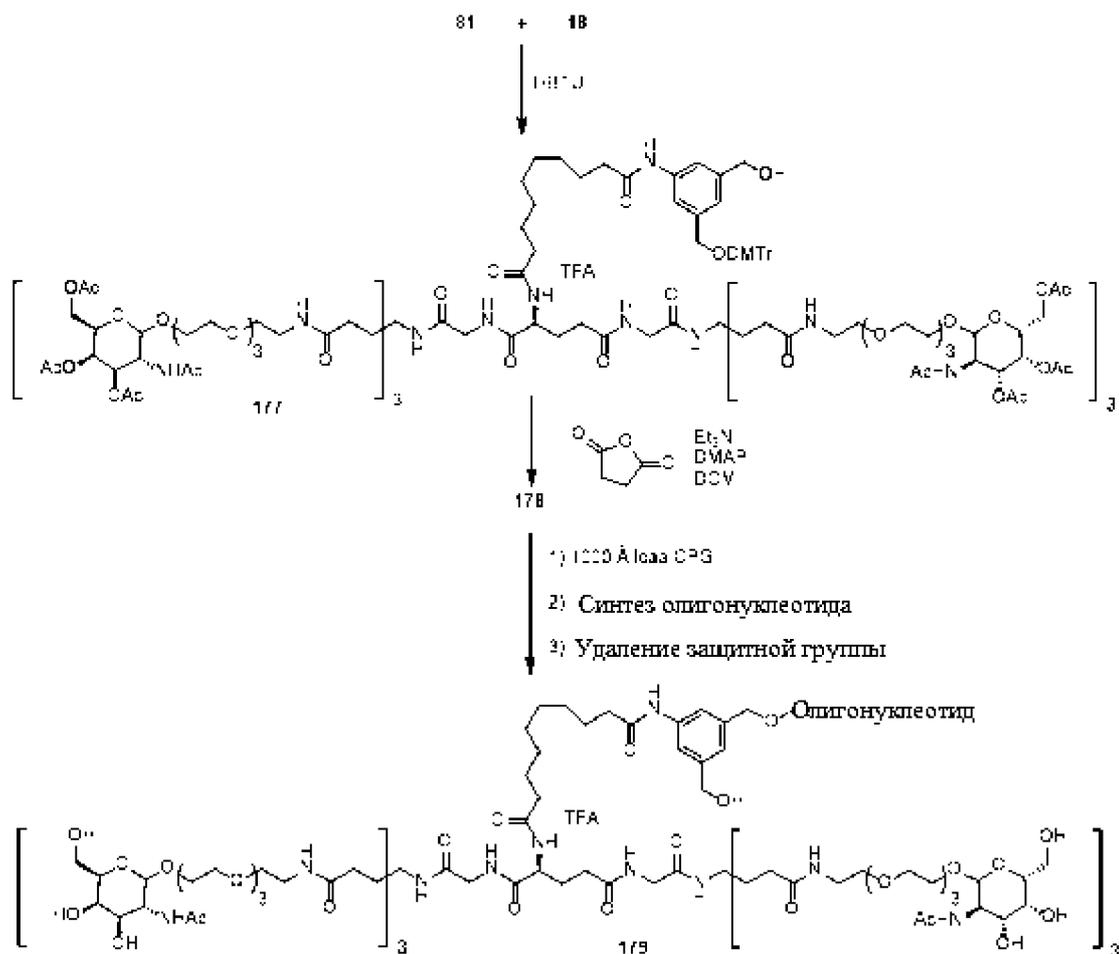


Схема 30



Этап 1. Получение соединения 80

Соединение **24** (2 г, 0,86 ммоль), N-карбобензоксиглутаминовую кислоту (120 мг, 0,43 ммоль), ГБТУ (326 мг, 0,86 ммоль) и ТЭА (353 мкл, 2,6 ммоль) перемешивали в ДХМ при комнатной температуре в течение ночи. Смесь концентрировали *in vacuo* и очистили с помощью колоночной хроматографии с получением соединения **80** (2,88 г, 83%).

Этап 2. Получение соединения 81

Соединение **81** получили из соединения **80** (670 мг, 0,17 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **14**. Данное соединение использовали в дальнейших реакциях неочищенным, выход считали количественным.

Этап 3. Получение конъюгата 179

Конъюгат **179** получили из соединений **18** и **81** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 14. Синтез конъюгата 182

Схема 31

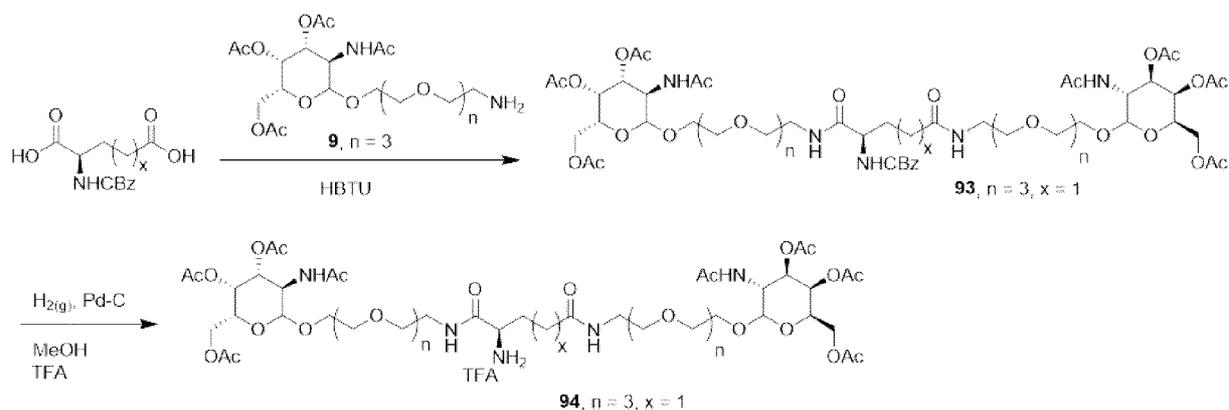
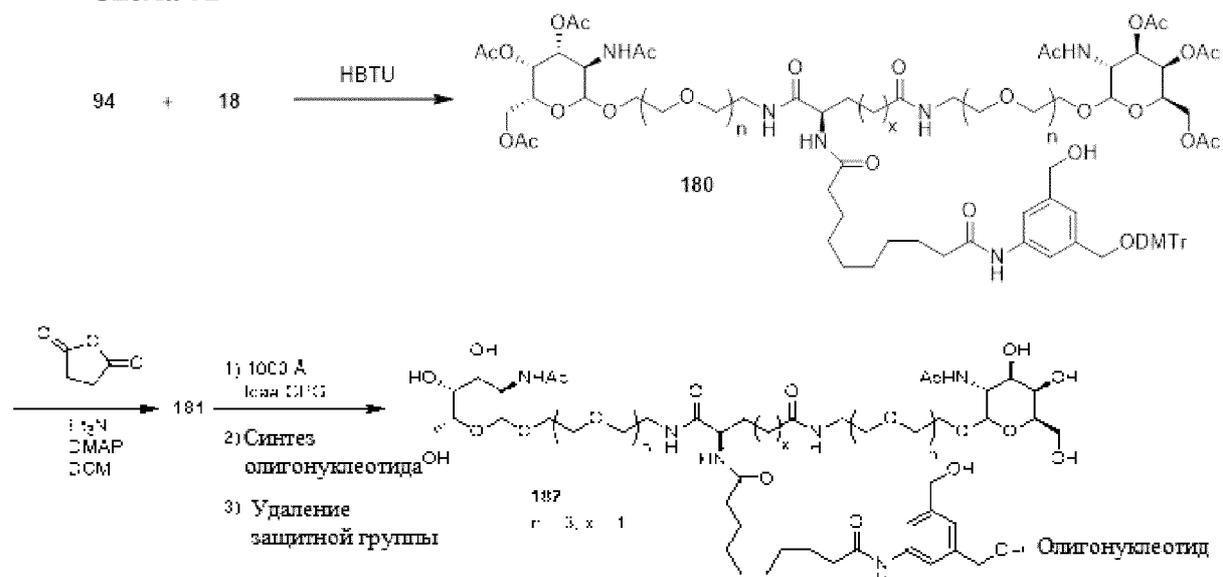


Схема 32



Этап 1. Получение соединения **93**

Соединение **93** получили из (2-оксо-2-фенил-1 λ^2 -этил)-D-глутаминовой кислоты (2,25 г, 8,1 ммоль) и **9** (13 г, 21 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 11,2 г.

Этап 2. Получение соединения **94**

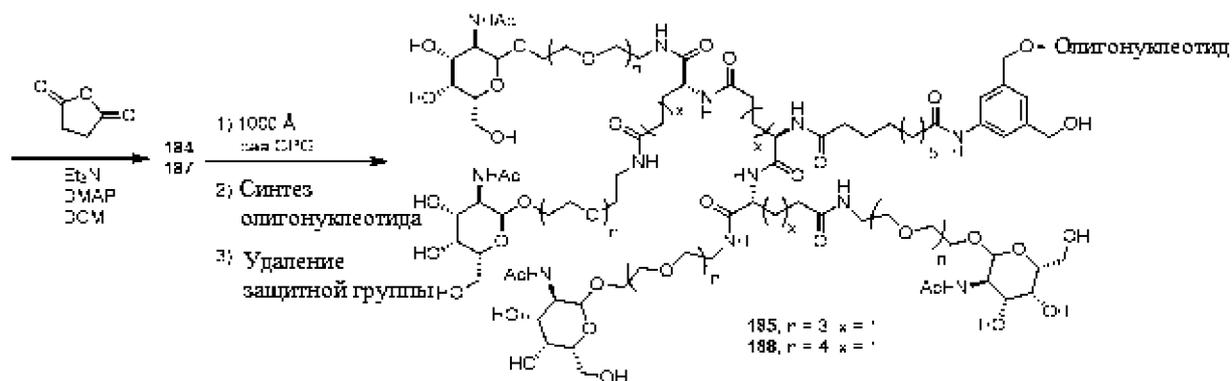
Соединение **94** получили из соединения **93** (11,1 г) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **90**. Выход: 10,2 г.

Этап 3. Получение конъюгата **182**

Конъюгат **182** получили из соединений **18** и **94** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 15. Синтез конъюгатов **185** и **188**

Схема 33



Этап 1. Получение 14-гидрокси-3,6,9,12-тетраоксатетрадецил-4-метилбензолсульфоната **82**

Раствор пентаэтиленгликоля (35 г, 147 ммоль), ТЭА (41 мл, 294 ммоль) и триметиламина-НСl (1,4 г, 14,7 ммоль) в CH_2Cl_2 (600 мл) обработали тозилхлоридом (29,4 г, 154 ммоль). После перемешивания (18 ч) реакционную смесь промыли смесью H_2O -высококонцентрированный солевой раствор (1:1), сушили (MgSO_4), отфильтровали, концентрировали и подвергли хроматографической очистке с получением **82** (24,6 г, 43%) в виде масла бледно-желтого цвета. R_f 0,8 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 2. 14-азидо-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ол **83**

14-азидо-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ол (**83**) получили из **82** (24,6 г, 62,7 ммоль) и натрия азиды (7,13 г, 110 ммоль), с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **4**. Выход: 14,8 г, 90%.

Этап 3. Получение соединения **84**

Раствор GalNAc **6** (12,2 г, 31,4 ммоль) и HO-PEG-N₃ **83** (9,2 г, 35 ммоль) в 1,2-дихлорметане (150 мл) обработали $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (771 мг, 1,6 ммоль). После перемешивания (85 °С, 2 ч) реакционную смесь охладили до комнатной температуры, погасили добавлением ТЭА (40 мл) и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **84** (11,16 г, 60%) в виде пены бледно-желтого цвета. R_f 0,7 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 4. Получение соединения **85**

Раствор **84** (11,16 г, 18,8 ммоль) и Pd/C (1,1 г, 10% – во влажном состоянии) в EtOAc (120 мл) обработали ТФУ (4,32 мл, 56,5 ммоль) и продули H_2 . После интенсивного перемешивания (4,5 ч) реакционную смесь продули N_2 , отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **85** (5,77 г, 45%) в виде бесцветной пены. R_f 0,5 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 5. Получение соединения **95**

Соединение **95** получили из (2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)-D-глутаминовой кислоты (1,04 г, 3,7 ммоль) и соединения **94** (10,2 г) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **91**. Выход: 7,2 г.

Этап 6. Получение соединения **96**

Соединение **96** получили из соединения **95** (11,1 г) с использованием методики,

идентичной той, которая использовалась для получения соединения **92**. Выход: 6,5 г.

Этап 7. Получение соединения **97**

Соединение **97** получили из (2-оксо-2-фенил-1 λ^2 -этил)-D-глутаминовой кислоты (2 г, 7,1 ммоль) и **85** (12,1 г, 17,8 ммоль), с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 10 г, количественный.

Этап 8. Получение соединения **98**

Соединение **98** получили из соединения **97** (10 г, 7,2 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **90**. Выход: 3,5 г, 36%.

Этап 9. Получение соединения **99**

Соединение **99** количественно получили из (2-оксо-2-фенил-1 λ^2 -этил)-D-глутаминовой кислоты (350 мг, 1,25 ммоль) и соединения **98** (2,86 мг, 2,5 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **91**.

Этап 10. Получение соединения **100**

Соединение **100** количественно получили из соединения **99** (3,2 г, 1,25 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **92**.

Этап 11. Получение конъюгатов **185** и **188**

Конъюгат **185** и **188** получили из соединений **18** и **96** или **18** и **100** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 16. Синтез конъюгатов **191**, **194**, **197** и **200**

Схема 36

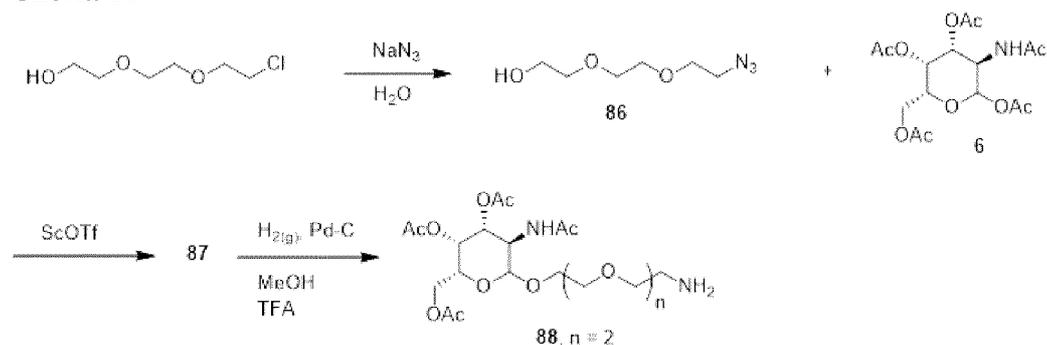


Схема 37

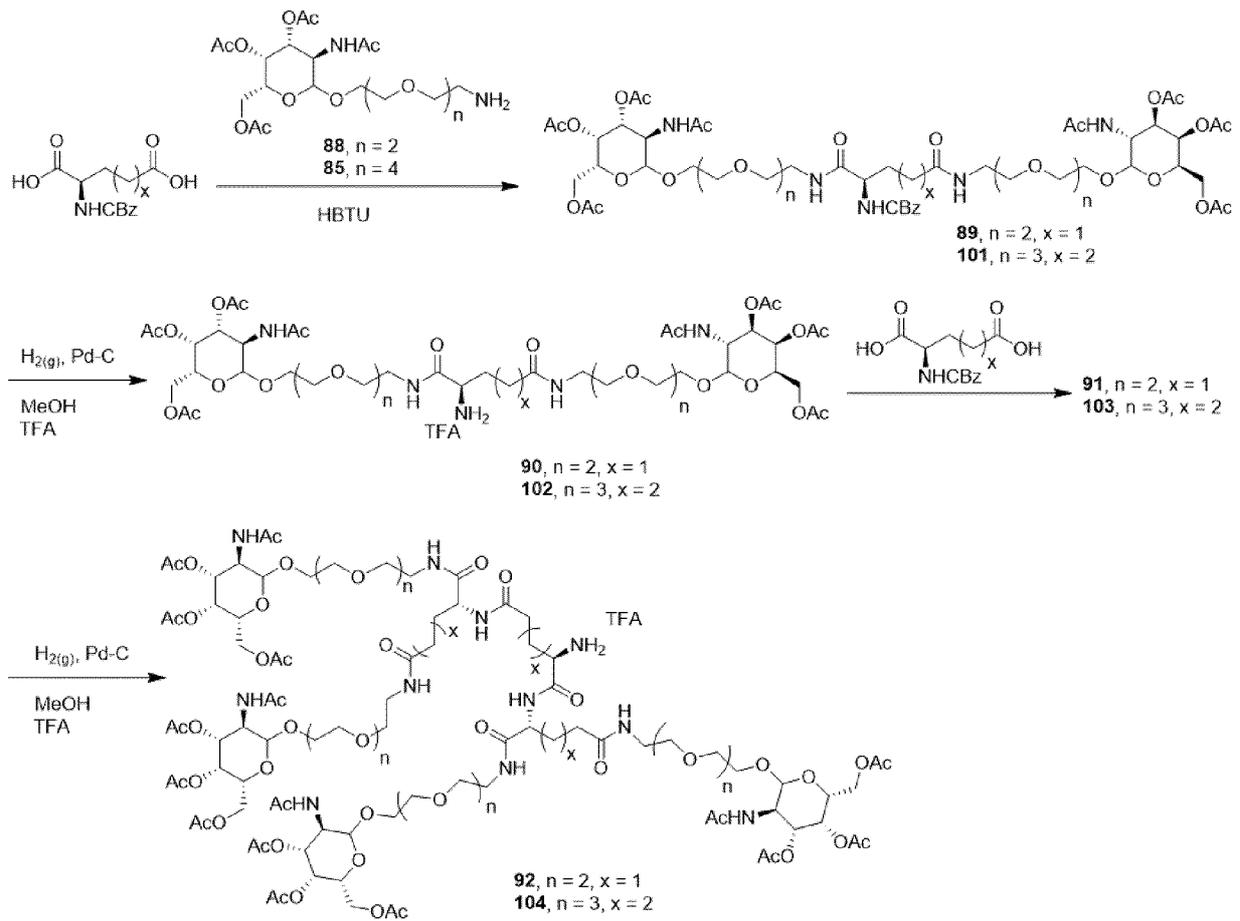
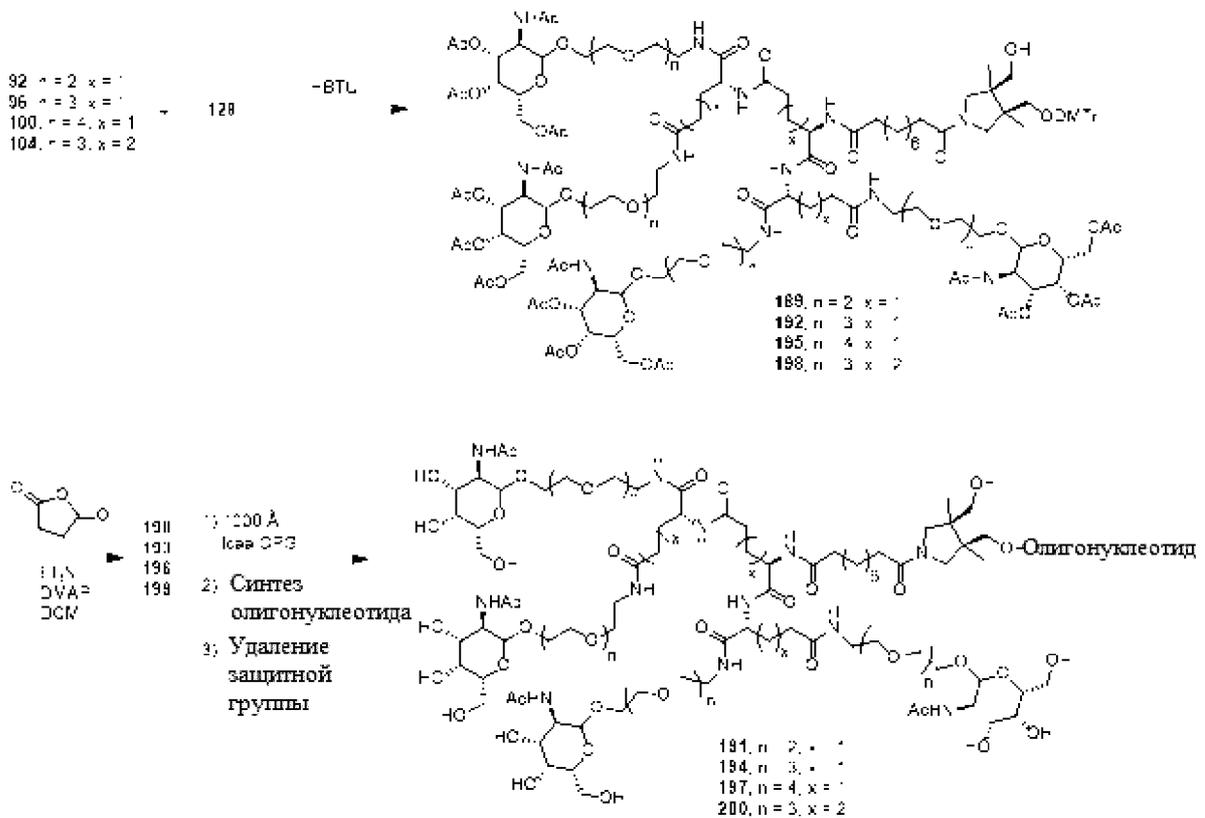


Схема 38



Этап 1. Получение 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-ола 86

К раствору 2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этан-1-ола (13 г, 77 ммоль) в воде (200 мл)

добавили азид натрия (10 г, 154 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 100°C в течение 18 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и перелили в делительную воронку объемом 1 л и экстрагировали дихлорметаном (3×200 мл). Объединенные экстракты дихлорметана сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-ола в виде бесцветного масла (11,7 г).

Этап 2. Получение соединения 87

Соединение **87** получили из соединений **86** (4,95 г, 28,3 ммоль) и **6** (10 г, 25,7 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **84**. Выход: 10 г, 77%.

Этап 3. Получение соединения 88

Соединение **88** получили из соединения **87** (10 г, 19,8 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **85**. Выход: 7,63 г, 65%.

Этап 4. Получение соединения 89

Раствор **88** (2 г, 3,38 ммоль) и Z-глутаминовой кислоты (427 мг, 1,52 ммоль) в CH₂Cl₂ (50 мл) обработали ГБТУ (1,41 г, 3,7 ммоль) и основанием Хюнига (1,77 мл, 10,1 ммоль). После перемешивания (18 ч) смесь концентрировали и подвергли хроматографической очистке с получением **89** (871 мг, 48%) в виде бесцветной пены. Rf 0,5 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 5. Получение соединения 90

Раствор **89** (870 мг, 0,72 ммоль) и Pd/C (90 мг, 10% – на влажной подложке) в EtOAc (10 мл) обработали ТФУ (84 мкл, 1,1 ммоль) и продули H₂. После интенсивного перемешивания (2 ч) реакционную смесь продули N₂, отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **90** (850 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. Rf 0,25 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 6. Получение соединения 91

Раствор **90** (850 мг, 0,72 ммоль) и Z-глутаминовой кислоты (91 мг, 0,32 ммоль) в CH₂Cl₂ (10 мл) обработали ГБТУ (300 мг, 0,79 ммоль) и основанием Хюнига (502 мкл, 2,9 ммоль). После перемешивания (1,5 ч) смесь разбавили CH₂Cl₂ и промыли NaHCO₃ (насыщенный водный раствор), сушили (MgSO₄), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **91** (590 мг, 76%) в виде бесцветной пены. Rf 0,5 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 7. Получение соединения 92

Раствор **91** (590 мг, 0,25 ммоль) и Pd/C (100 мг, 10% – на влажной подложке) в CH₃OH (30 мл) обработали ТФУ (29 мкл, 0,37 ммоль) и продули H₂. После перемешивания (3 ч) реакционную смесь продули N₂, отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **92** (600 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. Rf 0,1 (10%

CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 8. Получение соединения 101

Соединение **101** получили из (R)-2-((2-оксо-2-фенил-112-этил)амино)гександиовой кислоты (2,51 г, 8,6 ммоль) и **9** (11 г, 17,2 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 4,2 г, 37%.

Этап 9. Получение соединения 102

Соединение **102** получили из соединения **101** (4,2 г, 3,2 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **90**. Выход: 2,1 г, 47%.

Этап 10. Получение соединения 103

Соединение **103** получили из (R)-2-((2-оксо-2-фенил-112-этил)амино)гександиовой кислоты (265 мг, 0,9 ммоль) и соединения **102** (2,1 г, 1,8 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **91**. Выход: (560 мг, 24%).

Этап 11. Получение соединения 104

Соединение **104** получили с количественным выходом из соединения **103** (560 мг) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **92**. Данное соединение использовали без дополнительной очистки.

Этап 12. Получение конъюгатов 191, 194 и 197

Конъюгаты **191**, **194** и **197** получили из соединений **128** и **92**, **96** и **100** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 16а: Синтез конъюгатов 191а

Схема 36а

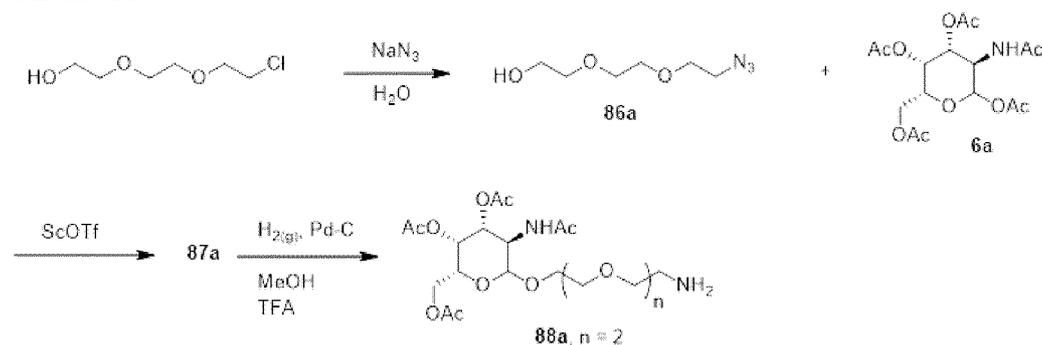


Схема 37а.

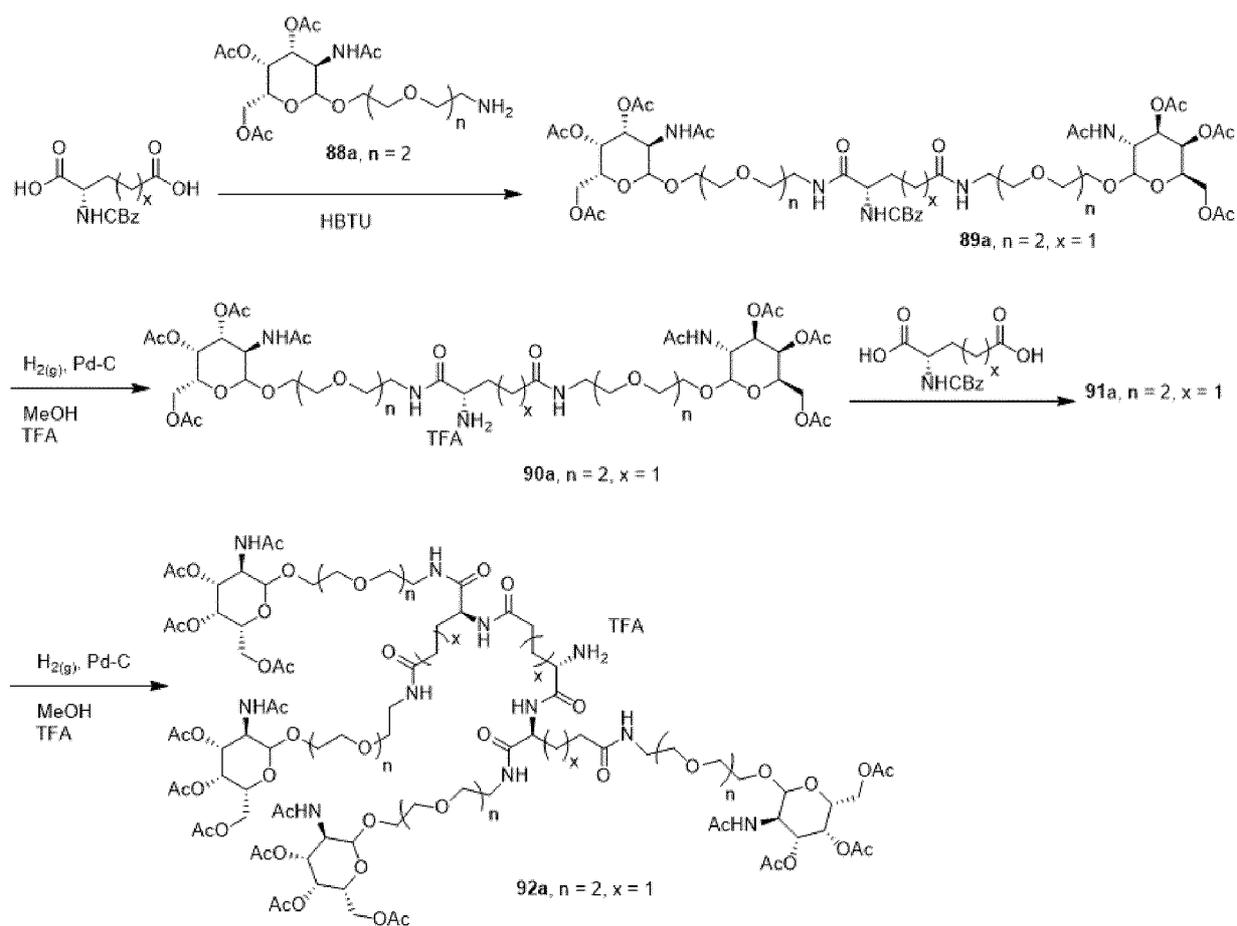
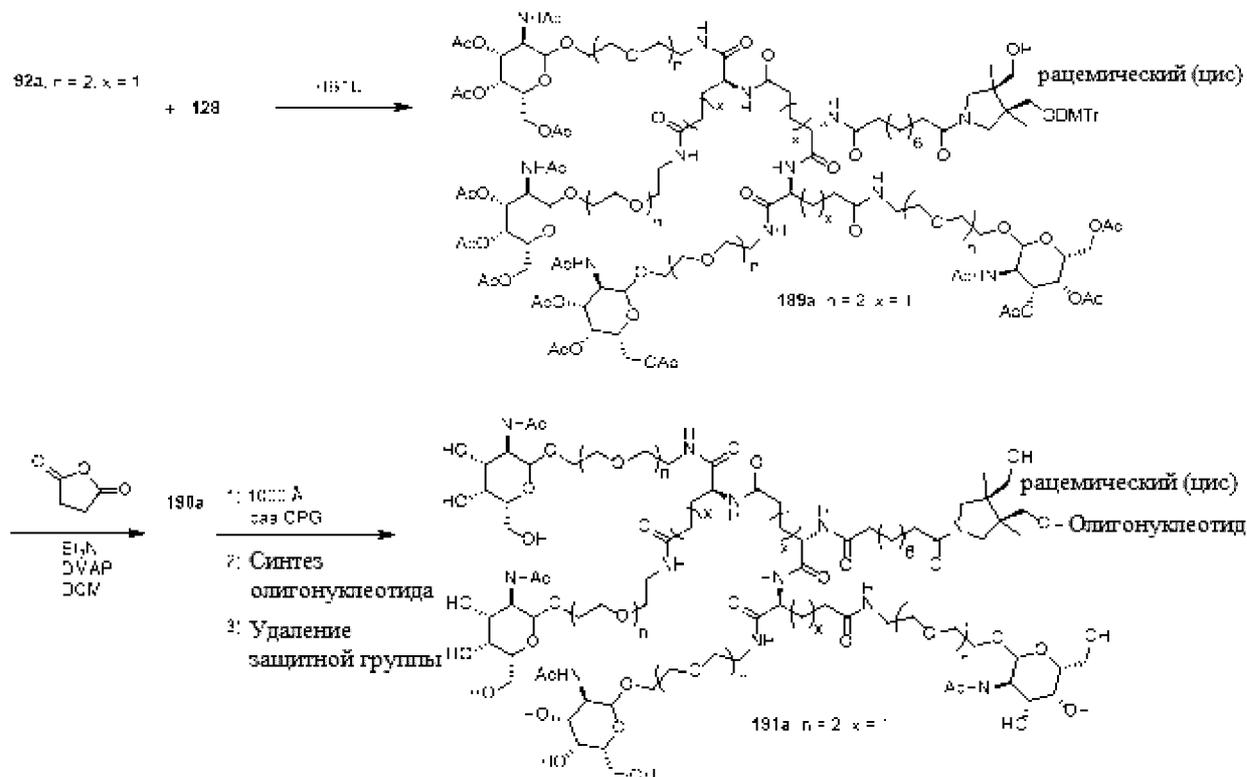


Схема 38а.

**Этап 1. Получение 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-ола 86а**

К раствору 2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этан-1-ола (13 г, 77 ммоль) в воде (200 мл)

добавили натрия азид (10 г, 154 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 100°C в течение 18 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и перелили в делительную воронку объемом 1 л, после чего экстрагировали дихлорметаном (3×200 мл). Объединенные экстракты дихлорметана сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-ола в виде бесцветного масла (11,7 г).

Этап 2. Получение соединения 87а

Соединение **87а** получили из соединений **86а** (4,95 г, 28,3 ммоль) и **6а** (10 г, 25,7 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **84**. Выход: 10 г, 77%.

Этап 3. Получение соединения 88а

Соединение **88а** получили из соединения **87а** (10 мг, 19,8 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **85**. Выход: 7,63 г, 65%.

Этап 4. Получение соединения 89а

Раствор **88а** (2 г, 3,38 ммоль) и Z-L-глутаминовой кислоты (427 мг, 1,52 ммоль) в CH₂Cl₂ (50 мл) обработали ГБТУ (1,41 г, 3,7 ммоль) и основанием Хюнига (1,77 мл, 10,1 ммоль). После перемешивания (18 ч) смесь концентрировали и подвергли хроматографической очистке с получением **89а** (871 мг, 48%) в виде бесцветной пены. Rf 0,5 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 5. Получение соединения 90а

Раствор **89а** (870 мг, 0,72 ммоль) и Pd/C (90 мг, 10% – на влажной подложке) в EtOAc (10 мл) обработали ТФУ (84 мкл, 1,1 ммоль) и продули H₂. После интенсивного перемешивания (2 ч) реакционную смесь продули N₂, отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **90а** (850 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. Rf 0,25 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 6. Получение соединения 91а

Раствор **90а** (850 мг, 0,72 ммоль) и Z-глутаминовой кислоты (91 мг, 0,32 ммоль) в CH₂Cl₂ (10 мл) обработали ГБТУ (300 мг, 0,79 ммоль) и основанием Хюнига (502 мкл, 2,9 ммоль). После перемешивания (1,5 ч) смесь разбавили CH₂Cl₂ и промыли NaHCO₃ (насыщенный водный раствор), сушили (MgSO₄), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **91а** (590 мг, 76%) в виде бесцветной пены. Rf 0,5 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 7. Получение соединения 92а

Раствор **91** (590 мг, 0,25 ммоль) и Pd/C (100 мг, 10% – на влажной подложке) в CH₃OH (30 мл) обработали ТФУ (29 мкл, 0,37 ммоль) и продули H₂. После перемешивания (3 ч) реакционную смесь продули N₂, отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **92а** (600 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. Rf 0,1 (10%

CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 8. Получение конъюгата 191a,

Конъюгат **191a** получали из соединения **128** и соединения **92a**, с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 16b Синтез конъюгатов 191b

Схема 36b

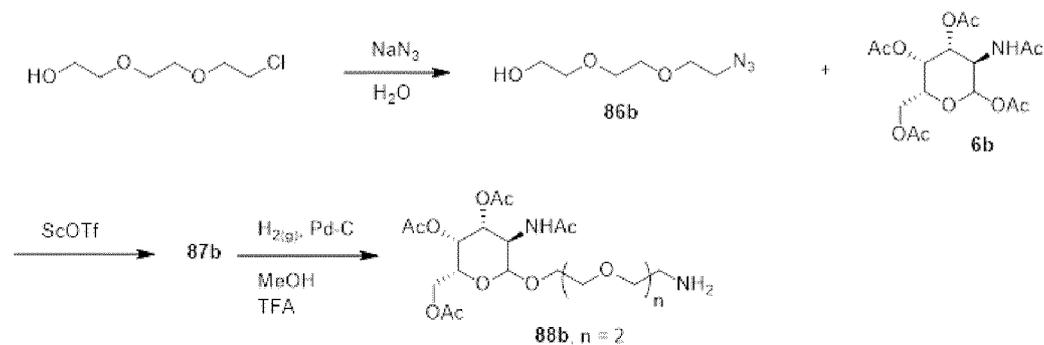


Схема 37b.

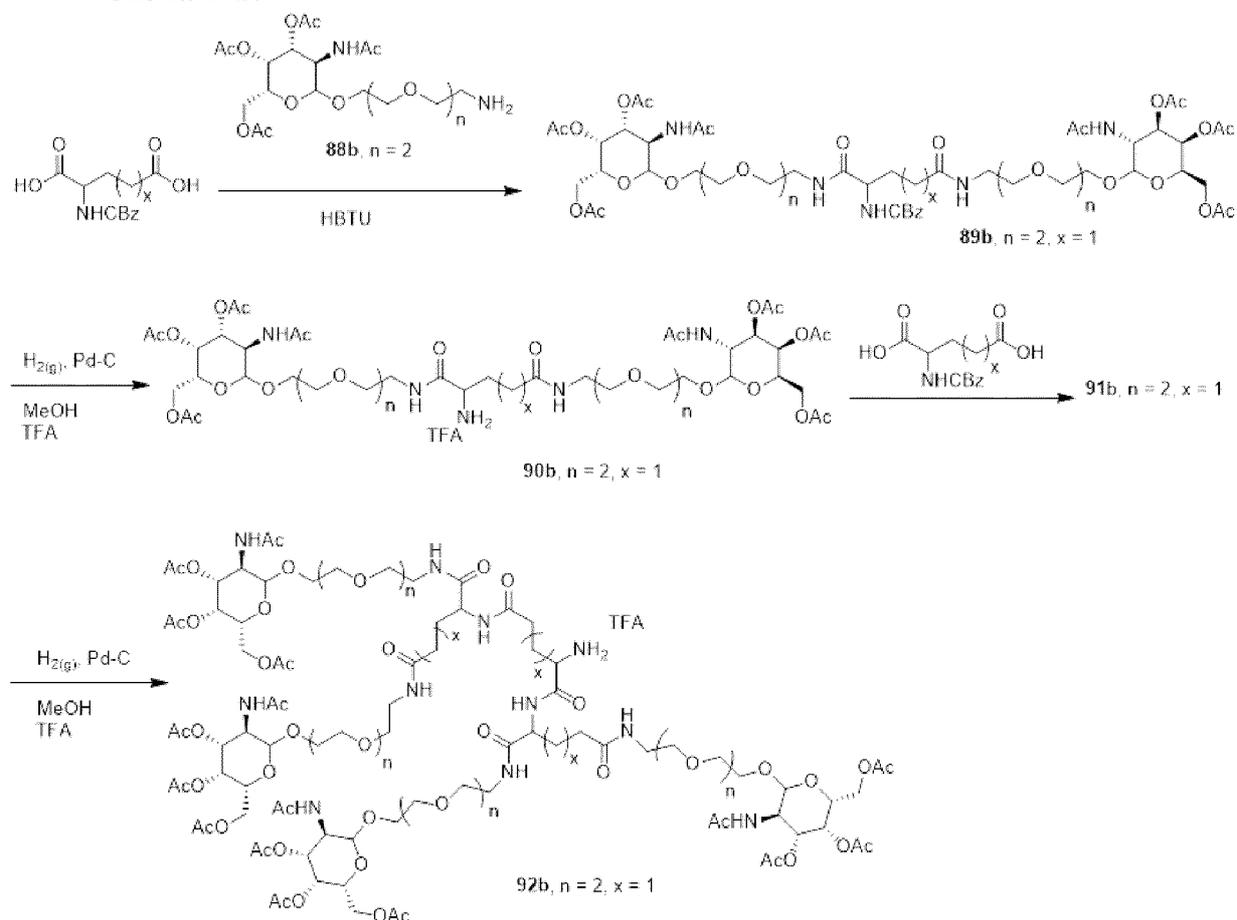
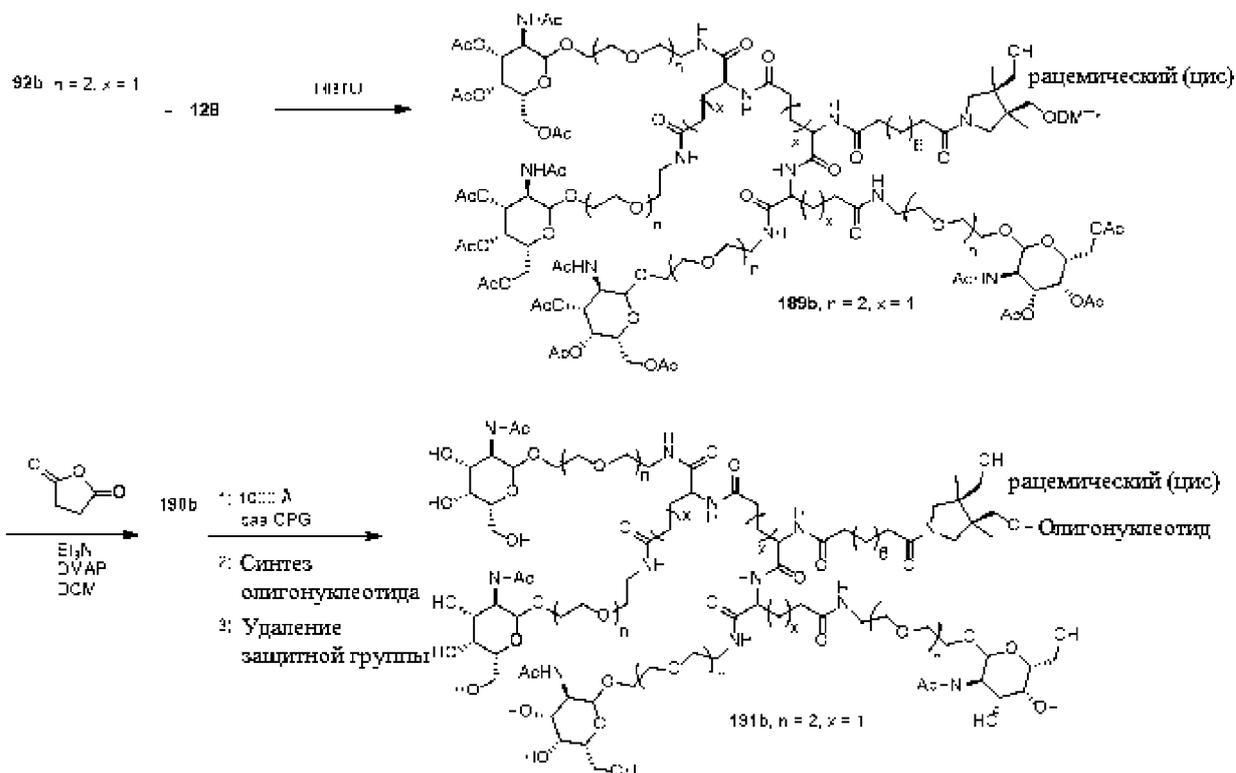


Схема 38b.



Этап 1. Получение 2-(2-(2-азидэтокси)этокси)этан-1-ола **86b**

К раствору 2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этан-1-ола (13 г, 77 ммоль) в воде (200 мл) добавили азид натрия (10 г, 154 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 100°C в течение 18 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и перелили в делительную воронку объемом 1 л, после чего экстрагировали дихлорметаном (3×200 мл). Объединенные экстракты дихлорметана сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением 2-(2-(2-азидэтокси)этокси)этан-1-ола в виде бесцветного масла (11,7 г).

Этап 2. Получение соединения **87b**

Соединение **87a** получили из **86b** (4,95 г, 28,3 ммоль) и **6b** (10 г, 25,7 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **84**. Выход: 10 г, 77%.

Этап 3. Получение соединения **88b**

Соединение **88a** получили из **87b** (10 мг, 19,8 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **85**. Выход: 7,63 г, 65%.

Этап 4. Получение соединения **89b**

Раствор **88b** (2 г, 3,38 ммоль) и Z-глутаминовой кислоты (427 мг, 1,52 ммоль) в CH_2Cl_2 (50 мл) обработали ГБТУ (1,41 г, 3,7 ммоль) и основанием Хюнига (1,77 мл, 10,1 ммоль). После перемешивания (18 ч) смесь концентрировали и подвергли хроматографической очистке с получением **89b** (871 мг, 48%) в виде бесцветной пены. R_f 0,5 (10% $CH_3OH-CH_2Cl_2$).

Этап 5. Получение соединения **90b**

Раствор **89b** (870 мг, 0,72 ммоль) и Pd/C (90 мг, 10% – на влажной подложке) в EtOAc (10 мл) обработали ТФУ (84 мкл, 1,1 ммоль) и продули H₂. После интенсивного перемешивания (2 ч) реакционную смесь продули N₂, отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **90b** (850 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. Rf 0,25 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 6. Получение соединения **91b**

Раствор **90b** (850 мг, 0,72 ммоль) и Z-глутаминовой кислоты (91 мг, 0,32 ммоль) в CH₂Cl₂ (10 мл) обработали ГБТУ (300 мг, 0,79 ммоль) и основанием Хюнига (502 мкл, 2,9 ммоль). После перемешивания (1,5 ч) смесь разбавили CH₂Cl₂ и промыли NaHCO₃ (насыщенный водный раствор), сушили (MgSO₄), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **91b** (590 мг, 76%) в виде бесцветной пены. Rf 0,5 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 7. Получение соединения **92b**

Раствор **91b** (590 мг, 0,25 ммоль) и Pd/C (100 мг, 10% – на влажной подложке) в CH₃OH (30 мл) обработали ТФУ (29 мкл, 0,37 ммоль) и продули H₂. После перемешивания (3 ч) реакционную смесь продули N₂, отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **92b** (600 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. Rf 0,1 (10% CH₃OH–CH₂Cl₂).

Этап 8. Получение конъюгата **191b**

Конъюгат **191b** получали из соединения **128** и соединения **92b**, с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 16с Синтез конъюгатов **191с**

Схема 36с

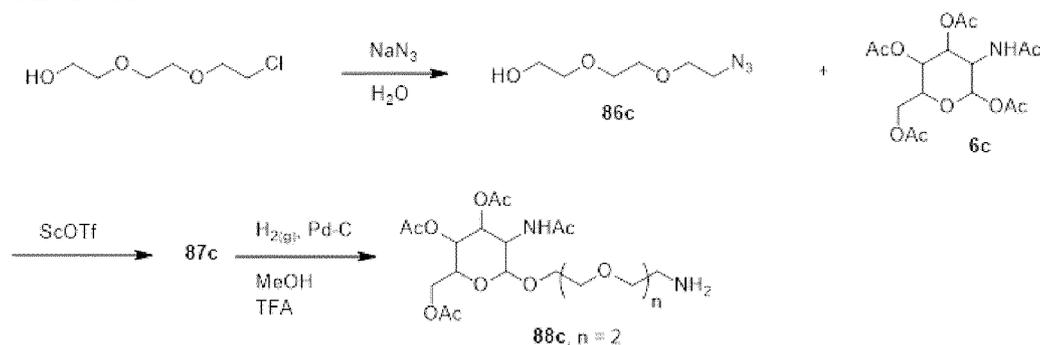


Схема 37с.

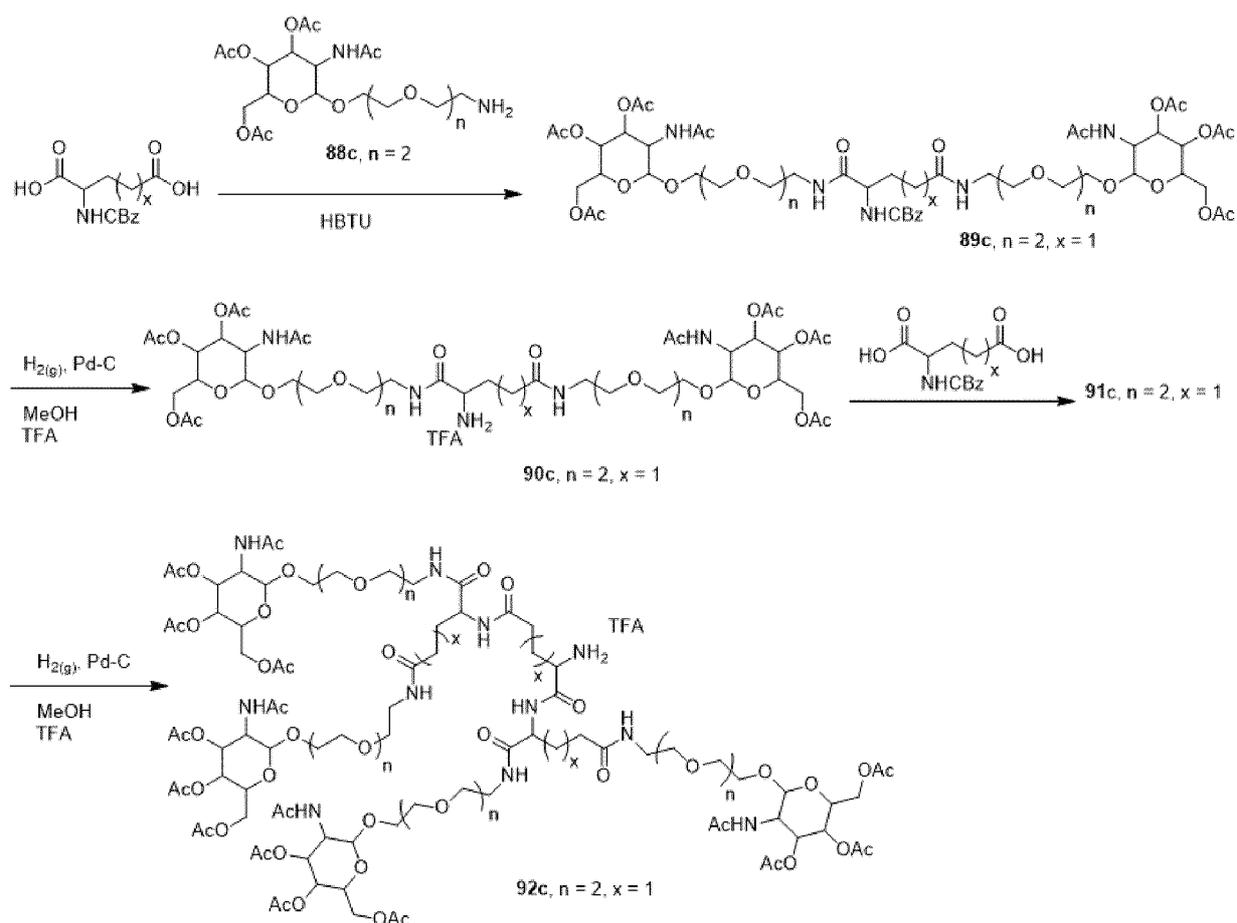
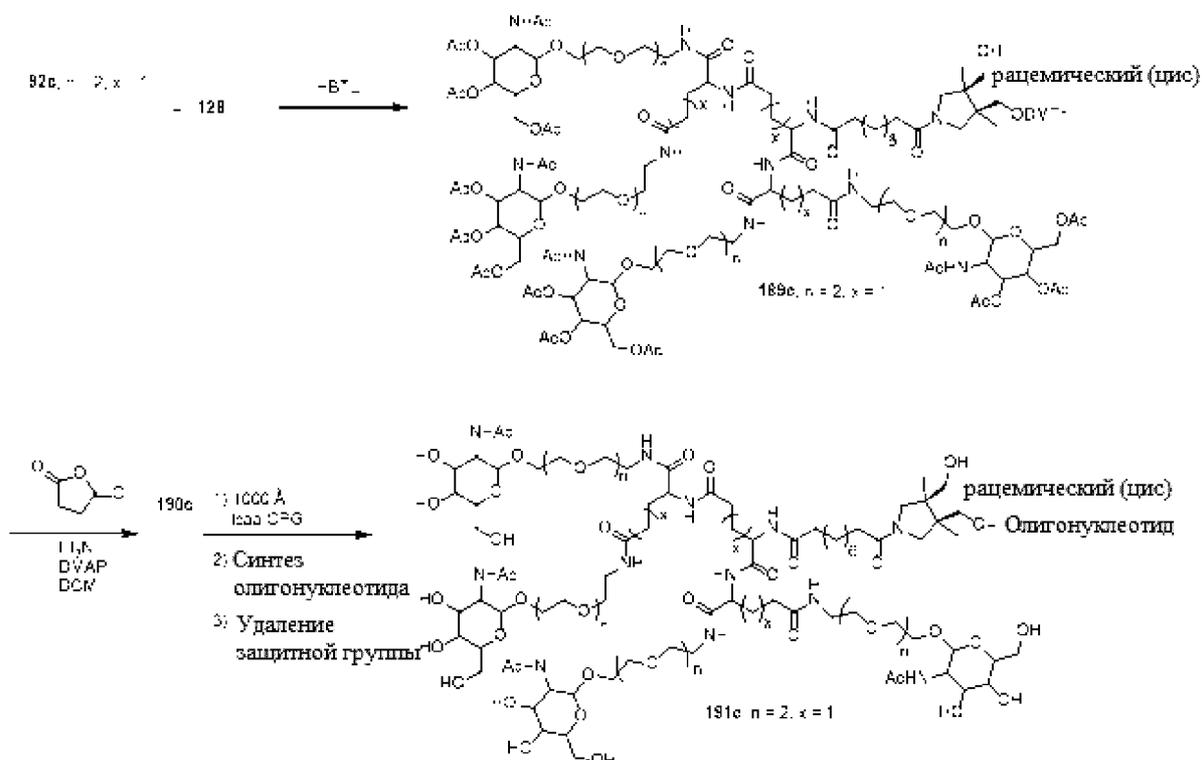


Схема 38с.



Этап 1. Получение 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-ола 86с

К раствору 2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этан-1-ола (13 г, 77 ммоль) в воде (200 мл) добавили азид натрия (10 г, 154 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 100°C в течение

18 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и перелили в делительную воронку объемом 1 л, после чего экстрагировали дихлорметаном (3×200 мл). Объединенные экстракты дихлорметана сушили над сульфатом магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этан-1-ола в виде бесцветного масла (11,7 г).

Этап 2. Получение соединения 87с

Соединение **87с** получили из **86с** (4,95 г, 28,3 ммоль) и **6с** (10 г, 25,7 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **84**. Выход: 10 г, 77%.

Этап 3. Получение соединения 88с

Соединение **88с** получили из **87с** (10 мг, 19,8 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **85**. Выход: 7,63 г, 65%.

Этап 4. Получение соединения 89с

Раствор **88с** (2 г, 3,38 ммоль) и *Z*-глутаминовой кислоты (427 мг, 1,52 ммоль) в CH_2Cl_2 (50 мл) обработали ГБТУ (1,41 г, 3,7 ммоль) и основанием Хюнига (1,77 мл, 10,1 ммоль). После перемешивания (18 ч) смесь концентрировали и подвергли хроматографической очистке с получением **89с** (871 мг, 48%) в виде бесцветной пены. R_f 0,5 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 5. Получение соединения 90с

Раствор **89с** (870 мг, 0,72 ммоль) и Pd/C (90 мг, 10% – на влажной подложке) в EtOAc (10 мл) обработали ТФУ (84 мкл, 1,1 ммоль) и продули H_2 . После интенсивного перемешивания (2 ч) реакционную смесь продули N_2 , отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **90с** (850 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. R_f 0,25 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 6. Получение соединения 91с

Раствор **90с** (850 мг, 0,72 ммоль) и *Z*-глутаминовой кислоты (91 мг, 0,32 ммоль) в CH_2Cl_2 (10 мл) обработали ГБТУ (300 мг, 0,79 ммоль) и основанием Хюнига (502 мкл, 2,9 ммоль). После перемешивания (1,5 ч) смесь разбавили CH_2Cl_2 и промыли NaHCO_3 (насыщенный водный раствор), сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **91с** (590 мг, 76%) в виде бесцветной пены. R_f 0,5 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 7. Получение соединения 92с

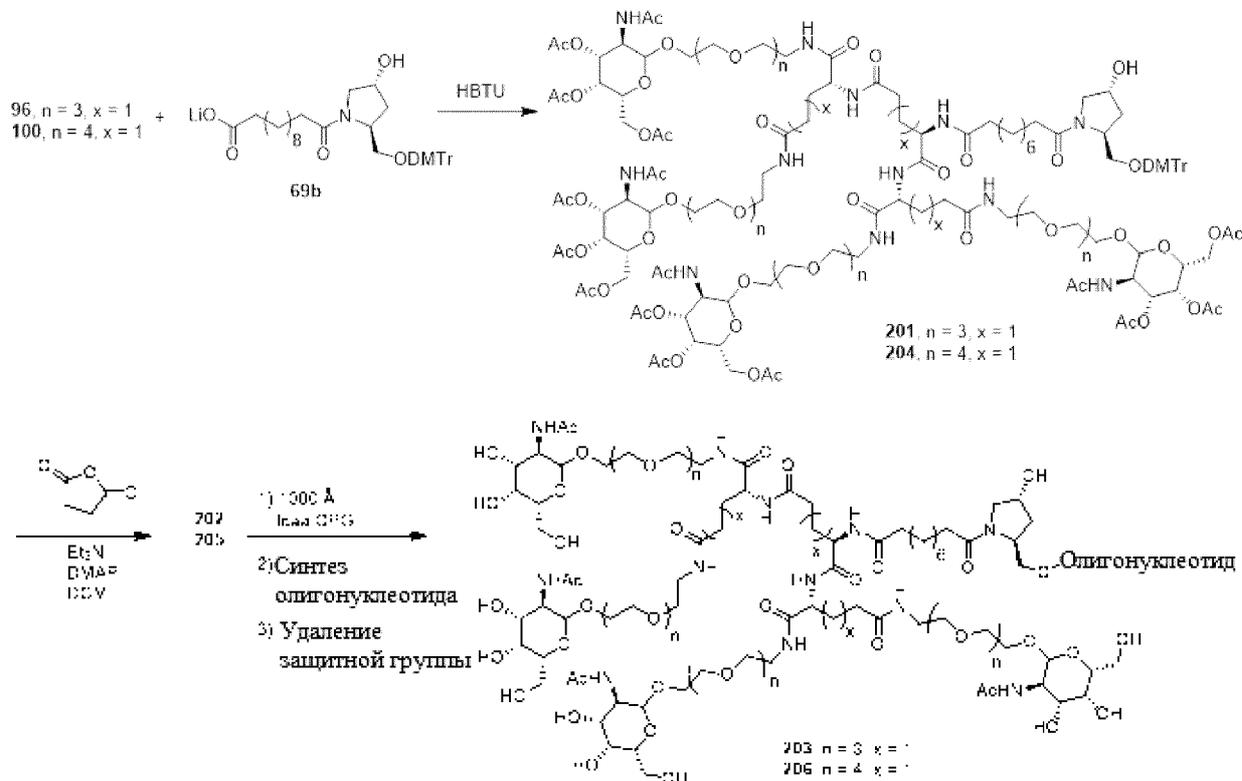
Раствор **91с** (590 мг, 0,25 ммоль) и Pd/C (100 мг, 10% – на влажной подложке) в CH_3OH (30 мл) обработали ТФУ (29 мкл, 0,37 ммоль) и продули H_2 . После перемешивания (3 ч) реакционную смесь продули N_2 , отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал использовали без дополнительной обработки с получением **92с** (600 мг, количественный выход) в виде бесцветной пены. R_f 0,1 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 8. Получение конъюгата 191с

Конъюгат **191с** получили из соединения **128** и соединения **92с** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 17. Синтез конъюгатов 203 и 206

Схема 39



Этап 1. Получение соединения 69b

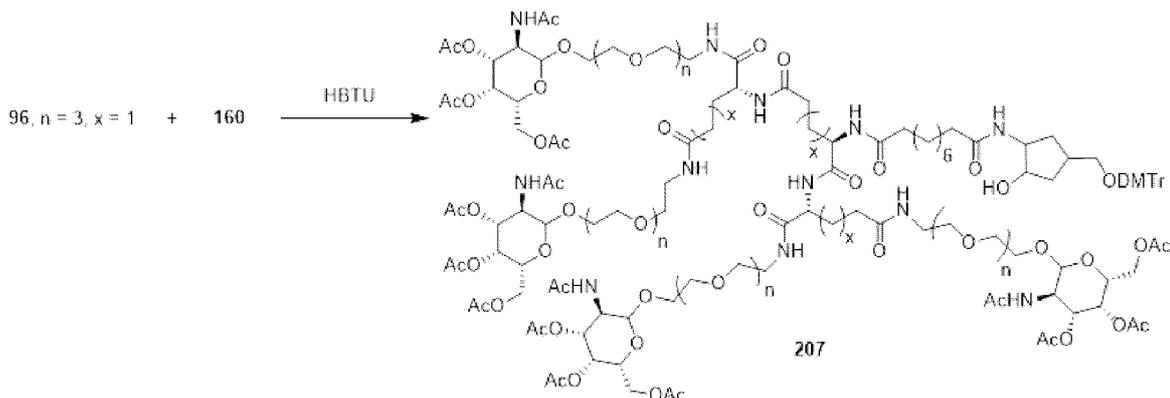
Соединение **69b** получили из (2S,4R)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **69**.

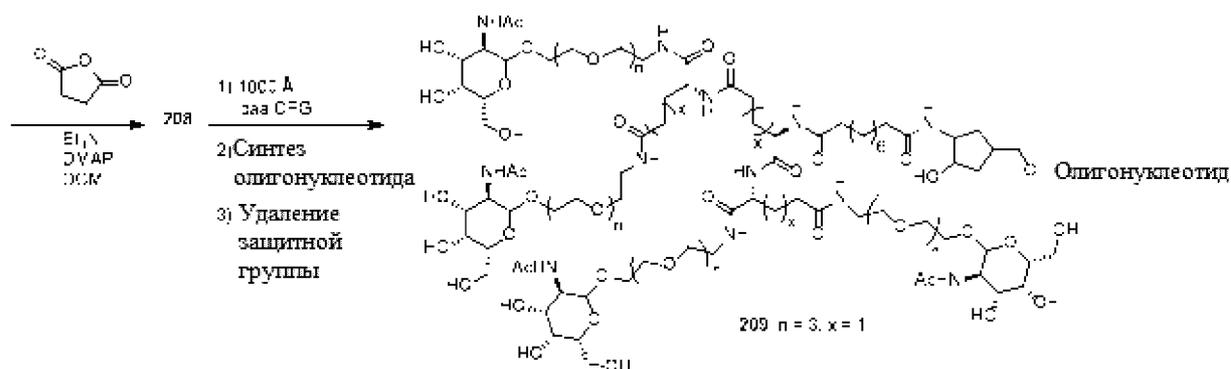
Этап 2. Получение конъюгатов 203 и 206

Конъюгаты **203** и **206** получили из соединений **96** и **100** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 18. Синтез конъюгата 209

Схема 40



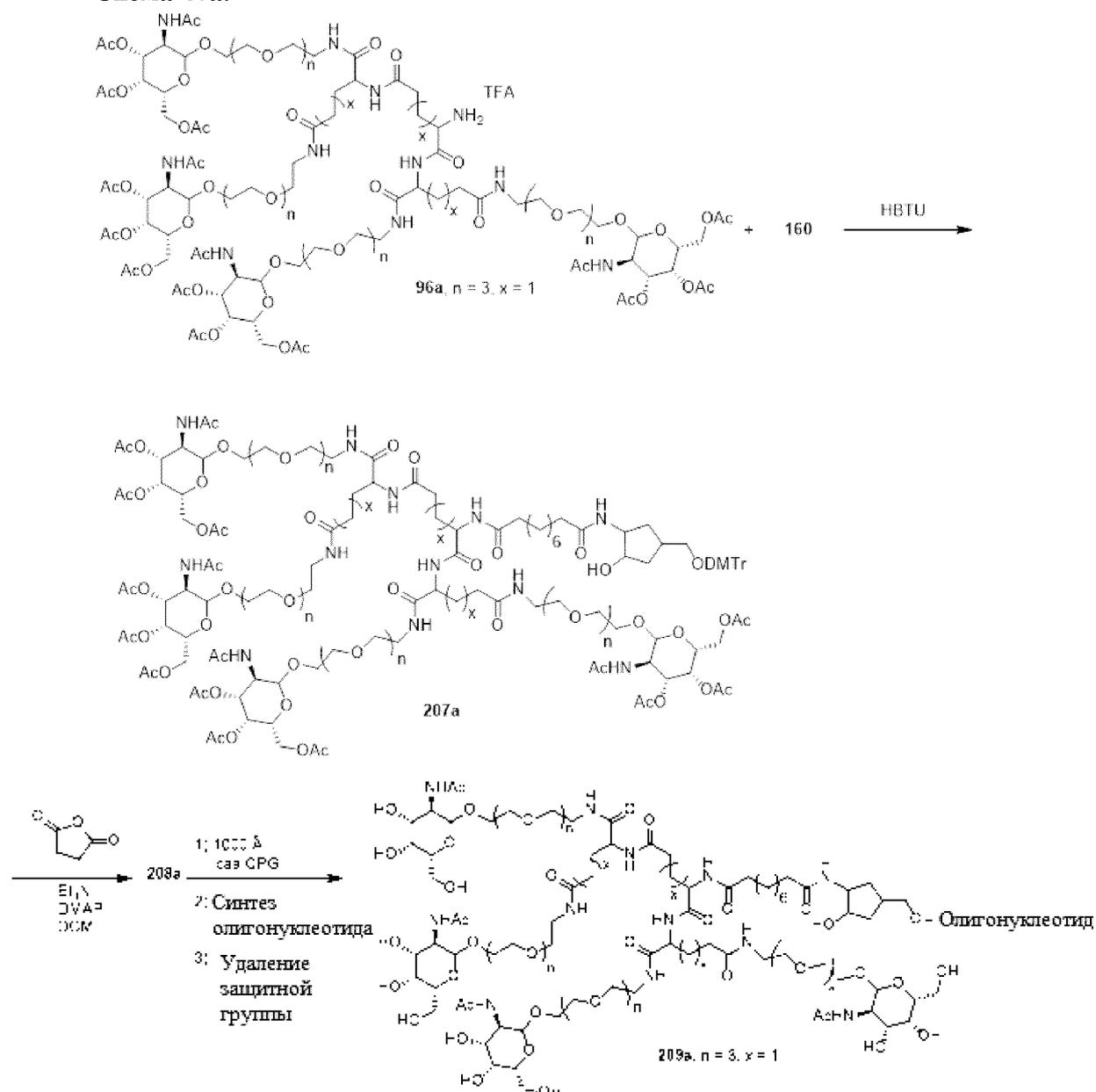


Этап 1. Получение конъюгата 209

Конъюгат **209** получили из соединений **96** и **160** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 18а: Синтез конъюгата 209а

Схема 40а.



Этап 1. Получение конъюгата 209a

Конъюгат **209a** получили из соединения **96a** и **160** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 19. Синтез конъюгатов 212 и 215

Схема 41

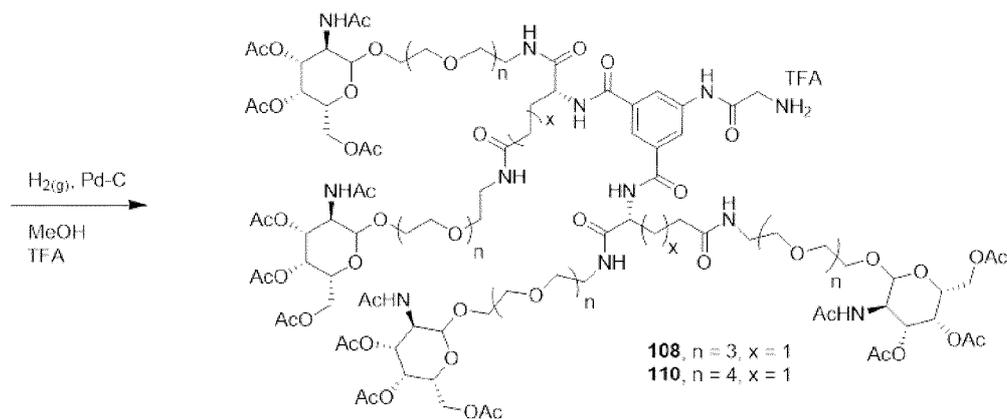
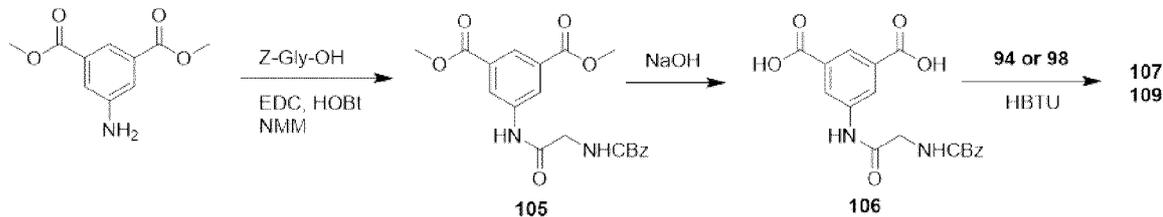
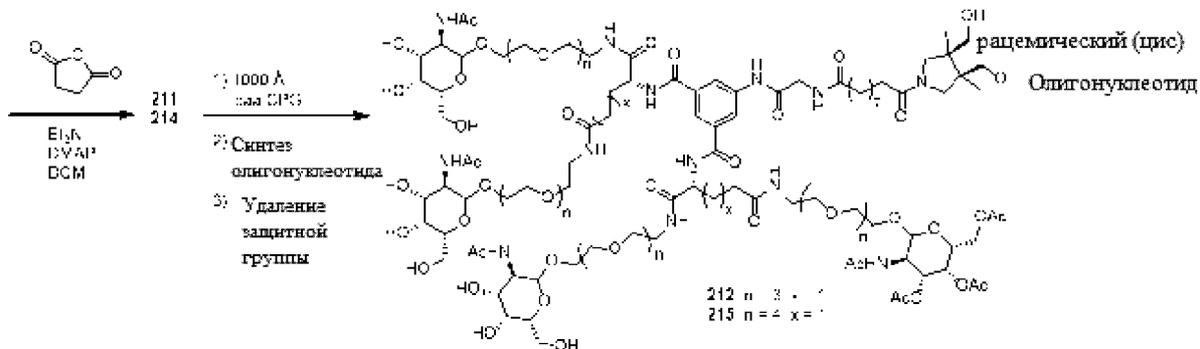
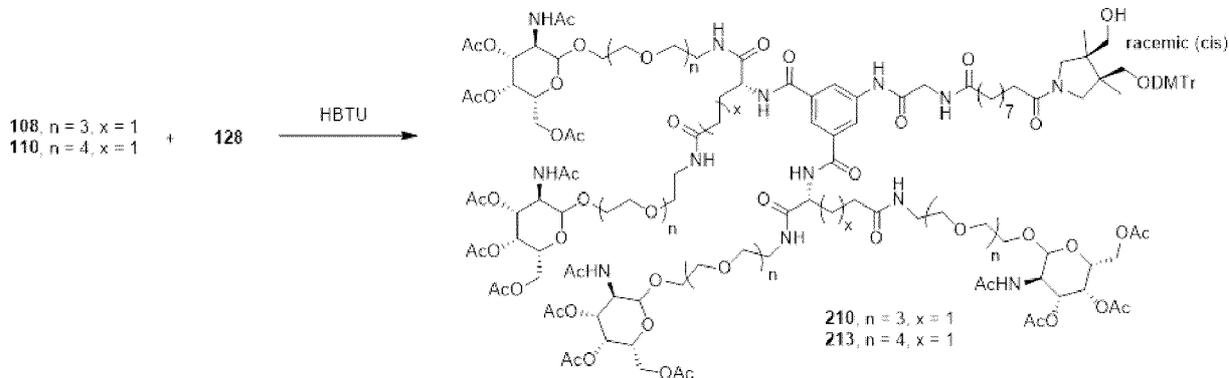


Схема 42



Этап 1. Получение диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталата 105

Раствор диметил-5-аминоизофталата (5 г, 24 ммоль), Z-Gly-OH (5 г, 24 ммоль),

ЭДК (5 г, 26,3 ммоль), ГОБт (3,6 г, 26,3 ммоль), НММ (N-метилморфолин) (2,9 мл, 26,3 ммоль) в ДМФА (50 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакцию смесь разбавили этилацетатом (250 мл) и промыли 1М HCl (2×100 мл), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (1×100 мл) и соевым раствором (2×100 мл). Сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталата в виде бесцветного твердого вещества (7,2 г, 79%).

Этап 2. Получение 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталевой кислоты 106

К раствору метил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталата (7,2 г) в метаноле (25 мл) и ТГФ (25 мл) добавили 1М NaOH (25 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем концентрировали для удаления ТГФ и MeOH. Оставшийся водный раствор разбавили водой (75 мл), охладили на водяной бане со льдом и подкислили до pH=1 с помощью 6М HCl. Твердое вещество отфильтровали и промыли водой (3×100 мл). Лиофилизировали твердое вещество с получением 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)-изофталевой кислоты (6,9 г, количественный выход) .

Этап 3. Получение соединения 107

Соединение **107** получили из 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталевой кислоты **106** (200 мг, 0,54 ммоль) и **94** (1,7 г, 1,3 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **95**. Выход: 600 мг.

Этап 4. Получение соединения 108

Соединение **108** получили из соединения **107** (600 мг) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **96**. Выход: 650 мг, количественный.

Этап 5. Получение соединения 109

Соединение **109** получили из 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталевой кислоты **106** (180 мг, 0,48 ммоль) и **98** (1,5 г, 1,1 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **99**. Выход: 900 мг.

Этап 6. Получение соединения 110

Соединение **110** получили из соединения **109** (900 мг) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **100**. Выход: 920 мг, количественный.

Этап 7. Получение конъюгатов 212 и 215

Конъюгаты **212** и **215** получили из соединений **128** и **108** или **110** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 19а: Синтез конъюгатов 212а и 215а

Схема 41а.

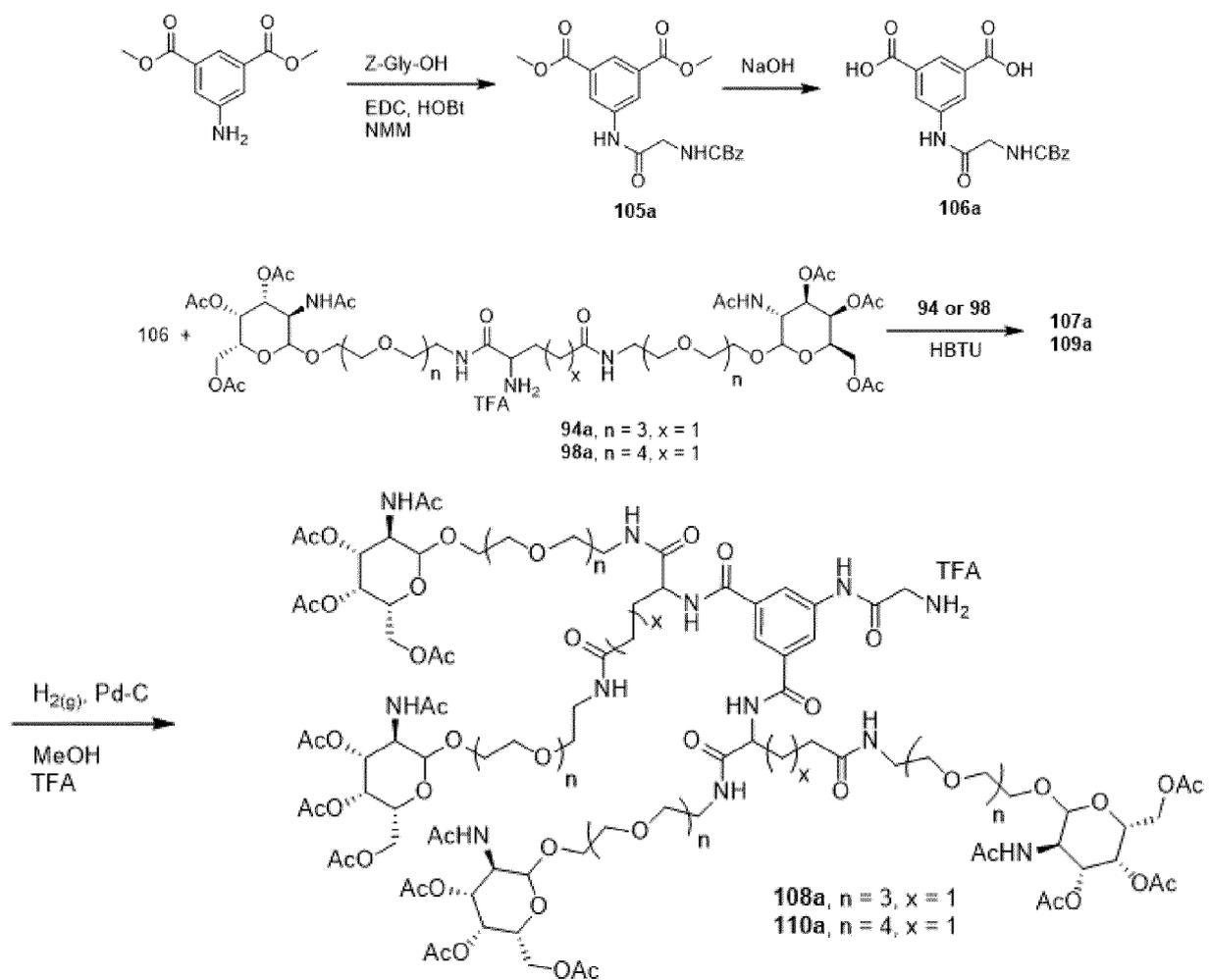
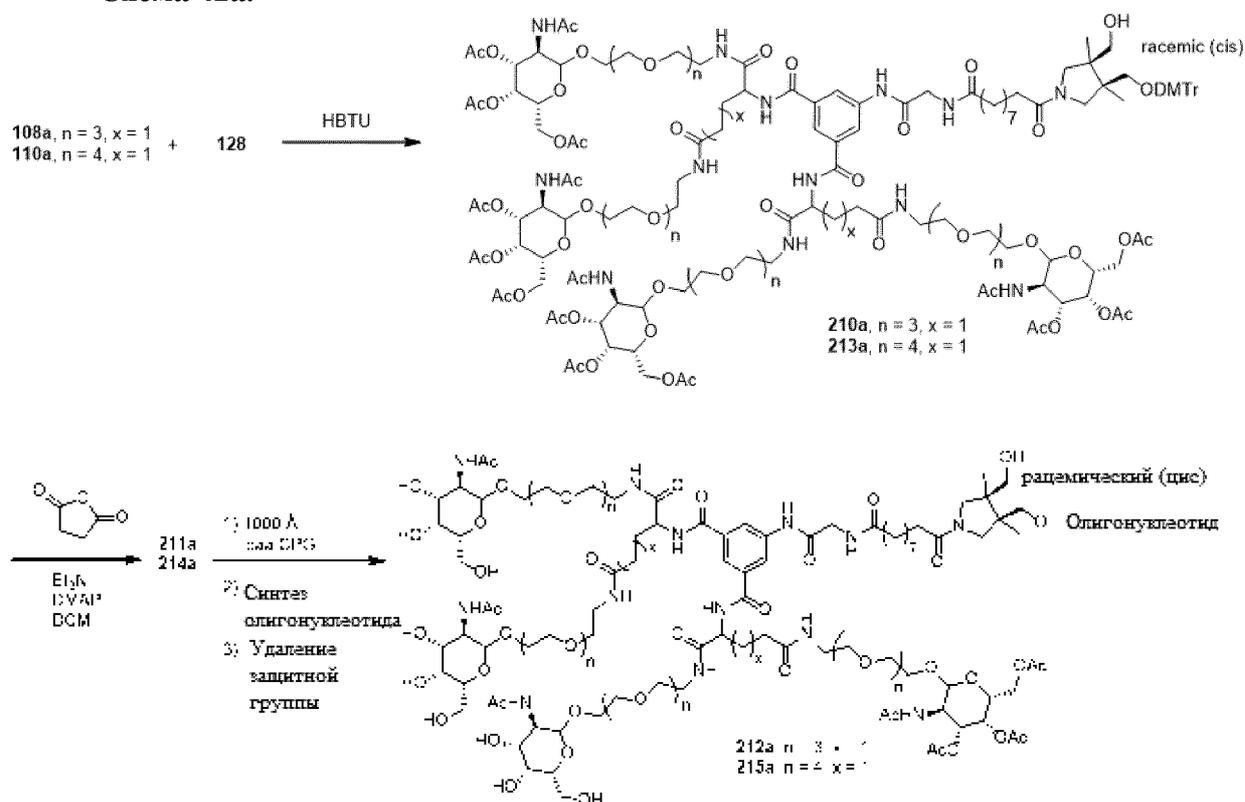


Схема 42а.



Этап 1. Получение диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-

этил)амино)ацетамидо)изофталата 105a

Раствор диметил-5-аминоизофталата (5 г, 24 ммоль), Z-Gly-OH (5 г, 24 ммоль), ЭДК (5 г, 26,3 ммоль), ГОБт (3,6 г, 26,3 ммоль), НММ (N-метилморфолин) (2,9 мл, 26,3 ммоль) в ДМФА (50 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакцию смесь разбавили этилацетатом (250 мл) и промыли 1М HCl (2×100 мл), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (1×100 мл) и соевым раствором (2×100 мл). Сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталата в виде бесцветного твердого вещества (7,2 г, 79%).

Этап 2. Получение 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталевой кислоты 106a

К раствору метил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталата (7,2 г) в метаноле (25 мл) и ТГФ (25 мл) добавили 1М NaOH (25 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем концентрировали для удаления ТГФ и MeOH. Оставшийся водный раствор разбавили водой (75 мл), охладили на водяной бане со льдом и подкислили до pH=1 с помощью 6М HCl. Твердое вещество отфильтровали и промыли водой (3×100 мл). Лиофилизировали твердое вещество с получением 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталевой кислоты (6,9 г, количественный выход).

Этап 3. Получение соединения 107a

Соединение **107a** получили из 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталевой кислоты **106a** (200 мг, 0,54 ммоль) и **94a** (1,7 г, 1,3 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **95**. Выход: 600 мг.

Этап 4. Получение соединения 108a

Соединение **108a** получили из соединения **107a** (600 мг) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **96a**. Выход: 650 мг, количественный.

Этап 5. Получение соединения 109a

Соединение **109a** получили из 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталевой кислоты **106a** (180 мг, 0,48 ммоль) и **98a** (1,5 г, 1,1 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **99**. Выход: 900 мг.

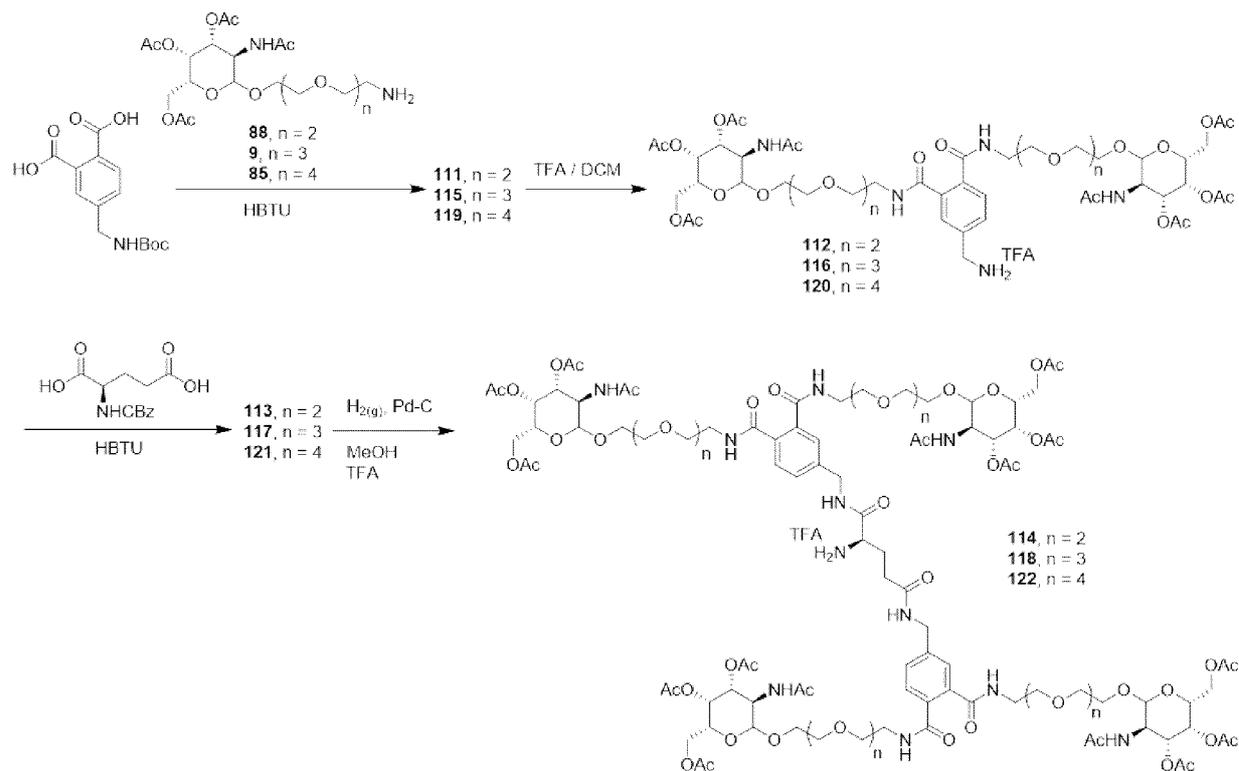
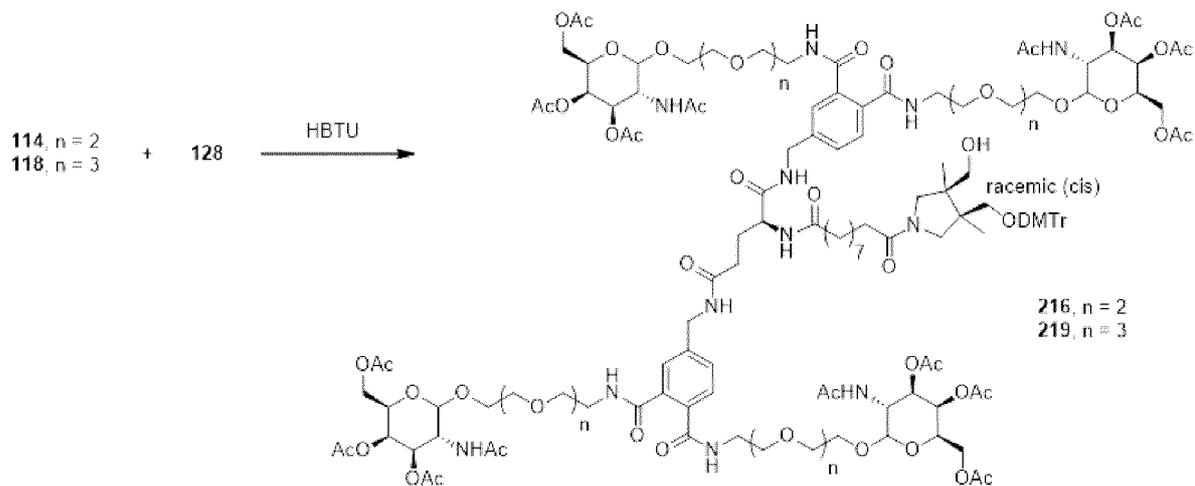
Этап 6. Получение соединения 110a

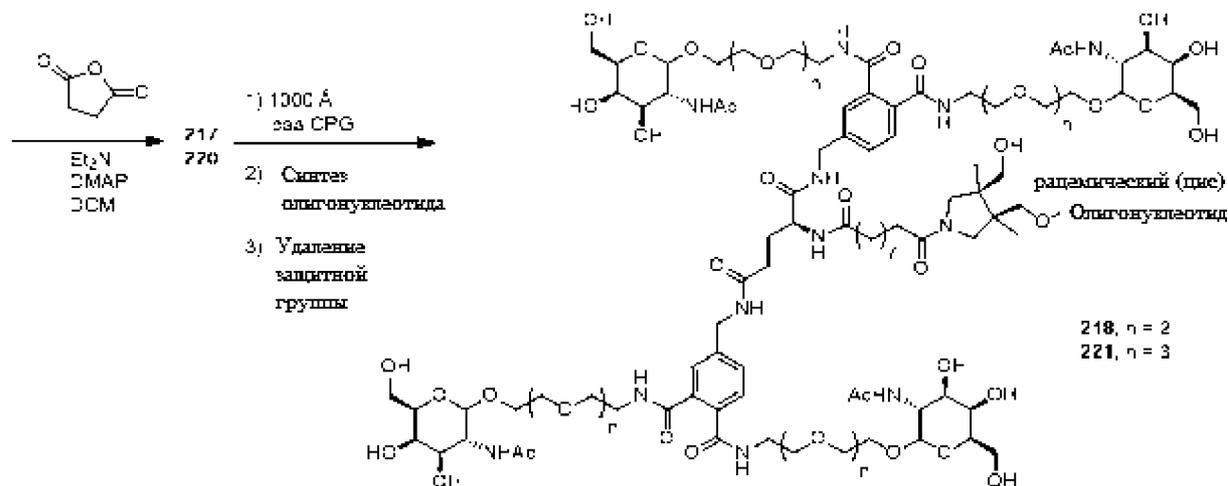
Соединение **110a** получили из соединений **109** (900 мг) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **100**. Выход: 920 мг, количественный.

Этап 7. Получение конъюгатов 212a и 215a

Конъюгаты **212a** и **21a5** получили из соединений **128** и **108a** или **110a** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения

соединения 1.

Пример 20. Синтез конъюгатов 218 и 221**Схема 43****Схема 44**



Этап 1. Получение соединения 111

Соединение **111** получили из 4-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)фталевой кислоты (1,13 г, 3,84 ммоль) и **88** (5 г, 8,44 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 2,21 г, 49%.

Этап 2. Получение соединения 112

Раствор **111** (2,21 г, 1,87 ммоль) в CH_2Cl_2 (40 мл) медленно обработали ТФУ (5 мл). После перемешивания (2 ч) смесь концентрировали и подвергли хроматографической очистке с получением **112** (1,08 г, 47%) в виде бесцветной пены. R_f 0,1 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 3. Получение соединения 113

Соединение **113** получили из соединения **112** (1,08 г, 0,88 ммоль) и (2-оксо-2-фенил-1 λ^2 -этил)-D-глутаминовой кислоты (112 мг, 0,39 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **91**. Выход: 600 мг, 62%.

Этап 4. Получение соединения 114

Соединение **114** получили из соединения **113** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **92**.

Этап 5. Получение соединения 115

Соединение **115** получили из 4-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)фталевой кислоты (3,94 г, 13,3 ммоль) и **9** (18,2 г, 29,4 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **93**. Выход: 9,02 г, 53%.

Этап 6. Получение соединения 116

Соединение **116** получили из соединения **115** (8 г, 6,3 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **112**. Выход: 3,23 г, 39%.

Этап 7. Получение соединения 117

Соединение **117** получили из соединения **116** (3,23 г, 2,45 ммоль) и (2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)-D-глутаминовой кислоты (192 мг, 1,1 моль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **95**. Выход: 2,22 г, 34%.

Этап 8. Получение соединения **118**

Соединение **118** получили из соединения **117** (2,22 г, 0,84 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **96**. Выход: 2,02 г, 91%.

Этап 9. Получение конъюгатов **218** и **221**

Конъюгаты **218** и **221** получили из соединений **128** и **114** или **118** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 20а: Синтез конъюгатов **218а** и **221а**

Схема 43а.

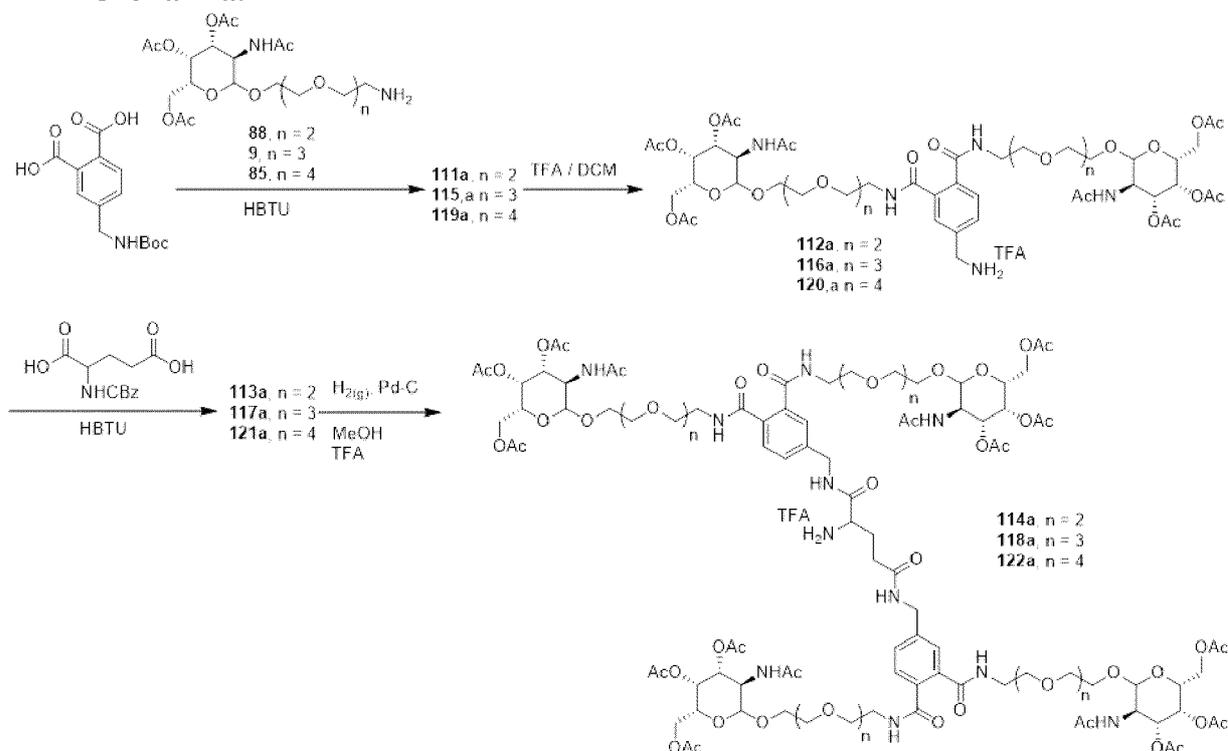
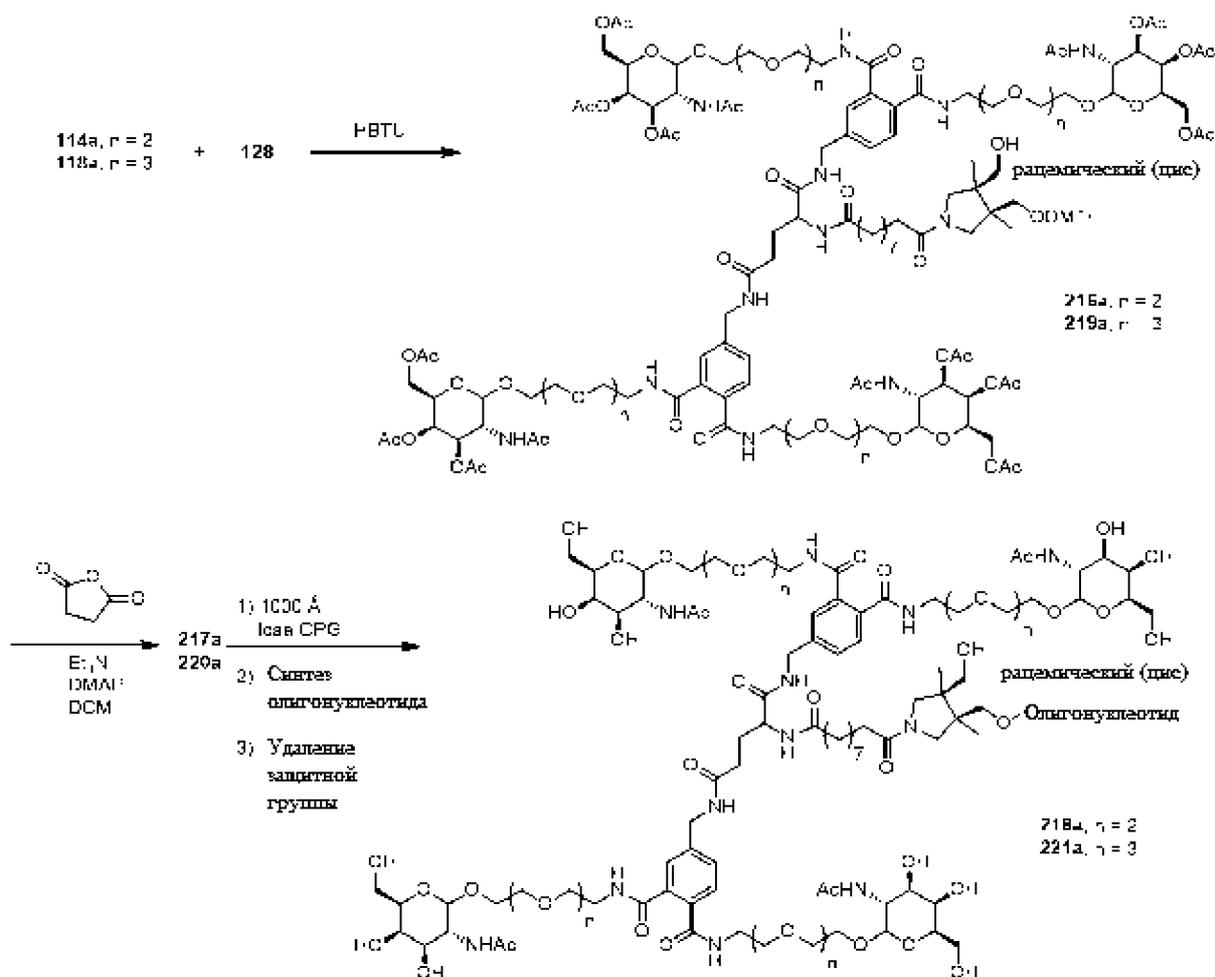


Схема 44а.



Этап 1. Получение соединения 111a

Соединение **111a** получили из 4-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)фталевой кислоты (1,13 г, 3,84 ммоль) и **88** (5 г, 8,44 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 2,21 г, 49%.

Этап 2. Получение соединения 112a

Раствор **111a** (2,21 г, 1,87 ммоль) в CH_2Cl_2 (40 мл) медленно обработали ТФУ (5 мл). После перемешивания (2 ч) смесь концентрировали и подвергли хроматографической очистке с получением **112a** (1,08 г, 47%) в виде бесцветной пены. R_f 0,1 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Этап 3. Получение соединения 113a

Соединение **113a** получили из соединения **112a** (1,08 г, 0,88 ммоль) и (2-оксо-2-фенил-1 λ^2 -этил)-D-глутаминовой кислоты (112 мг, 0,39 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **91**. Выход: 600 мг, 62%.

Этап 4. Получение соединения 114a

Соединение **114a** получили из соединения **113a** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **92**.

Этап 5. Получение соединения 115а

Соединение **115а** получили из 4-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)фталевой кислоты (3,94 г, 13,3 ммоль) и **9** (18,2 г, 29,4 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **93**. Выход: 9,02 г, 53%.

Этап 6. Получение соединения 116а

Соединение **116а** получили из соединения **115а** (8 г, 6,3 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **11а**. Выход: 3,23 г, 39%.

Этап 7. Получение соединения 117а

Соединение **117а** получили из соединения **116а** (3,23 г, 2,45 ммоль) и (2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)-D-глутаминовой кислоты (192 мг, 1,1 моль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **95**. Выход: 2,22 г, 34%.

Этап 8. Получение соединения 118а

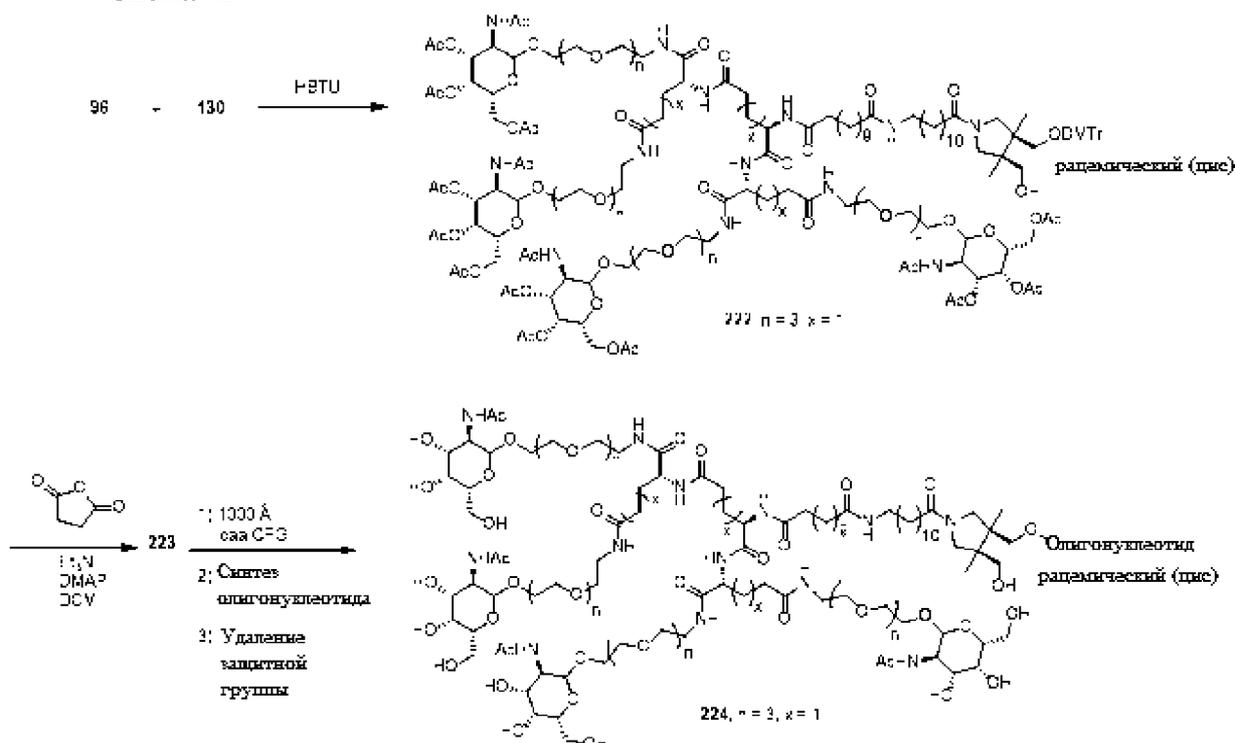
Соединение **118а** получили из соединения **117а** (2,22 г, 0,84 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **96**. Выход: 2,02 г, 91%.

Этап 9. Получение конъюгатов 21а8 и 221а

Конъюгаты **218а** и **22а1** получили из соединений **128** и **114а** или **118а** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 21. Синтез конъюгата 224

Схема 45

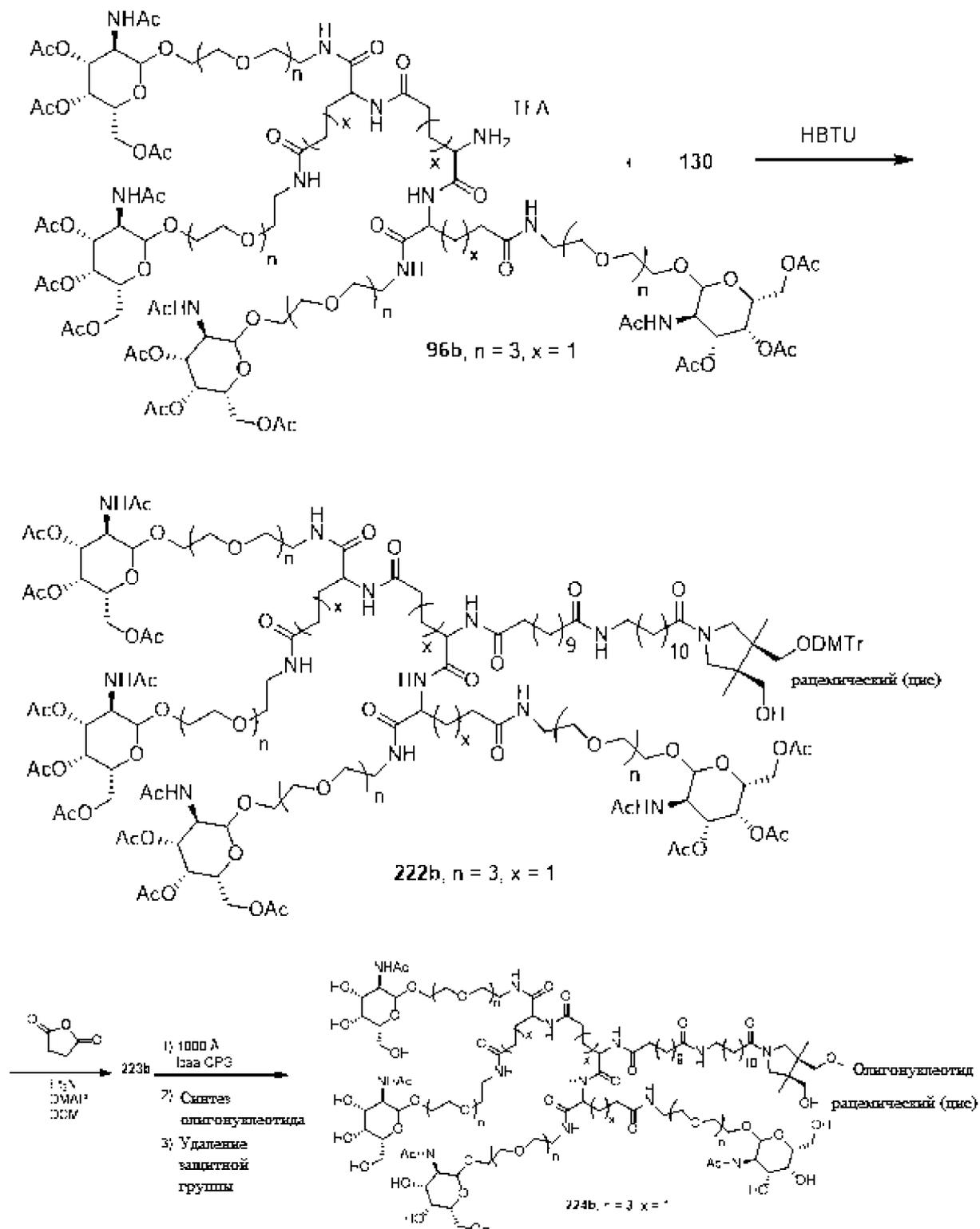


Этап 1. Получение соединения 224

Конъюгат **224** получили из соединений **96** и **130** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 21а: Синтез конъюгата 224b

Схема 45а.



Этап 1. Получение соединения 224b

Конъюгат **224b** получили из соединений **96b** и **130** с использованием методики,

идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 22 Синтез конъюгата 231

Схема 46

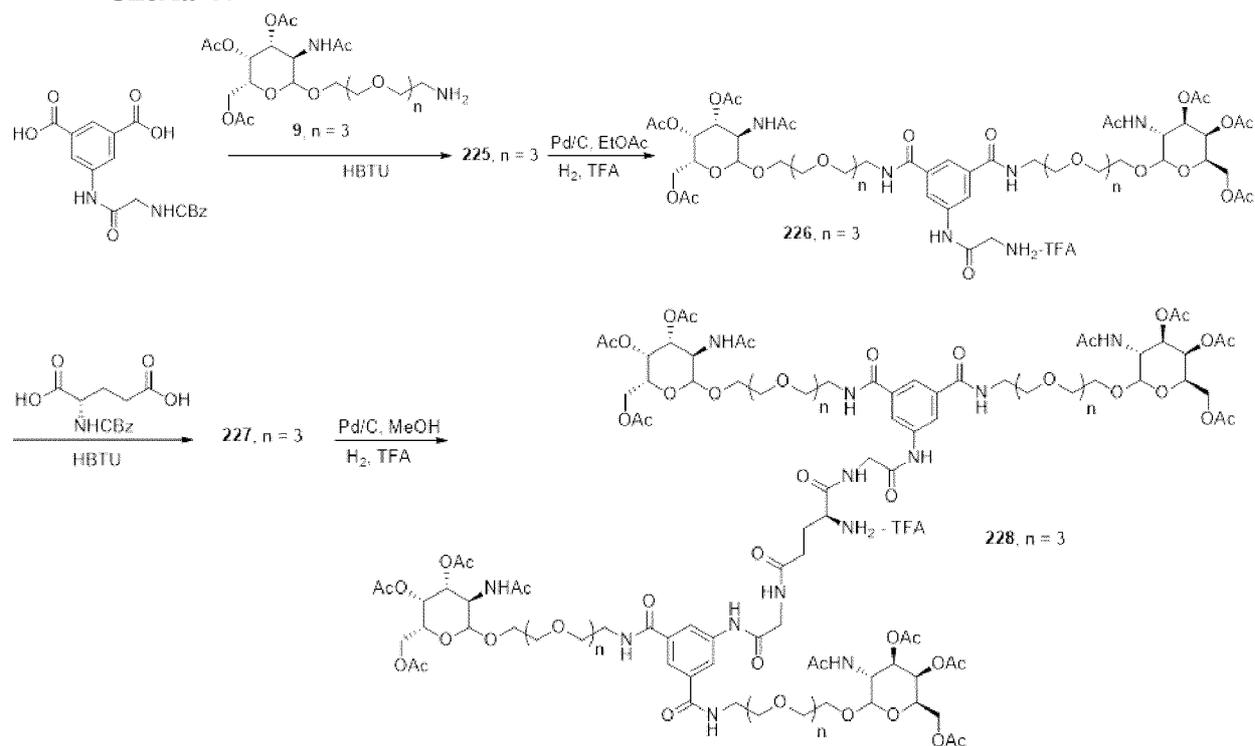
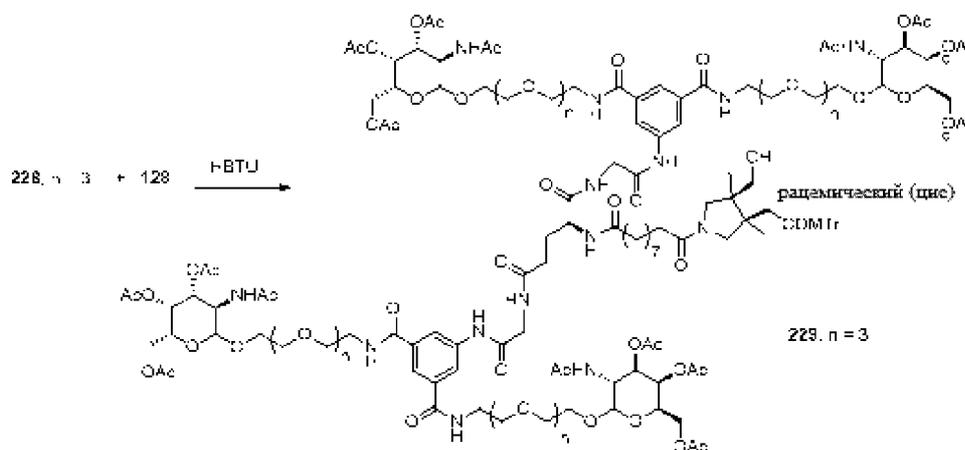
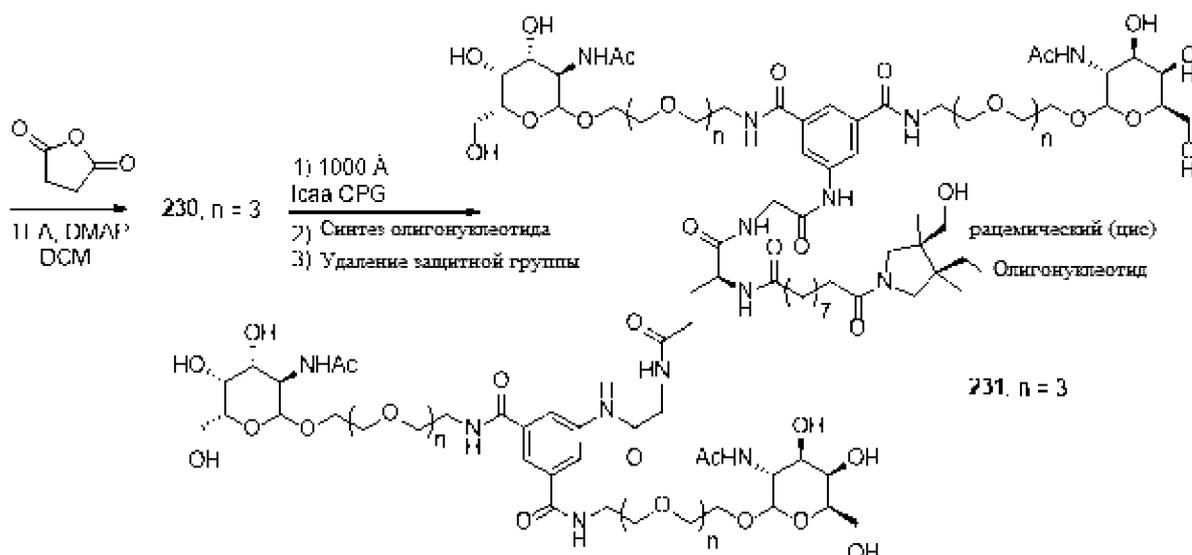


Схема 47





Стадия 1 Получение соединения 225

Соединение **225** получили из 5-(2-аминоацетида)изофталевой кислоты **106** (560 мг, 1,5 ммоль) и **9** (2,24 г, 3,6 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 1,6 г, 80%.

Стадия 2 Получение соединения 226

Соединение **226** получили путем, идентичным получению **14**. Выход: 1,22 г, 78%.

Стадия 3 Получение соединения 227

Соединение **227** получили путем, идентичным получению **89**, из *Z*-глутаминовой кислоты (108 мг, 0,38 ммоль) и **226** (1,22 г, 0,92 ммоль). Выход: 471 мг, 45%.

Стадия 4 Получение соединения 228

Соединение **228** получили путем, идентичным получению **14**. Выход: 460 мг, количественный.

Стадия 5 Получение соединения 229

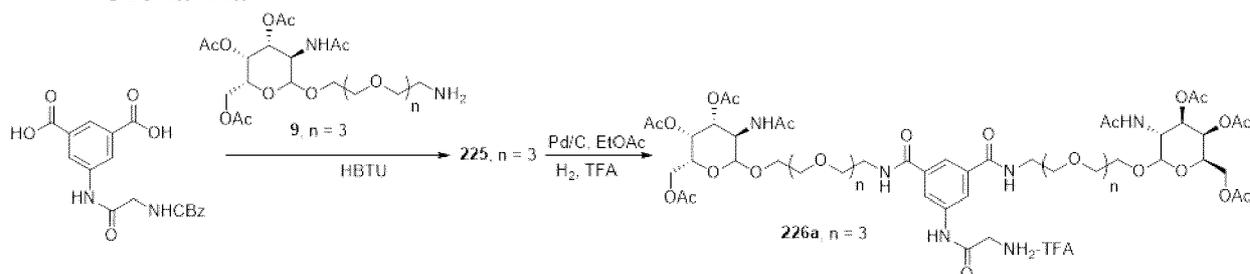
Соединение **229** получили из **228** (460 мг, 0,17 ммоль) и **128** (125 мг, 0,19 ммоль) путем, идентичным получению **89**. Выход: 365 мг, 66%.

Стадия 6 Получение соединения 231

Конъюгат **231** получили с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 22а Синтез конъюгата 231а

Схема 46а



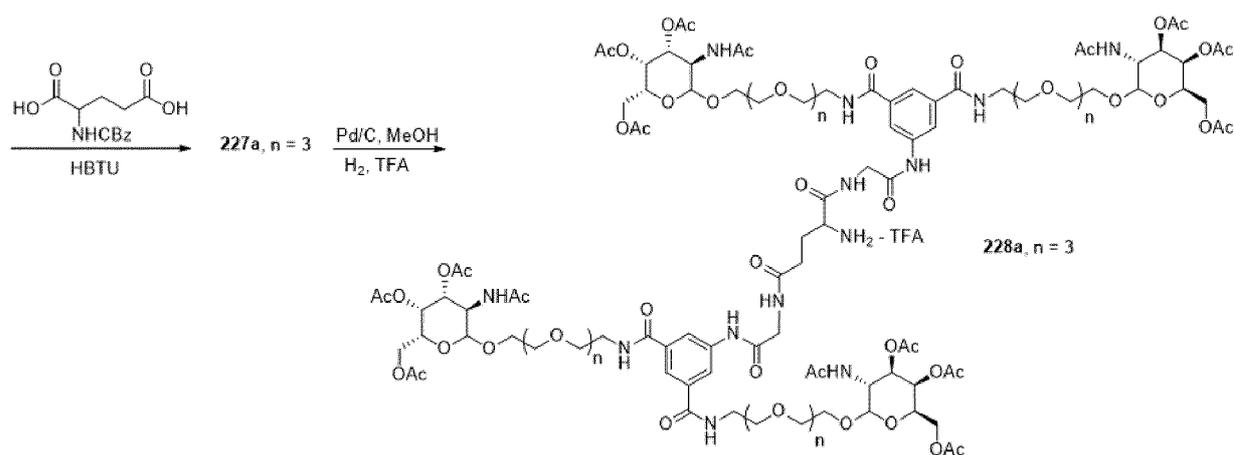
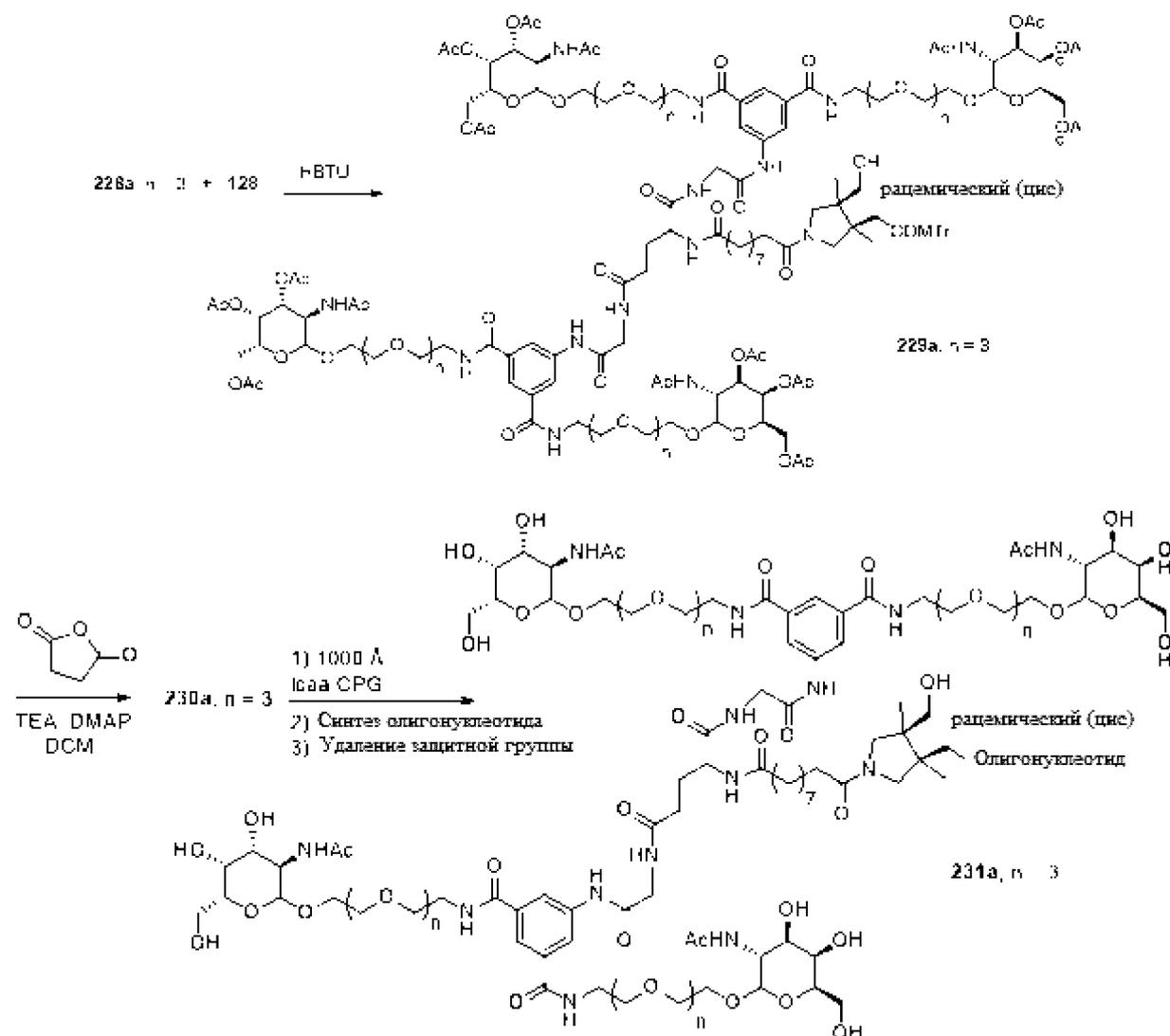


Схема 47а



Стадия 1 Получение соединения 225а

Соединение **225a** получили из 5-(2-аминоацетида)изофталевой кислоты **106** (560 мг, 1,5 ммоль) и **9** (2,24 г, 3,6 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 1,6 г, 80%.

Стадия 2 Получение соединения 226а

Соединение **226a** получили путем, идентичным получению **14**. Выход: 1,22 г, 78%.

Стадия 3 Получение соединения **227a**

Соединение **227a** получили путем, идентичным получению **89**, из Z-глутаминовой кислоты (108 мг, 0,38 ммоль) и **226a** (1,22 г, 0,92 ммоль). Выход: 471 мг, 45%.

Стадия 4 Получение соединения **228a**

Соединение **228a** получили путем, идентичным получению **14**. Выход: 460 мг, количественный.

Стадия 5 Получение соединения **229a**

Соединение **229a** получили из **228a** (460 мг, 0,17 ммоль) и **128** (125 мг, 0,19 ммоль) путем, идентичным получению **89**. Выход: 365 мг, 66%.

Стадия 6 Получение соединения **231a**

Соединение **231a** получили с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 22b Синтез конъюгата **231b**

Схема 46b

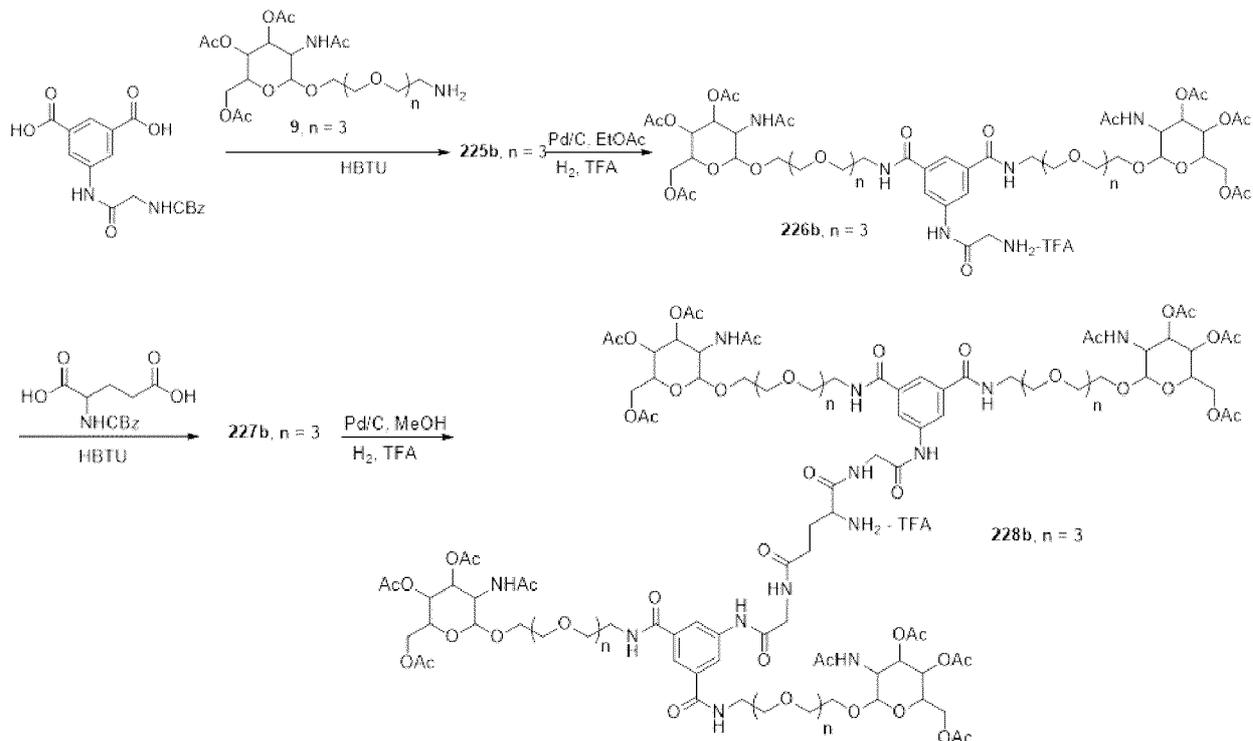
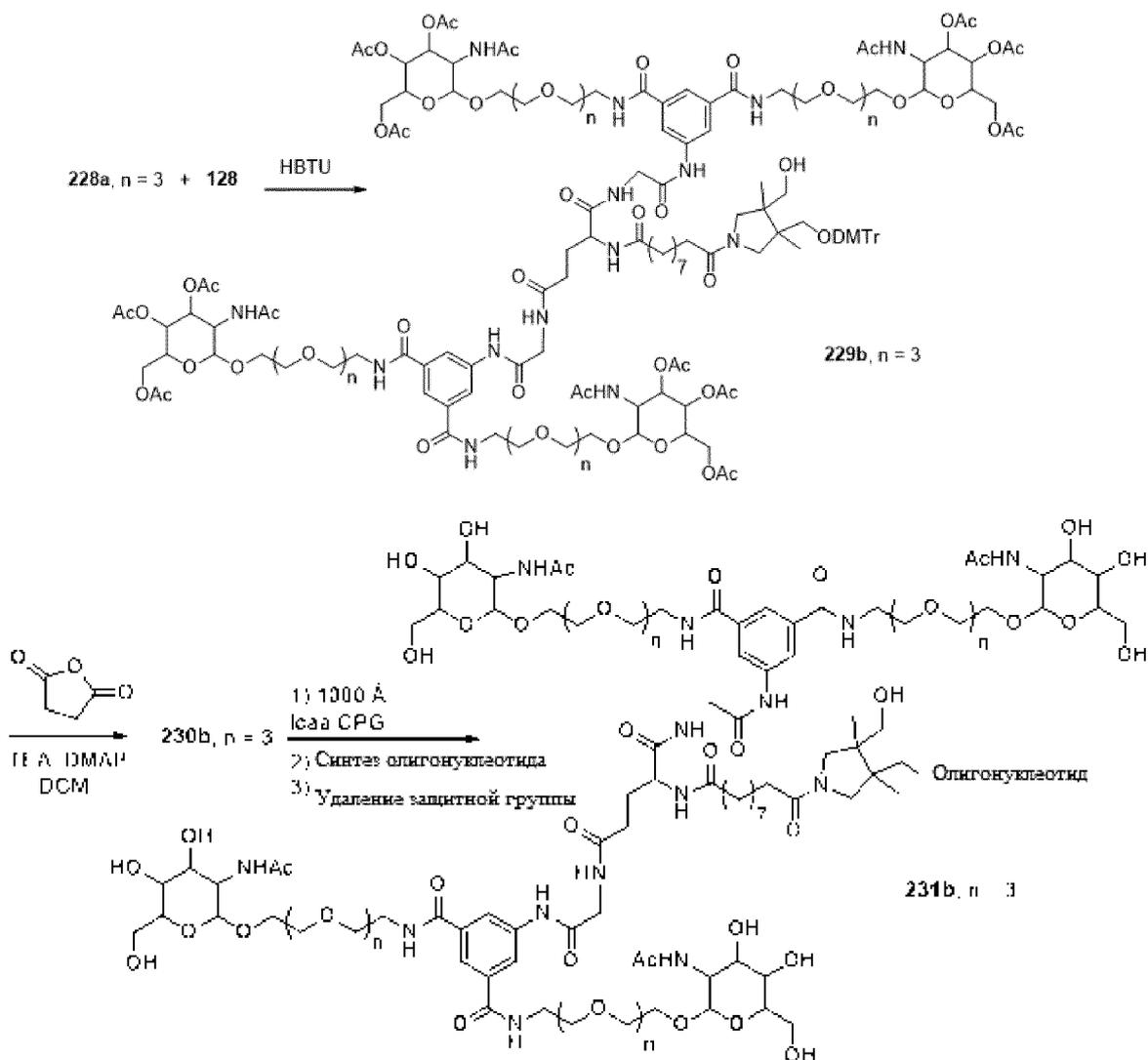


Схема 47b



Стадия 1 Получение соединения 225b

Соединение **225b** получили из 5-(2-аминоацетило)изофталевой кислоты **106** (560 мг, 1,5 ммоль) и **9** (2,24 г, 3,6 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **89**. Выход: 1,6 г, 80%.

Стадия 2 Получение соединения 226b

Соединение **226b** получили путем, идентичным получению **14**. Выход: 1,22 г, 78%.

Стадия 3 Получение соединения 227b

Соединение **227b** получили путем, идентичным получению **89**, из Z-глутаминовой кислоты (108 мг, 0,38 ммоль) и **226b** (1,22 г, 0,92 ммоль). Выход: 471 мг, 45%.

Стадия 4 Получение соединения 228b

Соединение **228b** получили путем, идентичным получению **14**. Выход: 460 мг, количественный.

Стадия 5 Получение соединения 229b

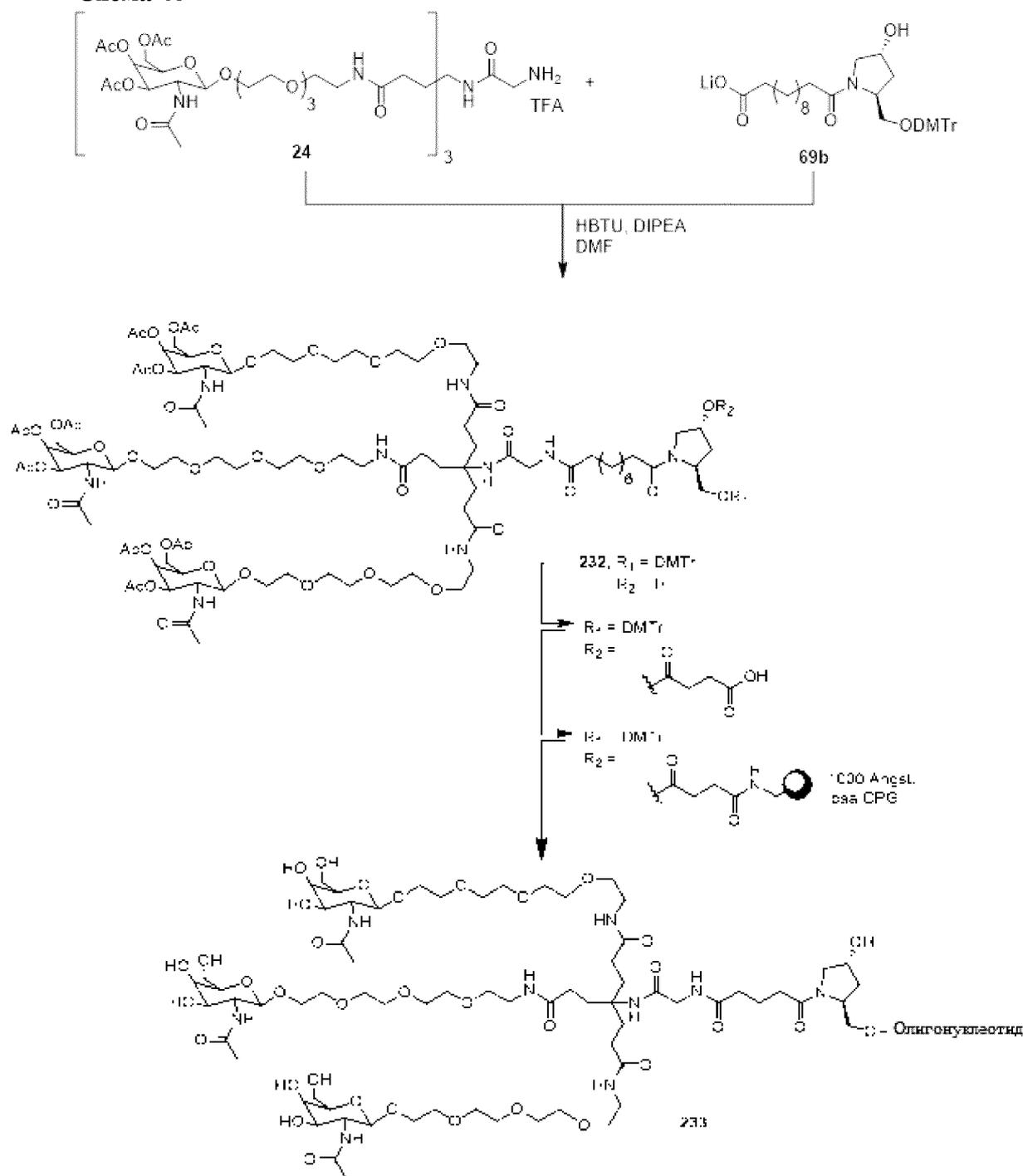
Соединение **229b** получили из **228b** (460 мг, 0,17 ммоль) и **128** (125 мг, 0,19 ммоль) путем, идентичным получению **89**. Выход: 365 мг, 66%.

Стадия 6 Получение соединения 231b

Конъюгат **231b** получили с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 23. Синтез конъюгата **233**

Схема 48



Этап 1. Получение соединения **232**

Соединение **232** получили из соединения **24** (650 мг, 0,33 ммоль) и соединения **69b** (175 мг, 0,33 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **19**. Выход: 380 мг, 47%.

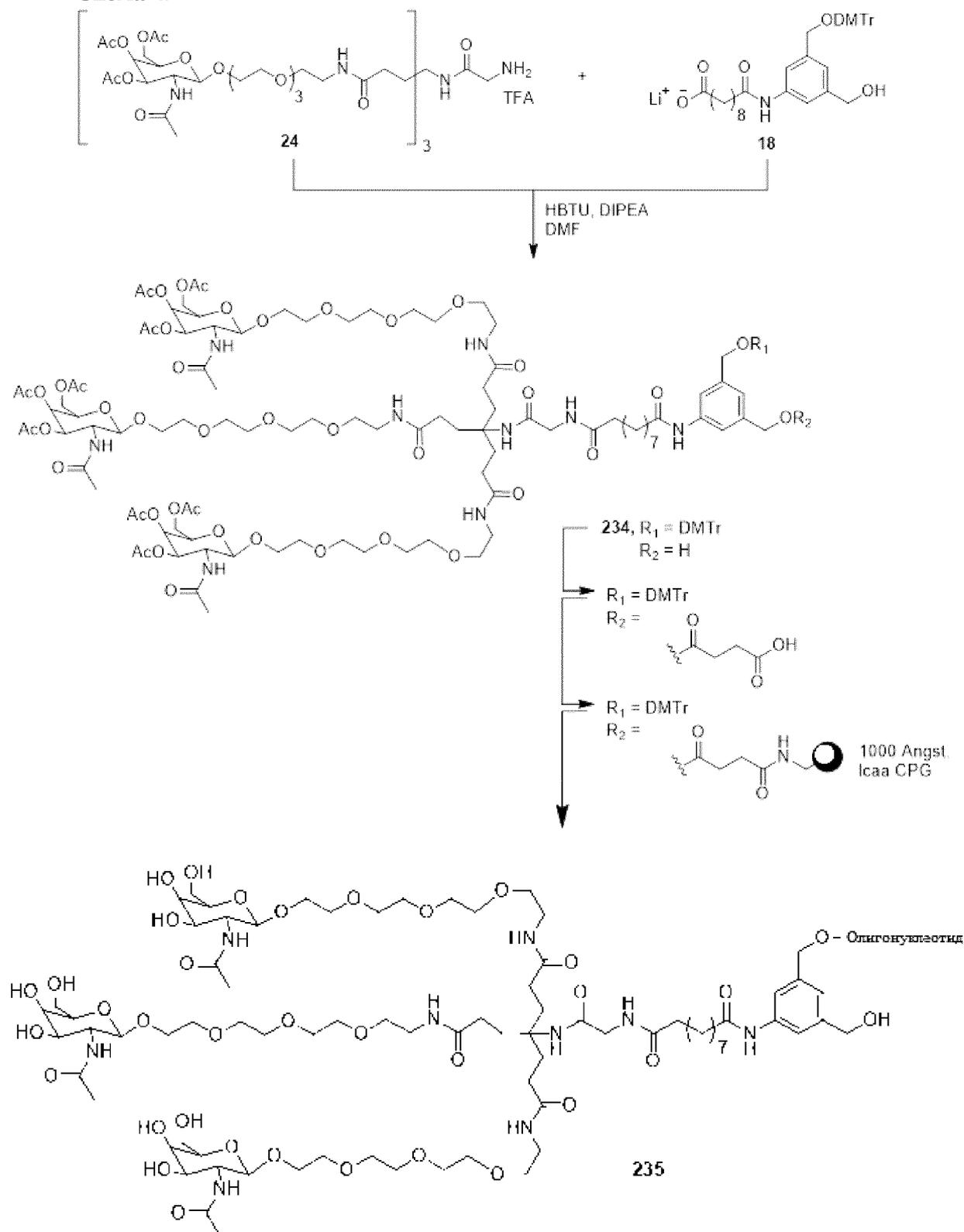
Этап 2. Получение соединения **233**

Соединение **233** получили из соединения **232** с использованием методики,

идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 24. Синтез конъюгата **235**

Схема 49



Этап 1. Получение соединения **234**

Соединение **234** получили из соединения **24** (1,1 г, 0,55 ммоль) и соединения **18** (175 мг, 0,33 ммоль) с использованием методики, идентичной той, которая использовалась

для получения соединения **19**. Выход: 685 мг, 51%.

Этап 2. Получение соединения 235

Соединение **235** получили из соединения **234** с использованием методики, идентичной той, которая использовалась для получения соединения **1**.

Пример 25. Тестирование in vitro конъюгатов вируса гепатита В (HBV)

Хроническая HBV-инфекция является заболеванием, распространенным во всем мире, с прогрессирующим повреждением печени. Имеющиеся в настоящее время способы лечения могут снижать вирусную ДНК, но мало влияют на вирусные антигены, которые в значительной степени способствуют прогрессированию заболевания. Таким образом, были разработаны миРНК для нацеливания на HBV для снижения вирусных антигенов.

Химически модифицированные миРНК HBV, описанные в Таблице 1, конъюгированные с лигандами GalNAc, тестировали на активность in vivo на представленной мышинной модели инфекции HBV. В мышинной модели AAV-HBV1.2 C57BL/6 стабильная и постоянная экспрессия HBV достигается после инъекции вектора аденоассоциированного вируса (AAV), кодирующего последовательность сверхгеномной длины HBV, что приводит к печеночной экспрессии РНК HBV и белков и секреции вирусных и субвирусных частиц в кровь.

Конструкция AAV-HBV1.2, использованная в этих исследованиях, была основана на деталях, предоставленных Dion, S., et al., Journal of Virology, 2013, 87(10): 5554–5563. Все связанные с животными процедуры проводились в соответствии с письменными операционными процедурами, в соответствии с Руководством Канадского совета по уходу за животными (CCAC) по надлежащей практике для животных и утвержденными местным Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC).

Каждое животное было инокулировано 1E11 векторными геномами (VG) вектора AAV-HBV1.2. Перед лечением у всех животных определяли пробы крови и определяли уровни HBsAg в сыворотке для отдельных животных, чтобы подтвердить установленную экспрессию HBV.

Лечение миРНК: Группам мышей (обычно n=5) вводили однократную дозу конъюгата миРНК HBV 3 мг/кг один раз в день 0 (1 доза на животное) путем подкожной инъекции в лопаточную область. Одна группа животных, которой вводили только несущую среду (физиологический раствор), служила контролем.

Взятие образцов: У всех мышей было проведено тестирование крови в день 0 до лечения и в определенные моменты времени после введения испытуемого изделия (например, в дни исследования 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 и 70) чтобы определить максимальное снижение уровня HBsAg в сыворотке и длительность фармакологической активности.

Анализ: Уровни HBsAg в образцах сыворотки определяли с использованием набора Biorad EIA GS HBsAg 3.0 (BioRad, № по каталогу 32591) в соответствии с инструкциями производителя. Смешанную сыворотку из каждой группы лечения использовали для определения средних уровней HBsAg в группе в отдельные моменты

времени. Данные анализировали и выражали в виде уровней HBsAg относительно исходного уровня до лечения (% относительно дня 0).

Результаты. Результаты тестирования каждой из химически модифицированных миРНК HBV, описанных в Таблице 1, представлены в Таблице 2. Значения представляют собой уровни % HBsAg (относительно исходного уровня дня 0) в дни 7, 14, 21, 28, 42, 49, 56 и 70 после лечения.

Таблица 1. Химически модифицированные дуплексы миРНК HBV

| Номер миРНК | Смысловая цепь SEQ ID NO | Смысловая цепь 5' – 3' | Смысловая цепь SEQ ID NO | Антисмысловая цепь 5'–3' |
|-------------|--------------------------|--|--------------------------|--|
| 1 | SEQ ID NO:1 | csgsugug <u>CaCUU</u> cgcuucaccu | SEQ ID NO:2 | as <u>G</u> sgug <u>AaGC</u> gaagU g <u>C</u> acacgsgsuUU |
| 2 | SEQ ID NO:3 | usgs <u>CaCUU</u> cgcu ucaccu | SEQ ID NO:4 | as <u>G</u> sgug <u>AaGC</u> gaagU g <u>C</u> acascsgU |
| 3 | SEQ ID NO:5 | usgsca <u>CUU</u> cgcu ucaccu | SEQ ID NO:6 | as <u>G</u> sgugaagcgaagUg <u>C</u> acascsgU |
| 4 | SEQ ID NO:7 | usgsca <u>CUUC</u> cgcu ucaccu | SEQ ID NO:8 | as <u>G</u> sgug <u>Aagc</u> gaagUg <u>C</u> acascsgU |
| 5 | SEQ ID NO:9 | <u>C</u> scs <u>GuGuGcAC</u> <u>UucGcuu</u> <u>Cacc</u> | SEQ ID NO:10 | gs <u>GsUgAaGcgAaguG</u> c <u>AcAcGgsusc</u> |
| 6 | SEQ ID NO:11 | cscsgugu <u>GcACU</u> ucgcuucacc | SEQ ID NO:12 | gs <u>GsugaAgCGaaguG</u> c <u>Acacggsusc</u> |
| 7 | SEQ ID NO:13 | cscsgu <u>GuGcAcU</u> ucgcuucacc | SEQ ID NO:14 | gs <u>GsugaAgCGaaguG</u> c <u>Acacggsusc</u> |
| 8 | SEQ ID NO:15 | cscsgugu <u>GcACU</u> ucgcuu <u>Cacc</u> | SEQ ID NO:16 | gs <u>GsugaAgCgaaguGc</u> <u>AcacGgsusc</u> |
| 9 | SEQ ID NO:17 | cscsgugugc <u>ACU</u> ucgcuucacc | SEQ ID NO:18 | gs <u>GsugaagcgaaguGc</u> <u>Acacggsusc</u> |
| 10 | SEQ ID NO:19 | cscsgugu <u>Gcacuu</u> cgcuucacc | SEQ ID NO:20 | gsgsuga <u>AgCGaagugc</u> acacggsusc |
| 11 | SEQ ID NO:21 | <u>C</u> scs <u>GuGuGcAC</u> <u>UucGcuu</u> <u>Cacc</u> | SEQ ID NO:22 | gs <u>GsUgAaGcgAaguG</u> c <u>AcAcGgsuscUU</u> |

| | | | | |
|----|--------------|---|--------------|--|
| 12 | SEQ ID NO:23 | <u>cscsguguGcACU</u> ucgcuucacc | SEQ ID NO:24 | gs <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>G</u> c <u>A</u> cacggsuscUU |
| 13 | SEQ ID NO:25 | <u>cscsguGuGcAcU</u> ucgcuucacc | SEQ ID NO:26 | gs <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>G</u> c <u>A</u> cacggsuscUU |
| 14 | SEQ ID NO:27 | <u>cscsguguGcACU</u> ucgcuu <u>C</u> acc | SEQ ID NO:28 | gs <u>G</u> suga <u>AgC</u> gaagu <u>Gc</u> <u>A</u> cac <u>G</u> gsuscUU |
| | | | | |
| 15 | SEQ ID NO:29 | <u>GsusGcACUucG</u> cuu <u>C</u> acc | SEQ ID NO:30 | gs <u>G</u> s <u>UgAaGcgA</u> agu <u>G</u> c <u>A</u> c <u>A</u> cs <u>G</u> sgU |
| | | | | |
| 16 | SEQ ID NO:31 | <u>GsusGcACUucG</u> cuu <u>C</u> acc | SEQ ID NO:32 | gs <u>G</u> s <u>UgAaGcgA</u> agu <u>G</u> c <u>A</u> c <u>A</u> cs <u>G</u> sg |
| 17 | SEQ ID NO:33 | <u>GsusGcACUucG</u> cuu <u>C</u> acc | SEQ ID NO:34 | gs <u>G</u> s <u>UgAaGcgA</u> agu <u>G</u> c <u>A</u> cs <u>A</u> scs <u>G</u> sg |
| | | | | |
| 18 | SEQ ID NO:35 | <u>CscsGuGuGcAC</u> <u>UucG</u> cuu <u>C</u> aca | SEQ ID NO:36 | us <u>G</u> s <u>UgAaGcgA</u> agu <u>G</u> c <u>A</u> c <u>A</u> c <u>G</u> gsusc |
| | | | | |
| 19 | SEQ ID NO:37 | <u>CscsGuGuGcAC</u> <u>UucG</u> cuu <u>C</u> aca | SEQ ID NO:38 | us <u>G</u> s <u>UgAaGcgA</u> agu <u>G</u> c <u>A</u> c <u>A</u> c <u>G</u> gsuscUU |
| 20 | SEQ ID NO:39 | <u>cscsguguGcACU</u> ucgcuucaca | SEQ ID NO:40 | us <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>G</u> c <u>A</u> cacggsuscUU |
| 21 | SEQ ID NO:41 | <u>cscsguGuGcAcU</u> ucgcuucaca | SEQ ID NO:42 | us <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>G</u> c <u>A</u> cacggsuscUU |
| 22 | SEQ ID NO:43 | <u>cscsguguGcACU</u> ucgcuu <u>C</u> aca | SEQ ID NO:44 | us <u>G</u> suga <u>AgC</u> gaagu <u>Gc</u> <u>A</u> cac <u>G</u> gsuscUU |
| 23 | SEQ ID NO:45 | <u>cscsgugugcACU</u> ucgcuucaca | SEQ ID NO:46 | us <u>G</u> sugaagcgaagu <u>Gc</u> <u>A</u> cacggsuscUU |
| | | | | |
| 24 | SEQ ID NO:47 | gsus <u>GcACUucgc</u> uucaca | SEQ ID NO:48 | us <u>G</u> suga <u>AgCG</u> aagu <u>G</u> c <u>A</u> cacs <u>g</u> sgU |
| 25 | SEQ ID NO:49 | gsus <u>gcACUucgc</u> uucaca | SEQ ID NO:50 | us <u>G</u> sugaagcgaagu <u>Gc</u> <u>A</u> cacs <u>g</u> sgU |
| 26 | SEQ ID NO:51 | gsus <u>GcaCUucgc</u> | SEQ ID NO:52 | us <u>G</u> sugaagcgaagu <u>Gc</u> |

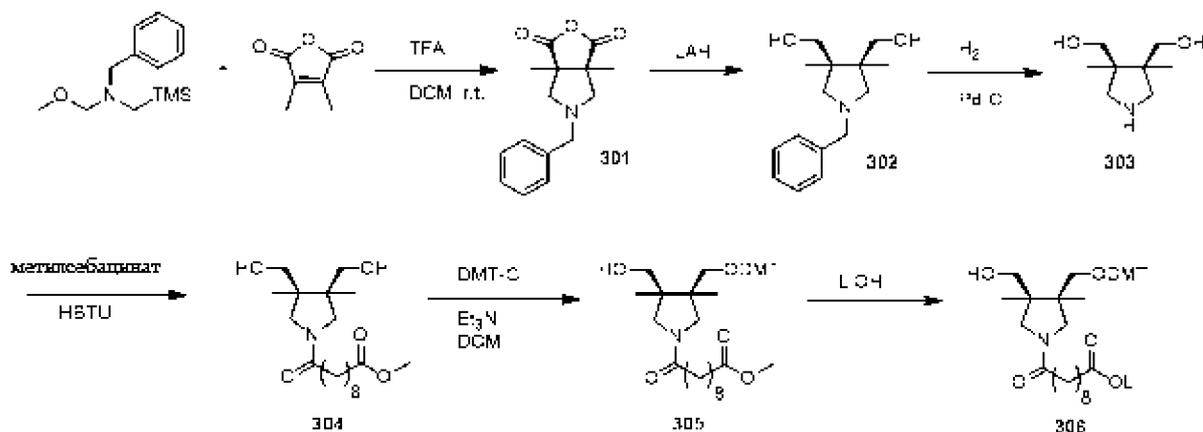
| Номер | ение лиганда № | 7 | 14 | 21 | 28 | 42 | 49 | 56 | 70 |
|--------------------------------|----------------------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| Физиологический раствор | | 95,7 | 118,6 | 101,0 | 111,4 | 115,3 | | 112,2 | 106,5 |
| 1 | 145 | 3,1 | 1,0 | 22,8 | 1,3 | | 3,2 | | 7,3 |
| 2 | 145 | 1,3 | 0,5 | 0,4 | 0,7 | | 3,4 | | 6,5 |
| 5 | 235 | 12,7 | 7,0 | 9,6 | 21,3 | 59,7 | | 74,6 | 98,8 |
| 5 | 233 | 16,6 | 8,2 | 11,0 | 12,6 | 24,4 | | 32,2 | 60,3 |
| 5 | 145 | 4,3 | 1,2 | 1,7 | 2,4 | | 11,9 | | 24,5 |
| 6 | 233 | 20,1 | 10,4 | 10,9 | 13,5 | 30,8 | | 46,0 | 67,5 |
| 7 | 233 | 20,7 | 12,4 | 10,5 | 13,6 | 24,9 | | 46,2 | 77,0 |
| 8 | 233 | 18,1 | 10,5 | 11,5 | 12,1 | 26,0 | | 37,6 | 64,9 |
| 9 | 145 | 10,0 | 2,7 | 2,0 | 3,6 | | 6,8 | | 17,0 |
| 10 | 145 | 16,7 | 16,7 | 16,0 | 16,7 | | 74,4 | | 97,3 |
| 11 | 233 | 20,5 | 14,8 | 16,0 | 23,9 | 65,2 | | 80,2 | |
| 12 | 233 | 18,4 | 11,6 | 12,2 | 14,1 | 23,6 | | 67,1 | 72,6 |
| 12 | 145 | 5,1 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 2,2 | | 4,5 | 8,2 |
| 13 | 233 | 20,7 | 10,1 | 11,6 | 13,2 | 21,1 | | 39,9 | 72,3 |
| 14 | 233 | 16,5 | 8,0 | 11,0 | 11,8 | 28,8 | | 48,0 | 90,0 |
| 15 | 145 | 6,3 | 3,5 | 8,4 | 11,4 | | 89,7 | | 83,1 |
| 16 | 145 | 4,0 | 3,4 | 9,7 | 14,8 | | 85,1 | | 88,9 |
| 17 | 145 | 2,4 | 0,6 | 0,7 | 1,1 | | 6,3 | | 15,1 |
| 18 | 233 | 2,5 | 1,0 | 1,3 | 2,6 | 11,2 | | 24,5 | 55,6 |
| 19 | 233 | 1,9 | 0,8 | 1,5 | 2,6 | 6,5 | | 12,9 | 23,4 |
| 19 | 145 | 1,7 | 0,6 | 0,7 | 1,4 | 3,8 | | 7,3 | 15,0 |
| 19 | 200 | 1,8 | 0,9 | 1,4 | 2,2 | 5,4 | | 10,2 | 27,5 |
| 19 | 197 | 2,0 | 0,8 | 1,4 | 2,1 | 3,1 | | 8,4 | 14,2 |
| 19 | 194 | 2,8 | 1,8 | 2,2 | 4,0 | 10,7 | | 26,0 | 37,3 |
| 20 | 145 | 2,7 | 0,5 | 0,7 | 1,0 | 4,7 | | 9,3 | 11,3 |
| 20 | 215 | 3,4 | 1,5 | 1,7 | 1,7 | 1,9 | | 4,5 | 6,2 |
| 20 | 194 | 1,4 | 0,5 | 0,3 | 0,7 | 1,2 | | 3,0 | 6,0 |
| 20 | 197 | 3,4 | 0,6 | 1,0 | 1,3 | 2,1 | | 4,9 | 8,2 |

| | | | | | | | | | |
|----|-----|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 20 | 212 | 3,2 | 0,8 | 1,0 | 1,9 | 2,4 | | 4,9 | 7,5 |
| 20 | 191 | 3,3 | 1,4 | 1,4 | 2,1 | 1,9 | | 1,2 | 3,4 |
| 21 | 215 | 2,5 | 1,1 | 1,9 | 2,6 | 3,8 | | 7,8 | 9,8 |
| 22 | 233 | 2,5 | 2,0 | 3,1 | 6,1 | 12,2 | | 30,4 | 61,9 |
| 23 | 215 | 1,6 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | | 1,0 | 1,7 |
| 24 | 197 | 1,9 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | | 1,7 | 3,2 |
| 25 | 197 | 2,1 | 2,2 | 0,9 | 0,5 | 0,9 | | 2,0 | 2,2 |
| 27 | 145 | 0,3 | 0,3 | 1,6 | 7,4 | | 71,1 | | 100,1 |
| 28 | 145 | 11,4 | 6,7 | 7,1 | 9,6 | 20,8 | | 27,1 | 36,7 |
| 29 | 145 | 2,9 | 1,7 | 2,1 | 3,3 | 7,9 | | 21,4 | 18,2 |
| 30 | 145 | 10,0 | 3,8 | 3,5 | 5,9 | 13,7 | | 19,0 | 28,8 |
| 34 | 233 | 13,2 | 7,4 | 8,9 | 16,8 | 55,2 | | 60,5 | |
| 35 | 233 | 11,6 | 8,5 | 14,0 | 19,5 | 58,4 | | 82,0 | |
| 36 | 145 | 11,3 | 8,5 | 11,6 | 12,5 | 36,6 | | 49,7 | 64,7 |
| 37 | 145 | 27,8 | 21,6 | 25,9 | 31,1 | 49,9 | | 43,3 | 64,5 |

В Таблице 2 указаны номера соединений (столбец 2) и соответствующий олигонуклеотид (столбец 1) для конъюгатов миРНК HBV, которые были протестированы.

Пример 26 Синтез конъюгата 320

Схема 50 Получение активированного линкера



Этап 1. Получение рацемического (цис) 5-бензил-3а,6а-диметилтетрагидро-1Н-фуро[3,4-с]пиррол-1,3(3аН)-диона 301

К охлажденному раствору (0°C) 3,4-диметилфуран-2,5-диона (3 г, 24 ммоль) и *N*-бензил-1-метокси-*N*-((триметилсилил)метил)метанамина (7 г, 29,8 ммоль) в дихлорметане (75 мл) медленно добавили трифторуксусную кислоту (75 мкл). Перемешивали в течение ночи, позволяя раствору медленно нагреться до комнатной температуры при расплавлении льда в водяной бане. Реакционную смесь концентрировали досуха, растворили в этилацетате (100 мл), промыли насыщенным

раствором гидрокарбоната натрия (2×100 мл), сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (градиент: от 20% этилацетата в смеси гексанов до 100% этилацетата) привела к получению (3aR,6aS)-5-бензил-3a,6a-диметилтетрагидро-1H-фуоро[3,4-c]пиррол-1,3(3aH)-диона в виде масла желтого цвета (3,5 г, 56%).

Этап 2. Получение рацемического (цис) 1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола 302

К охлажденному (0°C) раствору (3aR,6aS)-5-бензил-3a,6a-диметилтетрагидро-1H-фуоро[3,4-c]пиррол-1,3(3aH)-диона (3,5 г, 13,4 ммоль) в безводном диэтиловом эфире (50 мл) медленно, тремя порциями, добавили гранулы литийалюминийгидрида (1,5 г, 40 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи, позволяя ему нагреться до комнатной температуры из-за расплавления льда в водяной бане. После завершения реакцию смесь охладили до 0°C и очень медленно погасили с помощью 1,5 мл 5M NaOH, а затем 1,5 мл воды. Перемешивали в течение 30 минут, затем добавили магния сульфат и отфильтровали. Фильтрат концентрировали с получением ((3R,4S)-1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола в виде бесцветного масла (2,7 г).

Этап 3. Получение рацемического (цис) 3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола 303

К раствору ((3R,4S)-1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола (10 г, 40 ммоль) в метаноле (10 мл) добавили 10% влажной палладиевой черни (1 г). Раствор интенсивно перемешивали в атмосфере водорода в течение 16 часов. После завершения раствор отфильтровали через целит и концентрировали досуха с получением ((3R,4S)-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола в виде бесцветного твердого вещества (5,5 г, 86%).

Этап 4. Получение рацемического (цис) метил-10-(3,4-бис(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеканоата 304

Раствор **3** (1,3 г, 8,2 ммоль) и монометилсебаката (1,8 г, 8,2 ммоль) в CH_2Cl_2 (100 мл) обработали ГБТУ (3,41 г, 9,02 ммоль) и основанием Хюнига (5,71 мл, 32,8 ммоль). После перемешивания в течение ночи смесь промывали NaHCO_3 (насыщ. водн.), водой и соевым раствором, затем сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергали хроматографии (градиент: от 0% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ до 20%) с получением **4** (1,8 г, 61%).

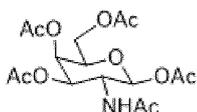
Этап 5. Получение рацемического (цис) метил-10-3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеканоата 305

Раствор **304** (1,8 г, 5,0 ммоль) и 4,4'-диметокситритилхлорида (1,7 г, 5,0 ммоль) в пиридине (180 мл) перемешивали в течение ночи. Затем пиридин удаляли при пониженном давлении и неочищенный материал подвергли хроматографической очистке (градиент: от 0% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ до 10%) с получением **5** (1,4 г, 42%) в виде масла желтого цвета.

Этап 6. Получение рацемического (цис) 10-3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеканоата лития 306

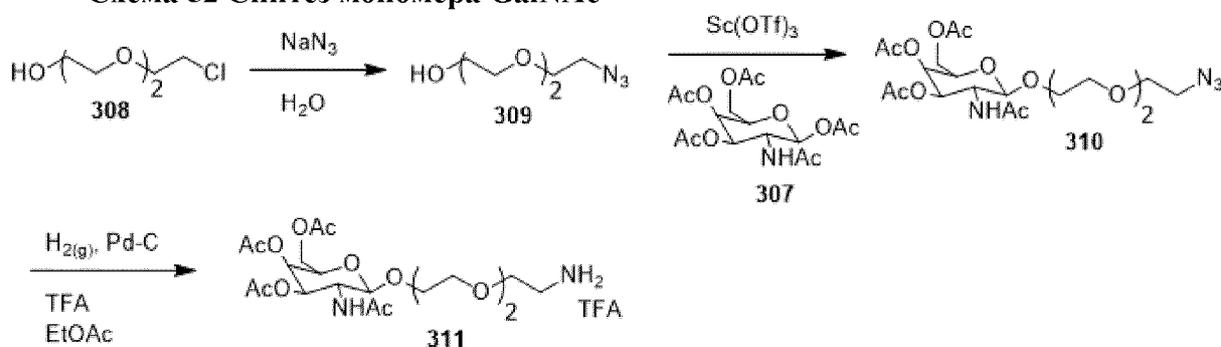
К раствору соединения **305** (3,0 г, 4,6 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воды (50 мл) добавили гидроксид лития (121 мг, 5,0 ммоль). Раствор перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре, затем концентрировали для удаления ТГФ. Оставшийся водный раствор лиофилизировали в течение ночи с получением твердого вещества бледно-розового цвета (2,9 г, количественный выход). Соединение **306** получили в виде смеси двух *цис*-диамтереомеров.

Схема 51 Синтез перацетилированного галактозамина 307



D-Галактозамин гидрохлорид (250 г, 1,16 моль) в пиридине (1,5 л) обрабатывали уксусным ангидридом (1,25 л, 13,2 моль) в течение 45 минут. После перемешивания в течение ночи реакционную смесь разделили на три порции объемом по 1 л. Каждую порцию объемом 1 л вылили в 3 л ледяной воды и перемешивали в течение одного часа. После перемешивания отфильтровали твердые частицы, объединили, заморозили над жидким азотом и затем лиофилизировали в течение пяти дней с получением перацетилированного галактозамина **7** (369,4 г, 82%) в виде твердого вещества белого цвета. R_f (0,58, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Схема 52 Синтез мономера GalNAc



Стадия 1 Получение соединения 309

Раствор 2-[2-(2-хлорэтокси)]этанола **308** (100 г, 593 ммоль) в воде (1 л) обрабатывали NaN₃ (77 г, 1,19 моль) и нагревали (90° С). После перемешивания (72 часа) раствор охлаждали (комн. темп.) и экстрагировали (4х) CH₂Cl₂. Объединенные органические фазы промывали солевым раствором, сушили (MgSO₄), отфильтровали, концентрировали и использовали без дальнейшей обработки. Соединение **9** (88,9 г, 86%) получили в виде масла бледно-желтого цвета.

Стадия 2 Получение соединения 310

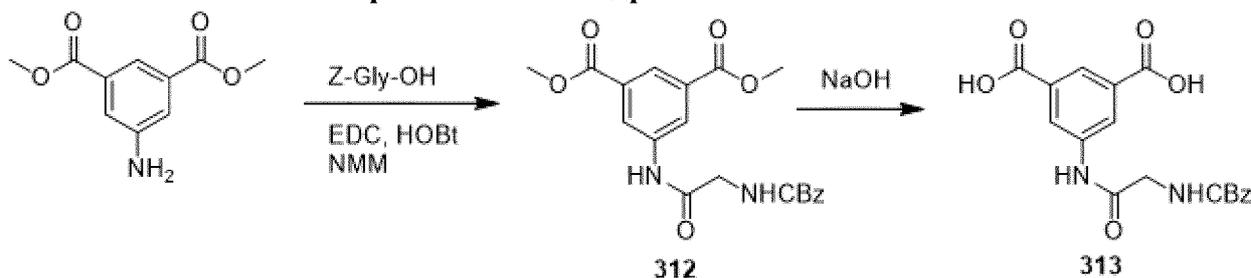
Раствор **7** (2,76 г, 7,1 ммоль) и **309** (1,37 г, 7,8 ммоль) в 1,2-дихлорэтаноле (40 мл) обрабатывали Sc(OTf)₃ (174 мг, 0,36 ммоль) и нагревали (85°С). После перемешивания (2 ч) реакционную смесь охладили (комн. темп.), погасили добавлением ТЭА (4 мл) и

концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **310** (3,03 г, 85%) в виде пены бледно-желтого цвета.

Стадия 3 Получение соединения **311**

Раствор **310** (3,02 г, 5,99 ммоль) и Pd/C (300 мг, 10% Pd загрузка – на влажной подложке) в EtOAc (30 мл) обрабатывали ТФУ (576 мкл, 7,5 ммоль). Реакционную смесь продували газообразным водородом (45 минут), затем продували газообразным азотом (10 мин), затем отфильтровали через целит. Фильтрат концентрировали и затем подвергли хроматографической очистке с получением **311** (2,67 г, 75%) в виде коричневой пены.

Схема 53 Синтез ароматического ядра



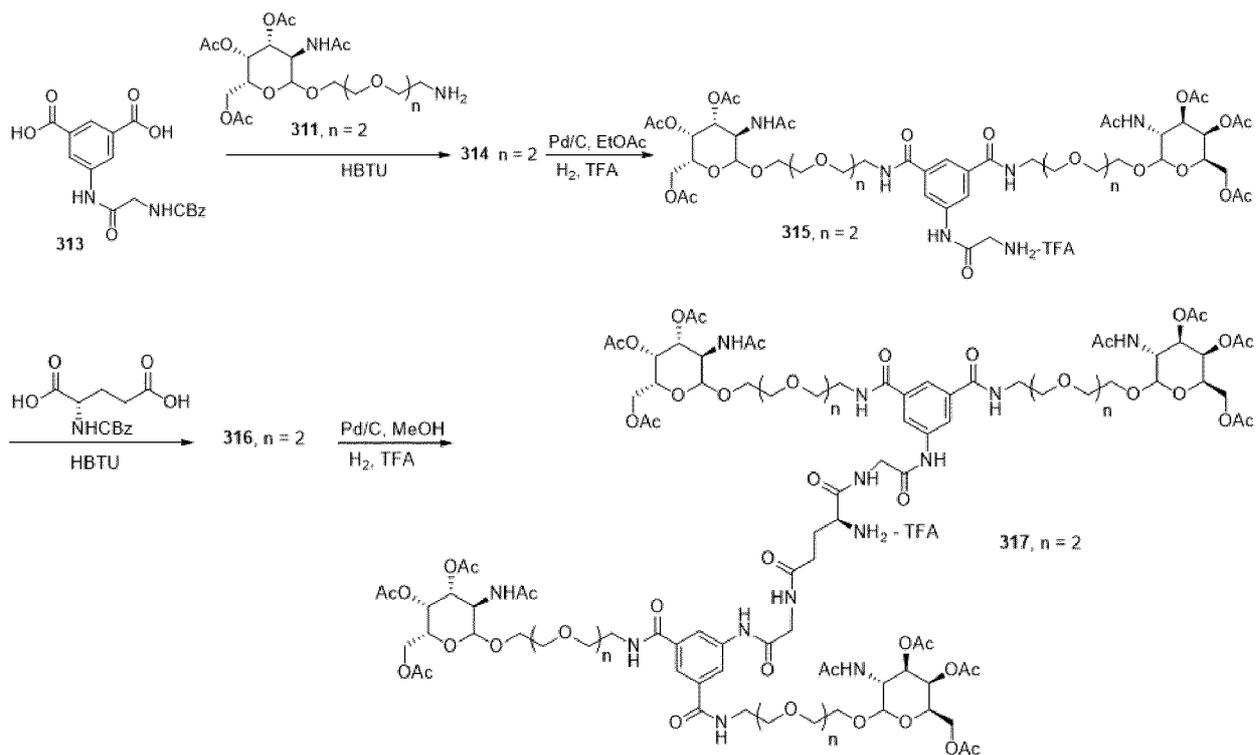
Этап 1. Получение диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталата **312**

Раствор диметил-5-аминоизофталата (5 г, 24 ммоль), Z-Gly-OH (5 г, 24 ммоль), ЭДК (5 г, 26,3 ммоль), ГОБт (3,6 г, 26,3 ммоль), НММ (N-метилморфолин) (2,9 мл, 26,3 ммоль) в ДМФА (50 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакцию смесь разбавили этилацетатом (250 мл) и промыли 1М HCl (2×100 мл), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (1×100 мл) и соевым раствором (2×100 мл). Сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталата в виде бесцветного твердого вещества (7,2 г, 79%).

Этап 2. Получение 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталевой кислоты **313**

К раствору метил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)изофталата (7,2 г) в метаноле (25 мл) и ТГФ (25 мл) добавили 1М NaOH (25 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем концентрировали для удаления ТГФ и MeOH. Оставшийся водный раствор разбавили водой (75 мл), охладили на водяной бане со льдом и подкислили до pH=1 с помощью 6М HCl. Твердое вещество отфильтровали и промыли водой (3×100 мл). Лиофилизировали твердое вещество с получением 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетамидо)-изофталевой кислоты (6,9 г, количественный выход).

Схема 54: Получение тетрамера



Стадия 1 Получение соединения 314

Раствор **313** (2,09 г, 5,6 ммоль) и **311** (8,34 г, 14,07 ммоль) в CH_2Cl_2 (150 мл) обработали ГБТУ (6,4 г, 16,9 ммоль) и основанием Хюнига (7,35 мл, 42,2 ммоль). После перемешивания (в течение ночи) реакционную смесь выливали в NaHCO_3 (насыщ. водн.), затем промывали водой и соевым раствором, сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке (градиент 1–12% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением **6** (3,97 г, 55%) в виде бледно-желтой пены.

Стадия 2 Получение соединения 315

Соединение **314** (3,92 г, 3,07 ммоль), Pd/C (400 мг, 10% загрузка – на влажной подложке) и трифторуксусную кислоту (308 мкл, 4 ммоль) продували H_2 . После перемешивания в атмосфере H_2 (в течение ночи) смесь продували N_2 (15–20 мин), затем отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **7** (3,36 г, 86%) в виде пены бледно-желтого цвета.

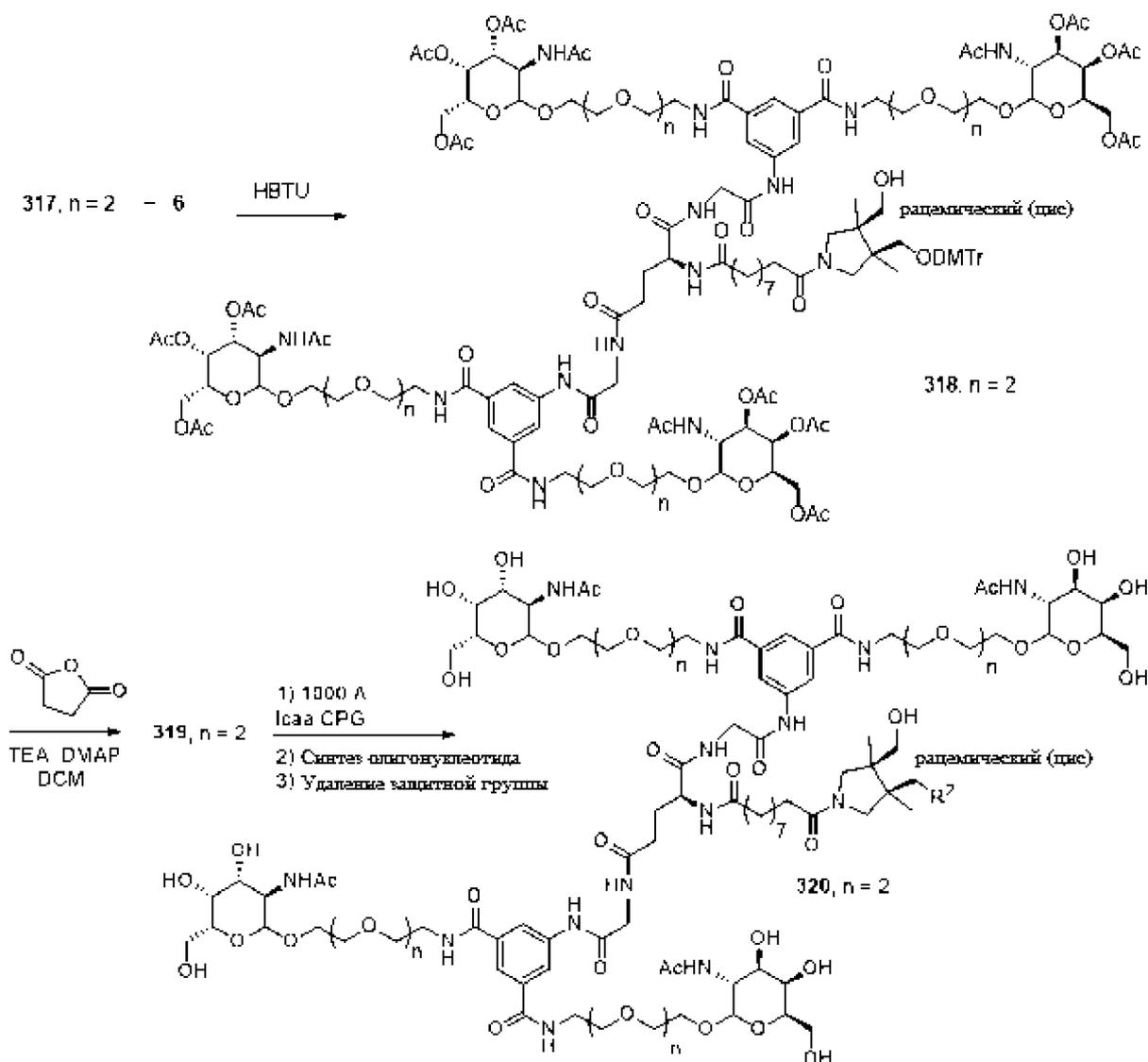
Стадия 3 Получение соединения 316

Соединение **316** получили путем, идентичным получению **314**, из Z-глутаминовой кислоты (306 мг, 1,09 ммоль) и **315** (3,3 г, 2,6 ммоль). Выход: 1,66 г, 60%.

Стадия 4 Получение соединения 317

Соединение **317** получили путем, идентичным получению **315**. Выход: 1,65 г, количественный.

Схема 55 Получение полного конъюгата



Стадия 1 Получение соединения 318

Раствор **317** (1,91 г, 0,75 ммоль) в CH_2Cl_2 (100 мл) обрабатывали сначала основанием Хюнига (392 мкл, 2,25 ммоль), затем **6** (смесь двух *cis*-диастереомеров, 509 мг, 0,79 ммоль), а затем HBTU (356 мг, 0,94 ммоль). После перемешивания (в течение ночи) раствор выливали в NaHCO_3 (насыщ. водн.), затем промывали водой и соевым раствором, сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **318** (1,19 г, 52%) в виде бесцветной пены.

Стадия 2 Получение соединения 319

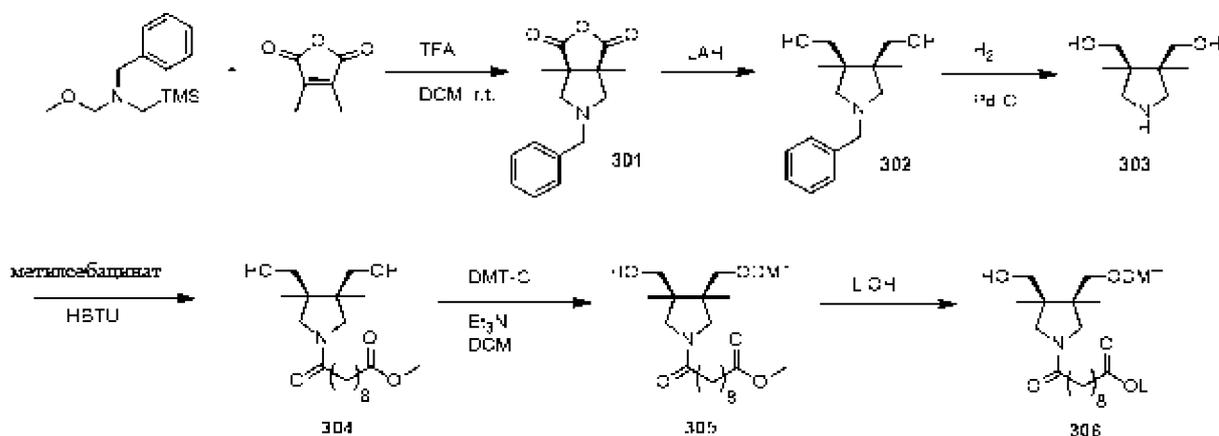
Раствор **318** (1,19 г, 0,39 ммоль) в 1,2-дихлорэтане (100 мл) обрабатывали ТЭА (542 мкл, 3,9 ммоль), DMAP (238 мг, 1,95 ммоль) и янтарным ангидридом (195 мг, 1,95 ммоль) и нагревали (85°C). После перемешивания (2,5 ч) раствор удаляли из тепла и обрабатывали CH_3OH (10 мл) и оставляли перемешиваться (1 ч). После перемешивания смесь вылили в NaHCO_3 (насыщ. водн.), затем промывали соевым раствором, сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Полученный остаток использовали без дополнительной очистки. Выход: 1,4 г, количественный.

Стадия 3 Получение соединения 320

Сукцинат **319** нанесли на 1000Å CPG (стекло с контролируемой пористостью) из LCAA (длинноцепочечный аминоксил) с использованием стандартного реагента, связывающего амиды. Раствор диизопропилкарбодиимида (52,6 ммоль), N-гидроксисукцинимид (0,3 мг, 2,6 ммоль) и пиридина (10 мкл) в безводном ацетонитриле (0,3 мл) добавили к **319** (20,6 мг, 8 ммоль) в безводном дихлорметане (0,2 мл). Данную смесь добавили к LCAA CPG (183 мг). Смесь аккуратно перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После исчезновения **319** (ВЭЖХ), реакционную смесь отфильтровали и CPG промыли по 1 мл каждого из дихлорметана, ацетонитрила, раствором 5% уксусного ангидрида/5% N-метилимидазола/5% пиридина в ТГФ, затем ТГФ, ацетонитрила и дихлорметана. Затем CPG высушивали в течение ночи при глубоком вакууме. Стандартным анализом ДМТ с помощью метода спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области (504 нм), нанесение определили равным 19 мкмоль/г. Полученную твердую подложку в виде CPG с нанесенным GalNAc использовали в автоматизированном синтезе олигонуклеотида с использованием стандартных методик. Путем снятия защитной группы с нуклеотида с последующим удалением его с твердой подложки (с попутным снятием защитной группы с галактозамина ацетата) получили конъюгат GalNAc-олигонуклеотид **320**.

Пример 27 Синтез конъюгата 520

Схема 56 Получение активированного линкера



Этап 1. Получение рацемического (цис) 5-бензил-3а,6а-диметилтетрагидро-1Н-фуро[3,4-с]пиррол-1,3(3аН)-диона **301**

К охлажденному раствору (0°C) 3,4-диметилфуран-2,5-диона (3 г, 24 ммоль) и N-бензил-1-метокси-N-((триметилсилил)метил)метанамина (7 г, 29,8 ммоль) в дихлорметане (75 мл) медленно добавили трифторуксусную кислоту (75 мкл). Перемешивали в течение ночи, позволяя раствору медленно нагреться до комнатной температуры при расплавлении льда в водяной бане. Реакционную смесь концентрировали досуха, растворили в этилацетате (100 мл), промыли насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (2×100 мл), сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле

(градиент: от 20% этилацетата в смеси гексанов до 100% этилацетата) привела к получению (3aR,6aS)-5-бензил-3a,6a-диметилтетрагидро-1H-фуоро[3,4-c]пиррол-1,3(3aH)-диона в виде масла желтого цвета (3,5 г, 56%).

Этап 2. Получение рацемического (цис) 1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола 302

К охлажденному (0°C) раствору (3aR,6aS)-5-бензил-3a,6a-диметилтетрагидро-1H-фуоро[3,4-c]пиррол-1,3(3aH)-диона (3,5 г, 13,4 ммоль) в безводном диэтиловом эфире (50 мл) медленно, тремя порциями, добавили гранулы литийалюминийгидрида (1,5 г, 40 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи, позволяя ему нагреться до комнатной температуры из-за расплавления льда в водяной бане. После завершения реакцию смесь охладили до 0°C и очень медленно погасили с помощью 1,5 мл 5M NaOH, а затем 1,5 мл воды. Перемешивали в течение 30 минут, затем добавили магния сульфат и отфильтровали. Фильтрат концентрировали с получением ((3R,4S)-1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола в виде бесцветного масла (2,7 г).

Этап 3. Получение рацемического (цис) 3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола 303

К раствору ((3R,4S)-1-бензил-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола (10 г, 40 ммоль) в метаноле (10 мл) добавили 10% влажной палладиевой черни (1 г). Раствор интенсивно перемешивали в атмосфере водорода в течение 16 часов. После завершения раствор отфильтровали через целит и концентрировали досуха с получением ((3R,4S)-3,4-диметилпирролидин-3,4-диил)диметанола в виде бесцветного твердого вещества (5,5 г, 86%).

Этап 4. Получение рацемического (цис) метил-10-(3,4-бис(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеканоата 304

Раствор **3** (1,3 г, 8,2 ммоль) и монометилсебаката (1,8 г, 8,2 ммоль) в CH₂Cl₂ (100 мл) обработали ГБТУ (3,41 г, 9,02 ммоль) и основанием Хюнига (5,71 мл, 32,8 ммоль). После перемешивания в течение ночи смесь промывали NaHCO₃ (насыщ. водн.), водой и соевым раствором, затем сушили (MgSO₄), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергали хроматографии (градиент: от 0% CH₃OH-CH₂Cl₂ до 20%) с получением **4** (1,8 г, 61%).

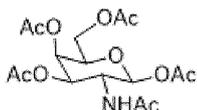
Этап 5. Получение рацемического (цис) метил-10-3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-1-ил)-10-оксодеканоата 305

Раствор **304** (1,8 г, 5,0 ммоль) и 4,4'-диметокситритилхлорида (1,7 г, 5,0 ммоль) в пиридине (180 мл) перемешивали в течение ночи. Затем пиридин удаляли при пониженном давлении и неочищенный материал подвергли хроматографической очистке (градиент: от 0% CH₃OH-CH₂Cl₂ до 10%) с получением **5** (1,4 г, 42%) в виде масла желтого цвета.

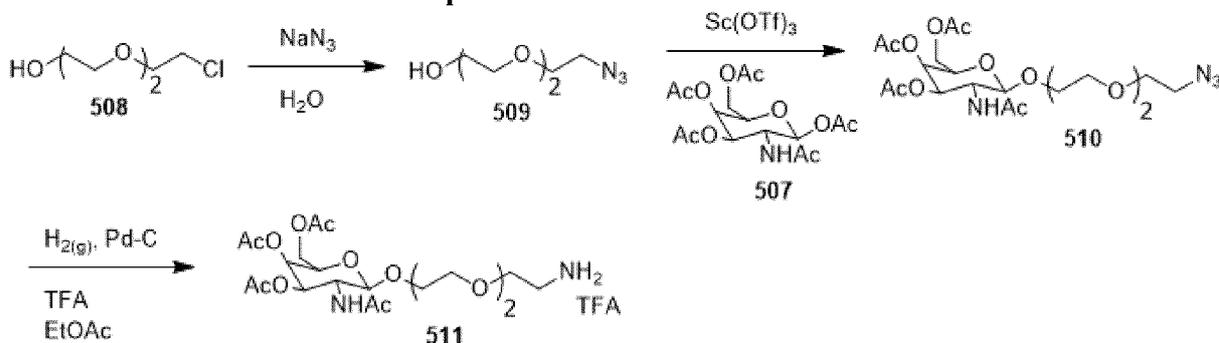
Этап 6. Получение рацемического (цис) 10-3-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-(гидроксиметил)-3,4-диметилпирролидин-

1-ил)-10-оксодеканоата лития 306

К раствору соединения **305** (3,0 г, 4,6 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воды (50 мл) добавили гидроксид лития (121 мг, 5,0 ммоль). Раствор перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре, затем концентрировали для удаления ТГФ. Оставшийся водный раствор лиофилизировали в течение ночи с получением твердого вещества бледно-розового цвета (2,9 г, количественный выход). Соединение **306** получили в виде смеси двух *цис*-диамтереомеров.

Схема 57 Синтез перацетилированного галактозамина 507

Галактозамин гидрохлорид (250 г, 1,16 моль) в пиридине (1,5 л) обрабатывали уксусным ангидридом (1,25 л, 13,2 моль) в течение 45 минут. После перемешивания в течение ночи реакционную смесь разделили на три порции объемом по 1 л. Каждую порцию объемом 1 л вылили в 3 л ледяной воды и перемешивали в течение одного часа. После перемешивания отфильтровали твердые частицы, объединили, заморозили над жидким азотом и затем лиофилизировали в течение пяти дней с получением перацетилированного галактозамина **507** (369,4 г, 82%) в виде твердого вещества белого цвета. R_f (0,58, 10% MeOH-CH₂Cl₂).

Схема 58 Синтез мономера GalNAc**Стадия 1 Получение соединения 509**

Раствор 2-[2-(2-хлорэтокси)]этанола **508** (100 г, 593 ммоль) в воде (1 л) обрабатывали NaN₃ (77 г, 1,19 моль) и нагревали (90° С). После перемешивания (72 ч) раствор охлаждали (комн. темп.) и экстрагировали (4х) CH₂Cl₂. Объединенные органические фазы промывали солевым раствором, сушили (MgSO₄), отфильтровали, концентрировали и использовали без дальнейшей обработки. Соединение **509** (88,9 г, 86%) получили в виде масла бледно-желтого цвета.

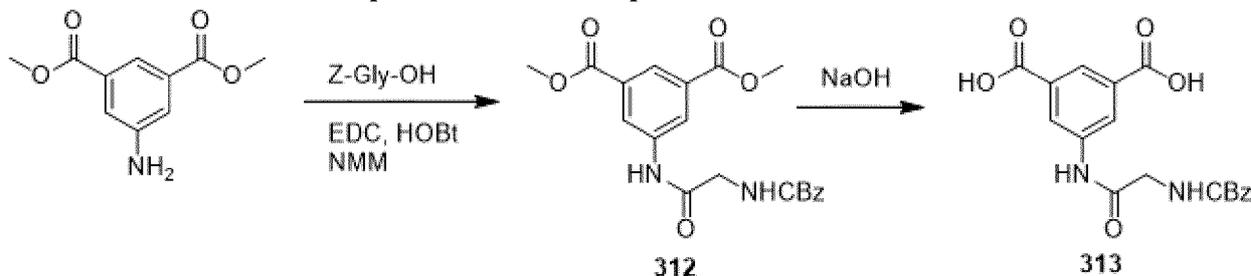
Стадия 2 Получение соединения 510

Раствор **507** (2,76 г, 7,1 ммоль) и **509** (1,37 г, 7,8 ммоль) в 1,2-дихлорэтаноле (40 мл) обрабатывали Sc(OTf)₃ (174 мг, 0,36 ммоль) и нагревали (85°С). После перемешивания (2 ч) реакционную смесь охладили (комн. темп.), погасили добавлением ТЭА (4 мл) и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **510** (3,03 г, 85%) в виде пены бледно-желтого цвета.

Стадия 3 Получение соединения 511

Раствор **510** (3,02 г, 5,99 ммоль) и Pd/C (300 мг, 10% Pd загрузка – на влажной подложке) в EtOAc (30 мл) обрабатывали ТФУ (576 мкл, 7,5 ммоль). Реакционную смесь продували газообразным водородом (45 мин), затем продували газообразным азотом (10 мин), затем отфильтровали через целит. Фильтрат концентрировали и затем подвергли хроматографической очистке с получением **511** (2,67 г, 75%) в виде коричневой пены.

Схема 59 Синтез ароматического ядра



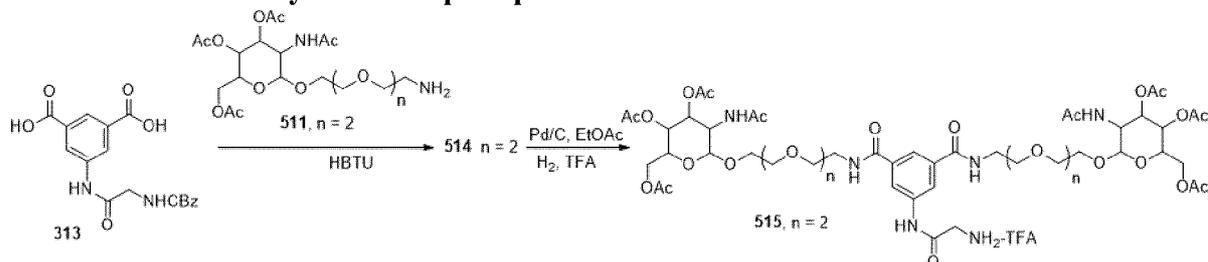
Этап 1. Получение диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталата **312**

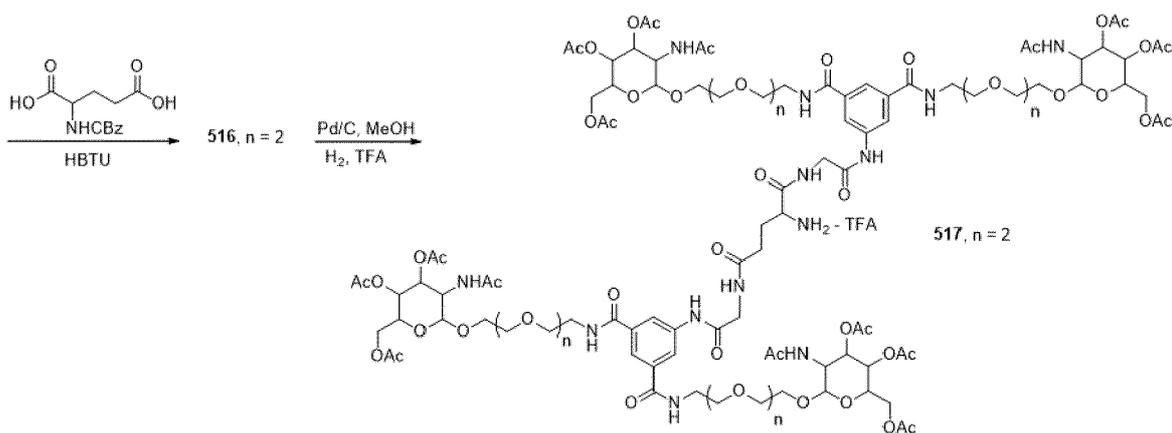
Раствор диметил-5-аминоизофталата (5 г, 24 ммоль), Z-Gly-OH (5 г, 24 ммоль), ЭДК (5 г, 26,3 ммоль), ГОБт (3,6 г, 26,3 ммоль), НММ (N-метилморфолин) (2,9 мл, 26,3 ммоль) в ДМФА (50 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакцию смесь разбавили этилацетатом (250 мл) и промыли 1М HCl (2×100 мл), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (1×100 мл) и соевым раствором (2×100 мл). Сушили на сульфате магния, отфильтровали и концентрировали досуха с получением диметил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталата в виде бесцветного твердого вещества (7,2 г, 79%).

Этап 2. Получение 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталевой кислоты **313**

К раствору метил-5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)изофталата (7,2 г) в метаноле (25 мл) и ТГФ (25 мл) добавили 1М NaOH (25 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем концентрировали для удаления ТГФ и MeOH. Оставшийся водный раствор разбавили водой (75 мл), охладили на водяной бане со льдом и подкислили до pH=1 с помощью 6М HCl. Твердое вещество отфильтровали и промыли водой (3×100 мл). Лиофилизировали твердое вещество с получением 5-(2-((2-оксо-2-фенил-1λ²-этил)амино)ацетида)-изофталевой кислоты (6,9 г, количественный выход).

Схема 60: Получение тетрамера





Стадия 1 Получение соединения 514

Раствор **313** (2,09 г, 5,6 ммоль) и **511** (8,34 г, 14,07 ммоль) в CH_2Cl_2 (150 мл) обработали ГБТУ (6,4 г, 16,9 ммоль) и основанием Хюнига (7,35 мл, 42,2 ммоль). После перемешивания (в течение ночи) реакционную смесь выливали в NaHCO_3 (насыщ. водн.), затем промывали водой и соевым раствором, сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке (градиент 1–12% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением **6** (3,97 г, 55%) в виде бледно-желтой пены.

Стадия 2 Получение соединения 515

Соединение **514** (3,92 г, 3,07 ммоль), Pd/C (400 мг, 10% загрузка – на влажной подложке) и трифторуксусную кислоту (308 мкл, 4 ммоль) продували H_2 . После перемешивания в атмосфере H_2 (в течение ночи) смесь продували N_2 (15–20 мин), затем отфильтровали через целит и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **7** (3,36 г, 86%) в виде пены бледно-желтого цвета.

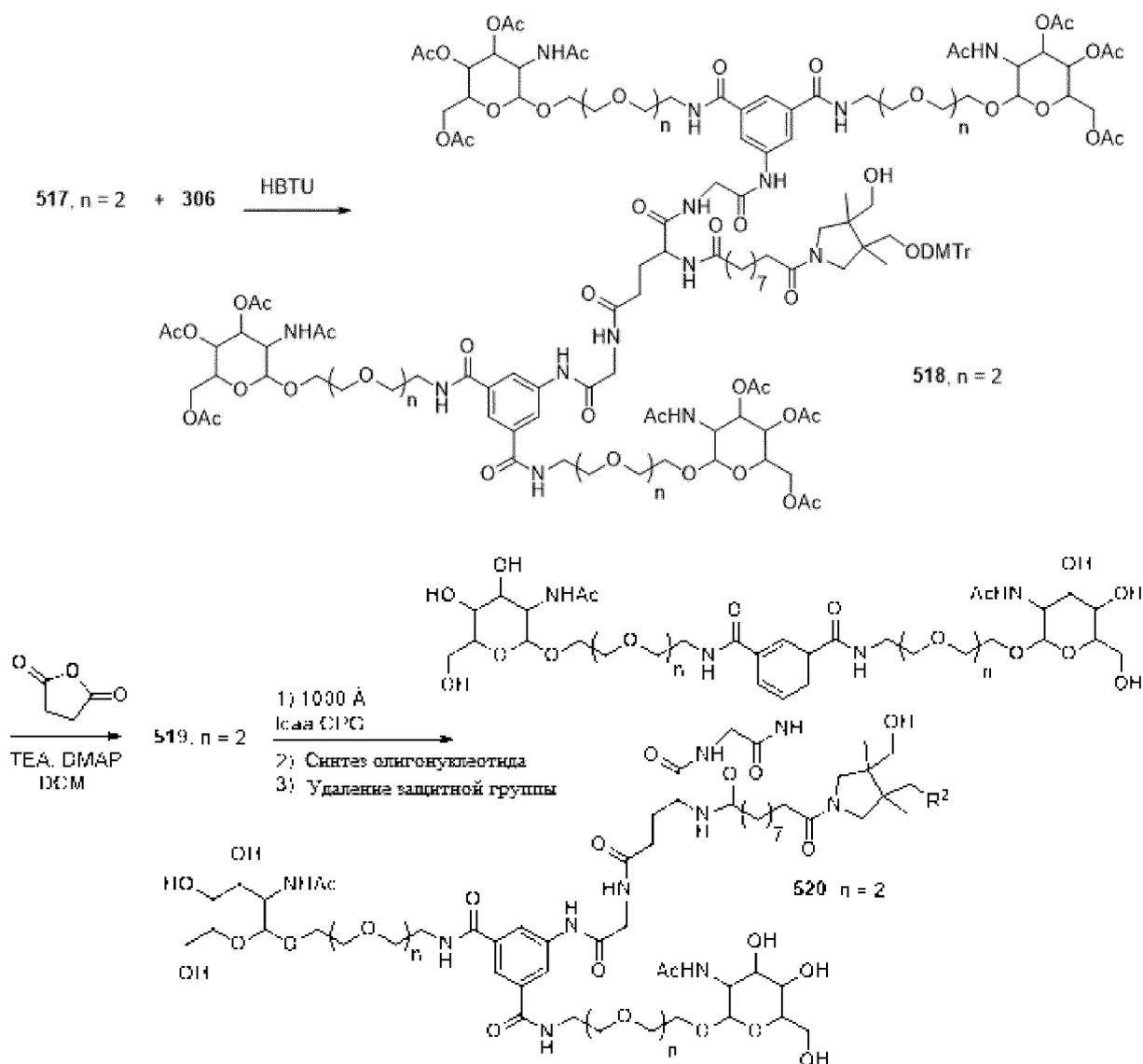
Стадия 3 Получение соединения 516

Соединение **516** получили путем, идентичным получению **514**, из Z-глутаминовой кислоты (306 мг, 1,09 ммоль) и **515** (3,3 г, 2,6 ммоль). Выход: 1,66 г, 60%.

Стадия 4 Получение соединения 517

Соединение **517** получили путем, идентичным получению **515**. Выход: 1,65 г, количественный.

Схема 61 Получение полного конъюгата



Стадия 1 Получение соединения 518

Раствор **517** (1,91 г, 0,75 ммоль) в CH_2Cl_2 (100 мл) обрабатывали сначала основанием Хюнига (392 мкл, 2,25 ммоль), затем **306** (смесь двух *cis*-диастереомеров, 509 мг, 0,79 ммоль), а затем HBTU (356 мг, 0,94 ммоль). После перемешивания (в течение ночи) раствор выливали в NaHCO_3 (насыщ. водн.), затем промывали водой и соевым раствором, сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Неочищенный материал подвергли хроматографической очистке с получением **518** (1,19 г, 52%) в виде бесцветной пены.

Стадия 2 Получение соединения 519

Раствор **518** (1,19 г, 0,39 ммоль) в 1,2-дихлорэтано (100 мл) обрабатывали ТЭА (542 мкл, 3,9 ммоль), DMAP (238 мг, 1,95 ммоль) и янтарным ангидридом (195 мг, 1,95 ммоль) и нагревали (85°C). После перемешивания (2,5 ч) раствор удаляли из тепла и обрабатывали CH_3OH (10 мл) и оставляли перемешиваться (1 ч). После перемешивания смесь вылили в NaHCO_3 (насыщ. водн.), затем промывали соевым раствором, сушили (MgSO_4), отфильтровали и концентрировали. Полученный остаток использовали без дополнительной очистки. Выход: 1,4 г, количественный.

Стадия 3 Получение соединения 520

Сукцинат **519** нанесли на 1000Å CPG (стекло с контролируемой пористостью) из LCAA (длинноцепочечный аминокислотный алкил) с использованием стандартного реагента, связывающего амиды. Раствор диизопропилкарбодиимида (52,6 ммоль), N-гидроксисукцинимид (0,3 мг, 2,6 ммоль) и пиридина (10 мкл) в безводном ацетонитриле (0,3 мл) добавили к **519** (20,6 мг, 8 ммоль) в безводном дихлорметане (0,2 мл). Данную смесь добавили к LCAA CPG (183 мг). Смесь аккуратно перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После исчезновения **519** (ВЭЖХ), реакционную смесь отфильтровали и CPG промыли по 1 мл каждого из дихлорметана, ацетонитрила, раствором 5% уксусного ангидрида/5% N-метилимидазола/5% пиридина в ТГФ, затем ТГФ, ацетонитрила и дихлорметана. Затем CPG высушивали в течение ночи при глубоком вакууме. Стандартным анализом ДМТ с помощью метода спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области (504 нм), нанесение определили равным 19 мкмоль/г. Полученную твердую подложку в виде CPG с нанесенным GalNAc использовали в автоматизированном синтезе олигонуклеотида с использованием стандартных методик. Путем снятия защитной группы с нуклеотида с последующим удалением его с твердой подложки (с попутным снятием защитной группы с галактозамина ацетата) получили конъюгат GalNAc–олигонуклеотид **520**.

Пример 28. Тестирование in vivo конъюгатов миРНК TTR

Соединение **320**, где R² содержит модифицированную миРНК TTR, описанную в Таблице 3, тестировали на активность in vivo на модели нокдаун TTR на мышах дикого типа. В настоящем примере соединение **320**, где R² содержит модифицированную миРНК TTR, продемонстрировано в качестве возможного лечения орфанного заболевания TTR (транстиретин) амилоидоза. У людей с этим заболеванием неправильное свертывание и агрегация белка транстиретина связаны с прогрессированием заболевания. При использовании этого конъюгата миРНК–GalNAc количество неправильно свернутого/агрегированного белка у пациента может быть уменьшено, что может привести к остановке прогрессирования заболевания. Соответственно, в конкретных вариантах осуществления предложено соединение **320**, где R² включает модифицированную миРНК TTR и его применение для лечения транстиретинового амилоидоза.

Таблица 3. Химически модифицированные дуплексы миРНК TTR

| Номер миРНК | Смысловая цепь SEQ ID NO | Смысловая цепь 5' – 3' | Смысловая цепь SEQ ID NO | Антисмысловая цепь 5'–3' |
|-------------|--------------------------|---|--------------------------|---|
| 40 | SEQ ID NO:75 | <u>AsasCaGuGuUC</u> <u>UuGcUcUaUaA</u> | SEQ ID NO:76 | us <u>UsaUaGaGcAaga</u> <u>AcAcUgUusus</u> |

2'-O-метилнуклеотиды=прописные буквы; 2'-фторнуклеотиды=ЗАГЛАВНЫЕ БУКВЫ; Фосфоротиоатный линкер=s; Немодифицированный=ЗАГЛАВНЫЕ БУКВЫ

Как последовательность миРНК TTR, так и животная модель были описаны Nair et al., J. Am. Chem. Soc., 36(49), 16958–16961 (2014). Все связанные с животными процедуры проводились в соответствии с письменными операционными процедурами, в соответствии с Руководством Канадского совета по уходу за животными (ССАС) по надлежащей практике для животных и утвержденными местным Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC).

Лечение миРНК: Самкам мышей C57BL/6 (n=4) вводили однократную дозу соединения 2 мг/кг **320** (R² содержит модифицированную миРНК TTR) один раз в день 0 (1 доза на животное) путем подкожной инъекции в лопаточную область. Одна группа животных, которой вводили только несущую среду (PBS), служила контролем.

Взятие образцов: Всех животных тестировали в определенные моменты времени после введения испытуемого изделия (дни 2, 4, 7, 9, 14 и 21) для определения максимального снижения уровней TTR в плазме и продолжительности фармакологической активности.

Анализ: Уровни белка TTR в образцах плазмы определяли с использованием набора ELISA для Abnova Prealbumin (мышь) (Cedar Lane, номер по каталогу KA2070) в соответствии с инструкциями производителя. Значения белка TTR в плазме были рассчитаны для отдельных образцов плазмы, и было определено среднее значение для каждой группы. Из этих средних значений были определены уровни белка TTR относительно контроля (% относительно животных, обработанных PBS).

Результаты. Результаты испытания представлены в Таблице 4. Значения представляют уровни % белка TTR (относительно контроля PBS) в дни 2, 4, 7, 9, 14 и 21 после обработки.

Таблица 4. Уровни белка TTR в плазме у мышей после однократного подкожного введения (2 мг/кг) GalNAc конъюгированной миРНК из Таблицы 3. Данные белка TTR, выраженные в процентах от значений у мышей, обработанных PBS

| Номер миРНК | Соединение лиганда № | День 2 | День 4 | День 7 | День 9 | День 14 | День 21 |
|-------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 40 | 320 | 36,6 | 15,7 | 17,2 | 17,7 | 36,9 | 59,2 |

Вывод: Животные, обработанные соединением **320**, где R² содержит модифицированную миРНК TTR, описанную в Таблице 3, демонстрировали заметный нокдаун мРНК–мишени и белка с максимальным нокдауном белка TTR, происходящим между 4 и 9 днями после подкожной инъекции.

Пример. 29. Тестирование in vitro конъюгатов вируса гепатита В (HBV)

Химически модифицированные миРНК HBV, описанные в Таблице 1 в Примере 25, конъюгированные с лигандами GalNAc, тестировали на активность in vivo на представленной мышинной модели инфекции HBV. В мышинной модели AAV–HBV1.2 C57BL/6 стабильная и постоянная экспрессия HBV достигается после инъекции вектора аденоассоциированного вируса (AAV), кодирующего последовательность сверхгеномной

длины HBV, что приводит к печеночной экспрессии РНК HBV и белков и секреции вирусных и субвирусных частиц в кровь.

Конструкция AAV–HBV1.2, использованная в этих исследованиях, была основана на деталях, предоставленных Dion et al., *Journal of Virology*, 87(10), 5554–5563 (2013). Все связанные с животными процедуры проводились в соответствии с письменными операционными процедурами, в соответствии с Руководством Канадского совета по уходу за животными (CCAC) по надлежащей практике для животных и утвержденными местным Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC).

Каждое животное было инокулировано 1E11 векторными геномами (VG) вектора AAV–HBV1.2. Перед лечением у всех животных определяли пробы крови и определяли уровни HBsAg в сыворотке для отдельных животных, чтобы подтвердить установленную экспрессию HBV.

Лечение миРНК: Группам мышей (обычно n=5) вводили однократную дозу конъюгата миРНК HBV 3 мг/кг один раз в день 0 (1 доза на животное) путем подкожной инъекции в лопаточную область. Одна группа животных, которой вводили только несущую среду (физиологический раствор), служила контролем.

Взятие образцов: У всех мышей было проведено тестирование крови в день 0 до лечения и в определенные моменты времени после введения испытуемого изделия (например, в дни исследования 7, 14, 21, 28, 42, 56 и 70) чтобы определить максимальное снижение уровня HBsAg в сыворотке и длительность фармакологической активности.

Анализ: Уровни HBsAg в образцах сыворотки определяли с использованием набора Biorad EIA GS HBsAg 3.0 (BioRad, № по каталогу 32591) в соответствии с инструкциями производителя. Смешанную сыворотку из каждой группы лечения использовали для определения средних уровней HBsAg в группе в отдельные моменты времени. Данные анализировали и выражали в виде уровней HBsAg относительно исходного уровня до лечения (% относительно дня 0).

Результаты. Результаты тестирования каждой из химически модифицированных миРНК HBV, описанных в Таблице 1, представлены в Таблице 5. Значения представляют собой уровни % HBsAg (относительно исходного уровня дня 0) в дни 7, 14, 21, 28, 42, 56 и 70 после лечения.

Таблица 5. Уровни HBsAg в сыворотке у мышей после однократного подкожного введения (3 мг/кг) GalNAc конъюгированной миРНК из Таблицы 1 в Примере 25. Данные HBsAg, выраженные в процентах от значений на исходном уровне (день 0)

| миРНК Номер | Соединение лиганда № | День 7 | День 14 | День 21 | День 28 | День 42 | День 56 | День 70 |
|----------------|-------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 2 | 194 | 7,0 | 4,1 | 4,2 | 5,6 | 10,1 | 17,2 | 29,5 |
| 3 | 194 | 5,8 | 2,4 | 1,8 | 2,3 | 4,6 | 10,6 | 12,9 |
| 3 | 191a | 1,7 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,9 | 2,3 |

| | | | | | | | | |
|-----------|------|------|-----|------|------|------|------|------|
| 3 | 320 | 3,1 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 1,6 | 3,6 |
| 4 | 194 | 5,5 | 3,1 | 3,2 | 4,4 | 6,0 | 9,5 | 16,2 |
| 20 | 231 | 5,3 | 2,2 | 1,9 | 3,4 | 4,8 | 9,8 | 17,4 |
| 20 | 320 | 2,6 | 1,0 | 1,1 | 1,3 | 3,1 | 6,4 | |
| 25 | 191a | 1,9 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 1,1 | 1,8 |
| 25 | 320 | 1,1 | 0,1 | 0,3 | 0,4 | 1,4 | 2,9 | 3,5 |
| 26 | 194 | 10,4 | 3,2 | 2,7 | 3,0 | 4,0 | 6,3 | 12,3 |
| 31 | 194 | 13,3 | 7,0 | 8,0 | 11,7 | 17,7 | 25,6 | 36,7 |
| 32 | 194 | 13,7 | 5,7 | 8,2 | 11,6 | 16,6 | 25,0 | 46,5 |
| 33 | 194 | 14,4 | 8,0 | 10,8 | 14,4 | 24,3 | 41,8 | 65,2 |

Каждое из 13 протестированных соединений вызывало снижение поверхностного антигена HBV в сыворотке после однократного введения подкожно, с максимальным эффектом, полученным на 14 или 21 день. Четыре соединения, показавшие наибольшее снижение, представляли собой соединение **191a**, где олигонуклеотид содержал миРНК 3 или 25, и соединение **320**, где R² содержал миРНК 3 или 25. Для четырех данных соединения были отмечены более быстрое снижение ($\geq 97\%$) в первый момент времени (день 7), более максимальное снижение ($\geq 99\%$) и более устойчивый восстановительный эффект (все еще $\geq 97\%$ в день 56, 8 недель после лечения).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, включающей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:71 и SEQ ID NO:73.

2. Молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, включающей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72 и SEQ ID NO:74.

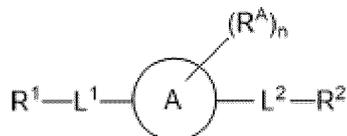
3. Композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 1, молекулу нуклеиновой кислоты по п. 2 или их комбинацию.

4. Двухцепочечная молекула миРНК, выбранная из группы, включающей миРНК 1 (SEQ ID NO:1 и 2), 2 (SEQ ID NO:3 и 4), 3 (SEQ ID NO:5 и 6), 4 (SEQ ID NO:7 и 8), 5 (SEQ ID NO:9 и 10), 6 (SEQ ID NO:11 и 12), 7 (SEQ ID NO:13 и 14), 8 (SEQ ID NO:15 и 16), 9 (SEQ ID NO:17 и 18), 10 (SEQ ID NO:19 и 20), 11 (SEQ ID NO:21 и 22), 12 (SEQ ID NO:23 и 24), 13 (SEQ ID NO:25 и 26), 14 (SEQ ID NO:27 и 28), 15 (SEQ ID NO:29 и 30), 16 (SEQ ID NO:31 и 32), 17 (SEQ ID NO:33 и 34), 18 (SEQ ID NO:35 и 36), 19 (SEQ ID NO:37 и 38), 20 (SEQ ID NO:39 и 40), 21 (SEQ ID NO:41 и 42), 22 (SEQ ID NO:43 и 44), 23 (SEQ ID NO:45 и 46), 24 (SEQ ID NO:47 и 48), 25 (SEQ ID NO:49 и 50), 26 (SEQ ID NO:51 и 52), 27 (SEQ ID NO:53 и 54), 28 (SEQ ID NO:55 и 56), 29 (SEQ ID NO:57 и 58), 30 (SEQ ID NO:59 и 60), 31 (SEQ ID NO:61 и 62), 32 (SEQ ID NO:63 и 64), 33 (SEQ ID NO:65 и 66), 34 (SEQ ID NO:67 и 68), 35 (SEQ ID NO:69 и 70), 36 (SEQ ID NO:71 и 72) и 37 (SEQ ID NO:73 и 74).

5. Композиция, содержащая двухцепочечную молекулу миРНК по п. 4.

6. Композиция по п. 3 или 5, отличающаяся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель.

7. Соединение формулы (I):



(I)

где:

 R^1 представляет собой направляющий лиганд; L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу; L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу; R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК по п. 4;

кольцо А отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксильную группу, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил-OR^B, C_{1-10} алкил, C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил; где C_{1-10} алкил, C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксильной группы и C_{1-3} алкокси; R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его соль.

8. Соединение по п. 7, где:

 R^1 представляет собой направляющий лиганд; L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу; L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу; R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК по п. 4;

кольцо А отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксильную группу, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил-OR^B и C_{1-8} алкил, который необязательно замещен одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксильной группы и C_{1-3} алкокси; R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его соль.

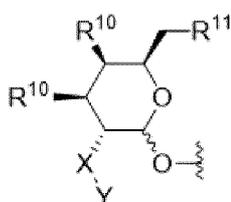
9. Соединение по п. 8, где R^1 представляет собой $-C(H)_{(3-p)}(L^3\text{-сахарид})_p$,где каждый из L^3 независимо представляет собой связывающую группу;

p равен 1, 2 или 3; и

сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид

или его соль.

10. Соединение по п. 9, где сахарид представляет собой:



где:

X представляет собой NR^3 , и Y выбран из $(\text{C}=\text{O})\text{R}^4$, $-\text{SO}_2\text{R}^5$ и $(\text{C}=\text{O})\text{NR}^6\text{R}^7$; или X представляет собой $(\text{C}=\text{O})$, и Y представляет собой NR^8R^9 ;

R^3 представляет собой водород или (C_1-C_4) алкил;

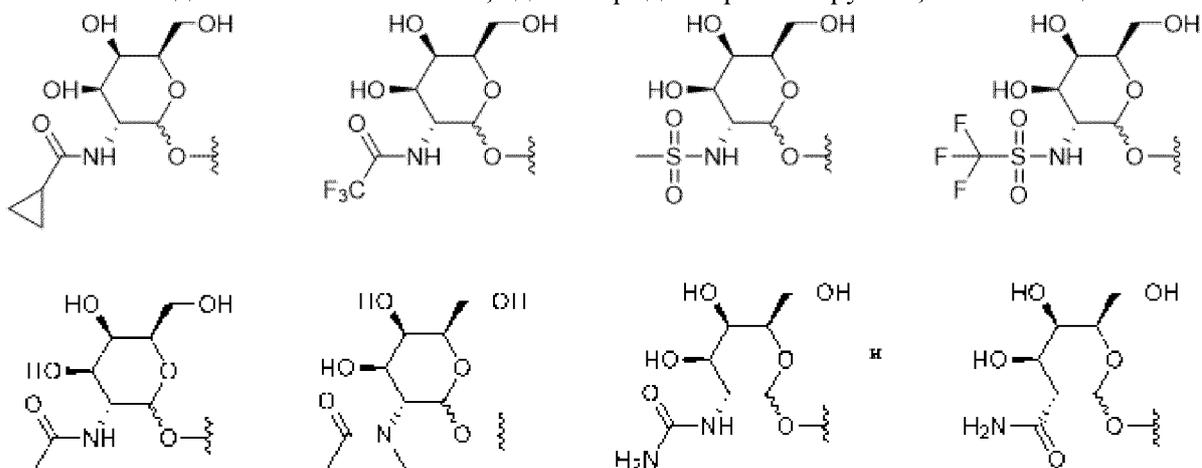
каждый из R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 независимо выбран из группы, включающей водород, (C_1-C_8) алкил, (C_1-C_8) галогеналкил, (C_1-C_8) алкокси и (C_3-C_6) циклоалкил, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

R^{10} представляет собой $-\text{OH}$, $-\text{NR}^8\text{R}^9$ или $-\text{F}$; и

R^{11} представляет собой $-\text{OH}$, $-\text{NR}^8\text{R}^9$, $-\text{F}$ или 5-членный гетероцикл, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, гидроксил, карбоксил, амина, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

или его соль.

11. Соединение по п. 9 или 10, где сахарид выбран из группы, включающей:



или его соль.

12. Соединение по любому из пп. 9–11, где сахарид представляет собой:



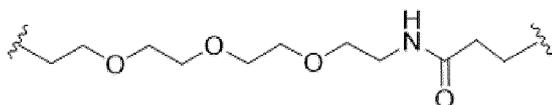
N-ацетилгалктозамин (GalNAc) GalPro

или его соль.

13. Соединение по любому из пп. 9–12, или его соль, где каждый из L^3 независимо представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 0 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азида, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

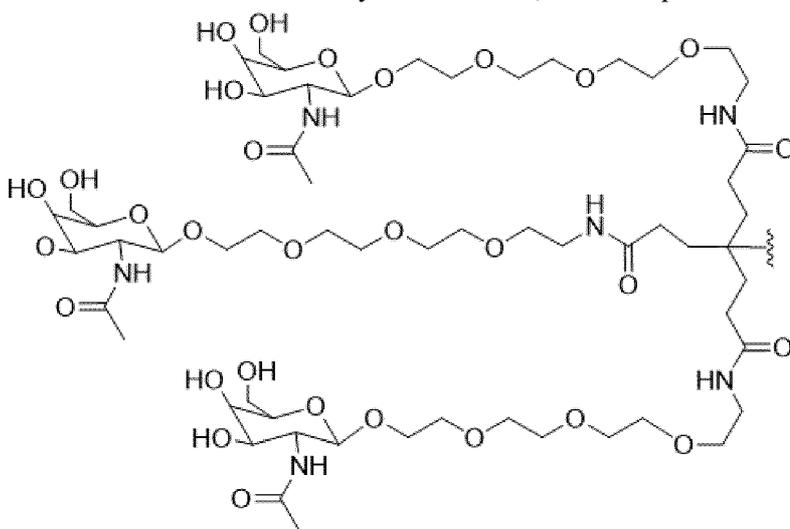
14. Соединение по любому из пп. 9–13, или его соль, где каждый из L^3 независимо представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азида, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

15. Соединение по любому из пп. 9–14, где L^3 представляет собой:



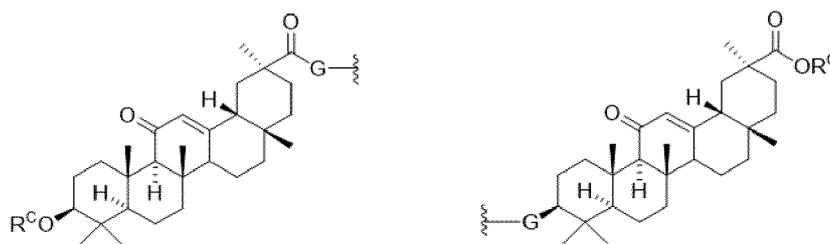
или его соль.

16. Соединение по любому из пп. 8–15, где R^1 представляет собой:



или его соль.

17. Соединение по п. 8, где R^1 представляет собой:



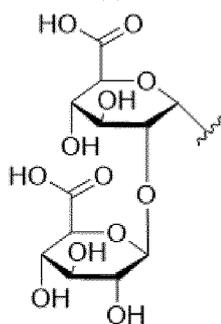
где:

G представляет собой –NH– или –O–;

R^C представляет собой водород, (C₁–C₈)алкил, (C₁–C₈)галогеналкил, (C₁–C₈)алкокси, (C₁–C₆)алканоил, (C₃–C₂₀)циклоалкил, (C₃–C₂₀)гетероцикл, арил, гетероарил, моносахарид, дисахарид или трисахарид; и где циклоалкил, гетероцикл, арил, гетероарил и сахарид, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, карбоксил, гидроксил, амино, (C₁–C₄)алкил, (C₁–C₄)галогеналкил, (C₁–C₄)алкокси и (C₁–C₄)галогеналкокси;

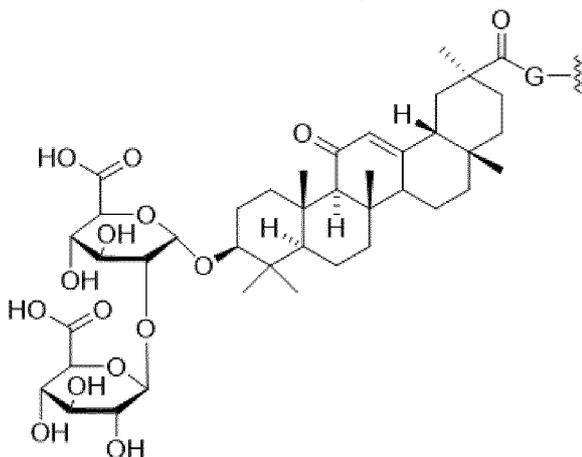
или его соль.

18. Соединение по п. 17, где R^C представляет собой:



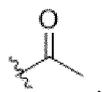
или его соль.

19. Соединение по любому из пп. 8, 17 и 18, где R¹ представляет собой:



или его соль.

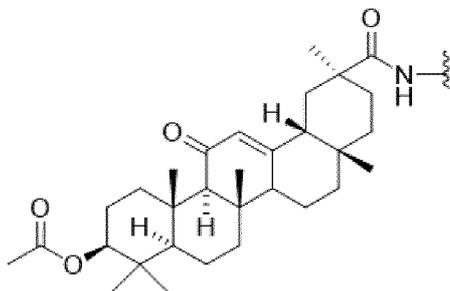
20. Соединение по п. 17 или его соль, где R^C представляет собой:



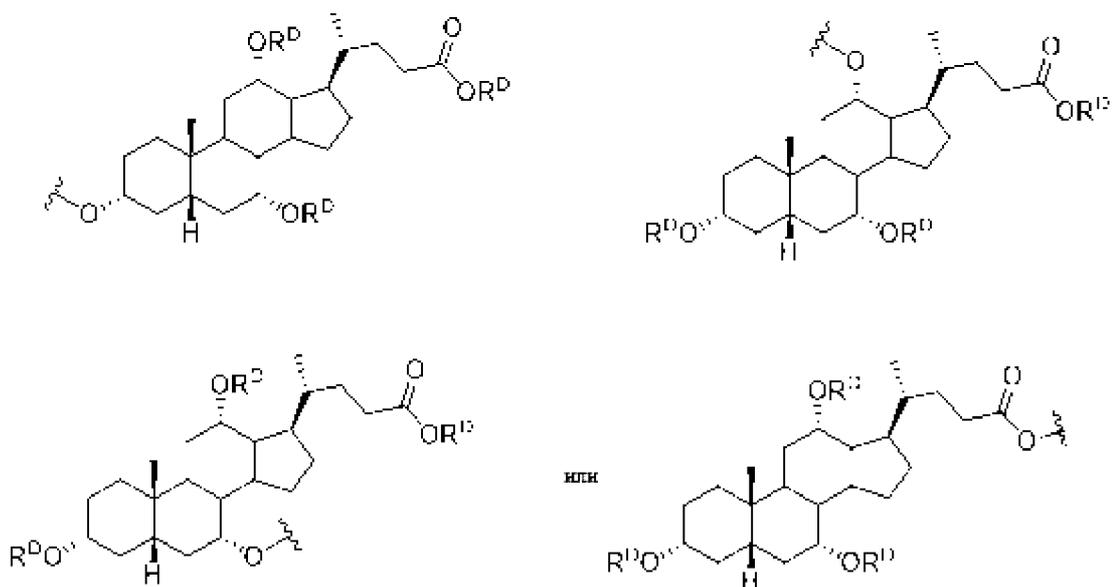
21. Соединение по любому из пп. 17–20 или его соль, где G представляет собой –

NH-

22. Соединение по любому из пп. 8, 17, 20 и 21, или его соль, где R^1 представляет собой:



23. Соединение по п. 8 или его соль, где R^1 представляет собой:



где каждый из R^D независимо выбран из группы, включающей водород, (C_1-C_6) алкил, (C_9-C_{20}) алкилсилл, $(R^W)_3Si-$, (C_2-C_6) алкенил, тетрагидропиранил, (C_1-C_6) алканоил, бензоил, арил (C_1-C_3) алкил, ТМТ (триметокситритил), ДМТ (диметокситритил), ММТ (монометокситритил) и Т (тритил); и

каждый из R^W независимо выбран из группы, включающей (C_1-C_4) алкил и арил.

24. Соединение по любому из пп. 8–23, или его соль, где каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азида, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

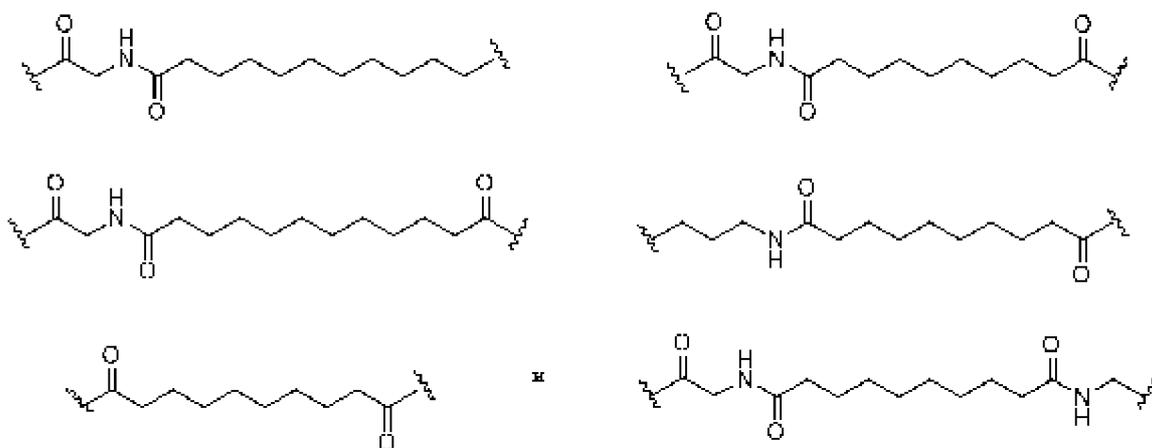
25. Соединение по любому из пп. 8–24 или его соль, где L^1 и L^2 независимо представляют собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, причем один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

26. Соединение по любому из пп. 8–25 или его соль, где L^1 и L^2 независимо представляют собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 14 атомов углерода, причем один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C_1-C_6) алкил, и при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C_1-C_6) алкокси, (C_3-C_6) циклоалкила, (C_1-C_6) алканоила, (C_1-C_6) алканоилокси, (C_1-C_6) алкоксикарбонила, (C_1-C_6) алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

27. Соединение по любому из пп. 8–26 или его соль, где L^1 соединен с R^1 с помощью $-NH-$, $O-$, $-S-$, $-(C=O)-$, $-(C=O)-NH-$, $-NH-(C=O)-$, $-(C=O)-O-$, $-NH-(C=O)-NH-$ или $-NH-(SO_2)-$.

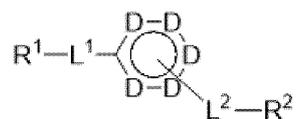
28. Соединение по любому из пп. 8–27 или его соль, где L^2 соединен с R^2 с помощью $-O-$.

29. Соединение по любому из пп. 8–28 или его соль, где L^1 выбран из группы, включающей:



30. Соединение по любому из пп. 8–29 или его соль, где L^2 представляет собой $-CH_2-O-$ или $-CH_2-CH_2-O-$.

31. Соединение по п. 8, которое представлено соединением формулы (Ia):



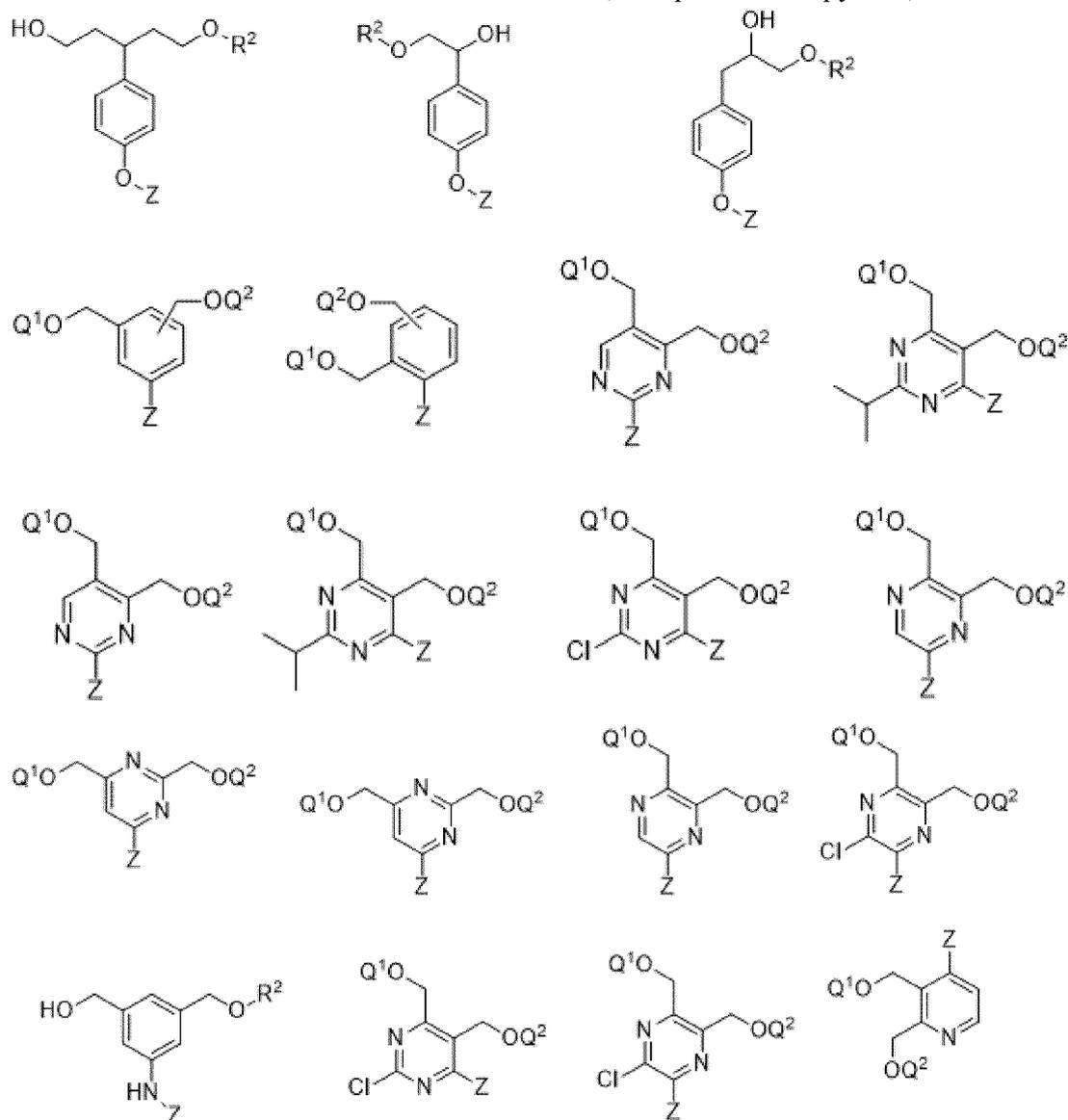
(Ia)

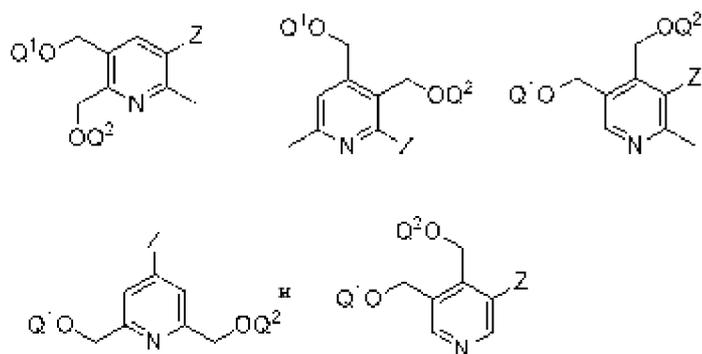
где:

каждый из D независимо выбран из группы, включающей $-\overset{\text{R}^A}{\text{C}}=$ и $-\text{N}=-$;

или его соль.

32. Соединение по п. 8 или п. 31 или его соль, выбранное из группы, включающей:





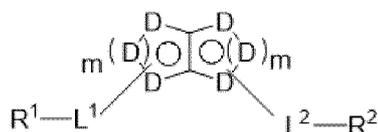
где:

Q^1 представляет собой водород, и Q^2 представляет собой R^2 ; или Q^1 представляет собой R^2 , и Q^2 представляет собой водород; и

Z представляет собой $-L^1-R^1$;

и его соли.

33. Соединение по п. 8 или его соль формулы (Ib):



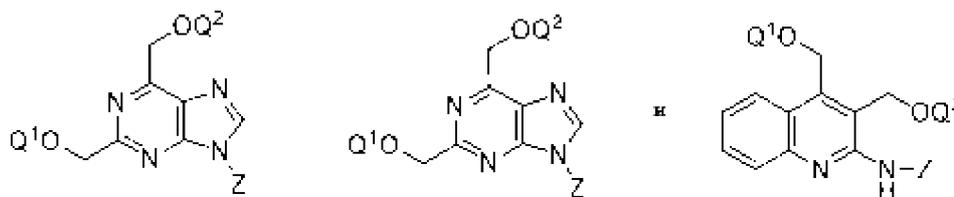
(Ib)

где:

каждый из D независимо выбран из группы, включающей $-\overset{R^A}{C}=\overset{\cdot}{\cdot}$ и $-N=\overset{\cdot}{\cdot}$; и

каждый из m независимо представляет собой 1 или 2.

34. Соединение по п. 8 или п. 33 или его соль, выбранное из группы, включающей:



где:

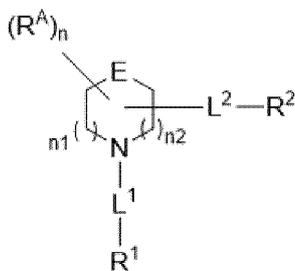
Q^1 представляет собой водород, и Q^2 представляет собой R^2 ; или Q^1 представляет собой R^2 , и Q^2 представляет собой водород; и

Z представляет собой $-L^1-R^1$;

и его соли.

35. Соединение по п. 8 или его соль, которое представлено соединением формулы

(Ic):



(Ic)

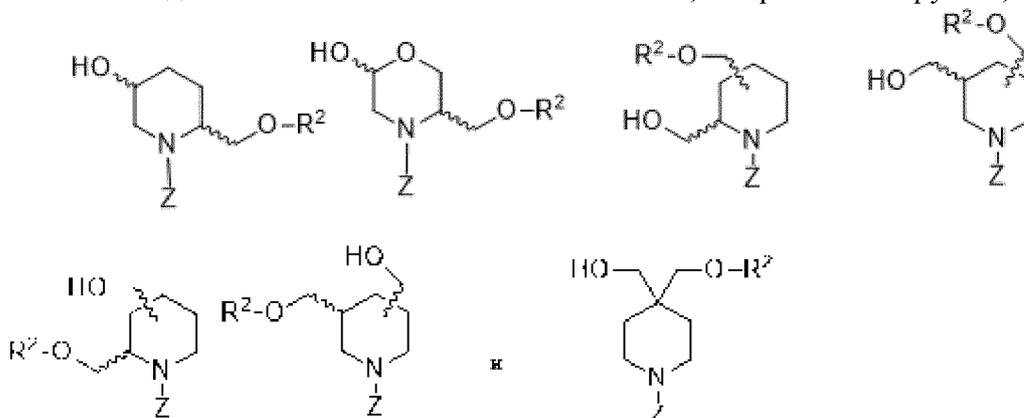
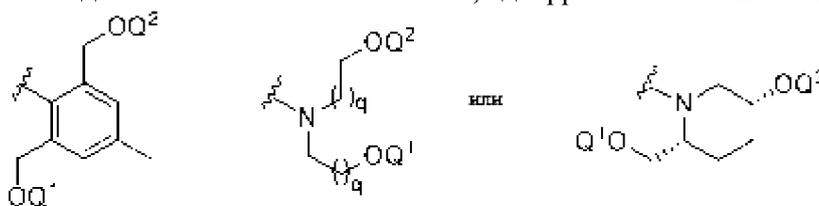
где:

E представляет собой $-O-$ или $-CH_2-$;

n выбран из группы, включающей 0, 1, 2, 3 и 4; и

каждый из n1 и n2 независимо выбраны из группы, включающей 0, 1, 2 и 3; или его соли.

36. Соединение по п. 8 или п. 35 или его соль, выбранное из группы, включающей:

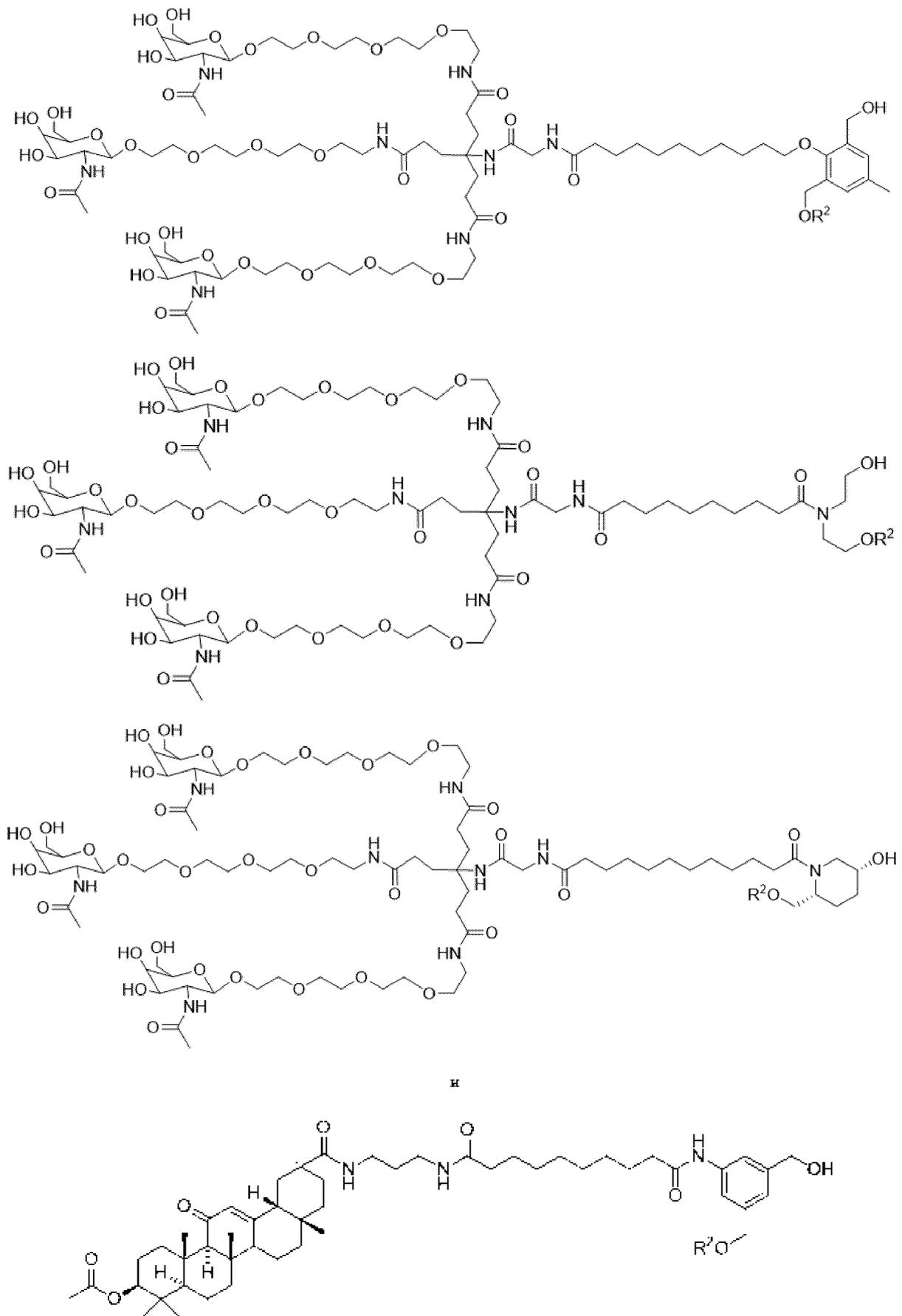
где: Z представляет собой $-L^1-R^1$; и его соли.37. Соединение по п. 8 или его соль, где фрагмент $-A-L^2-R^2$ представляет собой:

где:

 Q^1 представляет собой водород, и Q^2 представляет собой R^2 ; или Q^1 представляет собой R^2 , и Q^2 представляет собой водород; и

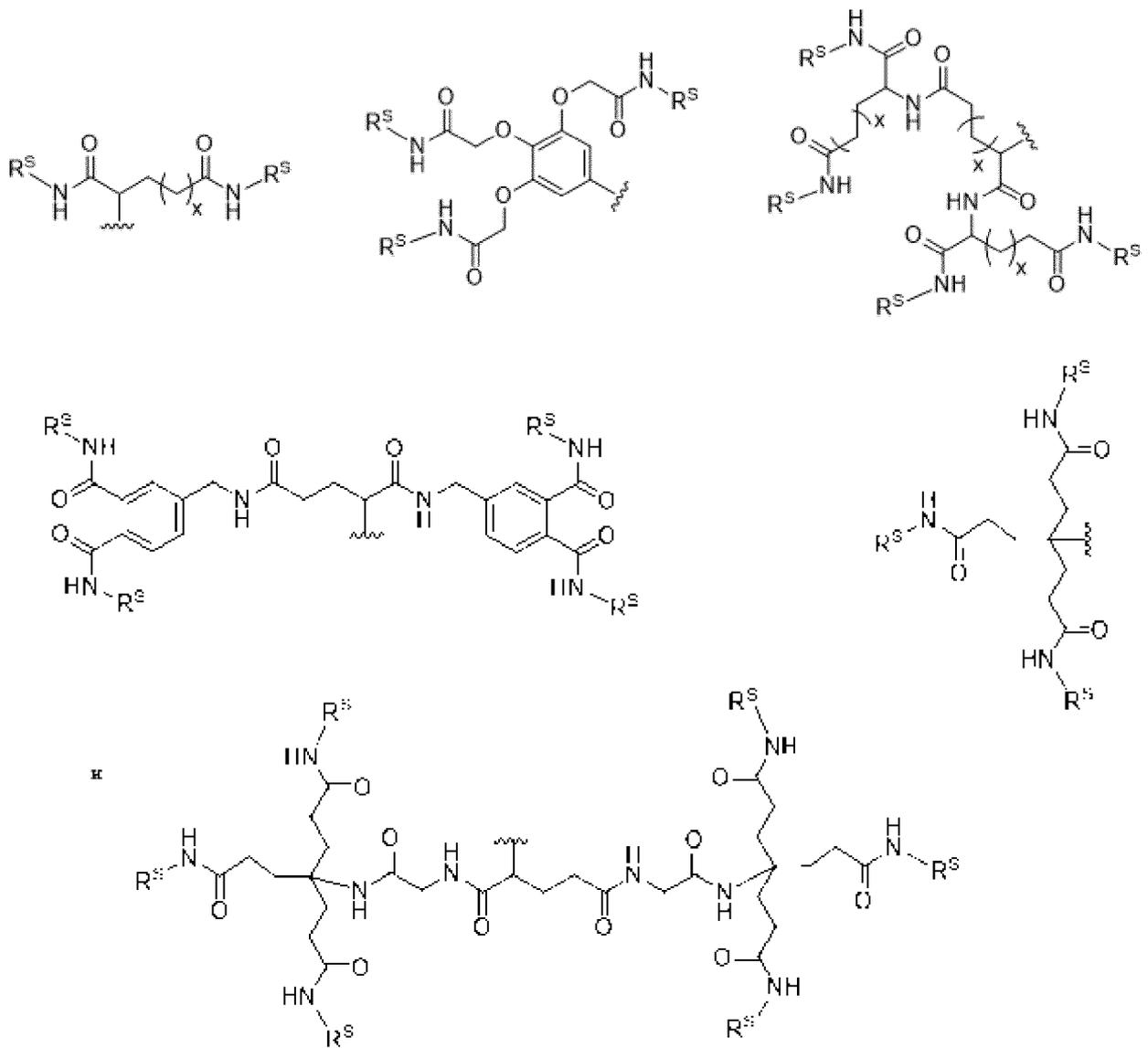
каждый из q независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

38. Соединение по п. 8 или его соль, выбранное из группы, включающей:

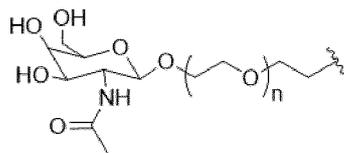


и его соли.

39. Соединение по п. 7 или его соль, где R^1 выбран из группы, включающей:



где:

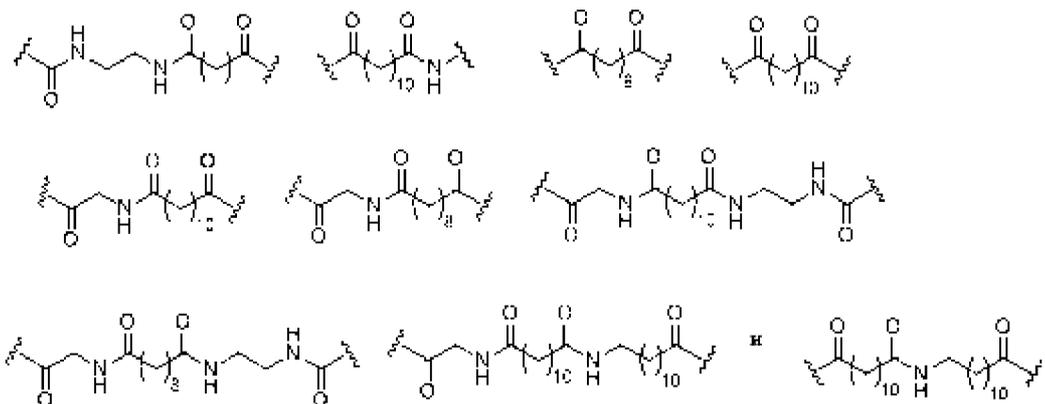


R^S представляет собой

n равен 2, 3 или 4; и

x равен 1 или 2.

40. Соединение по п. 7 или 39, или его соль, где L^1 выбран из группы, включающей:



41. Соединение по любому из пп. 7, 39 и 40, или его соль, где А отсутствует или представляет собой фенил, пирролидинил или циклопентил.

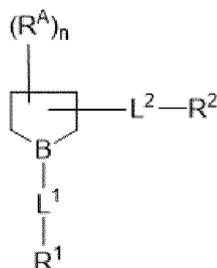
42. Соединение по любому из пп. 7 и 39–41, или его соль, где L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен–O–, который, необязательно, замещен гидроксигруппой.

43. Соединение по любому из пп. 7 и 39–42, или его соль, где L^2 представляет собой $-CH_2O-$, $-CH_2CH_2O-$ или $-CH(OH)CH_2O-$.

44. Соединение по любому из пп. 7 и 39–43, или его соль, где каждый из R^A независимо представляет собой C_{1-8} алкил, который, необязательно, замещен гидроксигруппой.

45. Соединение по любому из пп. 7 и 39–44, или его соль, где каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей гидроксигруппу, метил и $-CH_2OH$.

46. Соединение по п. 7 или его соль, формулы (Ig):



(Ig)

где:

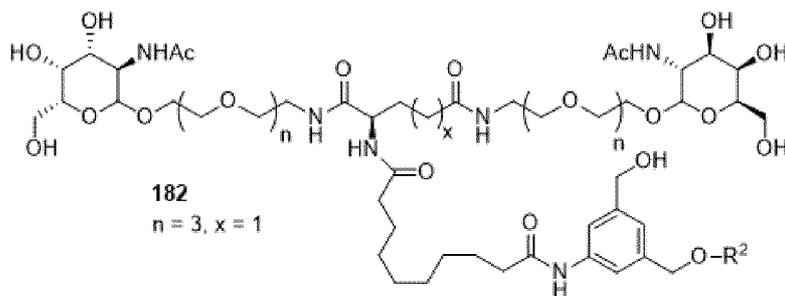
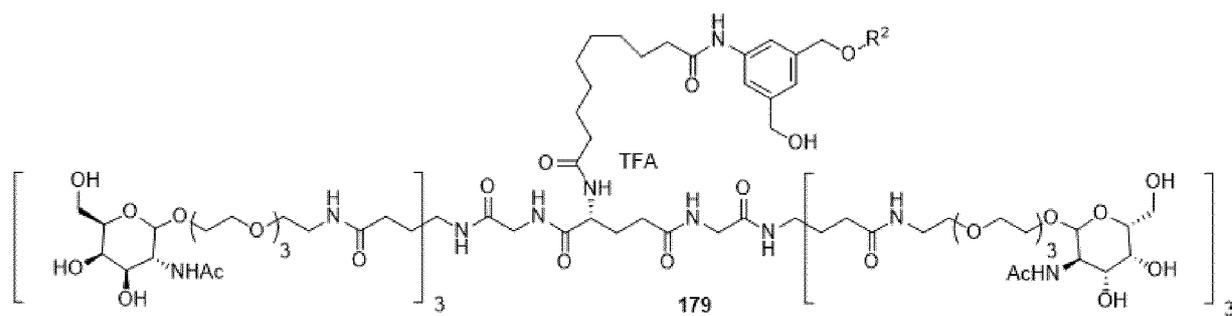
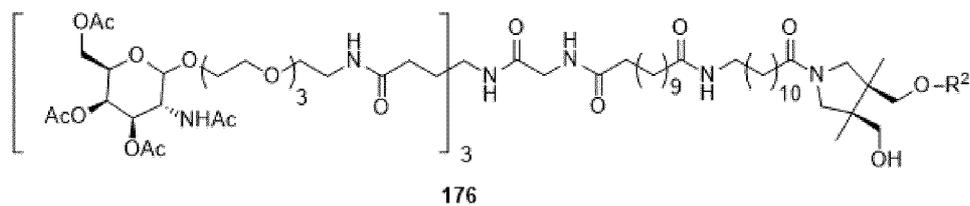
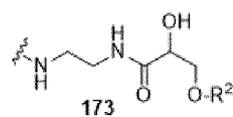
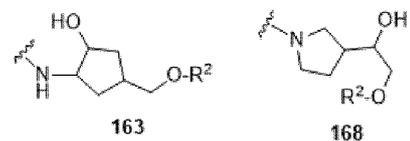
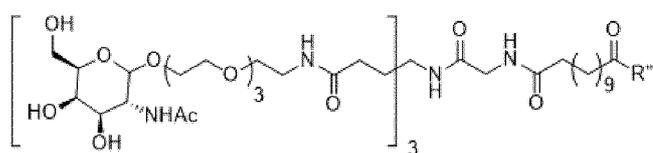
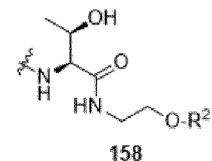
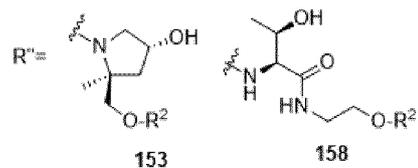
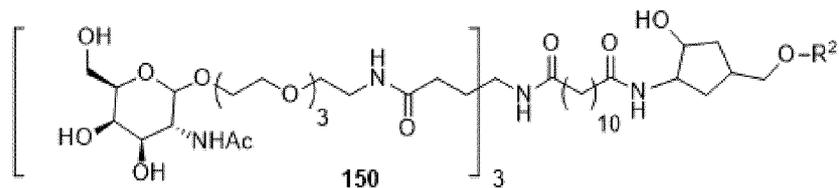
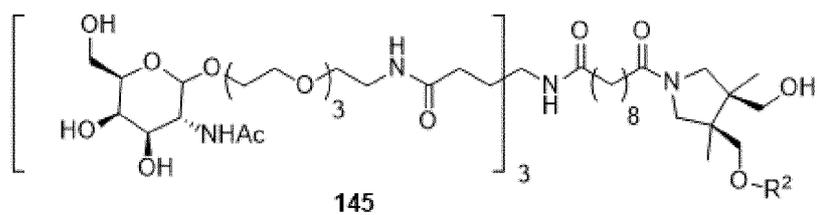
В представляет собой $-N-$ или $-CH-$;

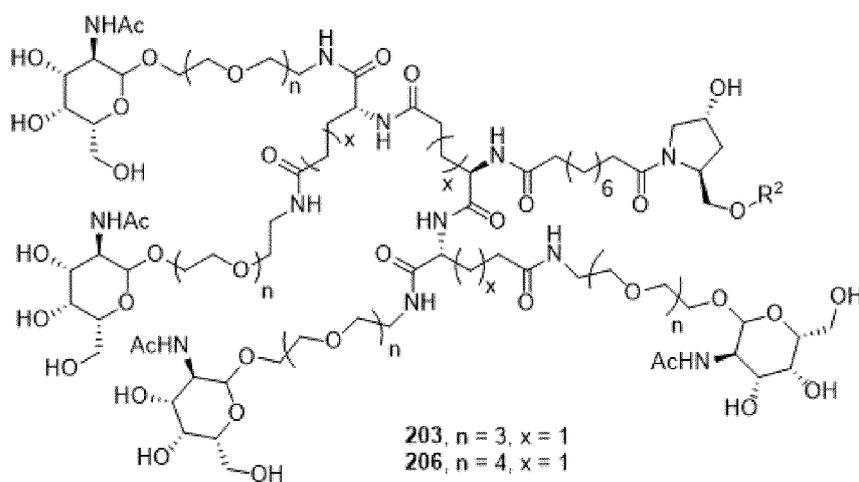
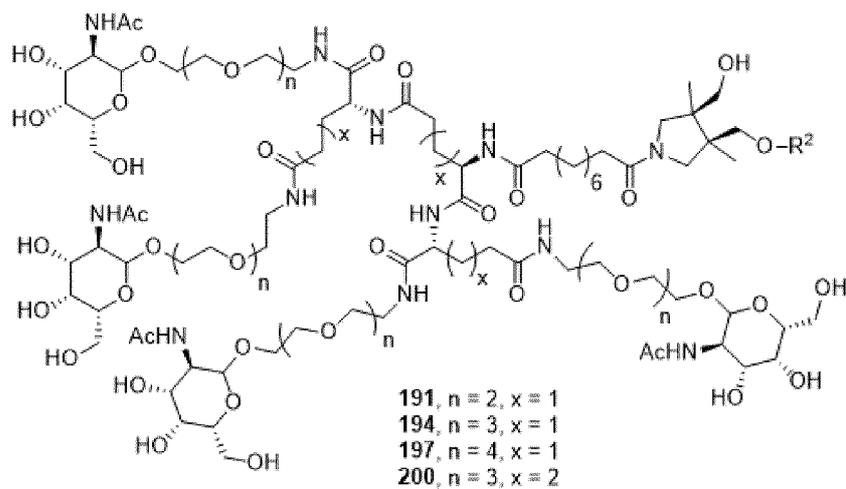
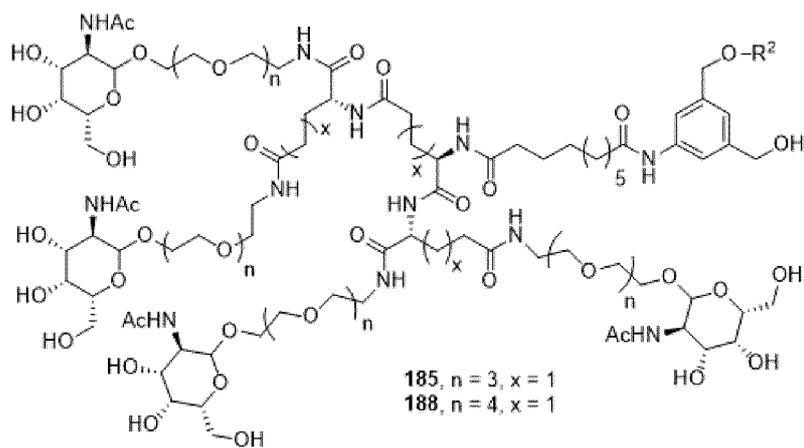
L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен–O–, который, необязательно, замещен гидроксигруппой или галогеном; и

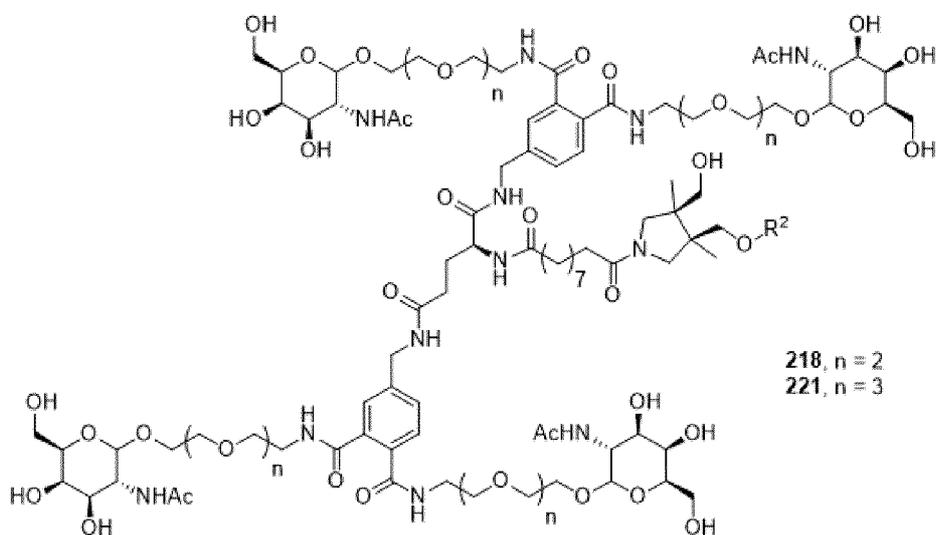
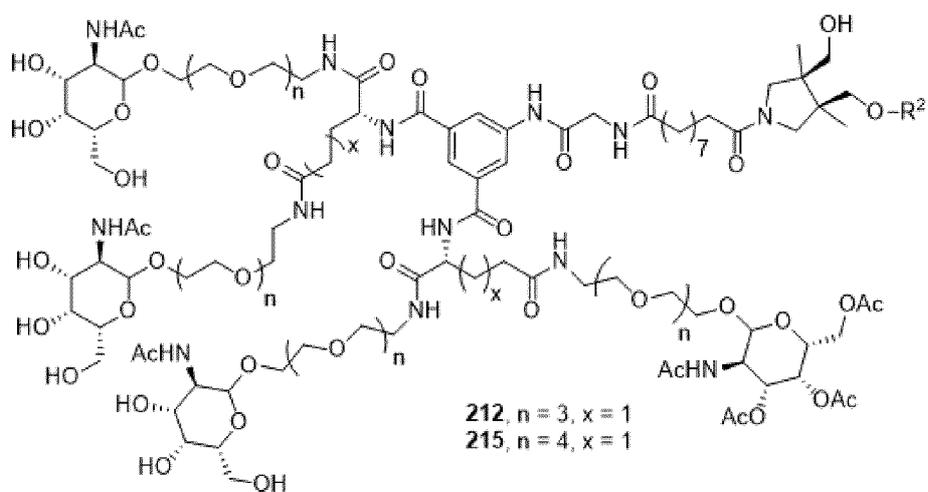
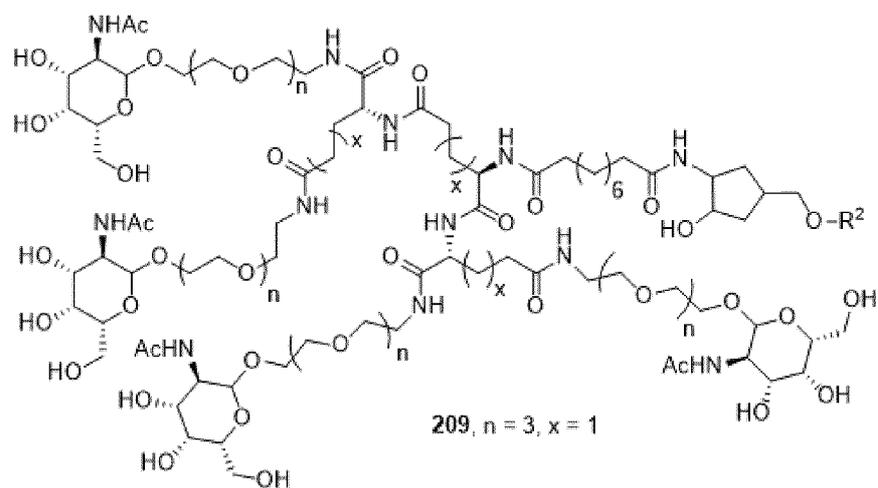
n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7;

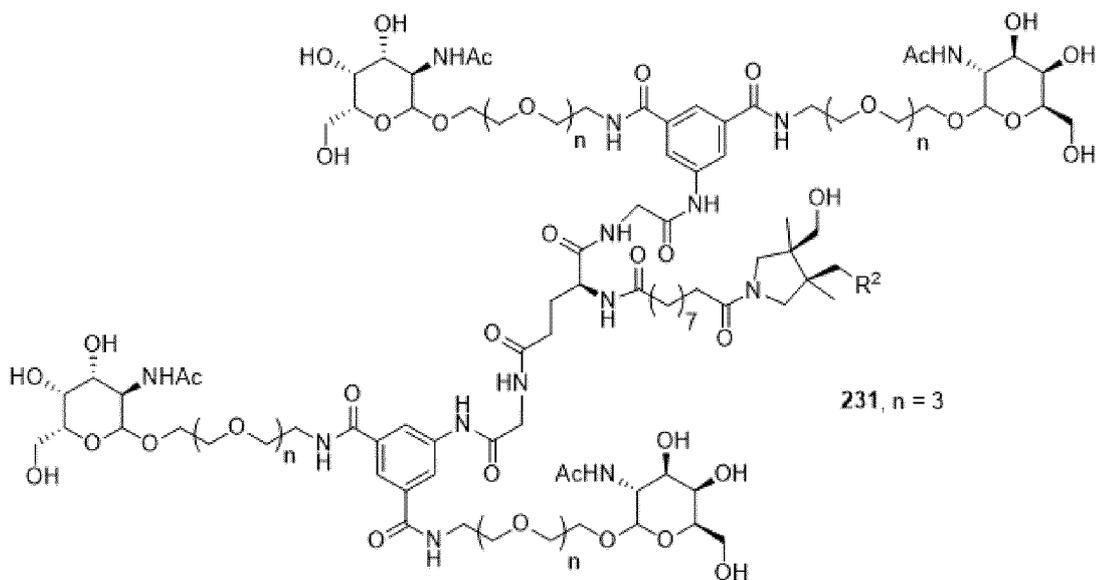
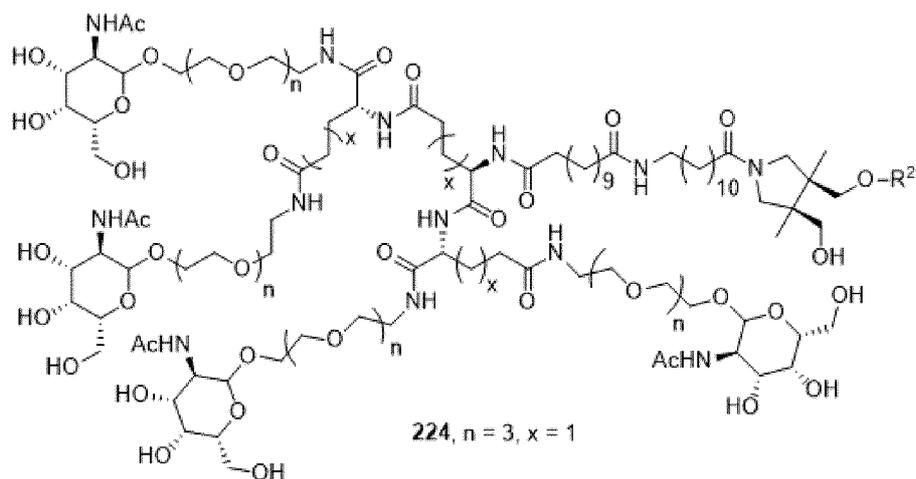
или его соль.

47. Соединение по п. 7 или 46, или его соль, выбранное из группы, включающей:









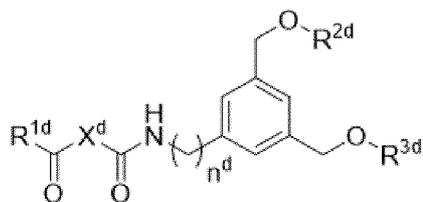
и

и его фармацевтически приемлемые соли, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в любом из пп. 1–49, или его фармацевтически приемлемая соль, и фармацевтически приемлемый носитель.

51. Способ доставки миРНК в печень животного, включающий введение животному соединения формулы I, как описано в любом из пп. 1–49, или его фармацевтически приемлемой соли.

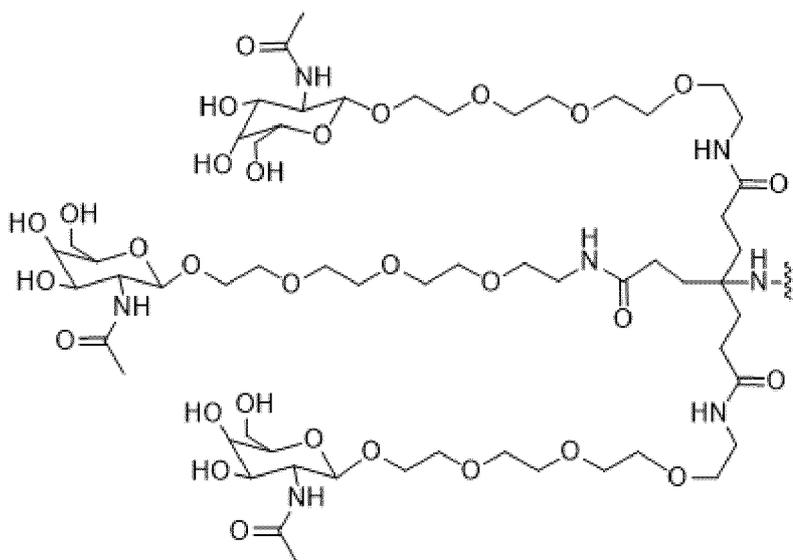
52. Соединение по п. 8 или его соль, формулы (Id):



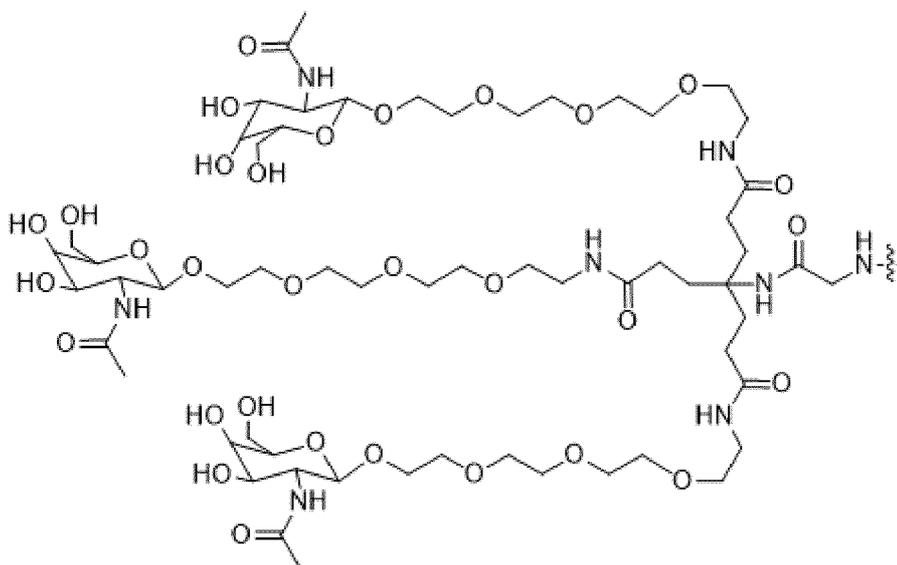
(Id)

где:

R^{1d} выбран из:



и



X^d представляет собой C_{2-10} алкилен;

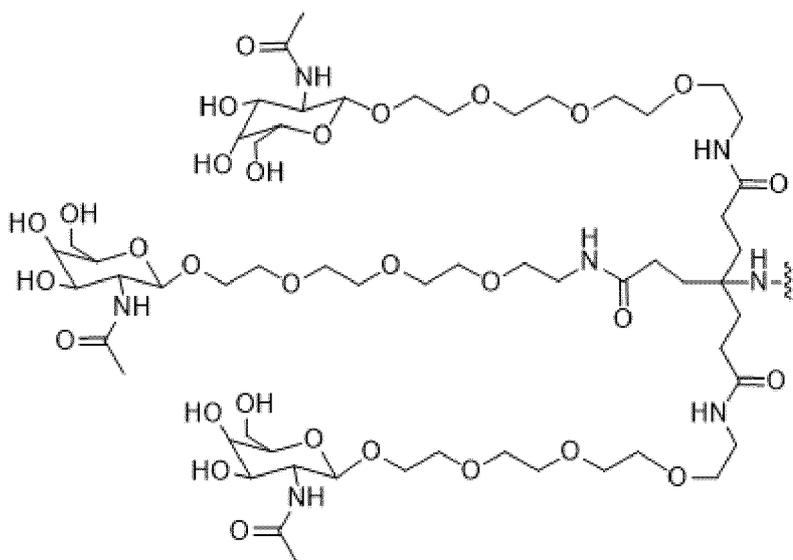
n^d равен 0 или 1;

R^{2d} представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК по п. 4; и

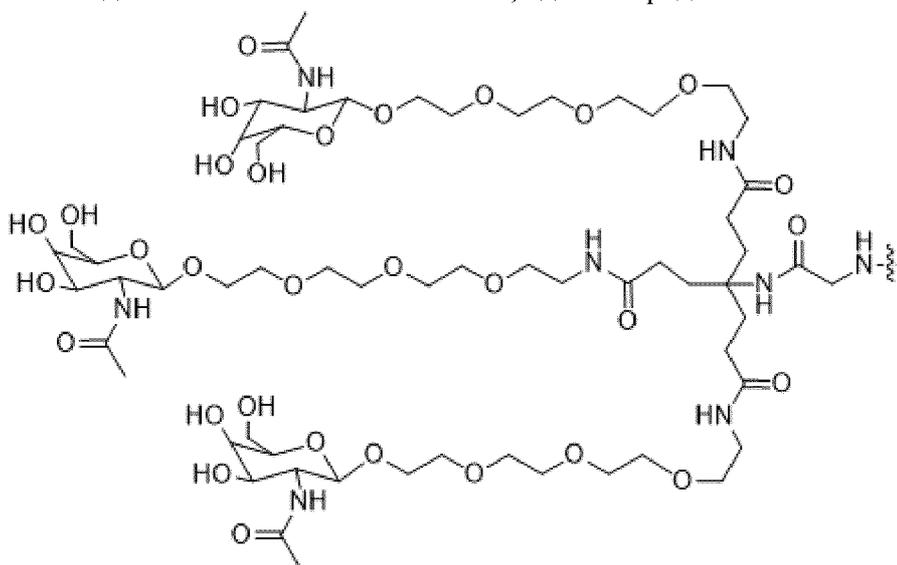
R^{3d} представляет собой H, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой.

или его соль.

53. Соединение по п. 52 или его соль, где R^{1d} представляет собой:



54. Соединение по п. 52 или его соль, где R^{1d} представляет собой:



55. Соединение или соль по любому из пп. 52–54, где X^d представляет собой C₈–алкилен.

56. Соединение по любому из пп. 52–54, где n^d равно 0.

57. Соединение или соль по любому из пп. 52–56, где R^{3d} представляет собой H.

58. Соединение или соль по любому из пп. 52–56, где R^{3d} представляет собой ковалентную связь с твердой подложкой.

59. Соединение по любому из пп. 52–56, или его соль, где R^{3d} представляет собой связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, где связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 15 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменены на (O) или (–N(H)–), и где цепь, необязательно, замещена у атома углерода одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C₁–C₆)алкокси, (C₃–C₆)циклоалкила, (C₁–C₆)алканоила, (C₁–C₆)алканоилокси, (C₁–

C₆)алкоксикарбонила, (C₁–C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), карбоксии, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

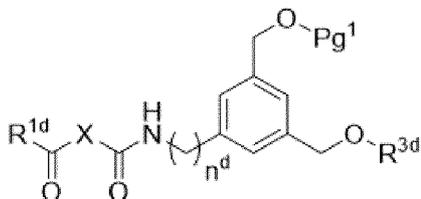
60. Соединение по любому из пп. 52–56, или его соль, где R^{3d} представляет собой связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, где связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменены на (O) или (–N(H)–), и где цепь, необязательно, замещена у атома углерода одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C₁–C₆)алкокси, (C₃–C₆)циклоалкила, (C₁–C₆)алканоила, (C₁–C₆)алканоилокси, (C₁–C₆)алкоксикарбонила, (C₁–C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), карбоксии, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

61. Соединение по любому из пп. 52–56, или его соль, где R^{3d} представляет собой связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, где связывающая группа представляет собой C(=O)CH₂CH₂C(=O)N(H)–.

62. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в любом из пп. 52–61, или его фармацевтически приемлемая соль, и фармацевтически приемлемый носитель.

63. Способ доставки миРНК в печень животного, включающий введение животному соединения формулы Id, как описано в любом из пп. 52–61, или его фармацевтически приемлемой соли.

64. Способ получения соединения формулы (Id), как описано в п. 48, или его соли, включающий оказание воздействия на соответствующее соединение формулы (Ie):



(Ie)

где:

X^d представляет собой C_{2–8} алкилен;

n^d равен 0 или 1;

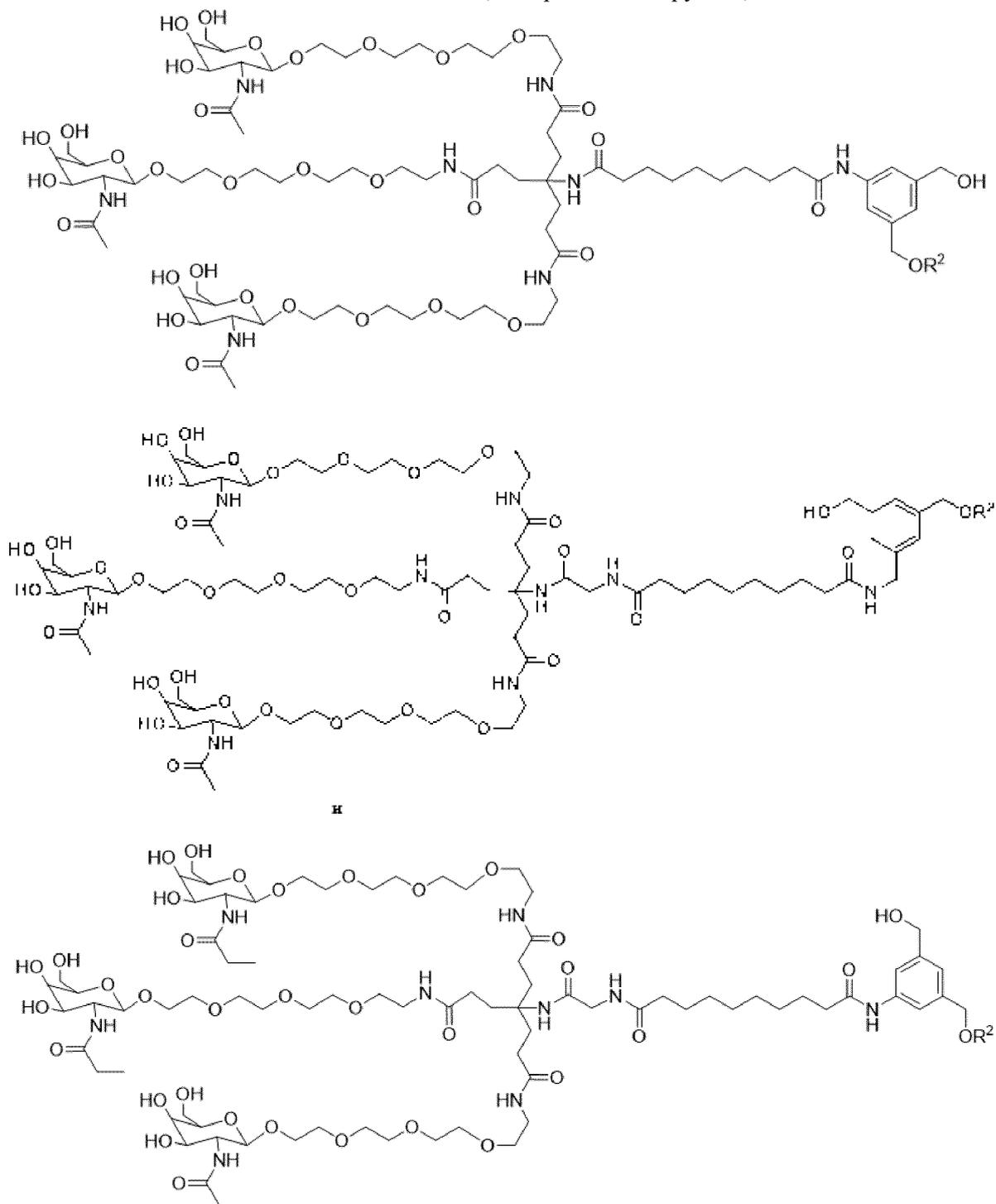
Pg¹ представляет собой H; и

R^{3d} представляет собой ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой, в условиях твердофазного синтеза нуклеиновых кислот, для получения соответствующего соединения формулы Id, где R^{2d} представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК по п. 4.

65. Способ по п. 64, дополнительно включающий удаление соединения с твердой подложки с целью получения соответствующего соединения формулы Id, где R^{3d}

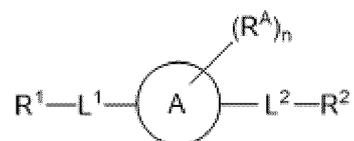
представляет собой Н.

66. Соединение по п. 52 или его соль, выбранное из группы, включающей:



и его соли.

67. Соединение формулы (I):



(I)

где:

R^1 представляет собой H или синтетическую активирующую группу;

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК по п. 4;

кольцо А отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксид, CN, F, Cl, Br, I, $-C_{1-2}$ алкил-OR^B, C_{1-10} алкил, C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил; где C_{1-10} алкил, C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксид и C_{1-3} алкокси;

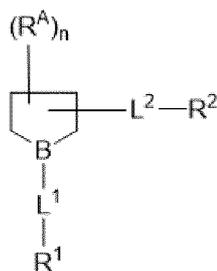
R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его соль.

68. Соединение по п. 67 или его соль, представляющее собой соединение формулы

(Ig):



(Ig)

где:

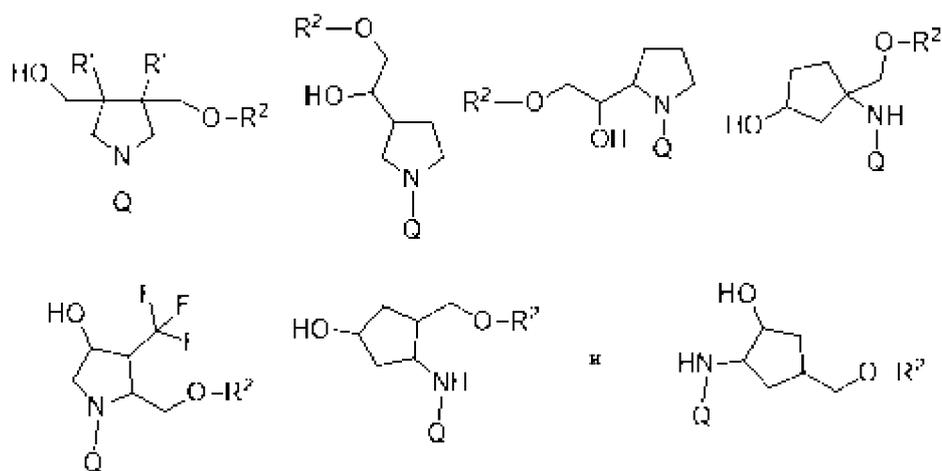
B представляет собой $-N-$ или $-CH-$;

L^2 представляет собой C_{1-4} алкилен-О-, который, необязательно, замещен гидроксидом или галогеном; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7;

или его соль.

69. Соединение по п. 67 или его соль, выбранное из группы, включающей:

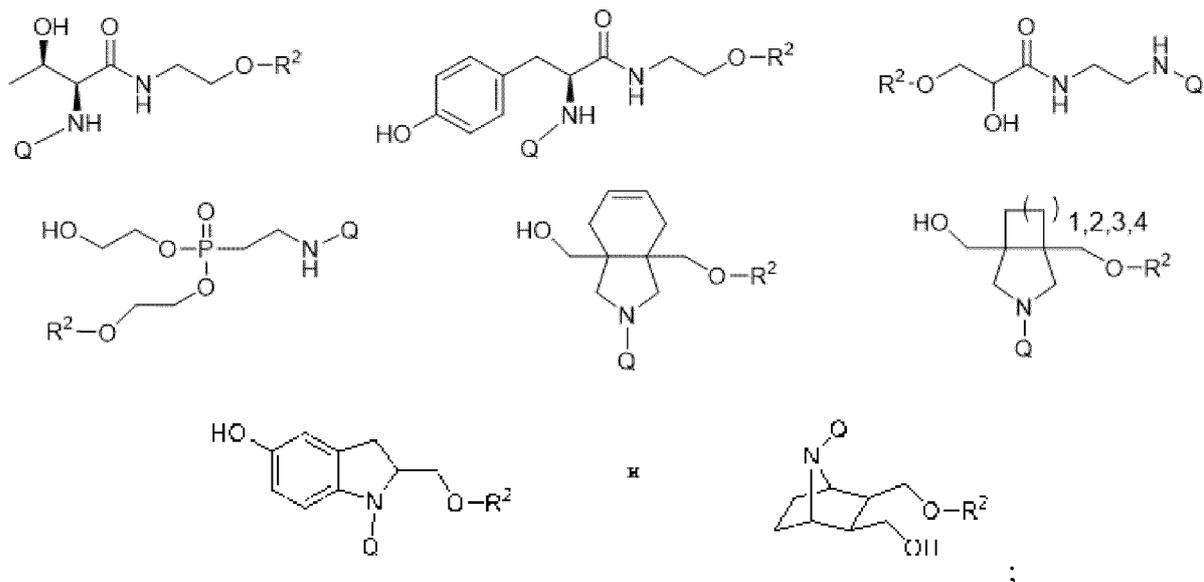


где:

Q представляет собой $-L^1-R^1$; и

R' представляет собой C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил; где C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксилом, и его соли.

70. Соединение по п. 67 или его соль, выбранное из группы, включающей:



где: Q представляет собой $-L^1-R^1$; и его соли.

71. Соединение по любому из пп. 66–73, или его соль, где R^1 представляет собой H или синтетическую активирующую группу, получаемую из ДЦК, ГОБт, ЭДК, БОФ, ПиБОФ или ГБТУ.

72. Соединение по любому из пп. 66–73, или его соль, где R^1 представляет собой синтетическую активирующую группу, получаемую из ДЦК, ГОБт, ЭДК, БОФ, ПиБОФ или ГБТУ.

73. Соединение по любому из пп. 66–77, или его соль, где L^1 представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 5 до 20 атомов углерода, где один или более

(например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NH-$, $-NH-C(=O)-$, $-C(=O)-NH-$ или $-S-$.

74. Соединения формулы (XX):



(XX)

где:

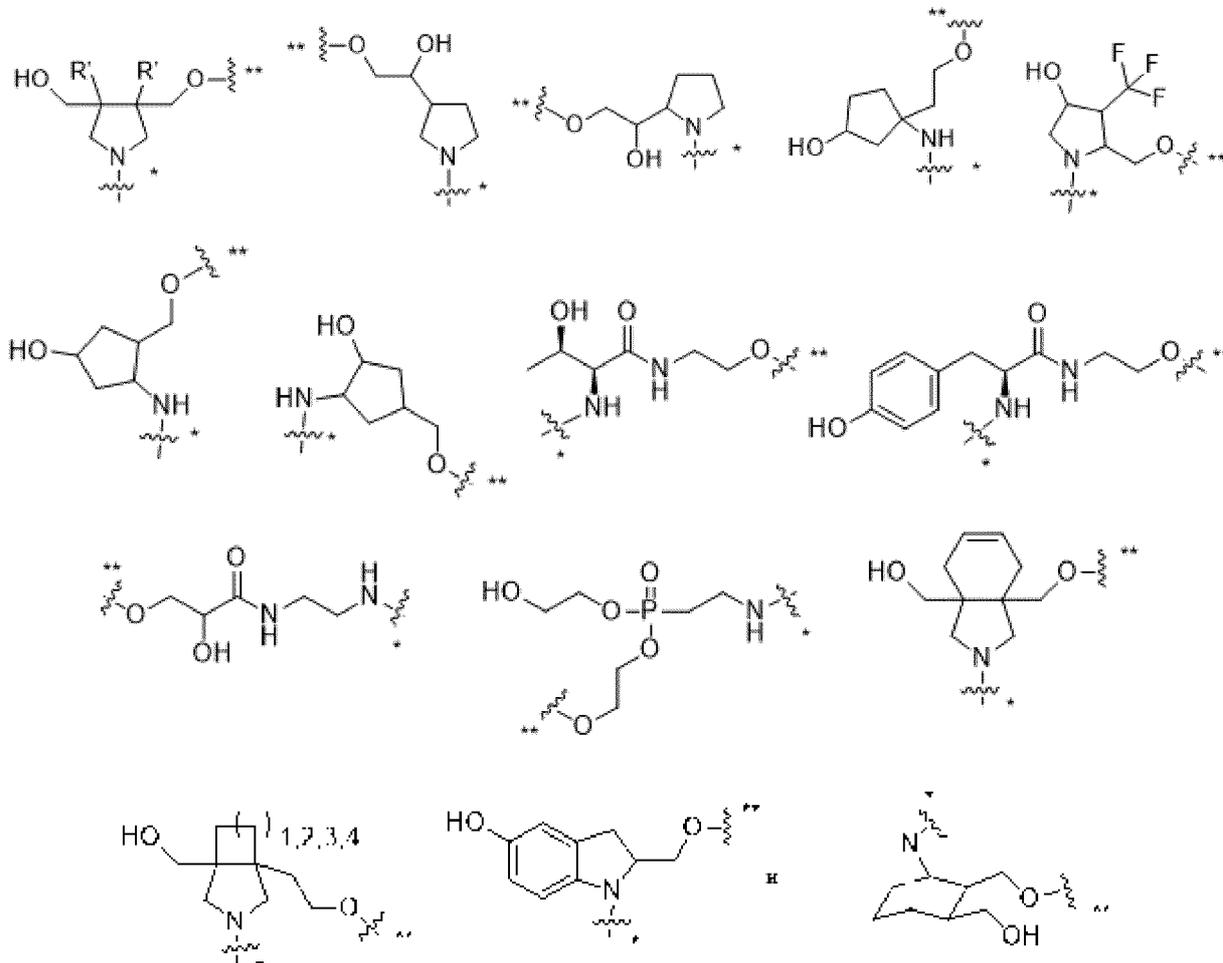
R^1 представляет собой направляющий лиганд;

L^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК по п. 4;

B является двухвалентным и выбран из группы, включающей:



где:

каждый из R' представляет собой C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил; где C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксилком;

валентность, отмеченная *, соединена с L^1 или соединена с R^1 , если L^1 отсутствует;

и

валентность, отмеченная **, соединена с L^2 или соединена с R^2 , если L^2 отсутствует;

или его соль.

75. Соединение по п. 74 или его соль, где направляющий лиганд R^1 содержит 2–8 сахаридов.

76. Соединение по п. 74 или его соль, где направляющий лиганд R^1 содержит 2–4 сахаридов.

77. Соединение по п. 74 или его соль, где направляющий лиганд R^1 содержит 3–8 сахаридов.

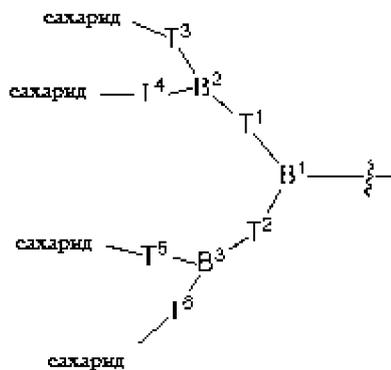
78. Соединение по п. 74 или его соль, где направляющий лиганд R^1 содержит 3–6 сахаридов.

79. Соединение по п. 74 или его соль, где направляющий лиганд R^1 содержит 3–4 сахаридов.

80. Соединение по п. 74 или его соль, где направляющий лиганд R^1 содержит 3 сахара.

81. Соединение по п. 74 или его соль, где направляющий лиганд R^1 содержит 4 сахара.

82. Соединение по любому из пп. 7–8, 31–36, 38–39, 40–44, 46–48, 67–69 и 74, или его соль, где направляющий фрагмент R^1 имеет следующую формулу:



где:

B^1 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от около 1 до около 20 атомов и которая ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

B^2 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от около 1 до около 20 атомов, и которая ковалентно связана с T^1 , T^3 и T^4 .

B^3 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от около 1 до около 20 атомов, и которая ковалентно связана с T^2 , T^5 и T^6 .

T^1 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

T^2 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

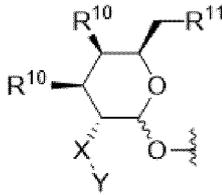
T^3 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

T^4 отсутствует или представляет собой связывающую группу;

T^5 отсутствует или представляет собой связывающую группу; и

T^6 отсутствует или представляет собой связывающую группу.

83. Соединение по п. 82 или его соль, где каждый сахарид независимо выбран из:



где:

X представляет собой NR^3 , и Y выбран из $(C=O)R^4$, $-SO_2R^5$ и $(C=O)NR^6R^7$; или X представляет собой $(C=O)$, и Y представляет собой NR^8R^9 ;

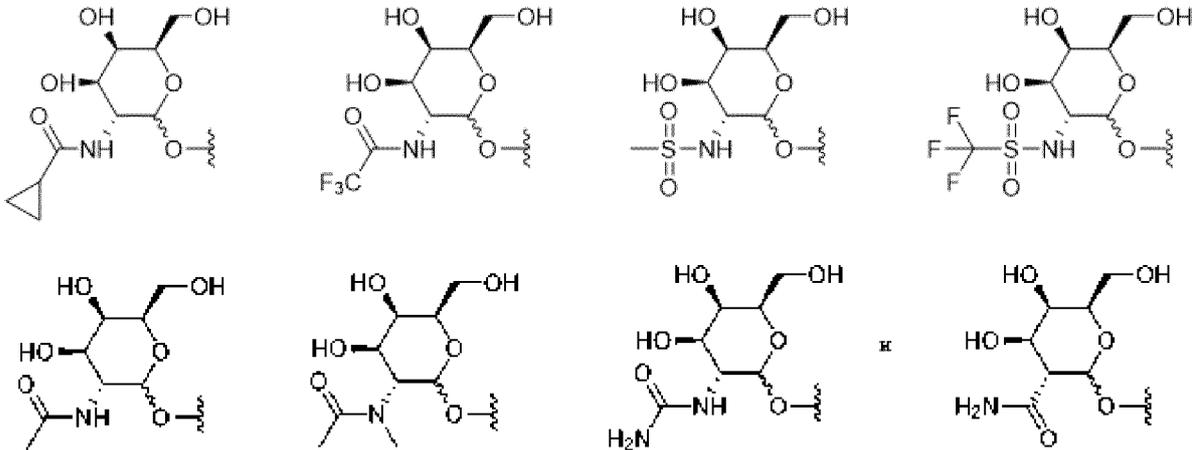
R^3 представляет собой водород или (C_1-C_4) алкил;

каждый из R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 и R^9 независимо выбран из группы, включающей водород, (C_1-C_8) алкил, (C_1-C_8) галогеналкил, (C_1-C_8) алкокси и (C_3-C_6) циклоалкил, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси;

R^{10} представляет собой $-OH$, $-NR^8R^9$ или $-F$; и

R^{11} представляет собой $-OH$, $-NR^8R^9$, $-F$ или 5-членный гетероцикл, который, необязательно, замещен одной или более группами, независимо выбранными из группы, включающей галоген, гидроксил, карбоксил, амина, (C_1-C_4) алкил, (C_1-C_4) галогеналкил, (C_1-C_4) алкокси и (C_1-C_4) галогеналкокси.

84. Соединение по п. 82 или его соль, где каждый сахарид независимо выбран из группы, включающей:



85. Соединение по п. 82 или его соль, где каждый сахарид независимо выбран из:



86. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где один из T^1 и T^2

отсутствует.

87. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый оба T^1 и T^2 отсутствуют.

88. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, причем один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C1–C6)алкил, и при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C1–C6)алкокси, (C3–C6)циклоалкила, (C1–C6)алканоила, (C1–C6)алканоилокси, (C1–C6)алкоксикарбонила, (C1–C6)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

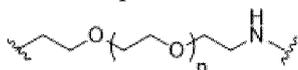
89. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, причем один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C1–C6)алкил, и при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C1–C6)алкокси, (C3–C6)циклоалкила, (C1–C6)алканоила, (C1–C6)алканоилокси, (C1–C6)алкоксикарбонила, (C1–C6)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидроксид, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

90. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, или ее соль, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$ или $-NR^X-$, и где R^X представляет собой водород или (C1–C6)алкил, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными галогена, гидроксид и оксо ($=O$).

91. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными галогена, гидроксид и оксо ($=O$).

92. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый из T^1 , T^2 , T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо отсутствует или представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, и где углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными галогена, гидроксид и оксо ($=O$).

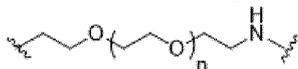
93. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где по меньшей мере один из T^3 , T^4 , T^5 и T^6 представляет собой:



где:

n равен 1, 2, 3.

94. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый из T^3 , T^4 , T^5 и T^6 независимо выбран из группы, включающей:



где:

n равен 1, 2, 3.

95. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где по меньшей мере один из T^1 и T^2 представляет собой глицин.

96. Соединение по любому из пп. 82–85 или его соль, где каждый из T^1 и T^2 представляет собой глицин.

97. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 15 атомов, и ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

98. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 10 атомов, и ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

99. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит (C_1-C_6) -алкил.

100. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит C_{3-8} циклоалкил.

101. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит силильную группу.

102. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит D- или L-аминокислоту.

103. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит сахарид.

104. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит фосфатную группу.

105. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит фосфонатную группу.

106. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит арил.

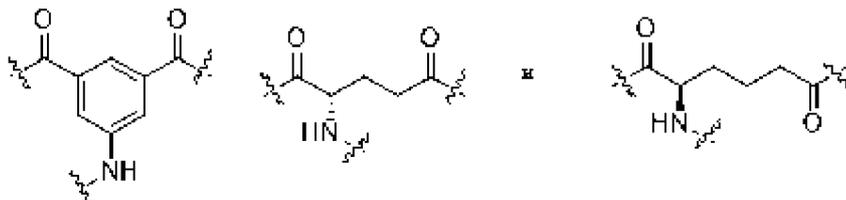
107. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит фенильное кольцо.

108. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 представляет собой фенильное кольцо.

109. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 представляет собой СН.

110. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 содержит гетероарил.

111. Соединение по любому из пп. 82–96 или его соль, где V^1 представляет собой:



112. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 15 атомов, и ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

113. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 10 атомов, и ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

114. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит (C_1-C_6) -алкил.

115. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит C_{3-8} циклоалкил.

116. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит силильную группу.

117. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит D- или L-аминокислоту.

118. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит сахарид.

119. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит фосфатную группу.

120. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит фосфонатную группу.

121. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит арил.

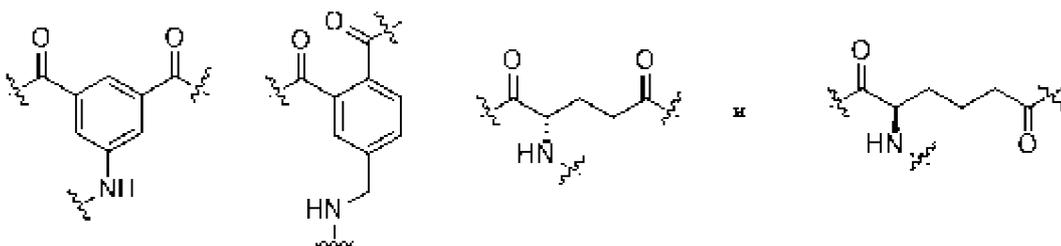
122. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит фенильное кольцо.

123. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 представляет собой фенильное кольцо.

124. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 представляет собой СН.

125. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 содержит гетероарил.

126. Соединение по любому из пп. 82–111 или его соль, где V^2 выбран из группы, включающей:



127. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 15 атомов, и ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

128. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 представляет собой трехвалентную группу, содержащую от 1 до 10 атомов, и ковалентно связана с L^1 , T^1 и T^2 .

129. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит (C_1-C_6) -алкил.

130. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит C_{3-8} циклоалкил.

131. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит силильную группу.

132. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит D- или L-аминокислоту.

133. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит сахарид.

134. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит фосфатную группу.

135. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит фосфонатную группу.

136. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит арил.

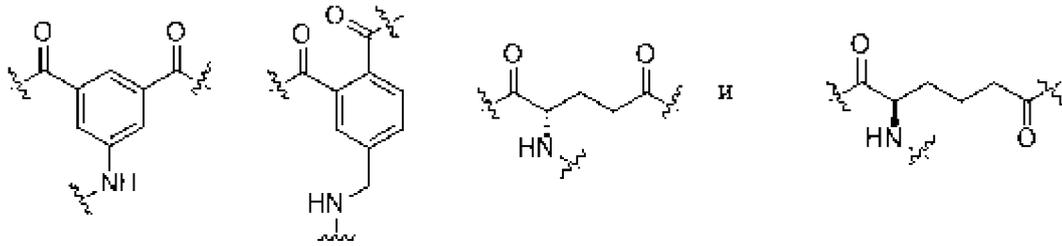
137. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит фенильное кольцо.

138. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 представляет собой фенильное кольцо.

139. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 представляет собой СН.

140. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 содержит гетероарил.

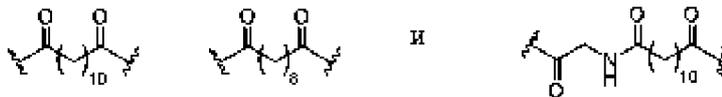
141. Соединение по любому из пп. 82–126 или его соль, где V^3 выбран из группы, включающей:



или его соль.

142. Соединение по любому из пп. 87–146, или его соль, где L^1 и L^2 независимо представляют собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или (C1–C6)алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из (C1–C6)алкокси, (C3–C6)циклоалкила, (C1–C6)алканоила, (C1–C6)алканоилокси, (C1–C6)алкоксикарбонила, (C1–C6)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

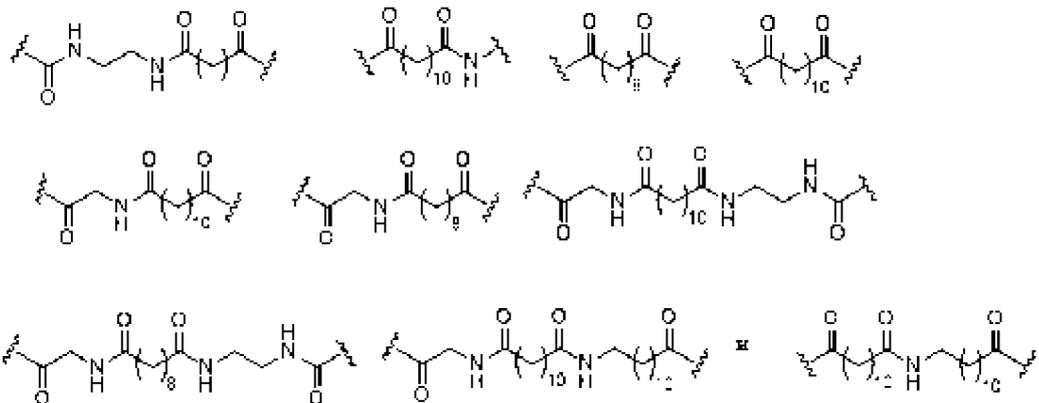
143. Соединение по любому из пп. 82–141 или его соль, где L^1 выбран из группы, включающей:



или его соль.

144. Соединение по любому из пп. 82–141 или его соль, где L^1 соединен с V^1 с помощью звена, выбранного из группы, включающей: $-O-$, $-S-$, $-(C=O)-$, $-(C=O)-NH-$, $-NH-(C=O)$, $(C=O)-O-$, $-NH-(C=O)-NH-$ или $-NH-(SO_2)-$.

145. Соединение по любому из пп. 87–141 или его соль, где L^1 выбран из группы, включающей:



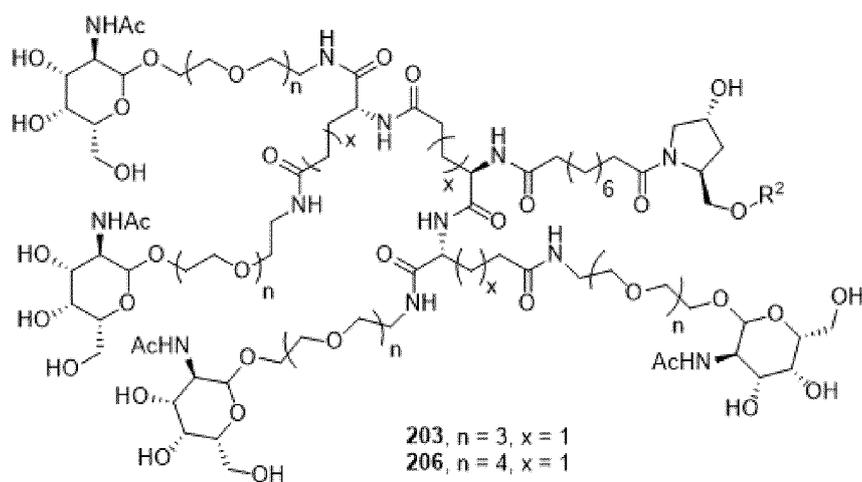
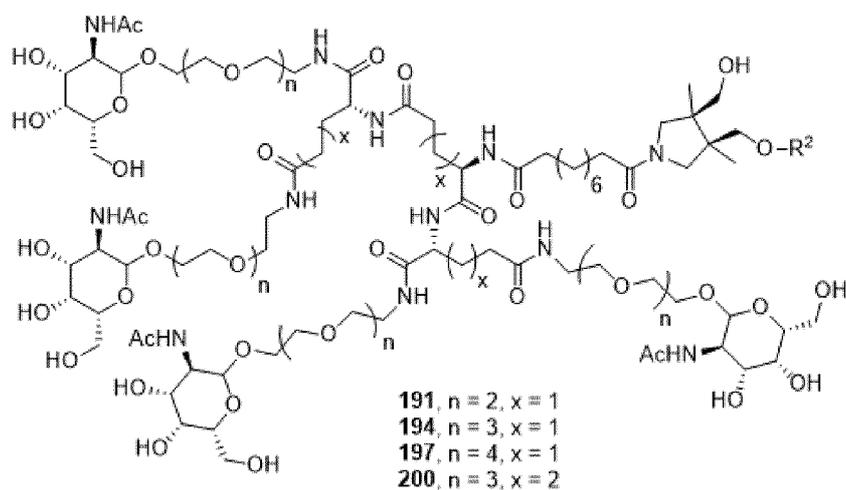
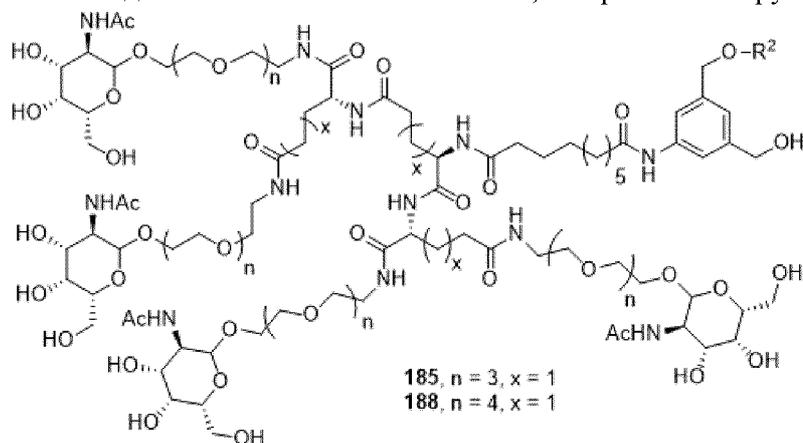
146. Соединение по любому из пп. 82–145 или его соль, где L^2 соединен с R^2 с помощью $-O-$.

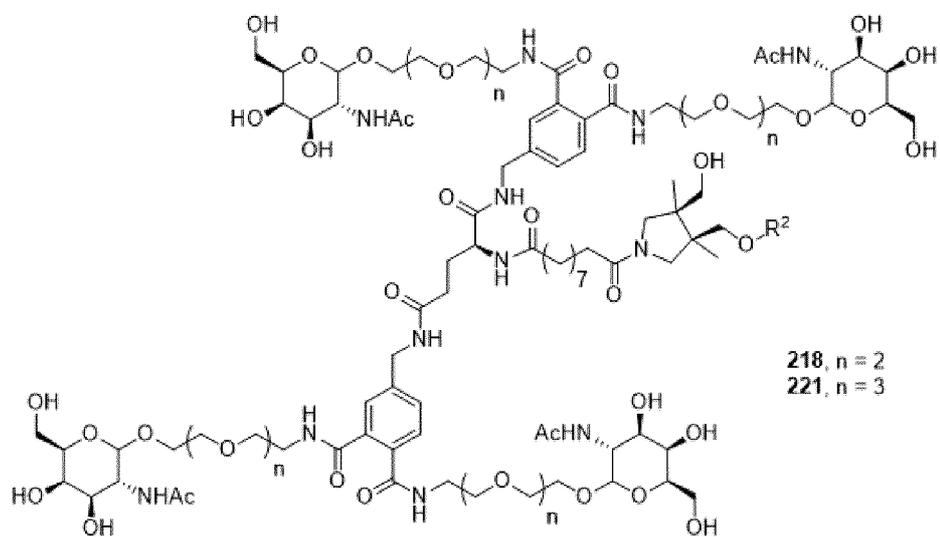
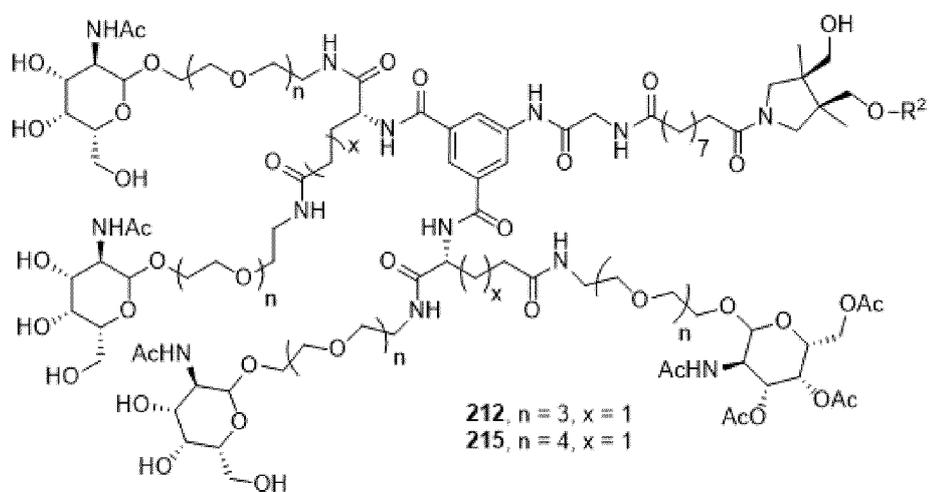
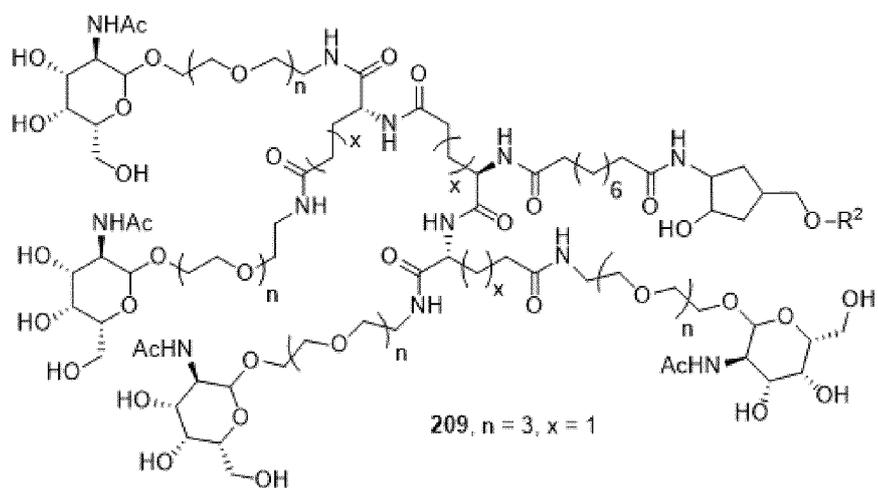
147. Соединение по любому из пп. 82–145 или его соль, где L^2 представляет собой C_{1-4} -алкилен- O -, который, необязательно, замещен гидроксидом.

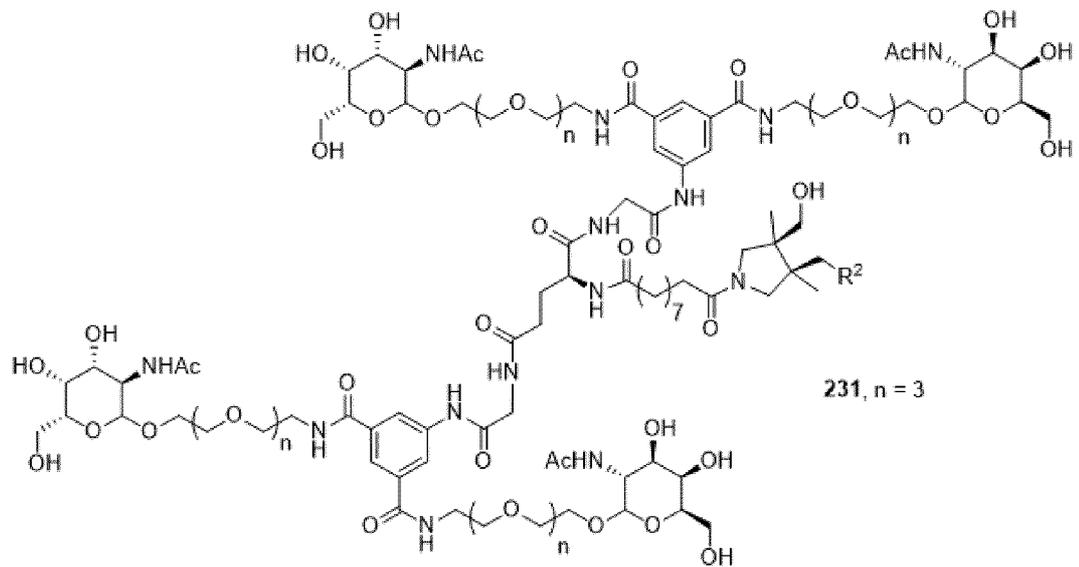
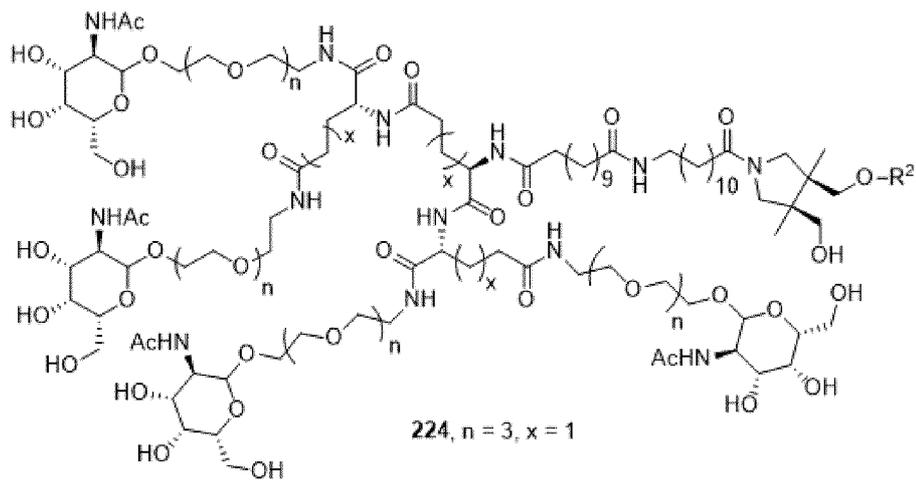
148. Соединение по любому из пп. 82–145 или его соль, где L^2 соединен с R^2 с помощью $-O-$.

149. Соединение по любому из пп. 82–145 или его соль, где L^2 отсутствует.

150. Соединение по п. 87 или его соль, выбранное из группы, включающей:





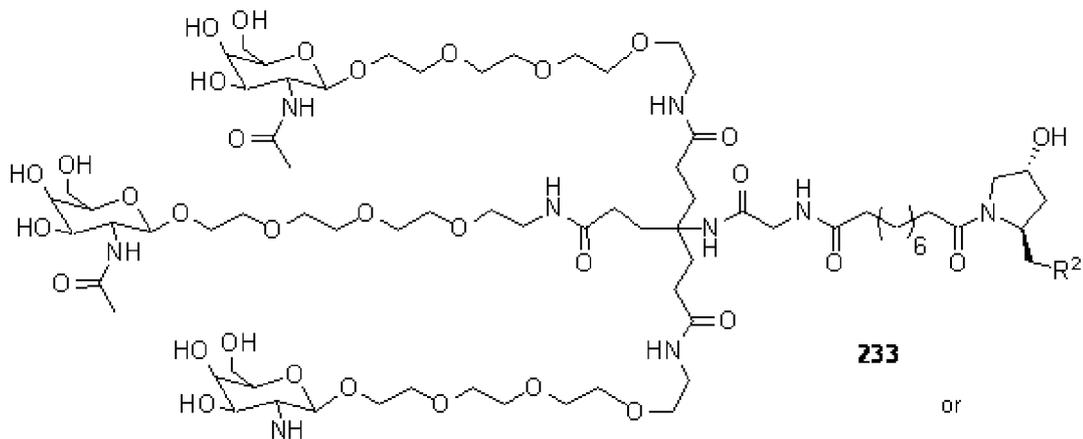


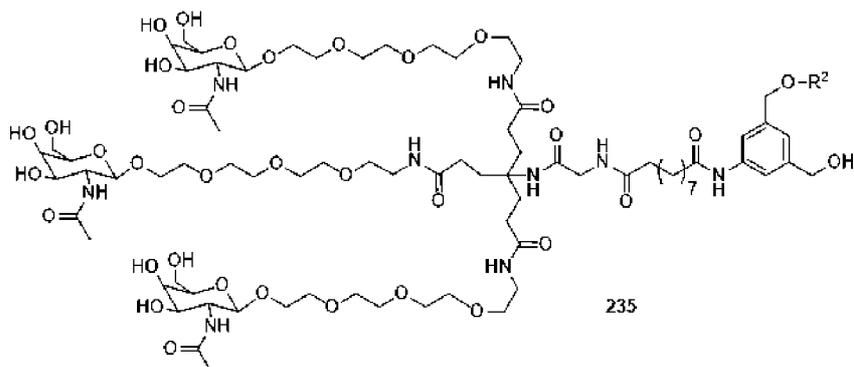
и

;

и его фармацевтически приемлемые соли, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

151. Соединение





или его соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

152. Конъюгат GalNAc формулы X:

A–B–C

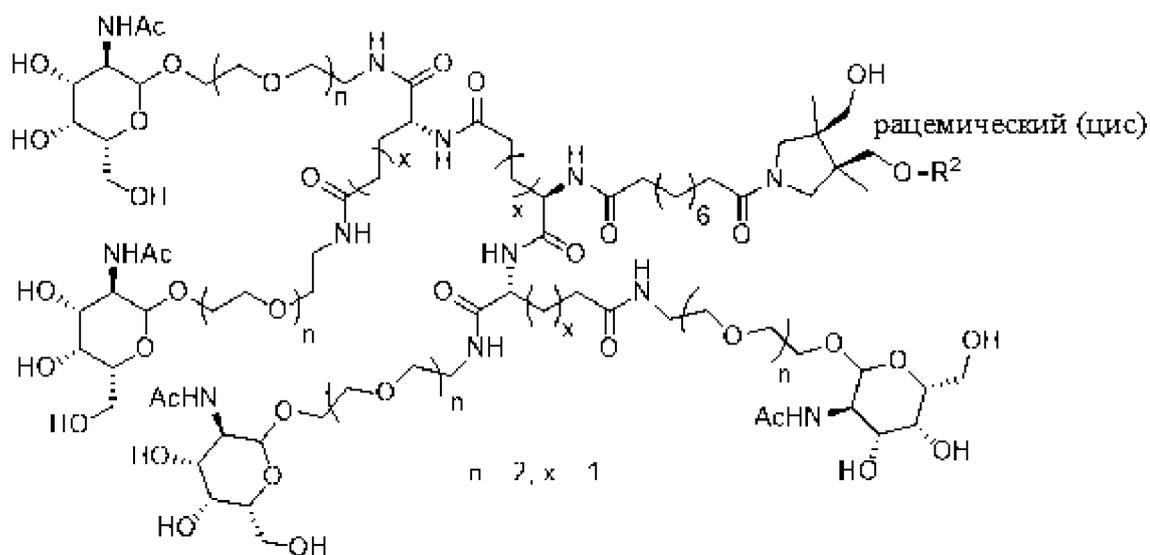
(X)

где A представляет собой направляющий лиганд;

B представляет собой необязательный линкер, а также

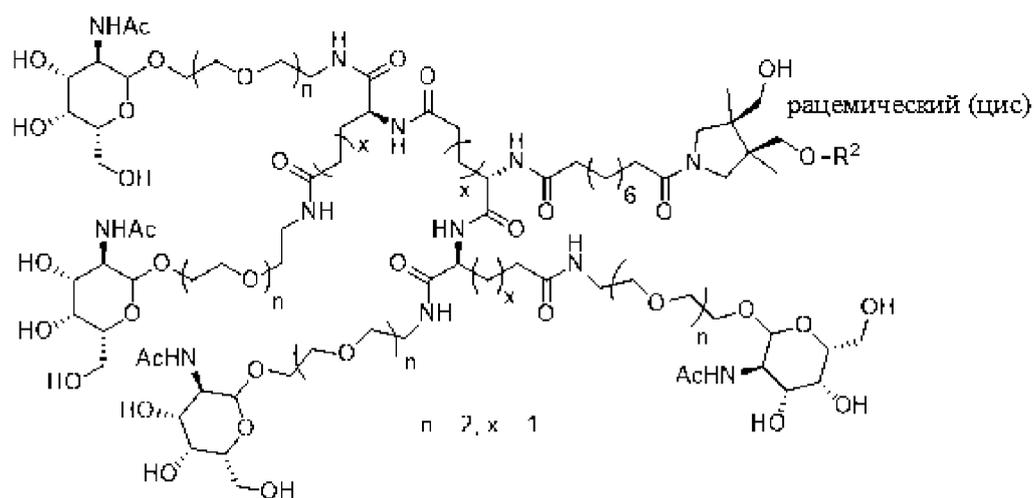
C представляет собой молекулу миРНК по п. 4.

153. Соединение формулы:



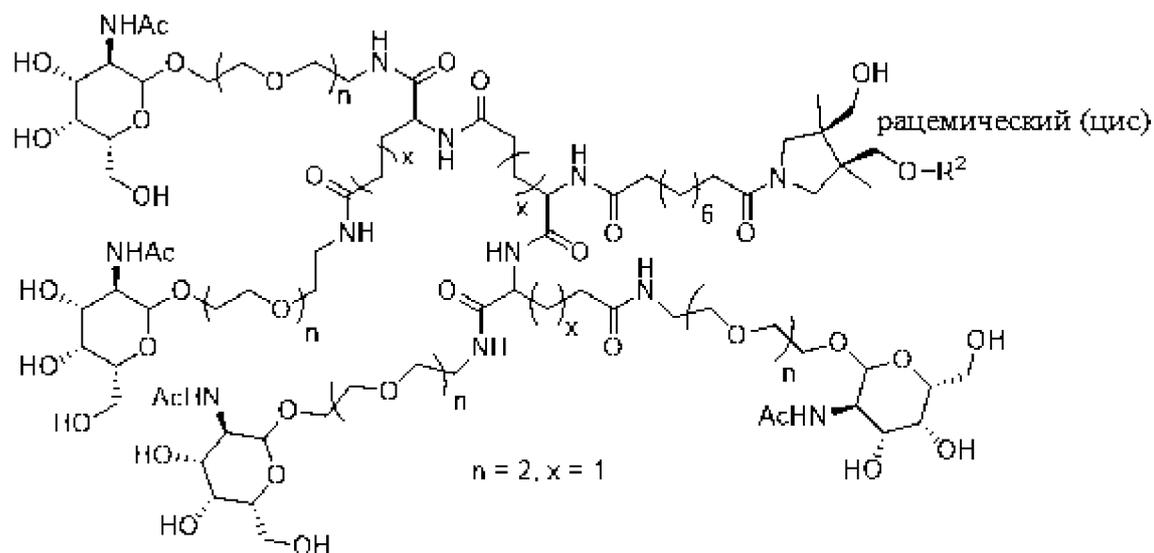
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

154. Соединение формулы:



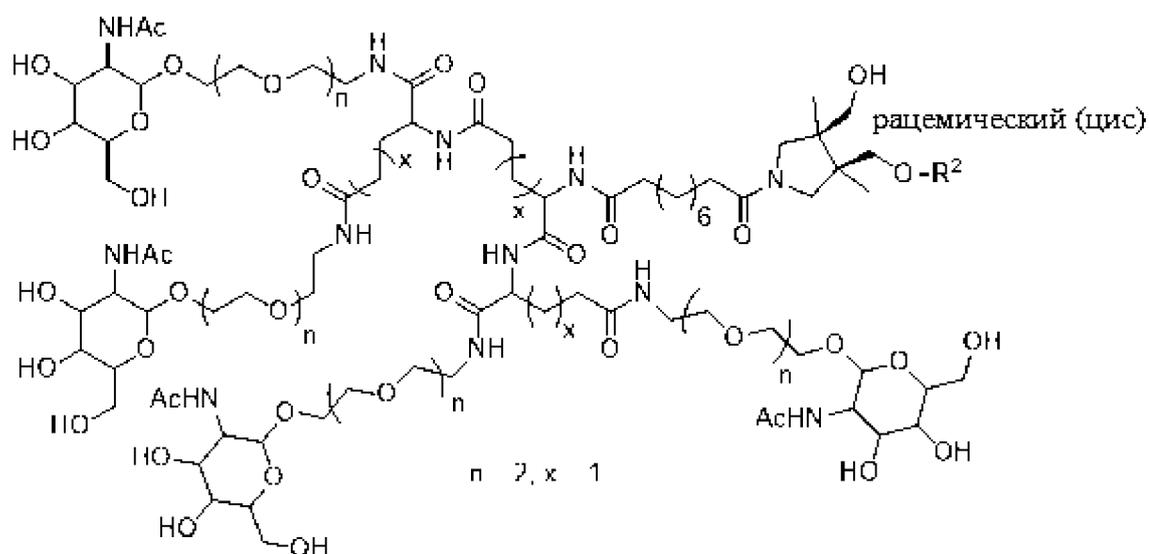
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

155. Соединение формулы:



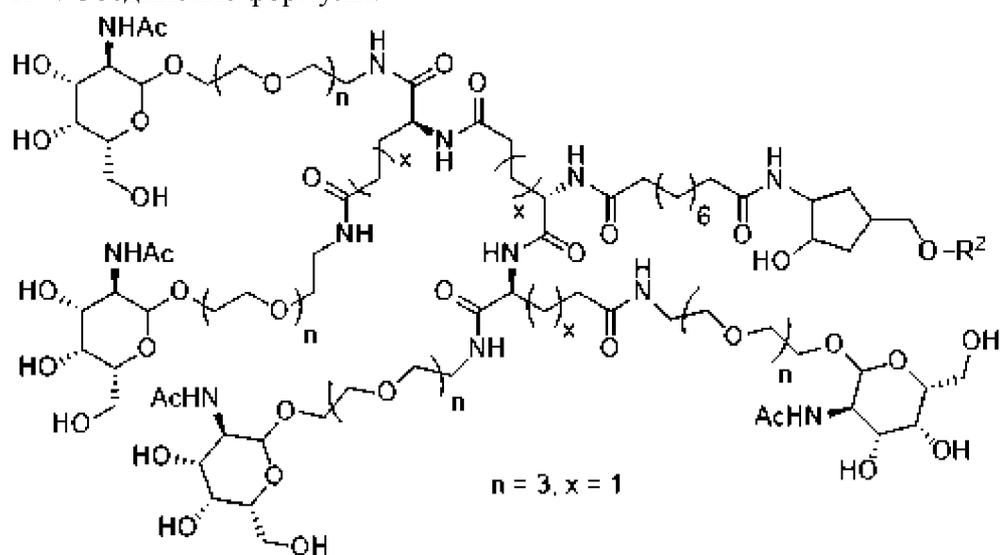
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

156. Соединение формулы:



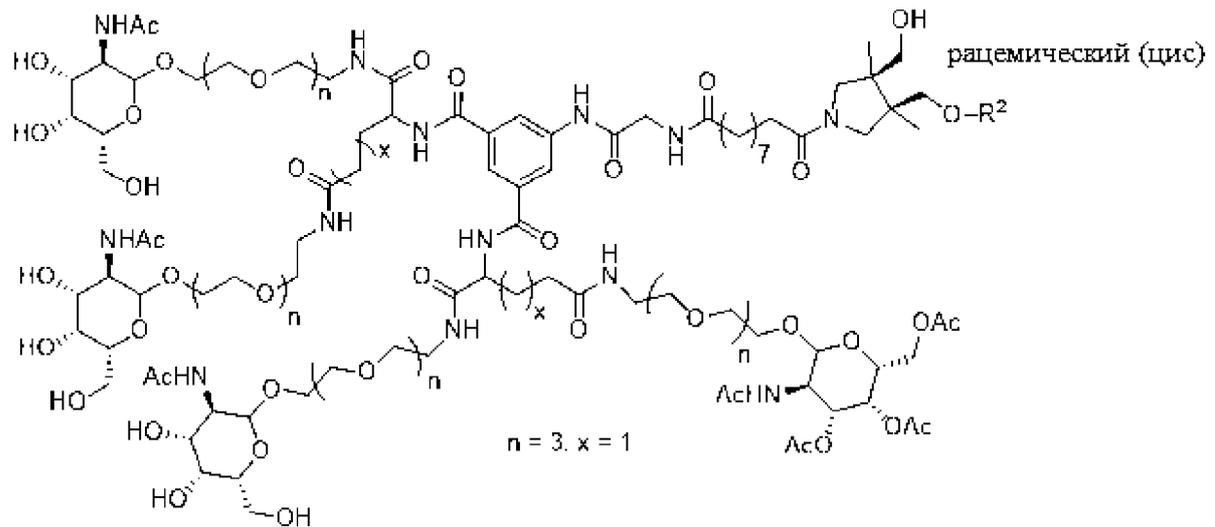
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

157. Соединение формулы:



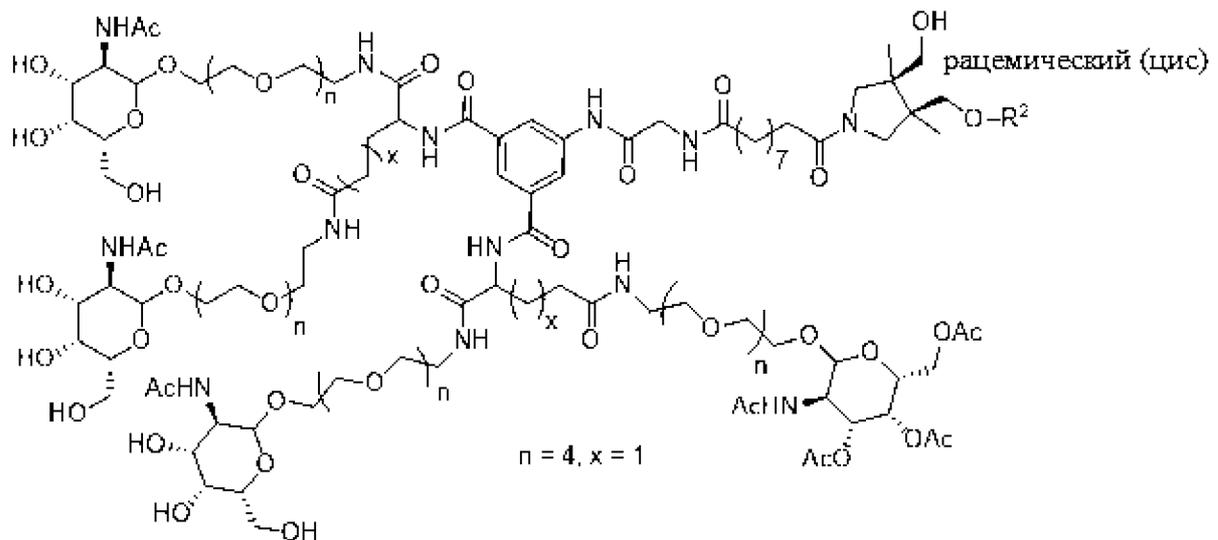
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

158. Соединение формулы:



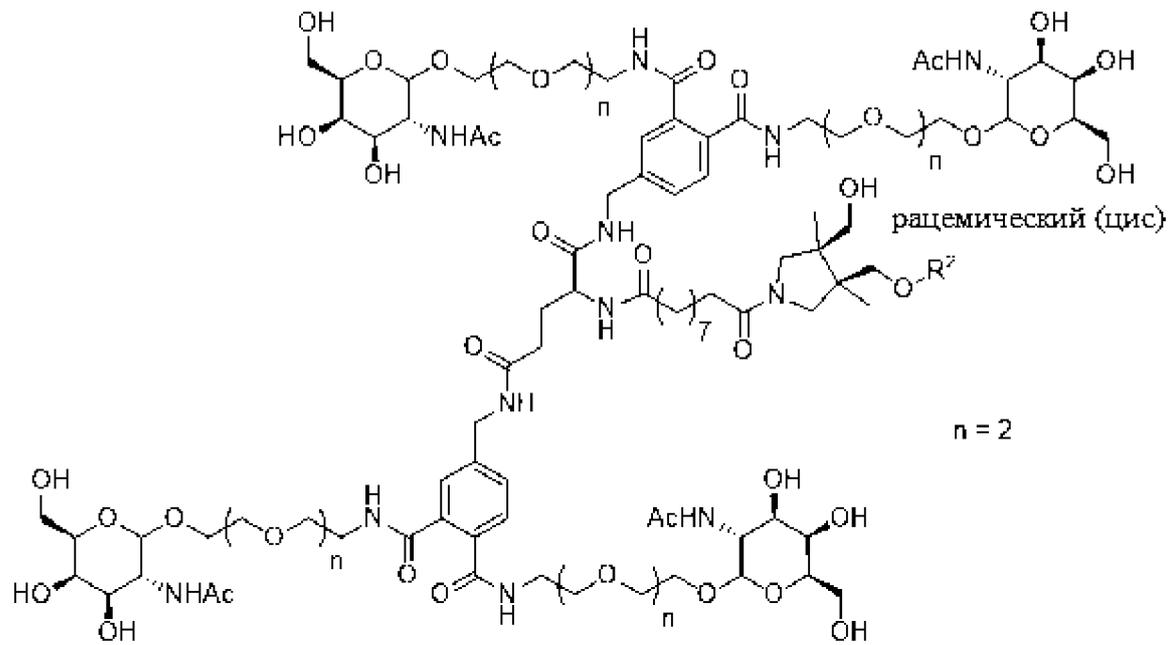
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

159. Соединение формулы:



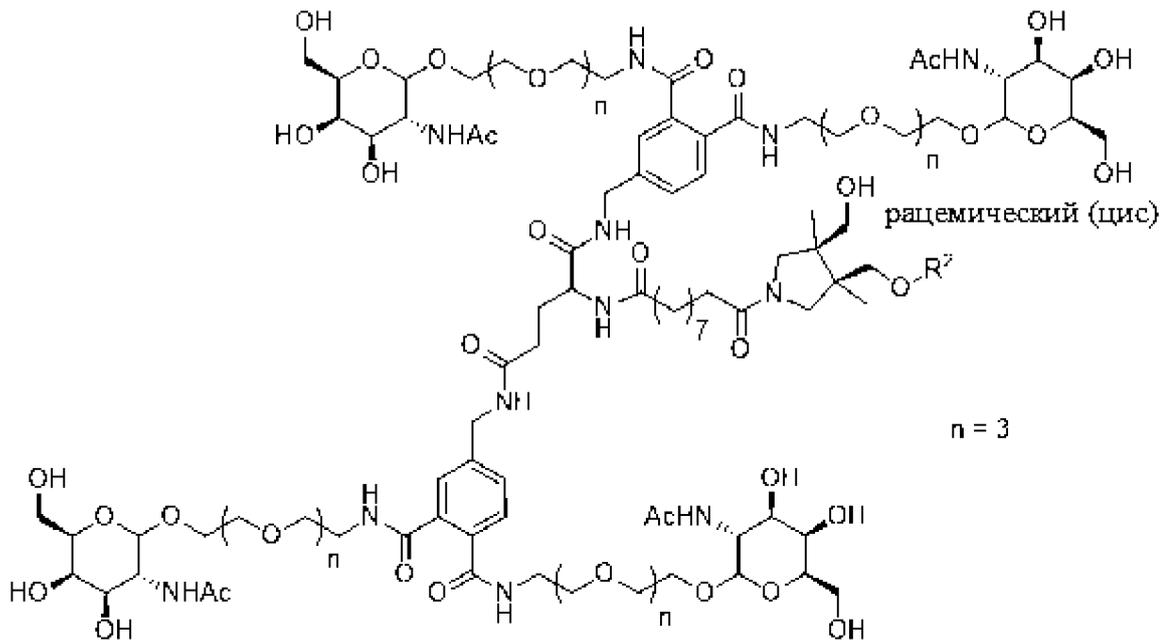
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

160. Соединение формулы:



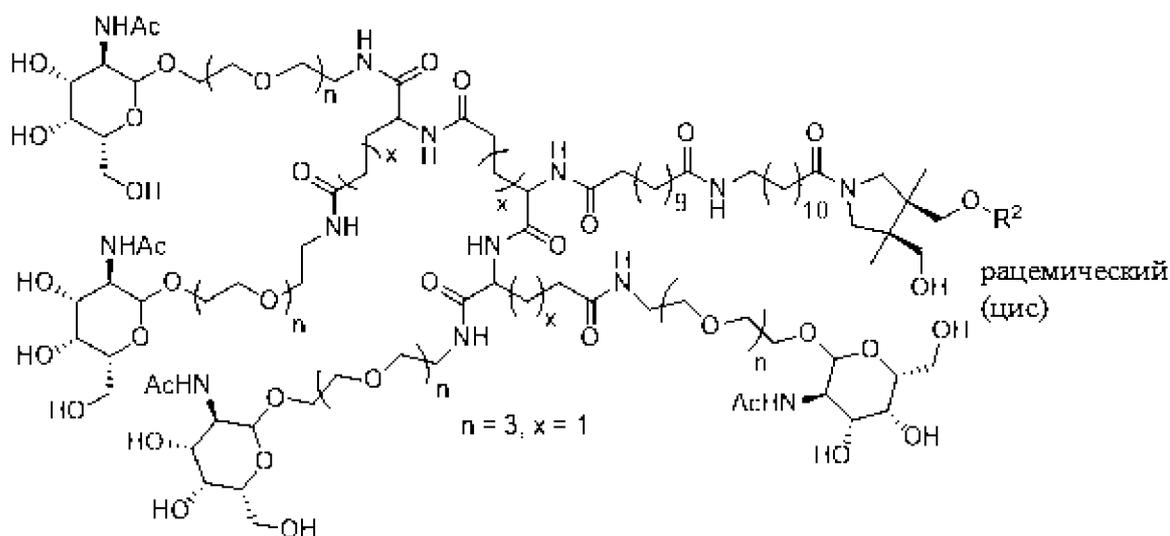
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

161. Соединение формулы:



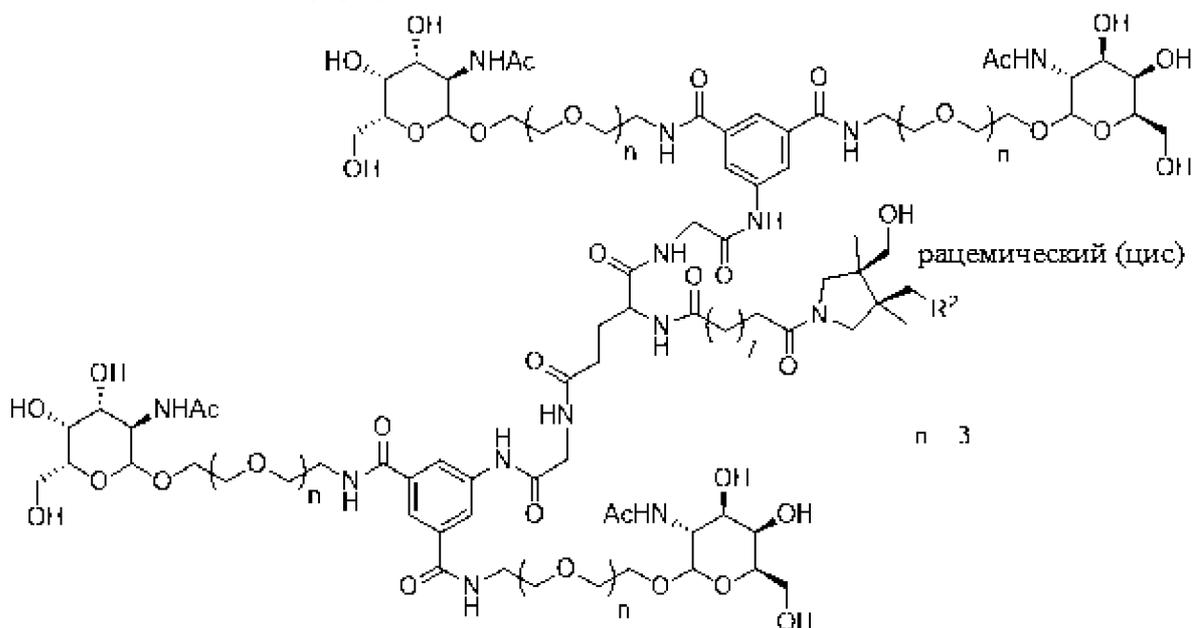
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

162. Соединение формулы:



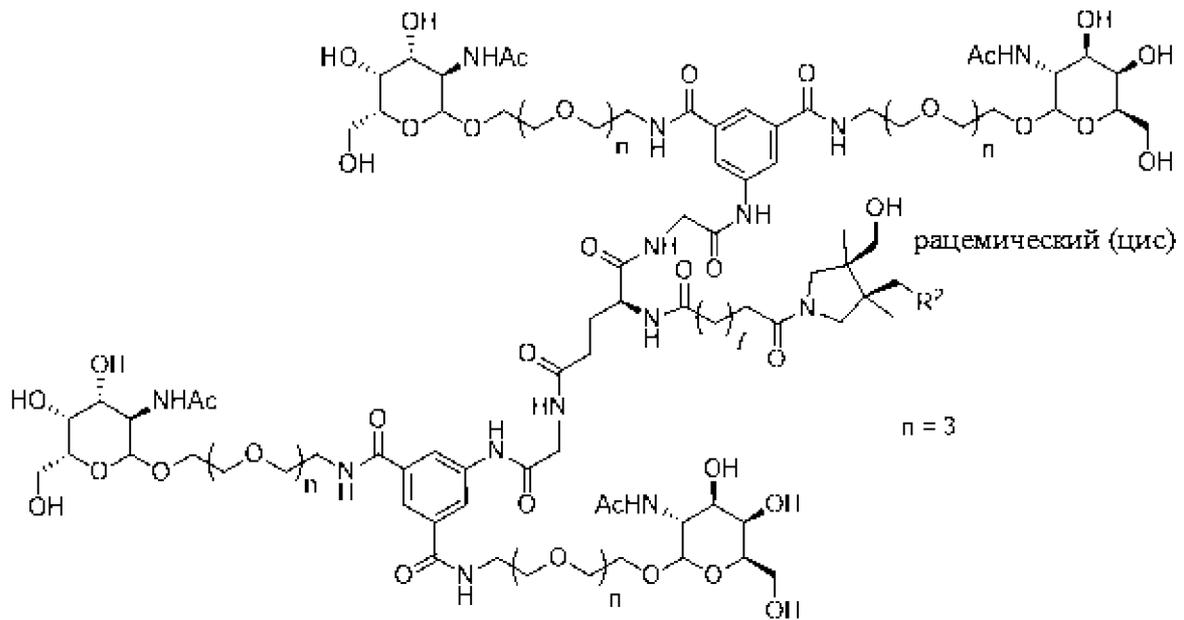
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

163. Соединение формулы:



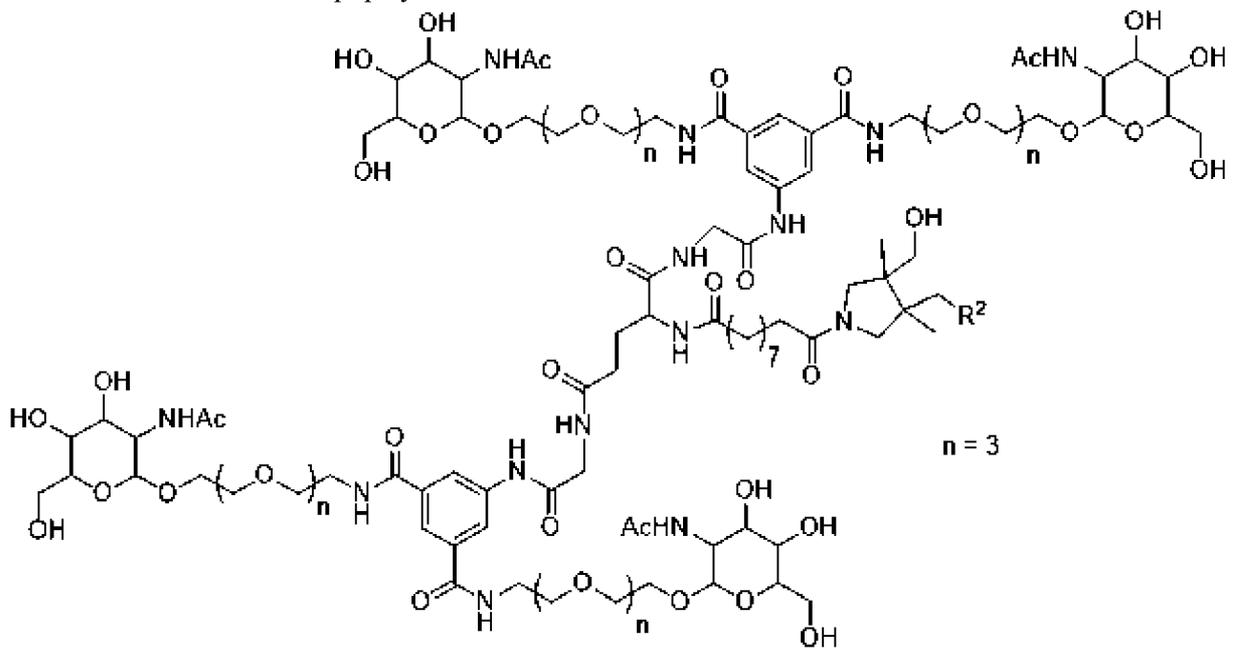
или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

164. Соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

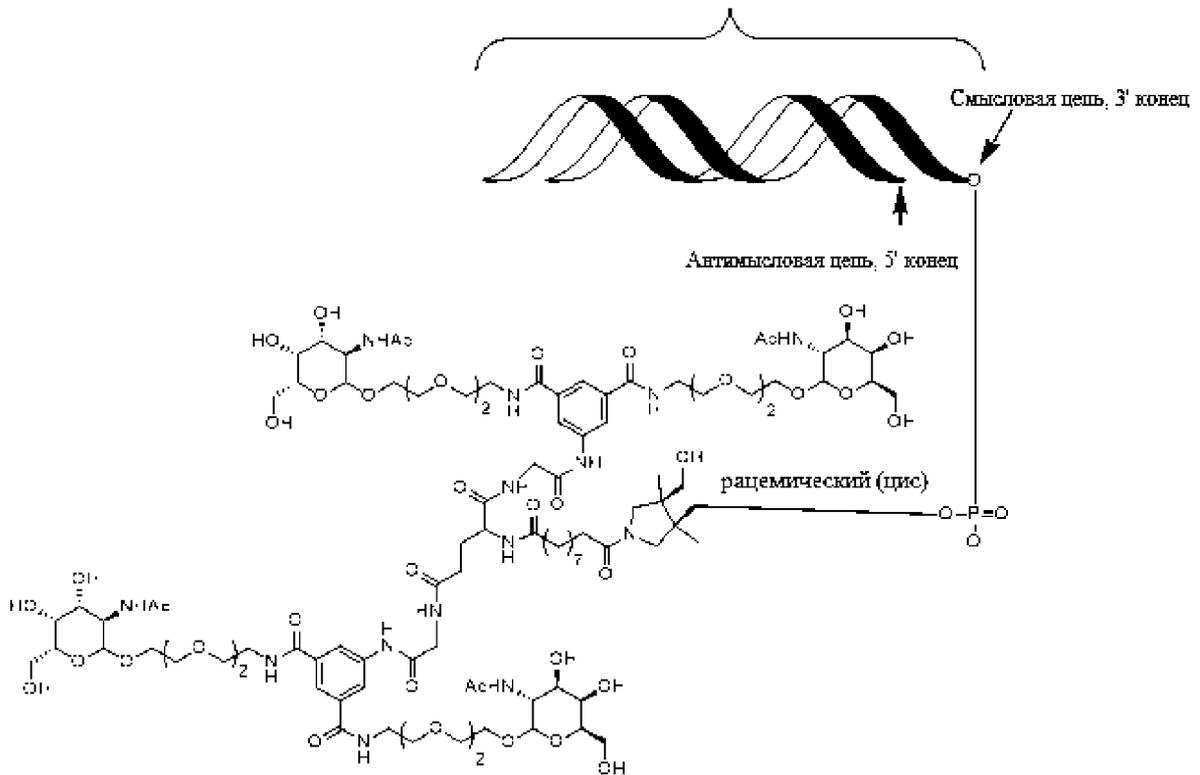
165. Соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой молекулу двухцепочечной миРНК, выбранную из молекул двухцепочечной миРНК по п. 4.

166. Соединение формулы:

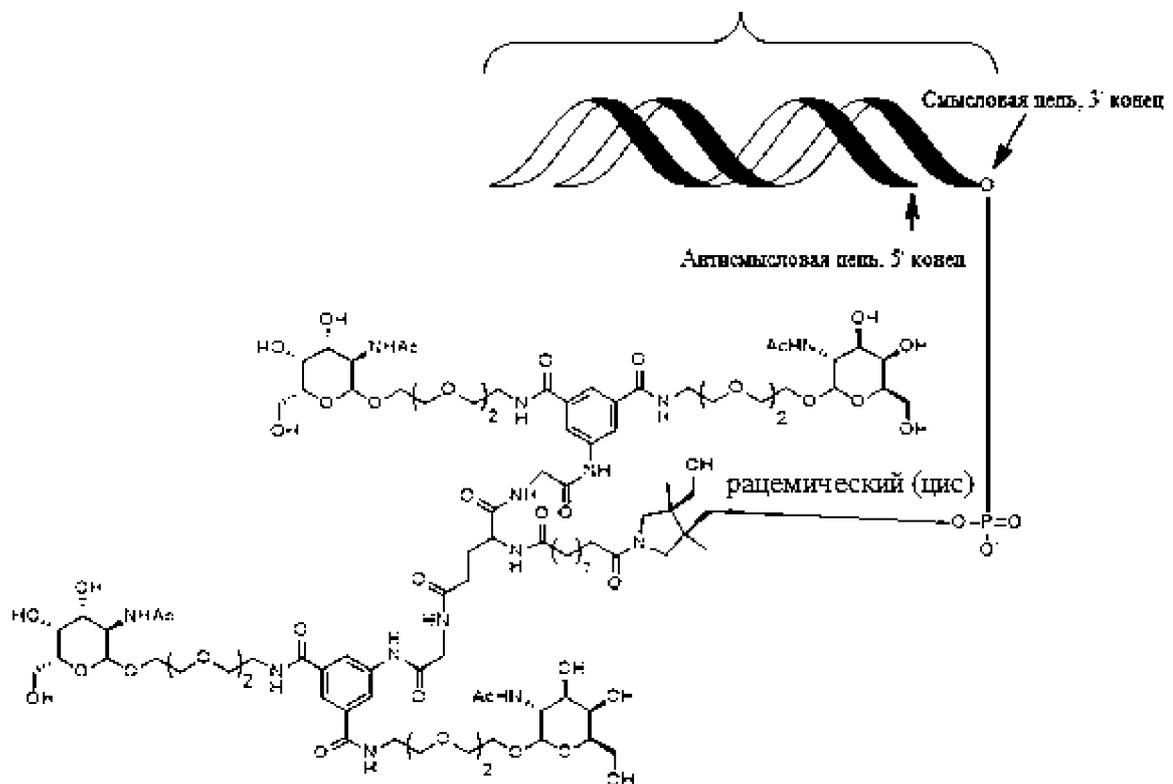
сирНК 3 (SI:O:O:O:5 и 6):



или его фармацевтически приемлемая соль.

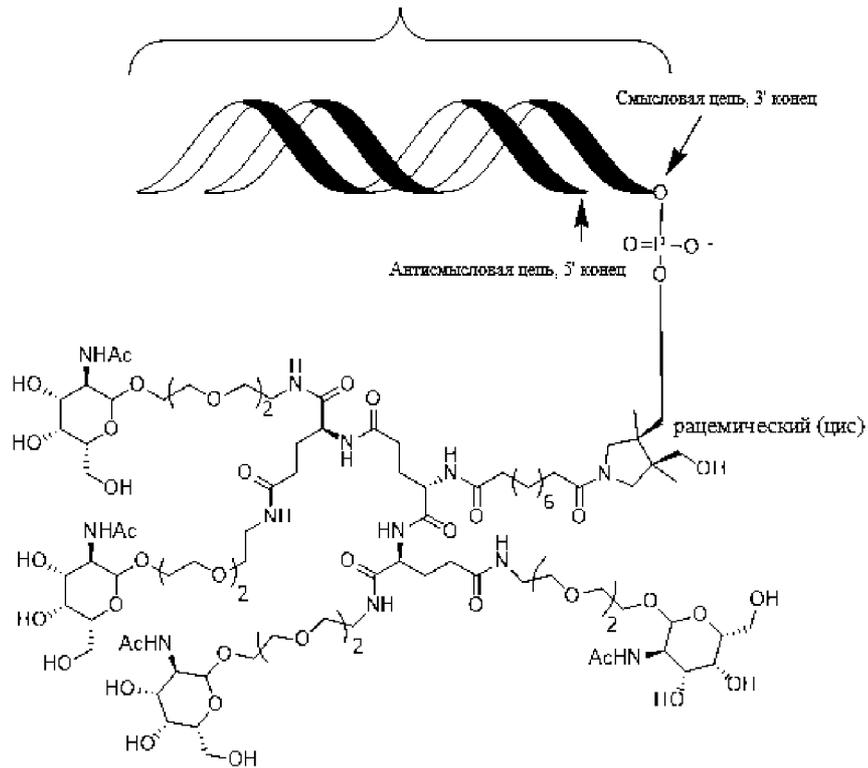
167. Соединение формулы:

сирНК 26 (SI:O:O:O:46 и 50):



или его фармацевтически приемлемая соль.

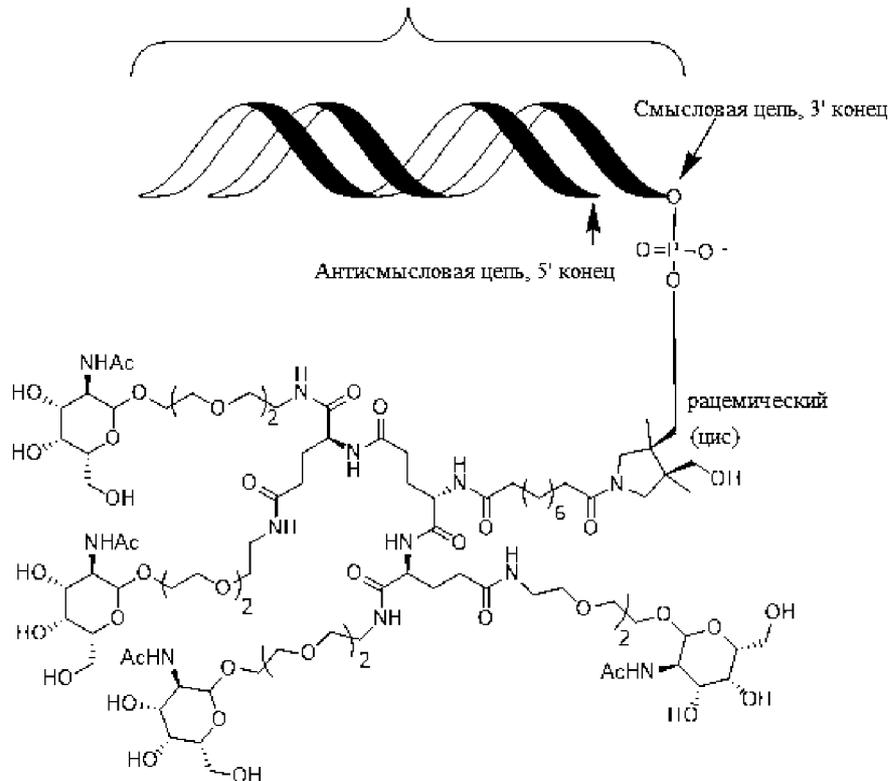
схРНК 3 (SEQ ID NO:5 и 6)



или его фармацевтически приемлемая соль.

171. Соединение формулы:

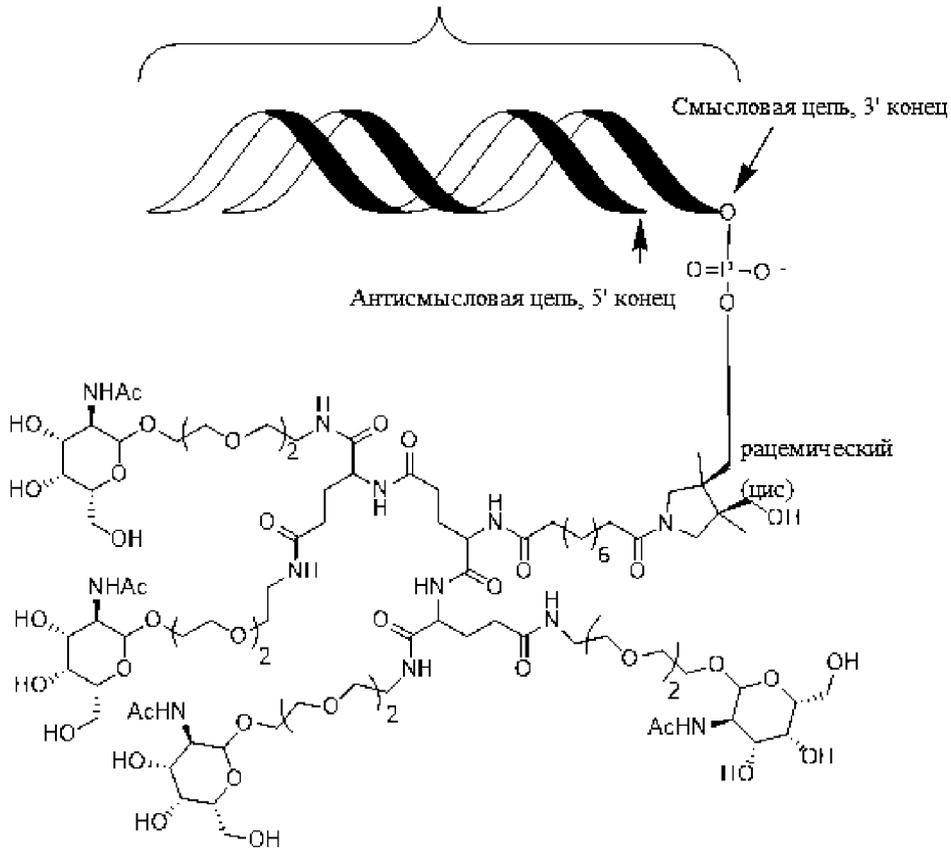
схРНК 25 (SEQ ID NO:49 и 50)



или его фармацевтически приемлемая соль.

172. Соединение формулы:

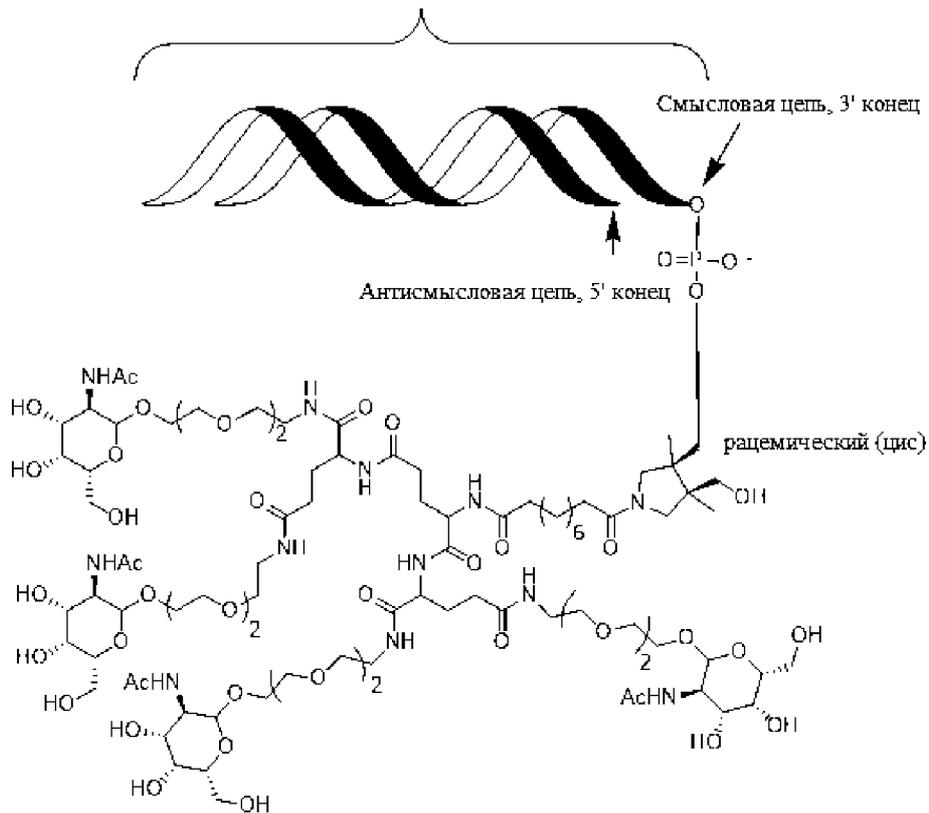
сирНК 3 (SEQ ID NO:5 и 6)



или его фармацевтически приемлемая соль.

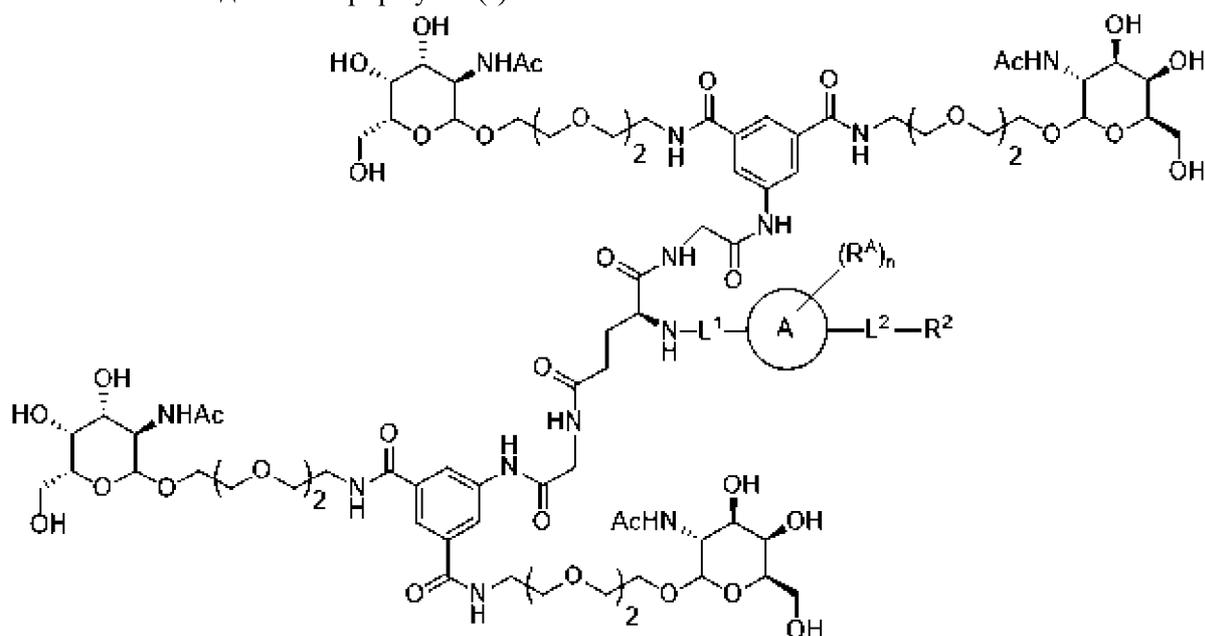
173. Соединение формулы:

сирНК 25 (SEQ ID NO:49 и 50)



или его фармацевтически приемлемая соль.

174. Соединение формулы (I):



(I),

где:

L¹ отсутствует или представляет собой связывающую группу;

L² отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R² представляет собой нуклеиновую кислоту;

кольцо A отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

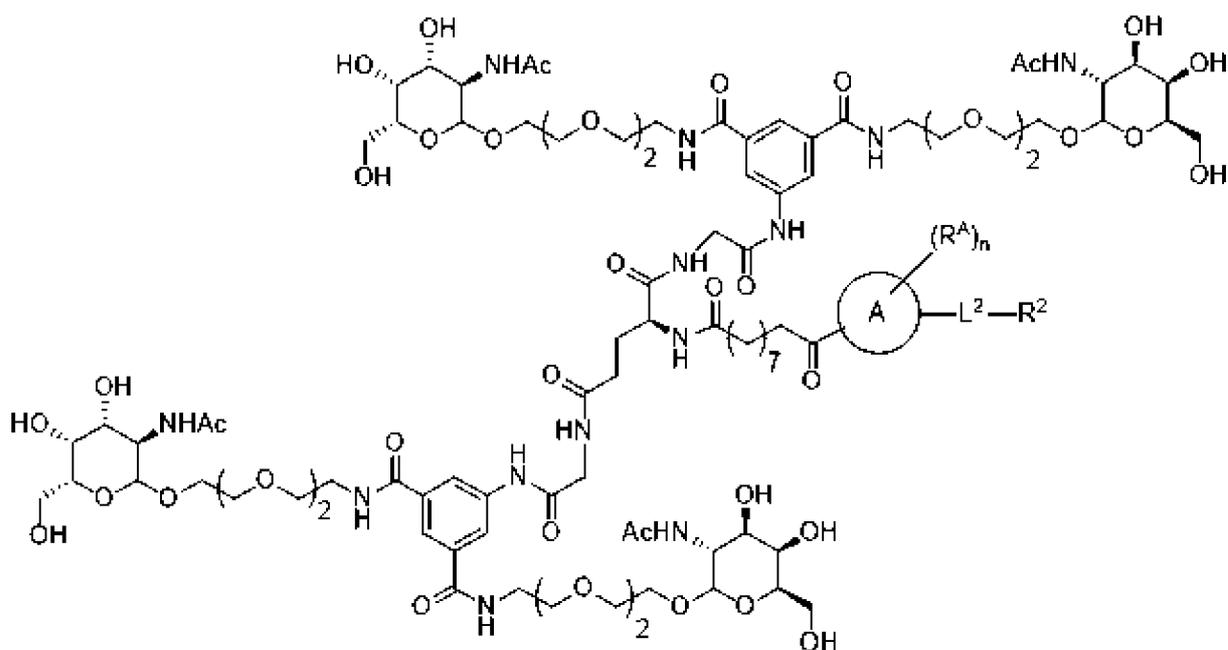
каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксильную, CN, F, Cl, Br, I, –C_{1–2} алкил–OR^B, C_{1–10} алкил, C_{2–10} алкенил и C_{2–10} алкинил; где C_{1–10} алкил, C_{2–10} алкенил и C_{2–10} алкинил, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксильной и C_{1–3} алкокси;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его соль.

175. Соединение формулы (Ia):



(Ia)

где:

L² отсутствует или представляет собой связывающую группу;

R² представляет собой нуклеиновую кислоту;

кольцо A отсутствует, представляет собой 3–20–членный циклоалкил, 5–20–членный арил, 5–20–членный гетероарил или 3–20–членный гетероциклоалкил;

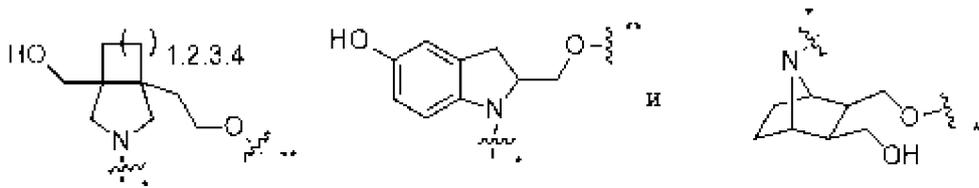
каждый из R^A независимо выбран из группы, включающей водород, гидроксильную, CN-, F-, Cl-, Br-, I-, -C₁₋₂ алкил-OR^B, C₁₋₁₀ алкил-, C₂₋₁₀ алкенил- и C₂₋₁₀ алкинил-группы; где C₁₋₁₀ алкил-, C₂₋₁₀ алкенил- и C₂₋₁₀ алкинил-группы, необязательно, замещены одной или более группами, независимо выбранными из галогена, гидроксильной и C₁₋₃ алкокси-групп;

R^B представляет собой водород, защитную группу, ковалентную связь с твердой подложкой или связь со связывающей группой, которая связана с твердой подложкой; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

или его соль.

176. Соединения формулы (XX):



где:

каждый из R' представляет собой C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил; где C_{1-9} алкил, C_{2-9} алкенил или C_{2-9} алкинил, необязательно, замещены галогеном или гидроксилом;

валентность, отмеченная *, соединена с L^1 или соединена с R^1 , если L^1 отсутствует;

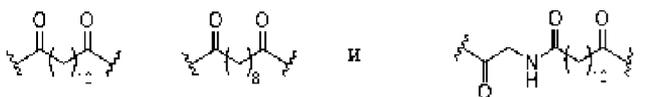
и

валентность, отмеченная **, соединена с L^2 или соединена с R^2 , если L^2 отсутствует;

или его соль.

177. Соединение по п. 175 или его соль, где L^1 и L^2 независимо представляют собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 1 до 50 атомов углерода, где один или более (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода в углеводородной цепи, необязательно, заменен на $-O-$, $-NR^X-$, $-NR^X-C(=O)-$, $-C(=O)-NR^X-$ или $-S-$, и где R^X представляет собой водород или $(C1-C6)$ алкил, а также при том, что углеводородная цепь, необязательно, замещена одним или более (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, выбранными из $(C1-C6)$ алкокси, $(C3-C6)$ циклоалкила, $(C1-C6)$ алканоила, $(C1-C6)$ алканоилокси, $(C1-C6)$ алкоксикарбонила, $(C1-C6)$ алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо ($=O$), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

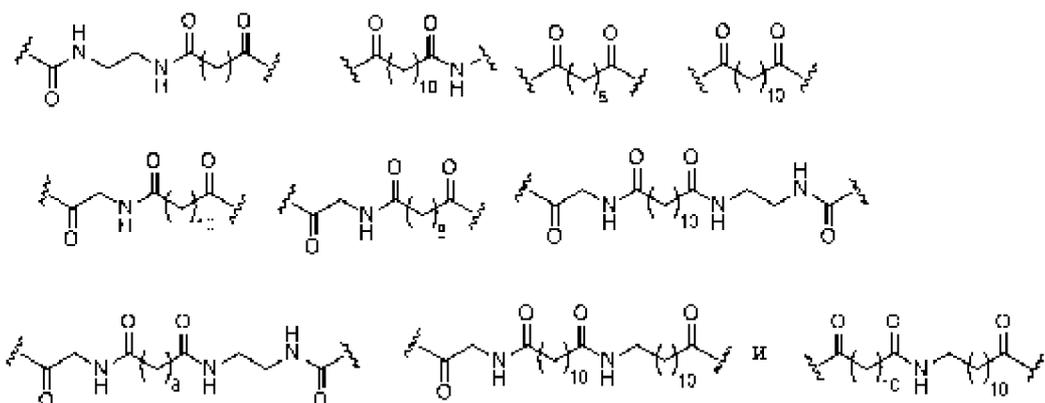
178. Соединение по п. 176 или его соль, где R^1 выбран из группы, включающей:



или его соль.

179. Соединение по п. 176 или его соль, где L^1 соединен с B^1 с помощью звена, выбранного из группы, включающей: $-O-$, $-S-$, $-(C=O)-$, $-(C=O)-NH-$, $-NH-(C=O)$, $(C=O)-O-$, $-NH-(C=O)-NH-$ или $-NH-(SO_2)-$.

180. Соединение по п. 176 или его соль, где L^1 выбран из группы, включающей:

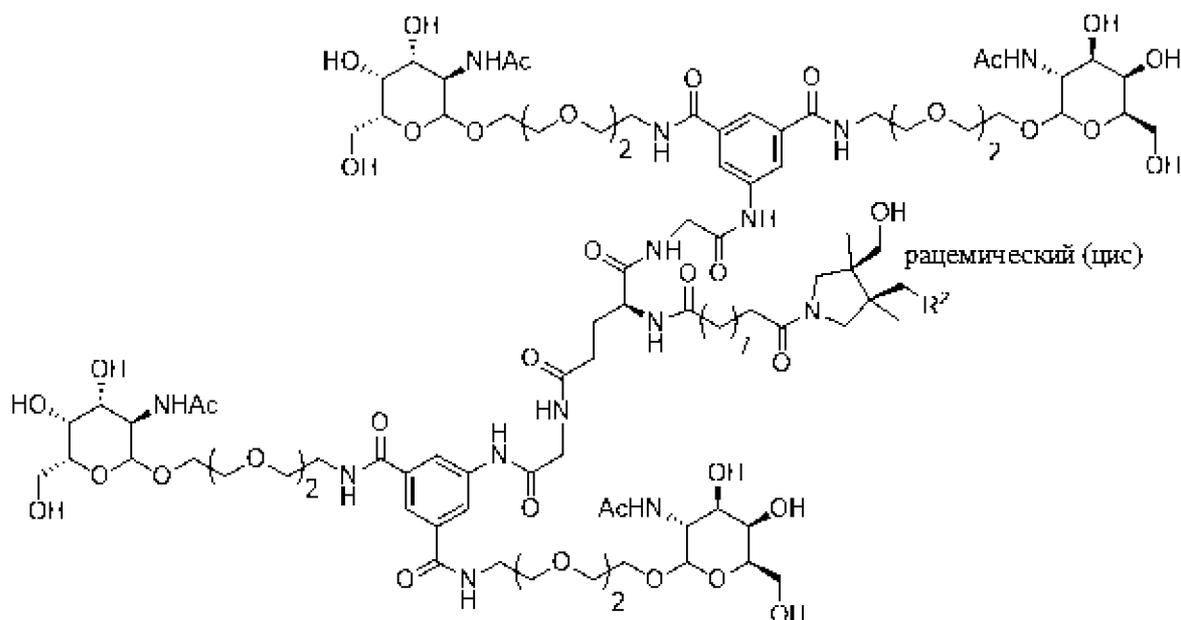


181. Соединение по п. 176 или его соль, где L^2 соединен с R^2 с помощью $-O-$.

182. Соединение по любому из п. 176 или его соль, где L^2 представляет собой C_{1-4} -алкилен- $O-$, который, необязательно, замещен гидроксигруппой.

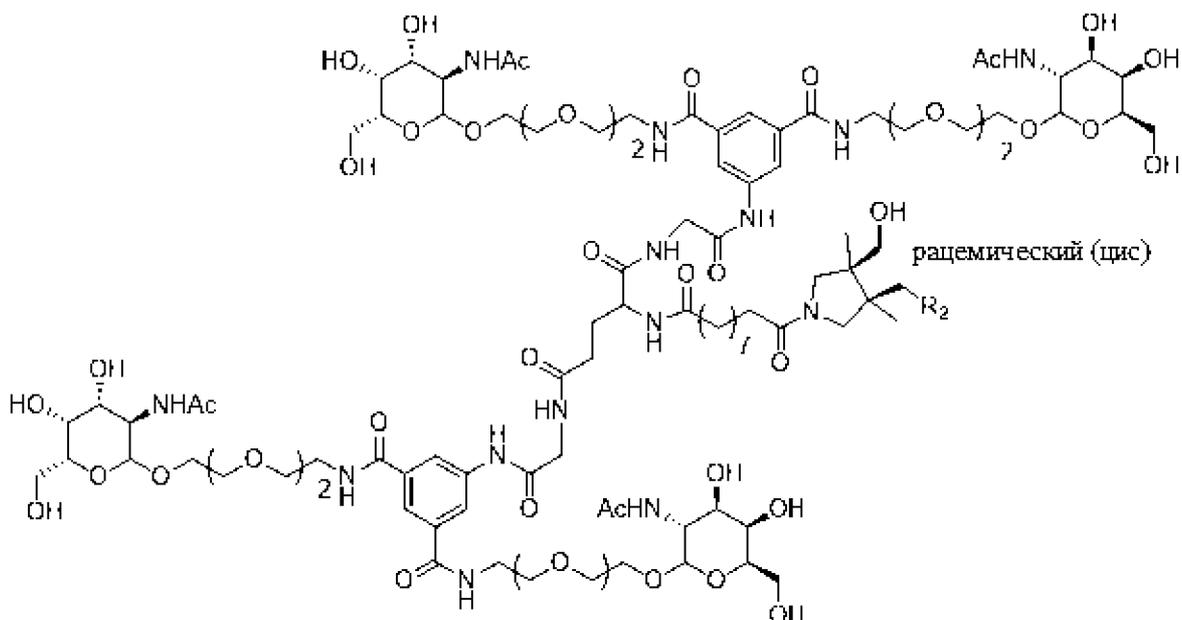
183. Соединение по п. 176 или его соль, где L^2 отсутствует.

184. Соединение



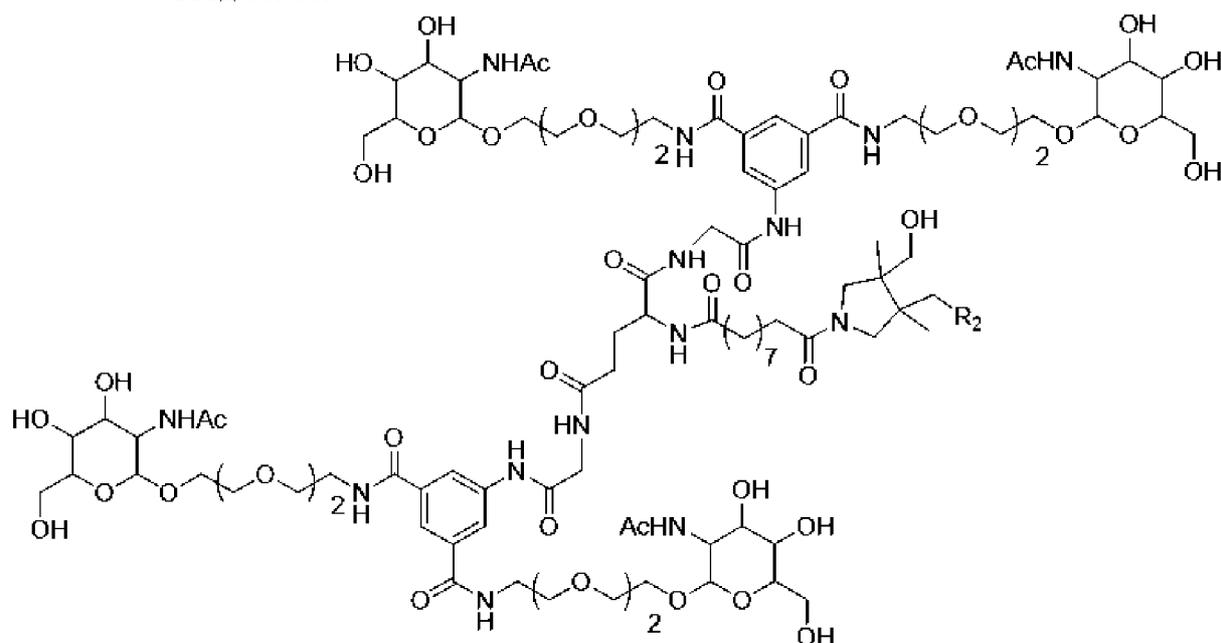
или его соль, где R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту.

185. Соединение



или его соль, где R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту.

186. Соединение



или его соль, где R^2 представляет собой нуклеиновую кислоту.

187. Соединение по любому из пп. 174–186, где R^2 представляет собой двухцепочечную молекулу миРНК, выбранную из двухцепочечных молекул миРНК по п. 4.

188. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в любом из пп. 174–186, или его фармацевтически приемлемая соль, и фармацевтически приемлемый носитель.

189. Способ доставки миРНК в печень животного, включающий введение животному соединения формулы I, как описано в любом из пп. 174–186, или его фармацевтически приемлемой соли.

190. Способ лечения вирусной инфекции гепатита В у животного, включающий введение животному соединения формулы I или Id, как описано в любом из пп. 1–49, 52–61 или 174–186, или его фармацевтически приемлемой соли.

191. Способ по п. 190, отличающийся тем, что соединение формулы I или Id или его фармацевтически приемлемую соль вводят подкожно.

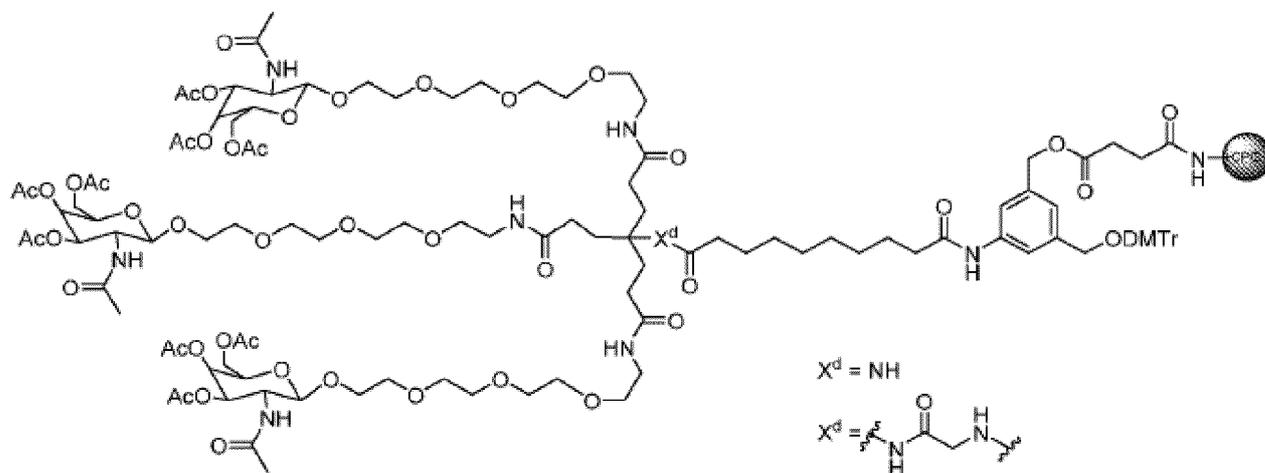
192. Соединение формулы I или Id, как описано в любом из пп. 1–49, 52–61 или 174–186, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в медикаментозной терапии.

193. Соединение формулы I или Id, как описано в любом из пп. 1–49, 52–61 или 174–186, или его фармацевтически приемлемая соль в медикаментозной терапии для профилактического или терапевтического лечения вирусной инфекции гепатита В у животного.

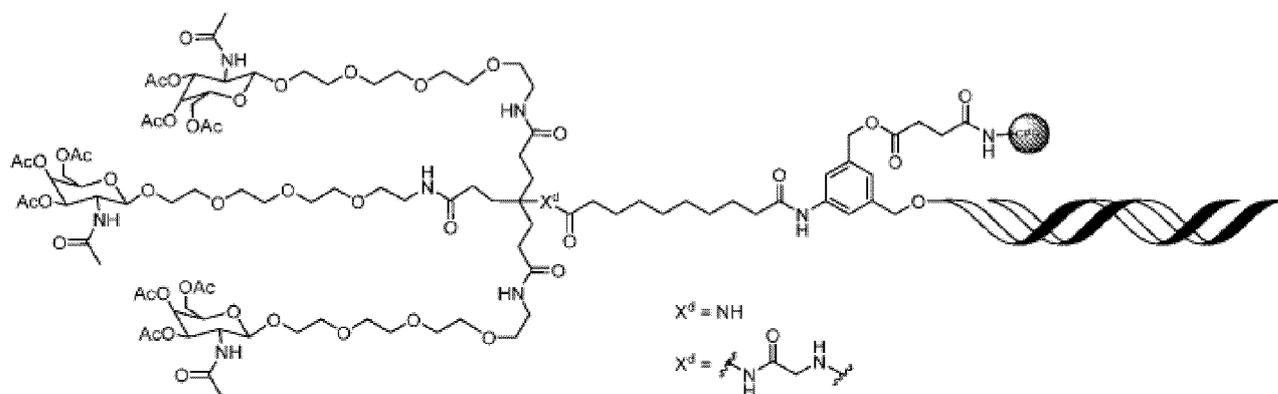
194. Применение соединения формулы I или Id, как описано в любом из пп. 1–49, 52–61 или 174–186, или его фармацевтически приемлемой соли для приготовления лекарственного средства для лечения вируса гепатита В у животного.

195. Способ, соединение или применение по любому из пп. 190–194, отличающийся тем, что животное представляет собой человека.

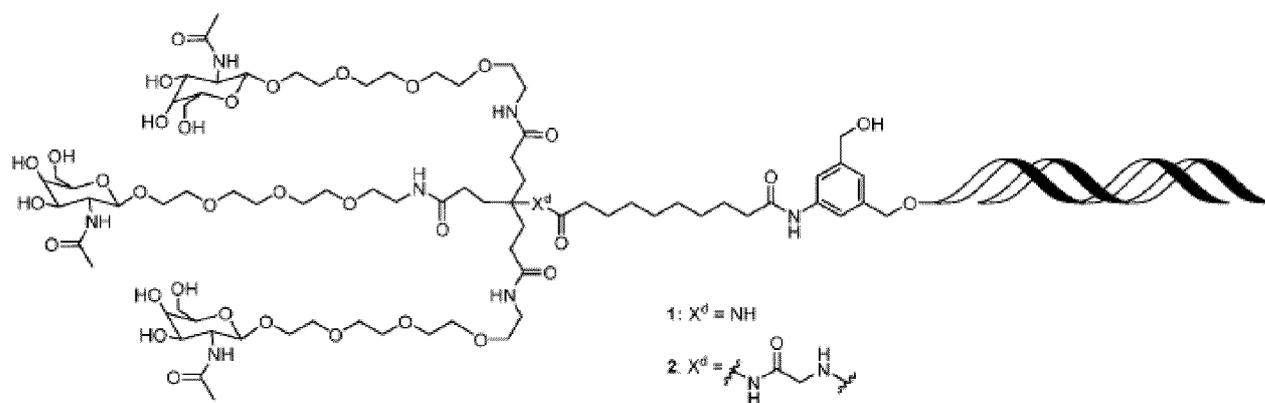
По доверенности



Фигура 1 Промежуточное соединение формулы Ie, в котором направляющий лиганд/линкер связан с твердофазной подложкой и в котором Pg^1 представляет собой защитную группу ДМТ.



Фигура 2 Типичное соединение формулы Id, где направляющий лиганд связан с твердой подложкой ковалентно связанной нуклеиновой кислотой.



Фигура 3: Типичное соединение формулы Id, где конъюгат – направляющий лиганд-олигонуклеотид — отщеплен от твердой подложки и лишен защитной группы.