

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090159 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.09

(51) Int. Cl. A61K 31/713 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.02

(54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ДЛЯ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛ

(31) 15/641,251; 15/662,665; 15/679,192;
15/691,821

(71) Заявитель:
АПОСЕНС ЛТД. (IL)

(32) 2017.07.04; 2017.07.28; 2017.08.17;
2017.08.31

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

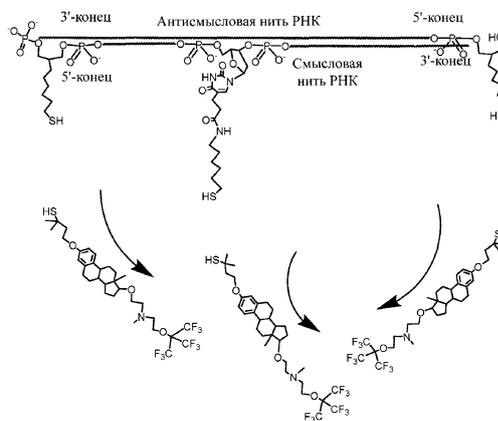
(33) US

(86) PCT/IL2018/050714

(87) WO 2019/008574 2019.01.10

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Предложен конъюгат для доставки лекарственных средств, таких как генетические лекарственные средства [например, миРНК, дмиРНК или антисмысловые олигонуклеотиды (АСО)] через биологические мембраны. Конъюгаты по изобретению способны доставлять лекарственные средства как в присутствии, так и в отсутствие белков плазмы.



A1

202090159

202090159

A1

СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ДЛЯ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5

Данная заявка представляет собой частичное продолжение заявки на патент США № 15/679192, поданной 17 августа 2017 г., которая представляет собой частичное продолжение заявки на патент США № 15/662665, поданной 28 июля 2017 г., которая представляет собой частичное продолжение заявки на патент США № 15/641251, поданной 4 июля 2017 г., которые являются тем самым включенными посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15

Данное изобретение относится к соединениям и конъюгатам, которые содержат соединения и макромолекулы, к системе доставки и способам доставки молекул и макромолекул через биологические мембраны в клетки, предназначенным для применений *in vitro* и *in vivo*.

20

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

«Олигонуклеотидные лекарственные средства» (ОЛС) представляют собой макромолекулярные лекарственные средства, которые содержат последовательности нуклеозидов или нуклеотидов. ОЛС могут быть многообещающими для революционных медицинских способов лечения многих медицинских расстройств. ОЛС представляют собой одноцепочечные или двухцепочечные, природные или модифицированные молекулы РНК или ДНК, или их комбинации, как известно в данной области. Примерами ОЛС являются, среди прочих, лекарственные средства в виде миРНК (малая интерферирующая РНК), субстратов в виде миРНК фермента дайсер (дмиРНК), микроРНК (мкРНК), матричной РНК (мРНК) или последовательности ДНК, сконструированные так, чтобы они служили в качестве антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), которые все являются активными в понижающей регуляции экспрессии генов-мишеней.

30
35
Главный вызов в применении ОЛС в клинической практике относится к оптимизации их связывания с белками плазмы, особенно с альбумином. Немодифицированные («голые») олигонуклеотиды не связываются специфично с

белками плазмы. В отличие от этого, модификация **ОЛС** посредством присоединения липофильных группировок, таких как холестерин – модификаций, которые часто требуются для трансмембранной доставки **ОЛС** – приводят к avidному связыванию с белками плазмы, главным образом, с альбумином.

5 Сильное связывание **ОЛС** с белками плазмы может препятствовать доступности лекарственного средства для связывания с мембранами его клеток-мишеней с соответствующим ингибированием эффективного поглощения **ОЛС** в клетки, потенциально приводя к недостатку эффективности **ОЛС**. В настоящее время многие системы доставки **ОЛС** не могут преодолеть данный вызов и,

10 следовательно, требуют бессывороточных условий для того, чтобы сохранять биологическую активность **ОЛС**. В то время как бессывороточные условия могут применяться *in vitro*, в культурах тканей, бессывороточные условия являются непрактичными *in vivo*, где **ОЛС** неизбежно находятся в тесном контакте с белками плазмы. Следовательно, имеется неудовлетворенная потребность в системах

15 доставки **ОЛС**, которая способна доставлять генетические лекарственные средства через гидрофобные фосфолипидные мембраны в клетки, как в присутствии, так и в отсутствие белков плазмы.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

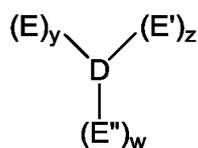
20

Данное изобретение основывается на *молекулярной системе доставки* [(МСД), описанная в **Формуле (II)**], которая, при конъюгировании с **ОЛС**, влечет доставку **ОЛС** через фосфолипидные мембраны в клетки и соответствующую активность в сайленсинге генов как в бессывороточных условиях [(С-) условия], так

25 и в присутствии сыворотки [условия (С+)]. Химические соединения с аналогичными структурами, но лишенные **МСД**, либо являются полностью биологически неактивными (например, в сайленсинге генов), либо, в качестве альтернативы, являются активными в условиях (С-), но менее активными или совсем не активными в условиях (С+), как проиллюстрировано в **Примере 6**.

30

В одном воплощении данного изобретения предложены конъюгаты, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (I)**:



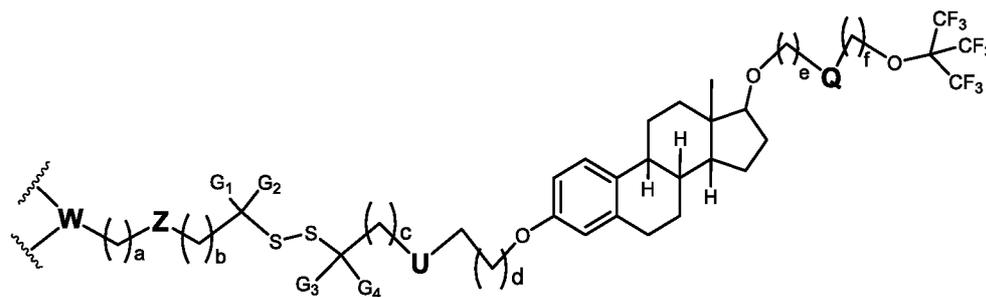
Формула (I)

включающей фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (I)**, и сольваты и гидраты данных солей, где:

D представляет собой лекарственное средство, подлежащее доставке через биологические мембраны (т.е. лекарственное средство – груз), выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного средства, пептида, белка и **ОЛС** (т.е. природной или модифицированной, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК, дмиРНК или АСО);

каждый **y**, **z** и **w** представляет собой целое число, независимо выбранное из 0, 1, 2, 3 или 4, где, если любой из **y**, **z** и **w** или их комбинация равен 0, это означает то, что соответствующая группировка **E** (или группировки) отсутствует(ют); по меньшей мере один из **y**, **z** и **w** отличается от 0;

E, **E'** или **E''** могут быть одинаковыми или разными, причем каждый независимо имеет структуру, как изложено в общей **Формуле (II)**:



Формула (II)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (II)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где:

один из **U** или **Q** независимо отсутствует, а другой выбран из группы, состоящей из $-NH-$, $-N(CH_3)-$, $-N(CH_2-CH_3)-$, $-NH-(CH_2)_2-NH-$ и $-N(CH_3)-(CH_2)_2-N(CH_3)-$;

G_1 , G_2 , G_3 и G_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, метила и этила; группировки G_1 , G_2 , G_3 и G_4 могут быть одинаковыми или разными; по меньшей мере два из G_1 , G_2 , G_3 и G_4 представляют собой атомы водорода;

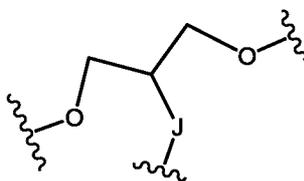
Z выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, простого эфира, сложного эфира, амина и амида;

a, **b**, **c**, **d** представляют собой целые числа, причем каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, где 0 равен отсутствию; **a**, **b**, **c**, **d** могут быть одинаковыми или разными;

e и **f** представляют собой целые числа, причем каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 1, 2 и 3; **e** и **f** могут быть одинаковыми или разными;

если любой из каждого **a** или **b** больше или равен 2, тогда соответствующая углеводородная цепь может быть либо насыщенной, либо ненасыщенной;

W выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, гидроксила, дигидроксила, природного или модифицированного нуклеозида и структуры, как изложено в **Формуле (II')**:



Формуле (II')

где **J** выбран из отсутствующей группы, $-CH_2-$, вторичного или третичного амина и атома кислорода;

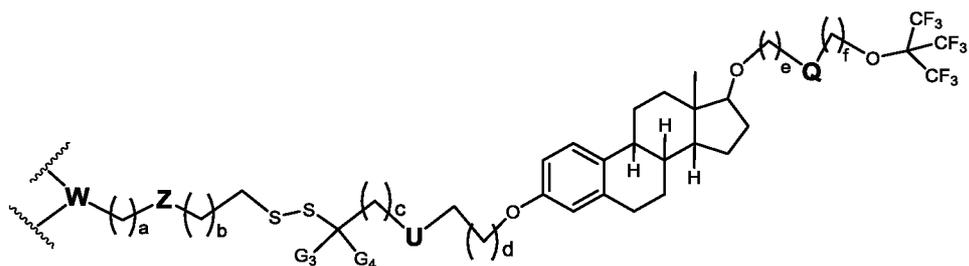
и где группировка согласно **Формуле (II')** может быть связана с любой из групп, состоящих из отсутствующей группы; атома водорода; **D**; защитной группы, как определено в данном документе (например, защитной группы спирта); фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы; и твердой подложкой. В контексте данного изобретения группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.

В одном воплощении данного изобретения **W** представляет собой нуклеозид, выбранный из природного или модифицированного аденина, цитозина, тимина и урацила; и сахарная группировка представляет собой рибозу или 2'-дезоксирибозу.

В другом воплощении данного изобретения **W** представляет собой 2'-дезоксисуридин.

В еще одном другом воплощении данного изобретения **W** имеет структуру, как изложено в **Формуле (II')**, в которой **J** представляет собой $-CH_2-$.

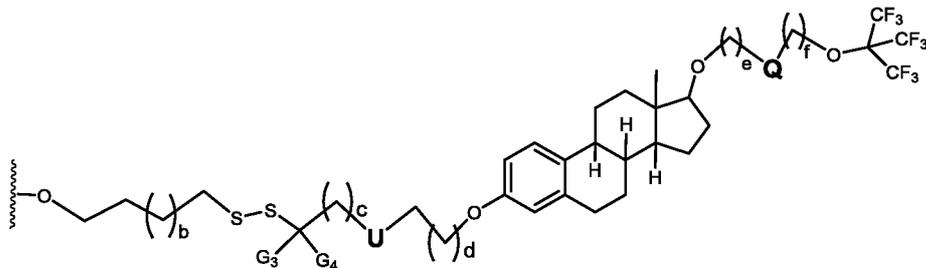
В одном воплощении данного изобретения предложены **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (II)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (III)**:



Формула (III)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (III)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **U**, **Q**, **Z**, **G₃**, **G₄**, **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** и **W** имеет такое же значение, как определено для **Формулы (II)**.

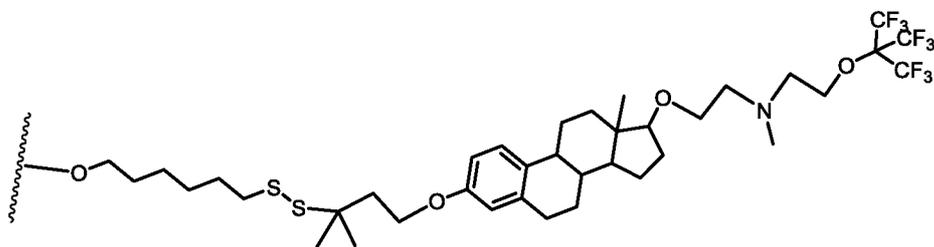
В одном воплощении данного изобретения предложены **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (III)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (IVb)**:



Формула (IVb)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVb)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **U**, **Q**, **G₃**, **G₄**, **b**, **c**, **d**, **e** и **f** имеет такое же значение, как и в **Формуле (III)**.

Согласно данному изобретению предложены **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (IVb)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vb')**:



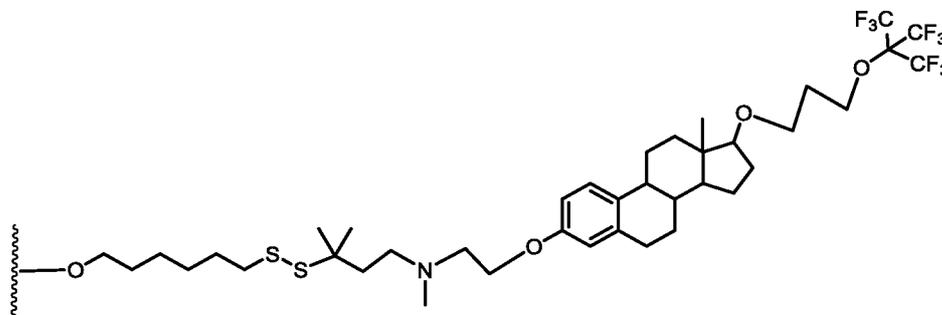
Формула (Vb')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb')**. Данная группировка **E**, **E'** или **E''**, как показано в **Формуле (Vb')**, обозначается Апо-

Si-K-18. В случае, когда данная группировка связывается с фосфорамидитной группой, данное соединение обозначено **Апо-Si-K-18-Предшественник**.

Согласно данному изобретению также предложены **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (IVb)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vb'')**:

5



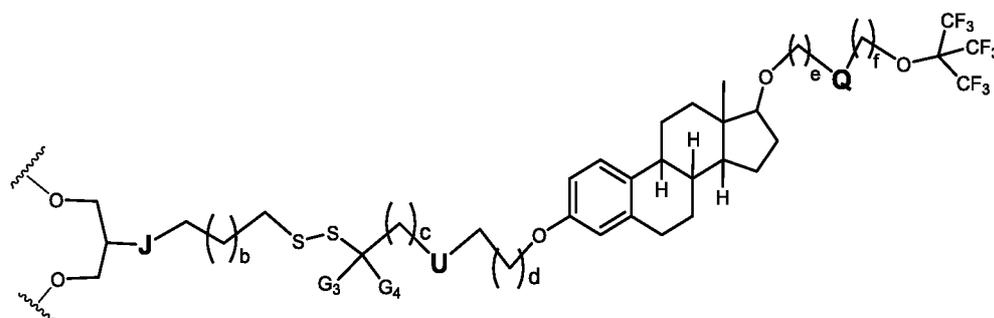
Формула (Vb'')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb'')**. Данная группировка **E**, **E'** или **E''**, как показано в **Формуле (Vb'')**, обозначается **Апо-Si-K-13**. В случае, когда данное соединение связывается с фосфорамидитной группой, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-13-Предшественник**.

10

В одном воплощении данного изобретения в нем предложена **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (III)**, имеющая структуру, как изложено в **Формуле (IVc)**:

15

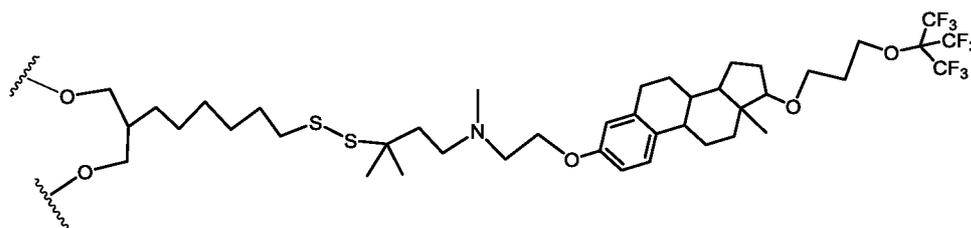


Формула (IVc)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVc)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **U**, **Q**, **G₃**, **G₄**, **b**, **c**, **d**, **e** и **f** имеет такое же значение, что и в **Формуле (III)**; **J** выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, $-CH_2-$ и атома кислорода.

20

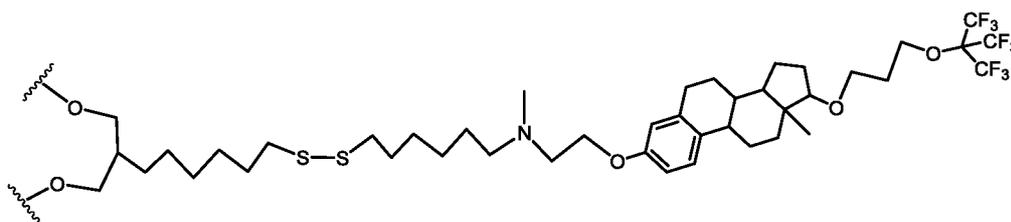
В одном воплощении данного изобретения согласно нему предложены **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (IVc)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vc'')**:



Формула (Vc'')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc'')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vc'')**, обозначается **Апо-Si-K-43**. В случае, когда данное соединение связывается с фосфорамидитной группой или с группой DMT, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-43-Предшественник**.

В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVc)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vc''')**:

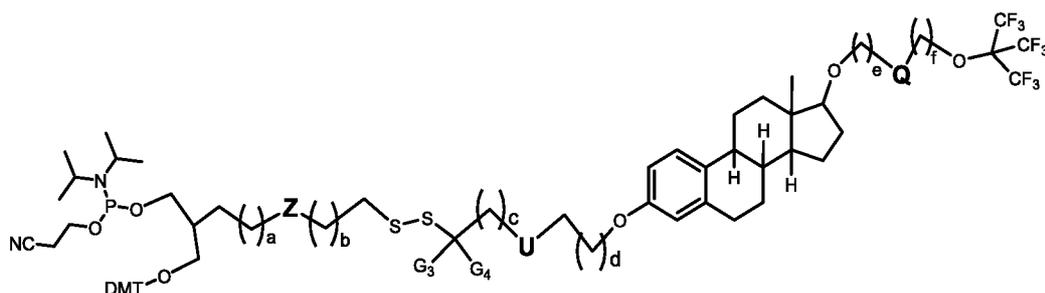


Формула (Vc''')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc''')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vc''')**, обозначается **Апо-Si-K-63**. В случае, когда данная молекула связывается с фосфорамидитной группой и с группой DMT, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-63-Предшественник**.

В некоторых воплощениях предложена **молекула-предшественник**, содержащая группировку E, E' или E'' по изобретению, связанная с одной или более чем одной защитной группой для спирта, как определено в данном документе, где указанная(ные) группа(пы) предназначена(ны) для удаления или модификации во время конъюгирования группировки E, E' или E'' с лекарственным средством-грузом (например, макромолекулярное лекарственное средство).

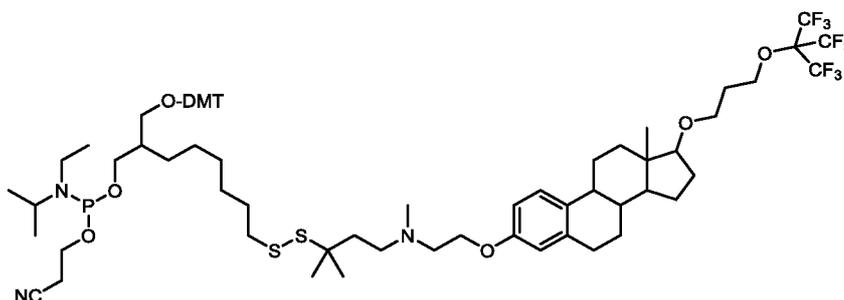
В одном воплощении молекула-предшественник содержит E, E' или E'' согласно **Формуле (IVc)** и имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (IVcP)**:



Формула (IVcP)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVcP)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый Z, U, Q, G₃, G₄, a, b, c, d, e, f имеет такое же значение, что и в **Формуле (IVc)**. Данная молекула-предшественник может служить для присоединения группировки E, E' или E'' либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи.

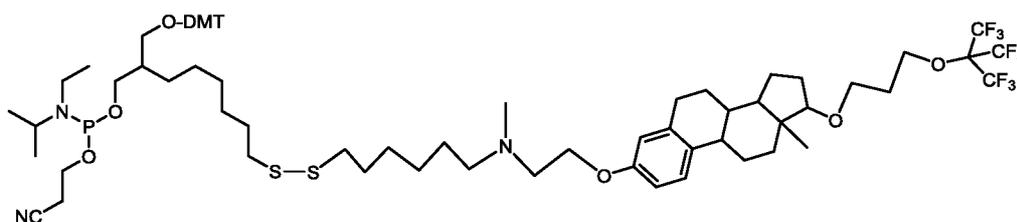
В другом воплощении молекула-предшественник согласно **Формуле (IVcP)** имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-2)**:



Формула(PP-2)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-2)**, и сольваты, и гидраты данных солей. Данная молекула-предшественник может служить для присоединения группировки E, E' или E'' либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи. Данная молекула-предшественник, как показано в **Формуле (PP-2)**, обозначается **Апо-Si-K-43-Предшественник**.

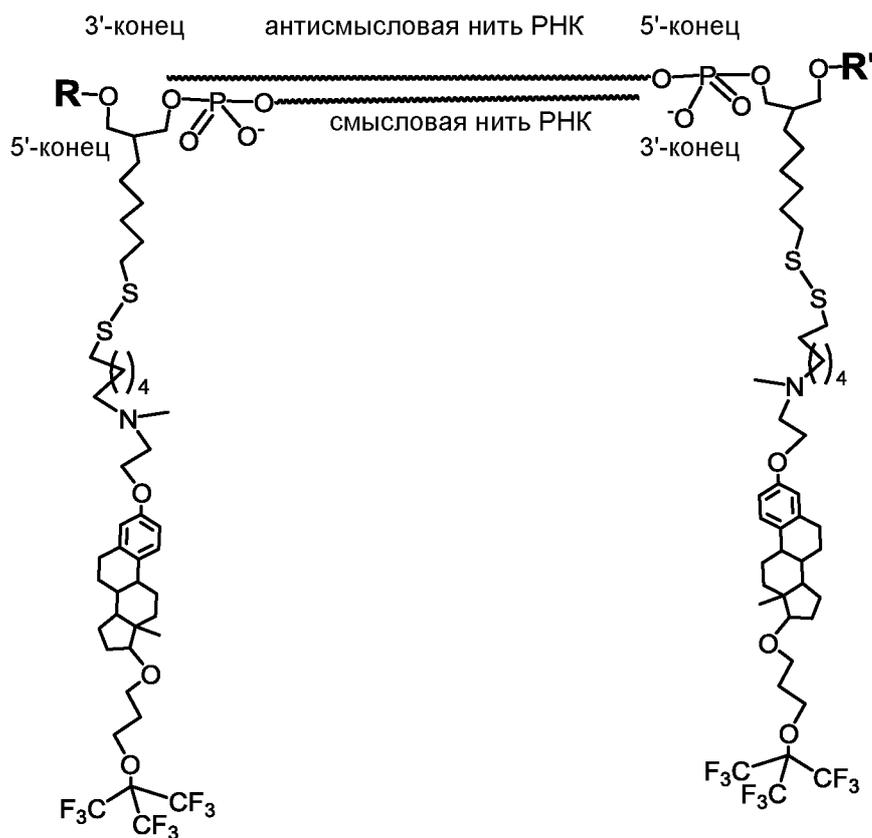
В другом воплощении молекула-предшественник согласно **Формуле (IVcP)** имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-3)**:



Формула (PP-3)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-3)**, и сольваты, и гидраты данных солей. Данная молекула-предшественник, как показано в **Формуле (PP-3)**, обозначается **Апо-Si-K-63-Предшественник**.

В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'**, причем каждая имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vc''')**, и является связанной с 5'-концами дуплекса РНК. Данный Конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Cn-12)**:

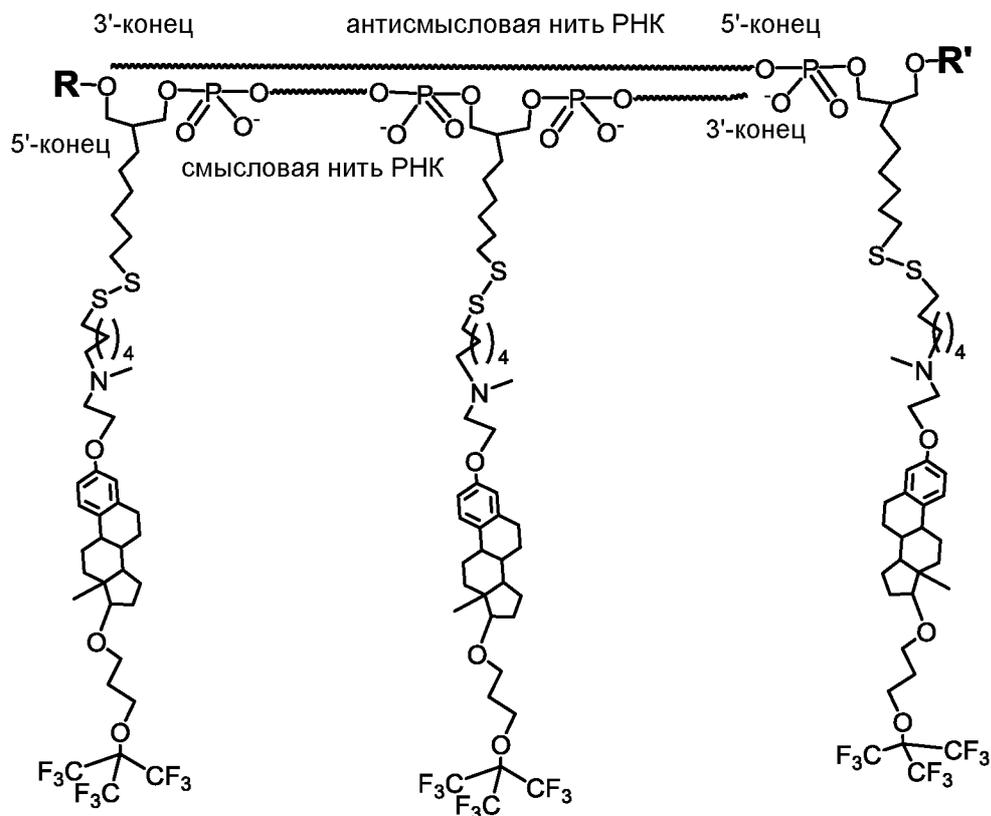


Формула (Cn-12)

15 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Cn-**

12), и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый R и R' независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы. Данный Конъюгат, как показано в **Формуле (Cn-12)**, обозначается **Апо-Si-K-63-B**.

- 5 В одном воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь D с двумя группировками E и E' согласно **Формуле (Vc''')** на 5'-концах дуплекса РНК и во внутреннем положении в смысловой (сопровождающей) цепи; данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Cn-14)**:



Формула (Cn-14)

10 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Cn-14)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый R и R' независимо выбран из

15 группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы. Данный конъюгат, как показано в **Формуле (Cn-14)**, обозначается **Апо-Si-K-63-C**.

- 20 В одном воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, содержащий дуплекс РНК, такой как миРНК или субстрат фермента дайсер (дмиРНК), где данный дуплекс РНК имеет длину 24-27 или 25-27

нуклеотидов и связывается на двух концах его нитей с группировкой E, E' или E'', причем каждая имеет структуру согласно любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc''')**.

В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, как описано выше, содержащий группировки E, E' или E'' согласно одной из следующих возможностей: **(1)**. две группировки E, E' или E'', расположенные на концах нитей РНК; или **(2)**. три или более чем три группировки E, E' или E'', расположенные на концах нитей РНК, но также и во внутреннем(них) положении(ниях) в пределах дуплекса миРНК; где каждая из группировки(вок) E, E' или E'' имеет структуру согласно любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc''')**.

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Данный патент или файл заявки содержит по меньшей мере один цветной графический материал. Копии данного патента или публикации патентной заявки с цветными графическими материалами будут предоставлены Офисом по запросу и при оплате необходимого сбора.

На **Фиг. 1 (а-б)** продемонстрирован конъюгат по изобретению: на **Фиг. (1а)** показан конъюгат по изобретению, содержащий две группировки E, причем каждая расположена на 5'-конце нити миРНК; и на **Фиг. (1б)** показан конъюгат при его приближении к мембране с миРНК, расположенной параллельно поверхности мембраны, перед процессом трансмембранной доставки; где синим и коричневым цветами показана каждая олигонуклеотидная нить дуплекса РНК миРНК; желтые атомы представляют собой атомы серы редоксчувствительных модулей, сконструированные для высвобождения при восстановительных условиях в пределах цитоплазмы, таким образом, высвобождая РНК из **МСД** для осуществления ее активности в сайленсинге гена; серые и белые атомы

представляют собой атомы углерода и водорода соответственно; красные и зеленые атомы представляют собой атомы кислорода и фтора соответственно.

На **Фиг. 2** проиллюстрирован примером способ связывания группировки **E** по изобретению согласно **Формуле (Va')** и соответствующее редокс-опосредованное расщепление группировки **E**. На **Фиг. 2a** показана нить РНК, где группировка **E** согласно **Формуле (Va')** связывается во внутреннем положении; на **Фиг. 2b** проиллюстрировано примером редокс-опосредованное расщепление дисульфидной группы группировки **E** согласно **Формуле (Va')** в восстановительных условиях, таких как условия, превалирующие в цитоплазме, с последующим высвобождением лекарственного средства в виде РНК.

На **Фиг. 3** проиллюстрирован примером механизм действия (МД) конъюгата по изобретению. Проиллюстрирован примером конъюгат согласно **Формуле (Cn-3)**, в котором дуплекс РНК представляет собой субстрат дайсер длиной 25/27 нуклеотидов, с фосфатной группой, связанной на 5'-конце сопровождающей цепи: на **Фиг. 3(a)** продемонстрировано расщепление и удаление группировок **E**, **E'** или **E''** в восстановительных условиях, которые превалируют в цитоплазме; на **Фиг. 3(b)** продемонстрировано взаимодействие дуплекса РНК с эндонуклеазой дайсер, которое индуцирует двухнитевой разрыв, оставляя 21/21 дуплекс РНК с одним остающимся остатком группировки **E**, связанным на 5'-конце сопровождающей цепи; на **Фиг. 3(в)** продемонстрировано удаление смысловой нити ферментом хеликазой (т.е. цитоплазматическим ферментом, способным разделять нити РНК). Данное событие приводит к удалению остатка обрубка второй группировки **E**, таким образом, высвобождая интактную антисмысловую нить, для вхождения в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) для того, чтобы индуцировать сайленсинг желательного гена [**Фиг. 3(г)**].

На **Фиг. 4** проиллюстрирован примером механизм действия (МД) конъюгата по изобретению, где конъюгат представляет собой конъюгат согласно **Формуле (Cn-8)**. Дуплекс РНК представляет собой субстрат дайсер длиной 25/27 нуклеотидов, с фосфатной группой, связанной на 5'-конце сопровождающей нити: на **Фиг. 4(a)** продемонстрировано расщепление и удаление группировок **E**, **E'** или **E''** в восстановительных условиях, которые превалируют в цитоплазме; на **Фиг. 4(b)** продемонстрировано взаимодействие дуплекса РНК с эндонуклеазой дайсер, которое индуцирует двухнитевой разрыв, оставляя 21/21 дуплекс РНК с одним остающимся остатком группировки **E**, связанным на 5'-конце сопровождающей нити; на **Фиг. 4(в)** продемонстрировано удаление смысловой нити ферментом хеликазой (т.е. цитоплазматическим ферментом, способным разделять нити РНК).

Данное событие приводит к удалению остатка обрубка второй группировки **E**, таким образом, высвобождая интактную антисмысловую нить для вхождения в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) для того, чтобы индуцировать сайленсинг желательного гена [**Фиг. 4(г)**].

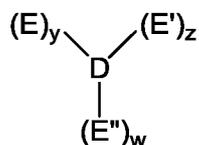
5 На **Фиг. 5** представлен гель-электрофорез дуплексов РНК, причем каждый состоит из одной нити длиной 25 нуклеотидов и одной нити длиной 27 нуклеотидов, специфичных в отношении сайленсинга гена EGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок) (как описано в **Примере 6**). Электрофорез проводили с конъюгатами, которые были растворены либо в воде (**Полосы А**), либо в присутствии 10% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (**Полосы Б**). Данные дуплексы были либо неконъюгированными (**Полоса 1**); либо конъюгированными с двумя группировками **E** контрольного **Апо-Si-S-1** (**Полоса 2**); либо конъюгированными с двумя группировками **E Апо-Si-K-13** по изобретению (**Полоса 3**); либо конъюгированными с двумя группировками **E Апо-Si-K-18** по изобретению (**Полоса 4**). Как показано, во время электрофореза в то время, как конъюгат **Апо-Si-S-1** проявлял прочное связывание с альбумином и, следовательно, не имел фракции, не связанной с альбумином, конъюгаты **Апо-Si-K-13** и **Апо-Si-K-18** демонстрировали и связанную с альбумином фракцию (**Стрелка №1**) и фракцию, не связанную с альбумином (**Стрелка №2**).

20

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к конъюгатам и их предшественникам, содержащим макромолекулярные лекарственные средства, такие как **ОЛС**, связанные с молекулярной системой доставки (**МСД**), которая может доставлять лекарственное средство через фосфолипидные биологические мембраны в клетки для осуществления биологической эффективности как в бессывороточных условиях, так и в присутствии белков плазмы. Данная система доставки обеспечивает трансмембранную доставку макромолекулярных лекарственных средств, таких как генетические лекарственные средства, например, миРНК или дмиРНК, антисмысловые олигонуклеотиды (**АСО**), или терапевтические белки. Активность в присутствии белков плазмы является особенно важной для применения конъюгатов по изобретению *in vivo* для местного или системного введения (например, посредством внутривенной инъекции) живому животному или 35 человеческому субъекту.

В одном воплощении данного изобретения предложены конъюгаты, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (I)**:



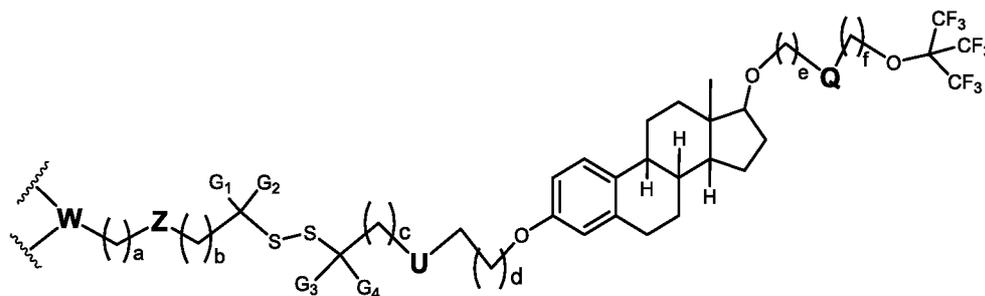
Формула (I)

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (I)**, и сольваты и гидраты данных солей, где:

D представляет собой лекарственное средство, подлежащее доставке через биологические мембраны (т.е. лекарственное средство – груз), выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного средства, пептида, белка и **ОЛС** (т.е. природной или модифицированной, одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК, дмиРНК или АСО);

каждый **y**, **z** и **w** представляет собой целое число, независимо выбранное из 0, 1, 2, 3 или 4, где, если любой из **y**, **z** и **w** или их комбинация равна 0, это означает то, что соответствующая группировка **E** (или группировки) отсутствует(ют); по меньшей мере один из **y**, **z** и **w** отличается от 0;

E, **E'** или **E''** могут быть одинаковыми или разными, причем каждая независимо имеет структуру, как изложено в общей **Формуле (II)**:



Формула (II)

20 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (II)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где:

один из **U** или **Q** независимо отсутствует, а другой выбран из группы, состоящей из $-\text{NH}-$, $-\text{N}(\text{CH}_3)-$, $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)-$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)-$;

G₁, **G**₂, **G**₃ и **G**₄ каждый независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, метила или этила; группировки **G**₁, **G**₂, **G**₃ и **G**₄ могут быть одинаковыми

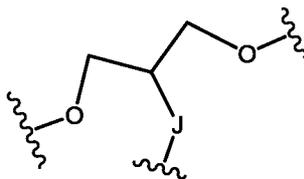
или разными; по меньшей мере две из G_1 , G_2 , G_3 и G_4 представляют собой атомы водорода;

Z выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, простого эфира, сложного эфира, амина и амида;

5 a , b , c , d представляют собой целые числа, причем каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, где 0 равен отсутствующей группе; a , b , c , d могут быть одинаковыми или разными;

e и f представляют собой целые числа, причем каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 1, 2 и 3; e и f могут быть одинаковыми или разными; если
10 любой из каждого a или b больше или равен 2, тогда соответствующая углеводородная цепь может быть либо насыщенной, либо ненасыщенной;

W выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, гидроксила, дигидроксила, природного или модифицированного нуклеозида и структуры, как изложено в **Формуле (II')**:



15

Формуле (II')

где J выбран из отсутствующей группы, $-CH_2-$, вторичного или третичного амина и атома кислорода;

и где группировка согласно **Формуле (II')** может быть связана с любой из
20 групп, состоящих из отсутствующей группы; атома водорода; D ; защитной группы, как определено в данном документе (например, защитной группы спирта); фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы и твердой подложки. В контексте данного изобретения группировка E , E' или E'' может быть связана с одной группировкой D через одну или две точки.

25 В одном воплощении данного изобретения W представляет собой нуклеозид, выбранный из природного или модифицированного аденина, цитозина, тимина и урацила; и сахарная группировка представляет собой рибозу или 2'-дезоксирибозу.

30 В другом воплощении данного изобретения W представляет собой 2'-дезоксинуридин.

В еще одном другом воплощении данного изобретения W имеет структуру, как изложено в **Формуле (II')**, в которой J представляет собой $-CH_2-$.

Роль химических группировок согласно **Формуле (II)** в обеспечении трансмембранной доставки конъюгатов по изобретению как в условиях (С+), так и в (С-) проиллюстрирована в **Примере 6**. В данном **Примере** показано то, что группировки **E**, которые соответствуют структуре **Формулы (II)**, демонстрируют надежную эффективность связанных конъюгатов как в доставке через клеточные мембраны в клетки, так и в индукции биологического эффекта, такого как, например, сайленсинг генов. Эта эффективность наблюдается и в (С-) условиях, и в (С+) условиях. В **Примере 6** описано два конъюгата по изобретению, причем оба имеют группировки **E**, которые соответствуют **Формуле (II)**, связанные с субстратом дайсер, который представляет собой дуплекс, разработанный для осуществления сайленсинга экспрессии гена усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Одним является конъюгат **Апо-Si-K-18**, имеющий две группировки **E Апо-Si-K-18** согласно **Формуле (Vb')**, а вторым – конъюгат **Апо-Si-K-13**, имеющий две группировки **E Апо-Si-K-13** согласно **Формуле (Vb'')**. В данном **Примере** сравнивается эффективность данных конъюгатов в сайленсинге генов с эффективностью трех структурно родственных контрольных конъюгатов, содержащих группировки **Апо-Si-K-19**, **Апо-Si-W** и **Апо-Si-G**. Данные группировки, хотя они и являются структурно сходными с группировками **E** по изобретению, не полностью соответствуют **Формуле (II)** и, соответственно, не могут эффективно работать в доставке в клетки и в сайленсинге гена в присутствии белков плазмы [условия С(+)].

Группировки **E** всех конъюгатов: обоих конъюгатов по изобретению и контрольных конъюгатов содержат стерольный остов и нона-фтор-*трет*-бутанольный остаток. Однако очевидно это не является достаточным для придания биологической активности (например, в сайленсинге генов), даже в бессывороточных условиях. Например, как описано в **Примере 6**, конъюгат **Апо-Si-W** не был активным ни в присутствии, ни в отсутствие белков плазмы. Добавление дисульфидной группы на группировку **E** влекло за собой активность (например, в сайленсинге генов) в бессывороточных условиях, что отражается в эффективности конъюгатов по изобретению, а также в эффективности контрольного конъюгата **Апо-Si-G**, который проявлял активность без сыворотки. Однако само по себе введение дисульфидной группировки не было достаточным для обеспечения эффективности в присутствии белков плазмы. В отличие от этого, добавление для каждой группировки **E** одной группировки **Q** и **U**, которая не является отсутствующей, придает активность в присутствии белков плазмы, что отражается высокой эффективностью в сайленсинге генов в условиях сыворотка

(+), оказываемой конъюгатами, которые содержат группировки **Апо-Si-K-18** или **Апо-Si-K-13**.

В целом, эти данные поддерживают представление о том, что **Формула (II)**, в самом деле, представляет уникальный, новый и непредсказуемый баланс между
5 разными детерминантами, требующимися для трансмембранной доставки олигонуклеотидного лекарственного средства и для оказания соответствующей благоприятной биологической эффективности (например, в сайленсинге генов).

Термины **«лекарственное средство»** или **«лекарственное средство - груз»** (т.е. группировка **D**) в контексте настоящего изобретения относятся к
10 молекуле(лам), подлежащим доставке конъюгатами по изобретению, представляющей(щим) собой либо низкомолекулярные лекарственные средства, либо макромолекулы, такие как пептиды, белки или олигонуклеотидные лекарственные средства.

Термин **«лекарственное средство»** или **«медикамент»** в контексте
15 настоящего изобретения относится к химическому веществу, которое, при введении пациенту, страдающему от заболевания, способно оказывать полезное влияние на данного пациента. Данным полезным влиянием может быть уменьшение интенсивности симптомов или противодействие эффектам агента или вещества, который(рые) играет(ют) роль в процессе заболевания. Данное
20 лекарственное средство может содержать маленькую молекулу или макромолекулу, такую как белок или одно- или двухцепочечная РНК или ДНК, вводимую для ингибирования экспрессии генов. Среди прочих, данное лекарственное средство может содержать миРНК или АСО. В некоторых воплощениях данное лекарственное средство нацелено на лечение
25 дегенеративных расстройств, рака, ишемических заболеваний, инфекций, токсических повреждений, метаболического заболевания или иммуноопосредованных расстройств.

Термин **«олигонуклеотидное лекарственное средство»**, далее также обозначенный **«ОЛС»**, в контексте данного изобретения относится к
30 лекарственному средству, которое содержит нуклеозиды или нуклеотиды. Примерами олигонуклеотидных лекарственных средств (**ОЛС**) являются одноцепочечные или двухцепочечные, природные или модифицированные РНК или ДНК. Примерами **ОЛС** являются миРНК (малая интерферирующая РНК), субстрат фермента дайсер (дмиРНК), микроРНК (мкРНК), матричная РНК (мРНК)
35 или последовательности ДНК, сконструированные так, чтобы служить в качестве антисмысловых олигонуклеотидов (АСО). Связывание между нуклеотидными

строительными блоками ОЛС может осуществляться, среди прочих причин, посредством фосфат-триэфирных или фосфоротиоатных связей.

В более конкретных воплощениях среди ОЛС согласно данному изобретению раскрыты:

5 **«миРНК»**, представляющая собой дуплекс РНК, в котором каждая нить РНК имеет длину 19-21 нуклеотид, направленный на сайленсинг экспрессии гена посредством белкового комплекса RISC (индуцированный РНК комплекс сайленсинга);

10 **миРНК – субстрат дайсер («дмиРНК»)**, представляющая собой дуплекс РНК, в котором каждая нить РНК имеет длину 24-30 нуклеотидов. В одном воплощении дуплекс дмиРНК состоит из одной нити из 25 нуклеотидов, тогда как вторая нить состоит из 27 нуклеотидов. В другом воплощении дуплекс дмиРНК состоит из одной нити из 24 нуклеотидов, тогда как вторая нить состоит из 27 нуклеотидов;

15 **«Антисмысловый олигонуклеотид» (АСО)**, представляющий собой синтетический одноцепочечный природный или модифицированный олигонуклеотид ДНК или РНК, обычно из 15-20 нуклеотидов в длину. Последовательность АСО является антисмысловой, т.е. она является комплементарной смысловой последовательности специфической мРНК белка, синтез которого стремятся ингибировать. Связывание АСО с указанной комплементарной последовательностью блокирует способность рибосом двигаться вдоль мРНК, таким образом, предотвращая синтез белка, или ускоряет скорость деградации мРНК.

25 **«Нуклеозид»** в контексте настоящего изобретения определяется как химическая группировка, которая содержит азотистое основание (нуклеиновое основание) и сахар из пяти или шести атомов углерода (например, рибоза или дезоксирибоза). Нуклеиновые основания выбирают из природных или модифицированных пуринов (например, аденин, гуанин) и природных или модифицированных пиримидинов (например, тимин, цитозин, урацил).

30 Нуклеиновое основание может быть модифицировано разными модификациями, как известно в данной области (например, метилирование, ацетилирование). Кроме того, сахарная группировка нуклеозида также может быть модифицирована, как известно в данной области [например, 2'-дезоксипроизводное, метилирование в 2'-положении рибозы, внедрение 2'-фторо атома или наличие мостика,

35 соединяющего атомы 2'-кислород и 4'-углерод, таким образом, генерируя запертую нуклеиновую кислоту (ЗНК)]. Применение таких модифицированных нуклеозидов,

следовательно, также находится в пределах объема данного изобретения. В одном воплощении данный нуклеозид содержит производное пиримидина, выбранное из природного или модифицированного цитозина, тимина и урацила, а сахарная группировка представляет собой либо рибозу, либо дезоксирибозу.

5 **«Нуклеотид»** в контексте данного изобретения представляет собой нуклеозид, как определено выше, связанный с фосфатной группой. Нуклеотиды являются строительными блоками олигонуклеотидов.

10 **«Молекула-предшественник»** в контексте данного изобретения определяется как группировка E, E' или E'', имеющая структуру, как изложено в любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'') или (Vc''')** по изобретению, которая присоединяется к защитной группе, как определено ниже.

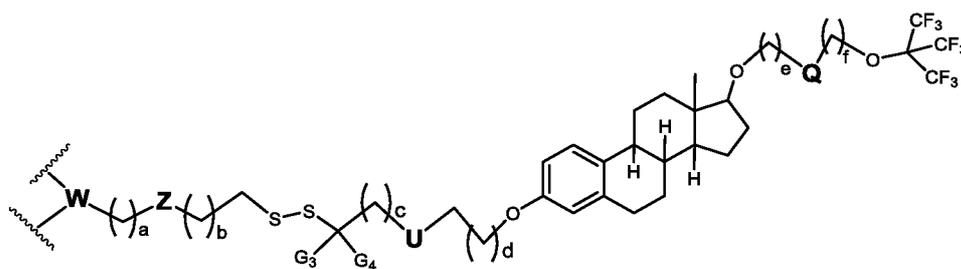
15 **«Защитная группа»** в контексте данного изобретения определяется как химическая группа, которая предназначена для удаления или модификации во время синтеза конъюгата. Такое удаление или модификация могут происходить на разных стадиях синтеза; например, без ограничения, во время присоединения группировок E, E' или E'' к D, в случае, когда D представляет собой макромолекулярное лекарственное средство, такое как олигонуклеотидное лекарственное средство. В предпочтительном воплощении изобретения защитная группа представляет собой **защитную группу спирта**, как определено ниже.

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

Термин «*присоединение к твердой подложке*» в контексте данного изобретения означает точку присоединения группировки E, E' или E'' к твердой подложке во время химического синтеза. Например, в качестве твердой подложки может использоваться стекло с заданным размером пор (CPG) для присоединения 3'-конца олигонуклеотида во время синтеза конъюгата по изобретению.

Термин «*биологическая мембрана*» согласно данному изобретению относится к любой фосфолипидной мембране, связанной с биологической системой. Примерами таких фосфолипидных мембран являются плазматическая мембрана клеток, внутриклеточные мембраны или фосфолипидные мембраны, ассоциированные с биологическими барьерами, такими как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), гематоофтальмический барьер (ГОб) или гематоплацентарный барьер.

В одном воплощении данного изобретения предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (II)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (III)**:



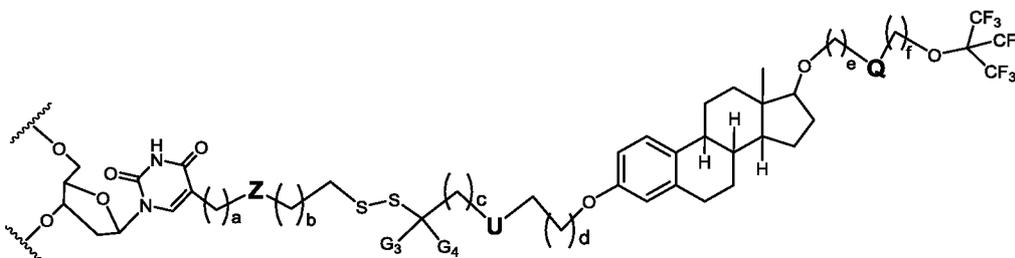
15

Формула (III)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (III)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый U, Q, Z, G₃, G₄, a, b, c, d, e, f, W имеет такое же значение, как определено для **Формулы (II)**.

20

В одном воплощении данного изобретения предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (III)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (IVa)**:

**Формула (IVa)**

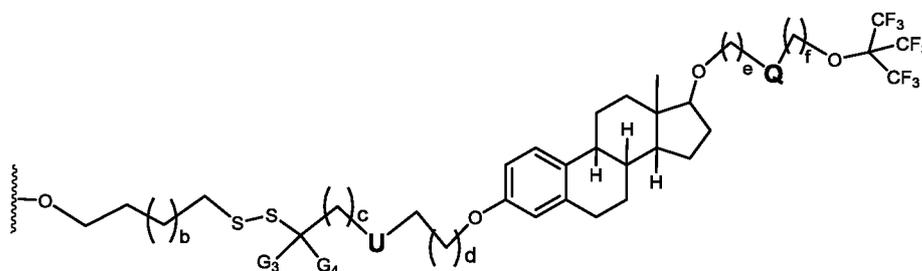
25

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVa)**,

и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый Z, U, Q, G₃, G₄, a, b, c, d, e и f имеет такое же значение, как и в **Формуле (III)**.

В одном воплощении данного изобретения предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (III)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (IVb)**:

5

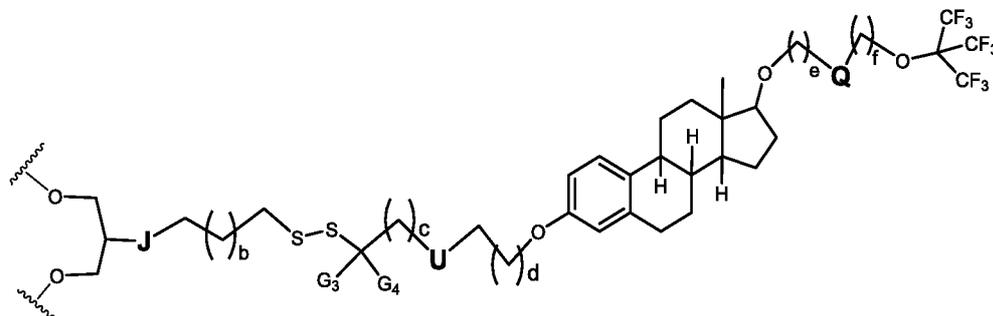


Формула (IVb)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVb)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый U, Q, G₃, G₄, b, c, d, e и f имеет такое же значение, как и в **Формуле (III)**.

10

В одном воплощении данного изобретения предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (III)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (IVc)**:



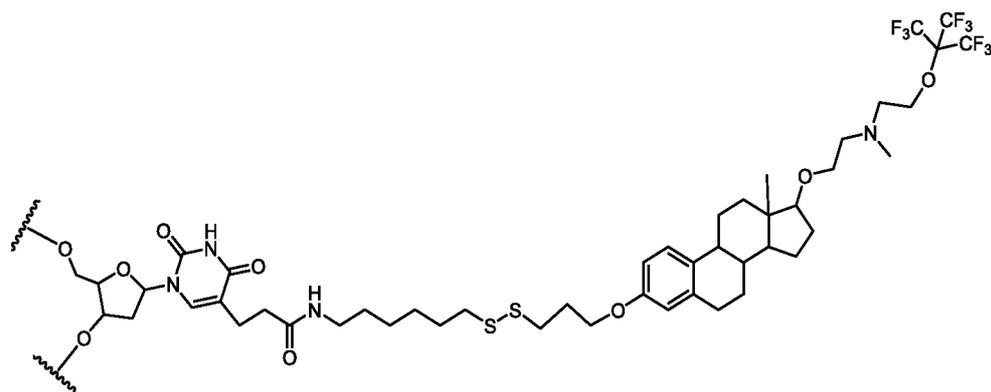
Формула (IVc)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVc)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый U, Q, G₃, G₄, b, c, d, e и f имеет такое же значение, как и в **Формуле (III)**; J выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, -CH₂- и атома кислорода.

15

20

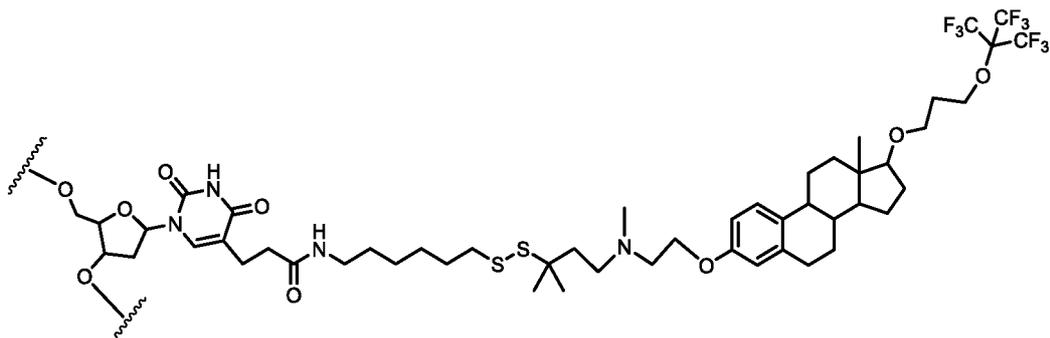
Согласно данному изобретению также предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVa)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Va')**:



Формула (Va')

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Va')**.

Согласно данному изобретению также предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVa)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Va'')**:



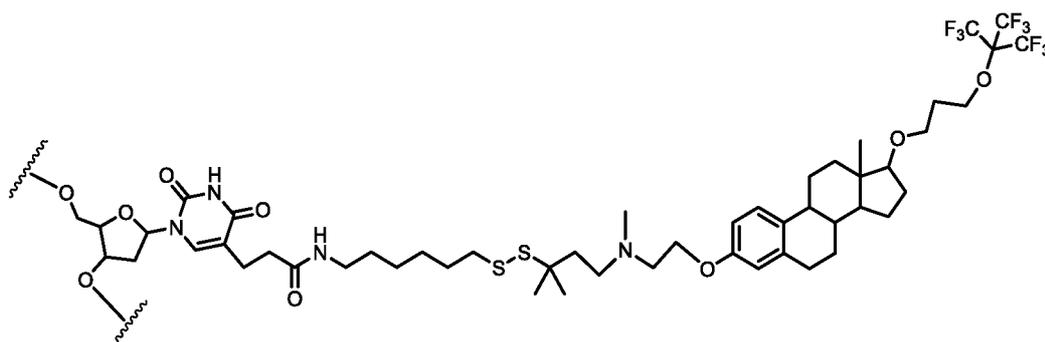
Формула (Va'')

10

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Va'')**. В случае, когда молекула связывается с фосфорамидитной и DMT группами, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-29D-Предшественник**.

15

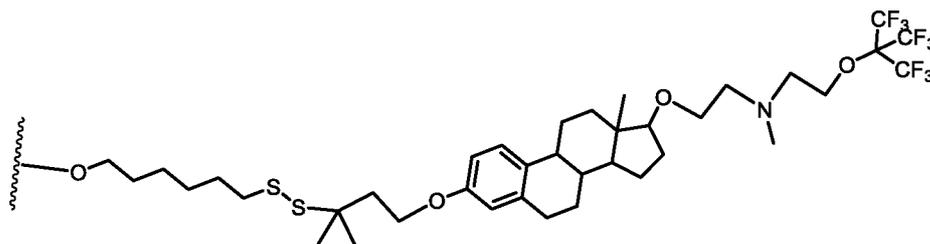
Согласно данному изобретению также предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVa)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Va''')**:



Формула (Va''')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Va''')**.

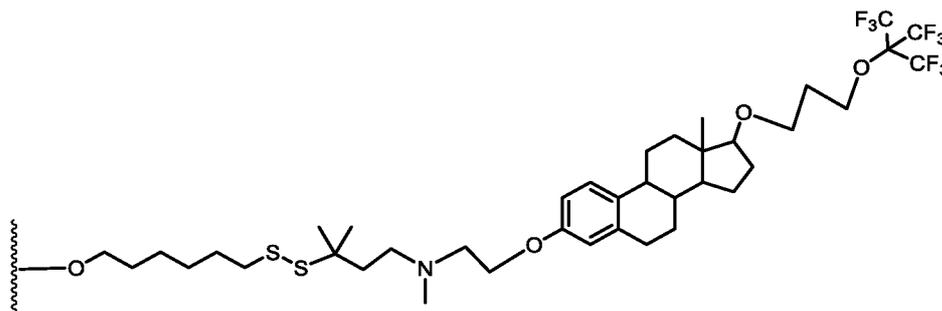
Согласно данному изобретению также предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVb)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vb')**:



Формула (Vb')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vb')**, обозначается **Апо-Si-K-18**. В случае, когда соединение связывается с фосфорамидитной группой, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-18-Предшественник**.

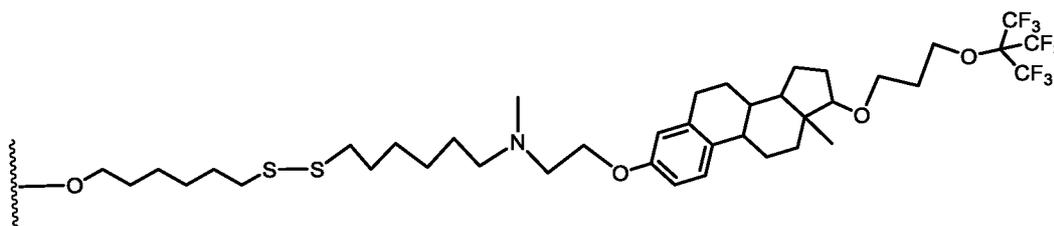
Согласно данному изобретению также предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVb)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vb'')**:



Формула (Vb'')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb'')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vb'')**, обозначается **Апо-Si-K-13**. В случае, когда соединение связывается с фосфорамидитной группой, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-13-Предшественник**.

Согласно данному изобретению также предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVb)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vb''')**:

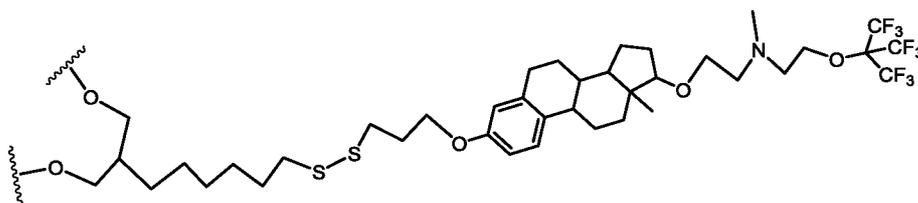


10

Формула (Vb''')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb''')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vb''')**, обозначается **Апо-Si-K-11**. В случае, когда данная молекула связывается с фосфорамидитной группой, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-11-Предшественник**.

В одном воплощении согласно данному изобретению предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVc)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vc')**:



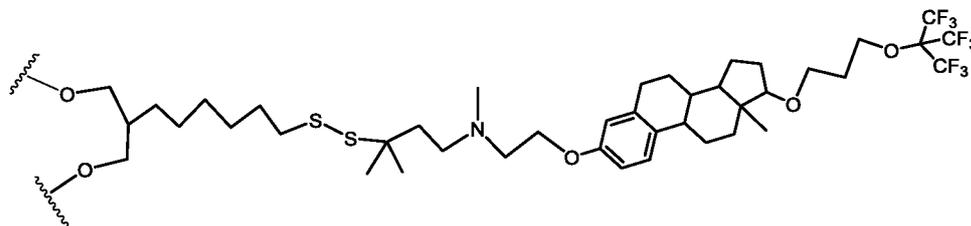
20

Формула (Vc')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vc')**, обозначается **Апо-Si-K-40**. В случае, когда данное соединение связывается с фосфорамидитной и DMT группами, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-40-Предшественник**.

25

В одном воплощении согласно данному изобретению предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVc)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vc'')**:



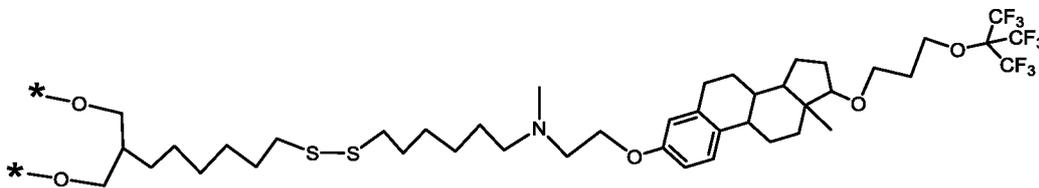
Формула (Vc'')

5

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc'')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vc'')**, обозначается **Апо-Si-K-43**. В случае, когда данное соединение связывается с фосфорамидитной и DMT группами, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-43-Предшественник**.

10

В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (IVc)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (Vc''')**:



15

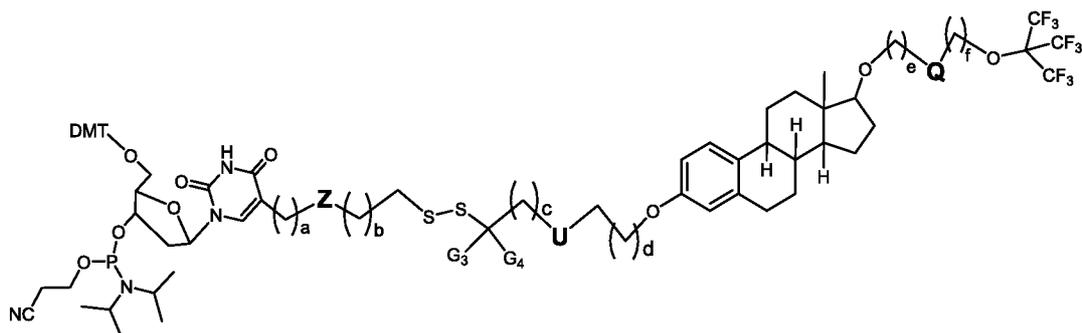
Формула (Vc''')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc''')**. Данная группировка E, E' или E'', как показано в **Формуле (Vc''')**, обозначается **Апо-Si-K-63**. В случае, когда данное соединение связывается с фосфорамидитной и DMT группами, данное соединение обозначается **Апо-Si-K-63-Предшественник**.

20

В одном воплощении согласно данному изобретению предложена молекула-предшественник, которая содержит E, E' или E'' согласно **Формуле (IVa)** и имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (IVaP)**:

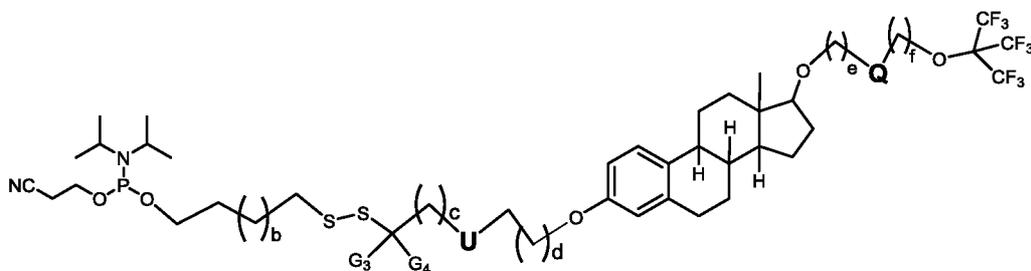
25



Формула (IVaP)

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVaP)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **Z**, **U**, **Q**, **G₃**, **G₄**, **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** имеет такое же значение, как и в **Формуле (IVa)**. Данная молекула-предшественник может служить для присоединения группировки **E**, **E'** или **E''** либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи.

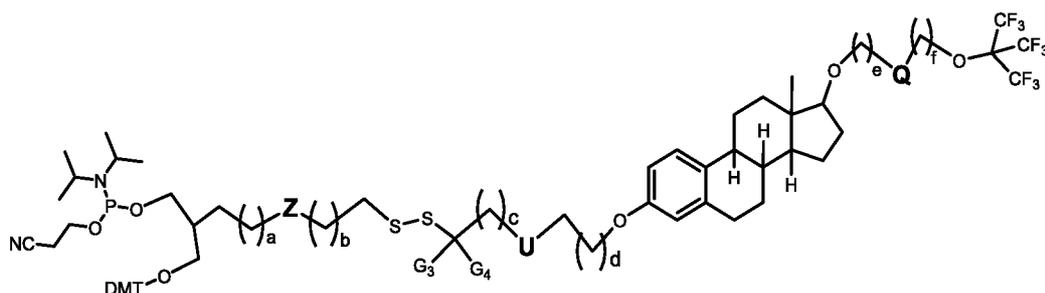
В другом воплощении согласно данному изобретению предложена молекула-предшественник, которая содержит **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (IVb)** и имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (IVbP)**:



Формула (IVbP)

15 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVbP)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **U**, **Q**, **G₃**, **G₄**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** имеет такое же значение, как и в **Формуле (IVb)**.

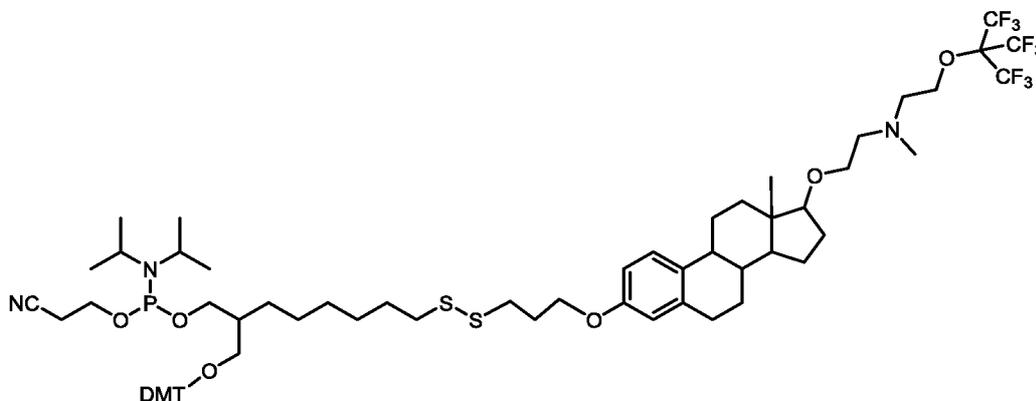
В еще одном другом воплощении согласно данному изобретению предложена молекула-предшественник, которая содержит **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (IVc)** и имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (IVcP)**:



Формула (IVcP)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVcP)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **Z, U, Q, G₃, G₄, a, b, c, d, e, f** имеет такое же значение, как и в **Формуле (IVc)**. Данная молекула-предшественник может служить для присоединения группировки **E, E'** или **E''** либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи.

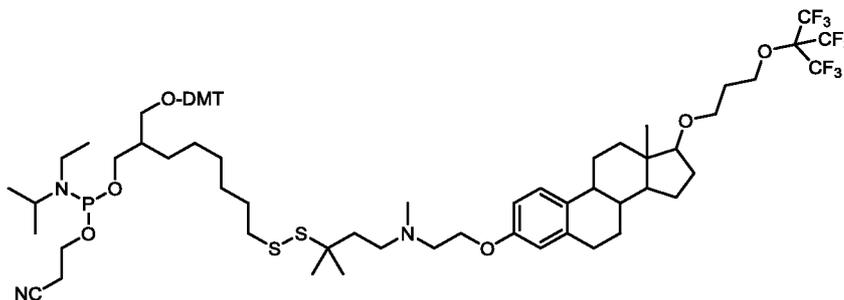
В конкретном воплощении молекула-предшественник согласно **Формуле (IVcP)** имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-1)**:



Формула(PP-1)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-1)**, и сольваты, и гидраты данных солей. Данная молекула-предшественник может служить для присоединения группировки **E, E'** или **E''** либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи. Данная молекула-предшественник, как показано в **Формуле (PP-1)**, обозначается **Апо-Si-K-40-Предшественник**.

В другом конкретном воплощении молекула-предшественник согласно **Формуле (IVcP)** имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-2)**:



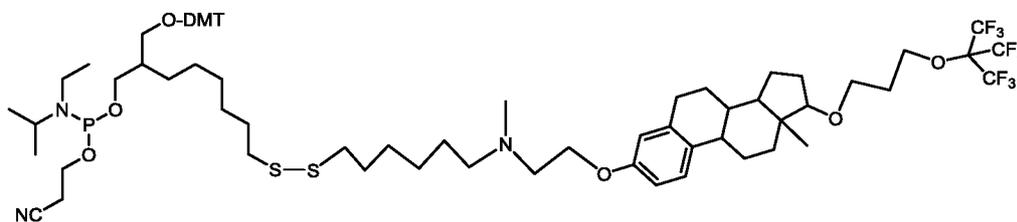
Формула (PP-2)

5

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-2)**, и сольваты, и гидраты данных солей. Данная молекула-предшественник может служить для присоединения группировки E, E' или E'' либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи. Данная молекула-предшественник, как показано в **Формуле (PP-2)**, обозначается **Апо-Si-K-43-Предшественник**.

10

В другом воплощении молекула-предшественник согласно **Формуле (IVcP)** имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-3)**:



Формула (PP-3)

15

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-3)**, и сольваты, и гидраты данных солей. Данная молекула-предшественник, как показано в **Формуле (PP-3)**, обозначается **Апо-Si-K-63-Предшественник**.

20

Соединение(ния) согласно любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'') или (Vc''')** могут служить в качестве группировок E, E' или E'' для связывания с D, таким образом, образуя желательный конъюгат по изобретению для биологической эффективности в трансмембранной доставке в клетки. В случае, когда D представляет собой олигонуклеотидное

25

лекарственное средство (ОЛС), конъюгаты могут соответствовать любой из следующих возможностей:

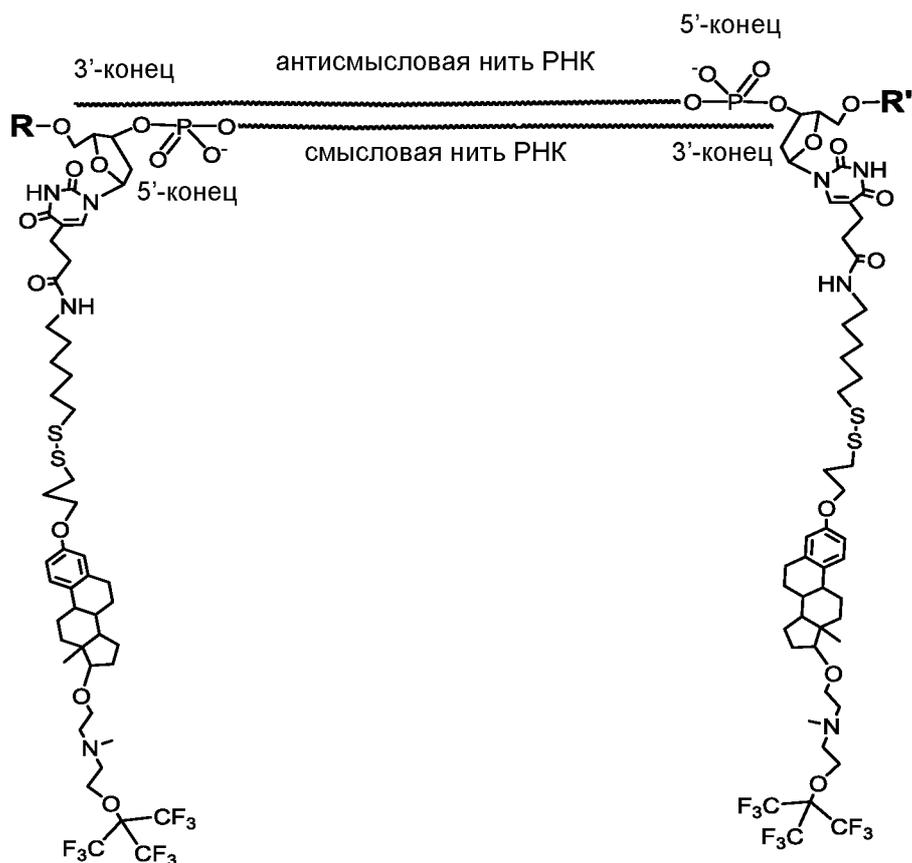
(i). D связывается с одной группировкой E, E' или E''.

5 (ii). D связывается с двумя группировками E и E', являющимися одинаковыми или разными; возможно на одном конце (например, 5'-конце) каждой олигонуклеотидной цепи.

10 (iii). D связывается с группировками E, E' или E'', являющимися одинаковыми или разными; группировки E и E' связываются на конце (например, на 5'-конце) каждой олигонуклеотидной цепи, тогда как E'' связывается во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи.

15 (iv). D связывается с несколькими (n больше 3) группировками E, являющимися одинаковыми или разными; группировки E связываются на конце (например, на 5'-конце) каждой олигонуклеотидной цепи, тогда как несколько других группировок E связываются в нескольких внутренних положениях вдоль олигонуклеотидной цепи.

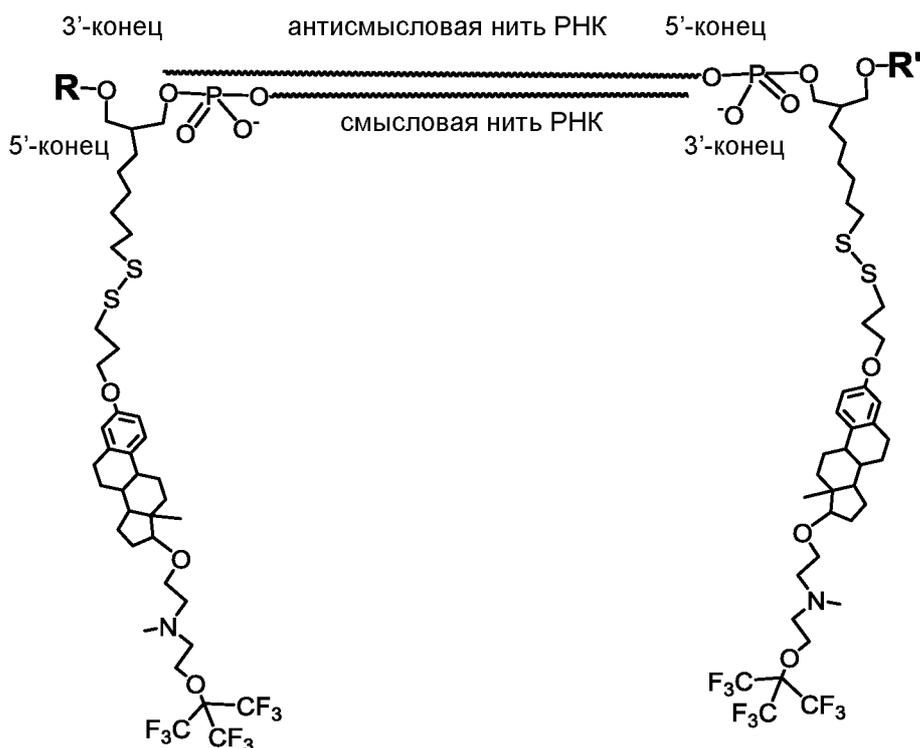
В одном воплощении данного изобретения согласно ему предложен конъюгат, который содержит связь D с группировками E и E' согласно **Формуле (Va')** на 5'-концах дуплекса РНК; причем указанный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Cn-1)**:



Формула (Сп-1)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-1)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый из **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

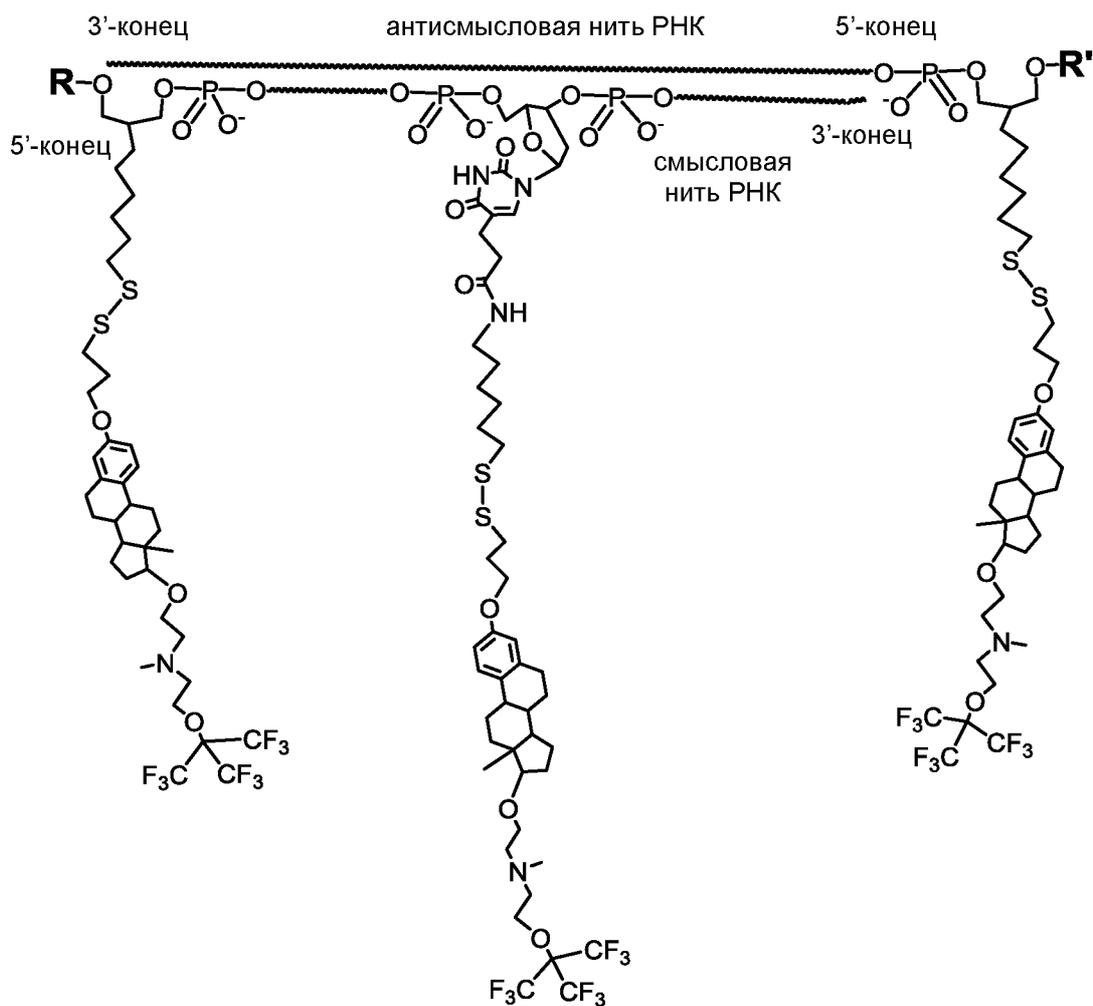
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с двумя группировками **E** и **E'** согласно **Формуле (Vc')** на 5'-концах дуплекса РНК; причем указанный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-2)**:



Формула (Сп-2)

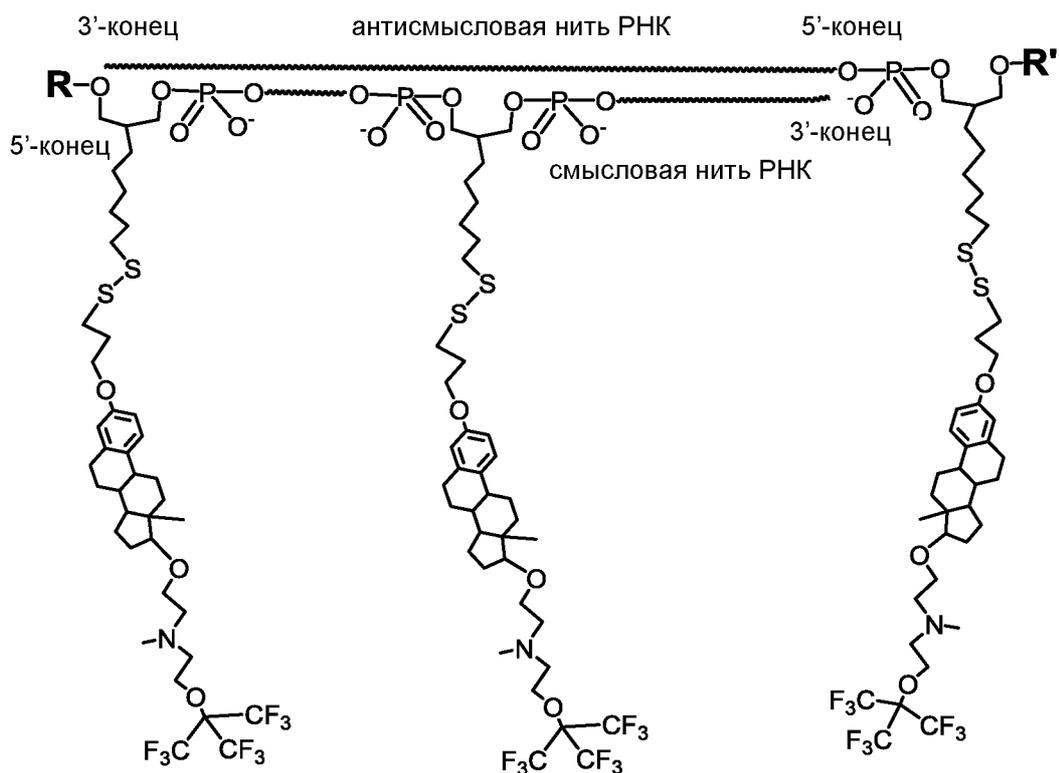
5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-2)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

10 В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'**, причем каждая имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vc')**, будучи связанной на 5'-концах дуплекса РНК; и группировкой **E''**, имеющей структуру, как изложено в **Формуле (Va')**, связанной во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи; причем данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-3)**:



Формула (Сп-3)

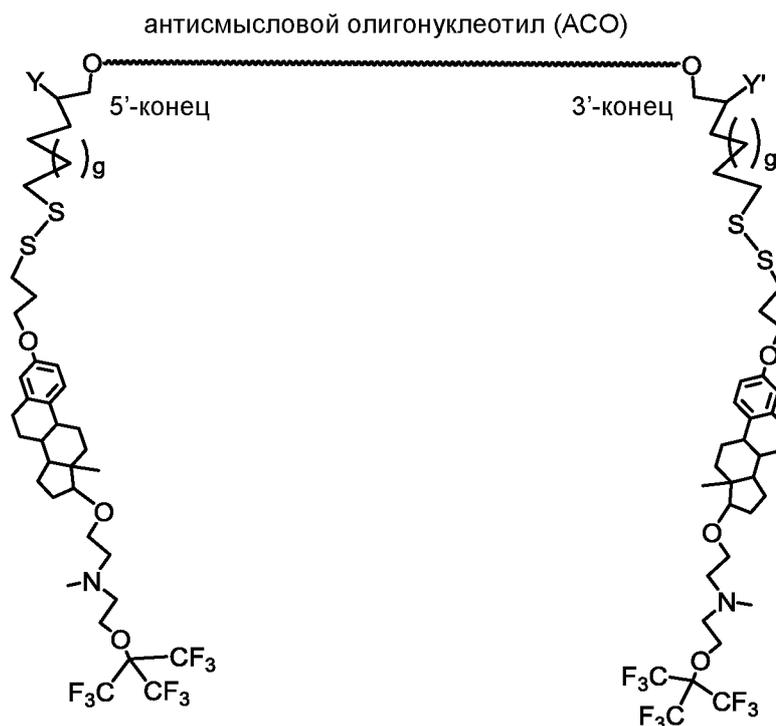
- 5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-3)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.
- 10 В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'** согласно **Формуле (Vc')** на 5'-концах дуплекса РНК; и группировку **E''** согласно **Формуле (Vc')**, связанную во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи; причем указанный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-4)**:



Формула (Сп-4)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-4)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

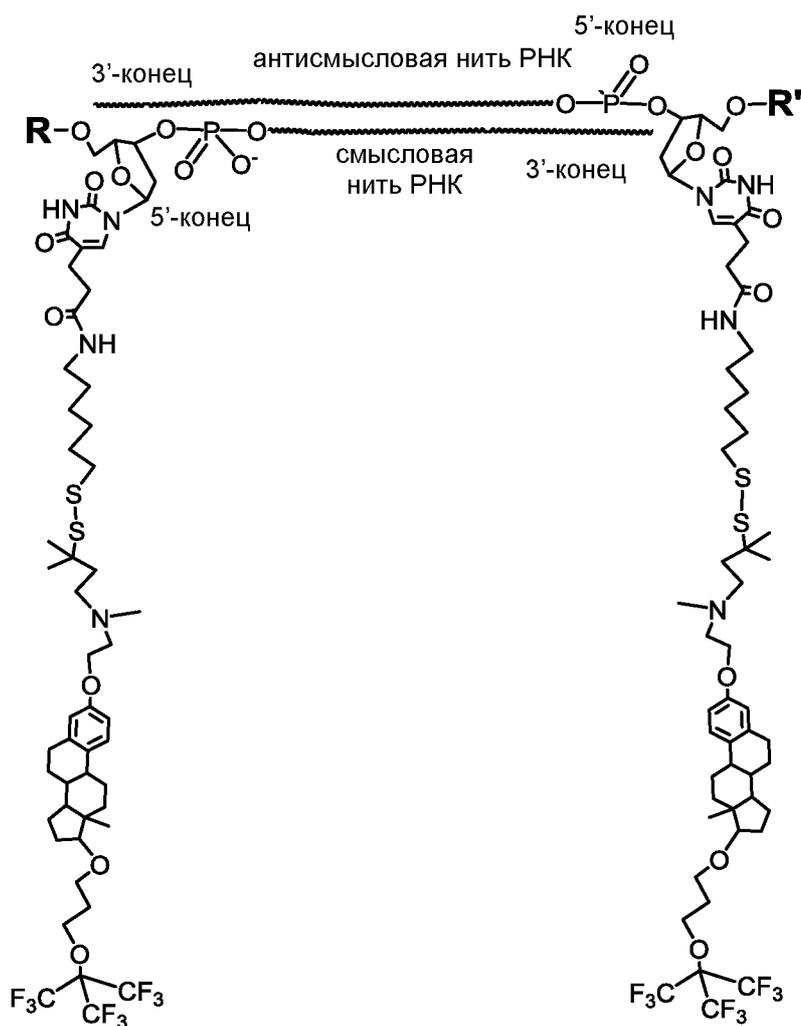
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит **D**, который представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (АСО), как определено выше, содержащий одноцепочечный олигонуклеотид длиной 15-25 нуклеотидов, выбранный из группы, состоящей из природных или модифицированных нуклеотидов ДНК, РНК, запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), фосфоротиоатных нуклеотидов и их комбинаций. Данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-5)**:



Формула (Сп-5)

- 5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-5)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **Y** и **Y'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, $-\text{CH}_2\text{-Z}$; $-\text{CH}_2\text{-Z}'$; $-\text{CH}_2\text{-O-Z}$ и $-\text{CH}_2\text{-O-Z}'$; где каждый **Z** и **Z'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода,
- 10 фосфата, сульфата, карбоксила, 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида и их комбинаций; **g** представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

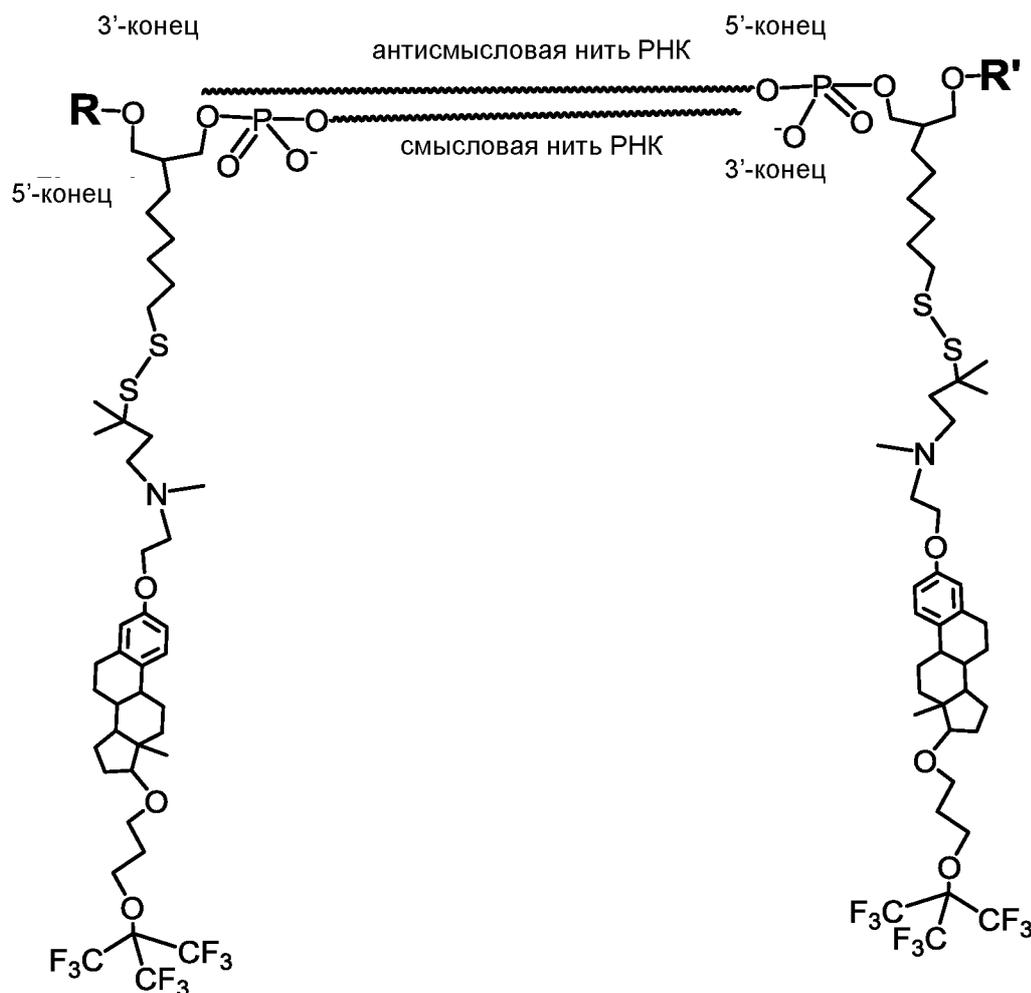
- В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'** согласно **Формуле (Va'')** на 5'-концах дуплекса РНК. Данный конъюгат имеет следующую структуру,
- 15 как изложено в **Формуле (Сп-6)**:



Формула (Сп-6)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты
 5 металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-6)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

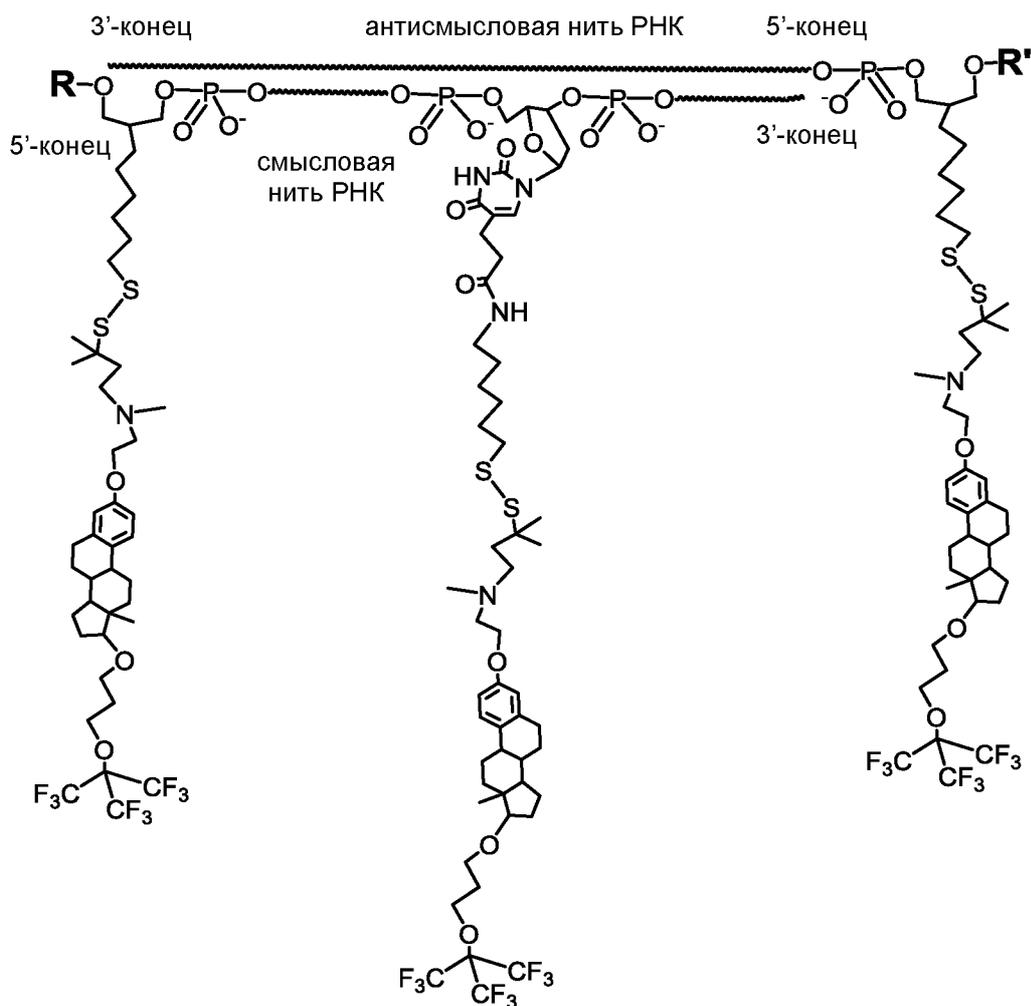
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен
 10 конъюгат, который содержит связь **D** с двумя группировками **E** и **E'** согласно **Формуле (Vc'')** на 5'-концах дуплекса РНК; данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-7)**:



Формула (Сп-7)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-7)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

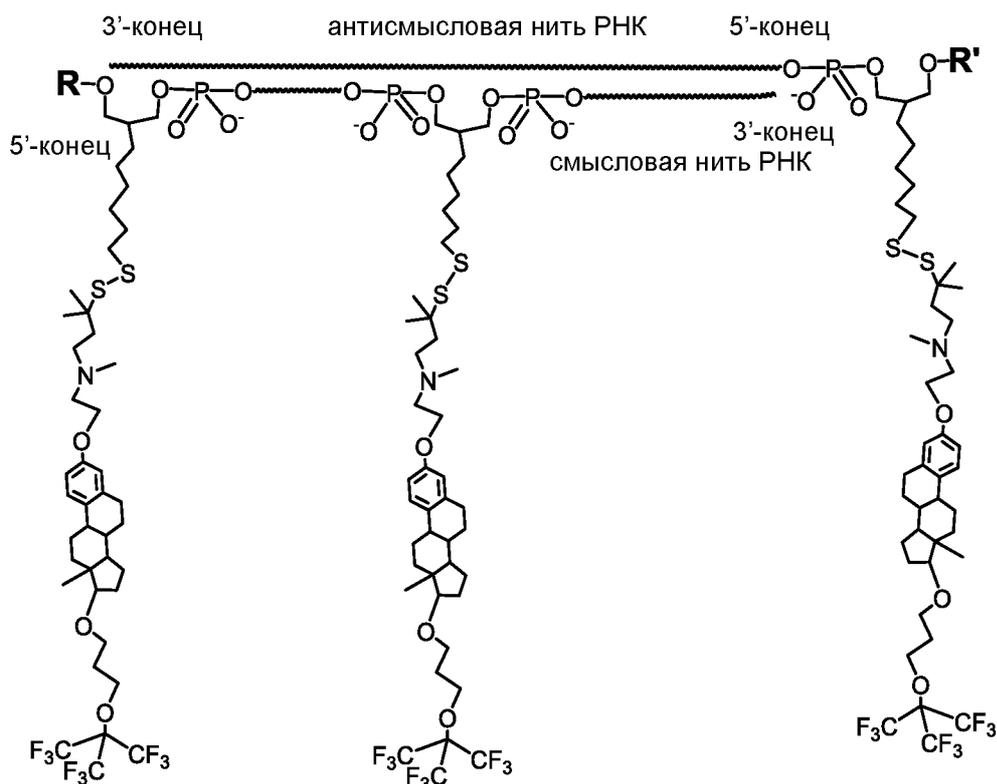
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'**, причем каждая имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vc'')**, и является связанной с 5'-концами дуплекса РНК; и группировкой **E''** согласно **Формуле (Va'')**, являющейся связанной во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи; причем данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-8)**:



Формула (Сп-8)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-8)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

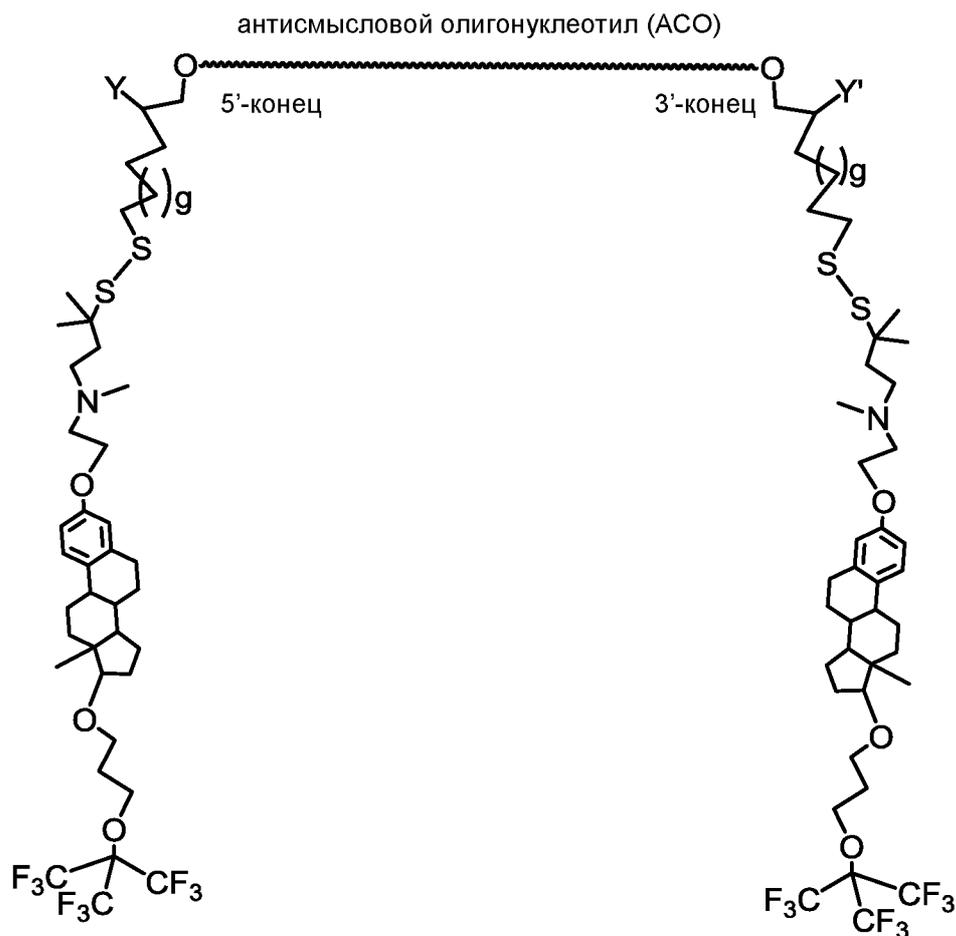
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'** согласно **Формуле (Vc'')** на 5'-концах дуплекса РНК; и группировкой **E''** согласно **Формуле (Vc''')**, являющейся связанной во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи; причем указанный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-9)**:



Формула (Сп-9)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-9)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

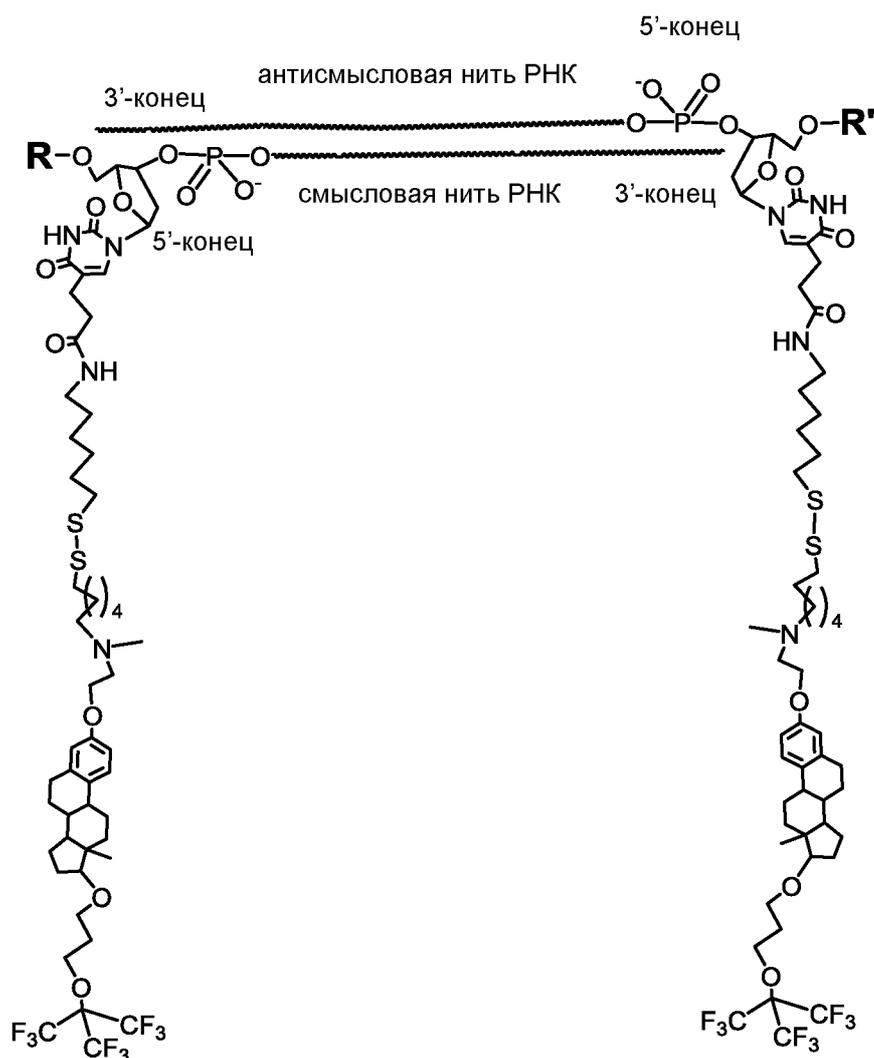
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит **D**, который представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (АСО), как определено выше, содержащий одноцепочечный олигонуклеотид длиной 15-25 нуклеотидов, выбранный из группы, состоящей из природных или модифицированных нуклеотидов ДНК, РНК, запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), фосфоротиоатных нуклеотидов и их комбинаций. Данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-10)**:



Формула (Сп-10)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-10)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **Y** и **Y'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, $-\text{CH}_2-\text{Z}$; $-\text{CH}_2-\text{Z}'$; $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Z}$ и $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Z}'$; где каждый **Z** и **Z'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфата, сульфата, карбоксила, 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида и их комбинаций; **g** представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

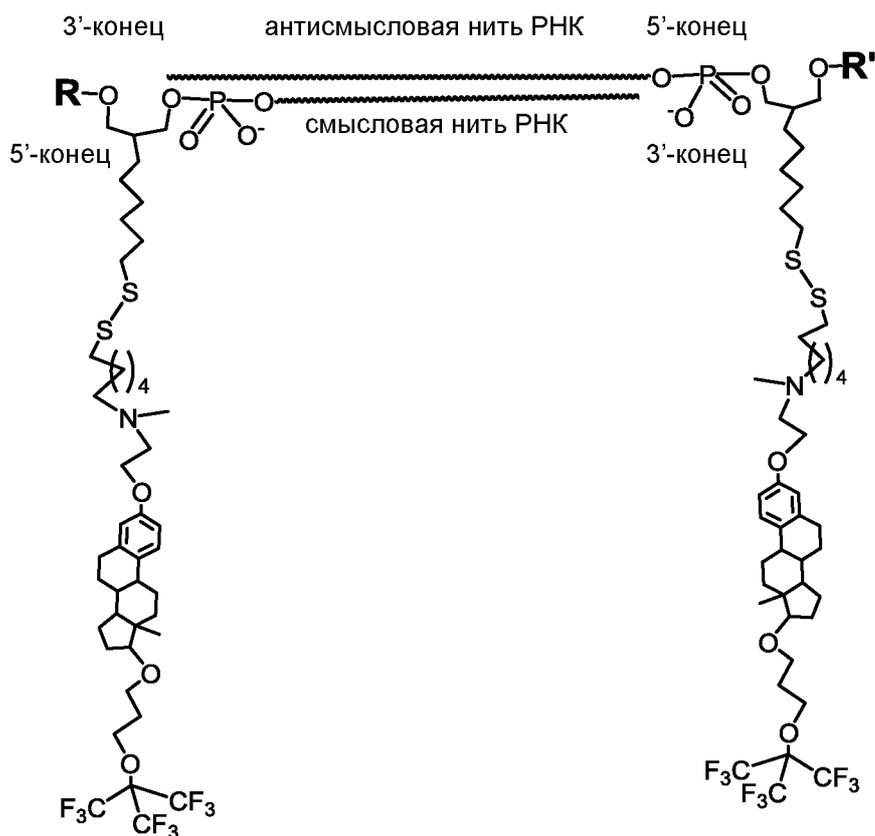
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'**, причем каждая имеет структуру, как изложено в **Формуле (Va''')**, и является связанной на 5'-концах дуплекса РНК; данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-11)**:



Формула (Сп-11)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-11)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый из **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

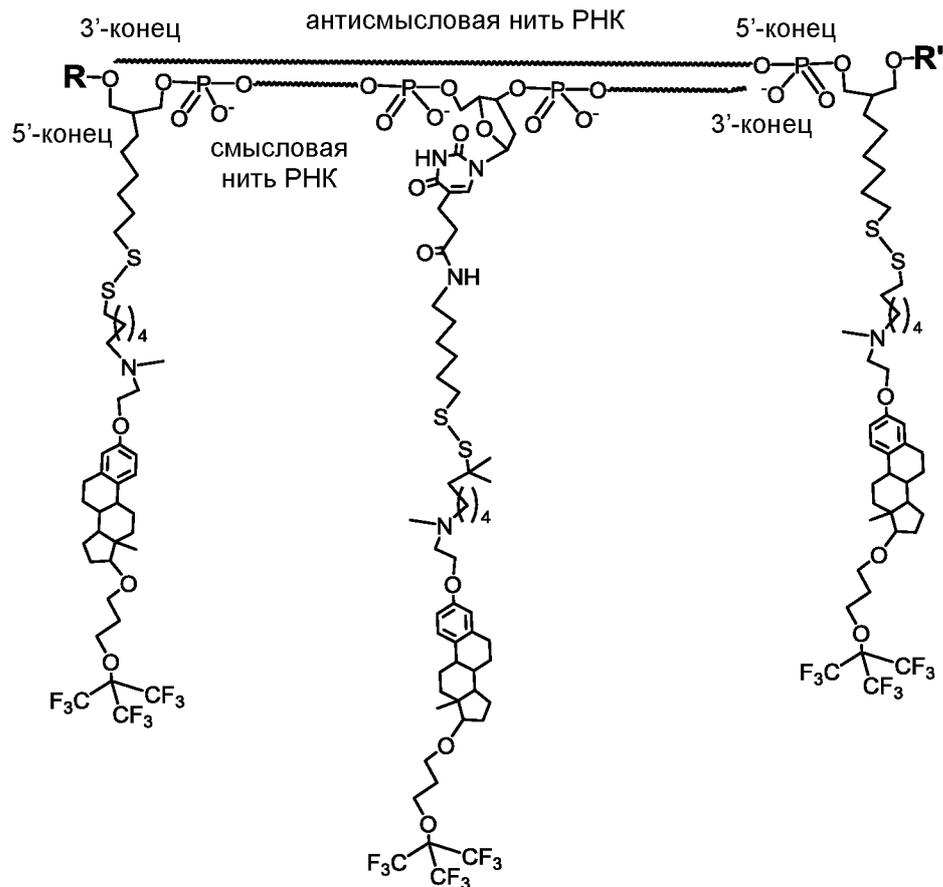
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'**, причем каждая имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vc''')**, и является связанной с 5'-концами дуплекса РНК. Данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-12)**:



Формула (Сп-12)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-12)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы. Данный конъюгат, как показано в **Формуле (Сп-12)**, обозначается **Апо-Si-K-63-B**.

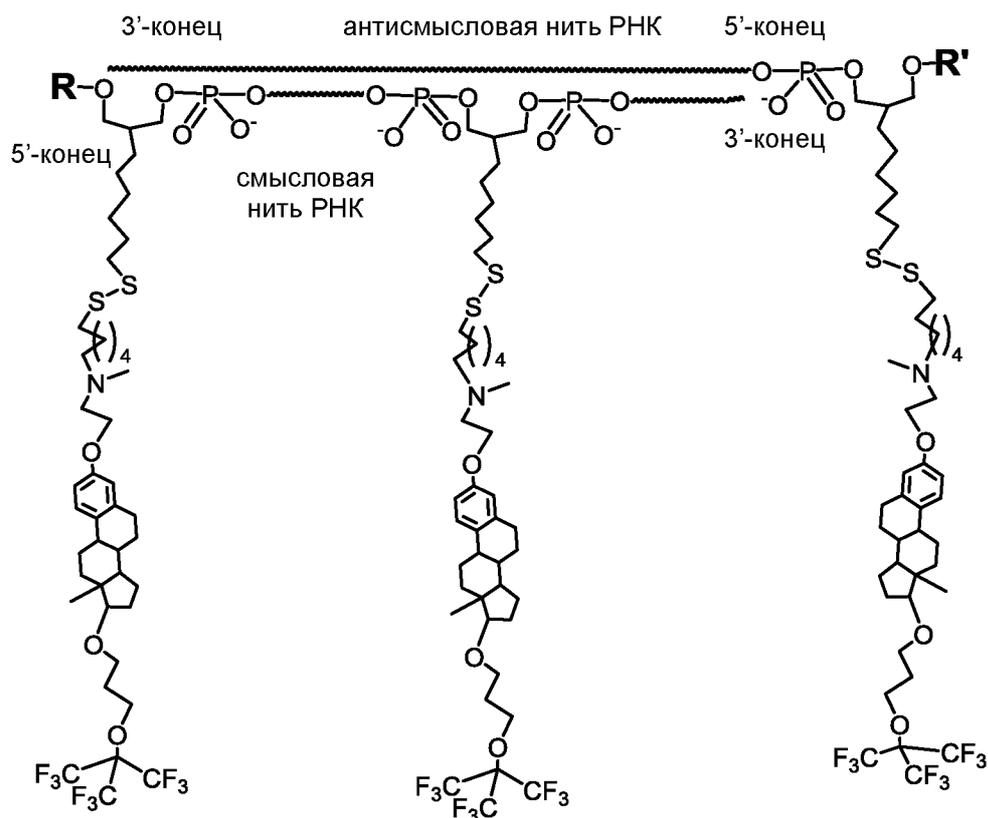
В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'**, причем каждая имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vc''')**, и является связанной с 5'-концами дуплекса РНК; и группировкой **E''** согласно **Формуле (Va''')**, связанной во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи; данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-13)**:



Формула (Сп-13)

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-13)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

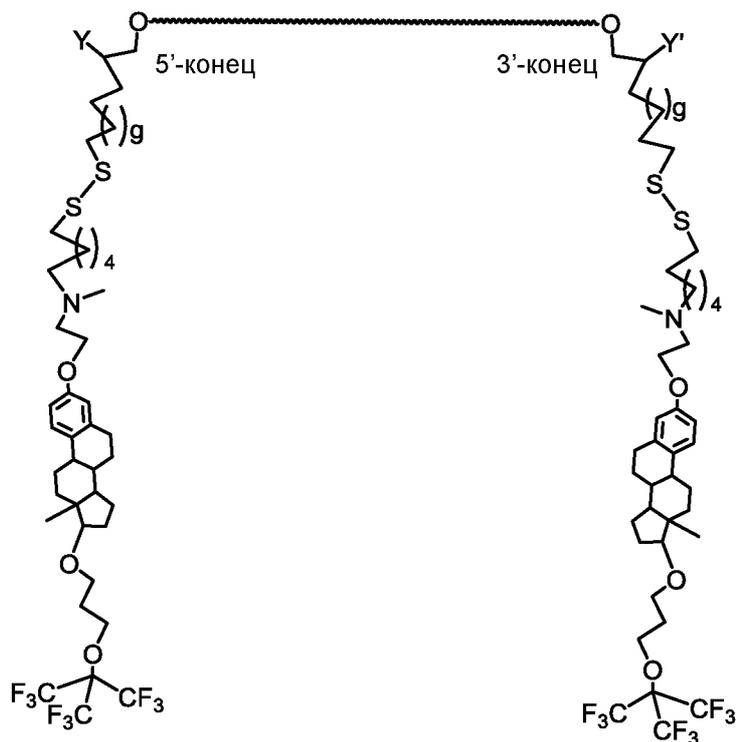
10 В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, который содержит связь **D** с группировками **E** и **E'**, причем каждая имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vc''')**, и является связанной с 5'-концами дуплекса РНК; и группировкой **E''** согласно **Формуле (Vc''')**, связанной во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи; данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сп-14)**:



Формула (Сn-14)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сn-14)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы. Данный Конъюгат, как показано в **Формуле (Сn-14)**, обозначается **Апо-Si-K-63-С**.

Согласно другому воплощению данного изобретения предложен конъюгат, который содержит **D**, который представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (АСО), как определено выше, содержащий одноцепочечный олигонуклеотид длиной 15-25 нуклеотидов, выбранных из группы, состоящей из природных или модифицированных нуклеотидов ДНК, РНК, запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), фосфоротиоатных нуклеотидов и их комбинаций. Данный конъюгат имеет следующую структуру, как изложено в **Формуле (Сn-15)**:

антисмысловой олигонуклеотил
(АСО)

Формула (Сn-15)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сn-15)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый Y и Y' независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, -CH₂-Z; -CH₂-Z'; -CH₂-O-Z и -CH₂-O-Z'; где каждый Z и Z' независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфата, сульфата, карбоксила, 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида и их комбинаций; g представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

В одном воплощении данного изобретения согласно ему предложен конъюгат или фармацевтическая композиция, которая включает конъюгат, содержащий дуплекс РНК, такой как миРНК или субстрат фермента дайсер (дмиРНК), где указанный дуплекс РНК имеет длину 27-25 или 27-24 нуклеотида, связывается на двух его концах с группировкой E, E' или E'', причем каждая имеет структуру согласно любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'') или (Vc''')**, с потенциальной дополнительной связью с фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой на 5'-конце сопровождающей (смысловой) нити и/или на 5'-конце направляющей (антисмысловой) нити.

В другом воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат, как описано выше, также связанный на двух его концах и также в одном или более чем одном внутреннем положении в пределах дуплекса миРНК с группировкой E, E' или E'', причем каждая имеет структуру согласно любой из 5 **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc''')**, с потенциальной дополнительной связью с фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой на 5'-конце сопровождающей (смысловой) нити и/или на 5'-конце направляющей (антисмысловой) нити.

Воплощения данного изобретения дополнительно относятся к применению 10 конъюгатов по изобретению, содержащих терапевтически полезные лекарственные средства, такие как белки или **ОЛС** (например, миРНК, дмиРНК или АСО), для лечения медицинских расстройств у субъекта, нуждающегося в этом. Данные медицинские расстройства могут представлять собой, без ограничения, дегенеративные расстройства, рак, сосудистые расстройства, метаболические 15 расстройства, травматические, токсические или ишемические инсульты, инфекции (например, вирусные или бактериальные) или иммуноопосредованные расстройства, в которых специфический(кие) белок(лки) играет(ют) роль либо в этиологии, либо в патогенезе заболевания. Для таких медицинских расстройств модуляция экспрессии соответствующего(щих) гена(нов) посредством механизма 20 миРНК или антисмыслового механизма, или модуляция активности соответствующего белка посредством терапевтического белка, такого как антитело, или посредством белка, который функционирует в трансдукции сигнала, или посредством белковой заместительной терапии могут иметь полезные эффекты в ингибировании процессов, связанных с заболеванием, или в лечении причины, 25 лежащей в основе заболевания.

Например, конъюгаты согласно воплощениям данного изобретения можно использовать в качестве терапии антисмысловыми олигонуклеотидами, миРНК или дмиРНК, которая представляет собой вид медицинского лечения, которое 30 включает введение последовательностей одноцепочечных или двухцепочечных нуклеиновых кислот (ДНК, РНК или химические аналоги), которые связываются либо с последовательностью ДНК, которая кодирует специфический белок, либо с матричной РНК (мРНК), которая транслируется в белок. Данное лечение может работать по ингибированию экспрессии генов, связанных с заболеванием, предупреждая, посредством этого, продукцию белков, связанных с заболеванием, 35 которые могут играть роль в этиологии или патогенезе заболевания. В качестве альтернативы, конъюгаты по изобретению могут содержать терапевтические белки

или комплексы белок/нуклеиновая кислота, такие как комплекс **Cas9-РНК**, способный осуществлять редактирование генов.

Согласно воплощениям данного изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемые носитель(ли) или соль(ли). Согласно некоторым воплощениям конъюгаты и фармацевтические композиции по данному изобретению можно использовать *in vivo* у живого субъекта, включая клиническую ситуацию.

Другие воплощения данного изобретения включают конъюгаты по изобретению или фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты по изобретению, для применения для лечения медицинских расстройств у пациента, нуждающегося в этом. Другие воплощения данного изобретения включают применение конъюгатов по изобретению в получении фармацевтических композиций для лечения медицинских расстройств у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых воплощениях данное медицинское расстройство представляет собой рак, метаболическое заболевание, инфекционное заболевание, дегенеративное заболевание, сосудистое заболевание или иммуноопосредованное заболевание.

Конъюгат согласно воплощениям данного изобретения может быть полезным в улучшении доставки миРНК, дмиРНК, АСО или терапевтического белка, такого как антитело, через клеточные мембраны или через биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), по сравнению с эффективностью таких же терапевтических агентов без группировок E, E' или E'' по изобретению. Таким образом, конъюгаты по изобретению могут улучшать эффективность макромолекулярного лекарственного средства в одном или более чем одном аспекте, как, например, эффективность, токсичность или фармакокинетику.

Конъюгаты по изобретению, в которых группировки **D** представляют собой олигонуклеотиды, могут быть синтезированы, неограничивающим образом, согласно следующему способу: исходно выбирается ген, подлежащий сайленсингу, на основе его роли в этиологии или патогенезе заболевания. Затем на основе методологий биоинформатики, как известно в данной области, разрабатываются и определяются нуклеотидные последовательности, подлежащие включению в конъюгат [типично 19-21 пар оснований двухцепочечной миРНК для субстрата RISC или 24-29 пар оснований двухцепочечной РНК для субстрата дайсер (дмиРНК)]. Синтез проводится в направлении от 3' к 5' олигонуклеотида.

Применяется твердофазный синтез с использованием защищенных строительных блоков, полученных из защищенных 2'-дезоксинуклеозидов (dA, dC, dG и dT), рибонуклеозидов (A, C, G и U) или химически модифицированных нуклеозидов, например, [ЗНК (запертые нуклеиновые кислоты) или МНК (мостиковые нуклеиновые кислоты)]. Строительные блоки предоставляются в виде нуклеозидных предшественников, в которых 5' и 3'-гидроксильные группы защищаются DMT и фосфорамидитом соответственно. Данные группы последовательно удаляются во время реакций связывания нуклеотидов с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, который определяется желательной нуклеотидной последовательностью.

С целью синтеза конъюгатов по изобретению группы E предоставляются в виде молекул-предшественников, причем каждая представляет собой группировку E, E' или E'' по изобретению, связанную с защитной группой, как описано выше. В то время как защитная группа может представлять собой любую защитную группу гидроксила, известную в данной области, в синтезе олигонуклеотидов традиционно используются фосфорамидит и DMT [диметокситритил-бис-(4-метоксифенил)фенилметил]. Главным преимуществом конъюгатов по настоящему изобретению является то, что они предоставляют, как описано для **Формул (IVa) и (IVc)** выше, возможность связывания группировок E, E' или E'' либо с 5'-концом олигонуклеотидной нити, либо с 3'-концом олигонуклеотидной нити, либо во внутреннем положении вдоль олигонуклеотида. Посредством этого, группировки E по изобретению могут стать интегрированными в пределы олигонуклеотидной цепи, аналогично любому собственному природному олигонуклеотидному строительному блоку. По завершению сборки цепи продукт высвобождается от твердой подложки в раствор, с него снимают защиту и собирают. Желательный конъюгат затем выделяют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с получением желательного конъюгата по изобретению с высокой чистотой. В случае миРНК или дмиРНК каждая из комплементарных нитей РНК синтезируется отдельно, и затем осуществляется отжиг двух нитей в стандартных условиях, как известно в данной области, с получением желательной двухцепочечной миРНК или дмиРНК, которые затем подвергаются очистке и аликвотированию.

В одном воплощении данного изобретения согласно нему предложен способ доставки лекарственных средств через фосфолипидные биологические мембраны, выбранные из группы, состоящей из клеточных мембран и биологических барьеров, где указанные биологические барьеры выбраны из

гематоэнцефалического барьера, гематоофтальмического барьера или гематофетального барьера, причем данный способ включает приведение клеток в контакт с конъюгатом по изобретению.

5 В одном воплощении данного изобретения согласно нему предложен способ доставки лекарственного средства в биологические клетки, где указанные клетки находятся в культуре, или в живое животное, или человеческому субъекту; причем данный способ включает приведение клеток в контакт с конъюгатом или с фармацевтической композицией, которая содержит конъюгат по изобретению.

10 В одном воплощении данного изобретения согласно нему предложен конъюгат по изобретению, или фармацевтическая композиция, которая включает конъюгат согласно **Формуле (I)**, в котором каждый E, E' или E'' независимо имеет структуру, как изложено в любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc''), (Vc''')** или **(Vc''')**.

15 Данное изобретение также включает способы специфичного ингибирования экспрессии генов *in vitro* или *in vivo*. В одном воплощении изобретения данный способ может включать применение конъюгата по любой из **Формул (I), (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc''), (Vc''')**, **(Cn-1), (Cn-2), (Cn-3), (Cn-4), (Cn-5), (Cn-6), (Cn-7), (Cn-8), (Cn-9), (Cn-10), (Cn-11), (Cn-12), (Cn-13), (Cn-14)**, или **(Cn-15)**, или фармацевтической композиции, которая
20 включает указанный конъюгат, где D, представляющее собой миРНК, дмиРНК или АСО, разработано для осуществления сайленсинга экспрессии специфического гена. В некоторых воплощениях данный ген кодирует патогенный белок, который играет роль в этиологии или патогенезе заболевания. В некоторых воплощениях D представляет собой терапевтический белок.

25 В еще одном другом воплощении данного изобретения согласно нему неограничивающим образом предложен способ индукции *эндоцитоза* или движения по типу «*флип-флоп*» в пределах биологической мембраны; причем указанный способ включает приведение в контакт конъюгата по изобретению или фармацевтической композиции, которая включает указанный конъюгат, с
30 биологической мембраной, где данный конъюгат содержит дуплекс миРНК или дмиРНК, связанный на двух из его концов и потенциально также во внутреннем положении в пределах дуплекса миРНК, с группировками E, E' или E'', где каждая имеет структуру, как изложено в любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc''), (Vc''')** или **(Vc''')**. Из-за структуры конъюгата по изобретению миРНК достигает мембраны параллельно ее поверхности, с группировками E, E' или E'', ориентированными к центру мембраны,
35

перпендикулярно ее поверхности (продемонстрировано на **Фиг. 1**). Образующаяся в результате вынужденная близость сильно отрицательно заряженной РНК с поверхностью мембраны может индуцировать образование мембранных везикул в пределах клетки (*эндосомы*, генерированные *эндоцитозом*) и также движение конъюгата из одного листка мембраны в другой (*флип-флоп*). Оба процесса могут быть весьма полезными для инициации и/или распространения трансмембранной доставки миРНК или других макромолекулярных лекарственных средств по данному изобретению в клетку.

Конъюгаты согласно воплощениям данного изобретения можно использовать для лечения медицинского расстройства. Воплощения данного изобретения включают способы медицинского лечения, включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат согласно любой из **Формул (I), (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc'''), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3), (Cn-4), (Cn-5), (Cn-6), (Cn-7), (Cn-8), (Cn-9), (Cn-10), (Cn-11), (Cn-12), (Cn-13), (Cn-14)**, или **(Cn-15)**; где D представляет собой полезное лекарственное средство для лечения соответствующего медицинского расстройства.

В одном воплощении данный способ служит для генетического медицинского лечения с использованием миРНК, дмиРНК или АСО; причем указанный способ включает введение нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по изобретению согласно любой из **Формул (I), (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc'''), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3), (Cn-4), (Cn-5), (Cn-6), (Cn-7), (Cn-8), (Cn-9), (Cn-10), (Cn-11), (Cn-12), (Cn-13), (Cn-14)** или **(Cn-15)**; где D представляет собой миРНК, дмиРНК или АСО, или терапевтический белок, полезный в ингибировании экспрессии гена или блокировании активности белка, который играет роль в заболевании конкретного пациента.

В другом воплощении изобретения данное изобретение включает способ медицинского лечения заболевания конъюгатом по изобретению согласно любой из **Формул (I), (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc'''), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3), (Cn-4), (Cn-5), (Cn-6), (Cn-7), (Cn-8), (Cn-9), (Cn-10), (Cn-11), (Cn-12), (Cn-13), (Cn-14)** или **(Cn-15)**; где D представляет собой миРНК, дмиРНК или АСО, или терапевтический белок, который должен быть доставлен через биологические фосфолипидные мембраны в клетки или через биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер. Указанные

клетки представляют собой либо клетки в культуре *in vitro*, либо клетки в живом животном или человеческом субъекте *in vivo*. В некоторых воплощениях данная клетка представляет собой неопластическую клетку. В некоторых воплощениях данная неопластическая клетка представляет собой опухолевую клетку. В некоторых воплощениях данная неопластическая клетка представляет собой клетку в пределах метастаза. Данная клетка может представлять собой эукариотическую клетку, эукариотическую клетку, трансфицированную онкогенным агентом, человеческую клетку, клетку, которая представляет собой предраковую клетку, или их любую комбинацию. Данная клетка может находиться *in vitro*, т.е. в культуре клеток, *ex vivo*, а именно: отобранной из живого субъекта, или *in vivo*, а именно: в живом животном или человеческом субъекте.

В еще одном другом воплощении данного изобретения **D** представляет собой белок, вводимый в качестве заместительной терапии, например, для замены мутировавшего, неправильно функционирующего белка, таким образом, удовлетворяя физиологическую потребность. В другом воплощении **D** представляет собой белок, который играет роль в регуляции генов, включая, среди прочих, белки, которые играют роль в редактировании ДНК или РНК (добавление, нарушение или изменение последовательности специфических генов). В одном воплощении указанный белок может представлять собой члена белков, родственных CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками). В частности, указанный белок может представлять собой белок **Cas9** (белок 9, ассоциированный с CRISPR), направляемый РНК ДНК-нуклеазный фермент или его аналог, потенциально загруженный его направляющей олигонуклеотидной последовательностью.

В одном из воплощений данного изобретения описывается способ генетического лечения медицинского расстройства, где указанный способ включает введение нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат согласно любой из **Формул (I), (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc'''), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3), (Cn-4), (Cn-5), (Cn-6), (Cn-7), (Cn-8), (Cn-9), (Cn-10), (Cn-11), (Cn-12), (Cn-13), (Cn-14)** или **(Cn-15)**; где **D** представляет собой белок CRISPR, такой как **Cas9**, вводимый совместно с подходящим направляющим олигонуклеотидом, таким образом, достигая доставки белка, загруженного соответствующим направляющим олигонуклеотидом, в клетки, где белок CRISPR может оказывать его активность по редактированию генома. Направляющий олигонуклеотид в данном контексте представляет собой последовательность РНК

или ДНК, которая направляет белок **Cas9** в специфический локус (место) на геномной ДНК для того, чтобы индуцировать двухнитевое расщепление ДНК в данном сайте, таким образом, обеспечивая репарацию местного дефекта в генетическом материале. В случае **Cas9** направляющий олигонуклеотид
5 представляет собой короткий отрезок РНК, последовательность которого является комплементарной последовательности целевого локуса ДНК.

Следовательно, конъюгаты согласно воплощениям данного изобретения и соответствующие фармацевтические композиции, а также соответствующие способы могут быть полезными, среди прочего, в лечении медицинских
10 расстройств, выбранных, среди прочих, из рака, токсических инсультов, метаболического заболевания, ишемического заболевания, инфекционного заболевания, сосудистых расстройств, белковых заболеваний накопления, травмы, иммуноопосредованного заболевания или дегенеративных заболеваний.

Следовательно, в одном воплощении данного изобретения согласно нему
15 предложен способ лечения медицинского расстройства, включающий введение нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат согласно любой из Формул (I), (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'') или (Vc'''), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3), (Cn-4), (Cn-5), (Cn-6), (Cn-7), (Cn-8), (Cn-9),
20 (Cn-10), (Cn-11), (Cn-12), (Cn-13), (Cn-14) или (Cn-15); где D представляет собой полезное лекарственное средство для лечения данного медицинского расстройства.

Согласно некоторым воплощениям данное медицинское расстройство представляет собой рак. Термин «рак» в том виде, в котором он используется в
25 данном документе, относится к присутствию клеток, которые демонстрируют характеристики, которые являются типичными для клеток, вызывающих рак, такие как неконтролируемая пролиферация, потеря специализированных функций, бессмертие, значительный метастатический потенциал, значительное увеличение антиапоптозной активности, высокая скорость роста и пролиферации или
30 некоторая характерная морфология и клеточные маркеры, которые, как известно, ассоциированы с раком. Типично раковые клетки находятся в виде опухоли, либо существующей местно в животном, либо циркулирующей в кровотоке в виде независимых клеток, как, например, лейкозные клетки.

В области неврологических расстройств конъюгаты согласно воплощениям
35 данного изобретения могут быть полезными, среди прочего, в лечении нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, заболевание

моторных нейронов, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, рассеянный склероз и болезнь Крейтцфельда-Якоба.

В области инфекционных расстройств конъюгаты согласно воплощениям данного изобретения могут быть полезными, среди прочего, для доставки 5 антибиотиков для борьбы с бактериальными, грибковыми или другими паразитарными инфекциями; или для доставки противовирусных средств для борьбы с вирусными инфекциями. Соответственно, конъюгаты по данному изобретению могут иметь противоинфекционные свойства, таким образом, будучи полезными для лечения инфекционных заболеваний, таких как бактериальные или 10 вирусные инфекции. Примерами вирусных инфекций, для которых могут быть полезными конъюгаты по данному изобретению, являются, без ограничения, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); гепатотропные вирусы, такие как вирус гепатита С (HCV) или вирус гепатита В (HBV); инфекция ортомиксовирусами, такими как вирус гриппа А, вирус гриппа В или вирус гриппа С; или инфекции вирусами парагриппа. Соответственно, одним воплощением данного изобретения является 15 конъюгат группировки (или группировок) E, E' или E'', связанной с противовирусным или антибактериальным лекарственным средством. Такое лекарственное средство, среди прочих, может представлять собой генетическую(кие) последовательность(ти), нацеленную(ные) на взаимодействие с 20 генетическим материалом инфекционного агента, таким образом, мешая мешая генетическим процессам, которые играют роль в репликации, метаболизме, заразности или выживании указанного патогена. Такие генетические последовательности могут представлять собой миРНК или дмиРНК, специально разработанные для осуществления сайленсинга экспрессии вирусных генов.

25 Ценность конъюгатов по данному изобретению в борьбе с инфекцией может заключаться по меньшей мере в одном из следующих применений: либо в доставке терапевтически полезных агентов через биологические мембраны в клетки хозяина (например, пациента-человека); либо через биологические мембраны в клетки патогена (например, бактерии или вируса).

30 В области метаболических расстройств конъюгаты согласно воплощениям данного изобретения могут быть полезными, среди прочего, для доставки генетических средств лечения, нацеленных на понижающую регуляцию экспрессии гена или генов, ответственных за указанное метаболическое расстройство, или для введения белка для замены дефектного мутировавшего белка, который играет 35 роль в этиологии или патогенезе заболевания.

В других воплощениях данное изобретение относится к применению соединений по изобретению для усиления доставки химических соединений через фосфолипидные мембраны в клетки растений, таким образом, будучи полезным для применений в сельском хозяйстве. В зависимости от присоединенного химического соединения и желательного показания, такая доставка может иметь разные полезные применения в сельском хозяйстве. Например, такая доставка в растения может помогать улучшению качества и количества урожая, среди прочего, посредством улучшения генетики растения или посредством искоренения разных насекомых, бактерий или грибов.

10

ПРИМЕРЫ

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

15

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

20

Исходно выбирают ген, подлежащий сайленсингу, на основе его роли в этиологии или патогенезе заболевания. Затем на основе методологий биоинформатики, известных в данной области, разрабатываются и определяются нуклеотидные последовательности, подлежащие включению в конъюгат [типично двухцепочечная миРНК из 19-21 пар оснований для субстрата RISC или двухцепочечная миРНК из 24-29 пар оснований для субстрата дайсер (дмиРНК)].

25

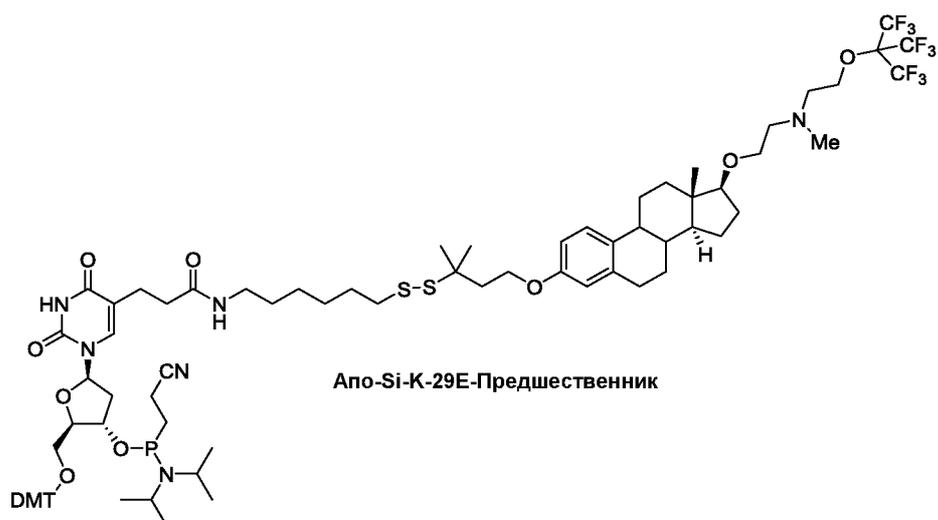
Синтез олигонуклеотида проводится в направлении от 3' к 5'. Применяется твердофазный синтез с использованием защищенных строительных блоков, полученных из защищенных 2'-дезоксинуклеозидов (dA, dC, dG и dT), рибонуклеозидов (A, C, G и U) или химически модифицированных нуклеозидов, например, [ЗНК (запертые нуклеиновые кислоты) или МНК (мостиковые нуклеиновые кислоты)]. Данные строительные блоки предоставляются в виде предшественников нуклеозидов, в которых 5'- и 3'-гидроксильные группы защищаются DMT и фосфорамидитом соответственно. Данные группы последовательно удаляются во время реакций связывания нуклеотида с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, определяемом желательной нуклеотидной последовательностью.

30
35

С целью синтеза конъюгатов по изобретению группы E предоставляются в виде молекул-предшественников, причем каждая представляет собой группировку E, E' или E'' по изобретению, связанную с защитной группой, как описано выше. В то время как защитной группой может быть любая защитная группа для гидроксила, известная в данной области, в синтезе олигонуклеотидов традиционно используются фосфорамидит и DMT [диметокситритил-бис-(4-метоксифенил)фенилметил]. Главным преимуществом конъюгатов по настоящему изобретению является то, что они предоставляют возможность, как описано в **Формулах (IVa) и (IVc)** выше, связывания группировок E, E' или E'' либо с 5'-концом олигонуклеотидной нити, либо с 3'-концом олигонуклеотидной нити, либо во внутреннем положении вдоль олигонуклеотида. Посредством этого, группировки E по изобретению могут становиться интегрированными в олигонуклеотидную цепь, аналогично любому собственному, природному олигонуклеотидному строительному блоку. При завершении сборки цепи данный продукт высвобождается от твердой подложки в раствор, с него снимается защита, и его собирают. Желательный конъюгат затем выделяют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с получением желательного конъюгата по изобретению с высокой чистотой. В случае миРНК или дмиРНК каждая из комплементарных цепей РНК синтезируется отдельно, и затем осуществляется отжиг двух нитей в стандартных условиях, как известно в данной области, с получением желательной двухцепочечной миРНК или дмиРНК, которая затем подвергается очистке и аликвотированию.

Пример 2: способы химического синтеза молекул-предшественников, содержащих группировки E, E' или E'' по изобретению

Пример 2а: синтез Апо-Si-K-29E-предшественника:



2aA. Синтез фенола 2:

- 5 Обрабатывали эстрадиол бензилбромидом и карбонатом калия в смеси ацетонитрила и метанола. Метанол использовали в качестве соразтворителя для облегчения растворимости, что приводило к полному и чистому превращению. После фильтрования и концентрирования фильтрата неочищенный продукт (2) использовали на следующей стадии.

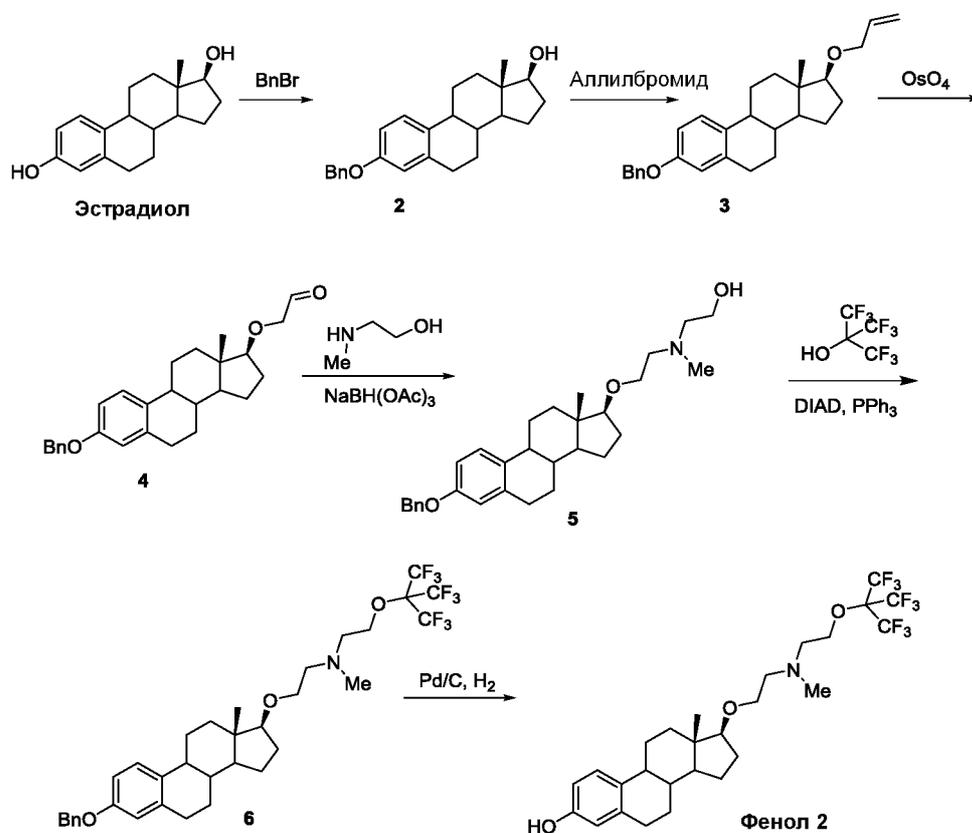


Схема 1. Синтез фенола 2

Соединение 2 обрабатывали избытком гидрида натрия, с последующим добавлением аллилбромида, что приводило к чистому превращению до соединения 3. Обработка аллильного производного 2 OsO₄ и NaIO₄ давала альдегид 4. Восстановительное аминирование между альдегидом 4 и N-метиламиноэтанолом давало спирт 5, который затем взаимодействовал при условиях Митсунобу с перфтор-*трет*-BuOH, приводя к соединению 6. Наконец удаляли бензильную защитную группу посредством гидрогеизации с получением фенола 2.

10 **2aA1. (8R,9S,13S,14S,17S)-3-Бензилокси-17-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен (2)**

Смесь эстрадиола (2, 300 г, 1,1 моль), бензилбромида (200 мл, 1,68 моль) и карбоната калия (304 г, 2,2 моль) в ацетоне (2 л) и MeOH (0,5 л) нагревали с обратным холодильником в течение 18 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Концентрат растворяли в горячем толуоле и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество (соединение 2, 508 г) использовали как таковое в следующей реакции.

20 **2aA2. (8R,9S,13S,14S,17S)-17-аллилокси-3-бензилоксиэстра-1,3,5(10)-триен (3)**

Гидрид натрия (110 г, 60%-ная дисперсия в минеральном масле, 2,7 моль) добавляли порциями в раствор неочищенного спирта 3 (508 г, примерно 1,1 моль) в безводном THF (тетрагидрофуран) (4 л). Примерно через 30 мин добавляли аллилбромид (240 мл, 2,7 моль) и тетрабутиламмония йодид (40 г, 108 ммоль), и образующуюся смесь нагревали с обратным холодильником в течение примерно 18 часов. Реакционной смеси давали охладиться до комнатной температуры, тщательно гасили водой (1 л), и смесь частично концентрировали. Данную смесь растворяли в EtOAc (1,5 л) и промывали водой (3 × 500 мл). Органическую фазу промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением для следующей стадии неочищенного соединения 3 (550 г, 1,36 моль) с достаточной чистотой.

2aA3. 2-(((13S,17S)-3-(Бензилокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-17-ил)окси)ацетальдегид (4)

В раствор соединения **3** (2,0 г, 5,0 ммоль) в диэтиловом эфире (30 мл) и воде (30 мл) добавляли 2,6-лутидин (1,33 г, 12,4 ммоль), периодат натрия (4,26 г, 20 ммоль) и 2,5%-ный раствор OsO₄ в tBuOH (2 мл). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Фазы разделяли, и водный слой дважды экстрагировали диэтиловым эфиром. Объединенные органические слои промывали водным насыщенным тиосульфатом натрия и рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Дальнейшая очистка давала альдегид **4** (1,51 г, 3,7 ммоль) в виде прозрачного масла с 75%-ным выходом.

2aA4. 2-((2-(((13S,17S)-3-(бензилокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-17-ил)окси)этил)(метил)амино)этан-1-ол (5)

В раствор соединения **4** (2,0 г, 4,9 ммоль) в дихлорметане (100 мл) добавляли 2-(метиламино)этан-1-ол (0,79 мл, 9,8 ммоль, 2 экв.), и образующуюся смесь перемешивали в течение 15 минут. Затем добавляли AcOH (0,56 мл, 9,8 ммоль, 2 экв.), и данную смесь перемешивали в течение еще 10 минут. Добавляли NaBH(OAc)₃ (4,2 г, 19,6 ммоль, 4 экв.), и образующуюся смесь перемешивали в течение ночи. Добавляли NaOH (1 M, 400 мл), данную смесь встряхивали, и слои разделялись. Водный слой экстрагировали EtOAc (2×, 300 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением соединения **5** (2,4 г, 4,9 ммоль, с количественным выходом).

2aA5. 2-(((13S,17S)-3-(бензилокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-17-ил)окси)-N-(2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)-N-метилэтан-1-амин (6)

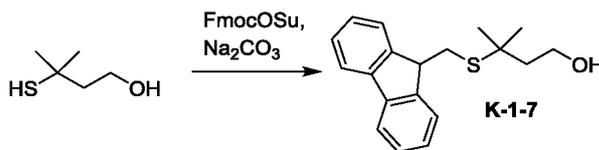
В раствор спирта **5** (2,4 г, 5 ммоль) в тетрагидрофуране (THF) (100 мл) добавляли перфтор-*трет*-бутанол (0,93 мл, 6,5 ммоль, 1,3 экв.), PPh₃ (2,1 г, 8,0 ммоль, 1,6 экв.) и диизопропилазодикарбоксилат (DIAD) (1,3 мл, 6,5 ммоль, 1,3 экв.), и образующуюся смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Данную смесь концентрировали, и неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией (20% EtOAc/гептан плюс 1% NEt₃) с получением соединения **6** в виде бесцветного масла, которое медленно отверждалось (2,1 г, 3,1 ммоль, 62%).

2aA6. (13S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ол (Фенол 2)

Соединение 6 (7,5 г, 11,0 ммоль) растворяли в этилацетате (EtOAc, 150 мл) и добавляли 10% Pd/C (900 мг ABCR плюс 900 мг Merck). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов под атмосферой водорода с давлением 500 кПа. Суспензию фильтровали через тонкий слой целита и концентрировали. **Фенол 2** (5,7 г, 9,6 ммоль) выделяли в виде бесцветного масла.

10 **2aB. Синтез K-1-7:**

Для дальнейшей дериватизации **фенола 2** требовался строительный блок **K-1-7**. Данное соединение получали присоединением флюоренильной группы с использованием 9-флюоренилметил-N-сукцинимидилкарбоната (FmocOSu) с тиолом, используя основные условия.



15

Схема 2. Синтез K-1-7.

(((9H-Флюрен-9-ил)метилтио)-3-метилбутан-1-ол (K-1-7):

К суспензии 3-метил-3-тиобутанола (13,6 г, 113 ммоль) и карбоната натрия (24 г, 340 ммоль) в N,N-диметилформамиде (DMF) (300 мл) добавляли FmocOSu (25,2 г, 75,4 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 2 часов при 40°C, затем охлаждали до комнатной температуры. Добавляли этилацетат (200 мл) и гептан (400 мл), и данную смесь промывали водой (3 × 200 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (30% этилацетата (EtOAc в гептане)) давала соединение **K-1-7** в виде вязкого масла с выходом 76%.

25

2aC. Синтез K-29U:

Синтез строительного блока **K-29U** проводили, как показано на схеме 3:

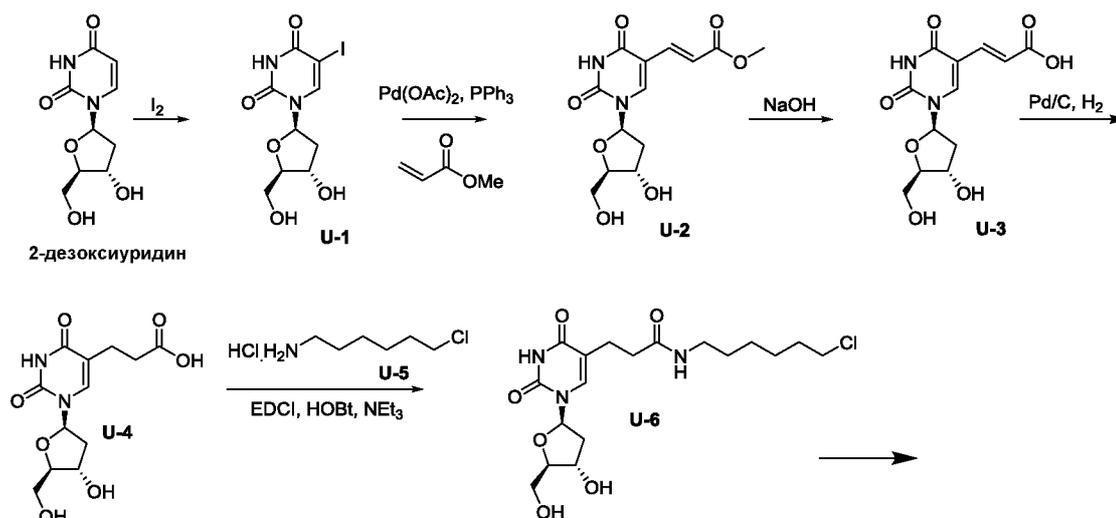


Схема 3. Синтез **K-29U**

2-Дезоксиуридин обрабатывали I_2 в присутствии HNO_3 с получением
 5 йодпроизводного дезоксиуридина **U-1**. Йодид **U-1** связывали с метакрилатом с
 использованием реакции Хека с получением сложного метилового эфира **U-2**
 после очистки колоночной хроматографией. Данный сложный метиловый эфир **U-2**
 гидролизировали $NaOH$, и образующееся соединение **U-3** гидрогенизировали с
 использованием Pd/C и H_2 с получением промежуточного соединения **U-4**.
 10 Промежуточные соединения **U-4** и **U-5** (имеющиеся в продаже) связывали с
 использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI) в качестве
 связывающего реактива с получением хлорида **U-6**. Хлорид **U-6** обрабатывали
 тиотозилатом калия при повышенных температурах с получением строительного
 блока **K-29U**.

15

2aC1. 1-((2R,4S,5R)-4-Гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-5-йодпиримидин-2,4(1H,3H)-дион (U-1):

2-Дезоксиуридин (15 г, 66 ммоль) и I_2 (19 г, 73 ммоль, 1,1 экв.) растворяли в
 смеси $CHCl_3$ (750 мл) и HNO_3 (водн., 1 М, 150 мл), и образующуюся пурпурную
 20 смесь перемешивали с обратным холодильником в течение 5 часов, после чего
 образовался осадок. Данную смесь охлаждали – сперва воздухом, затем в бане со
 льдом. Охлажденную смесь фильтровали, и осадок промывали холодным $CHCl_3$.
 Твердые вещества собирали и сушили под вакуумом с получением йодида **U-1** в
 виде беловатого твердого вещества (20 г, 57 ммоль, 86%).

25

2aC2. Метил-(E)-3-(1-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)акрилат (U-2):

Йодид U-1 (5,2 г, 15 ммоль) растворяли в DMF (100 мл) и добавляли в
5 данную смесь ТЕА (4,1 мл, 29,4 ммоль, 2 экв.), метилакрилат (8,0 мл, 88,2 ммоль, 6 экв.), PPh₃ (0,77 г, 2,9 ммоль, 0,2 экв.) и ацетат палладия (0,33 г, 1,5 ммоль, 0,1 экв.). Образующуюся смесь перемешивали при 100°C в течение 4 часов. Данную
реакционную смесь фильтровали через целит, и фильтрат концентрировали. Неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией (10% MeOH в
10 CH₂Cl₂) с получением акрилата U-2 (4,0 г, 13 ммоль, 87%) в виде оранжевого масла, которое медленно кристаллизовалось.

2aC3. (E)-3-(1-((2R,4S,5R)-4-Гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)акриловая кислота (U-3):

Акрилат U-2 (5,0 г, 16 ммоль) растворяли в NaOH (водн., 2M, 60 мл), и образующуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Данную смесь охлаждали до 0°C и добавляли HCl (37%), пока данная смесь не достигала примерно pH 1 (при измерении посредством индикаторной бумаги).
20 Данную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, после чего образовался осадок. Твердые вещества собирали фильтрованием и переносили во флакон. Неочищенное вещество совместно выпаривали с толуолом дважды с получением неочищенного продукта U-3 (присутствовало много воды) в виде беловатого слегка коричневатого твердого вещества (3,3 г, 11 ммоль, 69%).

25

2aC4. 3-(1-((2R,4S,5R)-4-Гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)пропановая кислота (U-4)

Неочищенную карбоновую кислоту U-3 (28,6 г, 96 ммоль) растворяли в H₂O (500 мл). Добавляли NaOH (10 мл, 10 M), пока все не растворялось. Добавляли
30 Pd/C (10%, 3 г), и данную смесь перемешивали под давлением H₂ 500 кПа в течение ночи. Данную смесь фильтровали через целит и концентрировали с получением желтого масла (50 г). Поскольку данная смесь содержала соли, ее растворяли в минимальном количестве H₂O (общий объем 130 мл) и подкисляли до приблизительно pH 2 (индикаторная бумага). Неочищенную смесь обессоливали с
35 использованием хроматографии с обращенной фазой. Фракции, содержащие

продукт, объединяли, концентрировали и лиофилизировали с получением карбоновой кислоты **U-4** (10 г, 33 ммоль, 35%) в виде пушистого белого твердого вещества.

5 **2aC5. N-(2-(3-Хлорпропокси)этил)-3-(1-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)пропанамид (U-6)**

В раствор уридинового производного карбоновой кислоты **U-4** (5,5 г, 18,4 ммоль) и амина **U-5** (3,2 г, 18,4 ммоль) в 350 мл DMF добавляли TEA (10,3 мл, 73,5 ммоль, 4 экв.), HOBT (3,1 г, 20,2 ммоль, 1,1 экв.) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDCI, 3,9 г, 20,2 ммоль, 1,1 экв.).
10 Образующуюся суспензию перемешивали в течение 5 суток при комнатной температуре, после чего большинство вещества растворялось. Данную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенную смесь очищали колоночной
15 хроматографией [7-8% MeOH в дихлорметане (DCM) с получением амида **U-6** (7,2 г, 17 ммоль, 93%) в виде желтого/оранжевого масла, которое медленно отверждалось.

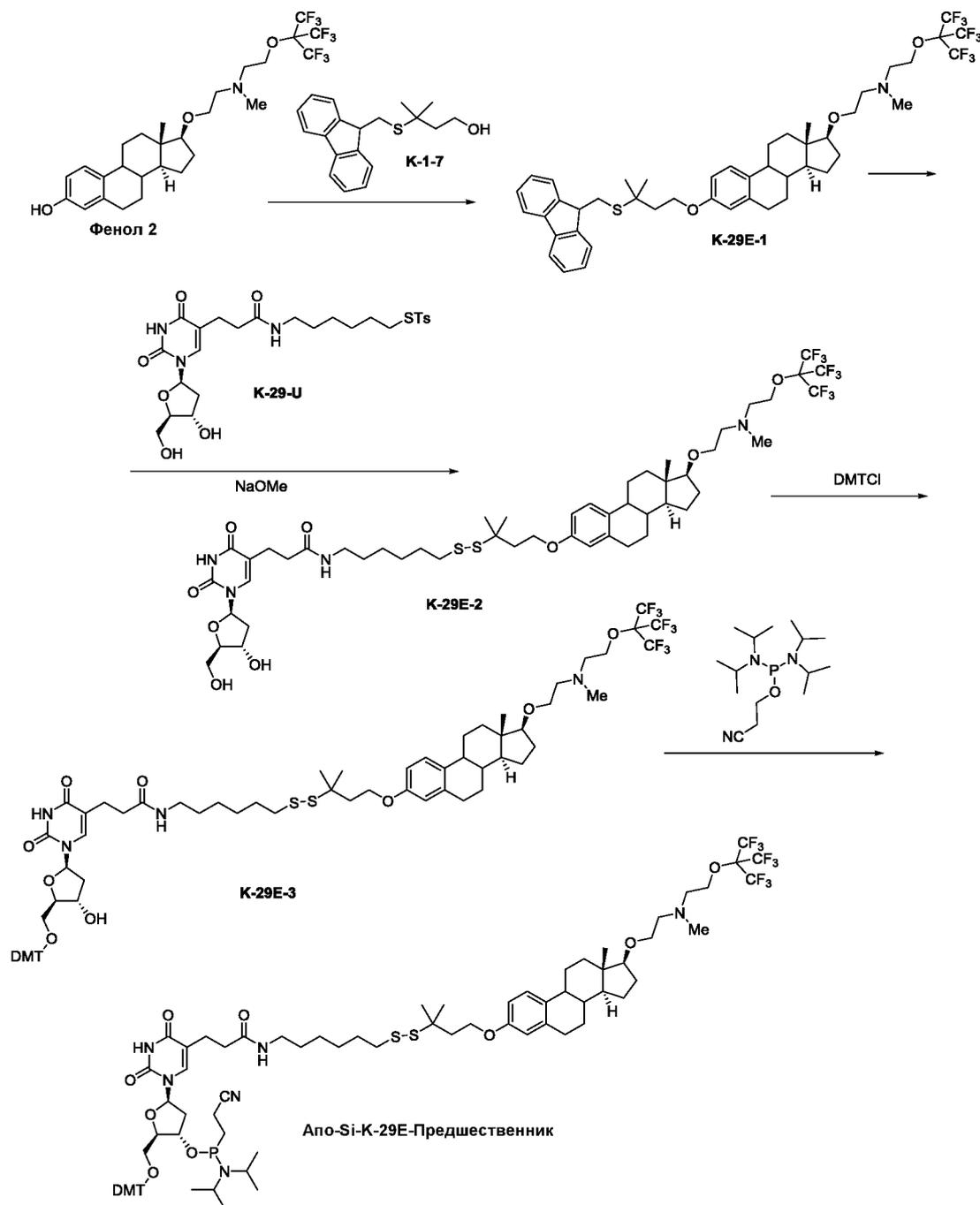
20 **2aC8. S-(3-(2-(3-(1-((2R,4S,5R)-4-Гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)пропанамидо)этокси)пропил)4-метилбензолсульфонотиоат (K-29U)**

Хлорид **U-6** (3,6 г, 8,6 ммоль) растворяли в DMF (100 мл) и добавляли TBAI (0,32 г, 0,86 ммоль) и толуолтиосульфонат калия (2,9 г, 12,9 ммоль).
25 Образующуюся смесь перемешивали в течение 40 часов при 80°C. Данную смесь концентрировали в вакууме. Добавляли EtOAc (500 мл) и H₂O (300 мл), и слои разделялись. Органический слой промывали рассолом. Объединенные водные слои экстрагировали EtOAc (4 × 250 мл). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенную смесь очищали с использованием
30 колоночной хроматографии (3-7% MeOH в дихлорметане (DCM)) с получением тиотозилата **K-29U** (1,75 г, 3,1 ммоль, 36%) в виде липкого твердого вещества.

2aD. Завершение синтеза Апо-Si-K-29E-предшественника:

35 **Фенол 2** и строительный блок **K-1-7** связывали при условиях Митсунобу с получением защищенного тиола **K-29E-1**. Флюоренильную группу можно удалять *in situ* посредством NaOMe в присутствии **K-29U** с получением дисульфида **K-29E-2**.

Группу DMT присоединяли с использованием стандартной фосфорамидатной группировки с использованием стандартных методик, как известно в данной области.



5

Схема 4. Синтез **Апо-Si-K-29E-Предшественника**

2aD1. 2-(((13S,14S,17S)-3-(3-(((9H-Флюорен-9-ил)метил)тио)-3-метилбутокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-

циклопента[а]фенантрен-17-ил)окси)-N-(2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)-N-метилэтан-1-амин (K-29E-1)

К раствору фенола 2 (1,47 г, 2,5 ммоль) в THF (40 мл) добавляли спирт K-1-7 (1,48 г, 5,0 ммоль), трифенилфосфин (0,91 г, 3,5 ммоль) и диизопропилазодикарбоксилат (0,6 мл, 2,9 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. После концентрирования данную смесь дополнительно очищали с использованием флэш-хроматографии (20% EtOAc и 1% Et₃N в гептанах) с получением K-29E-1 (1,5 г, 1,7 ммоль) в виде прозрачного масла с 67%-ным выходом.

10

2aD2. N-(6-((4-(((13S,14S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)-3-(1-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)пропанамид (K-29E-2)

15

Раствор соединения K-29E-1 (1 экв.) и тозилата K-29U (1,5 экв.) в дихлорметане обрабатывали 2 М NaOMe в MeOH (4 экв.). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Мутную суспензию промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии давала соединение K-29E-2.

20

2aD3. 3-(1-((2R,4S,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-N-(6-((4-(((13S,14S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)пропанамид (K-29E-3)

25

К раствору K-29E-2 (1 экв.) в пиридине добавляли DMT-Cl (2 экв.) и DMAP (0,1 экв.), образующуюся смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего данную смесь концентрировали. Остаток очищали с использованием колоночной хроматографии с получением соединения K-29E-3.

30

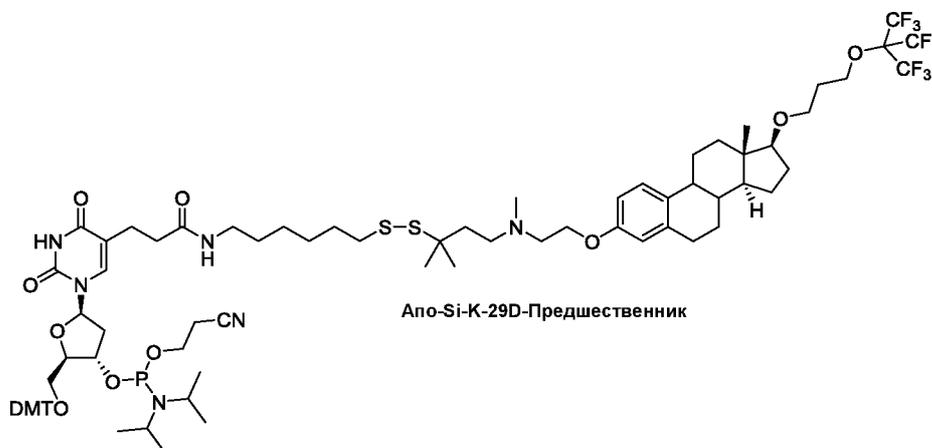
2aD4. 3-(1-((2R,4S,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-(((2-цианоэтил)(диизопропиламино)фосфанил)окси)тетрагидрофуран-2-ил)-

35

2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-N-(6-((4-(((13S,14S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)пропанамид Апо-Si-K29E-Предшественник)

К раствору соединения **К-29E-3** (1 экв.) в дихлорметане добавляли 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидит (1,3 экв.), с последующим добавлением по каплям 0,5 М раствора *N*-метилморфолина и 0,25 М трифторуксусной кислоты в дихлорметане (1,3 эквивалента *N*-метилморфолина в фосфородиамидитный агент). Образующуюся смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем гасили водным насыщенным бикарбонатом натрия, и продолжали перемешивание в течение еще 10 минут. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии давала соединение **Апо-Si-K-29E-Предшественник**.

Пример 2б: синтез Апо-Si-K-29D-Предшественника:



20

2bA. Синтез фенола 1:

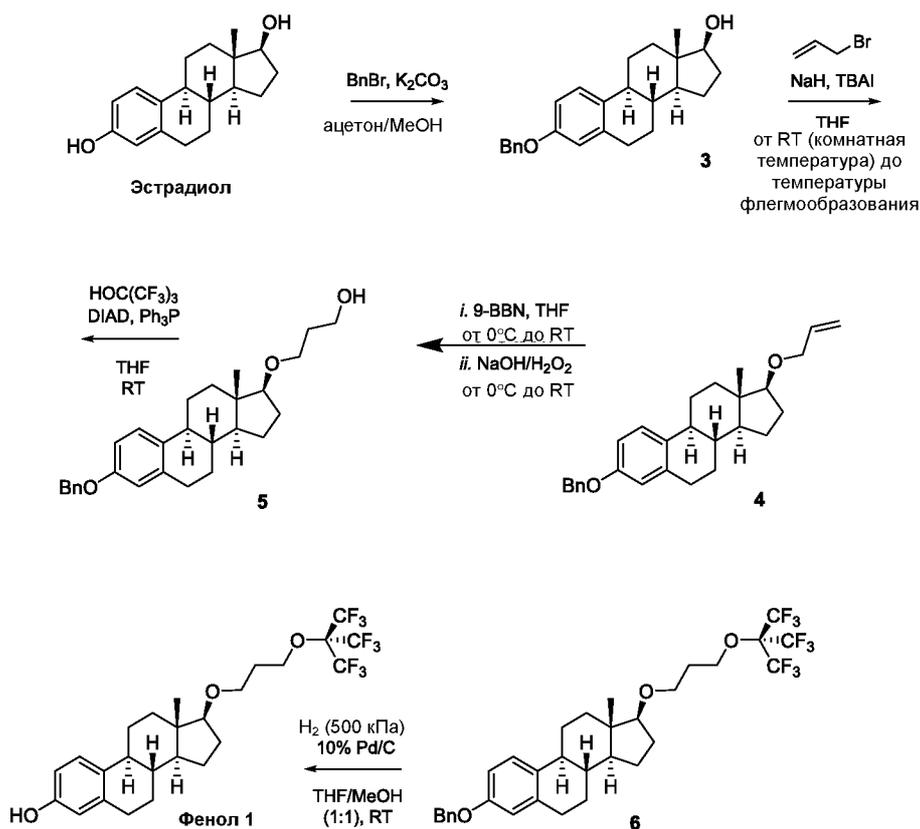


Схема 1. Синтез фенола 1

- 5 Эстрадиол обрабатывали избытком гидрида натрия, с последующим добавлением аллилбромид, что приводило к чистому превращению до соединения 3. Последующее гидроборирование 1,5 эквивалентами 9-BBN приводило единственно к терминальной гидроксильной группе, тогда как гидроборирование BH_3 являлось значительно менее селективным и давало смесь аддуктов. Спирт 5 подвергали условиям реакции Митсунобу для связывания его с перфторированным *трет*-бутанолом с получением соединения 6. Гидрогенолиз бензильной группы соединения 6 давал фенол 1. В заключение, фенол 1 получали из эстрадиола посредством 5 стадий синтеза с общим выходом 45%.

15 **2aA1. (8R,9S,13S,14S,17S)-3-Бензилокси-17-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен (2):**

Синтез (8R,9S,13S,14S,17S)-3-бензилокси-17-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триена (2) раскрывается в данном документе выше в разделе 2aA1.

2bA2. (8R,9S,13S,14S,17S)-17-Аллилокси-3-бензилоксиэстра-1,3,5(10)-триен (3):

Синтез (8R,9S,13S,14S,17S)-17-аллилокси-3-бензилоксиэстра-1,3,5(10)-триена (3) раскрывается в данном документе выше в разделе 2aA2.

5

2bA3. (8R,9S,13S,14S,17S)-3-Бензилокси-17-(3-гидроксипропокси)эстра-1,3,5(10)-триен (7):

9-Борабицикло[3.3.1]нонан (800 мл, 0,5 М раствор в THF, стабилизированный, 400 ммоль) добавляли по каплям к раствору неочищенного алкена **3** (101,2 г, 251 ммоль) в THF (1 л) при 0°C, и при полном добавлении данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Данный раствор охлаждали до 0°C, медленно одновременно добавляли по каплям 30%-ный водный NaOH (150 мл, 1,3 моль) и 35%-ный водный (120 мл, 1,3 моль), и образующуюся гетерогенную смесь энергично перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 1 ч. Реакционную смесь затем распределяли между EtOAc (2 л) и рассолом (500 мл). Органическую фазу промывали дополнительными 500 мл рассола, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Данную процедуру повторяли аналогичным образом, и обе части объединяли. Дальнейшая очистка концентрата флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 25% до 35% EtOAc в гептанах) давала спирт **5** (130 г, 310 ммоль) в виде белого твердого вещества с 61%-ным выходом (3 стадии).

10

15

20

2bA4. (8R,9S,13S,14S,17S)-3-Бензилокси-17-[3-(перфтор-трет-бутилокси)пропокси]эстра-1,3,5(10)-триен (8):

Диизопропилазодикарбоксилат (80 мл, 407 ммоль) добавляли по каплям к перемешиваемой смеси спирта **7** (130 г, 301 ммоль), трифенилфосфина (162 г, 618 ммоль), перфтор-трет-бутанола (70 мл, 497 ммоль) в сухом THF (2 л) в атмосфере азота. Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 18 ч. Реакционную смесь частично концентрировали, и добавляли гептан (1 л). После полного удаления THF начиналось осаждение. Твердые вещества удаляли с использованием фильтрования, и фильтрат концентрировали. Добавляли ацетонитрил (1,5 л), и данную смесь перемешивали в течение 30 минут, в то время как начиналось осаждение. Твердые вещества собирали посредством фильтрования и сушили под вакуумом. Соединение **8** (160 г, 251 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с 81%-ным выходом.

25

30

35

2bA5. (8R,9S,13S,14S,17S)-3-Гидрокси-17-[3-(перфтор-трет-бутилокси)пропокси]эстра-1,3,5(10)-триен (Фенол 1)

Сосуд Парра загружали бензиловым эфиром **8** (160 г, 251 ммоль) в EtOAc (1 л), в который добавляли 10% палладия на углероде (4 г). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре под давлением водорода (500 кПа). Реакцию отслеживали с использованием ¹H ЯМР (ядерный магнитный резонанс). Примерно через 72 ч реакционную смесь фильтровали через слой целита (промываемого EtOAc) и подвергали повторному воздействию свежего 10% палладия на угле (4 г) в атмосфере водорода (500 кПа). Примерно через 16 ч реакционную смесь фильтровали через слой целита (промываемого EtOAc) и концентрировали с получением **фенола 1** (125 г, 228 ммоль) в виде сероватого твердого вещества с 91%-ным выходом.

2bB. Синтез K-29U:

Синтез строительного блока **K-29U** описан в данном документе выше в разделе **2aC (2aC1-2aC8)**.

2bC. Завершение синтеза Апо-Si-K-29D-Предшественника:

Синтез начинался посредством сочетания по Митсунобу между защищенным Вос метиламиноэтанолом и **фенолом 1**. Данное сочетание давало приблизительно 50% превращения. Однако с использованием колоночной хроматографии был выделен продукт (**K-29C-1**), и могло быть выделено исходное вещество. Удаление группы Вос с использованием TFA обеспечивало последующее восстановительное аминирование с использованием NaBH(OAc)₃ – способа, который обеспечивает присутствие кислотной защиты амина. Затем проводили образование дисульфида с использованием снятия защиты тиацетата *in situ*, с последующим присоединением группы DMT и фосфорамидатной группировки с использованием стандартных методик, как известно в данной области.

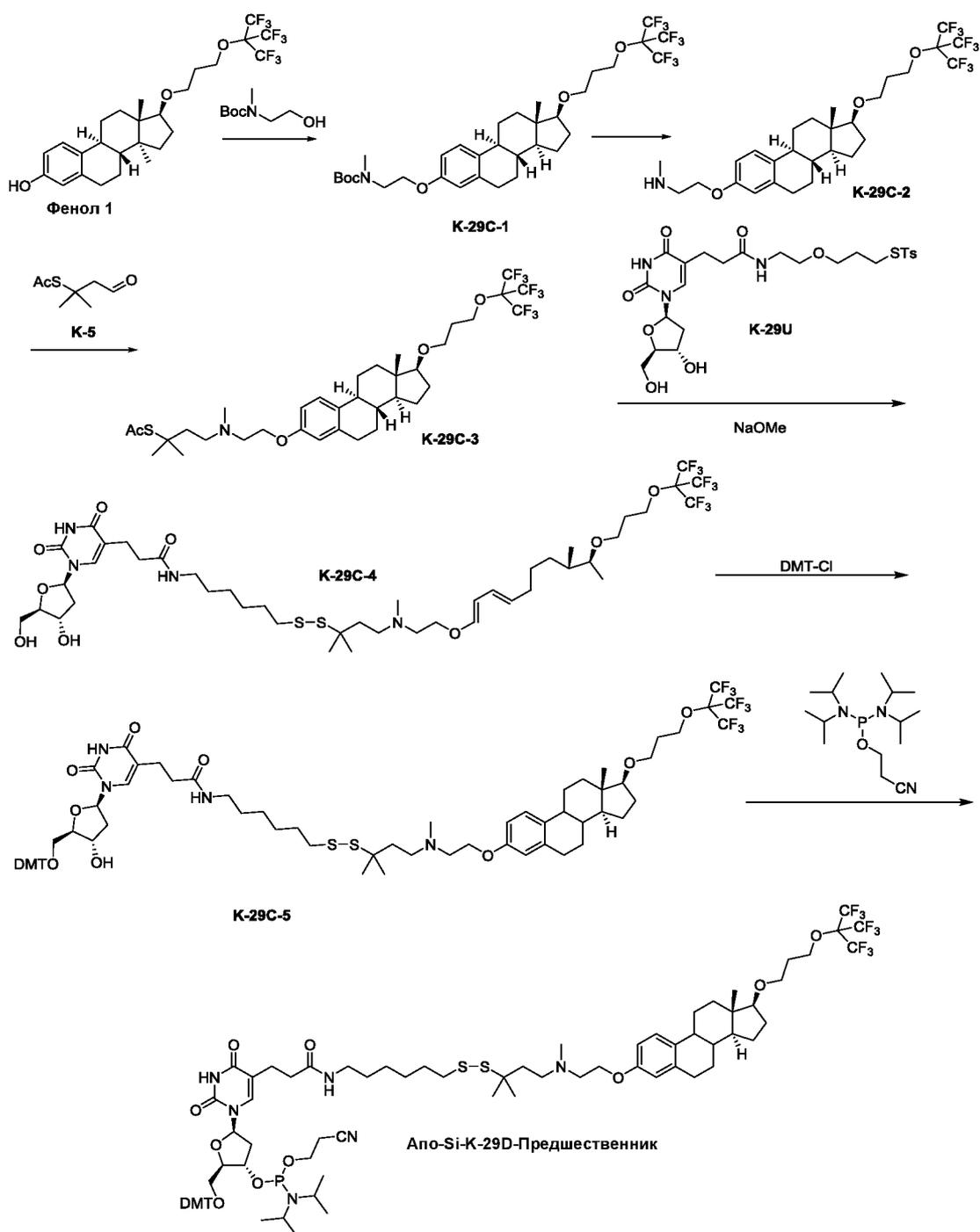


Схема 5. Синтез Апо-Si-K-29D-Предшественника

5 **2bC1. трет-Бутил-(2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)карбамат (K-29C-1)**

10 В раствор Фенола 1 (50 г, 91 ммоль) и Вос-N-метилглицинола (32 г, 182 ммоль) добавляли PPh_3 (38 г, 146 ммоль), и образующуюся смесь перемешивали,

пока все не растворялось. Добавляли DIAD (23 мл, 118 ммоль), и образующуюся смесь перемешивали 64 ч. Данную смесь концентрировали, и добавляли гептан. Образующийся осадок отфильтровывали, и фильтрат концентрировали. Неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (10% EtOAc/гептан с 0,1% TEA) (три раза). Чистые фракции объединяли и концентрировали, и получали соединение **К-29С-1** (51 г, 73 ммоль, 80%), а также выделяли **Фенол 1** (5 г, 9,5 ммоль, 10%).

10 **2bC2. 2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-N-метилэтан-1-амин (К-29С-2)**

Соединение **К-29С-1** (5,6 г, 7,9 ммоль) растворяли в 2 М HCl в EtOAc (100 мл), и образующийся раствор перемешивали в течение ночи. Добавляли водный NaOH (2 М, 150 мл) и энергично перемешивали, пока все не растворялось. Слои разделяли, и органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением **К-29С-2** (4,5 г, 7,4 ммоль, 94%) в виде розового маслянистого вещества.

20 **2bC3. S-(2-метил-4-оксобутан-2-ил)этантоат (К-5)**

К смеси диметилакролеина (25 мл, 435 ммоль) и тиоуксусной кислоты (44 мл, 608 ммоль, 1,4 экв.) добавляли по каплям при 0°C TEA (31 мл, 435 ммоль). Образующуюся смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Добавляли EtOAc и NaOH (1 М). Слои разделялись, и органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией (10% EtOAc в гептане) с получением **К-5** в виде желтого масла (22 г, 137 ммоль, 32%).

30 **2bC4. S-(4-(((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)этантоат (К-29С-3)**

К раствору **К-29С-2** (2,0 г, 3,3 ммоль) в дихлорэтано (100 мл) добавляли **Z-8-1** (1,1 г, 6,6 ммоль, 2 экв.), уксусную кислоту (0,57 мл, 9,9 ммоль, 3 экв.) и NaBH(OAc)₃ (2,1 г, 9,9 ммоль, 3 экв.), и образующуюся смесь перемешивали в течение 4 ч. Добавляли NaHCO₃ (насыщ., 500 мл), и данную смесь экстрагировали

CH₂Cl₂ (3×, 200 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (30% EtOAc в гептане плюс 0,1% NEt₃) с получением **К-29С-3** (1,1 г, 1,5 ммоль, 44%).

5

2bC4. N-(6-((4-((2-(((13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)-3-(1-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)пропанамид (К-29С-4)

10

Раствор соединения **К-29С-3** (1 экв.) и тозилата **К-29U** (1,5 экв.) в дихлорметане обрабатывали 2 М NaOMe в MeOH (4 экв.). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Мутную суспензию промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии давала соединение **К-29С-4**.

15

2bC5. 3-(1-((2R,4S,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокси-тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-N-(6-((4-((2-(((13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)пропанамид (К-29С-5)

20

К раствору **К-29С-4** (1 экв.) в пиридине добавляли DMT-Cl (2 экв.) и DMAP (0,1 экв.), и образующуюся смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего данную смесь концентрировали. Неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии с получением соединения **К-29С-5**.

25

2bC6. (2R,3S,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-(3-((6-((4-((2-(((13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)амино)-3-оксопропил)-2,4-диоксо-3,4-

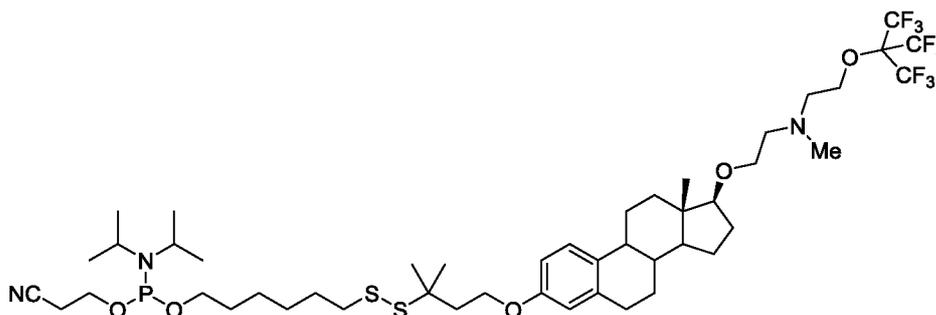
30

35

**дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил(2-
цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (Апо-Si-K29D-Предшественник)**

К раствору соединения **K-29C-5** (1 экв.) в дихлорметане добавляли 2-
цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидит (1,3 экв.), с последующим
5 добавлением по каплям 0,5 М раствора *N*-метилморфолина и 0,25 М
трифторуксусной кислоты в дихлорметане (1 эквивалент *N*-метилморфолина в
фосфородиамидитный агент). Образующуюся смесь перемешивали в течение 2
часов при комнатной температуре, затем гасили водным насыщенным
бикарбнатом натрия, и перемешивание продолжали в течение еще 10 минут.
10 Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали.
Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии давала соединение
Апо-Si-K-29D-Предшественник.

Пример 2с: синтез Апо-Si-K-18-Предшественника:



Апо-Si-K-18-Предшественник

15

2сА. Синтез Фенола 2:

Синтез **Фенола 2** описан в данном документе выше в разделе **2аА** (2аА1-
2аА6).

20

2сВ. Синтез К-1-7:

Синтез **строительного блока К-1-7** был описан в данном документе выше в
разделе **2аВ** (2аА1-2аА6).

25

2еС. Синтез К-6:

Последний строительный блок **К-6** получали реакцией замещения
тиотозилата калия хлоргексанолом.

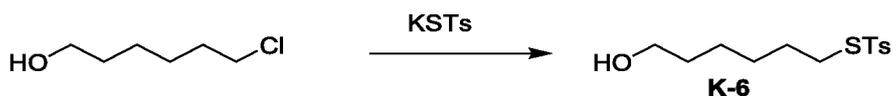


Схема 3. Синтез К-6.

S-(6-гидрогексил)-4-метилбензолсульфонат (К-6)

- 5 3-Хлоргексан-1-ол (5,0 мл, 36,6 ммоль) растворяли в диметилформамиде (DMF, 150 мл) и добавляли *p*-толуолтиосульфонат калия (KST, 12,4 г, 54,9 ммоль, 1,5 экв.) и тетрабутиламмония йодид (TBAI, 1,35 г, 3,66 ммоль, 0,1 экв.). Образующуюся смесь перемешивали при 80°C в течение ночи. Добавляли H₂O (500 мл) и EtOAc/гептан (800 мл, 1/1, об./об.). Слои разделяли, и органический слой
- 10 промывали H₂O (300 мл) и рассолом (300 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением **К-6** (9,0 г, 31,2 ммоль, 85%) в виде прозрачного масла.

2сD. Завершение синтеза Апо-Si-K-18-Предшественника:

- 15 Завершение синтеза **Апо-Si-K-18**, начиная с **фенола 2**, показано на схеме 4. Строительный блок **К-1-7** связывали с **фенолом 2** с использованием условий Митсунобу. После некоторых исходных анализов по снятию защиты флюоренильной защитной группы на сере обнаружили то, что с **К-18-1** могла быть снята защита *in situ* в присутствии **К-6** с образованием дисульфида **К-18-2**.

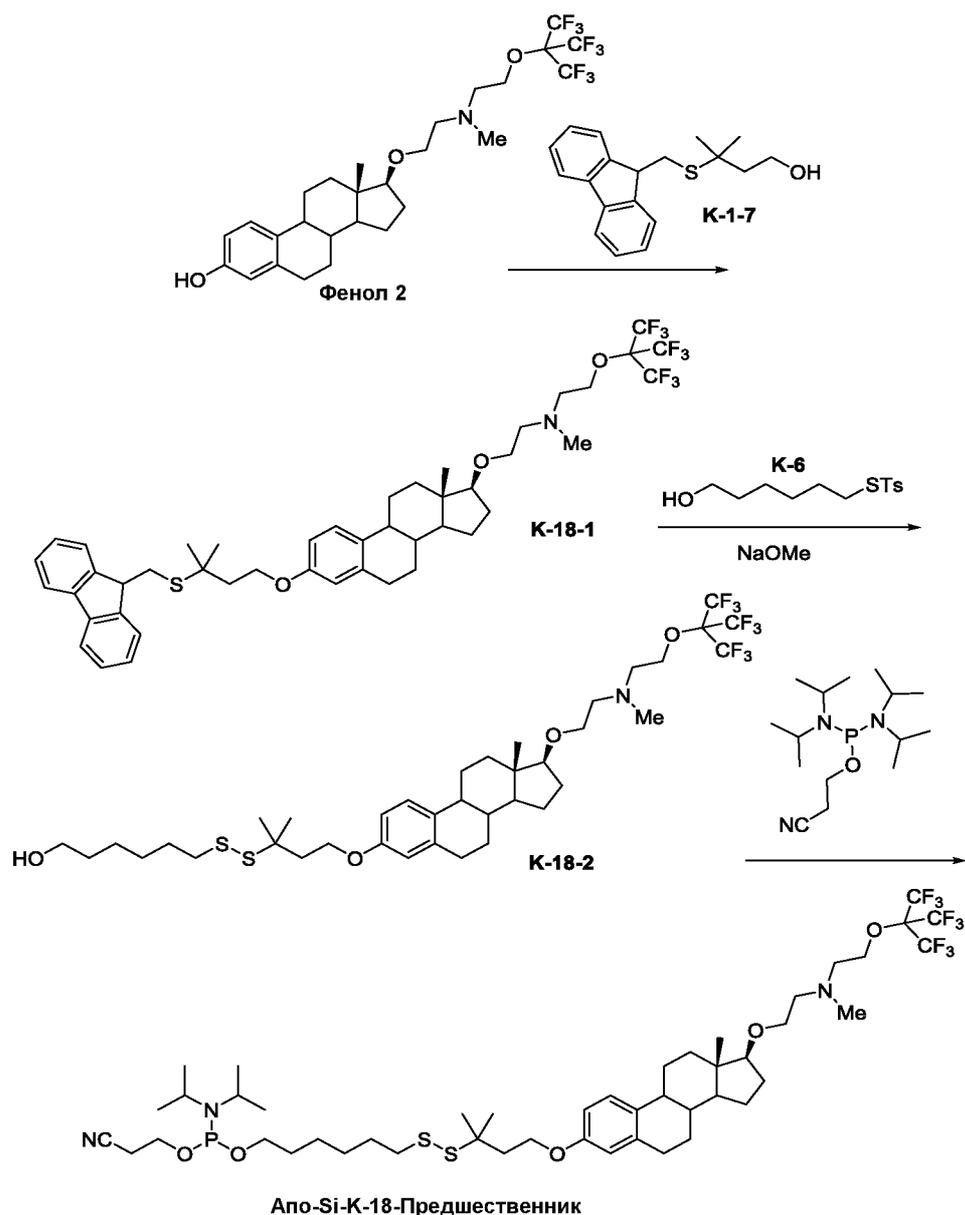


Схема 4. Синтез **Апо-Si-K-18-Предшественника**

Конечное присоединение фосфорамидата с использованием подходящего фосфородиамидатного агента давало прямой доступ к **Апо-Si-K-18**. Достигалась очистка данного вещества с использованием флэш-хроматографии, с последующей дезактивацией Et₃N до воздействия на кислотолабильный фосфорамидат.

В заключение, соединение Апо-Si-K-18 (2 × 350 мг) получали из эстрадиола за 11 этапов из **фенола 2** с приемлемым общим выходом.

2сD1. 2-(((13S,14S,17S)-3-(3-(((9H-Флюорен-9-ил)метил)тио)-3-метилбутокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-17-ил)окси)-N-(2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)-N-метилэтан-1-амин (К-18-1)

5 К раствору фенола **2** (1,47 г, 2,5 ммоль) в THF (40 мл) добавляли спирт **К-1-7** (1,48 г, 5,0 ммоль), трифенилфосфин (0,91 г, 3,5 ммоль) и диизопропилазодикарбоксилат (0,6 мл, 2,9 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. После концентрирования данную смесь дополнительно очищали с использованием флэш-хроматографии (20% EtOAc и 1% Et₃N в гептанах) с получением **К-18-1** (1,5 г, 1,7 ммоль) в виде
10 прозрачного масла с 67%-ным выходом.

2сD2. 6-((4-(((13S,14S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексан-1-ол (К-18-2)

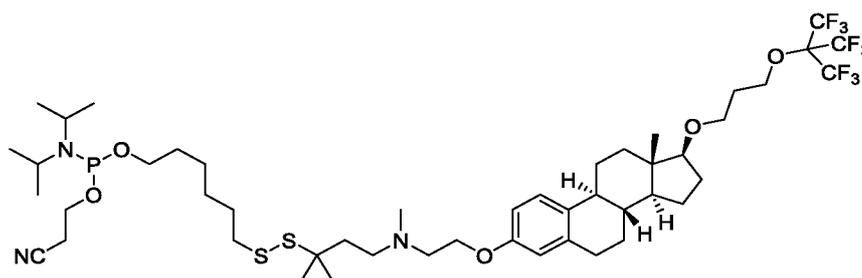
15 Раствор соединения **К-18-1** (400 мг, 0,45 ммоль) и тозилата **К-6** (388 мг, 1,34 ммоль) в дихлорметане (15 мл) обрабатывали 2 М NaOMe в MeOH (0,9 мл, 1,8 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Мутную суспензию промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (от 30% до 40% EtOAc плюс 1% Et₃N в гептанах) давала
20 соединение **К-18-2** (220 мг, 0,27 ммоль) в виде бесцветного масла с выходом 59%.

2сD3. 2-Цианоэтил-(6-((4-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)диизопропилфосфорамидит (Апо-Si-К-18-Предшественник).

30 В раствор соединения **К-18-2** (656 мг, 0,79 ммоль) в дихлорметане (25 мл) добавляли 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидит (0,31 мл, 1 ммоль), с последующим добавлением по каплям 0,5 М раствора *N*-метилморфолина и 0,25 М трифторуксусной кислоты в дихлорметане (2,1 мл, 1 эквивалент *N*-метилморфолина в фосфородиамидитный агент). Желтоватый
35 раствор перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем гасили водным насыщенным бикарбонатом натрия, и продолжали перемешивание

в течение еще 10 минут. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (30% EtOAc и 1% Et₃N в гептане) давала соединение **Апо-Si-K-18-Предшественник** (480 мг, 0,47 ммоль) в виде прозрачного масла с 59%-ным выходом. Также исходное вещество **K-18-2** (193 мг, 0,23 ммоль) выделяли с 29%-ным выходом.

Пример 2d: Синтез Апо-Si-K-13-Предшественника:



Апо-Si-K-13-Предшественник

10

2dA. Синтез фенола 1:

Синтез **фенола 1** был описан в данном документе выше в разделе **2bA** (**2bA1-2bA5**).

15

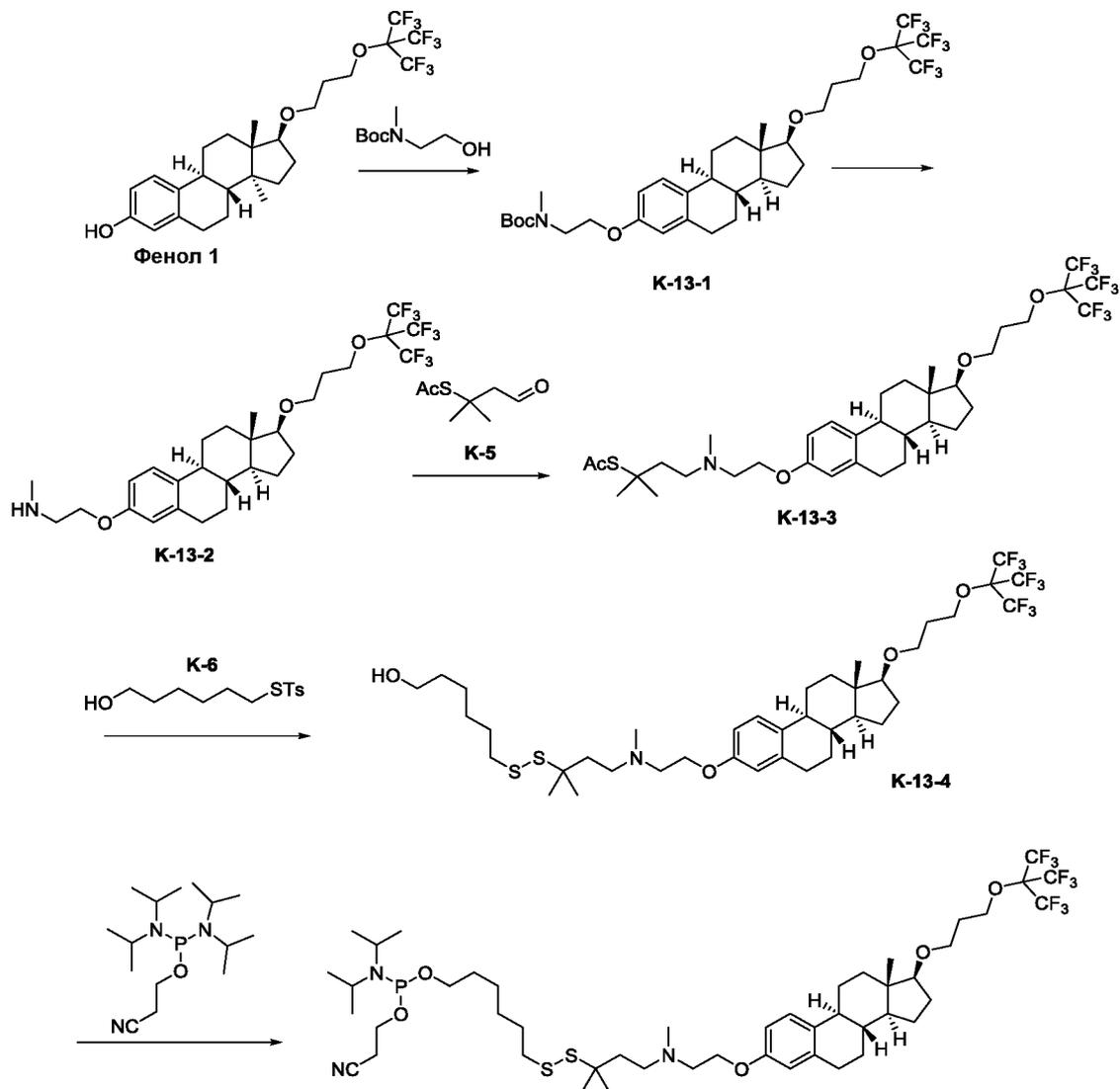
2dB. Завершение синтеза Апо-Si-K-13-Предшественника:

Фенол 1 связывали с защищенным Вос метиламиноэтанолом с использованием условий реакций Митсунобу с образованием соединения **K-13-1** с умеренным выходом (43%). Удаление группы Вос с использованием трифторуксусной кислоты (TFA) давало **K-13-2** в виде соли TFA, которую использовали в последующем восстановительном аминировании с **K-5**, используя триацетоксиборгидрид натрия в качестве восстановителя. Выход чистого продукта был скорее низким из-за переноса ацетата с тиола на амин, блокируя часть субстрата для дальнейшей реакции до желательного продукта.

Добавляли в раствор **K-13-3** и **K-6** метоксид натрия в метаноле, что удаляло ацетат от **K-13-3**, давая образующемуся тиолу реагировать с **K-6** с образованием желательного серного мостика. Проводили взаимодействие соединения **K-13-4** с подходящим фосфорамидитным агентом с получением **Апо-Si-K-13-Предшественника**. Очистку кислотолабильного фосфорамидитного продукта осуществляли с использованием флэш-хроматографии с диоксидом кремния, который был предобработан Et₃N.

30

В заключение, соединение Апо-Si-K-13-Предшественник (622 мг) получали из фенола 1 за пять этапов. Фенол 1 получали из эстрадиола через 5 стадий синтеза с общим выходом 45%.



Апо-Si-K-13-Предшественник

5

Схема 2. Синтез Апо-Si-K-13-Предшественника

2dB1. трет-Бутил-(2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)карбамат (K-13-1):

К раствору фенола 1 (23,4 г, 42,7 ммоль) в THF (600 мл) добавляли трифенилфосфин (26 г, 100 ммоль), трет-бутил (2-гидроксиэтил)(метил)карбамат (9,8 г, 61 ммоль) и по каплям DIAD (12 мл, 61 ммоль). Данную смесь перемешивали

10

в течение 16 ч при комнатной температуре. Желтоватый раствор частично концентрировали, добавляли гептан, и данный раствор дополнительно концентрировали с удалением всех следов THF. Образующийся осадок отфильтровывали, и фильтрат концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (градиент от 5% до 7% EtOAc в гептане) давала соединение **К-13-1** (13,05 г, 18,5 ммоль) с 43%-ным выходом в виде желтоватого масла.

10 **2dB2. S-(4-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)этантоат (К-13-3):**

15 Раствор соединения **К-13-1** (13,05 г, 18,5 ммоль) растворяли в дихлорметане (65 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (40 мл). После того, как смесь перемешивали в течение 2 часов, образование пузырьков прекращалось. Данную смесь концентрировали и использовали как таковую. Остаток растворяли в 1,2-дихлорэтаноле (400 мл), добавляли уксусную кислоту (5 мл, 75 ммоль), альдегид **К-5** (6 г, 37 ммоль), и перемешивание продолжали в течение 5 минут. Затем добавляли триацетоксиборгидрид натрия (16 г, 75 ммоль), и данную смесь 20 перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Данную смесь промывали 1 М NaOH и рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Дальнейшая очистка давала соединение **К-13-3** (3,0 г, 4 ммоль) в виде прозрачного желтоватого масла с 22%-ным выходом.

25 **2dB3. S-(6-Гидроксигексил)-4-метилбензолсульфонтоат (К-6):**

3-Хлоргексан-1-ол (5,0 мл, 36,6 ммоль) растворяли в DMF (150 мл) и добавляли KST (12,4 г, 54,9 ммоль, 1,5 экв.) и TBAI (1,35 г, 3,66 ммоль, 0,1 экв.). Образующуюся смесь перемешивали при 80°C в течение ночи. Добавляли H₂O (500 мл) и EtOAc/гептан (800 мл, 1/1, об./об.). Слои разделяли, и органический слой 30 промывали H₂O (300 мл) и рассолом (300 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением **К-6** (9,0 г, 31,2 ммоль, 85%) в виде прозрачного масла.

35 **2dB4. 6-((4-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-**

ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексан-1-ол (К-13-4):

Раствор соединения К-13-3 (1 г, 1,34 ммоль) и тозилата К-6 (770 мг, 2,7 ммоль) в дихлорметане (30 мл) обрабатывали 2 М NaOMe в MeOH (2 мл, 4 ммоль).
 5 Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Мутную суспензию промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (30% EtOAc плюс 1% Et₃N в гептанах) давала соединение К-13-4 (650 мг, 0,77 ммоль) в виде бесцветного масла с 58%-ным выходом.

10

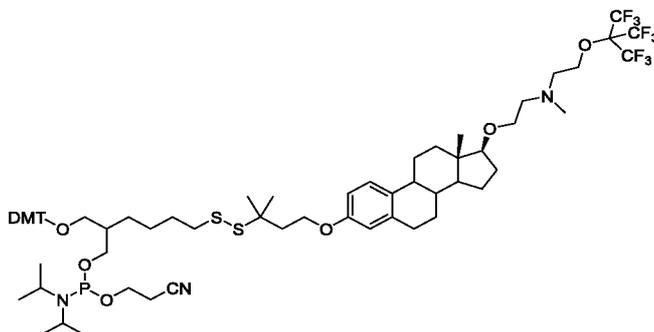
2dB5. 2-Цианоэтил-(6-((4-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-

15

ил)дисульфанил)гексил)диизопропилфосфорамидит (Апо-Si-K-13-Предшественник):

В раствор соединения К-13-4 (650 мг, 0,77 ммоль) в дихлорметане (25 мл) добавляли 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидит (0,3 мл, 1 ммоль) и добавляли по каплям 0,5 М раствор *N*-метилморфолина и 0,25 М трифторуксусной кислоты в дихлорметане (2 мл, 1 эквивалент *N*-метилморфолина в фосфорамидитный агент). Желтоватый раствор перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем данную реакционную смесь гасили водным насыщенным бикарбонатом натрия, и перемешивание продолжали в течение еще 10 минут. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (30% EtOAc и 1% Et₃N в гептане) давала соединение Апо-Si-K-13 (622 мг, 0,60 ммоль) в виде прозрачного масла с 78%-ным выходом.

25

Пример 2е: синтез Апо-Si-K-40-Предшественника:

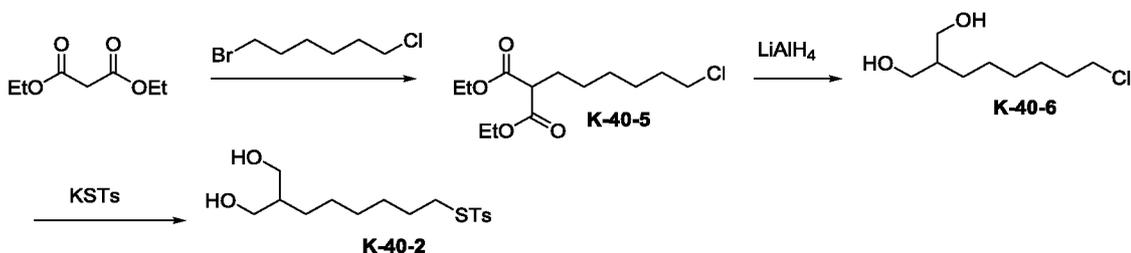
Апо-Si-K-40-Предшественник

2еА. Синтез Фенола 2:

5 Синтез **Фенола 2** был описан в данном документе выше в разделе **2аА** (2аА1-2аА6).

2еВ. Синтез К-1-7:

10 Синтез **строительного блока К-1-7** был описан в данном документе выше в разделе **2аВ** (2аА1-2аА6).

2еС. Синтез К-40-2:Схема 3: синтез **К-40-2**

15

2еС1. Диэтил-2-(6-хлоргексил)малонат (К-40-5)

20 В охлажденную льдом суспензию NaH (2,6 г, 66 ммоль, 1 экв.) в DMF (300 мл) добавляли по каплям диэтилмалонат (20 мл, 131 ммоль, 2 экв.). После завершения добавления баню со льдом удаляли, и данную смесь перемешивали в течение 1 часа при нагревании до комнатной температуры. Данная смесь стала прозрачным раствором. Данную смесь охлаждали до 0°C и добавляли по каплям 1-бром-6-хлоргексан (9,8 мл, 66 ммоль, 1 экв.). Образующуюся смесь перемешивали в течение 1 часа при 0°C и в течение еще 3 часов при комнатной температуре. Данную реакцию гасили концентрированной HCl (3 мл) и H₂O (500 мл).

Реакционную смесь экстрагировали EtOAc/гептаном (1/1, об./об., 3×400 мл). Объединенные органические фазы промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (5% EtOAc в гептане) с получением **K-40-5** (9,7 г, 35 ммоль, 53%) в виде прозрачного масла.

2eC2. 2-(6-хлоргексил)пропан-1,3-диол (K-40-6)

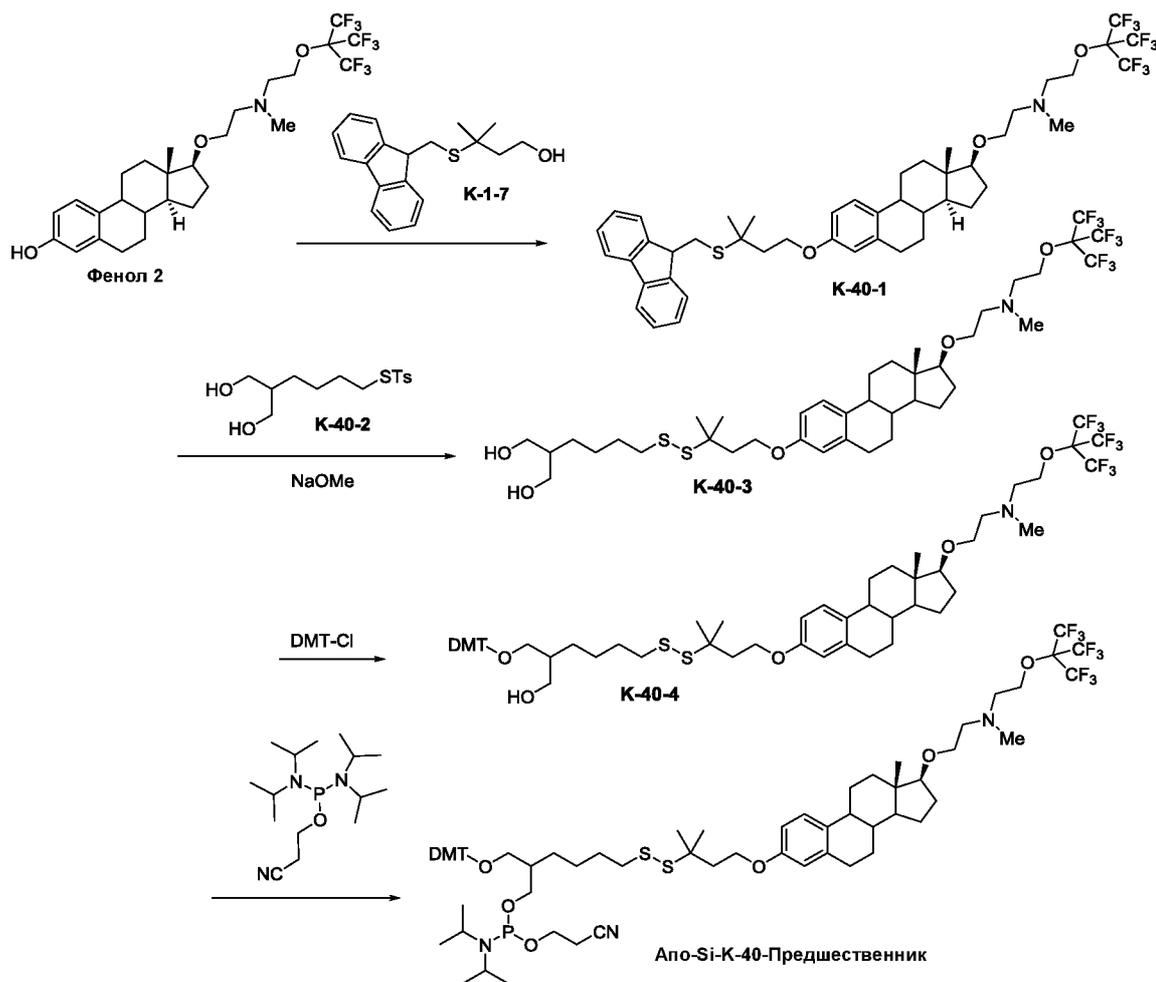
К охлажденной льдом суспензии LiAlH₄ (2,6 г, 70 ммоль) в Et₂O (250 мл) добавляли по каплям раствор **K-40-5** (9,7 г, 35 ммоль) в течение 30 минут, поддерживая температуру ниже 10°C. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при 0°C. Данную реакцию гасили H₂O (5 мл), NaOH (водн., 30%, 2,5 мл) и H₂O (12 мл) в таком порядке. Образующуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего образовался нерастворимый белый осадок. Данный осадок отфильтровывали, и фильтрат концентрировали с получением **K-40-6** (6,1 г, 31 ммоль, 90%) в виде бесцветного масла.

2eC3. S-(8-гидрокси-7-(гидроксиметил)октил)-4-метилбензолсульфонотиоат (K-40-2)

Хлорид **K-40-6** (6,1 г, 31 ммоль) растворяли в DMF (200 мл) и добавляли тиотозилат калия (10,7 г, 47 ммоль, 2 экв.) и TBAI (1,2 г, 3,1 ммоль, 0,1 экв.). Образующуюся смесь перемешивали в течение 24 часов при 80°C, после чего ее концентрировали в вакууме. Неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (7:3 EtOAc:гептан) с получением одной фракции, содержащей, главным образом, продукт (5,6 г), и второй фракции, содержащей и продукт, и исходное вещество (3,3 г). Последнюю фракцию растворяли в DMF (100 мл) и добавляли тиотозилат калия (4,5 г, 20 ммоль) и TBAI (0,37 г, 1,0 ммоль). Образующуюся смесь перемешивали в течение 24 часов при 80°C, и добавляли EtOAc (350 мл) и гептан (350 мл). Органическую фазу промывали H₂O (500 мл) и рассолом (250 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество объединяли с фракцией, содержащей продукт, из первой колонки, и неочищенное вещество очищали с использованием колоночной хроматографии (7:3 EtOAc:гептан) с получением **K-40-2** (8,2 г, 24 ммоль, 75%) в виде розоватого масла.

2eD. Завершение синтеза Апо-Si-K-40-Предшественника:

Фенол **2** и строительный блок **K-1-7** связывали заранее при условиях Митсунобу с получением защищенного тиола **K-40-1**. Флюоренильную группу удаляли *in situ* посредством NaOMe в присутствии **K-40-2**, с получением дисульфида **K-40-3**. Наконец, присоединяли защитную группу DMT и фосфорамидитные группы с получением конечного соединения **Апо-Si-K-40-Предшественник**:



10 **2eD1. 2-(((13S,14S,17S)-3-(3-(((9H-Флюорен-9-ил)метил)тио)-3-**
метилбутокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-
циклопента[а]фенантрен-17-ил)окси)-N-(2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-
(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)-N-метилэтан-1-амин (K-40-1)

15 К раствору фенола **2** (1,47 г, 2,5 ммоль) в THF (40 мл) добавляли спирт **K-1-7** (1,48 г, 5,0 ммоль), трифенилфосфин (0,91 г, 3,5 ммоль) и диизопропилазодикарбоксилат (0,6 мл, 2,9 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. После концентрирования данную

смесь дополнительно очищали с использованием флэш-хроматографии (20% EtOAc и 1% Et₃N в гептанах) с получением **К-40-1** (1,5 г, 1,7 ммоль) в виде прозрачного масла с 67%-ным выходом.

5 **2eD2. 2-(6-((4-(((13S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)пропан-1,3-диол (К-40-3)**

10 Раствор соединения **К-40-1** (1 экв.) и тозилата **К-40-2** (1,5 экв.) в дихлорметане обрабатывали 2 М NaOMe в MeOH (4 экв.). Данную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Мутную суспензию промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии давала соединение **К-40-3**.

15

2eD3. 2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-8-((4-(((13S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)октан-1-ол (К-40-4)

20

К раствору **К-40-3** (1 экв.) в пиридине добавляли DMT-Cl (2 экв.) и DMAP (0,1 экв.), и образующуюся смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего данную смесь концентрировали. Остаток очищали с использованием колоночной хроматографии с получением соединения **К-40-4**.

25

2eD4. 2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-8-((4-(((13S,17S)-17-(2-((2-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)этил)(метил)амино)этокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)октил(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (Апо-Si-K40-Предшественник)

30

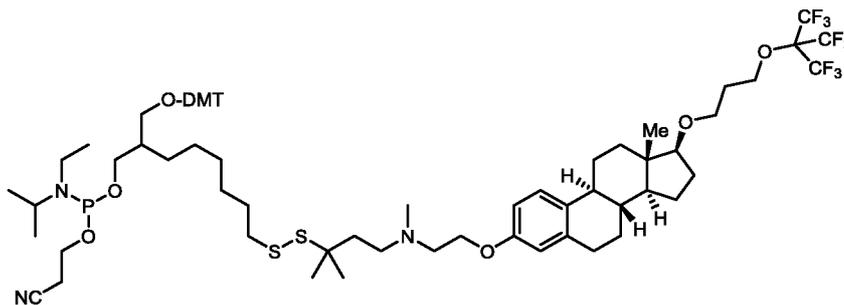
К раствору соединения **К-40-4** (1 экв.) в дихлорметане добавляли 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидит (1,3 экв.), с последующим добавлением по каплям 0,5 М раствора *N*-метилморфолина и 0,25 М трифторуксусной кислоты в дихлорметане (1,3 эквивалента *N*-метилморфолина в фосфородиамидитный агент). Образующуюся смесь перемешивали в течение 2

35

часов при комнатной температуре, затем гасили водным насыщенным бикарбонатом натрия, и продолжали перемешивание в течение еще 10 минут. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии давала соединение

5 **Апо-Si-K-40-Предшественник.**

Пример 2f: синтез Апо-Si-K-43-Предшественника:



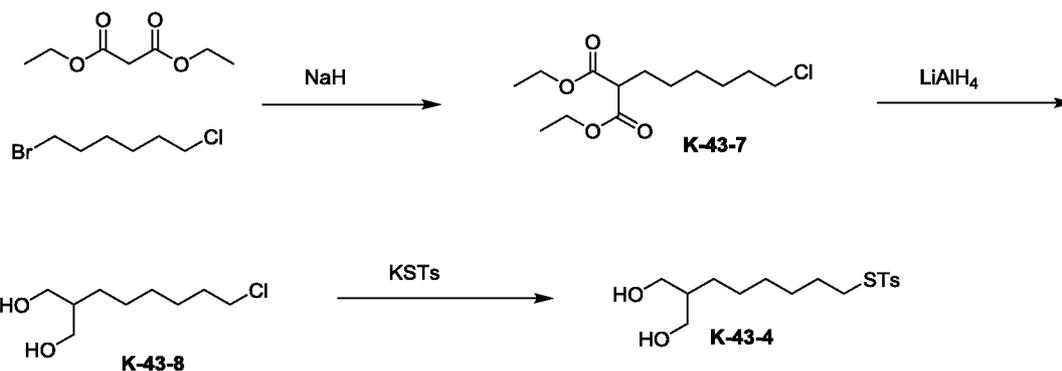
Апо-Si-K-43-Предшественник

10

2fA. Синтез фенола 1:

Синтез фенола 1 был описан в данном документе выше в разделе 2aA (2aA1-2aA6).

2fB. Синтез строительного блока K-43-4:



15

Синтез строительного блока K-43-4

Проводили взаимодействие диэтилмалоната с гидридом натрия и бромхлоргексаном с получением аклированного продукта K-43-7. Обработка лития алюминия гидридом восстанавливала сложный диэфир до диола K-43-8. Соединение K-43-8 подвергали взаимодействию с трифлатом калия с получением желательного строительного блока K-43-4.

20

2fB1. Диэтил-2-(6-хлоргексил)малонат (K-43-7)

К охлажденной льдом суспензии NaH (2,6 г, 66 ммоль, 1 экв.) в DMF (300 мл) добавляли по каплям диэтилмалонат (20 мл, 131 ммоль, 2 экв.). Образующуюся смесь перемешивали в течение 1 часа при нагревании вплоть до комнатной температуры. Данную смесь охлаждали до 0°C и медленно добавляли 1,6-бромхлоргексан (9,8 мл, 66 ммоль, 1 экв.). Образующуюся смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа и при комнатной температуре в течение 3 часов. Данную реакцию гасили HCl (2 M, 3 мл) и добавляли воду (500 мл). Данную смесь экстрагировали EtOAc/гептаном (1/1, об./об., 3×400 мл), и объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Дальнейшая очистка колоночной хроматографией (5% EtOAc в гептане) давала соединение K-43-7 (9,7 г, 34,8 ммоль, 53%) в виде прозрачного масла.

2fB2. 2-(6-Хлоргексил)пропан-1,3-диол (K-43-8)

В охлажденную льдом суспензию LiAlH₄ (2,6 г, 70 ммоль, 2 экв.) в диэтиловом эфире (200 мл) медленно добавляли раствор K-43-7 (9,7 г, 35 ммоль, 1 экв.) в диэтиловом эфире (50 мл), поддерживая температуру смеси ниже 10°C. Образующуюся смесь перемешивали при 0°C в течение 2 часов, после чего данную реакцию гасили добавлением воды (5 мл), NaOH (30% водн., 2,5 мл) и воды (12 мл) в этом порядке. Образующуюся смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего образовавшиеся твердые вещества отфильтровывали. Фильтрат концентрировали в вакууме с получением соединения K-43-8 (6,1 г, 31 ммоль, 90%) в виде бесцветного масла.

25

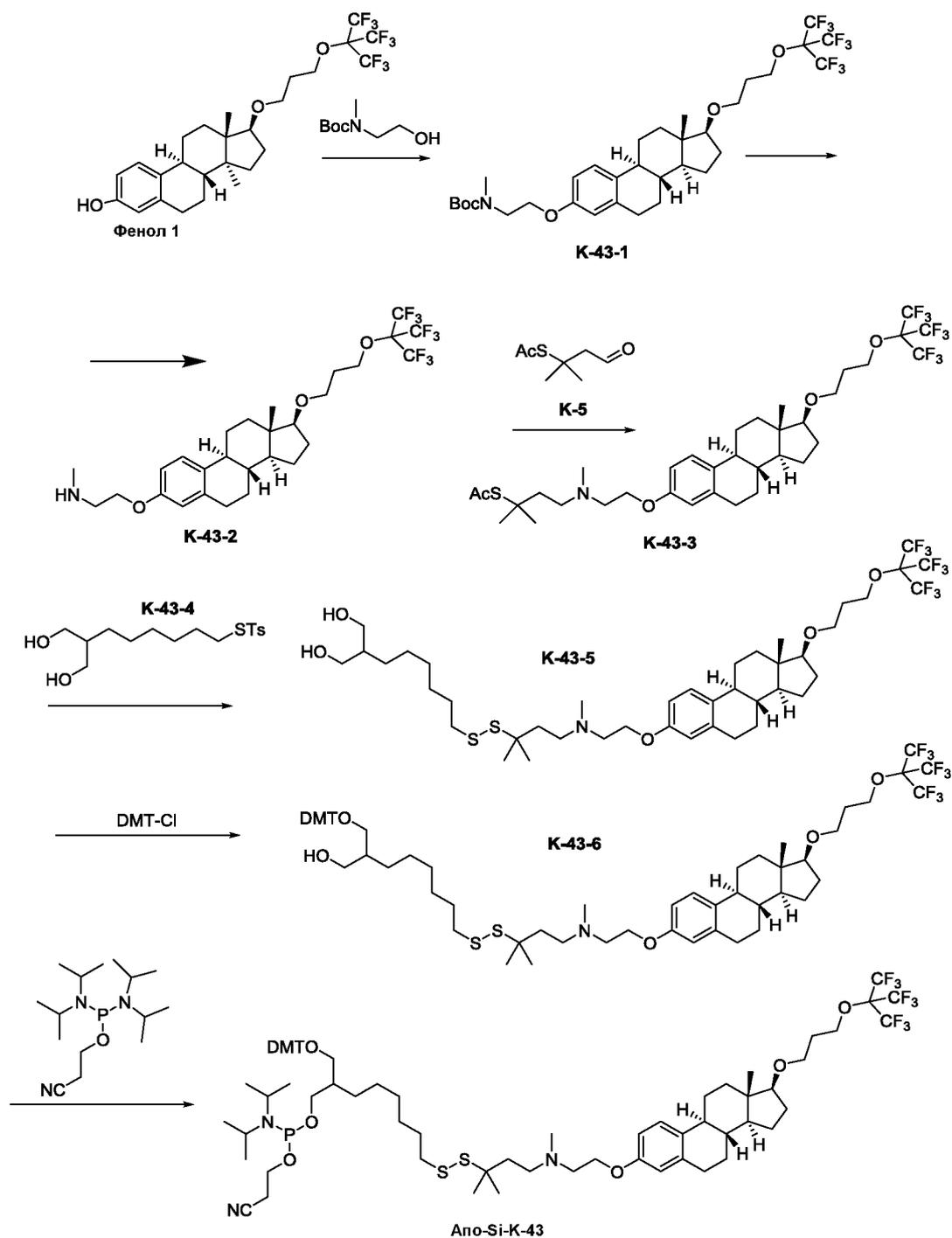
2fB3. S-(8-Гидрокси-7-(гидроксиметил)октил)-4-метилбензолсульфонотиоат (K-43-4)

В раствор K-43-8 (6,1 г, 31 ммоль) в DMF (200 мл) добавляли тиотозилат калия (11 г, 47 ммоль, 1,5 экв.) и TBAI (1,2 г, 3,1 ммоль). Образующуюся смесь перемешивали при 80°C в течение ночи, после чего данную смесь концентрировали. Очистка колоночной хроматографией давала K-43-4 (5,6 г, 16 ммоль, 52%) в виде розоватого масла.

30

2fC. Завершение синтеза Апо-Si-K-43-Предшественника

Фенол **1** связывали с защищенным Вос метиламиноэтанолом с использованием условий реакции Митсунобу с соединением **K-13-1** с умеренным выходом (43%). Удаление группы Вос с использованием TFA давало **K-13-2** в виде соли TFA, которую использовали в следующем восстановительном аминировании с использованием **K-5**, используя триацетоксиборгидрид натрия в качестве восстановителя.



Синтез Апо-Si-K-43

Метоксид натрия в метаноле добавляли в раствор К-43-3 и К-43-4, что удаляло ацетат от К-43-3, давая образующемуся тиолу реагировать с К-43-4 с образованием желательного серного мостика. Соединение К-43-5 подвергали взаимодействию с DMT-Cl с получением монозащищенного диола К-43-6. Реакция с подходящим фосфорамидитным агентом давала Апо-Si-K-43-Предшественник (1,6 г). Очистку кислотолабильного фосфорамидитного продукта осуществляли с использованием флэш-хроматографии с диоксидом кремния, который был преобработан Et₃N.

2fC1. трет-Бутил-(2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)карбамат (К-43-1)

В раствор фенола 1 (23,4 г, 42,7 ммоль) в THF (600 мл) добавляли трифенилфосфин (26 г, 100 ммоль), трет-бутил-(2-гидроксиэтил)(метил)карбамат (9,8 г, 61 ммоль) и добавляли по каплям DIAD (12 мл, 61 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Желтоватый раствор частично концентрировали, добавляли гептан, и данный раствор дополнительно концентрировали с удалением всех следов THF. Образующийся осадок отфильтровывали, и фильтрат концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (градиент от 5% до 7% EtOAc в гептане) давала соединение К-43-1 (13,05 г, 18,5 ммоль) с 43%-ным выходом в виде желтоватого масла.

2fC2. SS-(4-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)этантоат (К-43-3)

Раствор соединения К-43-1 (13,05 г, 18,5 ммоль) растворяли в дихлорметане (65 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (40 мл). После перемешивания смеси в течение 2 ч образование пузырьков прекращалось. Данную смесь концентрировали и использовали как таковую. Остаток растворяли в 1,2-дихлорэтане (400 мл), и добавляли уксусную кислоту (5 мл, 75 ммоль), альдегид К-5 (6 г, 37 ммоль), и перемешивание продолжали в течение 5 минут.

Затем добавляли триацетоксиборгидрид натрия (16 г, 75 ммоль), и данную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Данную смесь промывали 1 М NaOH и рассолом, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Дальнейшая очистка давала соединение **К-43-3** (3,0 г, 4 ммоль) в виде прозрачного желтоватого масла с 22%-ным выходом.

2fC3. 2-(6-((4-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)гексил)пропан-1,3-диол (К-43-5)

Раствор соединения **К-43-3** (2,2 г, 2,9 ммоль) и тозилата **К-43-4** (1,5 г, 4,4 ммоль) в метаноле (100 мл) обрабатывали 5,4 М NaOMe в MeOH (1,6 мл, 8,7 ммоль). Данную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Данную смесь промывали NaHCO₃ и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (20-30% ацетона плюс 1% Et₃N в гептанах) давала соединение **К-43-5** (1,3 г, 1,5 ммоль) в виде бесцветного масла с 50%-ным выходом.

2fC4. 2-((бис(4-Метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-8-((4-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)октан-1-ол (К-43-6)

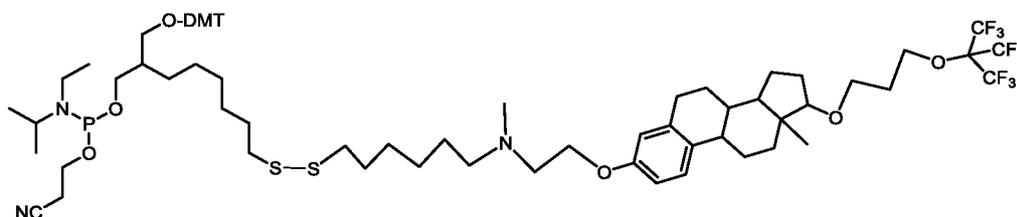
К раствору **К-43-5** (1,3 г, 1,5 ммоль, 1 экв.) добавляли Et₃N (0,2 мл, 1,5 ммоль, 1 экв.) и DMAP (17 мг, 0,15 ммоль, 0,1 экв.). В образующуюся смесь добавляли DMT-Cl (0,49 г, 1,5 ммоль, 1 экв.). Образующуюся оранжевую смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего она становилась желтой. Добавляли метанол (30 мл), и данную смесь перемешивали в течение 1 ч, после чего ее концентрировали. Очистка колоночной хроматографией (20% ацетона и 1% Et₃N в гептане) давала соединение **К-43-6** (1,5 г, 1,3 ммоль, 86%) в виде желтого масла.

2fC5. 2-((бис(4-Метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-8-((4-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-

циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)-2-метилбутан-2-ил)дисульфанил)октил(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (Апо-Si-K-43-Предшественник).

К раствору соединения **К-43-6** (1,5 г, 1,25 ммоль) в дихлорметане (25 мл) добавляли 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидит (0,51 мл, 1,6 ммоль, 1,3 экв.) и 0,5 М раствор *N*-метилморфолина и 0,25 М трифторуксусной кислоты в дихлорметане (3,3 мл, 1 эквивалент *N*-метилморфолина в фосфорамидитный агент). Желтоватый раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. ТСХ (тонкослойная хроматография) (20% ацетона в гептане и 1% Et₃N) показала неполное превращение, таким образом, добавляли дополнительные 0,5 экв. 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфородиамидита. Образующуюся смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем данную реакцию смесь гасили водным насыщенным бикарбонатом натрия. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Дальнейшая очистка с использованием флэш-хроматографии (10% ацетона и 1% Et₃N в гептане) давала соединение **Апо-Si-K-43-Предшественник** (1,6 г, 1,1 ммоль) в виде слегка желтого масла с 91%-ным выходом.

Пример 2g: синтез Апо-Si-K-63-Предшественника; Формула (PP-3):



Апо-Si-K-63-Предшественник; Формула (PP-3)

Структура **Апо-Si-K-63-Предшественника** является очень сходной со структурой **Апо-Si-K-43-Предшественника**, причем единственным отличием является фрагмент из 6 атомов углерода – линейный углеводород. Синтез, следовательно, является очень сходным с синтезом **Апо-Si-K-43-Предшественника**, описанным в Примере 2f.

2gA. Синтез фенола 1:

Синтез **фенола 1** был описан в данном документе выше в разделе **2aA** (**2aA1-2aA6**).

2gB. Синтез строительного блока К-43-4:

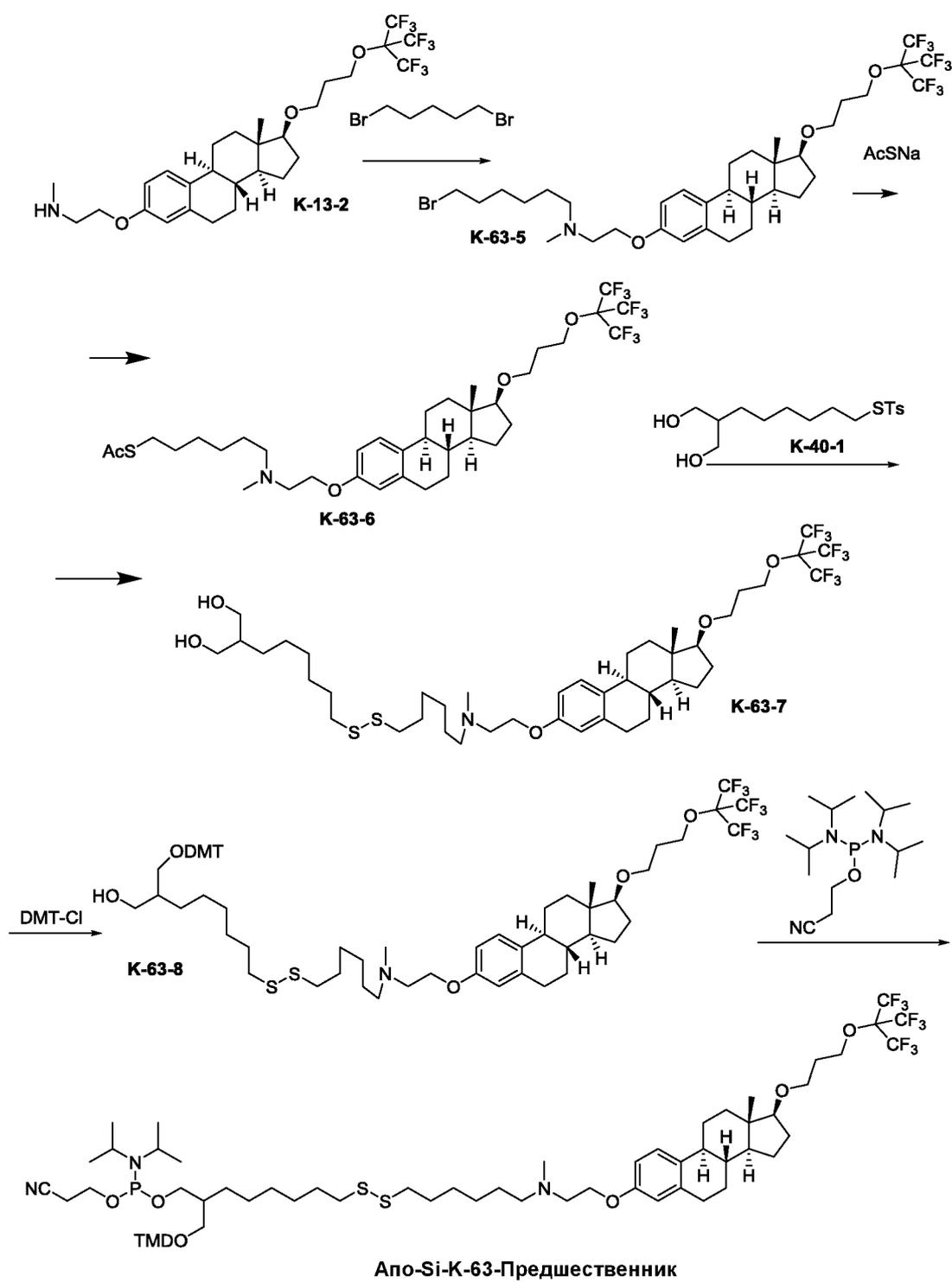
Синтез строительного блока К-43-4 был описан в данном документе выше в разделе 2fB (2fB1-2fB3).

5

2gC. Линейный углеводородный фрагмент: 1,6-дибромгексан имеется в продаже.

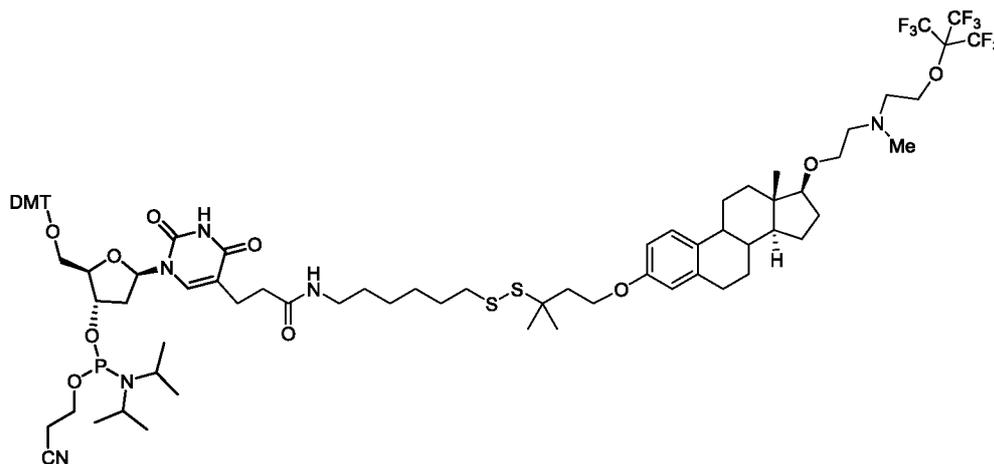
2gD. Завершение синтеза Апо-Si-K-63-Предшественника; Формула (PP-

3):



Пример 3: способ связывания группировки E по изобретению во внутреннем положении в пределах олигонуклеотидной цепи:

Приведен в качестве примера предшественник группировки E, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Va'P)**. Исходно группировка E находится в ее защищенной форме с 4,4'-диметокситритильной (DMT) и фосфорамидитной группами в 3'- и 5'-положениях дезоксирибозной группировки соответственно:



Формула (Va'P)

Внедрение в пределы олигонуклеотидной цепи проводится аналогично включению любого нуклеозидного строительного блока в традиционном олигонуклеотидном синтезе, приводя к образующейся в результате конфигурации, как описано на **Фиг. 2**.

Пример 4: редокс-опосредованное отделение и удаление группировки E в пределах цитоплазмы для высвобождения лекарственного средства-груза (например, миРНК):

В то время как по меньшей мере одна группировка E, E' или E'', как описано выше, требуется для трансмембранного прохождения конъюгатов миРНК или дмиРНК, желательно удалять данные группировки, как только конъюгат достигает цитоплазмы, и выводить их из организма. В случае, когда лекарственное средство-груз представляет собой миРНК или дмиРНК, данное расщепление является полезным для избегания стерических проблем во взаимодействии миРНК или дмиРНК с белковыми комплексами сайленсинга генов (дайсер и RISC). Кроме того, такое отделение лекарственного средства-груза от группировок E минимизировало бы нагрузку конъюгатов на клеточные фосфолипидные мембраны, что является полезным с точки зрения безопасности. С этой целью группировки E по

изобретению содержат дисульфидную группировку. При окислительных условиях, таких как условия, которые превалируют во внеклеточной среде, дисульфид является стабильным и, следовательно, дает возможность конъюгату, при его системном введении *in vivo*, распределяться в организме и проходить через

5 клеточные фосфолипидные мембраны в клетки. В отличие от этого, цитоплазма является сильно восстановительной средой, главным образом, из-за высоких концентраций в ней восстановленного глутатиона, непрерывно генерируемого в пределах цитоплазмы любой живой клетки, достигая концентрационного градиента примерно в четыре порядка между цитоплазмой и внеклеточным пространством.

10 Из-за этих примечательно восстановительных условий в цитоплазме, дисульфидные группы группировок **E** подвергаются надежному восстановлению в цитоплазматической среде. Вследствие этого происходит высвобождение лекарственного средства-груза (например, дмиРНК) для оказания его фармакологического действия в его сайтах-мишенях в цитоплазме (например, в

15 белковых комплексах дайсер или RISC для сайленсинга генов). Сопутствующе группировки **E** по изобретению выводятся из организма через желчь и/или мочу, аналогично другим молекулам на основе стеролов (например, эстрогены) либо непосредственно, либо после метаболизма (например, опосредованное цитохромом P450 гидроксилирование в печени). Это редокс-опосредованное

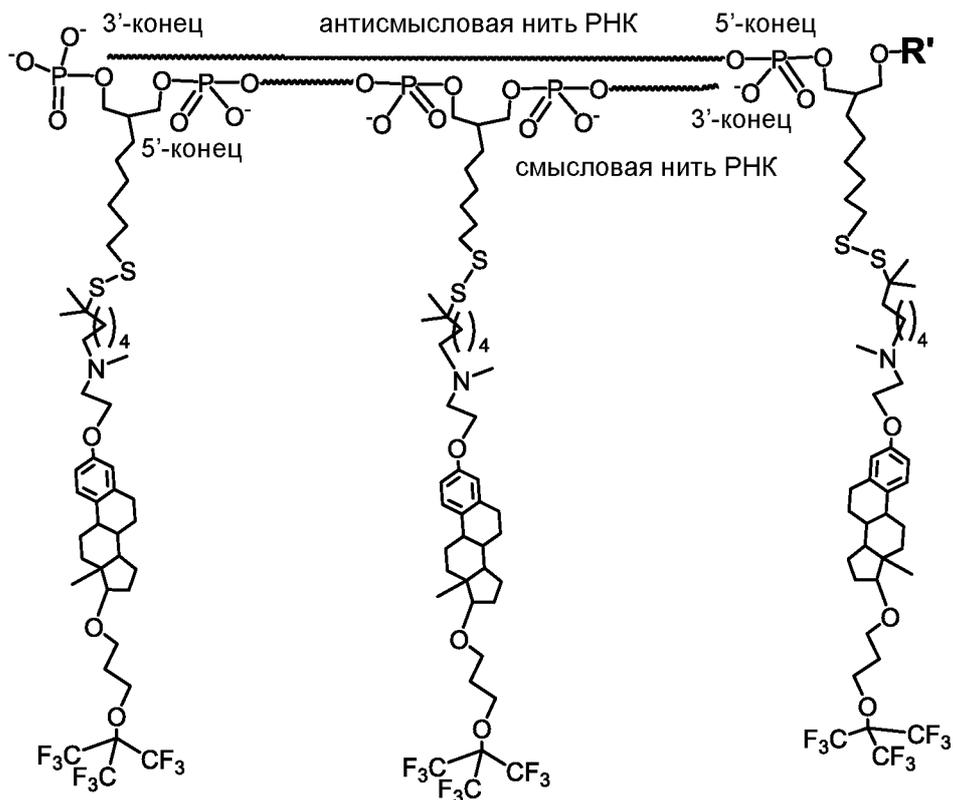
20 расщепление иллюстрируется примерами на **Фиг. 2**, **Фиг. 3** и **Фиг. 4**. На данных Фиг. продемонстрированы дуплексы РНК, имеющие группировки **E** согласно **Формуле (Va')**, **Формуле (Vc')** или **Формуле (Vc'')**. В то время как данный конъюгат является интактным в окислительных условиях, как условия, присутствующие во внеклеточном пространстве (**Фиг. 2a**), поступление в

25 цитоплазму приводит к расщеплению дисульфидной связи из-за характерных для нее восстановительных условий (**Фиг. 3, 4**): лекарственное средство-груз высвобождается для оказания его фармакологической активности в его цитоплазматических сайтах-мишенях (например, RISC), тогда как группировка **E** выводится из организма, аналогично другим соединениям на основе стеролов.

30 Стерическое препятствие, предоставляемое гем-диметильной группировкой на сульфгидрильной группе, дополнительно действует для придания стабильности в крови с виде окисленного дисульфида и для стабилизации свободной сульфгидрильной формы после расщепления.

Пример 5: пример структуры конъюгата по изобретению:

В качестве примера приведен конъюгат согласно **Формуле (Сп-14)**. Данный конъюгат содержит связь **D** (дмиРНК) с группировками **E**, **E'** и **E''** согласно **Формуле (Vc''')**, расположенными на 5'-концах дуплекса РНК и во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи:

**Формула (Сп-14)**

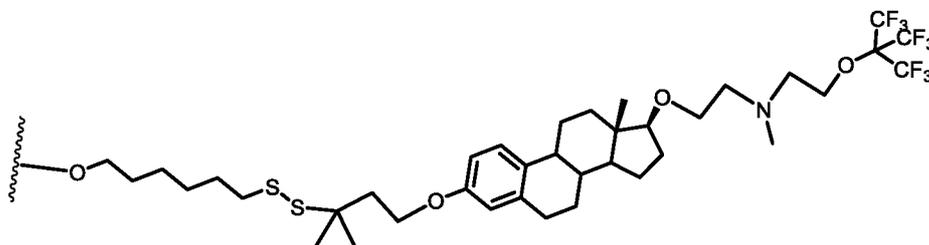
10 В данном примере **R** представляет собой фосфатную группу, тогда как **R'** представляет собой атом водорода. Как показано, фосфатная группа на 5'-конце сопровождающей (смысловой) нити дуплекса РНК субстрата дайсер (дмиРНК) может взаимодействовать с положительно заряженным карманом в сайте связывания РНК дайсер, таким образом, облегчая его активность и последующий
15 общий сайленсинг генов, опосредованный данным ферментом (см. **Пример 7**).

Пример 6: эффективность конъюгатов по изобретению в бессывороточных (С-) условиях и в присутствии белков плазмы [условия (С+)]:

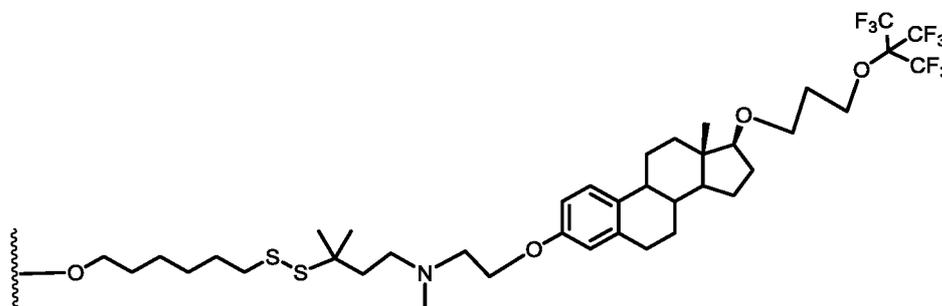
Цели: данный пример нацелен на демонстрацию того, что конъюгаты, содержащие ключевую химическую группировку согласно **Формуле (II)**, связанные с макромолекулярным лекарственным средством, таким как **ОЛС**, могут осуществлять доставку через фосфолипидные мембраны в клетки и, соответственно, вызывают сайленсинг генов как в **условиях (С-)**, так и в **условиях (С+)**. В отличие от этого, аналогичные соединения, структура которых не соответствует **Формуле (II)**, будут либо полностью неактивными в трансмембранной доставке, либо будут индуцировать сайленсинг генов только в бессывороточных условиях.

Способы:

Группировки E: группировки E, E' или E'' по изобретению: **Апо-Si-K-18** согласно **Формуле (Vb')** и **Апо-Si-K-13** согласно **Формуле (Vb'')** соответствуют всем структурным характеристикам, как изложено в **Формуле (II)**. Их структуры являются следующими:



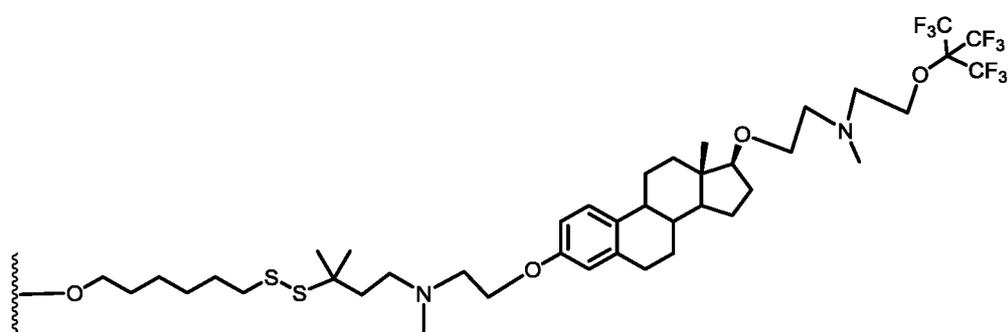
Апо-Si-K-18; Формула (Vb')



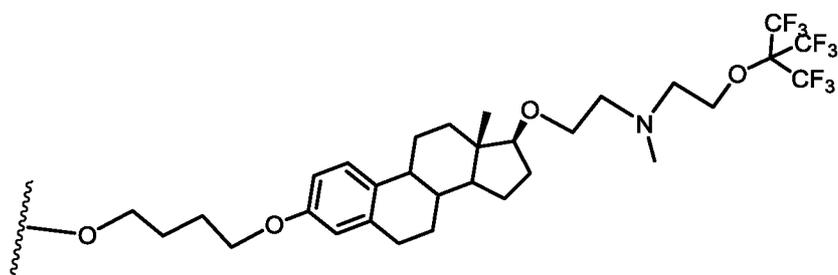
Апо-Si-K-13; Формула (Vb'')

Каждая группировка E связывается с 5'-концом олигонуклеотидной нити дуплекса дмРНК. **Апо-Si-K-18** и **Апо-Si-K-13** синтезировали согласно

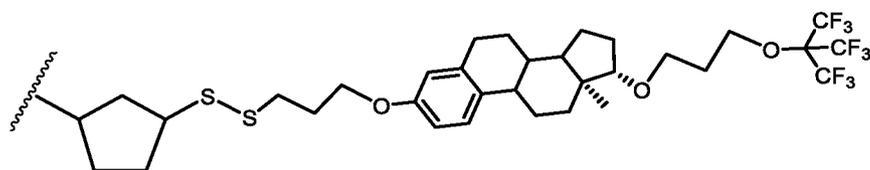
предыдущим Примерам. Кроме того, следующие структурно родственные группировки (**Апо-Si-K-19**, **Апо-Si-W** и **Апо-Si-G**) служили в качестве контролей, так как, хотя и имея существенное структурное сходство с **Апо-Si-K-18** и **Апо-Si-K-13**, данные группировки не полностью соответствуют всем структурным характеристикам **Формулы (II)** следующим образом: *(i)*. у **Апо-Si-K-19** и **U**, и **Q** не являются отсутствующими группами, тогда как **Формула (II)** подразумевает то, что один из **U** или **Q** должен отсутствовать; *(ii)*. **Апо-Si-W** не содержит дисульфидную группировку, которая является интегральной частью **Формулы (II)**; *(iii)*. в **Апо-Si-G** и **U**, и **Q** отсутствуют, тогда как **Формула (II)** подразумевает то, что один из **Q** или **U** не должен отсутствовать.



Апо-Si-K-19



Апо-Si-W



Апо-Si-G

Конъюгаты: дуплексы РНК, который каждый состоит из одной нити длиной 25 нуклеотидов и одной нити длиной 27 нуклеотидов, конструировали в качестве субстратов дайсер (дмиРНК) с целью сайленсинга экспрессии гена, кодирующего

EGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок). Последовательности олигонуклеотидов были следующими:

Антисмысловая последовательность:

5'-E-CGGUGGUGCAGAUGAACUUCAGGGUCA-3' (SEQ ID NO. 1);

5

Смысловая последовательность РНК:

5'-E-ACCCUGAAGUUCAUCUGCACCACCG-3' (SEQ ID NO. 2); где E означает

E, E' или E'' по изобретению или соответствующий контроль; r равен рибозе, и m (например, mG) равен метилированию на 2'-гидроксиле рибозной группировки.

10 Каждый дуплекс присоединяли к двум идентичным группировкам E, представляющим собой либо группировки E по изобретению (**Апо-Si-K-18** или **Апо-Si-K-13**); либо соответствующие контрольные группировки (**Апо-Si-K-19**, **Апо-Si-W** или **Апо-Si-G**).

15 В целом, следовательно, синтезировали 5 конъюгатов, причем каждый содержал дмиРНК для сайленсинга гена EGFR, и каждый присоединяется к двум группировкам E. Два представляли собой конъюгаты по изобретению, содержащие либо группировку **Апо-Si-K-13**, либо **Апо-Si-K-18**, тогда как три конъюгата представляли собой контрольные конъюгаты, в которых дуплекс дмиРНК был присоединен к одной из группировок **Апо-Si-G**, **Апо-Si-K-19** или **Апо-Si-W**. Каждый

20 конъюгат был назван согласно его группировке E.

Культура клеток:

Линию клеток **HeLa-EGFP** получали у Cell Biolabs. Клетки выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (Gibco), дополненной 10% FBS (фетальная телячья сыворотка) (Gibco), 100 U/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицидина. Клетки поддерживали в инкубаторе при 37°C с увлажненным воздухом с 5% CO₂.

25

За сутки до трансфекции клетки высаживали (40000 клеток/лунку) в 24-луночные черные планшеты со стеклянным дном. На следующие сутки клетки инкубировали либо с конъюгатом **Апо-Si-K-18**, либо с конъюгатом **Апо-Si-K-13** (конъюгаты по изобретению), либо с соответствующими контролями в присутствии 10% фетальной телячьей сыворотки [FBS, условия сыворотка (+)]. Для инкубации в бессывороточных условиях среду отсасывали, клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS), и затем среду заменяли

30

35 бессывороточной средой Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). Через 24 часа данную среду заменяли средой с 10% FCS. Период инкубации для всех клеток составлял

72 часа. Оценивали разные концентрации данных конъюгатов в интервале дозы 40-300 нМ.

Понижающая регуляция экспрессии генов:

5 Понижающую регуляцию экспрессии генов измеряли через 72 часа после трансфекции. Для этой цели среду отсасывали, и клетки промывали HBSS. Экспрессию белка измеряли посредством измерения интенсивности флуоресценции EGFP, которую количественно измеряли посредством многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan); длина волны возбуждения – 488 нм, длина волны
10 испускания – 535 нм. Эксперименты проводили в тройных повторностях, и результаты по флуоресценции EGFP сравнивали с интенсивностью флуоресценции необработанных клеток (т.е. не обработанных конъюгатами). Результаты представлены в виде процентной доли интенсивности флуоресценции по сравнению с контролями. Значимость межгрупповых различий оценивали
15 посредством двухстороннего t-критерия с p меньше 0,05, определенным как значимое различие.

Результаты:

Конъюгаты по изобретению: Апо-Si-K-13 и Апо-Si-K-18:

20 **Бессывороточные условия:** оба конъюгата: Апо-Si-K-13 и Апо-Si-K-18 проявляли надежное поглощение клетками и соответствующий эффективный сайленсинг гена. Конъюгат Апо-Si-K-13 при концентрации данного конъюгата 40 нМ проявлял сайленсинг 75,5 плюс/минус 2,0% (среднее значение плюс/минус SD (стандартное отклонение)). Сайленсинг увеличивался до 86,6 плюс/минус 0,5%
25 при 150 нМ данного конъюгата. Конъюгат Апо-Si-K-18 проявлял аналогичную эффективность сайленсинга – 68,4 плюс/минус 0,5% при 40 нМ данного конъюгата (среднее значение плюс/минус SD), которая увеличивалась до сайленсинга 84,7 плюс/минус 0,2% при 150 нМ данного конъюгата; [p меньше 0,001, t-критерий, по сравнению с контролем – необработанными клетками].

30 **В присутствии сыворотки:** в присутствии сыворотки оба конъюгата: Апо-Si-K-13 и Апо-Si-K-18 давали значимый сайленсинг генов. Конъюгат Апо-Si-K-13 при 300 нМ давал сайленсинг гена 15,5 плюс/минус 3,2%, который возрастал до 44 плюс/минус 1,5% при 600 нМ, тогда как конъюгат Апо-Si-K-18 давал сайленсинг гена 65,4 плюс/минус 0,6% при 300 нМ (среднее значение плюс/минус SD); (p меньше 0,001, t-критерий, по сравнению с контролем – необработанными
35 клетками).

Контрольные конъюгаты: Апо-Si-G, Апо-Si-K-19, Апо-Si-W:

Бессывороточные условия: в бессывороточных условиях конъюгат Апо-Si-G проявлял надежное поглощение клетками и соответствующий эффективный сайленсинг гена. Конъюгат Апо-Si-G проявлял при 40 нМ сайленсинг 40,7 плюс/минус 2,2% (среднее значение плюс/минус SD), который увеличивался при 150 нМ до 70,9 плюс/минус 1,1%. Апо-Si-K-19 проявлял сайленсинг гена 37,7 плюс/минус 0,8% при 150 нМ (среднее значение плюс/минус SD); (p меньше 0,001 по сравнению с контролем – необработанными клетками).

В присутствии сыворотки: ни один из контрольных конъюгатов: Апо-Si-G, Апо-Si-K-19 и Апо-Si-W, несмотря на их структурные сходства с конъюгатами по изобретению, не проявлял какого-либо сайленсинга гена в присутствии сыворотки. Конъюгат Апо-Si-W не проявлял какого-либо сайленсинга гена даже в бессывороточных условиях.

Резюме результатов:

Оба конъюгата: Апо-Si-K-13 и Апо-Si-K-18 проявляли надежное поглощение и сайленсинг гена при инкубации с клетками *in vitro*. Активность по сайленсингу гена, оказываемая обоими конъюгатами, была очевидна как в присутствии, так и в отсутствие белков плазмы в культуральной среде, т.е. и в условиях (C+), и в условиях (C-) соответственно. Эта эффективность конъюгатов по изобретению явно отличалась от эффективности контрольных конъюгатов. Конъюгаты Апо-Si-G и Апо-Si-K-19, но не конъюгат Апо-Si-W были активными в сайленсинге гена в бессывороточных (C-) условиях; ни один из контрольных конъюгатов не был активным в сайленсинге гена в присутствии белков плазмы [условия (C+)].

Обсуждение:

Как показано в данном Примере, ключевая химическая группировка по изобретению, имеющая структуру, как изложено в **Формуле (II)**, в самом деле, влечет за собой надежную эффективность родственных конъюгатов в доставке через клеточные мембраны в клетки и в индуцировании биологического эффекта: сайленсинга гена. Данную эффективность наблюдали и в (C-) условиях, и в (C+) условиях. Важно то, что конъюгаты по изобретению и группа контрольных конъюгатов дают важные перспективы структуры/функции по ключевой химической группировке по изобретению согласно **Формуле (II)**: группировки E всех конъюгатов: как конъюгатов по изобретению, так и контрольных конъюгатов

содержат стерольный остов и нона-фтор-*трет*-бутанольный остаток. Однако очевидно, что этого не достаточно для придания активности, даже в бессывороточных условиях (что отражается, например, в результатах конъюгата **Апо-Si-W**, который не демонстрировал активности). Добавление дисульфидной группы на группировку **E** влечет за собой активность в бессывороточных условиях (например, эффективность конъюгатов по изобретению **Апо-Si-K-13** и **Апо-Si-K-18**, а также эффективность контрольного конъюгата **Апо-Si-G** в бессывороточных условиях). Однако этого не было достаточно для обеспечения эффективности в присутствии белков плазмы.

В отличие от этого, добавление для каждой группировки **E** одной группировки **U** или **Q**, которая не представляет собой отсутствующую группу, в самом деле, придавало активность конъюгату в присутствии белков плазмы, что демонстрируется эффективным сайленсингом гена, наблюдаемым с конъюгатами **Апо-Si-K-18** или **Апо-Si-K-13**. Неожиданное наблюдение предоставлялось **Апо-Si-K-19**, демонстрирующим то, что случай, когда обе **U** и **Q** не являются отсутствующими группами на группировку **E**, является вредным для биологической эффективности соответствующего конъюгата.

В целом, эти данные поддерживают мнение о том, что **Формула (II)**, в самом деле, представляет уникальный, новый и непредсказуемый баланс между разными детерминантами, который совокупно и во взаимодействии влечет за собой желательную эффективность соответствующих конъюгатов в трансмембранной доставке и последующем сайленсинге гена.

Пример 7: положительное влияние 5'-фосфата на эффективность субстрата дайсер по изобретению:

Цель: субстраты дайсер, имеющие структуры, как изложено в любой из Формул **Cn-1**, **Cn-2**, **Cn-3**, **Cn-4**, **Cn-6**, **Cn-7**, **Cn-8** или **Cn-9**, также могут содержать фосфатную, сульфатную или карбоксильную группу на 5'-конце сопровождающей (смысловой) нити РНК с целью взаимодействия с карманом связывания, высланным положительно заряженными аминокислотными остатками, который находится в сайте заякоривания РНК на ферменте дайсер. Провели эксперимент для того, чтобы продемонстрировать полезное влияние на эффективность субстратов дайсер по изобретению, оказываемое такой отрицательно заряженной группировкой.

Способы: в данном эксперименте использовали два субстрата дайсер, причем каждый имел специфичную последовательность для сайленсинга

экспрессии гена EGFP, как описано в **Примере 6**. Одна из дмиРНК, кроме того, имела фосфатную группу, присоединенную на 5'-конце сопровождающей (смысловой) нити [**обозначенная (Ф+) дмиРНК**], тогда как у другой дмиРНК 5'-конец сопровождающей (смысловой) нити представлял собой 5'-гидроксил

5 концевое нуклеотида [**обозначенная (Ф-) дмиРНК**]. Линии клеток HeLa-GFP, полученные от Cell Biolabs, выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (Gibco), дополненной 10% FBS (Gibco), 100 U/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицидина. Клетки поддерживали в инкубаторе при 37°C с увлажненным воздухом с 5% CO₂.

10 За сутки до трансфекции клетки (40000 клеток/лунку) высаживали в 24-луночные черные планшеты со стеклянным дном с полной средой без добавки антибиотиков. На следующие сутки клетки трансфицировали RNAiMAX (Lipofectamine, Invitrogen) согласно инструкциям изготовителя в субоптимальных условиях с использованием 0,1 нМ дмиРНК и 1 мкл трансфекционного реактива. Клетки затем инкубировали с

15 трансфекционной смесью в течение 24 часов, с последующим добавлением полной среды без антибиотиков (1 мл/лунку). Понижающую регуляцию белка измеряли в 72 часа после трансфекции: с этой целью среду отсасывали, и клетки промывали HBSS. Интенсивность флуоресценции EGFP количественно измеряли

20 посредством многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan) при длине волны возбуждения – 488 нм, длина волны испускания – 535 нм.

Результаты: при использованных низких субоптимальных дозах (0,1 нМ дмиРНК) (**Ф-) дмиРНК** осуществляла понижающую регуляцию уровней EGFP на 20 плюс/минус 2% (среднее значение плюс/минус SD). В отличие от этого (**Ф+) дмиРНК** осуществляла сайленсинг экспрессии гена на 67 плюс/минус 2% (р меньше 0,0001; *t-критерий*).

25

Заключение: субстрат дайсер, который содержит фосфатную группу на 5'-конце сопровождающей (смысловой) нити, проявляет преимущественную эффективность в сайленсинге гена по сравнению с дмиРНК, лишенной данной группы.

30

Пример 8: механизм действия конъюгата по изобретению, представляющего собой субстрат дайсер:

На **Фиг. 3 и 4** проиллюстрирован примерами механизм действия (МД) конъюгата по изобретению. Проиллюстрированы примерами конъюгаты согласно

35 **Формулам (Сп-3) и (Сп-9)**, соответственно, где дуплекс РНК представляет собой субстрат дайсер длиной 25/27 нуклеотидов с фосфатной группой, связанной на 5'-

конце сопровождающей нити: при достижении цитоплазмы из-за заметно восстановительных окружающих условий происходит расщепление и удаление группировок E, E' и E'', оставляя короткий обрубок на каждую группировку E, содержащий тиольную группу, связанную с 6-углеродной углеводородной цепью (Фиг. 3 и Фиг. 4а). Данный дуплекс РНК затем взаимодействует с эндонуклеазой дайсер. Это взаимодействие инициируется связыванием 3'-конца направляющей (антисмысловой) нити дуплекса, который состоит из 2-нуклеотидного липкого конца, с гидрофобным карманом белка и взаимодействием фосфатной группы сопровождающей (смысловой) нити с соответствующим положительно заряженным карманом на поверхности белка. Данные положения заякоривания РНК на белке обеспечивают осуществление им точного двухнитевого разрыва дуплекса РНК, оставляя 21/21-нуклеотидную двойную спираль, связанную с одним остающимся обрубком E [Фиг. 3 и Фиг. 4б]. На Фиг. 3 и Фиг. 4 продемонстрировано удаление смысловой нити ферментом хеликазой (цитоплазматический фермент, способный разделять нити РНК). Это действие удаляет второй обрубок остатка E, таким образом, высвобождая интактную антисмысловую нить для вхождения в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) для того, чтобы индуцировать сайленсинг желательного гена [Фиг. 3 и Фиг. 4г].

20 **Пример 9: при инкубации соединений по изобретению с белками плазмы наблюдаются и связанные с альбумином, и не содержащие альбумин фракции**

25 **Цель:** данный эксперимент проводили для того, чтобы оценить, проявляют ли соединения по изобретению, при инкубации с альбумином, и связанную с альбумином и не содержащую альбумин фракции, таким образом, поддерживая потенциальный механизм действия в отношении их наблюдаемой активности в условиях сыворотка (+).

30 **Обоснование:** главным преимуществом конъюгатов по изобретению является их способность проявлять биологическую активность как в отсутствие, так и в присутствии белков плазмы. Связывание лекарственного средства с белками плазмы может быть полезным в разных аспектах, таких как продление периода полувыведения лекарственного средства в системе кровообращения и защита от деградации. Однако аффинность связывания с альбумином, которая является 35 слишком высокой, может неблагоприятно ограничивать доступность данного лекарственного средства для взаимодействия с его клетками-мишенями.

Следовательно, для конъюгатов по изобретению, при их взаимодействии с альбумином, желательна иметь и фракцию, которая связывается с белком плазмы (*связанная с альбумином фракция*), и фракцию, которая может свободно диффундировать во внеклеточных жидкостях с достижением и взаимодействием с клетками-мишенями (*фракция, не содержащая альбумин*). Настоящий Пример осуществляли для того, чтобы продемонстрировать данные характеристики конъюгатов по изобретению.

Способы:

Использовали гель-электрофорез для проверки того, в какой степени конъюгаты по изобретению связываются с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Для выявления свободной фракции образцы РНК разводили в буфере Tris, рН 8, и добавляли BSA (10%) до конечной концентрации 2 мг/мл (**полосы Б**). Контрольные образцы разводили в воде (**полосы А**).

Для каждой группы (А или Б) полосы обозначали согласно следующей

15 **Таблице:**

Номер полосы	1	2	3	4
Конъюгат	25/27 нуклеотидов "голая РНК"	Конъюгат Апо-Si-G	Конъюгат Апо-Si-K-13	Конъюгат Апо-Si-18

Все образцы инкубировали в течение ночи при 25°C. Затем загружали образцы РНК всех полос (19 пмоль на полосу) на 12%-ный нативный полиакриламидный гель и индуцировали к миграции в электрическом поле 5 В/см в течение 1 часа (прибор Mini-protean от Bio-Rad, Израиль).

Результаты:

Как показано на **Фиг. 5**, инкубация конъюгатов по изобретению, содержащих группировки **Е Апо-Si-K-13** или **Апо-Si-K-18**, приводила к образованию двух фракций: фракции, которая была связана с альбумином (**Стрелка №1**), и фракции, которая не содержала альбумин (**Стрелка №2**). В отличие от этого, контрольный конъюгат, который содержал группировки **Е Апо-Si-G**, имел только одну фракцию: наблюдали только фракцию, связанную с альбумином.

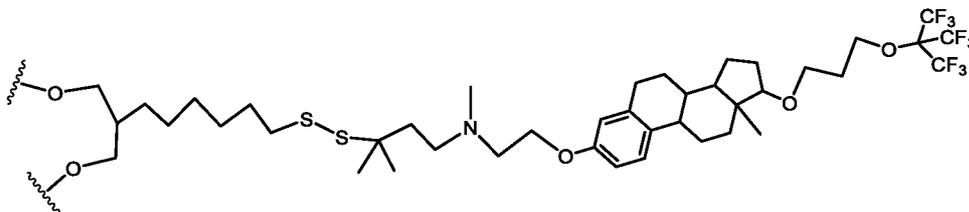
Заключения: эти данные демонстрируют то, что конъюгаты по изобретению, содержащие группировки **Апо-Si-K-18** или **Апо-Si-K-13**, проявляют две фракции при контакте с альбумином: связанную с альбумином и не содержащую альбумин фракцию. Это может объяснять их биологическую эффективность (например, в сайленсинге гена), наблюдаемую как в присутствии (**С+**), так и в отсутствие (**С-**) белков плазмы, так как даже в присутствии белков

плазмы данный конъюгат проявляет несвязанную фракцию, которая может свободно диффундировать и взаимодействовать с клетками-мишенями. В отличие от этого, контрольные конъюгаты, такие как конъюгат **Апо-Si-G**, имеют очень большую аффинность к альбумину и, следовательно, проявляют только связанную с альбумином фракцию. Эти контрольные конъюгаты, при взаимодействии с альбумином, не имеют свободной фракции, требующейся для диффузии через внеклеточное пространство для взаимодействия с клетками-мишенями и, следовательно, являются активными только в бессывороточных условиях.

10 **Пример 10: конъюгаты по изобретению, которые содержат три группировки E, превосходят конъюгаты, которые содержат только две группировки E, как без сыворотки [условия (С-)], так и в присутствии белков плазмы [условия (С+)]:**

Способы:

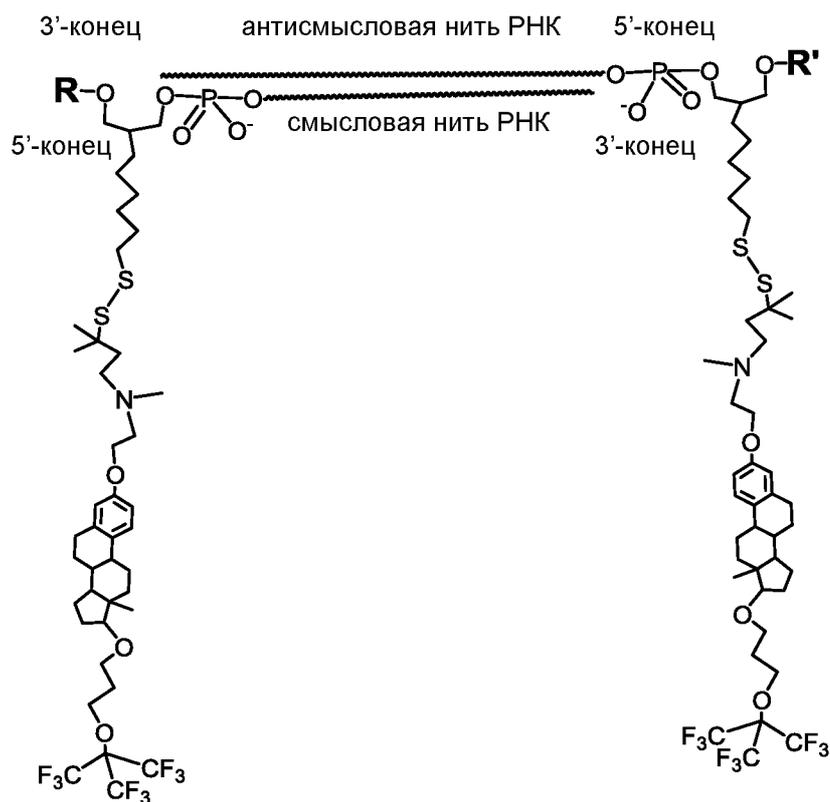
15 Группировка E, используемая в данных экспериментах, представляла собой **Апо-Si-K-43**, имеющую следующую структуру, как изложено в **Формуле (Vc'')**:



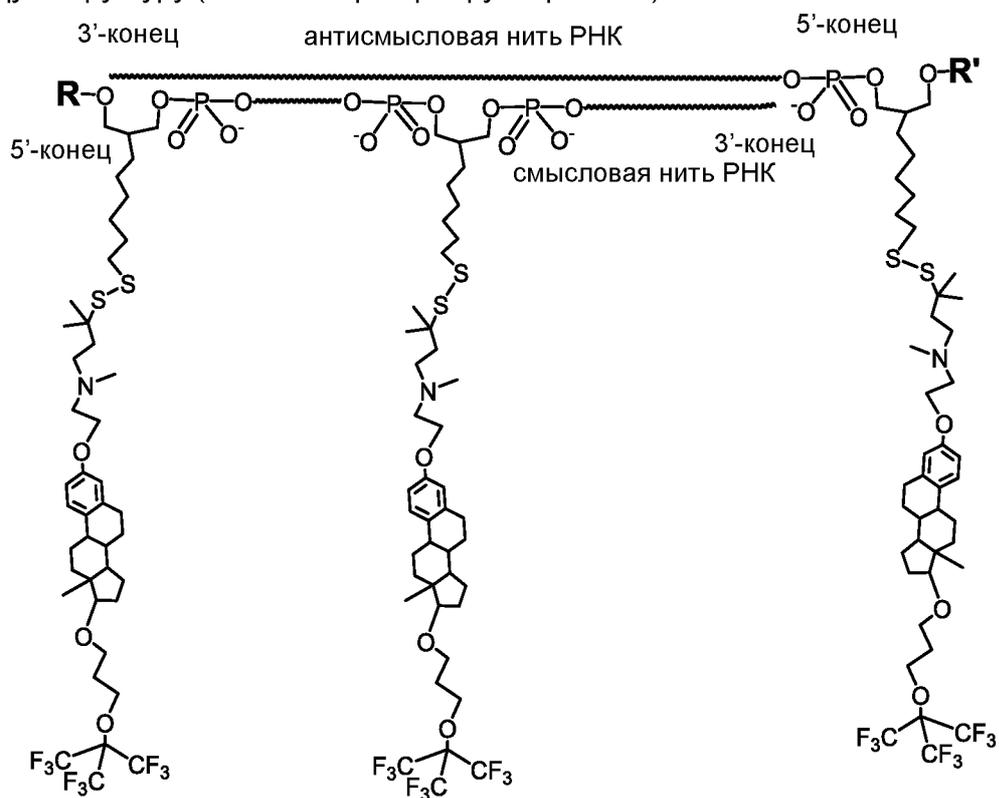
Формула (Vc'')

20 Проверяли два конъюгата, содержащих указанную группировку E: конъюгат, содержащий две группировки E, и конъюгат, содержащий три группировки E, связанные с олигонуклеотидом. Каждый конъюгат содержал дуплекс РНК субстрата дайсер (дмиРНК), содержащий одну нить длиной 25 нуклеотидов и одну нить длиной 27 нуклеотидов, нацеленный на сайленсинг экспрессии гена, кодирующего EGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок). Таким образом, сайленсинг экспрессии гена EGFP был выбран в качестве биологической функции, подлежащей оценке, после трансмембранной доставки *in vitro*, обеспечиваемой группировками E по изобретению. Нуклеотидная последовательность указанной дмиРНК была такой же, как описано выше в **Примере 6**.

30 Один из конъюгатов представлял собой **Конъюгат (Сп-7)**, имеющий следующую структуру (т.е. имеющий две группировки E):



Второй конъюгат представлял собой конъюгат (Сп-9), имеющий следующую структуру (т.е. имеющий три группировки E):



Формула (Cn-9)

В обоих конъюгатах все группировки R и R' представляли собой фосфатные группы.

5 Культура клеток:

Линию клеток **HeLa-EGFP** получали у Cell Biolabs. Клетки выращивали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (Gibco), дополненной 10% FBS (Gibco), 100 U/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицидина. Клетки поддерживали в инкубаторе при 37°C с
10 увлажненным воздухом с 5% CO₂.

За сутки до трансфекции клетки высаживали (40000 клеток/лунку) в 24-луночные черные планшеты со стеклянным дном. На следующие сутки клетки инкубировали либо с **конъюгатом (Cn-7)**, либо с **конъюгатом (Cn-9)** в присутствии 10% фетальной телячьей сыворотки [FBS, условия сыворотка (+)]. Для инкубации
15 при бессывороточных условиях [условия сыворотка (-)] среду отсасывали, клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS), и затем среду заменяли бессывороточной средой Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). Через 24 часа данную среду заменяли средой с 10% FCS для остального периода инкубации (всего 72 часа). Клетки инкубировали либо с **конъюгатом (Cn-7)**, либо с
20 **конъюгатом (Cn-9)**: доза 150 нМ в условиях без сыворотки [условия (C-)], либо доза 600 нМ в присутствии белков плазмы [условия (C+)].

Понижающая регуляция экспрессии генов:

Понижающую регуляцию экспрессии генов измеряли через 72 часа после
25 трансфекции. Для этой цели среду отсасывали, и клетки промывали HBSS. Экспрессию белка измеряли посредством измерения интенсивности флуоресценции EGFP, которую количественно измеряли посредством многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan); длина волны возбуждения – 488 нм, длина волны испускания – 535 нм. Эксперименты проводили в тройных
30 повторностях, и результаты по флуоресценции EGFP сравнивали с интенсивностью флуоресценции необработанных клеток (т.е. не обработанных конъюгатами). Результаты представлены в виде процентной доли интенсивности флуоресценции по сравнению с флуоресценцией другого конъюгата. Значимость различий между конъюгатами оценивали посредством двухстороннего *t-критерия*
35 с *p* меньше 0,05, определенным как значимое различие.

Результаты:

Бессывороточные условия: оба конъюгата: **Cn-7** и **Cn-9** проявляли значительное поглощение клетками и соответствующий эффективный сайленсинг гена. **Конъюгат Cn-7** проявлял сайленсинг гена **41,4 плюс/минус 1,0%** при концентрации данного конъюгата **150 нМ** (среднее значение плюс/минус SD). **Конъюгат Cn-9** проявлял более высокую эффективность сайленсинга – **61,0 плюс/минус 0,5%** при концентрации данного конъюгата **150 нМ**. Различие между конъюгатами было статистически значимым [p меньше 0,001, *t-критерий* сравнения между конъюгатами **Cn-7** и **Cn-9**].

В присутствии сыворотки: оба конъюгата **Cn-7** и **Cn-9** проявляли значительное поглощение клетками и соответствующий эффективный сайленсинг гена. **Конъюгат Cn-7** давал сайленсинг гена **12,3 плюс/минус 1,6%** при концентрации данного конъюгата **600 нМ**, тогда как **Cn-9** давал более сильный сайленсинг гена **25,4 плюс/минус 1,0%** при данной концентрации (среднее значение плюс/минус SD); [p меньше 0,001, *t-критерий* сравнения между конъюгатами **Cn-7** и **Cn-9**].

Резюме результатов:

Оба конъюгата **Cn-7** и **Cn-9** проявляли значительное поглощение и сайленсинг гена при инкубации с клетками *in vitro*. Активность сайленсинга гена, оказываемая обоими конъюгатами, была очевидной как в присутствии, так и в отсутствие белков плазмы в культуральной среде, т.е. в **условиях (C+)** и в **условиях (C-)** соответственно. Сайленсинг имел наибольшую амплитуду в бессывороточных условиях, что вразумительно согласуется с соответствующим отсутствием в данных условиях конкурентного связывания конъюгатов с альбумином. Важно то, что и в **условиях (C+)**, и в **условиях (C-)** сайленсинг гена был статистически значимо выше у конъюгата, который содержал три группировки **E (Cn-9)**, по сравнению с конъюгатом, который содержал только две группировки **E (Cn-7)**.

Заключения:

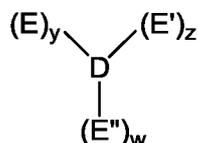
- ДмиРНК, содержащие либо 2, либо 3 две группировки **E** по изобретению проявляют значимый сайленсинг гена *in vitro*.

- Указанный сайленсинг гена встречается либо в присутствии, либо в отсутствие белков плазмы в культуральной среде.

- Конъюгат, который содержит три группировки E, имеет преимущество над конъюгатом, который содержит только две группировки E в предоставлении значимого сайленсинга гена.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (I)**:



5

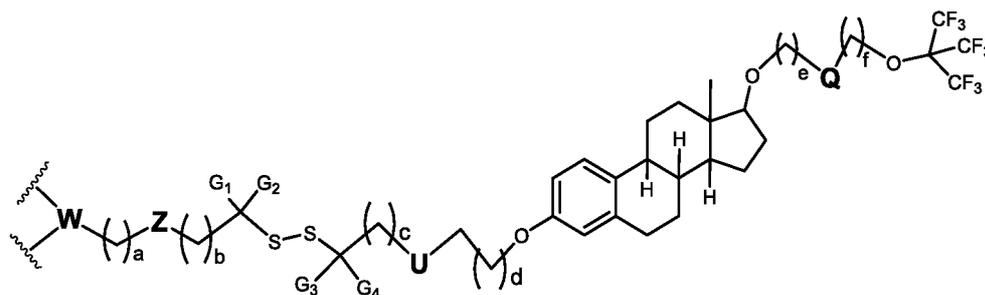
Формула (I)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (I)**, и сольваты и гидраты данных солей, где:

D представляет собой лекарственное средство, подлежащее доставке через биологические мембраны, выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного средства, пептида, белка и природной или модифицированной одноцепочечной или двуцепочечной ДНК или РНК, миРНК, дмиРНК или антисмыслового олигонуклеотида (АСО);

каждый **y**, **z** и **w** представляет собой целое число, независимо выбранное из 0, 1, 2, 3 или 4, где, если любой из **y**, **z** и **w** или их комбинация равен 0, это означает то, что соответствующая группировка **E** (или группировки) отсутствует(ют); по меньшей мере один из **y**, **z** и **w** отличается от 0;

E, **E'** или **E''** могут быть одинаковыми или разными, причем каждый независимо имеет структуру, как изложено в общей **Формуле (II)**:



20

Формула (II)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (II)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где:

один из **U** или **Q** независимо отсутствует, а другой выбран из группы, состоящей из $-\text{NH}-$, $-\text{N}(\text{CH}_3)-$, $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)-$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_3)-$;

25

G_1 , G_2 , G_3 и G_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, метила или этила; группировки G_1 , G_2 , G_3 и G_4 могут быть одинаковыми или разными; по меньшей мере два из G_1 , G_2 , G_3 и G_4 представляют собой атомы водорода;

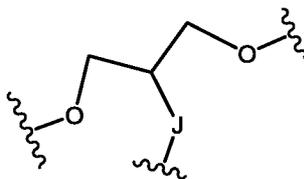
5 Z выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, простого эфира, сложного эфира, амина и амида;

a , b , c , d представляют собой целые числа, причем каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, где 0 равен отсутствию; a , b , c , d могут быть одинаковыми или разными;

10 e и f представляют собой целые числа, причем каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 1, 2 и 3; e и f могут быть одинаковыми или разными;

если любой из каждого a или b больше или равен 2, тогда соответствующая углеводородная цепь может быть либо насыщенной, либо ненасыщенной;

15 W выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, гидроксила, дигидроксила, природного или модифицированного нуклеозида и структуры, как изложено в **Формуле (II')**:



Формуле (II')

20 где J выбран из отсутствующей группы, $-CH_2-$, вторичного или третичного амина и атома кислорода;

и где группировка согласно **Формуле (II')** может быть связана с любой из групп, состоящих из отсутствующей группы; атома водорода; D ; защитной группы, как определено в данном документе (например, защитной группы спирта); фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы; и твердой подложкой;

25 группировка E , E' или E'' может быть связана с одной группировкой D через одну или две точки.

2. Конъюгат по п. 1, в котором в группировке E , E' или E'' W представляет собой нуклеозид, выбранный из природного или модифицированного аденина, цитозина, тимина и урацила; и сахарная группировка представляет собой рибозу

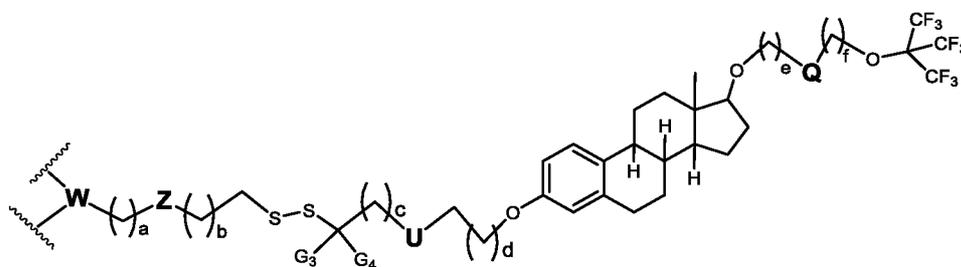
30 или 2'-дезоксирибозу.

3. Конъюгат по п. 2, в котором в группировке E , E' или E'' W представляет собой 2'-дезоксиуридин.

4. Конъюгат по п. 1, в котором в группировке E, E' или E'' W имеет структуру, изложенную в **Формуле (II')**, где J представляет собой $-\text{CH}_2-$.

5. В одном воплощении данного изобретения согласно нему предложены E, E' или E'' согласно **Формуле (II)**, имеющие структуру, как изложено в **Формуле (III)**:

5

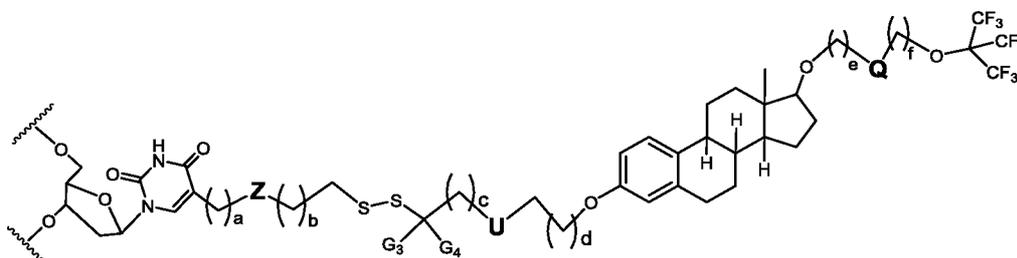


Формула (III)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (III)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый U, Q, Z, G₃, G₄, a, b, c, d, e, f, W имеет такое же значение, как определено для **Формулы (II)**.

10

6. Конъюгат по п. 5, в котором группировка E, E' или E'' имеет структуру, как изложено в **Формуле (IVa)**:



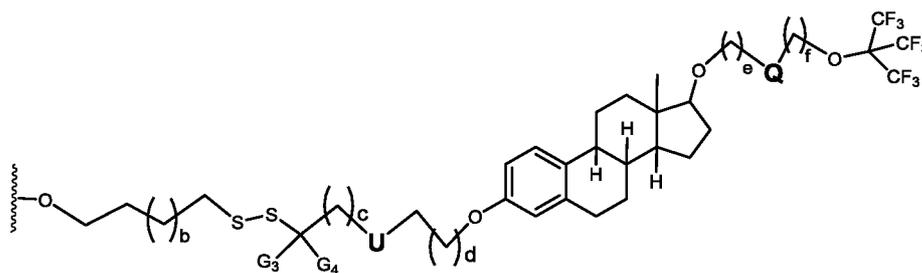
Формула (IVa)

15

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVa)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый Z, U, Q, G₃, G₄, a, b, c, d, e и f имеет такое же значение, как и в **Формуле (III)**.

20

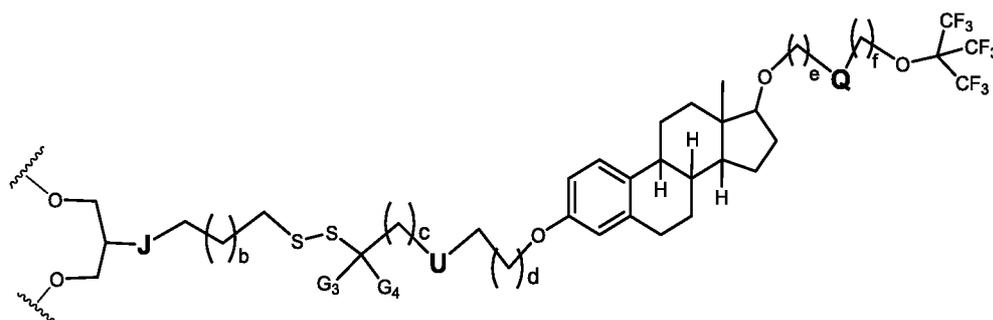
7. Конъюгат по п. 5, в котором группировка E, E' или E'' имеет структуру, как изложено в **Формуле (IVb)**:



Формула (IVb)

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVb)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **U**, **Q**, **G₃**, **G₄**, **b**, **c**, **d**, **e** и **f** имеет такое же значение, как и в **Формуле (III)**.

8. Конъюгат по п. 5, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, как изложено в **Формуле (IVc)**:

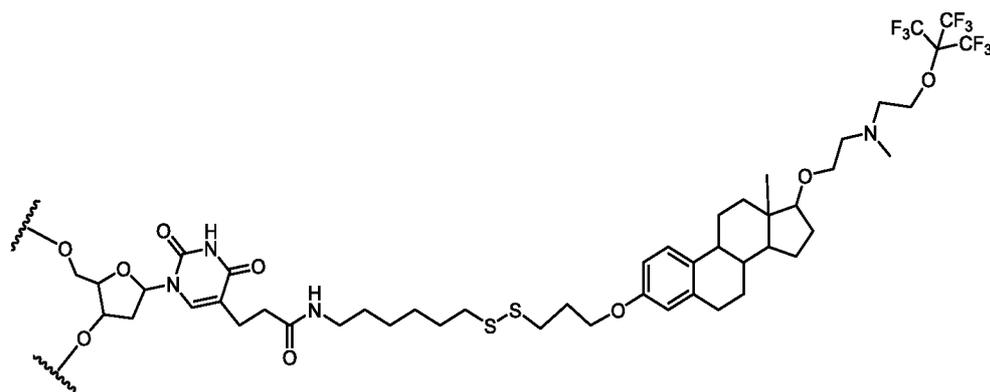


Формула (IVc)

10

15 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVc)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **U**, **Q**, **G₃**, **G₄**, **b**, **c**, **d**, **e** и **f** имеет такое же значение, как и в **Формуле (III)**; **J** выбран из группы, состоящей из отсутствующей группы, $-CH_2-$ и атома кислорода.

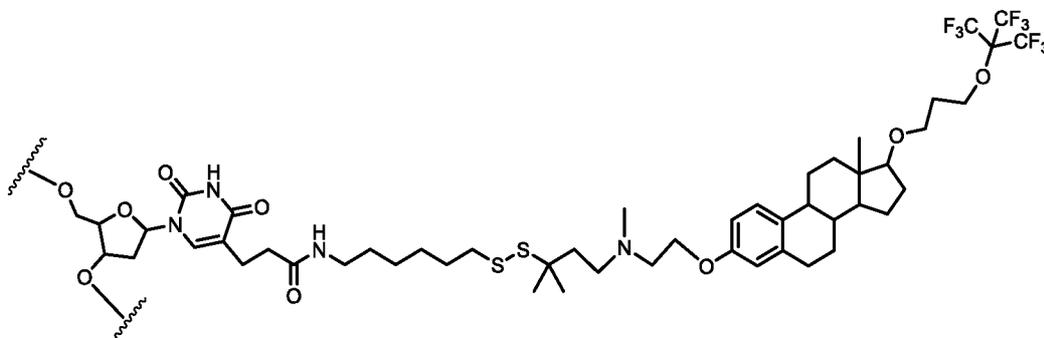
9. Конъюгат по п. 6, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, как изложено в **Формуле (Va')**:



Формула (Va')

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Va')**; где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.

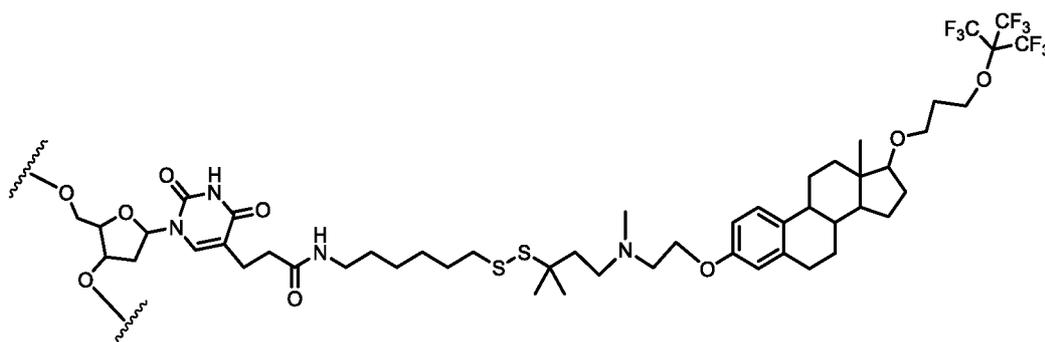
10 10. Конъюгат по п. 6, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, как изложено в **Формуле (Va'')**:



Формула (Va'')

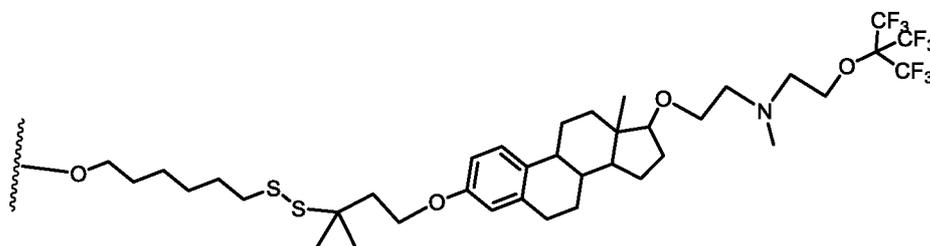
15 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Va'')**; где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.

20 11. Конъюгат по п. 6, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Va''')**:



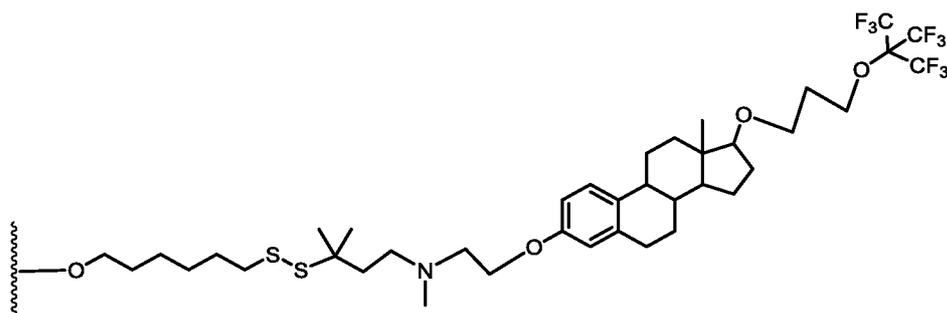
Формула (Va''')

- включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Va''')**; где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.
12. Конъюгат по п. 7, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vb')**:



Формула (Vb')

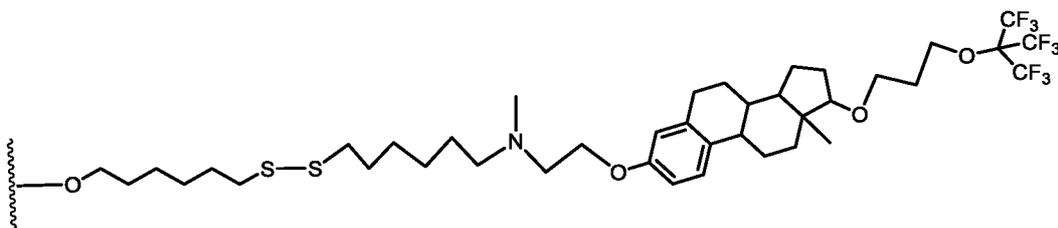
- включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb')**; где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.
13. Конъюгат по п. 7, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, как изложено в **(Vb'')**:



Формула (Vb'')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb'')**; где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.

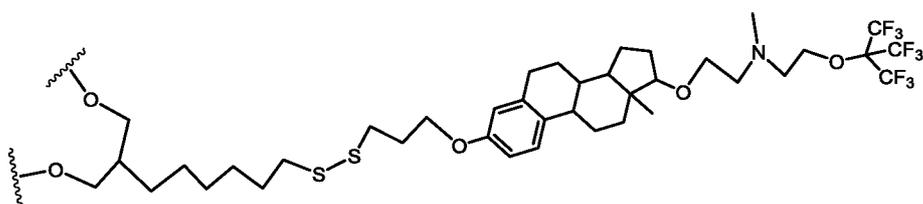
14. Конъюгат по п. 7, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vb''')**:



Формула (Vb''')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vb''')**; где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.

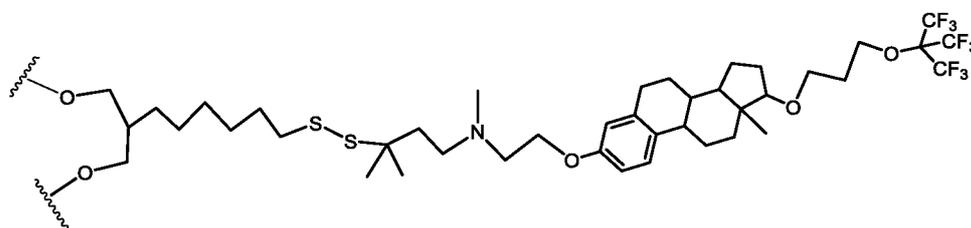
15. Конъюгат по п. 8, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру, как изложено в **(Vc')**:



Формула (Vc')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc')**;
 5 где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.

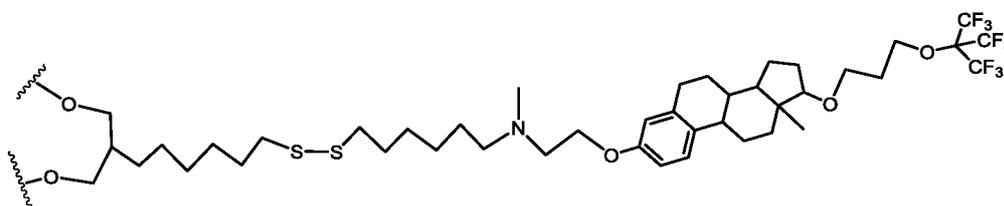
16. Конъюгат по п. 8, в котором группировка **E**, **E'** или **E''** имеет структуру,
 10 как изложено в **(Vc'')**:



Формула (Vc'')

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc'')**;
 15 где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка **E**, **E'** или **E''** может быть связана с одной группировкой **D** через одну или две точки.

20 17. Конъюгат по п. 8, в котором **E**, **E'** или **E''** согласно **Формуле (IVc)**, имеет структуру, как изложено в **Формуле (Vc''')**:



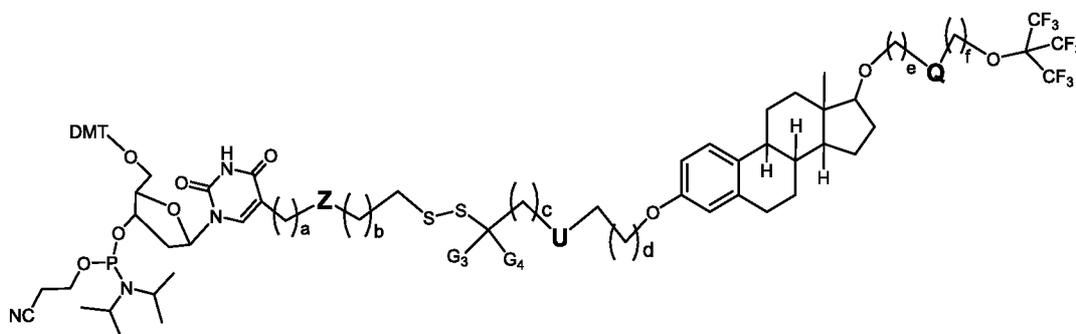
Формула (Vc''')

25 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Vc''')**;
 где указанная молекула возможно связана с отсутствующей группой; атомом водорода; **D**; защитной группой спирта; фосфатной, сульфатной или

карбоксильной группой; или твердой подложкой; группировка E, E' или E'' может быть связана с одной группировкой D через одну или две точки.

18. Молекула-предшественник, имеющая структуру, как изложено в **Формуле (IVaP)**:

5

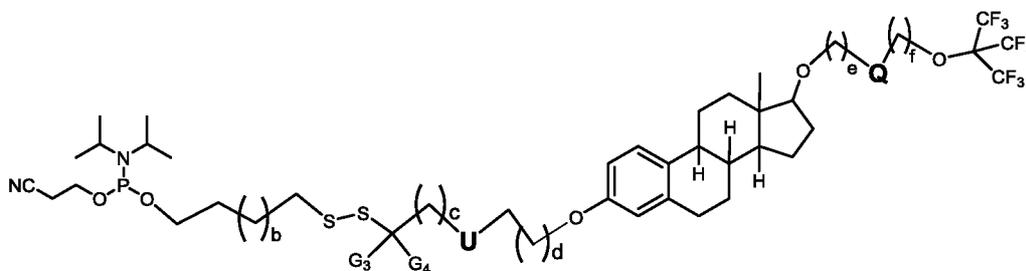


Формула (IVaP)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVaP)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый Z, U, Q, G₃, G₄, a, b, c, d, e, f имеет такое же значение, как и в п. 6.

19. Молекула-предшественник, имеющая структуру, как изложено в **Формуле (IVbP)**:

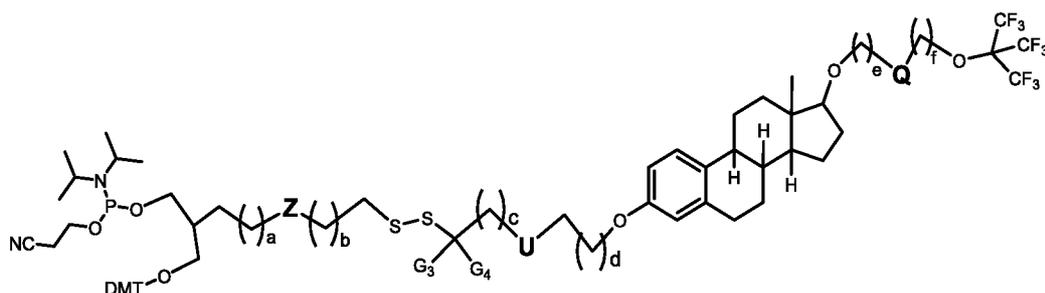
15



Формула (IVbP)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVbP)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый U, Q, G₃, G₄, b, c, d, e, f имеет такое же значение, как и в п. 7.

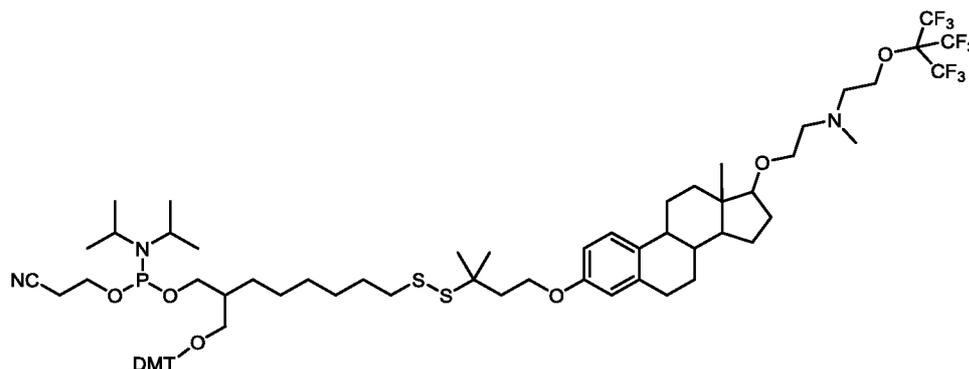
20. Молекула-предшественник, имеющая структуру, как изложено в **Формуле (IVcP)**:



Формула (IVcP)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (IVcP)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **Z, U, Q, G₃, G₄, a, b, c, d, e, f** имеет такое же значение, как и в п. 8.

21. Молекула-предшественник по п. 20, имеющая следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-1)**:

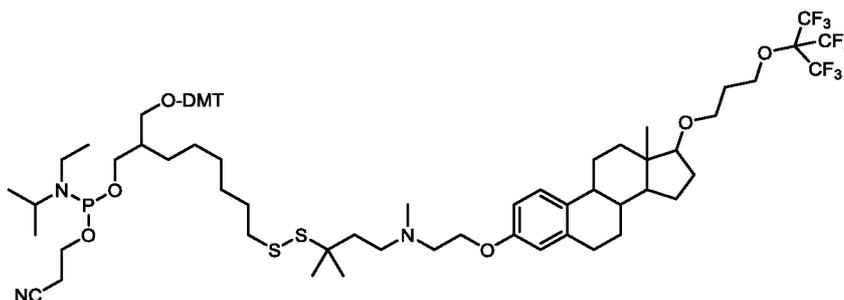


Формула(PP-1)

10

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-1)**, и сольваты, и гидраты данных солей.

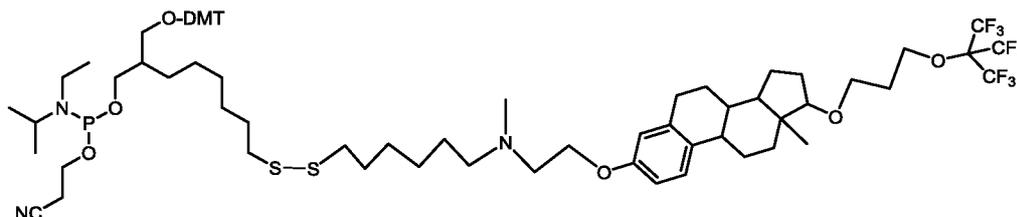
22. Молекула-предшественник по п. 20, имеющая следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-2)**:



Формула (PP-2)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-2)**, и сольваты, и гидраты данных солей.

23. Молекула-предшественник по п. 20, имеющая следующую структуру, как изложено в **Формуле (PP-3)**:



Формула (PP-3)

10

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (PP-3)**, и сольваты, и гидраты данных солей.

24. Конъюгат по п. 1, содержащий группировку **E**, **E'** или **E''** согласно любой из **Формул (II)**, **(III)**, **(IVa)**, **(IVb)**, **(IVc)**, **(Va')**, **(Va'')**, **(Va''')**, **(Vb')**, **(Vb'')**, **(Vb''')**, **(Vc')**, **(Vc'')** или **(Vc''')**, связанную с лекарственным средством.

25. Конъюгат по п. 24, в котором лекарственное средство представляет собой макромолекулярное лекарственное средство.

26. Конъюгат по п. 25, в котором макромолекулярное лекарственное средство представляет собой олигонуклеотидное лекарственное средство (**ОЛС**), содержащее природные или модифицированные олигонуклеотидные цепи, выбранные из миРНК, дмиРНК, мРНК, микроРНК и антисмыслового олигонуклеотида (**АСО**).

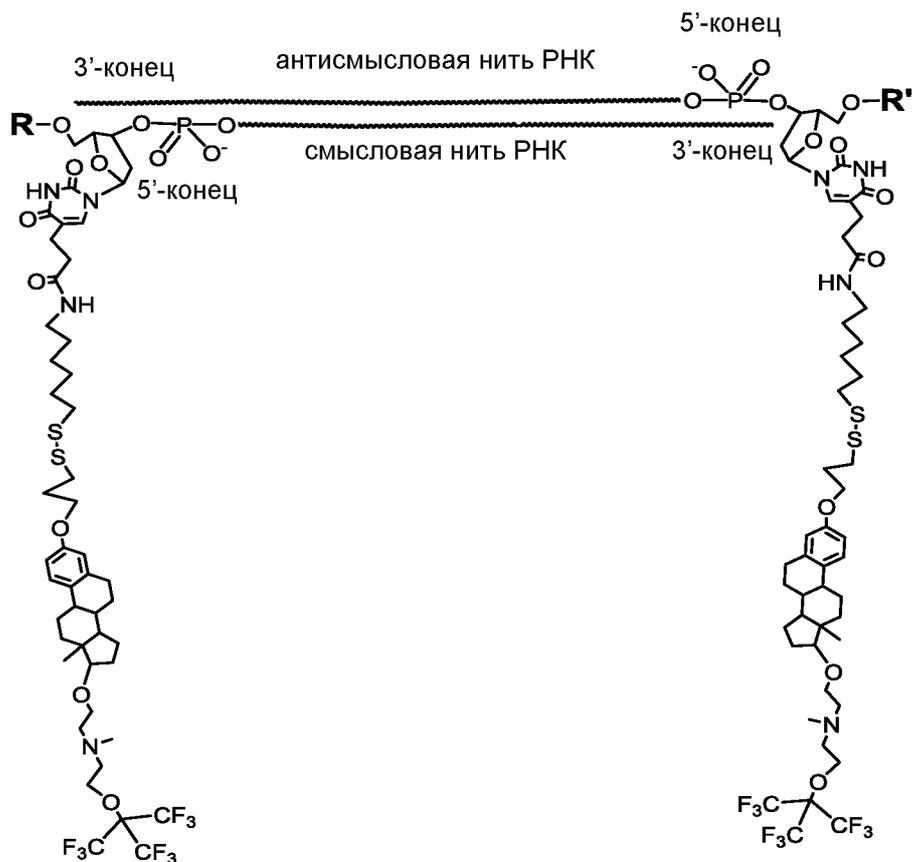
27. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по п. 24 и фармацевтически приемлемую соль или носитель.

28. Конъюгат по п. 26, в котором **ОЛС** связывается с одной, двумя, тремя или более чем тремя группировками **E**, **E'** или **E''**.

29. Конъюгат по п. 26, в котором **ОЛС** представляет собой субстрат дайсер, представляющий собой дуплекс РНК из 24 и 27 нуклеотидов или дуплекс РНК из 25 и 27 нуклеотидов.

30. Конъюгат по п. 29, возможно связанный с фосфатной, сульфатной или карбоксильной группой на одном или двух концах нитей РНК.

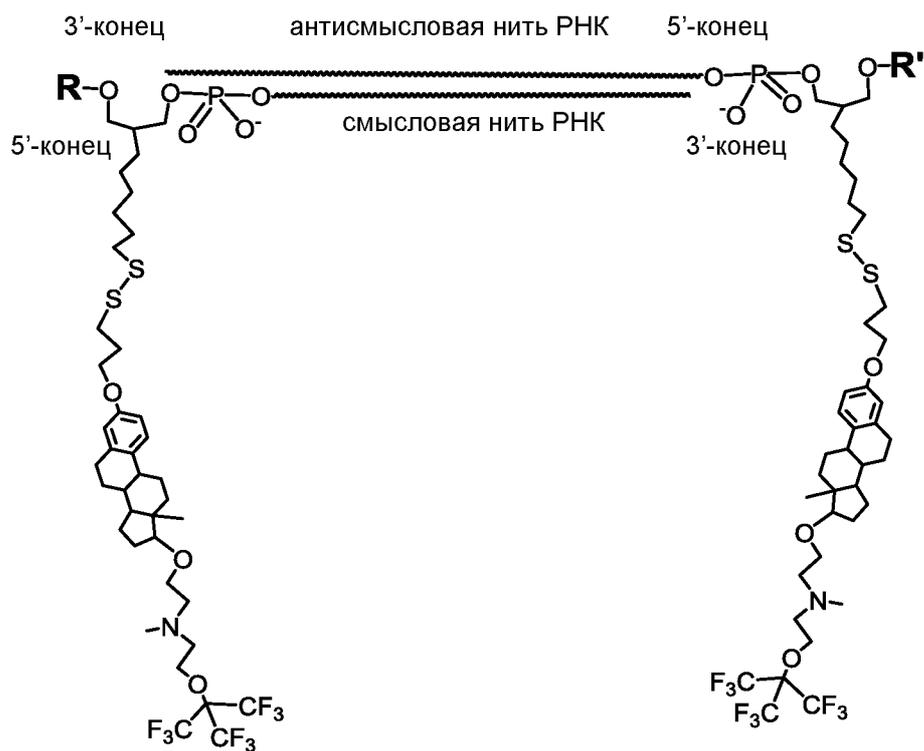
31. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-1)**:



Формула (Сп-1)

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-1)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

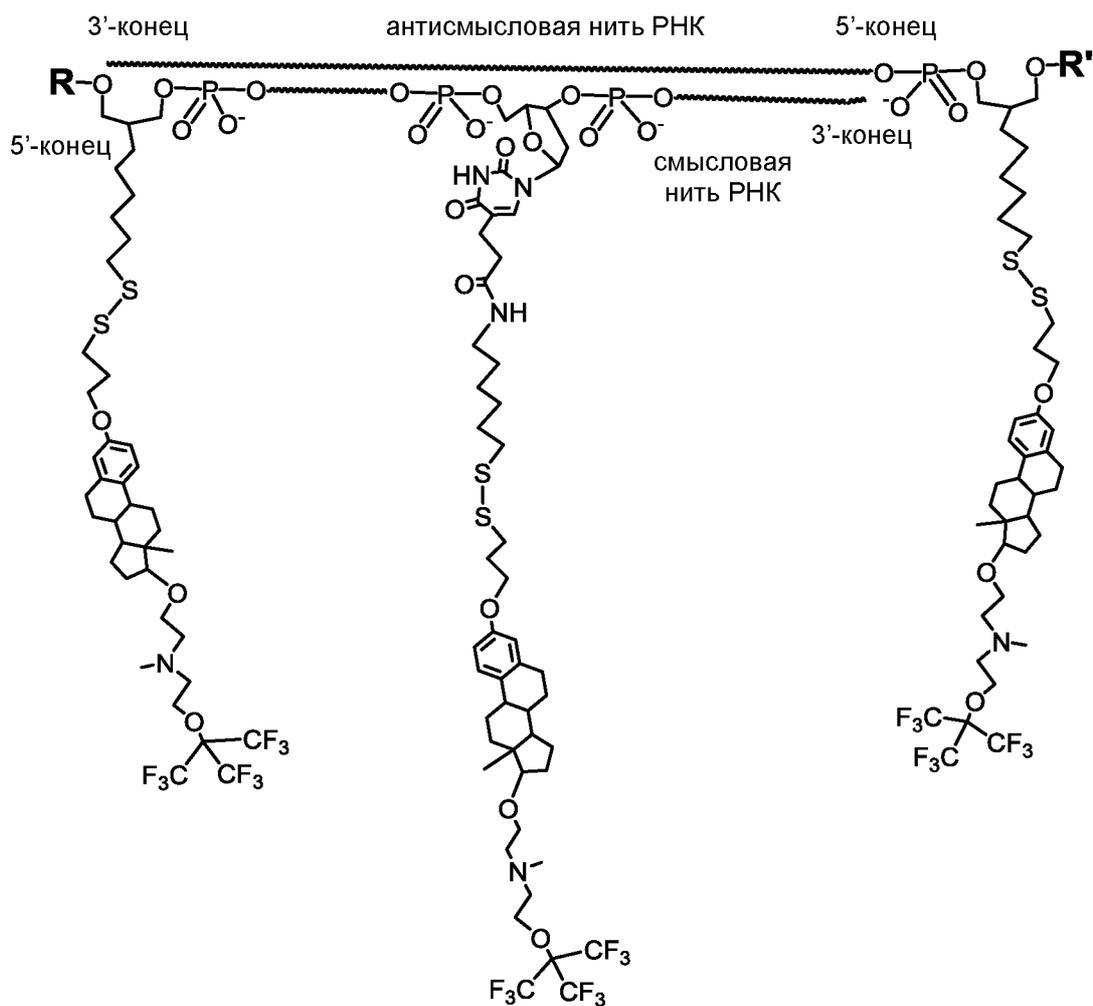
10 32. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-2)**:



Формула (Сп-2)

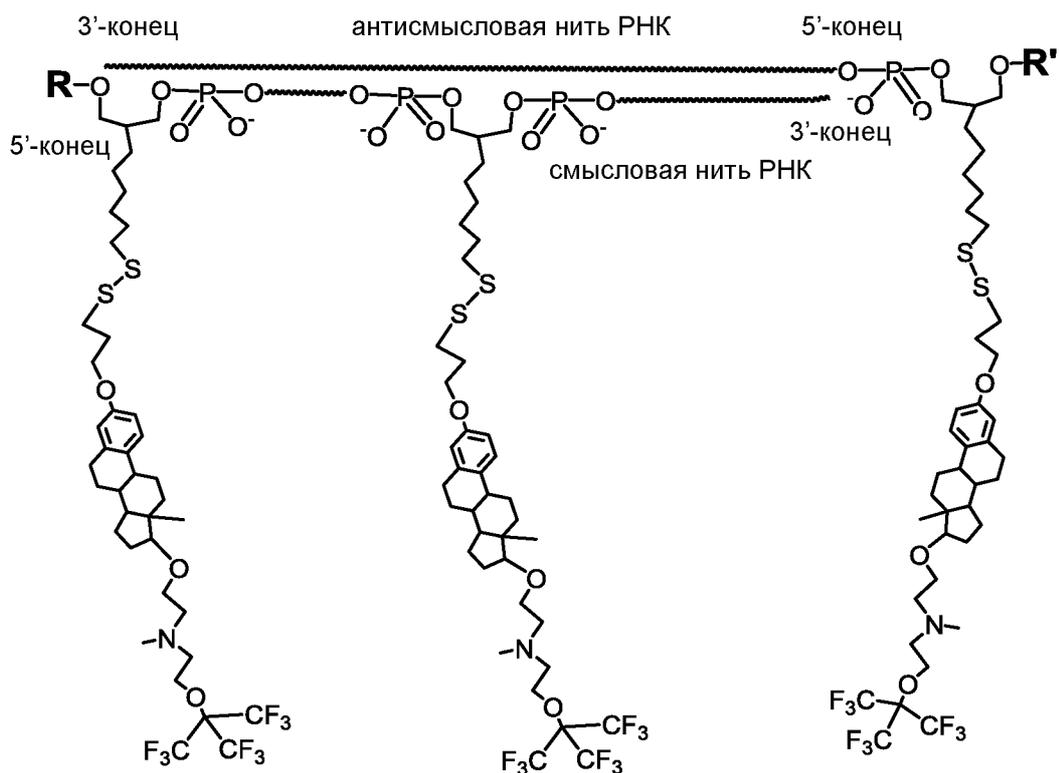
5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-2)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

33. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-3)**:



Формула (Сп-3)

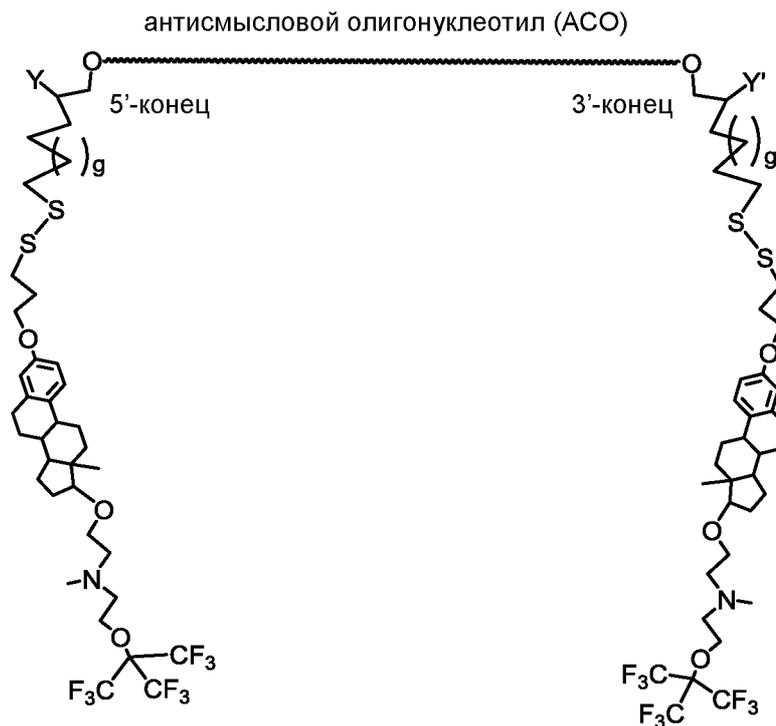
- 5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-3)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.
- 10 34. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-4)**:



Формула (Сп-4)

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-4)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый R и R' независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

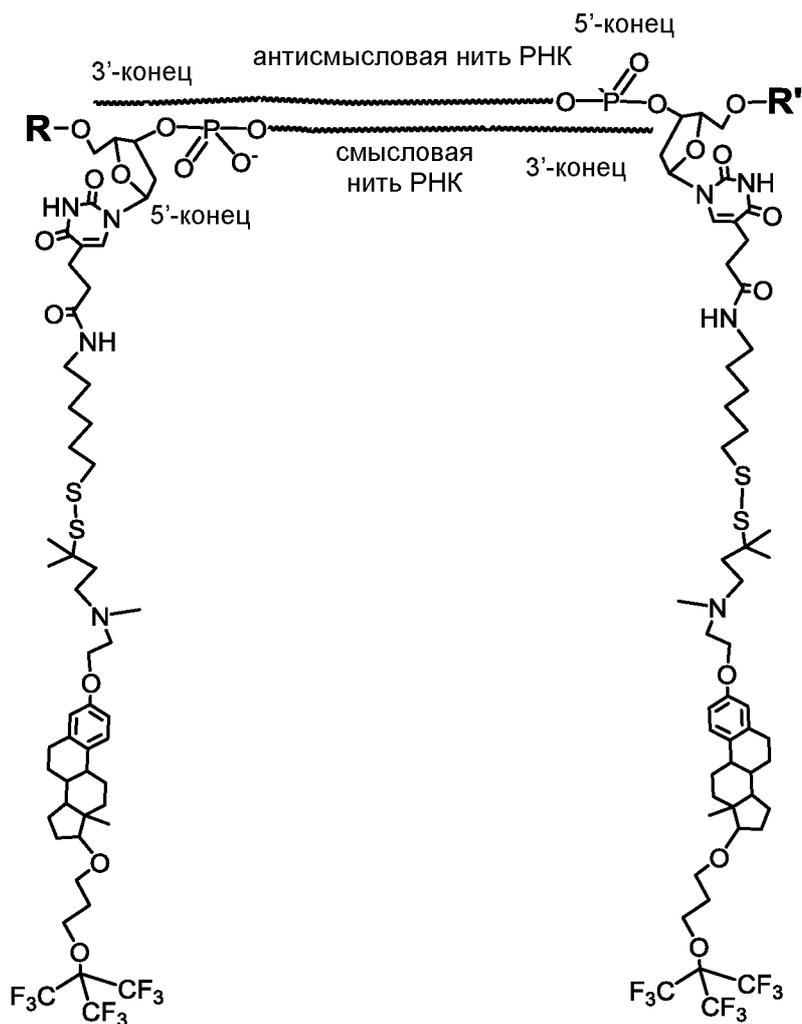
35. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-5)**:



Формула (Сп-5)

- 5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-5)**, и сольваты, и гидраты данных солей; где каждый **Y** и **Y'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, $-\text{CH}_2\text{-Z}$; $-\text{CH}_2\text{-Z}'$; $-\text{CH}_2\text{-O-Z}$ и $-\text{CH}_2\text{-O-Z}'$; где каждый **Z** и **Z'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфата, сульфата, карбоксила, 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида и их комбинаций; **g** представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

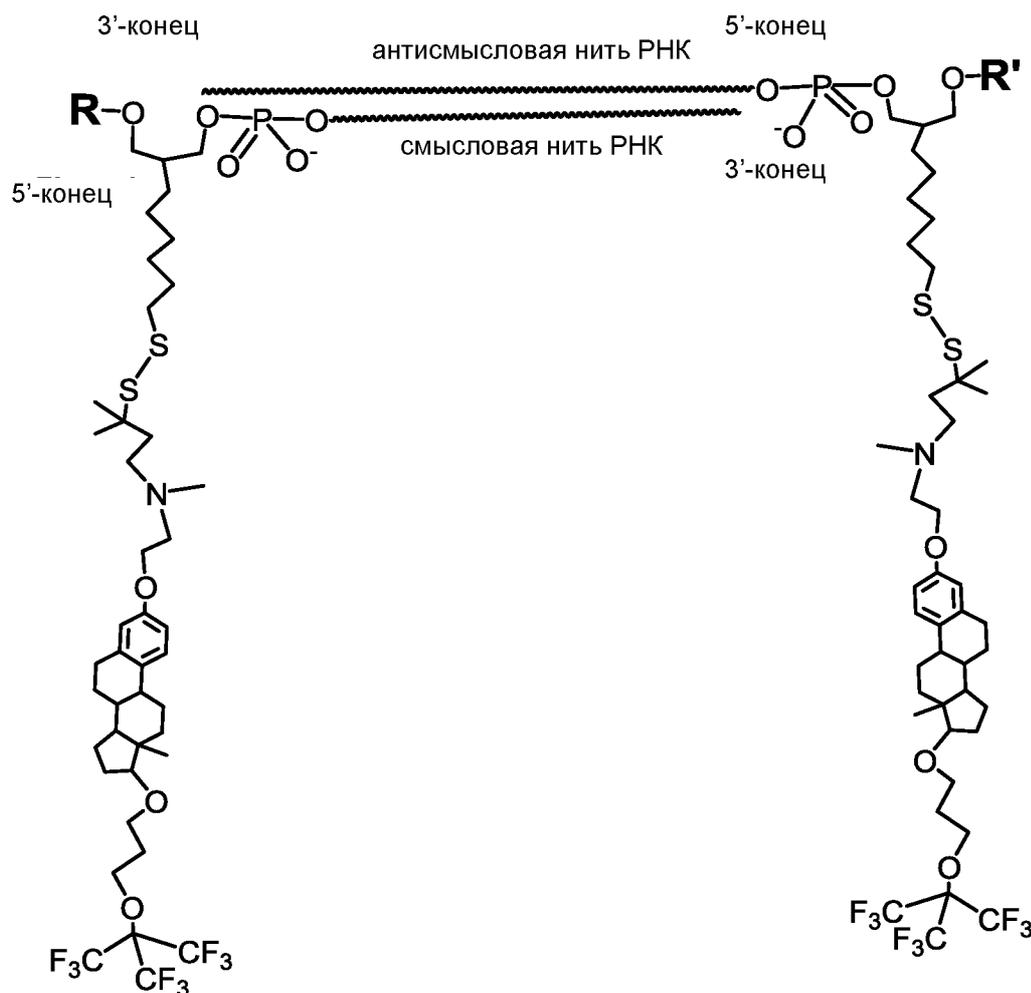
36. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-6)**:



Формула (Сп-6)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-6)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

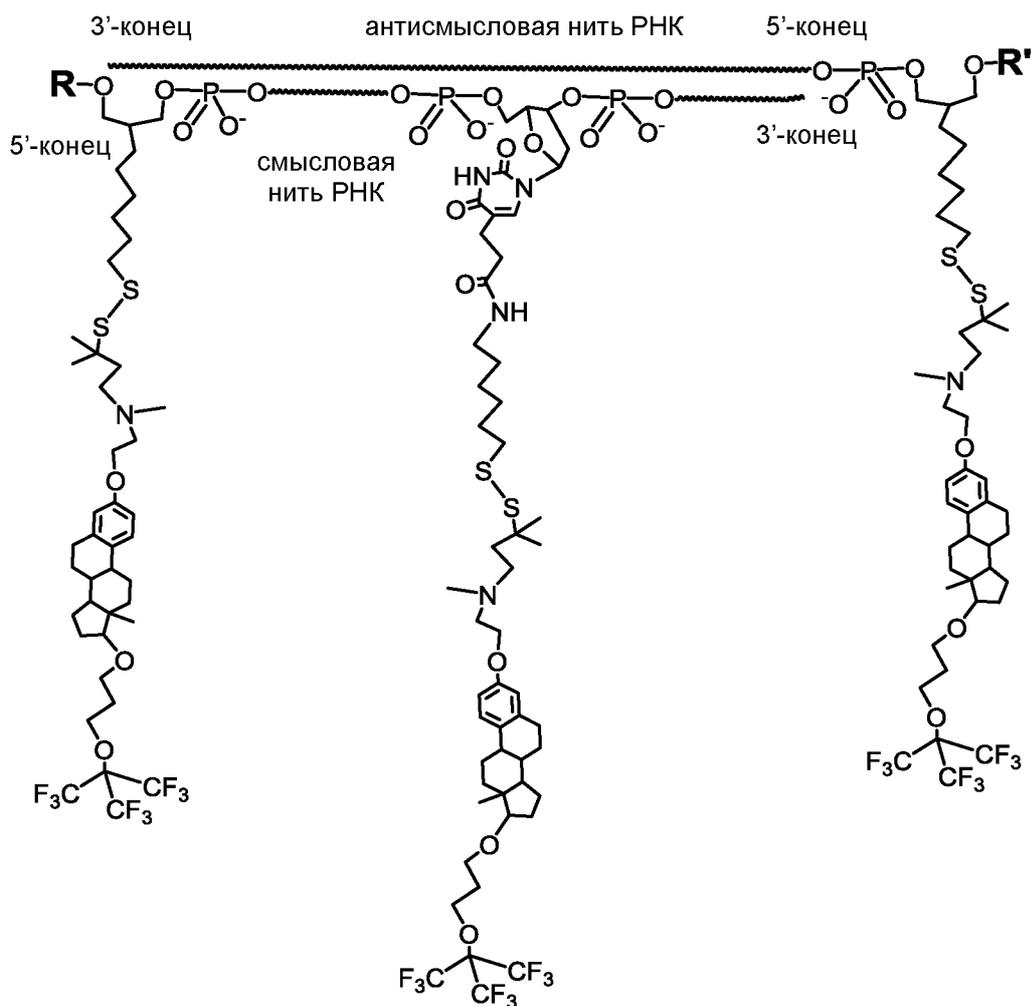
37. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-7)**:



Формула (Сп-7)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-7)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

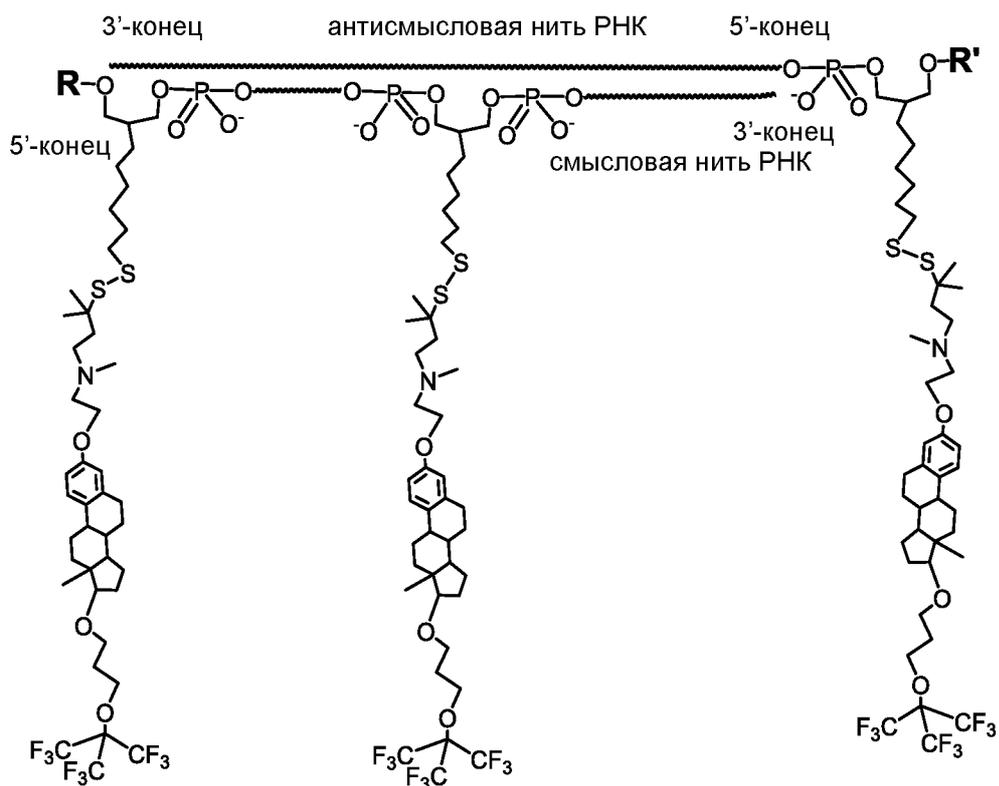
38. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-8)**:



Формула (Сп-8)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-8)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

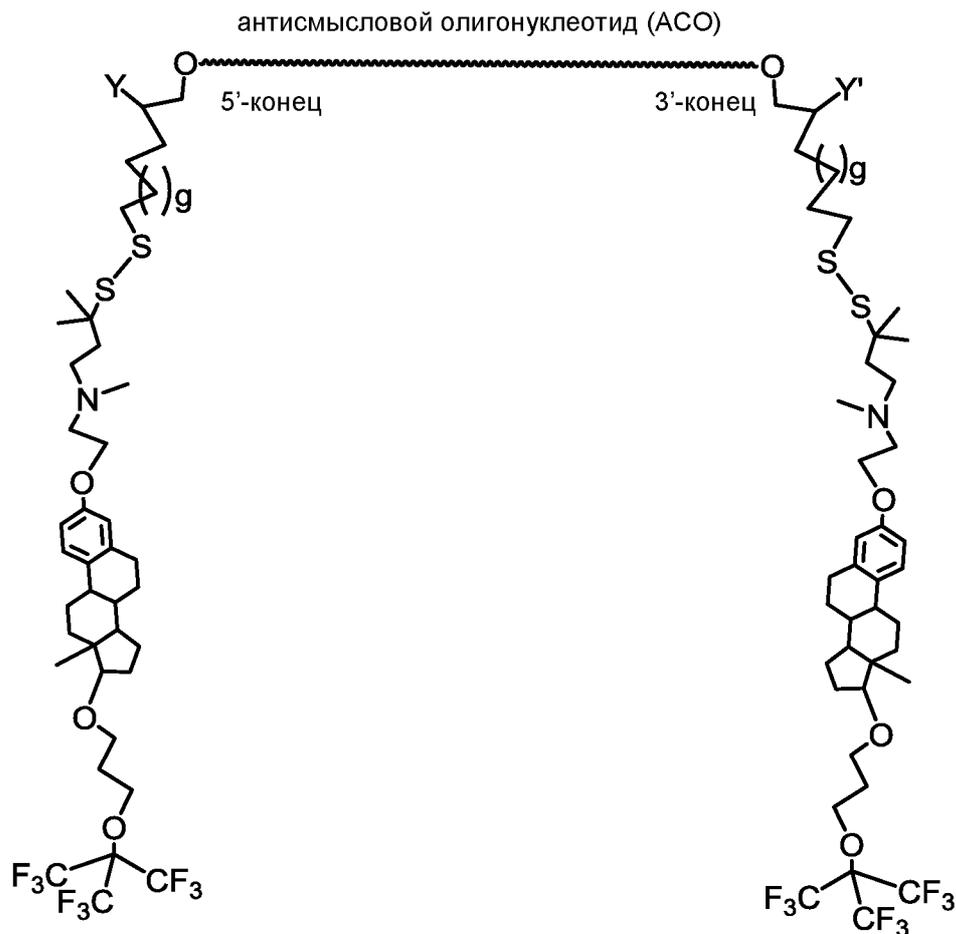
39. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-9)**:



Формула (Сп-9)

5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-9)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

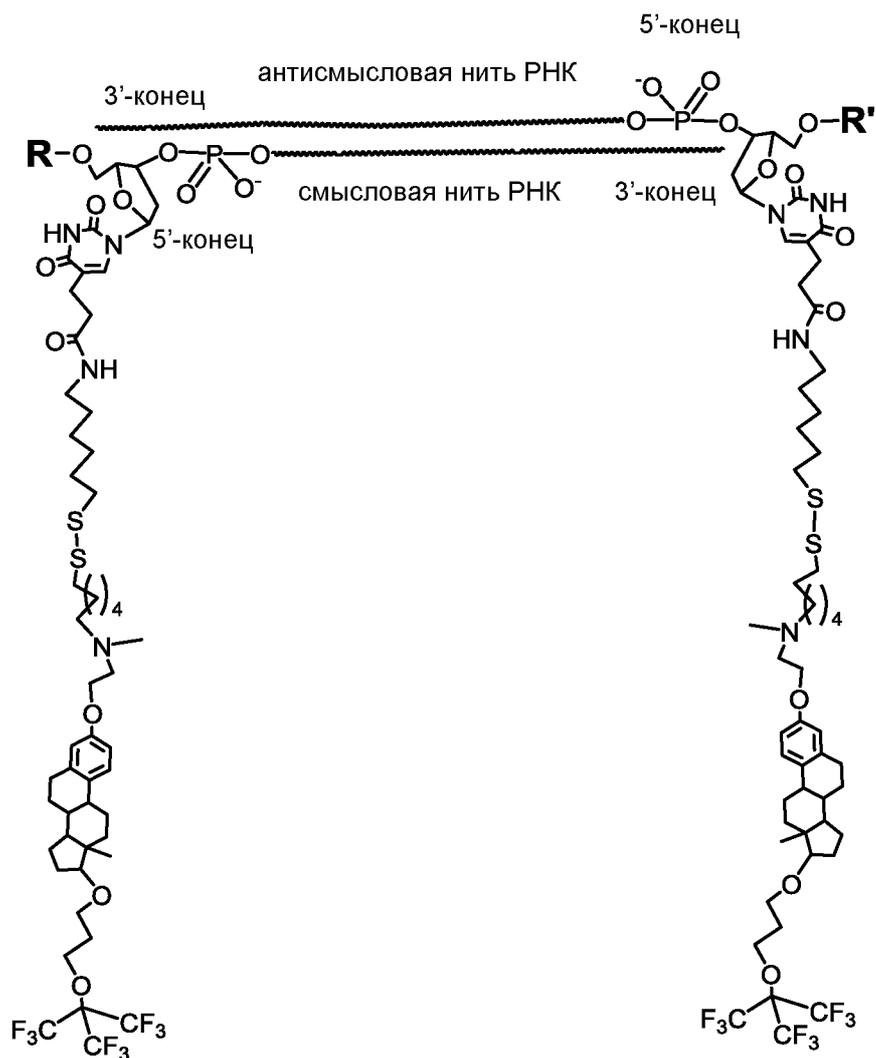
40. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-10)**:



Формула (Сп-10)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-10)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **Y** и **Y'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, $-CH_2-Z$; $-CH_2-Z'$; $-CH_2-O-Z$ и $-CH_2-O-Z'$; где каждый **Z** и **Z'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфата, сульфата, карбоксила, 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида и их комбинаций; **g** представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

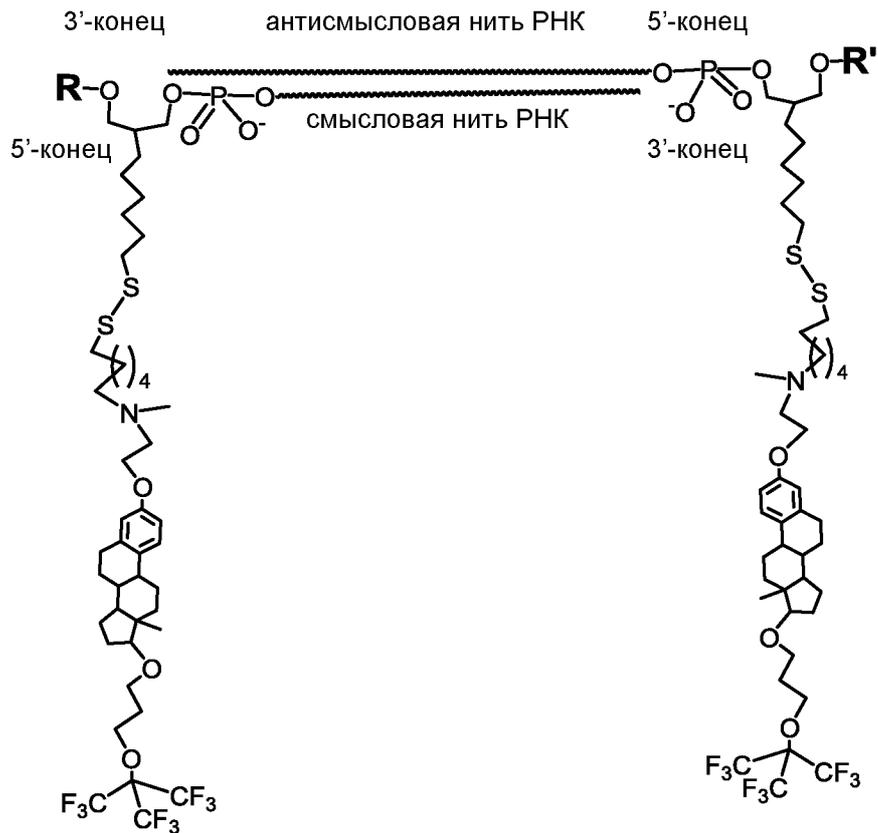
41. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-11)**:



Формула (Сп-11)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-11)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый из **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной или карбоксильной группы.

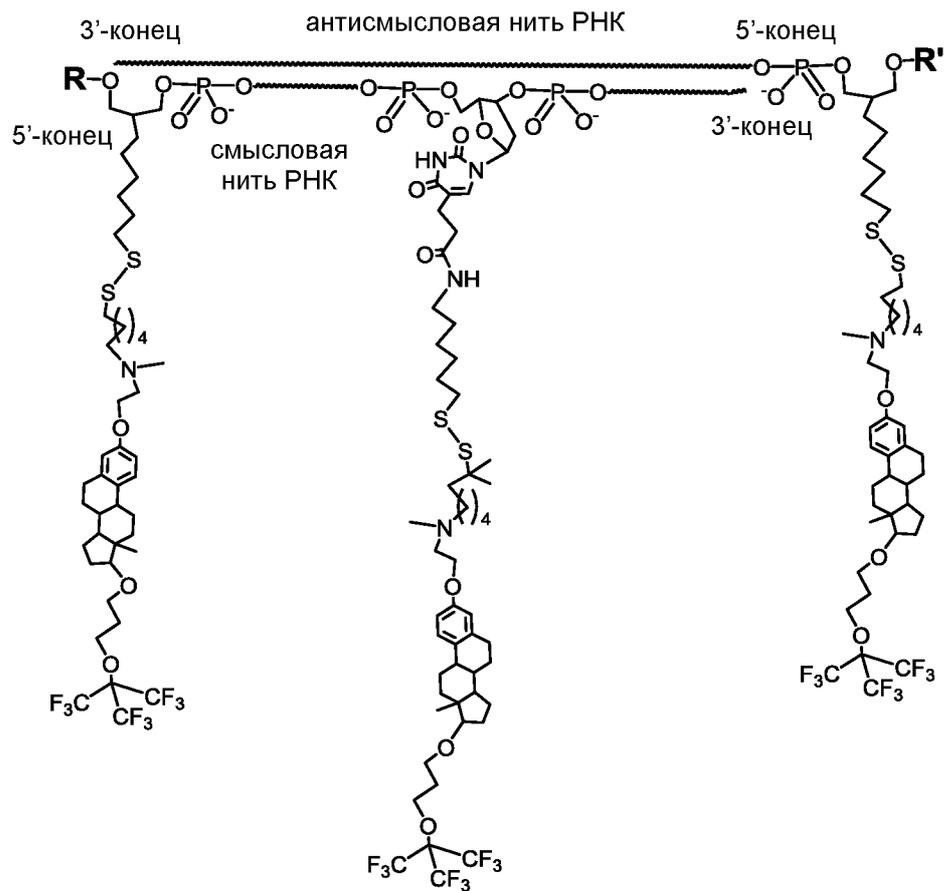
42. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-12)**:



Формула (Сп-12)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-12)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

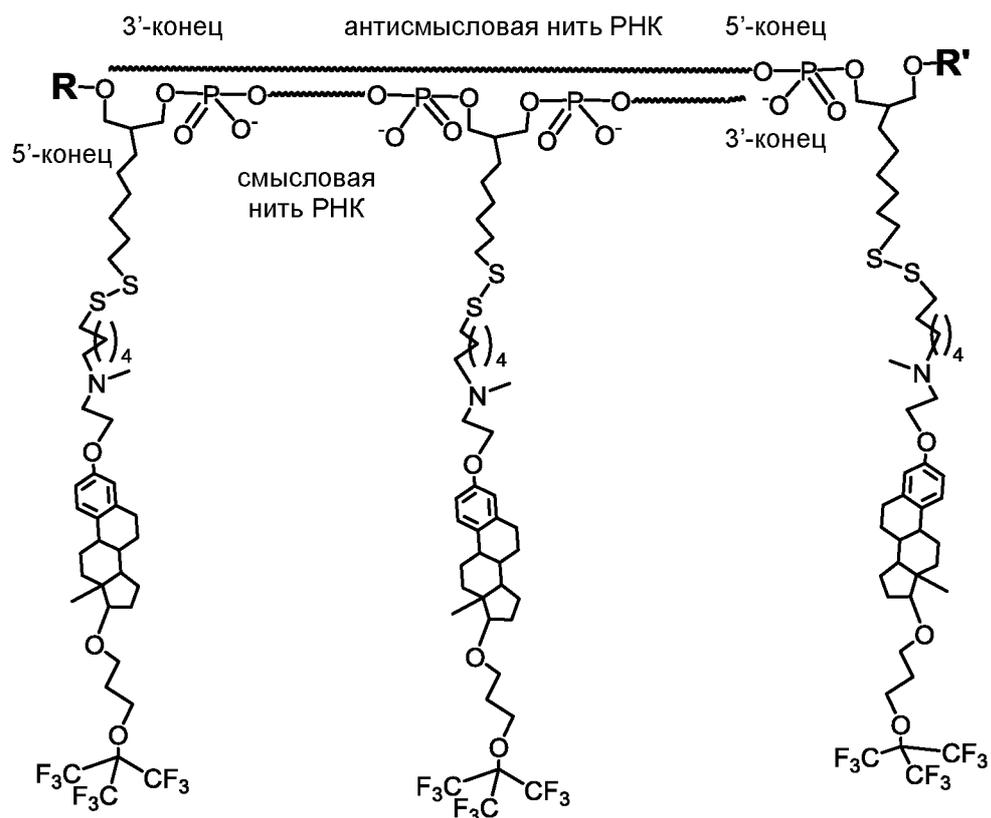
43. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-13)**:



Формула (Сп-13)

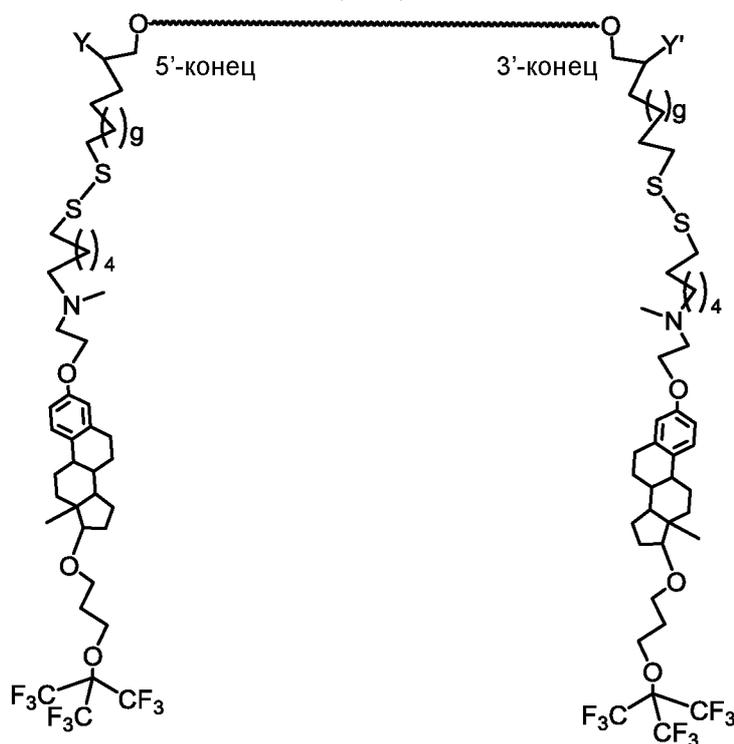
5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-13)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый **R** и **R'** независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

44. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-14)**:



5 включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сп-14)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый R и R' независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфатной, сульфатной и карбоксильной группы.

45. Конъюгат по п. 26, имеющий структуру, как изложено в **Формуле (Сп-15)**:

антисмысловой олигонуклеотид
(АСО)

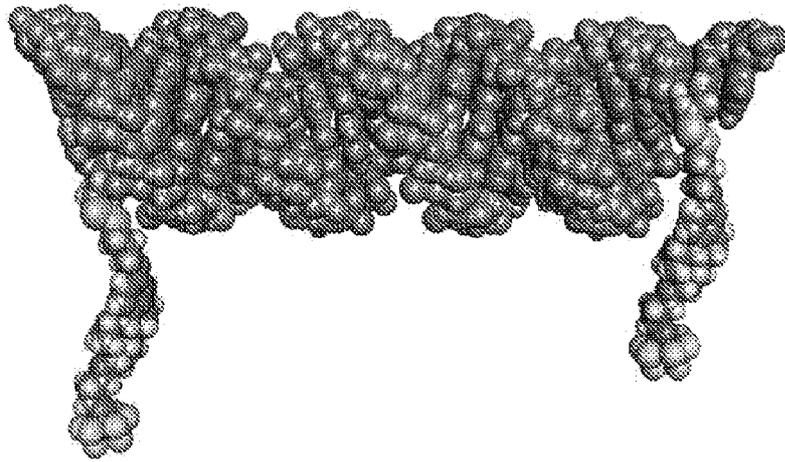
Формула (Сn-15)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и хелаты металлов соединения, представленного структурой, как изложено в **Формуле (Сn-15)**, и сольваты, и гидраты данных солей, где каждый Y и Y' независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, $-CH_2-Z$; $-CH_2-Z'$; $-CH_2-O-Z$ и $-CH_2-O-Z'$; где каждый Z и Z' независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, фосфата, сульфата, карбоксила, 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида и их комбинаций; g представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

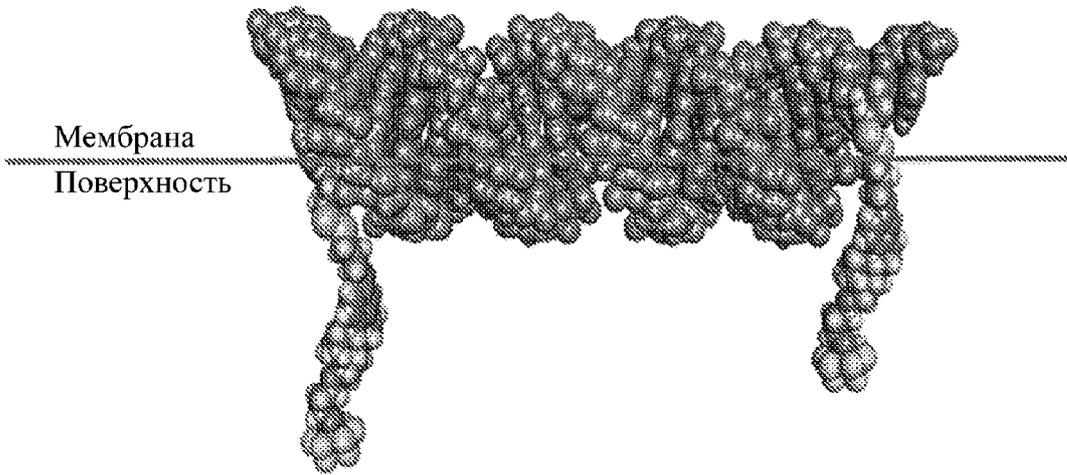
46. Способ доставки лекарственного средства в биологические клетки, где указанные клетки находятся в культуре или в живом животном или человеческом субъекте, включающий приведение данных клеток в контакт с конъюгатом по п. 24.

47. Способ доставки лекарственного средства через фосфолипидную мембрану, включающий конъюгирование данного лекарственного средства с группировкой E , E' или E'' согласно любой из **Формул (II), (III), (IVa), (IVb), (IVc), (Va'), (Va''), (Va'''), (Vb'), (Vb''), (Vb'''), (Vc'), (Vc'')** или **(Vc''')** и приведение в контакт данного конъюгата с указанной фосфолипидной мембраной.

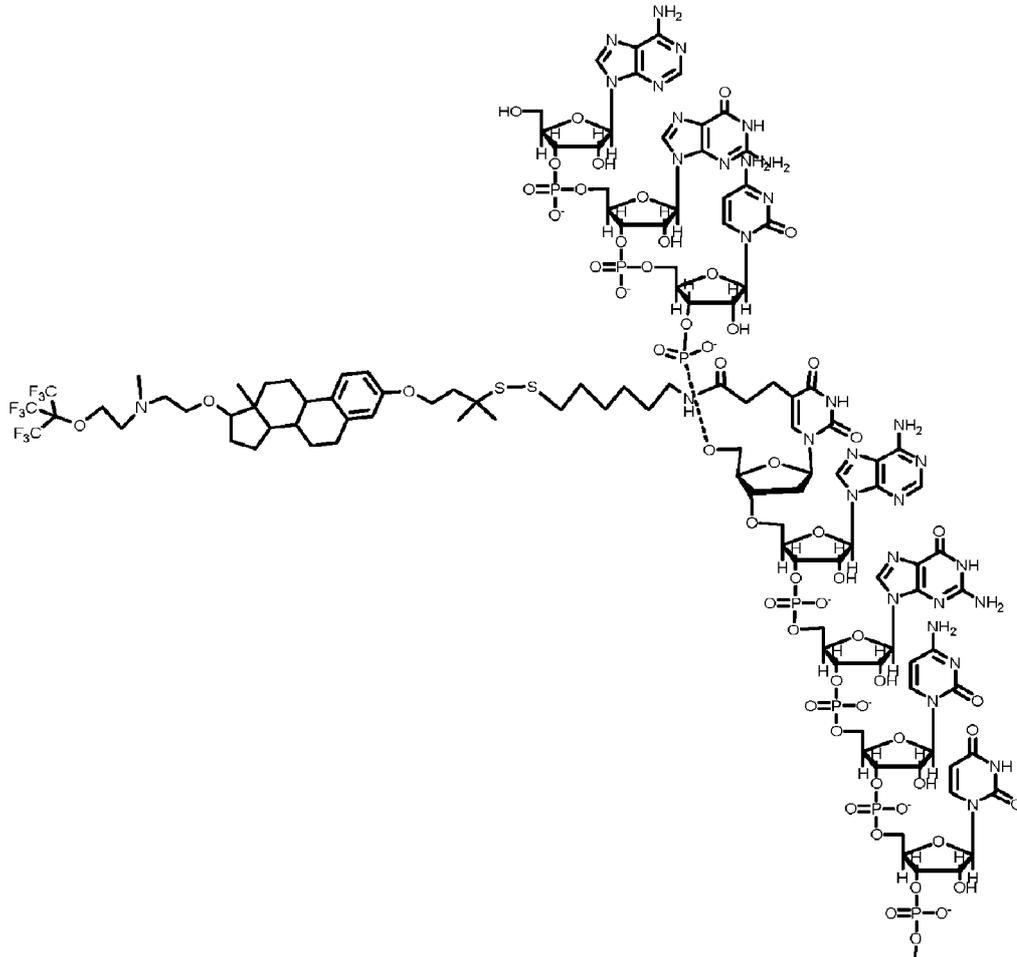
48. Способ лечения медицинского расстройства, включающий введение нуждающемуся пациенту терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции по п. 27.

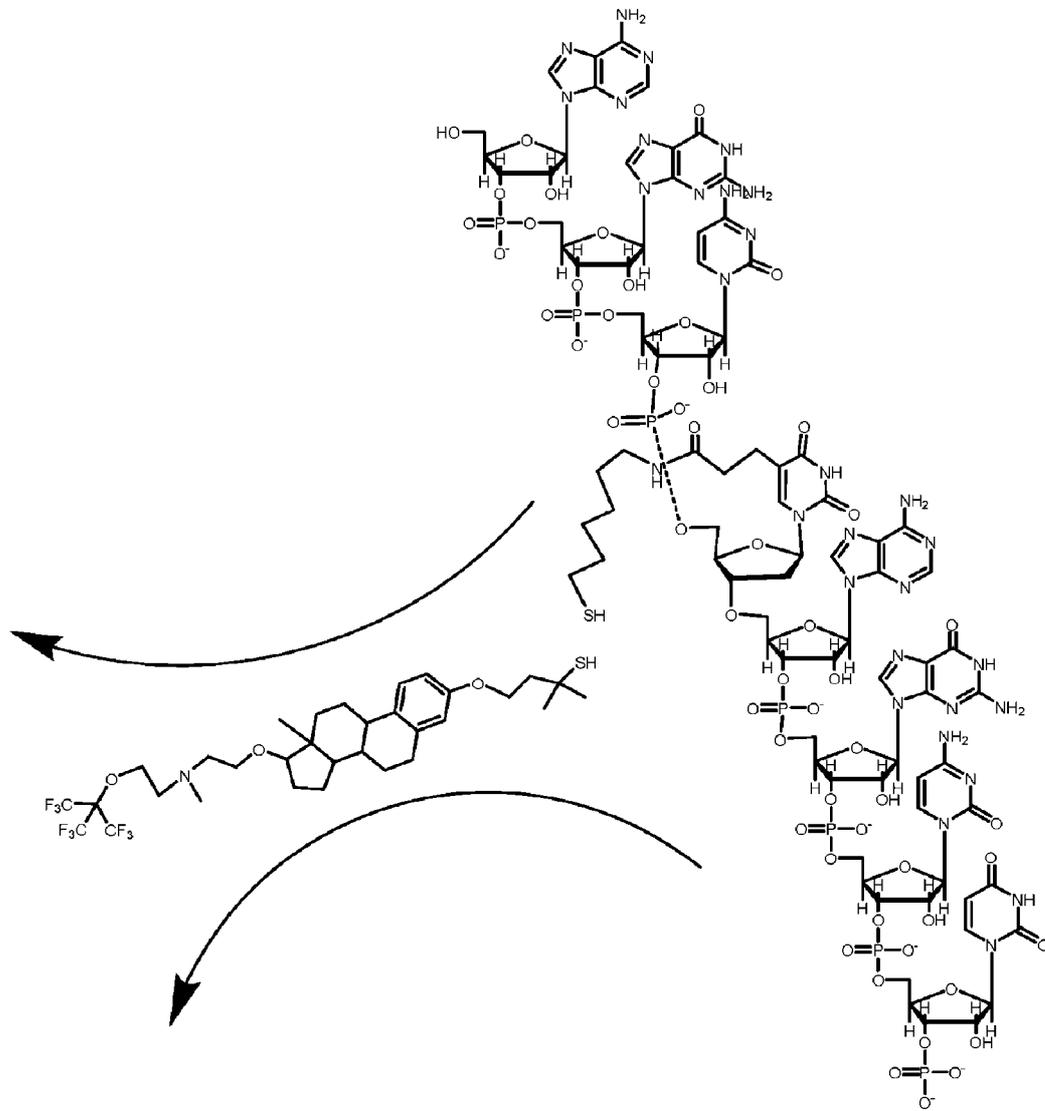


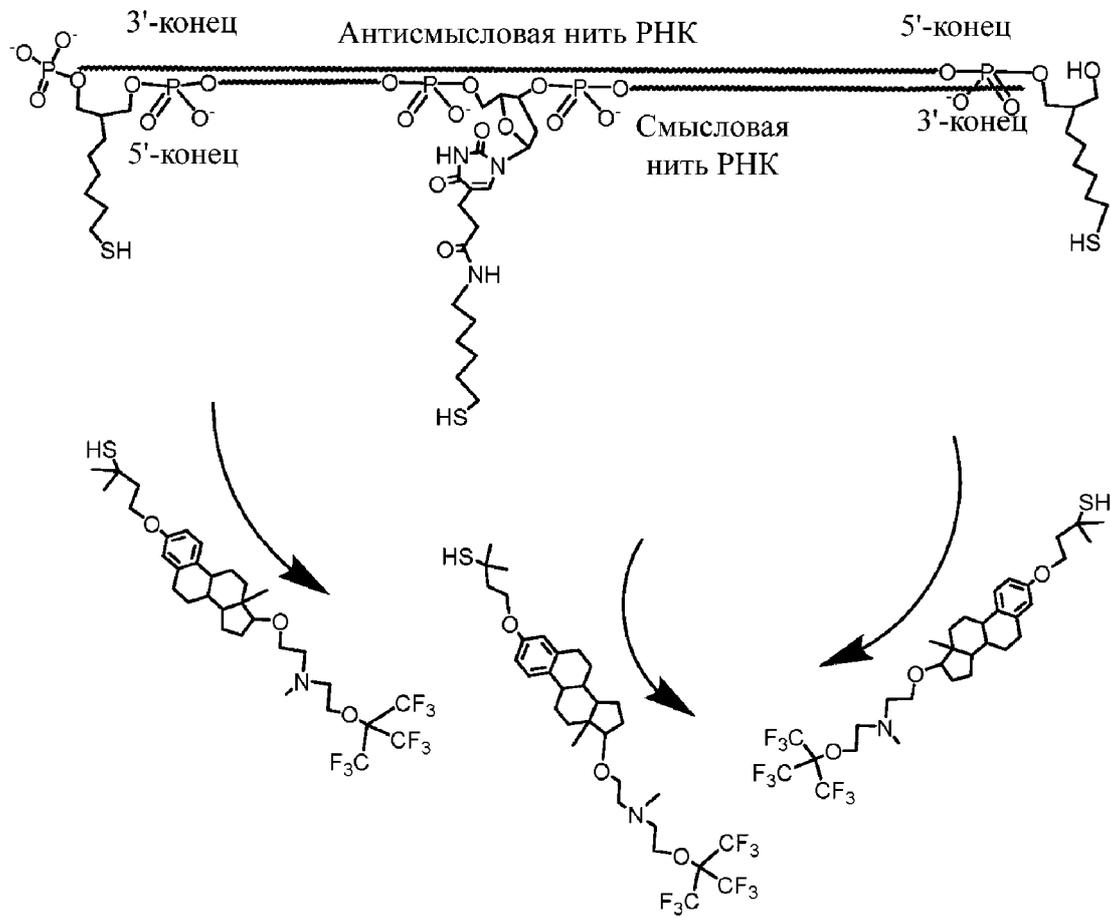
ФИГ. 1а

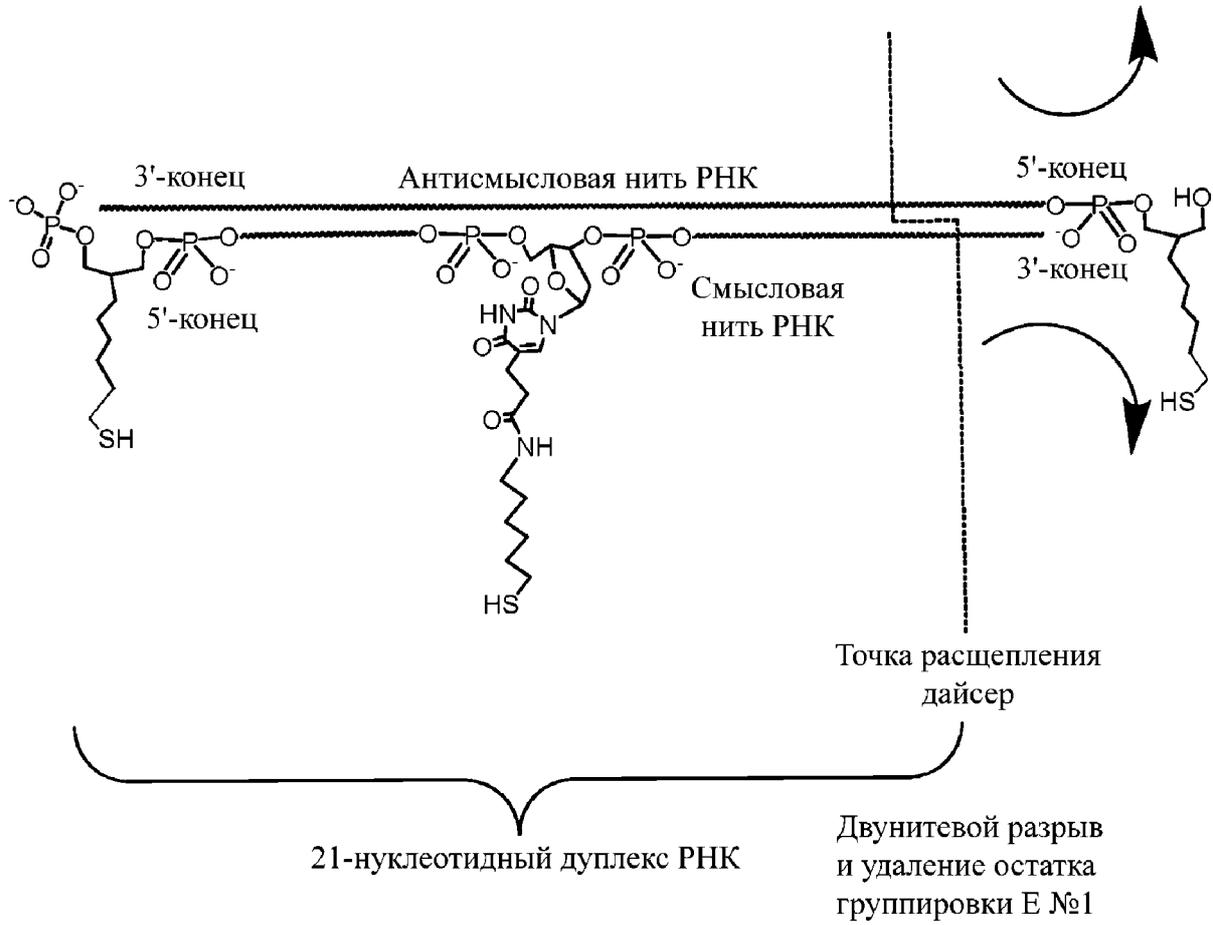


ФИГ. 1б

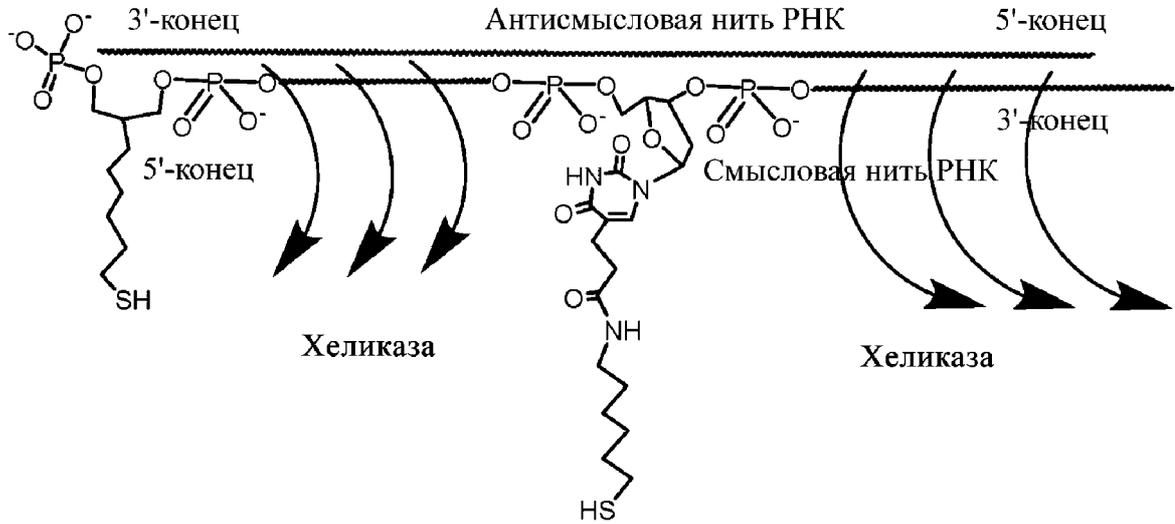
**ФИГ. 2a**

**ФИГ. 26**

**ФИГ. 3а**



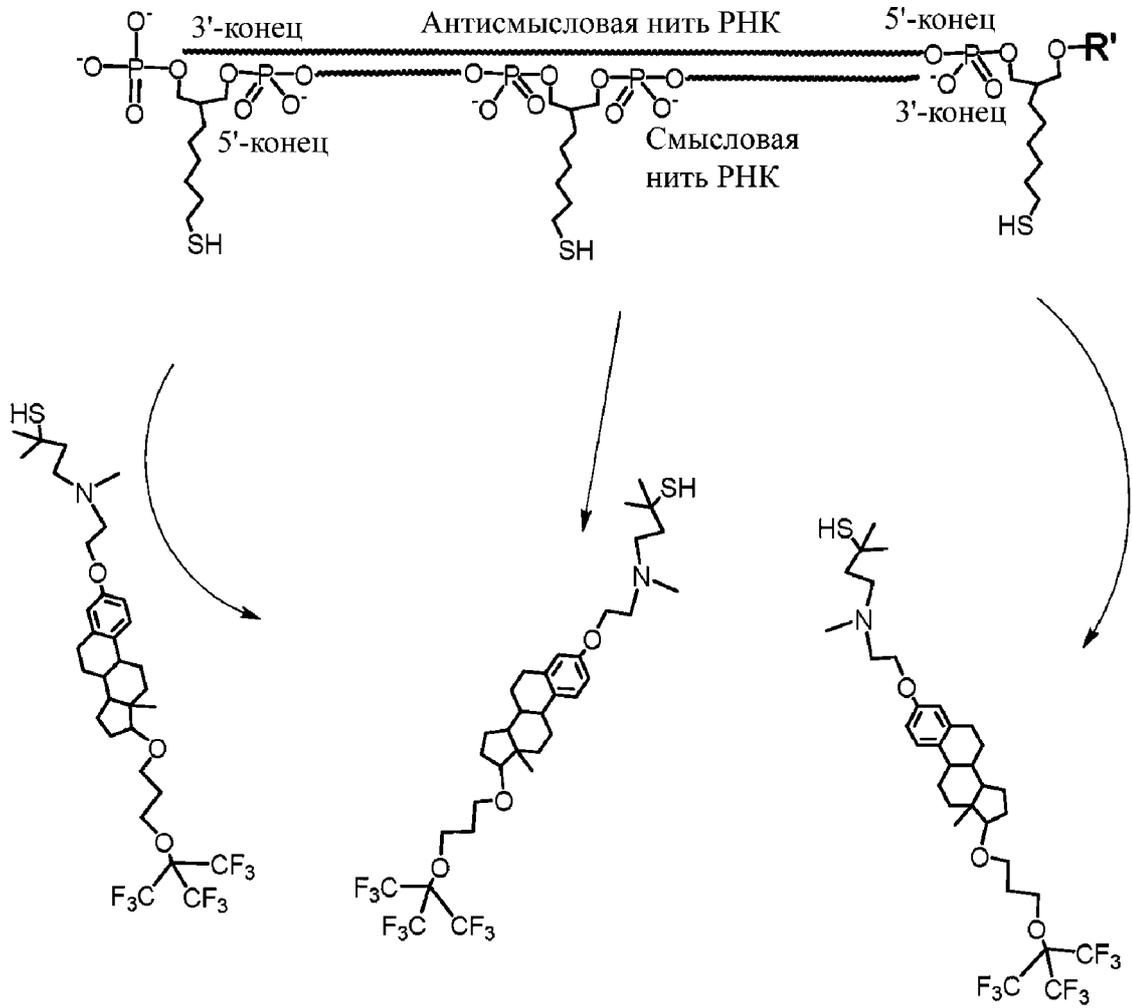
ФИГ. 36



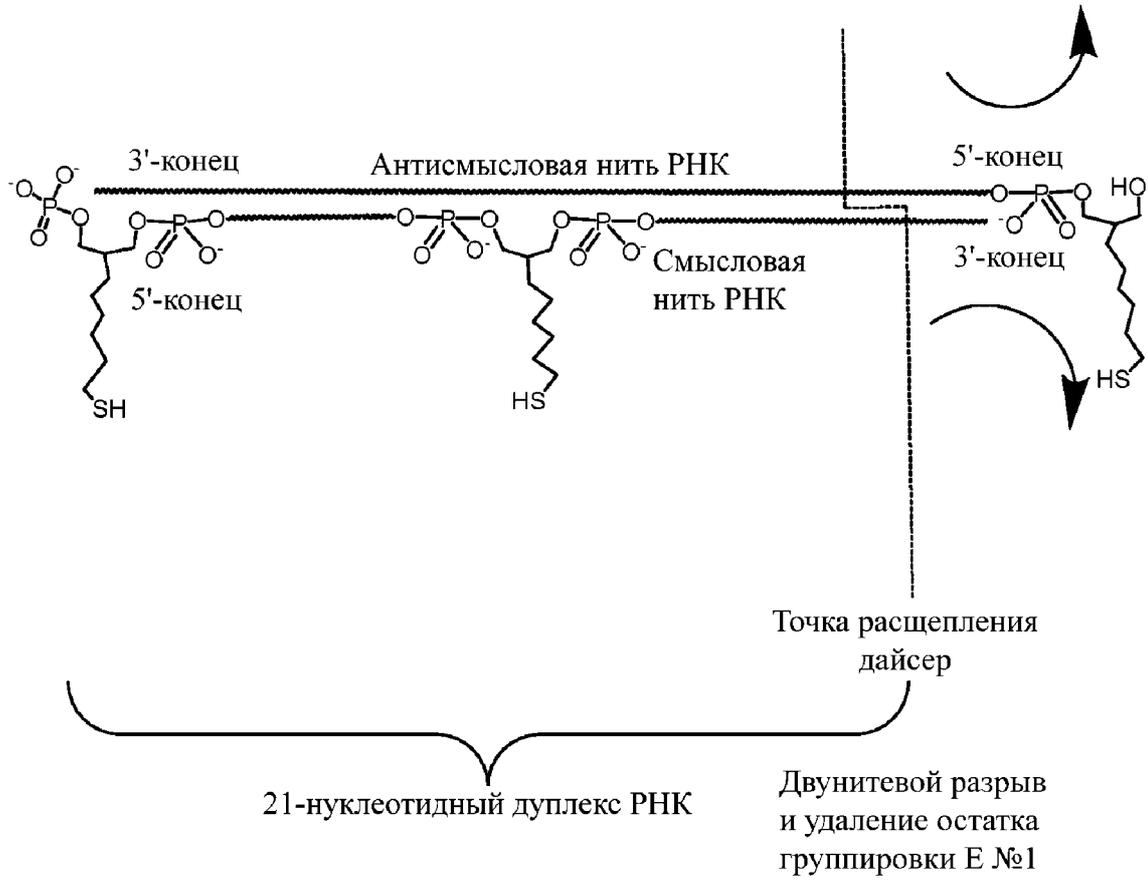
ФИГ. 3в



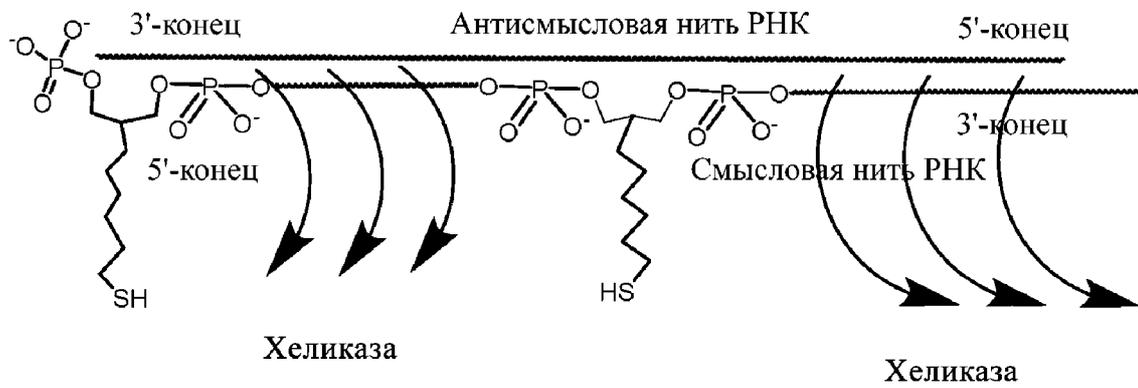
ФИГ. 3г



ФИГ. 4a



ФИГ. 4б



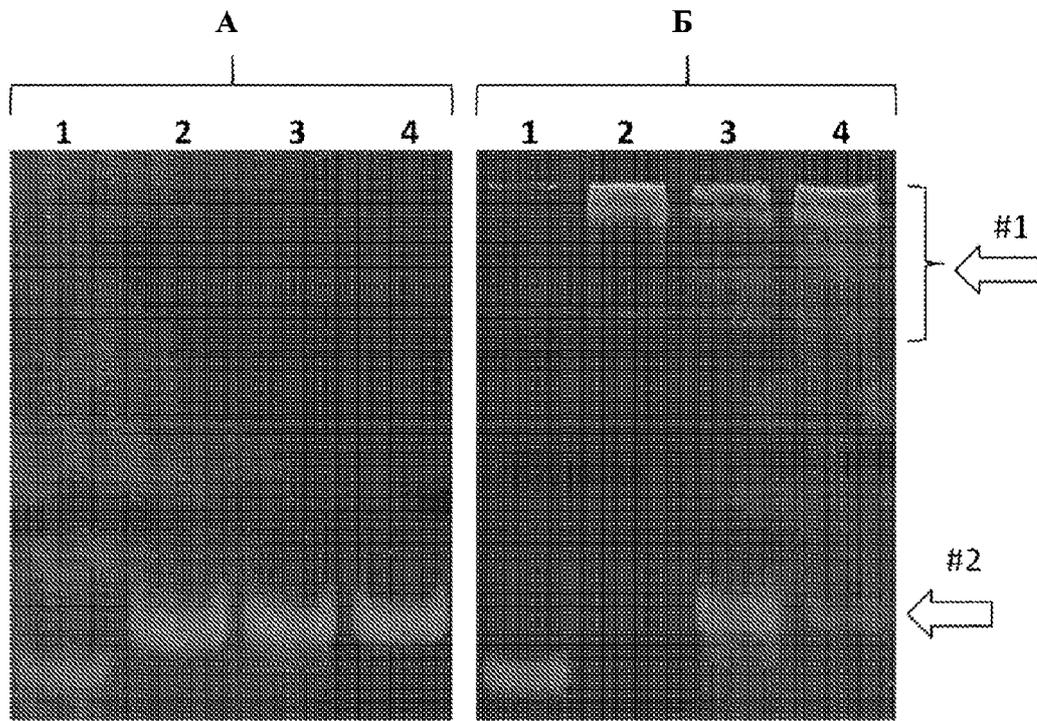
ФИГ. 4в

3'-конец Антисмысловая нить РНК 5'-конец



Поступление антисмысловой нити в комплекс RISC для сайленсинга гена

ФИГ. 4г



ФИГ. 5