

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091627 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.25

(51) Int. Cl. A61K 47/28 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.31

(54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛ

(31) 62/612,648; 62/612,733; 62/624,815;
62/626,179; 62/629,731; 62/633,107;
62/648,974; 62/684,763; 62/693,922

(32) 2018.01.01; 2018.01.02; 2018.02.01;
2018.02.05; 2018.02.13; 2018.02.21;
2018.03.28; 2018.06.14; 2018.07.04

(33) US

(86) PCT/IL2018/051416

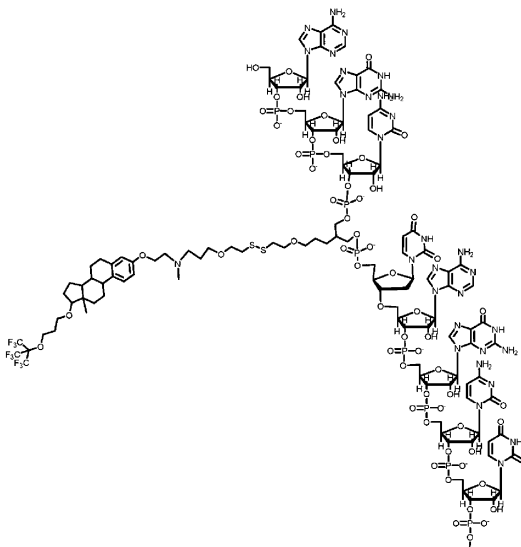
(87) WO 2019/130319 2019.07.04

(71) Заявитель:
АПОСЕНС ЛТД. (IL)

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

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) В данном изобретении предложена новая система доставки для доставки лекарственных соединений через биологические мембраны. Предложены новые химические конъюгаты, которые содержат указанную систему доставки, способы синтеза указанных соединений и способы применения указанной системы доставки, среди прочего, для доставки генетических лекарственных соединений в ткани и клетки, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, для лечения различных заболеваний.



A1

202091627

202091627

A1

СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Данное изобретение относится к соединениям и конъюгатам, которые содержат систему доставки, карго-соединения и макромолекулы, а также к способам доставки молекул и макромолекул через биологические мембраны в клетки, предназначенные для применения в биологических целях *in vitro* и *in vivo*.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

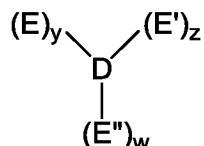
[0002] **«Олигонуклеотидные лекарственные соединения» (OD)** представляют собой макромолекулярные лекарственные соединения, которые содержат последовательности нуклеозидов или нуклеотидов. OD могут быть многообещающими для революционных медицинских средств лечения многих заболеваний. OD представляют собой одноцепочечные или двухцепочечные природные или модифицированные молекулы РНК или ДНК или их комбинации, как известно из уровня техники. Примерами OD, среди прочих, являются лекарственные соединения на основе миРНК (малой интерферирующей РНК), которая является субстратом для *РНК-индуцированного сайленсинг-комплекса* (RISC); последовательностей миРНК, которые являются субстратами для эндонуклеазы Дайсер (дмиРНК), на основе микроРНК (микро РНК), информационной РНК (иРНК) или последовательности ДНК, разработанные для выполнения функции антисмысловых олигонуклеотидов (ASO); и все они являются активными для понижающей регуляции экспрессии генов-мишеней.

[0003] Крупные и несущие большой электрический заряд структуры OD обуславливают насущную потребность в *системах доставки*, способных обеспечивать доставку OD через гидрофобные фосфолипидные мембраны в клетки. Для применения OD в клинических условиях преимущественными могут быть некоторые особенности конъюгата OD, связанного с системой доставки, такие как активность в присутствии или в отсутствие белков плазмы или наличие редокс-чувствительной расщепляемой группы, которая стабильна у внеклеточного отдела, но подвергается эффективному расщеплению в восстановительных условиях, преобладающих в цитоплазме, что обеспечивает возможность лекарственного карго-соединения, такого как OD, проявлять свою активность в отношении цитоплазматических мишеней, таких как Дайсер или RISC.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Данное изобретение основано на новой *молекулярной системе доставки (MDS)*, представляющей собой химические фрагменты, которые имеют структуру, представленную **Формулой (II)**, и которые при конъюгации с лекарственным карго-соединением, таким как макромолекулярное **OD**, с образованием конъюгата в соответствии с **Формулой (I)**, обеспечивают доставку **OD** через фосфолипидные мембраны в клетки, где оно проявляет свою соответствующую биологическую активность, например, сайленсинг гена. Данное изобретение основано на идентификации и разработке авторами изобретения новых соединений, которые могут преодолевать существенный барьер для доставки крупных и несущих большой заряд макромолекулярных лекарственных соединений через липофильные клеточные мембраны. В данном изобретении предложены, среди прочего, **MDS**, конъюгаты, которые содержат их, способы синтеза **MDS** и его конъюгатов, а также способы применения **MDS** для доставки генетических лекарственных соединений в ткани и клетки, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, для лечения различных заболеваний.

[0005] В одном варианте реализации данного изобретения предложены конъюгаты, имеющие структуру, представленную **Формулой (I)**:



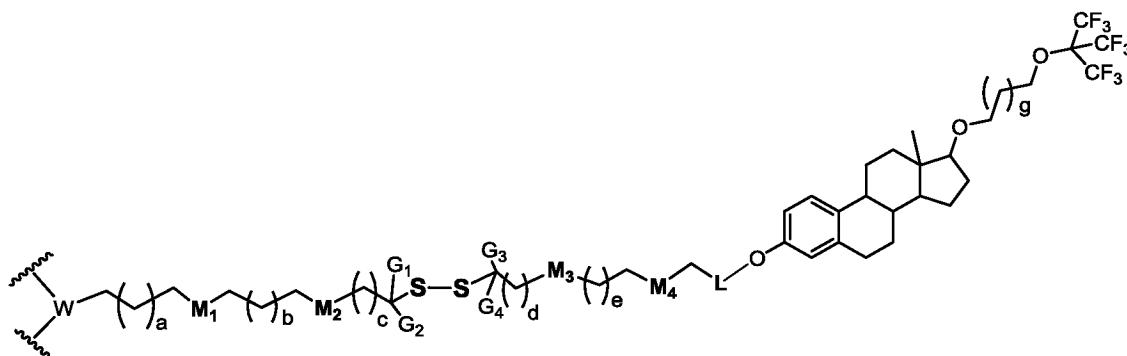
Формула (I)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (I)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где:

D представляет собой лекарственное соединение, подлежащее доставке через биологические мембраны (т.е. *лекарственное карго-соединение*), выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного соединения, пептида, белка и **OD** (т.е. нативной или модифицированной одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК, дмиРНК или ASO);

y , z и w представляют собой целые числа, независимо выбранные из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 или 4, причем если любой из y , z или w равен 0, это означает, что соответствующий фрагмент (или фрагменты) E является нулевым; по меньшей мере один из y , z или w отличен от 0;

E , E' или E'' могут быть одинаковыми или различными, каждый независимо имеет структуру, представленную ниже общей **Формулой (II)**:



Формула (II),

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (II)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где:

M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , каждый независимо, выбраны из группы, состоящей из N' , N'' , нуля, простого эфира, амида, сложного эфира, простого тиоэфира и сложного тиоэфира; причем каждый N' и N'' независимо выбран из группы, состоящей из $-N(CH_3)-$, $-NH-$ и $N(X)-$; где X представляет собой защитную группу для амина; M_1 , M_2 , M_3 , M_4 могут быть одинаковыми или различными; N' , N'' могут быть одинаковыми или различными.

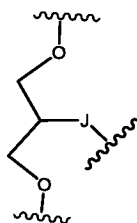
L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из нуля, C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 алкилена или гетероалкилена; C_5 или C_6 арила или гетероарила, необязательно замещенного атомом(ами) фтора или гидроксильной группой(ами); и их комбинации;

G_1 , G_2 , G_3 , G_4 , каждый независимо представляют собой атом водорода или метильную группу; группы G могут быть одинаковыми или различными; по меньшей мере две группы G_1 , G_2 , G_3 или G_4 представляют собой атомы водорода;

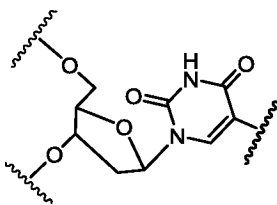
a , b , c , d , e представляют собой целые числа, каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где 0 = ноль; a , b , c , d , e могут быть одинаковыми или различными;

g означает целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

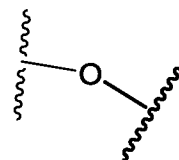
W выбран из группы, состоящей из нуля, остатка гидроксила, дигидроксила, амида, природного или модифицированного нуклеозида, любой из структур, представленных **Формулами (II¹), (II²) и (II³)**, и их комбинации:



Формула (II¹)



Формула (II²)



Формула (II³)

где **J** выбран из группы, состоящей из нуля, $-\text{CH}_2-$, вторичного или третичного амина и кислорода;

E, **E'** или **E''** могут быть связаны с любым фрагментом группы, состоящей из **D**; защитной группы, определение которой приведено в данном документе (например, защитной группы для спирта); **R** или **R'** группы, выбранной из группы, состоящей из водорода, фосфата, сульфата и карбоксильной группы; и твердой подложки. В контексте данного изобретения фрагмент **E**, **E'** или **E''** **может** быть связан с одним фрагментом **D** в одной или более точках; и **W** может быть связан одновременно и с **D**, и с **R** или **R'**.

[0006] В одном варианте реализации данного изобретения **g** представляет собой целое число, выбранное из 0, 1 или 2.

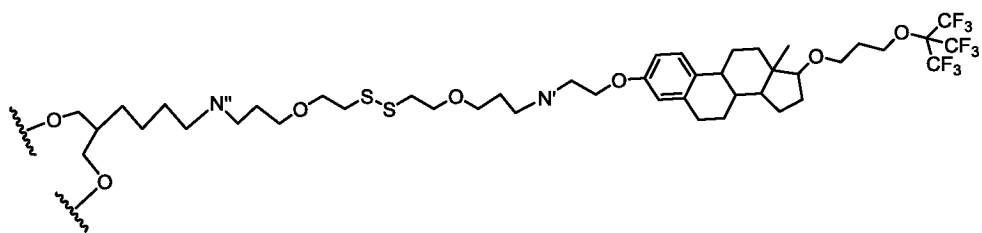
[0007] В одном варианте реализации каждый **c** и **d** независимо может представлять собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3; **c** и **d** могут быть одинаковыми или различными.

[0008] В одном варианте реализации данного изобретения все **G₁**, **G₂**, **G₃**, **G₄** представляют собой атомы водорода.

[0009] В одном варианте реализации **L** представляет собой дифторбензиламин.

[0010] В другом варианте реализации **X** представляет собой защитные группы для аминов ТЕОС [2-(триметилсилил)этилкарбамат] или Fmoc.

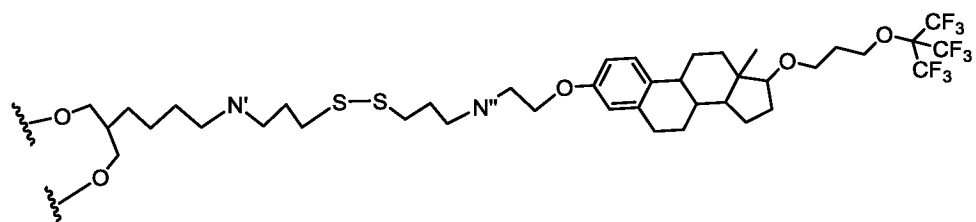
[0011] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (V)**:



Формула (V)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (V)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано для **Формулы (II)**.

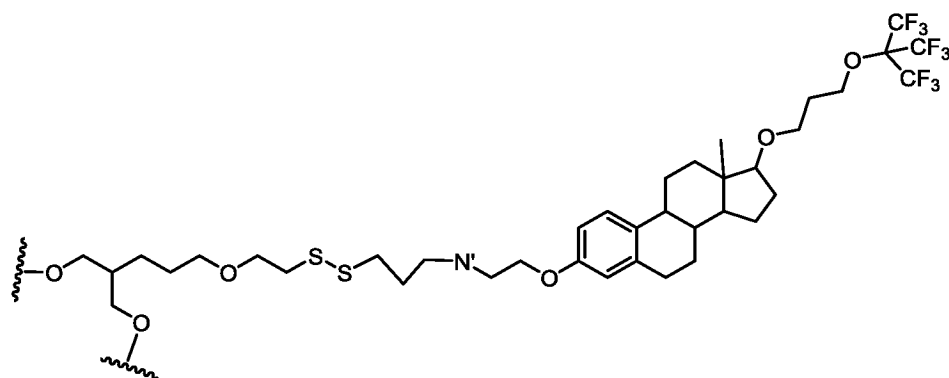
[0012] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VII)**:



Формула (VII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VII)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано для **Формулы (II)**.

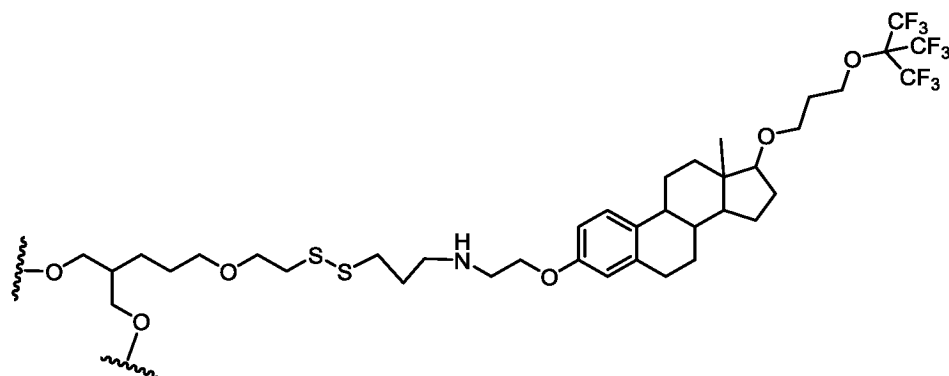
[0013] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII)**:



Формула (VIII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

[0014] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-H)**:



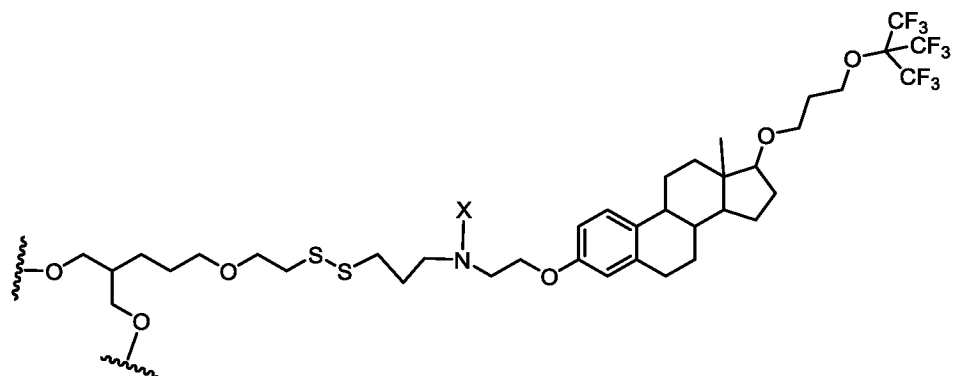
Формула (VIII-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[0015] В родственном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-M)**:

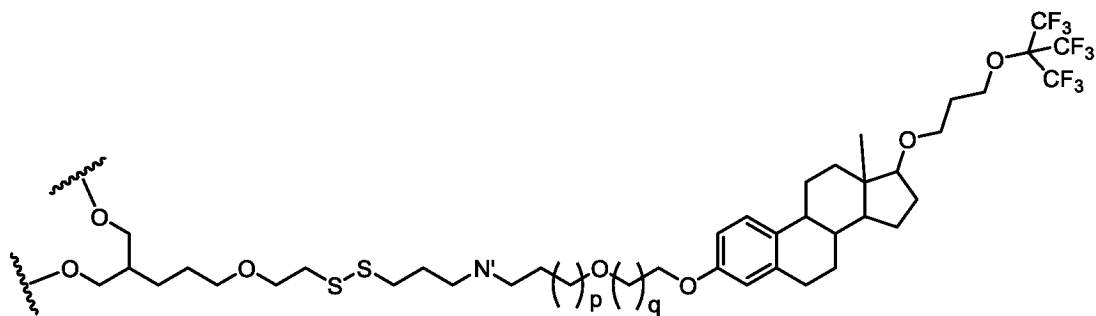
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[0016] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-F)**:



включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где **X** представляет собой защитную группу для амина.

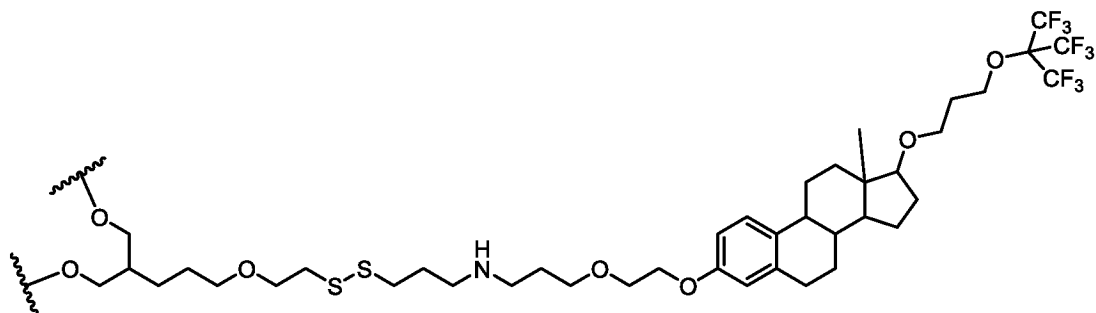
[0017] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV)**:



Формула (XIV)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где **p** и **q**, каждый независимо, представляют собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; **N'** имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

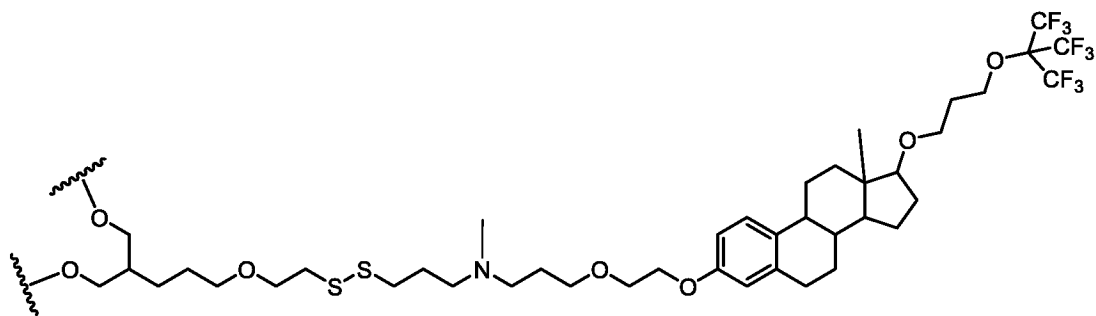
[0018] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-H)**:



Формула (XIV-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

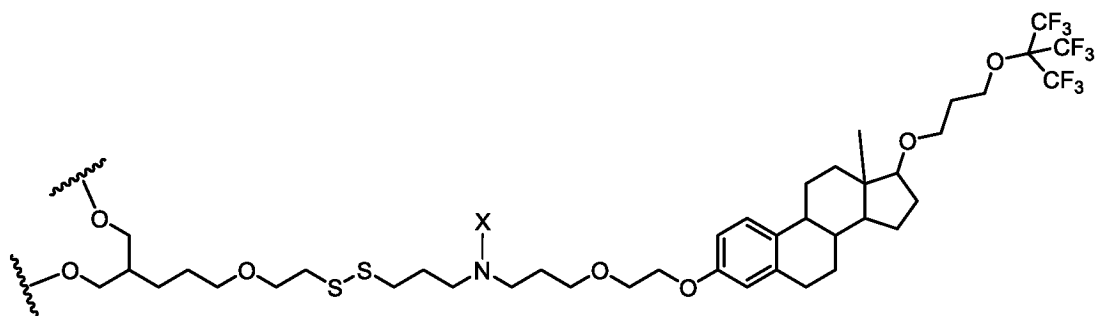
[0019] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-M)**:



Формула (XIV-M)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

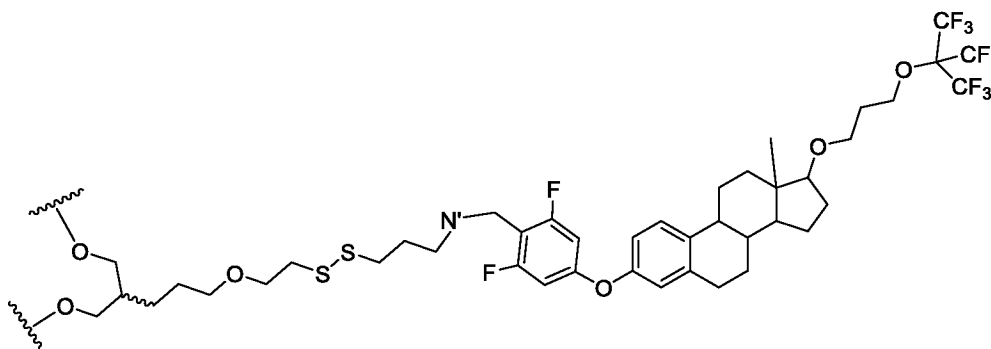
[0020] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-F)**:



Формула (XIV-F)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где X представляет собой защитную группу для амина.

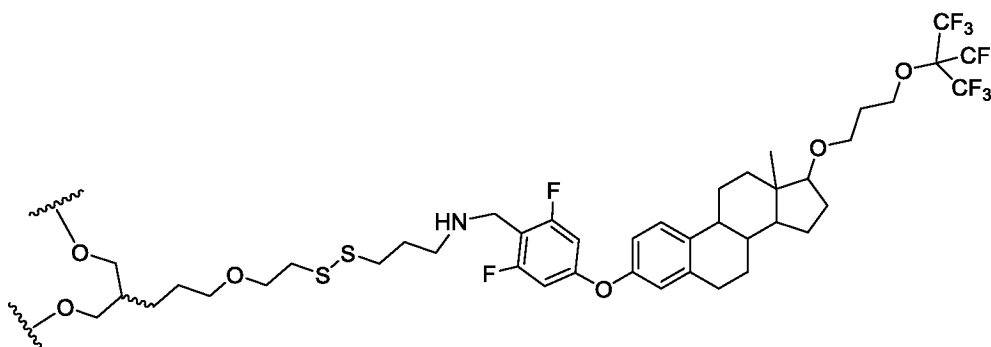
[0021] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где фрагмент L представляет собой дифторбензиламин; и, следовательно, каждый E, E' или E'' имеет структуру, представленную **Формулой (XV)**:



Формула (XV)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XV)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

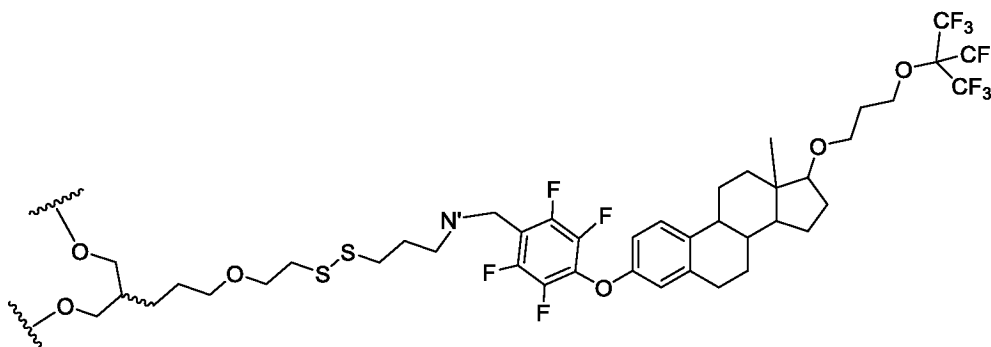
[0022] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XV-H)**:



Формула (XV-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XV-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

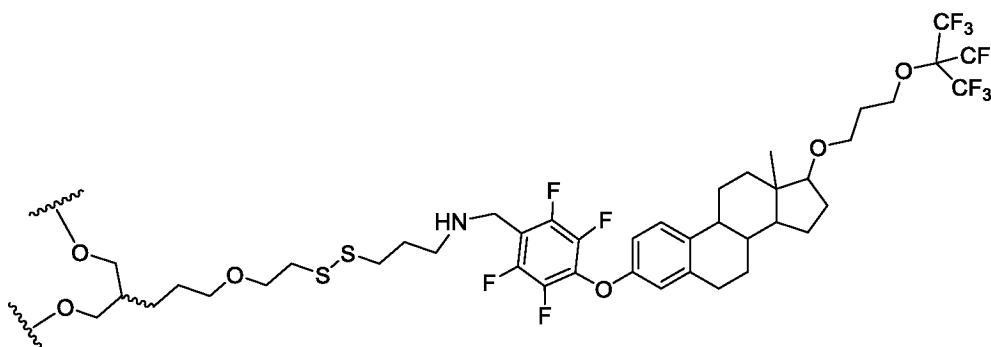
[0023] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XV-M)**:



Формула (XVI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

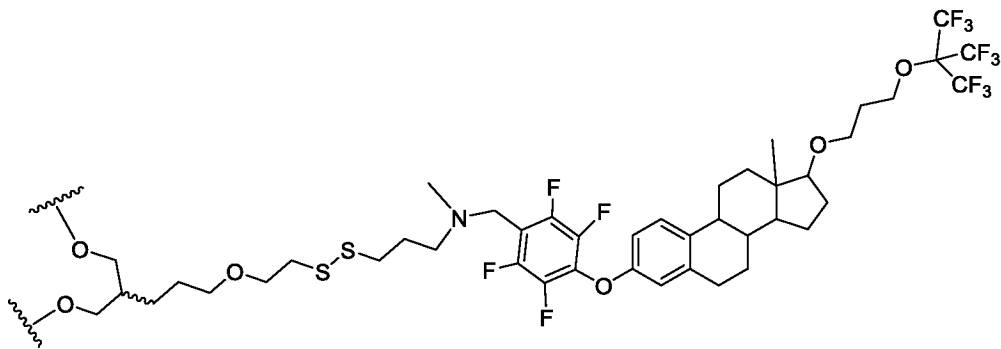
[0026] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-H)**:



Формула (XVI-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

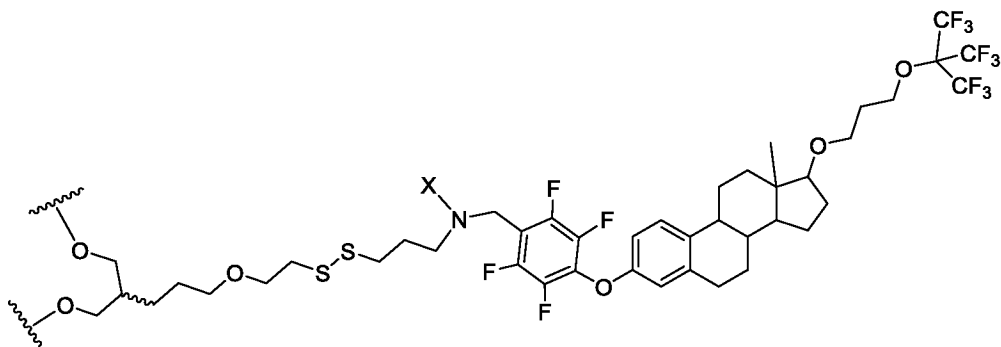
[0027] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-M)**:



Формула (XVI-M)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[0028] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-F)**:



Формула (XVI-F)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где X представляет собой защитную группу для амина.

[0029] В данном изобретении предложена также **молекула-предшественник**, представляющая собой любой фрагмент или фрагменты E, E' или E'', имеющие структуру, представленную любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, связанные с защитными группами для спиртов и/или защитными группами для аминов,

причем указанные защитные группы предназначены для удаления во время химической обработки молекулы, например, во время конъюгации с олигонуклеотидной цепью.

[0030] Некоторые варианты реализации данного изобретения относятся к способу доставки лекарственного соединения через биологическую мембрану в клетки, как *in vitro*, так и *in vivo*; указанный способ включает приведение в контакт клеток с конъюгатом, описанным в данном документе.

[0031] Другой вариант реализации данного изобретения относится к способу лечения заболевания у пациента, нуждающегося в этом; указанный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат по данному изобретению, содержащий лекарственное соединение **D**, пригодное для лечения данного заболевания у указанного пациента, и фармацевтически приемлемую соль или носитель.

[0032] Описаны также примеры, иллюстрирующие данное изобретение неограничивающим образом, для демонстрации того, как варианты реализации данного изобретения могут быть осуществлены на практике. В примерах описаны различные соединения и конъюгаты по данному изобретению. Все описанные конъюгаты соответствуют **Формулам (Cn-1)** или **(Cn-2)**, каждая из которых содержит фрагменты **E**, **E'** или **E''**, имеющие структуру общей **Формулы (II)**. В примерах представлены различные фрагменты **E**, **E'** или **E''**, иллюстрирующие структуры, указанные в **Формулах (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**. Все указанные конъюгаты проявляют биологическое действие в отношении сайленсинга гена, в отличие от контрольных соединений, которые могут иметь общее структурное сходство с вышеописанными соединениями, но которые, тем не менее, не вполне соответствуют структурным мотивам в соответствии с **Формулой (II)**, и, соответственно, не проявляют требуемую биологическую активность. Таким образом, профиль функциональных характеристик, демонстрируемый конъюгатами по данному изобретению в соответствии с **Формулами (I) и (II)**, отображает общее и уникальное структурное строение, которое обеспечивает возможность применения родственных соединений для доставки макромолекулярных **OD** через фосфолипидные мембраны в клетки, с последующим осуществлением полезной биологической активности, как *in vitro*, так и *in vivo*.

[0033] Кроме того, в примерах описаны способы химического синтеза фрагментов **E** по данному изобретению, их предшественников и их сборки в эффективные конъюгаты.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР И ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0034] На **Фиг. 1А и 1В** приведен пример способа связывания фрагмента **Е** по данному изобретению в соответствии с **Формулой (III)** с олигонуклеотидной цепью и соответствующего редокс-опосредованного расщепления фрагмента **Е**. На **Фиг. 1А** показана спираль РНК, в которой фрагмент **Е** в соответствии с **Формулой (III)** связан во внутреннем положении; на **Фиг. 1В** представлен пример редокс-опосредованного расщепления дисульфидной группы указанного фрагмента **Е** в соответствии с **Формулой (III)** в восстановительной среде, такой как среда, преобладающая в цитоплазме, с последующим высвобождением лекарственной РНК.

[0035] На **Фиг. 2А, 2В, 2С, 2D и 2Е** приведен пример механизма действия (МОА) конъюгата по данному изобретению, где конъюгат соответствует **Формуле [Cn-2-(III)]**. Дуплекс РНК представляет собой субстрат Дайсер длиной 25/27 нуклеотидов с фосфатной группой, связанной на 5'-конце каждой спирали, и при этом группа **W** в расположенном внутри фрагменте **Е** соответствует **Формуле (II')**, где **J** представляет собой $-CH_2-$; на **Фиг. 2А** показан интактный конъюгат; на **Фиг. 2В** показано расщепление и удаление фрагментов **Е**, **Е'** и **Е''** в восстановительной среде, которая преобладает в цитоплазме, в результате чего от каждого фрагмента **Е**, **Е'** или **Е''** остается короткий остаточный обрывок; на **Фиг. 2С** показано взаимодействие дуплекса РНК с эндонуклеазой Дайсер, которое приводит к разрыву двойной спирали с образованием дуплекса РНК 21/21 и удалению остатка фрагмента **Е''**, при этом остаются два остальных остатка **Е** и **Е'**, связанных на 5'-конце и во внутреннем положении сопровождающей цепи; на **Фиг. 2D** показано удаление смысловой (сопровождающей) цепи под действием фермента геликазы (т.е. цитоплазматического фермента, способного разделять спирали РНК) с одновременным удалением оставшихся остатков фрагментов **Е** и **Е'**, которые связаны с сопровождающей цепью. Затем происходит высвобождение интактной антисмысловой цепи для внедрения в РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC), для инициации требуемого сайленсинга гена [**Фиг. 2Е**].

[0036] На **Фиг. 3А и 3В** описано действие конъюгата по данному изобретению **Формулы [Cn-1-(IX)]**, а именно, содержащего фрагменты **Е** и **Е'**, каждый из которых соответствует **Формуле (IX)**, в отношении сайленсинга экспрессии гена *ApoC3* при внутривенном введении в мышиную модель, *in vivo*; (**Фиг. 3А**). Сайленсинг гена в печени; (**Фиг. 3В**). Сайленсинг гена в почках. Экспериментальные группы: (i). Носитель: 5% глюкоза в воде для инъекций; (ii). «Оголенная» дмРНК для *ApoC3* (без присоединения молекулярных

наномоторных фрагментов); (iii). Конъюгат [Cn-1-(IX)]-Kras-дмиРНК (неродственная последовательность РНК, конъюгированная с молекулярной наномоторной системой доставки Apo-Si); (iv). Целевой конъюгат [Cn-1-(IX)]-ApoC3 и дмиРНК.

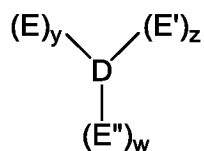
[0037] На **Фиг. 4А и 4В** [Cn-2-(VIII)], а именно, содержащий фрагменты E, E' и E'', каждый из которых соответствует **Формуле (VIII)**, при сайленсинге экспрессии гена EGFP, *in vitro*: (**Фиг. 4А**): Выращенные клетки Hela; (**Фиг. 4В**): Выращенные клетки 3Т3. Представлены кривые зависимости ответа от дозы в диапазоне концентраций 0-300 нМ.

[0038] На **Фиг. 5** описаны биологические характеристики двух конъюгатов по данному изобретению: конъюгата [Cn-1-(VIII-M)] и конъюгата [Cn-2-(VIII-M)], в отношении сайленсинга экспрессии гена EGFP в клетках 3Т3, *in vitro*. Наблюдали очевидную зависимость ответа от дозы с высокосignificantным логарифмическим снижением, с приближением кривой $R^2 \approx 0,97$ для обеих клеточных линий. Для конъюгата [Cn-1-(VIII-M)] (пунктирная линия), содержащего 2 фрагмента E, найденное значение IC_{50} составляет 2,2 нМ, а для конъюгата [Cn-2-(VIII-M)] (сплошная линия), содержащего 3 фрагмента E, найденное значение IC_{50} составляет 0,8 нМ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0039] Данное изобретение относится к конъюгатам и их предшественникам, содержащим макромолекулярные лекарственные соединения, такие как OD, связанные с новой молекулярной системой доставки (MDS), которая может обеспечивать доставку лекарственного карго-соединения через фосфолипидные биологические мембраны в клетки для проявления биологической активности, такой как сайленсинг экспрессии гена-мишени. Указанная система доставки обеспечивает возможность трансмембранной доставки макромолекулярных лекарственных соединений, таких как генетические лекарственные соединения, например, миРНК или дмиРНК, антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) или терапевтические белки. Данное изобретение основано на идентификации и разработке авторами изобретения новых соединений, которые оказывают преимущественное действие в отношении сайленсинга гена, сочетая эффективную трансмембранную доставку через фосфолипидные мембраны и последующее устойчивое, опосредованное восстановлением высвобождение карго-OD в цитоплазму, где оно оказывает свой биологический эффект.

[0040] В одном варианте реализации данного изобретения предложены конъюгаты, имеющие структуру, представленную **Формулой (I)**:



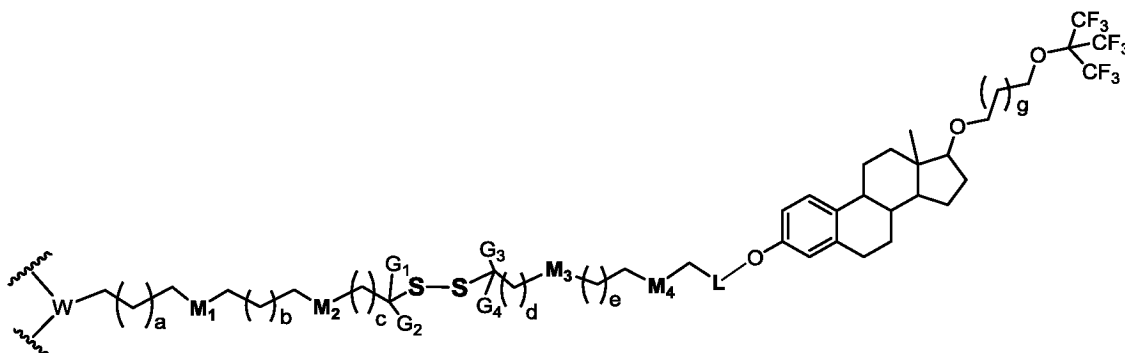
Формула (I)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (I)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где:

D представляет собой лекарственное соединение, подлежащее доставке через биологические мембраны (т.е. *лекарственное карго-соединение*), выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного соединения, пептида, белка и **OD** (т.е. нативной или модифицированной одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК, дмиРНК или ASO);

y, z и w представляют собой целые числа, независимо выбранные из 0, 1, 2, 3 или 4, причем если любой из **y, z** или **w** равен 0, это означает, что соответствующий фрагмент (или фрагменты) **E** является нулевым; по меньшей мере один из **y, z** или **w** отличен от 0;

E, E' или **E''** могут быть одинаковыми или различными, каждый независимо имеет структуру, представленную ниже общей **Формулой (II)**:



Формула (II),

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (II)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где:

M₁, M₂, M₃, M₄, каждый независимо, выбраны из группы, состоящей из **N', N''**, нуля, простого эфира, амида, сложного эфира, простого тиоэфира и сложного тиоэфира;

причем каждый N' и N'' независимо выбран из группы, состоящей из $-N(CH_3)-$, $-NH-$ и $N(X)-$; где X представляет собой защитную группу для амина; M_1, M_2, M_3, M_4 могут быть одинаковыми или различными; N', N'' могут быть одинаковыми или различными.

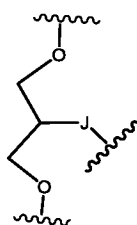
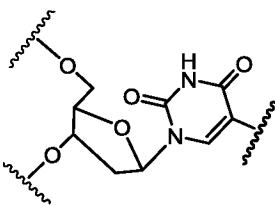
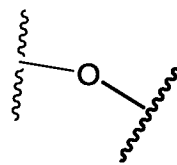
L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из нуля, $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6$ алкилена или гетероалкилена; C_5 или C_6 арила или гетероарила, необязательно замещенного атомом(ами) фтора или гидроксильной группой(ами); и их комбинации;

G_1, G_2, G_3, G_4 , каждый независимо представляют собой атом водорода или метильную группу; группы G могут быть одинаковыми или различными; по меньшей мере две группы G_1, G_2, G_3 или G_4 представляют собой атомы водорода;

a, b, c, d, e представляют собой целые числа, каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где 0 = ноль; a, b, c, d, e могут быть одинаковыми или различными;

g означает целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

W выбран из группы, состоящей из нуля, остатка гидроксила, дигидроксила, амида, природного или модифицированного нуклеозида, и любой из структур, представленных Формулами (II¹), (II²) и (II³), и их комбинации:

Формула (II¹)Формула (II²)Формула (II³)

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

E, E' или E'' могут быть связаны с любым фрагментом группы, состоящей из D ; защитной группы, определение которой приведено в данном документе (например, защитной группы для спирта); R или R' группы, выбранной из группы, состоящей из водорода, фосфата, сульфата и карбоксильной группы; и твердой подложки. В контексте данного изобретения фрагмент E, E' или E'' **может** быть связан с одним фрагментом D в одной или более точках; и W может быть связан одновременно и с D , и с R или R' .

[0041] В одном варианте реализации данного изобретения **g** представляет собой целое число, выбранное из 0, 1 или 2.

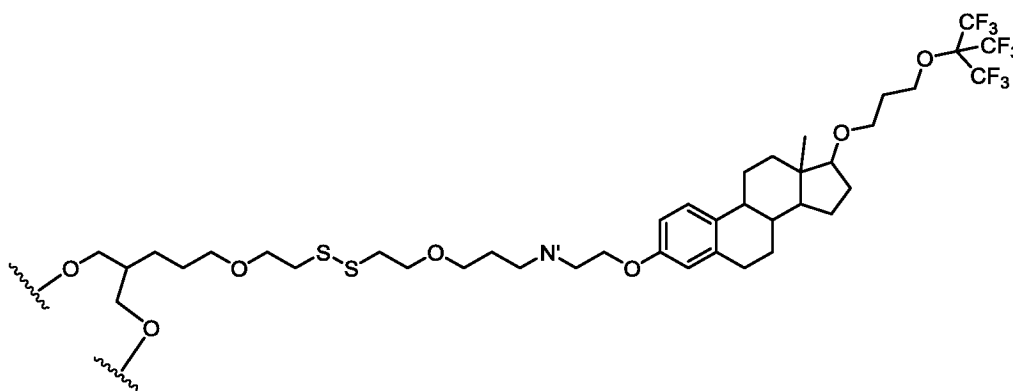
[0042] В одном варианте реализации каждый **c** и **d** независимо может представлять собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3; **c** и **d** могут быть одинаковыми или различными.

[0043] В одном варианте реализации данного изобретения все **G₁**, **G₂**, **G₃**, **G₄** представляют собой атомы водорода.

[0044] В одном варианте реализации **L** представляет собой дифторбензиламин.

[0045] В другом варианте реализации **X** представляет собой ТЕОС [2-(триметилсилил)этилкарбамат] или Fмос.

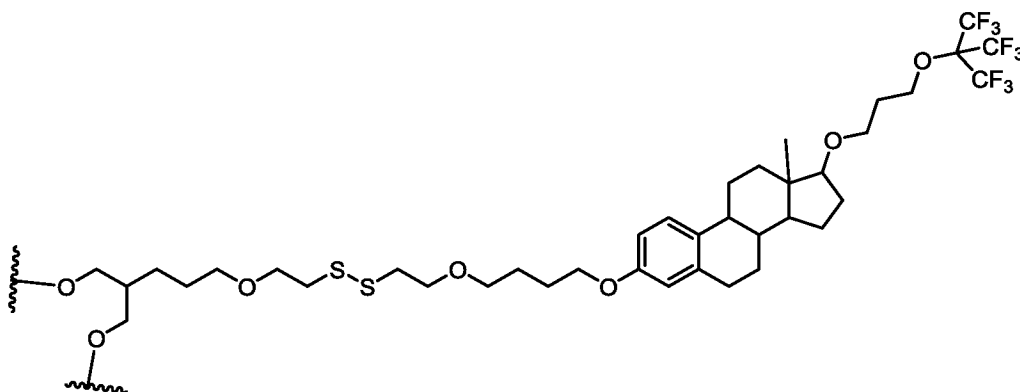
[0046] Соответственно, в одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (III)**:



Формула (III)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (III)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где **N'** имеет такое же значение, как указано для **Формулы (II)**.

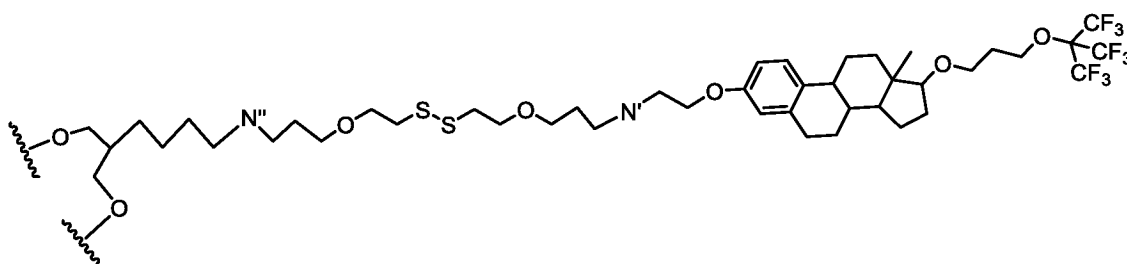
[0047] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (IV)**:



Формула (IV)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (IV)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

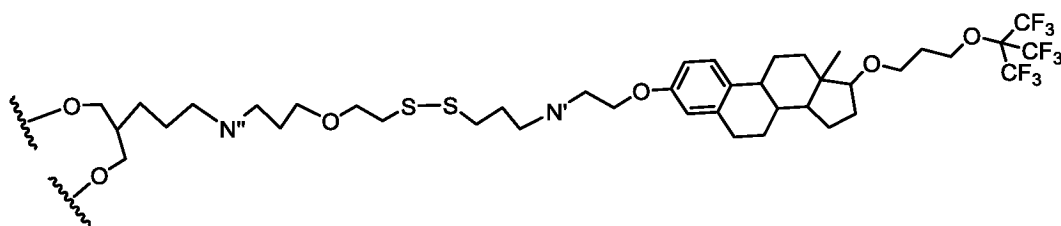
[0048] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (V)**:



Формула (V)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (V)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано для **Формулы (II)**.

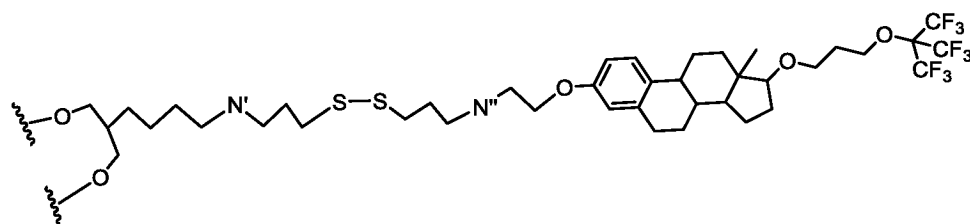
[0049] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VI)**:



Формула (VI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VI)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано для **Формулы (II)**.

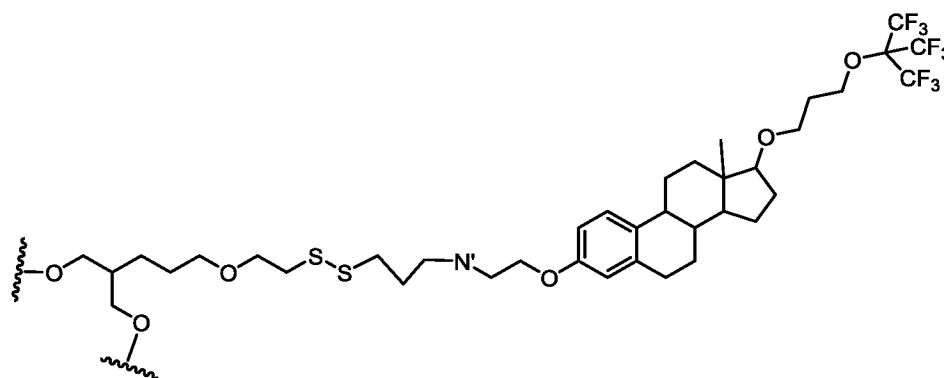
[0050] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VII)**:



Формула (VII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VII)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано для **Формулы (II)**.

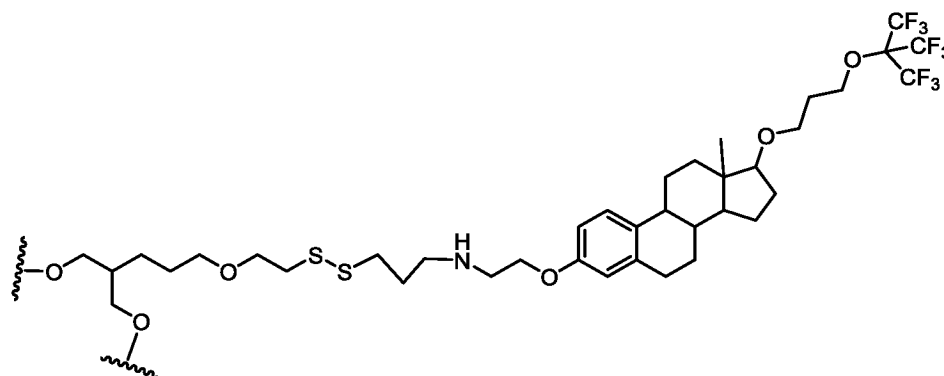
[0051] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII)**:



Формула (VIII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где **N'** имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

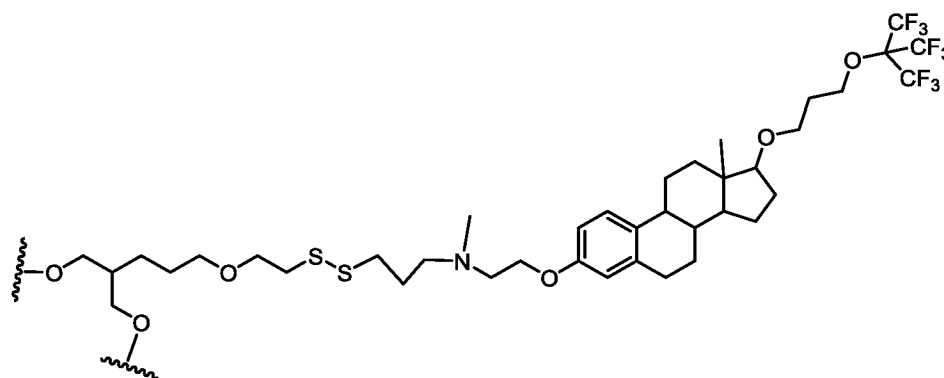
[0052] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-H)**:



Формула (VIII-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

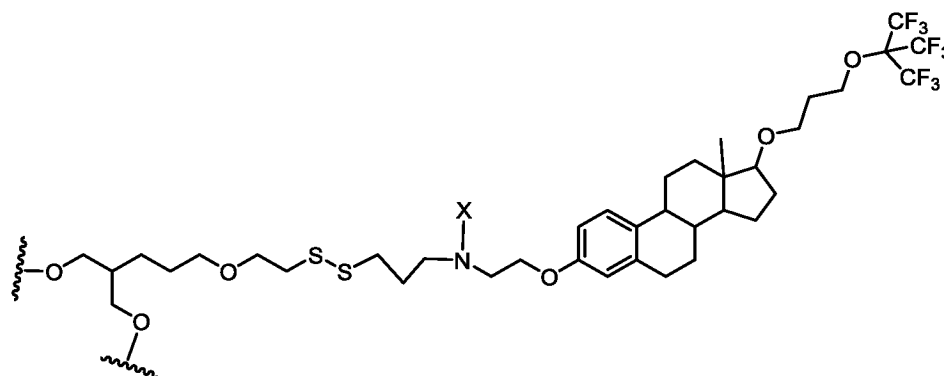
[0053] В родственном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-M)**:



Формула (VIII-M)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

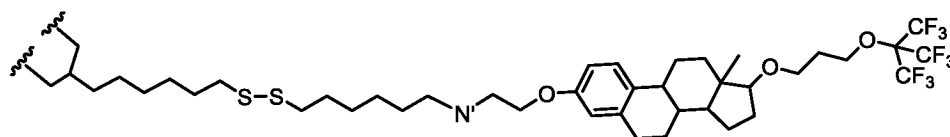
[0054] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-F)**:



Формула (VIII-F)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где X представляет собой защитную группу для амина.

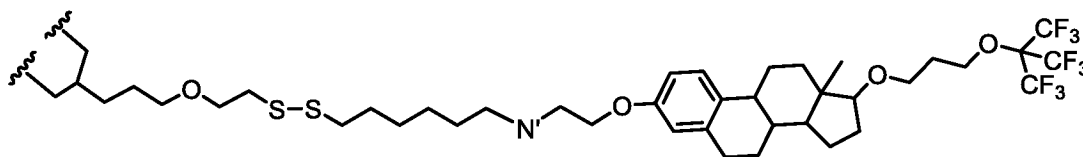
[0055] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (IX)**:



Формула (IX)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (IX)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

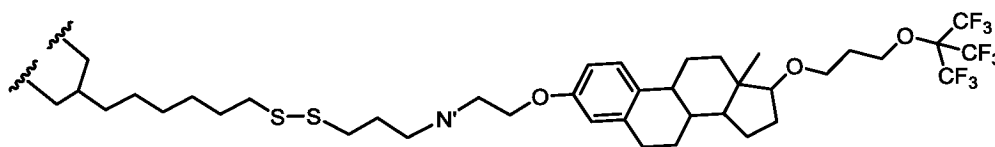
В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (X)**:



Формула (X)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (X)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

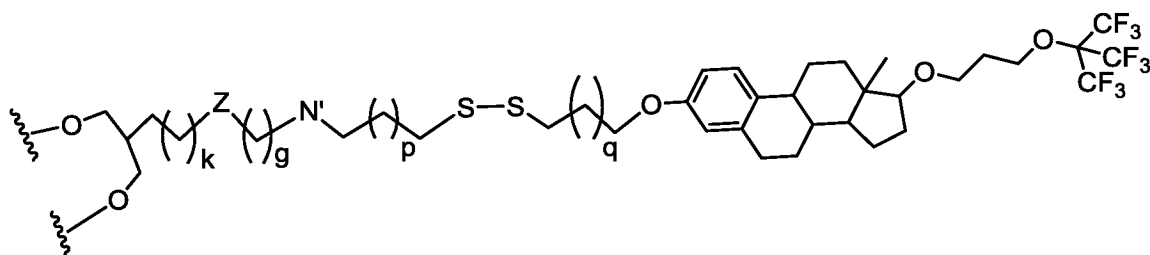
[0056] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XI)**:



Формула (XI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XI)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

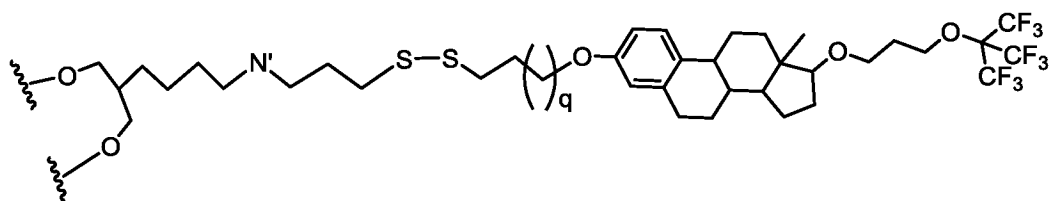
[0057] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XII)**:



Формула (XII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIII)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где p и q независимо представляют собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где 0 означает ноль; p и q могут быть одинаковыми или различными; каждый k и g независимо представляют собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, где 0 означает ноль; k и g могут быть одинаковыми или различными; Z выбран из группы, состоящей из нуля, -O- и N''; где N' и N'' имеют такое же значение, как в **Формуле (II)**.

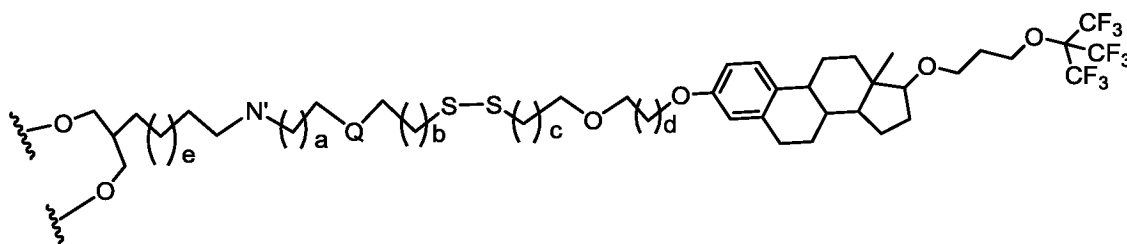
[0058] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (XII)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIIa)**:



Формула (XIIa)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIIa)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где q представляет собой целое число, равное 0 или 1; и N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

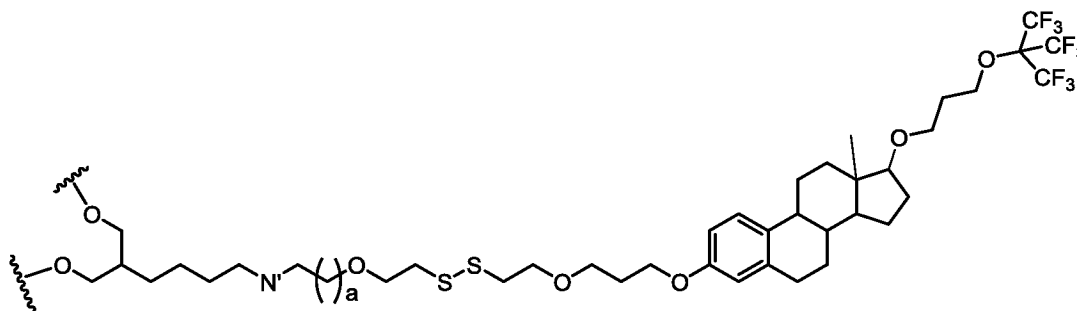
[0059] В данном изобретении предложен также конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIII)**:



Формула (XIII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIII)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где каждый **a**, **b**, **c**, **d**, **e** независимо представляет собой целое число, выбранное из 0, 1, 2 или 3, где 0 означает ноль; **a**, **b**, **c**, **d** и **e** могут быть одинаковыми или различными; **Q** выбран из группы, состоящей из нуля и -O-; **N'** имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

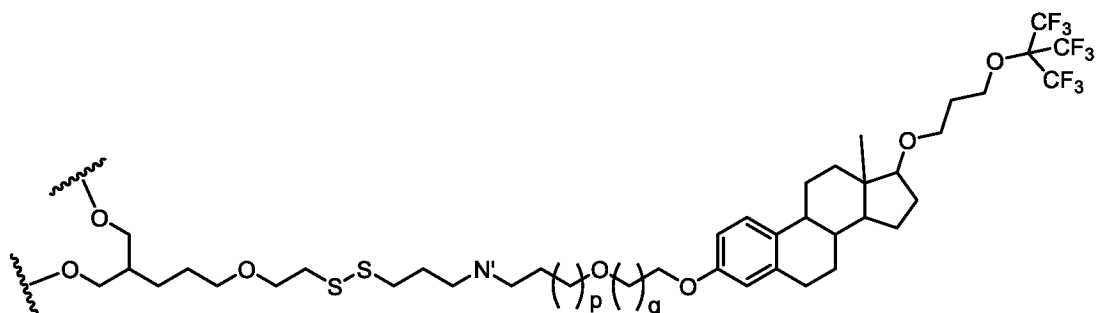
[0060] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (XIII)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIIIa)**:



Формула (XIIIa)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIIIa)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где **a** представляет собой целое число, равное 1 или 2; **N'** имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

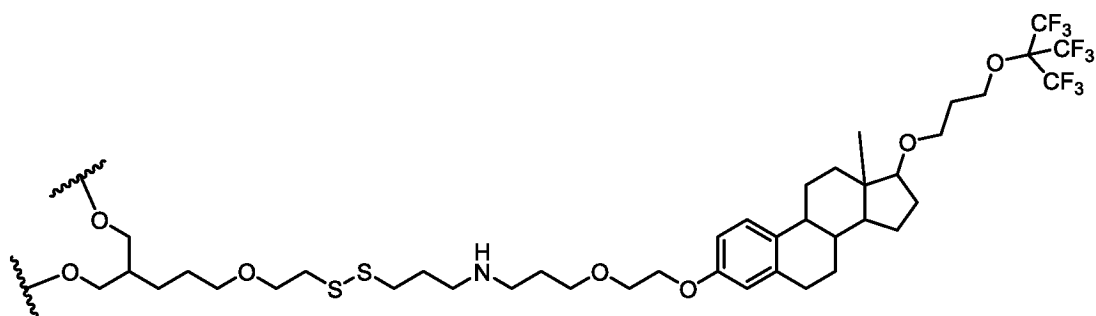
[0061] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV)**:



Формула (XIV)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где **p** и **q**, каждый независимо, представляют собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; **N'** имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

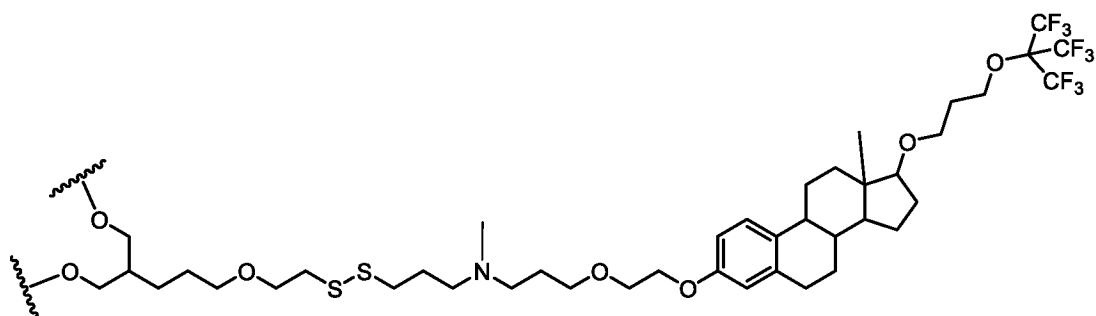
[0062] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-H)**:



Формула (XIV-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

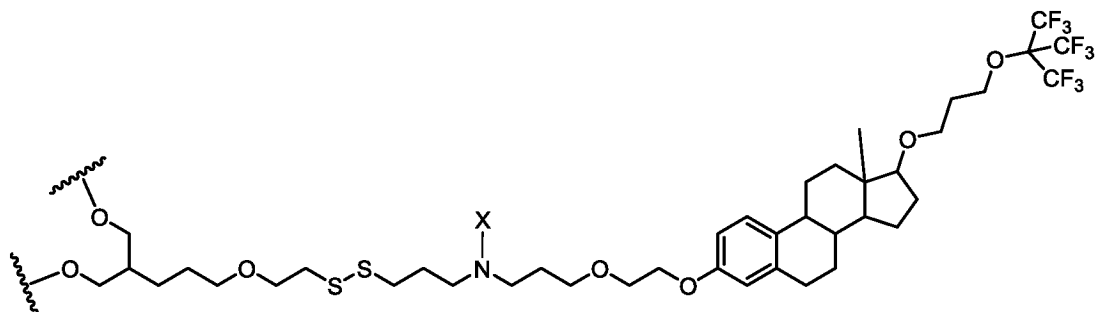
[0063] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-M)**:



Формула (XIV-M)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[0064] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-F)**:

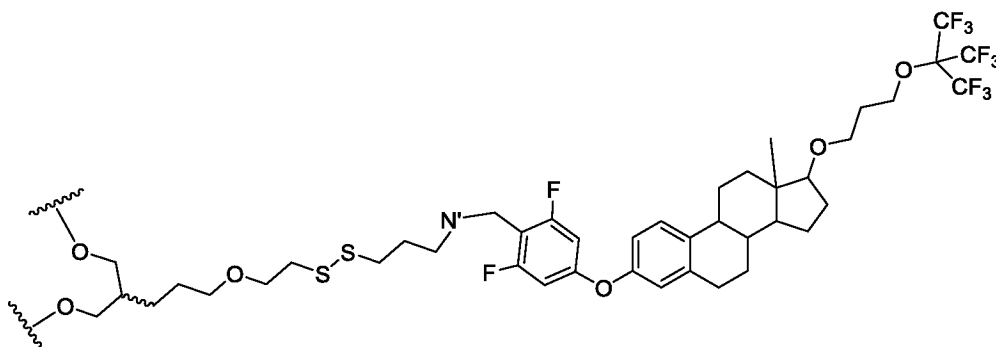


Формула (XIV-F)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где X представляет собой защитную группу для амина.

[0065] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где фрагмент L представляет собой

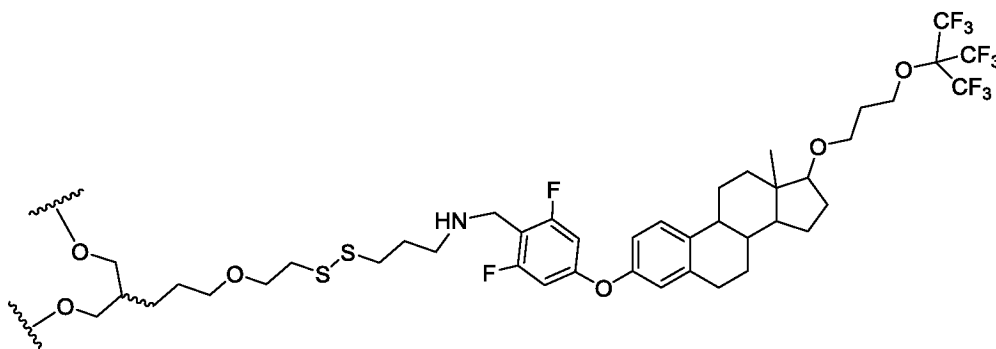
дифторбензиламин; и, следовательно, каждый E, E' или E'' имеет структуру, представленную **Формулой (XV)**:



Формула (XV)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XV)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где **p** и **q**, каждый независимо, представляют собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; **N'** имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

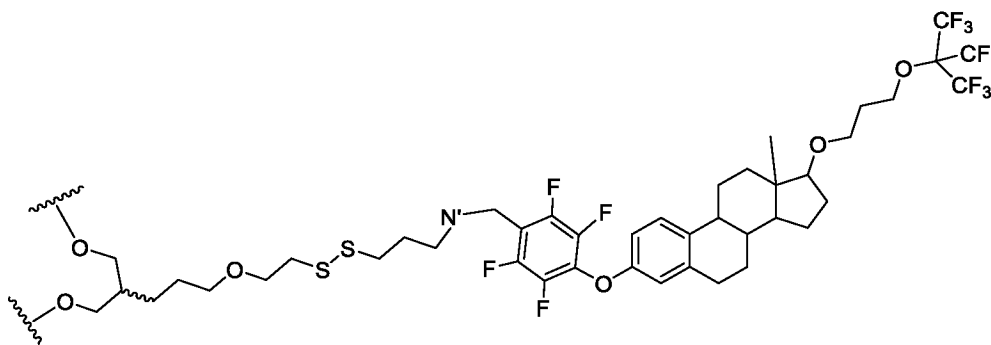
[0066] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XV-H)**:



Формула (XV-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XV-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

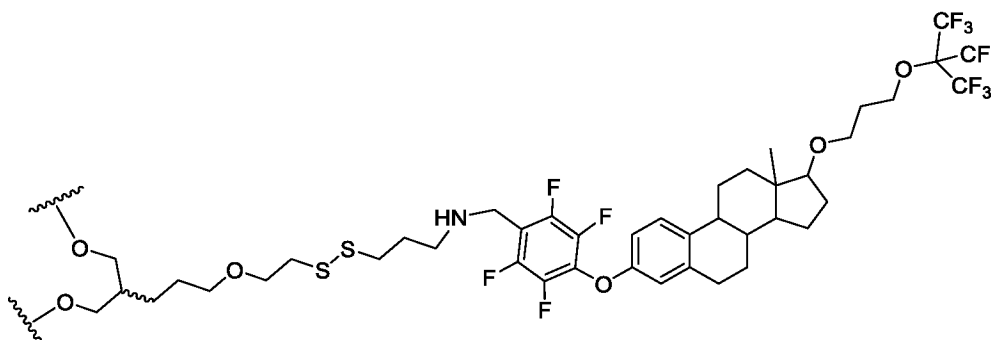
[0067] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XV-M)**:



Формула (XVI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где **N'** имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

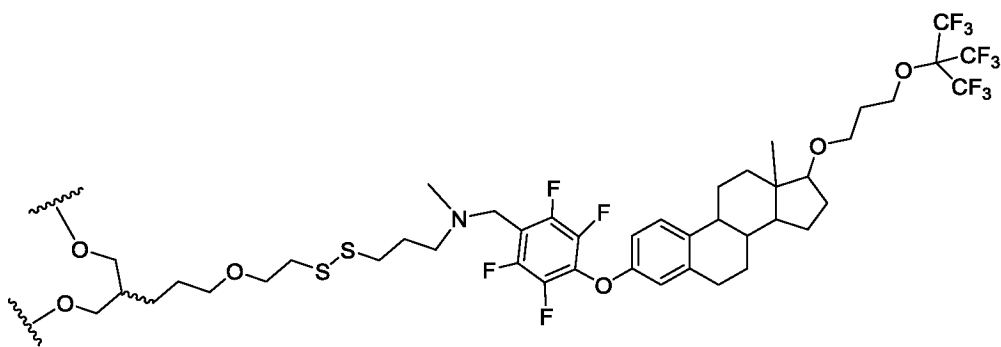
[0070] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-H)**:



Формула (XVI-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

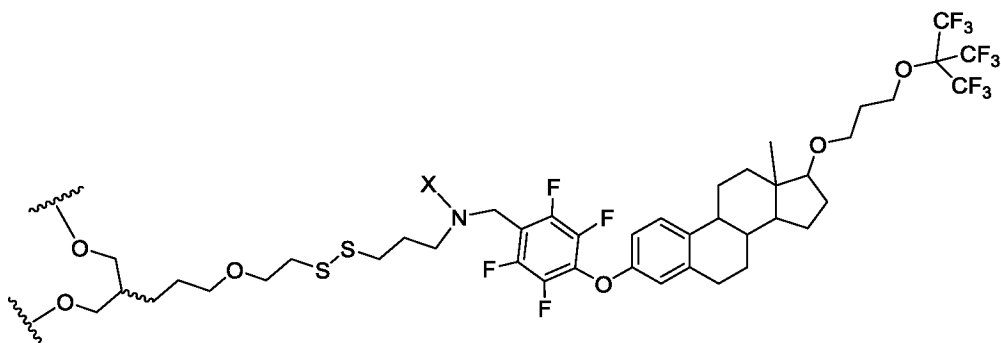
[0071] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-M)**:



Формула (XVI-M)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[0072] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (I)** и **Формулой (II)**, где E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-F)**:



Формула (XVI-F)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где X представляет собой защитную группу для амина.

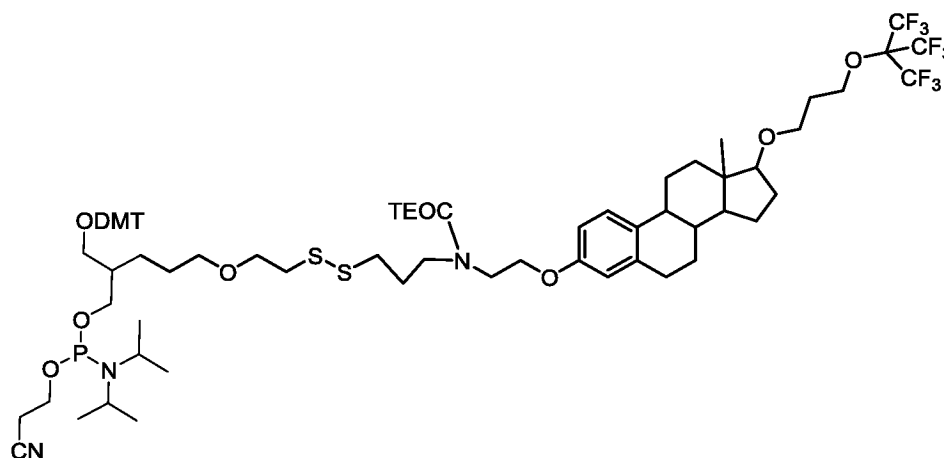
[0073] Если фрагменты E, E' или E'' имеют структуру, представленную любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, они могут быть связаны с защитными группами для спиртов или аминов, причем указанные защитные группы чаще предназначены для аминов, включая, без ограничения, диметокситритил [бис-(4-

метоксифенил)фенилметил (DMT) и фосфорамидит. Указанные фрагменты пригодны, среди прочего, для конъюгации фрагмента E, E' или E'' по данному изобретению с олигонуклеотидной цепью в процессе конструирования олигонуклеотидного лекарственного соединения (OD).

[0074] Кроме того, часто используемые защитные группы для амина представляют собой Fmoc и TEOC [2-(триметилсилил)этилкарбамат], которые можно использовать для защиты различных функциональных групп, присоединенных к E, E' или E'', во время синтеза OD. Будучи удаляемыми в основной среде, такие защитные группы, следовательно, могут быть эффективно сняты на стадии удаления защитных групп по окончании синтеза OD, обнажая требуемую функциональную группу в готовом конъюгате OD, которая ранее была замаскирована данным защитным фрагментом(ами).

[0075] **Молекула-предшественник** в контексте данного изобретения представляет собой любой фрагмент или фрагменты E, E' или E'', имеющие структуру, представленную любой из Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M), связанные с защитными группами для спиртов и/или амина, причем указанные защитные группы предназначены для удаления во время химической обработки молекулы, например, при конъюгации с олигонуклеотидной цепью; включая соответствующие фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты, сольваты и гидраты солей.

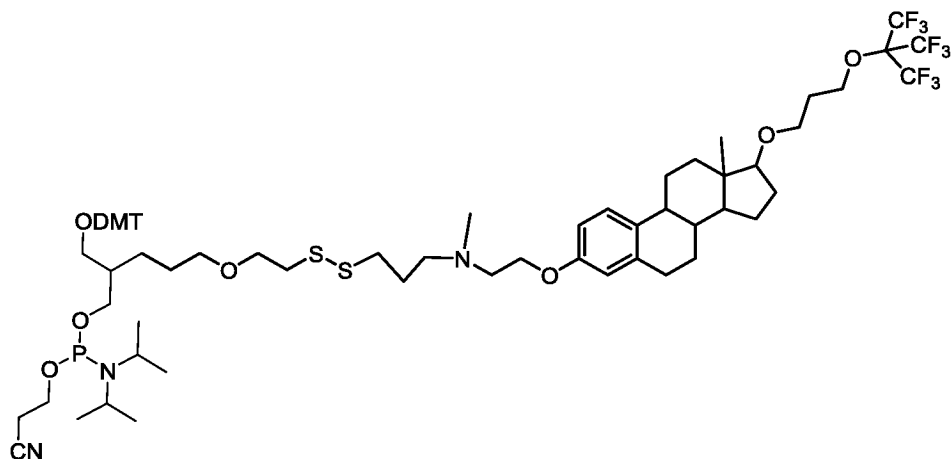
[0076] Пример **молекулы-предшественника** по данному изобретению, представленный неограничивающим образом, основан на структуре **Формулы (VIII)**, и имеет структуру, представленную следующей **Формулой (VIII-F)-предшественником**:



Формула (VIII-F)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

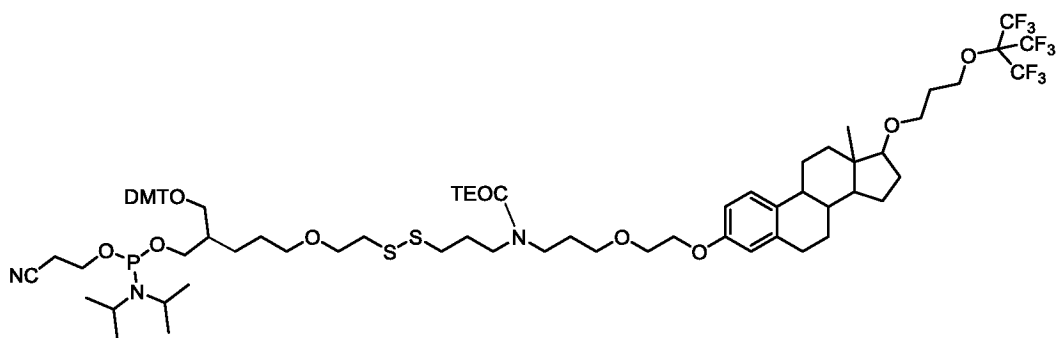
[0077] Другой пример **молекулы-предшественника** по данному изобретению основан на структуре **Формулы (VIII)**, имеет следующую **Формулу (VIII-M)-предшественник**:



Формула (VIII-M)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного указанной структурой, а также сольваты и гидраты таких солей.

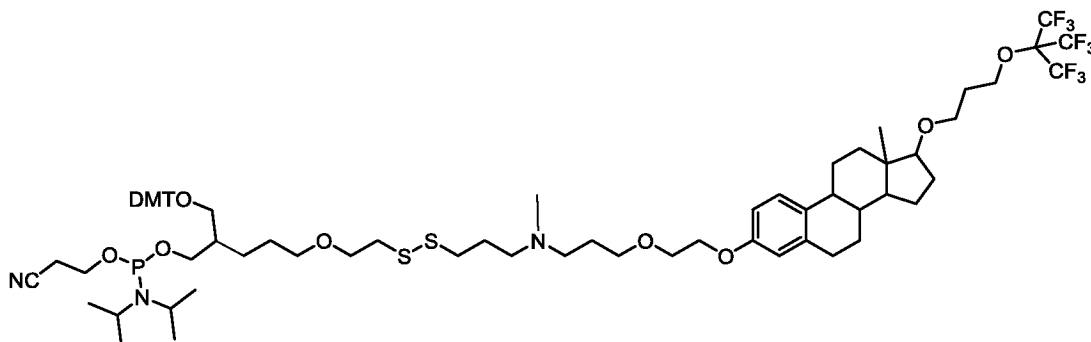
[0078] Другой пример **молекулы-предшественника** по данному изобретению основан на структуре **Формулы (XIV)** и имеет следующую **Формулу (XIV-F)-предшественник**:



Формула (XIV-F)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

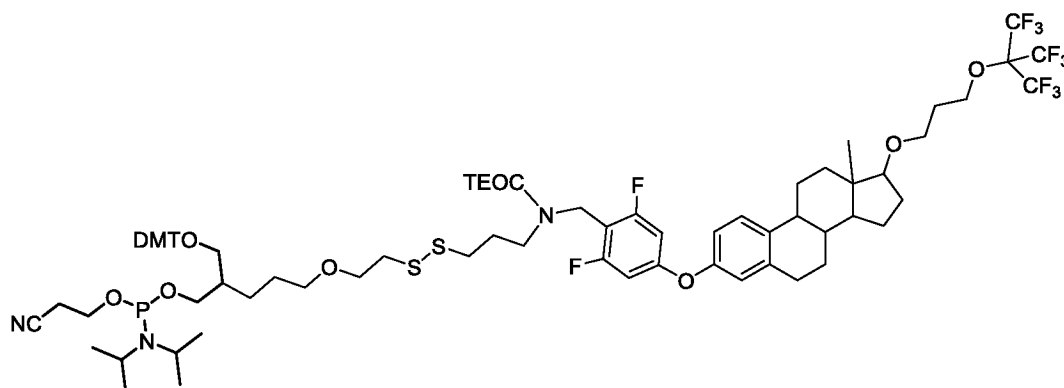
[0079] Другой пример **молекулы-предшественника** по данному изобретению основан на структуре **Формулы (XIV)**, имеет следующую **Формулу (XIV-M)-предшественник**:



Формула (XIV-M)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного указанной структурой, а также сольваты и гидраты таких солей.

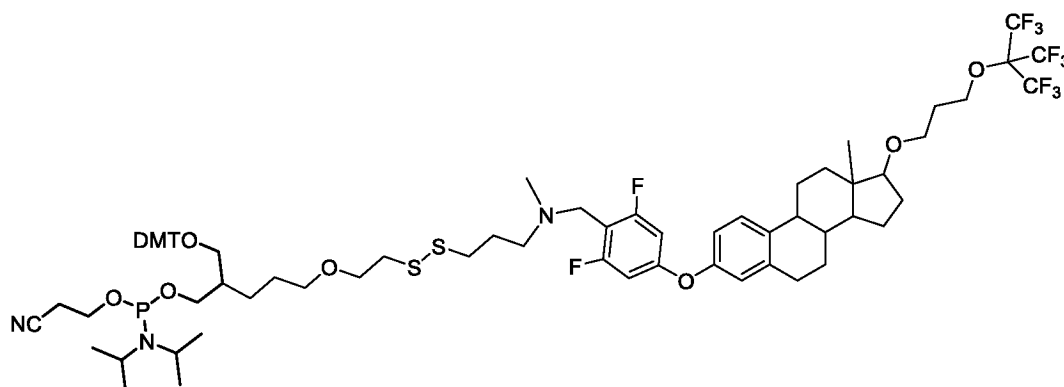
[0080] Другой пример **молекулы-предшественника** по данному изобретению основан на структуре **Формулы (XV)**, имеет следующую **Формулу (XV-F)-предшественник**:



Формула (XV-F)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XV-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

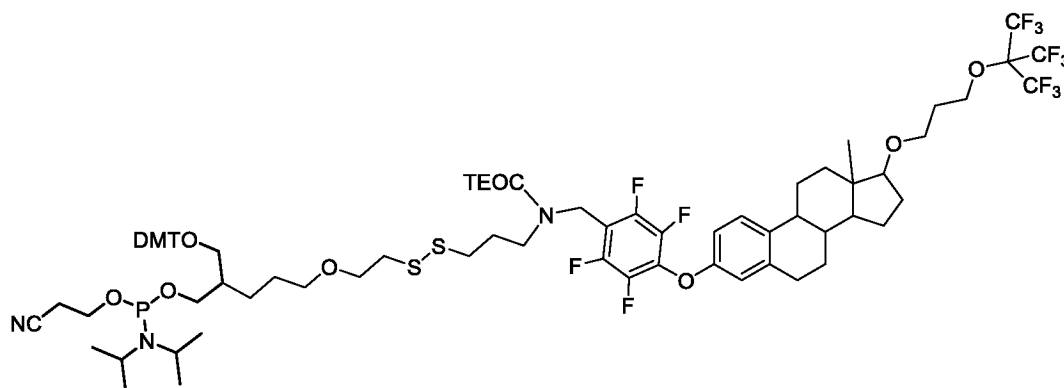
[0081] Другой пример *молекулы-предшественника* по данному изобретению основан на структуре **Формулы (XV)**, имеет следующую **Формулу (XV-M)-предшественник**:



Формула (XV-M)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного указанной структурой, а также сольваты и гидраты таких солей.

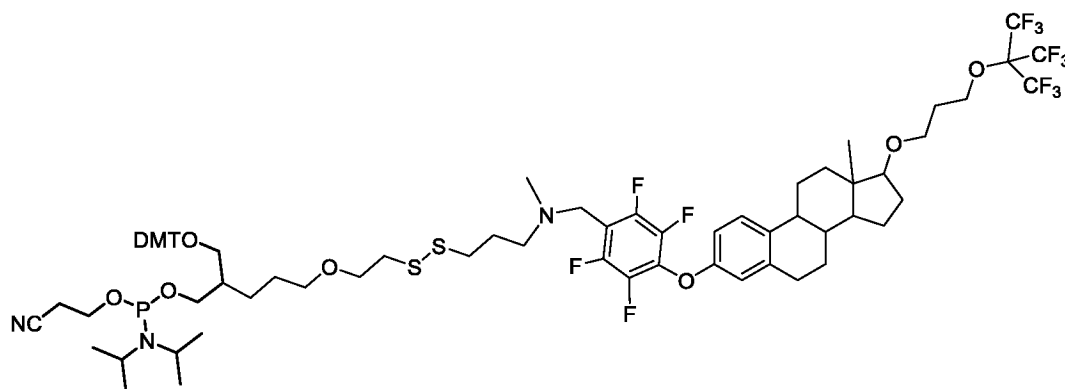
[0082] Другой пример *молекулы-предшественника* по данному изобретению основан на структуре **Формулы (XVI)**, имеет следующую **Формулу (XVI-F)-предшественник**:



Формула (XVI-F)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[0083] Другой пример *молекулы-предшественника* по данному изобретению основан на структуре **Формулы (XVI)**, имеет следующую **Формулу (XVI-M)-предшественник**:



Формула (XVI-M)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного указанной структурой, а также сольваты и гидраты таких солей.

[0084] Соединение(ия) согласно любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)** могут служить в качестве фрагментов E, E' или E'' для связывания с лекарственным соединением, D, образуя, таким образом, требуемый конъюгат по данному изобретению, предназначенный для осуществления биологической функции в отношении трансмембранной доставки D в клетки.

[0085] В одном варианте реализации данного изобретения предложены конъюгаты, в которых D представляет собой OD, такое как миРНК или субстрат Дайсера, связанный с фрагментами E, E' или E'', каждый из которых соответствует любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты и металло-хелаты соответствующих конъюгатов.

[0086] В том случае, если D представляет собой олигонуклеотидное лекарственное соединение (OD), конъюгаты могут соответствовать, среди прочего, любому из следующих вариантов:

- (i). OD связано с одним фрагментом E, E' или E''.
- (ii). OD связано с двумя фрагментами E, которые являются одинаковыми или различными; и каждый из них необязательно связан на каждом конце (например, 5'-конце) каждой олигонуклеотидной цепи.

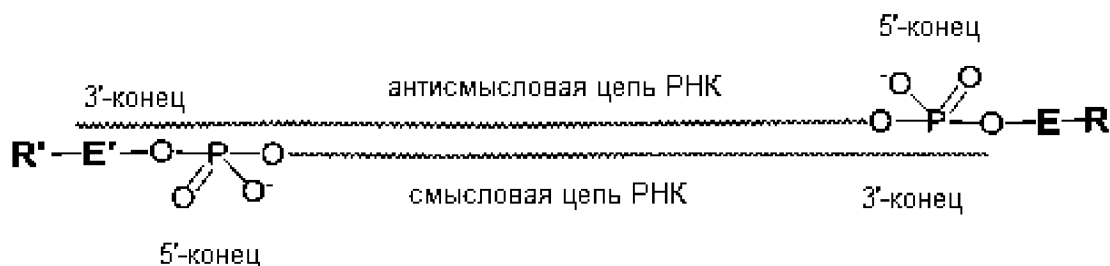
(iii). OD связано с тремя фрагментами E, которые являются одинаковыми или различными; фрагменты E и E' связаны на конце (например, 5'-конце) каждой олигонуклеотидной цепи, а E'' связан во внутреннем положении олигонуклеотидной цепи.

(iv). OD связано с несколькими ($n > 3$) фрагментами E, которые являются одинаковыми или различными; фрагменты E связаны на конце (например, 5'-конце) каждой олигонуклеотидной цепи, а несколько других фрагментов E связаны в нескольких внутренних положениях вдоль олигонуклеотидной цепи.

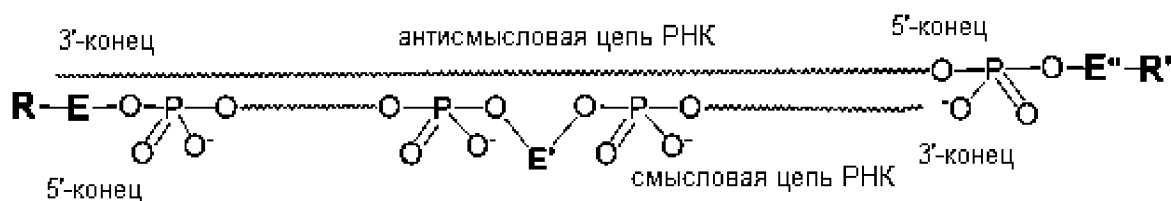
[0087] В том случае, если фрагмент E вставлен во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи, он может быть расположен в любой нужной точке. В том случае, если D представляет собой OD, которое представляет собой дуплекс РНК-миРНК, то предпочтительно, если внутренний фрагмент E вставлен в сопровождающую цепь. Потенциально выгодные положения вдоль сопровождающей цепи, которые не мешают активности конструктора в отношении сайленсинга гена, могут представлять собой положения №12 или №14. Фрагмент E может либо заменять нуклеотид в цепи, либо может дополнять последовательность, тем самым образуя, после процесса гибридизации, в котором образуется дуплекс миРНК, «выпетливание» в структуре дуплекса РНК.

[0088] Для каждого конъюгата E, E' или E'' может быть также связан с фрагментами R или R', каждый из которых является таким, как указано для **Формулы (II)** (фосфат, сульфат или карбоксильная группа). Фрагменты E, E', E'' могут быть одинаковыми или различными, и также фрагменты R и R' могут быть одинаковыми или различными.

[0089] Например, конъюгаты по данному изобретению могут иметь структуры, представленные следующими **Формулами (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3)**, которые содержат фрагменты E, E' или E'', каждый из которых имеет структуру в соответствии с любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, при этом каждый R и R' является таким, как указано в **Формуле (II)**:



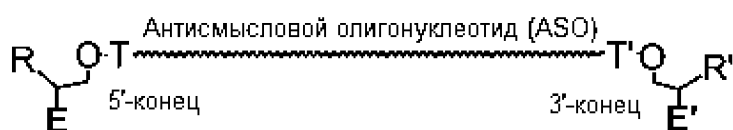
Формула (Cn-1)



Формула (Cn-2)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соответствующих конъюгатов.

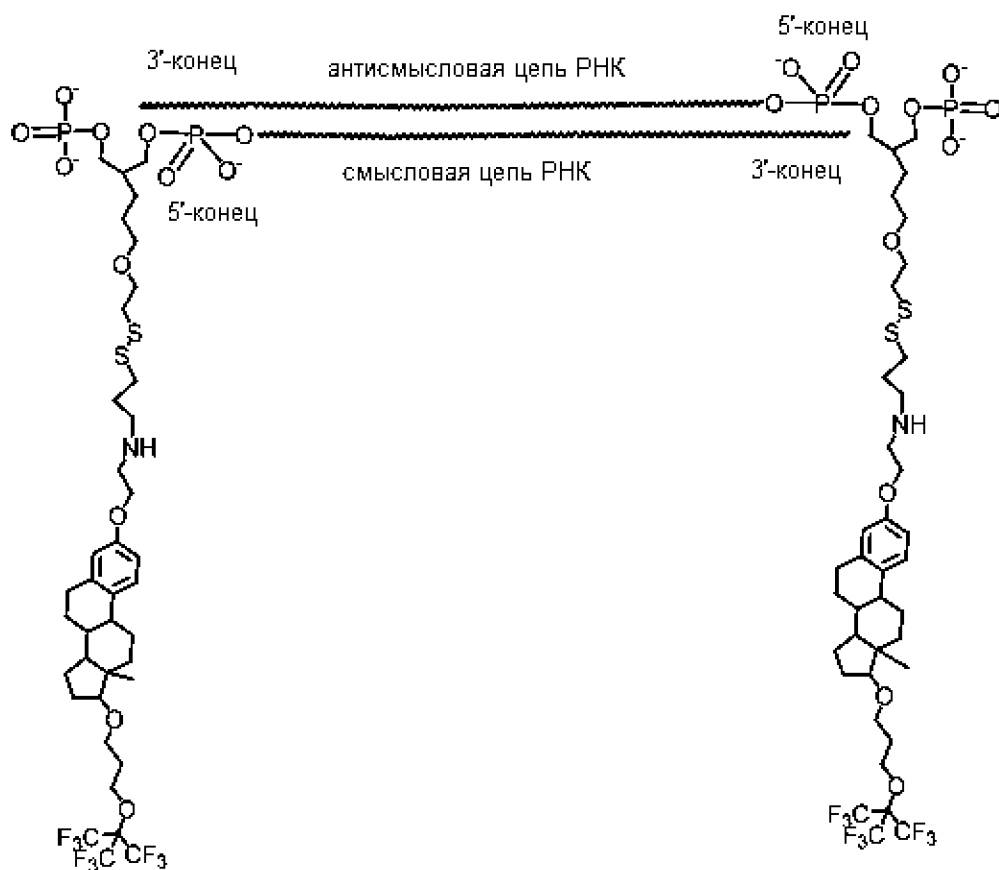
[0090] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат, который содержит **D**, представляющий собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO), описанный выше, содержащий одноцепочечный олигонуклеотид длиной 15-25 нуклеотидов. Указанный ASO выбран из группы, состоящей из природной или модифицированной ДНК, РНК, нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот (ЗНК), с нуклеотидами, связанными через фосфотриэфирные группы, тиофосфатные группы, посредством других способов связывания нуклеиновых кислот, известных в данной области техники, или их комбинаций. Указанный конъюгат содержит связи с фрагментами **E**, **E'**, как показано в **Формуле (Cn-3)**:



Формула (Cn-3)

где каждый **T** и **T'** независимо выбран из нуля и группы, состоящей из 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида или их комбинаций; **T** и **T'** могут быть одинаковыми или различными; и фрагменты **R** и **R'** являются такими, как указано в **Формуле (II)**; включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (Cn-3)**, а также сольваты и гидраты солей.

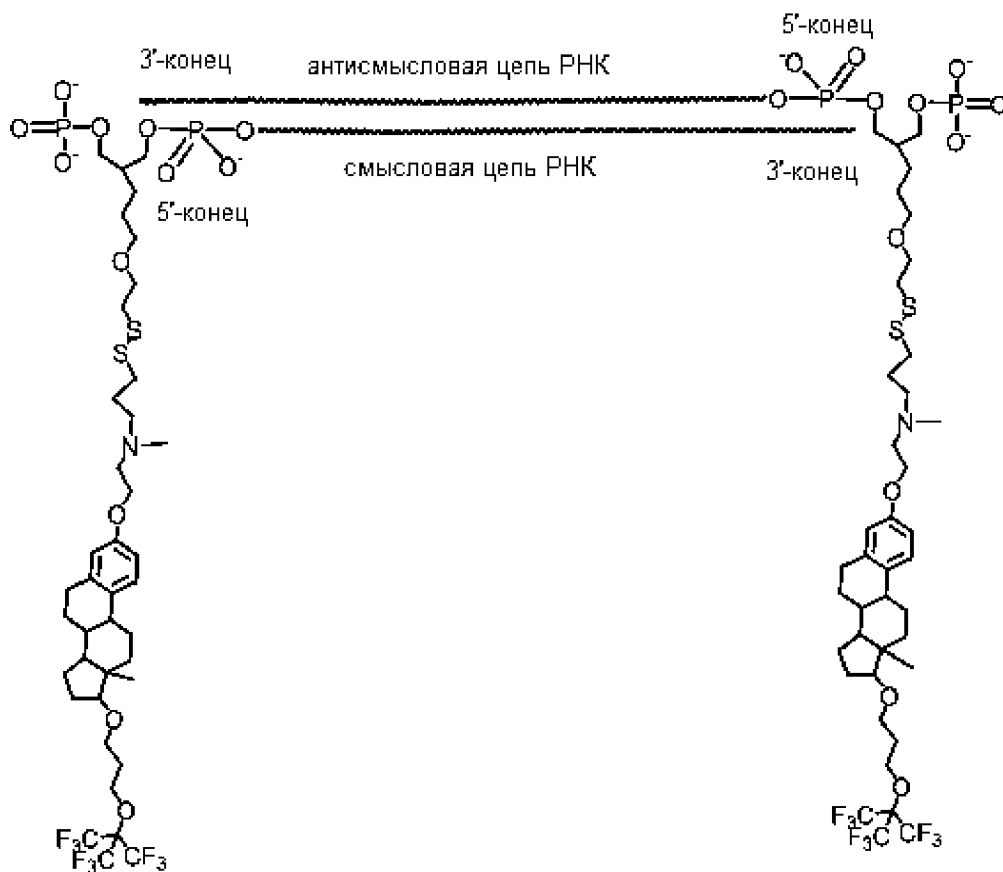
[0091] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-1)**, где каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (VIII-H)**; таким образом, указанный конъюгат имеет структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(VIII-H)]**:



Формула [Cn-1-(VIII-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(VIII-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

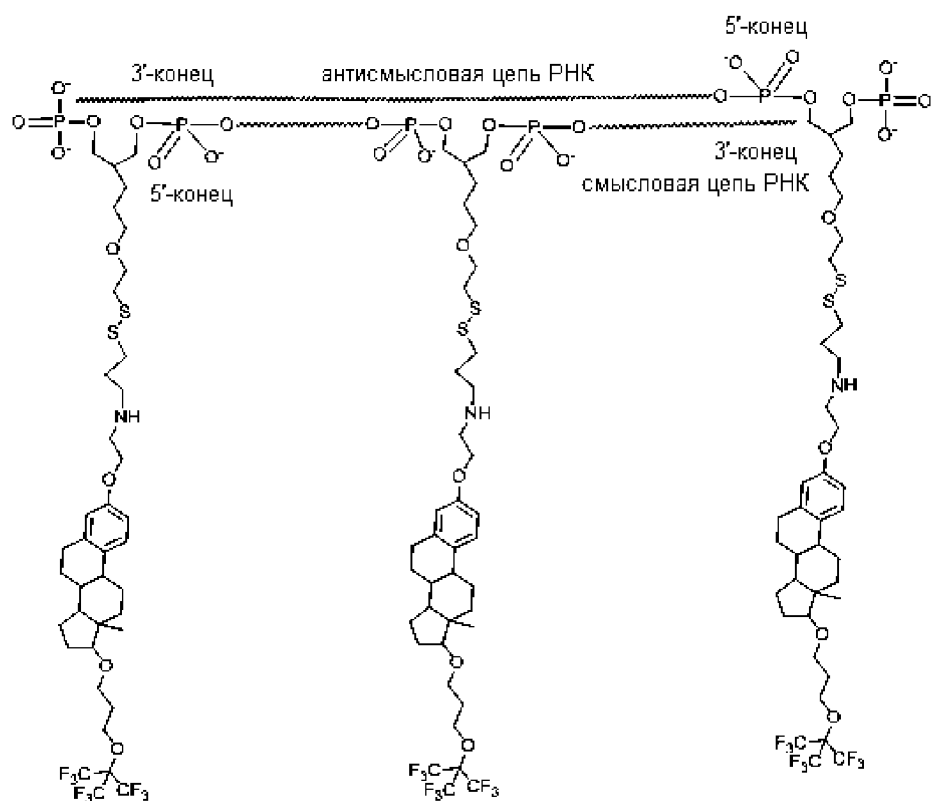
[0092] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-1)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (VIII-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(VIII-M)]**:



Формула [Cn-1-(VIII-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(VIII-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

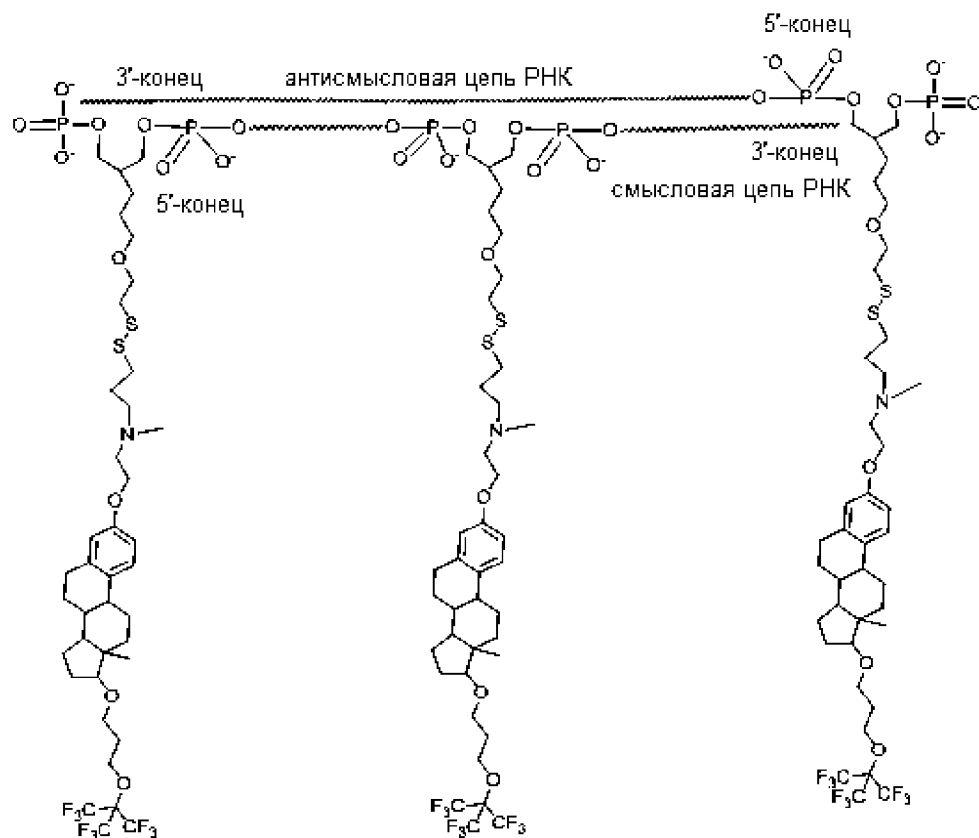
[0093] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-2)**, где каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (VIII-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(VIII-H)]**:



Формула [Cn-2-(VIII-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(VIII-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

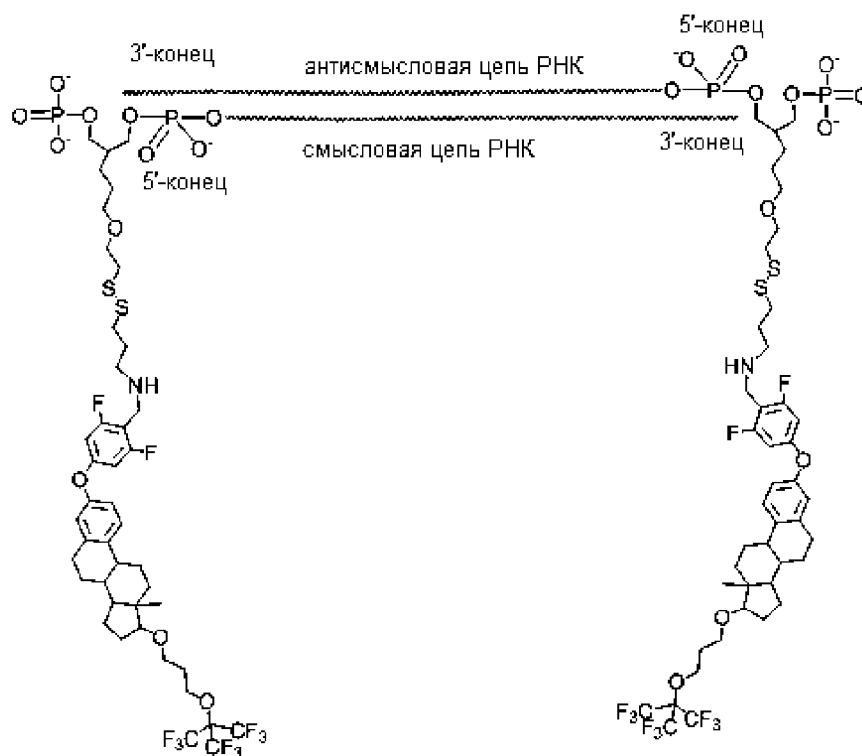
[0094] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-2)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (VIII-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(VIII-M)]**:



Формула [Cn-2-(VIII-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(VIII-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

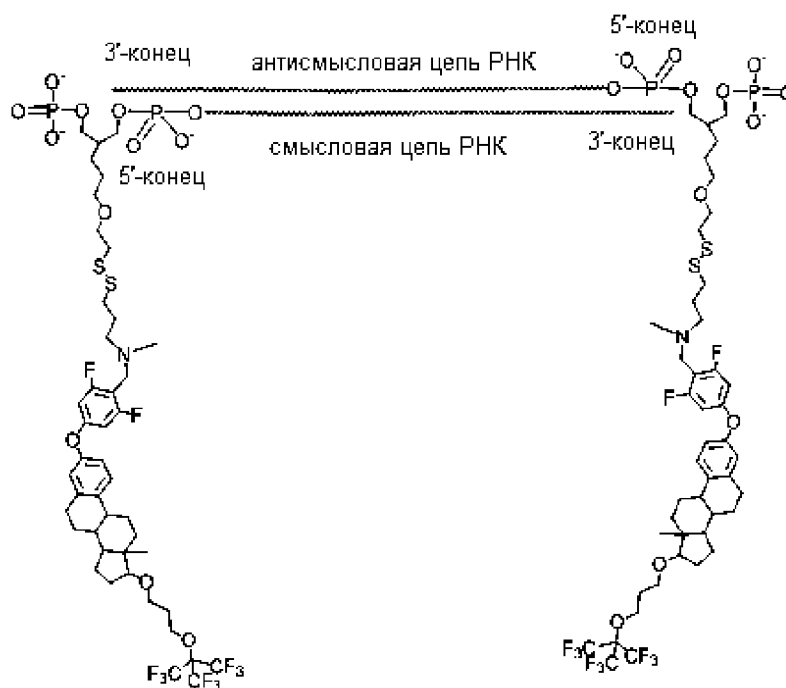
[0095] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-1)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XV-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XV-H)]**:



Формула [Cn-1-(XV-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(XV-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

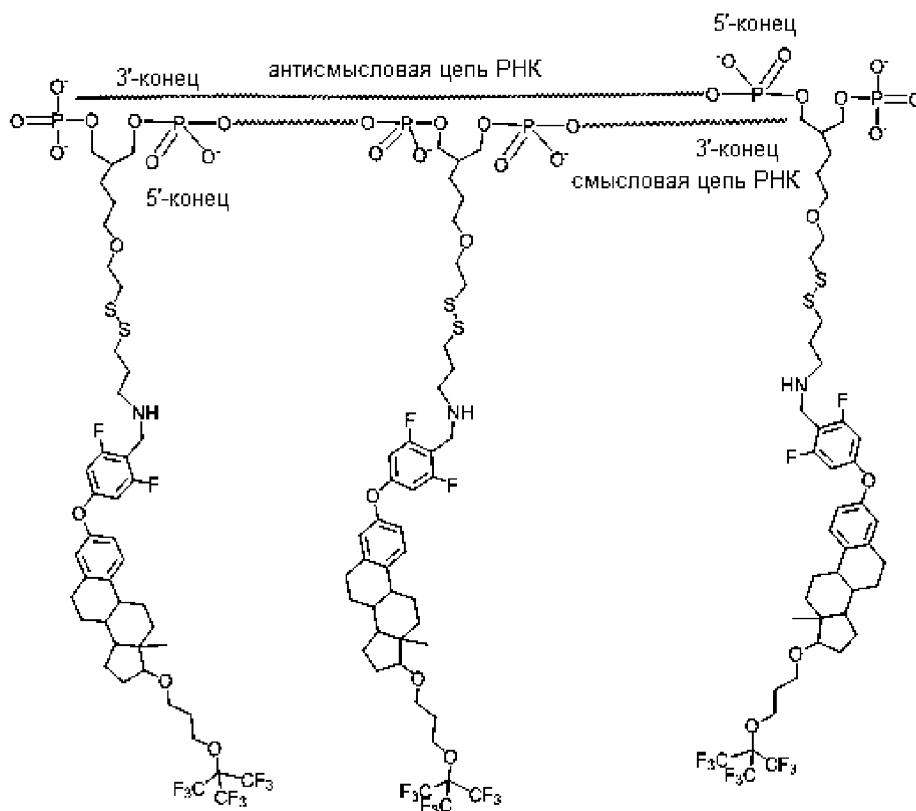
[0096] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-1)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XV-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XV-M)]**:



Формула [Cn-1-(XV-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(XV-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

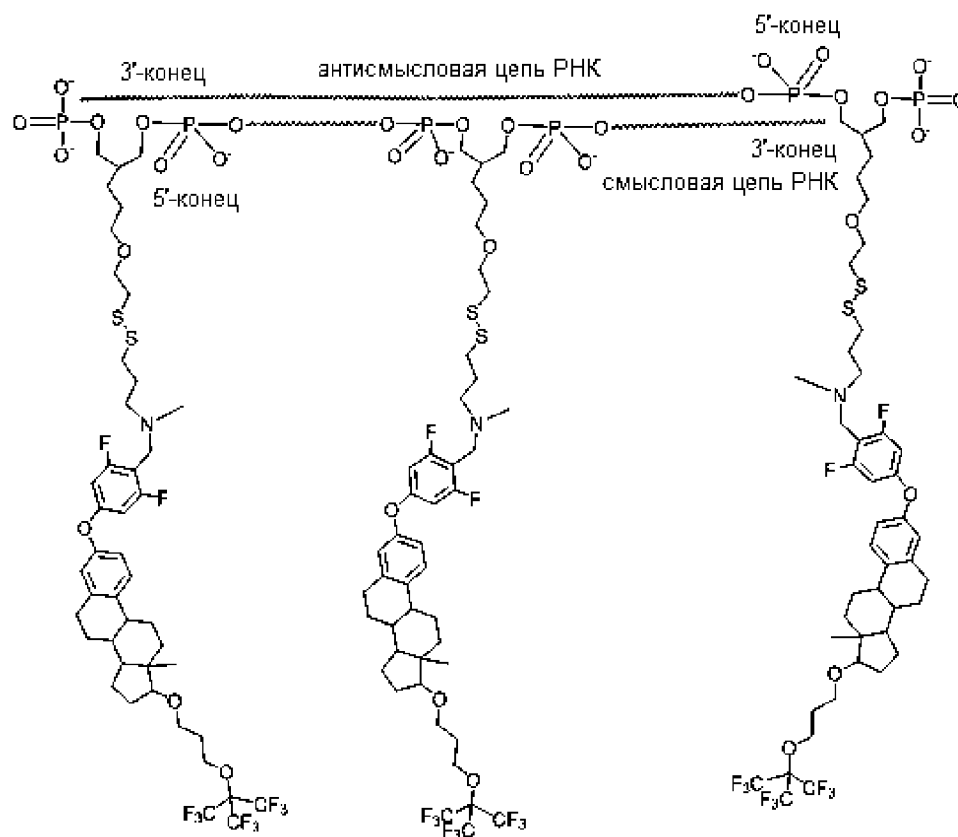
[0097] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-2)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XV-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(XV-H)]**:



Формула [Cn-2-(XV-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(XV-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

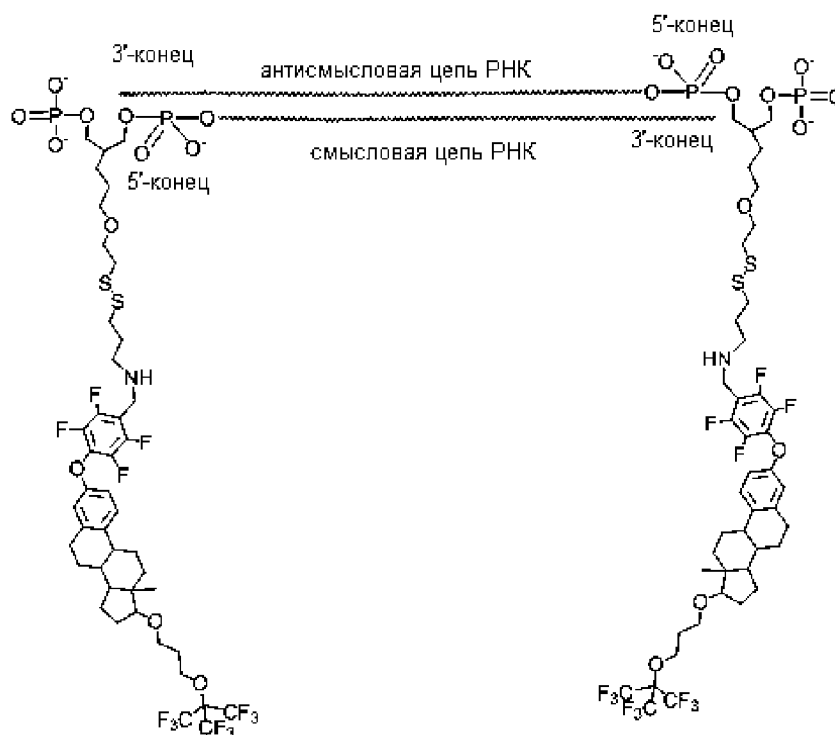
[0098] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-2)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XV-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(XV-M)]**:



Формула [Cn-2-(XV-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(XIV-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

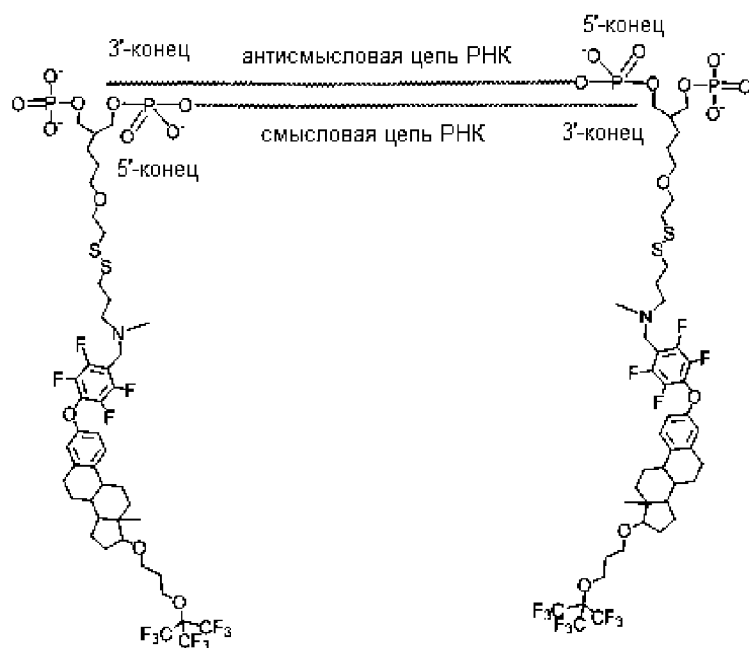
[0099] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-1)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XVI-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XVI-H)]**:



Формула [Cn-1-(XVI-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(XVI-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

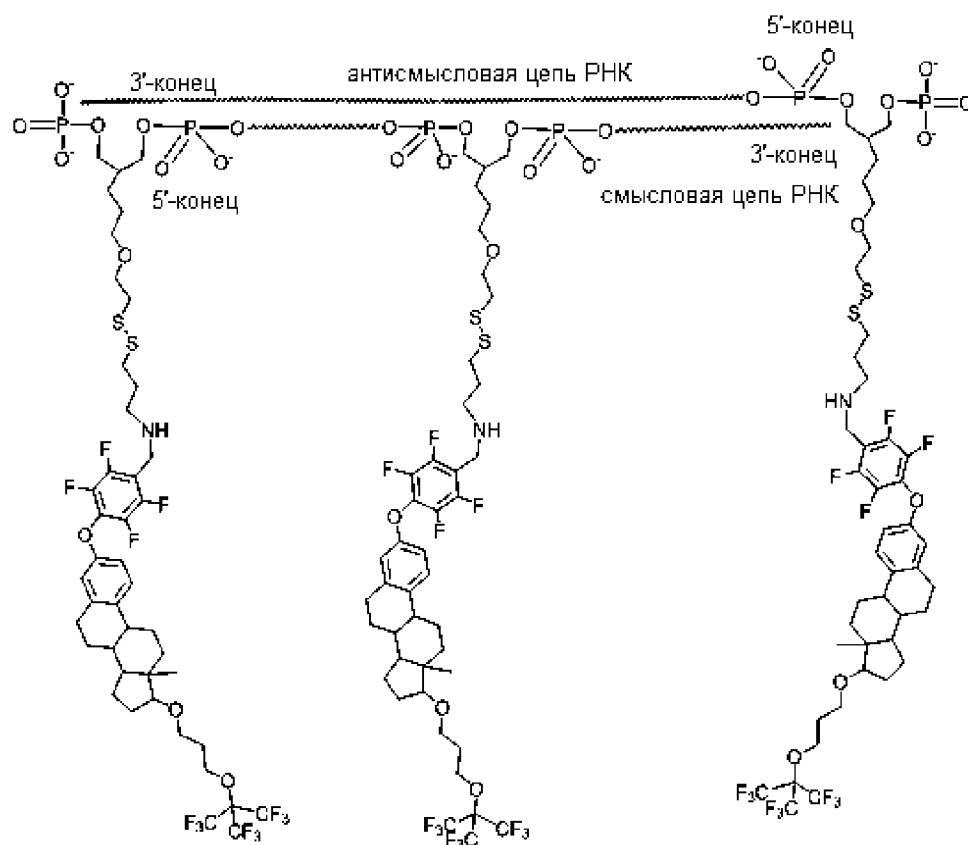
[00100] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-1)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XVI-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XVI-M)]**:



Формула [Cn-1-(XVI-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(XVI-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

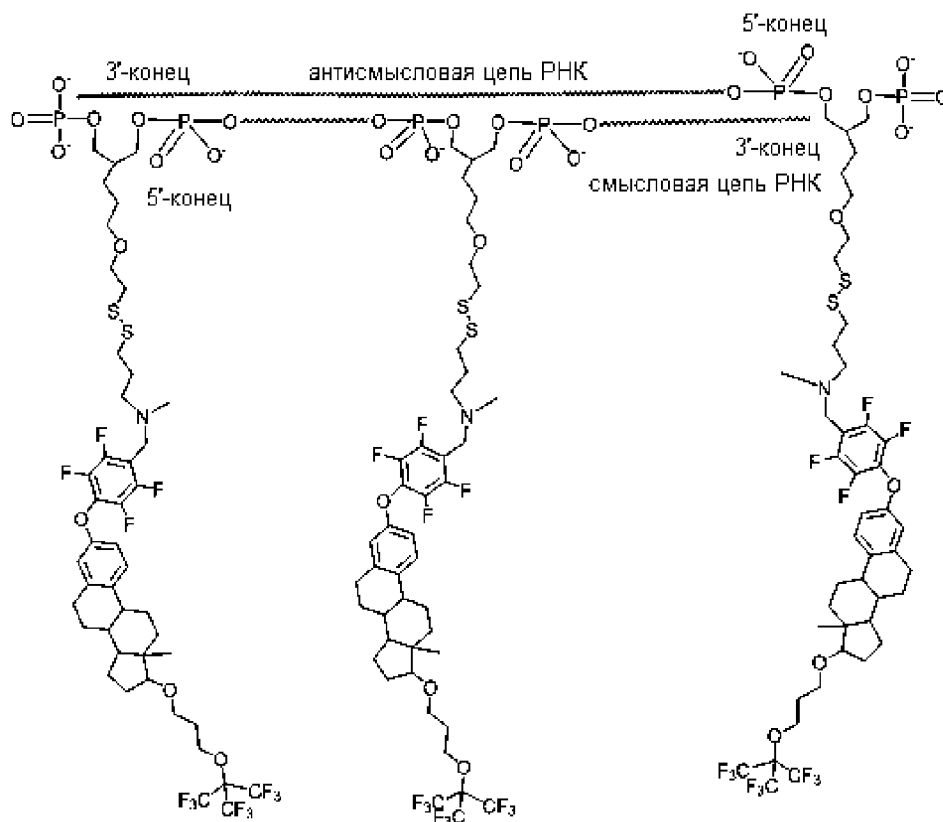
[00101] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-2)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XVI-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(XVI-H)]**:



Формула [Cn-2-(XVI-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(XVI-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[00102] В другом варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат в соответствии с **Формулой (Cn-2)**, где каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XVI-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(XVI-M)]**:



Формула [Cn-2-(XVI-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(XVI-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

[00103] **«Лекарственное соединение»** или **«Лекарственное карго-соединение»** (т.е. фрагмент **D**) в контексте данного изобретения относится к молекуле, которая предназначена для доставки с помощью конъюгатов по данному изобретению через фосфолипидные мембраны в клетки, где **D** представляет собой либо низкомолекулярное лекарственное соединение, либо макромолекулярное лекарственное соединение, такое как пептидное, белковое или олигонуклеотидное лекарственное соединение (**OD**).

[00104] Термин **«лекарственное соединение»** или **«лекарственное средство»** в контексте данного изобретения относится к химическому веществу, которое при введении пациенту, страдающему от заболевания, может оказывать благотворный эффект на пациента. Благотворный эффект может варьироваться от облегчения симптомов до противодействия эффекту какого-либо агента или вещества (например, белков), которое играет роль в процессе заболевания. Лекарственное соединение может содержать молекулу малого размера или может представлять собой макромолекулу, такую как белок,

или одно- или двухцепочечная РНК или ДНК, которые вводят для подавления экспрессии гена. Среди прочего, лекарственное соединение может содержать миРНК, дмиРНК или ASO. В некоторых вариантах реализации лекарственное соединение предназначено для лечения дегенеративных расстройств, рака, ишемических, инфекционных, токсических или травматических инсультов, врожденного или приобретенного метаболического заболевания или иммунных расстройств.

[00105] Термин **«олигонуклеотидное лекарственное соединение»**, также упоминаемый далее как **«OD»**, относится в контексте данного изобретения к лекарственному соединению, которое содержит нуклеозиды или нуклеотиды. Примерами олигонуклеотидных лекарственных соединений (OD) являются одноцепочечные или двухцепочечные природные или модифицированные РНК или ДНК. OD может представлять собой последовательности миРНК (малой интерферирующей РНК), субстрата для фермента Дайсер (дмиРНК), микроРНК (микро РНК), информационной РНК (иРНК) или ДНК, которые предназначены для выполнения функции антисмысловых олигонуклеотидов (ASO). Связь между нуклеотидными строительными блоками OD может быть осуществлена, среди прочего, посредством фосфат-триэфирных мостиков, посредством тиофосфатных связей или любым другим способом, известным в данной области техники. Нуклеотиды, которые служат в качестве строительных блоков OD, могут быть природными или модифицированными нуклеотидами, такими как запертые нуклеиновые кислоты (ЗНК).

[00106] Более конкретные OD, которые являются вариантами реализации данного изобретения, представляют собой: **«миРНК»**, которая представляет собой дуплекс РНК, в котором каждая цепь РНК имеет 19-21 нуклеотидов в длину, направленный на сайленсинг экспрессии гена через цитоплазматический белковый комплекс (РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс);

[00107] **субстрат миРНК для Дайсер, («дмиРНК»)**, который представляет собой дуплекс РНК, в котором каждая цепь РНК имеет 24-30 нуклеотидов в длину. В одном варианте реализации дуплекс дмиРНК состоит из одной цепи из 25 нуклеотидов, а вторая цепь состоит из 27 нуклеотидов. В другом варианте реализации дуплекс дмиРНК состоит из одной цепи из 24 нуклеотидов, а вторая цепь состоит из 27 нуклеотидов. В другом варианте реализации дуплекс дмиРНК содержит цепи РНК равной длины, каждая из которых состоит из 27 нуклеотидов.

[00108] **«Антисмысловой олигонуклеотид» (ASO)** представляет собой синтетический одноцепочечный, природный или модифицированный олигонуклеотид ДНК

или РНК, обычно имеющий 15-20 нуклеотидов в длину. Последовательность ASO является антисмысловой, т.е. она комплементарна смысловой последовательности конкретной иРНК, которая кодирует белок, синтез которого необходимо ингибировать. Связывание ASO с указанной комплементарной последовательностью блокирует способность рибосом двигаться вдоль иРНК, тем самым препятствуя синтезу белка, или, альтернативно, увеличивает скорость распада иРНК.

[00109] **«Нуклеозид»** в контексте данного изобретения определяют как химический фрагмент, который содержит азотистое основание (нуклеобазу) и сахар из пяти или шести атомов углерода (например, рибозу или дезоксирибозу). Нуклеобазы выбраны из природных или модифицированных пуринов (например, аденина, гуанина) и природных или модифицированных пиримидинов (например, тимина, цитозина, урацила). Нуклеобазу может быть модифицировано различными модификациями, известными в данной области техники (например, метилирование, ацетилирование). Кроме того, сахарный фрагмент нуклеозида также может быть модифицирован, как известно в данной области техники [например, 2'-дезоксипроизводное, метилирование в 2'-положении рибозы, внедрение 2'-атома фтора или 2'-О-метоксиэтила, или наличие мостика, связывающего 2'-атом кислорода и 4'-атом углерода с образованием запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК)]. Таким образом, использование таких модифицированных нуклеозидов, конъюгированных с фрагментами Е по данному изобретению, также входит в объем данного изобретения. В одном варианте реализации нуклеозид содержит производное пиримидина, выбранное из природного или модифицированного цитозина, тимина и урацила, и сахарный фрагмент представляет собой либо рибозу, либо дезоксирибозу.

[00110] **«Нуклеотид»** в контексте данного изобретения представляет собой нуклеозид, описание которого приведено выше, связанный с фосфатной группой. Нуклеотиды являются строительными блоками для олигонуклеотидов.

[00111] **«Молекула-предшественник»** в контексте данного изобретения определена как фрагмент Е, Е' или Е'', имеющий структуру, представленную любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, который присоединен к защитной группе для спирта или амина, как описано ниже.

[00112] **«Защитная группа»** в контексте данного изобретения определена как химическая группа, которая предназначена для удаления или модификации в процессе синтеза конъюгата по данному изобретению. Такое удаление или модификацию можно

осуществлять на разных стадиях синтеза; например, без ограничения, во время присоединения фрагментов **E**, **E'** или **E''** к **D**, в случае если **D** представляет собой макромолекулярное лекарственное соединение, такое как олигонуклеотидное лекарственное соединение (**OD**). В предпочтительном варианте реализации данного изобретения защитная группа представляет собой ***защитную группу для спирта***, как описано ниже.

[00113] ***«Защитная группа для спирта»*** в контексте данного изобретения относится к химической группе, присоединенной к гидроксильной группе для «маскирования» ее во время некоторых химических реакций, и которая позже может быть потенциально удалена, как известно в данной области техники. Примерами таких защитных групп являются ацетил (**Ac**), бензоил (**Bz**), бензил (**Bn**), β -метоксиэтоксиметилловый эфир (**MEM**), диметокситритил [бис-(4-метоксифенил)фенилметил] (**DMT**), метоксиметилловый эфир (**MOM**), метокситритил [(4-метоксифенил)дифенилметил] (**MMT**), *п*-метоксибензиловый эфир (**PMB**), пивалоил (**Piv**), тетрагидропиранил (**THP**), тетрагидрофуран (**ТГФ**), тритил (трифенилметил, **Tr**), силиловый простой эфир [например, триметилсилиловый (**TMS**), *трет*-бутилдиметилсилиловый (**TBDMS**), три-*изо*-пропилсилилоксиметилловый (**ТОМ**) и триизопропилсилиловый (**TIPS**) простые эфиры], этоксиэтиловые простые эфиры (**EE**), фосфорамидит, *N*-гидроксисукцинимид (**NHS**). Часто используемые защитные группы для спирта для конъюгации фрагментов с макромолекулярными лекарственными соединениями, такими как **OD**, представляют собой диметокситритил [бис-(4-метоксифенил)фенилметил] (**DMT**) и фосфорамидит.

[00114] Термин ***«защитная группа для амина» [фрагмент X в соответствии с Формулой (II)]*** в контексте данного изобретения относится к химической группе, присоединенной к аминогруппе для ее «маскирования» во время некоторых химических реакций, и которая позже может быть потенциально удалена, как известно в данной области техники. Примерами защитных групп для амина в контексте данного изобретения, которые приведены неограничивающим образом, являются: карбобензилокси-группа (**Cbz**), *п*-метоксибензилкарбонильная группа (**Moz** или **MeOZ**); *трет*-бутоксикарбонильная группа (**BOC**); 9-флуоренилметилоксикарбонильная группа (**Fmoc**), феноксиацетильная группа (**PAC**); 4-*трет*-бутилфеноксиацетильная группа (**t-PAC**); ацетильная группа (**Ac**); бензоильная группа (**Bz**), бензильная группа (**Bn**); карбаматная группа; *п*-метоксибензил (**PMB**); 3,4-диметоксибензил (**DMPM**); *п*-метоксифенильная группа (**PMP**); тозильная группа (**Ts**); группа **Тгос** (трихлорэтилхлорформиат), 2-(триметилсилил)этилкарбамат (**ТЕОС**).

[00115] Термин **«точка связи с твердой подложкой»** в контексте данного изобретения означает точку присоединения фрагмента E, E' или E'' к твердой подложке во время химического синтеза. Например, в качестве твердой подложки можно использовать стекло с заданным размером пор для присоединения 3'-конца олигонуклеотида во время синтеза олигонуклеотидных цепей по данному изобретению.

[00116] Термин **«биологическая мембрана»** в контексте данного изобретения относится к любой фосфолипидной мембране, которая связана с биологической системой. Примерами таких фосфолипидных мембран являются цитоплазматические мембраны клеток, внутриклеточные мембраны или фосфолипидные мембраны, связанные с биологическими барьерами, такими как гематоэнцефалический барьер (BBB), гематоофтальмический барьер (BOB) или гематоплацентарный барьер.

[00117] Термин **«флип-флоп-переход»** в контексте данного изобретения относится к движению амфипатического соединения (а именно, молекулы, которая содержит и гидрофобные, и гидрофильные элементы) из одного слоя двойного слоя фосфолипидной мембраны в другой слой.

[00118] Термин «эндоцитоз» в контексте данного изобретения относится к процессу, посредством которого живая клетка захватывает молекулы, связанные с ее поверхностью; указанный процесс включает сворачивание цитоплазматической мембраны внутрь, что обеспечивает перенос указанных молекул в клетку.

[00119] Варианты реализации данного изобретения дополнительно относятся к применению конъюгатов по данному изобретению, содержащих терапевтически эффективные лекарственные соединения, такие как белки или OD (например, миРНК, дмиРНК или ASO), для лечения заболеваний у субъекта, нуждающегося в этом. Заболевания могут представлять собой, без ограничения, дегенеративные расстройства, рак, сосудистые расстройства, метаболические расстройства, травматические, токсические или ишемические инсульты, инфекции (например, вирусные или бактериальные) или иммунные расстройства, в этиологии или патогенезе которых играет роль определенный белок (белки). Для таких заболеваний модулирование экспрессии гена(ов), который кодирует указанные белки, связанные с данным заболеванием, посредством миРНК или антисмысловых механизмов, или модулирование активности соответствующего белка, связанного с данным заболеванием, под действием терапевтического белка, такого как антитело, или белка, который участвует в передаче сигналов, или посредством заместительной белковой терапии может оказывать преимущественный эффект для

подавления процессов, связанных с заболеванием, или для лечения главной причины заболевания.

[00120] Например, конъюгаты в соответствии с вариантами реализации данного изобретения можно использовать в качестве антисмысловой, миРНК или дмиРНК терапии, которая является формой медицинского лечения, которая включает введение одноцепочечных или двухцепочечных последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК, РНК или их химических аналогов), которые связываются либо с последовательностью ДНК, которая кодирует определенный белок, либо с информационной РНК (иРНК), которая транслируется в белок. Такое лечение может обеспечивать подавление экспрессии генов, связанных с данным заболеванием, препятствуя образованию белков, связанных с данным заболеванием, которые могут играть роль в этиологии или патогенезе заболевания. Альтернативно, конъюгаты по данному изобретению могут содержать терапевтические белки или комплексы белок/нуклеиновая кислота, такие как комплекс Cas9-РНК, способные осуществлять редактирование генов.

[00121] В вариантах реализации данного изобретения также предложены фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель(и) или соль(и). В соответствии с некоторыми вариантами реализации, конъюгаты и фармацевтические композиции по данному изобретению можно использовать *in vitro* (например, в клеточной культуре), *ex vivo* или *in vivo*, у живого субъекта, включая клинические условия.

[00122] Другие варианты реализации данного изобретения включают конъюгаты по данному изобретению или фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты по данному изобретению, для применения для лечения заболеваний у пациента, нуждающегося в этом. Дополнительные варианты реализации данного изобретения включают применение конъюгатов по данному изобретению для получения фармацевтических композиций для лечения заболеваний у пациента, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах реализации заболевание представляет собой рак, метаболическое заболевание, инфекционное заболевание, дегенеративное заболевание, сосудистое заболевание, травму или иммунное заболевание. Указанные фармацевтические композиции могут содержать фармацевтически приемлемые ингредиенты, известные в данной области техники, которые включены для обеспечения преимущественных свойств указанной композиции, таких как, в различных аспектах, медленное высвобождение, увеличение времени удерживания, диспергирование или безопасность.

[00123] Конъюгат в соответствии с вариантами реализации данного изобретения может быть преимущественным для увеличения эффективности доставки миРНК, дмиРНК, ASO или терапевтического белка, такого как антитело, через клеточные мембраны или через дополнительные биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер (BBB), по сравнению с эффективностью доставки тех же терапевтических агентов, которые не содержат фрагменты E, E' или E'' по данному изобретению. Таким образом, конъюгаты по данному изобретению могут улучшать характеристики макромолекулярного лекарственного соединения в одном или более аспектах, помимо эффективности, например, в отношении безопасности или фармакокинетики. Конъюгаты по данному изобретению можно вводить любым способом введения, известным в данной области техники, включая, среди прочего, *per os*, внутривенно, внутримышечно, подкожно, интратрахеально, интрабронхиально, интраперитонеально или интратекально.

[00124] Конъюгаты по данному изобретению, в которых D представляет собой OD, могут быть синтезированы, неограничивающим образом, в соответствии со следующим способом: сначала выбирают ген, подлежащий сайленсингу, основываясь на его роли в этиологии или патогенезе заболевания. Затем на основании биоинформационных методик, известных в данной области техники, разрабатывают и определяют нуклеотидные последовательности, подлежащие внедрению в конъюгат [обычно двухцепочечная миРНК длиной 19-21 пара оснований для субстрата RISC; или двухцепочечная РНК длиной 24-29 пар оснований для субстрата Дайсер (дмиРНК)]. Синтез осуществляют в направлении от 3' к 5' олигонуклеотида. Используют твердофазный синтез с применением защищенных строительных блоков, таких как защищенные 2'-дезоксинуклеозиды (dA, dC, dG и dT), рибонуклеозиды (A, C, G и U) или химически модифицированные нуклеозиды [например, ЗНК (запертые нуклеиновые кислоты) или БНК (мостиковые нуклеиновые кислоты)]. Строительные блоки представляют в виде нуклеотидных предшественников, в которых 5'- и 3'-гидроксильные группы защищены с помощью DMT и фосфорамидита, соответственно. Затем указанные группы удаляют в процессе реакций связывания нуклеотида с растущей олигонуклеотидной цепью во время синтеза в порядке, определенном требуемой нуклеотидной последовательностью.

[00125] Для синтеза конъюгатов по данному изобретению группы E представляют в виде **молекул-предшественников**, каждая из которых представляет собой фрагмент E, E' или E'' по данному изобретению, связанный с защитной группой(ами), как описано выше. Несмотря на то, что защитная группа может быть любой защитной группой для гидроксила, известной в данной области техники, в синтезе олигонуклеотидов традиционно часто используют фосфорамидит и DMT [диметокситритил, бис(4-метоксифенил)фенилметил]. Основное преимущество конъюгатов по данному изобретению заключается в том, что они

могут обеспечивать, как показано выше на примере конъюгатов (Cn-1) и (Cn-2), возможность связывания фрагментов E, E' или E'' с 5'-концом олигонуклеотидной цепи, 3'-концом олигонуклеотидной цепи или также с внутренним положением(ями) вдоль олигонуклеотидной цепи. Таким образом, фрагменты E по данному изобретению могут становиться встроенными в олигонуклеотидную цепь, подобно любому естественному, природному олигонуклеотидному строительному блоку. Связь между нуклеозидами может быть осуществлена через стандартные фосфотриэфирные связи или через синтетические тиофосфатные связи, которые могут обеспечивать такие преимущества, как стабильность в крови или эффективное связывание с белками крови, или посредством любой другой стратегии связывания нуклеотидов, известной в данной области техники. По окончании сборки цепи продукт отделяют от твердой подложки в раствор, снимают защиту и собирают. Затем требуемый конъюгат выделяют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с получением требуемого конъюгата по данному изобретению с высокой степенью чистоты. В случае миРНК или дмиРНК каждую комплементарную цепь РНК синтезируют по отдельности, а затем выполняют гибридизацию двух цепей, как известно в данной области техники, с получением требуемой двухцепочечной миРНК или дмиРНК, которую затем подвергают очистке и разделению на аликвоты.

[00126] В одном варианте реализации данного изобретения предложен способ доставки лекарственного соединения через фосфолипидные биологические мембраны, выбранные из группы, состоящей из клеточных мембран и биологических барьеров, причем указанные биологические барьеры выбраны из гематоэнцефалического барьера, гематоокулярного барьера или гематофетального барьера; указанный способ включает приведение в контакт клеток или соответствующих биологических барьеров с конъюгатом по данному изобретению.

[00127] В одном варианте реализации данного изобретения предложен способ доставки лекарственного соединения в биологические клетки, причем указанные клетки находятся в культуре или в организме живого животного, или в организме человека; предложенный способ включает приведение в контакт клеток с конъюгатом или с фармацевтической композицией, которая содержит конъюгат по данному изобретению. В случае введения *in vivo* контакт с клеткой может быть осуществлен посредством любого способа введения лекарственного соединения, известного в данной области техники, такого как *per-os*, внутривенное, подкожное или внутримышечное введение.

[00128] В одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат по данному изобретению или фармацевтическая композиция, которая содержит конъюгат в

соответствии с **Формулой (I)**, где каждый **E**, **E'** или **E''** независимо имеет структуру, указанную в любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**. Данное изобретение включает также способы специфического ингибирования генной экспрессии, *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте реализации данного изобретения предложенный способ может включать использование конъюгата в соответствии с любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3)** или фармацевтической композиции, которая содержит указанный конъюгат, где **D** представляет собой миРНК, дмиРНК или ASO, предназначенного для сайленсинга экспрессии определенного гена. В некоторых вариантах реализации указанный ген кодирует патогенный белок, который играет роль в этиологии или патогенезе заболевания. В некоторых вариантах реализации **D** представляет собой терапевтический белок.

[00129] В другом варианте реализации данного изобретения неограничивающим образом предложен способ инициации *эндоцитоза* и/или *флип-флоп-перехода* в биологической мембране; указанный способ включает приведение в контакт биологической мембраны с конъюгатом по данному изобретению или с фармацевтической композицией, которая содержит указанный конъюгат, причем указанный конъюгат содержит **OD** и фрагмент(ы) **E**, **E'** или **E''**, каждый из которых имеет структуру, указанную в любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, что обеспечивает *эндоцитоз* и/или *флип-флоп-переход* указанного конъюгата в биологической мембране.

[00130] В неограничивающей гипотезе сущность такой инициации *эндоцитоза* или *флип-флоп-перехода* связана со структурой конъюгата по данному изобретению. В том случае, если **OD** представляет собой миРНК или дмиРНК, связанную с фрагментами **E**, указанный конъюгат приближается к внешнему слою мембраны, при этом его цилиндрический дуплекс РНК располагается параллельно поверхности мембраны, а его фрагменты **E** ориентированы в сторону центральной части мембраны, перпендикулярно поверхности мембраны. Такая ориентация заякоривает дуплекс РНК на внешнем слое мембраны. Вынужденная близость РНК с высоким отрицательным зарядом к внешнему слою мембраны обуславливает энергетически невыгодную локальную деформацию с растягиванием площади поверхности внешнего фосфолипидного слоя, нарушением гидратных оболочек вокруг фосфолипидных концевых групп и локальным изгибом мембраны. Затем может происходить релаксация энергии изгиба посредством *эндоцитоза* и/или *флип-флоп-перехода*. Оба процесса способствуют инициации и/или продолжению

трансмембранной доставки конъюгата по данному изобретению в клетку, включая его макромолекулярное лекарственное карго-соединение. Соответственно, способ инициации *эндоцитоза* или *флип-флоп-перехода* в фосфолипидной мембране входит в объем данного изобретения; указанный способ включает приведение в контакт мембраны с конъюгатами по данному изобретению.

[00131] Конъюгаты в соответствии с вариантами реализации данного изобретения можно использовать для лечения заболеваний. Варианты реализации данного изобретения включают способы медицинского лечения, включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат в соответствии с любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3)**, где D представляет собой лекарственное соединение, пригодное для лечения соответствующего заболевания.

[00132] В одном варианте реализации предложенный способ предназначен для генетического медицинского лечения с применением миРНК, дмиРНК или ASO в качестве терапевтических агентов. Указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по данному изобретению, в соответствии с любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3)**, где D представляет собой миРНК, дмиРНК, иРНК, микроРНК, ASO или терапевтический белок, пригодный для ингибирования экспрессии гена или для блокирования активности соответствующего белка, который играет роль в этиологии или патогенезе заболевания у конкретного пациента.

[00133] Такое лечение может включать доставку лекарственного соединения в клетки, которые находятся в культуре *in vitro*, *ex vivo* (т.е. клетки, изъятые из живой ткани, которые необязательно будут возвращены пациенту после терапевтической обработки), или в клетки, которые находятся в живом организме животного или человека *in vivo*. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой неопластическую клетку. В некоторых вариантах реализации неопластическая клетка представляет собой опухолевую клетку. В некоторых вариантах реализации неопластическая клетка представляет собой клетку в метастазе. Клетка может представлять собой эукариотическую клетку, эукариотическую клетку, трансфицированную онкогенным агентом, клетку человека, клеточную линию, клетку, которая является предраковой клеткой, или любую их комбинацию.

[00134] В другом варианте реализации данного изобретения **D** представляет собой белок, введенный в качестве заместительной терапии, т.е. для замещения мутированного, неисправного белка для удовлетворения физиологической потребности. В другом варианте реализации **D** представляет собой белок, который играет роль в регуляции гена, включая, среди прочего, белки, которые играют роль в редактировании ДНК или РНК (присоединение, разрыв или изменение последовательности определенных генов). В одном варианте реализации указанный белок может быть членом CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)-связанных белков. В частности, указанный белок может представлять собой белок Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9), РНК-управляемый фермент ДНК-нуклеазы или его аналог, потенциально несущий свою гидовую олигонуклеотидную последовательность.

[00135] В одном из вариантов реализации данного изобретения описан способ генетического лечения заболевания, и указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, содержащей конъюгат в соответствии с любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3)**, где **D** представляет собой белок CRISPR, такой как **Cas9**, который вводят вместе с соответствующим гидовым олигонуклеотидом, обеспечивая доставку указанного белка, несущего соответствующий гидовый олигонуклеотид, в клетки, в которых белок CRISPR может проявлять свою активность в отношении редактирования генома. Гидовый олигонуклеотид в данном контексте представляет собой последовательность РНК или ДНК, которая направляет белок **Cas9** в определенный локус (положение) на геномной ДНК для инициации расщепления двухцепочечной ДНК в указанном месте, что обеспечивает возможность восстановления локального дефекта генома. В случае **Cas9** гидовый олигонуклеотид представляет собой короткий сегмент РНК, последовательность которого комплементарна последовательности целевого локуса ДНК.

[00136] Таким образом, конъюгаты в соответствии с вариантами реализации данного изобретения и соответствующие фармацевтические композиции, а также соответствующие способы, могут быть эффективны, среди прочего, для лечения заболеваний, выбранных, среди прочего, из рака, токсических инсультов, метаболического заболевания, ишемического заболевания, инфекционного заболевания, сосудистых расстройств, болезни накопления белков, травмы, иммунного заболевания, дегенеративных заболеваний, врожденных или приобретенных заболеваний.

[00137] Таким образом, в одном варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения заболевания, включающий введение пациенту, нуждающемуся в

этом, терапевтически эффективных количеств фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат в соответствии с любой из **Формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M), (Cn-1), (Cn-2), (Cn-3)**, где **D** представляет собой лекарственное соединение, пригодное для лечения данного заболевания.

[00138] В соответствии с некоторыми вариантами реализации, заболеванием является рак. В данном контексте термин «рак» относится к присутствию клеток, которые проявляют свойства, типичные для клеток, вызывающих рак, такие как неконтролируемая пролиферация, утрата специализированных функций, бессмертие, значительный метастатический потенциал, существенное увеличение антиапоптозной активности, быстрый рост и высокая скорость пролиферации или определенная характерная морфология и клеточные маркеры, которые, как известно, связаны с раком. Как правило, раковые клетки присутствуют в форме опухоли, существующей локально в организме животного или циркулирующей в кровотоке в виде отдельных клеток, таких как, например, лейкозные клетки.

[00139] В области неврологических расстройств конъюгаты по данному изобретению могут быть пригодны, среди прочего, для лечения нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь двигательных нейронов, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, рассеянный склероз и болезнь Крейтцфельда-Якоба.

[00140] В области инфекционных заболеваний конъюгаты в соответствии с вариантами реализации данного изобретения могут быть пригодны, среди прочего, для доставки антибиотиков для борьбы с бактериальными, грибковыми или другими паразитическими инфекциями; или для доставки противовирусных агентов для борьбы с вирусными инфекциями. Соответственно, **D** в конъюгатах по данному изобретению может иметь антиинфекционные свойства и быть пригодным для лечения инфекционных заболеваний, таких как бактериальные или вирусные инфекции. Примерами вирусных инфекций, для борьбы с которыми могут быть пригодны 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, вызванная ортомиксовирусами, такая как вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, или инфекции, вызванные вирусами парагриппа. Соответственно, одним вариантом реализации данного изобретения является конъюгат фрагмента (или фрагментов) **E**, **E'** или **E''**, связанного с противовирусным или антибактериальным лекарственным соединением. Такое лекарственное соединение может представлять собой, среди прочего, **OD**, последовательность которого предназначена для взаимодействия с

генетическим материалом инфекционного агента, препятствуя генетическим процессам, играющим роль в репликации, метаболизме, инфективности или выживании указанного патогена. Такие генетические последовательности могут представлять собой миРНК или дмиРНК, специально сконструированные для сайленсинга экспрессии гена(ов) инфекционного агента (например, вируса).

[00141] Пригодность конъюгатов по данному изобретению для борьбы с инфекциями может находить по меньшей мере одно из следующих применений: доставка терапевтически эффективных агентов через биологические мембраны в клетки хозяина (например, пациента); или через биологические мембраны в клетки патогенна (например, бактерии или вируса).

[00142] В области метаболических расстройств конъюгаты в соответствии с вариантами реализации данного изобретения могут быть пригодны, среди прочего, для доставки генетических средств лечения, направленных на подавление экспрессии гена или генов, ответственных за указанное метаболическое расстройство, или для введения белка для замены дефектного мутированного белка, который играет роль в этиологии или патогенезе заболевания.

[00143] В других вариантах реализации данное изобретение относится к потенциальному применению соединений по данному изобретению для усиления доставки химических соединений через фосфолипидные мембраны в клетки растений, что является потенциально преимущественным для применения в сельском хозяйстве. В зависимости от присоединенного химического соединения и предполагаемого показания, такая доставка может находить различные области применения в сельском хозяйстве. Например, такая доставка в растения может способствовать улучшению качества и количества зерна, среди прочего, посредством улучшения генетики растений или посредством устранения различных патогенов: насекомых, бактерий или грибов.

ПРИМЕРЫ

[00144] Следующие примеры иллюстрируют данное изобретение неограничивающим образом, для демонстрации того, как варианты реализации данного изобретения могут быть осуществлены на практике. В примерах описаны различные соединения и конъюгаты по данному изобретению. Все описанные конъюгаты соответствуют **Формулам (Cn-1)** или **(Cn-2)**, каждая из которых содержит фрагменты E, E' или E'', имеющие структуру общей **Формулы (II)**. В примерах представлены различные фрагменты E, E' или E'', выбранные из

структур, указанных в **Формулах (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H) или (XIV-M)**. Указанные конъюгаты проявляют биологическую активность в отношении сайленсинга генов. Указанное свойство подтверждает ту концепцию, что конъюгаты, которые содержат **Формулы (I) и (II)**, содержат общий и единый структурный мотив, который обеспечивает возможность эффективной доставки макромолекулярных **OD** через фосфолипидные мембраны в клетки, где они затем выполняют требуемую биологическую функцию (в данном случае сайленсинг гена). Кроме того, в примерах описаны способы химического синтеза мотивов **E** по данному изобретению, их предшественников и их сборки в эффективные конъюгаты.

Пример 1: Общий способ синтеза конъюгатов в соответствии с вариантами реализации данного изобретения, где фрагменты D представляют собой олигонуклеотиды:

[00145] Сначала выбирали ген, подлежащий сайленсингу, основываясь на его роли в этиологии или патогенезе заболевания. Затем на основании биоинформационных методик, известных в данной области техники, разрабатывали и определяли нуклеотидные последовательности, подлежащие внедрению в конъюгат [обычно двухцепочечная миРНК длиной 19-21 пара оснований для субстрата RISC, или двухцепочечная РНК длиной 24-29 пар оснований для субстрата Дайсер (дмиРНК)].

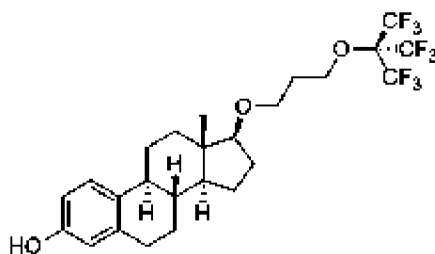
[00146] Синтез осуществляли в направлении от 3' к 5' олигонуклеотида. Использовали твердофазный синтез с применением защищенных строительных блоков, полученных из защищенных 2'-дезоксинуклеозидов (dA, dC, dG и dT), рибонуклеозидов (A, C, G и U) или химически модифицированных нуклеозидов [например, ЗНК (запертые нуклеиновые кислоты) или БНК (мостиковые нуклеиновые кислоты)]. Строительные блоки представляли в виде нуклеозидных предшественников, в которых 5'- и 3'-гидроксильные группы защищены с помощью DMT и фосфорамидита, соответственно. Затем указанные группы удаляли в процессе реакций связывания нуклеотида с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, определенном требуемой нуклеотидной последовательностью.

[00147] Для синтеза конъюгатов по данному изобретению группы **E** представляли в виде молекул-предшественников, каждая из которых представляет собой фрагмент **E**, **E'** или **E''** по данному изобретению, связанный с защитной группой, как описано выше. Несмотря на то, что защитная группа может быть любой защитной группой для гидроксила, известной в данной области техники, в синтезе олигонуклеотидов традиционно часто используют фосфорамидит и DMT [Диметокситритил, бис(4-метоксифенил)фенилметил]. Основное преимущество конъюгатов по данному изобретению заключается в том, что они могут обеспечивать, как показано на примере конъюгатов **(Cn-1)** и **(Cn-2)**, возможность связывания фрагментов **E**, **E'** или **E''** с 5'-концом олигонуклеотидной цепи, 3'-концом

олигонуклеотидной цепи или также с внутренним положением вдоль олигонуклеотидной цепи. Таким образом, фрагменты **Е** по данному изобретению могут становиться встроенными в олигонуклеотидную цепь, подобно любому естественному, природному олигонуклеотидному строительному блоку. Связь между нуклеотидами может быть осуществлена через стандартные фосфотриэфирные связи или через синтетические тиофосфатные связи, которые могут обеспечивать такие преимущества, как стабильность в крови или связывание с белками крови, или посредством любого другого способа связывания нуклеотидов, известного в данной области техники. По окончании сборки цепи продукт отделяли от твердой подложки в раствор, снимали защиту и собирали. Затем требуемый конъюгат выделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с получением требуемого конъюгата по данному изобретению с высокой степенью чистоты. В случае миРНК или дмиРНК каждую комплементарную цепь РНК синтезировали по отдельности, а затем выполняли гибридизацию двух цепей в стандартных условиях, как известно в данной области техники, с получением требуемой двухцепочечной миРНК или дмиРНК, которую затем подвергают очистке и разделению на аликваты.

Примеры 2: Способы химического синтеза молекул-предшественников, содержащих фрагмент Е, Е' или Е'' по данному изобретению:

Пример 2А: Синтез ключевого промежуточного фенола 1:



Фенол 1

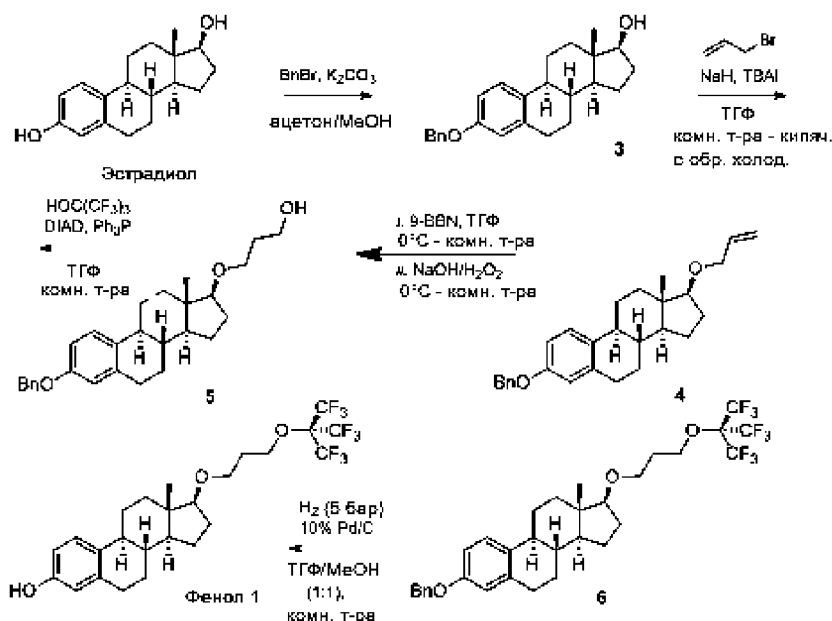


Схема 1. Синтез фенола 1.

[00148] Эстрадиол обрабатывали избытком гидрида натрия, затем добавляли аллибромид, что приводило к чистому превращению в соединение 3. В результате последующего гидроборирования с использованием 1,5 экв. 9-BBN получали только концевую гидроксигруппу, тогда как гидроборирование с использованием BH_3 является гораздо менее селективным и приводит к образованию смеси аддуктов. Спирт 5 подвергали действию условий реакции Мицунобу для его связывания с перфоринованным *трет*-бутанолом с образованием соединения 6. В результате гидрогенолиза бензильной группы соединения 6 получали фенол 1. Таким образом, фенол 1 получали из эстрадиола за 5 стадий синтеза с общим выходом 45%.

2bA1. (8R,9S,13S,14S,17S)-3-Бензилокси-17-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен (2):

[00149] Синтез (8R,9S,13S,14S,17S)-3-бензилокси-17-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триена (2) описан выше в разделе 2aA1.

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

[00150] Синтез (8R,9S,13S,14S,17S)-17-аллилокси-3-бензилоксиэстра-1,3,5(10)-триена (3) описан выше в разделе 2aA2.

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

[00151] 9-Борабицикло[3.3.1]нонан (800 мл), 0,5 М раствор в ТГФ, стабилизированный, 400 ммоль) по каплям добавляли к раствору неочищенного алкена 3 (101,2 г, 251 ммоль) в ТГФ (1 л) при 0 °C и после завершения добавления перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Раствор охлаждали до 0 °C, и медленно, по каплям одновременной добавляли 30% водный раствор NaOH (150 мл, 1,3 моль) и 35%

водный (120 мл, 1,3 моль), и энергично перемешивали полученную гетерогенную смесь при комнатной температуре в течение около 1 часа. Затем реакционную смесь разделяли между EtOAc (2 л) и насыщенным солевым раствором (500 мл). Органическую фазу промывали, используя еще 500 мл насыщенного солевого раствора, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали *in vacuo*. Указанный прием повторяли таким же образом и объединяли обе порции. В результате следующей очистки концентрата флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 25% до 35% EtOAc в гептанах) получали спирт **5** (130 г, 310 ммоль) в виде белого твердого вещества с выходом 61% (3 стадии).

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

[00152] Диизопропилазодикарбоксилат (80 мл, 407 ммоль) по каплям добавляли к перемешанной смеси спирта **7** (130 г, 301 ммоль), трифенилфосфина (162 г, 618 ммоль), перфтор-*трет*-бутанола (70 мл, 497 ммоль) в сухом ТГФ (2 л) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение около 18 часов. Реакционную смесь частично концентрировали и добавляли гептан (1 л). После полного удаления ТГФ начиналось образование осадка. Твердое вещество удаляли фильтрованием и концентрировали фильтрат. Добавляли ацетонитрил (1,5 л) и перемешивали смесь 30 минут, при этом начиналось образование осадка. Твердое вещество собирали фильтрованием и сушили *in vacuo*. Соединение **8** (160 г, 251 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с выходом 81%.

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

[00153] В аппарат Парра загружали бензиловый эфир **8** (160 г, 251 ммоль) в EtOAc (1 л), к которому добавляли 10% палладий на углероде (4 г). Смесь перемешивали в атмосфере водорода (5 бар) при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ¹H ЯМР. Примерно через 72 часа реакционную смесь фильтровали через слой целита (промытый EtOAc) и снова обрабатывали свежим 10% палладием на углероде (4 г) в атмосфере водорода (5 бар). Примерно через 16 часов реакционную смесь фильтровали через слой целита (промытый EtOAc) и концентрировали с получением **фенола 1** (125 г, 228 ммоль) в виде сероватого твердого вещества с выходом 91%.

Пример 2b: Синтез ключевого строительного блока К-93-А-1:

[00154] Синтез осуществляли в соответствии со следующей схемой синтеза:

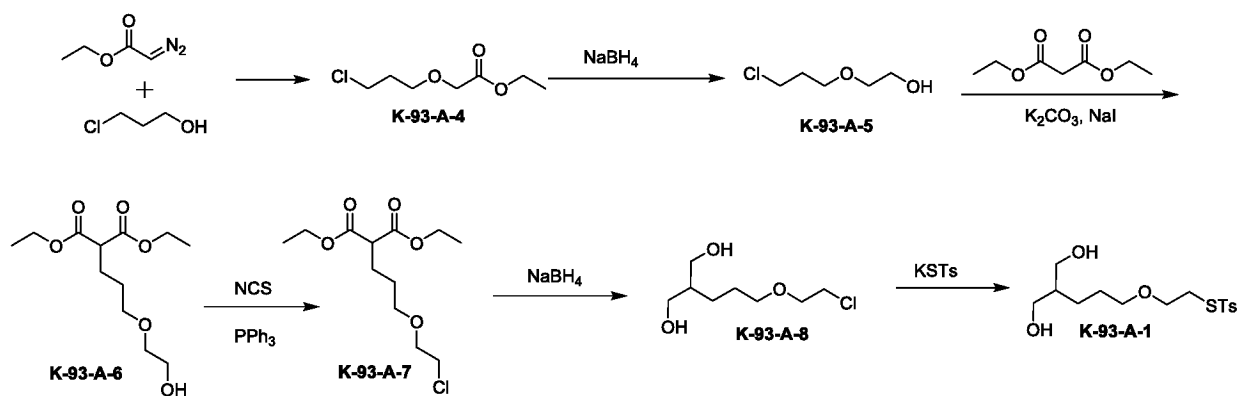
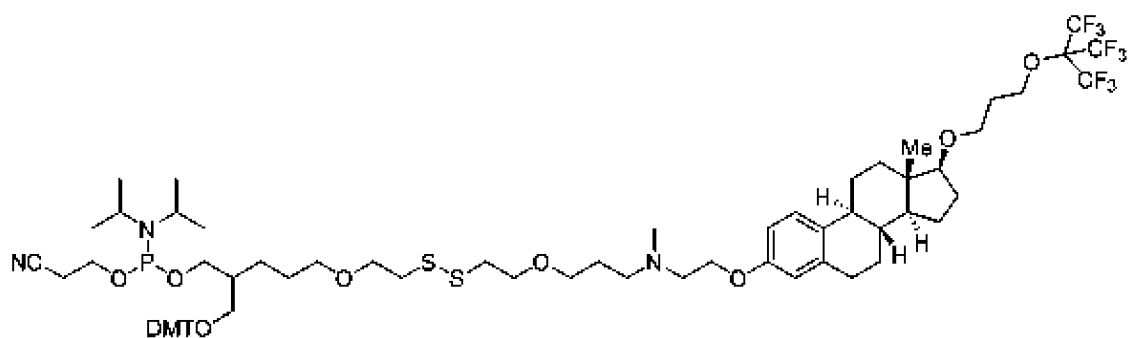
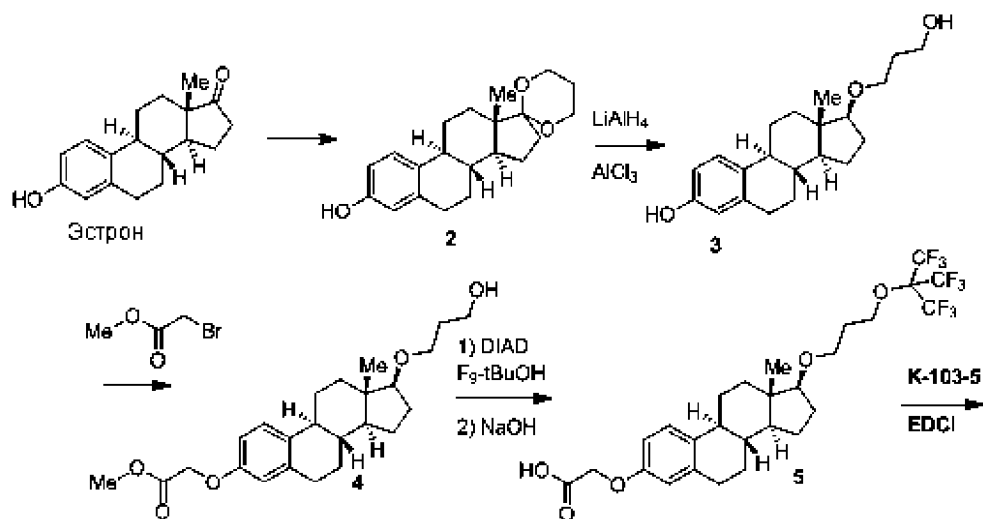


Схема 2. Синтез *строительного блока* K-93-A-1

Пример 2с: Синтез Формулы (III)-предшественника:



Формула (III)-предшественник



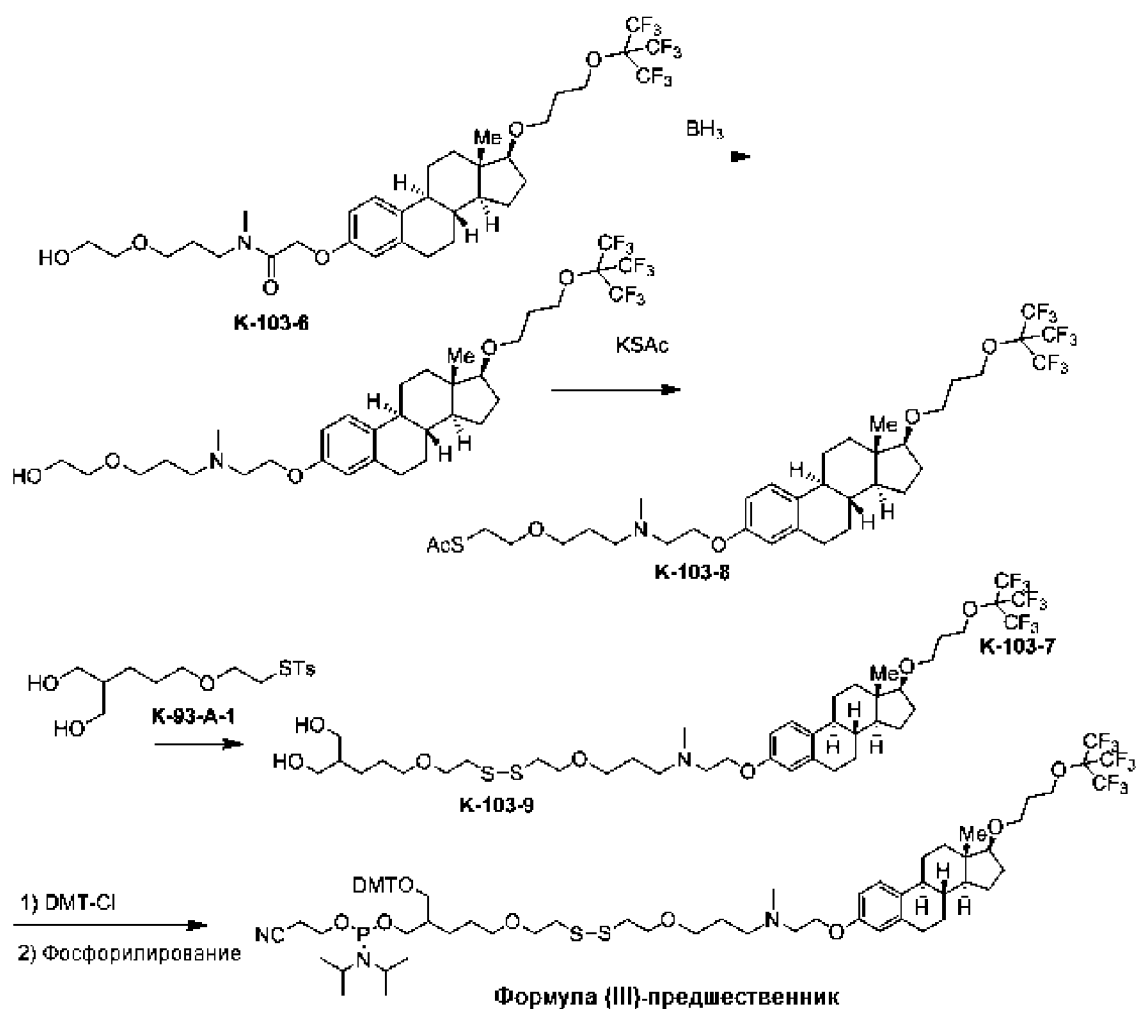
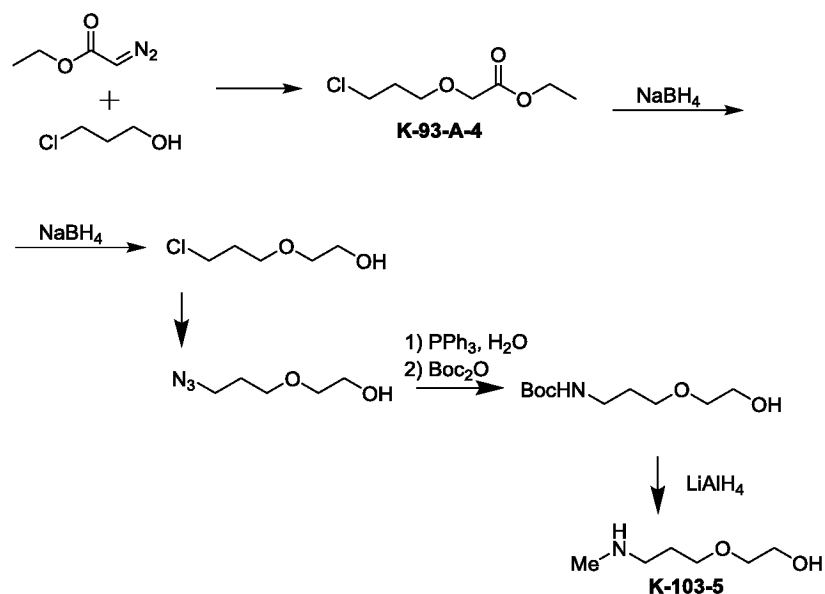


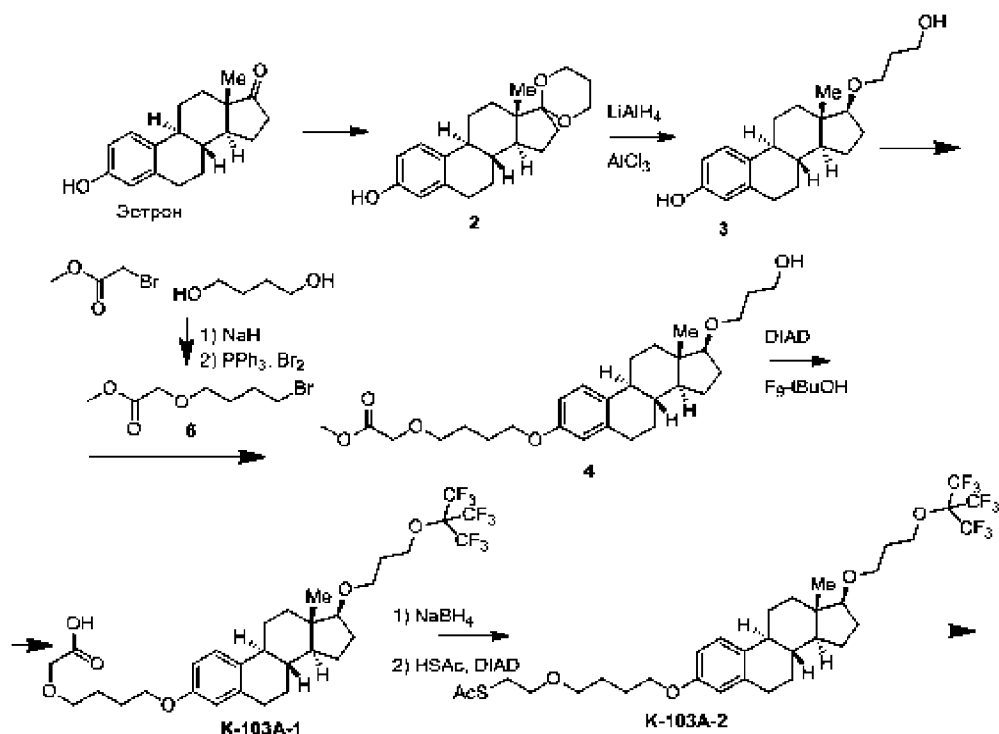
Схема 3. Синтез **Формулы (III)-предшественника**

[00155] При том, что промежуточное соединение **K-93-A-1** синтезировали так, как описано выше, синтез промежуточного соединения **K-103-5** осуществляли в соответствии со следующей схемой синтеза:



[illegible]

[00156] Синтез **Формулы (IV)-предшественника** осуществляли посредством конъюгации соединения **К-103А-2**, которое является производным **фенола 1**, с **ключевым строительным блоком К-93-А-1**. Синтез осуществляли в соответствии со следующей схемой синтеза:



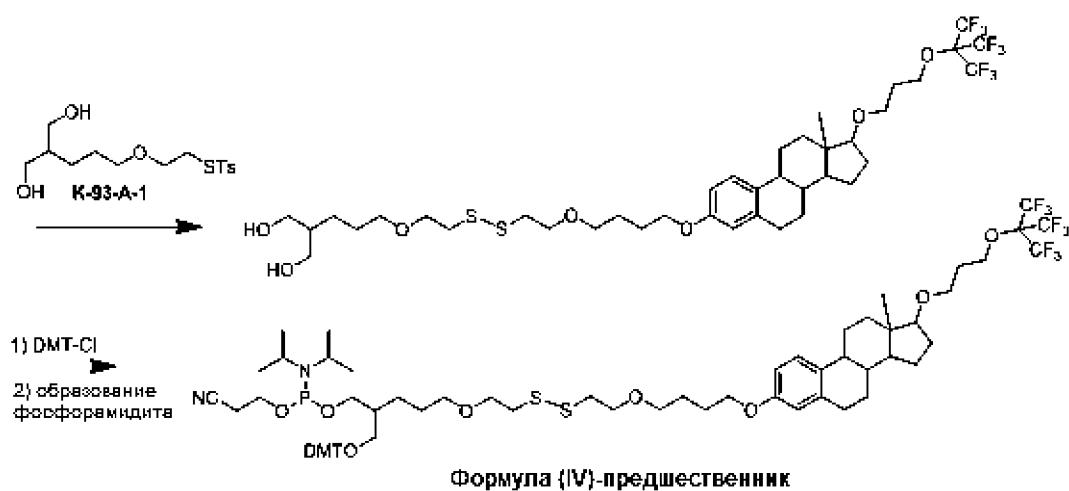
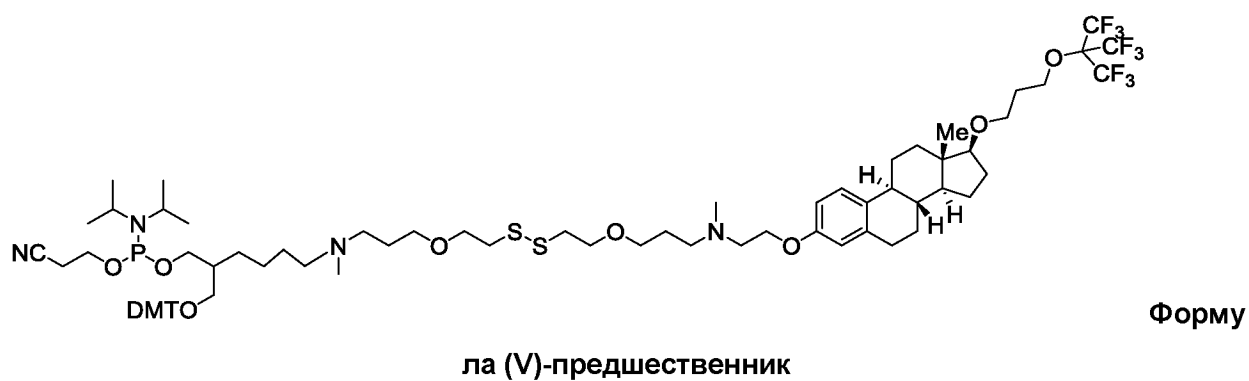
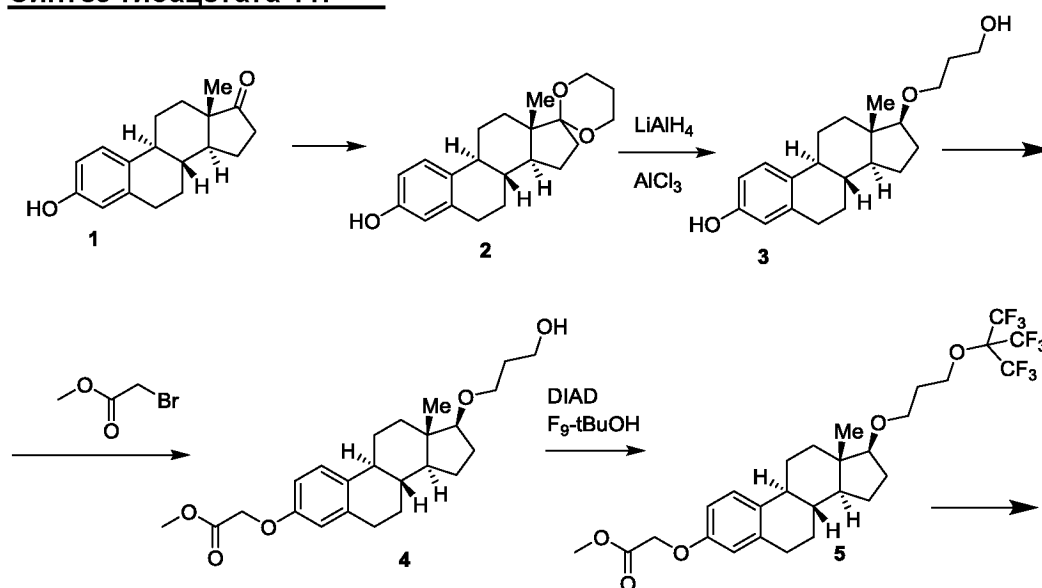


Схема 5. Синтез Формулы (IV)-предшественника

Пример 2е: Способ синтеза Формулы (V)-предшественника:



Синтез тиацетата 11:



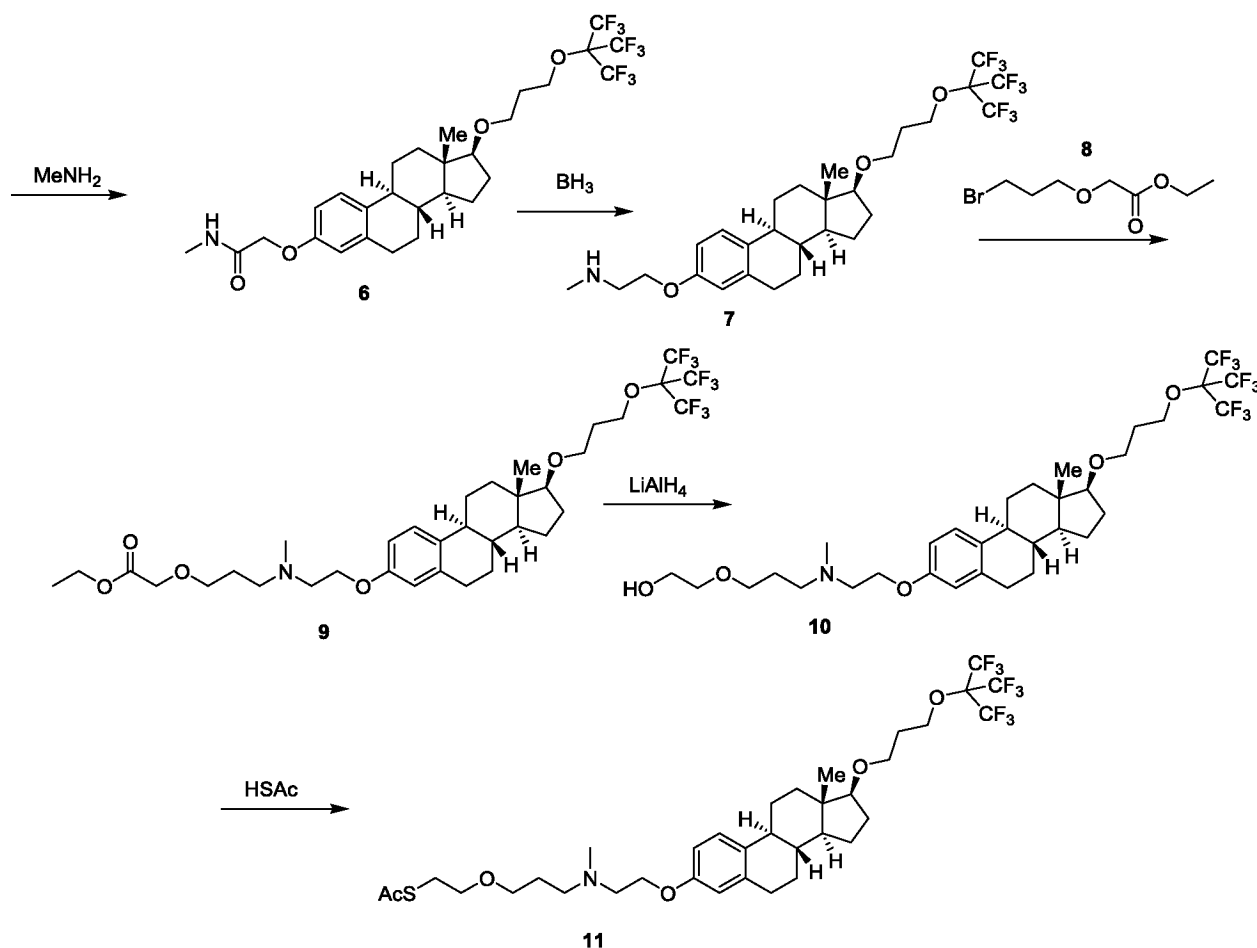


Схема 6. Синтез тиацетата 11

[00157] Синтез начинали с защиты кетона 1,3-пропандиолом с получением соединения 2 с хорошей степенью чистоты. В результате раскрытия кольца ацетала под действием LiAlH₄ и AlCl₃ получали смесь соединения 3 и эстрадиола в соотношении около 85:15, последний является менее реакционноспособным, и его удаляли на следующих стадиях.

[00158] Фенол алкилировали метилбромацетатом и получали соединение 4. Фрагмент перфтор-*трет*-бутанола внедряли в условиях реакции Мицунобу (соединение 5). Соединение 5 обрабатывали метиламином с получением амида 6. В результате восстановления амида с помощью BH₃.DMS получали амин 7. Полученный амин алкилировали бромидом 8 с получением сложного эфира 9. Сложный эфир восстанавливали с помощью LiAlH₄ до соответствующего спирта (10). Наконец, внедряли тиацетат в условиях реакции Мицунобу с получением требуемого строительного блока 11.

[00159] Алкилирование амина 7, по-видимому, является менее простым, чем ожидалось. При комнатной температуре превращение не происходило, и, видимо, требовалось присутствие основания (такого как Et₃N или K₂CO₃). Однако полученный выход

обычно составлял порядка 40%. Последующее восстановление сложного эфира до спирта **10** с помощью LiAlH_4 обеспечивало хорошее превращение и простое выделение продукта. Соли алюминия обычно разрушали добавлением 20% водного раствора KOH (160 мл на моль), из которого после несложного фильтрования получали требуемый материал в ТГФ. Превращение спирта в тиацетат осуществляли в условиях реакции Мицунобу. Следует отметить, что при добавлении тиоуксусной кислоты указанный компонент необходимо добавлять последним. После выделения продукта и осторожной очистки может быть получен сложный тиозфир **11**.

Синтез тиотозилата **18**:

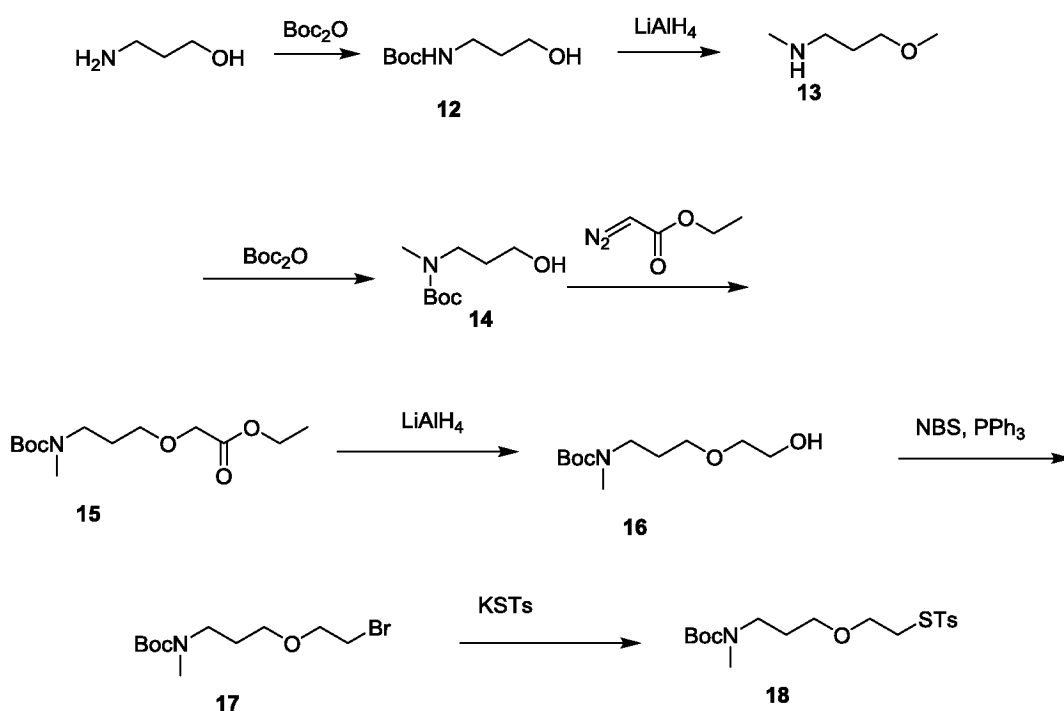


Схема 7. Синтез тиотозилата **18**

[00160] Во время синтеза предыдущего соединения наблюдали, что присутствие амина в тиотозилатном строительном блоке обуславливает чрезвычайно низкий выход. Таким образом, необходим Вос-защищенный тиотозилат **18**. Вос-группа будет удалена после образования дисульфида с последующим алкилированием амина. В аминпропанол вводили защитную Вос-группу, который затем восстанавливали с помощью LiAlH_4 до соответствующего метиламина **13**. Затем вводили новую защитную Вос-группу теперь уже во вторичный амин с получением соединения **14**. Спирт приводили во взаимодействие с этилдиазоацетатом для внедрения простой эфирной группы (**15**). Сложный эфир восстанавливали, используя LiAlH_4 , с получением спирта **16**. В результате бромирования с

помощью NBS получали бромид **17**. Замещение бромидом тиотозилатом калия обеспечивало получение требуемого тиотозилатного строительного блока **18**.

Синтез иодида **22**:

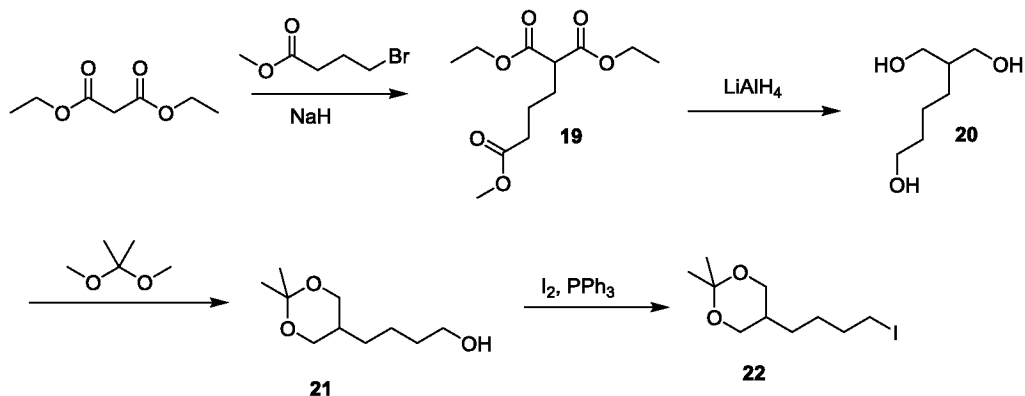
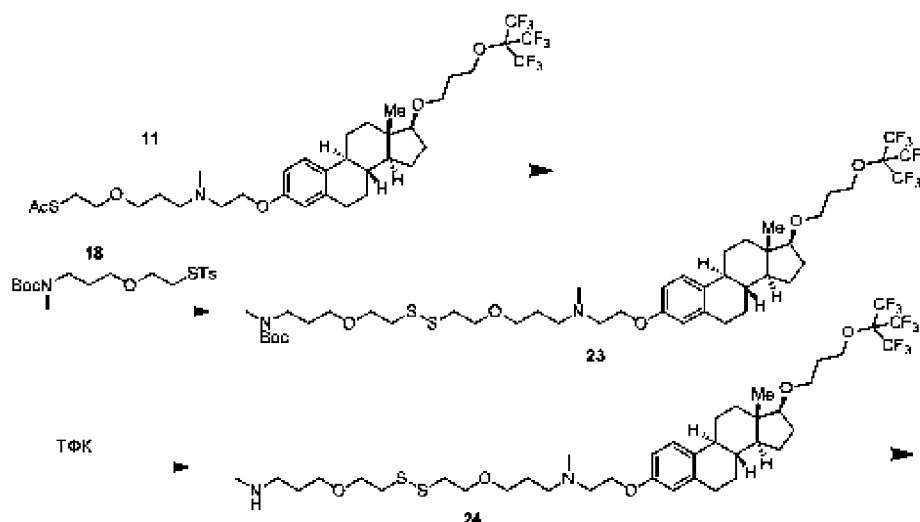


Схема 8. Синтез иодида **22**

[00161] Диэтилмалонат алкилировали метил-4-бромбутиратом с получением сложного триэфира **19**. Все три сложноэфирные группы одновременно восстанавливали обработкой LiAlH_4 с получением триола **20**. Внедряли ацетонидную защитную группу по реакции с диметоксипропаном и получали спирт **21**. Спирт превращали в иодид с получением требуемого строительного блока **22**.

Интеграция синтеза Формулы (V)-предшественника:



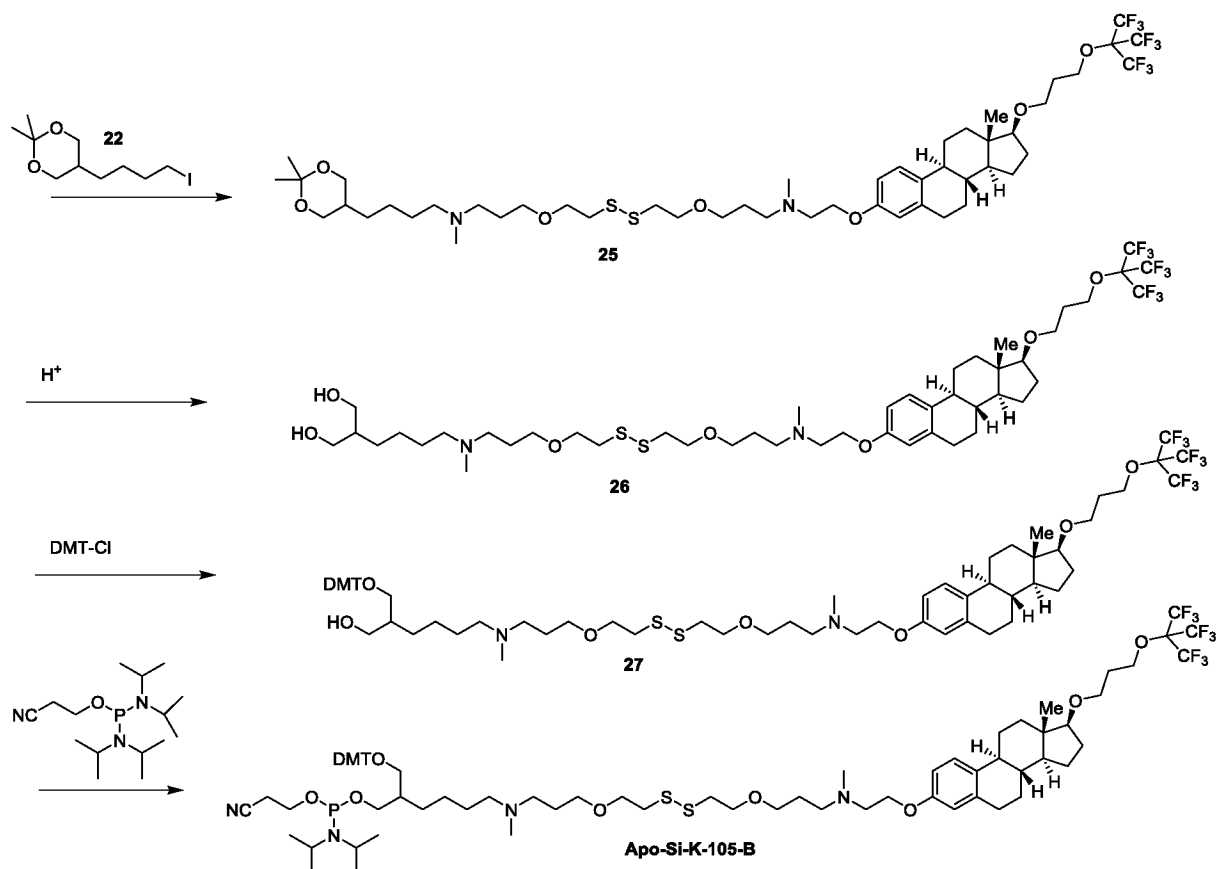


Схема 9. Синтез Формулы (V)-предшественника

[00162] В результате образования дисульфидной связи между тиацетатом 11 и тиотозилатом 18 получали дисульфид 23 с высоким выходом. После обработки ТФК для удаления Вос-группы получали амин 24. Амин алкилировали иодидом 22 с получением 25 с выходом 40%. Ацетонид удаляли посредством обработки кислотой с получением диола 26. Внедряли DMT-группу с получением соединения 27. После окончательного образования фосфорамидита получали **Формулу (V)-предшественник**.

Экспериментальный раздел:

Синтез тиацетата 11:

(8R,9S,13S,14S)-13-Метил-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-

декагидроспиро[циклопента[а]фенантрен-17,2'-[1,3]диоксан]-3-ол (2)

[00163] К суспензии экстрона (252 г, 0,93 моль) в толуоле (1,5 L) добавляли триметоксиметан (297 г, 350 мл, 2,80 моль), пропан-1,3-диол (213 г, 250 мл, 2,80 моль) и pTsOH (2 г, 10 ммоль). Нагревали до 60 °C и перемешивали в течение 16 часов. Добавляли триэтиламин (6 мл) и воду (600 мл) и продолжали перемешивание еще 1 час. Разделяли фазы и промывали органический слой водой (3 x 400 мл) и насыщенным соевым раствором. Сушили над Na₂SO₄ и частично концентрировали до около 1 л. Выливали в гептан (4 л) и отфильтровывали белое твердое вещество. Промывали гептаном, сушили in

васио. Соединение **2** (271 г, 825 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с выходом 88,5%.

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

[00164] К раствору (13S)-13-метил-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-декагидроспиро[циклопента[а]фенантрен-17,2'-[1,3]диоксан]-3-ола (**2**, 60,7 г, 185 ммоль) в ТГФ при 0 °С осторожно добавляли алюмогидрид лития (8,42 г, 222 ммоль), затем по частям добавляли хлорид алюминия (98,6 г, 739 ммоль) (большой экзотермический эффект!). Перемешивали 15 минут при 0 °С, затем нагревали до 50 °С. Перемешивали 2 часа при 50 °С (вследствие налипания на ротационный испаритель), затем охлаждали 0 °С и начинали гасить, по каплям добавляя NH₄Cl (водн.) (500 мл). Перемешивали 1 час при комнатной температуре. Фазы разделяли и промывали органический слой насыщенным соевым раствором, концентрировали. Получали белое твердое вещество (65 г) с примесью эстрадиола (около 15%).

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

[00165] Неочищенный материал **3** (89,4 г) растворяли в ацетоне (1,25 л) и MeOH (0,2 л) и обрабатывали карбонатом калия (60 г, 435 ммоль) и метилбромацетатом (50 мл, 435 ммоль). Суспензию нагревали до 60 °С и продолжали перемешивание в течение 16 часов. По данным ТСХ, все фенольные фрагменты были алкилированы. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат концентрировали и дополнительно очищали флэш-хроматографией (элюент от 20% до 30% EtOAc в гептане, удаление всех примесей, 100% EtOAc для получения требуемого вещества).

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

Метил-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)ацетат (5)

[00166] К раствору соединения **4** (56,7 г, 140,3 ммоль) в ТГФ (1 л) добавляли трифенилфосфин (55,4 г, 211 ммоль), нафтафтор-трет-бутиловый спирт (30 мл) и ди-трет-бутилазодикарбоксилат (38,5 г, 167 ммоль). Смесь перемешивали 30 минут, затем ТСХ показала полное превращение. Добавляли гептан (500 мл) и частично концентрировали смесь до ~500 мл. Добавляли дополнительное количество гептана (1 л) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Образовался осадок, который

отфильтровывали, фильтрат концентрировали с получением соединения **5** в виде желтого сиропообразного вещества, содержащего следовые примеси DBAD и трифенилфосфина.

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-метилацетамид (6)

[00167] Неочищенное сиропообразное вещество соединения **5** разбавляли MeOH (250 мл) и добавляли 40% водный раствор метиламина (350 мл). Белый осадок перемешивали в течение 1 часа, после чего ТСХ показала полное превращение. Добавляли воду (1 л) и отфильтровывали твердое вещество. Остаток промывали водой и растворяли в дихлорметане (1 л). Органический слой промывали насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Дополнительную очистку осуществляли, используя около 7 см диоксида кремния и первоначальное элюирование с 15% EtOAc в гептане. После полного удаления примесей из колонки элюировали соединение **6**, используя 100% EtOAc. Соединение **6** (82,0 г, 132 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с выходом 94%, хотя остаточные следы трифенилфосфоксида присутствовали.

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(7).

[00168] К раствору соединения **6** (56,0 г, 90,5 ммоль) в ТГФ (500 мл) при 65 °С по каплям добавляли BH₃.DMS (56 мл, 590 ммоль). Продолжали кипячение с обратным холодильником еще 5 часов, затем охлаждали смесь до комнатной температуры. Смесь тщательно растворяли в MeOH (300 мл) и добавляли 4 М диоксана в HCl (50 мл). Раствор кипятили с обратным холодильником 30 минут, затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Смесь растворяли в MeOH (300 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 30 минут. После охлаждения и концентрирования сиропообразное вещество растворяли в CH₂Cl₂ (1 л) и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (2 ×). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Соединение **7** (50,0 г, 82,6 ммоль) выделяли в виде прозрачного маслянистого вещества, которое медленно затвердевало, с выходом 91%. Профиль содержания примесей со следами трифенилфосфоксида был таким же, как для соединения **6**.

Этил-2-(3-бромпропокси)ацетат (8)

[00169] К раствору этил-2-диазоацетата (100 г, 0,74 моль) и 3-бромпропан-1-ола (0,10 кг, 74 мл, 0,74 моль) в ДХМ (100 мл) добавляли BF₃·OEt₂ (1,1 г, 0,94 мл, 7,4 ммоль) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 15 минут и при комнатной температуре в течение 3 часов до прекращения наблюдаемого выделения газа. Смесь

разбавляли ДХМ (500 мл) и промывали смесь H_2O (500 мл) и насыщенным соевым раствором (500 мл), и сушили над Na_2SO_4 . Растворители удаляли *in vacuo* с получением этил-2-(3-бромпропокси)ацетата (**8**, 180 г, 0,80 моль, 110%) в виде прозрачного желтого маслянистого вещества.

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

[00170] Суспензию этил-2-(3-бромпропокси)ацетата (11 г, 50 ммоль), соединения **7** (25 г, 41 ммоль), карбоната калия (11 г, 83 ммоль) и иодида калия (0,69 г, 4,1 ммоль) в ацетонитриле (300 мл) нагревали до 70 °С в течение 16 часов. Смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли EtOAc (100 мл), фильтровали и концентрировали. После дополнительной очистки флэш-хроматографией (градиент от 20% до 30% ацетона + 1% Et_3N в гептане) получали соединение **8** (12,0 г, 16 ммоль) с выходом 39% в виде прозрачного маслянистого вещества, которое медленно затвердевало.

2-(3-((2-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)(метил)амино)пропокси)этан-1-ол (10**)**

[00171] К раствору соединения **9** (12 г, 16 ммоль) в ТГФ (200 мл) при 0 °С добавляли алюмогидрид лития (0,91 г, 24 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 часа 30 минут. ТСХ показала полное исчерпание. Реакционную смесь гасили 20% КОН (160 мл/моль, $V = 4,2$ мл), перемешивали 1 час, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Соединение **10** (10,2 г, 14,4 ммоль) выделяли в виде прозрачного вещества.

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

[00172] К раствору соединения **10** (20,2 г, 28,5 ммоль) в ТГФ добавляли трифенилфосфин (9,73 г, 37,1 ммоль) и DIAD (6,93 г, 6,66 мл, 34,3 ммоль), затем через 5 минут добавляли тиоуксусную кислоту (3,26 г, 3,07 мл, 42,8 ммоль). Продолжали перемешивание в течение 3 часов, добавляли гептан (20 мл) и концентрировали.

[00173] Очищали флэш-хроматографией (10% ацетона + 1% Et_3N в гептане). Соединение **11** (15,4 г, 20,1 ммоль) выделяли в виде прозрачного густого маслянистого вещества с выходом 71%.

Синтез тиотозилата 18:

трет-бутил-(3-гидроксипропил)карбамат (12)

[00174] К раствору 3-аминопропан-1-ола (28,5 г, 379 ммоль) и триэтиламина (38,4 г, 53 мл, 379 ммоль) в ДХМ (500 мл) медленно добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (91,1 г, 417 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 2 часов. Смесь гасили имидазолом (ложка) и перемешивали в течение 5 минут. Смесь промывали 1 М HCl (300 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением соединения **12** (55 г, 0,31 моль, 83%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

3-(метиламино)пропан-1-ол (13)

[00175] К ледяной суспензии алюмогидрида лития (26 г, 0,67 моль) в ТГФ (500 мл) по каплям добавляли раствор этил-трет-бутил-(3-гидроксипропил)карбамата (**12**, 88 г, 0,34 моль) в ТГФ (250 мл) при 0 °С. После завершения добавления смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут и в течение 16 часов при 70 °С. Смесь охлаждали до комнатной температуры и затем гасили, по каплям добавляя KOH (20%, 107 мл) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Смесь фильтровали через целит и сушили фильтрат над Na₂SO₄, и концентрировали. ЯМР показала, что часть Вос осталась без изменений. Вещество растворяли в ТГФ (500 мл) и добавляли LiAlH₄ (13 г, 0,34, 1 экв.). Смесь перемешивали при 80 °С в течение 16 часов. Смесь охлаждали до комнатной температуры. При 0 °С реакционную смесь гасили, медленно добавляя KOH (20%, 54 мл), и перемешивали полученную смесь в течение 2 часов при комнатной температуре. Смесь фильтровали через целит и сушили фильтрат над Na₂SO₄, и концентрировали с получением Вос-метиламинопропанола (22,6 г, 170 ммоль, 50%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

трет-бутил-(3-гидроксипропил)(метил)карбамат (14)

[00176] К раствору 3-(метиламино)пропан-1-ола (**13**, 22,6 г, 254 ммоль) и триэтиламина (25,7 г, 35 мл, 254 ммоль) в ДХМ (500 мл) по частям добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (55,3 г, 254 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа до прекращения наблюдаемого выделения газа. Смесь промывали 1 М HCl, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением Вос-защищенного амина **14** (43 г, 230 ммоль, 90%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

этил-2-(3-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)пропокси)ацетат (15)

[00177] К раствору спирта **14** (36 г, 0,19 моль) в ДХМ (500 мл) добавляли этил-2-диазоацетат (25 г, 23 мл, 0,19 моль) и эфират трифторида бора (2,7 г, 2,4 мл, 19 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение 16 часов. Смесь промывали водой и насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное

вещество очищали колоночной хроматографией (20% EtOAc в гептане) с получением сложного эфира **15** (11 г, 40 ммоль, 21%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

трет-бутил-(3-(2-гидроксиэтокси)пропил)(метил)карбамат (16)

К ледяной суспензии алюмогидрида лития (2,7 г, 71 ммоль) в ТГФ по каплям добавляли раствор сложного эфира **15** (13 г, 47 ммоль) в ТГФ (50 мл) при 0 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакцию гасили, по каплям добавляя КОН (20%, 11 мл) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Смесь фильтровали через целит, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением спирта **16** (8,5 г, 36 ммоль, 77%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

трет-бутил-(3-(2-бромэтокси)пропил)(метил)карбамат (17)

[00178] К раствору спирта **16** (8,5 г, 36 ммоль) в ДХМ (300 мл) добавляли трифенилфосфин (13 г, 51 ммоль) и NBS (7,8 г, 44 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 16 часов. Смесь промывали NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и фильтровали. Добавляли гептан и удаляли ДХМ посредством выпаривания. Образовавшееся твердое вещество отфильтровывали и концентрировали фильтрат. Неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией (20% EtOAc/гептан) с получением трет-бутилбромида **17** (7,6 г, 26 ммоль, 70%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

S-(2-(3-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)пропокси)этил)-4-метилбензолсульфонотиоат (18)

[00179] Раствор бромида **17** (7,6 г, 26 ммоль) и 4-метилбензолсульфонотиоата калия (8,7 г, 38 ммоль) в ДМФА (200 мл) перемешивали при 50 °С в течение 16 часов. Смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой (1 л). Смесь экстрагировали смесью EtOAc/гептан (3x 200 мл, 1:1), а объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией (20% EtOAc/гептан) с получением тиотозилата **18** (9,1 г, 23 ммоль, 88%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

Синтез иодида 22:

1,1-диэтил-4-метилбутан-1,1,4-трикарбоксилат (19)

[00180] К ледяной суспензии гидроксида натрия (10 г, 0,26 моль) в ДМФА (500 мл) медленно добавляли диэтилмалонат (42 г, 40 мл, 0,26 моль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа, пока смесь не стала прозрачной. Добавляли метил-4-бромбутаноат (47 г, 0,26 моль) при 0 °С и перемешивали полученную

смесь в течение 18 часов при комнатной температуре. Смесь частично концентрировали и гасили остаток, используя 1 н. HCl (300 мл) и воду (1,3 л). Смесь экстрагировали смесью гептан/EtOAc (1/1; 2 x 250 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (500 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (20% EtOAc/гептан) с получением сложного триэфира **19** (63 г, 0,24 моль, 92%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

2-(гидроксиметил)гексан-1,6-диол (20)

[00181] К ледяной суспензии алюмогидрида лития (25 г, 0,66 моль) в ТГФ (500 мл) медленно добавляли раствор сложного триэфира **19** (63 г, 0,24 моль) в ТГФ (100 мл) при 0 °С и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакцию гасили, медленно добавляя KOH (20% водн., 106 мл) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Смесь фильтровали через целит, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением триола **20** (16 г, 0,11 моль, 45%) в виде прозрачного желтого маслянистого вещества.

4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутан-1-ол (21)

[00182] К раствору триола **20** (16 г, 0,11 моль) в ТГФ (200 мл) добавляли *p*-толуолсульфоновую кислоту (5,1 г, 27 ммоль) и 2,2-диметоксипропан (34 г, 40 мл, 0,32 моль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь концентрировали и растворяли остаток в ДХМ (200 мл). Смесь промывали NaHCO₃ (насыщ. водн., 200 мл) и насыщенным соевым раствором (200 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением ацетонида **21** (9,0 г, 48 ммоль, 44%) в виде коричневого маслянистого вещества.

5-(4-иодбутил)-2,2-диметил-1,3-диоксан (22)

[00183] К раствору спирта **21** (3,7 г, 20 ммоль), трифенилфосфина (6,2 г, 24 ммоль) и имидазола (1,6 г, 24 ммоль) в ДХМ (250 мл) добавляли иод (5,5 г, 22 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь промывали раствором тиосульфата натрия (насыщ. водн., 2 x 100 мл) и насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией (15% EtOAc в гептане) с получением иодида **22** (3,7 г, 12 ммоль, 63%) в виде прозрачного желтого маслянистого вещества.

Синтез Формулы (V)-предшественника:

трет-бутил-(1-(((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-6Н-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-3-метил-7,14-диокса-10,11-дитиа-3-азагептадекан-17-ил)(метил)карбамат (23)

[00184] К раствору тиотозилата **18** (3,4 г, 8,5 ммоль) и тиацетата **11** (5,0 г, 6,5 ммоль) в ДХМ (200 мл) и MeOH (20 мл) добавляли раствор метоксида натрия (1,1 г, 3,6 мл, 20 ммоль) в MeOH (5,4 М) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь разбавляли 200 мл ДХМ, промывали NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (10% ацетона в гептане + 1% NEt₃) с получением дисульфида **23** (6,5 г, 6,7 ммоль, колич.) в виде прозрачного маслянистого вещества.

N-(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-6Н-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)-N-метил-3-(2-((3-(метиламино)пропокси)этил)дисульфанил)этокси)пропан-1-амин (24)

[00185] К раствору трет-бутилдисульфида **23** (6,5 г, 6,7 ммоль) в ДХМ (200 мл) добавляли ТФК (15 г, 10 мл, 0,13 моль) и перемешивали полученную реакцию смесь в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляли дополнительное количество ТФК (5 мл) и перемешивали 30 минут. Смесь концентрировали и растворяли остаток в ДХМ (250 мл). Смесь промывали раствором NaHCO₃ и насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением амина **24** (5,3 г, 6,1 ммоль, 91%) в виде желтоватого прозрачного маслянистого вещества.

4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)-N-(1-(((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-6Н-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-3-метил-7,14-диокса-10,11-дитиа-3-азагептадекан-17-ил)-N-метилбутан-1-амин (25)

[00186] К раствору амина **24** (5,3 г, 6,1 ммоль) в ацетонитриле (200 мл) добавляли карбонат калия (0,84 г, 6,1 ммоль) и иод **22** (1,8 г, 6,1 ммоль) и перемешивали полученную смесь при 50 °С в течение 16 часов. Смесь концентрировали и растворяли остаток в ДХМ (300 мл). Смесь промывали раствором NaHCO₃ (полунасыщенный, водный, 250 мл) и насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (25% ацетона в гептане + 1 % NEt₃) с получением ацетонида **25** (2,5 г, 39%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

2-(1-(((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-6Н-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-3,18-диметил-7,14-диокса-10,11-дитиа-3,18-диазадокозан-22-ил)пропан-1,3-диол (26)

[00187] К раствору ацетонида **25** в MeOH (100 мл) добавляли *p*-толуолсульфоновую кислоту (1,1 г, 6,0 ммоль) и перемешивали смесь в течение 1 часа при комнатной температуре. Смесь концентрировали и растворяли остаток в ДХМ (200 мл). Смесь промывали раствором NaHCO₃ и насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄, и концентрировали с получением диола **26** (2,1 г, 2,1 ммоль, 87%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

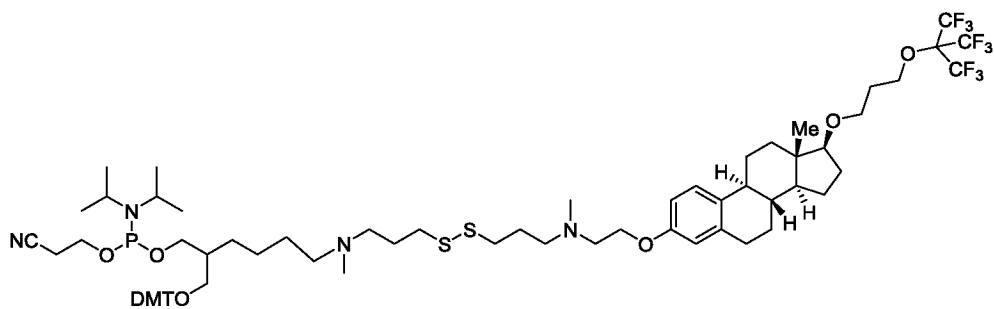
23-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-1-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-3,18-диметил-7,14-диокса-10,11-дитиа-3,18-дiazатетракозан-24-ол (27)

[00188] К раствору диола **26** (2,1 г, 2,1 ммоль) в ДХМ (200 мл) добавляли триэтиламин (0,42 г, 0,58 мл, 4,2 ммоль), DMAP (26 мг, 0,21 ммоль) и 4,4'-(хлор(фенил)метил)бис(метоксибензол) (0,71 г, 2,1 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 16 часов. Смесь промывали раствором NaHCO₃ и насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (25-40% ацетона в гептане + 1% NEt₃, диоксид кремния, предварительно обработанный NEt₃) с получением DMT-защищенного соединения **27** (2,3 г, 1,8 ммоль, 84%) в виде желтоватого маслянистого вещества.

23-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-1-(((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)-3,18-диметил-7,14-диокса-10,11-дитиа-3,18-дiazатетракозан-24-ил (2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (Apo-Si-K-105-B)

[00189] К раствору соединения **27** (2,3 г, 1,8 ммоль) в ДХМ (100 мл) добавляли 3-((бис(диизопропиламино)фосфанил)окси)пропаннитрил (0,69 г, 0,72 мл, 2,3 ммоль) и раствор NMM и ТФК (4,6 мл, 0,5 М NMM и 0,25 М ТФК, 1,3 экв. NMM) в ДХМ. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Смесь промывали раствором NaHCO₃ и насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄, и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (30% ацетона в гептане + 1% NEt₃, диоксид кремния, предварительно обработанный смесью гептан/NEt₃ для дезактивации) с получением **Формулы (V)-предшественника** (2,2 г, 83%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

Пример 2f: Способ синтеза Формулы (VII)-предшественника:



Формула (VII)-предшественник

[00190] Синтез **Формулы (VII)-предшественника** осуществляли в соответствии со следующими схемами синтеза. Синтез направлен на три главных строительных блока:

Строительный блок K-105-6:

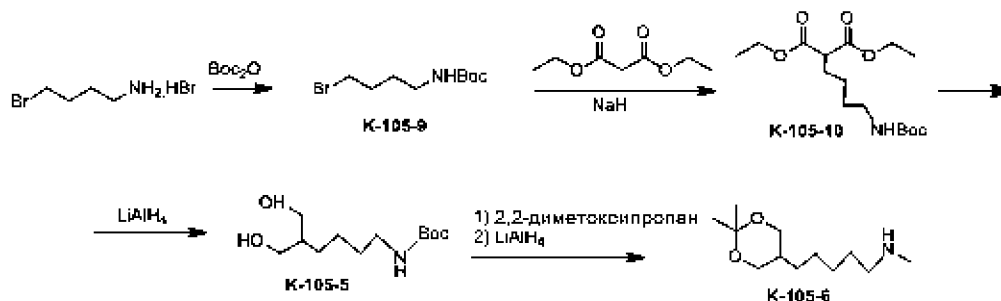


Схема 10. Синтез K-105-6

Строительный блок K-109B-1:

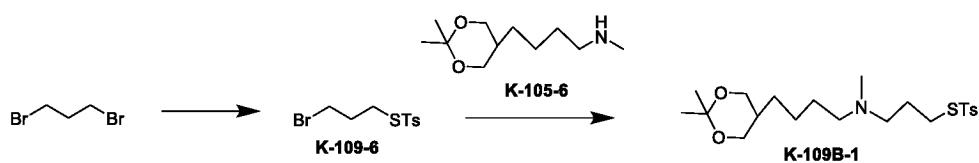


Схема 11. Синтез K-109B-1

Строительный блок K-53-2:

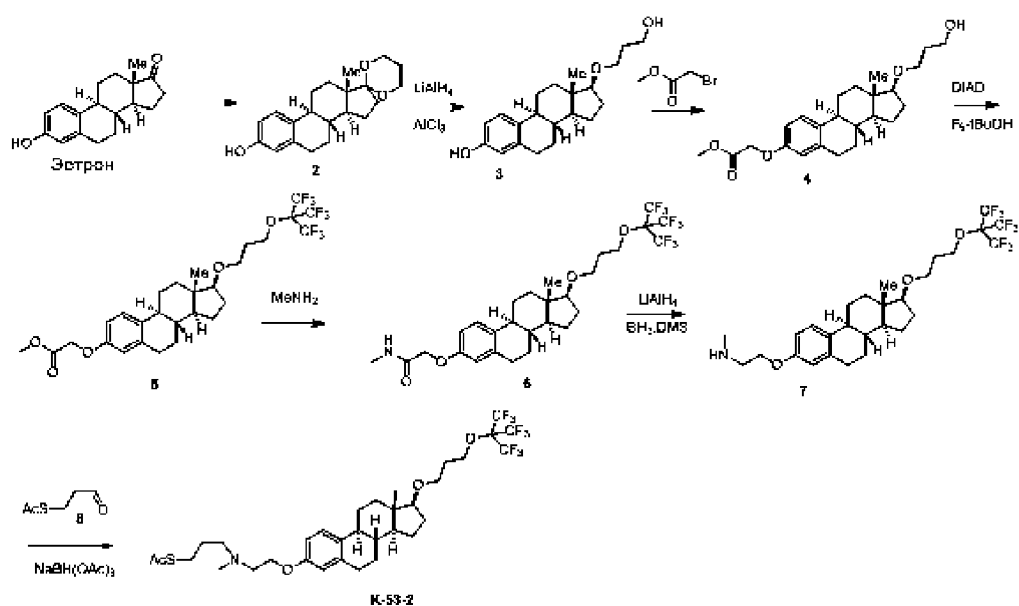


Схема 12. Синтез K-53-2

[00191] Затем все строительные блоки объединяли в конечное соединение, **Формулу (VII)-предшественник**:

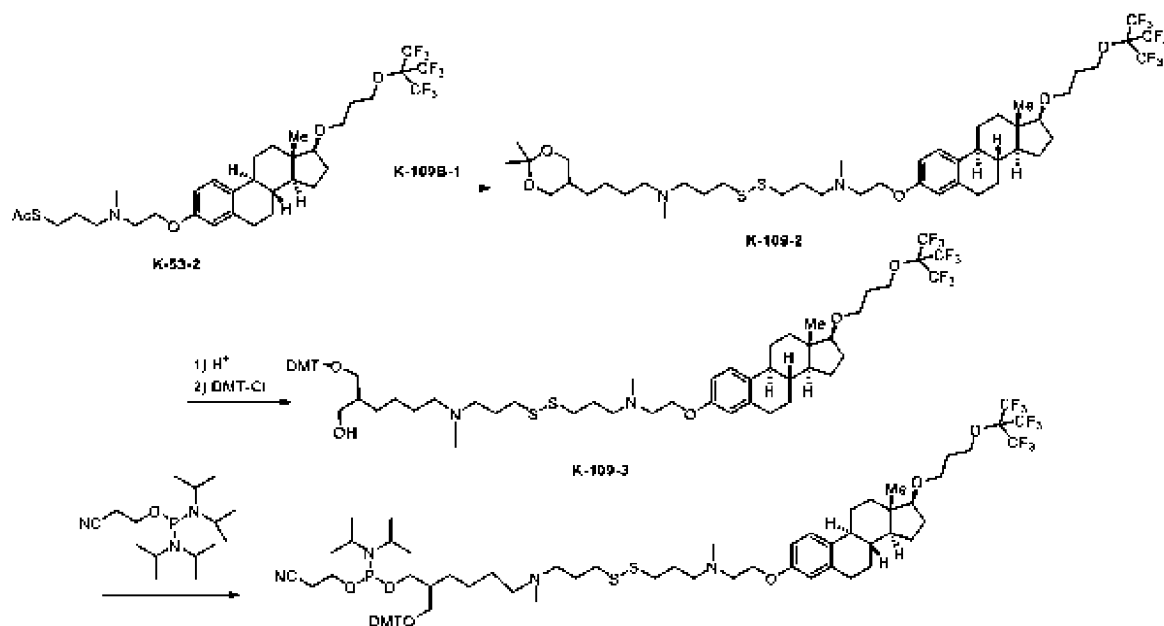


Схема 13. Синтез Формулы (VII)-предшественника

Пример 2g: Способ синтеза Формулы (VIII-F)-предшественника:

[00192] Начиная с эстрона, можно использовать известные способы химического синтеза для получения метилового сложного эфира **5**, известного промежуточного соединения. Затем можно ввести азот путем реакции с аминпропанолом. Это можно осуществить напрямую, как это было сделано ранее для метиламина. Иначе, метиловый

сложный эфир можно гидролизовать и ввести азот стандартным способом пептидного связывания. Затем амид можно восстановить с получением требуемого вторичного амина **K-93-F-2**. Последующее введение Вос-группы и введение тиацетатной функциональной группы в условиях реакции Мицунобу обеспечивает получение требуемого строительного блока **K-93-F-4**.

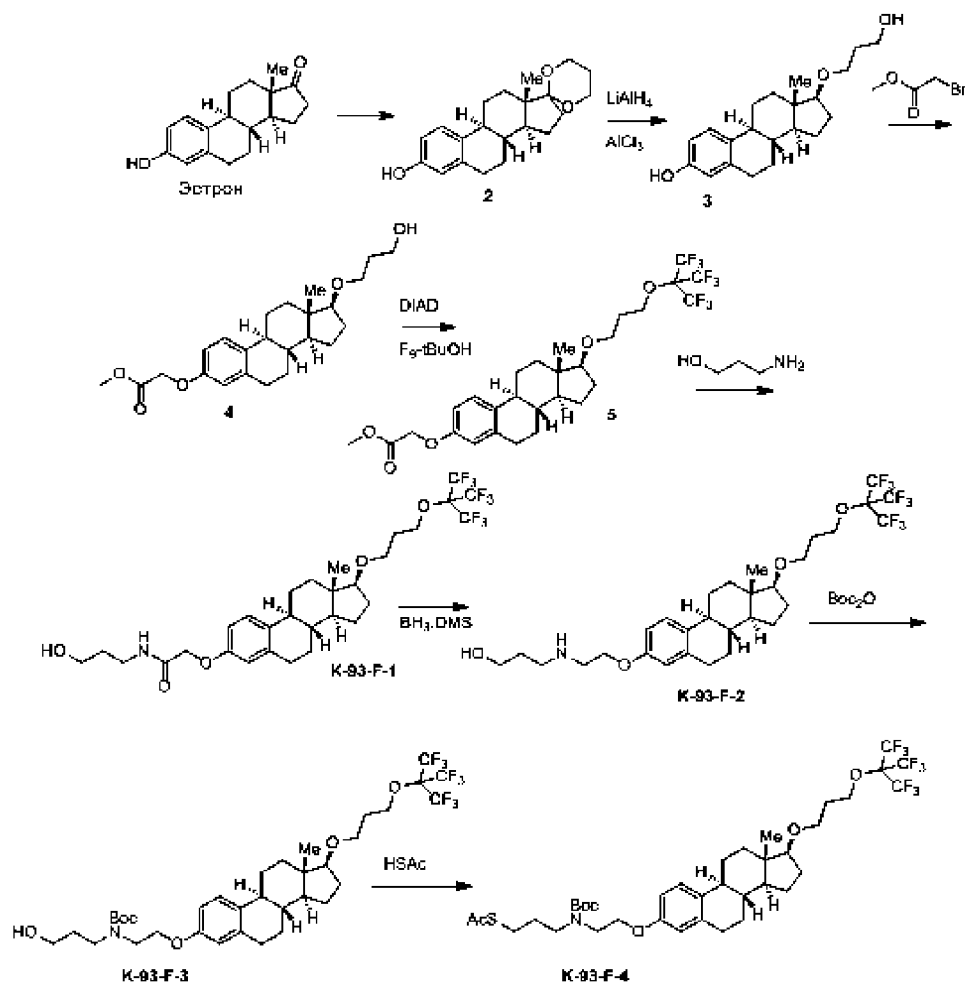


Схема 14: Синтез тиацетата K-93-F-4

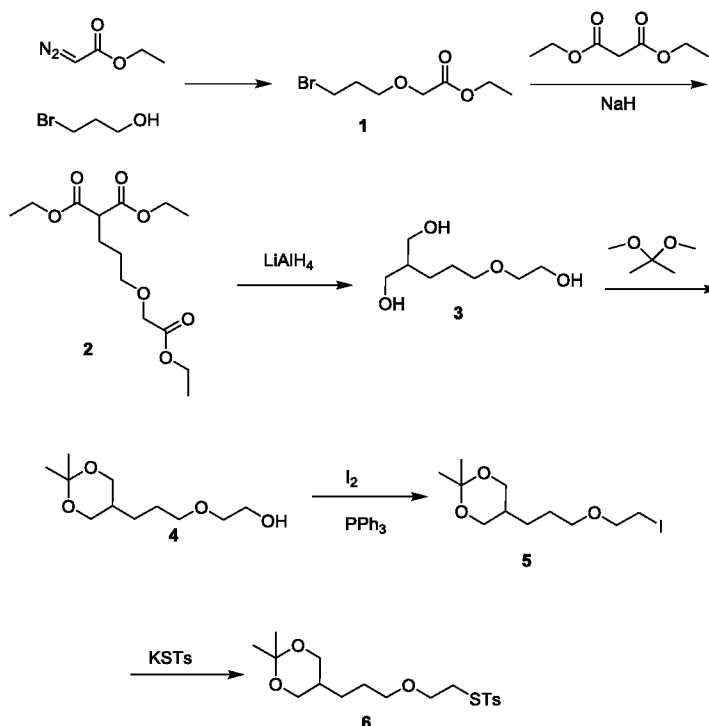
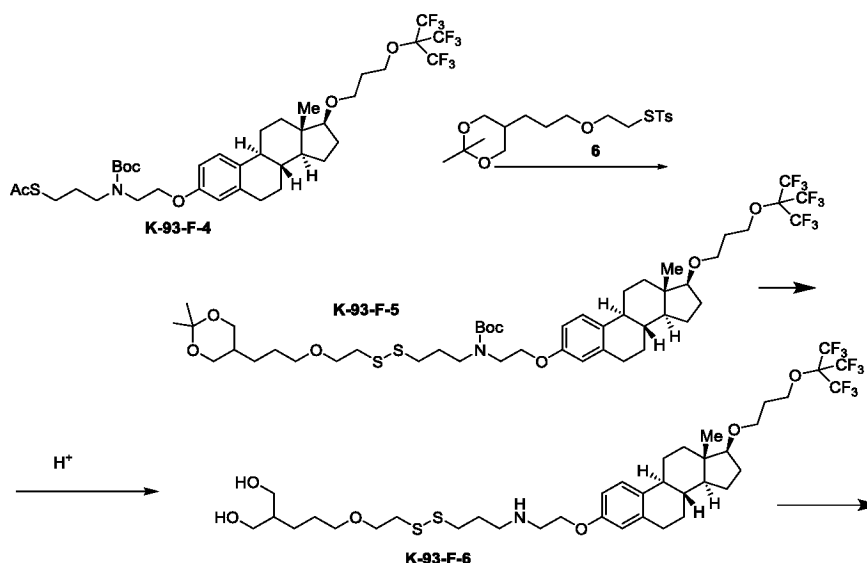


Схема 15: Синтез тиотозилата 6

Объединение фрагментов в конечную Формулу (VIII-F)-предшественник:

[00193] Сборка **Формулы (VIII-F)-предшественника** начинается с образования дисульфидной связи между строительными блоками **K-93-F-4** и тиотозилатом **6**. Затем одновременно удаляют ацетонидный фрагмент и Вос-группу посредством обработки кислотой. Затем обеспечивают защиту свободного вторичного амина Fmoc-группой. Последующее присоединение DMT и образование фосфорамидита обеспечивает получение **Формулы (VIII-F)-предшественника (схема 16)**.



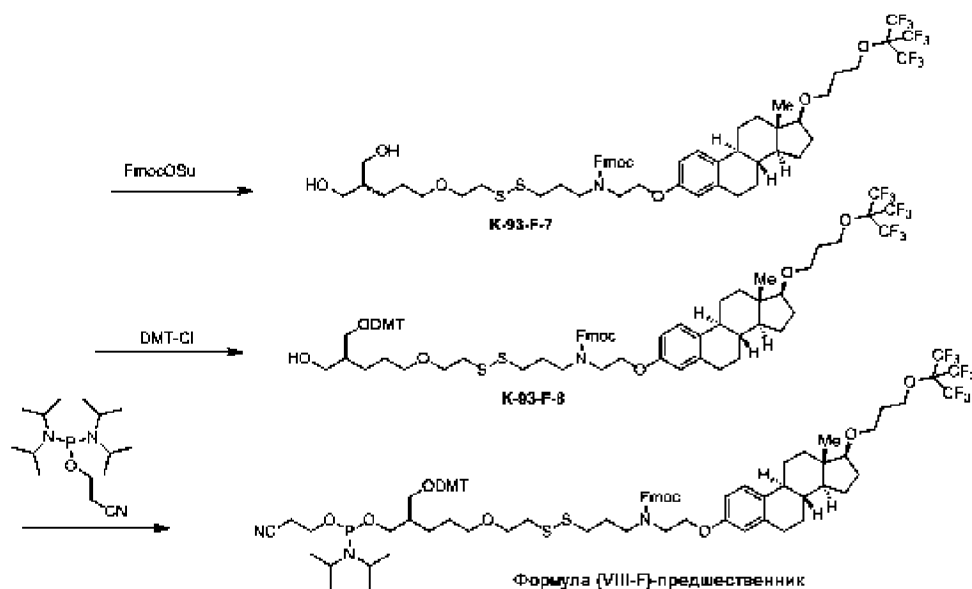
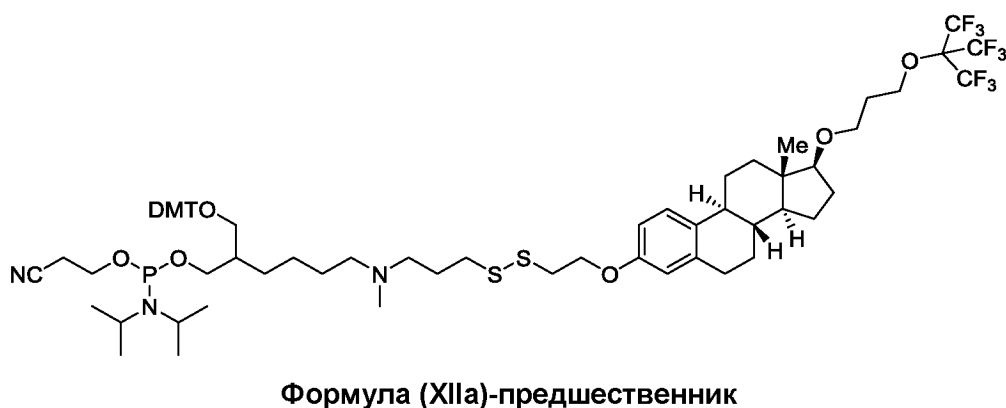


Схема 16: Объединение в конечную Формулу (VIII-F)-предшественник

Пример 2h: Способ синтеза Формулы (XIIa)-предшественника:



[00194] Синтез изображен на следующих схемах. Синтез приводит к связыванию обоих концов дисульфидного фрагмента, для чего левая часть функционализирована в виде тиацетата, а стероид-содержащая правая часть – в виде тиотозилата. Происходит их связывание, и необходимы незначительные модификации для получения конечного соединения.

Синтез тиотозилата 8:

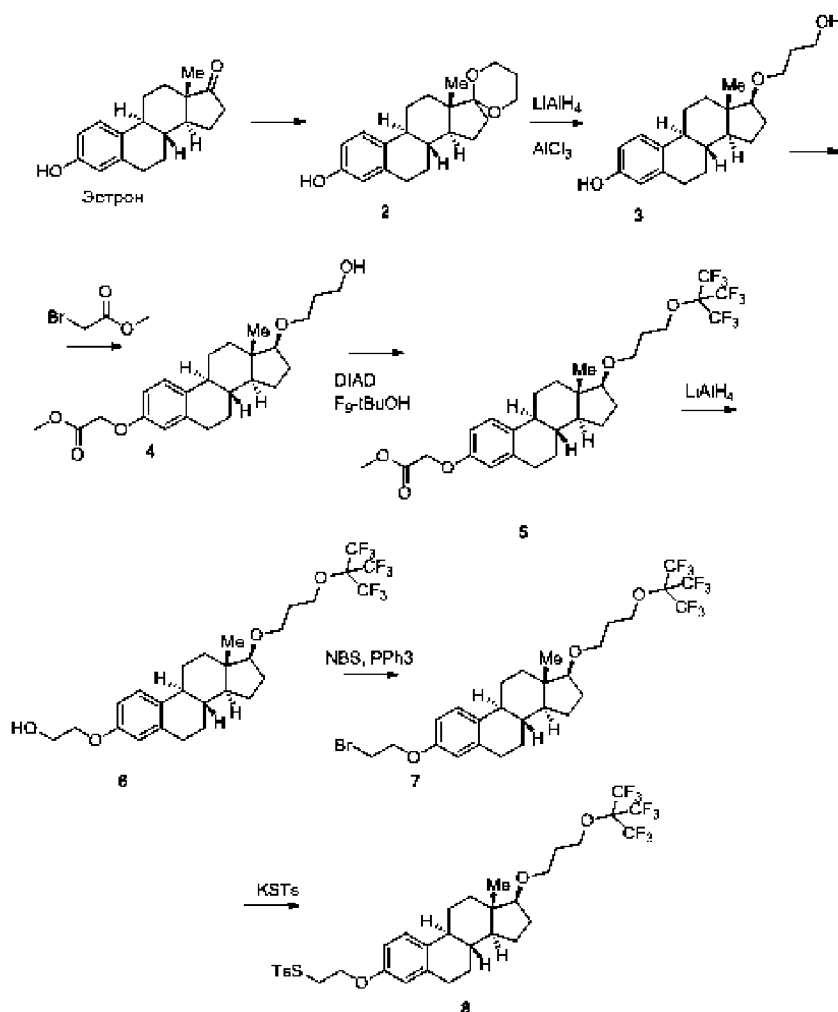


Схема 17. Синтез тиотозилата 8

[00195] Синтез начинали с защиты кетона 1,3-пропандиолом с получением соединения 2 с хорошей степенью чистоты. В результате раскрытия кольца ацетала под действием LiAlH_4 и AlCl_3 получали смесь соединения 3 и эстрадиола в соотношении около 85:15, последний является менее реакционноспособным, и его удаляли на следующих стадиях. Фенол алкилировали метилбромацетатом с получением метилового сложного эфира 4. Затем вводили фрагмент перфторбутанола в условиях реакции Мицунобу и получали соединение 5. Метилловый сложный эфир восстанавливали алюмогидридом лития и бромировали полученный спирт 6 с получением бромида 7. После обработки тиотозилатом калия получали требуемый строительный блок, тиотозилат 8.

Синтез тиацетата 16:

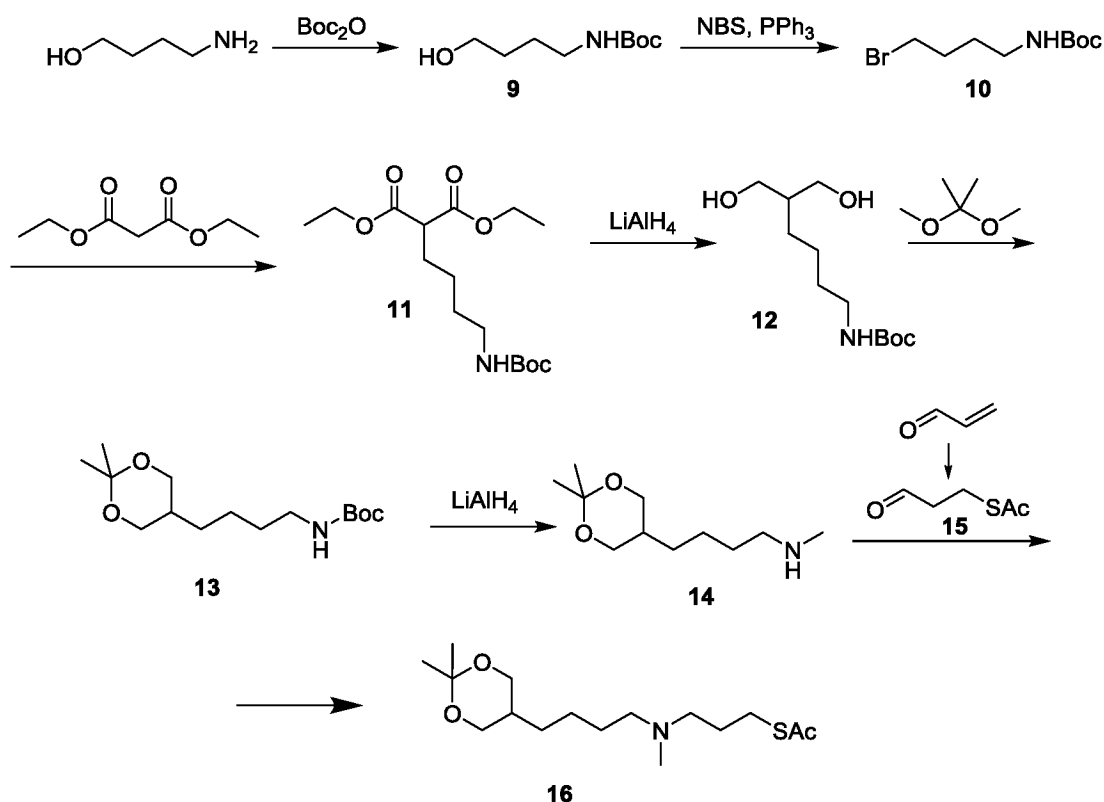


Схема 14. Синтез тиоацетата **16**

[00196] Синтез строительного блока **16** начинали с 4-аминобутан-1-ола. Амин защищали Вос-группой. Затем спирт превращали в соответствующий бромид (**10**), который затем можно алкилировать до диэтилмалоната с получением сложного бис-эфира **11**. При обработке соединения **11** с использованием LiAlH_4 при комнатной температуре происходит восстановление сложных эфиров, но Вос-группа остается без изменений. Затем защищали диол **12** посредством обработки диметоксипропаном в присутствии каталитического количества кислоты с получением ацетонида **13**. Обработка LiAlH_4 при повышенной температуре обеспечивала восстановление Вос-фрагмента до требуемого метиламина (**14**). Наконец, в результате восстановительного аминирования с применением альдегида **15** получали тиоацетат **16**. Альдегид **15** может быть без труда получен по одностадийной реакции, т.е. присоединения Михаэля тиоуксусной кислоты с акролеином.

Сборка Формулы (XIIa)-предшественника:

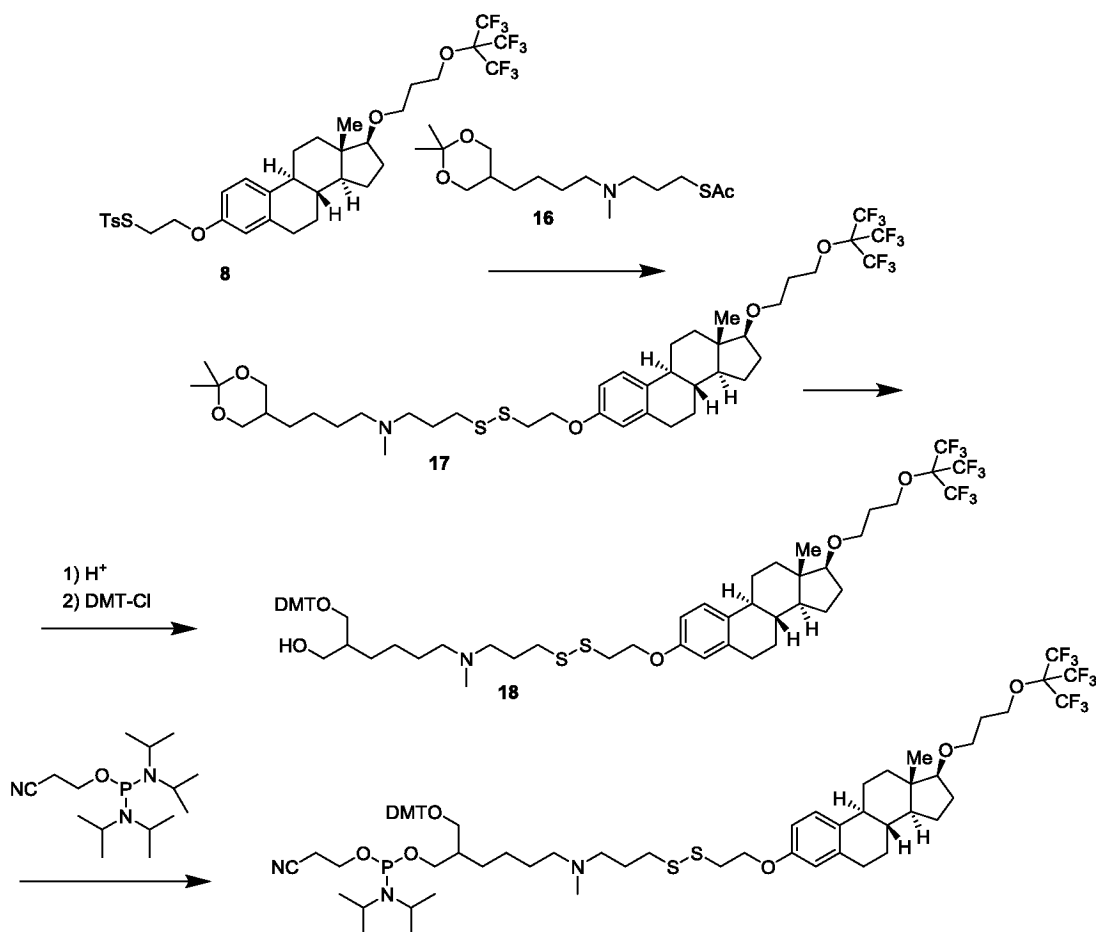


Схема 15. Синтез Формулы (XIIa)-предшественника

[00197] Образование дисульфидной связи между тиотозилатом **8** и тиацетатом **16** осуществляли в известных условиях реакции, при этом ацетат удаляется *in situ* под действием NaOMe, а образовавшийся тиол взаимодействует с тиотозилатом. В результате удаления ацетонида и последующего присоединения DMT-Cl получали соединение **18**. Окончательное образование фосфорамидита обеспечивало получение **Формулы (XIIa)-предшественника**.

Экспериментальный раздел:

Синтез тиотозилата **8**:

(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Метил-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-

декагидроспиро[циклопента[а]фенантрен-17,2'-[1,3]диоксан]-3-ол (**2**)

[00198] К суспензии эстрона (252 г, 0,93 моль) в толуоле (1,5 л) добавляли триметоксиметан (297 г, 350 мл, 2,80 моль), пропан-1,3-диол (213 г, 250 мл, 2,80 моль) и рTsOH (2 г, 10 ммоль). Нагревали до 60 °С и перемешивали в течение 16 часов. Добавляли триэтиламин (6 мл) и воду (600 мл) и продолжали перемешивание еще 1 час. Разделяли

фазы и промывали органический слой водой (3 x 400 мл) и насыщенным соевым раствором. Сушили над Na_2SO_4 и частично концентрировали до около 1 л. Выливали в гептан (4 л) и отфильтровывали белое твердое вещество. Промывали гептаном, сушили *in vacuo*. Соединение **2** (271 г, 825 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с выходом 88,5%.

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

[00199] К раствору (13S)-13-метил-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-декагидроспиро[циклопента[а]фенантрен-17,2'-[1,3]диоксан]-3-ола (**2**, 60,7 г, 185 ммоль) в ТГФ при 0 °С осторожно добавляли алюмогидрид лития (8,42 г, 222 ммоль), затем по частям добавляли хлорид алюминия (98,6 г, 739 ммоль) (большой экзотермический эффект!). Перемешивали 15 минут при 0 °С, затем нагревали до 50 °С. Перемешивали 2 часа при 50 °С (вследствие налипания на ротационный испаритель), затем охлаждали до 0 °С и начинали гасить, добавляя по каплям NH_4Cl (водн.) (500 мл). Перемешивали 1 час при комнатной температуре. Фазы разделяли и промывали органический слой насыщенным соевым раствором, концентрировали. Получали белое твердое вещество (65 г) с примесью эстрадиола (около 15%).

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

[00200] Неочищенное соединение **3** (89,4 г) растворяли в ацетоне (1,25 л) и MeOH (0,2 л) и обрабатывали карбонатом калия (60 г, 435 ммоль) и метилбромацетатом (50 мл, 435 ммоль). Суспензию нагревали до 60 °С и продолжали перемешивание в течение 16 часов. По данным ТСХ, все фенольные фрагменты были алкилированы. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат концентрировали и дополнительно очищали флэш-хроматографией (элюент от 20% до 30% EtOAc в гептане, удаление всех примесей, 100% EtOAc для получения требуемого вещества). Соединение **4** (56,7 г, 140,3 ммоль) выделяли в виде желтого маслянистого вещества с выходом 65%.

Метил-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)ацетат (5)

[00201] К раствору соединения **4** (56,7 г, 140,3 ммоль) в ТГФ (1 л) добавляли трифенилфосфин (55,4 г, 211 ммоль), нонафтор-трет-бутиловый спирт (30 мл) и ди-трет-бутилазодикарбоксилат (38,5 г, 167 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 минут, затем ТСХ показала полное превращение. Добавляли гептан (500 мл) и частично

концентрировали смесь до ~500 мл. Добавляли дополнительное количество гептана (1 л) и перемешивали смесь в течение ночи при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали и концентрировали фильтрат с получением соединения **5** в виде желтого сиропообразного вещества.

2-(((13S,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)этан-1-ол (6)

[00202] К ледяной суспензии алюмогидрид лития (2,0 г, 53 ммоль) в ТГФ (300 мл) медленно добавляли раствор метилового сложного эфира **5** (17 г, 27 ммоль) в ТГФ (100 мл) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 2 часов. Медленно добавляли КОН (8,5 мл, 20% водн., 160 мл/моль LiAlH₄) при 0°C и перемешивали полученную смесь в течение 30 минут при комнатной температуре. Смесь фильтровали через целит, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением спирта **6** (15 г, 94%) в виде прозрачного маслянистого вещества, которое медленно кристаллизовалось.

(13S,17S)-3-(2-бромэтокси)-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 (7)

[00203] К раствору соединения **6** (15 г, 25 ммоль) в ДХМ (300 мл) добавляли трифенилфосфин (9,8 г, 38 ммоль) и NBS (5,3 г, 30 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 16 часов. Смесь промывали раствором NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. К темно-зеленому остатку добавляли гептан (500 мл) и перемешивали полученную смесь 30 минут. Твердое вещество удаляли фильтрованием и концентрировали фильтрат. Смесь растворяли в гептане (250 мл) и перемешивали в течение 1 часа. Смесь фильтровали и концентрировали фильтрат с получением бромида **7** (15,4 г, 94,1%) в виде прозрачного желтоватого маслянистого вещества. Для удаления остаточного PPh₃ полученный материал растворяли в Et₂O (300 мл) и промывали водным раствором KMnO₄, водой и насыщенным солевым раствором. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Затем удаляли P(O)Ph₃ колоночной хроматографией (5% EtOAc в гептане) с получением продукта в виде прозрачного маслянистого вещества.

S-(2-(((13S,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)4-метилбензолсульфонотиоат (8)

[00204] К раствору бромида **7** (2,9 г, 4,4 ммоль) в ДМФА (150 мл) добавляли 4-метилбензолсульфонотиоат калия (2,0 г, 8,8 ммоль) и перемешивали полученную смесь при

50 °C в течение 16 часов и в течение 128 часов при комнатной температуре. Добавляли воду (500 мл) и экстрагировали смесь, используя EtOAc/гептан (1/1, 2 x 250 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением тиотозилата **8** (2,2 г, 65%).

Синтез тиацетата 14:

***трет*-Бутил-(4-гидроксibuтил)карбамат (9)**

[00205] К раствору 4-аминобутан-1-ола (25 г, 0,28 моль) в ДХМ (50 мл) медленно добавляли раствор ди-трет-бутилдикарбоната (61 г, 0,28 моль) в ДХМ (150 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 90 минут, после чего уже не наблюдали образование газа. Смесь разбавляли ДХМ (200 мл), промывали 1 М HCl (400 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением трет-бутил-(4-гидроксibuтил)карбамата (43 г, 230 ммоль, 82%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

***трет*-Бутил-(4-бромбутил)карбамат (10)**

[00206] *трет*-Бутил-(4-гидроксibuтил)карбамат (7,43 г, 230 ммоль) растворяли в ДХМ (500 мл) и добавляли трифенилфосфин (90 г, 340 ммоль), и медленно добавляли NBS (45 г, 250 ммоль), охлаждая водой. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 90 минут. ЯМР показала полное превращение. Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (насыщ., 300 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали до одной трети объема. Добавляли гептан (500 мл) и удаляли оставшийся ДХМ in vacuo. Добавляли дополнительное количество гептана (200 мл) и перемешивали смесь в течение ночи при комнатной температуре. Смесь фильтровали и концентрировали с получением неочищенного трет-бутил-(4-бромбутил)карбамата (**10**, 75 г, 74%) в виде желтого маслянистого вещества. ЯМР показала 43% PPh₃ и 57% требуемого продукта.

Диэтил-2-(4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)бутил)малонат (11)

[00207] К ледяной суспензии гидрида натрия (6,8 г, 0,17 моль) в ДМФА (500 мл) медленно добавляли диэтилмалонат (27 г, 26 мл, 0,17 моль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь снова охлаждали при 0 °C и добавляли *трет*-бутил-(4-бромбутил)карбамат (**10**, 75 г, 0,17 моль). Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 18 часов. Реакционную смесь гасили 1 н. HCl (300 мл) и водой (1,3 л). Смесь экстрагировали, используя гептан/EtOAc (1/1) (2 x 250 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (500 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (20% EtOAc/гептан) с получением соединения **11** (48 г, 85%) в виде

прозрачного маслянистого вещества. ЯМР показала наличие небольшого количества диэтилмалоната. Материал использовали в таком виде для восстановления.

***трет*-Бутил-(6-гидрокси-5-(гидроксиметил)гексил)карбамат (12)**

[00208] К ледяному раствору LiAlH_4 (25 г, 0,66 моль) в ТГФ (750 мл) по каплям добавляли диэтил-2-(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)малонат (11, 48 г, 0,14 моль) в ТГФ (100 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течении 2,5 часов. Реакцию гасили, медленно добавляя 20% КОН (106 мл) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего ее фильтровали через целит. Фильтрат сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением *трет*-бутил-(6-гидрокси-5-(гидроксиметил)гексил)карбамата (12, 22,3 г, 62%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

***трет*-Бутил-(4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)карбамат (13)**

[00209] К раствору *трет*-бутил-(6-гидрокси-5-(гидроксиметил)гексил)карбамата (12, 22,3 г, 90,2 ммоль) в ТГФ (300 мл) добавляли 2,2-диметоксипропан (28,2 г, 34 мл, 270 ммоль) и гидрат 4-метилбензолсульфоновой кислоты (3,43 г, 18,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего ЯМР показала полное превращение. Смесь разбавляли EtOAc (300 мл) и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (300 мл). Водный слой еще один раз экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением *трет*-бутил-(4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)карбамата (13, 21,6 г, 83,4%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

4-(2,2-Диметил-1,3-диоксан-5-ил)-N-метилбутан-1-амин (14)

[00210] К суспензии LiAlH_4 (4,28 г, 113 ммоль) в ТГФ (300 мл) медленно добавляли раствор *трет*-бутил-(4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)карбамата (13, 21,6 г, 75,2 ммоль) в ТГФ (100 мл). Полученную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 16 часов при 70 °С. Смесь охлаждали до 0 °С, после чего реакцию гасили, медленно добавляя КОН (20% водн., 18 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь фильтровали через целит и сушили фильтрат над Na_2SO_4 , затем концентрировали *in vacuo* с получением соединения 14 (13 г, 86%) в виде светло-желтоватого прозрачного маслянистого вещества.

S-(3-Оксопропил)этантаноат (15)

[00211] К раствору акриальдегида (15 г, 18 мл, 0,27 моль) в ДХМ (200 мл) добавляли триэтиламин (6,8 г, 9,3 мл, 67 ммоль) и медленно добавляли тиоуксусную кислоту (20 г, 19 мл, 0,27 моль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Смесь концентрировали и очищали неочищенное вещество колоночной

хроматографией (15% EtOAc/гептан) с получением *S*-(3-оксопропил)этантаноата (**15**, 26,3 г, 74%) в виде темно-желтого/оранжевого маслянистого вещества.

***S*-(3-((4-(2,2-Диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)(метил)амино)пропил)этантаноат (**16**)**

[00212] К раствору 4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)-*N*-метилбутан-1-амина (**14**, 9,2 г, 46 ммоль) в 1,2-дихлорэтаноле (400 мл) и уксусной кислоте (11 г, 10 мл, 0,18 ммоль) добавляли *S*-(3-оксопропил)этантаноат (**15**, 7,2 г, 55 ммоль) и перемешивали полученную смесь 5 минут. Затем добавляли триацетоксиборгидрид натрия (39 г, 180 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение 90 минут при комнатной температуре. Добавляли насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (100 мл), чтобы погасить реакцию, и перемешивали смесь 15 минут. Смесь разбавляли насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (300 мл) и разделяли фазы. Водную фазу экстрагировали дихлорметаном, и объединенные органические фазы промывали насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (40-50% EtOAc в гептане +1% NEt₃) с получением *S*-(3-((4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)(метил)амино)пропил)этантаноата (**16**, 11,5 г, 79%) в виде оранжевого маслянистого вещества.

Синтез Формулы (XIIa)-предшественника:

4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)-*N*-(3-((2-(((13*S*,17*S*)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)дисульфанил)пропил)-*N*-метилбутан-1-амин (17**)**

[00213] К раствору тиотозилата **8** (3,3 г, 4,3 ммоль) и тиоацетата **16** (2,3 г, 7,4 ммоль) в ДХМ (200 мл) и MeOH (20 мл) добавляли метоксид натрия (0,47 г, 1,6 мл, 8,7 ммоль) в MeOH. Полученную смесь перемешивали 2 часа. ЯМР показала полное расходование тиотозилата. Смесь разбавляли ДХМ (200 мл), промывали раствором NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (10% ацетона в гептане + 1% NEt₃) с получением дисульфида **17** (0,85 г, 22%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

2-(4-((3-((2-(((13*S*,17*S*)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)дисульфанил)пропил)(метил)амино)бутил)пропан-1,3-диол

[00214] К раствору ацетонида **17** (2,1 г, 2,3 ммоль) в MeOH (100 мл) добавляли *p*-толуолсульфоновую кислоту (530 мг, 2,8 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего ТСХ показала полное превращение.

Летучие вещества удаляли *in vacuo*. Неочищенный материал растворяли в ДХМ (100 мл), промывали NaHCO_3 , сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением продукта (1,7 г, 2,0 ммоль, 87%) в виде белого твердого вещества.

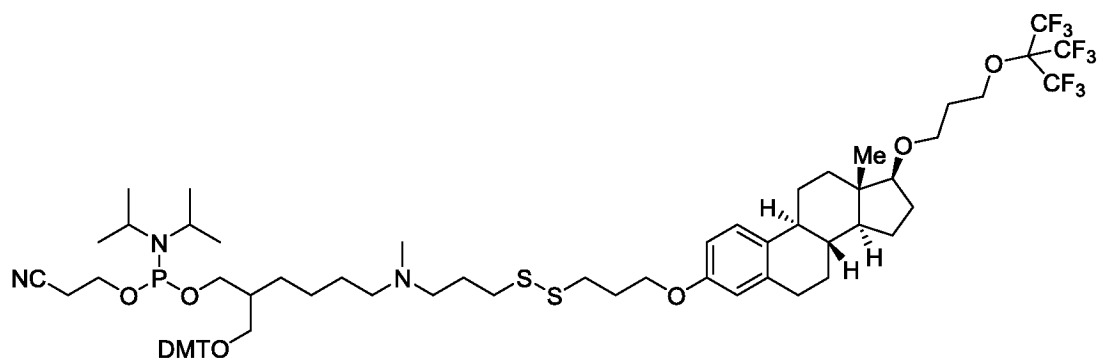
2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-6-((3-((2-(((13S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)этил)дисульфанил)пропил)(метил)амино)гексан-1-ол (18)

[00215] К раствору полученного диола (1,7 г, 2,0 ммоль), триэтиламина (0,25 г, 0,34 мл, 2,4 ммоль) и DMAP (25 мг, 0,20 ммоль) в ДХМ (100 мл) добавляли 4,4'-(хлор(фенил)метил)ен)бис(метоксибензол) (0,68 г, 2,0 ммоль) и перемешивали полученную желтую смесь при комнатной температуре в течение 16 часов. Смесь промывали NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (25% ацетон/гептан + 1% NEt_3) с получением продукта **18** (1,3 г, 1,1 ммоль, 56%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-6-((3-((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)дисульфанил)пропил)(метил)амино)гексил-(2-цианозтил)-диизопропилфосфорамидит (Apo-Si-K-113)

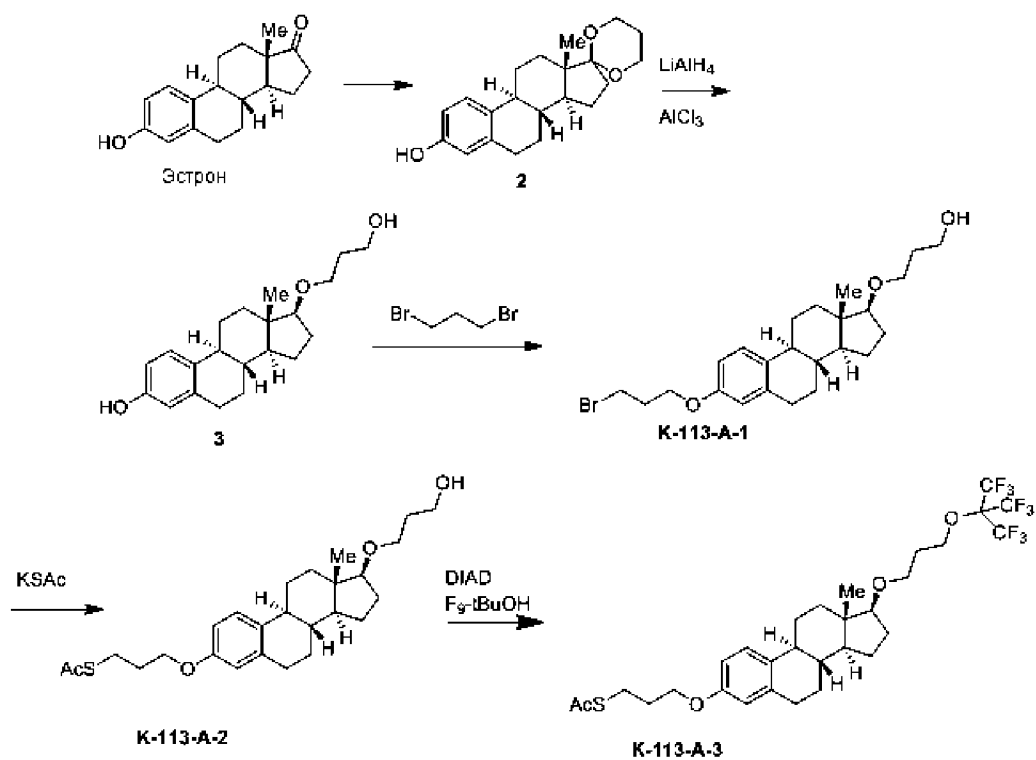
[00216] К раствору соединения **18** (1,3 г, 1,1 ммоль) в ДХМ (100 мл) добавляли раствор N-метилморфолина (0,15 г, 3,0 мл, 1,5 ммоль) и ТФК (84 мг, 3,0 мл, 0,74 ммоль) в ДХМ (0,5 М NMM, 0,25 М ТФК). Затем добавляли 3-((бис(диизопропиламино)фосфанил)окси)пропаннитрил (0,45 г, 0,47 мл, 1,5 ммоль) и перемешивали полученную реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 часов, и контролировали реакцию по ТСХ. После полного превращения смесь промывали раствором NaHCO_3 , сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (15% ацетона в гептане + 1% NEt_3) с получением **Apo-Si-K-113** (1,5 г, 1,1 ммоль, 98%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

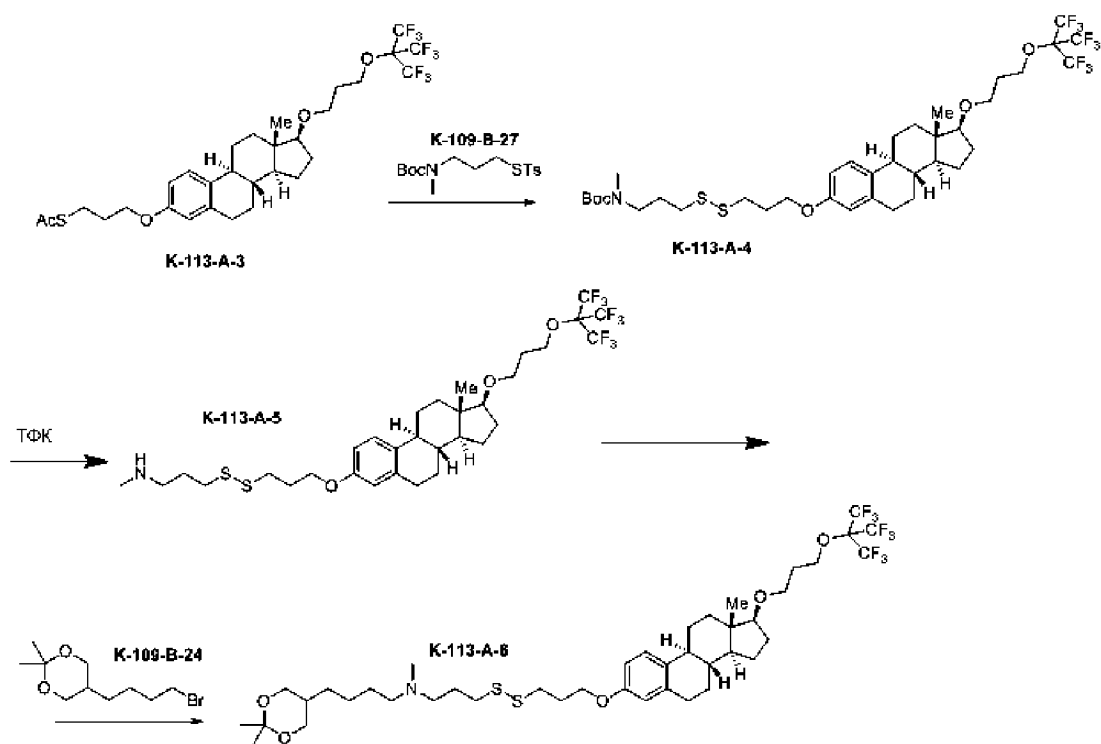
Пример 2i: Способ синтеза Формулы (XIIb)-предшественника:



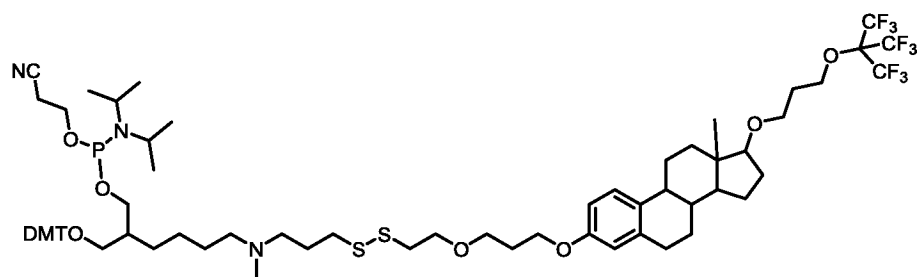
Формула (XIIb)-предшественник

[00217] Синтез Формулы (XIIb)-предшественника осуществляли в соответствии со следующей схемой синтеза:



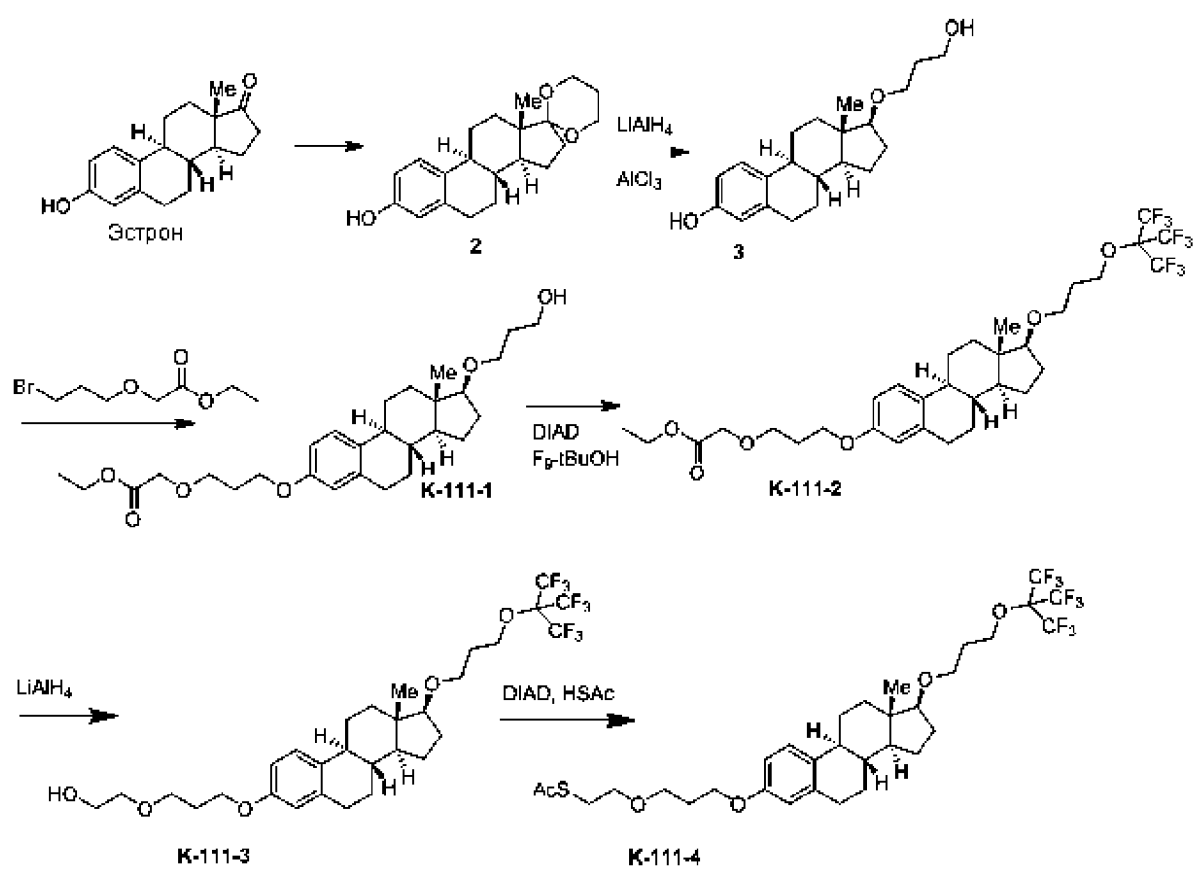


Пример 2j: Способ синтеза Формулы (XIIIa)-предшественника:



Формула (XIIIa)-предшественник

[00218] Синтез Формулы (XIIIa)-предшественника осуществляли в соответствии со следующей схемой синтеза:



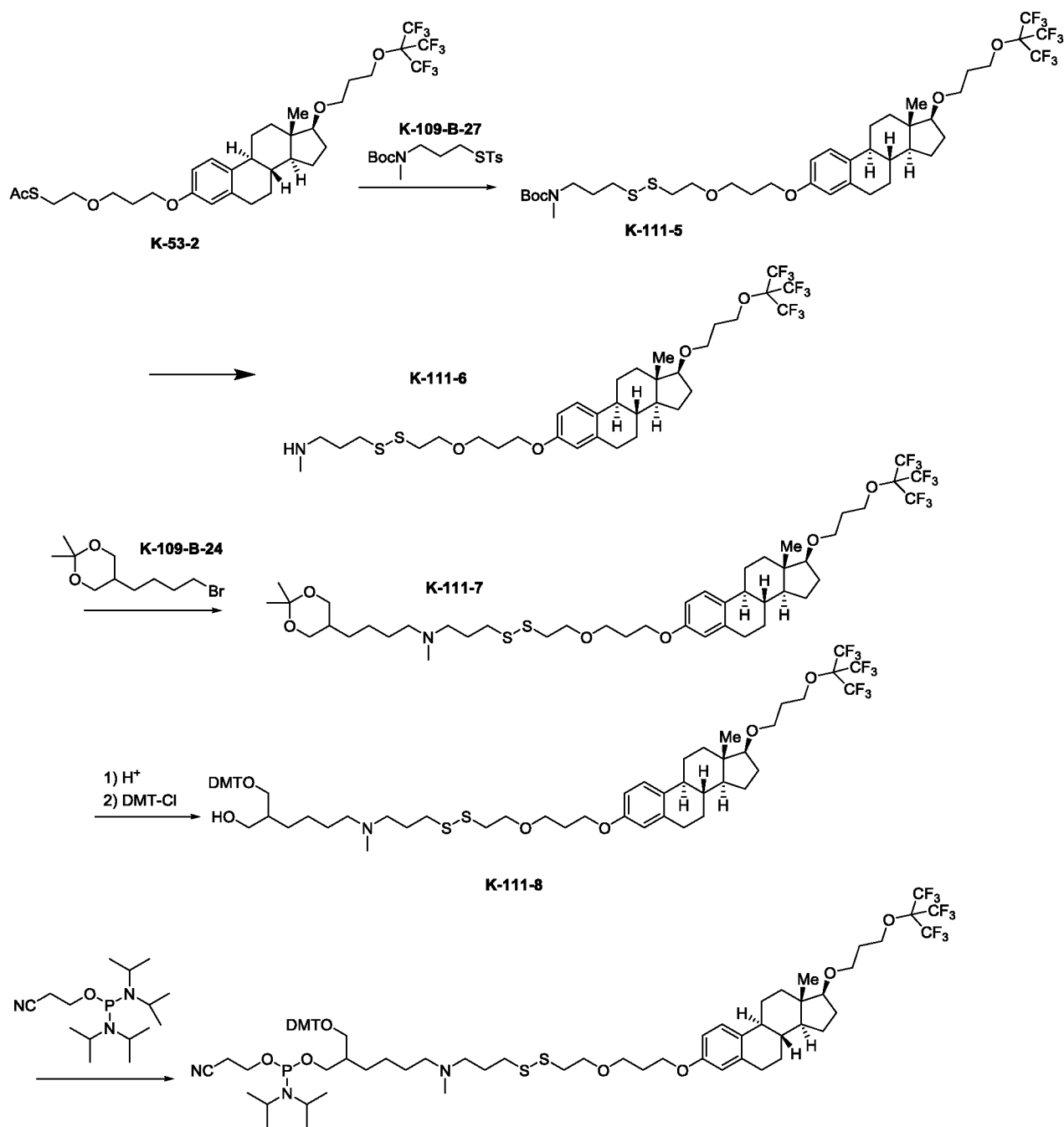
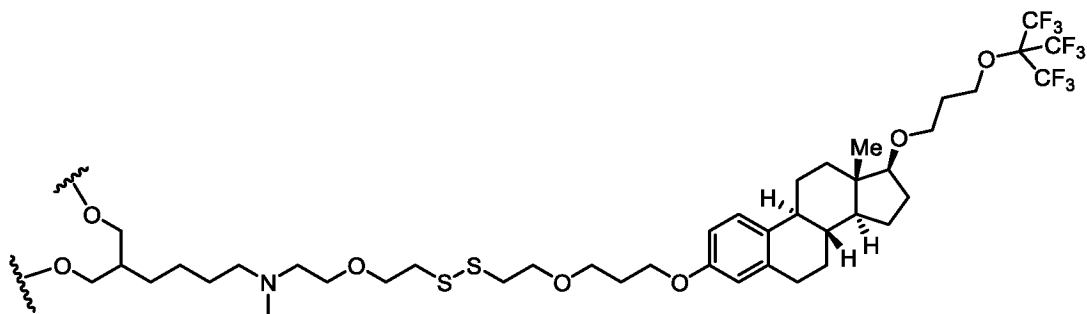


Схема 16. Синтез Формулы (XIIIa)-предшественника

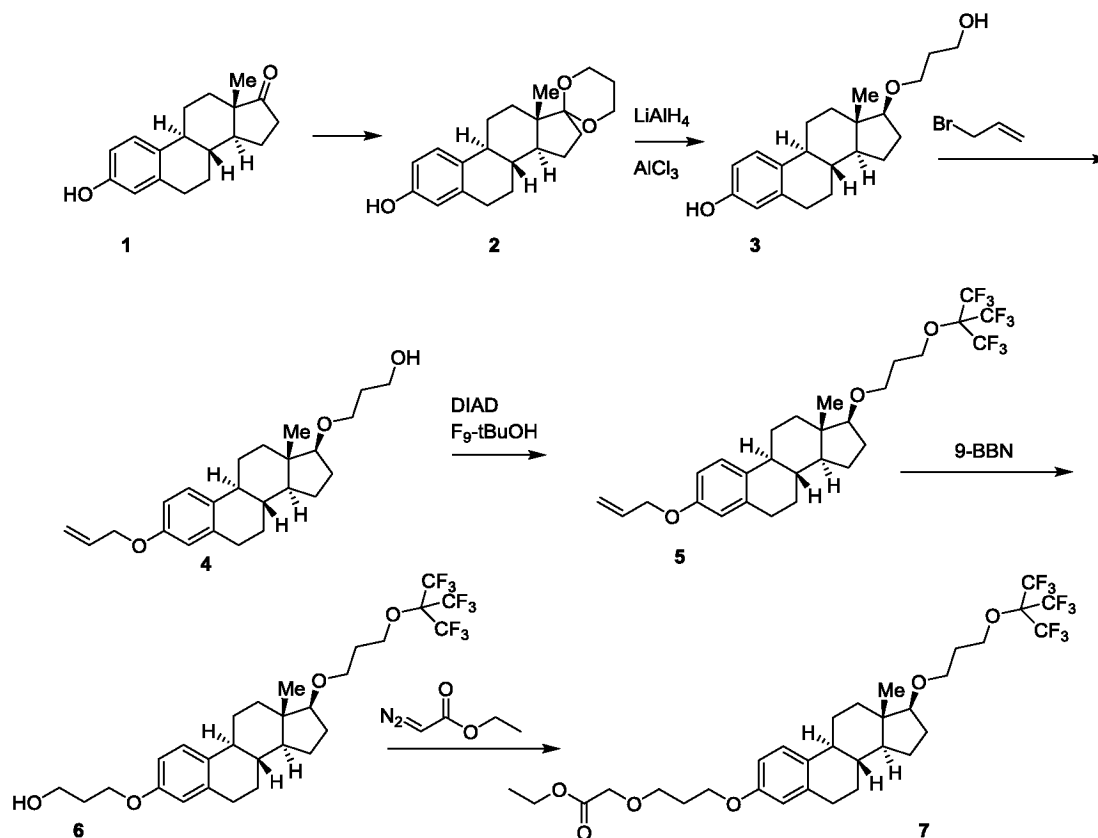
Пример 2к: Способ синтеза Формулы (XIIIb)-предшественника:



Формула (XIIIb)-предшественник

[00219] Основной отличительной особенностью **Формулы (XIIIb)-предшественника** является простая эфирная группа между дисульфидом и стероидной частью. С другой стороны дисульфида находится другая простая эфирная группа, а также третичный амин.

Синтез тиотозилата 10:



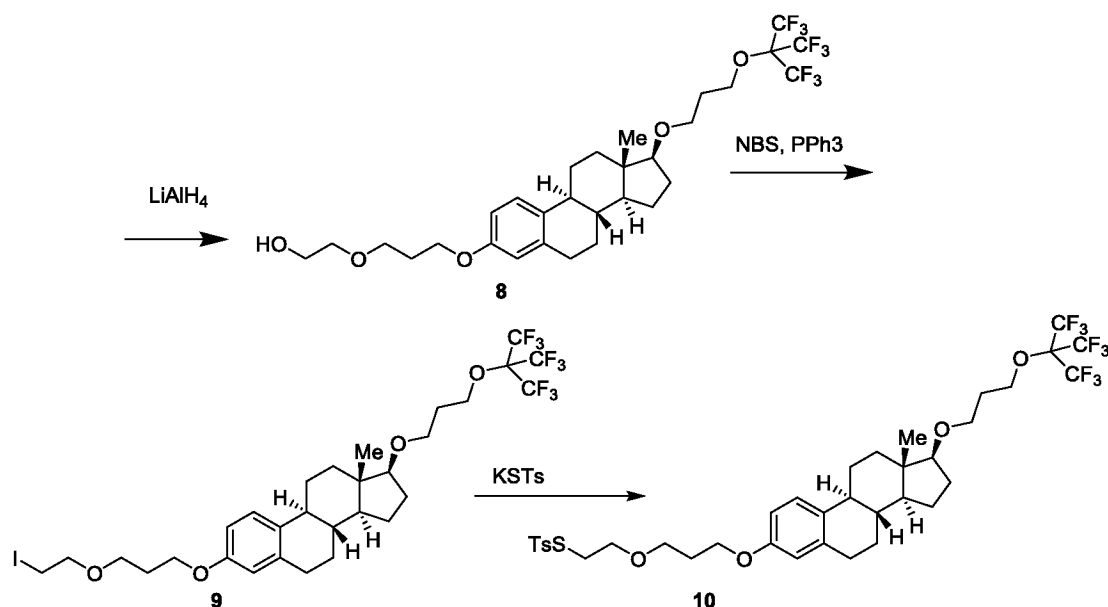


Схема 17. Синтез тиотозилата 10

[00220] Синтез начинали с защиты кетона 1,3-пропандиолом с получением соединения 2 с хорошей степенью чистоты. В результате раскрытия кольца ацетала под действием LiAlH_4 и AlCl_3 получали смесь соединения 3 и эстрадиола в соотношении около 85:15, последний является менее реакционноспособным, и его удаляли на следующих стадиях. В качестве реакционноспособного электрофила использовали аллилбромид. Селективное алкилирование фенола обеспечивает возможность последующего присоединения перфторированного *трет*-бутанола к алифатическому спирту в условиях реакции Мицунобу с получением соединения 5. Дальнейшая функционализация аллила посредством обработки 9-BBN с последующим восстановлением обеспечивает получение спирта 6. Полученный спирт можно удлинить этилдиазоцетатом с получением соединения 7. После восстановления до спирта, превращения в соответствующий иодид с последующим тиотозилированием получали соединение 10.

Синтез тиацетата 18:

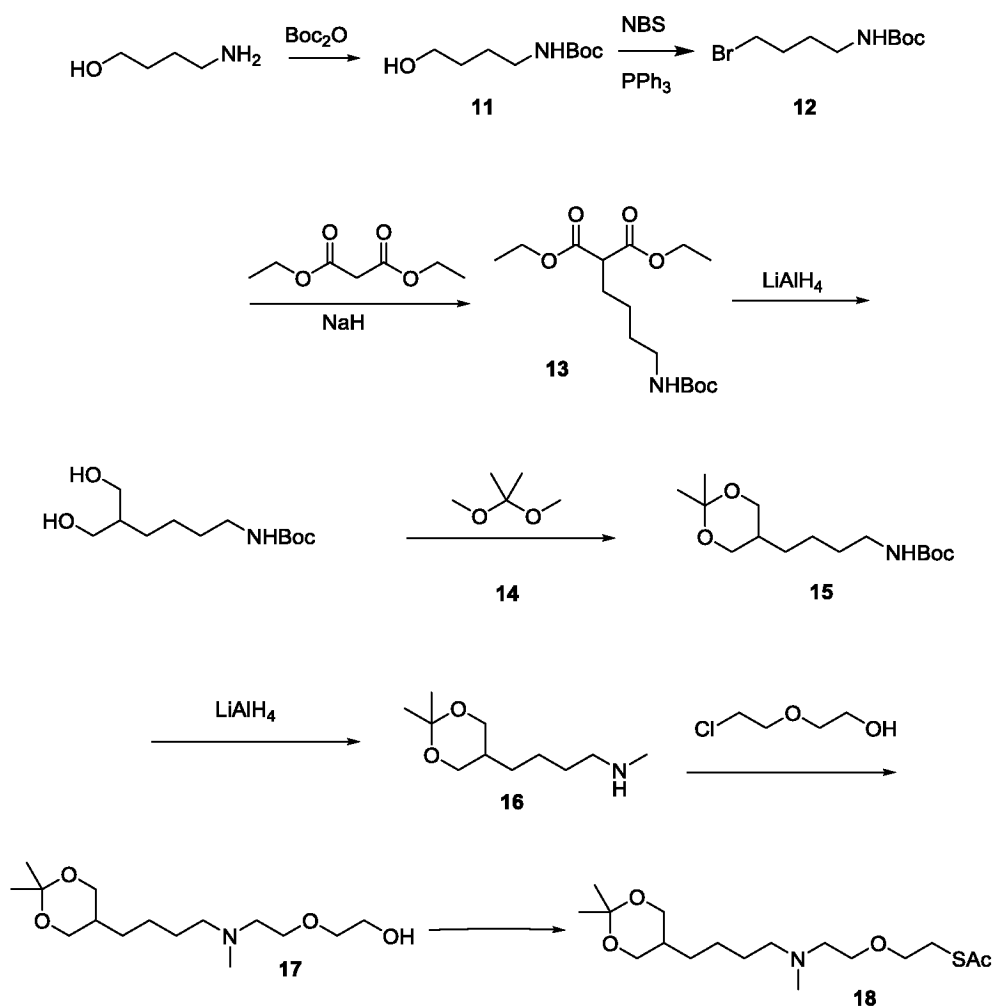


Схема 18. Синтез тиоацетата 18

[00221] Первой стадией синтеза строительного блока **18** была защита амина в аминобутаноле с образованием спирта **11**. Затем полученный спирт превращали в бромид **12** посредством обработки NBS и PPh_3 . Затем бромид алкилировали с помощью диэтилмалоната с получением сложного диэфира **13**. Обработка LiAlH_4 при комнатной температуре приводила к восстановлению указанных сложноэфирных групп, но не к восстановлению Boc -группы, в результате чего получали диол **14**. Затем в полученный диол внедряли защитную группу с получением ацетонида (**15**). Boc -группу восстанавливали обработкой LiAlH_4 при повышенной температуре с получением амина **16**. Алкилирование амина соответствующим хлоридом приводило к образованию соединения **17**. Гидроксифрагмент превращали в тиоацетат в условиях реакции Мицунобу с получением строительного блока **18**.

Синтез Формулы (XIIIb)-предшественника:

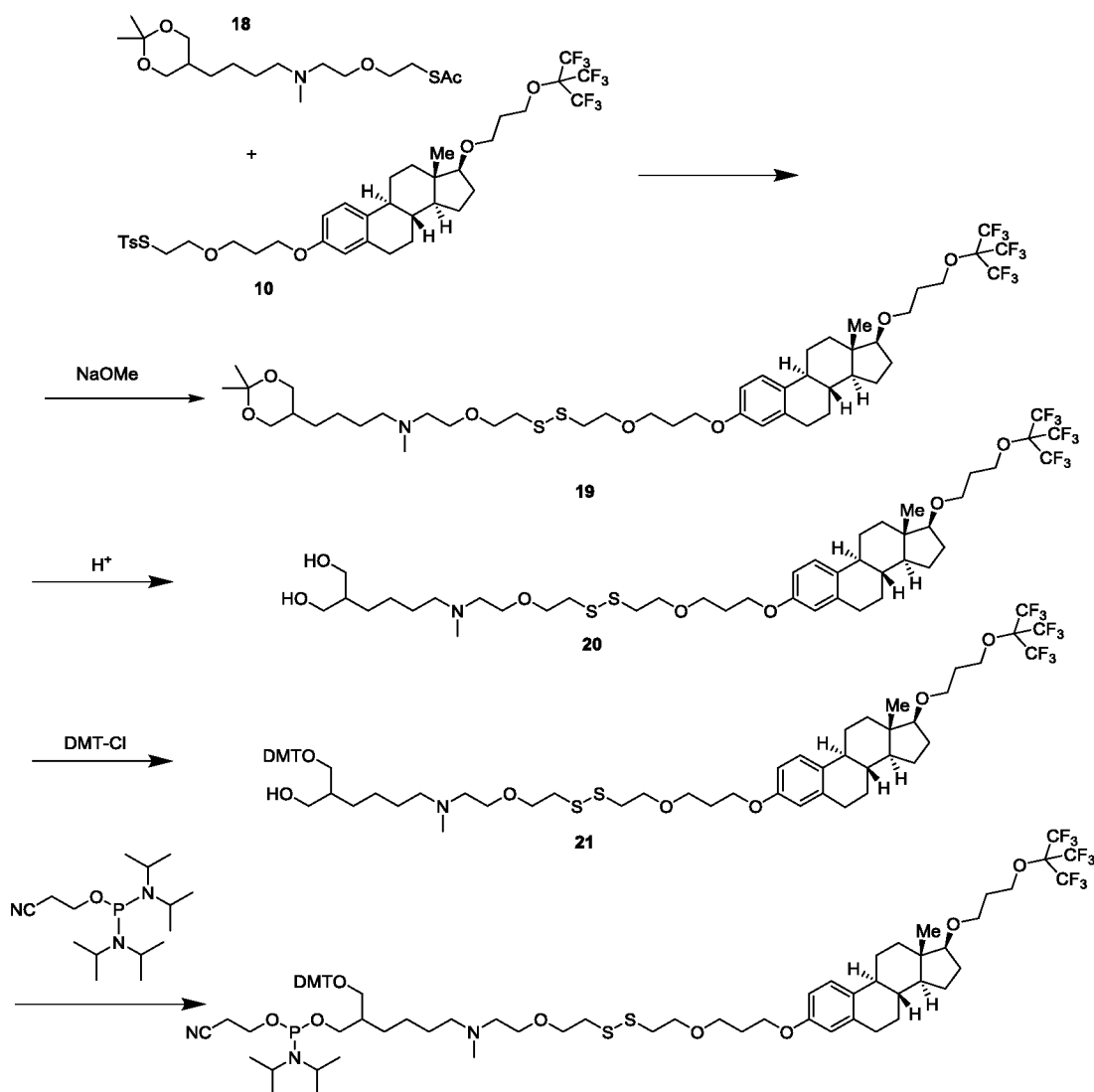


Схема 19: Синтез Формулы (XIIIb)-предшественника:

[00222] Смесь тиотозилата 10 и тиацетата 18 обрабатывали NaOMe с получением дисульфида 19. Ацетонидную группу удаляли обработкой кислотой с получением диола 20. Присоединяли группу DMT к одной из спиртовых групп с получением соединения 21. Наконец, в результате образования фосфорамидита получали **Формулу (XIIIb)-предшественник**.

Экспериментальный раздел:

Синтез тиотозилата 10:

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

[00223] К суспензии эстрона (252 г, 0,93 моль) в толуоле (1,5 л) добавляли триметоксиметан (297 г, 350 мл, 2,80 моль), пропан-1,3-диол (213 г, 250 мл, 2,80 моль) и pTsOH (2 г, 10 ммоль). Смесь нагревали до 60 °С и перемешивали в течение 16 часов. Добавляли триэтиламин (6 мл) и воду (600 мл) и продолжали перемешивание еще 1 час. Фазы разделяли и промывали органический слой водой (3 x 400 мл) и насыщенным соевым раствором. Смесь сушили над Na₂SO₄ и частично концентрировали до около 1 л. Смесь выливали в гептан (4 л) и отфильтровывали белое твердое вещество, промывали гептаном и сушили in vacuo. Соединение **2** (271 г, 825 ммоль) выделяли в виде белого твердого вещества с выходом 88,5%.

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

[00224] К раствору (13S)-13-метил-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-декагидроспиро[циклопента[а]фенантрен-17,2'-[1,3]диоксан]-3-ола (**2**, 60,7 г, 185 ммоль) в ТГФ при 0 °С осторожно добавляли алюмогидрид лития (8,42 г, 222 ммоль), затем по частям добавляли хлорид алюминия (98,6 г, 739 ммоль) (большой экзотермический эффект!). Перемешивали в течение 15 минут при 0 °С, затем нагревали до 50 °С. Перемешивали 2 часа при 50 °С (вследствие налипания на ротационный испаритель), затем охлаждали до 0 °С и начинали гасить реакцию, по каплям добавляя NH₄Cl (водн.) (500 мл). Перемешивали 1 час при комнатной температуре. Разделяли фазы и промывали органический слой насыщенным соевым раствором, концентрировали. Получали белое твердое вещество (65 г) с примесью эстрадиола (около 15%).

3-(((8R,9S,13S,14S,17S)-3-(Аллилокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-17-ил)окси)пропан-1-ол (4)

[00225] Суспензию соединения **3** (10,1 г, 30,6 ммоль) и карбоната калия (8,45 г, 61,1 ммоль) в смеси MeOH/ацетон обрабатывали аллилбромидом (7,39 г, 5,28 мл, 61,1 ммоль). Нагревали до кипения с обратным холодильником в течение 4 часов, затем наблюдали полное превращение. Охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и концентрировали. Добавляли дихлорметан (250 мл) и промывали насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали.

Неочищенное вещество (12,8 г, 34,5 ммоль) использовали в таком виде для следующих химических превращений:

(8R,9S,13S,14S,17S)-3-(Аллилокси)-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 (5)

[00226] К раствору соединения **4** (12,78 г, 34,49 ммоль) и трифенилфосфина (13,57 г, 51,74 ммоль) в ТГФ (300 мл) добавляли 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ол (12,21 г, 7,23 мл, 51,74 ммоль) и ди-трет-бутил-(Е)-диазен-1,2-дикарбоксилат (10,32 г, 44,84 ммоль). Смесь перемешивали 16 часов при комнатной температуре и затем концентрировали.

[00227] После очистки флэш-хроматографией (градиент от 5% до 10% EtOAc в гептане) выделяли соединение **5** (16,7 г, 28,4 ммоль) в виде желтоватого маслянистого вещества с выходом 82%.

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

[00228] 9-BBN (5,54 г, 90 мл, 45,4 ммоль) по каплям добавляли к раствору неочищенного соединения **5** (16,7 г, 28,4 ммоль) в ТГФ (250 мл) при 0 °С и после завершения добавления перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Раствор охлаждали до 0 °С и медленно, по каплям одновременно добавляли гидроксид натрия (20 г, 16 мл, 148 ммоль) и пероксид водорода (14 г, 13 мл, 148 ммоль), и энергично перемешивали полученную гетерогенную смесь при комнатной температуре в течение около 1 часа. Реакционную смесь декантировали и разделяли между EtOAc (700 мл) и насыщенным солевым раствором (100 мл). Органическую фазу промывали дополнительным количеством насыщенного солевого раствора (100 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали под вакуумом. После дополнительной очистки концентрата флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 25% до 35% EtOAc в гептанах) получали соединение **6** (13,6 г, 22,4 ммоль) с выходом 79,0%.

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

[00229] Соединение **6** (13,6 г, 22,4 ммоль) и этил-2-диазоацетат (3,0 г, 2,8 мл, 22,4 ммоль) растворяли в ДХМ (250 мл) и при 0 °С добавляли BF₃·OEt₂ (31,8 мг, 28,4 мкл, 224 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 15 минут и при комнатной температуре в течение 3 часов до прекращения наблюдаемого выделения газа. По данным ТСХ, не наблюдали полного превращения. Добавляли дополнительное количество этил-2-диазоацетата (5 мл) и BF₃·OEt₂ и продолжали перемешивание в течение 2 часов. Смесь разбавляли ДХМ (200 мл), добавляли триэтиламин (1 мл) и промывали смесь водой (100 мл) и насыщенным солевым раствором (50 мл), и сушили над Na₂SO₄. Растворители удаляли под вакуумом и дополнительно очищали флэш-хроматографией (градиент от 5%

до 10% EtOAc в гептане) с получением соединения **7** (5,5 г, 7,9 ммоль) в виде прозрачного желтоватого маслянистого вещества с выходом 35%.

[00230] **2-(3-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*))-17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)пропокси)этан-1-ол (8)**. К суспензии LiAlH₄ (0,36 г, 9,5 ммоль) в ТГФ (100 мл) при 0 °С по каплям добавляли раствор соединения **7** (5,5 г, 7,9 ммоль). Смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем гасили, добавляя 20% KOH в воде (1,7 мл). Суспензию перемешивали еще 1 час, затем фильтровали через короткий слой целита. Концентрировали. Соединение **8** (4,81 г, 7,4 ммоль) выделяли с выходом 93% и использовали в таком виде для следующих химических реакций.

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

[00231] К раствору соединения **8** (4,81 г, 7,39 ммоль), имидазола (604 мг, 8,87 ммоль) и трифенилфосфина (2,33 г, 8,87 ммоль) в дихлорметане (250 мл) добавляли иод (2,06 г, 8,13 ммоль) при 0 °С. Смесь перемешивали в течение 16 часов, затем добавляли насыщенный водный раствор тиосульфата натрия и разделяли фазы. Органический слой промывали насыщенным соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток растворяли в гептане, оставляли стоять для образования осадка и отфильтровывали твердое вещество. Концентрировали.

[00232] После дополнительной очистки с помощью флэш-хроматографии (5% EtOAc в гептане) получали соединение **9** (3,90 г, 5,13 ммоль) в виде прозрачного маслянистого вещества с выходом 69%.

S-(2-(3-(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*))17-(3-((1,1,1,3,3,3-Гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)пропокси)этил)-4-метилбензолсульфонотиоат (10)

[00233] Соединение **9** (3,90 г, 5,13 ммоль) растворяли в ДМФА и добавляли 4-метилбензолсульфонотиоат калия (1,72 г, 7,6 ммоль). Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. ТСХ показала лишь частичное превращение. Смесь нагревали до 50 °С в течение 4 часов и затем охлаждали до комнатной температуры. Добавляли EtOAc (50 мл), затем гептан (100 мл) и промывали 3 х водой, затем один раз насыщенным соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Проводили дополнительную очистку с помощью флэш-хроматографии (5% – 15% EtOAc в

гептане). Соединение **10** (3,45 г, 4,2 ммоль) выделяли в виде чистого маслянистого вещества с выходом 83%.

Синтез тиацетата 18:

трет-Бутил-(4-гидроксibuтил)карбамат (11)

[00234] К раствору 4-аминобутан-1-ола (25 г, 0,28 моль) в ДХМ (50 мл) медленно добавляли раствор ди-трет-бутилдикарбоната (61 г, 0,28 моль) в ДХМ (150 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 90 минут, после чего уже не наблюдали образование газа. Смесь разбавляли ДХМ (200 мл), промывали 1 М раствором HCl (400 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением трет-бутил-(4-гидроксibuтил)карбамата (**11**, 43 г, 82%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

трет-Бутил-(4-бромбутил)карбамат (12)

[00235] К раствору трет-бутил-(4-гидроксibuтил)карбамата (**11**, 23 г, 120 ммоль) в ДХМ (500 мл) добавляли трифенилфосфин (44 г, 170 ммоль) и медленно добавляли NBS (25 г, 143 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Смесь промывали NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Добавляли гептан (500 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Образовавшееся твердое вещество удаляли фильтрованием и концентрировали фильтрат с получением трет-бутил-(4-бромбутил)карбамата (**12**, 32,8 г, 130 ммоль, колич.) в виде прозрачного маслянистого вещества.

Диэтил-2-(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)малонат (13)

[00236] К ледяной суспензии гидрида натрия (6,8 г, 0,17 моль) в ДМФА (500 мл) медленно добавляли диэтилмалонат (27 г, 26 мл, 0,17 моль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь снова охлаждали до 0 °C и добавляли трет-бутил-(4-бромбутил)карбамат (**12**, 75 г, 0,17 моль). Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали 18 часов. Реакционную смесь гасили 1 н. раствором HCl (300 мл) и водой (1,3 л). Смесь экстрагировали смесью гептан/EtOAc (1/1, 2 x 250 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (500 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (20% EtOAc/гептан) с получением сложного диэфира **13** (48 г, 0,14 моль, 85%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

трет-Бутил-(6-гидрокси-5-(гидроксиметил)гексил)карбамат (14)

[00237] К ледяному раствору LiAlH_4 (8,7 г, 0,23 моль) в ТГФ (750 мл) по каплям добавляли сложный диэфир **13** (19 г, 57 ммоль) в ТГФ (100 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакцию гасили, медленно добавляя 20% КОН (водн., 37 мл) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего ее фильтровали через целит. Фильтрат сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением диола **14** (12 г, 50 ммоль, 86%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

трет-Бутил-(4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)карбамат (15)

[00238] К раствору диола **14** (22 г, 90 ммоль) в ТГФ (300 мл) добавляли 2,2-диметоксипропан (28 г, 34 мл, 270 ммоль) и гидрат 4-метилбензолсульфоновой кислоты (3,4 г, 18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Смесь разбавляли EtOAc (300 мл) и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (300 мл). Водный слой еще один раз экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением ацетонида **15** (21,6 г, 83,4%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

4-(2,2-Диметил-1,3-диоксан-5-ил)-N-метилбутан-1-амин(16)

[00239] К суспензии LiAlH_4 (2,2 г, 58 ммоль) в ТГФ (300 мл) добавляли ацетонид **15** (11 г, 39 ммоль) и перемешивали полученную смесь при 70 °С в течение 16 часов. Смесь оставляли остывать до комнатной температуры. Затем смесь охлаждали до 0 °С и гасили реакцию, медленно добавляя КОН (20%, 9,3 мл) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Смесь фильтровали через целит, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением метиламина **16** (7,8 г, 39 ммоль, колич.) в виде прозрачного маслянистого вещества.

2-(2-((4-(2,2-Диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)(метил)амино)этокси)этан-1-ол (17)

[00240] К раствору амина **16** (4,1 г, 20 ммоль) в MeCN (150 мл) добавляли 2-(2-хлорэтокси)этан-1-ол (2,5 г, 2,1 мл, 20 ммоль), иодид калия (0,34 г, 2,0 ммоль) и карбонат калия (5,6 г, 41 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение 40 часов при 80 °С. Смесь разбавляли водой (100 мл) и NaHCO_3 (100 мл) и экстрагировали ДХМ (2 x 200 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (3% 7 М NH_3 в MeOH: 97% ДХМ) с получением спирта **17** (2,9 г, 10 ммоль, 49%) в виде желтоватого маслянистого вещества.

S-(2-(2-((4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)бутил)(метил)амино)этокси)этил)этантаноат (18)

[00241] К раствору спирта **17** (2,9 г, 10 ммоль) в ТГФ (100 мл) добавляли трифенилфосфин (4,2 г, 16 ммоль) и ди-трет-бутил-(Е)-дiazен-1,2-дикарбоксилат (3,0 г, 13 ммоль) и перемешивали полученную смесь 5 минут. Затем добавляли тиоуксусную кислоту (0,99 г, 0,94 мл, 13 ммоль), и смесь, по большей части, обесцвечивалась. Полученную смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали и очищали неочищенный материал колоночной хроматографией (20% ацетона в гептане + 1% NEt₃) с получением тиацетата **18** (3,5 г, 10 ммоль, колич.) в виде желтого маслянистого вещества.

Сборка Формулы (XIIIb)-предшественника:

4-(2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)-N-(2-(2-((2-(3-(((13S,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)пропокси)этил)дисульфанил)этокси)этил)-N-метилбутан-1-амин (19)

[00242] К раствору тиотозилата **10** (1,1 г, 1,3 ммоль) и тиацетата **18** (0,70 г, 2,0 ммоль) в ДХМ (100 мл) и MeOH (10 мл) добавляли раствор метоксида натрия (5,4 М, 0,50 мл, 2,7 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа. Смесь разбавляли ДХМ (100 мл), промывали NaHCO₃ и насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (10-20% ацетон/гептан + 1% NEt₃) с получением дисульфида **19** (0,58 г, 0,6 ммоль, 45%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

2-(1-(((13S,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)-14-метил-4,11-диокса-7,8-дитиа-14-азаоктадекан-18-ил)пропан-1,3-диол (20)

[00243] К раствору дисульфида **20** (0,58 г, 0,60 ммоль) в MeOH (50 мл) (для растворения добавляли дополнительное количество ДХМ) добавляли *p*-толуолсульфоновую кислоту (0,14 г, 0,72 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь концентрировали и растворяли остаток в ДХМ (100 мл). Смесь промывали NaHCO₃ и насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением диола **20** (0,53 г, 0,57 ммоль, 95%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

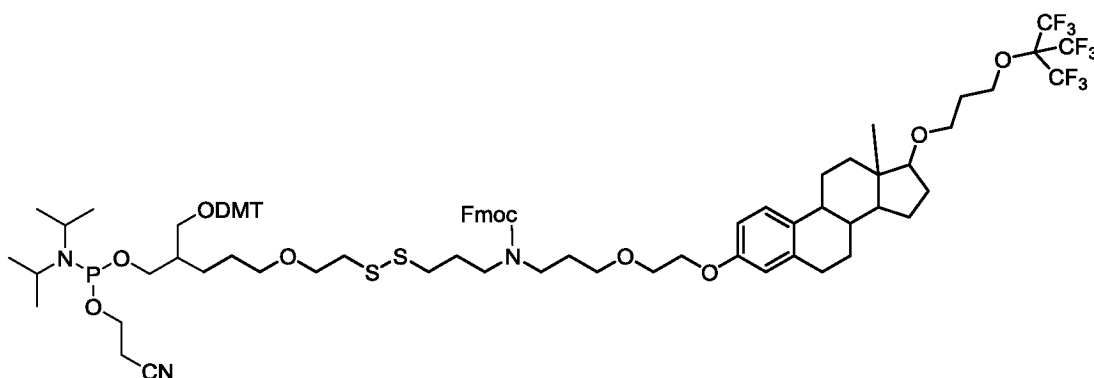
19-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-1-(((13S,17S)-17-(3-((1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-(трифторметил)пропан-2-ил)окси)пропокси)-13-метил-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-декагидро-6H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)-14-метил-4,11-диокса-7,8-дитиа-14-азаикозан-20-ол (21)

[00244] К раствору диола **20** (1,0 г, 1,1 ммоль) в ДХМ (50 мл) добавляли триэтиламин (0,22 г, 0,30 мл, 2,2 ммоль), DMAP (13 мг, 0,11 ммоль) и, наконец, 4,4'-(хлор(фенил)метил)ен)бис(метоксибензол) (0,36 г, 1,1 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение 16 часов при комнатной температуре. Смесь промывали NaHCO_3 и насыщенным солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (20-25% ацетона в гептане + 1% NEt_3 , используя диоксид кремния, предварительно обработанный NEt_3) с получением соединения **21** (0,96 г, 0,78 ммоль, 72%) в виде прозрачного желтоватого маслянистого вещества.

19-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-1-(((13S,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)-14-метил-4,11-диокса-7,8-дитиа-14-азаикозан-20-ил (2-цианозтил)диизопропилфосфорамидит [Формула (XIIIb)-предшественник].

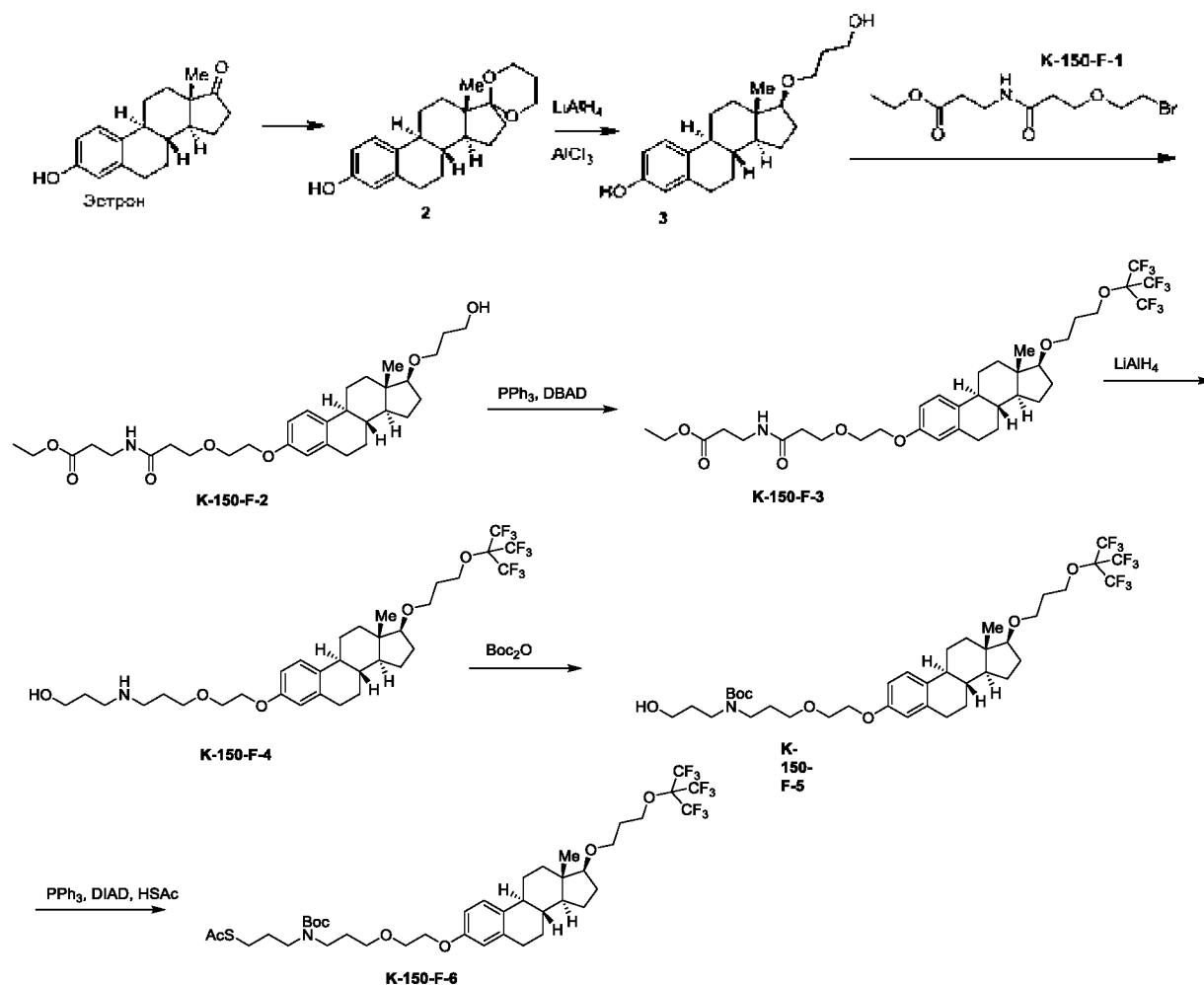
[00245] К раствору спирта **21** (0,96 г, 0,78 ммоль) в ДХМ (50 мл) добавляли 3-((бис(диизопропиламино)фосфанил)окси)пропаннитрил (0,31 г, 0,32 мл, 1,0 ммоль) и раствор NMM и ТФК (2,0 мл, 0,5 М NMM и 0,25 М ТФК, 1,3 экв. NMM) в ДХМ. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, после чего ТСХ показала частичное превращение. Добавляли дополнительное количество фосфанила (0,5 экв.) и раствора NMM/ТФК (0,5 экв. NMM) и перемешивали смесь в течение 1 часа. ТСХ показала полное превращение. Смесь промывали NaHCO_3 и насыщенным солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (20% ацетона в гептане + 1% NEt_3 , используя диоксид кремния, предварительно обработанный NEt_3) с получением **Формулы (XIIIb)-предшественника** (0,96 г, 0,67 ммоль, 86%) в виде прозрачного маслянистого вещества.

Пример 2L: Синтез Формулы (XIV-F)-предшественника:



Формула (XIV-F)-предшественник

[00246] Исходя из соединения **3**, указанный фенол можно алкилировать бромидом **K-105-F-1** (см. ниже). Затем можно вводить перфтор-фрагмент в условиях реакции Мицунобу (**K-150-F-3**). Амид и сложный эфир одновременно восстанавливают, и затем в образовавшийся вторичный амин можно вводить защитную Вос-группу. Окончательное введение тиацетатной группы в условиях реакции Мицунобу приводит к получению строительного блока **K-150-F-6**.



Схем 20. Синтез тиацетата **K-150-F-6**

[00247] Самым быстрым способом получения требуемого строительного блока **K-150-F** является раскрытие кольца 1,5-диоксепан-2-она с использованием бета-аланина. Раскрытие кольца с использованием бета-аланина обеспечивает получение амида **K-150-F-7**. Эстерификация с помощью EtOH обеспечивает защиту карбоновой кислоты. Последующее превращение спирта в бромид приводит к образованию строительного блока **K-105-F-1**, который затем алкилируют в фенол.

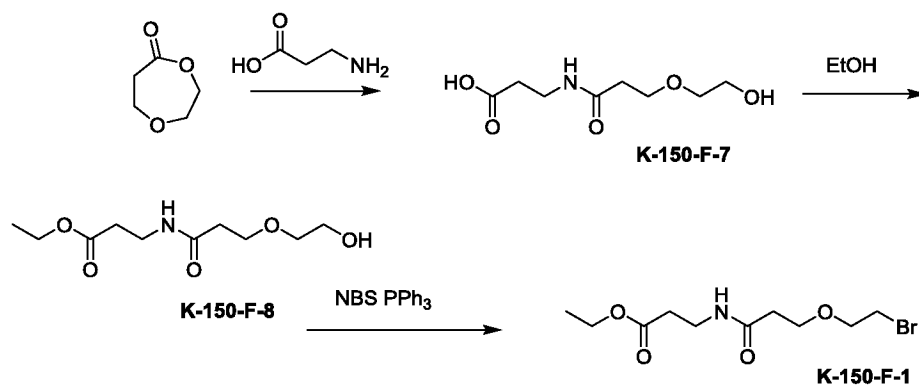
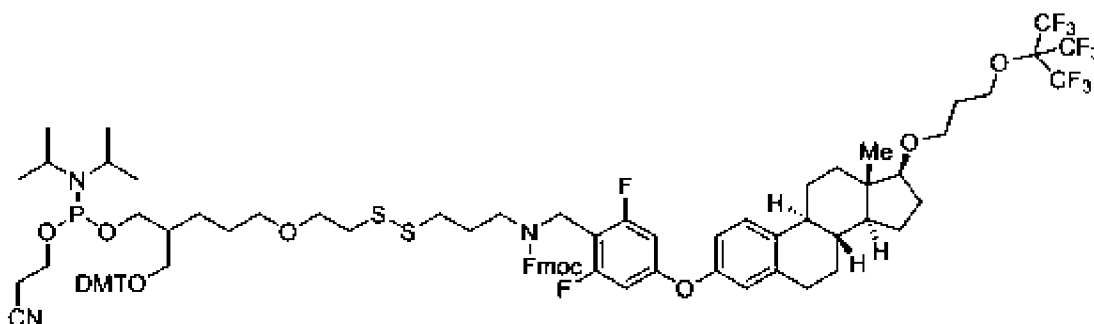


Схема 21. Синтез бромида K-150-F-1

Сборка Формулы (XIV-F)-предшественника

[00248] Сборка начинается с образования дисульфидной связи между строительными блоками K-150-F-6 и тиотозилатом 6. Затем одновременно удаляют ацетонидный фрагмент и Вос-группу посредством обработки кислотой. Затем можно обеспечить защиту свободного вторичного амина Fmoc-группой. Последующее присоединение DMT и образование фосфорамидита обеспечивает получение **Формулы (XIV-F)-предшественника**.

Пример 2m: Синтез Формулы (XV-F)-предшественника:



Формула (XV-F)-предшественник

[00249] **Формулу (XV-F)-предшественник** получают из тиотозилата 13 (схема 22) и строительного блока 7 (схема 23):

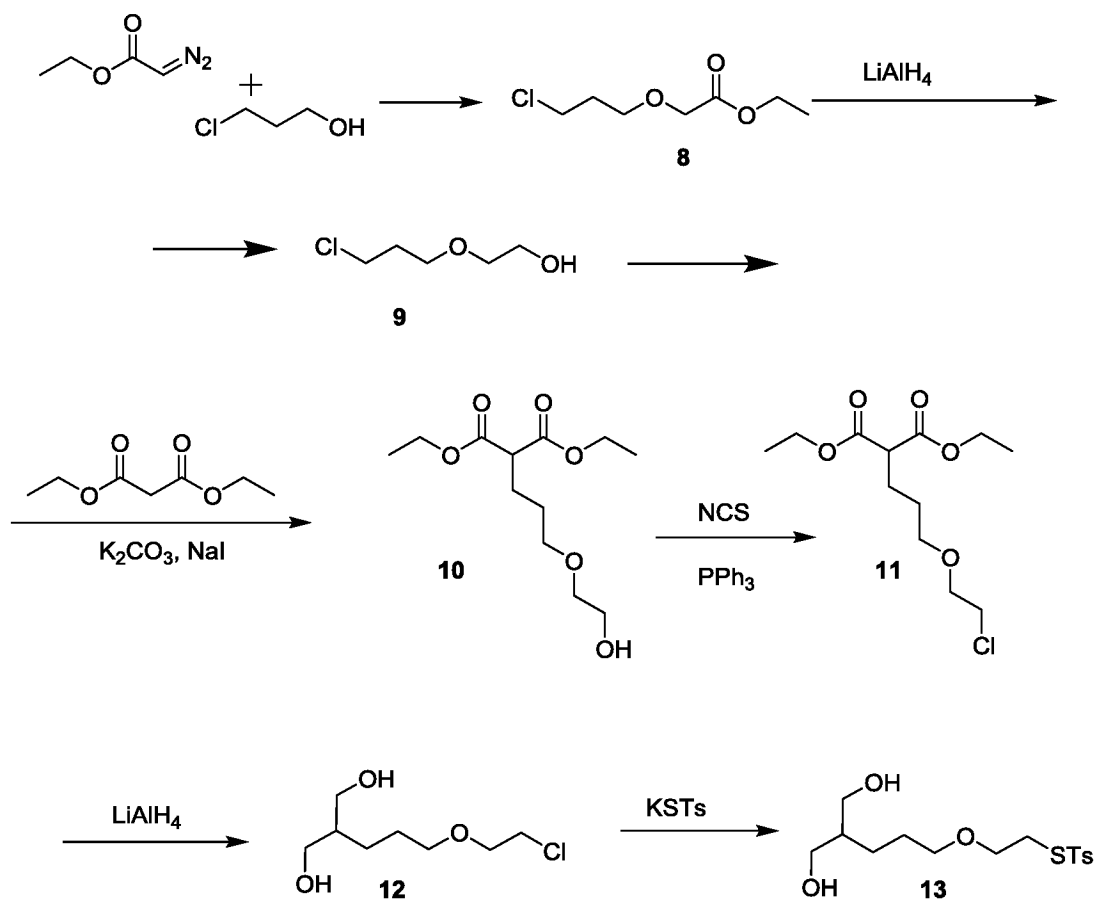


Схема 22. Синтез строительного блока тиотозилата 13

[00250] Второй строительный блок, соединение 7, синтезируют так, как показано на схеме 23:

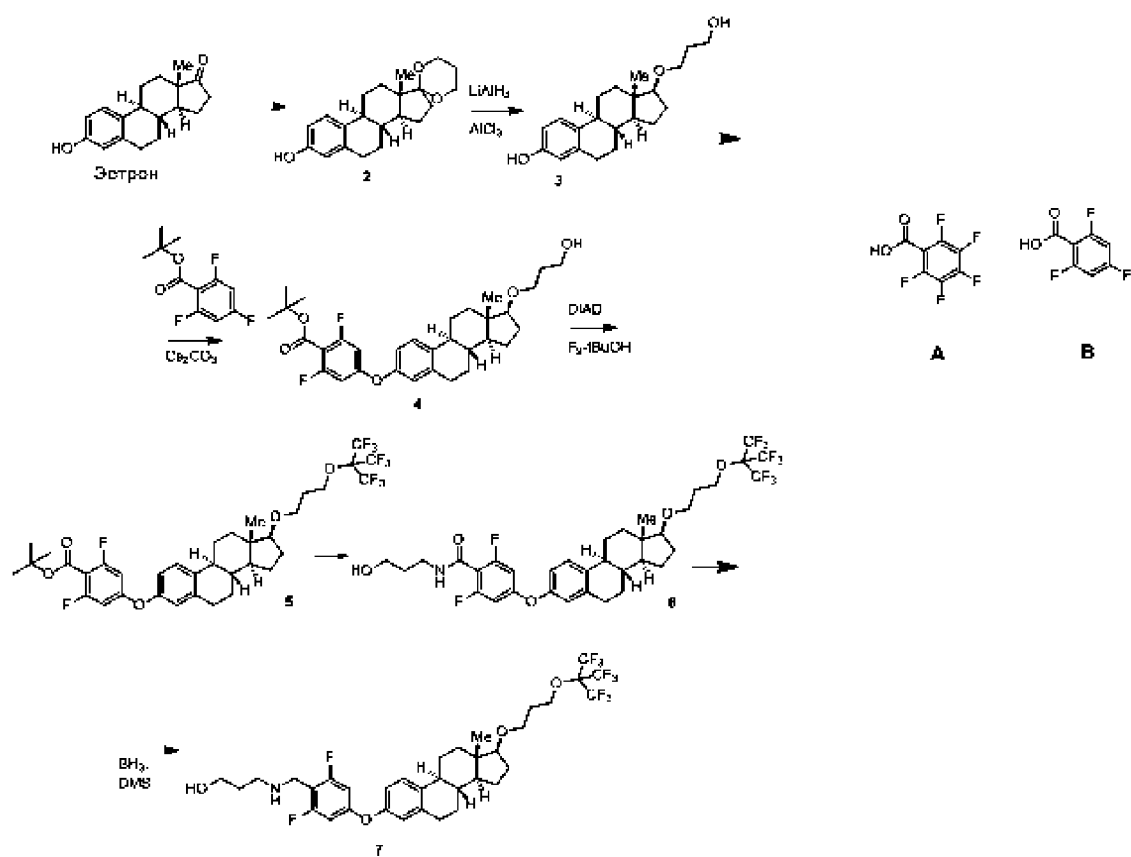
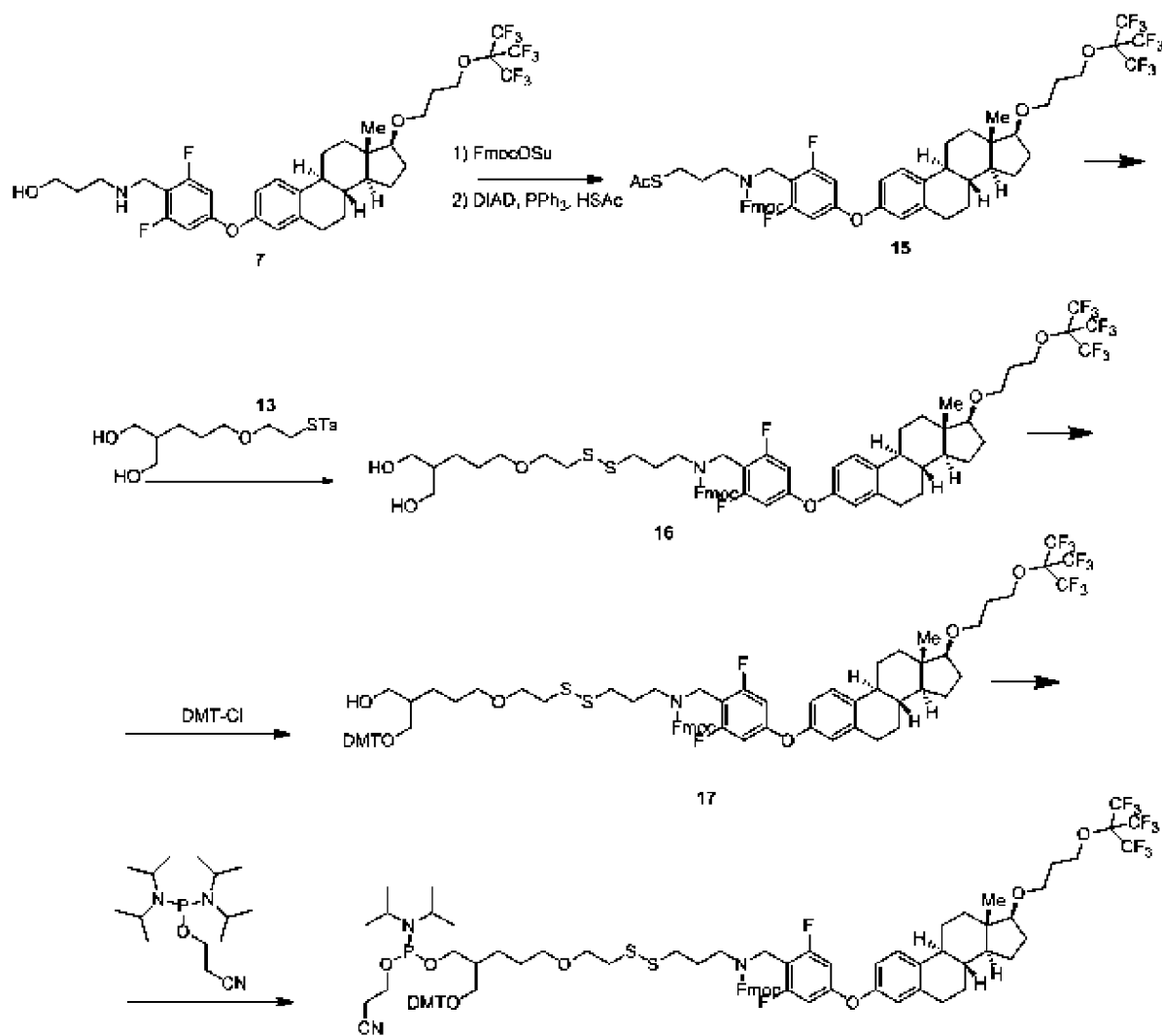


Схема 23. Синтез строительного блока 7

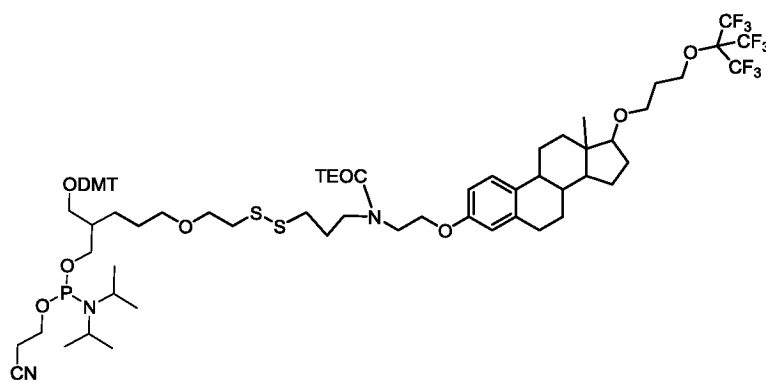
Сборка и завершение синтеза Формулы (XV-F)-предшественника:



Формула (XV-F)-предшественник

Схема 24. Стратегия синтеза Формулы (XV-F)-предшественника

Пример 2n: Способ синтеза Формулы (VIII-F)-предшественника:



Формула (VIII-F)-предшественник

[00251] Синтез начинают с синтеза ключевого строительного блока, *тиотозилата* **16**, который осуществляют в соответствии со следующей *схемой 25*:

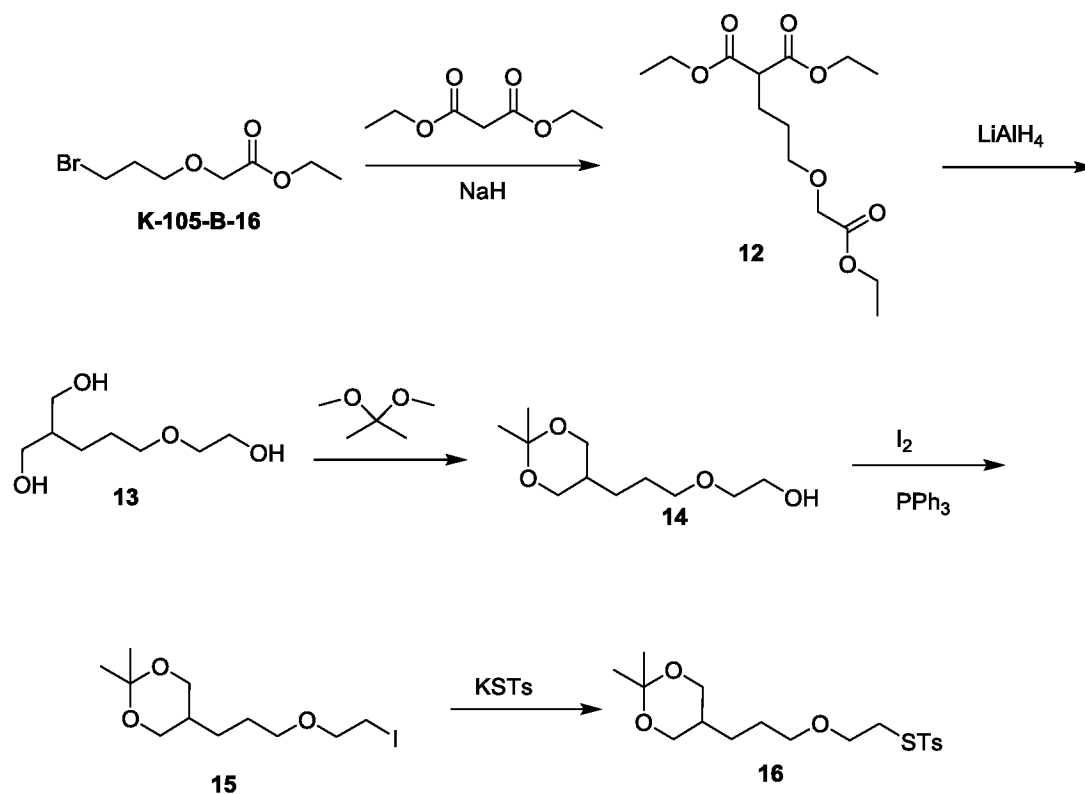
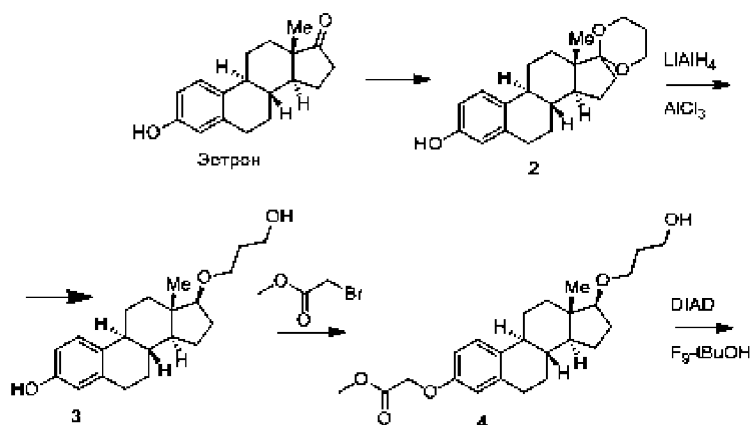


Схема 25. Синтез тиотозилата 16.

[00252] Затем продолжают синтез, синтезируя *тиоацетат K-93-F-4*, который получают в соответствии со следующей *схемой синтеза 26*:



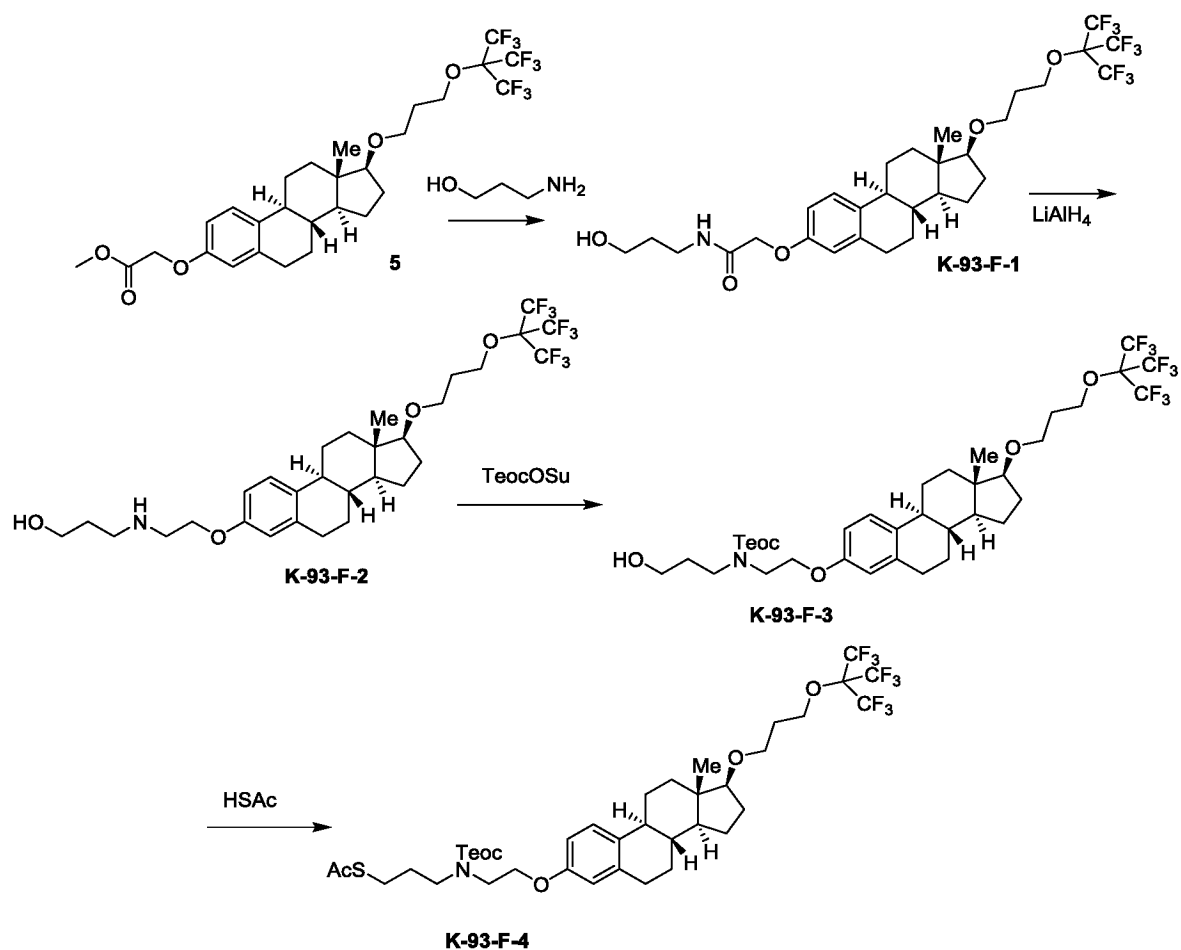


Схема 26. Синтез тиацетата **K-93-F-4**

[00253] В соединение **F-2** вводили защитную Теос-группу с получением соединения **F-3** с выходом 95%. Синтез тиацетата **F-4** осуществляли с выходом около 60%. Выделяли 1,76 г. Получив ключевые фрагменты, тозилат **16** и тиацетат **K-93-F-4**, затем проводили синтез в соответствии со **схемой 27**:

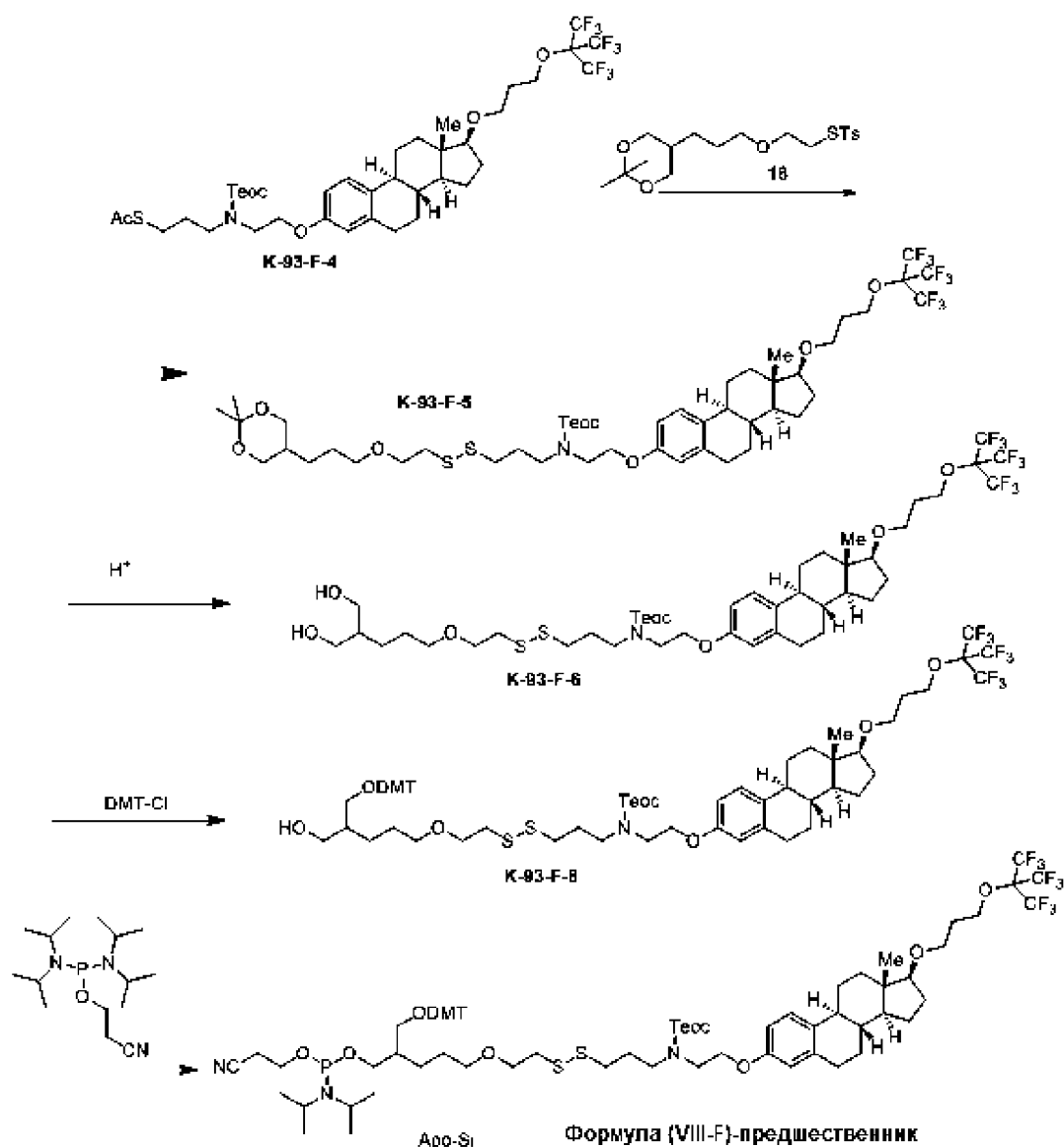
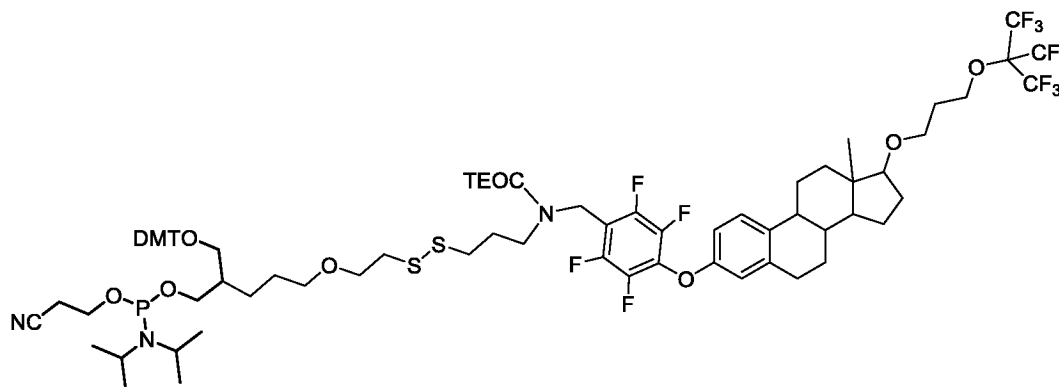


Схема 27: Завершение синтеза Формулы (VIII-F)-предшественника

[00254] Сначала связывали фрагменты тиотозилата **16** и тиацетата **K-93-F-4** с образованием дисульфидной связи с получением промежуточного соединения **K-95-F-5**. **F-5** обрабатывали рTsOH в MeOH для высвобождения диола с получением соединения **F-6** (выход 93%; 1,3 г). Затем осуществляли снятие одной защитной группы с **F-6** с помощью DMT-Cl с получением соединения **F-8**. Затем присоединяли фосфорамидит, соединение **Формулы (VIII-F)-предшественник (Теос)** выделяли с выходом 1,004 г и хранили в пробирках для транспортировки. Следует упомянуть, что **Теос** в качестве защитной группы является относительно стабильной в отношении действия кислот, оснований, а также в отношении действия восстановительных и окислительных агентов, но ее можно без труда удалить посредством добавления фторидов, что обеспечивает ее пригодность в качестве защитной группы для аминов во время синтеза олигонуклеотидов. Таким образом, при синтезе фрагментов **Е** по данному изобретению указанная защитная группа может играть

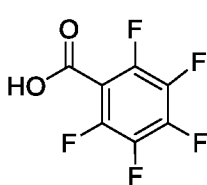
роль в образовании вторичных аминов, присутствующих в соединениях в соответствии с Формулами (VIII-H), (XIV-H) и (XV-H).

Пример 2р: Способ синтеза Формулы (XVI-F)-предшественника:

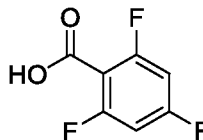


Формула (XVI-F)-предшественник

[00255] Синтез идентичен синтезу **Формулы (XV-F)-предшественника**, описанному в **примере 2m**; с двумя исключениями: (i). Исходным материалом для **фрагмента L** является пentaфторбензоат (**A**), а не дифторбензоат (**B**). (ii). Защитная группа для амина представляет собой ТОЕС, которую внедряли так, как описано в **примере 2n**;



A



B

Пример 3: Потенциальный механизм действия (МОА) конъюгата по данному изобретению, представляющего собой субстрат Дайсера, при трансмембранной доставке:

[00256] Потенциальный **механизм действия** конъюгатов по данному изобретению, содержащих **OD**, описан в данном документе неограничивающим образом. Указанный МОА включает четыре стадии:

1. Взаимодействие конъюгата с внешним слоем мембраны:

[00257] Если конъюгат по данному изобретению представляет собой миРНК или дмиРНК, связанный с 2-3 фрагментами **E**, указанный конъюгат приближается к внешнему

слою мембраны в том положении, в котором цилиндрический дуплекс РНК параллелен поверхности мембраны, а фрагменты E, E' или E'' ориентированы в сторону центральной части мембраны, перпендикулярно поверхности мембраны. Такое сближение приводит к закориванию OD на поверхности мембраны. Вынужденная близость РНК с высоким отрицательным зарядом к внешнему слою мембраны обуславливает энергетически невыгодную локальную деформацию, растягивание площади поверхности внешнего фосфолипидного слоя и нарушение гидратной оболочки вокруг фосфолипидных концевых групп, что в совокупности приводит к локальному изгибу мембраны.

2. Релаксация энергии изгиба:

[00258] Релаксация неблагоприятного изгиба мембраны происходит посредством *эндоцитоза, флип-флоп-перехода* или обоих вариантов. Оба процесса благоприятны для инициации и/или продолжения трансмембранной доставки конъюгата по данному изобретению, содержащего макромолекулярное лекарственное соединение, в цитоплазму, напрямую или через эндосомальный отдел.

3. Отделение фрагментов E, E' или E'' в цитоплазме в ходе редокс-опосредованного процесса с высвобождением лекарственного карго-соединения.

[00259] Несмотря на то, что для трансмембранного переноса конъюгатов миРНК или дмиРНК необходим один или более фрагментов E, E' или E'', как описано выше, необходимо удалять указанные доставочные фрагменты, как только конъюгат достигнет цитоплазмы, и выводить их из организма, высвобождая лекарственное карго-соединение с целью приближения его цитоплазматических сайтов действия. Если лекарственное карго-соединение представляет собой миРНК или дмиРНК, такое расщепление обеспечивает возможность предотвращения стерического затруднения при взаимодействии миРНК или дмиРНК с белковыми комплексами сайленсинга гена (Дайсер и RISC). Кроме того, такое отделение лекарственного карго-соединения от фрагментов E минимизирует нагрузку конъюгатов на клеточные фосфолипидные мембраны, что является преимущественной характеристикой с точки зрения безопасности. Для этого фрагменты E по данному изобретению содержат дисульфидный фрагмент. В окислительных условиях, таких как преобладают во внеклеточной среде, дисульфид проявляет высокую стабильность и, следовательно, обеспечивает возможность широкого распространения в организме конъюгата по данному изобретению, при его системном введении *in vivo*, и его контакта с огромным множеством клеточных мембран.

[00260] Напротив, цитоплазма является в высокой степени восстановительной средой, главным образом вследствие высоких концентраций восстановленного глутатиона (GSH), который постоянно вырабатывается в цитоплазме живой клетки, причем указанные концентрации в плазме примерно на три-четыре порядка выше, чем во внеклеточной среде: 1-5 мМ по сравнению с 3-5 мкМ.

[00261] Благодаря таким исключительным восстановительным условиям в цитоплазме, дисульфидные группы фрагментов **E** подвергаются устойчивому восстановлению в цитоплазматической среде. Затем происходит высвобождение лекарственного карго-соединения (например, дмиРНК) и проявление его фармакологического действия у сайтов-мишеней в цитоплазме (например, у белковых комплексов Дайсер и/или RISC для сайленсинга гена). После расщепления дисульфида фрагменты **E** по данному изобретению выводятся из организма с желчью и/или мочой, подобно другим молекулам на основе стерола (например, эстрогены), либо напрямую, либо после метаболизма (например, цитохром-Р450-опосредованного гидроксилирования или глюкоронидации в печени).

4. Взаимодействие высвобожденного OD с цитоплазматическими сайтами для сайленсинга гена.

[00262] Пример описанного выше МОА конъюгата по данному изобретению представлен, без ограничения, на **Фиг. 2А, 2В, 2С, 2D и 2Е**. В качестве примера приведен конъюгат в соответствии с **[Сп-1-(III)]**, где каждый **E** и **E'** имеет структуру **Формулы (III)**. **W** соответствует **Формуле (II')**. Приведенный в качестве примера дуплекс РНК представляет собой субстрат Дайсер длиной 25/27 нуклеотидов с фосфатной группой, связанной с 5'-концом каждой цепи. После трансмембранной доставки, по достижении цитоплазмы, вследствие исключительно восстановительных условий среды, происходит расщепление и удаление фрагментов **E**, **E'** и **E''** с образованием короткого остатка каждого фрагмента **E**, который все еще связан с дуплексом РНК, содержащего фрагмент тиола, связанный с короткой углеводородной цепью (**Фиг. 2В**). Затем дуплекс РНК взаимодействует с эндонуклеазой Дайсер. Такое взаимодействие инициируется связыванием 3'-конца дуплекса гидовой (антисмысловой) цепи, который имеет «липкий» конец из 2 нуклеотидов, с гидрофобным карманом белка Дайсер; и взаимодействием фосфатной группы сопровождающей (смысловой) цепи с соответствующим положительно заряженным карманом на поверхности белка. Такое заякоривание обеспечивает расположение дуплекса РНК на поверхности белка и дает возможность ферменту осуществлять точный разрыв двойной цепи дуплекса РНК с высвобождением двойной спирали длиной 21/21 нуклеотид и образованием двух остатков **E**, остающихся на сопровождающей (смысловой) цепи (**Фиг.**

2С). На Фиг. 2D показано последующее удаление смысловой спирали под действием фермента геликазы (цитоплазматический фермент, способный разделять цепи РНК). В результате такого действия происходит удаление остаточных остатков фрагментов Е с высвобождением интактной антисмысловой спирали, которая входит в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) для инициации требуемого сайленсинга гена (Фиг. 2Е).

Пример 4: Биологические свойства конъюгата по данному изобретению в отношении инициации сайленсинга гена после внутривенного введения в мышинной модели, *in vivo*:

Цель:

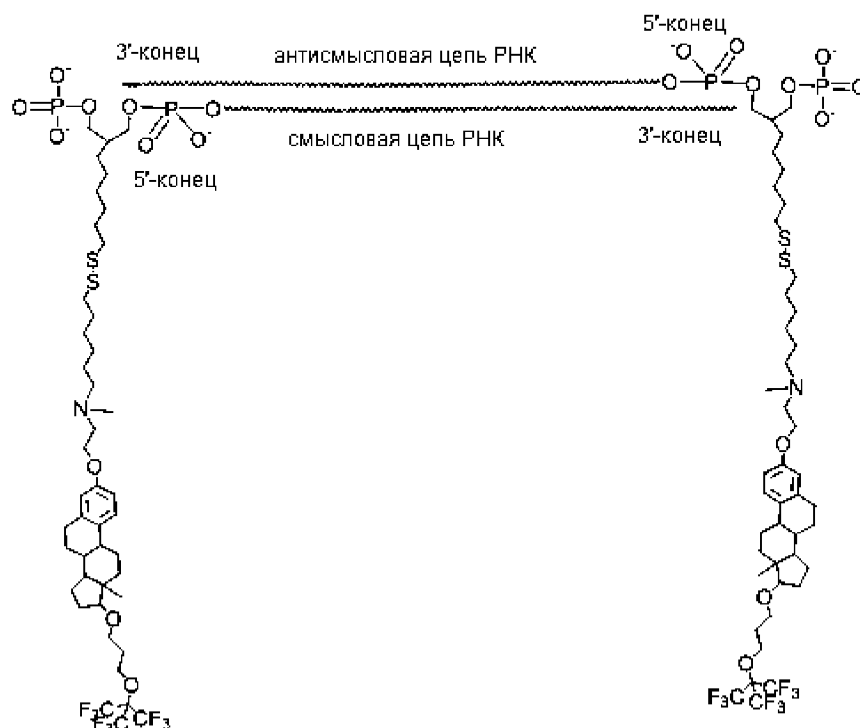
[00263] Демонстрация способности конъюгата по данному изобретению, содержащего дмиРНК, связанную с двумя фрагментами Е по данному изобретению, вызывать сайленсинг гена при внутривенном введении.

Способы:

1). Дуплекс дми-РНК, конъюгированный с фрагментами Е по данному изобретению:

[00264] Использовали дуплекс дмиРНК длиной 25/27 нуклеотидов, разработанный для сайленсинга гена АРОС3. Указанный дуплекс РНК связывали на 5'-конце каждой цепи с фрагментом Е по данному изобретению в соответствии с **Формулой (IX)**, имеющей структуру, описанную ниже. Ген АРОС3 кодирует белок АРОС3, который синтезируется печенью и который имеет решающую роль в распределении и метаболизме триглицеридов. Экспрессия АРОС3 ограничена, главным образом, печенью и почками.

[00265] Фрагмент Е, использованный для эксперимента, соответствовал **Формуле (IX)**. Его синтезировали в компании Syncom BV (Нидерланды) в качестве молекулы-предшественника, содержащей DMT и фосфорамидит в качестве защитных групп. Конъюгат **Аро-Si-АРОС3-дмиРНК** синтезировали в компании Integrated DNA Technologies (IDT, Левен, Бельгия), как описано выше в **Примере 1**. Он представлял собой конъюгат **[Сп-1-(IX)]-АРОС3-дмиРНК**, а именно, он содержал два фрагмента Е, каждый из которых имеет структуру, представленную **Формулой (IX)**, сопряженных с дмиРНК, для сайленсинга гена АРОС3. Таким образом, указанный конъюгат имел следующую структуру:



Конъюгат [Cn-1-(IX)]-АРОСЗ-дмиРНК

[00266] Генетические последовательности, использованные в данном исследовании, представлены ниже:

Целевой конъюгат АроСЗ-дмиРНК:

Последовательность смысловой цепи:

/5'-(IX)/ mGmGrAmUrGmGrArCrArArUmCrAmCrUmUrCmArGrArUrCr CCT;

Последовательность антисмысловой цепи:

/5'(IX)/ rArGmGrGrArUrCrUmGrAmArGmUrGrArUrUrGrUrCrCrAmUrCmCmAmG;

где **m** означает метилированный, и **r** означает рибонуклеотид.

Контроль №1: Обнаженный конъюгат АроСЗ-дмиРНК (дуплекс РНК с последовательностью, которая специфична для сайленсинга гена АроСЗ, но не содержит молекулярную наномоторную систему доставки Аро-Si).

Последовательность смысловой цепи:

mGmGrAmUrGmGrArCrA rArUmCrAmCrUmUrCmA rGrArU rCrCCT;

Последовательность антисмысловой цепи:

rArGmG rGrArU rCrUmG rAmArG mUrGrA rUrUrG rUrCrCrAmUrCmCmAmG.

Контроль №2: Конъюгат [Cn-1-(IX)]-KRAS-дмиРНК; (неродственная последовательность РНК, конъюгированная с молекулярной наномоторной системой доставки Аро-Si).

Последовательность смысловой цепи:

/5'-(IX)/mAmArGmGrUmGrUrArCrArGmUrUmArU mGrUmGrArArUrArCTT;

Последовательность антисмысловой цепи:

/5'-(IX)/rArAmGrUrArUrUrCmArCmArUmArArCrUrGrUrArCrArCmCrUmU mGmU.

Контроль №3: Носитель; 5% раствор глюкозы в воде для инъекций.

2). Лекарственная форма:

Все экспериментальные и контрольные препараты растворяли в стерильной воде для инъекций, не содержащей РНазу, с содержанием 5% глюкозы. Перед введением готовили свежий исходный раствор с концентрацией 5 мг/мл.

3). Уход за животными и их содержание:

Мышей BALB/c (самцы, 22-29 г) приобретали у компании Envigo (Israel Ltd.). Мышей содержали в условиях 12-часового цикла дня/ночи, с доступом к корму без ограничений, и давали возможность акклиматизироваться в течение по меньшей мере 3 дней до проведения экспериментов. Каждая экспериментальная группа содержала 7 животных.

4). Дизайн исследования:

В исследование включали 4 экспериментальные группы: *(i)*. Носитель: 5% глюкоза в воде для инъекций; *(ii)*. «Оголенная» дмиРНК для AроC3 (без присоединения молекулярных наномоторных фрагментов); *(iii)*. Конъюгат [Cn-1-(IX)]-KRAS-дмиРНК (неродственная последовательность РНК, конъюгированная с молекулярной наномоторной системой доставки Aро-Si); *(iv)*. Целевой конъюгат [Cn-1-(IX)]-AроC3 и дмиРНК.

Каждая экспериментальная группа содержала 5-7 мышей. Мышам вводили внутривенные (*i.v.*) инъекции доз в течение 3 последовательных дней, каждая доза составляла 50 мг/кг, инъекции вводили в хвостовую вену в объеме дозы 10 мл/кг. Описанный протокол адаптирован с модификациями из статьи Wolfram, C, et al., (*Nat Biotechnol.* 25:1149-57, 2007). На 4 день, через 24 часа после введения последней дозы, мышей взвешивали, усыпляли под CO₂ наркозом, вырезали печень и сразу подвергали ее выделению РНК.

5). Выделение РНК и кПЦР-РВ:

Образцы печени массой 10-100 мг извлекали и погружали в реагент TRIzol. Затем ткани гомогенизировали с помощью горизонтального цилиндрического смесителя-гомогенизатора (Next Advance) с шариками из нержавеющей стали (0,9-2,0 мм). Смеси

быстро центрифугировали для удаления дебриса и шариков. Суммарную РНК экстрагировали с помощью мини-набора для РНК PureLink (Invitrogen) по инструкциям производителя. РНК количественно определяли с помощью многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan). Выполняли обратную транскрипцию РНК с помощью набора для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК (ABI), и измеряли экспрессию мРНК ApoC3 методом кПЦР-РВ Taqman с нормализацией по бета-актину (Step-one-Plus, ABI).

6). Анализ данных

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Статистическую межгрупповую значимость оценивали с использованием неспаренного (двустороннего) t-критерия Стьюдента с достоверностью, определенной как $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значение $\pm$ СО (стандартное отклонение).

Результаты:

[00267] Как показано на **Фиг. 3А**, конъюгат **[Cn-1-(IX)]-ApoC3** с дмиРНК вызывает заметный нокдаун экспрессии гена ApoC3 (40%). Такое снижение экспрессии гена имеет высокую степень статистической значимости, по сравнению со всеми остальными экспериментальными группами.

[00268] Как показано на **Фиг. 3В**, статистически значимый нокдаун экспрессии гена ApoC3 наблюдали также в почках (21%). Важно, что в почках указанное различие также было статистически значимым, по сравнению со всеми тремя контрольными группами.

Вывод:

[00269] Конъюгат по данному изобретению, содержащий два фрагмента **Е**, связанных с дмиРНК, предназначенной для сайленсинга экспрессии гена ApoC3, проявляет существенную активность при системном внутривенном введении *in vivo* в отношении инициации селективного нокдауна экспрессии гена-мишени, как в печени, так и в почках. Полученные результаты подтверждают то мнение, что предложенная система доставки лекарственного соединения Apo-Si имеет системный способ действия: при внутривенном введении система Apo-Si, конъюгированная с дмиРНК, обеспечивает *системное* распределение генетического лекарственного соединения и соответствующий мультиорганный и специфический сайленсинг гена.

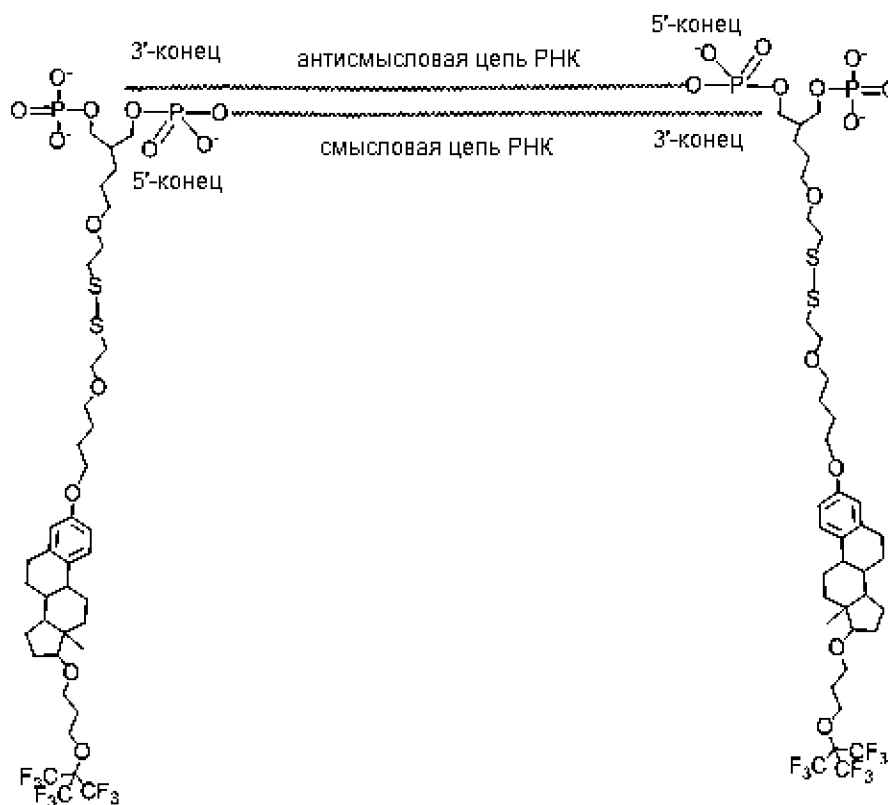
Пример 5: Биологические свойства конъюгата по данному изобретению, в котором каждый **Е и **Е'** соответствует Формуле (IV), в отношении сайленсинга гена *in vitro*:**

Цель исследования:

[00270] Оценка свойств конъюгата по данному изобретению, **[Cn-1-(IV)]-EGFP-дмиРНК**, содержащего фрагменты **Е** и **Е'**, каждый из которых имеет структуру, представленную **Формулой (IV)**, и связан с EGFP-специфической дмиРНК, в отношении сайленсинга экспрессии гена EGFP, *in vitro*.

Способы:**Дуплекс дмиРНК:**

[00271] Дуплекс миРНК представлял собой субстрат Дайсера, выполненный с возможностью сайленсинга гена EGFP. Фрагмент **Е**, имеющий структуру, представленную **Формулой (IV)**, был присоединен к каждой цепи РНК на 5'-конце. Таким образом, конъюгат, использованный в данном исследовании, представлял собой **[Cn-1-(IV)]-EGFP-дмиРНК**, имеющий следующую структуру:



Конъюгат [Cn-1-(IV)]-EGFP-дмиРНК

[00272] Ниже представлены нуклеотидные последовательности:

Смысловая:

5'-phos/iApo-Si-K103A/mAmCrCmCrUmGrArArGrUrUmCrAmUrCmUrGm
CrArCrCrArCmCGrUrCrA

Антисмысловая:

5'-phos/iApo-Si-K103A/rCrGmGrUrGrGrUrGmCrAmGrAmUr
GrArArCrUrGmGrGmUmCmA

Исследования *in vitro*: Клеточные линии Hela-GFP приобретали у компании Cell Biolabs. Клетки выращивали в среде Игла в модификации Дульбекко (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco), 100 Е/мл пенициллина, 100 мг/кл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицидина. Клетки выдерживали в инкубаторе при 37 °С с увлажненным воздухом, содержащим 5% CO₂. За один день до трансфекции клетки наносили на планшет (40000 клеток/лунка) на 24-луночные планшеты с черным стеклянным дном. На следующий день клетки обрабатывали конъюгатом [Cn-1-(IV)]-EGFP-дмиРНК в присутствии 10% сыворотки. Для трансфекций без сыворотки проводили аспирацию среды, клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS) и затем меняли среду на бессывороточную Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) на 24 часа, после чего добавляли сыворотку для инкубации в течение еще 48 часов. Понижающую регуляцию экспрессии белка измеряли через 72 часа после трансфекции. Для этого аспирировали среду и промывали клетки HBSS. Интенсивность флуоресценции EGFP количественно измеряли с помощью многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan), длина волны возбуждения составляла 488 нм, длина волны испускания 535 нм. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Эксперименты проводили в трех экземплярах, результаты выражали как среднее значение $\pm$ CO, межгрупповое различие оценивали с помощью двухстороннего *t*-критерия и определяли статистическую значимость как $p < 0,05$.

Результаты:

[00273] Конъюгат [Cn-1-(IV)]-EGFP-дмиРНК вызывал эффективный нокдаун экспрессии EGFP, как показано ниже:

[00274] В присутствии сыворотки, 600 нМ конъюгат обеспечивал снижение экспрессии EGFP до **73,7% $\pm$ 1,3** (среднее $\pm$ CO) относительно контроля. В условиях без сыворотки наблюдали дозозависимый эффективный нокдаун EGFP под действием указанного конъюгата, и экспрессия EGFP была снижена до **55,0% $\pm$ 2,6%**, **29,9% $\pm$ 0,5%** и **7,4% $\pm$ 0,6%** относительно контроля, если клетки обрабатывали 10, 40 и 150 нМ конъюгата, соответственно ($p < 0,001$ во всех межгрупповых сравнениях).

Выводы:

[00275] Конъюгат по данному изобретению [Cn-1-(IV)]-EGFP-дмиРНК является эффективным фрагментом для доставки макромолекулярного конструкта дмиРНК через фосфолипидные мембраны в клетки и для соответствующей инициации существенного сайленсинга гена.

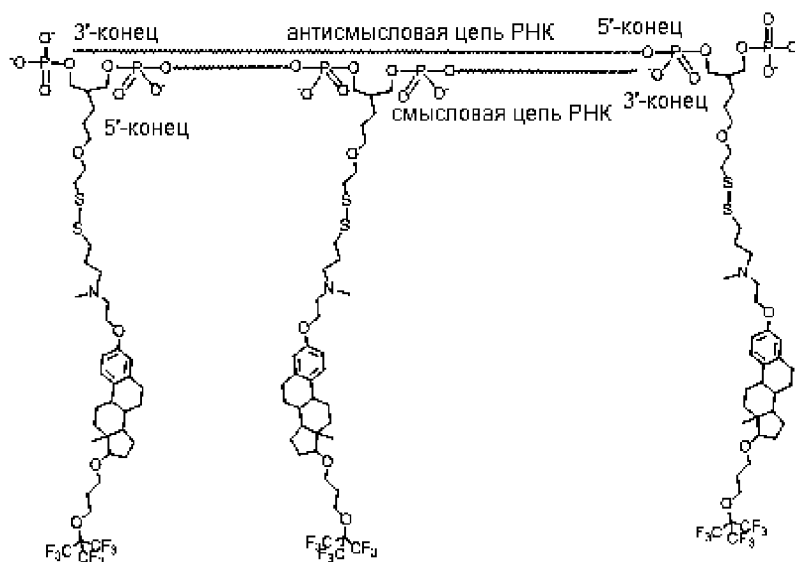
Пример 6: Биологические свойства конъюгата по данному изобретению, содержащего E, E' и E'', которые соответствуют Формуле (VIII-M), в отношении сайленсинга гена in vitro: исследование зависимости ответа от дозы

Цель исследования:

[00276] Оценка *in vitro* биологических свойств конъюгата по данному изобретению [Cn-2-(VIII-M)], а именно, дуплекса дмРНК с присоединенными фрагментами E, E' и E'', каждый из которых соответствует **Формуле (VIII-M)**, и связанного с субстратом Дайсера длиной 25/27 нуклеотидов, выполненным с возможностью сайленсинга гена EGFP.

Способы:

[00277] Ниже представлена структура конъюгата [Cn-2-(VIII-M)]:



Конъюгат [Cn-2-(VIII-M)]

Клеточная культура:

[00278] Клеточные линии Hela-GFP и 3T3 приобретали у компании Cell Biolabs. Клетки каждого клеточного типа выращивали в среде Игла в модификации Дульбекко (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco), 100 Е/мл пенициллина, 100 мг/кл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицидина. Клетки выдерживали в инкубаторе при 37 °C с увлажненным воздухом, содержащим 5% CO₂. За день до трансфекции клетки наносили на планшет (40000 клеток/лунка) на 24-луночные планшеты с черным стеклянным дном. На следующий день клетки начинали инкубировать в течение 72 часов с **конъюгатом [Cn-2-(VIII-M)]** при концентрациях 2 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 40 нМ, 80 нМ, 150 нМ и 300 нМ, из которых первые 24 часа проводили в бессывороточной среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific),

после чего инкубацию проводили в среде, содержащей 10% сыворотки, в течение еще 48 часов. Понижающую регуляцию экспрессии белка измеряли через 72 часа после трансфекции. Для этого аспирировали среду и промывали клетки HBSS. Интенсивность флуоресценции EGFP количественно измеряли с помощью многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan), длина волны возбуждения составляла 488 нм, длина волны испускания 535 нм. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Эксперименты проводили в трех экземплярах, результаты записывали как среднее значение $\pm$ CO. Строили кривые экспрессии гена в зависимости от концентраций конъюгата и рассчитывали приближение кривой в программном обеспечении GraphPad, Prism-5.

Результаты:

[00279] Как показано на **Фиг. 4А и 4В**, для клеток Hela и клеток 3Т3 наблюдали выраженную зависимость ответа от дозы с высокосignificantным логарифмическим снижением, с приближением кривой $R^2 \approx 0,95$ для обеих клеточных линий. Для клеток Hela найденное значение IC_{50} составило 13,54 нМ, подобно клеткам 3Т3, которые демонстрировали значение IC_{50} 19,25 нМ.

Выводы:

[00280] На основании изучения в двух клеточных линиях *in vitro*, показано, что **конъюгат [Cn-2-(VIII-M)]-EGFP** демонстрирует эффективную доставку в клетки, находящиеся в культуре, и эффективную активацию сайленсинга гена, по результатам оценки содержания белка. Наблюдаемые значения EC_{50} в нижнем наномолярном диапазоне подтверждают то мнение, что структура конъюгата, содержащего три присоединенных фрагмента Е на один дуплекс, пригодна для обеспечения эффективного биологического действия в отношении сайленсинга гена.

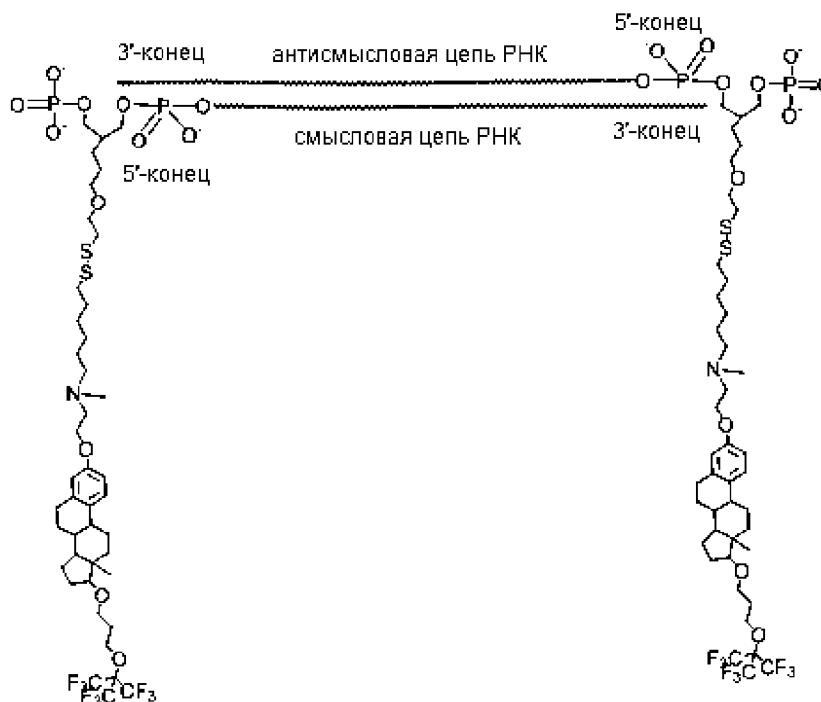
Пример 7: Биологические свойства конъюгата по данному изобретению, содержащего фрагменты Е и Е', каждый из которых соответствует Формуле (X), в отношении сайленсинга гена in vitro

Цель исследования:

[00281] Оценка *in vitro* биологических свойств конъюгата по данному изобретению **[Cn-1-(X)]**, а именно, дуплекса дмРНК с присоединенными фрагментами Е и Е', каждый из которых соответствует **Формуле (X)**, и связанного с субстратом Дайсера длиной 25/27 нуклеотидов, выполненным с возможностью сайленсинга гена EGFP.

Способы:

[00282] Ниже представлена структура конъюгата **[Cn-1-(X)]-EGFP-дмРНК**:



Конъюгат [Cn-1-(X)]-EGFP-дмРНК

[00283] Последовательность EGFP-дмРНК, клеточные культуры клеток Hela и 3T3, а также протоколы обработки были таким же, как описано в **примере 5**. Количественную оценку интенсивности флуоресценции EGFP проводили с помощью многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan), длина волны возбуждения 488 нм, длина волны испускания 535 нм. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Эксперименты проводили в трех экземплярах, результаты выражали как среднее значение $\pm$ CO, межгрупповое различие оценивали с помощью двухстороннего *t*-критерия и определяли статистическую значимость как $p < 0,05$.

Результаты:

[00284] Конъюгат [Cn-1-(X)]-EGFP-дмРНК вызывал эффективный нокдаун экспрессии EGFP, как показано ниже:

В клетках Hela: В присутствии сыворотки, 600 нМ конъюгат обеспечивал снижение экспрессии EGFP до **76% $\pm$ 2** (среднее $\pm$ CO) относительно контроля. В условиях без сыворотки наблюдали эффективный дозозависимый нокдаун экспрессии EGFP под действием указанного конъюгата, и экспрессия EGFP была снижена до **57,4% $\pm$ 4,8%**; **32,1% $\pm$ 5,0%**; и **15,9% $\pm$ 4,2%** относительно контроля, если клетки обрабатывали 10, 40 и 150 нМ конъюгата, соответственно ($p < 0,001$ во всех межгрупповых сравнениях).

В клетках 3T3: В условиях без сыворотки наблюдали заметный дозозависимый нокдаун экспрессии EGFP под действием указанного конъюгата, и экспрессия EGFP была снижена

до $91\% \pm 2,0\%$; $50,0\% \pm 5,0\%$; и $27\% \pm 4,0\%$ относительно контроля, если клетки обрабатывали 10, 40 и 150 нМ конъюгата, соответственно ($p < 0,001$ во всех межгрупповых сравнениях).

Выводы:

[00285] Конъюгат по данному изобретению [Cn-1-(X)]-EGFP-дмиРНК является эффективным фрагментом для доставки макромолекулярного конструкта дмиРНК через фосфолипидные мембраны в клетки и для последующей инициации существенного сайленсинга гена.

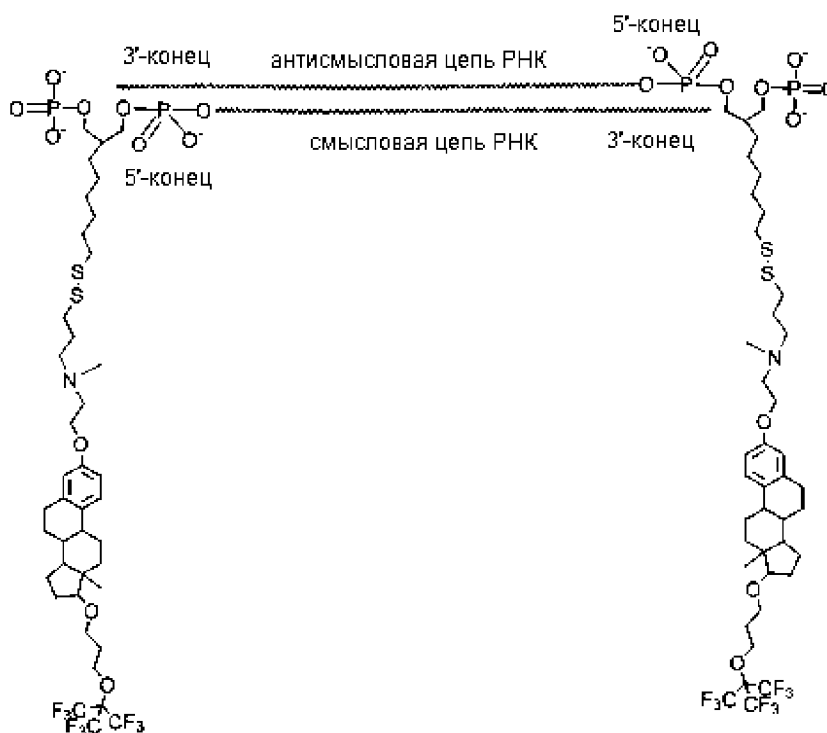
Пример 8: Биологические свойства конъюгата по данному изобретению, содержащего фрагменты Е и Е', каждый из которых соответствует Формуле (XI), в отношении сайленсинга гена in vitro

Цель исследования:

[00286] Оценка *in vitro* биологических свойств конъюгата по данному изобретению [Cn-1-(XI)], а именно, дуплекса дмиРНК с присоединенными фрагментами Е и Е', каждый из которых соответствует **Формуле (XI)**, и связанного с субстратом Дайсера длиной 25/27 нуклеотидов, выполненным с возможностью сайленсинга гена EGFP.

Способы:

[00287] Ниже представлена структура конъюгата [Cn-1-(XI)]-EGFP-дмиРНК:



Конъюгат [Cn-1-(XI)]-EGFP-дмиРНК

[00288] Исследование проводили в клетках Hela. Последовательность EGFP-дмиРНК, клеточная культура, а также протоколы обработки были таким же, как описано в **примере 5**. Количественную оценку интенсивности флуоресценции EGFP проводили с помощью многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan), длина волны возбуждения 488 нм, длина волны испускания 535 нм. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Эксперименты проводили в трех экземплярах, результаты выражали как среднее значение $\pm$ CO, межгрупповое различие оценивали с помощью двухстороннего *t*-критерия и определяли статистическую значимость как $p < 0,05$.

Результаты:

[00289] Конъюгат [Cn-1-(XI)]-EGFP-дмиРНК вызывал эффективный нокдаун экспрессии EGFP, как показано ниже: В присутствии сыворотки, 600 нМ конъюгат обеспечивал снижение экспрессии EGFP до **83% $\pm$ 4** (среднее $\pm$ CO) относительно контроля. В условиях без сыворотки наблюдали заметный дозозависимый нокдаун экспрессии EGFP под действием указанного конъюгата, и экспрессия EGFP была снижена до **55,2% $\pm$ 10%**; **34,5% $\pm$ 8%**; и **15,9% $\pm$ 4,2%** относительно контроля, если клетки обрабатывали 10, 40 и 150 нМ конъюгата, соответственно ($p < 0,01$ во всех межгрупповых сравнениях).

Выводы:

[00290] Конъюгат по данному изобретению [Cn-1-(XI)]-EGFP-дмиРНК является эффективным фрагментом для доставки макромолекулярного конструкта дмиРНК через фосфолипидные мембраны в клетки и для последующей инициации существенного сайленсинга гена.

Пример 9: Биологические свойства конъюгатов (Cn-1) и (Cn-2) по данному изобретению, содержащих различные фрагменты E, E' и E'', в отношении сайленсинга экспрессии гена EGFP *in vitro*.

Цель исследования:

[00291] Оценка сайленсинга гена *in vitro* под действием различных конъюгатов по данному изобретению, содержащих различные фрагменты E, E' или E'', которые относятся к **Общим формулам (I) и (II)**, использование их в качестве примеров **Формул (I) и (II)** как общих, единых структурных мотивов, обеспечивающих возможность трансмембранной доставки дмиРНК через фосфолипидные мембраны в клетки, где они впоследствии проявляют свою биологическую активность.

Способы:

[00292] Исследование проводили на выращенных клетках 3Т3, и оценивали сайленсинг гена EGFP после инкубации с различными конъюгатами по данному изобретению. Использовали такую же методику исследования, как описано выше в **примерах 5-8**. Инкубацию проводили в течение 72 часов, из которых инкубацию в течение первых 24 часов проводили без сыворотки, после чего добавляли 10% сыворотки. Для всех анализов концентрации конъюгата составляли 40 нМ или 150 нМ. Экспрессию EGFP оценивали посредством измерения флуоресценции белка в иммуноферментном твердофазном анализе, как описано в приведенных выше примерах. Экспрессию EGFP измеряли также в необработанных клетках, которые использовали в качестве контроля. Фрагменты **Е** по данному изобретению, для которых проводили оценку, представляли собой **(II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII-M), (IX)**. Как указано выше, все эти фрагменты относятся к общей **Формуле (II)**. Кроме того, синтезировали **6 контрольных фрагментов Е** и конъюгировали их с дмРНК для сайленсинга гена EGFP. Структурные особенности контрольных фрагментов (**таблица 3**) были таким же, как для фрагментов **Е**, сконструированных в соответствии с **общей Формулой (II)**. Однако они не имели полного выравнивания с основной структурой **Формулы (II)**.

Результаты:

[00293] Результаты представлены ниже в **таблицах 1, 2 и 3**.

Таблица 1: Концентрация конъюгата 40 нМ:

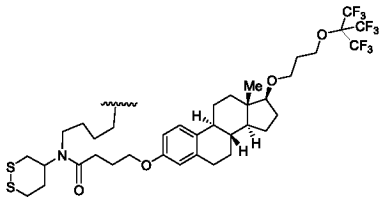
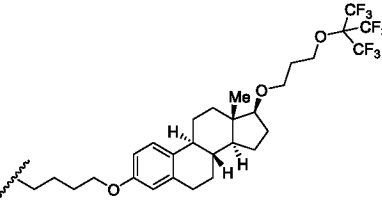
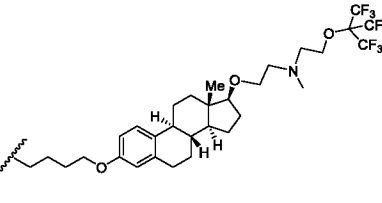
Название формулы	Формула скелета конъюгата	Формула фрагментов Е	Количество фрагментов Е в конъюгате	Экспрессия EGFP (% от контроля)	% сайленсинга гена EGFP
[Cn-1-(VIII-M)]	(Cn-1)	(VIII-M)	2	31,8	68,2
[Cn-2-(VIII-M)]	(Cn-2)	(VIII-M)	3	13,4	86,6
[Cn-1-(III)]	(Cn-1)	(III)	2	55	45,0
[Cn-2-(III)]	(Cn-2)	(III)	3	18,3	81,7
[Cn-1-(IV)]	(Cn-1)	(IV)	2	34,4	65,6
[Cn-1-(V)]	(Cn-1)	(V)	2	24,8	75,2
[Cn-1-(VI)]	(Cn-1)	(VI)	2	23,8	76,2

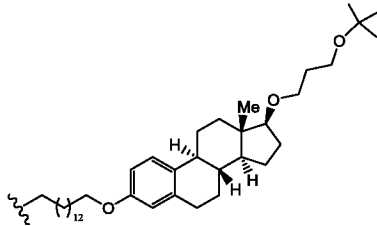
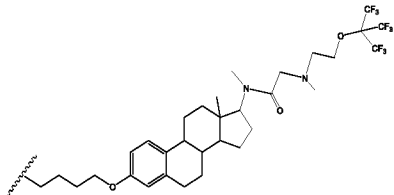
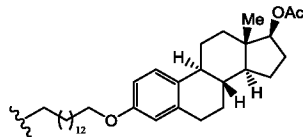
[Cn-1-(VII)]	(Cn-1)	(VII)	2	23,2	78,8
--------------	--------	-------	---	------	------

Таблица 2: Концентрация конъюгата 150 нМ:

Название формулы	Формула скелета конъюгата	Формула фрагментов Е	Количество фрагментов Е в конъюгате	Экспрессия EGFP (% от контроля)	% сайленсинга гена EGFP
[Cn-1-(IX)]	(Cn-1)	(IX)	2	21,9	78,1
[Cn-1-(VIII-M)]	(Cn-1)	(VIII-M)	2	15,5	84,5
[Cn-1-(III)]	(Cn-1)	(III)	2	34,2	63,8
[Cn-1-(IV)]	(Cn-1)	(IV)	2	18,5	81,5
[Cn-1-(VI)]	(Cn-1)	(VI)	2	12,1	87,9

Таблица 3: Конъюгаты с контрольными фрагментами Е; изученные в концентрациях конъюгата до 400 нМ:

№	Формула скелета конъюгата	Количество фрагментов Е в конъюгате	Структура контрольного фрагмента Е	% сайленсинга гена EGFP
Контроль 1	(Cn-1)	2		0%
Контроль 2	(Cn-1)	2		0%
Контроль 3	(Cn-1)	2		0%

Контроль 4	(Cn-1)	2		0%
Контроль 5	(Cn-1)	2		0%
Контроль 6	(Cn-1)	2		0%

Обобщение результатов:

[00294] Как показано в **таблице 1** и в **таблице 2**, все конъюгаты, структура которых соответствует общим **формулам (I)** и **(II)**, несмотря на содержание разных скелетов конъюгата и фрагментов **Е**, демонстрируют эффективный сайленсинг изученного гена EGFP в изученных наномолярных концентрациях (40 и 150 нМ). Напротив, все контрольные конъюгаты (**таблица 3**) не проявляют сайленсинг гена, даже при испытании в относительно высоких концентрациях (до 400 нМ).

Выводы:

[00295] Таким образом, указанный профиль свойств подтверждает ту концепцию, что конъюгаты в соответствии с **Формулами (I)** и **(II)** имеют общие и характерные структурные мотивы, которые обеспечивают возможность эффективной доставки макромолекулярных **ОД** через фосфолипидные мембраны в клетки, где они затем выполняют требуемую биологическую функцию (в данном случае сайленсинг гена).

Пример 10: Биологические свойства конъюгата по данному изобретению, содержащего фрагменты Е, каждый из которых соответствует Формуле (VIII-M), в отношении сайленсинга гена *in vitro*; исследование зависимости ответа от дозы и сравнительный анализ конъюгатов (Cn-1) и (Cn-2):

Цель исследования:

[00296] Оценка *in vitro* биологических свойств конъюгатов по данному изобретению [Cn-1-(VIII-M)] и [Cn-2-(VIII-M)], а именно, дуплекса дмРНК с присоединенными 2 или 3

фрагментами E, соответственно, каждый фрагмент E соответствует Формуле (VIII-M), и связанного с субстратом Дайсера длиной 25/27 нуклеотидов, выполненным с возможностью сайленсинга гена EGFP.

Способы:

Клеточная культура:

[00297] Клеточные линии 3T3 приобретали у компании Cell Biolabs. Клетки каждого клеточного типа выращивали в среде Игла в модификации Дульбекко (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco), 100 Е/мл пенициллина, 100 мг/кл стрептомицина (Biological Industries, Израиль) и 10 мкг/мл бластицидина. Клетки выдерживали в инкубаторе при 37 °C с увлажненным воздухом, содержащим 5% CO₂. За день до трансфекции клетки наносили на планшет (40000 клеток/лунка) на 24-луночные планшеты с черным стеклянным дном. На следующий день клетки начинали инкубировать в течение 48 часов с **конъюгатом [Cn-1-(VIII-M)]** или с **конъюгатом [Cn-2-(VIII-M)]**, при концентрациях 1 нМ, 2 нМ, 5 нМ, 10 нМ и 40, из которых первые 24 часа проводили в бессывороточной среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific), после чего инкубацию проводили в среде, содержащей 10% сыворотки, в течение еще 24 часов. Понижающую регуляцию экспрессии белка измеряли через 48 часа после трансфекции. Для этого аспирировали среду и промывали клетки HBSS.

Выделение РНК и кПЦР-PB:

[00298] Суммарную РНК экстрагировали с помощью мини-набора для РНК PureLink (Invitrogen) по инструкциям производителя. РНК количественно определяли с помощью многорежимного ридера Infinite M200-Pro (Tecan). Выполняли обратную транскрипцию РНК с помощью набора для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК (ABI), и измеряли экспрессию мРНК AроС3 методом кПЦР-PB Syber с нормализацией по бета-актину (Step-one-Plus, ABI).

Результаты:

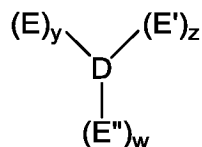
[00299] Как показано на **Фиг. 5**, оба конъюгата, **конъюгат [Cn-1-(VIII-M)]** и **конъюгат [Cn-2-(VIII-M)]**, вызывают эффективный сайленсинг экспрессии гена EGFP, по результатам оценки в клетках 3T3, *in vitro*. Наблюдали очевидную зависимость ответа от дозы с высокосignificantным логарифмическим снижением, с приближением кривой $R^2 \approx 0,97$ для обеих клеточных линий. Для **конъюгата [Cn-1-(VIII-M)]** (*пунктирная линия*), содержащего 2 фрагмента E, найденное значение IC₅₀ составляет 2,2 нМ, а для **конъюгата [Cn-2-(VIII-M)]** (*сплошная линия*), содержащего 3 фрагмента E, найденное значение IC₅₀ составляет 0,8 нМ (**Фиг. 5**).

Выводы:

[00300] По результатам изучения двух конъюгатов: **конъюгата [Cn-1-(VIII)]-EGFP** и **конъюгата [Cn-2-(VIII-M)]**, указанные конъюгаты по данному изобретению оказывают эффективный сайленсинг гена, который оценивали посредством измерения уровней РНК, с очень низкими значениями IC_{50} . Интересно, что конъюгат, который содержит три фрагмента **Е [Cn-2-(VIII-M)]**, проявляет более высокую эффективность в отношении сайленсинга гена, по сравнению с конъюгатом, который содержит два фрагмента **Е**, что отражается в более низком значении IC_{50} (0,8 против 2,2 нМ). Данное наблюдение подтверждает ту концепцию, что система доставки по данному изобретению оказывает положительный совместный эффект, причем каждый фрагмент **Е** способствует и усиливает общую эффективность конъюгата в отношении сайленсинга гена.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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



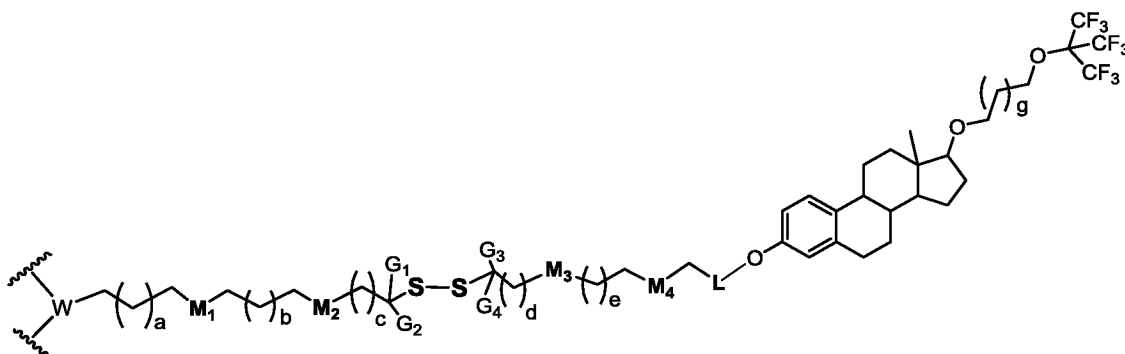
Формула (I)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (I)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где:

D представляет собой лекарственное соединение, подлежащее доставке через биологические мембраны (т.е. *лекарственное карго-соединение*), выбранное из группы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного соединения, пептида, белка и **OD** (т.е. нативной или модифицированной одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, миРНК, дмиРНК или ASO);

y, **z** и **w** представляют собой целые числа, независимо выбранные из 0, 1, 2, 3 или 4, причем если любой из **y**, **z** или **w** равен 0, это означает, что соответствующий фрагмент (или фрагменты) **E** является нулевым; по меньшей мере один из **y**, **z** или **w** отличен от 0;

E, **E'** или **E''** могут быть одинаковыми или различными, каждый независимо имеет структуру, представленную ниже общей **Формулой (II)**:



Формула (II),

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (II)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где:

M_1, M_2, M_3, M_4 , каждый независимо, выбраны из группы, состоящей из N' , N'' , нуля, простого эфира, амида, сложного эфира, простого тиоэфира и сложного тиоэфира; причем каждый N' и N'' независимо выбран из группы, состоящей из $-N(CH_3)-$, $-NH-$ и $-N(X)-$; где X представляет собой защитную группу для амина; M_1, M_2, M_3, M_4 могут быть одинаковыми или различными; N', N'' могут быть одинаковыми или различными;

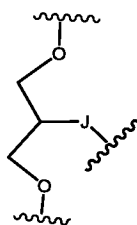
L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из нуля, $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6$ алкилена или гетероалкилена; C_5 или C_6 арила или гетероарила, необязательно замещенного атомом(ами) фтора или гидроксильной группой(ами); и их комбинации;

G_1, G_2, G_3, G_4 , каждый независимо представляют собой атом водорода или метильную группу; группы G могут быть одинаковыми или различными; по меньшей мере две группы G_1, G_2, G_3 или G_4 представляют собой атомы водорода;

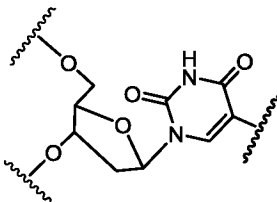
a, b, c, d, e представляют собой целые числа, каждое независимо выбрано из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где 0 = ноль; a, b, c, d, e могут быть одинаковыми или различными;

g означает целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

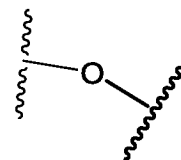
W выбран из группы, состоящей из нуля, остатка гидроксила, дигидроксила, амида, природного или модифицированного нуклеозида, и любой из структур, представленных **Формулами (II¹), (II²) и (II³)**, и их комбинации:



Формула (II¹)



Формула (II²)

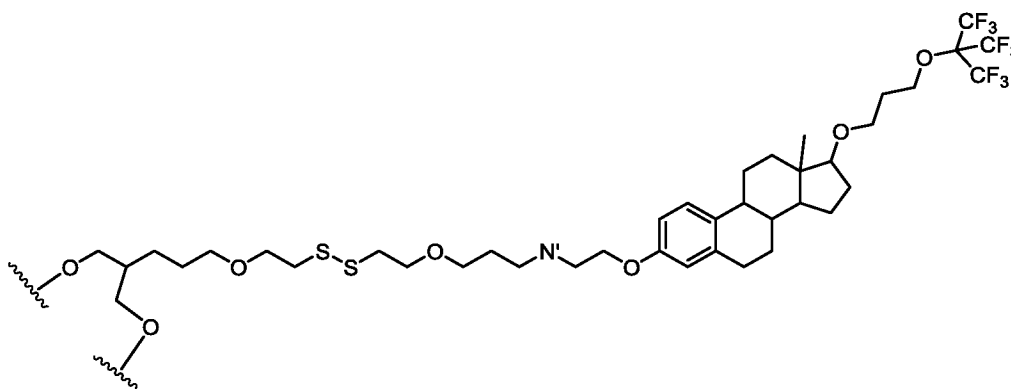


Формула (II³)

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

E, E' или E'' могут быть связаны с любым фрагментом группы, состоящей из D; защитной группы, определение которой приведено в данном документе (например, защитной группы для спирта); R или R' группы, выбранной из группы, состоящей из водорода, фосфата, сульфата и карбоксильной группы; и твердой подложки. В контексте данного изобретения фрагмент E, E' или E'' может быть связан с одним фрагментом D в одной или более точках; и W может быть связан одновременно и с D, и с R или R'.

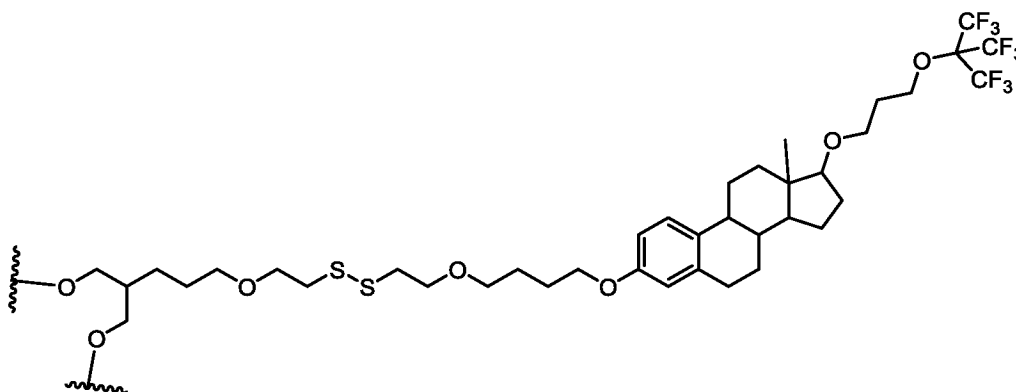
2. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что g представляет собой целое число, равное 0, 1 или 2.
3. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что каждый c и d независимо представляют собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3; c и d могут быть одинаковыми или различными.
4. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что L представляет собой дифторбензиламин.
5. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что все G₁, G₂, G₃, G₄ представляют собой атомы водорода.
6. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что X представляет собой TEOC [2-(триметилсилил)этилкарбамат] или Fмос.
7. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (III)**:



Формула (III)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (III)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как указано в п. 1.

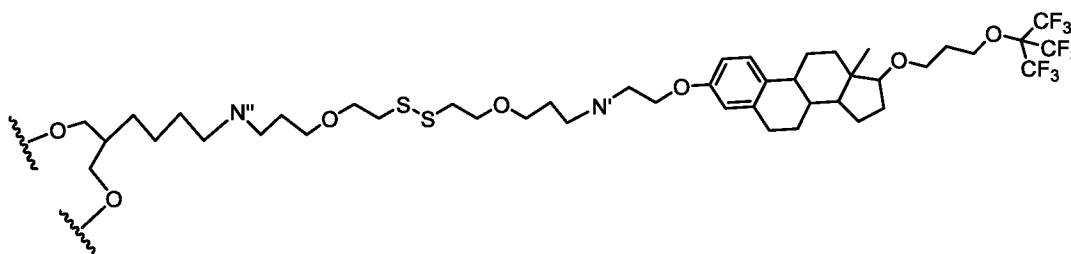
8. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (IV)**:



Формула (IV)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (IV)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

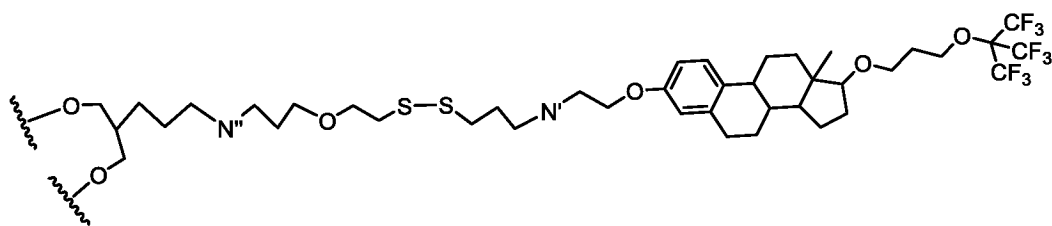
9. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (V)**:



Формула (V)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (V)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано в п. 1.

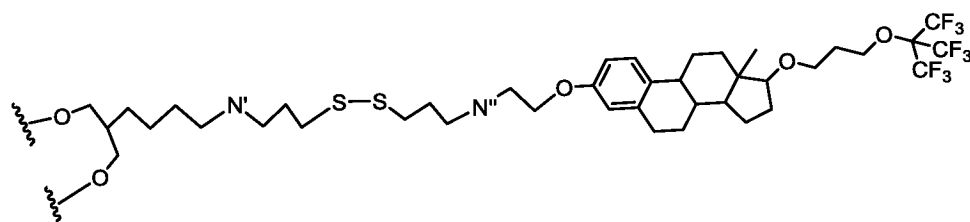
10. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VI)**:



Формула (VI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VI)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано в п. 1.

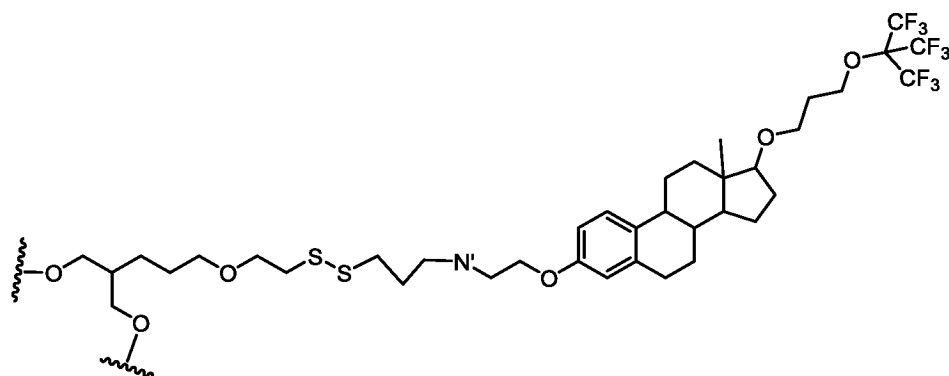
11. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VII)**:



Формула (VII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VII)**, а также сольваты и гидраты таких солей, где каждый N' и N'' независимо имеет такое же значение, как указано в п. 1.

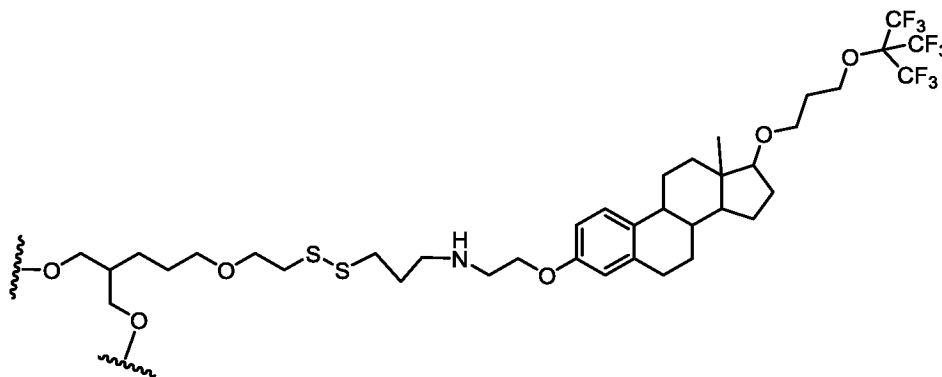
12. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII)**:



Формула (VIII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в п. 1.

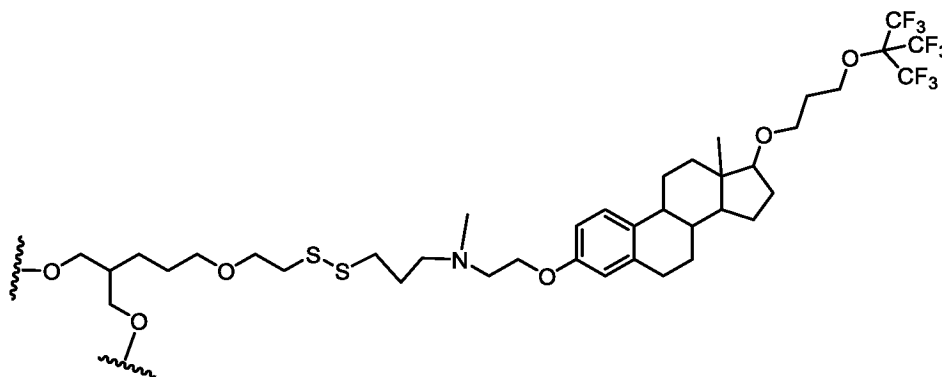
13. Конъюгат по п. 12, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-H)**:



Формула (VIII-H)

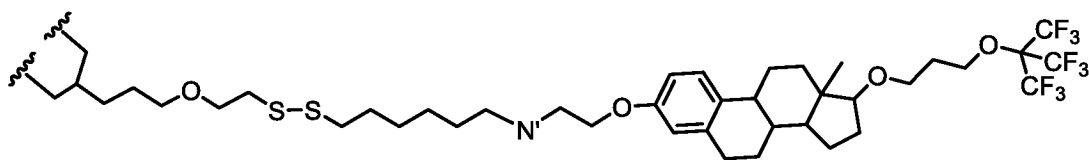
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

14. Конъюгат по п. 12, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (VIII-M)**:



Формула (VIII-M)

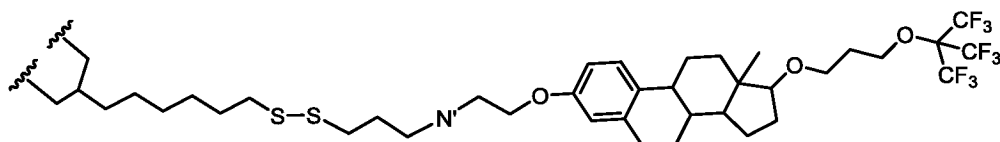
17. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E , E' или E'' имеют структуру, представленную Формулой (X):



Формула (X)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (X)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где **N'** имеет такое же значение, как в п. 1.

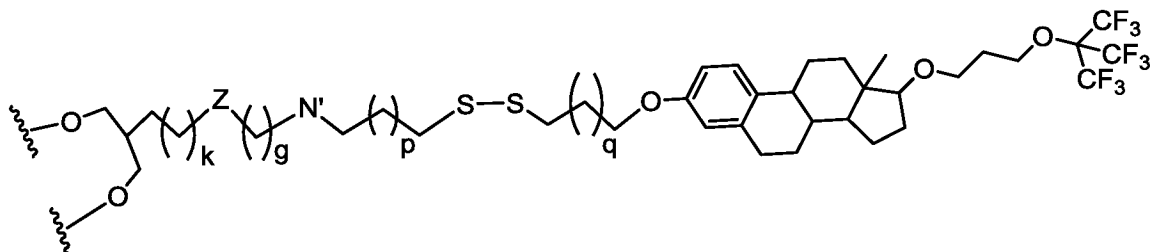
18. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (XI)**:



Формула (XI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XI)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где **N'** имеет такое же значение, как в п. 1.

19. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что **E**, **E'** или **E''** имеют структуру, представленную **Формулой (XII)**:

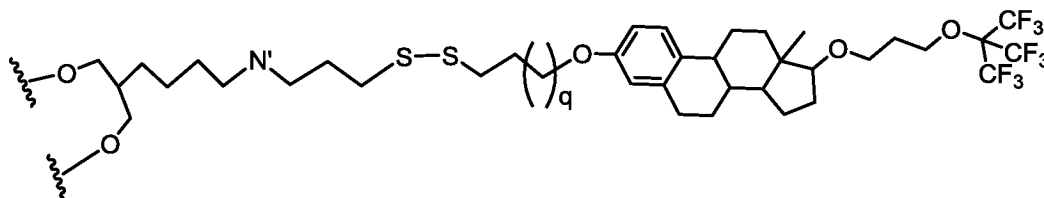


Формула (XII)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XII)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где каждый **p**, **q**, **k**, **g** независимо представляет собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, где 0 означает ноль; **p**, **q**, **k**, **g** могут быть одинаковыми

или различными; Z выбран из группы, состоящей из нуля, -O- и N''; причем каждый N' и N'' имеет такое же значение, как в п. 1.

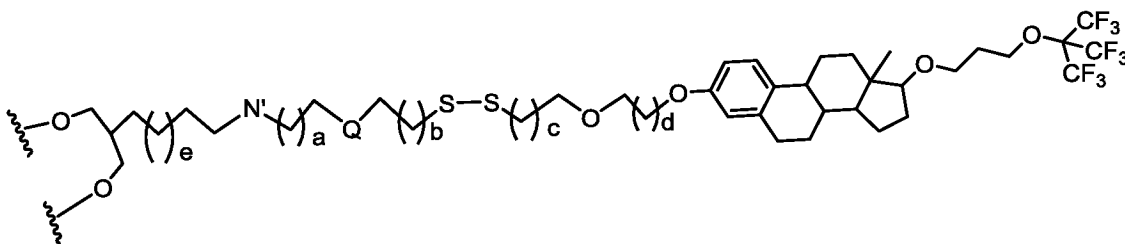
20. Конъюгат по п. 19, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIIa)**:



Формула (XIIa)

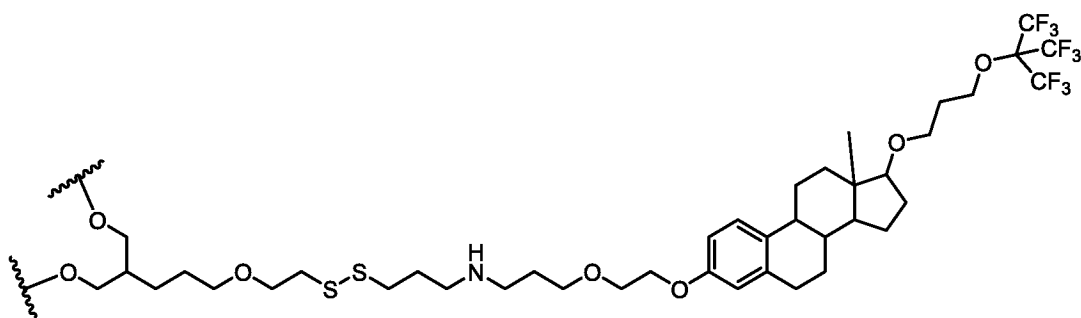
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIIa)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где q представляет собой целое число, равное 0 или 1; и N' имеет такое же значение, как в п. 1.

21. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIII)**:



Формула (XIII)

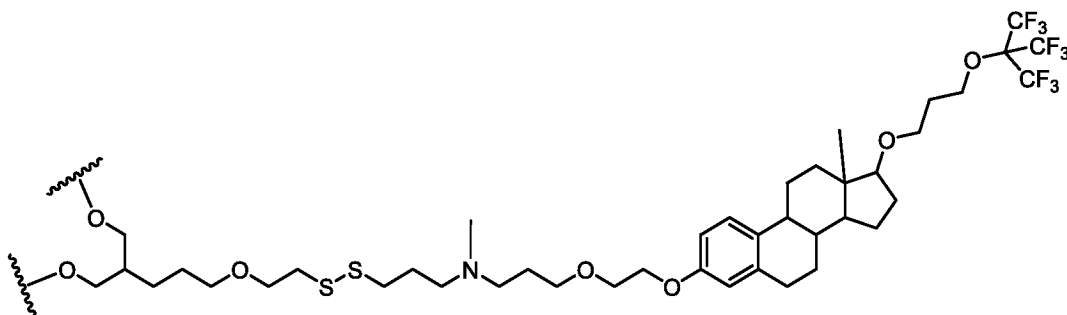
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIII)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где каждый a, b, c, d, e независимо представляет собой целое число, выбранное из 0, 1, 2 или 3, где 0 означает ноль; a, b, c, d и e могут быть одинаковыми или различными; Q выбран из группы, состоящей из нуля и -O-; N' имеет такое же значение, как в п. 1.



Формула (XIV-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

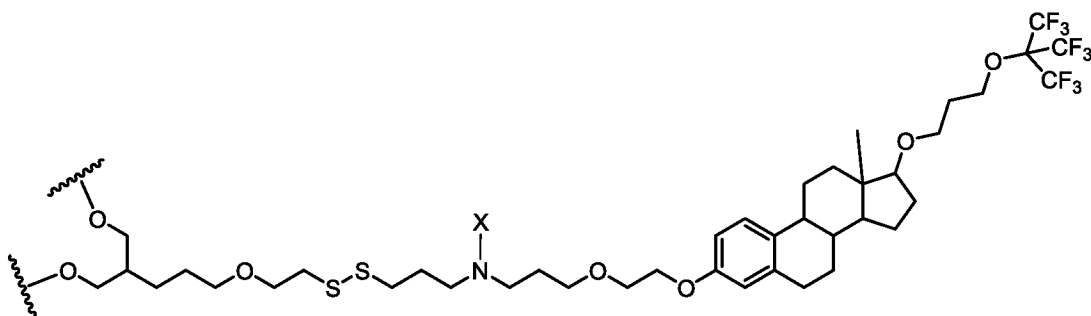
25. Конъюгат по п. 23, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-M)**:



Формула (XIV-M)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

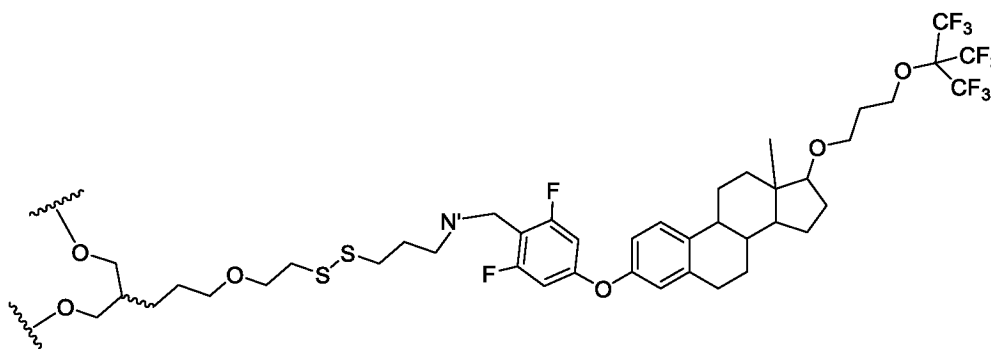
26. Конъюгат по п. 23, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XIV-F)**:



Формула (XIV-F)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где X представляет собой защитную группу для амина.

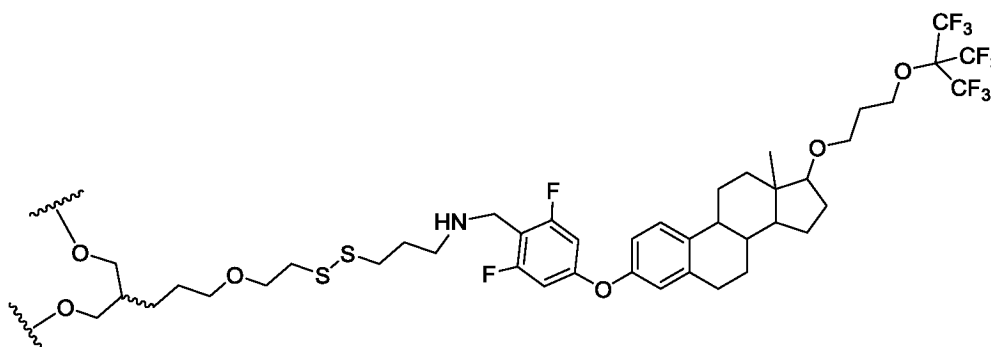
27. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что фрагмент L представляет собой дифторбензиламин; и, следовательно, E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XV)**:



Формула (XV)

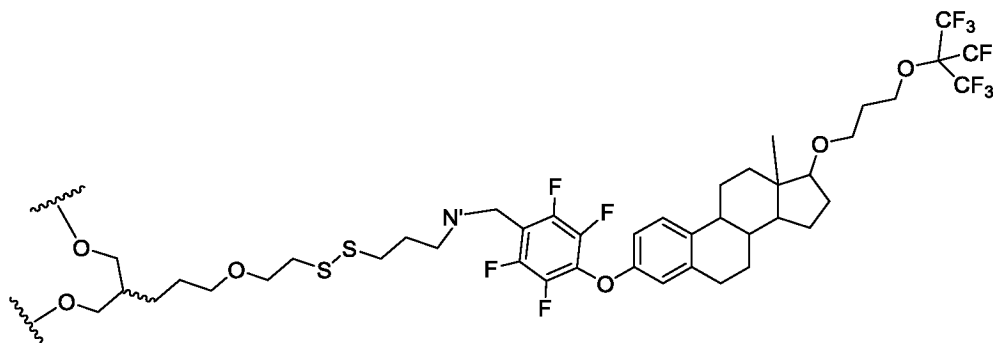
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XV)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в п. 1.

28. Конъюгат по п. 27, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XV-H)**:



Формула (XV-H)

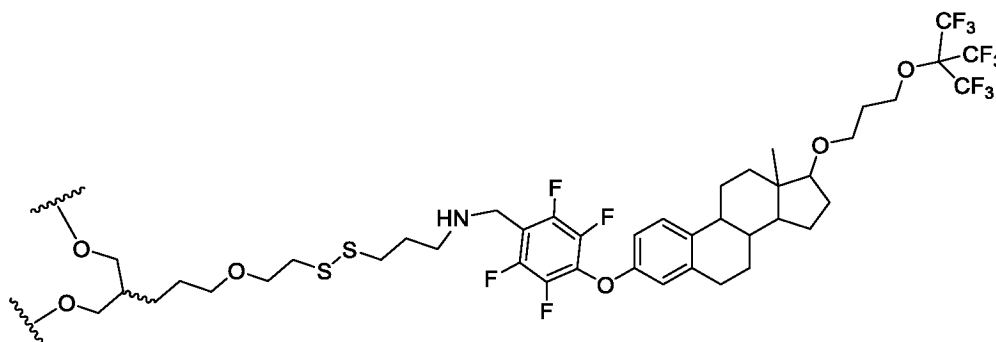
31. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что фрагмент L представляет собой тетрафторбензиламин; и, следовательно, каждый E, E' или E'' имеет структуру, представленную **Формулой (XVI)**:



Формула (XVI)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где N' имеет такое же значение, как в **Формуле (II)**.

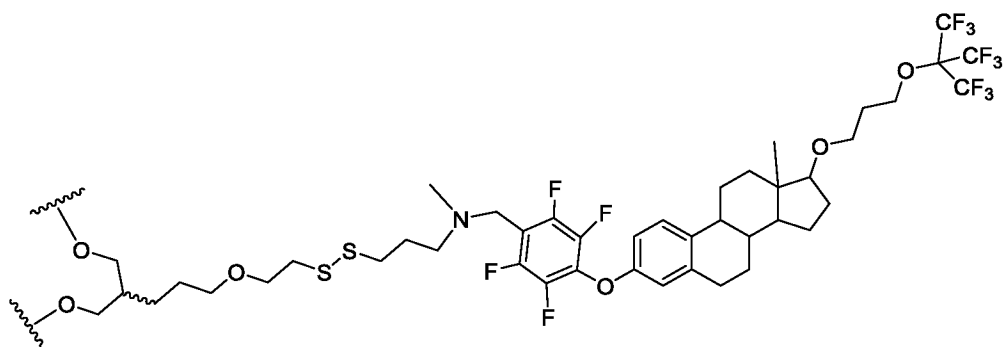
32. Конъюгат по п. 31, отличающийся тем, что фрагмент L представляет собой тетрафторбензиламин; и, следовательно, каждый E, E' или E'' имеет структуру, представленную **Формулой (XVI-H)**:



Формула (XVI-H)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-H)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

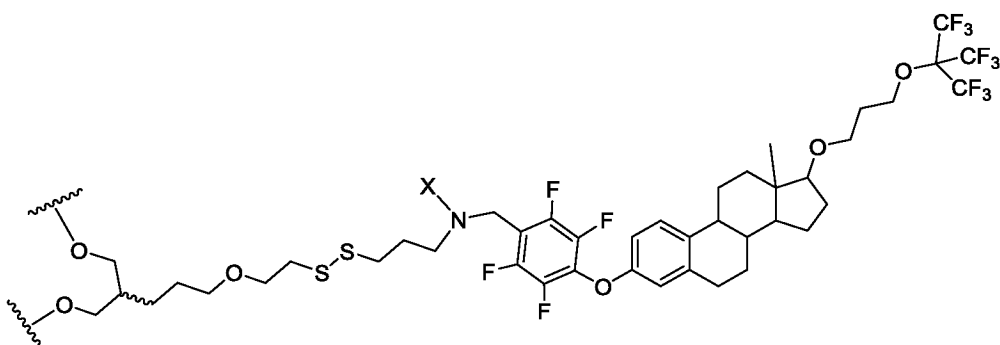
33. Конъюгат по п. 31, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-M)**:



Формула (XVI-M)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-M)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

34. Конъюгат по п. 31, отличающийся тем, что E, E' или E'' имеют структуру, представленную **Формулой (XVI-F)**:



Формула (XVI-F)

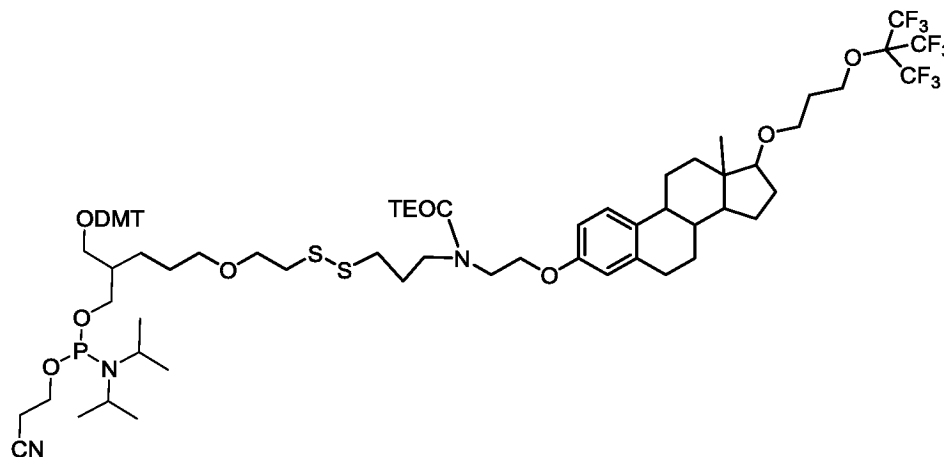
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-F)**, а также сольваты и гидраты таких солей; где X представляет собой защитную группу для амина.

35. Молекула-предшественник, содержащая любой E, E' или E'' по п. 1, связанный с защитными группами для спиртов и/или аминов; включая соответствующие фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты, сольваты и гидраты таких солей.

36. Молекула-предшественник по п. 35, содержащая фрагмент E, E' или E'' по любому из пп. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,

29, 30, 31, 32, 33, 34, связанный с диметокситритилом [бис-(4-метоксифенил)фенилметилом] (DMT) и фосфорамидитом.

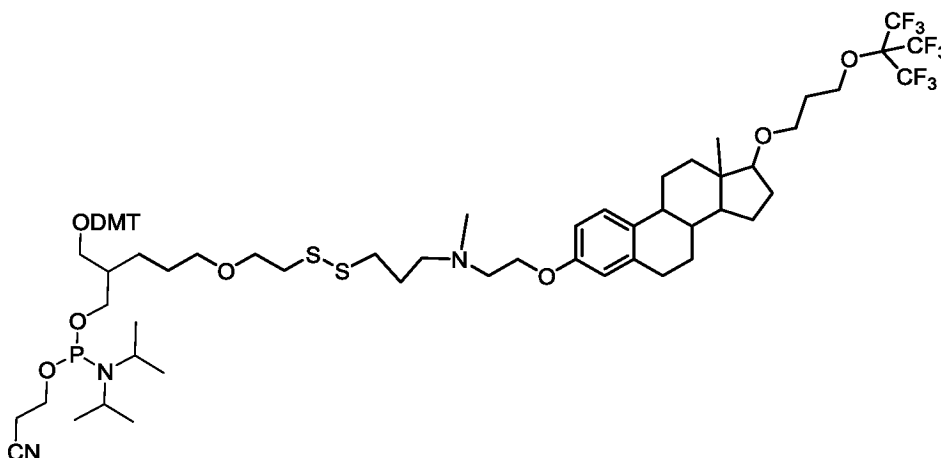
37. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (VIII-F)-предшественником**:



Формула (VIII-F)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

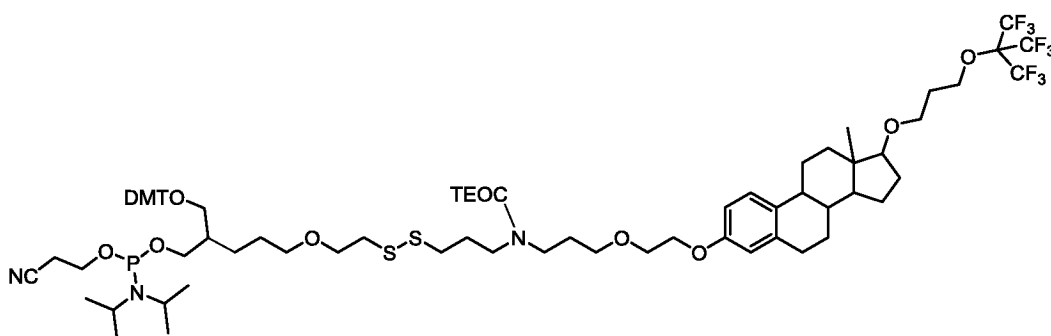
38. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (VIII-M)-предшественником**:



Формула (VIII-M)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (VIII-M)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

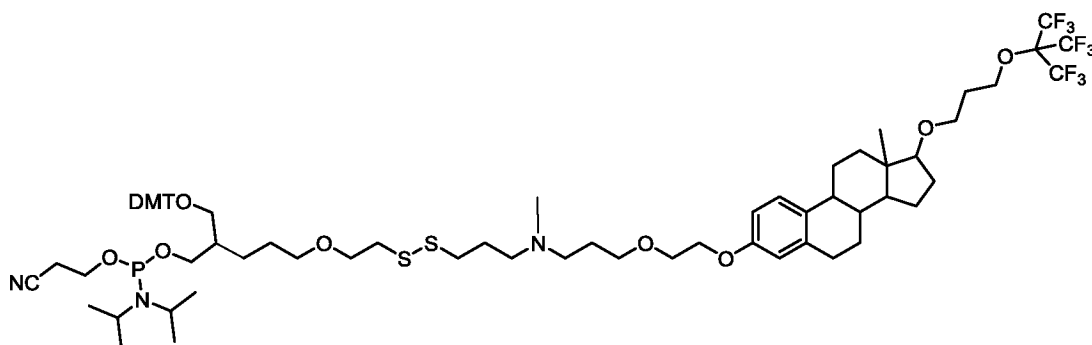
39. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (XIV-F)-предшественником**:



Формула (XIV-F)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XIV-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

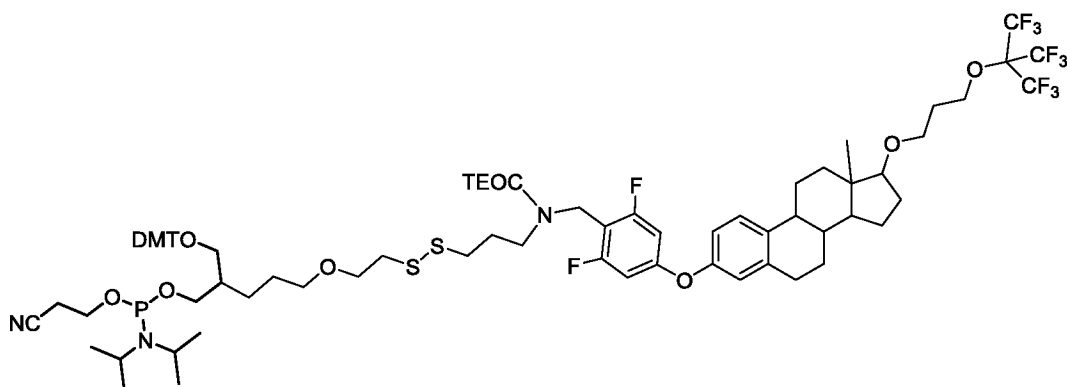
40. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (XIV-M)-предшественником**:



Формула (XIV-M)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного указанной структурой, а также сольваты и гидраты таких солей.

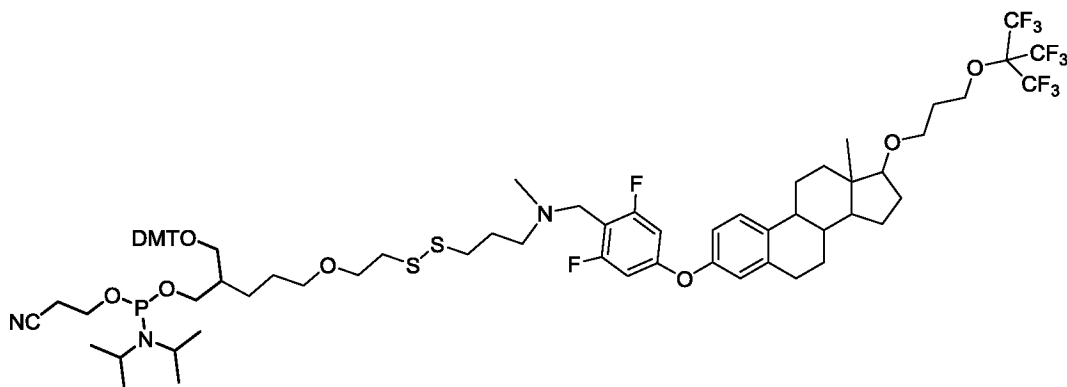
41. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (XV-F)-предшественником**:



Формула (XV-F)-предшественник

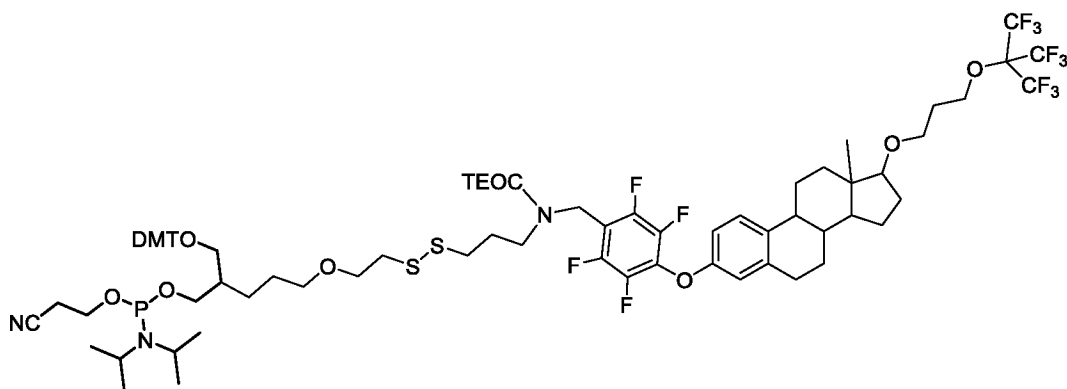
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XV-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

42. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (XV-M)-предшественником**:



Формула (XV-M)-предшественник

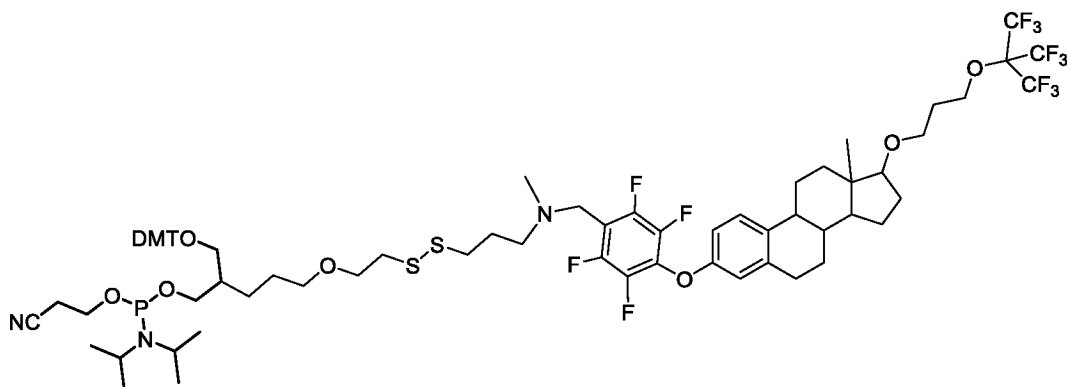
43. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (XVI-F)-предшественником**:



Формула (XVI-F)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (XVI-F)-предшественником**, а также сольваты и гидраты таких солей.

44. Молекула-предшественник по п. 35, имеющая структуру, представленную **Формулой (XVI-M)-предшественником**:



Формула (XVI-M)-предшественник

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного указанной структурой, а также сольваты и гидраты таких солей.

45. Конъюгат по п. 1, содержащий фрагменты E, E' или E'' в соответствии с любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, связанные с лекарственным соединением.

46. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по п. 45 и фармацевтически приемлемую соль или носитель.

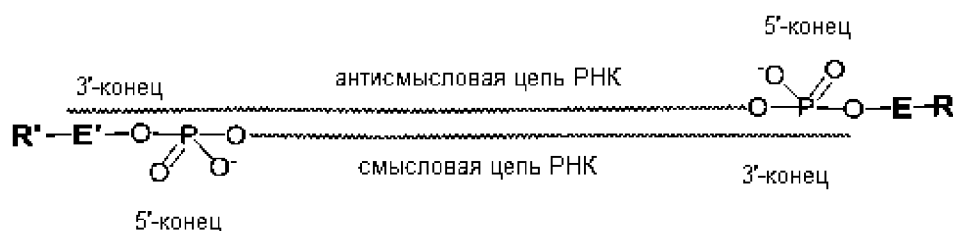
47. Конъюгат по п. 45, отличающийся тем, что D представляет собой олигонуклеотидное лекарственное соединение (OD), включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соответствующих конъюгатов.

48. Конъюгат по п. 47, отличающийся тем, что OD представляет собой субстрат Дайсер, представляющий собой дуплекс РНК из 24 и 27 нуклеотидов, дуплекс РНК из 25 и 27 нуклеотидов или дуплекс РНК из 27 и 27 нуклеотидов.

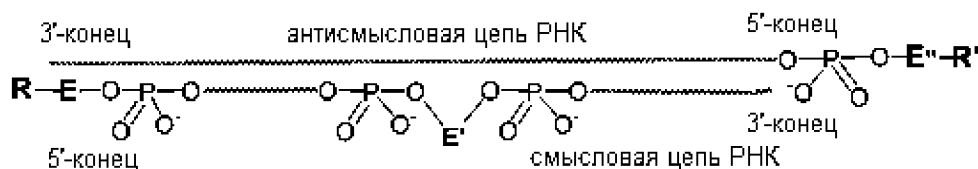
49. Конъюгат по п. 47, состав которого выбран из следующих вариантов: (i). OD связано с одним фрагментом E, E' или E"; (ii). OD связано с двумя фрагментами E, которые являются одинаковыми или различными; (iii). OD связано с тремя фрагментами E, которые являются одинаковыми или различными; (iv). OD связано с несколькими ($n > 3$) фрагментами E, которые являются одинаковыми или различными; и при этом для каждого конъюгата фрагменты E, E' или E" также могут быть связаны с фрагментами R или R', каждый из которых является таким, как указано в п. 1.

50. Конъюгат по п. 47, отличающийся тем, что OD представляет собой миРНК или дмиРНК, которая содержит по меньшей мере один фрагмент E во внутреннем положении вдоль олигонуклеотидной цепи; указанное внутреннее положение представляет собой положение № 12 или положение № 14 олигонуклеотидной цепи, заменяющее соответствующий нуклеотид или присоединенное к нуклеотидной последовательности.

51. Конъюгат по п. 47, имеющий структуру, представленную любой из следующих **Формул (Cn-1)** или **(Cn-2)**, содержащий фрагменты E, E' или E", каждый из которых имеет структуру, представленную любой из **Формул (II)**, **(III)**, **(IV)**, **(V)**, **(VI)**, **(VII)**, **(VIII)**, **(VIII-H)**, **(VIII-M)**, **(IX)**, **(X)**, **(XI)**, **(XII)**, **(XIIa)**, **(XIII)**, **(XIIIa)**, **(XIV)**, **(XIV-H)**, **(XIV-M)**, **(XV)**, **(XV-H)**, **(XV-M)**, **(XVI)**, **(XVI-H)**, **(XVI-M)**:



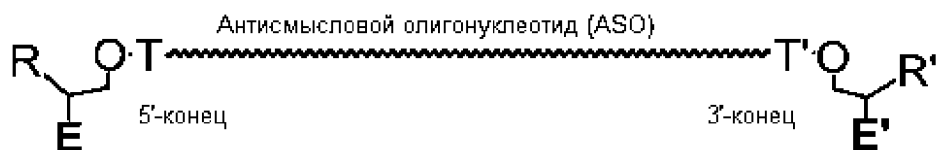
Формула (Cn-1)



Формула (Cn-2)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соответствующих конъюгатов, где каждый **R** и **R'** является таким, как указано в п. 1.

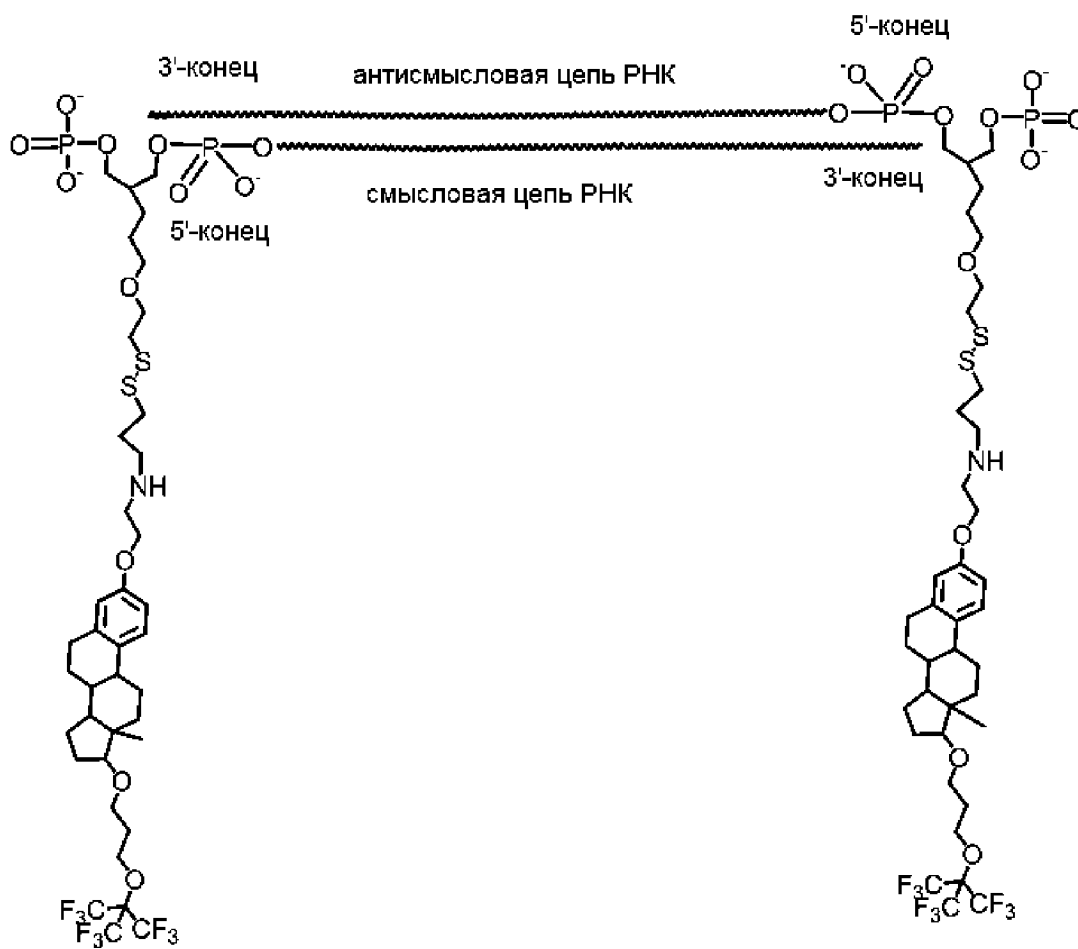
52. Конъюгат по п. **47**, отличающийся тем, что **OD** представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO), имеющий структуру, представленную **Формулой (Cn-3)**; где каждый **T** и **T'** независимо выбран из нуля и группы, состоящей из 1',2'-дидезоксирибозы, нуклеотида или их комбинаций; **T** и **T'** могут быть одинаковыми или различными; фрагменты **R** и **R'** имеют такое же значение, как указано в п. 1:



Формула (Cn-3)

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой (Cn-3)**, а также сольваты и гидраты таких солей.

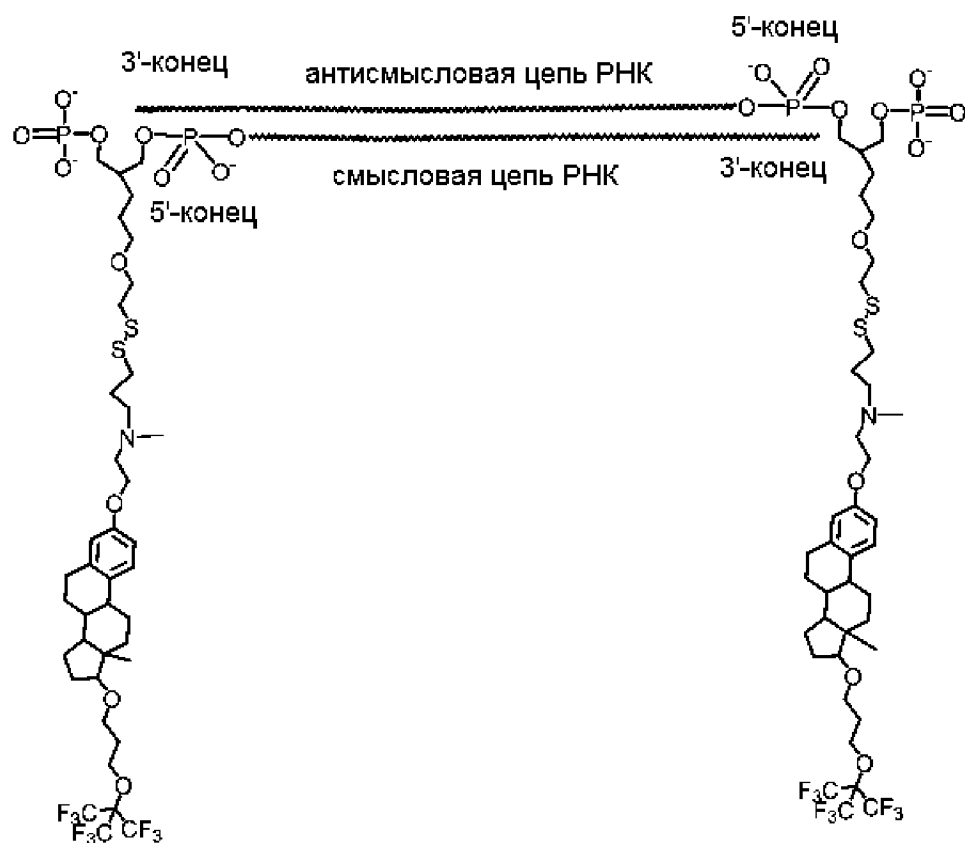
53. Конъюгат по п. **51**, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (VIII-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(VIII-H)]**:



Формула [Cn-1-(VIII-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(VIII-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

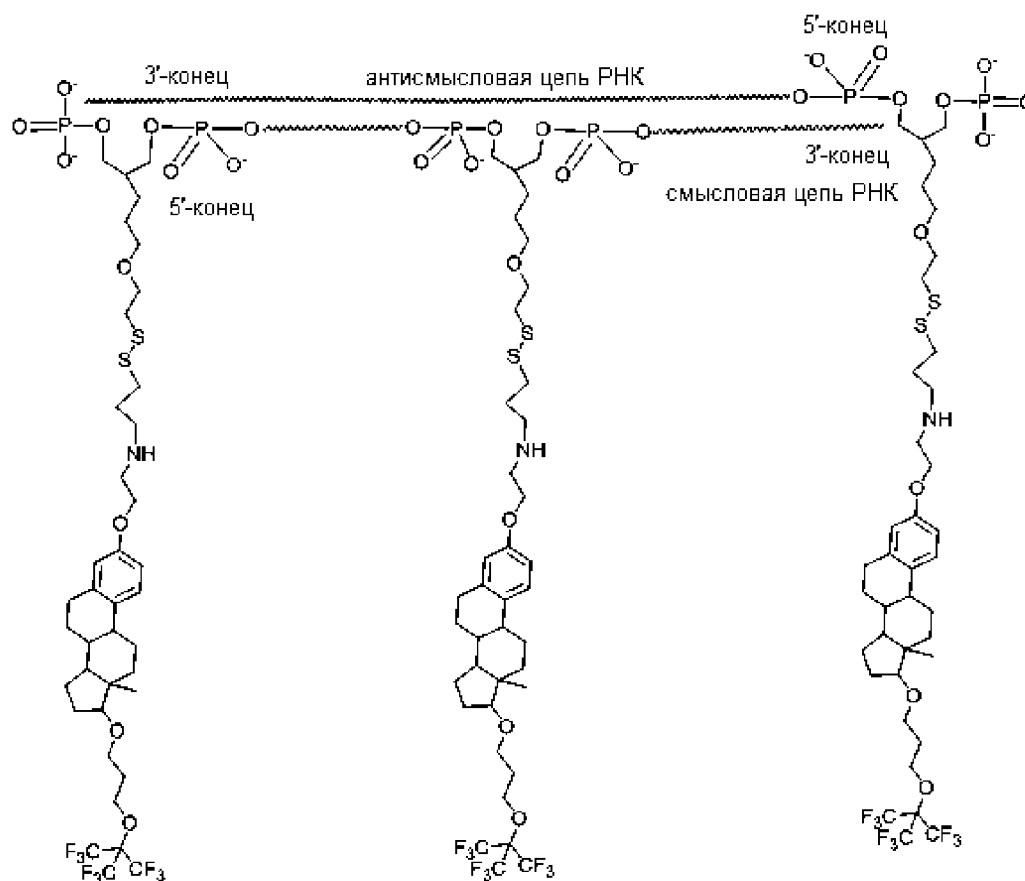
54. Конъюгат по п. **51**, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (VIII-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(VIII-M)]**:



Формула [Cn-1-(VIII-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(VIII-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

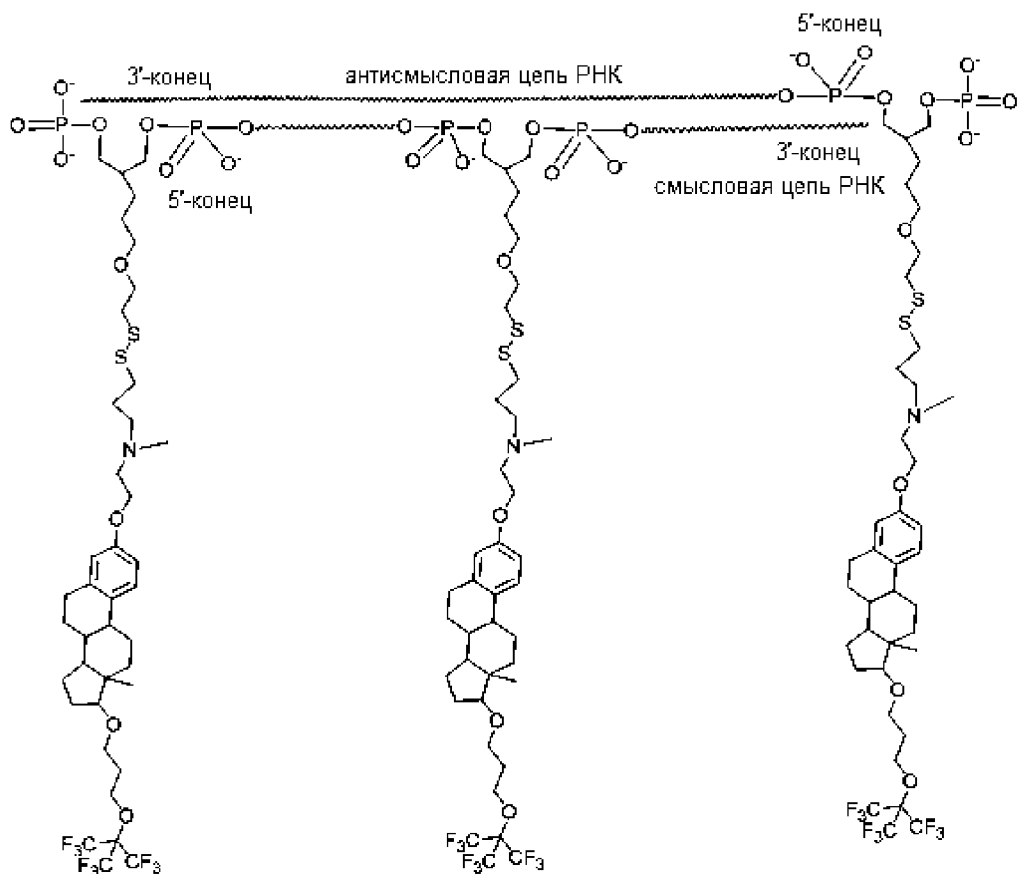
55. Конъюгат по **п. 51**, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (VIII-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(VIII-H)]**:



Формула [Cn-2-(VIII-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(VIII-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

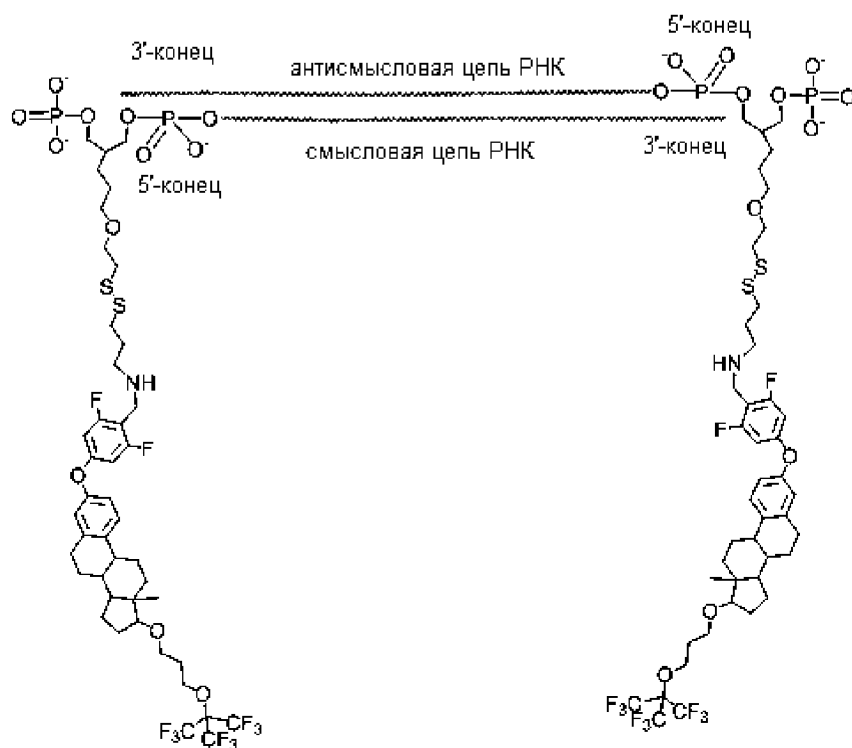
56. Конъюгат по п. **51**, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (VIII-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(VIII-M)]**:



Формула [Cn-2-(VIII-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(VIII-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

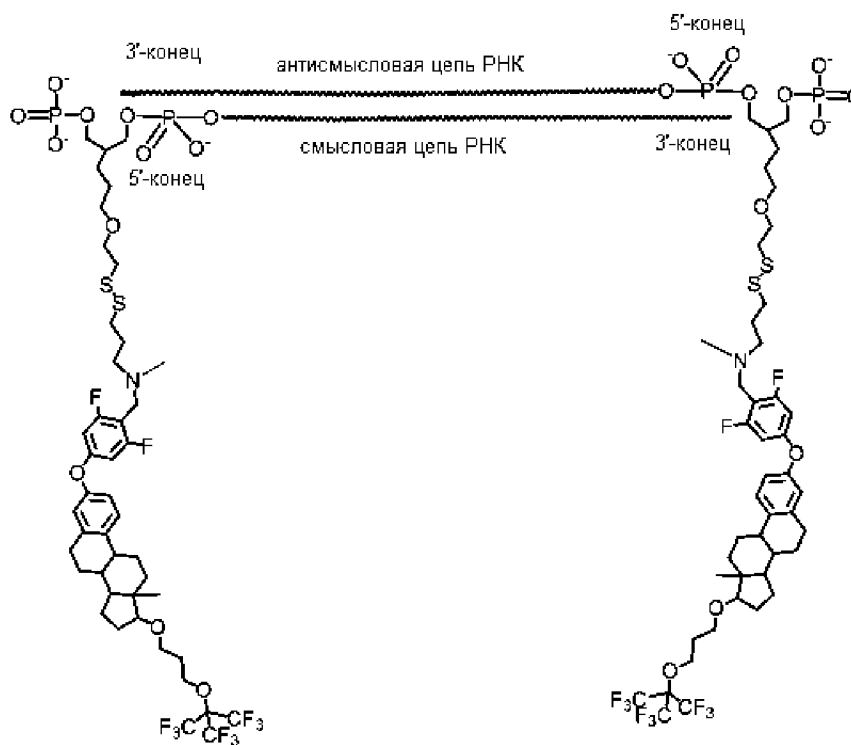
57. Конъюгат по п. 51, отличающийся тем, что каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XV-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XV-H)]**:



Формула [Cn-1-(XV-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(XV-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

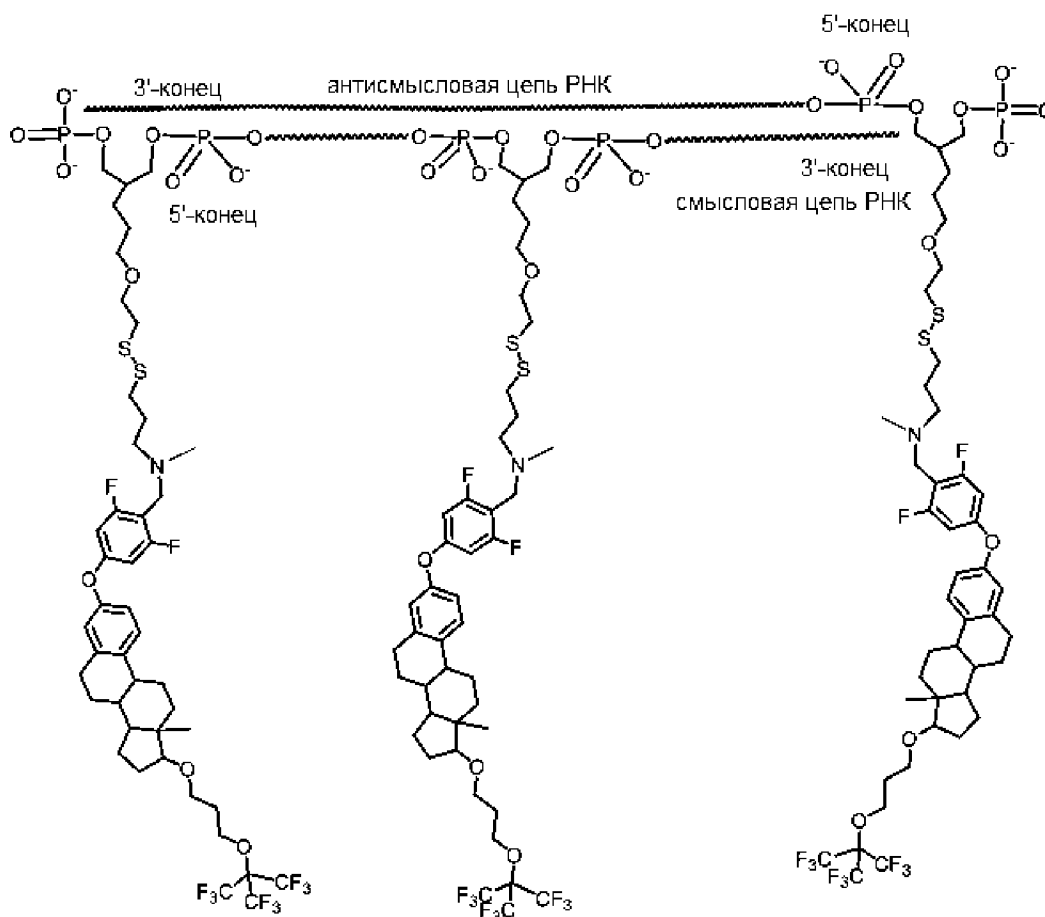
58. Конъюгат по **п. 51**, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (XV-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XV-M)]**:



Формула [Cn-1-(XV-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой** [Cn-1-(XV-M)], а также сольваты и гидраты таких солей.

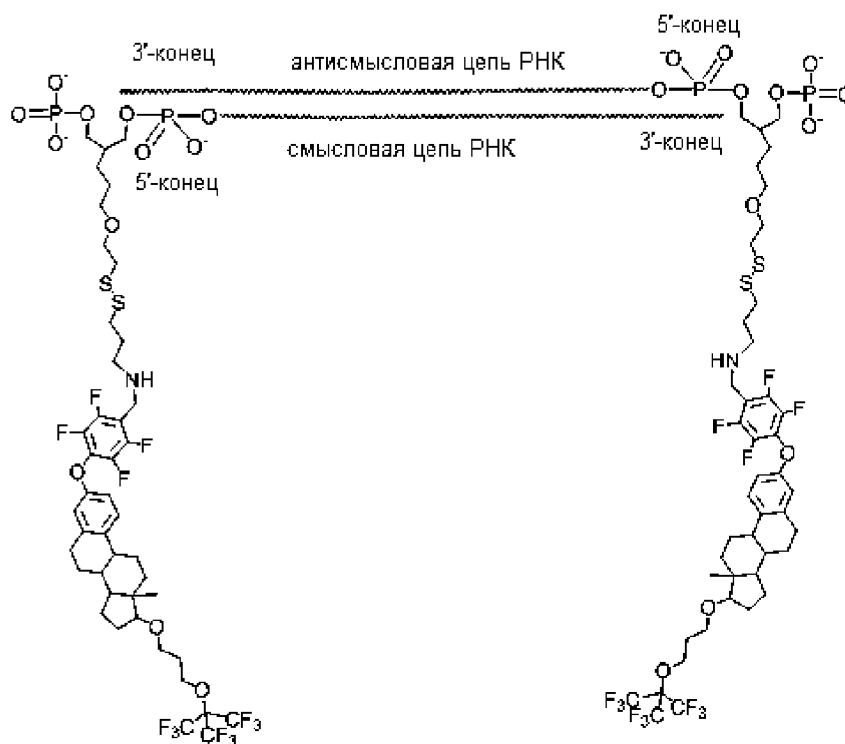
59. Конъюгат по п. 51, отличающийся тем, что каждый R и R' представляет собой фосфатную группу; и каждый E и E' соответствует **Формуле (XV-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой** [Cn-2-(XV-H)]:



Формула [Cn-2-(XV-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(XV-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

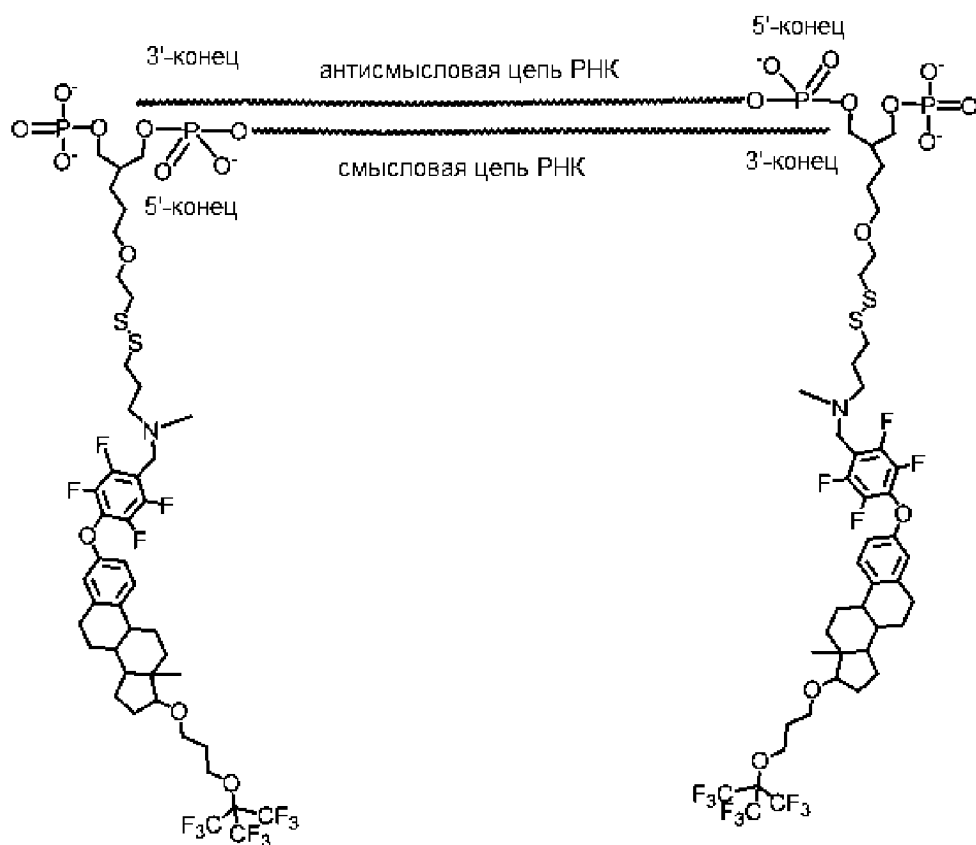
61. Конъюгат по п. **51**, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (XVI-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XVI-H)]**:



Формула [Cn-1-(XVI-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(XVI-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

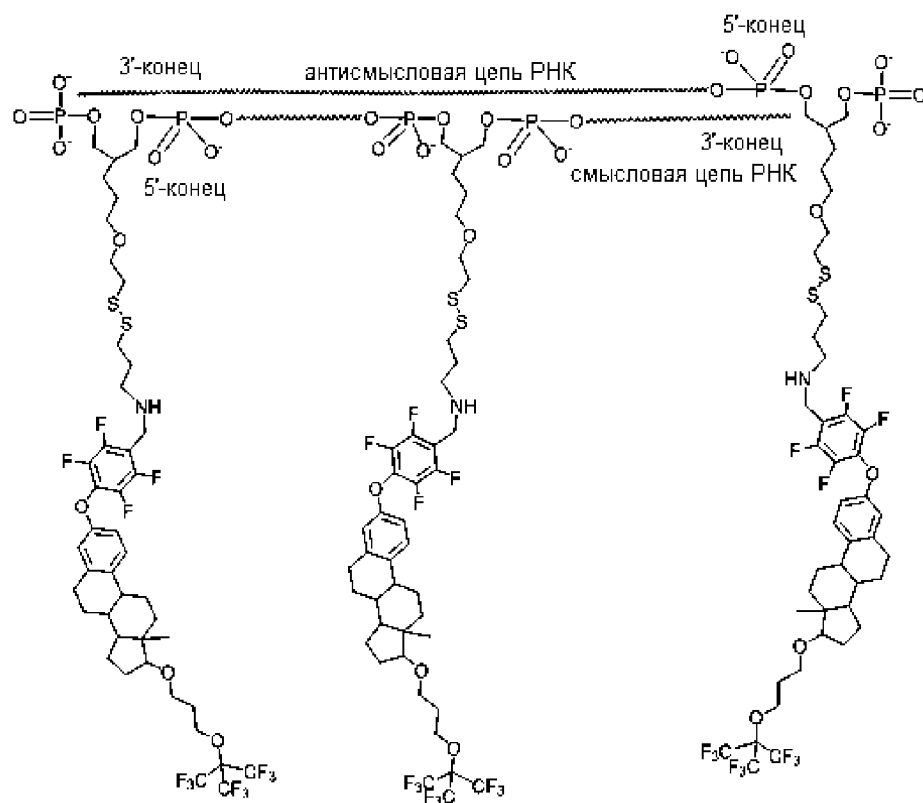
62. Конъюгат по п. 51, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (XVI-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-1-(XVI-M)]**:



Формула [Cn-1-(XVI-M)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-1-(XVI-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

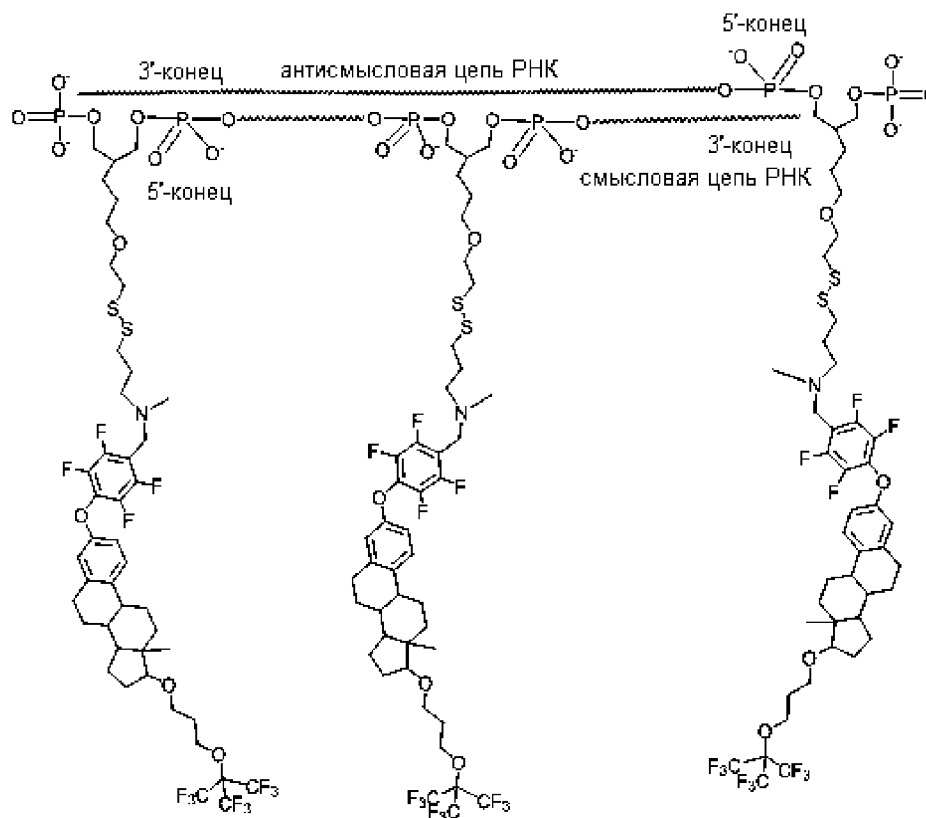
63. Конъюгат по п. **51**, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (XVI-H)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(XVI-H)]**:



Формула [Cn-2-(XVI-H)]

включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(XVI-H)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

64. Конъюгат по п. 51, отличающийся тем, что каждый **R** и **R'** представляет собой фосфатную группу; и каждый **E** и **E'** соответствует **Формуле (XVI-M)**, имеющий структуру, представленную ниже следующей **Формулой [Cn-2-(XVI-M)]**:



Формула [Cn-2-(XVI-M)]

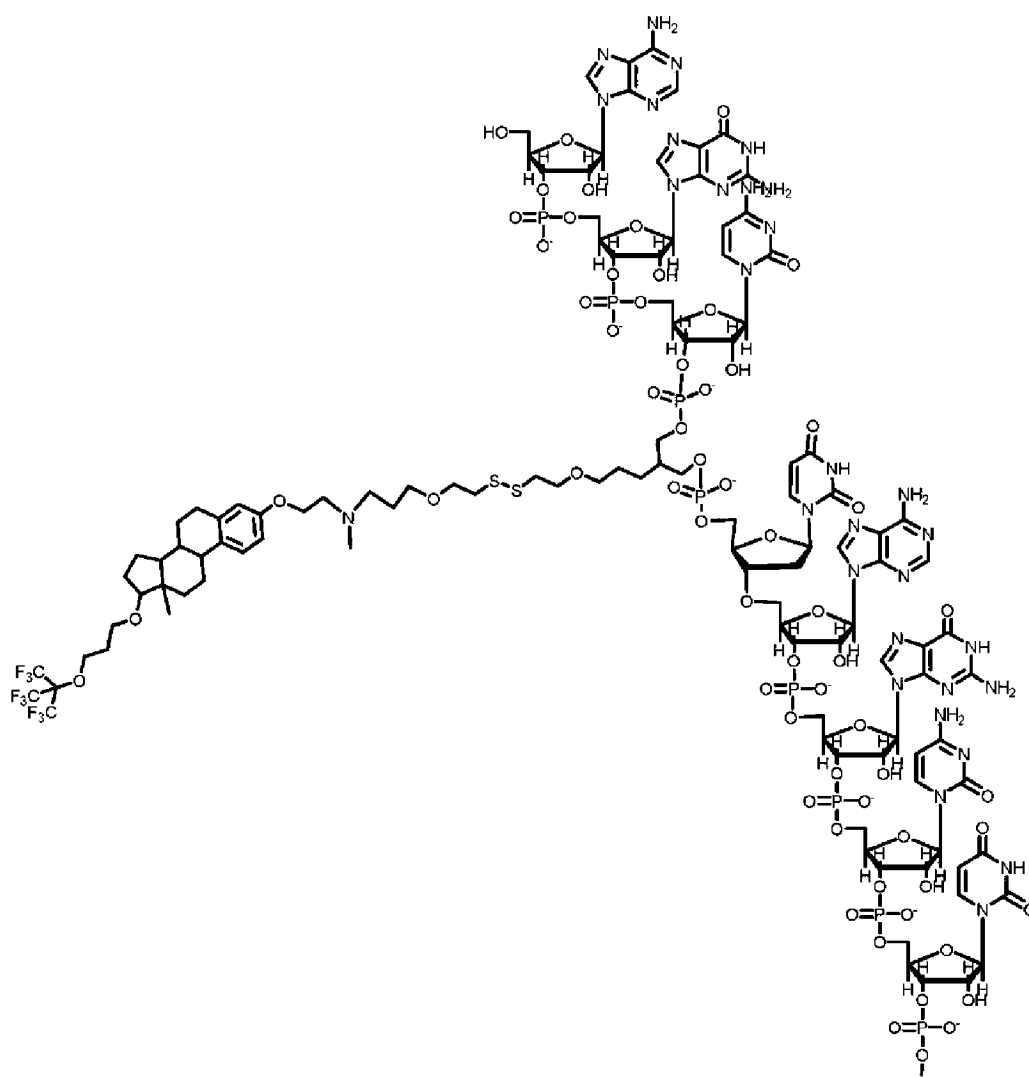
включая фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты и металло-хелаты соединения, представленного структурой, изображенной **Формулой [Cn-2-(XVI-M)]**, а также сольваты и гидраты таких солей.

65. Способ доставки лекарственного соединения в биологические клетки, в котором указанные клетки находятся в культуре или в живом организме животного или человека; предложенный способ включает приведение в контакт указанных клеток с конъюгатом по п. **45** или с фармацевтической композицией по п. **46**.

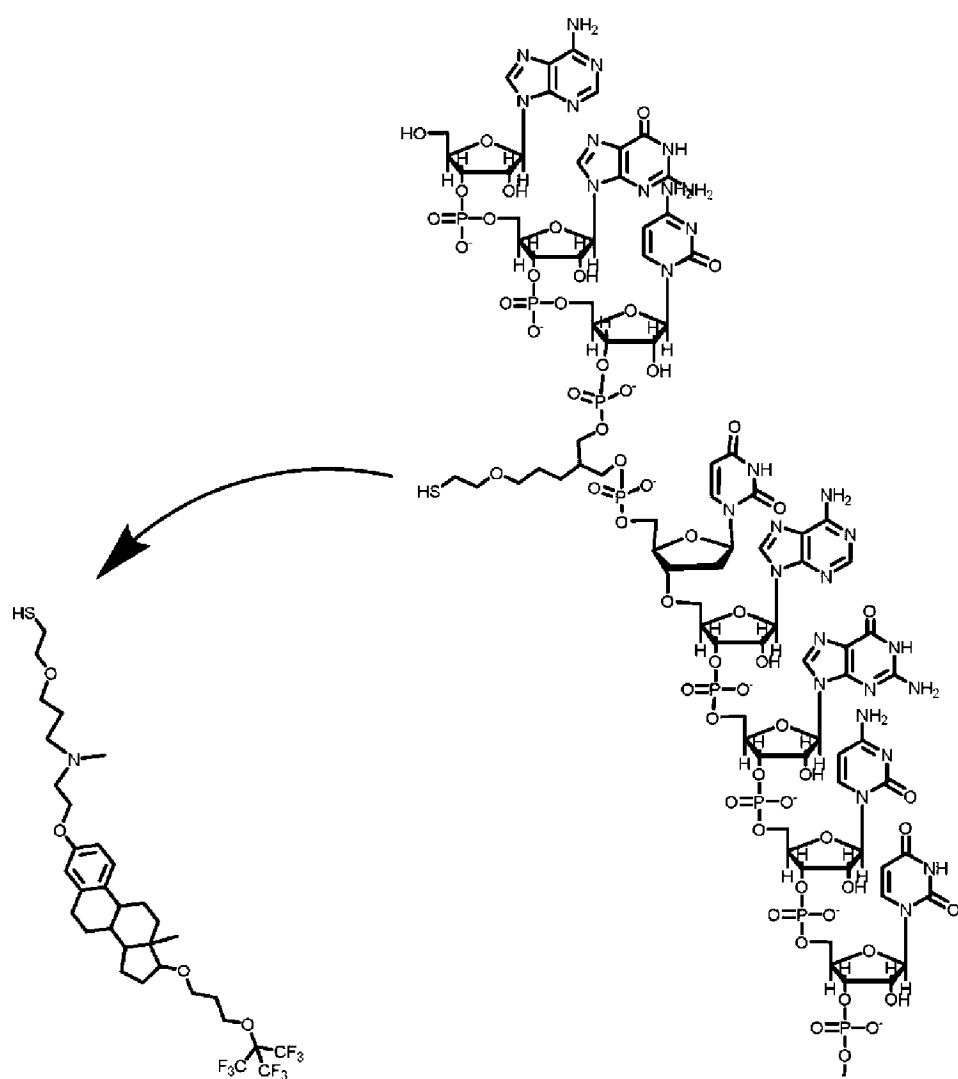
66. Способ доставки лекарственного соединения через фосфолипидную мембрану, включающий конъюгацию лекарственного соединения с фрагментом **E**, **E'** или **E''** в соответствии с любой из **Формул (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (VIII-H), (VIII-M), (IX), (X), (XI), (XII), (XIIa), (XIII), (XIIIa), (XIV), (XIV-H), (XIV-M), (XV), (XV-H), (XV-M), (XVI), (XVI-H), (XVI-M)**, и приведение в контакт полученного конъюгата с указанной фосфолипидной мембраной.

67. Способ лечения заболевания, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. **46**.

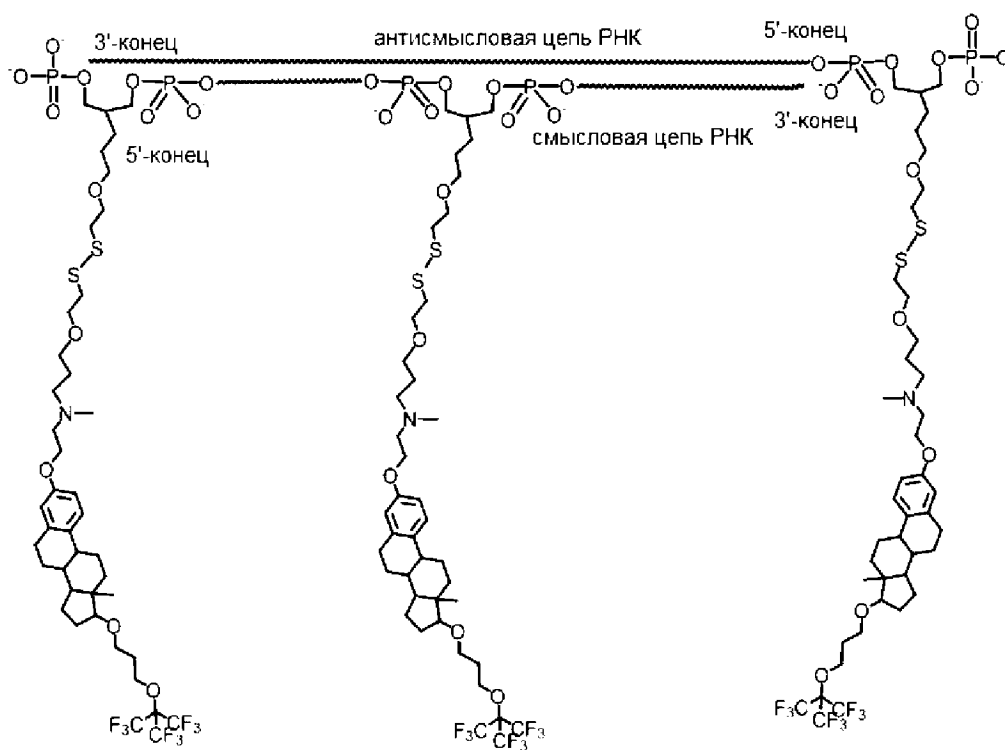
68. Способ инициации *эндоцитоза* и/или *флип-флоп-перехода* в фосфолипидной мембране; указанный способ включает приведение в контакт мембраны с любым из конъюгатов по данному изобретению.



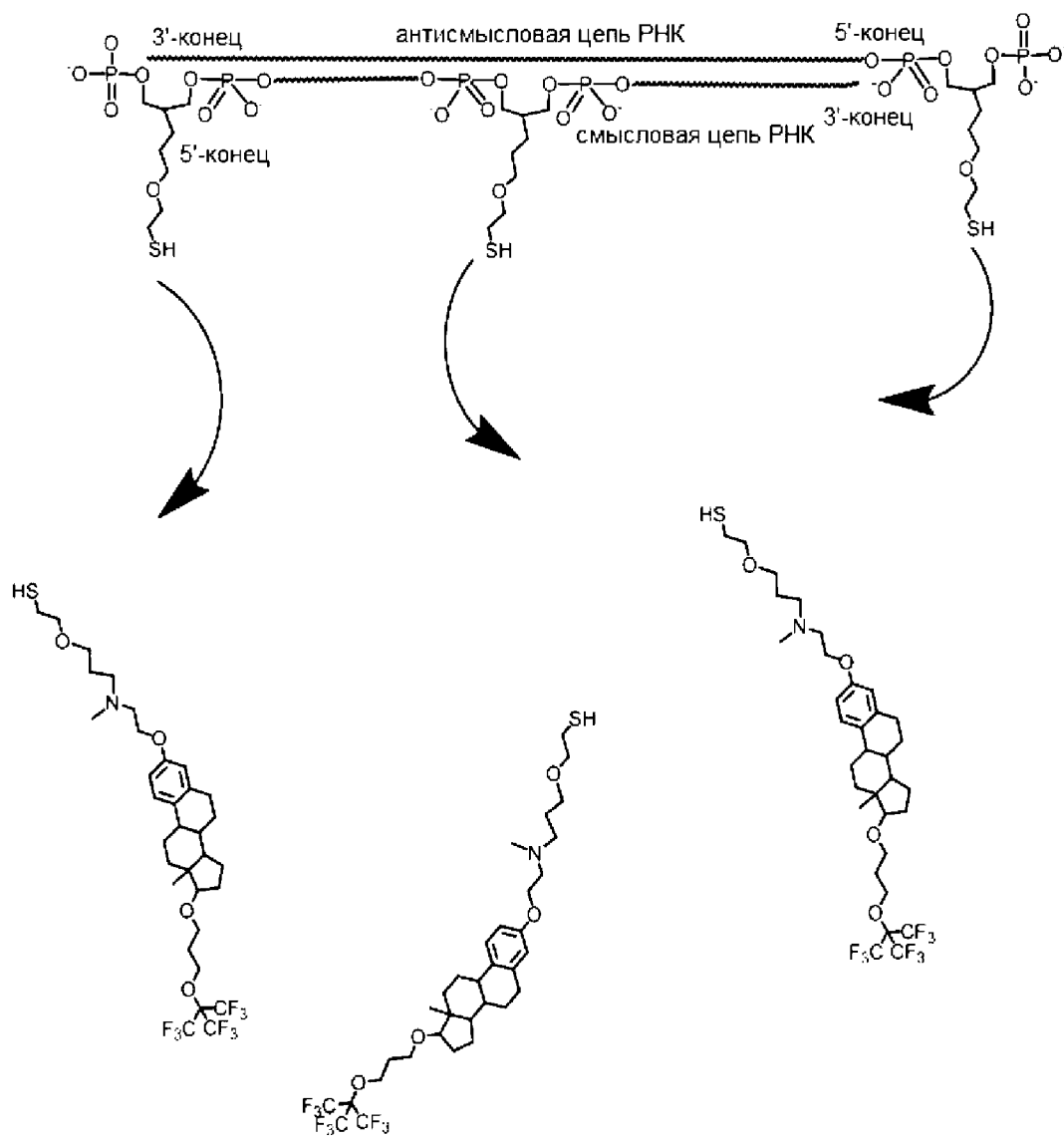
Фиг. 1А



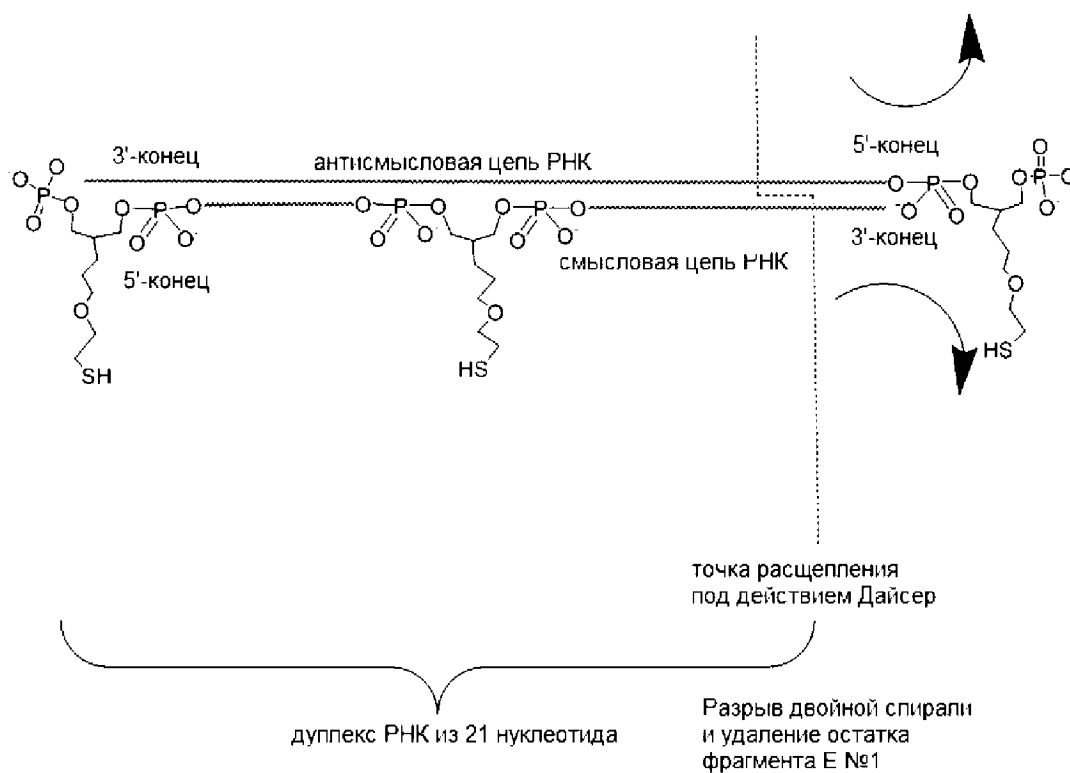
Фиг. 1В



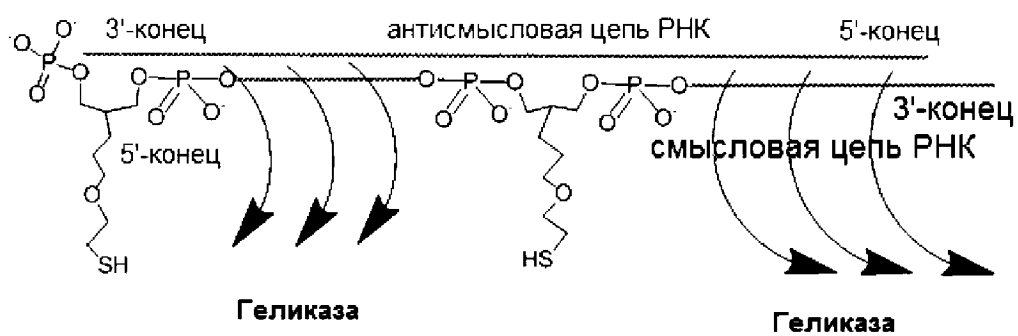
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С



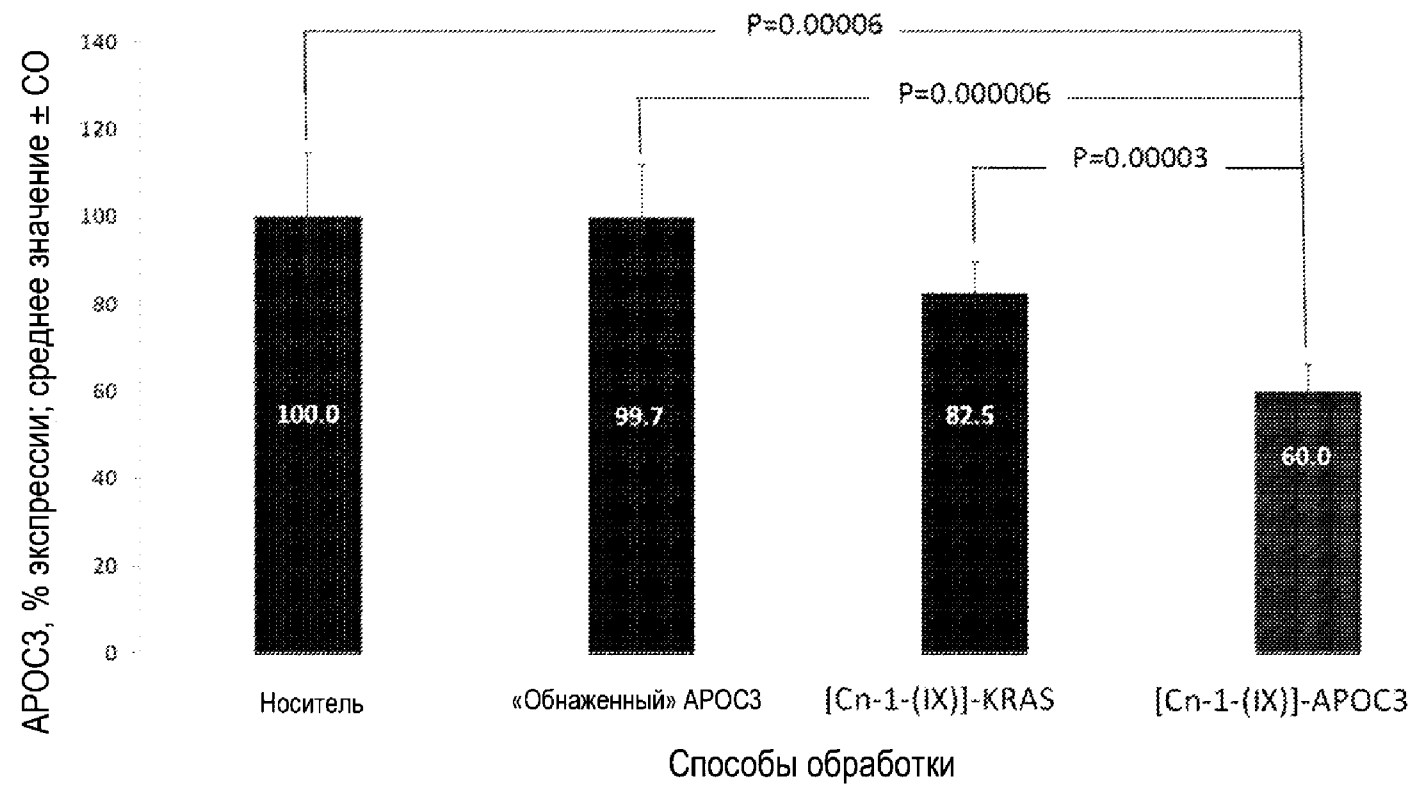
Фиг. 2D

3'-конец антисмысловая цепь РНК 5'-конец

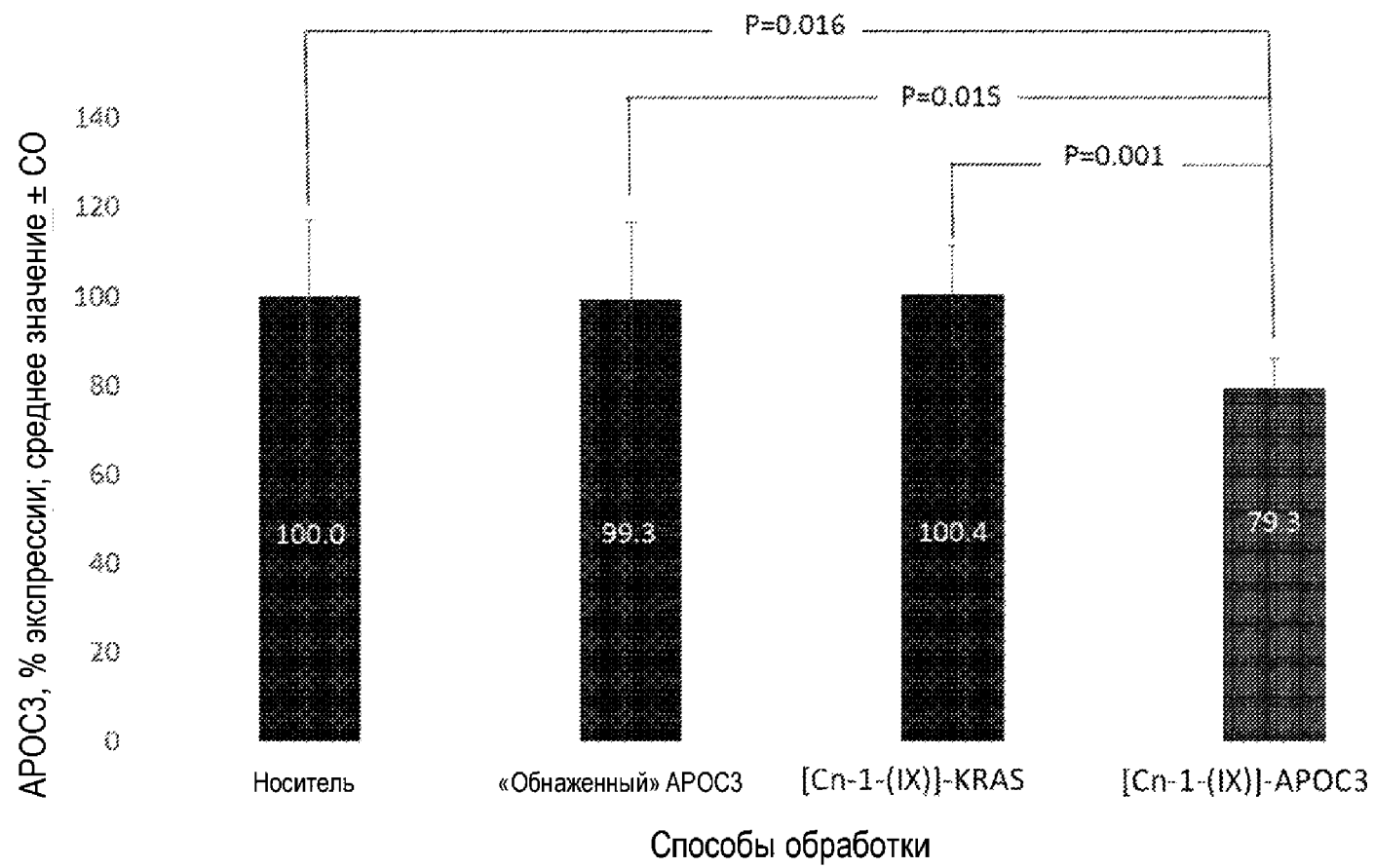


Вхождение антисмысловой цепи в комплекс RISC для сайленсинга гена

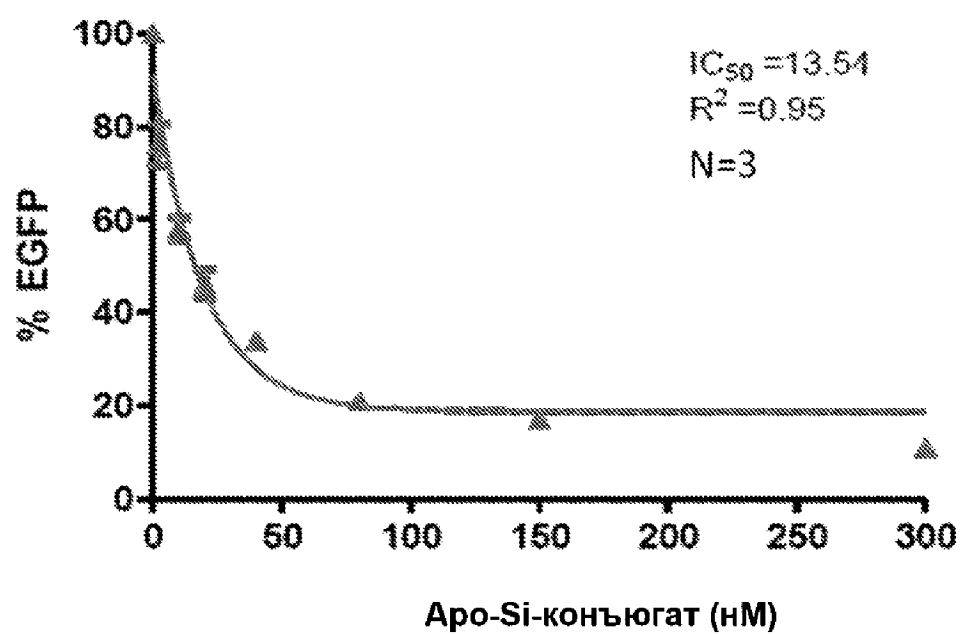
Фиг. 2Е



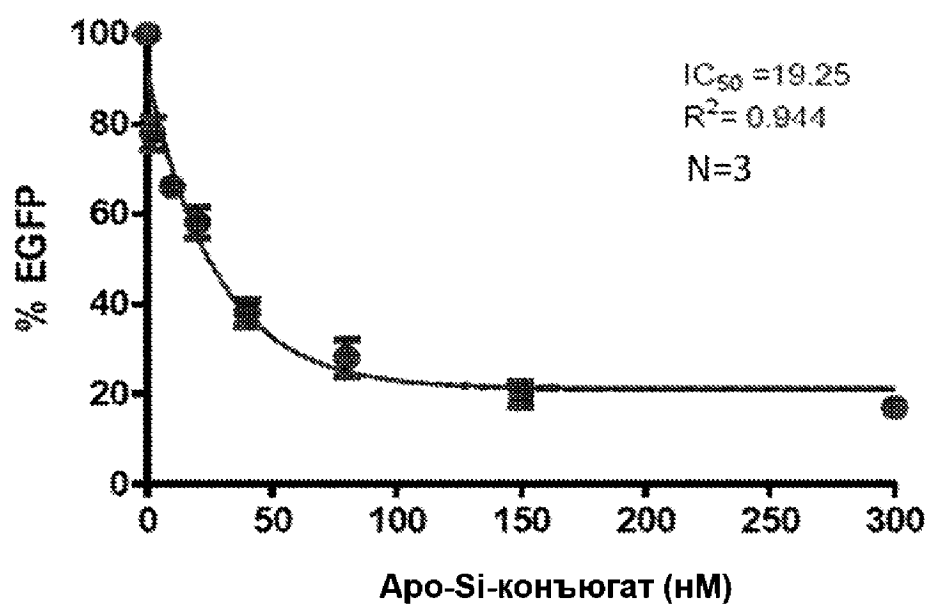
Фиг. 3А



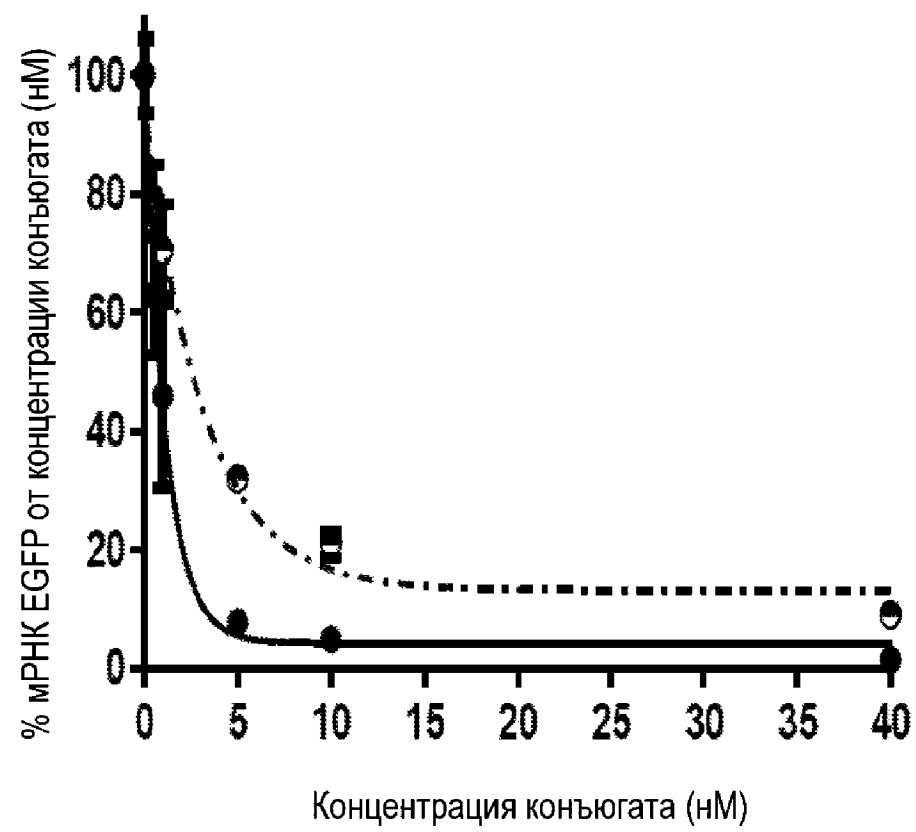
Фиг. 3В



Фиг. 4А – Клетки Hela



Фиг. 4В – Клетки 3Т3



Фиг. 5