

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092520** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.03.02

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.26

(54) **НАЦЕЛЕННЫЕ НА ИНТЕГРИН ЛИГАНДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/663,763; 62/790,372

(32) 2018.04.27; 2019.01.09

(33) US

(86) PCT/US2019/029393

(87) WO 2019/210200 2019.10.31

(71) Заявитель:
ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Ли Чжэнь, Карлсон Джеффри,
Николас Энтони, Ли Сяокай, Шу
Дунсюй, Фаулер-Уоттерс Мэттью (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны соединения, имеющие сродство к интегринам, синтез этих соединений и применение этих соединений в качестве лигандов для облегчения доставки карго-молекул в клетки, экспрессирующие интегрины. Описанные нацеленные на интегрин лиганды являются стабильными и имеют сродство в сыворотке к интегрину $\alpha\nu\beta 3$ и/или интегрину $\alpha\nu\beta 5$, и подходят для конъюгации с карго-молекулами, такими как терапевтические агенты на основе олигонуклеотидов (например, агенты РНКи), для облегчения доставки карго-молекулы в клетки и ткани, такие как опухолевые клетки, которые экспрессируют интегрин $\alpha\nu\beta 3$, интегрин $\alpha\nu\beta 5$ или оба интегрин $\alpha\nu\beta 3$ и интегрин $\alpha\nu\beta 5$. Также описаны композиции, которые включают нацеленные на интегрин лиганды и способы применения.

A1

202092520

202092520

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564980EA/025

НАЦЕЛЕННЫЕ НА ИНТЕГРИН ЛИГАНДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительных заявок на патент США 62/663,763, выданной 27 апреля 2018 г., и 62/790,372, выданной 9 января 2019 г., которые включены в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Раскрыты соединения, которые обладают сродством к интегринам, способы синтеза таких соединений и применение таких соединений в качестве лигандов для *in vivo* доставки карго-молекул.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Интегрины являются трансмембранными гликопротеинами, которые опосредуют межклеточные взаимодействия и взаимодействия клетка-матрикс. Интегрины альфа- v бета-3 ($\alpha v\beta 3$) и альфа- v бета-5 ($\alpha v\beta 5$) являются членами суперсемейства интегринов молекул клеточной адгезии и известны как рецепторы белка внеклеточного матрикса (ECM) витронектина. (Horton, MA, 29(5) Int. J. Biochem. Cell Biol. 721-725 (1997)). Считается, что измененная экспрессия некоторых интегринов, включая интегрин $\alpha v\beta 3$ и интегрин $\alpha v\beta 5$, способствует прогрессированию опухоли, инвазивности и метастазированию.

[0004] Действительно, во многих опухолевых клетках обнаружена сверхэкспрессия интегринов, включая интегрины $\alpha v\beta 3$ и $\alpha v\beta 5$ (Desgrosellier, JS et al., Nat Rev Cancer, 10 (1):9-22 (2010)). Для использования при различных заболеваниях, связанных с измененной функцией интегрин рассматривали антагонисты $\alpha v\beta 3$ (и, в меньшей степени, $\alpha v\beta 5$). Например, были предприняты попытки разработать ингибиторы $\alpha v\beta 3$ в качестве потенциальных средств лечения рака, поскольку было показано, что ингибирование рецептора $\alpha v\beta 3$ подавляет ангиогенез, тем самым предотвращая образование новых кровеносных сосудов, которые, как считается, необходимы для роста опухоли. (См., например, Brooks et al., 79 Cell 1157-1164 (1994); Mas-Moruno et al., Anticancer Agents Med Chem, 10(10):753-768). Однако один из ведущих примеров ингибитора $\alpha v\beta 3$, антагонист циленгитид, оказался неэффективным в клинических испытаниях, направленных на ограничение ангиогенеза и прогрессирования опухоли у пациентов с глиобластомой. (См., например, Ley et al., Integrin-based Therapeutics: Biological Basis, Clinical Use and New Drugs, 15(3) Nat. Rev. Drug Discov. 173-183 (2016)).

[0005] В общем, доставка грузовых молекул *in vivo*, включая терапевтически эффективные фармацевтические соединения или активные фармацевтические ингредиенты, к требуемым клеткам и/или тканям, продолжает оставаться общей проблемой при разработке терапевтически жизнеспособных лекарственных продуктов. По-прежнему существует потребность в стабильных и эффективных таргетных соединениях, которые обладают сродством и/или способны избирательно связываться с

конкретными клетками и тканями и которые можно использовать или применять в качестве лигандов для облегчения доставки терапевтических карго-молекул к этим конкретным клеткам или ткани. Более того, существует особая потребность в соединениях, которые способны селективно воздействовать на интегрин альфа-v бета-3 и которые подходят для конъюгирования с карго-молекулами и *in vivo* доставки карго-молекул в экспрессирующие такие интегрин клетки, например опухолевые клетки. Для олигонуклеотидов и, в частности, терапевтических средств на основе олигонуклеотидов (например, соединения на основе олигонуклеотида, такого как антисмысловый олигонуклеотид или РНКи-агент), продолжает существовать потребность в лигандах, которые способны нацеливаться на интегрин альфа-v бета-3 и/или интегрин альфа-v бета-5 и облегчают доставку этих соединений на основе олигонуклеотидов в клетки, экспрессирующие такие интегрин.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем описании представлены соединения, которые обладают сродством к определенным интегринам, включая $\alpha v \beta 3$ и $\alpha v \beta 5$, которые можно использовать в качестве лигандов (называемых в настоящем описании «нацеленными на интегрин лигандами», «нацеленными на интегрин $\alpha v \beta 3$ лигандами», «лигандами интегрин $\alpha v \beta 3$ » или просто «лигандами интегрин») для избирательного нацеливания соединений или других молекул, к которым они присоединены, на клетки или ткани, экспрессирующие интегрин $\alpha v \beta 3$ и/или $\alpha v \beta 5$. Раскрытые в настоящем описании нацеленные на интегрин лиганды являются стабильными в сыворотке, обладают сродством к интегринам и могут специфически связываться с ними. Раскрытые в настоящем описании нацеленные на интегрин лиганды могут быть конъюгированы с карго-молекулой(ами) для облегчения доставки карго-молекулы(молекул) к клеткам или тканям, экспрессирующим интегрин $\alpha v \beta 3$ и/или $\alpha v \beta 5$.

[0007] В другом аспекте описаны способы доставки карго-молекулы в ткань и/или клетку, экспрессирующую интегрин $\alpha v \beta 3$ и/или интегрин $\alpha v \beta 5$ *in vivo*, при этом способы включают введение субъекту одного или более раскрытых в настоящем описании лигандов, нацеленных на интегрин, которые конъюгированы с одной или более карго-молекулами. Кроме того, раскрыты способы лечения субъекта, страдающего заболеванием, имеющим симптомом или расстройством, при которых доставка терапевтической карго-молекулы (например, активного фармацевтического ингредиента) в клетку, экспрессирующую интегрин $\alpha v \beta 3$ и/или интегрин $\alpha v \beta 5$, способна оказать лечебное воздействие у субъекта, при этом способы включают введение субъекту одного или более нацеленных на интегрин лигандов, раскрытых в настоящем документе, которые конъюгированы с одной или более терапевтическими карго-молекулами.

[0008] Кроме того, в настоящем описании представлены способы подавления экспрессии целевого гена в клетке *in vitro* или *in vivo*, при этом способы включают введение в клетку эффективного количества конъюгата, включающего один или более нацеленных на интегрин лигандов, раскрытых в настоящем описании, которые

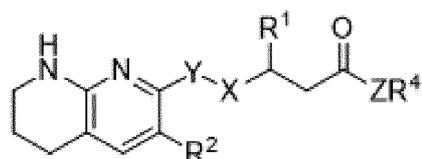
конъюгированы с одним или более терапевтическими средствами на основе олигонуклеотидов, таких как агент РНКи, способных подавлять экспрессию целевого гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлены способы подавления экспрессии целевого гена в клетке субъекта, при этом субъекту вводят эффективное количество одного или более терапевтических средств на основе олигонуклеотидов (таких как агент РНКи), которые конъюгированы с одним или более нацеленными на интегрин лигандами, раскрытыми в настоящем описании.

[0009] В еще одном аспекте описаны композиции, которые включают нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании. Композиции, раскрытые в настоящем описании, могут быть фармацевтическими композициями или лекарственными средствами, которые включают один или более нацеленных на интегрин лигандов, раскрытых в настоящем описании, конъюгированных с одной или более терапевтическими карго-молекулами, такими как агент РНКи или другая карго-молекула, или терапевтическим веществом.

[0010] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлены способы лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, опосредованным, по меньшей мере частично, экспрессией целевого гена в клетке, экспрессирующей интегрин $\alpha\beta 3$, причем способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, включающей одно или более терапевтических средств на основе олигонуклеотидов, способных подавлять экспрессию целевого гена, таких как агент РНКи, конъюгированных с одним или более нацеленными на интегрин лигандами, раскрытыми в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлены способы лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, опосредованным, по меньшей мере частично, экспрессией гена-мишени в опухолевой клетке, при этом способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, включающей одно или более терапевтических средств на основе олигонуклеотидов, способных подавлять экспрессию целевого гена, таких как агент РНКи, конъюгированных с одним или более нацеленными на интегрин лигандами, раскрытыми в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлены способы лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, опосредованным, по меньшей мере частично, экспрессией целевого гена в опухолевой клетке почки, такой как опухолевая клетка светлоклеточной карциномы почек, при этом способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, включающей одно или более терапевтических средств на основе олигонуклеотидов, способных подавлять экспрессию целевого гена, таких как агент РНКи, конъюгированных с одним или более нацеленными на интегрин лигандами, раскрытыми в настоящем описании.

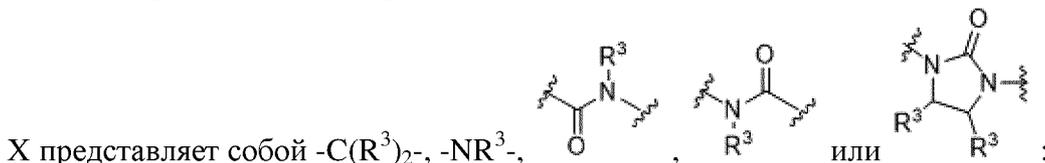
[0011] В первом аспекте в настоящем описании представлены синтетические нацеленные на интегрин лиганды.

[0012] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, включает структуру следующей формулы:



(формула I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где,



Y представляет собой необязательно замещенный C_1-C_8 алкилен;

Z представляет собой O, NR^3 или S;

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из Y, R^1 , R^2 , любого радикала R^3 и R^4 содержит карго-молекулу.

[0013] Любой из раскрытых в настоящем описании нацеленных на интегрин лигандов может быть связан с карго-молекулой, реакционноспособной группой и/или защищенной реакционноспособной группой. Связывание с реакционноспособной группой, например, можно использовать для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с карго-молекулой. Нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут усиливать нацеливание карго-молекулы на клетку, экспрессирующую интегрин, включая интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и/или интегрин $\alpha\upsilon\beta 5$. Карго-молекула может представлять собой, без ограничения, фармацевтически активный ингредиент или соединение, пролекарство или другое вещество с известным терапевтическим эффектом. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула может представлять собой, без ограничения, малую молекулу, антитело, фрагмент антитела, иммуноглобулин, моноклональное антитело, метку или маркер, липид, природный или модифицированный олигонуклеотид, модифицированное соединение на основе олигонуклеотида (например, антисмысловый олигонуклеотид или агент РНКи), природную или модифицированную нуклеиновую кислоту, пептид, аптамер, полимер, полиамин, белок, токсин, витамин, полиэтиленгликоль, гаптен, дигоксигенин, биотин,

радиоактивный атом или молекулу или флуорофор. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула включает фармацевтически активный ингредиент или пролекарство. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула представляет собой или включает терапевтическое средство на основе олигонуклеотида, такое как антисмысловое соединение или агент РНКи. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула представляет собой или включает соединение на основе олигонуклеотида, которое является фармацевтически активным ингредиентом. В некоторых вариантах осуществления карго-молекула представляет собой или включает агент РНКи, который является фармацевтически активным ингредиентом.

[0014] В настоящем описании представлено применение описанных лигандов, нацеленных на интегрин $\alpha\beta 3/5$, для нацеливания и доставки карго-молекулы в клетку, экспрессирующую интегрин. Карго-молекула может быть доставлена в клетку *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* или *in vivo*.

[0015] В другом аспекте в настоящем раскрытии представлены композиции, которые включают один или более нацеленных на интегрин лигандов, раскрытых в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие один или более нацеленных на интегрин лигандов, раскрытых в настоящем описании, включают одно или более соединений на основе олигонуклеотидов, таких как один или несколько агентов РНКи, для *in vivo* доставки в клетку. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлены композиции для *in vivo* доставки агента РНКи в клетку, причем агент РНКи связан с одним или более нацеленными на интегрин лигандами.

[0016] Описаны композиции, которые включают один или более нацеленных на интегрин лигандов. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления композиция, которая включает один или более нацеленных на интегрин лигандов, содержит одно или более других фармацевтических веществ или фармацевтически активных ингредиентов или соединений. В некоторых вариантах осуществления описаны лекарственные средства, которые включают один или более нацеленных на интегрин лигандов.

[0017] Композиции, которые включают один или более нацеленных на интегрин лигандов, раскрытых в настоящем описании, могут быть доставлены *in vivo* или *in vitro* в различные раковые клетки, включая, например, опухолевые клетки светлоклеточной карциномы почек (например, A498), другие клетки рака почки (например, ACHN, CAKI-2, 769-P, 786-O), клетки меланомы (например, A375), клетки глиобластомы (например, U87MG), клетки рака поджелудочной железы (например, (PANC-1), клетки рака легкого (например, H460, H661, H1573, H2126), клетки рака толстой кишки (например, HT29, HCT116), клетки рака печени (например, Hep2G, Hep3B), клетки рака груди (например, MCF7, SK-BR3), клетки рака простаты (например, DU145, PC3, LNCaP, MDA-PCa-2b), клетки рака полости рта (например, KB), клетки рака языка (например, CAL27, SCC9),

клетки рака глотки (например, Detroit562) и/или клетки рака яичников (например, OVCAR3, SKOV3, A2780), и/или другие ксенотрансплантаты, полученные от пациента.

[0018] В другом аспекте представлены способы, которые включают применение одного или более нацеленных на интегрин лигандов и/или композиций, раскрытых в настоящем описании, и, при необходимости, придания раскрытым нацеленным на интегрин лигандам и/или композициям формы, подходящей для введения в качестве фармацевтического продукта. В других вариантах осуществления предоставлены способы производства лигандов и композиций, например, лекарственных средств, раскрытых в настоящем описании.

[0019] Композиции, которые включают один или более нацеленных на интегрин лигандов можно вводить субъектам *in vivo* с помощью способов введения, известных в данной области техники, которые подходят для такого введения с учетом предполагаемой для введения карго-молекулы, включая, например, подкожное, внутривенное, внутриопухолевое, ингаляционное (аэрозольные или сухие порошковые препараты), интраназальное, внутривентральное, внутрикожное, трансдермальное, пероральное, сублингвальное или местное введение. В некоторых вариантах осуществления композиции, которые включают один или более нацеленных на интегрин лигандов можно вводить для системной доставки, например, путем внутривенного или подкожного введения.

[0020] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы *in vivo* доставки одной или более требуемых карго-молекул в опухолевую клетку светлоклеточной карциномы почек, причем способы включают введение субъекту одного или более нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с одной или более карго-молекулами.

[0021] В некоторых вариантах осуществления раскрыты способы *in vivo* доставки соединения на основе олигонуклеотида в опухолевую клетку, причем способы включают введение субъекту одного или более нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с одним или более соединениями на основе олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании раскрыты способы *in vivo* доставки агента РНКи в опухолевую клетку, причем способы включают введение субъекту одного или более нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с одним или более агентами РНКи. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы подавления *in vivo* экспрессии гена-мишени в опухолевой клетке светлоклеточной карциномы почек, при этом способы включают введение субъекту агента РНКи, конъюгированного с одним или более лигандами, имеющими сродство к интегрину $\alpha v \beta 3$ и/или интегрину $\alpha v \beta 5$.

[0022] Другие объекты, особенности, аспекты и преимущества изобретения будут очевидны из приведенных ниже подробного описания и формулы изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

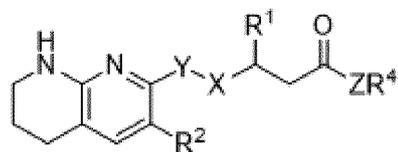
Нацеленные на интегрин лиганды

[0023] В настоящем описании представлены соединения, которые обладают сродством к интегринам, демонстрируют *in vivo* стабильность в сыворотке крови и могут использоваться в качестве лигандов для облегчения доставки карго-молекул в клетки и/или ткани, экспрессирующие интегрины, такие как интегрин $\alpha\beta3$ и/или интегрин $\alpha\beta5$. Нацеленные на интегрин лиганды можно использовать для нацеливания на клетки, которые экспрессируют интегрины *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* и/или *in vivo*.

[0024] В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, могут быть конъюгированы с одной или более карго-молекулами, чтобы предпочтительно направлять и нацеливать карго-молекулы на клетки или ткани, экспрессирующие интегрины, включая интегрин $\alpha\beta3$ и/или интегрин $\alpha\beta5$. В некоторых вариантах осуществления карго-молекулы включают или состоят из фармацевтически активных соединений. В некоторых вариантах осуществления карго-молекулы включают или состоят из соединений на основе олигонуклеотидов, таких как агенты РНКи. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, конъюгированы с карго-молекулами для *in vivo* нацеливания карго-молекул на опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, конъюгированы с карго-молекулами для *in vivo* нацеливания карго-молекулы на опухолевые клетки светлоклеточной карциномы почек.

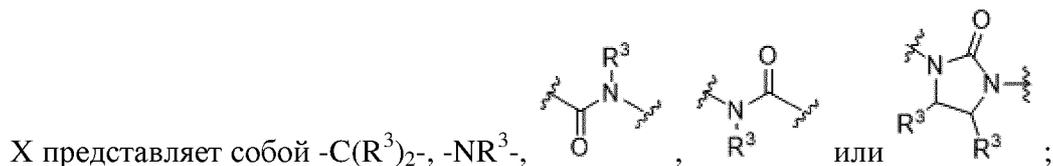
Формула I

[0025] В одном из аспектов изобретение относится к лигандам интегрина структуры:



(формула I),

где



Y представляет собой необязательно замещенный алкилен;

Z представляет собой O, NR^3 или S;

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

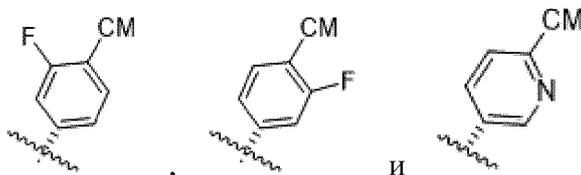
каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и

необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из Y, R^1 , R^2 , любого радикала R^3 и R^4 содержит карго-молекулу.

[0026] В некоторых вариантах осуществления формулы I R^1 выбирают из группы,

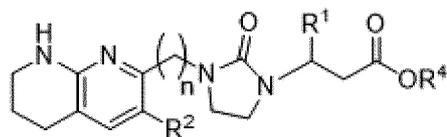


состоящей из: , и , где \sim указывает точку присоединения, и CM содержит карго-молекулу.

[0027] В некоторых вариантах осуществления формулы I Y представляет собой C_1 - C_6 алкилен.

Формула II

[0028] В некоторых вариантах осуществления формулы I нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, включает структуру следующей формулы:



(формула II),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из R^1 и R^2 содержит карго-молекулу.

Формула III

[0029] В некоторых вариантах осуществления формулы I нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, включает структуру следующей формулы:



(формула III),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

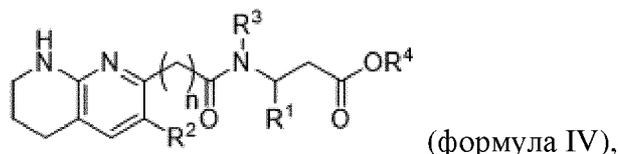
R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

R^3 выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и
причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

Формула IV

[0030] В некоторых вариантах осуществления формулы I нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, включает структуру следующей формулы:



или ее фармацевтически приемлемую соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

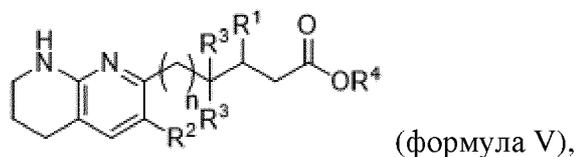
R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

R^3 выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и
причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

Формула V

[0031] В некоторых вариантах осуществления формулы I нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, включает структуру следующей формулы:



или ее фармацевтически приемлемую соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

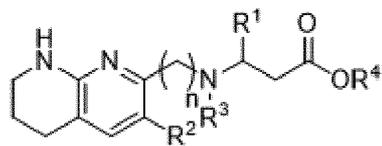
каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

Формула VI

[0032] В некоторых вариантах осуществления формулы I нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, включает структуру следующей формулы:



(формула VI),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

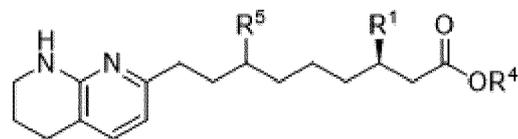
каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

Формула VII

[0033] В некоторых вариантах осуществления формулы I нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, включает структуру следующей формулы:



(формула VII),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

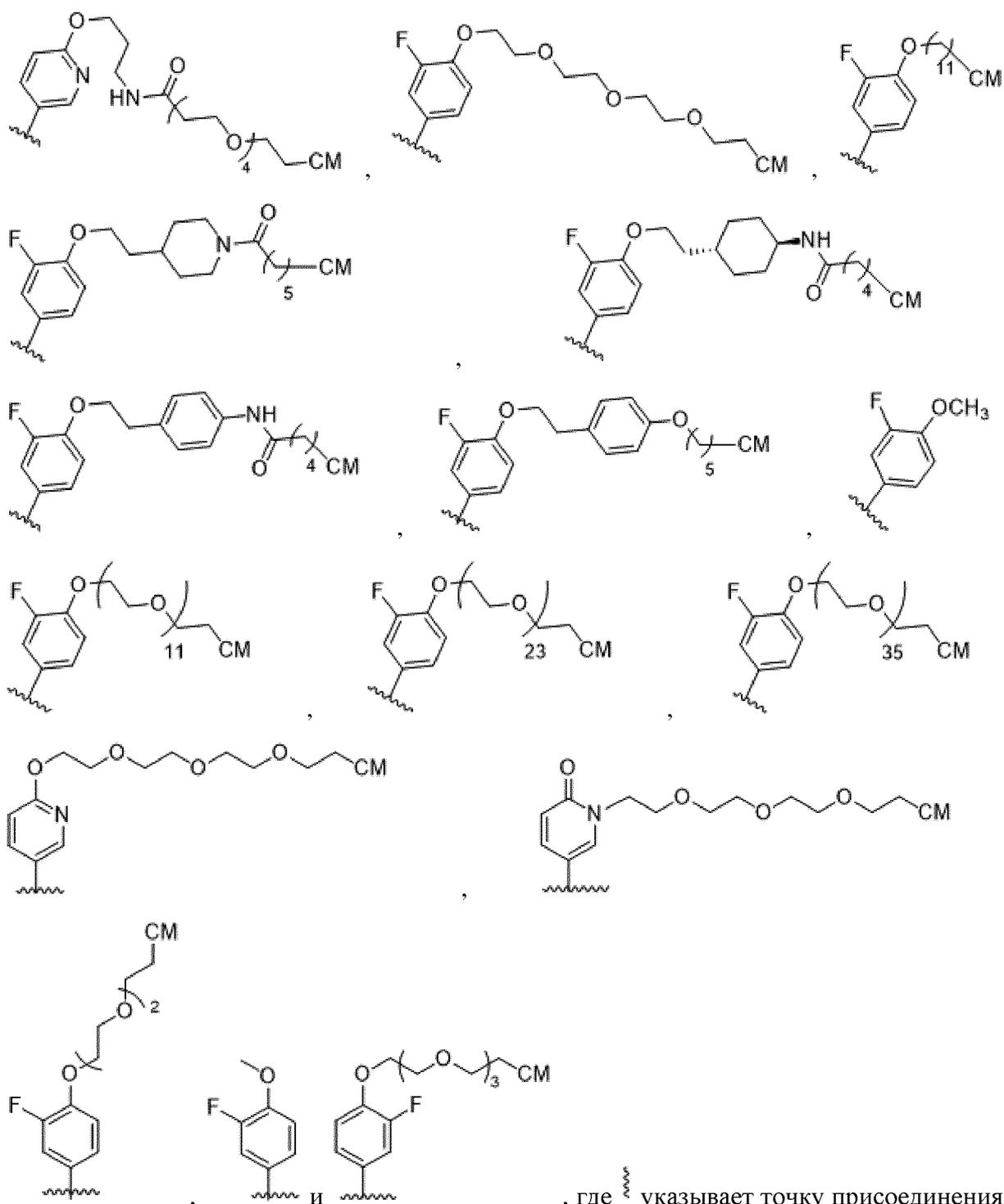
R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из R^1 , R^4 и R^5 содержит карго-молекулу.

R^1

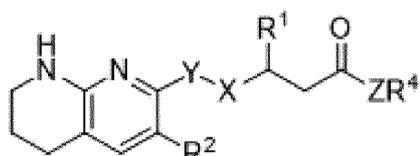
[0034] В вариантах осуществления формулы I R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу.

В некоторых вариантах осуществления R^1 выбирают из группы, состоящей из:



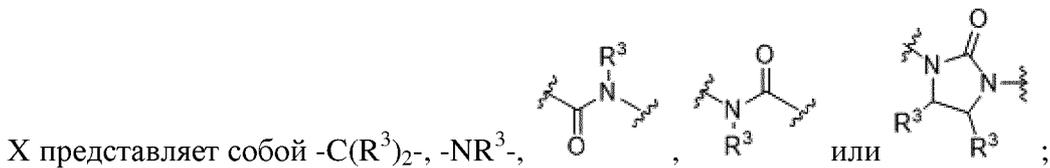
Предшественники нацеленного на интегрин лиганда

[0035] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к предшественникам нацеленного на интегрин лиганда, которые можно использовать для присоединения нацеленного на интегрин лиганда к фрагменту, содержащему карго-молекулу. Представлены предшественники нацеленного на интегрин лиганда формулы:



(формула Ip),

где



Y представляет собой необязательно замещенный алкилен;

Z представляет собой O, NR^3 или S;

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

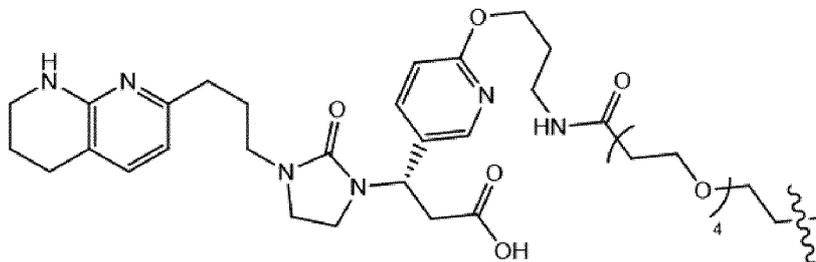
R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из Y, R^1 , R^2 , любого радикала R^3 и R^4 содержит реакционноспособную группу.

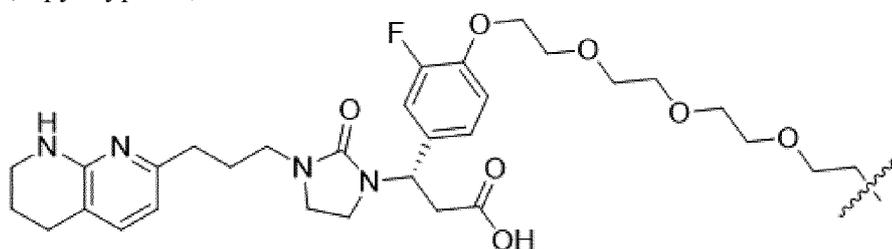
[0036] В некоторых вариантах осуществления соединений формулы Ip реакционноспособная группа содержит азид.

Соединения формулы I

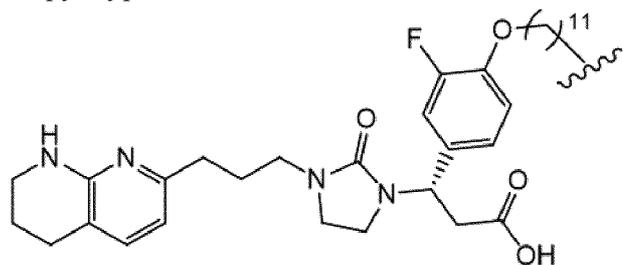
[0037] В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, имеют структуры, которые включают, состоят из или, по существу, состоят из любой из представленных ниже структур:



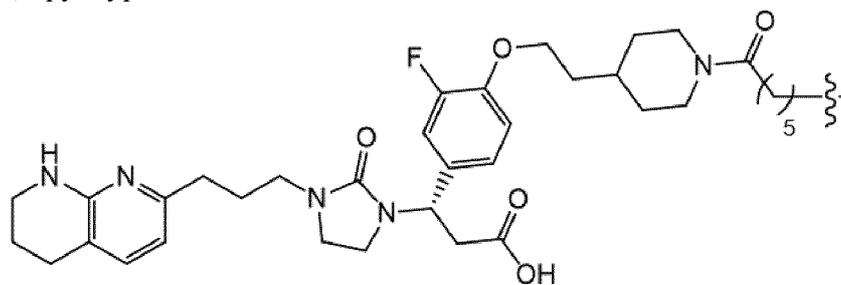
(структура 1a);



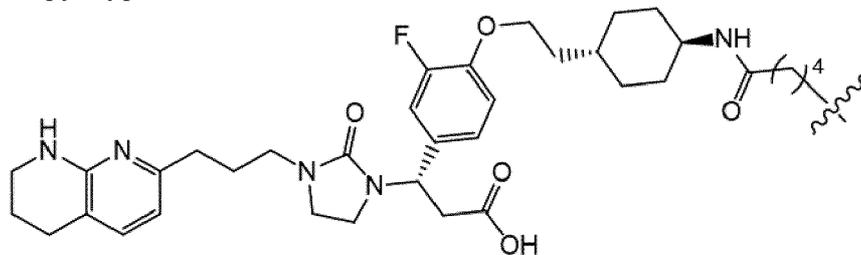
(структура 2a);



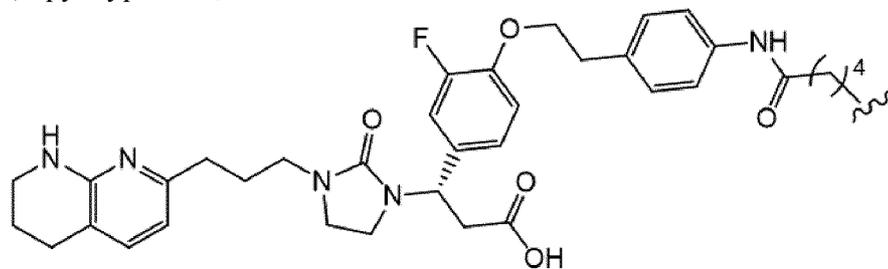
(структура 2.1a);



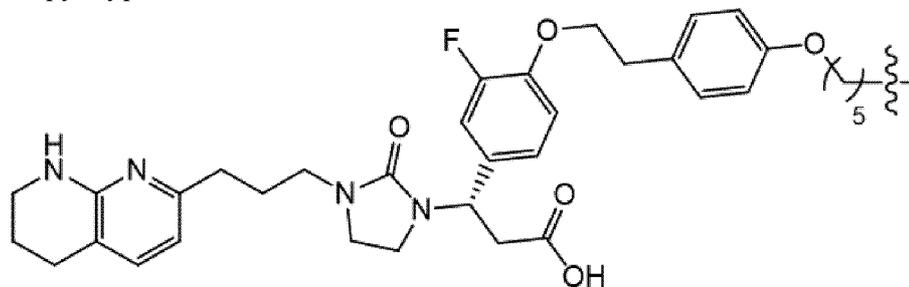
(структура 2.2a);



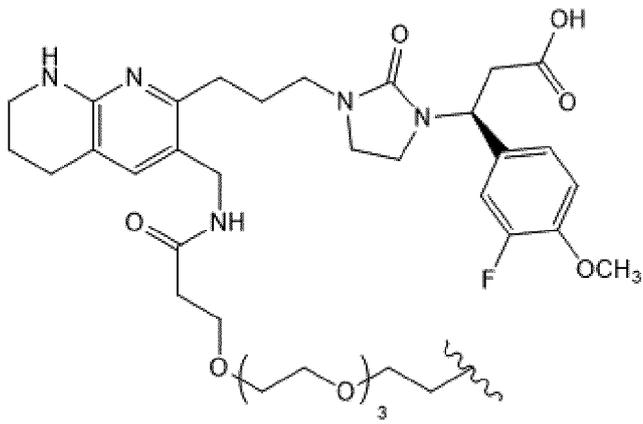
(структура 2.3a);



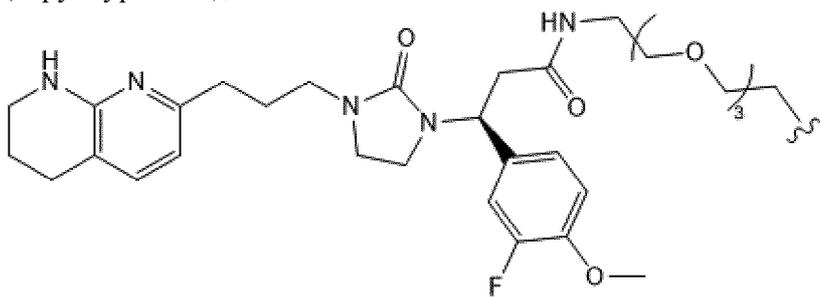
(структура 2.4a);



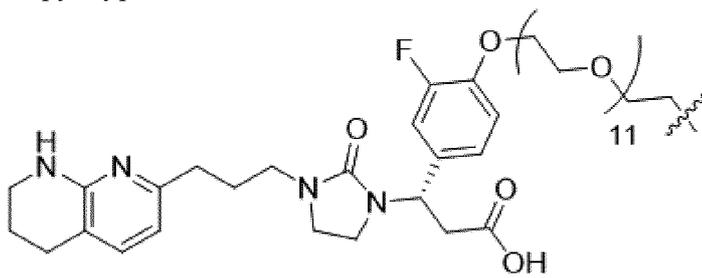
(структура 2.5a);



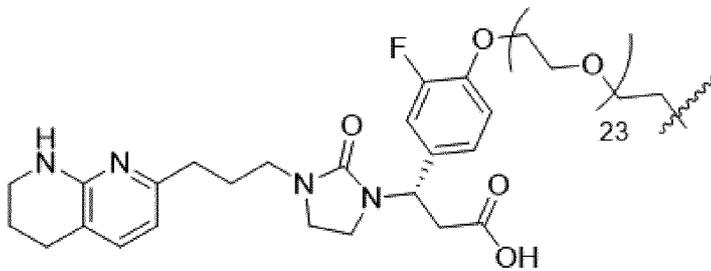
(структура 2.6a);



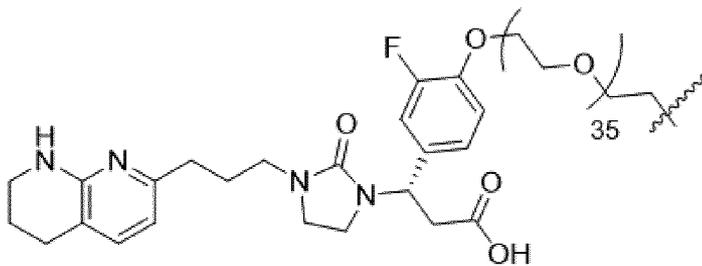
(структура 2.7a);



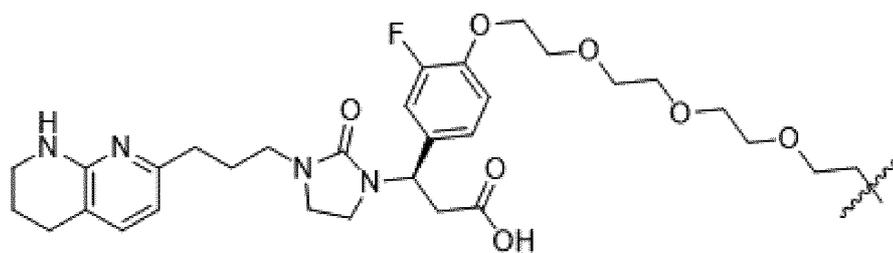
(структура 2.8a);



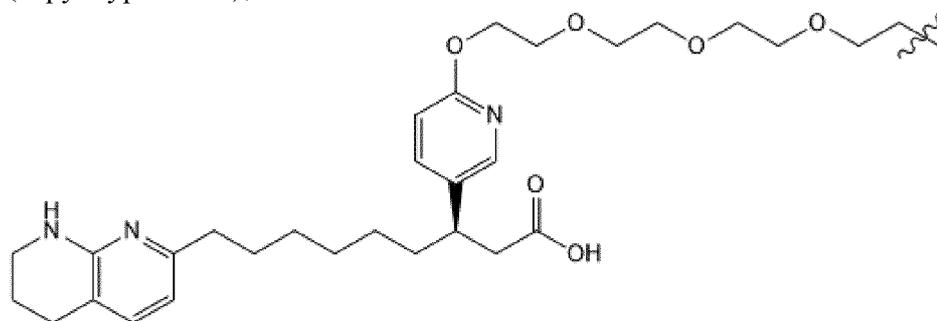
(структура 2.9a);



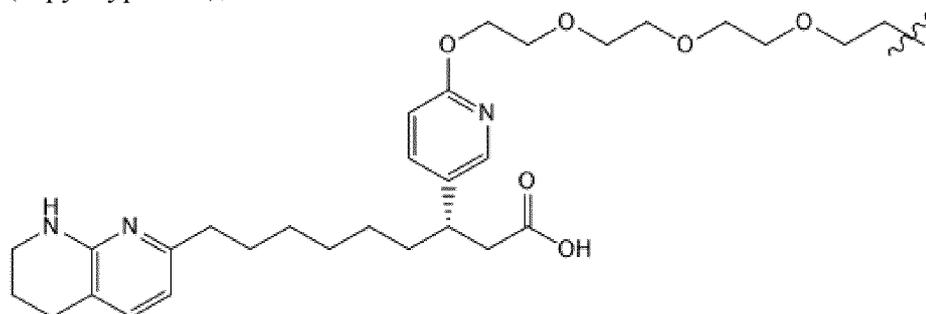
(структура 2.10a);



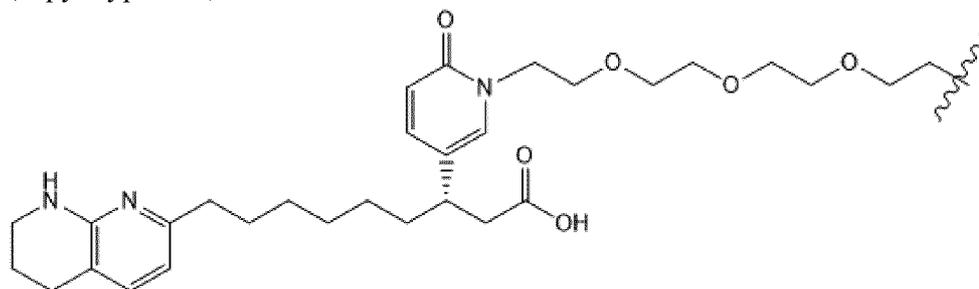
(структура 2.11a);



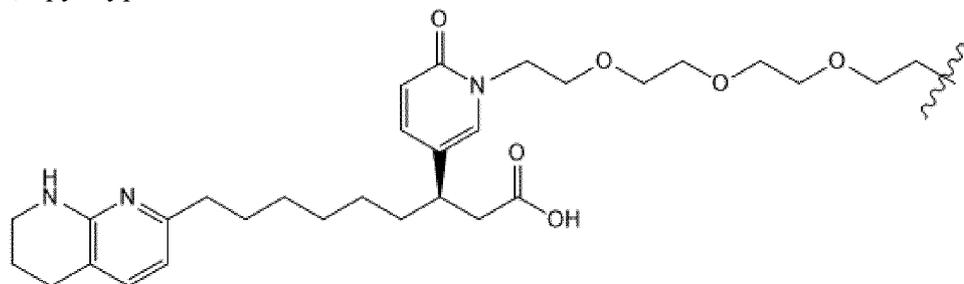
(структура 28a);



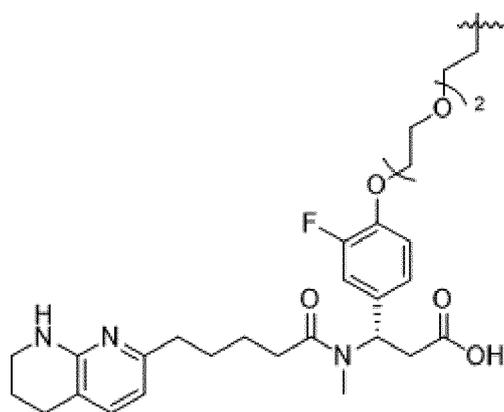
(структура 29a);



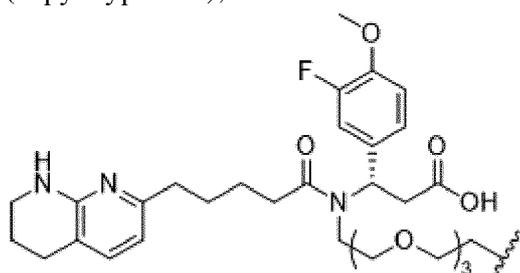
(структура 30a);



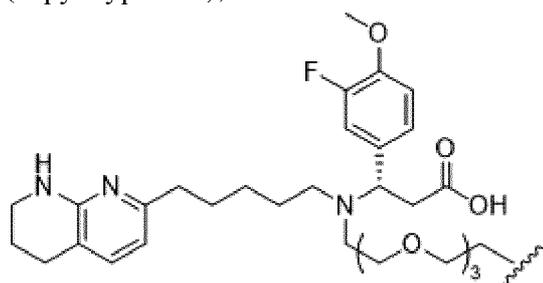
(структура 31a);



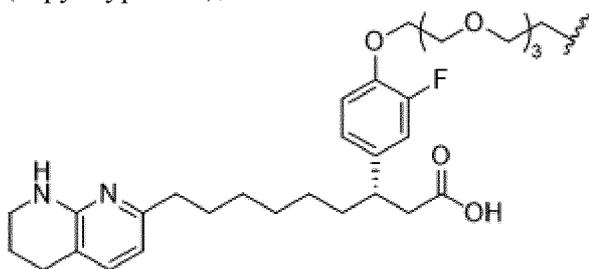
(структура 32a);



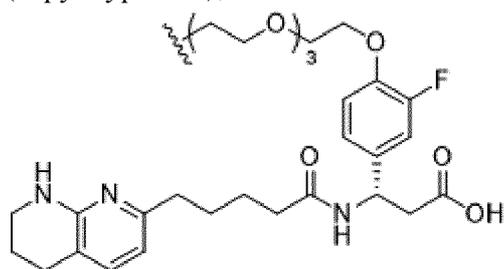
(структура 33a);



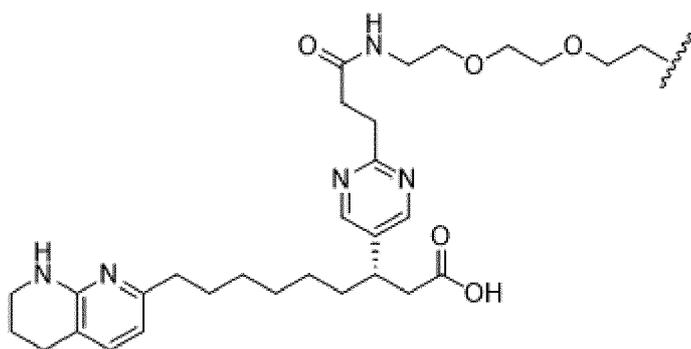
(структура 34a);



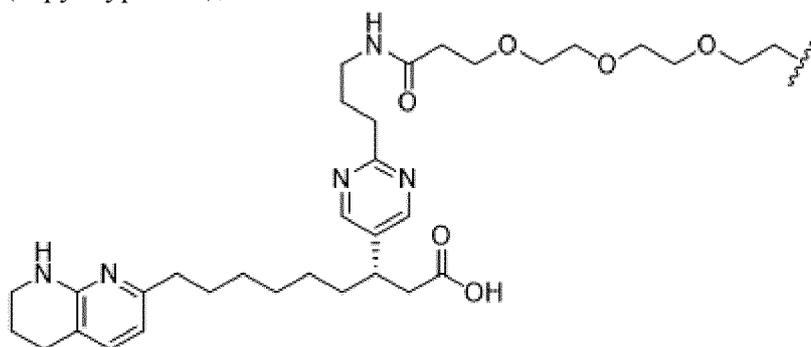
(структура 36a);



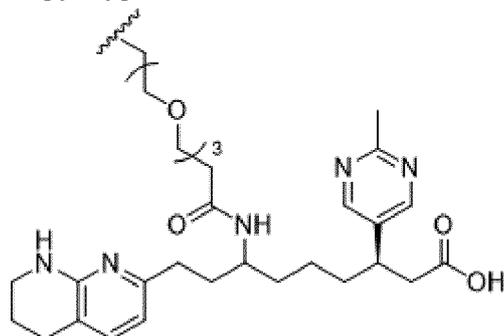
(структура 37a);



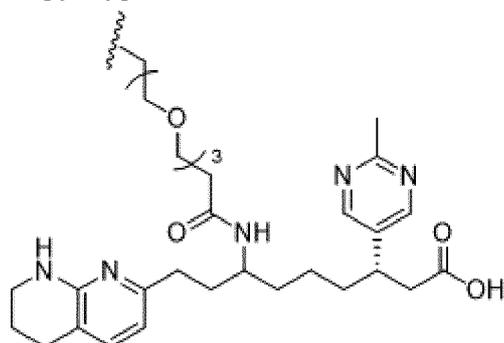
(структура 38a);



(структура 39a);



(структура 40a); и



(структура 41a).

[0038] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, может быть конъюгирован с одной или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; или от 1 до 10, от 2 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, от 2 до 10, от 3 до 10, от 4 до 10, от 5 до

10, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 3 до 5) карго-молекулами (например, любой из карго-молекул, раскрытых в настоящем описании или известных в данной области).

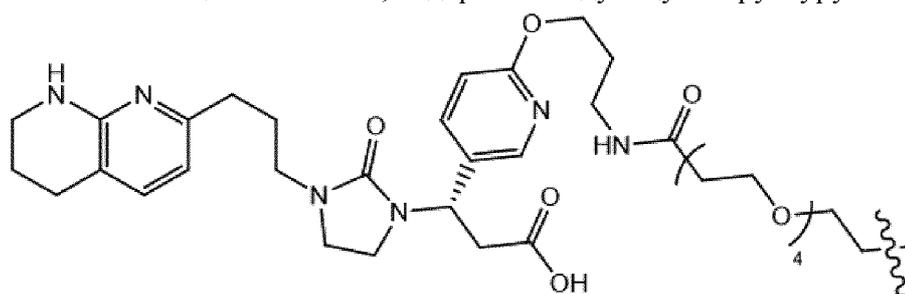
[0039] В некоторых вариантах осуществления более чем один нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; или от 1 до 30, от 1 до 25, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, от 5 до 30, от 5 до 25, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 10 до 30, от 10 до 25, от 10 до 20, от 10 до 15, от 15 до 30, от 15 до 25, от 15 до 20, от 20 до 30, от 20 до 25 или от 25 до 30 нацеленных на интегрин лигандов), могут быть конъюгированы с одной карго-молекулой (например, любой из карго-молекул, раскрытых в настоящем описании или известных в данной области).

[0040] В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, необязательно конъюгированы с одной или более карго-молекулами через связующую группу, такую как, например, группа полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG).

[0041] В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, необязательно конъюгированы с одной или более карго-молекулами через каркас, который включает по меньшей мере одну точку присоединения для каждого лиганда и по меньшей мере одну точку присоединения для каждой карго-молекулы. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды содержат, состоят из или, по существу, состоят из нацеленного на интегрин лиганда, конъюгированного с одной карго-молекулой. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды содержат, состоят из или, по существу, состоят из нацеленного на интегрин лиганда, конъюгированного с более чем одной карго-молекулой.

В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды содержат, состоят из или, по существу, состоят из любой из: структуры 1a, структуры 2a, структуры 2.1a, структуры 2.2a, структуры 2.3a, структуры 2.4a, структуры 2.5a, структуры 2.6a, структуры 2.8a, структуры 2.9a, структуры 2.10a, структуры 2.11a, структуры 28a, структуры 29a, структуры 30a, структуры 31a, структуры 32a, структуры 33a, структуры 34a, структуры 36a, структуры 37a, структуры 38a, структуры 39a, структуры 40a и структуры 41a, каждая из которых раскрыта в настоящем описании.

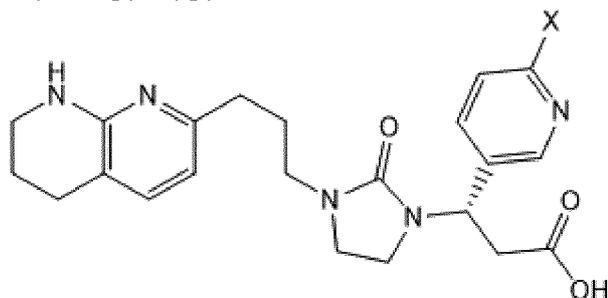
[0042] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 1a).

[0043] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 1a соединен с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

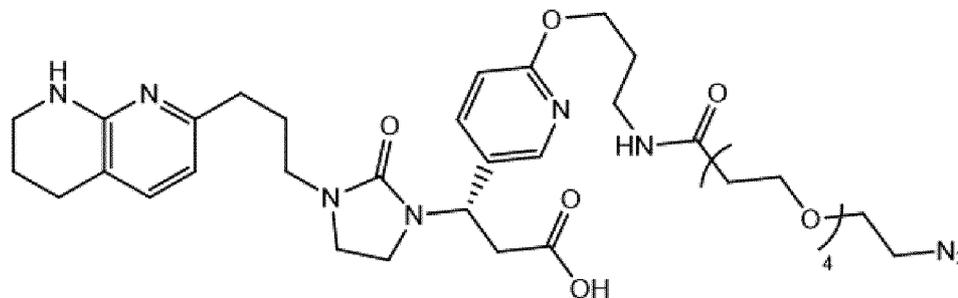
[0044] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 1b),

где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

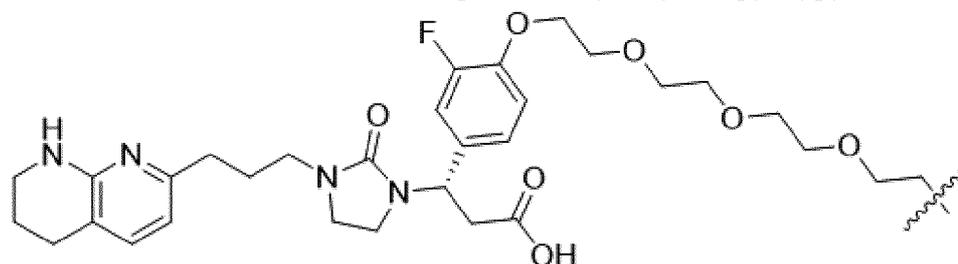
[0045] В некоторых вариантах осуществления предшественник нацеленного на интегрин лиганда может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 1c).

[0046] Реакционноспособная группа (или защищенная реакционноспособная группа) может использоваться для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с представляющей интерес молекулой, например, с карго-молекулой (либо непосредственно, либо через один или более каркасов и/либо линкер).

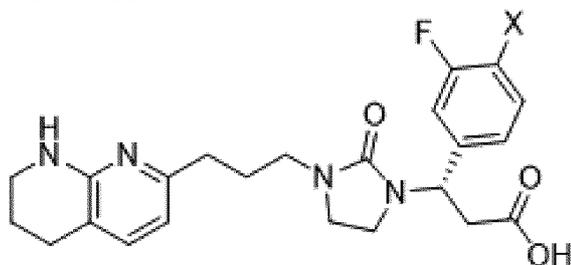
[0047] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2a).

[0048] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

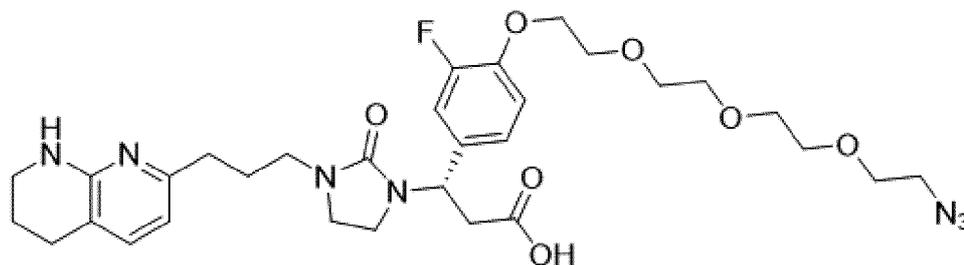
[0049] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 2b),

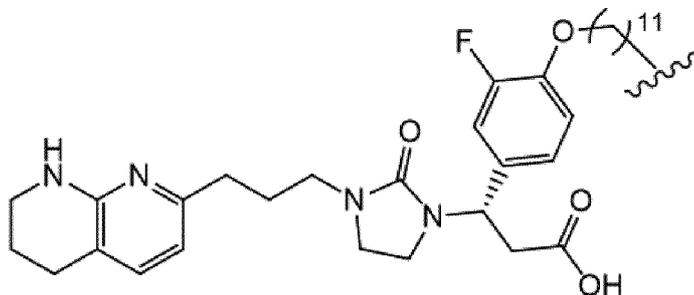
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0050] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2c).

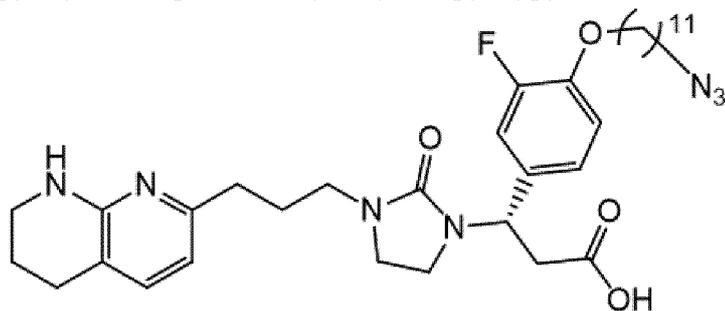
[0051] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.1a).

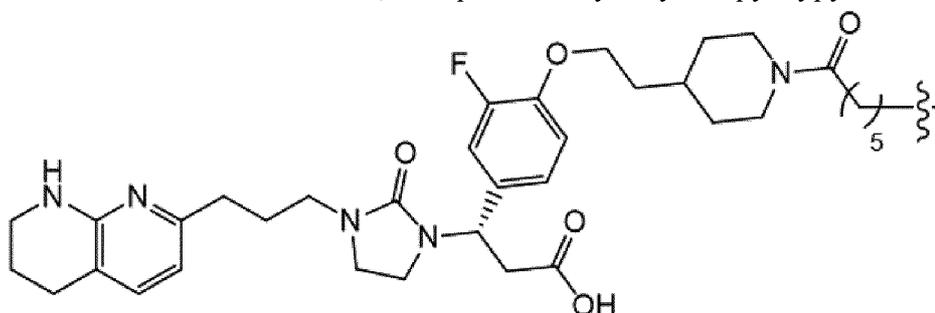
[0052] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.1a связан с одной или более карго-молекулами (например агентом(ами) РНКи).

[0053] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.1с).

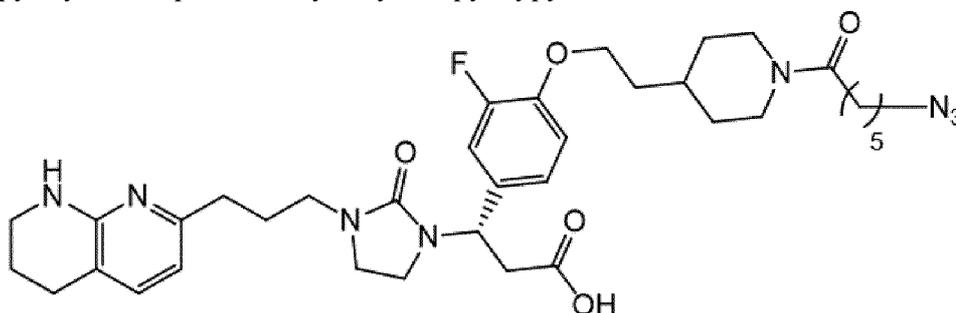
[0054] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.2а).

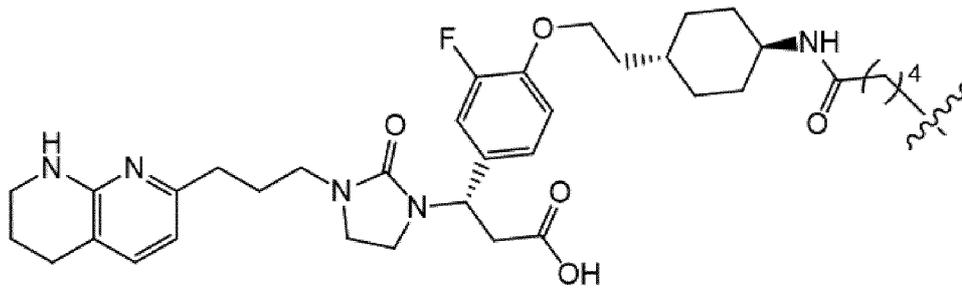
[0055] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.2а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

[0056] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.2с).

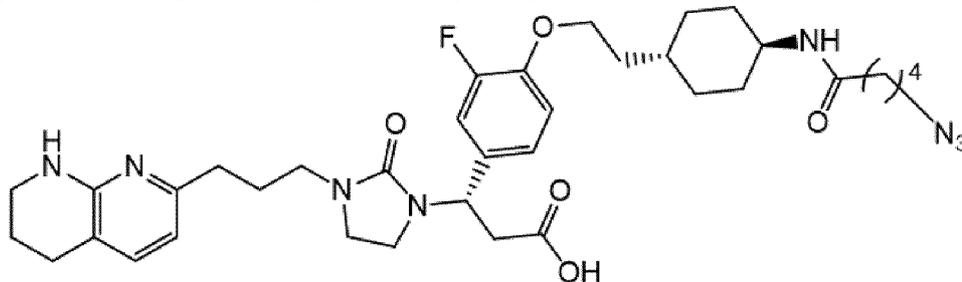
[0057] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.3a).

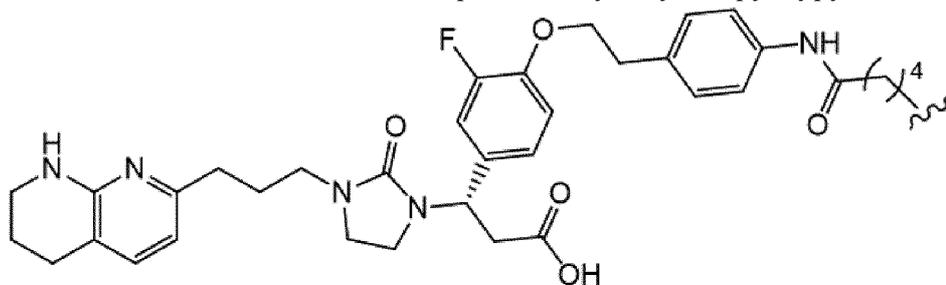
[0058] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.3a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

[0059] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.3c).

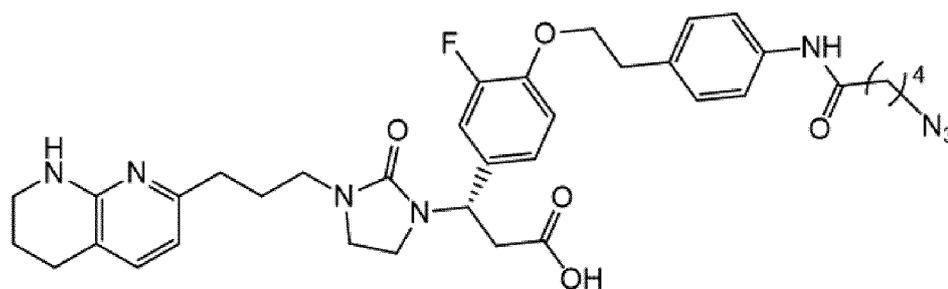
[0060] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.4a).

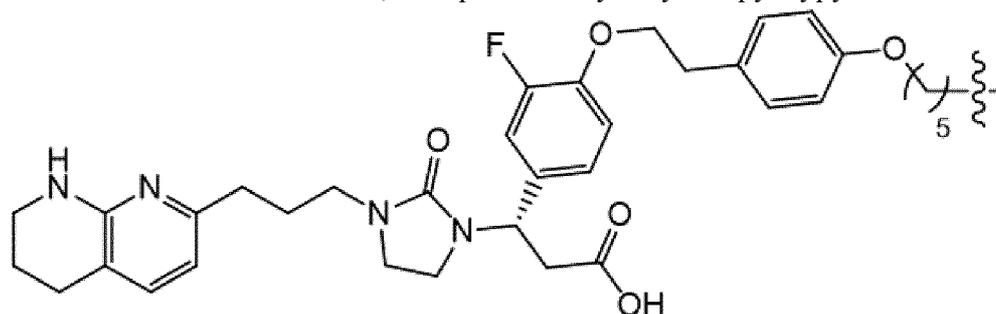
[0061] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.4a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

[0062] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.4с).

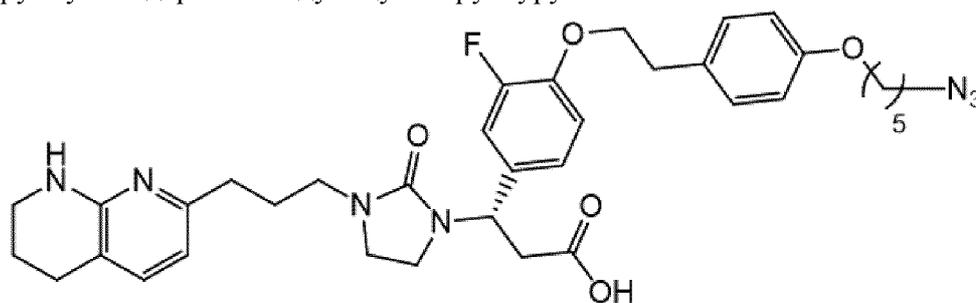
[0063] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.5а).

[0064] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.5а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

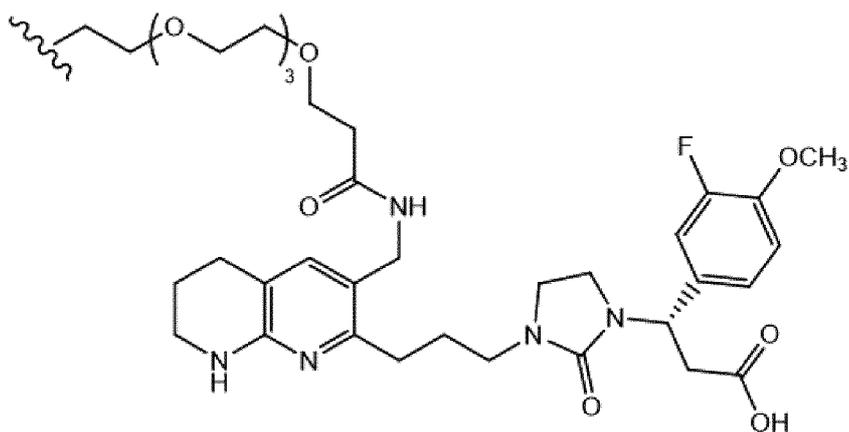
[0065] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



2.5с).

(структура

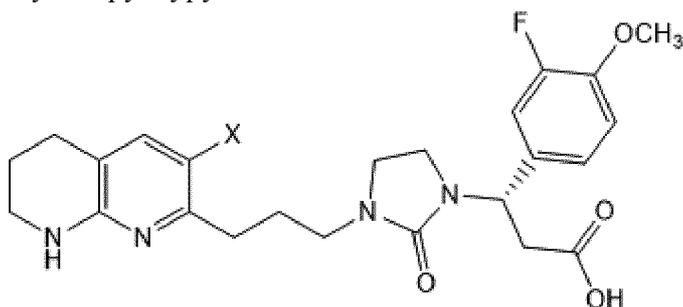
[0066] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.6a).

[0067] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.6a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

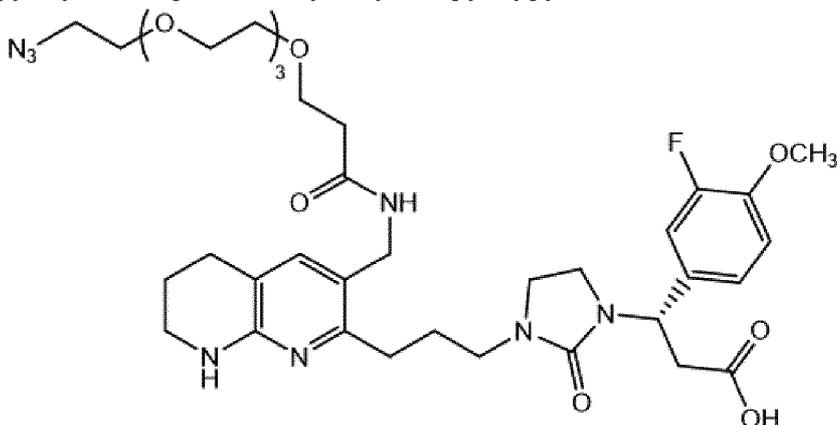
[0068] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 2.6b),

где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

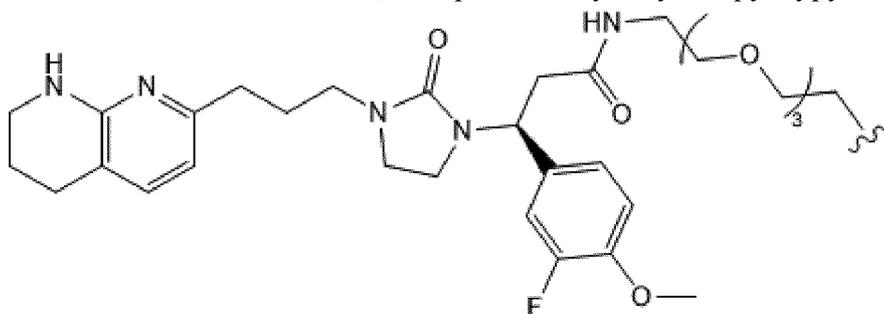
[0069] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.6с).

[0070] Реакционноспособная группа (или защищенная реакционноспособная группа) может использоваться для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с представляющей интерес молекулой, например, с карго-молекулой (либо непосредственно, либо через один или более каркасов и/либо линкер).

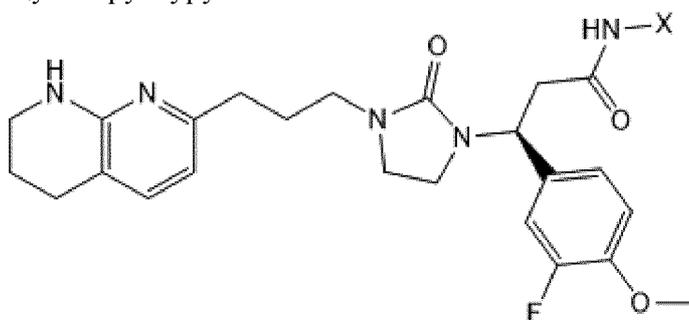
[0071] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.7а).

[0072] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.7а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

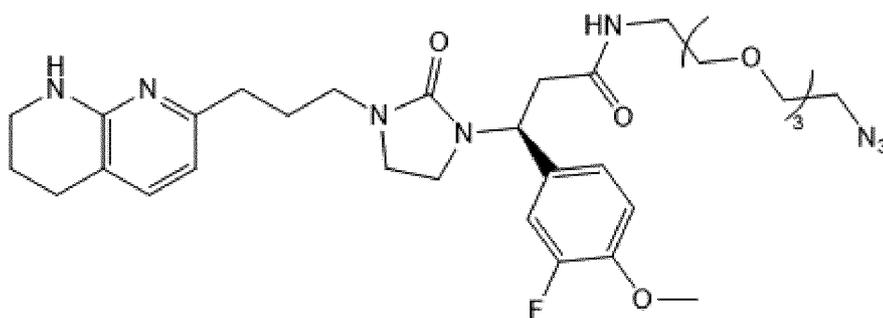
[0073] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 2.7b),

где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

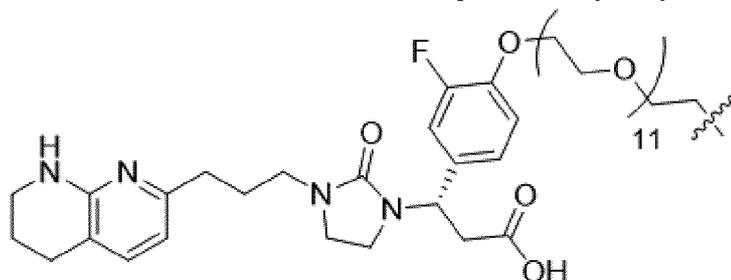
[0074] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержит следующую структуру:



(структура 2.7с).

[0075] Реакционноспособная группа (или защищенная реакционноспособная группа) может использоваться для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с представляющей интерес молекулой, например, с карго-молекулой (либо непосредственно, либо через один или более каркасов и/либо линкер).

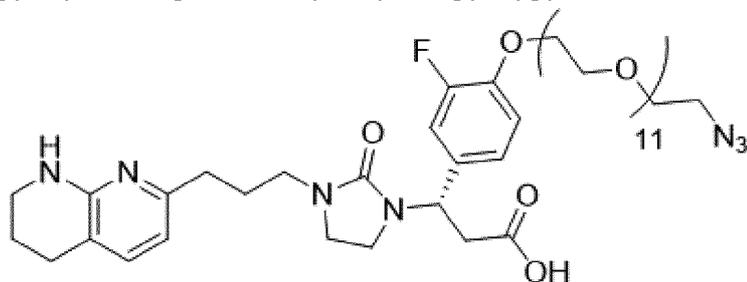
[0076] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.8а).

[0077] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.8а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

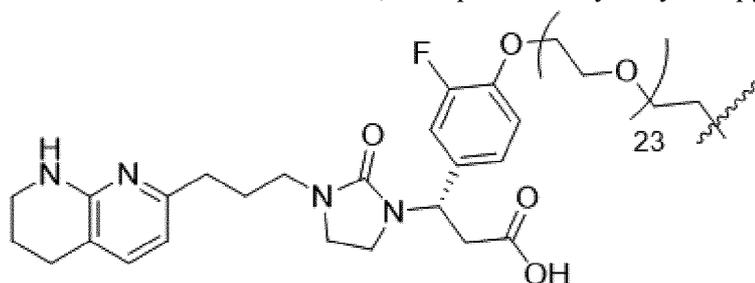
[0078] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.8с).

[0079] Реакционноспособная группа (или защищенная реакционноспособная группа) может использоваться для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с представляющей интерес молекулой, например, с карго-молекулой (либо непосредственно, либо через один или более каркасов и/либо линкер).

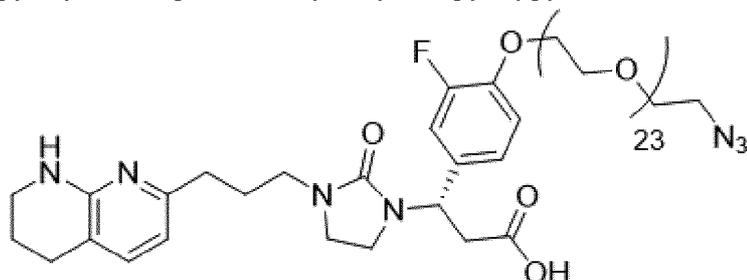
[0080] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.9а).

[0081] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.9а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

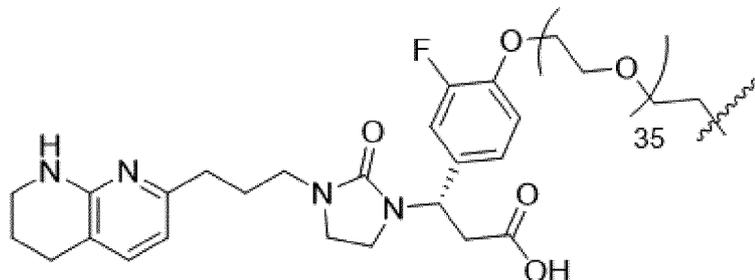
[0082] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.9с).

[0083] Реакционноспособная группа (или защищенная реакционноспособная группа) может использоваться для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с представляющей интерес молекулой, например, с карго-молекулой (либо непосредственно, либо через один или более каркасов и/либо линкер).

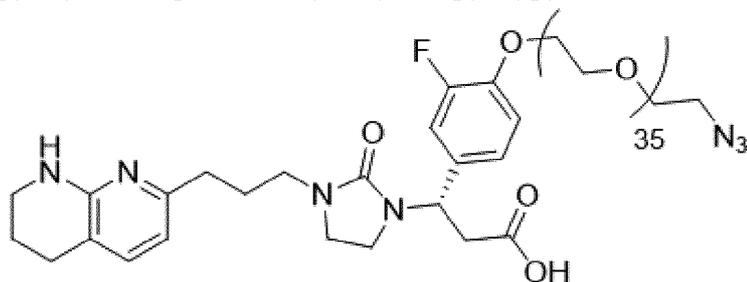
[0084] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.10а).

[0085] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.10а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

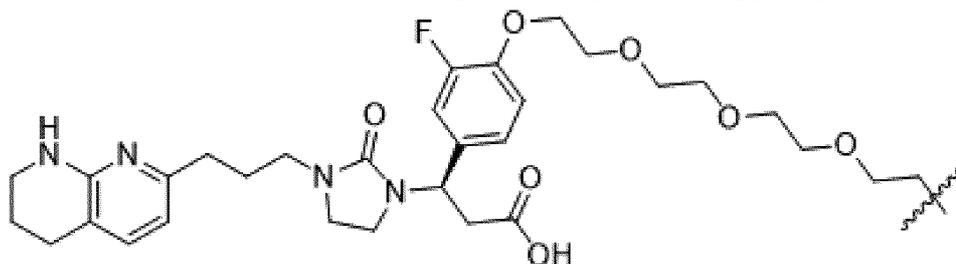
[0086] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 2.10с).

[0087] Реакционноспособная группа (или защищенная реакционноспособная группа) может использоваться для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с представляющей интерес молекулой, например, с карго-молекулой (либо непосредственно, либо через один или более каркасов и/либо линкер).

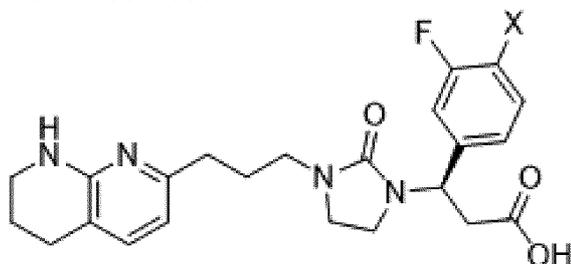
[0088] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 2.11а).

[0089] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

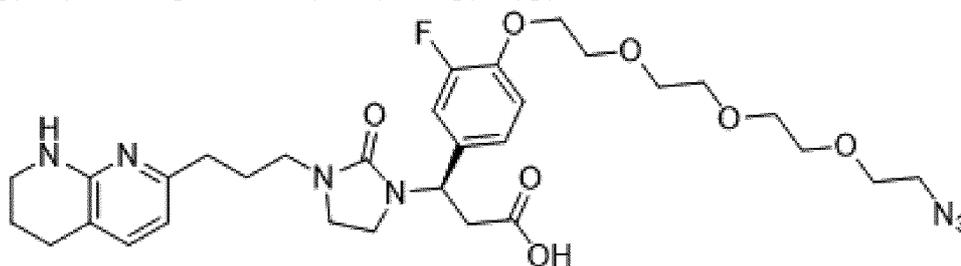
[0090] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 2.11b),

где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

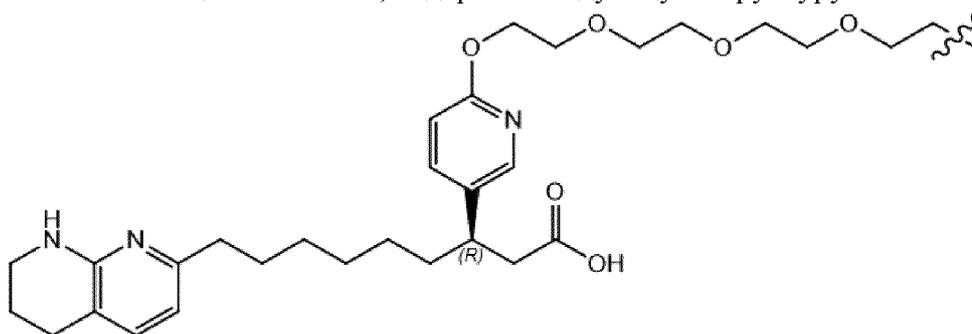
[0091] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



[0092] (структура 2.11с).

[0093] Реакционноспособная группа (или защищенная реакционноспособная группа) может использоваться для облегчения конъюгации нацеленного на интегрин лиганда с представляющей интерес молекулой, например, с карго-молекулой (либо непосредственно, либо через один или более каркасов и/либо линкер).

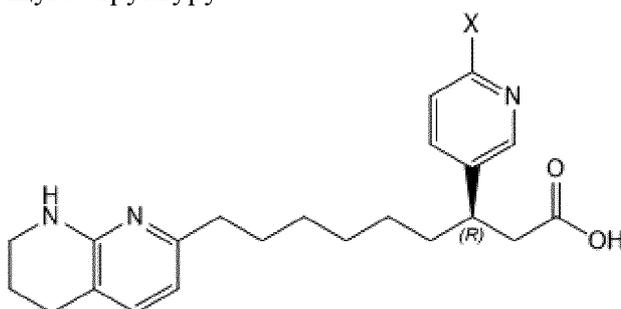
[0094] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 28а).

[0095] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 28а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

[0096] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:

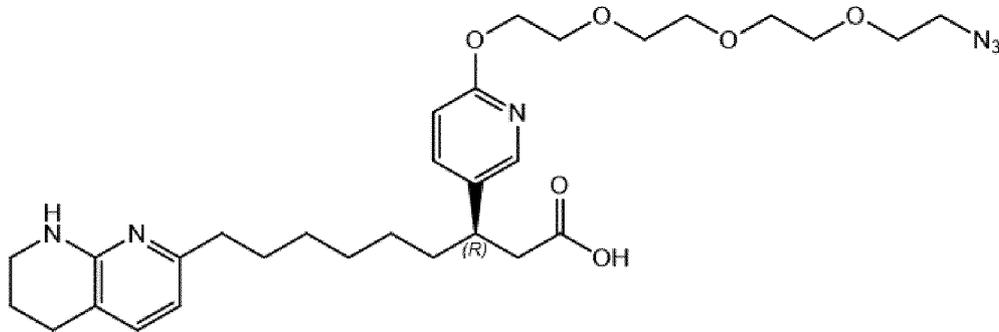


(структура 28b),

где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную

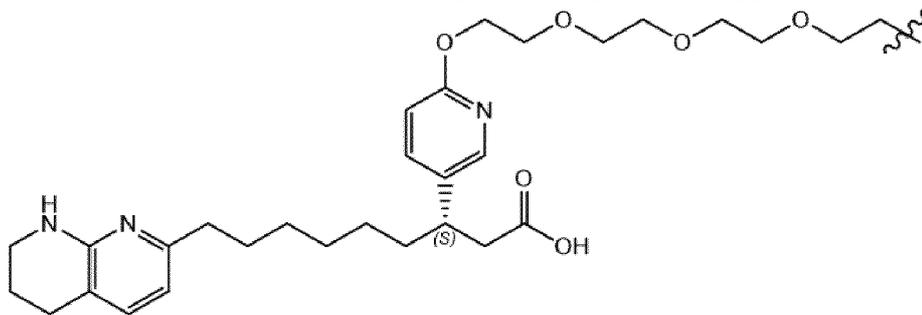
группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0097] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 28с).

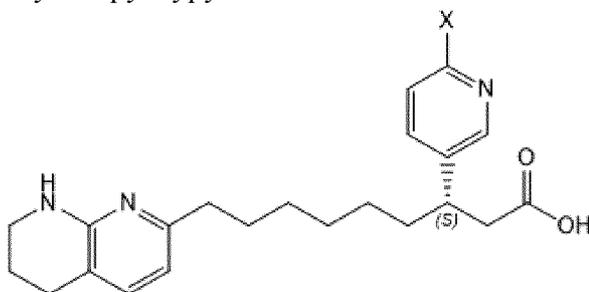
[0098] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 29а).

[0099] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 29а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

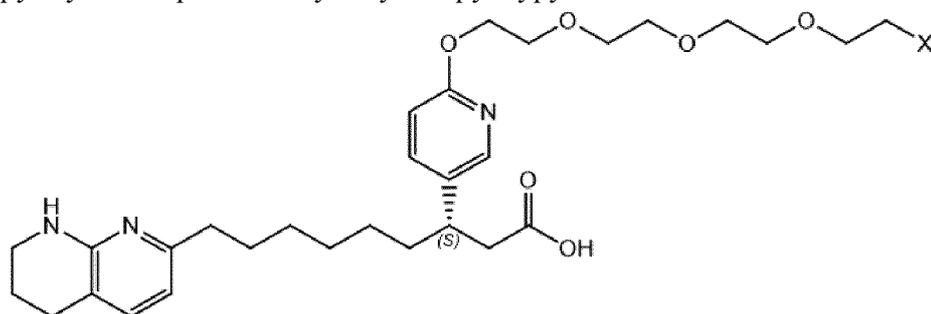
[0100] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 29b),

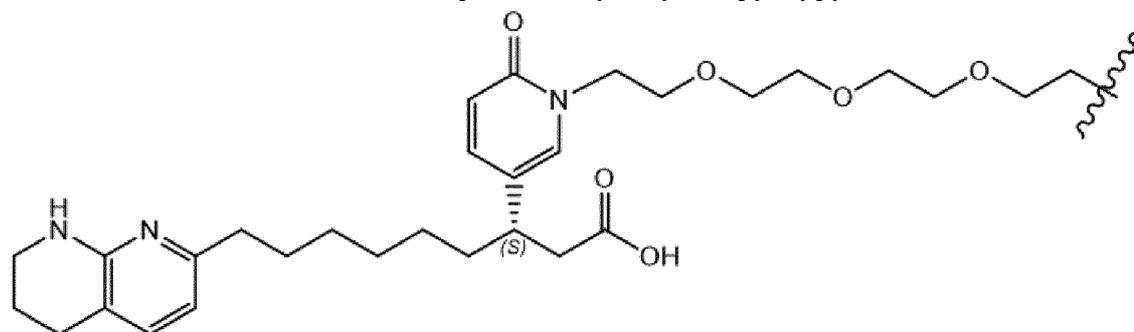
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0101] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 29с).

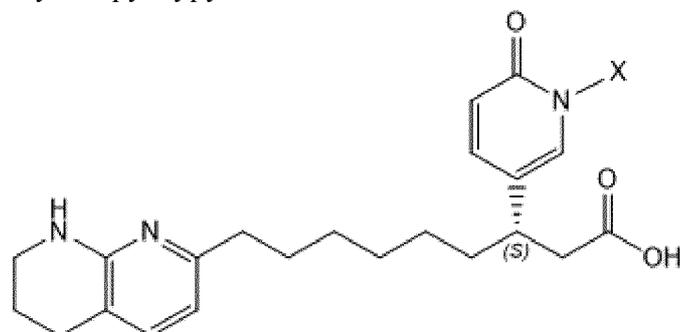
[0102] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 30а).

[0103] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 30а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

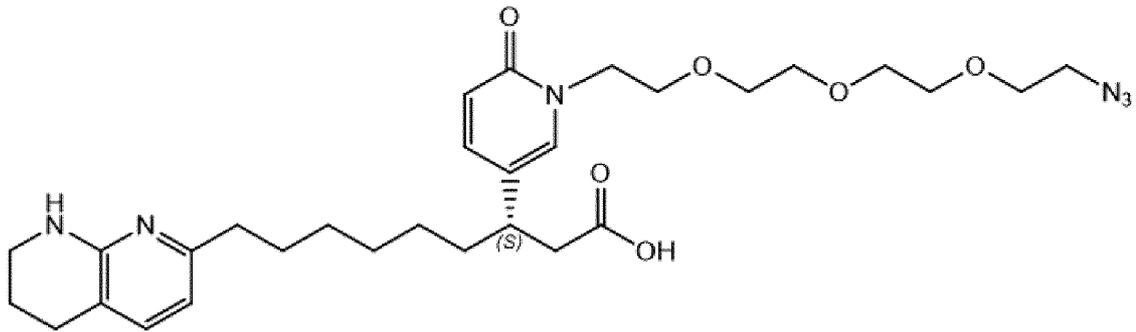
[0104] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 30b),

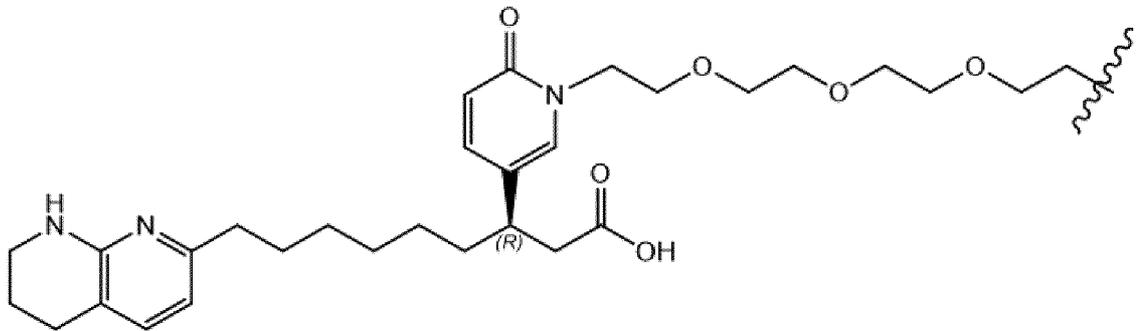
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0105] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 30с).

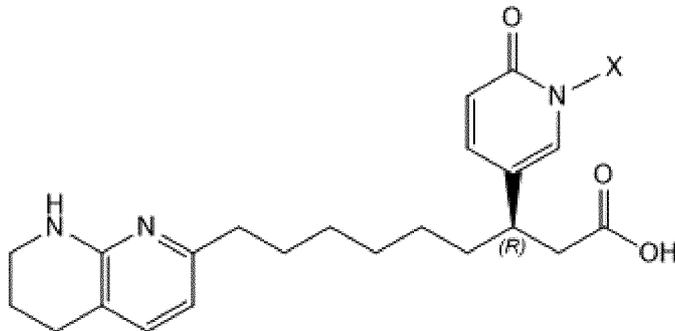
[0106] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 31а).

[0107] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 31а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

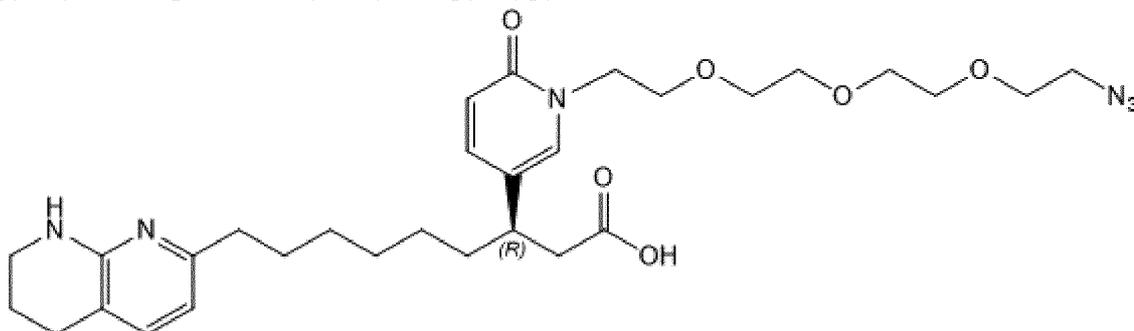
[0108] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 31b),

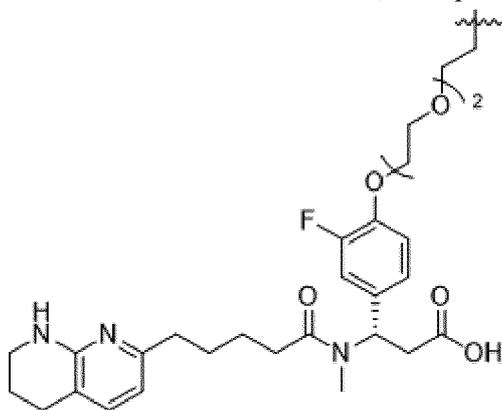
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0109] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 31c).

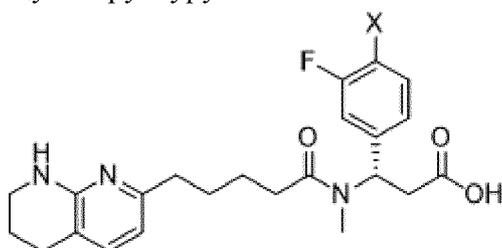
[0110] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 32a).

[0111] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 32a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

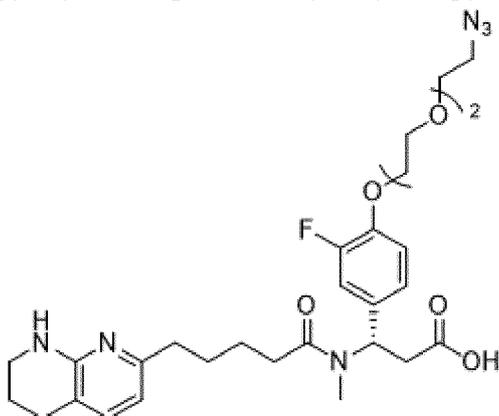
[0112] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 32b),

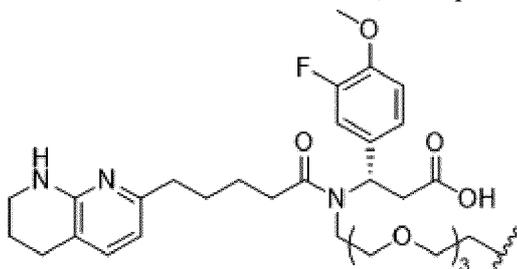
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0113] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 32с).

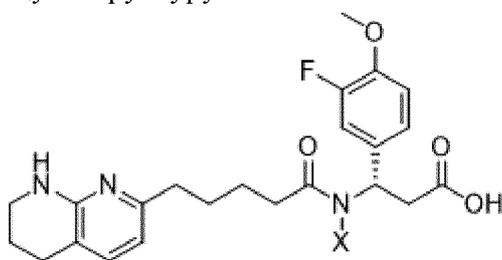
[0114] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 33а).

[0115] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 33а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

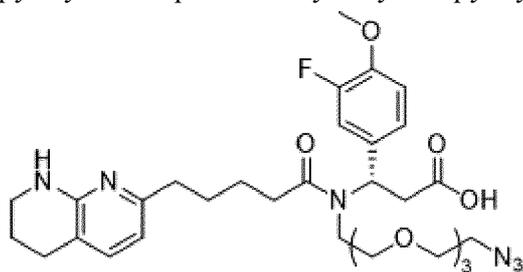
[0116] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 33b),

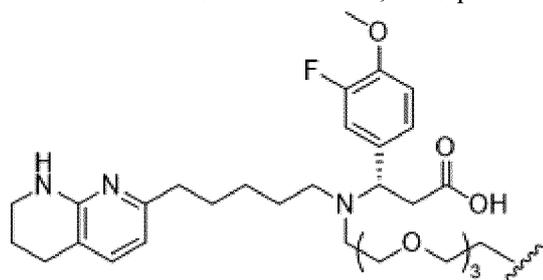
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0117] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 33с).

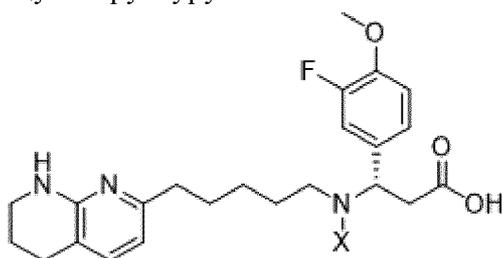
[0118] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 34а).

[0119] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 34а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

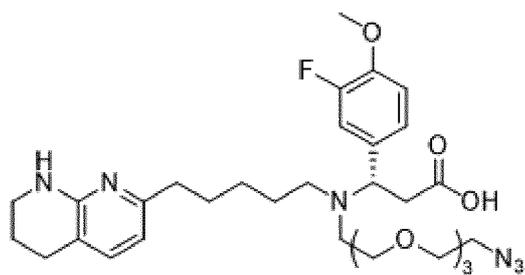
[0120] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 34b),

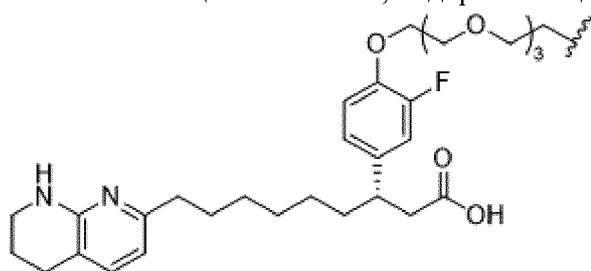
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0121] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 34с).

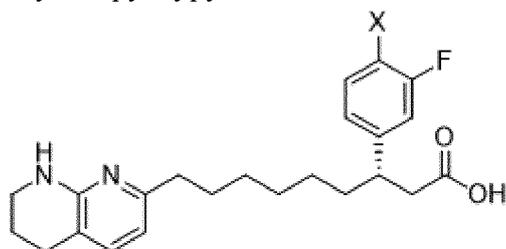
[0122] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 36а).

[0123] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 36а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

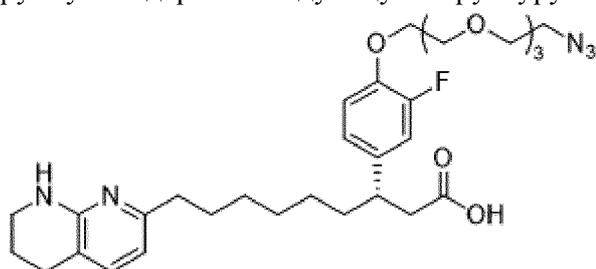
[0124] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 31b),

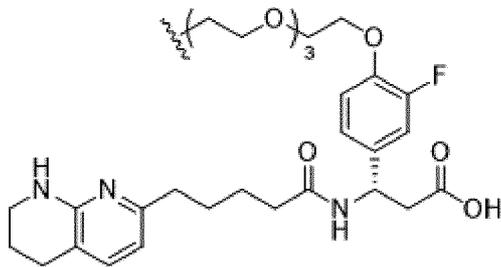
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0125] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 31с).

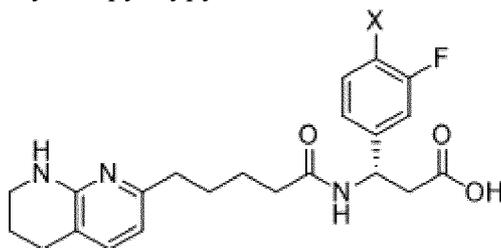
[0126] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 37а).

[0127] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 37а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

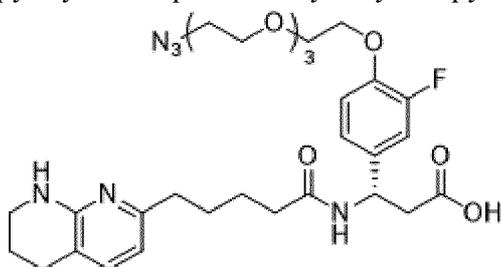
[0128] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 37b),

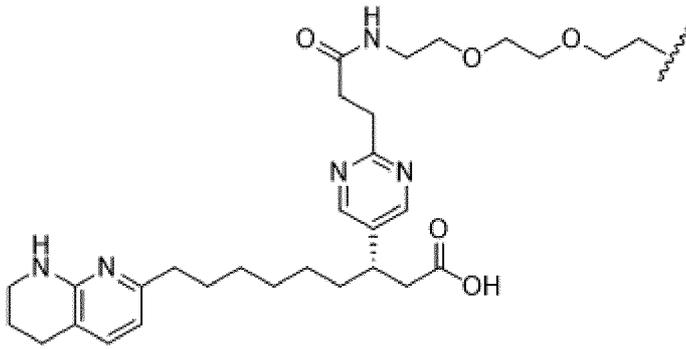
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0129] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 37с).

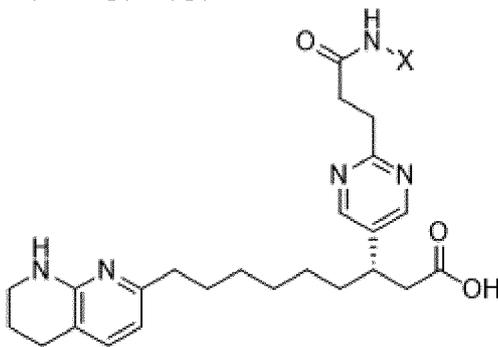
[0130] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 38a).

[0131] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 38a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

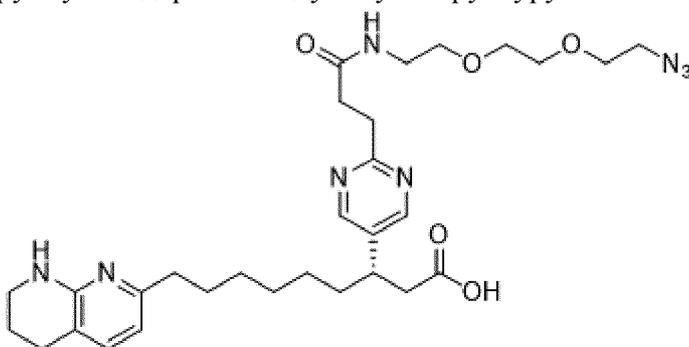
[0132] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 38b),

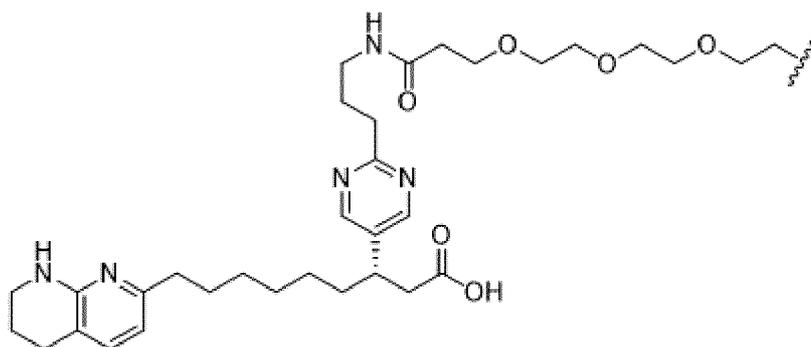
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0133] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 38c).

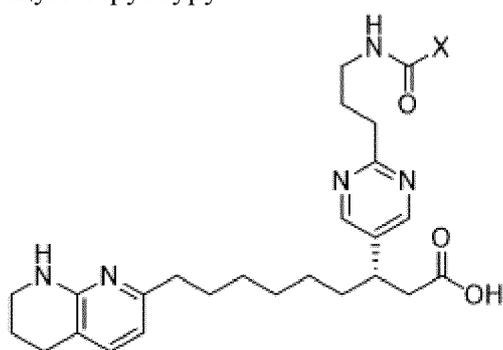
[0134] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 39a).

[0135] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 39a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

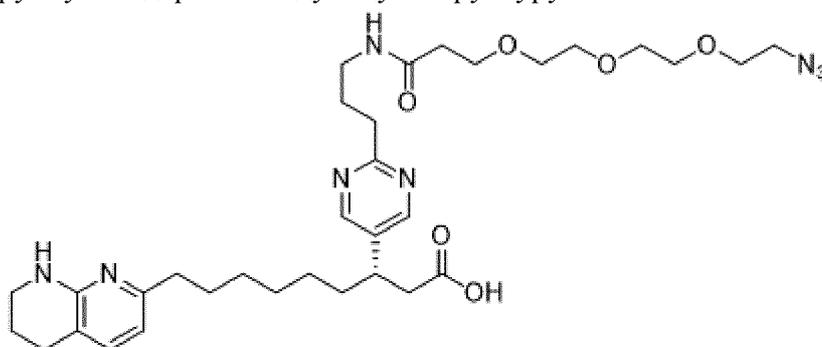
[0136] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 39b),

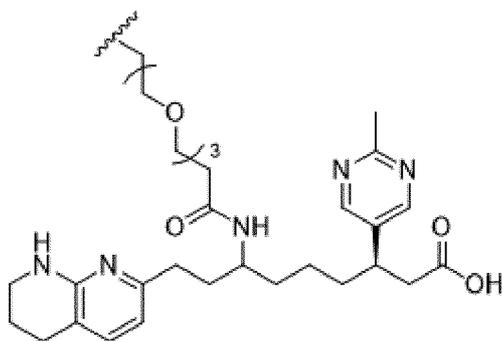
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0137] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 39c).

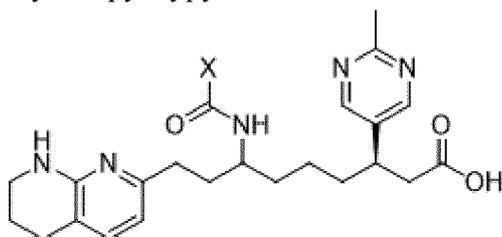
[0138] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 40а).

[0139] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 40а связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

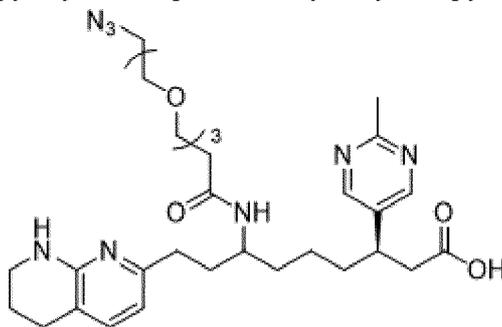
[0140] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 40b),

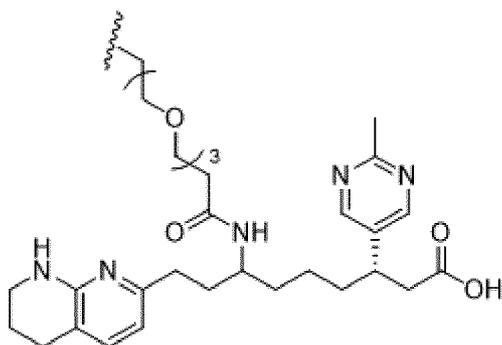
где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0141] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 40с).

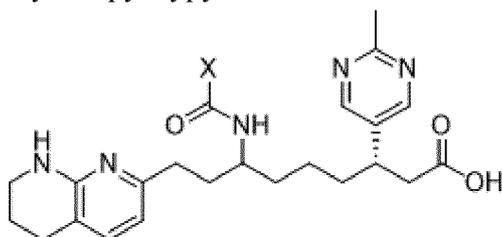
[0142] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд, раскрытый в настоящем описании, содержит следующую структуру:



(структура 41a).

[0143] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд структуры 41a связан с одной или более карго-молекулами (например, агентом(ами) РНКи).

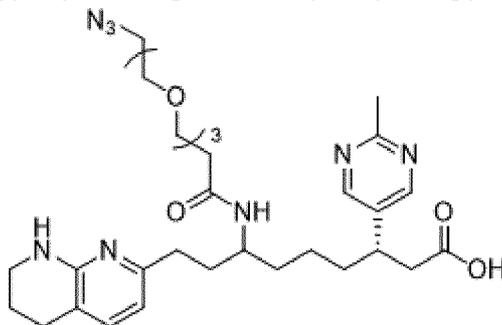
[0144] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу и содержал следующую структуру:



(структура 41b),

где X включает реакционноспособную группу, защищенную реакционноспособную группу или карго-молекулу (например, агент РНКи).

[0145] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на интегрин лиганд может быть синтезирован таким образом, чтобы он включал реакционноспособную азидогруппу и содержал следующую структуру:



(структура 41c).

[0146] Реакционноспособная азидогруппа, описанная в любой из: структуры 1с, структуры 2с, структуры 2.1с, структуры 2.2с, структуры 2.3с, структуры 2.4с, структуры 2.5с, структуры 2.6с, структуры 2.7с, структуры 2.8с, структуры 2.9с, структуры 2.10с, структуры 2.11с, структуры 28с, структуры 29с, структуры 30с, структуры 31с, структуры 32с, структуры 33с, структуры 34с, структуры 36с, структуры 37с, структуры 38с,

структуры 39с, структуры 40с и структуры 41с, может быть использована для присоединения нацеленного на интегрин лиганда к представляющей интерес молекуле, т.е. карго-молекуле, такой как агент РНКи. Карго-молекула может быть любой молекулой, которая предназначена для нацеливания на экспрессирующую интегрин клетку.

[0147] В контексте настоящей заявки термин “алкил” относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, линейной или разветвленной, имеющей от 1 до 10 томов углерода, если не указано иное. Например, “C₁-C₆ алкил” включает алкильные группы, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, расположенных линейно или разветвленно. Неограничивающие примеры алкильных групп включают метил, этил, *изо*-пропил, *трет*-бутил, *n*-гексил. В контексте настоящей заявки термин “аминоалкил” относится к алкильной группе, определенной выше, замещенной в любом положении одной или более аминогруппами согласно обычной валентности. Аминогруппы могут быть незамещенными, монозамещенными или дизамещенными. Неограничивающие примеры аминоалкильных групп включают аминометил, диметиламинометил и 2-аминопроп-1-ил.

[0148] В контексте настоящей заявки термин “циклоалкил” означает насыщенную или ненасыщенную неароматическую углеводородную кольцевую группу, имеющую от 3 до 14 атомов углерода, если не указано иное. Неограничивающие примеры циклоалкильных групп включают, без ограничения, циклопропил, метил-циклопропил, 2,2-диметил-циклобутил, 2-этил-циклопентил и циклогексил. Циклоалкилы могут включать несколько спиро- или слитых колец. Циклоалкильные группы являются необязательно моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении согласно обычной валентности.

[0149] В контексте настоящей заявки термин “алкенил” относится к неароматическому углеводородному радикалу, линейному или разветвленному, содержащему по меньшей мере одну углерод-углерод двойную связь и имеющему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное. В такой группе может присутствовать до пяти углерод-углерод двойных связей. Например, “C₂-C₆” алкенил определен как алкенильный радикал, имеющий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают, без ограничения, этенил, пропенил, бутенил и циклогексенил. Линейная, разветвленная или циклическая часть алкенильной группы может содержать двойные связи и необязательно является моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенной в любом положении согласно обычной валентности. Термин “циклоалкенил” означает моноциклическую углеводородную группу, содержащую определенное количество атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углерод двойную связь.

[0150] В контексте настоящей заявки термин “алкинил” относится к углеводородному радикалу, линейному или разветвленному, содержащему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное, и содержащему по меньшей мере одну углерод-углерод тройную связь. Может присутствовать до пяти углерод-углерод тройных связей. Таким образом, “C₂-C₆ алкинил” означает алкинильный радикал, имеющий от 2 до 6

атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают, без ограничения, этинил, 2-пропинил и 2-бутинил. Линейная или разветвленная часть алкинильной группы может быть необязательно моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенной в любом положении согласно обычной валентности.

[0151] В контексте настоящей заявки “алкоксил” или “алкокси” относится к -О-алкильному радикалу, имеющему указанное количество атомов углерода. Например, C₁₋₆ алкокси включает C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ и C₆ алкокси группы. Например, C₁₋₈ алкокси включает C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇ и C₈ алкокси группы. Примеры алкокси групп включают, без ограничения, метокси, этокси, н-пропокси, изо-пропокси, н-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентокси, втор-пентокси, н-гептокси и н-октокси.

[0152] В контексте настоящей заявки “кето” относится к любой алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, гетероциклической, гетероарильной или арильной группе, определенной в настоящем описании, присоединенной через карбонильный мостик. Примеры кетогрупп включают, без ограничения, алканоил (например, ацетил, пропионил, бутаноил, пентаноил или гексаноил), алкеноил (например, акрилоил), алкиноил (например, этиноил, пропиноил, бутиноил, пентиноил или гексиноил), арилоил (например, бензоил), гетероарилоил (например, пирролоил, имидазолоил, хинолиноил или пиридиноил).

[0153] В контексте настоящей заявки “алкоксикарбонил” относится к любой алкокси группе, определенной выше, присоединенной через карбонильный мостик (например, -C(O)O-алкил). Примеры алкоксикарбонильных групп включают, без ограничения, метоксикарбонил, этоксикарбонил, изо-пропоксикарбонил, н-пропоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или н-пентоксикарбонил.

[0154] В контексте настоящей заявки “арилоксикарбонил” относится к любой арильной группе, определенной выше, присоединенной через оксикарбонильный мостик (например, -C(O)O-арил). Примеры арилоксикарбонильных групп включают, без ограничения, феноксикарбонил и нафтилоксикарбонил.

[0155] В контексте настоящей заявки “гетероарилоксикарбонил” относится к любой гетероарильной группе, определенной в настоящем описании, присоединенной через оксикарбонильный мостик (например, -C(O)O-гетероарил). Примеры гетероарилоксикарбонильных групп включают, без ограничения, 2-пиридилоксикарбонил, 2-оксазолилоксикарбонил, 4-тиазолилоксикарбонил или пиримидинилоксикарбонил.

[0156] В контексте настоящей заявки “арил” или “ароматический” означает любое стабильное моноциклическое или полициклическое углеродное кольцо, содержащее до 6 атомов в каждом кольце, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Примеры арильных групп включают, без ограничения, фенил, нафтил, антраценил, тетрагидронафтил, инданил и бифенил. В случаях, когда арильный заместитель является бициклическим и одно кольцо является неароматическим, следует понимать, что присоединение осуществляется через ароматическое кольцо. Арильные группы являются

необязательно моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении согласно обычной валентности.

[0157] В контексте настоящей заявки термин “гетероарил” представляет собой стабильное моноциклическое или полициклическое кольцо, содержащее до 7 атомов в каждом кольце, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и содержит от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Примеры гетероарильных групп включают, без ограничения, акридинил, карбазолил, циннолинил, хиноксалинил, пирразолил, индолил, бензотриазолил, фуранил, тиенил, бензотиенил, бензофуранил, бензимидозолонил, безоксазолонил, хинолинил, изохинолинил, дигидроизоиндолонил, имидазопиридинил, изоиндолонил, индазолил, оксазолил, оксадиазолил, изоксазолил, индилил, пиразинил, пирадазинил, пиридинил, пиримидинил, пирролил и тетрагидрохинолин. “Гетероарил” также следует понимать, как включающий производное N-оксида любого азотсодержащего гетероарила. В случаях, когда гетероарильный заместитель является бициклическим и одно кольцо является неароматическим или не содержит гетероатомы, следует понимать, что присоединение происходит через ароматическое кольцо или через кольцо, содержащее гетероатом. Гетероарильные группы являются необязательно моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении согласно нормальной валентности.

[0158] В контексте настоящей заявки термин “гетероцикл”, “гетероциклический” или “гетероциклил” означает 3-14-членный ароматический или неароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, включая полициклические группы. В контексте настоящей заявки термин “гетероциклический” также следует рассматривать как являющийся синонимом терминам “гетероцикл” и “гетероциклил” и следует понимать как имеющий те же определения, как указано в настоящем описании. “Гетероциклил” включает указанные выше гетероарилы, а также их дигидро и тетрагидро аналоги. Примеры гетероциклильных групп включают, без ограничения, азетидинил, бензоимидазолил, бензофуранил, бензофуразанил, бензопиразолил, бензотриазолил, бензотиофенил, бензоксазолил, карбазолил, карболинил, циннолинил, фуранил, имидазолил, индолинил, индолил, индолазинил, индазолил, изобензофуранил, изоиндолил, изохинолинил, изотиазолил, изоксазолил, нафтпиридинил, оксадиазолил, оксооксазолидинил, оксазолил, оксазолин, оксопиперазинил, оксопирролидинил, оксоморфолинил, изоксазолин, оксетинил, пиранил, пиразинил, пиразолил, пиридазинил, пиридопиридинил, пиридазинил, пиридил, пиридинонил, пиримидил, пиримидинонил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, хиноксалинил, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиопиранил, тетрагидроизохинолинил, тетразолил, тетразолопиридил, тиадиазолил, тиазолил, тиенил, триазолил, 1,4-диоксанил, гексагидроазепинил, пиперазинил, пиперидинил, пиридин-2-онил, пирролидинил, морфолинил, тиоморфолинил, дигидробензоимидазолил, дигидробензофуранил, дигидробензотиофенил, дигидробензоксазолил, дигидрофуранил, дигидроимидазолил, дигидроиндолил, дигидроизоксазолил, дигидроизотиазолил,

дигидрооксадиазолил, дигидрооксазолил, дигидропиразинил, дигидропиразолил, дигидропиридинил, дигидропиримидинил, дигидропирролил, дигидрохинолинил, дигидроетразолил, дигидротиадиазолил, дигидротиазолил, дигидротииенил, дигидротриазолил, дигидроазетидинил, диоксидотиоморфолинил, метилендиоксибензоил, тетрагидрофуранил и тетрагидротииенил и их N-оксиды. Присоединение гетероциклического заместителя может происходить через атом углерода или через гетероатом. Гетероциклические группы являются необязательно моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении согласно обычной валентности.

[0159] В контексте настоящей заявки термины “лечить,” “лечение” и т.п. означают способы или этапы, выполняемые для обеспечения облегчения или уменьшения количества симптомов, тяжести и/или частоты появления одного или более симптомов заболевания у субъекта. В контексте настоящего описания термины «лечить» и «лечение» могут включать профилактику, терапию, профилактическое лечение и/или уменьшение количества симптомов, уменьшения тяжести и/или частоты появления одного или более симптомов заболевания у субъекта.

[0160] В контексте настоящей заявки фраза «доставить в клетку» и т.п., когда относится к карго-молекуле, означает функциональную доставку карго-молекулы в клетку. Фраза «функциональная доставка» означает доставку карго-молекулы в клетку таким образом, чтобы карго-молекула имела требуемую биологическую активность. Когда речь идет конкретно о карго-молекуле, которая является агентом РНКи, требуемая биологическая активность представляет собой, например, специфическое для последовательности ингибирование экспрессии гена.

[0161] Если не указано иное, использование символа  в контексте настоящей заявки означает, что с ним может быть связана любая группа или группы, которые входят в объем изобретений, представленных в настоящем описании.

[0162] В контексте настоящей заявки термин «изомеры» относится к соединениям, которые имеют идентичные молекулярные формулы, но различаются характером или порядком связывания или расположением их атомов в пространстве. Изомеры, различающиеся расположением атомов в пространстве, называются «стереоизомерами». Стереоизомеры, которые не являются зеркальным отображением друг друга, называются «диастереоизомерами», а стереоизомеры, которые не являются накладываемыми друг на друга зеркальными изображениями, называются «энантиомерами» или, иногда, оптическими изомерами. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется «хиральным центром».

[0163] В контексте настоящей заявки связующая группа представляет собой один или более атомов, которые соединяют одну молекулу или часть молекулы с другой, со второй молекулой или второй частью молекулы. В данной области техники термины «связующая группа» и «спейсеры» иногда используются взаимозаменяемо. Аналогично, в контексте настоящей заявки термин «каркас» иногда используется взаимозаменяемо со

связующей группой. В некоторых вариантах осуществления связующая группа может включать или состоять из группы ПЭГ или фрагмента ПЭГ.

[0164] В контексте настоящей заявки термин «связанный» или «конъюгированный», когда относится к связи между двумя молекулами, означает, что две молекулы соединены ковалентной связью или что две молекулы связаны нековалентными связями (например, водородными связями или ионными связями). В некоторых примерах, в которых термин «связанный» относится к ассоциации между двумя молекулами через нековалентные связи, ассоциация между двумя разными молекулами имеет K_D менее 1×10^{-4} М (например, менее 1×10^{-5} М, менее 1×10^{-6} М или менее 1×10^{-7} М) в физиологически приемлемом буфере (например, забуференном фосфатом физиологическом растворе). Если не указано иное, в контексте настоящей заявки термин «связанный» может относиться к связи между первым соединением и вторым соединением либо через любые промежуточные атомы или группы атомов, либо без них.

[0165] Специалист в данной области легко поймет и оценит, что соединения и композиции, раскрытые в настоящем описании, могут иметь определенные атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии, в зависимости от среды, в которой соединение или композиция находится. Соответственно, используемые в настоящем описании структуры предполагают, что определенные функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут быть протонированы или депротонированы. Изобретение охватывает раскрытые соединения и композиции независимо от их состояния протонирования в зависимости от pH окружающей среды, что будет легко понять специалисту в данной области.

[0166] Используемая в формуле изобретения фраза «состоящий из» исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанные в формуле изобретения. Используемая в формуле изобретения фраза «по существу из состоящий» ограничивает объем формулы указанными материалами или этапами, а также теми, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики заявленного изобретения.

[0167] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные раскрытым в настоящем описании, можно использовать на практике или при тестировании настоящего изобретения, подходящие методы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки. В случае противоречия преимущественную силу имеет настоящее описание, включая определения. Кроме того, материалы, методы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Полидентатные лиганды и каркасы для нацеливания на интегрин $\alpha\beta 3$

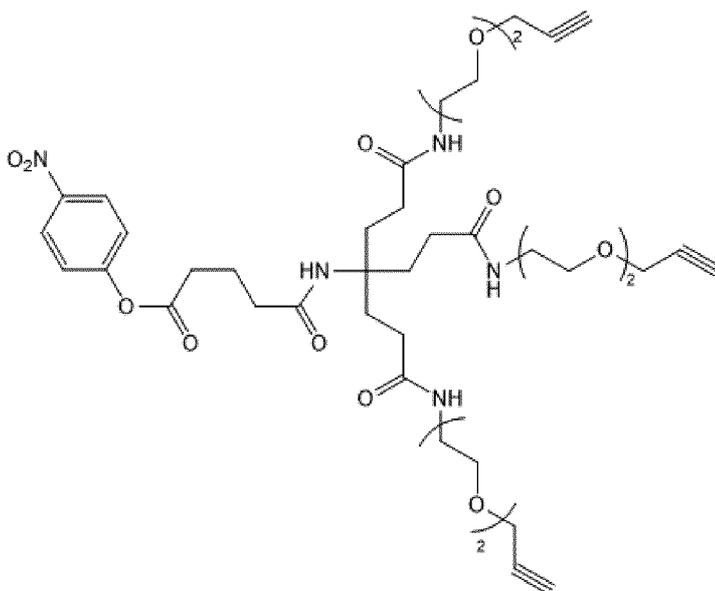
[0168] Как раскрыто в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления один или более лигандов интегрина $\alpha\beta 3/5$ могут быть связаны с одной или более карго-

молекулами. В некоторых вариантах осуществления только один лиганд интегрина конъюгирован с карго-молекулой (называемый в настоящем описании «монодентатным» или «моновалентным» лигандом). В некоторых вариантах осуществления два лиганда интегрина конъюгированы с карго-молекулой (называемые в настоящем описании «бидентатной» или «двухвалентной» нацеленной группой). В некоторых вариантах осуществления три лиганда интегрина конъюгированы с карго-молекулой (называемой в настоящем описании «тридентатной» или «трехвалентной» нацеленной группой). В некоторых вариантах осуществления четыре лиганда интегрина конъюгированы с карго-молекулой (называемой в настоящем описании «тетрадентатной» или «четырёхвалентной» нацеленной группой). В некоторых вариантах осуществления более четырех лигандов интегрина конъюгированы с карго-молекулой.

[0169] В некоторых вариантах осуществления, в которых только один лиганд интегрина конъюгирован с карго-молекулой (называемый в настоящем описании «монодентатным» лигандом), лиганд интегрина может быть непосредственно конъюгирован с карго-молекулой. В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрина, раскрытый в настоящем описании, может быть конъюгирован с карго-молекулой через каркас или другую линкерную структуру.

[0170] В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе лиганды интегрина включают один или более каркасов. Каркасы, также иногда называемые в данной области связующими группами или линкерами, можно использовать для облегчения связывания одной или более карго-молекул с одним или более лигандами интегрина, раскрытыми в настоящем описании. Подходящие каркасы, совместимые с лигандами, раскрытыми в настоящем описании, как правило известны в данной области. Неограничивающие примеры каркасов, которые можно использовать с лигандами интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, раскрытыми в настоящем описании, включают без ограничения полимеры и полиаминовые кислоты (например, бис-глутаминовую кислоту, поли-L-лизин и т.д.). В некоторых вариантах осуществления каркасы могут включать цистеиновые линкеры или группы, DBCO-PEG₁₋₂₄-NHS, пропаргил-PEG₁₋₂₄-NHS и/или мультидентатные DBCO и/или фрагменты пропаргила.

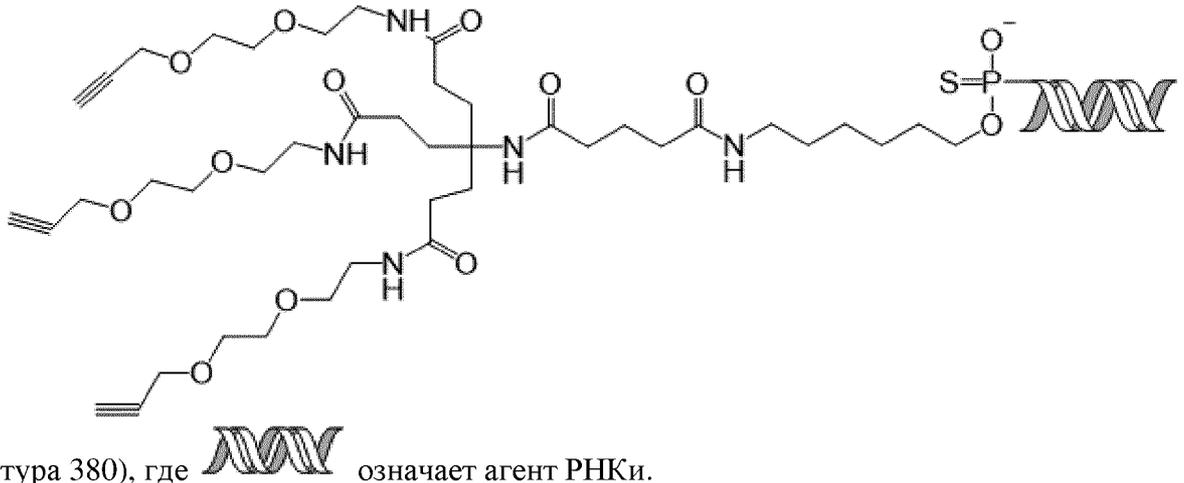
[0171] В некоторых вариантах осуществления каркас, используемый для связывания одного или более раскрытых в настоящем описании лигандов интегрина с одной или более карго-молекулами, имеет следующую структуру:



(каркас 1)

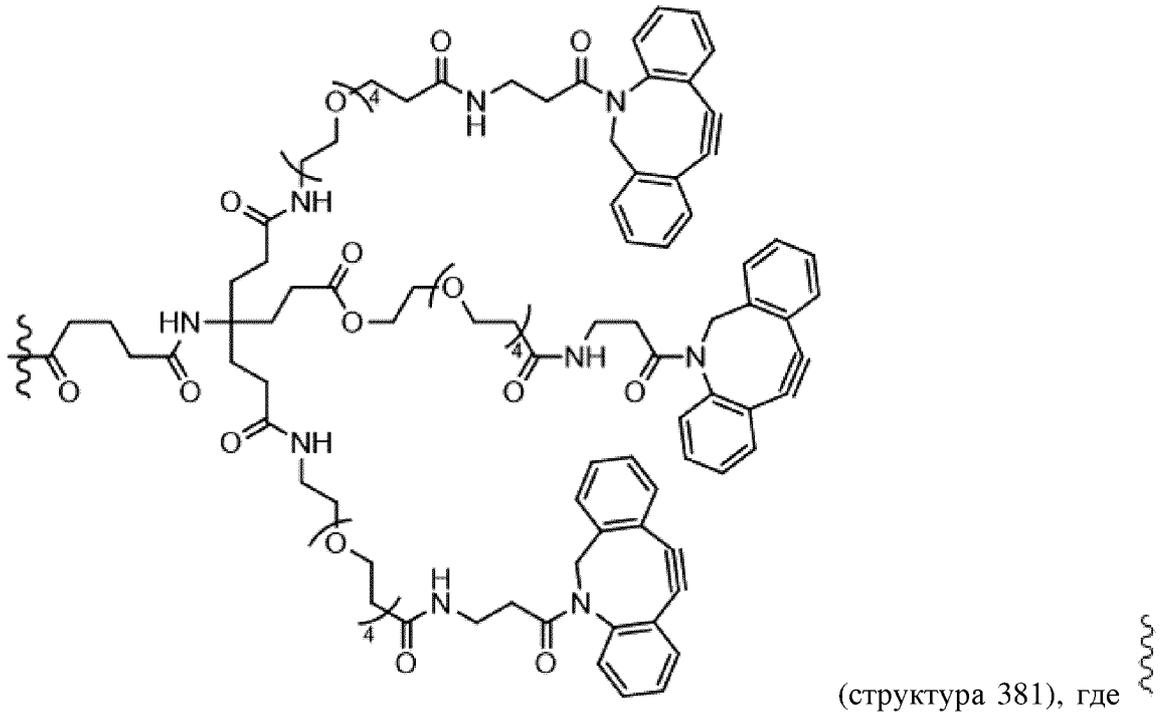
[0172] Применение каркаса 1, например, способствует эффективной конъюгации как с мономерами лиганда интегрина, так и с одной или более карго-молекулами. Каркас 1 включает содержащий реакционноспособную аминогруппу сложный эфир *p*-нитрофенола (также называемый 4-нитрофенолом), амидную связь и три ответвления звена ПЭГ₂, а также концевые алкины. 4-нитрофеноловый сложный эфир может быть конъюгирован с первичным амином на карго-молекуле, например, с первичным амином на триггере РНК, содержащем концевую аминогруппу (например, NH₂-(CH₂)₆), посредством образования амида. Концевой алкин может быть конъюгирован с азидомодифицированными лигандами (как пептидами, так и малыми молекулами) посредством клик-химии, катализируемой медью.

[0173] В некоторых вариантах осуществления карго-молекула представляет собой агент РНКи. В некоторых вариантах осуществления каркас 1 может быть присоединен к терминальному концу агента РНКи, например к 5'-терминальному концу смысловой цепи агента РНКи. Например, 5'-терминальный конец смысловой цепи агента РНКи может быть модифицирован путем включения амина C₆-(CH₂)₆-NH₂, присоединенного к 5'-концу 5'-терминального нуклеотида агента РНКи. Агент РНКи, имеющий такую модификацию с помощью C₆-амина (или другую модификацию, приводящую к образованию терминального амина), может быть легко конъюгирован с каркасом 1, как показано в приведенной ниже структуре:



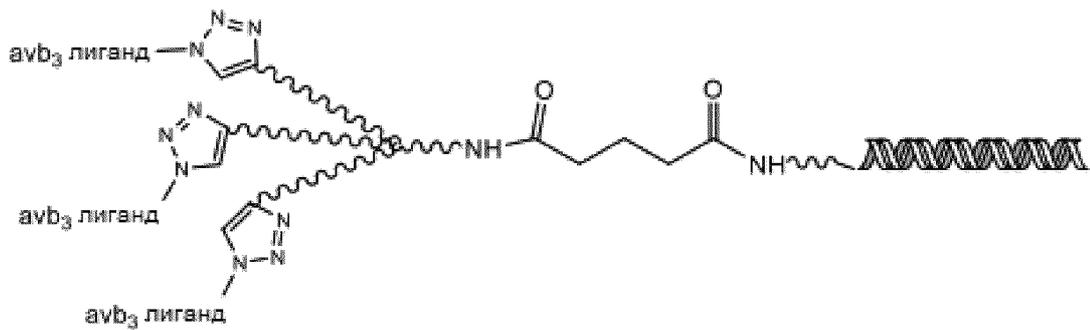
[0174] Алкиновые группы структуры 380, указанной выше, затем могут быть конъюгированы с лигандами интегрин, раскрытыми в настоящем описании, с образованием тридентатных групп, нацеленных на интегрин.

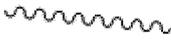
[0175] В некоторых вариантах осуществления каркас можно синтезировать с использованием DBCO (добензоциклооктина), который может быть представлен следующей структурой:



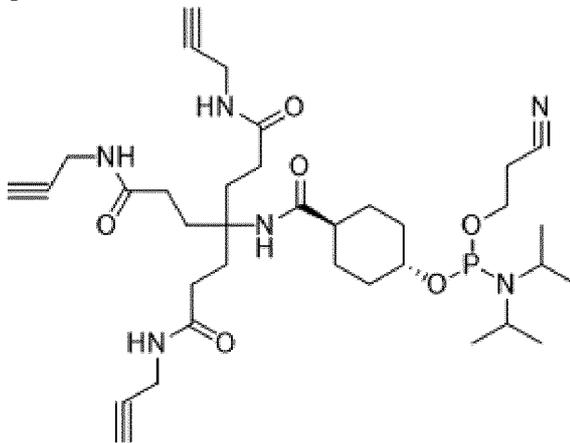
указывает присоединение к реакционноспособной сложноэфирной группе или фрагменту, содержащему карго-молекулу.

[0176] В некоторых вариантах осуществления между агентом РНКи и лигандами интегрин, раскрытыми в настоящем описании, образуются группы триазола, показанные в приведенной ниже общей структуре:



(структура 390), где  указывает любой подходящий каркас или линкер, который может быть использован для связывания лиганда с агентом РНКи, и  означает агент РНКи.

[0177] В некоторых вариантах осуществления каркас может быть синтезирован в виде соединения фосфорамидита, пример которого показан в приведенной ниже структуре:

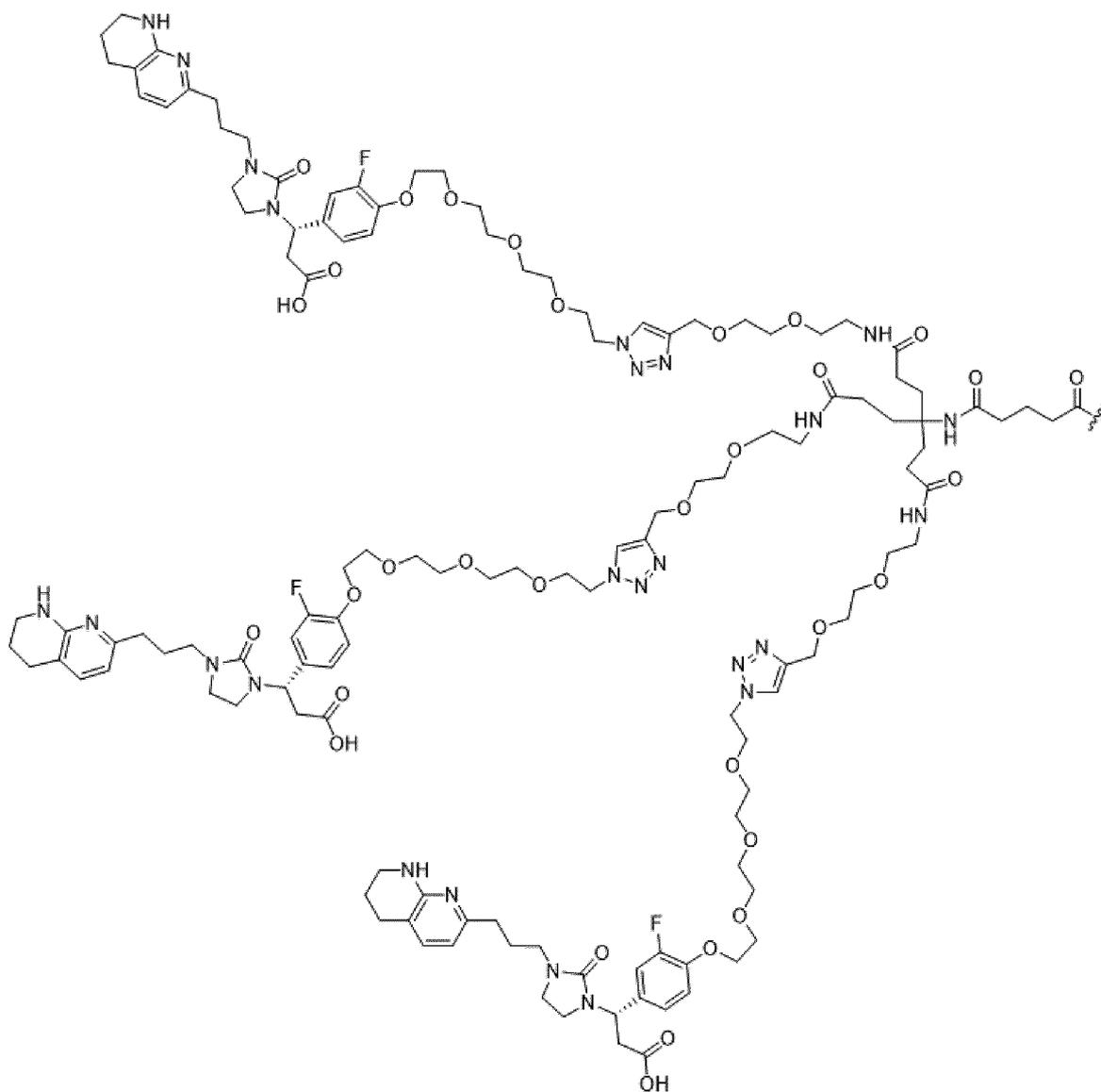


(структура 400).

[0178] Триалкиновое соединение структуры 400 облегчает связывание тридентатного лиганда с 5'-концом смысловой цепи агента РНКи посредством реакции алкина с нацеленным лигандом, содержащим азид.

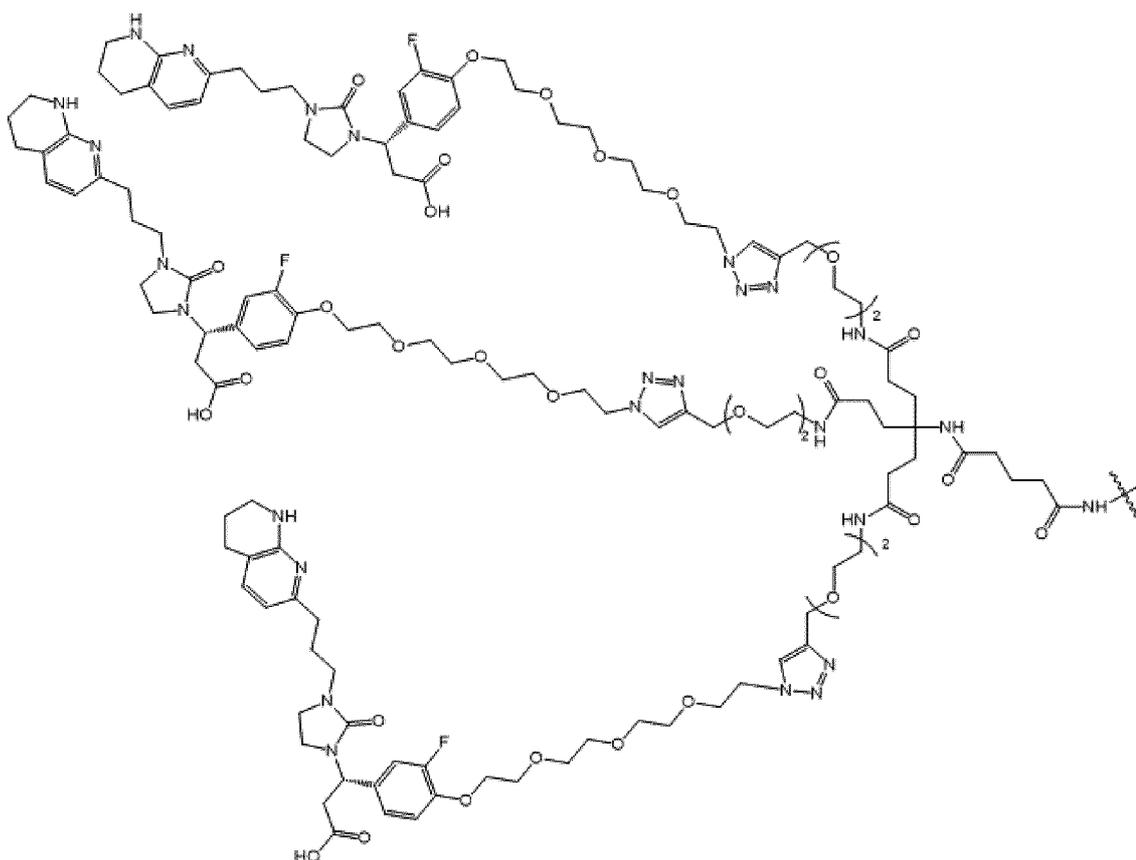
[0179] В некоторых вариантах осуществления раскрытая в настоящем описании нацеленная на интегрин группа содержит структуру 1а, структуру 2а, структуру 2.1а, структуру 2.2а, структуру 2.3а, структуру 2.4а, структуру 2.5а, структуру 2.6а, структуру 2.7а, структуру 2.8а, структуру 2.9а, структуру 2.10а, структуру 2.11а, структуру 28а, структуру 29а, структуру 30а, структуру 31а, структуру 32а, структуру 33а, структуру 34а, структуру 36а, структуру 37а, структуру 38а, структуру 39а, структуру 40а и структуру 41а, при этом нацеленная на интегрин $\alpha\nu\beta 3$ группа является тридентатной нацеленной группой и содержит три лиганда.

[0180] В некоторых вариантах осуществления нацеленная на интегрин $\alpha\nu\beta 3$ группа, раскрытая в настоящем описании, содержит три лиганда структуры 2а и может быть представлена следующей структурой:



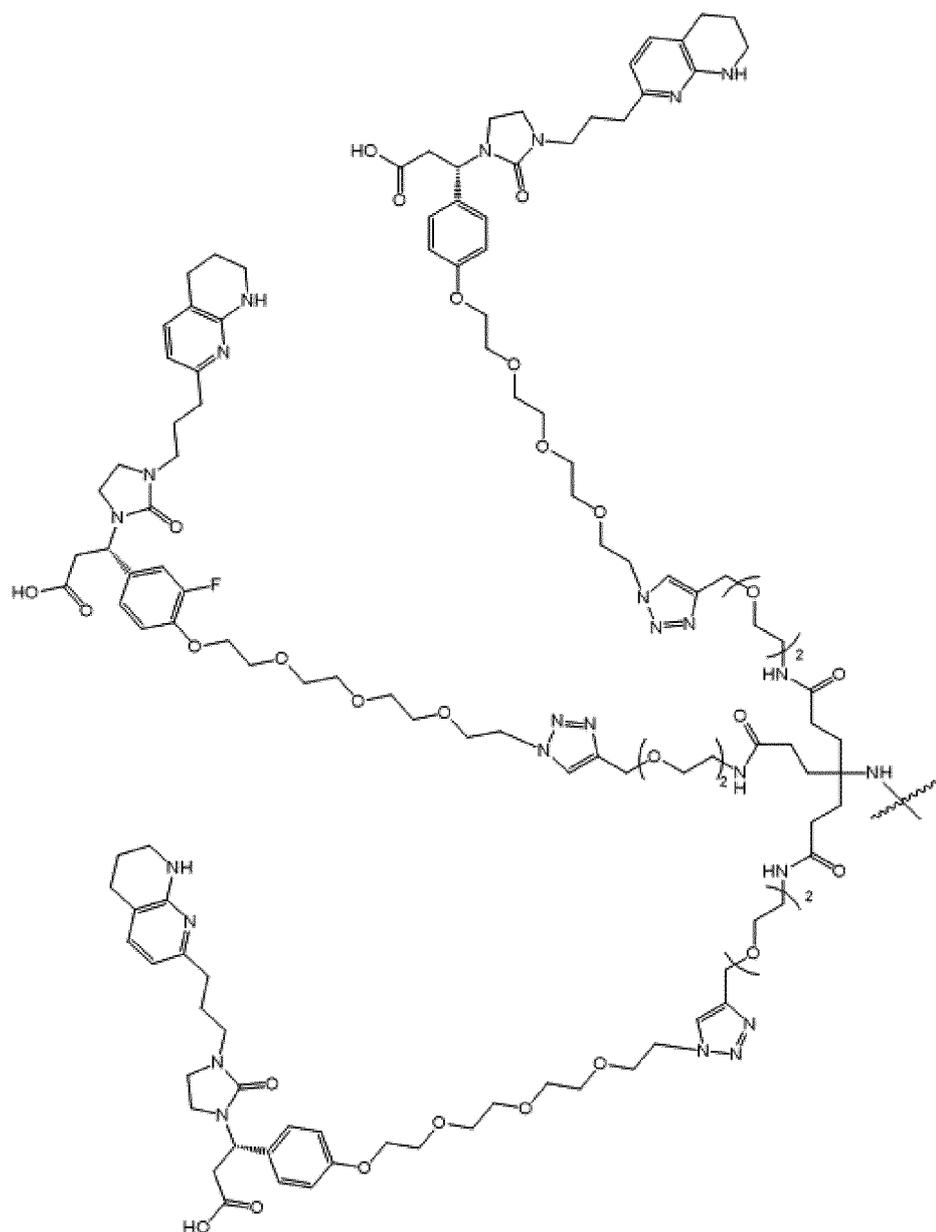
(структура 700)

[0181] В некоторых вариантах осуществления тридентатная нацеленная группа, раскрытая в настоящем описании, содержит три лиганда структуры 2а, и может быть представлена следующей структурой:



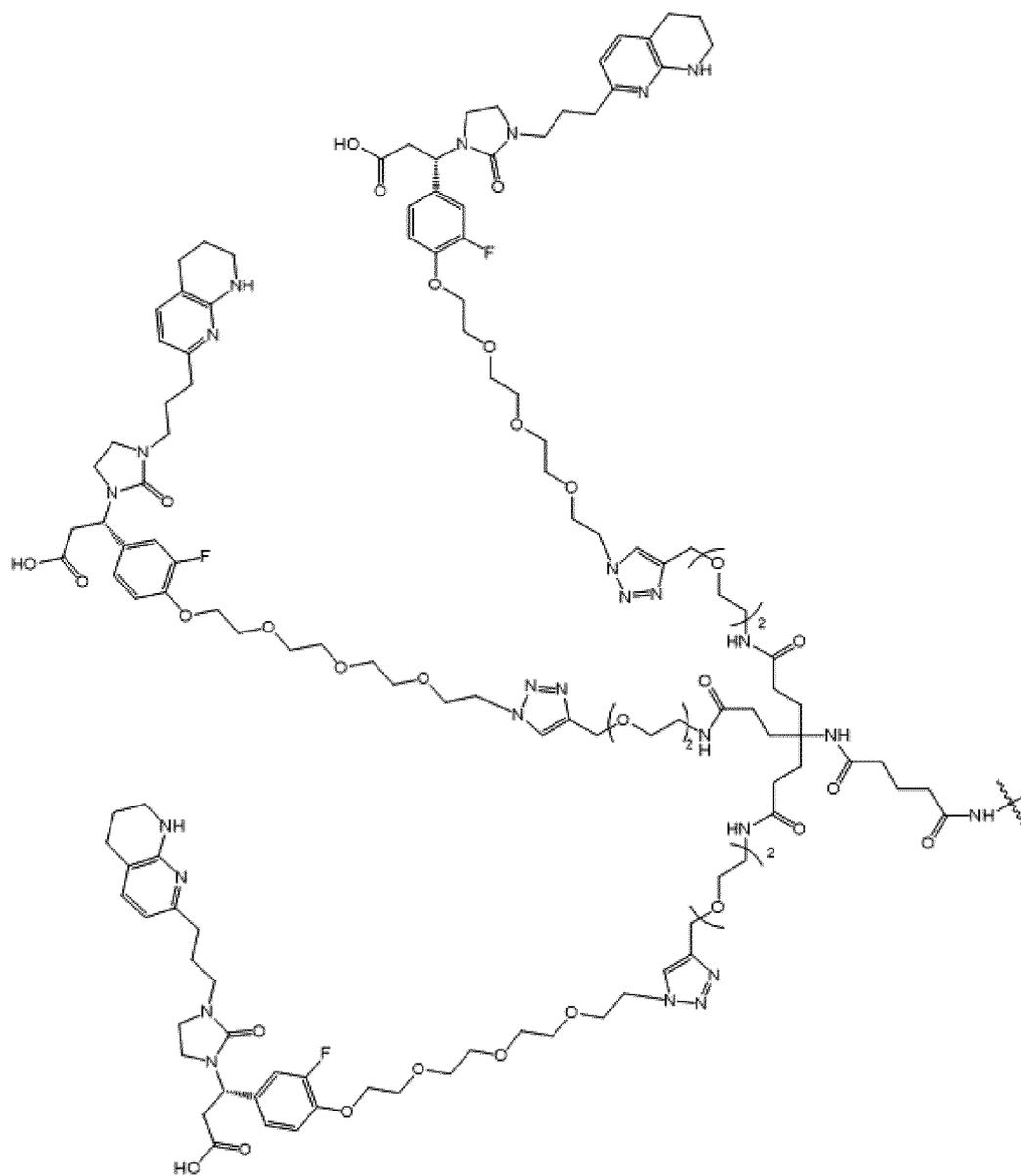
(структура 701)

[0182] В некоторых вариантах осуществления тридентатная нацеленная группа, раскрытая в настоящем описании, содержит три лиганда структуры 2а, и может быть представлена следующей структурой:



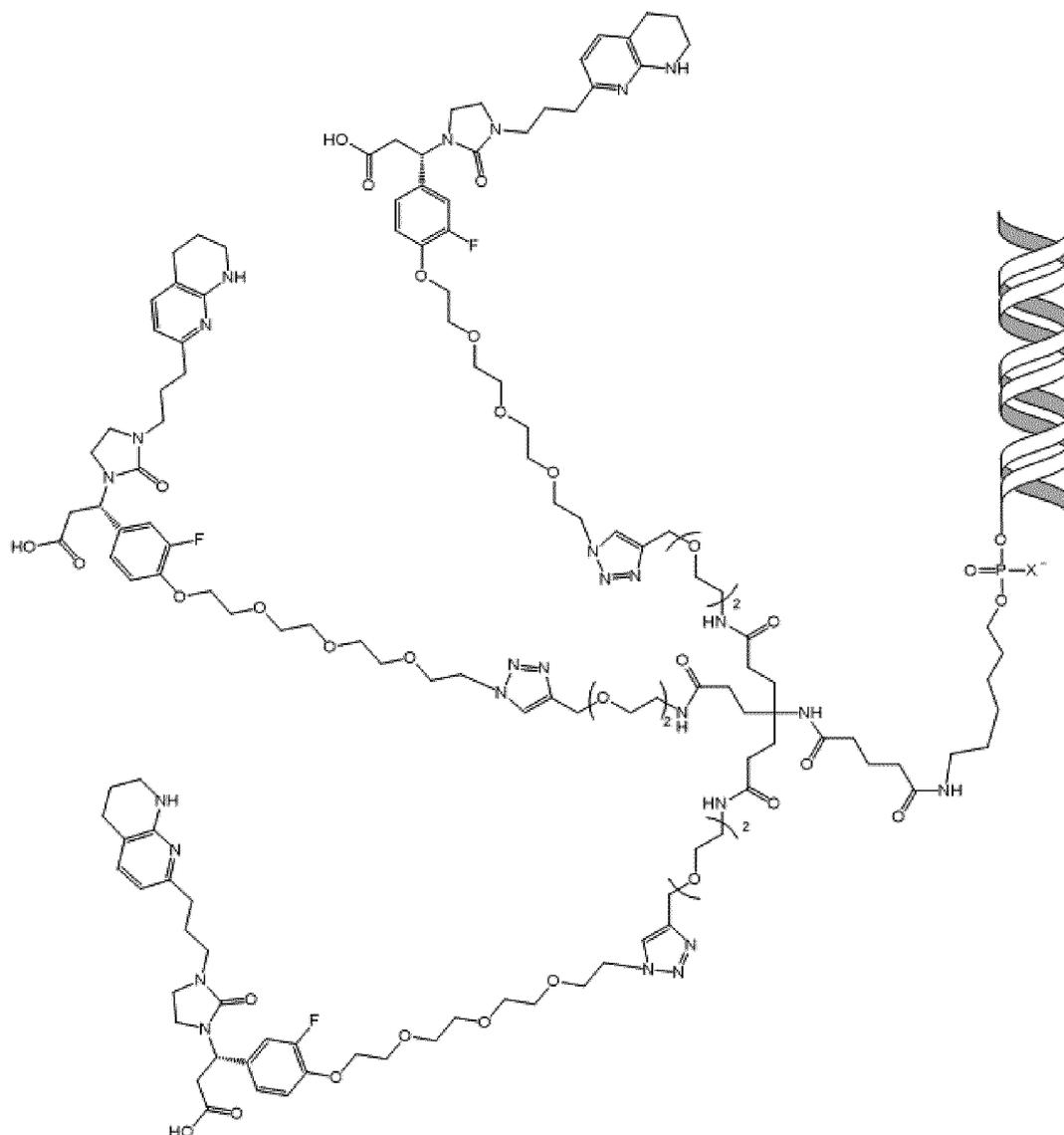
(структура 701a)

[0183] В некоторых вариантах осуществления тридентатная нацеленная группа, содержащая глутаровый линкер, содержит три лиганда структуры 2a, и может быть представлена следующей структурой:



(структура 701b)

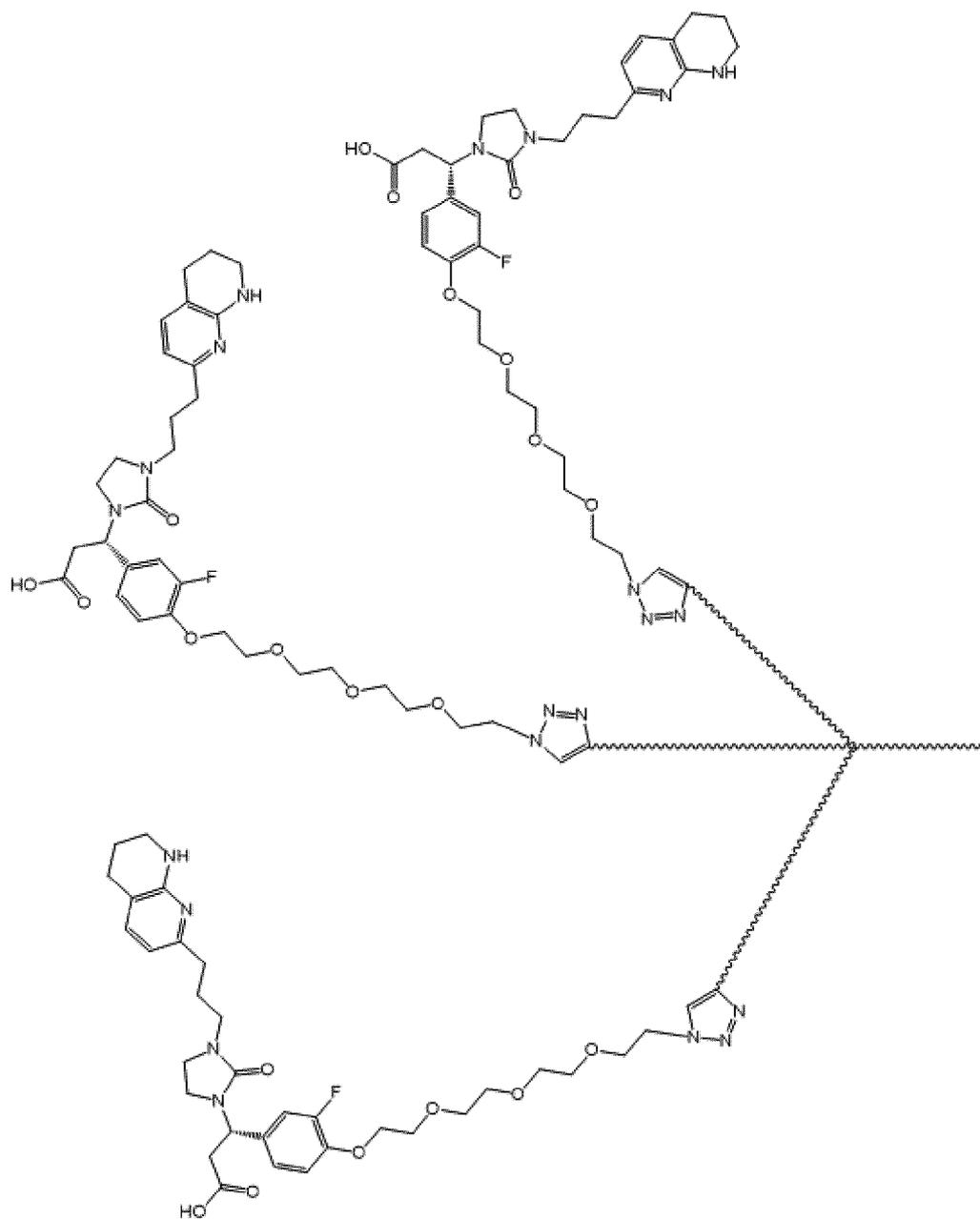
[0184] В некоторых вариантах осуществления тридентатная нацеленная группа, раскрытая в настоящем описании, содержит три лиганда структуры 2а, и может быть представлена следующей структурой:



(структура 701c),

где  означает агент РНКи, и X=O или S.

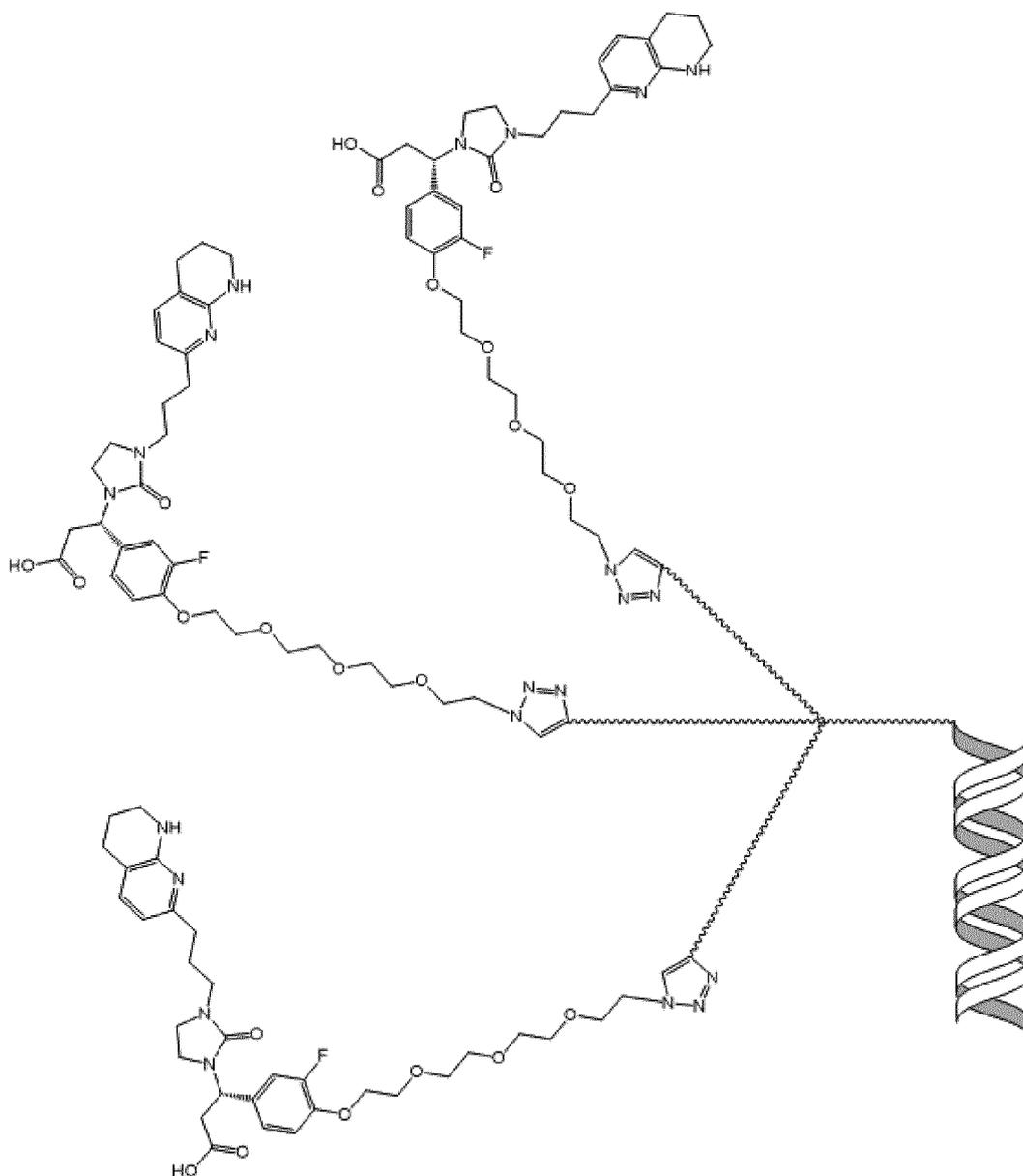
[0185] В некоторых вариантах осуществления тридентатная нацеленная группа, раскрытая в настоящем описании, содержит три лиганда структуры 2a, и может быть представлена следующей структурой:



(структура 701d),

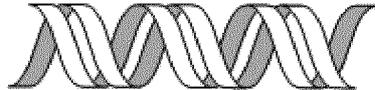
где ~~~~~ указывает любой подходящий каркас или линкер, который может быть использован для связывания лиганда с карго-молекулой.

[0186] В некоторых вариантах осуществления $\alpha v \beta 3$ тридентатная нацеленная группа, конъюгированная с агентом РНКи, содержит три лиганда структуры 2a, и может быть представлена следующей структурой:



(структура 701e),

где  указывает любой подходящий каркас или линкер, который может

быть использован для связывания лиганда с агентом РНКи, и  означает агент РНКи.

Реакционноспособные группы и защищенные реакционноспособные группы.

[0187] Реакционноспособные группы хорошо известны в данной области техники и обеспечивают образование ковалентных связей между двумя молекулами или реагентами. Подходящие для применения в рамках настоящего изобретения реакционноспособные группы включают, без ограничения: аминогруппы, амидные группы, группы карбоксильной кислоты, азиды, алкины, группы пропаргила, BCN (бикло[6.1.0]нонин), DBCO(добензоциклооктин)-тиолы, малеимидные группы, аминокси-группы, группы N-гидрокси-сукцинимид (NHS) или другого активированного сложного эфира (например,

PNP, TFP, PFP), бромогруппы, альдегидные, карбонатные, тозилатные, тетразиновые, транс-циклооктеновые (TCO) группы, группы гидразида, гидроксильные группы, дисульфидные и ортопиридилдисульфидные группы.

[0188] Включение реакционноспособных групп может облегчить конъюгацию представленного в настоящем описании лиганда интегрин с карго-молекулой. Реакции конъюгации хорошо известны в данной области и обеспечивают образование ковалентных связей между двумя молекулами или реагентами. Подходящие реакции конъюгации для применения в рамках настоящего изобретения включают, без ограничения, реакцию амидного сочетания, реакцию присоединения по Михаэлю, реакцию образования гидразона и реакцию циклодобавления методом клик-химии.

[0189] В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем описании нацеленные на интегрин лиганды синтезируют в виде сложного эфира тетрафторфенила (TFP), который может быть замещен реакционноспособной аминогруппой для присоединения карго-молекулы. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, синтезируют в виде азида, который может быть конъюгирован с группой пропаргила или DBCO-группой, например, посредством реакции циклодобавления методом клик-химии для присоединения карго-молекулы.

[0190] Защищенные реакционноспособные группы также широко используются в данной области. Защитная группа обеспечивает временное химическое преобразование реакционноспособной группы в группу, которая не является реакционноспособной в условиях, при которых незащищенная группа вступает в реакцию, например, для обеспечения хемоселективности в последующей химической реакции. Подходящие защищенные реакционноспособные группы для использования в рамках настоящего изобретения включают, без ограничения, ВОС-группы (т-бутоксикарбонил), Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил), карбоксибензильные (CBZ) группы, бензиловые эфиры и PBF (2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил).

Карго-молекулы (включая агенты РНКи)

[0191] Карго-молекула представляет собой любую молекулу, которая, будучи отделенной от лигандов интегрин, раскрытых в настоящем описании, оказывает требуемый эффект на клетку, содержащую рецептор интегрин. Карго-молекула может представлять собой фармацевтический ингредиент, лекарственный продукт, пролекарство, вещество с известным терапевтическим эффектом, малую молекулу, антитело, фрагмент антитела, иммуноглобулин, моноклональное антитело, метку или маркер, липид, природную или модифицированную нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, пептид, полимер, полиамин, белок, аптамер, токсин, витамин, ПЭГ, гаптен, диоксигенин, биотин, радиоактивный атом или молекулу или флуорофор. В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул (например, одинаковые или разные карго-молекулы) связаны с одним или более лигандами интегрин для нацеливания карго-молекул на клетку, экспрессирующую интегрин $\alpha\beta3$ и/или интегрин $\alpha\beta5$.

[0192] В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул представляют собой фармацевтический ингредиент или фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул представляют собой соединение на основе олигонуклеотида. В контексте настоящей заявки “соединение на основе олигонуклеотида” представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую примерно 10-50 (например, от 10 до 48, от 10 до 46, от 10 до 44, от 10 до 42, от 10 до 40, от 10 до 38, от 10 до 36, от 10 до 34, от 10 до 32, от 10 до 30, от 10 до 28, от 10 до 26, от 10 до 24, от 10 до 22, от 10 до 20, от 10 до 18, от 10 до 16, от 10 до 14, от 10 до 12, от 12 до 50, от 12 до 48, от 12 до 46, от 12 до 44, от 12 до 42, от 12 до 40, от 12 до 38, от 12 до 36, от 12 до 34, от 12 до 32, от 12 до 30, от 12 до 28, от 12 до 26, от 12 до 24, от 12 до 22, от 12 до 20, от 12 до 18, от 12 до 16, от 12 до 14, от 14 до 50, от 14 до 48, от 14 до 46, от 14 до 44, от 14 до 42, от 14 до 40, от 14 до 38, от 14 до 36, от 14 до 34, от 14 до 32, от 14 до 30, от 14 до 28, от 14 до 26, от 14 до 24, от 14 до 22, от 14 до 20, от 14 до 18, от 14 до 16, от 16 до 50, от 16 до 48, от 16 до 46, от 16 до 44, от 16 до 42, от 16 до 40, от 16 до 38, от 16 до 36, от 16 до 34, от 16 до 32, от 16 до 30, от 16 до 28, от 16 до 26, от 16 до 24, от 16 до 22, от 16 до 20, от 16 до 18, от 18 до 50, от 18 до 48, от 18 до 46, от 18 до 44, от 18 до 42, от 18 до 40, от 18 до 38, от 18 до 36, от 18 до 34, от 18 до 32, от 18 до 30, от 18 до 28, от 18 до 26, от 18 до 24, от 18 до 22, от 18 до 20, от 20 до 50, от 20 до 48, от 20 до 46, от 20 до 44, от 20 до 42, от 20 до 40, от 20 до 38, от 20 до 36, от 20 до 34, от 20 до 32, от 20 до 30, от 20 до 28, от 20 до 26, от 20 до 24, от 20 до 22, от 22 до 50, от 22 до 48, от 22 до 46, от 22 до 44, от 22 до 42, от 22 до 40, от 22 до 38, от 22 до 36, от 22 до 34, от 22 до 32, от 22 до 30, от 22 до 28, от 22 до 26, от 22 до 24, от 24 до 50, от 24 до 48, от 24 до 46, от 24 до 44, от 24 до 42, от 24 до 40, от 24 до 38, от 24 до 36, от 24 до 34, от 24 до 32, от 24 до 30, от 24 до 28, от 24 до 26, от 26 до 50, от 26 до 48, от 26 до 46, от 26 до 44, от 26 до 42, от 26 до 40, от 26 до 38, от 26 до 36, от 26 до 34, от 26 до 32, от 26 до 30, от 26 до 28, от 28 до 50, от 28 до 48, от 28 до 46, от 28 до 44, от 28 до 42, от 28 до 40, от 28 до 38, от 28 до 36, от 28 до 34, от 28 до 32, от 28 до 30, от 30 до 50, от 30 до 48, от 30 до 46, от 30 до 44, от 30 до 42, от 30 до 40, от 30 до 38, от 30 до 36, от 30 до 34, от 30 до 32, от 32 до 50, от 32 до 48, от 32 до 46, от 32 до 44, от 32 до 42, от 32 до 40, от 32 до 38, от 32 до 36, от 32 до 34, от 34 до 50, от 34 до 48, от 34 до 46, от 34 до 44, от 34 до 42, от 34 до 40, от 34 до 38, от 34 до 36, от 36 до 50, от 36 до 48, от 36 до 46, от 36 до 44, от 36 до 42, от 36 до 40, от 36 до 38, от 38 до 50, от 38 до 48, от 38 до 46, от 38 до 44, от 38 до 42, от 38 до 40, от 40 до 50, от 40 до 48, от 40 до 46, от 40 до 44, от 40 до 42, от 42 до 50, от 42 до 48, от 42 до 46, от 42 до 44, от 44 до 50, от 44 до 48, от 44 до 46, от 46 до 50, от 46 до 48 или от 48 до 50) нуклеотидов или пар нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления соединение на основе олигонуклеотида имеет последовательность нуклеотидных оснований, которая, по меньшей мере, частично комплементарна кодирующей последовательности в экспрессируемой целевой нуклеиновой кислоте или целевом гене (например, транскрипте гена или мРНК целевого гена) внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления соединения на основе олигонуклеотидов при доставке в клетку, экспрессирующую ген, способны подавлять

экспрессию лежащего в основе гена и упоминаются в настоящем описании как «подавляющие экспрессию соединения на основе олигонуклеотидов». Экспрессия гена может подавляться *in vitro* или *in vivo*.

[0193] «Соединения на основе олигонуклеотидов» включают, без ограничения: одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, короткие или малые интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микро РНК (миРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), рибозимы, молекулы интерферирующих РНК и субстраты Дайсера. В некоторых вариантах осуществления соединение на основе олигонуклеотида представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, такой как антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления соединение на основе олигонуклеотида представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления соединения на основе олигонуклеотида представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид, который является агентом РНКи.

[0194] В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул представляют собой «агент РНКи», который, как определено в настоящем описании, представляет собой химическую композицию, включающую РНК или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) олигонуклеотидную молекулу, которая способна разлагать или подавлять трансляцию транскриптов РНК-мессенджеров (мРНК) целевой мРНК специфическим для последовательности образом. В контексте настоящей заявки агенты РНКи могут действовать по механизму РНК-интерференции (т.е. индуцировать РНК-интерференцию через взаимодействие с клеточным аппаратом млекопитающих пути РНК-интерференции (комплексом РНК-индуцированного сайленсинга или RISC)) или с помощью любого альтернативного механизма(ов) или пути(ей). Хотя считается, что агенты РНКи, как этот термин используется в настоящем описании, действуют в основном через механизм РНК-интерференции, раскрытые агенты РНКи не связаны и не ограничены каким-либо конкретным путем или механизмом действия. Раскрытые в настоящем описании агенты РНКи состоят из смысловой цепи и антисмысловой цепи и включают, без ограничения: короткие или малые интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микро РНК (миРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), и субстраты Дайсера. Антисмысловая цепь агентов РНКи, раскрытых в настоящем описании, по меньшей мере частично комплементарна целевой мРНК. Агенты РНКи могут включать один или более модифицированных нуклеотидов и/или одну или более нефосфодиэфирных связей.

[0195] Как правило, агенты РНКи могут состоять по меньшей мере из смысловой цепи (также называемой сопровождающей цепью), которая включает первую последовательность, и антисмысловой цепи (также называемой направляющей цепью), которая включает вторую последовательность. Длина смысловой и антисмысловой цепей агента РНКи может составлять от 16 до 49 нуклеотидов каждая. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи агента РНКи независимо имеют длину

от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 19 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 21 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину от 21 до 24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи имеют длину 21 нуклеотид каждая. Смысловые и антисмысловые цепи могут быть одинаковой или разной длины. Агенты РНКи включают последовательность антисмысловой цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна последовательности в гене-мишени, и при доставке в клетку, экспрессирующую мишень, агент РНКи может подавлять экспрессию одного или более генов-мишеней *in vivo* или *in vitro*.

[0196] Соединения на основе олигонуклеотидов в целом и, в частности агенты РНКи, могут состоять из модифицированных нуклеотидов и/или одной или более нефосфодиэфирных связей. Используемый в настоящем описании термин «модифицированный нуклеотид» означает нуклеотид, отличный от рибонуклеотида (2'-гидроксилнуклеотида). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, или 100%) нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. В данном контексте модифицированные нуклеотиды включают, без ограничения, дезоксирибонуклеотиды, нуклеотиды-миметики, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием (абазические), 2'-модифицированные нуклеотиды, нуклеотиды с 3'-3'-связью (инвертированные), нуклеотиды, содержащие неприродные основания, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты, 2',3'-секо-нуклеотиды-миметики (разблокированные аналоги азотистых оснований), заблокированные нуклеотиды, 3'-О-метокси (связанные 2'-межнуклеозидными связями) нуклеотиды, 2'-F-арабино-нуклеотиды, 5'-Me,2'-фторнуклеотид, морфолинонуклеотиды, винилфосфонат-дезоксирибонуклеотиды, винилфосфонат-содержащие нуклеотиды и циклопропилфосфонат-содержащие нуклеотиды. 2'-Модифицированные нуклеотиды (т.е. нуклеотид с группой, отличной от гидроксильной группы в 2'-положении пятичленного сахарного кольца) включают, без ограничения, 2'-О-метил-нуклеотиды, 2'-деокси-2'-фтор-нуклеотиды, 2'-деокси-нуклеотиды, 2'-метоксиэтил(2'-О-2-метоксиэтил)-нуклеотиды, 2'-аминонуклеотиды и 2'-алкил-нуклеотиды.

[0197] Более того, один или более нуклеотидов соединения на основе олигонуклеотида, такого как агент РНКи, могут быть связаны нестандартными связями или каркасами (т.е. модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными каркасами). Модифицированная межнуклеозидная связь может быть ковалентной межнуклеозидной связью, не содержащей фосфатов. Модифицированные межнуклеозидные связи или каркасы включают, без ограничения, 5'-фосфоротиоатные группы, хиральные фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры,

аминоалкил-фосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты) хиральные фосфонаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидат, аминоалкилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкил-фосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые связи, боронофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, 2'-5'-связанные аналоги боронофосфатов или боронофосфаты, имеющие инвертированную полярность, при которой соседние пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'.

[0198] Необязательно, чтобы все положения в данном соединении были модифицированы одинаковым образом. Напротив, в одном соединении на основе олигонуклеотида или даже в одном его нуклеотиде может быть сделано более одной модификации.

[0199] В некоторых вариантах осуществления карго-молекула представляет собой агент РНКи для подавления экспрессии гена HIF-2 альфа (EPAS1). Карго-молекула может быть агентом РНКи, описанным в публикациях международных заявок на патент №№ WO 2016/196239 и WO 2014/134255, каждая из которых включена в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

[0200] Смысловые цепи и антисмысловые цепи агента РНКи могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в данной области. Например, раскрытие агентов РНКи, направленных на подавление экспрессии гена HIF-2 альфа, можно найти, например, в публикации международной заявки на патент № WO 2016/196239, которая включена в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

[0201] В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул могут включать или состоять из фрагмента ПЭГ, который может действовать в качестве фармакокинетического (ПК) усилителя или модулятора. В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул могут включать фрагмент ПЭГ, содержащий примерно 20-900 звеньев этиленоксида (CH₂-CH₂-O) (например, от 20 до 850, от 20 до 800, от 20 до 750, от 20 до 700, от 20 до 650, от 20 до 600, от 20 до 550, от 20 до 500, от 20 до 450, от 20 до 400, от 20 до 350, от 20 до 300, от 20 до 250, от 20 до 200, от 20 до 150, от 20 до 100, от 20 до 75, от 20 до 50, от 100 до 850, от 100 до 800, от 100 до 750, от 100 до 700, от 100 до 650, от 100 до 600, от 100 до 550, от 100 до 500, от 100 до 450, от 100 до 400, от 100 до 350, от 100 до 300, от 100 до 250, от 100 до 200, от 100 до 150, от 200 до 850, от 200 до 800, от 200 до 750, от 200 до 700, от 200 до 650, от 200 до 600, от 200 до 550, от 200 до 500, от 200 до 450, от 200 до 400, от 200 до 350, от 200 до 300, от 200 до 250, от 250 до 900, от 250 до 850, от 250 до 800, от 250 до 750, от 250 до 700, от 250 до 650, от 250 до 600, от 250 до 550, от 250 до 500, от 250 до 450, от 250 до 400, от 250 до 350, от 250 до 300, от 300 до 900, от 300 до 850, от 300 до 800, от 300 до 750, от 300 до 700, от 300 до 650, от 300 до 600, от 300 до 550, от 300 до 500, от 300 до 450, от 300 до 400, от 300 до 350, от 350 до 900, от 350 до 850, от 350 до 800, от 350 до 750, от 350 до 700, от 350 до 650, от 350 до 600, от 350 до 550, от 350 до 500, от 350 до 450, от 350 до 400, от 400 до 900, от 400 до

850, от 400 до 800, от 400 до 750, от 400 до 700, от 400 до 650, от 400 до 600, от 400 до 550, от 400 до 500, от 400 до 450, от 450 до 900, от 450 до 850, от 450 до 800, от 450 до 750, от 450 до 700, от 450 до 650, от 450 до 600, от 450 до 550, от 450 до 500, от 500 до 900, от 500 до 850, от 500 до 800, от 500 до 750, от 500 до 700, от 500 до 650, от 500 до 600, от 500 до 550, от 550 до 900, от 550 до 850, от 550 до 800, от 550 до 750, от 550 до 700, от 550 до 650, от 550 до 600, от 600 до 900, от 600 до 850, от 600 до 800, от 600 до 750, от 600 до 700, от 600 до 650, от 650 до 900, от 650 до 850, от 650 до 800, от 650 до 750, от 650 до 700, от 700 до 900, от 700 до 850, от 700 до 800, от 700 до 750, от 750 до 900, от 750 до 850, от 750 до 800, от 800 до 900, от 850 до 900 или от 850 до 900 звеньев этиленоксида). В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул состоят из фрагмента ПЭГ, имеющего приблизительно 455 звеньев этиленоксида (молекулярной массы примерно 20 килодальтон (кДа)). В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу примерно 2 килодальтон. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу примерно 20 килодальтон. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу примерно 40 килодальтон. Раскрытые в настоящем описании фрагменты ПЭГ могут быть линейными или разветвленными. Фрагменты ПЭГ могут быть дискретными (монодисперсными) или недискретными (полидисперсными). Фрагменты ПЭГ для применения в качестве молекулы, усиливающей РК, являются коммерчески доступными. В некоторых вариантах осуществления одна или более карго-молекул включают фрагмент ПЭГ, который может действовать в качестве модулятора или усилителя РК, а также другую карго-молекулу, такую как фармацевтически активный ингредиент или соединение.

[0202] Описанные лиганды интегрин включают соли или сольваты. Сольваты лиганда интегрин означают присоединение к лиганду интегрин молекул инертного растворителя за счет сил взаимного притяжения. Сольваты представляют собой, например, моно- или дигидраты или соединения, образующиеся в результате присоединения спиртов, таких как, например, метанол или этанол.

[0203] В качестве заместителей лигандов интегрин могут быть предусмотрены свободные аминогруппы или свободные гидроксигруппы с соответствующими защитными группами.

[0204] Лиганды интегрин $\alpha\beta3$ также включают, например, производные, т.е. лиганды интегрин, модифицированные, например, алкильными или ацильными группами, сахарами или олигопептидами, которые расщепляются либо *in vitro*, либо в организме.

[0205] В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин, раскрытый в настоящем описании, облегчает доставку карго-молекулы в цитозоль клетки, презентирющей на своей поверхности интегрин $\alpha\beta3$ и/или интегрин $\alpha\beta5$, либо за счет лиганд-опосредованного эндоцитоза, пиноцитоза, либо посредством других способов. В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин, раскрытый в настоящем

описании, облегчает доставку карго-молекулы к плазматической мембране клетки, презентующей интегрин $\alpha\nu\beta 3$ и/или интегрин $\alpha\nu\beta 5$.

Фармацевтические композиции

[0206] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые включают, состоят из или, по существу, состоят из одного или более лигандов интегрина, раскрытых в настоящем описании.

[0207] В контексте настоящей заявки «фармацевтическая композиция» содержит фармакологически эффективное количество активного фармацевтического ингредиента (API) и, необязательно, один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (вспомогательные вещества) представляют собой вещества, отличные от активного фармацевтического ингредиента (API, терапевтического продукта), которые намеренно включены в систему доставки лекарственного средства. Вспомогательные вещества не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического эффекта в намеченной дозировке. Вспомогательные вещества могут действовать для: а) облегчения обработки системы доставки лекарственного средства во время производства, б) защиты, поддержки или улучшения стабильности, биодоступности или переносимости API пациентом, с) облегчения идентификации продукта и/или g) улучшения любых других характеристик общей безопасности, эффективности доставки API во время хранения или применения. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может быть или не быть инертным веществом.

[0208] Вспомогательные вещества включают, без ограничения: усилители абсорбции, антиадгезивы, пеногасители, антиоксиданты, связующие, буферные агенты, носители, покрывающие агенты, красители, усилители доставки, полимеры для доставки, декстран, декстозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, экстендеры, наполнители, ароматизаторы, глиданты, увлажнители, лубриканты, масла, полимеры, консерванты, физиологический раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие агенты, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, тонизирующие агенты, несущие среды, водоотталкивающие агенты и смачивающие агенты.

[0209] Раскрытые в настоящем описании фармацевтические композиции могут содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. В некоторых вариантах осуществления дополнительный компонент представляет собой фармацевтически активный материал. Фармацевтически активные материалы включают, без ограничения: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные агенты (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.д.), низкомолекулярные лекарственные средства, антитела, фрагменты антител, аптамеры и/или вакцины.

[0210] Фармацевтические композиции также могут содержать консерванты, солюбилизирующие агенты, стабилизирующие агенты, смачивающие агенты, эмульгаторы, подсластители, красители, отдушки, соли для изменения осмотического

давления, буферы, покрывающие агенты или антиоксиданты. Они также могут содержать другой агент с известным терапевтическим эффектом.

[0211] Фармацевтические композиции можно вводить разными способами в зависимости от того, желательно ли местное или системное лечение, и от области, предназначенной для лечения. Введение может осуществляться любым способом, широко известным в данной области, таким как, без ограничения, местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью распылителя, интратрахеально, интраназально), эпидермальным, трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает, без ограничения, внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное (например, через имплантированное устройство), внутричерепное, интрапаренхимальное, интратекальное и внутрижелудочковое введение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем описании, вводят путем внутривенной инъекции или инфузии или подкожной инъекции. Фармацевтические композиции можно вводить перорально, например, в форме таблеток, таблеток с покрытием, драже, твердых или мягких желатиновых капсул, растворов, эмульсий или суспензий. Введение также можно осуществлять ректально, например, с помощью суппозиториев; местно или чрескожно, например, с использованием мазей, кремов, гелей или растворов; или парентерально, например, с использованием растворов для инъекций.

[0212] Фармацевтические композиции, подходящие для введения путем инъекции, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки, обеспечивающие приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или забуференный фосфатом физиологический раствор. Он должен быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть защищен от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[0213] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы приготовления включают вакуумную сушку и лиофилизацию, в результате которой получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием.

[0214] Составы, подходящие для внутрисуставного введения, могут быть в форме стерильного водного препарата любого из лигандов, раскрытых в настоящем описании, который может быть в микрокристаллической форме, например, в форме водной микрокристаллической суспензии. Липосомные составы или биоразлагаемые полимерные системы также можно использовать для представления любого из лигандов, раскрытых в настоящем описании, как для внутрисуставного, так и офтальмологического введения.

[0215] Активные соединения могут быть приготовлены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов очевидны специалистам в данной области. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно использовать липосомальные суспензии. Их можно приготовить способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

[0216] Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, без ограничения: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.д.). В контексте настоящей заявки термины «фармакологически эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или просто «эффективное количество» относятся к количеству фармацевтически активного агента, которое обеспечивает фармакологический, терапевтический или профилактический эффект.

[0217] Лекарственные средства, содержащие лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, также являются объектом настоящего изобретения, как и способы производства таких лекарственных средств, которые включают введение одного или более соединений,

содержащих лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, и, при желании, одного или более других веществ с известным терапевтическим действием в фармацевтически приемлемой форме.

[0218] Описанные лиганды интегрин и фармацевтические композиции, содержащие лиганды интегрин, раскрытые в настоящем описании, могут быть упакованы или включены в набор, контейнер, упаковку или дозатор. Лиганды интегрин и фармацевтические композиции, содержащие лиганды интегрин, могут быть упакованы в предварительно заполненные шприцы или флаконы.

Связующие группы, фармакокинетические (PK) усилители, фармакодинамические (PD) модуляторы, средства доставки и целевые группы

[0219] В некоторых вариантах осуществления лиганд $\alpha\upsilon\beta 3$ конъюгирован с одной или более нуклеотидными группами, включая, помимо прочего, связующую группу, фармакокинетический (PK) энхансер (также называемый модулятором PK), фармакодинамический (PD) модулятор, полимер для доставки или средство доставки. Нуклеотидная группа может улучшать нацеливание, доставку или прикрепление карго-молекулы. В этом разделе раскрыты примеры каркасов для нацеленных групп и связующих групп. Нуклеотидная группа может быть ковалентно связана с 3'- и/или 5'-концом либо смысловой цепи, либо антисмысловой цепи. В вариантах осуществления, в которых карго-молекула представляет собой агент РНКи, агент РНКи содержит нуклеотидную группу, связанную с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа связана с 5'-концом смысловой цепи агента РНКи. Раскрытый в настоящем описании лиганд интегрин может быть связан с карго-молекулой непосредственно или опосредованно через линкер/связующую группу. В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин связан с карго-молекулой через лабильную, расщепляемую или обратимую связь или линкер.

[0220] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа усиливает фармакокинетические свойства или свойства биораспределения агента РНКи или конъюгата, к которому она присоединена, для улучшения специфичного для клетки или ткани распределения и специфичного для клетки захвата агента РНКи или конъюгата. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа усиливает эндоцитоз агента РНКи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа усиливает или модулирует фармакодинамические свойства агента РНКи или конъюгата, к которому она присоединена, для улучшения специфичного для клетки или ткани распределения и специфичного для клетки захвата агента РНКи или конъюгата.

[0221] Нацеленные группы или нацеленные фрагменты усиливают фармакокинетические или биораспределительные свойства карго-молекулы, к которой они присоединены, улучшая специфичное для клетки (включая, в некоторых случаях, органоспецифичное) распределение и специфичный для клетки (или органоспецифичный) захват карго-молекулы. В некоторых вариантах осуществления нацеленная группа может содержать лиганд $\alpha\upsilon\beta 3$, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления нацеленная группа включает линкер. В некоторых вариантах

осуществления нацеленная группа включает усилитель РК. В некоторых вариантах осуществления лиганд интегрин $\alpha\beta3$ связан с карго-молекулой с помощью линкера, такого как линкер ПЭГ или один, два или три абазических остатка и/или остатка рибита (абазической рибозы), которые в некоторых случаях могут служить линкерами. Нацеленные группы могут содержать один или более нацеленных лигандов. В некоторых вариантах осуществления нацеленная группа может включать от одного до четырех лигандов интегрин, раскрытых в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления нацеленная группа представляет собой тридентатную нацеленную группу и включает три лиганда интегрин, раскрытых в настоящем описании.

[0222] Могут быть синтезированы карго-молекулы, имеющие реакционноспособную группу, такую как аминогруппа (также называемая в настоящем описании амином). В вариантах осуществления, в которых карго-молекула представляет собой агент РНКи, реакционноспособная группа может быть связана на 5'-конце и/или 3'-конце. Реакционноспособная группа может быть впоследствии использована для присоединения лиганда интегрин $\alpha\beta3$ способами, обычно используемыми в данной области техники.

[0223] Например, в некоторых вариантах осуществления синтезируют агент РНКи, 5'-конец смысловой цепи которого содержит $\text{NH}_2\text{-C}_6$ -группу. Концевая аминогруппа впоследствии может вступать в реакцию с образованием конъюгата, например, с группой, которая включает нацеленный на интегрин лиганд. В некоторых вариантах осуществления синтезируют агент РНКи, содержащий на 5'-конце смысловой цепи одну или более алкиновых групп. Терминальная(ые) алкиновая(ые) группа(ы) может впоследствии вступить в реакцию с образованием конъюгата, например, с группой, которая включает лиганд, нацеленный на интегрин $\alpha\beta3$.

[0224] В некоторых вариантах осуществления с лигандом $\alpha\beta3$ конъюгирована связующая группа. Связующая группа способствует ковалентному связыванию лиганда $\alpha\beta3$ с карго-молекулой, усилителем РК, полимером для доставки или носителем для доставки. Примеры связующих групп включают, без ограничения: Alk-SMPT-C6, Alk-SS-C6, DBCO-TEG, Me-Alk-SS-C6 и C6-SS-Alk-Me, реакционноспособные группы, такие как первичные амины и алкины, алкильные группы, абазические остатки/нуклеотиды, аминокислоты, триалкиновые функционализированные группы, рибит и/или группы ПЭГ.

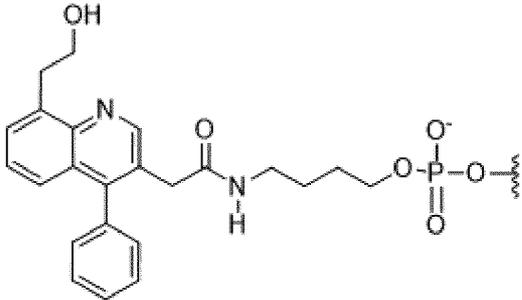
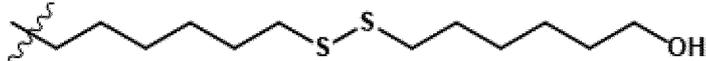
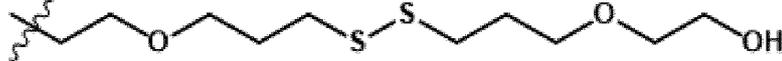
[0225] Линкер или связующая группа представляет собой соединение между двумя атомами, которое связывает одну химическую группу (например, агент РНКи) или представляющий интерес сегмент с другой химической группой (такой как лиганд интегрин $\alpha\beta3$, усилитель РК, модулятор PD или полимер для доставки) или представляющий интерес сегмент посредством одной или более ковалентных связей. Лабильное соединение содержит лабильную связь. Соединение может дополнительно включать спейсер, который увеличивает расстояние между двумя соединенными атомами. Спейсер может дополнительно повышать гибкость и/или длину соединения. Спейсеры включают, без ограничения, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные

группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы и аралкинильные группы; каждая из которых может содержать один или более гетероатомов, гетероциклов, аминокислот, нуклеотидов и сахаридов. Спейсерные группы хорошо известны в данной области техники, и приведенный выше список не предназначен для ограничения объема описания.

[0226] В некоторых вариантах осуществления лиганды $\alpha\beta\beta_3$ связаны с карго-молекулами без использования дополнительного линкера. В некоторых вариантах осуществления разработан лиганд $\alpha\beta\beta_3$, содержащий линкер, присутствующий для облегчения связывания с карго-молекулой. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включены два или более агента РНКи, два или более агента РНКи могут быть связаны со своими соответствующими целевыми группами с помощью одних и тех же линкеров. В некоторых вариантах осуществления, когда в композицию включены два или более агента РНКи, два или более агента РНКи связаны со своими соответствующими целевыми группами с помощью разных линкеров.

[0227] Примеры некоторых связующих групп и каркасов приведены в таблице А.

Таблица А. Структуры, представляющие различные связующие группы и каркасы

 <p>(PAZ)</p>	
<p>При расположении на 3'-терминальном конце олигонуклеотида:</p>  <p>(C6-SS-C6)</p>	
<p>При расположении внутри олигонуклеотида:</p> <p>связь в направлении к 5'-концу олигонуклеотида</p>	<p>связь в направлении к 3'-концу олигонуклеотида</p>
 <p>(C6-SS-C6)</p>	
<p>При расположении на 3'-терминальном конце олигонуклеотида:</p> 	

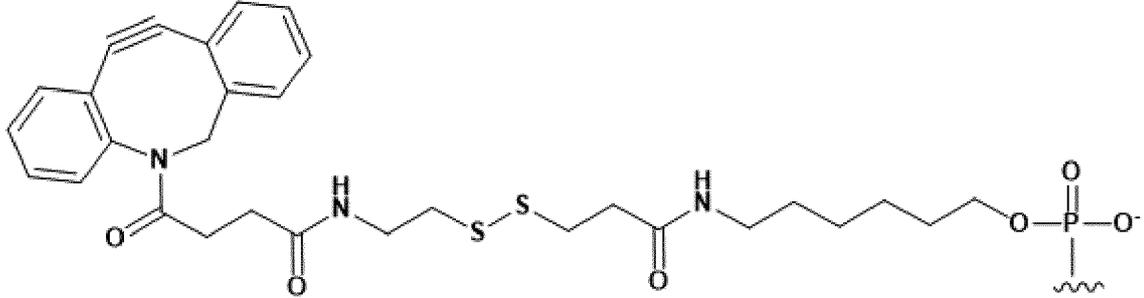
При расположении внутри олигонуклеотида:

связь в направлении к 5'-концу
олигонуклеотида

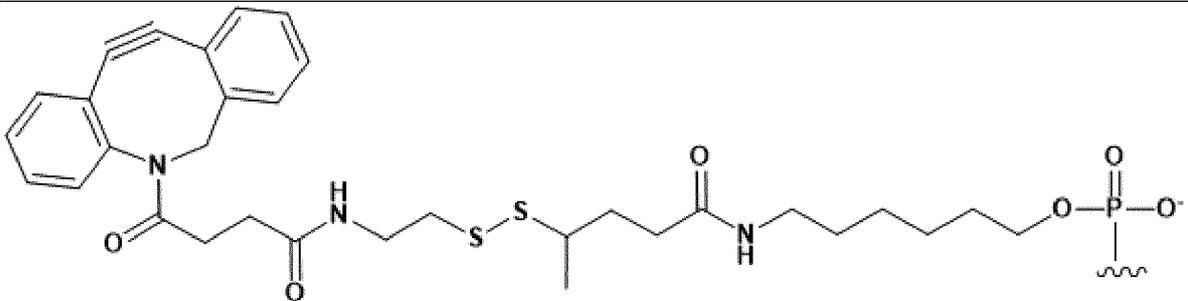
связь в направлении к 3'-концу
олигонуклеотида



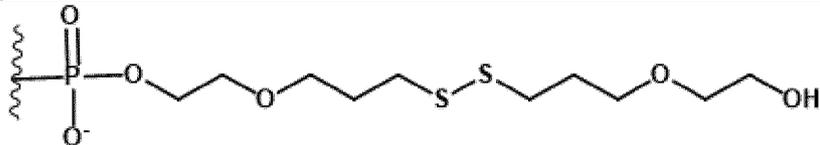
(6-SS-6)



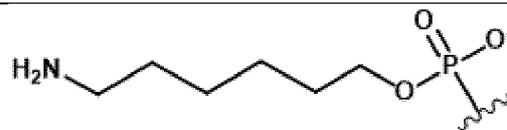
(C6-SS-Alk) или (Alk-SS-C6)



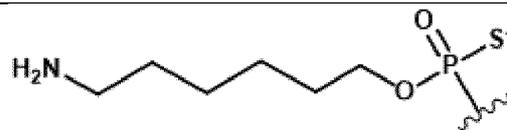
(C6-SS-Alk-Me)



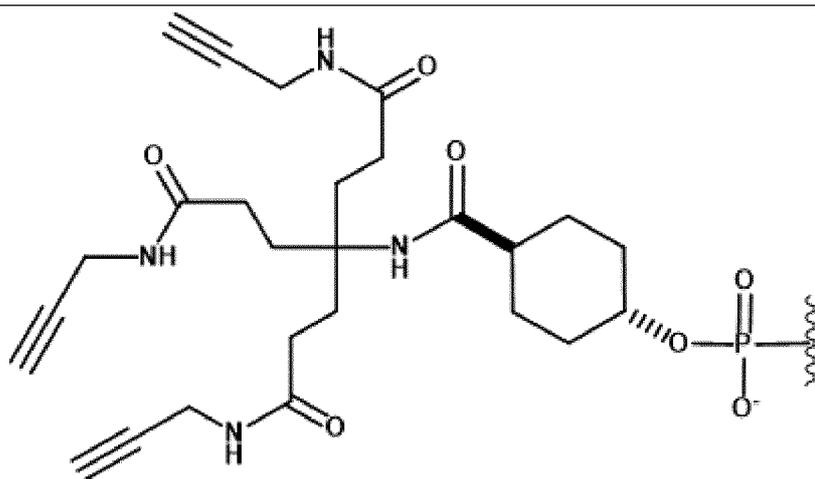
(PEG-C3-SS)



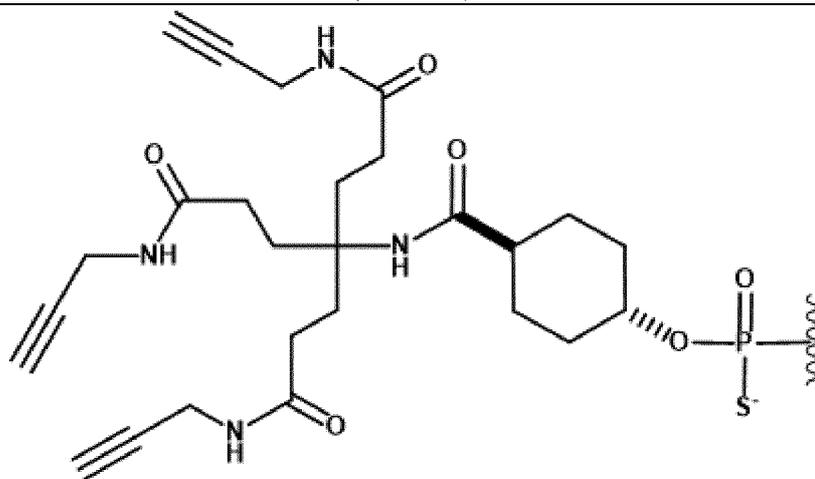
(NH2-C6)



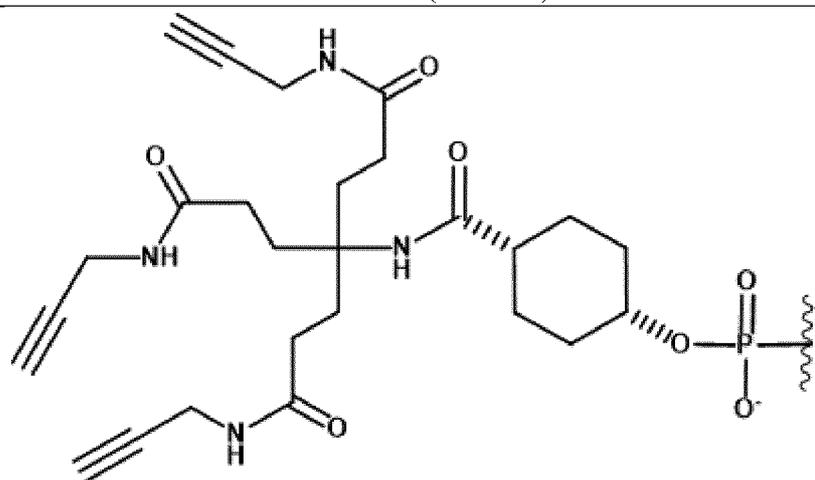
Несколько (NH2-C6)



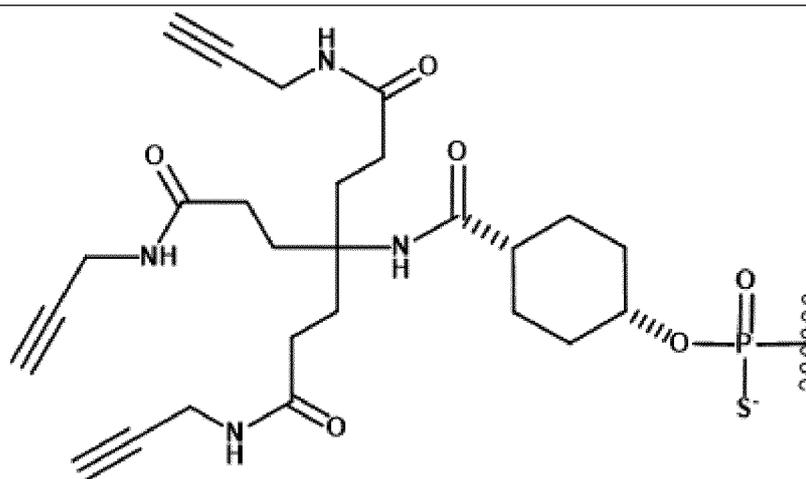
(TriAlk1)



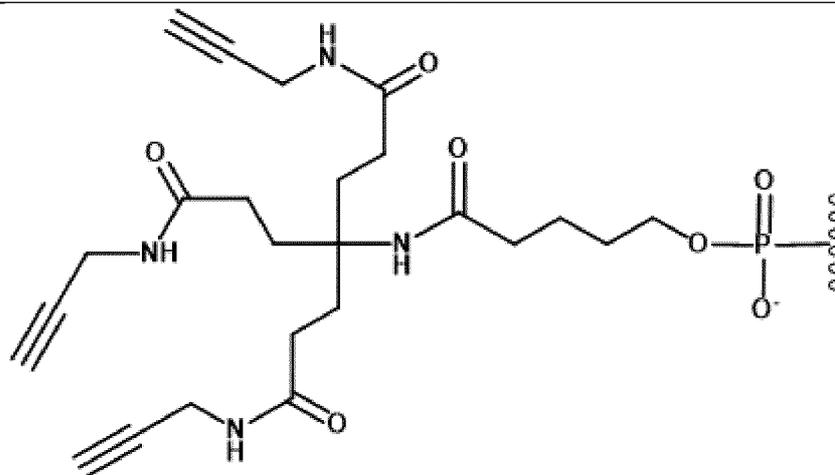
Несколько (TriAlk1)



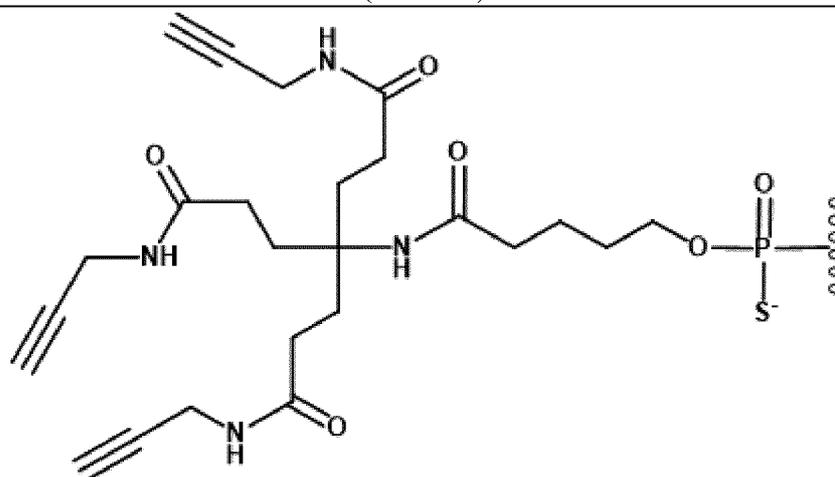
(TriAlk2)



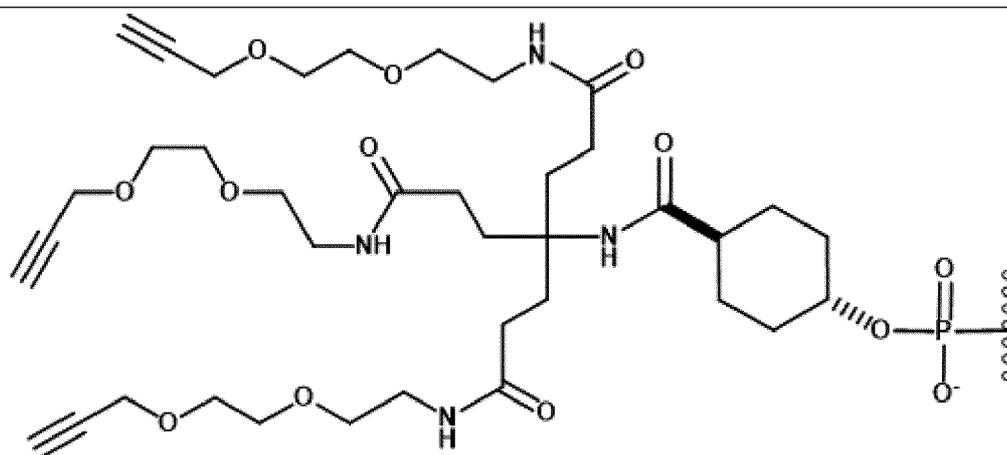
Несколько (TriAlk2)



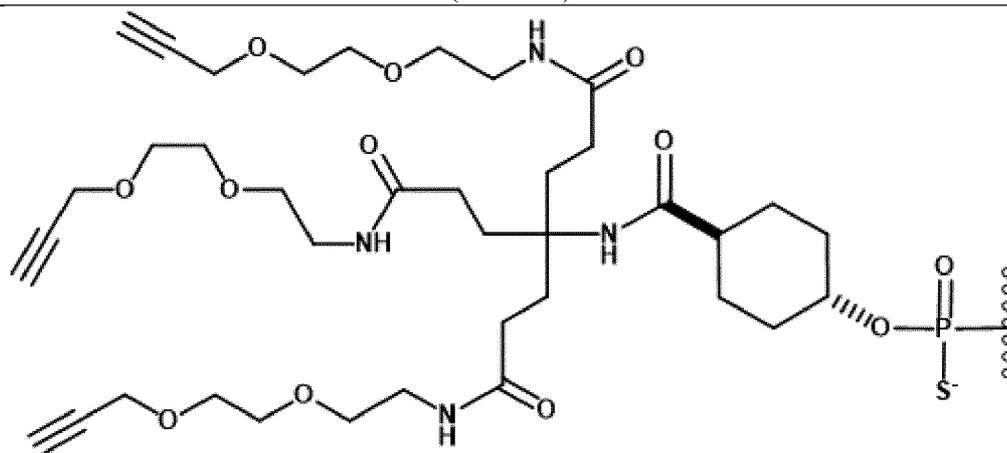
(TriAlk3)



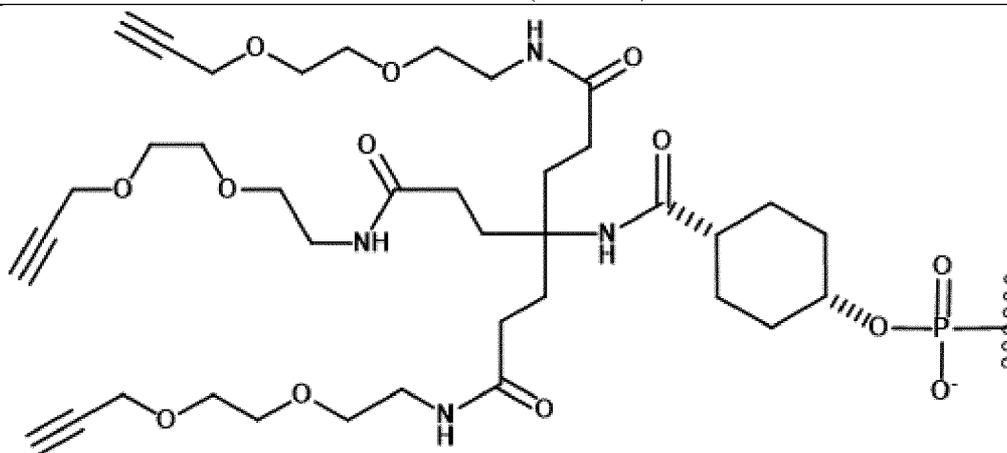
Несколько (TriAlk3)



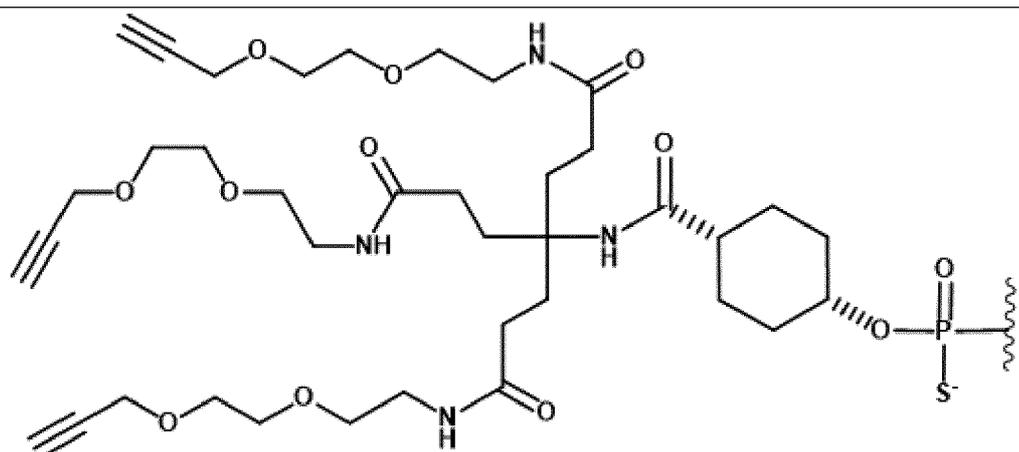
(TriAlk4)



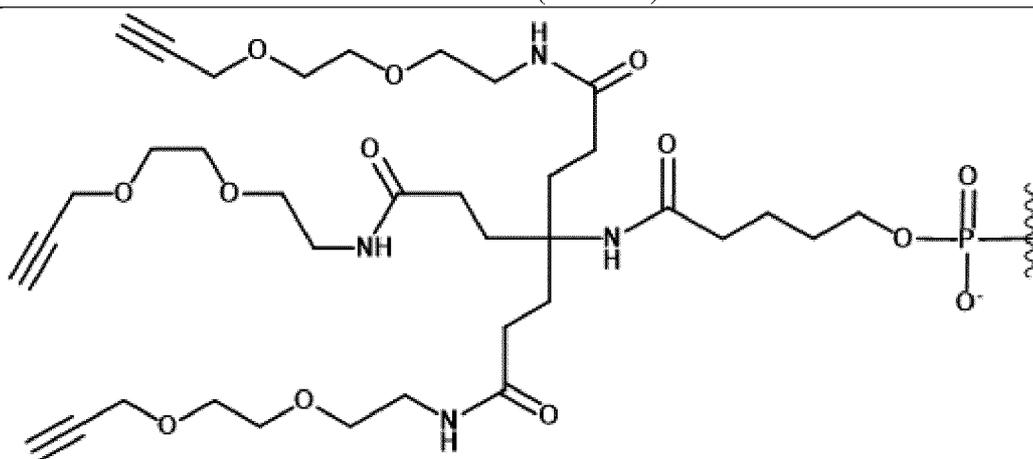
Несколько (TriAlk4)



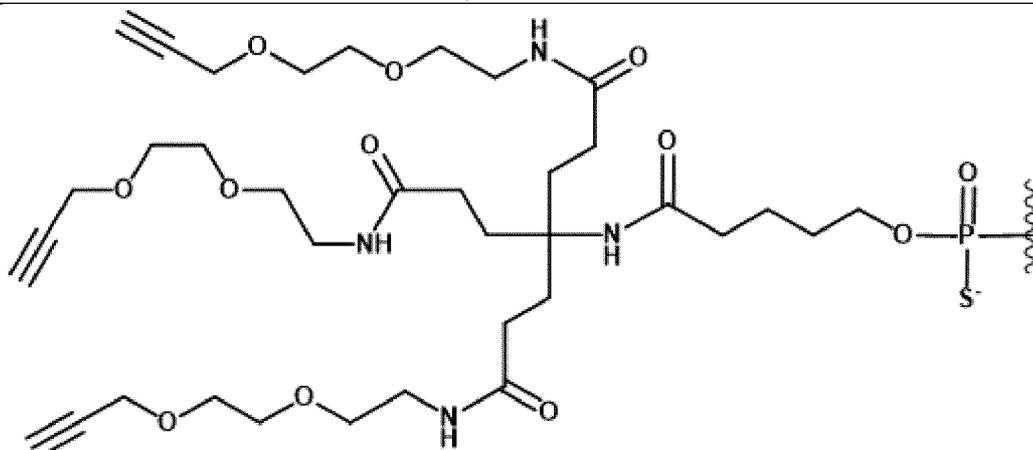
(TriAlk5)



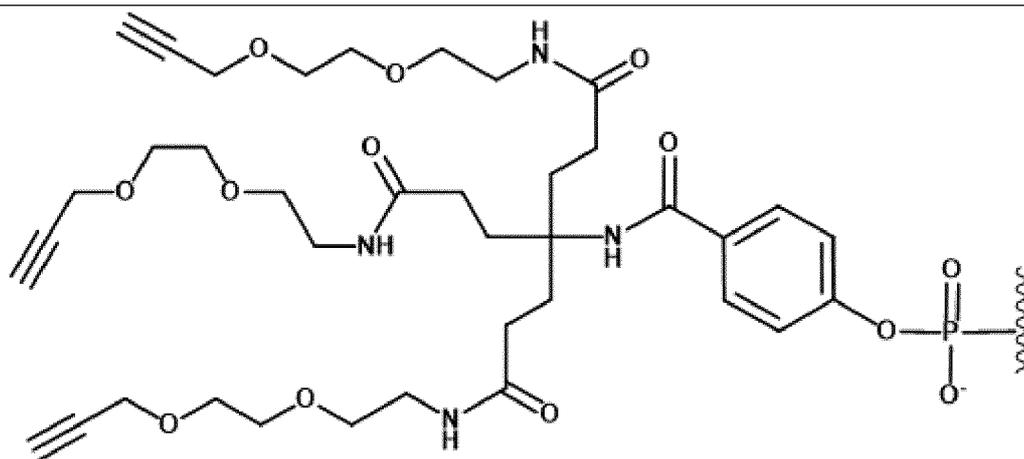
Несколько (TriAlk5)



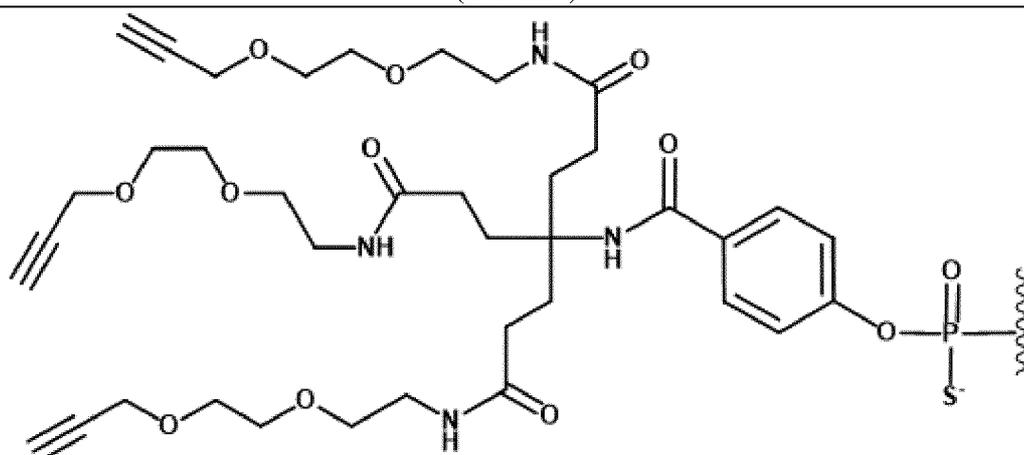
(TriAlk6)



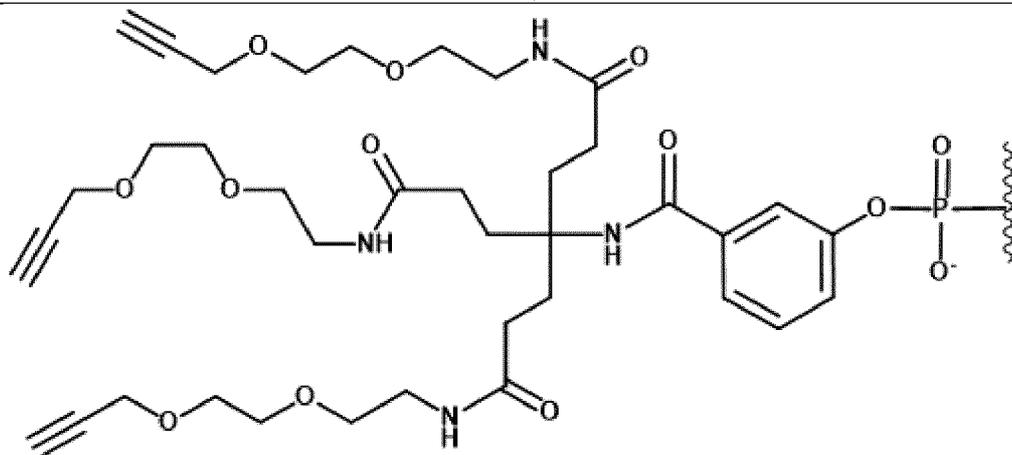
Несколько (TriAlk6)



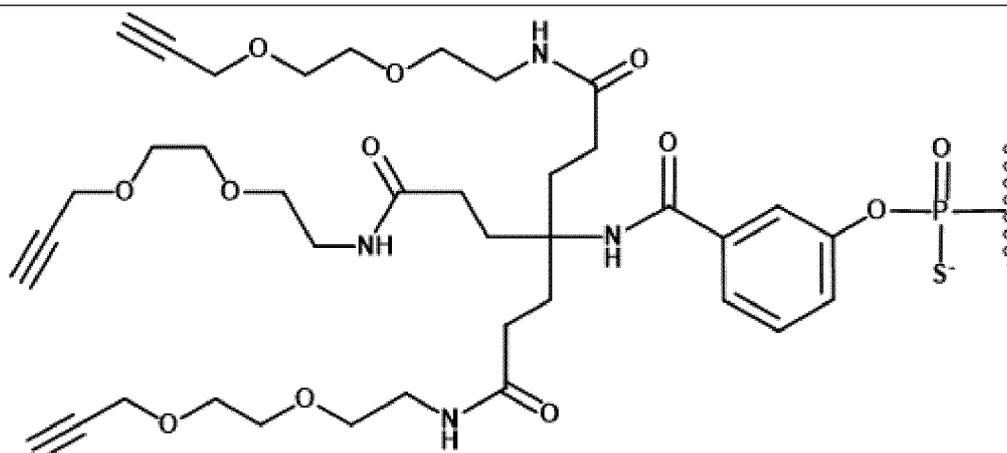
(TriAlk7)



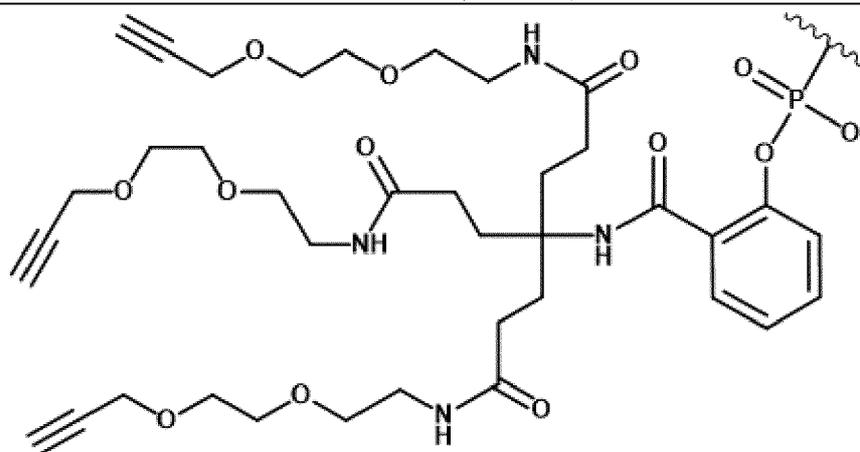
Несколько (TriAlk7)



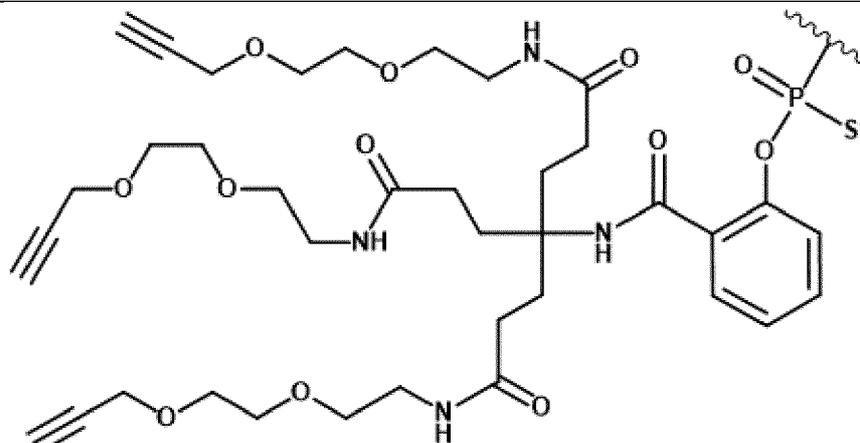
(TriAlk8)



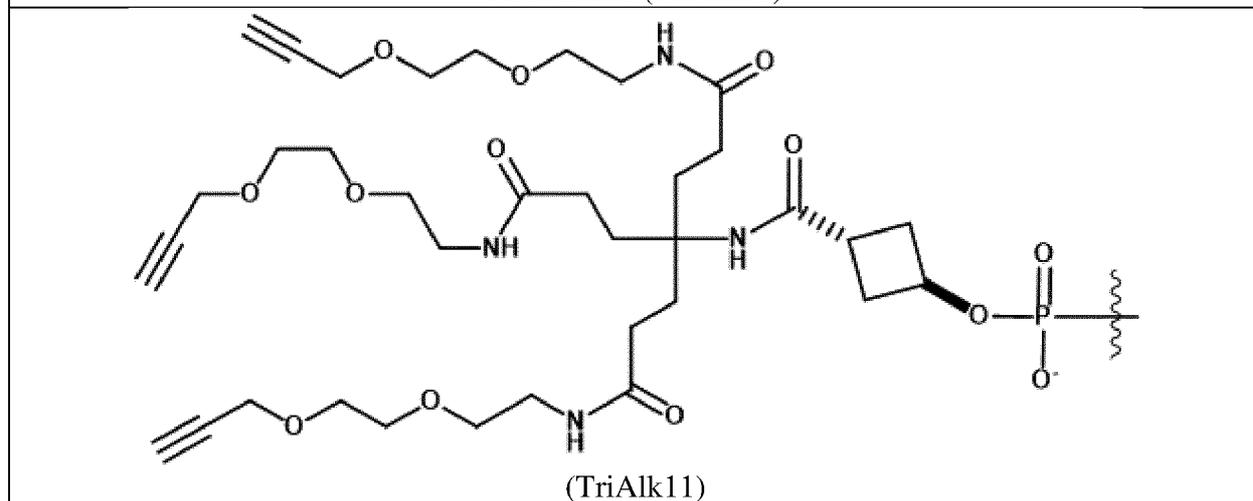
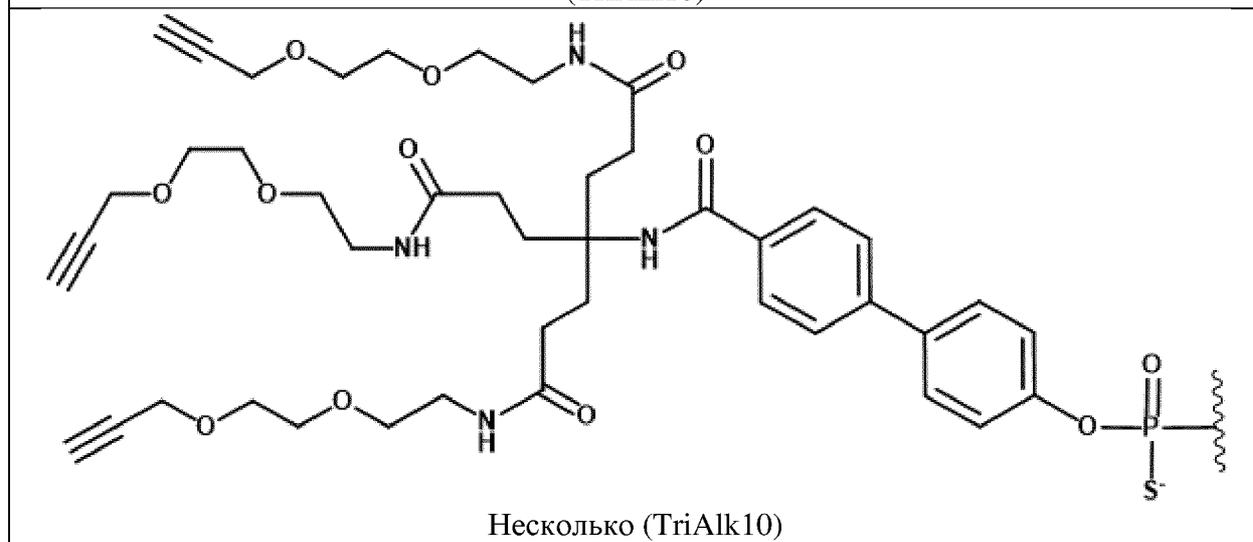
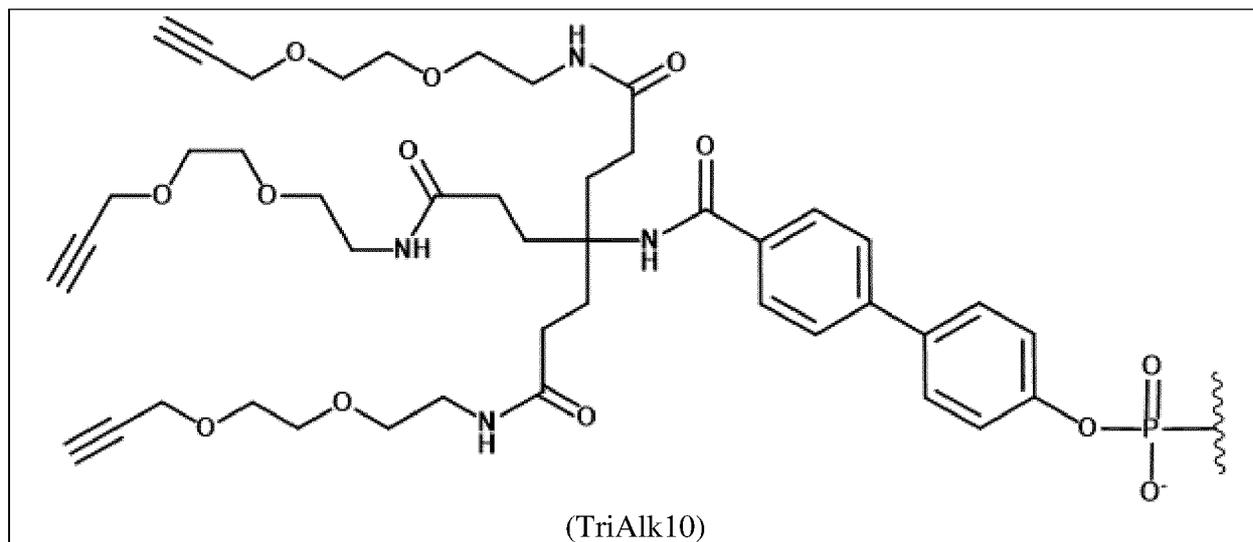
Несколько (TriAlk8)

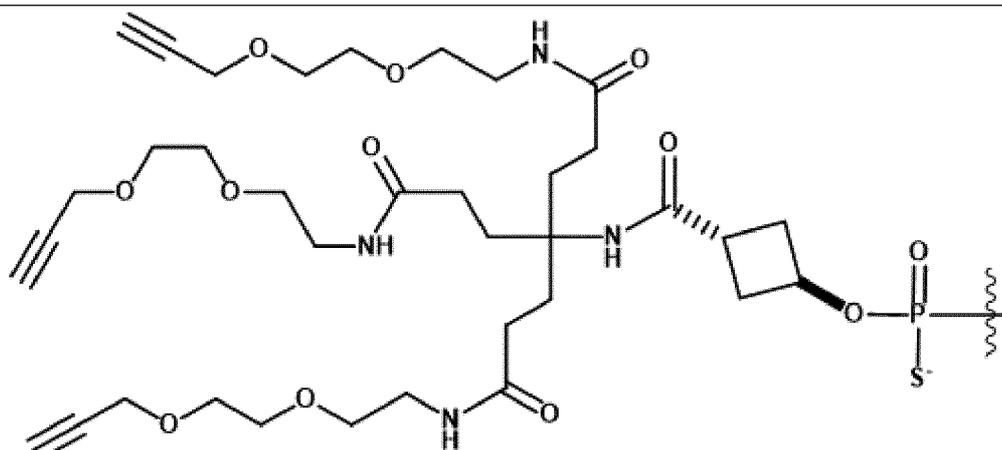


(TriAlk9)

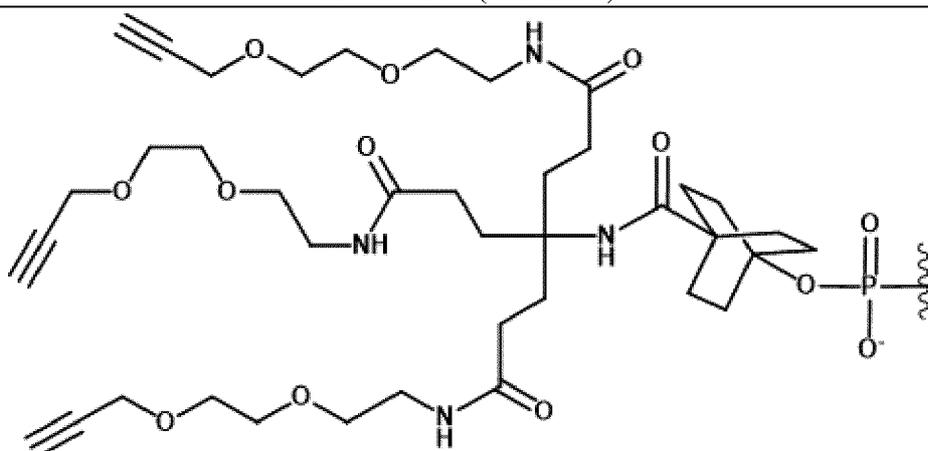


Несколько (TriAlk9)

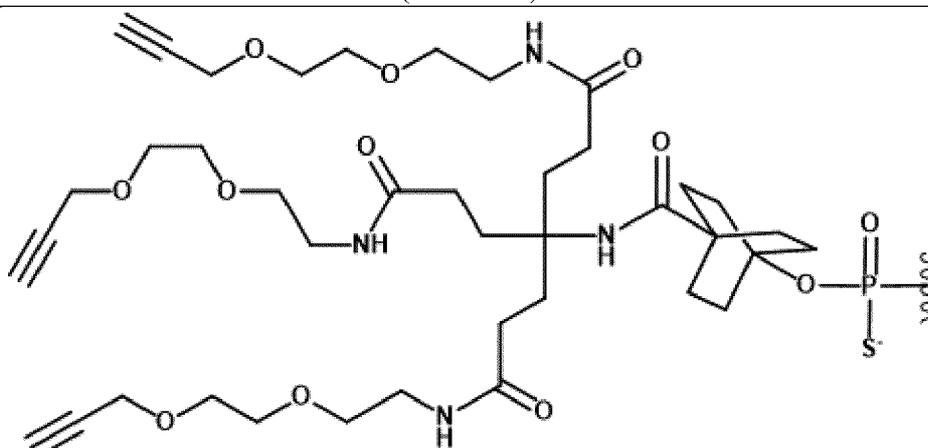




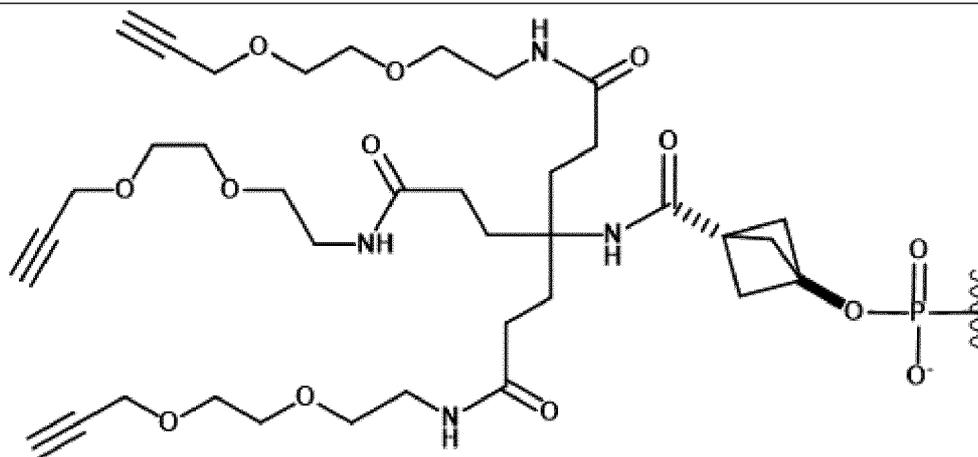
Несколько (TriAlk11)



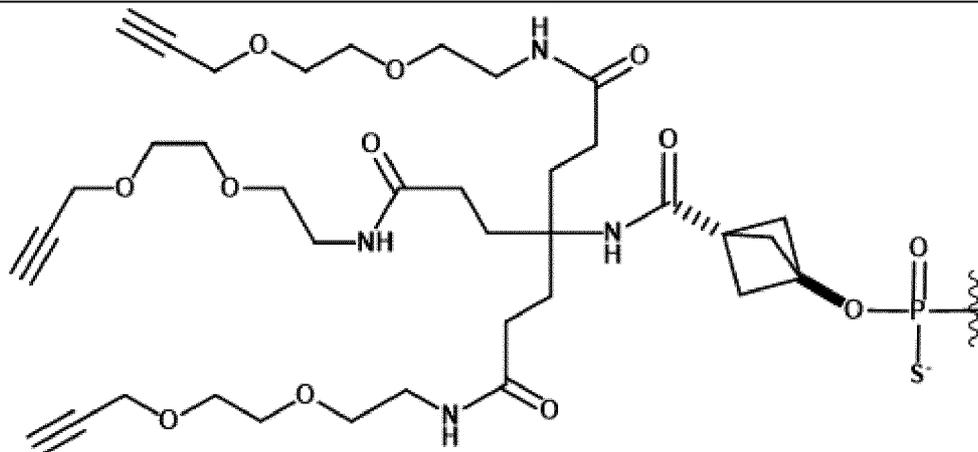
(TriAlk12)



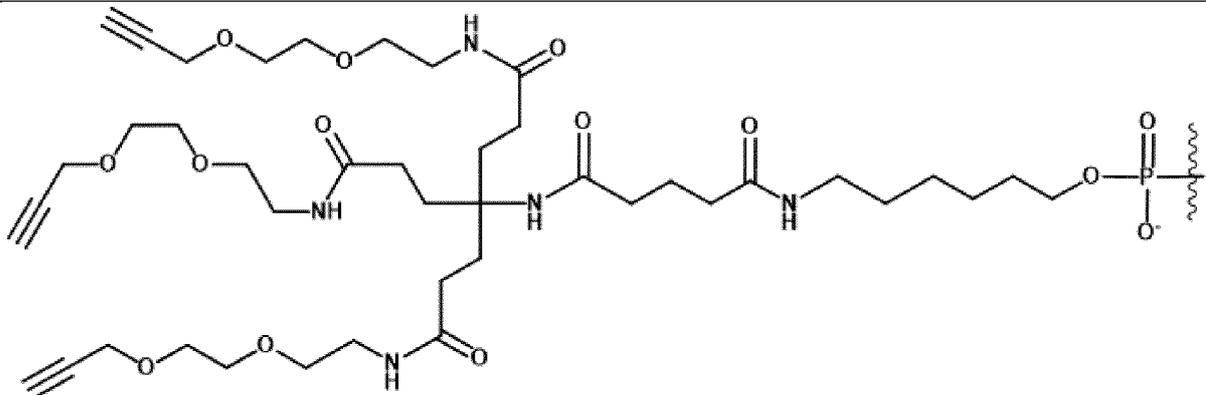
Несколько (TriAlk12)



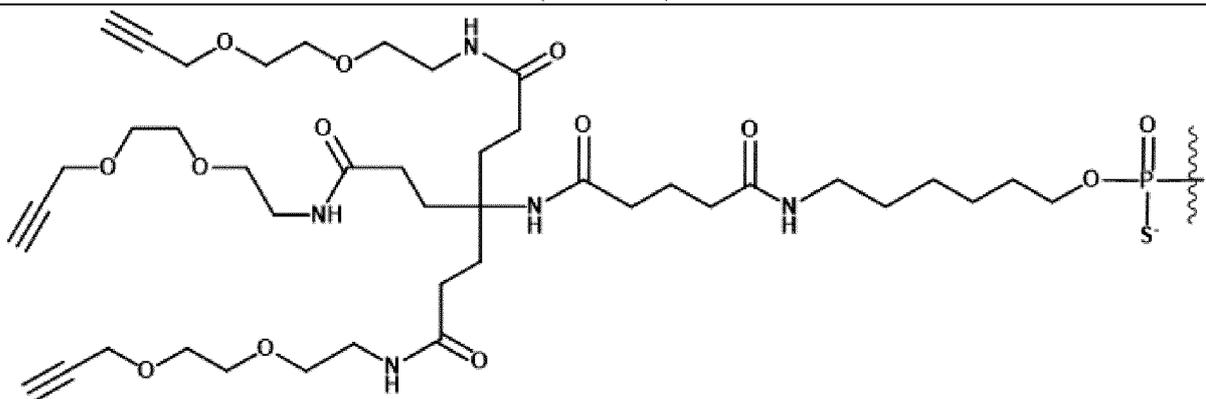
(TriAlk13)



Несколько (TriAlk13)



(TriAlk14)



Несколько (TriAlk14)

где  указывает точку присоединения к карго-молекуле.

[0228] В качестве альтернативы можно использовать другие связующие группы, известные в данной области. Примеры подходящих связующих групп представлены в заявке РСТ № РСТ/US19/18232, которая включена в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки.

[0229] Приведенные выше варианты осуществления и элементы проиллюстрированы приведенными ниже неограничивающими примерами.

Внутренне связанные нацеленные лиганды

[0230] В некоторых вариантах осуществления, когда нацеленные на интегрин лиганды, раскрытые в настоящем описании, связаны или присоединены к молекуле РНКи, нацеленный на интегрин лиганд может быть связан с внутренними нуклеотидами на смысловой цепи или антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления с внутренними нуклеотидами на смысловой цепи агента РНКи могут быть конъюгированы до 15 нацеленных лигандов. В некоторых вариантах осуществления с внутренними нуклеотидами на смысловой цепи агента РНКи Н1F-2 альфа могут быть конъюгированы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нацеленных лигандов. В некоторых вариантах осуществления с внутренними нуклеотидами на смысловой цепи агента РНКи конъюгированы от 1 до 5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) нацеленных лигандов. В некоторых вариантах осуществления с внутренними нуклеотидами на смысловой цепи агента РНКи конъюгированы от 3 до 4 нацеленных лигандов.

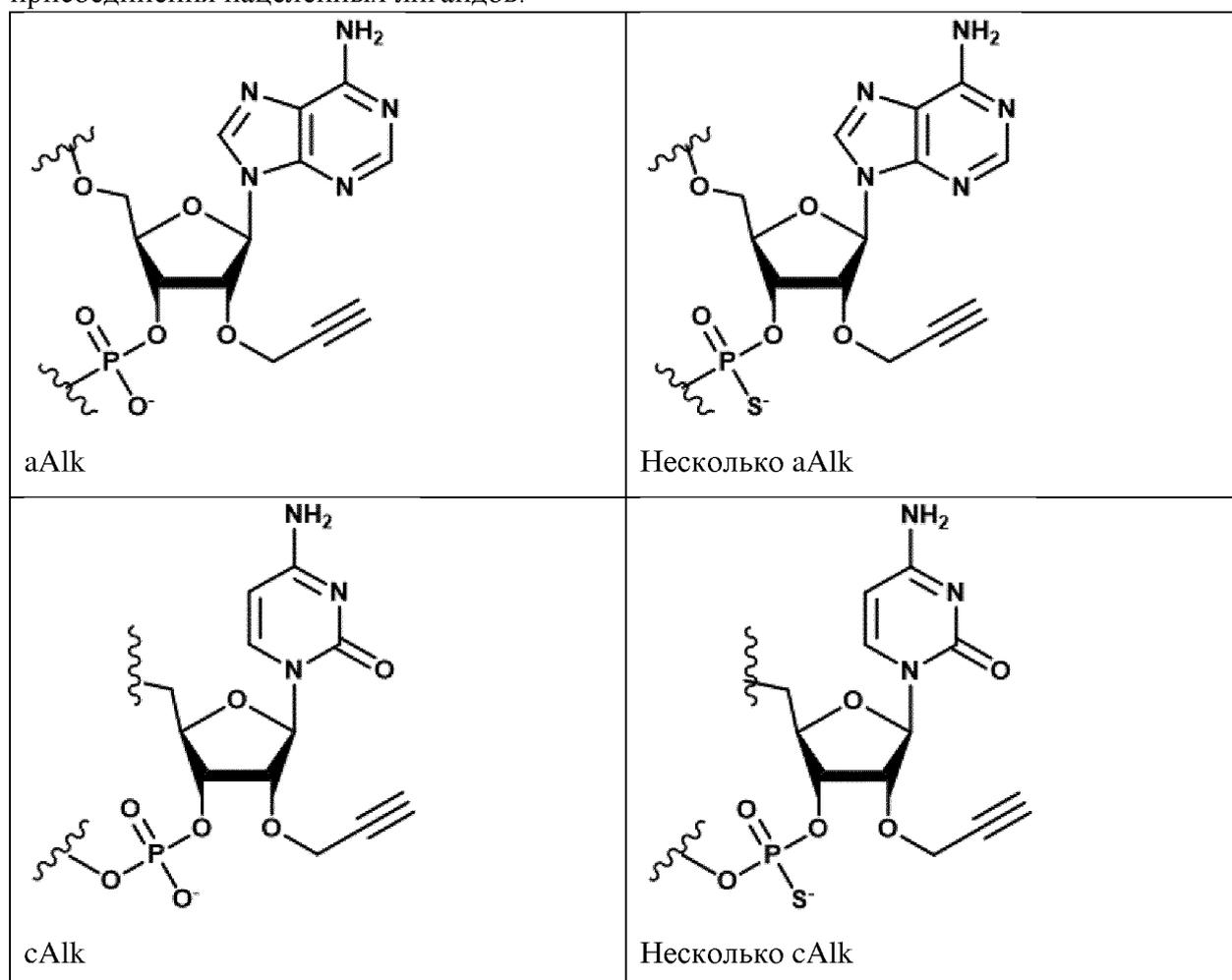
[0231] В некоторых вариантах осуществления размещение внутренних нацеленных лигандов может влиять на эффективность или активность агента РНКи. В некоторых вариантах осуществления нацеленных на интегрин $\alpha v \beta 3$ лигандов, связанных с агентами РНКи, нацеленная группа конъюгирована с 5'-концом смысловой цепи, и между тридентатной нацеленной группой, расположенной на 5'-конце смысловой цепи, и следующим ближайшим нацеленным лигандом, расположенным на смысловой цепи расположены по меньшей мере 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления между тридентатной нацеленной группой, расположенной на 5'-конце смысловой цепи, и следующим ближайшим нацеленным лигандом, расположенным на смысловой цепи, расположены по меньшей мере 5 нуклеотидов.

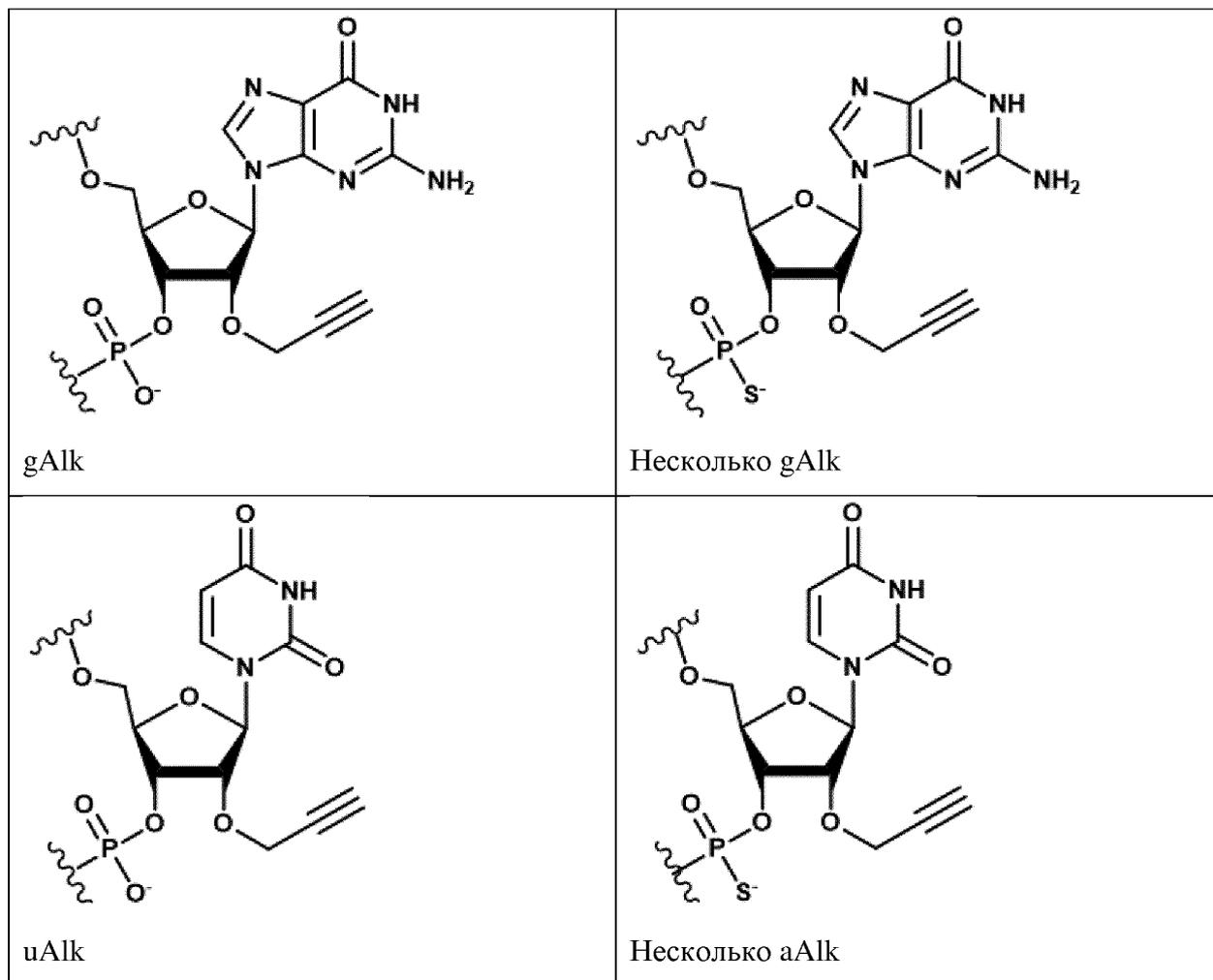
[0232] В некоторых вариантах осуществления, в которых два или более нацеленных лиганда конъюгированы с внутренними нуклеотидами, расположенными на смысловой цепи агента РНКи, существует пространство по меньшей мере из одного нуклеотида, который не конъюгирован с нацеленным лигандом, расположенным между двумя внутренними нуклеотидами, конъюгированными с нацеленным лигандом. В некоторых вариантах осуществления, в которых два или более нацеленных лиганда конъюгированы со смысловой цепью агента РНКи, между двумя внутренними нуклеотидами, конъюгированными с нацеленными лигандами, расположены по меньшей мере два нуклеотида, которые не конъюгированы с нацеленным лигандом.

[0233] В некоторых вариантах осуществления нацеленные лиганды конъюгированы со 2-м, 4-м и 6-м нуклеотидами на смысловой цепи, пронумерованные в направлении от 3' к 5'-концу, начиная с самого дальнего 3'-нуклеотида, который образует пару оснований с нуклеотидом на антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления нацеленные лиганды конъюгированы со 2-м, 4-м, 6-м и 8-м нуклеотидами (3' → 5'), начиная от 3'-терминального нуклеотида на смысловой цепи, которая образует пару оснований с антисмысловой цепью.

[0234] Примеры модифицированных нуклеотидов для присоединения внутренних нацеленных лигандов показаны в Таблице В ниже:

Таблица В. Структуры, представляющие модифицированные нуклеотиды для присоединения нацеленных лигандов.





ПРИМЕРЫ

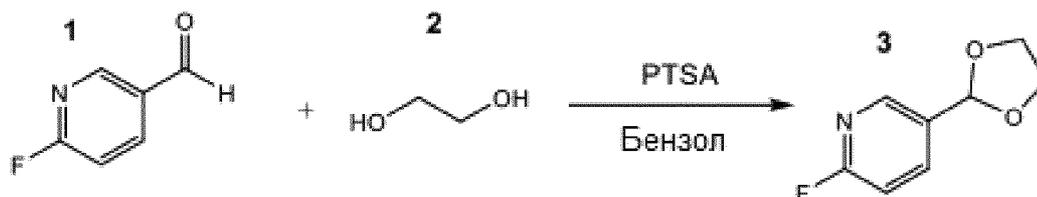
[0235] Приведенные ниже примеры не являются ограничивающими и предназначены для иллюстрации определенных вариантов осуществления, раскрытых в настоящем описании.

Пример 1. Синтез нацеленных на интегрин лигандов.

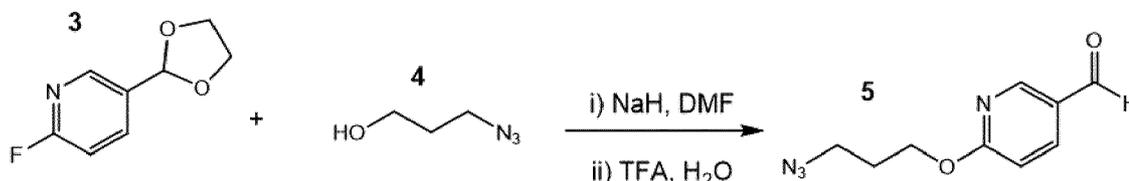
[0236] Некоторые из сокращений, используемых в приведенных ниже экспериментальных примерах синтеза, определены следующим образом: ч=час(ы); мин=минута(ы); моль=моль(и); ммоль=миллимоль(и); М=молярный; мкМ=микромольный; г=грамм(ы); мкг=микрограмм(ы); rt или RT=комнатная температура; л=литр(ы); мл=миллилитр(ы); вес=вес; Et₂O=диэтил эфир; THF=тетрагидрофуран; DMSO=диметилсульфоксид; EtOAc=этилацетат; Et₃N или TEA=триэтиламин; i-Pr₂NEt или DIPEA или DIEA=диизопропилэтиламин; CH₂Cl₂ или DCM=метиленхлорид; CHCl₃=хлороформ; CDCl₃=дейтерированный хлороформ; CCl₄=четырёххлористый углерод; MeOH=метанол; EtOH=этанол; DMF=диметилформамид; Boc=трет-бутоксикарбонил; CBZ=бензилоксикарбонил; TBS=трет-бутилдиметилсилил; TBSCl или TBDMSCl=трет-бутилдиметилсилилхлорид; TFA=трифторуксусная кислота; DMAP=4-диметиламинопиридин; NaN₃=азид натрия; Na₂SO₄=сульфат натрия; NaHCO₃=бикарбонат натрия; NaOH=гидроксид натрия; MgSO₄=сульфат магния; K₂CO₃=карбонат калия; KOH=гидроксид калия;

NH_4OH =гидроксид аммония; NH_4Cl =хлорид аммония; SiO_2 =диоксид кремния; Pd-C=палладий на угле; HCl =хлористый водород или соляная кислота; NMM=N-метилморфолин; H_2 =газообразный водород; KF=фторид калия; EDC-HCl=N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимида гидрохлорид; MTBE=метил-*трет*-бутилэфир; MeOH=метанол; Ar=аргон; N_2 =азот; SiO_2 =диоксид кремния; R_T =время удерживания; PTSA=пара-толуолсульфоновая кислота; PPTS=пара-толуолсульфонат пиридиния.

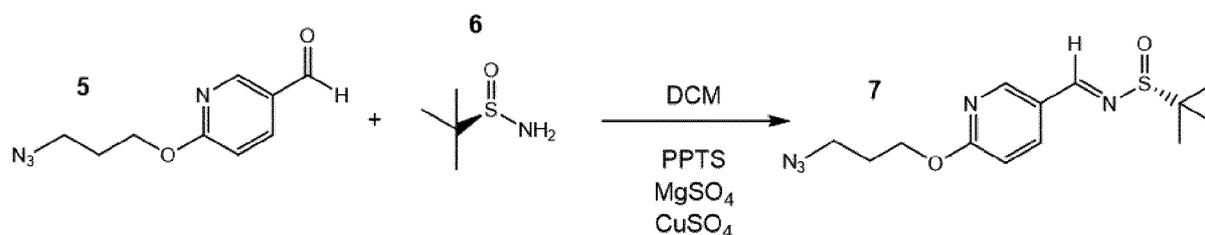
Синтез структуры 1с ((S)-3-(6-((1-азидо-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азанонадекан-19-ил)окси)пиридин-3-ил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).



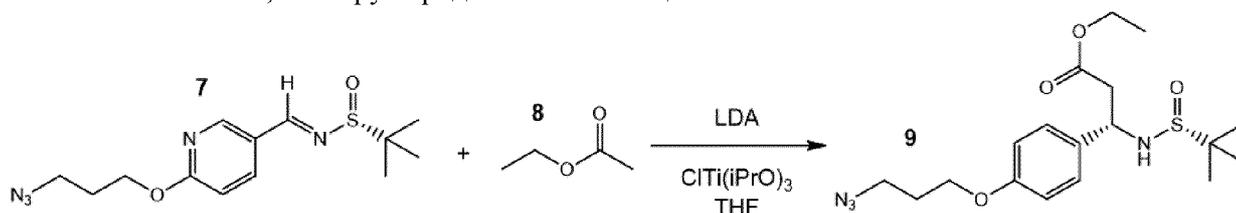
[0237] Смесь, содержащую соединение 1 (1,03 г, 8,23 ммоль), соединение 2 (0,92 г, 14,8 ммоль) и гидрат PTSA (156 мг, 0,82 ммоль), в бензоле (25 мл) нагревали с обратным холодильником, используя насадку Дина-Старка в течение ночи. На следующее утро реакционную смесь выливали в насыщенный раствор бикарбоната натрия, и затем добавляли этилацетат. Органическую фазу отделяли, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали с получением соединения 3 с 95% выходом, которое впоследствии использовали без дополнительной очистки.



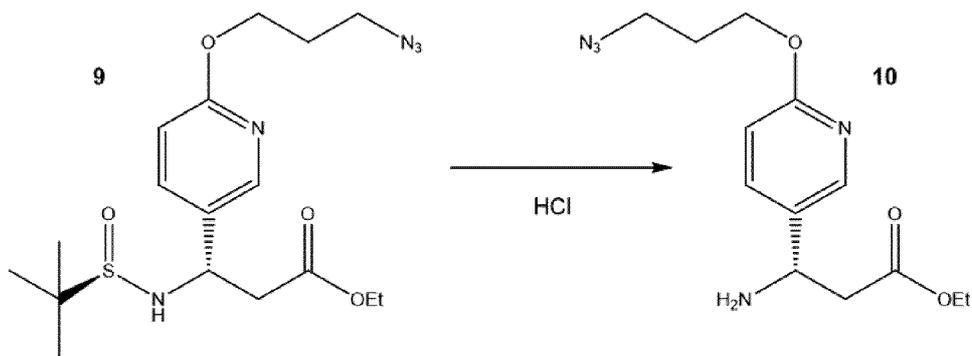
[0238] К раствору, содержащему соединение 4 (5,39 г, 53,3 ммоль) и 3 Å молекулярные сита, в DMF (100 мл) добавляли гидрид натрия (60 масс.%, 2,13 г, 53,3 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа. Затем добавляли раствор соединения 3 (7,52 г, 7,52 ммоль) в DMF (20 мл), и суспензию нагревали при 80°C в течение ночи. После нагревания суспензию фильтровали через ватную пробку и концентрировали при пониженном давлении. Остаток разделяли между диэтиловым эфиром и водой, и органическую фазу отделяли, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали при пониженном давлении. Остаток обрабатывали 20 мл 10% H_2O в TFA и перемешивали в течение 30 минут. По завершении раствор охлаждали до 0°C, и значение pH довели до 11, используя 6M NaOH, при этом продукт осаждался в виде масла. Соединение 5 экстрагировали три раза из масляной суспензии, используя диэтиловый эфир. Органические фазы объединяли, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Затем выделяли соединение 5 с 26% выходом путем деления с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах.



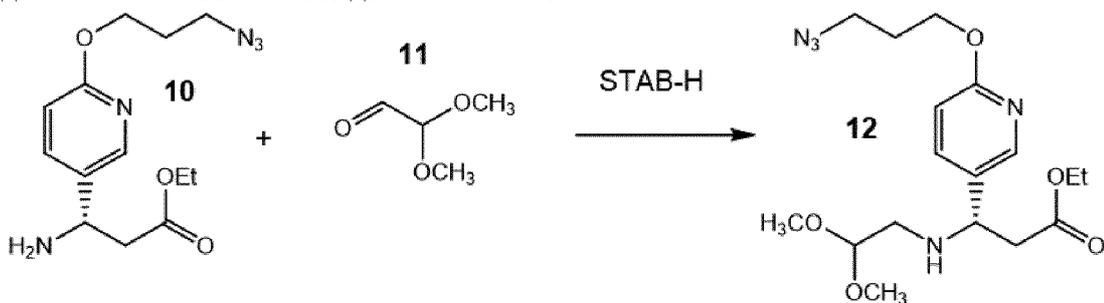
[0239] Смесь, содержащую соединение 5 (2,29 г, 9,94 ммоль), соединение 6 (4,82 г, 39,8 ммоль), PPTS (125 мг, 0,50 ммоль), сульфат магния (3 г, 24,9 ммоль), сульфат меди (3,97 г, 24,9 ммоль) и 3Å молекулярные сита, в DCM (22 мл) нагревали с обратным холодильником в течение ночи. По завершении смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Затем выделяли соединение 7 с 76% выходом путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах.



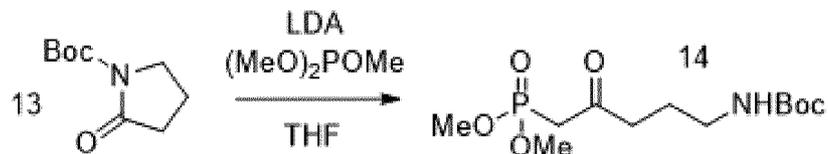
[0240] Высушенный на огне флакон заполняли THF (40 мл) и диизопропиламином (2,29 г, 22,6 ммоль). Охлаждали до -20°C , и через канюлю добавляли n-BuLi (2,5 М, 8,64 мл, 21,6 ммоль). Раствор перемешивали в течение 10 мин при -20°C , затем охлаждали до -78°C . Соединение 8 (2,02 мл, 20,6 ммоль) добавляли по каплям при энергичном перемешивании. После добавления раствор перемешивали в течение 30 мин при -78°C . Затем через капельную воронку добавляли $\text{ClTi}(\text{iPrO})_3$ (11,26 г, 43,2 ммоль) в виде раствора в THF (10 мл) в течение приблизительно 10 минут при энергичном перемешивании. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут при -78°C . Наконец, по каплям добавляли соединение 7 (2,29 г, 6,86 ммоль) в виде суспензии в THF и перемешивали при -78°C в течение 1,25 часов до завершения реакции. К реакционной смеси при -78°C добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония. Затем охлаждение реакционной смеси прекращали, и давали возможность водной фазе постепенно оттаять, и реакцию останавливали (желто-оранжевый цвет исчезает). Смесь разделяли между EtOAc и насыщенным водным раствором хлорида аммония. Органическую фазу отделяли, и водную фазу экстрагировали два раза EtOAc. Органические фазы объединяли и сушили над рассолом, затем над сульфатом натрия и затем фильтровали и концентрировали. Осадок очищали, пропуская через силикагель, элюируя градиентом этилацетата в гексанах. После очистки получали соединение 9 с 75% выходом в виде одного диастереомера.



[0241] Соединение 9 (1,28 г, 3,21 ммоль) в MeOH (3,2 мл) обрабатывали HCl в диоксане (4M, 3,2 мл, 12,9 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. По завершении реакцию смесь разбавляли водой, промывали диэтиловым эфиром. Затем значение pH доводили до 11, используя 2N водный раствор NaOH, и продукт экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением соединения 10 с 92% выходом, которое впоследствии использовали без дополнительной очистки.

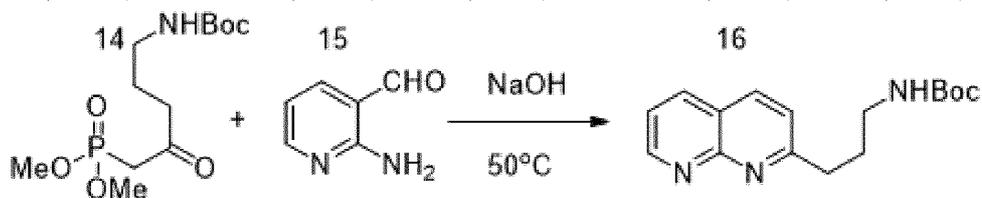


[0242] К смеси соединения 10 (0,78 г, 2,67 ммоль) и соединения 11 (0,60 г, 3,46 ммоль) в THF (6 мл) при 15°C порциями добавляли STAB-H (1,29 г, 6,12 ммоль) в виде твердого вещества. После добавления охлаждение прекращали, и смесь перемешивали в течение приблизительно 2,5 часов до завершения реакции. Реакцию останавливали путем добавления насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, и значение pH доводили до 9. Продукт экстрагировали три раза EtOAc, органические фазы объединяли, сушили, используя рассол, затем фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Соединение 12 выделяли с 85% выходом путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах.

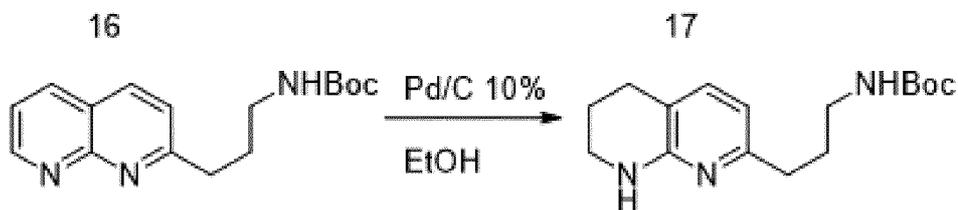


[0243] К DIPEA (7,53 мл, 53,75 ммоль) в THF (35 мл) добавляли n-BuLi (2,5 M, 19,9 мл, 49,8 ммоль), используя высушенный в печи газонепроницаемый шприц, в течение 2 минут при -10°C. Смесь перемешивали в течение 10 минут при -10°C, затем охлаждали до -60°C, и по каплям добавляли раствор диметил метилфосфоната (6,42 г, 51,8 ммоль) в THF (8 мл) в течение 5-10 минут. После выдерживания при -60°C в течение примерно 1 часа по каплям добавляли соединение 13 (7,37 г, 39,82 ммоль) в виде раствора в THF (15 мл) в

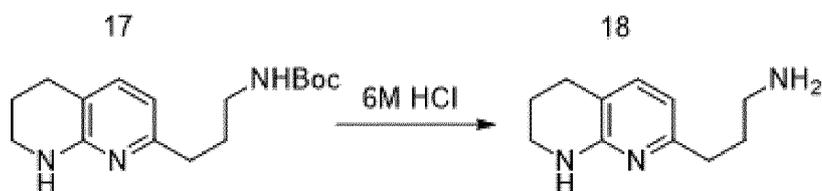
течение 5 минут при -60°C . Реакционную смесь перемешивали при -60°C в течение 1 часа и затем при -41°C в течение примерно 1,5 часов. Реакцию останавливали путем добавления 2,6 эквивалентов H_2SO_4 (2,0 М) и экстрагировали три раза этилацетатом (~50 мл). Органические фазы объединяли и сушили, используя рассол, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали в течение непродолжительного времени для определения сырой массы и взятия образца для ЯМР. При определении сухой массы соединение 14 растворяли в MeOH для использования в следующей реакции без дополнительной очистки. Вычисленный выход составил 75,83%. Сырая масс./масс.% - 76,3% согласно ЯМР. ^1H ЯМР: 400 МГц CDCl_3 δ 4,75 (с, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,78 (с, 3H), 3,10-3,14 (м, 2H), 3,04-3,09 (м, 2H), 2,68 (т, 2H), 1,82-1,75 (м, 2H), 1,44 (с, 9H).



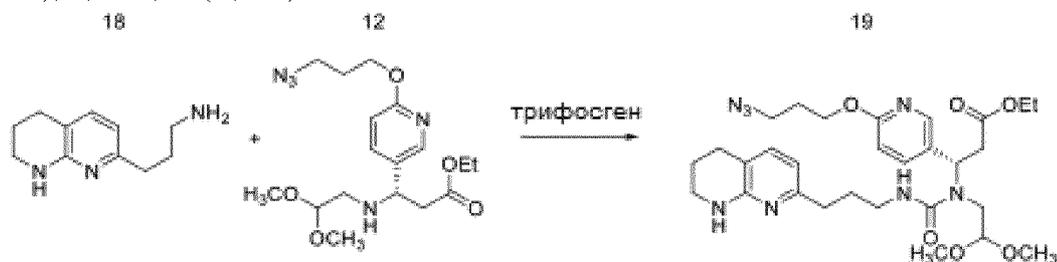
[0244] К соединению 14 (9,33 г по массе, исходя из сырого веса согласно ЯМР ~12 г, 30,16 ммоль) в MeOH (40 мл) добавляли раствор NaOH (1,45 г, 36,2 ммоль) в воде (1,5 мл). Смесь нагревали до 50°C , и добавляли соединение 15 (2,76 г, 22,62 ммоль). После перемешивания в течение 30 минут добавляли вторую порцию соединения 15 (736 мг, 6,03 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при 50°C . Затем реакционную смесь концентрировали до состояния масла и разделяли между 2 объемами EtOAc и 1 объемом H_2O . Органическую фазу отделяли, промывали 1 объемом воды. Водные смывы объединяли и снова экстрагировали (2х, 1 об.) EtOAc. Объединенную органическую фазу сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Сырую массу сушили на приблизительно 20 г силикагеле, соединение 16 выделяли с 69% выходом путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, содержащих 1% триэтиламина. ^1H ЯМР: 400 МГц CDCl_3 δ 9,09 (дд, 1H), 8,17 (дд, 1H), 8,12 (д, 1H), 7,46 (дд, 1H), 7,41 (д, 1H), 4,78 (с, 1H), 3,24 (к, 2H), 3,10 (т, 2H), 2,12 (квин., 2H), 1,43 (с, 9H).



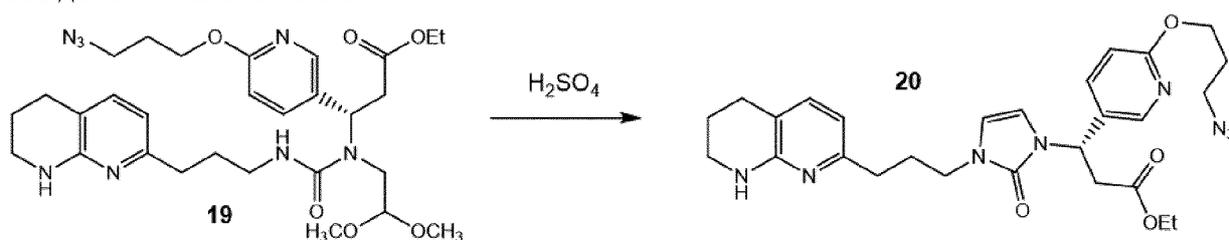
[0245] В раствор соединения 16 (5,98 г, 20,8 ммоль) в EtOH (50 мл) вносили палладий (10% на угле, 2,22 г, 2,08 ммоль) и водород при 1 атмосфере. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. По завершении реакционную смесь фильтровали над Celite® и концентрировали. Соединение 17 выделяли с 79% выходом путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, содержащих 1% триэтиламина. ^1H ЯМР: 400 МГц CDCl_3 δ 7,05 (д, 1H), 6,34 (д, 1H), 5,48 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 3,36-3,43 (м, 2H), 3,16 (к, 2H), 2,68 (т, 2H), 2,59 (т, 2H), 1,90 (дт, 2H), 1,83 (квин., 2H), 1,44 (с, 9H).



[0246] Соединение 17 (4,81 г, 16,53 ммоль) растворяли в водном 6М HCl (16,4 мл) и нагревали при 42°C в течение 2 часов. Затем добавляли дополнительную порцию 6М HCl (2,8 мл), и реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 2 часов. К реакционной смеси добавляли хлорид натрия с последующим добавлением водного 2N NaOH до тех пор, пока не произошло осаждение продукта в виде масла (pH выше 12). Смесь экстрагировали три раза 2-бутанолом. Объединенную органическую фазу сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Соединение 18 получали с 85% выходом и затем использовали без дополнительной очистки. ^1H ЯМР: 400 МГц CDCl_3 δ 7,06 (д, 1H), 6,35 (д, 1H), 4,83 (с, 1H), 3,35-3,46 (м, 2H), 2,75-2,67 (м, 4H), 2,58 (т, 2H), 1,88-1,95 (м, 2H), 1,84-1,76 (м, 4H).

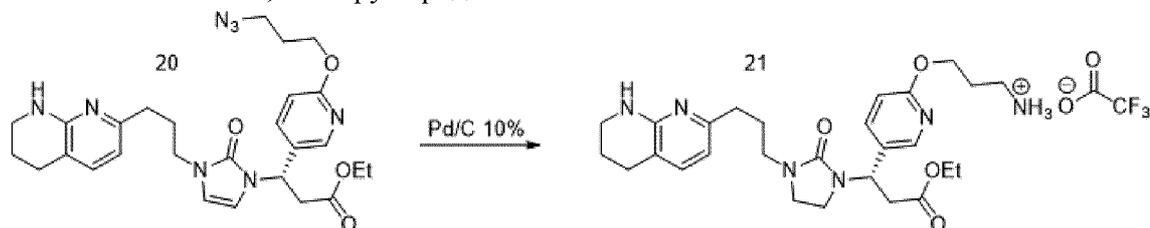


[0247] К раствору трифосгена (85 мг, 0,28 ммоль) в THF (0,9 мл) в высушенном на огне флаконе при -10°C по каплям добавляли раствор соединения 18 (236 мг, 0,62 ммоль) и TEA (0,134 мл, 0,96 ммоль) в THF (0,5 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. После завершения реакции согласно результатам TLC добавляли дополнительный TEA (0,134 мл) с последующим добавлением соединения 12 (166 мг, 0,87 ммоль) в виде твердого вещества. Гетерогенную смесь нагревали при 50°C в течение 2 часов при энергичном перемешивании. По завершении реакцию останавливали добавлением 1 объема воды и экстрагировали три раза EtOAc. Объединенную органическую фазу сушили, используя рассол, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Соединение 19 получали из расчета 100% выхода и затем использовали без дополнительной очистки.

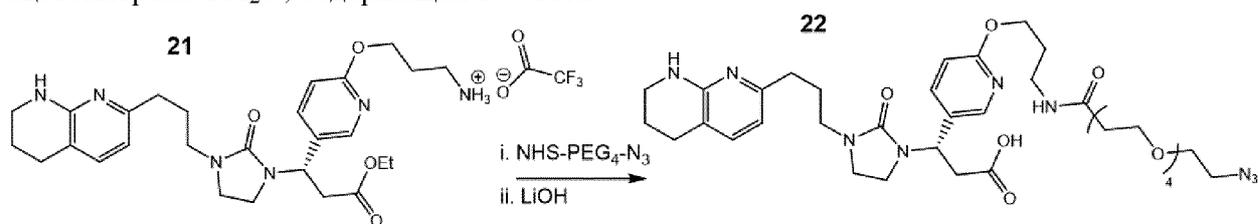


[0248] К неочищенному соединению 19 (400 мг, из расчета 0,62 ммоль), растворенному в THF (37 мл), добавляли H_2SO_4 (2M, 0,6 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. На следующее утро добавляли дополнительную

порцию H_2SO_4 (0,65 эквивалентов). Через четыре часа реакцию завершали. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом. Органическую фазу отделяли, и водную фазу снова экстрагировали один раз этилацетатом. Объединенную органическую фазу фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Соединение 20 выделяли с 75% выходом путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM .

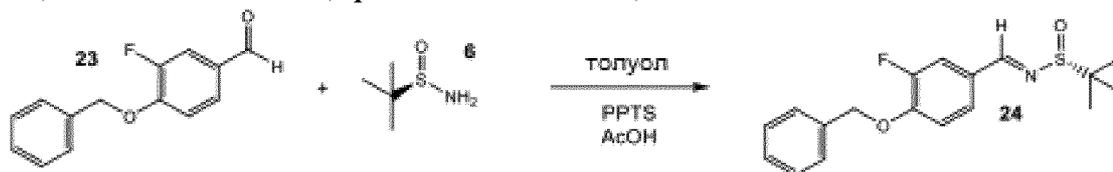


[0249] В суспензию соединения 20 (251 мг, 0,47 ммоль) и Pd/C (10 масс.%, 100 мг, 0,094 ммоль) в этаноле (9 мл) вводили H_2 при 1 атмосфере и перемешивали при 35°C в течение ночи. По завершении палладий удаляли фильтрованием через Celite®. Соединение 21 выделяли с 20% выходом в виде соли TFA с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке ВЕН C_{18} 5u 19×250 мм (Waters Corp.), элюируя градиентом ацетонитрила в H_2O , содержащей 1% TFA.

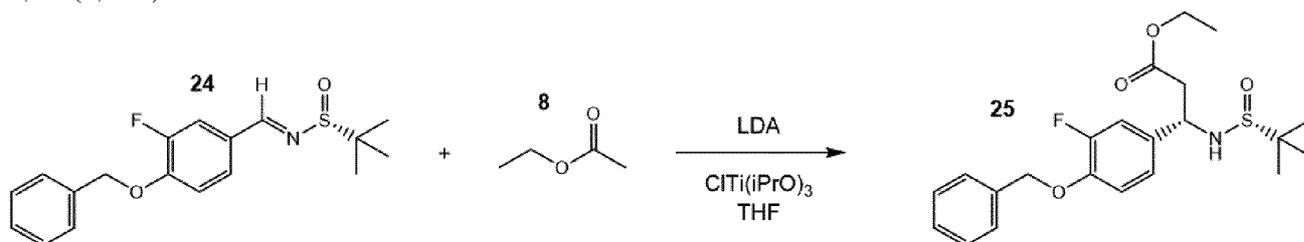


[0250] К раствору соединения 21 (61 мг, 0,097 ммоль) в DCM (250 мкл) добавляли TEA (8 мкл, 0,24 ммоль) с последующим добавлением NHS-ПЭГ₄-N₃ (41,4 мг, 0,11 ммоль) в виде раствора в DCM (275 мкл). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут и проверяли методом ЖХ-МС, которая показала завершение реакции. Все летучие вещества удаляли, и остаток растворяли в EtOH (0,4 мл) и воде (0,4 мл). Добавляли LiOH (11,2 мг, 0,47 ммоль), и реакционную смесь нагревали при 40°C в течение 2 часов. По завершении реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Соединение 22 (структура 1с) выделяли с 42% выходом с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке ВЕН C_{18} 5u 19×250 мм (Waters Corp.), элюируя градиентом ацетонитрила в H_2O , содержащей 1% TFA.

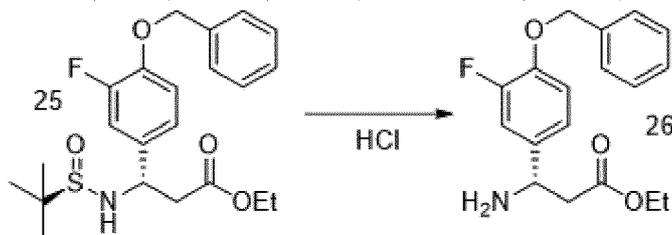
Синтез структуры 2с ((S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-фторфенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).



[0251] К раствору соединения 23 (10 г, 43,4 ммоль) в толуоле (80 мл) добавляли соединение 6 (21,1 г, 0,17 моль), PPTS (0,55 г, 2,2 ммоль), а затем уксусную кислоту (1,24 мл, 21,7 ммоль). В реакционный сосуд вставляли насадку Дана Старка и затем нагревали с обратным холодильником в течение ночи. По завершении реакцию смесь концентрировали и сушили над 60 граммами силикагеля и очищали через SiO₂ с градиентом этилацетата в гексанах с получением соединения 24 с 66% выходом. ¹H ЯМР: 400 МГц CDCl₃ δ 8,47 (с, 1H), 7,68 (д, 1H), 7,31-7,56 (м, 6H), 6,98-7,16 (м, 1H), 5,23 (с, 2H), 1,26 (с, 9H).

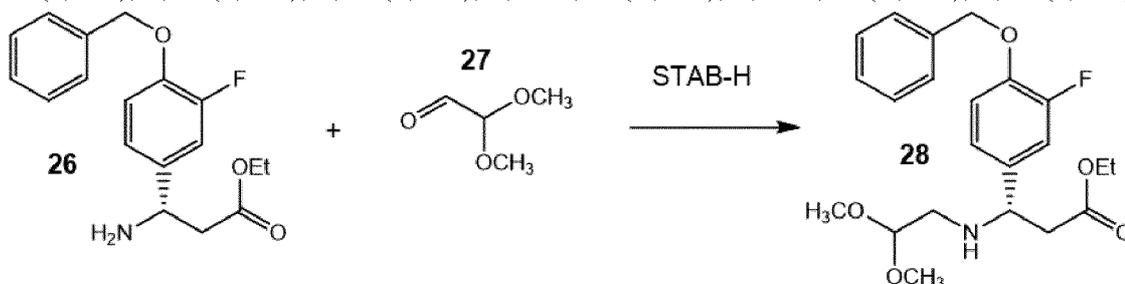


[0252] Высушенный на огне флакон заполняли THF (190 мл) и DIPEA (9,07 г, 89,7 ммоль), охлаждали до -20°C, и затем заполняли n-BuLi (2,5M, 34,2 мл, 85,6 ммоль) через канюлю. Раствор перемешивали в течение 10 мин при -20°C, затем охлаждали до -78°C. Добавляли по каплям соединение 8 (8 мл, 81,5 ммоль) при энергичном перемешивании. После добавления перемешивали в течение 30 мин при -78°C. Затем через капельную воронку добавляли ClTi(iPrO)₃ (44,6 г, 0,171 моль) в виде раствора в THF (40 мл) в течение 10 минут. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут при -78°C. Наконец, добавляли по каплям соединение 24 (9,06 г, 27,2 ммоль) в виде суспензии в THF (20 мл) и перемешивали при -78°C в течение 1,25 часа до завершения реакции. К реакционной смеси при -78°C добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония. Затем охлаждение реакционной смеси прекращали, и давали возможность водной фазе постепенно оттаять, и реакцию останавливали (желто-оранжевый цвет исчезает). Смесь разделяли между EtOAc и насыщенным водным раствором хлорида аммония. Органическую фазу отделяли, и водную фазу промывали два раза EtOAc. Органические фазы объединяли и сушили над рассолом, затем над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Соединение 25 получали с 70% выходом в виде одного диастереомера путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах. ¹H ЯМР: 400 МГц CDCl₃ δ 7,31-7,48 (м, 5H), 7,09 (дд, 1H), 6,89-7,04 (м, 2H), 5,13 (с, 2H), 4,59-4,76 (м, 2H), 4,13 (к, 2H), 2,81 (дд, 2H), 1,21-1,25 (м, 12H).

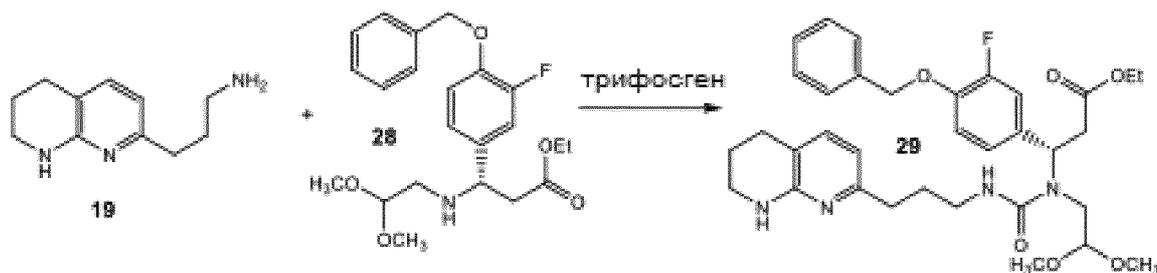


[0253] К соединению 25 (8,07 г, 19,1 ммоль) добавляли водный раствор HCl (6M, 20,7 мл, 0,124 моль) с последующим добавлением MeOH (60 мл). Добавляли THF до

получения гомогенного раствора, и реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь подщелачивали до значения pH 10 водным 2N NaOH и затем экстрагировали три раза EtOAc. Объединенную органическую фазу сушили, используя рассол, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Соединение 26 получали с 95% выходом и впоследствии использовали без дополнительной очистки. ^1H ЯМР: 400 МГц CDCl_3 δ 7,28-7,46 (м, 6H), 7,18 (д, 1H), 6,99 (т, 1H), 5,11 (с, 2H), 4,57 (т, 1H), 4,09 (к, 2H), 2,97-3,09 (м, 1H), 2,81-2,93 (м, 1H), 1,18 (т, 3H).

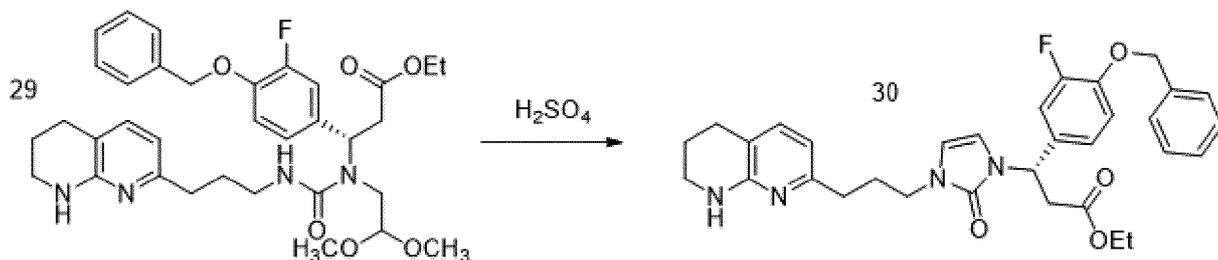


[0254] К смеси соединения 26 (5,76 г, 18,2 ммоль) и соединения 27 (4,09 г, 23,6 ммоль) в THF (40 мл) при 0°C добавляли порциями STAB-H (8,85 г, 41,8 ммоль) в виде твердого вещества. После последнего добавления охлаждение прекращали, и смесь перемешивали в течение приблизительно 2,5 часов до завершения реакции. Реакцию останавливали добавлением насыщенного водного бикарбоната натрия. Смесь экстрагировали три раза EtOAc. Объединенную органическую фазу сушили, используя рассол, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Соединение 28 выделяли с 73% выходом путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах. ^1H ЯМР: 400 МГц CDCl_3 δ 7,30-7,49 (м, 5H), 7,11 (дд, 1H), 6,88-7,02 (м, 2H), 5,13 (с, 2H), 4,40 (т, 1H), 4,10 (к, 2H), 4,00 (дд, 1H), 3,35 (с, 3H), 3,31 (с, 3H), 2,47-2,75 (м, 4H), 1,20 (т, 3H).

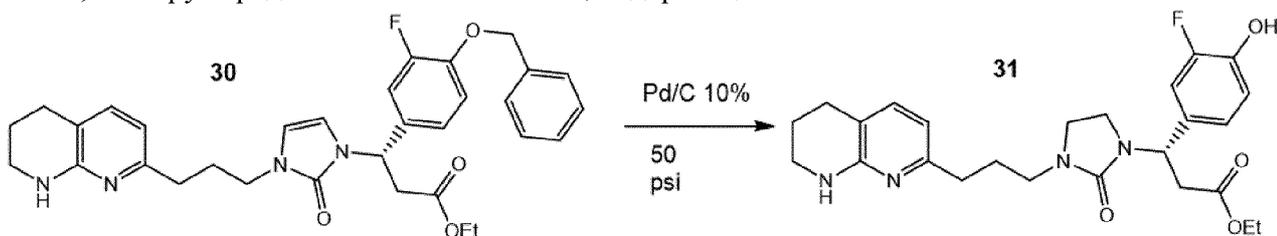


[0255] К раствору трифосгена (1,2 г, 4,04 ммоль) в THF (24 мл) в высушенном на огне флаконе при -10°C добавляли по каплям раствор соединения 19 (3,64 г, 8,99 ммоль) и TEA (1,94 ммоль, 13,9 ммоль) в THF (6 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. После завершения реакции согласно результатам TLC добавляли дополнительный TEA (3,3 мл, 23,6 ммоль) с последующим добавлением соединения 28 (2,61 г, 13,7 ммоль) в виде твердого вещества. Гетерогенную смесь нагревали при 50°C в течение 2 часов при энергичном перемешивании. По завершении реакцию останавливали добавлением 1 объема воды и экстрагировали три раза EtOAc. Объединенную органическую фазу сушили, используя рассол, фильтровали через сульфат натрия и

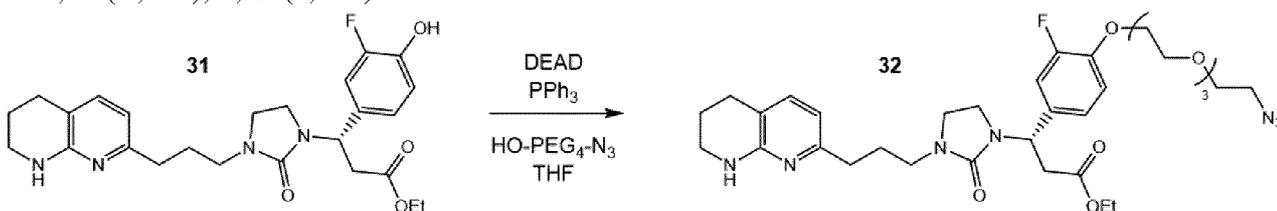
концентрировали. Соединение 29 получали из расчета 100% выхода, и неочищенное соединение впоследствии использовали без дополнительной очистки.



[0256] К соединению 29 (5,59 г, 8,97 ммоль), растворенному в THF (37 мл), добавляли воду (0,8 мл) и H_2SO_4 (2M, 8,07 мл, 16,2 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 28°C в течение ночи. На следующее утро значение pH смеси довели до 9, используя бикарбонат натрия, и смесь экстрагировали три раза DCM. Объединенную органическую фазу сушили, используя рассол, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Соединение 30 выделяли с 82% выходом путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM, содержащем 1% TEA.

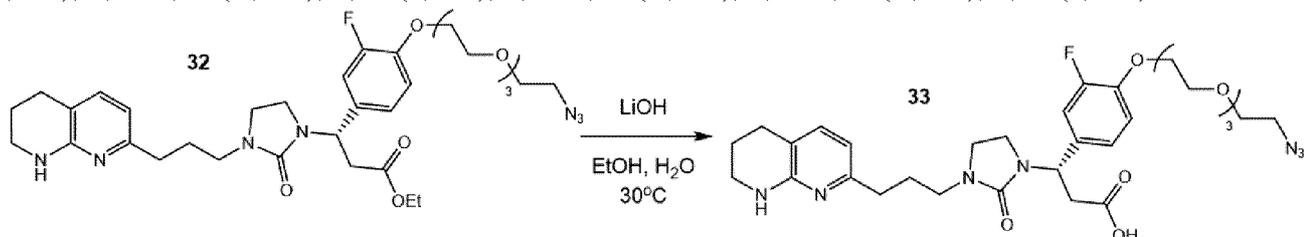


[0257] К соединению 30 (4,13 г, 7,39 ммоль), растворенному в EtOH (30 мл), добавляли палладий Degussa® (10 масс.%, 3,15 г, 2,96 ммоль) и водород при 50 фунт/дюйм² (344,7 кПа). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. На следующий день реакция была завершена на 64%. Реакционную смесь фильтровали над Celite® и концентрировали. Остаток растворяли в EtOH, и добавляли палладий (10 масс.%, 1,57 г, 1,48 ммоль) и водород при 50 фунт/дюйм² (344,7 кПа). После перемешивания в течение 48 часов реакционную смесь нагревали до 30°C и перемешивали еще в течение 24 часов. По завершении суспензию фильтровали через Celite®, и все летучие вещества удаляли под вакуумом. Осадок очищали на колонке с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM, с получением соединения 31 с 72% выходом. ¹H ЯМР: 400 МГц DMSO-d₆ δ 9,88 (с, 1H), 7,02-7,14 (м, 2H), 6,86-6,93 (м, 2H), 6,50-6,76 (м, 1H), 6,31 (д, 1H), 5,17 (т, 1H), 4,00 (к, 2H), 3,23-3,28 (м, 4H), 2,79-3,18 (м, 7H), 2,61 (т, 2H), 2,41 (т, 2H), 1,65-1,78 (м, 4H), 1,09 (т, 3H).



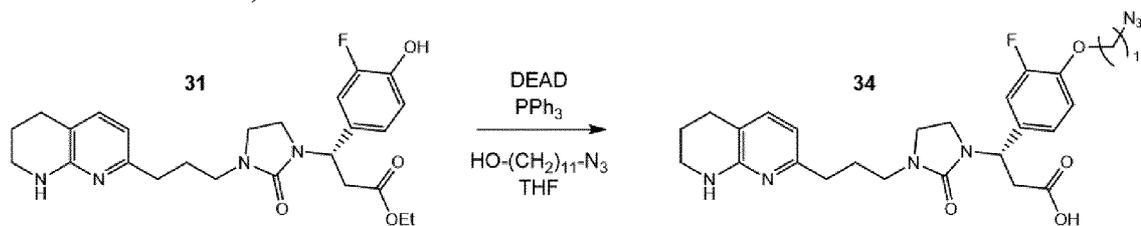
[0258] К раствору PPh_3 (699 мг, 2,66 ммоль) в THF (0,47 мл) при -10°C добавляли по каплям раствор DEAD. Смесь нагревали до комнатной температуры и добавляли к

чистой (без примесей) смеси соединения 31 (600 мг, 1,33 ммоль) и HO-ПЭГ₄-N₃, (466 мг, 3,06 ммоль) и перемешивали в течение ночи. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, и осадок очищали на колонке с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM, с получением соединения 32 с 50% выходом. ¹H ЯМР: 400 МГц DMSO-d₆ δ 7,10-7,19 (м, 2H), 6,97-7,06 (м, 2H), 6,18-6,31 (м, 2H), 5,20 (т, 1H), 4,13-4,16 (м, 1H), 3,98-4,04 (м, 2H), 3,71-3,80 (м, 2H), 3,52-3,61 (м, 8H), 3,38-3,37 (м, 5H), 3,10-3,25 (м, 5H), 2,79-3,08 (м, 5H), 2,59 (т, 2H), 2,31-2,42 (м, 2H), 1,65-1,75 (м, 4H), 1,10 (т, 3H).



[0259] К соединению 32 (826 мг, 1,23 ммоль) добавляли EtOH (3 мл) и H₂O (3 мл) с последующим добавлением LiOH (97 мг, 4,05 ммоль). Смесь перемешивали при 30°C в течение ночи. По завершении смесь нейтрализовали до pH=5, используя 6M водный раствор HCl и концентрировали. Осадок очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на 10 мкм колонке Phenomenex Gemini C18, 50×250 мм, элюируя градиентом ацетонитрила в воде, содержащей 0,1%, с получением соединения 33 (структура 2с) с 81% выходом. ¹H ЯМР: 400 МГц D₂O δ 7,30 (д, 1H), 7,01-7,19 (м, 3H), 6,45 (д, 1H), 5,24 (т, 1H), 4,14-4,32 (м, 2H), 3,84-3,92 (м, 2H), 3,59-3,77 (м, 10H), 3,14-3,45 (м, 8H), ,02-3,12 (м, 1H), 2,97 (д, 2H), 2,85 (к, 1H), 2,50-2,72 (м, 4H), 1,68-1,94 (м, 4H).

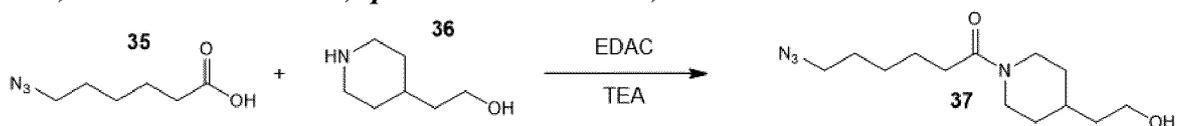
Синтез структуры 2.1с ((S)-3-(4-((11-азидоундецил)окси)-3-фторфенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).



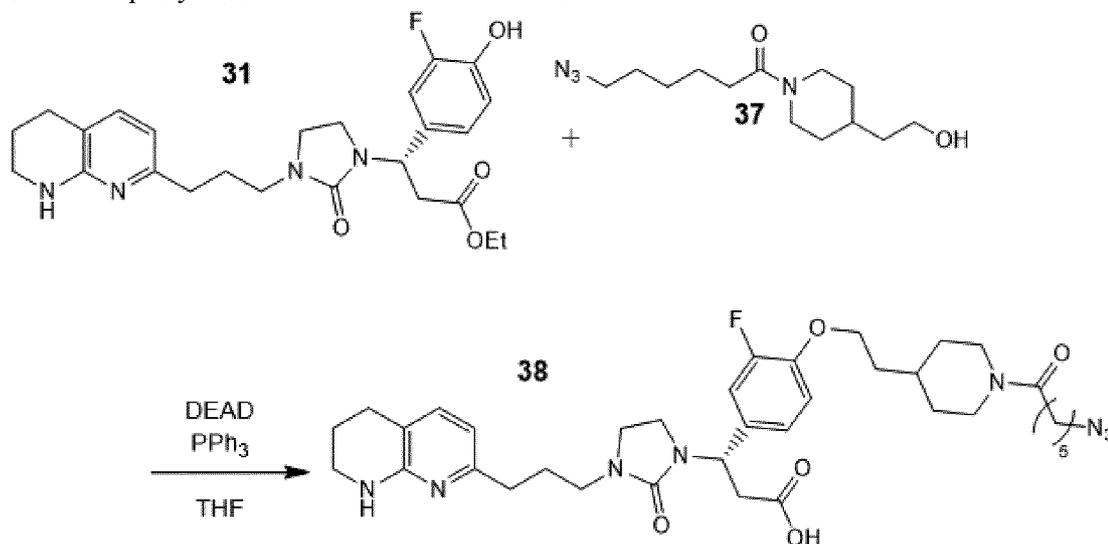
[0260] К раствору PPh₃ в THF добавляли по каплям раствор DEAD при комнатной температуре. Смесь переносили во флакон, содержащий смесь соединения 31 и OH-(CH₂)₁₁-N₃, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Из реакционной смеси удаляли летучие вещества, и неочищенный продукт растворяли в EtOH. LiOH добавляли в виде раствора в H₂O, и дополнительно добавляли смесь вода/EtOH до тех пор, пока реакционная смесь не стала гомогенной. После перемешивания при комнатной температуре в течение 1,5 часов смесь подкисляли до pH=3, используя H₂SO₄, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (Phenomenex Gemini C18, 50×250 мм, 10 мкм, 0,1% TFA в смеси ацетонитрил/вода, градиентная элюция).

Синтез структуры 2.2с ((S)-3-(4-(2-(1-(6-азидогексаноил)пиперидин-4-

ил)этокси)-3-фторфенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).

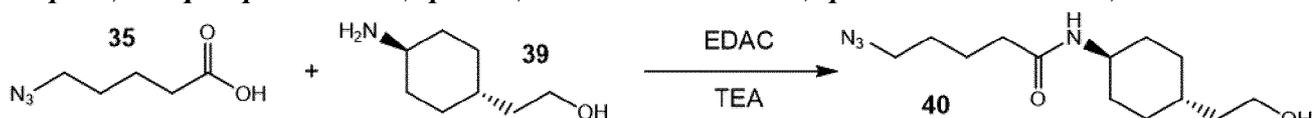


[0261] Соединение 35, растворенное в DCM, обрабатывали EDAC при 0° и для улучшения растворимости добавляли ацетонитрил. Через 5 минут добавляли TEA и соединение 36, охлаждение прекращали, и перемешивание продолжали в течение 2 часов. По завершении добавляли насыщенный раствор хлорида аммония, и органическую фазу отделяли, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Полученный неочищенный продукт далее использовали без дополнительной очистки.

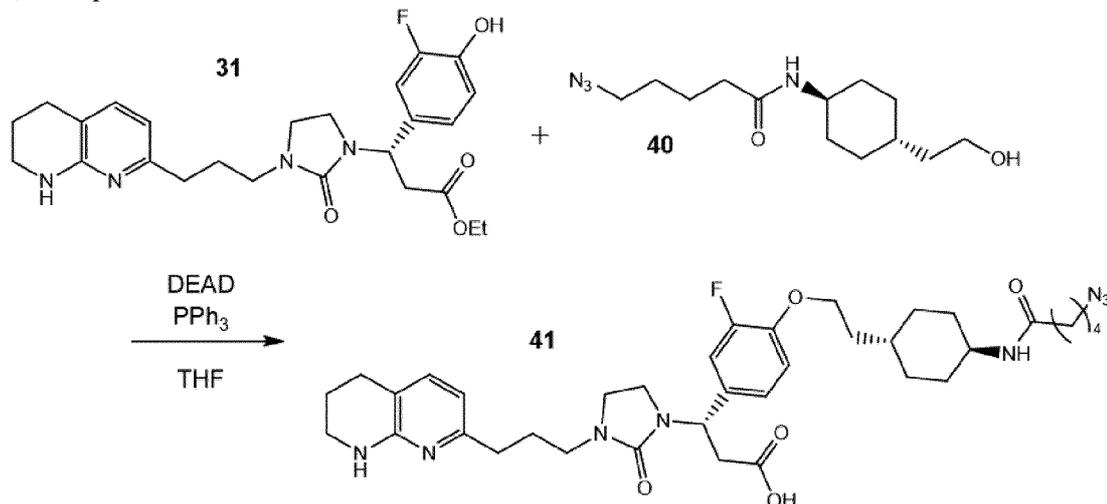


[0262] К раствору PPh₃ в THF добавляли по каплям раствор DEAD при комнатной температуре при энергичном перемешивании. Смесь переносили во флакон, содержащий смесь соединения 31 и соединения 37, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Из реакционной смеси удаляли летучие вещества, и неочищенный продукт растворяли в EtOH. LiOH добавляли в виде раствора в H₂O, и дополнительно добавляли воду до тех пор, пока реакционная смесь не стала гомогенной. После перемешивания при комнатной температуре в течение 1,5 часов смесь подкисляли до pH=3, используя H₂SO₄, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (Phenomenex Gemini C18, 50×250 мм, 10 мкм, 0,1% TFA в смеси ацетонитрил/вода, градиентная элюция) с получением соединения 38 (структура 2.2с).

Синтез структуры 2.3с ((S)-3-(4-(2-((1r,4S)-4-(5-азидопентанамидо)циклогексил)этокси)-3-фторфенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).

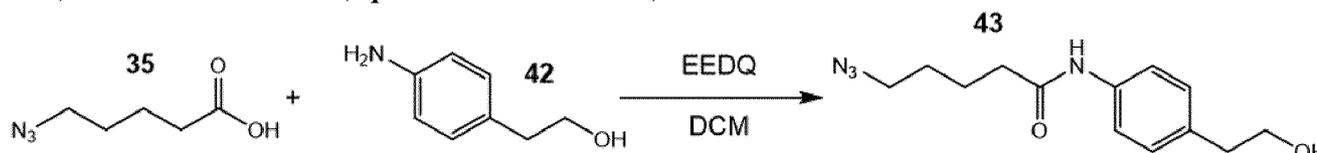


[0263] К суспензии соединения 35 в DCM при 0°C добавляли EDAC в виде раствора в DCM. Через 5 минут охлаждение прекращали и добавляли соединение 39 с последующим добавлением ТЕА. Гетерогенную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. На следующий день реакционную смесь разбавляли DCM, и осадок растворяли. Смесь промывали дважды 5% KHSO₄ и затем один раз рассолом. Органическую фазу фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Неочищенный остаток, содержащий соединение 40, использовали без дополнительной очистки.

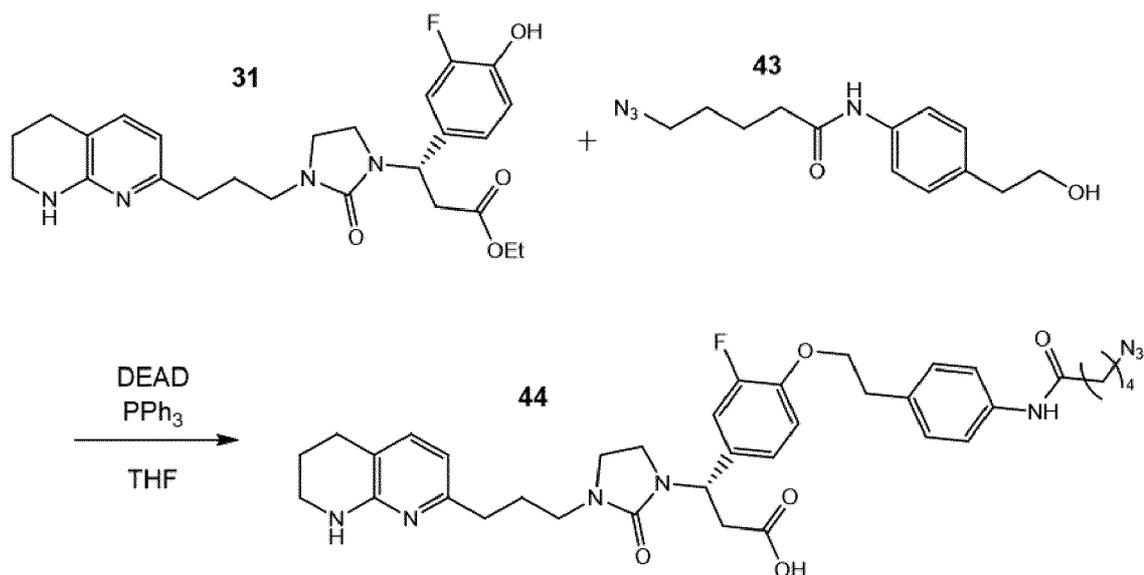


[0264] К раствору PPh₃ в THF добавляли по каплям раствор DEAD при комнатной температуре при энергичном перемешивании. Смесь переносили во флакон, содержащий смесь соединения 31 и соединения 40, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Летучие вещества удаляли из реакционную смесь, и неочищенный продукт растворяли в EtOH. LiOH добавляли в виде раствора в H₂O, и дополнительно добавляли воду до тех пор, пока реакционная смесь не стала гомогенной. После перемешивания при комнатной температуре в течение 1,5 часов смесь подкисляли до pH=3, используя H₂SO₄, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (Phenomenex Gemini C18, 50×250 мм, 10 мкм, 0,1% TFA в смеси ацетонитрил/вода, градиентная элюция) с получением соединения 41 (структура 2.3с).

Синтез структуры 2.4с ((S)-3-(4-(4-(5-азидопентанамидо)фенетокси)-3-фторфенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).

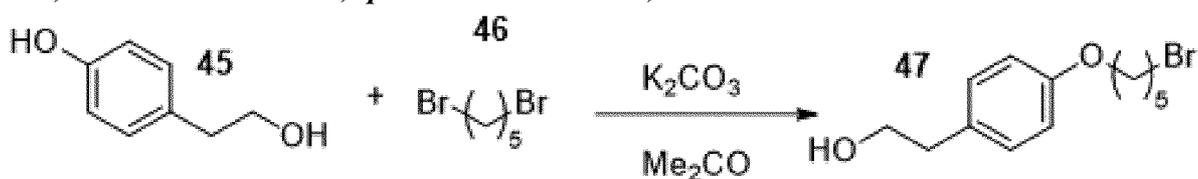


[0265] К смеси соединения 35 и соединения 42 в DCM добавляли EEDQ, и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакционную смесь разбавляли DCM, промывали три раза 1M HCl и один раз рассолом. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Соединение 43 далее использовали без дополнительной очистки.

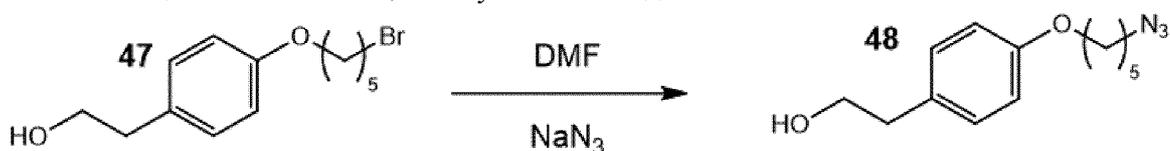


[0266] К раствору PPh_3 в THF добавляли по каплям раствор DEAD при комнатной температуре при энергичном перемешивании. Смесь переносили во флакон, содержащий смесь соединения 31 и соединения 43, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Летучие вещества удаляли из реакционную смесь, и неочищенный продукт растворяли в EtOH. LiOH добавляли в виде раствора в H_2O , и дополнительно добавляли воду до тех пор, пока реакционная смесь не стала гомогенной. После перемешивания при комнатной температуре в течение 1,5 часов смесь подкисляли до $\text{pH}=3$, используя H_2SO_4 , концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (Phenomenex Gemini C18, 50×250 мм, 10 мкм, 0,1% TFA в смеси ацетонитрил/вода, градиентная элюция) с получением соединения 44 (структура 2.4с).

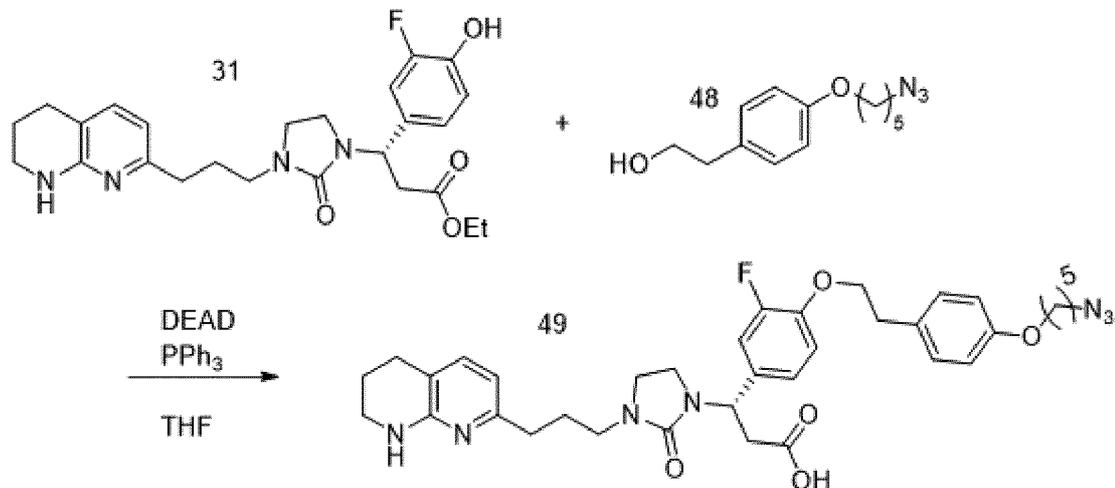
Синтез структуры 2.5с ((S)-3-(4-(4-((5-азидопентил)окси)фенетокси)-3-фторфенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).



[0267] К раствору соединения 45 и соединения 46 в ацетоне добавляли карбонат калия. Смесь нагревали до 65°C в герметично закрытом флаконе в виде суспензии при энергичном перемешивании в течение ночи при защите N_2 . Затем реакционную смесь фильтровали, концентрировали и очищали, пропуская через силикагель, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, с получением соединения 47.

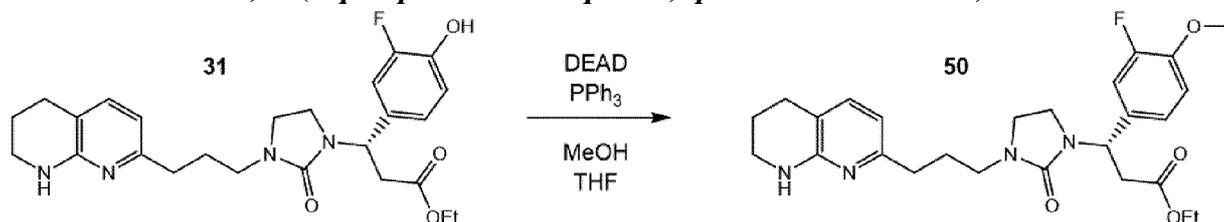


[0268] К раствору соединения 47 в DMF добавляли азид натрия, и смесь перемешивали при 80°C в герметично закрытом флаконе под защитой азота в течение ночи. По завершении добавляли 1 объем воды, и продукт экстрагировали этилацетатом. Отделенную органическую фазу фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Неочищенное соединение 48 использовали без дополнительной очистки.

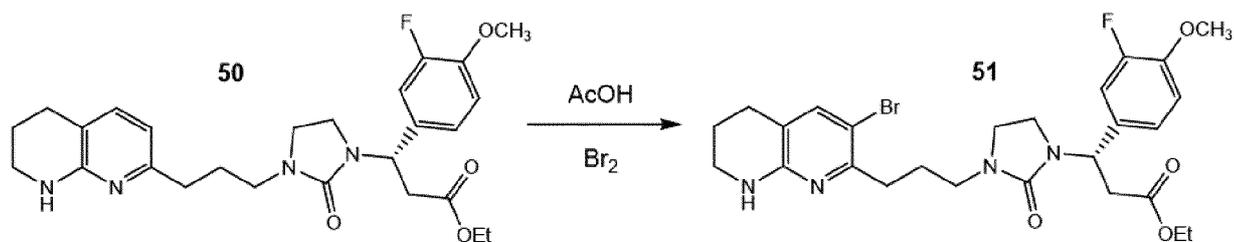


[0269] К раствору PPh₃ в THF добавляли по каплям раствор DEAD при комнатной температуре при энергичном перемешивании. Смесь переносили во флакон, содержащий смесь соединения 31 и соединения 48, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Летучие вещества удаляли из реакционную смесь, и неочищенный продукт растворяли в EtOH. LiOH добавляли в виде раствора в H₂O, и дополнительно добавляли воду до тех пор, пока реакционная смесь не стала гомогенной. После перемешивания при комнатной температуре в течение 1,5 часов смесь подкисляли до pH=3, используя H₂SO₄, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (Phenomenex Gemini C18, 50×250 мм, 10 мкм, 0,1% TFA в смеси ацетонитрил/вода, градиентная элюция) с получением соединения 49 (структура 2.5с).

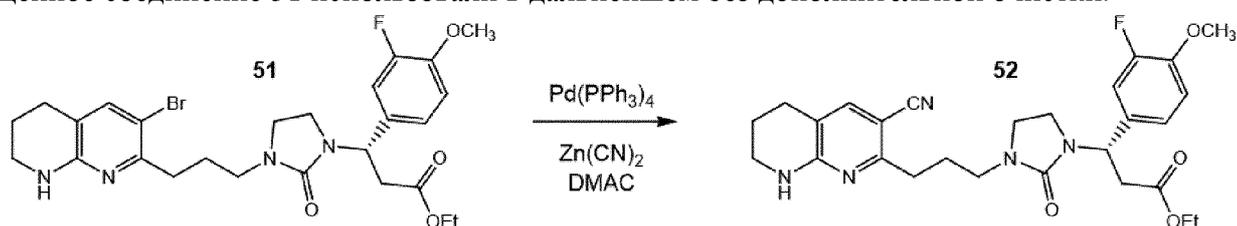
Синтез структуры 2.6с ((S)-3-(3-(3-(3-(17-азидо-3-оксо-6,9,12,15-тетраокса-2-азагептадецил)-5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)-2-оксоимидазолидин-1-ил)-3-(3-фтор-4-метоксифенил)пропановая кислота).



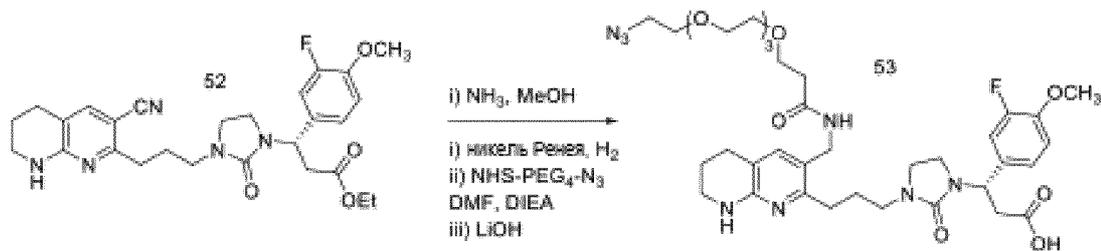
[0270] К раствору PPh₃ в THF добавляли по каплям раствор DEAD при 0°C. После завершения добавления смесь переносили во флакон, содержащий чистую (без примесей) смесь соединения 31 и MeOH. Флакон укупоривали в атмосфере N₂ и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. По завершении все летучие вещества удаляли, и полученный неочищенный продукт очищали на колонке с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM, с получением соединения 50.



[0271] К раствору соединения 50 в AcOH добавляли бром, и смесь перемешивали в течение 0,5 часов. По завершении реакцию смесь разбавляли 5 объемами этилацетата и 2,5 объемами воды. Водный слой нейтрализовали до pH=7, используя насыщенный водный раствор бикарбоната натрия, и органическую фазу отделяли. Водный слой экстрагировали дополнительно два раза этилацетатом. Объединенную органическую фазу сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Полученное неочищенное соединение 51 использовали в дальнейшем без дополнительной очистки.



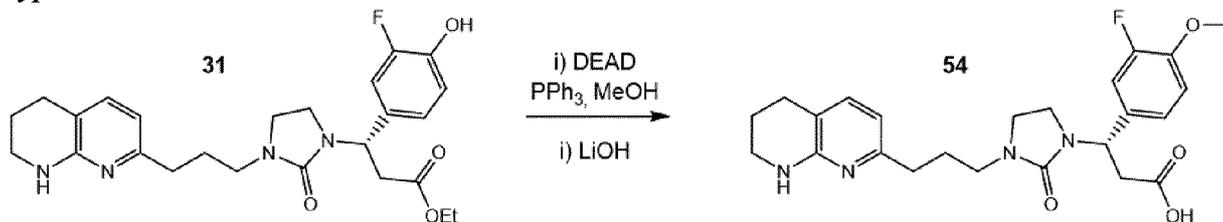
[0272] Раствор соединения 51, Pd(PPh₃)₄ и Zn(CN)₂ в DMAC дегазировали азотом в течение 30 минут, смесь нагревали при 128°C в герметично закрытом флаконе в течение ночи. По завершении смесь разбавляли 5 объемами EtOAc. Органическую фазу отделяли, затем промывали два раза водой и один раз рассолом, и затем органическую фазу фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Осадок очищали, пропуская через силикагель, элюируя 100% EtOAc, с получением соединения 52.



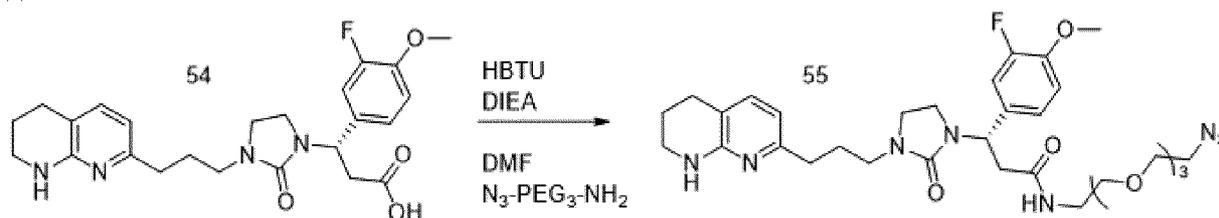
[0273] К раствору соединения 52 в MeOH добавляли аммиак, затем суспензию никеля Ренея, который предварительно ополаскивали три раза метанолом. Флакон Parr® заполняли водородом до 60 фунт/дюйм² (413,7 кПа) и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. По завершении суспензию фильтровали и концентрировали. Полученный неочищенный остаток повторно растворяли в DMF. Добавляли DIEA и NHS-PEG₄-N₃, и смесь перемешивали в течение одного часа. По завершении все летучие вещества удаляли, и неочищенный остаток повторно растворяли в смеси MeOH и THF. Добавляли LiOH в H₂O, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 17 часов. По завершении реакции значение pH доводили до 3, используя TFA, и смесь сразу наносили на колонку с обращенной фазой для проведения

полупрепаративной ВЭЖХ (Phenomenex Gemini C18, 250×21,2 мм, 5 мкм, 0,1% TFA в смеси вода/ACN, градиентная элюция) с получением соединения 53 (структура 2.6с).

Синтез структуры 2.7с ((S)-N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-3-(3-фтор-4-метоксифенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропанамид), структуры 2.8с, структуры 2.9с и структуры 2.10с.



[0274] К соединению 31 добавляли последовательно THF, PPh₃ и раствор DEAD по каплям при 0°C. Смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Затем смесь охлаждали до -20°C в течение 1 часа и фильтровали для удаления оксида трифенилфосфина. Фильтрат концентрировали, и промежуточный продукт O-алкилирования выделяли путем очистки, пропуская через силикагель, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, содержащих 1% ТЕА. Затем выделенный промежуточный продукт суспендировали в смеси THF и H₂O, обрабатывали LiOH в H₂O и перемешивали при 35°C в течение 16 часов. По завершении значение pH доводили до 7, используя 2М HCl, и все летучие вещества удаляли. Неочищенный продукт суспендировали в H₂O; добавляли хлорид натрия, и соединение 54 экстрагировали этилацетатом пять раз. Органические фазы объединяли, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Соединение 54 впоследствии использовали без дополнительной очистки.

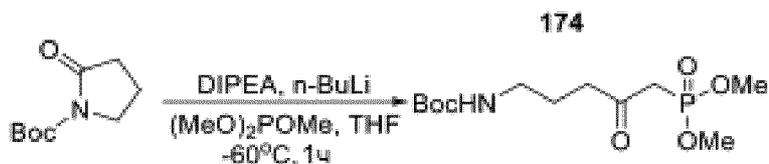


[0275] Раствор соединения 54 в DMF обрабатывали HBTU и перемешивали в течение 5 минут. Затем добавляли DIEA и N₃-PEG₃-NH₂, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. По завершении значение pH доводили до 3, используя TFA, и соединение 55 выделяли путем непосредственного нанесения на колонку с обращенной фазой для полупрепаративной ВЭЖХ (Phenomenex Gemini C18, 250×21,2 мм, 5 мкм, 0,1% TFA в смеси вода/ACN, градиентная элюция) с получением соединения 55.

[0276] Аналогичные процедуры применяли для синтеза соединений 2.8с, 2.9с и 2.10с, используя N₃-PEG₁₁-NH₂, N₃-PEG₂₃-NH₂ и N₃-PEG₃₅-NH₂, соответственно.

Синтез структуры 2.11с ((R)-3-(4-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-фторфенил)-3-(2-оксо-3-(3-(5,6,7,8-

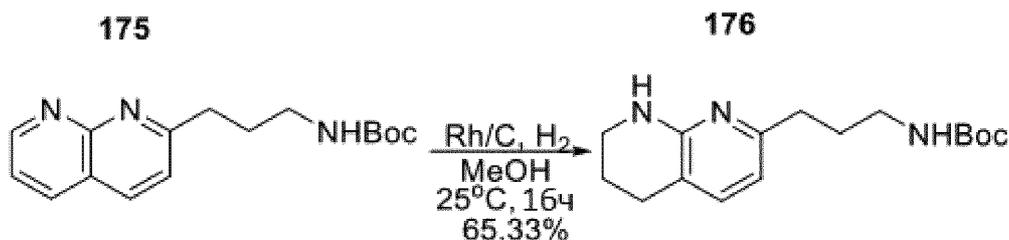
тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил)имидазолидин-1-ил)пропановая кислота).



[0277] В 3-х литровую 4-х горлую круглодонную колбу, продуваемую азотом и поддерживаемую в инертной атмосфере азота, помещали THF (1,50 л), DIPEA (150,00 мл, 716,000 ммоль, 0,88 экв.), n-BuLi (430,00 мл, 680,000 ммоль, 0,84 экв.). Затем добавляли триметилфосфит (195,00 мл) при -60°C и перемешивали в течение 1 часа при -60°C . К этой смеси добавляли трет-бутил 2-оксопирролидин-1-карбоксилат (150,00 г, 809,835 ммоль, 1,00 экв.) при -60°C . Полученный раствор перемешивали в течение 1 часа при -60°C в бане с жидким азотом. Затем реакцию останавливали добавлением 350 мл H_2SO_4 (2N) и разбавляли 1,5 л H_2O . Полученный раствор экстрагировали 2×1 л этилацетата. Полученную смесь промывали 1×1 л H_2O , сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Получали 200 г (неочищенного) трет-бутил N-[5-(диметоксифосфорил)-4-оксопентил]карбамата в виде желтого масла.

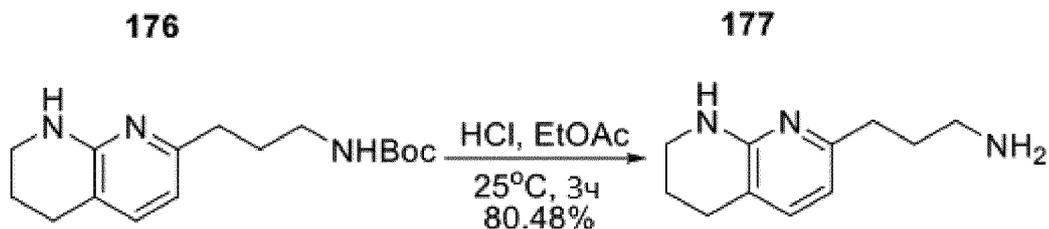


[0278] В 3-х литровую круглодонную колбу помещали трет-бутил N-[5-(диметоксифосфорил)-4-оксопентил]карбамат (200,00 г, 1500,00 ммоль, 1,50 экв.), MeOH (1,50 л), 2-аминопиридин-3-карбальдегид (53,00 г, 1000,00 ммоль, 1,00 экв.), NaOH (50,00 г, 1500,00 ммоль, 1,50 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 часов при 50°C на масляной бане. Значение pH раствора доводили до 8, используя NaHCO_3 (водн.). Полученную смесь концентрировали. Затем реакцию останавливали добавлением 1,5 л воды и экстрагировали $2 \times 1,5$ л этилацетата. Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Получали 160 г (неочищенного) трет-бутил N-[3-(1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]карбамата в виде желтого масла.

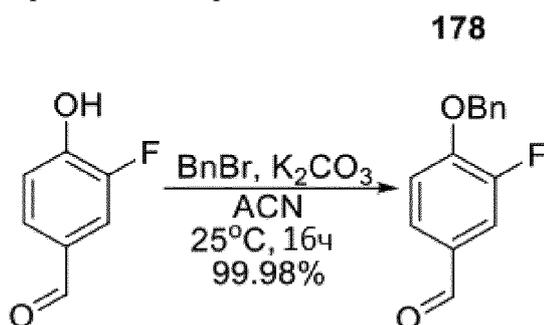


[0279] В 5-ти литровую круглодонную колбу помещали трет-бутил N-[3-(1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]карбамат (160,00 г, 556,787 ммоль, 1,00 экв.), MeOH (2,00 л),

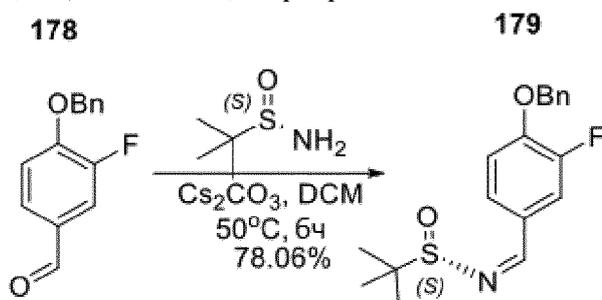
Rh/C (140,00 г, 1,360 ммоль), H₂ (40 фунт/дюйм² (275,8 кПа)). Полученный раствор перемешивали в течение 16 часов при 25°C. Твердые вещества отфильтровывали. Полученную смесь концентрировали. Получали 106 г (65,33%) трет-бутил N-[3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]карбамата в виде желтого твердого вещества.



[0280] В 1-но литровую круглодонную колбу помещали трет-бутил N-[3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]карбамат (106,00 г, 363,767 ммоль, 1,00 экв.), EtOAc (500,00 мл), HCl в EtOAc (4M, 400,00 мл). Полученный раствор перемешивали в течение 3 часов при 25°C. Полученный раствор разбавляли 1 л H₂O. NaOH (водн.) использовали для доведения значения pH до 11. Полученный раствор экстрагировали 2×1 л этилацетата. Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Получали 56 г (80,48%) 3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропан-1-амин в виде желтого твердого вещества.

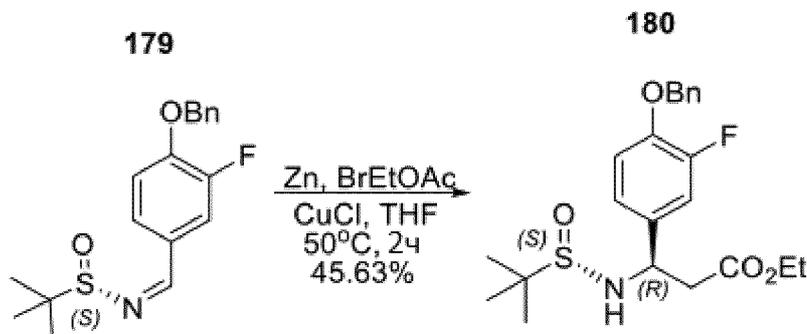


[0281] В 2-х литровую круглодонную колбу помещали 3-фтор-4-гидроксibenзальдегид (140,00 г, 999,194 ммоль, 1,00 экв.), ACN (1000 мл), (бромметил)бензол (205,08 г, 1199,039 ммоль, 1,20 экв.), K₂CO₃ (414,28 г, 2997,581 ммоль, 3,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 16 часов при 25°C. Твердые вещества отфильтровывали. Полученную смесь концентрировали. Получали 230 г (99,98%) 4-(бензилокси)-3-фторбензальдегида в виде белого твердого вещества.

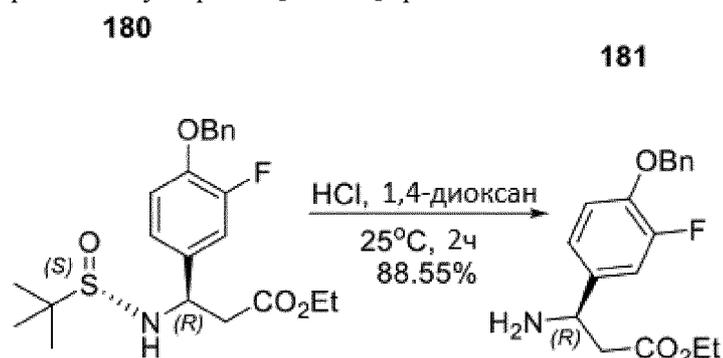


[0282] В 3-х литровую круглодонную колбу помещали 4-(бензилокси)-3-фторбензальдегид (230,00 г, 998,966 ммоль, 1,00 экв.), DCM (1600 мл), (S)-2-метилпропан-

2-сульфинамид (145,29 г, 1198,762 ммоль, 1,20 экв.), Cs₂CO₃ (650,97 г, 1997,933 ммоль, 2,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 6 часов при 50°C на масляной бане. Твердые вещества отфильтровывали. Полученную смесь концентрировали. Получали 260 г (78,06%) (S)-N-[[4-(бензилокси)-3-фторфенил]метилен]-2-метилпропан-2-сульфинамида в виде белого твердого вещества.

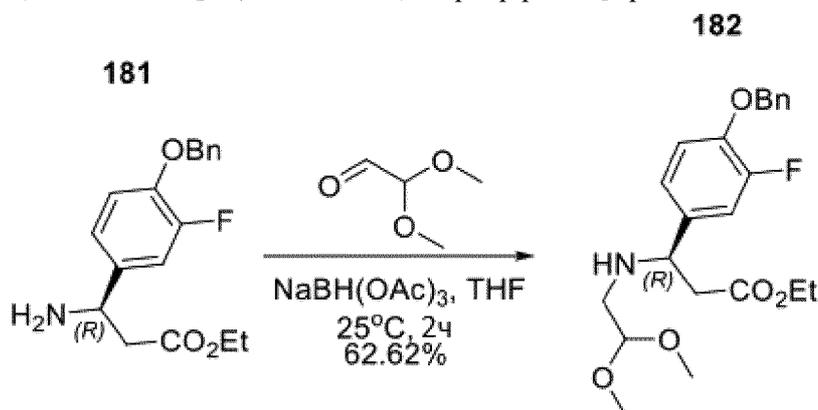


[0283] В 3-х литровую круглодонную колбу, продуемую азотом и поддерживаемую в инертной атмосфере азота, помещали THF (2,0 л), Zn (1,02 кг, 15595,945 ммоль, 20,00 экв.), CuCl (115,80 г, 1169,696 ммоль, 1,50 экв.), этил 2-бромацетат (325,57 г, 1949,498 ммоль, 2,50 экв.), (S)-N-[[4-(бензилокси)-3-фторфенил]метилен]-2-метилпропан-2-сульфинамид (260,00 г, 779,797 ммоль, 1,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин при 0°C на водяной/ледяной бане. Полученный раствор оставляли для осуществления реакции, перемешивая в течение дополнительных 2 часов, при этом температуру поддерживали при 50°C на водяной бане. Твердые вещества отфильтровывали. Полученную смесь концентрировали. Затем реакцию останавливали добавлением 2 л воды и экстрагировали 2×2 л этилацетата. Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Получали 150 г (45,63%) этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[[S)-2-метилпропан-2-сульфинил]амино]пропаноата в виде желтого масла.

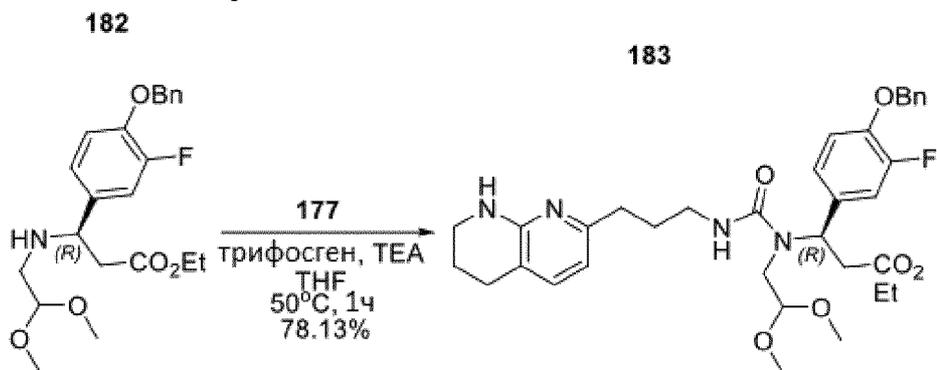


[0284] В 1-но литровую круглодонную колбу помещали этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[[S)-2-метилпропан-2-сульфинил]амино]пропаноат (150,00 г, 355,847 ммоль, 1,00 экв.), HCl в 1,4-диоксане (400,00 мл, 4M). Полученный раствор перемешивали в течение 2 часов при 25°C. Полученную смесь концентрировали. Затем реакцию останавливали добавлением 1 л воды. NaHCO₃ (водн.) использовали для доведения значения pH до 8. Полученный раствор экстрагировали 2×1 л этилацетата,

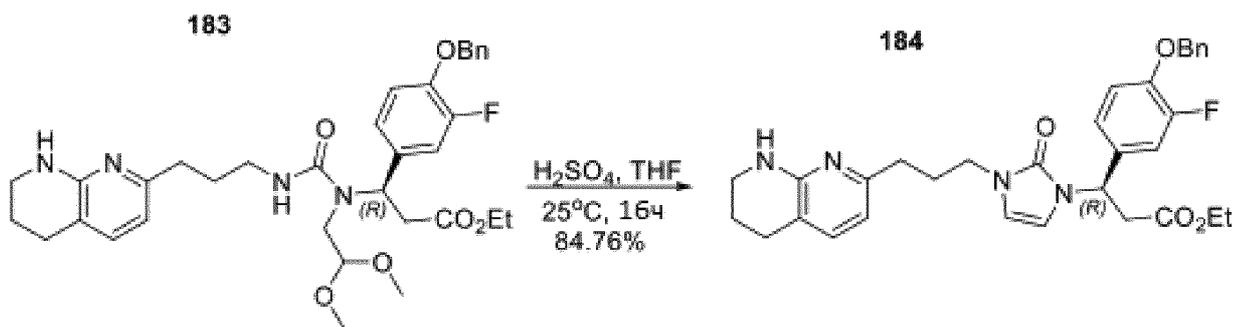
сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Получали 100 г (88,55%) этил (3R)-3-амино-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]пропаноата в виде желтого масла.



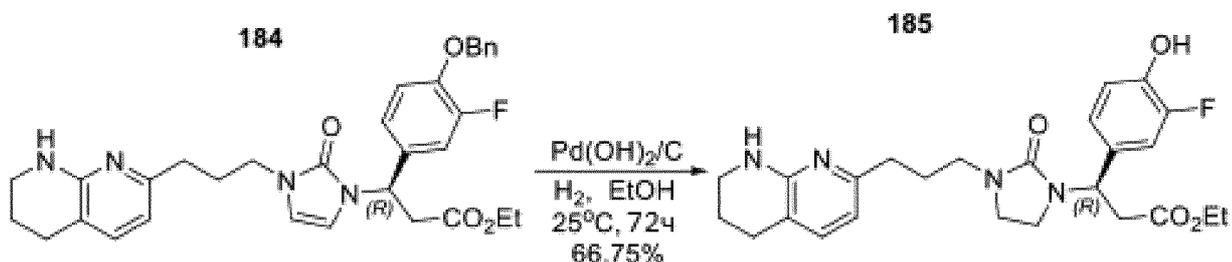
[0285] В 2-х литровую круглодонную колбу помещали этил (3R)-3-амино-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]пропаноат (100,00 г, 315,100 ммоль, 1,00 экв.), THF (1,00 л), 2,2-диметоксиацетальдегид (49,21 г, 472,696 ммоль, 1,50 экв.), NaBH(OAc)₃ (133,57 г, 630,199 ммоль, 2,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 2 часов при 25°C. Затем реакцию останавливали добавлением 1 л воды. Полученный раствор экстрагировали 2×1 л этилацетата, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали под вакуумом. Получали 80 г (62,62%) этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[(2,2-диметоксиэтил)амино]пропаноат в виде желтого масла.



[0286] В 2-х литровую 3-х горлую круглодонную колбу помещали трифосген (22,25 г, 74,975 ммоль, 0,38 экв.), THF (500 мл), этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[(2,2-диметоксиэтил)амино]пропаноат (80,00 г, 197,304 ммоль, 1,00 экв.), TEA (29,95 г, 295,956 ммоль, 1,50 экв.), 3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропан-1-амин (соединение 177, 33,97 г, 177,573 ммоль, 0,90 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение 1 часа при 50°C на масляной бане. Затем реакцию останавливали добавлением 1 л воды. NaHCO₃ (водн.) использовали для доведения значения pH до 8. Полученный раствор экстрагировали 2×1 л этилацетата, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Получали 96 г (78,13%) этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[(2,2-диметоксиэтил)([3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]карбамоил)амино]пропаноата в виде желтого неочищенного масла.



[0287] В 1000-мл круглодонную колбу помещали этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[(2,2-диметоксиэтил)([3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]карбамоил)амино]пропаноат (96,00 г, 154,158 ммоль, 1,00 экв.), THF (500,00 мл), H₂SO₄ (180,00 мл, 2M). Полученный раствор перемешивали в течение 16 часов при 25°C. NaOH (5M) использовали для доведения значения pH до 8. Полученный раствор экстрагировали 2×1 л дихлорметана, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток помещали на колонку с силикагелем в смеси дихлорметан/метанол (50/1). Собранные фракции объединяли и концентрировали. Получали 73 г (84,76%) этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[2-оксо-3-[3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]-2,3-дигидро-1H-имидазол-1-ил]пропаноата в виде желтого масла.

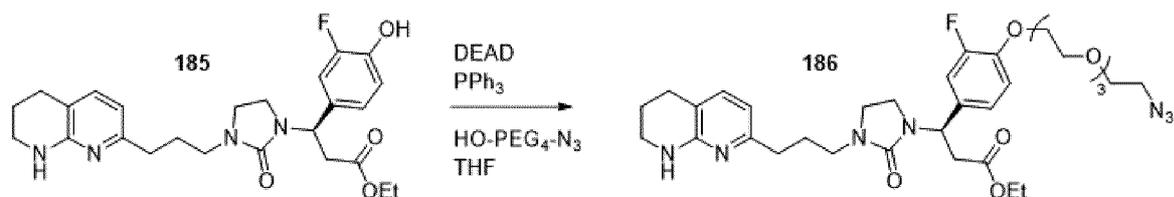


[0288] В 3-х литровую круглодонную колбу помещали этил (3R)-3-[4-(бензилокси)-3-фторфенил]-3-[2-оксо-3-[3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]-2,3-дигидро-1H-имидазол-1-ил]пропаноат (73,00 г, 130,671 ммоль, 1,00 экв.), EtOH (1,50 л), Pd(OH)₂/C (60,00 г, 427,259 ммоль, 3,27 экв.), H₂ (50 атм.). Полученный раствор перемешивали в течение 72 часов при 25°C. Твердые вещества отфильтровывали. Остаток помещали на колонку с силикагелем в смеси дихлорметан/метанол (9/1). Собранные фракции объединяли и концентрировали. Получали 41,0415 г (66,75%) этил (3R)-3-(3-фтор-4-гидроксифенил)-3-[2-оксо-3-[3-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пропил]имидазолидин-1-ил]пропаноата в виде желтого масла.

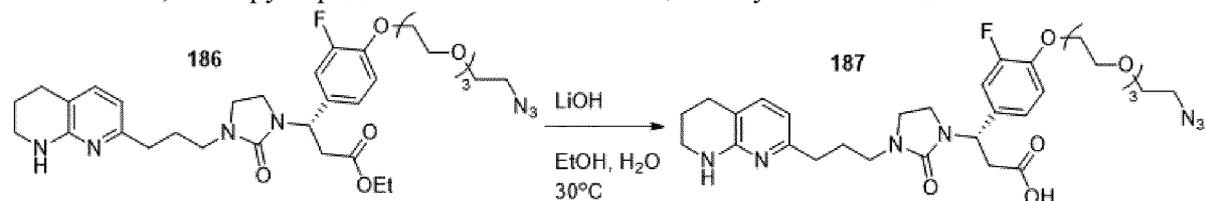
[0289] ЖХ/МС-PH-ARP-052-0: [MS+1]⁺=471

[0290] Вращение, оптическое [α]_D^{20,0} = +37,5° (C=1 г/100 мл в MeOH)

¹H ЯМР: (300 МГц, DMSO-d₆, ppm) δ 9,84 (с, 1H), 7,07-7,00 (м, 2H), 6,95-6,850 (м, 2H), 6,24 (д, 2H), 5,18 (т, 1H), 4,06-3,96 (м, 2H), 3,32-2,75 (м, 10H), 2,60 (т, 2H), 2,37 (т, 2H), 1,77-1,67 (м, 4H), 1,10 (т, 3H).

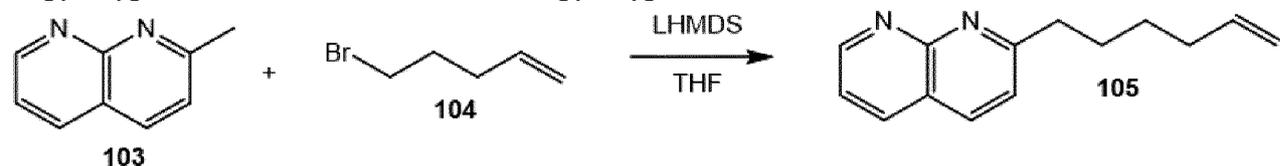


[0291] К раствору PPh_3 в THF при -10°C добавляли по каплям раствор DEAD. Смесь нагревали до комнатной температуры и добавляли к чистой (без примеси) смеси соединения 185 и $\text{HO-PEG}_4\text{-N}_3$, и перемешивали в течение ночи. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, и осадок очищали, пропуская через силикагель, элюируя градиентом MeOH в DCM, с получением соединения 186.

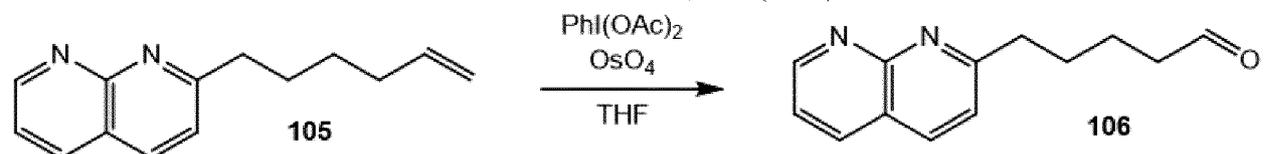


[0292] К соединению 186 добавляли EtOH и H_2O с последующим добавлением LiOH. Смесь перемешивали при 30°C в течение ночи. По завершении смесь нейтрализовали до $\text{pH}=5$, используя 6M водный HCl и концентрировали. Осадок очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на 10 мкм колонке Phenomenex Gemini C18, 50×250 мм, элюируя градиентом ацетонитрила в воде, содержащей 0,1%, с получением соединения 187 (структура 2.11с).

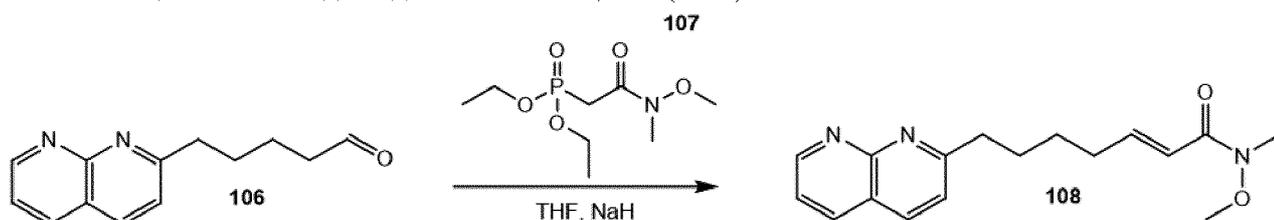
Синтез структуры 28с (соединение 118а) структуры 29с (соединение 118b), структуры 31с (соединение 119а) и структуры 30с (соединение 119b).



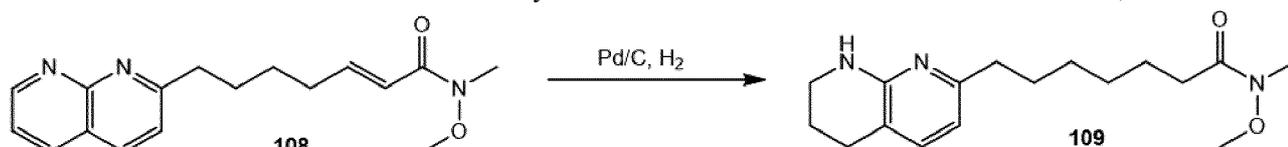
[0293] К раствору LHMDS (1,0 M в THF, 95 мл, 95 ммоль) и THF (60 мл) добавляли по каплям раствор соединения 103 (2-метил-[1,8]нафтиридин (12,5 г, 86,7 ммоль)) в THF (180 мл) при -78°C . После перемешивания в течение 30 минут в реакционную смесь по каплям добавляли раствор соединения 104 (5-бром-1-пентен (19,4 г, 130 ммоль)) в THF (120 мл). Реакционную смесь нагревали до 0°C и перемешивали в течение 4 часов. Реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора NH_4Cl (100 мл) и деионизированной воды (100 мл), затем экстрагировали этилацетатом (2×400 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали, концентрировали, и соединение 105 выделяли, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 50-100% этилацетата в гексанах. Выход соединения 105: 7,93 г (43%).



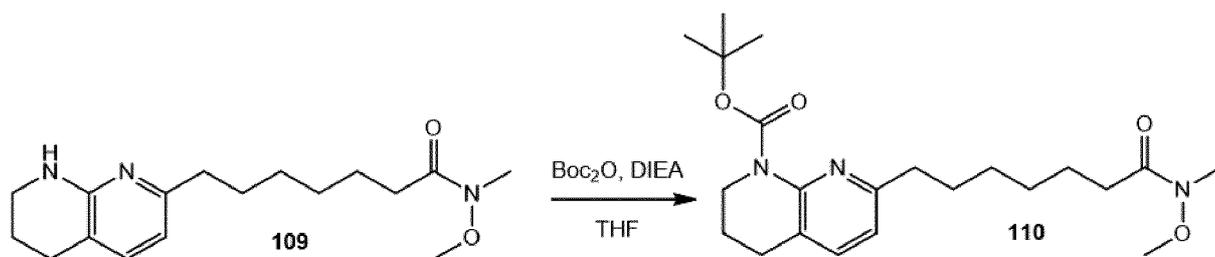
[0294] К раствору соединения 105 (2,50 г, 11,8 ммоль) в ацетоне (67,5 мл), воды (7,5 мл) и 2,6 лутидина (2,74 мл, 23,6 ммоль) добавляли N-оксид 4-метилморфолина (2,07 г, 17,7 ммоль) и тетроксид осмия (2,5 масс.% в трет-бутаноле, 2,40 г, 0,24 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 75 минут к реакционной смеси добавляли (диацетоксиод)бензол (5,69 г, 17,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, затем реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора тиосульфата натрия (100 мл), и смесь экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали, концентрировали, и соединение 106 выделяли, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 0-5% метанола в этилацетате. Выход соединения 106: 1,12 г (44%).



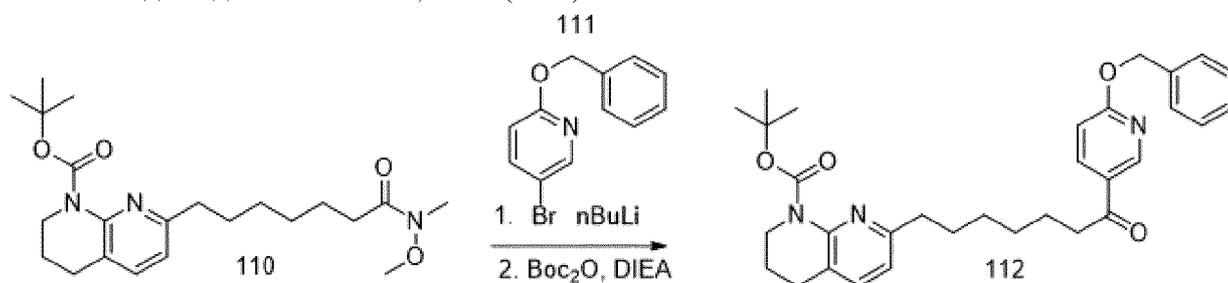
[0295] К суспензии гидроксида натрия (60% дисперсия в минеральном масле, 0,185 г, 4,64 ммоль) в THF (9 мл) добавляли раствор соединения 107 (диэтил (N-метокси-N-метилкарбамоилметил)фосфонат) (1,06 г, 4,43 ммоль) в THF (5 мл) при 0°C. После перемешивания в течение 30 минут добавляли по каплям раствор соединения 106 (0,903 г, 4,21 ммоль) в THF (9 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут при 0°C, затем реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора NH₄Cl (30 мл), и смесь экстрагировали этилацетатом (3×30 мл). Объединенные органические фазы дважды промывали полунасыщенным водным раствором NaHCO₃. Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Выход соединения 108: 1,40 г (из расчета 100% выхода и использовали на следующем этапе без дополнительной очистки).



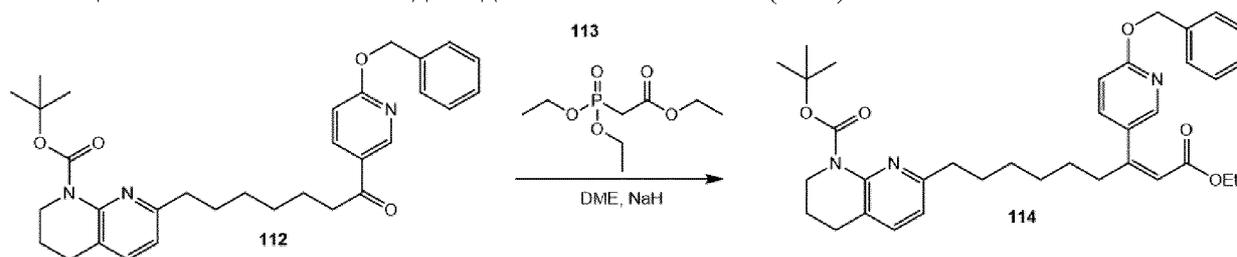
[0296] К раствору соединения 108 (1,31 г, 4,38 ммоль) в этилацетате (20 мл) добавляли Pd/C (10% загрузка, 0,466 г, 0,44 ммоль). В реакционный сосуд нагнетали H₂ до 50 фунт/дюйм² (344,7 кПа). После перемешивания в течение 3,5 часов реакционную смесь фильтровали через Celite® и промывали метанолом. Фильтрат концентрировали, и соединение 109 выделяли, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 50-100% этилацетата в гексанах, содержащих 1% триэтиламина. Выход соединения 109: 0,833 г (62%).



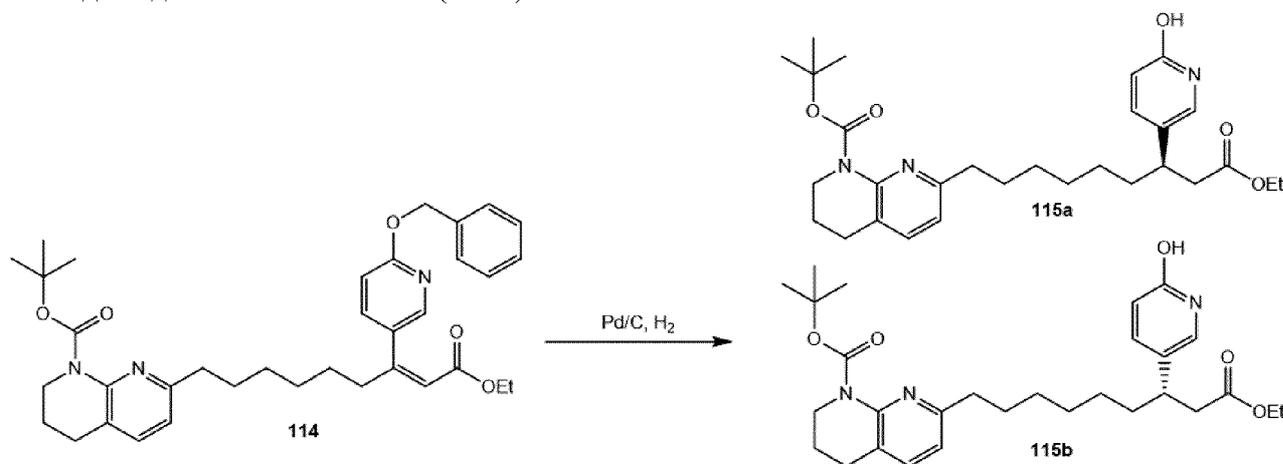
[0297] К раствору соединения 109 (0,833 г, 2,73 ммоль) в THF (10 мл) добавляли DIEA (0,590 мл, 3,41 ммоль) и ди-трет-бутил дикарбонат (0,744 г, 3,41 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 50°C в течение 5 часов. По данным ЖХ/МС реакция не была завершена, и добавляли дополнительные порции DIEA (0,590 мл, 3,41 ммоль) и ди-трет-бутил дикарбоната (0,744 г, 3,41 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 50°C в течение дополнительных 16 часов. Реакционную смесь концентрировали, и соединение 110 выделяли, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 50-100% этилацетата в гексанах. Выход соединения 110: 0,934 г (84%).



[0298] К раствору *n*-бутиллития (2,5 М в гексанах, 0,70 мл, 1,8 ммоль) и THF (1,5 мл) добавляли по каплям соединение 111 (5-бром-2-(фенилметокси)-пиридин) (0,465 г, 1,8 ммоль) в виде раствора в THF (0,8 мл) в течение 3 минут при -78°C. Затем добавляли соединение 110 (0,535 г, 1,3 ммоль) в виде раствора в THF (1 мл). После перемешивания в течение 30 минут реакционную смесь нагревали до 0°C, реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора NH₄Cl (10 мл), и смесь подкисляли дополнительным 6М водным раствором HCl до значения pH=7. Смесь экстрагировали этилацетатом (3×10 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. К раствору неочищенного продукта в THF (8 мл) добавляли DIEA (0,94 мл, 5,4 ммоль) и ди-трет-бутил дикарбонат (1,18 г, 5,4 ммоль). Смесь перемешивали при 40°C в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали, и соединение 112 выделяли, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 0-40% этилацетата в гексанах. Выход соединения 112: 471 мг (50%).

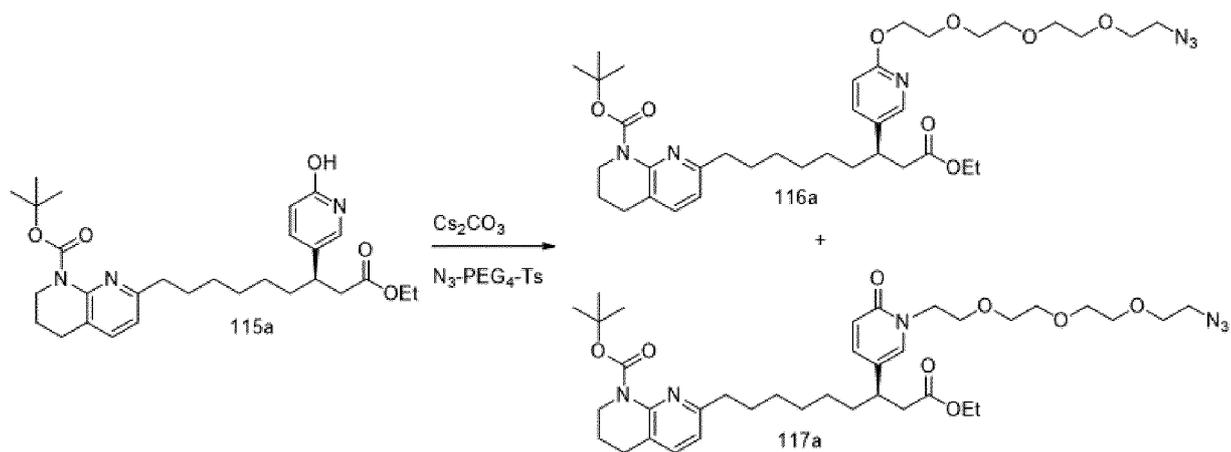


[0299] К суспензии гидроксида натрия (60% дисперсия в минеральном масле, 0,106 г, 2,65 ммоль) в диметоксиэтаноле (2 мл) добавляли соединение 113 (триэтил фосфоноацетат) (0,593 г, 2,65 ммоль) в виде раствора в диметоксиэтаноле (1 мл) при 0°C. После перемешивания в течение 20 минут реакционную смесь нагревали до комнатной температуры, и добавляли раствор соединения 112 (0,467 г, 0,88 ммоль) в диметоксиэтаноле (2 мл). Реакционную смесь нагревали при 70°C в течение 4 часов. Реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора NH₄Cl (10 мл), и продукт экстрагировали этилацетатом (3×15 мл). Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали, концентрировали, и соединение 114 выделяли в виде 1:1 смеси цис:транс изомеров, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 0-30% этилацетата в гексанах. Выход соединения 114: 392 мг (74%).

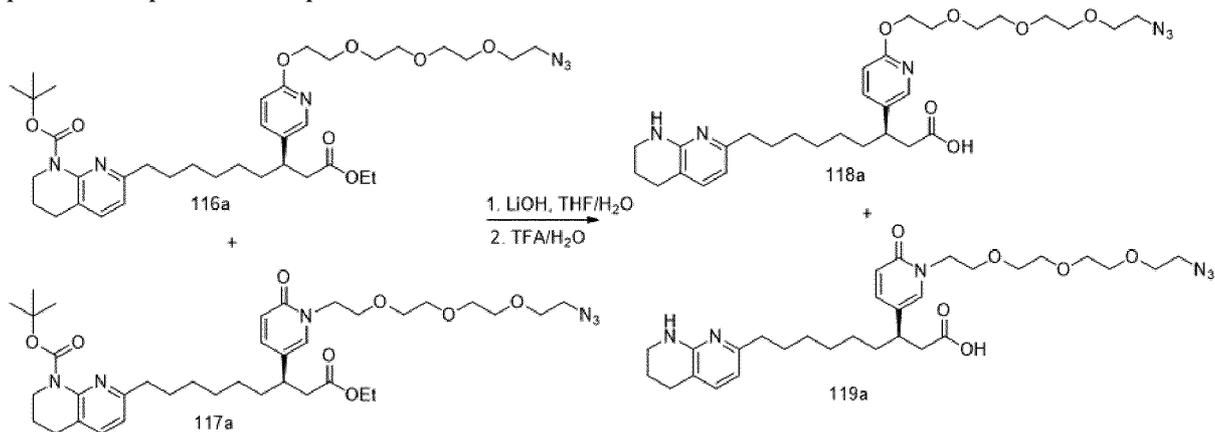


[0300] К раствору соединения 114 (390 мг, 0,65 ммоль) в этаноле (6 мл) добавляли Pd/C (10% загрузка, 69 мг, 0,07 ммоль). В реакционный сосуд нагнетали H₂ до 50 фунт/дюйм² (344,7 кПа). После перемешивания в течение 4 часов реакционную смесь фильтровали через Celite® и промывали метанолом. Фильтрат концентрировали, и соединение 115 выделяли в виде рацемической смеси, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 0-10% метанола в DCM. Выход соединения 115: 95 мг (29%). Для выделения 42 мг первого элюируемого R-изомера (RT=12-14 мин, >99% ee, соединение 115a) и 40 мг второго элюируемого S-изомера (RT=15-18 мин, >98% ee, соединение 115b) использовали хиральную полупрепаративную ВЭЖХ (колонка Chiralpak® AD 250×21 мм, 5 мкм, 90/10 смесь гексаны/EtOH, 40 мл/мин). Идентичность R- и S-изомеров определяли на основе порядка элюирования структурно подобного соединения, описанного Coleman et al. 47 J. Med. Chem. 4834 (2004).

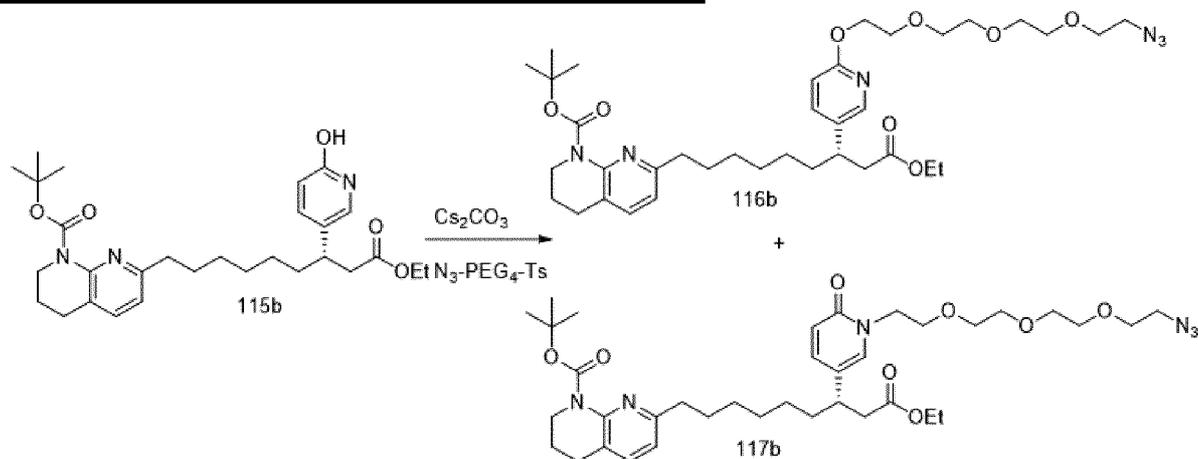
Структуры **28c** **((R)-3-(6-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)пиридин-3-ил)-9-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)нонановая кислота)** и **31c** **((R)-3-(1-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-6-оксо-1,6-дигидропиридин-3-ил)-9-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)нонановая кислота)**



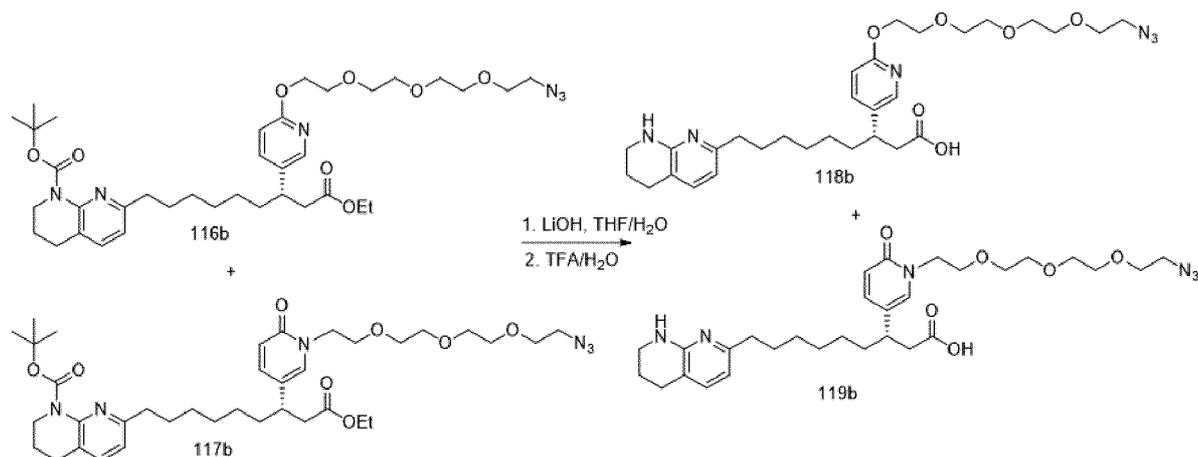
[0301] К раствору соединения 115a (41 мг, 0,08 ммоль) и N₃-PEG₄-OT (61 мг, 0,16 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли карбонат цезия (53 мг, 0,16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением водного раствора NaHCO₃ (1 мл), затем экстрагировали этилацетатом (3×3 мл). Органическую фазу концентрировали при пониженном давлении. Смесь неочищенных N- и O-алкилированных региоизомеров впоследствии использовали без дополнительной очистки.



[0302] К раствору соединений 116a и 117a (58 мг, 0,08 ммоль, 4:6 смесь 9a:10a) в THF (1,0 мл) и деионизированной воды (1,0 мл) добавляли гидроксид лития (6 мг, 0,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и затем при 35°C в течение 2 часов. Добавляли дополнительную порцию гидроксида лития (4 мг, 0,16 ммоль), и температуру реакции увеличивали до 40°C. После перемешивания в течение 3 часов добавляли последнюю порцию гидроксида лития (4 мг, 0,25 ммоль, общее количество - 16 мг, 0,66 ммоль). Реакционную смесь подкисляли до pH=7, используя 6N водный раствор HCl и концентрировали при пониженном давлении. Региоизомеры, соединения 118a и 119a, разделяли, используя систему CombiFlash®, элюируя градиентом 0-5% метанола в DCM, содержащем 0,5% уксусную кислоту. Соединение 118a дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (Thermo Scientific™ Aquasil™ C18, 250×21,2 мм, 5 мкм, 20 мл/мин, 0,1% TFA в смеси вода/ACN, градиентная элюция), с выходом 13 мг соединения 118a (структура 28c). Соединение 119a очищали в тех же условиях с выходом 16 мг соединения 119a (структура 31c).

азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)пиридин-3-ил)-9-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)нонановая кислота) и 30с ((S)-3-(1-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-6-оксо-1,6-дигидропиридин-3-ил)-9-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)нонановая кислота)

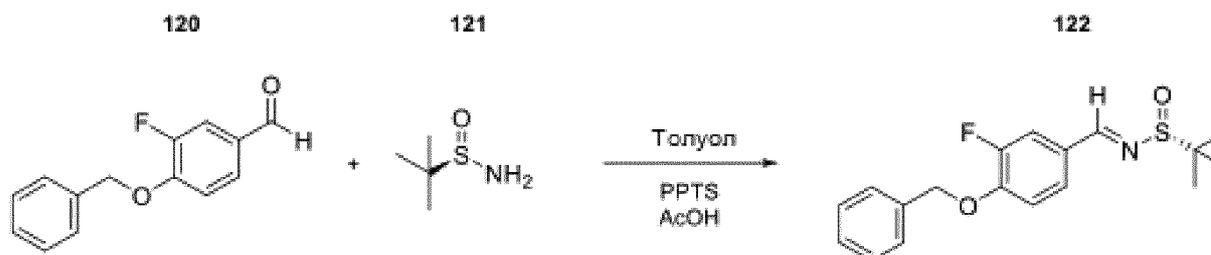
[0303] К раствору соединения 115b (40 мг, 0,08 ммоль) и $\text{N}_3\text{-PEG}_4\text{-OT}$ (58 мг, 0,16 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли карбонат цезия (51 мг, 0,16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 30 минут. Реакцию останавливали добавлением водного раствора NaHCO_3 (1 мл), затем экстрагировали этилацетатом (3×3 мл). Органическую фазу концентрировали при пониженном давлении. Смесь неочищенных N- и O- алкилированных региоизомеров впоследствии использовали без дополнительной очистки.



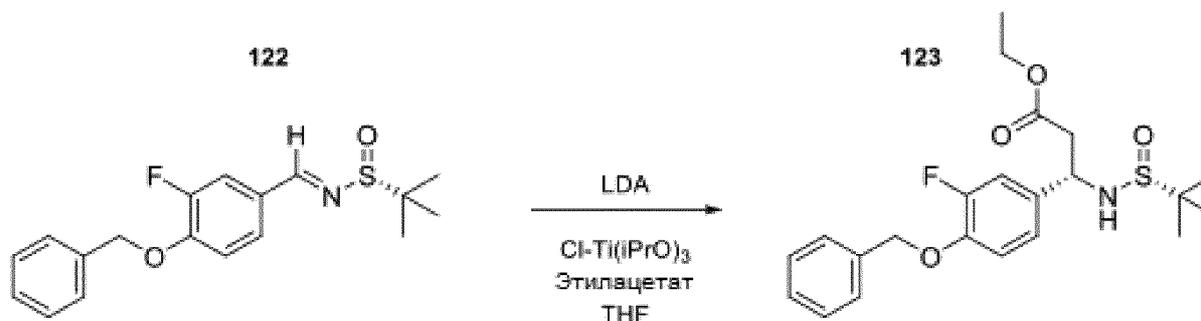
[0304] К раствору соединений 116b и 117b (56 мг, 0,08 ммоль, 4:6 смесь 9a:10a) в THF (0,75 мл) и деионизированной воды (0,75 мл) добавляли гидроксид лития (6 мг, 0,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 45°C в течение 2,5 часов. Добавляли дополнительную порцию гидроксид лития (6 мг, 0,25 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 2,5 часов. Температуру реакции понижали до 35°C , и смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь подкисляли до $\text{pH}=7$, используя 6N водный раствор HCl , и концентрировали при пониженном давлении. Региоизомеры, соединения 118b и 119b, разделяли, используя систему CombiFlash, элюируя градиентом

0-5% метанола в DCM, содержащем 0,5% уксусной кислоты. Соединение 118b дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (Thermo Scientific™ Aquasil™ C18, 250×21,2 мм, 5 мкм, 20 мл/мин, 0,1% TFA в смеси вода/ACN, градиентная элюция), с выходом 14 мг соединения 118b (структура 29c). Соединение 119b очищали в тех же условиях с выходом 18 мг соединения 119b (структура 30c).

Синтез структуры 32c ((R)-3-(4-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-3-фторфенил)-3-(N-метил-5-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пентанамидо)пропановая кислота)

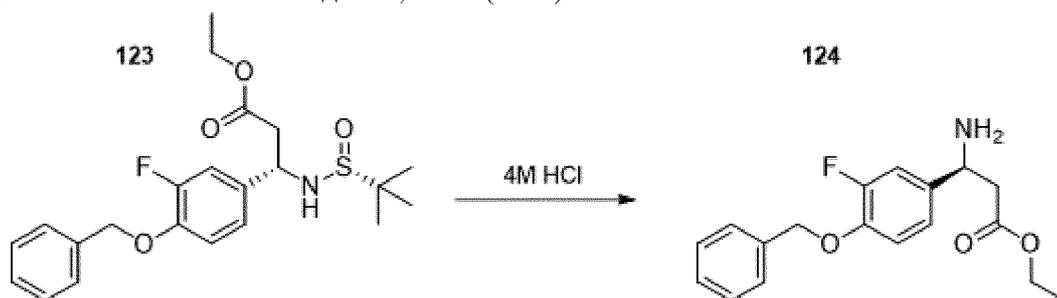


[0305] К соединению 120 (2,75 г, 11,94 ммоль) в толуоле (80 мл) через 3Å сита добавляли соединение 121 (5,79 г, 47,78 ммоль) с последующим добавлением PPTS (300 мг, 1,19 ммоль) и затем AcOH (683 мкл, 11,94 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение ночи. По завершении реакцию останавливали путем добавления насыщенного раствора бикарбоната натрия. Органический слой разбавляли 2 объемами этилацетата, отделяли и фильтровали через сульфат натрия. Продукт выделяли на колонке с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата (0-30%) в гексане с выходом 2,054 г (54%).

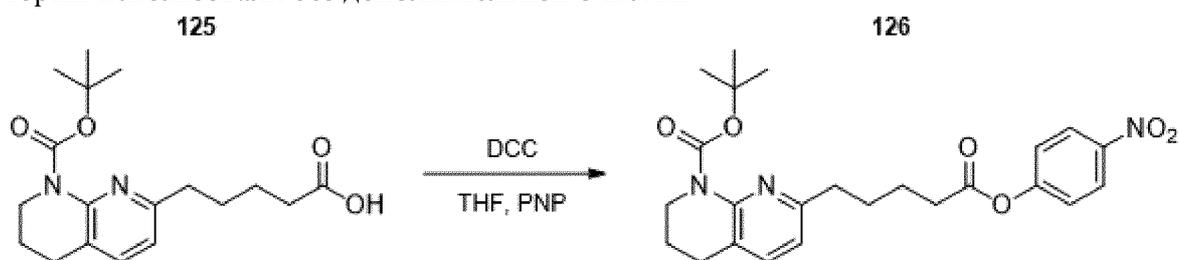


[0306] К DIA (2,85 мл, 20,33 ммоль) в THF (15 мл) при -78°C добавляли по каплям 2,5М раствор n-BuLi (7,76 мл, 19,41 ммоль). Перемешивание продолжали в течение 5 минут при -78°C, и по каплям добавляли этилацетат (1,81 мл, 18,48 ммоль). Перемешивание продолжали в течение еще 10 минут при -78°C, и по каплям добавляли раствор триизопропоксида хлортитана (9,27 мл, 38,381 ммоль) в THF (10 мл). Перемешивание продолжали в течение еще 15 минут при -78°C, и по каплям добавляли раствор соединения 122 (2,054 г, 6,16 ммоль) в THF (10 мл). Перемешивание продолжали в течение 1,5 часов при -78°C. По завершении реакцию останавливали добавлением насыщенного бикарбоната аммония. Суспензию разбавляли 6 объемами этилацетата, органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и

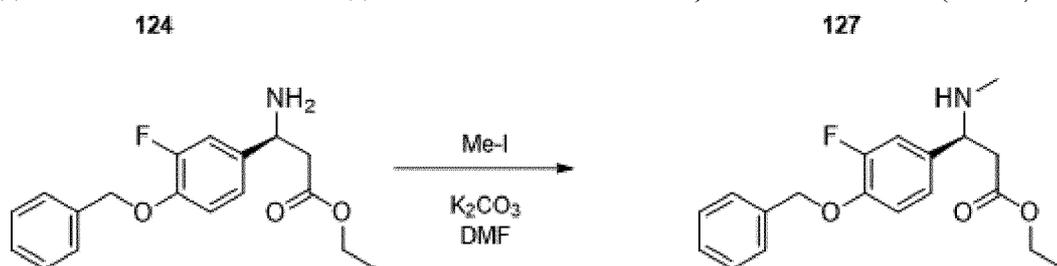
концентрировали. Продукт выделяли, пропуская через силикагель, элюируя градиентом этилацетата в гексанах с выходом 1,043 г (53%).



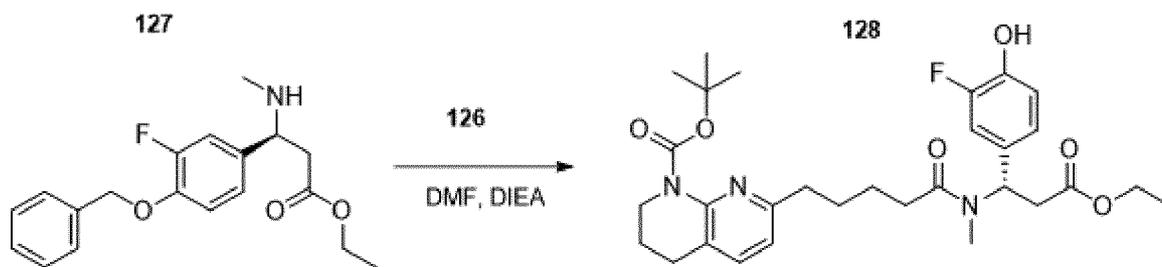
[0307] К соединению 123 (1,043 г, 2,47 ммоль) при перемешивании в MeOH (3 мл) добавляли 4М раствор HCl в диоксане (3,09 мл, 12,37 ммоль). По завершении снятия защиты раствор разбавляли водой (8 мл) и промывали дважды диэтиловым эфиром (6 мл). Затем значение pH водного слоя доводили до 11, используя гидроксид натрия. Осадок экстрагировали этилацетатом, объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, получая 0,616 г (78,5%) продукта 124, который использовали без дополнительной очистки.



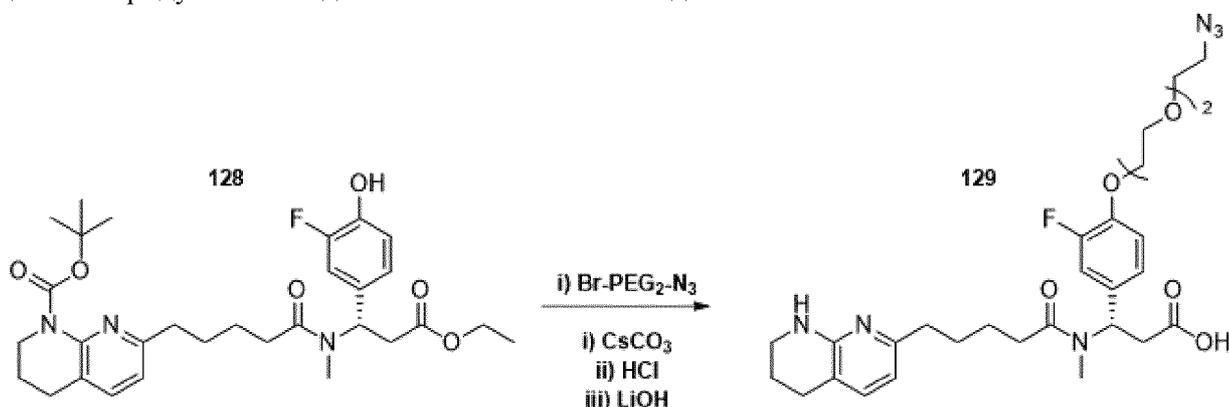
[0308] К соединению 125 (92,1 мг, 0,275 ммоль) в THF (1,5 мл) при 0°C добавляли DCC (68,1 мг, 0,331 ммоль). Через 5 минут добавляли PNP (106,1 мг, 0,331 ммоль), ледяную баню удаляли, и перемешивание продолжали в течение 1 часа. По завершении суспензию охлаждали до -20°C в течение 1 часа, и осадок удаляли фильтрованием. Супернатант концентрировали, и выход неочищенного продукта 126, который впоследствии использовали без дополнительной очистки, составил 129 мг (103%).



[0309] Смесь, содержащую соединение 124 (148,6 мг, 0,468 ммоль) и карбонат калия (129 мг, 0,937 ммоль) в DMF (2 мл) обрабатывали метилиодидом (66,5 мг, 0,468 ммоль) и перемешивали при 50°C в течение 3 часов. По завершении алкилирования все летучие вещества удаляли, и продукт выделяли на колонке с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, каждый забуференный 1% TEA, с выходом 94,6 мг (61%).

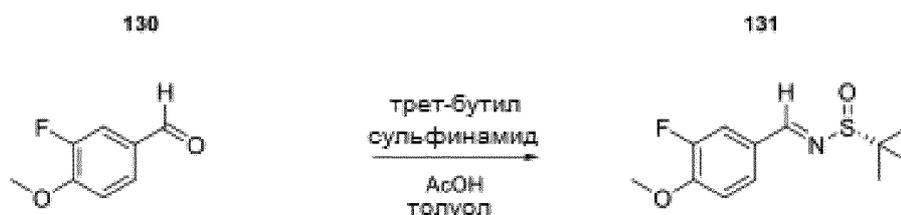


[0310] К соединению 127 (94,5 мг, 0,285 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (149 мкл, 0,856 ммоль) с последующим добавлением соединения 126 (129,9 мг, 0,285 ммоль), и смесь перемешивали в течение 1 часа при 80°C. По завершении все летучие вещества удаляли, и неочищенный продукт растворяли в MeOH, обрабатывали 10% палладия на угле (20 мг), и флакон заполняли водородом до 60 фунт/дюйм² (413,7 кПа). По завершении суспензию фильтровали. Супернатант концентрировали, и полученный неочищенный продукт впоследствии использовали без дополнительной очистки.

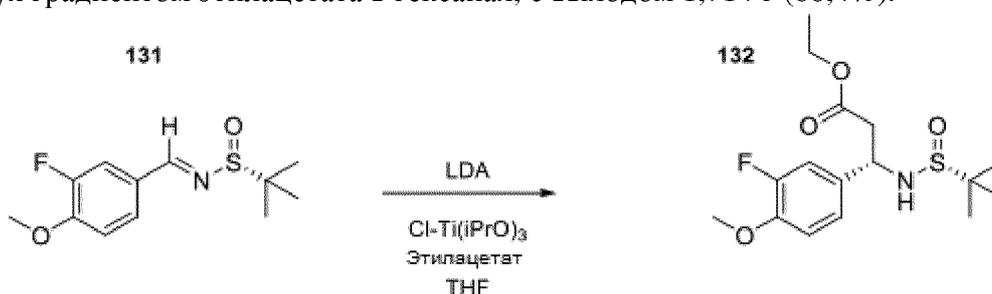


[0311] Смесь, содержащую соединение 128 (159 мг, 0,285 ммоль), бром-PEG₂-азид (74,7 мг, 0,314 ммоль) и карбонат цезия (204 мг, 0,627 ммоль) в DMF (2 мл) нагревали до 60°C в течение 2 часов. По завершении все летучие вещества удаляли, и неочищенный продукт обрабатывали 4М HCl в диоксане (0,5 мл, 2 ммоль) и нагревали до 40°C в течение 3 часов. По завершении все летучие вещества удаляли. Неочищенный продукт суспендировали в смеси THF (1 мл), MeOH (1,5 мл) и H₂O (1,5 мл), обрабатывали гидроксидом лития (83,5 мг, 3,48 ммоль) и нагревали до 40°C в течение 16 часов. По завершении значение pH доводили до 3, используя TFA, и продукт выделяли путем разделения на колонке Phenomenex® Gemini® C18 (21,2×250 мм, 5 мкм), элюируя градиентом ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% TFA, с выходом 33,1 мг (20%).

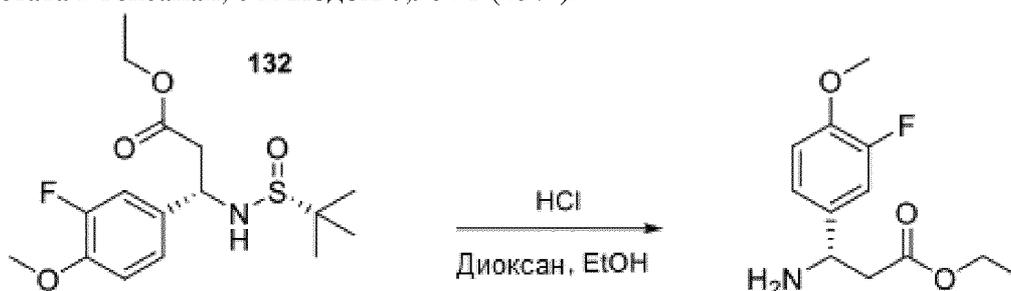
Синтез структуры 33с ((R)-1-азидо-13-(3-фтор-4-метоксифенил)-12-(5-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пентаноил)-3,6,9-триокса-12-азапентадекан-15-оевая кислота)



[0312] Смесь, содержащую соединение 130 (1,5 г, 9,73 ммоль), (R) трет-бутил сульфинамид (2,36 г, 19,46 ммоль) и AcOH (0,14 мл) в толуоле (45 мл) нагревали с обратным холодильником во флаконе со вставленной насадкой Дина-Старка в течение 16 часов. По завершении реакцию останавливали добавлением насыщенного раствора бикарбоната натрия. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Продукт выделяли путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, с выходом 1,714 г (68,4%).

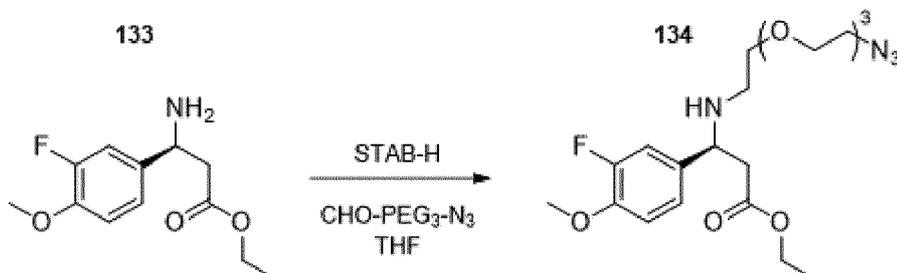


[0313] К DIA (3,056 мл, 21,80 ммоль) в THF (18 мл) при -78°C добавляли по каплям 2,5М раствор n-BuLi (8,324 мл, 20,81 ммоль). Перемешивание продолжали в течение 5 минут при -78°C , и по каплям добавляли этилацетат (1,94 мл, 19,82 ммоль). Перемешивание продолжали в течение еще 10 минут при -78°C , и по каплям добавляли раствор триизопроксида хлортитана (9,94 мл, 41,62 ммоль) в THF (10 мл). Перемешивание продолжали в течение еще 15 минут при -78°C , и по каплям добавляли раствор соединения 131 (1,70 г, 6,61 ммоль) в THF (12 мл). Перемешивание продолжали в течение 1,5 часов при -78°C . По завершении реакцию останавливали добавлением насыщенного бикарбоната аммония. Суспензию разбавляли 7 объемами этилацетата, органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Продукт выделяли, пропуская через силикагель, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, с выходом 0,984 г (43%).

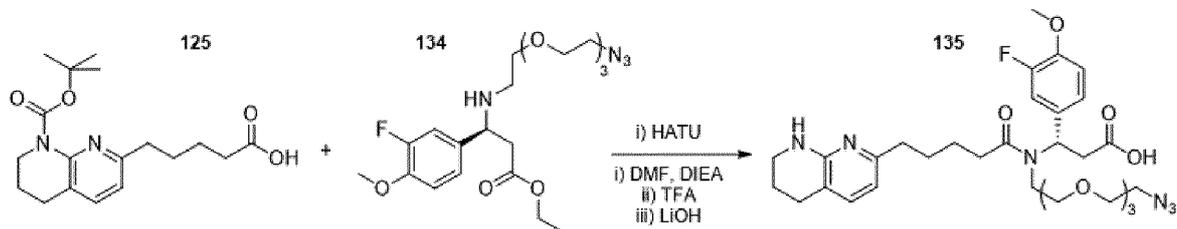


[0314] К соединению 132 (0,975 г, 2,82 ммоль) в EtOH (6 мл) при 0°C добавляли 4М HCl (2,12 мл, 8,47 ммоль) в диоксане и перемешивали в течение 30 минут. По завершении

реакционную смесь разбавляли водой (15 мл) промывали диэтиловым эфиром. Органический слой отделяли, и значение pH водного слоя доводили до 12, используя гидроксид натрия. Водный слой промывали 5 объемами этилацетата, органический слой отделяли, фильтровали через сульфат натрия и концентрировали. Продукт выделяли путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, содержащих 1% TEA, с выходом 0,434 г (64%).



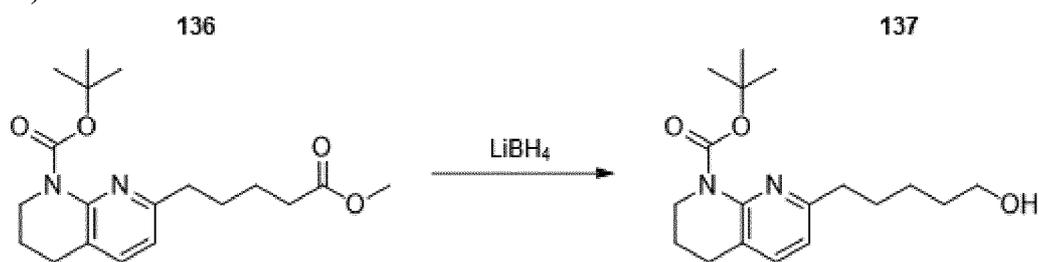
[0315] К смеси соединения 133 (0,120 г, 0,497 ммоль) и ПЭГ (0,151 г, 0,696 ммоль) в THF (2 мл) добавляли через 3 Å молекулярные сита STAB-N (0,253 г, 1,19 ммоль), и суспензию перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. По завершении реакцию останавливали добавлением насыщенного раствора бикарбоната натрия, и неочищенный продукт экстрагировали тремя порциями этилацетата. Отделенные органические экстракты объединяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Полученный неочищенный продукт впоследствии использовали без дополнительной очистки.



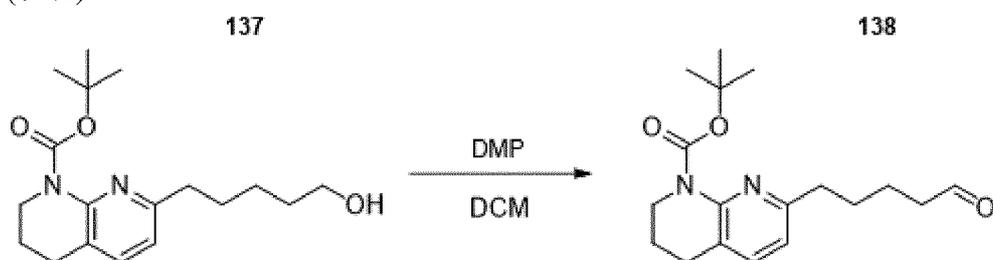
[0316] Соединение 134 (0,200 г, 0,597 ммоль) в DMF (2 мл) обрабатывали HATU (0,227 г, 0,597 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут. К активированному сложному эфиру добавляли DIEA (0,259 мл, 1,49 ммоль) с последующим добавлением соединения 125 (0,220 г, 0,497 ммоль) в DMF (1 мл), и полученную смесь перемешивали в течение 1 часа. Все летучие вещества удаляли, и полученный неочищенный остаток обрабатывали чистым (без примеси) TFA (3,8 мл) и перемешивали в течение 3 часов при 40°C. По завершении удаления Boc все летучие вещества удаляли, и неочищенный продукт суспендировали в смеси THF (4 мл), воды (8 мл) и MeOH (8 мл). Полученную смесь обрабатывали LiOH (71,6 мг, 2,98 ммоль) и нагревали до 40°C в течение 16 часов. По завершении значение pH доводили до 3, используя TFA, и продукт выделяли путем разделения на колонке Phenomenex® Gemini® c18 (21,2×250 мм, 5 мкм), элюируя градиентом ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% TFA, с выходом 56,2 мг (18%, 3-этапа).

Синтез структуры 34с ((S)-1-азидо-13-(3-фтор-4-метоксифенил)-12-(5-(5,6,7,8-

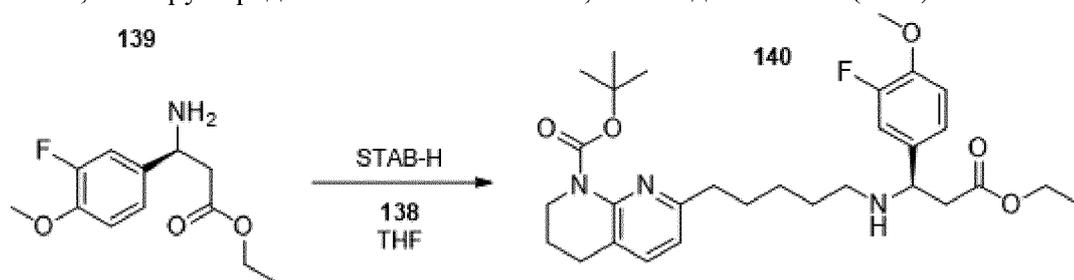
тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пентил)-3,6,9-триокса-12-азапентадекан-15-оевая кислота)



[0317] Соединение 136 (0,500 г, 1,45 ммоль) в смеси THF (9,0 мл) и MeOH (0,5 мл) при 0°C обрабатывали боргидридом лития (94,5 мг, 4,34 ммоль). Охлаждение прекращали, и перемешивание продолжали до прекращения выделения газа. Реакционную смесь разбавляли 5 объемами EtOAc. Органический слой промывали бикарбоната аммония, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Продукт выделяли, пропуская через слой силикагеля, элюируя градиентом этилацетата в гексанах, с выходом 309 мг (67%).

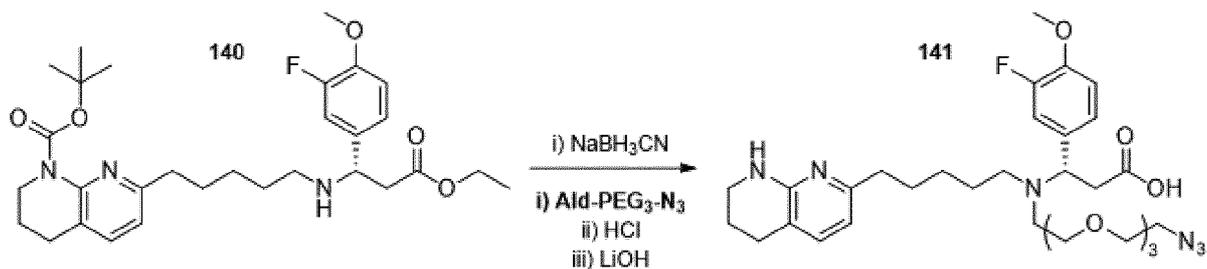


[0318] К раствору, содержащему соединение 137 (0,305 г, 0,952 ммоль) в DCM (9 мл) при 0°C добавляли несколькими порциями реагент Мартина. Добавляли несколько капель воды, охлаждение прекращали, и реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов. По завершении смесь промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия затем насыщенным раствором тиосульфата натрия. Отделенный органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Продукт 138 разделяли с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM, с выходом 140 мг (46%).



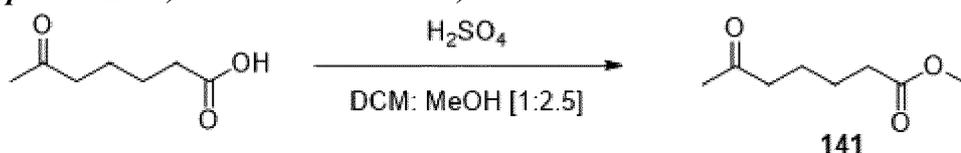
[0319] К смеси, содержащей соединения 1 (85,2 мг, 0,353 ммоль) и 138 (134,9 мг, 0,424 ммоль) в THF (2,5 мл), добавляли через 3Å молекулярные сита STAB-H (0,150 г, 0,706 ммоль), и полученную суспензию нагревали до 40°C в течение 16 часов. По завершении реакционную смесь разбавляли 5 объемами этилацетата и обрабатывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Продукт выделяли путем разделения

с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM, содержащем 1% TEA, с выходом 64 мг (33%).

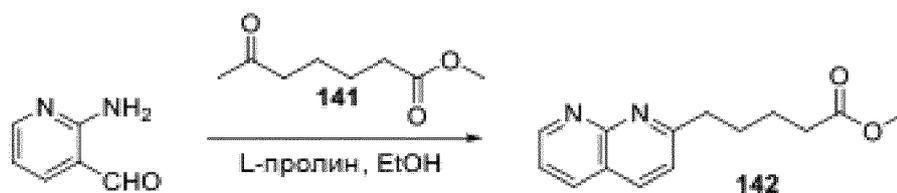


[0320] К смеси, содержащей соединение 140 (60 мг, 0,110 ммоль), Ald-PEG₃-N₃ (71,9 мг, 0,331 ммоль) и AcOH (3 мкл, 0,0276 ммоль) в MeOH (1 мл), добавляли через 3 Å молекулярные сита цианоборгидрид натрия (28,9 мг, 0,276 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 3 часов. По завершении смесь охлаждали до 0°C, добавляли воду (0,15 мл), и раствор подкисляли до pH=7, используя HCl (4M) в диоксане. Затем весь метанол удаляли, добавляли 4M HCl (0,138 мл, 0,552 ммоль) в диоксане, и смесь перемешивали при 40°C в течение 2 часов. По завершении удаления Boc все летучие вещества удаляли, и неочищенный остаток суспендировали в смеси THF (1 мл), воды (2 мл) и MeOH (2 мл) и обрабатывали гидроксидом лития (26,5 мг, 1,104 ммоль). По завершении удаления сложного эфира значение pH доводили до 3 добавлением TFA, и продукт выделяли путем разделения на колонке C18 Phenomenex® (21,2×250 мм), элюируя градиентом ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% TFA, с выходом 16,4 мг (24%, 3-этапа).

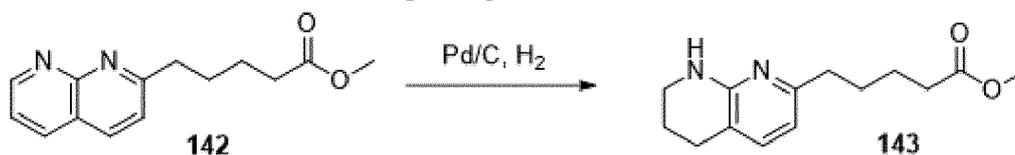
Синтез **структуры** **36с** ((S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-фторфенил)-9-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)нонановая кислота)



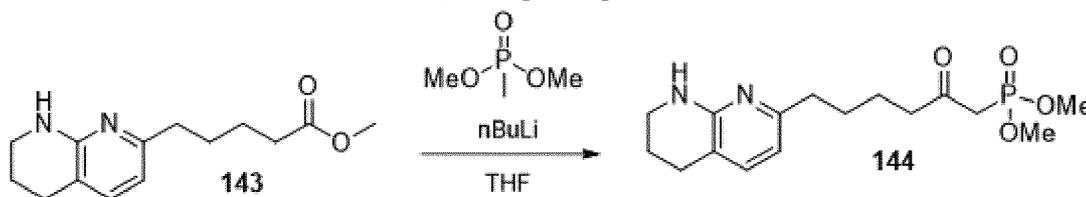
[0321] К раствору 6-оксогептановой кислоты (9,74 г, 68 ммоль) в DCM (30 мл) и MeOH (75 мл) добавляли концентрированную H₂SO₄ (0,18 мл, 3,4 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Затем реакционную смесь концентрировали до состояния масла, повторно растворяли в DCM (150 мл), промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2×40 мл) и рассолом (40 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Продукт использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. Выход соединения 141: 10,2 г (95%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 3,58 (с, 3H), 2,43 (т, 2H), 2,29 (т, 2H), 1,46 (м, 4H).



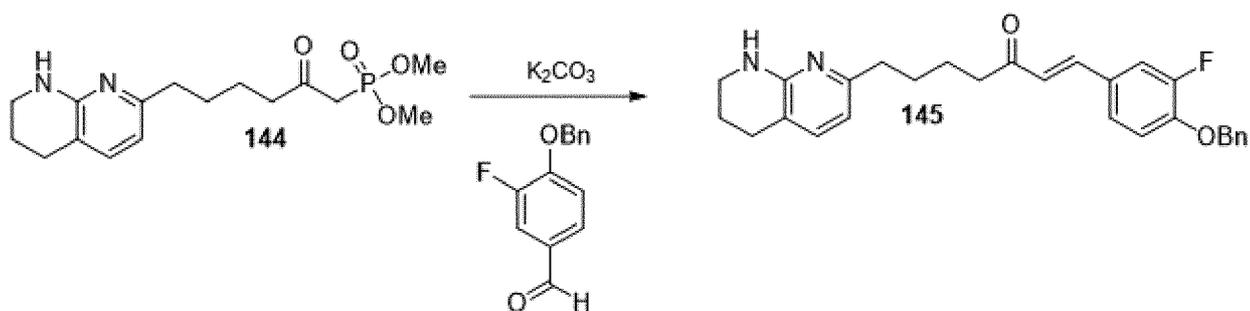
[0322] К раствору соединения 141 (10,2 г, 65 ммоль) и 2-амино-3-формилпиридина (7,89 г, 65 ммоль) в EtOH (80 мл) добавляли L-пролин (3,72 г, 32 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Затем реакционную смесь концентрировали, растворяли в EtOAc (50 мл), промывали водой (3×30 мл). Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc в DCM (10-100%). Выход соединения 142: 6,08 г (39%). Вычисленная масса для C₁₄H₁₆N₂O₂ [M+H]⁺: 245,13, найденная: 245,21.



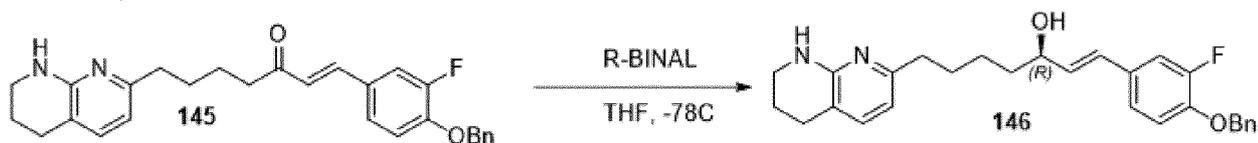
[0323] К раствору соединения 142 (6,08 г, 24,9 ммоль) в MeOH (50 мл) добавляли Pd/C (10% загрузка, тип Degussa, 1,99 г, 1,87 ммоль). Реакционный флакон заполняли азотом, откачивали газ и снова заполняли азотом, три раза. Этот процесс повторяли с водородом, и наконец реакционный сосуд заполняли водородом (1 атм.) и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтровали через слой Celite®, который промывали MeOH, и фильтрат концентрировали. Продукт, соединение 143, использовали на следующем этапе без дополнительной очистки из расчета 100% выхода. Вычисленная масса для C₁₄H₂₀N₂O₂ [M+H]⁺: 249,16, найденная: 249,08.



[0324] К раствору диметил метилфосфоната (12,3 г, 100 ммоль) в безводном THF (120 мл) добавляли раствор n-BuLi (2,5 М в гексанах, 40 мл, 100 ммоль) с помощью шприца в течение 1 часа при -78°C. К реакционной смеси добавляли раствор соединения 143 (6,175 г, 24,9 ммоль) в THF (40 мл) в течение 45 мин при -78°C. После перемешивания в течение 20 минут при -78°C реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора NH₄Cl (200 мл), нагревали до комнатной температуры и экстрагировали EtOAc (400 мл). Органический слой промывали водой (200 мл) и рассолом (200 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Продукт использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. Выход соединения 144: 7,86 г (93%). Вычисленная масса для C₁₆H₂₅N₂O₄P [M+H]⁺: 341,17, найденная: 341,17.



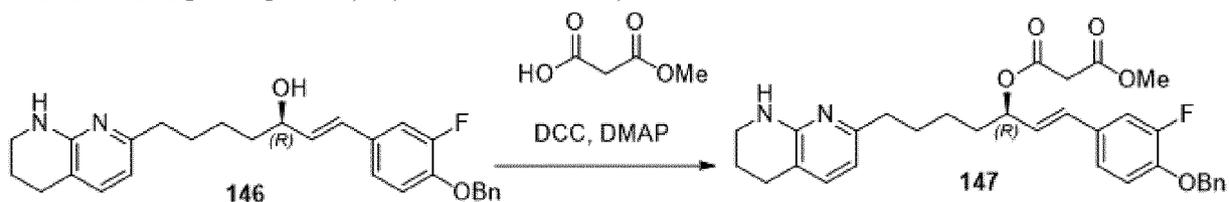
[0325] Суспензию 3-фтор-4-(фенилметокси)-бензальдегида (0,38 г, 1,65 ммоль), соединения 144 (0,67 г, 1,98 ммоль) и безводного карбоната калия (0,547 г, 3,96 ммоль) в THF (13,5 мл) нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Дополнительно добавляли 3-фтор-4-(фенилметокси)-бензальдегид (0,19 г, 0,83 ммоль) и карбонат калия (0,23 г, 1,65 ммоль), и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение дополнительных 4 часов. Смесь разбавляли EtOAc (100 мл), промывали водой (30 мл) и рассолом (30 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом MeOH в DCM (0-10%). Выход соединения 145: 446 мг (61%). Вычисленная масса для $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{FN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 445,23, найденная: 445,41.



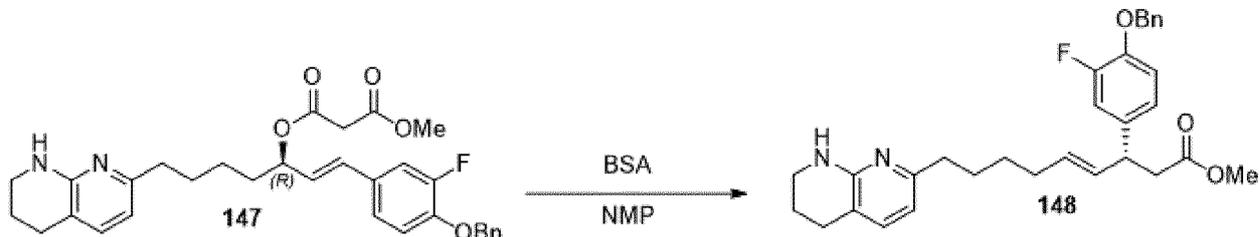
[0326] Приготовление R-BINAL: К суспензии ЛАН (0,396 г, 10,4 ммоль, 0,98 экв.) в сухом THF (34 мл) добавляли EtOH (0,492 г, 10,65 ммоль, 1,00 экв.) в виде раствора в THF (3,2 мл) в течение 10 мин, при этом поддерживая внутреннюю температуру $<35^\circ\text{C}$. После выдерживания смеси в течение 30 мин добавляли R-BINOL (3,05 г, 10,65 ммоль, 1,00 экв.) в виде раствора в THF (10 мл), при этом поддерживая внутреннюю температуру $<35^\circ\text{C}$ (приблизительно 10 минут). После перемешивания в течение 2 часов при комнатной температуре реакционную смесь охлаждали на бане сухой лед/ацетон до -78°C .

[0327] Соединение 145 (1,18 г, 2,65 ммоль) подвергали азеотропной сушке безводным толуолом (50 мл) и растворяли в безводном THF (12 мл). К раствору R-BINAL добавляли по каплям раствор соединения 145 через шприц в течение 45 мин при -78°C . Через 1,5 часа реакционный сосуд переносили в очень большой влагометр, заполненный смесью сухой лед/ацетон и накрывали алюминиевой фольгой. Реакционную смесь перемешивали при -78°C . Большая часть восстановления произошла в первые 1,5 часа, а в течение ночи произошло только небольшое количество дополнительных преобразований. Реакцию останавливали путем добавления насыщенного водного раствора NH_4Cl (150 мл) и нагревали до комнатной температуры. Смесь дополнительно подкисляли до $\text{pH}=7$, используя 6N HCl, затем экстрагировали EtOAc (2×250 мл). Объединенную органическую фазу промывали водой (125 мл) и рассолом (125 мл). Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash

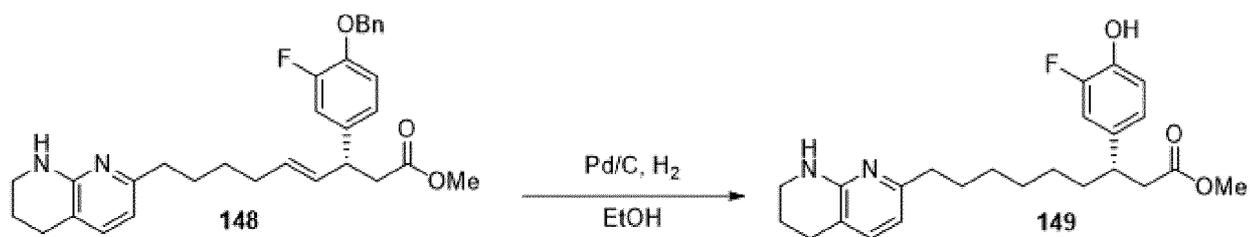
с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом MeOH в DCM (0-5%). Выход соединения 146: 634 мг (53%). Хиральную чистоту определяли аналитической хиральной ВЭЖХ на колонке Chiralpak AD-H 4,6×250 мм, 5 мкм, EtOH 0,1% диэтиламин, изократный, 1,75 мл/мин. Первый элюируемый R-изомер имел чистоту 86% по площади, что соответствует 72% ee. Соединение 6 дополнительно очищали хиральной полупрепаративной ВЭЖХ (Chiralpak AD-H 21,2×250 мм, 5 мкм, EtOH 0,1% диэтиламин, 20 мл/мин). Конечный выход соединения 146: 445 мг (98% ee). Масса, вычисленная для $C_{28}H_{31}FN_2O_2$ $[M+H]^+$: 447,25, найденная: 447,30.



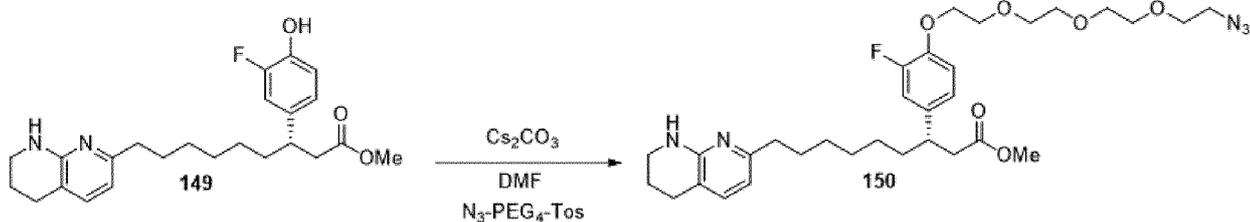
[0328] К раствору соединения 146 (0,325 г, 0,73 ммоль) и монометилового эфира малоновой кислоты (0,103 г, 0,87 ммоль) в DCM (3 мл) добавляли раствор DMAP (9 мг, 0,073 ммоль) в DCM. Смесь охлаждали до 0°C, и добавляли DCC (0,180 г, 0,87 ммоль). Охлаждающую баню удаляли, и реакцию перемешивали при комнатной температуре. Затем реакцию разбавляли DCM (10 мл) и фильтровали. Фильтрат концентрировали и очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом MeOH (0-5%) в DCM. Выход соединения 147: 142 мг (37%). Вычисленная масса для $C_{32}H_{35}FN_2O_5$ $[M+H]^+$: 547,26, найденная: 547,58.



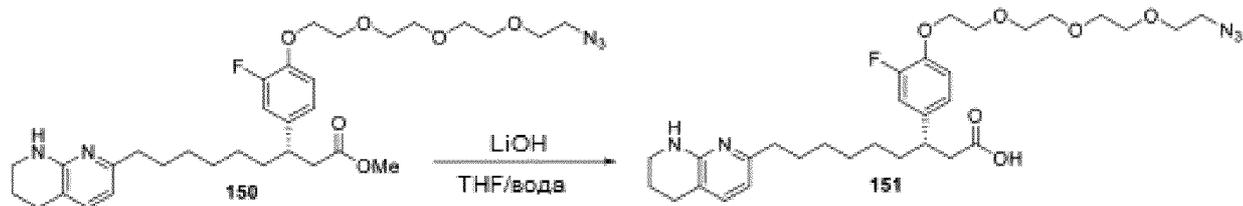
[0329] К раствору соединения 147 (0,232 г, 0,42 ммоль) в NMP (0,5 мл) добавляли N, O-бис(триметилсилил)ацетамид (0,229 г, 1,12 ммоль) при комнатной температуре. Смесь нагревали при 60°C в течение 30 мин. Рассол (58 мкл) добавляли двумя порциями в течение 5 мин. Затем реакцию нагревали до 90°C в течение 3 часов, а затем до комнатной температуры в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (12 мл), промывали водой (3 мл). Водный слой снова экстрагировали EtOAc (12 мл). Объединенный органический слой концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом MeOH в DCM. Выход соединения 148: 140 мг (66%). Вычисленная масса для $C_{31}H_{35}FN_2O_3$ $[M+H]^+$: 503,27, найденная: 503,29.



[0330] К раствору соединения 148 (0,169 г, 0,34 ммоль) в EtOH (3 мл) добавляли суспензию Pd/C (10% загрузка, 36 мг, 0,034 ммоль) в EtOH (1 мл). В реакционный сосуд нагнетали водород и выпускали три раза. В реакционный сосуд повторно нагнетали водород до 55 фунт/дюйм² (379,2 кПа) в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли MeOH (5 мл) и фильтровали. Фильтрат концентрировали, и продукт, соединение 149, использовали на следующем этапе без дополнительной очистки из расчета 100% выхода. Вычисленная масса для C₂₄H₃₁FN₂O₃ [M+H]⁺: 415,24, найденная: 415,07.



[0331] К раствору соединения 149 (139 мг, 0,34 ммоль) и азидо-PEG₄-тозилата (0,188 мг, 0,50 ммоль) в DMF (2,5 мл) добавляли карбонат цезия (164 мг, 0,50 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 40°C в течение 1 часа, затем реакцию останавливали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (3 мл). Смесь экстрагировали EtOAc, (3×10 мл). Объединенную органическую фазу промывали водой (2×5 мл). Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали, концентрировали и использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. Вычисленная масса для C₃₂H₄₆FN₅O₆ [M+H]⁺: 616,35, найденная: 616,90.



[0332] К раствору соединения 150 (0,207 мг, 0,34 ммоль) в THF (1,5 мл) и воде (1,5 мл) добавляли гидроксид лития (0,040 г, 1,68 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 40°C в течение ночи. На следующее утро реакционную смесь подкисляли, используя 6N HCl, до pH=7 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в 35% ACN в H₂O, 0,1% TFA и очищали ОТ-ВЭЖХ (Thermo Aquasil C18, 250×21 мм, 5 мкм, 20 мл/мин, градиент ACN в H₂O, содержащей 0,1% TFA). Выход соединения 151 (SM 36): 125 мг (52% за 3 этапа). Вычисленная масса для C₃₁H₄₄FN₅O₆ [M+H]⁺: 602,34, найденная: 602,85.

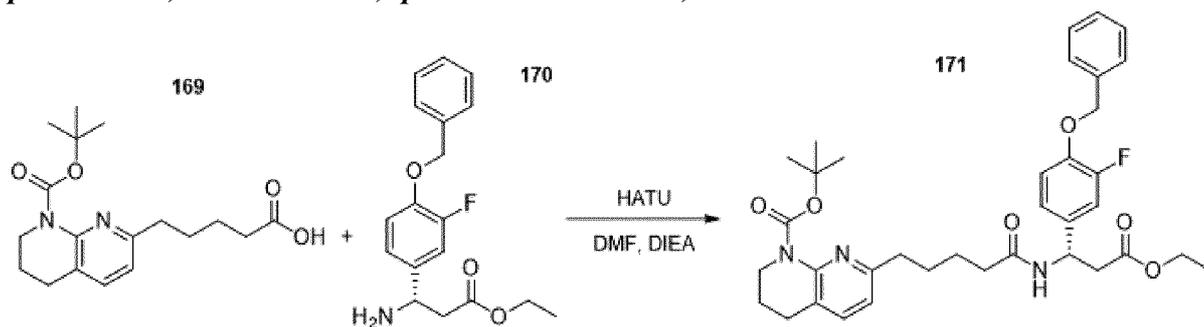
Синтез

структуры

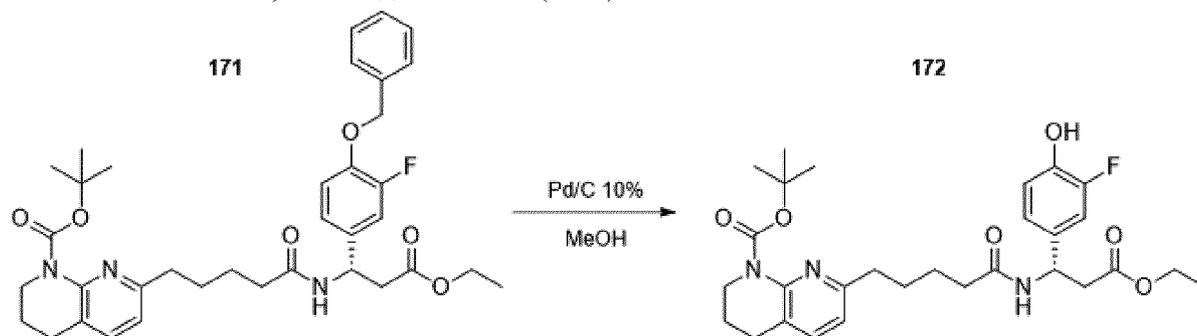
37с

((S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-

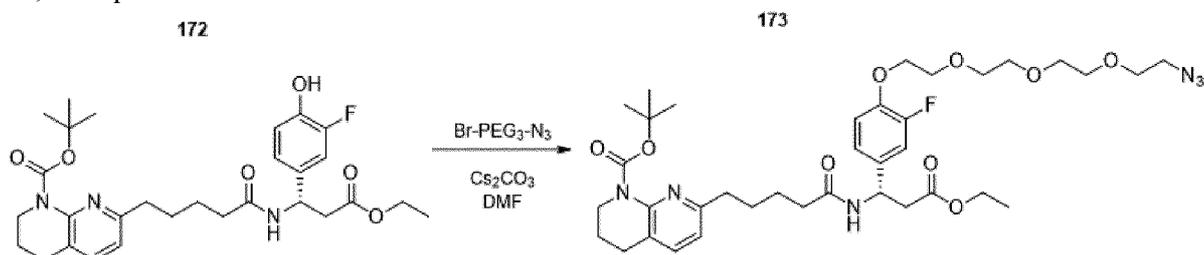
азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-3-фторфенил)-3-(5-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пентанамидо)пропановая кислота)



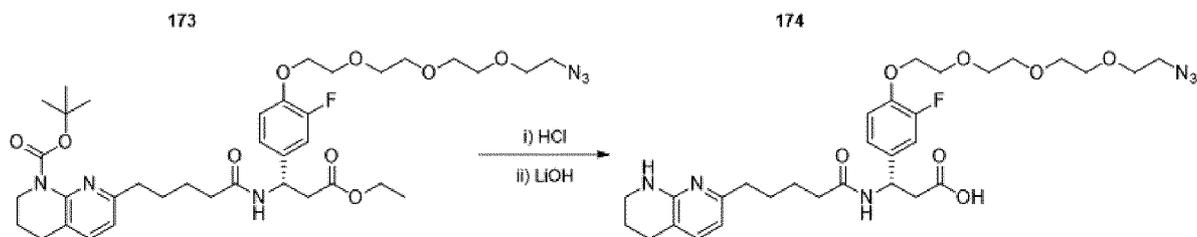
[0333] Соединение 169 (90 мг, 0,268 ммоль) в DMF (1,5 мл) обрабатывали HATU (112 мг, 0,295 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут. Затем добавляли смесь, содержащую соединение 170 (94 мг, 0,295 ммоль) и DIEA (0,154 мл, 0,884 ммоль) в DMF (0,5), и перемешивание продолжали в течение 1 часа. По завершении все летучие вещества удаляли, и соединение 171 выделяли путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM, с выходом 123 мг (72%).



[0334] Суспензию, содержащую 10% палладия на угле (21 мг, 0,0194 ммоль) и соединение 171 (123 мг, 0,194 ммоль) в MeOH (2 мл), заполняли водородом до 60 фунт/дюйм² (413,7 кПа) и перемешивали в течение 1 часа. По завершении суспензию фильтровали через Celite® и концентрировали с выходом 88 мг (83%) неочищенного продукта, который впоследствии использовали без дополнительной очистки.

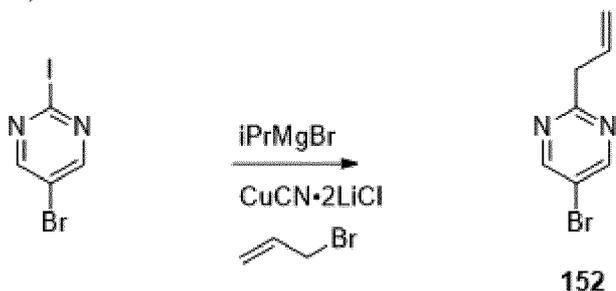


[0335] Суспензию, содержащую соединение 172 (87 мг, 0,160 ммоль), Br-PEG₃-N₃ (50 мг, 0,176 ммоль) и карбонат цезия (115 мг, 0,352 ммоль) в DMF (1 мл), нагревали до 60°C и перемешивали в течение 2 часов. По завершении все летучие вещества удаляли, и соединение 173 выделяли путем разделения с силикагелем, элюируя градиентом MeOH в DCM с выходом 91 мг (76%).

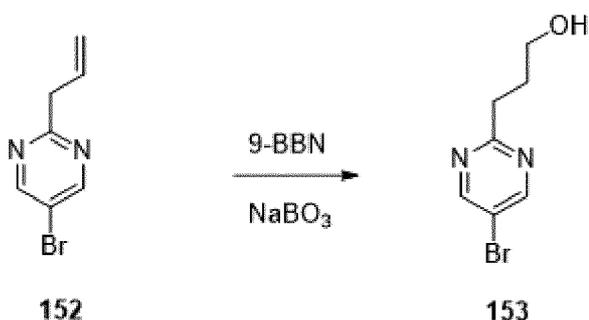


[0336] Соединение 173 (50 мг, 0,067 ммоль) в диоксане (0,5 мл) обрабатывали 4М раствором HCl (0,671 ммоль, 0,168 мл) в диоксане и перемешивали при 40°C в течение 3 часов. По завершении все летучие вещества удаляли. Неочищенный остаток растворяли в смеси H₂O (0,4 мл), THF (0,2 мл) и MeOH (0,4 мл), обрабатывали LiOH (8 мг, 0,356 ммоль), и перемешивали при 40°C в течение 16 часов. По завершении значение pH доводили до 3, используя TFA, и продукт выделяли путем разделения на колонке C18 Phenomenex Gemini (21,2×250 мм, 5 мкм), элюируя градиентом ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% TFA, с выходом 25 мг (60%, 2-этапа).

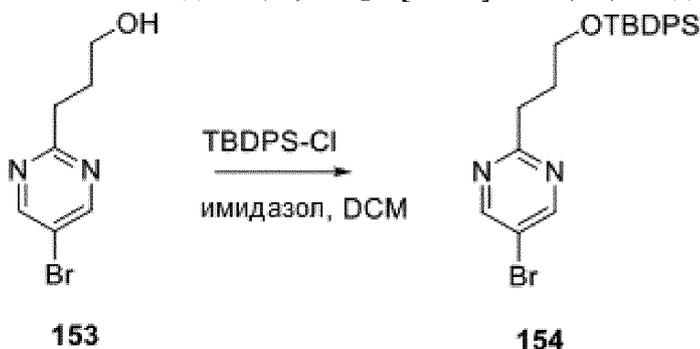
Синтез структуры 38с ((S)-3-(2-(3-((2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)амино)-3-оксопропил)пиримидин-5-ил)-9-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)нонановая кислота) и структуры 39с ((S)-3-(2-(1-азидо-12-оксо-3,6,9-триокса-13-азагексадекан-16-ил)пиримидин-5-ил)-9-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)нонановая кислота)



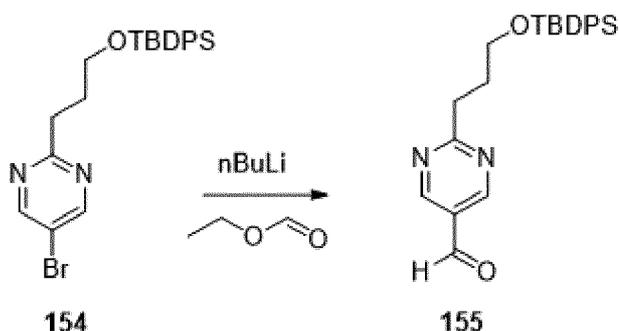
[0337] К раствору 5-бром-2-иодо-пиримидина (8,00 г, 28,1 ммоль) в безводном THF (95 мл) добавляли раствор *i*-PrMgBr в THF (0,75 М, 56 мл, 42,0 ммоль) при -78°C, при этом поддерживая внутреннюю температуру <-70°C (приблизительно 15 минут). Затем полученный раствор перемешивали в течение 15 минут перед добавлением раствора CuCN·2LiCl в THF (1 М, 31 мл, 31,0 ммоль) и затем аллилбромид (5,10 г, 42 ммоль) в виде раствора в THF (10 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением MeOH (40 мл) и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc в гексанах (0-20%). Выход соединения 152: 4,13 г (74%). Вычисленная масса для C₇H₇BrN₂ [M+H]⁺: 198,99, найденная: 199,05.



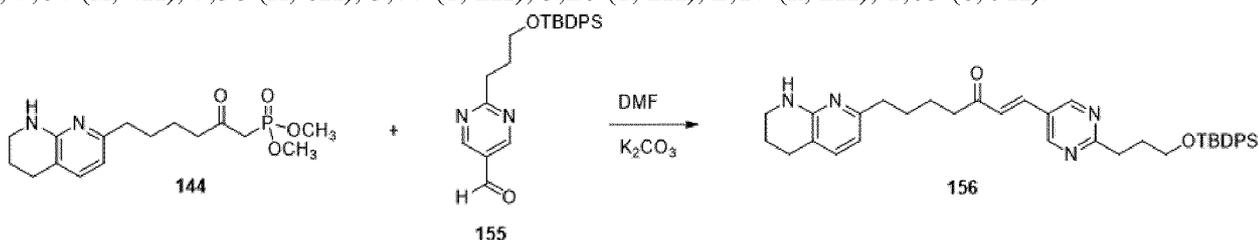
[0338] К раствору соединения 152 (7,70 г, 38,7 ммоль) в THF (115 мл) добавляли раствор 9-BBN в THF (0,5 М, 131 мл, 65,8 ммоль) при 0°C в течение 30 мин. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. К реакционной смеси добавляли суспензию NaHCO₃ (48,7 г, 580 ммоль) в воде (100 мл) с последующим добавлением суспензии NaBO₃ моногидрата (46,3 г, 464 ммоль) в воде (100 мл) при 0°C. Охлаждающую баню удаляли, и смесь интенсивно перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь переносили в разделительную воронку, и слои разделяли. Водный слой экстрагировали EtOAc (200 мл). Органические фазы объединяли промывали рассолом (100 мл). Слой с рассолом снова экстрагировали EtOAc (100 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с выходом ~15 г неочищенного продукта в виде желтого масла. Неочищенный продукт очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc в гексанах (50-100%). Выход соединения 153: 3,44 г (41%). Вычисленная масса для C₇H₉BrN₂O [M+H]⁺: 217,00, найденная: 216,97.



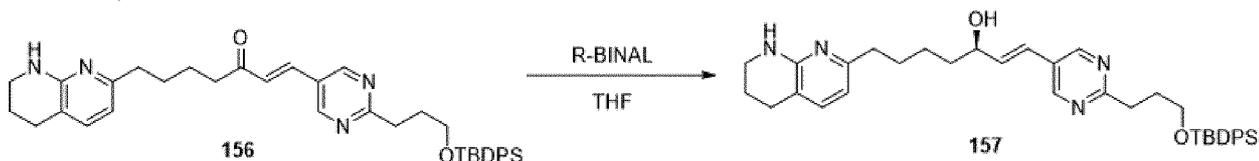
[0339] К раствору соединения 153 (3,44 г, 15,8 ммоль) в DCM (40 мл) добавляли имидазол (1,73 г, 25,4 ммоль) и раствор TBDPSCl (5,23 г, 19,0 ммоль) в DCM (12 мл) при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли DCM (75 мл), промывали водой (50 мл) и рассолом (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc (0-8%) в гексанах. Выход соединения 154: 5,56 г (77%). Вычисленная масса для C₂₃H₂₇BrN₂OSi [M+H]⁺: 455,12, найденная: 455,44.



[0340] К раствору соединения 154 (6,07 г, 13,3 ммоль) в THF (150 мл) при -75°C добавляли по каплям раствор nBuLi в THF (2,5 М, 5,6 мл, 14,0 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру $<-70^\circ\text{C}$ (приблизительно 10 мин). Через 3 минуты добавляли по каплям раствор этилформиата (1,04 г, 1,13 мл, 14,0 ммоль) в THF (5 мл), поддерживая внутреннюю температуру $<-70^\circ\text{C}$. Смесь перемешивали при -78°C в течение 20 мин, затем реакцию останавливали добавлением HCl в диоксане (4 М, 3,67 мл, 14,7 ммоль), и смесь дополнительно разбавляли THF (5 мл), поддерживая внутреннюю температуру $<-65^\circ\text{C}$. Охлаждающую баню удаляли, и реакционную смесь нагревали до температуры окружающей среды и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc в гексанах (0-20%). Выход соединения 155: 1,79 г (33%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 10,09 (с, 1H), 9,06 (с, 2H), 7,64 (м, 4H), 7,38 (м, 6H), 3,77 (т, 2H), 3,20 (т, 2H), 2,17 (к, 2H), 1,03 (с, 9H).



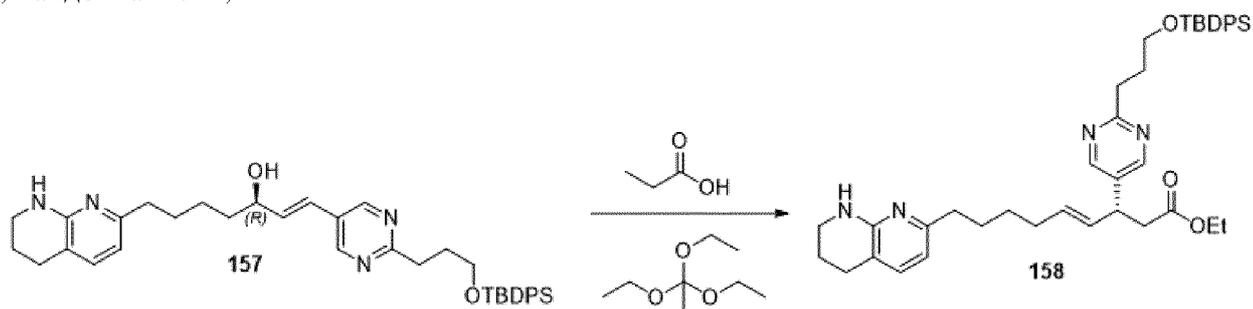
[0341] К раствору соединения 144 (1,68 г, 4,15 ммоль) и соединения 155 (1,70 г, 4,98 ммоль) в THF (25 мл) добавляли K_2CO_3 (0,861 г, 6,23 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 40°C в течение 2,5 часов, затем до 50°C в течение 12 часов. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (100 мл), промывали водой (50 мл) и рассолом (50 мл). Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc (0-100%) в гексанах, содержащих 1% триэтиламина. Выход соединения 156: 2,04 г (79%). Вычисленная масса для $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 619,35, найденная: 619,69.



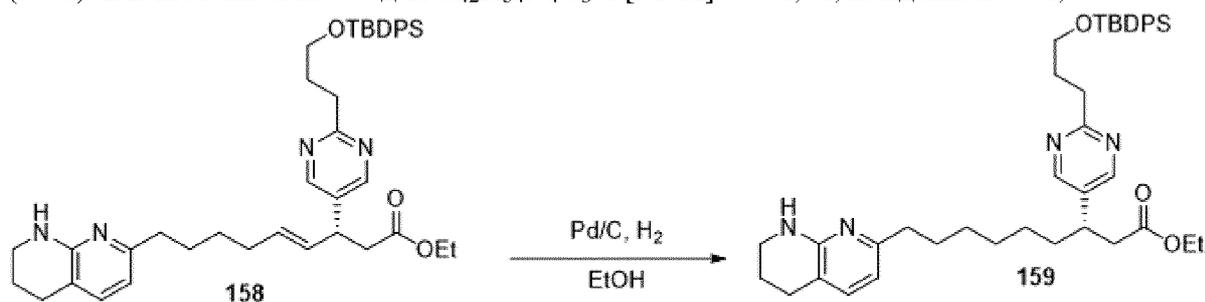
[0342] Приготовление R-BINAL: получали суспензию ЛАН (1,169 г, 30,8 ммоль) в сухом THF (90 мл). К суспензии добавляли EtOH в виде раствора в THF (6 М, 5,2 мл, 31,4

ммоль), поддерживая $T_{\text{int}} < 40^{\circ}\text{C}$. Смесь выдерживали при 35°C в течение 40 минут, затем охлаждали до 30°C . Добавляли раствор R-(BINOL) (9,00 г, 31,4 ммоль) в THF (45 мл), поддерживая $T_{\text{внутр.}} < 40^{\circ}\text{C}$. Смесь выдерживали при 50°C в течение 1 часа, охлаждали до температуры окружающей среды, затем нагревали до 50°C , и добавляли TMEDA (14,1 мл, 11,0 г, 94,3 ммоль). Смесь выдерживали при 50°C в течение 1 часа, охлаждали до температуры окружающей среды и затем использовали с соединением 156.

[0343] К раствору R-BINAL (~0,2 М, 110 мл, 22,0 ммоль) в THF добавляли раствор соединения 16 (1,16 г, 1,88 ммоль) в THF (12 мл) при -78°C в течение 5 минут. Через 30 минут реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора NH_4Cl , нагревали до комнатной температуры, и продукт экстрагировали EtOAc (3×125 мл). Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом MeOH (0-5%) в EtOAc, содержащем 1% триэтиламина. Выход соединения 157: 0,96 г (82%). Хиральную чистоту определяли аналитической хиральной ВЭЖХ на колонке Chiralpak AD-H, $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм, 25% EtOH, 75% гексаны, 0,1% диэтиламин, изократный, 2 мл/мин). Второй элюируемый изомер R имел чистоту ~95% по площади, что соответствовало ~90% ee. Вычисленная масса для $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 621,36, найденная: 621,71.

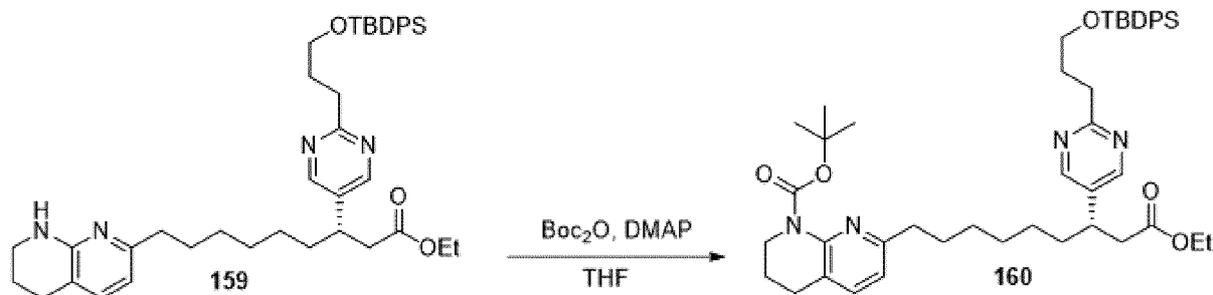


[0344] К раствору соединения 157 (0,925 г, 1,49 ммоль) в триэтилортоацетате (9,25 мл) добавляли раствор пропионовой кислоты в триметилортоацетате (0,15 М, 0,55 мл, 0,08 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 140°C в герметично закрытом флаконе в течение 1,5 часов. Реакционную смесь концентрировали, и осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc (0-50%) в гексанах, содержащих 1% триэтиламина. Выход соединения 158: 0,898 г (87%). Вычисленная масса для $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 691,41, найденная: 691,93.

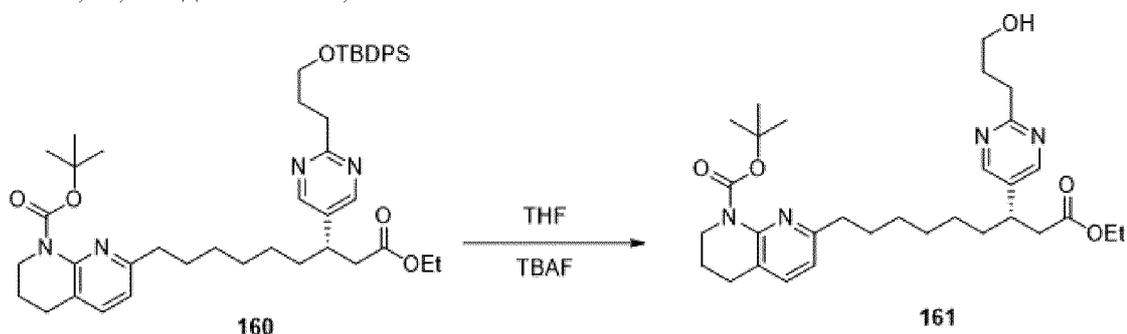


[0345] К раствору соединения 158 (0,893 г, 1,30 ммоль) в EtOH (10 мл) добавляли

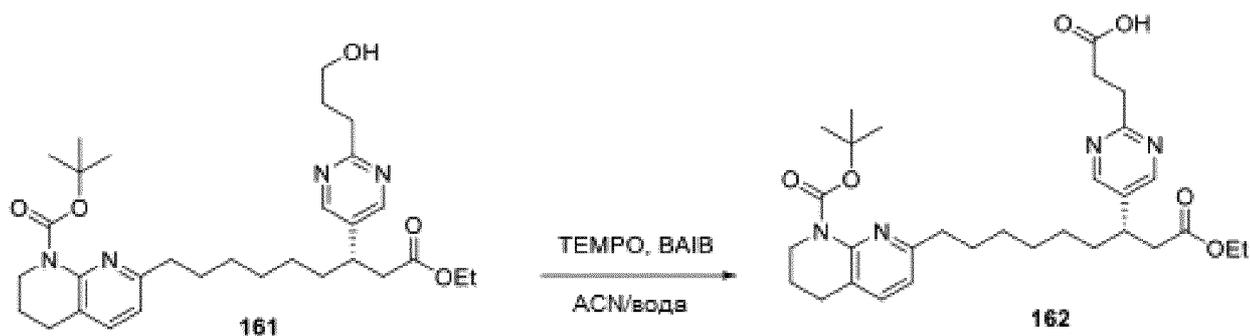
суспензию Pd/C (степень загрузки: 10 масс.%, 0,138 г, 0,13 ммоль) в EtOH (4 мл). Реакционную смесь загружали H₂ до 50 фунт/дюйм² (344,7 кПа) и перемешивали в течение 4,5 часов. Реакционную смесь фильтровали, концентрировали и использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. Выход соединения 159: 0,885 г (99%). Вычисленная масса для C₄₂H₅₆N₄O₃Si [M+H]⁺: 693,42, найденная: 693,82.



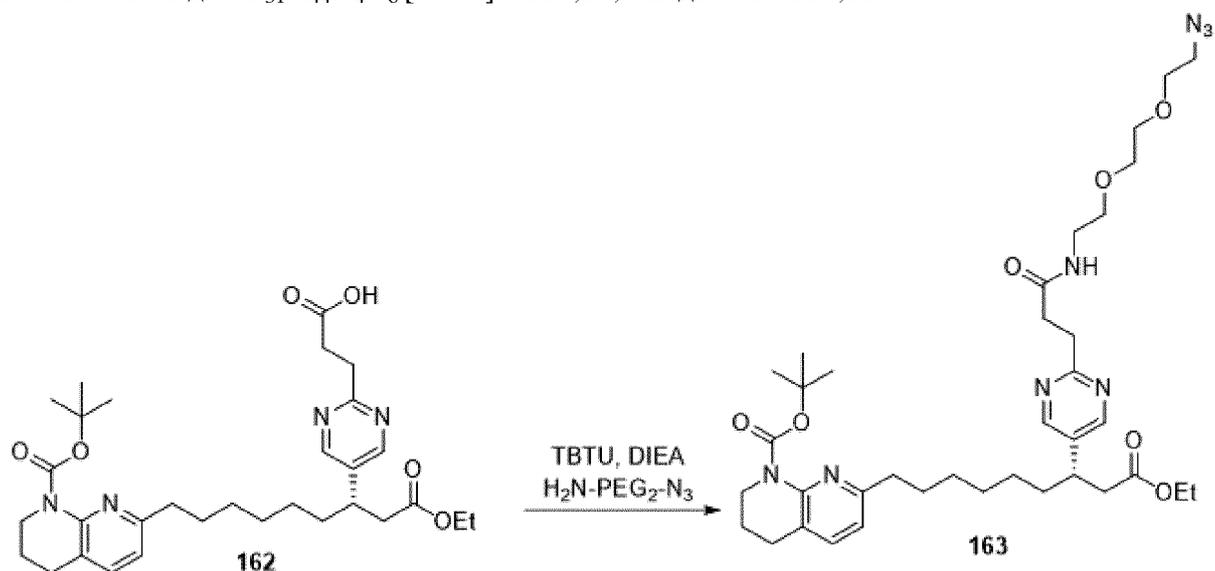
[0346] Раствор Voc ангидрида (0,836 г, 3,83 ммоль) в THF (2,5 мл) добавляли к соединению 159 (0,885 г, 1,28 ммоль) с последующим добавлением раствора DMAP (20 мг/мл в THF, 155 мкл, 0,0031 г, 0,026 ммоль). Смесь нагревали до 60°C в течение 6 часов. Реакционную смесь концентрировали, и осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc (0-50%) в гексанах. Выход соединения 160: 0,721 г (71%). Вычисленная масса для C₄₇H₆₄N₄O₅Si [M+H]⁺: 793,47, найденная: 794,28.



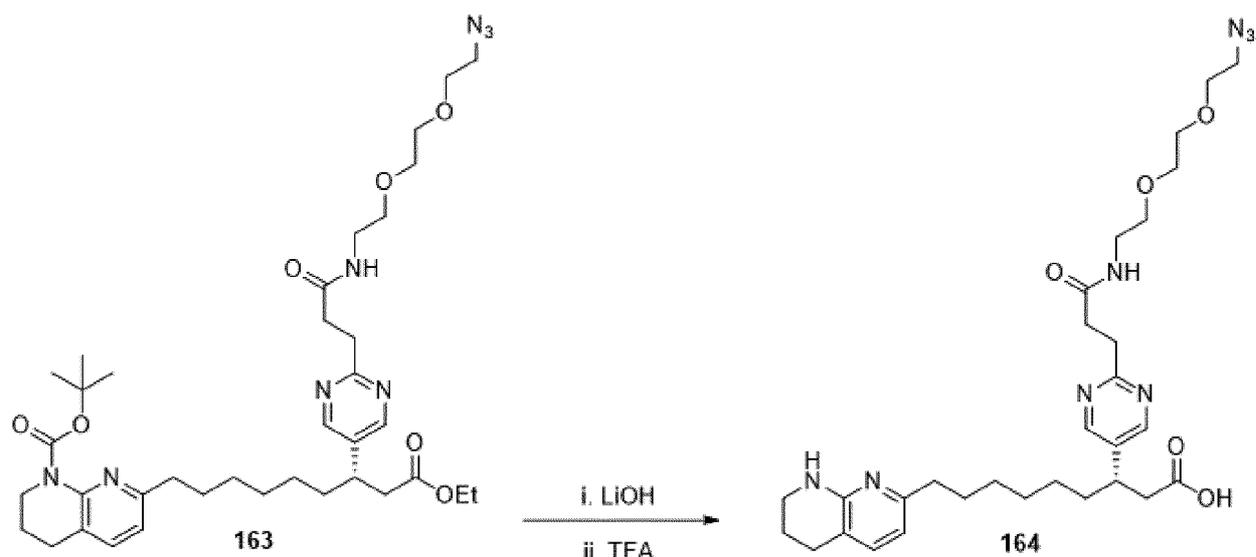
[0347] К раствору соединения 160 (0,621 г, 0,783 ммоль) в THF (6 мл) добавляли раствор TBAF в THF (1 M, 1,2 мл, 1,2 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (30 мл), промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl (2×10 мл). Органический слой концентрировали. Осадок очищали, используя систему CombiFlash с силикагелем в качестве стационарной фазы, элюируя градиентом EtOAc (50-100%) в гексанах. Выход соединения 21: 0,362 г (83%). Хиральную чистоту определяли аналитической хиральной HPLC на колонке Chiralpak AD-H, 4,6×250 мм, 5 мкм, 20% EtOH, 80% гексаны, 0,1% диэтиламин, изократный, 1,5 мл/мин. Второй элюируемый R-изомер имел чистоту 93%, что соответствовало 86% ee. Соединение 161 дополнительно очищали хиральной полупрепаративной ВЭЖХ (Chiralpak AD-H 21,2×250 мм, 5 мкм, 20% EtOH, 80% гексаны, 0,1% диэтиламин, 60 мл/мин). Окончательный выход соединения 161: 308 мг (99% ee). Вычисленная масса для C₃₁H₄₆N₄O₅ [M+H]⁺: 555,36, найденная: 555,72.



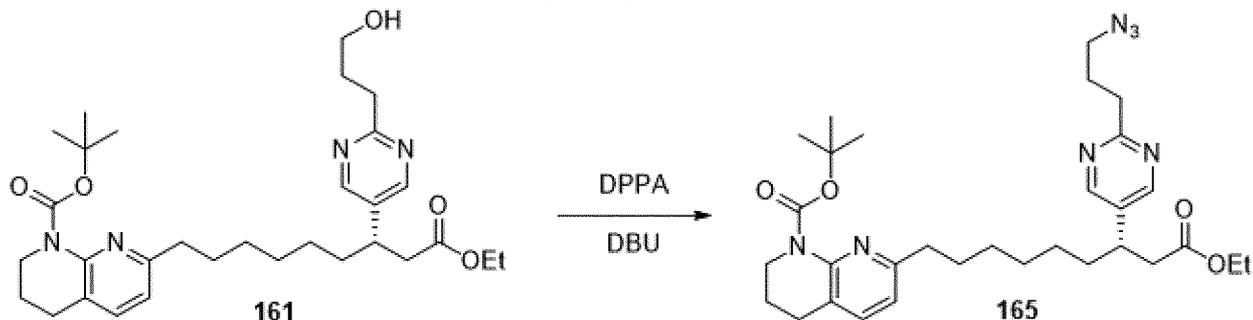
[0348] К раствору соединения 161 (0,030 г, 0,054 ммоль) в ACN (0,30 мл) добавляли VAIB (0,042 г, 0,130 ммоль) и TEMPO (2,5 мг, 0,016 ммоль) с последующим добавлением воды (0,30 мл) при комнатной температуре. Через 2 часа реакционную смесь концентрировали. Осадок очищали ОТ-ВЭЖХ (Phenomenex Gemini C18 21,2×250 мм, 5 мкм, 0,1% TFA вода/ACN, 30-80% ACN градиент). Выход соединения 162: 0,030 г (97%). Вычисленная масса для $C_{31}H_{44}N_4O_6 [M+H]^+$: 569,34, найденная: 569,68.



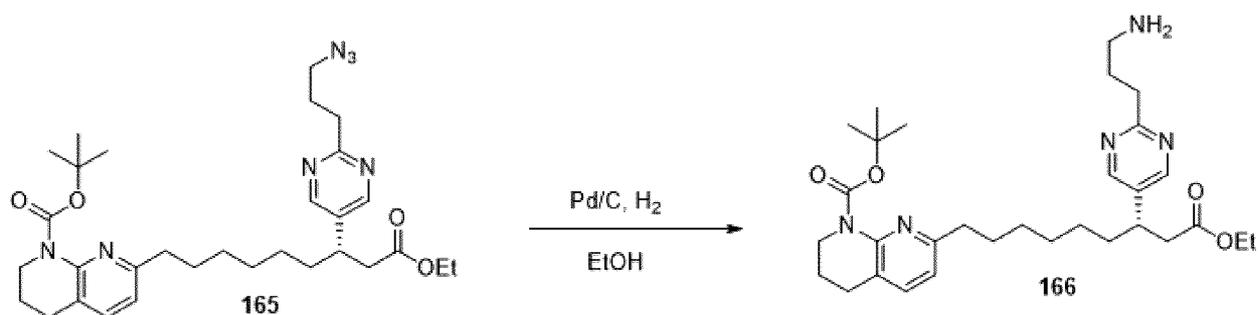
[0349] К раствору соединения 162 (33 мг, 0,058 ммоль) и амино-PEG₂-азида (15 мг, 0,087 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли TBTU (32 мг, 0,099 ммоль), затем DIEA (35 мкл, 26 мг, 0,203 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь концентрировали, и продукт, соединение 163, использовали на следующем этапе без очистки. Вычисленная масса для $C_{37}H_{56}N_8O_7 [M+H]^+$: 725,44, найденная: 725,77.



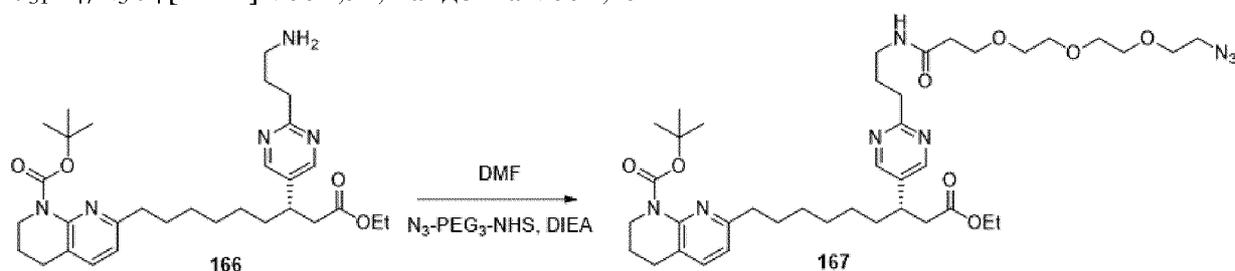
[0350] К раствору соединения 163 (42 мг, 0,058 ммоль) в THF (0,30 мл) добавляли 1М раствор LiOH (0,174 мл, 0,174 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 40°C в течение 1 часа. Добавляли дополнительную порцию LiOH (0,174 мл, 0,174 ммоль). Через 3 часа реакцию останавливали, и добавляли дополнительную порцию LiOH (0,174 мл, 0,174 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 2 часов (9 экв. LiOH, общее время - 5 часов). Реакционную смесь нейтрализовали до pH=5, используя 3N HCl, и концентрировали. Осадок растворяли в смеси TFA:вода [95:5] и перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали, и осадок очищали ОТ-ВЭЖХ (Phenomenex Gemini C18 21,2×250 мм, 5 мкм, вода/ACN, содержащая 0,1% TFA, 20-50% ACN градиент). Выход соединения 164 (Structure 38c): 23 мг (66%). Вычисленная масса для C₃₀H₄₄N₈O₅ [M+H]⁺: 597,35, найденная: 597,85.



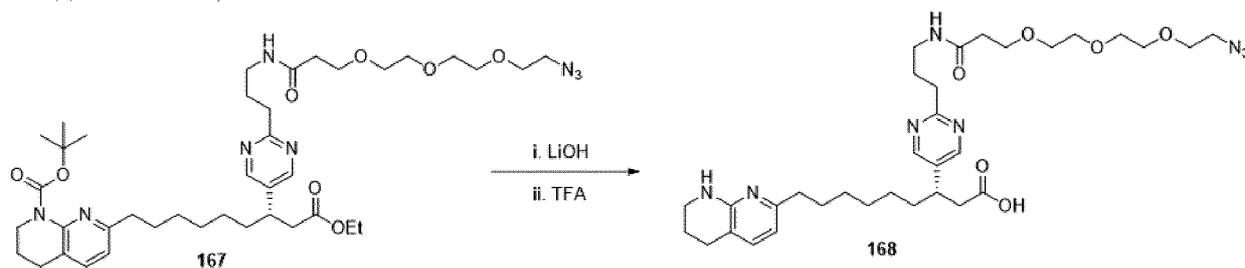
[0351] К раствору соединения 161 (30 мг, 0,054 ммоль) в THF (150 мкл) добавляли дифенилфосфорил азид (35 мкл, 45 мг, 0,162 ммоль) с последующим добавлением DBU (12 мкл, 12 мг, 0,081 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. На следующее утро реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 7 часов. Реакционную смесь концентрировали и очищали ОТ-ВЭЖХ (Phenomenex Gemini C18 21,2×250 мм, 5 мкм, 0,1% TFA вода/ACN, 32-60% ACN градиент). Выход соединения 165: 14 мг (44%). Вычисленная масса для C₃₁H₄₅N₇O₄ [M+H]⁺: 580,36, найденная: 580,66.



[0352] К раствору соединения 165 (18 мг, 0,031 ммоль) в EtOH (100 мкл) добавляли суспензию Pd/C (10% загрузка, 3,3 мг, 0,003 ммоль) в EtOH (170 мкл). Реакционный сосуд заполняли H₂, затем вакуумировали три раза и снова заполняли H₂ (1 атм.). Через 30 мин реакционную смесь фильтровали, концентрировали и использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. Выход соединения 166: 17 мг (99%). Вычисленная масса для C₃₁H₄₇N₅O₄ [M+H]⁺: 554,37, найденная: 554,73.



[0353] К раствору соединения 166 (17 мг, 0,031 ммоль) и сложного эфира азидо-PEG₃-NHS (14 мг, 0,040 ммоль) в DMF (170 мкл) добавляли DIEA (16 мкл, 12 мг, 0,092 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре, концентрировали и затем использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. Вычисленная масса для C₄₀H₆₂N₈O₈ [M+H]⁺: 783,48, найденная: 783,84.



[0354] К раствору соединения 167 (24 мг, 0,031 ммоль) в THF (180 мкл) добавляли 1M раствор LiOH (153 мкл, 0,153 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 40°C. Через 1 час добавляли дополнительную порцию LiOH (153 мкл, 0,153 ммоль, 5 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 асов при 40°C, затем при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь нейтрализовали до pH=5, используя 3N HCl и концентрировали. Остаток растворяли в смеси TFA:вода [95:5] и перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали, и осадок очищали ОТ-ВЭЖХ (Phenomenex Gemini C18 21,2×250 мм, 5 мкм, вода/ACN, содержащая 0,1% TFA, 15-45% ACN градиент). Выход соединения 168 (Structure 39c): 9,8 мг (49%).

Вычисленная масса для $C_{33}H_{50}N_8O_6 [M+H]^+$: 655,40, найденная: 656,01.

Пример 2. Синтез тридентатных нацеленных на интегрин лигандов, агентов РНКи, и конъюгация нацеленных на интегрин лигандов с карго-молекулами (агенты РНКи).

[0355] Нацеленные на интегрин лиганды могут быть конъюгированы с одним или более агентами РНКи, полезными для подавления экспрессии одного или более генов-мишеней в клетках, экспрессирующих интегрин. Раскрытые в настоящем описании нацеленные на интегрин лиганды обеспечивают доставку агентов РНКи к целевым клеткам и/или тканям. В приведенном выше примере 1 описан синтез некоторых нацеленных на интегрин лигандов, представленных в настоящем описании. Ниже описаны общие процедуры синтеза некоторых конъюгатов нацеленных на интегрин лигандов с агентами РНКи, которые проиллюстрированы в неограничивающих примерах, изложенных в настоящем описании.

[0356] А. *Синтез агентов РНКи.* Агенты РНКи могут быть синтезированы методами, хорошо известными в данной области. Для синтеза агентов РНКи, проиллюстрированных в приведенных в настоящем описании Примерах, смысловые и антисмысловые цепи агентов РНКи синтезировали согласно фосфорамидитному методу на твердой фазе, используемой в синтезе олигонуклеотидов. В зависимости от масштаба использовали MerMade96E® (Bioautomation), MerMade12® (Bioautomation) или OP Pilot 100 (GE Healthcare). Синтез выполняли на твердой подложке из стекла с контролируемым размером пор (CPG, 500 или 600 Å, от компании Prime Synthesis, Aston, PA, USA). Все РНК и 2'-модифицированные фосфорамидиты РНК приобретали у компании Thermo Fisher Scientific (Милуоки, Висконсин, США). В частности, использовали следующие 2'-О-метил фосфорамидиты: (5'-О-диметокситритил-N⁶-(бензоил)-2'-О-метил-аденозин-3'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропиламино)фосфорамидит, 5'-О-диметокси-третил-N⁴-(ацетил)-2'-О-метил-цитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропил-амино)фосфорамидит, (5'-О-диметокситритил-N²-(изобутирил)-2'-О-метил-гуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропиламино)фосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метил-уридин-3'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропиламино)фосфорамидит. 2'-Дезокси-2'-фтор-фосфорамидиты содержат такие же защитные группы, как и 2'-О-метил амидиты РНК. 5'-Диметокситритил-2'-О-метил-инозин-3'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропиламино)фосфорамидиты приобретали у компании Glen Research (Вирджиния). Инвертированные абазические (3'-О-диметокситритил-2'-дезоксирибоза-5'-О-(2-цианоэтил-N, N-диизопропиламино) фосфорамидиты приобретали у компании ChemGenes (Wilmington, Массачусетс, США). Использовали следующие UNA фосфорамидиты: 5'-(4,4'-диметокситритил)-N⁶-(бензоил)-2',3'-секо-аденозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N, N-диизопропил)]-фосфорамидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-ацетил-2',3'-секо-цитозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N, N-диизо-пропил)]-фосфорамидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-изобутирил-2',3'-секо-гуанозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N, N-диизопропил)]-фосфорамидит и 5'-(4,4'-диметокси-третил)-2',3'-секо-уридин, 2'-бензоил-

3'-[(2-цианоэтил)-(N, N-диизо-пропил)]-фосфорамидит. Также приобретали коммерчески доступные TFA-амиолинкер фосфорамидиты (ThermoFisher).

[0357] В некоторых примерах, раскрытые в настоящем описании, нацеленные на интегрин лиганды конъюгировали с агентами РНКи путем связывания компонентов с каркасом, содержащим триалкиновую группу, или с модифицированным нуклеотидом, содержащим группу пропаргила, как показано в таблице В выше. В некоторых примерах триалкиновую группу добавляли, используя триалкиновый фосфор, который может быть добавлен к 5'-концу смысловой цепи агента РНКи. При использовании в сочетании с агентами РНКи, представленными в некоторых примерах в настоящем описании, триалкин-содержащие фосфорамидиты растворяли в безводном дихлорметане или безводном ацетонитриле (50 мМ), в то время как все остальные амидиты растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ), и добавляли молекулярные сита (3Å). В качестве раствора активатора использовали 5-бензилтио-1Н-тетразол (ВТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ, 250 мМ в ацетонитриле). Время связывания составляло 10 минут (РНК), 90 секунд (2'О-Ме) и 60 секунд (2'F). Для введения фосфоротиоатных связей использовали 100 мМ раствор 3-фенил 1,2,4-дитиазолин-5-она (POS, приобретенный у компании PolyOrg, Inc., Leominster, Массачусетс, США) в безводном ацетонитриле.

[0358] В качестве альтернативы, когда нацеленные на интегрин лиганды конъюгированы с агентами РНКи через триалкиновый каркас, вместо использования фосфорамидитного подхода, триалкин-содержащие соединения могут быть введены постсинтетически (см., например, раздел Е ниже). При использовании в сочетании с агентами РНКи, представленными в определенных примерах, раскрытых в настоящем описании, при постсинтетическом присоединении триалкиновой группы к 5'-концу смысловой цепи 5'-концевой нуклеотид смысловой цепи функционализируют нуклеотидом, который содержит первичный амин на 5'-конце для облегчения присоединения к триалкин-содержащему каркасу. TFA-амиолинкер фосфорамидит растворяют в безводном ацетонитриле (50 мМ) и добавляют молекулярные сита (3Å). В качестве раствора активатора используют 5-бензилтио-1Н-тетразол (ВТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ, 250 мМ в ацетонитриле). Время связывания составляет 10 минут (РНК), 90 секунд (2'О-Ме) и 60 секунд (2'F). Для введения фосфоротиоатных связей используют 100 мМ раствор 3-фенил 1,2,4-дитиазолин-5-она (POS, приобретенный у компании PolyOrg, Inc., Leominster, Массачусетс, США) в безводном ацетонитриле.

[0359] В приведенных ниже примерах показана модифицированная нуклеотидная последовательность для синтезированных дуплексов:

Дуплекс AD04545:

Модифицированная последовательность антисмысловой цепи (5' → 3):
usUfsusCfaUfgAfaAfuCfgUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO: 1)

Модифицированная последовательность смысловой цепи (5' → 3): (NH2-C6)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb) (SEQ ID NO: 2)

Дуплекс AD04546:

Модифицированная последовательность антисмысловой цепи (5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfGUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO: 3)

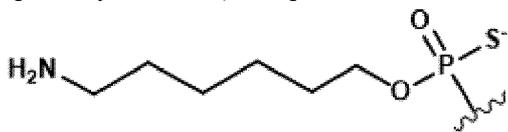
Модифицированная последовательность смысловой цепи (5' → 3): (NH2-C6)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb)(C6-S-Mal-X) (SEQ ID NO: 4)

Дуплекс AD05971:

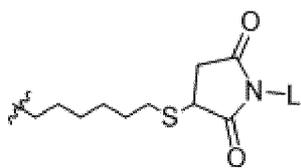
Модифицированная последовательность антисмысловой цепи (5' → 3): usUfsusCfaUfgAfaAfuCfGUfuAfcGfuUfsg (SEQ ID NO: 5)

Модифицированная последовательность смысловой цепи 5' → 3): (NH2-C6)scsaacguaaCfGfAfuuuAlkcaAlkugAlkaaAlksa(invAb)(C6-S-Mal-C18 двухосновный фрагмент) (SEQ ID NO: 6)

Для модифицированных нуклеотидных последовательностей, перечисленных выше, а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил аденозин, цитидин, гуанозин или уридин, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор аденозин, цитидин, гуанозин или уридин, соответственно; aAlk, cAlk, gAlk и uAlk представляют собой 2'-О-пропаргил аденозин, цитидин, гуанозин или уридин, соответственно; (invAb) представляет собой инвертированный абазический остаток (инвертированный абазический дезоксирибонуклеотид); s представляет собой фосфоротиоатную связь;



; и (C6-S-Mal-L) представляет собой:



, где L представляет собой цепь ПЭГ или этил, как указано в примерах ниже. Для вариантов осуществления, раскрытых в настоящем описании, инвертированные абазические основания вставлены в соответствующую цепь (в направлении 5'→3) таким образом, что 3' положение дезоксирибозы связано с 3' концом предыдущего мономера на соответствующей нити.

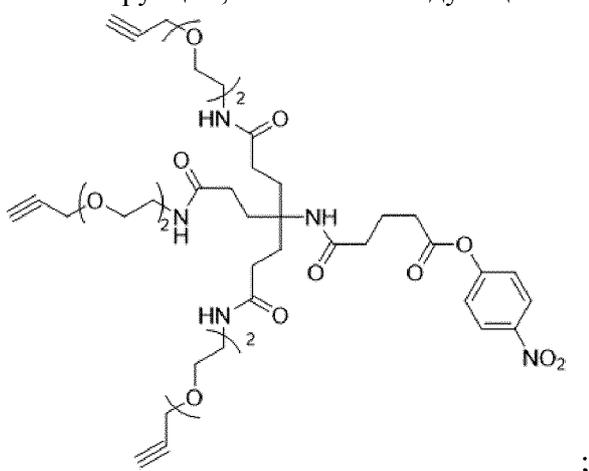
[0360] В. *Расщепление и снятие защиты с олигомера, связанного с носителем.* После завершения твердофазного синтеза высушенные твердые носители обрабатывали раствором, в 1:1 объемном отношении 40 мас.% метиламина в воде к 28%-31% раствора гидроксида аммония (Aldrich) в течение 1,5 часов при 30°C. Раствор упаривали, и твердый остаток восстанавливали в воде (см. ниже).

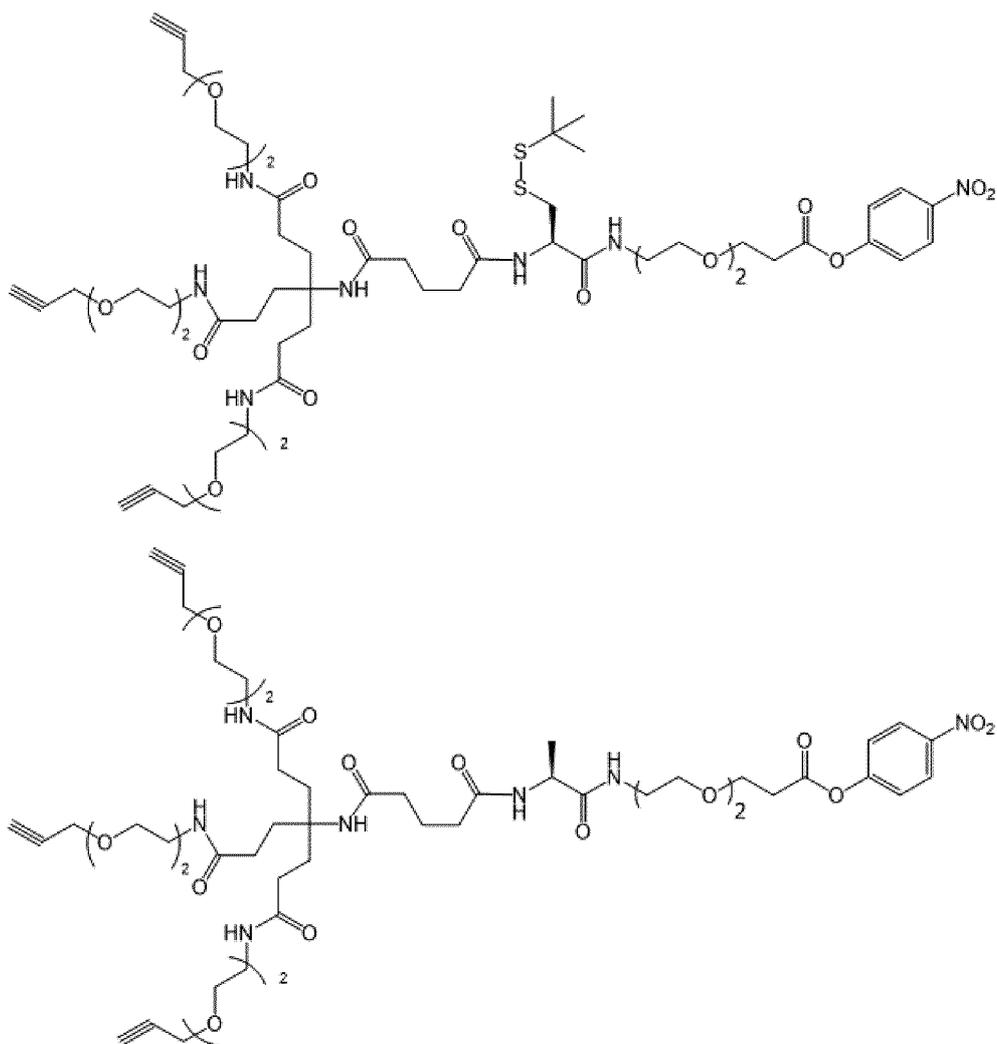
[0361] С. *Очитка.* Неочищенные олигомеры очищали анионообменной ВЭЖХ на 13 мкм колонке TSKgel SuperQ-5PW с помощью системы Shimadzu LC-8. Буфер А представлял собой 20 мМ Трис, 5 мМ EDTA, pH 9,0 и содержал 20% ацетонитрил; буфер

В был таким же, как буфер А, с добавлением 1,5 М хлорида натрия. Регистрировали УФ-следы при 260 нм. Соответствующие фракции объединяли, затем выполняли гель-фильтрацию на колонке GE Healthcare XK 16/40, заполненной Sephadex G25 fine, с 100 мМ бикарбоната аммония в качестве рабочего буфера, рН 6,7, и 20% ацетонитрила или фильтрованной воды.

[0362] *D. Отжиг.* Комплементарные цепи смешивали, объединяя эквимольные растворы РНК (смысловой и антисмысловой) в 1×PBS (фосфатно-солевой буфер, 1×, Corning, Cellgro) для образования агентов РНКи. Некоторые агенты РНКи лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25°C. Концентрацию дуплекса определяли путем измерения оптической плотности раствора на спектрометре UV-Vis в 1×PBS. Затем оптическую плотность раствора при 260 нм умножали на коэффициент конверсии и коэффициент разбавления для определения концентрации дуплекса. Используемый коэффициент конверсии составлял 0,037 мг/(мл·см), или, в качестве альтернативы, для некоторых экспериментов коэффициент конверсии вычисляли из экспериментально определенного коэффициента экстинкции.

[0363] *E. Конъюгация триалкинового каркаса.* 5'- или 3'-амин-функционализованная смысловая цепь агента РНКи может быть конъюгирована с триалкиновым каркасом либо до, либо после отжига. Примеры триалкиновых каркасных структур, которые могут быть использованы при формировании раскрытых в настоящем описании конструкций, включают следующие:



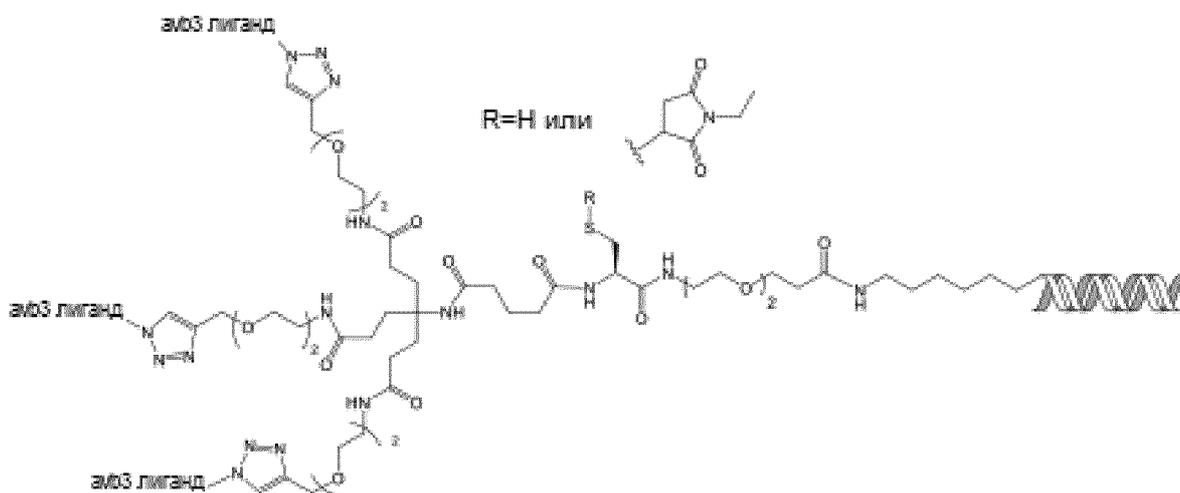


[0364] Ниже описана конъюгация триалкинового каркаса с гибридным дуплексом: амин-функционализированный дуплекс растворяли в 90% DMSO/10% H₂O в количестве ~50-70 мг/мл. Добавляли 40 экв. триэтиламина, с последующим добавлением 3 экв. три-алкин-PNP. После завершения конъюгат дважды осаждали в системе растворителей 1х фосфатно-солевой буфер/ацетонитрил (соотношение 1:14) и сушили.

[0365] *F. Конъюгация нацеленных на интегрин лигандов.* 5'- или 3'-тридентный алкин-функционализированную смысловую цепь конъюгируют с нацеленными на интегрин лигандами либо до, либо после отжига. В приведенном ниже примере описана конъюгация лигандов, нацеленных на интегрин $\alpha v\beta 3/5$, с гибридным дуплексом: Маточные растворы 0,5М трис(3-гидроксипропилтриазилилметил)амин (ТНРТА), 0,5М пентагидрата сульфата Cu (II) (Cu(II)SO₄·5H₂O) и 2М раствор аскорбата натрия готовили в деионизированной воде. Готовили раствор нацеленного на интегрин лиганда в ДМСО с концентрацией 75 мг/мл. В 1,5 мл центрифужную пробирку с дуплексом с триалкиновыми функциональными группами (3 мкг, 75 мкл, 40 мг/мл в деионизированной воде, ~15 000 г/моль) добавляли 25 мкл 1М буфера Hepes, pH 8,5. После встряхивания добавляли 35 мкл DMSO, и раствор встряхивали. К реакционной смеси (6 экв./дуплекс, 2 экв./алкин, ~15мкл) добавляли нацеленный на интегрин лиганд, и раствор встряхивали. Используя pH-бумагу, проверяли pH и подтверждали, что значение pH составляет ~8. В отдельной

1,5 мл центрифужной пробирке смешивали 50 мкл 0,5М ТНРТА с 10 мкл 0,5М $\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, пробирку встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Через 5 мин в пробирку с реакционной смесью добавляли раствор ТНРТА/Cu (7,2 мкл, 6 экв. 5:1 ТНРТА:Cu) и встряхивали. Сразу после этого к реакционной смеси в пробирке добавляли 2М аскорбат (5 мкл, 50 экв. на дуплекс, 16,7 на алкин) и перемешивали. После завершения реакции (обычно через 0,5-1 час) реакционную смесь сразу очищали анионообменной хроматографией в неденатурирующих условиях.

[0366] *G. Функционализация тиоловой группы на цистеиновом линкере.* В некоторых вариантах осуществления можно использовать цистеиновый линкер для облегчения конъюгации нацеленных на интегрин лигандов с агентом РНКи. Либо до, либо после отжига 5'- или 3'-триденатную алкин-Cys(Stbu)-PEG₂-функционализированную смысловую цепь функционализируют малеимид-содержащей группой, или ее можно восстановить и оставить в виде свободного тиола, как показано на приведенной ниже структуре:



[0367] В приведенном ниже примере описана модификация три-алкин-Cys(Stbu)-PEG₂-дуплекса N-этил малеимидом: Три-алкин-Cys(Stbu)-PEG₂-дуплекс (35 мг) растворяли в 500 мкл деионизированной H₂O. К реакционной смеси добавляли буфер HEPES (1М, pH 8,5, 82 мкл), и раствор встряхивали. Добавляли раствор 1М дитиотреитола (DTT, 100 экв., 236 мкл), и раствор помещали на вихревой шейкер на 3 часа. После подтверждения восстановления дисульфида ОТ-ВЭЖХ в денатурирующих условиях конъюгат трижды осаждали в системе растворителей 1x фосфатно-солевой буфер/ацетонитрил (соотношение 1:14). Выпавший осадок восстанавливали в 0,5 мл 0,1М HEPES, pH 6,5, и к раствору добавляли N-этил малеимид (3 мг, 10 экв.) и помещали в вихревой смеситель на ~15 мин. После завершения реакции конъюгат трижды осаждали в системе растворителей 1x фосфатно-солевой буфер/ацетонитрил (соотношение 1:14), обессоливали и сушили.

Пример 3. Связывающая активность нацеленных на интегрин лигандов

[0368] Как показано в приведенной ниже таблице 1, для нацеленных на интегрин

лигандов, структур 1с, 2с и 3с, а также для RGD пептидомиметика получали данные по связыванию, IC_{50} :

Таблица 1. Активность связывания, IC_{50} .

Группа	IC_{50} (нМ)		
	$\alpha\nu\beta 3$	$\alpha\nu\beta 5$	$\alpha\nu\beta 6$
Структура 1с	0,3	0,6	5,3
Структура 2с	0,3	5,6	8,9
Структура 3с	0,8	1,8	81
RGD-пептидомиметик	1,6	2,5	81

[0369] Как показано в таблице 1 выше, каждая из структур 1, 2 и 3 демонстрирует сильное связывание с интегрином $\alpha\nu\beta 3$ и интегрином $\alpha\nu\beta 5$, при этом структуры 2 и 3, например, продемонстрировали особо предпочтительное связывание с интегрином $\alpha\nu\beta 3$ ($IC_{50}=0,3$ нМ и 0,8 нМ, соответственно). Кроме того, каждая из структур 1, 2 и 3 продемонстрировала немного увеличенную активность связывания с интегрином $\alpha\nu\beta 3$ по сравнению с RGD пептидомиметиком (см., например, структуры лиганда на основе RGD-миметика, раскрытые в патенте США № 9,487,556). Более того, несмотря на наличие связывающей активности у лиганда на основе RGD-миметика, нацеленные на интегрин лиганды по настоящему изобретению демонстрируют повышенную стабильность как в сыворотке крови *in vivo*, так и химическую стабильность *ex vivo*, по сравнению с лигандами на основе RGD-пептидомиметика.

Пример 4. Мышиная модель опухоли почки (ортотопический ксенотрансплантат).

Создание SEAP-экспрессирующих клеток почечно-клеточной карциномы (ccRCC) A498

[0370] Вектор экспрессии pCR3.1, экспрессирующий репортерный ген секретлируемой щелочной фосфатазы (SEAP) под управлением CMV-промотора, получали путем направленного клонирования кодирующей последовательности SEAP, амплифицированной ПЦР, из pSEAP2-базового вектора компании Clontech. К праймерам, используемым для амплификации кодирующей последовательности SEAP (Invitrogen) добавляли удобные для клонирования в вектор pCR3.1 сайты рестрикции. Полученную конструкцию pCR3-SEAP использовали для создания линии клеток A498 ccRCC, экспрессирующих SEAP. Вкратце, плазмиду pCR3-SEAP трансфицировали в клетки ccRCC A498 путем электропорации в соответствии с рекомендациями производителя. Стабильные трансфектанты отбирали по устойчивости к G418. Отобранные клоны A498-SEAP оценивали на экспрессию SEAP и стабильность интеграции.

Имплантация экспрессирующих SEAP клеток светлоклеточной почечно-клеточной карциномы (ccRCC) A498.

[0371] Самок бестимусных голых мышей анестезировали ~3% изофлуорана и клали на правый бок. На левом боку делали небольшой, 0,5-1 см, продольный разрез брюшной

полости. Используя влажный ватный тампон, левую почку извлекли из брюшины и осторожно стабилизировали. Непосредственно перед инъекцией шприц объемом 1,0 мл заполняли смесью клетки/матригель, и к кончику шприца прикрепляли игольчатый катетер 27 размера. Затем заполненный шприц присоединяли к шприцевому насосу (Harvard Apparatus, модель PHD2000) и прокачивали для удаления воздуха. Наконечник игольчатого катетера 27-го размера, прикрепленный к шприцу, вводили чуть ниже почечной капсулы рядом с каудальным полюсом, и затем кончик иглы осторожно продвигали краниально вдоль капсулы на 3-4 мм. Аликвоту 10 мкл 2:1 (об.:об.) смеси клетки/Matrigel®, содержащей примерно 300000 клеток, медленно вводили в паренхиму почек с помощью шприцевого насоса. Иглу оставляли в почке на 15-20 сек для завершения инъекции. Затем иглу извлекали из почки, и помещали ватный тампон над местом инъекции на 30 секунд для предотвращения утечки клеток или кровотечения. Затем почку осторожно помещали обратно в брюшную полость, и брюшную стенку закрывали. Сыворотку собирали каждые 7-14 дней после имплантации для мониторинга роста опухоли с помощью коммерческого набора для анализа SEAP. Для большинства исследований мышей с опухолями использовали через 5-6 недель после имплантации, когда размеры опухоли обычно составляли примерно 4-8 мм.

Определение экспрессии мРНК HIF2.

[0372] Для исследований, представленных в примерах в настоящем описании, через сутки после инъекции мышей умерщвляли, и выделяли общую РНК из опухоли почки с помощью реагента Тризол в соответствии с рекомендациями производителя. Относительные уровни мРНК Hif2 α определяли с помощью ОТ-кПЦР, как описано ниже, и сравнивали только с мышами, обработанными буфером для доставки (изотоническая глюкоза).

[0373] При подготовке к количественной ПЦР общую РНК выделяли из образцов тканей, гомогенизированных в TriReagent (Molecular Research Center, Цинциннати, Огайо) в соответствии с протоколом производителя. Приблизительно 500 нг РНК подвергали обратной транскрипции с помощью набора для обратной транскрипции High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Экспрессию человеческого (опухолевого) Hif2 α (EPAS1) анализировали с помощью приобретенных зондов TaqMan для анализа экспрессии гена человеческого Hif2 α (Каталожный № 4331182) и CysA (PPIA) (Каталожный №: 4326316E) в реакциях биплекс в трех экземплярах, используя смесь TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) или смесь VeriQuest Probe Master Mix (Affymetrix). Количественную ПЦР выполняли с помощью системы ПЦР в реальном времени 7500 Fast или StepOnePlus (Life Technologies). Для расчета относительной экспрессии генов использовали метод $\Delta\Delta C_T$.

Пример 5. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа (EPAS1), мышам с опухолью почки.

[0374] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь,

синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи включали антисмысловую цепь, имеющую последовательность азотистых оснований, по меньшей мере, частично комплементарную гену HIF-2 альфа (Hif2 α или EPAS1). EPAS1 является членом семейства генов HIF (фактора, индуцируемого гипоксией) и кодирует половину фактора транскрипции, участвующего в индукции генов, регулируемых кислородом. Его индукция происходит при падении уровня кислорода (состояние, известное как гипоксия) и, как известно, он часто сверхэкспрессируется в клетках светлоклеточного рака почек. Агенты РНКи Hif2 α разрабатывали таким образом, чтобы они были способны разрушать или подавлять трансляцию транскриптов матричной РНК (мРНК) Hif2 α специфическим для последовательности образом, тем самым подавляя экспрессию гена EPAS1. Агенты РНКи Hif2 α состояли из модифицированных нуклеотидов и более чем одной нефосфодиэфирной связи.

[0375] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

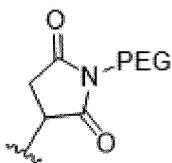
Таблица 2. Группы дозирования мышей с опухолью почки в примере 5.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (5% декстроза в воде (d5w)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
2	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с фрагментом ПЭГ 40 килодальтон (кДа) (без присоединенного нацеленного на интегрин лиганда).	Одна инъекция в день 1
3	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с лигандом на основе RGD-пептидомиметика, и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
4	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин лигандом структуры 1a, и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1

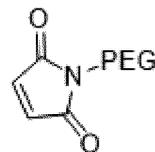
Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
5	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин лигандом структуры 2a, и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
6	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с четырьмя нацеленными на интегрин лигандами структуры 2a (т.е., тетрадентатной нацеленной группой), и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
7	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04545), конъюгированного с кластером, содержащим четыре нацеленных на интегрин лиганда структуры 2a (т.е., тетрадентатной нацеленной группой) (без фрагмента ПЭГ).	Одна инъекция в день 1
8	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин лигандом структуры 2a, и дополнительно включающего 20 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1

[0376] Агенты РНКи в примере 5 синтезировали с нуклеотидными последовательностями, направленными для нацеливания на ген человеческого Hif2 α , и вводили функционализированную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C₆) на 5'-терминальном конце смысловой цепи для облегчения конъюгации с нацеленными на интегрин лигандами (или, в случае группы 3, с лигандом на основе RGD-пептидомиметика). Модифицированные последовательности агентов РНКи показаны в примере 2 выше. Для групп 4 и 5 единственный нацеленный на интегрин лиганд (называемый в настоящем описании «монодентатным» лигандом), конъюгировали с агентом РНКи через линкер сложного эфира DBCO-PEG₅-NHS (BroadPharm), который конъюгировали с терминальным первичным амином на 5'-терминальном конце смысловой цепи. Соответствующие нацеленные на интегрин лиганды синтезировали с использованием реакционноспособной азидогруппы (см., например, пример 1), которую затем конъюгировали с компонентом DBCO линкера.

[0377] Синтезировали агенты РНКи, содержащие модулятор РК, называемый «20 кДа фрагмент ПЭГ» или «40 кДа фрагмент ПЭГ», имеющий структуру:

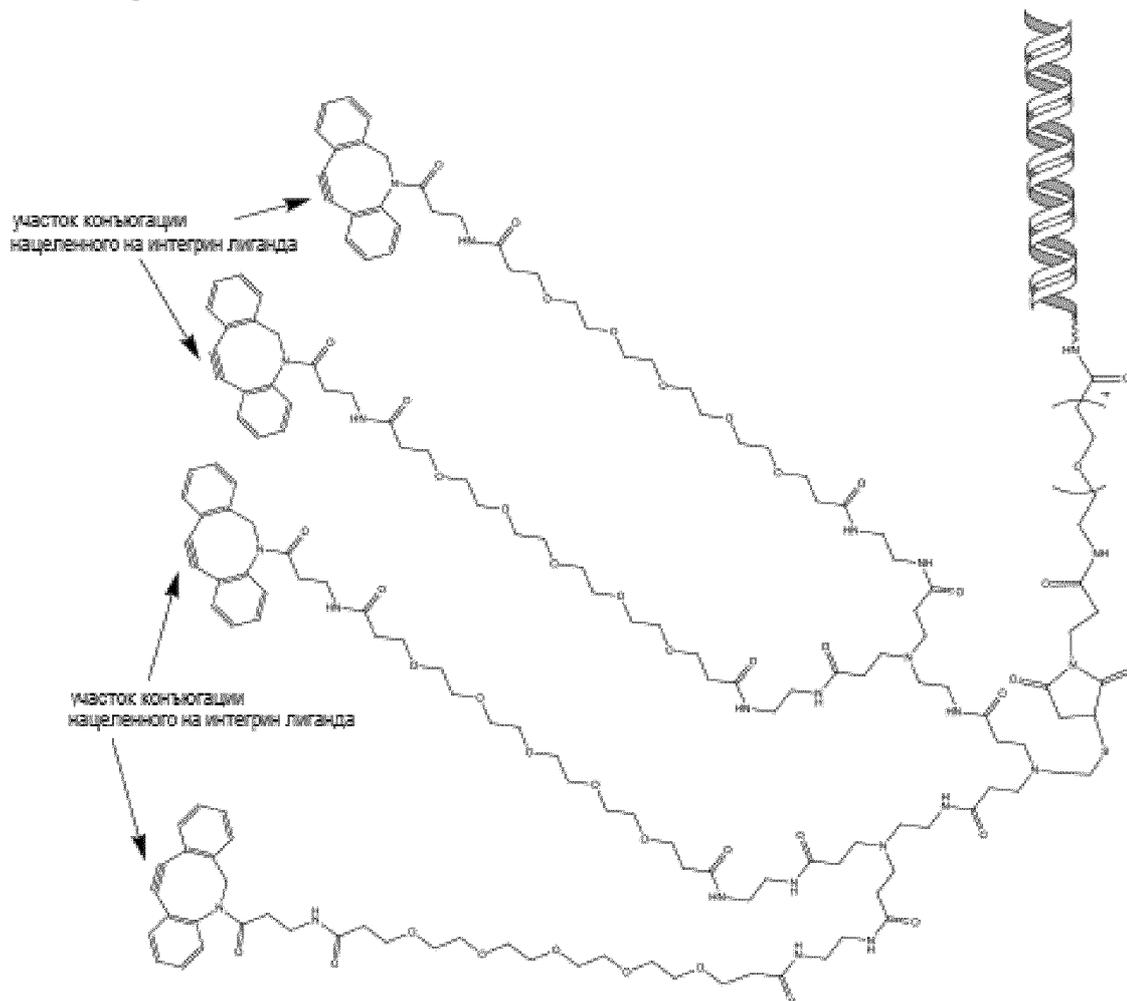


, где указывает точку присоединения к агенту РНКи в С6-S-группе, как указано в AD04546 (см. пример 2), и ПЭГ означает 20 КДа или 40 КДа цепь ПЭГ. Модулятор РК конъюгировали с 3'-концом смысловой цепи путем восстановления С6-SS-С6 группы, как показано в таблице А, который затем использовали в реакции



присоединения по Михаэлю со следующим соединением: , где ПЭГ означает 20 КДа или 40 кДа цепь ПЭГ.

[0378] В случае групп 6 и 7 четыре нацеленных на интегрин лиганда конъюгировали через тетраденатный каркас, который включал DBCO-функционализированное ядро цистамина РАМАМ-G1 общей структуры, представленной следующим образом:



[0379] Как указано в Таблице 2 выше, в некоторых группах присоединяли 40 или 20 кДа фрагмент ПЭГ, который служил в качестве усилителя РК для увеличения времени циркуляции конъюгата с лекарственным препаратом. 40 кДа или 20 кДа фрагмент ПЭГ присоединяли с использованием реагента формулы:

[0380] Дозу вводили трем (3) мышам с опухолью в каждой группе (n=3). Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зондов (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза) (геометрическое среднее, +/-95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 3. Средняя относительная экспрессия мРНК huHif2 α на момент умерщвления в примере 5.

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,069	0,074
Группа 2 (7,5 мг/кг агента РНК) (без лиганда, 40 кДа ПЭГ)	0,563	0,016	0,017
Группа 3 (7,5 мг/кг агента РНК-лиганда на основе RGD-пептидомиметика, 40 кДа ПЭГ)	0,400	0,087	0,112
Группа 4 (7,5 мг/кг агента РНК-нацеленного на интегрин лиганда структуры 1а, 40 кДа ПЭГ)	0,390	0,027	0,029
Группа 5 (7,5 мг/кг агента РНК-нацеленного на интегрин лиганда структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)	0,308	0,061	0,077
Группа 6 (7,5 мг/кг агента РНК-тетраденатная нацеленная группа нацеленного на интегрин лиганда структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)	0,289	0,069	0,091
Группа 7 (7,5 мг/кг агента РНК-тетраденатная нацеленная группа нацеленного на интегрин лиганда структуры	0,589	0,050	0,054

2а)			
Группа 8 (77,5 мг/кг агента РНК-нацеленного на интегрин лиганда структуры 2а, 20 кДа ПЭГ)	0,647	0,098	0,115

[0381] Как показано в таблице 3 выше, каждый из агентов РНКи Hif2 α показал снижение экспрессии мРНК у мышей по сравнению с контролем. Включение 40 кДа фрагмента ПЭГ в качестве усилителя РК как правило улучшает подавление экспрессии гена-мишени. Более того, сравнение групп 3, 4 и 5 показало, что раскрытый в настоящем описании нацеленный на интегрин лиганд структуры 1а сопоставим с лигандом на основе RGD-пептидомиметика, который, как известно, имеет сродство к $\alpha v \beta 3$, при этом лиганд структуры 2а показал почти 10% улучшение по нокдауну по сравнению с лигандом на основе RGD-пептидомиметика. Например, группа 3 (RGD-миметик) имела приблизительно 60% нокдаун (0,400); группа 4 (структура 1а) имела приблизительно 61% нокдаун (0,390); и группа 5 (структура 2а) имела приблизительно 69% нокдаун (0,308).

[0382] Важно отметить, что эти данные также продемонстрировали зависимость от лиганда, поскольку включение нацеленного на интегрин лиганда, раскрытого в настоящем описании, показало улучшение по сравнению с той же конструкцией без лиганда. Например, группа 6 (тридентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а) продемонстрировала приблизительно 72% нокдаун (0,289) по сравнению с группой 2 (без нацеленного на интегрин лиганда), которая показала только приблизительно 44% нокдаун (0,563).

[0383] Кроме того, группа 6 показала небольшое улучшение по сравнению с группой 5, что указывает на некоторое предпочтение полидентатного лиганда относительно монодентатного лиганда; однако обе формы были активными и доставляли агент РНКи в почки (о чем свидетельствует подавление экспрессии генов агентом РНКи).

Пример 6. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки.

[0384] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

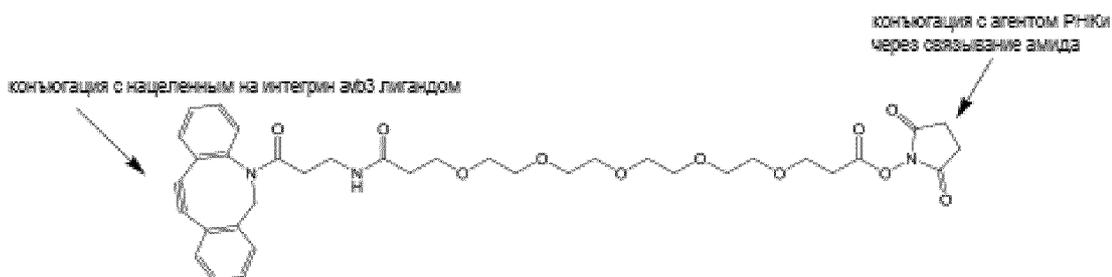
[0385] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Таблица 4. Группы дозирования мышей с опухолью почки в примере 6.

Групп	Агент РНКи и доза	Режим
-------	-------------------	-------

а		дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w) (без РНКи агента)	Одна инъекция в день 1
2	30 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с лигандом на основе RGD-пептидомиметика и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
3	15 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с лигандом на основе RGD-пептидомиметика и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
4	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с лигандом на основе RGD-пептидомиметика и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
5	30 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
6	15 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1

[0386] Синтезировали агенты РНКи, имеющие нуклеотидные последовательности, направленные для нацеливания на ген человеческого Hif2 α и вводили функционализированную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C₆) на 5'-терминальном конце смысловой цепи для облегчения конъюгации с нацеленными на интегрин лигандами (или, в случае групп 2, 3 и 4, с RGD-пептидомиметиком). В случае групп 5 и 6, с агентом РНКи конъюгировали один нацеленный на интегрин лиганд («монодентатный» лиганд) через приведенный ниже сложный эфир DBCO-PEG₅-NHS:



[0387] Трём (3) мышам с опухолью каждой группы ($n=3$) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессии человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза) (геометрическое среднее, $\pm 95\%$ доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 5. Средняя относительная экспрессия мРНК человеческого Hif2 α на момент умерщвления в примере 6.

ИД группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,072	0,078
Группа 2 (30 мг/кг агент РНКи-лиганд на основе RGD-пептидомиметика, 40 кДа ПЭГ)	0,300	0,041	0,047
Группа 3 (15 мг/кг агент РНКи-лиганд на основе RGD-пептидомиметика, 40 кДа ПЭГ)	0,330	0,080	0,106
Группа 4 (7,5 мг/кг агент РНКи-лиганд на основе RGD-пептидомиметика, 40 кДа ПЭГ)	0,446	0,068	0,080
Группа 5 (30 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)	0,198	0,007	0,007
Группа 6 (15 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)	0,271	0,012	0,012

[0388] Как показано в таблице 5 выше, каждый из агентов РНКи Hif2 α показал снижение экспрессии мРНК по сравнению с контролем. Более того, группы 5 и 6, которые содержали нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а, раскрытые в настоящем описании, показали улучшение нокдауна мРНК Hif2 α по сравнению с лигандами на основе RGD-пептидомиметика групп 2 и 3 (например, при сравнении группы 6

(приблизительно 73% нокдаун при дозе 15 мг/кг агента РНКи (0,271)) с группой 3 (приблизительно 67% нокдаун при дозе 15 мг/кг агента РНКи (0,330)).

Пример 7. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки.

[0389] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

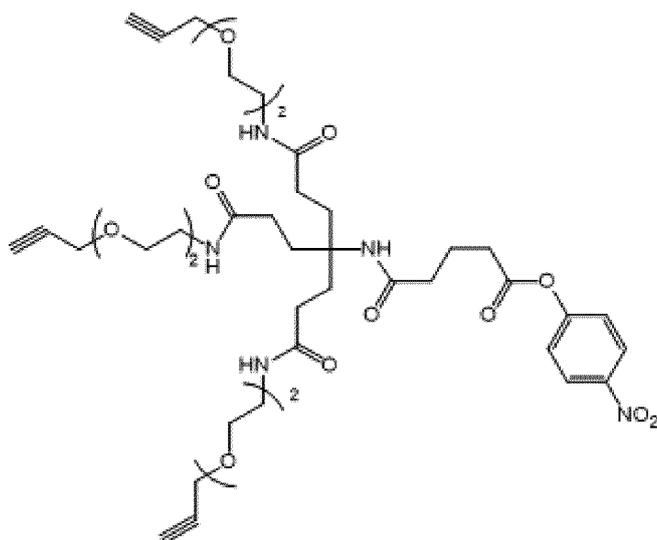
[0390] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Таблица 6. Группы дозирования мышей с опухолью почки в примере 7.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
2	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 кДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
3	30 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 кДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
4	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2.8а и дополнительно включающего 40 кДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
5	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с	Одна инъекция в день 1

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
	тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2.9а и дополнительно включающего 40 кДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	
6	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2.10а и дополнительно включающего 40 кДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
7	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2.10а и дополнительно включающего N-этилмалеимид, прикрепленный к 3'-тиолу на смысловой цепи.	Одна инъекция в день 1
8	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с монодентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 кДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1

[0391] Синтезировали агенты РНКи, имеющие нуклеотидные последовательности, направленные для нацеливания на ген человеческого Hif2 α и вводили функционализированную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C₆) на 5'-терминальном конце смысловой цепи для облегчения конъюгации с нацеленными на интегрин лигандами. Для групп со 2 по 7 использовали следующее соединение для функционализации конъюгата с тридентатными каркасами:



[0392] В группе 8 использовали сложный эфир алкин-PEG₄-NHS для связывания нацеленного на интегрин монодентатного лиганда с 5'-амином на смысловой цепи. Как изложено в данном документе, в группах с 4 по 7 использовали нацеленные на интегрин лиганды с различной длиной ПЭГ.

[0393] Трем (3) мышам с опухолью в каждой группе (n=3) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза) (геометрическое среднее, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 7. Средняя относительная экспрессия мРНК Hif2 α на момент умерщвления в примере 7.

ИД группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,078	0,085
Группа 2 (7,5 мг/кг агент РНКи-тридентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)	0,361	0,025	0,026
Группа 3 (30 мг/кг агент РНКи-тридентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)	0,259	0,024	0,026

Группа 4 (7,5 мг/кг агент РНКи-тридентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.8а, 40 кДа ПЭГ)	0,428	0,062	0,073
Группа 5 (7,5 мг/кг агент РНКи-тридентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.9а, 40 кДа ПЭГ)	0,481	0,014	0,014
Группа 6 (7,5 мг/кг агент РНКи-тридентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.10а, 40 кДа ПЭГ)	0,419	0,040	0,044
Группа 7 (7,5 мг/кг агент РНКи-тридентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.10а, N-этилмалеимид)	0,627	0,054	0,060
Группа 8 (7,5 мг/кг агент РНКи-монодентатный нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)	0,537	0,041	0,045

[0394] Как показано в таблице 7 выше, каждый из агентов РНКи Hif2 α показал снижение экспрессии мРНК у мышей по сравнению с контролем. Например, группа 2, которая включала дозу 7,5 мг/кг агента РНКи, конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 2а (который включает группу ПЭГ4), показала примерно 64% нокдаун Hif2 α (0,361). Кроме того, хотя все конструкции, в которых длина группы ПЭГ увеличена до ПЭГ36 (например, группы 6 и 7), демонстрировали нокдаун, не имели никакого преимущества по сравнению с группой ПЭГ4 в структуре 2а.

Пример 8. Изучение зависимости доза-ответ при введении *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки.

[0395] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

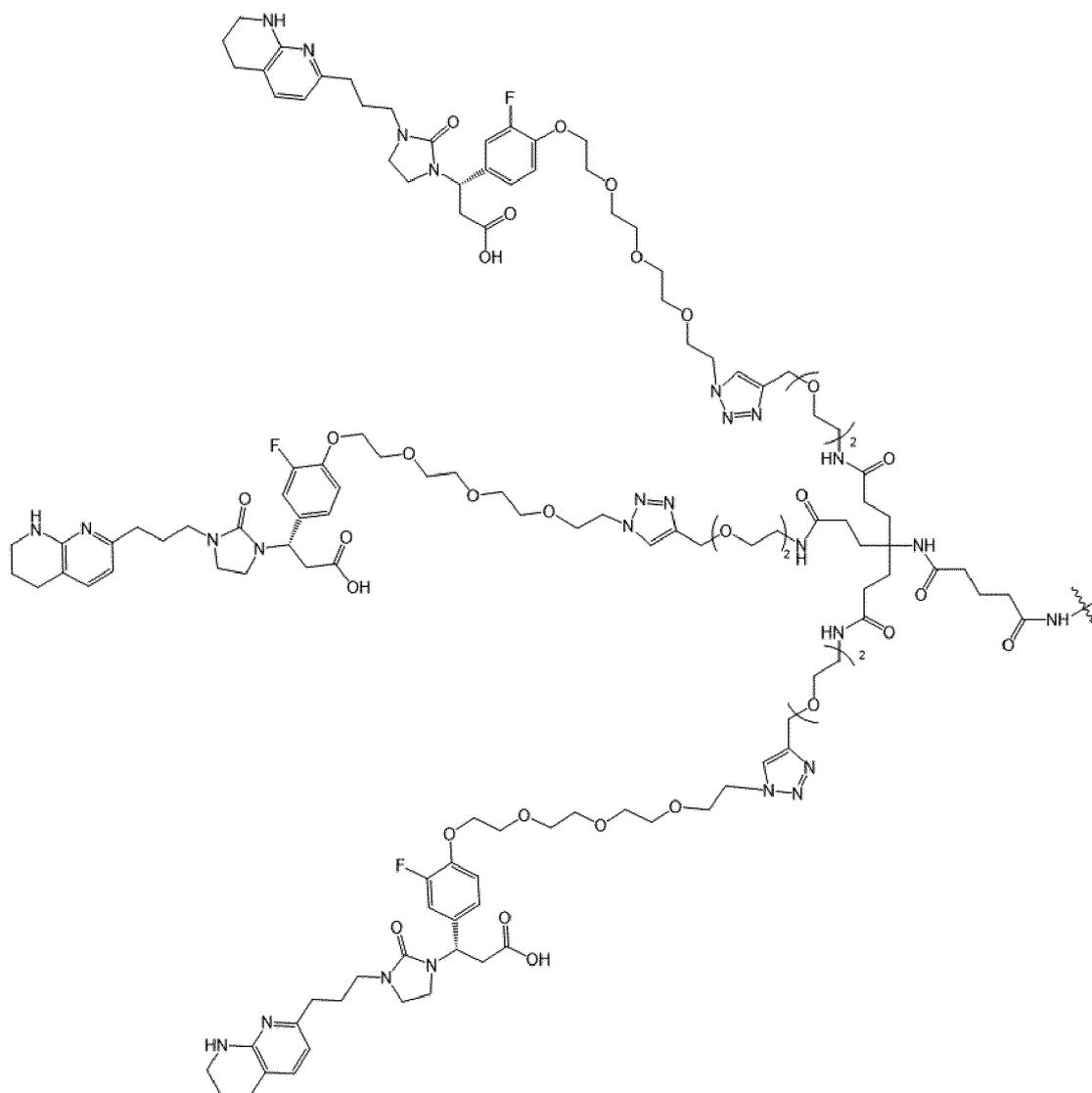
[0396] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Таблица 8. Группы дозирования мышей с опухолью почки в примере 8.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим
--------	-------------------	-------

		дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
2	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2a и дополнительно включающего фрагмент 40 кДа ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
3	10 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2a и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
4	20 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2a и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
5	30 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2a и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1

[0397] Синтезировали агенты РНКи, имеющие нуклеотидные последовательности, направленные для нацеливания на ген человеческого Hif2 α и вводили функционализированную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C₆) на 5'-терминальном конце смысловой цепи для облегчения конъюгации с нацеленными на интегрин лигандами. Каждая из групп содержала тридентатные лиганды интегринна структуры 2a, как показано в приведенной ниже структуре:



[0398] Трем (3) мышам с опухолью в каждой группе (n=3) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза) (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 9. Средняя относительная экспрессия мРНК человеческого Hif2 α на момент умерщвления в примере 8.

ИД группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,131	0,150

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 2 (7,5 мг/кг агента РНКи)	0,313	0,027	0,030
Группа 3 (10 мг/кг агента РНКи)	0,349	0,033	0,036
Группа 4 (20 мг/кг агента РНКи)	0,216	0,040	0,050
Группа 5 (30 мг/кг агента РНКи)	0,203	0,035	0,042

[0399] Как показано в Таблице 9 выше, агенты РНКи Hif2 α , конъюгированные с нацеленными на интегрин лигандами структуры 2а, раскрытыми в настоящем описании, показали снижение экспрессии мРНК у мышей по сравнению с контролем при всех уровнях дозирования.

Пример 9. Продолжительность нокдауна, обусловленного нацеленными на HIF-2 альфа агентами РНКи, конъюгированными с нацеленными на интегрин лигандами, у мышей с опухолью почки.

[0400] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

[0401] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования.

Таблица 10. Группы дозирования мышей в примере 9.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи); мышей умерщвляли в день 5	Одна инъекция в день 1
1А	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи); мышей умерщвляли в день 22	Одна инъекция в день 1
2	20 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией; мышей умерщвляли в день 5.	Одна инъекция в день 1

3	20 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546) конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией; мышей умерщвляли в день 8.	Одна инъекция в день 1
4	20 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546) конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией; мышей умерщвляли в день 15.	Одна инъекция в день 1
5	20 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546) конъюгированного с тридентатным нацеленным на интегрин лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией; мышей умерщвляли в день 22.	Одна инъекция в день 1

[0402] Мышей в группах 1 и 2 умерщвляли в день 5 после инъекции; мышей в группе 3 умерщвляли в день 8 после инъекции; мышей в группе 4 умерщвляли в день 15 после инъекции; и мышей в группах 1А и 5 умерщвляли в день 22 после инъекции.

[0403] В контрольных группах с носителем двум мышам вводили дозу в группе 1 и трем мышам вводили дозу в группе 1А. Для групп, получавших конъюгат агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд (т.е. групп 2, 3, 4 и 5), четверем (4) мышам, несущим опухоль, в каждой группе (n=4) вводили дозы конъюгата агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд. Из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурами, изложенными в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза) (среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 11. Средняя относительная экспрессия мРНК человеческого Hif2 α на момент умерщвления в примере 9.

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК <i>huNIF2α</i>	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза; умерщвление в день 5)	0,741	0,028	0,029
Группа 1А (изотоническая глюкоза; умерщвление в день 22)	1,000	0,066	0,070
Группа 2 (7,5 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ; умерщвление в день 5)	0,262	0,028	0,031
Группа 3 (7,5 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ; умерщвление в день 5)	0,202	0,021	0,023
Группа 4 (7,5 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ; умерщвление в день 8)	0,233	0,034	0,039
Группа 5 (7,5 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ; умерщвление в день 15)	0,299	0,017	0,018

[0404] Как показано в Таблице 11 выше, в день 22 агенты РНКи *Hif2α* продолжали демонстрировать снижение экспрессии мРНК по сравнению с контролем (приблизительно 70% нокдаун в день 22 (0,299)).

Пример 10. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на *NIF-2* альфа, мышам с опухолью почки.

[0405] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на *Hif2α* (EPAS1).

[0406] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Table 12. Группы дозирования мышей в примере 10.

Group	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
2	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 2а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1
3	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 2.6а и дополнительно включающего 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией.	Одна инъекция в день 1

[0407] Синтезировали РНКи-агенты, имеющие нуклеотидные последовательности, направленные для нацеливания на ген человеческого Hif2 α и вводили функционализированную реакционноспособную аминогруппу (NH₂-C₆) на 5'-терминальном конце смысловой цепи для облегчения конъюгации с нацеленными на интегрин лигандами.

[0408] Трём (3) мышам с опухолью в каждой группе (n=3) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза)(среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 13. Средняя относительная экспрессия мРНК Hif2 α на момент умерщвления в примере 10.

ИД группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,087	0,095
Группа 2 (7,5 мг/кг агент РНКи-нацеленный на	0,351	0,080	0,104

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК <i>huHIF2α</i>	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, 40 кДа ПЭГ)			
Группа 3 (7,5 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2.6а, 40 кДа ПЭГ)	0,441	0,040	0,043

[0409] Как показано в Таблице 13 выше, каждый из конъюгатов Hif2 α агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд показал снижение экспрессии мРНК у мышей по сравнению с контролем. Например, группа 2, которая включала дозу 7,5 мг/кг агента РНКи, конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 2а, продемонстрировала примерно 65% нокдаун мРНК Hif2 α (0,351).

Пример 11. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки $\alpha\beta3$ КО А498.

[0410] Клетки опухоли светлоклеточной почечно-клеточной карциномы (ccRCC) А498 экспрессируют как интегрин $\alpha\beta3$, так и интегрин $\alpha\beta5$, причем по данным анализа проточной цитометрии экспрессия $\alpha\beta3$ примерно в 4 раза превышает экспрессию $\alpha\beta5$. Для оценки вклада $\alpha\beta5$ в эту модель синтезировали клетки А498 с нокаутом гена $\alpha\beta3$ (КО) с помощью технологии редактирования генов. Нокаут гена интегрин $\alpha\beta3$ подтверждали геномным секвенированием и иммуногистохимическим окрашиванием $\alpha\beta3$, которое показало отрицательное окрашивание в клетках $\alpha\beta3$ КО А498. Мышей, несущих опухоль почки, с клетками А498 WT (как с $\alpha\beta3$, так и с $\alpha\beta5$) и с клетками А498 $\alpha\beta3$ КО получали, как описано выше в примере 4.

[0411] В день 1 исследования мышам с опухолью почки вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену. Трех (3) мышам с опухолью в каждой группе, указанной в таблице 13 ниже (n=3) вводили дозы. Мышей умерщвляли в день 8 исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК, как указано в примере 4. Выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессии человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза) (среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 14. Средняя относительная экспрессия мРНК Hif2 α на момент умерщвления в примере 11.

ID группы	Опухоль	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	A498 WT	1,000	0,084	0,092
Группа 2 (7,5 мг/кг агент РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, дополнительно включающий 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией)	A498 WT	0,295	0,040	0,046
Группа 3 (изотоническая глюкоза)	A498 $\alpha\beta 3$ КО	1,000	0,232	0,302
Группа 4 (7,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, дополнительно включающий 40 КДа фрагмент ПЭГ, связанный с конструкцией)	A498 $\alpha\beta 3$ КО	0,621	0,068	0,077

[0412] Как показано в таблице 14 выше, конъюгаты агент РНКи Hif2 α -нацеленный на интегрин лиганд показали снижение экспрессии мРНК Hif2 α в опухолях A498 WT (дикого типа) по сравнению с контролем (примерно 71% нокдаун (0,295)). Напротив, как и ожидалось, снижение экспрессии мРНК Hif2 α было менее эффективным в опухолях A498 $\alpha\beta 3$ КО; тем не менее, снижение было значительным при 38% нокдауне (0,621). Это показывает, что как интегрин $\alpha\beta 3$, так и интегрин $\alpha\beta 5$ вносят вклад в доставку агента РНКи.

Пример 12. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки.

[0413] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

[0414] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

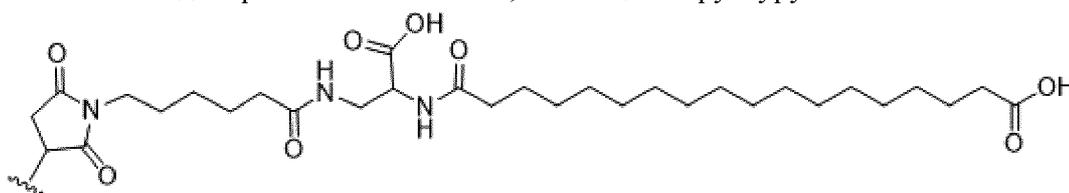
Таблица 15. Группы дозирования мышей в примере 12.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
2	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 2a и дополнительно включающий фрагмент C18-дикарбоновой кислоты, присоединенный к конструкции.	Одна инъекция в день 1
6	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 28a и дополнительно включающий фрагмент Mal-C18-дикарбоновой кислоты, присоединенный к конструкции.	Одна инъекция в день 1
7	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 29a и дополнительно включающий фрагмент Mal-C18-дикарбоновой кислоты, присоединенный к конструкции.	Одна инъекция в день 1
8	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом структуры 30a и дополнительно включающий фрагмент Mal-C18-дикарбоновой кислоты, присоединенный к конструкции.	Одна инъекция в день 1
9	7,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе агента РНКи Hif2 α (AD04546), конъюгированного с нацеленным на интегрин тридентатным лигандом	Одна инъекция в день 1

	структуры 31a и дополнительно включающий фрагмент Mal-C18-дикарбоновой кислоты, присоединенный к конструкции.	
--	---	--

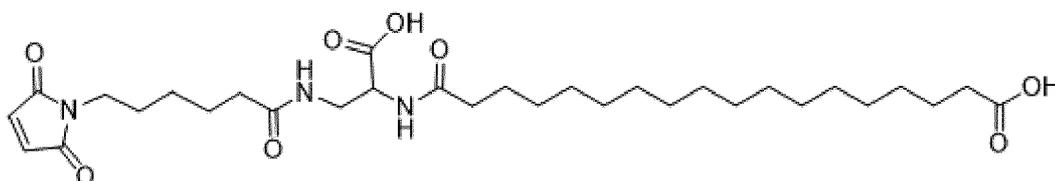
[0415] Синтезировали РНКи-агенты, имеющие нуклеотидные последовательности, направленные для нацеливания на ген человеческого *Hif2α* и вводили функционализированную реакционноспособную аминогруппу ($\text{NH}_2\text{-C}_6$) на 5'-терминальном конце смысловой цепи для облегчения конъюгации с нацеленным на интегрин лигандом.

[0416] Синтезировали агенты РНКи, содержащие модулятор PD, называемый «фрагмент Mal-C18-дикарбоновой кислоты», имеющий структуру:



, где

 указывает точку присоединения к агенту РНКи в C6-S-группе, как указано в AD05971 (см. пример 2). Модулятор PD конъюгировали с 3'-концом смысловой цепи путем восстановления C6-SS-C6 группы, как показано в таблице А, которую затем подвергли реакции присоединения Михаэля со следующим соединением:



[0417] Трем (3) мышам с опухолью в каждой группе ($n=3$) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого *HIF2α* с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза)(среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 16. Средняя относительная экспрессия мРНК *Hif2α* на момент умерщвления в примере 12.

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,077	0,083
Группа 2 (7,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, Mal-C18-дикарбоновая кислота)	0,456	0,113	0,150
Группа 6 (7,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 28а, Mal-C18-дикарбоновая кислота)	0,649	0,072	0,081
Группа 7 (7,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 29а, Mal-C18-дикарбоновая кислота)	0,426	0,054	0,062
Группа 8 (7,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 30а, Mal-C18-дикарбоновая кислота)	0,699	0,064	0,070
Группа 9 (7,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 31а, Mal-C18-дикарбоновая кислота)	0,580	0,069	0,079

Как показано в таблице 16 выше, каждый из конъюгатов Hif2 α агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд показал снижение экспрессии мРНК по сравнению с контролем.

Пример 13. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки

[0418] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

[0419] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Таблица 17. Группы дозирования мышей в примере 13.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
4	5,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
5	5,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 32a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 32a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

6	5,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 33а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 33а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
7	5,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 34а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 34а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

⁽ⁱ⁾ avb3 нацеленные лиганды связаны с нуклеотидами 2'-О-пропаргила (представленными aAlk, gAlk и uAlk в модифицированной последовательности смысловой цепи), которые в направлении 5'→3' последовательности смысловой цепи находятся на нуклеотидах 14, 16, 18 и 20 смысловой цепи.

[0420] Трем (3) мышам с опухолью в каждой группе (n=3) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза)(среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 18. Средняя относительная экспрессия мРНК Hif2α на момент умерщвления в примере 13.

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,083	0,090
Группа 4 (5,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 2а, три внутренних лиганда структуры 2а, и модулятор PD - C-18-дикарбоновая кислота)	0,245	0,048	0,059
Группа 5 (5,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 32а, три внутренних лиганда структуры 32а, и модулятор PD - C-18-дикарбоновая кислота)	0,213	0,065	0,094
Группа 6 (5,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 33а, три внутренних лиганда структуры 33а, и модулятор PD - C-18-дикарбоновая кислота)	0,603	0,117	0,146
Группа 7 (5,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 34а, три внутренних лиганда структуры 34а, и модулятор PD - C-18-дикарбоновая кислота)	0,528	0,067	0,077

[0421] Как показано в таблице 18 выше, каждый из конъюгатов Hif2 α агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд показал снижение экспрессии мРНК у мышей по сравнению с контролем, при этом конструкции, которые включали нацеленные на интегрин лиганды Структуры 2а и Структуры 32а, показали наибольшую ингибирующую активность.

Пример 14. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки

[0422] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

[0423] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Таблица 19. Группы дозирования мышей в примере 14.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
2	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 3ба, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 3ба внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
5	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

6	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, имеющей структуру нацеленного на интегрин лиганда SM37-avb3, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры SM37-avb3 внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой .	Одна инъекция в день 1
----------	--	------------------------

(i) avb3 нацеленные лиганды связаны с нуклеотидами 2'-О-пропаргила (представленными aAlk, gAlk и uAlk в модифицированной последовательности смысловой цепи), которые в направлении 5'→3' последовательности смысловой цепи находятся на нуклеотидах 14, 16, 18 и 20 смысловой цепи.

[0424] Трем (3) мышам с опухолью в каждой группе (n=3) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2 α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза)(среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 20. Средняя относительная экспрессия мРНК Hif2 α на момент умерщвления в примере 14.

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2 α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,090	0,099
Группа 2 (2,0 мг/кг агента РНКи-ацелленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a и C-18-дикарбоновая кислота)	0,362	0,021	0,022
Группа 5 (2,0 мг/кг агента РНКи-ацелленного на	0,617	0,028	0,029

интегрин тридентатного лиганда структуры 36аа, три внутренних лиганда структуры 36а и C-18-дикарбоновая кислота)			
Группа 6 (2,0 мг/кг агента РНКи-ацелленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 37аа, три внутренних лиганда структуры 37а и C-18-дикарбоновая кислота)	0,375	0,081	0,103

[0425] Как показано в Таблице 20 выше, каждый из конъюгатов Hif2 α агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд показал снижение экспрессии мРНК по сравнению с контролем.

Пример 15. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки.

[0426] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

[0427] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Таблица 21. Группы дозирования мышей в примере 15.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Изотоническая глюкоза (d5w (5% декстроза в воде)) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1

2	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
3	4,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
6	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 38a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 38a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

7	4,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 38а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 38а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
8	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 39а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 39а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
9	4,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе НИФ-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 39а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 39а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

10	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 40a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 40a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
11	4,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 40a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 40a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
12	2,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 41a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 41a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

13	4,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 41a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 41a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
-----------	---	------------------------

⁽ⁱ⁾ avb3 нацеленные лиганды связаны с нуклеотидами 2'-О-пропаргила (представленными aAlk, gAlk и uAlk в модифицированной последовательности смысловой цепи), которые в направлении 5'→3' последовательности смысловой цепи находятся на нуклеотидах 14, 16, 18 и 20 смысловой цепи.

[0428] Трем (3) мышам с опухолью в каждой группе (n=3) вводили дозу. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза)(среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 22. Средняя относительная экспрессия мРНК Hif2α на момент умерщвления в примере 15.

ID группы	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,247	0,327
Группа 2 (2,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,286	0,037	0,043

Группа 3 (4,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,263	0,035	0,040
Группа 6 (2,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 38a, три внутренних лиганда структуры 38a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,655	0,050	0,054
Группа 7 (4,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 38a, три внутренних лиганда структуры 38a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,488	0,042	0,046
Группа 8 (2,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 39a, три внутренних лиганда структуры 39a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,609	0,065	0,073
Группа 9 (4,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 39a, три внутренних лиганда структуры 39a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,518	0,050	0,055
Группа 10 (2,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 40a, три внутренних лиганда структуры 40a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,805	0,113	0,132
Группа 11 (4,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 40a, три внутренних лиганда структуры 40a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,738	0,091	0,104
Группа 12 (2,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 41a, три внутренних лиганда структуры 41a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,978	0,082	0,090

Группа 13 (4,0 мг/кг агента РНКи-нацеленного на интегрин тридентатного лиганда структуры 41a, три внутренних лиганда структуры 41a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,779	0,106	0,123
---	-------	-------	-------

[0429] Как показано в Таблице 22 выше, каждый из конъюгатов Hif2 α агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд, показал снижение экспрессии мРНК у мышей по сравнению с контролем.

Пример 16. Введение *in vivo* нацеленных на интегрин лигандов, конъюгированных с агентами РНКи, нацеленными на HIF-2 альфа, мышам с опухолью почки.

[0430] Агенты РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали фосфорамидитным методом на твердой фазе в соответствии с общими процедурами, известными в данной области и обычно используемыми в синтезе олигонуклеотидов, как изложено в настоящем описании в Примере 2. Агенты РНКи имели соответствующие модифицированные нуклеотидные последовательности, указанные в настоящем описании в примере 2, и были разработаны для нацеливания на Hif2 α (EPAS1).

[0431] В день 1 исследования мышам с опухолью почки (см. пример 4) вводили дозу путем инъекции в хвостовую вену в соответствии со следующими группами дозирования:

Таблица 23. Группы дозирования мышей в примере 16.

Группа	Агент РНКи и доза	Режим дозирования
1	Физиологический раствор (0,9%) (без агента РНКи)	Одна инъекция в день 1
2	2,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

3	5,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
4	10,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
5	2,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

6	<p>5,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью⁽ⁱ⁾, и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.</p>	Одна инъекция в день 1
7	<p>10,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2.11a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2.11a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью⁽ⁱ⁾, и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.</p>	Одна инъекция в день 1
8	<p>2,5 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2a, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2a внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью⁽ⁱ⁾, и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.</p>	Одна инъекция в день 1

9	5,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1
10	10,0 мг/кг приготовленного в изотонической глюкозе HIF-2-альфа агента РНКи AD05971, связанного на 5'-терминальном конце смысловой цепи с тридентатной нацеленной группой, содержащей три нацеленные на интегрин лиганда структуры 2а, причем нацеленный на интегрин лиганд структуры 2а внутренне связан в 2' положении каждого из нуклеотидов 2, 4, 6 и 8 (3'→5'), начиная с первого нуклеотида, который образует пару оснований с антисмысловой цепью ⁽ⁱ⁾ , и дополнительно связанного на 3'-терминальном конце смысловой цепи с модулятором PD, Mal-C18-дикарбоновой кислотой.	Одна инъекция в день 1

⁽ⁱ⁾ avb3 нацеленные лиганды связаны с нуклеотидами 2'-О-пропаргила (представленными aAlk, gAlk и uAlk в модифицированной последовательности смысловой цепи), которые в направлении 5'→3' последовательности смысловой цепи находятся на нуклеотидах 14, 16, 18 и 20 смысловой цепи.

[0432] Четырем (4) мышам с опухолью в каждой группе (n=4) вводили дозу, за исключением группы 4, в которой было только три (3) мыши, поскольку посчитали, что одна мышь получила неправильную инъекцию. Мышей умерщвляли на 8-й день исследования после инъекции, и из опухоли почки выделяли общую РНК в соответствии с процедурой, изложенной в примере 4. Затем выполняли количественную оценку относительной экспрессии мРНК человеческого HIF2α с помощью количественной ПЦР на основе зонда (ОТ-кПЦР), нормализованную относительно экспрессия человеческого циклофилина А (PPIA) и выраженную в виде доли относительно контрольной группы носителя (изотоническая глюкоза)(среднее геометрическое, +/- 95% доверительный интервал), как описано в примере 4.

Таблица 24. Средняя относительная экспрессия мРНК Hif2α на момент

умерщвлении в примере 16.

ID группа	Средняя относительная экспрессия мРНК huHIF2α	низкая (ошибка)	высокая (ошибка)
Группа 1 (изотоническая глюкоза)	1,000	0,180	0,220
Группа 2 (2,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,278	0,068	0,091
Группа 3 (5,0 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,229	0,062	0,086
Группа 4 (10,0 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,202	0,014	0,015
Группа 5 (2,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,324	0,035	0,040
Группа 6 (5,0 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,308	0,018	0,019
Группа 7 (10,0 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2.11a, три внутренних лиганда структуры 2.11a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,197	0,041	0,052
Группа 8 (2,5 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2a, три внутренних лиганда структуры 2a, и C-18-дикарбоновая кислота)	0,218	0,048	0,062

Группа 9 (5,0 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, три внутренних лиганда структуры 2а, и С-18-дикарбоновая кислота)	0,160	0,065	0,109
Группа 10 (10,0 мг/кг агента РНКи-нацеленный на интегрин тридентатный лиганд структуры 2а, три внутренних лиганда структуры 2а, и С-18-дикарбоновая кислота)	0,276	0,053	0,066

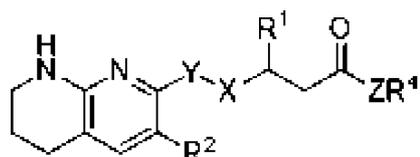
[0433] Как показано в Таблице 24 выше, каждый из конъюгатов Hif2 α агент РНКи-нацеленный на интегрин лиганд показал снижение экспрессии мРНК у мышей по сравнению с контролем.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0434] Следует понимать, что хотя изобретение подробно описано, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. В объем приведенной ниже формулы изобретения входят другие аспекты, преимущества и модификации.

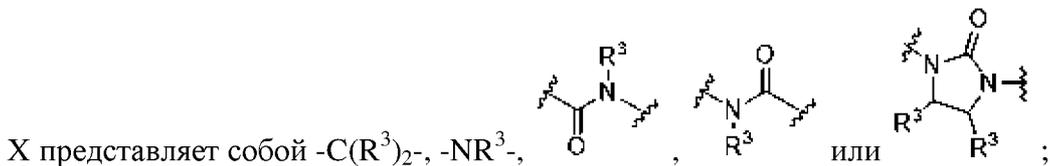
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нацеленный на интегрин лиганд формулы:



(Формула I),

где,



Y представляет собой необязательно замещенный алкилен;

Z представляет собой O, NR^3 или S;

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

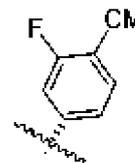
R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

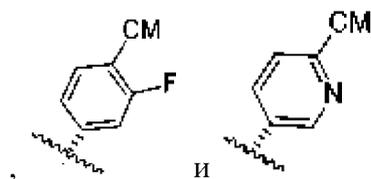
R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из Y, R^1 , R^2 , любого радикала R^3 и R^4 содержит карго-молекулу.

2. Нацеленный лиганд по п.1, где R^1 представляет собой необязательно замещенный арил.



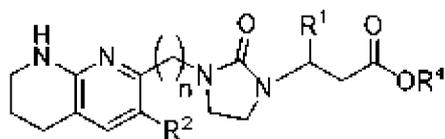
3. Нацеленный лиганд по п.2, где R^1 выбирают из группы, состоящей из:



, где  указывает точку присоединения, и CM содержит карго-молекулу.

4. Нацеленный лиганд по п.1, где Y представляет собой C_1-C_6 алкилен.

5. Нацеленный на интегрин лиганд формулы:



(формула II),

или его фармацевтически приемлемая соль, где

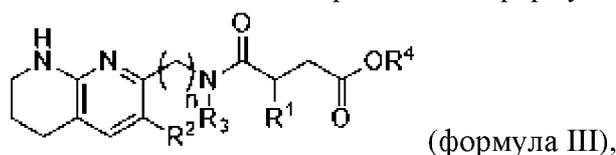
n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и причем по меньшей мере один из R^1 или R^2 содержит карго-молекулу.

6. Нацеленный на интегрин лиганд формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

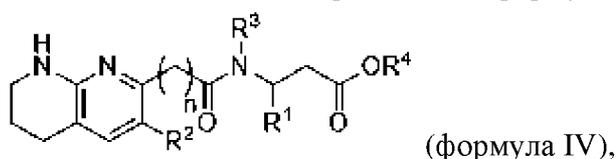
R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

R^3 выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

7. Нацеленный на интегрин лиганд формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

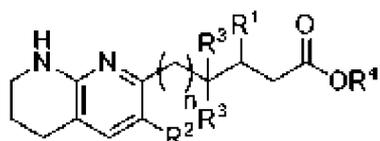
R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

R^3 выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

8. Нацеленный на интегрин лиганд формулы



(формула V),

или его фармацевтически приемлемая соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

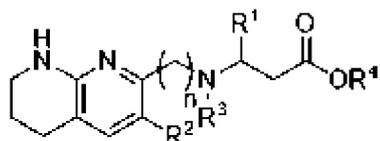
R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

9. Нацеленный на интегрин лиганд формулы



(формула VI),

или его фармацевтически приемлемая соль, где

n является целым числом от 1 до 8;

R^1 представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R^1 содержит карго-молекулу;

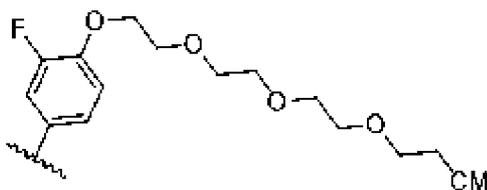
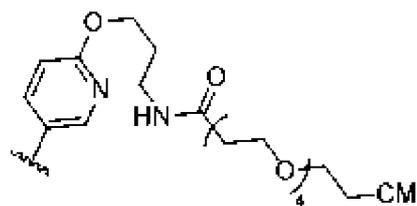
R^2 представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R^2 содержит карго-молекулу;

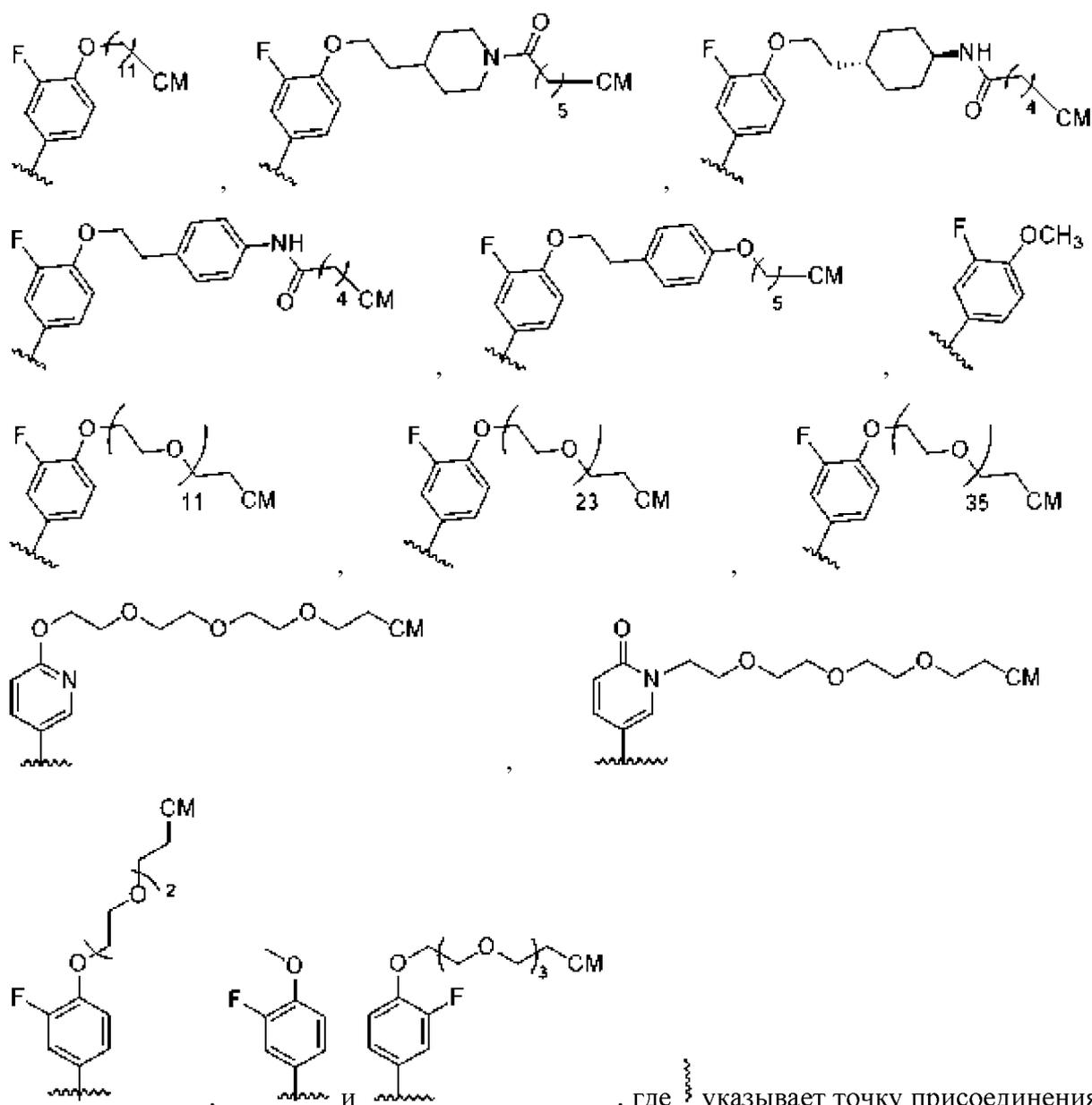
каждый радикал R^3 независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R^3 содержит карго-молекулу;

R^4 представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из R^1 , R^2 и R^3 содержит карго-молекулу.

10. Нацеленный на интегрин лиганд по любому из п.1 или пп.5-9, где R^1 выбирают из группы, состоящей из:



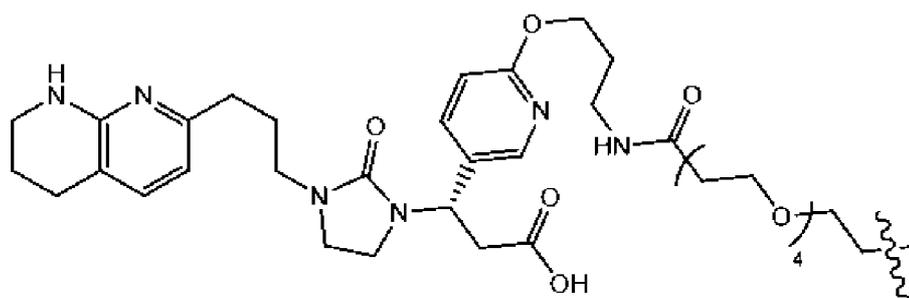


CM содержит карго-молекулу.

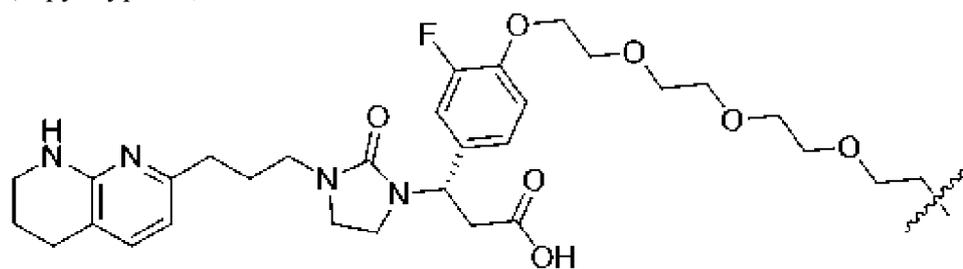
11. Нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-10, где карго-молекула является активным фармацевтическим ингредиентом или пролекарством.

12. Нацеленный на интегрин лиганд по п.11, где арго-молекула содержит малую молекулу, антитело, фрагмент антитела, иммуноглобулин, моноклональное антитело, метку или маркер, липид, природный или модифицированный олигонуклеотид, соединение на основе модифицированного олигонуклеотида (например, антисмысловой олигонуклеотид или агент РНКи), природную или модифицированную нуклеиновую кислоту, пептид, аптамер, полимер, полиамин, белок, токсин, витамин, полиэтиленгликоль, гаптен, дигоксигенин, биотин, радиоактивный атом или молекулу или флуорофор.

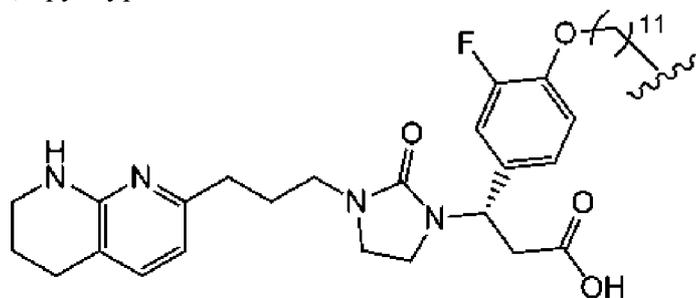
13. Нацеленный на интегрин лиганд, содержащий формулу, выбранную из:



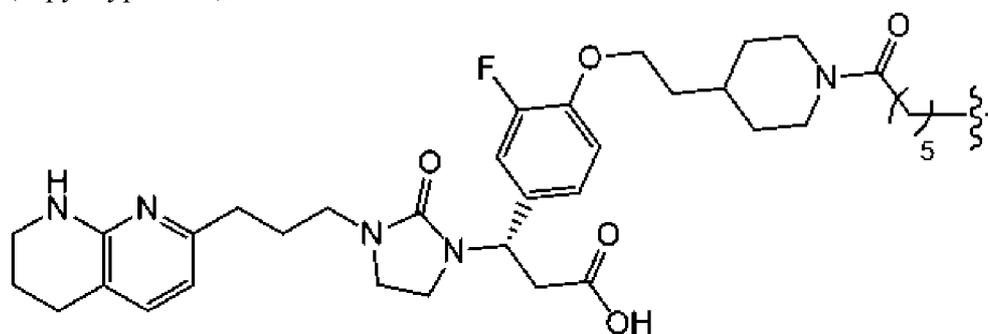
(структура 1a);



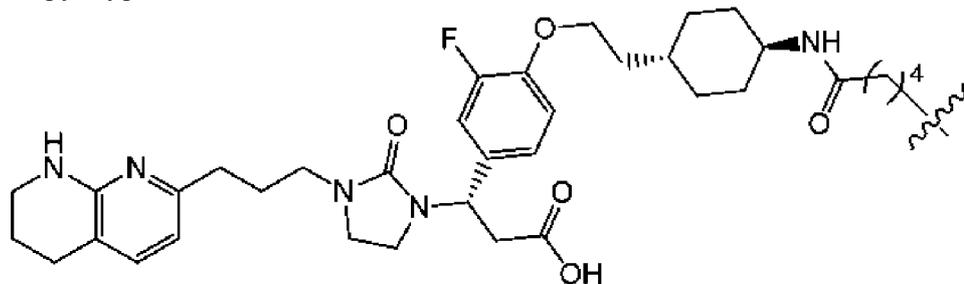
(структура 2a);



(структура 2.1a);

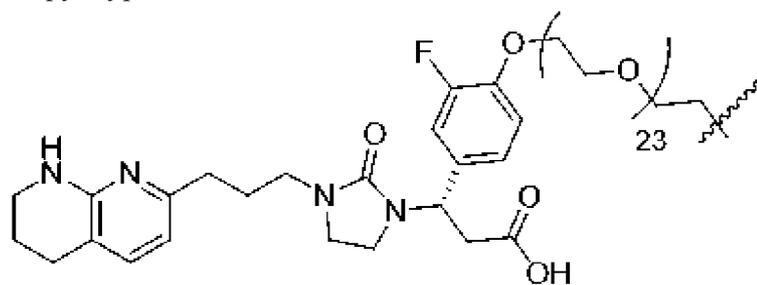


(структура 2.2a);

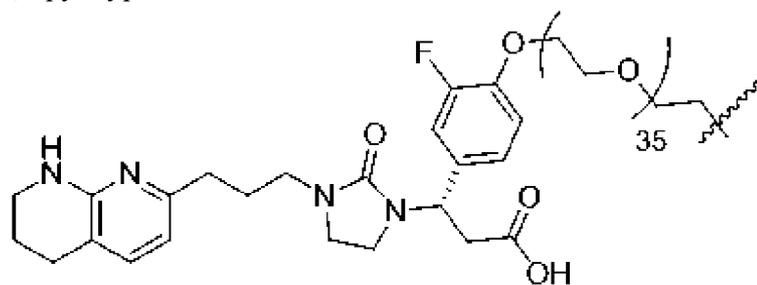


(структура 2.3a);

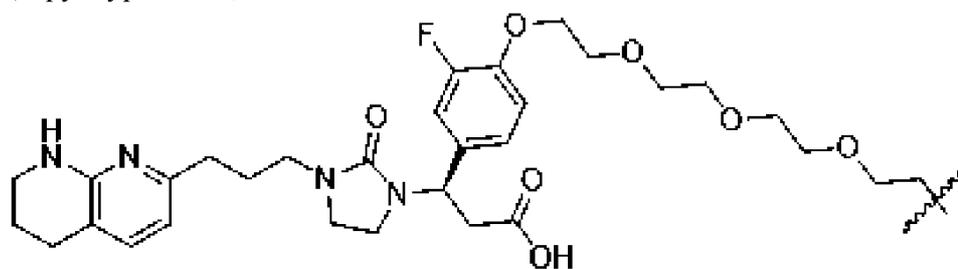
(структура 2.8a);



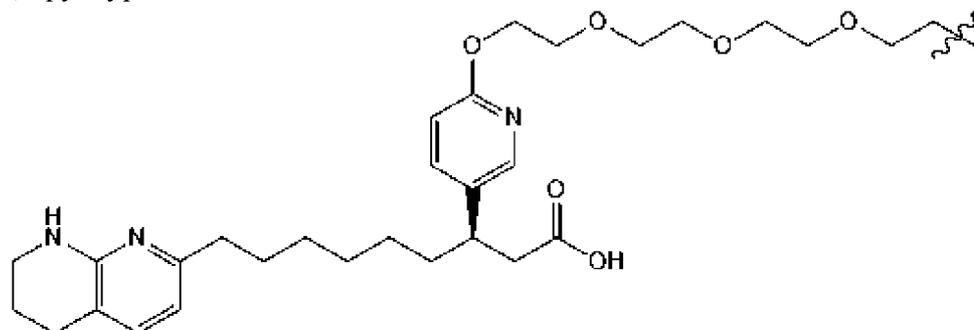
(структура 2.9a);



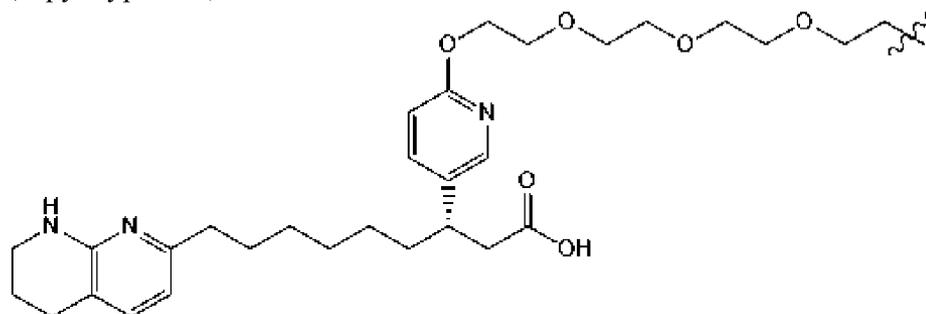
(структура 2.10a);



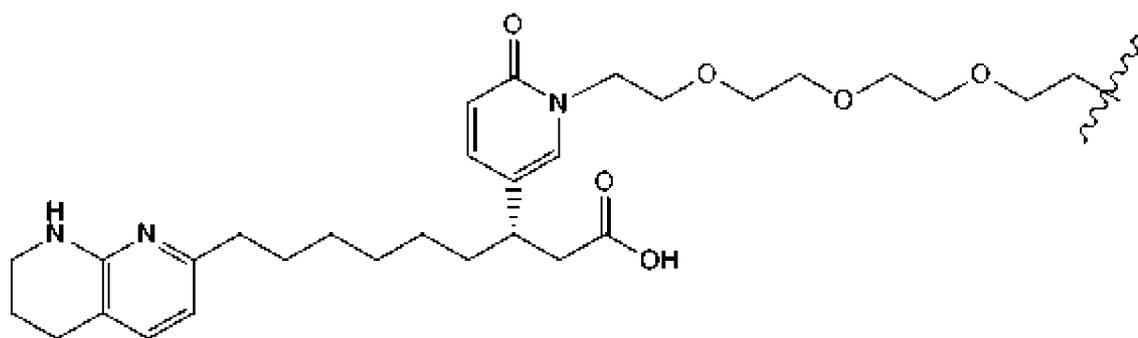
(структура 2.11a);



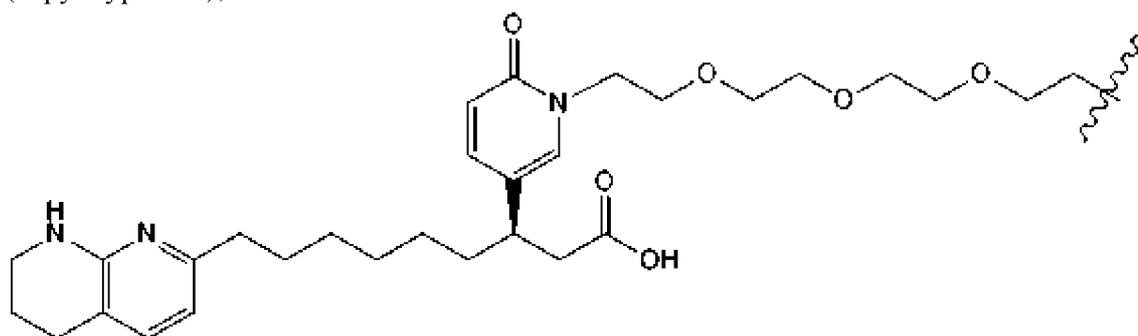
(структура 28a);



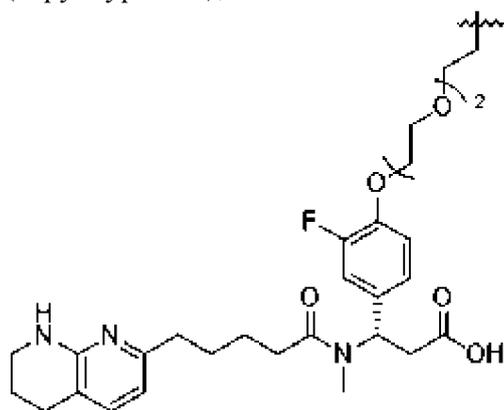
(структура 29a);



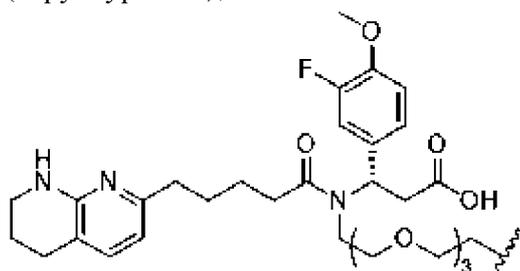
(структура 30a);



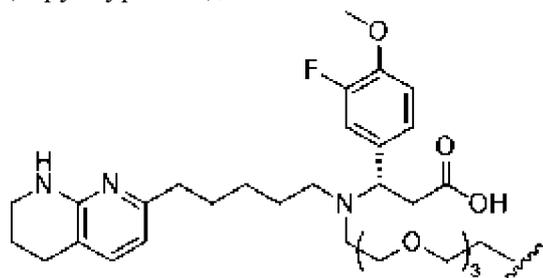
(структура 31a);



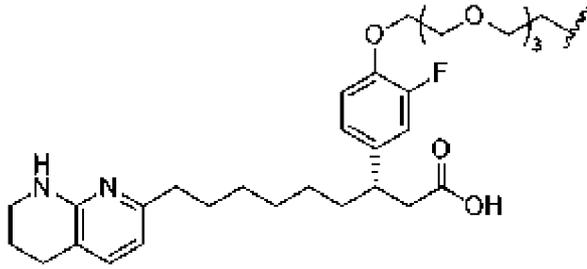
(структура 32a);



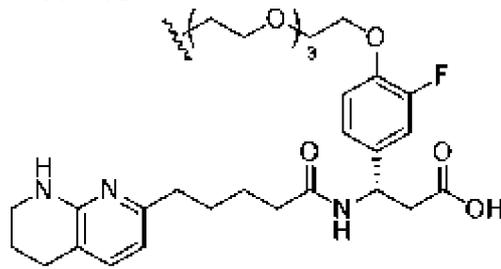
(структура 33a);



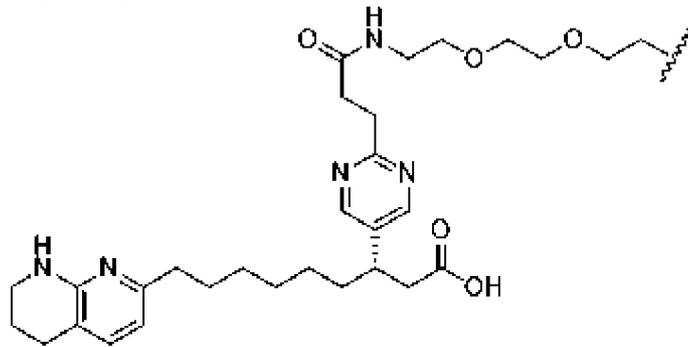
(структура 34a);



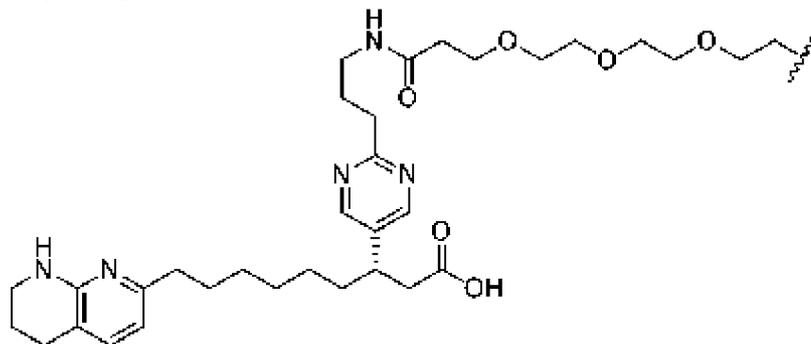
(структура 36a);



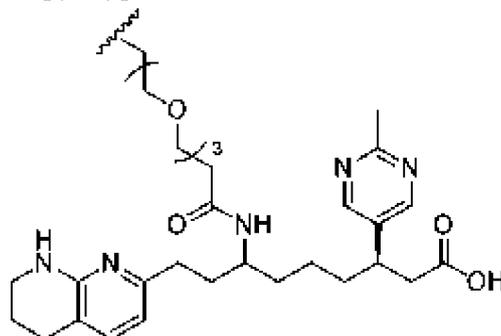
(структура 37a);



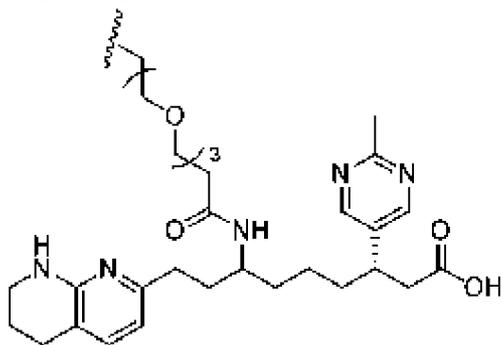
(структура 38a);



(структура 39a);



(структура 40a); и



(структура 41a)

или его фармацевтически приемлемая соль, где  указывает точку соединения с фрагментом, содержащим карго-молекулу.

14. Нацеленная на интегрин группа, содержащая нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13, причем нацеленная группа находится в монодентатной форме, при этом нацеленная на интегрин группа конъюгирована с карго-молекулой.

15. Нацеленная на интегрин группа, содержащая нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13, причем нацеленная группа находится в бидентатной форме, при этом нацеленная на интегрин группа конъюгирована с карго-молекулой.

16. Нацеленная на интегрин группа, содержащая нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13, причем нацеленная группа находится в тридентатной форме, при этом нацеленная на интегрин группа конъюгирована с карго-молекулой.

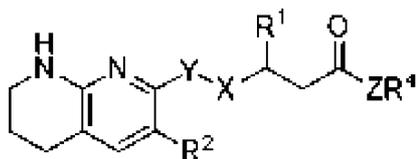
17. Нацеленная на интегрин группа, содержащая нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13, причем нацеленная группа находится в тетрадентатной форме, при этом нацеленная на интегрин группа конъюгирована с карго-молекулой.

18. Нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13, конъюгированный с карго-молекулой, которая содержит соединение на основе олигонуклеотида.

19. Нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13, в котором карго-молекула содержит агент РНКи.

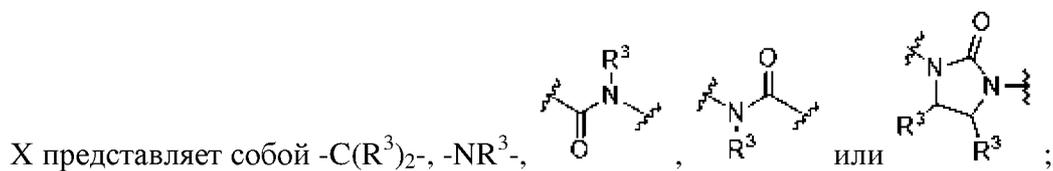
20. Нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13, дополнительно содержащий линкер из полиэтиленгликоля, имеющий 2-20 единиц этиленоксида.

21. Предшественник нацеленного на интегрин лиганда формулы:



(формула Ip),

где,



Y представляет собой необязательно замещенный алкилен;

Z представляет собой O, NR³ или S;

n является целым числом от 1 до 8;

R¹ представляет собой необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный циклоалкил, или R¹ содержит карго-молекулу;

R² представляет собой H, необязательно замещенный алкил, или R² содержит карго-молекулу;

каждый радикал R³ независимо выбирают из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила, или R³ содержит карго-молекулу;

R⁴ представляет собой H или необязательно замещенный алкил; и

причем по меньшей мере один из Y, R¹, R², любого радикала R³ и R⁴ содержит реакционноспособную группу.

22. Предшественник нацеленного на интегрин лиганда по п.21, где реакционноспособная группа является азидом.

23. Предшественник нацеленного на интегрин лиганда, имеющий структуру, представленную группой, состоящей из: структуры 1b, структуры 1c, структуры 2b, структуры 2c, структуры 2.1b, структуры 2.1c, структуры 2.2b, структуры 2.2c, структуры 2.3b, структуры 2.3c, структуры 2.4b, структуры 2.4c, структуры 2.5b, структуры 2.5c, структуры 2.6b, структуры 2.6c, структуры 2.7b, структуры 2.8c, структуры 2.8b, структуры 2.8c, структуры 2.9b, структуры 2.9c, структуры 2.10b, структуры 2.10c, структуры 2.11b, структуры 2.11c, структуры 28b, структуры 28c, структуры 29b, структуры 29c, структуры 30b, структуры 30c, структуры 31b, структуры 31c, структуры 32b, структуры 32c, структуры 33b, структуры 33c, структуры 34b, структуры 34c, структуры 36b, структуры 36c, структуры 37b, структуры 37c, структуры 38b, структуры 38c, структуры 39b, структуры 39c, структуры 40b, структуры 40c, структуры 41b и структуры 41c.

24. Конъюгат, содержащий терапевтическое средство на основе олигонуклеотида, связанное с нацеленным на интегрин лигандом по любому из пп.1-21.

25. Конъюгат по п.24, в котором терапевтическое средство на основе олигонуклеотида представляет собой агент РНКи.

26. Композиция, содержащая нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13 или нацеленную группу по пп.14-17, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

27. Композиция, содержащая нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13 или нацеленную группу по любому из пп.14-17, причем нацеленный на интегрин лиганд или нацеленная группа конъюгирована с соединением на основе олигонуклеотида, которое способно подавлять экспрессию целевого гена в экспрессирующей интегрин клетке.

28. Композиция по п.27, в которой нацеленный на интегрин лиганд или нацеленная

группа конъюгирована с агентом РНКи, который способен подавлять экспрессию целевого гена в экспрессирующей интегрин клетке.

29. Композиция по любому из пп.26-28, в которой интегрин представляет собой интегрин $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$ или оба $\alpha\nu\beta3$ и $\alpha\nu\beta5$.

30. Способ доставки одной или более карго-молекул в клетку, экспрессирующую интегрин $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$ или оба $\alpha\nu\beta3$ и $\alpha\nu\beta5$, у субъекта, причем способ включает введение субъекту либо (i) композиции, содержащей нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13 или нацеленную группу по пп.14-17, причем нацеленный на интегрин лиганд или нацеленная группа конъюгирована с одной или более карго-молекулами, или (ii) композиции по любому из пп.26-28.

31. Способ доставки одной или более карго-молекул в клетку или ткань субъекта *in vivo*, при этом способ включает введение субъекту либо (i) композиции, содержащей нацеленный на интегрин лиганд по любому из пп.1-13 или нацеленную группу по пп.14-17, причем нацеленный на интегрин лиганд или нацеленная группа конъюгирована с одной или более карго-молекулами, или (ii) композиции по любому из пп.26-29.

32. Способ по п.30 или п.31, в котором одна или более карго-молекул содержат соединение на основе олигонуклеотида.

33. Способ по п.32, в котором соединение на основе олигонуклеотида представляет собой агент РНКи.

34. Способ подавления *in vivo* экспрессии целевого гена в клетке, которая экспрессирует интегрин $\alpha\nu\beta3$, интегрин $\alpha\nu\beta5$ или оба интегрин $\alpha\nu\beta3$ и $\alpha\nu\beta5$, причем способ включает введение субъекту эффективного количества (i) композиции, которая включает агент РНКи, конъюгированный с нацеленным на интегрин лигандом по любому из пп.1-13 или нацеливающей группой по пп.14-17, или (ii) композиции по любому из пп.26-28.

35. Способ по п.34, в котором целевой ген представляет собой EPAS1 (HIF2 альфа).

36. Способ по п.34 или п.35, в котором клетка представляет собой опухолевую клетку светлоклеточной карциномы почек.

37. Применение нацеленного на интегрин лиганда по любому из пп.1-13 или нацеленной группы по пп.14-17, или композиции по любому из пп.26-28 для доставки карго-молекулы в клетку, содержащую $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$ или оба $\alpha\nu\beta3$ и $\alpha\nu\beta5$.

38. Применение по п.37, в котором клетка представляет собой клетку почки.

39. Применение композиции по любому из пп.26-28 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, причем заболевание или расстройство может быть вылечено или облегчено путем доставки карго-молекулы в клетку, содержащую $\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$ или оба $\alpha\nu\beta3$ и $\alpha\nu\beta5$.