

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291933 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.03(22) Дата подачи заявки
2021.01.15

(51) Int. Cl. C07H 19/10 (2006.01)
C07H 19/20 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) 4'-О-МЕТИЛЕНФОСФОНАТНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ АНАЛОГИ

(31) 62/961,360; 62/975,352; 62/991,738

(32) 2020.01.15; 2020.02.12; 2020.03.19

(33) US

(86) PCT/US2021/013525

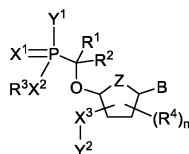
(87) WO 2021/146488 2021.07.22

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

(72) Изобретатель:
Ван Вэйминь, Юй Хунчуань (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к нуклеиновым кислотам и их аналогам, применимым в качестве сильнодействующих и стабильных агентов РНК-интерференции.



202291933

A1

A1

202291933

4'-О-МЕТИЛЕНФОСФОНАТНЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ АНАЛОГИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка претендует, согласно §119(e) раздела 35 Свода федеральных законов США, на приоритет предварительной заявки на патент № 62/961360, поданной 15 января 2020 г., предварительной заявки на патент № 62/975352, поданной 12 февраля 2020 г., и предварительной заявки на патент № 62/991738, поданной 19 марта 2020 г., содержание каждой из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам и их аналогам, а также к способам, пригодным для модулирования экспрессии гена-мишени в клетке, с использованием предложенных нуклеиновых кислот и их аналогов в соответствии с приведенным в данном документе описанием. Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтически приемлемые композиции, содержащие нуклеиновые кислоты и их аналоги по настоящему изобретению, и способы применения указанных композиций при лечении различных заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Регуляция экспрессии генов модифицированными нуклеиновыми кислотами демонстрирует большой потенциал как в качестве инструмента лабораторных исследований, так и в качестве терапевтического подхода в клинике. В стадии клинических исследований находятся несколько классов терапевтических средств на основе олигонуклеотидов или нуклеиновых кислот, включая антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), короткие интерферирующие РНК (киРНК), аптамеры, рибозимы, пропускающие экзоны или изменяющие сплайсинг олигонуклеотиды, мРНК и CRISPR. Ключевую роль в преодолении препятствий, стоящих перед олигонуклеотидной терапией, играют химические модификации, включая улучшение нуклеазной стабильности, аффинности связывания РНК и фармакокинетических свойств олигонуклеотидов. За последние три десятилетия были разработаны различные стратегии химической модификации олигонуклеотидов, включая модификацию сахаров, нуклеосахаров и фосфодиэфирного остова (Deleavey and Darna, CHEM. BIOL. 2012, 19(8):937-54; Wan and Seth, J., MED.CHEM. 2016, 59(21):9645-67, и Egli and Manoharan,

[0004] Одной из наиболее широко используемых модификаций остова в терапии АСО и кРНК является фосфотиоатная (PS) связь, которая заменяет один из немоستيковых атомов кислорода на атом серы. Хотя эта модификация повышает устойчивость к нуклеазам и улучшает фармакокинетику терапевтических олигонуклеотидов без ущерба для их биологической функции, наблюдались токсические эффекты, такие как воспаление, нефротоксичность, гепатотоксичность и тромбоцитопения, как в доклинических моделях, так и в клинике (Frazier, TOXICOL. PATHOL., 2015, 43(1):78-89). Считается, что токсичность возникает из-за сильной тенденции АСО к связыванию с белком через PS-связи (Shen et al., NAT. BIOTECH., 2019, 37:640-50). Кроме того, PS-связи являются хиральными, что приводит к 2^N-диастереомерам, где N обозначает количество PS-связей в основной цепи. Несмотря на десятилетия усилий (Stec et al., NUCLEIC ACID RES., 1991, 1(21):5883-8 и J. AM. CHEM. SOC., 1998, 120(29):7156-67; Agrawal et al., TETRAHEDRON, 1995, 6(5):1051-4, Iyer et al., J. AM. CHEM. SOC., 2000, 112(3), 1253-4, и Oka et al., J. AM. CHEM. SOC., 2008, 130(47):16031-7), включая недавние разработки (Iwamoto et al., NAT. BIOTECH., 2017, 35(9):845-51) в химическом синтезе олигонуклеотидов с определенной стереохимией PS-связей, указанные методы все еще не обеспечивают высокой стереоселективности и высокой эффективности синтеза, и в целом не являются надежными и доступными. Желательно разработать новые межнуклеотидные связи, которые не только могут поддерживать желаемые свойства PS-связей, такие как устойчивость к нуклеазам, аффинность связывания РНК и надлежащую фармакокинетику, но также могут снижать токсичность без ущерба для биологической функции. В идеале новые связи должны быть ахиральными. Даже если хиральности нельзя избежать, контроль стереохимии должен быть надежным и легкодоступным.

[0005] Недавно сообщалось о нейтральных по заряду алкилфосфонатных связях, которые использовались для замены PS-связей в АСО для снижения токсичности и расширения терапевтического окна (Migawa et al., NUCLEIC ACIDS RES., 2019, 47(11):5465-79, и Shen et al., 2019). Однако такие алкилфосфонатные связи являются хиральными, не поддерживают опосредованную РНКазой Н активность вблизи места включения и более восприимчивы к расщеплению цепи в основных условиях, необходимых для снятия защиты олигонуклеотидов после твердофазного синтеза.

[0006] В данной области техники сохраняется потребность в эффективных методах лечения заболеваний, особенно рака. Терапевтические агенты на основе нуклеиновых кислот, которые применимы для модуляции экспрессии гена-мишени в клетке, являются перспективными терапевтическими агентами. Соответственно, остается потребность в

поиске нуклеиновых кислот и их аналогов, которые были бы пригодны для использования в качестве терапевтических агентов.

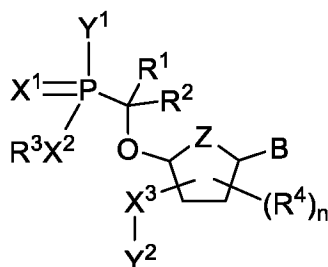
СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Данная заявка относится к новым нуклеиновым кислотам или их аналогам, содержащим 4'-О-метиленфосфонатные межнуклеотидные связи, функция которых заключается в модуляции экспрессии гена-мишени в клетке, а также к способам их получения и применения. Нуклеиновые кислоты и их аналоги, предусмотренные в данном документе, являются стабильными и связываются с РНК-мишенями, вызывая активность РНКазы Н, сравнимую с активностью их фосфоротиоатных (PS) аналогов, а также применимы для переключения сплайсинга и в РНКи. Предусматриваемые нуклеиновые кислоты и их аналоги также можно использовать в других механизмах, таких как переключение сплайсинга, РНКи и т. д. Включение 4'-О-метиленфосфонатной связи придает межнуклеотидным связям устойчивость к нуклеазе, не создает хиральный центр у атома фосфора и сохраняет отрицательный заряд фосфатного остова, который может быть необходим при связывании белка (например, РНКазы Н или Ago2) для проявления высокой активности подавления генов, в отличие от подходов с использованием алкилфосфонатов с нейтральным зарядом (Migawa et al., 2019).

[0008] Подходящие нуклеиновые кислоты или их аналоги, содержащие 4'-О-метиленфосфонатные межнуклеотидные связи, включают молекулы-ингибиторы нуклеиновых кислот, такие как молекулы-ингибиторы дцРНКи, антисмысловые олигонуклеотиды, микроРНК, рибозимы, антагомиры, аптамеры и молекулы-ингибиторы оцРНКи. В частности, настоящее изобретение предусматривает нуклеиновые кислоты и их аналоги, которые находят применение в качестве модуляторов уровней внутриклеточной РНК, которые затем восстанавливаются нуклеиновыми кислотами и их аналогами, как описано в данном документе. Молекулы-ингибиторы нуклеиновых кислот могут модулировать экспрессию РНК с помощью различных механизмов, например, путем РНК-интерференции (РНКи). Преимущество нуклеиновых кислот и их аналогов, представленных в данном документе, заключается в том, что возможен широкий спектр фармакологической активности, согласующийся с модуляцией уровней внутриклеточной РНК. Кроме того, в описании представлены способы применения эффективного количества нуклеиновых кислот и их аналогов, как описано в данном документе, для лечения или облегчения болезненного состояния, такого как рак, вирусная инфекция или генетическое расстройство.

[0009] В настоящее время обнаружено, что нуклеиновые кислоты и их аналоги по

настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемые композиции эффективны в качестве модуляторов уровней внутриклеточной РНК. Такие нуклеиновые кислоты и их аналоги содержат 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, где 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I:



I

или ее фармацевтически приемлемую соль, где все переменные имеют значения, определенные и описанные в данном документе.

[0010] Нуклеиновые кислоты и их аналоги по настоящему изобретению, а также их фармацевтически приемлемые композиции применимы для лечения различных заболеваний, расстройств или состояний, связанных с регуляцией уровней внутриклеточной РНК. Такие заболевания, расстройства или состояния включают описанные в данном документе.

[0011] Нуклеиновые кислоты и их аналоги, представленные в настоящем изобретении, также полезны для изучения экспрессии генов при биологических и патологических явлениях; изучения уровней РНК в тканях организма; и сравнительной оценки новых агентов РНК-интерференции *in vitro* или *in vivo*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0012] Фиг. 1 включает результаты замены межнуклеотидной фосфоротиаотной (PS) связи в эталонном АСО SGLT2 на межнуклеотидную фосфодиэфирную (PO) связь, показывающие % оставшегося SGLT2 по сравнению с ФСБ (ось Y), и ФСБ, эталонный АСО SGLT2 (ACO) и олигонуклеотид с заменой между нуклеотидами 1 и 2 (ACO1), 2 и 3 (ACO2), 3 и 4 (ACO3), 4 и 5 (ACO4), 5 и 6 (ACO5), 6 и 7 (ACO6), 7 и 8 (ACO7), 8 и 9 (ACO8), 9 и 10 (ACO9), 10 и 11 (ACO10) и 11 и 12 (ACO11), считая от 5'-конца к 3'-концу, соответственно (ось X).

[0013] Фиг. 2 включает результаты замены межнуклеотидной фосфоротиаотной (PS) связи на межнуклеотидную 4'-О-метиленфосфонатную (iMOP) связь в остоле АСО *in vivo*, измеренные с помощью нокдауна мРНК SGLT2 (KD) в почках мышей через 5 дней после однократной дозы 0,5 и 3,0 миллиграмма на килограмм массы тела (mpk) (% экспрессии [Slc5a2/Ppib] + ст. ош.)) (ось Y) ФСБ, эталонного АСО SGLT2 (ACO), ACO12 и ACO13

(ось X). АСО12 представляет собой экспериментальный контроль, отличающийся от эталона только тем, что модификация 2'-углерода нуклеотида 11 (считая с 5'-конца) представляет собой 2'-ОМе вместо 2'-МОЕ. АСО13 представляет собой тестируемый образец, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMOP (показано в нуклеиновой кислоте **I-3**) вместо PS. В остальном АСО12 идентичен АСО13.

[0014] Фиг. 3 включает результаты влияния замены PS-связи на межнуклеотидную 4'-О-метиленфосфонатную (iMOP) связь или межнуклеотидную 4'-О-метилметиленфосфонатную (iMeMOP) связь в остова АСО *in vivo*, измеренные с помощью нокдауна (KD) мРНК SGLT2 в почках мышей через 7 дней после однократной дозы 0,5 мг на килограмм массы тела (мрк), показывающие (% оставшейся мРНК SGLT2 по отношению к ФСБ) (ось Y) и АСО14, эталонный АСО SGLT2 (АСО), АСО12, АСО13 и АСО15 (ось X). АСО14 представляет собой РО-контроль, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой фосфодиэфирную связь, а нуклеотид 11 представляет собой 2'-ОМе. АСО12 представляет собой PS-контроль, в котором все связи представляют собой PS, а нуклеотид 11 представляет собой 2'-ОМе. АСО13 представляет собой тестируемый образец iMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMOP вместо PS. АСО15 представляет собой тестируемый образец iMeMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMeMOP (показана в нуклеиновой кислоте **I-6**) вместо PS.

[0015] Фиг. 4 включает результаты связывания iMOP на 5'-конце антисмысловой цепи в молекуле GalXC, измеренные по нокдауну мРНК гена-мишени в печени мыши через 4 дня после разовой дозы 1,0 мг/кг массы тела, показывающие (% оставшейся мРНК Aldh2 по отношению к ФСБ) (ось Y) и ФСБ, GalXC1 и GalXC2 (ось X). GalXC1 представляет собой контрольную молекулу GalXC с PS-связью между нуклеотидами 1 и 2 на 5'-конце антисмысловой цепи. GalXC2 представляет собой молекулу GalXC с заменой 5'-концевой PS-связи антисмысловой цепи на связь iMOP. В остальном, молекулы GalXC идентичны контролю.

[0016] Фиг. 5 раскрывает влияние замены связи PS на связь iMOP или связь iMeMOP на положение GAP2 остова АСО *in vivo*.

[0017] На Фиг. 6 представлены результаты масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS) на основе анализа тритосомальной стабильности *in vitro* для эталонной АСО (А), АСО12 (В), АСО13 (С), АСО14 (D) и АСО15 (Е), показывающие процент остатка (%) (ось Y) в зависимости от времени инкубации с тритосомами (часов) (ось X), как описано в **Таблице 3** Примера 8.

[0018] Фиг. 7 включает результаты определения термостабильности при включении

iMeMOP и iMOP в цепь АСО дуплекса АСО:РНК для эталонного АСО:РНК1, АСО12:РНК1, АСО13:РНК1, АСО15:РНК1 и АСО14:РНК1, показывающие зависимость нормализованной абсорбции (ось Y) от температуры (°C) (ось X).

[0019] Фиг. 8 включает результаты определения активности РНКазы Н при включении iMeMOP и iMOP в цепь АСО гибрида АСО:РНК для эталонного АСО:РНК2, АСО15:РНК2 и АСО13:РНК2, показывающие зависимость процента оставшейся РНК (%) (ось Y) от времени (мин) (ось X).

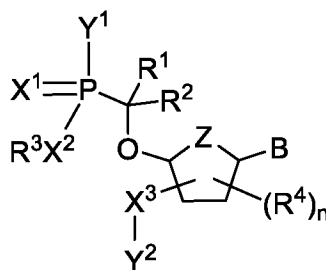
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. *Общее описание определенных вариантов осуществления изобретения:*

[0020] Химия 4'-О-метиленфосфоната для 5'-углеродного миметика фосфата, улучшающая активность и продолжительность РНКи, описана в WO 2018/045317 и U.S. 2019/177729, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Этот тип химического аналога не только имитирует электростатические и/или стерические свойства фосфатной группы, но также обладает превосходной метаболической стабильностью и полностью совместим со стандартным твердофазным синтезом олигонуклеотидов.

[0021] Нуклеиновые кислоты и их аналоги по настоящему изобретению и их композиции пригодны для использования в качестве агентов РНК-интерференции. В некоторых вариантах осуществления предложенная нуклеиновая кислота или ее аналог ингибируют экспрессию гена в клетке.

[0022] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащие 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I:



I

или представляет собой ее фармацевтически приемлемую соль, где:

В представляет собой нуклеобазу или водород;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -

Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R^3 представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, -CN, -NO₂, -OR, -SR, -NR₂, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -S(O)R, -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NR₂, -C(O)N(R)OR, -OC(O)R, -OC(O)NR₂, -OP(O)R₂, -OP(O)(OR)₂, -OP(O)(OR)NR₂, -OP(O)(NR₂)₂, -N(R)C(O)OR, -N(R)C(O)R, -N(R)C(O)NR₂, -N(R)S(O)₂R, -N(R)P(O)R₂, -N(R)P(O)(OR)₂, -N(R)P(O)(OR)NR₂, -N(R)P(O)(NR₂)₂, -N(R)S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X^1 представляет собой O, S или NR;

X^2 представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь;

X^3 представляет собой -O-, -S-, -Se- или -N(R)-;

Y^1 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида;

Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

Z представляет собой -O-, -S-, -N(R)- или -C(R)₂-; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

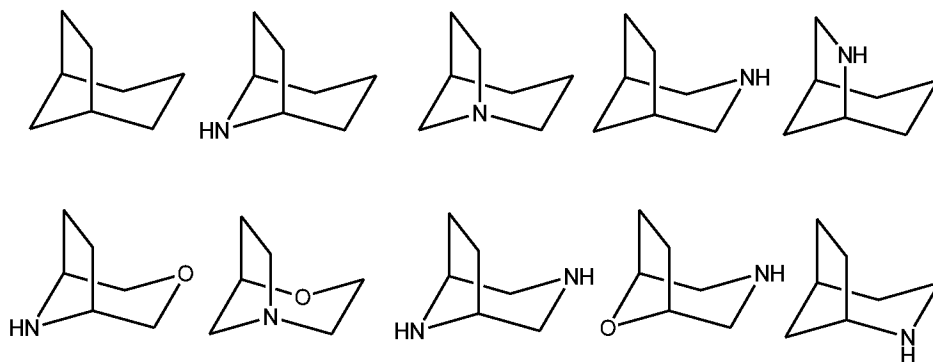
2. Соединения и определения:

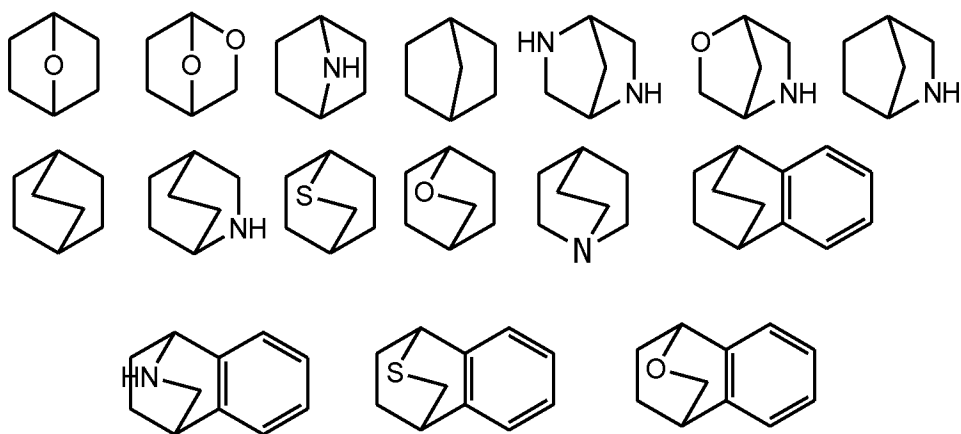
[0023] Соединения по настоящему изобретению (т. е. нуклеиновые кислоты и их аналоги) включают соединения, в общем описанные в данном документе, и дополнительно проиллюстрированы классами, подклассами и видами, раскрытыми в данном документе. При использовании в данном документе должны применяться следующие определения, если не указано иное. Для целей настоящего изобретения химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75^{-е} изд. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в «Organic Chemistry», Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и «March's Advanced Organic Chemistry», 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых настоящим включено посредством ссылки.

[0024] Термин «алифатический» или «алифатическая группа», используемый в данном документе, означает линейную (т. е. неразветвленную) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая является полностью насыщенной или содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, или моноциклический углеводород или бициклический углеводород, который является полностью насыщенным или содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, но не является ароматическим (также именуемый в данном документе «карбоциклом», «циклоалифатическим» или «циклоалкилом»), которые имеют единственную точку присоединения к остальной части молекулы. Если не указано иное, алифатические группы содержат 1-6 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-5 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-4 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-3 алифатических атома углерода, и в других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1-2 алифатических атома углерода. В

некоторых вариантах осуществления «циклоалифатический» (или «карбоцикл» или «циклоалкил») относится к моноциклическому C_3 - C_6 углеводороду, который является полностью насыщенным или содержит одну или несколько единиц ненасыщенности, но не является ароматическим, т. е. имеет единственную точку присоединения к остальной части молекулы. Подходящие алифатические группы включают, без ограничений, линейные или разветвленные, замещенные или незамещенные алкильные, алкенильные, алкинильные группы и их гибриды, такие как (циклоалкил)алкил, (циклоалкенил)алкил или (циклоалкил)алкенил.

[0025] Используемый в данном документе термин «мостиковый бициклический» относится к любой бициклической кольцевой системе, т. е. карбоциклической или гетероциклической, насыщенной или частично ненасыщенной, имеющей по меньшей мере один мостик. По определению ИЮПАК «мостик» представляет собой неразветвленную цепочку атомов или атом или валентную связь, соединяющую два соединяемых мостиковой связью атома, где «соединяемый мостиковой связью атом» — это любой скелетный атом кольцевой системы, который связан с тремя или более скелетными атомами (за исключением водорода). В некоторых вариантах осуществления бициклическая группа с мостиковой связью имеет 7-12 членов кольца и 0-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы. Такие мостиковые бициклические группы хорошо известны в данной области техники и включают указанные ниже группы, причем каждая группа присоединена к остальной части молекулы по любому замещаемому атому углерода или азота. Если не указано иное, мостиковая бициклическая группа необязательно замещена одним или несколькими заместителями, как указано для алифатических групп. Дополнительно или альтернативно, любой замещаемый атом азота мостиковой бициклической группы является необязательно замещенным. Примеры мостиковых бициклов включают:





[0026] Термин «низший алкил» относится к C_{1-4} линейной или разветвленной алкильной группе. Примерами низших алкильных групп являются метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил и трет-бутил.

[0027] Термин «низший галоидалкил» относится к C_{1-4} линейной или разветвленной алкильной группе, замещенной одним или несколькими атомами галогена.

[0028] Термин «гетероатом» обозначает что-то одно или несколько из кислорода, серы, азота, фосфора или кремния (включая любую окисленную форму азота, серы, фосфора или кремния; кватернизованную форму любого основного азота; или замещаемый азот гетероциклического кольца, например, N (как в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как в пирролидине) или NR^+ (как в N-замещенном пирролидине)).

[0029] Термин «ненасыщенный», используемый в данном документе, означает, что фрагмент имеет одну или несколько единиц ненасыщенности.

[0030] Используемый в данном документе термин «двухвалентная C_{1-8} (или C_{1-6}) насыщенная или ненасыщенная, прямая или разветвленная углеводородная цепь» относится к двухвалентным алкиленовым, алкениленовым и алкиниленовым цепям, которые являются линейными или разветвленными, как определено в данном документе.

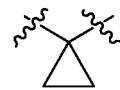
[0031] Термин «алкилен» относится к двухвалентной алкильной группе. «Алкиленовая цепь» представляет собой полиметиленовую группу, т. е. $-(CH_2)_n-$, где n обозначает положительное целое число, предпочтительно, от 1 до 6, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, или от 2 до 3. Замещенная алкиленовая цепь представляет собой полиметиленовую группу, в которой один или несколько метиленовых атомов водорода заменены заместителем. Подходящие заместители включают описанные ниже для замещенной алифатической группы.

[0032] Термин «алкенилен» относится к двухвалентной алкенильной группе. Замещенная алкениленовая цепь представляет собой полиметиленовую группу, содержащую по меньшей мере одну двойную связь, в которой один или несколько атомов водорода замещены заместителем. Подходящие заместители включают описанные ниже

для замещенной алифатической группы.

[0033] Используемый в данном документе термин «циклопропиленил» относится к

двухвалентной циклопропильной группе следующей структуры:



[0034] Термин «галоген» означает F, Cl, Br или I.

[0035] Термин «арил», используемый отдельно или как часть более крупного фрагмента, как в «аралкиле», «аралкокси» или «арилоксиалкиле», относится к моноциклическим или бициклическим кольцевым системам, имеющим в общей сложности от пяти до четырнадцати членов в кольце, причем по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, и при этом каждое кольцо в системе содержит от 3 до 7 членов кольца. Термин «арил» может использоваться взаимозаменяемо с термином «арильное кольцо». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, «арил» относится к ароматической кольцевой системе, которая включает, без ограничений, фенил, бифенил, нафтил, антрацил и т. п., которые могут иметь один или несколько заместителей. Также в объем термина «арил», используемого в данном документе, входит группа, в которой ароматическое кольцо конденсировано с одним или несколькими неароматическими кольцами, такая как инданил, фталимидил, нафтимидил, фенантридинил или тетрагидронафтил и т. п.

[0036] Термины «гетероарил», или «гетероар-», используемые отдельно или как часть более крупного фрагмента, например, «гетероаралкил», или «гетероаралкокси», относятся к группам, имеющим от 5 до 10 кольцевых атомов, предпочтительно, 5, 6 или 9 кольцевых атомов; имеющим 6, 10 или 14 обобществленных π -электронов в циклической части; и содержащим, в дополнение к атомам углерода, от одного до пяти гетероатомов. Термин «гетероатом» относится к азоту, кислороду или сере, и включает любую окисленную форму азота или серы, и любую кватернизированную форму основного атома азота. Гетероарильные группы включают, без ограничений, тиенил, фуранил, пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, тиазолил, изотиазолил, тиадиазолил, пиридил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, индолизинил, пуринил, нафтиридинил и птеридинил. Термины «гетероарил» и «гетероар-», используемые в данном документе, также включают группы, в которых гетероароматическое кольцо конденсировано с одним или несколькими арильными, циклоалифатическими или гетероциклическими кольцами, причем радикал или точка присоединения находятся на гетероароматическом кольце. Неограничительные примеры включают индолил, изоиндолил, бензотиенил, бензофуранил, дибензофуранил, индазолил, бензимидазолил, бензтиазазол, хинолил, изохинолил, циннолинил, фталазинил,

хиназолинил, хиноксалинил, 4*H*–хинолизинил, карбазолил, акридинил, феназинил, фенотиазинил, феноксазинил, тетрагидрохинолил, тетрагидроизохинолинил и пиридо[2,3-*b*]-1,4-оксазин-3(4*H*)-он. Гетероарильная группа может быть моно- или бициклической. Термин «гетероарил» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «гетероарильное кольцо», «гетероарильная группа» или «гетероароматический», любой из указанных терминов включает кольца, которые являются необязательно замещенными. Термин «гетероаралкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероарилом, причем алкильная и гетероарильная части независимо являются необязательно замещенными.

[0037] Используемые в данном документе термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклический радикал» и «гетероциклическое кольцо» используются взаимозаменяемо и относятся к стабильному от 5-7-членному моноциклическому или 7-10-членному бициклическому гетероциклическому фрагменту, который либо насыщен, либо частично ненасыщен, и имеет, в дополнение к атомам углерода, один или несколько, предпочтительно от одного до четырех, гетероатомов, как определено выше. При использовании в ссылке на кольцевой атом гетероцикла, термин «азот» включает замещенный атом азота. В качестве примера, в насыщенном или частично ненасыщенном кольце, содержащем 0-3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы или азота, азот может представлять собой N (как в 3,4-дигидро-2*H*–пирролиле), NH (как в пирролидиниле), или ⁺NR (как в *N*–замещенном пирролидиниле).

[0038] Гетероциклическое кольцо может быть соединено с боковой группой через любой гетероатом или атом углерода, приводящий к образованию стабильной структуры, и любой из атомов в кольце может быть необязательно замещен. Примеры таких насыщенных или частично ненасыщенных гетероциклических радикалов включают, без ограничений, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофенил, пирролидинил, пиперидинил, пирролинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, diaзепинил, оксазепинил, тиазепинил, морфолинил и хинуклидинил. Термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклильное кольцо», «гетероциклическая группа», «гетероциклический фрагмент» и «гетероциклический радикал» используются в данном документе взаимозаменяемо и также включают группы, в которых гетероциклильное кольцо конденсировано с одним или несколькими арильными, гетероарильными или циклоалифатическими кольцами, такими как индолинил, 3*H*–индолил, хроманил, фенантридинил или тетрагидрохинолинил. Гетероциклильная группа может быть моно- или бициклической. Термин «гетероциклилалкил» относится к алкильной группе, замещенной

гетероциклилом, причем алкильная и гетероциклильная части независимо являются необязательно замещенными.

[0039] Используемый в данном документе термин «частично ненасыщенный» относится к кольцевому фрагменту, который включает по меньшей мере одну двойную или тройную связь. Предусматривается, что термин «частично ненасыщенный» охватывает кольца, имеющие множественные участки ненасыщенности, но не включает арильные или гетероарильные фрагменты, как определено в данном документе.

[0040] Как описано в данном документе, соединения по настоящему изобретению могут содержать «необязательно замещенные» фрагменты. В общем, термин «замещенный», с предшествующим термином «необязательно» или без него, означает, что один или несколько атомов водорода указанного фрагмента замещены подходящим заместителем. Если не указано иное, то «необязательно замещенная» группа может иметь подходящий заместитель в каждом замещаемом положении указанной группы, и если в любой данной структуре более чем одно положение может быть замещено более чем одним заместителем, выбранным из определенной группы, то указанный заместитель может быть одним и тем же или разными в каждом положении. Комбинации заместителей, предусматриваемых настоящим изобретением, предпочтительно являются такими, которые приводят к образованию стабильных или химически возможных соединений. Термин «стабильный», при использовании в данном документе, относится к соединениям, которые существенно не изменяются под действием условий их получения, обнаружения и, в некоторых вариантах, их выделения, очистки и применения для одной или нескольких целей, раскрытых в данном документе.

[0041] Подходящие одновалентные заместители у замещаемого атома углерода «необязательно замещенной» группы независимо представляют собой галоген; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$, который может быть замещен R° ; $-CH=CHPh$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -пиридил, который может быть замещен R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$; $-C(S)NR^\circ_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-$

$(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$; $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})\text{R}^\circ$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{N}(\text{OR}^\circ)\text{R}^\circ$; $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^\circ_2$; $-\text{P}(\text{O})_2\text{R}^\circ$; $-\text{P}(\text{O})\text{R}^\circ_2$; $-\text{OP}(\text{O})\text{R}^\circ_2$; $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$; SiR°_3 ; $-(\text{C}_{1-4}$ линейный или разветвленный алкилен) $-\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; или $-(\text{C}_{1-4}$ линейный или разветвленный алкилен) $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$, где каждый R° может быть замещен, как описано ниже, и независимо представляет собой водород, C_{1-6} алифатическую группу, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$, $-\text{CH}_2$ -(5-6-членное гетероарильное кольцо), или 5-6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или, несмотря на приведенное выше определение, два независимых случая R° , взятые вместе с атомом (атомами), промежуточными между ними, образуют 3-12-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моно- или бициклическое кольцо, содержащее 0-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, которое может быть замещено, как описано ниже.

[0042] Подходящие одновалентные заместители у R° (или кольца, образованного при объединении двух независимых случаев R° вместе с их промежуточными атомами) независимо представляют собой галоген, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{R}^\bullet$, $-(\text{галоид}-\text{R}^\bullet)$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{CH}(\text{OR}^\bullet)_2$; $-\text{O}-(\text{галоид}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{N}_3$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{R}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NR}^\bullet_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SiR}^\bullet_3$, $-\text{OSiR}^\bullet_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^\bullet$, $-(\text{C}_{1-4}$ линейный или разветвленный алкилен) $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$ или $-\text{SSR}^\bullet$, где каждый $\text{R}^\bullet$ является незамещенным или, в случае использования предшествующего термина «галоид», является замещенным только одним или несколькими галогенами, и независимо выбран из C_{1-4} алифатической группы, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5-6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, содержащего 0-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы. Подходящие двухвалентные заместители у насыщенного атома углерода R° включают $=\text{O}$ и $=\text{S}$.

[0043] Подходящие двухвалентные заместители у насыщенного атома углерода «необязательно замещенной» группы включают следующие: $=\text{O}$, $=\text{S}$, $=\text{NNR}^*_2$, $=\text{NNHC}(\text{O})\text{R}^*$, $=\text{NNHC}(\text{O})\text{OR}^*$, $=\text{NNHS}(\text{O})_2\text{R}^*$, $=\text{NR}^*$, $=\text{NOR}^*$, $-\text{O}(\text{C}(\text{R}^*_2))_{2-3}\text{O}-$ или $-\text{S}(\text{C}(\text{R}^*_2))_{2-3}\text{S}-$, где каждый независимый случай R^* выбран из водорода, C_{1-6} алифатической группы, которая может быть замещена, как описано ниже, или незамещенного 5-6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, содержащего 0-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы. Подходящие двухвалентные заместители, которые связаны с вицинальными

замещаемыми атомами углерода «необязательно замещенной» группы, включают: $-\text{O}(\text{CR}^*)_{2-3}\text{O}-$, где каждый независимый случай R^* выбирают из водорода, C_{1-6} алифатической группы, которая может быть замещена, как описано ниже, или незамещенного 5–6–членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, содержащего 0–4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[0044] Подходящие заместители у алифатической группы R^* включают галоген, $-\text{R}^\bullet$, $-(\text{галоид}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^\bullet$, $-\text{O}-(\text{галоид}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^\bullet$, $-\text{NR}^{\bullet 2}$ или $-\text{NO}_2$, где каждый $\text{R}^\bullet$ является незамещенным или, в случае использования предшествующего термина «галоид», замещен только одним или несколькими галогенами, и независимо представляет собой C_{1-4} алифатическую группу, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5–6–членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0–4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[0045] Подходящие заместители у замещаемого атома азота «необязательно замещенной» группы включают $-\text{R}^\dagger$, $-\text{NR}^{\dagger 2}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{\dagger 2}$, $-\text{C}(\text{S})\text{NR}^{\dagger 2}$, $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^{\dagger 2}$ или $-\text{N}(\text{R}^\dagger)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$; где каждый $\text{R}^\dagger$ независимо представляет собой водород, C_{1-6} алифатическую группу, которая может быть замещена, как описано ниже, незамещенный $-\text{OPh}$ или незамещенное 5–6–членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0–4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или, несмотря на приведенное выше определение, два независимых случая $\text{R}^\dagger$, взятые вместе с промежуточным атомом (атомами), образуют незамещенное 3–12–членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моно- или бициклическое кольцо, содержащее 0–4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[0046] Подходящие заместители у алифатической группы $\text{R}^\dagger$ независимо представляют собой галоген, $-\text{R}^\bullet$, $-(\text{галоид}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^\bullet$, $-\text{O}-(\text{галоид}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^\bullet$, $-\text{NR}^{\bullet 2}$ или $-\text{NO}_2$, где каждый $\text{R}^\bullet$ является незамещенным или, в случае использования с предшествующим термином «галоид», является замещенным только одним или несколькими галогенами, и независимо представляет собой C_{1-4} алифатическую группу, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5–6–членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0–4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

[0047] Если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также подразумевают включение всех изомерных (например, энантиомерных, диастереомерных и геометрических (или конформационных)) форм структуры, например, R- и S-

конфигураций каждого асимметричного центра, (Z)- и (E)-изомеров двойной связи, и (Z)- и (E)-конформационных изомеров. Таким образом, настоящее изобретение включает отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси соединений по настоящему изобретению. Если не указано иное, все таутомерные формы соединений по изобретению входят в объем изобретения. Кроме того, если не указано иное, структуры, представленные в данном документе, также включают соединения, которые отличаются только присутствием одного или нескольких изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие структуры по настоящему изобретению, включающие замену водорода на дейтерий или тритий, или замену углерода на обогащенный ^{13}C или ^{14}C углерод, входят в объем настоящего изобретения. Такие соединения полезны, например, в качестве аналитических инструментов, в качестве зондов в биологических анализах или в качестве терапевтических агентов по настоящему изобретению.

[0048] В данном документе термины в единственном числе включают указания на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, ссылка на «способ» включает один или несколько способов и/или стадий описанного в данном документе типа, и/или таких, которые будут очевидными специалистам в данной области техники после прочтения этого описания и т. п.

[0049] Используемый в данном документе термин «и/или» служит в данном описании для обозначения либо «и», либо «или», если не указано иное.

[0050] Используемый в данном документе термин «4'-О-метиленфосфонат» относится ко всем аналогам замещенного метилена (например, метилен, замещенный метилом, диметилом, этилом, фтором, циклопропилом и т. д.) и ко всем аналогам фосфоната (например, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфодиэфир и т. д.), описанные в данном документе.

[0051] Используемый в данном документе термин «5'-концевой нуклеотид» относится к нуклеотиду, расположенному на 5'-конце олигонуклеотида. В данной заявке 5'-концевой нуклеотид может также называться «нуклеотид N1».

[0052] Используемый в данном документе термин «аптамер» относится к олигонуклеотиду, обладающему аффинностью связывания с конкретной мишенью, включая нуклеиновую кислоту, белок, специфическую цельную клетку или конкретную ткань. Аптамеры могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники, например, путем отбора *in vitro* из большого пула случайных последовательностей нуклеиновых кислот. Lee et al., NUCLEIC ACID RES., 2004, 32:D95-D100.

[0053] Используемый в данном документе термин «антагомир» относится к олигонуклеотиду, обладающему аффинностью связывания со специфической мишенью, включая ведущую цепь экзогенной молекулы ингибитора РНКи или природной микроРНК (Krutzfeldt et al. NATURE 2005, 438(7068):685-689).

[0054] Молекула двухцепочечного ингибитора РНКи включает две олигонуклеотидных цепи: антисмысловую цепь и смысловую цепь. Антисмысловая цепь или ее участок является частично, по существу или полностью комплементарной соответствующему участку нуклеиновой кислоты-мишени. Кроме того, антисмысловая цепь двухцепочечной молекулы ингибитора РНКи или ее область является частично, по существу или полностью комплементарной смысловой цепи двухцепочечной молекулы ингибитора РНКи или ее области. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь может также содержать нуклеотиды, не комплементарные последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Некомплеметарные нуклеотиды могут находиться с любой стороны комплементарной последовательности или могут находиться с обеих сторон комплементарной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, когда антисмысловая цепь или ее участок частично или по существу комплементарна смысловой цепи или ее участку, некомплеметарные нуклеотиды могут быть расположены между одной или несколькими областями комплементарности (например, одно или несколько несовпадений). Антисмысловая цепь двухцепочечной молекулы ингибитора РНКи также называется ведущей цепью.

[0055] Используемый в данном документе термин «каноническая молекула ингибитора РНК» относится к двум цепям нуклеиновых кислот, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид, с центральной областью комплементарности длиной 19 пар оснований для образования двухцепочечной нуклеиновой кислоты и двумя выступающими нуклеотидами на каждом из 3'-концов.

[0056] Используемый в данном документе термин «комплеметарный» относится к структурной взаимосвязи между двумя нуклеотидами (например, на двух противоположных нуклеиновых кислотах или на противоположных участках одной цепи нуклеиновой кислоты), которая позволяет двум нуклеотидам образовывать друг с другом пары оснований. Например, пуриновый нуклеотид одной нуклеиновой кислоты и комплементарный ему пиримидиновый нуклеотид противоположной нуклеиновой кислоты могут вместе создавать пары оснований путем образования водородных связей друг с другом. В некоторых вариантах осуществления комплементарные нуклеотиды могут образовывать пары оснований по Уотсону-Крику или любым другим способом, который обеспечивает образование стабильных дуплексов. «Полная комплементарность»

или 100% комплементарность относится к ситуации, в которой каждый нуклеотидный мономер первой олигонуклеотидной цепи или сегмента первой олигонуклеотидной цепи может образовывать пару оснований с каждым нуклеотидным мономером второй олигонуклеотидной цепи или сегмента второй олигонуклеотидной цепи. Менее чем 100% комплементарность относится к ситуации, когда некоторые, но не все нуклеотидные мономеры двух олигонуклеотидных цепей (или двух сегментов двух олигонуклеотидных цепей) могут образовывать пары оснований друг с другом. «Существенная комплементарность» относится к двум олигонуклеотидным цепям (или сегментам двух олигонуклеотидных цепей), демонстрирующим 90% или более комплементарности друг с другом. «Достаточно комплементарный» относится к такой комплементарности между мРНК-мишенью и молекулой ингибитора нуклеиновой кислоты, чтобы происходило снижение количества белка, кодируемого мРНК-мишенью.

[0057] Используемый в данном документе термин «комплементарная цепь» относится к цепи двухцепочечной молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты, которая частично, по существу или полностью комплементарна другой цепи.

[0058] Используемый в данном документе термин «обычный антисмысловой олигонуклеотид» относится к одноцепочечным олигонуклеотидам, которые ингибируют экспрессию гена-мишени по одному из следующих механизмов: (1) Стерическое затруднение, например, антисмысловой олигонуклеотид препятствует какой-то стадии в последовательности событий, связанных с экспрессией гена и/или продуцированием кодируемого белка путем непосредственного вмешательства, например, в транскрипцию гена, сплайсинг пре-мРНК и трансляцию мРНК; (2) Индукция ферментативного расщепления транскриптов РНК гена-мишени с помощью РНКазы Н; (3) Индукция ферментативного расщепления транскриптов РНК гена-мишени с помощью РНКазы L; (4) Индукция ферментативного расщепления РНК-транскриптов гена-мишени с помощью РНКазы Р; (5) Индукция ферментативного расщепления РНК-транскриптов гена-мишени с помощью двухцепочечной РНКазы; и (6) Комбинация стерического затруднения и индукции активности ферментативного расщепления в одном и том же антисмысловом олигонуклеотиде. Обычные антисмысловые олигонуклеотиды не обладают механизмом действия РНКи, подобно молекулам-ингибиторам РНКи. Молекулы ингибиторов РНКи можно отличить от обычных антисмысловых олигонуклеотидов несколькими способами, включая потребность в Ago2, который соединяется с антисмысловой цепью РНКи таким образом, что антисмысловая цепь направляет белок Ago2 к намеченной мишени (мишеням), причем Ago2 требуется для подавления активности мишени.

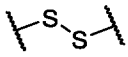
[0059] Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами

(«CRISPR») представляют собой микробную нуклеазную систему, участвующую в защите от вторжения фагов и плазмид. Wright et al., *Cell*, 2016, 164:29-44. Эта прокариотическая система была адаптирована для использования при редактировании представляющих интерес последовательностей нуклеиновых кислот-мишеней в геноме эукариотических клеток. Cong et al., *SCIENCE*, 2013, 339:819-23; Mali et al., *SCIENCE*, 2013, 339:823-26; Woo Cho et al., *NAT. BIOTECHNOLOGY*, 2013, 31(3):230-232. Используемый в данном документе термин «CRISPR-РНК» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей часть «CRISPR» РНК (crPHK) и/или часть транскрибирующей crPHK (tracrPHK), причем часть CRISPR имеет первую последовательность, которая частично, по существу или полностью комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени, и вторую последовательность (также называемую парной индикаторной последовательностью), которая в достаточной степени комплементарна части tracrPHK, чтобы парная индикаторная последовательность и часть tracrPHK гибридизовались с образованием направляющей РНК. Направляющая РНК образует комплекс с эндонуклеазой, такой как эндонуклеаза Cas (например, Cas9), и направляет нуклеазу, опосредующую расщепление нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления часть crPHK сливают с частью tracrPHK с образованием химерной направляющей РНК. Jinek et al., *SCIENCE*, 2012, 337:816-21. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность части crPHK включает от примерно 16 до примерно 24 нуклеотидов, предпочтительно около 20 нуклеотидов, которые гибридизуются с нуклеиновой кислотой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК состоит из примерно 10-500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК состоит из примерно 20-100 нуклеотидов.

[0060] Используемый в данном документе термин «агент доставки» относится к агенту трансфекции или лиганду, который находится в комплексе с олигонуклеотидом или связан с ним, и который опосредует его проникновение в клетки. Этот термин охватывает, например, катионные липосомы, имеющие суммарный положительный заряд, который связывается с отрицательным зарядом олигонуклеотида. Этот термин также охватывает описанные в данном документе конъюгаты, такие как GalNAc и холестерин, которые могут быть ковалентно присоединены к олигонуклеотиду для прямой доставки в определенные ткани. В данном документе также описаны дополнительные конкретные подходящие агенты доставки.

[0061] Используемый в данном документе термин «дезоксирибонуклеотид» относится к нуклеотиду, который имеет водородную группу в 2'-положении фрагмента сахара.

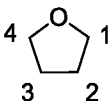
[0062] Используемый в данном документе термин «дисульфид» относится к

химическому соединению, содержащему группу . Обычно каждый атом серы ковалентно связан с углеводородной группой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один атом серы ковалентно связан с группой, отличной от углеводорода. Указанная связь также называется SS-связью или дисульфидным мостиком.

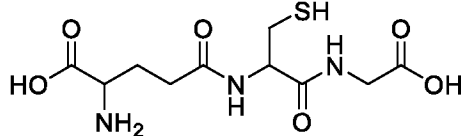
[0063] Используемый в данном документе термин «дуплекс» в отношении нуклеиновых кислот (например, олигонуклеотидов) относится к структуре двойной спирали, образованной за счет комплементарного спаривания оснований двух антипараллельных последовательностей нуклеотидов.

[0064] Используемый в данном документе термин «эксципиент» относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в композицию, например, для придания или усиления желательной консистенции или стабилизирующего эффекта.

[0065] Используемый в данном документе термин «фураноза» относится к углеводу, имеющему пятичленную кольцевую структуру, причем кольцевая структура содержит 4

атома углерода и один атом кислорода, представленную , где числа обозначают положения 4 атомов углерода в пятичленной кольцевой структуре.

[0066] Используемый в данном документе термин «глутатион» (GSH) относится к

трипептиду, имеющему структуру . GSH присутствует в клетках в концентрации приблизительно 1-10 мМ. GSH восстанавливает чувствительные к глутатиону связи, включая дисульфидные связи. В процессе, глутатион превращается в свою окисленную форму - глутатиондисульфид (GSSG). После окисления глутатион может быть восстановлен глутатионредуктазой с использованием НАДФН в качестве донора электронов.

[0067] Встречающиеся в данном документе термины «чувствительное к глутатиону соединение» или «чувствительный к глутатиону фрагмент» используются взаимозаменяемо и относятся к любому химическому соединению (например, олигонуклеотиду, нуклеотиду или нуклеозиду) или фрагменту, содержащему по меньшей мере одну чувствительную к глутатиону связь, такому как дисульфидный мостик или сульфонильная группа. Используемый в данном документе термин «чувствительный к глутатиону олигонуклеотид» представляет собой олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере один нуклеотид, содержащий чувствительную к глутатиону связь. Чувствительный к глутатиону фрагмент может быть расположен на 2'-углероде или 3'-

углероде фрагмента сахара и содержит сульфонильную группу или дисульфидный мостик. В определенном варианте осуществления чувствительный к глутатиону фрагмент совместим со способами синтеза фосфорамидитных олигонуклеотидов, как описано, например, в международной патентной заявке № PCT/US2017/048239, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Чувствительный к глутатиону фрагмент также может быть расположен на фосфорсодержащей межнуклеотидной связи. В определенном варианте осуществления чувствительный к глутатиону фрагмент выбран из описанных в документе PCT/US2013/072536, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки.

[0068] Используемый в данном документе термин «межнуклеотидная связывающая группа» или «межнуклеотидная связь» относится к химической группе, способной ковалентно связывать два нуклеозидных фрагмента. Как правило, химическая группа представляет собой фосфорсодержащую связывающую группу, содержащую фосфогруппу или фосфитную группу. Подразумевается, что связывающие фосфогруппы включают фосфодиэфирную связь, фосфородитионатную связь, фосфототионатную связь, фосфотриэфирную связь, тиоалкилфосфонатную связь, тиоалкилфосфотриэфирную связь, фосфорамидитную связь, фосфонатную связь и/или боранофосфатную связь. Многие фосфорсодержащие связи хорошо известны в данной области, как раскрыто, например, в патентах США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5194599; 5565555; 5527899; 5721218; 5672697 и 5625050. В других вариантах осуществления олигонуклеотид содержит одну или несколько межнуклеотидных связывающих групп, не содержащих атом фосфора, таких как короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межнуклеотидные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межнуклеотидные связи, или одна или несколько короткоцепочечных гетероароматических или гетероциклических межнуклеотидных связей, включая, без ограничений, имеющие силоксановые основные цепи; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые основные цепи; формацетильные и тиоформацетильные основные цепи; метиленформацетильные и тиоформацетильные основные цепи; рибоацетильные основные цепи; алкенсодержащие основные цепи; сульфаматные основные цепи; метилениминовые и метиленигидразиновые основные цепи; сульфонатные и сульфаниламидные основные цепи; и амидные основные цепи. Не содержащие фосфора связи хорошо известны в данной области техники, как раскрыто, например, в патентах США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 5264562; 5264564;

5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5610289; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; 5792608; 5646269 и 5677439.

[0069] Используемый в данном документе термин «петля» относится к структуре, образованной одной цепью нуклеиновой кислоты, в которой комплементарные области, фланкирующие конкретную одноцепочечную нуклеотидную область, гибридизуются таким образом, что одноцепочечная нуклеотидная область между комплементарными областями исключена из образования дуплекса или спаривания оснований по Уотсону-Крику. Петля представляет собой одноцепочечный нуклеотидный участок любой длины. Примеры петель включают неспаренные нуклеотиды, присутствующие в таких структурах, как шпильки и тетрапетли.

[0070] Используемые в данном документе термины «микроРНК», «зрелая микроРНК», «miRNA» и «miR» являются взаимозаменяемыми и относятся к некодирующим молекулам РНК, закодированным в геномах растений и животных. Обычно зрелые микроРНК имеют длину около 18-25 нуклеотидов. В некоторых случаях высококонсервативные, эндогенно экспрессируемые микроРНК регулируют экспрессию генов путем связывания с 3'-нетранслируемыми областями (3'-НТО) специфических мРНК. Некоторые зрелые микроРНК, по-видимому, происходят из длинных эндогенных первичных транскриптов микроРНК (также известных как пре-микроРНК, при-микроРНК, при-miR, при-miR или при-пре-микроРНК), длина которых часто составляет сотни нуклеотидов (Lee, et al., EMBO 1, 2002, 21(17), 4663-4670).

[0071] Используемый в данном документе термин «модифицированный нуклеозид» относится к нуклеозиду, содержащему одно или несколько модифицированных или универсальных нуклеобаз или модифицированный сахар. Модифицированные или универсальные нуклеобазы (также называемые в данном документе аналогами оснований) обычно расположены в 1'-положении нуклеозидного фрагмента сахара и относятся к нуклеобазам в 1'-положении, отличным от аденина, гуанина, цитозина, тимина и урацила. В некоторых вариантах осуществления модифицированное или универсальное нуклеобаз представляет собой азотистое основание. В некоторых вариантах модифицированное нуклеобаз не содержит атом азота. См., например, опубликованную заявку на патент США № 20080274462. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид не содержит азотистого основания (является безосновным). Модифицированный сахар (также называемый в данном документе аналогом сахара) включает модифицированные дезоксирибозные или рибозные фрагменты, в которых, например, модификация происходит в положении 2'-, 3'-, 4'- или

5'-углерода сахара. Модифицированный сахар может также включать неприродные альтернативные углеродные структуры, такие как присутствующие в замкнутых нуклеиновых кислотах («ЗНК») (см., например, Koshkin et al. (1998), TETRAHEDRON, 54, 3607-3630); мостиковых нуклеиновых кислотах («МНК») (см., например, патент США № 7427672 и Mitsuoka et al. (2009), NUCLEIC ACIDS RES., 37(4):1225-38); и разблокированных нуклеиновых кислотах («UNA») (см., например, Snead et al. (2013), MOLECULAR THERAPY—NUCLEIC ACIDS, 2, e103 (doi:10.1038/mtna.2013.36)). Подходящие модифицированные или универсальные нуклеооснования или модифицированные сахара в контексте настоящего изобретения описаны в данном документе.

[0072] Используемый в данном документе термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, содержащему одно или несколько модифицированных или универсальных нуклеооснований, модифицированный сахар или модифицированный фосфат. Модифицированные или универсальные нуклеооснования (также в общем называемые в данном документе нуклеооснованиями) обычно расположены в 1'-положении фрагмента сахара нуклеозида и относятся к нуклеооснованиям, отличным от аденина, гуанина, цитозина, тимина и урацила в 1'-положении. В некоторых вариантах осуществления модифицированное или универсальное нуклеооснование представляет собой азотистое основание. В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеооснование не содержит атома азота. См., например, опубликованную заявку на патент США № 20080274462. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид не содержит нуклеооснования (является безосновным). Модифицированный сахар (также называемый в данном документе аналогом сахара) включает модифицированные дезоксирибозные или рибозные фрагменты, например, в случаях, когда модификация происходит в положении 2'-, 3'-, 4'- или 5'-углерода сахара. Модифицированный сахар может также включать неприродные альтернативные углеродные структуры, такие как присутствующие в замкнутых нуклеиновых кислотах («ЗНК») (см., например, Koshkin et al. (1998), TETRAHEDRON, 54, 3607-3630), мостиковых нуклеиновых кислотах («МНК») (см., например, патент США № 7427672 и Mitsuoka et al. (2009), NUCLEIC ACIDS RES., 37(4):1225-38); и разблокированных нуклеиновых кислотах («UNA») (см., например, Snead et al. (2013), MOLECULAR THERAPY—NUCLEIC ACIDS, 2, e103(doi: 10.1038/mtna.2013.36)). Модифицированные фосфатные группы относятся к модификации фосфатной группы, которая не встречается в природных нуклеотидах и включает не встречающиеся в природе фосфатные миметики, как описано в данном документе. Модифицированные фосфатные группы также включают не встречающиеся в природе межнуклеотидные связывающие группы, включая как фосфорсодержащие

межнуклеотидные связывающие группы, так и не содержащие фосфора связывающие группы, как описано в данном документе. Пригодные модифицированные или универсальные нуклеос основания, модифицированные сахара или модифицированные фосфаты в контексте настоящего изобретения описаны в данном документе.

[0073] Используемый в данном документе термин «голая нуклеиновая кислота» относится к нуклеиновой кислоте, которая не включена в защитную липидную наночастицу или другой защитный состав и, таким образом, подвергается воздействию крови и эндосомальных/лизосомальных компартментов при введении *in vivo*.

[0074] Используемый в данном документе термин «природный нуклеозид» относится к гетероциклическому азотистому основанию в N-гликозидной связи с сахаром (например, дезоксирибозой или рибозой или их аналогом). Природные гетероциклические азотистые основания включают аденин, гуанин, цитозин, урацил и тимин.

[0075] Используемый в данном документе термин «природный нуклеотид» относится к гетероциклическому азотистому основанию в N-гликозидной связи с сахаром (например, рибозой или дезоксирибозой или их аналогом), который связан с фосфатной группой. Природные гетероциклические азотистые основания включают аденин, гуанин, цитозин, урацил и тимин.

[0076] Используемый в данном документе термин «нуклеиновая кислота или ее аналог» относится к любому природному или модифицированному нуклеотиду, нуклеозиду, олигонуклеотиду, обычному антисмысловому олигонуклеотиду, рибонуклеотиду, дезоксирибонуклеотиду, рибозиму, молекуле ингибитора РНКи, антисмысловому олигонуклеотиду (АСО), малой интерферирующей РНК (миРНК), молекуле канонического ингибитора РНК, аптамеру, антагомиру, пропускающим экзоны или изменяющим сплайсинг олигонуклеотидам, мРНК, микроРНК или нуклеазным системам CRISPR, содержащим одну или несколько 4'-О-метиленфосфонатных межнуклеотидных связей, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложенные нуклеиновые кислоты или их аналоги используются в антисмысловых олигонуклеотидах, миРНК и миРНК-субстрате рибонуклеазы *dicer*, включая описанные в US 2010/331389, US 8513207, US 10131912, US 8927705, CA 2738625, EP 2379083 и EP 3234132, каждый из которых в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки.

[0077] Используемый в данном документе термин «молекула ингибитора нуклеиновой кислоты» относится к молекуле олигонуклеотида, которая снижает или устраняет экспрессию гена-мишени, при этом молекула олигонуклеотида содержит область, которая специфически нацелена на последовательность в мРНК гена-мишени. Как правило,

нацеливающая область молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности мРНК гена-мишени, чтобы направить воздействие молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты на указанный ген-мишень. Молекула ингибитора нуклеиновой кислоты может включать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды и/или модифицированные нуклеотиды.

[0078] Используемый в данном документе термин «нуклеооснование» относится к природному нуклеооснованию, модифицированному нуклеооснованию или универсальному нуклеооснованию. Нуклеооснование представляет собой гетероциклический фрагмент, расположенный в 1'-положении фрагмента сахара нуклеотида в модифицированном нуклеотиде, который может быть включен в дуплекс нуклеиновой кислоты (или в эквивалентном положении в замене фрагмента сахара нуклеотида, который может быть включен в дуплекс нуклеиновой кислоты). Соответственно, настоящее изобретение предусматривает нуклеиновую кислоту и ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где нуклеооснованием обычно является либо пуриновое, либо пиримидиновое основание. В некоторых вариантах осуществления нуклеооснование может также включать обычные основания гуанин (G), цитозин (C), аденин (A), тимин (T) или урацил (U) или их производные, такие как защищенные производные, подходящие для использования при получении олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждое из нуклеооснований G, A и C независимо содержит защитную группу, выбранную из изобутирила, ацетила, дифторацетила, трифторацетила, феноксиацетила, изопропилфеноксиацетила, бензоила, 9-флуоренилметоксикарбонила, феноксиацетила, диметилформамидина, дибутилформамидина и N,N-дифенилкарбамата. Аналоги нуклеиновых оснований могут образовывать дуплексы с другими основаниями или аналогами оснований в дцРНК. Аналоги нуклеооснований включают те, которые могут использоваться в нуклеиновых кислотах и их аналогах и в способах по изобретению, например, раскрытые в патентах США №№ 5432272 и 6001983, выданных на имя Benner, и патентной публикации США № 20080213891, выданной на имя Manoharan, которые включены в данный документ посредством ссылки. Неограничивающие примеры нуклеооснований включают гипоксантин (I), ксантин (X), 3 β -D-рибофуранозил-(2,6-диаминопиримидин) (K), 3-O-D-рибофуранозил-(1-метил-пиразоло[4,3-d]пиримидин-5,7(4H,6H)-дион) (P), изо-цитозин (изо-C), изо-гуанин (изо-G), 1- β -D-рибофуранозил-(5-нитроиндол), 1- β -D-рибофуранозил-(3-нитропиррол), 5-бром урацил, 2-аминопурин, 4-тио-

dT, 7-(2-тиенил)-имидазо[4,5-b]пиридин (Ds) и пиррол-2-карбальдегид (Pa), 2-амино-6-(2-тиенил)пурин (S), 2-оксопиридин (Y), дифтортолил, 4-фтор-6-метилбензимидазол, 4-метилбензимидазол, 3-метилизокарбостирлил, 5-метилизокарбостирлил и 3-метил-7-пропинилизокарбостирлил, 7-азаиндолил, 6-метил-7-азаиндолил, имидизопиридинил, 9-метилимидизопиридинил, пирролопиризинил, изокарбостирлил, 7-пропинилизокарбостирлил, пропинил-7-азаиндолил, 2,4,5-триметилфенил, 4-метилиндолил, 4,6-диметилиндолил, фенил, нафталенил, антраценил, фенантраценил, пиренил, стильбензил, тетраценил, пентаценил и их структурные производные (Schweitzer et al., J. ORG. CHEM., 59:7238-7242 (1994); Berger et al., NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 28(15):2911-2914 (2000); Moran et al., J. AM. CHEM. SOC., 119:2056-2057 (1997); Morales et al., J. AM. CHEM. SOC., 121:2323-2324 (1999); Guckian et al., J. AM. CHEM. SOC., 118:8182-8183 (1996); Morales et al., J. AM. CHEM. SOC., 122(6):1001-1007 (2000); McMinin et al., J. AM. CHEM. SOC., 121:11585-11586 (1999); Guckian et al., J. ORG. CHEM., 63:9652-9656 (1998); Moran et al., PROC. NATL. ACAD. SCI., 94:10506-10511 (1997); Das et al., J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS., 1:197-206 (2002); Shibata et al., J. CHEM. SOC., Perkin Trans., 1: 1605-1611 (2001); Wu et al., J. AM. CHEM. SOC., 122(32):7621-7632 (2000); O'Neill et al., J. ORG. CHEM., 67:5869-5875 (2002); Chaudhuri et al., J. AM. CHEM. SOC., 117:10434-10442 (1995); и патент США № 6218108). Аналоги оснований также могут быть универсальным основанием.

[0079] Используемый в данном документе термин «нуклеозид» относится к природному нуклеозиду или модифицированному нуклеозиду.

[0080] Используемый в данном документе термин «нуклеотид» относится к природному нуклеотиду или модифицированному нуклеотиду.

[0081] Используемый в данном документе термин «положение нуклеотида» относится к положению нуклеотида в олигонуклеотиде, считая от нуклеотида на 5'-конце. Например, положение нуклеотида 1 относится к 5'-концевому нуклеотиду олигонуклеотида.

[0082] Используемый в данном документе термин «олигонуклеотид» относится к полимерной форме нуклеотидов, содержащей от 2 до 2500 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит 500-1500 нуклеотидов, как правило, например, в случае использования олигонуклеотида в генной терапии. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является одноцепочечным или двухцепочечным и содержит 7-100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид является одноцепочечным или двухцепочечным и содержит 15-100 нуклеотидов. В другом варианте осуществления олигонуклеотид является

одноцепочечным или двухцепочечным, содержит 15-50 нуклеотидов, как правило, например, в тех случаях, когда олигонуклеотид представляет собой молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления, олигонуклеотид является одноцепочечным или двухцепочечным, содержит 25-40 нуклеотидов, как правило, например, в тех случаях, когда олигонуклеотид представляет собой молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления, олигонуклеотид является одноцепочечным или двухцепочечным, содержит 19-40 или 19-25 нуклеотидов, как правило, например, в тех случаях, когда олигонуклеотид представляет собой двухцепочечную молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты и образует дуплекс с по меньшей мере 18-25 парами оснований. В других вариантах осуществления олигонуклеотид является одноцепочечным и содержит 15-25 нуклеотидов, как правило, например, когда олигонуклеотид представляет собой одноцепочечную молекулу ингибитора РНКи. Как правило, олигонуклеотид содержит одну или несколько фосфорсодержащих межнуклеотидных связывающих групп, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления межнуклеотидная связывающая группа представляет собой не содержащую фосфора связь, как описано в данном документе.

[0083] Используемый в данном документе термин «выступающий конец» относится к терминальному нуклеотиду (нуклеотидам), не участвующему в образовании пар оснований, на любом конце любой цепи двухцепочечной молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец возникает из-за того, что одна цепь или область выходит за конец комплементарной цепи, с которой первая цепь или область образует дуплекс. Одна или обе из двух областей олигонуклеотида, которые способны образовывать дуплекс за счет водородных связей пар оснований, может иметь 5'- и/или 3'-конец, выступающий за 3'- и/или 5'-конец участка комплементарности, общего для двух полинуклеотидов или областей. Одноцепочечная область, выступающая за 3'- и/или 5'-конец дуплекса, называется выступающим концом.

[0084] Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» включает фармакологически эффективное количество олигонуклеотида, модифицированного аналогом фосфата, и фармацевтически приемлемый эксципиент. Используемые в данном документе термины «фармакологически эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относятся к такому количеству олигонуклеотида, модифицированного аналогом фосфата, согласно настоящему изобретению, которое эффективно обеспечивает предполагаемый фармакологический, терапевтический или профилактический результат.

[0085] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый

эксципиент» означает, что эксципиент подходит для применения у людей и/или животных без нежелательных побочных эффектов (таких как токсичность, раздражение и аллергическая реакция), и соответствуют разумному соотношению польза/риск.

[0086] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к таким солям, которые, в рамках здравого медицинского суждения, пригодны для применения в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п., и соответствуют разумному соотношению польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, S.M. Berge et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1–19, включенной в данный документ посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли нуклеиновых кислот и их аналогов по настоящему изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминокислот, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или полученные путем использования других способов, применяемых в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипатные, альгинатные, аскорбатные, аспартатные, бензосульфатные, бензоатные, бисульфатные, боратные, бутиратные, камфоратные, камфорсульфонатные, цитратные, циклопентанпропионатные, биглюконатные, додецилсульфатные, этансульфонатные, формиатные, фумаратные, глюкогептонатные, глицерофосфатные, глюконатные, гемисульфатные, гептаноатные, гексаноатные, гидройодидные, 2-гидроксиэтансульфонатные, лактобионатные, лактатные, лауратные, лаурилсульфатные, малатные, малеатные, малонатные, метансульфонатные, 2-нафталинсульфонатные, никотинатные, нитратные, олеатные, оксалатные, пальмитатные, памоатные, пектинатные, персульфатные, 3-фенилпропионатные, фосфатные, пивалатные, пропионатные, стеаратные, сукцинатные, сульфатные, тартратные, тиоцианатные, п-толуолсульфонатные, ундеканоатные, валератные соли и т. п.

[0087] Соли, полученные из подходящих оснований включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и $N^+(C_{1-4}\text{-алкил})_4$. Типичные соли щелочного или щелочно-земельного металла включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т. п. Дополнительно, фармацевтически приемлемые соли включают, в

соответствующих случаях, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, и образованы с помощью противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат.

[0088] Используемый в данном документе термин «подходящее пролекарство» должен означать соединение, которое может быть преобразовано в физиологических условиях или путем сольволиза в биологически активную нуклеиновую кислоту или ее аналог, описанные в данном документе. Таким образом, термин «пролекарство» относится к предшественнику биологически активной нуклеиновой кислоты или ее аналога, который является фармацевтически приемлемым. Пролекарство может быть неактивным при введении субъекту, но *in vivo* превращается в активное соединение, например, путем гидролиза. Пролекарственное соединение часто обладает преимуществами растворимости, тканевой совместимости или замедленного высвобождения в организме млекопитающих (см., например, Bundgard, H., DESIGN OF PRODRUGS (1985), pp. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam). Обсуждение пролекарств приведено в публикации Higuchi, T., et al., «*Prodrugs as Novel Delivery Systems*», A.C.S. Symposium Series, Vol. 14, и в публикации Roche, E.B., ed. BIOREVERSIBLE CARRIERS IN DRUG DESIGN, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, которые обе включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Термин «пролекарство» также включает любые ковалентно связанные носители, которые высвобождают активное соединение *in vivo*, когда такое пролекарство вводят субъекту-млекопитающему. Пролекарства активного соединения, как описано в данном документе, могут быть получены путем модификации функциональных групп, присутствующих в активном соединении, таким образом, чтобы модификации отщеплялись либо при обычных манипуляциях, либо *in vivo*, с образованием исходного активного соединения. Пролекарства включают соединения, в которых гидроксильная, amino- или меркаптогруппа связана с любой группой, которая при введении пролекарства активного соединения субъекту отщепляется с образованием свободной гидроксильной, свободной amino- или свободной меркаптогруппы, соответственно. Примеры подходящих пролекарств включают, без ограничений, глутатион, ацилокси, тиоацилокси, 2-карбоалкоксиэтил, дисульфид, тиаминаль и производные сложного енольного эфира нуклеиновой кислоты с модифицированным атомом фосфора. Термин «проолигонуклеотид» или «пронуклеотид» или «пролекарство в виде нуклеиновой кислоты» относится к олигонуклеотиду, который был модифицирован для создания пролекарственной формы олигонуклеотида. Фосфонатные и фосфатные пролекарства описаны, например, в Wiener et al., «*Prodrugs or phosphonates and phosphates: crossing the membrane*» TOP. CURR. CHEM. 2015, 360:115–160, которая в полном

объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[0089] Используемый в данном документе термин «фосфорамидит» относится к азотсодержащему производному трехвалентного фосфора. Примеры подходящих фосфорамидитов описаны в данном документе.

[0090] Используемый в данном документе термин «действенность» относится к количеству олигонуклеотида или другого лекарственного средства, которое необходимо ввести *in vivo* или *in vitro* для достижения определенного уровня активности против предполагаемой мишени в клетках. Например, олигонуклеотид, который подавляет экспрессию своей мишени у субъекта на 90% при дозе 1 мг/кг, обладает большей действенностью, чем олигонуклеотид, который подавляет экспрессию своей мишени у субъекта на 90% при дозе 100 мг/кг.

[0091] Используемый в данном документе термин «защитная группа» используется в обычном химическом значении как группа, которая делает функциональную группу обратимо нереакционноспособной при определенных условиях желаемой реакции. После проведения желаемой реакции защитные группы могут быть удалены для снятия защиты с защищенной функциональной группы. Все защитные группы должны обеспечивать возможность удаления в условиях, при которых не разрушается значительная часть синтезируемых молекул.

[0092] Используемый в данном документе термин «предложенная нуклеиновая кислота» относится к любому роду, подроду и/или виду, описанным в данном документе.

[0093] Используемый в данном документе термин «рибонуклеотид» относится к природному или модифицированному нуклеотиду, который имеет гидроксильную группу в 2'-положении фрагмента сахара.

[0094] Используемый в данном документе термин «рибозим» относится к молекуле каталитической нуклеиновой кислоты, которая специфически распознает и расщепляет определенную последовательность нуклеиновой кислоты-мишени, которая может представлять собой либо ДНК, либо РНК. Каждый рибозим содержит каталитический компонент (также называемый «каталитический домен») и компонент, связывающий последовательность-мишень, состоящий из двух связывающих доменов, по одному с каждой стороны каталитического домена.

[0095] Используемый в данном документе термин «молекула ингибитора РНКи» относится либо к (а) двухцепочечной молекуле ингибитора нуклеиновой кислоты («молекула ингибитора дцРНКи»), имеющей смысловую цепь (сопровождающую) и антисмысловую цепь (ведущую), причем антисмысловая цепь или часть антисмысловой цепи используется эндонуклеазой Argonaute 2 (Ago2) при расщеплении мРНК-мишени,

либо к (b) одноцепочечной молекуле ингибитора нуклеиновой кислоты («молекула ингибитора оцРНКи»), имеющей одну антисмысловую цепь, причем эта антисмысловая цепь (или часть этой антисмысловой цепи) используется эндонуклеазой Ago2 при расщеплении мРНК-мишени.

[0096] Молекула двухцепочечного ингибитора РНКи включает две олигонуклеотидных цепи: антисмысловую цепь и смысловую цепь. Смысловая цепь или ее область частично, по существу или полностью комплементарна антисмысловой цепи двухцепочечной молекулы ингибитора РНКи или ее области. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь может также содержать нуклеотиды, не комплементарные антисмысловой цепи. Некомплементарные нуклеотиды могут находиться с любой стороны комплементарной последовательности или могут находиться по обе стороны комплементарной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, когда смысловая цепь или ее область частично или по существу комплементарна антисмысловой цепи или ее области, некомплементарные нуклеотиды могут быть расположены между одной или несколькими областями комплементарности (например, одно или несколько несовпадений). Смысловую цепь также называют сопровождающей цепью.

[0097] Используемый в данном документе термин «системное введение» относится к *in vivo* системной абсорбции или накоплению лекарственных средств в кровотоке с последующим распределением по всему телу.

[0098] Используемые в данном документе термины «участок-мишень», «последовательность-мишень», «целевая нуклеиновая кислота», «область-мишень», «целевой ген» используются взаимозаменяемо и относятся к последовательности РНК или ДНК, которая является «мишенью», например, для расщепления, опосредованного молекулой ингибитора РНКи, содержащей в своей ведущей/антисмысловой области последовательность, которая частично, по существу, полностью или в достаточной степени комплементарна этой последовательности-мишени.

[0099] Используемый в данном документе термин «тетрапетля» относится к петле (одноцепочечной области), которая образует стабильную вторичную структуру, способствующую стабильности соседних нуклеотидов, гибридованных по Уотсону-Крику. Не ограничиваясь теорией, укажем, что тетрапетля может стабилизировать соседнюю уотсон-криковскую пару оснований за счет стэкинг-взаимодействий. Кроме того, взаимодействия между нуклеотидами в тетрапетле включают, без ограничений, не-уотсон-криковское спаривание оснований, стэкинг-взаимодействия, водородные связи и контактные взаимодействия (Cheong et al., NATURE 1990; 346(6285):680-2; Heus and Pardi,

SCIENCE 1991; 253(5016):191-4). Тетрапетля обеспечивает повышение температуры плавления (T_m) прилегающего дуплекса, которое превышает ожидаемое для простой модели последовательности петли, состоящей из случайных оснований. Например, тетрапетля может обеспечивать температуру плавления не менее 50 °C, не менее 55 °C, не менее 56 °C, не менее 58 °C, не менее 60 °C, не менее 65 °C или не менее 75 °C в 10 мМ NaHPO_4 для шпильки, содержащей дуплекс длиной не менее 2 пар оснований. Тетрапетля может содержать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления тетрапетля состоит из четырех нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления тетрапетля состоит из пяти нуклеотидов.

[00100] Примеры тетрапетель РНК включают тетрапетли семейства UNCG (например, UUCG), тетрапетли семейства GNRA (например, GAAA) и тетрапетлю CUUG. (Woese et al., PNAS, 1990, 87(21):8467-71; Antao et al., NUCLEIC ACIDS RES., 1991, 19(21):5901-5). Примеры тетрапетель ДНК включают тетрапетли семейства d(GNNA) (например, тетрапетли d(GTTA), d(GNRA)) тетрапетли семейства d(GNAB), тетрапетли семейства d(CNNG) и тетрапетли семейства d(TNCG) (например, d(TTCG)). (Nakano et al., BIOCHEMISTRY, 2002, 41(48):14281-14292; Shinji et al., NIPPON KAGAKKAI KOEN YOKOSHU, 2000, 78(2):731).

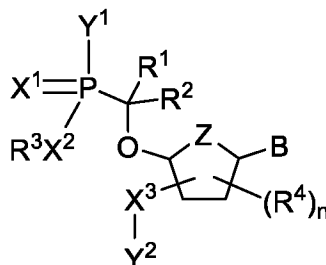
[00101] Используемый в данном документе термин «универсальное основание» относится к гетероциклическому фрагменту, расположенному в 1'-положении фрагмента сахара нуклеотида в модифицированном нуклеотиде, или в эквивалентном положении замены фрагмента сахара нуклеотида, который в случае его присутствия в дуплексе нуклеиновой кислоты, может быть расположен напротив более чем одного типа оснований без изменения структуры двойной спирали (например, структуры фосфатного остова). Кроме того, универсальное основание не нарушает способность одноцепочечной нуклеиновой кислоты, в которой оно находится, образовывать дуплекс с нуклеиновой кислотой-мишенью. Способность одноцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей универсальное основание, образовывать дуплекс с нуклеиновой кислотой-мишенью можно оценить способами, очевидными для специалистов в данной области техники (например, УФ-поглощение, круговой дихроизм, гелевая ретардация, чувствительность к нуклеазе, специфичной к одноцепочечным участкам, и т. д.). Кроме того, условия, при которых наблюдается образование дуплекса, например, температуру, можно варьировать для определения стабильности дуплекса или его образования, поскольку температура плавления (T_m) коррелирует со стабильностью дуплексов нуклеиновых кислот. По сравнению с эталонной одноцепочечной нуклеиновой кислотой, которая точно

комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени, одноцепочечная нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с нуклеиновой кислотой-мишенью, имеющий более низкую T_m , чем дуплекс, образованный с комплементарной нуклеиновой кислотой. Однако по сравнению с эталонной одноцепочечной нуклеиновой кислотой, в которой универсальное основание было заменено основанием для получения одиночного несоответствия, одноцепочечная нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с целевой нуклеиновой кислотой, имеющий более высокую T_m , чем дуплекс, образованный нуклеиновой кислотой с несовпадающим основанием.

[00102] Некоторые универсальные основания способны к спариванию оснований путем образования водородных связей между универсальным основанием и любым основанием из гуанина (G), цитозина (C), аденина (A), тимина (T) и урацила (U) в условиях образования пары оснований. Универсальное основание не является основанием, образующим пару оснований только с одним комплементарным основанием. В дуплексе универсальное основание может не образовывать водородных связей, образовывать одну водородную связь или более одной водородной связи с каждым из G, C, A, T и U, расположенных напротив него в противоположной цепи дуплекса. Предпочтительно, универсальные основания не взаимодействуют с расположенным напротив него основанием в противоположной цепи дуплекса. Спаривание оснований в дуплексе с участием универсального основания происходит без изменения структуры двойной спирали фосфатного остова. Универсальное основание может также взаимодействовать с основаниями соседних нуклеотидов в той же цепи нуклеиновой кислоты путем стэкинг-взаимодействий. Такие стэкинг-взаимодействия стабилизируют дуплекс, особенно в ситуациях, когда универсальное основание не образует никаких водородных связей с основанием, расположенным напротив него на противоположной цепи дуплекса. Неограничивающие примеры нуклеотидов с универсальным связыванием включают инозин, 1-O-D-рибофуранозил-5-нитроиндол и/или 1-β-D-рибофуранозил-3-нитропиррол (публикация патентной заявки США № 20070254362 на имя Quay et al.; Van Aerschot et al., *An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside*, NUCLEIC ACIDS RES. 1995 Nov. 11; 23(21):4363-70; Loakes et al., *3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR*, NUCLEIC ACIDS RES. 1995 Jul. 11; 23(13):2361-6; Loakes and Brown, *5-Nitroindole as a universal base analogue*, NUCLEIC ACIDS RES. 1994 Oct. 11; 22(20):4039-43).

3. Описание примерных вариантов осуществления:

[00103] Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I:



I

или представляет собой ее фармацевтически приемлемую соль, где:

B представляет собой нуклеобазу или водород;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R¹ и R² на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X^1 представляет собой O, S или NR;

X^2 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

Y^1 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида;

Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

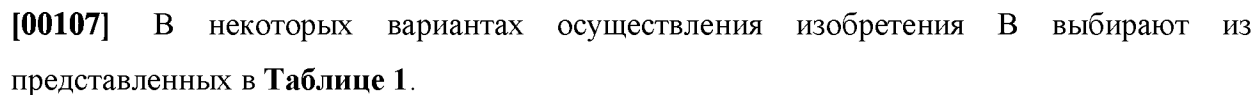
Z представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00104] Как определено выше и описано в данном документе, В представляет собой нуклеооснование или водород.

[00105] В некоторых вариантах осуществления В представляет собой нуклеооснование. В некоторых вариантах осуществления, В представляет собой аналог нуклеооснования. В некоторых вариантах осуществления, В представляет собой модифицированное нуклеооснование. В некоторых вариантах осуществления, В представляет собой универсальное нуклеооснование. В некоторых вариантах осуществления В представляет собой водород.

[00106] В некоторых вариантах осуществления изобретения В выбирают из



[00108] Как определено выше и описано в данном документе, R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^3 , $-CN$, $-S(O)R$, $-S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$, или R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[00109] В некоторых вариантах осуществления изобретения R^1 и R^2 независимо представляют собой водород. В некоторых вариантах осуществления изобретения R^1 и R^2 независимо представляют собой дейтерий. В некоторых вариантах осуществления, R^1 и R^2 независимо представляют собой галоген. В некоторых вариантах осуществления, R^1 и R^2 независимо представляют собой R^5 . В некоторых вариантах осуществления, R^1 и R^2 независимо представляют собой -CN. В некоторых вариантах осуществления, R^1 и R^2 независимо представляют собой -S(O)R. В некоторых вариантах осуществления R^1 и R^2 независимо представляют собой -S(O)₂R. В некоторых вариантах осуществления R^1 и R^2 независимо представляют собой -Si(OR)₂R. В некоторых вариантах осуществления R^1 и R^2 независимо представляют собой -Si(OR)R₂. В некоторых вариантах осуществления, R^1 и R^2 независимо представляют собой -SiR₃. В некоторых вариантах осуществления, R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[00110] В некоторых вариантах осуществления изобретения R¹ представляет собой метил и R² представляет собой водород.

[00111] В некоторых вариантах осуществления, R^1 и R^2 выбирают из представленных в **Таблице 1**.

[00112] Как определено выше и описано в данном документе, каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного

кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы.

[00113] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой подходящую защитную группу. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенную C₁₋₆ алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный 4-7-членный насыщенный или частично ненасыщенный гетероцикл, содержащий 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления, две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы.

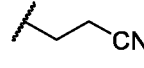
[00114] В некоторых вариантах осуществления, R выбирают из представленных в **Таблице 1** ниже.

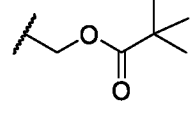
[00115] Как определено выше и описано в данном документе, R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

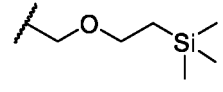
[00116] В некоторых вариантах осуществления R³ представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R³ представляет собой подходящую защитную группу. В некоторых вариантах осуществления R³ представляет собой подходящее пролекарство. В некоторых вариантах осуществления R³ представляет собой подходящее фосфатное/фосфонатное пролекарство, которое представляет собой глутатион-чувствительный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R³ представляет собой чувствительный к глутатиону фрагмент, выбранный из описанных в международной

патентной заявке № PCT/US2017/048239, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления, R^3 представляет собой необязательно замещенную C_{1-6} алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления, R^3 представляет собой необязательно замещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления, R^3 представляет собой необязательно замещенную 4-7-членный насыщенный или частично ненасыщенный гетероцикл, содержащий 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления, R^3 представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[00117] В некоторых вариантах осуществления изобретения R^3 представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления изобретения R^3 представляет собой этил.

В некоторых вариантах осуществления, R^3 представляет собой . В некоторых

вариантах осуществления, R^3 представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления, R^3 представляет собой .

[00118] В некоторых вариантах осуществления, R^3 выбирают из представленных в **Таблице 1** ниже.

[00119] Как определено выше и описано в данном документе, каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, -CN, -NO₂, -OR, -SR, -NR₂, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -S(O)R, -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NR₂, -C(O)N(R)OR, -OC(O)R, -OC(O)NR₂, -OP(O)R₂, -OP(O)(OR)₂, -OP(O)(OR)NR₂, -OP(O)(NR₂)₂, -N(R)C(O)OR, -N(R)C(O)R, -N(R)C(O)NR₂, -N(R)S(O)₂R, -N(R)P(O)R₂, -N(R)P(O)(OR)₂, -N(R)P(O)(OR)NR₂, -N(R)P(O)(NR₂)₂, -N(R)S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃.

[00120] В некоторых вариантах осуществления изобретения, R^4 представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой дейтерий. В некоторых вариантах осуществления, R^4 представляет собой подходящее пролекарство. В некоторых вариантах осуществления, R^4 представляет собой подходящее фосфатное/фосфонатное пролекарство, которое представляет собой глутатион-чувствительный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, R^4 представляет собой глутатион-чувствительный фрагмент, выбранный из описанных в международной патентной заявке № PCT/US2013/072536, которая включена в данный документ в полном

[illegible]

представляет собой 

[00122] В некоторых вариантах осуществления, R^4 выбирают из представленных в Таблице 1.

[00123] Как определено выше и описано в данном документе, каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[00124] В некоторых вариантах осуществления, R^5 представляет собой необязательно замещенную C_{1-6} алифатическую группу. В других вариантах осуществления R^5 представляет собой необязательно замещенный низший алкил. В некоторых вариантах осуществления, R^5 представляет собой необязательно замещенное 4-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления, R^5 представляет собой необязательно замещенное 5-6-членное гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[00125] В некоторых вариантах осуществления, R^5 выбирают из представленных в Таблице 1 ниже.

[00126] Как определено выше и описано в данном документе, X^1 представляет собой O, S или NR.

[00127] В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой NR.

[00128] В некоторых вариантах осуществления, X^1 выбирают из представленных в Таблице 1 ниже.

[00129] Как определено выше и описано в данном документе, X^2 представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь.

[00130] В некоторых вариантах осуществления X^2 представляет собой -O-. В некоторых вариантах осуществления, X^2 представляет собой -S-. В некоторых вариантах осуществления, X^2 представляет собой -B(H)₂-. В некоторых вариантах осуществления X^2 и R^3 образуют -BH₃. В некоторых вариантах осуществления X^2 представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления X^2 представляет собой ковалентную связь, которая образует боранофосфатный остов.

[00131] В некоторых вариантах осуществления, X^2 выбирают из представленных в

Таблице 1 ниже.

[00132] Как определено выше и описано в данном документе, X^3 представляет собой -O-, -S-, -Se- или -N(R)-.

[00133] В некоторых вариантах осуществления, X^3 представляет собой -O-. В некоторых вариантах осуществления, X^3 представляет собой -S-. В некоторых вариантах осуществления, X^3 представляет собой -Se-. В некоторых вариантах осуществления, X^3 представляет собой -N(R)-.

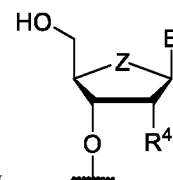
[00134] В некоторых вариантах осуществления, X^3 выбирают из представленных в **Таблице 1** ниже.

[00135] Как определено выше и описано в данном документе, Y^1 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида.

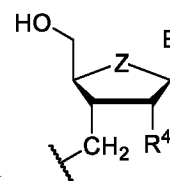
[00136] В некоторых вариантах осуществления, Y^1 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, Y^1 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида.

[00137] В некоторых вариантах осуществления связывающая группа Y^1 представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления, связывающая группа Y^1 представляет собой $-C(R)_2-$. В некоторых вариантах осуществления, связывающая группа Y^1 представляет собой $-CH_2-$.

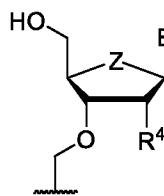
[00138] В некоторых вариантах осуществления, Y^1 представляет собой

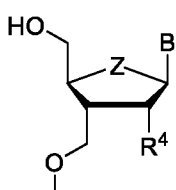


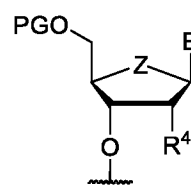
некоторых вариантах осуществления, Y^1 представляет собой

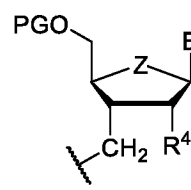


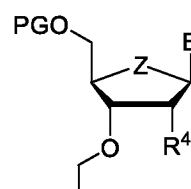
вариантах осуществления, Y^1 представляет собой

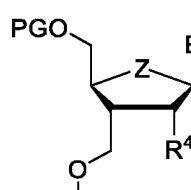


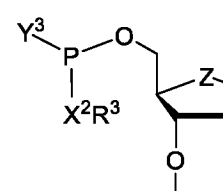
осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

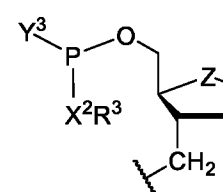
осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

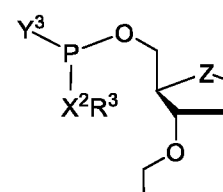
осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

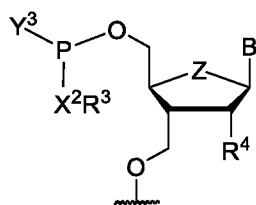
осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

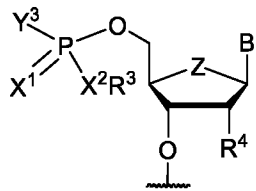
осуществления, Y^1 представляет собой  . В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой



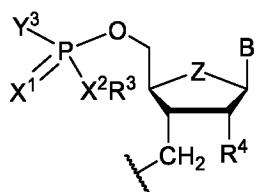
. В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой



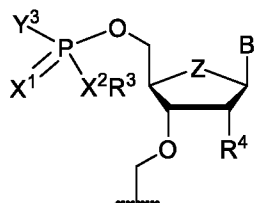
. В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой



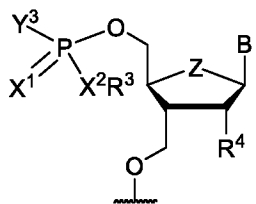
. В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой



. В некоторых вариантах

осуществления, Y^1 представляет собой



[00139] В некоторых вариантах осуществления, Y^1 выбирают из представленных в **Таблице 1** ниже.

[00140] Как определено выше и описано в данном документе, Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорида, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке.

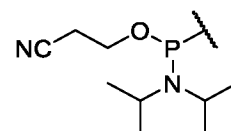
[00141] В некоторых вариантах осуществления Y^2 представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления Y^2 представляет собой защитную группу. В некоторых вариантах осуществления Y^2 представляет собой аналог фосфорида. В некоторых вариантах осуществления Y^2 представляет собой аналог фосфорида

формулы: R^3X^2-P-E , где каждый из R^3 , X^2 и E независимо имеет значения, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'-углероду нуклеозида,

нуклеотида или олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления Y^2 представляет собой связывающую группу, присоединенную к твердой подложке.

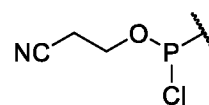
[00142] В некоторых вариантах осуществления Y^2 представляет собой бензоил. В некоторых вариантах осуществления Y^2 представляет собой трет-бутилдиметилсилил. В

некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой



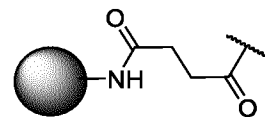
. В

некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой



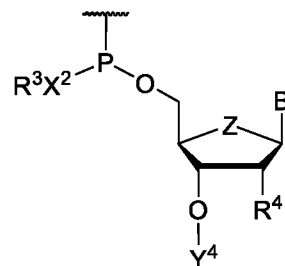
. В

некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой



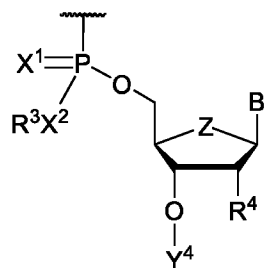
. В

некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой



. В

некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой



[00143] В некоторых вариантах осуществления, Y^2 выбирают из представленных в **Таблице 1** ниже.

[00144] Как указано выше, в некоторых вариантах осуществления Y^1 , Y^3 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида.

[00145] В некоторых вариантах осуществления, Y^3 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, Y^3 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида.

[00146] В некоторых вариантах осуществления, Y^3 выбирают из представленных в Таблице 1 ниже.

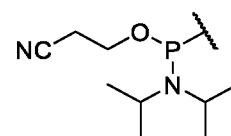
[00147] Как указано выше в некоторых вариантах осуществления Y^2 , Y^4 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке.

[00148] В некоторых вариантах осуществления Y^4 представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления Y^4 представляет собой защитную группу. В некоторых вариантах осуществления, Y^4 представляет собой аналог фосфорамидита. В некоторых вариантах осуществления, Y^4 представляет собой аналог фосфорамидита

формулы: R^3X^2-P-E , где каждый из R^3 , X^2 и E независимо имеет значение, описанное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, Y^4 представляет собой межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, Y^4 представляет собой межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, Y^4 представляет собой связывающую группу, присоединенную к твердой подложке.

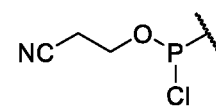
[00149] В некоторых вариантах осуществления Y^4 представляет собой бензоил. В некоторых вариантах осуществления Y^4 представляет собой трет-бутилдиметилсиллил. В

некоторых вариантах осуществления Y^4 представляет собой



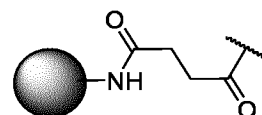
В

некоторых вариантах осуществления, Y^2 представляет собой



В

некоторых вариантах осуществления Y^4 представляет собой



[00150] В некоторых вариантах осуществления, Y^4 выбирают из представленных в Таблице 1 ниже.

[00151] Как определено выше и описано в данном документе, Z представляет собой -O-, -S-, -N(R)- или -C(R)₂-.

[00152] В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой -O-. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой -S-. В некоторых вариантах

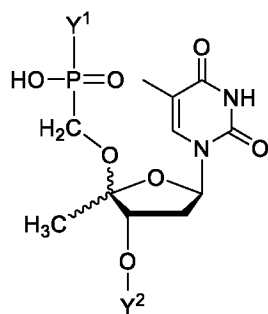
осуществления Z представляет собой -N(R)-. В некоторых вариантах осуществления изобретения Z представляет собой -C(R)₂-.

[00153] В некоторых вариантах осуществления, Z выбирают из представленных в **Таблице 1** ниже.

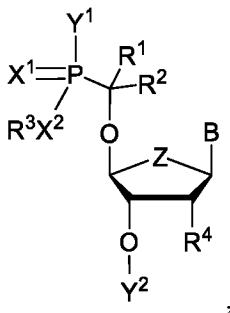
[00154] Как определено выше и описано в данном документе, n равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00155] В некоторых вариантах осуществления n равен 0. В некоторых вариантах осуществления n равен 1. В некоторых вариантах осуществления n равен 2. В некоторых вариантах осуществления n равен 3. В некоторых вариантах осуществления n равен 4. В некоторых вариантах осуществления n равен 5. В некоторых вариантах осуществления n выбран из значений, представленных в **Таблице 1** ниже.

[00156] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или ее аналог, содержащие 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, не содержат метильной замены в положении 4'-С. В некоторых вариантах осуществления 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь, представленная формулой **I**, не является



[00157] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, n равен 1, а связность и стереохимия являются такими, как показано, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-a-1**:

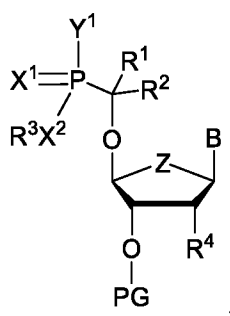


I-a-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y¹, Y² и Z имеет значения, определенные выше.

[00158] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой подходящую защитную группу (PG) гидроксила, n равен 1, а связность и стереохимия являются такими, как показано, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-a-2**:

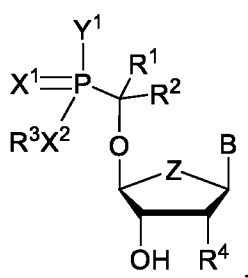


I-a-2

или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 , Y^1 и Z имеет значения, определенные выше.

[00159] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой водород, n равен 1, а связность и стереохимия являются такими, как показано, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-a-3**:

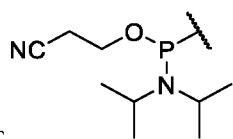


I-a-3

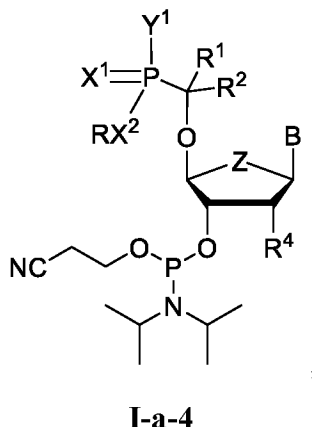
или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 , Y^1 и Z имеет значения, определенные выше.

[00160] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой



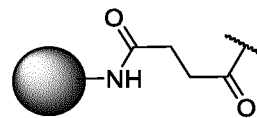
фосфорамидит , n равен 1, а связность и стереохимия являются такими, как показано, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-a-4**:



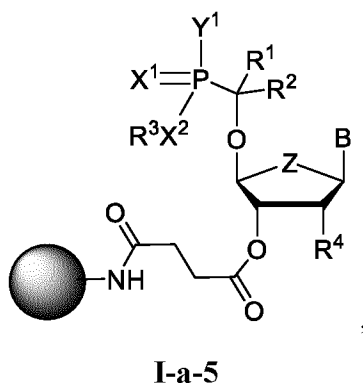
или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y¹ и Z имеет значения, определенные выше.

[00161] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, Y² представляет собой



связывающую группу, присоединенную к твердой подложке , n равен 1, а связность и стереохимия являются такими, как показано, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-a-5**:

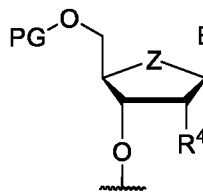


или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

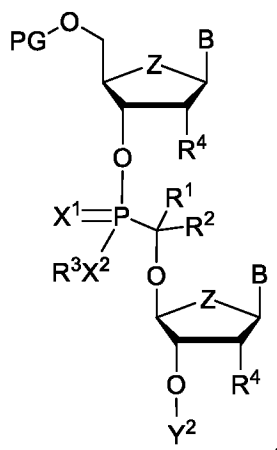
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y¹ и Z имеет значения, определенные выше.

[00162] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную

межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X^3 представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой ковалентную связь,



присоединенную к 3'-гидроксилу нуклеозида, при этом PG Y^1 представляет собой подходящую защитную группу гидроксила, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-b-1**:

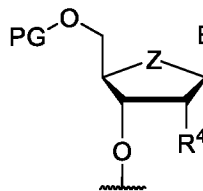


I-b-1

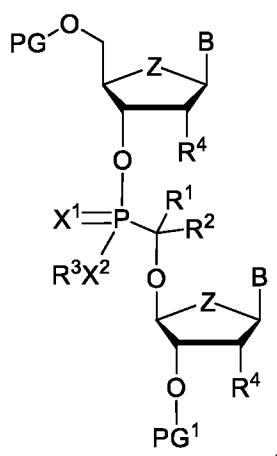
или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 , Y^2 и Z имеет значения, определенные выше.

[00163] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой подходящую защитную группу гидроксила PG^1 , n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой ковалентную связь,



присоединенную к 3'-гидроксилу нуклеозида, при этом PG Y^1 представляет собой подходящую защитную группу гидроксила, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-c-1**:

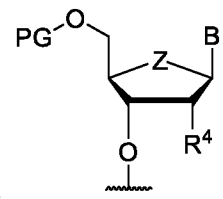


I-c-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

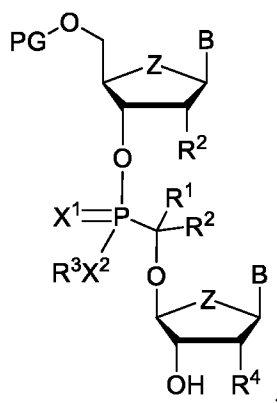
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X² и Z имеет значения, определенные выше.

[00164] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнауклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнауклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, Y² представляет собой водород, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y¹ представляет



собой ковалентную связь, присоединенную к 3'-гидроксилу нуклеозида

при этом PG Y¹ представляет собой подходящую защитную группу гидроксила, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d-1**:



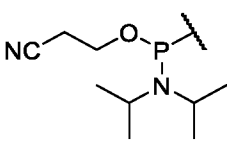
I-d-1

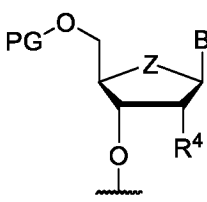
или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

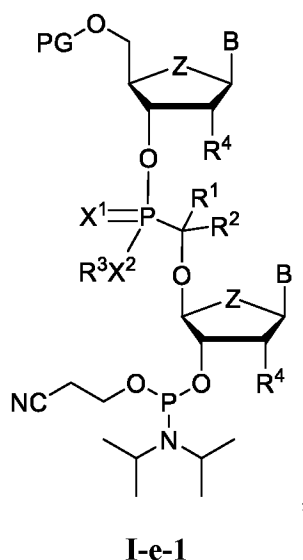
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X² и Z имеет значения, определенные выше.

[00165] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную

межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой

фосфорамидит , n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой ковалентную связь, присоединенную к 3'-гидроксилу

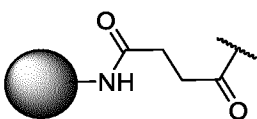
нуклеозида , при этом PG Y^1 представляет собой подходящую защитную группу гидроксила, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы I-e-1:

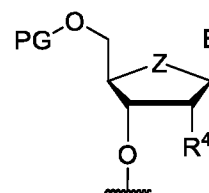


или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

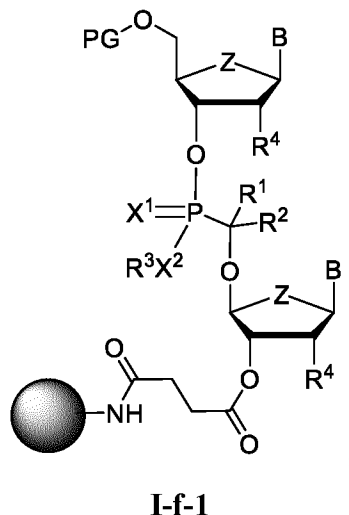
каждый из B, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 и Z имеет значения, определенные выше.

[00166] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой

связывающую группу, присоединенную к твердой подложке , n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой



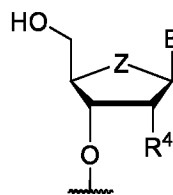
ковалентную связь, присоединенную к 3'-гидроксилу нуклеозида , при этом PG Y¹ представляет собой подходящую защитную группу гидроксила, с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-f-1**:



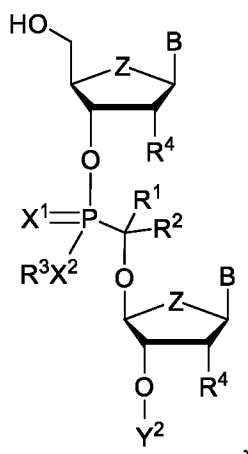
или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y¹ и Z имеет значения, определенные выше.

[00167] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y¹ представляет собой ковалентную связь,



присоединенную к 3'-гидроксилу нуклеозида , с образованием при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-g-1**:

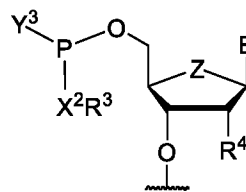


I-g-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

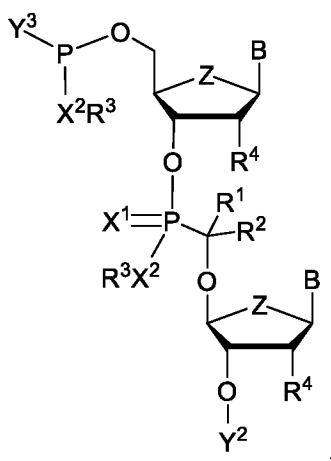
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y² и Z имеет значения, определенные выше.

[00168] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межинуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межинуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y¹ представляет собой ковалентную связь,



присоединенную к 3'-гидроксилу олигонуклеотида

при этом нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-h-1**:



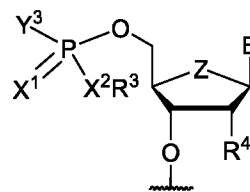
I-h-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

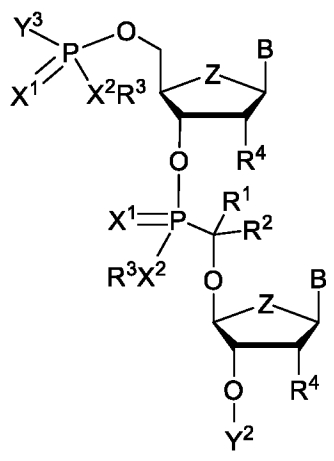
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y², Y³ и Z имеет значения, определенные выше.

[00169] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную

межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I, где X^3 представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой ковалентную связь,



присоединенную к 3'-гидроксилу олигонуклеотида при этом олигонуклеотида формулы I-i-1:

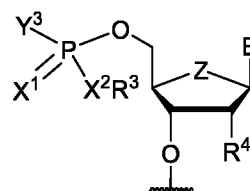


I-i-1

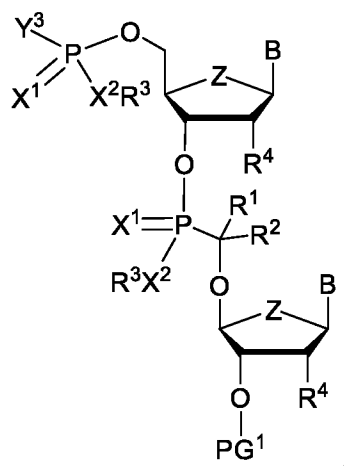
или его фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 , Y^2 , Y^3 и Z имеет значения, определенные выше.

[00170] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой подходящую защитную группу гидроксила PG^1 , n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой ковалентную связь,



присоединенную к 3'-гидроксилу олигонуклеотида при этом олигонуклеотида формулы I-j-1:

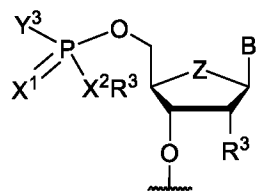


I-j-1

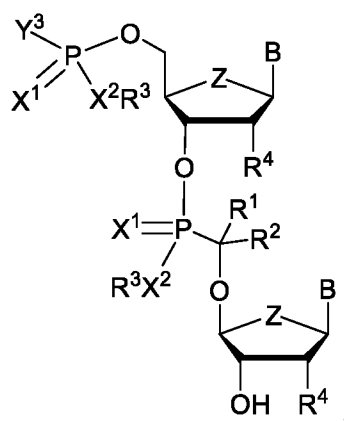
или его фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y³ и Z имеет значения, определенные выше.

[00171] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, Y² представляет собой водород, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y¹ представляет собой ковалентную связь, присоединенную к 3'-гидроксилу олигонуклеотида



, с образованием при этом олигонуклеотида формулы **I-k-1**:



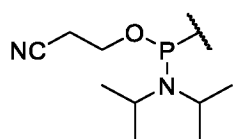
I-k-1

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

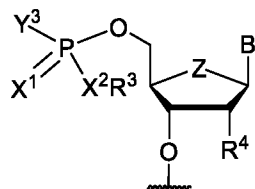
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y³ и Z имеет значения, определенные выше.

[00172] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную

межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой

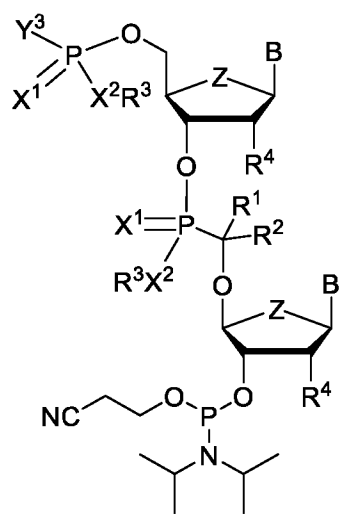


, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой ковалентную связь, присоединенную к 3'-гидроксилу



олигонуклеотида, с образованием при этом олигонуклеотида формулы

I-I-1:

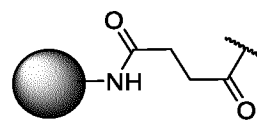


I-I-1

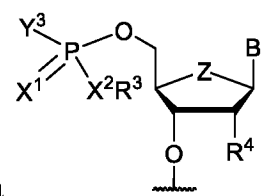
или его фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 , Y^3 и Z имеет значения, определенные выше.

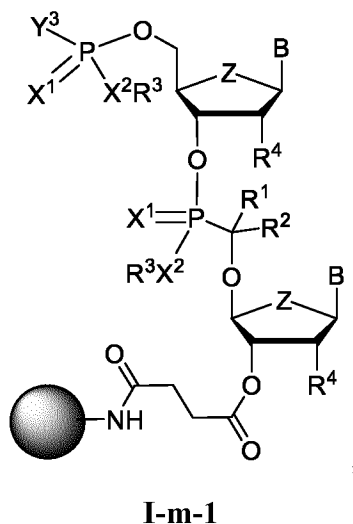
[00173] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I, где X^3 представляет собой -O-, Y^2 представляет собой



связывающую группу, присоединенную к твердой подложке, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y^1 представляет собой



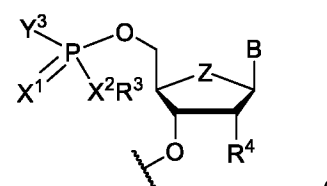
ковалентную связь, присоединенную к 3'-гидроксилу олигонуклеотида с образованием при этом олигонуклеотида формулы **I-m-1**:



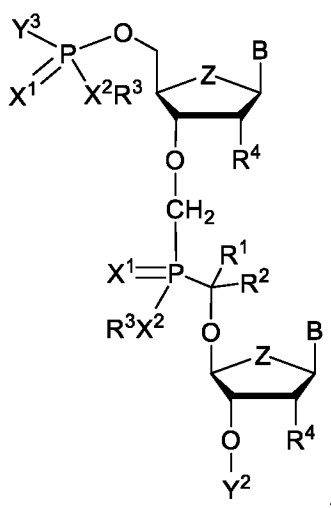
или его фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y³ и Z имеет значения, определенные выше.

[00174] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y¹ представляет собой метиленовую



группу, присоединенную к 3'-гидроксилу олигонуклеотида с образованием при этом олигонуклеотида формулы **I-n-1**:

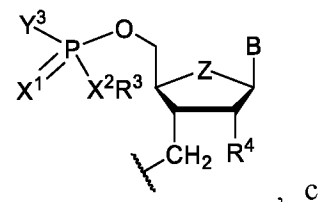


I-n-1

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

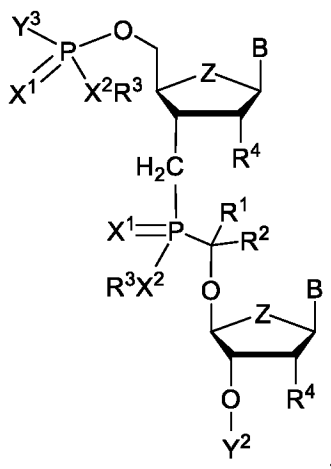
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y², Y³ и Z имеет значения, определенные выше.

[00175] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I**, где X³ представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, и Y¹ представляет собой метиленовую



группу, присоединенную к 3'-атому углерода олигонуклеотида

образованием при этом олигонуклеотида формулы **I-o-1**:

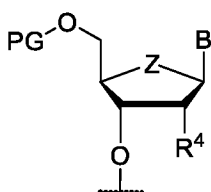


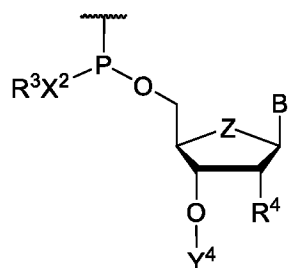
I-o-1

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

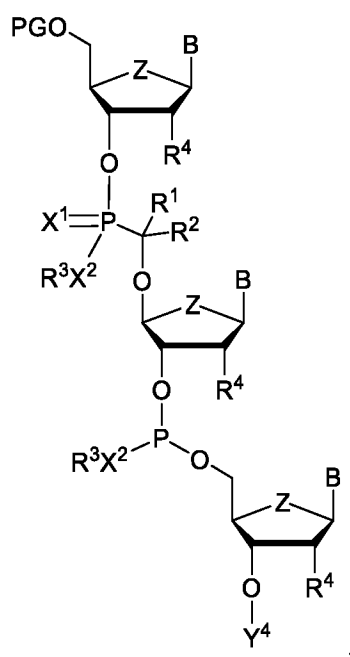
каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y², Y³ и Z имеет значения, определенные выше.

[00176] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнауклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнауклеотидная связь представлена формулой **I**, где X^3 представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, Y^1 представляет собой ковалентную связь,

присоединенную к 3'-гидроксилу нуклеозида , и Y^2 представляет собой



, с образованием при этом олигонуклеотида формулы **I-p-1**:

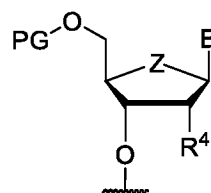


I-p-1

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

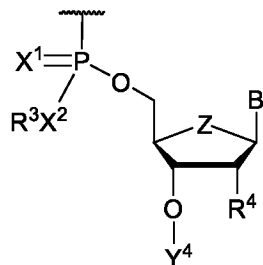
каждый из B , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 , Y^4 и Z имеет значения, определенные выше.

[00177] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнауклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнауклеотидная связь представлена формулой **I**, где X^3 представляет собой -O-, n равен 1, связность и стереохимия являются такими, как показано, Y^1 представляет собой ковалентную связь,

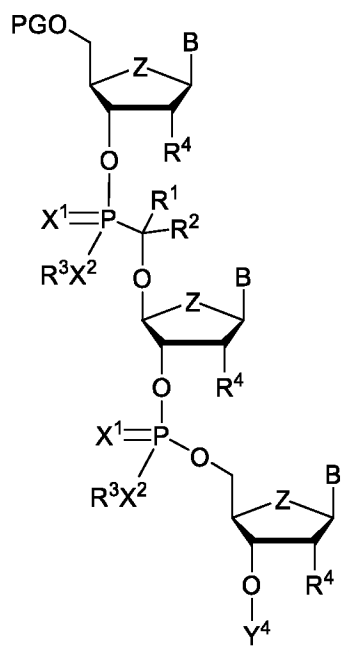


присоединенную к 3'-гидроксилу нуклеозида

, и Y^2 представляет собой



, с образованием при этом олигонуклеотида формулы **I-q-1**:



I-q-1

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

каждый из B , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , X^1 , X^2 , Y^4 и Z имеет значения, определенные выше.

[00178] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает конъюгат олигонуклеотид-лиганда, содержащему антисмысловую цепь длиной от 15 до 30 нуклеотидов с одним или несколькими любыми из раскрытых выше аналогов нуклеиновых кислот, и смысловую цепь длиной от 10 до 53 нуклеотидов, в котором смысловая цепь образует дуплексную область с антисмысловой цепью, и смысловая цепь содержит один или несколько фрагментов лиганда. В некоторых вариантах осуществления фрагмент лиганда представляет собой GalNAc.

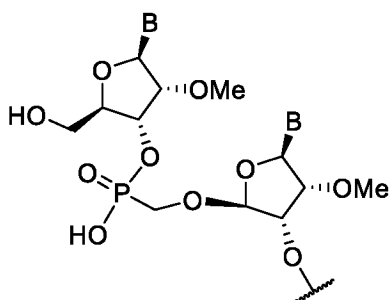
[00179] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 4'-О-метилфосфонатную межнуклеотидную связь на 5'-конце.

[00180] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает

конъюгат олигонуклеотид-лиганд или его фармацевтически приемлемую соль, содержащий:

смысловую цепь длиной 36 нуклеотидов, содержащую 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15 и 17, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 16, 18-27 и 31-36, и одну фосфоротиоатную межнауклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 1 и 2, при этом нуклеотиды в положениях 27-30 образуют тетрапетлю, и каждый из нуклеотидов в положениях 28-30 конъюгирован с моновалентным фрагментом GalNac в 2'-положении; и

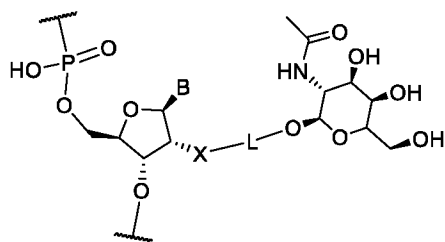
антисмысловую цепь длиной 22 нуклеотида, содержащую 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 3, 4, 5, 7, 10, 14, 16 и 19, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 2, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 18 и 20-22, и три фосфоротиоатные межнауклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 20 и 21, и между нуклеотидами в положениях 21 и 22, причем нуклеотиды в положениях 1 и 2 образуют 4'-О-метиленфосфонатную межнауклеотидную связь, имеющую следующую структуру:



, где каждый В независимо представляет собой нуклеобазу, как описано в данном документе, например, аденин, гуанин, цитозин или урацил.

[00181] В некоторых вариантах осуществления положения 27-30 смысловой цепи образуют тетрапетлю GAAA.

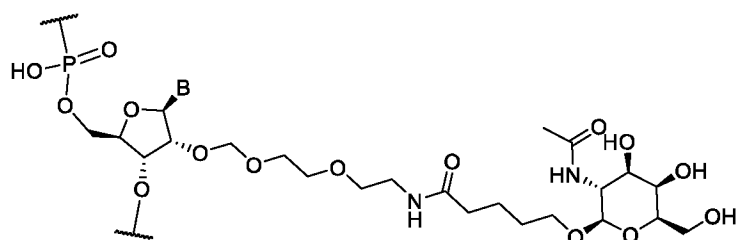
[00182] В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, конъюгированный с моновалентным фрагментом GalNac в 2'-положении, имеет следующую структуру:



, где В представляет собой нуклеобазу, как описано в данном документе, например, аденин, гуанин, цитозин или урацил; Х представляет

собой O, S или N; и L представляет собой связь, маркер клик-химии или линкер длиной от 1 до 20 включительно последовательных ковалентно связанных атомов, выбранный из группы, состоящей из замещенного и незамещенного алкилена, замещенного и незамещенного алкенилена, замещенного и незамещенного алкинилена, замещенного и незамещенного гетероалкилена, замещенного и незамещенного гетероалкенилена, замещенного и незамещенного гетероалкинилена и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ацетальный линкер. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой O.

[00183] В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, конъюгированный с моновалентным фрагментом GalNac в 2'-положении, имеет следующую структуру:



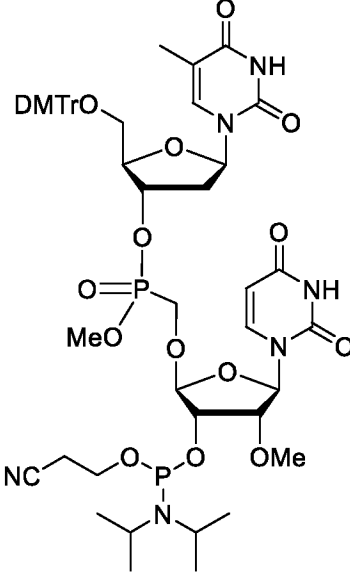
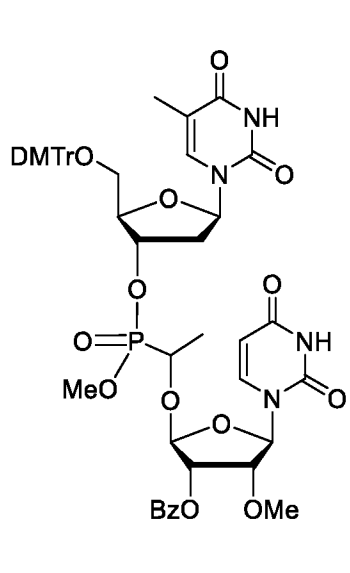
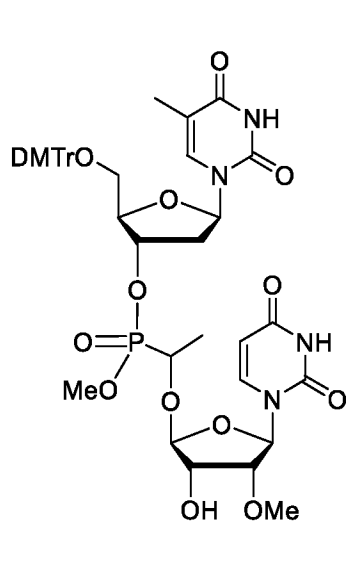
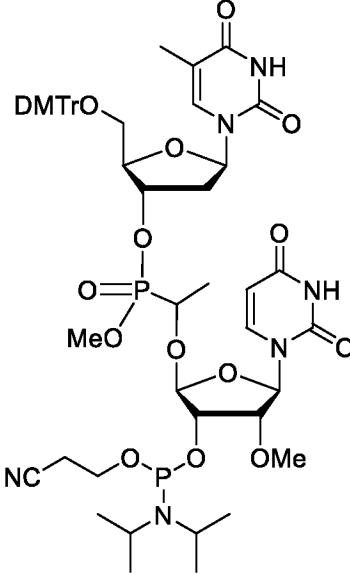
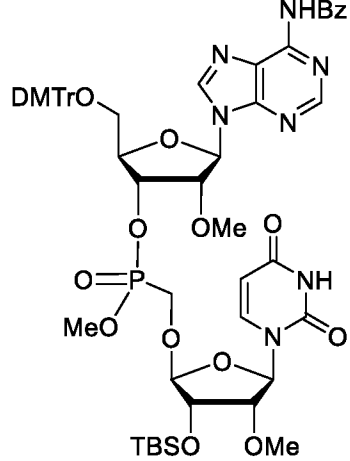
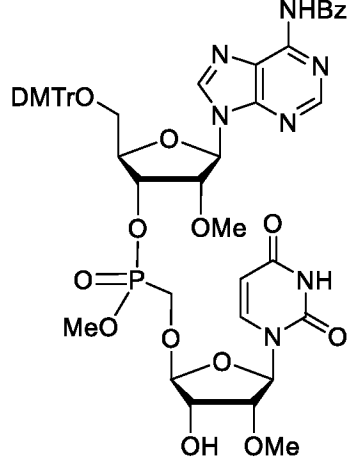
, где В представляет собой нуклеобазу, как описано в данном документе, например, аденин, гуанин, цитозин или урацил.

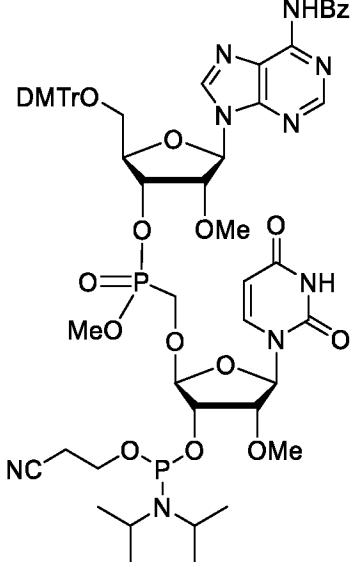
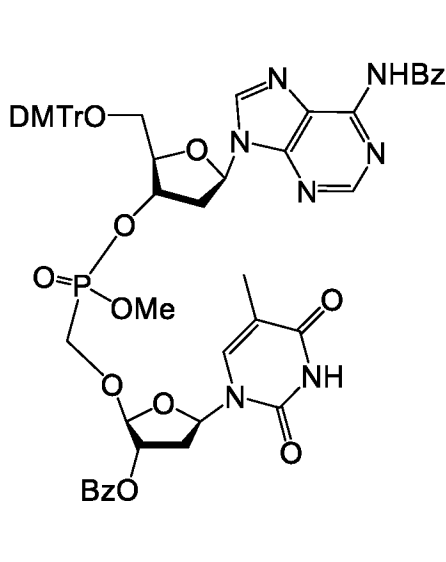
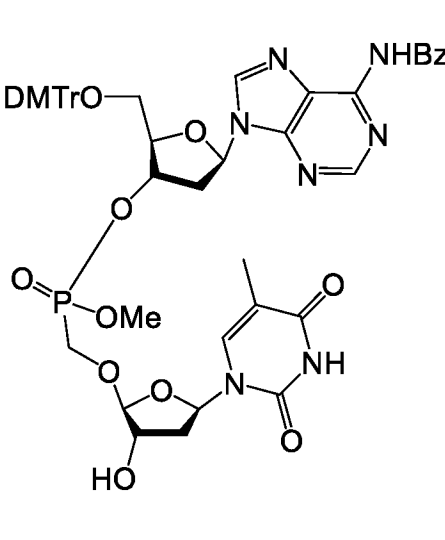
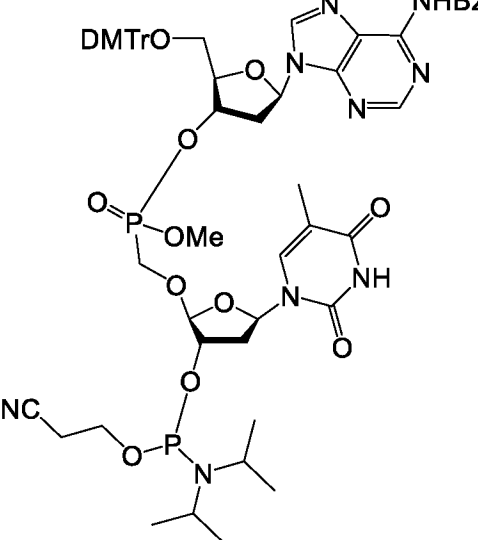
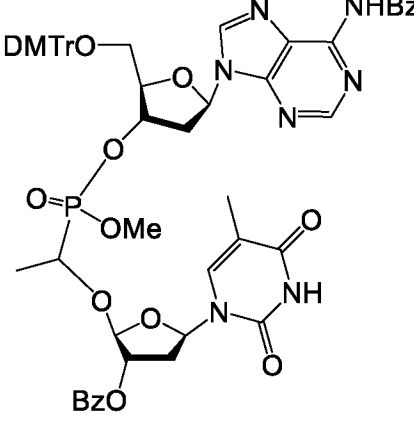
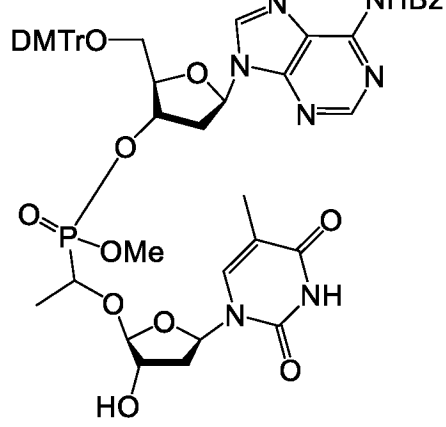
[00184] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает конъюгат олигонуклеотид-лиганд, имеющему структуру GalXC2, показанную на Фиг. 4.

[00185] Примеры нуклеиновых кислот и их аналогов, содержащих 4'-O-метилфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению, представлены в **Таблице 1** ниже.

Таблица 1. Примеры нуклеиновых кислот и их аналогов

I-№	Структура	I-№	Структура
I-1		I-2	

I-3		I-4	
I-5		I-6	
I-7		I-8	

I-9		I-10	
I-11		I-12	
I-13		I-14	

I-15		I-16	
I-17		I-18	

[00186] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащий 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению, указанную в **Таблице 1** выше, или ее фармацевтически приемлемую соль.

4. Общие способы получения нуклеиновых кислот и их аналогов.

[00187] Нуклеиновые кислоты и их аналоги, содержащие 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, описанную в данном документе, могут быть получены с использованием различных методов синтеза, известных в данной области техники, включая стандартные фосфорамидитные методы. Для синтеза нуклеиновых кислот, предложенных в настоящем изобретении, можно использовать любой метод фосфорамидитного синтеза. В некоторых вариантах осуществления фосфорамидиты используют в методе твердофазного синтеза для получения реакционноспособных

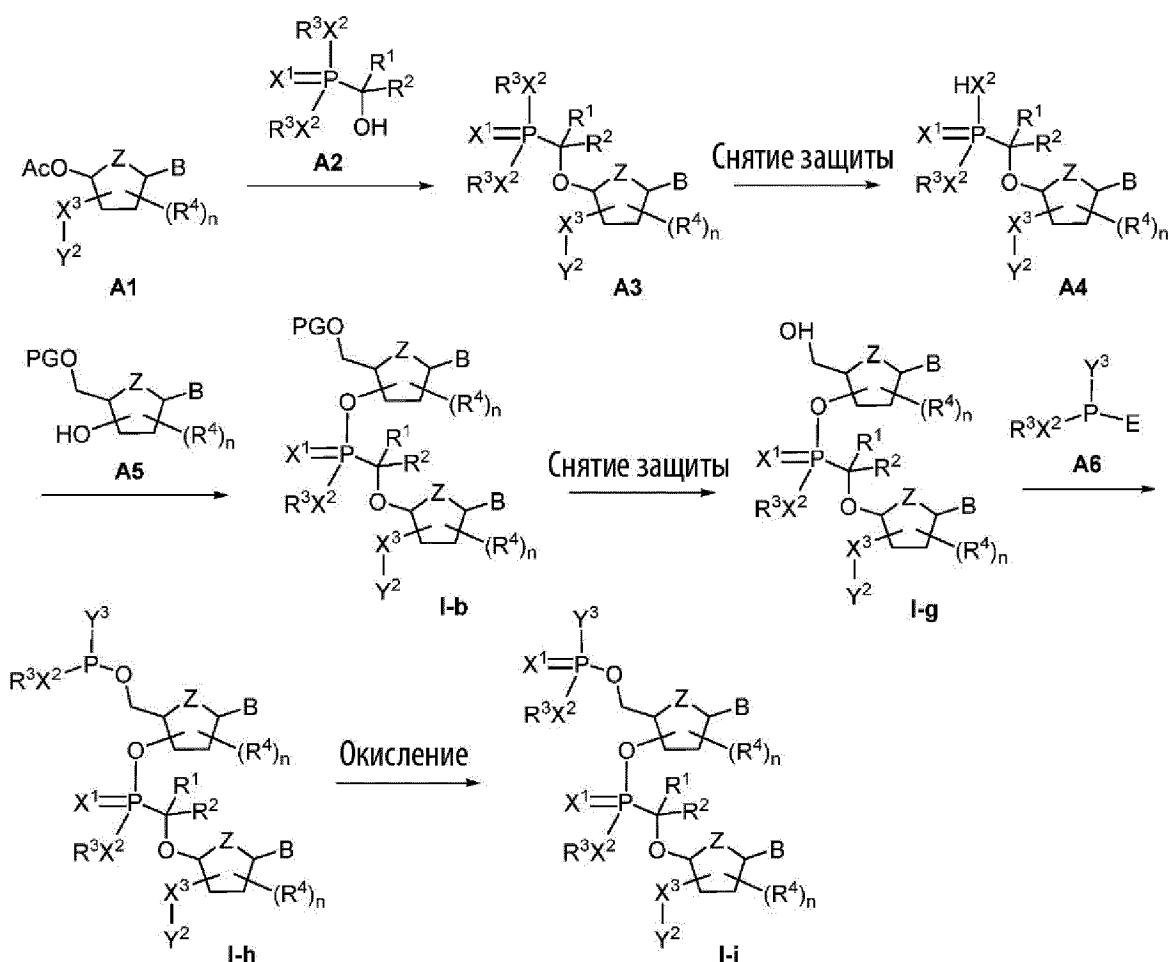
промежуточных фосфитных соединений, которые затем окисляют с использованием известных способов для получения фосфонат-модифицированных олигонуклеотидов, обычно с фосфодиэфирными или фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. Синтез олигонуклеотидов по настоящему изобретению можно проводить в любом направлении: от 5' к 3' или от 3' к 5' с использованием способов, известных в данной области техники.

[00188] В некоторых вариантах осуществления способ синтеза предложенной нуклеиновой кислоты включает (а) присоединение нуклеозида или его аналога к твердой подложке посредством ковалентной связи; (b) связывание нуклеозида фосфорамидита или его аналога с реакционноспособной гидроксильной группой нуклеозида или его аналога со стадии (а) с образованием между ними межнуклеотидной связи, при этом кэпируют любые несвязанные нуклеозиды или их аналоги на твердом носителе кэпирующим реагентом; (с) окисление указанной межнуклеотидной связи окисляющим агентом; и (d) итеративное повторение стадий (b)-(с) с последующими нуклеозидными фосфорамидитами или их аналогами с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, причем по меньшей мере нуклеозид или его аналог со стадии (а), нуклеозидный фосфорамидит или его аналог со стадии (b) или по меньшей мере один из последующих нуклеозидных фосфорамидитов или их аналогов со стадии (d) включает фосфонатсодержащую группу, как описано в данном документе. Обычно стадии связывания, кэпирования/окисления и, необязательно, стадии снятия защиты повторяют до тех пор, пока олигонуклеотид не достигнет желаемой длины и/или последовательности, после чего его отщепляют от твердой подложки.

[00189] На **Схеме А** ниже, в тех случаях, когда указаны конкретная защитная группа, уходящая группа или условия трансформации, рядовому специалисту в данной области техники будет понятно, что другие защитные группы, уходящие группы и условия трансформации также являются подходящими и предусматриваемыми. Определенные реакционноспособные функциональные группы (например, -N(H)-, -ОН и т. д.), изображенные в общем на **Схеме А**, требующие дополнительных стратегий защитных групп, также предусматриваются и известны специалистам в данной области техники. Такие группы и превращения подробно описаны в *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, M. B. Smith and J. March, 5th Edition, John Wiley & Sons, 2001, *Comprehensive Organic Transformations*, R. C. Larock, 2nd Edition, John Wiley & Sons, 1999, и *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, каждое из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[00190] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты и их аналоги по настоящему изобретению обычно получают в соответствии со **Схемой А** и **Схемой В**, представленными ниже:

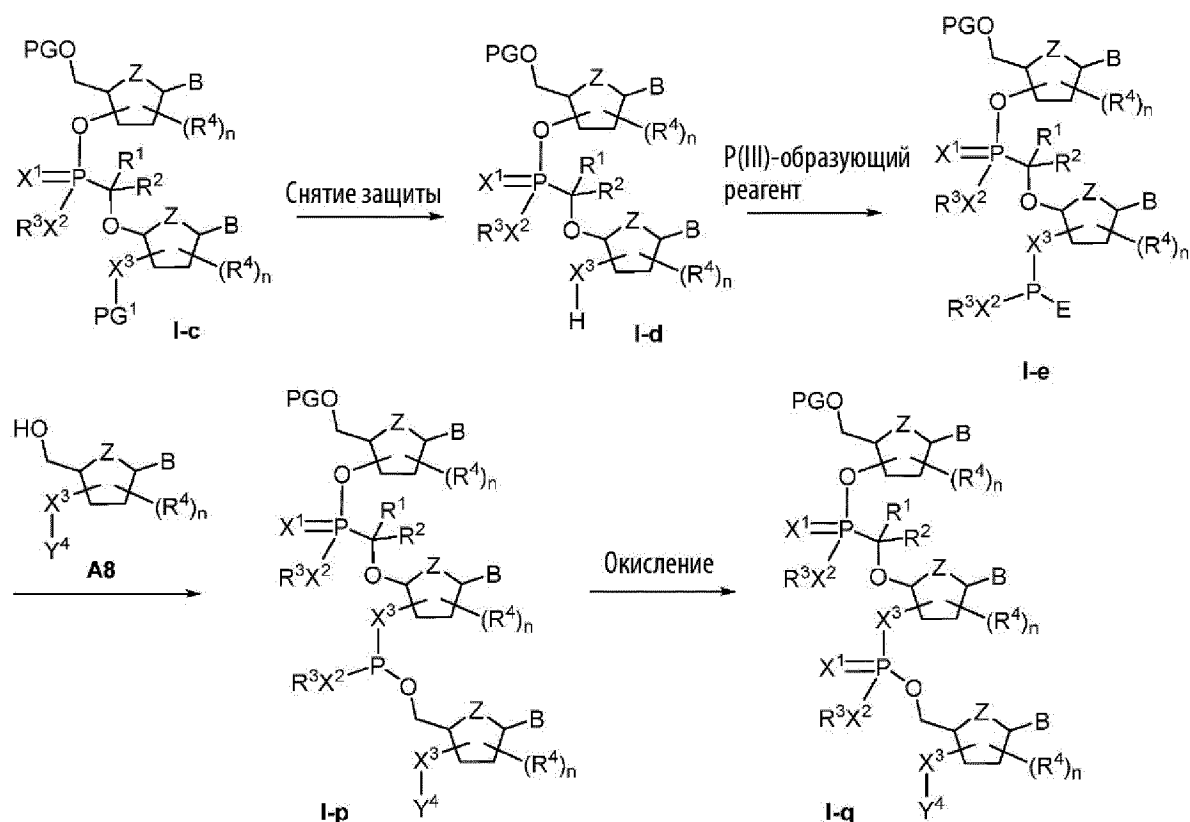
Схема А: Проведение синтеза нуклеиновых кислот и их аналогов по изобретению и синтеза олигонуклеотидов по изобретению в направлении от 3' к 5'



[00191] Как показано на **Схеме А** выше, нуклеиновую кислоту или ее аналог формулы **A1** связывают с соединением P(V) формулы **A2**, например, с использованием кислоты Льюиса (например, $BF_3 \cdot OEt_2$), с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A3**, содержащей, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонат. После этого сначала снимают защиту с нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A3** (например, гидролизуют) с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4**, содержащей, без ограничений, водород-4'-О-метиленфосфонат, с последующей конденсацией с нуклеотидом или его аналогом формулы **A5** с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-b**, содержащей, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению. Затем у нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-b** удаляют защиту с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-g**, и проводят реакцию с фосфорамидитным аналогом

формулы **A6** с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-h**, включающей, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению. Окисление нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-h** дает затем олигонуклеотидное соединение формулы **I-i**, содержащее, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению. Каждый из B, E, PG, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², X³, Y², Y³, Z и n имеет значения, определенные выше и описанные в данном документе.

Схема В: Проведение синтеза нуклеиновых кислот и их аналогов по изобретению и олигонуклеотидов по изобретению в направлении от 5' к 3'

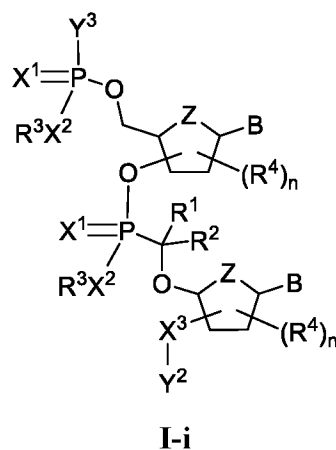


[00192] Как показано на **Схеме В** выше, у нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-c**, содержащей, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению, сначала селективно снимают защиту с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d** по изобретению, а затем проводят реакцию с P(III)-образующим реагентом, с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e** по изобретению. Руководство по выбору PG¹ и PG в нуклеиновой кислоте или ее аналоге формулы **I-c** для селективного удаления PG¹ представлено в настоящем изобретении и подробно описано в *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, которая в полном объеме полностью включена в данный документ посредством ссылки. Нуклеиновая кислота или ее аналог формулы **I-e**,

содержащая, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению, может быть затем конденсирована с нуклеотидом или его аналогом формулы **A8** с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-p**, содержащей, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению. Окисление нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-p** дает затем олигонуклеотидное соединение формулы **I-q**, содержащее, без ограничений, 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по изобретению. Каждый из B, E, PG, PG¹, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², X³, Y⁴, Z и n имеет значения, определенные выше и описанные в данном документе.

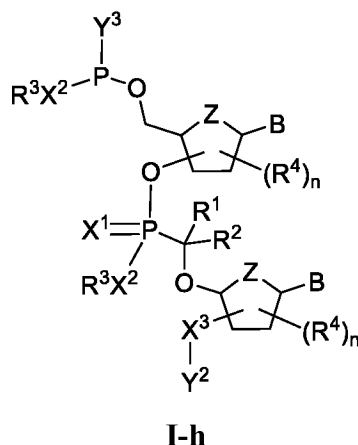
[00193] Специалисту в данной области техники понятно, что различные функциональные группы, присутствующие в нуклеиновой кислоте или ее аналогах по изобретению, такие как алифатические группы, спирты, карбоновые кислоты, сложные эфиры, амиды, альдегиды, галогены и нитрилы, могут подвергаться взаимным превращениям методами, хорошо известными в данной области техники, включая, без ограничений, восстановление, окисление, эстерификацию, гидролиз, частичное окисление, частичное восстановление, галогенирование, дегидратацию, частичную гидратацию и гидратацию. См., например, «March's Advanced Organic Chemistry», 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Для таких взаимных превращений может потребоваться один или несколько вышеупомянутых способов, и некоторые способы синтеза предложенных нуклеиновых кислот по изобретению описаны ниже в разделе «Примеры».

[00194] В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение предусматривает способ получения олигонуклеотидного соединения, содержащего 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-i**:



или его фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-h**:



или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) окисления нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-h**, с образованием олигонуклеотидного соединения, имеющего формулу **I-i**, где:

каждый B представляет собой нуклеобазу или водород;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R¹ и R² на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы,

фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый X^1 независимо представляет собой O, S или NR;

каждый X^2 независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

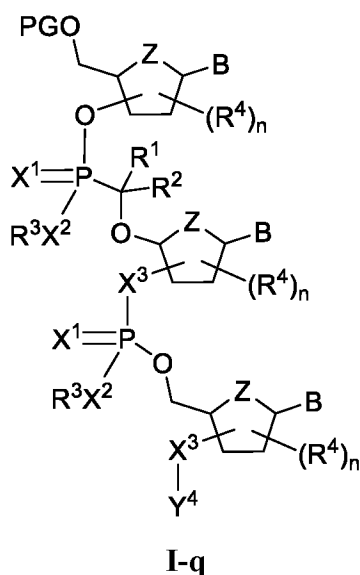
Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

Y^3 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеотида, нуклеозида или олигонуклеотида;

каждый Z независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

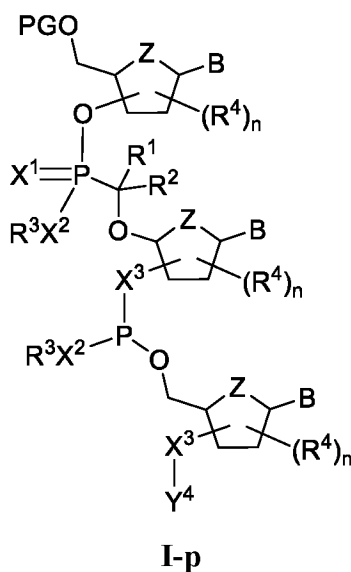
каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00195] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения олигонуклеотидного соединения, содержащего 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-q**:



или его фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-p**:



или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) окисления нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-p**, с образованием олигонуклеотидного соединения, имеющего формулу **I-q**, где:

каждый В представляет собой нуклеобазу или водород;

PG представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;

R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^5 , $-CN$, $-S(O)R$, $-S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)_2R$ или $-SiR_3$, или:

R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо,

содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R⁴ независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R⁵, галоген, -CN, -NO₂, -OR, -SR, -NR₂, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -S(O)R, -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NR₂, -C(O)N(R)OR, -OC(O)R, -OC(O)NR₂, -OP(O)R₂, -OP(O)(OR)₂, -OP(O)(OR)NR₂, -OP(O)(NR₂)₂, -N(R)C(O)OR, -N(R)C(O)R, -N(R)C(O)NR₂, -N(R)S(O)₂R, -N(R)P(O)R₂, -N(R)P(O)(OR)₂, -N(R)P(O)(OR)NR₂, -N(R)P(O)(NR₂)₂, -N(R)S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃;

каждый R⁵ независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый X¹ независимо представляет собой O, S или NR;

каждый X² независимо представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь;

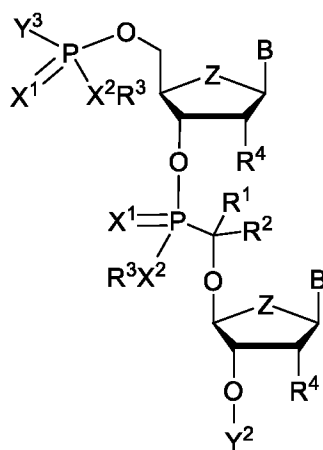
каждый X³ независимо представляет собой -O-, -S-, -Se- или -N(R)-;

Y⁴ представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду

нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке; каждый Z независимо представляет собой -O-, -S-, -N(R)- или -C(R)₂-; и каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00196] Окисление нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-h**, с образованием олигонуклеотидного соединения, имеющего формулу **I-i**, или нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-p**, с образованием олигонуклеотидного соединения, имеющего формулу **I-q**, можно проводить с использованием известных условий окисления. Специалисту в данной области понятно, что окисление P(III) до P(V) можно проводить с помощью различных реагентов, таких как перекись водорода, гидропероксиды, пероксиды, надкислоты, йод и их смеси. Перекись водорода можно использовать в присутствии растворителя, такого как ацетонитрил. Гидропероксиды (т. е. ROOH) включают пероксиды, где R представляет собой алкил или арил, и их соли, включая, без ограничений, трет-бутилпероксид (tBuOOH). Пероксиды включают алкил-, арил- или смешанные алкил/арилпероксиды и их соли. Перкислоты включают, без ограничений, алкил- и арилперкислоты, включая хлорпероксибензойную кислоту (mCPBA). Использование основных галогенов, таких как бром (Br₂), хлор (Cl₂) или йод (I₂), можно осуществлять в присутствии воды и других компонентов, таких как пиридин, тетрагидрофуран и вода. Альтернативно, также предусматриваются водные растворы Cl₂ в присутствии TEMPO. Таким образом, термин «окисляющий агент» включает «сульфурирующий агент», который также считается имеющим то же значение, что и «тионирующий реагент». Примеры сульфурющих реагентов, которые использовались для синтеза олигонуклеотидов, содержащих фосфоротиоатные (PS) связи, включают элементарную серу, дибензоилтетрасульфид, 3-Н-1,2-бензидитиол-3-он 1,1-диоксид (реагент Бокажа), тетраэтилтиурамдисульфид (TETD) и бис(О,О-диизопропоксифосфинотиоил)дисульфид (реагент Стеца (Stec)). Окисляющие реагенты для получения фосфоротиоатных диэфирных связей включают фенилацетилдисульфид (PADS), как описано Cole et al. в патенте США № 6242591. В некоторых вариантах осуществления окисление проводят с использованием йода в водном пиридине.

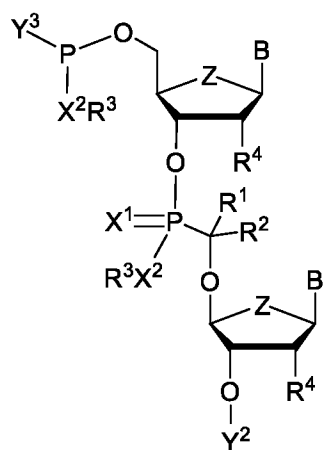
[00197] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения олигонуклеотидного соединения, содержащего 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-i-1**:



I-i-1

или его фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-h-1**:

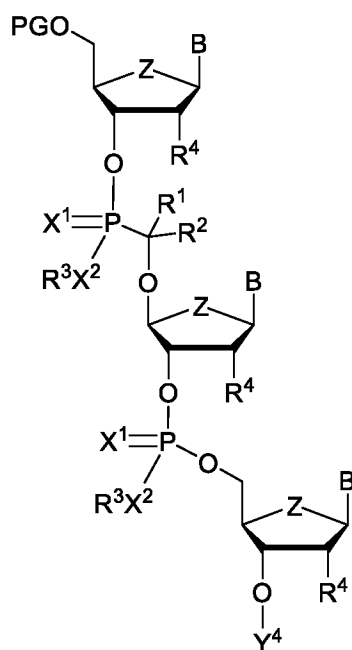


I-h-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) окисления нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-h-1**, с образованием олигонуклеотидного соединения, имеющего формулу **I-i-1**, где: каждый из B, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y², Y³ и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

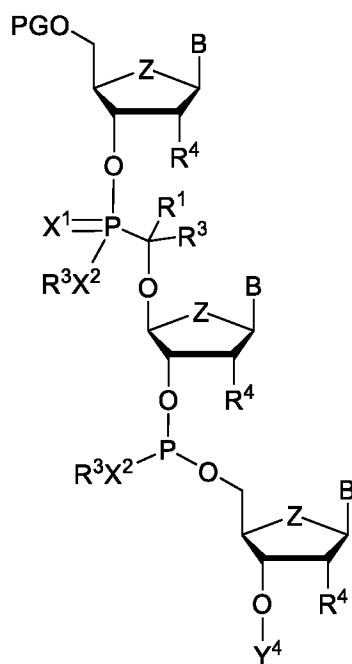
[00198] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения олигонуклеотидного соединения, содержащего 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-q-1**:



I-q-1

или его фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-p-1**:



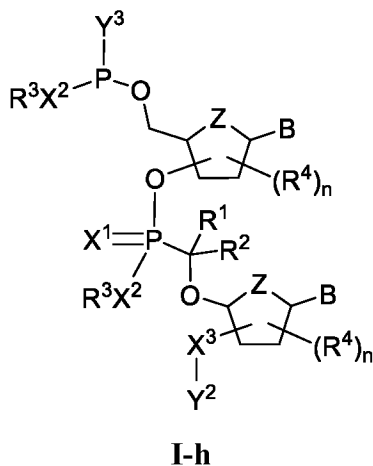
I-p-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) окисления нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-p-1**, с образованием олигонуклеотидного соединения, имеющего формулу **I-q-1**, где:

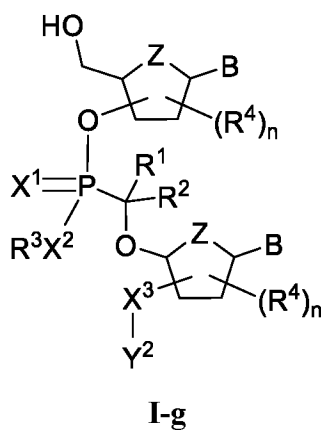
каждый из B, PG, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y⁴ и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

[00199] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-h**:

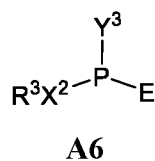


или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-g**:



- (b) взаимодействия нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-g**, с фосфорамидитным аналогом формулы **A6**:



с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-h**, где: каждый B представляет собой нуклеобазовое основание или водород;

R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^5 , $-CN$, $-S(O)R$, $-S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$, или:

R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R^3 представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

E представляет собой галоген или $-NR_2$;

X^1 представляет собой O, S или NR;

каждый X^2 независимо представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь;

X^3 представляет собой -O-, -S-, -Se- или -N(R)-;

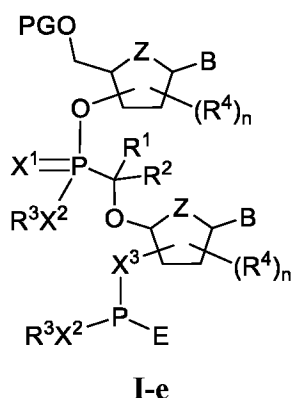
Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

Y^3 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида;

каждый Z независимо представляет собой -O-, -S-, -N(R)- или -C(R)₂-; и

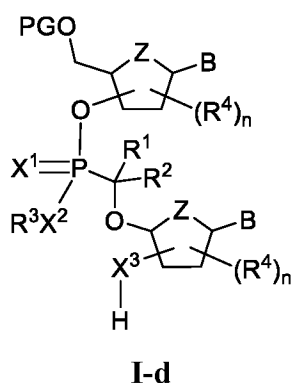
каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00200] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e**:



или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

(a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d**:



(b) взаимодействия нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d** с реагентом, образующим P(III), с получением нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e**, где:

каждый B представляет собой нуклеобазу или водород;

PG представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;

R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^5 , $-CN$, $-S(O)R$, $-S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$, или:

R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R^3 представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

E представляет собой галоген или $-NR_2$;

X^1 представляет собой O, S или NR;

каждый X^2 независимо представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь;

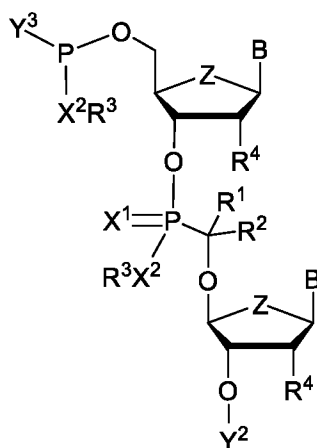
X^3 представляет собой -O-, -S-, -Se- или -N(R)-;

каждый Z независимо представляет собой -O-, -S-, -N(R)- или -C(R)₂-; и

каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00201] В соответствии с одним вариантом осуществления фосфорамидитный аналог формулы **A6** на стадии (b) выше представляет собой нуклеозид, нуклеотид или олигонуклеотид, содержащий фосфорамидитный фрагмент, обычно используемый в синтезах фосфорамидитных олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фосфорамидиты или их аналоги получают с использованием P(III)-образующего реагента. В некоторых вариантах осуществления P(III)-образующий реагент представляет собой 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфорамидит или 2-цианоэтилфосфородихлоридат. В некоторых вариантах осуществления P(III)-образующий реагент представляет собой 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфорамидит. Специалисту в данной области будет понятно, что замещение уходящей группы в аналоге P(III) на стадии (b) гидроксилем или фрагментом X^3 нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-d** или формулу **I-g** соответственно, проводится либо в присутствии подходящего основания, либо без него. Такие подходящие основания хорошо известны специалистам и включают органические и неорганические основания. В некоторых вариантах осуществления, основание представляет собой третичный амин, такой как триэтиламин или диизопропилэтиламин. В некоторых вариантах осуществления основание представляет собой 4,5-дицианимидазол.

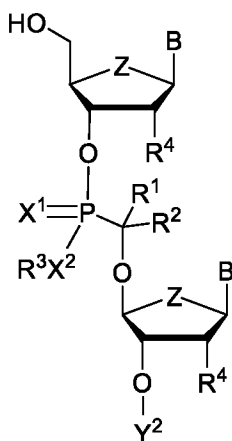
[00202] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-O-метиленфосфонатную межнауклеотидную связь, причем 4'-O-метиленфосфонатная межнауклеотидная связь представлена формулой **I-h-1**:



I-h-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

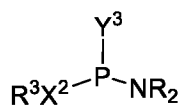
- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-g-1**:



I-g-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

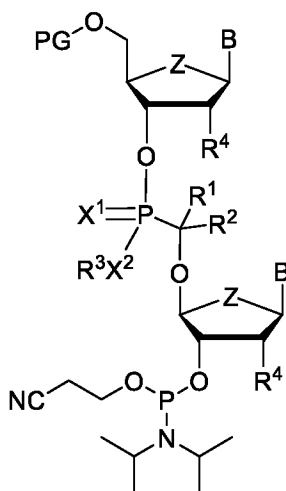
- (b) проведения реакции нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-g-1**, с аналогом фосфорамидита формулы **A6**:



A6

с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-h-1**, где: каждый из B, E, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y², Y³ и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

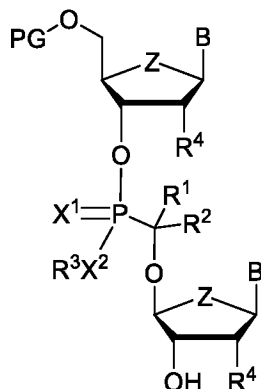
[00203] В некоторых аспектах настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e-1**:



I-e-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d-1**:



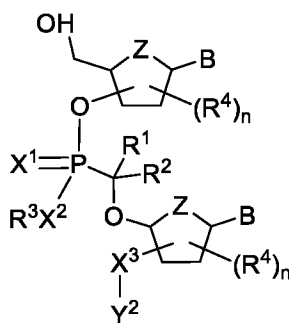
I-d-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) проведения реакции нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d-1** с P(III)-образующим реагентом с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e-1**, где:

каждый из B, PG, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X² и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

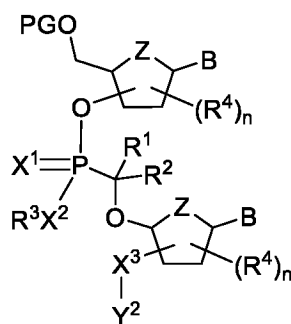
[00204] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-g**:



I-g

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-b**:



I-b

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) снятия защиты с нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-b**, с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-g**, где:

каждый B представляет собой нуклеобазу или водород;

PG представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R¹ и R² на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X^1 представляет собой O, S или NR;

каждый X^2 независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

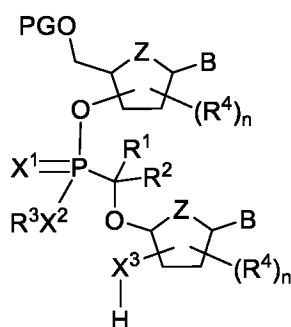
X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

каждый Z независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

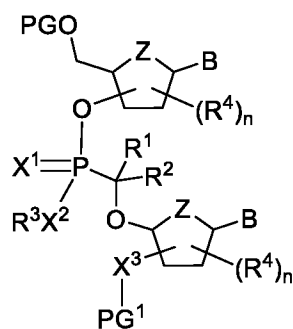
[00205] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты формулы **I-d**:



I-d

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

(a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-c**:



I-c

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) снятия защиты нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-d**, с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-c**, где:

каждый В представляет собой нуклеобазовое основание или водород;

PG представляет собой подходящую защитную группу гидроксильной;

PG¹ представляет собой защитную группу;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R¹ и R² на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, -CN, -NO₂, -OR, -SR, -NR₂, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -S(O)R, -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NR₂, -C(O)N(R)OR, -OC(O)R, -OC(O)NR₂, -OP(O)R₂, -OP(O)(OR)₂, -OP(O)(OR)NR₂, -OP(O)(NR₂)₂, -N(R)C(O)OR, -N(R)C(O)R, -N(R)C(O)NR₂, -N(R)S(O)₂R, -N(R)P(O)R₂, -N(R)P(O)(OR)₂, -N(R)P(O)(OR)NR₂, -N(R)P(O)(NR₂)₂, -N(R)S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X^1 представляет собой O, S или NR;

каждый X^2 независимо представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь;

X^3 представляет собой -O-, -S-, -Se- или -N(R)-;

каждый Z независимо представляет собой -O-, -S-, -N(R)- или -C(R)₂-; и

каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00206] В соответствии с вариантами осуществления, описанными в данном документе, удаление защитной группы (например, PG или PG¹) на стадиях (b) выше включает защитные группы, подробно описанные в *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления защитная группа представляет собой подходящую защитную группу гидроксила, подходящую аминозащитную группу или подходящую защитную группу тиола.

[00207] Используемая в данном документе фраза «подходящая защитная группа гидроксила» хорошо известна в данной области техники и, в сочетании с атомом кислорода, с которым она связана, независимо выбирается из сложных эфиров, простых эфиров, простых силиловых эфиров, простых алкиловых эфиров, простых арилалкиловых эфиров и простых алкоксиалкиловых эфиров. Примеры таких сложных эфиров включают формиаты, ацетаты, карбонаты и сульфонаты. Конкретные примеры включают формиат, бензоилформиат, хлорацетат, трифторацетат, метоксиацетат, трифенилметоксиацетат, п-хлорфеноксиацетат, 3-фенилпропионат, 4-оксопентаноат, 4,4-(этилендитио)пентаноат, пивалоат (триметилацетил), кротонат, 4-метоксикротонат, бензоат, п-бензилбензоат, 2,4,6-триметилбензоат, карбонаты, такие как метил-, 9-флуоренилметил-, этил-, 2,2,2-

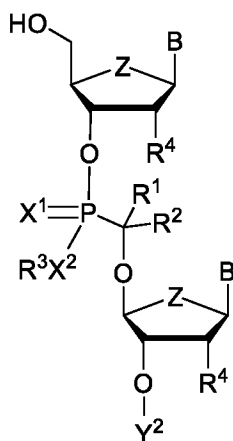
трихлорэтил-, 2-(триметилсилил)этил-, 2-(фенилсульфонил)этил-, винил-, аллил- и п-нитробензил-. Примеры таких простых силиловых эфиров включают триметилсилиловый, триэтилсилиловый, трет-бутилдиметилсилиловый, трет-бутилдифенилсилиловый, триизопропилсилиловый и другие триалкилсилиловые простые эфиры. Простые алкиловые эфиры включают метиловый, бензиловый, п-метоксибензиловый, 3,4-диметоксибензиловый, тритиловый, трет-бутиловый, аллиловый и аллилоксикарбониловый простые эфиры или производные. Простые алкоксиалкиловые эфиры включают ацетали, такие как метоксиметиловый, метилтиометиловый, (2-метоксиэтокси)метиловый, бензилоксиметиловый, бета-(триметилсилил)этоксиметиловый и тетрагидропираниловый простые эфиры. Примеры простых арилалкиловых эфиров включают бензиловый, п-метоксибензиловый, 3,4-диметоксибензиловый, О-нитробензиловый, п-нитробензиловый, п-галоидгенбензиловый, 2,6-дихлорбензиловый, п-цианобензиловый и 2- и 4-пиколиловый. В некоторых вариантах осуществления подходящая защитная группа гидроксила представляет собой кислотолабильную группу, такую как тритил, 4-метокситритил, 4,4'-диметокситритил (DMTr), 4,4',4''-триметокситритил, 9-фенилксантен-9-ил, 9-(п-толил)ксантен-9-ил, пиксил, 2,7-диметилпиксил и т. п., подходящую для снятия защиты во время синтеза как в фазе раствора, так и твердофазного, кислоточувствительных олигонуклеотидов с использованием, например, дихлоруксусной кислоты, трихлоруксусной кислоты, трифторуксусной кислоты или уксусной кислоты. т-Бутилдиметилсилильная группа стабильна в кислых условиях, используемых для удаления группы DMTr во время синтеза, но может быть удалена после расщепления и снятия защиты с олигомера РНК с помощью источника фтора, например, фторида тетрабутиламмония или гидрофторида пиридина.

[00208] Используемая в данном документе фраза «подходящая аминозащитная группа» хорошо известна в данной области техники и при использовании с азотом, к которому она присоединена, включает, без ограничений, аралкиламины, карбаматы, аллиламины, амиды и т. п. Примеры монозащитных групп для аминов включают трет-бутилоксикарбонил (BOC), этилоксикарбонил, метилоксикарбонил, трихлорэтилоксикарбонил, аллилоксикарбонил (Alloc), бензилоксокарбонил (CBZ), аллил, бензил (Bn), флуоренилметилкарбонил (Fmoc), ацетил, хлорацетил, дихлорацетил, трихлорацетил, трифторацетил, фенилацетил, бензоил и т. п. Примеры ди-защитных групп для аминов включают амины, которые замещены двумя заместителями, независимо выбранными из описанных выше в качестве монозащитных групп, и дополнительно включают циклические имиды, такие как фталимид, малеимид, сукцинимид, 2,2,5,5-тетраметил-1,2,5-азадисилолидин, азид и т. п. Следует понимать, что при кислотном гидролизе

аминозащитных групп образуется их солевое соединение. Например, если аминозащитную группу удаляют обработкой кислотой, такой как соляная кислота, то полученное соединение амина будет образовываться в виде его гидрохлоридной соли. Специалисту в данной области техники будет понятно, что для удаления кислотно-лабильных аминозащитных групп можно использовать различные кислоты и, следовательно, предусматривается большое разнообразие солевых форм.

[00209] Используемая в данном документе фраза «подходящая защитная группа тиола» дополнительно включает, без ограничений, дисульфиды, простые тиоэфиры, простые силилтиоэфиры, сложные тиоэфиры, тиокарбонаты и тиокарбаматы и т. п. Примеры таких групп включают, без ограничений, простые алкилтиоэфиры, простые бензиловые и замещенные бензилтиоэфиры, простые трифенилметилтиоэфиры и сложный трихлорэтоксикарбонилтиоэфир, в качестве некоторых примеров.

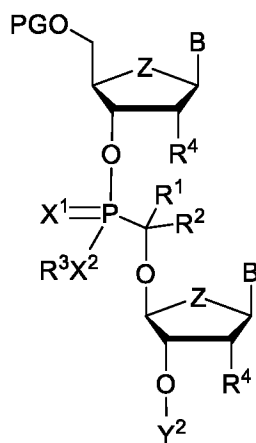
[00210] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-g-1**:



I-g-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-b-1**:

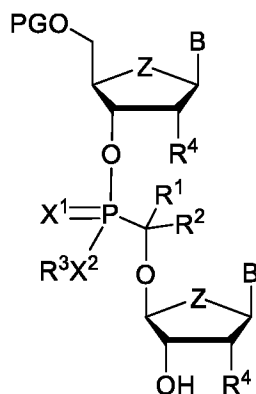


I-b-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) снятия защиты нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-b-1**, с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-g-1**, где: каждый из B, PG, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y² и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

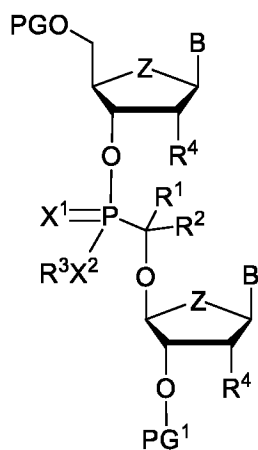
[00211] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d-1**:



I-d-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-c-1**:



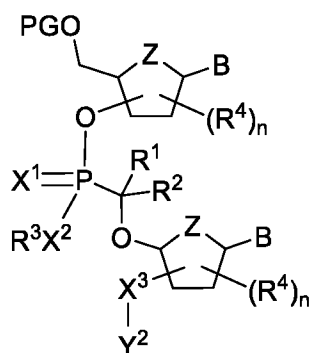
I-c-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) снятия защиты нуклеиновой кислоты или аналога формулы **I-d-1** с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-c-1**, где:

каждый из B, PG, PG¹, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X² и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

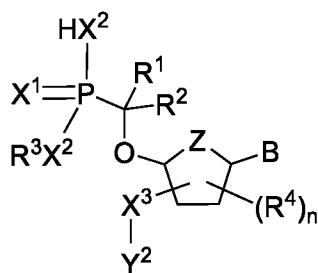
[00212] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-b**:



I-b

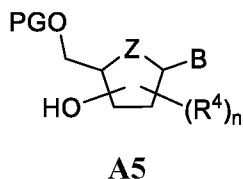
или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4**:



A4

- или ее фармацевтически приемлемой соли, и
- (b) конденсации нуклеиновой кислоты или аналога формулы **A4** с нуклеозидом или его аналогом формулы **A5**:



- с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-b**, где:
- каждый **B** представляет собой нуклеобазу или водород;
- PG** представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;
- R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^5 , $-CN$, $-S(O)R$, $-S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$, или:
- R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;
- каждый **R** независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:
- две группы **R** на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;
- R^3 представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;
- каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, -

каждый R⁵ независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый X^2 независимо представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь;

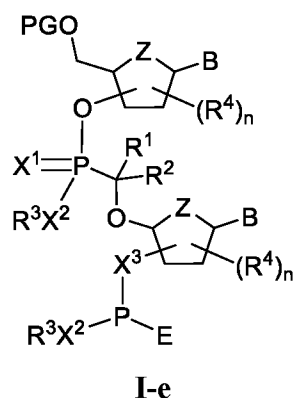
Y² представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00213] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-p**:

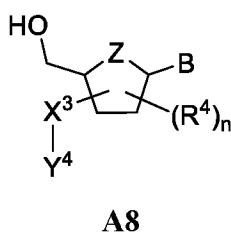


(а) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e**:



или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) конденсации нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e** с нуклеозидом или его аналогом формулы **A8**:



с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-p**, где:

каждый B представляет собой нуклеобазу или водород;

PG представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;

R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^5 , -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R^3 представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

E представляет собой галоген или $-NR_2$;

X^1 представляет собой O , S или NR ;

каждый X^2 независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

Y^4 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

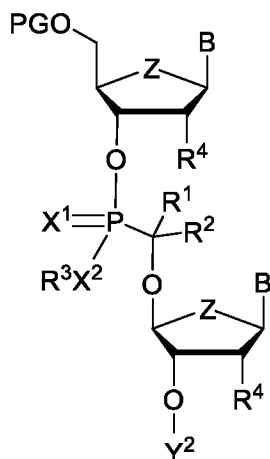
каждый Z независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00214] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конденсация на вышеуказанных стадиях (b) включает использование конденсирующего агента. Конденсирующий агент, используемый для конденсации нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4** с нуклеозидом или его аналогом формулы **A5**, или нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e** с нуклеозидом или его аналогом формулы **A8**, может включать сульфонилхлориды, такие как метансульфонилхлорид, толуолсульфонилхлорид, 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид или мезитилен-2-сульфонилхлорид;

сульфонилтетразолы, такие как 1-толуолсульфонилтетразол, 1-(мезитилен-2-сульфонил)тетразол или 1-(2,4,6-триизопропилбензолсульфонил)тетразол; сульфонильтриазолы, такие как 3-нитро-1-толуолсульфонил-1,2,4-триазол, 3-нитро-1-(мезитилен-2-сульфонил)-1,2,4-триазол или 3-нитро-1-(2,4,6-триизопропилбензолсульфонил)-1,2,4-триазол; и т. п. В некоторых вариантах осуществления конденсирующий агент представляет собой триизопропилбензолсульфонилхлорид. При конденсации может присутствовать основание. Примеры используемого для этого основания включают триэтиламин, этилдиизопропиламин, пиридин, лутидин, имидазол, N-метилимидазол, N-метилбензимидазол и т. п. В некоторых вариантах осуществления основание представляет собой N-метилимидазол.

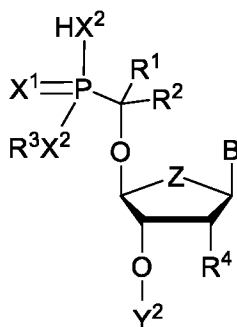
[00215] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-O-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-O-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-b-1**:



I-b-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

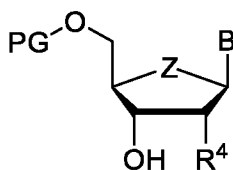
(a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4-1**:



A4-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

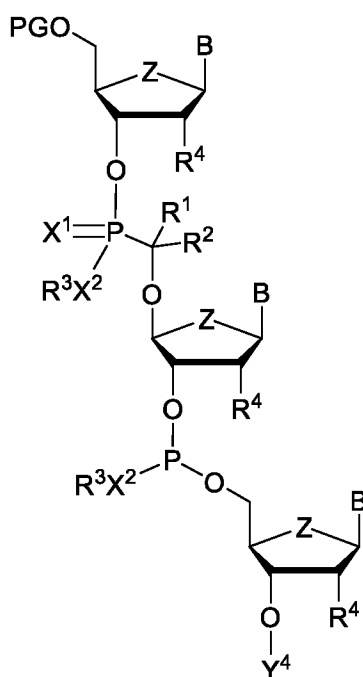
- (b) конденсации нуклеиновой кислоты или ее аналога имеющей формулу **A4-1** с нуклеозидом или его аналогом формулы **A5-1**:



A5-1

с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-b-1**, где: каждый из B, PG, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y² и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

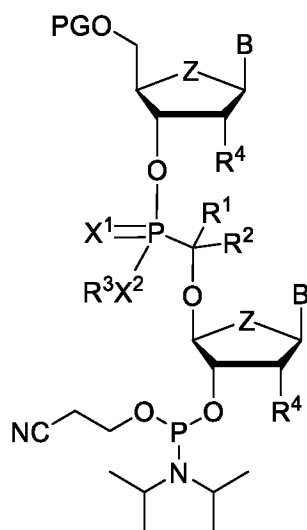
[00216] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-O-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-O-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-p-1**:



I-p-1

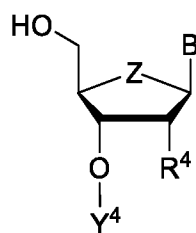
или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-c-1**:



I-e-1

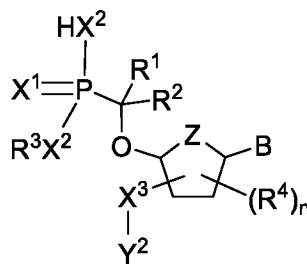
- или ее фармацевтически приемлемой соли, и
- (b) конденсации нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e-1** с нуклеозидом или его аналогом формулы **A8-1**:



A8-1

с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-p-1**, где: каждый из B, PG, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y⁴ и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

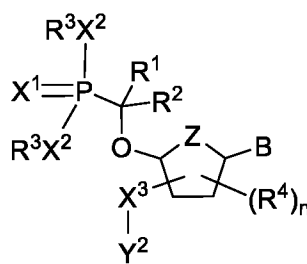
[00217] В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения олигонуклеотидного соединения, содержащего 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **A4**:



A4

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A3**:



A3

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) снятия защиты нуклеиновой кислоты или аналога формулы **A3** с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4**, где:

B представляет собой нуклеобазу или водород;

R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^5 , $-\text{CN}$, $-\text{S(O)R}$, $-\text{S(O)}_2\text{R}$, $-\text{Si(OR)}_2\text{R}$, $-\text{Si(OR)R}_2$ или $-\text{SiR}_3$, или:

R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый **R** независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы **R** на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R^3 представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{S(O)}_2\text{R}$, $-\text{S(O)}_2\text{NR}_2$, $-\text{S(O)R}$, $-\text{C(O)R}$, $-\text{C(O)OR}$, $-\text{C(O)NR}_2$, $-\text{C(O)N(R)OR}$, $-\text{OC(O)R}$, $-\text{OC(O)NR}_2$, $-\text{OP(O)R}_2$, $-\text{OP(O)(OR)}_2$, -

OP(O)(OR)NR₂, -OP(O)(NR₂)₂-, -N(R)C(O)OR, -N(R)C(O)R, -N(R)C(O)NR₂, -N(R)S(O)₂R, -N(R)P(O)R₂, -N(R)P(O)(OR)₂, -N(R)P(O)(OR)NR₂, -N(R)P(O)(NR₂)₂, -N(R)S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃;

каждый R⁵ независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X¹ представляет собой O, S или NR;

каждый X² независимо представляет собой -O-, -S-, -B(H)₂- или ковалентную связь;

X³ представляет собой -O-, -S-, -Se- или -N(R)-;

Y² представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

Z представляет собой -O-, -S-, -N(R)- или -C(R)₂-; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

[00218] В некоторых вариантах осуществления Y² представляет собой защитную группу.

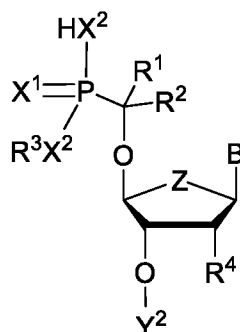
[00219] В соответствии с вариантами осуществления, описанными в данном документе, снятие защиты соединения формулы **A3** на стадии (b) выше может включать снятие защиты с любой подходящей защитной группы, описанной выше или определенной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или аналог формулы **A3** содержит сложный эфир 4'-О-метиленфосфоната, и снятие одной защитной группы проводят в водной среде в основных условиях. Подходящими основаниями являются гидроксиды металлов (например, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид лития и гидроксид бария), карбонаты металлов (например, карбонат лития, карбонат натрия, карбонат калия, карбонат кальция, карбонат цезия), гидрокарбонат натрия, органические амины (например, триэтиламин, N,N-диизопропилэтиламин (DIEA), N-метилморфолин, N-этилморфолин, трибутиламин, 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан (DABCO), N-метилимидазол (NMI), пиридин, 2,6-лутидин, 2,4,6-коллидин, 4-диметиламинопиридин (ДМАП), 1,8-бис(диметиламино)нафталин («протонная губка»), 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (ДБУ), 1,5-диазабицикло[4.3.0]нон-5-ен (ДБН), 7-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ен (МТБД),

2-трет-бутил-1,1,3,3-тетраметилгуанидин,

2,8,9-триметил-2,5,8,9-тетрааза-1-

фосфабицикло[3.3.3]ундекан или фосфазеновое основание).

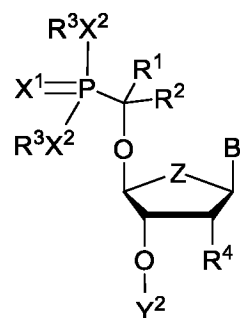
[00220] В некоторых аспектах, настоящее изобретение предлагает способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4-1**:



A4-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

(a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A3-1**:



A3-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

(b) снятия защиты нуклеиновой кислоты или аналога формулы **A4-1** с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A3-1**, где:

каждый из B, PG, R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², Y² и Z имеет значения, описанные в данном документе и определенные выше.

[00221] В некоторых вариантах осуществления Y² представляет собой защитную группу.

5. Применения, составы и введение

Фармацевтически приемлемые композиции

[00222] В соответствии с другим вариантом осуществления, настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую нуклеиновую кислоту или ее аналог, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

Количество предлагаемой нуклеиновой кислоты в композициях по настоящему изобретению эффективно обеспечивает измеримую модуляцию экспрессии гена-мишени в биологическом образце или у пациента. В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению составлена для введения пациенту, нуждающемуся в такой композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению составлена для парентерального или перорального введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель и молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты, причем молекула ингибитора нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один нуклеотид, содержащий 4'-О-метиленфосфонатную межнауклеотидную связь, или его аналог, как описано в данном документе.

[00223] Термин «пациент», используемый в данном документе, означает животное, предпочтительно, млекопитающее, и наиболее предпочтительно - человека.

[00224] Термин «фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель» относится к нетоксичному носителю, адъюванту или наполнителю, который не нарушает фармакологическую активность предлагаемой нуклеиновой кислоты, в состав композиции с которой он входит. Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты или наполнители, которые могут применяться в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают, без ограничений, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси частичных глицеридов насыщенных жирных кислот растительного происхождения, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, дигидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрия карбоксиметилцеллюлозу, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропиленовые блок-полимеры, полиэтиленгликоль и шерстяной жир.

[00225] Термин «фармацевтически приемлемое производное» означает любую нетоксичную соль, сложный эфир, соль сложного эфира или другое производное предлагаемой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, которые, после введения реципиенту, способны высвобождать, прямо или косвенно, предлагаемую нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению или ингибирующе активный метаболит или его остаток.

[00226] Используемый в данном документе термин «ингибирующе активный метаболит или его остаток» означает, что метаболит или его остаток также пригодны для

модулирования экспрессии гена-мишени в биологическом образце или у пациента.

[00227] Композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, ингаляцией спрея, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или с помощью имплантированного резервуара. Термин «парентеральный», при использовании в данном документе, включает методы подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, интрасиновиальной, интрастеральной, интратекальной, внутрипеченочной, внутриочаговой и интракраниальной инъекции или инфузии. Предпочтительно, композиции составляют в жидкой форме для парентерального введения, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции. Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, обычно содержат один или несколько подходящих носителей для парентерального введения, включая, в качестве примера, стерильные водные растворы, физиологический раствор, низкомолекулярные спирты, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, желатин, сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат и т. п. Парентеральные составы могут содержать сахара, спирты, антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества, растворенные вещества, которые придают составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с помощью поверхностно-активных веществ. Жидкие составы можно лиофилизировать и хранить для последующего использования после восстановления стерильным раствором для инъекций.

[00228] Стерильные формы для инъекций композиций по настоящему изобретению могут представлять собой водную или маслянистую суспензию. Такие суспензии могут быть приготовлены в соответствии с методиками, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или увлажняющих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный инъеклируемый препарат может также представлять собой стерильный инъеклируемый раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. К приемлемым носителям и растворителям, которые можно применять, относятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспензионной среды обычно используются стерильные нелетучие масла.

[00229] Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, пригодны для приготовления препаратов для инъекций,

также как и натуральные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксизтилированных вариантах. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать разбавитель или диспергент на основе длинноцепочечного спирта, такой как карбоксиметилцеллюлоза или подобные диспергирующие агенты, которые обычно используются при составлении фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Другие широко применяемые поверхностно-активные вещества, такие как твины или спаны и другие эмульгаторы или агенты для повышения биодоступности, которые обычно используются в производстве фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм, также можно применять при составлении препаратов.

[00230] Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально в любой приемлемой для перорального введения лекарственной форме, включая, без ограничений, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения, обычно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие агенты, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсул полезные разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Если для перорального применения требуются водные суспензии, то активный ингредиент комбинируют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости также могут быть добавлены определенные подсластители, вкусовые или красящие агенты. Композиции по настоящему изобретению, составленные для перорального введения, можно вводить с пищей или отдельно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению вводят без приема пищи. В других вариантах осуществления, фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению вводят с пищей.

[00231] Альтернативно, фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде суппозитория для ректального введения. Они могут быть приготовлены путем смешения агента с подходящим нераздражающим эксципиентом, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре прямой кишки, и поэтому будут расплавляться в прямой кишке, высвобождая лекарственное средство. К таким материалам относятся масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

[00232] Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению также можно вводить местно, особенно когда целью лечения являются области или органы, легко доступные для местного применения, включая заболевания глаз, кожи или нижнего

отдела кишечного тракта. Подходящие составы для местного применения могут быть легко приготовлены для каждой из этих областей или органов.

[00233] Местное применение в нижних отделах кишечного тракта может осуществляться в форме ректальных суппозиториев (см. выше) или в составе, подходящем для клизмы. Также можно использовать трансдермальные пластыри для местного применения.

[00234] В случае местного применения предлагаемые фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в виде подходящей мази, содержащей активный компонент, суспендированный или растворенный в одном или нескольких носителях. Носители для местного применения нуклеиновой кислоты или ее аналогов по настоящему изобретению включают, без ограничений, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, соединения полиоксиэтилена-полиоксипропилена, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно, предлагаемые фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в виде подходящего лосьона или крема, содержащего активные компоненты, суспендированные или растворенные в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Подходящие носители включают, без ограничений, минеральное масло, сорбитанмоностеарат, полисорбат 60, цетилэфирный воск, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

[00235] Для офтальмологического применения предлагаемые фармацевтически приемлемые композиции могут быть приготовлены в виде микронизированных суспензий в изотоническом стерильном солевом растворе с отрегулированным значением pH или, предпочтительно, в виде растворов в изотоническом стерильном солевом растворе с отрегулированным pH либо с консервантом, таким как хлорид бензилалкония, либо без него. Альтернативно, для офтальмологических применений фармацевтически приемлемые композиции могут быть приготовлены в виде мази, например, вазелиновой.

[00236] Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению можно также вводить в виде назального аэрозоля или путем ингаляции. Такие композиции готовят в соответствии с методиками, хорошо известными в области получения фармацевтических составов, и могут быть приготовлены в виде растворов в солевом растворе, с применением бензилового спирта или других подходящих консервантов, ускорителей всасывания для повышения биодоступности, фторуглеродов и/или других традиционных солюбилизующих или диспергирующих агентов.

[00237] В некоторых вариантах осуществления предлагаемая нуклеиновая кислота (например, молекула ингибитора нуклеиновой кислоты) может быть смешана, инкапсулирована, конъюгирована или иным образом связана с другими молекулами,

молекулярными структурами или смесями соединений, включая, например, липосомы и липиды, такие как раскрытые в патентах США №№ 6815432, 6586410, 6858225, 7811602, 7244448 и 8158601; полимерные материалы, такие как раскрытые в патентах США №№ 6835393, 7374778, 7737108, 7718193, 8137695 и опубликованных патентных заявках США №№ 2011/0143434, 2011/0129921, 2011/0123636, 2011/0143435, 2011/0142951, 2012/0021514, 2011/0281934, 2011/0286957 и 2008/0152661; капсиды, капсоиды или нацеленные на рецепторы молекулы для содействия поглощению, распределению или абсорбции, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[00238] В некоторых вариантах осуществления предлагаемая нуклеиновая кислота (например, молекула ингибитора нуклеиновой кислоты) содержится в липидной наночастице (ЛНЧ). Наночастицы липид-нуклеиновая кислота обычно образуются спонтанно при смешивании липидов с нуклеиновой кислотой с образованием комплекса. В зависимости от желаемого распределения частиц по размерам, полученную смесь наночастиц можно необязательно экструдировать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечкой 100 нм) с использованием, например, экструдера с термоцилиндром, такого как экструдер LIPEX® (Northern Lipids, Inc). Для получения липидной наночастицы для терапевтического применения может быть желательным удаление растворителя (например, этанол), используемого для образования наночастицы, и/или обменного буфера, что можно осуществить с помощью, например, диализа или тангенциальной проточной фильтрации. Способы получения липидных наночастиц, содержащих молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты, известны в данной области техники, как описано, например, в опубликованных заявках на патент США №№ 2015/0374842 и 2014/0107178, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[00239] В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержит липидное ядро, содержащее катионную липосому и пегилированный липид. ЛНЧ может дополнительно содержать один или несколько липидов оболочки, таких как катионный липид, структурный или нейтральный липид, стерол, пегилированный липид или их смеси.

[00240] В некоторых вариантах осуществления предлагаемая нуклеиновая кислота ковалентно конъюгирована с лигандом, который направляет доставку нуклеиновой кислоты в представляющую интерес ткань. Многие такие лиганды были исследованы. См., например, Winkler, THER. DELIV., 2013, 4(7): 791-809. Например, предлагаемая нуклеиновая кислота может быть конъюгирована с несколькими фрагментами сахарного лиганда (например, N-ацетилгалактозамином (GalNAc)) для прямого поглощения

нуклеиновой кислоты печенью. См., например, WO 2016/100401. Другие лиганды, которые могут быть использованы, включают, без ограничений, маннозо-6-фосфат, холестерин, фолат, трансферрин и галактозу (другие конкретные примеры лигандов приведены, например, в WO 2012/089352). Как правило, когда предлагаемая нуклеиновая кислота конъюгирована с лигандом, нуклеиновую кислоту вводят в виде «голой» нуклеиновой кислоты, при этом олигонуклеотид также не входит в состав ЛНЧ или не имеет другого защитного покрытия. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в голой нуклеиновой кислоте модифицирован в 2'-положении сахарного фрагмента, обычно с помощью 2'-F или 2'-OMe.

[00241] Такие фармацевтические композиции можно стерилизовать обычными методами стерилизации или подвергать стерилизации фильтрованием. Полученные водные растворы могут быть упакованы в готовом для применения виде, или лиофилизированы, при этом лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным эксципиентом перед введением. Препараты обычно имеют значение pH в диапазоне от 3 до 11, более предпочтительно, от 5 до 9 или от 6 до 8, и наиболее предпочтительно, от 7 до 8, например, от 7 до 7,5. Фармацевтические композиции в твердой форме могут быть расфасованы в виде нескольких единиц однократной дозы, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутого агента или агентов, например, в запечатанной упаковке таблеток или капсул. Фармацевтические композиции в твердой форме также могут быть упакованы в контейнер для применения переменного количества, например, в выдавливаемый тубик, предназначенный для крема или мази для местного нанесения.

[00242] Количество нуклеиновой кислоты или ее аналога по настоящему изобретению, которая может быть объединена с материалами носителя для получения композиции в виде лекарственной формы с однократной дозировкой, может меняться в зависимости от хозяина, получающего лечение, и конкретного способа введения. Предпочтительно, предлагаемые композиции следует составлять таким образом, чтобы пациенту, получающему такие композиции, можно было ввести дозу нуклеиновой кислоты или ее аналога в диапазоне 0,01-100 мг/кг массы тела/день.

[00243] Следует также понимать, что конкретная дозировка и схема лечения любого конкретного пациента будут зависеть от различных факторов, включая активность конкретной применяемой нуклеиновой кислоты или ее аналога, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, рацион, время введения, скорость выведения, комбинация лекарственных средств и выбор лечащего врача и тяжесть конкретного заболевания, лечение которого проводится. Количество нуклеиновой кислоты или ее аналога по

настоящему изобретению в композиции будет также зависеть от конкретной нуклеиновой кислоты или ее аналога в композиции.

Применение нуклеиновых кислот и их аналогов и фармацевтически приемлемых композиций

[00244] Нуклеиновые кислоты и их аналоги, а также композиции, описанные в данном документе, обычно применимы для модуляции уровней внутриклеточной РНК. Предлагаемая нуклеиновая кислота, содержащая 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, или ее аналог может быть использована в способе модулирования экспрессии гена-мишени в клетке. Как правило, такие способы включают введение в клетку предлагаемой молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты в количестве, достаточном для модуляции экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют *in vivo*. Способ также можно осуществлять *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего, включая, без ограничений, клетку человека.

[00245] В некоторых вариантах осуществления предлагаемая нуклеиновая кислота, содержащая 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь или ее аналог (например, молекула ингибитора нуклеиновой кислоты), может быть использована в способе лечения нуждающегося в этом пациента. Как правило, такие способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей предлагаемую молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, нуждающемуся в этом пациенту.

[00246] Используемые в данном документе термины «лечение», «лечить» и «лечащий» относятся к обращению вспять, облегчению, задержке начала или ингибированию прогрессирования заболевания или расстройства или одного или нескольких его симптомов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться после развития одного или нескольких симптомов. В других вариантах осуществления лечение можно проводить при отсутствии симптомов. Например, лечение может быть назначено восприимчивому индивидууму до появления симптомов (например, с учетом наличия симптомов в анамнезе и/или с учетом генетических или других факторов восприимчивости). Лечение также может продолжаться после исчезновения симптомов, например, для предотвращения или задержки их рецидива.

[00247] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, могут быть полезны для лечения или профилактики

симптомов, связанных с вирусной инфекцией у нуждающегося в этом пациента. Один вариант осуществления относится к способу лечения вирусной инфекции, включающему введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество предлагаемой нуклеиновой кислоты, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, или ее аналога (например, молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты), как описано в данном документе. Неограничивающие примеры таких вирусных инфекций включают инфекцию вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита В (HBV), вируса папилломы человека (HPV), вируса простого герпеса (HSV) или ВИЧ.

[00248] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, могут быть полезны для лечения или профилактики симптомов, связанных с раком у нуждающегося в этом пациента. Один вариант осуществления относится к способу лечения рака, включающему введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество предложенной молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. Неограничивающие примеры таких видов рака включают рак желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, переходно-клеточную карциному, уротелиальную карциному, рак головного мозга, глиомы, астроцитомы, карциному молочной железы, метастатическую карциному, рак шейки матки, плоскоклеточный рак шейки матки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак толстой кишки, наследственный неполипозный колоректальный рак, колоректальные аденокарциномы, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), карциному эндометрия, стромальные саркомы эндометрия, рак пищевода, плоскоклеточный рак пищевода, аденокарциному пищевода, меланому глаза, увеальную меланому, карциномы желчного пузыря, аденокарциному желчного пузыря, почечно-клеточную карциному, светлоклеточную почечно-клеточную карциному, переходно-клеточную карциному, уротелиальные карциномы, опухоль Вильмса, лейкемию, острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), рак печени, карциному печени, гепатому, гепатоцеллюлярную карциному, холангиокарциному, гепатобластому, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мезотелиому, В-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, мантийно-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, Т-лимфобластную лимфому/лейкоз из клеток-предшественников, периферические Т-клеточные лимфомы, множественную миелому,

назофарингеальную карциному (НПК), нейробластому, рак ротоглотки, плоскоклеточные карциномы полости рта, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, аденокарциному протоков поджелудочной железы, псевдопапиллярные новообразования, ацинарно-клеточные карциномы, рак простаты, аденокарциному простаты, рак кожи, меланому, злокачественную меланому, меланому кожи, карциному тонкой кишки, рак желудка, карциному желудка, гастроинтестинальную стромальную опухоль (GIST), рак матки или саркому матки. Как правило, настоящее изобретение описывает способы лечения рака печени, карциномы печени, гепатомы, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы и гепатобластомы путем введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, как описано в данном документе.

[00249] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, могут быть полезны для лечения или профилактики симптомов, связанных с пролиферативными, воспалительными, аутоиммунными, неврологическими, глазными, респираторными, метаболическими, дерматологическими, слуховыми, печеночными, почечными или инфекционными заболеваниями. Один вариант осуществления относится к способу лечения пролиферативного, воспалительного, аутоиммунного, неврологического, глазного, респираторного, метаболического, дерматологического, слухового, печеночного, почечного или инфекционного заболевания, включающему введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество предлагаемой молекулы ингибитора нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. Как правило, заболевание или состояние представляет собой заболевание печени.

[00250] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения экспрессии гена-мишени у субъекта, включающему введение фармацевтической композиции субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для снижения экспрессии гена-мишени, причем фармацевтическая композиция содержит предлагаемую молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты, содержащую 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь или ее аналог, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент, также описанный в данном документе.

[00251] В некоторых вариантах осуществления предлагаемая молекула ингибитора нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ингибитора РНКи, как описано в данном документе, включая молекулу ингибитора дцРНКи или молекулу ингибитора оцРНКи.

[00252] Ген-мишень может быть геном-мишенью любого млекопитающего, таким как

ген-мишень человека. Любой ген может быть заглушен в соответствии со способом по настоящему изобретению. Типичные гены-мишени включают, без ограничений, фактор VII, Eg5, PCSK9, TPX2, апоB, SAA, TTR, HBV, HCV, RSV, ген PDGF-бета, ген Erb-B, ген Src, ген CRK, ген GRB2, ген RAS, ген MEKK, ген JNK, ген RAF, ген Erk1/2, ген PCNA(p21), ген MYB, ген JUN, ген FOS, ген BCL-2, ген циклина D, ген VEGF, ген EGFR, ген циклина A, ген циклина E, ген WNT-1, ген бета-катенина, ген c-MET, ген PKC, ген NFkB, ген STAT3, ген сурвивина, ген Her2/Neu, ген топоизомеразы I, ген топоизомеразы II альфа, ген p73, p21 (WAF1/CIP1), ген p27(KIP1), ген PPM1D, ген RAS, ген кавеолина I, ген MIB I, ген MTA1, ген M68, мутации в генах-супрессорах опухолей, ген-супрессор опухолей p53, LDHA и их комбинации.

[00253] В некоторых вариантах осуществления предложенная молекула ингибитора нуклеиновой кислоты, содержащая 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь или ее аналог, подавляет ген-мишень и, таким образом, может применяться для лечения субъекта, имеющего или подверженного риску заболевания, характеризующегося нежелательной экспрессией гена-мишени. Например, в некоторых вариантах осуществления предложенная молекула ингибитора нуклеиновой кислоты подавляет ген бета-катенина и, таким образом, может применяться для лечения субъекта, имеющего или подверженного риску заболевания, характеризующегося нежелательной экспрессией бета-катенина, например, аденокарциномы или гепатоцеллюлярной карциномы.

[00254] Как правило, предложенную нуклеиновую кислоту (например, молекулу ингибитора нуклеиновой кислоты) по настоящему изобретению вводят внутривенно или подкожно. Однако, фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, можно также вводить любым способом, известным в данной области техники, включая, например, пероральный, трансбуккальный, сублингвальный, ректальный, вагинальный, интрауретральный, местный, внутриглазной, интраназальный и/или интрааурикулярный, причем указанное введение может включать таблетки, капсулы, гранулы, водные суспензии, гели, спреи, суппозитории, бальзамы, мази и т. п.

[00255] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию доставляют посредством системного введения (например, путем внутривенного или подкожного введения) в соответствующие ткани или клетки субъекта или организма, такие как печень. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию доставляют посредством местного введения или системного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию доставляют путем местного введения в соответствующие ткани или клетки, такие как клетки и ткани легкого, например, путем легочной доставки.

[00256] Терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты или ее аналогов, раскрытой в данном документе, может зависеть от пути введения и физических характеристик пациента, таких как размер и вес субъекта, степень прогрессирования или проникновения заболевания, возраст, состояние здоровья и пол субъекта.

[00257] В некоторых вариантах осуществления предлагаемую нуклеиновую кислоту, как описано в данном документе, вводят в дозе от 20 микрограммов до 10 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в день, от 100 микрограммов до 5 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в день, или от 0,5 до 2,0 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в день.

[00258] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить каждый день или с перерывами. Например, прерывистое введение нуклеиновой кислоты или ее аналогов по настоящему изобретению может представлять собой введение от одного до шести дней в неделю, от одного до шести дней в месяц, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один или два раза в год, или с делением на несколько ежегодных, ежемесячных, еженедельных или ежедневных доз. В некоторых вариантах осуществления прерывистое введение доз может означать введение циклами (например, ежедневное введение в течение одного дня, одной недели или от двух до восьми последовательных недель, затем период отдыха без введения на протяжении до одной недели, до одного месяца, до двух месяцев, до трех месяцев или до шести месяцев или более), или оно может означать введение в чередующиеся дни, недели, месяцы или годы.

[00259] В любом из способов лечения по изобретению нуклеиновую кислоту или ее аналоги можно вводить субъекту отдельно в виде монотерапии или в комбинации с дополнительными видами терапии, известными в данной области.

ПРИМЕРЫ

Сокращения

Ac: ацетил

AcOH: уксусная кислота

ACN: ацетонитрил

Ad: категорически

AIBN: 2,2'-азобисизобутиронитрил

безв.: безводный

водн.: водный

B₂Pin₂: бис(пинаколато)дибор -4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолан)

BINAP: 2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил

BH₃: боран

Bn: бензил

Boc: *трет*-бутоксикарбонил

Boc₂O: ди-трет-бутилдикарбонат

BPO: перекись бензоила

ⁿBuOH: н-бутанол

CDI: карбонилдиимидазол

COD: циклооктадиен

д: дней

DABCO: 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан

DAST: трифторид диэтиламиносеры

dba: дибензилиденацетон

DBU: 1,8-дiazобикарбо[5.4.0]ундец-7-ен

DCE: 1,2-дихлорэтан

ДХМ: дихлорметан

DEA: диэтиламин

DHP: дигидропиран

DIBAL-H: гидрид диизобутилалюминия

DIPA: диизопропиламин

DIPEA или DIEA: N,N-диизопропилэтиламин

DMA: N,N-диметилацетамид

DME: 1,2-диметоксиэтан

DMAp: 4-диметиламинопиридин

ДМФА: N,N-диметилформамид

DMP: периодинан Десса-Мартина

ДМСО: диметилсульфоксид

DMTr: 4,4'-диметокситритил

DPPA: дифенилфосфориазид

dppf: 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен

EDC или EDCI: 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорид

э.и.: энантиомерный избыток

ESI: ионизация электрораспылением

ЭА: этилацетат
EtOAc: этилацетат
EtOH: этанол
FA: муравьиная кислота
ч: часы, часов
HATU: N,N,N',N'-тетраметил-О-(7-азабензотриазол-1-ил)урония
гексафторфосфат
HCl: соляная кислота
ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография
HOAc: уксусная кислота
IBX: 2-йодоксибензойная кислота
IPA: изопропиловый спирт
KHMDS: гексаметилдисилазид калия
K₂CO₃: карбонат калия
LAH: алюмогидрид лития
LDA: диизопропиламид лития
L-DBTA: дибензоил-L-винная кислота
m-CPBA: мета-хлорпербензойная кислота
M: молярный
MeCN: ацетонитрил
MeOH: метанол
Me₂S: диметилсульфид
MeONa: метилат натрия
MeI: йодметан
мин: минуты
мл: миллилитры
mM: миллимолярный
ммоль: миллимоли
МПа: мегапаскаль
MOMCl: простой метилхлорметиловый эфир
MsCl: метансульфонилхлорид
MTBE: метил-*трет*-бутиловый эфир
nBuLi: н-бутиллитий
NaNO₂: нитрит натрия
NaOH: гидроксид натрия

Na₂SO₄: натрий сульфат
NBS: N-бромсукцинимид
NCS: N-хлорсукцинимид
NFSI: N-фторбензолсульфонимид
NMO: N-оксид N-метилморфолина
NMP: N-метилпирролидин
ЯМР: ядерный магнитный резонанс
°C: градусы Цельсия
Pd/C: палладиевый катализатор на углеродном носителе
Pd(OAc)₂: ацетат палладия
ФСБ: фосфатно-солевой буфер
ПЭ: петролейный эфир
POCl₃: оксихлорид фосфора
PPh₃: трифенилфосфин
PyBOP: (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат
Отн.: относительный
КТ или к.т.: комнатная температура
насыщ.: насыщенный
SEMCl: простой хлорметил-2-триметилсилилэтиловый эфир
СФХ: сверхкритическая флюидная хроматография
SOCl₂: дихлорид серы
tBuOK: *трет*-бутоксид калия
TBAB: бромид тетрабутиламмония
TBAF: фторид тетрабутиламмония
TBAI: иодид тетрабутиламмония
ТЭА: триэтиламин
Tf: трифторметансульфонат
TfAA, TFMSA или Tf₂O: ангидрид трифторметансульфокислоты
ТФУК: трифторуксусная кислота
TIBSCl: 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид
TIPS: триизопропилсилил
ТГФ: тетрагидрофуран
THP: тетрагидропиран
ТСХ: тонкослойная хроматография.
TMEDA: тетраметилэтилендиамин

pTSA: пара-толуолсульфокислота

СВЭЖХ = сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

вес: вес

Xantphos: 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен

Общие способы синтеза

[00260] Следующие примеры предназначены для дополнительной иллюстрации изобретения, и не должны рассматриваться как ограничивающие его. Температура указывается в градусах Цельсия (°C). Если не указано иное, все выпаривания проводят при пониженном давлении, предпочтительно, примерно от 15 мм рт. ст. до 100 мм рт. ст. (= 20-133 мбар). Структура конечных продуктов, промежуточных соединений и исходных материалов подтверждается стандартными аналитическими методами, например, микроанализом и спектроскопическими характеристиками, например, МС, ИК, ЯМР. Используемые сокращения являются общепринятыми в данной области техники.

[00261] Все исходные материалы, строительные блоки, реагенты, кислоты, основания, дегидратирующие агенты, растворители и катализаторы, используемые для синтеза нуклеиновой кислоты или ее аналогов по настоящему изобретению либо являются коммерчески доступными, либо могут быть получены методами органического синтеза, известными рядовым специалистам в данной области техники (Houben-Weyl 4th Ed. 1952, Methods of Organic Synthesis, Thieme, Volume 21). Кроме того, нуклеиновая кислота или ее аналоги по настоящему изобретению могут быть получены способами органического синтеза, известными специалистам в данной области, как показано в следующих примерах.

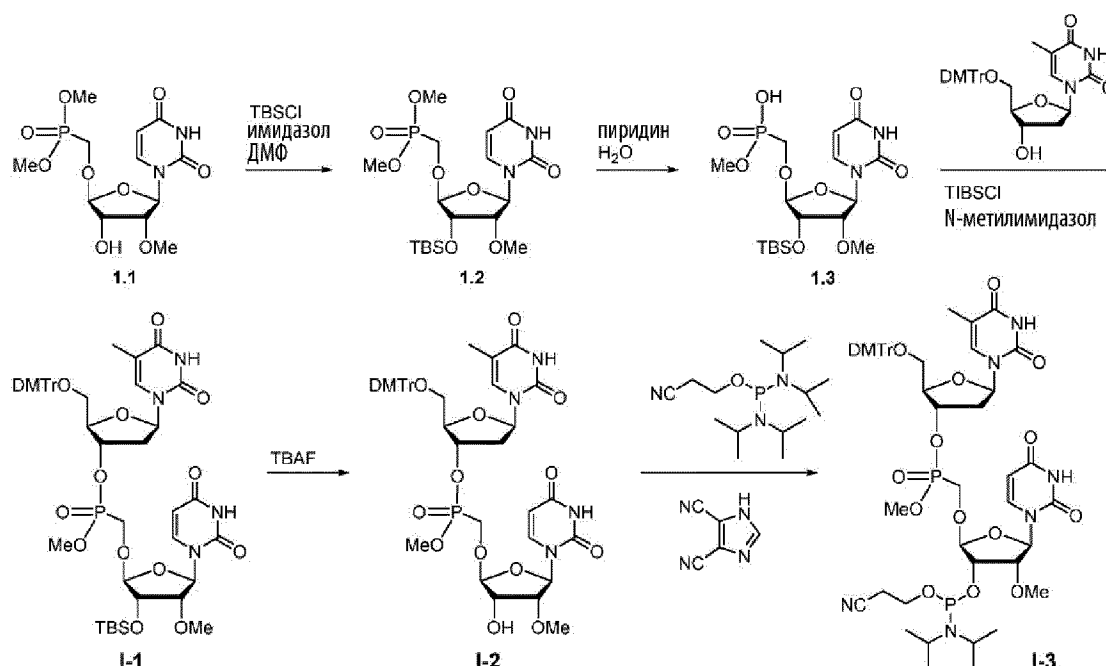
[00262] Все реакции проводят в атмосфере азота или аргона, если не указано иное.

[00263] Протонный ЯМР (^1H ЯМР) проводят в дейтерированном растворителе. В некоторых нуклеиновых кислотах или их аналогах, раскрытых в данном документе, один или несколько сдвигов ^1H перекрываются с остаточными сигналами протона растворителя; об этих сигналах не сообщается в экспериментах, представленных ниже.

[00264] Как показано в приведенных ниже примерах, в некоторых иллюстративных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту или ее аналоги получали в соответствии со следующими общими процедурами. Следует понимать, что, хотя общие способы описывают синтез определенных нуклеиновых кислот или их аналогов по настоящему изобретению, следующие общие способы и другие способы, известные специалистам в данной области техники, могут быть применены ко всем нуклеиновым кислотам или их аналогам и подклассам и видам каждой из таких нуклеиновых кислот или их аналогов, как

описано в данном документе.

Пример 1. Синтез (2R,3S,4R,5R)-2-((((2R,3S,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (I-3)



[00265] Стадия 1: Диметил-((((2R,3S,4R,5R)-3-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат. (1.2)

[00266] Растворяли 1,10 г соединения **1.1** в 10 мл безводного ДМФ. Затем к раствору добавляли 1,22 г имидазола. После добавления 1,36 г TBSCl, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 часов. После завершения реакции, подтвержденного методом СВЭЖХ, ДМФА удаляли при пониженном давлении. Затем желтоватый остаток повторно растворяли в 200 мл ЭА и дважды промывали 75 мл воды и один раз рассолом. Полученный раствор осушали над безводным сульфатом натрия и летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Неочищенный продукт затем очищали на флэш-колонке (0-10% MeOH в ДХМ) с получением соединения **1.2** (1,21 г, выход 83%) в виде белой пены. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ (м.д.): 8,42 (с, 1H), 7,59 (д, J=8 Гц, 1H), 7,58 (д, J=4 Гц, 1H), 6,33 (дд, J₁=8 Гц, J₂=1,6 Гц, 1H), 4,89 (с, 1H), 4,25 (д, J=4 Гц, 1H), 4,03 (м, 1H), 3,76-3,91 (м, 2H), 3,85 (д, J=4 Гц, 3H), 3,82 (д, J=4 Гц, 3H), 3,37 (с, 3H), 0,91 (с, 9H), 0,13 (с, 3H), 0,11 (с, 3H). МС (ESI) m/z рассчитано для

$C_{18}H_{33}N_2NaO_9PSi^-$ 503,5150, найдено: 503,55.

[00267] Стадия 2: Метилгидроген-(((2R,3S,4R,5R)-3-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат. (**1.3**)

[00268] Растворяли 3,30 г соединения **1.2** в 120 мл водного пиридина (пиридин:вода 3:2). Реакционную смесь нагревали до 50 °С и перемешивали в течение 16 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт **1.3** (3,74 г, количественный выход) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. 1H -ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 11,16 (широкий, 1H), 7,75 (д, $J=1$ Гц, 1H), 6,09 (д, $J=8$ Гц, 1H), 5,67 (д, $J=8$ Гц, 1H), 4,94 (с, 1H), 4,24 (д, $J=4$ Гц, 1H), 3,95 (м, 1H), 3,45-3,61 (м, 2H), 3,43 (д, $J=4$ Гц, 3H), 3,26 (с, 3H), 0,87 (с, 9H), 0,11 (с, 3H), 0,10 (с, 3H). ^{31}P -ЯМР (200 МГц, ДМСО- d_6): 19,96. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{17}H_{30}N_2O_9PSi^-$ 465,4913, найдено: 465,23.

[00269] Стадия 3: (2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илметил-(((2R,3S,4R,5R)-3-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат (**I-1**).

[00270] Растворяли 4,65 г соединения **1.3** в 100 мл безводного пиридина. Смесь охлаждали до 0 °С и добавляли 7,72 г TIBSCl (3 экв.) при перемешивании в течение 5 минут с последующим нагреванием до комнатной температуры и перемешиванием в течение еще 15 минут. Затем к полученному раствору добавляли 4,63 г 1-((2R,4R,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)-диона, а затем 4,1 мл 1-метилимидазола. Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 2 часов. Подтверждали завершение реакции с помощью СВЭЖХ и добавляли 25 мл насыщенного бикарбоната натрия, чтобы погасить реакцию. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении и полученное желто-коричневую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА), получая соединение **I-1** (3,67 г, выход 44%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{48}H_{61}N_4NaO_{15}PSi^+$ 1016,0770, найдено: 1016,01.

[00271] Стадия 4: (2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илметил-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-3-гидрокси-4-метокситетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат (**I-2**).

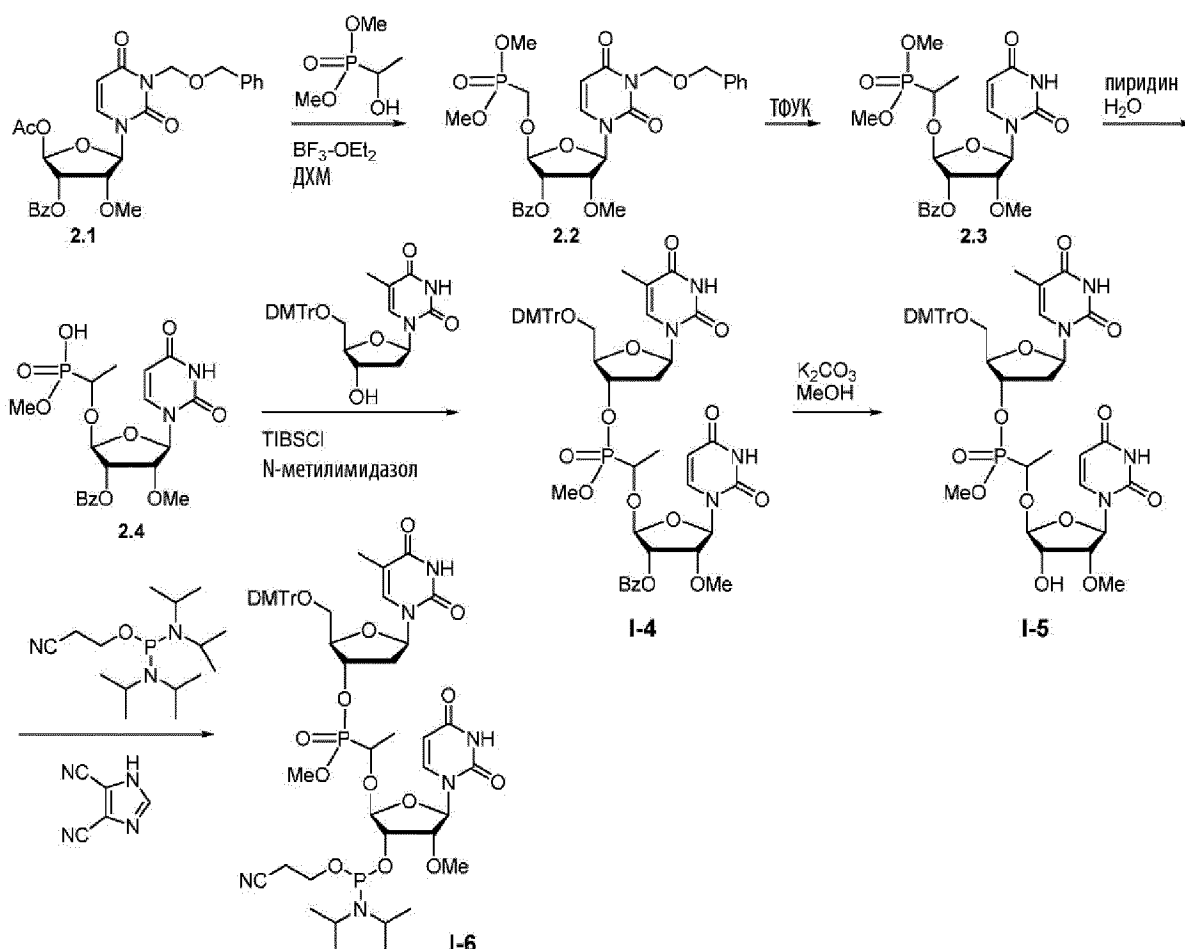
[00272] Растворяли 2,50 г соединения **I-1** в 50 мл безводного ТГФ. Затем к раствору добавляли по каплям 7,5 мл TBAF (1M) в течение 3 мин при перемешивании при

комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакцию останавливали, когда анализ СВЭЖХ показывал, что было израсходовано >85% исходного материала. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении и полученное желто-коричневую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА), получая соединение **I-2** (1,07 г, выход 49%) в виде белого порошка. ^{31}P -ЯМР (200 МГц, CDCl_3): 21,93, 21,91. МС (ESI) m/z рассчитано для $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{P}^-$ 877,8173, найдено: 877,91.

[00273] Стадия 5: (2R,3S,4R,5R)-2-((((2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (I-3).

[00274] Растворяли 440 мг соединения **I-2** в 6 мл безводного ДХМ. После перемешивания при комнатной температуре в течение 10 минут к реакционной смеси добавляли 262 мкл 2-цианоэтил- $\text{N}',\text{N}',\text{N}',\text{N}'$ -тетраизопропилфосфородиамидита, а затем 100 мг 4,5-дицианоимидазола. Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Мониторинг методом СВЭЖХ подтвердил полную конверсию исходного материала. Затем реакционную смесь промывали 5 мл насыщенного бикарбоната натрия и 5 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток белой маслянистой жидкости затем очищали флэш-хроматографией (0-8% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-3** (346 мг, выход 64%) в виде белого порошка. ^{31}P -ЯМР (200 МГц, CDCl_3): 152,80, 152,75, 151,53, 151,38, 22,65, 22,47, 22,19, 22,16. МС (ESI) m/z рассчитано для $\text{C}_{51}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{NaO}_{16}\text{P}_2^+$ 1102,0357, найдено: 1102,08.

Пример 2. Синтез (2R,3S,4R,5R)-2-(1-((((2R,3S,5R)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)этокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидита (I-6)



[00275] Стадия 1: (2R,3S,4R,5R)-5-(3-((Бензилокси)метил)-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-2-((диметоксифосфорил)метокси)-4-метокситетрагидрофуран-3-илбензоат (**2.2**).

[00276] Растворяли 3,06 г соединения **2.1** в 20 мл безводного ДХМ. Затем раствор охлаждали до 0 °С и добавляли 3,77 мл $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, а затем 3 мл диметил-(1-гидроксиэтил)фосфоната. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре, после чего добавляли к реакционной смеси еще 1,9 мл $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ и 1,5 мл диметил-(1-гидроксиэтил)фосфоната. Полученный раствор перемешивали еще 84 часа. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакцию гасили 15 мл воды и разбавляли 40 мл ДХМ. Слои разделяли и органический слой промывали 30 мл насыщенного бикарбоната натрия и 30 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия смесь концентрировали и очищали флэш-хроматографией (30-100% ЭА в гексанах, затем 0-5% MeOH в ДХМ) с получением соединения **2.2** (2,04 г, выход 56%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{NaO}_{11}\text{P}^+$ 627,5380, найдено: 627,21.

[00277] Стадия 2: (2R,3S,4R,5R)-2-(1-(Диметоксифосфорил)этокс)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-илбензоат (**2.3**).

[00278] Растворяли 1,80 г соединения **2.2** в 0,9 мл безводного толуола и добавляли к раствору 7,2 мл ТФУК. Затем реакционную смесь нагревали до 45 °С и перемешивали в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, смесь разбавляли 70 мл толуола и удаляли летучие вещества при пониженном давлении. Затем пурпурно-коричневый остаток растворяли в 100 мл ЭА и промывали 50 мл бикарбоната натрия и 50 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Затем полученную коричневую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией с получением соединения **2.3** (1,11 г, выход 77%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{20}H_{25}N_2NaO_{10}P^+$ 507,3870, найдено: 507,43.

[00279] Стадия 3: (2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-Диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-2-(1-(гидрокси(метокси)фосфорил)этокси)-4-метокситетрагидрофуран-3-илбензоат (**2.4**).

[00280] Растворяли 1,11 г соединения **2.3** в 40 мл 3:2 смеси пиридина и воды. Реакционную смесь нагревали до 50 °С и перемешивали в течение 16 часов. После завершения реакции, подтвержденного методом СВЭЖХ, летучие вещества удаляли при пониженном давлении и сырой продукт **2.4** (1,26 г, количественный выход) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

[00281] Стадия 4: (2R,3S,4R,5R)-2-(1-(((2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)этокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-илбензоат (**I-4**).

[00282] Растворяли 1,04 г соединения **2.4** в 24 мл безводного пиридина и охлаждали до 0 °С. Добавляли 1,81 г TIBSCl и смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре. Добавляли к полученному раствору 2,16 г 1-((2R,4R,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)-диона, а затем 1,0 мл 1-метилимидазола. Реакционную смесь затем перемешивали при к.т. в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, добавляли 10 мл насыщенного бикарбоната натрия, чтобы погасить реакцию. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении и полученную желтую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-4** (0,89 г, выход 47%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{50}H_{53}N_4NaO_{16}P^+$ 1019,9490, найдено: 1019,78.

[00283] Стадия 5: (2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илметил-(1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-3-гидрокси-4-

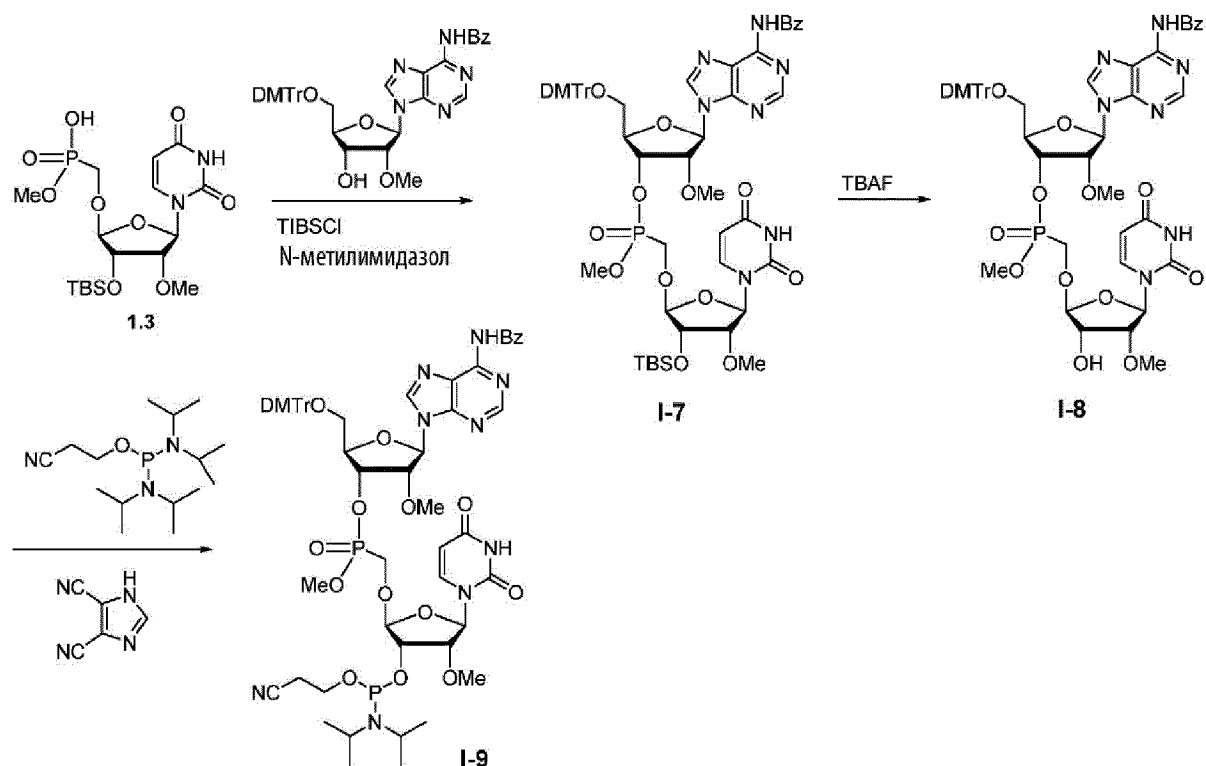
метокситетрагидрофуран-2-ил)окси)этил)фосфонат (**I-5**).

[00284] Добавляли 1,38 г карбоната калия к 20 мл MeOH и полученную суспензию перемешивали в течение 12 часов. Растворяли 0,89 г **I-4** в 5 мл безводного MeOH и добавляли 5 мл предварительно приготовленной суспензии карбоната калия. Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 2,5 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь фильтровали и фильтрат гасили 2 мл 1М уксусной кислоты. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Затем сырой продукт очищали флэш-хроматографией (30-100% ЭА в гексанах, затем 0-5% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-5** (0,42 г, выход 53%) в виде белой пены. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{43}H_{49}N_4NaO_{15}P^+$ 915,8410, найдено: 915,48.

[00285] Стадия 6: (2R,3S,4R,5R)-2-(1-((((2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)этокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (**I-6**).

[00286] Растворяли 550 мг соединения **I-5** в 7,5 мл безводного ДХМ. После перемешивания при к.т. в течение 10 мин, добавляли к реакционной смеси 320 мкл 2-цианоэтил-N',N',N',N'-тетраизопропилфосфоамидита, а затем 90 мг 4,5-дицианоимидазола. Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь промывали 5 мл насыщенного бикарбоната натрия и 5 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток белой маслянистой жидкости затем очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-6** (451 мг, выход 67%) в виде белого порошка. ^{31}P -ЯМР (200 МГц, $CDCl_3$): 152,48, 152,46, 151,32, 151,29, 24,74, 24,50, 24,13, 23,96. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{52}H_{66}N_6NaO_{16}P_2^+$ 1116,0627, найдено: 1116,12.

Пример 3. Синтез (2R,3R,4S,5R)-2-((((2R,4S,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидита (I-9**)**



[00287] Стадия 3: (2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илметил-(((2R,3S,4R,5R)-3-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат (I-7).

[00288] Растворяли 2,60 г соединения **1.3** в 55 мл безводного пиридина и охлаждали до 0 °С. Добавляли TIBSCl (3 экв.) и перемешивали в течение 15 минут при 0 °С. После нагревания до комнатной температуры добавляли 2,48 г N-(9-((2R,3S,4S,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокси-3-метокситетрагидрофуран-2-ил)-9H-пурин-6-ил)бензамида, а затем 2,3 мл 1-метилимидазола. Реакционную смесь затем перемешивали при к.т. в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, добавляли к реакционной смеси 10 мл насыщенного бикарбоната натрия, чтобы погасить реакцию. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении и полученную желтую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-7** (2,26 г, выход 55%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для C₅₆H₆₇N₇O₁₅PSi⁺ 1137,2442, найдено: 1137,45.

[00289] Стадия 4: (2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илметил-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-3-гидрокси-4-метокситетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат (I-8).

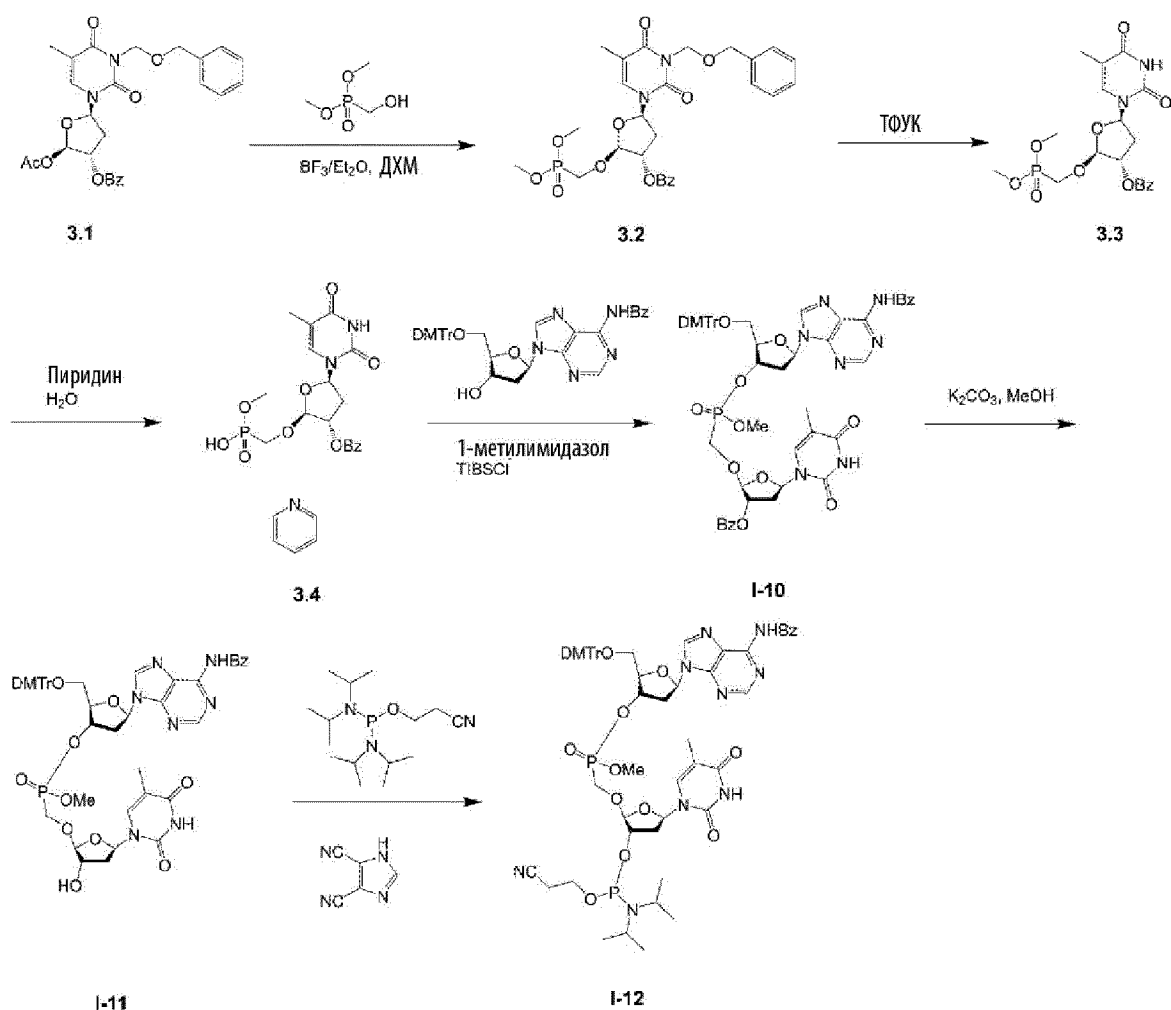
[00290] Растворяли 1,30 г **I-7** в 40 мл безводного ТГФ и добавляли по каплям 3,0 мл

ТВАФ (1М) в течение 3 минут при комнатной температуре при перемешивании, и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. После израсходования >90% исходного материала, при подтверждении СВЭЖХ, летучие вещества удаляли при пониженном давлении с получением желтого масла, которое очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением соединения **I-8** (0,53 г, выход 45%) в виде беловатого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для C₅₀H₅₁N₇O₁₅P⁺ 1021,9663, найдено: 1020,84.

[00291] Стадия 5: (2R,3S,4R,5R)-2-((((2R,3S,5R)-2-((Бис(4-метоксифенил)(фенил)-метокси)метил)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-4-метокситетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфoramидит (I-9).

Растворяли 416 мг соединения **I-8** в 5 мл безводного ДХМ. После перемешивания при к.т. в течение 10 мин добавляли к реакционной смеси 224 мкл 2-цианоэтил-N',N',N',N'-тетраизопропилфосфороамидита, а затем 63 мг 4,5-дицианоимидазола. Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь промывали 5 мл насыщенного бикарбоната натрия, 5 мл рассола, осушали над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток белой маслянистой жидкости затем очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-9** (305 мг, выход 61%) в виде белой пены. ³¹P-ЯМР (200 МГц, CDCl₃): 152,89, 152,71, 151,60, 151,51, 23,19, 22,81, 22,16, 21,75. МС (ESI) m/z рассчитано для C₅₉H₇₀N₉O₁₆P₂⁺ 1223,2023, найдено: 1222,91.

Пример 4. Синтез (2R,3R,5R)-2-((((2R,3R,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфoramидита (I-12)



[00292] Стадия 1: (2R,3S,5R)-5-(3-((Бензилокси)метил)-5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-2-(1-(диметоксифосфорил)этокси)тетрагидрофуран-3-илбензоат (**3.2**)

[00293] Растворили 4,10 г соединения **3.1** в 24 мл безводного ДХМ. Затем раствор охлаждали до 0 °С и добавляли 5,40 мл $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, а затем 3,60 мл диметил(гидроксиметил)фосфоната. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 15 мин и позволяли постепенно нагреться до комнатной температуры. Полученный раствор перемешивали в течении 18 часов при к.т. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакцию гасили 20 мл воды и разбавляли 60 мл ДХМ. Слои разделяли и органический слой промывали 30 мл насыщенного бикарбоната натрия и 30 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия смесь концентрировали и очищали флэш-хроматографией (30-100% ЭА в гексанах, затем 0-10% MeOH в ДХМ) с получением соединения **3.2** (2,15 г, выход 45%) в виде белого порошка. ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ (м.д.): 8,04 (дд, $J_1=12$ Гц, $J_2=4$ Гц, 2H), 7,24-7,64 (м, 9H), 6,86 (т, $J=8$ Гц, 1H), 5,53 (с, 1H), 5,52 (с, 2H), 5,21 (с, 1H), 4,72 (с, 2H), 4,06 (дд, $J_1=14$ Гц, $J_2=8$ Гц, 1H), 3,82-3,90 (м, 7H), 2,58-2,63 (м, 1H), 2,32-2,39 (м, 1H), 2,02 (с, 3H). МС (ESI) m/z

рассчитано для $C_{27}H_{31}N_2NaO_{10}P^+$ 597,1614, найдено: 597,1783.

[00294] Стадия 2: (2R,3S,5R)-2-((Диметоксифосфорил)метокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илбензоат (3.3)

[00295] Растворяли 2,12 г соединения **3.2** в 2,0 мл безводного толуола и добавляли к раствору 16,0 мл ТФУК. Затем реакционную смесь нагревали до 45 °С и перемешивали в течение 5 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, смесь разбавляли 70 мл толуола и летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Пурпурно-коричневый остаток затем растворяли в 100 мл ЭА и промывали 100 мл бикарбоната натрия и 100 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия, летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Затем полученную коричневую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией с получением соединения **3.3** (1,21 г, выход 75%) в виде белого порошка. 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ (м.д.): 8,46 (с, 1H), 7,40-8,05 (м, 6H), 6,82 (т, $J=8$ Гц, 1H), 5,53 (с, 1H), 5,22 (с, 1H), 4,07 (дд, $J_1=14$ Гц, $J_2=8$ Гц, 1H), 3,83-3,91 (м, 7H), 2,59-2,64 (м, 1H), 2,38-2,44 (м, 1H), 1,98 (с, 3H). МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{19}H_{23}N_2NaO_9P^+$ 477,3615, найдено: 477,4387.

[00296] Стадия 3: (2R,3S,5R)-2-((Гидрокси(метокси)фосфорил)метокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илбензоат (3.4)

[00297] Растворяли 1,2 г соединения **3.4** в 40 мл смеси 3:2 пиридина и воды. Реакционную

смесь нагревали до 50 °С и перемешивали в течение 16 часов. После завершения реакции, подтвержденного методом СВЭЖХ, летучие вещества удаляли при пониженном давлении и сырой **продукт 3.4** (1,37 г, количественный выход)

использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

[00298] Стадия 4: (2R,3R,5R)-2-((((2R,3R,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илбензоат (I-10).

[00299] Растворяли 2,56 г соединения **3.4** и 2,98 г 1-((2R,4R,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)-диона в 64 мл безводного пиридина и охлаждали до 0 °С. Добавляли 3,44 г $TIBSCl$. Смесь затем перемешивали в течении 15 мин при 0 °С. После нагревания до комнатной температуры к реакционной смеси добавляли 2,5 мл 1-метилимидазола. Реакционную смесь затем перемешивали при к.т. в течение 3,5 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, добавляли 30 мл насыщенного бикарбоната натрия, чтобы погасить реакцию. Летучие вещества удаляли при

пониженном давлении и полученную желтую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ЭА с 0,1% ТЭА) с получением **I-10** (2,42 г, выход 46%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{56}H_{55}N_7O_{14}P^+$ 1080,3545, найдено: 1080,3895.

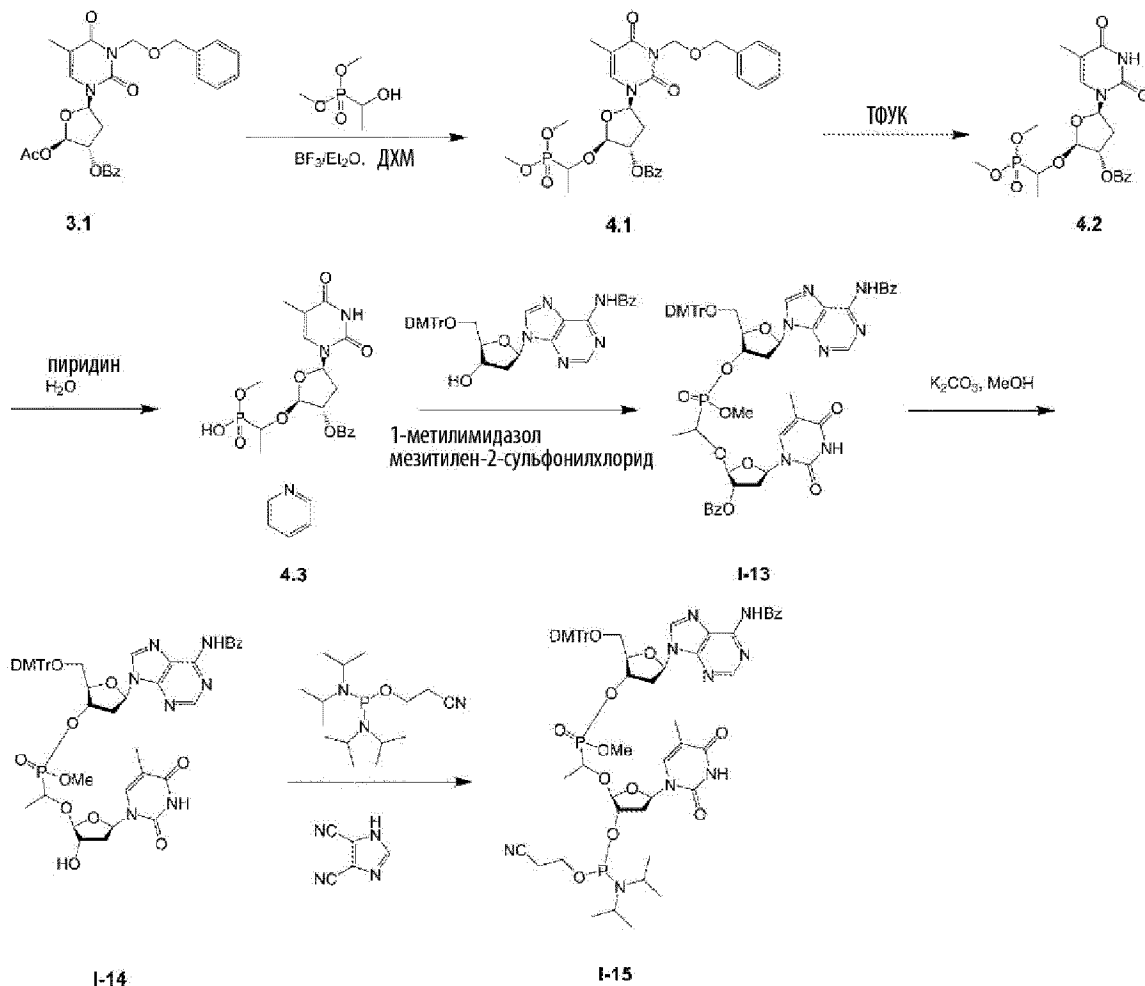
[00300] Стадия 5: (2R,3R,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-илметил-(((2R,3R,5R)-3-гидрокси-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат (**I-11**).

[00301] Добавляли 1,38 г карбоната калия к 20 мл MeOH и полученную суспензию перемешивали в течение 12 часов. Суспензию затем фильтровали, получая прозрачный фильтрат в растворе карбоната калия. Растворяли 1,0 г **I-10** в 45 мл безводного MeOH и добавляли 5 мл предварительно приготовленного раствора карбоната калия. Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 1 часа. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь фильтровали, и фильтрат гасили 1,5 мл 1М уксусной кислоты. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Неочищенный материал затем очищали флэш-хроматографией (30-100% ЭА в гексанах с 0,1% ТЭА, а затем 0-10% MeOH в ДХМ) с получением **I-11** (0,52 г, выход 58%) в виде белой пены. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{49}H_{51}N_7O_{13}P^+$ 976,3283, найдено: 976,6138.

[00302] Стадия 6: (2R,3R,5R)-2-((((2R,3R,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (**I-12**).

[00303] Растворяли 291 мг соединения **I-11** в 4,0 мл безводного ДХМ. После перемешивания при к.т. в течение 10 мин, добавляли к реакционной смеси 143 мкл 2-цианоэтил-N',N',N',N'-тетраизопропилфосфороамидита, а затем 39 мг 4,5-дицианоимидазола. Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь промывали 5 мл насыщенного бикарбоната натрия и 5 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток белой маслянистой жидкости затем очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-12** (220 мг, выход 62%) в виде белого порошка. 31P-ЯМР (200 МГц, DMSO-d6): 149,64, 149,51, 149,49, 149,37, 23,67, 23,65, 23,38, 23,33. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{58}H_{68}N_9O_{14}P_2^+$ 1176,4361, найдено: 1176,7185.

Пример 5. Синтез (2R,3R,5R)-2-(1-(((2R,3R,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-(((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)этокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидита (I-15)



[00304] Стадия 1: (2R,3S,5R)-5-(3-((Бензилокси)метил)-5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-2-(1-(диметоксифосфорил)этокси)тетрагидрофуран-3-илбензоат (**4.1**)

[00305] Растворяли 4,50 г **3.1** в 27 мл безводного ДХМ. Затем раствор охлаждали до 0 °С и добавляли 5,90 мл $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, а затем 4,50 мл диметил-(1-гидроксиэтил)фосфоната. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 15 мин и позволяли постепенно нагреться до комнатной температуры. Полученный раствор перемешивали в течении 24 часов при к.т. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакцию гасили 40 мл воды и разбавляли 100 мл ДХМ. Слои разделяли и органический слой промывали 30 мл насыщенного бикарбоната натрия и 30 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия, смесь концентрировали и очищали флэш-хроматографией (30-100% ЭА в гексанах, а затем 0-10% MeOH в ДХМ) с получением **4.1**

(2,15 г, выход 45%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{28}H_{33}N_2NaO_{10}P^+$ 611,1771, найдено: 611,3412.

[00306] Стадия 2: (2R,3S,5R)-2-(1-(Диметоксифосфорил)этокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илбензоат (4.2)

[00307] Растворяли 1,90 г соединение **4.1** в 2,0 мл безводного толуола и добавляли к раствору 16,0 мл ТФУК. Затем реакционную смесь нагревали до 45 °С и перемешивали в течение 5 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, смесь разбавляли 70 мл толуола и летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Пурпурно-коричневый остаток затем растворяли в 100 мл ЭА и промывали 100 мл бикарбоната натрия и 100 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия, летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Затем полученную коричневую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией с получением **4.2** (1,15 г, выход 76%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{20}H_{25}N_2NaO_9P^+$ 491,1195, найдено: 491,2625.

[00308] Стадия 3: (2R,3S,5R)-2-(1-(Гидрокси(метокси)фосфорил)этокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илбензоат (4.3)

[00309] Растворяли 1,0 г соединения **4.2** в 40 мл смеси 3:2 пиридина и воды. Реакционную

смесь нагревали до 50 °С и перемешивали в течение 16 часов. После завершения реакции, подтвержденного

СВЭЖХ, летучие вещества удаляли при пониженном давлении и неочищенный материал **4.3** (1,14 г, количественный выход)

использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

[00310] Стадия 4: (2R,3R,5R)-2-(1-(((2R,3R,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)этокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илбензоат (I-13)

[00311] Растворяли 1,35 г **4.3** и 1,50 г 1-((2R,4R,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)-диона в 27 мл безводного пиридина и охлаждали до 0 °С. Добавляли 2,35 г мезитилен-2-сульфонилхлорида. Смесь затем перемешивали в течении 15 мин при 0 °С. После нагрева до к.т., к реакционной смеси добавляли 1,20 мл 1-метилимидазола. Реакционную смесь затем перемешивали при к.т. в течение 4 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, добавляли 30 мл насыщенного бикарбоната натрия, чтобы погасить реакцию. Летучие вещества удаляли при

пониженном давлении и полученную желтую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ЭА с 0,1% ТЭА) с получением **I-13** (1,03 г, выход 46%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{57}H_{57}N_7O_{14}P^+$ 1094,3701, найдено: 1094,3352.

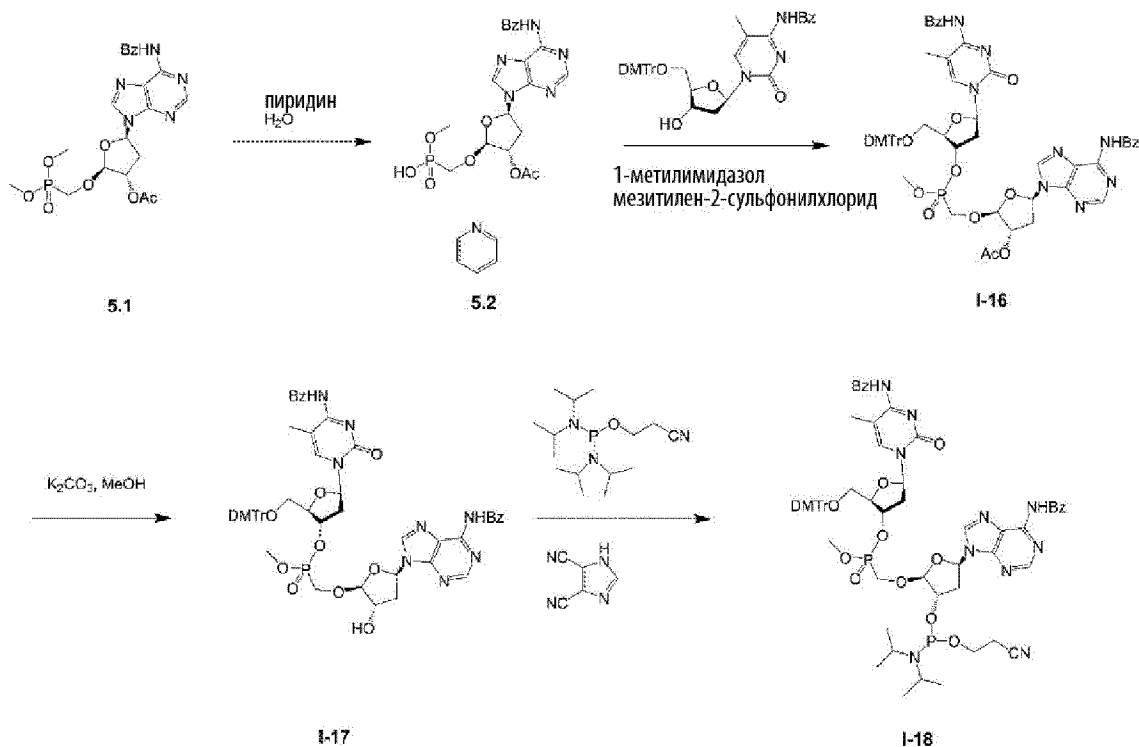
[00312] Стадия 5: (2R,3R,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-илметил-(1-(((2R,3R,5R)-3-гидрокси-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)окси)этил)фосфонат (**I-14**).

[00313] Добавляли 1,38 г карбоната калия к 20 мл MeOH и полученную суспензию перемешивали в течение 12 часов. Суспензию затем фильтровали, получая прозрачный фильтрат в виде раствора карбоната калия. Растворяли 680 мг **I-13** в 45 мл безводного MeOH и добавляли 5 мл предварительно приготовленного раствора карбоната калия. Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 1,5 часа. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь фильтровали, и фильтрат гасили 1,5 мл 1М уксусной кислоты. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Неочищенный материал затем очищали флэш-хроматографией (30-100% ЭА в гексанах с 0,1% ТЭА, а затем 0-10% MeOH в ДХМ) с получением **I-14** (310 мг, выход 51%) в виде белой пены. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{50}H_{53}N_7O_{13}P^+$ 990,3439, найдено: 990,5858.

[00314] Стадия 6: (2R,3R,5R)-2-(1-(((2R,3R,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)этокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (**I-15**).

Растворяли 300 мг **I-14** в 4,0 мл безводного ДХМ. После перемешивания при к.т. в течение 10 мин добавляли к реакционной смеси 150 мкл 2-цианоэтил-N',N',N',N'-тетраизопропилфосфоамидита, а затем 42 мг 4,5-дицианоимидазола. Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь промывали 5 мл насыщенного бикарбоната натрия и 5 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток белой маслянистой жидкости затем очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с получением **I-15** (225 мг, выход 74%) в виде белого порошка. ^{31}P -ЯМР (200 МГц, DMSO-d₆): 149,41, 148,96, 148,84, 148,74, 148,73, 148,66, 148,61, 148,53, 24,61, 24,58, 24,55, 24,52, 24,48, 24,46, 24,42, 24,37. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{59}H_{70}N_9O_{14}P_2^+$ 1190,4518, найдено: 1190,4528.

Пример 6. Синтез (2R,3S,5R)-2-((((2R,3R,5R)-5-(4-бензамидо-5-метил-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)тетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидита (I-18)



[00315] Стадия 1: (2R,3S,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((гидрокси(метокси)фосфорил)метокси)тетрагидрофуран-3-илацетат (**5.2**)

[00316] Растворили 2,0 г соединения **5.1** ((2R,3S,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((диметоксифосфорил)метокси)тетрагидрофуран-3-илацетата) в 72 мл смеси 5:4 пиридина и воды. Реакционную смесь нагревали до 50 °С и перемешивали в течение 16 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, летучие вещества удаляли при пониженном давлении и неочищенный материал **5.2** (2,26 г, количественный выход) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

[00317] Стадия 2: (2R,3R,5R)-2-((((2R,3R,5R)-5-(6-Бензамидо-9H-пурин-9-ил)-2-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-3-илбензоат (**I-16**).

[00318] Растворили 1,87 г **5.2** и 2,02 г N-(1-((2R,4R,5R)-5-((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)-4-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)-5-метил-2-оксо-1,2-дигидропиримидин-4-ил)бензамида в 47,5 мл безводного пиридина и охлаждали до 0 °С. Добавляли 3,44 г мезитилен-2-сульфонилхлорида. Смесь затем перемешивали в

течении 15 мин при 0 °С. После нагрева до к.т., к реакционной смеси добавляли 1,6 мл 1-метилимидазола. Реакционную смесь затем перемешивали при к.т. в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, добавляли 30 мл насыщенного бикарбоната натрия, чтобы погасить реакцию. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении и полученную желтую маслянистую жидкость очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ЭА с 0,1% ТЭА) с получением **I-16** (1,72 г, выход 46%) в виде белого порошка. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{58}H_{58}N_8O_{14}P^+$ 1121,3810, найдено: 1121,4519.

[00319] Стадия 5: (2R,3R,5R)-5-(4-Бензамидо-5-метил-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-2-(((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-илметил-((((2R,3S,5R)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)-3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)окси)метил)фосфонат (**I-17**).

[00320] Добавляли 1,38 г карбоната калия к 20 мл MeOH и полученную суспензию перемешивали в течение 12 часов. Суспензию затем фильтровали, получая прозрачный фильтрат в виде раствора карбоната калия. Растворяли 1,4 г **I-16** в 100 мл безводного MeOH и добавляли 4 мл предварительно приготовленного раствора карбоната калия. Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течении 20 мин. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь фильтровали, и фильтрат гасили 1,5 мл 1М уксусной кислоты. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Неочищенный материал затем очищали флэш-хроматографией (30-100% ЭА в гексанах с 0,1% ТЭА, а затем 0-10% MeOH в ДХМ) с получением **I-17** (0,85 г, выход 63%) в виде белой пены. МС (ESI) m/z рассчитано для $C_{56}H_{56}N_8O_{13}P^+$ 1079,3705, найдено: 1079,6301.

[00321] Стадия 6: (2R,3S,5R)-2-((((2R,3R,5R)-5-(4-Бензамидо-5-метил-2-оксопиримидин-1(2H)-ил)-2-(((бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)метил)тетрагидрофуран-3-ил)окси)(метокси)фосфорил)метокси)-5-(6-бензамидо-9H-пурин-9-ил)тетрагидрофуран-3-ил-(2-цианоэтил)диизопропилфосфорамидит (**I-18**).

[00322] Растворяли 640 мг **I-17** в 10,0 мл безводного ДХМ. После перемешивания при к.т. в течение 10 мин, добавляли к реакционной смеси 285 мкл 2-цианоэтил-N',N',N',N'-тетраизопропилфосфоамидита, а затем 99 мг 4,5-дицианоимидазола. Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции, подтвержденного СВЭЖХ, реакционную смесь промывали 5 мл насыщенного бикарбоната натрия и 5 мл рассола. После сушки над безводным сульфатом натрия летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток белой маслянистой жидкости затем очищали флэш-хроматографией (0-10% MeOH в ДХМ с 0,1% ТЭА) с

получением **I-18** (420 мг, выход 55%) в виде белого порошка. ³¹P-ЯМР (200 МГц, ДМСО-d₆): 149,59, 149,56, 149,47, 149,46, 23,83, 23,82, 23,38, 23,36. МС (ESI) m/z рассчитано для C₆₅H₇₃N₁₀O₁₅P₂⁺ 1279,4783, найдено: 1279,7819.

Пример 7. Эффект замены фосфоротиоатной связи на фосфодиэфирную связь в осто́ве ACO SGLT2.

[00323] На Фиг. 1 ACO обозначает эталонный ACO SGLT2. ACO1, ACO2, ACO3, ACO4, ACO5, ACO6, ACO7, ACO8, ACO9, ACO10 и ACO11 представляют собой замены межнуклеотидной фосфоротиоатной (PS) связи в эталонном ACO на межнуклеотидную фосфодиэфирную (PO) связь между нуклеотидами 1 и 2, 2 и 3, 3 и 4, 4 и 5, 5 и 6, 6 и 7, 7 и 8, 8 и 9, 9 и 10, 10 и 11, 11 и 12 (считая от 5'-конца к 3'-концу), соответственно.

[00324] Вышеуказанные олигонуклеотиды использовали для лечения самок мышей CD-1 IGS (в возрасте 6-8 недель) подкожно с использованием объема дозы 0,2 мл. Вводимая доза составляла 1,3 мг/кг в расчете на массу РНК и была приготовлена в фосфатно-солевом буфере. Через 5 дней животных подвергали эвтаназии с помощью CO₂ и обескровливали путем пункции сердца. Образцы почек собирали с использованием одноразового биопсийного пуансона диаметром 4 мм и фиксировали в течение 24 часов с использованием раствора RNeasyTM. Образцы тканей гомогенизировали в реагенте TrizolTM с использованием стальных шариков диаметром 5 мм и выделяли тотальную РНК с помощью системы MagMAXTM в соответствии с рекомендациями производителя. Использовали стандартные промышленные методики для получения кДНК из тотальной РНК (одноцепочечный синтез), и кДНК использовали в качестве субстрата количественной ПЦР в реальном времени TaqManTM (кПЦР-PB) для количественного обнаружения мРНК SGLT2. Относительную мРНК SGLT2 рассчитывали с использованием стандартного метода ddCt и нормализовали к мРНК Ppib в качестве эталонного гена.

[00325] Результаты нокдауна мРНК SGLT2, представленные на Фиг. 1, продемонстрировали, что замена одиночной межнуклеотидной связи PS на связь PO в молекуле ACO SGLT2 значительно снижает активность для всех положений в осто́ве, за исключением положения между нуклеотидами 2 и 3 (ACO2). Снижение активности было частичным при замене PS на PO между нуклеотидами 1 и 2 (ACO1), 3 и 4 (ACO3), а также 11 и 12 (ACO11). В любом другом положении замена PS на PO устраняет активность.

Пример 8. Эффект замены фосфоротиоатной связи на iMOP в осто́ве ACO SGLT2.

[00326] На Фиг. 2, ACO представляет собой эталонный ACO SGLT2. ACO12 представляет собой экспериментальный контроль, единственным отличием которого от

эталона является то, что 2'-модификацией нуклеотида 11 (считая с 5'-конца) является 2'-ОМе, а не 2'-МОЕ. АСО13 представляет собой тестируемый образец, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMOP (показано в нуклеиновой кислоте I-3) вместо PS. В остальном АСО13 идентичен АСО12.

[00327] Вышеуказанные олигонуклеотиды использовали для лечения самок мышей CD-1 IGS (в возрасте 6-8 недель) подкожно с использованием объема дозы 0,2 мл. Вводимая доза составляла 0,5 или 3 мг/кг, в пересчете на вес РНК, и готовилась в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Через 5 дней животных подвергали эвтаназии с помощью CO₂ и обескровливали сердечной пункцией. Образцы почек собирали с использованием одноразового биопсийного пуансона диаметром 4 мм и фиксировали в течение 24 часов с использованием раствора RNeasy Lysis Buffer™. Образцы тканей гомогенизировали в реагенте Trizol™ с использованием стальных шариков диаметром 5 мм и выделяли тотальную РНК с помощью системы MagMAX™ в соответствии с рекомендациями производителя. Для получения кДНК (одноцепочечный синтез) из тотальной РНК использовали стандартные промышленные методики, и кДНК использовали в качестве субстрата количественной ПЦР в реальном времени TaqMan™ (кПЦР-РВ) для количественного обнаружения мРНК SGLT2. Относительную мРНК SGLT2 рассчитывали с использованием стандартного метода ddCt и нормализовали к мРНК Ppib в качестве эталонного гена.

[00328] Фиг. 2 демонстрирует, что замена PS-связи на iMOP-связь в АСО SGLT2 в значительной степени поддерживала нокдаун (KD)-активность мРНК *in vivo* с ED₅₀ ~0,5 мг/кг, в отличие от замены на фосфодиэфир, показанной на Фиг. 1. Экспериментальный контроль 2'-ОМе (АСО12) продемонстрировал одинаковую эффективность с эталоном (АСО). Все три олигонуклеотида АСО, АСО12 и АСО13 проявляли дозозависимую активность.

Пример 9. Влияние замены фосфоротиоатной связи на iMOP и iMeMOP в остоле АСО SGLT2.

[00329] На Фиг.3, АСО представляет собой эталонный АСО SGLT2. АСО14 представляет собой РО-контроль, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой фосфодиэфирную связь, а нуклеотид 11 представляет собой 2'-ОМе. АСО12 представляет собой PS-контроль, в котором все связи представляют собой PS, а нуклеотид 11 представляет собой 2'-ОМе. АСО13 представляет собой тестируемый образец iMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMOP (показана в нуклеиновой кислоте I-3) вместо PS. АСО15 представляет собой тестируемый образец iMeMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой

iMeMOP (показана в нуклеиновой кислоте **I-6**) вместо PS.

[00330] Описанные выше тестируемые образцы растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и вводили подкожной инъекцией самкам мышей CD-1 в дозе 0,5 мг/кг. Образцы тканей собирали через 7 дней после инъекции ФСБ или тестируемого образца. Затем образцы тканей гомогенизировали в реагенте для лизиса QIAzol Lysis Reagent с помощью TissueLyser II (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Затем РНК очищали с использованием технологии MagMAX в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Для получения кДНК использовали набор для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Специфичные для мышей праймеры SGLT2 (Integrated DNA Technology, Коралвилль, Айова) использовали для ПЦР в системе обнаружения ПЦР в реальном времени CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния).

[00331] Результаты, представленные на Фиг. 3, демонстрируют, что замена межнуклеотидной PS-связи на iMeMOP в АСО SGLT2 в полной мере поддерживает нокдаун (KD)-активность мРНК по сравнению с активностью эталонного АСО со всеми PS-связями. Эталонный АСО (АСО) и PS-контроль (АСО12) продемонстрировали аналогичную нокдаун-активность с $ED_{50} < 0,5$ мг/кг. РО-контроль (АСО14) утратил большую часть нокдаун-активности ($ED_{50} > 0,5$ мг/кг). iMOP (АСО13) сохраняет некоторую нокдаун-активность ($ED_{50} \sim 0,5$ мг/кг), что аналогично результату, показанному на Фиг. 2.

Пример 10. Эффект iMOP связи на 5'-конце антисмысловой цепи в молекуле GalXC.

[00332] На Фиг. 4 GalXC1 представляет собой контрольную молекулу GalXC, имеющую одну из PS-связей между нуклеотидами 1 и 2 на 5'-конце антисмысловой цепи. GalXC2 представляет собой молекулу GalXC с заменой 5'-концевой PS-связи антисмысловой цепи на iMOP-связь. В остальном указанная молекула идентична контролю.

[00333] Тестируемые нуклеиновые кислоты растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и вводили подкожной инъекцией самкам мышей CD-1 в дозе 0,5 мг/кг. Образцы тканей собирали через 7 дней после инъекции ФСБ или тестируемой нуклеиновой кислоты. Затем образцы тканей гомогенизировали в реагенте для лизиса QIAzol Lysis Reagent с помощью TissueLyser II (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Затем РНК очищали с использованием технологии MagMAX в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Для получения кДНК использовали набор для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК (ThermoFisher Scientific,

Уолтем, Массачусетс). Специфические для мышей праймеры ALDH2 (Integrated DNA Technology, Коралвилль, Айова) использовали для ПЦР в системе CFX384 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния).

[00334] Результаты на Фиг. 4 демонстрируют, что замена межнуклеотидной PS-связи в GalXC1 на 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь в GalXC2, полученную из нуклеиновой кислоты **I-9** в молекуле GalXC на 5'-конце антисмысловой цепи, сохраняет нокдаун (KD)-активность мРНК *in vivo*.

Пример 11. Замена фосфоротиоатной связи на iMOP в положении GAP 2 остова АСО SGLT2.

[00335] На Фиг. 5, АСО представляет собой эталонный АСО SGLT2. АСО4 представляет собой экспериментальный РО-контроль, единственное отличие которого от эталона заключается в том, что связь между нуклеотидами 4 и 5 (считая с 5'-конца) представляет собой межнуклеотидную фосфодиэфирную (РО) вместо фосфоротиоатной (PS) связи. АСО18 представляет собой тестируемый образец, в котором связь между нуклеотидами 4 и 5 представляет собой iMOP (показана в нуклеиновой кислоте **I-12**) вместо PS. АСО19 представляет собой тестируемый образец iMeMOP, в котором связь между нуклеотидами 4 и 5 представляет собой iMeMOP (показана в нуклеиновой кислоте **I-15**) вместо PS.

[00336] Описанные выше тестируемые образцы растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и вводили подкожной инъекцией самкам мышей CD-1 в дозе 0,5 мг/кг. Образцы тканей собирали через 5 дней после инъекции ФСБ или тестируемого образца. (За исключением группы тестируемого препарата АСО*, образцы которой собирали через 7 дней после инъекции в другом эксперименте.) Образцы тканей затем гомогенизировали в реагенте QIAzol Lysis Reagent с помощью TissueLyser II (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Затем РНК очищали с использованием технологии MagMAX в соответствии с инструкциями производителя (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Для получения кДНК использовали набор для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Специфические для мышей праймеры SGLT2 (Integrated DNA Technology, Коралвилль, Айова) использовали для ПЦР в системе обнаружения ПЦР в реальном времени CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния).

[00337] Результаты, представленные на Фиг. 5, демонстрируют, что замена межнуклеотидной PS-связи на iMOP (АСО18) или iMeMOP (АСО19) в АСО SGLT2 в значительной мере сохраняет *in vivo* нокдаун (KD)-активность мРНК по сравнению с

активностью эталона АСО со всеми PS-связями. Значения ED₅₀ обоих АСО составляют ~0,5 мг/кг. Эталонный АСО (АСО) показал нокдаун-активность с ED₅₀ <0,5 мг/кг. РО-контроль (АСО4) утратил большую часть нокдаун-активности (ED₅₀ >0,5 мг/кг).

Пример 12. Тритосомная стабильность

[00338] Для *in vitro* оценки метаболической стабильности соединений с модификацией межнуклеотидных связей, ~4 мкМ тестируемых соединений и соответствующих им контрольных соединений инкубировали в тритосомах печени крыс (активность кислой фосфатазы) (Sekisui Xenotech, Канзас-Сити, Канзас) при 38 °С. Тритосомы печени крыс представляют собой лизосомы из клеток печени крыс, обработанных Triton WR 1339 (также называемым тилоксаполом). Инкубируемые тестируемые соединения и их соответствующие контрольные соединения собирали при инкубации тритосом в различные запланированные моменты времени и затем экстрагировали из лизосомального матрикса с использованием 96-луночных планшетов/100 мг картриджей CLARITY® ОТХ™ для ТФЭ (Phenomenex, Торранс, Калифорния) и вакуумного коллектора для 96-луночного планшета в соответствии с инструкциями производителя. Элюэнты выпаривали с использованием установки для выпаривания растворителей TURBOVAP® (Biotage, Шарлотт, Северная Каролина) и восстанавливали в воде и анализировали методом ЖХ-МС.

[00339] Прибор ACQUITY UPLC® (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс) использовали для подачи подвижных фаз, содержащих буферные добавки, со скоростью 0,4 мл/мин, с хроматографическим разделением, выполняемым с использованием колонки ACQUITY UPLC® Oligonucleotide BEH C18, размер частиц 1,7 мкм, для обращенно-фазовой сверхвысокопроизводительной жидкостной хроматографии (2,1×50 мм) (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс). Температуру колонки поддерживали на уровне 70 °С, а объем вводимого образца составлял 8 мкл. Времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения SYNAPT® G2S (HRMS, Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс), работающий в режиме отрицательных ионов и в условиях ионизации электрораспылением (ESI), использовали для обнаружения контролей, тестируемых соединений и их метаболитов. Массы молекулярных ионов с нулевым зарядом были получены путем деконволюции зарядового состояния с использованием программного обеспечения PROMASS DECONVOLUTION™ (Novatia, Ньютаун, Пенсильвания). Контроли, тестируемые соединения и их метаболиты идентифицировали путем сравнения экспериментально определенных масс с ожидаемыми теоретическими молекулярными массами.

[00340] Для оценки метаболической стабильности связи iMOP в контексте молекул GalXC два соединения, показанные на Фиг. 4, были протестированы в анализе с тритосомами, описанном выше. GalXC1 представляет собой молекулу GalXC с PS-связью между нуклеотидами 1 и 2 на 5'-конце антисмысловой цепи. GalXC2 представляет собой молекулу GalXC с заменой 5'-концевой PS-связи антисмысловой цепи на связь iMOP.

[00341] В течение 24-часового периода инкубации не наблюдалось продукта расщепления связи iMOP тестируемой нуклеиновой кислоты. Данные в **Таблице 2** свидетельствуют о том, что антисмысловая цепь, содержащая межнуклеотидную связь iMOP, продемонстрировала улучшенную общую метаболическую стабильность по сравнению с контрольной антисмысловой цепью с PS-связью. Основные наблюдаемые метаболиты относились к 3'-концу антисмысловых цепей (данные не приведены).

Таблица 2. Процент полноразмерных антисмысловых цепей, оставшихся после инкубации с тритосомами крыс

Тестируемый образец	0 ч	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч	24 ч
GalXC1	100	102	104	85	56	25
GalXC2	100	88	86	82	73	49

[00342] Для оценки метаболической стабильности связи iMOP и iMeMOP в контексте платформы АСО тестируемые образцы, показанные на Фиг. 3, были протестированы в анализе с тритосомами, описанном выше. Как показано в **Таблице 3**, тестируемые образцы со связью iMOP или iMeMOP продемонстрировали аналогичную метаболическую стабильность по сравнению с исходным контролем и 2'OMe PS-контролем. РО-контроль, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой фосфодиэфирную связь (АСО14), показал наименьшую стабильность. На Фиг. 6 показаны результаты **Таблицы 3** в графической форме.

Таблица 3. Процент полноразмерных антисмысловых цепей, оставшихся после инкубации с тритосомами крыс

Тестируемый образец	0 ч	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч	24 ч	48 ч
АСО	100	94	88	78	72	59	23
АСО12	100	80	83	76	68	44	25

ACO13	100	86	79	71	55	33	41
ACO14	100	77	70	56	33	25	6
ACO15	100	90	85	79	69	28	20

Пример 13. Влияние модификаций iMOP и iMeMOP на стабильность дуплекса

[00343] Образование и плавление дуплекса ACO SGLT2 и РНК1, 12-мера РНК, предназначенного для связывания с ACO SGLT2 с полной комплементарностью по Уотсону-Крику, контролировали с помощью ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии и на спектрофотометре Agilent Cary 3500 UV-VIS, оснащённом температурным контроллером элементов Пельтье. Концентрация дуплекса составляла 2 мкМ (общая концентрация цепей 4 мкМ) в ФСБ (фосфатно-солевом буфере) (1X, pH 7,4). После нагревания до 90 °С образцы медленно охлаждали до комнатной температуры и выдерживали в холодильнике в течение ночи. Затем образцы переносили в холодные кюветы в спектрофотометре и контролировали изменение оптической плотности при 260 нм при нагревании от 5 °С до 90 °С со скоростью 0,5 °С/мин. При температуре ниже 20 °С образцы находились в токе азота, и значения поглощения регистрировали каждые 30 секунд. Значения T_m были рассчитаны с использованием метода базовой линии и показаны на Фиг. 7.

[00344] ACO представляет собой эталонный ACO SGLT2 со всеми фосфоротиоатными связями. ACO14 является РО-контролем эталона и имеет фосфодиэфирную связь между нуклеотидами 10 и 11. ACO13 является тестируемым образцом iMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMOP вместо PS. ACO15 является тестируемым образцом iMeMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMeMOP вместо PS. Результаты показывают, что ACO14 проявляет самую высокую термическую стабильность при связывании с комплементарной РНК1. Результаты также показывают, что замена межнуклеотидной PS-связи новыми модификациями iMeMOP или iMOP поддерживает термическую стабильность дуплекса ACO:РНК, причем включение iMeMOP оказывает незначительное дестабилизирующее действие на -1 °С (см. ACO15:РНК1 на Фиг. 6), а включение iMOP - стабилизирующее на +1,5 °С (см. ACO13:РНК1 на Фиг. 7).

Пример 14. Влияние модификаций iMOP и iMeMOP на активность РНКазы Н

[00345] Известно, что фермент РНКазы Н гидролизует РНК-часть гибрида ACO:РНК, в то время как цепь ACO остается нетронутой. Для мониторинга эффективности модификаций межнуклеотидных связей в индукции активности РНКазы Н при включении

в АСО, модифицированные iMOP и iMeMOP АСО гибридизировали с комплементарной РНК и тестировали на их чувствительность к расщеплению РНКазой Н человека. Реакции расщепления контролировали с использованием метода ЖХ-МС высокого разрешения вместо классических методов электрофореза. Анализ масс-пиков генерируемых фрагментов РНК позволяет определить точные сайты расщепления на РНК, в то время как количественное определение площадей пиков, соответствующих фрагментам РНК и/или оставшейся полноразмерной РНК на спектрах ЖХ, позволяет сравнивать кинетику реакций расщепления, индуцируемых разными АСО (Фиг. 8).

[00346] Была сконструирована цепь РНК длиной 32 нуклеотида (РНК2), содержащая участок длиной 12 нуклеотидов с полной комплементарностью 12-мерным АСО SGLT2. Отжиг каждой АСО с комплементарной РНК дает дуплексные субстраты (АСО15:РНК2, АСО13:РНК2 и АСО:РНК2). АСО представляет собой эталонный АСО SGLT2, в котором все связи являются PS. АСО13 представляет собой тестируемый образец iMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMOP вместо PS. АСО15 представляет собой тестируемый образец iMeMOP, в котором связь между нуклеотидами 10 и 11 представляет собой iMeMOP вместо PS.

[00347] Обычно, 2 нмоль каждого антисмыслового олигонуклеотида смешивали с 1 нмоль РНК в 1X реакционном буфере РНКазы Н (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ и 10 mM дитиотреитола (DTT) при pH 8,3). Образцы нагревали при 90 °C в течение 5 минут и медленно охлаждали до комнатной температуры, чтобы образовались дуплексные субстраты. Каждый раствор для отжига готовили с 2-кратным избытком антисмыслового олигонуклеотида (AON) по отношению к РНК, чтобы гарантировать, что вся РНК гибридизуется с АСО, и свободная РНК в растворе отсутствует. Затем аликвоты по 100 мкл переносили в стеклянные флаконы для МС с полным извлечением вещества и выдерживали в держателе образцов для ЖХ-МС при 20 °C (температура анализа) в течение 1 минуты. Температура анализа была выбрана значительно ниже температуры плавления гибридов АСО:РНК, чтобы дополнительно гарантировать гибридизацию всей РНК с АСО. После 1 минуты инкубации дуплексные субстраты АСО:РНК анализировали на ЖХ-МС высокого разрешения Waters Synapt, получая спектры для момента времени 0.

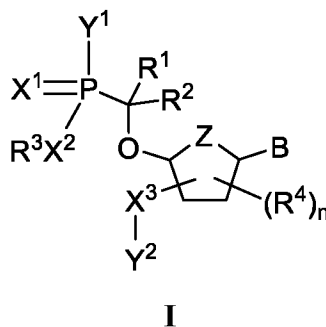
[00348] Затем инициировали реакции расщепления РНК добавлением 2 мкл 0,25 ед. свежеразведенного фермента РНКазы Н *E. coli* в 1X буфере РНКазы Н. Манипуляции с ферментом выполняли на льду, чтобы избежать потери активности. Смесь осторожно перемешивали пипетированием и расщепление РНК контролировали с помощью ЖХ-МС в моменты времени 30 с, 15 мин, 30 мин и 45 мин после добавления фермента. Оптимальную для этих анализов концентрацию РНКазы Н 0,25 ед. выбирали из ряда

предварительных разведений фермента (10 ед., 5 ед., 1 ед., 0,5 ед. и 0,25 ед.). При 0,25 ед. расщепление РНК происходит медленно, что позволяет рассчитать и сравнить скорости расщепления, как показано на Фиг. 8. В каждый момент времени доля РНК, превращенной в продукт расщепления, рассчитывается путем количественного определения площади пика ЖХ, соответствующего оставшейся полноразмерной РНК в этот момент времени. Как показано на Фиг. 8, результаты указывают, что замена межнуклеотидной PS-связи на iMeMOP или iMOP в последовательности ACO SGLT2 полностью сохраняет активность РНКазы H, со скоростями расщепления, сопоставимыми со скоростью расщепления эталона SGLT2.

[00349] Хотя в данном документе был описан ряд вариантов осуществления настоящего изобретения, понятно, что базовые примеры, приведенные в данном документе, можно изменить, получая другие варианты осуществления, использующие нуклеиновую кислоту или ее аналоги и способы согласно настоящему изобретению. Поэтому следует принимать во внимание, что объем настоящего изобретения должен определяться описанием и прилагаемой формулой изобретения, а не конкретными вариантами осуществления, представленными в качестве примеров.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота или ее аналог, содержащая 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой I:



или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

B представляет собой нуклеобазу или водород;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R¹ и R² на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X^1 представляет собой O, S или NR;

X^2 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

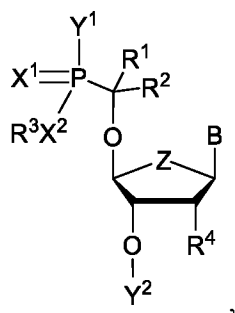
Y^1 представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида;

Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

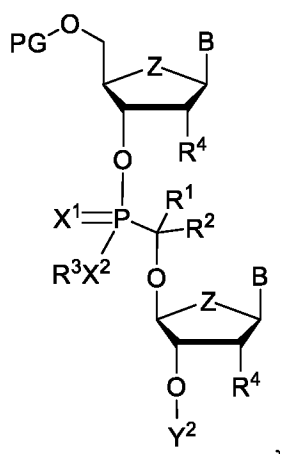
Z представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

n равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

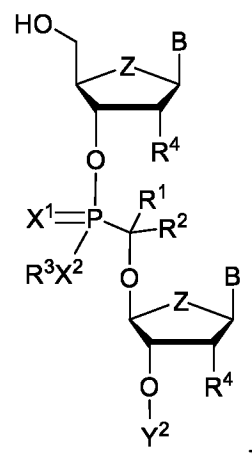
2. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1, отличающаяся тем, что 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь выбрана из любой из репрезентативных формул:



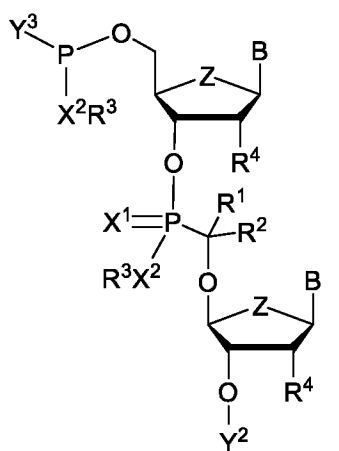
I-a-1



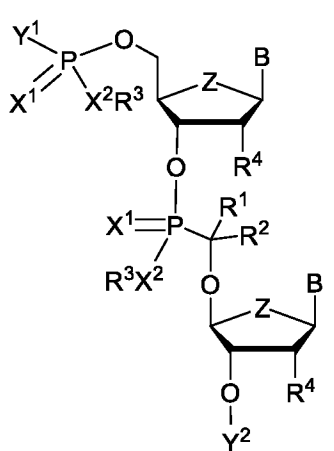
I-b-1



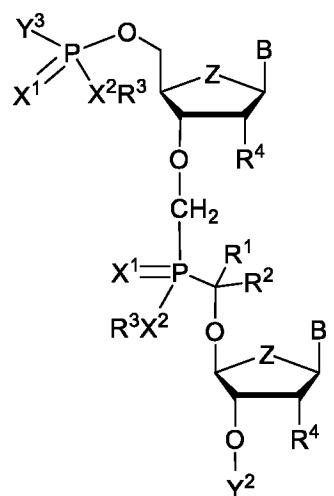
I-g-1



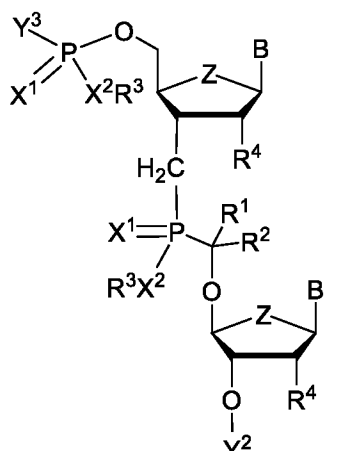
I-h-1



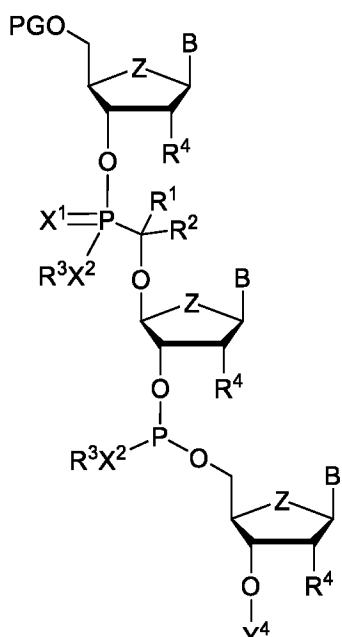
I-i-1



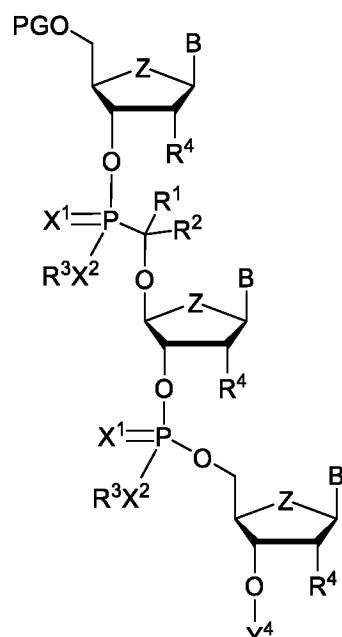
I-n-1



I-o-1



I-p-1



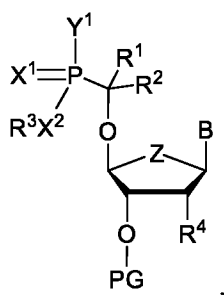
I-q-1

или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

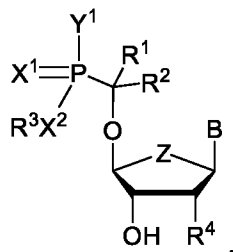
Y³ представляет собой связывающую группу, присоединенную к 2'- или 3'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида; и

Y⁴ представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке.

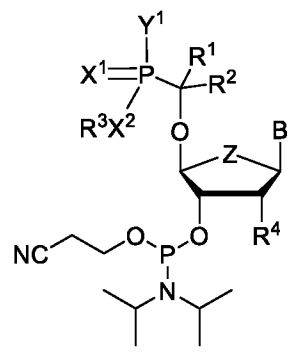
3. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что нуклеиновую кислоту или ее аналог выбирают из любой из следующих формул:



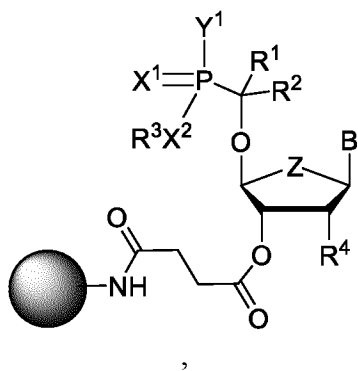
I-a-2



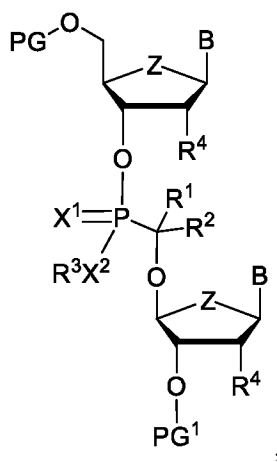
I-a-3



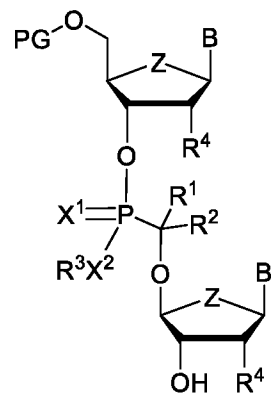
I-a-4



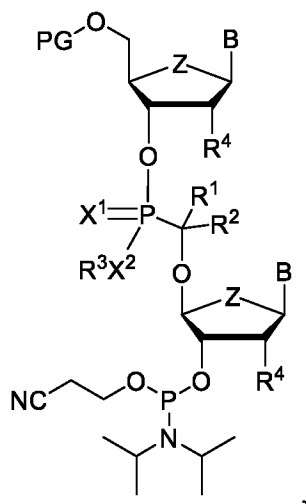
I-a-5



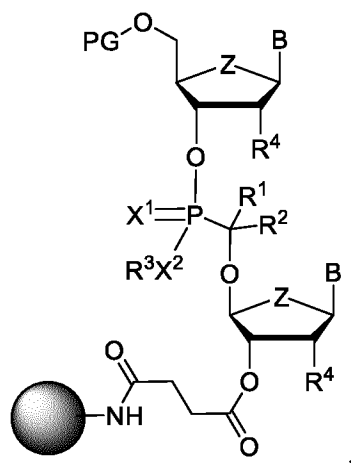
I-c-1



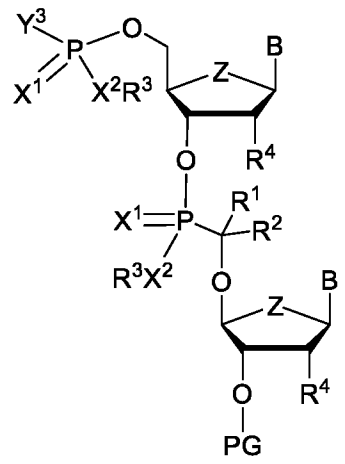
I-d-1



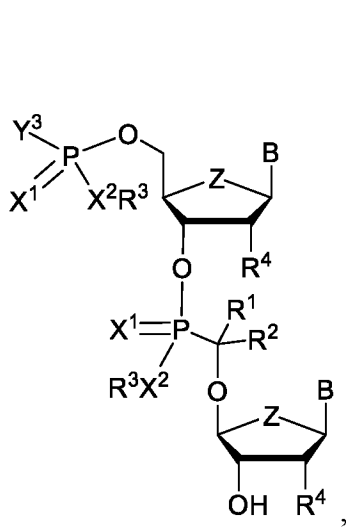
I-e-1



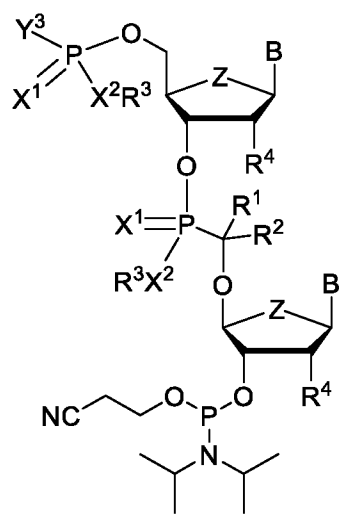
I-f-1



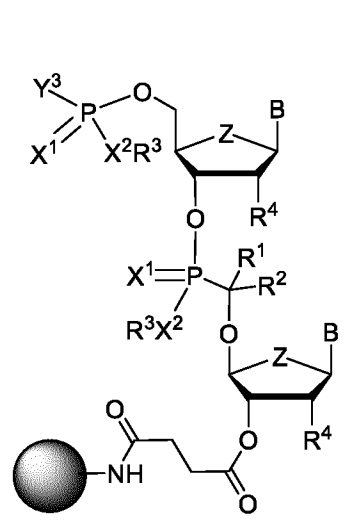
I-j-1



I-k-1



I-l-1

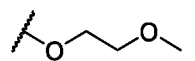


I-m-1

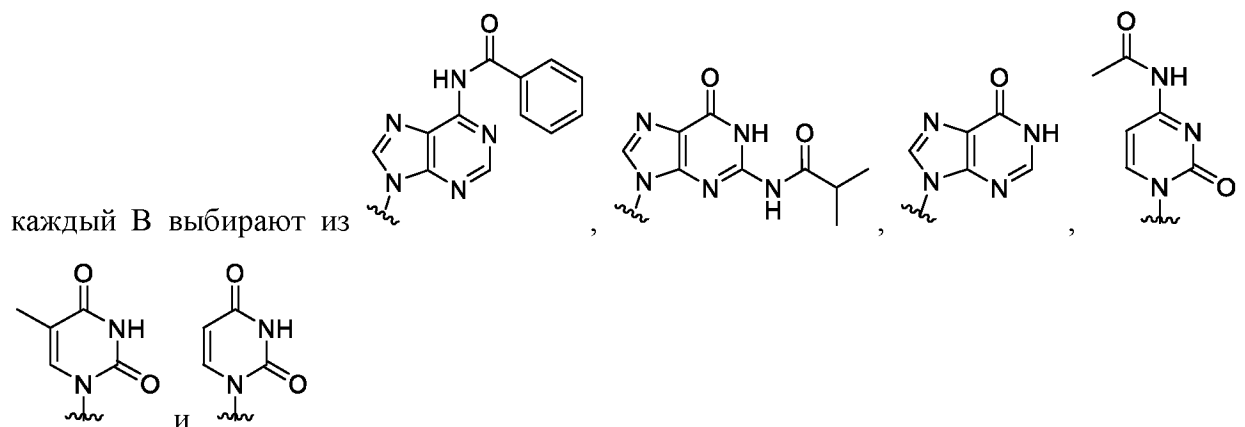
или ее фармацевтически приемлемой соли.

4. Нуклеиновая кислота или ее аналог по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что R^1 представляет собой водород, и R^2 представляет собой водород или метил.

5. Нуклеиновая кислота или ее аналог по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что каждый R^4 независимо представляет собой водород, гидроксиль, фтор, метокси или



6. Нуклеиновая кислота или ее аналог по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что



7. Нуклеиновая кислота или ее аналог по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что указанную нуклеиновую кислоту или ее аналог выбирают из любой из представленных в **Таблице 1** или ее фармацевтически приемлемой соли.

8. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота или ее аналог представляет собой двухцепочечную молекулу ингибитора РНКи, содержащую первую цепь и вторую цепь, причем первая цепь представляет собой смысловую цепь, а вторая цепь представляет собой антисмысловую цепь.

9. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 8, отличающаяся тем, что двухцепочечная молекула ингибитора РНКи содержит область комплементарности между смысловой цепью и антисмысловой цепью, состоящую из 15-45 нуклеотидов.

10. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 9, отличающаяся тем, что область комплементарности между смысловой цепью и антисмысловой цепью состоит из 20-30 нуклеотидов.

11. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 10, отличающаяся тем, что область комплементарности между смысловой цепью и антисмысловой цепью состоит из 21-26 нуклеотидов.

12. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 9, отличающаяся тем, что область комплементарности между смысловой цепью и антисмысловой цепью состоит из 19-24 нуклеотидов.

13. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 12, отличающаяся тем, что область комплементарности между смысловой цепью и антисмысловой цепью состоит из 19-21 нуклеотидов.
14. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 8, отличающаяся тем, что двухцепочечная молекула ингибитора РНКи содержит тетрапетлю.
15. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота или ее аналог представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту.
16. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 15, отличающаяся тем, что одноцепочечная нуклеиновая кислота представляет собой одноцепочечную молекулу ингибитора РНКи.
17. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 15, отличающаяся тем, что одноцепочечная нуклеиновая кислота представляет собой обычную антисмысловую нуклеиновую кислоту, рибозим или аптамер.
18. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 16 или п. 17, отличающаяся тем, что длина одноцепочечной молекулы ингибитора РНКи составляет 14-50 нуклеотидов.
19. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 18, отличающаяся тем, что длина одноцепочечной молекулы ингибитора РНКи составляет примерно 16-30, 18-22 или 20-22 нуклеотидов.
20. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота или ее аналог представляет собой «голую» нуклеиновую кислоту.
21. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1, дополнительно содержащая по меньшей мере один агент доставки, при этом указанный по меньшей мере один агент доставки конъюгирован с нуклеиновой кислотой или ее аналогом для облегчения транспорта нуклеиновой кислоты или ее аналога через наружную мембрану клетки.
22. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1, отличающаяся тем, что агент доставки выбирают из группы, состоящей из углеводов, пептидов, липидов, витаминов и антител.

23. Нуклеиновая кислота или ее аналог по п. 1, отличающаяся тем, что агент доставки выбирают из N-ацетилгалактозамина (GalNAc), маннозо-6-фосфата, галактозы, олигосахарида, полисахарида, холестерина, полиэтиленгликоля, фолата, витамина А, витамина Е, литохоловой кислоты и катионного липида.

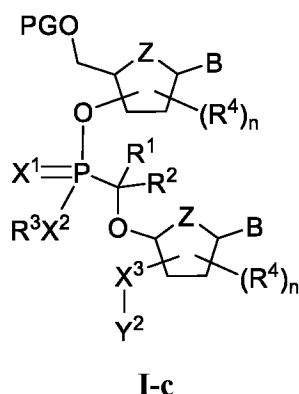
24. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту или ее аналог по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

25. Способ снижения экспрессии гена-мишени у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 24 в количестве, достаточном для снижения экспрессии гена-мишени.

26. Способ лечения рака, вирусной инфекции или генетического расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 24 в количестве, достаточном для лечения рака, вирусной инфекции или генетического расстройства.

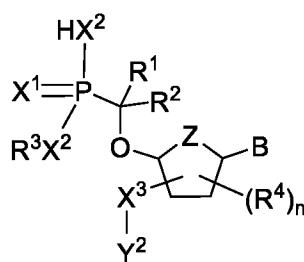
27. Способ по п. 24 или п. 25, отличающийся тем, что введение включает системное введение.

28. Способ получения нуклеиновой кислоты или ее аналога, содержащей 4'-О-метиленфосфонатную межнуклеотидную связь, причем 4'-О-метиленфосфонатная межнуклеотидная связь представлена формулой **I-c**:



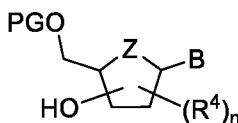
или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

(a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4**:



A4

- или ее фармацевтически приемлемой соли, и
- (b) конденсации нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **A4** с нуклеозидом или его аналогом формулы **A5**:



A5

- с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-b**, где:
- каждый **B** представляет собой нуклеобазу или водород;
- PG** представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;
- R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, галоген, R^5 , $-CN$, $-S(O)R$, $-S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)_2R_2$ или $-SiR_3$, или:
- R^1 и R^2 на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;
- каждый **R** независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:
- две группы **R** на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;
- R^3 представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла,

содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X^1 представляет собой O, S или NR;

каждый X^2 независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

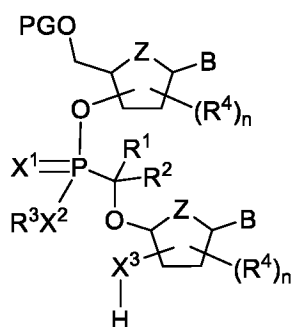
Y^2 представляет собой водород, защитную группу, аналог фосфорамидита, межнуклеотидную связывающую группу, присоединенную к 4'- или 5'-углероду нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида, или связывающую группу, присоединенную к твердой подложке;

каждый Z независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что Y^2 представляет собой защитную группу.

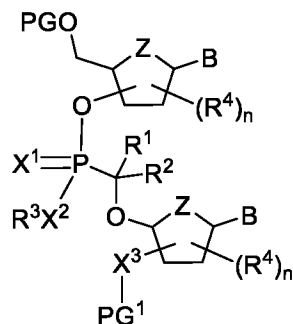
30. Способ по п. 29, дополнительно включающий стадии получения нуклеиновой кислоты формулы **I-d**:



I-d

или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

- (a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-c**:



I-c

или ее фармацевтически приемлемой соли, и

- (b) снятия защиты нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-c**, с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога, имеющей формулу **I-d**, где:

каждый В представляет собой нуклеобазовое основание или водород;

PG представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;

PG¹ представляет собой защитную группу;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R¹ и R² на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла,

содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

X^1 представляет собой O, S или NR;

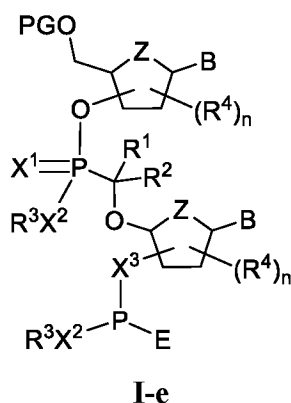
каждый X^2 независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

каждый Z независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

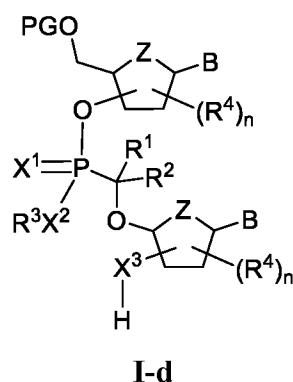
каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

31. Способ по п. 30, дополнительно включающий стадии получения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e**:



или ее фармацевтически приемлемой соли, включающий стадии:

(a) обеспечения нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d**:



(b) взаимодействия нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-d** с P(III)-образующим реагентом

с образованием нуклеиновой кислоты или ее аналога формулы **I-e**, где:

каждый B представляет собой нуклеобазу или водород;

PG представляет собой подходящую защитную группу гидроксила;

R¹ и R² независимо представляют собой водород, галоген, R⁵, -CN, -S(O)R, -S(O)₂R, -Si(OR)₂R, -Si(OR)R₂ или -SiR₃, или:

R¹ и R² на одном и том же атоме углерода вместе с промежуточными атомами образуют 3-7-членное насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R независимо представляет собой водород, подходящую защитную группу или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или:

две группы R на одном и том же атоме вместе с промежуточными атомами образуют 4-7-членное насыщенное, частично ненасыщенное или гетероарильное кольцо, содержащее 0-3 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, кремния и серы;

R³ представляет собой водород, подходящую защитную группу, подходящее пролекарство или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁-₆ алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероцикла, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, подходящее пролекарство, R^5 , галоген, $-CN$, $-NO_2$, $-OR$, $-SR$, $-NR_2$, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2NR_2$, $-S(O)R$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NR_2$, $-C(O)N(R)OR$, $-OC(O)R$, $-OC(O)NR_2$, $-OP(O)R_2$, $-OP(O)(OR)_2$, $-OP(O)(OR)NR_2$, $-OP(O)(NR_2)_2$, $-N(R)C(O)OR$, $-N(R)C(O)R$, $-N(R)C(O)NR_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-N(R)P(O)R_2$, $-N(R)P(O)(OR)_2$, $-N(R)P(O)(OR)NR_2$, $-N(R)P(O)(NR_2)_2$, $-N(R)S(O)_2R$, $-Si(OR)_2R$, $-Si(OR)R_2$ или $-SiR_3$;

каждый R^5 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатической группы, фенила, 4-7-членного насыщенного или частично ненасыщенного гетероциклического кольца, содержащего 1-2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и 5-6-членного гетероарильного кольца, содержащего 1-4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы;

E представляет собой галоген или $-NR_2$;

X^1 представляет собой O, S или NR;

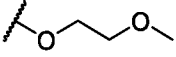
каждый X^2 независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-B(H)_2-$ или ковалентную связь;

X^3 представляет собой $-O-$, $-S-$, $-Se-$ или $-N(R)-$;

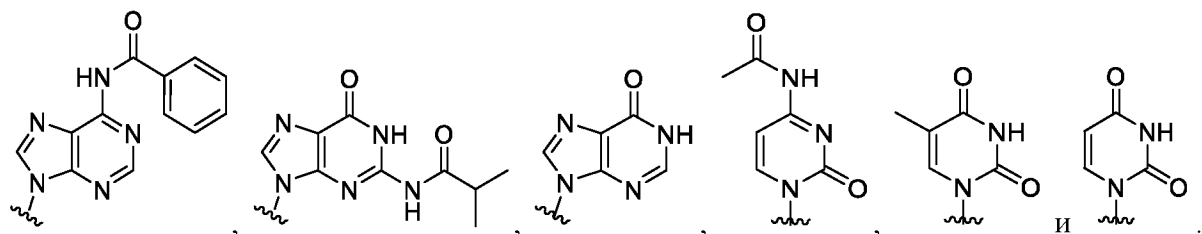
каждый Z независимо представляет собой $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$ или $-C(R)_2-$; и

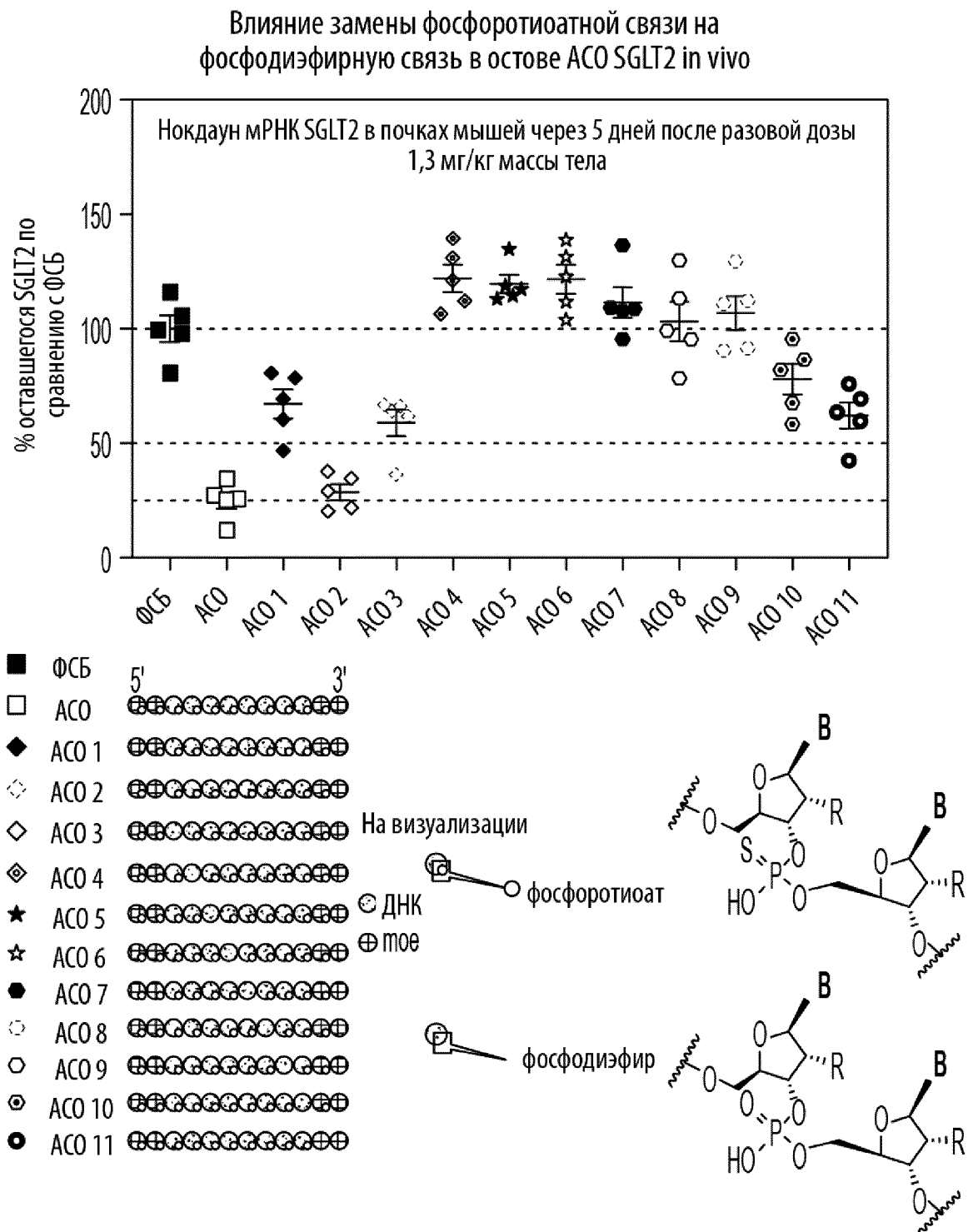
каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

32. Способ по любому из пп. 28-31, отличающийся тем, что каждый R^1 представляет собой водород, и R^2 представляет собой водород или метил.

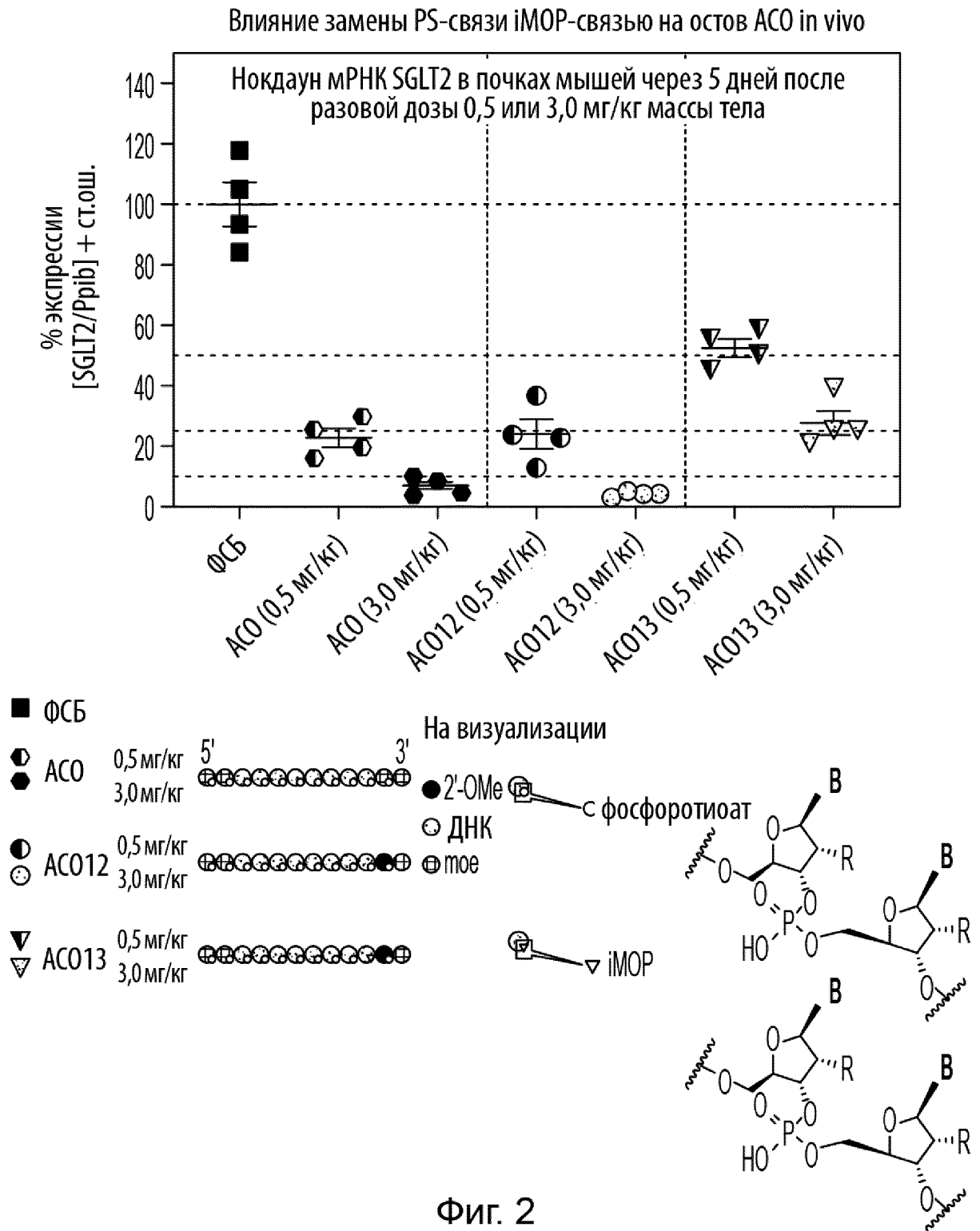
33. Способ по любому из пп. 28-32, отличающийся тем, что каждый R^4 независимо представляет собой водород, гидроксид, фтор, метокси или .

34. Способ по любому из пп. 28-33, отличающийся тем, что каждый B выбирают из



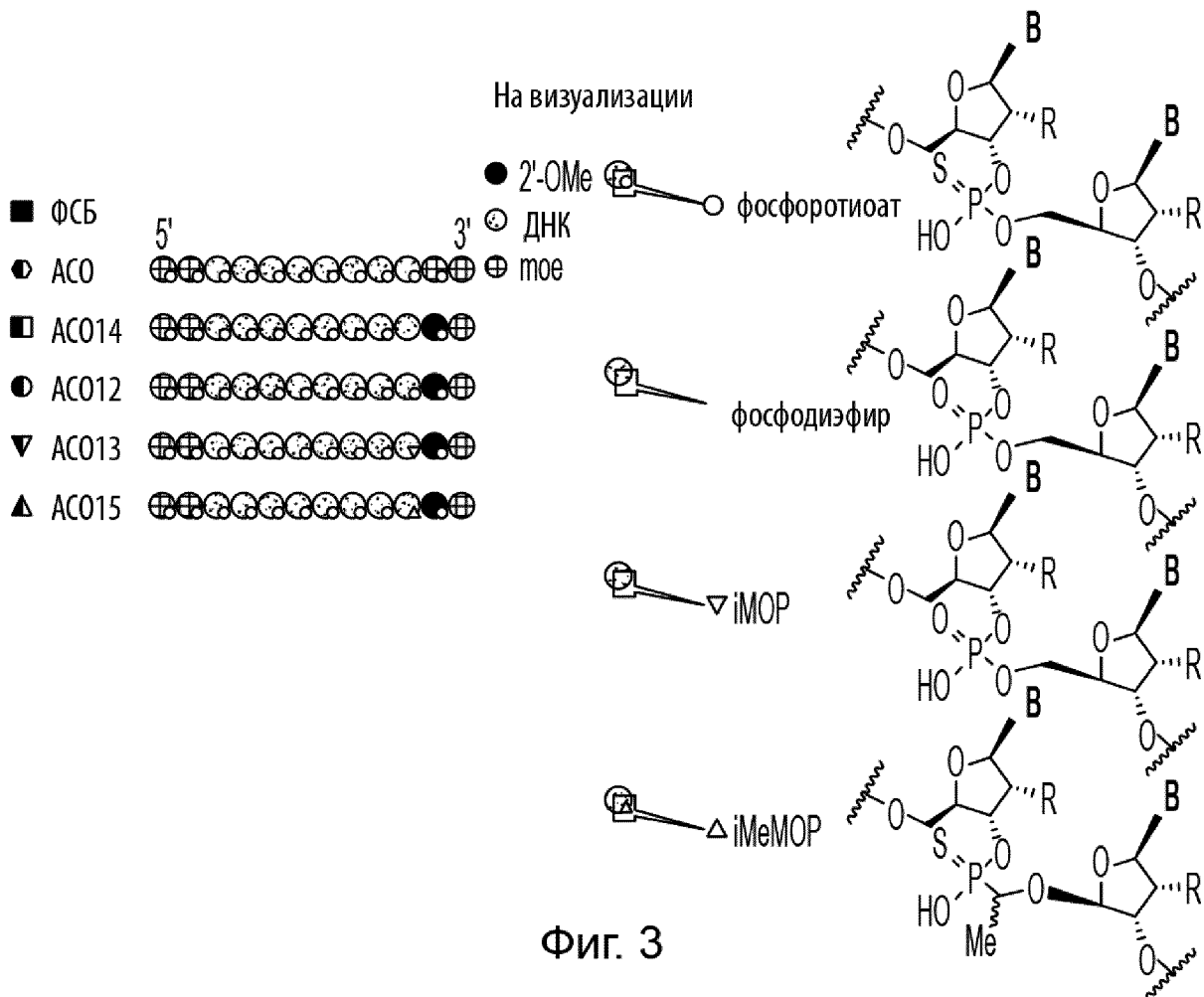
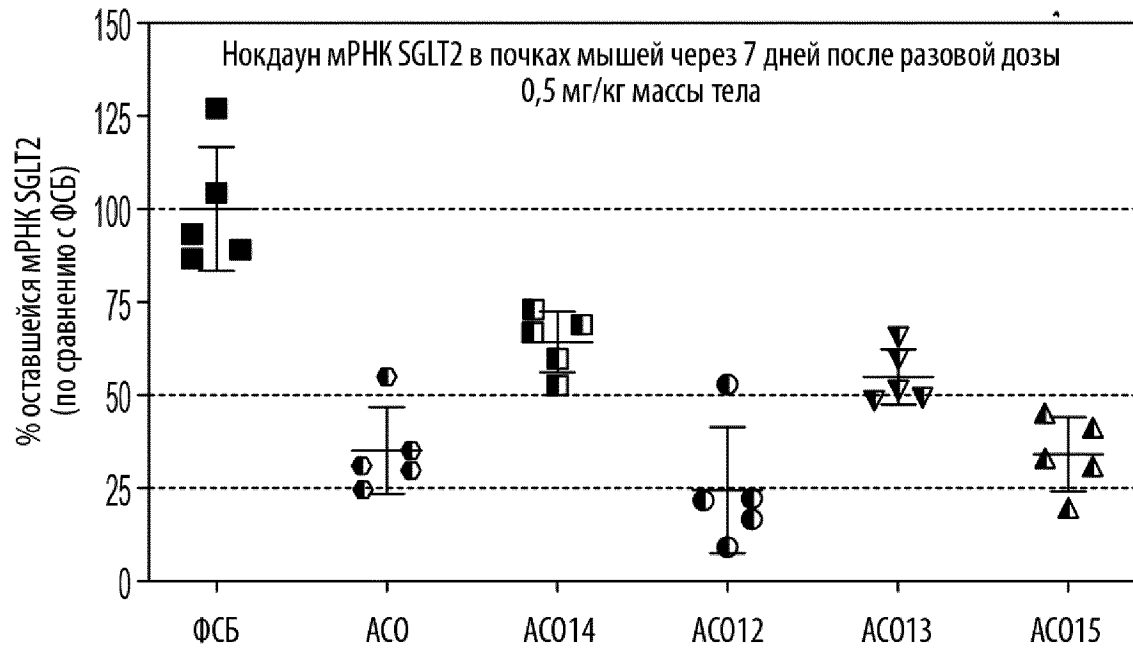


Фиг. 1



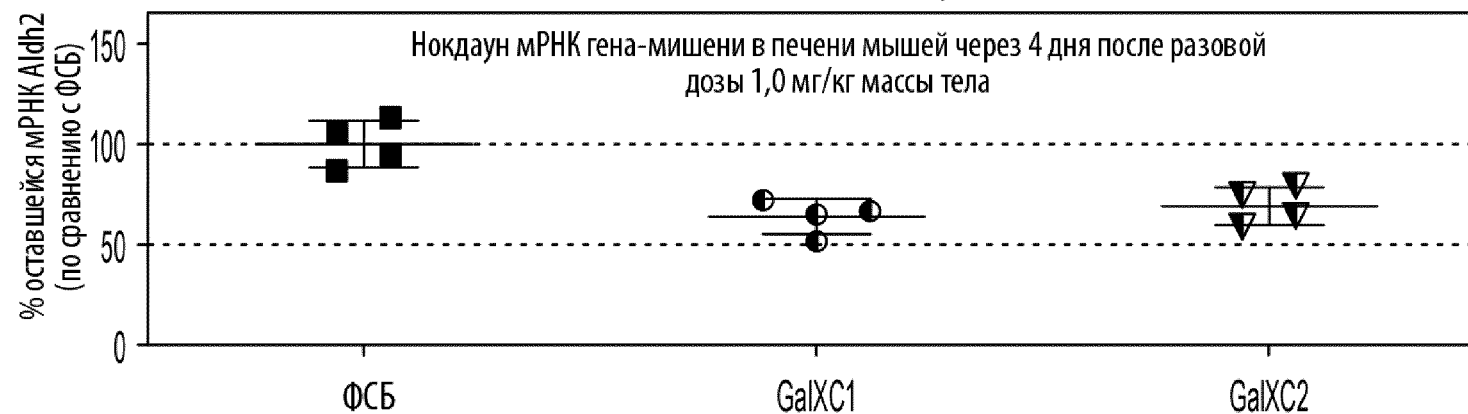
Фиг. 2

Влияние замены PS-связи iMOP-связью или
iMeMOP-связью на остов АСО in vivo



Фиг. 3

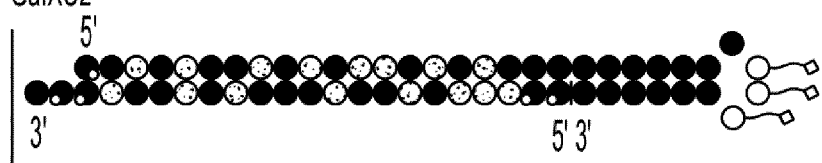
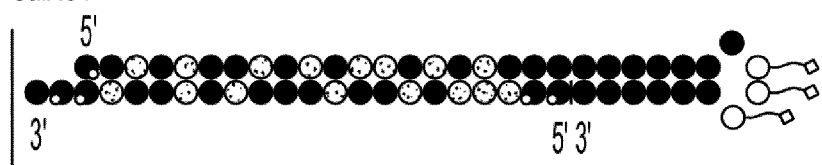
Влияние iMOP-связи на 5'-конце антисмысловой цепи в молекуле GalXC



■ ФСБ

● GalXC1

▼ GalXC2



На визуализации

● 2'-ОМе

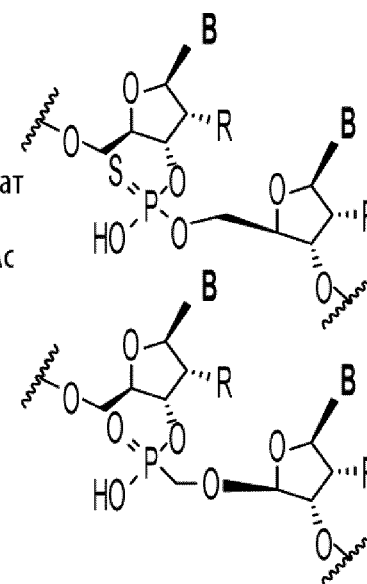
⊙ 2'-F

○ Конъюгированный с GalNAc нуклеотид

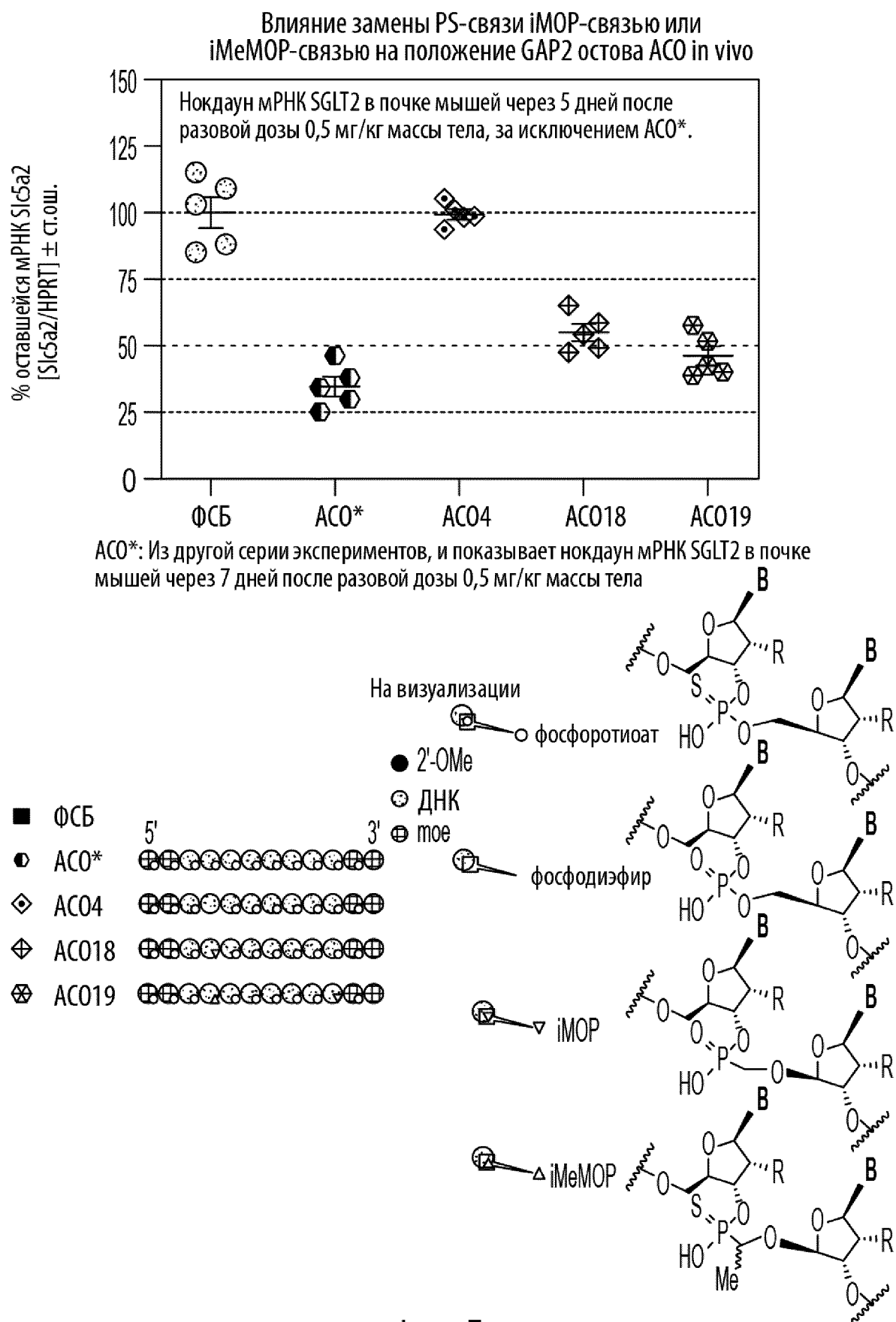
| Ник тетрапепти

▼ iMOP

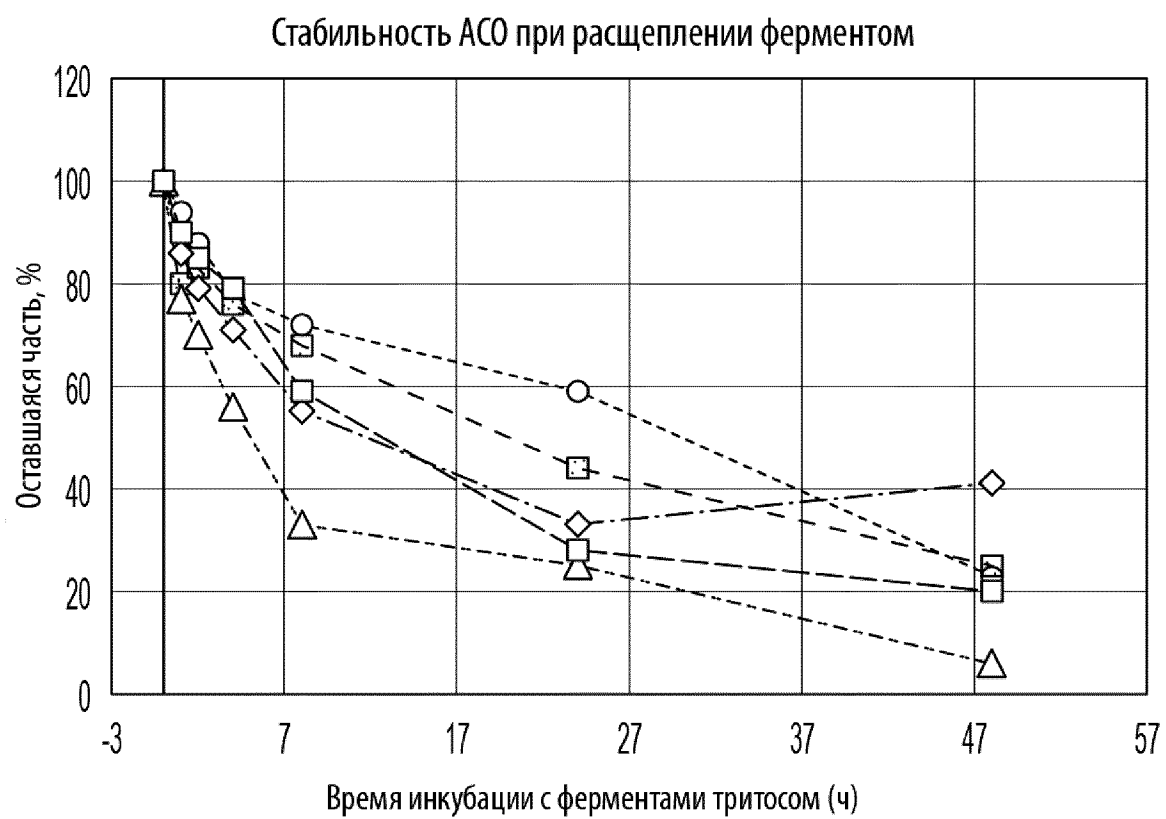
○ фосфоротиоат



Фиг. 4



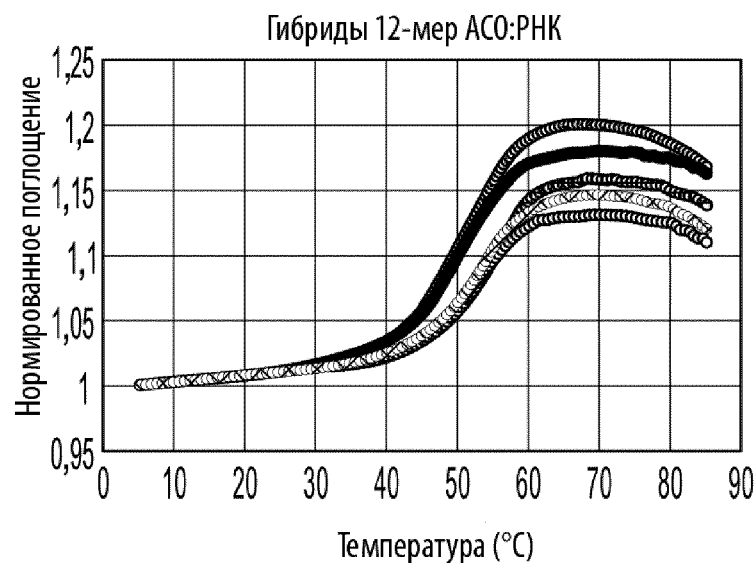
Фиг. 5



- A ○ ACO
- B ◻ ACO12
- C ◇ ACO13
- D △ ACO14
- E ◻ ACO15

Фиг. 6

Влияние включения iMeMOP и iMOP в цепь АСО на термическую стабильность гибрида 12-мер АСО:РНК. Для сравнения приведены включения PS и PO.



—○— АСО:РНК1 —○— АСО12:РНК1 —○— АСО15:РНК1
—●— АСО14:РНК1 —○— АСО13:РНК1

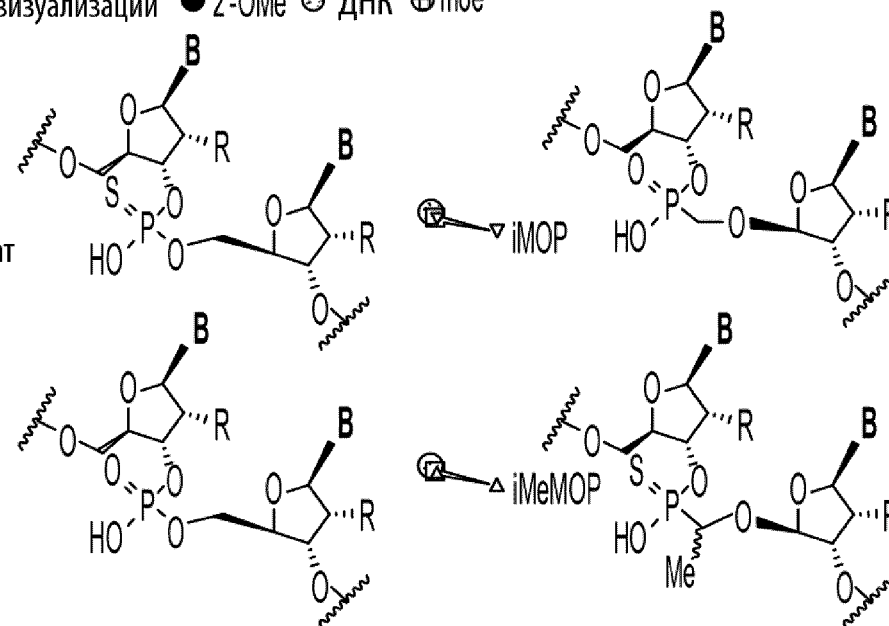
Название	Последовательность АСО (5'-3')	Химия связи	Tm *
АСО : РНК1	⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕	PS	51 °C
АСО15 : РНК1	⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕	Монометил-МОР	50 °C
АСО13 : РНК1	⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕	МОР	52,5 °C
АСО12 : РНК1	⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕	PS (moeT - mU)	51,5 °C
АСО14 : РНК1	⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕⊕	PO-контроль	53 °C

*Все АСО были гибридизированы с 12-мерной комплементарной РНК (РНК1).

На визуализации ● 2'-ОМе ⊕ ДНК ⊕ moe

⊕ фосфоротиоат

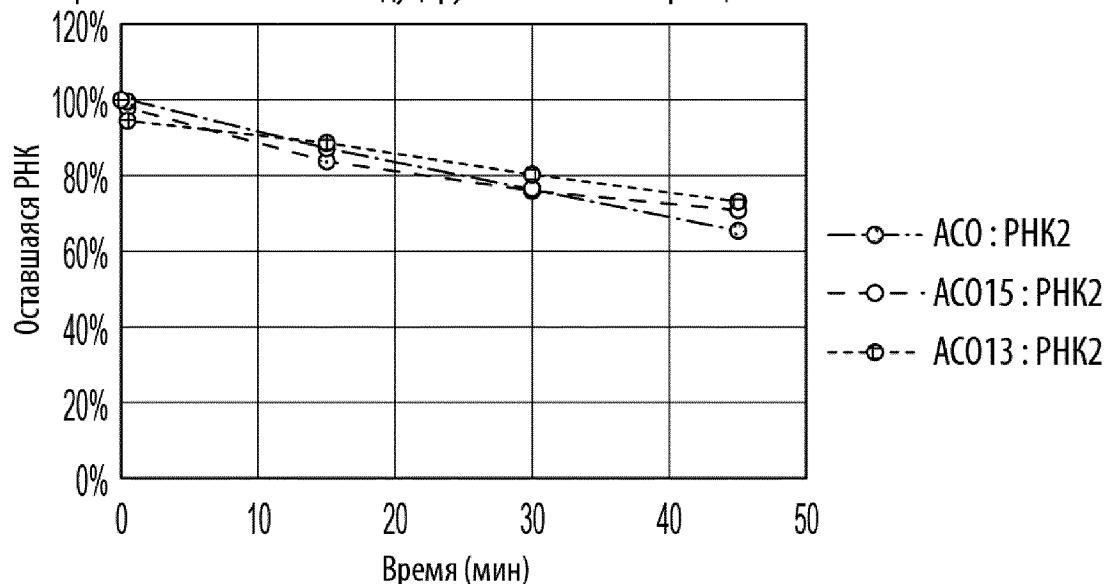
⊕ фосфодиэфир



Фиг. 7

Влияние включения iMeMOP и iMOP на активность РНКазы H гибридов АСО:РНК. Все PS-АСО включены для сравнения

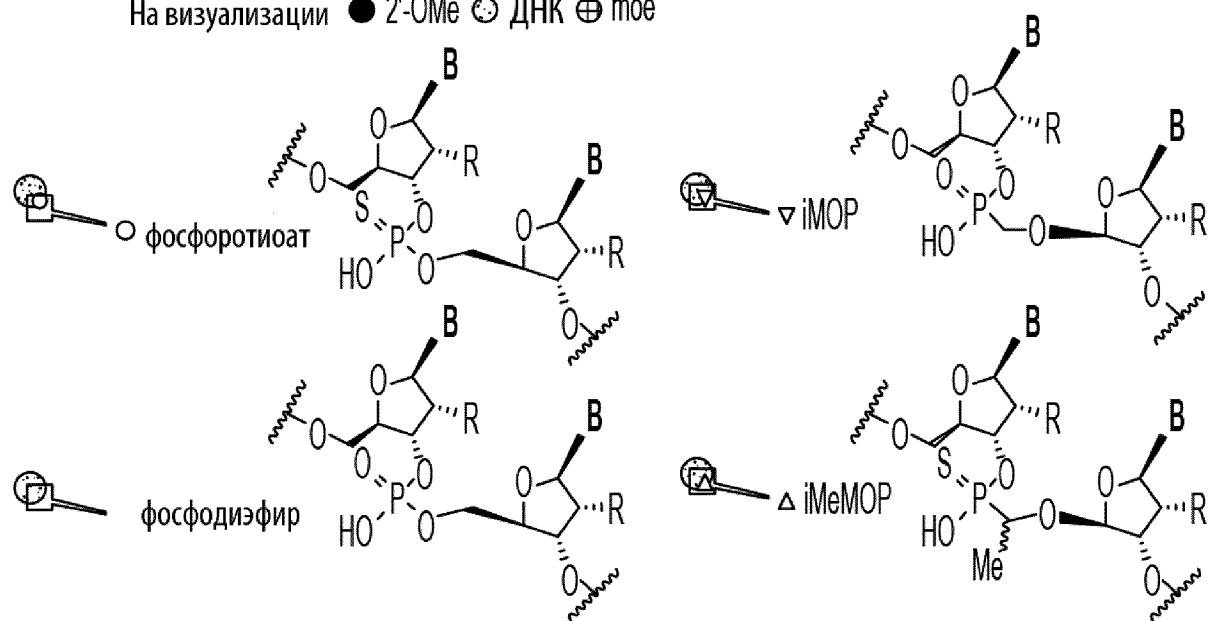
Временная зависимость индуцируемого РНКазой H расщепления РНК



Название	Последовательность АСО (5'-3')	Химия связи
АСО : PHK2		PS
АСО15 : PHK2		Монометил-МОР
АСО13 : PHK2		МОР

*Все АСО были гибридизированы с 32-мерной комплементарной PHK (PHK2).

На визуализации ● 2'-OMe ☉ ДНК ⊕ мое



Фиг. 8