

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202191936 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.15(51) Int. Cl. C07C 237/06 (2006.01)  
C07D 207/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2020.01.10

## (54) ЛИПИДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ АКТИВНЫХ АГЕНТОВ

(31) 62/791,566; 62/890,469

(72) Изобретатель:

(32) 2019.01.11; 2019.08.22

Ду Синяо (CA)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2020/013196

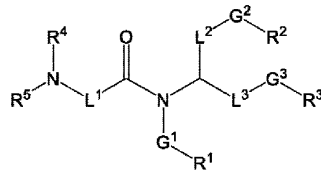
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2020/146805 2020.07.16

(71) Заявитель:

ЭКВИТАС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(CA)

(57) Обеспечиваются соединения, имеющие следующую структуру:



или их фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $G^1$ ,  $G^2$  и  $G^3$  такие, как определены в настоящей заявке. Также обеспечиваются применение соединений в качестве компонента композиций липидных наночастиц для доставки терапевтического средства, композиции, включающие соединения, и способы их применения и получения.

A1

202191936

202191936

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569739EA/019

### ЛИПИДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ АКТИВНЫХ АГЕНТОВ

#### **Предпосылки создания изобретения**

#### **Область техники**

Настоящее изобретение в целом относится к новым катионным липидам, которые можно использовать в комбинации с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, холестерин и конъюгированные с полимером липиды, для образования липидных наночастиц с олигонуклеотидами, для облегчения внутриклеточной доставки терапевтических нуклеиновых кислот (*например*, олигонуклеотиды, информационная РНК) как *in vitro*, так и *in vivo*.

#### **Описание предшествующего уровня техники**

Есть много проблем, связанных с доставкой нуклеиновых кислот для влияния на желаемый ответ в биологической системе. Терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот обладают огромным потенциалом, но остается потребность в более эффективной доставке нуклеиновых кислот к соответствующим участкам внутри клетки или организма, чтобы реализовать этот потенциал. Терапевтические нуклеиновые кислоты включают, например, информационную РНК (мРНК), антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, ДНКзимы, плазмиды, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, антагомир, антимир, миметик, супермир и аптамеры. Некоторые нуклеиновые кислоты, такие как мРНК или плазмиды, можно использовать для воздействия на экспрессию конкретных клеточных продуктов, которые могут быть полезны при лечении, например, заболеваний, связанных с дефицитом белка или фермента. Терапевтические применения доставки транскрибируемых нуклеотидов чрезвычайно широки, поскольку конструкции могут быть синтезированы для получения любой выбранной белковой последовательности, независимо от того, свойственна она системе или нет. Продукты экспрессии нуклеиновой кислоты могут увеличивать существующие уровни белка, заменять отсутствующие или нефункциональные версии белка или вводить новый белок и связанные с ним функциональные возможности в клетку или организм.

Некоторые нуклеиновые кислоты, такие как ингибиторы миРНК, можно использовать для воздействия на экспрессию специфических клеточных продуктов, которые регулируются при помощи миРНК, что может быть полезно при лечении, например, заболеваний, связанных с дефицитом белка или фермента. Терапевтические применения ингибирования миРНК чрезвычайно широки, поскольку можно синтезировать конструкции для ингибирования одной или нескольких миРНК, которые, в свою очередь, регулируют экспрессию продуктов мРНК. Ингибирование эндогенной миРНК может увеличить нисходящую экспрессию целевого эндогенного белка и восстановить надлежащую функцию в клетке или организме в качестве средства лечения заболевания, связанного с конкретной миРНК или группой миРНК.

Другие нуклеиновые кислоты могут отрицательно регулировать внутриклеточные

уровни специфической мРНК и, как результат, подавлять синтез соответствующих белков посредством таких процессов, как РНК-интерференция (РНКи) или комплементарное связывание антисмысловой РНК. Терапевтические применения антисмысловых олигонуклеотидов и РНКи также чрезвычайно широки, поскольку олигонуклеотидные конструкции могут быть синтезированы с любой нуклеотидной последовательностью, направленной против мРНК-мишени. Мишени могут включать мРНК из нормальных клеток, мРНК, ассоциированные с болезненными состояниями, такими как рак, и мРНК инфекционных агентов, таких как вирусы. На сегодняшний день антисмысловые олигонуклеотидные конструкции продемонстрировали способность специфически подавлять целевые белки посредством деградации родственной мРНК как в моделях *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, антисмысловые олигонуклеотидные конструкции в настоящее время проходят клинические исследования.

Однако в настоящее время при использовании олигонуклеотидов в терапевтических целях возникают две проблемы. Во-первых, свободные РНК в плазме чувствительны к расщеплению нуклеазами. Во-вторых, свободные РНК имеют ограниченную способность получать доступ к внутриклеточному компартменту, где находится соответствующий механизм трансляции. Липидные наночастицы, образованные из катионных липидов с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, холестерин, ПЭГ, ПЭГилованные липиды и олигонуклеотиды, использовались для блокировки разрушения РНК в плазме и облегчения клеточного поглощения олигонуклеотидов.

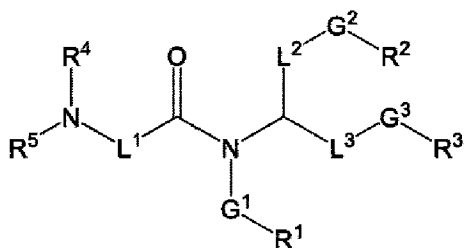
Остается потребность в улучшенных катионных липидах и липидных наночастицах для доставки олигонуклеотидов. Предпочтительно, эти липидные наночастицы должны обеспечивать оптимальное соотношение лекарственное средство:липид, защищать нуклеиновую кислоту от разложения и клиренса в сыворотке, подходить для системной или местной доставки и обеспечивать внутриклеточную доставку нуклеиновой кислоты. Кроме того, эти частицы липид-нуклеиновая кислота должны быть хорошо переносимыми и обеспечивать адекватный терапевтический индекс, чтобы лечение пациента эффективной дозой нуклеиновой кислоты не было связано с неприемлемой токсичностью и/или риском для пациента. Настоящее раскрытие обеспечивает эти и связанные с ними преимущества.

### **Сущность изобретения**

Вкратце, в настоящем описании представлены липидные соединения, включая их стереоизомеры, фармацевтически приемлемые соли или таутомеры, которые можно использовать отдельно или в комбинации с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, заряженные липиды, стероиды (включая, например, все стерины) и/или их аналоги, и/или конъюгированные с полимером липиды, с образованием липидных наночастиц для доставки терапевтических средств. В некоторых случаях липидные наночастицы используют для доставки нуклеиновых кислот, таких как антисмысловая и/или информационная РНК. Также представлены способы применения

таких липидных наночастиц для лечения различных заболеваний или состояний, например, вызванных инфекционными агентами и/или недостаточностью белка.

В одном варианте осуществления обеспечиваются соединения, имеющие следующую структуру (I):



(I)

или их фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $G^1$ ,  $G^2$  и  $G^3$  такие, как определены в настоящей заявке.

Также обеспечиваются фармацевтические композиции, включающие одно или несколько из вышеуказанных соединений структуры (I) и терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции дополнительно включают один или несколько компонентов, выбранных из нейтральных липидов, заряженных липидов, стероидов и конъюгированных с полимером липидов. Такие композиции полезны для формирования липидных наночастиц для доставки терапевтического средства.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ введения терапевтического средства нуждающемуся в этом пациенту, при этом способ включает получение или предоставление композиции липидных наночастиц, включающей соединение структуры (I) и терапевтическое средство, и доставку или введение композиции пациенту.

Эти и другие аспекты раскрытия будут очевидны при обращении к нижеследующему подробному описанию.

### **Подробное описание изобретения**

В нижеследующем описании изложены некоторые конкретные детали, чтобы обеспечить полное понимание различных вариантов осуществления изобретения. Однако специалист в данной области поймет, что раскрытие может быть осуществлено без этих деталей.

Настоящее изобретение частично основано на открытии новых катионных (амино) липидов, которые обеспечивают преимущества при использовании в липидных наночастицах для доставки *in vivo* активного или терапевтического средства, такого как нуклеиновая кислота, в клетку млекопитающего. В частности, варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают композиции нуклеиновая кислота-липидная наночастица, включающие один или несколько новых катионных липидов, описанных в настоящей заявке, которые обеспечивают повышенную активность нуклеиновой кислоты

и улучшенную переносимость композиций *in vivo*, что приводит к значительному увеличению терапевтического индекса по сравнению с ранее описанными композициями наночастиц нуклеиновая кислота-липид. В других вариантах осуществления раскрытые липиды и липидные наночастицы, включающие их, обладают повышенной безопасностью и/или переносимостью при использовании для доставки активных агентов, таких как нуклеиновые кислоты.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает новые катионные липиды, которые позволяют создавать улучшенные композиции для доставки мРНК и/или других олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления эти улучшенные композиции липидных наночастиц полезны для экспрессии белка, кодируемого мРНК. В других вариантах осуществления эти улучшенные композиции липидных наночастиц полезны для повышения экспрессии эндогенного белка путем доставки ингибиторов миРНК, нацеленных на одну конкретную миРНК или группу миРНК, регулирующих одну являющуюся мишенью мРНК или несколько мРНК. В других вариантах осуществления эти улучшенные композиции липидных наночастиц полезны для даун-регуляции (*например*, подавления экспрессии) уровней белка и/или уровней мРНК генов-мишеней. В некоторых других вариантах осуществления липидные наночастицы также полезны для доставки мРНК и плазмид для экспрессии трансгенов. Еще в одних вариантах осуществления композиции липидных наночастиц полезны для индукции фармакологического эффекта, возникающего в результате экспрессии белка, например, повышенного продуцирования эритроцитов посредством доставки подходящей мРНК эритропоэтина или защиты от инфекции посредством доставки мРНК, кодирующей подходящий антиген или антитело.

Липидные наночастицы и композиции вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать для различных целей, включая доставку инкапсулированных или связанных (*например*, связанных в комплекс) терапевтических средств, таких как нуклеиновые кислоты, в клетки, как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способы лечения или профилактики заболеваний или расстройств у нуждающегося в этом субъекта путем контактирования субъекта с липидной наночастицей, которая инкапсулирует или которая связана с подходящим терапевтическим средством, при этом липидная наночастица включает один или несколько из новых катионных липидов, описанных в настоящей заявке.

Как описано в настоящей заявке, варианты осуществления липидных наночастиц настоящего изобретения особенно полезны для доставки нуклеиновых кислот, включая, *например*, мРНК, бессмысловый олигонуклеотид, плазмидную ДНК, микроРНК (миРНК), ингибиторы миРНК (антагомиры/антимирны), информационную РНК-интерферирующую комплементарную РНК (микРНК), ДНК, поливалентную РНК, РНК субстрат дайсера, комплементарную ДНК (кДНК) и т.д. Поэтому липидные наночастицы и композиции определенных вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать для

индукции экспрессии желаемого белка как *in vitro*, так и *in vivo* путем контактирования клеток с липидной наночастицей, включающей один или несколько новых катионных липидов, описанных в настоящей заявке, где липидная наночастица инкапсулирует или связана с нуклеиновой кислотой, которая экспрессируется для получения желаемого белка (*например*, информационной РНК или плазмидой, кодирующей желаемый белок), или ингибирует процессы, которые прекращают экспрессию мРНК (*например*, ингибиторы миРНК). Альтернативно, липидные наночастицы и композиции вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать для снижения экспрессии генов-мишеней и белков как *in vitro*, так и *in vivo* путем контактирования клеток с липидной наночастицей, включающей один или несколько новых катионных липидов, описанных в настоящей заявке, где липидная наночастица инкапсулирует или связана с нуклеиновой кислотой, которая снижает экспрессию гена-мишени (*например*, антисмысловым олигонуклеотидом или малой интерферирующей РНК (миРНК)). Липидные наночастицы и композиции вариантов осуществления настоящего изобретения также можно использовать для совместной доставки различных нуклеиновых кислот (*например*, мРНК и плазмидной ДНК) по отдельности или в комбинации, что может быть полезно для обеспечения эффекта, требующего совместной локализации различных нуклеиновых кислот (*например*, мРНК, кодирующей подходящий фермент, модифицирующий ген, и сегмента(сегментов) ДНК для включения в геном хозяина).

Нуклеиновые кислоты для использования в вариантах осуществления настоящего изобретения можно получить любым доступным способом. Для мРНК основной методологией получения является, но не ограничиваясь этим, ферментативный синтез (также называемый транскрипцией *in vitro*), который в настоящее время представляет собой наиболее эффективный метод получения специфической для длинной последовательности мРНК. Транскрипция *in vitro* описывает процесс матрица-управляемого синтеза молекул РНК из сконструированной ДНК-матрицы, состоящей из вышележащей промоторной последовательности бактериофага (*например*, включая, но не ограничиваясь этим, из колифага Т7, Т3 и SP6), связанной с нижележащей последовательностью, кодирующей интересующий ген. Матричную ДНК можно получить для транскрипции *in vitro* из ряда источников подходящими методами, которые хорошо известны в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, плазмидную ДНК и амплификацию с использованием полимеразной цепной реакции (см. Linpinsel, J.L and Conn, G.L., General protocols for preparation of plasmid DNA template and Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P., and Williams, L.D. in RNA *in vitro* transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and *in vitro* RNA syntheses Methods v. 941 Conn G.L. (ed), New York, N.Y. Humana Press, 2012).

Транскрипция РНК происходит *in vitro* с использованием линеаризованной матричной ДНК в присутствии соответствующей РНК-полимеразы и аденозин-, гуанозин-, уридин- и цитидин-рибонуклеозид трифосфатов (rNTP) в условиях, которые поддерживают активность полимеразы, сводя к минимуму потенциальное разрушение

полученных транскриптов мРНК. Транскрипцию *in vitro* можно осуществить с использованием различных коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, RiboMax Large Scale RNA Production System (Promega), MegaScript Transcription kits (Life Technologies), а также с коммерчески доступными реагентами, включая РНК-полимеразы, и гНТФ. Методология транскрипции мРНК *in vitro* хорошо известна в данной области. (см., *например*, Losick, R., 1972, *In vitro* transcription, *Ann Rev Biochem* v.41 409-46; Kamakaka, R. T. and Kraus, W. L. 2001. *In Vitro* Transcription. *Current Protocols in Cell Biology*. 2:11.6:11.6.1-11.6.17; Beckert, B. And Masquida, B.,(2010) *Synthesis of RNA by In Vitro Transcription in RNA in Methods in Molecular Biology* v. 703 (Neilson, H. Ed), New York, N.Y. Humana Press, 2010; Brunelle, J.L. and Green, R., 2013, Chapter Five - *In vitro* transcription from plasmid or PCR-amplified DNA, *Methods in Enzymology* v. 530, 101-114; все они включены в настоящую заявку посредством ссылки).

Затем желаемую транскрибированную *in vitro* мРНК очищают от нежелательных компонентов транскрипции или соответствующих реакций (включая неинкорпорированные гНТФ, белковый фермент, соли, короткие РНК олигонуклеотиды и т.д.). Способы выделения транскриптов мРНК хорошо известны в данной области. Хорошо известные процедуры включают экстракцию фенолом/хлороформом или осаждение либо спиртом (этанолом, изопропанолом) в присутствии одновалентных катионов, либо хлоридом лития. Дополнительные, неограничивающие примеры процедур очистки, которые можно использовать, включают эксклюзионную хроматографию (Lukavsky, P.J. and Puglisi, J.D., 2004, *Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides*, *RNA* v.10, 889-893), аффинную хроматографию на основе диоксида кремния и электрофорез в полиакриламидном геле (Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P., and Williams, L.D. in *RNA in vitro* transcription and RNA purification by denaturing PAGE in *Recombinant and in vitro* RNA syntheses *Methods* v. 941 Conn G.L. (ed), New York, N.Y. Humana Press, 2012). Очистку можно осуществить с использованием множества коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, SV Total Isolation System (Promega) и *In Vitro* Transcription Cleanup and Concentration Kit (Norgen Biotek).

Кроме того, хотя обратная транскрипция может давать большие количества мРНК, продукты могут содержать ряд aberrantных примесей РНК, связанных с нежелательной полимеразной активностью, которые, возможно, необходимо будет удалить из препарата полноразмерной мРНК. К ним относятся короткие РНК, которые возникают в результате abortивной инициации транскрипции, а также двухцепочечная РНК (дцРНК), генерируемая активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы, РНК-примированная транскрипция с матриц РНК и самокомплементарное 3'-удлинение. Было продемонстрировано, что эти контаминанты со структурами дцРНК могут приводить к нежелательной иммуностимулирующей активности за счет взаимодействия с различными сенсорами врожденного иммунитета в эукариотических клетках, которые распознают специфические структуры нуклеиновых кислот и вызывают сильные иммунные ответы.

Это, в свою очередь, может резко снизить трансляцию мРНК, поскольку синтез белка снижается во время врожденного клеточного иммунного ответа. Поэтому были разработаны дополнительные методы удаления этих примесей дцРНК, которые известны в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, масштабируемую ВЭЖХ очистку (см., *например*, Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. And Weissman, D., 2011, Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA, Nucl Acid Res, v. 39 e142; Weissman, D., Pardi, N., Muramatsu, H., and Kariko, K., HPLC Purification of in vitro transcribed long RNA in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013). Сообщалось, что мРНК, очищенная методом ВЭЖХ, транслируется на гораздо более высоких уровнях, особенно в первичных клетках и *in vivo*.

В данной области описано значительное разнообразие модификаций, которые используются для изменения конкретных свойств транскрибируемой *in vitro* мРНК и повышения ее полезности. Они включают, но не ограничиваются этим, модификации 5' и 3' концов мРНК. Эндогенная эукариотическая мРНК обычно содержит кэп-структуру на 5'-конце зрелой молекулы, которая играет важную роль в опосредовании связывания мРНК кэп-связывающего белка (СВР), который, в свою очередь, отвечает за повышение стабильности мРНК в клетке и эффективности трансляции мРНК. Следовательно, самые высокие уровни экспрессии белка достигаются с кэпированными транскриптами мРНК. 5'-кэп содержит 5'-5'-трифосфатную связь между самым крайним нуклеотидом с 5'конца и гуаниновым нуклеотидом. Конъюгированный гуаниновый нуклеотид метилирован в положении N7. Дополнительные модификации включают метилирование последних и предпоследних с 5'-конца нуклеотидов по 2'-гидроксильной группе.

Для создания 5'-кэпа транскрибируемой *in vitro* синтетической мРНК можно использовать несколько различных кэп-структур. 5'-кэпирование синтетической мРНК можно осуществить котранскрипционно с химическими аналогами кэпа (т.е. кэпирование во время транскрипции *in vitro*). Например, кэп Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) содержит связь 5'-5'-трифосфат-гуанин-гуанин, где один гуанин содержит N7 метильную группу, а также 3'-О-метильную группу. Однако до 20% транскриптов остаются некэпированными во время этого ко-транскрипционного процесса, и синтетический кэп-аналог не идентичен структуре 5'-кэпа аутентичной клеточной мРНК, что потенциально снижает трансляционную способность и стабильность в клетках. Альтернативно, синтетические молекулы мРНК также могут быть ферментативно кэпированы пост-транскрипционно. Они могут создавать более аутентичную 5'-кэп структуру, которая более точно имитирует, структурно или функционально, эндогенный 5'-кэп, который имеет усиленное связывание кэп-связывающихся белков, увеличенный период полужизни и пониженную чувствительность к 5'-эндонуклеазам и/или уменьшенное 5'-декэпирование. Многочисленные синтетические 5'-кэп аналоги были разработаны и известны в данной области для повышения стабильности и трансляционной способности мРНК (см.,



например, Grudzien-Nogalska, E., Kowalska, J., Su, W., Kuhn, A.N., Slepencov, S.V., Darynkiewicz, E., Sahin, U., Jemielity, J., and Rhoads, R.E., Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

На 3'-конце длинная цепь адениновых нуклеотидов (поли-А-хвост) обычно добавляется к молекулам мРНК во время процессинга РНК. Сразу после транскрипции 3'-конец транскрипта расщепляется с высвобождением 3'-гидроксила, к которому поли-А-полимераза добавляет цепь адениновых нуклеотидов к РНК в процессе, называемом полиаденилированием. Широко показано, что поли-А-хвост увеличивает как эффективность трансляции, так и стабильность мРНК (см., Bernstein, P. and Ross, J., 1989, Poly (A), poly (A) binding protein and the regulation of mRNA stability, *Trends Bio Sci* v. 14 373-377; Guhaniyogi, J. And Brewer, G., 2001, Regulation of mRNA stability in mammalian cells, *Gene*, v. 265, 11-23; Dreyfus, M. And Regnier, P., 2002, The poly (A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria, *Cell*, v.111, 611-613).

Формирования поли (А) хвостов транскрибируемой *in vitro* мРНК можно достичь с использованием различных подходов, включая, помимо прочего, клонирование поли (Т) тракта в ДНК матрицу или посттранскрипционное добавление с использованием поли (А) полимеразы. В первом случае возможна *in vitro* транскрипция мРНК с поли (А) хвостами определенной длины, в зависимости от размера поли (Т) тракта, но требует дополнительных манипуляций с матрицей. Последний случай включает ферментативное добавление поли (А) хвоста к *in vitro* транскрибируемой мРНК с использованием поли (А) полимеразы, которая катализирует включение адениновых остатков на 3'-концах РНК, не требуя дополнительных манипуляций с ДНК матрицей, но приводит к получению мРНК с поли (А) хвостами гетерогенной длины. 5'-кэпирование и формирование 3'-поли (А) хвоста можно осуществить с использованием множества коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, Poly (A) Polymerase Tailing kit (EpiCenter), mMMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit и Poly (A) Tailing kit (Life Technologies), а также с коммерчески доступными реагентами, различными ARCA кэпами, поли (А) полимеразой и т.д.

Сообщалось, что помимо 5'кэп и 3' полиаденилирования, другие модификации транскриптов *in vitro* обеспечивают преимущества, связанные с эффективностью трансляции и стабильности. В данной области хорошо известно, что патогенные ДНК и РНК могут распознаваться множеством сенсоров внутри эукариот и запускать сильные врожденные иммунные ответы. Было показано, что способность различать патогенные и собственные ДНК и РНК основана, по меньшей мере частично, на модификациях структуры и нуклеозидов, поскольку большинство нуклеиновых кислот из природных источников содержат модифицированные нуклеозиды. Напротив, РНК, синтезированная *in vitro*, лишена этих модификаций, что делает ее иммуностимулирующей, что, в свою очередь, может ингибировать эффективную трансляцию мРНК, как описано выше. Введение модифицированных нуклеозидов в *in vitro* транскрибируемую мРНК можно

использовать для предотвращения распознавания и активации сенсоров РНК, тем самым смягчая эту нежелательную иммуностимулирующую активность и повышая способность к трансляции (см., *например*, Kariko, K. And Weissman, D. 2007, Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development, *Curr Opin Drug Discov Devel*, v.10 523-532; Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013; Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F.A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D., 2008, Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability, *Mol Ther* v.16, 1833-1840). Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, используемые в синтезе модифицированных РНК, можно получить, контролировать и применять с использованием общих методов и процедур, известных в данной области. Доступно большое количество модификаций нуклеозидов, которые могут быть включены отдельно или в комбинации с другими модифицированными нуклеозидами до некоторой степени в *in vitro* транскрибируемую мРНК (см., *например*, US 2012/0251618). Сообщается, что синтез нуклеозид-модифицированной мРНК *in vitro* снижает способность активировать иммунные сенсоры с сопутствующим повышением трансляционной способности.

Другие компоненты мРНК, которые можно модифицировать для обеспечения преимущества с точки зрения трансляционной способности и стабильности, включают 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR). Оптимизация UTR (благоприятные 5' и 3' UTR могут быть получены из клеточных или вирусных РНК), обеих или независимо друг от друга, как было показано, увеличивает стабильность мРНК и эффективность трансляции транскрибируемой *in vitro* мРНК (см., *например*, Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro* transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

Помимо мРНК, для настоящего изобретения можно использовать другие полезные нагрузки нуклеиновых кислот. Для олигонуклеотидов способы получения включают, но не ограничиваются этим, химический синтез и ферментативное, химическое расщепление более длинного предшественника, транскрипцию *in vitro*, как описано выше, и т.д. Способы синтеза нуклеотидов ДНК и РНК широко используются и хорошо известны в данной области (см., *например*, Gait, M. J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: IRL Press, 1984; и Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005; оба источника включены в настоящую заявку в качестве ссылки).

Что касается плазмидной ДНК, получение для применения с вариантами осуществления настоящего изобретения обычно использует, но не ограничивается этим,

размножение и выделение плазмидной ДНК *in vitro* в жидкой культуре бактерий, содержащей интересующую плазмиду. Присутствие в интересующей плазмиде гена, который кодирует устойчивость к определенному антибиотику (пенициллину, канамицину и т.д.), позволяет тем бактериям, которые содержат интересующую плазмиду, селективно расти в культурах, содержащих антибиотик. Способы выделения плазмидной ДНК широко используются и хорошо известны в данной области (см., *например*, Heilig, J., Elbing, K. L. and Brent, R., (2001), Large-Scale Preparation of Plasmid DNA, Current Protocols in Molecular Biology, 41:II:1.7:1.7.1-1.7.16; Rozkov, A., Larsson, B., Gillström, S., Björnstedt, R. and Schmidt, S. R., (2008), Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture, Biotechnol. Bioeng., 99: 557-566; и US 6197553 B1). Выделение плазмиды можно осуществить с использованием множества коммерчески доступных наборов, включая, но не ограничиваясь этим, наборы Plasmid Plus (Qiagen), GenJET plasmid MaxiPrep (Thermo) и PureYield MaxiPrep (Promega), а также с коммерчески доступными реагентами.

Ниже более подробно описаны различные иллюстративные варианты осуществления катионных липидов в соответствии с настоящим изобретением, липидные наночастицы и композиции, включающие их, и их использование для доставки активных (например, терапевтических средств), таких как нуклеиновые кислоты, для модуляции экспрессии генов и белков.

При использовании в настоящей заявке следующие термины имеют приписываемые им значения, если не указано иное.

Если контекст не требует иного, повсеместно в описании и формуле изобретения слово "включать" и его варианты, такие как "включает" и "включающий", следует толковать в открытом и инклюзивном смысле, то есть как "включая, но не ограничиваясь этим".

Ссылка в описании на "один вариант осуществления" или "вариант осуществления" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление фраз "в одном варианте осуществления" или "в варианте осуществления" в различных местах в настоящем описании не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные особенности, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. При использовании в описании и формуле изобретения формы единственного числа "a", "an" и "the" включают ссылки во множественном числе, если контекст явно не диктует иное.

Фраза "индуцировать экспрессию желаемого белка" относится к способности нуклеиновой кислоты увеличивать экспрессию желаемого белка. Для изучения степени

экспрессии белка, исследуемый образец (например, образец клеток в культуре, экспрессирующих желаемый белок) или модель млекопитающего (например, млекопитающего, такого как человек или животное), такого как грызун (например, мышь) или модель приматов, отличных от человека (например, обезьяны) приводят в контакт с нуклеиновой кислотой (например, нуклеиновой кислотой в комбинации с липидом по настоящему изобретению). Экспрессию желаемого белка в испытываемом образце или у подопытного животного сравнивали с экспрессией желаемого белка в контрольном образце (например, образце клеток в культуре, экспрессирующих желаемый белок) или у контрольного млекопитающего (например, млекопитающего, такого как человек или животное), такой как модель грызуна (например, мыши) или примата, отличного от человека (например, обезьяны), который не контактирует с нуклеиновой кислотой или которому ее не вводят. Когда желаемый белок присутствует в контрольном образце или у контрольного млекопитающего, экспрессии желаемого белка в контрольном образце или в организме контрольного млекопитающего может быть присвоено значение 1,0. В конкретных вариантах осуществления индуцирование экспрессии желаемого белка достигается, когда отношение желаемой экспрессии белка в испытываемом образце или у подопытного животного к уровню желаемой экспрессии белка в контрольном образце или у контрольного млекопитающего больше 1, например, около 1,1, 1,5, 2,0, 5,0 или 10,0. Когда желаемый белок не присутствует в контрольном образце или в организме контрольного млекопитающего, индуцирование экспрессии желаемого белка достигается при обнаружении любого измеримого уровня желаемого белка в испытываемом образце или у испытываемого животного. Обычному специалисту в данной области должны быть известны соответствующие анализы для определения уровня экспрессии белка в образце, например дот-блоттинг, нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ*, ELISA, иммунопреципитация, ферментативная функция и фенотипические анализы или анализы, основанные на репортерных белках, которые могут продуцировать флуоресценцию или люминесценцию в соответствующих условиях.

Фраза "ингибирование экспрессии гена-мишени" относится к способности нуклеиновой кислоты подавлять, снижать или ингибировать экспрессию гена-мишени. Для изучения степени подавления экспрессии гена испытываемый образец (*например*, образец клеток в культуре, экспрессирующих ген-мишень) или испытываемая модель млекопитающего (*например*, млекопитающего, такого как человек или животное), такого как грызун (*например*, мышь) или модель примата, отличного от человека (например, обезьяны), контактирует с нуклеиновой кислотой, которая подавляет, снижает или ингибирует экспрессию гена-мишени. Экспрессию гена-мишени в испытываемом образце или у испытываемого животного сравнивают с экспрессией гена-мишени в контрольном образце (*например*, образце клеток в культуре, экспрессирующих ген-мишень) или модели контрольного млекопитающего (*например*, млекопитающего, такого как человек или животное), такого как грызун (*например*, мышь) или модели примата, отличного от человека (например, обезьяны), который не контактирует с нуклеиновой кислотой или

которому ее не вводят. Экспрессии целевого гена в контрольном образце или у контрольного млекопитающего может быть присвоено значение 100%. В конкретных вариантах осуществления подавление экспрессии, ингибирование или снижение экспрессии гена-мишени достигается, когда уровень экспрессии гена-мишени в испытываемом образце или у подопытного животного относительно уровня экспрессии гена-мишени в контрольном образце или у контрольного млекопитающего составляет около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 0%. Другими словами, нуклеиновые кислоты способны к подавлению экспрессии, снижению или ингибированию экспрессии гена-мишени по меньшей мере на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% в испытываемом образце или у испытываемого млекопитающего относительно уровня экспрессии гена-мишени в контрольном образце или у контрольного млекопитающего, который не контактирует с нуклеиновой кислотой или которому ее не вводят. Подходящие анализы для определения уровня экспрессии гена-мишени включают, без ограничения, исследование уровней белка или мРНК с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как, например, дот-блоттинг, нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ*, ELISA, иммунопреципитация, ферментативная функция, а также фенотипические анализы, известные специалистам в данной области.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" активного вещества или терапевтического средства, такого как терапевтическая нуклеиновая кислота, представляет собой количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например увеличения или ингибирования экспрессии целевой последовательности по сравнению с нормальным уровнем экспрессии, обнаруживаемом в отсутствие нуклеиновой кислоты. Увеличение экспрессии целевой последовательности достигается, когда любой измеримый уровень обнаруживается в случае продукта экспрессии, который не присутствует в отсутствие нуклеиновой кислоты. В случае, когда продукт экспрессии присутствует на некотором уровне до контакта с нуклеиновой кислотой, увеличение экспрессии достигается, когда кратное увеличение значения, полученное с нуклеиновой кислотой, такой как мРНК, по сравнению с контролем составляет около 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 5000, 10000 или более. Ингибирование экспрессии гена-мишени или целевой последовательности достигается, когда значение, полученное с нуклеиновой кислотой, такой как антисмысловый олигонуклеотид, относительно контроля составляет около 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 0%. Подходящие анализы для измерения экспрессии гена-мишени или целевой последовательности включают, например, исследование уровней белка или РНК с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как дот-блоттинг, нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ*, ELISA, иммунопреципитация, ферментативная функция, флуоресценция или люминесценция

подходящих репортерных белков, а также фенотипические анализы, известные специалистам в данной области.

Термин "нуклеиновая кислота" в контексте настоящей заявки относится к полимеру, содержащему по меньшей мере два дезоксирибонуклеотида или рибонуклеотида в одноцепочечной или двухцепочечной форме, и включает ДНК, РНК и их гибриды. ДНК может быть в форме антисмысловых молекул, плазмидной ДНК, кДНК, продуктов ПЦР или векторов. РНК может быть в форме малой шпилечной РНК (мшРНК), информационной РНК (мРНК), антисмысловой РНК, миРНК, микРНК, поливалентной РНК, РНК субстрата дайсера или вирусной РНК (вРНК) и их комбинаций. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остатки или связи в основной цепи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, и которые обладают такими же связывающими свойствами, что и эталонная нуклеиновая кислота. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды и пептидно-нуклеиновые кислоты (PNAs). Если специально не ограничивается, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают такими же связывающими свойствами, что и эталонная нуклеиновая кислота. Если не указано иное, также предполагается, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, одонуклеотидные полиморфизмы и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов можно осуществить путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено смешанными основаниями и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). "Нуклеотиды" содержат сахар дезоксирибозу (ДНК) или рибозу (РНК), основание и фосфатную группу. Нуклеотиды связаны друг с другом через фосфатные группы. "Основания" включают пурины и пиримидины, которые дополнительно включают природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и природные аналоги, а также синтетические производные пуринов и пиримидинов, которые включают, но не ограничиваются этим, модификации, которые вводят новые реакционноспособные группы, такие как, но не ограничиваясь этим, амины, спирты, тиолы, карбоксилаты и алкилгалогениды.

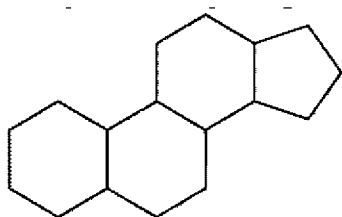
Термин "ген" относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), которая включает кодирующие последовательности частичной или полной длины, необходимые для продуцирования полипептида или полипептида-предшественника.

"Генный продукт" в контексте настоящей заявки относится к продукту гена, такому

как транскрипт РНК или полипептид.

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

"Стероид" представляет собой соединение, включающее следующий углеродный скелет:



Неограничивающие примеры стероидов включают холестерин и тому подобное.

"Катионный липид" относится к липиду, способному быть положительно заряженным. Типичные катионные липиды включают одну или несколько аминогрупп, несущих положительный заряд. Предпочтительные катионные липиды являются ионизируемыми, так что они могут существовать в положительно заряженной или нейтральной форме в зависимости от pH. Ионизация катионного липида влияет на поверхностный заряд липидной наночастицы при различных условиях pH. Это состояние заряда может влиять на абсорбцию белков плазмы, клиренс крови и распределение в тканях (Semple, S.C., et al., *Adv. Drug Deliv Rev* 32:3-17 (1998)), а также на способность образовывать эндосомолитические недвухслойные структуры (Hafez, I.M., et al., *Gene Ther* 8:1188-1196 (2001)), важные для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот.

Термин "конъюгированный с полимером липид" относится к молекуле, включающей как липидную часть, так и полимерную часть. Примером конъюгированного с полимером липида является пегилированный липид. Термин "пегилированный липид" относится к молекуле, включающей как липидную часть, так и полиэтиленгликолевую часть. Пегилированные липиды известны в данной области и включают 1 (монометоксиполиэтиленгликоль) 2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG) и т.д.

Термин "нейтральный липид" относится к любому из множества видов липидов, которые существуют либо в незаряженной, либо в нейтральной цвиттерионной форме при выбранном pH. При физиологическом pH такие липиды включают, но не ограничиваются этим, фосфотидилхолины, такие как 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-Димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), фосфатидилэтаноламины, такие как 1,2-

диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), сфингомиелины (SM), церамиды, стероиды, такие как стеринны и их производные. Нейтральные липиды могут быть синтетическими или природного происхождения.

Термин "заряженный липид" относится к любому из множества видов липидов, которые существуют либо в положительно заряженной, либо в отрицательно заряженной форме, независимо от pH в пределах полезного физиологического диапазона, например, от pH ~ 3 до pH ~ 9. Заряженные липиды могут быть синтетическими или природного происхождения. Примеры заряженных липидов включают фосфатидилсеринны, фосфатидные кислоты, фосфатидилглицеринны, фосфатидилинозиты, гемисукцинаты стеролов, диалкилтриметиламмонийпропаны, (*например*, DOTAP, DOTMA), диалкилдиметиламинопропаны, этилфосфохолины, диметиламиноэтанкарбамоил стеролы (*например*, DC-Chol).

Термин "липидная наночастица" относится к частицам, имеющим по меньшей мере один размер порядка нанометров (*например*, 1-1000 нм), которые включают одно или несколько соединений структуры (I) или другие указанные катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы, включающие раскрытые катионные липиды (*например*, соединения структуры (I)), включены в композицию, которую можно использовать для доставки активного вещества или терапевтического средства, такого как нуклеиновая кислота (*например*, мРНК), в интересующий сайт-мишень (*например*, клетка, ткань, орган, опухоль и т.п.). В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы включают соединение структуры (I) и нуклеиновую кислоту. Такие липидные наночастицы обычно включают соединение структуры (I) и один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, заряженных липидов, стероидов и конъюгированных с полимером липидов. В некоторых вариантах осуществления активное вещество или терапевтическое средство, такое как нуклеиновая кислота, может быть инкапсулировано в липидную часть липидной наночастицы или водное пространство, окруженное частью или всей липидной частью липидной наночастицы, тем самым защищая ее от ферментативного разрушения или других нежелательных эффектов, индуцируемых механизмами организма-хозяина или клеток, *например*, неблагоприятного иммунного ответа.

В различных вариантах осуществления липидные наночастицы имеют средний диаметр от около 30 нм до около 150 нм, от около 40 нм до около 150 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 60 нм до около 130 нм, от около 70 нм до около 110 нм, от около 70 нм до около 100 нм, от около 80 нм до около 100 нм, от около 90 нм до около 100 нм, от около 70 до около 90 нм, от около 80 нм до около 90 нм, от около 70 нм до около 80 нм или около 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм или 150 нм. В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы практически нетоксичны. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, когда они присутствуют в липидных наночастицах, устойчивы в водном растворе к



расщеплению нуклеазой. Липидные наночастицы, включающие нуклеиновые кислоты, и способ их получения раскрыты, например, в патентных публикациях США №№ 2004/0142025, 2007/0042031 и публикациях РСТ №№ WO 2013/016058 и WO 2013/086373, полное раскрытие которых включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

В контексте настоящей заявки "инкапсулированный липид" относится к липидной наночастице, которая обеспечивает активное вещество или терапевтическое средство, такое как нуклеиновая кислота (*например*, мРНК), как с полной инкапсуляцией, так и с частичной инкапсуляцией. В варианте осуществления нуклеиновая кислота (*например*, мРНК) полностью инкапсулирована в липидную наночастицу.

В контексте настоящей заявки термин "водный раствор" относится к композиции, включающей воду.

"Сывороточно-стабильный" по отношению к наночастицам нуклеиновая кислота-липид означает, что нуклеотид не подвергается значительному разрушению, когда подвергается сывороточному или нуклеазному анализу, который мог бы значительно разрушить свободную ДНК или РНК. Подходящие анализы включают, например, стандартный сывороточный анализ, ДНКазный анализ или РНКазный анализ.

"Системная доставка" в контексте настоящей заявки относится к доставке терапевтического продукта, которая может привести к широкому воздействию активного вещества в организме. Некоторые методы введения могут привести к системной доставке определенных веществ, но не других. Системная доставка означает, что полезное, предпочтительно терапевтическое, количество вещества воздействует на большинство частей организма. Системная доставка липидных наночастиц может осуществляться любыми способами, известными в данной области, включая, например, внутривенную, внутриартериальную, подкожную и внутрибрюшинную доставку. В некоторых вариантах осуществления системная доставка липидных наночастиц осуществляется путем внутривенной доставки.

"Местная доставка" в контексте настоящей заявки относится к доставке активного вещества непосредственно на целевой участок в организме. Например, вещество может быть доставлено локально путем прямой инъекции в очаг заболевания, такой как опухоль, другой участок-мишень, такой как участок воспаления, или орган-мишень, такой как печень, сердце, поджелудочная железа, почка и т.д. Местная доставка может также включать местное нанесение или методы локальных инъекций, такие как внутримышечная, подкожная или внутрикожная инъекция. Местная доставка не исключает системного фармакологического эффекта.

"Алкил" относится к радикалу углеводородной цепи с прямой или разветвленной цепью, состоящему только из атомов углерода и водорода, который является насыщенным или ненасыщенным (т.е. содержит одну или несколько двойных (алкенил) и/или тройных связей (алкинил)), например, имеющим от одного до двадцати четырех атомов углерода (C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкил), от четырех до двадцати атомов углерода (C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> алкил), от шести до

шестнадцати атомов углерода ( $C_6$ - $C_{16}$  алкил), от шести до девяти атомов углерода ( $C_6$ - $C_9$  алкил), от одного до пятнадцати атомов углерода ( $C_1$ - $C_{15}$  алкил), от одного до двенадцати атомов углерода ( $C_1$ - $C_{12}$  алкил), от одного до восьми атомов углерода ( $C_1$ - $C_8$  алкил) или от одного до шести атомов углерода ( $C_1$ - $C_6$  алкил), и который присоединен к остальной части молекулы простой связью, такому как метил, этил, *n*-пропил, 1-метилэтил (изопропил), *n*-бутил, *n*-пентил, 1,1-диметилэтил (*трет*-бутил), 3-метилгексил, 2-метилгексил, этенил, проп-1-енил, бут-1-енил, пент-1-енил, пента-1,4-диенил, этинил, пропирил, бутинил, пентинил, гексинил и т.д. Если в описании конкретно не указано иное, алкильная группа необязательно является замещенной.

"Алкилен" или "алкиленовая цепь" относится к линейной или разветвленной двухвалентной углеводородной цепи, связывающей остальную часть молекулы с радикальной группой, состоящей только из углерода и водорода, которая является насыщенной или ненасыщенной (т.е. содержит одну или несколько двойных (алкенилен) и/или тройных связей (алкинилен)), и например, имеющей от одного до двадцати четырех атомов углерода ( $C_1$ - $C_{24}$  алкилен), от одного до пятнадцати атомов углерода ( $C_1$ - $C_{15}$  алкилен), от одного до двенадцати атомов углерода ( $C_1$ - $C_{12}$  алкилен), от одного до восьми атомов углерода ( $C_1$ - $C_8$  алкилен), от одного до шести атомов углерода ( $C_1$ - $C_6$  алкилен), от двух до четырех атомов углерода ( $C_2$ - $C_4$  алкилен), от одного до двух атомов углерода ( $C_1$ - $C_2$  алкилен), *например*, такой как метилен, этилен, пропилен, *n*-бутилен, этенилен, пропенилен, *n*-бутенилен, пропилилен, *n*-бутилилен и т.д. Алкиленовая цепь присоединена к остальной части молекулы простой или двойной связью и к радикальной группе через простую или двойную связь. Точки присоединения алкиленовой цепи к остальной части молекулы и к радикальной группе могут быть через один атом углерода или любые два атома углерода в цепи. Если в описании конкретно не указано иное, алкиленовая цепь может быть необязательно замещенной.

"Циклоалкил" или "карбоциклическое кольцо" относится к стабильному неароматическому моноциклическому или полициклическому углеводородному радикалу, состоящему только из атомов углерода и водорода, который может включать конденсированные или мостиковые кольцевые системы, содержащие от трех до пятнадцати атомов углерода, предпочтительно от трех до десяти атомов углерода, и который является насыщенным или ненасыщенным и присоединен к остальной части молекулы простой связью. Моноциклические радикалы включают, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил. Полициклические радикалы включают, например, адамантил, норборнил, декалинил, 7,7-диметилбицикло [2.2.1] гептанил и т.д. Если в описании конкретно не указано иное, циклоалкильная группа может быть необязательно замещенной.

"Циклоалкилен" представляет собой двухвалентную циклоалкильную группу. Если в описании конкретно не указано иное, циклоалкиленовая группа может быть необязательно замещенной.

"Гетероциклил" или "гетероциклическое кольцо" относится к стабильному 3-18-

членному (например, 5, 6 или 7-членному) неароматическому кольцевому радикалу, имеющему от одного до двенадцати кольцевых атомов углерода (*например*, от двух до двенадцати) и от одного до шести кольцевых гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы. Примеры таких гетероциклических радикалов включают, но не ограничиваются этим, азетидинил, пирролидинил, пиперидинил, имидазолидинил, тетрагидропиримидинил и т.д. Если в описании конкретно не указано иное, гетероциклическая группа может быть необязательно замещенной.

"Гетероарил" относится к 5-14-членному радикалу кольцевой системы, содержащему атомы водорода, от одного до тринадцати кольцевых атомов углерода, от одного до шести кольцевых гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы, и по меньшей мере одно ароматическое кольцо. Примеры включают, но не ограничиваются этим, пирролил, имидазолил, триазолил, тиазолил, пиридинил, пиримидинил, пиразинил, пиридазинил и т.д. Если в описании конкретно не указано иное, гетероарильная группа может быть необязательно замещенной.

Термин "замещенный", используемый в настоящей заявке, означает любую из вышеуказанных групп (*например*, алкил, алкилен, циклоалкил или циклоалкилен), где по меньшей мере один атом водорода заменен связью с атомом, не являющимся водородом, таким как, но не ограничиваясь этим: атом галогена, такой как F, Cl, Br или I; оксо группы ( $=O$ ); гидроксильные группы ( $-OH$ );  $C_1$ - $C_{12}$  алкильные группы; циклоалкильные группы;  $-(C=O)OR'$ ;  $-O(C=O)R'$ ;  $-C(=O)R'$ ;  $-OR'$ ;  $-S(O)_xR'$ ;  $-S-SR'$ ;  $C(=O)SR'$ ;  $-SC(=O)R'$ ;  $-NR'R'$ ;  $-NR'C(=O)R'$ ;  $-C(=O)NR'R'$ ;  $-NR'C(=O)NR'R'$ ;  $-OC(=O)NR'R'$ ;  $-NR'C(=O)OR'$ ;  $-NR'S(O)_xNR'R'$ ;  $-NR'S(O)_xR'$ ; и  $-S(O)_xNR'R'$ , где:  $R'$  в каждом случае независимо представляет собой H,  $C_1$ - $C_{15}$  алкил или циклоалкил, и  $x$  имеет значение 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления заместитель представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкильную группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой циклоалкильную группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой галогеновую группу, такую как фтор. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой оксо группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой гидроксильную группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой алкокси группу ( $-OR'$ ). В других вариантах осуществления заместитель представляет собой карбоксильную группу. В других вариантах осуществления заместитель представляет собой группу амина ( $-NR'R'$ ).

"Необязательный" или "необязательно" (*например*, необязательно замещенный) означает, что описанное далее событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда это не происходит. Например, "необязательно замещенный алкил" означает, что алкильный радикал может быть или не быть замещенным, и что описание включает как замещенные алкильные радикалы, так и алкильные радикалы, не имеющие замещения.

Изобретение, раскрытое в настоящей заявке, также подразумевает охват всех

фармацевтически приемлемых соединений соединения структуры (I), меченных изотопами, посредством замены одного или нескольких атомов атомом, имеющим другую атомную массу или массовое число. Примеры изотопов, которые могут быть включены в описанные соединения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора, хлора и йода, такие как  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{123}\text{I}$  и  $^{125}\text{I}$ , соответственно. Эти радиоактивно меченные соединения могут быть полезны для помощи в определении или измерении эффективности соединений путем характеристики, например, участка или способа действия или аффинности связывания с фармакологически важным участком действия. Некоторые меченные изотопами соединения структуры (I), (IA) или (IB), например, содержащие радиоактивный изотоп, полезны в исследованиях распределения лекарственных средств и/или субстратов в тканях. Радиоактивные изотопы трития, *т.е.*  $^3\text{H}$ , и углерода-14, *т.е.*  $^{14}\text{C}$ , особенно полезны для этой цели ввиду простоты их включения и имеющихся средств обнаружения.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, *т.е.*  $^2\text{H}$ , может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенным периодом полураспада *in vivo* или уменьшенными требованиями к дозировке, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

Замещение изотопами, излучающими позитроны, такими как  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  и  $^{13}\text{N}$ , может быть полезно в исследованиях позитронно-эмиссионной томографии (PET) для изучения степени занятости рецептора субстратом. Меченые изотопами соединения структуры (I), как правило, можно получить обычными методами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными тем, которые описаны в разделах Получения и Примеры, представленных ниже, с использованием подходящего меченого изотопами реагента вместо ранее используемого немеченого реагента.

Варианты осуществления, раскрытые в настоящей заявке, также предназначены для охвата продуктов метаболизма описанных соединений *in vivo*. Такие продукты могут быть получены, например, в результате окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, этерификации и т.п. вводимого соединения, в первую очередь из-за ферментативных процессов. Соответственно, варианты осуществления настоящего изобретения включают соединения, полученные способом, включающим введение соединения по настоящему изобретению млекопитающему в течение периода времени, достаточного для получения его метаболического продукта. Такие продукты обычно идентифицируют путем введения радиоактивно-меченого соединения по настоящему изобретению в поддающейся обнаружению дозе животному, такому как крыса, мышь, морская свинка, обезьяна, или человеку, обеспечивая достаточное время для метаболизма и выделяя продукты его конверсии из мочи, крови или других биологических образцов.

"Стабильное соединение" и "стабильная структура" предназначены для обозначения соединения, которое достаточно устойчиво, чтобы выдержать выделение до полезной степени чистоты из реакционной смеси и формулирование в эффективное

терапевтическое средство.

"Млекопитающее" включает людей и домашних животных, таких как лабораторные животные и домашние животные (например, кошки, собаки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, кролики), и не домашних животных, таких как дикие животные и т.д.

"Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент" включает без ограничения любой адъювант, носитель, наполнитель, глидант, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/красящее вещество, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, увлажняющий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель или эмульгатор, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США как приемлемый для применения для людей или домашних животных.

"Фармацевтически приемлемая соль" включает как кислотно-, так и основно-аддитивные соли.

"Фармацевтически приемлемая кислотно-аддитивная соль" относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований, которые не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения и которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, но не ограничиваясь этим, хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.д., и органическими кислотами, такими как, но не ограничиваясь этим, уксусная кислота, 2,2-дихлоруксусная кислота, адипиновая кислота, альгиновая кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, бензолсульфоновая кислота, бензойная кислота, 4-ацетамидобензойная кислота, камфорная кислота, камфор-10-сульфоновая кислота, каприновая кислота, капроновая кислота, каприловая кислота, угольная кислота, коричная кислота, лимонная кислота, цикламовая кислота, додецилсерная кислота, этан-1,2-дисульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, муравьиная кислота, фумаровая кислота, галактариновая кислота, гентизиновая кислота, глюкогептоновая кислота, глюконовая кислота, глюкуроновая кислота, глутаминовая кислота, глутаровая кислота, 2-оксоглутаровая кислота, глицерофосфорная кислота, гликолевая кислота, гиппуровая кислота, изомаляновая кислота, молочная кислота, лактобионовая кислота, лауриновая кислота, малеиновая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, муциновая кислота, нафталин-1,5-дисульфоновая кислота, нафталин-2-сульфоновая кислота, 1-гидрокси-2-нафтойная кислота, никотиновая кислота, олеиновая кислота, оротовая кислота, щавелевая кислота, пальмитиновая кислота, памоевая кислота, пропионовая кислота, пироглутаминовая кислота, пировиноградная кислота, салициловая кислота, 4-аминосалициловая кислота, себациновая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, винная кислота, тиоциановая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, трифторуксусная кислота, ундециленовая кислота и т.д.

"Фармацевтически приемлемая основно-аддитивная соль" относится к тем солям,

которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных кислот, которые не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения. Эти соли получают добавлением неорганического основания или органического основания к свободной кислоте. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, но не ограничиваются этим, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца, алюминия и т.д. Предпочтительными неорганическими солями являются соли аммония, натрия, калия, кальция и магния. Соли, полученные из органических оснований, включают, но не ограничиваются этим, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклических аминов и основных ионообменных смол, таких как аммиак, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, диэтанолламин, этаноламин, деанол, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидрабаин, холин, бетаин, бенетамин, бензатин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, триэтанолламин, трометамин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы и т.д. Особенно предпочтительными органическими основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин.

Часто кристаллизация дает сольват соединения по настоящему изобретению (*m.e.* соединения структуры (I)). В контексте настоящей заявки термин "сольват" относится к агрегату, который включает одну или несколько молекул соединения по настоящему изобретению с одной или несколькими молекулами растворителя. Растворителем может быть вода, и в этом случае сольват может быть гидратом. Альтернативно, растворитель может быть органическим растворителем. Таким образом, соединения по настоящему изобретению могут существовать в виде гидрата, включая моногидрат, дигидрат, полугидрат, сесквигидрат, тригидрат, тетрагидрат и т.п., а также в соответствующих сольватированных формах. Сольваты соединения по настоящему изобретению могут быть истинными сольватами, тогда как в других случаях соединение по настоящему изобретению может просто удерживать дополнительную воду или представлять собой смесь воды с некоторым дополнительным растворителем.

"Фармацевтическая композиция" относится к композиции соединения по настоящему изобретению и среде, общепринятой в данной области для доставки биологически активного соединения млекопитающим, например людям. Такая среда включает все подходящие для этого фармацевтически приемлемые носители, разбавители или эксципиенты.

"Эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к тому количеству соединения по настоящему изобретению, которое при введении млекопитающему, предпочтительно человеку, является достаточным для осуществления лечения млекопитающего, предпочтительно человека. Количество липидной наночастицы согласно раскрытию, которое составляет "терапевтически

эффективное количество", будет варьироваться в зависимости от соединения, состояния и его тяжести, способа введения и возраста млекопитающего, подлежащего лечению, но может быть определено обычным образом специалистом в данной области техники на основании его собственных знаний и данного раскрытия.

"Лечащий" или "лечение" в контексте настоящей заявки охватывает лечение представляющего интерес заболевания или состояния у млекопитающего, предпочтительно человека, страдающего от интересующего заболевания или состояния, и включает:

(i) предотвращение возникновения заболевания или состояния у млекопитающего, в частности, когда такое млекопитающее предрасположено к состоянию, но оно еще не диагностировано у него;

(ii) ингибирование заболевания или состояния, *т.е.* остановку его развития;

(iii) облегчение заболевания или состояния, *т.е.* индукцию регресса заболевания или состояния; или

(iv) облегчение симптомов, вызванных заболеванием или состоянием, то есть облегчение боли без устранения основного заболевания или состояния. В контексте настоящей заявки термины "заболевание" и "состояние" можно использовать взаимозаменяемо, или они могут отличаться в том смысле, что конкретное заболевание или состояние может не иметь известного возбудителя (так что этиология еще не выяснена), и поэтому пока не распознается как заболевание, а только как нежелательное состояние или синдром, при котором клиницистами был идентифицирован более или менее специфический набор симптомов.

Соединения по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли могут содержать один или несколько стереоцентров и, таким образом, могут давать энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные формы, которые могут быть определены с точки зрения абсолютной стереохимии как (R) или (S), или как (D) или (L) для аминокислот. Подразумевается, что настоящее описание включает все такие возможные изомеры, а также их рацемические и оптически чистые формы. Оптически активные (+) и (-), (R)- и (S)- или (D)- и (L)-изомеры можно получить с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов, или они могут быть разделены с использованием обычных методов, например хроматографии и фракционной кристаллизации. Обычные методы получения/выделения индивидуальных энантиомеров включают хиральный синтез из подходящего оптически чистого предшественника или разделение рацемата (или рацемата соли или производного) с использованием, например, хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Когда соединения, описанные в настоящей заявке, содержат олефиновые двойные связи или другие центры геометрической асимметрии, и если не указано иное, предполагается, что соединения включают геометрические изомеры E и Z. Аналогичным образом, также должны быть включены все таутомерные формы.

"Стереоизомер" относится к соединению, состоящему из одних и тех же атомов,

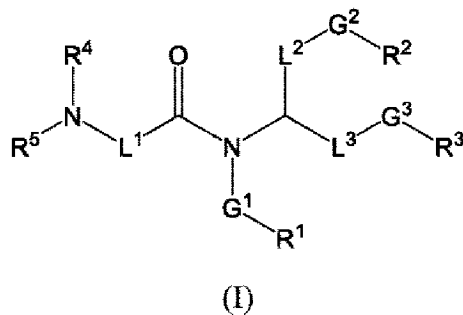
связанных одинаковыми связями, но имеющему разные трехмерные структуры, которые не являются взаимозаменяемыми. Настоящее раскрытие рассматривает различные стереоизомеры и их смеси и включает "энантиомеры", которые относятся к двум стереоизомерам, молекулы которых являются несовпадающими зеркальными отображениями друг друга.

"Таутомер" относится к сдвигу протона от одного атома молекулы к другому атому той же молекулы. Настоящее описание включает таутомеры любых указанных соединений.

### Соединения

В одном аспекте раскрытие обеспечивает новые липидные соединения, которые способны объединяться с другими липидными компонентами, такими как нейтральные липиды, заряженные липиды, стероиды и/или конъюгированные с полимером липиды, с образованием липидных наночастиц с олигонуклеотидами. Не ограничиваясь теорией, считается, что эти липидные наночастицы защищают олигонуклеотиды от разрушения в сыворотке и обеспечивают эффективную доставку олигонуклеотидов в клетки *in vitro* и *in vivo*.

В одном варианте осуществления соединения имеют следующую структуру (I):



или их фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

$R^1$  представляет собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_{24}$  алкил или необязательно замещенный  $C_2$ - $C_{24}$  алкенил;

$R^2$  и  $R^3$  каждый независимо представляют собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_{36}$  алкил;

$R^4$  и  $R^5$  каждый независимо представляют собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил, или  $R^4$  и  $R^5$  объединяются вместе с N атомом, к которому они присоединены, с образованием гетероциклила или гетероарила;

$L^1$ ,  $L^2$  и  $L^3$  каждый независимо представляет собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_{18}$  алкилен;

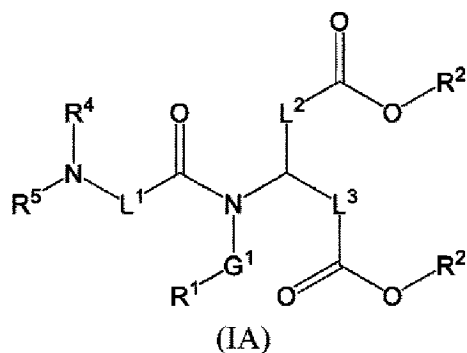
$G^1$  представляет собой прямую связь,  $-(CH_2)_nO(C=O)-$ ,  $-(CH_2)_n(C=O)O-$  или  $-(C=O)-$ ;

$G^2$  и  $G^3$  каждый независимо представляет собой  $-(C=O)O-$  или  $-O(C=O)-$ ; и

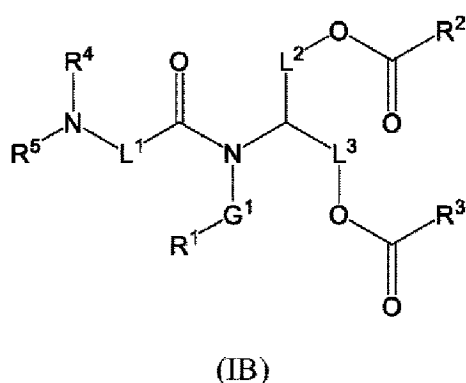
$n$  представляет собой целое число больше 0.

В некоторых вариантах осуществления соединения имеют следующую структуру (IA):





В некоторых вариантах осуществления соединение имеет следующую структуру (IB):



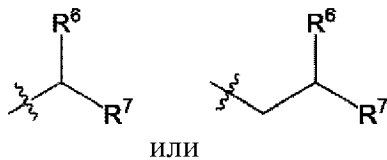
В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой необязательно замещенный  $C_6$ - $C_{18}$  алкил или  $C_{14}$ - $C_{18}$  алкенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой  $C_8$  алкил,  $C_9$  алкил,  $C_{10}$  алкил,  $C_{12}$  алкил,  $C_{14}$  алкил или  $C_{16}$  алкил. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой  $C_{16}$  алкенил. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $R^1$  является неразветвленным. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  является разветвленным. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  является незамещенным.

В некоторых вариантах осуществления  $G^1$  представляет собой прямую связь,  $-(CH_2)_nO(C=O)-$  или  $-(CH_2)_n(C=O)O-$ . В некоторых вариантах осуществления  $G^1$  представляет собой прямую связь. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $G^1$  представляет собой  $-(CH_2)_n(C=O)O-$ , и  $n$  больше 1. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 1-20. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 1-10. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 5-11. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 6-10. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $n$  имеет значение 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 5. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 6. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 7. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 8. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 9. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение 10.

В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкилен. В

некоторых вариантах осуществления  $L^1$  представляет собой  $C_2$  алкилен,  $C_3$  алкилен или  $C_4$  алкилен. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $L^1$  является неразветвленным. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $L^1$  является незамещенным.

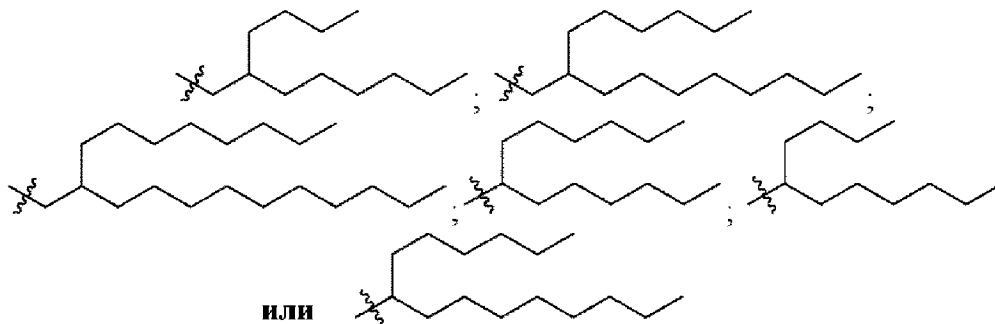
В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой  $C_8$ - $C_{24}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой  $C_8$ - $C_{24}$  алкил. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  оба представляют собой  $C_8$ - $C_{24}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  каждый независимо представляет собой  $C_{11}$  алкил,  $C_{12}$  алкил,  $C_{13}$  алкил,  $C_{14}$  алкил,  $C_{15}$  алкил,  $C_{16}$  алкил,  $C_{18}$  алкил или  $C_{20}$  алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  является разветвленным. В более конкретных вариантах осуществления  $R^3$  является разветвленным. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  каждый независимо имеет одну из следующих структур:



где:

$R^6$  и  $R^7$  каждый независимо представляет собой  $C_2$ - $C_{12}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  каждый независимо имеет одну из следующих структур:



В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  и  $L^3$  каждый независимо представляет собой  $C_4$ - $C_{10}$  алкилен. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_5$  алкилен. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_6$  алкилен. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_8$  алкилен. В некоторых более конкретных вариантах осуществления  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_9$  алкилен. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  является неразветвленным. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  является неразветвленным. В более конкретных вариантах осуществления  $L^2$  является незамещенным. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  является незамещенным.

В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  и  $R^5$  каждый независимо представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкил. В более конкретных вариантах осуществления  $R^4$  и  $R^5$  оба

представляют собой метил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  и  $R^5$  оба представляют собой этил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой метил и  $R^5$  представляет собой н-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  и  $R^5$  оба представляют собой н-бутил. В различных вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой метил, и  $R^5$  представляет собой н-гексил.

В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  и  $R^5$  объединяются вместе с N атомом, к которому они присоединены, с образованием гетероцикла. В некоторых вариантах осуществления гетероцикл представляет собой 5-членный гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления гетероцикл имеет следующую структуру:

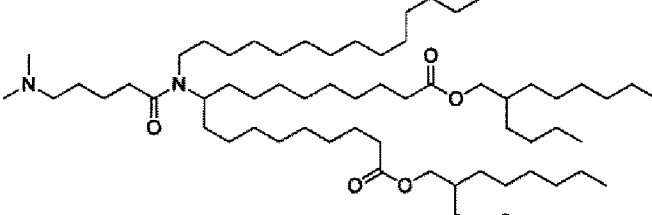
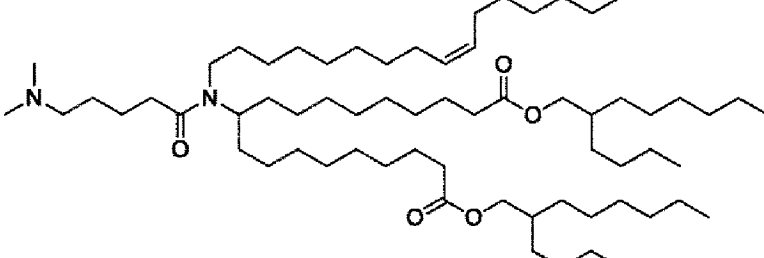
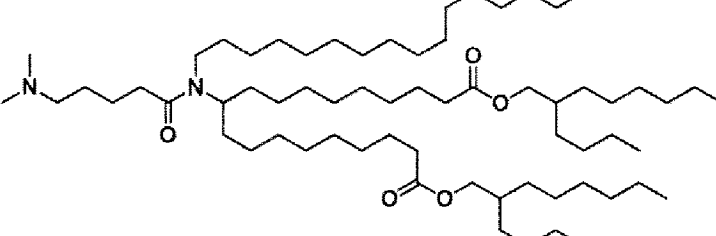
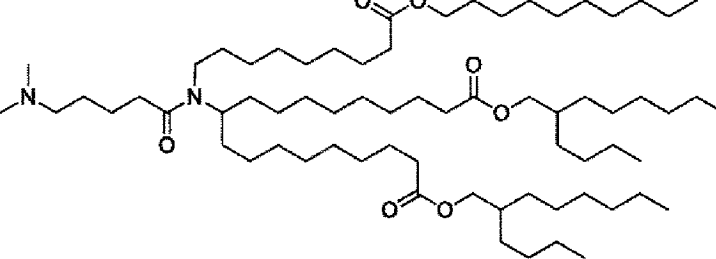
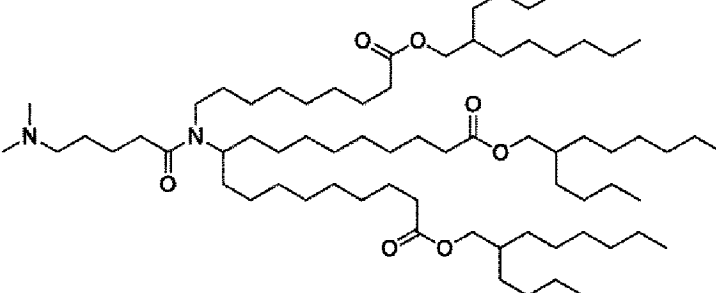


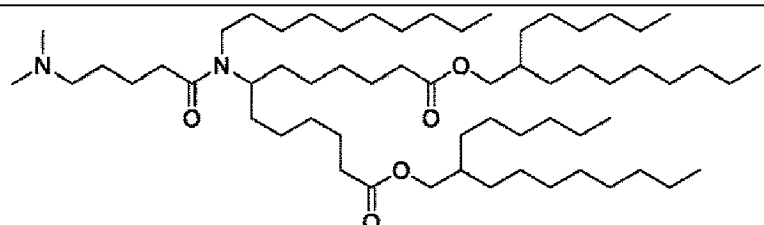
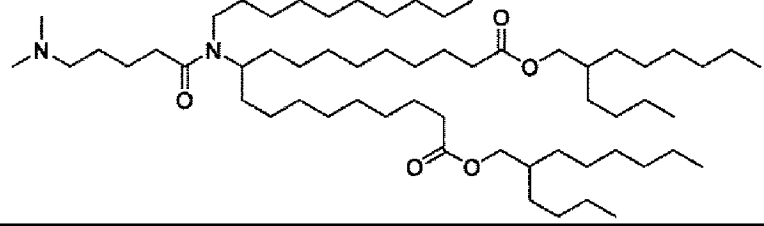
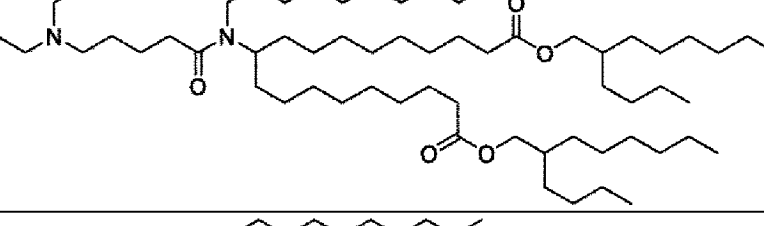
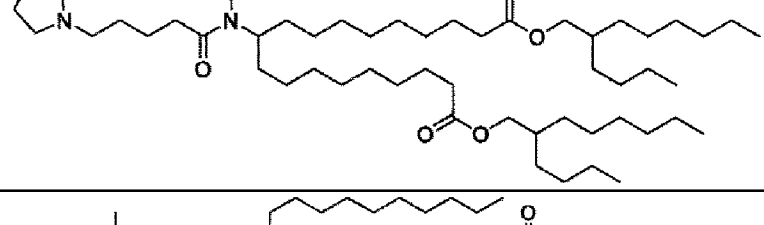
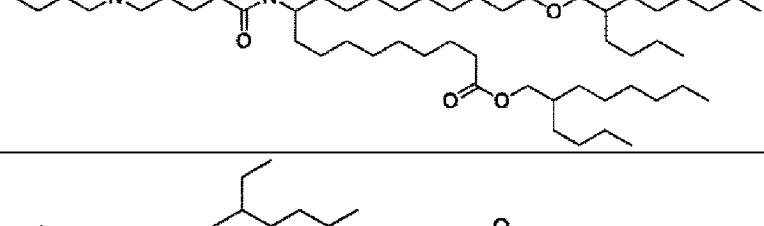
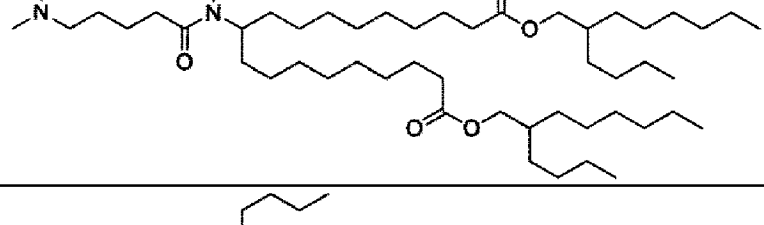
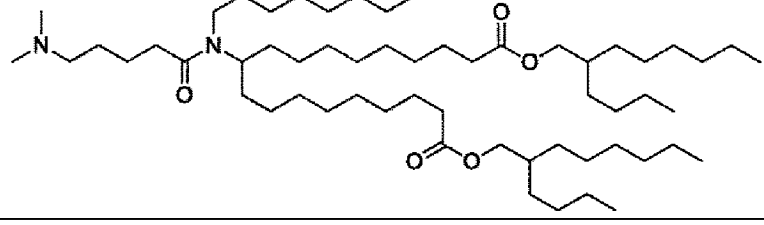
В различных вариантах осуществления соединение имеет одну из структур, представленных в Таблице 1 ниже.

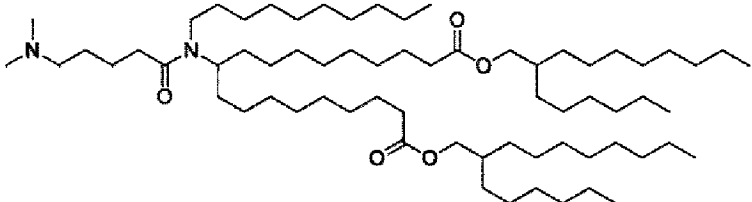
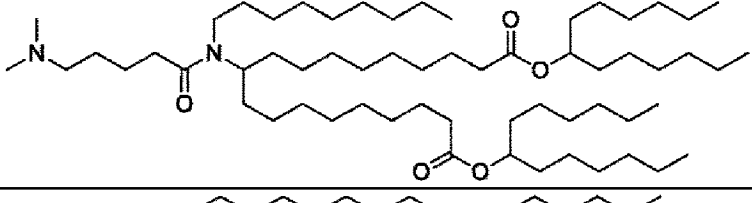
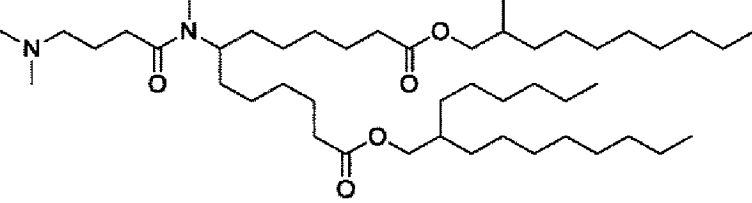
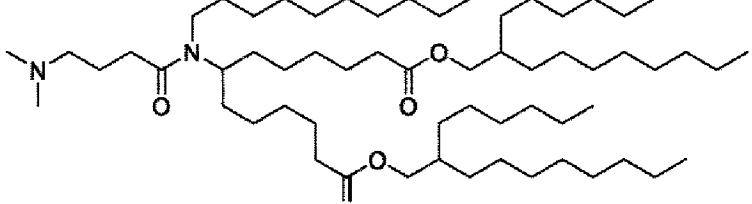
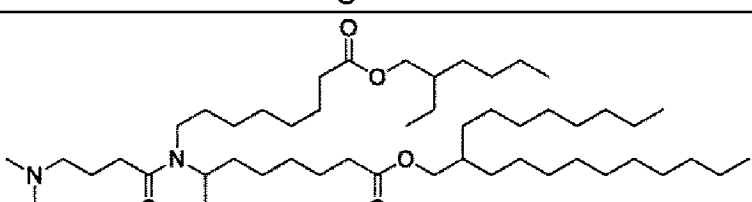
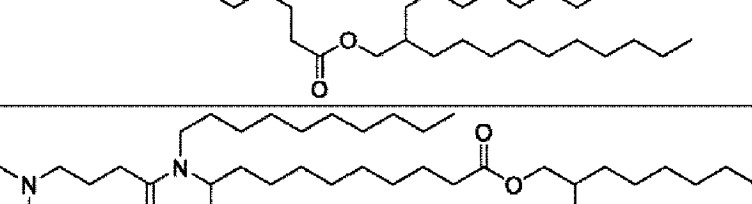
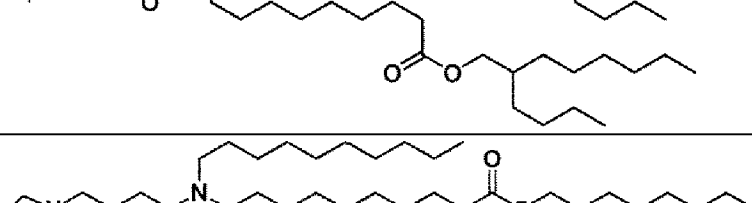
Таблица 1

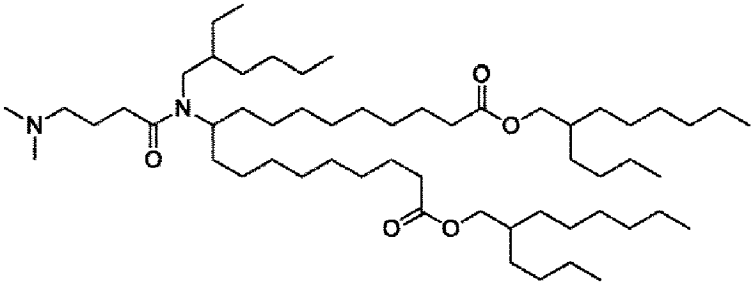
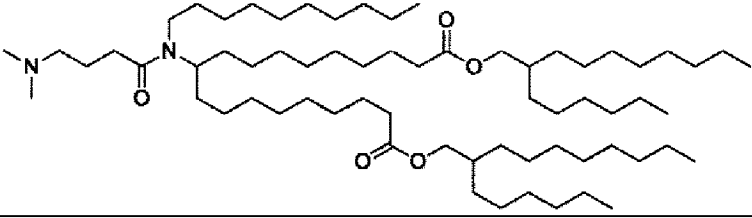
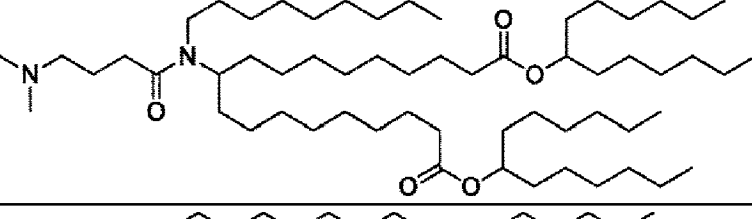
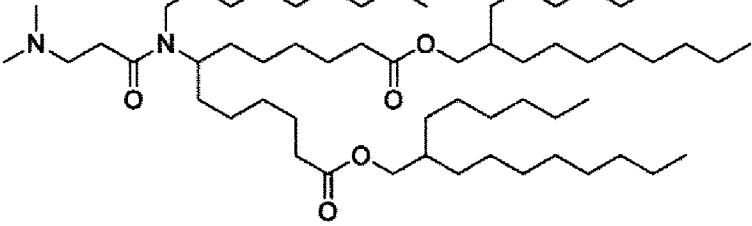
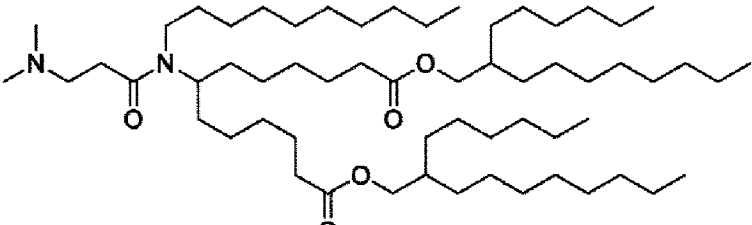
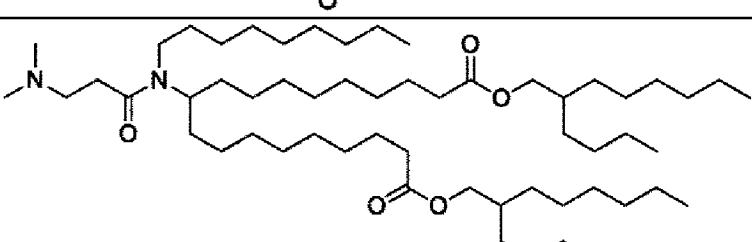
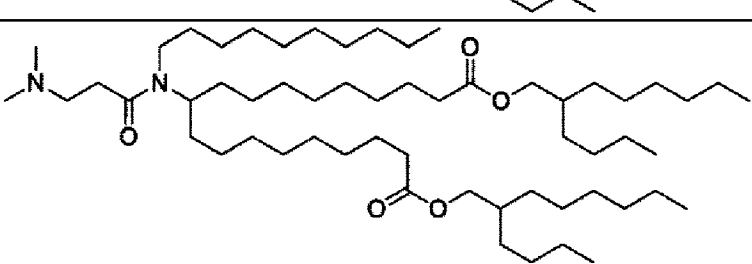
Соединения, включенные в варианты осуществления соединений структуры (I)

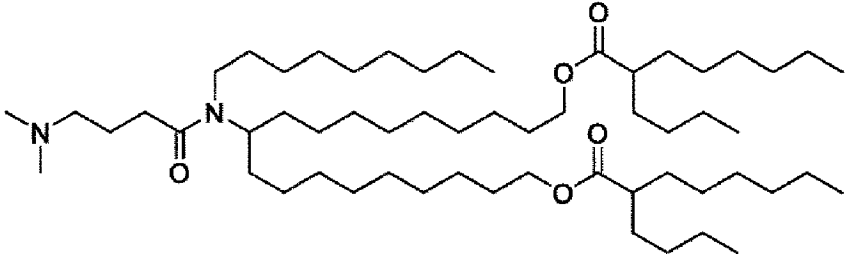
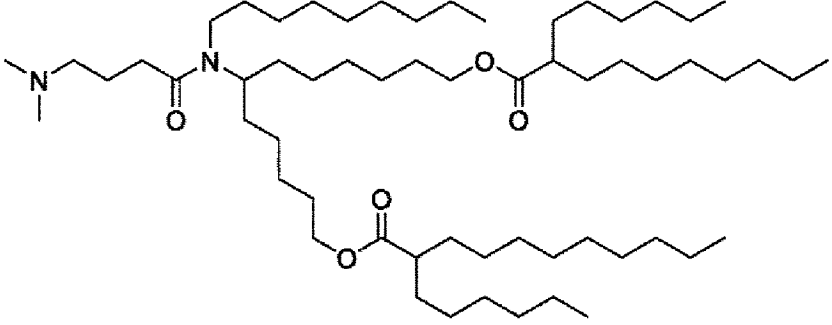
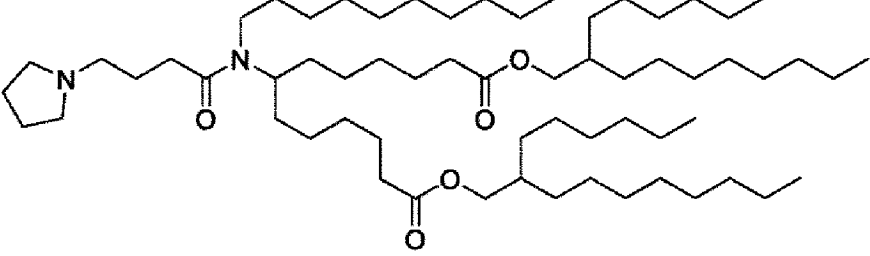
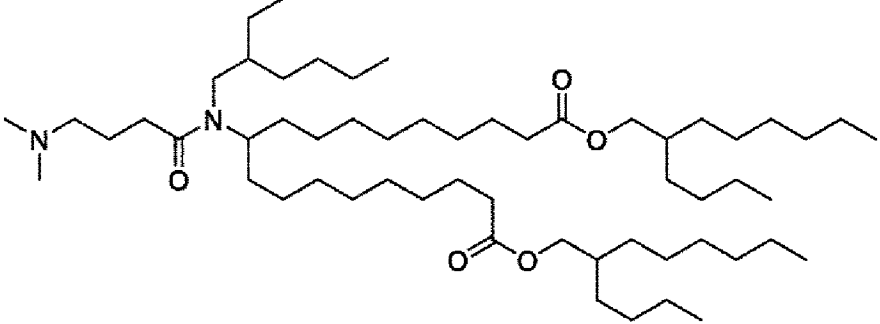
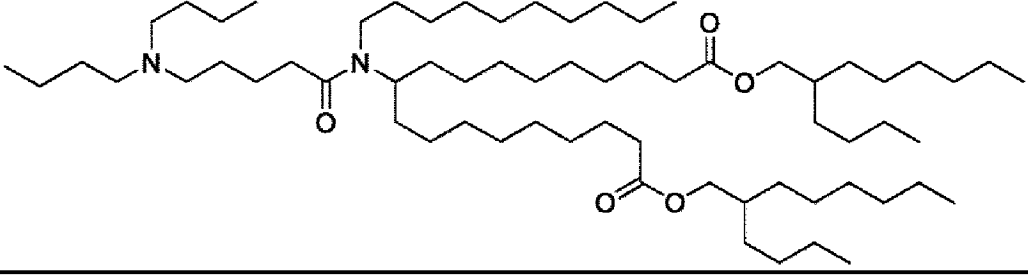
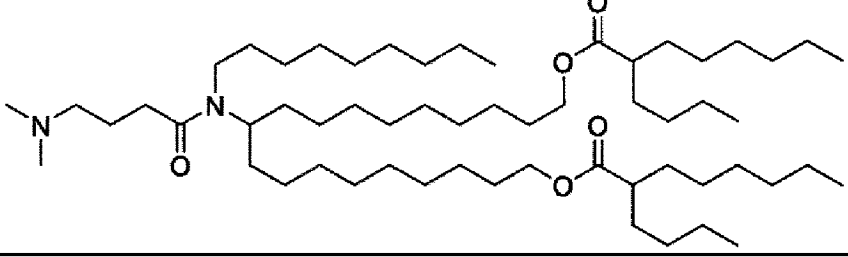
---

№	Структура	pKa
I-1		-
I-2		-
I-3		-
I-4		-
I-5		-

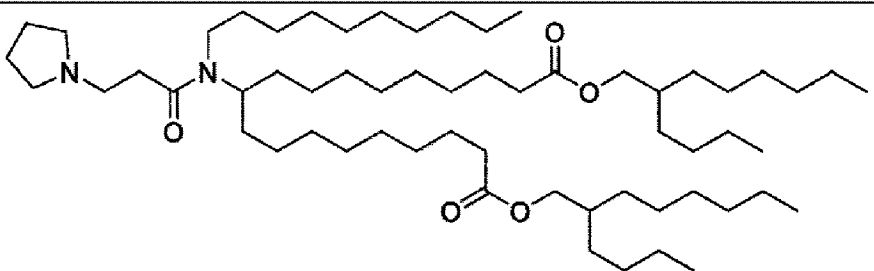
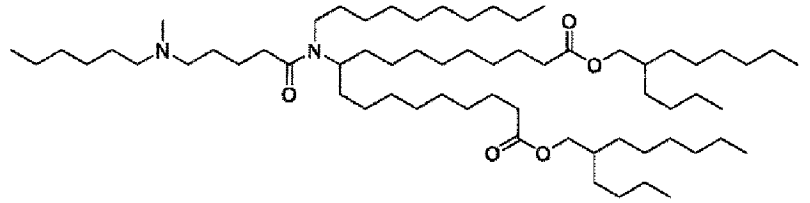
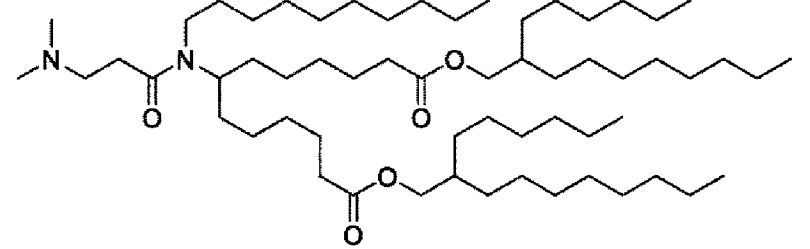
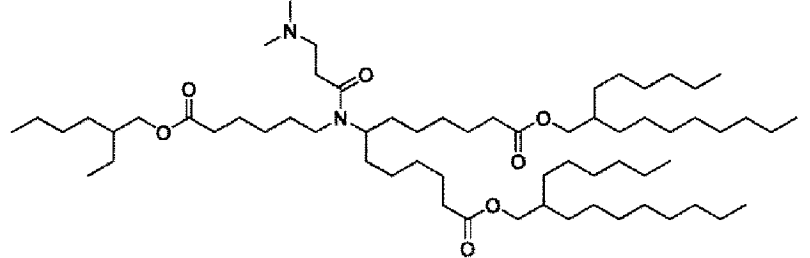
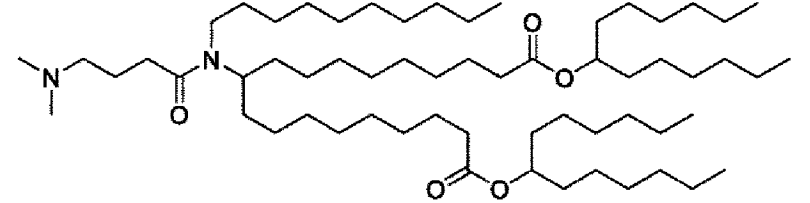
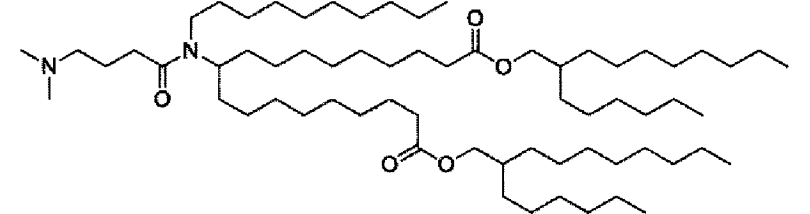
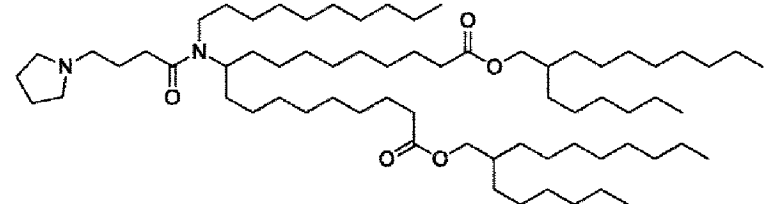
I-6		-
I-7		6,74
I-8		6,68
I-9		6,83
I-10		-
I-11		-
I-12		-

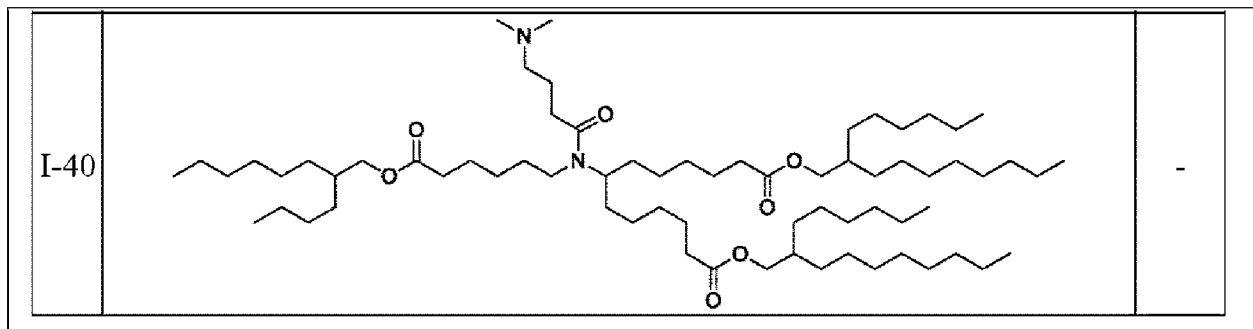
I-13		-
I-14		-
I-15		-
I-16		6,77
I-17		-
I-18		6,47
I-19		-

I-20		6,84
I-21		-
I-22		-
I-23		-
I-24		-
I-25		6,20
I-26		-

I-27		-
I-28		-
I-29		6,81
I-30		6,47
I-31		5,05
I-32		6,41



I-33		6,19
I-34		-
I-35		-
I-36		-
I-37		-
I-38		-
I-39		-



Понятно, что любой вариант осуществления соединений структуры (I), как изложено выше, и любой конкретный заместитель и/или переменная в структуре соединения (I), как изложено выше, могут быть независимо объединены с другими вариантами осуществления и/или заместителями и/или переменными соединений структуры (I) для формирования вариантов осуществления изобретения, которые конкретно не описаны выше. Кроме того, в том случае, если перечень заместителей и/или переменных указан для любой конкретной группы R, группы G, группы L или переменной p в конкретном варианте осуществления и/или формуле изобретения, следует понимать, что каждый отдельный заместитель и/или переменная могут быть исключены из конкретного варианта осуществления и/или формулы изобретения, и что оставшийся перечень заместителей и/или переменных будет считаться находящимся в пределах объема раскрытия.

Понятно, что в настоящем описании комбинации заместителей и/или переменных представленных формул допустимы, только если они приводят к стабильным соединениям.

В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются липидные наночастицы, включающие соединение структуры (I). Липидные наночастицы необязательно включают эксципиенты, выбранные из нейтрального липида, стероида и конъюгированного с полимером липида.

В некоторых вариантах осуществления обеспечиваются композиции, включающие любое одно или несколько из соединений структуры (I) и терапевтическое средство. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции включают любое из соединений структуры (I) и терапевтическое средство и один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и конъюгированных с полимером липидов. Другие фармацевтически приемлемые эксципиенты и/или носители также включены в различные варианты осуществления композиций.

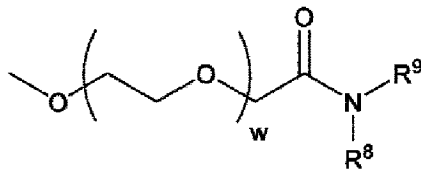
В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид выбран из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM. В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC. В различных вариантах осуществления молярное отношение соединения к нейтральному липиду находится в диапазоне от около 2:1 до около 8:1.

В различных вариантах осуществления композиции дополнительно включают стероид или аналог стероида. В некоторых вариантах осуществления стероид или аналог

стероида представляет собой холестерин. В некоторых из этих вариантов осуществления молярное отношение соединения к холестерину находится в диапазоне от около 5:1 до 1:1.

В различных вариантах осуществления конъюгированный с полимером липид представляет собой пегилированный липид. Например, некоторые варианты осуществления включают пегилированный диацилглицерин (PEG-DAG), такой как 1-(монометокси-полиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), PEG сукцинат диацилглицерин (PEG-S-DAG), такой как 4-O-(2',3'-ди(тетрадеканоксипропил)-1-O-( $\omega$ -метокси(полиэтокси)этил)бутандиоат (PEG-S-DMG), пегилированный церамид (PEG-cer) или PEG диалкоксипропилкарбамат, такой как  $\omega$ -метокси(полиэтокси)этил-N-(2,3-ди(тетрадеканокси)пропил)карбамат или 2,3-ди(тетрадеканокси)пропил-N-( $\omega$ -метокси(полиэтокси)этил)карбамат. В различных вариантах осуществления молярное отношение соединения к пегилированному липиду находится в диапазоне от около 100:1 до около 20:1.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает пегилированный липид, имеющий следующую структуру (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, таутомер или стереоизомер, где:

$R^8$  и  $R^9$  каждый независимо представляет собой прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

$w$  имеет среднее значение от 30 до 60.

В некоторых вариантах осуществления  $R^8$  и  $R^9$  представляют собой, каждый независимо, прямые, насыщенные алкильные цепи, содержащие от 12 до 16 атомов углерода. В других вариантах осуществления среднее значение  $w$  находится в диапазоне от около 42 до 55, например около 49.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанной композиции терапевтическое средство включает нуклеиновую кислоту. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота выбрана из антисмысловой и информационной РНК. В некоторых из описанных выше вариантов осуществления композиция включает липидную наночастицу.

Некоторые соответствующие варианты осуществления обеспечивают липидную наночастицу, включающую соединение любого из вышеуказанных вариантов осуществления (например, соединение структуры (I)). В некоторых вариантах

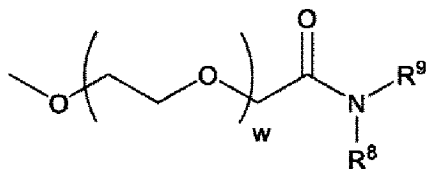
осуществления липидная наночастица также включает терапевтическое средство (*например*, нуклеиновую кислоту, такую как антисмысловая и информационная РНК).

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица дополнительно включает один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и конъюгированных с полимером липидов. В некоторых вариантах осуществления нейтральные липиды выбраны из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM. В более конкретных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой DSPC.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления молярное отношение соединения к нейтральному липиду находится в диапазоне от около 2:1 до около 8:1. В некоторых вариантах осуществления стероид представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соединения к холестерину находится в диапазоне от 5:1 до 1:1.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированный с полимером липид представляет собой пегилированный липид. В некоторых более конкретных вариантах осуществления молярное отношение соединения к пегилированному липиду находится в диапазоне от около 100:1 до около 20:1.

В некоторых вариантах осуществления пегилированный липид представляет собой PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-сег или PEG диалкилоксипропилкарбамат. В других вариантах осуществления пегилированный липид имеет следующую структуру (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

$\text{R}^8$  и  $\text{R}^9$  каждый независимо представляет собой прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

$w$  имеет среднее значение от 30 до 60.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления структуры (II)  $\text{R}^8$  и  $\text{R}^9$  представляют собой, каждый независимо, прямые, насыщенные алкильные цепи, содержащие от 12 до 16 атомов углерода. В более конкретных вариантах осуществления среднее значение  $w$  составляет около 49.

В других различных вариантах осуществления раскрытие направлено на способ введения терапевтического средства нуждающемуся в этом пациенту, при этом способ включает получение или обеспечение любой из вышеуказанных композиций и введение

композиции пациенту.

Для целей введения варианты осуществления соединений по настоящему изобретению (обычно в форме липидных наночастиц в комбинации с терапевтическим средством) можно вводить в виде необработанного химического вещества или можно формулировать в виде фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции вариантов осуществления настоящего изобретения включают соединение структуры (I) и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления соединение структуры (I) присутствует в композиции в количестве, которое эффективно для образования липидной наночастицы и доставки терапевтического средства, например, для лечения конкретного заболевания или состояния, представляющего интерес. Соответствующие концентрации и дозировки может легко определить специалист в данной области.

Введение композиций вариантов осуществления изобретения можно осуществить при помощи любого из принятых способов введения веществ для аналогичных целей. Фармацевтические композиции вариантов осуществления изобретения могут быть сформулированы в виде препаратов в твердых, полутвердых, жидких или газообразных формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суспензии, суппозитории, инъекции, ингаляции, гели, микросферы и аэрозоли. Типичные пути введения таких фармацевтических композиций включают, без ограничения, пероральный, местный, трансдермальный, ингаляционный, парентеральный, сублингвальный, буккальный, ректальный, вагинальный и интраназальный. Термин парентеральный в контексте настоящей заявки включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, внутрикожные, внутригрудинные инъекции или методы инфузии. Фармацевтические композиции вариантов осуществления изобретения формулируют таким образом, чтобы позволить активным ингредиентам, содержащимся в них, быть биодоступными при введении композиции пациенту. Композиции, которые будут вводить субъекту или пациенту в некоторых вариантах осуществления, имеют форму одной или нескольких единиц дозирования, где, например, таблетка может быть отдельной единицей дозирования, а контейнер с соединением вариантов осуществления изобретения в аэрозольной форме может содержать множество единиц дозирования. Актуальные способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области; например, см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). В некоторых вариантах осуществления композиция, которую нужно вводить, в любом случае будет содержать терапевтически эффективное количество соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для лечения заболевания или состояния, представляющего интерес, в соответствии с положениями настоящего раскрытия.

Фармацевтическая композиция вариантов осуществления изобретения может быть в твердой или жидкой форме. В одном аспекте носитель(носители) представляет собой

частицы, так что композиции находятся, например, в форме таблеток или порошка. Носитель(носители) может быть жидким, при этом композиции представляют собой, например, пероральный сироп, жидкость для инъекций или аэрозоль, который можно использовать, например, для ингаляционного введения.

Когда фармацевтическая композиция некоторых вариантов осуществления предназначена для перорального введения, она предпочтительно находится либо в твердой, либо в жидкой форме, при этом полутвердые, полужидкие, суспензионные и гелевые формы включены в формы, рассматриваемые в настоящей заявке как твердые или жидкие.

В качестве твердой композиции для перорального введения фармацевтическая композиция некоторых вариантов осуществления может быть сформулирована в форму порошка, гранулы, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, облатки или т.п. Такая твердая композиция обычно будет содержать один или несколько инертных разбавителей или съедобных носителей. Кроме того, может присутствовать одно или несколько из следующих: связующие, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиенты, такие как крахмал, лактоза или декстрины, дезинтегрирующие агенты, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, примогель, кукурузный крахмал и т.д.; лубриканты, такие как стеарат магния или Sterotex; глиданты, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор; и краситель.

Когда фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления находится в форме капсулы, например желатиновой капсулы, она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления может быть в форме жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть для перорального введения или для доставки путем инъекции, в качестве двух примеров. Когда она предназначена для перорального введения, предпочтительная композиция содержит, помимо соединения структуры (I), один или несколько подсластителей, консервантов, красителей/красящих веществ и усилителей вкуса. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции, могут быть включены одно или несколько из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Жидкие фармацевтические композиции вариантов осуществления настоящего изобретения, будь то растворы, суспензии или другая подобная форма, могут включать один или несколько из следующих адъювантов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, физиологический раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические

моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза; агенты, действующие как криопротекторы, такие как сахароза или трегалоза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократных доз, изготовленные из стекла или пластика. Предпочтительным адьювантом является физиологический раствор. Фармацевтическая композиция для инъекций предпочтительно является стерильной.

Жидкая фармацевтическая композиция вариантов осуществления изобретения, предназначенная для парентерального или перорального введения, должна содержать такое количество соединения в соответствии с настоящим изобретением, чтобы можно было получить подходящую дозировку.

Фармацевтическая композиция вариантов осуществления изобретения может быть предназначена для местного введения, и в этом случае носитель может подходящим образом включать раствор, эмульсию, мазь или гелевую основу. Основа, например, может содержать один или несколько из следующих компонентов: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, а также эмульгаторы и стабилизаторы. В фармацевтической композиции для местного применения могут присутствовать загустители. Если композиция предназначена для трансдермального введения, она может включать трансдермальный пластырь или устройство для ионофореза.

Фармацевтическая композиция вариантов осуществления изобретения может быть предназначена для ректального введения, например, в форме суппозитория, который плавится в прямой кишке и высвобождает лекарственное средство. Композиция для ректального введения может содержать масляную основу в качестве подходящего не вызывающего раздражения эксципиента. Такие основы включают, без ограничения, ланолин, масло какао и полиэтиленгликоль.

Фармацевтическая композиция вариантов осуществления изобретения может включать различные вещества, которые модифицируют физическую форму твердой или жидкой единицы дозирования. Например, композиция может включать вещества, которые образуют покрывающую оболочку вокруг активных ингредиентов. Вещества, которые образуют оболочку покрытия, обычно инертны и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других энтеросолюбильных покрытий. Альтернативно, активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу.

Фармацевтическая композиция вариантов осуществления изобретения в твердой или жидкой форме может включать агент, который связывается с соединением по настоящему изобретению и тем самым способствует доставке соединения. Подходящие

агенты, которые могут действовать в этом качестве, включают моноклональные или поликлональные антитела или белок.

Фармацевтическая композиция вариантов осуществления изобретения может состоять из единиц дозирования, которые можно вводить в виде аэрозоля. Термин аэрозоль используется для обозначения множества систем, от систем коллоидной природы до систем, состоящих из аэрозольных упаковок. Доставка может осуществляться посредством сжиженного или сжатого газа или при помощи подходящей насосной системы, которая дозирует активные ингредиенты. Аэрозоли соединений вариантов осуществления изобретения могут доставляться в однофазных, двухфазных или трехфазных системах для доставки активного ингредиента(ингредиентов). Доставка аэрозоля включает необходимый контейнер, активаторы, клапаны, суб-контейнеры и т.д., которые вместе могут образовывать набор. Специалист в данной области без излишних экспериментальных работ сможет определить предпочтительные аэрозоли.

Фармацевтические композиции вариантов осуществления изобретения можно получить методами, хорошо известными в области фармацевтики. Например, фармацевтическую композицию, предназначенную для введения путем инъекции, можно получить путем объединения липидных наночастиц по настоящему изобретению со стерильной дистиллированной водой или другим носителем с образованием раствора. Поверхностно-активное вещество может быть добавлено для облегчения образования гомогенного раствора или суспензии. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют с соединением по настоящему изобретению, чтобы облегчить растворение или гомогенное суспендирование соединения в водной системе доставки.

Композиции вариантов осуществления изобретения или их фармацевтически приемлемые соли вводят в терапевтически эффективном количестве, которое будет варьироваться в зависимости от множества факторов, включая активность конкретного применяемого терапевтического средства; метаболическую стабильность и продолжительность действия терапевтического средства; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента; режим и время приема; скорость выведения; комбинацию лекарственных средств; тяжесть конкретного расстройства или состояния; и субъекта, проходящего терапию.

Композиции вариантов осуществления изобретения также можно вводить одновременно с введением, до или после введения одного или нескольких других терапевтических средств. Такая комбинированная терапия включает введение одной фармацевтической лекарственной формы композиции вариантов осуществления изобретения и одного или нескольких дополнительных активных веществ, а также введение композиции вариантов осуществления изобретения и каждого активного вещества в отдельной лекарственной форме. Например, композиция вариантов осуществления изобретения и другое активное вещество можно вводить пациенту вместе в одной пероральной дозированной композиции, такой как таблетка или капсула, или



каждое средство вводят в отдельных пероральных лекарственных формах. Если используют отдельные лекарственные формы, соединения вариантов осуществления изобретения и одно или несколько дополнительных активных веществ можно вводить по существу в одно и то же время, то есть одновременно или раздельно с разнесением по времени, то есть последовательно; подразумевается, что комбинированная терапия включает все эти схемы.

Способы получения вышеуказанных соединений и композиций описаны в настоящей заявке ниже и/или известны в данной области.

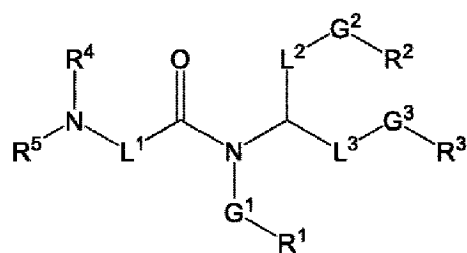
Специалистам в данной области будет понятно, что в описанном в настоящей заявке способе функциональные группы промежуточных соединений могут нуждаться в защите подходящими защитными группами. Такие функциональные группы включают гидроксильные, амино-, меркапто- и карбоновую кислоты. Подходящие защитные группы для гидроксильных включают триалкилсилил или диарилалкилсилил (например, *трет*-бутилдиметилсилил, *трет*-бутилдифенилсилил или триметилсилил), тетрагидропиранил, бензил и т.д. Подходящие защитные группы для амино-, амидино- и гуанидино- включают трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил и т.д. Подходящие защитные группы для меркапто- включают  $-C(O)-R''$  (где  $R''$  представляет собой алкил, арил или арилалкил), *пара*-метоксибензил, тритил и т.д. Подходящие защитные группы для карбоновой кислоты включают сложные алкиловые, ариловые или арилалкиловые эфиры. Защитные группы могут быть добавлены или удалены в соответствии со стандартными методами, которые известны специалистам в данной области, и в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке. Использование защитных групп подробно описано в Green, T.W. and P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3<sup>rd</sup> Ed., Wiley. Как будет понятно специалистам в данной области, защитная группа также может быть полимерной смолой, такой как смола Ванга, смола Ринка или 2-хлортритилхлоридная смола.

Специалистам в данной области также будет понятно, что, хотя такие защищенные производные соединений по настоящему изобретению могут не обладать фармакологической активностью как таковые, они могут быть введены млекопитающему, а затем метаболизироваться в организме с образованием соединений по настоящему изобретению, которые являются фармакологически активными. Таким образом, такие производные можно назвать "пролекарствами". Все пролекарства соединений по настоящему изобретению включены в объем раскрытия.

Кроме того, соединения вариантов осуществления изобретения, которые существуют в форме свободного основания или кислоты, могут быть преобразованы в их фармацевтически приемлемые соли путем обработки подходящим неорганическим или органическим основанием или кислотой способами, известными специалистам в данной области. Соли соединений вариантов осуществления изобретения могут быть преобразованы в форму их свободного основания или кислоты стандартными способами.

Следующая Общая схема реакций 1 представляет иллюстративные способы

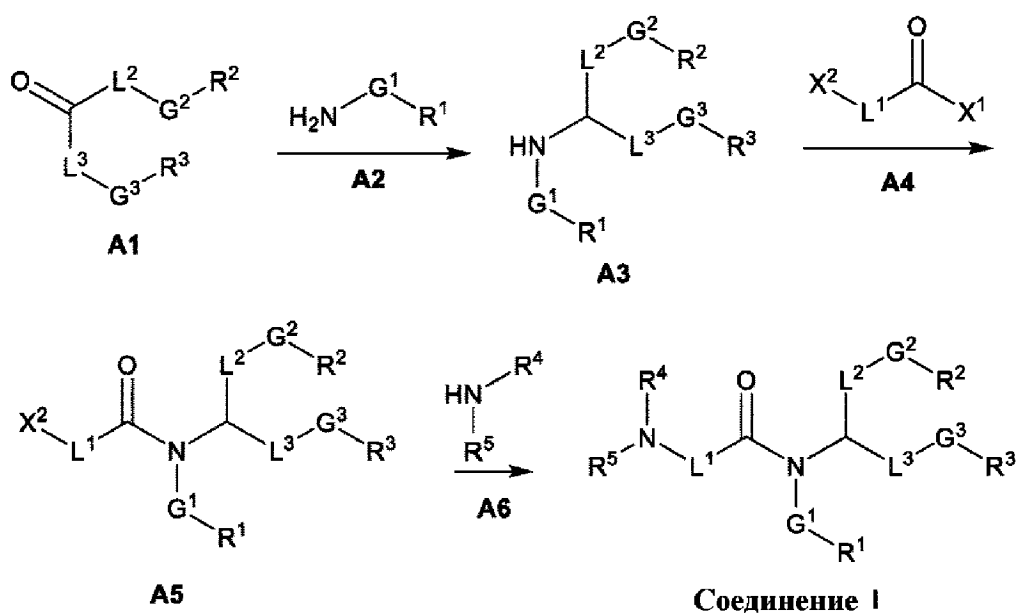
получения соединений по настоящему изобретению, *т.е.* соединений структуры (I):



(I)

или их фармацевтически приемлемой соли, таутомера или стереоизомера, где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $G^1$ ,  $G^2$  и  $G^3$  такие, как определены в настоящей заявке. Понятно, что специалист в данной области может получить эти соединения аналогичными способами или путем комбинирования других способов, известных специалисту в данной области. Также понятно, что специалист в данной области сможет получить способом, аналогичным описанному ниже, другие соединения структуры (I), конкретно не проиллюстрированные ниже, с использованием соответствующих исходных компонентов и изменением параметров синтеза по мере необходимости. Как правило, исходные компоненты могут быть получены из таких источников, как Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI и Fluorochem USA и т.д., или синтезированы на основании источников, известных специалистам в данной области (см., например, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th edition (Wiley, December 2000)), или получены, как описано в настоящем раскрытии.

#### ОБЩАЯ СХЕМА РЕАКЦИЙ 1



Общая схема реакций I обеспечивает иллюстративный способ получения соединений структуры (I).  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $G^1$ ,  $G^2$  и  $G^3$  в Общей схеме реакций I такие, как определены в настоящей заявке.  $X^1$  и  $X^2$  представляют собой

реакционноспособные группы, выбранные для облегчения желаемой реакции (например, галоген). Соединения структуры A1 приобретают или получают способами, известными в данной области. Взаимодействие A1 в подходящих восстанавливающих условиях (например, триацетоксиборгидрид натрия) дает продукт восстановительного аминирования между A1 и A2, A3. Затем A3 подвергают взаимодействию с A4 в подходящих щелочных условиях (например, с использованием триэтиламина и DMAP) с получением соединения A5. Затем A5 подвергают взаимодействию с амином A6, используя подходящие условия (например, нагревание), с получением соединения структуры (I), как показано.

Следует отметить, что обычным специалистам в данной области доступны различные альтернативные стратегии получения соединений структуры (I). Например, другие соединения структуры (I) могут быть получены аналогичными способами с использованием подходящего исходного вещества. Использование защитных групп по мере необходимости и другие модификации приведенной выше общей схемы реакций будут легко очевидны обычному специалисту в данной области.

Следующие ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения.

#### ПРИМЕР 1

Оценка люциферазной мРНК *in vivo* с использованием композиции липидных наночастиц

Липидные наночастицы получали и тестировали в соответствии с общими процедурами, описанными в публикациях РСТ №№ WO 2015/199952 и WO 2017/004143, полные описания которых включены в настоящую заявку в качестве ссылки. Вкратце, катионный липид, DSPC, холестерин и PEG-липид солибилизировали в этаноле при молярном отношении около 50:10:38,5:1,5 или около 47,5:10:40,8:1,7. Липидные наночастицы (LNP) получали при массовом отношении общего липида к мРНК приблизительно от 10:1 до 30:1. мРНК разбавляли до 0,2 мг/мл в 10-50 мМ цитратном или ацетатном буфере, pH 4. Шприцевые насосы использовали для смешивания этанольного липидного раствора с водным раствором мРНК в соотношении от около 1:5 до 1:3 (об/об) с общей скоростью потока более 15 мл/мин. Затем удаляли этанол и внешний буфер заменяли на PBS путем диализа. Наконец, липидные наночастицы фильтровали через стерильный фильтр с размером пор 0,2 мкм. Размер частиц липидных наночастиц составлял приблизительно 55-95 нм в диаметре, а в некоторых случаях приблизительно 70-90 нм в диаметре, как определено методом квазиупругого рассеяния света с использованием Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK).

Исследования осуществляли на самках мышей C57BL/6 возраста 6-8 недель (Charles River) или на мышях CD-1 (Harlan) возраста 8-10 недель (Charles River) в соответствии с руководящими принципами, установленными комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных (ACC) и Канадским советом по уходу за животными (CCAC). Различные дозы мРНК-липидных наночастиц вводили системно путем инъекции в хвостовую вену, и животных умерщвляли в определенный момент

времени (например, 4 часа) после введения. Печень и селезенку собирали в предварительно взвешенные пробирки, определяли массу, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до обработки для анализа.

Что касается печени, приблизительно 50 мг иссекали для анализа в пробирках FastPrep на 2 мл (MP Biomedicals, Solon OH).  $\frac{1}{4}$ " керамические сферы (MP Biomedicals) добавляли в каждую пробирку и 500 мкл буфера для лизиса Glo - GLB (Promega, Madison WI), уравновешенного до комнатной температуры, добавляли к ткани печени. Ткани печени гомогенизировали с использованием устройства FastPrep24 (MP Biomedicals) при  $2 \times 6,0$  м/с в течение 15 секунд. Гомогенат инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут перед разведением 1:4 в GLB и оценивали с использованием системы анализа люциферазы SteadyGlo (Promega). В частности, 50 мкл разбавленного гомогената ткани вводили в реакцию с 50 мкл субстрата SteadyGlo, встряхивали в течение 10 секунд с последующей 5-минутной инкубацией и затем количественно определяли с использованием люцинометра CentroXS<sup>3</sup> LB 960 (Berthold Technologies, Germany). Количество анализируемого белка определяли с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, Rockford IL). Затем относительные единицы люминесценции (RLU) нормализовали к общему количеству анализируемого белка в мкг. Для преобразования RLU в нг люциферазы строили стандартную кривую с использованием рекомбинантной люциферазы QuantiLum (Promega).

мРНК FLuc (L-6107 или L-7202) от Trilink Biotechnologies будет экспрессировать белок люциферазы, первоначально выделенный из светлячка *photinus pyralis*. FLuc обычно используют в культуре клеток млекопитающих для измерения как экспрессии генов, так и жизнеспособности клеток. Он излучает биолюминесценцию в присутствии субстрата люциферина. Эта кэпированная и полиаденилированная мРНК была полностью замещена в отношении уридиновых и/или цитидиновых нуклеозидов.

## ПРИМЕР 2

### Определение $pK_a$ сформулированных липидов

Как описано в другом разделе,  $pK_a$  сформулированных катионных липидов коррелирует с эффективностью LNP для доставки нуклеиновых кислот (см., Jayaraman et al, *Angewandte Chemie, International Edition* (2012), 51(34), 8529-8533; Semple et al, *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010)). Предпочтительный диапазон  $pK_a$  составляет от  $\sim 5$  до  $\sim 7$ .  $pK_a$  каждого катионного липида определяли в липидных наночастицах с использованием анализа, основанного на флуоресценции 2-(*p*-толуидино)-6-нафталинсульфоновой кислоты (TNS). Липидные наночастицы, включающие катионный липид/DSPC/холестерин/PEG-липид (50/10/38,5/1,5 моль%) в PBS при общей концентрации липидов 0,4 мМ, получали с использованием поточного процесса, как описано в Примере 1. TNS получали в виде 100 мкМ исходного раствора в дистиллированной воде. Везикулы разбавляли до 24 мкМ липида в 2 мл буферных растворов, содержащих 10 мМ HEPES, 10 мМ MES, 10 мМ ацетата аммония, 130 мМ NaCl, при этом pH составлял от 2,5 до 11. Аликвоту раствора TNS добавляли для

достижения конечной концентрации 1 мкМ и после перемешивания вихревым способом измеряли интенсивность флуоресценции при комнатной температуре на люминесцентном спектрофотометре SLM Aminco Series 2, используя длины волн возбуждения и испускания 321 нм и 445 нм. К данным флуоресценции применяли анализ с использованием сигмоидальной кривой наилучшего соответствия, и рКа измеряли как рН, вызывающий половину максимальной интенсивности флуоресценции.

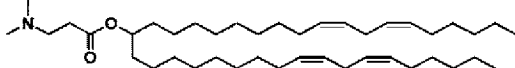
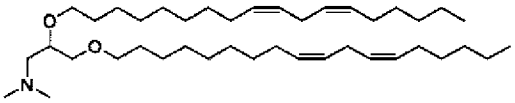
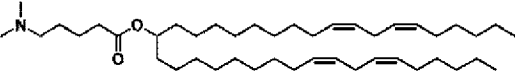
### ПРИМЕР 3

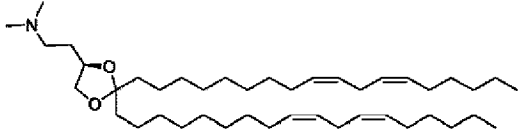
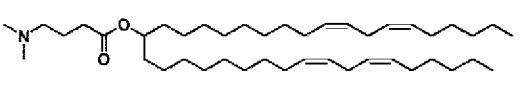
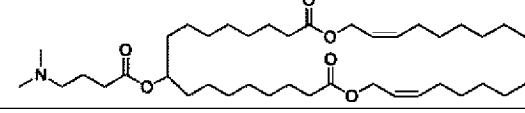
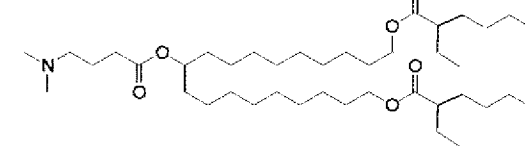
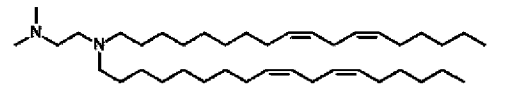
Определение эффективности композиций липидных наночастиц, содержащих различные катионные липиды, с использованием *in vivo* модели экспрессии мРНК люциферазы у грызунов

Катионные липиды, показанные ранее в Таблице 2, были протестированы с нуклеиновыми кислотами. Для сравнительных целей эти липиды также использовали для формулирования липидных наночастиц, содержащих FLuc мРНК (L-6107), с использованием метода последовательного смешивания, как описано в Примере 1 и в PCT/US10/22614, который полностью включен в настоящее раскрытие посредством ссылки. Липидные наночастицы формулировали с использованием следующего молярного соотношения: 50% Катионного липида/10% дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) / 38,5% Холестерина/1,5% PEG липида ("PEG-DMG", *т.е.* 1-(монометокси-полиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин, со средней молекулярной массой PEG равной 2000). В альтернативных вариантах осуществления катионный липид, DSPC, холестерин и PEG-липид формулируют в молярном соотношении приблизительно 47,5:10:40,8:1,7. Относительную активность определяли путем измерения экспрессии люциферазы в печени через 4 часа после введения путем инъекции в хвостовую вену, как описано в Примере 1. Активность сравнивали при дозах 0,3 и 1,0 мг мРНК/кг и выражали как нг люциферазы/г печени, измеренные через 4 часа после введения, как описано в Примере 1.

Таблица 2

Липиды сравнения, демонстрирующие активность с мРНК

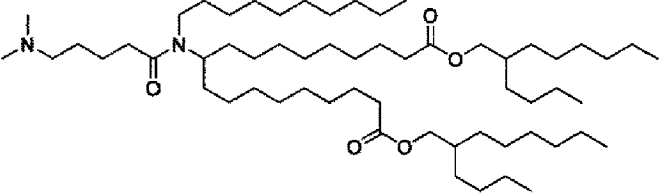
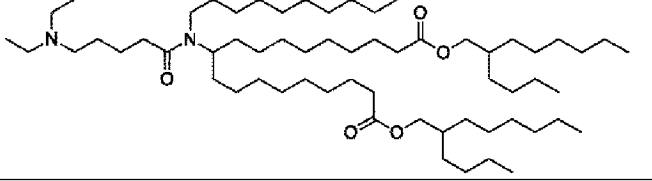
Соединение	люцифераза печени при дозе 0,3 мг/кг	люцифераза печени при дозе 1,0 мг/кг	Структура
MC2	4+1	не определяли	
DLinDMA	13+3	67+20	
MC4	41+10	не определяли	

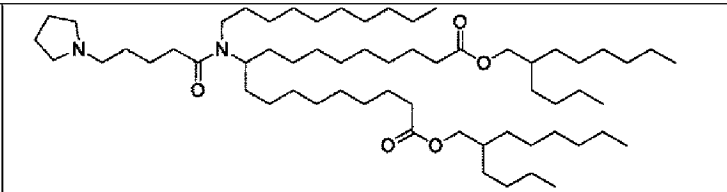
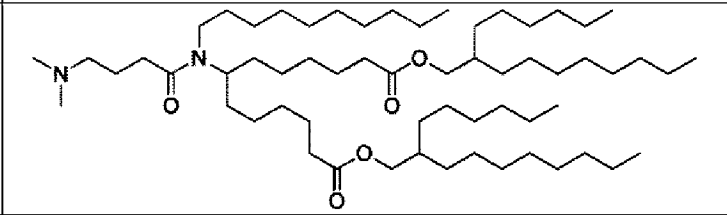
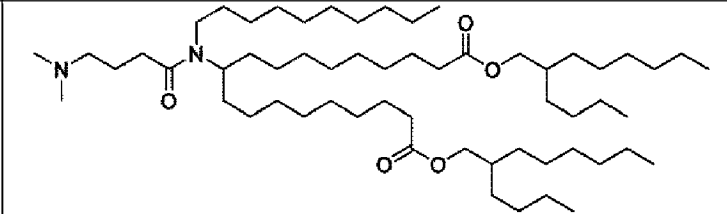
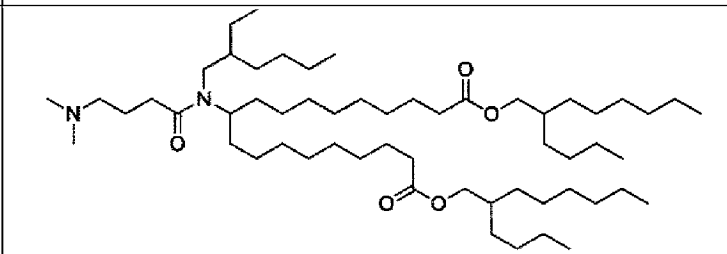
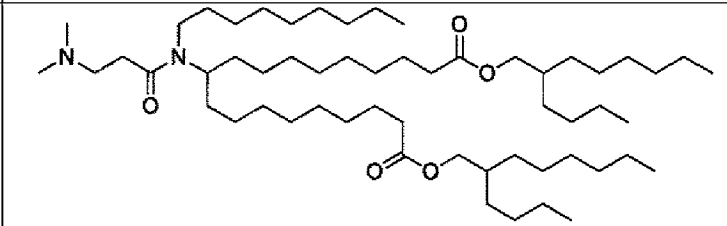
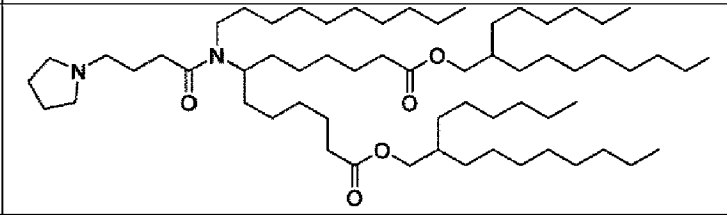
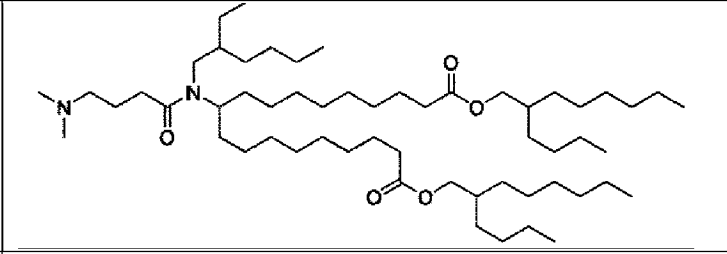
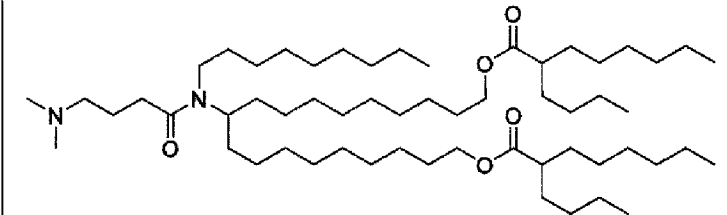
<b>XTC2</b>	80+28	237+99	
<b>MC3</b>	198+126	757+528	
<b>319 (2% PEG)</b>	258+67	681+203	
<b>137</b>	281+203	588+303	
<b>A</b>	77 ± 40	203 ± 122	

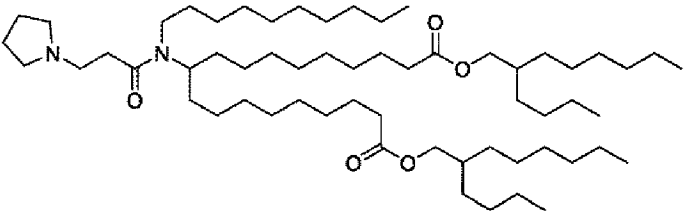
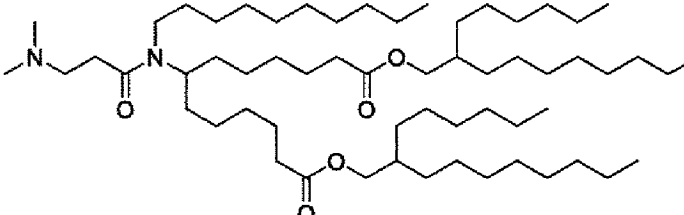
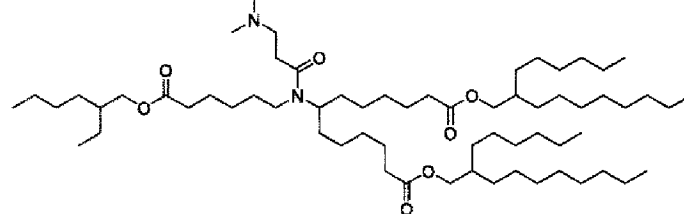
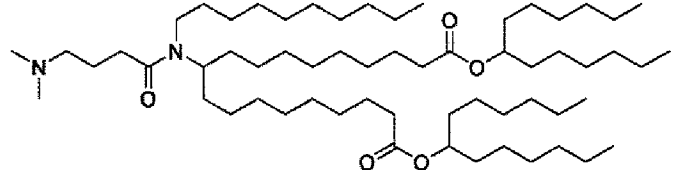
Репрезентативные соединения раскрытия, показанные в Таблице 3, формулировали с использованием следующего молярного соотношения: 50% катионного липида/10% дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) / 38,5% Холестерина/1,5% PEG липида ("PEG-DMA" 2-[2-( $\omega$ -метокси(полиэтиленгликоль<sub>2000</sub>)этокси]-N, N-дитетрадецилацетамид), или 47,5% катионного липида/10% DSPC/40,7% Холестерина/1,8% PEG липида. Относительную активность определяли путем измерения экспрессии люциферазы в печени через 4 часа после введения путем инъекции в хвостовую вену, как описано в Примере 1. Активность сравнивали при дозе 0,5 мг мРНК/кг и выражали как нг люцифераза/г печени, измеренные через 4 часа после введения, как описано в Примере 1. Номера соединений в Таблице 3 соотносятся с номерами соединений в Таблице 1.

Таблица 3

## Новые катионные липиды и связанная с ними активность

<b>№ соед.</b>	<b>pK<sub>a</sub></b>	<b>люцифераза печени при дозе 0,5 мг/кг (нг luc/г печени)</b>	<b>Структура</b>
I-7	6,74	2420 ± 1079	
I-8	6,68	7384 ± 1916	

I-9	6,83	2223 ± 777	
I-16	6,77	4678 ± 1243	
I-18	6,47	13301 ± 8071	
I-20	6,84	949 ± 628	
I-25	6,20	7904 ± 1778	
I-29	6,81	5551 ± 1650	
I-30	6,47	13614 ± 3348	
I-32	6,41	4091 ± 713	

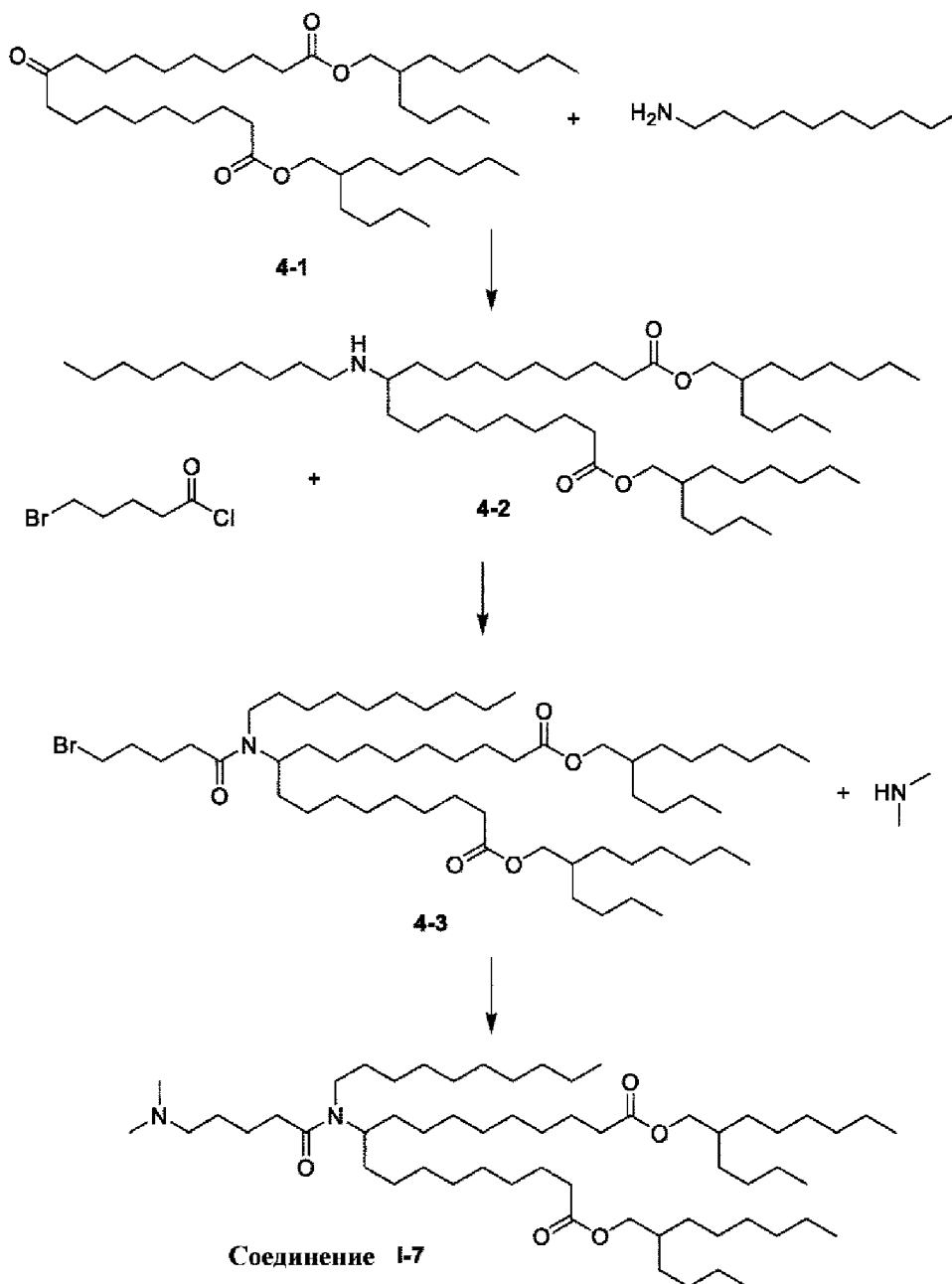
I-33	6,19	1304 ± 278	
I-35	6,39	14312 ± 4174	
I-36	6,55	10377 ± 1435	
I-37	6,30	15234 ± 5248	

## ПРИМЕР 4

Синтез бис(2-бутилоктил)  
(диметиламино)пентанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-7)

10-(N-децил-5-





### Синтез Соединения 4-2

Раствор кетона **4-1** (1,10 г, 1,62 ммоль) и 1-дециламина (2,43 ммоль, 382 мг, 0,486 мл) в DCE (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим добавлением триацетоксиборгидрида натрия (2,43 ммоль, 515 мг) и уксусной кислоты (2,43 ммоль, 146 мг; 0,138 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 2 дней реакционную смесь концентрировали. Остаток разбавляли смесью гексана и промывали разбавленным NaOH, насыщенным NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным солевым раствором. Органическую фазу отделяли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали (бесцветное масло, 1,41 г). Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc/Et<sub>3</sub>N, от 95:5:0 до 80:20:1). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (863 мг бесцветное масло, 1,05 ммоль, 65% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3,98 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,54 (т, 7,1 Гц, 2H),

2,43 (квинтет, 5,5 Гц, 1H), 2,30 (т, 7,5 Гц, 4H), 1,68-1,57 (м, 6H), 1,50-1,41 (м, 2H), 1,41-1,08 (70H), 0,92-0,86 (м, 15H), 0,86-0,77 (шир. 1H).

#### Синтез соединения 4-3

К перемешиваемому раствору 5-бромовалериановой кислоты (1,12 ммоль, 204 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 мл) при комнатной температуре добавляли раствор тионилхлорида (3,36 ммоль, 400 мг, 0,25 мл) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл) в течение 1 минуты с последующим добавлением DMF (прим. 16 мг). Смесь затем нагревали до кипения с обратным холодильником в течение 2 часов. Реакционную смесь затем концентрировали в вакууме. Хлорангидрид использовали непосредственно на следующей стадии.

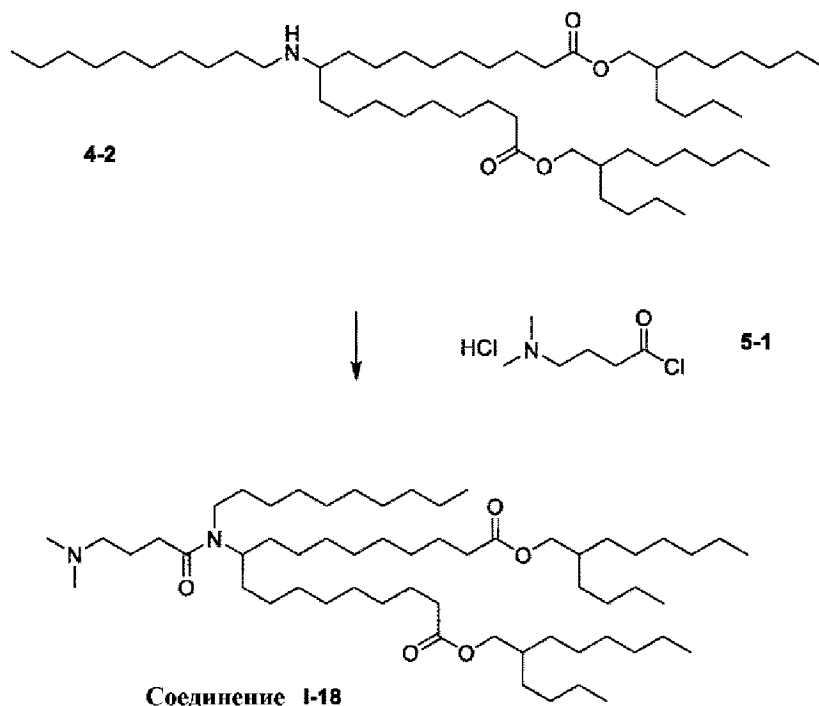
Раствор вышеуказанного 5-бромпентаноилхлорида в бензоле (5 мл) добавляли по каплям к раствору соединения **4-2** (230 мг, 0,28 ммоль) и триэтиламина (5,6 ммоль, 565 мг, 0,780 мл) и DMAP (5 мг) в бензоле (5 мл) при комнатной температуре в течение 2 минут. После добавления реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли метанол (1 мл) и смесь перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc, 98:2-85:15). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (250 мг, 0,25 ммоль, 91%, бесцветное масло).

#### Синтез соединения I-7

К соединению **4-2** (250 мг, 0,25 ммоль) добавляли диметиламин (2M в THF, 10 мл). Раствор перемешивали при 64°C в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через слой силикагеля и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало коричневатое масло (прибл. 233 мг). Неочищенный продукт (233 мг) очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-6% метанола в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде (194 мг, бесцветное масло, 0,20 ммоль, 82%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4,60-4,20 (шир., предполагаемый 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,97, 3,96 (2 набора дублетов, 5,8 Гц, 4H), 3,60 (квинтетопоподобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,06-2,99 (м, 2H), 2,34-2,24 (м, 8H), 2,21 (синглет, 6H), 1,72-1,56 (м, 8H), 1,56-1,37 (м, 8H), 1,37-1,10 (66H), 0,91-0,85 (м, 15H).

#### ПРИМЕР 5

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-децил-4-(диметиламино)бутанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-18)



#### Синтез соединения I-18, (Способ А)

К перемешиваемому раствору гидрохлорида 4-(диметиламино)масляной кислоты (1,12 ммоль, 188 мг) и DMF (10-20 мкл) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) при комнатной температуре добавляли оксалилхлорид (5,6 ммоль, 722 мг, 0,496 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь (темно-красную) концентрировали при пониженном давлении. Полученный хлорангидрид (твердое вещество кирпично-красного цвета) использовали непосредственно на следующей стадии.

Раствор вышеуказанного ацилхлорида в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) добавляли по каплям к раствору соединения **4-2** (230 мг, 0,28 ммоль) и триэтиламина (5,6 ммоль, 565 мг, 0,780 мкл) и DMAP (5 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc/Et<sub>3</sub>N, от 80:20:0,1 до 75:25:1) и далее очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% метанол в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде (92 мг, бесцветное масло, 0,10 ммоль, 35%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4,57-4,29 (шир. 0,4H), 3,97, 3,96 (2 набора дублетов, 5,8 Гц, 5,8 Гц, 4H), 3,63 (квинтетоподобный, 6,8 Гц, 0,6H), 3,06-3,00 (м, 2H), 2,35-2,26 (м, 8H), 2,213, 2,211 (2 набора синглетов, 6H), 1,82 (секстетоподобный, 7,6 Гц, 2H), 1,65-1,56 (м, 6H), 1,54-1,48 (м, 2H), 1,47-1,37 (м, 4H), 1,36-1,06 (66H), 0,91-0,86 (м, 15H).

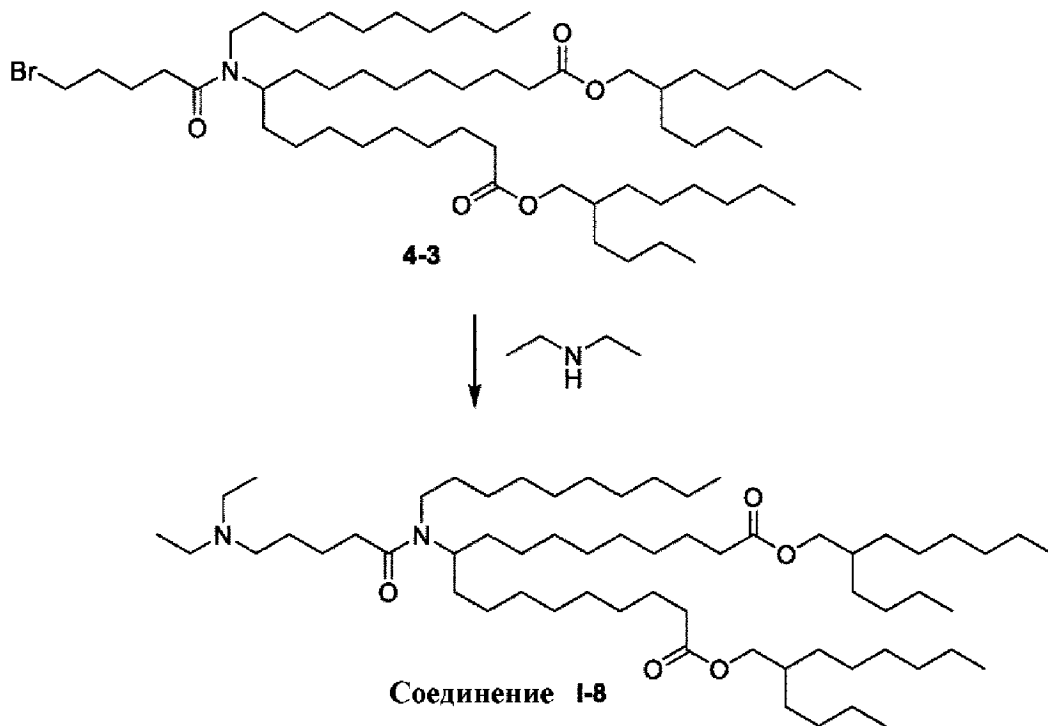
#### Синтез соединения I-18, (Способ В)

К раствору гидрохлорида 4-диметиламиномасляной кислоты (2 эквив., 3,04 ммоль, 510 мг) и 4-диметиламинопиридина (3 эквив., DMAP, 4,56 ммоль, 557 мг) в ацетонитриле (30 мл) добавляли DCC (2,2 эквив., 3,34 ммоль, 690 мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Добавляли раствор соединения **4-2** (1,25 г, 1,52

ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 мл) и полученную смесь перемешивали в течение ночи. На следующий день добавляли еще DCC (450 мг) и смесь перемешивали еще один день. Смесь затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало бесцветное масло. Продукт дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% метанола в хлороформе со следовым количеством  $\text{Et}_3\text{N}$ ). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (1,14 г, 81%).

#### ПРИМЕР 6

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-децил-5-(диэтиламино)пентанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-8)

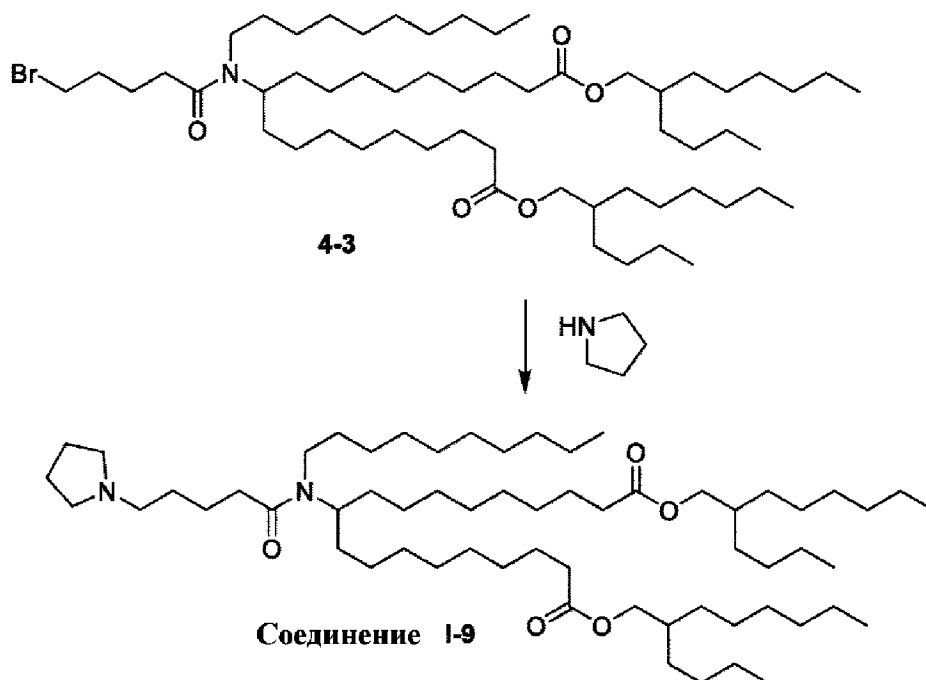


#### Синтез соединения I-8

Смесь соединения **4-3** (179 мг, 0,18 ммоль), диэтиламина (0,90 ммоль, 66 мг, 0,093 мл), N, N-диизопропилэтиламина (0,36 ммоль, 46 мг, 0,063 мл) в ацетонитриле (6 мл) герметично закрывали и нагревали при  $83^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Реакционную смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через слой силикагеля и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало коричневатое масло (153 мг). Неочищенный продукт (233 мг) очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-6% MeOH в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде (136 мг, бесцветное масло, 0,14 ммоль, 77%).

#### ПРИМЕР 7

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-децил-5-(пирролидин-1-ил)пентанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-9)

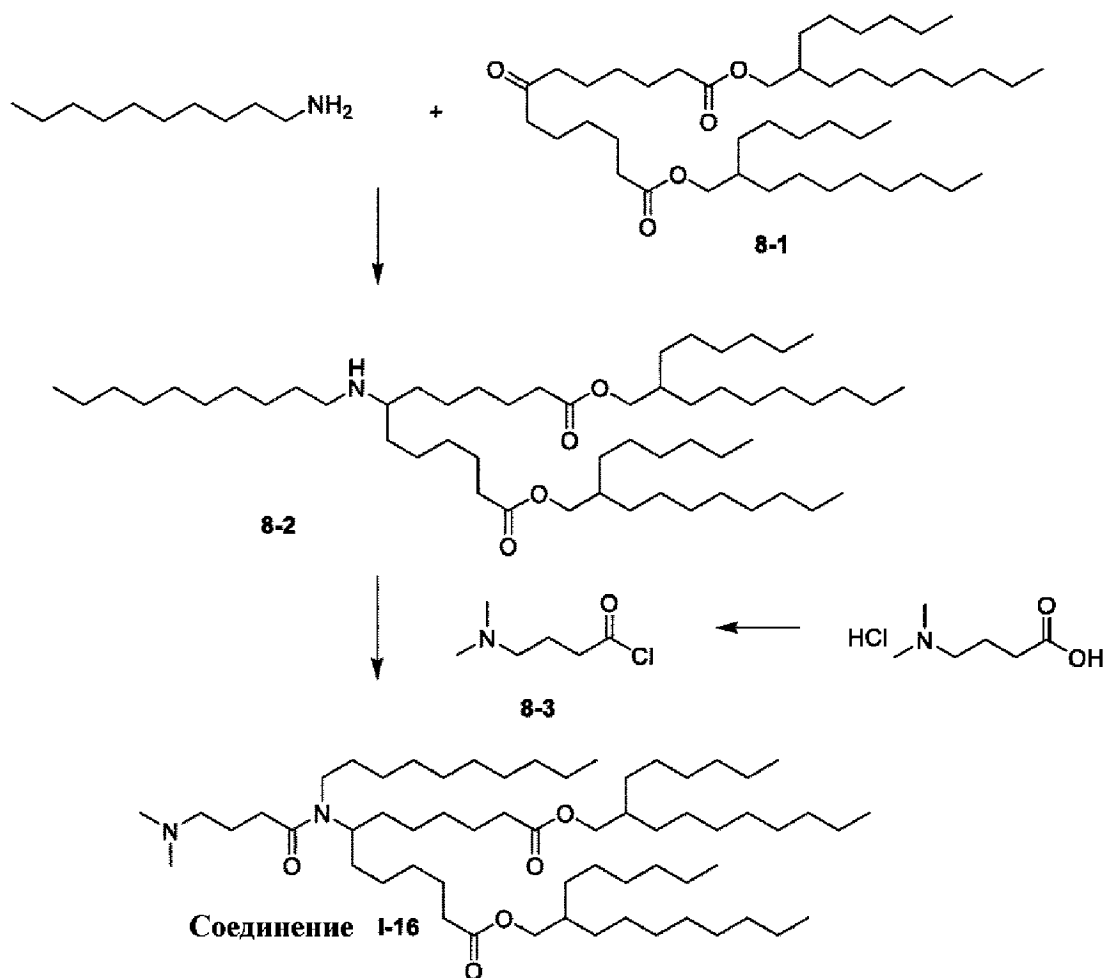


### Синтез соединения I-9

Смесь соединения **4-3** (200 мг, 0,20 ммоль), пирролидина (50 экв. 0,83 мл, 10 ммоль) в THF (10 мл) герметично закрывали и нагревали при 64°C в течение 24 часов. Реакционную смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через слой силикагеля и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало коричневатое масло. Неочищенный продукт (233 мг) очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-6% MeOH в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде (158 мг, бесцветное масло, 0,16 ммоль, 80%).

### ПРИМЕР 8

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-(N-децил-4-(диметиламино)бутанамидо)тридекандиоата (Соединение I-16)



### Синтез 8-2

Раствор соединения **8-1** (1 экв., 1,15 г, 1,62 ммоль) и 1-дециламина (1,5 экв., 2,43 ммоль, 382 мг, 0,486 мл) в DCE (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 15 мин. К раствору добавляли триацетоксиборгидрид натрия (1,5 экв., 2,43 ммоль, 515 мг) и AcOH (1,5 экв., 2,43 ммоль, 146 мг, 0,14 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней. Реакционную смесь затем концентрировали. Остаток разбавляли смесью гексан/EtOAc (99:1) и промывали разбавленным раствором NaOH, насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным соевым раствором. Органический экстракт сушили над сульфатом натрия и выливали на короткую колонку с силикагелем. Колонку элюировали смесью гексана, EtOAc и Et<sub>3</sub>N (95:5:0-80:20:1). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и концентрировали. Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (1,28 г, 1,51 ммоль, 93%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3,97 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,53 (т, 7,2 Гц, 2H), 2,43 (квинтетопоподобный, 5,5 Гц, 1H), 2,30 (т, 7,5 Гц, 4H), 1,68-1,57 (м, 6H), 1,49-1,40 (м, 2H), 1,40-1,08 (74H), 0,91-0,85 (м, 15H), 0,83-0,74 (шир. 1H).

### Синтез соединения I-16

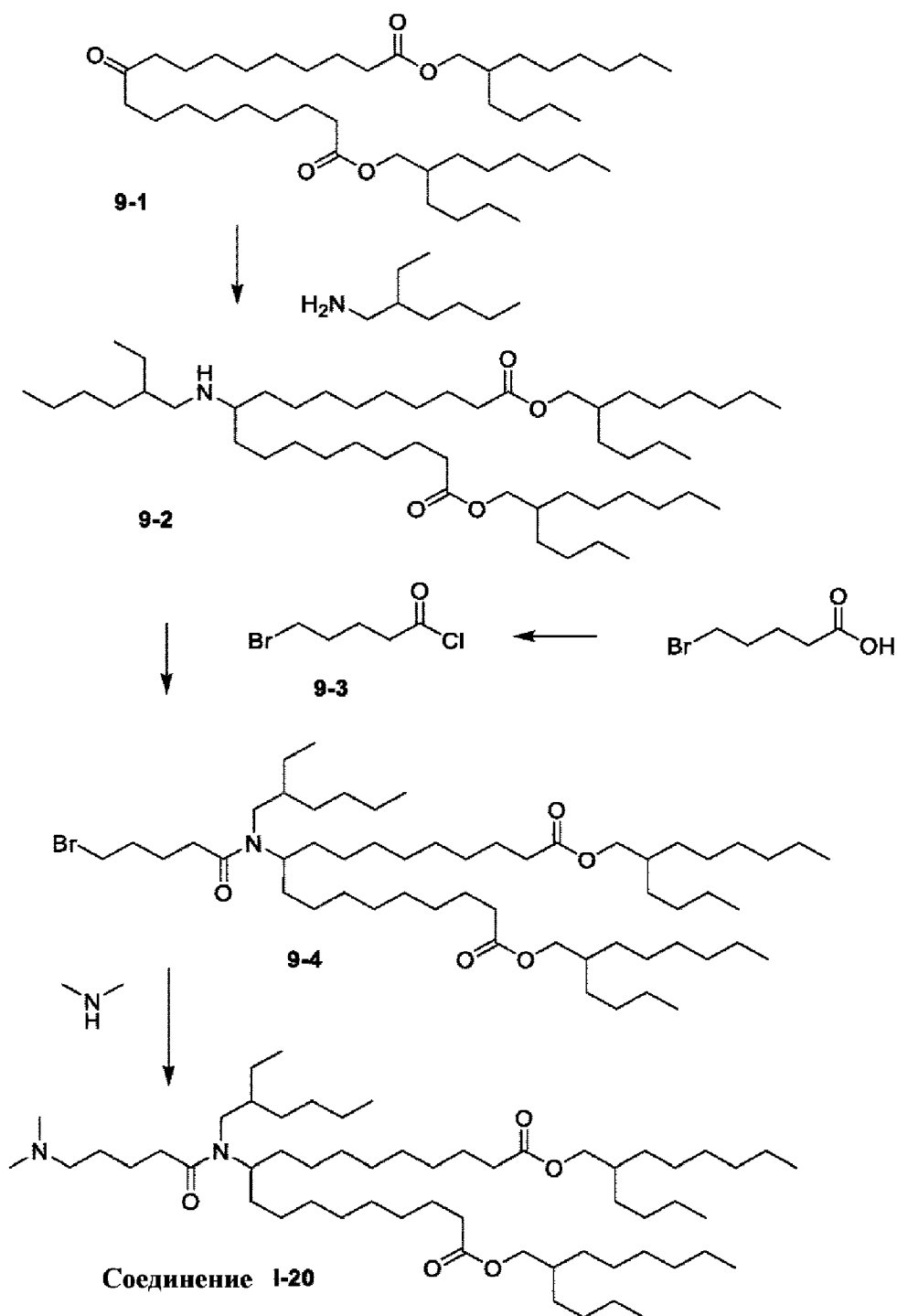
К перемешиваемому раствору гидрохлорида 4-(диметиламино)масляной кислоты (2,1 ммоль, 352 мг) и DMF (прибл. 13 мг) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 мл) при комнатной температуре добавляли оксалилхлорид (3 экв., 6,3 ммоль, 800 мг, 0,55 мл) в атмосфере Ar. Полученную

смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь (светло-оранжевый раствор) концентрировали в вакууме. Полученный хлорангидрид кислоты (**8-3**, светло-коричневое твердое вещество) использовали непосредственно для следующей реакции.

Раствор вышеуказанного хлорангидрида кислоты в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) добавляли к раствору соединения **8-2** (300 мг, 0,35 ммоль) и триэтиламина (10,5 ммоль, 1,06 г, 1,5 мл) и DMAР (5 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл) при комнатной температуре. После добавления реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования смеси продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (гексан, EtOAc и  $\text{Et}_3\text{N}$ , от 80:20:0,1 до 70:30:1) и продукт дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде слегка желтого масла (110 мг, 0,11 ммоль, 32%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$  при 7,26 м.д.)  $\delta$ : 4,57-4,34 (шир. 0,4H), 3,98-3,94 (м, 4H), 3,64 (квинтетоподобный, 6,8 Гц, 0,6H), 3,06-3,00 (м, 2H), 2,35-2,25 (м, 8H), 2,213, 2,210 (2 набора синглетов, 6H), 1,82 (секстетоподобный, 7,4 Гц, 2H), 1,65-1,56 (м, 6H), 1,54-1,48 (м, 2H), 1,48-1,37 (м, 4H), 1,37-1,06 (70H), 0,91-0,86 (м, 15H).

#### ПРИМЕР 9

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(4-(диметиламино)-N-(2-этилгексил)бутанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-20)



### Синтез 9-2

Раствор соединения **9-1** (1 экв., 0,82 г, 1,21 ммоль) и 2-этил-1-гексиламина (1,5 экв., 1,81 ммоль, 234 мг) в DCE (8 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 15 мин. К раствору добавляли триацетоксиборгидрид натрия (1,5 экв., 1,81 ммоль, 384 мг) и AcOH (1,5 экв., 1,81 ммоль, 109 мг). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней. Реакционную смесь затем концентрировали. Остаток разбавляли гексаном и EtOAc (прибл. 99:5) и промывали разбавленным NaOH, насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным солевым раствором. Экстракт фильтровали через короткую



колонку с силикагелем. Колонку промывали смесью гексана и EtOAc (95:5) и затем смесью гексана, EtOAc и Et<sub>3</sub>N (80:20:0,5). Фильтрат последней промывки концентрировали досуха. Это давало чистый продукт в виде бесцветного масла (888 мг, 1,12 ммоль, 93%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3,98 (д, 5,8 Гц, 4H), 2,45 (д, 5,1 Гц, 2H), 2,39 (квинтетоподобный, 5,5 Гц, 1H), 2,30 (т, 7,5 Гц, 4H), 1,68-1,57 (м, 6H), 1,41-1,08 (65H), 0,92-0,85 (м, 18H), 0,84-0,78 (шир. 1H).

#### Синтез 9-4

К перемешиваемому раствору 5-бромовалериановой кислоты (2,24 ммоль, 405 мг) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 мл) при комнатной температуре медленно добавляли раствор тионилхлорида (3 экв. 6,72 ммоль, 800 мг, 0,49 мл) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 мл) в течение 1 мин. DMF (две крошечные капли, около 16 мг) добавляли к реакционной смеси. Смесь затем нагревали до кипения с обратным холодильником в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Полученный хлорангидрид кислоты **9-3** использовали непосредственно на следующей стадии.

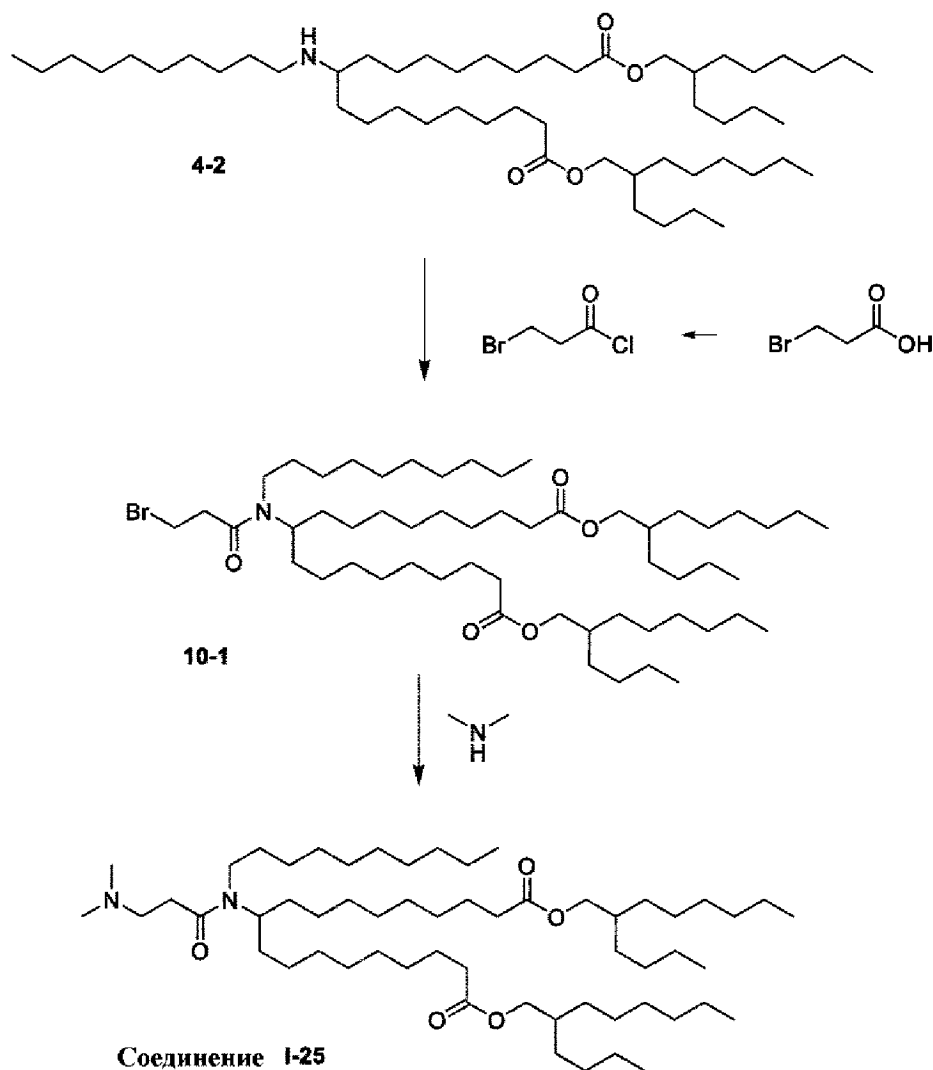
Раствор вышеуказанного 5-бромпентаноилхлорида в бензоле (8 мл) добавляли к раствору соединения **9-2** (444 мг, 0,56 ммоль) и триэтиламина (1,56 мл) и DMAP (5 мг) в бензоле (5 мл) при комнатной температуре в течение 2 мин. После добавления смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После выпаривания растворителей в вакууме продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc, 99:1-90:10). Желаемый продукт был достаточно чистым для следующей стадии (бесцветное масло, 527 мг, 0,55 ммоль, 98%).

#### Синтез соединения I-20

В колбу под давлением, содержащую соединение **9-4** (260 мг, 0,27 ммоль), добавляли диметиламин (2М в THF, 10 мл). Раствор перемешивали при 64°C (температура масляной бани) в течение ночи. Избыток амина и растворитель выпаривали. Остаток растворяли в смеси этилацетата и гексана (95:5) и фильтровали через подушку силикагеля. Подушку промывали смесью гексана и EtOAc (95:5) и затем смесью гексана, EtOAc и Et<sub>3</sub>N (80:20:1). Фильтрат последней промывки концентрировали досуха. Это давало неочищенный продукт в виде коричневого масла (233 мг). Неочищенный продукт дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (204 мг, 0,22 ммоль, 82%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub> при 7,27 м.д.) δ: 3,97 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,66-3,57 (м, прим. 1H), 3,19-2,99 (2 набора пиков, 2H), 2,38-2,24 (м, 8H), 2,22 (синглет, 6H), 1,72-1,37 (м, 15H), 1,37-1,10 (60H), 0,91-0,85 (м, 18H).

#### ПРИМЕР 10

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(3-(диметиламино)-N-нонилпропанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-25)



### Синтез 10-1

К раствору 3-бромпропионовой кислоты (2,02 ммоль, 311 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл) и DMF (0,01 мл) добавляли оксалилхлорид (5,05 ммоль, 641 мг, 0,44 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь затем концентрировали в вакууме. Остаточную жидкость/твердое вещество (желтое) растворяли в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и добавляли к раствору соединения **4-2** (833 мг, 1,02 ммоль) и триэтиламина (5,05 ммоль, 0,7 мл) и DMAP (5 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) при комнатной температуре в течение 4 мин. После добавления смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После выпаривания растворителей в вакууме продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/ $\text{EtOAc}$ , 99:1-90:10). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (794 мг, 0,83 ммоль, 81%).

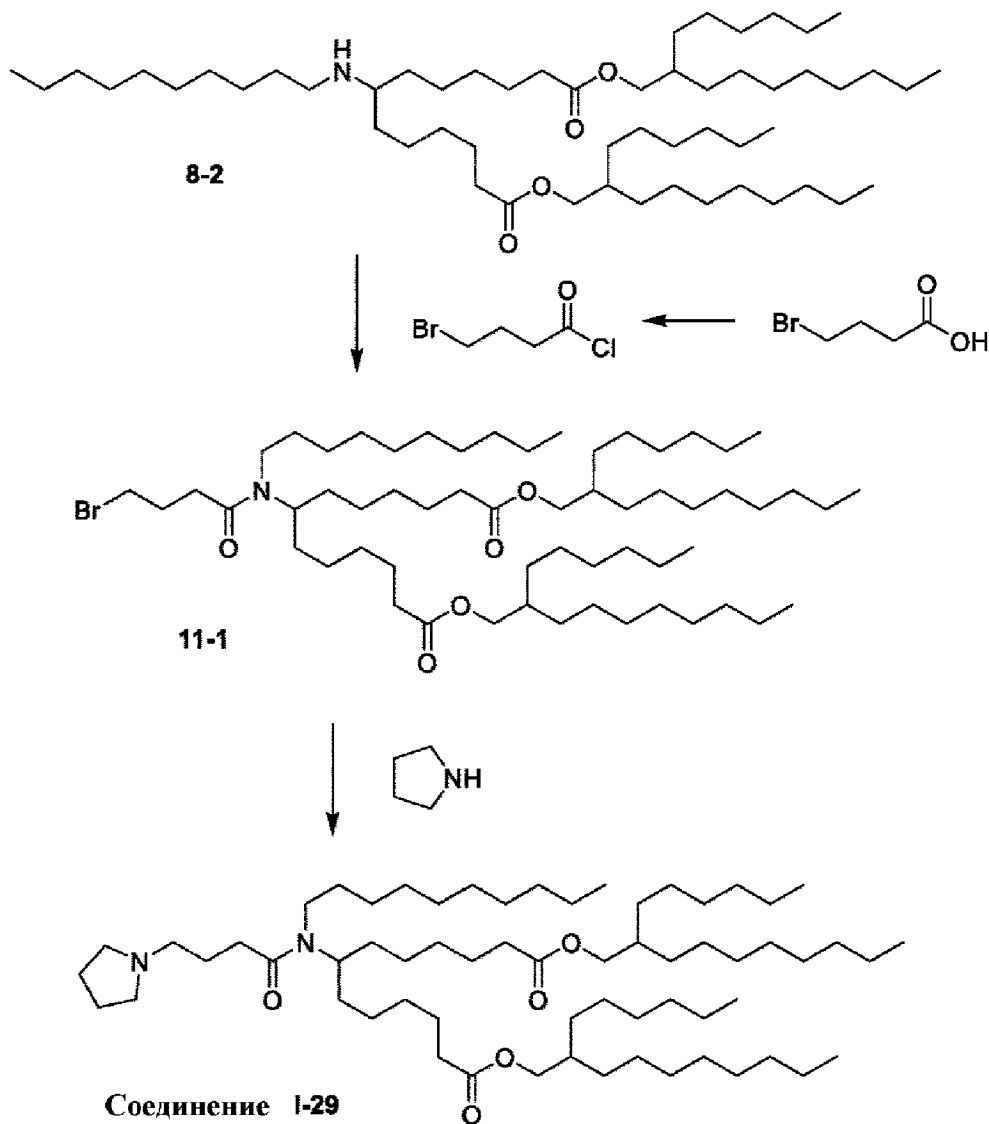
### Синтез соединения 1-25

Смесь соединения **10-1** (283 мг, 0,30 ммоль) и диметиламина (2М в THF, 12 мл) в колбе под давлением перемешивали при  $68^\circ\text{C}$  (температура масляной бани) в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через слой силикагеля и промывали той же

смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало коричневатое масло (302 мг). Неочищенный продукт (302 мг) очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством Et<sub>3</sub>N). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (169 мг, 0,18 ммоль, 61%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub> при 7,26) δ: 4,50-4,31 (шир., предполагаемый 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,97 (плечевидный дублет, 5,8 Гц, 4H), 3,60 (квинтетоподобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,07-3,00 (м, 2H), 2,65 (кв-подобный, 7,6 Гц, 2H), 2,48 (кв-подобный, 7,6 Гц, 2H), 2,29 (плечевидный триплет, 7,6 Гц, 4H), 2,26, 2,25 (2 набора синглетов, 6H), 1,66-1,56 (м, 6H), 1,56-1,48 (м, 2H), 1,48-1,37 (м, 4H), 1,37-1,10 (66H), 0,91-0,85 (м, 15H).

### ПРИМЕР 11

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-(N-децил-4-(пирролидин-1-ил)бутанамидо)тридекандиоата (Соединение I-29)



### Синтез 11-1

К раствору 4-броммасляной кислоты (0,97 ммоль, 161 мг) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 мл) и DMF (0,01 мл) добавляли оксалилхлорид (3 экв., 2,91 ммоль, 370 мг, 0,25 мл) при комнатной

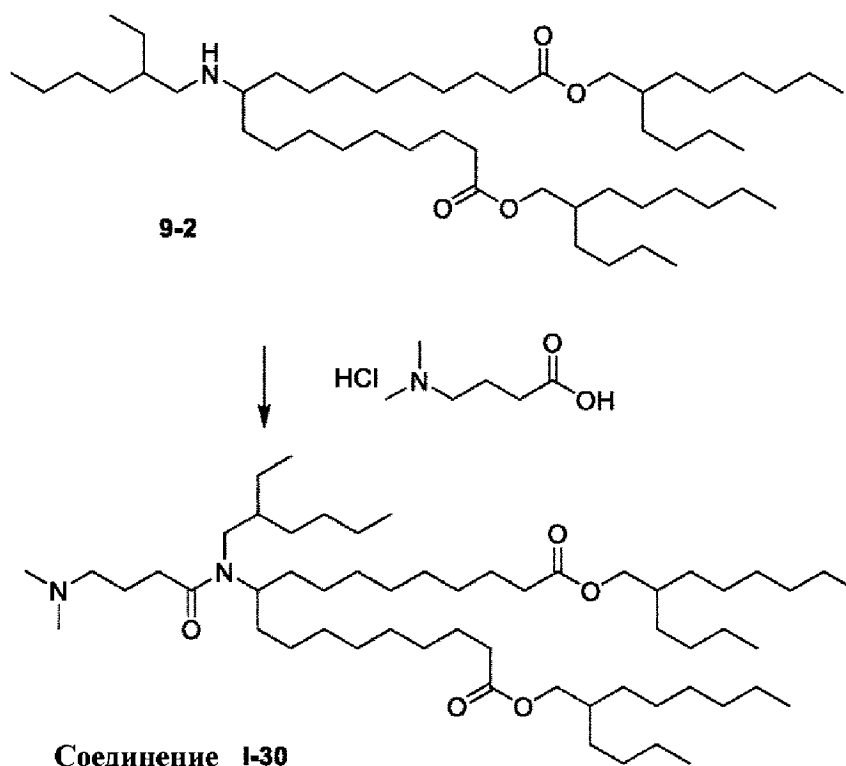
температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь затем концентрировали в вакууме. Остаточную жидкость/твердое вещество (слегка желтое) растворяли в 5 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и добавляли раствор соединения **8-2** (410 мг, 0,48 ммоль), триэтиламина (0,4 мл) и DMAP (2 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл) при комнатной температуре в течение 2 мин. После добавления полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 час. ТСХ (Гексан/Этилацетат=9:1) показала два основных пятна. Реакционную смесь затем концентрировали при комнатной температуре при пониженном давлении. Остаток использовали для следующей реакции без какой-либо очистки.

#### Синтез соединения I-29

Вышеуказанный остаток, содержащий соединение **11-1**, растворяли в смеси пирролидина (2,10 мл, 25 ммоль) и THF (15 мл). Смесь переносили в колбу под давлением и нагревали при  $68^\circ\text{C}$  в течение ночи. Смесь охлаждали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало желтое масло/твердое вещество. Неочищенный продукт (300 мг) очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0% - 10% MeOH и 0% - 0,5%  $\text{Et}_3\text{N}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Желаемый продукт получали в виде желтого масла (215 мг). Продукт (215 мг) дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (162 мг, 0,16 ммоль, 34%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$  при 7,26 м.д.)  $\delta$ : 4,57-4,34 (шир. 0,4H), 3,98-3,94 (м, 4H), 3,64 (квинтетоподобный, 6,8 Гц, 0,6H), 3,06-3,00 (м, 2H), 2,51-2,44 (м, 6H), 2,37-2,21 (м, 6H), 1,86 (секстетоподобный, 7,6 Гц, 2H), 1,80-1,71 (м, 4H), 1,65-1,48 (м, 8H), 1,48-1,37 (м, 4H), 1,37-1,06 (70H), 0,91-0,86 (м, 15H).

#### ПРИМЕР 12

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(4-(диметиламино)-N-(2-этилгексил)бутанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-30)

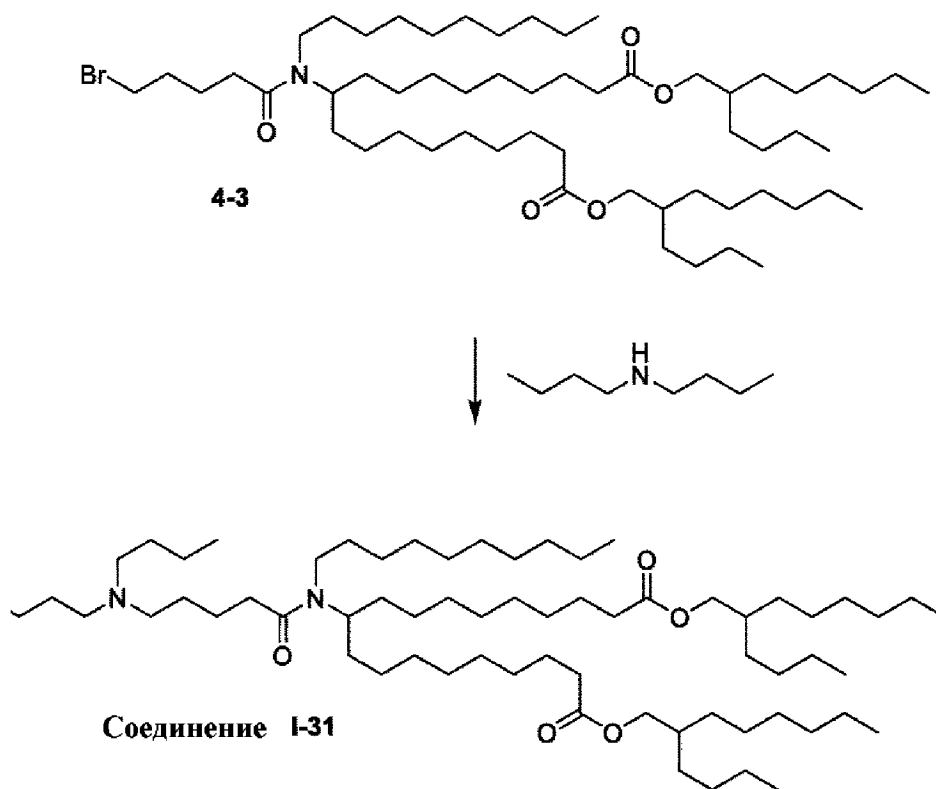


### Синтез соединения I-30

К раствору гидрохлорида 4-диметиламиномасляной кислоты (0,50 ммоль, 85 мг) и 4-диметиламинопиридина (3 эквив., DMAP, 0,75 ммоль, 92 мг) в ацетонитриле (5 мл) добавляли DCC (1,1 ммоль  $\times$  2, 226, мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Раствор соединения **9-2** (160 мг, 0,20 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 мл) добавляли к реакционной смеси и полученную смесь перемешивали в течение уик-энда. Добавляли еще DCC (135 мг) и перемешивали еще один день. По данным анализа ТСХ никакого прогресса не наблюдалось. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана и EtOAc (прибл. 99:5) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем. Колонку промывали смесью гексана и EtOAc (95:5) и затем смесью гексана, EtOAc и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1). Фильтрат последней промывки концентрировали досуха (133 мг). Неочищенный продукт (133 мг) дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством  $\text{Et}_3\text{N}$ ). Желаемый продукт получали в виде (48 мг, бесцветное масло, 0,053 ммоль, 27%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$  при 7,27 м.д.)  $\delta$ : 3,97 (д, 5,8 Гц, 4H), 3,70-3,60 (м, ~ 1H), 3,19-2,99 (2 набора пиков, 2H), 2,39-2,25 (м, 8H), 2,22 (синглет, 6H), 1,86-1,76 (м, 2H), 1,72-1,37 (м, ~ 11H), 1,37-1,10 (60H), 0,91-0,85 (м, 18H).

### ПРИМЕР 13

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-децил-5-(дибутиламино)пентанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-31)

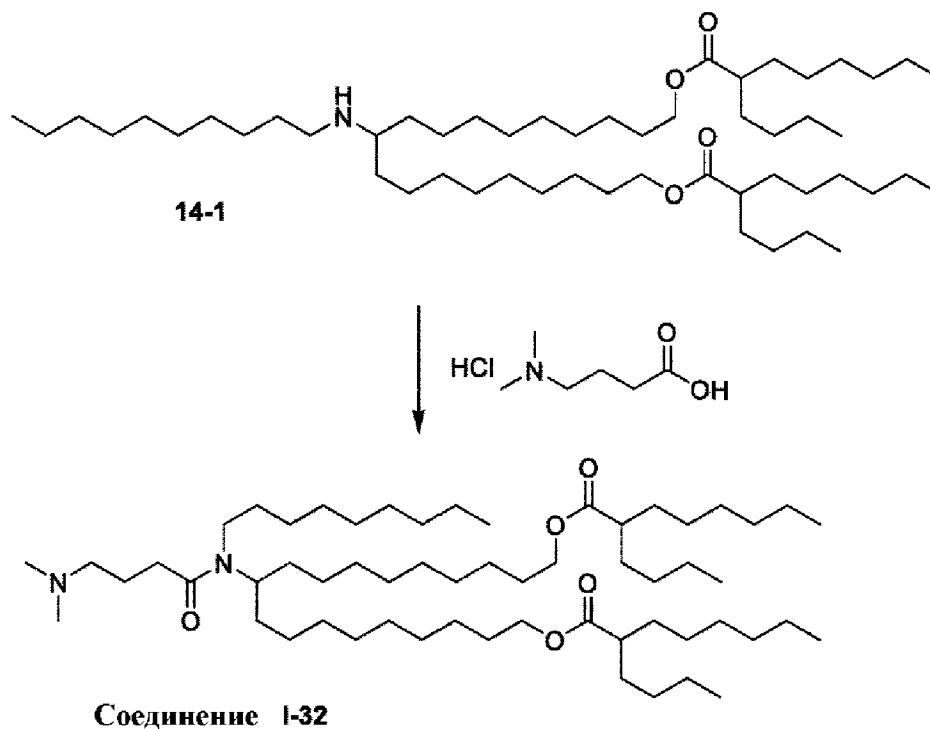


### Синтез соединения I-31

Смесь соединения **4-3** (284 мг, 0,29 ммоль), THF (10 мл), йодида натрия (5 мг) и дибутиламина (10 ммоль, 1,29 г, 1,68 мл) в колбе под давлением перемешивали при 78°C в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через слой силикагеля и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало коричневатое масло (продукт и дибутиламин). Масло разбавляли гексаном и дважды промывали разбавленным водным раствором HCl (0,5 М), насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным соевым раствором и сушили сульфатом натрия. Экстракт концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт (309 мг) очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством Et<sub>3</sub>N). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (216 мг, 0,21 ммоль, 72%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,50-4,35 (шир., предполагаемый 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,97, 3,96 (2 набора дублетов, 5,8 Гц, 4H), 3,61 (квинтетопоподобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,07-2,99 (м, 2H), 2,45-2,36 (м, 6H), 2,34-2,27 (м, 6H), 1,70-1,56 (м, 8H), 1,56-1,36 (м, 12H), 1,37-1,10 (70 H), 0,97-0,85 (м, 21H).

### ПРИМЕР 14

Синтез 10-(4-(диметиламино)-N-нонилбутанамида)нонадекан-1,19-диил бис(2-бутилоктаноат) (Соединение I-32)

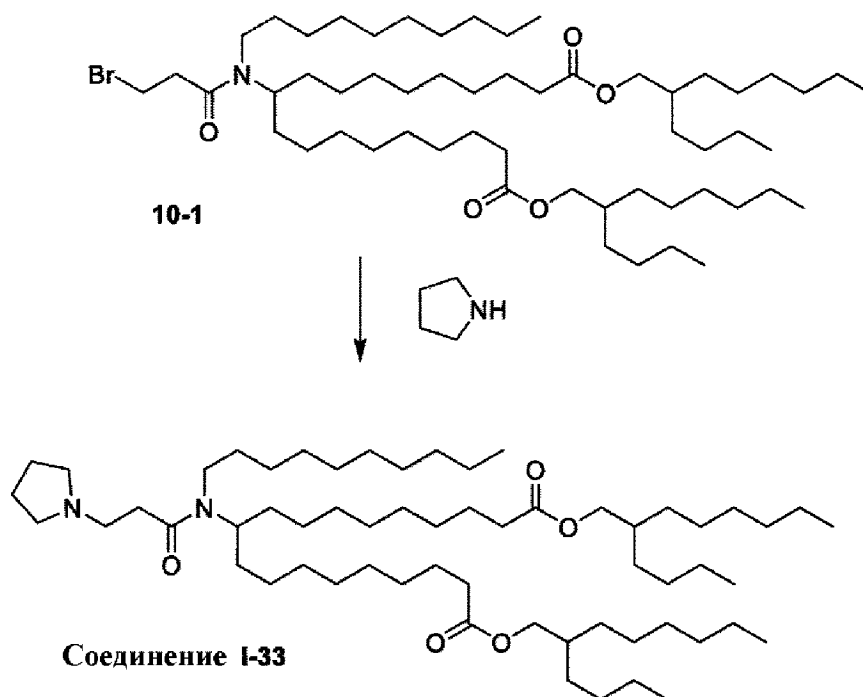


### Синтез соединения I-32

К раствору гидрохлорида 4-диметиламиномасляной кислоты (2 эквив., 1,08 ммоль, 181 мг) и 4-диметиламинопиридина (3 эквив., DMAP, 1,62 ммоль, 198 мг) в ацетонитриле (10 мл) добавляли DCC (2,2 эквив., 1,18 ммоль, 245 мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Затем добавляли раствор соединения **14-1** (442 мг, 0,54 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 мл). Полученную смесь перемешивали в течение ночи. Добавляли еще DCC (140 мг) и смесь перемешивали еще один день. Смесь затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало желтое масло (381 мг). Неочищенный продукт (381 мг) очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством Et<sub>3</sub>N). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (345 мг, 0,38 ммоль, 70%).  
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub> при 7,26 м.д.) δ: 5,30-4,34 (шир., 0,3H), 4,061, 4,056 (два набора триплетов, 6,7 Гц, 4H), 3,64 (квинтетопоподобный, 6,8 Гц, 0,7H), 3,07-3,01 (м, 2H), 2,35-2,26 (м, 6H), 2,214, 2,211 (два набора синглетов, 6H), 1,82 (секстетоподобный, 7,6 Гц, 2H), 1,65-1,48 (м, 10H), 1,48-1,37 (м, 8H), 1,37-1,02 (60H), 0,90-0,85 (м, 15H).

### ПРИМЕР 15

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-децил-3-(пирролидин-1-ил)пропанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-33)



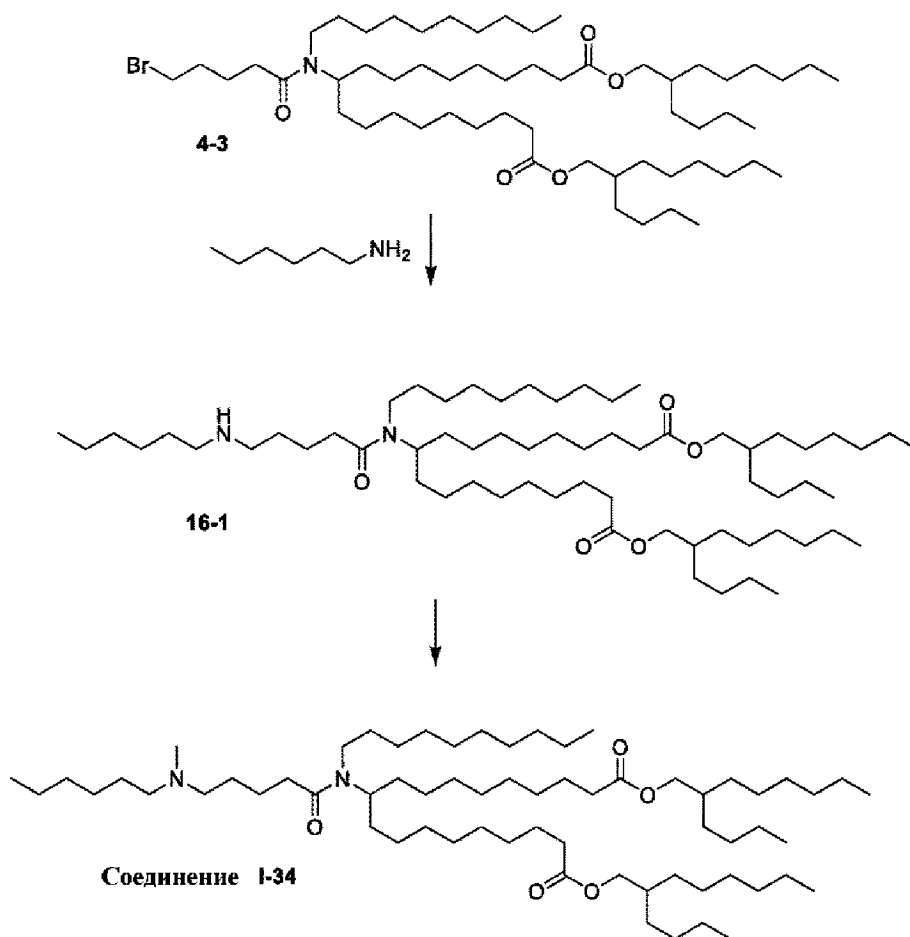
### Синтез соединения I-33

Смесь соединения **10-1** (283 мг, 0,30 ммоль), пирролидина (1,25 мл, 15 ммоль) и THF (10 мл) в пробирке под давлением нагревали при 64°C в течение ночи. Смесь охлаждали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало желтое масло. Неочищенный продукт (314 мг) дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством Et<sub>3</sub>N). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (113 мг, 0,12 ммоль, 40%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub> at 7,26) δ: 4,55-4,30 (шир., предполагаемый 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,97 (плечевидный дублет, 5,8 Гц, 4H), 3,61 (квинтетоподобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,06-3,00 (т-подобный, 2H), 2,81 (кв-подобный, 7,6 Гц, 2H), 2,58-2,51(м, 6H), 2,292, 2,285 (2 набора триплетов, 7,5 Гц, 4H), 1,83-1,73 (м, 4H), 1,65-1,56 (м, 6H), 1,56-1,48 (м, 2H), 1,48-1,37 (м, 4H), 1,37-1,10 (66H), 0,91-0,85 (м, 15H).

### ПРИМЕР 16

Синтез бис(2-бутилоктил) 10-(N-децил-5-(гексил(метил)амино)пентанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-34)





### Синтез 16-1

Смесь соединения **4-3** (200 мг, 0,20 ммоль), гексиламина (20 ммоль, 2 г), N, N-диизопропилэтиламина (5 эквив., 1,0 ммоль, 0,17 мл) и йодида натрия (10 мг) в ацетонитриле (6 мл) герметично закрывали и нагревали при 70°C в течение 24 час. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении (прибл. 30 мм рт.ст.) при температуре 75-85°C. ТСХ показала, что большую часть избытка гексиламина удалили. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало коричневое масло (192 мг), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

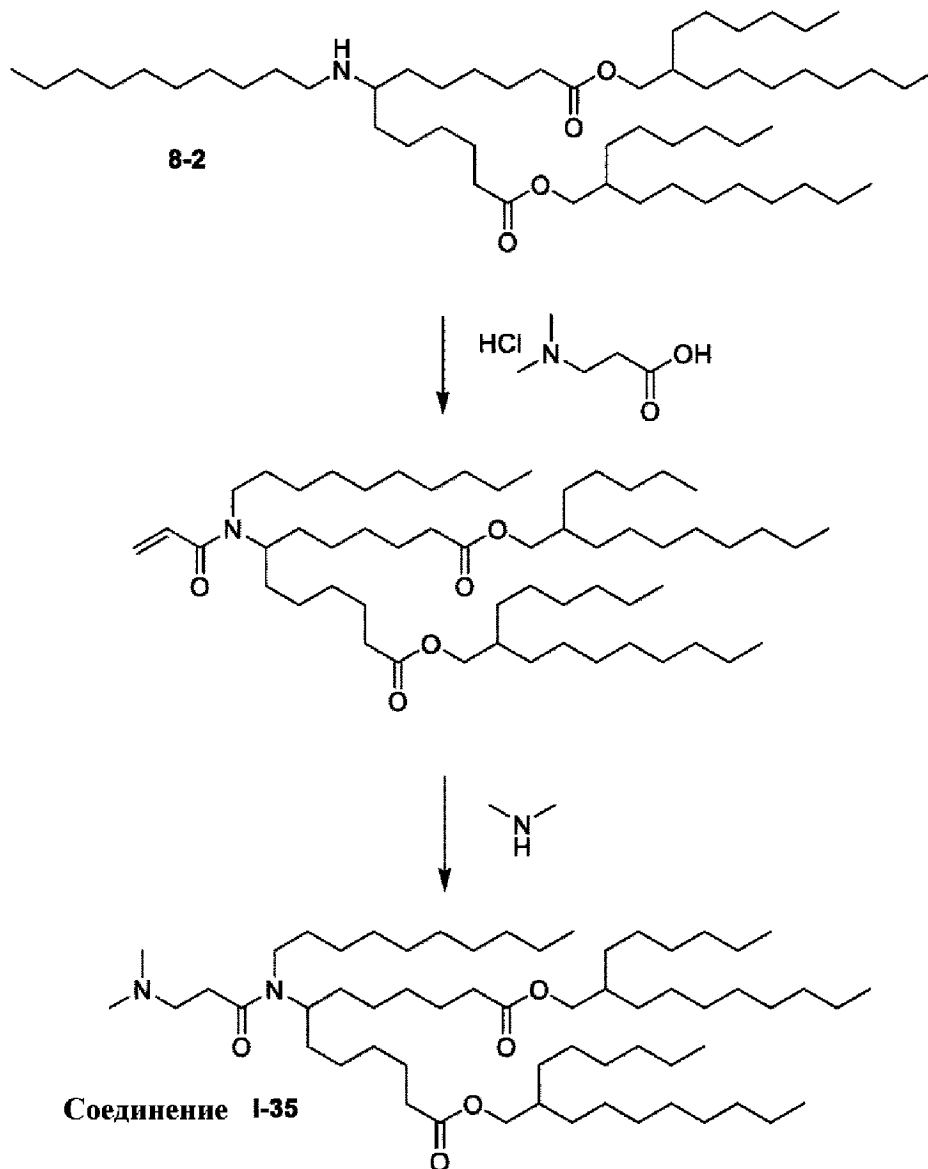
### Синтез соединения I-34

К раствору соединения **16-1** (192 мг, 0,19 ммоль) в THF (5 мл) добавляли раствор формальдегида HCHO (500 мг, 37 масс.% раствор в воде) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин перед тем, как ввести триацетоксиборгидрид натрия (1,2 ммоль, 243 мг). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана и промывали разбавленным раствором NaOH, насыщенным раствором бикарбоната натрия и насыщенным солевым раствором. После сушки над сульфатом натрия раствор концентрировали досуха (желтое масло). Остаток растворяли в

смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало желтое масло (220 мг). Неочищенный продукт (220 мг) дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5%  $\text{MeOH}$  в хлороформе со следовым количеством  $\text{Et}_3\text{N}$ ). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (113 мг, 0,13 ммоль, 69%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$  при 7,26 м.д.)  $\delta$ : 4,50-4,35 (шир., предполагаемый 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,97, 3,96 (2 набора дублетов, 5,8 Гц, 4H), 3,60 (квинтетопоподобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,06-2,98 (м, 2H), 2,36-2,26 (м, 10H), 2,191, 2,189 (2 набора синглетов, 3H), 1,70-1,56 (м, 8H), 1,56-1,36 (м, 10H), 1,37-1,10 (72 H), 0,91-0,85 (м, 18H).

#### ПРИМЕР 17

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-(N-децил-3-(диметиламино)пропаноидо)тридекандиоата (Соединение I-35)

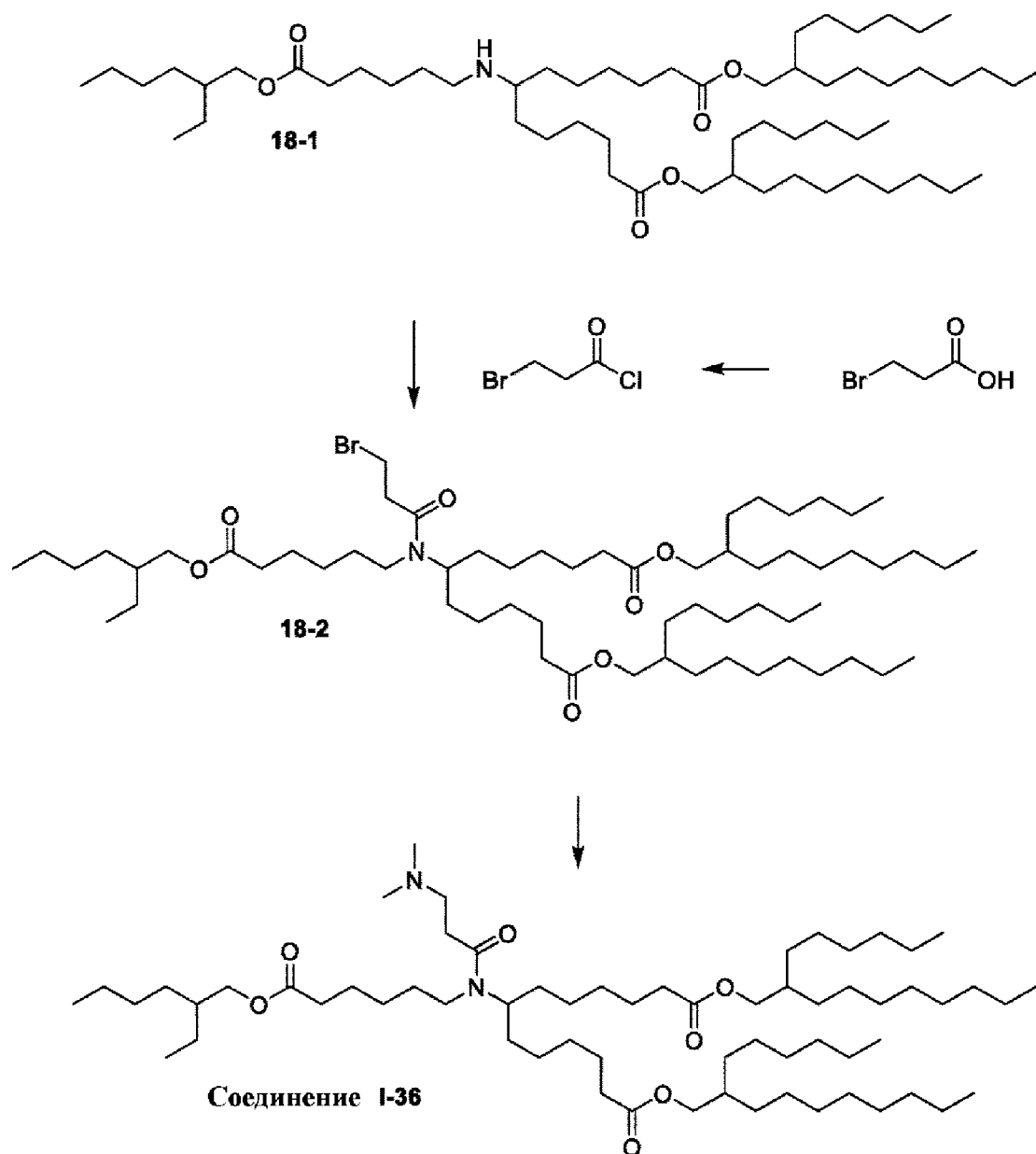


#### Синтез соединения I-35

К раствору гидрохлорида 3-диметиламинопропионовой кислоты (2 эквив., 0,62 ммоль, 95 мг) и 4-диметиламинопиридина (3 эквив., DMAP, 0,93 ммоль, 114 мг) в ацетонитриле (10 мл) добавляли DCC (2,2 эквив., 0,68 ммоль, 141 мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Добавляли раствор соединения **8-2** (262 мг, 0,31 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 мл) и полученную смесь перемешивали в течение уик-энда. ТСХ (хлороформ/MeOH, 9:1) показала основное пятно на фронте растворителя, которое могло быть продуктом элиминирования, отсутствие исходного вещества и небольшое количество желаемого продукта. Реакционную смесь концентрировали. Возможный продукт элиминирования (107 мг бесцветное масло) выделяли колоночной хроматографией (гексан-EtOAc, 95:5) и обрабатывали раствором диметиламина в THF (2M, 9 мл) при комнатной температуре в течение 4 дней. Смесь концентрировали. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало желтое масло. Неочищенный продукт дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством  $\text{Et}_3\text{N}$ ). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (62 мг).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$  при 7,26)  $\delta$ : 4,50-4,36 (шир., предполагаемый 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 3,97, 3,96 (два набора дублетов, 5,8 Гц, 4H), 3,61 (квинтетоподобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,07-3,00 (м, 2H), 2,65 (кв-подобный, 7,2 Гц, 2H), 2,53-2,41 (м, 2H), 2,31-2,26 (м, 4H), 2,26, 2,25 (2 набора синглетов, 6H), 1,66-1,56 (м, 6H), 1,56-1,48 (м, 2H), 1,48-1,37 (м, 4H), 1,37-1,10 (70H), 0,91-0,85 (м, 15H)

#### ПРИМЕР 18

Синтез бис(2-гексилдецил) 7-(3-(диметиламино)-N-(6-((2-этилгексил)окси)-6-оксогексил)пропанамидо)тридекандиоата (Соединение I-36)



### Синтез 18-2

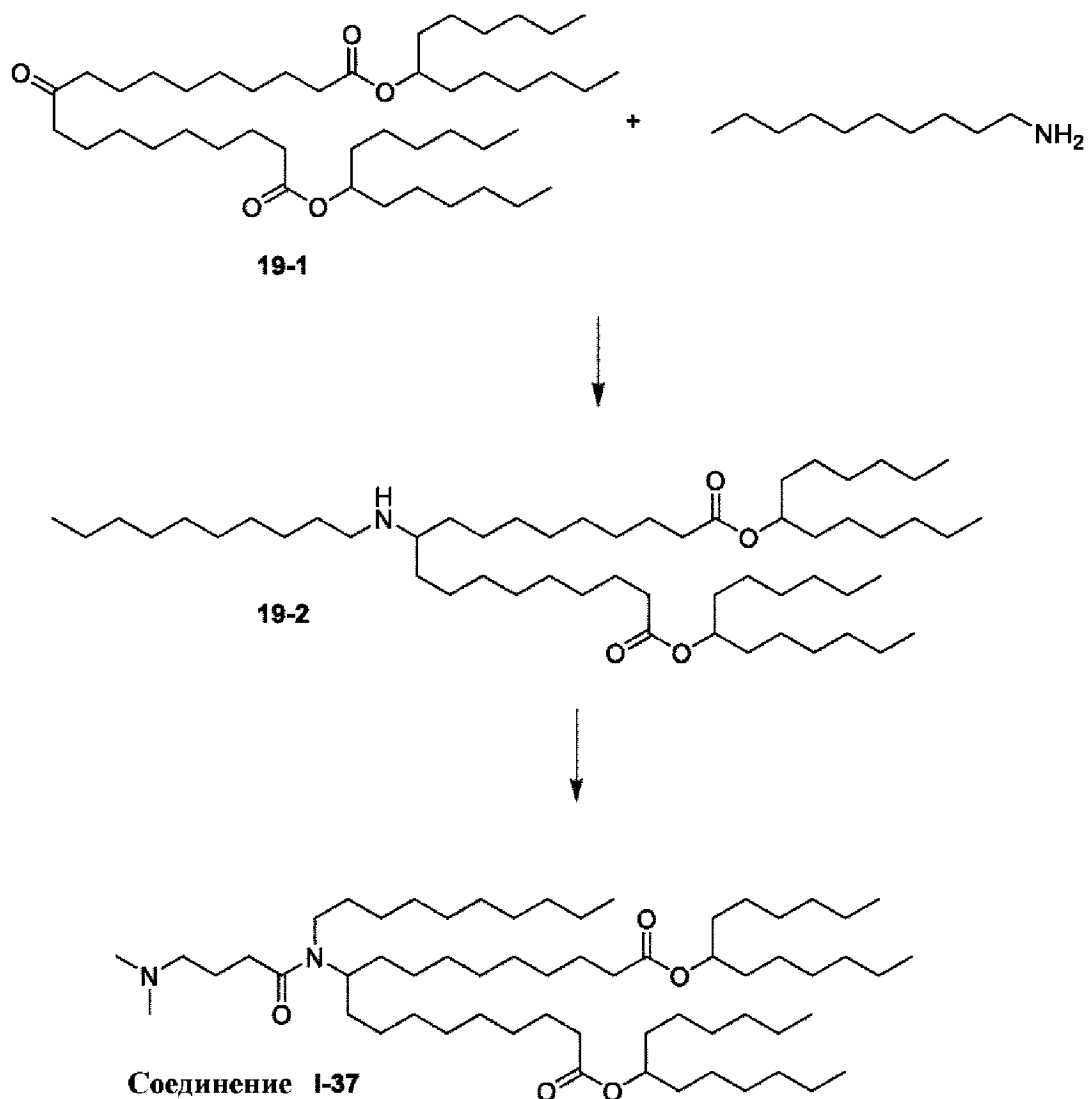
К раствору 3-бромпропионово́й кислоты (0,34 ммоль, 52 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 мл) и DMF (1 капля из тонкой иглы) добавляли оксалилхлорид (0,86 ммоль, 109 мг, 74 мкл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь затем концентрировали при пониженном давлении в течение 60 минут при комнатной температуре. Остаточную жидкость/твердое вещество (желтое) растворяли в 5 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и добавляли к раствору соединения **18-1** (160 мг, 0,17 ммоль) и триэтиламина (0,86 ммоль, 0,12 мл) и DMAP (1 мг) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл) при комнатной температуре за 1 мин. После добавления смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов и затем концентрировали. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (гексан, EtOAc и  $\text{Et}_3\text{N}$  от 95:5 до 85:15). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (99 мг, 0,09 ммоль, 53%).

### Синтез соединения I-36

В колбу под давлением, содержащую соединение **18-2** (99 мг, 0,09 ммоль), добавляли диметиламин (2М в THF, 5 мл). Раствор перемешивали при 68°C (температура масляной бани) в течение 2 дней. Смесь охлаждали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало коричневое масло (94 мг). Продукт (94 мг) дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством Et<sub>3</sub>N). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (71 мг, 0,069 ммоль, 76%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub> при 7,26) δ: 4,53-4,35 (шир., предполагаемый 0,3H, из-за медленной изомеризации вокруг амидной связи), 4,02-3,93 (м, 6H), 3,62 (квинтетоподобный, 7,0 Гц, 0,7H), 3,07-3,01 (м, 2H), 2,65 (кв-подобный, 7,6 Гц, 2H), 2,50-2,44 (м, 2H), 2,34-2,26 (м, 6H), 2,26, 2,25 (2 набора синглетов, 6H), 1,69-1,56-1,48 (м, предполагаемый 11H, перекрывается пиком воды), 1,49-1,37 (м, 4H), 1,37-1,10 (66H), 0,92-0,86 (м, 18H).

#### ПРИМЕР 19

Синтез ди(тридекан-7-ил) 10-(N-децил-4-(диметиламино)бутанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-37)



### Синтез 19-2

Раствор соединения **19-1** (1 экв., 0,493 г, 0,70 ммоль) и 1-дециламина (1,5 экв., 1,05 ммоль, 165 мг, 0,21 мл) в DCE (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 15 мин. К раствору добавляли триацетоксиборгидрид натрия (1,5 экв., 1,05 ммоль, 222 мг) и АсОН (1,5 экв., 1,05 ммоль, 63 мг, 0,059 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней. Реакционную смесь затем концентрировали. Остаток разбавляли гексаном и промывали разбавленным NaOH, насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным соевым раствором. Затем органический экстракт сушили над сульфатом натрия, растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало желаемый продукт в виде бесцветного масла (582 мг, 0,69 ммоль, 98%). Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

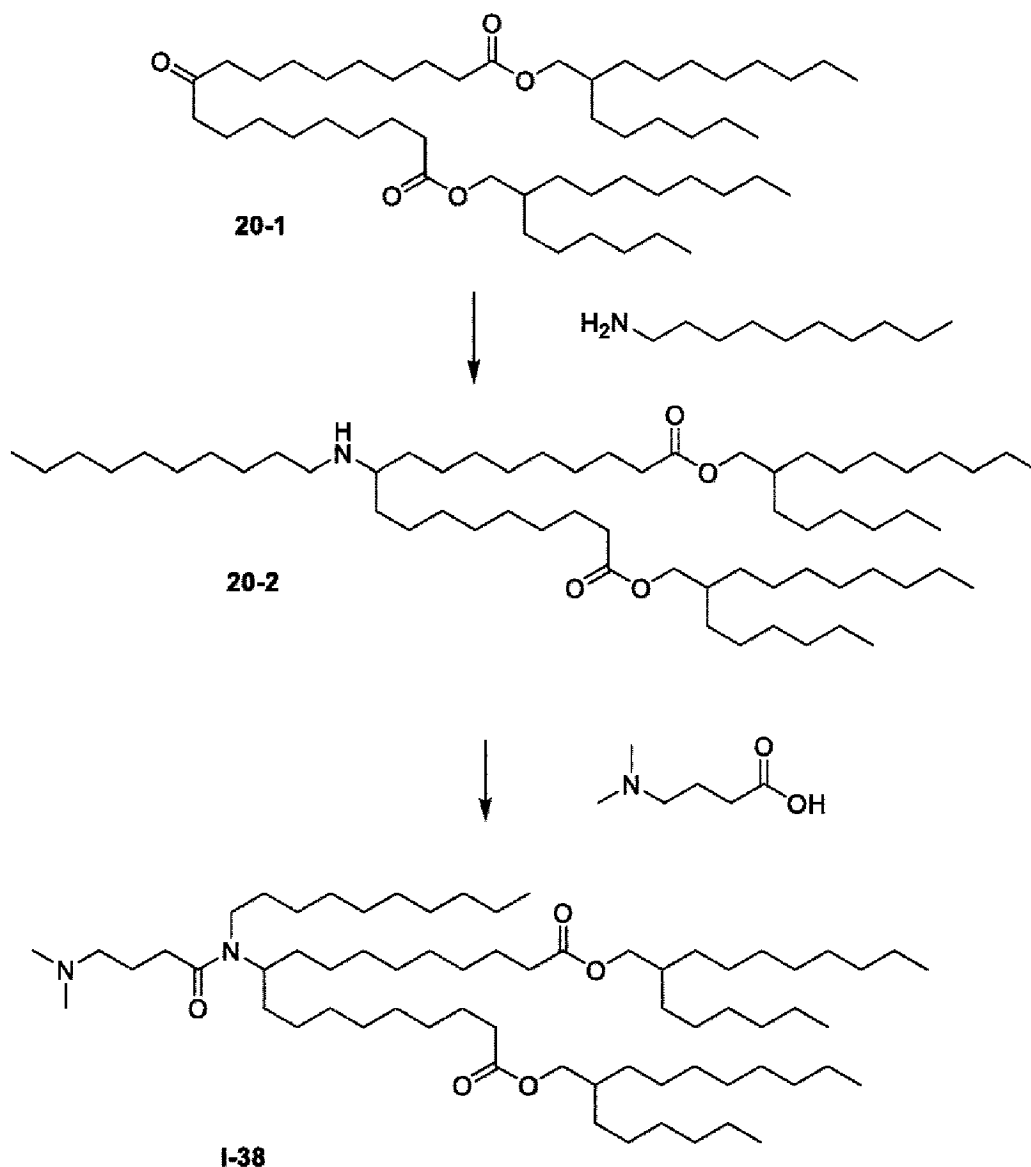
### Синтез соединения I-37

К раствору гидрохлорида 4-диметиламиномасляной кислоты (1,71 ммоль, 287 мг) и 4-диметиламинопиридина (3 эквив., DMAP, 2,07 ммоль, 253 мг) в ацетонитриле (15 мл)

добавляли DCC (2,2 эквив., 1,52 ммоль, 313 мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Добавляли раствор соединения **19-2** (582 мг, 0,69 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 мл) и полученную смесь перемешивали в течение ночи. На следующий день добавляли еще DCC (200 мг) и перемешивание продолжали в течение уик-энда (4 дня). Смесь затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и  $\text{Et}_3\text{N}$  (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало желтое масло. Продукт дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством  $\text{Et}_3\text{N}$ ). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла.

#### ПРИМЕР 20

Синтез бис(2-гексилдецил) 10-(N-децил-4-(диметиламино)бутанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-38)



#### Синтез 20-2

Раствор кетона **20-1** (0,92 г, 1,16 ммоль) и 1-дециламина (2,03 ммоль, 319 мг, 0,40

мл) в DCE (6 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. с последующим добавлением триацетоксиборгидрида натрия (2,03 ммоль, 429 мг) и AcOH (2,03 ммоль, 121 мг, 0,115 мл). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 2 дней реакцию смесь концентрировали. Остаток разбавляли гексаном и промывали разбавленным NaOH, насыщенным NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным соевым раствором. Органическую фазу отделяли, сушили над сульфатом натрия. Экстракт фильтровали через короткую колонку с силикагелем и колонку промывали смесью гексана/EtOAc/Et<sub>3</sub>N, 95:5:0-80:20:1). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (814 мг бесцветное масло, 0,87 ммоль, 75% выход).

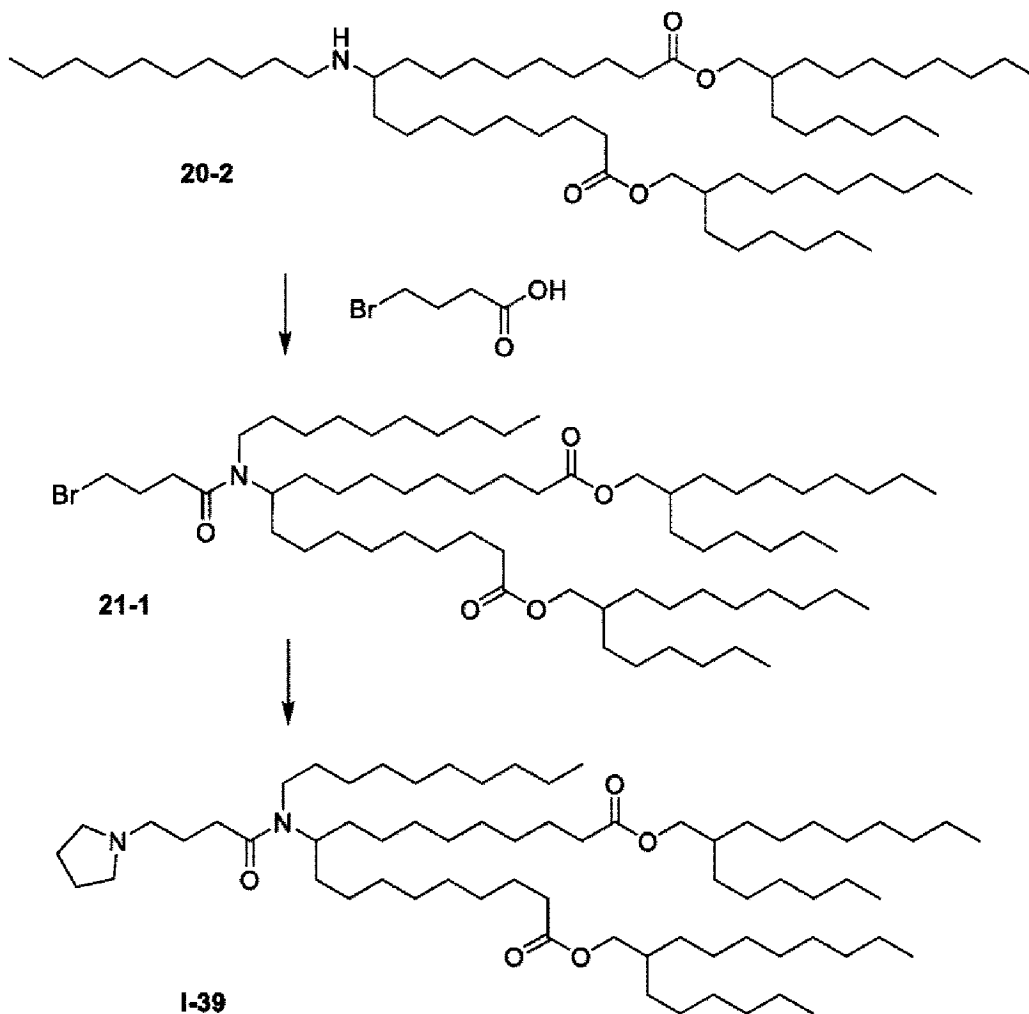
### Синтез I-38

К раствору гидрохлорида 4-диметиламиномасляной кислоты (2 эквив., 0,76 ммоль, 127 мг), 4-диметиламинопиридина (3 экв., 1,14 ммоль, 139 мг) в CH<sub>3</sub>CN (5 мл) добавляли DCC (2,2 эквив., 0,84 ммоль, 172 мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Добавляли раствор соединения **20-2** (350 мг, 0,38 ммоль) в DCM (1 мл) и полученную смесь перемешивали в течение ночи. На следующий день добавляли еще DCC (50 мг) и перемешивали еще один день. Смесь затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование фильтрата давало бесцветное масло. Продукт дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе со следовым количеством Et<sub>3</sub>N). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (260 мг).

### ПРИМЕР 21

Синтез бис(2-гексилдецил) 10-(N-децил-4-(пирролидин-1-ил)бутанамидо)нонадекандиоата (Соединение I-39)





### Синтез 21-1

К раствору 4-броммасляной кислоты (1,00 ммоль, 167 мг) в DCM (3 мл) и DMF (одна крошечная капля) добавляли оксалилхлорид (3 экв., 3,00 ммоль, 381 мг, 0,26 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь затем концентрировали в вакууме. Остаточную жидкость/твердое вещество (слегка желтое) растворяли в 5 мл DCM и добавляли раствор соединения **20-2** (464 мг, 0,50 ммоль) и триэтиламин (0,42 мл) и DMAP (2 мг) в DCM (5 мл) при комнатной температуре в течение 2 мин. После добавления полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 час. ТСХ (Гексан/Этилацетат=9:1) показала два основных пятна. Реакционную смесь затем концентрировали при комнатной температуре при пониженном давлении. Остаток использовали для следующей реакции без какой-либо очистки.

### Синтез I-39

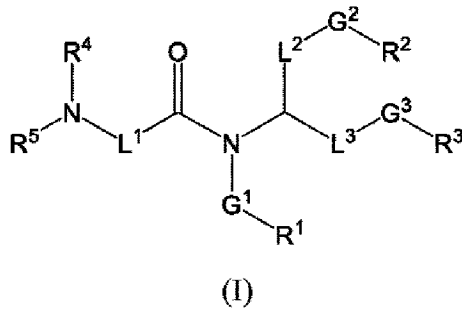
Вышеуказанный остаток растворяли в смеси пирролидина (2,20 мл, 26 ммоль) и THF (15 мл). Смесь переносили в колбу под давлением и нагревали при 68°C в течение ночи. Смесь охлаждали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в смеси гексана, этилацетата и Et<sub>3</sub>N (80:20:1) и фильтровали через короткую колонку с силикагелем и промывали той же смесью растворителей. Концентрирование

фильтрата давало желтое масло/твердое вещество (359 мг). Неочищенный продукт (359 мг) дополнительно очищали сухой колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (0-5% MeOH в хлороформе). Желаемый продукт получали в виде бесцветного масла (165 мг).

Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены для предоставления дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации патентных заявок США, заявки на патенты США, иностранные патенты, зарубежные патентные заявки и непатентные публикации, указанные в данном описании и/или перечисленные в информационном листе заявки, включая U.S. 62/791566 и 62/890469, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Аспекты вариантов осуществления могут быть изменены, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций для предоставления дополнительных вариантов осуществления. Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете вышеприведенного подробного описания. В целом, в нижеследующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничение формулы конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на который дают право такие притязания. Соответственно, формула изобретения не ограничивается раскрытием.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее следующую структуру (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

$R^1$  представляет собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_{24}$  алкил или необязательно замещенный  $C_2$ - $C_{24}$  алкенил;

$R^2$  и  $R^3$  каждый независимо представляет собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_{36}$  алкил;

$R^4$  и  $R^5$  каждый независимо представляет собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил, или  $R^4$  и  $R^5$  объединяются вместе с N атомом, к которому они присоединены, с образованием гетероциклила или гетероарила;

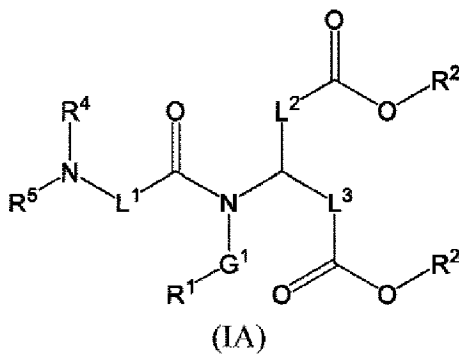
$L^1$ ,  $L^2$ , и  $L^3$  каждый независимо представляет собой необязательно замещенный  $C_1$ - $C_{18}$  алкилен;

$G^1$  представляет собой прямую связь,  $-(CH_2)_nO(C=O)-$ ,  $-(CH_2)_n(C=O)O-$  или  $-(C=O)-$ ;

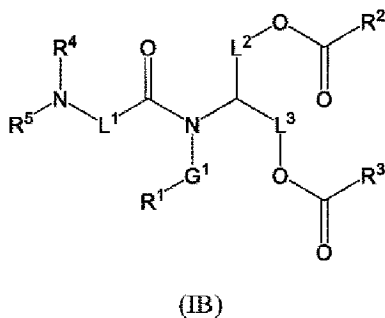
$G^2$  и  $G^3$  каждый независимо представляет собой  $-(C=O)O-$  или  $-O(C=O)-$ ; и

$n$  представляет собой целое число больше 0.

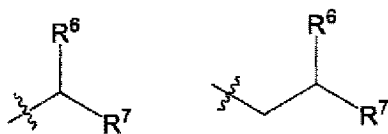
2. Соединение по пункту 1, имеющее следующую структуру (IA):



3. Соединение по пункту 1, имеющее следующую структуру (IB):



4. Соединение по любому из пунктов 1-3, где  $R^1$  представляет собой необязательно замещенный  $C_6$ - $C_{18}$  алкил или  $C_{14}$ - $C_{18}$  алкенил.
5. Соединение по любому из пунктов 1-4, где  $R^1$  представляет собой  $C_8$  алкил,  $C_9$  алкил,  $C_{10}$  алкил,  $C_{12}$  алкил,  $C_{14}$  алкил или  $C_{16}$  алкил.
6. Соединение по любому из пунктов 1-4, где  $R^1$  представляет собой  $C_{16}$  алкенил.
7. Соединение по любому из пунктов 1-6, где  $R^1$  является неразветвленным.
8. Соединение по любому из пунктов 1-6, где  $R^1$  является разветвленным.
9. Соединение по любому из пунктов 1-8, где  $R^1$  является незамещенным.
10. Соединение по любому из пунктов 1-9, где  $G^1$  представляет собой прямую связь,  $-(CH_2)_nO(C=O)-$  или  $-(CH_2)_n(C=O)O-$ .
11. Соединение по пункту 10, где  $G^1$  представляет собой прямую связь.
12. Соединение по пункту 10, где  $G^1$  представляет собой  $-(CH_2)_n(C=O)O-$  и  $n$  больше 1.
13. Соединение по пункту 12, где  $n$  имеет значение 5, 6, 7, 8, 9 или 10.
14. Соединение по пункту 13, где  $n$  имеет значение 7.
15. Соединение по пункту 13, где  $n$  имеет значение 8.
16. Соединение по любому из пунктов 1-15, где  $L^1$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкилен.
17. Соединение по пункту 16, где  $L^1$  представляет собой  $C_2$  алкилен,  $C_3$  алкилен или  $C_4$  алкилен.
18. Соединение по любому из пунктов 1-17, где  $L^1$  является неразветвленным.
19. Соединение по любому из пунктов 1-18, где  $L^1$  является незамещенным.
20. Соединение по любому из пунктов 1-19, где  $R^2$  представляет собой  $C_8$ - $C_{24}$  алкил.
21. Соединение по любому из пунктов 1-20, где  $R^3$  представляет собой  $C_8$ - $C_{24}$  алкил.
22. Соединение по любому из пунктов 1-21, где  $R^2$  и  $R^3$  оба представляют собой  $C_8$ - $C_{24}$  алкил.
23. Соединение по любому из пунктов 1-22, где  $R^2$  и  $R^3$  каждый независимо представляет собой  $C_{11}$  алкил,  $C_{12}$  алкил,  $C_{13}$  алкил,  $C_{14}$  алкил,  $C_{15}$  алкил,  $C_{16}$  алкил,  $C_{18}$  алкил или  $C_{20}$  алкил.
24. Соединение по любому из пунктов 1-23, где  $R^2$  является разветвленным.
25. Соединение по любому из пунктов 1-24, где  $R^3$  является разветвленным.
26. Соединение по любому из пунктов 1-19, где  $R^2$  и  $R^3$  каждый независимо имеет одну из следующих структур:

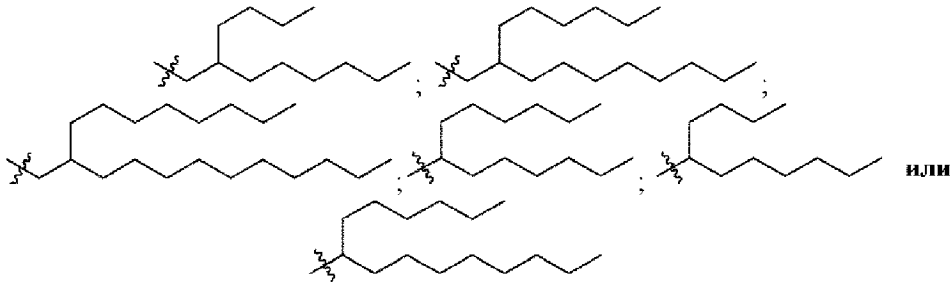


или

где:

$R^6$  и  $R^7$  каждый независимо представляет собой  $C_2-C_{12}$  алкил.

27. Соединение по пункту 26, где  $R^2$  и  $R^3$  каждый независимо имеет одну из следующих структур:



28. Соединение по любому из пунктов 1-27, где  $L^2$  и  $L^3$  каждый независимо представляет собой  $C_4-C_{10}$  алкилен.

29. Соединение по любому из пунктов 1-28, где  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_5$  алкилен.

30. Соединение по любому из пунктов 1-28, где  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_6$  алкилен.

31. Соединение по любому из пунктов 1-28, где  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_8$  алкилен.

32. Соединение по любому из пунктов 1-28, где  $L^2$  и  $L^3$  оба представляют собой  $C_9$  алкилен.

33. Соединение по любому из пунктов 1-32, где  $L^2$  является неразветвленным.

34. Соединение по любому из пунктов 1-33, где  $L^3$  является неразветвленным.

35. Соединение по любому из пунктов 1-34, где  $L^2$  является незамещенным.

36. Соединение по любому из пунктов 1-35, где  $L^2$  является незамещенным.

37. Соединение по любому из пунктов 1-36, где  $R^4$  и  $R^5$  каждый независимо представляет собой  $C_1-C_6$  алкил.

38. Соединение по пункту 37, где  $R^4$  и  $R^5$  оба представляют собой метил.

39. Соединение по пункту 37, где  $R^4$  и  $R^5$  оба представляют собой этил.

40. Соединение по пункту 37, где  $R^4$  представляет собой метил и  $R^5$  представляет собой н-бутил.

41. Соединение по любому из пунктов 1-36,  $R^4$  и  $R^5$  объединяются вместе с N атомом, к которому они присоединены, с образованием гетероциклила.

42. Соединение по пункту 41, где гетероциклил представляет собой 5-членный гетероциклил.

43. Соединение по пункту 42, где гетероциклил имеет следующую структуру:



44. Соединение по пункту 1, где соединение выбрано из соединений в Таблице 1.

45. Композиция, включающая соединение по любому из пунктов 1-44 и терапевтическое средство.

46. Композиция по пункту 45, дополнительно включающая один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и конъюгированных с полимером липидов.

47. Композиция по пункту 46, где композиция включает один или несколько нейтральных липидов, выбранных из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM.

48. Композиция по пункту 47, где нейтральный липид представляет собой DSPC.

49. Композиция по любому из пунктов 46-48, где молярное отношение соединения к нейтральному липиду находится в диапазоне от около 2:1 до около 8:1.

50. Композиция по любому из пунктов 46-49, где стероид представляет собой холестерин.

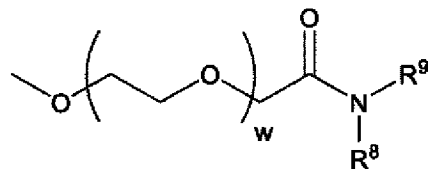
51. Композиция по пункту 50, где молярное отношение соединения к холестерину находится в диапазоне от 5:1 до 1:1.

52. Композиция по любому из пунктов 46-51, где конъюгированный с полимером липид представляет собой пегилированный липид.

53. Композиция по пункту 52, где молярное отношение соединения к пегилированному липиду находится в диапазоне от около 100:1 до около 20:1.

54. Композиция по любому из пунктов 52 или 53, где пегилированный липид представляет собой PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-cer или PEG диалкилоксипропилкарбамат.

55. Композиция по любому из пунктов 52 или 53, где пегилированный липид имеет следующую структуру (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

R<sup>8</sup> и R<sup>9</sup> каждый независимо представляет собой прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

w имеет среднее значение от 30 до 60.

56. Композиция по пункту 55, где R<sup>8</sup> и R<sup>9</sup> представляют собой, каждый независимо, прямые, насыщенные алкильные цепи, содержащие от 12 до 16 атомов углерода.

57. Композиция по любому из пунктов 55 или 56, где среднее значение w составляет около 49.

58. Композиция по любому из пунктов 45-57, где терапевтическое средство

включает нуклеиновую кислоту.

59. Композиция по пункту 58, где нуклеиновая кислота выбрана из антисмысловой и информационной РНК.

60. Композиция по любому из пунктов 45-59, где композиция включает липидную наночастицу.

61. Способ введения терапевтического средства нуждающемуся в этом пациенту, при этом способ включает получение или обеспечение композиции по любому из пунктов 45-60 и введение композиции пациенту.

62. Липидная наночастица, включающая соединение по любому из пунктов 1-44.

63. Липидная наночастица по пункту 62, дополнительно включающая терапевтическое средство.

64. Липидная наночастица по пункту 63, где терапевтическое средство включает нуклеиновую кислоту.

65. Липидная наночастица по пункту 64, где нуклеиновая кислота выбрана из антисмысловой и информационной РНК.

66. Липидная наночастица по любому из пунктов 62-65, дополнительно включающая один или несколько эксципиентов, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и конъюгированных с полимером липидов.

67. Липидная наночастица по пункту 66, где нейтральные липиды выбраны из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM.

68. Липидная наночастица по пункту 67, где нейтральный липид представляет собой DSPC.

69. Липидная наночастица по любому из пунктов 66-68, где молярное отношение соединения к нейтральному липиду находится в диапазоне от около 2:1 до около 8:1.

70. Липидная наночастица по любому из пунктов 66-69, где стероид представляет собой холестерин.

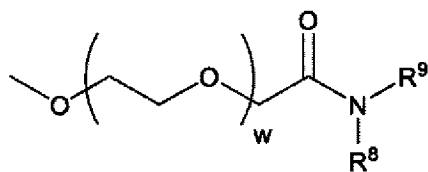
71. Липидная наночастица по пункту 70, где молярное отношение соединения к холестерину находится в диапазоне от 5:1 до 1:1.

72. Липидная наночастица по любому из пунктов 66-71, где конъюгированный с полимером липид представляет собой пегилированный липид.

73. Липидная наночастица по пункту 72, где молярное отношение соединения к пегилированному липиду находится в диапазоне от около 100:1 до около 20:1.

74. Липидная наночастица по пунктам 72 или 73, где пегилированный липид представляет собой PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-cer или PEG диалкилоксипропилкарбамат.

75. Липидная наночастица по пунктам 72 или 73, где пегилированный липид имеет следующую структуру (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль, таутомер или стереоизомер, где:

R<sup>8</sup> и R<sup>9</sup> каждый независимо представляет собой прямую или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую от 10 до 30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и

w имеет среднее значение от 30 до 60.

76. Липидная наночастица по пункту 75, где R<sup>8</sup> и R<sup>9</sup> представляют собой, каждый независимо, прямые, насыщенные алкильные цепи, содержащие от 12 до 16 атомов углерода.

77. Липидная наночастица по любому из пунктов 75 или 76, где среднее значение w составляет около 49.