

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390837 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.14

(51) Int. Cl. A61K 47/54 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.10

(54) КОНЬЮГАТЫ ЛИПИДОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

(31) 63/077,290; 63/214,745; 63/230,257

(72) Изобретатель:

(32) 2020.09.11; 2021.06.24; 2021.08.06

Ли Сяокай, Пэй Тао, Ай Тэн, Фан
Сьюзан, Рамос-Хантер Сьюзан (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/049880

(74) Представитель:

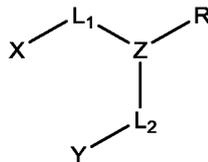
(87) WO 2022/056273 2022.03.17

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(71) Заявитель:

ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКЛЗ,
ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I), содержащим модуляторы РК/PD для доставки средств на основе олигонуклеотидов, например средств на основе двухцепочечных РНКи, в клетки определенных типов, такие как, например, клетки скелетных мышц, in vivo. Модуляторы РК/PD, раскрытые в настоящем изобретении, если они конъюгированы с терапевтическим или диагностическим средством на основе олигонуклеотида, таким как средство на основе РНКи, могут улучшить доставку композиции в указанные клетки, на которые направленно действуют для обеспечения подавления экспрессии гена в этих клетках.



A1

202390837

202390837

A1

КОНЬЮГАТЫ ЛИПИДОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке РСТ испрашивается преимущество по предварительной заявке U.S. № 63/077290, поданной 11 сентября 2020 г., предварительной заявке U.S. № 63/214745, поданной 24 июня, 2021 г., и предварительной заявке U.S. № 63/230257, поданной 6 августа, 2021 г. Каждый из этих документов во всей его полноте включен в настоящее изобретение в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к конъюгатам липидов (в настоящем изобретении также называемые липидами-модуляторами РК/PD (ФК/ФД - фармакокинетические характеристики / фармакодинамические характеристики), предназначенным для доставки средств на основе олигонуклеотидов, например, средств на основе двухцепочечных интерферирующих РНК (или средств, действующих в соответствии с механизмом РНК-интерференции, или средств на основе РНКи), в клетки определенных типов (например, в клетки скелетных мышц) *in vivo*, для ингибирования генов, которые экспрессируются в этих клетках.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

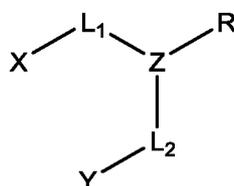
Средства на основе олигонуклеотидов, такие как антисмысловые средства и средства на основе двухцепочечных интерферирующих РНК (РНКи), являются весьма перспективными и могут привести к коренным изменениям в области медицины и обеспечить пациентам возможности эффективного терапевтического лечения. Однако при разработке приемлемых терапевтических фармацевтических средств обеспечение эффективной доставки средств на основе олигонуклеотидов и, в частности, терапевтических средств на основе двухцепочечных РНКи, долгое время являлось затруднительным. В особенности, это относится к случаю обеспечения специфичной и селективной доставки средств на основе олигонуклеотидов во внепеченочные (т.е. не являющиеся гепатоцитами) клетки.

Хотя в последние несколько лет были предприняты различные попытки обеспечения направленной доставки средств на основе олигонуклеотидов в некоторые внепеченочные клетки, включая клетки скелетных мышц, адипоциты, кардиомиоциты и т.п., с использованием например конъюгатов холестерина (которые являются неспецифичными и обладают тем известным недостатком, что они проникают в различные нежелательные ткани и органы) и липидных наночастиц (ЛНЧ) (для которых часто сообщали, что они являются токсичными), до настоящего времени никому не удалось обеспечить подходящую доставку. В результате этого, сохраняется необходимость в системе доставки, предназначенной для направленной доставки средств на основе олигонуклеотидов и, в частности, средств на основе РНКи, в не являющиеся гепатоцитами клетки.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к соединениям, содержащим липид-модулятор РК/PD, конъюгированный (или связанный) со средством на основе олигонуклеотида. Настоящее изобретение также относится к предшественникам липида-модулятора РК/PD.

Одним объектом настоящего изобретения является соединение формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R обозначает $-L_A-R_Z$; L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с Z; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; Z обозначает СН, фенил или N; L_1 и L_2 каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев полиэтиленгликоля (ПЭГ); и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 20 до

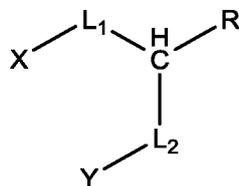
примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ. В других вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления один из L_1 и L_2 содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ и другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления каждый L_1 и L_2 независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления L_A выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 4.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает ненасыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает насыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает разветвленный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает холестерил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

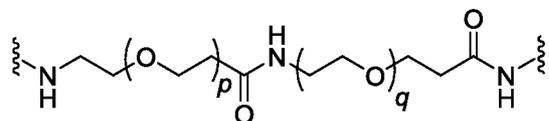
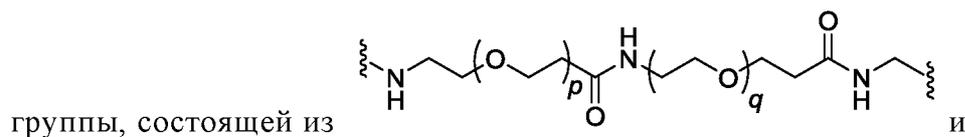
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ia):



(Ia)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой каждый R , L_1 , L_2 , X и Y является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 независимо выбраны из

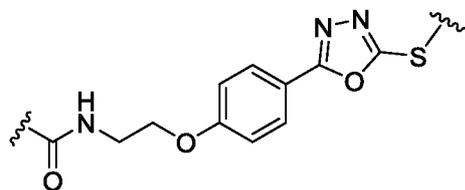


; где каждый p независимо равен 20, 21, 22,

23, 24 или 25; каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и каждый

5 знак  обозначает положение присоединения к X, Y или CH в формуле (Ia).

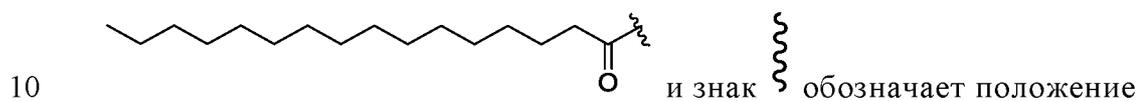
В некоторых вариантах осуществления L_A обозначает



, и каждый знак  обозначает положение

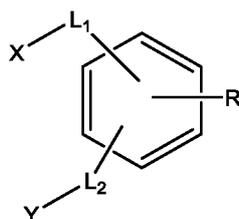
присоединения к R_Z или CH в формуле (Ia).

В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает



присоединения к L_1 или L_2 .

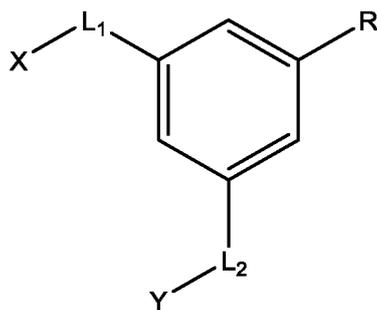
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ib):



(Ib)

15 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой каждый R, L_1 , L_2 , X и Y является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I) или (Ia).

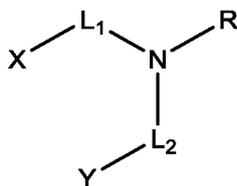
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ib1):



(Ib1)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia) или (Ib).

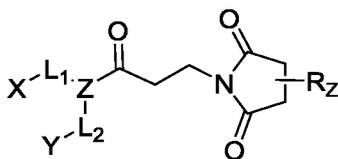
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ic):



(Ic)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib) или (Ib1).

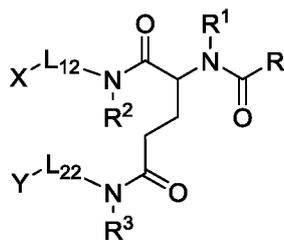
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Id):



(Id)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R_Z, Z, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib) (Ib1) или (Ic).

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (II):



или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic); L₁₂ обозначает L₁, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id); L₂₂ обозначает L₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id); и R¹, R² и R³ каждый независимо обозначает водород или C₁-C₆-алкил.

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A2}-R_Z; L_{A2} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с -C(O)-; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; R¹, R² и R³ каждый независимо обозначает водород или C₁-C₆-алкил; L₁₂ и L₂₂ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления L₁₂ и L₂₂ каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L₁₂ и L₂₂ каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L₁₂ и L₂₂ каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ. В других вариантах осуществления L₁₂ и L₂₂ каждый независимо содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления один из L₁₂ и L₂₂ содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ и другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления каждый L₁₂ и L₂₂ независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 5.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает ненасыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по

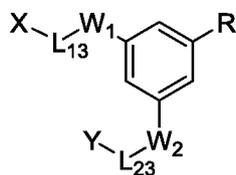
меньшей мере один из X и Y обозначает насыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает разветвленный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает холестерил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 6. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 6.

10 В некоторых вариантах осуществления L_{A2} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 7.

В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 , R^2 и R^3 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 , R^2 и R^3 обозначает водород.

15 В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (III):



(III)

20 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (II); L_{13} обозначает L_1 , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), или L_{13} обозначает L_{12} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II); L_{23} обозначает L_2 , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), или L_{23} обозначает L_{22} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II); W_1 обозначает -
30 $C(O)NR_1$ - или $-OCH_2CH_2NR_1C(O)-$, где R_1 обозначает водород или C_1 - C_6 -алкил;

и W_2 обозначает $-C(O)NR_2-$ или $-OCH_2CH_2NR_2C(O)-$, где R_2 обозначает водород или C_1-C_6 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления R обозначает $L_{A3}-R_Z$; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; W_1 обозначает $-C(O)NR_1-$ или $-OCH_2CH_2NR_1C(O)-$, где R_1 обозначает водород или C_1-C_6 -алкил; W_2 обозначает $-C(O)NR_2-$ или $-OCH_2CH_2NR_2C(O)-$, где R_2 обозначает водород или C_1-C_6 -алкил; L_{13} и L_{23} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления L_{13} и L_{23} каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{13} и L_{23} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{13} и L_{23} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ. В других вариантах осуществления L_{13} и L_{23} каждый независимо содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления один из L_{13} и L_{23} содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ и другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления каждый L_{13} и L_{23} независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 8.

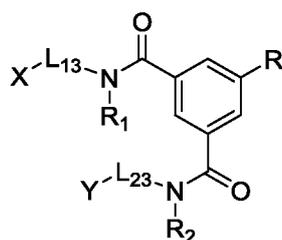
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает ненасыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает насыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает разветвленный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает холестерил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 9. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 9.

В некоторых вариантах осуществления L_{A3} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 10.

В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил. В некоторых вариантах осуществления
5 каждый R^1 и R^2 обозначает водород.

В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IIIa):



10

(IIIa)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой каждый R, X и Y является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II) или (III); L_{13} обозначает L_1 ,
15 определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), L_{13} обозначает L_{12} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L_{13} является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III); L_{23} обозначает L_2 , определенный в любом из вариантов
20 осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), L_{23} обозначает L_{22} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L_{13} является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III); и каждый R_1 и R_2
25 является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II) или (III).

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A3} - R_Z ; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; R_1 и R_2 каждый независимо обозначает водород или C_1 - C_6 -алкил (например, метил, этил, н-пропил, н-бутил

или н-пентил); L_{13} и L_{23} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

5 В некоторых вариантах осуществления каждый L_{13} и L_{23} выбран из группы, состоящей из мостика 1-3 и мостика 2-3, указанных в Таблице 8.

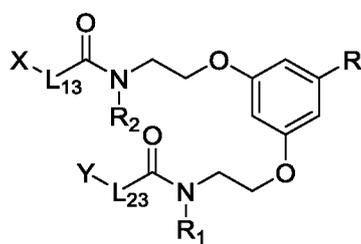
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из липида 3 и липида 19, указанных в Таблице 9. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из липида 3 и липида 19, указанных в Таблице 9.

10 В некоторых вариантах осуществления L_{A3} выбран из группы, состоящей из линкера 1-3, линкера 2-3 и линкера 5-3, указанных в Таблице 10.

В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 обозначает водород.

15 В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IIIb):



(IIIb)

20 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II), (III) или (IIIa); L_{13} обозначает L_1 , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), L_{13} обозначает L_{12} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L_{13} является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III) или (IIIa); L_{23} обозначает L_2 , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic)

25

или (Id), L_{23} обозначает L_{22} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L_{23} является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III) или (IIIa); и каждый R_1 и R_2 является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), (III) или (IIIa).

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A3} - R_Z ; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; R_1 и R_2 каждый независимо выбран из водорода или C_1 - C_6 -алкила; L_{13} и L_{23} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления каждый L_{13} и L_{23} обозначает мостик 3-3, указанный в Таблице 8.

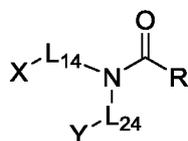
В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает липид 3, указанный в Таблице 9.

В некоторых вариантах осуществления L_{A3} выбран из группы, состоящей из линкера 3-3 и линкера 4-3, указанных в Таблице 10.

В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 обозначает водород.

В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R , X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II), (III), (IIIa) или (IIIb); L_{14} обозначает L_1 , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic), L_{14} обозначает L_{12} ,

определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L_{14} обозначает L_{13} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III), (IIIa) или (IIIb); L_{24} обозначает L_2 , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic), L_{24} обозначает L_{22} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L_{24} обозначает L_{23} , определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III), (IIIa) или (IIIb).

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A4} - R_Z ; L_{A4} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с $-C(O)-$; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; L_{14} и L_{24} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления L_{14} и L_{24} каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{14} и L_{24} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{14} и L_{24} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ. В других вариантах осуществления L_{14} и L_{24} каждый независимо содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления один из L_{14} и L_{24} содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ и другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления каждый L_{14} и L_{24} независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 11.

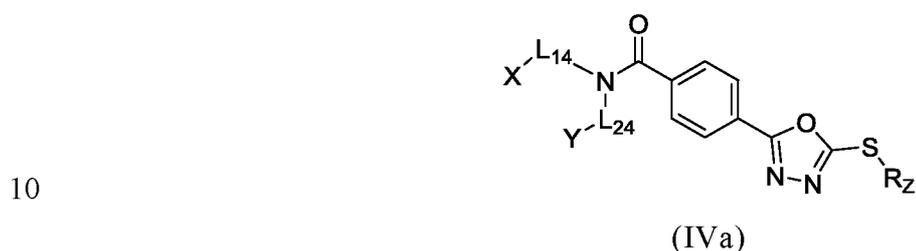
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает ненасыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает насыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает разветвленный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает холестерил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере

мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 12. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 12.

5 В некоторых вариантах осуществления L_{A4} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 13.

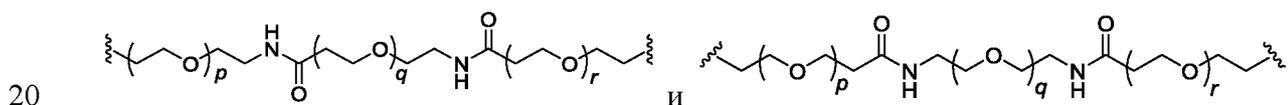
В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IVa):

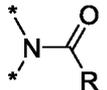


или его фармацевтически приемлемая соль, в которой X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II), (III), (IIIa), (IIIb) или (IV); L_{14} и L_{24} являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (IV); и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

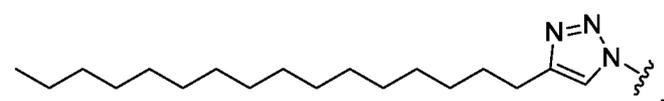
В некоторых вариантах осуществления R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; каждый L_{14} и L_{24} независимо выбран из группы, состоящей из

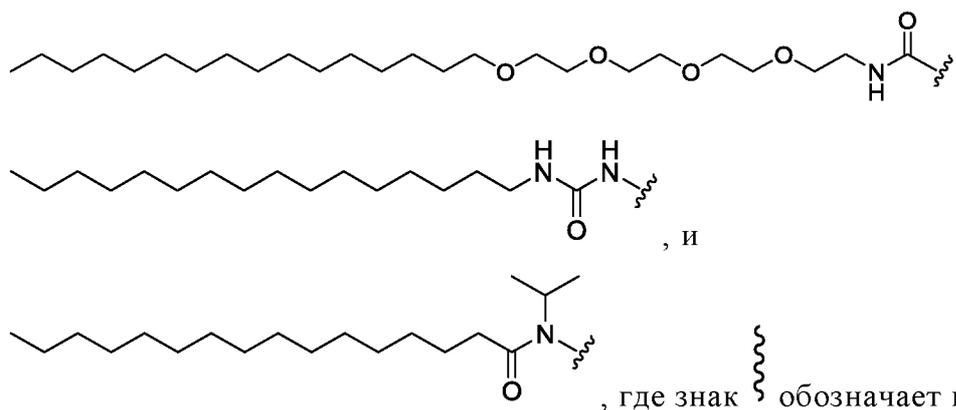


где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или фрагменту

 формулы (IVa), каждый знак * обозначает положение присоединения к L_{14}

или L_{24} , каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25, каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25, и каждый r независимо равен 2, 3, 4, 5 или 6; и каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из

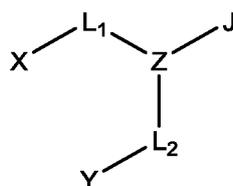




присоединения к L_{14} или L_{24} .

5 В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 14, или их фармацевтически приемлемых солей. В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 16, или их фармацевтически приемлемых солей.

10 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (V):

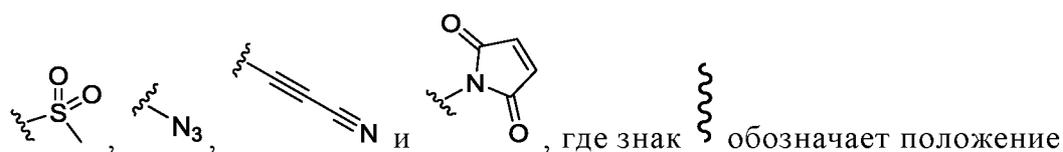


(V)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z, L_1 , L_2 , X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic); J обозначает $L_{A5}-R_X$; L_{A5} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_X с Z; и R_X обозначает реакционноспособный фрагмент для конъюгирования со средством на основе олигонуклеотида.

20 В некоторых вариантах осуществления J обозначает $L_{A5}-R_X$; L_{A5} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_X с Z; R_X обозначает реакционноспособный фрагмент для конъюгирования со средством на основе олигонуклеотида; Z обозначает CH, фенил или N; L_1 и L_2 каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до
25 примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления R_X выбран из группы, состоящей из



присоединения к L_{A5} .

5 В некоторых вариантах осуществления L_{A5} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 18.

В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 20, или их фармацевтически приемлемых солей.

10 В настоящем изобретении также раскрыты способы получения соединений формулы (I). Одним объектом настоящего изобретения является способ получения соединения формулы (I), который включает конъюгирование средства на основе олигонуклеотида, содержащего первый реакционноспособный фрагмент, с соединением содержащим липид и второй реакционноспособный фрагмент, с получением соединения формулы (I). В некоторых вариантах
15 осуществления первый реакционноспособный фрагмент выбран из группы, состоящей из дисульфида и пропаргильной группы. В некоторых вариантах осуществления второй реакционноспособный фрагмент выбран из группы, состоящей из малеинимида, сульфона, азида и алкина.

20 Другим объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая соединение любой из формул (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), или фармацевтически приемлемую соль любого из этих соединений, и фармацевтически приемлемый инертный наполнитель.

25 Другим объектом настоящего изобретения является способ уменьшения экспрессии целевого гена *in vivo*, включающий введение в клетку соединения любой из формул (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), или фармацевтически приемлемой соли любого из этих соединений, где соединение включает средство на основе РНКи по меньшей мере в основном комплементарное к целевому гену.

30 Если не приведено другое определение, то все технические и научные термины, использованные в настоящем изобретении, обладают такими же

значениями, которые обычно подразумевает специалист в данной области техники. Хотя при осуществлении и проверке настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, сходные с описанными в настоящем изобретении или эквивалентные им, ниже описаны подходящие способы, устройства и материалы. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другая литература, указанная в настоящем изобретении, во всей их полноте включены в настоящее изобретение в качестве ссылки. В случае противоречия, определяющим является настоящее описание, включая определения. Кроме того, материалы, методики и примеры являются лишь иллюстративными и не являются ограничивающими.

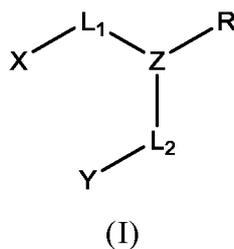
Другие объекты, особенности, характеристики и преимущества настоящего изобретения станут понятны из приведенного ниже подробного описания, прилагаемых чертежей и из формулы изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

15 Липиды-модуляторы РК/PD

В настоящем изобретении описаны соединения, содержащие модуляторы РК/PD, конъюгированные со средством (средствами) на основе олигонуклеотида, с обеспечением доставки полезных средств, таких как средства на основе интерферирующих РНК (РНКи), в клетки *in vivo*. Если не ограничиваться какими-либо теоретическими соображениями, то можно предположить, что соединения, описанные в настоящем изобретении, модулируют фармакокинетические и/или фармакодинамические характеристики соответствующих систем доставки, и таким образом, усиливают вызванное РНКи разрушение целевого гена в клетке. Соединения, описанные в настоящем изобретении, могут способствовать доставке в клетки определенных типов, включая, но не ограничиваясь только ими, клетки скелетных мышц и адипоциты.

Настоящее изобретение относится к соединению формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, в которой R обозначает L_A-R_Z ; L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с Z; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида (например, средство на основе РНКи); Z обозначает СН, фенил или N; L_1 и L_2 каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев полиэтиленгликоля (ПЭГ); и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

При использовании в настоящем изобретении и, как это должно быть очевидно для специалиста в данной области техники, звенья полиэтиленгликоля (ПЭГ) означают повторяющиеся звенья формулы $-(CH_2CH_2O)-$. Следует понимать, что в химических структурах, раскрытых в настоящем изобретении, звенья ПЭГ могут быть обозначены, как $-(CH_2CH_2O)-$, $-(OCH_2CH_2)-$ или $-(CH_2OCH_2)-$. Также следует понимать, что численное значение, обозначающее количество повторяющихся звеньев ПЭГ, может находиться на любой стороне круглых скобок, использующихся при представлении звеньев ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления один из L_1 и L_2 содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ, и другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ. Так, например, L_1 и L_2 все независимо могут содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 звеньев ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления каждый L_1 и L_2 содержит один или большее количество дополнительных двухвалентных фрагментов (например, $-C(O)-$, $-N(H)-$, $-N(H)-C(O)-$, $-C(O)-N(H)-$, $-S(O)_2-$, $-S-$, и другие двухвалентные фрагменты, которые не являются ПЭГ), которые соединяют два звена ПЭГ,

содержащиеся в мостике. Так, например, каждый L_1 и L_2 включает структуру

$\text{---}(\text{ПЭГ})\text{---X'---X'---}(\text{ПЭГ})\text{---}$ или $\text{---}(\text{ПЭГ})\text{---X'---}(\text{ПЭГ})\text{---}$, где каждый X' независимо обозначает двухвалентный фрагмент, отличающийся от звена ПЭГ, и каждый ПЭГ обозначает звено ПЭГ.

5 В некоторых вариантах осуществления каждый L_1 и L_2 независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 1.

Таблица 1: Примеры фрагментов L_1 и L_2 , предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|-----------|-----------|
| Мостик 1 | |
| Мостик 2 | |
| Мостик 3 | |
| Мостик 4 | |
| Мостик 5 | |
| Мостик 6 | |
| Мостик 7 | |
| Мостик 8 | |
| Мостик 9 | |
| Мостик 10 | |

| Название | Структура |
|-----------|-----------|
| Мостик 11 | |
| Мостик 12 | |

где каждый p независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; каждый q независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; каждый r независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

и каждый знак обозначает положение присоединения к X, Y или Z, при условии, что:

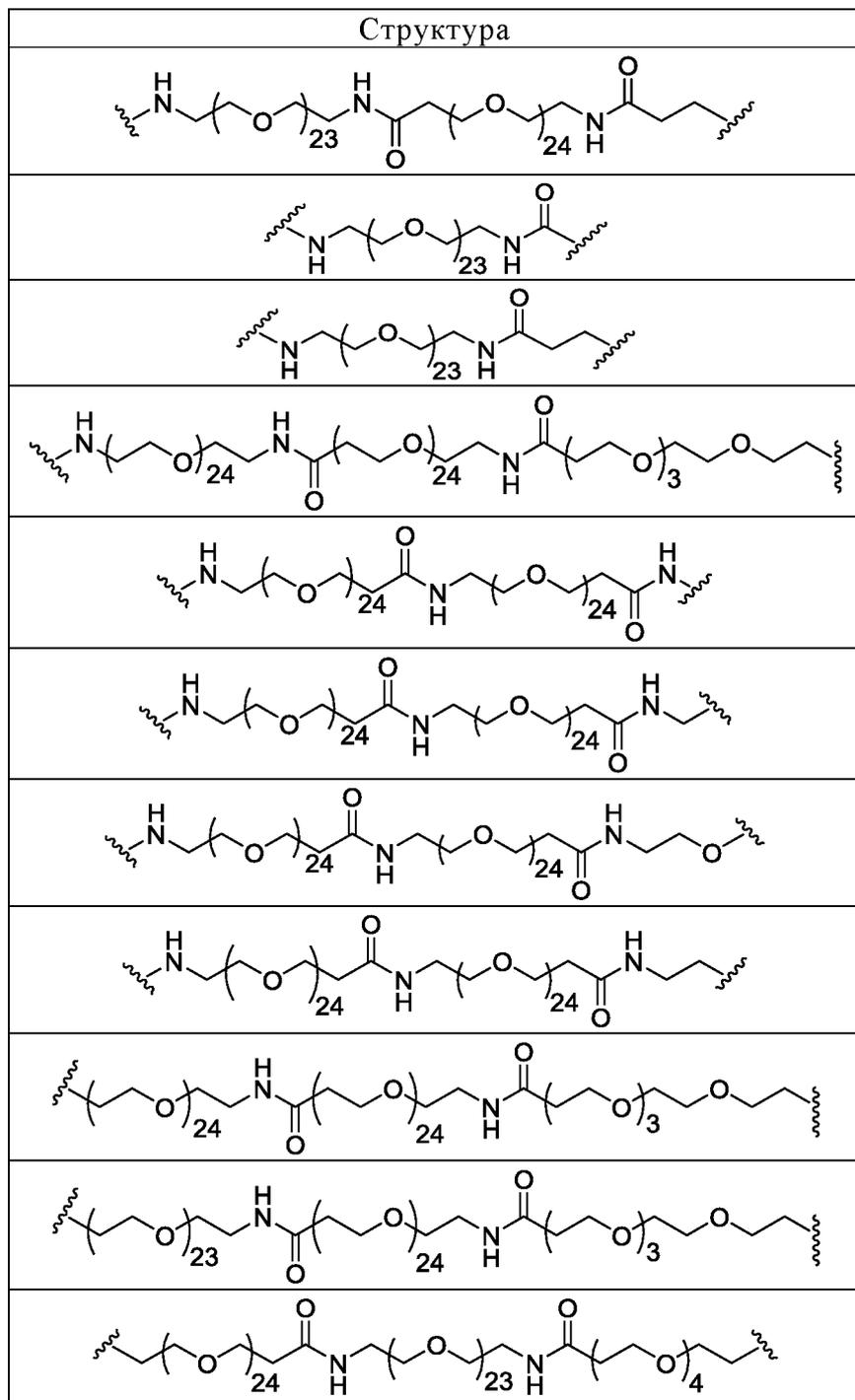
- (i) в мостике 1, 6 и 11: $p + q + r \geq 5$;
- (ii) в мостике 2, 3, 7, 8, 9 и 10: $p + q \geq 5$; и
- (iii) в мостике 4 и 5: $p \geq 5$.

В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и каждый r независимо равен 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый r равен 4.

В некоторых вариантах осуществления каждый L_1 и L_2 независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 2.

Таблица 2: Примеры фрагментов L_1 и L_2 , предлагаемых в настоящем изобретении

| Структура |
|-----------|
| |
| |



где знак  обозначает положение присоединения к X, Y или Z.

В некоторых вариантах осуществления L_1 и L_2 являются одинаковыми. В других вариантах осуществления L_1 и L_2 являются разными.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает ненасыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает ненасыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает насыщенный липид.

В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает насыщенный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает разветвленный липид. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает разветвленный липид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает липид с линейной цепью. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает обладающий липид с линейной цепью. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y обозначает холестерил. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает холестерил. В некоторых вариантах осуществления X и Y являются одинаковыми. В других вариантах осуществления X и Y являются разными.

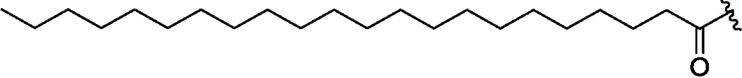
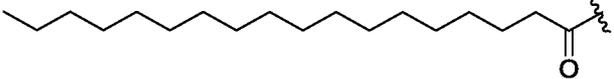
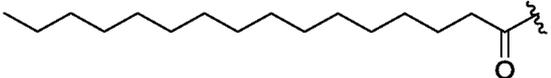
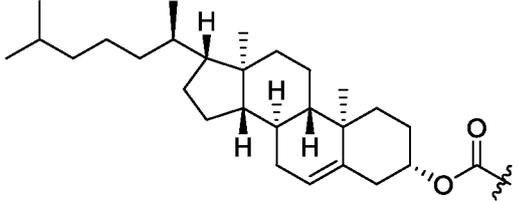
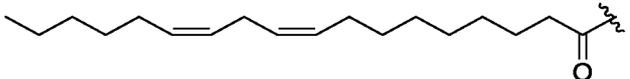
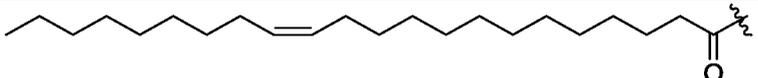
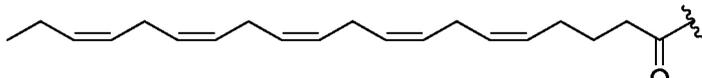
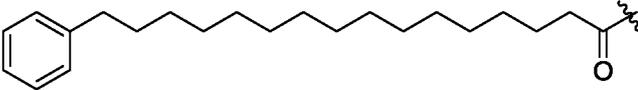
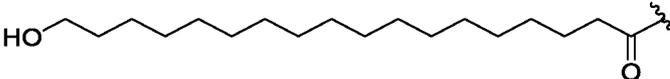
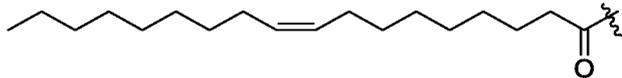
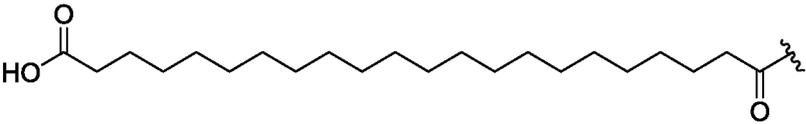
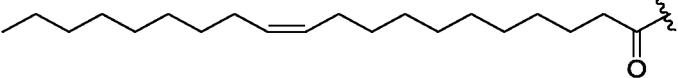
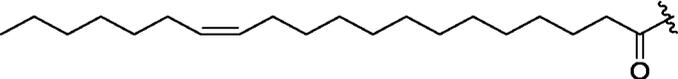
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y содержит от примерно 10 до примерно 45 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y содержит от примерно 10 до примерно 40 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y содержит от примерно 10 до примерно 35 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y содержит от примерно 10 до примерно 30 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y содержит от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y содержит от примерно 10 до примерно 20 атомов углерода.

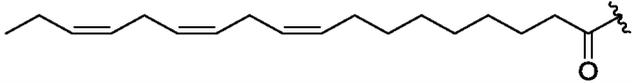
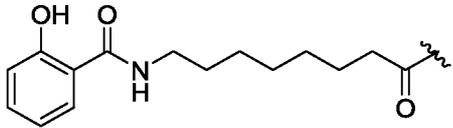
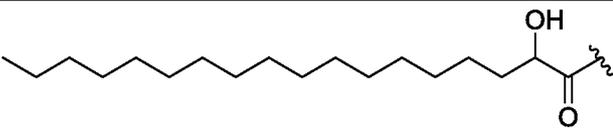
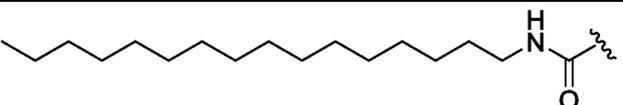
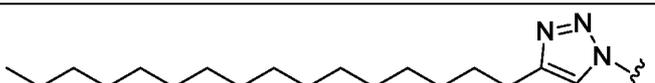
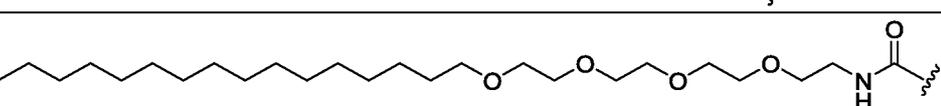
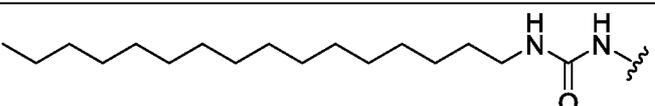
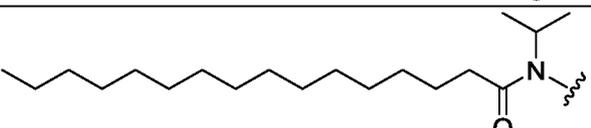
В некоторых вариантах осуществления X и Y каждый независимо содержит от примерно 10 до примерно 45 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления X и Y каждый независимо содержит от примерно 10 до примерно 40 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления X и Y каждый независимо содержит от примерно 10 до примерно 35 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления X и Y каждый независимо содержит от примерно 10 до примерно 30 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления X и Y каждый независимо содержит от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления X и Y каждый независимо содержит от примерно 10 до примерно 20 атомов углерода. Так, например, X и Y все независимо могут содержать 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3.

Таблица 3: Примеры фрагментов X и Y, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 4 (холестерил) |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |

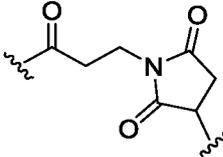
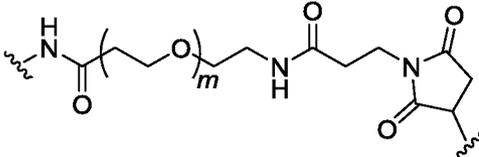
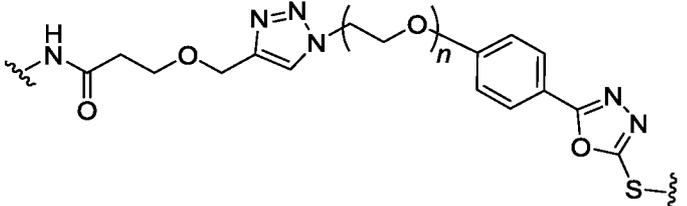
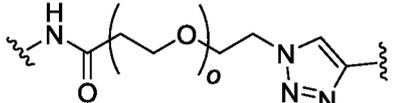
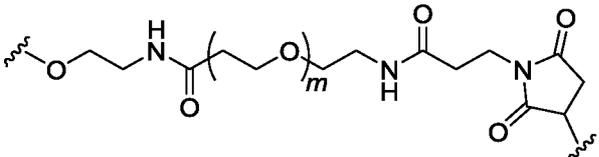
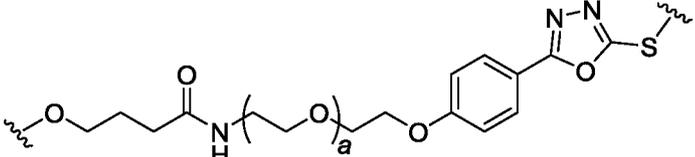
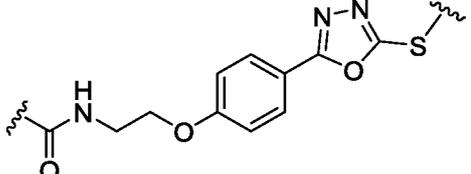
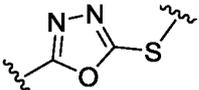
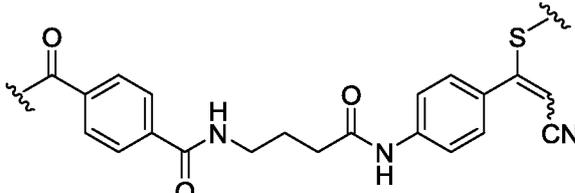
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L_1 или L_2 .

В некоторых вариантах осуществления L_A содержит по меньшей мере одно звено ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_A не содержит какие-либо звенья ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_A содержит $-C(O)-$, $-C(O)N(H)-$, $-N(H)C(O)-$, необязательно замещенную алкоксигруппу или необязательно замещенный алкиленгетероцикл. В некоторых вариантах осуществления L_A обозначает связь.

В некоторых вариантах осуществления L_A выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 4.

Таблица 4: Примеры фрагментов L_A, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1 |  |
| Линкер 2 |  |
| Линкер 3 |  |
| Линкер 4 |  |
| Линкер 5 |  |
| Линкер 6 |  |
| Линкер 7 |  |
| Линкер 8 |  |
| Линкер 9 |  |

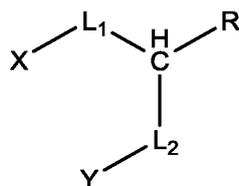
| Название | Структура |
|-----------|-----------|
| Линкер 10 | |
| Линкер 11 | |
| Линкер 12 | |
| Линкер 13 | |
| Линкер 14 | |

где каждый m , n , o и a независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и каждый знак  обозначает положение присоединения к Z или R_Z .

5 В некоторых вариантах осуществления каждый m независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23 или 25; каждый n независимо равен 2, 3, 4 или 5; каждый a независимо равен 2, 3 или 4; и каждый o независимо равен 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13. В некоторых вариантах осуществления каждый m независимо равен 2, 4, 8 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый n равен 3. В некоторых вариантах осуществления каждый o независимо равен 4, 8 или 12. В некоторых вариантах осуществления каждый a равен 3.

В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении.

15 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ia):



(Ia)

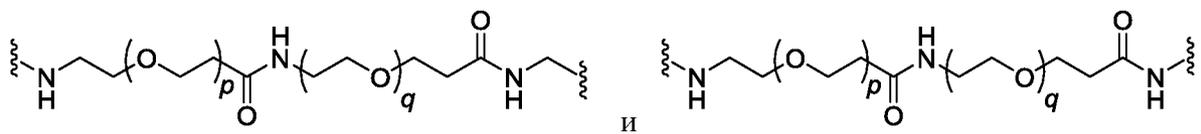
или его фармацевтически приемлемая соль, в которой каждый R, L₁, L₂, X и Y является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления X и Y все независимо выбраны из группы, состоящей из липида 3, липида 4, липида 5, липида 6, липида 7, липида 10, липида 12 и липида 19, указанных в Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁ или L₂.

В некоторых вариантах осуществления каждый L₁ и L₂ независимо выбран из группы, состоящей из мостика 2, мостика 3, мостика 4 и мостика 5, указанных в Таблице 1, где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или СН в формуле (Ia). В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24.

В некоторых вариантах осуществления L_A выбран из группы, состоящей из линкера 2, линкера 3 и линкера 4, указанных в Таблице 4. В некоторых вариантах осуществления каждый m независимо равен 2, 4, 8 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый n равен 4. В некоторых вариантах осуществления каждый o независимо равен 4, 8 или 12.

В некоторых вариантах осуществления L₁ и L₂ независимо выбраны из группы, состоящей из



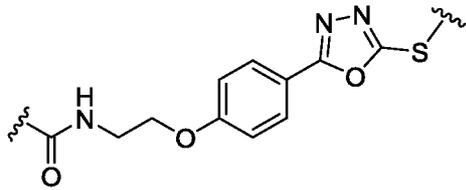
где каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; каждый q независимо

равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и каждый знак  обозначает положение

присоединения к X, Y или СН в формуле (Ia). В некоторых вариантах

осуществления каждый p равен 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24.

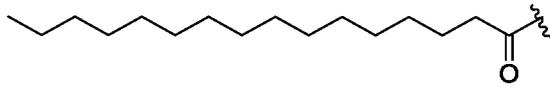
В некоторых вариантах осуществления L_A обозначает



и каждый знак  обозначает положение

5 присоединения к R_Z или CH в формуле (Ia).

В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначают



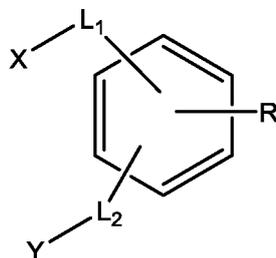
; где знак  обозначает положение

присоединения к L_1 или L_2 .

10 В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Ia) выбрано из группы, состоящей из LP 210a или LP 217a, указанных в Таблице 14, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R обозначает L_A-R_Z ; L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с остальной частью соединения; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

15 В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Ia) выбрано из группы, состоящей из LP 210b и LP 217b, указанных в Таблице 16, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ib):



(Ib)

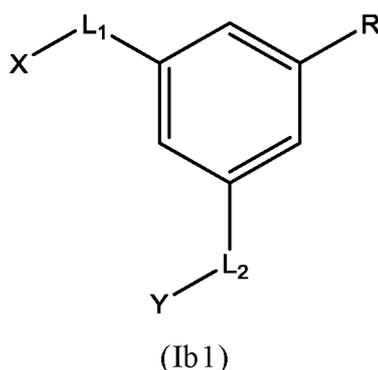
20 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой каждый R , L_1 , L_2 , X и Y является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I) или (Ia).

В некоторых вариантах осуществления X и Y все независимо выбраны из группы, состоящей липида 3 и липида 19, указанных в Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁ или L₂. В некоторых вариантах осуществления X и Y каждый обозначает липид 3. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает липид 19.

В некоторых вариантах осуществления каждый L₁ и L₂ независимо выбраны из группы, состоящей из мостика 3, мостика 5 и мостика 9, указанных в Таблице 1, где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или фенильному кольцу в формуле (Ib). В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24.

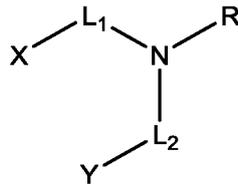
В некоторых вариантах осуществления L_A выбран из группы, состоящей из линкера 5, линкера 6, линкера 7, линкера 8 и линкера 14, указанных в Таблице 4, где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или фенильному кольцу в формуле (Ib). В некоторых вариантах осуществления каждый m равен 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления каждый a равен 3.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ib1):



или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia) или (Ib).

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ic):



(Ic)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib) или (Ib1).

В некоторых вариантах осуществления X и Y все независимо выбраны из группы, состоящей из липида 1, липида 2, липида 3, липида 5, липида 8, липида 9, липида 11, липида 12, липида 14, липида 15, липида 16, липида 17, липида 18, липида 19, липида 20, липида 21, липида 22, липида 23 и липида 24, указанных в

Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁ и L₂. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает липид 1, липид 2, липид 3, липид 5, липид 8, липид 9, липид 11, липид 12, липид 14, липид 15, липид 16, липид 17, липид 18, липид 19, липид 20, липид 21, липид 22, липид 23 или липид 24.

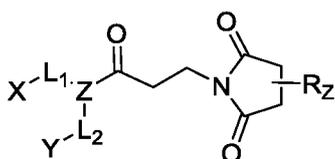
В некоторых вариантах осуществления каждый L₁ и L₂ независимо выбраны из группы, состоящей из мостика 1, мостика 6, мостика 10, мостика 11 и мостика

12, указанных в Таблице 1, где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или N в формуле (Ic). В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый r равен 4.

В некоторых вариантах осуществления L_A выбран из группы, состоящей из линкера 1, линкера 9, линкера 10, линкера 11, линкера 12 и линкера 13,

указанных в Таблице 4, где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или N в формуле (Ic).

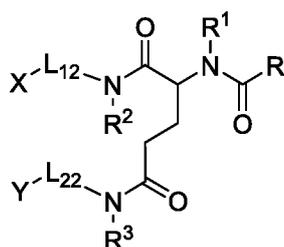
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Id):



(Id)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R_Z, Z, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib) (Ib1) или (Ic).

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic); L₁₂ обозначает L₁, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id); L₂₂ обозначает L₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id); и R¹, R² и R³ каждый независимо обозначает водород или C₁-C₆-алкил.

В некоторых вариантах осуществления; R обозначает L_{A2}-R_Z; L_{A2} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с -C(O)-; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; R¹, R² и R³ каждый независимо обозначает водород или C₁-C₆-алкил; L₁₂ и L₂₂ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления каждый L₁₂ и L₂₂ независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 5.

Таблица 5: Примеры фрагментов L₁₂ и L₂₂, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 1-2 | |
| Мостик 2-2 | |

где p и q все независимо равны 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; и каждый знак  обозначает положение присоединения к X , Y , $-NR^2-$ или $-NR^3-$, при условии, что:

- 5 (i) в мостике 1-2: $p + q \geq 5$; и
(ii) в мостике 2-2: $p \geq 5$.

В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24.

В некоторых вариантах осуществления L_{12} и L_{22} являются одинаковыми. В других вариантах осуществления L_{12} и L_{22} являются разными.

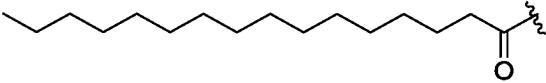
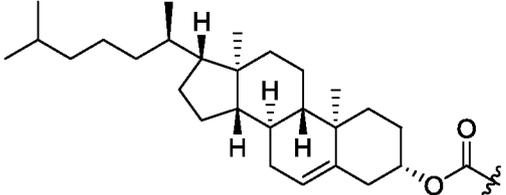
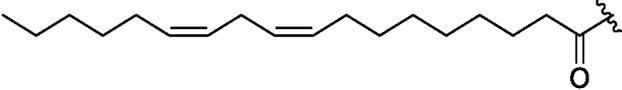
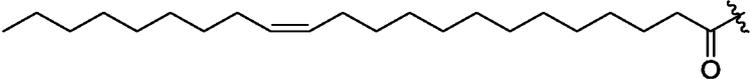
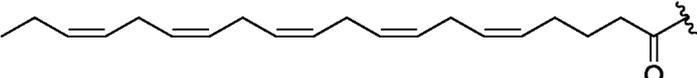
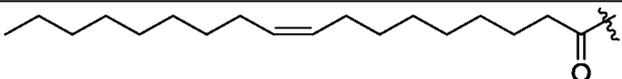
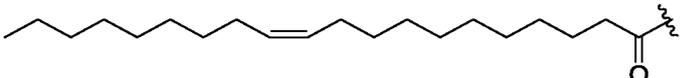
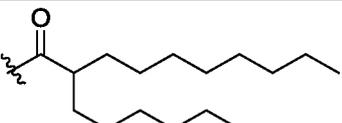
15 В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3, где

каждый знак  обозначает положение присоединения к L_{12} или L_{22} . В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы,

состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L_{12} или L_{22} .

20 В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 6. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 6.

Таблица 6: Примеры фрагментов X и Y, содержащихся в соединении формулы (II).

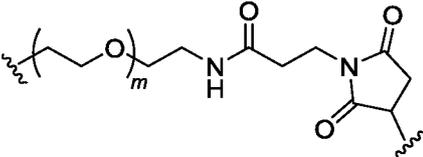
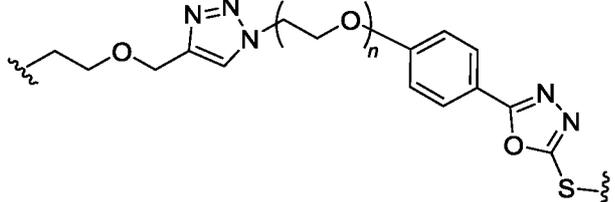
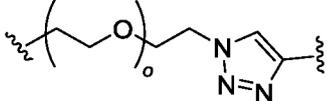
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 19 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₂ или L₂₂.

В некоторых вариантах осуществления L_{A2} содержит по меньшей мере одно звено ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{A2} не содержит какие-либо звенья ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{A2} содержит -C(O)-, -C(O)NH-, необязательно замещенную алкоксигруппу или необязательно замещенный алкиленгетероцикл. В некоторых вариантах осуществления L_{A2} обозначает связь.

В некоторых вариантах осуществления L_{A2} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 7.

Таблица 7: Примеры фрагментов L_{A2}, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1-2 |  |
| Линкер 2-2 |  |
| Линкер 3-2 |  |

где каждый m , n и o независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или $-C(O)-$.

5 В некоторых вариантах осуществления m равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23 или 25. В некоторых вариантах осуществления m равен 2, 4, 8 или 24. В некоторых вариантах осуществления n равен 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления n равен 4. В некоторых вариантах осуществления o равен 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13. В некоторых вариантах осуществления o равен 4, 8 или 12.

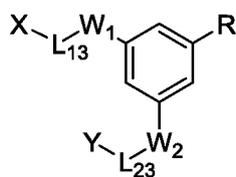
В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 , R^2 и R^3 независимо обозначает водород или C_1-C_3 -алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 , R^2 и R^3 обозначает водород.

15 В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II) выбрано из группы, состоящей из LP 38a, LP 39a, LP 43a, LP 44a, LP 45a, LP 47a, LP 53a, LP 54a, LP 55a, LP 57a, LP 58a, LP 59a, LP 62a, LP 101a, LP 104a и LP 111a, указанных в Таблице 14, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R обозначает $L_{A2}-R_Z$; L_{A2} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с $-C(O)-$; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

20 В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II) выбрано из группы, состоящей из LP 38b, LP 39b, LP 41b, LP 42b, LP 43b, LP 44b, LP 45b,

LP 47b, LP 53b, LP 54b, LP 55b, LP 57b, LP 58b, LP 59b, LP 60b, LP 62b, LP 101b, LP 104b, LP 106b, LP 107b, LP 108b, LP 109b и LP 111b, указанных в Таблице 16, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

5 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, X и Y являются
10 такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (II); L₁₃ обозначает L₁, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), или L₁₃ обозначает L₁₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II); L₂₃ обозначает L₂,
15 определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), или L₂₃ обозначает L₂₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II); W₁ обозначает -C(O)NR₁- или -OCH₂CH₂NR₁C(O)-, где R₁ обозначает водород или C₁-C₆-алкил; и W₂ обозначает -C(O)NR₂- или -OCH₂CH₂NR₂C(O)-, где R₂ обозначает водород
20 или C₁-C₆-алкил.

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A3}-R_Z; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; W₁ обозначает -C(O)NR₁- или -OCH₂CH₂NR₁C(O)-, где R₁ обозначает водород или C₁-C₆-алкил; W₂ обозначает -
25 C(O)NR₂- или -OCH₂CH₂NR₂C(O)-, где R₂ обозначает водород или C₁-C₆-алкил; L₁₃ и L₂₃ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления каждый L₁₃ и L₂₃ независимо выбран
30 из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 8.

Таблица 8: Примеры фрагментов L₁₃ и L₂₃, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 1-3 | |
| Мостик 2-3 | |
| Мостик 3-3 | |

где p и q все независимо равны 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; и каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y, W₁ или W₂; при условии, что:

(i) в мостике 1-3 и мостике 3-3: $p + q \geq 5$; и

(ii) в мостике 2-3: $p \geq 5$.

В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3, где

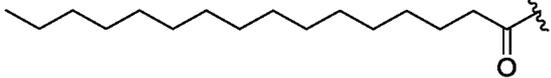
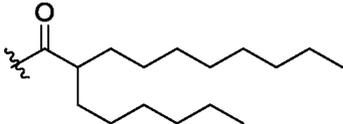
каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁₃ или L₂₃. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы,

состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁₃ или L₂₃.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 9. В

некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 9.

Таблица 9: Примеры фрагментов X и Y, содержащихся в соединении формулы (III).

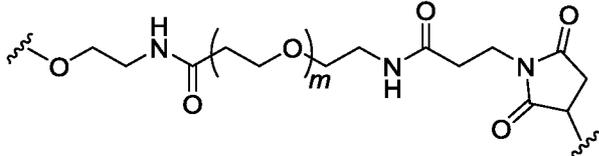
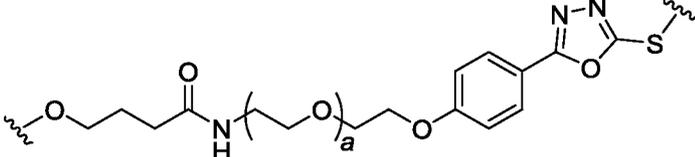
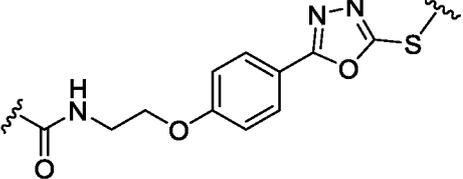
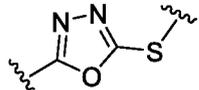
| Название | Структура |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 3 |  |
| Липид 19 |  |

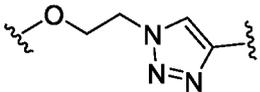
5 где знак  обозначает положение присоединения к L₁₃ или L₂₃.

В некоторых вариантах осуществления L_{A3} содержит по меньшей мере одно звено ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{A3} не содержит какие-либо звенья ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{A3} содержит -C(O)-, -C(O)N(H)-, -N(H)C(O)-, необязательно замещенную алкоксигруппу или
10 необязательно замещенный алкиленгетероцикл. В некоторых вариантах осуществления L_{A3} обозначает связь.

В некоторых вариантах осуществления L_{A3} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 10.

15 Таблица 10: Примеры фрагментов L_{A3}, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1-3 |  |
| Линкер 2-3 |  |
| Линкер 3-3 |  |
| Линкер 4-3 |  |

| Название | Структура |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 5-3 |  |

где каждый m и a независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или фенильному кольцу в формуле (III).

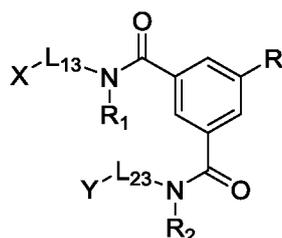
5 В некоторых вариантах осуществления m равен 1, 2, 3, 4, 5, 20, 21, 22, 23 или 25. В некоторых вариантах осуществления m равен 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления m равен 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления a равен 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления a равен 3.

10 В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил (например, метил, этил или *n*-пропил). В некоторых вариантах осуществления оба R^1 и R^2 обозначают водород.

15 В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) выбрано из группы, состоящей из LP 110a, LP 124a, LP 130a и LP 220a, указанных в Таблице 14, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R обозначает L_{A3} - R_Z ; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

20 В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) выбрано из группы, состоящей из LP 110b, LP 124b, LP 130b, LP 143b, LP 220b, LP 221b и LP 240b, указанных в Таблице 16, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

25 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IIIa):



(IIIa)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой каждый R, X и Y является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II) или (III); L₁₃ обозначает L₁,
5 определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), L₁₃ обозначает L₁₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L₁₃ является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III); L₂₃ обозначает L₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), L₂₃ обозначает L₂₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L₁₃ является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III); и каждый R₁ и R₂ является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II) или (III).
10
15

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A3}-R_Z; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; R₁ и R₂ каждый независимо обозначает водород или C₁-C₆-алкил (например, метил, этил, н-пропил, н-бутил или н-пентил); L₁₃ и L₂₃ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.
20

В некоторых вариантах осуществления каждый L₁₃ и L₂₃ выбран из группы, состоящей из мостика 1-3 и мостика 2-3, указанных в Таблице 8, где каждый

25 знак  обозначает положение присоединения к X, Y, -NR₁- или -NR₂- в формуле (IIIa), при условии, что:

(i) в мостике 1-3: $p + q \geq 5$; и

(ii) в мостике 2-3: $p \geq 5$.

В некоторых вариантах осуществления один из L₁₃ и L₂₃ обозначает мостик 1-3 и другой обозначает мостик 2-3. В некоторых вариантах осуществления каждый L₁₃ и L₂₃ обозначает мостик 1-3. В некоторых вариантах осуществления каждый L₁₃ и L₂₃ обозначает мостик 2-3.
30

В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый r равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 24. В некоторых вариантах осуществления q равен 24.

5 В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из липида 3 и липида 19, указанных в Таблице 9,

где каждый знак  обозначает положение присоединения к L_{13} или L_{23} в формуле (IIIa). В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из липида 3 и липида 19. В некоторых вариантах осуществления один из X и Y обозначает липид 3 и другой обозначает липид 19. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает липид 3. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает липид 19.

10 В некоторых вариантах осуществления L_{A3} выбран из группы, состоящей из линкера 1-3, линкера 2-3 и линкера 5-3, указанных в Таблице 10, где каждый

15 знак  обозначает положение присоединения к R_Z или фенильному кольцу в формуле (IIIa). В некоторых вариантах осуществления L_{A3} обозначает линкер 1-3. В некоторых вариантах осуществления L_{A3} обозначает линкер 2-3. В некоторых вариантах осуществления L_{A3} обозначает линкер 5-3.

20 В некоторых вариантах осуществления m равен 1, 2, 3, 4, 5, 20, 21, 22, 23 или 25. В некоторых вариантах осуществления m равен 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления m равен 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления a равен 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления a равен 3.

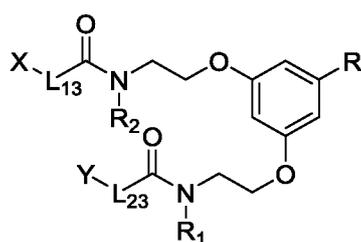
25 В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 обозначает водород.

30 В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IIIa) выбрано из группы, состоящей из LP 110a, LP 124a и LP 130a, указанных в Таблице 14, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R обозначает L_{A3} - R_Z ; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент,

соединяющий R_Z с фенильным кольцом; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IIIa) выбрано из группы, состоящей из LP 110b, LP 124b, LP 130b, LP 143b и LP 240b, указанных в Таблице 16, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IIIb):



(IIIb)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II), (III) или (IIIa); L₁₃ обозначает L₁, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), L₁₃ обозначает L₁₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L₁₃ является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III) или (IIIa); L₂₃ обозначает L₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic) или (Id), L₂₃ обозначает L₂₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L₂₃ является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III) или (IIIa); и каждый R₁ и R₂ является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), (III) или (IIIa).

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A3}-R_Z; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; R₁ и R₂ каждый независимо выбран из группы, включающей водород или C₁-C₆-алкил; L₁₃ и L₂₃ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5

звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления каждый L_{13} и L_{23} обозначает мостик

3-3, указанный в Таблице 8, где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или -C(O)-, при условии, что в мостике 3-3: $p + q \geq 5$.

В некоторых вариантах осуществления p равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления p равен 23. В некоторых вариантах осуществления p равен 24. В некоторых вариантах осуществления q равен 24.

В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает липид 3,

указанный в Таблице 9, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L_{13} или L_{23} .

В некоторых вариантах осуществления L_{A3} выбран из группы, состоящей из

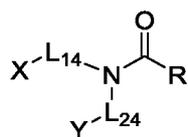
линкера 3-3 и линкера 4-3, указанных в Таблице 10, где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или фенильному кольцу в формуле (IIIb). В некоторых вариантах осуществления L_{A3} обозначает линкер 3-3. В некоторых вариантах осуществления L_{A3} обозначает линкер 4-3.

В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 и R^2 обозначает водород.

В некоторых вариантах осуществления соединением формулы (IIIb) является LP 220a, указанный в Таблице 14, или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R обозначает L_{A3} - R_Z ; L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IIIb) выбран из группы, состоящей из LP 220b и LP 221b, указанных в Таблице 16, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II), (III), (IIIa) или (IIIb); L₁₄ обозначает L₁, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic), L₁₄ обозначает L₁₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L₁₄ обозначает L₁₃, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III), (IIIa) или (IIIb); L₂₄ обозначает L₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic), L₂₄ обозначает L₂₂, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (II), или L₂₄ обозначает L₂₃, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (III), (IIIa) или (IIIb).

В некоторых вариантах осуществления R обозначает L_{A4}-R_Z; L_{A4} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с -C(O)-; R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; L₁₄ и L₂₄ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления каждый L₁₄ и L₂₄ независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 11.

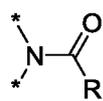
Таблица 11: Примеры фрагментов L₁₄ и L₂₄, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 1-4 | |
| Мостик 2-4 | |

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 3-4 | |
| Мостик 4-4 | |
| Мостик 5-4 | |

где каждый p независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; каждый q независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; каждый r независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

и каждый знак обозначает положение присоединения к X, Y или фрагменту



в формуле (IV), где каждый знак * обозначает положение присоединения к L_{14} или L_{24} ; при условии, что:

- (i) в мостике 1-4, мостике 2-4 и мостике 4-4: $p + q + r \geq 5$; и
 (ii) в мостике 3-4: $p + q \geq 5$.

В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления каждый p независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25. В некоторых вариантах осуществления каждый q независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый g независимо равен 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления каждый g равен 4.

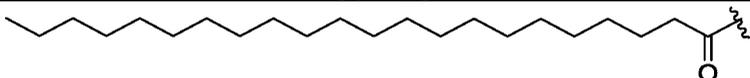
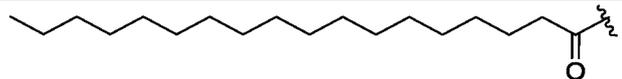
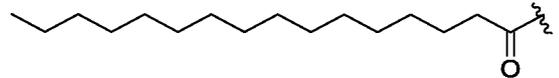
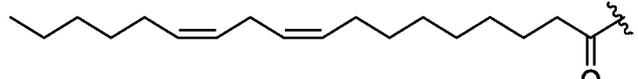
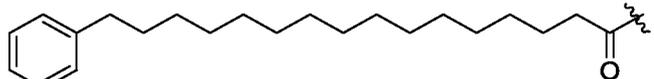
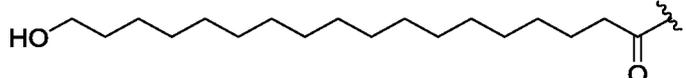
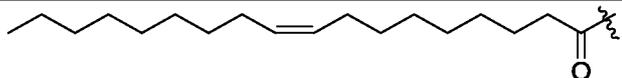
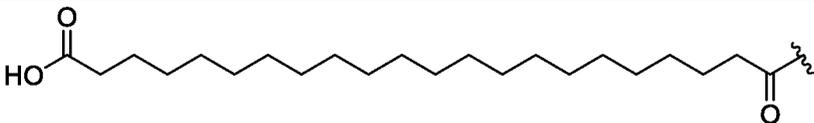
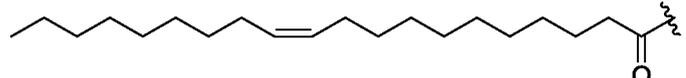
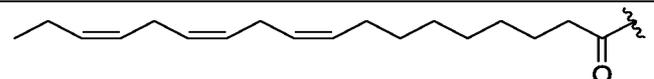
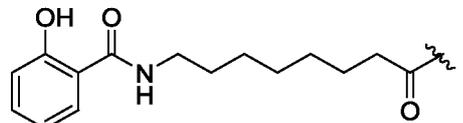
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3, где

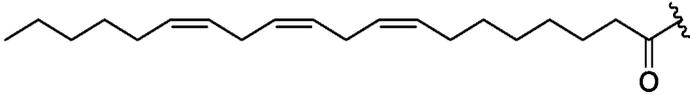
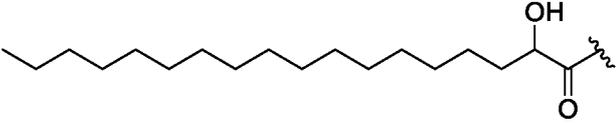
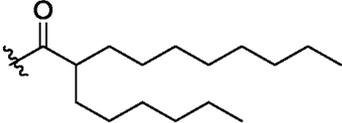
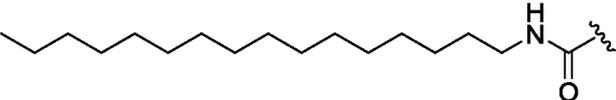
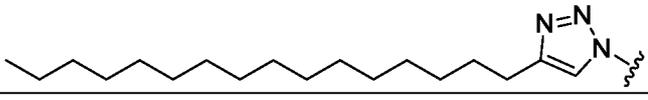
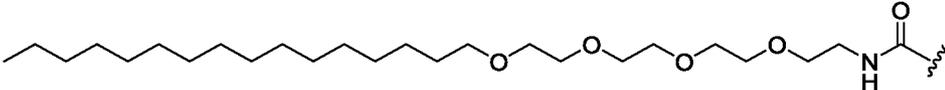
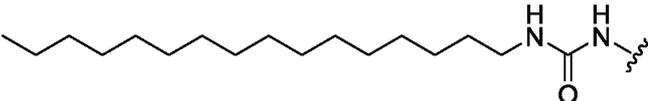
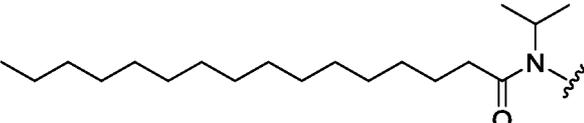
каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁₄ или L₂₄. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы,

состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁₄ или L₂₄.

- 5 В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из X и Y выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 12. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 12.

10 Таблица 12: Примеры фрагментов X и Y, содержащихся в соединении формулы (IV)

| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |

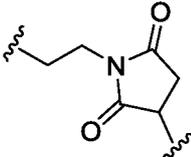
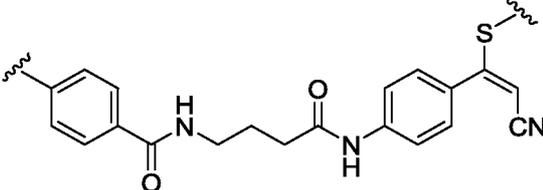
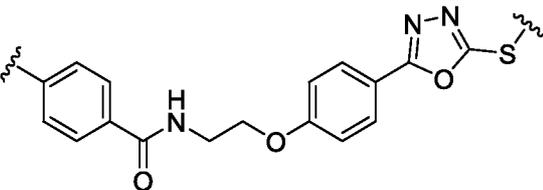
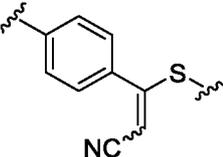
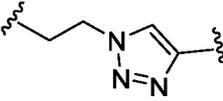
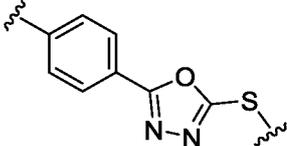
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₄ или L₂₄.

В некоторых вариантах осуществления L_{A4} содержит по меньшей мере одно звено ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{A4} не содержит какие-либо звенья ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления L_{A4} содержит -C(O)-, -C(O)NH-, необязательно замещенную алкоксигруппу или необязательно замещенный алкиленгетероцикл. В некоторых вариантах осуществления L_{A4} обозначает связь.

В некоторых вариантах осуществления L_{A4} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 13.

Таблица 13: Примеры фрагментов L_{A4}, предлагаемых в настоящем изобретении

| Название | Структура |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1-4 |  |
| Линкер 2-4 |  |
| Линкер 3-4 |  |
| Линкер 4-4 |  |
| Линкер 5-4 |  |
| Линкер 6-4 |  |

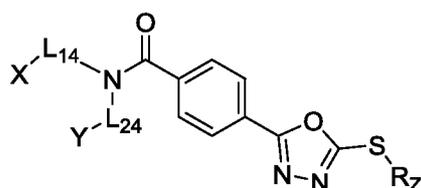
где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или $-C(O)-$ в формуле (IV).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IV) выбрано из группы, состоящей из LP 1a, LP 28a, LP 29a, LP 48a, LP 49a, LP 56a, LP 61a, LP 87a, LP 89a, LP 90a, LP 92a, LP 93a, LP 94a, LP 95a, LP 102a, LP 103a, LP 223a, LP 225a, LP 246a, LP 339a, LP 340a, LP 357a и LP 358a, указанных в Таблице 14, или фармацевтически приемлемой соли любого из этих соединений, где каждый R обозначает $L_{A4}-R_Z$; L_{A4} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с $-C(O)-$; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IV) выбрано из группы, состоящей из LP 1b, LP 28b, LP 29b, LP 48b, LP 49b, LP 56b, LP 61b, LP 87b, LP 89b, LP 90b, LP 92b, LP 93b, LP 94b, LP 95b, LP 102b, LP 103b, LP

223b, LP 224b, LP 225b, LP 226b, LP 238b, LP 246b, LP 247b, LP 339b, LP 340b, LP 357b и LP 358b, указанных в Таблице 16, или фармацевтически приемлемой соли любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

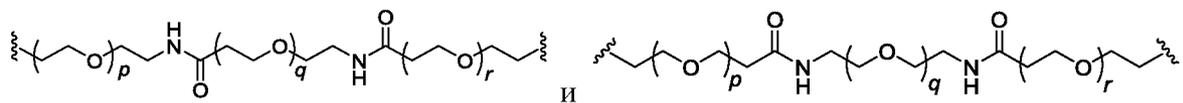
5 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (IVa):



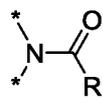
(IVa)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой X и Y являются
10 такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (II), (III), (IIIa), (IIIb) или (IV); L_{14} и L_{24} являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (IV); и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

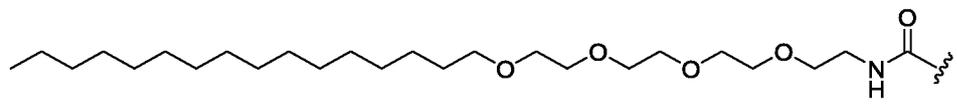
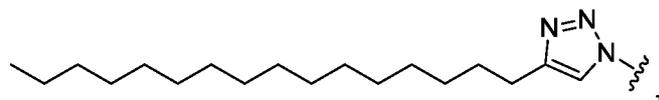
15 В некоторых вариантах осуществления R_Z включает средство на основе олигонуклеотида; каждый L_{14} и L_{24} независимо выбран из группы, состоящей из

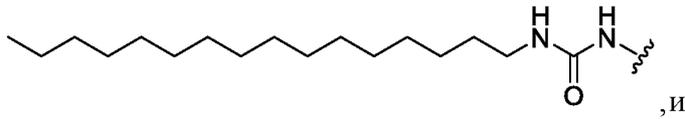


где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или фрагменту

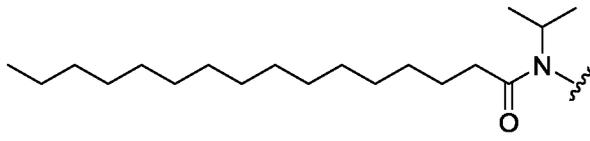


20 L_{14} или L_{24} , каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25, каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25, и каждый g независимо равен 2, 3, 4, 5 или 6; и каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:





, и



, где знак  обозначает положение

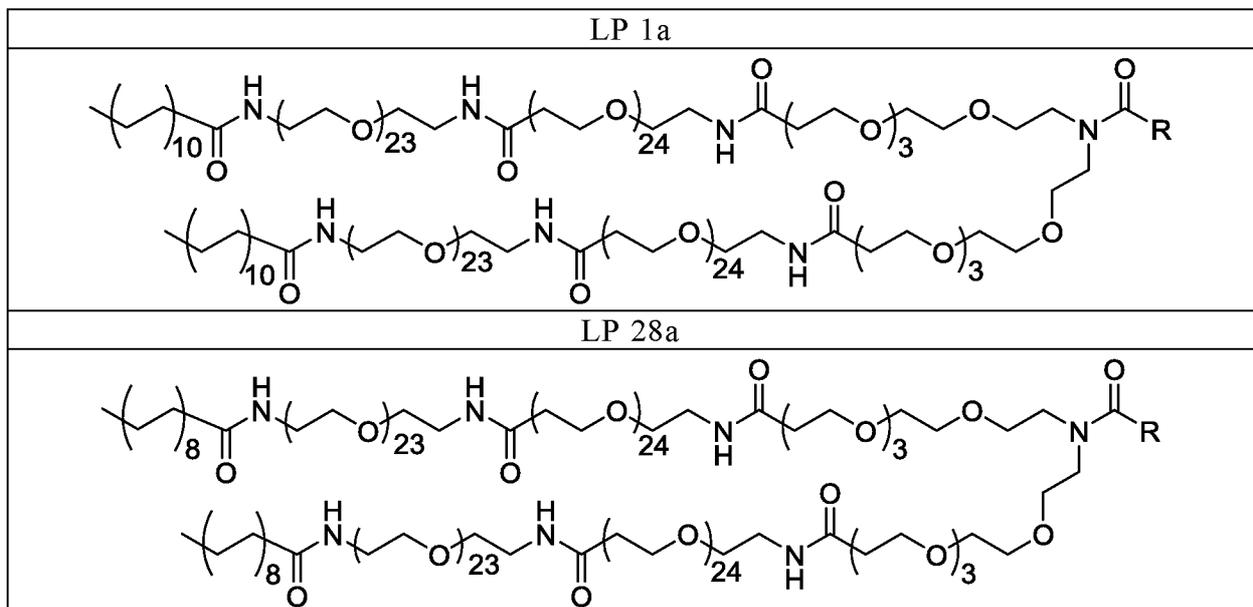
присоединения к L₁₄ или L₂₄.

В некоторых вариантах осуществления каждый р независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый р равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый р равен 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый г равен 4.

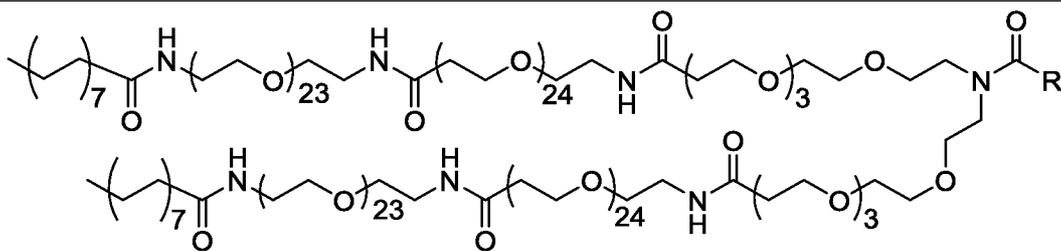
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IVa) выбрано из группы, состоящей из LP 339b, LP 340b, LP 357b и LP 358b, указанных в Таблице 16, или фармацевтически приемлемой соли любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 14, или их фармацевтически приемлемых солей.

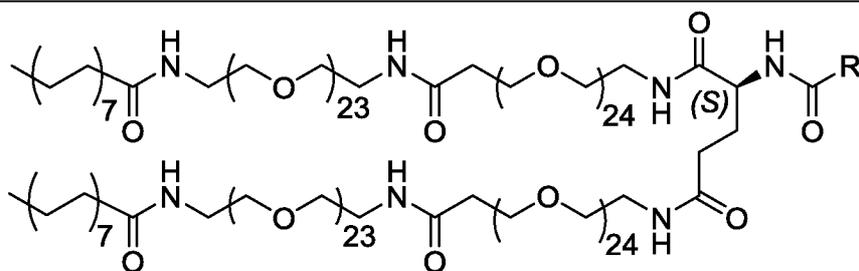
Таблица 14: Примеры соединений, предлагаемых в настоящем изобретении (номер соединения указан перед его структурой)



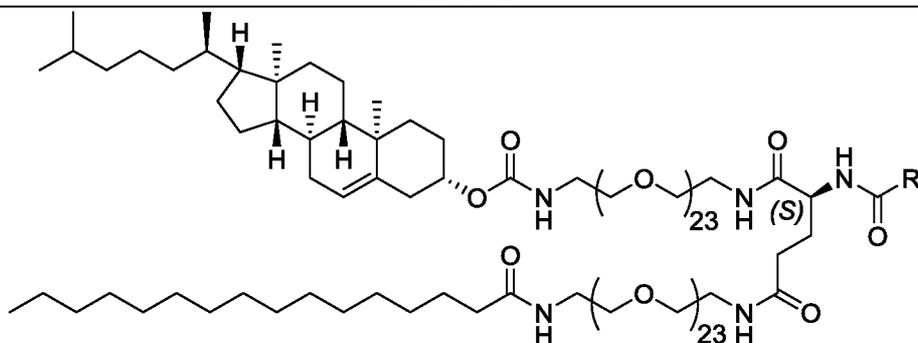
LP 29a



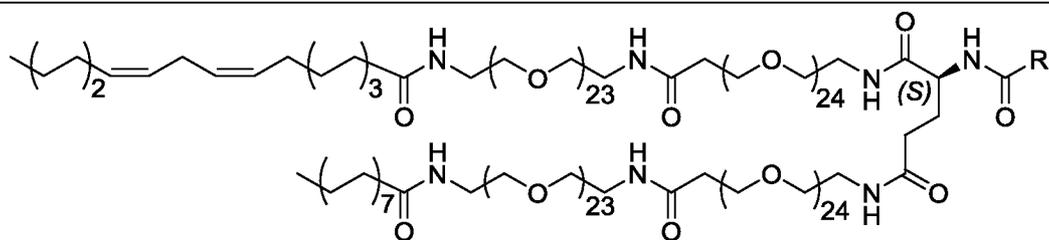
LP 38a



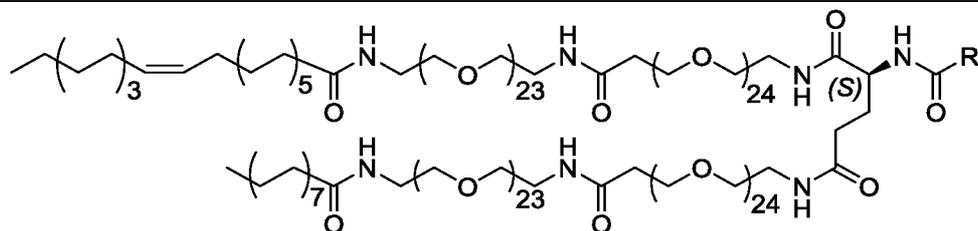
LP 39a



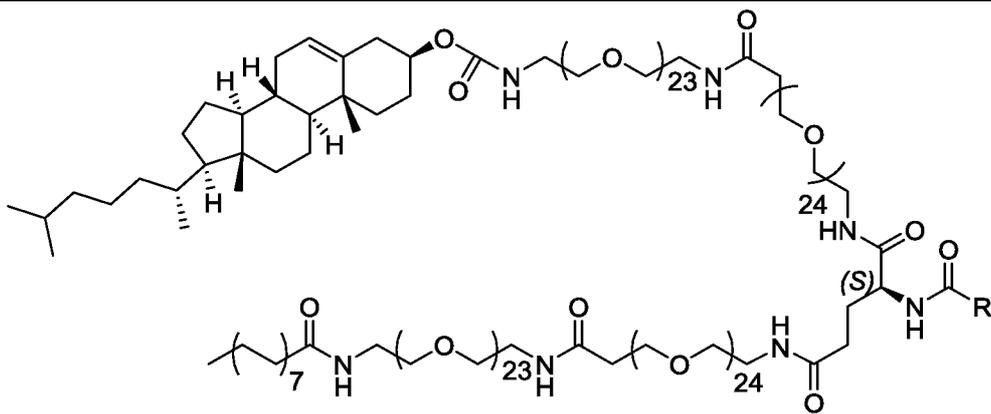
LP 43a



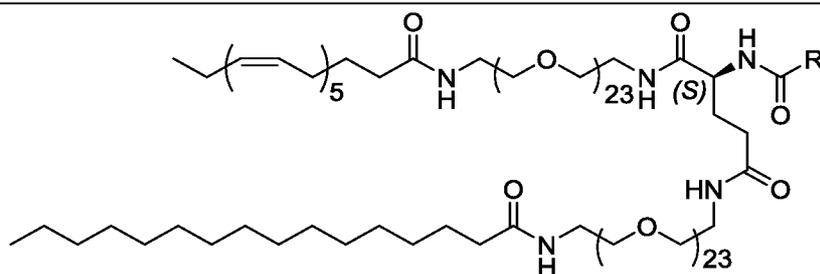
LP 44a



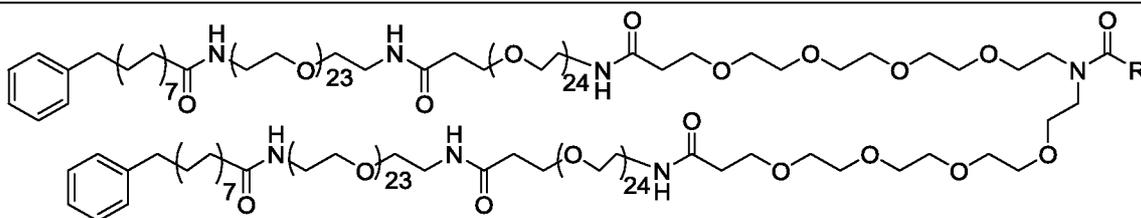
LP 45a



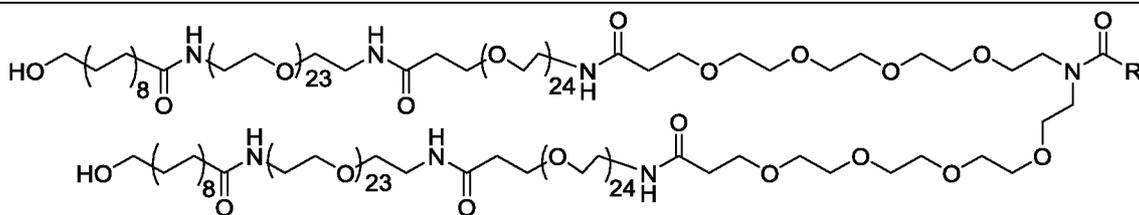
LP 47a



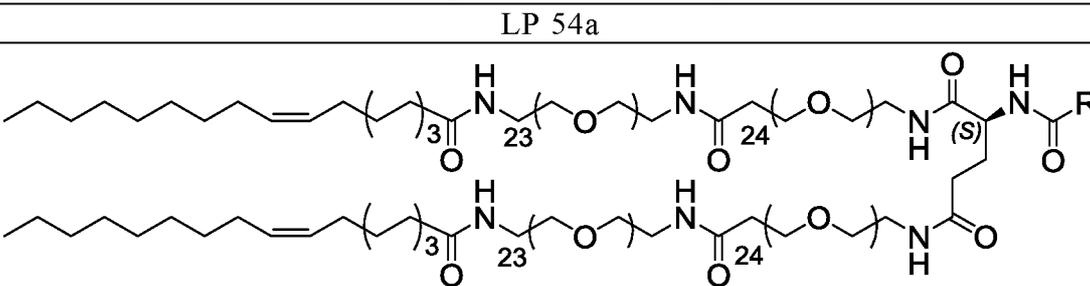
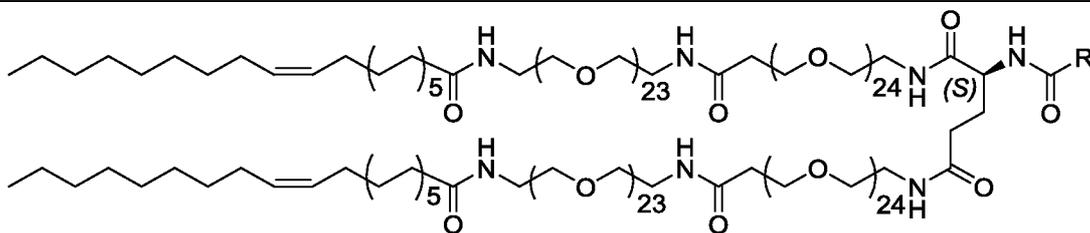
LP 48a



LP 49a

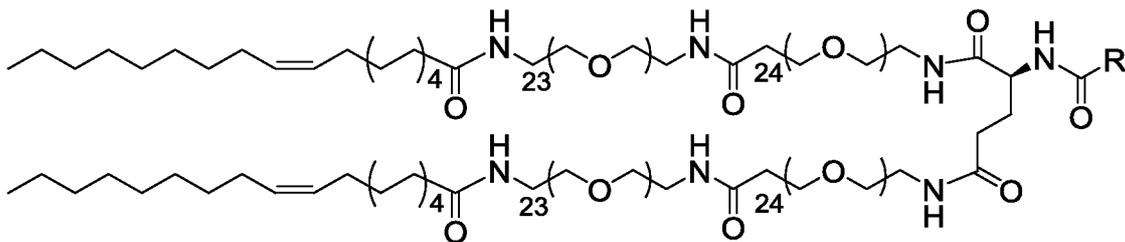


LP 53a

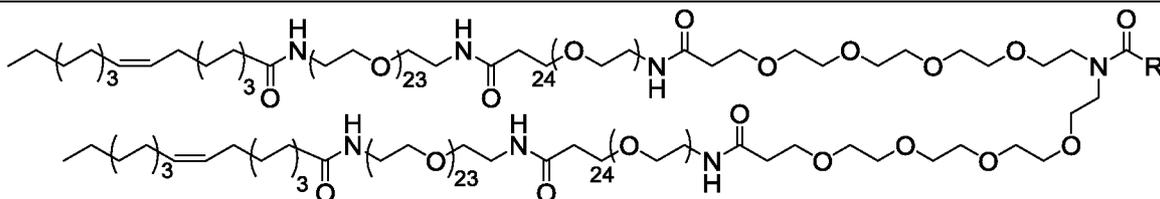


LP 54a

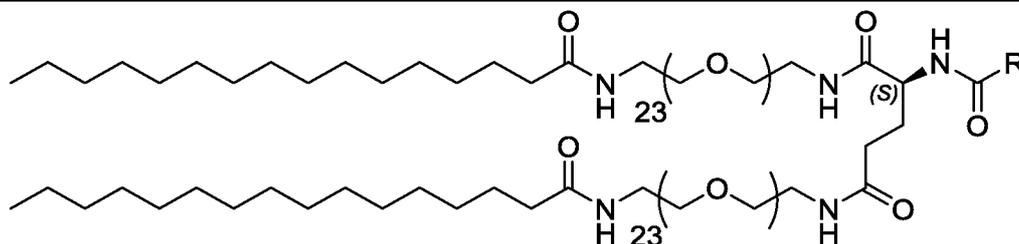
LP 55a



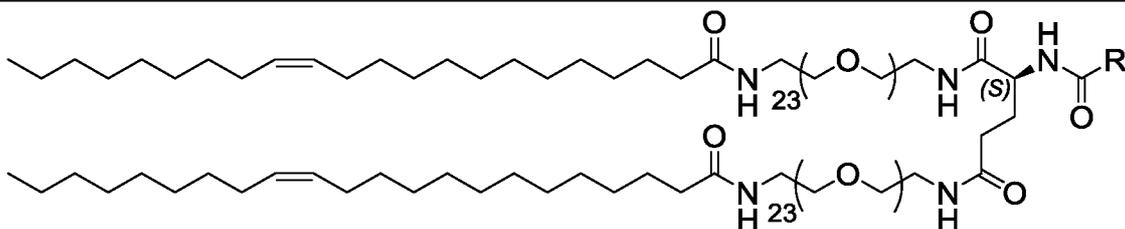
LP 56a



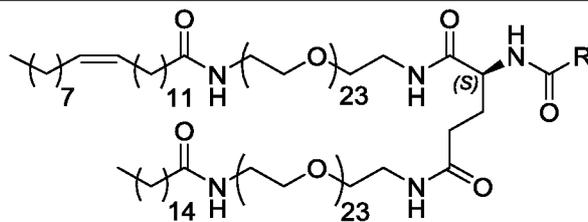
LP 57a



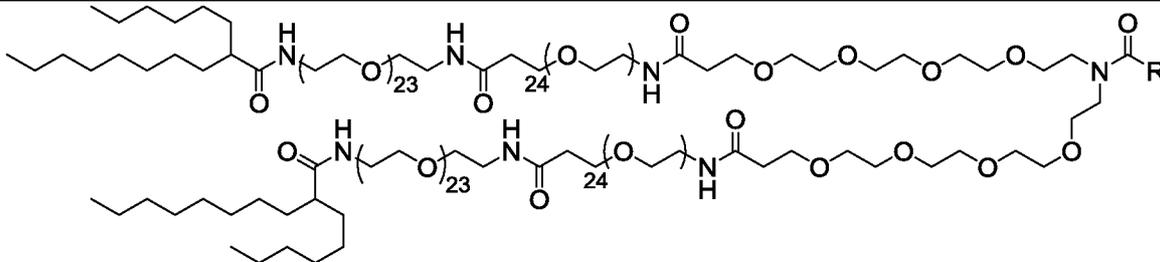
LP 58a



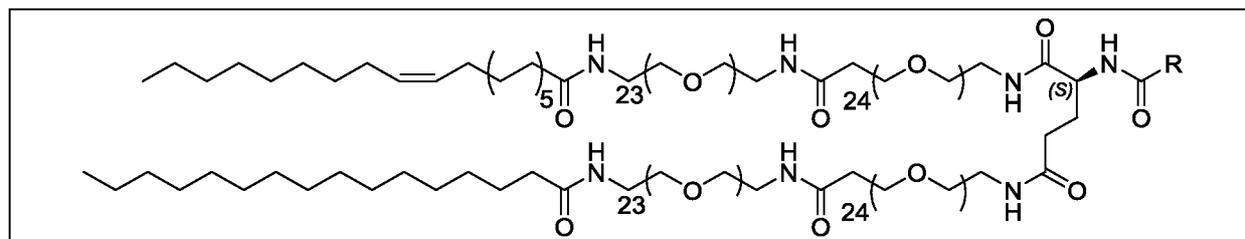
LP 59a



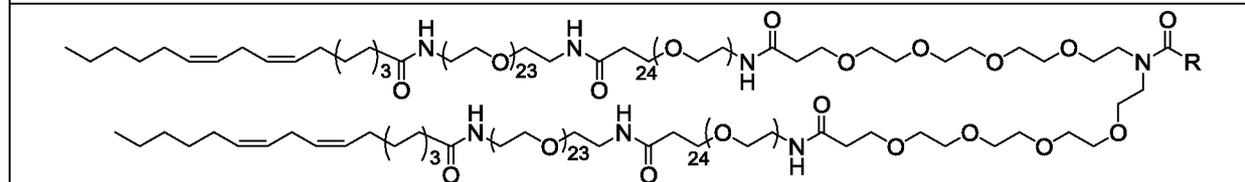
LP 61a



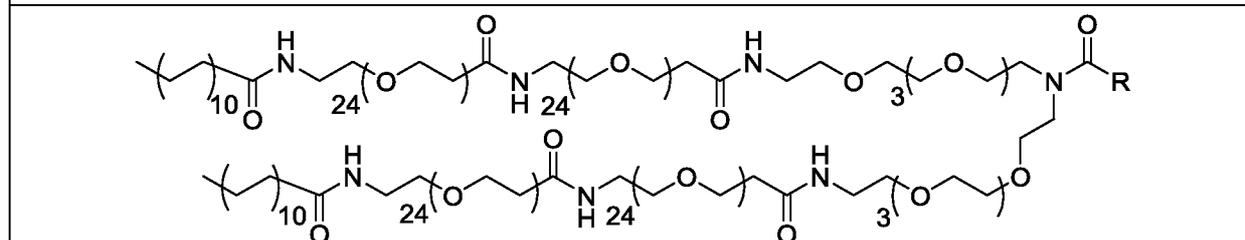
LP 62a



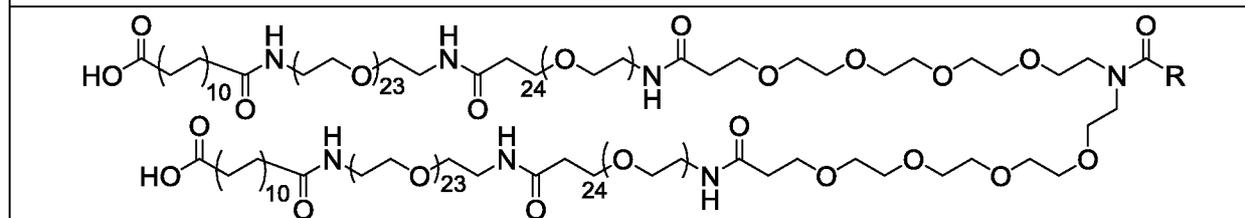
LP 87a



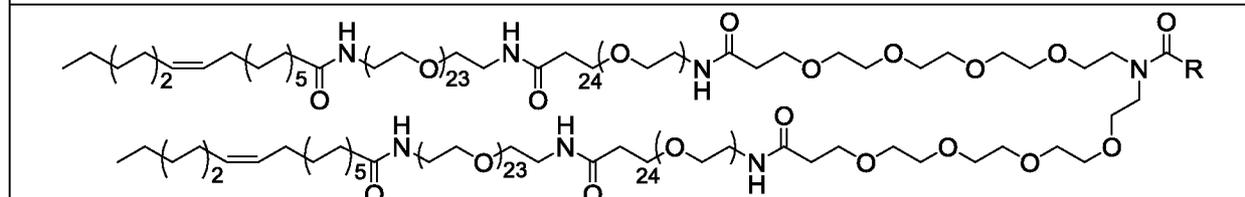
LP 89a



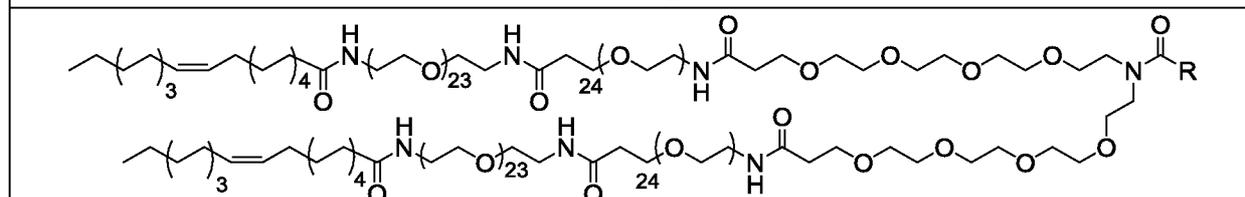
LP 90a



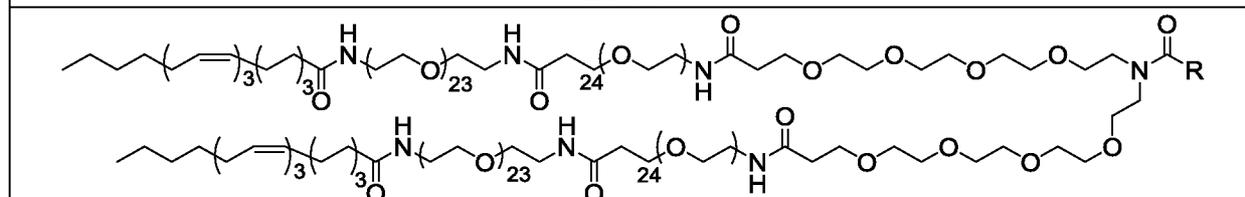
LP 92a



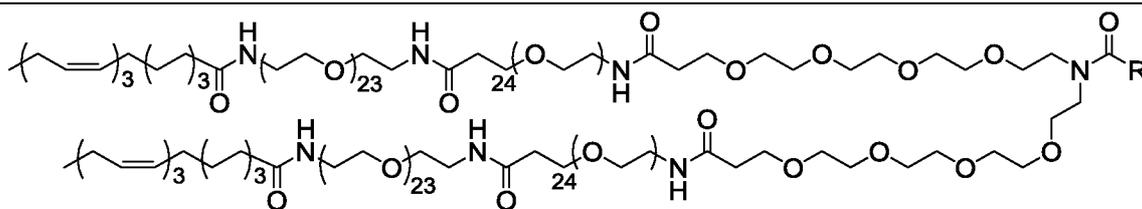
LP 93a



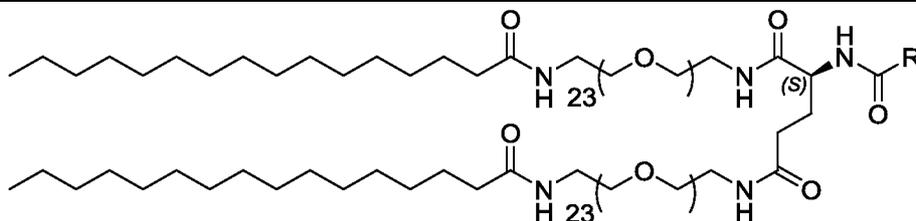
LP 94a



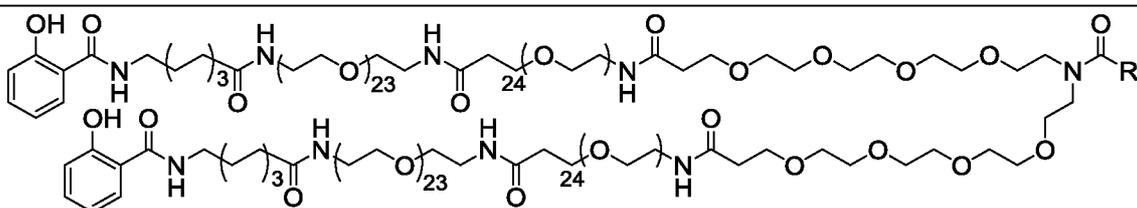
LP 95a



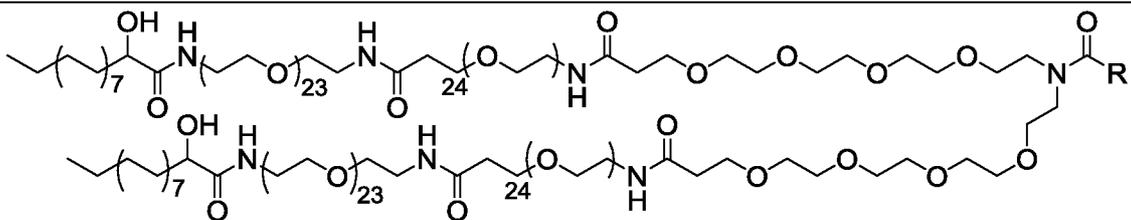
LP 101a



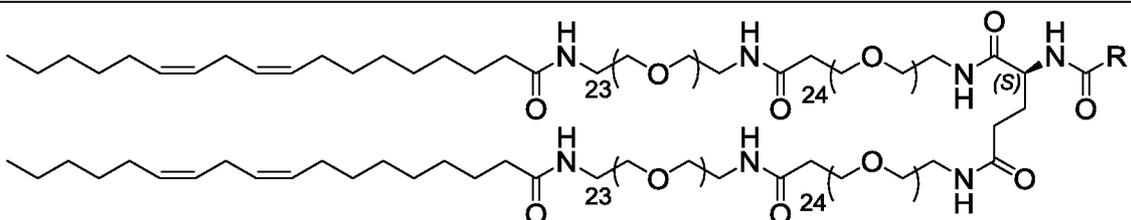
LP 102a



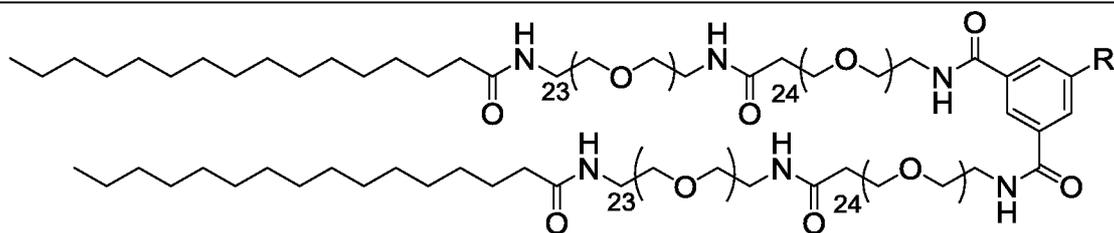
LP 103a



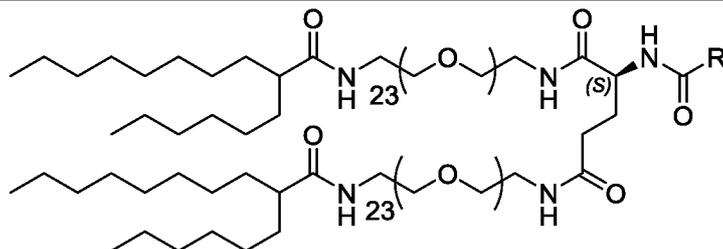
LP 104a



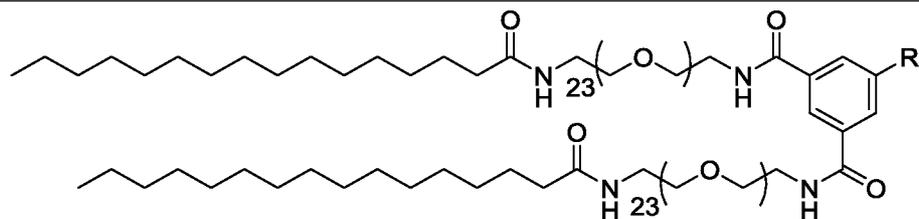
LP 110a



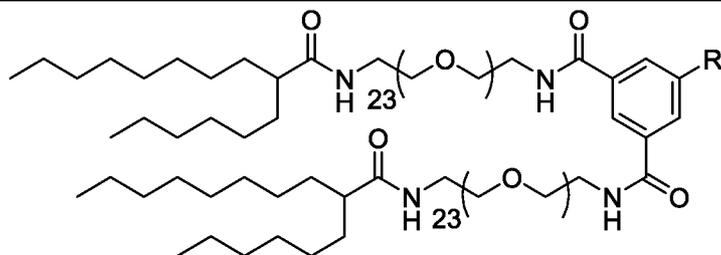
LP 111a



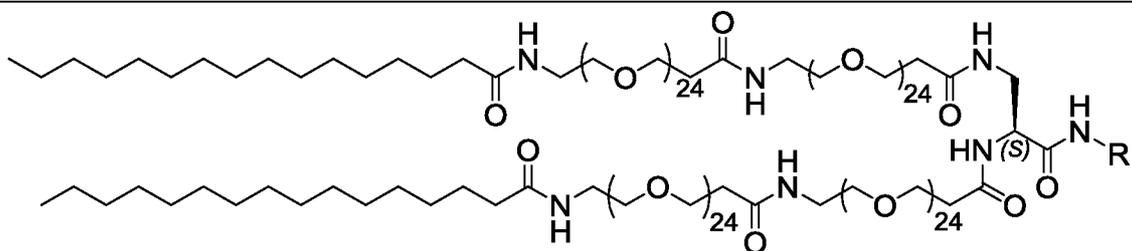
LP 124a



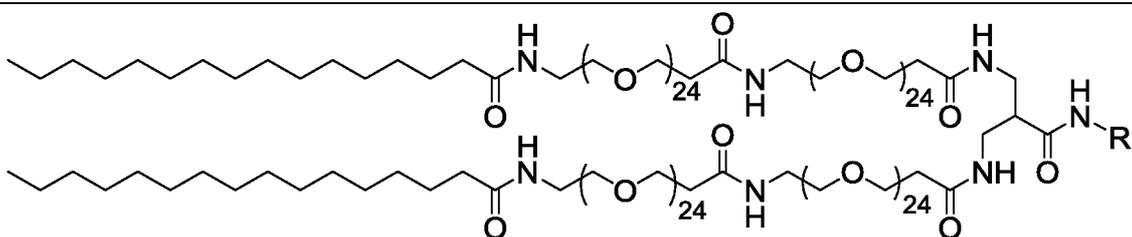
LP 130a



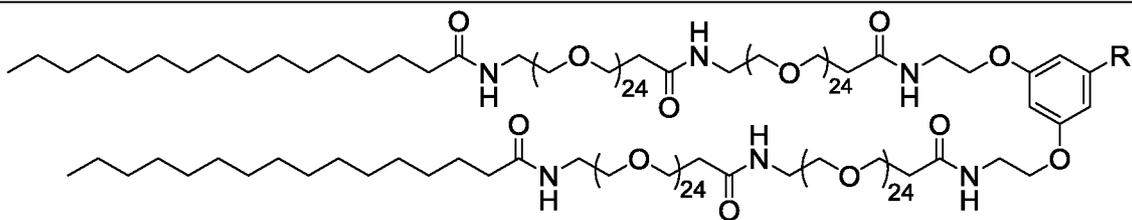
LP 210a



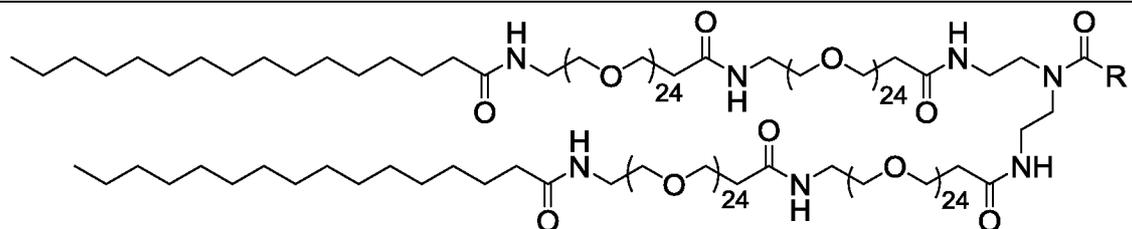
LP 217a



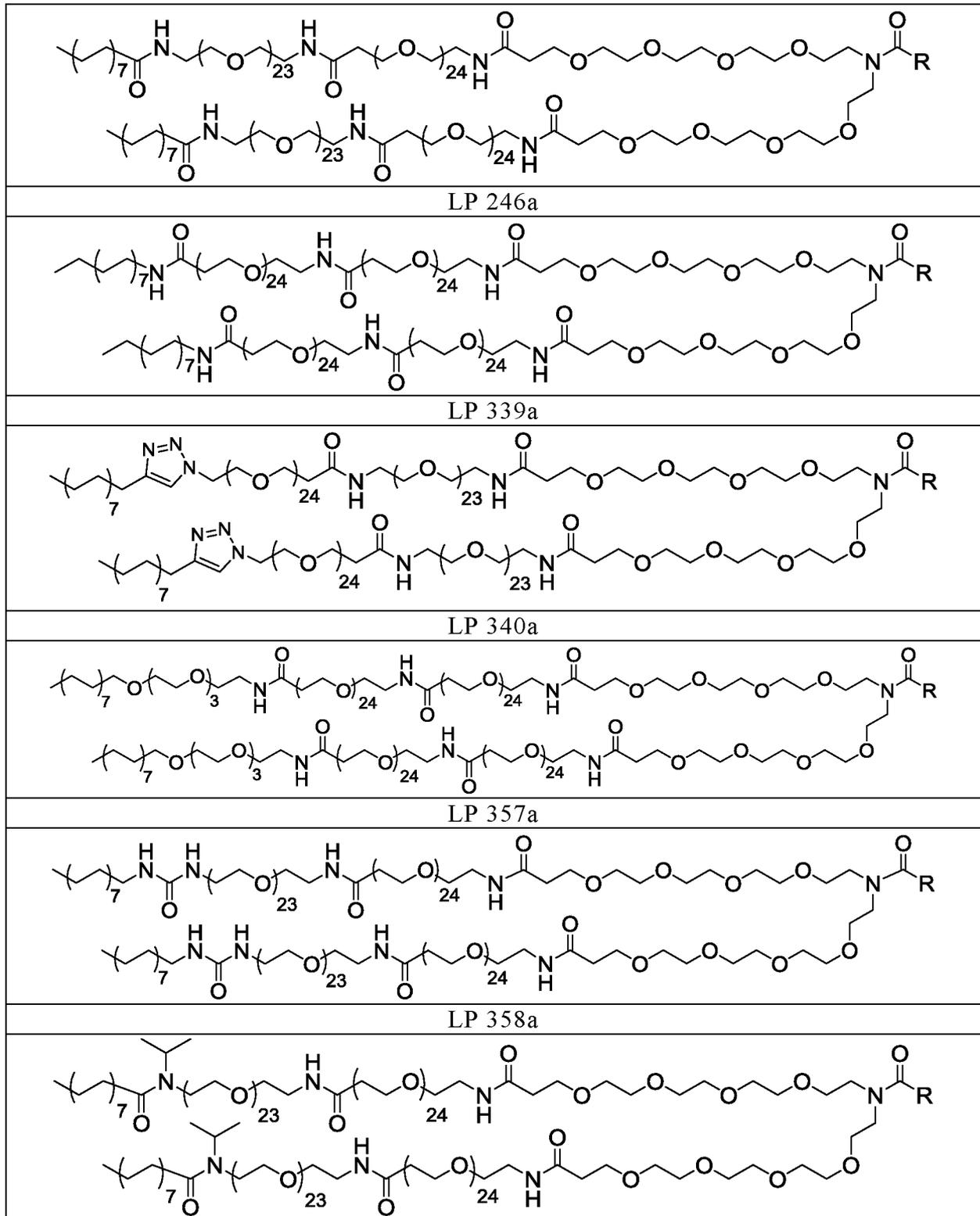
LP 220a



LP 223a



LP 225a

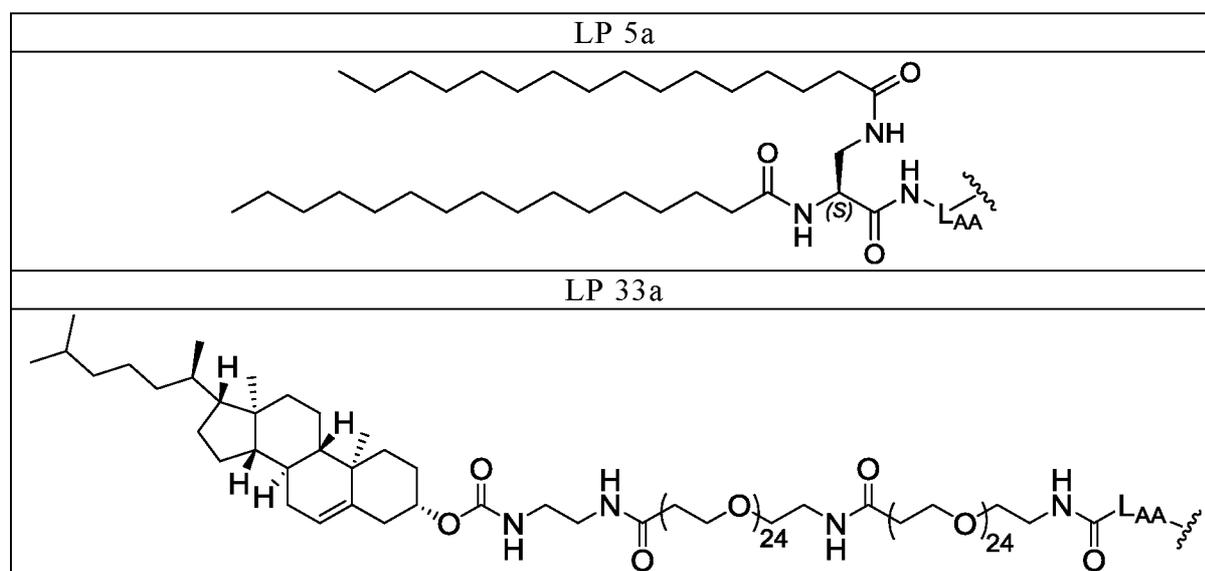


или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa).

В некоторых вариантах осуществления каждый R обозначает L_A-R_Z ; L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с остальной частью соединения; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

5 В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 15, или их фармацевтически приемлемых солей.

Таблица 15: Примеры соединений, предлагаемых в настоящем изобретении (номер соединения указан перед его структурой)



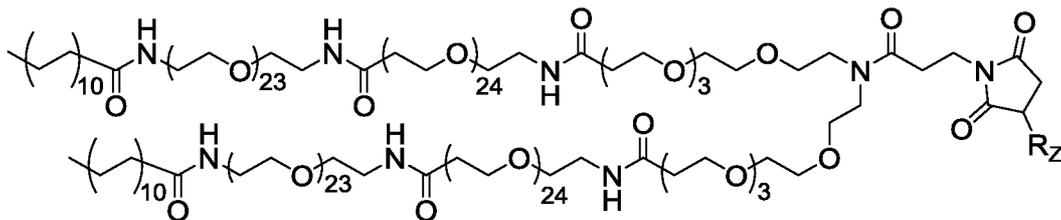
10 или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где R является таким, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa).

15 В некоторых вариантах осуществления каждый R обозначает L_A-R_Z ; L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с остальной частью соединения; и R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

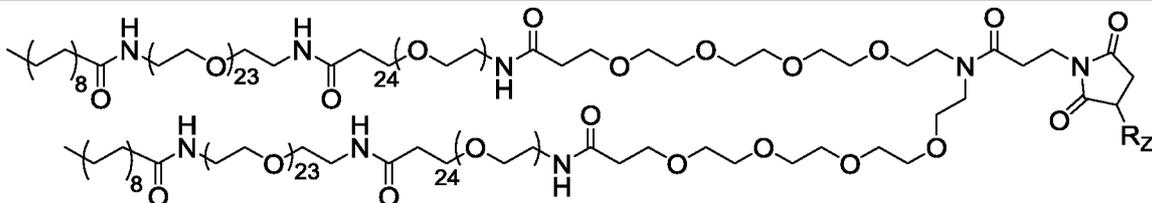
20 В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 16, или их фармацевтически приемлемых солей.

Таблица 16: Примеры соединений, предлагаемых в настоящем изобретении (номер соединения указан перед его структурой)

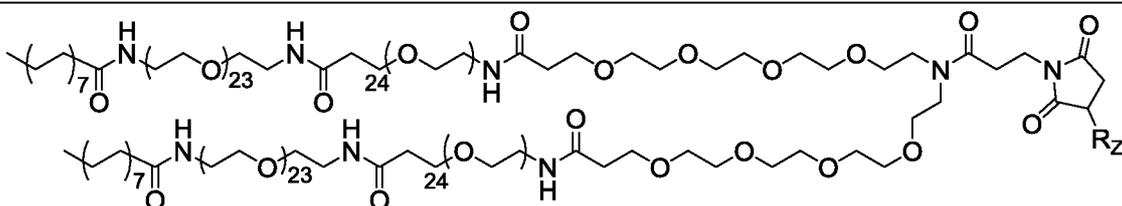
LP 1b



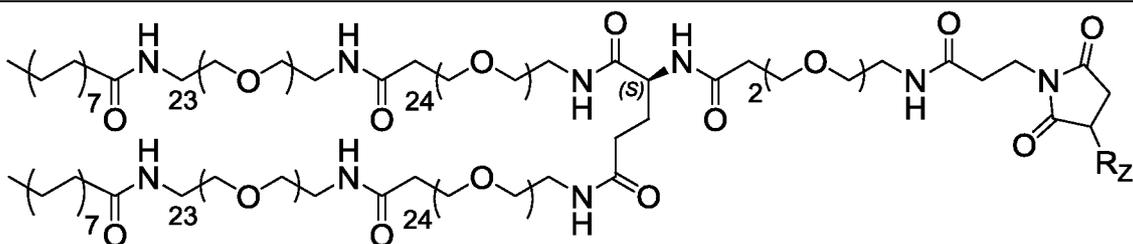
LP 28b



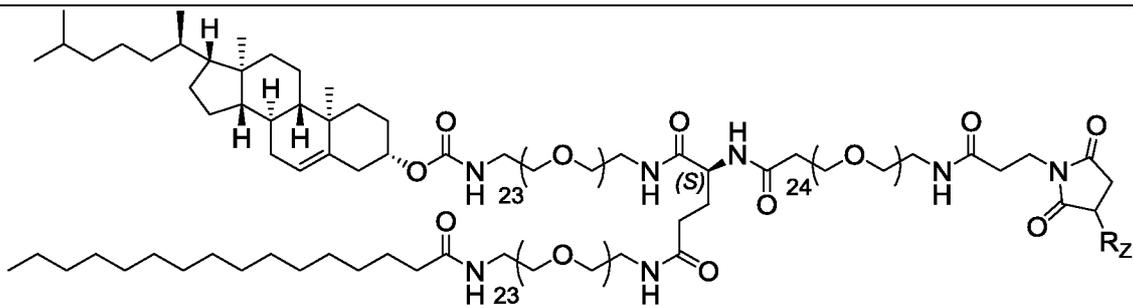
LP 29b



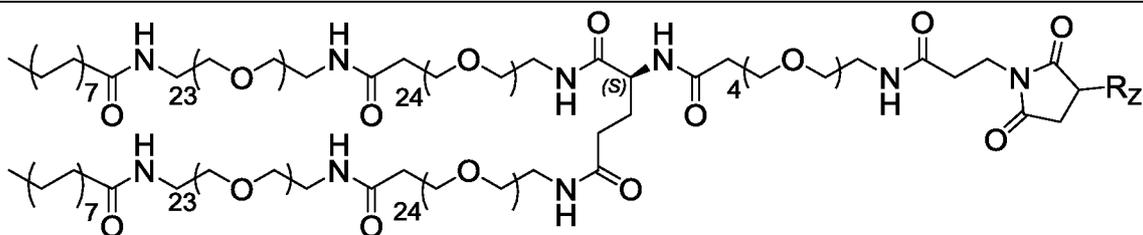
LP 38b



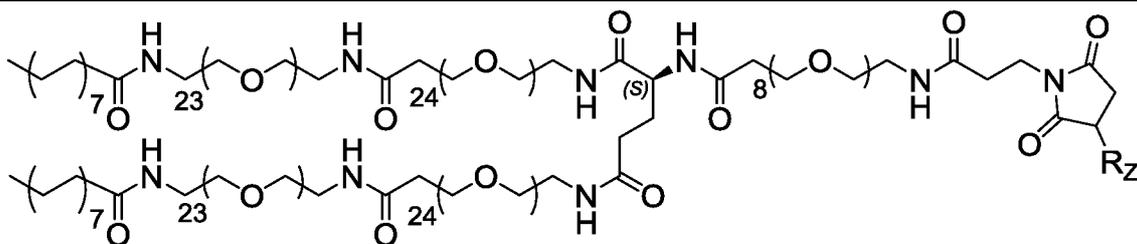
LP 39b



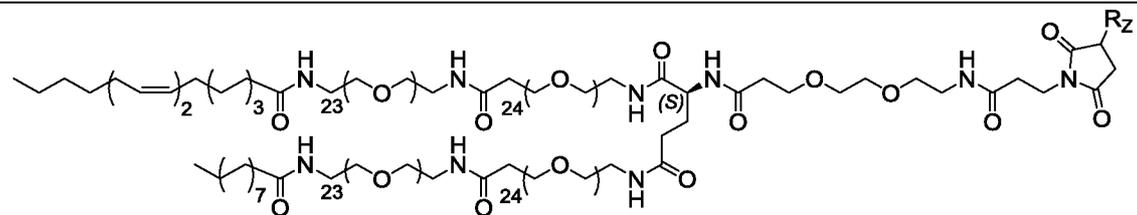
LP 41b



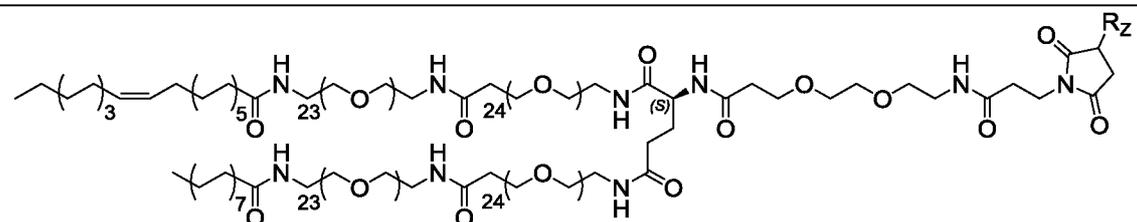
LP 42b



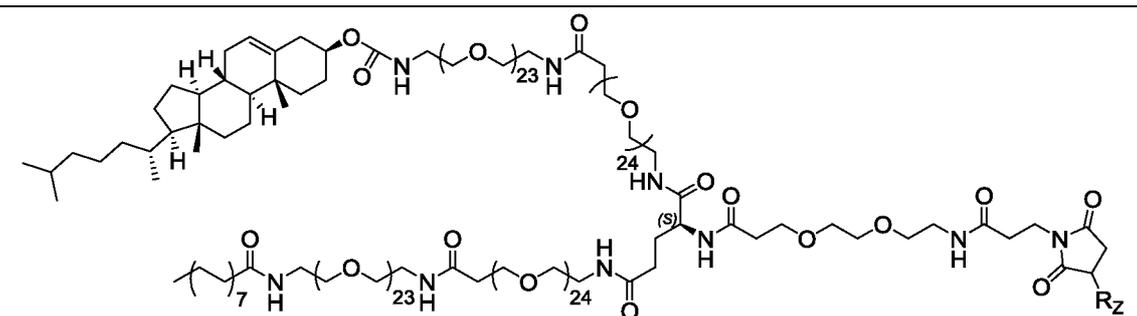
LP 43b



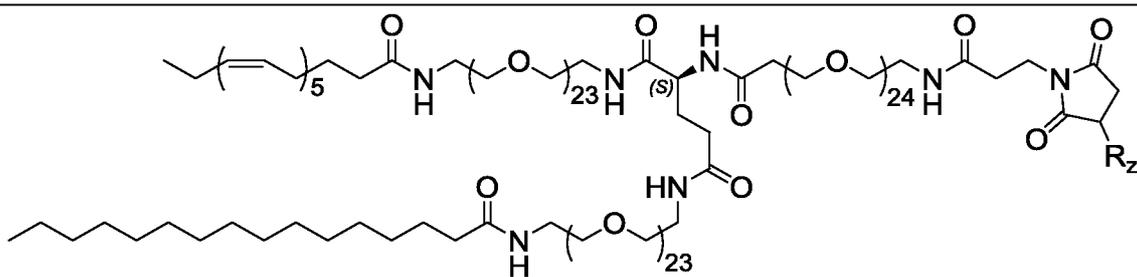
LP 44b



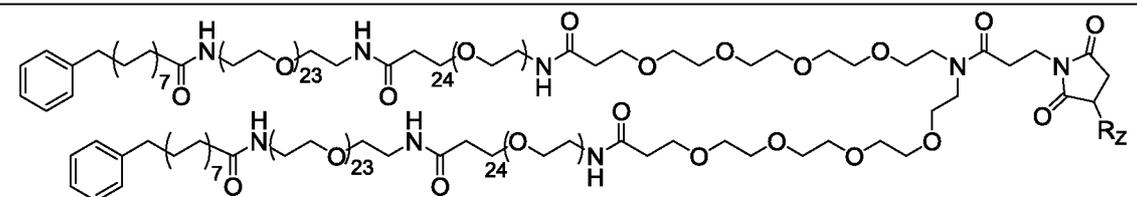
LP 45b



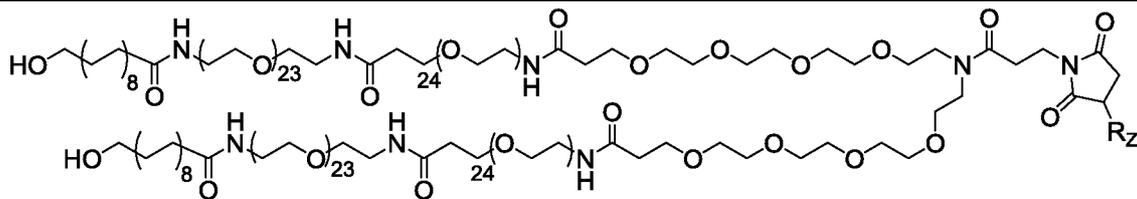
LP 47b



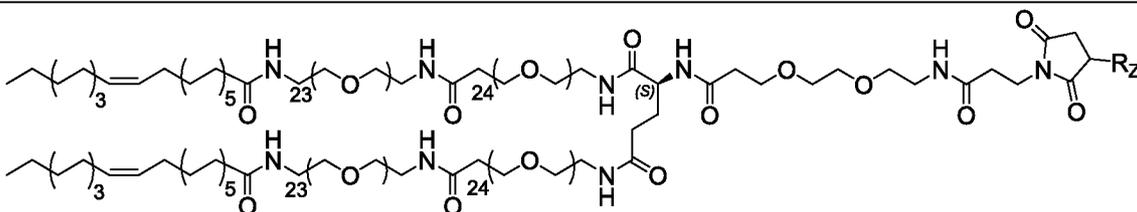
LP 48b



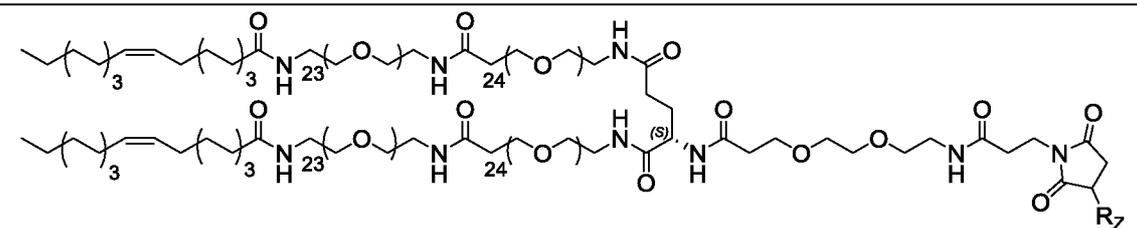
LP 49b



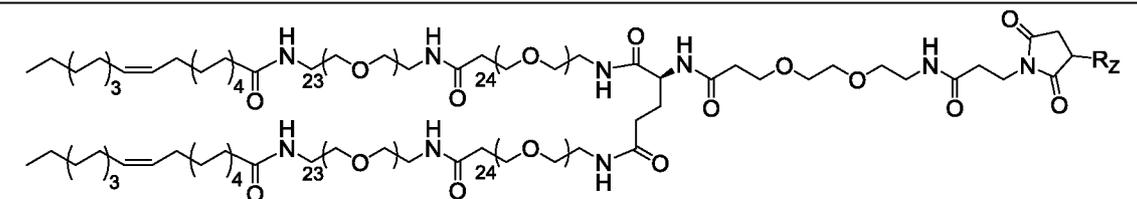
LP 53b



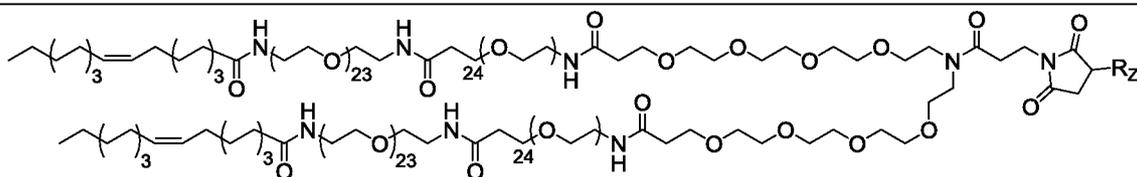
LP 54b



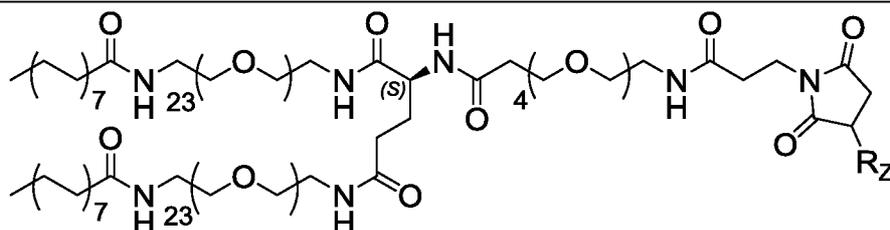
LP 55b



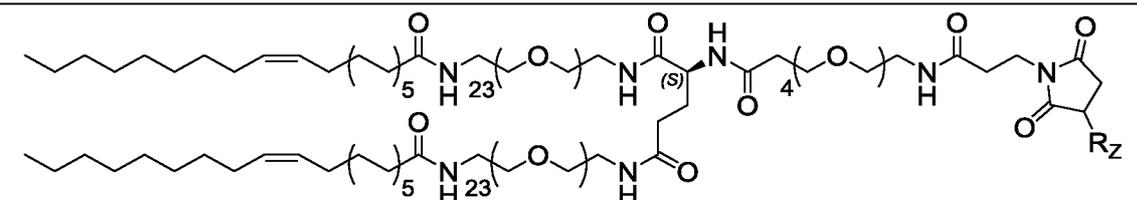
LP 56b



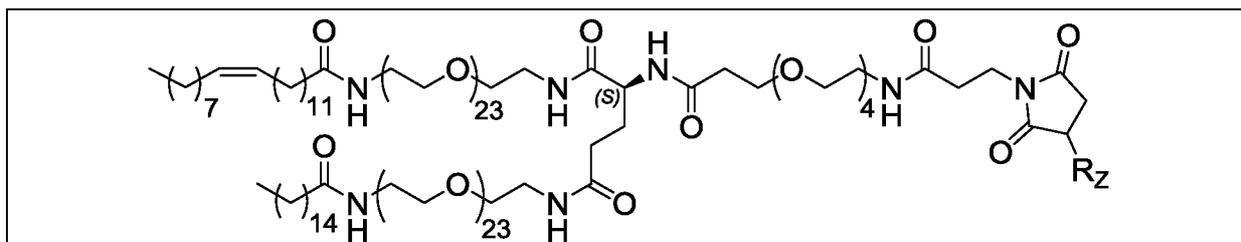
LP 57b



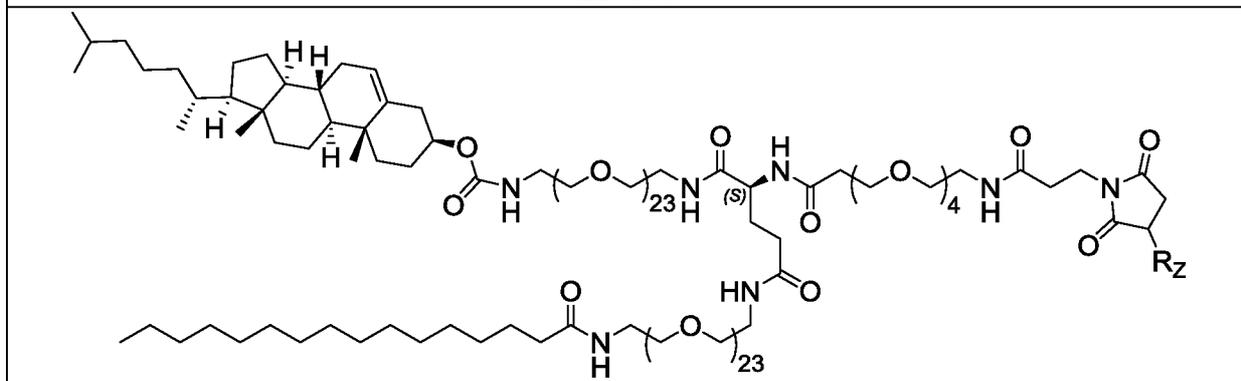
LP 58b



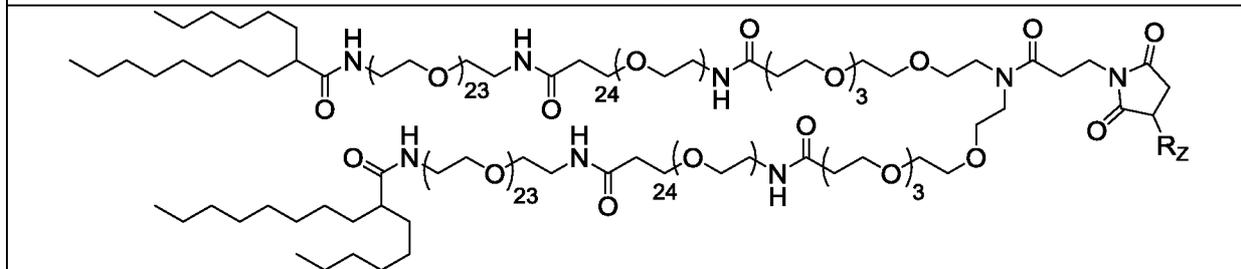
LP 59b



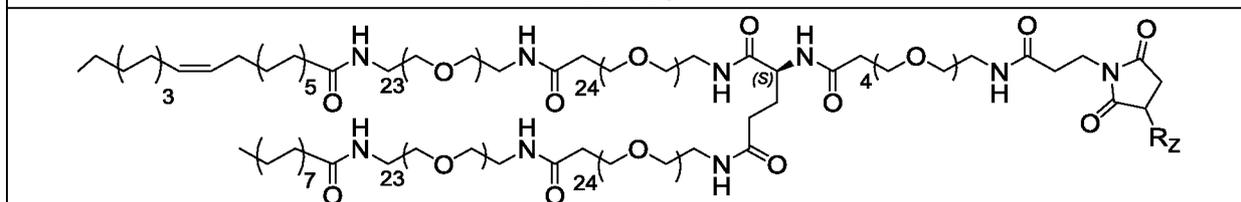
LP 60b



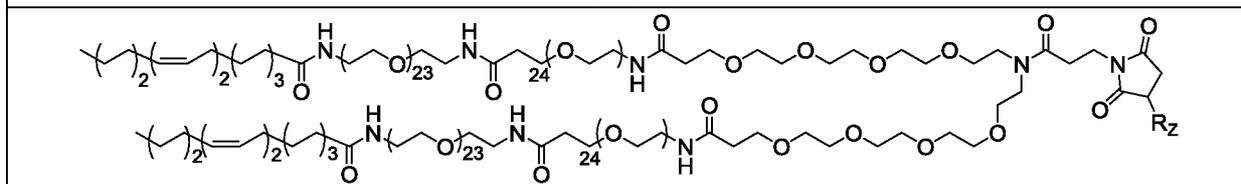
LP 61b



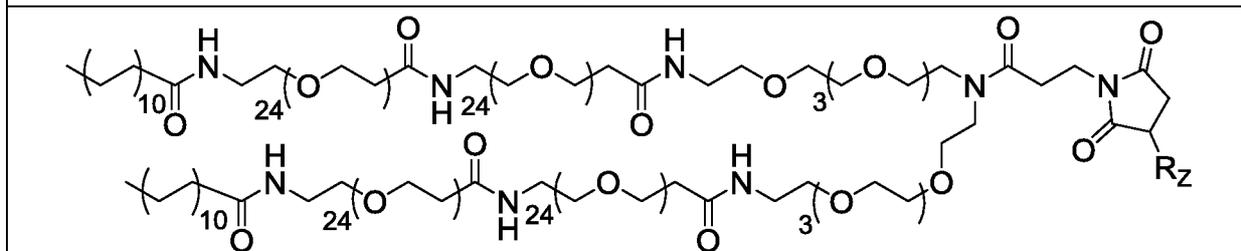
LP 62b



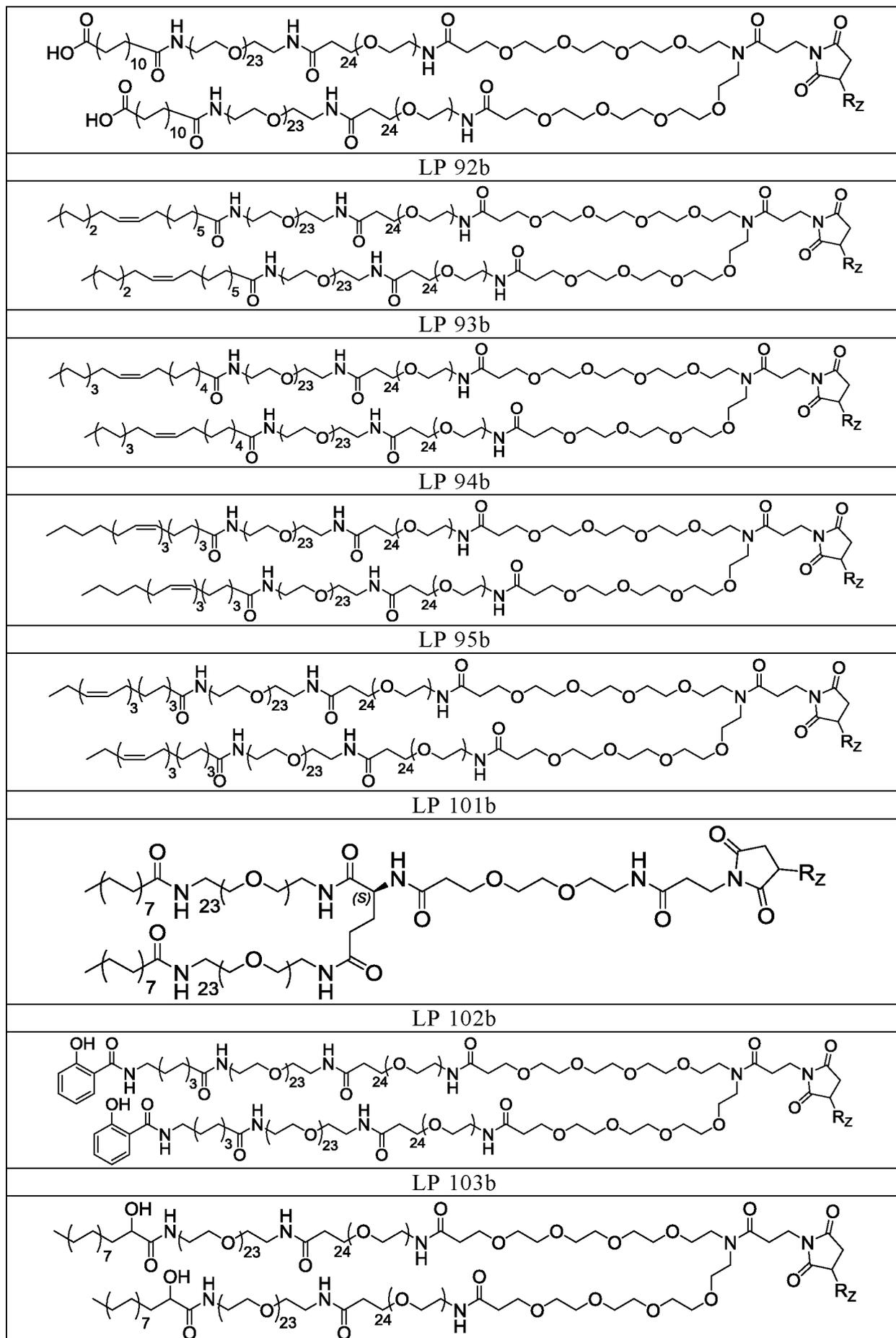
LP 87b



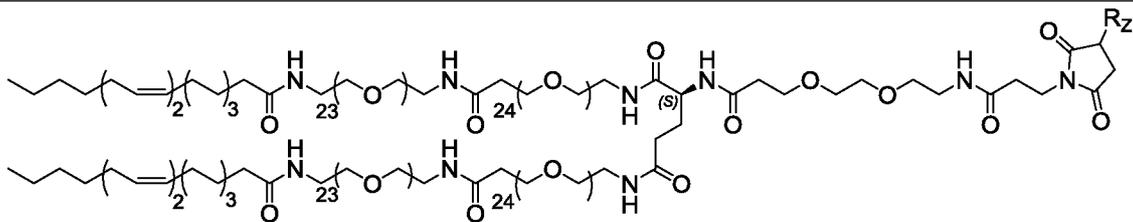
LP 89b



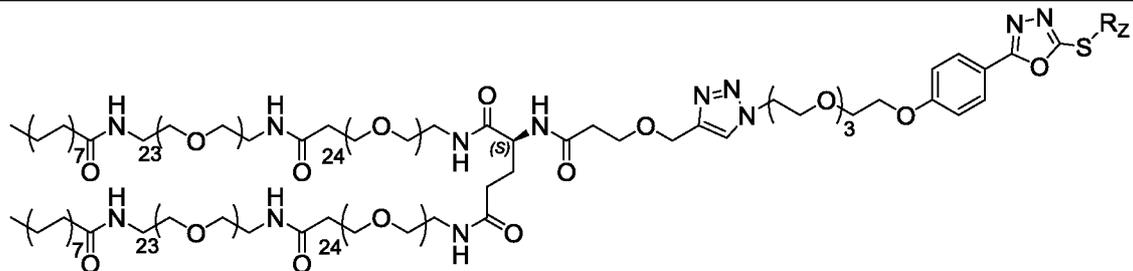
LP 90b



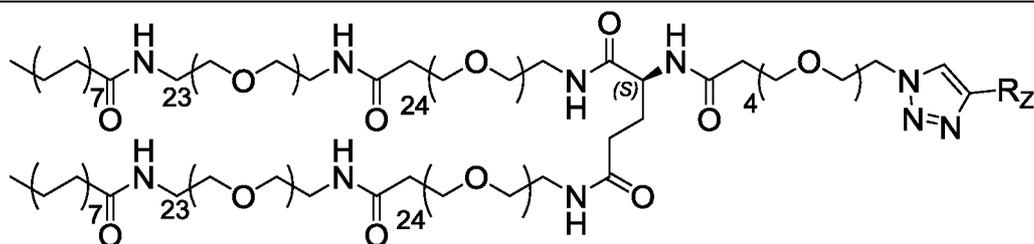
LP 104b



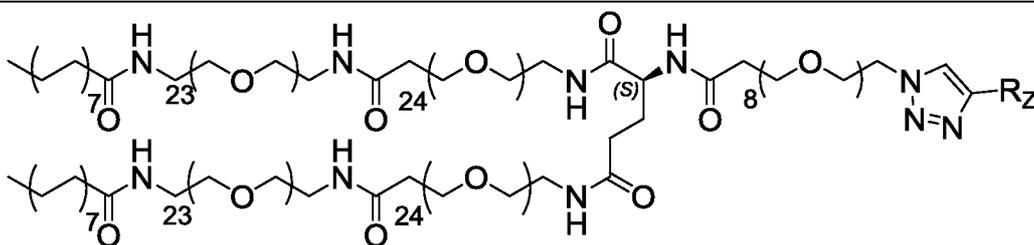
LP 106b



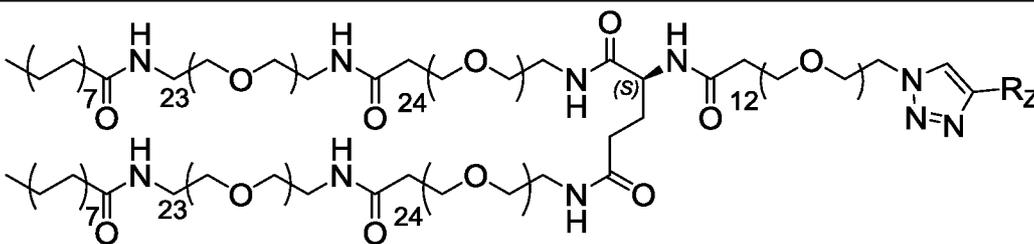
LP 107b



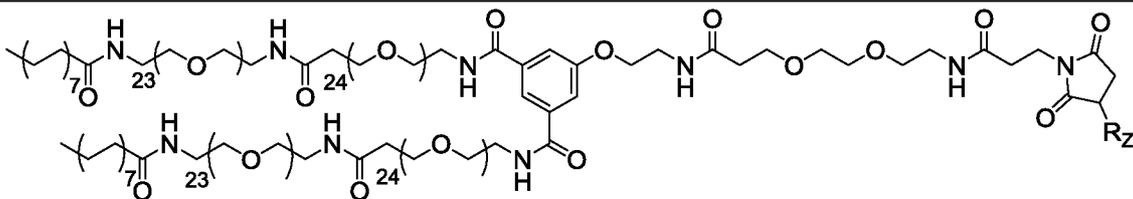
LP 108b



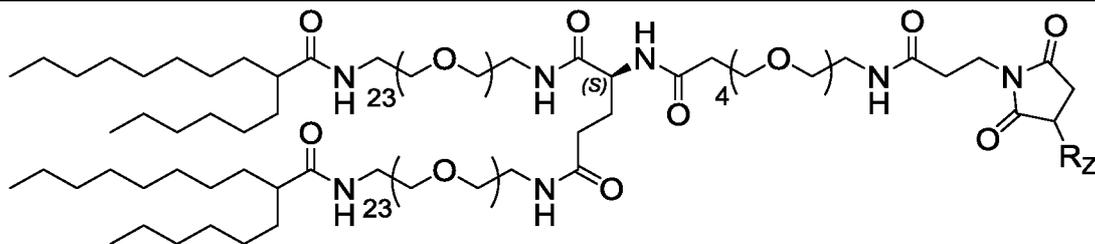
LP 109b



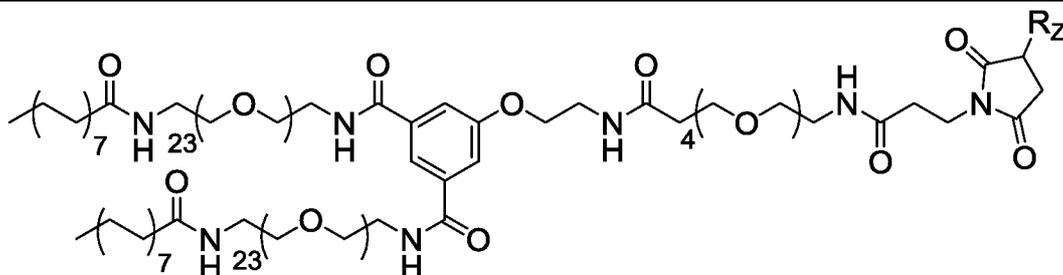
LP 110b



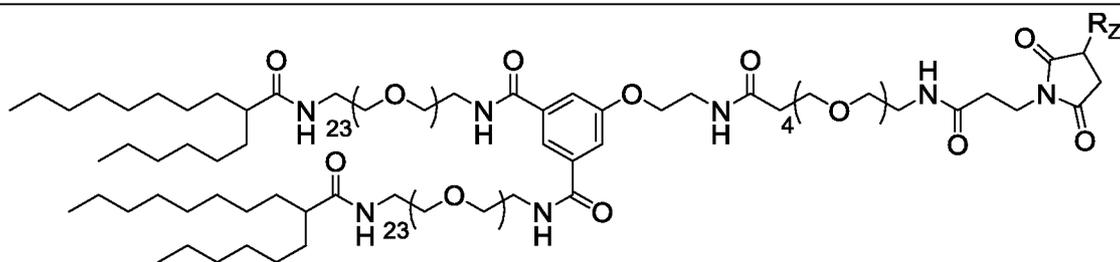
LP 111b



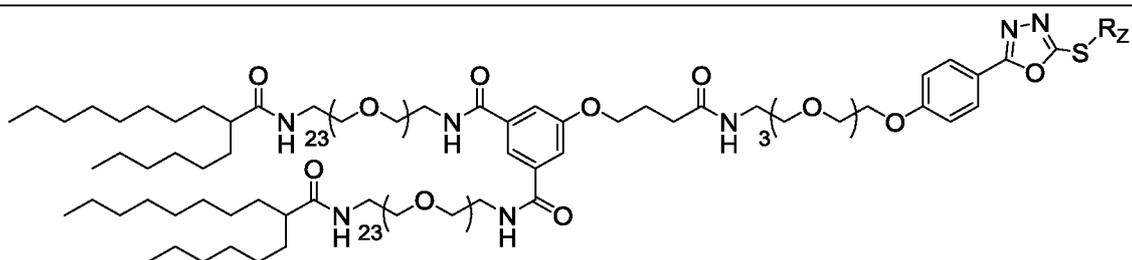
LP 124b



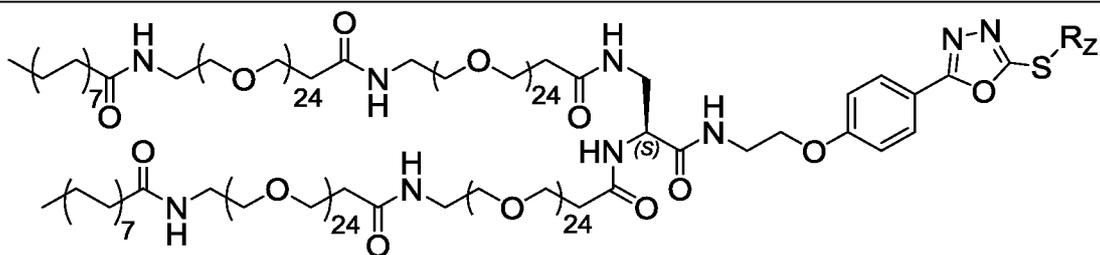
LP 130b



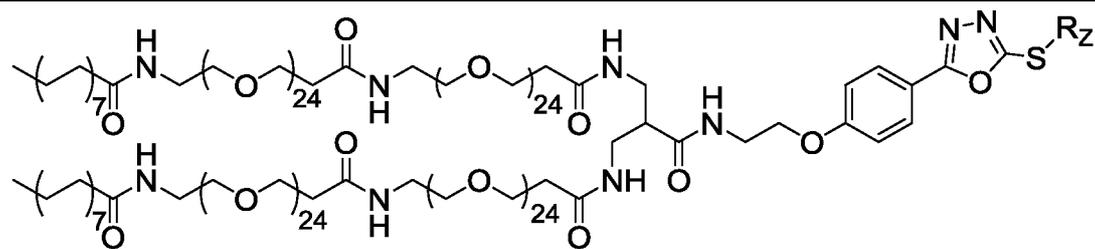
LP 143b



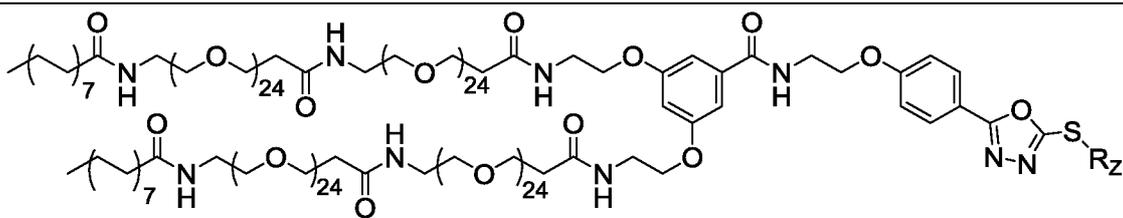
LP 210b



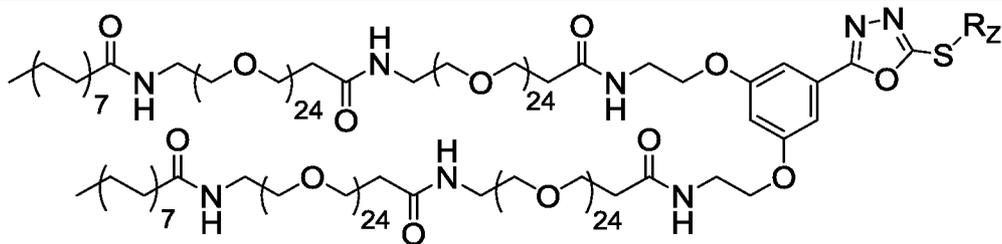
LP 217b



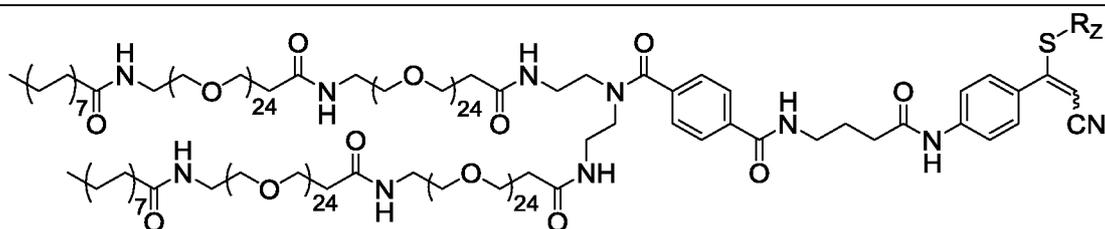
LP 220b



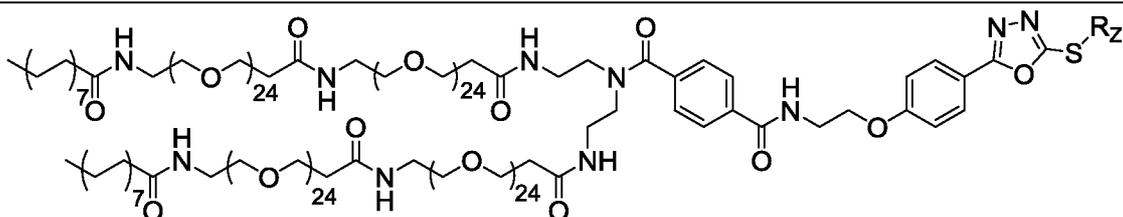
LP 221b



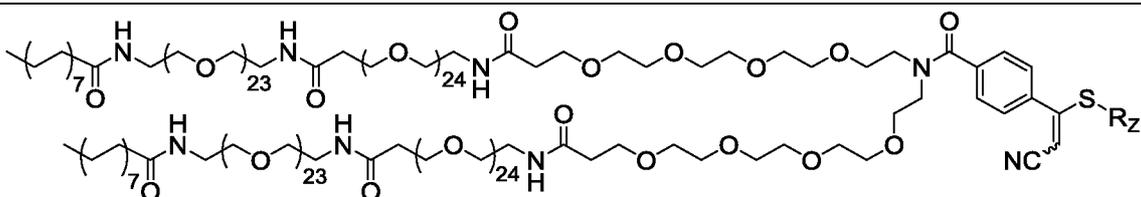
LP 223b



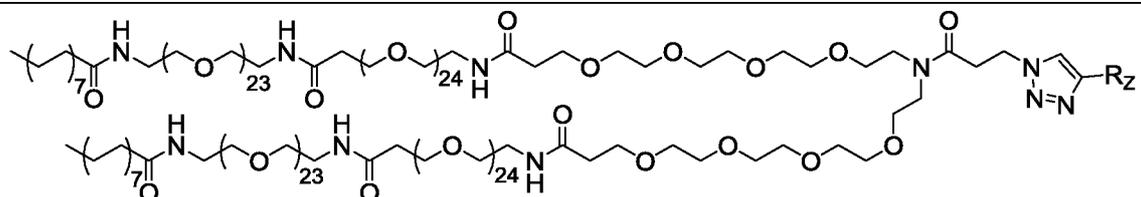
LP 224b



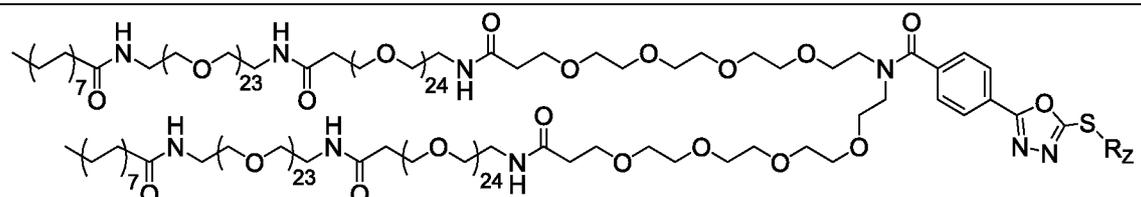
LP 225b



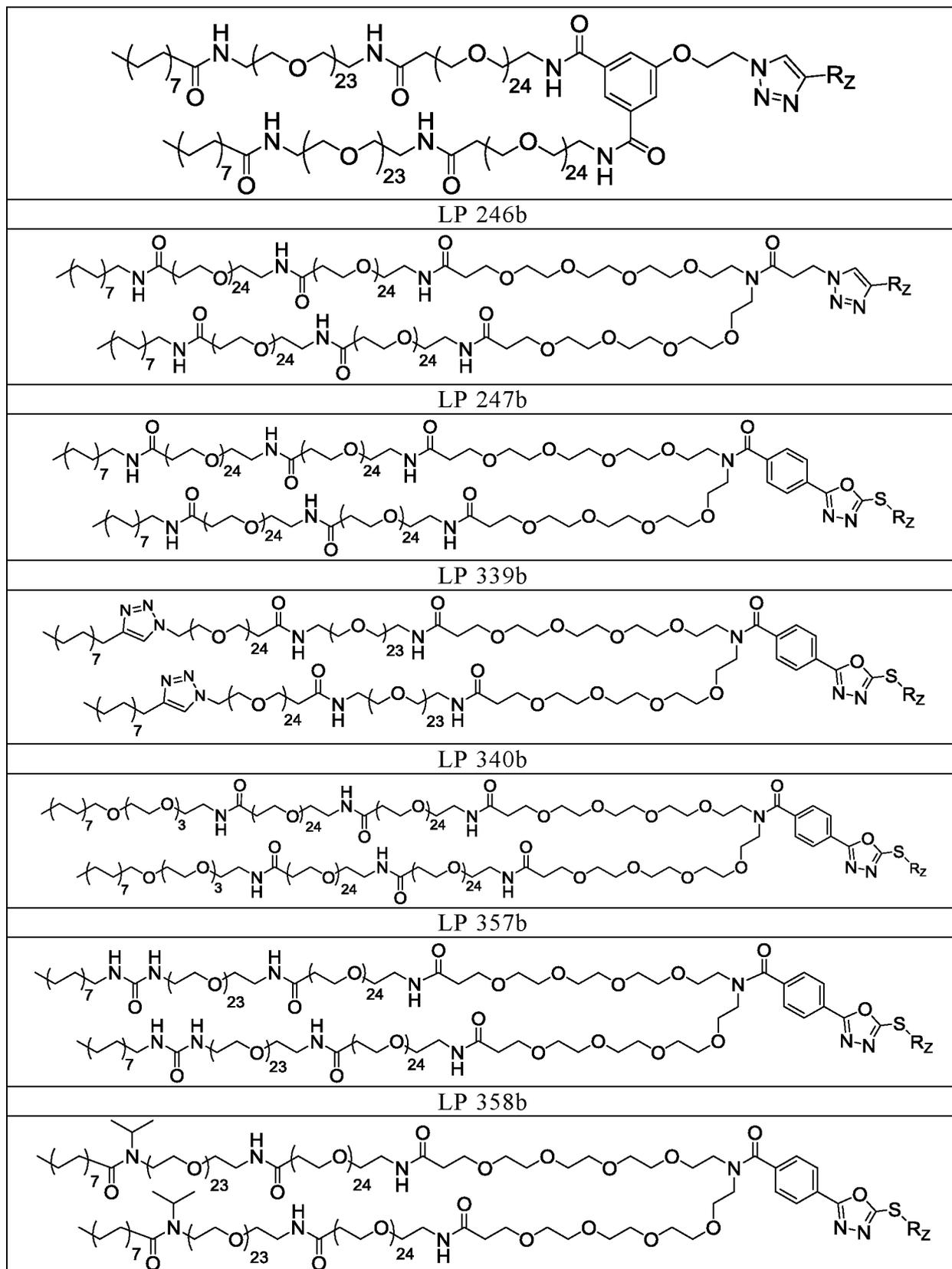
LP 226b



LP 238b



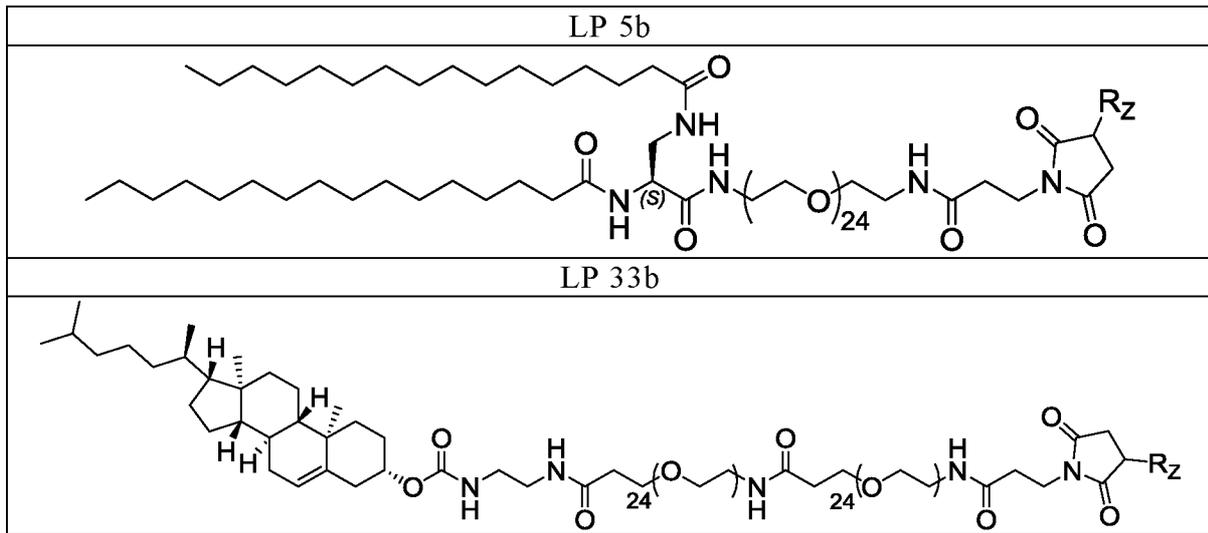
LP 240b



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

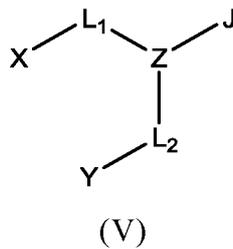
В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 17, или их фармацевтически приемлемых солей.

5 Таблица 17: Примеры соединений, предлагаемых в настоящем изобретении (номер соединения указан перед его структурой)



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

10 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (V):



или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z , L_1 , L_2 , X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic); J обозначает $L_{A5}-R_X$; L_{A5} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_X с Z ; и R_X обозначает реакционноспособный фрагмент для конъюгирования со средством на основе олигонуклеотида.

15 В некоторых вариантах осуществления J обозначает $L_{A5}-R_X$; L_{A5} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_X с Z ; R_X обозначает реакционноспособный фрагмент для конъюгирования со средством на основе

20

олигонуклеотида; Z обозначает СН, фенил или N; L₁ и L₂ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

5 В некоторых вариантах осуществления L_{A5} обозначает L_A, определенный в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1) или (Ic). В некоторых вариантах осуществления L_{A5} выбран из группы, состоящей из фрагментов, указанных в Таблице 18.

Таблица 18: Примеры фрагментов L_{A5}, предлагаемых в настоящем изобретении

10

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Линкер 1-5 | |
| Линкер 2-5 | |
| Линкер 3-5 | |
| Линкер 4-5 | |
| Линкер 5-5 | |
| Линкер 6-5 | |
| Линкер 7-5 | |
| Линкер 8-5 | |

| Название | Структура |
|-------------|-----------|
| Линкер 9-5 | |
| Линкер 10-5 | |
| Линкер 11-5 | |
| Линкер 12-5 | |
| Линкер 13-5 | |

где каждый m , n , o и a независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и где каждый

знак  обозначает положение присоединения к Z или R_X .

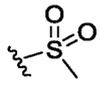
5 В некоторых вариантах осуществления каждый m независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23 или 25; каждый n независимо равен 2, 3, 4 или 5; каждый a независимо равен 2, 3 или 4; и каждый o независимо равен 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13.

10 В некоторых вариантах осуществления каждый m независимо равен 2, 4, 8 или 24. В некоторых вариантах осуществления каждый n равен 4. В некоторых вариантах осуществления каждый o независимо равен 4, 8 или 12. В некоторых вариантах осуществления каждый a равен 3.

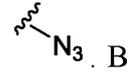
В некоторых вариантах осуществления R_X выбран из группы, состоящей из



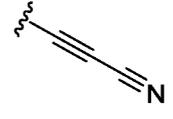
15 присоединения к L_{A5} . В некоторых вариантах осуществления R_X обозначает



. В некоторых вариантах осуществления R_X обозначает

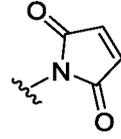


некоторых вариантах осуществления R_X обозначает



. В некоторых

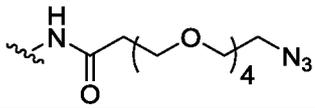
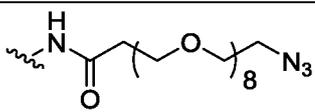
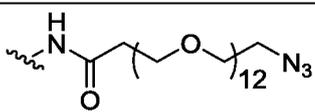
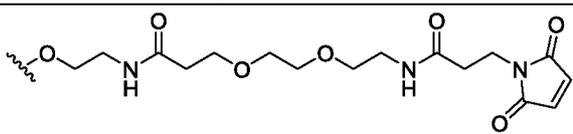
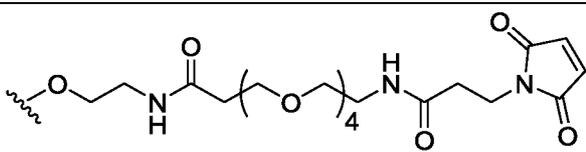
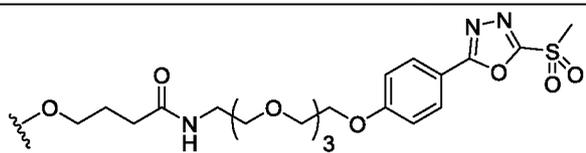
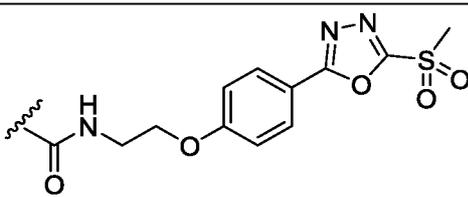
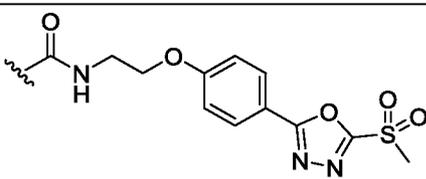
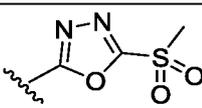
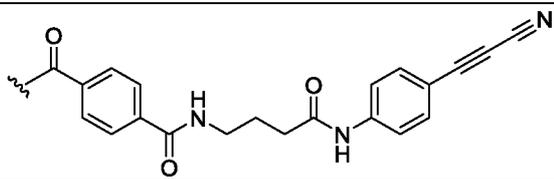
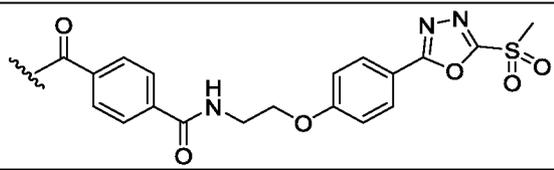
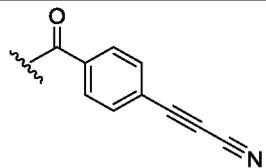
вариантах осуществления R_X обозначает

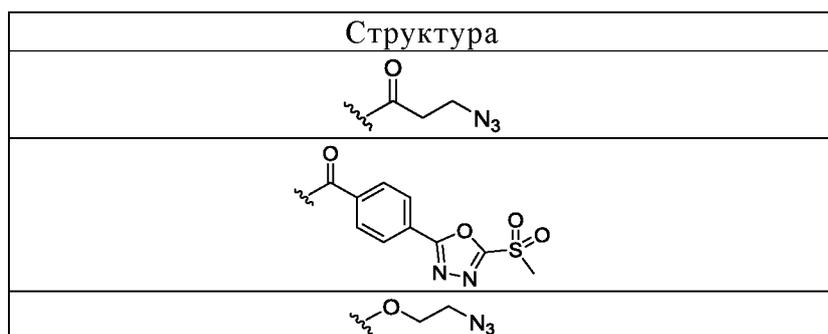


В некоторых вариантах осуществления J выбран из группы, состоящей из
5 фрагментов, указанных в Таблице 19.

Таблица 19: Примеры фрагментов J , предлагаемых в настоящем изобретении

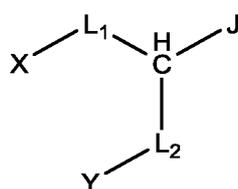
| Структура |
|-----------|
| |
| |
| |
| |
| |
| |
| |

| Структура |
|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |



где каждый знак  обозначает положение присоединения к Z.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Va):



(Va)

5

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой J, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V).

В некоторых вариантах осуществления X и Y все независимо выбраны из группы, состоящей из липида 3, липида 4, липида 5, липида 6, липида 7, липида 10, липида 12 и липида 19, указанных в Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁ или L₂.

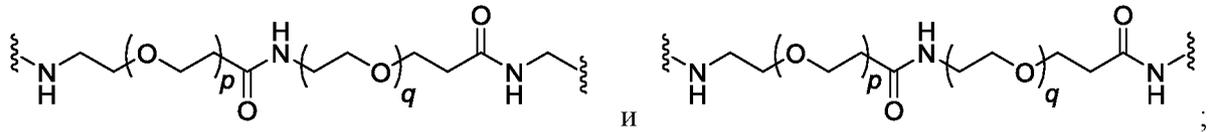
В некоторых вариантах осуществления каждый L₁ и L₂ независимо выбран из группы, состоящей из мостика 2, мостика 3, мостика 4 и мостика 5, указанных в Таблице 1, где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или CH в формуле (Va). В некоторых вариантах осуществления каждый p равен 23. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24.

В некоторых вариантах осуществления L_{A5} выбран из группы, состоящей из линкера 2-5, линкера 3-5 и линкера 4-5, указанных в Таблице 18, где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_X или CH в формуле (Va). В

20

некоторых вариантах осуществления m равен 2, 4, 8 или 24. В некоторых вариантах осуществления n равен 4. В некоторых вариантах осуществления o равен 4, 8 или 12.

В некоторых вариантах осуществления каждый L_1 и L_2 независимо выбраны из группы, состоящей из



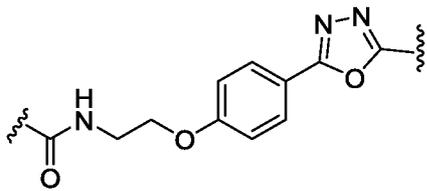
где каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; каждый q независимо

равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и каждый знак обозначает положение

присоединения к X , Y или CH в формуле (Va). В некоторых вариантах

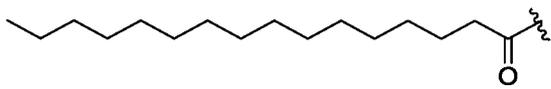
осуществления каждый p равен 24. В некоторых вариантах осуществления каждый q равен 24.

В некоторых вариантах осуществления L_{A5} обозначает



; где каждый знак обозначает положение присоединения к R_X или CH в формуле (Va).

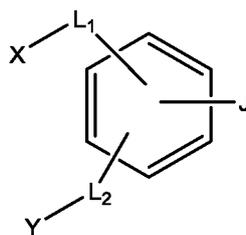
В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает



, где знак обозначает положение присоединения к L_1 или L_2 .

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Va) выбрано из группы, состоящей из LP210-р или LP 217-р, указанных в Таблице 20, или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Vb):



(Vb)

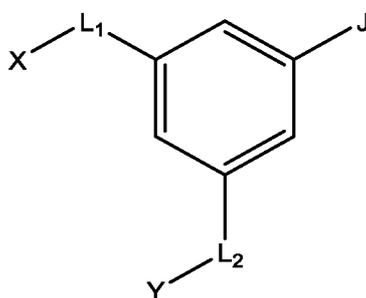
или его фармацевтически приемлемая соль, в которой J, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V) или (Va).

В некоторых вариантах осуществления X и Y все независимо выбраны из группы, состоящей из липида 3 и липида 19, указанных в Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁ или L₂. В некоторых вариантах осуществления X и Y все обозначают липид 3. В некоторых вариантах осуществления X и Y все обозначают липид 19.

В некоторых вариантах осуществления каждый L₁ и L₂ независимо выбраны из группы, состоящей из мостика 3, мостика 5 и мостика 9, указанных в Таблице 1, где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или фенильному кольцу в формуле (Vb). В некоторых вариантах осуществления p равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления q равен 24.

В некоторых вариантах осуществления L_{A5} выбран из группы, состоящей из линкера 5-5, линкера 6-5, линкера 7-5, линкера 8-5 и линкера 13-5, указанных в Таблице 18, где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_X или фенильному кольцу в формуле (Vb). В некоторых вариантах осуществления m равен 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления a равен 3.

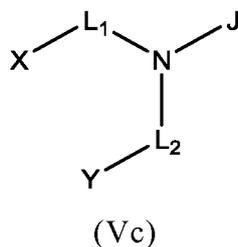
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Vb1):



(Vb1)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой J, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V), (Va) или (Vb).

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Vc):



5 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой J, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления соединения формулы (V), (Va), (Vb) или (Vb1).

В некоторых вариантах осуществления X и Y все независимо выбраны из группы, состоящей из липида 1, липида 2, липида 3, липида 5, липида 8, липида 9, липида 11, липида 12, липида 14, липида 15, липида 16, липида 17, липида 18, липида 19, липида 20, липида 21, липида 22, липида 23 и липид 24, указанных в

Таблице 3, где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁ и L₂. В некоторых вариантах осуществления каждый X и Y обозначает липид 1, липид 2, липид 3, липид 5, липид 8, липид 9, липид 11, липид 12, липид 14, липид 15, липид 16, липид 17, липид 18, липид 19, липид 20, липид 21, липид 22, липид 23 или липид 24.

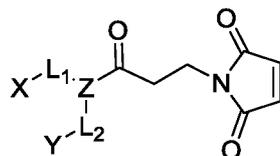
В некоторых вариантах осуществления каждый L₁ и L₂ независимо выбраны из группы, состоящей из мостика 1, мостика 6, мостика 10, мостика 11 и мостика

12, указанных в Таблице 1, где каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или N в формуле (Vc). В некоторых вариантах осуществления r независимо равен 23 или 24. В некоторых вариантах осуществления q равен 24. В некоторых вариантах осуществления г равен 4.

В некоторых вариантах осуществления L_{A5} выбран из группы, состоящей из линкера 1-5, линкера 9-5, линкера 10-5, линкера 11-5 или линкера 12-5,

указанных в Таблице 18, где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или N в формуле (Vc).

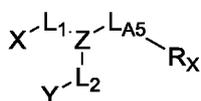
Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Vd):



(Vd)

5 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z, L₁, L₂, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V), (Va), (Vb) (Vb1) или (Vc).

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ve):

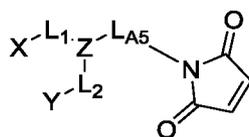


10

(Ve)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z, L₁, L₂, R_X, LA₅, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc) или (Vd).

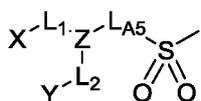
15 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ve1):



(Ve1)

20 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z, L₁, L₂, LA₅, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd) или (Ve).

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ve2):

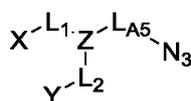


25

(Ve2)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z, L₁, L₂, L_{A5}, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd), (Ve) или (Ve1).

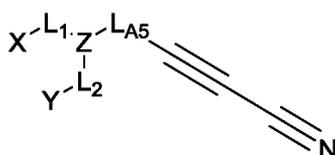
5 Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ve3):



(Ve3)

10 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z, L₁, L₂, L_{A5}, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd), (Ve), (Ve1) или (Ve2).

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (Ve4):

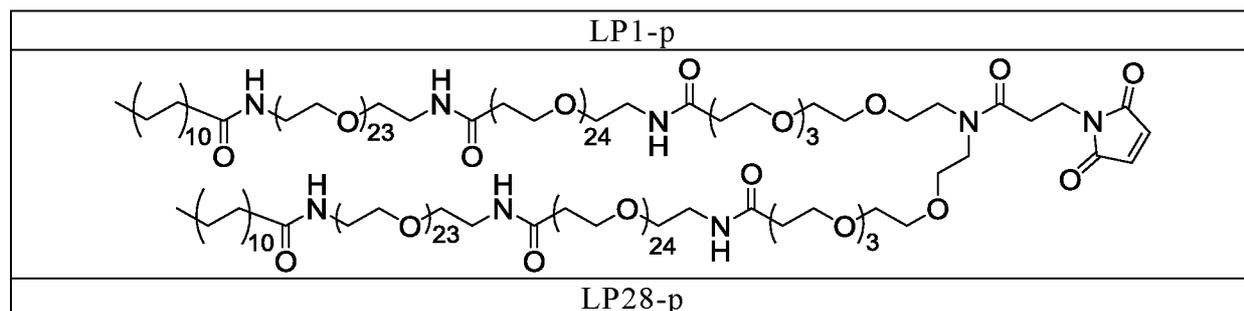


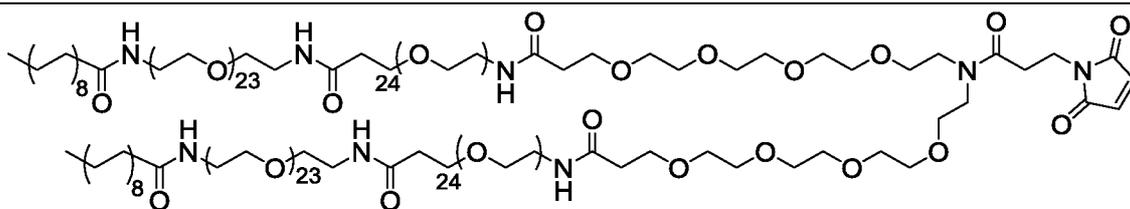
(Ve4)

15 или его фармацевтически приемлемая соль, в которой Z, L₁, L₂, L_{A5}, X и Y являются такими, как это определено в любом из вариантов осуществления для соединения формулы (V), (Va), (Vb) (Vb1), (Vc), (Vd), (Ve), (Ve1), (Ve2) или (Ve3).

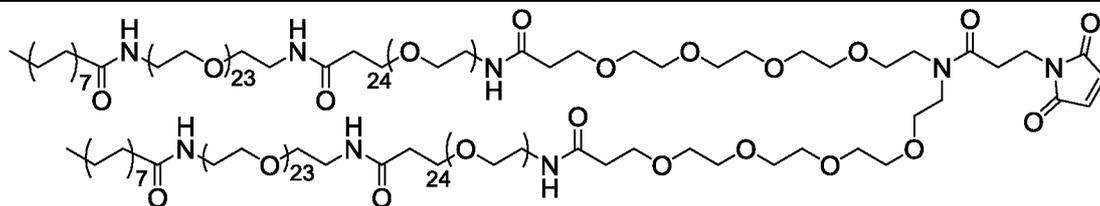
20 В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 20, или их фармацевтически приемлемых солей.

Таблица 20: Примеры соединений, предлагаемых в настоящем изобретении (номер соединения указан перед его структурой)

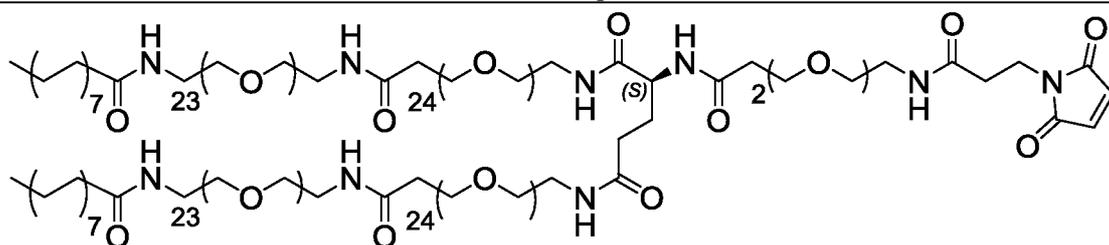




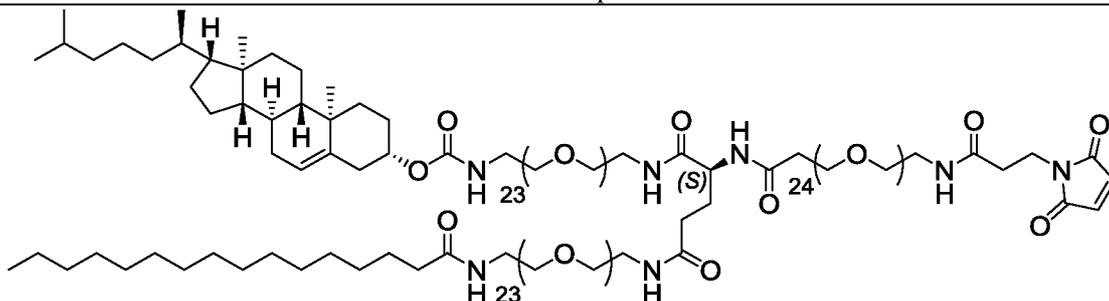
LP29-p



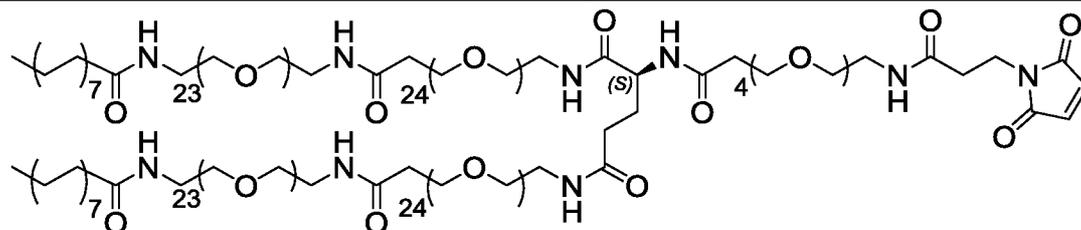
LP38-p



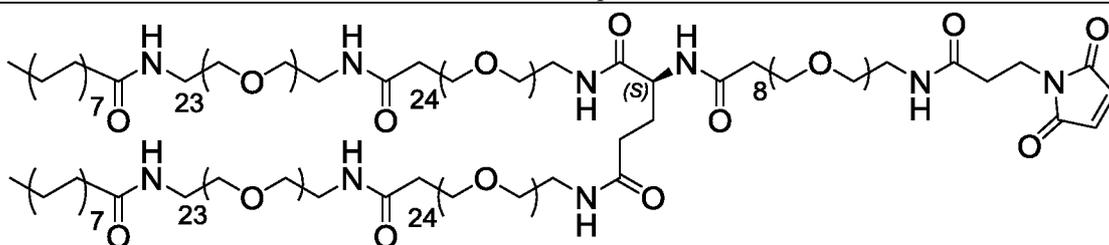
LP39-p



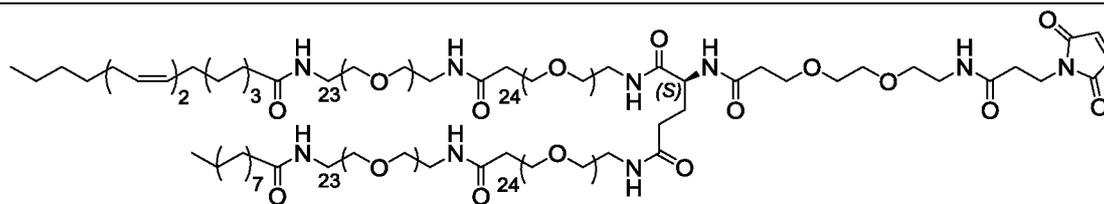
LP41-p



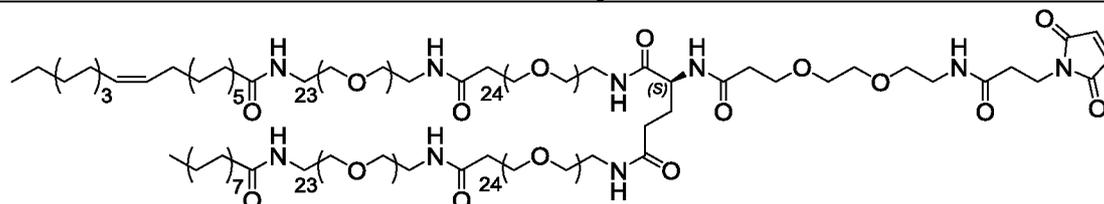
LP42-p



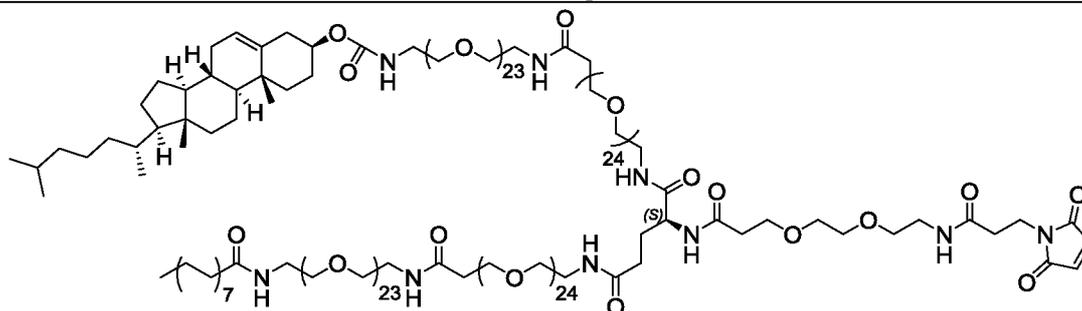
LP43-p



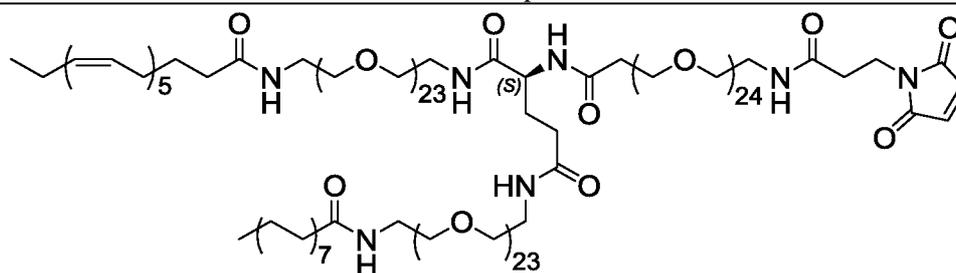
LP44-p



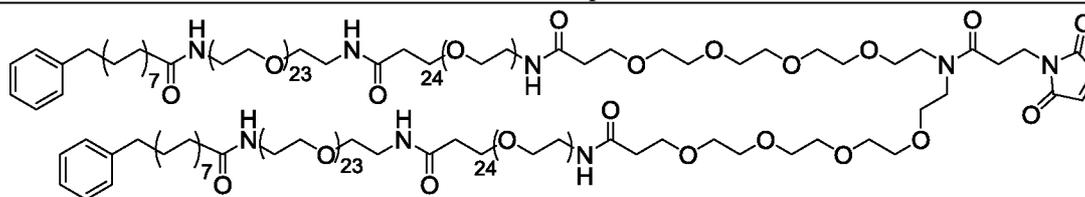
LP45-p



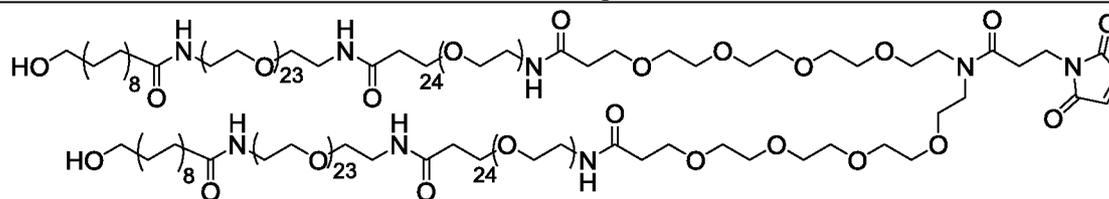
LP47-p



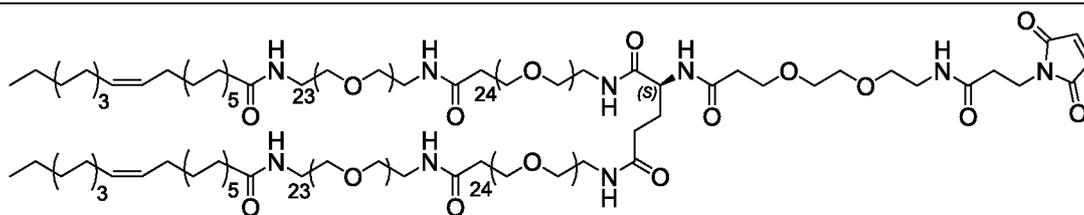
LP48-p



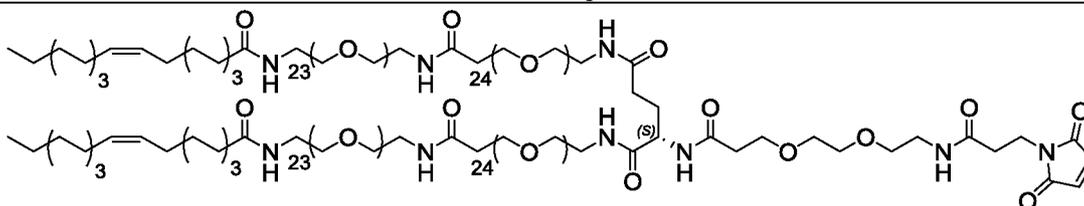
LP49-p



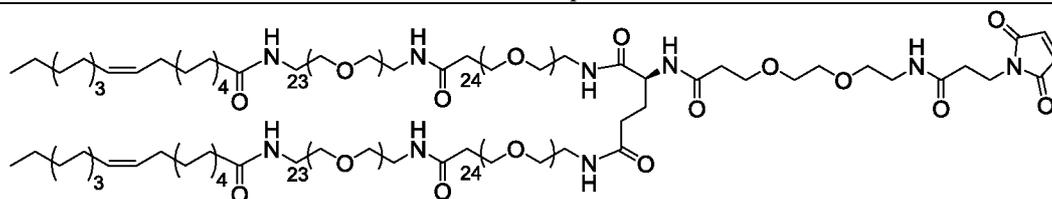
LP53-p



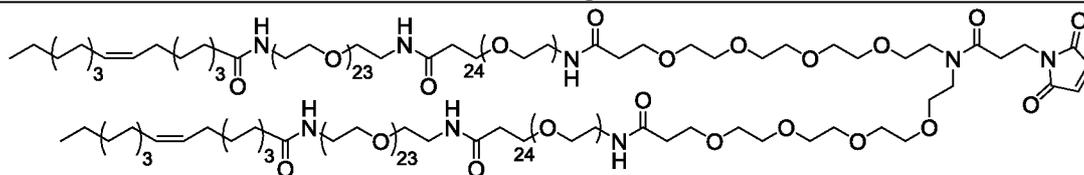
LP54-p



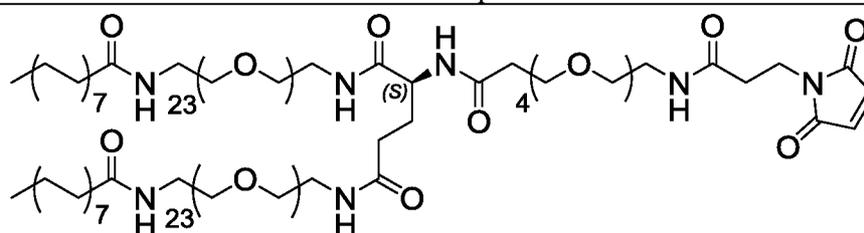
LP55-p



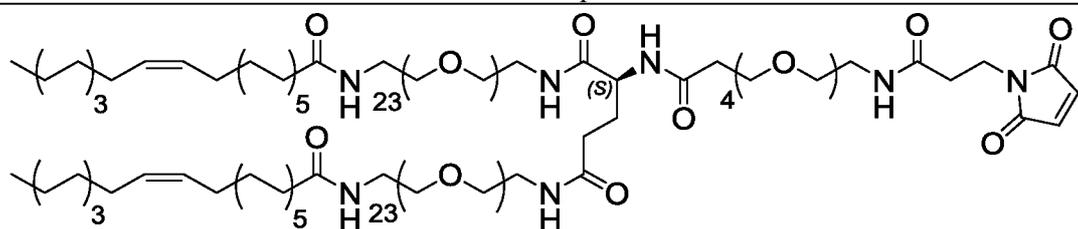
LP56-p



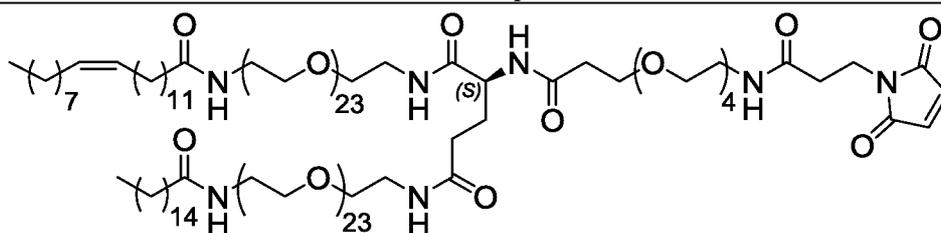
LP57-p



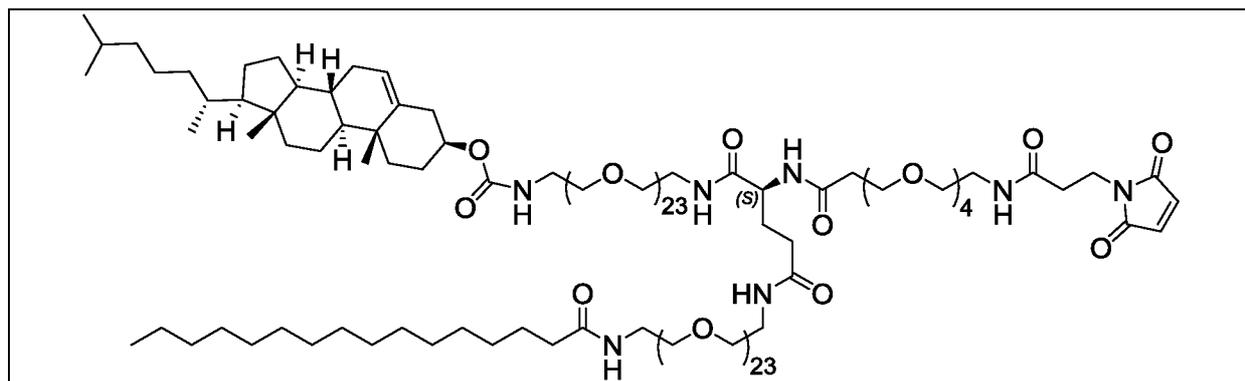
LP58-p



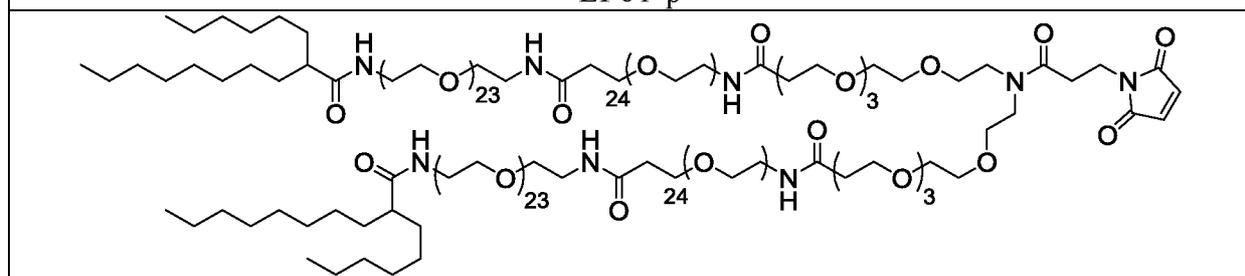
LP59-p



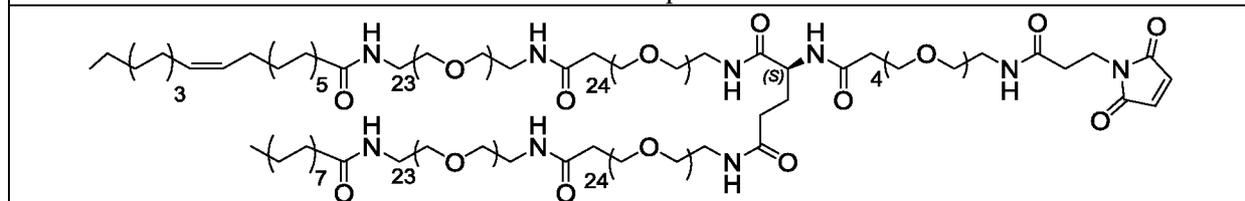
LP60-p



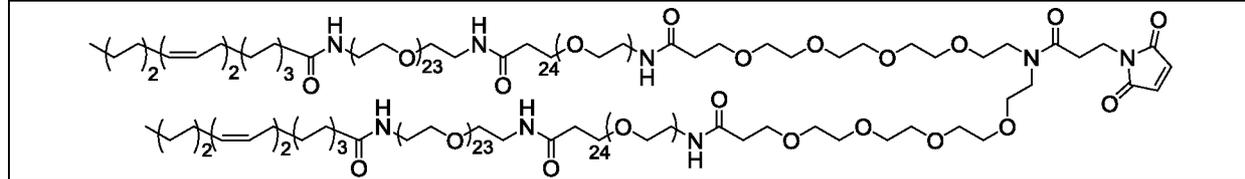
LP61-p



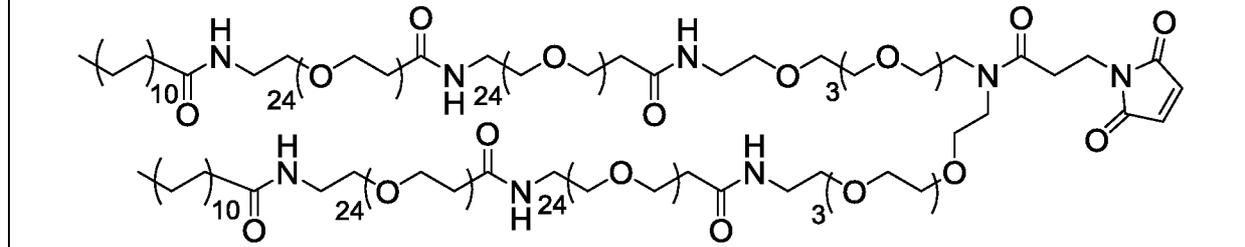
LP62-p



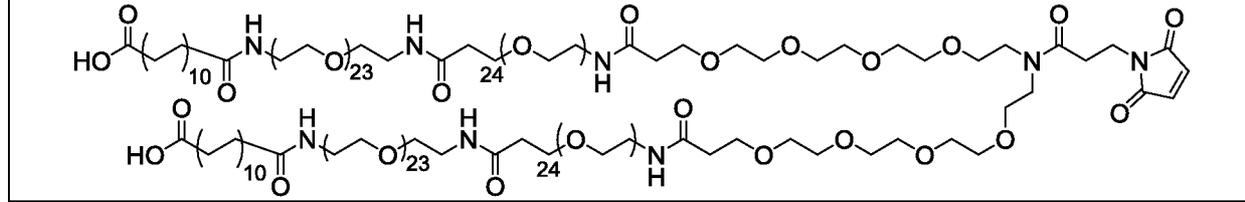
LP87-p



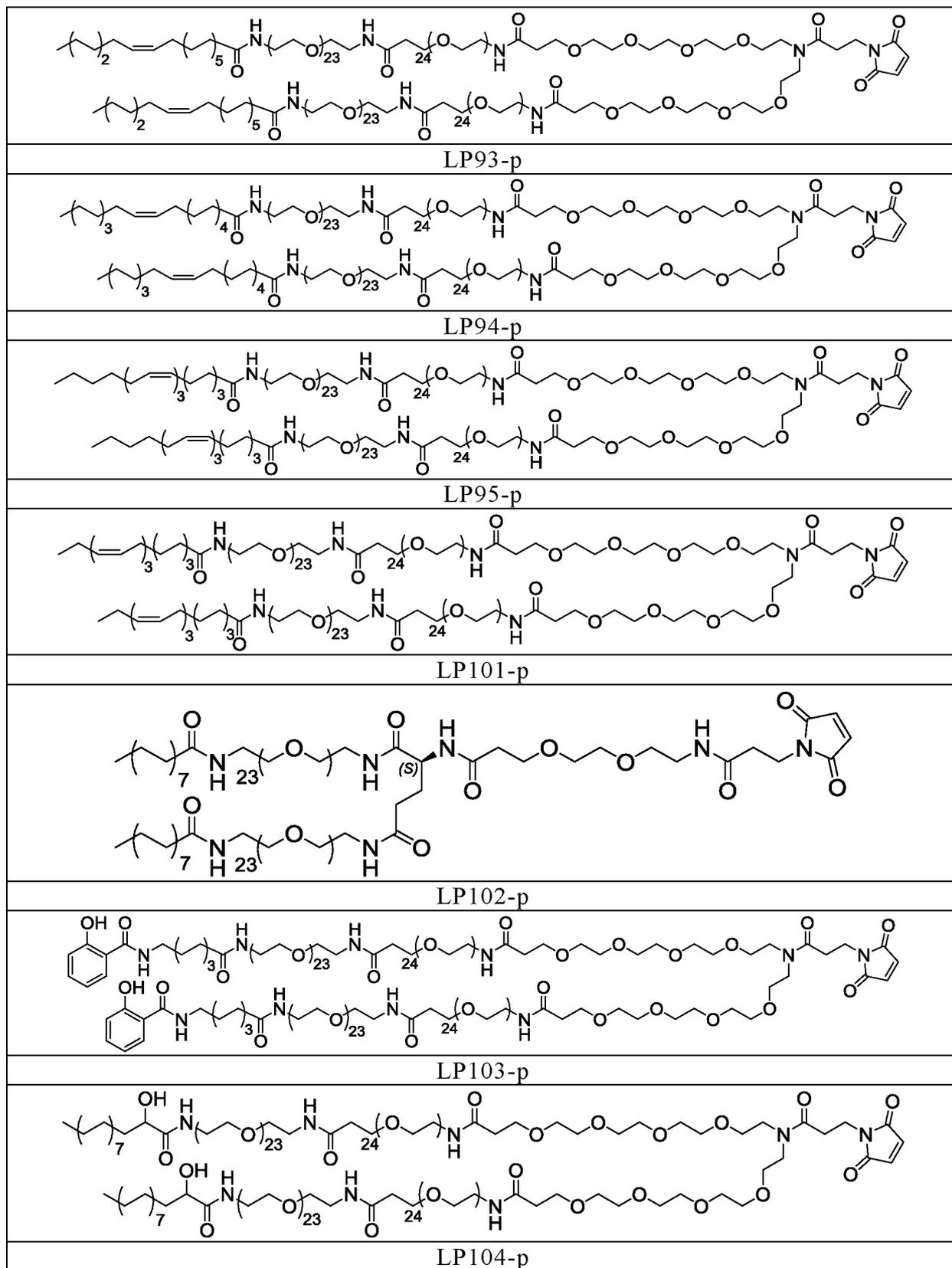
LP89-p

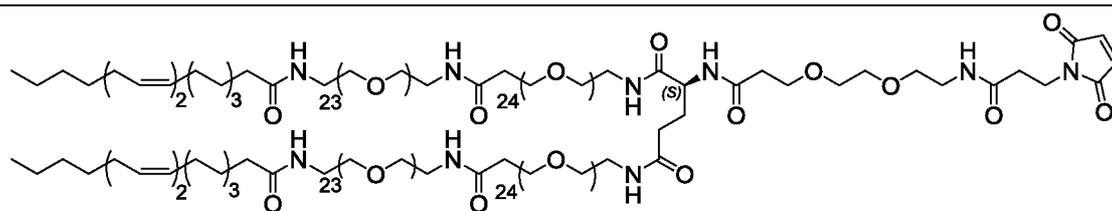


LP90-p

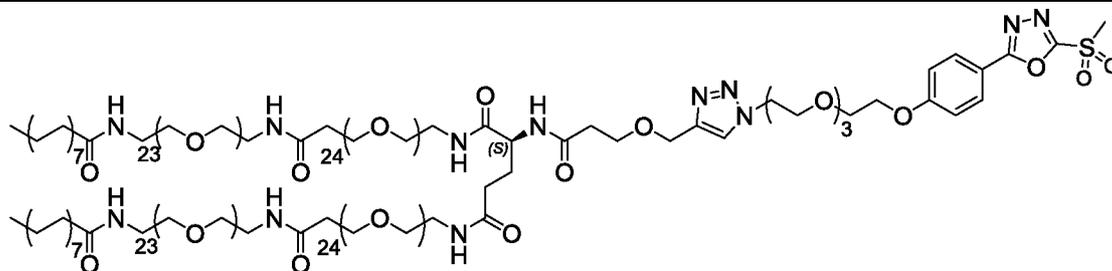


LP92-p

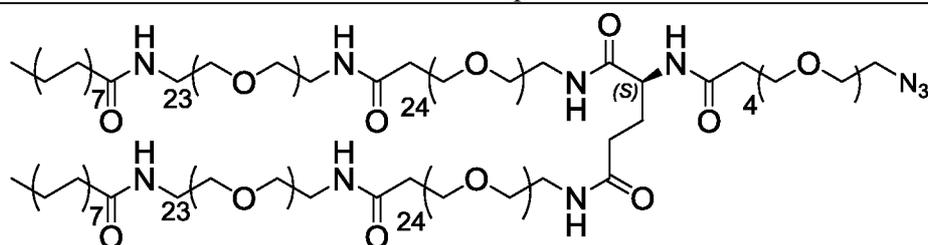




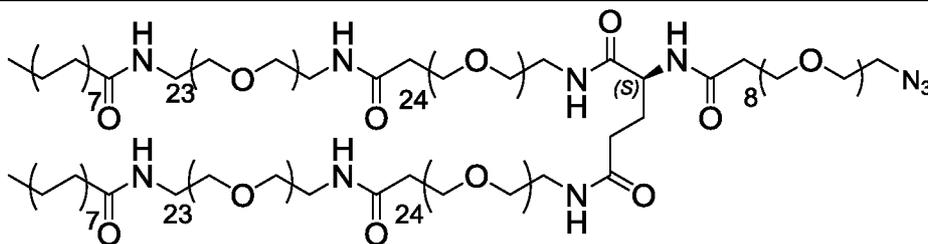
LP106-p



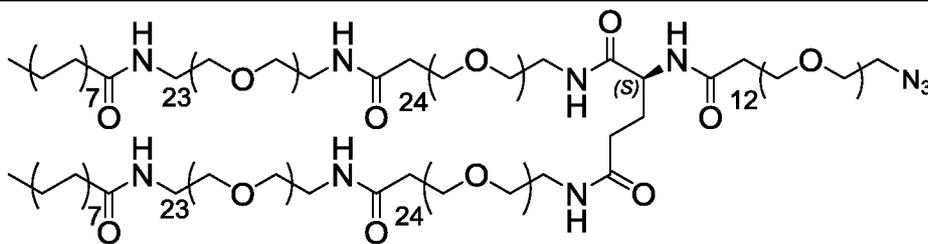
LP107-p



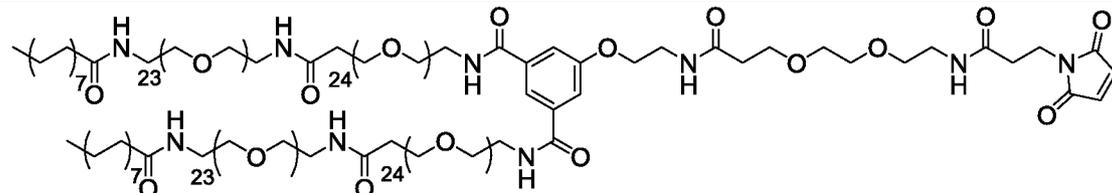
LP108-p



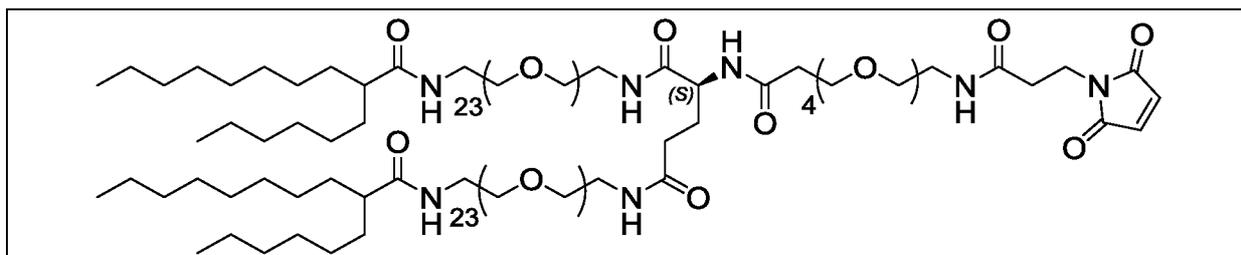
LP109-p



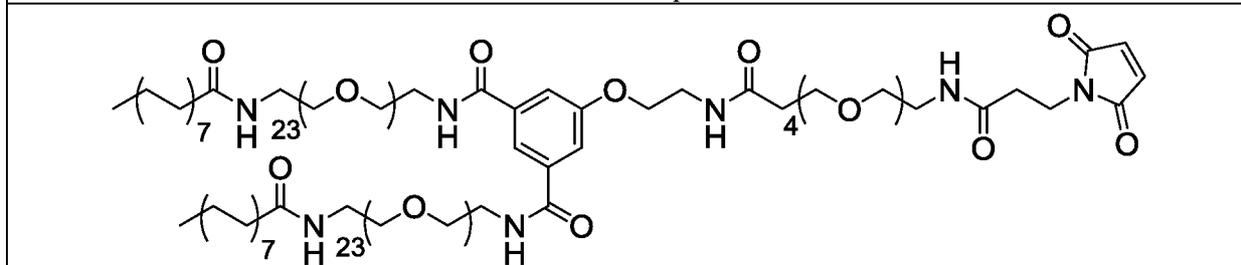
LP110-p



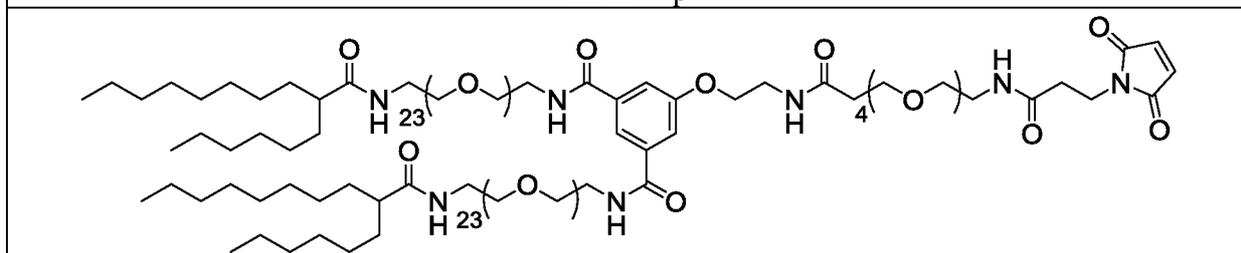
LP111-p



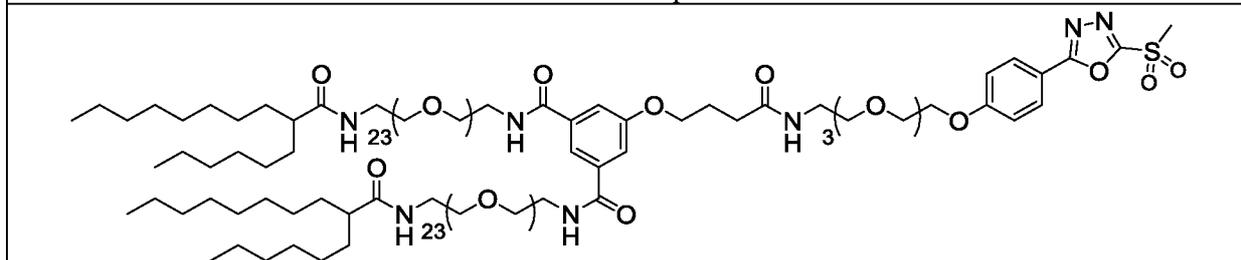
LP124-p



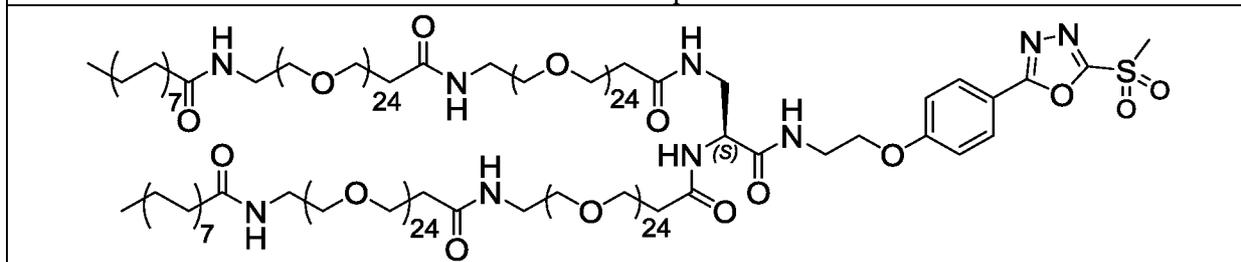
LP130-p



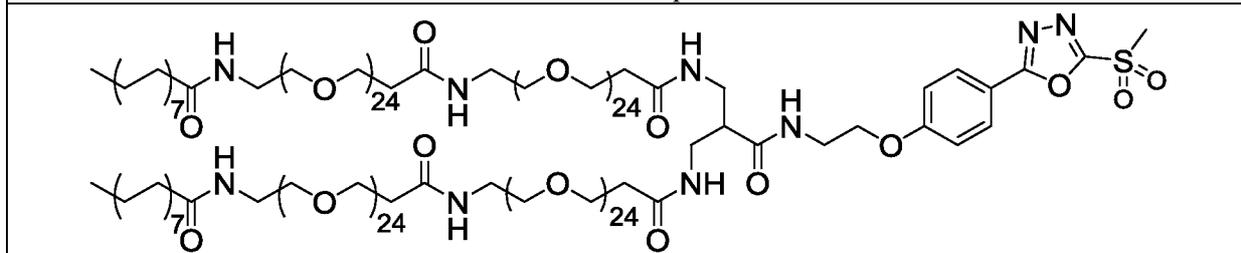
LP143-p



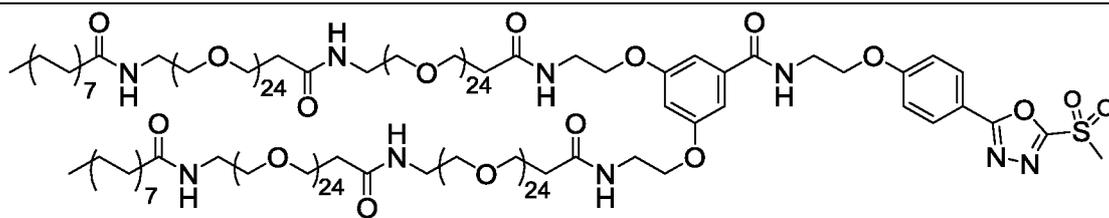
LP210-p



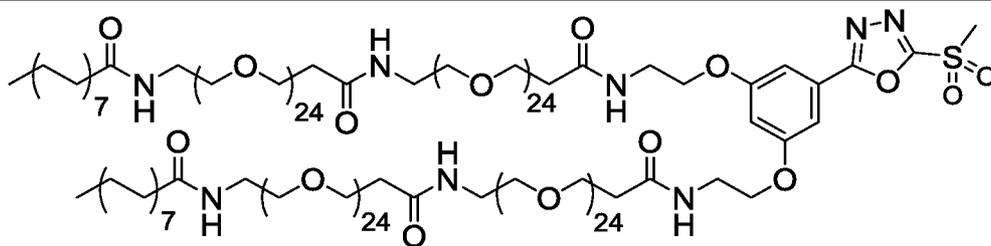
LP217-p



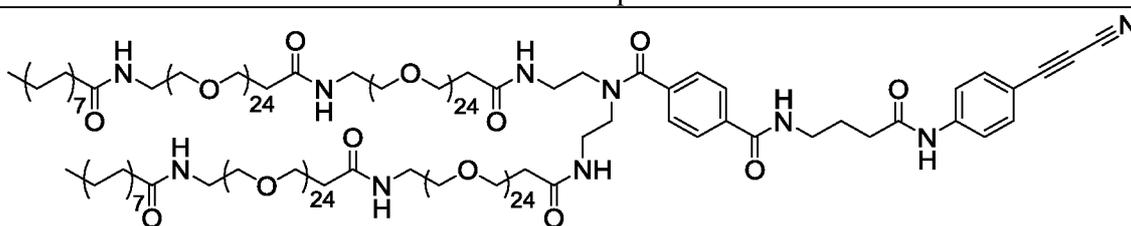
LP220-p



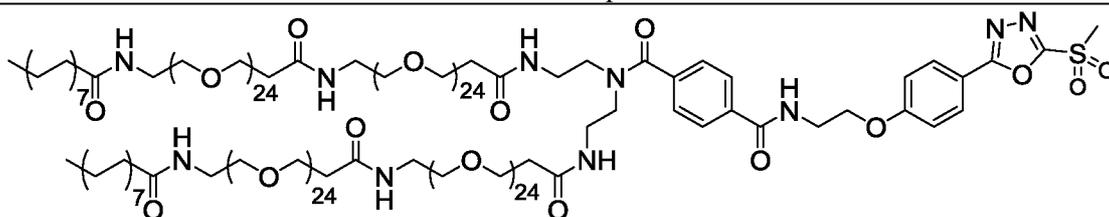
LP221-p



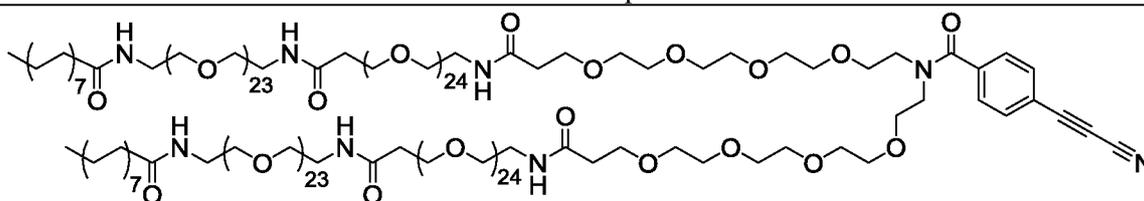
LP223-p



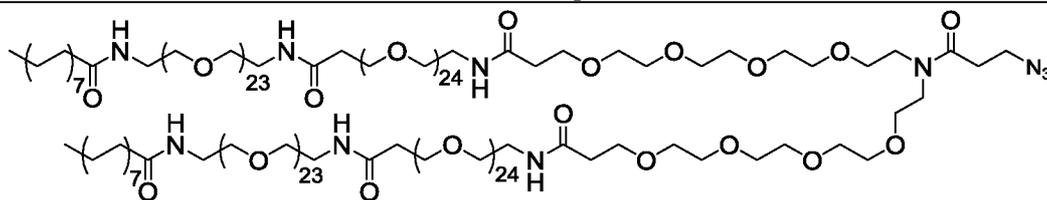
LP224-p



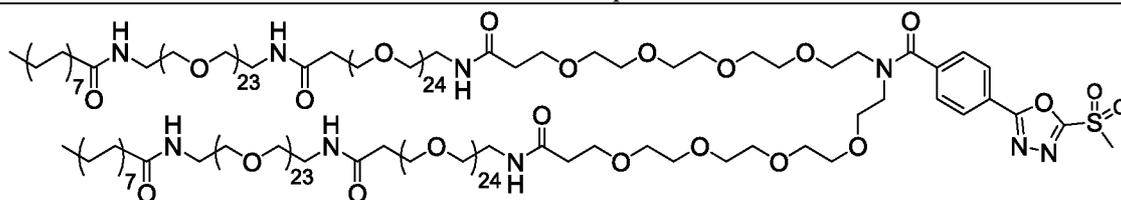
LP225-p



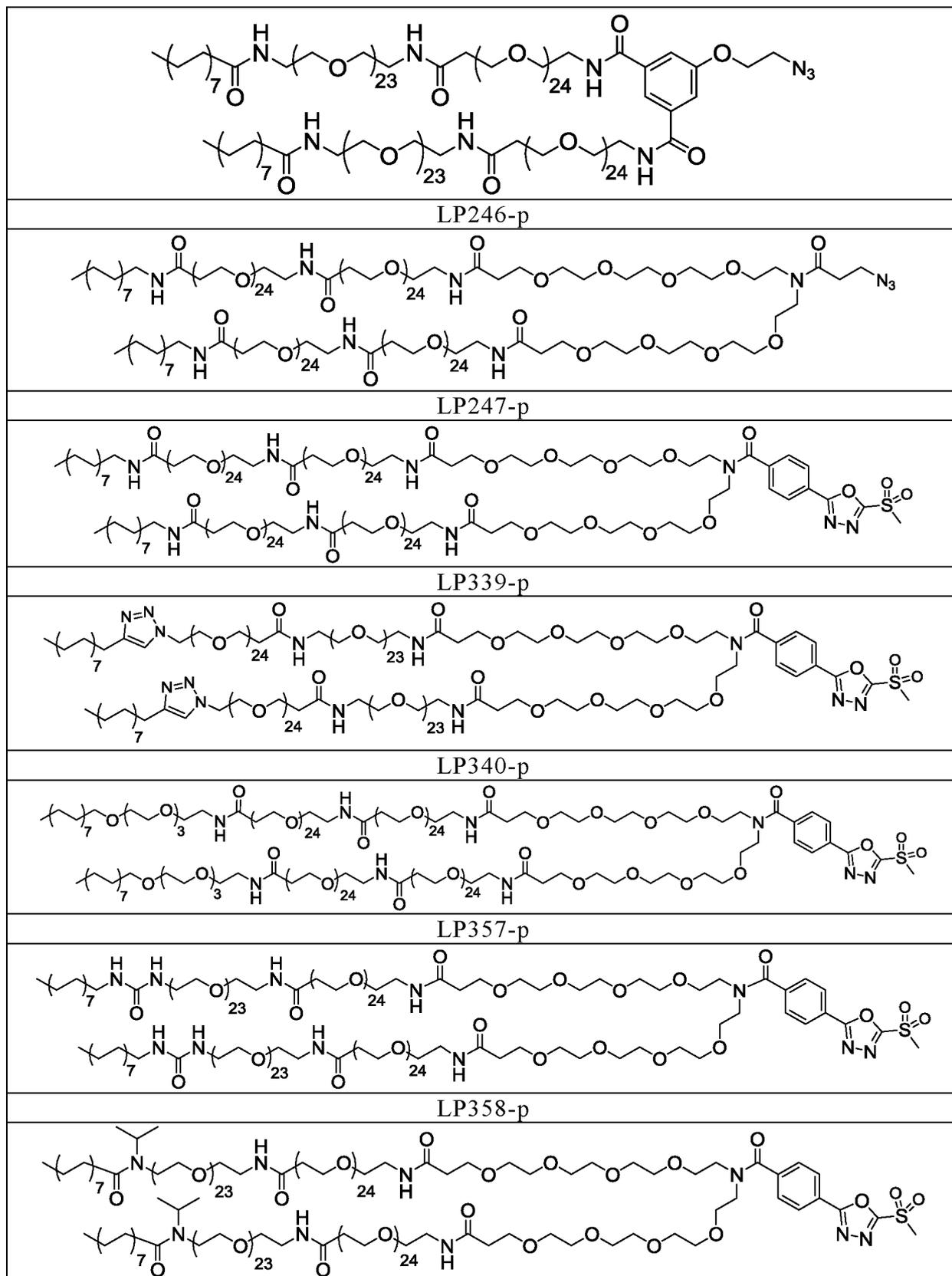
LP226-p



LP238-p



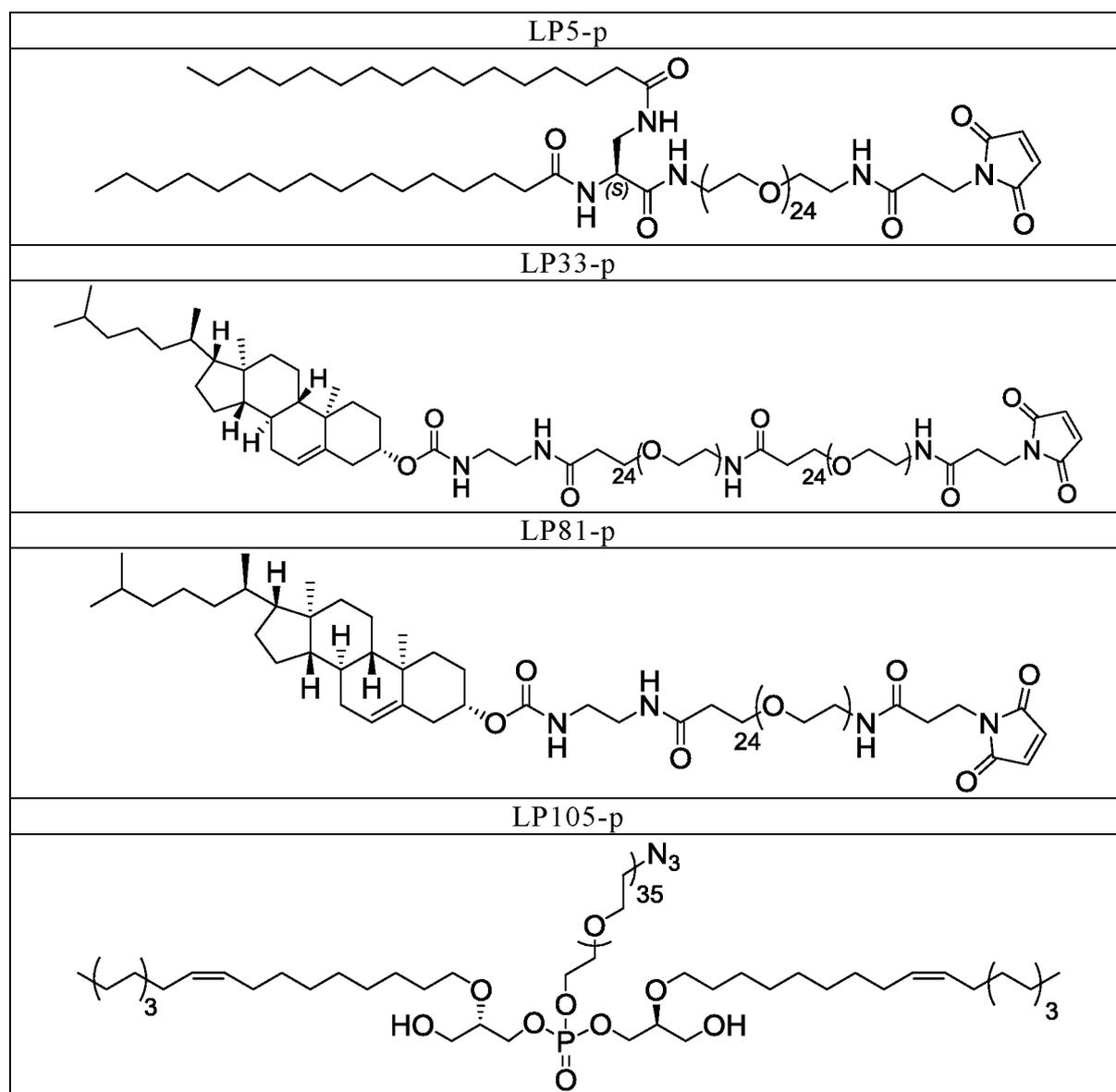
LP240-p



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

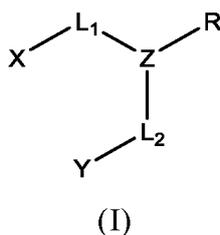
В другом объекте настоящего изобретения соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, указанных в Таблице 21, или их фармацевтически приемлемых солей.

Таблица 21: Примеры соединений, предлагаемых в настоящем изобретении
5 (номер соединения указан перед его структурой)



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

Другим объектом настоящего изобретения является способ получения
10 соединений формулы (I):



или их фармацевтически приемлемых солей.

5 Способ включает конъюгирование средства на основе олигонуклеотида, содержащего первый реакционноспособный фрагмент, с соединением содержащим липид и второй реакционноспособный фрагмент, с получением соединения формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления первый реакционноспособный фрагмент выбран из группы, состоящей из дисульфида и пропаргильной группы.
10 В некоторых вариантах осуществления первым реакционноспособным фрагментом является дисульфид. В некоторых вариантах осуществления первым реакционноспособным фрагментом является пропаргильная группа.

В некоторых вариантах осуществления второй реакционноспособный фрагмент выбран из группы, состоящей из малеинимида, сульфона, азида и алкина.
15 В некоторых вариантах осуществления вторым реакционноспособным фрагментом является малеинимид. В некоторых вариантах осуществления вторым реакционноспособным фрагментом является сульфон. В некоторых вариантах осуществления вторым реакционноспособным фрагментом является азид. В некоторых вариантах осуществления вторым реакционноспособным
20 фрагментом является алкин.

Соединения формулы (V), (Va), (Vb), (Vb1), (Vc), (Vd), (Ve), (Ve1), (Ve2), (Ve3) или (Ve4), описанные в настоящем изобретении, могут называться "предшественниками модуляторов фармакокинетических и/или фармакодинамических характеристик" (ниже в настоящем изобретении обозначены, как "предшественники модуляторов РК/PD или ФК/ФД"). Кроме
25 того, следует понимать, что фрагменты соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанных в настоящем изобретении, могут называться "модуляторами фармакокинетических и/или фармакодинамических характеристик" (ниже в настоящем изобретении обозначены, как "модуляторы РК/PD или ФК/ФД "). При использовании в
30 отношении фрагмента соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II),

(III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) термин "модулятор РК/PD" означает фрагмент соединения, не включающий R_Z (т.е. средство на основе олигонуклеотида).

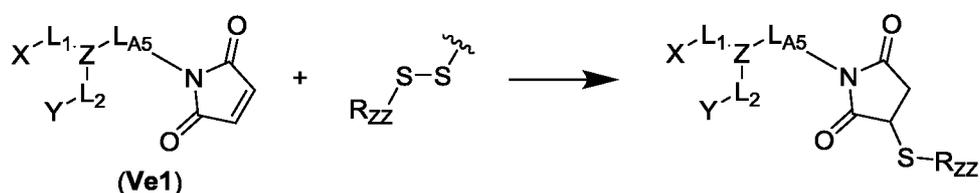
Модулятор РК/PD связан со средством на основе олигонуклеотида, таким как средство на основе РНКи, для содействия доставке средства на основе РНКи в 5
необходимые клетки или ткани. Можно синтезировать предшественники модуляторов РК/PD, содержащие такие реакционноспособные фрагменты, как малеинимидные или азидные группы, которые способствуют быстрому связыванию с одним или большим количеством мостиковых групп, содержащихся в средстве на основе РНКи. Реакции химического синтеза, 10
предназначенные для связывания таких предшественников модуляторов РК/PD со средствами на основе РНКи, в общем известны в данной области техники. Термины "модулятор РК/PD" и "липид-модулятор РК/PD" в настоящем изобретении можно использовать взаимозаменяемым образом.

Предшественники модуляторов РК/PD, выбранные из группы, состоящей из 15
LP1-р, LP5-р, LP28-р, LP29-р, LP33-р, LP38-р, LP39-р, LP41-р, LP42-р, LP43-р, LP44-р, LP45-р, LP47-р, LP48-р, LP49-р, LP53-р, LP54-р, LP55-р, LP56-р, LP57-р, LP58-р, LP59-р, LP60-р, LP61-р, LP62-р, LP81-р, LP87-р, LP89-р, LP90-р, LP92-р, LP93-р, LP94-р, LP95-р, LP101-р, LP102-р, LP103-р, LP104-р, LP105-р, LP106-р, LP107-р, LP108-р, LP109-р, LP110-р, LP111-р, LP124-р, LP130-р, LP143-р, 20
LP210-р, LP217-р, LP220-р, LP221-р, LP223-р, LP224-р, LP225-р, LP226-р, LP238-р, LP240-р, LP246-р, LP247-р, LP339-р, LP340-р, LP357-р и LP358-р, можно использовать в качестве исходных веществ для связывания со средствами на основе РНКи. Предшественники модуляторов РК/PD можно связать со средством на основе РНКи ковалентной связью с использованием любой 25
методики, известной в данной области техники. Так, например, в некоторых вариантах осуществления содержащие малеинимид предшественники модуляторов РК/PD можно ввести в реакцию с содержащим дисульфид фрагментом, находящимся на 3'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления один или большее количество 30
модуляторов РК/PD можно конъюгировать со средствами на основе РНКи, описанными в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или большее количество модуляторов РК/PD можно

конъюгировать со средствами на основе РНКи, описанными в настоящем изобретении.

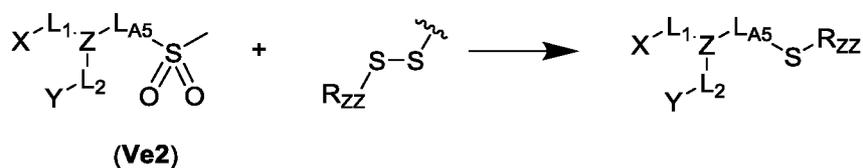
Предшественники модуляторов РК/PD можно конъюгировать со средствами на основе РНКи с использованием любой методики, известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления предшественники модуляторов РК/PD, содержащие малеинимидный фрагмент, можно ввести в реакцию со средствами на основе РНКи, содержащими дисульфидный мостик, с получением соединения, содержащего модулятор РК/PD, конъюгированный со средством на основе РНКи. Дисульфид можно восстановить и присоединить к малеинимиду по реакции присоединения по Михаэлю. Пример схемы реакции приведен ниже:



где R_{ZZ} включает средство на основе РНКи и знак обозначает положение присоединения к любой подходящей группе, известной в данной области техники. В некоторых случаях использования схемы реакции, приведенной

выше, R_{ZZ} присоединен к алкильной группе, такой как гексил (C_6H_{13}).

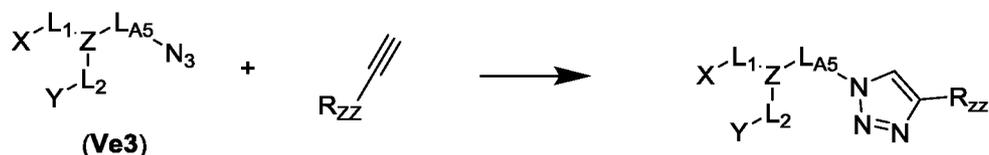
В некоторых вариантах осуществления предшественники модуляторов РК/PD могут содержать сульфоновый фрагмент и могут вступать в реакцию с дисульфидом. Пример схемы реакции приведен ниже:



где R_{ZZ} включает средство на основе РНКи и знак обозначает положение присоединения к любой подходящей группе, известной в данной области техники. В некоторых случаях использования схемы реакции, приведенной

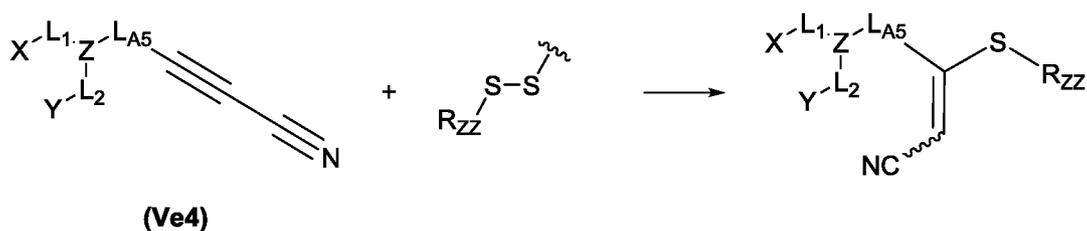
выше, R_{ZZ} присоединен к алкильной группе, такой как гексил (C_6H_{13}).

В некоторых вариантах осуществления предшественники модуляторов РК/PD могут содержать азидный фрагмент и могут вступать в реакцию со средством на основе РНКи, содержащим алкин, с получением соединения, содержащего модулятор РК/PD, конъюгированный со средством на основе РНКи, в соответствии с приведенной ниже общей схемой реакции:



где R_{ZZ} включает средство на основе РНКи.

В некоторых вариантах осуществления предшественники модуляторов РК/PD могут содержать алкиновый фрагмент и могут вступать в реакцию со средством на основе РНКи, содержащим дисульфид, с получением соединения, содержащего модулятор РК/PD, конъюгированный со средством на основе РНКи, в соответствии с приведенной ниже общей схемой реакции:



где R_{ZZ} включает средство на основе РНКи и знак  обозначает положение присоединения к любой подходящей группе, известной в данной области техники. В некоторых случаях использования схемы реакции, приведенной

выше, R_{ZZ}  присоединен к алкильной группе, такой как гексил (C_6H_{13}).

В некоторых вариантах осуществления модуляторы РК/PD могут быть конъюгированы с 5'-концом смысловой или антисмысловой цепи, с 3'-концом смысловой или антисмысловой цепи или с внутренним нуклеотидом средств на основе РНКи. В некоторых вариантах осуществления синтезируют средство на основе РНКи, включающее находящийся на 3'-конце смысловой цепи содержащий дисульфид фрагмент, и предшественник модулятора РК/PD можно конъюгировать с 3'-концом смысловой цепи с использованием любой подходящей общей схемы синтеза, описанной выше.

Определения

При использовании в настоящем изобретении термины "олигонуклеотид" и "полинуклеотид" означают полимер, состоящий из связанных нуклеозидов, каждый из которых независимо может являться модифицированным или немодифицированным.

При использовании в настоящем изобретении термин "средство на основе РНКи" (также называемый "триггером на основе РНКи") означает композицию, которая содержит РНК или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) олигонуклеотидную молекулу, которая способна нарушать или подавлять (например, нарушать или подавлять при подходящих условиях) трансляцию транскриптов матричной РНК (мРНК) целевой мРНК специфичным по отношению к последовательности образом. При использовании в настоящем изобретении средства на основе РНКи могут действовать в соответствии с механизмом РНК-интерференции (т.е. индуцировать РНК-интерференцию путем взаимодействия с компонентами пути РНК-интерференции (РНК-индуцируемый комплекс выключения гена или RISC) в клетках млекопитающего) или в соответствии с любым альтернативным механизмом (механизмами) или путем (путями). Хотя полагают, что средства на основе РНКи в основном действуют в соответствии с механизмом РНК-интерференции, поскольку этот термин используется в настоящем изобретении, действие раскрытых средств на основе РНКи не связано с определенным путем или механизмом и не ограничено им. Средства на основе РНКи, раскрытые в настоящем изобретении, состоят из смысловой цепи и антисмысловой цепи и включают, но не ограничиваются только ими: короткие (или малые) интерферирующие РНК (киРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микро-РНК (миРНК), короткие образующие шпильки РНК (кшРНК) и субстраты Dicer. Антисмысловая цепь средств на основе РНКи, описанных в настоящем изобретении, по меньшей мере частично комплементарна целевой мРНК. Средства на основе РНКи могут включать один или большее количество модифицированных нуклеотидов и/или один или большее количество не являющихся фосфодиэфирами мостиков.

При использовании в настоящем изобретении термин "липид" означает фрагменты или молекулы, которые растворимы в неполярных растворителях.

Термин "липид" включает амфифильные молекулы, содержащие полярную, растворимую в воде головную группу и гидрофобный хвост. Липиды могут являться природными или синтетическими. Неограничивающие примеры липидов включают жирные кислоты (например, насыщенные жирные кислоты, 5 мононенасыщенные жирные кислоты и полиненасыщенные жирные кислоты), глицеролипиды (например, моноацилглицерины, диацилглицерины и триацилглицерины), фосфолипиды (например, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и фосфатидилсерин), сфинголипиды (например, сфингомиелин) и эфиры холестерина. При использовании в настоящем 10 изобретении термин "насыщенный липид" означает липиды, которые не содержат какие-либо ненасыщенные связи. При использовании в настоящем изобретении термин "ненасыщенный липид" означает липиды, которые содержат по меньшей мере одну (1) ненасыщенную связь. При использовании в настоящем изобретении термин "разветвленный липид" означает липиды, содержащие 15 более, чем одну линейную цепь, где каждая линейная цепь связана по меньшей мере с одной другой линейной цепью ковалентной связью. При использовании в настоящем изобретении термин "обладающий линейной цепью липид" означает липиды, которые не содержат какие-либо разветвления.

При использовании в настоящем изобретении в отношении экспрессии 20 определенного гена термины "выключать", "уменьшать", "подавлять", "понижать регуляцию" или "разрушать" означают, что экспрессия гена, определенная, как количество РНК, транскрибированной из гена, или количество полипептида, белка или белковой субъединицы, транслируемой из мРНК в клетку, группу 25 клеток, ткань, орган или у субъекта, у которого транскрибирован ген, уменьшена, если в клетку, группу клеток, ткань, орган или субъекту вводят средства на основе РНКи, описанные в настоящем изобретении, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или субъектом, которым не проводят или не проводили такое введение.

При использовании в настоящем изобретении термины 30 "последовательность" и "нуклеотидная последовательность" означают последовательность или порядок расположения нуклеиновых оснований или нуклеотидов, описанный с помощью последовательности букв с использованием стандартной номенклатуры.

При использовании в настоящем изобретении термин "основание", "нуклеотидное основание" или "нуклеиновое основание" означает гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, которое является компонентом нуклеотида, и включает первичные пуриновые основания, аденин и гуанин, и первичные пиримидиновые основания, цитозин, тимин и урацил. Нуклеиновое основание может быть дополнительно модифицировано и включает, но не ограничивается только ими, универсальные основания, гидрофобные основания, нерегулярные основания, удлиненные основания и фторированные основания (см, например, публикацию Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008). Синтез таких модифицированных нуклеиновых оснований (включая фосфорамидитные соединения, которые включают модифицированные нуклеиновые основания) известен в данной области техники.

При использовании в настоящем изобретении и, если не указано иное, если термин "комплементарный" при использовании для описания взаимосвязи первого нуклеинового основания или нуклеотидной последовательности (например, смысловой цепи средства на основе РНКи или целевой мРНК) и второго нуклеинового основания или нуклеотидной последовательности (например, антисмысловой цепи средства на основе РНКи или одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида) означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться (образовывать водородные связи между спаренными основаниями при физиологических условиях организма млекопитающего (или при сходных условиях *in vitro*)) и при определенных стандартных условиях образовывать дуплекс или двойную спиральную структуру с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. Комплементарные последовательности включают спаренные основания, образующиеся по Уотсону-Крику, или спаренные основания, образующиеся не по Уотсону-Крику, и включают природные или модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов по меньшей мере в таком количестве, что удовлетворены требования описанной выше гибридизации. Идентичность или комплементарность последовательности не зависит от модификации. Так, например, с целью определения идентичности или комплементарности а и Af,

определенные в настоящем изобретении, комплементарны U (или T) и идентичны A.

При использовании в настоящем изобретении термин "совершенно комплементарный" или "полностью комплементарный" означает, что в гибридной паре нуклеиновых оснований или молекул нуклеотидной последовательности все (100%) основания в смежной последовательности первого олигонуклеотида гибридизируются с таким же количеством оснований в смежной последовательности второго олигонуклеотида. Смежная последовательность может включать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в настоящем изобретении термин "частично комплементарный" означает, что в гибридной паре нуклеиновых оснований или молекул нуклеотидной последовательности по меньшей мере 70% оснований, но не все основания, в смежной последовательности первого олигонуклеотида гибридизируются с таким же количеством оснований в смежной последовательности второго олигонуклеотида. Смежная последовательность может включать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в настоящем изобретении термин "в основном комплементарный" означает, что в гибридной паре нуклеиновых оснований или молекул нуклеотидной последовательности по меньшей мере 85% оснований, но не все основания, в смежной последовательности первого олигонуклеотида гибридизируются с таким же количеством оснований в смежной последовательности второго олигонуклеотида. Смежная последовательность может включать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в настоящем изобретении термины "комплементарный", "полностью комплементарный", "частично комплементарный" и "в основном комплементарный" используют для описания степени совпадения нуклеинового основания или нуклеотида смысловой цепи и антисмысловой цепи средства на основе РНКи, или антисмысловой цепи средства на основе РНКи и последовательности целевой мРНК.

При использовании в настоящем изобретении в отношении последовательности нуклеиновых кислот термин "в основном совпадающая" или "существенная совпадение" означает, что совпадение нуклеотидной последовательности (или части нуклеотидной последовательности) с эталонной последовательностью составляет по меньшей мере примерно 85% или более, например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%. Выраженную в процентах степень совпадения определяют путем сопоставления двух оптимально построенных последовательностей с помощью окна сравнения. Выраженное в процентах значение рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях находится основание нуклеиновой кислоты одинакового типа с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на полное количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением выраженной в процентах степени совпадения последовательностей. В объем настоящего изобретения входят нуклеотидные последовательности, в основном совпадающие с раскрытыми в настоящем изобретении.

При использовании в настоящем изобретении термины "лечить", "лечение" и т.п., означают способы или стадии, проводимые для обеспечения облегчения или уменьшения количества, тяжести и/или частоты проявления одного или большего количества симптомов заболевания у субъекта. При использовании в настоящем изобретении термины "лечить" и "лечение" могут включать предупредительное лечение, лечение, профилактическое лечение и/или подавление или уменьшение количества, тяжести и/или частоты проявления одного или большего количества симптомов заболевания у субъекта.

При использовании в настоящем изобретении в отношении средства на основе РНКи выражение "введение в клетку" означает функциональную доставку средства на основе РНКи в клетку. Выражение "функциональная доставка" означает доставку средства на основе РНКи в клетку таким образом, что средство на основе РНКи обладает ожидаемой биологической активностью, например, специфичным по отношению к последовательности подавлением экспрессии гена.

При использовании в настоящем изобретении термин "изомеры" означает соединения, которые описываются одинаковыми молекулярными формулами, но обладают разной природой или последовательностью соединения их атомов, или расположением их атомов в пространстве. Изомеры, которые различаются расположением их атомов в пространстве, называются "стереоизомерами".
5 Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются "диастереоизомерами" и стереоизомеры, которые не являются накладывающимися зеркальными отображениями друг друга, называются "энантиомерами" или иногда оптическими изомерами. Атом углерода,
10 соединенный с четырьмя разными заместителями называется "хиральным центром".

При использовании в настоящем изобретении, если явно не указано, что структура обладает определенной конформацией, в случае каждой структуры, содержащей асимметрические центры, наличие которых приводит к
15 существованию энантиомеров, диастереоизомеров или других стереоизомерных конфигураций, каждая структура, раскрытая в настоящем изобретении, описывает все такие возможные изомеры, включая их оптически чистые и рацемические формы. Так, например, структуры, раскрытые в настоящем изобретении, включают смеси диастереоизомеров, а также отдельные
20 стереоизомеры.

При использовании в пункте формулы изобретения выражение "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в пункте формулы изобретения. При использовании в пункте формулы изобретения выражение "в основном состоящий из" ограничивает объем пункта формулы
25 изобретения указанными материалами или стадиями и теми, которые не оказывают существенное влияние на основную и новую характеристику (характеристики) заявленного изобретения.

Для специалиста с общей подготовкой в данной области техники должно быть совершенно понятно и очевидно, что соединения и композиции, раскрытые
30 в настоящем изобретении, могут содержать определенные атомы (например, атомы N, O или S), находящиеся в протонированной или депротонированной форме в зависимости от среды, в которую помещают соединение или композицию. Соответственно, при использовании в настоящем изобретении

структуры, раскрытые в настоящем изобретении, предусматривают, что определенные функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут являться протонированными или депротонированными. В объем
5 независимо от их степени протонирования, зависящей от среды (например, значения pH), как это совершенно очевидно для специалиста с общей подготовкой в данной области техники.

При использовании в настоящем изобретении термин "связанный" или "конъюгированный" в отношении связывания двух соединений или молекул
10 означает, что две молекулы связаны ковалентной связью или они ассоциированы с помощью нековалентных связей (например, с помощью водородных связей или ионных связей). В некоторых случаях, если термин "связанный" или "конъюгированный" означает ассоциацию двух молекул с помощью нековалентных связей, то степень ассоциации двух разных молекул в
15 физиологически приемлемом буфере (например, забуференном физиологическом растворе) характеризуется значением K_D , равным менее 1×10^{-4} М (например, менее 1×10^{-5} М, менее 1×10^{-6} М или менее 1×10^{-7} М). Если не указано иное, при использовании в настоящем изобретении термины "связанный" и "конъюгированный" могут означать связь между первым соединением и вторым
20 соединением при наличии или при отсутствии каких-либо промежуточных атомов или групп атомов.

При использовании в настоящем изобретении мостиковая группа представляет собой один или большее количество атомов, которые соединяют одну молекулу или часть молекулы с другой второй молекулой или частью
25 второй молекулы. Аналогичным образом, в данной области техники термины "каркас" и "мостиковая группа" иногда используют взаимозаменяемым образом. Мостиковые группы могут содержать любое количество атомов или функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления мостиковые группы могут не способствовать биологическому или фармакологическому
30 ответу и они предназначены лишь для связывания двух биологически активных молекул.

При использовании в настоящем изобретении термин "алкил" означает насыщенную алифатическую углеводородную группу, содержащую 1-12

(например, 1-8, 1-6, 1-4 или 1-3) атомов углерода. Алкильная группа может являться линейной или разветвленной. Примеры алкильных групп включают, но не ограничиваются только ими, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, н-гептил или 2-этилгексил.

5 Если не указано иное, в настоящем изобретении использование знака  означает, что любая группа или группы могут быть связаны (или соединены) с ним, это находится в соответствии с объемом описанного изобретения.

10 При использовании в настоящем изобретении термин "включая" означает выражение "включая, но не ограничиваясь только ими" и они используются взаимозаменяемым образом. Термин "или" при использовании в настоящем изобретении означает термин "и/или" и они используются взаимозаменяемым образом, если из контекста явно не следует иное.

15 При использовании в пункте формулы изобретения выражение "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в пункте формулы изобретения. При использовании в пункте формулы изобретения выражение "в основном состоящий из" ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или стадиями и теми, которые не оказывают существенное влияние на основную и новую характеристику (характеристики) заявленного изобретения.

20 Средства на основе олигонуклеотидов, включая средства на основе РНКи

25 При использовании в настоящем изобретении термин "средство на основе олигонуклеотида" означает нуклеотидную последовательность, содержащую примерно 10-50 (например, от 10 до 48, от 10 до 46, от 10 до 44, от 10 до 42, от 10 до 40, от 10 до 38, от 10 до 36, от 10 до 34, от 10 до 32, от 10 до 30, от 10 до 28, от 10 до 26, от 10 до 24, от 10 до 22, от 10 до 20, от 10 до 18, от 10 до 16, от 10 до 14, от 10 до 12, от 12 до 50, от 12 до 48, от 12 до 46, от 12 до 44, от 12 до 42, от 12 до 40, от 12 до 38, от 12 до 36, от 12 до 34, от 12 до 32, от 12 до 30, от 12 до 28, от 12 до 26, от 12 до 24, от 12 до 22, от 12 до 20, от 12 до 18, от 12 до 16, от 12 до 14, от 14 до 50, от 14 до 48, от 14 до 46, от 14 до 44, от 14 до 42, от 14 до 40, от 14 до 38, от 14 до 36, от 14 до 34, от 14 до 32, от 14 до 30, от 14 до 28, от 14 до 26, от 14 до 24, от 14 до 22, от 14 до 20, от 14 до 18, от 14 до 16, от 16 до 50, от 16 до 48, от 16 до 46, от 16 до 44, от 16 до 42, от 16 до 40, от 16 до 38, от 16 до 36, от 16 до 34, от 16 до 32, от 16 до 30, от 16 до 28, от 16 до 26, от

16 до 24, от 16 до 22, от 16 до 20, от 16 до 18, от 18 до 50, от 18 до 48, от 18 до 46, от 18 до 44, от 18 до 42, от 18 до 40, от 18 до 38, от 18 до 36, от 18 до 34, от 18 до 32, от 18 до 30, от 18 до 28, от 18 до 26, от 18 до 24, от 18 до 22, от 18 до 20, от 20 до 50, от 20 до 48, от 20 до 46, от 20 до 44, от 20 до 42, от 20 до 40, от 20 до 38, от 20 до 36, от 20 до 34, от 20 до 32, от 20 до 30, от 20 до 28, от 20 до 26, от 20 до 24, от 20 до 22, от 22 до 50, от 22 до 48, от 22 до 46, от 22 до 44, от 22 до 42, от 22 до 40, от 22 до 38, от 22 до 36, от 22 до 34, от 22 до 32, от 22 до 30, от 22 до 28, от 22 до 26, от 22 до 24, от 24 до 50, от 24 до 48, от 24 до 46, от 24 до 44, от 24 до 42, от 24 до 40, от 24 до 38, от 24 до 36, от 24 до 34, от 24 до 32, от 24 до 30, от 24 до 28, от 24 до 26, от 26 до 50, от 26 до 48, от 26 до 46, от 26 до 44, от 26 до 42, от 26 до 40, от 26 до 38, от 26 до 36, от 26 до 34, от 26 до 32, от 26 до 30, от 26 до 28, от 28 до 50, от 28 до 48, от 28 до 46, от 28 до 44, от 28 до 42, от 28 до 40, от 28 до 38, от 28 до 36, от 28 до 34, от 28 до 32, от 28 до 30, от 30 до 50, от 30 до 48, от 30 до 46, от 30 до 44, от 30 до 42, от 30 до 40, от 30 до 38, от 30 до 36, от 30 до 34, от 30 до 32, от 32 до 50, от 32 до 48, от 32 до 46, от 32 до 44, от 32 до 42, от 32 до 40, от 32 до 38, от 32 до 36, от 32 до 34, от 34 до 50, от 34 до 48, от 34 до 46, от 34 до 44, от 34 до 42, от 34 до 40, от 34 до 38, от 34 до 36, от 36 до 50, от 36 до 48, от 36 до 46, от 36 до 44, от 36 до 42, от 36 до 40, от 36 до 38, от 38 до 50, от 38 до 48, от 38 до 46, от 38 до 44, от 38 до 42, от 38 до 40, от 40 до 50, от 40 до 48, от 40 до 46, от 40 до 44, от 40 до 42, от 42 до 50, от 42 до 48, от 42 до 46, от 42 до 44, от 44 до 50, от 44 до 48, от 44 до 46, от 46 до 50, от 46 до 48, или от 48 до 50) нуклеотидов или спаренных нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления средство на основе олигонуклеотида содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая по меньшей мере частично комплементарна кодирующей последовательности целевой нуклеиновой кислоты или целевого гена, экспрессирующегося в клетке. В некоторых вариантах осуществления при доставке в клетку, экспрессирующую ген, средства на основе олигонуклеотидов способны подавлять экспрессию основного гена и в настоящем изобретении они называются "подавляющие экспрессию средства на основе олигонуклеотидов". Подавление экспрессии гена может происходить *in vitro* или *in vivo*.

"Средства на основе олигонуклеотидов" включают, но не ограничиваются только ими: одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые

олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (киРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микро-РНК (миРНК), короткие образующие шпильки РНК (кшРНК), рибозимы, молекулы интерферирующих РНК и субстраты Dicer. В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является одноцепочечный олигонуклеотид, такой как антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является двухцепочечный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является двухцепочечный олигонуклеотид, который является средством на основе РНКи.

10 В некоторых вариантах осуществления средством на основе олигонуклеотида является "средство на основе РНКи", которое, как это определено в настоящем изобретении, представляет собой композицию, которая содержит РНК или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) олигонуклеотидную молекулу, которая способна нарушать или подавлять трансляцию транскриптов матричной РНК (мРНК) целевой мРНК специфичным по отношению к последовательности образом. При использовании в настоящем изобретении средства на основе РНКи могут действовать в соответствии с механизмом РНК-интерференции (т.е. индуцировать РНК-интерференцию путем взаимодействия с компонентами пути РНК-интерференции (РНК-индуцируемый комплекс выключения гена или RISC) в клетках млекопитающего) или в соответствии с любым альтернативным механизмом (механизмами) или путем (путями). Хотя полагают, что средства на основе РНКи в основном действуют в соответствии с механизмом РНК-интерференции, поскольку этот термин используется в настоящем изобретении, действие раскрытых средств на основе РНКи не связано с определенным путем или механизмом и не ограничено им. Средства на основе РНКи, раскрытые в настоящем изобретении, состоят из смысловой цепи и антисмысловой цепи и включают, но не ограничиваются только ими: короткие (или малые) интерферирующие РНК (киРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микро-РНК (миРНК), короткие образующие шпильки РНК (кшРНК) и субстраты Dicer. Антисмысловая цепь средств на основе РНКи, описанных в настоящем изобретении, по меньшей мере частично комплементарна целевой мРНК. Средства на основе РНКи могут включать один

или большее количество модифицированных нуклеотидов и/или один или большее количество не являющихся фосфодиэфирами мостиков.

Средства на основе РНКи обычно могут состоять по меньшей мере из смысловой цепи (также называемой пассажирской цепью), которая включает первую последовательность, и антисмысловой цепи (также называемой направляющей цепью), которая включает вторую последовательность. Длины смысловой и антисмысловой цепей средства на основе РНКи могут составлять от 16 до 49 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длины смысловой и антисмысловой цепей средства на основе РНКи независимо составляют от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длины смысловой и антисмысловой цепей независимо составляют от 21 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длины смысловой и антисмысловой цепей независимо составляют от 21 до 24 нуклеотидов. Смысловая и антисмысловая цепи могут обладать одинаковой длиной или разной длиной. Средства на основе РНКи включают последовательность антисмысловой цепи, которая по меньшей мере частично комплементарна последовательности целевого гена, и при доставке в клетку, экспрессирующую целевой ген, средство на основе РНКи может подавлять экспрессию одного или большего количества целевых генов *in vivo* или *in vitro*.

Средства на основе олигонуклеотидов в общем и, в частности, средства на основе РНКи могут состоять из модифицированных нуклеотидов и/или одного или большего количества не являющихся фосфодиэфирами мостиков. При использовании в настоящем изобретении термин "модифицированный нуклеотид" означает нуклеотид, отличающийся от рибонуклеотида (2'-гидроксинуклеотида). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. При использовании в настоящем изобретении модифицированные нуклеотиды включают, но не ограничиваются только ими, дезоксирибонуклеотиды, миметики нуклеотидов, абазические нуклеотиды, модифицированные в положении 2' нуклеотиды, мостиковые

(обращенные) нуклеотиды, связывающие 3' с 3', содержащие неприродные основания нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты, миметики 2',3'-секонуклеотидов ((неблокированные аналоги нуклеиновых оснований), блокированные нуклеотиды, 3'-О-метоксинуклеотиды

5 (связанные с 2' межнуклеозидным мостиком), 2'-F-арабинонуклеотиды, 5'-Me,2'-фторнуклеотид, морфолиновые нуклеотиды, содержащие винилфосфонатную группу дезоксирибонуклеотиды, содержащие винилфосфонатную группу нуклеотиды и содержащие циклопропилфосфонатную группу нуклеотиды.

Модифицированные в положении 2' нуклеотиды (т.е. нуклеотиды, содержащие в

10 положении 2' 5-членного кольца сахара группу, отличающуюся от гидроксигруппы) включают, но не ограничиваются только ими, 2'-О-метилнуклеотиды, 2'-дезоксид-2'-фторнуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-метоксиэтилнуклеотиды (2'-О-2-метоксиэтилнуклеотиды), 2'-аминонуклеотиды и 2'-алкилнуклеотиды.

15 Кроме того, один или большее количество нуклеотидов средства на основе олигонуклеотида, такого как средство на основе РНКи, могут быть связаны с помощью нестандартных мостиков или каркасных цепей (т.е. с помощью модифицированных межнуклеозидных мостиков или модифицированных каркасных цепей). Модифицированным межнуклеозидным мостиком может

20 являться не содержащий фосфат ковалентный межнуклеозидный мостик.

Модифицированные межнуклеозидные мостики или каркасные цепи включают, но не ограничиваются только ими, 5'-фосфоротиоатные группы, хиральные фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминоалкилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например,

25 метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфороамидаты (например, 3'-аминофосфороамидат, аминоалкилфосфороамидаты или тионофосфороамидаты), тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые мостики, боранофосфаты, содержащие обычные мостики 3'-5', 2'-5'-связанные аналоги боранофосфатов

30 или боранофосфаты, обладающие обращенной полярностью, где соседние пары нуклеозидных звеньев связаны следующим образом: 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'.

Отсутствует необходимость того, чтобы определенное соединение было однородно модифицировано во всех положениях. Наоборот, в одно средство на

основе олигонуклеотида или даже в один его нуклеотид можно включить более, чем одну модифицирующую группу.

Смысловые цепи и антисмысловые цепи средства на основе РНКи можно синтезировать и/или модифицировать по методикам, известным в данной области техники. Дополнительные раскрытия, относящиеся к средствам на основе РНКи описаны, например, в раскрытии модификаций, которые описаны, например, в заявке на международный патент PCT/US 2017/045446 (WO 2018027106) фирмы Arrowhead Pharmaceuticals, Inc., которая также во всей ее полноте включена в настоящее изобретение в качестве ссылки.

Модифицированные нуклеотиды

В некоторых вариантах осуществления средство на основе РНКи содержит один или большее количество модифицированных нуклеотидов. При использовании в настоящем изобретении термин "модифицированный нуклеотид" означает нуклеотид, отличающийся от рибонуклеотида (2'-гидроксинуклеотида). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. При использовании в настоящем изобретении модифицированные нуклеотиды могут включать, но не ограничиваются только ими, дезоксирибонуклеотиды, миметики нуклеотидов, абазические нуклеотиды (в настоящем изобретении обозначенные, как Ab), модифицированные в положении 2' нуклеотиды, мостиковые (обращенные) нуклеотиды, связывающие 3' с 3' (в настоящем изобретении обозначенные, как invdN, invN, invn), модифицированные нуклеиновые основания, содержащие нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК), миметики 2',3'-секонуклеотидов (неблокированные аналоги нуклеиновых оснований, в настоящем изобретении обозначенные, как N_{UNA} или NUNA), блокированные нуклеотиды (в настоящем изобретении обозначенные, как N_{LNA} или NLNA), 3'-О-метоксинуклеотиды (связанные с 2' межнуклеозидным мостиком) (в настоящем изобретении обозначенные, как 3'-OMen), 2'-F-арабинонуклеотиды (в настоящем изобретении обозначенные, как NfANA или Nf_{ANA}), 5'-Me,2'-фторнуклеотид (в настоящем изобретении обозначенный, как

5Me-Nf), морфолиновые нуклеотиды, содержащие винилфосфонатную группу дезоксирибонуклеотиды (в настоящем изобретении обозначенные, как vpdN), содержащие винилфосфонатную группу нуклеотиды и содержащие циклопропилфосфонатную группу нуклеотиды (сPrpN). Модифицированные в
5 положении 2' нуклеотиды (т.е. нуклеотиды, содержащие в положении 2' 5-членного кольца сахара группу, отличающуюся от гидроксигруппы) включают, но не ограничиваются только ими, 2'-О-метилнуклеотиды (в настоящем изобретении обозначенные в нуклеотидной последовательности с помощью строчной буквы "n"), 2'-дезокси-2'-фторнуклеотиды (в настоящем изобретении
10 также называемые 2'-фторнуклеотидами и в настоящем изобретении обозначенные, как Nf), 2'-дезоксинуклеотиды (в настоящем изобретении обозначенные, как dN), 2'-метоксиэтилнуклеотиды (2'-О-2-метоксиэтилнуклеотиды) (в настоящем изобретении также называемые 2'-МОЕ и в настоящем изобретении обозначенные, как NM), 2'-аминонуклеотиды и
15 2'-алкилнуклеотиды. Отсутствует необходимость того, чтобы определенное соединение было однородно модифицировано во всех положениях. Наоборот, в одно целевое средство на основе РНКи или даже в один его нуклеотид можно включить более, чем одну модифицирующую группу. Смысловые цепи и антисмысловые цепи целевого средства на основе РНКи можно синтезировать
20 и/или модифицировать по методикам, известным в данной области техники. Модификация одного нуклеотида не зависит от модификации другого нуклеотида.

Модифицированные нуклеиновые основания включают синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-
25 азапиримидины и N-2-, N-6- и O-6-замещенные пурины, (например, 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил или 5-пропинилцитозин), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, инозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-алкил- (например, 6-метил-, 6-этил-, 6-изопропил- или 6-н-бутил-) замещенные производные аденина и гуанина, 2-алкил- (например, 2-метил-, 2-этил-, 2-изопропил- или 2-н-бутил-) и другие алкилзамещенные
30 производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил, цитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-,

8-амино-, 8-сульфгидрил-, 8-тиоалкил-, 8-гидрокси- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген- (например, 5-бром-), 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин, 7-дезааденин, 3-деазагуанин и 3-дезааденин.

В некоторых вариантах осуществления все или в основном все нуклеотиды средства на основе РНКи являются модифицированными нуклеотидами. При использовании в настоящем изобретении средство на основе РНКи, в котором в основном все содержащиеся нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой средство на основе РНКи, содержащее в смысловой цепи и в антисмысловой цепи четыре или меньшее количество (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) нуклеотидов, которые являются рибонуклеотидами (т.е. немодифицированными). При использовании в настоящем изобретении смысловая цепь, в которой в основном все содержащиеся нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой смысловую цепь, содержащую два или меньшее количество (т.е. 0, 1 или 2) нуклеотидов, которые являются немодифицированными рибонуклеотидами. При использовании в настоящем изобретении антисмысловая цепь, в которой в основном все содержащиеся нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, представляет собой антисмысловую цепь, содержащую два или меньшее количество (т.е. 0, 1 или 2) нуклеотидов, которые являются немодифицированными рибонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество нуклеотидов средства на основе РНКи являются немодифицированными рибонуклеотидами.

Модифицированные межнуклеозидные мостики

В некоторых вариантах осуществления один или большее количество нуклеотидов средства на основе РНКи связаны с помощью нестандартных мостиков или каркасных цепей (т.е. с помощью модифицированных межнуклеозидных мостиков или модифицированных каркасных цепей). Модифицированные межнуклеозидные мостики или каркасные цепи включают, но не ограничиваются только ими, фосфоротиоатные группы (в настоящем изобретении обозначены строчной буквой "s"), хиральные фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные

аминоалкилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидат, аминоалкилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкилфосфонаты, сложные

5 тионоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые мостики, боранофосфаты, содержащие обычные мостики 3'-5', 2'-5'-связанные аналоги боранофосфатов или боранофосфаты, обладающие обращенной полярностью, где соседние пары нуклеозидных звеньев связаны следующим образом: 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'.

10 В некоторых вариантах осуществления модифицированный межнуклеозидный мостик или каркасная цепь не содержит атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные мостики, не содержащие атом фосфора, включают, но не ограничиваются только ими, обладающие короткой цепью алкильные циклоалкильные межсахарные мостики, смешанные содержащие гетероатом и алкил или циклоалкил межсахарные мостики, или один или большее количество

15 обладающих короткой цепью содержащих гетероатом или гетероциклических межсахарных мостиков. В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные каркасные цепи включают, но не ограничиваются только ими, силоксановые каркасные цепи, сульфидные каркасные цепи, сульфоксидные каркасные цепи, сульфоновые каркасные цепи,

20 формацетильные и тиоформацетильные каркасные цепи, метиленформацетильные и -тиоформацетильные каркасные цепи, содержащие алкен каркасные цепи, сульфаматные каркасные цепи, метилениминные и метиленигидразинные каркасные цепи, сульфонатные и сульфонамидные каркасные цепи, амидные каркасные цепи и другие каркасные цепи, содержащие

25 смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь средства на основе РНКи может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных мостиков, антисмысловая цепь средства на основе РНКи может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных мостиков, или смысловая цепь и антисмысловая цепь

30 независимо могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфоротиоатных мостиков. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь средства на основе РНКи может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных мостика, антисмысловая цепь средства на основе РНКи может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных

мостика, или смысловая цепь и антисмысловая цепь независимо могут содержать 1, 2, 3 или 4 фосфоротиоатных мостика.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь средства на основе РНКи содержит по меньшей мере два фосфоротиоатных межнуклеозидных мостика. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два фосфоротиоатных межнуклеозидных мостика находятся между нуклеотидами в положениях 1-3, считая с 3'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления один фосфоротиоатный межнуклеозидный мостик находится на 5'-конце смысловой цепи и другой фосфоротиоатный мостик находится на 3'-конце смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления два фосфоротиоатных межнуклеозидных мостика находятся на 5'-конце смысловой цепи и другой фосфоротиоатный мостик находится на 3'-конце смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь не содержит какие-либо фосфоротиоатные межнуклеозидные мостики между нуклеотидами, однако она содержит один, два или три фосфоротиоатных мостика, находящиеся между концевыми нуклеотидами на 5'- и 3'-конце и необязательно содержит обращенные абазические терминальные кэппированные остатки. В некоторых вариантах осуществления направленно действующий лиганд связан со смысловой цепью с помощью фосфоротиоатного мостика.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь средства на основе РНКи содержит четыре фосфоротиоатных межнуклеозидных мостика. В некоторых вариантах осуществления четыре фосфоротиоатных межнуклеозидных мостика находятся между нуклеотидами в положениях 1-3, считая с 5'-конца антисмысловой цепи, и между нуклеотидами в положениях 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25 или 24-26, считая с 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления три фосфоротиоатных межнуклеозидных мостика находятся между положениями 1-4, считая с 5'-конца антисмысловой цепи, и четвертый фосфоротиоатный межнуклеозидный мостик находится между положениями 20-21, считая с 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления средство на основе РНКи содержит в антисмысловой цепи по меньшей мере три или четыре фосфоротиоатных межнуклеозидных мостика.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе РНКи содержит один или большее количество модифицированных нуклеотидов и один или большее количество модифицированных межнуклеозидных мостиков. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид объединен с модифицированным межнуклеозидным мостиком.

Направленно действующие лиганды и направленно действующие группы

В некоторых вариантах осуществления средства на основе олигонуклеотидов также могут быть конъюгированы с направленно действующим лигандом или направленно действующей группой с образованием соединения, предлагаемого в настоящем изобретении. Направленно действующие лиганды или направленно действующие группы улучшают фармакокинетические характеристики или биологическое распределение конъюгата или средства на основе РНКи, к которому они присоединены, для улучшения специфичного по отношению к клетке (в некоторых случаях включая специфичное по отношению к органу) распределения и специфичного по отношению к клетке (или специфичного по отношению к органу) захвата конъюгата или средства на основе РНКи. Направленно действующая группа может являться одновалентной, двухвалентной, трехвалентной, четырехвалентной или может обладать более высокой валентностью по отношению к цели, на которую направлено ее действие. Типичные направленно действующие группы включают, но не ограничиваются только ими, соединения, обладающие сродством к молекулам, находящимся на поверхности клетки, лиганды клеточных рецепторов, гаптен, антитела, моноклональные антитела, фрагменты антител и миметики антител, обладающие сродством к молекулам, находящимся на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа связана со средством на основе РНКи с помощью мостика, такого как мостик на основе ПЭГ, или с помощью 1, 2 или 3 абазических и/или рибитных (абазическая рибоза) остатков, которые в некоторых случаях могут выступать в роли мостиков. В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа включает лиганд, направленно действующий на интегрин.

В некоторых вариантах осуществления направленно действующий лиганд улучшает способность средства на основе РНКи связываться с конкретным

клеточным рецептором целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления направленно действующие лиганды, конъюгированные со средствами на основе РНКи, описанными в настоящем изобретении, обладают сродством к рецепторам интегрин. В некоторых вариантах осуществления направленно действующий лиганд, подходящий для использования со средствами на основе РНКи, описанными в настоящем изобретении, обладает сродством к интегрину альфа-v-бета-6.

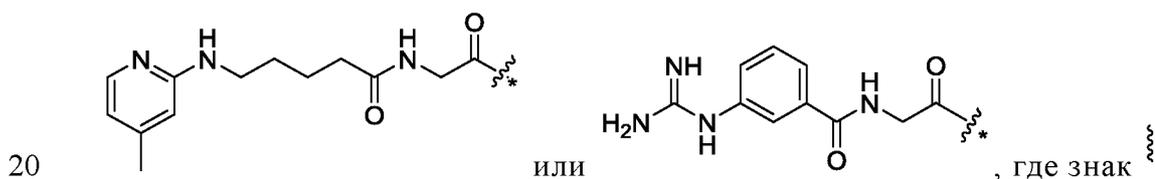
В некоторых вариантах осуществления средства на основе РНКи, описанные в настоящем изобретении, конъюгированы с направленно действующими группами. Направленно действующие группы содержат два или большее количество направленно действующих лигандов.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, связано с одним или большим количеством лигандов, направленно действующих на интегрин, которые включают соединение, обладающее следующей структурой:



(P)

или его фармацевтически приемлемую соль, в которой Xaa¹ обозначает L-аргинин, необязательно содержащий кэпированный N-конец,



обозначает положение присоединения к G'; G' обозначает L-глицин или N-метил-L-глицин; D обозначает L-аспарагиновую кислоту (L-аспартат); L обозначает L-лейцин; Xaa² обозначает L-α-аминокислоту, L-β-аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту; Xaa³ обозначает L-α-аминокислоту, L-β-аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту; Xaa⁴ обозначает L-α-аминокислоту, L-β-аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту; Xaa⁵ обозначает L-α-аминокислоту, L-β-аминокислоту или α,α-дизамещенную аминокислоту; и знак --- обозначает положение присоединения к средству на основе РНКи.

В некоторых вариантах осуществления направленно действующие лиганды конъюгированы со средством на основе РНК с использованием реакции "клик-химии". В некоторых вариантах осуществления средства на основе РНК функционализированы одной или большим количеством содержащих алкин групп и направленно действующие лиганды включают содержащие азид группы. В ходе реакции азиды и алкины образуют триазолы. Пример схемы реакции приведен ниже:



где TL включает направленно действующий лиганд и R_{ZZZ} включает средство на основе РНК.

Средства на основе РНК могут включать более, чем один направленно действующий лиганд. В некоторых вариантах осуществления средства на основе РНК включают 1-20 направленно действующих лигандов. В некоторых вариантах осуществления средства на основе РНК включают от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 направленно действующих лигандов до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 направленно действующих лигандов.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе РНК, описанные в настоящем изобретении, включают направленно действующую группу, которая содержит 2 или большее количество направленно действующих лигандов. В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа может быть конъюгирована с 5'- или 3'-концом смысловой цепи средства на основе РНК. В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа может быть конъюгирована с внутренним нуклеотидом, содержащимся в средстве на основе РНК. В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа может состоять из двух направленно действующих лигандов, связанных вместе, она называется "бидентатной" направленно действующей группой. В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа может состоять из трех направленно действующих лигандов, связанных вместе, она называется "тридентатной" направленно действующей группой. В некоторых вариантах

осуществления направленно действующая группа может состоять из четырех направленно действующих лигандов, связанных вместе, она называется "тетраденатной" направленно действующей группой.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе РНКи может
5 содержать направленно действующую группу, конъюгированную с 5'- или 3'-
концом смысловой цепи средства на основе РНКи, и дополнительно содержать
направленно действующие лиганды, конъюгированные с внутренними
нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления триденатная
направленно действующая группа конъюгирована с 5'- или 3'-концом смысловой
10 цепи средства на основе РНКи и по меньшей мере один направленно
действующий лиганд конъюгирован с внутренним нуклеотидом, содержащимся в
смысловой цепи. В других вариантах осуществления триденатная направленно
действующая группа конъюгирована с 5'-концом смысловой цепи средства на
основе РНКи и четыре направленно действующих лиганда конъюгированы с
15 внутренними нуклеотидами, содержащимися в смысловой цепи.

Мостиковые группы и средства доставки

В некоторых вариантах осуществления средства на основе
олигонуклеотидов, такие как средства на основе РНКи, описанные в настоящем
изобретении, содержат одну или большее количество не являющихся
20 нуклеотидами групп или конъюгированы с ними, включая, но не ограничиваясь
только ими мостиковую группу или средство доставки. Не являющаяся
нуклеотидом группа может улучшить направленное действие, доставку или
присоединение средства на основе РНКи. Примеры мостиковых групп
приведены в Таблице 22. Не являющаяся нуклеотидом группа может быть
25 связана с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи и/или антисмысловой цепи
ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления средство на основе
РНКи содержит не являющуюся нуклеотидом группу, связанную с 3'- и/или 5'-
концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления не являющаяся
нуклеотидом группа связана с 5'-концом смысловой цепи средства на основе
30 РНКи. Не являющаяся нуклеотидом группа может быть связана со средством на
основе РНКи прямо или косвенно с помощью мостика/мостиковой группы. В
некоторых вариантах осуществления не являющаяся нуклеотидом группа

связана со средством на основе РНКи с помощью лабильной, расщепляющейся или обратимой связи или мостика.

В некоторых вариантах осуществления не являющаяся нуклеотидом группа улучшает фармакокинетические характеристики или биологическое распределение средства на основе РНКи или конъюгата, к которому она присоединена, для улучшения специфичного по отношению к клетке или ткани распределения и специфичного по отношению к клетке захвата конъюгата. В некоторых вариантах осуществления не являющаяся нуклеотидом группа улучшает эндоцитоз средства на основе РНКи.

10 Можно синтезировать средства на основе РНКи, описанные в настоящем изобретении, содержащие реакционноспособную группу, такую как аминогруппа (в настоящем изобретении также называющаяся амином), на 5'-конце и/или 3'-конце. Затем реакционноспособную группу можно использовать для присоединения направленно действующего фрагмента по методикам, типичным
15 для данной области техники.

Так, например, в некоторых вариантах осуществления синтезируют средства на основе РНКи, раскрытые в настоящем изобретении, содержащие группу $\text{NH}_2\text{-C}_6$ на 5'-конце смысловой цепи средства на основе РНКи. Затем концевую аминогруппу можно ввести в реакцию, например, с группой, которая
20 включает соединение, обладающее сродством к одному или большему количеству интегринов (т.е. лиганд, направленно действующий на интегрин), или средством, улучшающим ФК, с получением конъюгата. В некоторых вариантах осуществления синтезируют средства на основе РНКи, раскрытые в настоящем изобретении, содержащие одну или большее количество алкиновых групп на 5'-конце смысловой цепи средства на основе РНКи. Затем концевую алкиновую группу можно ввести в реакцию, например, с группой, которая
25 содержит направленно действующий лиганд, с получением конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа содержат лиганд, направленно действующий на интегрин. В некоторых
30 вариантах осуществления лиганд, направленно действующий на интегрин, включает соединение, которое соединение обладает сродством к интегрину альфа- ν -бета-6. Использование лигандов, направленно действующих на интегрин, может обеспечить специфичное по отношению к клетке направленное

действие на клетки, содержащие соответствующий интегрин на их соответствующей поверхности, и связывание лиганда, направленно действующего на интегрин, может обеспечить проникновение средства на основе РНКи, к которому он присоединен, в клетки, такие как клетки скелетных мышц. Направленно действующие лиганды, направленно действующие группы и/или модуляторы РК/PD можно присоединить к 5'- или 3'-концу средства на основе РНКи и/или к внутренним нуклеотидам, содержащимся в средстве на основе РНКи, по методикам, общеизвестным в данной области техники.

5

10

Получение направленно действующего лиганда и направленно действующих групп, таких как интегрин $\alpha\beta6$, описано в приведенном ниже в примере 3.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают фармацевтические композиции, предназначенные для доставки средства на основе РНКи в клетку скелетной мышцы *in vivo*. Такие фармацевтические композиции могут включать, например, средство на основе РНКи, конъюгированное с направленно действующей группой, которая содержит лиганд, направленно действующий на интегрин, который обладает сродством к интегрину $\alpha\beta6$. В некоторых вариантах осуществления направленно действующий лиганд состоит из соединения, обладающего сродством к интегрину $\alpha\beta6$.

15

20

В некоторых вариантах осуществления синтезируют средство на основе РНКи, содержащее мостиковую группу, которая затем может обеспечить ковалентное связывание средства на основе РНКи с направленно действующим лигандом, направленно действующей группой, модулятором РК/PD или средством доставки другого типа. Мостиковая группа может быть связана с 3'- и/или 5'-концом смысловой цепи или антисмысловой цепи средства на основе РНКи. В некоторых вариантах осуществления мостиковая группа связана со смысловой цепью средства на основе РНКи. В некоторых вариантах осуществления мостиковая группа конъюгирована с 5'- или 3'-концом смысловой цепи средства на основе РНКи. В некоторых вариантах осуществления мостиковая группа конъюгирована с 5'-концом смысловой цепи средства на основе РНКи. Примеры мостиковых групп, включают, но не ограничиваются только ими: Alk-SMPT-C₆, Alk-SS-C₆, ДБЦО-ТЭГ (триэтиленгликоль), Me-Alk-SS-C₆ и C₆-SS-Alk-Me, реакционноспособные

25

30

группы, такие как первичные амины и алкины, алкильные группы, абазические остатки/нуклеотиды, аминокислоты, функционализированные триалкиновыми фрагментами группы, рибит и/или содержащие ПЭГ группы.

5 Мостик или мостиковая группа представляет собой связь между двумя атомами, которая связывает одну химическую группу (такую как средство на основе РНКи) или необходимый фрагмент с другой химической группой (такой как направленно действующий лиганд, направленно действующая группа, модулятор РК/PD или средство доставки) или необходимым фрагментом с помощью одной или большего количества ковалентных связей. Лабильный мостик содержит лабильную связь. Мостик необязательно может включать 10 разделяющую группу, которая увеличивает расстояние между двумя связанными атомами. Разделяющая фрагмент группа дополнительно увеличивает гибкость и/или длину мостика. Разделяющие группы включают, но не ограничиваются только ими, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, арильные группы, арилалкильные группы, арилалкенильные группы и арилалкинильные группы; каждая из которых может содержать один или большее количество гетероатомов, гетероциклы, аминокислоты, нуклеотиды и сахараиды. Разделяющие группы хорошо известны в данной области техники и 15 указанный выше перечень не ограничивает объем настоящего описания.

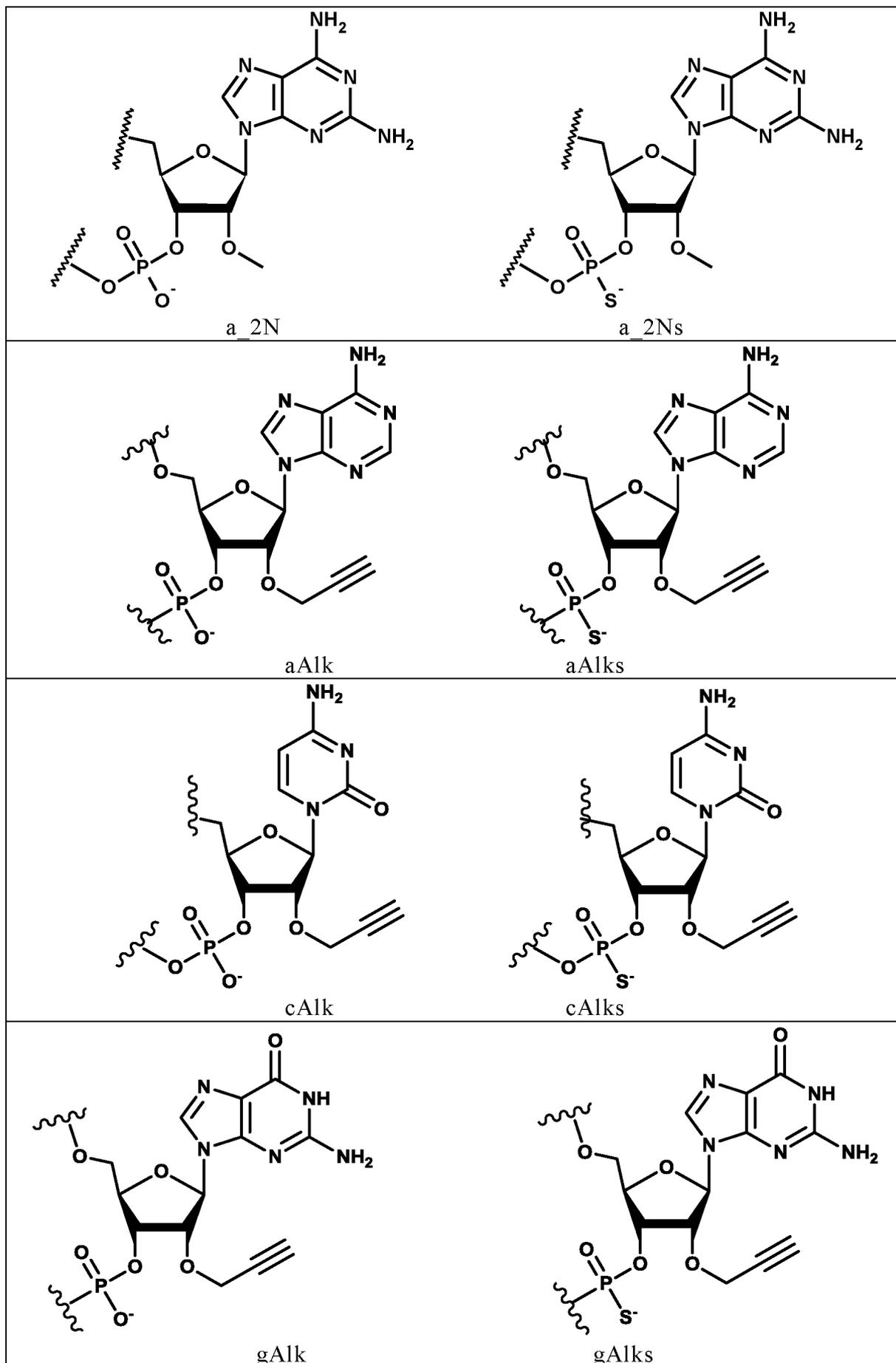
20 В некоторых вариантах осуществления направленно действующие группы связаны со средствами на основе РНК без использования дополнительного мостика. В некоторых вариантах осуществления направленно действующая группа сформирована таким образом, что она содержит мостик для обеспечения связывания со средством на основе РНКи. В некоторых вариантах 25 осуществления, в которых два или большее количество средств на основе РНКи включены в композицию, два или большее количество средств на основе РНКи могут быть связаны с их соответствующими направленно действующими группами с помощью одинаковых мостиков. В некоторых вариантах осуществления, в которых два или большее количество средств на основе РНКи 30 включены в композицию, два или большее количество средств на основе РНКи связаны с их соответствующими направленно действующими группами с помощью разных мостиков.

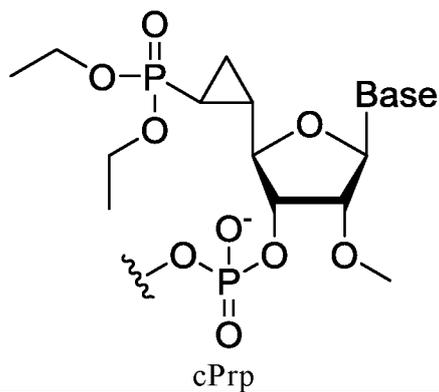
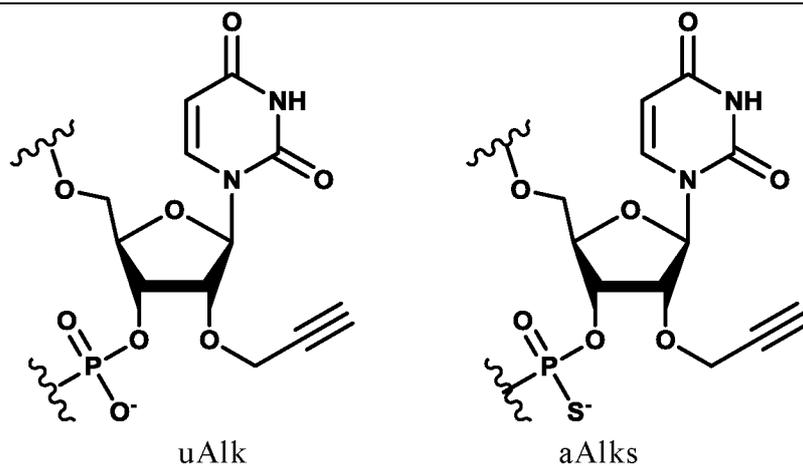
Средства на основе РНКи, модифицированные или немодифицированные, могут содержать связанные с 3'- и/или 5'-концом направленно действующую группу (группы), мостиковую группу (группы) и/или могут быть конъюгированы с модулятором (модуляторами) РК/PD или включать их. Любая из последовательностей средств на основе РНКи, перечисленных в таблицах 3, 4, 8, 9, 14 и 15, или другим образом описанных в настоящем изобретении, которые содержат связанные с 3'- или 5'-концом направленно действующий лиганд, направленно действующую группу, модулятор РК/PD или мостиковую группу, альтернативно, могут не содержать связанные с 3'- или 5'-концом направленно действующий лиганд, направленно действующую группу, мостиковую группу или модулятор РК/PD, или могут содержать другие связанные с 3'- или 5'-концом направленно действующий лиганд, направленно действующую группу, мостиковую группу или модулятор РК/PD, включая, но не ограничиваясь только ими, приведенные в Таблице 22. Любой из дуплексов средств на основе РНКи, перечисленных в Таблице 24, модифицированный или немодифицированный, может дополнительно содержать направленно действующий лиганд, направленно действующую группу, мостиковую группу или модулятор РК/PD, и направленно действующая группа или мостиковая группа может быть присоединена к 3'- или 5'-концу смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса средства на основе РНКи.

В некоторых вариантах осуществления мостиковая группа может быть конъюгирована синтетическим путем с 5'- или 3'-концом смысловой цепи средства на основе РНКи, описанного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления мостиковая группа конъюгирована синтетическим путем с 5'-концом смысловой цепи средства на основе РНКи. В некоторых вариантах осуществления мостиковой группой, конъюгированной со средством на основе РНКи, может являться триалкиновая мостиковая группа.

Примеры некоторых модифицированных нуклеотидов и мостиковых групп представлены в Таблице 22.

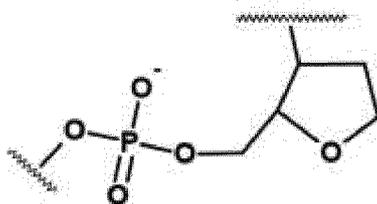
Таблица 22: Структуры, описывающие различные модифицированные нуклеотиды и мостиковые группы





В случае расположения внутри олигонуклеотида

мостик для связывания с 5'-концом
олигонуклеотида

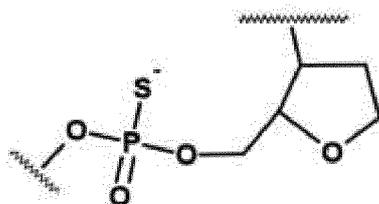


мостик для связывания с 3'-концом
олигонуклеотида

(invAb)

В случае расположения внутри олигонуклеотида

мостик для связывания с 5'-концом
олигонуклеотида

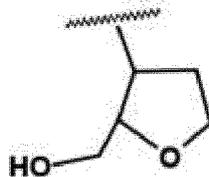


мостик для связывания с 3'-концом
олигонуклеотида

(invAb)s

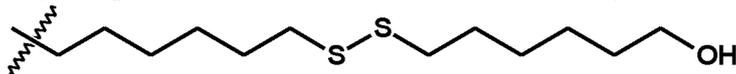
В случае расположения на 3'-конце олигонуклеотида

мостик для связывания с 5'-
концом олигонуклеотида



(invAb)

В случае расположения на 3'-конце олигонуклеотида

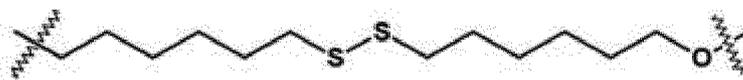


(C₆-SS-C₆)

В случае расположения внутри олигонуклеотида

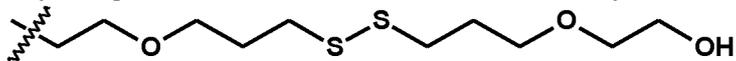
мостик для связывания с 5'-концом
олигонуклеотида

мостик для связывания с 3'-концом
олигонуклеотида



(C₆-SS-C₆)

В случае расположения на 3'-конце олигонуклеотида

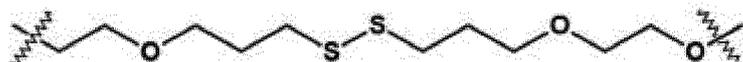


(6-SS-6)

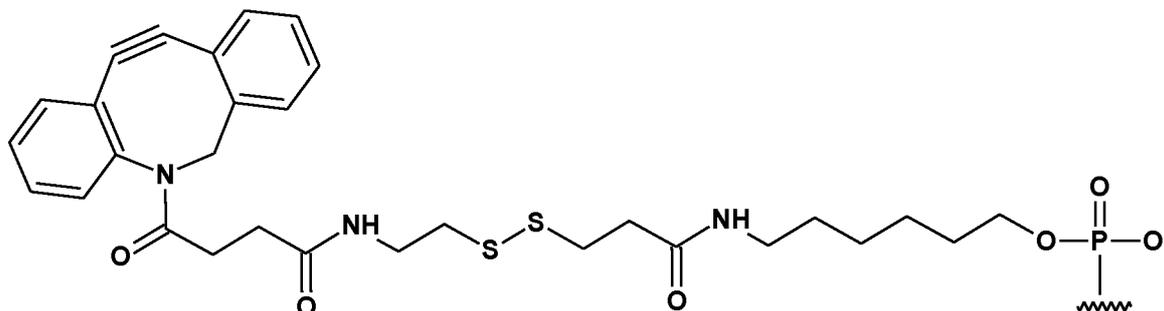
В случае расположения внутри олигонуклеотида

мостик для связывания с 5'-концом
олигонуклеотида

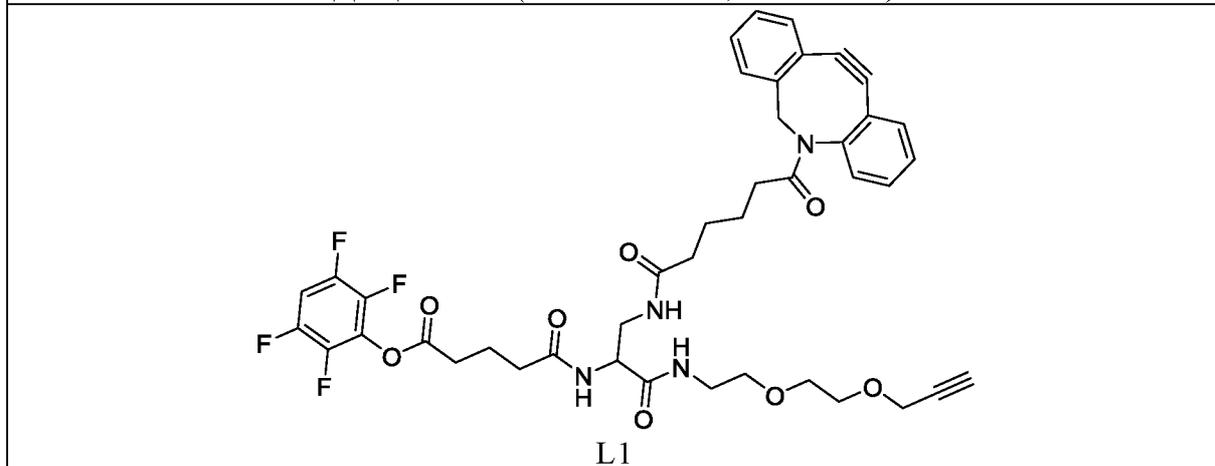
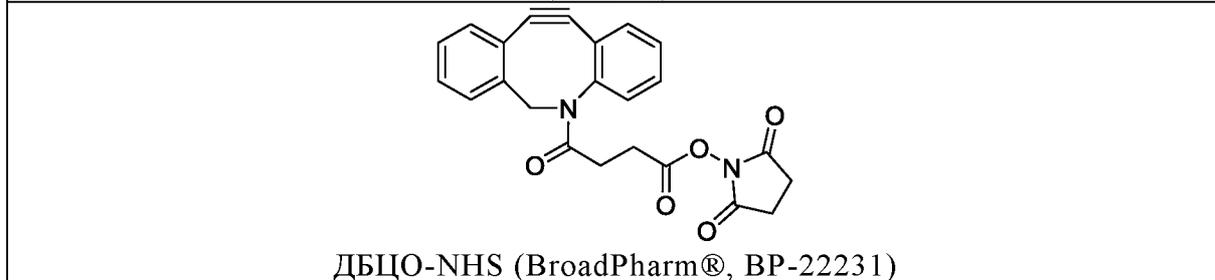
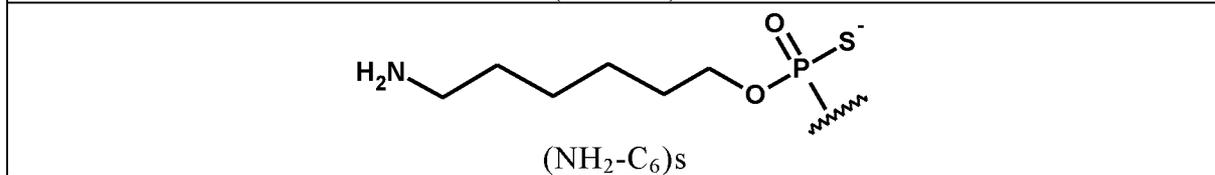
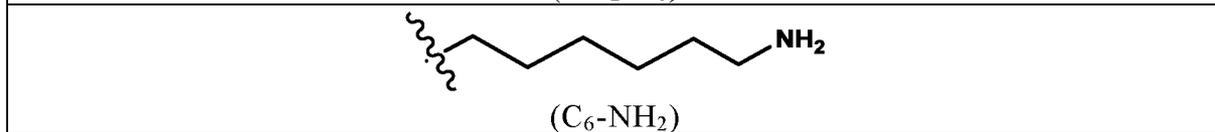
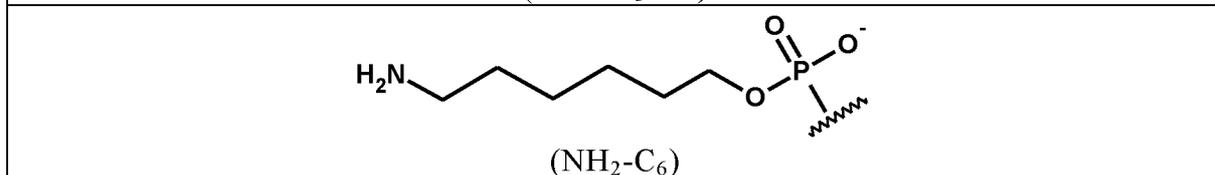
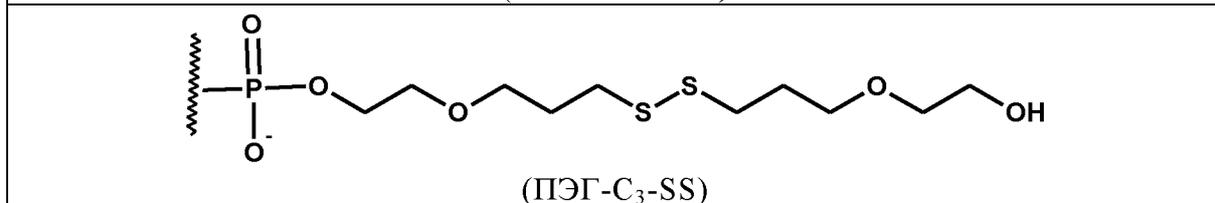
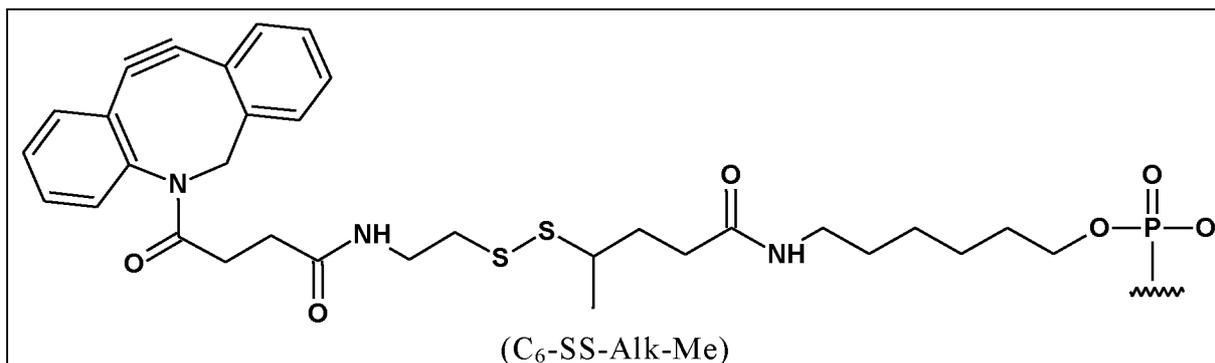
мостик для связывания с 3'-концом
олигонуклеотида

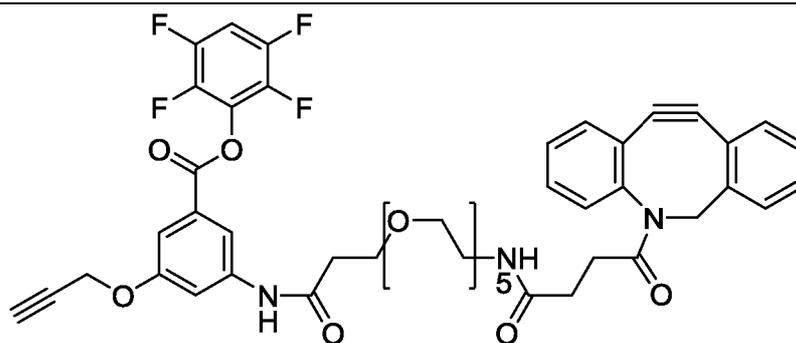


(6-SS-6)

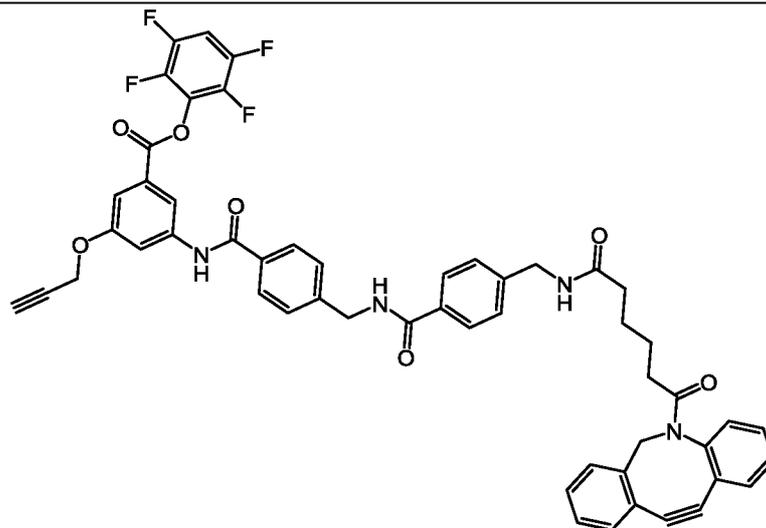


(C₆-SS-Alk) или (Alk-SS-C₆)

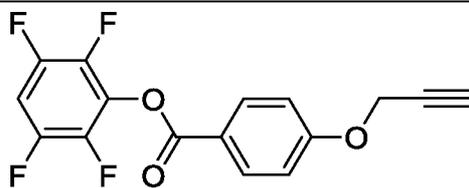




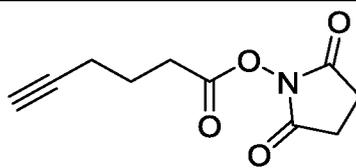
L2



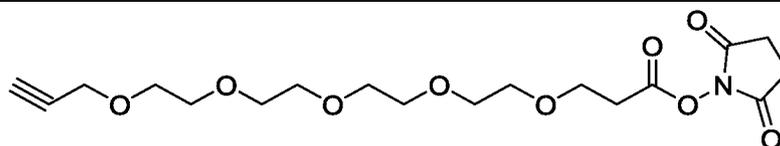
L3



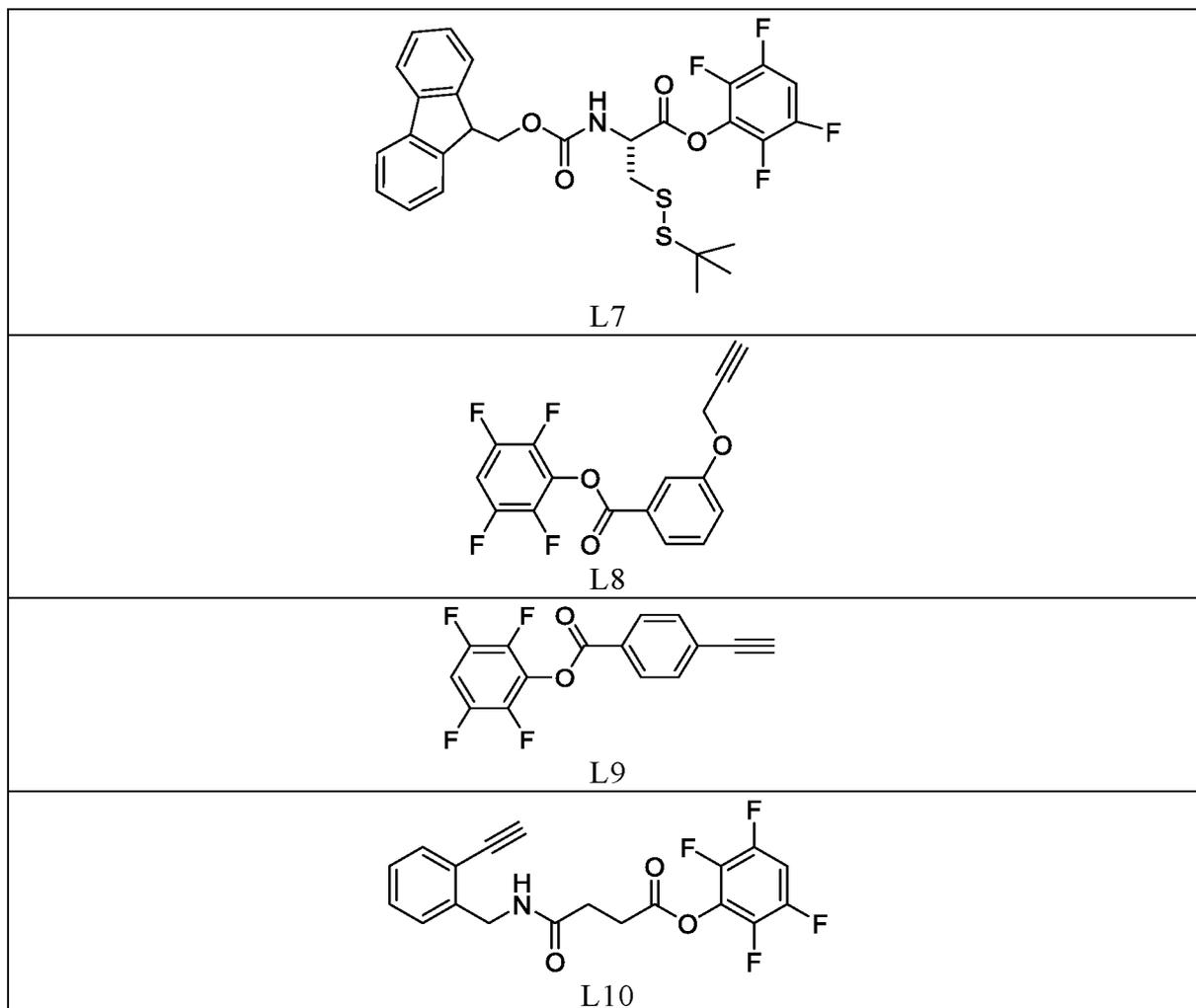
L4



L5 (Activate Scientific®, AS28942)



L6 (BroadPharm®, BP-20907)



Альтернативно, можно использовать другие мостиковые группы, известные в данной области техники.

Кроме того, или альтернативно связыванию средства на основе РНКи с
5 одним или большим количеством направленно действующих лигандов, направленно действующих групп и/или модуляторов РК/PD, в некоторых вариантах осуществления можно использовать средство доставки, предназначенное для доставки средства на основе РНКи в клетку или ткань. Средство доставки представляет собой соединение, которое может улучшить
10 доставку средства на основе РНКи в клетку или ткань, и оно может включать, но не ограничивается только ими: полимер, такой как амфифильный полимер, активный по отношению к мембране полимер, пептид, пептид-мелиттин, подобный мелиттину пептид (MLP), липид, обратимо модифицированный полимер или пептид или обратимо модифицированный активный по отношению
15 к мембране полиамин, или состоять из них.

В некоторых вариантах осуществления средства на основе РНКи можно объединить с липидами, наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, системами для СДБ (сшивка ДНК-белок) или другими системами доставки, имеющимися в данной области техники. Средства на основе РНКи также могут
5 быть химически конъюгированы с направленно действующими группами, липидами (включая, но не ограничиваясь только ими холестерин и производные холестерила), наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, системами для СДБ (см., например, WO 2000/053722, WO 2008/022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141, каждый из которых
10 включен в настоящее изобретение в качестве ссылки) или другими системами доставки, имеющимися в данной области техники.

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат одно или большее
15 количество соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), состоят из них или в основном состоят из них.

При использовании в настоящем изобретении "фармацевтическая композиция" содержит активный фармацевтический ингредиент (API) в фармакологически эффективном количестве и необязательно один или большее
20 количество фармацевтически приемлемых инертных наполнителей.

Фармацевтически приемлемые инертные наполнители (инертные наполнители) представляют собой вещества, отличающиеся от активного фармацевтического ингредиента (API, терапевтический продукт), которые специально включают в систему доставки лекарственного средства. Инертные наполнители не
25 оказывают терапевтическое воздействие и не предназначены для оказания терапевтического воздействия при заданной дозе. Инертные наполнители могут а) способствовать обработке системы доставки лекарственного средства во время изготовления, б) обеспечивать защиту, поддержку или увеличение стабильности, биологической доступности API или его переносимости
30 пациентом, с) способствовать идентификации продукта, и/или d) улучшать любую другую характеристику общей безопасности и эффективности доставки API во время хранения и использования. Фармацевтически приемлемый наполнитель может являться или может не являться инертным веществом.

Инертные наполнители включают, но не ограничиваются только ими: усилители всасывания, антиадгезивы, противовспенивающие агенты, антиоксиданты, связующие, буферные реагенты, носители, агенты для нанесения покрытия, красители, средства, улучшающие доставку, обеспечивающие доставку полимеры, декстран, декстозу, разбавители, разрыхлители, 5 эмульгаторы, средства, увеличивающие объем, наполнители, вкусовые добавки, агенты, придающие скользкость, влагоудерживающие средства, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, физиологический раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие агенты, матрицы для замедленного высвобождения, подсластители, загущающие агенты, агенты, регулирующие 10 тоничность, разбавители, гидрофобизирующие агенты и смачивающие агенты.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, могут содержать другие дополнительные компоненты, обычно используемые в фармацевтических композициях. В некоторых вариантах осуществления 15 дополнительным компонентом является фармацевтически активное вещество. Фармацевтически активные вещества включают, но не ограничиваются только ими: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.п.), лекарственные средства - малые молекулы, антитела, фрагменты антител, 20 аптамеры и/или вакцины.

Фармацевтические композиции также могут содержать консерванты, солюбилизующие агенты, стабилизирующие агенты, смачивающие агенты, эмульгаторы, подсластители, красители, отдушки, соли, предназначенные для изменения осмотического давления, буферы, агенты для нанесения покрытия 25 или антиоксиданты. Они также могут содержать другое средство, обладающее известным полезным терапевтическим воздействием.

Фармацевтические композиции можно вводить самыми разными путями в зависимости от того, необходимо ли местное или системное лечение, и в зависимости от подвергающегося лечению участка. Введение можно проводить 30 любым путем, общеизвестным в данной области техники, например, но не ограничиваясь только ими, местное введение (например, с помощью чрескожного пластыря), введение в легкие (например, путем ингаляции или вдывания порошков или аэрозолей, включая введение с помощью небулайзера,

внутритрахеальное, внутриназальное введение), эпидермальное, чрескожное, пероральное или парентеральное введение. Парентеральное введение включает, но не ограничивается только ими, внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутривентральную или внутримышечную инъекцию или вливание; 5 подкожное (например, с помощью имплантированного устройства), внутричерепное, внутримозговое, внутриоболочечное и внутрижелудочковое введение. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, вводят путем подкожной инъекции. Фармацевтические композиции можно вводить 10 перорально, например, в виде таблеток, таблеток с покрытием, драже, капсул из твердого или мягкого желатина, растворов, эмульсий или суспензий. Также можно провести ректальное введение, например, с помощью суппозитория; местное или чрескожное введение, например, с помощью мазей, кремов, гелей или растворов; или парентеральное введение, например, с помощью растворов 15 для инъекций.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для проводимого непосредственно перед использованием приготовления стерильных растворов или дисперсий для 20 инъекций. В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, кремофор® EL (BASF, Parsippany, NJ) или забуференный фосфатом физиологический раствор. Композиция должна являться стабильной при условиях ее приготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющего воздействия 25 микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может являться растворитель или диспергирующая среда, включая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Соответствующую сыпучесть можно обеспечивать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем 30 поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов можно обеспечить с помощью различных антибактериальных или фунгицидных средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола,

аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях в композицию предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия.

5 Пролонгирование всасывание композиций для инъекций можно обеспечить путем включения в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

10 Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения необходимого количества активного соединения в подходящем растворителе вместе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Дисперсии обычно готовят путем включения активного соединения в стерильный разбавитель, который содержит основную диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты, выбранные из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков, предназначенных для приготовления стерильных 15 растворов для инъекций, типичные методики приготовления включают вакуумную сушку и сушку вымораживанием, с помощью которых получают порошкообразный активный ингредиент с добавлением любого дополнительного необходимого ингредиента из его подвергнутого стерильному фильтрованию раствора.

20 Препараты, подходящие для внутрисуставного введения, могут находиться в форме стерильных водных препаратов, содержащих любой из лигандов, описанных в настоящем изобретении, который может находиться в виде микрокристаллического вещества, например, в виде водной суспензии микрокристаллического вещества. В случае внутрисуставного введения и 25 введения в глаза для введения любого из лигандов, описанных в настоящем изобретении, также можно использовать липосомальные препараты или биологически разлагающихся полимерные системы.

30 Активные соединения можно приготовить вместе с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, например, можно использовать препарат регулируемого высвобождения, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биологически разлагающиеся, биологически совместимые полимеры, такие как сополимер этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген,

сложные полиортоэффиры и полимолочную кислоту. Методики приготовления таких препаратов очевидны для специалистов в данной области техники. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно использовать суспензии липосом. Их можно получить по методикам, известным специалистам в данной области техники, например, как это описано в патенте U.S. № 4522811.

Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно используемые в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, но не ограничиваются только ими: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистамин, дифенгидрамин и т.п.). При использовании в настоящем изобретении "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" означает такое количество фармацевтически активного средства, которое обеспечивает фармакологическое, терапевтическое или профилактическое воздействие.

Объектом настоящего изобретения также являются лекарственные средства, содержащие соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), а также способы приготовления таких лекарственных средств, эти способы включают включение одного или большего количества соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), и, при необходимости, одного или большего количества других веществ, обладающих известным благоприятным терапевтическим воздействием, в фармацевтически приемлемую форму.

Описанные соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) и фармацевтические композиции, содержащие соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), раскрытые в настоящем изобретении, можно поместить или включить в набор, контейнер, упаковку или диспенсер. Соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) и фармацевтические композиции, содержащие соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) можно поместить в предварительно заполненные шприцы или флаконы.

Способы лечения и подавления экспрессии

Соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), раскрытые в настоящем изобретении, можно применять для лечения субъекта (например, человека или другого млекопитающего), страдающего заболеванием или нарушением, для которого благоприятно введение таких соединений. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), раскрытые в настоящем изобретении, можно применять для лечения субъекта (например, человека), для которого благоприятно уменьшение и/или подавление степени экспрессии целевой мРНК и/или целевого белка, например, субъекта, у которого диагностированы симптомы, связанные с мышечной дистрофией, или который страдает от таких симптомов.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят одно или большее количество соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), раскрытых в настоящем изобретении, в терапевтически эффективном количестве. Лечение субъекта может включать терапевтическое и/или профилактическое лечение. Субъекту вводят одно или большее количество соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанных в настоящем изобретении, в терапевтически эффективном количестве. Субъектом может являться человек, пациент или являющийся человеком пациент. Субъектом может являться взрослый, подросток, ребенок или младенец. Фармацевтическую композицию, описанную в настоящем изобретении, можно вводить человеку или животному.

Соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанные в настоящем изобретении, можно применять для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, связанным с целевым геном, или страдающего заболеванием или нарушением, которое по меньшей мере отчасти опосредовано экспрессией целевого гена. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) применяют для лечения или оказания помощи в случае клинического проявления у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, для которого благоприятно уменьшение уровня мРНК целевого гена, или которое по меньшей мере отчасти опосредовано таким уменьшением. Субъекту вводят одно или

большее количество соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) или композиций, описанных в настоящем изобретении, в терапевтически эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем изобретении, включают

5 введение подвергающемуся лечению субъекту композиции, содержащей соединение формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанное в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят любое одно или большее количество описанных

10 профилактически соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) в профилактически эффективном количестве, таким образом, субъекта лечат путем предупреждения появления или подавления по меньшей мере одного симптома.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения у нуждающегося в нем пациента заболеваний, нарушений,

15 состояний или патологических состояний, по меньшей мере отчасти опосредуемых экспрессией целевого гена, где способы включают введение пациенту любого из соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанных в настоящем изобретении,

В некоторых вариантах осуществления степень экспрессии гена и/или

20 уровень мРНК целевого гена у субъекта, которому вводили соединение формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанное в настоящем изобретении, уменьшен по меньшей мере примерно на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, чем на 99%, по сравнению со значением у субъекта до введения

25 соединения или у субъекта, которому не вводили соединение. Степень экспрессии гена и/или уровень мРНК у субъекта может быть уменьшен в клетке, группе клеток и/или ткани субъекта.

В некоторых вариантах осуществления уровень целевого белка у субъекта, которому вводили соединение формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III),

30 (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанное в настоящем изобретении, уменьшен по меньшей мере примерно на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, чем на 99%, по сравнению со значениями у субъекта до введения соединения или у субъекта,

которому не вводили соединение. Уровень белка у субъекта может быть уменьшен в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или другой жидкости организма субъекта.

5 Уменьшение уровней целевой мРНК и/или уровней целевого белка можно определить по любым методикам, известным в данной области техники. При использовании в настоящем изобретении уменьшение или снижение уровня целевой мРНК и/или уровня целевого белка в настоящем изобретении совместно означают уменьшение или снижение уровней целевого гена и/или белка или подавление или уменьшение экспрессии целевого гена.

10 В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанные в настоящем изобретении, можно применять для получения фармацевтической композиции, предназначенной для лечения заболевания, нарушения или симптома, который по меньшей мере отчасти опосредован экспрессией целевого гена. В некоторых
15 вариантах осуществления заболеванием, нарушением или симптомом, который по меньшей мере отчасти опосредован экспрессией целевого гена, является мышечная дистрофия.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта зависит от массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления соединения
20 формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) можно вводить при дозе, равной от примерно 0,05 до примерно 40,0 мг/(кг массы тела субъекта). В других вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) можно вводить при дозе, равной от примерно 5 до примерно 20 мг/(кг массы тела субъекта).

25 В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) можно вводить в виде разделенной дозы, это означает, что две дозы вводят субъекту в течение небольшого промежутка времени (например, менее 24 ч). В некоторых вариантах осуществления проводят начальное введение примерно половины
30 необходимого суточного количества и примерно через 4 часа после начального введения вводят оставшуюся часть, примерно половину необходимого суточного количества.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанные в настоящем изобретении, можно вводить один раз в неделю (т.е. еженедельно). В других вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанные в настоящем изобретении, можно вводить каждые две недели (один раз в две недели).

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанные в настоящем изобретении, или композиции, содержащие такие соединения, можно применять для лечения заболевания, нарушения или симптома, который по меньшей мере отчасти опосредован экспрессией целевого гена. В некоторых вариантах осуществления заболеванием, нарушением или симптомом, который по меньшей мере отчасти опосредован экспрессией целевого гена, является мышечная дистрофия.

Другим объектом настоящего изобретения является способ уменьшения экспрессии целевого гена *in vivo*, способ включает введение в клетку соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанного в настоящем изобретении, где соединение включает средство на основе РНКи, по меньшей мере в основном комплементарное целевому гену. В некоторых вариантах осуществления клеткой является клетка скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления клетка находится внутри субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностировано заболевание или нарушение, которое лечат, предупреждают, или облегчают его протекание путем уменьшения экспрессии целевого гена. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является мышечная дистрофия, выбранная из группы, состоящей из следующих: мышечная дистрофия Дюшенна, миотоническая мышечная дистрофия, мышечная дистрофия Беккера, конечностно-поясная мышечная дистрофия, плече-лопаточно-лицевая миопатия, наследственная мышечная дистрофия, окулофаренгиальная мышечная дистрофия, дистальная мышечная дистрофия и мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса.

Другим объектом настоящего изобретения является применение любого одного из липидов-модуляторов РК/PD, конъюгированных со средством на

основе олигонуклеотида, описанным в настоящем изобретении, для лечения, предупреждения или облегчения протекания заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является мышечная дистрофия, выбранная из группы, состоящей из мышечной дистрофии Дюшенна, миотонической мышечной дистрофии, мышечной дистрофии Беккера, конечностно-поясная мышечной дистрофии, плече-лопаточно-лицевой дистрофии, наследственной мышечной дистрофии, окулофаренгиальной мышечной дистрофии, дистальной мышечной дистрофии и мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса.

10 Клетки, ткани и не являющиеся человеком организмы

В объем настоящего изобретения также входят клетки, ткани и не являющиеся человеком организмы, которые содержат по меньшей мере одно из соединений формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa), описанных в настоящем изобретении. Клетки, ткани и не являющиеся человеком организмы получают путем доставки соединения формулы (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ic), (Id), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IV) или (IVa) в клетку, ткань или не являющийся человеком организм по любой методике, имеющейся в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления клеткой является клетка млекопитающего, включая, но не ограничиваясь только ей, клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клеткой является клетка скелетной мышцы.

Приведенные выше варианты осуществления и положения проиллюстрированы с помощью приведенных ниже неограничивающих примеров.

25 **ПРИМЕРЫ**

Приведенные ниже примеры не являются ограничивающими и предназначены для иллюстрации некоторых вариантов осуществления, раскрытых в настоящем изобретении.

Если явно не указано иное, то номера, использующиеся для обозначения соединений в определенном примере, относятся только к этому конкретному примеру и не относятся к любым другим примерам, раскрытым в настоящем изобретении. Так, например, соединение 1, описанное в методике "синтеза LP1-p" в примере 4, отличается от соединения 1, описанного в методике "синтеза LP-

5p" в примере 4, и не относится к нему. Аналогичным образом, следует понимать, что конкретное соединение, раскрытое в настоящем изобретении, может быть обозначено в разных примерах разными номерами. Так, например, соединение 12, описанное в методике "синтеза LP223-p" в примере 4, является таким же, как соединение 3, описанное в методике "синтеза LP224-p" в примере 4. Обозначения соединений, которые раскрыты в подробном описании в различных таблицах (т.е. LPXXa, LPXXb, и LPXX-p, где XX обозначает номер), согласуются во всех примерах, приведенных в настоящем изобретении.

10 Таблица 23: Некоторые общеизвестные аббревиатуры, использовавшиеся в примерах

| Название | Аббревиатура (аббревиатуры) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Триэтиламин | ТЭА, NEt ₃ |
| Дихлорметан | ДХМ, CH ₂ Cl ₂ |
| Этилацетат | ЭА, EtOAc |
| Гексаны | Гекс. |
| Метанол | MeOH |
| Ацетонитрил | АЦН, MeCN |
| Трифторуксусная кислота | ТФК |
| Уксусная кислота | AcOH |
| Флуоренилметилоксикарбонил | FMOC |
| трет-Бутилоксикарбонил | BOS |
| Диметилформамид | DMF |
| Толуол | PhMe |
| 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид | ЭДК |
| Триизопропилсилан | ТИС, ТИПС |
| 2-(1H-Бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламинийтетрафторборат | ТВТУ |
| N,N-Диизопропилэтиламин | ДИПЭА, ДИЭА, i-Pr ₂ NEt |
| 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат | НВТУ |
| 1-Циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси)диметиламино-морфолинокарбеныйгексафторфосфат | СОМУ |
| 1-[Бис(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксидгексафторфосфат | ГАТУ |
| N-Гидроксисукцинимид | NHS |
| Дибензоциклооктин | ДБЦО |
| Три(2-фурил)фосфин | ТФФ |
| Тетрагидрофуран | ТГФ |
| Хлористоводородная кислота | HCl |
| Метилйодид | MeI, CH ₃ I |

| Название | Аббревиатура (аббревиатуры) |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| 4-Диметиламинопиридин | ДМАП |
| мета-Хлорпероксибензойная кислота | мХПБК |
| Дисульфид углерода | CS ₂ |
| Гидроксид натрия | NaOH |
| Ангидрид | Безводный |
| Водный | Водн. |
| Эквивалент/эквиваленты | экв. |
| Насыщенный | Насыщ., Нас. |

Следует понимать, что, если явно не указано иное, термин "ЭДК" в примерах, приведенных в настоящем изобретении, означает гидрохлорид ЭДК, который имеется в продаже.

5 Пример 1. Синтез средств на основе РНКи и композиций

Нижe описаны общие методики синтеза некоторых средств на основе РНКи и их конъюгатов, которые проиллюстрированы в неограничивающих примерах, приведенных в настоящем изобретении.

10 Синтез средств на основе РНКи. Средства на основе РНКи можно синтезировать по методикам, общеизвестным в данной области техники. При проведении синтеза средств на основе РНКи, проиллюстрированных в примерах, приведенных в настоящем изобретении, смысловые и антисмысловые цепи средств на основе РНКи синтезировали в соответствии с технологией твердофазного синтеза с использованием фосфорамидита, использующейся для

15 синтеза олигонуклеотидов. В зависимости от масштаба использовали MerMade96E® (Bioautomation), MerMade12® (Bioautomation) или Oligopilot 100 (GE Healthcare). Синтез проводили на твердой подложке, изготовленной из стекла с контролируемым размером пор (СКП, 500 Å или 600 Å, приобретали у фирмы Prime Synthesis, Aston, PA, USA) или полистирола (приобретали у фирмы

20 Kinovate, Oceanside, CA, USA). Все РНК и 2'-модифицированные РНК-фосфорамидиты приобретали у фирмы Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA), ChemGenes (Wilmington, MA, USA) или HONGENE Biotech (Morrisville, NC, USA). Точнее, приведенные ниже 2'-О-метилфосфорамидиты, которые

25 использовали, включали следующие: (5'-О-диметокситритил-N⁶-(бензоил)-2'-О-метиладенозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидит, 5'-О-диметокситритил-N⁴-(ацетил)-2'-О-метилцитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидит, (5'-О-диметокситритил-N²-(изобутирил)-2'-

О-метилгуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метилуридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидит. 2'-Дезокси-2'-фторфосфoramидиты и 2'-О-пропаргилфосфoramидиты, содержащие такие же защитные группы, как 2'-О-метилфосфoramидиты. 5'-диметокситритил-2'-О-метилюридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидиты, приобретали у фирмы Glen Research (Virginia). Обращенные абазические (3'-О-диметокситритил-2'-дезоксирибоза-5'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфoramидиты приобретали у фирмы ChemGenes. Приведенные ниже содержащие НАК (неблокированные

5

10

аминокислоты) фосфoramидиты, которые использовали, включали следующие: 5'-(4,4'-диметокситритил)-N⁶-(бензоил)-2',3'-секоаденозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-ацетил-2',3'-секоцитозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-изобутирил-2',3'-секогуанозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит и 5'-(4,4'-диметокситритил)-2',3'-секоуридин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфoramидит. Для введения фосфоротиоатных мостиков использовали 100 мМ раствор 3-фенил-1,2,4-дитиазолин-5-она (POS, приобретали у фирмы PolyOrg, Inc., Leominster, MA, USA) в безводном ацетонитриле или 200 мМ раствор гидрида ксантана (TCI America, Portland, OR, USA) в пиридине.

15

20

Для введения мостиков, содержащих реакционноспособную группу (NH₂-C₆), использовали ТФК-AminoLink-фосфoramидиты, которые также приобретали у поставщика (ThermoFisher). ТФК-AminoLink-фосфoramидит растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ) и добавляли молекулярные сита (3 Å). В качестве активирующего раствора использовали 5-бензилтио-1Н-тетразол (БТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЭТТ, 250 мМ в ацетонитриле). Время проведения реакции сочетания составляло 10 мин (РНК), 90 с (2'-О-Ме) и 60 с (2'-F). Для введения соответствующих мостиков (TriAlk#) синтезировали содержащие триалкин фосфoramидиты. При использовании в случае средств на основе РНКи, представленных в некоторых примерах, приведенных в настоящем изобретении, содержащие триалкин фосфoramидиты растворяли в безводном дихлорметане или в безводном ацетонитриле (50 мМ),

25

30

тогда как все другие амидиты растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ) и добавляли молекулярные сита (3Å). В качестве активирующего раствора использовали 5-бензилтио-1Н-тетразол (БТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЭТТ, 250 мМ в ацетонитриле) использовали. Время проведения реакции сочетания составляло 10 мин (РНК), 90 с (2'-О-Ме) и 60 с (2'-F).

В случае некоторых средств на основе РНКи к 3'-концу смысловой цепи присоединяли мостик, такой как группа C₆-SS-C₆ или 6-SS-6. Предварительно загруженную смолу, содержащую соответствующий мостик приобретали у поставщика. Альтернативно, в случае некоторых смысловых цепей использовали смолу dT и затем соответствующий мостик вводили путем стандартного синтеза с использованием фосфорамидита.

Отщепление связанного с подложкой олигомера и удаление защитной группы. После завершения твердофазного синтеза высушенную твердую подложку обрабатывали 40 мас.% раствором метиламина в воде, 1:1 (об./об.), и 28-31% раствором гидроксида аммония (Aldrich) при 30°C в течение 1,5 ч. Растворитель выпаривали и твердый остаток восстанавливали в воде (см. ниже).

Очистка. Неочищенные олигомеры очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) с использованием колонки TSKgel® SuperQ-5PW, 13 мкм (выпускается фирмой Tosoh Biosciences), и системы Shimadzu LC-8. Буфер А являлся следующим: 20 мМ Tris (трис(гидрокси метиламинометан)), 5 мМ ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота), рН 9,0, с добавлением 20% ацетонитрила, и буфер В являлся таким же, как буфер А, с добавлением 1,5 М хлорид натрия. Снимали УФ-спектры при 260 нм. Соответствующие фракции объединяли и затем обрабатывали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ с использованием колонки GE Healthcare XK 16/40, содержащей тонкодисперсный Sephadex® G25 (выпускается фирмой Sigma Aldrich), и движущегося буфера: 100 мМ бикарбонат аммония, рН 6,7, и 20% ацетонитрила или профильтрованной воды.

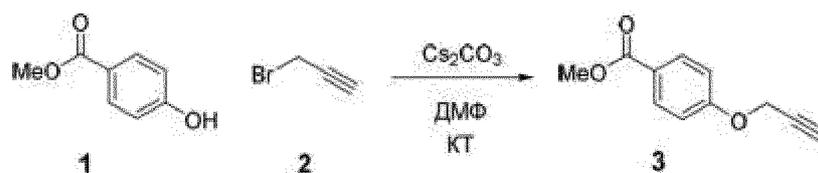
Отжиг. Комплементарные цепи смешивали путем объединения эквимольных количеств растворов РНК (смысловая и антисмысловая) в 1×3ФФ (забуференный фосфатом физиологический раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением средств на основе РНКи. Некоторые средства на основе РНКи

лиофилизировали и хранили при -15 - -25°C . Концентрацию дуплекса определяли путем измерения интенсивности поглощения раствора в $1 \times 3 \text{ ФФ}$ с помощью спектрометра УФ-ВИД (ультрафиолетовая-видимая область). Затем для определения концентрации дуплекса интенсивность поглощения раствора при 260 нм умножали на коэффициент пересчета и коэффициент разбавления. Используемым коэффициентом пересчета являлся равный $0,037 \text{ мг}/(\text{мл} \cdot \text{см})$ или его рассчитывали на основании определенного экспериментально коэффициента поглощения.

Проводимое после синтеза конъюгирование содержащего триалкин каркаса. До или после отжига функционализированную амином по $5'$ - или $3'$ -концу смысловую цепь средства на основе РНК можно конъюгировать с содержащим триалкин каркасом. Ниже описано конъюгирование содержащего триалкин каркаса с подвергнутым отжигу дуплексом: Функционализированный амином дуплекс растворяли в смеси 90% ДМСО (диметилсульфоксид)/ 10% H_2O при концентрации, равной примерно 50 - $70 \text{ мг}/\text{мл}$. добавляли 40 экв. триэтиламина (ТЭА), затем 3 экв. содержащего триалкин РNP. После завершения конъюгат дважды осаждали из системы растворителей, содержащей $1 \times$ забуференный фосфатом физиологический раствор/ацетонитрил (отношение $1:14$), и сушили.

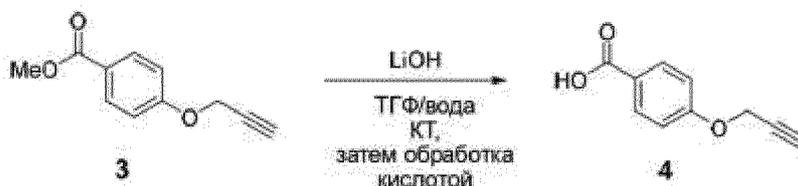
Пример 2. Синтез мостиковых групп

20 Синтез L4



К раствору соединения 1 ($3,00 \text{ г}$) в ДМФ при комнатной температуре добавляли Cs_2CO_3 ($7,71 \text{ г}$). Затем медленно добавляли соединение 2 ($1,85 \text{ мл}$). Полученную реакционную смесь перемешивали в атмосфере N_2 (газообразный) в течение ночи. Затем ЖХ-МС (жидкостная хроматография - масс-спектрометрия) указывала на почти полное превращение в искомый продукт. Реакцию останавливали с помощью NaHCO_3 (10 мл). Продукт экстрагировали с помощью EtOAc ($5 \times 10 \text{ мл}$) и затем промывали водой ($3 \times 8 \text{ мл}$) и рассолом (8 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием

силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме: от гексанов до EtOAc (0-30%), при этом продукт элюировался при 14% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белое твердое вещество. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 191,06 m/z, найдено: 191,23 m/z.

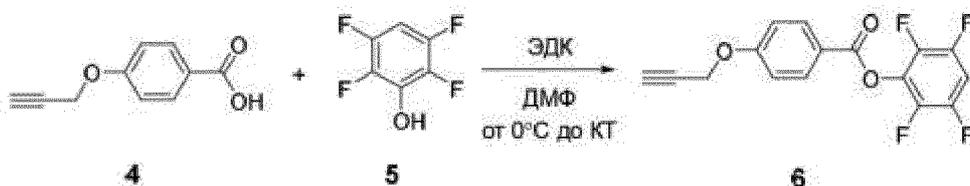


К раствору соединения 3 (2,87 г) в смеси ТГФ/вода состава 1:1 в обычной атмосфере при комнатной температуре добавляли LiOH (1,08 г). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение соединения 3. Оставшееся исходное вещество экстрагировали с помощью EtOAc и затем водную фазу подкисляли 6 н. раствором HCl до обеспечения значения pH, равного примерно 3. Соединение 4 осаждалось в виде белого твердого вещества и его отфильтровывали в вакууме и промывали водой. Вследствие того, что твердое вещество являлось влажным/липким, для его переноса в круглодонную колбу требовался растворитель; вещество переносили с помощью MeOH и ДХМ. Вследствие плохой растворимости в обоих растворителях и наличия примесей вещество невозможно было сушить над Na₂SO₄. Соединение 4 концентрировали в вакууме и получали белое, рыхлое кристаллическое твердое вещество и его использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 177,05 m/z, найдено: 177,19 m/z.

10

15

20

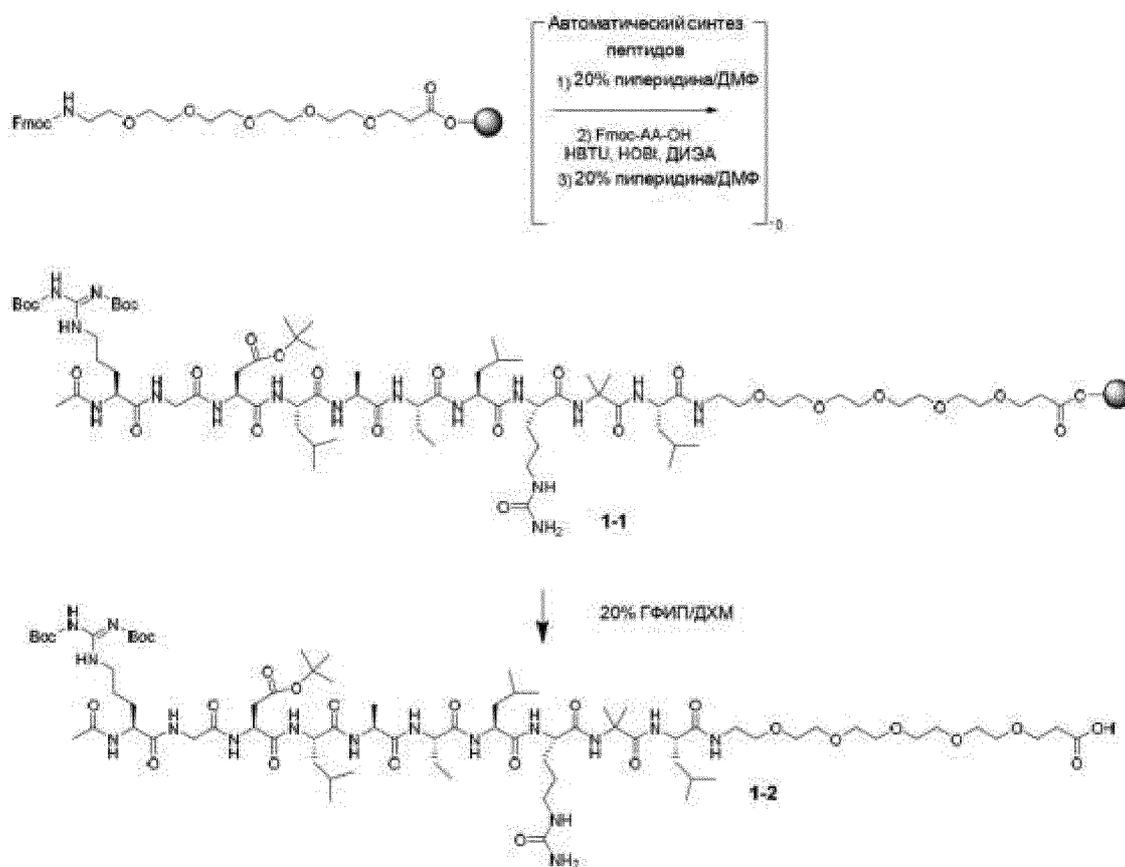


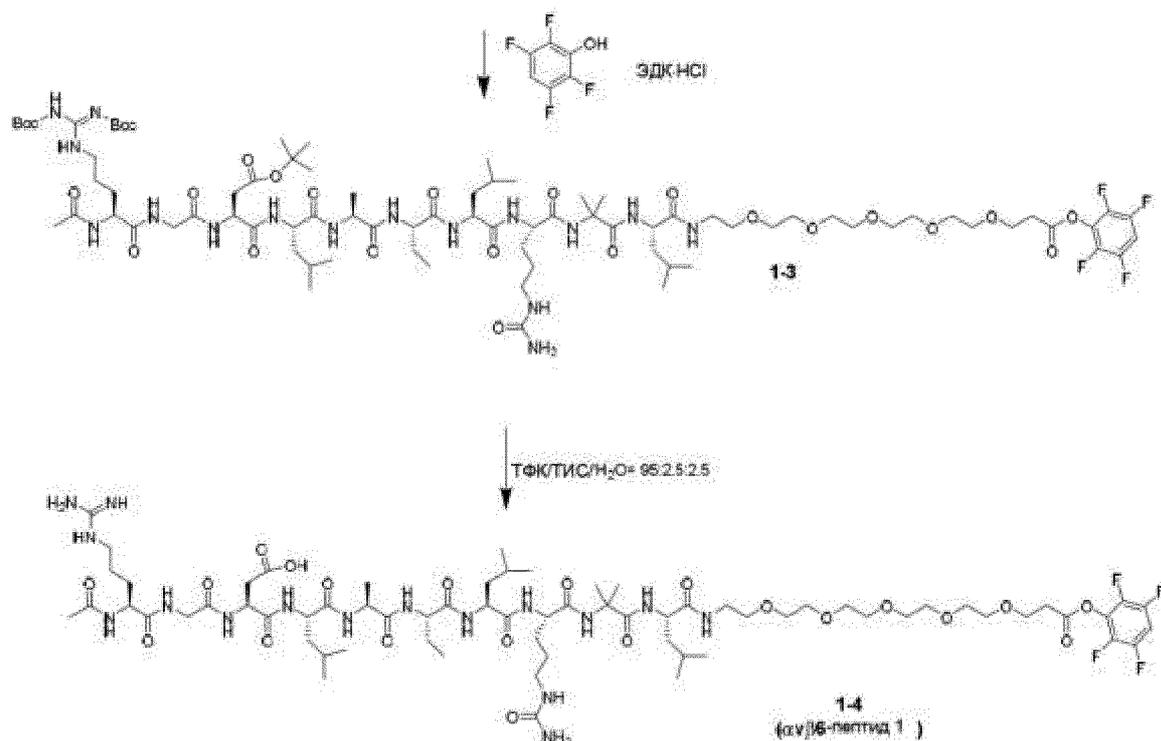
К раствору соединений 4 (1,00 г) и 5 (1,04 г) в ДМФ (10,0 мл) в атмосфере N₂ (газообразный) при комнатной температуре добавляли ЭДК (1,20 г). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Вследствие того, что после перемешивания в течение ночи невозможно было успешно определить наличие продукта, реакцию останавливали с помощью NaHCO₃. ЖХ-МС указывала на то, что полученный

25

осадок содержал исходные вещества и его отфильтровывали в вакууме, предпринимали попытку повторно суспендировать в смеси MeOH/ДХМ и затем концентрировали в вакууме. Затем смесь повторно растворяли в ДМФ, сушили над Na₂SO₄, фильтровали в вакууме и промывали с помощью ДМФ. К раствору 5 филтрат (т.е. к раствору соединений 4 и 5) в ДМФ повторно добавляли ЭДК и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь непосредственно концентрировали и для выделения азеотропно перегоняли с MeOH и PhMe. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы и при 10 элюировании с помощью 0-20% MeOH в ДХМ. Соединение L4 элюировалось при 0% В и получали белое твердое вещество. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 325,04 m/z, найдено: 325,35 m/z.

Пример 3. Синтез направленно действующих лигандов
Синтез αβ6-пептида 1

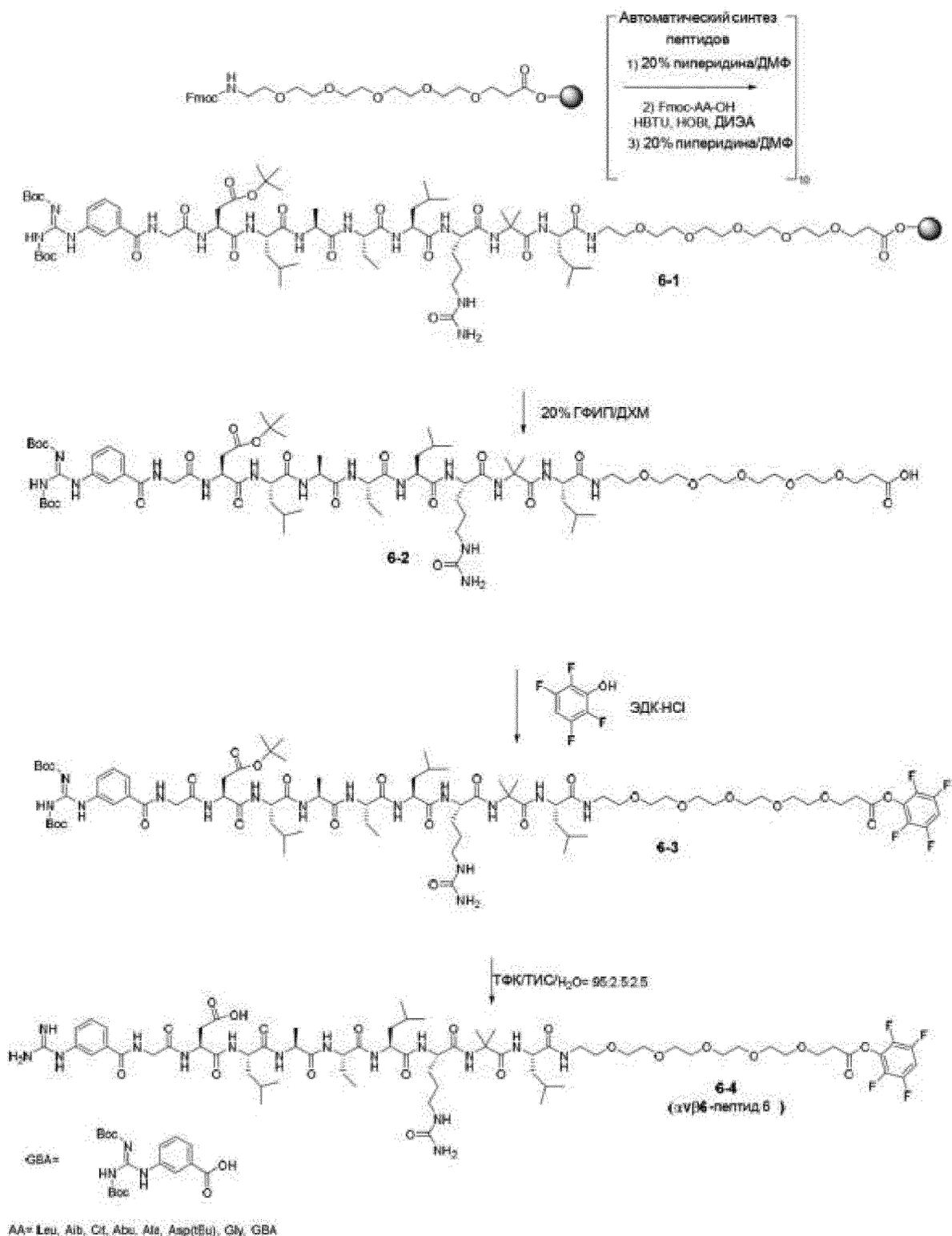




$\alpha\beta 6$ -Пептид 1 получали путем модификации Arg-Gly-Asp(tBu)-Leu-Ala-
Abu-Leu-Cit-Aib-Leu-ПЭГ₅-CO₂-2-Cl-Trt-смолы 1-1, которую получали с
помощью общих химических реакций синтеза пептидов с защитной группой
5 Fmoc с использованием синтезатора пептидов CS Bio и с использованием Fmoc-
ПЭГ₅-CO₂H, предварительно загруженной на смолу 2-Cl-Trt (0,79 ммоль/г),
масштаб: 4,1 ммоль, как это описано выше. После отщепления от смолы пептид
1-2 превращали в сложный тетрафторфениловый эфир 1-3 и неочищенный
продукт использовали на следующей стадии без очистки.

10 Заключительное удаление защитной группы проводили путем обработки
неочищенного пептида 1-3 смесью для удаления защитной группы
ТФК/ТИС/Н₂O = 90:5:5 (80 мл) в течение 1,5 ч. Реакционную смесь по каплям
добавляли к метил-трет-бутиловому эфиру (700 мл) и полученный осадок
собирали центрифугированием. Пеллеты промывали дополнительным
15 количеством метил-трет-бутилового эфира (500 мл). Остаток очищали с
помощью (ОФ)-ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография с
обращенной фазой, Phenomenex Gemini C18, 250×50 мм, 10 мкм, 60 мл/мин,
градиентный режим: 30-45% АЦН в воде с добавлением 0,1% ТФК, примерно 1 г
неочищенного пептида за один проход) и получали 4,25 г чистого пептида 1-4
20 ($\alpha\beta 6$ -пептид 1).

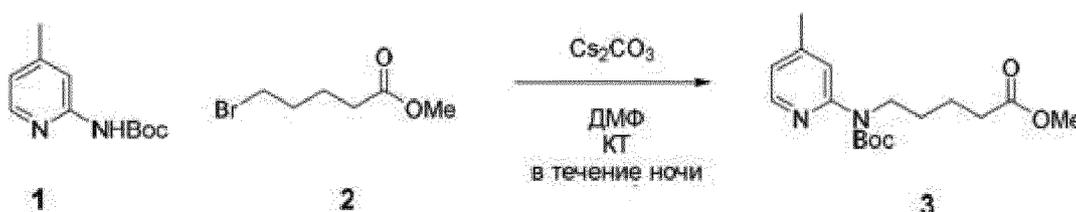
Синтез $\alpha\beta 6$ -пептида 6



5 $\alpha\beta 6$ -Пептид 6 получали путем модификации GBA-Gly-Asp(tBu)-Leu-Ala-
Abu-Leu-Cit-Aib-Leu-ПЭГ₅-CO₂-2-Cl-Trt-смолы 6-1 которую получали с
помощью общих химических реакций синтеза пептидов с защитной группой

Фмос с использованием синтезатора пептидов Symphony и с использованием Фмос-ПЭГ₃-CO₂H, предварительно загруженной на смолу 2-Cl-Trt (0,85 ммоль/г), масштаб: 0,2 ммоль, как это описано выше. После отщепления от смолы пептид 6-2 превращали в сложный тетрафторфениловый эфир 6-3 и очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы 20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 15-100%, 25 мин, и получали 160 мг чистого пептида 6-3. Заключительное удаление защитной группы проводили путем обработки неочищенного пептида 6-3 смесью для удаления защитной группы ТФК/ТИС/H₂O = 90:5:5 (80 мл) в течение 1,5 ч. Реакционную смесь по каплям добавляли к метил-трет-бутиловому эфиру (700 мл) и полученный осадок собирали центрифугированием. Пеллеты промывали дополнительным количеством метил-трет-бутилового эфира (500 мл). Остаток очищали с помощью ВЭЖХ с использованием следующих условий: АЦН (0,1% ТФК) в H₂O (0,1% ТФК), 27-57%, 25 мин, Выход: 94 мг. Рассчитано: ММ (молекулярная масса) = 1527,76, 1/2М = 763,88. Найдено: МС (ЭР (электрораспыление), в режиме положительных ионов): 1529,48 [M+1]⁺; 765,39 [M+2]²⁺.

Синтез αβ6-соединения 45, (S)-3-(4-(4-((14-азидо-3,6,9,12-тетраоксатетрадецил)окси)нафталин-1-ил)фенил)-3-(2-(5-((4-метилпиридин-2-ил)амино)пентанамидо)ацетамидо)пропановой кислоты



К раствору соединения 1 (0,50 г) в ДМФ в атмосфере N₂ (газообразный) при комнатной температуре добавляли Cs₂CO₃ (0,94 г). Затем по каплям медленно добавляли соединение 2 (0,49 г). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Затем ЖХ-МС указывала на степень превращения в искомый продукт, составляющую примерно 50%. Реакцию останавливали с помощью NaHCO₃ (10 мл). Продукт экстрагировали с помощью EtOAc (3×15 мл) и затем промывали водой (3×10 мл) и рассолом (10 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в

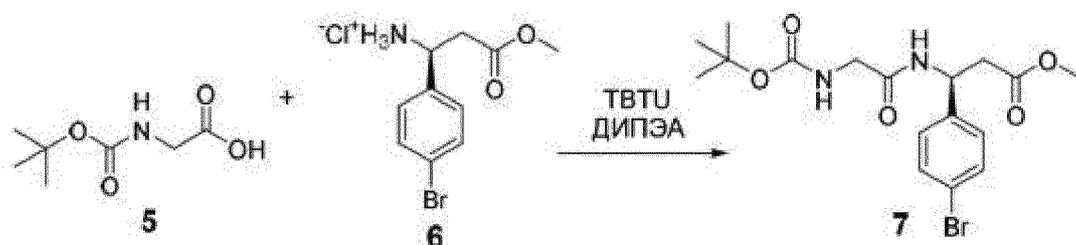
градиентном режиме с использованием 0-70% EtOAc в гексанах, при этом продукт элюировался при 16% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали прозрачное масло (0,35 г, выход 45,0%). ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 323,19 m/z, найдено: 328,38 m/z.



5

К раствору соединения 3 (0,35 г) в смеси ТГФ/вода состава 1:1 в обычной атмосфере при комнатной температуре добавляли LiOH (0,078 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Через 1 ч реакционную смесь подкисляли 6 н. раствором HCl до обеспечения значения pH, равного примерно 3. Продукт экстрагировали с помощью EtOAc (3×15 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали и получали соединение 4 в виде прозрачного бесцветного масла (0,32 г, выход 94,9%). Выделение не требовалось. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 309,17 m/z, найдено: 309,24 m/z.

10

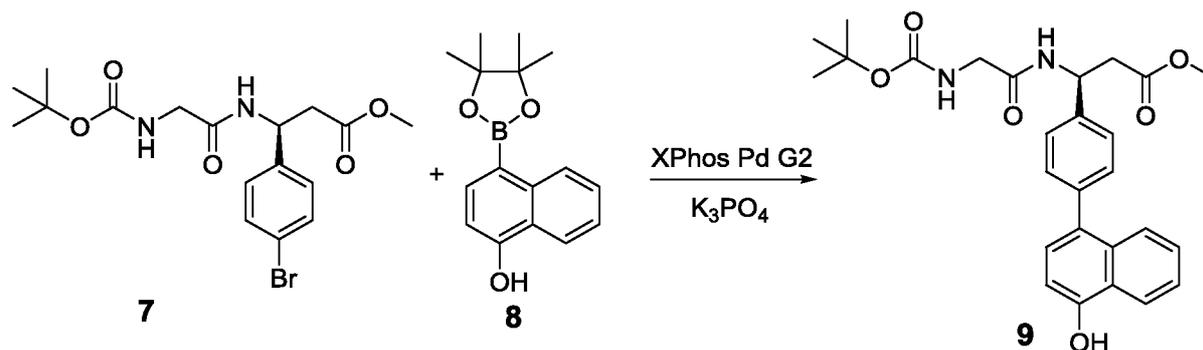


15

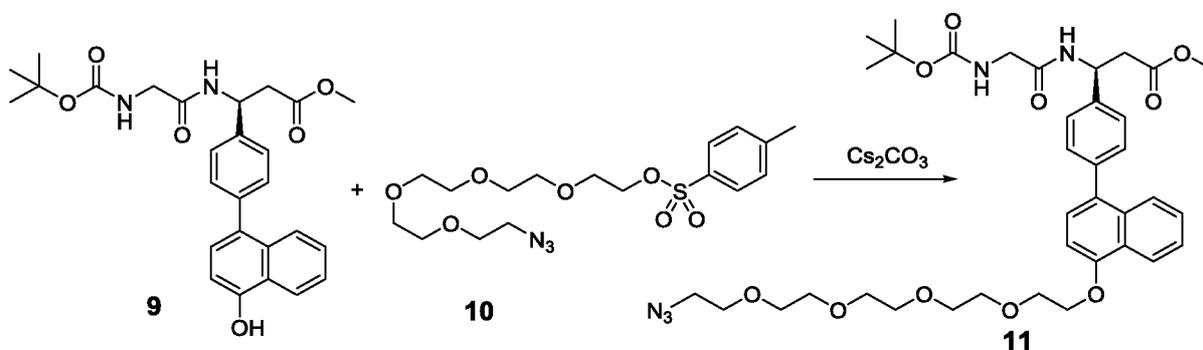
К раствору соединения 5 (1300 мг, 7,42 ммоль, 1,0 экв.), соединения 6 (2295 мг, 7,792 ммоль, 1,05 экв.) и диизопропилэтиламина (3,878 мл, 22,262 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (2859 мг, 8,905 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (5 мл) и водную фазу экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Объединенные органические фазы сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали. Продукт очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 2-4% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 415,08, найдено: 415,29. Выход: 0,19 г, 6,04%.

20

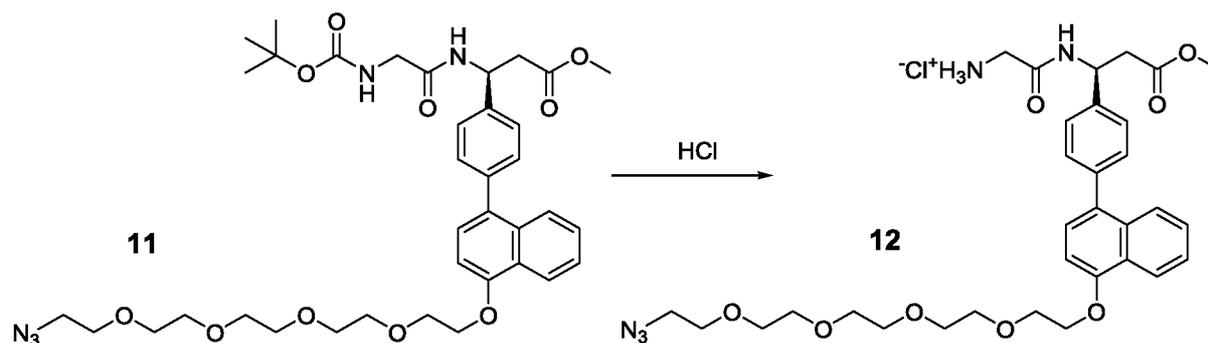
25



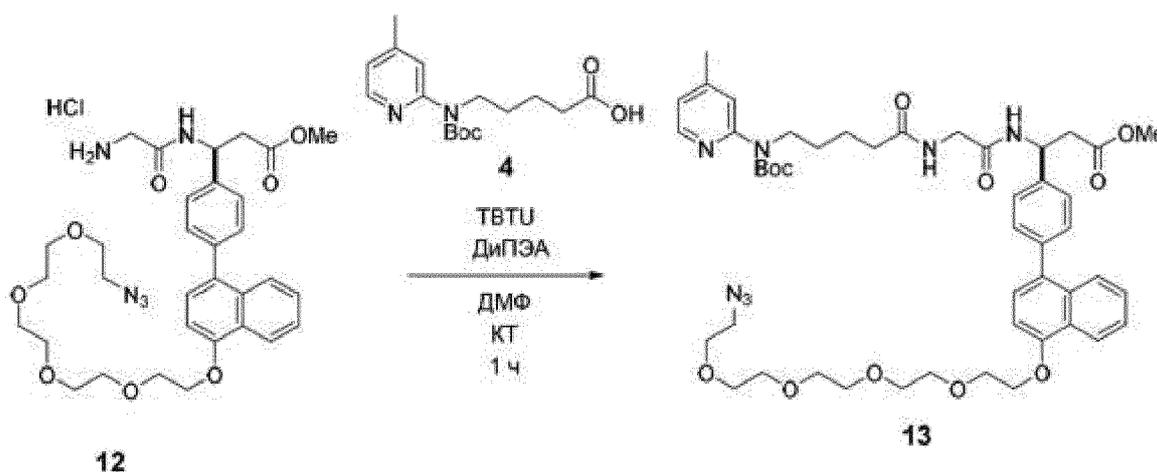
Соединение 7 (3,20 г, 7,705 ммоль, 1,0 экв.), соединение 8 (3,12 г, 11,558 ммоль, 1,5 экв.), XPhos Pd G2 (121 мг, 0,154 ммоль, 0,02 экв.) и K_3PO_4 (3,27 г, 15,411 ммоль, 2,0 экв.) смешивали в круглодонной колбе. Колбу герметично закрывали завинчивающейся крышкой с мембраной и затем вакуумировали и повторно заполняли азотом (эту процедуру повторяли всего 3 раза). Затем шприцем добавляли ТГФ (20 мл) и воду (4 мл). Реакционную смесь продували азотом в течение 10 мин и выдерживали при 40°C в течение 3 ч. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (20 мл) и водную фазу экстрагировали этилацетатом (3×20 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na_2SO_4 , и концентрировали. Соединение 9 очищали с помощью CombiFlash® и элюировали с помощью 2-4% MeOH в ДХМ.



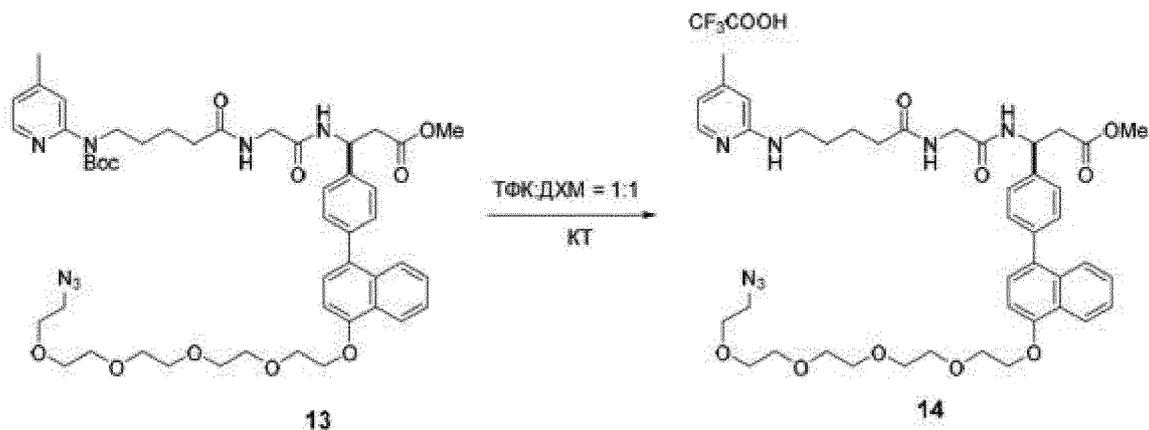
К раствору соединения 9 (1,61 г, 3,364 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 10 (1,75 г, 4,205 ммоль, 1,25 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли карбонат цезия (2,19 г, 6,728 ммоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали 50°C в течение 2 ч. Реакцию останавливали водой (20 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (3×10 мл). Органическую фазу объединяли, сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. Соединение 11 очищали с помощью CombiFlash® и элюировали с помощью 2-4% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 724,35, найдено: 724,60.



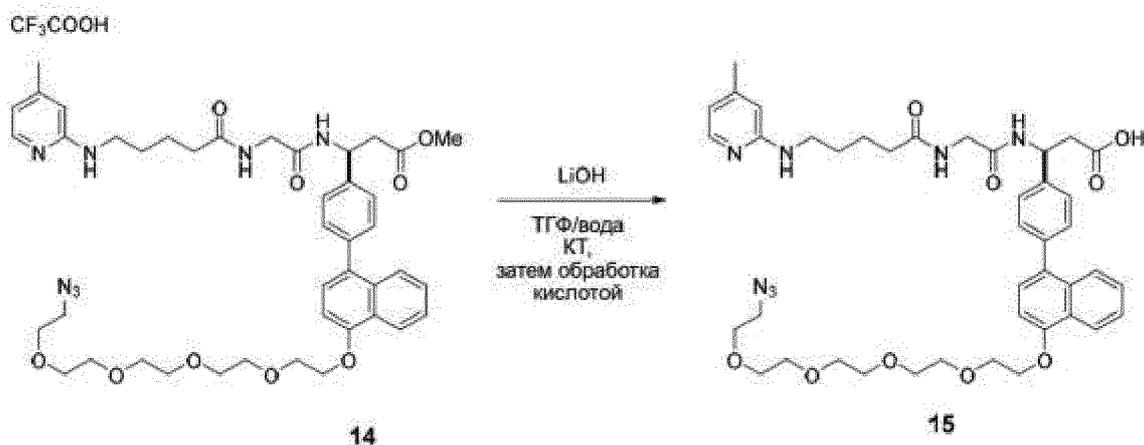
К раствору соединения 11 (1880 мг, 2,597 ммоль, 1,0 экв.) в безводном диоксане (3 мл) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (3,25 мл, 12,986 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Растворитель удаляли и соединение 12 использовали непосредственно без очистки. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 624,30, найдено: 624,41.



К раствору соединений 12 (0,10 г) и 4 (0,049 г) в ДМФ при комнатной температуре добавляли ТВТУ (0,058 г) и затем ДИПЭА (0,079 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакцию останавливали с помощью NaHCO_3 (10 мл). Продукт экстрагировали с помощью EtOAc (3×15 мл) и затем промывали водой (3×10 мл) и рассолом (10 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-70%), при этом соединение 13 элюировалось при 23% В. Продукт концентрировали в вакууме и получали прозрачное бесцветное масло (0,088 г, выход 63,6%).



К раствору соединения 13 (0,088 г) в ДХМ при комнатной температуре добавляли ТФК (0,22 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме. Выделение не требовалось. После концентрирования получали соединение 14 в виде прозрачного бесцветного масла (0,10 г, выход 113%.) ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 814,41 m/z, найдено: 814,63 m/z.



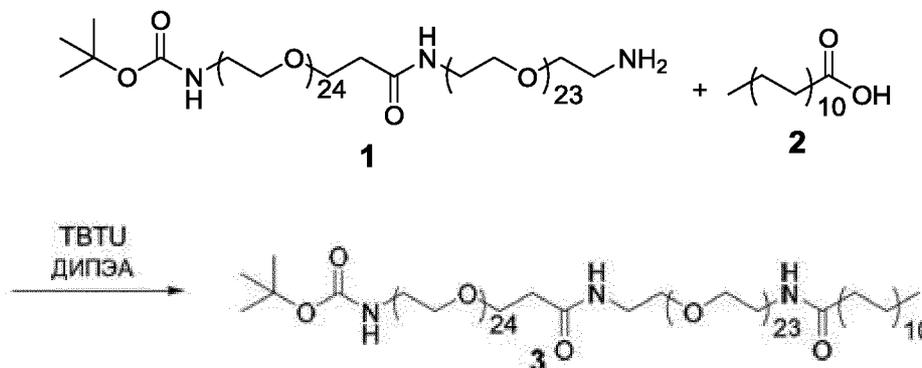
К раствору соединения 14 (0,10 г) в смеси ТГФ/вода состава 1:1 в обычной атмосфере при комнатной температуре добавляли LiOH (0,0078 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Через 4 ч реакционную смесь подкисляли 6 н. раствором HCl до обеспечения значения pH, равного примерно 3. Продукт экстрагировали смесью 20% CF₃CH₂OH/ДХМ (3×15 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали и

получали соединение 15 в виде светло-желтого твердого вещества (0,104 г, выход 119%.) ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 800,39 m/z, найдено: 800,76 m/z.

Пример 4. Синтез предшественников липидов-модуляторов РК/PD

Синтез LP1-p

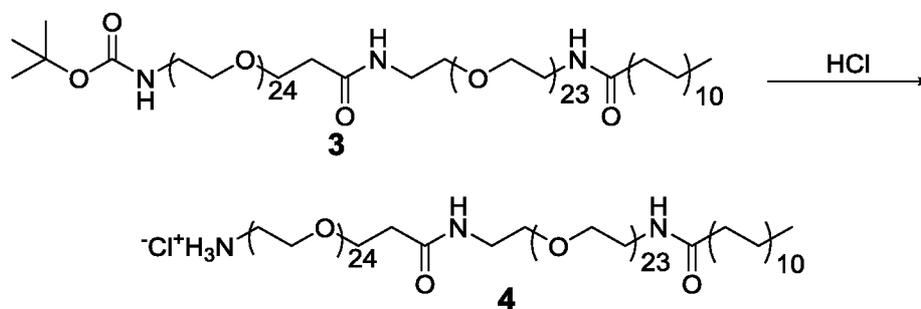
5



10

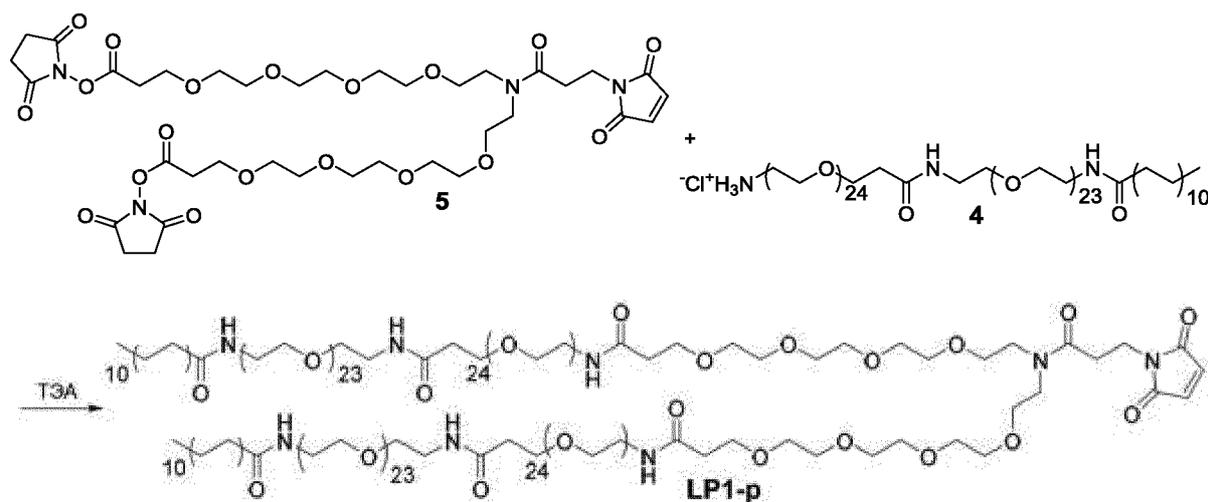
К раствору соединения 1 (2630 мг, 1,142 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (428 мг, 1,256 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламина (0,597 мл, 3,427 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (440 мг, 1,371 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч и затем концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-17% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[M+4H]^+/4$, рассчитано: 656,66, найдено: 656,65.

15



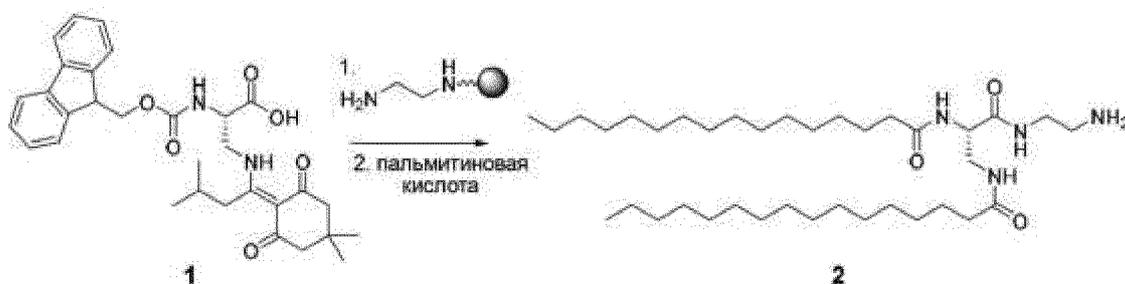
20

К твердому соединению 3 (1150 мг, 0,438 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (5,478 мл, 21,910 ммоль, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+3H]^+/3$, рассчитано: 841,88, найдено: 842,56, $[M+4H]^+/4$, рассчитано: 631,66, найдено: 632,41.



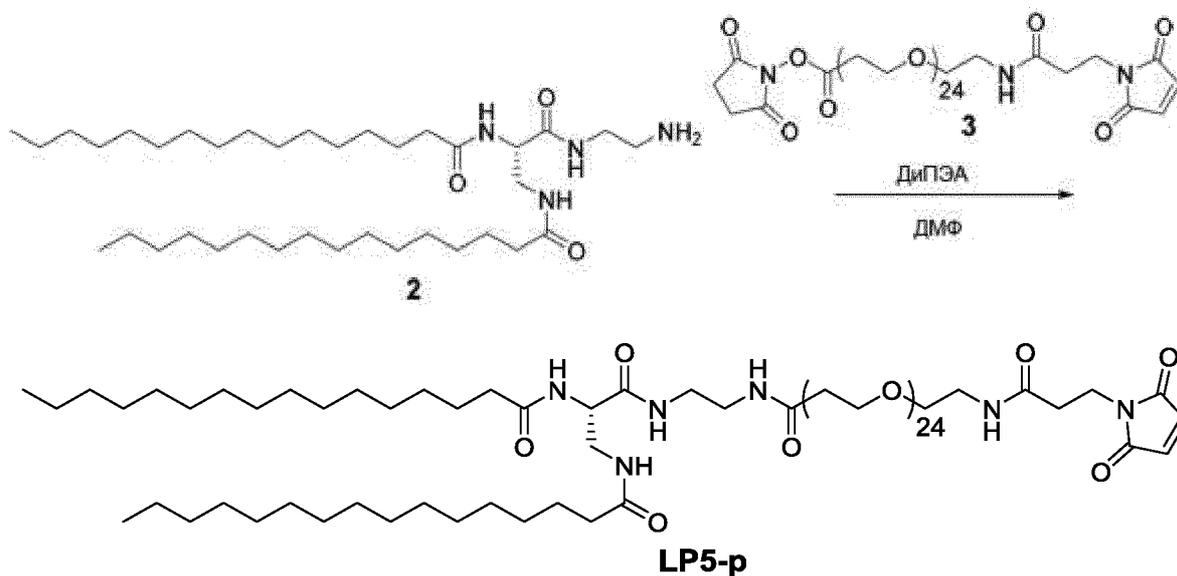
К раствору соединения 5 (175 мг, 0,203 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 4 (1095 мг, 0,427 ммоль, 2,1 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли ТЭА (0,144 мл, 1,018 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч и растворитель удаляли в вакууме. LP1-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-17% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[M+6H]^+/6$, рассчитано: 946,60, найдено: 947,10, $[M+7H]^+/7$, рассчитано: 811,51, найдено: 811,35.

10 Синтез LP5-p



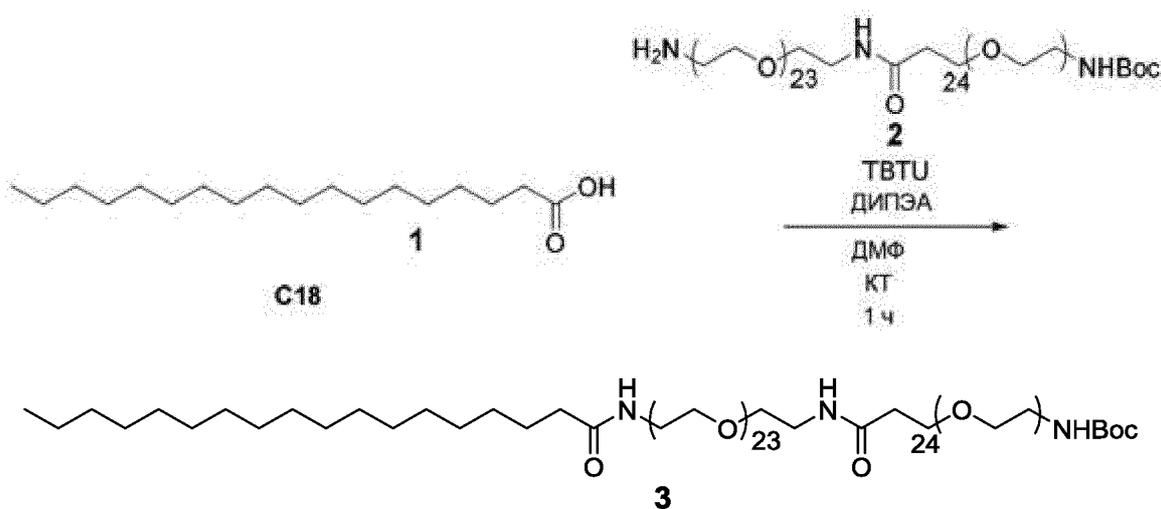
Соединение 1 (105 мг, 0,198 ммоль) в ДМФ обрабатывали с помощью ТВТУ (4 экв.) и перемешивали в течение 5 мин. Затем добавляли ДИЭА (8 экв.) и смесь добавляли к 1 мол. экв. этиламиндиамин на подвергнутой предварительному набуханию 2-хлортритильной смоле. После перемешивания в течение 30 мин смолу трижды промывали с помощью ДМФ и затем в течение 10 мин обрабатывали 2% раствором гидразин в ДМФ. Реакцию сочетания с пальмитиновой кислотой (202 мг, 0,789 ммоль) повторяли с использованием такой же методики, как использовавшаяся для реакции сочетания соединения 1. После завершения смолу промывали 3 порциями ДХМ и в течение 10 мин обрабатывали 1% раствором ТФК в ДХМ. Повторяли обработку с помощью ТФК

и смолу промывали 3 порциями ДХМ. Все летучие вещества удаляли и неочищенное соединение 2 использовали без дополнительной очистки. Выход: 126 мг (81%).



К смеси, содержащей соединение 2 (23 мг, 37 мкмоль) и ДИЭА (14,1 мкл, 81 мкмоль) в ДМФ (1 мл), добавляли NHS-ПЭГ₂₄-МАL (соединение 3, 61,5 мг, 0,0441 ммоль) и реакцию перемешивали в течение 30 мин. После завершения неочищенное соединение LP5-p в сухом виде помещали на диоксид кремния и выделяли при элюировании в градиентном режиме с использованием MeOH в ДХМ. Выход: 15 мг (21%).

Синтез LP28-p

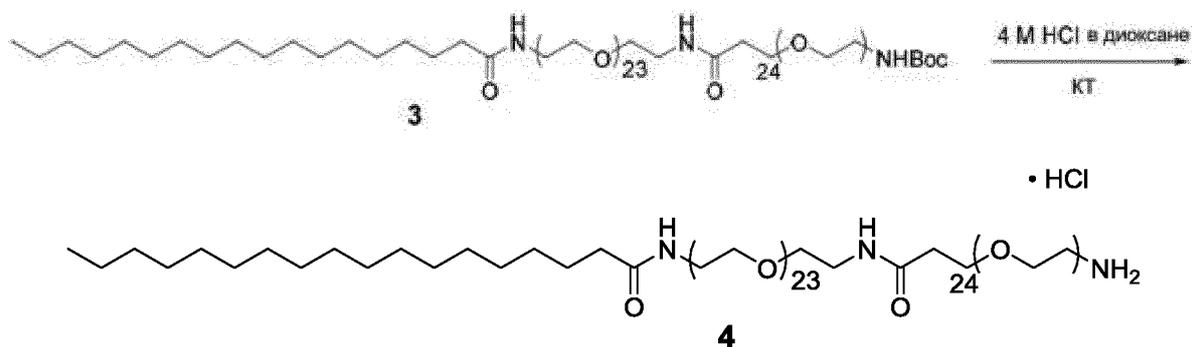


К раствору соединений 1 (80 мг) и 2 (60,2 мг) в ДМФ при комнатной температуре добавляли TBUTU (90,3 мг) и затем ДИПЭА (0,147 мл). Реакционную

смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали.

Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20%

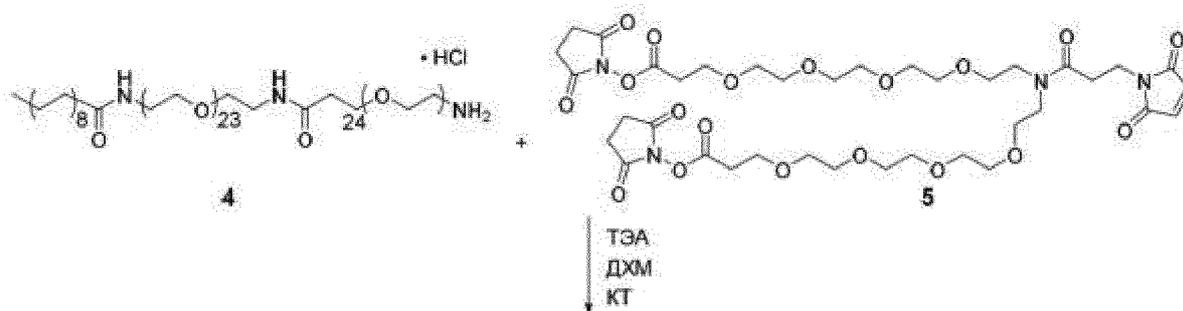
5 MeOH в ДХМ (0-80%, в изократическом режиме, и затем до 100%) в течение 20-30 мин, при этом соединение 3 элюировалось при 68% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2567,65 m/z, найдено: 1301,78 (+2/2, +H₂O) m/z.

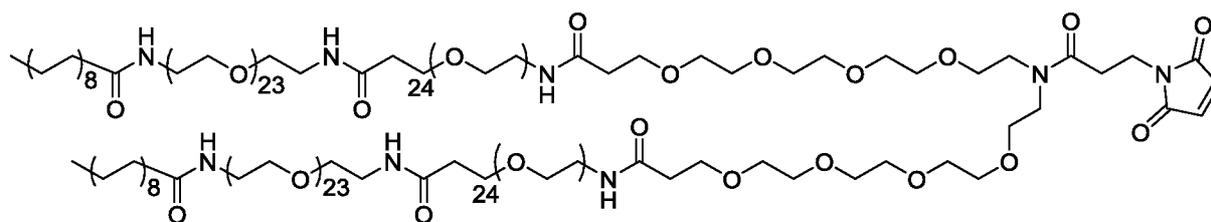


10

К соединению 3 (100,4 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (14,3 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи и получали соединение 4 в виде масла. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2467,60 m/z, найдено: 1243,32 m/z.

15

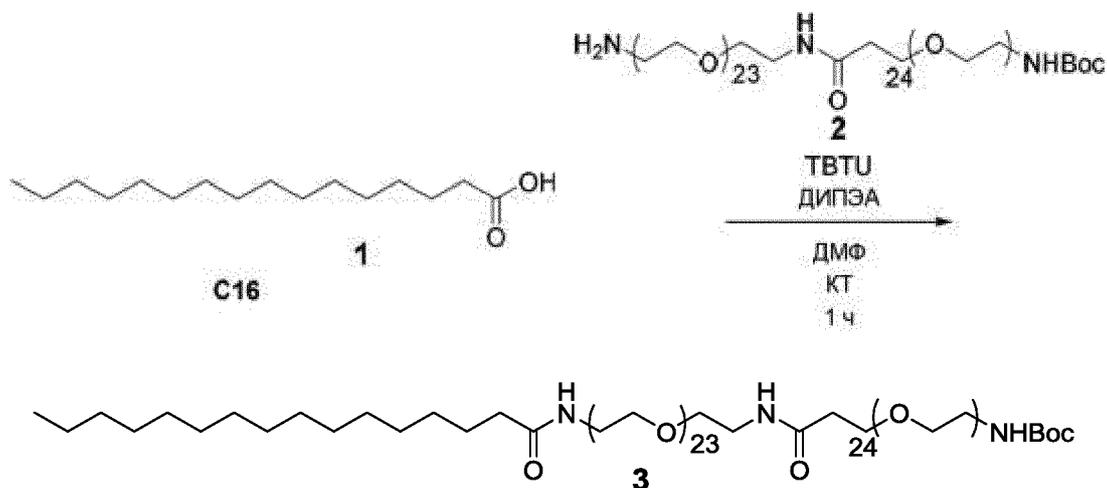




LP28-p

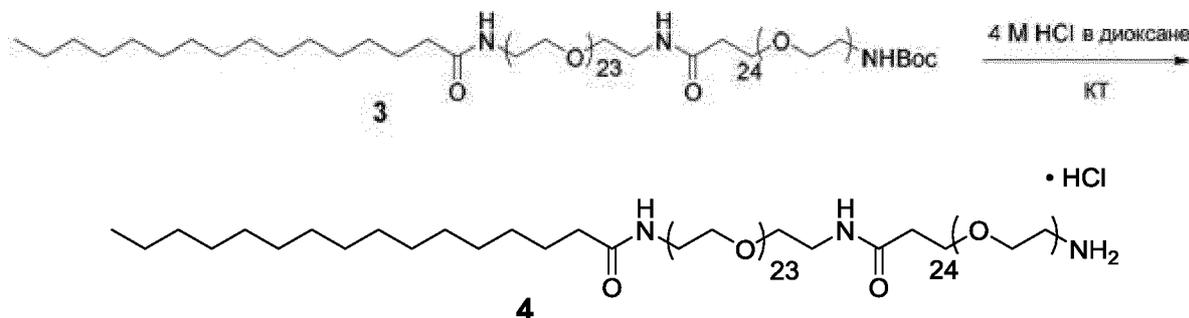
Получали раствор соединения 4 (97,9 мг) и ТЭА (0,016 мл) в безводном ДХМ и его перемешивали, продувая азотом. Затем к реакционной смеси добавляли соединение 5 (15,8 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы и при элюировании в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% В). Соединение LP28-p элюировалось при 67% В. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5562,48 m/z, найдено: 1409,68 (+4/4, +H₂O) m/z.

Синтез LP29-p

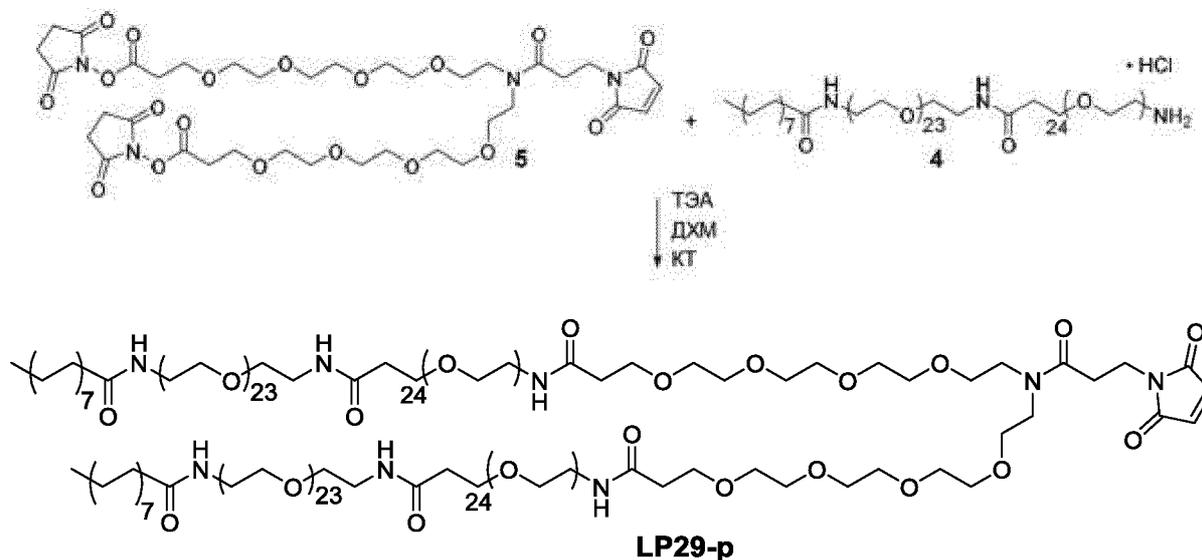


К раствору соединений 1 (40 мг) и 2 (334 мг) в ДМФ при комнатной температуре добавляли TVTU (50,1 мг) и затем ДИПЭА (0,082 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-80%) в течение 20-30 мин, при этом соединение 3

элюировалось при 71% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2539,62 m/z, найдено: 1288,21 (+2/2, +H₂O) m/z.



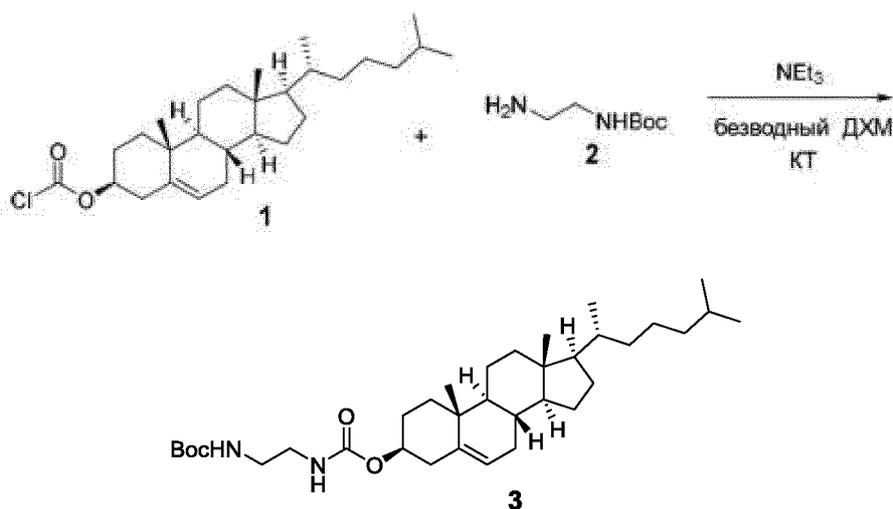
К соединению 3 (147 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (21,2 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи и получали соединение 4 в виде масла. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2439,57 m/z, найдено: 611,16 (+4/4) m/z.



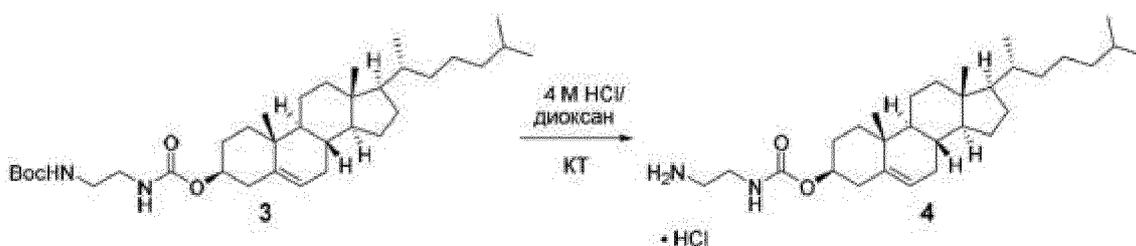
Получали раствор соединения 4 (143 мг) и ТЭА (0,024 мл) в безводном ДХМ и его перемешивали, продувая азотом. Затем к реакционной смеси добавляли соединение 5 (23,4 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение.

Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы и при элюировании в градиентном режиме с помощью 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% В). Соединение LP29-р элюировалось при 54% В. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5506,42 m/z, найдено: 1854,41 (+3/3, +H₂O) m/z.

Синтез LP33-р



К раствору соединений 1 (2,00 г, 4,45 ммоль) и 2 (1,07 г, 6,68 ммоль) в безводном ДХМ при комнатной температуре добавляли NEt₃ (1,86 мл, 13,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 45 мин, при этом соединение 3 элюировалось при 8% В. Соединение 3 концентрировали и получали белое твердое вещество. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 573,46 m/z, найдено: 573,60 m/z.

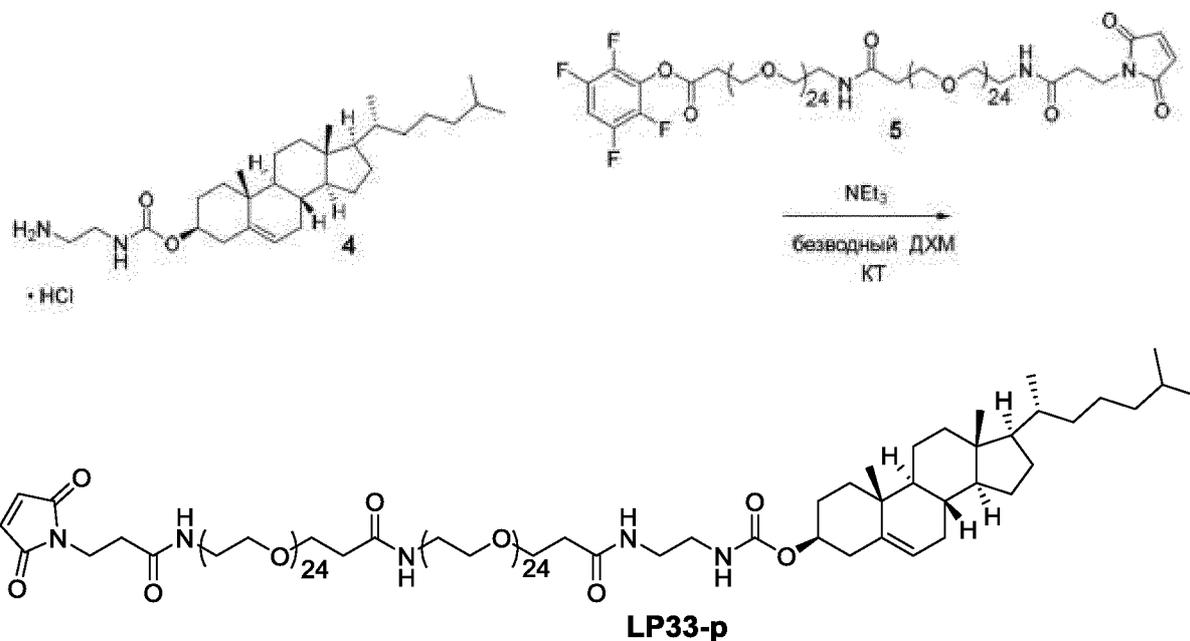


К соединению 3 (317 мг, 0,553 ммоль) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (1,383 мл). Реакционную смесь

перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение.

Реакционную смесь концентрировали в высоком вакууме в течение ночи и получали соединение 4 в виде прозрачного и бесцветного маслянистого остатка.

5 ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 473,40 m/z, найдено: 473,58 m/z.

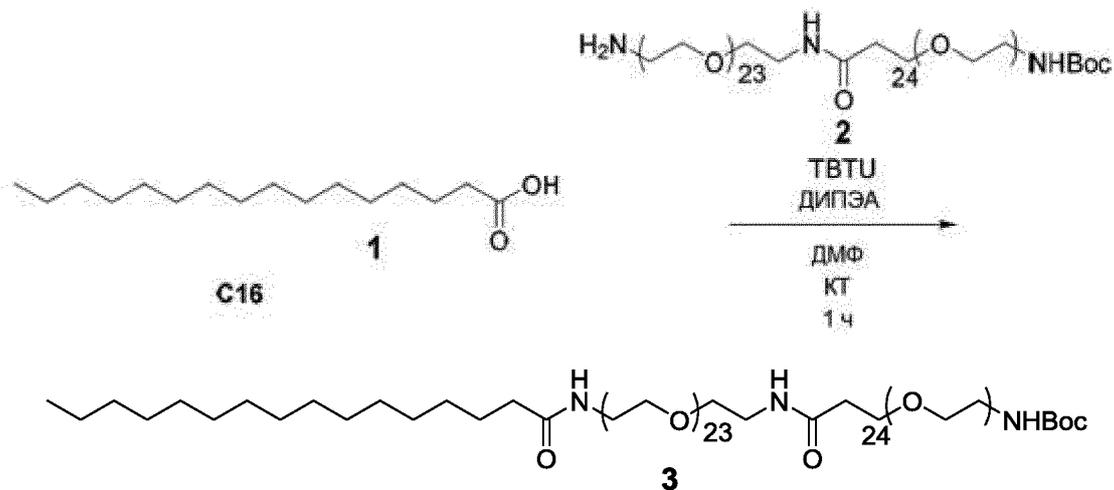


К раствору соединений 4 (282 мг, 0,553 ммоль) и 5 (1,35 г, 0,526 ммоль) в безводном ДХМ в атмосфере N₂ (газообразный) добавляли NEt₃ (0,386 мл).

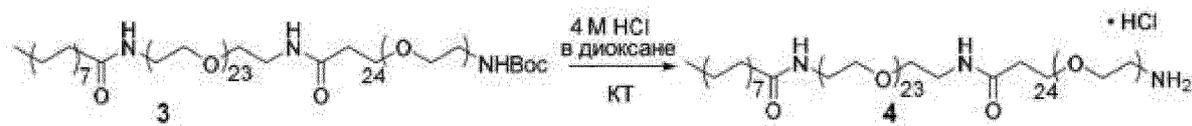
10 Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 45 мин, при этом

15 соединение LP33-p элюировалось при 46% В. LP33-p концентрировали и получали белое твердое вещество. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2879,76 m/z, найдено: 960,98 (+3/3) m/z.

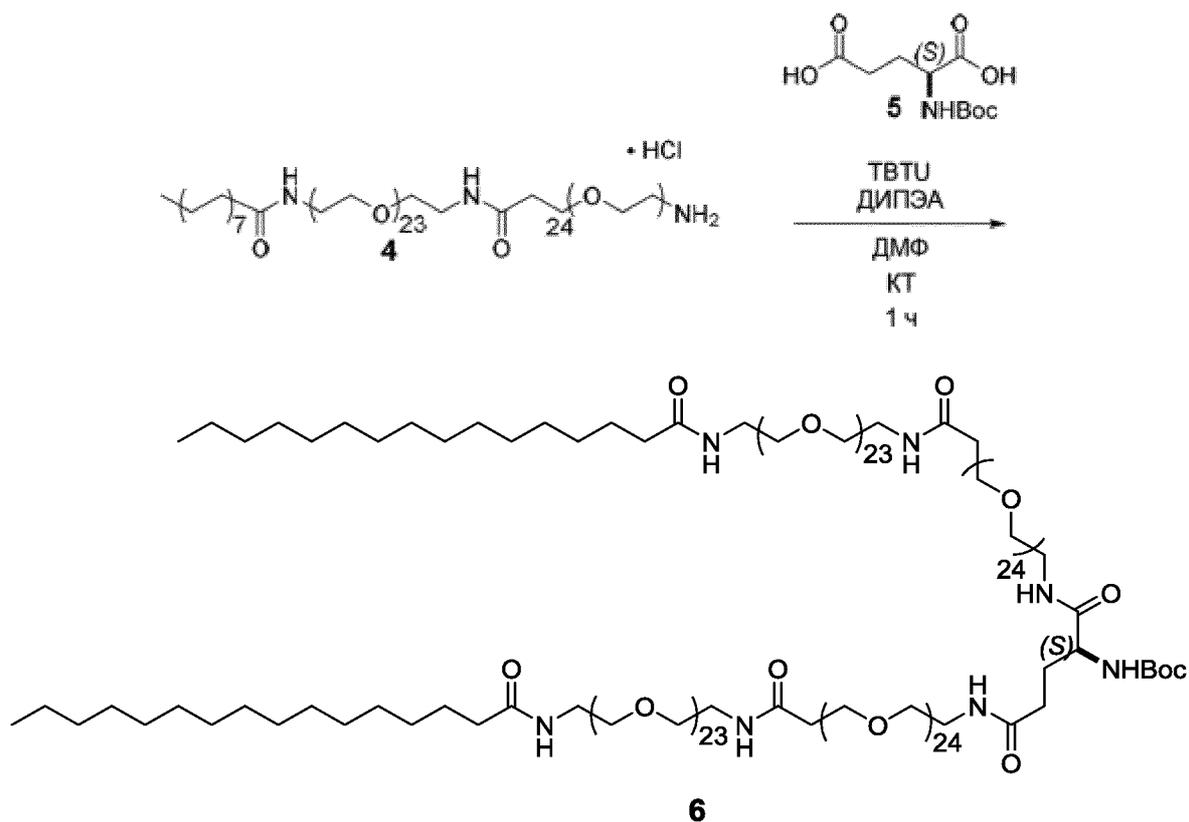
Синтез LP38-p



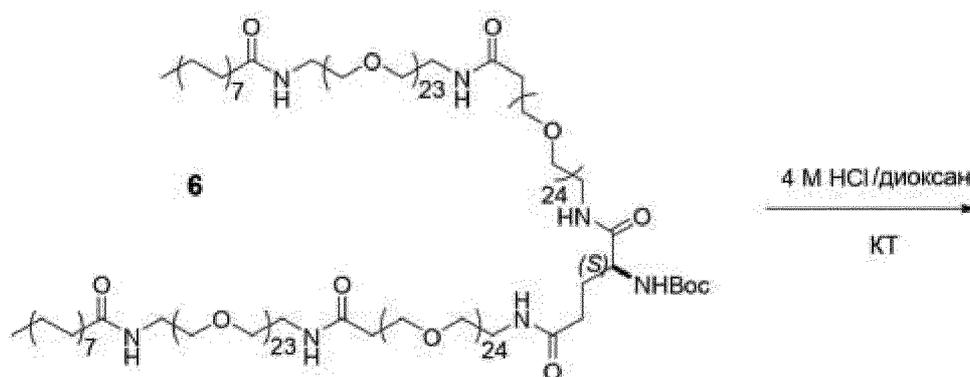
К раствору соединений 1 (35 мг) и 2 (299 мг) в ДМФ при комнатной температуре добавляли ТВТУ (43,8 мг) и затем ДИПЭА (0,071 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 20-30 мин, при этом соединение 3 элюировалось при 56% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2539,62 m/z, найдено: 1288,07 (+2/2, +H₂O) m/z.

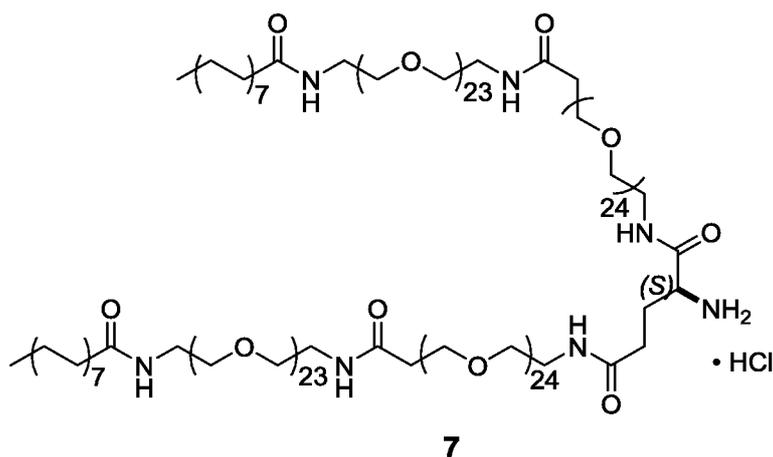


К соединению 3 (186 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор НСl в диоксане (26,7 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи и получали соединение 4 в виде масла. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2439,57 m/z, найдено: 1220,97 (+2/2) m/z.

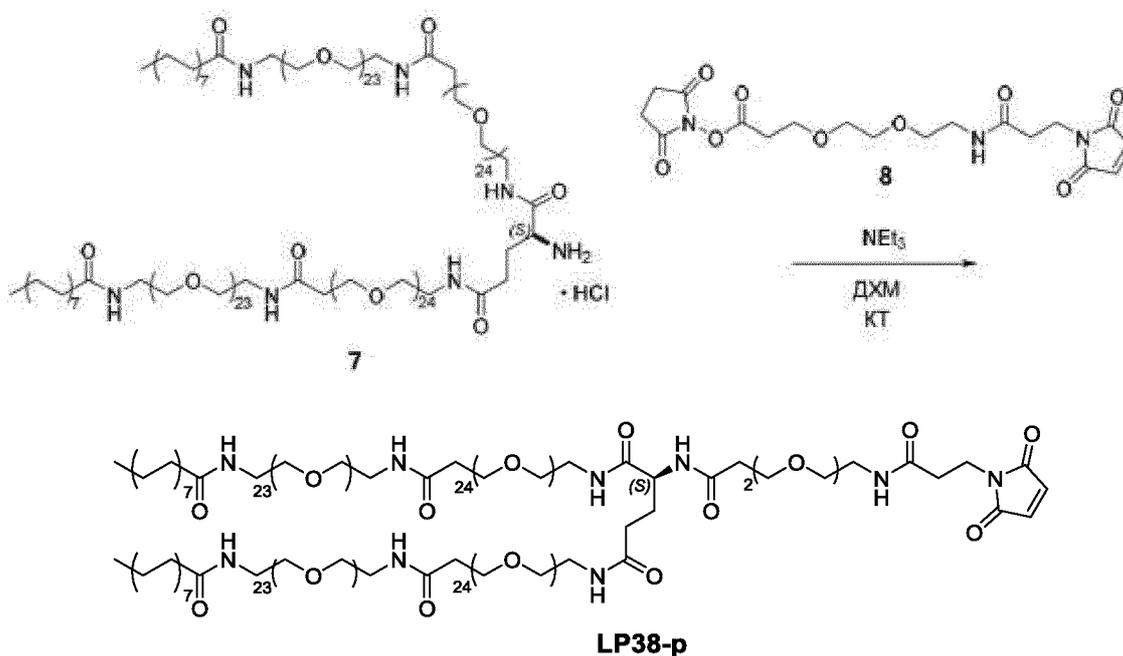


К раствору соединения 4 (181 мг), TBTU (24 мг) и ДИЭА (0,033 мл) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 5 (8,7 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 20-30 мин, при этом соединение 6 элюировалось при 65% В. Соединение 6 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5089,22 m/z, найдено: 1036,24 (+5/5, +H₂O) m/z.





К соединению 6 (130 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (9,3 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи и получали соединение 7 в виде масла. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 4989,17m/z, найдено: 1248,58 (+4/4) m/z.



10

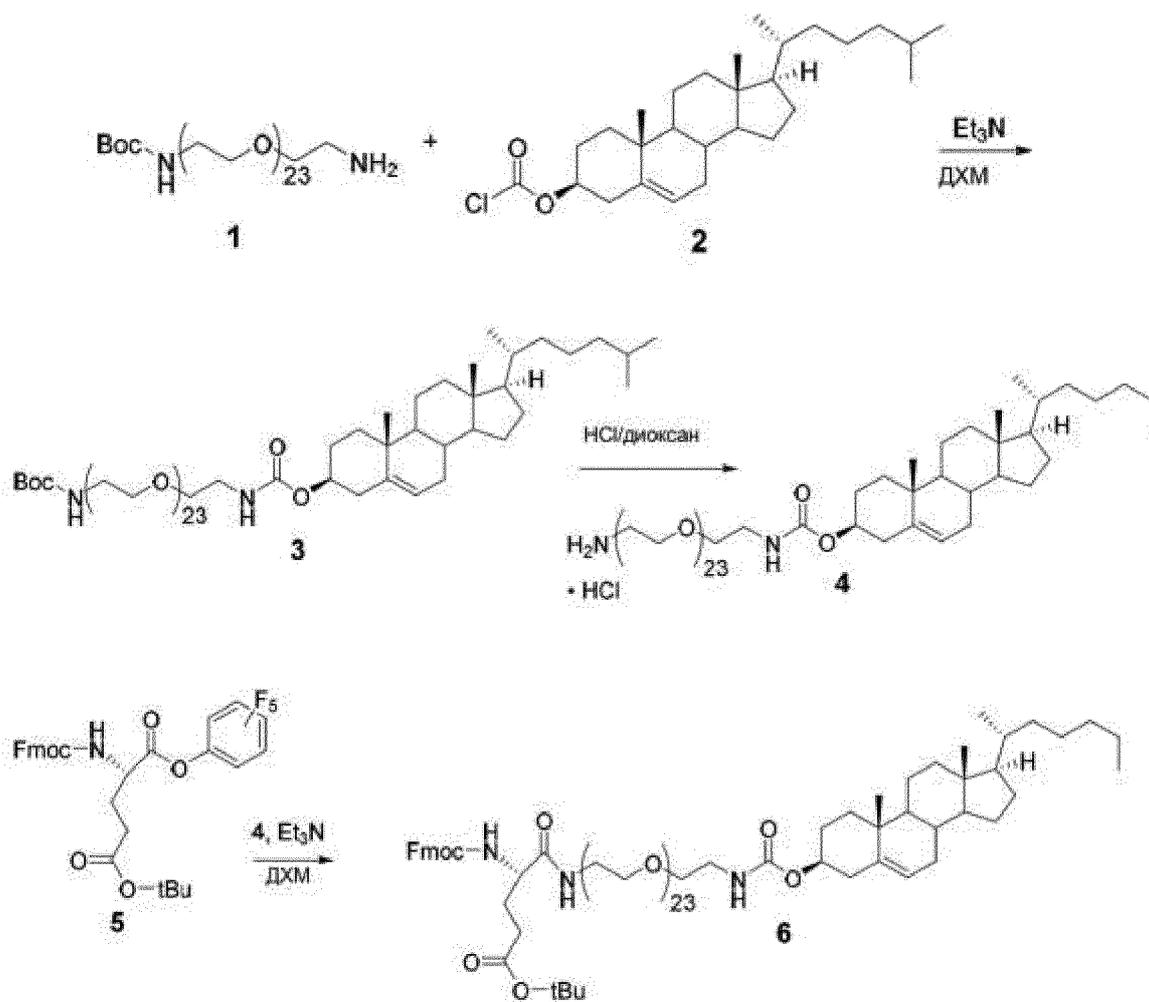
При комнатной температуре и при продувке с помощью N₂ (газообразный) получали раствор соединения 7 (128 мг) и NEt₃ (0,018 мл) в безводном ДХМ. Затем медленно добавляли соединение 8 (10,3 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение.

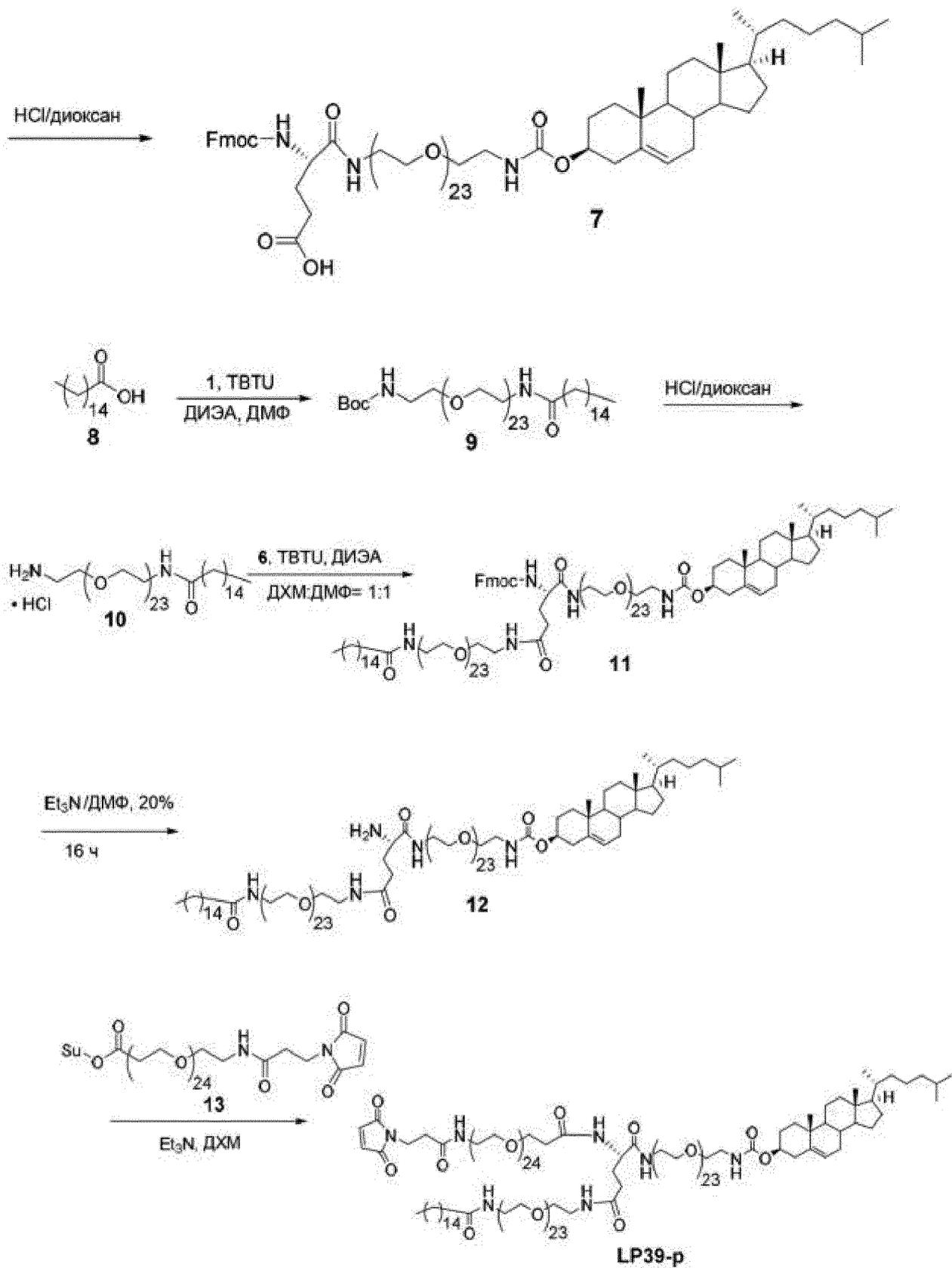
15 Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали

с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 30 мин, при этом соединение LP38-р элюировалось при 100% В. LP38-р концентрировали и получали белое твердое вещество. ЖХ-МС: $[M+H]^+$,

5 рассчитано: 5299,28 m/z, найдено: 1786,62 (+3/3, +H₂O) m/z.

Синтез LP39-р





Содержащий защитную группу Boc ПЭГ₂₃-амин 1 (Quanta Biodesign Limited, 200 мг, 0,17 ммоль), холестеринхлорформат 2 (77 мг, 0,17 ммоль) и

Et₃N (48 мкл, 0,341 ммоль) перемешивали в 5 мл ДХМ в течение 1,5 ч.

Растворитель удаляли в вакууме, остаток смешивали с SiO₂ (1 г) и помещали в CombiFlash®. Соединение 3 очищали с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-80%, 40 мин. Рассчитано: MM = 1586,09, M+18 = 1604,09, (M + 2×18)/2 = 811,05. Найдено: MS (ЭР, в режиме положительных ионов): 1603,55 [M⁺NH₄]⁺, 811,07 [M⁺²NH₄]²⁺.

Из продукта 3 удаляли защитную группу Вос и полученный гидрохлорид 4 (62 мг, 0,04 ммоль), сложный пентафторфениловый эфир 5 (24 мг, 0,04 ммоль) и Et₃N (14 мкл, 0,1 ммоль) в ДХМ (5 мл) перемешивали в течение 1,5 ч.

10 Растворитель удаляли в вакууме, остаток смешивали с SiO₂ (400 мг) и помещали в CombiFlash®. Продукт 6 очищали с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-70%, 30 мин. Выход: 57 мг. Рассчитано: MM = 1893,44, M+18 = 1911,44, (M + 2×18)/2 = 964,72. Найдено: MS (ЭР, в режиме положительных ионов): 1911,00 [M+NH₄]⁺, 964,46 [M+2NH₄]²⁺.

15 Продукт 6 обрабатывали 4 M раствором HCl в диоксане (10 мл) при комнатной температуре в течение 4 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток 2 раза выпаривали с толуолом, продукт 7 сушили и непосредственно использовали на следующей стадии.

20 Твердый ТВТУ (50 мг, 0,156 ммоль) добавляли к раствору содержащего защитную группу Вос ПЭГ₂₃-амина 1 (Quanta Biodesign Limited, 152 мг, 0,13 ммоль), пальмитиновой кислоты 8 (33 мг, 0,13 ммоль) и ДИЭА (68 мкл, 0,39 ммоль) в ДМФ (9 мл). Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком для растворения твердых веществ и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток дважды выпаривали с 25 толуолом, остаток растворяли в хлороформе (50 мл), промывали с помощью NaHCO₃ (2×10 мл) и рассолом (10 мл). Соединение 9 сушили (Na₂SO₄), концентрировали в вакууме, и очищали с помощью CombiFlash® (SiO₂) с использованием системы ДХМ: 20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-80%, 20 мин. Рассчитано: MM = 1411,85, M+18 = 1429,85, (M + 1 + 18)/2 = 715,43. 30 Найдено: MS (ЭР, в режиме положительных ионов): 1429,24 [M+NH₄]⁺, 715,41 [M+H+N₄]²⁺.

Из соединения 9 удаляли защитную группу Вос с помощью раствора HCl в диоксане и соединение 10 непосредственно использовали на следующей стадии.

Производное 7 (60 мг, 0,028 ммоль), гидрохлорид 10 (42 мг, 0,03 ммоль), ТВТУ (11 мг, 0,034 ммоль) и ДИЭА (18 мкл, 0,1 ммоль) в смеси ДХМ:ДМФ = 1:1 (8 мл) перемешивали в течение 3 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток 2
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500

мил). Суспензию дважды промывали 2% раствором NaHCO₃ и рассолом. После концентрирования в вакууме продукт 11 очищали с помощью CombiFlash® (0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-70%, 35 мин).

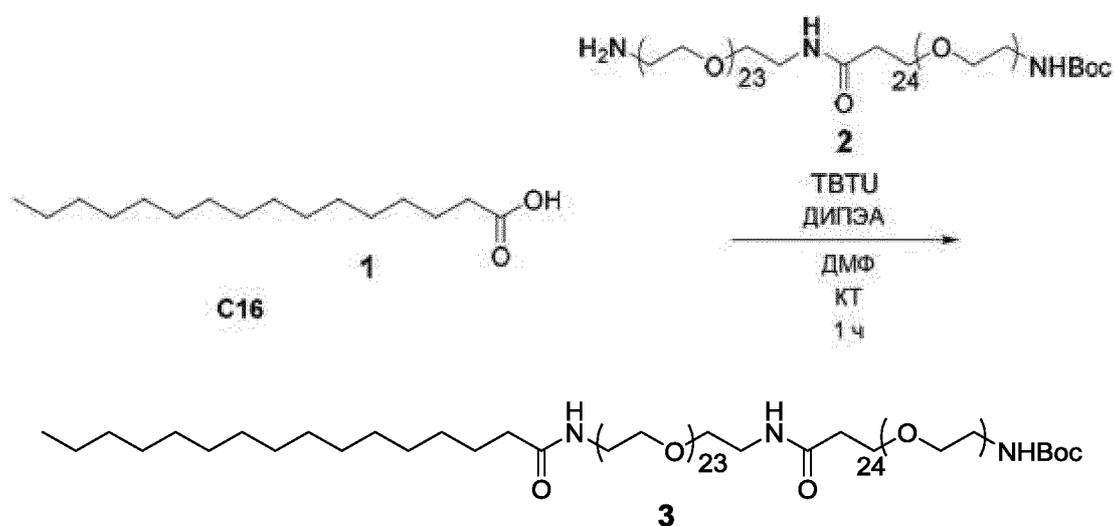
Продукт 11 (51 мг, 0,0162 ммоль) и Et₃N в ДМФ (20%, 3 мл) перемешивали в течение 16 ч, содержащий Et₃N растворитель удаляли в вакууме, остаток 3 раза
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500

выпаривали с толуолом и получали амин 12 с удаленной защитной группой. Рассчитано: ММ = 2908,81, (М + 1 + 18)/2 = 1463,91, (М + 1 + 18 × 2)/3 = 981,94. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1463,69 [М + Н + NH₄]²⁺, 981,99 [М + Н + 2NH₄]³⁺.

Амин 12 (47 мг, 0,0162 ммоль) и смесь сложного эфира NHS 13 (21 мг, 0,0147 ммоль) и Et₃N (6 мкл, 0,041 ммоль) в ДХМ (4 мл) перемешивали в
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500

течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме и продукт LP39-р очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-100%, 40 мин. Рассчитано: ММ = 4188,28, (М + 2 + 18)/3 = 1402,76, (М + 3 + 18 × 2)/4 = 1052,32. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1402,71 [М + 2Н + NH₄]³⁺, 1052,32 [М + 3Н + NH₄]⁴⁺.

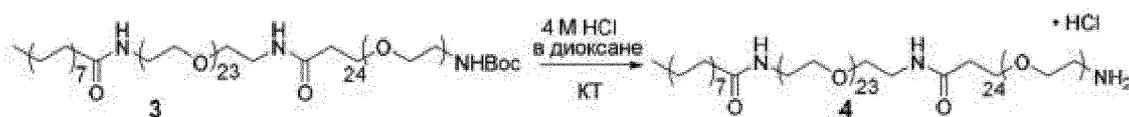
Синтез LP41-р



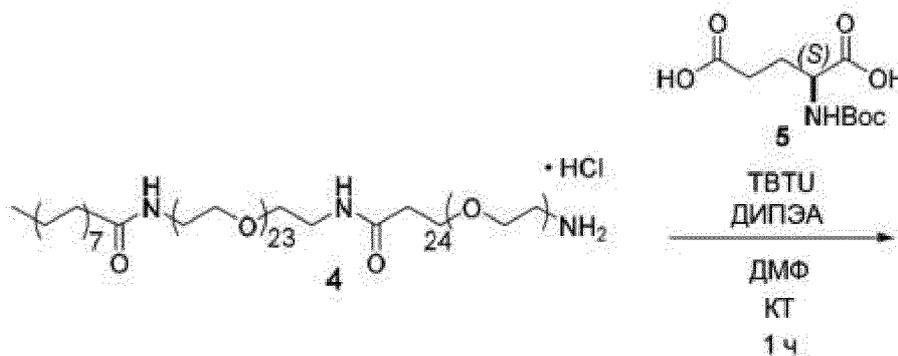
К раствору соединения 1 (40,0 мг), ТВТУ (50,1 мг) и ДИЭА (0,098 мл) в
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500

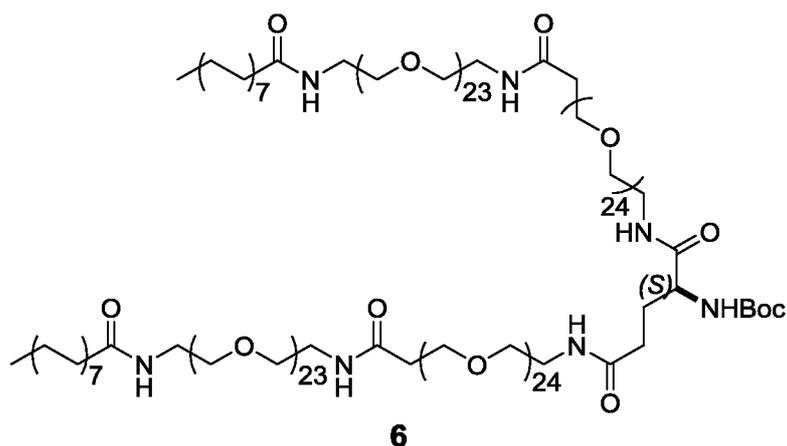
ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 2 (298 мг).

Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (10-100% В) в течение 20-30 мин, при этом соединение 3 элюировалось при 43% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2539,62 m/z, найдено: 1287,83 (+2/2, +H₂O) m/z.



10 К соединению 1 (260 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (37,4 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи и
15 получали соединение 4 в виде масла. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2439,57 m/z, найдено: 1220,61 (+2/2) m/z.

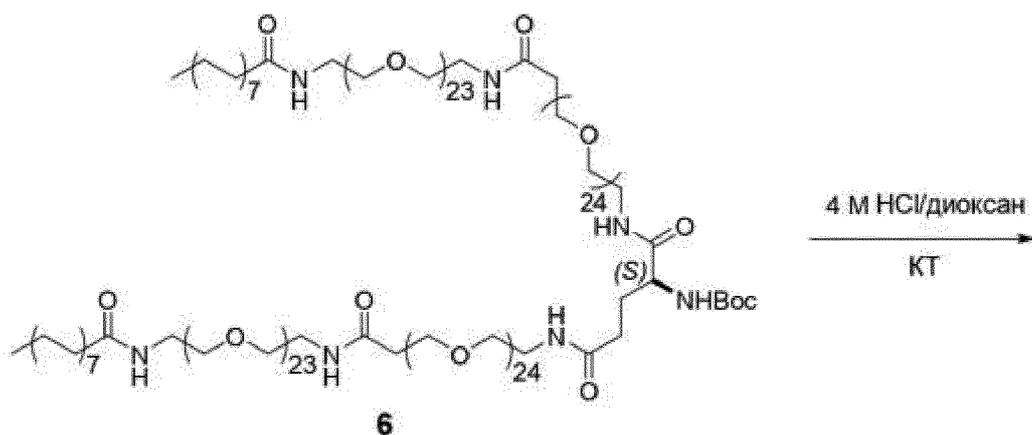


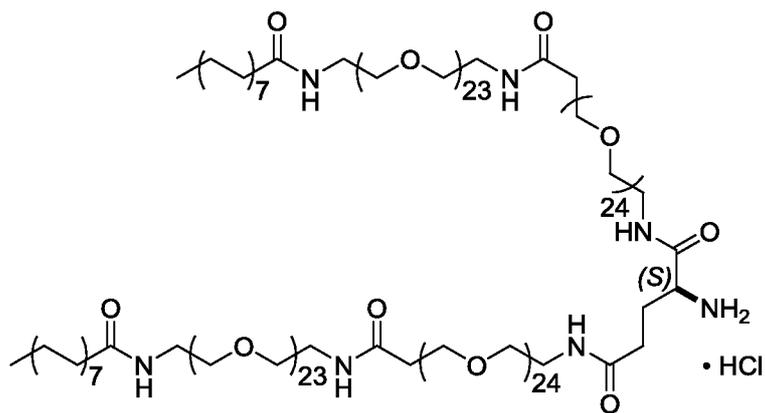


К раствору соединения 4 (253 мг), ТВТУ (36,1 мг) и ДИЭА (0,045 мл) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 5 (11,9 мг).

5 Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (10-30, 35, затем 100%) в течение 30 мин, при этом соединение 6 элюировалось при 35% В. Соединение 6 концентрировали

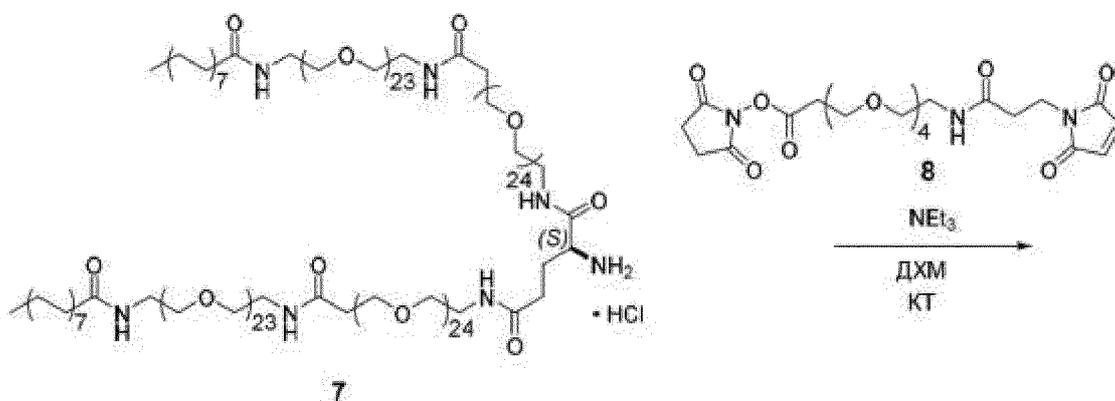
10 в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 5089,22 m/z, найдено: 1715,43 (+3/3, +H₂O) m/z.



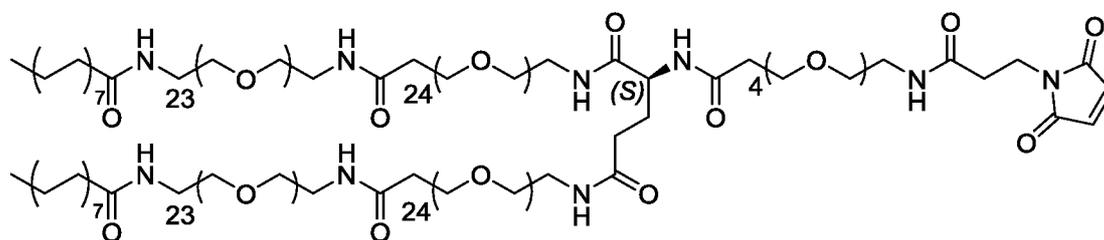


7

К соединению 6 (35,4 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (2,5 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли со смесью PhMe/MeOH и концентрировали в высоком вакууме в течение ночи и получали соединение 7 в виде масла. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 4989,17 m/z , найдено: 1676,42 (+ HCl , +3/3) m/z .



7



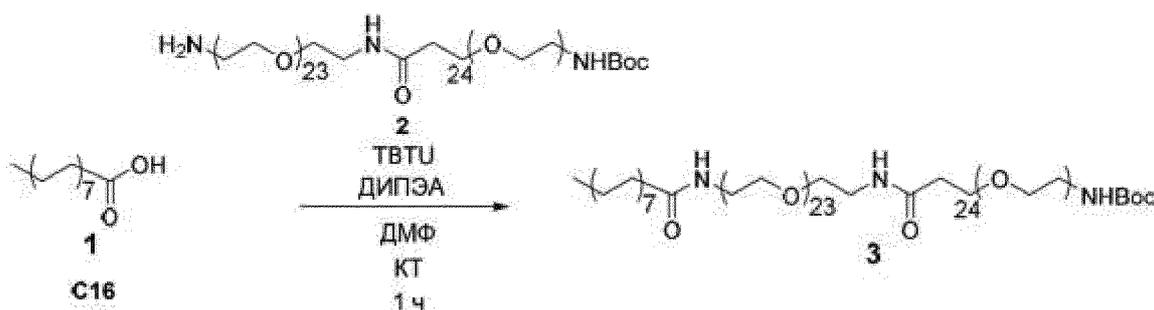
LP41-p

10

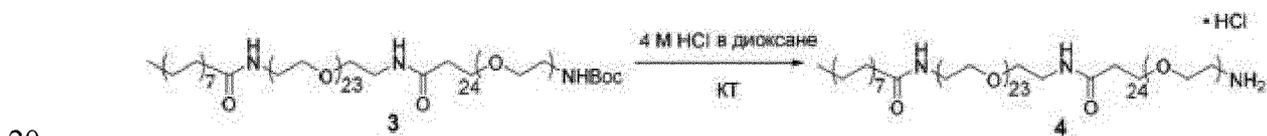
При комнатной температуре и при продувке с помощью N_2 (газообразный) получали раствор соединения 7 (35 мг) и NEt_3 (0,005 мл) в безводном ДХМ. Затем медленно добавляли соединение 8 (3,2 мг). Реакционную смесь

перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH/ДХМ (от 10 до 30%, 40%, 50%, 70%, затем 100% В) в течение 30 мин, при этом соединение LP41-р элюировалось при 100% В. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5837,84 m/z, найдено: 1079,90 (+5/5) m/z.

Синтез LP42-р

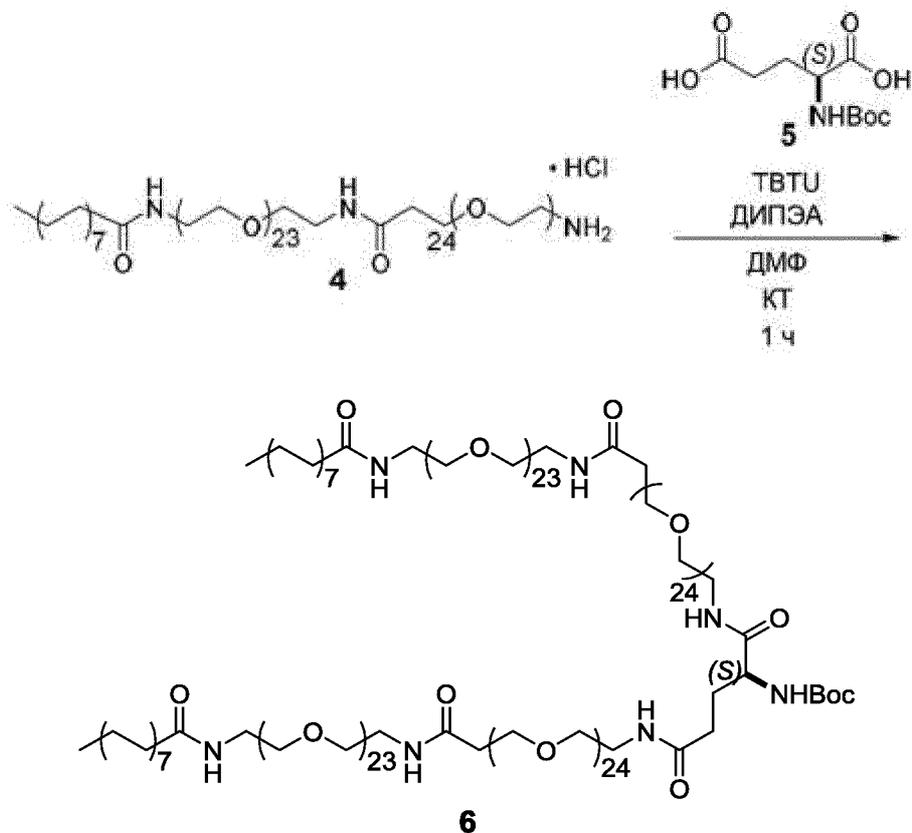


К раствору соединения 1 (40 мг), TBTU (50,1 мг) и ДИЭА (0,098 мл) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 2 (298 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (10-100% В) в течение 20-30 мин, при этом соединение 3 элюировалось при 43% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2539,62 m/z, найдено: 1287,83 (+2/2, +H₂O) m/z.

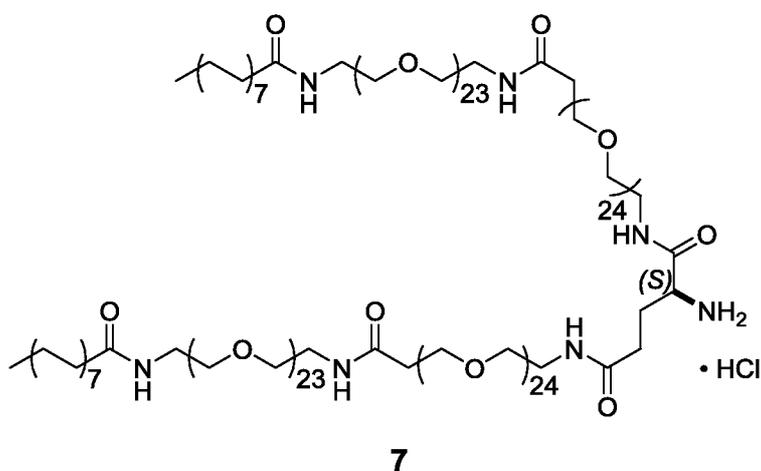
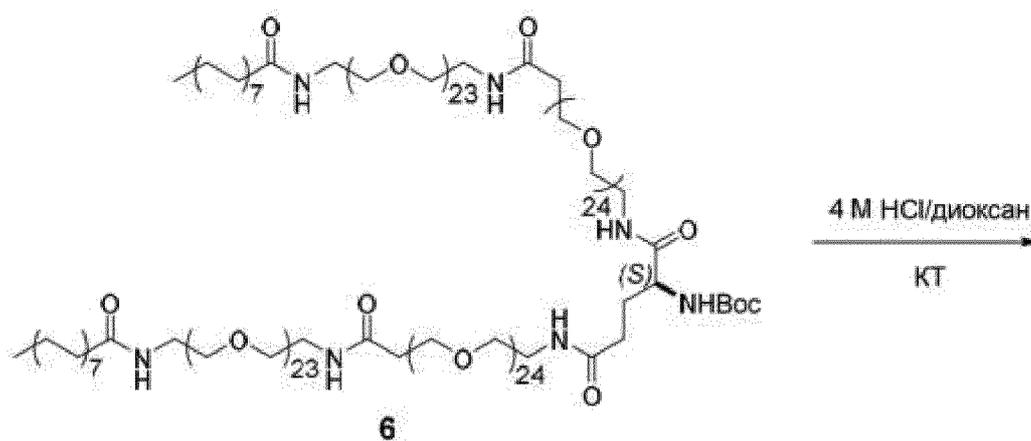


К соединению 3 (260 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (37,4 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи и

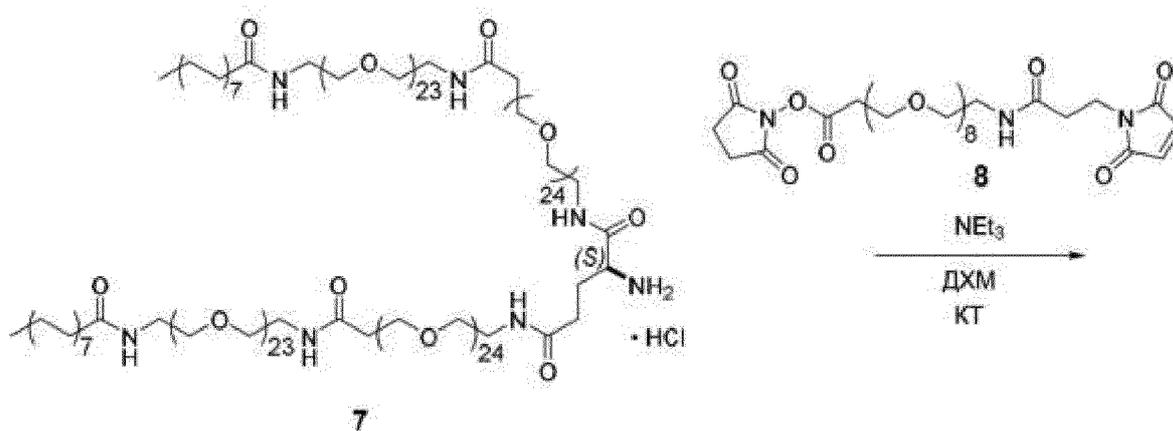
получали соединение 4 в виде масла. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2439,57 m/z, найдено: 1220,61 (+2/2) m/z.

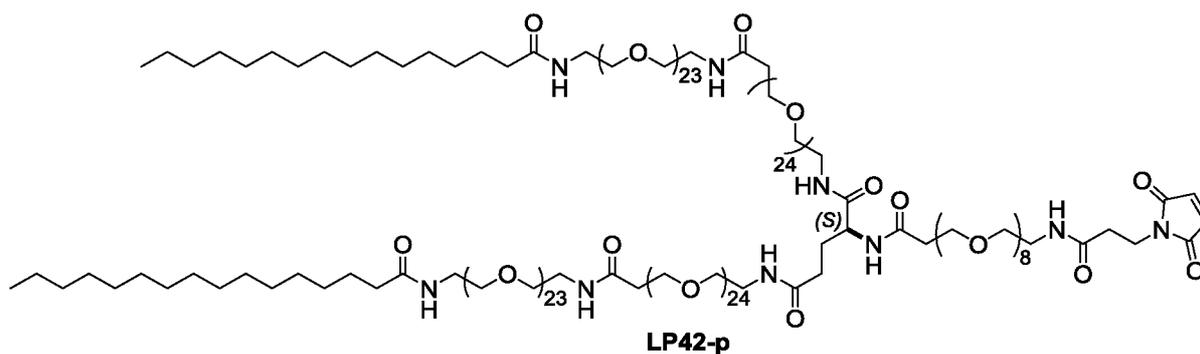


- 5 К раствору соединения 4 (253 мг), TBTU (36,1 мг) и ДИЭА (0,045 мл) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 5 (11,9 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (10-30, 35, затем 100%) в течение 30 мин, при этом соединение 6 элюировалось при 35% В. Соединение 6 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5089,22 m/z, найдено: 1715,43 (+3/3, +H₂O) m/z.
- 10



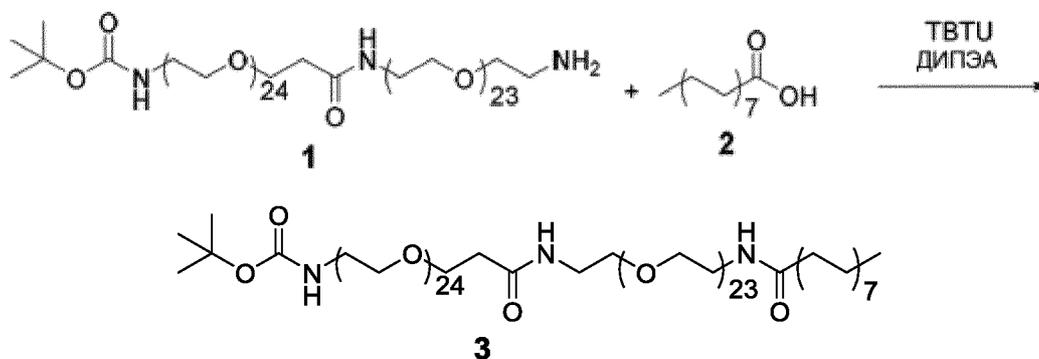
К соединению 6 (28,2 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (2,0 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли со смесью PhMe/MeOH и концентрировали в высоком вакууме в течение ночи и получали масло. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 4989,17 m/z, найдено: 1000,21 (+5/5) m/z.



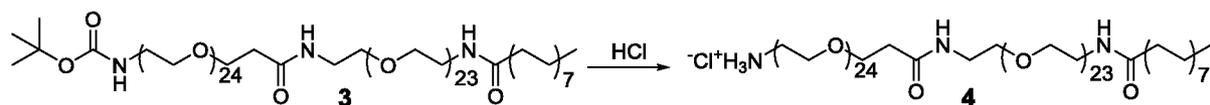


При комнатной температуре и при продувке с помощью N₂ (газообразный) получали раствор соединения 7 (27,9 мг) и NEt₃ (0,004 мл) в безводном ДХМ. Затем медленно добавляли соединение 8 (3,4 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (от 25 до 50%, затем 100% B) в течение 30 мин, при этом соединение LP42-p элюировалось при 100% B через 5 мин. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 5563,44 m/z, найдено: 946,45 (+6/6, +вода) m/z.

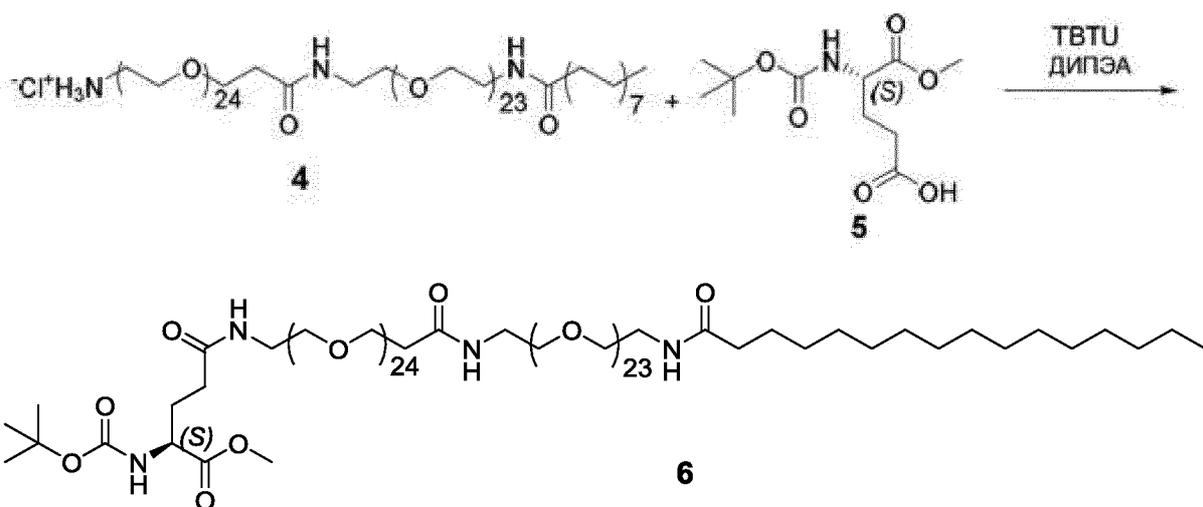
Синтез LP43-p



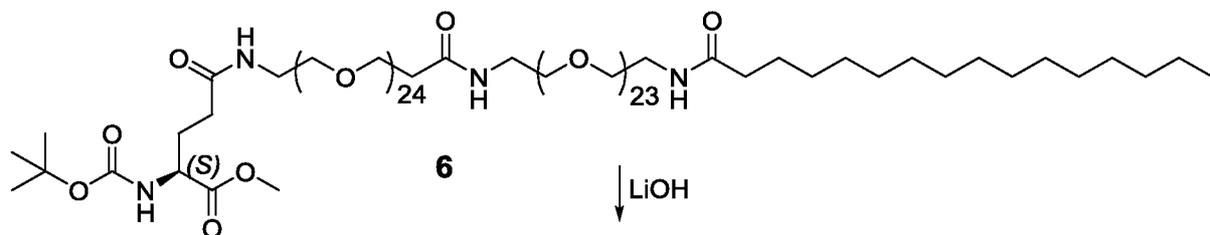
К раствору соединения 1 (3,0 г, 1,303 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (0,401 г, 1,564 ммоль, 1,2 экв.) и диизопропилэтиламин (0,681 мл, 3,91 ммоль, 3,0 экв.) в ДМФ (20 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (0,502 г, 1,564 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. Структуру подтверждали с помощью Н-ЯМР (ядерный магнитный резонанс).

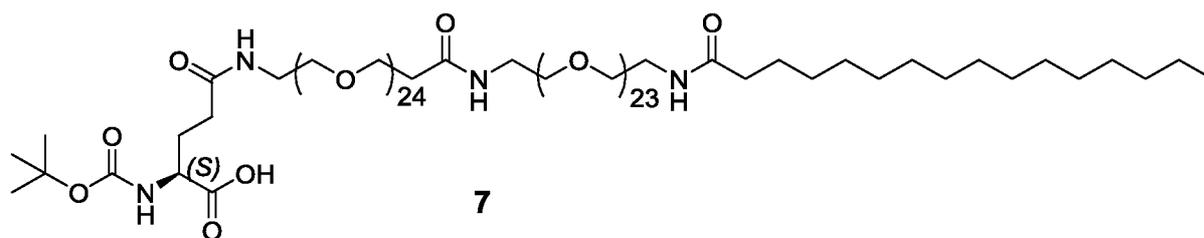


К твердому соединению 3 (2060 мг, 0,811 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (4,055 мл, 16,219 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и растворитель удаляли в вакууме. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. Структуру подтверждали с помощью Н-ЯМР.

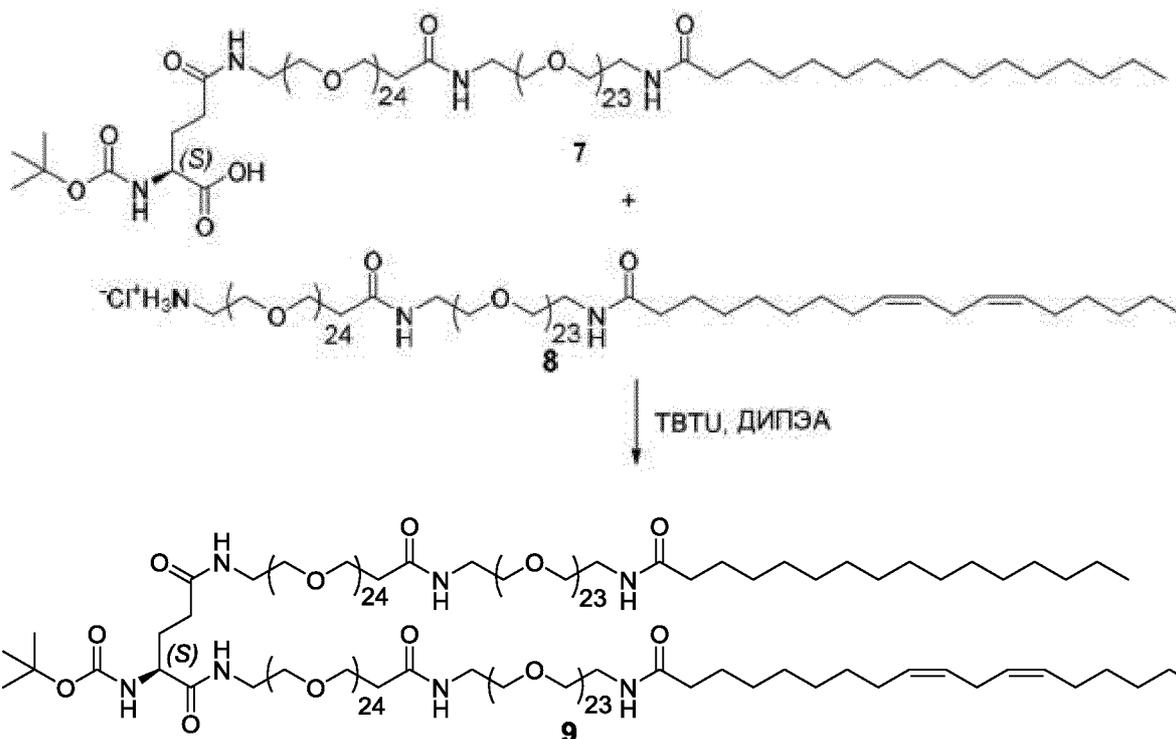


К раствору соединения 4 (2030 мг, 0,819 ммоль, 1,0 экв.), соединение 5 (257 мг, 0,983 ммоль, 1,2 экв.) и диизопропилэтиламина (0,428 мл, 2,459 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (315 мг, 0,983 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали. Соединение 6 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]/2$, рассчитано: 1341,84, найдено: 1342,69.





К раствору соединения 6 (1430 мг, 0,530 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (20 мл) и воде (20 мл) при комнатной температуре добавляли гидроксид лития (63,8 мг, 2,664 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию останавливали раствором HCl и значение pH устанавливали равным 3,0. Водную фазу экстрагировали с помощью ДХМ (3×20 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄, и концентрировали. Соединение 7 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+2H]/2, рассчитано: 1334,83, найдено: 1335,49.



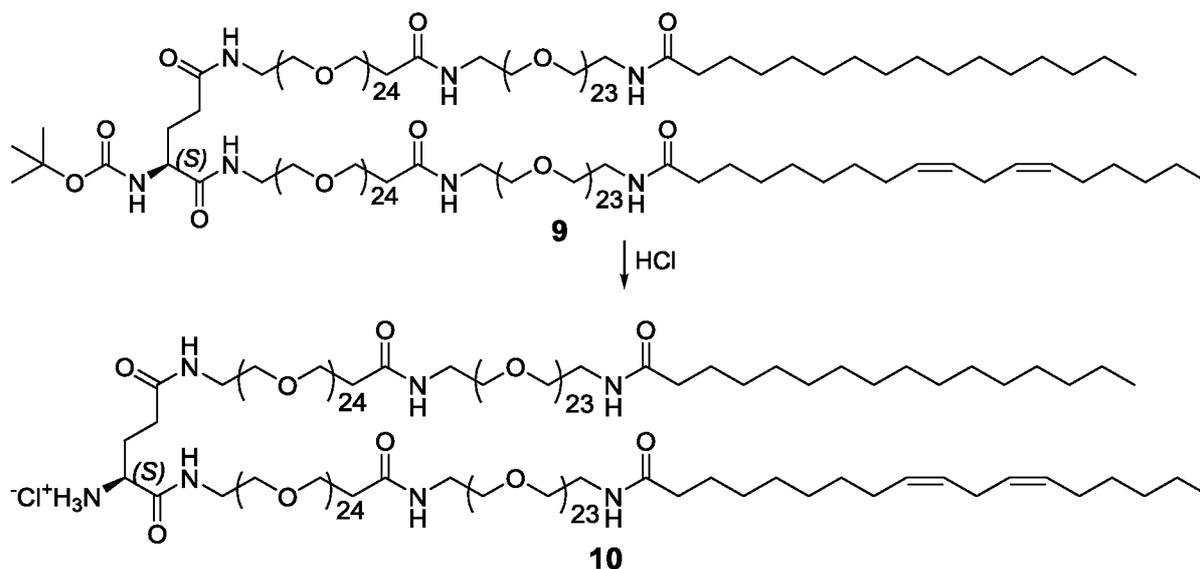
10

15

К раствору соединения 7 (110 мг, 0,0412 ммоль, 1,0 экв.), соединения 8 (103 мг, 0,0412 ммоль, 1,00 экв.) и диизопропилэтиламина (0,022 мл, 0,123 ммоль, 3,0 экв.) в ДМФ (2 мл) при комнатной температуре добавляли TBUT (15,9 мг, 0,0495 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и затем концентрировали. Соединение 9 очищали с помощью

CombiFlash® при элюировании с помощью 16-20% метанола в дихлорметане.

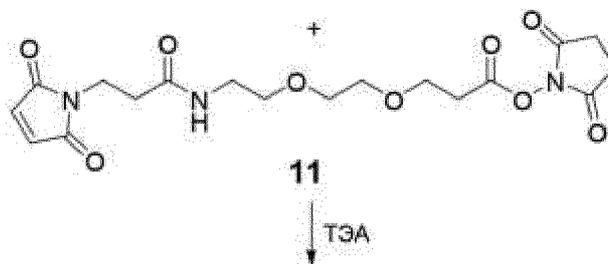
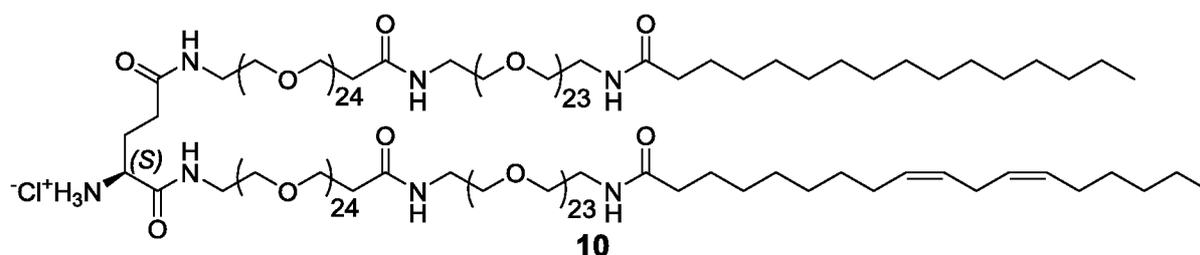
ЖХ-МС: [M+5H]/5, рассчитано: 1023,44, найдено: 1024,00.

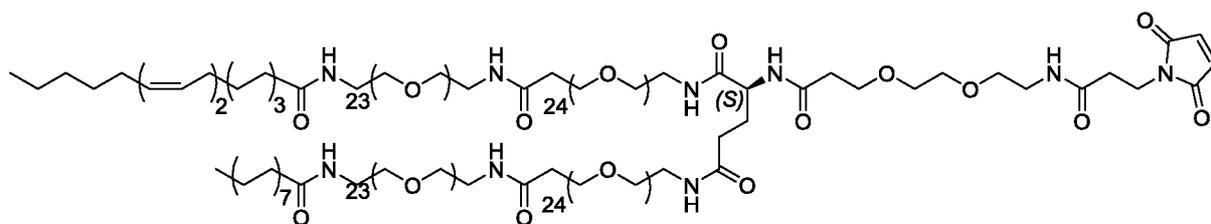


5 К соединению **9** (84 мг, 0,0164 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,205 мл, 0,0821 ммоль, 50 экв.).

Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение **10** использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+5H]/5, рассчитано: 1003,44, найдено:

10 1004,07.



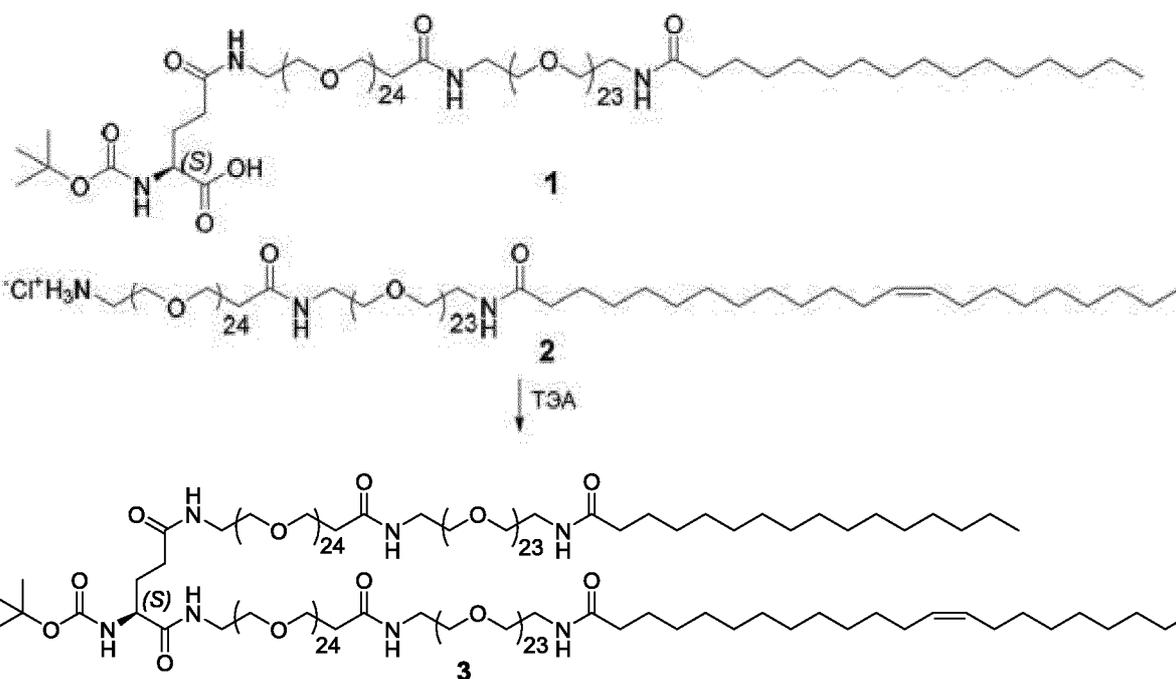


LP43-p

К раствору соединения 10 (125 мг, 0,0247 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 11 (116 мг, 0,0272 ммоль, 1,10 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,017 мл, 0,123 ммоль, 5,0 экв.).

- 5 Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и затем концентрировали. LP43-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 18-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+5H]^+/5$, рассчитано: 1065,46, найдено: 1066,13.

Синтез LP44-p

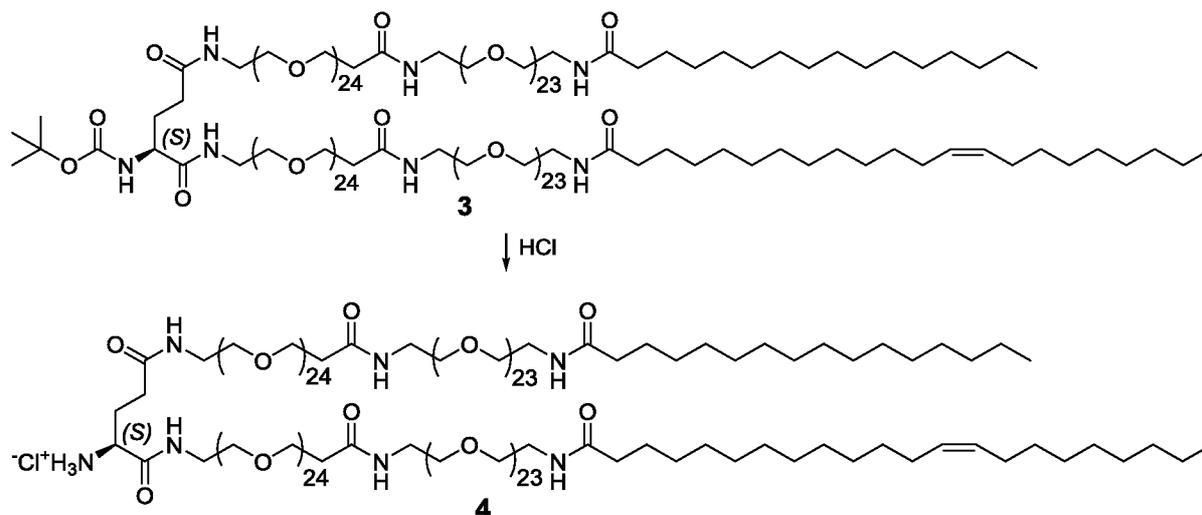


10

15

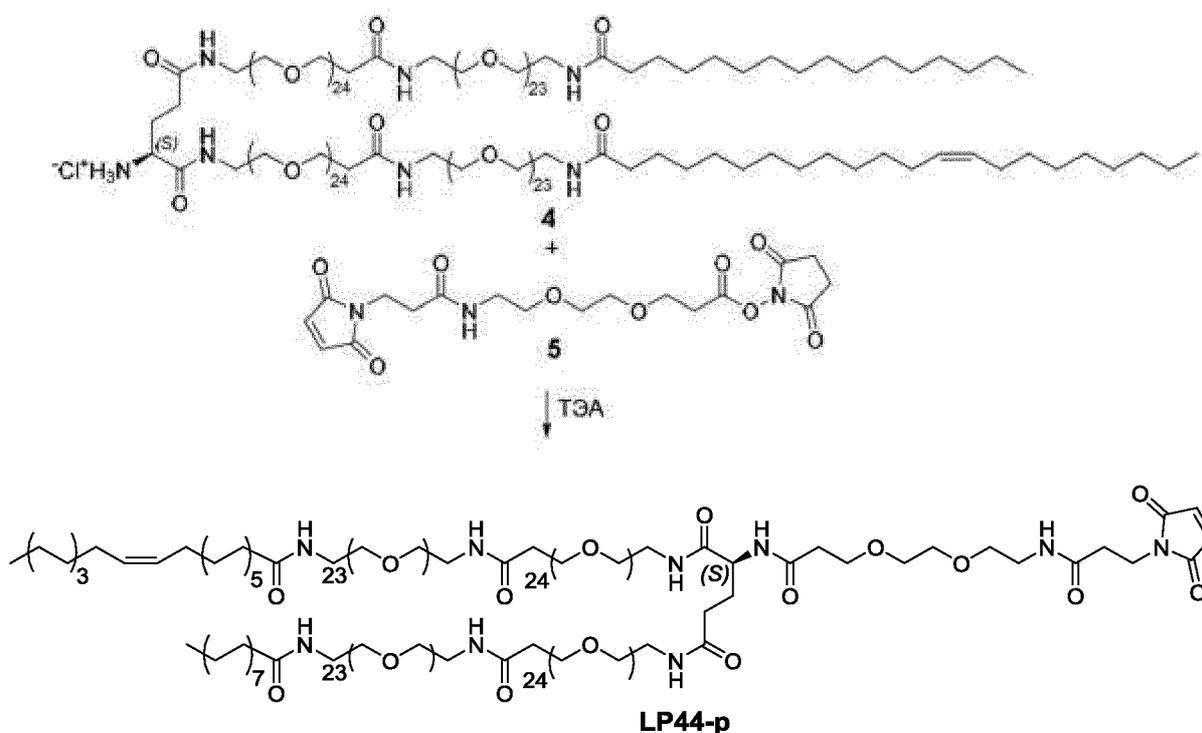
Соединение 1 синтезировали так, как это описано выше для стадий синтеза LP43-p (соединение 7, описанное для синтеза LP43-p). К раствору соединения 1 (135 мг, 0,0506 ммоль, 1,0 экв.), соединение 2 (129 мг, 0,0506 ммоль, 1,00 экв.) и диизопропилэтиламина (0,026 мл, 0,151 ммоль, 3,0 экв.) в ДМФ (2 мл) при комнатной температуре добавляли ТВТУ (19,5 мг, 0,0607 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и затем концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при

элюирования с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано: 1035,06, найдено: 1035,40.



5 К соединению 3 (100 мг, 0,0193 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,242 мл, 0,966 ммоль, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано: 1015,05, найдено:

10 1015,71.

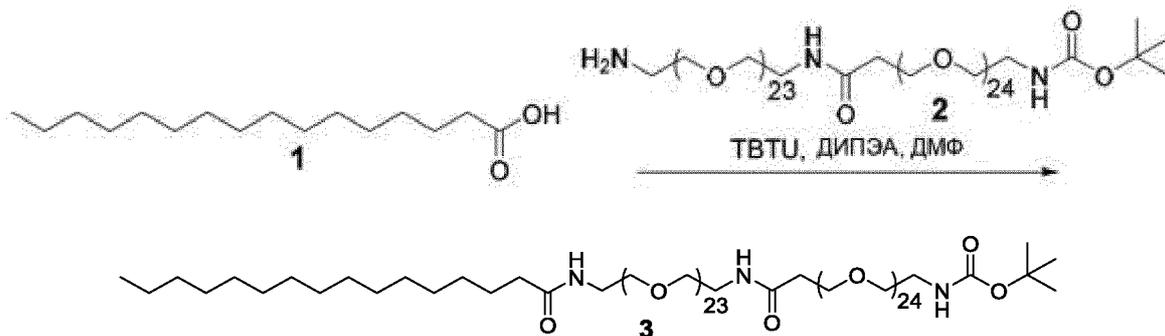


К раствору соединения 4 (95 мг, 0,0186 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 5 (8 мг, 0,0186 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре

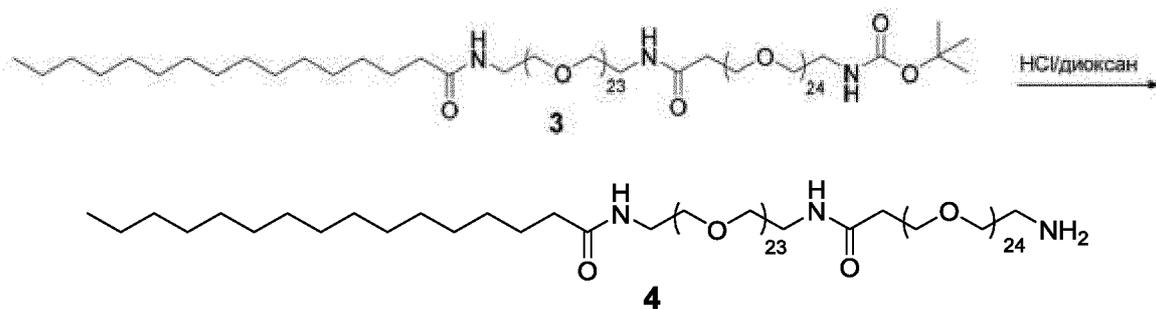
добавляли триэтиламин (0,013 мл, 0,0930 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и затем растворитель удаляли в вакууме. LP44-р очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано:

5 1077,74, найдено: 1079.

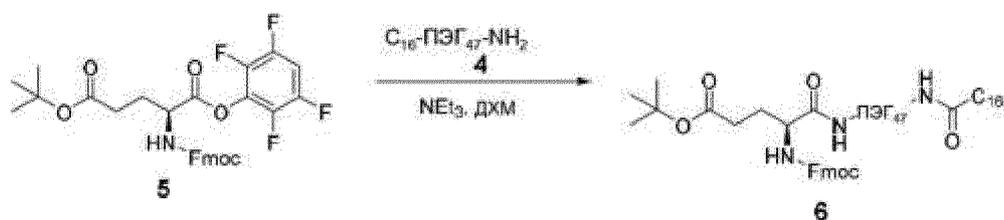
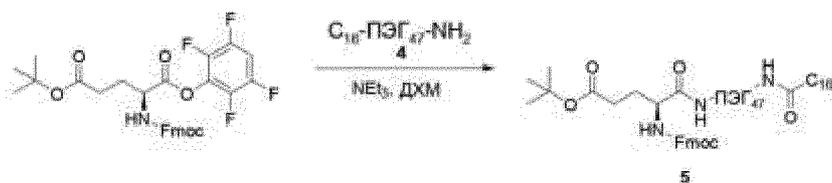
Синтез LP45-р



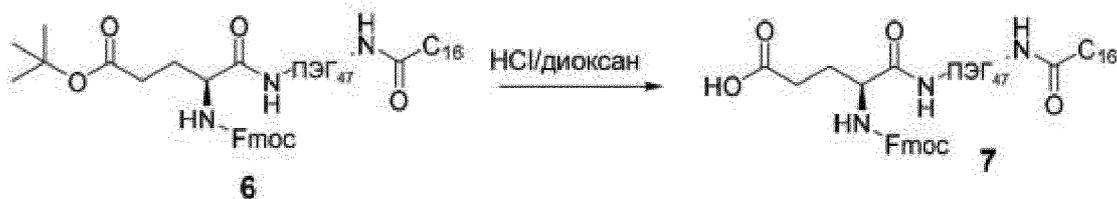
10 К пальмитиновой кислоте 1 (30 мг, 0,1170 ммоль) в растворе Вос-ПЭГ₄₇-NH₂ 2 (269 мг, 0,1170 ммоль) в ДМФ (2,0 мл) добавляли TBTU (45,1 мг, 0,1404 ммоль) и ДИПЭА (60 мкл). После перемешивания реакционной смеси в течение ночи добавляли воду и соединение 3 экстрагировали с использованием ДХМ:20% ТФЭ (трифторэтанол) и сушили над Na₂SO₄. После фильтрования растворитель выпаривали в вакууме досуха и соединение 3 очищали с помощью
15 флэш-хроматографии (ДХМ:20% MeOH).



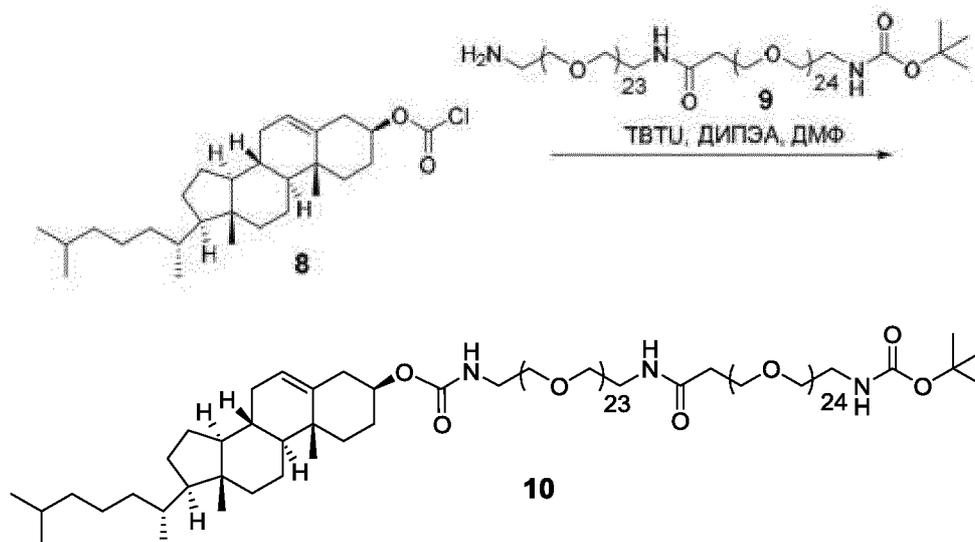
20 К соединению 3 добавляли 2 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и реакционную смесь перемешивали в безводной среде до завершения превращения по данным ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано для C₁₆-ПЭГ₄₇-NH₂: 2301 m/z, найдено: 2302.



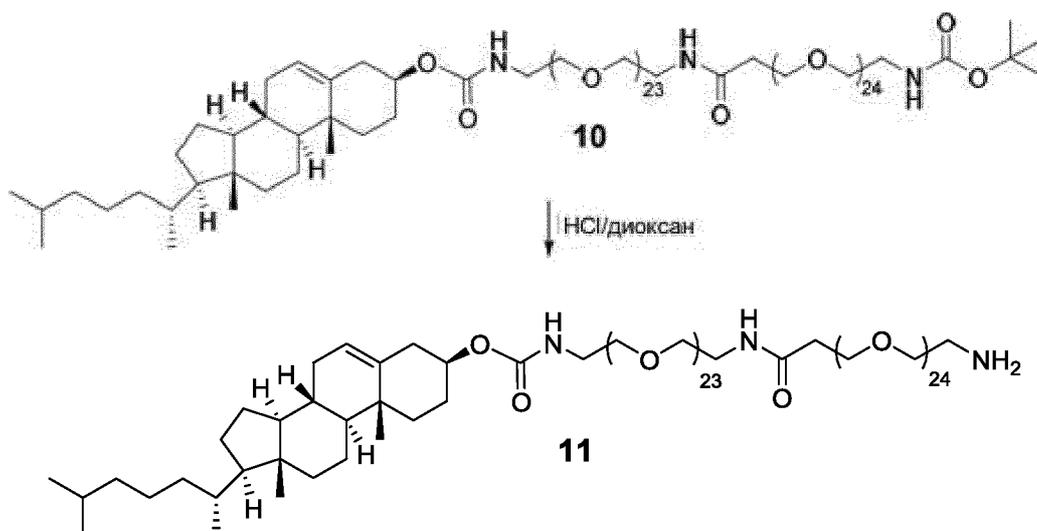
К Fmoc-Glu(OtBu)-Opfp 5 (50 мг, 0,0845 ммоль) в растворе C₁₆-ПЭГ₄₇-NH₂ 4 (206 мг, 0,0845 ммоль) в ДХМ (5,0 мл) при перемешивании добавляли NEt₃ (29 мкл). После завершения реакции растворитель выпаривали в вакууме досуха и неочищенное соединение 6 очищали с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:20% MeOH).



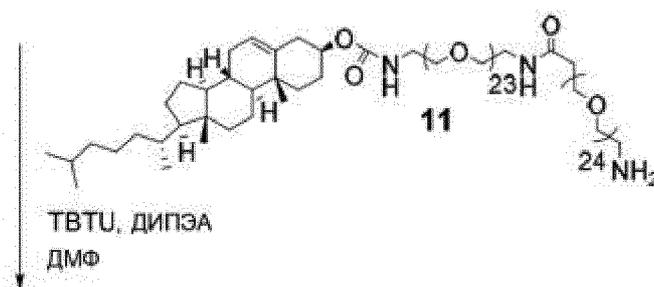
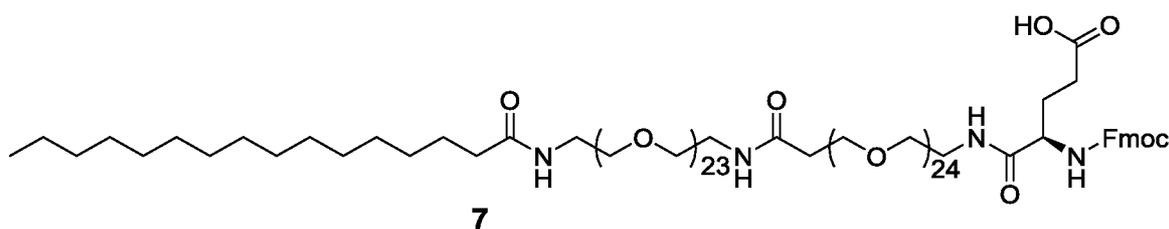
К соединению 6 добавляли 2 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и перемешивали в безводной среде до завершения превращения по данным ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 2866,0, найдено: 2867.



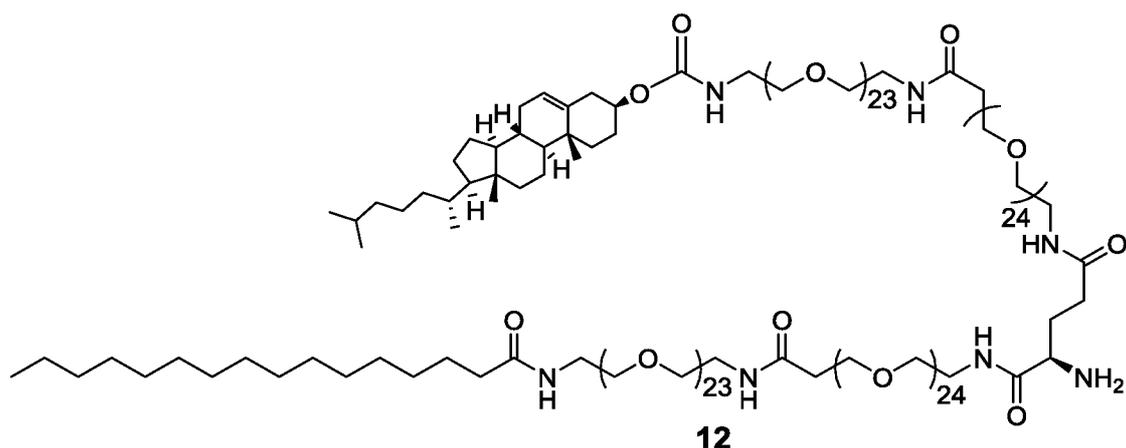
К раствору Вос-ПЭГ₄₇-NH₂ 9 (269 мг, 0,1170 ммоль), ТВТУ (45,1 мг, 0,1404 ммоль) и ДИПЭА (60 мкл) в ДМФ (2,0 мл) при перемешивании добавляли соединение 8 (30 мг, 0,1170 ммоль). После перемешивания полученной суспензии в течение ночи добавляли воду и продукт экстрагировали с использованием ДХМ:20% ТФЭ и сушили над Na₂SO₄. После фильтрования растворитель выпаривали в вакууме досуха и соединение 10 очищали с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:20% MeOH). [M+H]⁺, рассчитано: 2614,32 m/z, найдено: 2615,32.



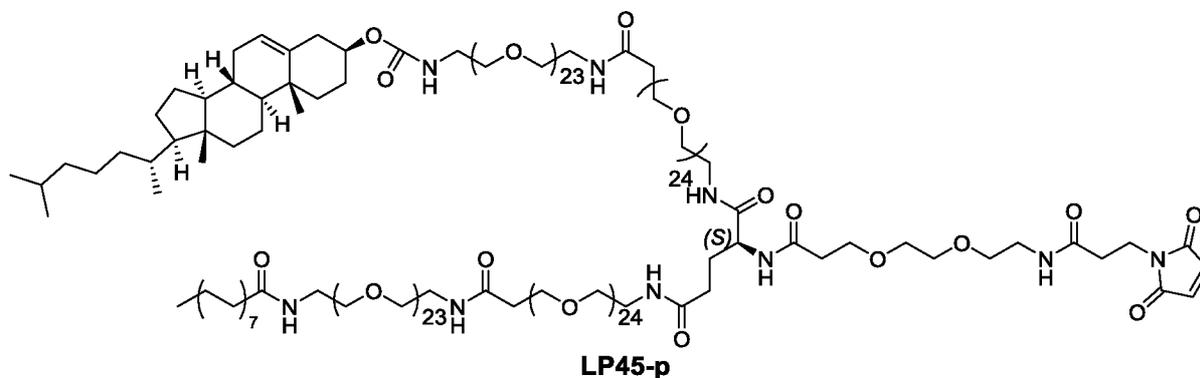
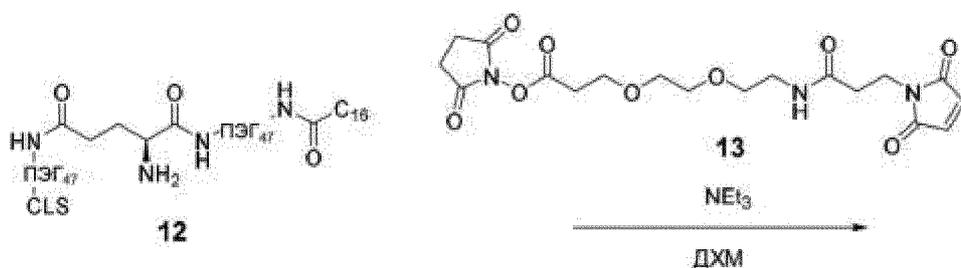
К соединению 10 добавляли 2 мл 4 н. раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали в безводной среде до завершения превращения. Продукт 11 использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.



15



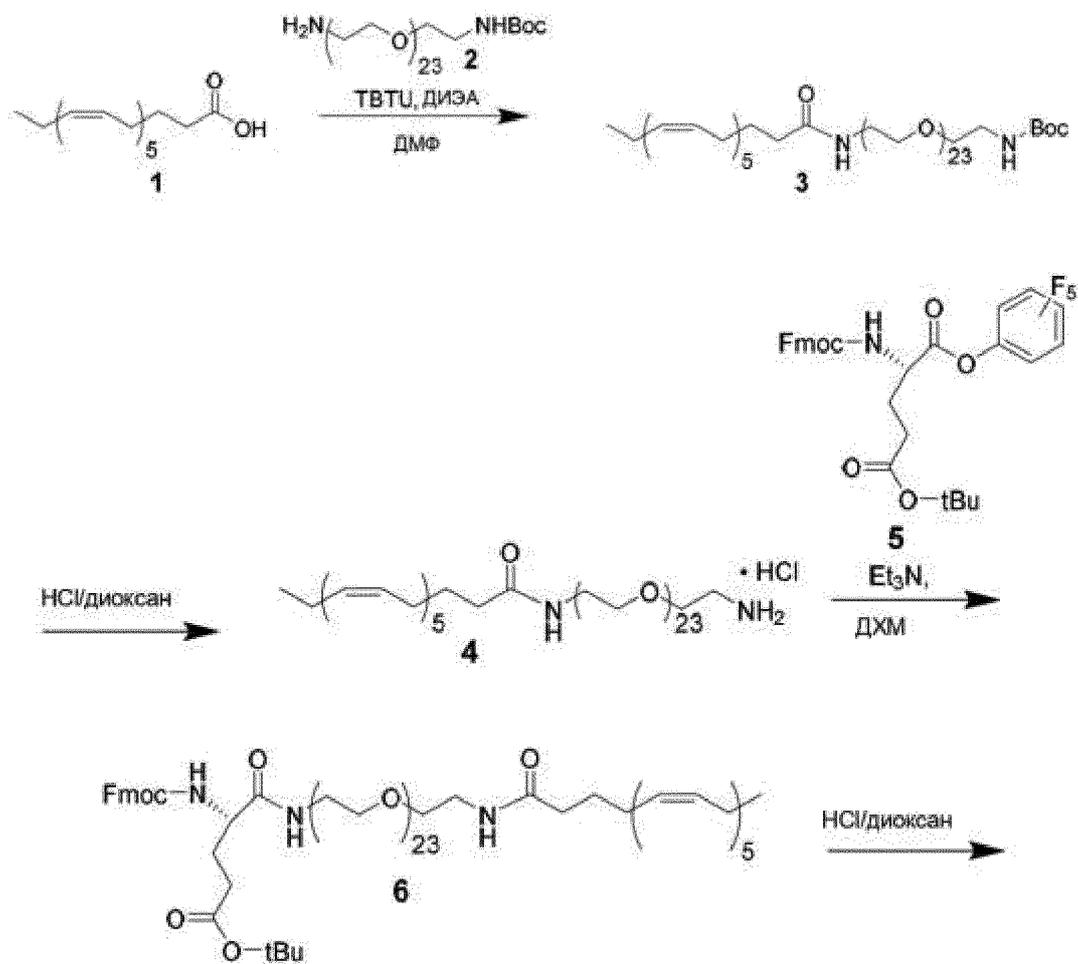
К соединению 7 (100 мг, 0,0375 ммоль) и раствору соединения 11 (98 мг, 0,1914 ммоль) в ДМФ (5,0 мл) добавляли ТВТУ (14,4 мг, 0,045 ммоль) и ДИПЭА (20 мкл). После перемешивания полученной суспензии в течение ночи добавляли воду и экстрагировали с использованием ДХМ:20% ТФЭ и сушили над Na_2SO_4 . После фильтрования растворитель выпаривали в вакууме досуха и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:20% MeOH). К нему добавляли 2 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и реакционную смесь перемешивали в безводной среде до завершения превращения по данным ЖХ-МС и получали соединение 12. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 5134,26 m/z, найдено: 5135.

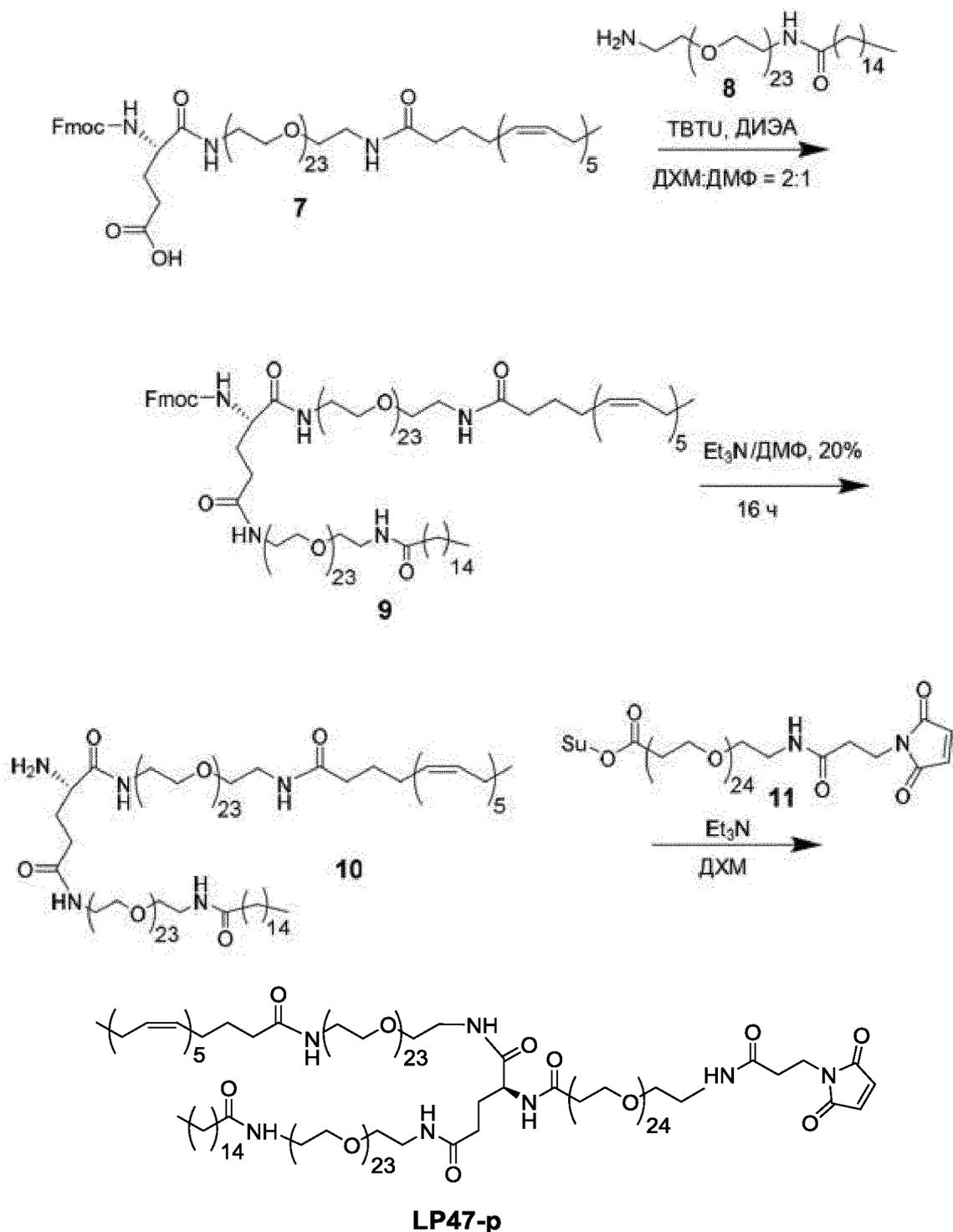


К раствору соединения 13 (10 мг, 0,0235 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 12 (120 мг, 0,0235 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (17 мкл, 0,1175 ммоль, 5,0 экв.).

Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. LP45-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-17% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+6H]^+$, рассчитано: 5474,38, найдено: 5475,01.

5 Синтез LP47-p





5 Твердый TBTU (50 мг, 0,156 ммоль) добавляли к раствору содержащего защитную группу Fmoc ПЭГ₂₃-амина 2 (Quanta Biodesign Limited, 150 мг, 0,13 ммоль), эйкозапентаеновой кислоты 1 (39 мг, 0,13 ммоль) и ДИЭА (68 мкл, 0,39 ммоль) в ДМФ (9 мл). Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком для растворения твердых веществ и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток дважды выпаривали с

толуолом, остаток растворяли в хлороформе (50 мл), промывали с помощью NaHCO_3 (2×10 мл) и рассолом (10 мл). Продукт сушили (Na_2SO_4), концентрировали в вакууме, и очищали с помощью CombiFlash® (SiO_2) с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-80%, 20 мин. Группу Вос удаляли с помощью 4 М раствора HCl в диоксане и получали гидрохлорид 4. Рассчитано: $\text{MM} = 1357,76$, $(\text{M} + 2)/2 = 679,88$. Найдено: MS (ЭР, в режиме положительных ионов): 1358,29 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 679,77 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$.

Гидрохлорид 4 (167 мг, 0,123 ммоль), сложный пентафторфениловый эфир 5 (73 мг, 0,123 ммоль) и Et_3N (43 мкл, 0,31 ммоль) в ДХМ (5 мл) перемешивали в течение 2 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток смешивали с SiO_2 (1 г) и помещали в CombiFlash®. Продукт 6 очищали с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-50%, 25 мин. Выход: 169 мг. Рассчитано: $\text{MM} = 1765,23$, $\text{M} + 18 = 1783,23$, $(\text{M} + 1 + 18)/2 = 892,12$. Найдено: MS (ЭР, в режиме положительных ионов): 1782,78 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$, 891,97 $[\text{M} + \text{H} + \text{NH}_4]^{2+}$.

Продукт 6 обрабатывали раствором HCl в диоксане и получали свободную кислоту 7 и ее непосредственно использовали на следующей стадии. Рассчитано: $\text{MM} = 3002,84$, $(\text{M} + 2 \times 18)/2 = 1519,42$, $(\text{M} + 3 \times 18)/3 = 1018,95$. Найдено: MS (ЭР, в режиме положительных ионов): 1519,39 $[\text{M} + 2\text{NH}_4]^{2+}$, 1019,17 $[\text{M} + \text{H} + 2\text{NH}_4]^{3+}$.

Производное 7 (47 мг, 0,028 ммоль), гидрохлорид 8 (42 мг, 0,03 ммоль), ТВТУ (11 мг, 0,034 ммоль) и ДИЭА (18 мкл, 0,1 ммоль) в смеси ДХМ:ДМФ = 1:1 (8 мл) перемешивали в течение 3 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток 2 раза выпаривали с толуолом и твердое вещество суспендировали в CHCl_3 (50 мл). Суспензию дважды промывали с помощью 2% NaHCO_3 и рассолом. После концентрирования в вакууме продукт 9 очищали с помощью CombiFlash® (0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-70%, 35 мин.).

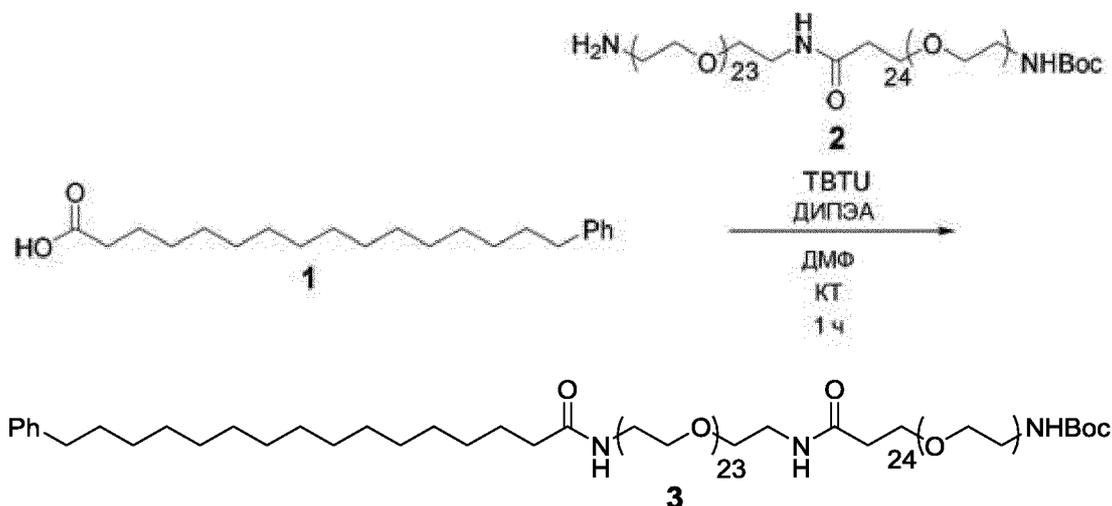
Продукт 9 (49 мг, 0,0162 ммоль) и Et_3N в ДМФ (20%, 3 мл) перемешивали в течение 16 ч, содержащий Et_3N растворитель удаляли в вакууме, остаток 3 раза выпаривали с толуолом и получали амин 10 с удаленной защитной группой, который непосредственно использовали на следующей стадии.

Амин 10 (45 мг, 0,0162 ммоль) и смесь сложного эфира NHS 11 (21 мг, 0,0147 ммоль) и Et_3N (6 мкл, 0,041 ммоль) в ДХМ (4 мл) перемешивали в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме и продукт LP47-р очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы ДХМ: 20% MeOH в ДХМ,

градиентный режим: 0-100%, 40 мин. Рассчитано: $MM = 4060,07, (M + 3 \times 18)/3 = 1371,36, (M + 4 \times 18)/4 = 1033,02$. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): $1371,76 [M + 3NH_4]^{3+}, 1033,70 [M + 4NH_4]^{4+}$.

Синтез LP48-p

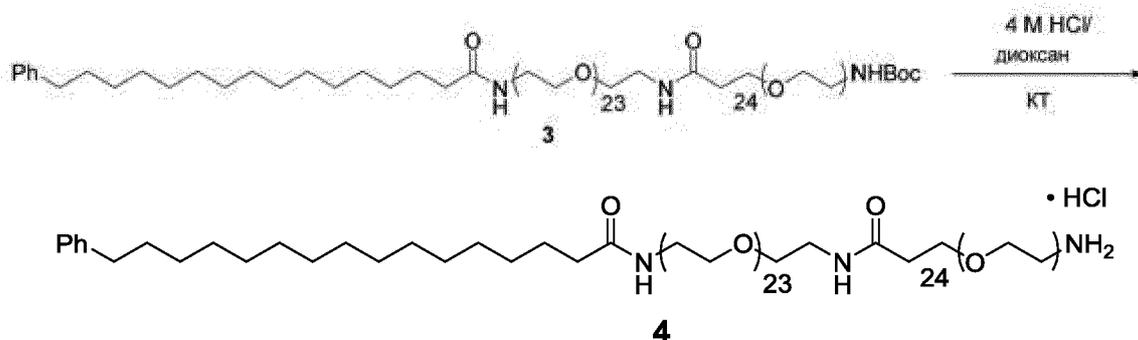
5



10

К раствору соединения 1 (27,5 мг), ТВТУ (26,6 мг) и ДИЭА (0,022 мл) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 2 (173 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки, содержащей в качестве неподвижной фазы 12 г силикагеля, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (10-100%) в течение 20 мин, при этом соединение 3 элюировалось при 66% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M + H]^+$, рассчитано: 2615,65 m/z, найдено: 1326,52 (+2/2, +H₂O) m/z.

15

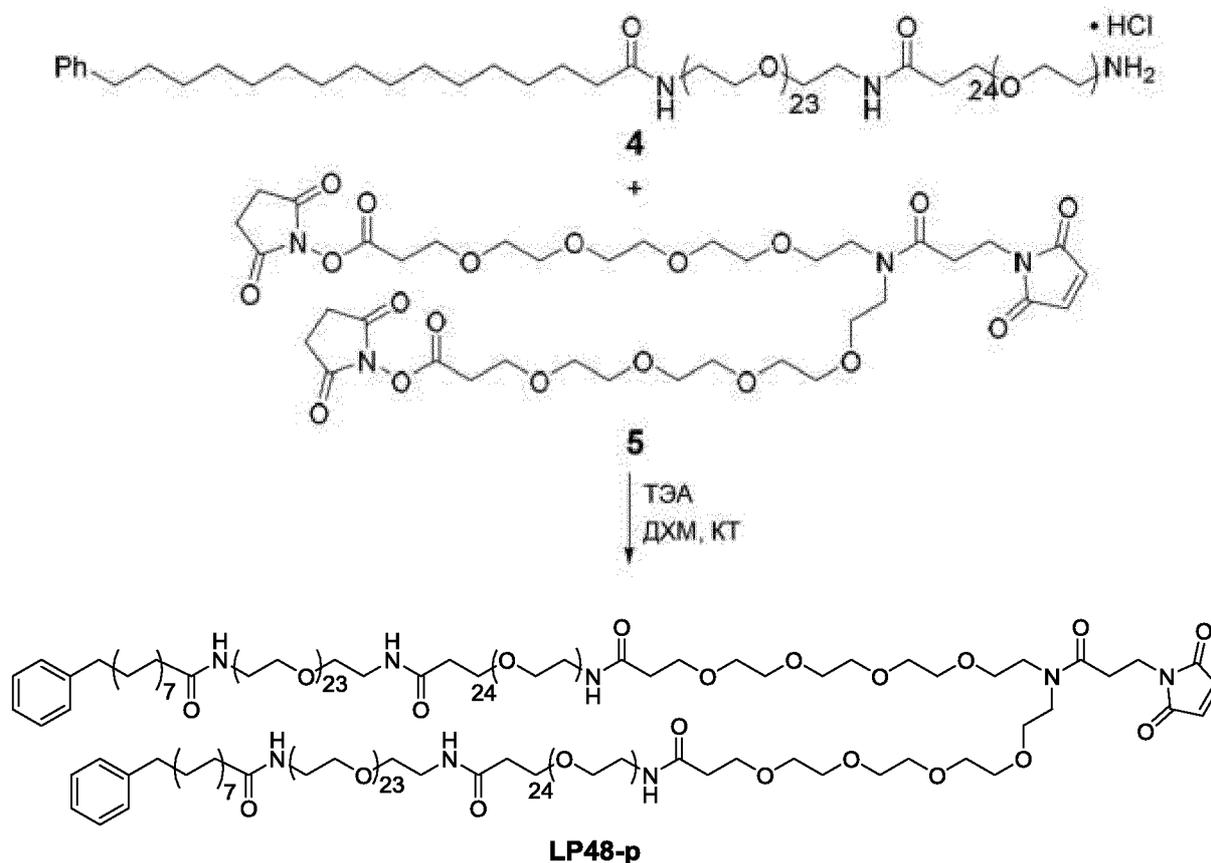


20

К соединению 3 (56,7 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (7,9 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до

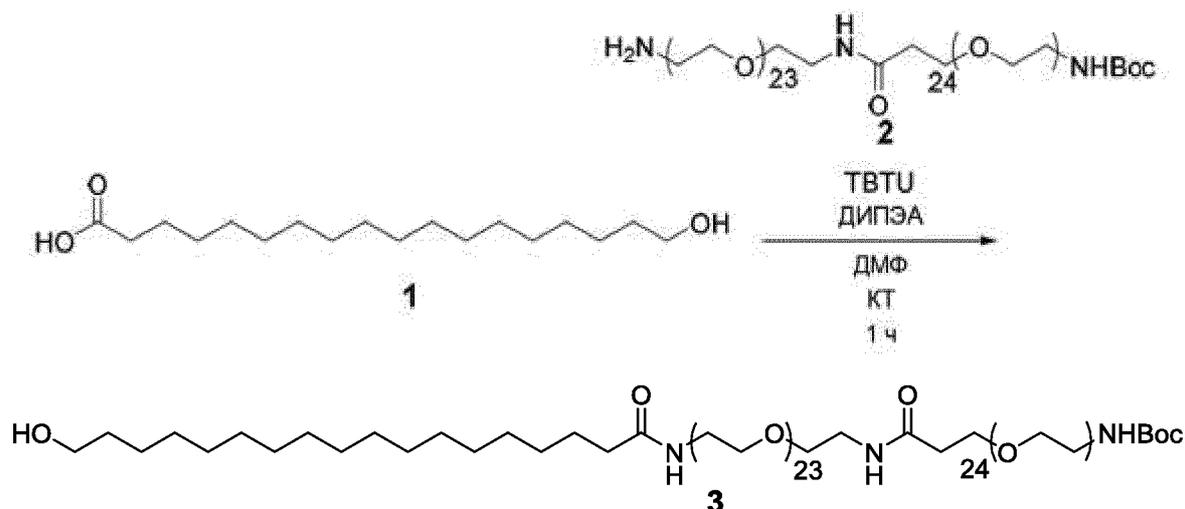
тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли со смесью PhMe/MeOH и концентрировали в высоком вакууме в течение ночи и получали соединение 4 в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2515,60 m/z, найдено: 1259,91 (+2/2) m/z.

5



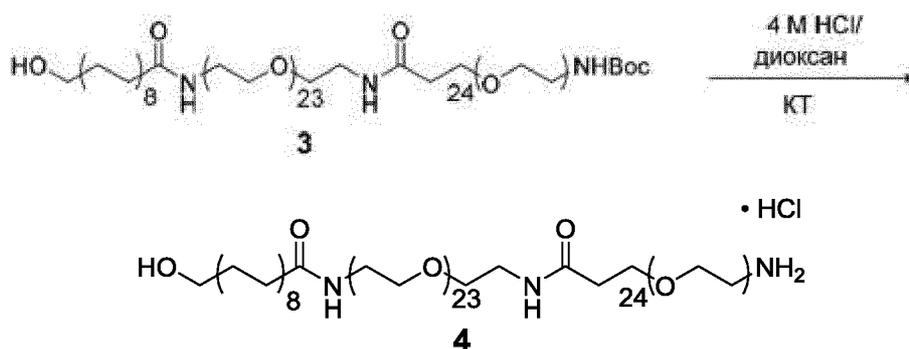
10 При комнатной температуре и при продувке с помощью N_2 (газообразный) получали раствор соединения 4 (55,4 мг) и NEt_3 (0,015 мл) в безводном ДХМ. Затем медленно добавляли соединение 5 (8,9 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки, содержащей в качестве неподвижной фазы 4 г силикагеля, в градиентном режиме с использованием 0-15 20% MeOH/ДХМ (от 10% В до 100% В) в течение 20 мин, при этом соединение LP48-p элюировалось при 100% В. LP48-p концентрировали и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5558,48 m/z, найдено: 1152,98 (+5/5, +H₂O) m/z.

Синтез LP49-p



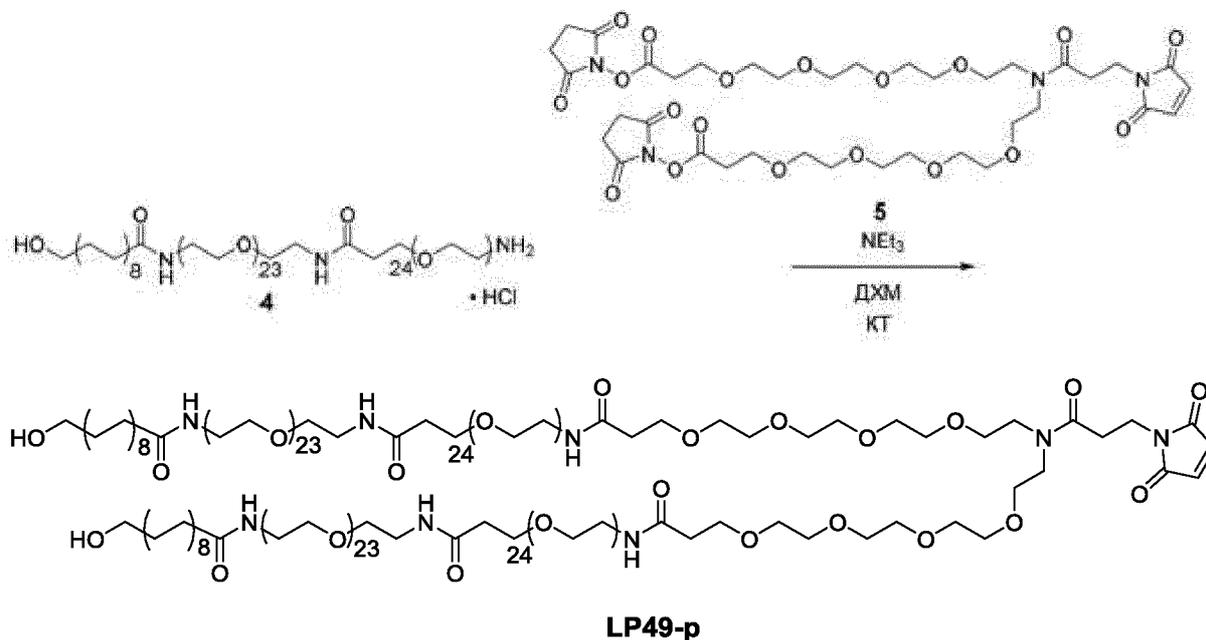
К раствору соединения 1 (31,3 мг), ТВТУ (33,4 мг) и ДИЭА (0,023 мл) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 2 (199 мг).

- 5 Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (10-100%) в течение 30 мин, при этом
- 10 соединение 3 элюировалось при 57% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2583,65 m/z, найдено: 1311,03 (+2/2, +H₂O) m/z.



- 15 К соединению 3 (70 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (9,9 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли с PhMe и концентрировали в вакууме в течение ночи и получали соединение 4 в виде

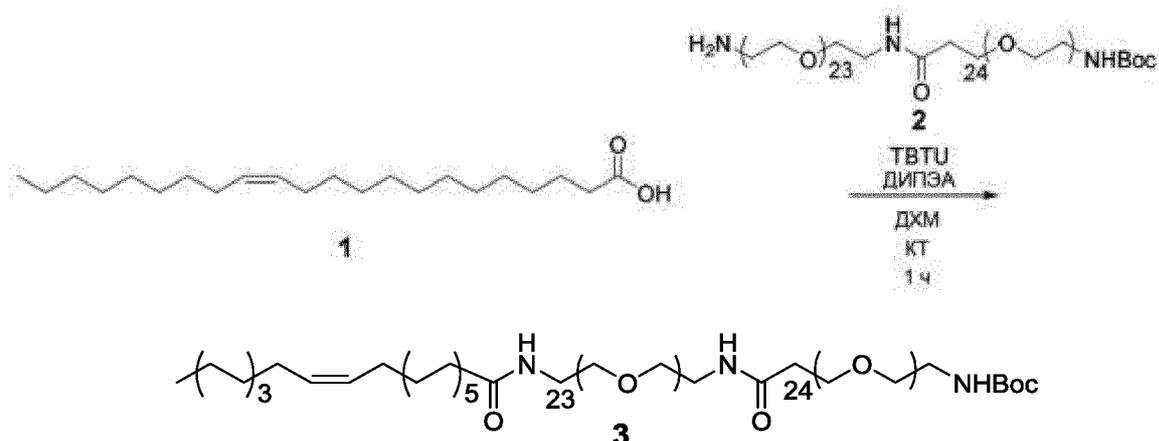
масла. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2483,59 m/z, найдено: 841,32 (+2/2, +H₂O) m/z.



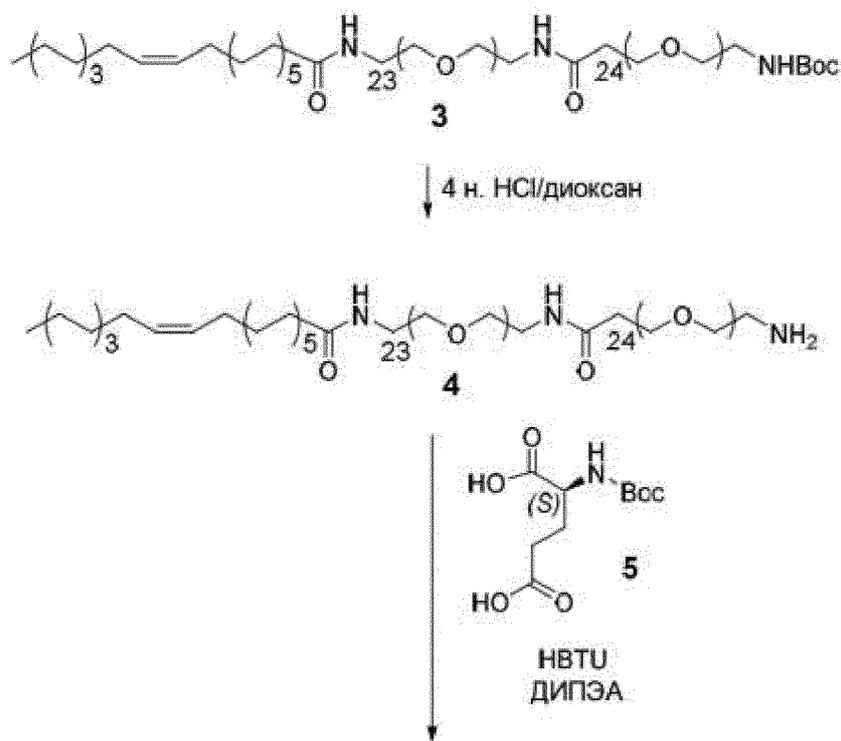
5 При комнатной температуре и при продувке с помощью N₂ (газообразный) получали раствор соединения 4 (68,3 мг) и NEt₃ (13,7 мг) в безводном ДХМ. Затем медленно добавляли соединение 5 (11,2 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали

10 с помощью CombiFlash® с использованием колонки, содержащей в качестве неподвижной фазы 4 г силикагеля, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (от 10% В до 100% В) в течение 20 мин, при этом соединение LP49-p элюировалось при 100% В. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5594,97 m/z, найдено: 1418,68 (+4/4, +H₂O) m/z.

15 Синтез LP53-p



К раствору соединений 1 (706 мг) и 2 (4,00 г) в ДХМ при комнатной температуре добавляли ТВТУ (670 мг) и затем ДИПЭА (0,908 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали для выделения. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием инжестирования жидкости, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 40 мин. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток.



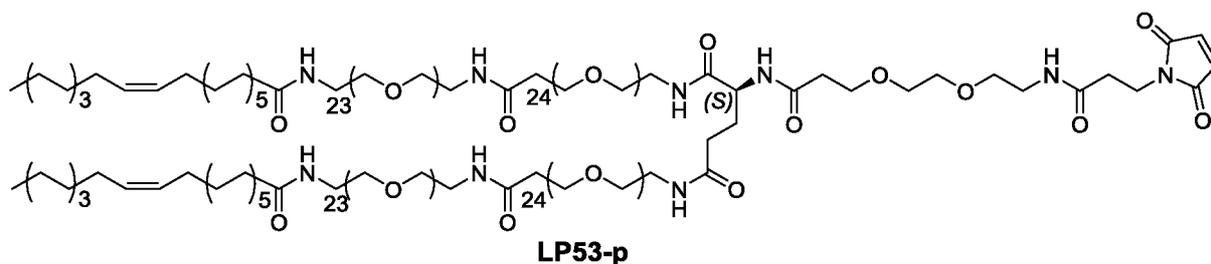
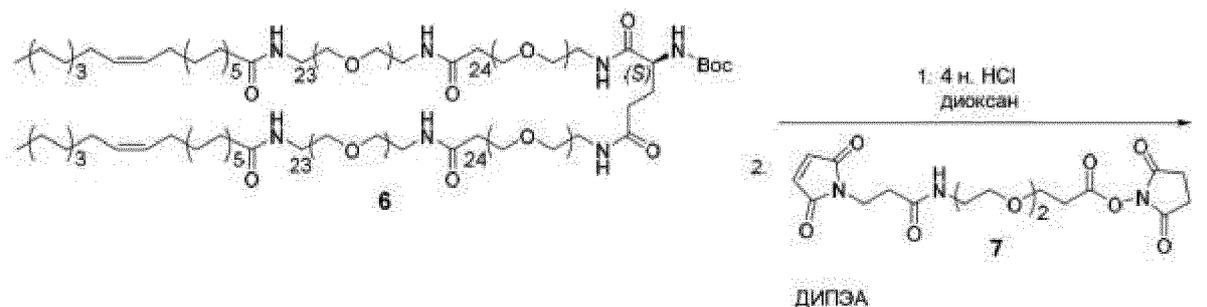
10

К соединению 3 (4,00 г) при комнатной температуре добавляли 25 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ, затем добавляли соединение 5 (189 мг), НВТУ (588 мг) и

15

ДИПЭА (0,797 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение.

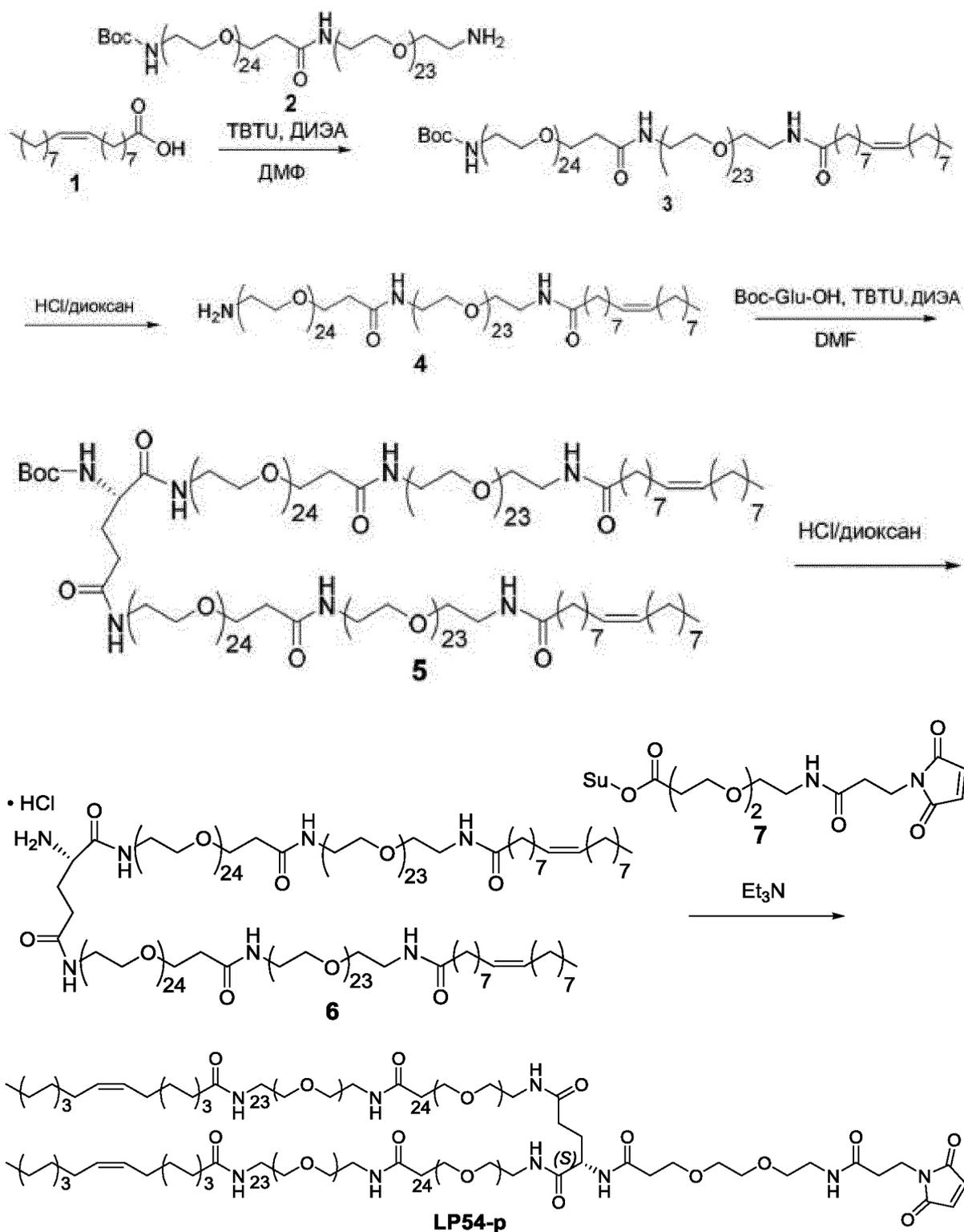
5 Реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% В) и получали соединение 6.



10 К соединению 6 (2,00 г) при комнатной температуре добавляли 20 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ, затем добавляли соединение 7 (170 мг) и ДИПЭА (148 мг).
15 Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ (тонкослойная хроматография) не указывала на полное превращение.

Продукт LP53-p экстрагировали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% В).

20 Синтез LP54-p



5

Олеиновую кислоту 1 (491 мг, 1,736 ммоль) производное Вос-амино-ПЭГ₄₇ 2, TBTU (670 мг, 2,086 ммоль) и ДИЭА (908 мкл, 5,21 ммоль) в ДМФ (50 мл) перемешивали в течение 4 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток 3 раза выпаривали с толуолом и остаток суспендировали в CHCl₃ (150 мл).

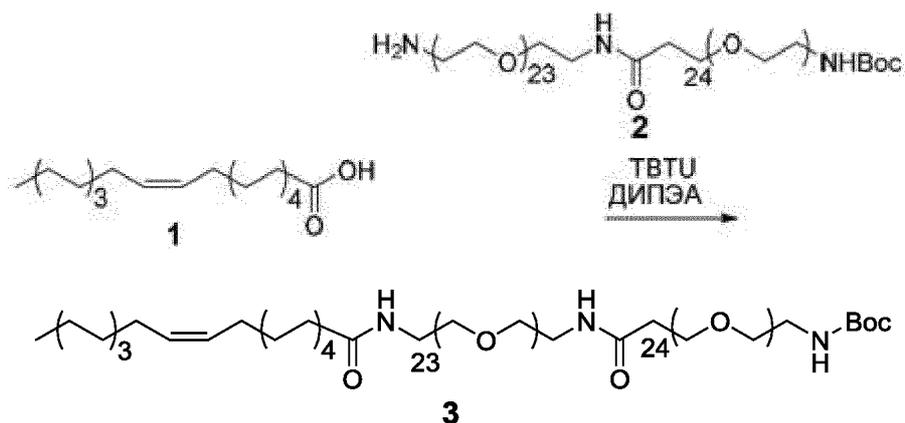
10 Полученную суспензию промывали с помощью H₂O, дважды 2% раствором

NaHCO₃, рассолом, обрабатывали безводным Na₂SO₄. Смесь концентрировали и получали продукт 3, который сушили в вакууме. Выход: 4,391 г. Рассчитано: ММ = 2566,24, (М + 2×18)/2 = 1301,12, (М + 3×18)/3 = 873,41. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1301,79 [М+2NH₄]²⁺, 874,08 [М+3NH₄]³⁺.

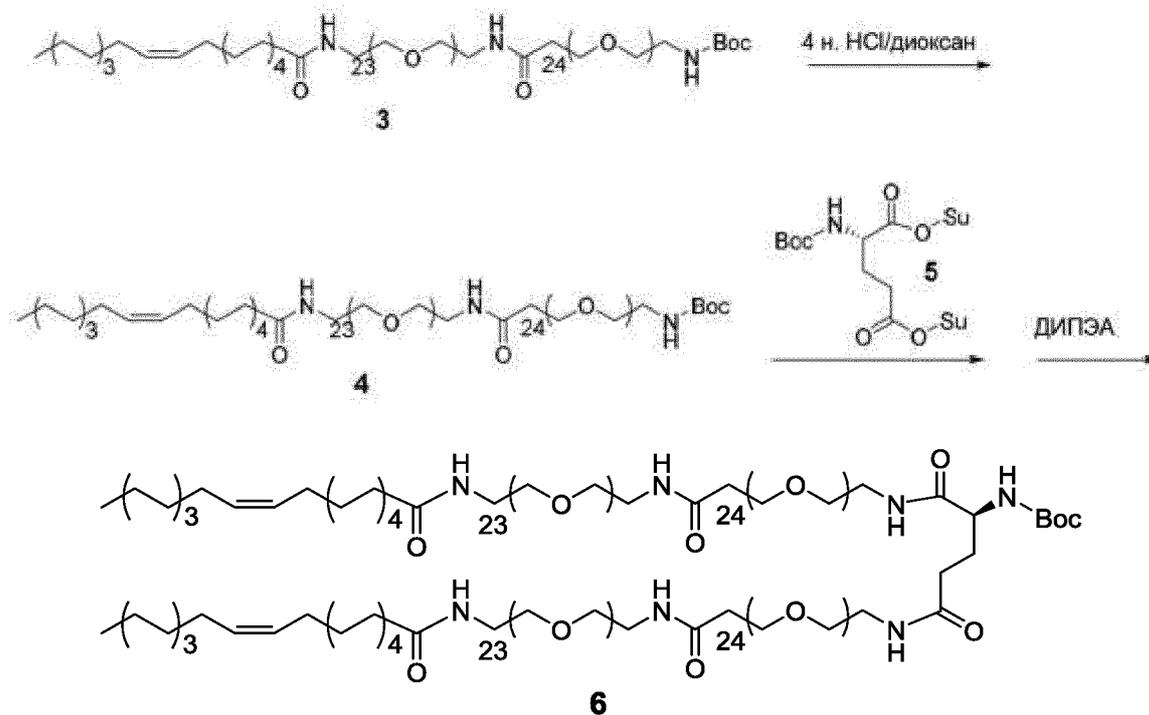
5 Соединение 3 превращали в амингидрохлорид 4 путем обработки охлажденным льдом 4 М раствором HCl в диоксане (5 мл) с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали и сушили в вакууме, оставшуюся HCl удаляли путем проводимого 2 раза выпаривания продукта с толуолом. Полученный
10 амингидрохлорид 4, Вос-Glu-OH (197 мг, 0,796 ммоль), ТВТУ (594 мг, 1,85 ммоль) и ДИЭА (1 мл, 5,74 ммоль) в смеси ДМФ:ДХМ = 1:1 (60 мл) перемешивали в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток 3 раза выпаривали с толуолом и остаток суспендировали в CHCl₃ (300 мл). Суспензию промывали с помощью H₂O, дважды 2% раствором NaHCO₃, рассолом, сушили
15 над безводным Na₂SO₄. Продукт 5 очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-100%, 45 мин. Выход: 2,72 г. Рассчитано: ММ = 5143,46, (М + 3×18)/3 = 1732,49, (М + 4×18)/4 = 1303,87. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1733,46 [М+3NH₄]³⁺, 1304,55 [М+4NH₄]⁴⁺.

20 Соединение 5 (2,72 г, 0,529 ммоль) в 4 М растворе HCl в диоксане (30 мл) перемешивали в течение 1 ч, растворитель удаляли в вакууме, остаток 2 раза выпаривали с толуолом и полученный сухой гидрохлорид 6, сложный эфир NHS 7 (212 мг, 0,5 ммоль) и Et₃N в ДХМ (45 мл) перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь 3 раза разбавляли с помощью CHCl₃, промывали с помощью
25 H₂O и рассолом, сушили (Na₂SO₄), концентрировали и продукт LP54-р очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-100%, 55 мин. Выход: 440 мг. Рассчитано: ММ = 5353,65, (М + 3×18)/3 = 1802,55, (М + 4×18)/4 = 1356,41. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1803,19 [М+3NH₄]³⁺, 1357,24 [М+4NH₄]⁴⁺.

30 Синтез LP55-р



К раствору соединений 1 (297 мг) и 2 (2,00 г) в ДХМ при комнатной температуре добавляли TBTU (307 мг) и затем ДИПЭА (0,454 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Продукт экстрагировали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, промывка рассолом) и сушили над Na₂SO₄. Неочищенное соединение 3 непосредственно использовали на следующей стадии.



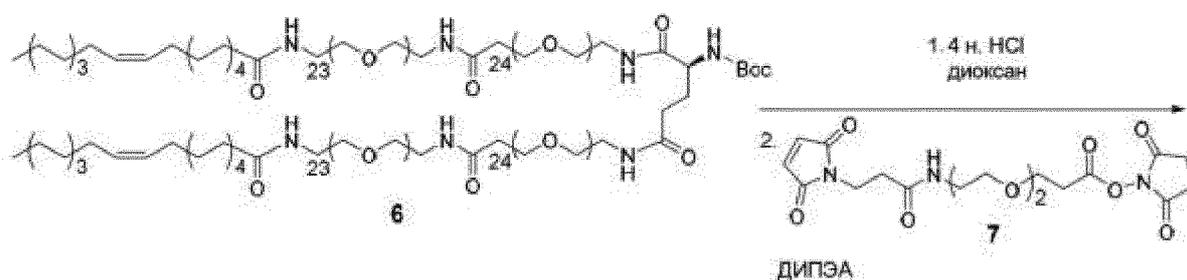
10

15

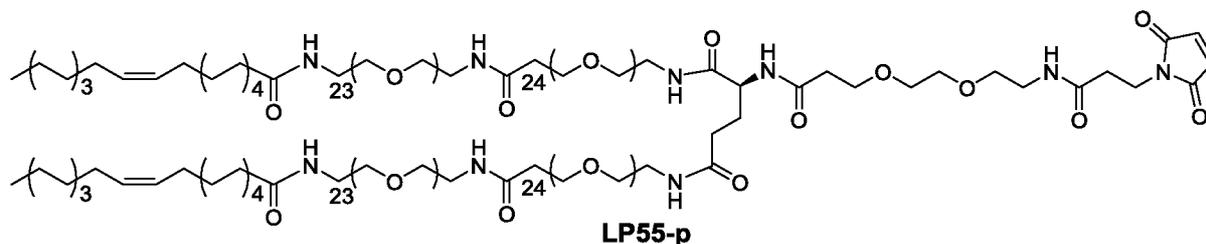
К соединению 3 (2,00 г) при комнатной температуре добавляли 20 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток

растворяли в ДХМ, затем добавляли ДИПЭА (0,0403 мл). затем шприцевым насосом (в течение 2-3 ч) медленно добавляли соединение 5 (160 мг в ДХМ). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

5 Продукт экстрагировали с использованием стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% B) и получали соединение 6.



10



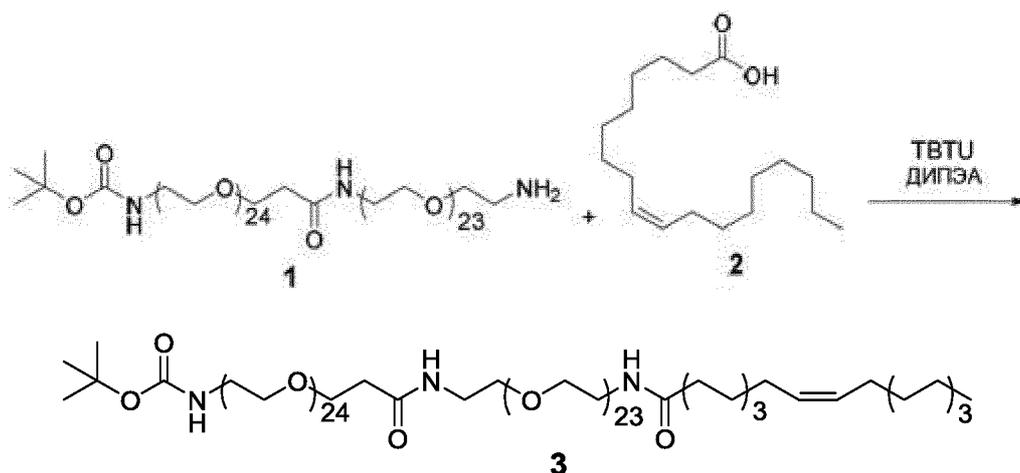
15

К соединению 6 (1,22 г) при комнатной температуре добавляли 10 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ, затем добавляли соединение 7 (105 мг) и ДИПЭА (148 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

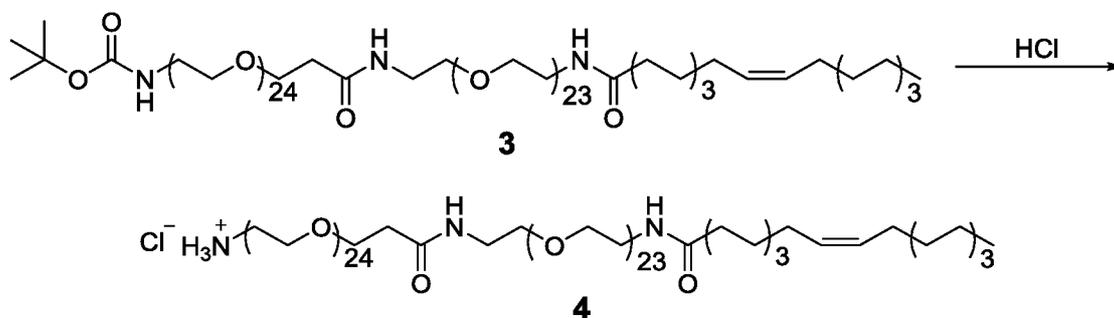
20

Продукт LP55-p экстрагировали с использованием стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% B).

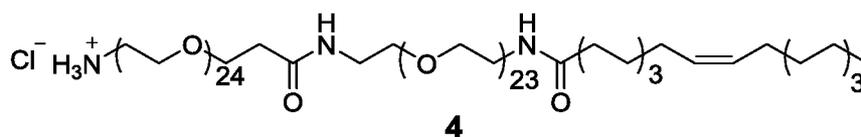
Синтез LP56-p



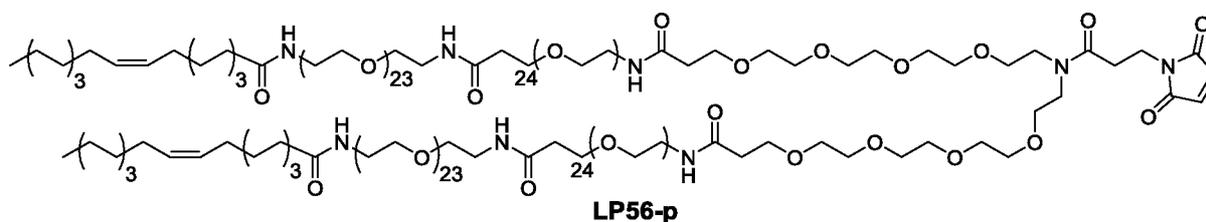
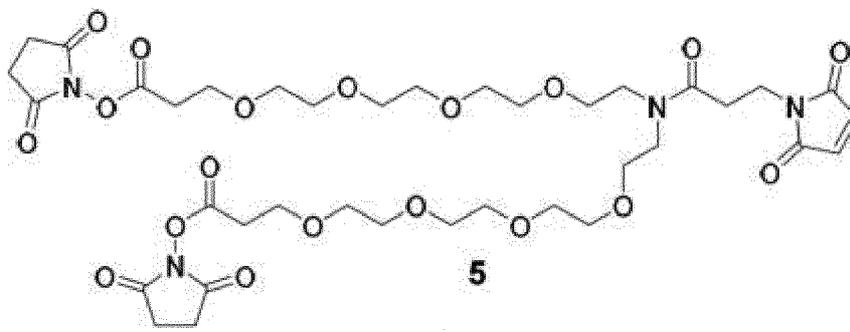
К раствору соединения 1 (150 мг, 0,0652 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (20 мг, 0,0717 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламина (0,034 мл, 0,195 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (3 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (25,1 мг, 0,0782 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч и затем концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1283,32, найдено: 1283,87.



К твердому соединению 3 (82 мг, 0,0320 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (0,4 мл, 1,597 ммоль, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и растворитель удаляли в вакууме. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1233,29, найдено: 1233,69.

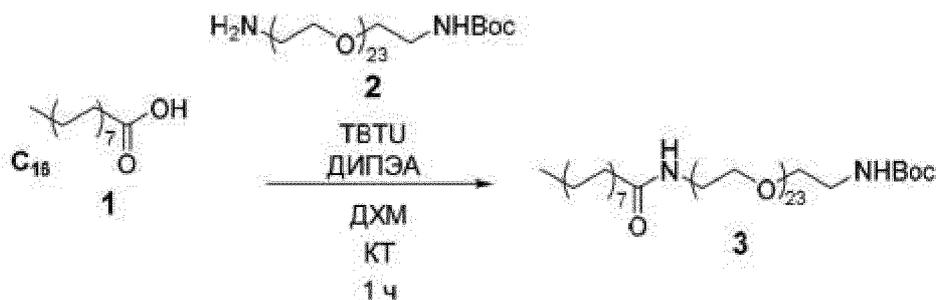


+

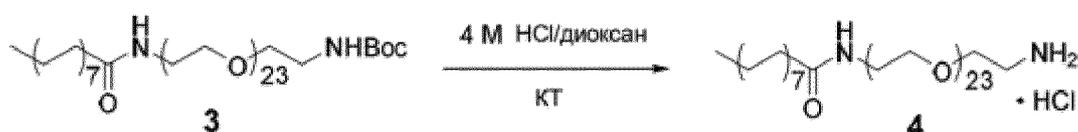


К раствору соединения 5 (13 мг, 0,0151 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 4 (77,7 мг, 0,0310 ммоль, 2,05 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,011 мл, 0,0757 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и растворитель удаляли концентрированием. LP56-p очищали с помощью CombiFlash при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+5H]^+/5$, рассчитано: 1112,49, найдено: 1112,34, $[M+6H]^+/6$, рассчитано: 927,24, найдено: 927,97.

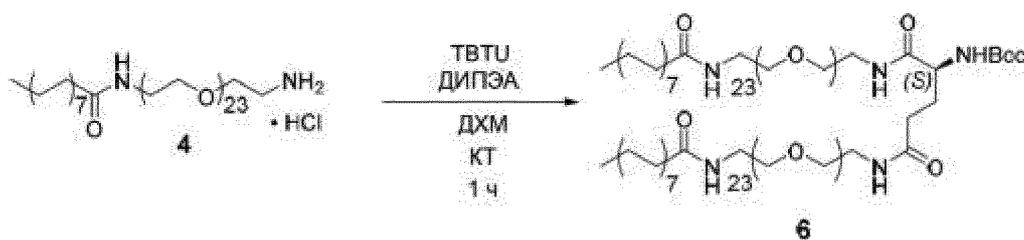
Синтез LP57-p



К раствору соединения 1 (787 мг), ТВТУ (985 мг) и ДИЭА (662 мг) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 2 (3,06 г). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь промывали с помощью NaHCO_3 и экстрагировали смесью 20% трифторэтанола/ДХМ. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки, содержащей в качестве неподвижной фазы 80 г силикагеля, в градиентном режиме с использованием от ДХМ до 20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 45 мин, при этом соединение 3 элюировалось при 28% В. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 1411,95 m/z, найдено: 724,80 (+2/2, +H₂O) m/z.

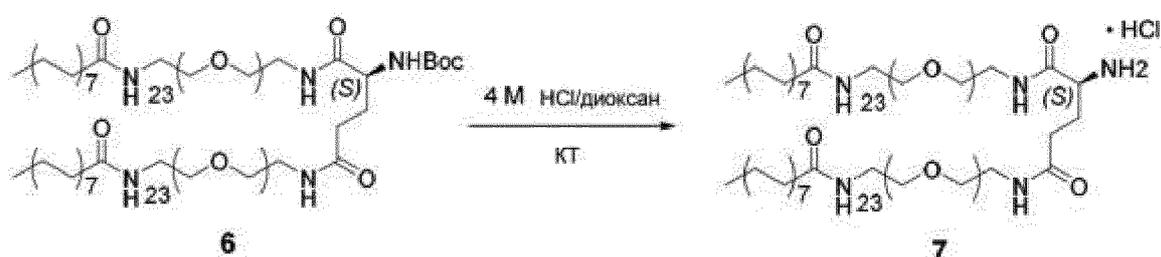


К соединению 3 (1,27 г) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (329 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли со смесью PhMe/MeOH и концентрировали в высоком вакууме в течение ночи и получали соединение 4 в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 1311,90 m/z, найдено: 657,59 (+2/2) m/z.



К раствору соединения 4 (1,22 г), ТВТУ (348 мг) и ДИЭА (0,3825 мл) в ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 5 (109 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь промывали с помощью NaHCO_3 , экстрагировали смесью 20% 2,2,2-трифторэтанола (ТФЭ)/ДХМ, промывали раствором NH_4Cl , сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием

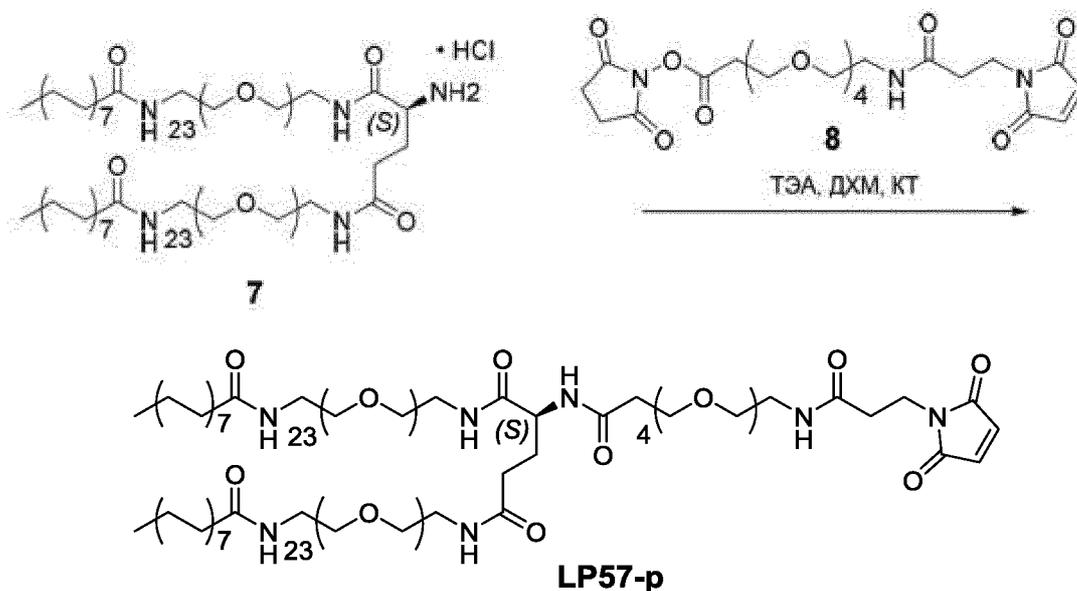
силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100%) в течение 30 мин, при этом соединение 6 элюировалось при 51% В. Чистые и неочищенные фракции собирали и концентрировали. Неочищенную фракцию повторно очищали с использованием от ДХМ до 20% MeOH/ДХМ (0-100% В), при этом соединение 6 элюировалось при 54% В и его собирали и концентрировали с получением чистых фракций. После концентрирования в вакууме получали соединение 6 в виде белого маслообразного остатка. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2833,89 m/z, найдено: 727,56 (+4/4, +H₂O) m/z.



10

К соединению 6 (130 мг) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (16,7 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли со смесью PhMe/MeOH и концентрировали в высоком вакууме в течение ночи и получали соединение 7 в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 2769,81 m/z, найдено: 694,07 (+ HCl, +4/4) m/z.

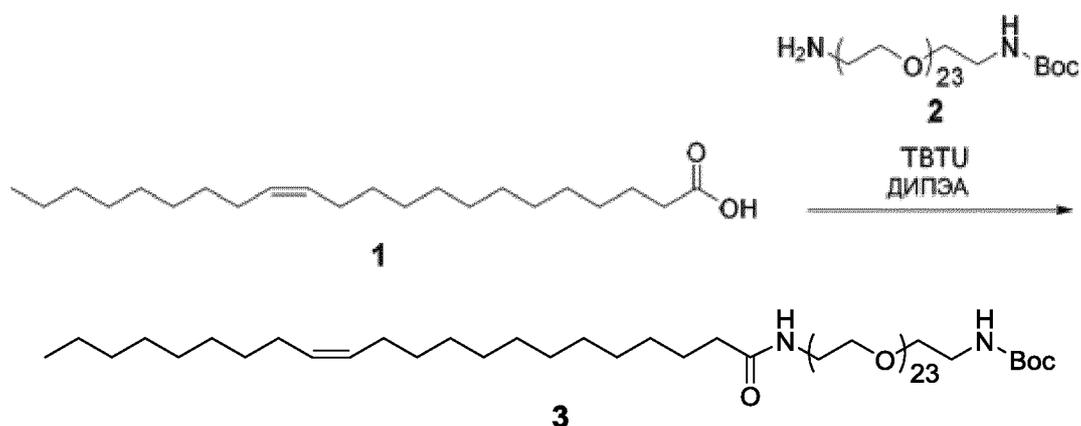
15



При комнатной температуре и при продувке с помощью N₂ (газообразный) получали раствор соединения 7 (127 мг) и ТЭА (0,026 мл) в безводном ДХМ. Затем медленно добавляли соединение 8 (24,8 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение.

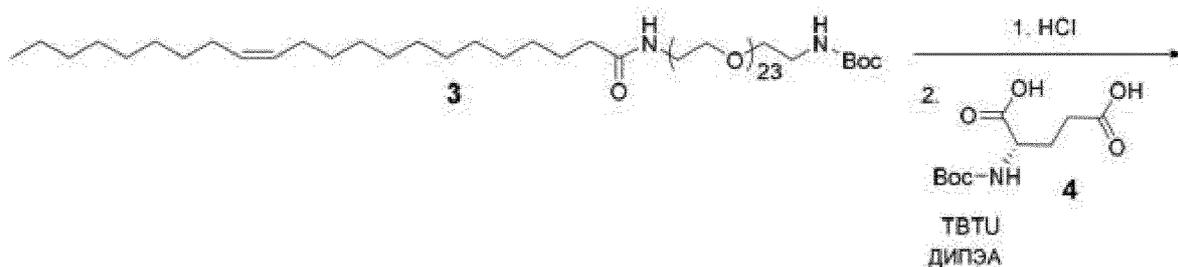
5 Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки, содержащей в качестве неподвижной фазы 12 г силикагеля, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (от 0% В до 100% В) в течение 20 мин, при этом соединение LP57-р элюировалось при 100% В. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 3132,00 m/z, найдено: 1584,89 (+3/3, +H₂O) m/z.

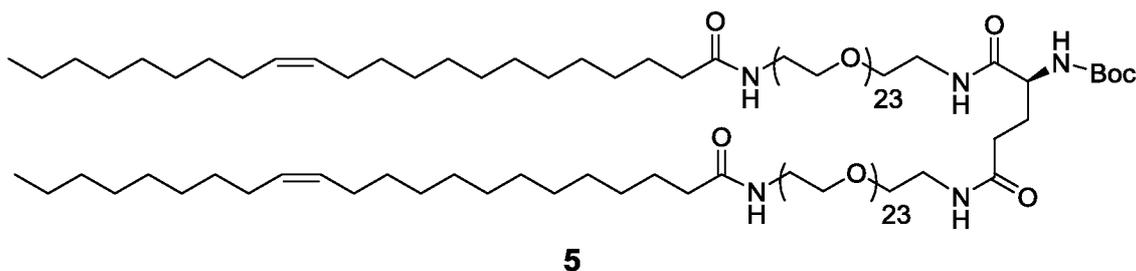
Синтез LP58-р



15 К раствору соединений 1 (606 мг) и 2 (2,00 г) в ДХМ при комнатной температуре добавляли TBTU (657 мг) и затем ДИПЭА (0,891 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием инжектирования жидкости, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-20

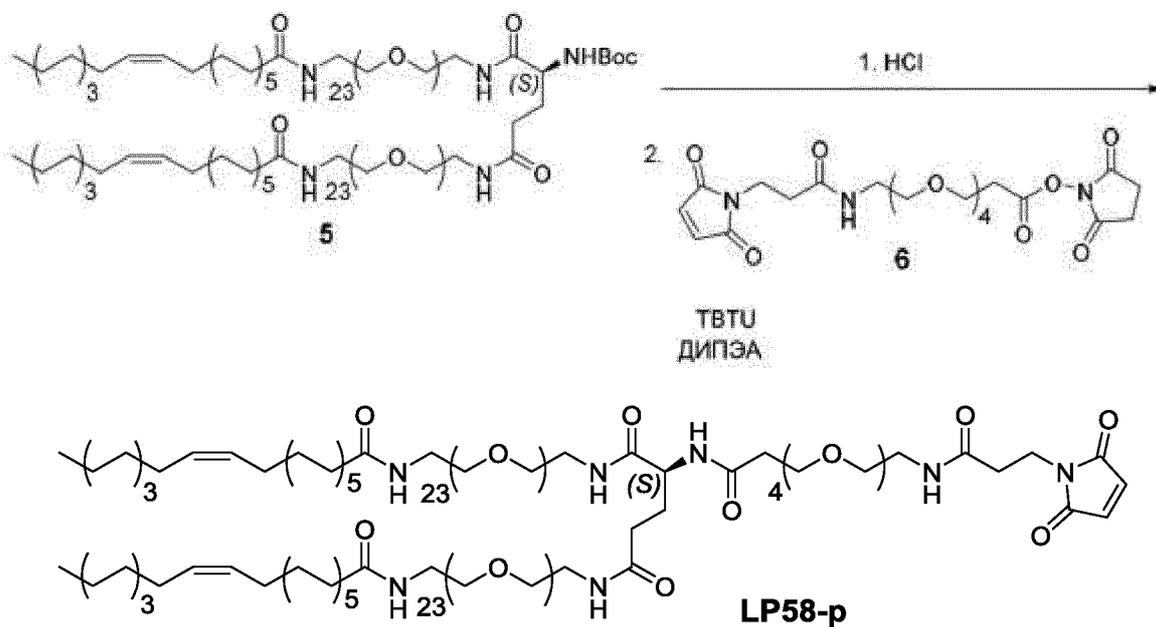
20 100%) в течение 40 мин. Соединение 3 концентрировали в вакууме и получали белый маслообразный остаток.





5 К соединению 3 (2,20 г) при комнатной температуре добавляли 5 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ, затем добавляли соединение 4 (171 мг), ТВТУ (567 мг) и ДИПЭА (0,770 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

10 Продукт экстрагировали с использованием стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% B).

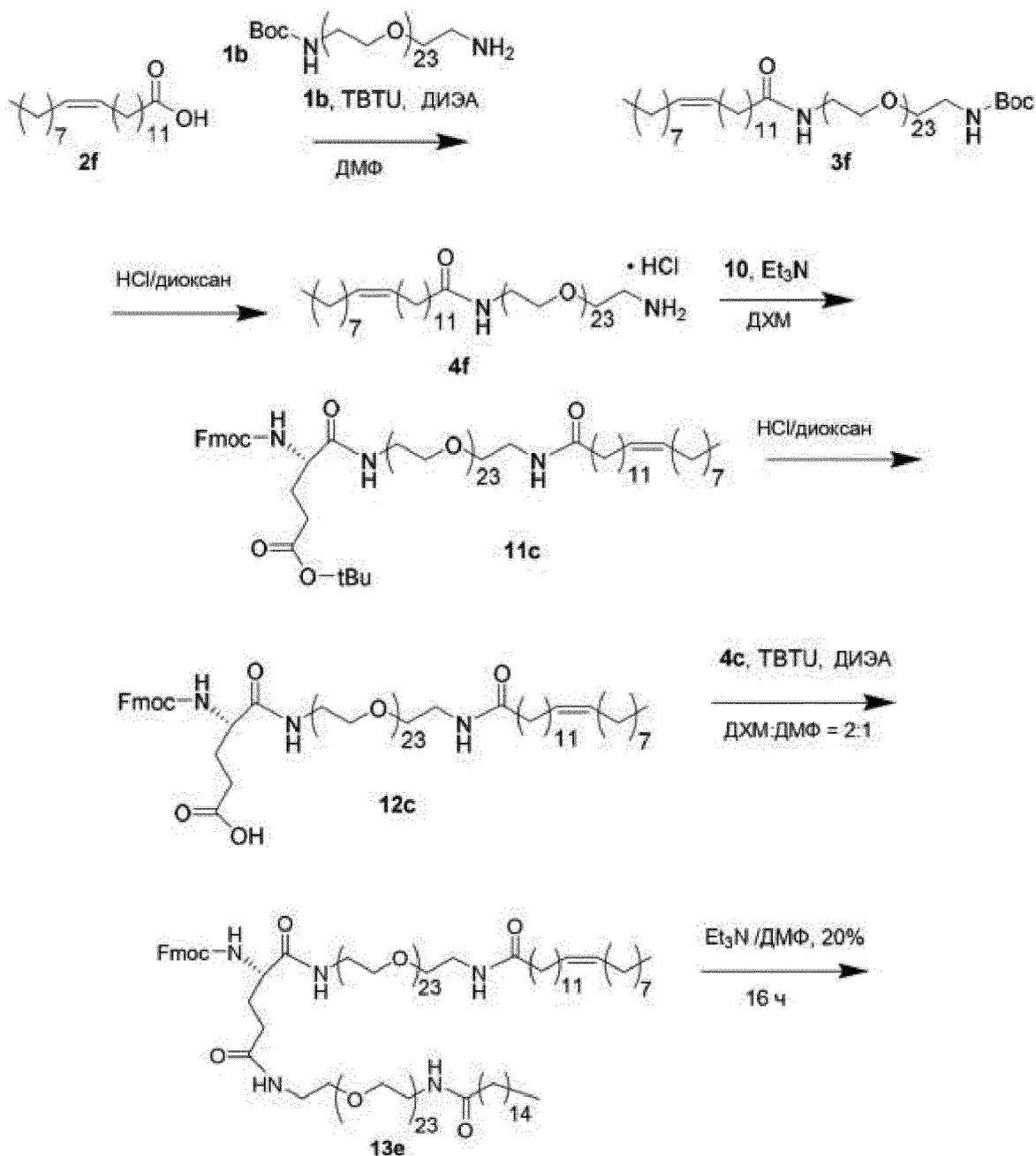


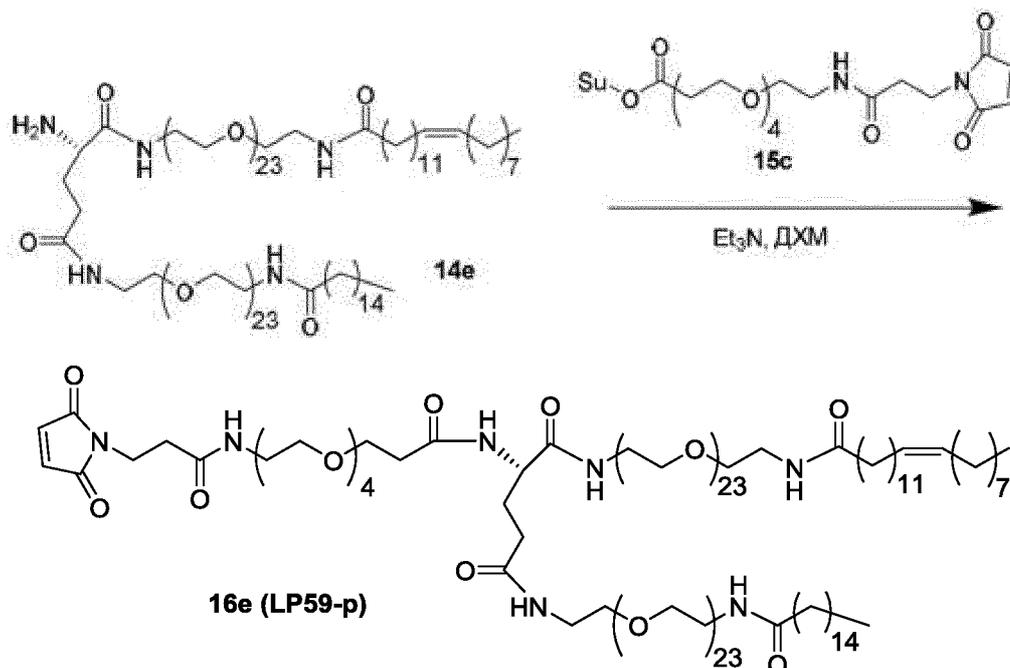
15 К соединению 5 (1,34 г) при комнатной температуре добавляли 10 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ, затем добавляли соединение 6, ТВТУ (172 мг) и ДИПЭА

(0,234 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

Продукт LP58-р экстрагировали с использованием стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% В).

Синтез LP59-р





Эруктовую кислоту **2f** (587 мг, 1,736 ммоль) производное Вос-амино-ПЭГ₄₇ **1b**, ТВТУ (670 мг, 2,086 ммоль) и ДИЭА (908 мкл, 5,21 ммоль) в ДМФ (50 мл) перемешивали в течение 4 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток 3 раза выпаривали с толуолом и остаток суспендировали в CHCl_3 (150 мл).
Полученную суспензию промывали с помощью H_2O , дважды 2% раствором NaHCO_3 , рассолом и обрабатывали безводным Na_2SO_4 . Продукт **3f** выделяли, концентрировали и сушили в вакууме. Выход: 4,391 г. Рассчитано: $\text{MM} = 1494,00$, $\text{M}+18 = 1512,00$, $(\text{M} + 2 \times 18)/2 = 765,00$. Найдено: MC (ЭР, в режиме положительных ионов): $1512,53 [\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $765,72 [\text{M}+2\text{NH}_4]^{2+}$.

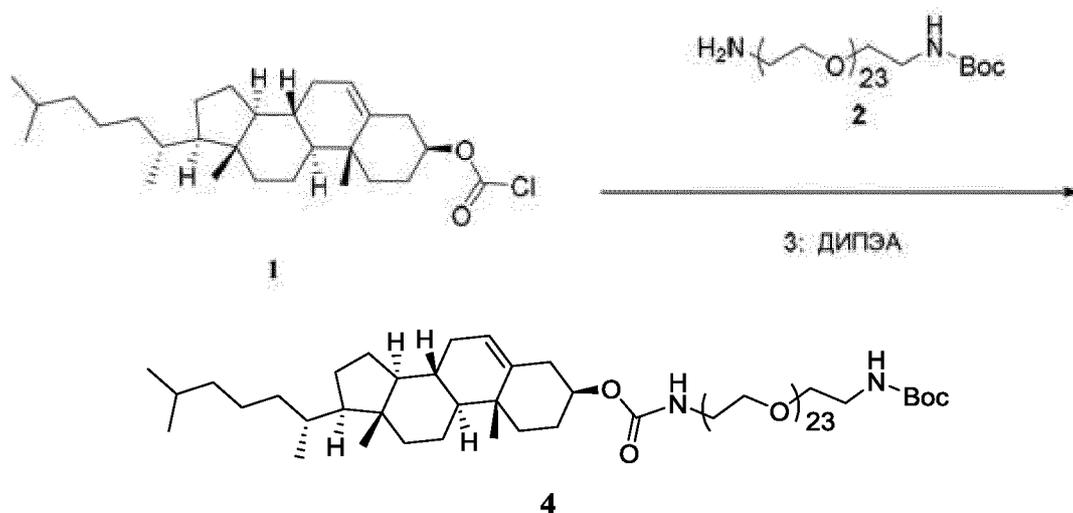
Защитную группу Вос удаляли с использованием 4 М раствора HCl в диоксане и получали гидрохлорид **4f** (1,192 г, 0,834 ммоль), который непосредственно использовали на следующей стадии без очистки. Сложный пентафторфениловый эфир **10** (493 мг, 0,834 ммоль) и Et_3N (290 мкл, 2,084 ммоль) в ДХМ (30 мл) смешивали с гидрохлоридом **4f**. После перемешивания в течение 2 ч реакционную смесь разбавляли с помощью CHCl_3 (150 мл), промывали с помощью H_2O , 3% водным раствором NaHCO_3 и рассолом. Высушенный продукт **11c**, 1,539 г, непосредственно использовали на следующей стадии.

Соединение **11c** (1,539 г, 0,834 ммоль) в 4 М растворе HCl в диоксане (20 мл) перемешивали в течение 4 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток 2 раза выпаривали с толуолом и получали сухую кислоту с удаленной защитной

группой 12с (1,52 г, 0,827 ммоль). Эту кислоту, амингидрохлорид 4с (1,114 г, 0,827 ммоль, синтезировали так, как это описано выше для синтеза LP39), ТВТУ (318,6 мг, 0,992 ммоль) и ДИЭА (532 мкл, 3,05 ммоль) в смеси ДХМ:ДМФ = 1:2 (30 мл) перемешивали в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме, оставшийся ДМФ удаляли путем проводимого 3 раза дополнительного выпаривания с толуолом. Остаток суспендировали в CHCl_3 (150 мл), промывали с помощью H_2O , дважды 3% раствором NaHCO_3 и рассолом. После сушки над Na_2SO_4 продукт 13е концентрировали и очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы ДХМ:20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-100%, 55 мин. Выход: 1,429 г. Рассчитано: $\text{MM} = 3038,96$, $(\text{M} + 2 \times 18)/2 = 1537,48$, $(\text{M} + 3 \times 18)/3 = 1030,99$. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1537,97 $[\text{M} + 2\text{NH}_4]^{2+}$, 1031,66 $[\text{M} + 3\text{NH}_4]^{3+}$.

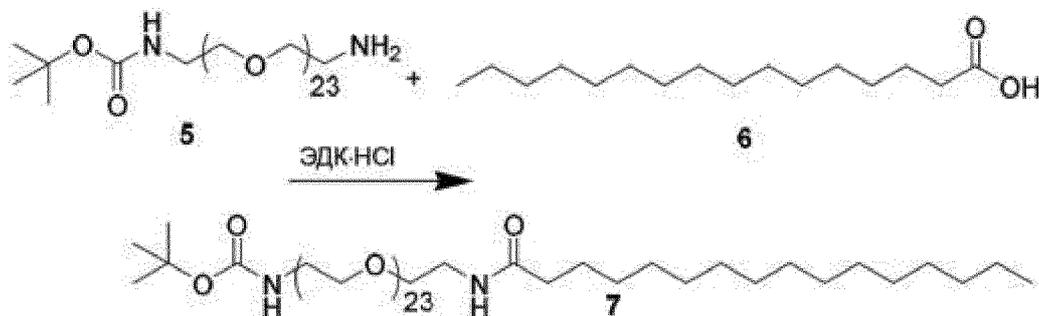
Из продукта 13е удаляли защитную группу Fmoc так, как это описано в приведенной выше методике получения соединения LP39. Продукт 14е сушили и вводили в реакцию со сложным эфиром NHS 15с так, как это описано в приведенной выше методике получения соединения LP39. Продукт 16е (LP59-p) выделяли путем очистки с помощью CombiFlash®. Рассчитано: $\text{MM} = 3215,13$, $(\text{M} + 2 \times 18)/2 = 1625,57$, $(\text{M} + 3 \times 18)/4 = 1089,71$. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1626,30 $[\text{M} + 2\text{NH}_4]^{2+}$, 1090,58 $[\text{M} + 3\text{NH}_4]^{3+}$.

20 Синтез LP60-p

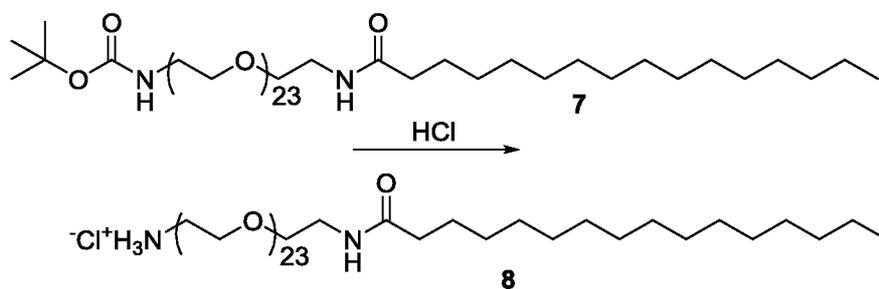


К раствору соединений 1 (278 мг) и 2 (1,00 г) в ДХМ добавляли соединение 3 (ДИПЭА, 0,223 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение соединения 2. Продукт экстрагировали с

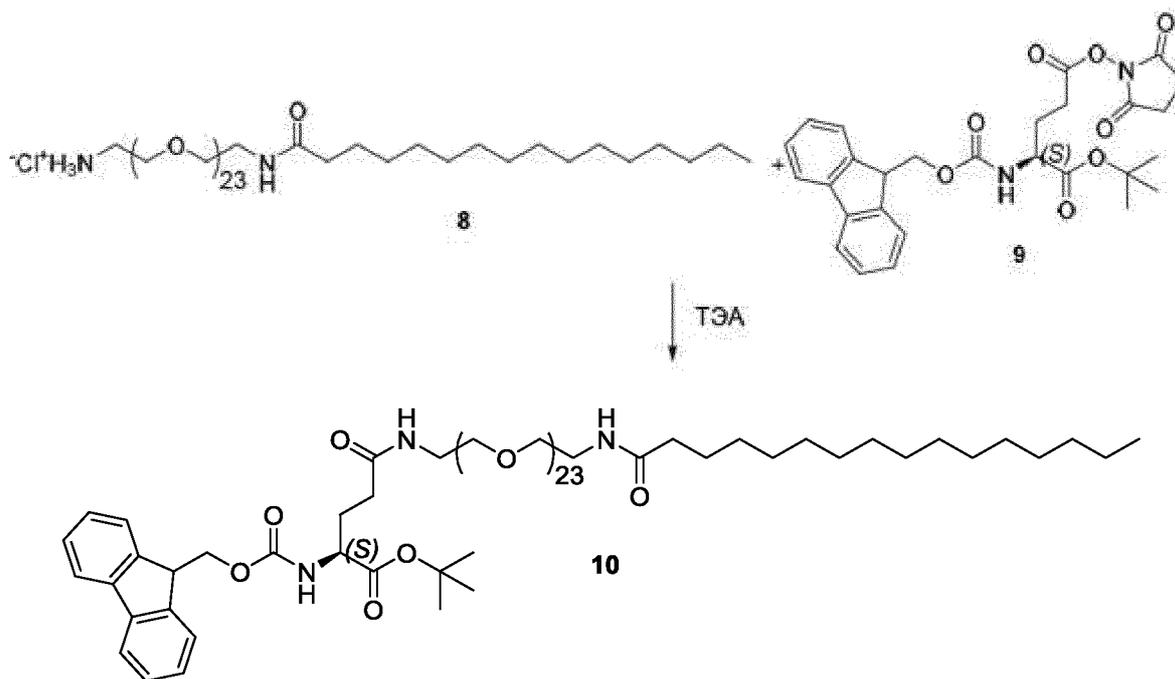
использованием стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол) и сушили над Na₂SO₄. Неочищенное соединение 4 непосредственно использовали на следующей стадии.



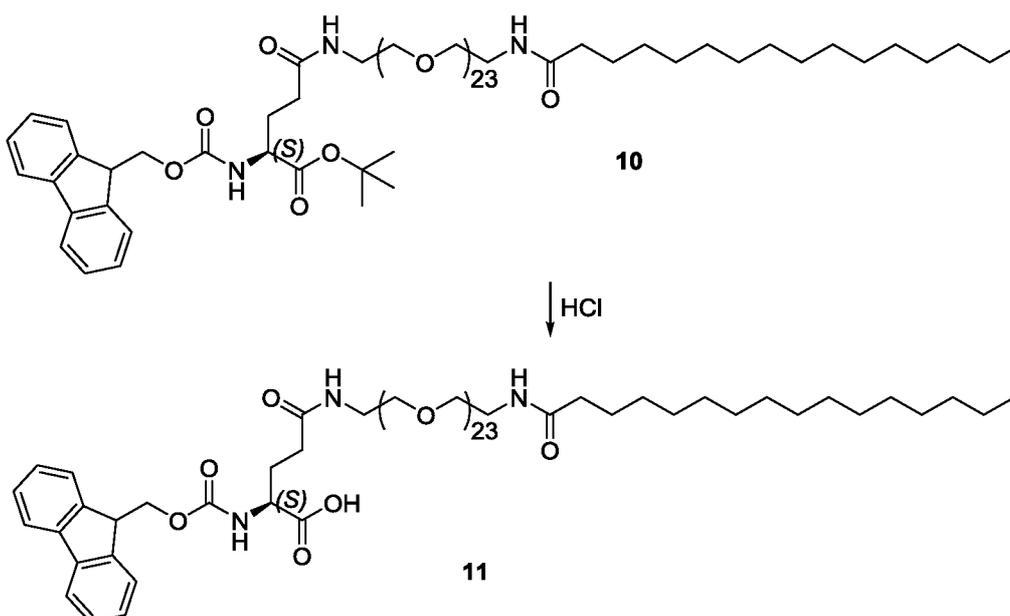
- 5 К раствору соединения 5 (2500 мг, 2,130 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 6 (655 мг, 2,556 ммоль, 1,2 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли ЭДК·НСl (630 мг, 3,195 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали. Продукт очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 1411,95, найдено: 1413,64.



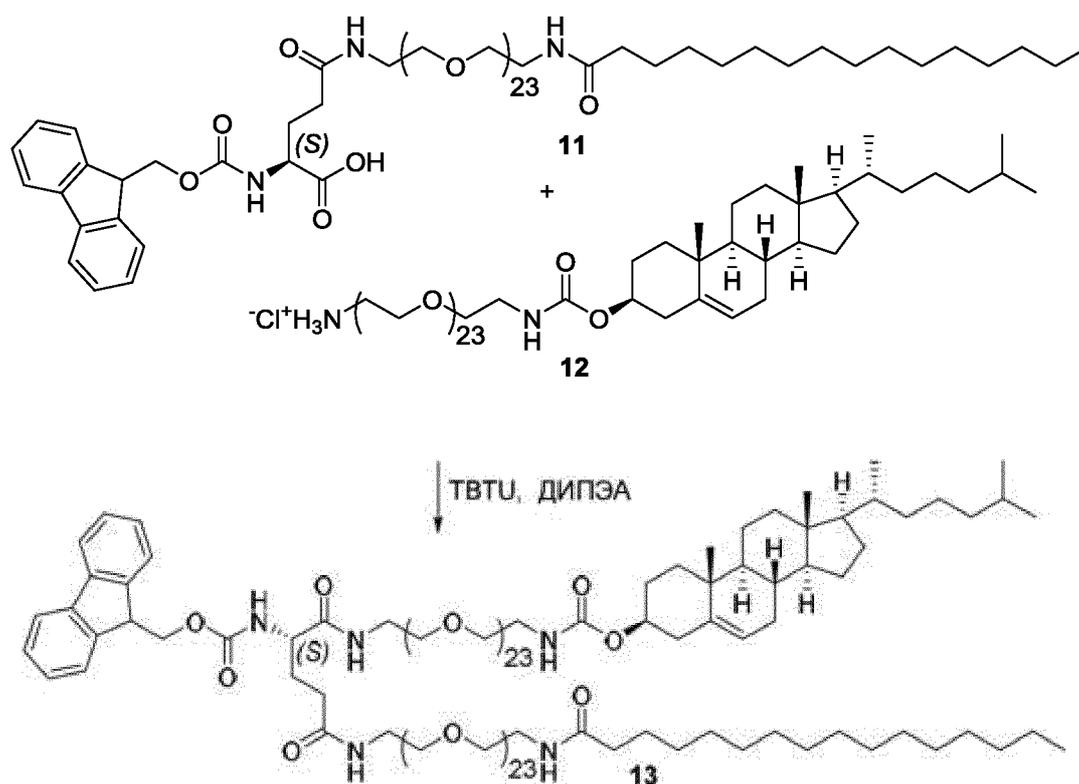
- 15 К твердому соединению 7 (2100 мг, 1,487 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (7,438 мл, 29,75 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и растворитель удаляли концентрированием. Соединение 8 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 1311,90, найдено: 1312,95.



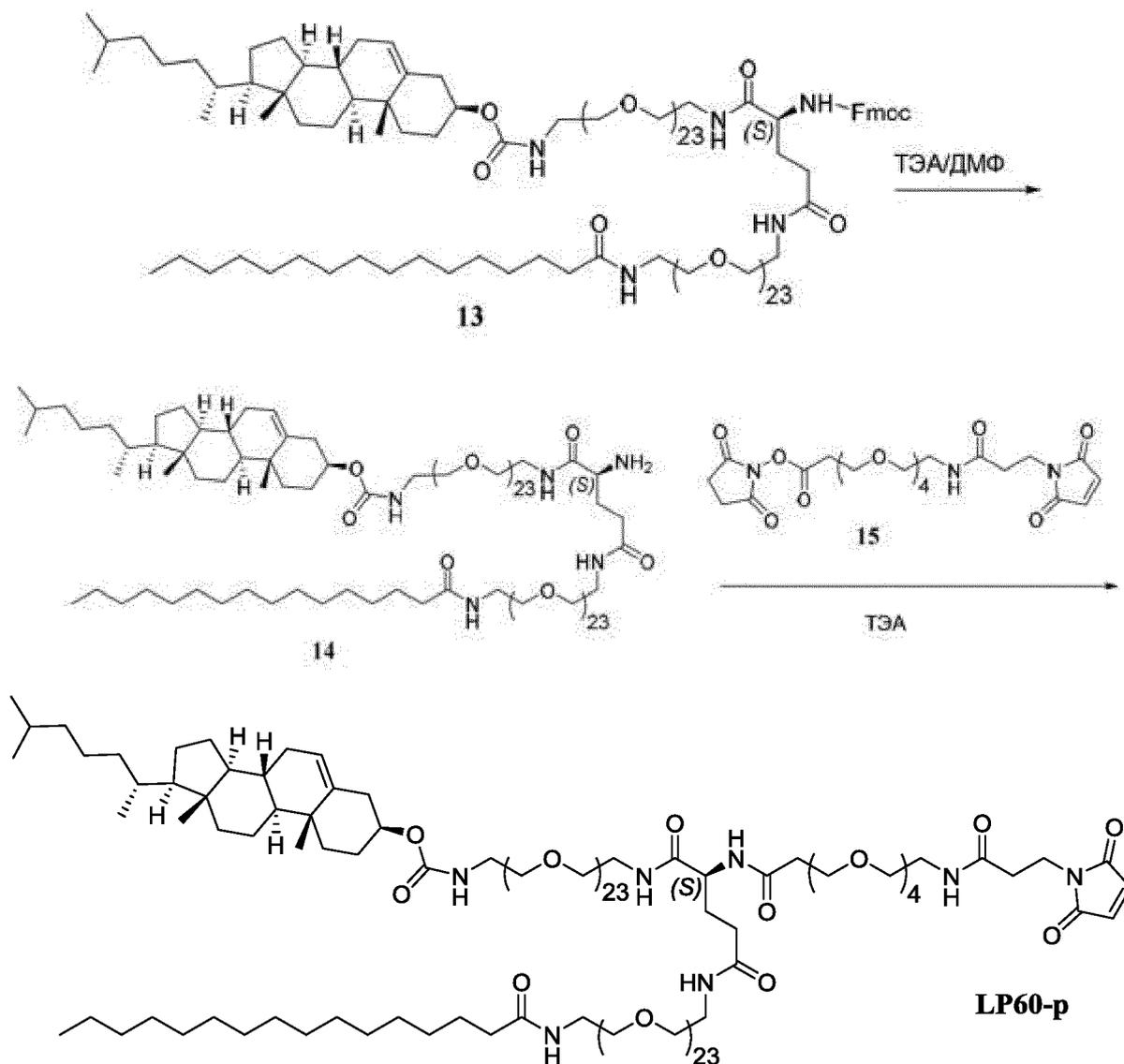
К раствору соединения 8 (1210 мг, 0,897 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 9 (539 мг, 1,032 ммоль, 1,15 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,381 мл, 2,692 ммоль, 3,0 экв.).
5 Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NH_4Cl и насыщенным водным раствором NaHCO_3 . Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Соединение 10 выделяли с помощью CombiFlash® и при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС:
10 $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 1719,07, найдено: 1719,42.



К соединению 10 (1100 мг, 0,639 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (3,199 мл, 12,796 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 8 ч. Реакционную смесь концентрировали. Соединение 11 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 1663,01, найдено: 1664,00.



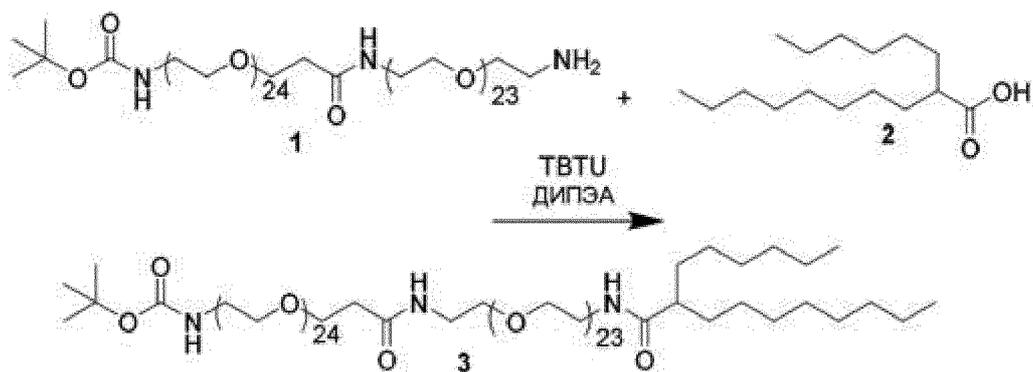
К раствору соединения 11 (1060 мг, 0,637 ммоль, 1,0 экв.), соединения 12 (970 мг, 0,637 ммоль, 1,0 экв.) и диизопропилэтиламина (0,444 мл, 2,549 ммоль, 4,0 экв.) в ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли TBVTU (245 мг, 0,764 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали. Остаток промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Соединение 13 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]/2$, рассчитано: 1565,50, найдено: 1567,13.



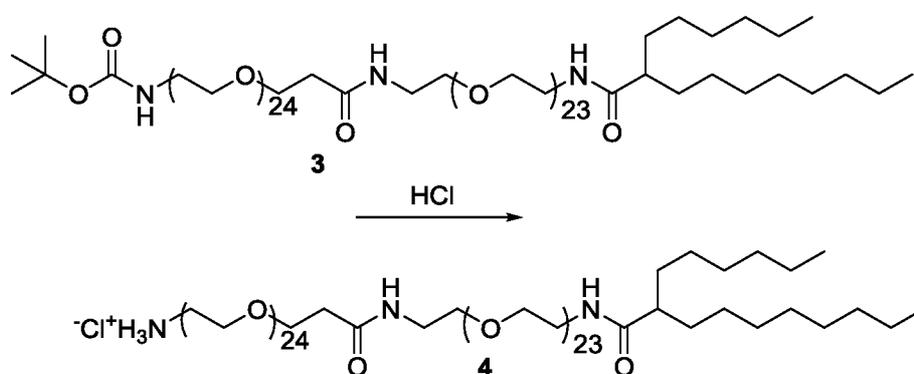
К раствору соединения 13 (1,05 г) в 4 мл ДМФ при комнатной температуре добавляли 1 мл ТЭА. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме и получали соединение 14. Соединение 14 использовали без дополнительной очистки.

К раствору соединения 14 (585 мг) в 6 мл ДХМ при комнатной температуре добавляли соединение 15 (124 мг) и ТЭА (0,085 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Продукт экстрагировали с использованием стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол) и сушили над Na₂SO₄. LP60-p дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии.

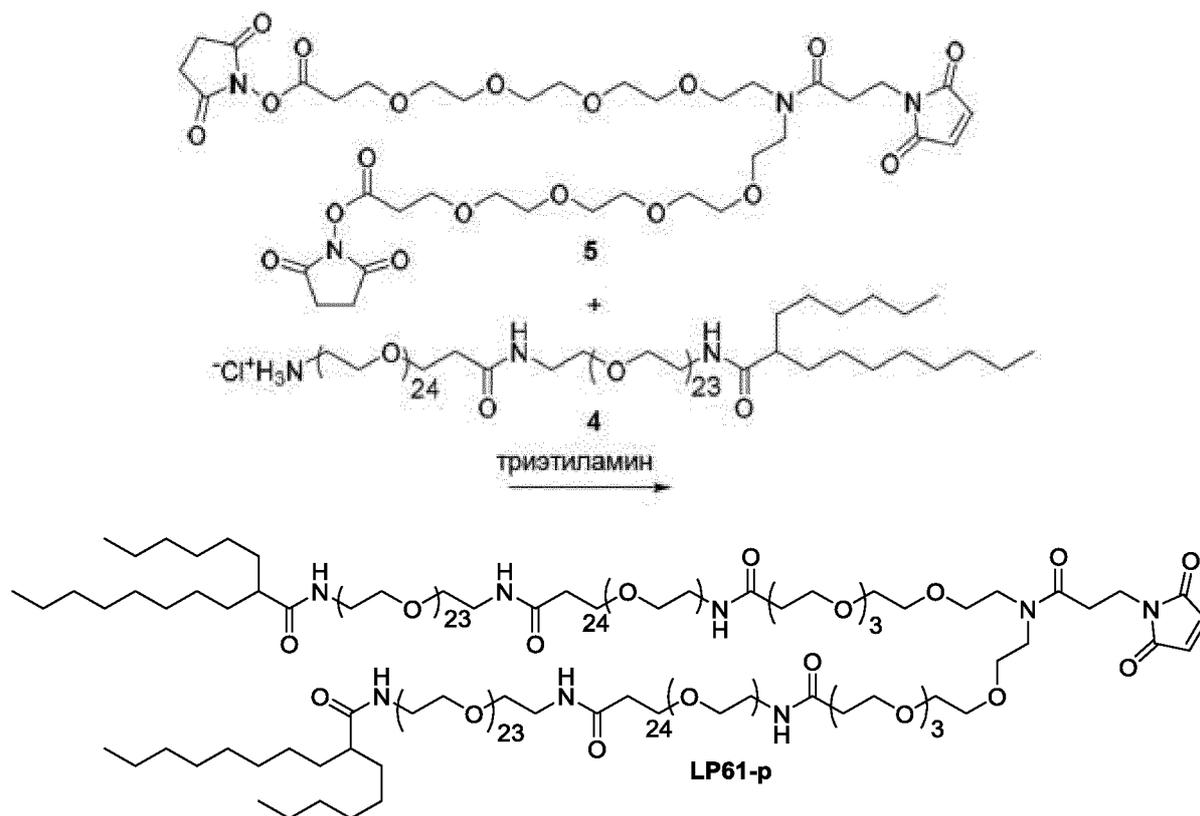
Синтез LP61-p



К раствору соединения 1 (124 мг, 0,0539 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (19,5 мг, 0,0646 ммоль, 1,2 экв.) и диизопропилэтиламина (0,028 мл, 0,161 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (2 мл) при комнатной температуре добавляли 5 TBTU (20,8 мг, 0,0646 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Водную фазу экстрагировали с помощью ДХМ (3×10 мл) и объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-12% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: [M+2H]⁺/2, рассчитано: 1270,31, найдено: 1269,15.

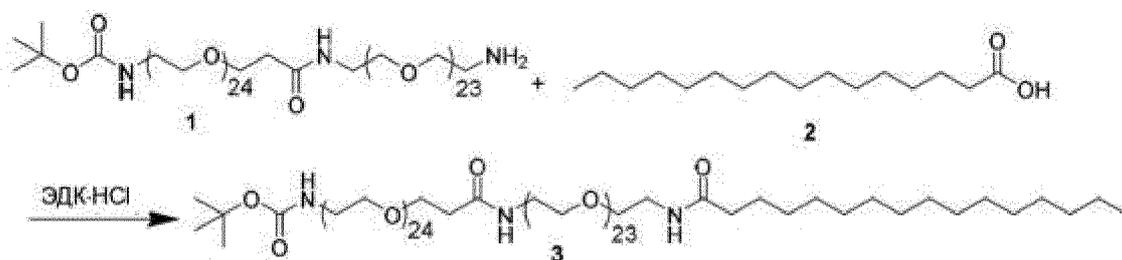


К соединению 3 (56 мг, 0,0220 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,276 мл, 1,102 ммоль, 50 экв.). 15 Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+2H]⁺/2, рассчитано: 1220,28, найдено: 1221,63.



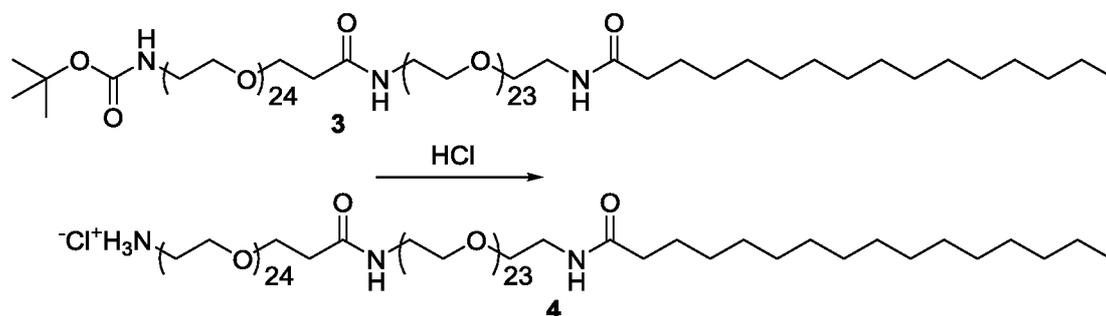
К раствору соединения 5 (10 мг, 0,0116 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 6 (59,1 мг, 0,0239 ммоль, 2,05 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,008 мл, 0,0931 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 4 ч и растворитель удаляли в вакууме. LP61-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-15% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+6H]^+/6$, рассчитано: 918,57, найдено: 919,69.

10 Синтез LP62-p

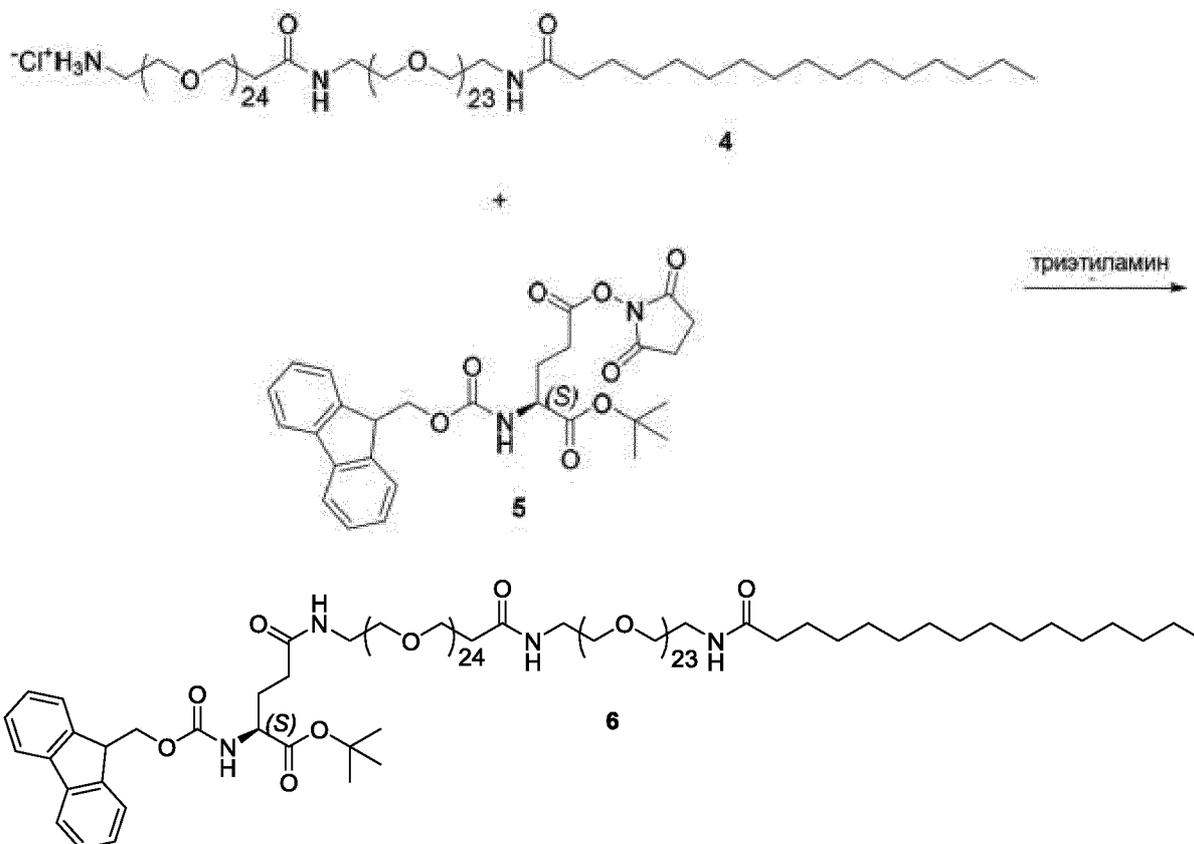


К раствору соединения 1 (1500 мг, 0,6517 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 2 (200 мг, 0,782 ммоль, 1,2 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли ЭДК·НСl (192 мг, 0,997 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и затем

концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1270,31, найдено: 1271,43.

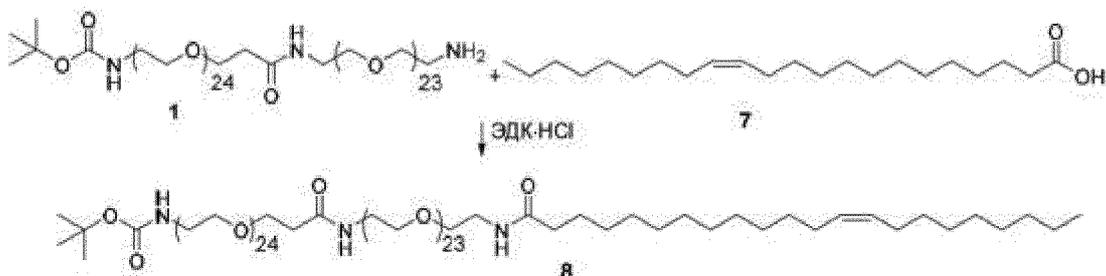


5 К соединению 3 (1300 мг, 0,511 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (6,397 мл, 25,588 ммоль, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+2H]/2$, рассчитано: 1220,28, найдено: 1221,87.

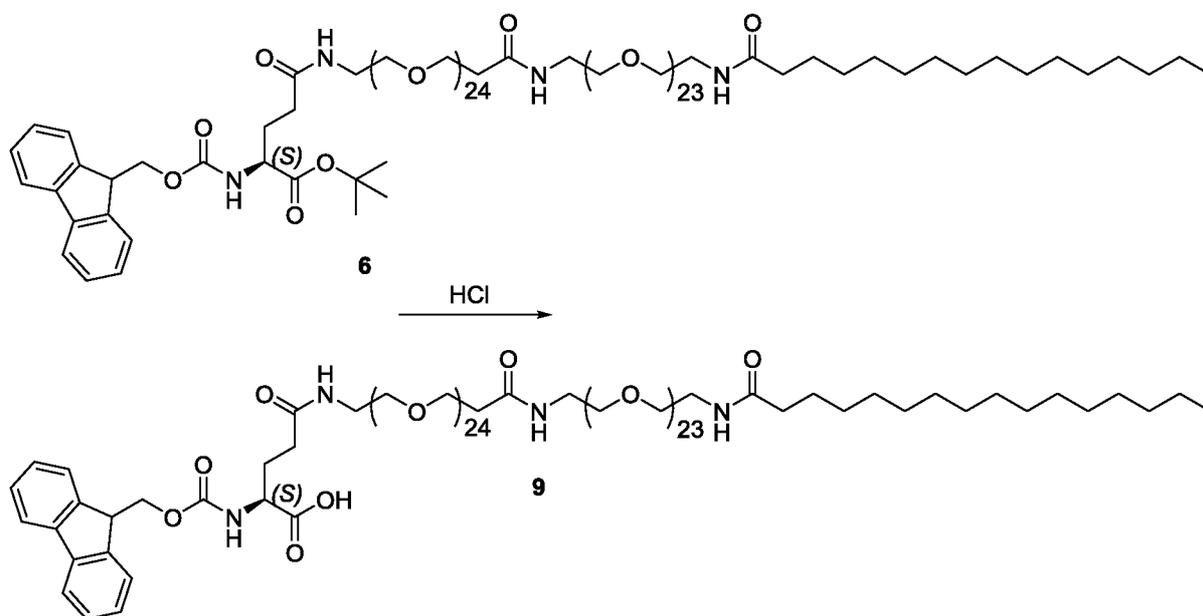


К раствору соединения 4 (1350 мг, 0, ммоль, 1,0 экв.) и соединения 5 (327 мг, 0,626 ммоль, 1,15 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре

добавляли триэтиламин (0,231 мл, 1,625 ммоль, 3,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и затем концентрировали. Соединение 6 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+3H]/3$, рассчитано: 949,58, найдено: 950,77.

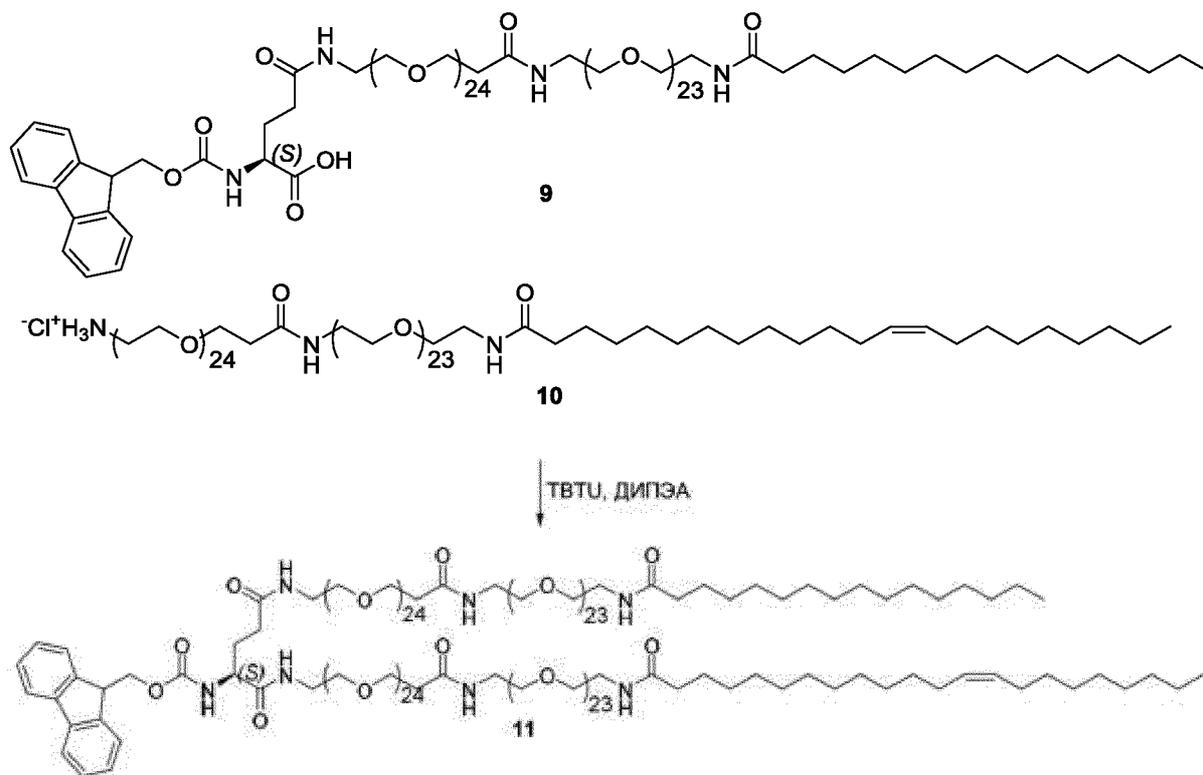


К раствору соединения 1 (1500 мг, 0,6517 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 7 (265 мг, 0,782 ммоль, 1,2 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли ЭДК·HCl (192 мг, 0,997 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч и затем концентрировали. Продукт соединения 8 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1311,35, найдено: 1311,87.

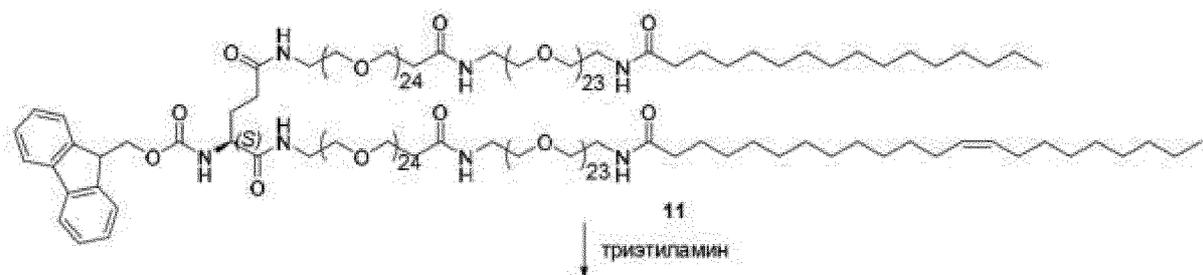


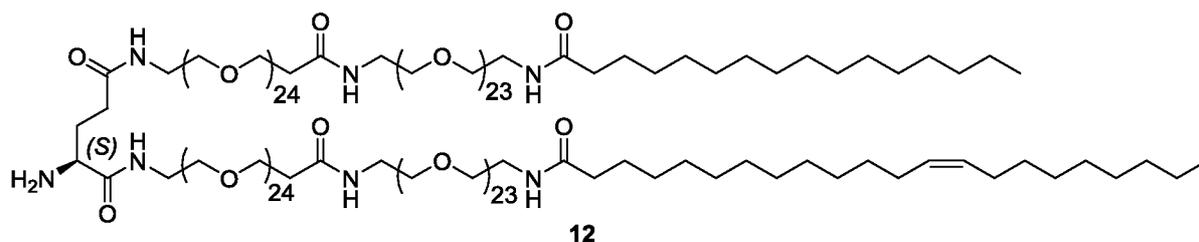
К соединению 6 (1220 мг, 0,428 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (2,142 мл, 8,568 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 5 ч. Затем реакционную смесь концентрировали. Соединение 9 использовали

непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+3H]/3$, рассчитано: 930,89, найдено: 932,29.

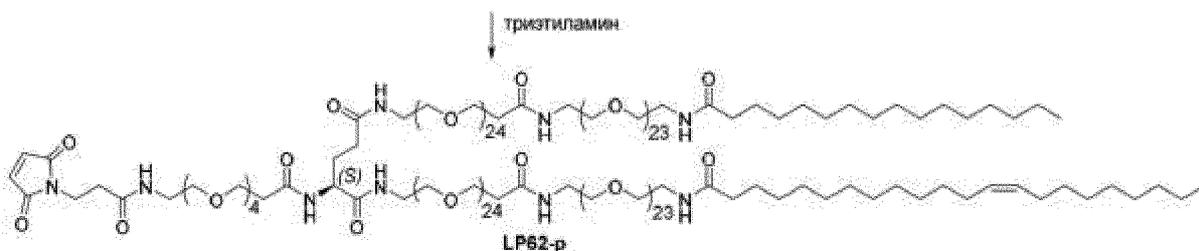
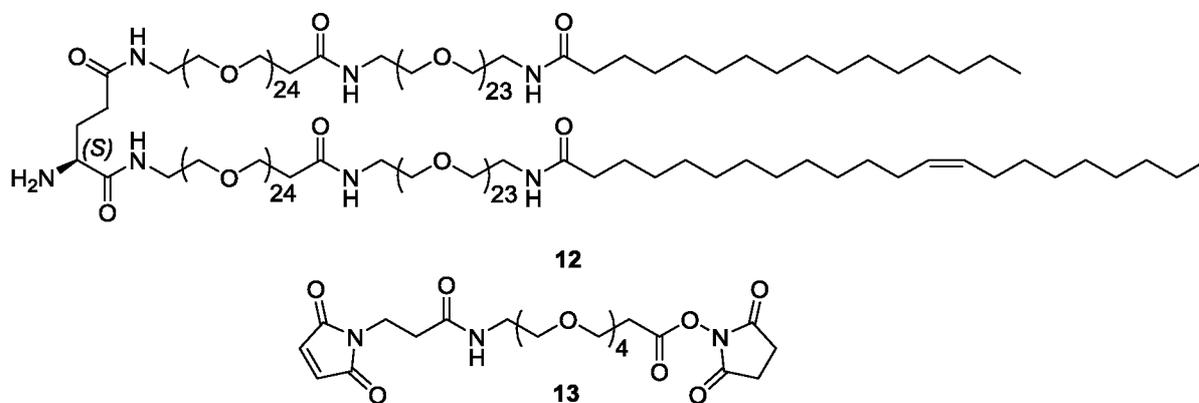


- 5 К раствору соединения 9 (800 мг, 0,286 ммоль, 1,0 экв.), соединения 10 (получали из соединения 8 при обычных условиях удаления защитной группы; 733 мг, 0,286 ммоль, 1,00 экв.) и диизопропилэтиламина (0,150 мл, 0,859 ммоль, 3,0 экв.) в ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (110 мг, 0,344 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной
- 10 температуре в течение 3 ч. Затем реакционную смесь концентрировали. Соединение 11 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано: 1059,46, найдено: 1060,94.



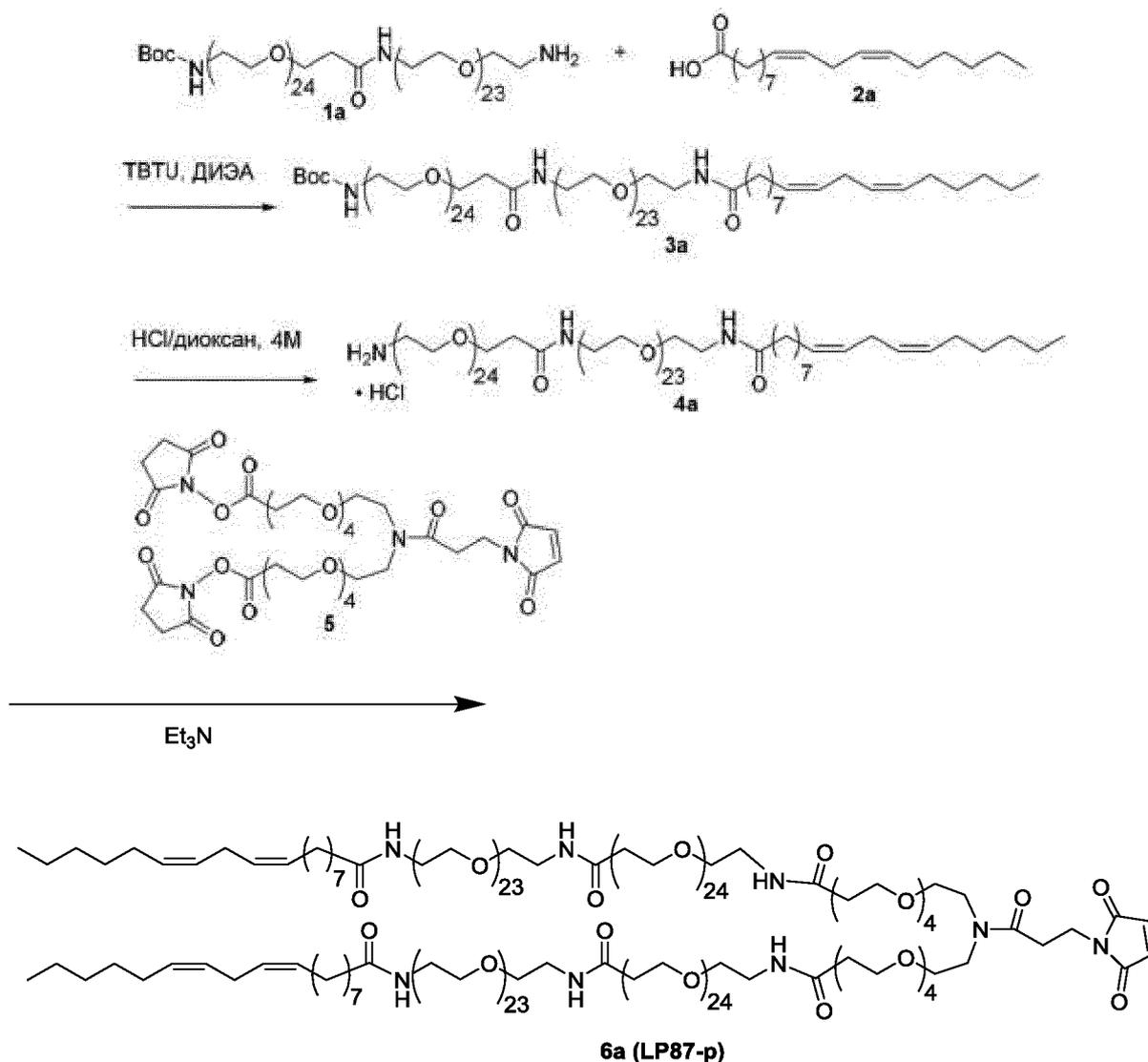


К раствору соединения 11 (914 мг, 0,172 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДМФ (4 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (1 мл). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. соединение 12 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1015,05, найдено: 1016,41.



К раствору соединения 12 (875 мг, 0,172 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 13 (97,5 мг, 0,189 ммоль, 1,1 экв.) в безводном ДХМ (20 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,073 мл, 0,517 ммоль, 3,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли концентрированием. LP62-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1094,68, найдено: 1095,98.

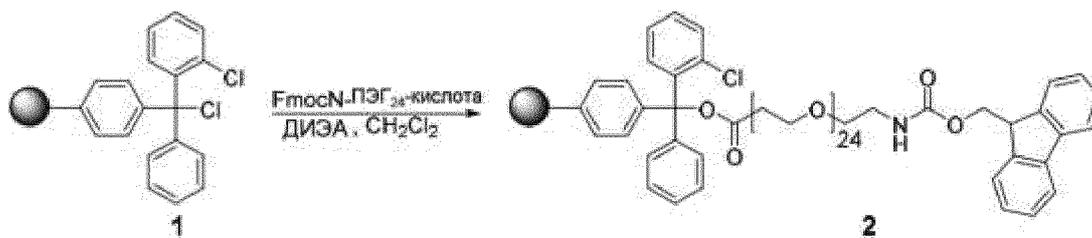
Синтез LP87-p



Твердый TBTU (50 мг, 0,156 ммоль) добавляли к раствору содержащего защитную группу Boc ПЭГ₄₇-амина 1a (Quanta Biodesign Limited, 300 мг, 0,13 ммоль), линолевой кислоты 2a (37 мг, 0,13 ммоль) и ДИЭА (68 мкл, 0,39 ммоль) в ДМФ (9 мл). Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком для растворения твердых веществ и при комнатной температуре в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме и остаток дважды выпаривали с толуолом. Остаток растворяли в хлороформе (50 мл), промывали с помощью NaHCO₃ (2×10 мл) и рассолом (10 мл). Продукт сушили (Na₂SO₄), концентрировали в вакууме и очищали с помощью CombiFlash® (SiO₂) с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-80%, 20 мин. Рассчитано: ММ = 2564,22, (М + 2×18)/2 = 1300,1, (М + 3×18)/3 = 872,74. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1299,74 [М+2NH₄]²⁺, 873,04 [М+3NH₄]³⁺. Соединение 3a (195 мг, 0,0764 ммоль) превращали в амингидрохлорид 4b путем обработки

охлажденным льдом 4 М раствором HCl в диоксане (5 мл) с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали и сушили в вакууме, оставшуюся HCl удаляли путем проводимого 2 раза выпаривания продукта с толуолом. Сухой амингидрохлорид растворяли в безводном ДМФ (5 мл), Добавляли сложный эфир бис-NHS 5 (28 мг, 0,033 ммоль) и Et₃N (28 мкл, 0,198 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Растворитель удаляли в вакууме, остаток дважды выпаривали с толуолом и продукт 6а (LP87-p) очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-100%, 30 мин. Рассчитано: ММ = 5556,9, (М + 3×18)/3 = 1870,50, (М + 4×18)/4 = 1407,23. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1870,50 [М+3NH₄]³⁺, 1407,40 [М+4NH₄]⁴⁺.

Синтез LP89-p

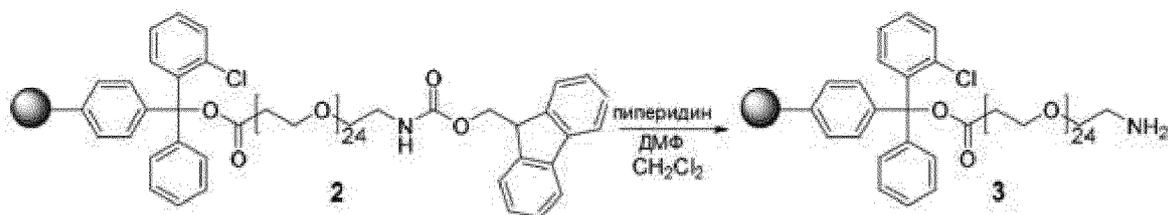


В изготовленный из пористого стекла сосуд для синтеза пептидов объемом 25 мл помещали 2-хлортритилхлоридную смолу 1 (0,4589 г, 1,46 ммоль/г, 0,670 ммоль). Смоле давали набухнуть в ДХМ и жидкость сливали, затем добавляли Fmoc-N-амидо-ПЭГ₂₄-кислоту (0,9170 г, 0,670 ммоль, 1 экв.) и диизопропилэтиламин (ДИЭА) (0,584 мл, 3,35 ммоль, 5 экв.). Колбу встряхивали в течение 1 ч, затем добавляли метанол (0,367 мл, 0,8 мл/г смолы) для блокирования всей оставшейся тритильной смолы. Через 40 мин из колбы сливали жидкость и содержимое промывали трижды с помощью ДХМ, дважды с помощью ДМФ, дважды с помощью ДХМ и трижды с помощью MeOH (при каждой промывке использовали примерно 5). Смолу сушили в высоком вакууме в течение ночи.

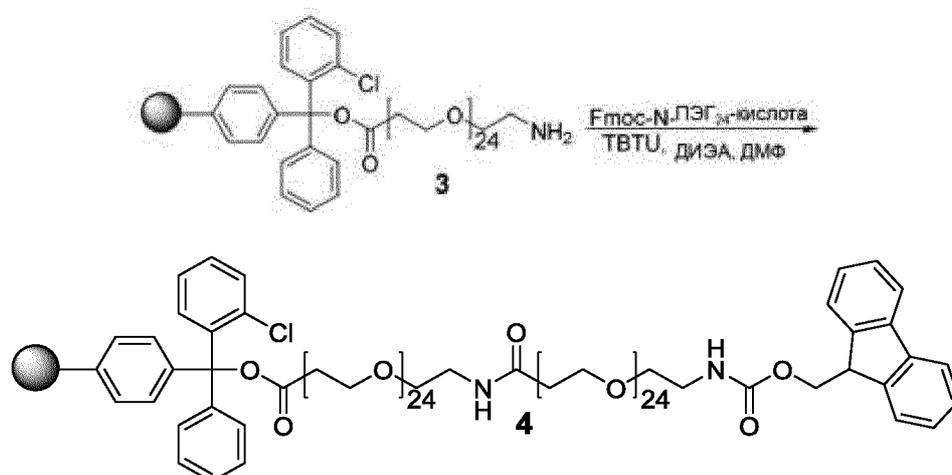
Загрузка смолы: 11,5 мг смолы суспендировали в 0,8 мл ДМФ и ей давали набухнуть в течение 15 мин. Добавляли 0,2 мл пиперидина и смесь выдерживали 15 мин. Разведенное в 10 раз вещество переносили в ДМФ и снимали спектры в

УФ-ВИД (ультрафиолетовой-видимой) области, $A = 2,66$ (примерно).

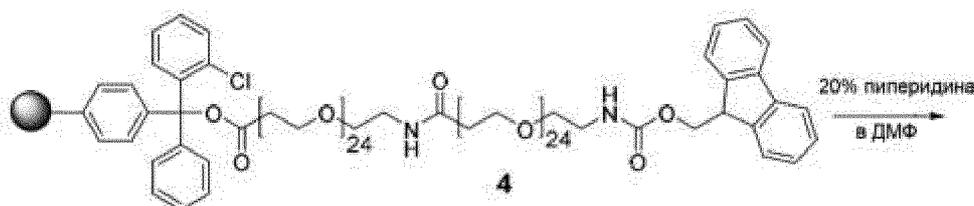
Рассчитанная загрузка смолы составляла 0,297 ммоль/г, при использовании всего 919 мг смолы, масштаб: 0,273 ммоль.

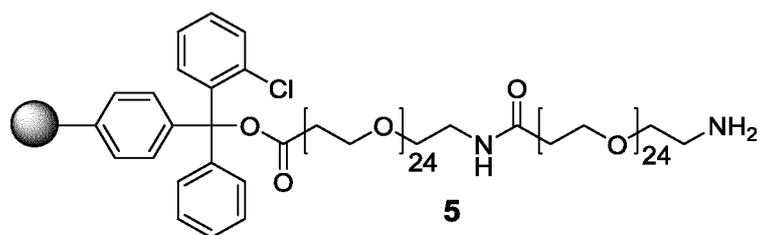


- 5 Смолу 2 суспендировали в смеси ДХМ/ДМФ/пиперидин состава 1:1:2, 9,6 мл. После встряхивания в течение 30 мин раствор сливали и смолу промывали с помощью ДМФ (4×9,2 мл).

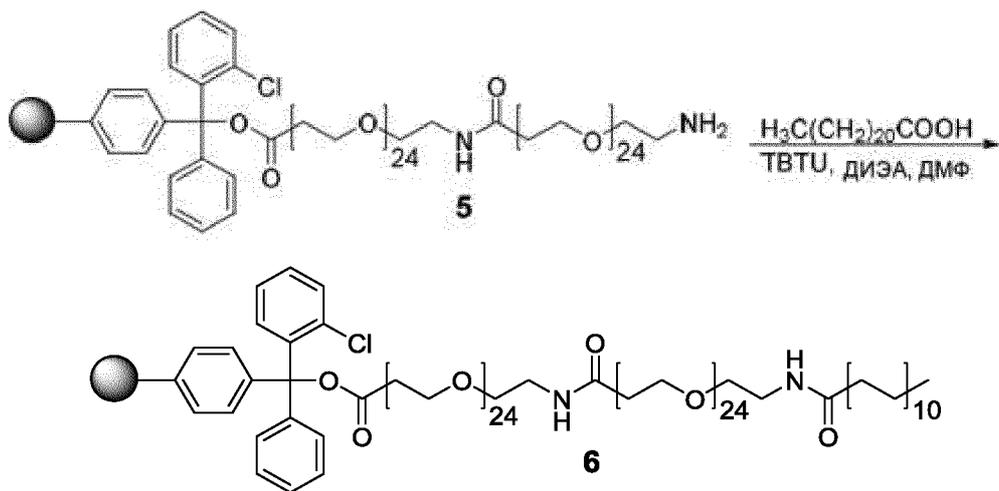


- 10 Fmoc-N-амидо-ПЭГ₂₄-кислоту (0,7473 г, 0,5460 ммоль, 2 экв.), ТВТУ (0,1753 г, 0,5460 ммоль, 2 экв.) и ДИЭА (0,190 мл, 1,092 ммоль, 4 экв.) объединяли в ДМФ (7,6 мл) и перемешивали в течение 2-3 мин, затем раствор добавляли к смоле, находящейся в колбе для синтеза. Колбу встряхивали в течение 1 ч, затем с оранжевой смолы сливали желтовато-оранжевый раствор.
- 15 Смолу промывали с помощью ДМФ и MeOH (каждым с помощью 3×8,6 мл), затем сушили в высоком вакууме в течение ночи. Получали 1,277 г смолы, теоретическое количество: 1,227 г. После микрорасщепления массу продукта определяли с помощью ЖХ-МС.





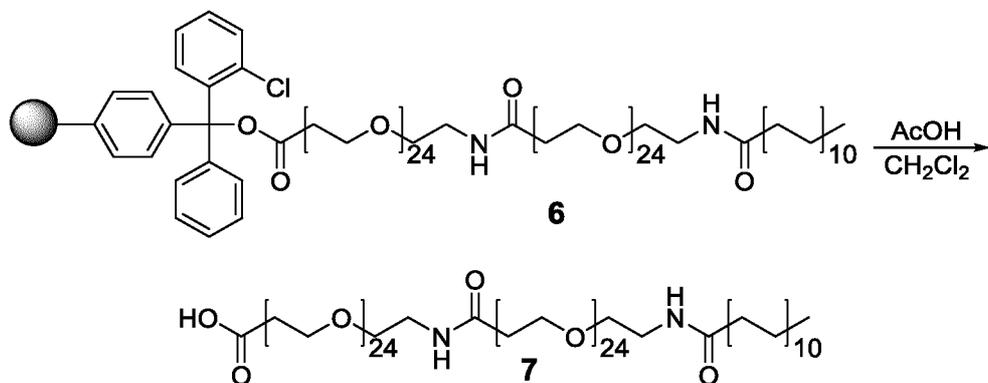
Смолу обрабатывали 20% раствором пиперидина в ДМФ (12,3 мл) в течение 30 мин, затем промывали с помощью ДМФ (4×12,3 мл).



5

Бегеновую кислоту (0,186 г, 0,546 ммоль, 2,0 экв.), ТВТУ (0,175 г, 0,546 ммоль, 2 экв.) и ДИЭА (0,190 мл, 1,092 ммоль, 4 экв.) растворяли в ДМФ (10,7 мл). Раствор добавляли к смоле. Раствор в сосуде промывали с помощью ДМФ (2×1 мл) и добавляли к смоле. Смесь встряхивали в течение 75 мин, затем жидкость сливали и смолу и промывали с помощью ДМФ, ТГФ и MeOH (каждым с помощью 3×13 мл). Смолу сушили в высоком вакууме (90 мин). Получали 1,351 г, теоретическое количество: 1,254 г. После микрорасщепления массу продукта (и отсутствие масс, соответствующих исходным веществам) определяли с помощью ЖХ-МС.

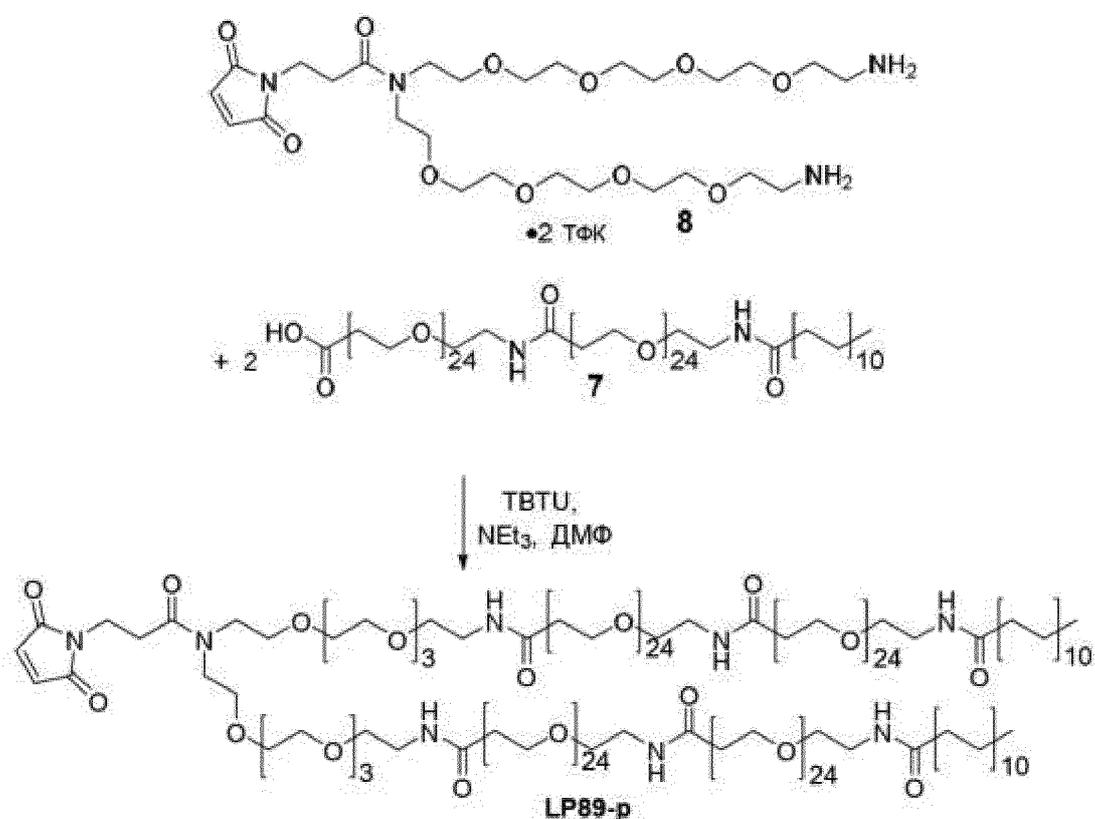
10



15

Смолу обрабатывали с помощью ДХМ (11 мл) и АсОН (1,1 мл) в течение 30 мин, затем жидкость сливали. Это расщепление повторяли всего 4 раза, затем смолу обрабатывали с помощью 8 мл CH_2Cl_2 , 1 мл АсОН и 1 мл 2,2,2-трифторэтанола, встряхивали в течение 30 мин и жидкость сливали. Это расщепление повторяли второй раз. Растворы, полученные при проведении всех расщеплений, объединяли и концентрировали и получали 530,8 мг соединения, которое очищали с помощью колоночной хроматографии.

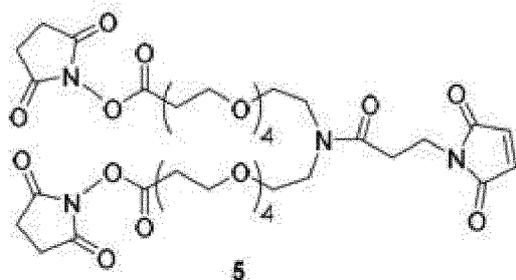
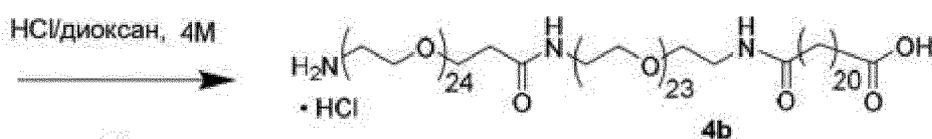
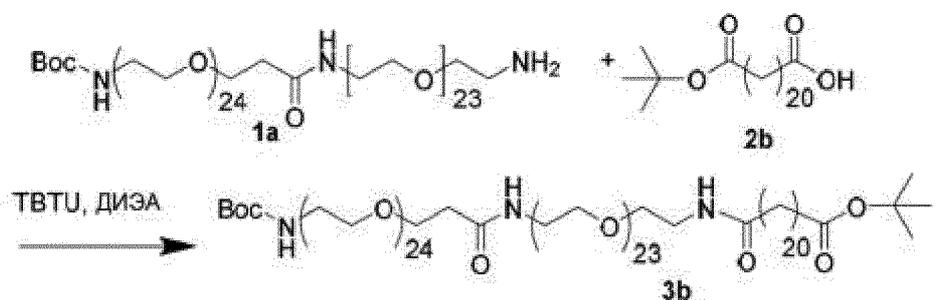
Неочищенное соединение загружали в колонку с диоксидом кремния (24 г) и элюировали с помощью 0-20% MeOH в CH_2Cl_2 . Чистые фракции объединяли и получали 69,9 мг искомого соединения.



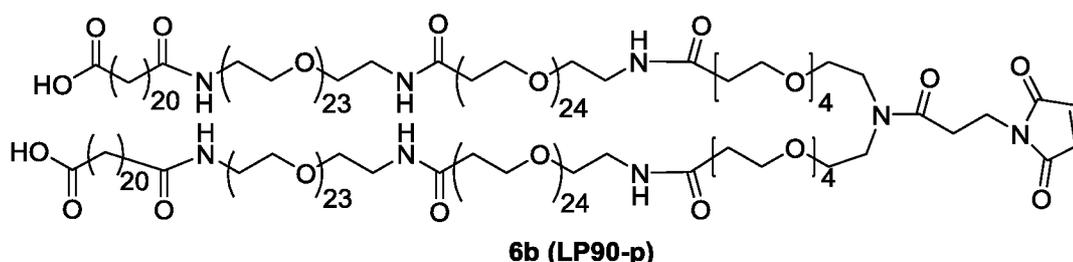
В сосуд помещали соль N-MAL-N-бис(ПЭГ₄)аминa с ТФК (10,7 мг, 0,0128 ммоль, 1 экв.), кислоту-ПЭГ₂₄-амидо-ПЭГ₂₄-C₂₂ (69,9 мг, 0,0269 ммоль, 2,1 экв.), TBTU (10,3 мг, 0,0320 ммоль, 2,5 экв.), NEt_3 (5,4 мкл, 0,0385 ммоль, 3 экв.) и CH_2Cl_2 (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч, затем добавляли NEt_3 (5,4 мкл, 0,0385 ммоль, 3 экв.). Примерно через 50 ч реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью колоночной

хроматографии, 0-30% MeOH в ДХМ, и получали 32,8 мг соединения LP89-p (44%).

Синтез LP90-p



5



Твердый TBVTU (50 мг, 0,156 ммоль) добавляли к раствору содержащего защитную группу Boc ПЭГ-амина 1a (Quanta Biodesign Limited, 300 мг, 0,13 ммоль), содержащей одну защитную группу докозандикарбоновой кислоты 2b (56 мг, 0,13 ммоль) и DIEA (68 мкл, 0,39 ммоль) в ДМФ (9 мл). Реакционную смесь при комнатной температуре в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме и остаток 3 раза выпаривали с толуолом. Остаток переносили в ДХМ (30 мл), смешивали с SiO₂ (1,6 г) и помещали в CombiFlash®. Продукт очищали с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-100%, 45

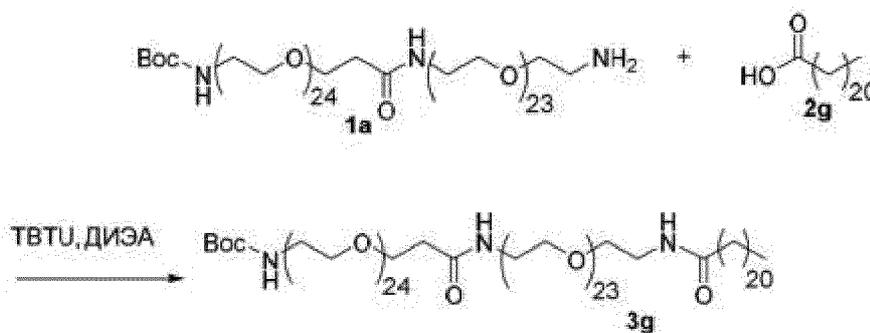
мин. Рассчитано: $MM = 2710,45$, $(M + 2 \times 18)/2 = 1373,22$, $(M + 3 \times 18)/3 = 921,48$.

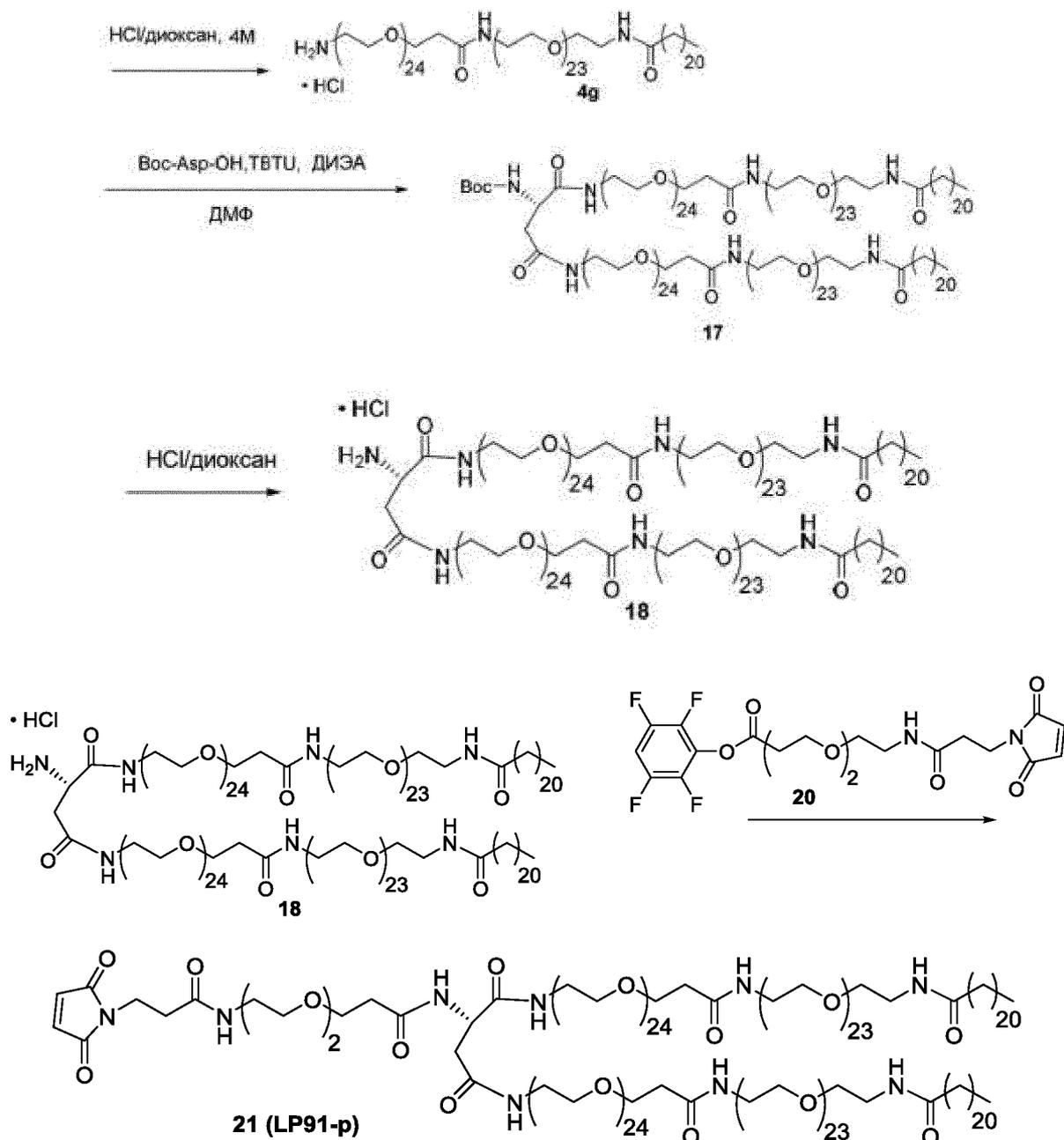
Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): $1373,18 [M+2NH_4]^{2+}$, $921,37 [M+3NH_4]^{3+}$.

5 Соединение 3b (238 мг, 0,088 ммоль) превращали в гидрохлорид аминокислоты 4b путем обработки охлажденным льдом 4 М раствором HCl в диоксане (6 мл) с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали и сушили в вакууме, оставшуюся HCl удаляли путем проводимого 2 раза выпаривания остатка с толуолом.

10 Сухой амингидрохлорид 4b растворяли в безводном ДХМ (5 мл), Добавляли сложный эфир бис-NHS 5 (34,2 мг, 0,04 ммоль) и Et₃N (55 мкл, 0,4 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Растворитель удаляли в вакууме и продукт 6b (LP90-p) очищали с помощью CombiFlash® с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ, градиентный режим: 0-100%, 40
15 мин. Рассчитано: $MM = 5737,13$, $(M + 3 \times 18)/3 = 1930,38$, $(M + 4 \times 18)/4 = 1452,28$.
Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): $1930,45 [M+3NH_4]^{3+}$, $1452,29 [M+4NH_4]^{4+}$.

Синтез LP91-p





- 5 Твердый TBVTU (335 мг, 1,043 ммоль) добавляли к раствору содержащего защитную группу Boc ПЭГ₄₇-амина 1a (2 г, 0,869 ммоль), бегеновой кислоты 2g (296 мг, 0,87 ммоль) и ДИЭА (454 мкл, 2,067 ммоль) в ДМФ (16 мл). Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком для растворения твердых веществ и при комнатной температуре в течение 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме и остаток дважды выпаривали с толуолом. Остаток растворяли в хлороформе (150 мл) и промывали с помощью NaHCO₃ (2×30 мл) и рассолом (30 мл). Продукт 3g сушили (Na₂SO₄), концентрировали в вакууме и очищали с помощью CombiFlash® (SiO₂) с использованием системы 0-20% MeOH в ДХМ,
- 10

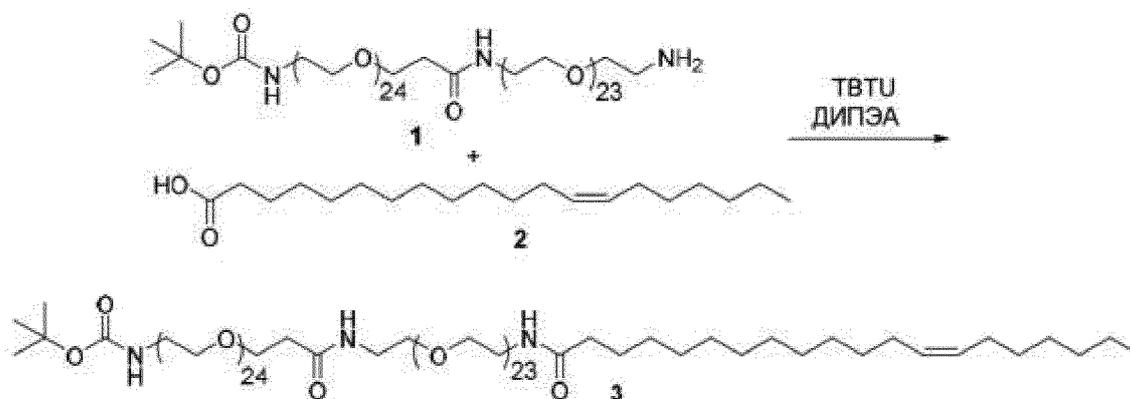
градиентный режим: 0-80%, 35 мин. Рассчитано: $MM = 2624,36, (M + 2 \times 18)/2 = 1330,18, (M + 3 \times 18)/4 = 892,79$. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): $1330,58 [M + 2NH_4]^{2+}, 893,21 [M + 3NH_4]^{3+}$.

Соединение 3g (1,862 г) превращали в амингидрохлорид 4g путем
5 обработки 4 М раствором HCl в диоксане (10 мл) так, как описано выше в методике получения LP39-р.

Аликвоту сухой соли 4g (227 мг, 0,089 ммоль) объединяли с Вос-Asp-ОН (10 мг, 0,043 ммоль), ТВТУ (32 мг, 0,099 ммоль) и ДИЭА (96 мкл, 0,55 ммоль) так, как описано выше для получения LP54-р и получали соединение 17, выход
10 152 мг (0,029 ммоль). Этот продукт обрабатывали раствором HCl в диоксане так, как описано выше для получения соединения 14с, описанного выше в методике синтеза LP54-р, и получали гидрохлорид 18 (выход 100%), который непосредственно использовали на следующей стадии. Рассчитано: $MM = 5145,57, (M + 3)/3 = 1716,19, (M + 4)/4 = 1287,23$. Найдено: МС (ЭР, в режиме
15 положительных ионов): $1715,91 [M + 3H]^{3+}, 1287,23 [M + 4H]^{4+}$.

Гидрохлорид 18 (0,029 ммоль) объединяли со сложным тетрафторфениловым эфиром 20 (Quanta Biodesign, 15 мг, 0,032 ммоль) и Et₃N (12 мкл, 0,087 ммоль) так, как описано выше для получения соединения 16с, описанного выше в методике синтеза LP54-р. Продукт 21 (LP91-р) очищали с
20 помощью CombiFlash®. Выход: 40 мг. Рассчитано: $MM = 5455,87, (M + 4)/4 = 1364,97, (M + 5)/5 = 1092,17$. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): $1364,66 [M + 4H]^{4+}, 1092,05 [M + 4H]^{4+}$.

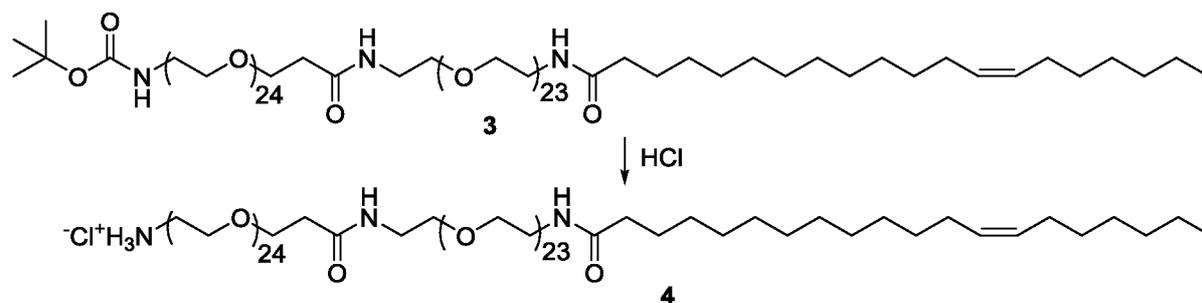
Синтез LP92-р



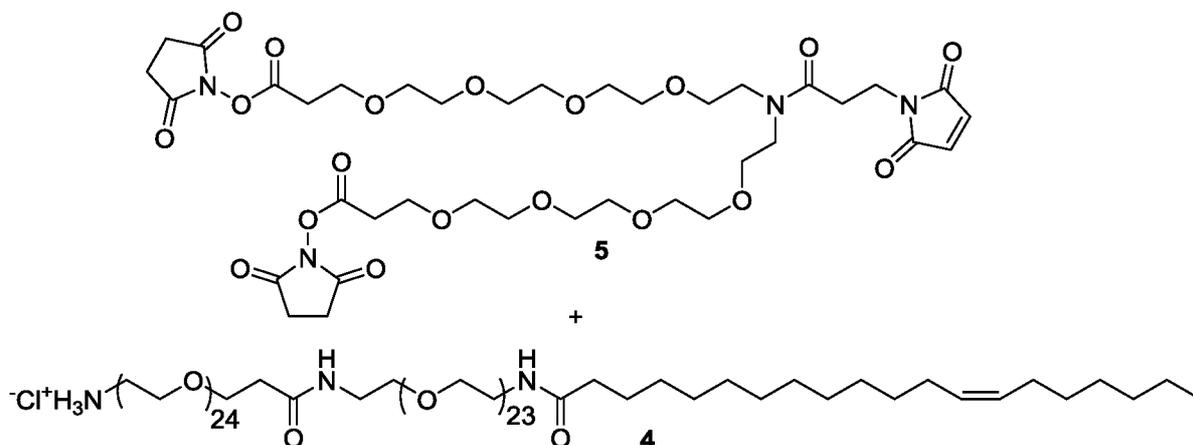
25 К раствору соединения 1 (140 мг, 0,0608 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (20,8 мг, 0,0669 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламина (0,032 мл, 0,182

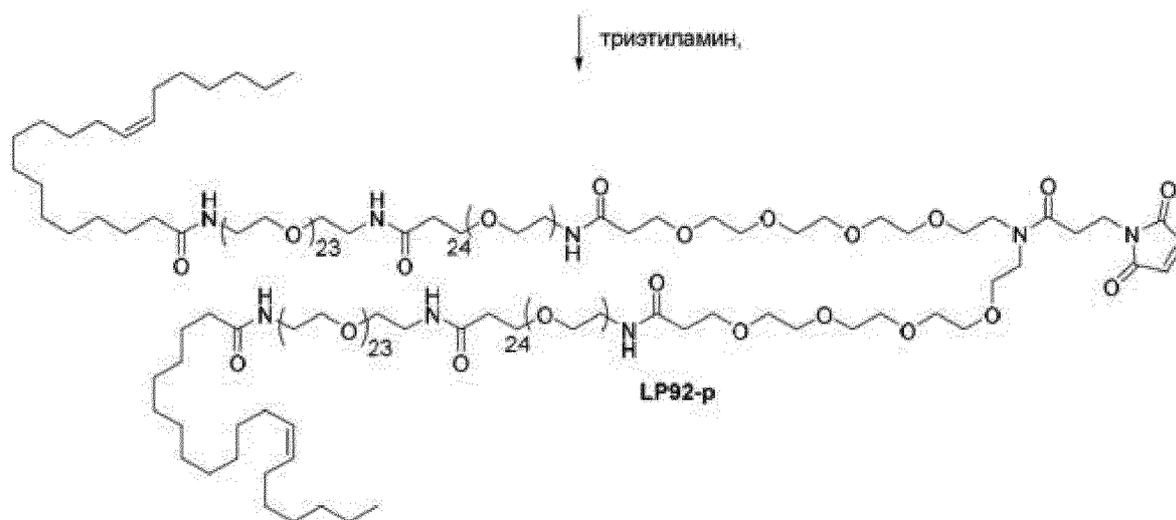
ммоля, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (3 мл) при комнатной температуре добавляли ТВТУ (23,4 мг, 0,073 ммоля, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали.

5 Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1297,33, найдено: 1297,19.



10 К твердому соединению 3 (90 мг, 0,0347 ммоля, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (0,434 мл, 1,734 ммоля, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1247,30, найдено: 1247,98.

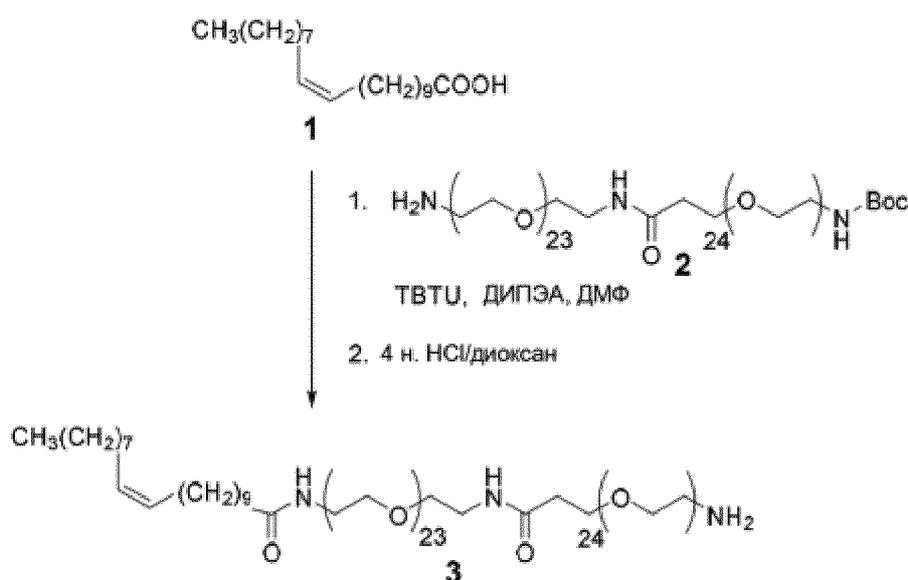




К раствору соединения 5 (14 мг, 0,0163 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 4 (84,6 мг, 0,0334 ммоль, 2,05 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,012 мл, 0,0815 ммоль, 5,0 экв.).

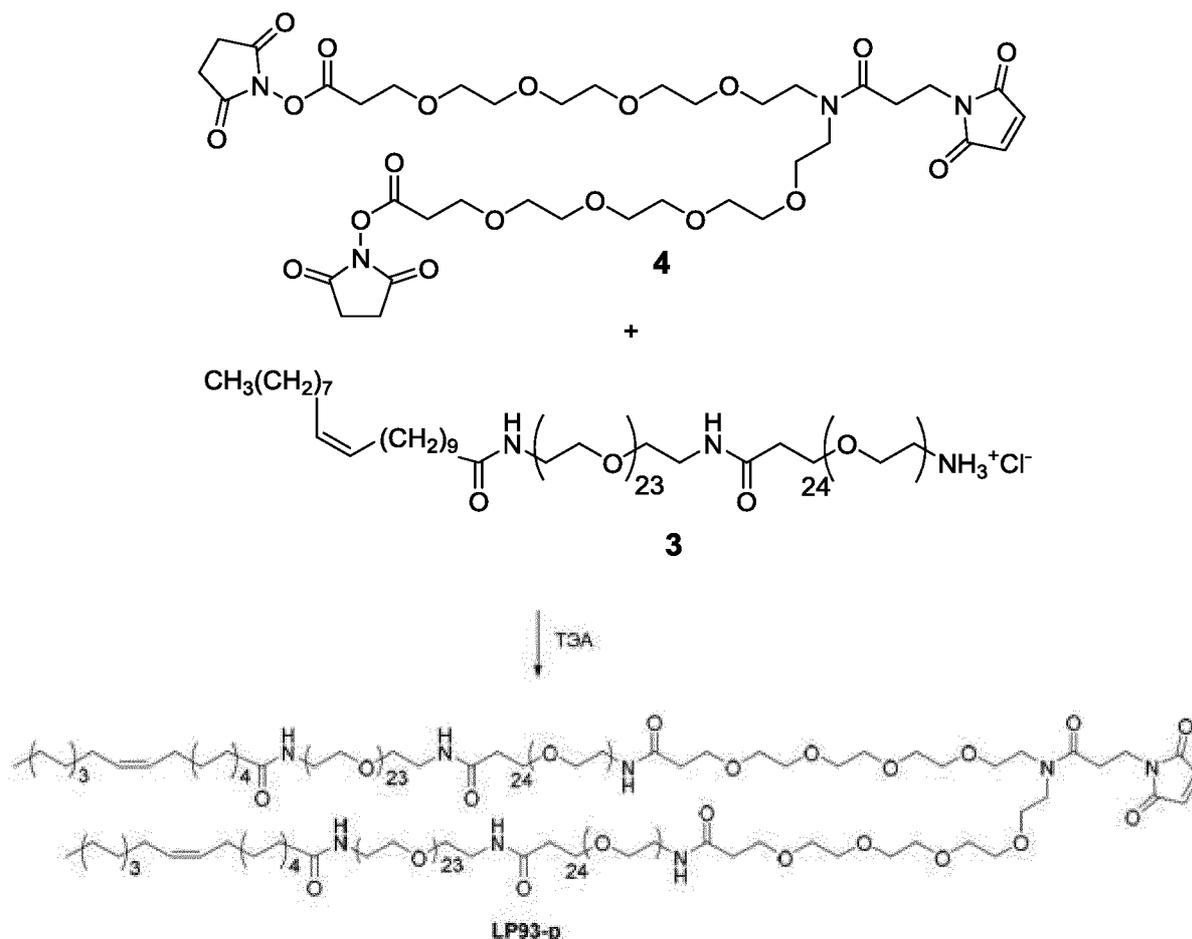
- 5 Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и растворитель удаляли в вакууме. LP92-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+5H]^+/5$, рассчитано: 1123,70, найдено: 1124,10, $[M+6H]^+/6$, рассчитано: 936,58, найдено: 937,22.

10 Синтез LP93-p



К цис-11-эйкозеновой кислоте 1 (30 мг, 0,0979 ммоль) в растворе Вос-ПЭГ₄₇-NH₂ 2 (223 мг, 0,1 ммоль) в ДМФ (2,0 мл) добавляли ТВТУ (37,2 мг, 0,115 ммоль) и ДИПЭА (50 мкл). После перемешивания полученной суспензии в

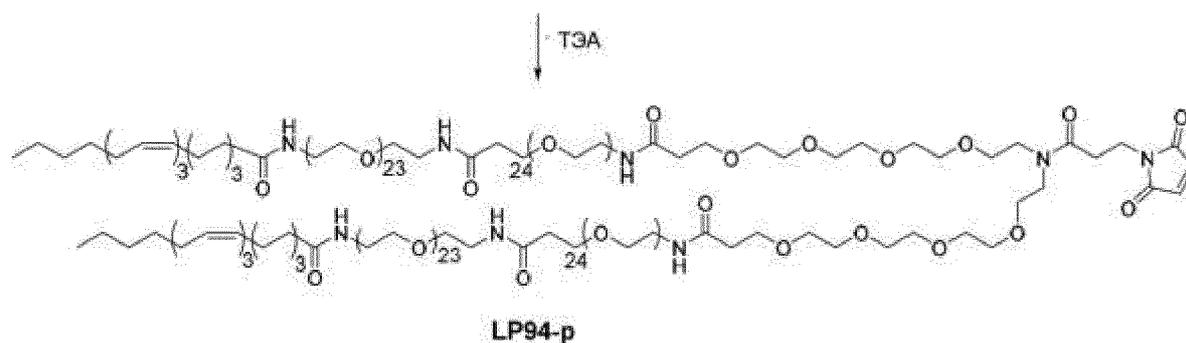
течение ночи добавляли воду. Смесь экстрагировали смесью ДХМ:20%ТФЭ и объединенные органические фазы сушили над Na_2SO_4 . После фильтрования растворитель выпаривали в вакууме досуха и неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (20% MeOH в ДХМ). К продукту в безводной среде добавляли 2 мл 4 н. раствора HCl в диоксане до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на завершение реакции удаления защитной группы: $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 2550,28 m/z , найдено: 2551.



10 К раствору соединения 4 (19 мг, 0,0221 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 3 (16 мг, 0,0454 ммоль, 2,05 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (16 мкл, 0,1106 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. LP93-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с

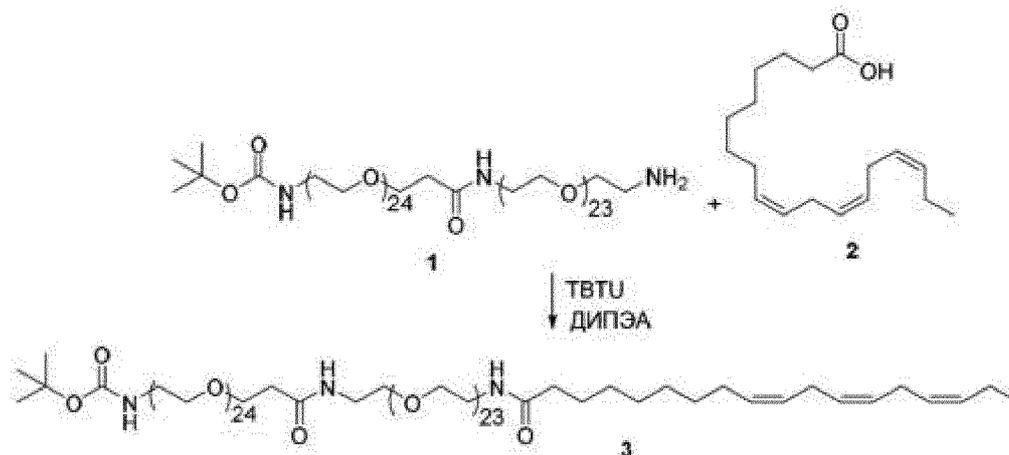
15 помощью 10-17% метанола в дихлорметане.

Синтез LP94-p

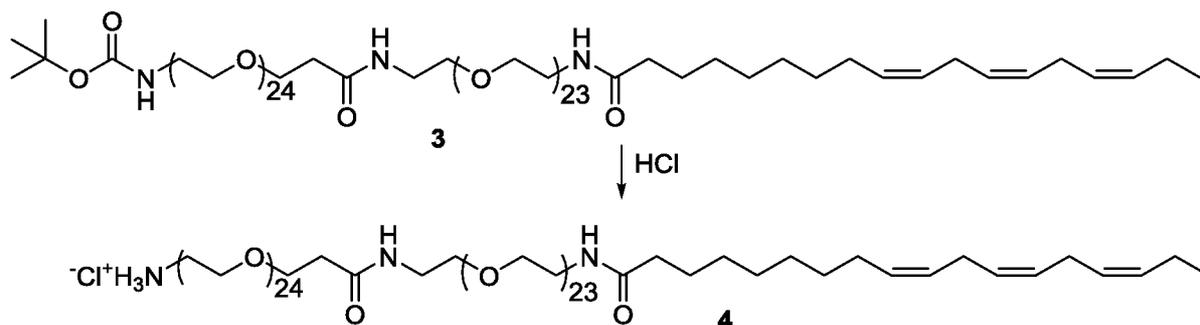


5 К раствору соединения 4 (19 мг, 0,0221 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 3 (112 мг, 0,0454 ммоль, 2,05 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (16 мкл, 0,1106 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. LP94-p выделяли с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-17% метанола в дихлорметане.

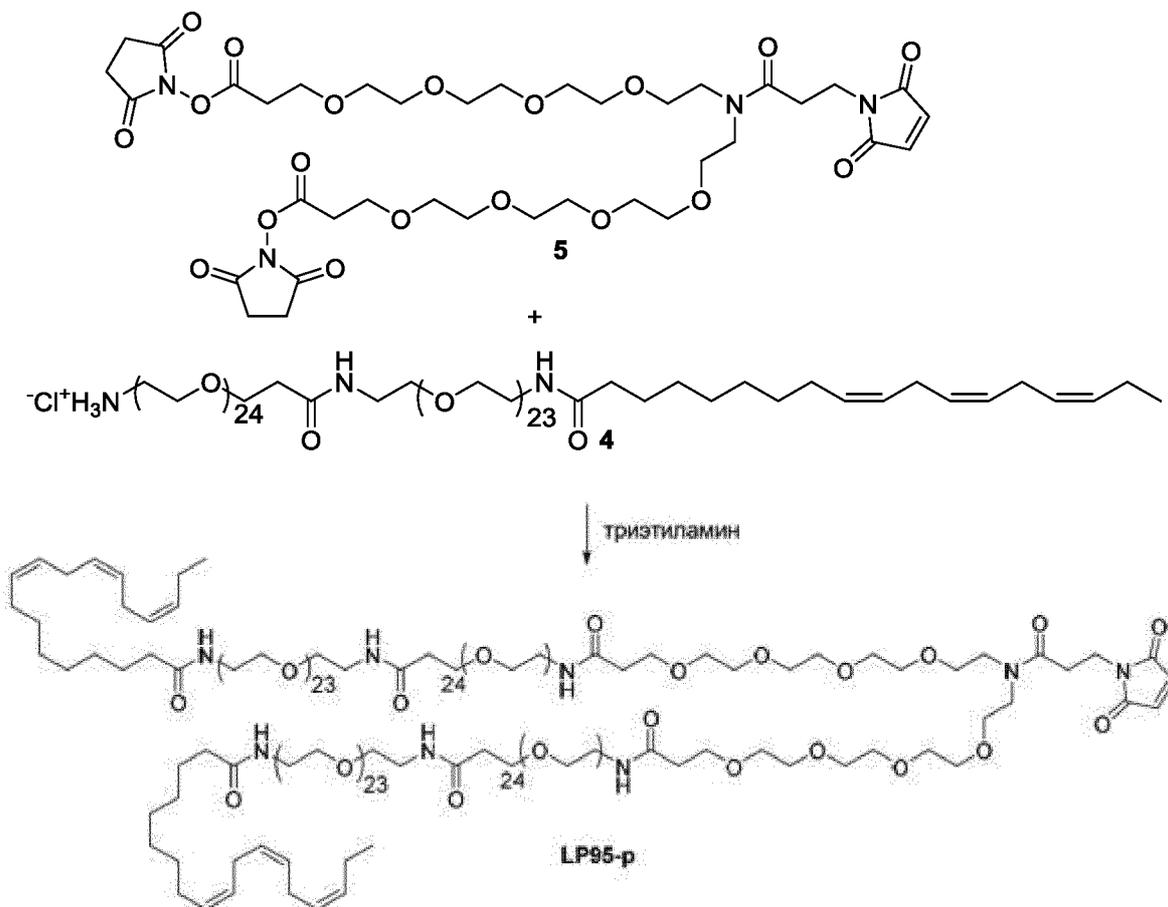
Синтез LP95-p



10 К раствору соединения 1 (150 мг, 0,0652 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (20 мг, 0,0717 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламина (0,034 мл, 0,195 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (3 мл) при комнатной температуре добавляли TBUTU (25,1 мг, 0,0782 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь
15 концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1281,30, найдено: 1281,71.



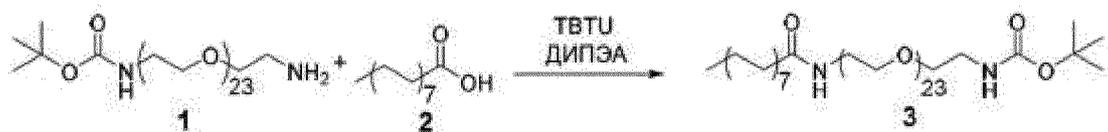
К соединению 3 (80 мг, 0,0312 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (0,390 мл, 1,561 ммоль, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и растворитель удаляли в вакууме. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1231,27, найдено: 1231,65.



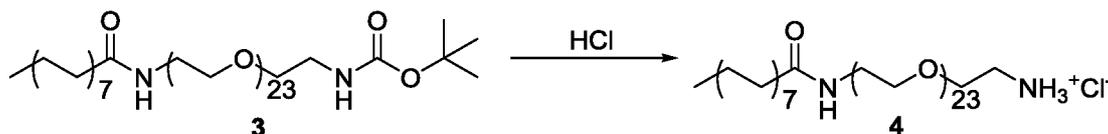
10 К раствору соединения 5 (13 мг, 0,0151 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 4 (77,5 мг, 0,0310 ммоль, 2,05 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,011 мл, 0,0757 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и

растворитель удаляли в вакууме. LP95-р очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+5H]^+/5$, рассчитано: 1110,88, найдено: 1111,62, $[M+6H]^+/6$, рассчитано: 925,90, найдено: 926,41.

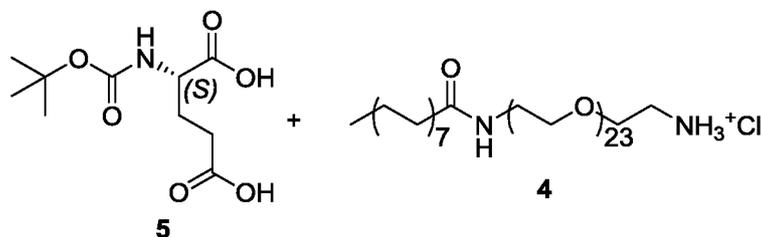
5 Синтез LP101-р

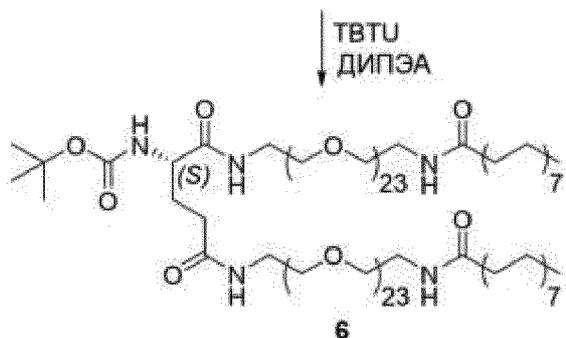


К раствору соединения 1 (250 мг, 0,213 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (65 мг, 0,255 ммоль, 1,20 экв.) и диизопропилэтиламина (0,111 мл, 0,629 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (3 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (102 мг, 0,319 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 6-12% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 1411,95, найдено: 1411,95.

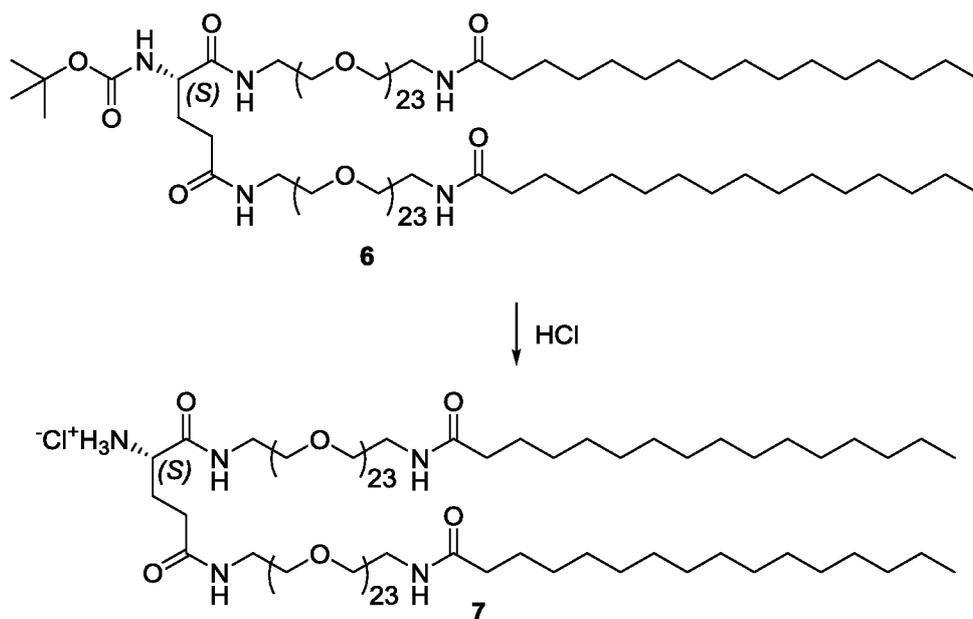


15 К твердому соединению 3 (200 мг, 0,141 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли раствор HCl в диоксане (0,708 мл, 2,833 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и растворитель удаляли в вакууме. Продукт использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 1311,90, найдено: 1312,32.

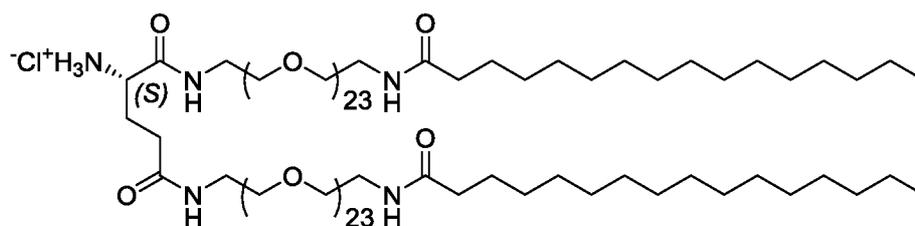




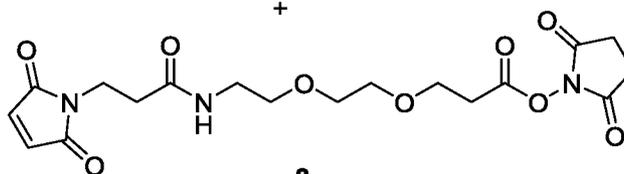
К раствору соединения 5 (100 мг, 0,0404 ммоль, 1,0 экв.), соединения 4 (111 мг, 0,0829 ммоль, 2,05 экв.) и диизопропилэтиламина (35 мл, 0,202 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (3 мл) при комнатной температуре добавляли ТВТУ (32,5 мг, 0,101 ммоль, 2,5 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и затем концентрировали. Соединение 6 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 6-10% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1417,44, найдено: 1418,19.



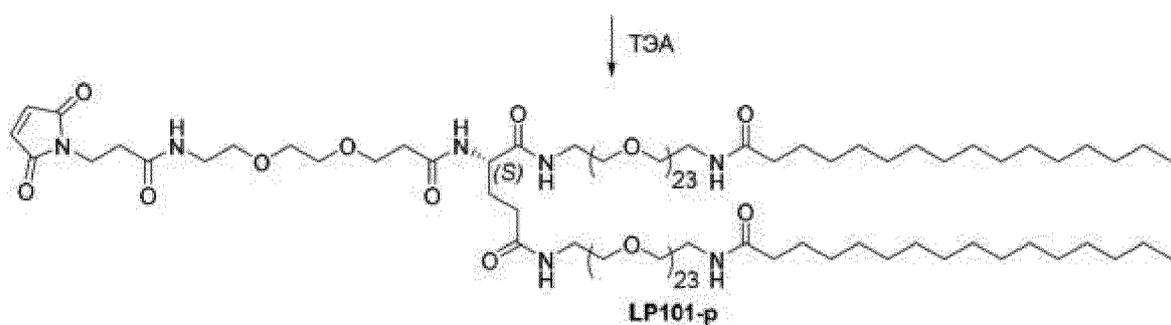
10 К соединению 6 (80 мг, 0,0282 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,353 мл, 1,411 ммоль, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 7 использовали непосредственно без
15 дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+2H]^+/2$, рассчитано: 1367,41, найдено: 1368,26.



7



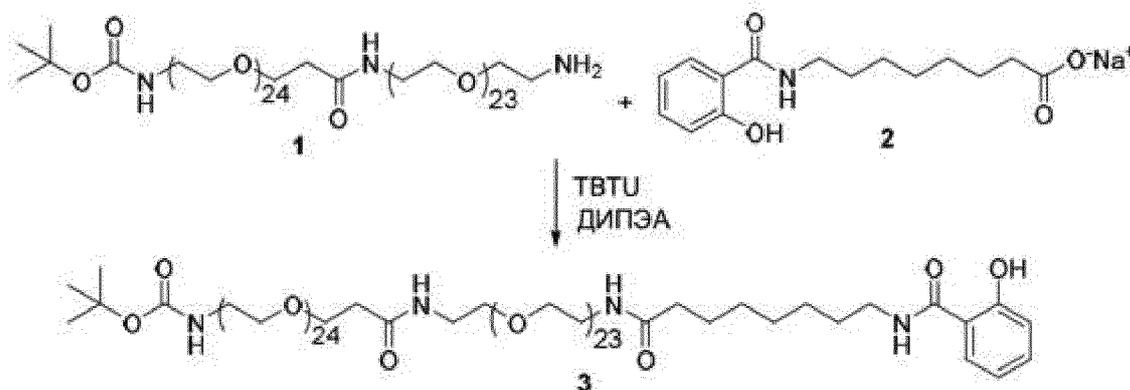
8



LP101-p

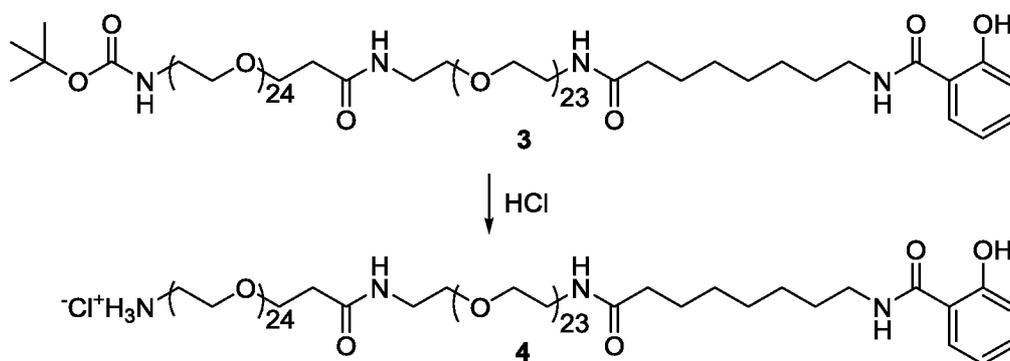
К раствору соединения 7 (78 мг, 0,0281 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 8 (12 мг, 0,0281 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,020 мл, 0,140 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли концентрированием. LP101-p выделяли с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+3H]/3$, рассчитано: 1015,31, найдено: 1015,71.

Синтез LP102-p

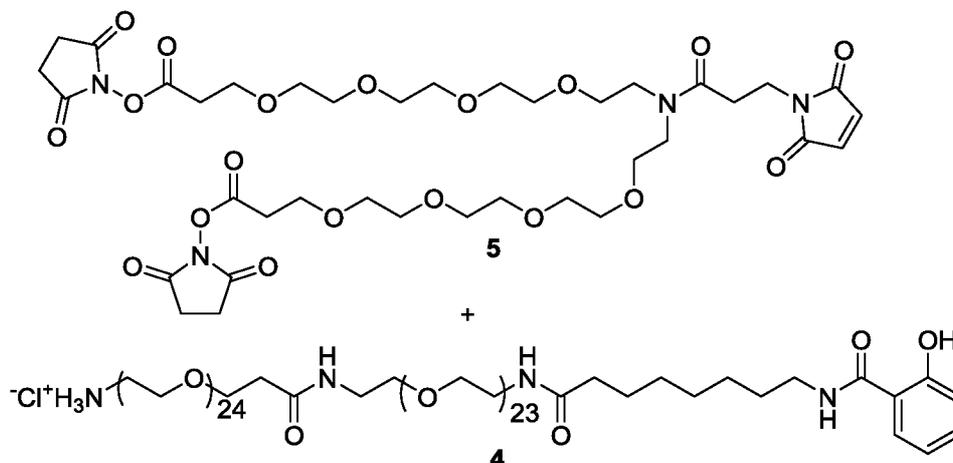


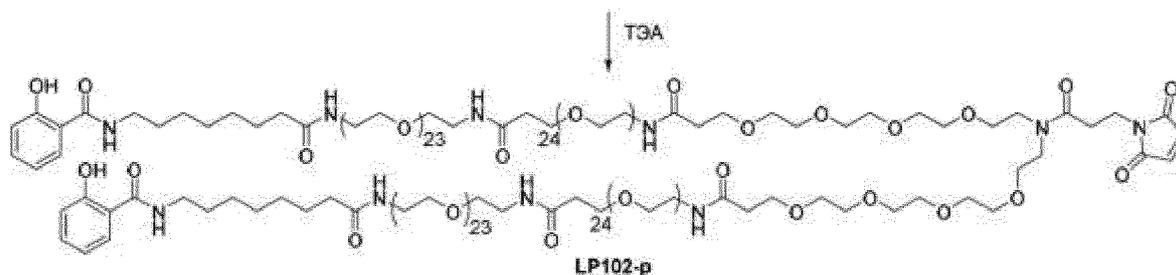
3

К раствору соединения 1 (124 мг, 0,0539 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (19,5 мг, 0,0646 ммоль, 1,2 экв.) и диизопропилэтиламина (0,028 мл, 0,161 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (2 мл) при комнатной температуре добавляли ТВТУ (20,8 мг, 0,0646 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Водную фазу экстрагировали с помощью ДХМ (3×10 мл) и объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-12% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: [M+2H]⁺/2, рассчитано: 1281,76, найдено: 1282,19.



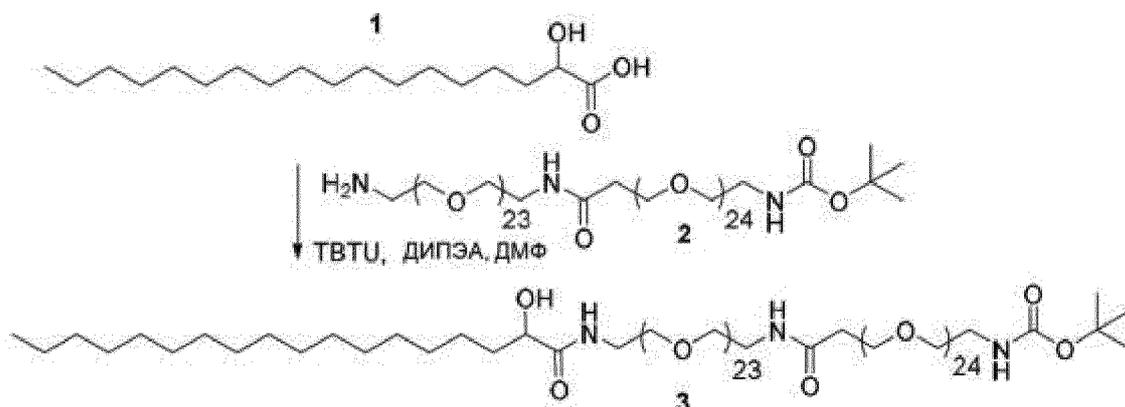
К соединению 3 (66 мг, 0,0257 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,322 мл, 1,287 ммоль, 50 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+2H]⁺/2, рассчитано: 1231,75, найдено: 1232,01.





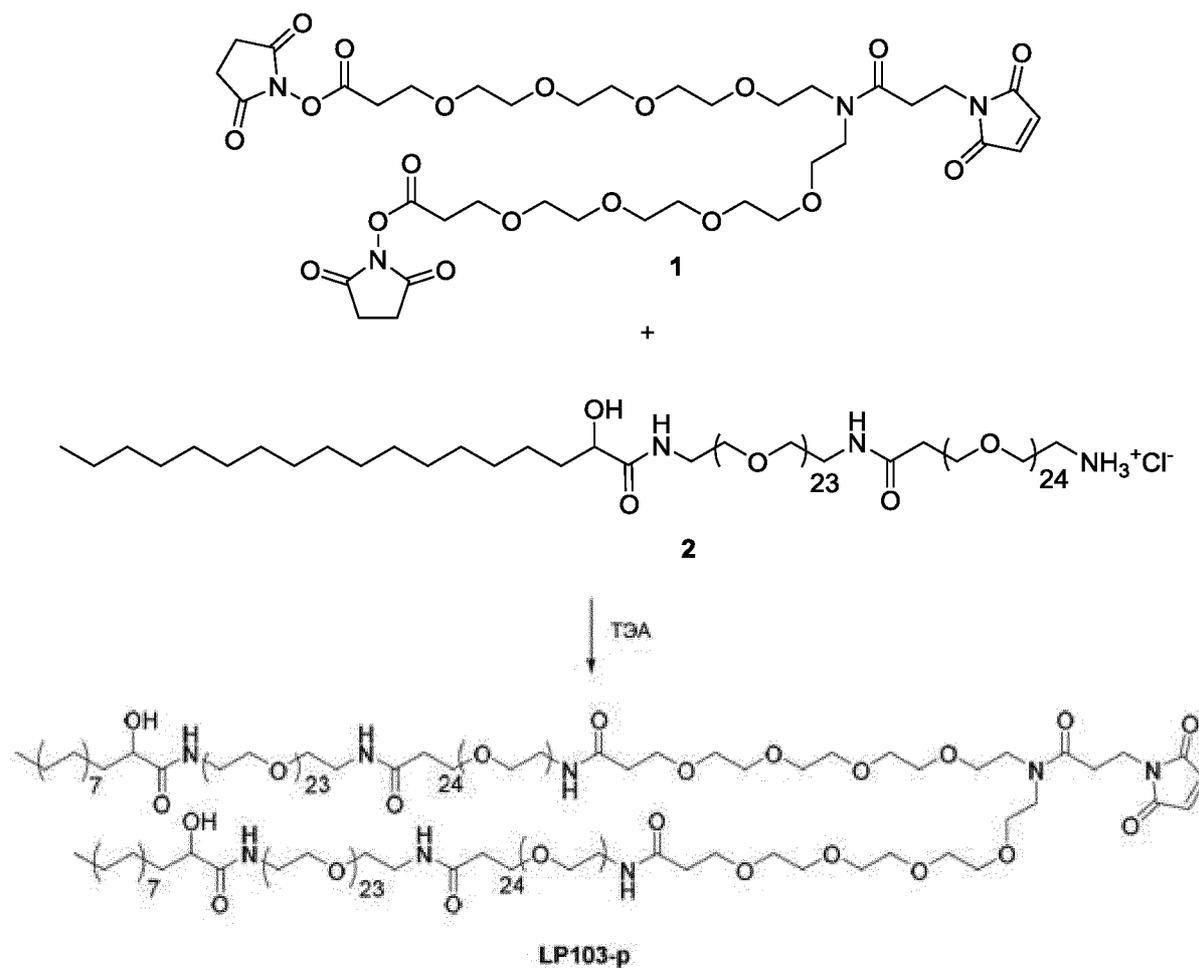
5 К раствору соединения 5 (11 мг, 0,0128 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 4 (64 мг, 0,0256 ммоль, 2,00 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,009 мл, 0,064 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и растворитель удаляли концентрированием. LP102-p выделяли с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+6H]^+/6$, рассчитано: 926,20, найдено: 926,41.

Синтез LP103-p



10 К раствору соединения 1 (35 мг, 0,1170 ммоль) в ДМФ (2,0 мл) добавляли Вос-ПЭГ₄₇-NH₂ 2 (269 мг, 0,1170 ммоль), ТВТУ (45,1 мг, 0,1404 ммоль) и ДИПЭА (60 мкл). После перемешивания полученной суспензии в течение ночи добавляли воду. Смесь экстрагировали с использованием смеси ДХМ:20%ТФЭ и объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄. После фильтрования растворитель выпаривали в вакууме досуха и неочищенное соединение 3 очищали с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:20% MeOH). К продукту в безводной среде добавляли 2 мл 4 н. раствора HCl в диоксане до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на завершение реакции удаления защитной группы:

20 $[M+H]^+$, рассчитано: 2483,59 m/z, найдено: 2484,01.

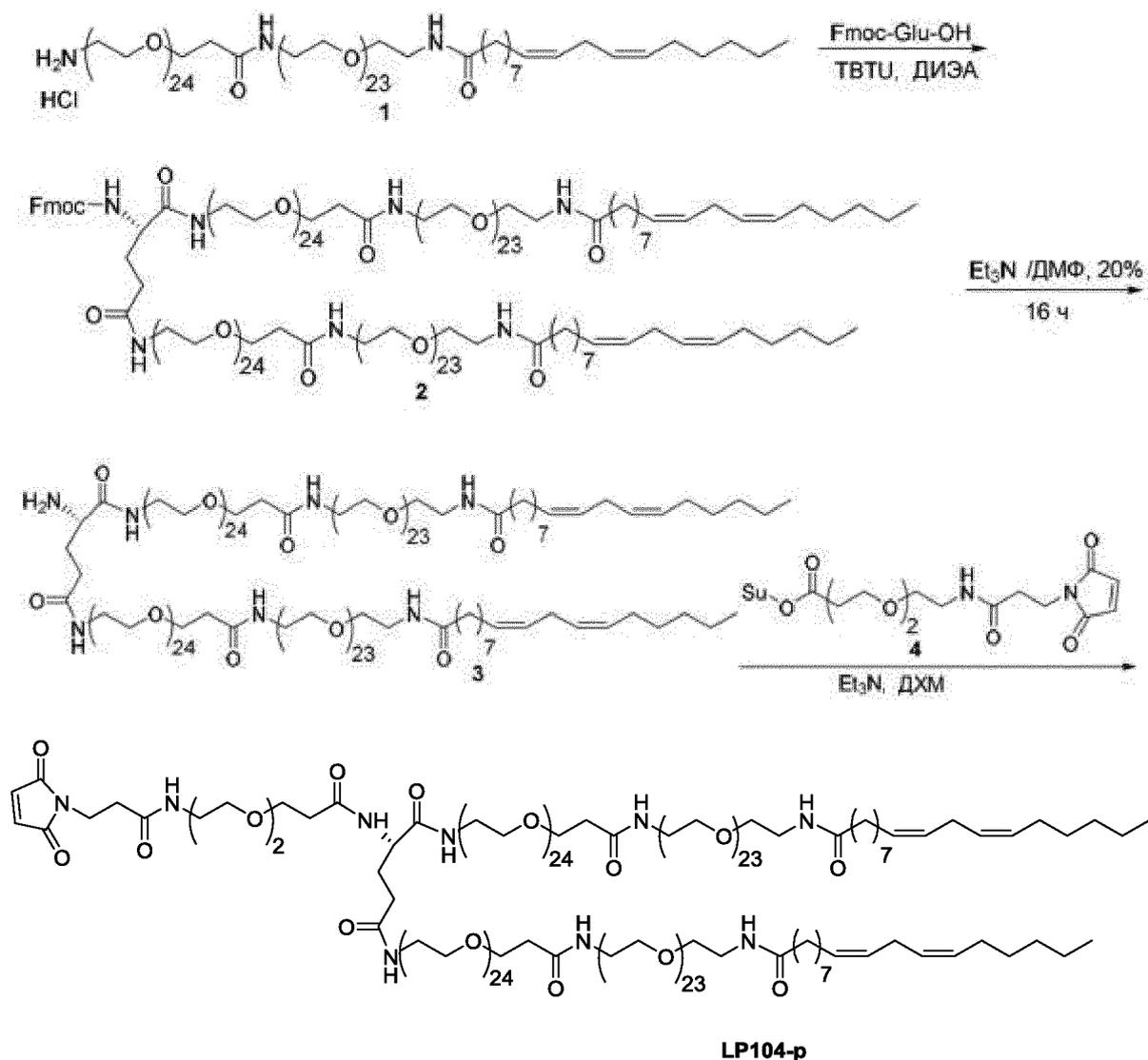


К раствору соединения 4 (10 мг, 0,0116 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 5 (59,3 мг, 0,0239 ммоль, 2,05 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (8 мкл, 0,0582 ммоль, 5,0 экв.).

5

Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. LP103-p выделяли с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-17% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+6H]^+/6$, рассчитано: 933, найдено: 934, $[M+7H]^+/7$, рассчитано: 800, найдено: 801.

10 Синтез LP104-p



Соединение 1 (синтез описан выше в методиках получения LP87)

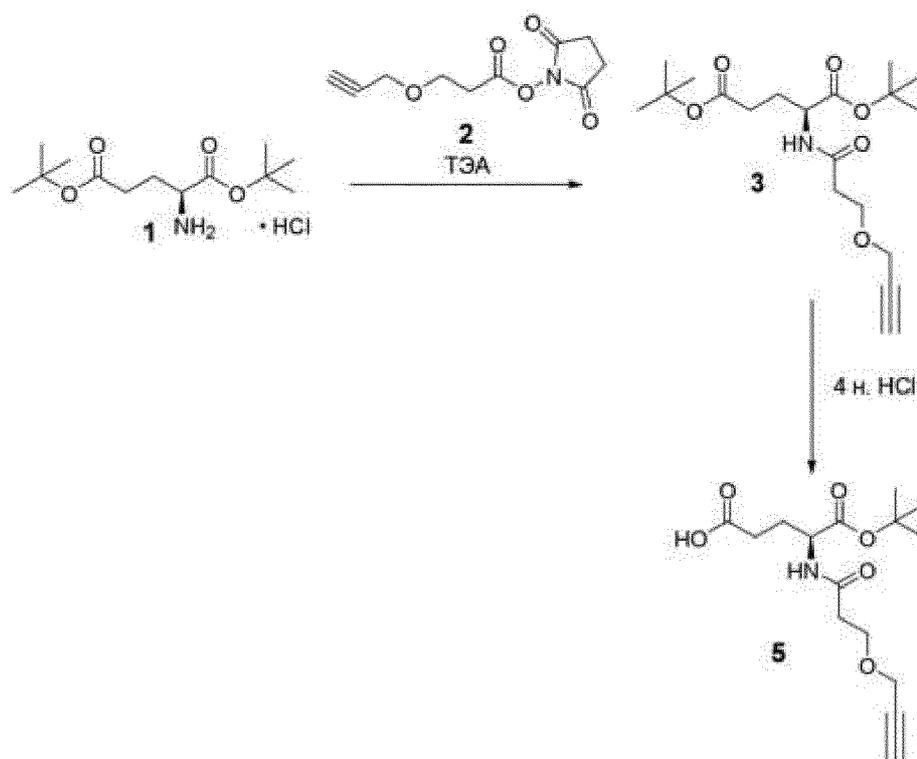
5 конъюгировали с Fmoc-Glu-OH так, как это описано выше в методике получения LP54-p. Рассчитано: $MM = 5261,56$, $(M + 3 \times 18)/3 = 1771,86$, $(M + 4 \times 18)/4 = 1333,39$. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): $1771,98 [M+3NH_4]^3+$, $1333,57 [M+4NH_4]^4+$.

10 Из соединения 2 удаляли защитную группу Fmoc так, как это описано для получения соединения 11, описанного выше в методике синтеза LP39-p.

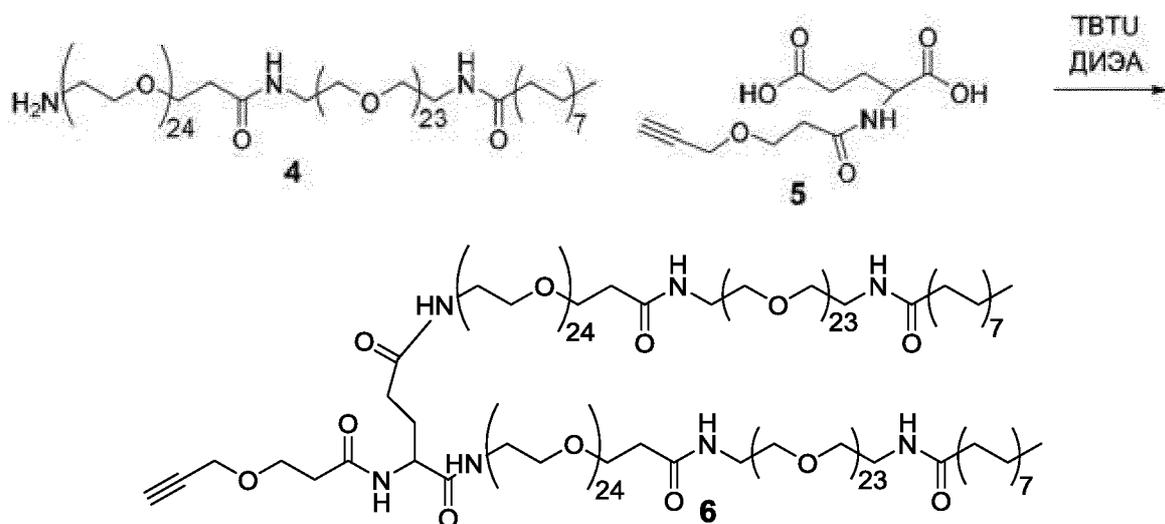
Полученный продукт 3 конъюгировали с активированным сложным эфиром-соединением 4 так, как это описано выше в методике синтеза LP39-p. LP104-p

15 выделяли путем очистки с помощью CombiFlash®. Рассчитано: $MM = 5349,62$, $(M + 3 \times 18)/3 = 1801,21$, $(M + 4 \times 18)/4 = 1355,41$. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): $1801,87 [M+3NH_4]^3+$, $1355,92 [M+4NH_4]^4+$.

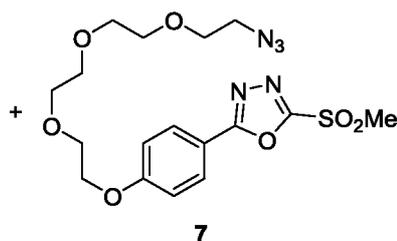
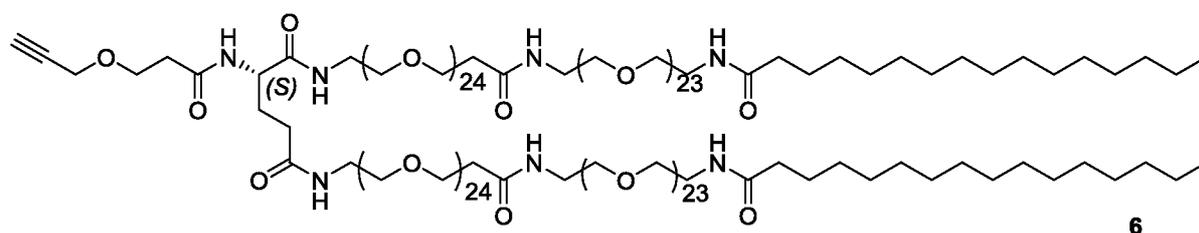
Синтез LP106-p



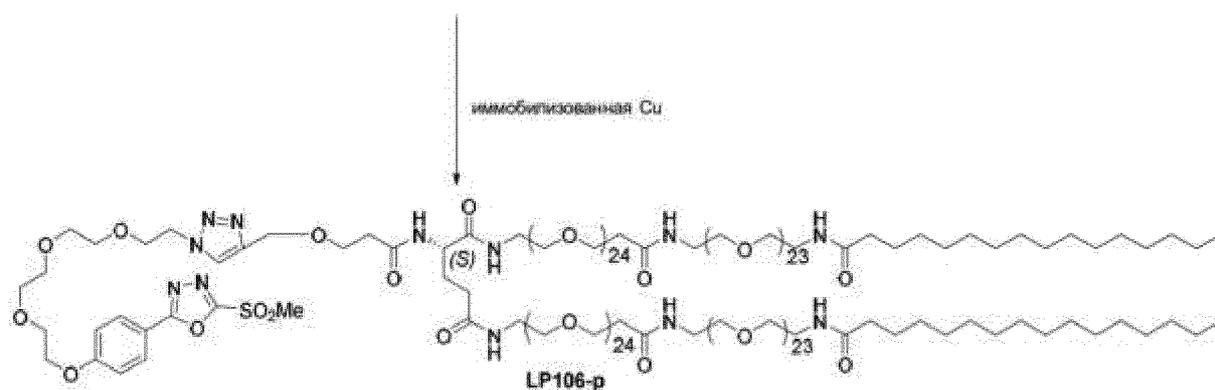
К соединению 1 (200 мг, 0,676 ммоль) в ДХМ (4 мл) добавляли ТЭА (218 мкл, 1,56 ммоль) затем соединение 2 (198 мг, 0,879 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После завершения все летучие вещества удаляли и из неочищенного соединения 3 удаляли защитную группу с использованием 4 н. раствора HCl и получали кислоту 5, которую затем использовали без дополнительной очистки.



Неочищенное соединение 5 (60 мг, предположительно 0,1014 ммоль) растворяли в ДМФ (1 мл), обрабатывали с помощью ТВТУ (71,6 мг, 0,223 ммоль) и перемешивали в течение 5 мин. Затем добавляли соединение 4 (668 мг, 0,273 ммоль) и ДИЭА (91,8 мкл, 0,527 ммоль) в ДМФ (1 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения все летучие вещества удаляли и соединение 6 выделяли при элюировании в градиентном режиме с использованием MeOH (0,1% ТФК) в воде (0,1% ТФК) и с использованием колонки Waters™ Phenomenex C18 Gemini (10 мкм, 50 мм×250 мм).



10

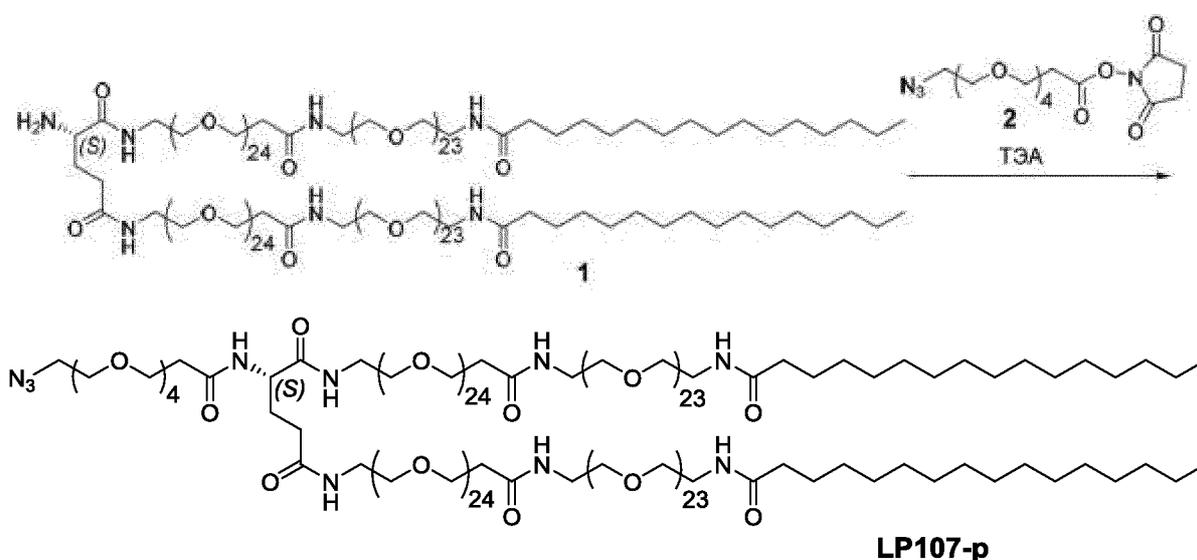


15

Соединение 6 (23,5 мг, 0,0532 ммоль) и соединение 7 (29,9 мг, 0,0586 ммоль) растворяли в 12,0 мл ДМФ и сосуд продували с помощью N₂ в течение 5 мин. Затем добавляли иммобилизованную медь (337 мг, 0,0532 ммоль) и аскорбат натрия (31,6 мг, 0,1597 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение ночи.

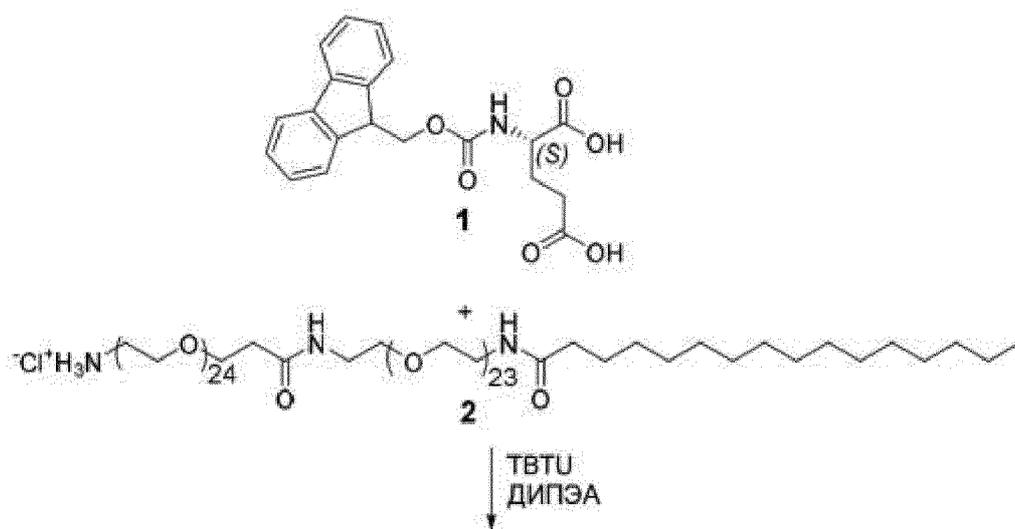
Смолу и другие твердые вещества отфильтровывали. Фильтрат концентрировали в вакууме и очищали с помощью ВЭЖХ и получали LP106-p.

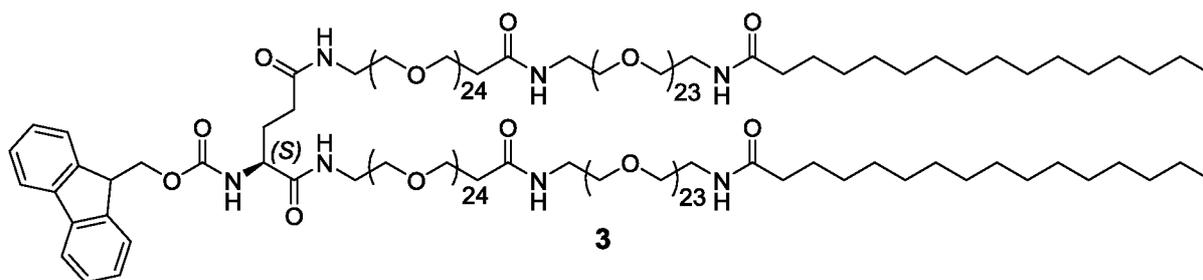
Синтез LP107-p



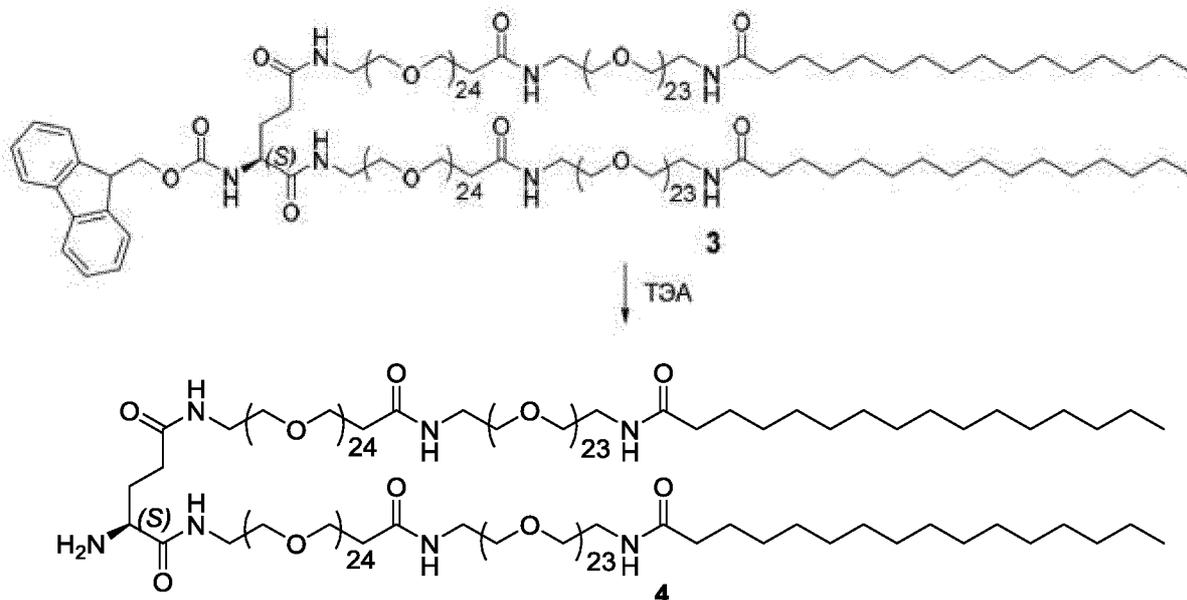
Соединение 1 (982 мг, синтезировали так, как это описано выше в
5 методиках получения LP38-p) растворяли в 10 мл ДХМ. Добавляли соединение 2
(90 мг) и триэтиламин (0,081 мл). Реакционную смесь перемешивали при
комнатной температуре в течение 5-8 ч до завершения реакции. Продукт
экстрагировали 1 н. раствором HCl, затем насыщенным раствором NaHCO₃,
затем промывали рассолом и в заключение сушили над Na₂SO₄. LP107-p
10 дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии.

Синтез LP108-p

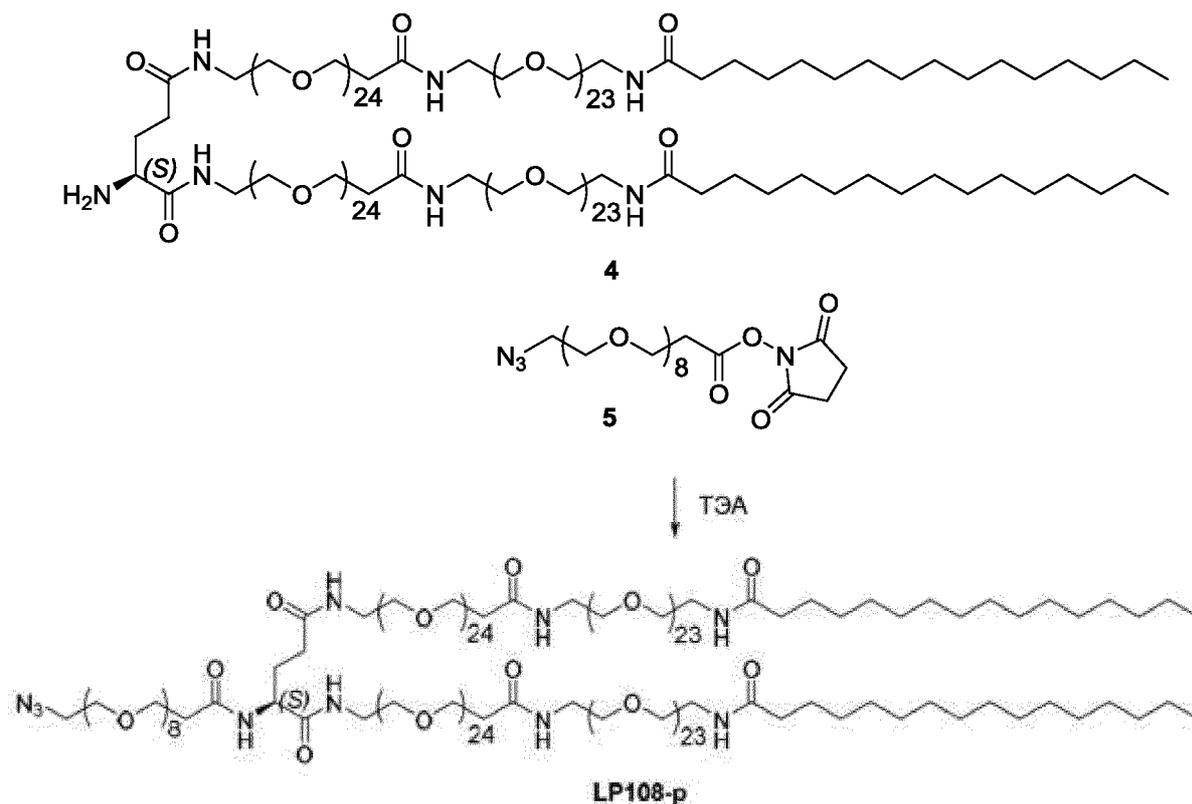




К раствору соединения 1 (595 мг, 1,610 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (8377 мг, 3,382 ммоль, 2,10 экв.) и диизопропилэтиламина (1,122 мл, 6,443 ммоль, 4,0 экв.) в безводном ДМФ (100 мл) при комнатной температуре добавляли ТВТУ (1241 мг, 3,865 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем реакционную смесь концентрировали. Остаток промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[\text{M}+5\text{H}]/5$, рассчитано: 1043,05, найдено: 1044,38.

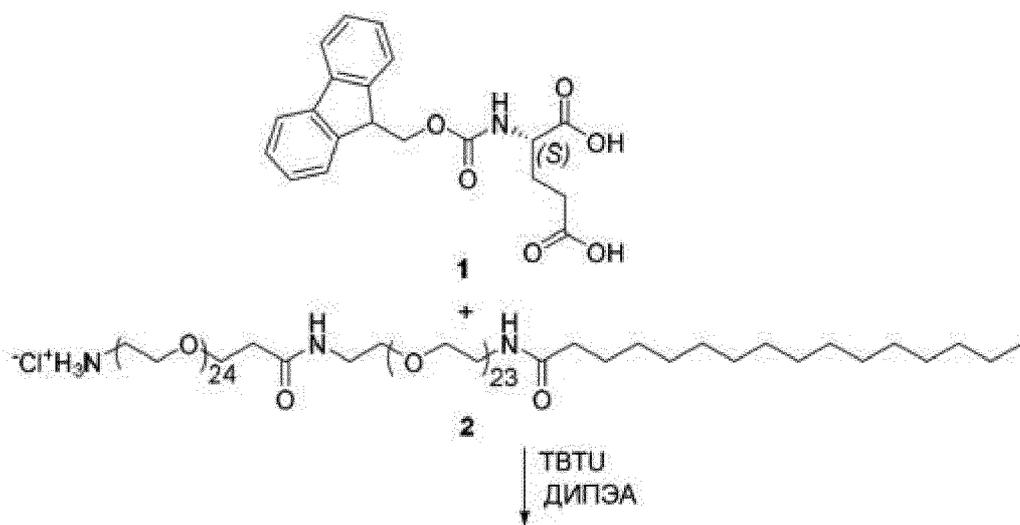


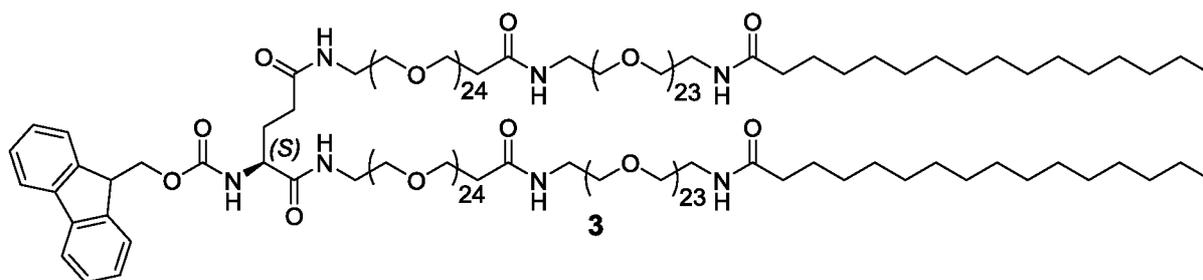
К раствору соединения 1 (104 мг, 0,0199 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДМФ (1,6 мл) при комнатной температуре добавляли ТЭА (0,4 мл). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[\text{M}+5\text{H}]/5$, рассчитано: 998,63, найдено: 999,97.



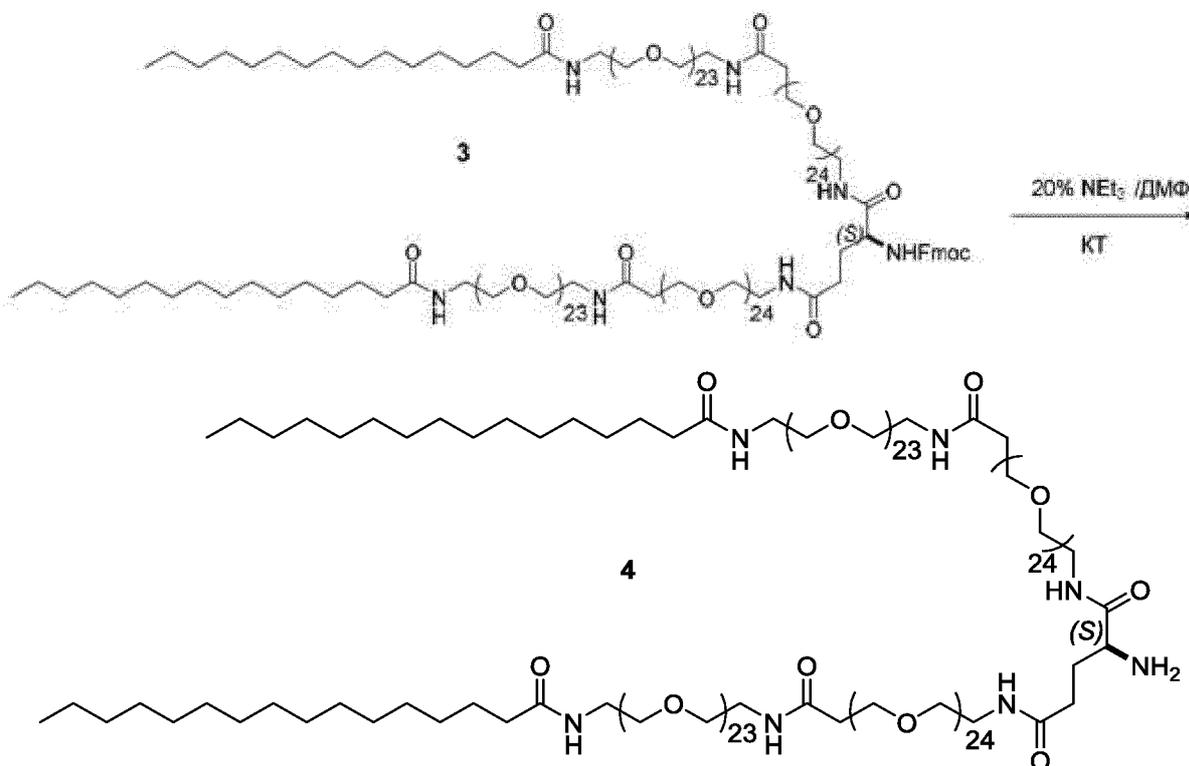
К раствору соединения 4 (99 мг, 0,198 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 5 (134 мг, 0,238 ммоль, 1,2 экв.) в безводном ДХМ (3 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (0,006 мл, 0,0397 ммоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. LP108-p выделяли с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1088,48, найдено: 1089,86.

10 Синтез LP109-p



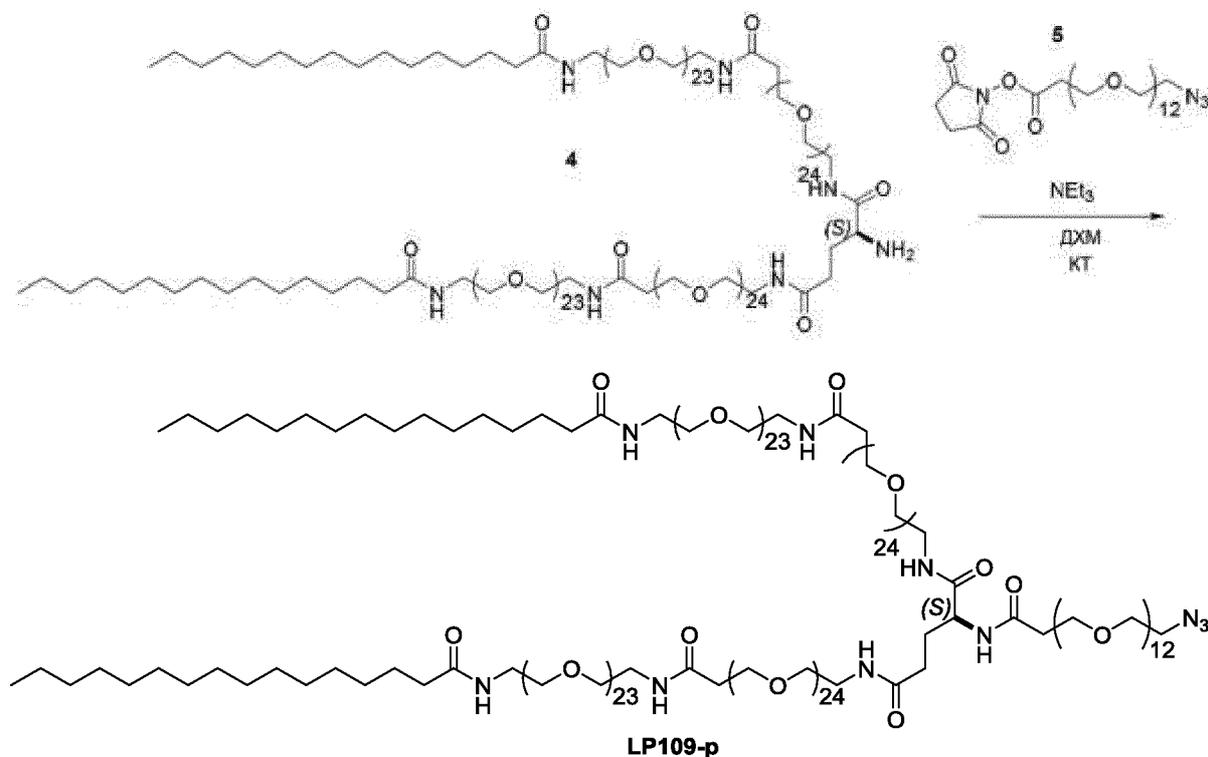


К раствору соединения 1 (595 мг, 1,610 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (8377 мг, 3,382 ммоль, 2,10 экв.) и диизопропилэтиламина (1,122 мл, 6,443 ммоль, 4,0 экв.) в безводном ДМФ (100 мл) при комнатной температуре добавляли ТВТУ (1241 мг, 3,865 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем реакционную смесь концентрировали. Остаток промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 12-20% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1043,05, найдено: 1044,38.



К соединению 3 (100 мг) при комнатной температуре добавляли 20% раствор NEt₃ (0,053 мл) в ДМФ. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь азеотропно перегоняли со смесью

PhMe/MeOH и концентрировали в высоком вакууме в течение ночи и получали неочищенное соединение 4. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 4989,17 m/z, найдено: 1262,31 (+4/4, +H₂O) m/z.



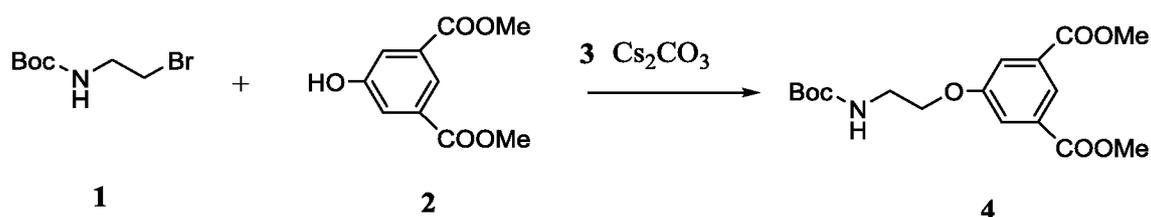
При комнатной температуре и при продувке с помощью N₂ (газообразный) получали раствор соединения 4 (95,7 мг) и NEt₃ в безводном ДХМ (0,008 мл). Затем медленно добавляли соединение 5 (14,2 мг). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение.

10 Затем реакционную смесь непосредственно концентрировали. Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки, содержащей в качестве неподвижной фазы 12 г силикагеля, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (от 0% В до 100% В) в течение 20 мин, при этом соединение LP109-p элюировалось при 100% В, и получали чистые и неочищенные фракции.

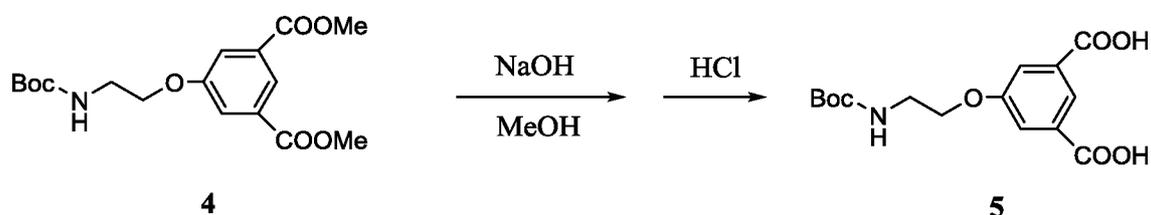
15 Две чистые фракции собирали и концентрировали. Неочищенную фракцию концентрировали и повторно вводили в реакцию для обеспечения дополнительного превращения. Выделение в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (от 0% В до 100% В) давало обладающее улучшенным качеством, но все еще немного загрязненное соединение LP109-p,

20 которое элюировалось при 88% В. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 5614,51 m/z, найдено: 1422,64 (+4/4, +H₂O) m/z.

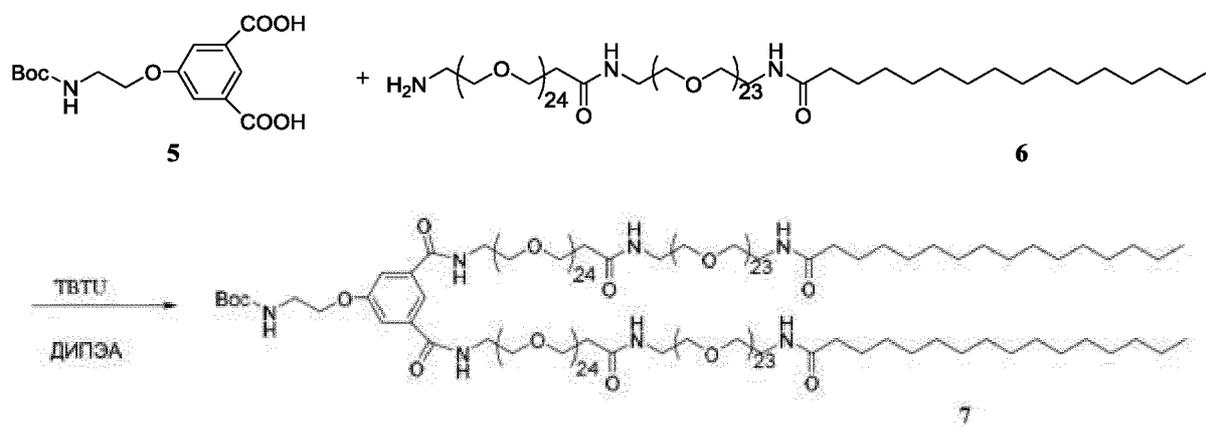
Синтез LP110-p



К раствору соединения 1 (4,00 г) в 20 мл ДМФ при комнатной температуре добавляли соединения 2 (4,50 г) и 3 (11,6 г). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Продукт экстрагировали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор NaOH, рассол) и сушили над Na₂SO₄. ТСХ показала, что соединение 2 удалено с помощью NaOH. Соединение 4 непосредственно использовали на следующей стадии.

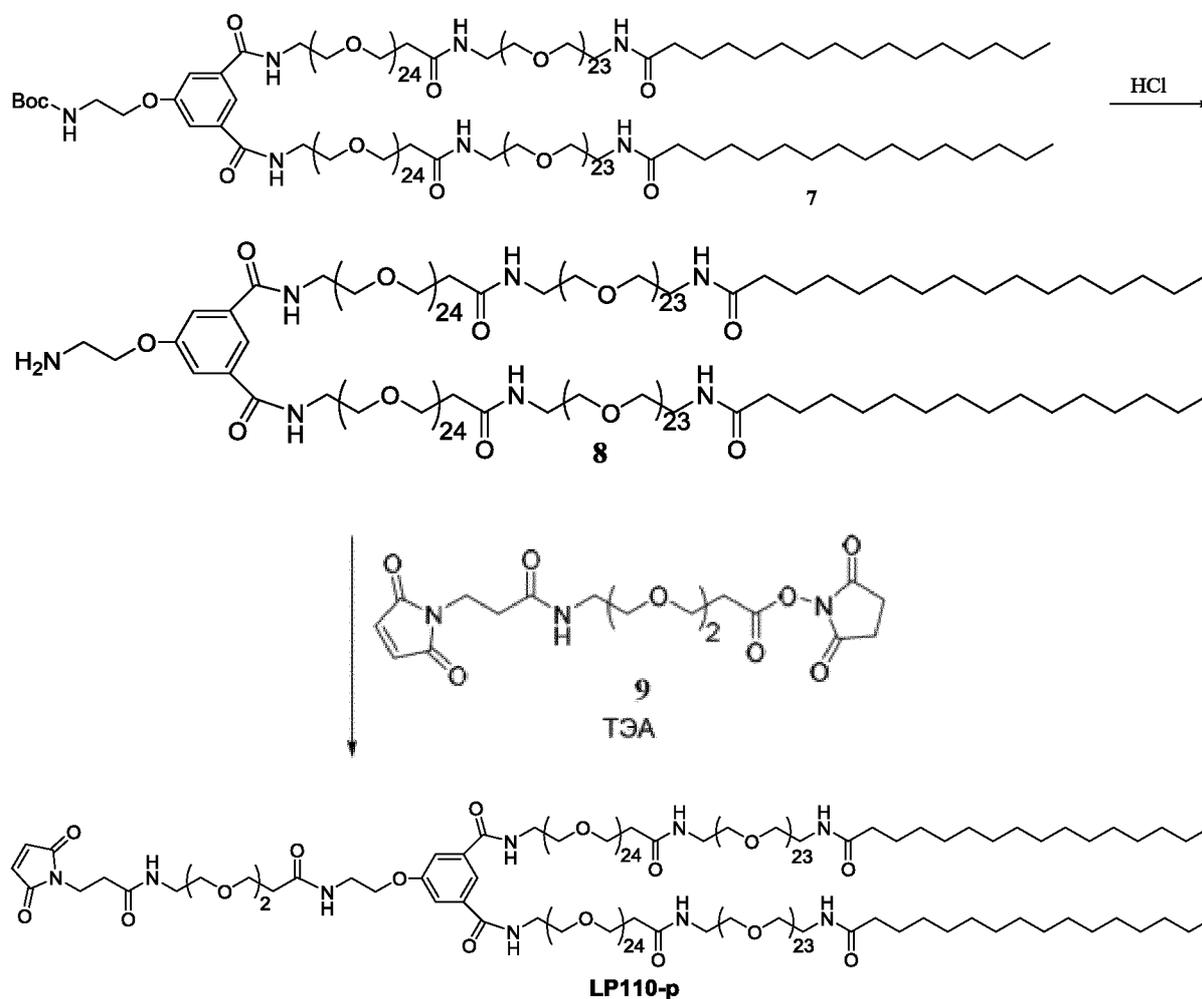


К раствору соединения 4 (3,04 г) в 100 мл MeOH при комнатной температуре добавляли раствор NaOH (1,03 г). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали для удаления MeOH. Водную фазу экстрагировали этилацетатом для удаления какого-либо непрореагировавшего исходного вещества. Смесь подкисляли до обеспечения значения pH, равного 3, затем экстрагировали этилацетатом, сушили с использованием Na₂SO₄ и концентрировали и получали соединение 5 в виде белого твердого вещества. Соединение 5 непосредственно использовали на следующей стадии.



К соединению 1 (2,9 мг) в ДХМ при комнатной температуре добавляли 2 экв. ДИПЭА (0,006 мл). Соединение 6 (45 мг), ТВТУ (6,3 мг) и 2 экв. ДИПЭА (0,006 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. К раствору ПЭГ шприцевым насосом (в течение 2-3 ч) медленно добавляли смесь, содержащую активированную кислоту. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

Продукт экстрагировали с использованием стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Остаток очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% B).

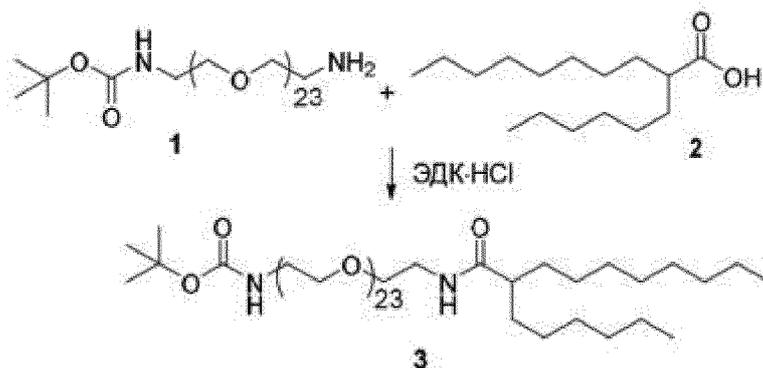


К соединению 7 (27 мг) при комнатной температуре добавляли 1,5 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенное

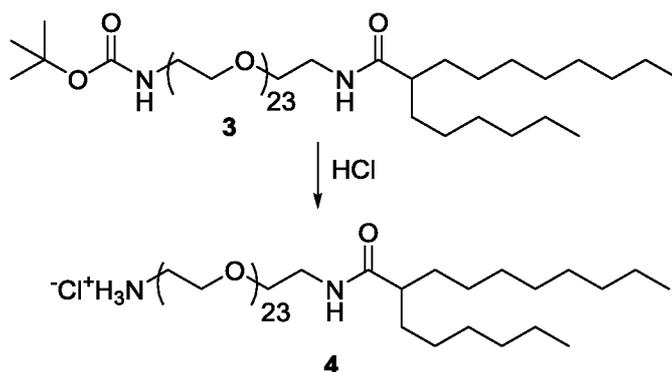
соединение 8 растворяли в ДХМ и добавляли соединение 9 (2,7 мг) и ТЭА (1,1 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

5 LP110-р очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием от ДХМ до 20% MeOH в ДХМ (0-100% B).

Синтез LP111-р

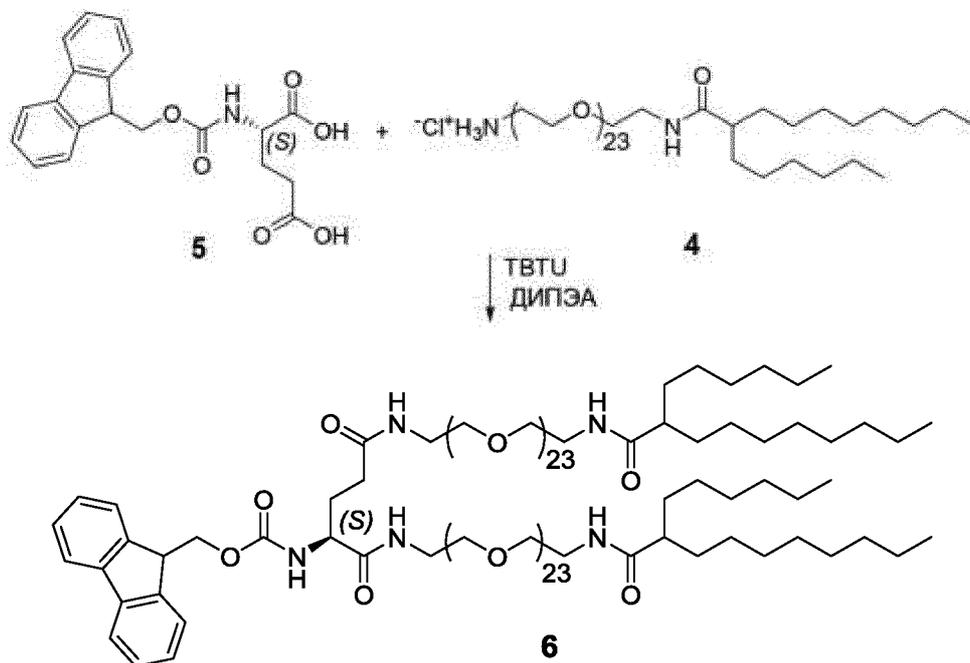


10 К раствору соединения 1 (2500 мг, 2,130 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 2 (655 мг, 2,556 ммоль, 1,2 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли ЭДК·НСІ (630 мг, 3,195 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+H]^+$,
15 рассчитано: 1411,95, найдено: 1412,80.

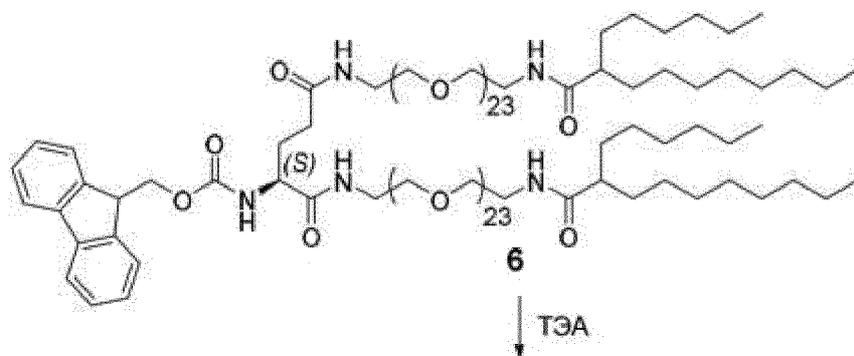


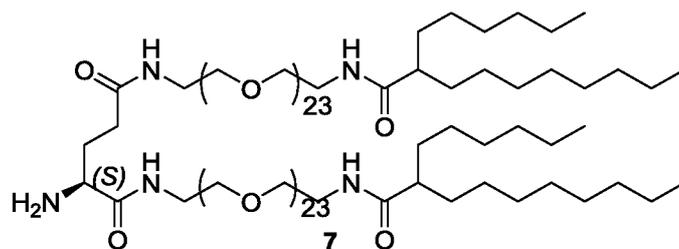
20 К соединению 3 (2400 мг, 1,699 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (8,499 мл, 33,997 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без

дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 1311,90, найдено: 1312,95.

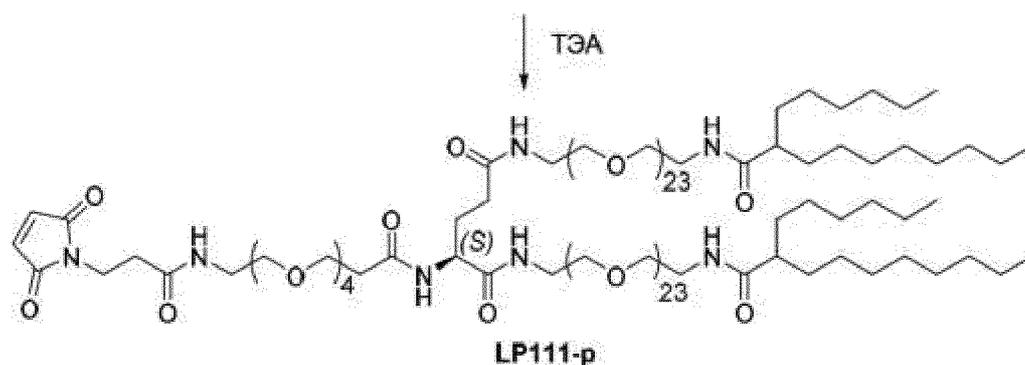
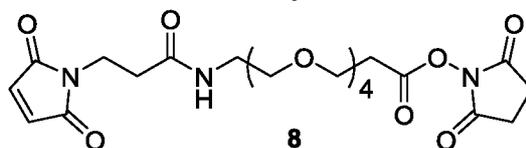
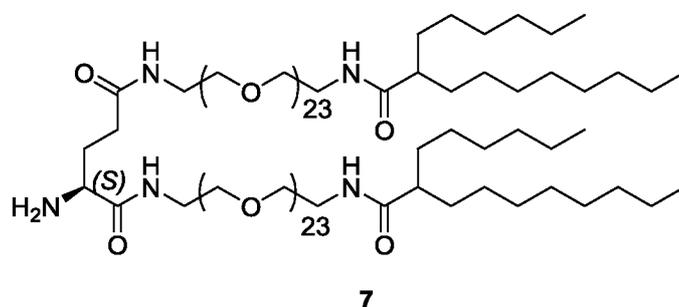


- 5 К раствору соединения 5 (300 мг, 0,812 ммоль, 1,0 экв.), соединения 4 (2,299 г, 1,705 ммоль, 2,10 экв.) и диизопропилэтиламина (0,566 мл, 3,248 ммоль, 4,0 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (625 мг, 1,949 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем реакционную смесь концентрировали. Остаток промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Соединение 6 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 10-18% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+2H]/2$, рассчитано: 1478,45, найдено: 1479,89.
- 10





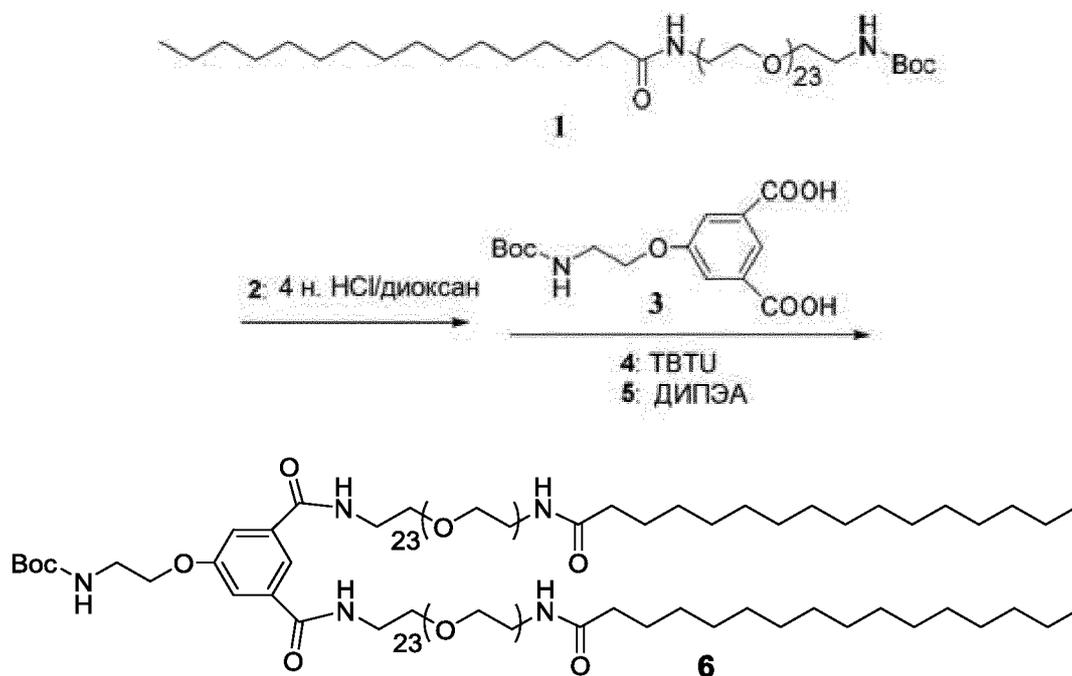
5 К раствору соединения 6 (1690 мг, 0,571 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДМФ (8 мл) при комнатной температуре добавляли триэтиламин (2 мл). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. Соединение 7 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+2H]/2$, рассчитано: 1367,41, найдено: 1368,88.



10 К раствору соединения 7 (1563 мг, 0,571 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 2 (381 мг, 0,743 ммоль, 1,3 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли ТЭА (0,162 мл, 1,143 ммоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи и растворитель удаляли в вакууме. LP111-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании

с помощью 8-16% метанола в дихлорметане. ЖХ-МС: $[M+3H]/3$, рассчитано: 1044,67, найдено: 1046,18.

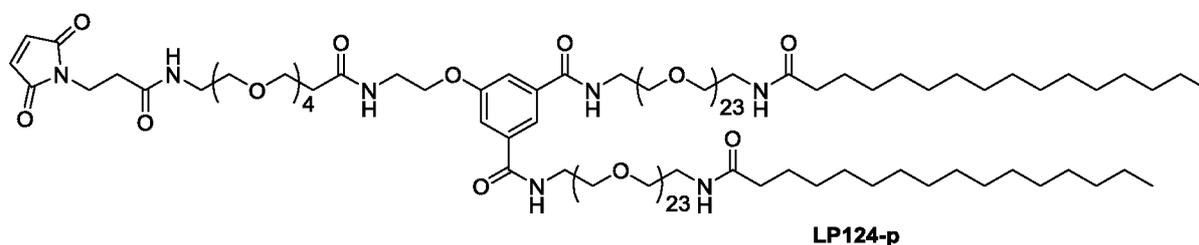
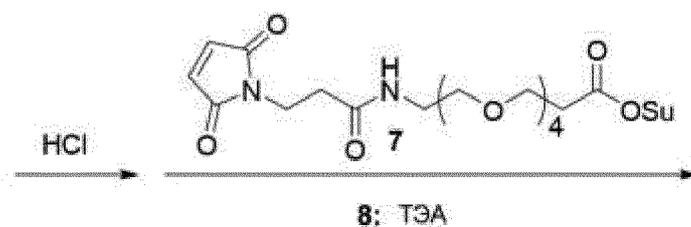
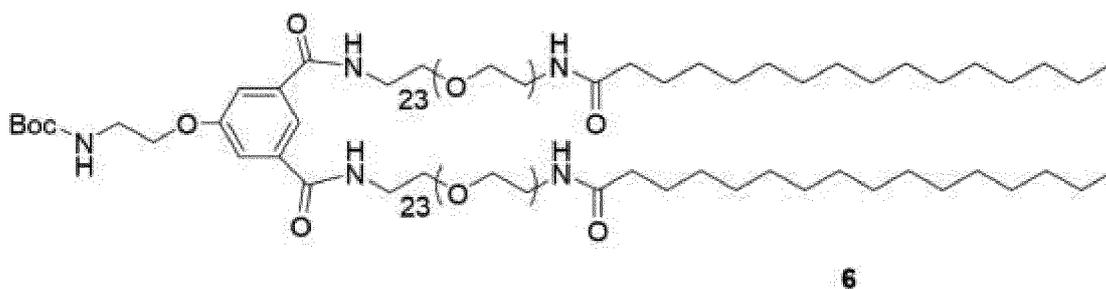
Синтез LP124-p



5

К соединению 1 (760 мг) при комнатной температуре добавляли 2 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ и добавляли соединения 3 (84,1 мг), 4 (207 мг) и 5 (0,281 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

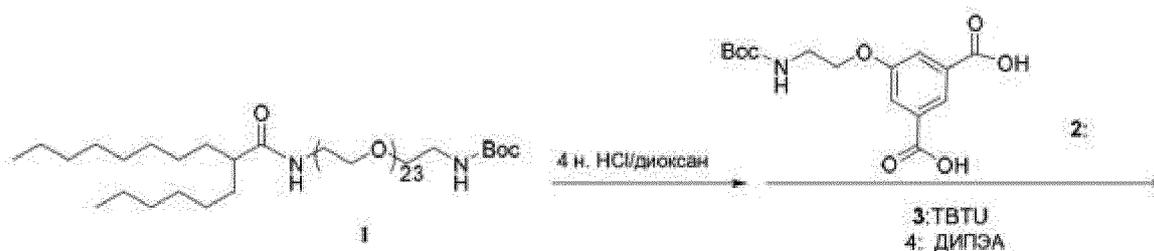
15 Продукт экстрагировали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Соединение 6 очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% B).

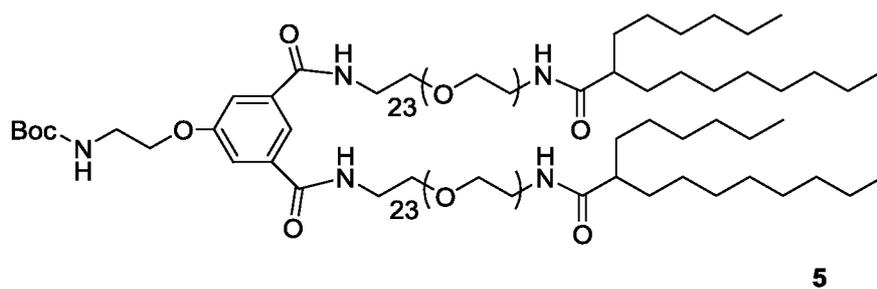


К соединению 6 (250 мг) при комнатной температуре добавляли 4 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ, затем добавляли соединения 7 (52,9 мг) и 8 (0,036 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

LP124-p очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% B).

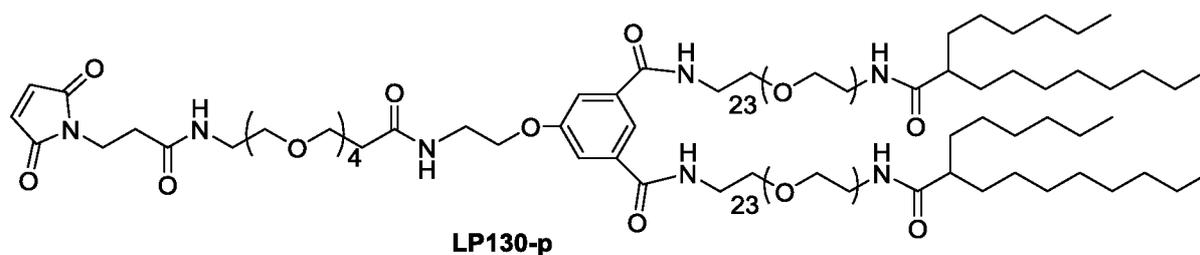
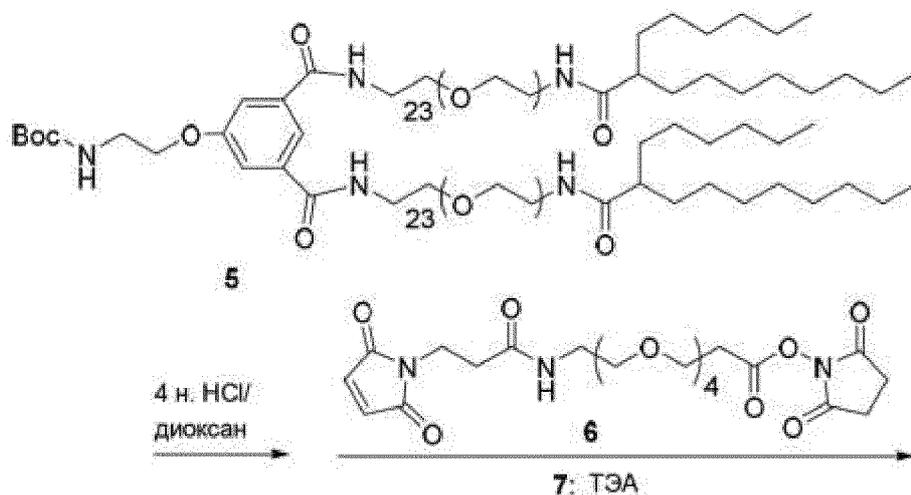
Синтез LP130-p





К соединению 1 (1,89 г) при комнатной температуре добавляли 5 мл 4 М раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ и добавляли соединения 2 (209 мг), 3 (516 мг) и 4 (0,70 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

Продукт экстрагировали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, рассол). Соединение 5 очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием 0-20% MeOH в ДХМ (0-100% В).



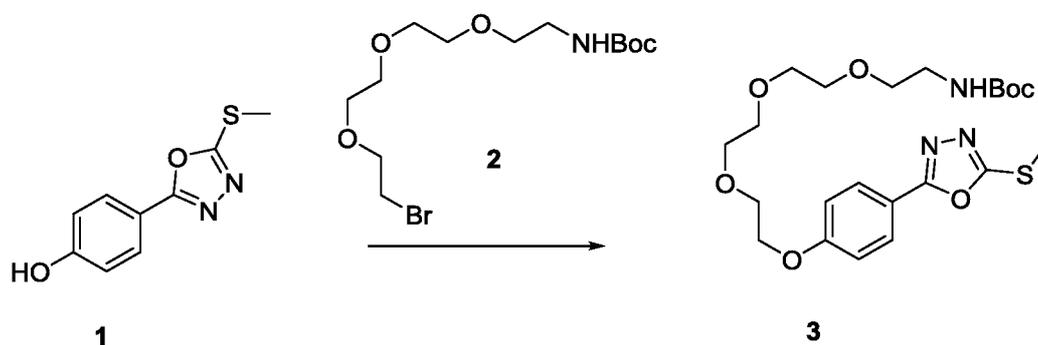
К соединению 5 (800 мг) при комнатной температуре добавляли 5 мл 4 н. раствора HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной

температуре в течение 2 ч до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ, затем добавляли соединения 2 (169 мг) и 3 (0,116 мл).

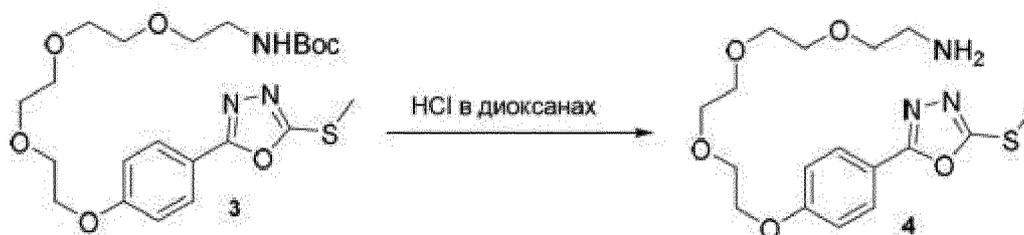
5 Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение.

LP130-р очищали с помощью CombiFlash® с использованием силикагеля в качестве неподвижной фазы, в градиентном режиме с использованием от ДХМ до 20% MeOH в ДХМ (0-100% B).

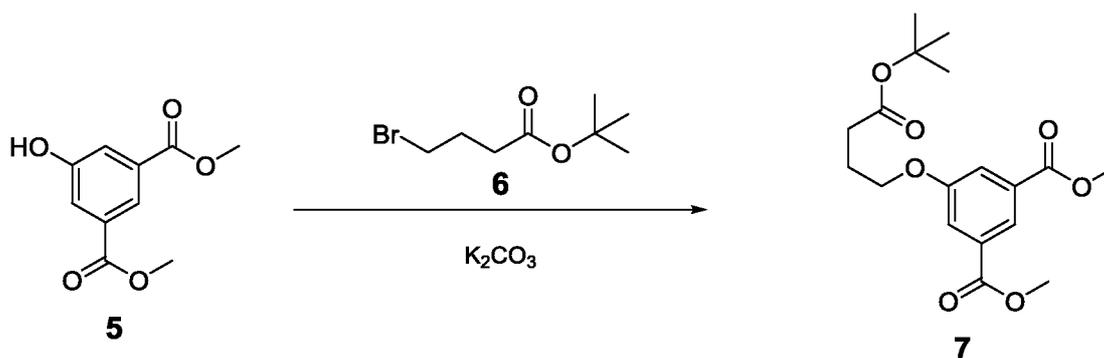
Синтез LP143-р



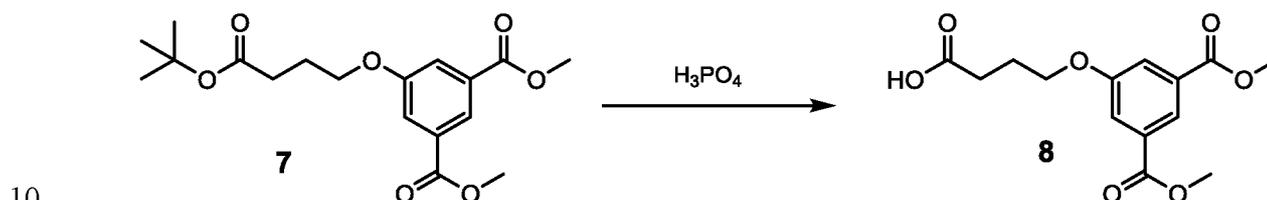
15 В сосуде высокого давления соединение 1 (500 мг) растворяли в 10 мл безводного ТГФ и добавляли K_2CO_3 (398 мг). Добавляли соединение 2 (983 мг) в виде раствора в минимальном количестве ДМФ и сосуд закрывали и реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение ночи. Затем реакционной смеси давали охладиться до комнатной температуры. Твердые вещества отфильтровывали и реакционную смесь концентрировали в вакууме. Соединение 3 очищали с помощью флэш-хроматографии при элюировании с помощью 0-100% EtOAc в гексанах.



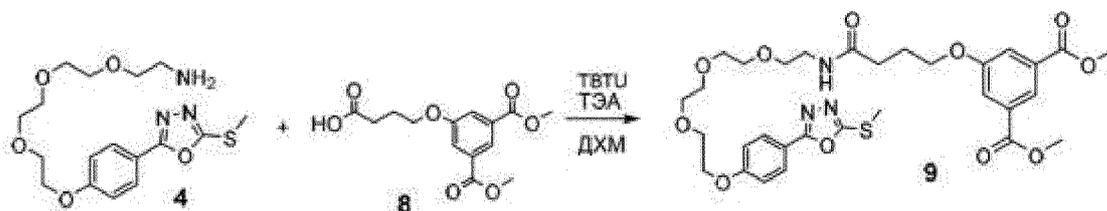
Соединение 3 (1070 мг) растворяли в 4 мл 4 М раствора HCl в диоксанах и перемешивали до удаления всех групп Boc. Затем реакционную смесь концентрировали. Соединение 4 очищали с помощью флэш-хроматографии при элюировании с помощью 0-20% MeOH в ДХМ.



В сосуде высокого давления соединение 5 (1000 мг) растворяли в 5 мл безводного ДМФ и добавляли K_2CO_3 (1,315 г). Затем добавляли соединение 6 (850 мг) в минимальном количестве ДМФ и сосуд закрывали и реакционную смесь перемешивали при $40^\circ C$. Затем реакционной смеси давали охладиться до комнатной температуры. Твердые вещества отфильтровывали и затем реакционную смесь концентрировали в вакууме. Соединение 7 очищали с помощью флэш-хроматографии при элюировании с помощью 0-100% EtOAc в гексанах.



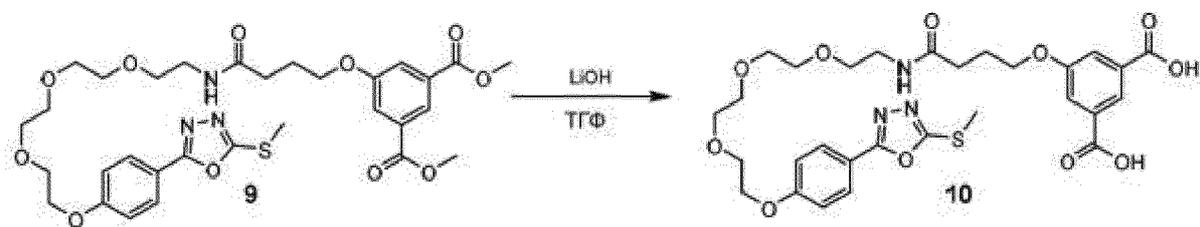
H_3PO_4 (0,594 мл) при перемешивании добавляли к раствору соединения 7 (900 мг) в 20 мл толуола. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакционную смесь разбавляли водой (30 мл) и 3 раза промывали этилацетатом (30 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали.



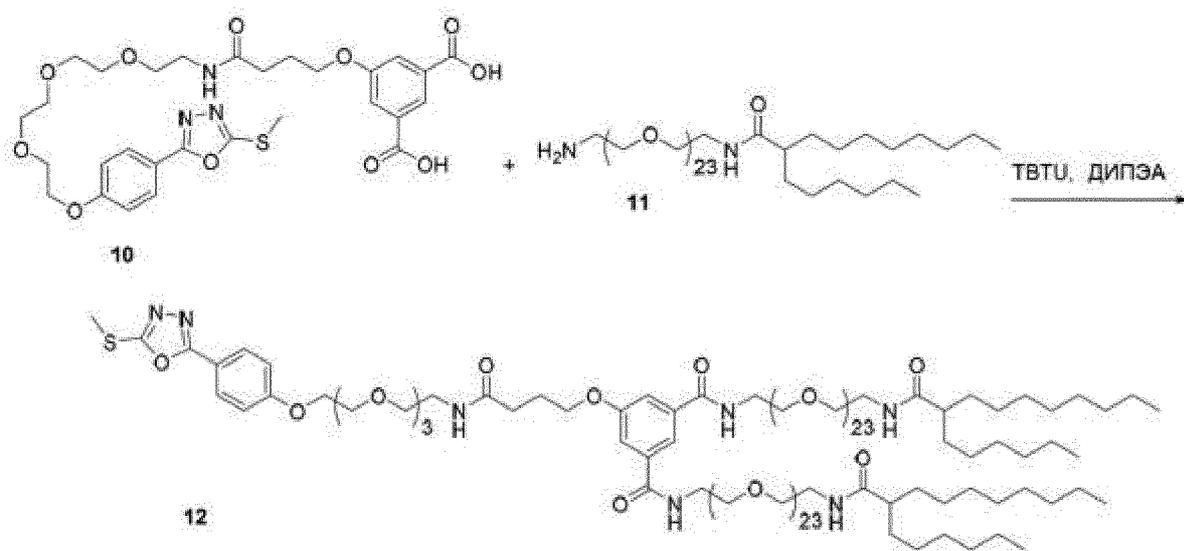
Соединение 8 (100 мг) и TBTU (149 мг) растворяли в 2 мл ДМФ и перемешивали в течение 5 мин. Затем к смеси добавляли TЭА (0,152 мл) и соединение 4 (142 мг) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (10 мл) и промывали с насыщенным раствором хлорида аммония (3×10 мл).

Органический слой сушили над сульфатом натрия и концентрировали.

Соединение 9 очищали с помощью флэш-хроматографии при элюировании с помощью 0-100% гексаны/этилацетат и затем с помощью ДХМ/0-20% MeOH.

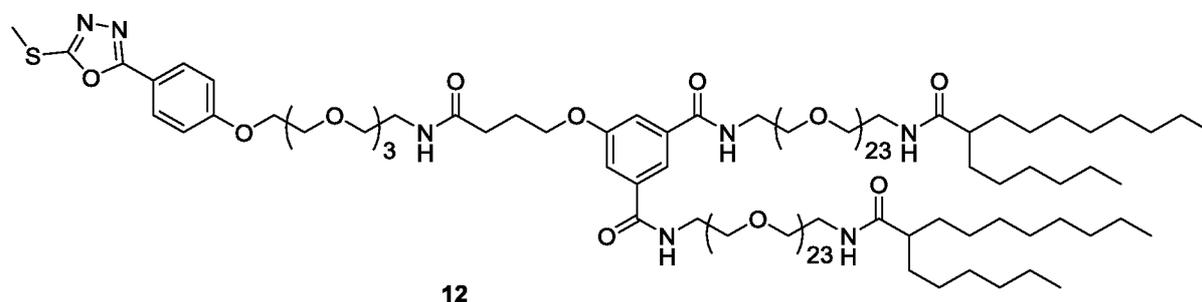


5 Соединение 9 (197 мг) растворяли в 4 мл ТГФ. Затем добавляли LiOH (43 мг) и воду (0,4 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на удаление защитной группы. Реакцию останавливали с помощью Amberlyst® 15. Amberlyst отфильтровывали и реакционную смесь концентрировали. Соединение 10 очищали с помощью флэш-хроматографии при элюировании с помощью 0-100% этилацетата в гексанах с добавлением 0,1 % НОАс.



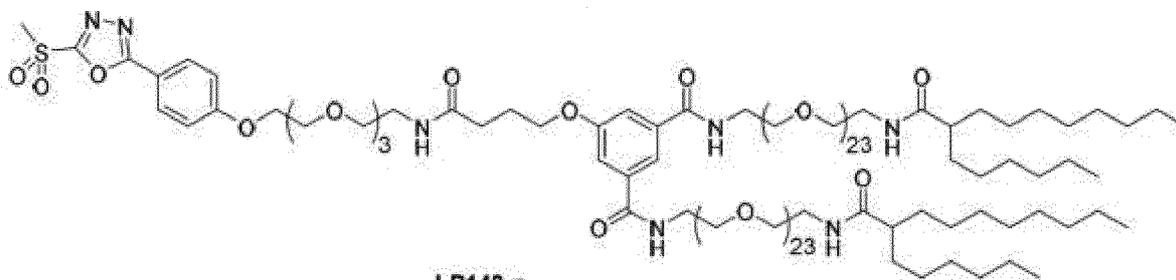
15 Соединение 10 (380 мг) и TBTU (424 мг) в 4 мл ДМФ перемешивали в течение 5 мин. Затем добавляли соединение 11 (2,12 г), затем ДИПЭА (0,542 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и дополнительные количества добавляли следующим образом: 50% TBTU и 50% ДИПЭА через 2 ч., 25% TBTU и 50% ДИПЭА через 3 ч., 50% ДИПЭА через 4 ч., 50% ДИПЭА через 5 ч. Реакцию останавливали через 6,5 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью 20% ТФЭ в ДХМ (15 мл) и дважды промывали

насыщенным раствором хлорида аммония (15 мл). Органический слой сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Затем соединение 12 очищали с помощью ВЭЖХ.



12

↓ мХПБК



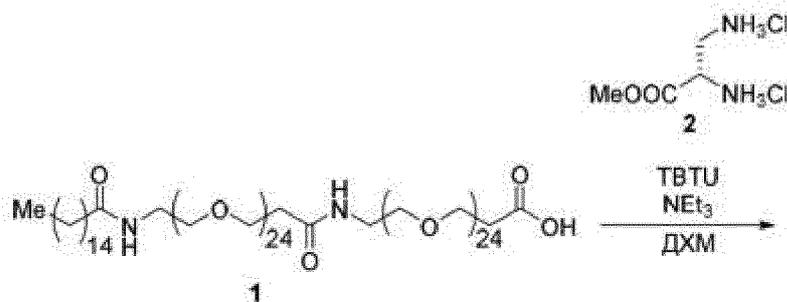
LP143-p

5

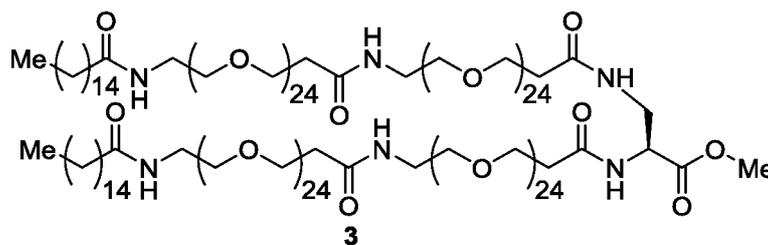
К раствору соединения 12 (28 мг) в 1 мл ДХМ при перемешивании при 0°C добавляли мХПБК (чистота 70%, 12 мг). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры, ее перемешивали в течение ночи и за протеканием реакции следили с помощью ЖХ-МС. Смесь разбавляли с помощью 20% ТФЭ в ДХМ (5 мл), затем промывали насыщенным раствором сульфита натрия (2×5 мл) и один раз насыщенным раствором бикарбоната натрия (5 мл). Органический слой сушили над сульфатом натрия. С помощью ЖХ-МС подтверждали соответствующую массу LP143-p.

10

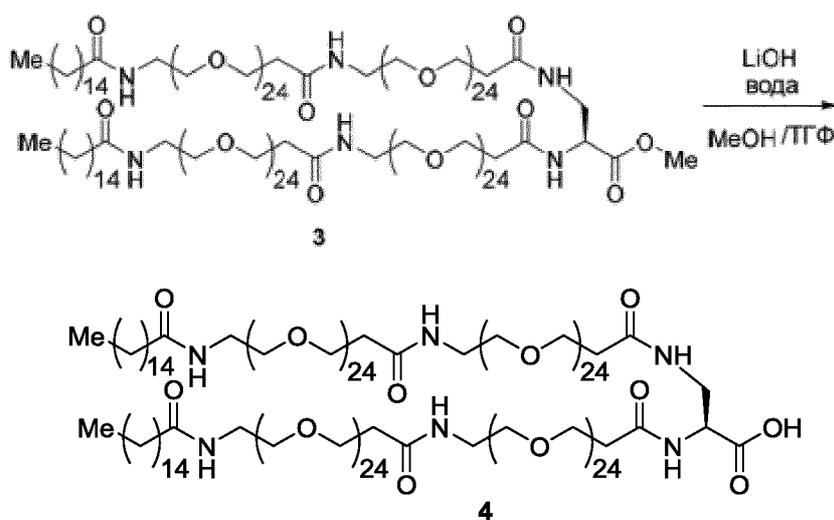
Синтез LP210-p



15



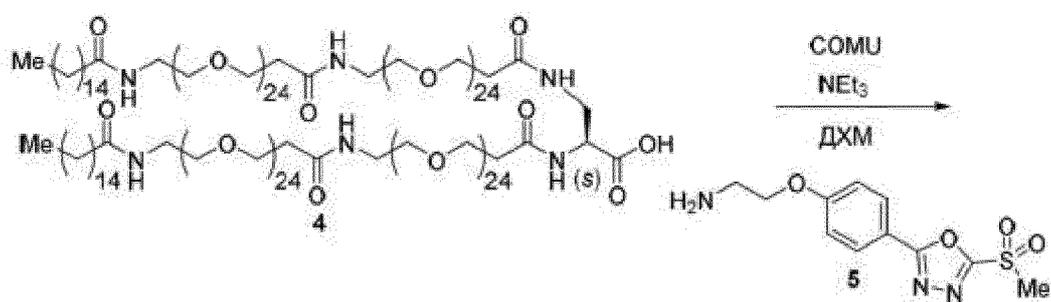
Соединение 1 (0,2 г, 0,08 ммоль) и ТВТУ (0,0542 г, 0,735 ммоль) растворяли в ДХМ (5 мл) и добавляли NEt_3 (0,0244 мл, 0,175 ммоль). В отдельном сосуде соединение 2 (0,007г, 0,037 ммоль) и NEt_3 (0,0244 мл, 0,175 ммоль) перемешивали в ДХМ (1 мл). Полученные растворы перемешивали в течение 10 мин. Через 10 мин раствор соединения 2 добавляли к раствору соединения 1. Полученную смесь перемешивали в течение 90 мин и затем проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Реакцию останавливали с помощью 5 мл воды и смесь перемешивали в течение 5 мин. Слои разделяли и органический слой промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 (2×20 мл), водой (20 мл), насыщенным водным раствором NH_4Cl (2×20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (2×20 мл), сушили над Na_2SO_4 и концентрировали и получали неочищенное соединение 3 в виде почти белого воскообразного твердого вещества (примерно 200 мг). Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании с помощью 0-20% MeOH в ДХМ. Чистые фракции объединяли и получали 50 мг (выход 27%) соединения 3 в виде белого твердого вещества.



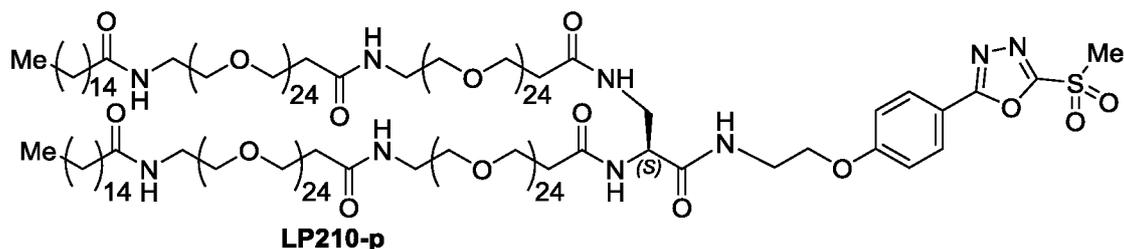
Соединение 3 (0,05 г, 0,010 ммоль) растворяли в смеси $\text{MeOH}/\text{TГФ}$ состава 1:1 (5 мл) и добавляли LiOH (0,042 г, 1,74 ммоль) и воду (100 мкл, 5,55 ммоль).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Органические вещества выпаривали и полученную суспензию разбавляли с помощью примерно 10 мл воды.

Полученную суспензию подкисляли 3 М водным раствором HCl до обеспечения значения pH, равного 1, и экстрагировали с помощью ДХМ (3×25 мл)
Объединенные органические вещества промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, концентрировали и сушили в вакууме и получали 49 мг (выход 98%) соединения 4 в виде почти белого твердого вещества. Продукт использовали без дополнительной очистки.



10



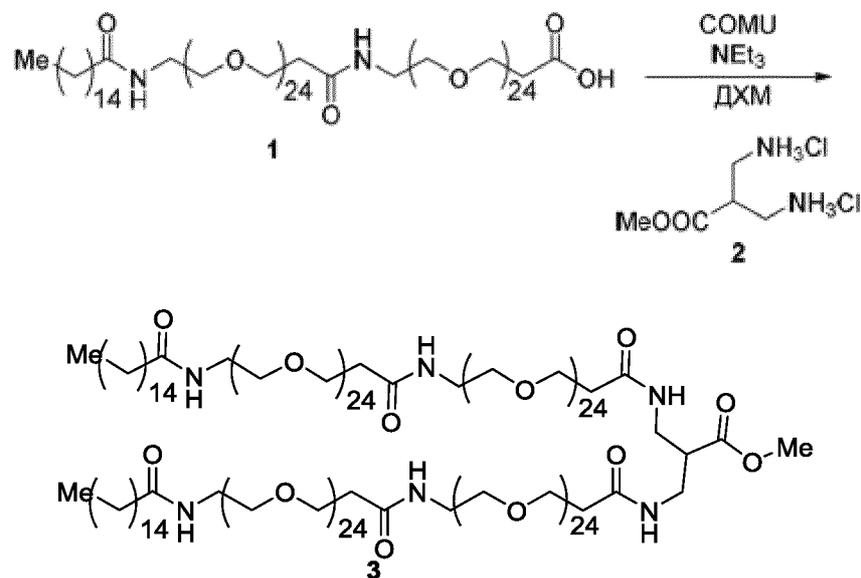
15

20

Соединение 4 (0,05 г, 0,010 ммоль) и COMU (0,0063 г, 0,015 ммоль) растворяли в ДХМ (1 мл) и добавляли NEt₃ (13,7 мкл, 0,098 ммоль), полученный раствор перемешивали в течение 10 мин. В отдельном сосуде соединение 5 растворяли в ДХМ (0,3 мл). Через 10 мин раствор соединения 5 добавляли к раствору, содержащему 1807-019. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч. Реакцию останавливали 1 М водным раствором HCl (10 мл) и органический слой разбавляли с помощью 10 мл ДХМ. Слои разделяли и органический слой дополнительно промывали 1 М водным раствором HCl (20 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (1×20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (1×20 мл), сушили над Na₂SO₄, концентрировали и сушили в вакууме и получали 94 мг неочищенного соединения LP210-p в виде почти белого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании с помощью 0-20% MeOH в ДХМ. Чистые фракции,

содержащие соединение LP210-р, объединяли и концентрировали и получали 7 мг (выход 13,3 %).

Синтез LP217-р

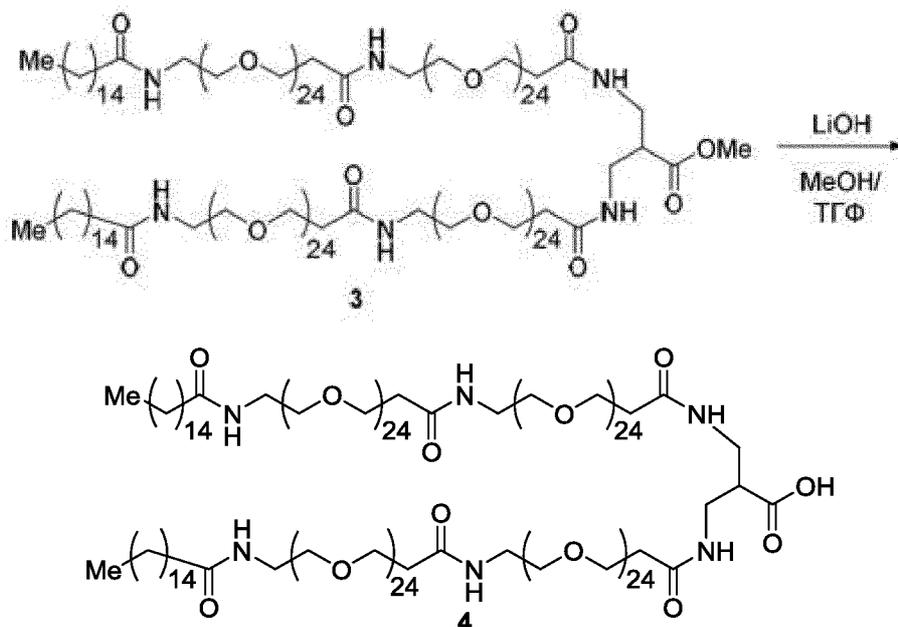


5

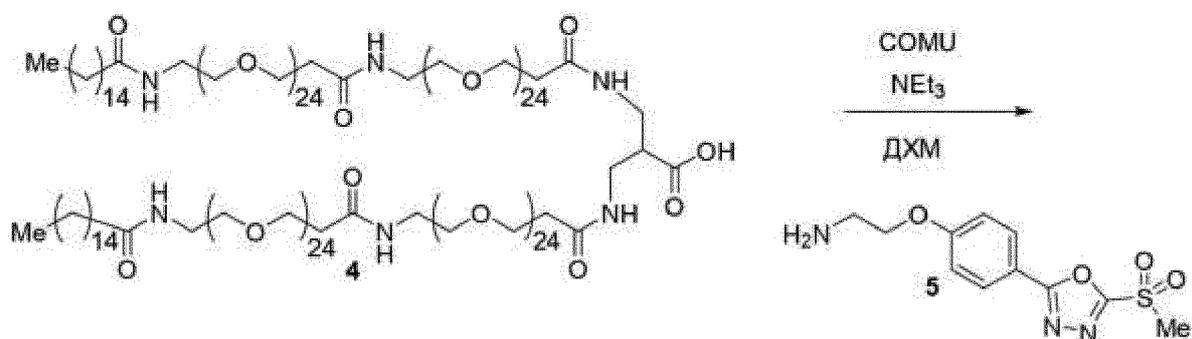
Соединение 1 (0,265 г, 0,105 ммоль) и COMU (0,0542 г, 0,735 ммоль) растворяли в ДХМ (5 мл) и добавляли NEt₃ (0,1 мл, 0,74 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 10 мин. Через 10 мин к реакционной смеси добавляли соединение 2 (0,010 г, 0,049 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение ночи и проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Реакцию останавливали с помощью 5 мл воды и смесь перемешивали в течение 5 мин. Слои разделяли, и органический слой промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2×20 мл), водой (20 мл), 2 М водным раствором HCl (2×20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали и получали неочищенное соединение 3 почти белого воскообразного твердого вещества (примерно 350 мг). Неочищенное соединение 3 очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 2-20% MeOH в ДХМ. Фракции, содержащие соединение 3, объединяли и получали 89 мг (выход 36%) почти белого твердого вещества.

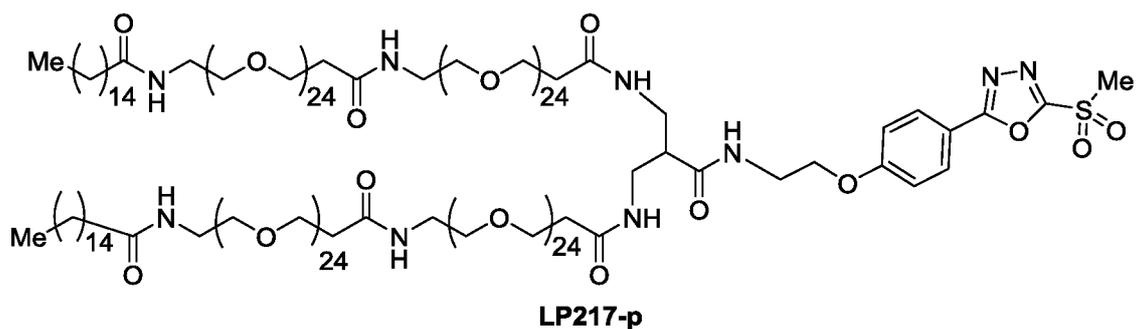
10

15



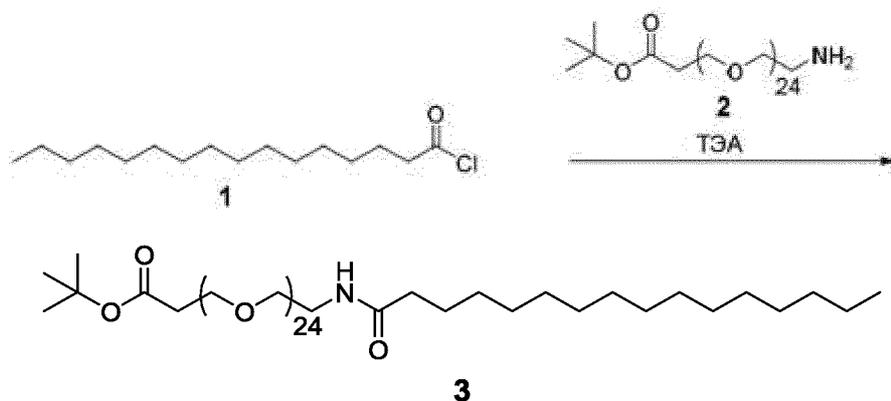
Соединение 3 (0,089 г, 0,017 ммоль) растворяли в смеси MeOH/ТГФ состава 1:1 (5 мл) и добавляли LiOH (0,042 г, 1,74 ммоль) и воду (180 мкл, 9,85 ммоль).
5 Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Органические вещества выпаривали и полученную суспензию разбавляли с помощью примерно 10 мл воды. Суспензию подкисляли 3 М водным раствором HCl до обеспечения значения pH, равного 1, и экстрагировали с помощью ДХМ (3×25 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, концентрировали и сушили в вакууме
10 и получали 81 мг (выход 91%) соединения 4 в виде почти белого твердого вещества. Продукт использовали без дополнительной очистки.





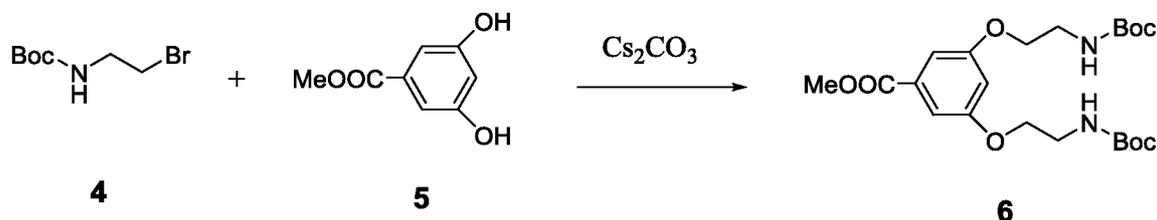
Соединение 4 (0,081 г, 0,016 ммоль) и COMU (0,010 г, 0,024 ммоль) растворяли в ДХМ (1 мл) и добавляли NEt_3 (44,2 мкл, 0,32 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 10 мин. В отдельном сосуде соединение 5 растворяли в ДХМ (0,3 мл). Через 10 мин раствор соединения 5 добавляли к раствору, содержащему соединение 4. Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч. Реакцию останавливали 1 М водным раствором HCl (10 мл) и органический слой разбавляли с помощью 10 мл ДХМ. Слои разделяли и органический слой дополнительно промывали 1 М водным раствором HCl (20 мл), насыщенным водным раствором NaHCO_3 (1×20 мл) насыщенным водным раствором NaCl (1×20 мл), сушили над Na_2SO_4 , концентрировали и сушили в вакууме и получали 94 мг неочищенного LP217-p в виде почти белого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. Чистые фракции, содержащие соединение LP217-p, объединяли и концентрировали и получали 24 мг (выход 28%).

Синтез LP220-p

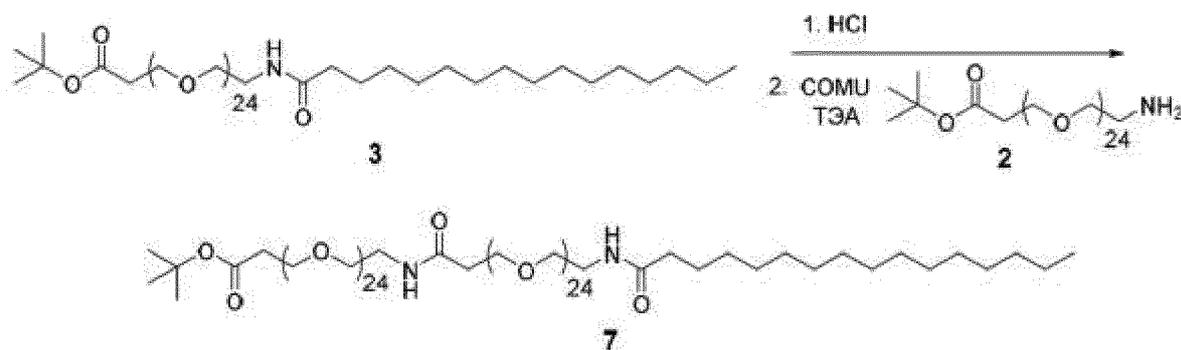


К раствору соединения 2 (3,3381 ммоль, 4,0140 г) и ТЭА (4,0058 ммоль, 0,4054 г, 0,558 мл) в ДХМ добавляли соединение 1 (3,5050 ммоль, 0,9634 г, 1,059 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на

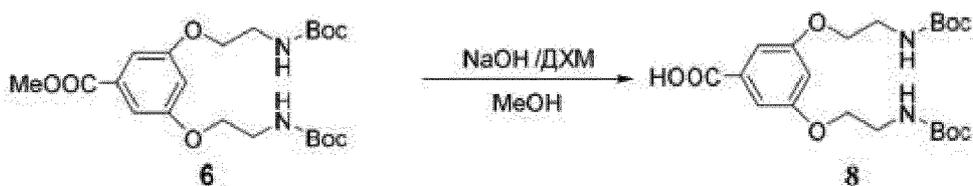
полное превращение соединения 2. Остаток очищали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, промывка рассолом и сушка над Na₂SO₄). Соединение 3 использовали без дополнительной очистки. Выход: 4,5 г.



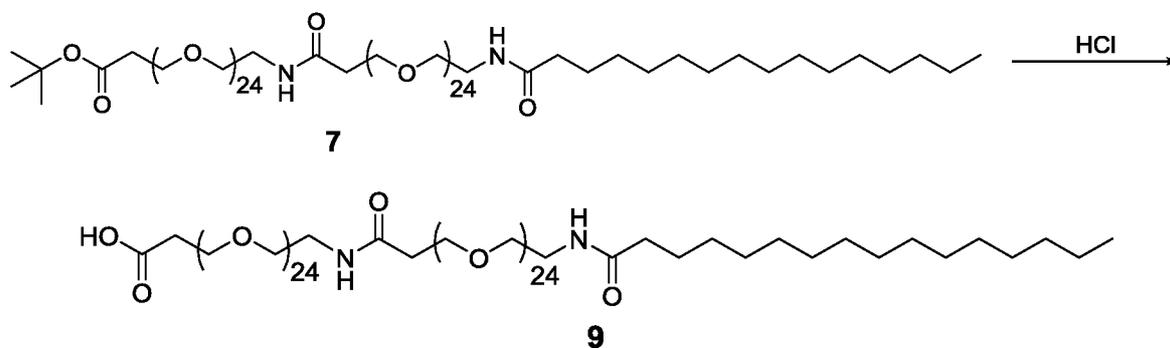
5 К раствору соединения 5 (29,7354 ммоль, 5,0000 г) в 50 мл ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 4 (65,4178 ммоль, 13,7502 г) и Cs₂CO₃ (118,9414 ммоль, 38,7535 г). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение ночи. Реакционную смесь очищали путем проведения стандартной
10 обработки (1 н. раствор NaOH, промывка рассолом и сушка над Na₂SO₄). Соединение 6 очищали с помощью хроматографии на силикагеле и концентрировали и получали 6,0 г.



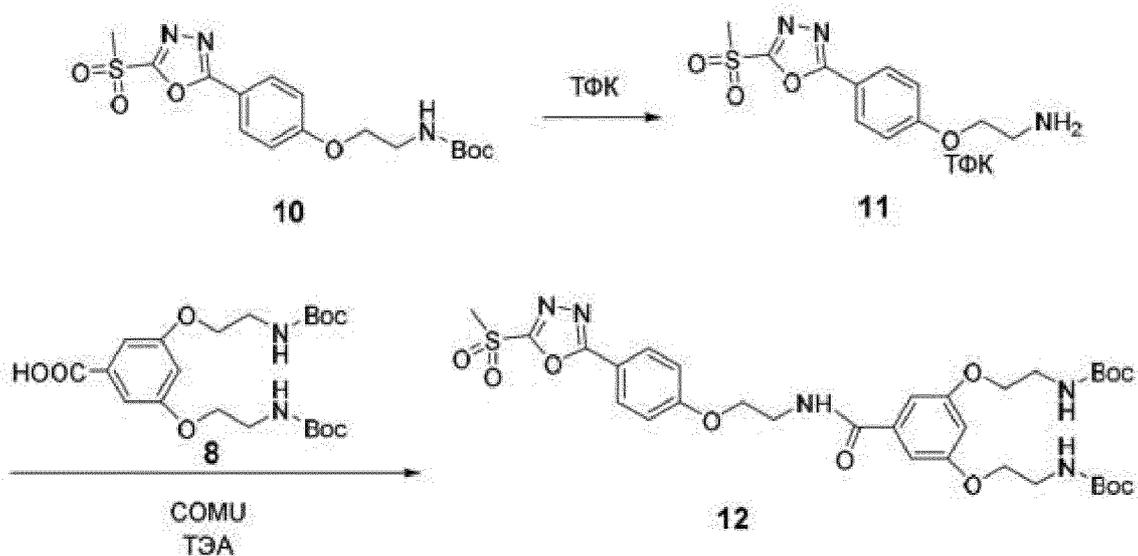
15 Соединение 3 (1,0500 ммоль, 1,5129 г) растворяли в 8 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. После удаления HCl добавляли соединение 2 (1,0000 ммоль, 1,2020 г), COMU (1,2000 ммоль, 0,5139 г) и T3A (3,0000 ммоль, 0,3035 г, 0,418 мл) в ДХМ. Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение
20 соединения 2. Остаток очищали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, промывка рассолом и сушка над Na₂SO₄). Соединение 7 очищали с помощью хроматографии на силикагеле и концентрировали и получали 2,28 г.



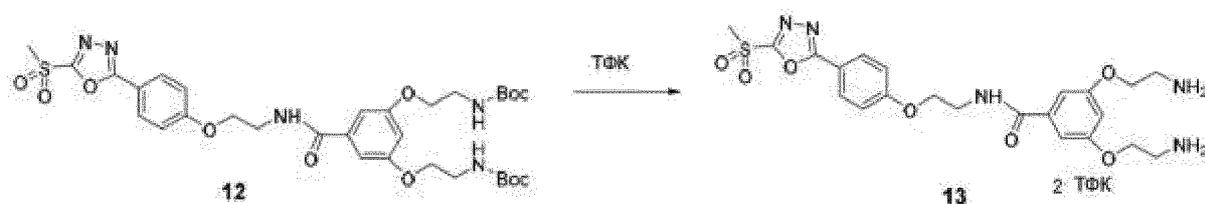
К раствору NaOH в 5 мл MeOH при комнатной температуре добавляли соединение 6 (1,0000 ммоль, 0,4545 г) в 20 мл ДХМ. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь подкисляли до обеспечения значения pH, равного 3. Продукт сушили над Na₂SO₄ и получали 0,200 г соединения 8, которое использовали без дополнительной очистки.



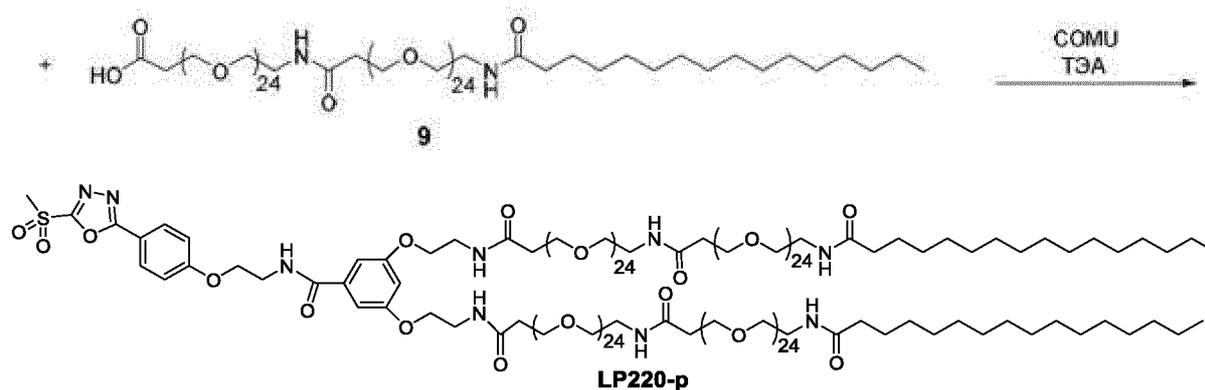
Соединение 7 (0,7707 ммоль, 1,9800 г) растворяли в 10 мл 4 н. раствора HCl в диоксане при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли и продукт помещали в вакуум и выдерживали в течение 2 ч и получали 1,50 г соединения 9, которое использовали без дополнительной очистки.



Соединение 10 (0,0782 ммоль, 0,0300 г) растворяли в 1 мл ДХМ и добавляли 0,5 мл ТФК и смесь перемешивали в течение 2 ч. ТФК удаляли и соединение 11 сушили в вакууме в течение 1 ч. Соединение 8 (0,0822 ммоль, 0,0362 г), СОМУ (0,0939 ммоль, 0,0402 г) и ТЭА (0,2347 ммоль, 0,0237 г, 0,033 мл) растворяли в 5 мл ДХМ в течение 5 мин, затем добавляли соединение 11 в ДХМ. Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение соединения 11. Соединение 12 очищали с помощью хроматографии на силикагеле и получали 0,0135 г.



10

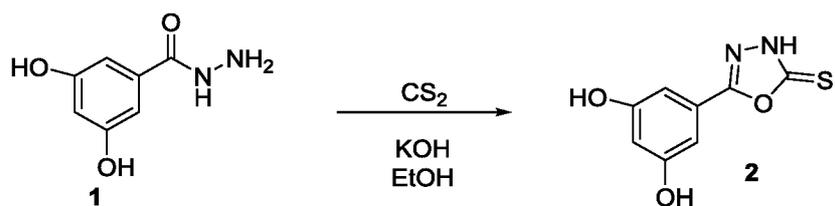


15

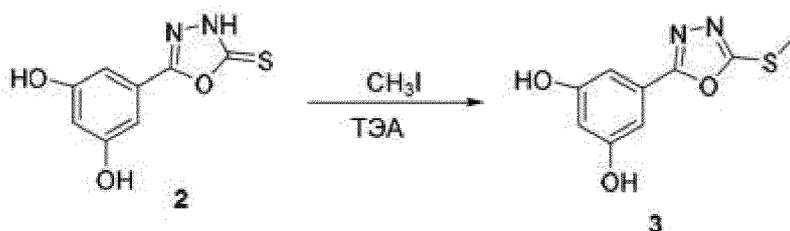
Соединение 12 (0,0191 ммоль, 0,0135 г) растворяли в 1 мл ДХМ, добавляли 0,5 мл ТФК и смесь перемешивали в течение 1 ч. ТФК удаляли и соединение 13 сушили в вакууме в течение 1 ч. Соединение 9 (0,0398 ммоль, 0,1000 г), СОМУ (0,0477 ммоль, 0,0204 г) и ТЭА (0,1194 ммоль, 0,0121 г, 0,017 мл) растворяли в 3 мл ДХМ в течение 5 мин, затем добавляли соединение 13 в ДХМ. Смесь перемешивали до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение соединения 13. LP220-p очищали с помощью хроматографии на силикагеле и получали 0,0400 г.

20

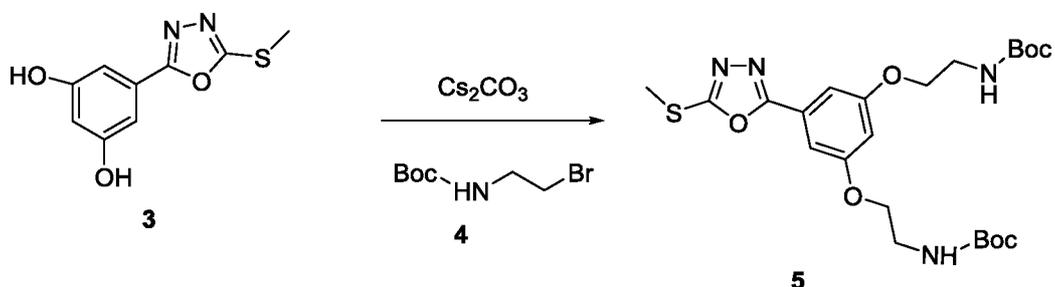
Синтез LP221-p



Дисульфид углерода (75,0045 ммоль, 5,7101 г, 4,532 мл) медленно добавляли к раствору соединения 1 (25 ммоль, 4,20 г) и гидроксид калия в EtOH (150 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 24 ч. После завершения растворитель выпаривали при пониженном давлении и остаток растворяли в воде. Водный раствор подкисляли до обеспечения значения pH, равного 2, с использованием HCl. Продукт экстрагировали с помощью EtOAc, и очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием смеси EtOAc/гексаны. После очистки получали 3,5 г соединения 2 в виде оранжевого твердого вещества.

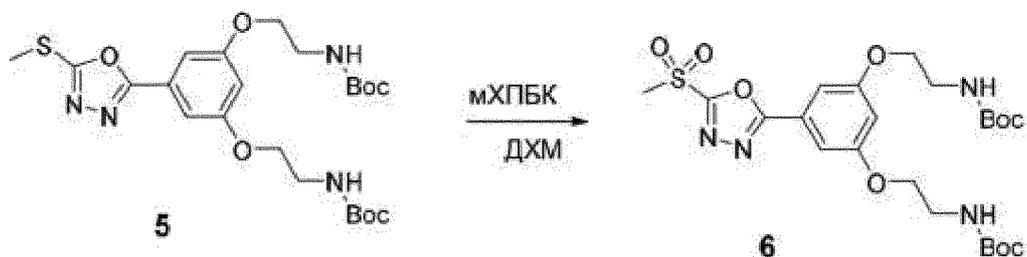


Соединение 2 (10,0000 ммоль, 2,1021 г) в ТГФ (40 мл) охлаждали до 0°C. Добавляли CH₃I (11,0000 ммоль, 1,5609 г, 0,685 мл), затем ТЭА (10,1000 ммоль, 1,0221 г, 1,408 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. После завершения реакцию останавливали с помощью NH₄Cl. Органическую фазу промывали рассолом, сушили и очищали с помощью хроматографии на силикагеле и получали 1,5 г соединения 3.

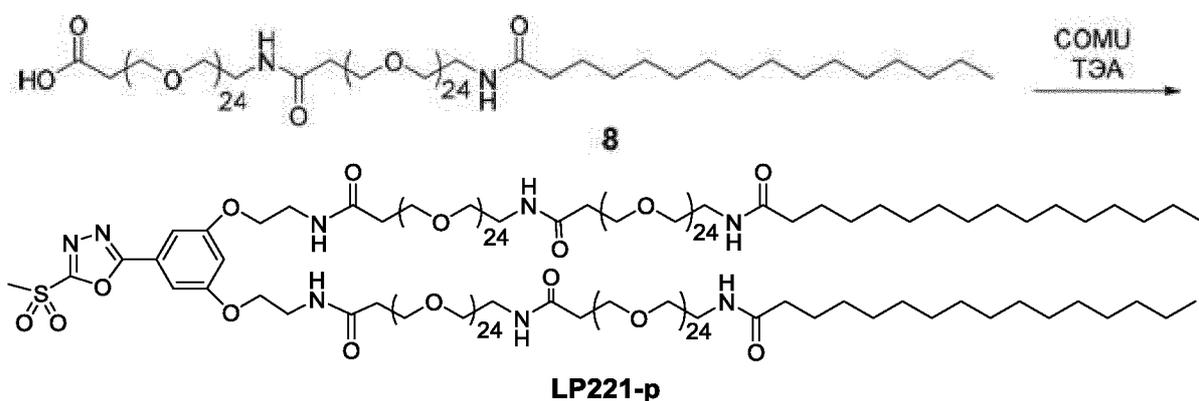
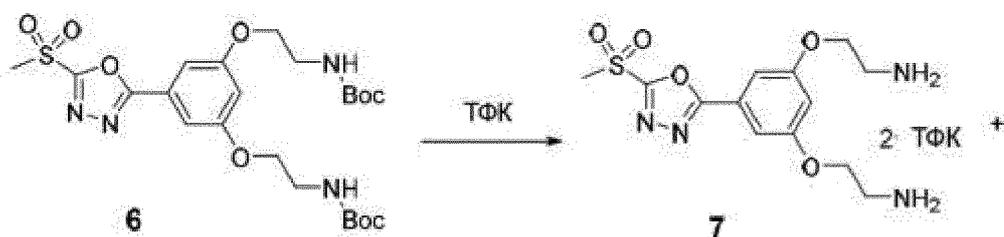


К раствору соединения 4 (6,8679 ммоль, 1,5391 г) в 10 мл ДМФ при комнатной температуре добавляли соединение 3 (3,1218 ммоль, 0,7000 г) и Cs₂CO₃ (9,3654 ммоль, 3,0514 г). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в

течение ночи. Реакционную смесь очищали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор NaOH, промывка рассолом и сушка над Na₂SO₄) и хроматографии на силикагеле и получали 1,0 г соединения 5.



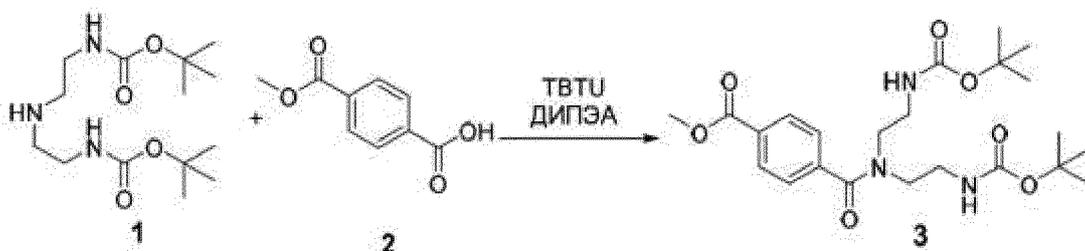
5 Смесь соединения 5 (0,2000 ммоль, 0,1021 г) и мХПБК (0,9998 ммоль, 0,1725 г) в ДХМ перемешивали до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение мХПБК. Реакционную смесь очищали путем проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор NaHCO₃, промывка рассолом и сушка над Na₂SO₄) и хроматографии на силикагеле и
10 получали 0,05 г соединения 6.



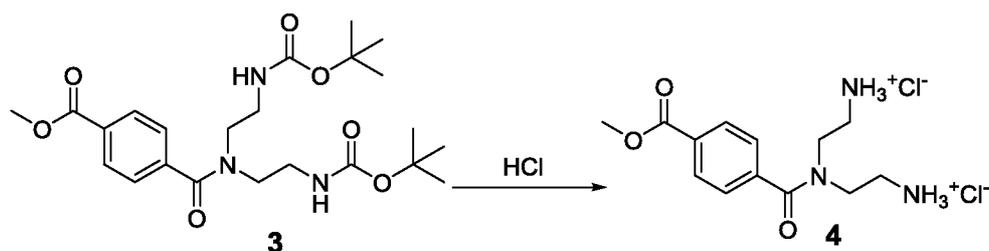
15 Соединение 6 (0,0191 ммоль, 0,0104 г) растворяли в 1 мл ДХМ и добавляли 0,5 мл ТФК и смесь перемешивали в течение 1 ч. Все количество ТФК удаляли и соединение 7 сушили в вакууме в течение 1 ч. Соединение 8 (0,0398 ммоль, 0,1000 г), СОМУ (0,0477 ммоль, 0,0204 г) и ТЭА (0,1990 ммоль, 0,0201 г, 0,028

мл) растворяли в 3 мл ДХМ в течение 5 мин, затем добавляли соединение 7 в ДХМ. Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ТСХ не указывала на полное превращение соединения 7. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле и получали 0,016 г соединения LP221-р.

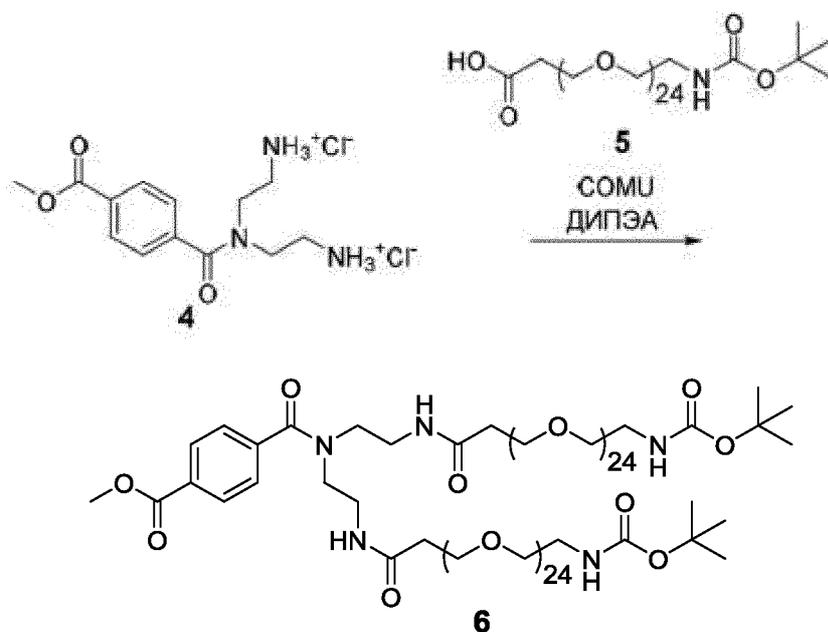
5 Синтез LP223-р



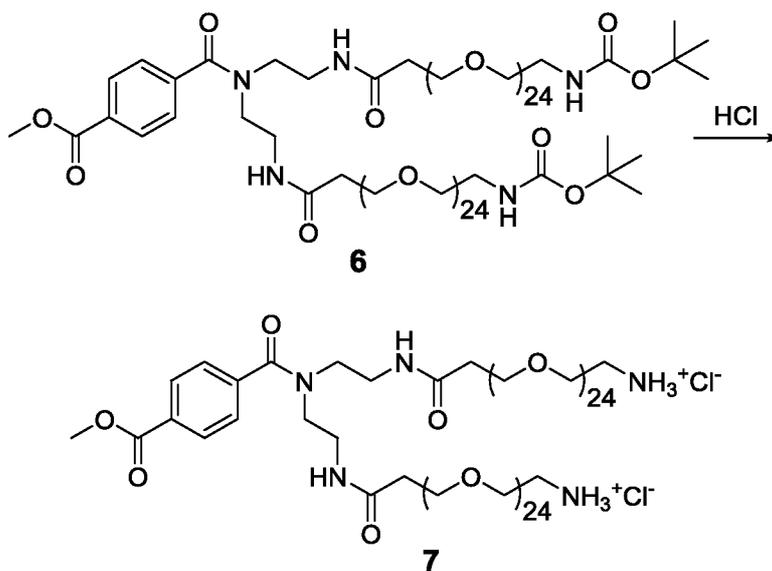
К раствору соединения 1 (741 мг, 2,442 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (528 мг, 2,930 ммоль, 1,20 экв.) и диизопропилэтиламина (1,276 мл, 7,327 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли TBTU (980 мг, 3,052 ммоль, 1,25 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию в органической фазе останавливали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл) и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (2×10 мл). Органические фазы объединяли, сушили над безводным Na₂SO₄, и концентрировали. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® и элюировали с помощью 40-80% EtOAc в гексанах. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 466,25, найдено: 466,72.



К соединению 3 (990 мг, 2,126 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (6,38 мл, 25,518 ммоль, 12 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 266,14, найдено: 266,43.



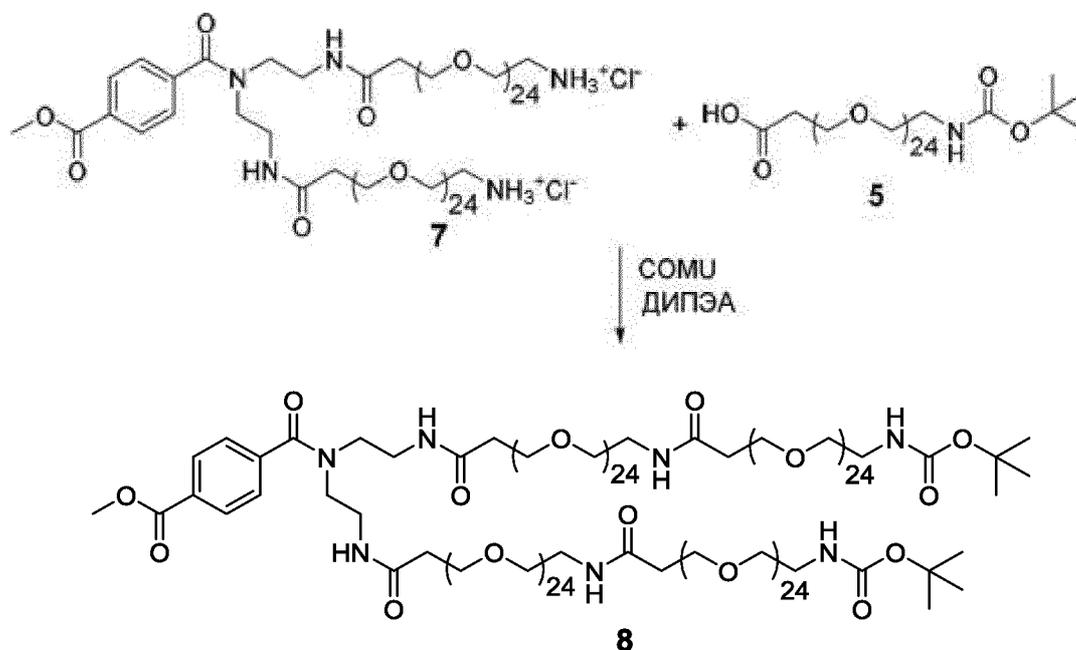
К раствору соединения 4 (100 мг, 0,295 ммоль, 1,0 экв.), соединения 5 (755 мг, 0,606 ммоль, 2,05 экв.) и диизопропилэтиламина (0,257 мл, 0,025 ммоль, 5,0 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли COMU (278 мг, 0,650 ммоль, 2,20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония (10 мл) и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. Соединение 6 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-18% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[\text{M}+3\text{H}]/3$, рассчитано: 907,86, найдено: 907,61.



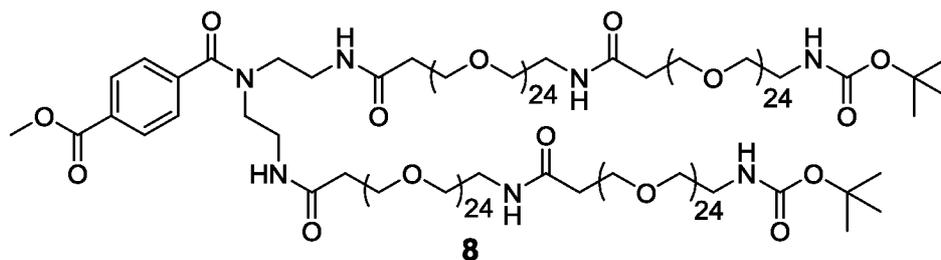
К соединению 6 (550 мг, 0,202 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (1,01 мл, 4,040 ммоль, 20 экв.).

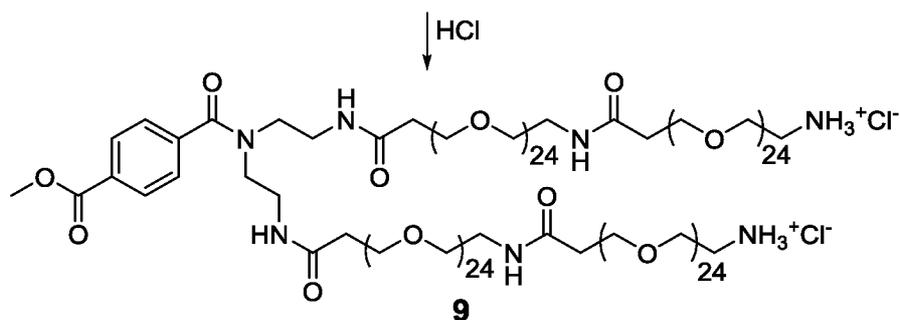
Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 7 использовали непосредственно без

5 дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+H]^+$, рассчитано: 841,16, найдено: 842,20.

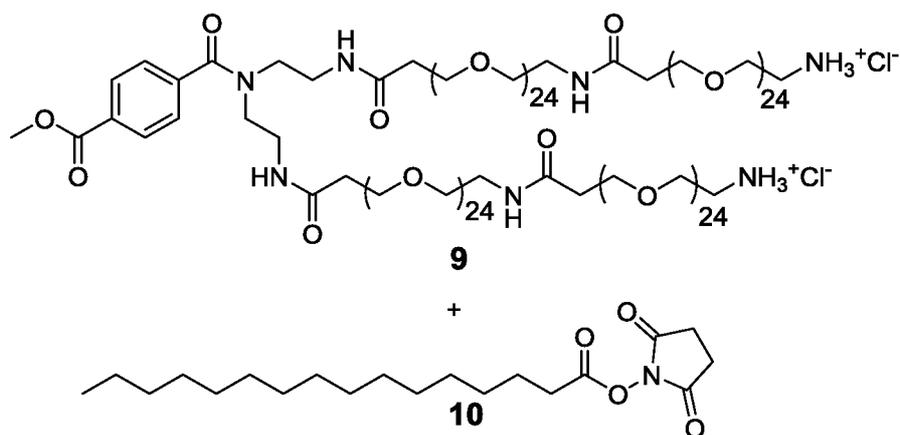


К раствору соединения 1 (490 мг, 0,188 ммоль, 1,0 экв.), соединения 5 (482 мг, 0,387 ммоль, 2,05 экв.) и диизопропилэтиламина (0,164 мл, 0,944 ммоль, 5,0 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли COMU (177 мг, 0,415 ммоль, 2,20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония (10 мл) и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. Соединение 8 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-20% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано: 960,18, найдено: 961,74.



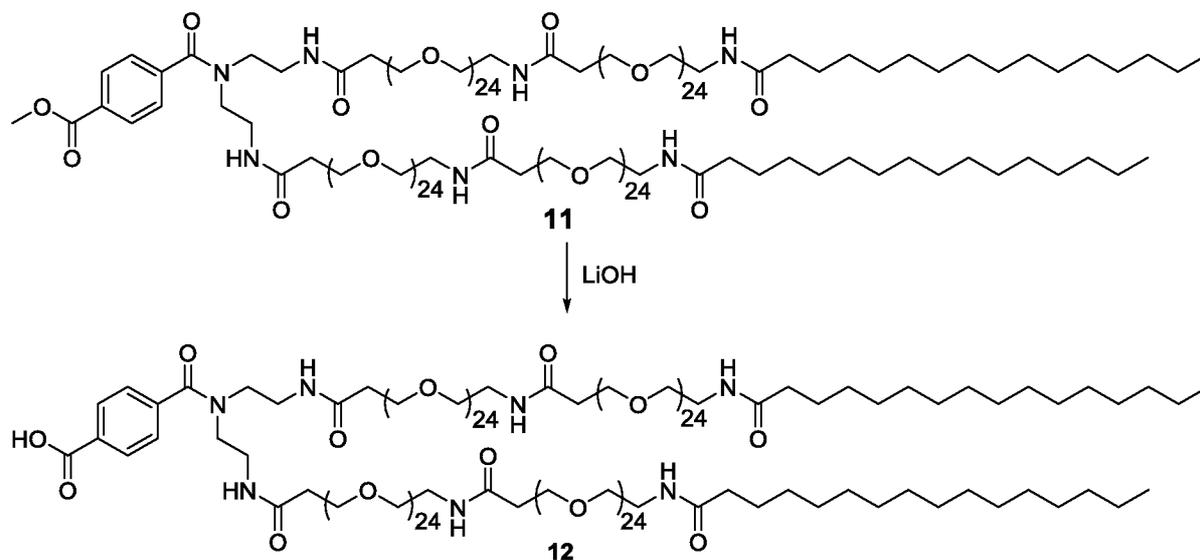


К соединению 1 (670 мг, 0,134 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,673 мл, 2,691 ммоль, 20 экв.).
Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и
5 затем концентрировали. Соединение 9 использовали непосредственно без
дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано: 956,16, найдено:
957,66.

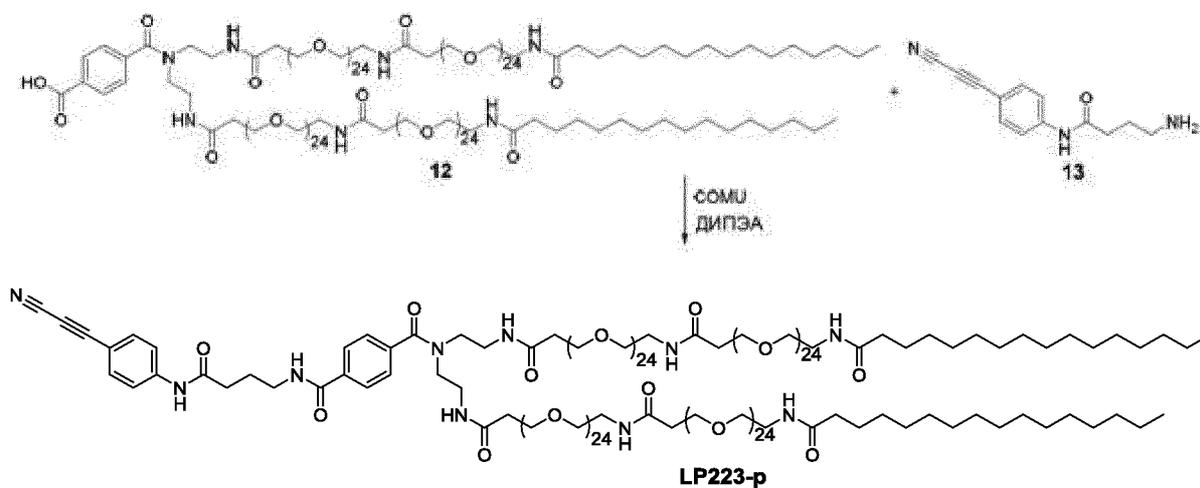


10 К раствору соединения 9 (650 мг, 0,134 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 10
(106 мг, 0,301 ммоль, 2,25 экв.) в безводном ДХМ (20 мл) при комнатной
температуре добавляли ТЭА (0,095 мл, 0,669 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную
смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч и растворитель
удаляли концентрированием. Соединение 11 выделяли с помощью CombiFlash®

при элюировании с помощью 8-20% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$,
рассчитано: 1051,45, найдено: 1053,44.



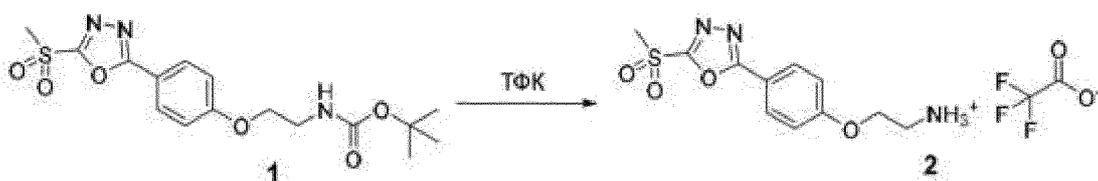
- 5 К раствору соединения 11 (460 мг, 0,0875 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (5 мл) и воде (5 мл) при комнатной температуре добавляли LiOH (10,5 мг, 0,437 ммоль, 5,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Значение pH реакционной смеси устанавливали равным 3,0 путем добавления HCl и смесь экстрагировали с помощью ДХМ (2×10 мл).
- 10 Объединенные органические фазы сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали. Соединение 12 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+5H]^+/5$, рассчитано: 1048,65, найдено: 1050,68.



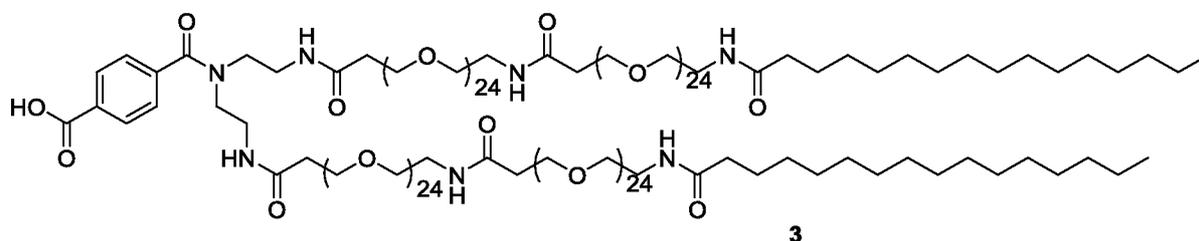
- 15 К раствору соединения 12 (100 мг, 0,0191 ммоль, 1,0 экв.), соединения 13 (4,8 мг, 0,021 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламина (0,010 мл, 0,0572 ммоль,

3,0 экв.) в безводном ДХМ (3 мл) при комнатной температуре добавляли СОМУ (10,2 мг, 0,0238 ммоль, 1,25 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (5 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. LP223-р очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-20% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[\text{M}+5\text{H}]^+$ /5, рассчитано: 1090,47, найдено: 1091,85.

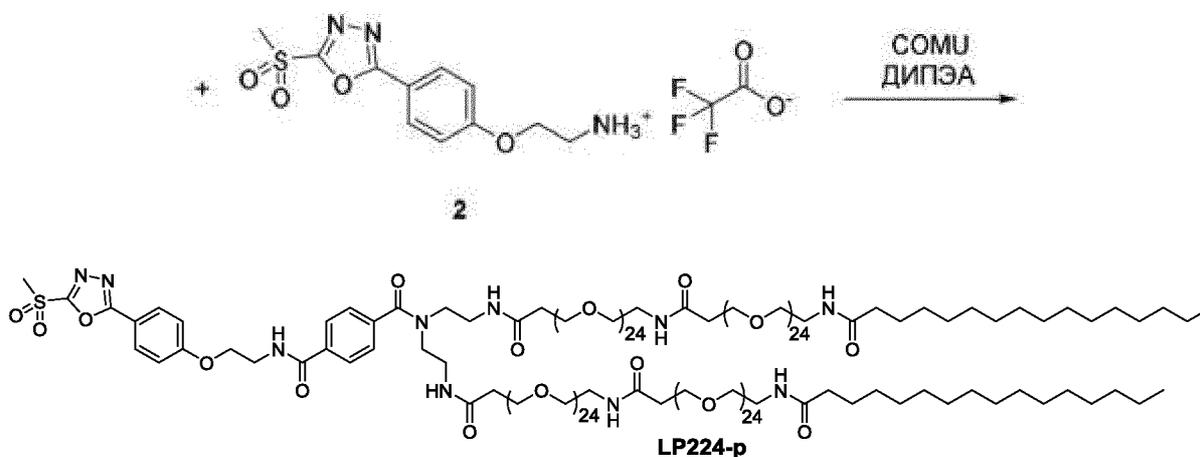
Синтез LP224-р



10 К раствору соединения 1 (12 мг, 0,0313 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (1 мл) при комнатной температуре добавляли ТФК (0,5 мл). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин и затем концентрировали. Соединение 2 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]^+$, рассчитано: 284,06, найдено: 284,26.

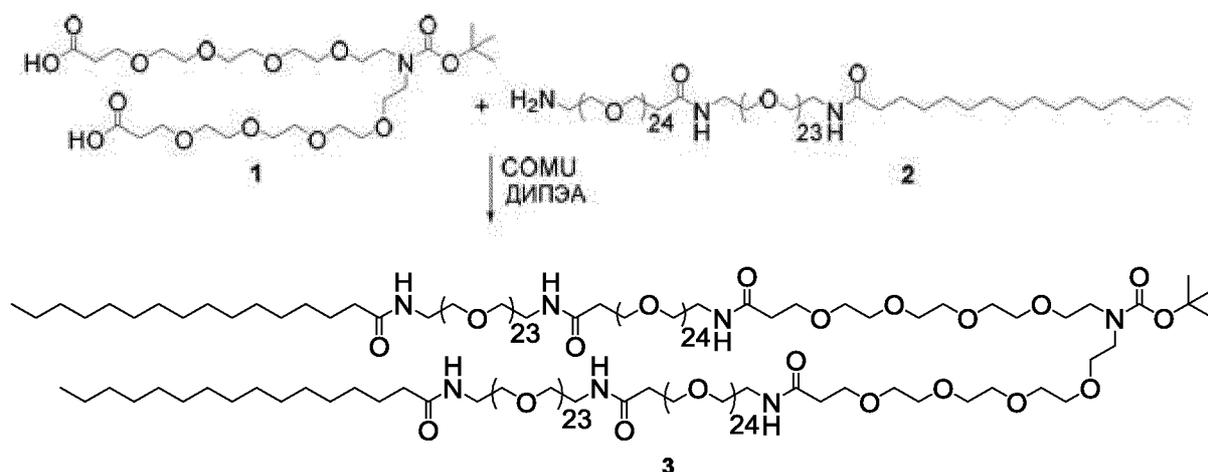


15

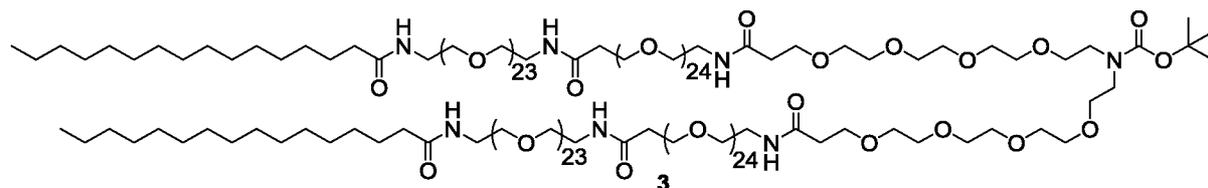


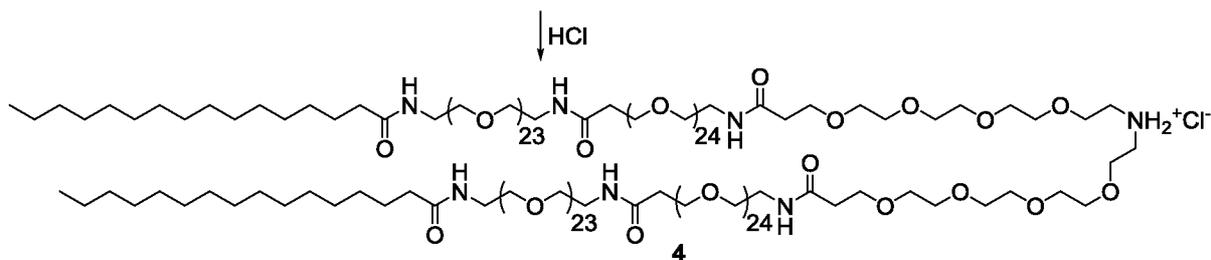
К раствору соединения 3 (150 мг, 0,0286 ммоль, 1,0 экв., соединение 12, полученное при синтезе соединения LP223-p), соединение 2 (12,5 мг, 0,0315 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламин (0,015 мл, 0,0859 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (3 мл) при комнатной температуре добавляли COMU (15,3 мг, 0,0358 ммоль, 1,25 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (5 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. LP224-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-16% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1101,66, найдено: 1103,13.

Синтез LP225-p

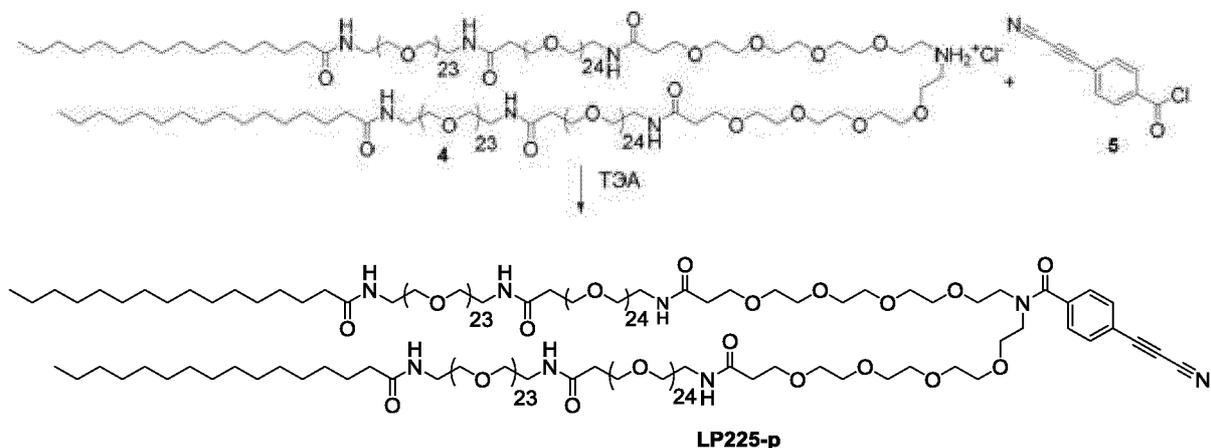


К раствору соединения 1 (80 мг, 0,130 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (652 мг, 0,267 ммоль, 2,05 экв.) и диизопропилэтиламина (0,068 мл, 0,391 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли COMU (134 мг, 0,312 ммоль, 2,40 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-16% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1091,89, найдено: 1093,41.



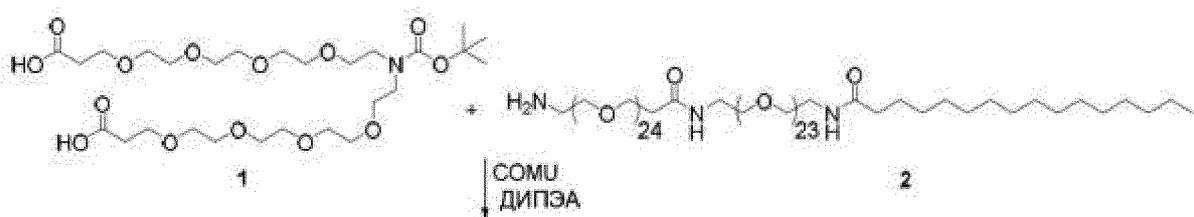


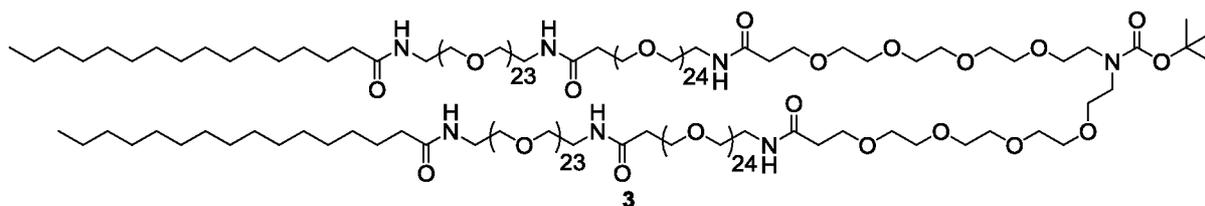
5 К соединению 3 (340 мг, 0,0623 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,311 мл, 1,245 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано: 1071,88, найдено: 1073,36.



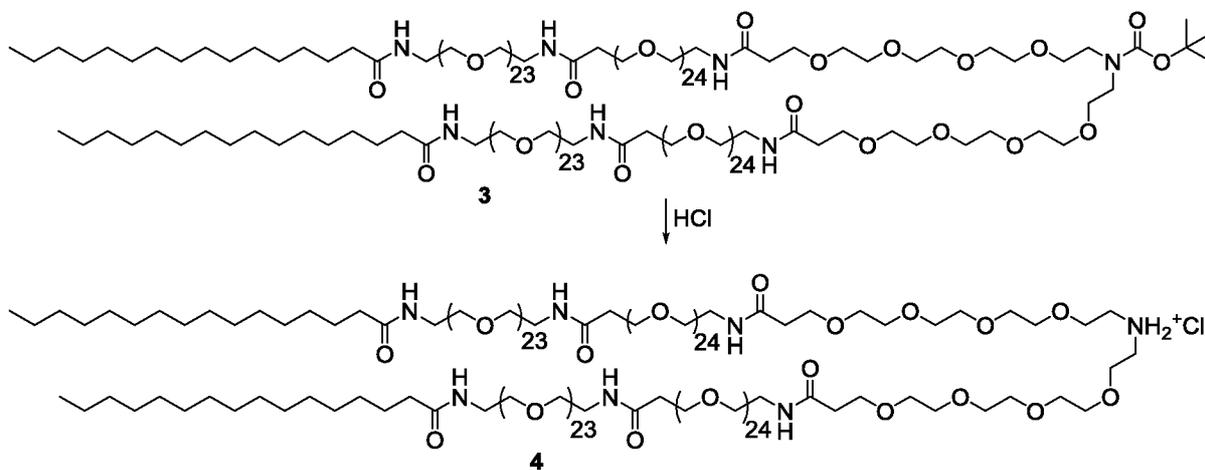
10 К раствору соединения 4 (100 мг, 0,0185 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 5 (3,9 мг, 0,0204 ммоль, 1,10 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли ТЭА (0,008 мл, 0,0556 ммоль, 3,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч и растворитель удаляли концентрированием. LP225-p выделяли с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 13-20% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: $[M+5H]/5$, рассчитано: 1102,48, найдено: 1104,45.

Синтез LP226-p

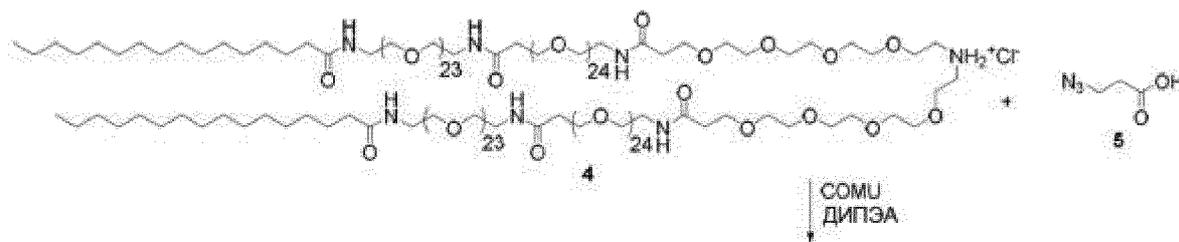


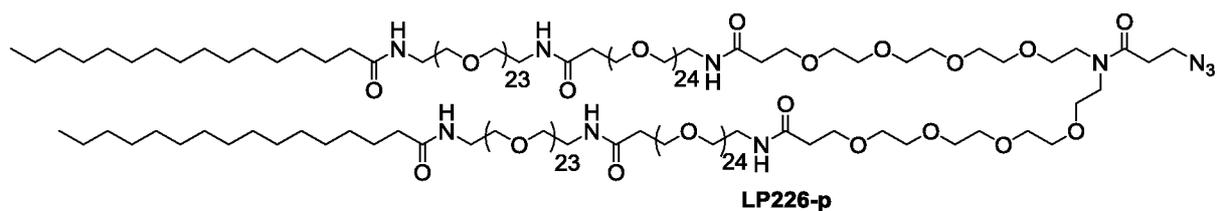


К раствору соединения 1 (80 мг, 0,130 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (652 мг, 0,267 ммоль, 2,05 экв.) и диизопропилэтиламина (0,068 мл, 0,391 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли COMU (134 мг, 0,312 ммоль, 2,40 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-16% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: [M+5H]⁵⁺, рассчитано: 1091,89, найдено: 1093,41.



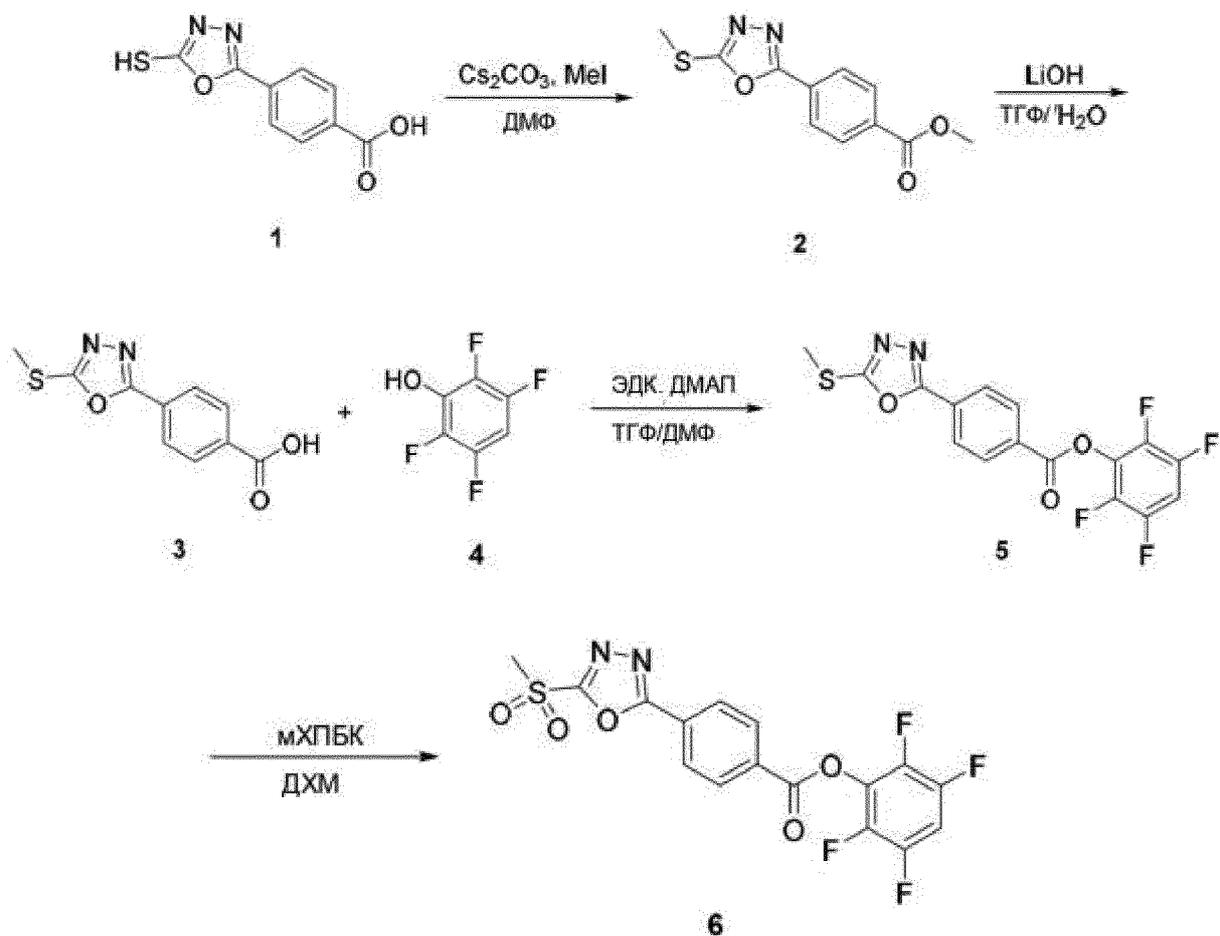
К соединению 3 (340 мг, 0,0623 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (0,311 мл, 1,245 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+5H]⁵⁺, рассчитано: 1071,88, найдено: 1073,36.

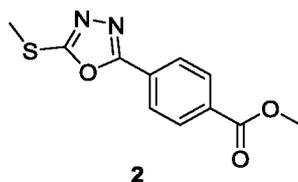




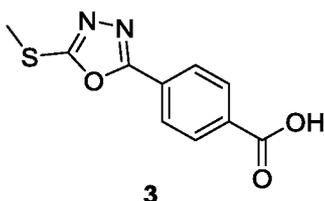
К раствору соединения 4 (80 мг, 0,0148 ммоль, 1,0 экв.), соединения 5 (1,9 мг, 0,0163 ммоль, 1,1 экв.) и диизопропилэтиламина (0,008 мл, 0,0445 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли COMU (7,9 мг, 0,0185 ммоль, 1,25 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (5 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. LP226-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 15-20% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1091,28, найдено: 1093,41.

Синтез LP238-p

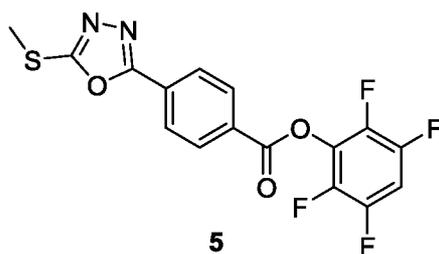




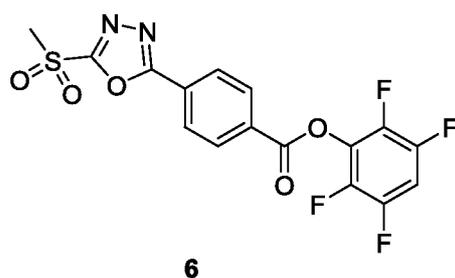
К суспензии соединения 1 (5,00 г, 22,50 ммоль) и Cs_2CO_3 (25,66 г, 78,75 ммоль) в безводном ДМФ (80 мл) при комнатной температуре добавляли метилйодид (4,20 мл, 67,50 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 5 комнатной температуре в течение 48 ч. Реакцию останавливали водой (200 мл) и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3×100 мл). Органическую фазу объединяли и промывали водой и рассолом. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. Соединение 2 получали в виде светло-желтого твердого вещества, 5,41 г, 96%. Соединение 2 использовали 10 непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]$, рассчитано: 251,05, найдено: 251,18.



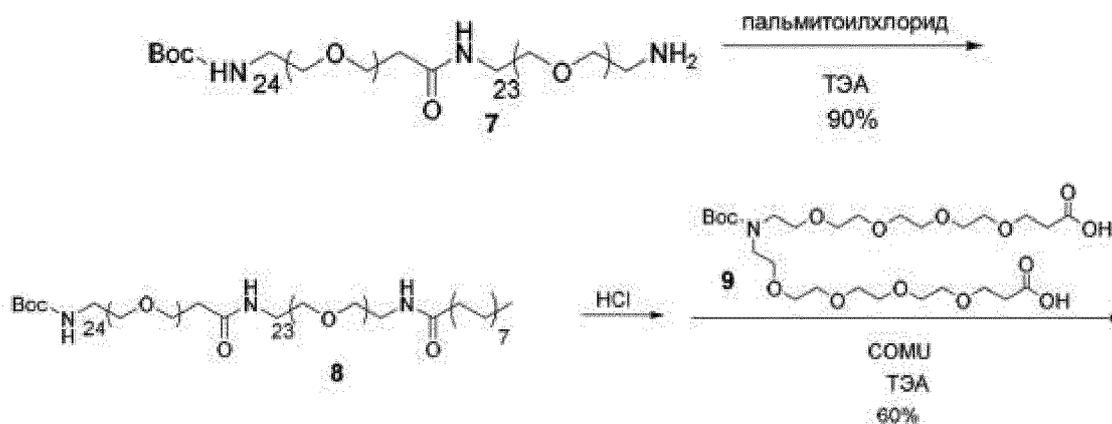
К раствору соединения 2 (5,41 г, 21,62 ммоль) в смеси ТГФ/ H_2O (50 мл/50 мл) при комнатной температуре добавляли LiOH (2,59 г, 108,08 ммоль). 15 Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После удаления ТГФ в вакууме значение pH устанавливали равным примерно 2 концентрированной HCl. Затем для экстрагирования использовали EtOAc (3×60 мл). Органические слои объединяли, промывали рассолом, затем сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали. Соединение 3 получали в виде почти 20 белого твердого вещества, 5 г, 98%. Соединение 3 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: $[\text{M}+\text{H}]$, рассчитано: 237,03, найдено: 237,26.

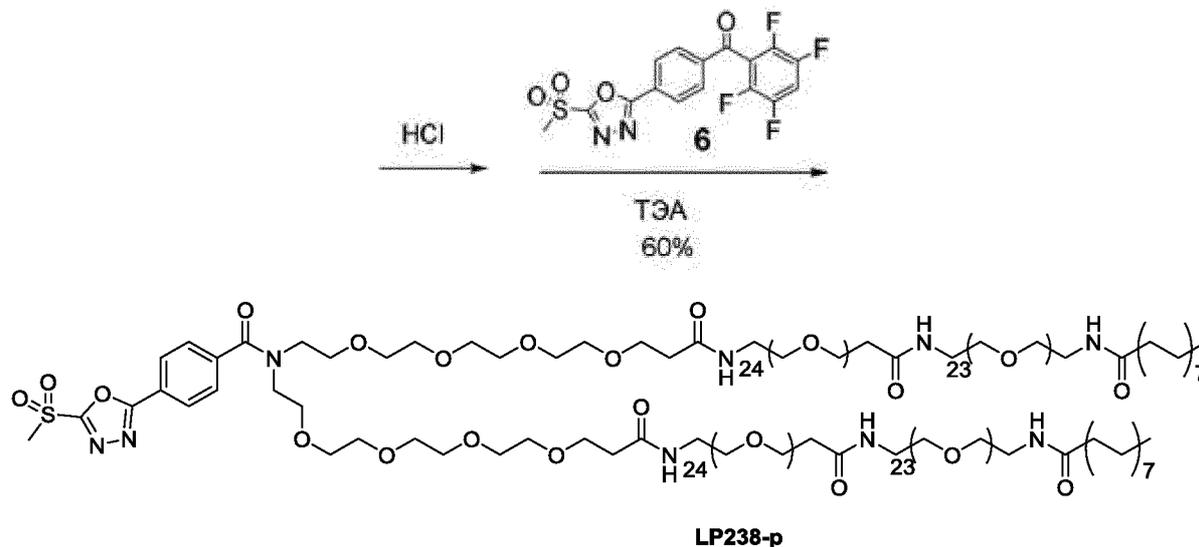
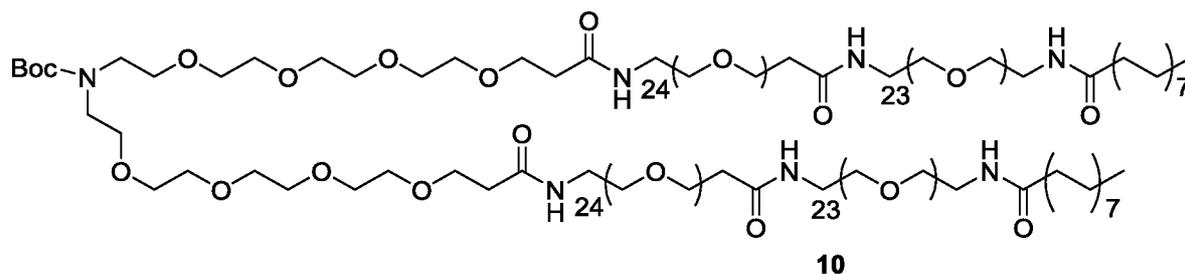


К раствору соединения 3 (5,81 г, 24,60 ммоль) в смеси ТГФ/ДМФ (80 мл/20 мл) при комнатной температуре добавляли ЭДК (7,07 г, 36,90 ммоль), ДМАП (0,30 г, 2,46 ммоль) и соединение 4 (6,13 г, 36,90 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После удаления растворителя в вакууме остаток помещали в колонку, 120 г, и соединение 5 элюировали с помощью 0-50% EtOAc в гексанах. Соединение 5 получали в виде белого твердого вещества, 9,36 г, 99%. ЖХ-МС: [M+H], рассчитано: 385,03, найдено: 385,46.

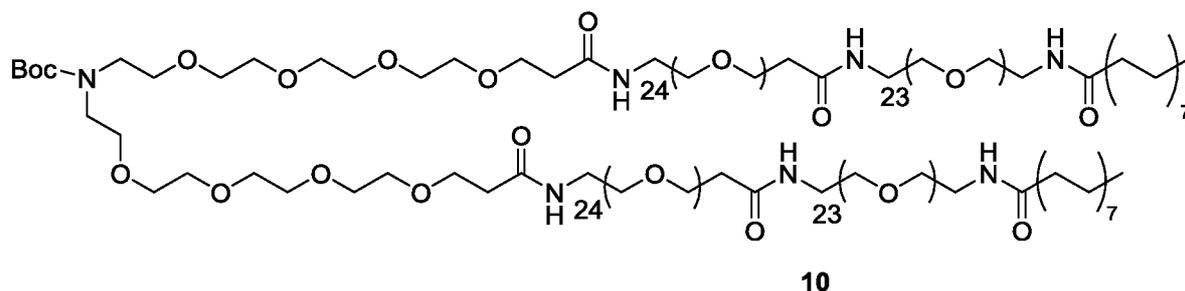


К раствору соединения 5 (2,29 г, 5,96 ммоль) в ДХМ (110 мл) добавляли 70% мХПБК (5,14 г, 27,79 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. При комнатной температуре добавляли еще 1,8 г мХПБК. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После фильтрования растворитель удаляли в вакууме. Остаток дважды перекристаллизовывали из смеси ДХМ/EtOAc (50 мл/50 мл). Соединение 6 получали в виде белых игольчатых кристаллов, 1,93 г, 78%. ЖХ-МС: [M+H], рассчитано: 417, найдено: 417.



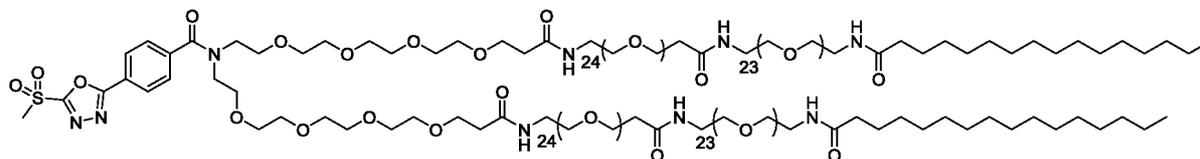


5 К раствору соединения 7 (10,00 г, 4,34 ммоль) в ДХМ (100 мл) при 0°С добавляли пальмитоилхлорид (1,31 г, 4,78 ммоль) и ТЭА. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и затем растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. Соединение 8 получали в виде белого твердого вещества, 10,0 г, 90%.



10
15 Соединение 8 (9,56 г, 3,76 ммоль) растворяли в 25 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Весь растворитель удаляли и остаток сушили в вакууме в течение 2 ч. Остаток повторно растворяли в 150 мл ДХМ и добавляли ТЭА, затем соединение 9 (1,10 г, 1,79 ммоль) и COMU (1,69 г, 3,94 ммоль). Реакционную смесь перемешивали

при комнатной температуре в течение ночи. После проведения стандартной обработки (1 н. раствор HCl, насыщенный раствор бикарбоната натрия, промывка рассолом) ДХМ удаляли. Соединение 10 очищали с помощью колонки, 120 г, с использованием 0-20% MeOH в ДХМ и получали 5,90 г, 60%.



LP238-p

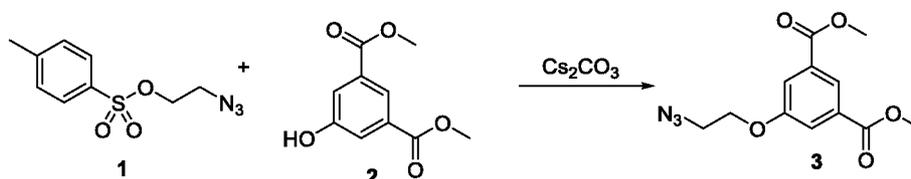
5

Соединение 10 (4,50 г, 0,82 ммоль) растворяли в 20 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Весь растворитель удаляли и остаток сушили в вакууме в течение 2 ч. Остаток повторно растворяли в 100 мл ДХМ и добавляли ТЭА, затем соединение 6 (0,69 г, 1,65 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ТЭА удаляли путем промывки 1 н. раствором HCl и органический слой концентрировали. Неочищенное соединение LP238-p очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. Получали 2,80 г (60%) LP238-p в виде светло-желтого твердого вещества.

10

15

Синтез LP240-p



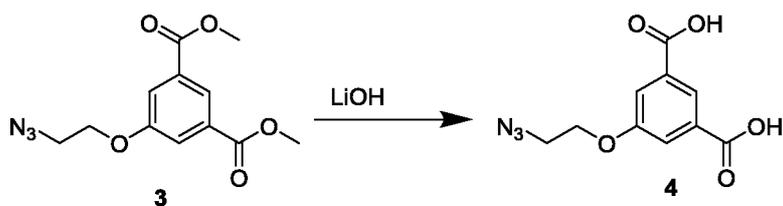
К суспензии соединения 1 (880 мг, 3,647 ммоль, 1,0 экв.) и Cs₂CO₃ (1,782 г, 5,471 ммоль, 1,50 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) при комнатной температуре добавляли соединение 2 (0,843 г, 4,012 ммоль, 1,10 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию останавливали водой (20 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (2×10 мл). Объединенные органические фазы промывали рассолом (1×20 мл) и водой (1×20 мл).

20

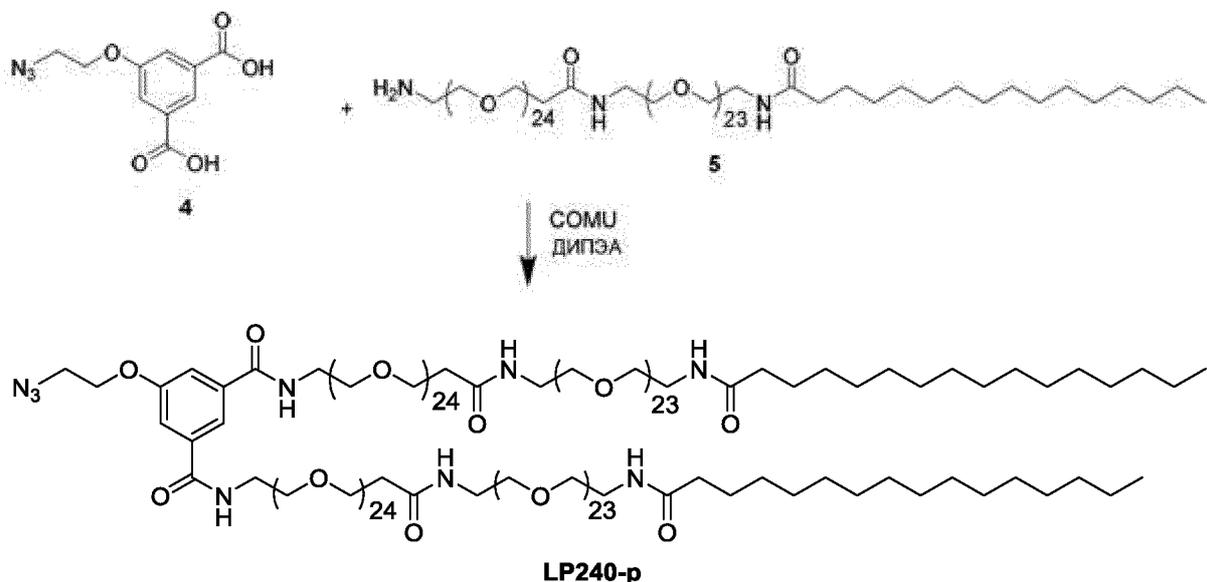
Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали.

Соединение 3 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 280,09, найдено: 280,39.

25



К раствору соединения 3 (1000 мг, 3,581 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (10 мл) и воде (10 мл) при комнатной температуре добавляли LiOH (686 мг, 19,978 ммоль, 8,0 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Значение pH реакционной смеси доводили до равного 1,0 путем добавления HCl. Продукт экстрагировали этилацетатом (2×10 мл). Объединенные органические фазы сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали. Соединение 4 использовали непосредственно без дополнительной очистки. ЖХ-МС: [M+H]⁺, рассчитано: 252,05, найдено: 251,31.

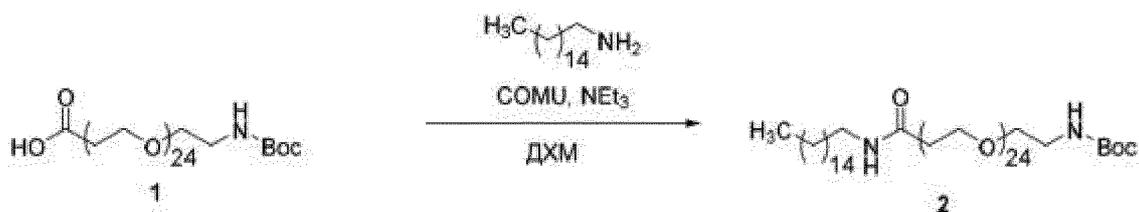


10

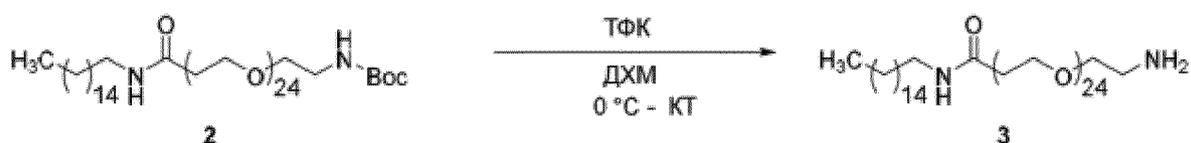
15

К раствору соединения 4 (5 мг, 0,0199 ммоль, 1,0 экв.), соединения 5 (100 мг, 0,0408 ммоль, 2,05 экв.) и диизопропилэтиламина (0,017 мл, 0,0995 ммоль, 5,0 экв.) в безводном ДХМ (2 мл) при комнатной температуре добавляли COMU (20,5 мг, 0,0478 ммоль, 2,40 экв.). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. LP240-p очищали с помощью CombiFlash® при элюировании с помощью 8-20% MeOH в ДХМ. ЖХ-МС: [M+5H]⁺/5, рассчитано: 1019,43, найдено: 1020,79.

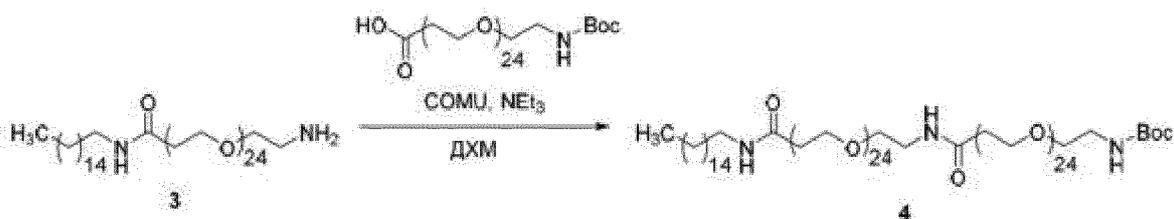
Синтез LP246-p



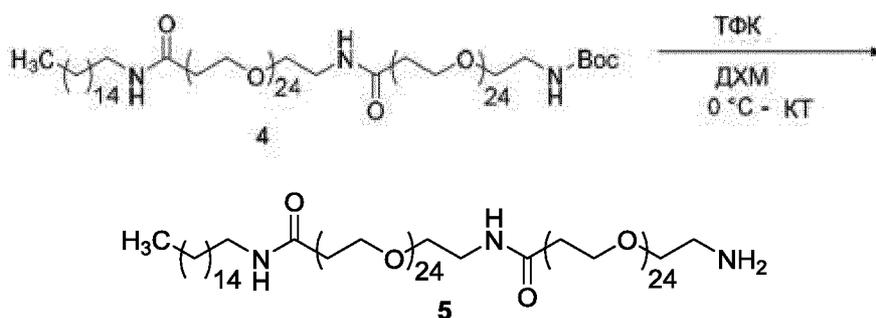
Соединение 1 (0,5 г, 0,401 ммоль) и COMU (0,206 г, 0,481 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) и добавляли NEt₃ (0,168 мл, 1,2 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 10 мин. Через 10 мин к раствору соединения 1 и COMU добавляли 1-аминогексадекан (0,102 г, 0,42 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 90 мин и затем проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Реакцию останавливали с помощью 5 мл воды и смесь перемешивали в течение 5 мин. Слои разделяли и органический слой промывали 1 М водным раствором HCl (2×15 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2×20 мл), водой (20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (2×20 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали и получали светло-желтое вспененное твердое вещество. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. Фракции, содержащие чистое соединение 2, объединяли и получали 515 мг (выход 87%) в виде белого твердого вещества.



Соединение 2 (0,515 г, 0,35 ммоль) растворяли в ДХМ (4 мл), охлаждали до 0°C и добавляли ТФК (1 мл, 13 ммоль). После добавления ТФК реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Полученный раствор перемешивали в течение 90 мин и затем анализировали с помощью ЖХ-МС. Реакцию останавливали путем добавления насыщенного водного раствора NaHCO₃ до прекращения выделения газа и смесь перемешивали в течение 5 мин. Слои разделяли и органический слой промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2×20 мл), водой (20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали и получали соединение 3 в виде белого вспененного твердого вещества, 0,4674 г (выход 97,4%).



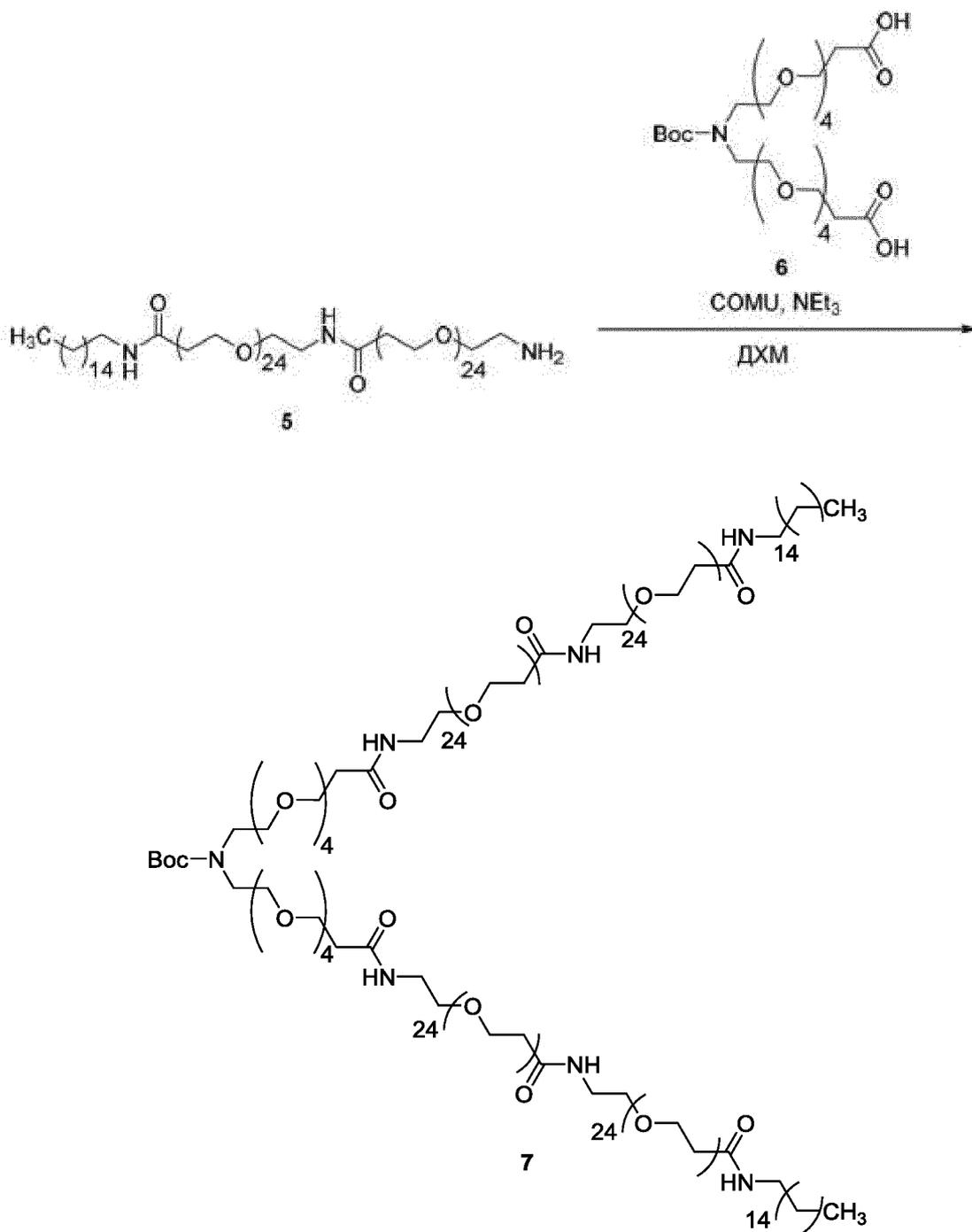
t-Вос-амидо-ПЭГ₂₄-СООН (0,524 г, 0,42 ммоль) и COMU (0,180 г, 0,42 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) и добавляли NEt₃ (0,488 мл, 3,5 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 10 мин. Через 10 мин к раствору t-Вос-амидо-ПЭГ₂₄-СООН добавляли соединение 3 (0,480 г, 0,35 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч и проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Реакцию останавливали с помощью 5 мл воды и смесь перемешивали в течение 5 мин. Слои разделяли и органический слой промывали 1 М раствором HCl (1×15 мл), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2×20 мл), водой (20 мл), 1 М раствором HCl (1×20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (2×20 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали и получали светло-желтое вспененное твердое вещество (примерно 900 мг). Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. Соединение 4 элюировалось при 4% MeOH в ДХМ. Чистые фракции, содержащие соединение 4, объединяли и получали 0,780 г (85,7%) светло-розового твердого вещества.



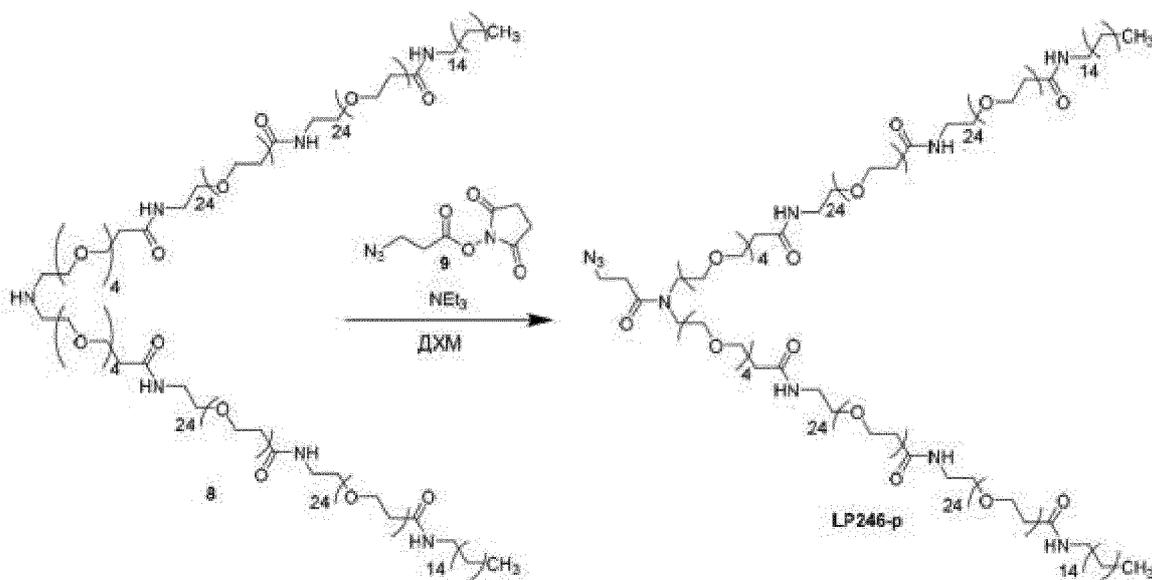
Соединение 4 (0,78 г, 0,3 ммоль) растворяли в ДХМ (4 мл), охлаждали до 0°C и добавляли ТФК (1 мл, 13 ммоль). После добавления ТФК реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч и проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Реакцию останавливали путем добавления насыщенного водного раствора NaHCO₃ до прекращения выделения газа и смесь перемешивали в течение 5 мин. Слои

разделяли и органический слой промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 (2×20 мл), водой (20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na_2SO_4 и концентрировали и получали соединение 5 в виде белого вспененного твердого вещества, 0,741 г (выход 98,9%). Соединение 5

5 использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

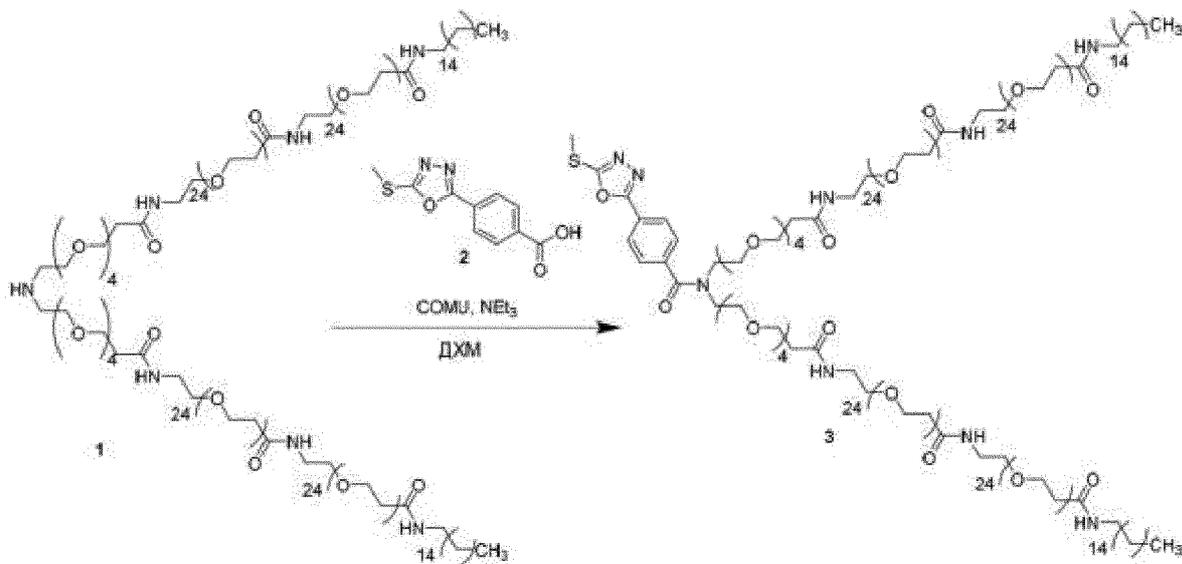


N-Boc-*N*-бис-ПЭГ₄-кислоту (соединение 6, 0,0339 г, 0,055 ммоль) и COMU (0,0473 г, 0,11 ммоль) растворяли в ДХМ (3 мл) и добавляли NEt_3 (0,167 мл, 1,20

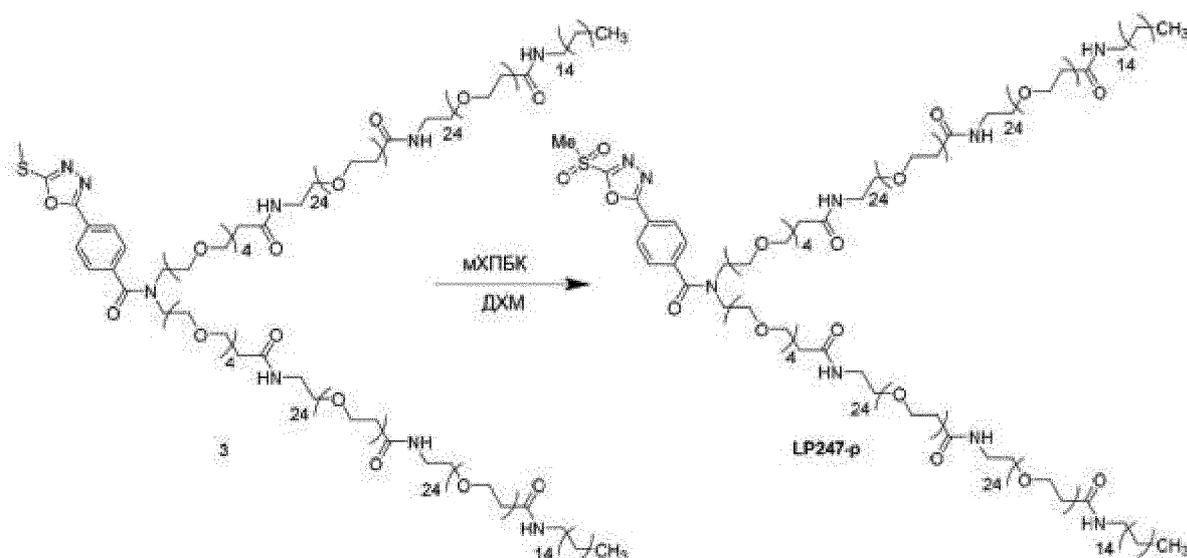


Соединение 8 (0,090 г, 0,016 ммоль) растворяли в ДХМ (3 мл) и добавляли NEt_3 (22,9 мкл, 0,164 ммоль), затем добавляли сложный эфир, 3-азидопропионат NHS (соединение 9, 0,0174 г, 0,082 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч и проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Реакционную смесь концентрировали и непосредственно помещали в колонку с силикагелем для проведения очистки. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле (колонка Redisep Gold®, 4 г, выпускающаяся фирмой Teledyne Isco) с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. LP246-p элюировали с помощью 16% MeOH в ДХМ. Чистые фракции, содержащие соединение LP246-p, объединяли и получали 0,019 г почти белого твердого вещества (выход 20,7%).

Синтез LP247-p

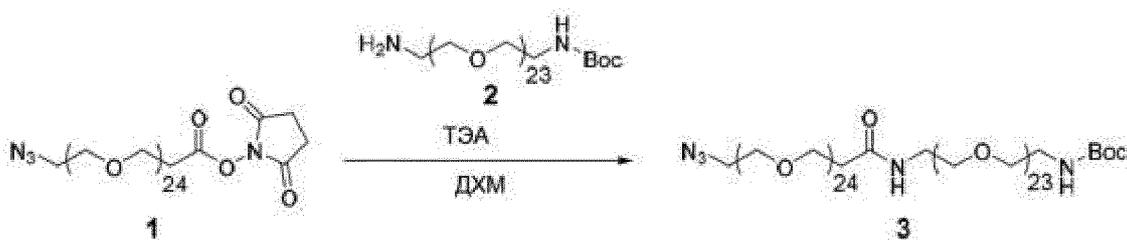


Соединение 2 (11,2 мг, 0,047 ммоль) и COMU (20 мг, 0,047 ммоль) растворяли в ДХМ (3 мл) и добавляли NEt_3 (16,7 мкл, 0,12 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 10 мин. Через 10 мин к раствору соединения 2 и COMU добавляли раствор соединения 1 (130 мг, 0,024 ммоль, соединение 8, полученное при синтезе соединения LP246-p) в ДХМ (2 мл). Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч и проводили проверку с помощью ЖХ-МС. Реакцию останавливали с помощью 5 мл воды и смесь перемешивали в течение 5 мин. Слои разделяли, и органический слой промывали 1 М водным раствором HCl (1×15 мл), насыщенным водным раствором NaHCO_3 (3×20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na_2SO_4 и концентрировали и получали прозрачную жидкость. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле (4 колонка Redisep Gold®, 4 г, выпускающаяся фирмой Teledyne Isco) с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. Соединение 3 элюировали при 12% MeOH в ДХМ. Чистые фракции, содержащие соединение 3, объединяли и получали 0,086 г (выход 63,6%) почти белого твердого вещества.



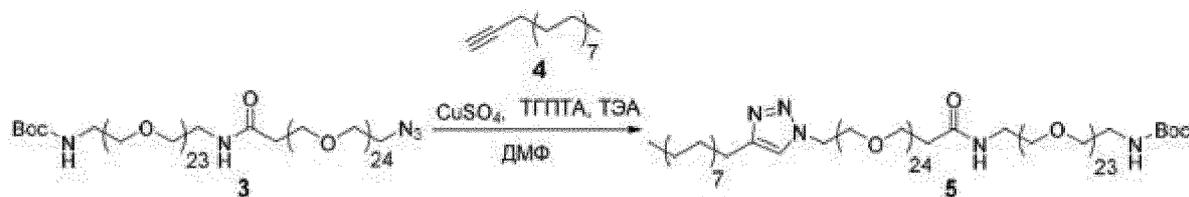
Соединение 3 (0,086 г, 0,015 ммоль) растворяли в ДХМ (3 мл) и добавляли мХПБК (0,0131 г, 0,076 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и непосредственно помещали в колонку с силикагелем. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле (колонка Redisep Gold®, 4 г, выпускающаяся фирмой Teledyne Isco) с использованием 0-20% MeOH в ДХМ. LP247-p элюировали при 12% MeOH в ДХМ. Чистые фракции, содержащие соединение LP247-p, объединяли и получали 0,041 мг (выход 47,4 %) почти белого твердого вещества.

Синтез LP339-p



Вос-амидо-ПЭГ₂₃-амин 2 (8,00 г, 6,82 ммоль) растворяли в ДХМ (250 мл) и добавляли триэтиламин (2,85 мл, 20,45 ммоль), затем сложный эфир, азидо-ПЭГ₂₄-NHS 1 (9,95 г, 7,84 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 2 ч ЖХ-МС указывала на отсутствие исходного вещества. Реакционную смесь концентрировали и непосредственно помещали в колонку с силикагелем для проведения очистки. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием от 2% MeOH:98%

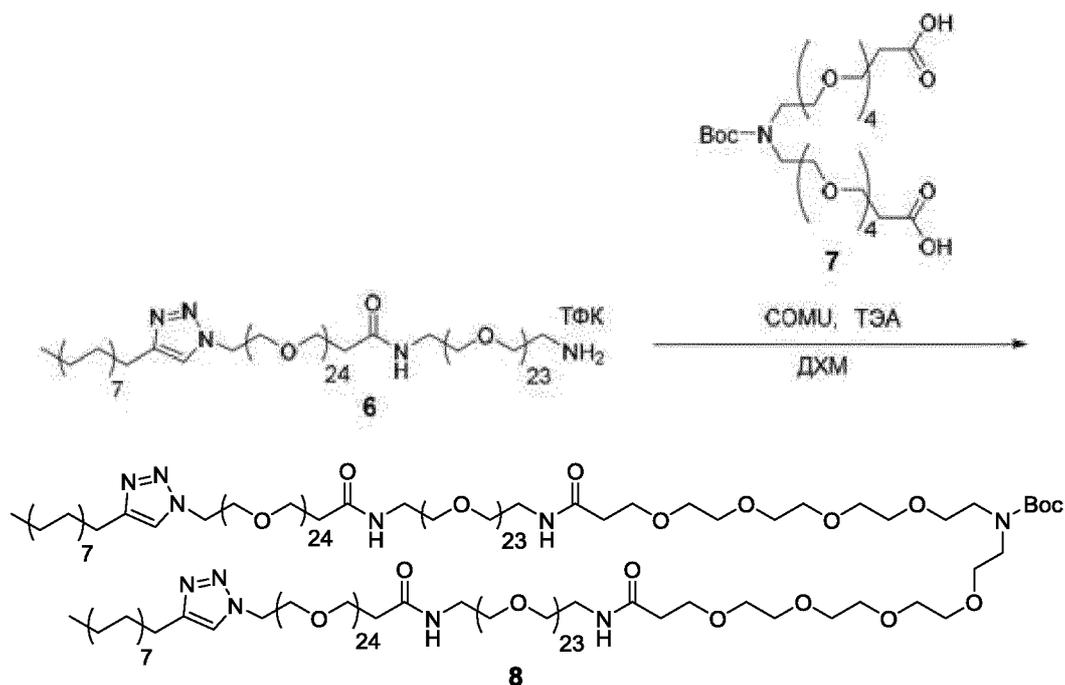
ДХМ до 20% MeOH:80% ДХМ. Фракции, содержащие продукт, объединяли и получали 14,3 г (выход 90%) соединения 3 в виде белого твердого вещества.



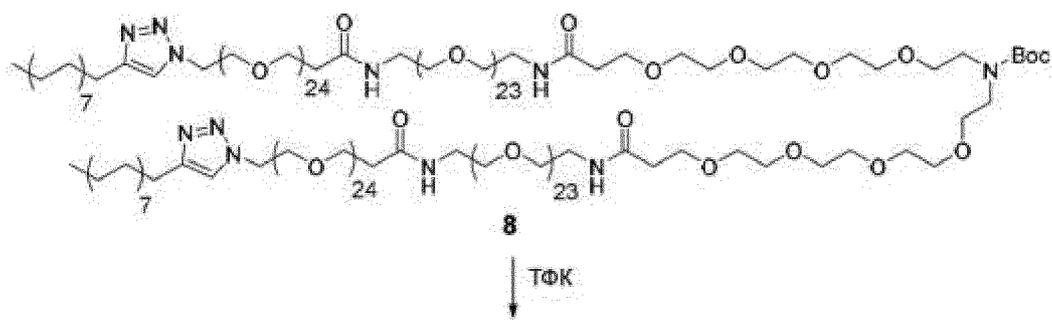
5 N-Вос-ПЭГ₂₃-амидо-ПЭГ₂₄-азид 3 (10,0 г, 4,296 ммоль), 1-октадецин 4 (1,183 г, 4,726 ммоль), пентагидрат сульфата меди (0,268 г, 1,074 ммоль), трис((1-гидроксипропил-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амин (ТГПТА) (0,653 г, 1,504 ммоль) и аскорбат натрия (1,872 г, 9,451 ммоль) растворяли в ДМФ (500 мл) и добавляли триэтиламин (0,290 мл, 2,148 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C. Через 2 ч ЖХ-МС указывала на отсутствие исходного
10 вещества. Реакционную смесь концентрировали, и остаток разбавляли дихлорметаном и фильтровали через воронку с пористым стеклянным фильтром. Фильтрат концентрировали и непосредственно помещали в колонку с силикагелем для проведения очистки. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием от 0% MeOH:100%
15 ДХМ до 20% MeOH:80% ДХМ. Продукт элюировался при 8% MeOH/92% ДХМ. Чистые фракции объединяли и получали 9,5 г (выход 86%) соединения 5 в виде светло-желтого твердого вещества.

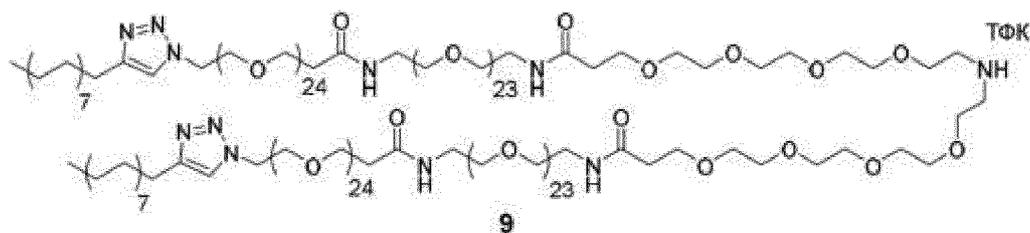


20 N-Вос-ПЭГ₂₃-амидо-ПЭГ₂₄-триазол-С₁₆ 5 (0,358 г, 0,139 ммоль) растворяли в ДХМ (4 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (0,9 мл, 11,8 ммоль). Через 1 ч ЖХ-МС указывала на отсутствие исходного вещества. Реакционную смесь концентрировали и сушили в вакууме в течение нескольких часов и получали 0,325 мг (выход 90,9%) соединения 6 в виде светло-желтого твердого вещества. Продукт непосредственно использовали в следующей реакции без
25 дополнительной очистки.

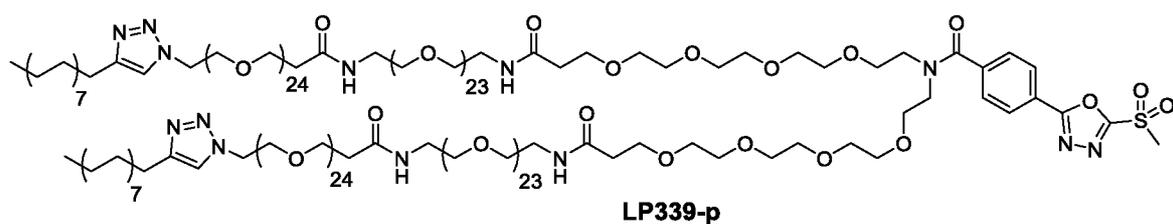
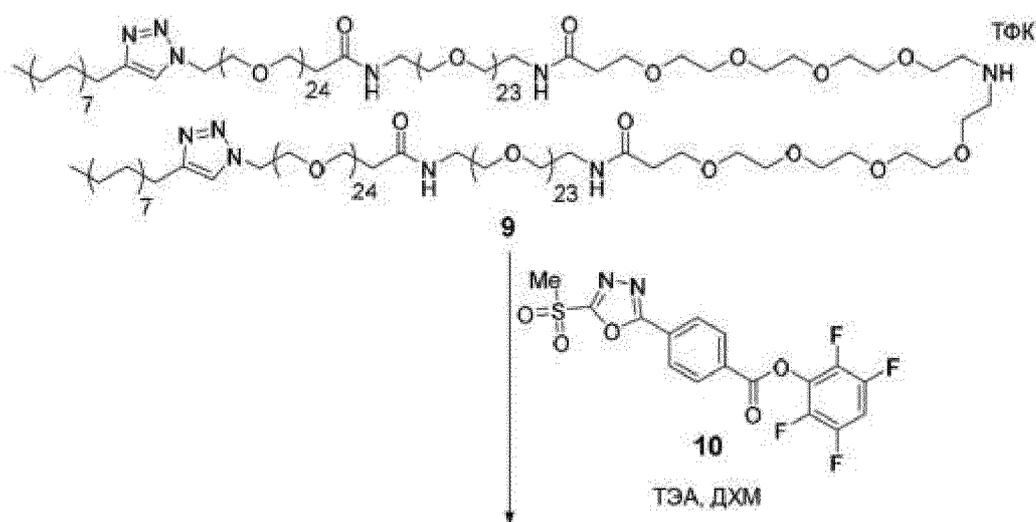


N-Вос-N-бис-ПЭГ₄-кислоту 7 (0,0372 г, 0,061 ммоль) и COMU (0,052 г, 0,121 ммоль) растворяли в ДХМ (5 мл) и добавляли ТЭА (0,395 мл, 2,84 ммоль).
 5 Полученный раствор перемешивали в течение 10 мин. В отдельном сосуде перемешивали раствор соли amino-ПЭГ₂₃-амидо-ПЭГ₂₄-триазола-С₁₆ 6 с ТФК (0,325 г, 0,126 ммоль) в ДХМ (5 мл) и ТЭА (0,5 мл, 3,60 ммоль). Раствор N-Вос-N-бис-ПЭГ₄-кислоты 7 добавляли к раствору amino-ПЭГ₂₃-амидо-ПЭГ₂₄-триазола-С₁₆ 6. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную
 10 смесь концентрировали и непосредственно помещали в колонку с силикагелем для проведения очистки. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием от 4% MeOH:96% ДХМ до 20% MeOH:80% ДХМ. Чистые фракции объединяли и получали 89 мг (выход 26,5%) соединения 8 в виде светло-желтого твердого вещества.





5 N-Вос-бис-ПЭГ₄-амидо-ПЭГ₂₃-амидо-ПЭГ₂₄-Триазол-С₁₆ 8 (5,9 г, 1,066 ммоль) растворяли в ДХМ (100 мл) и добавляли ТФК (20 мл, 262,3 ммоль). Через 2 ч ЖХ-МС указывала на отсутствие исходного вещества. Реакционную смесь концентрировали и получали соединение 9 в виде густой желтой жидкости. Соединение 9 непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

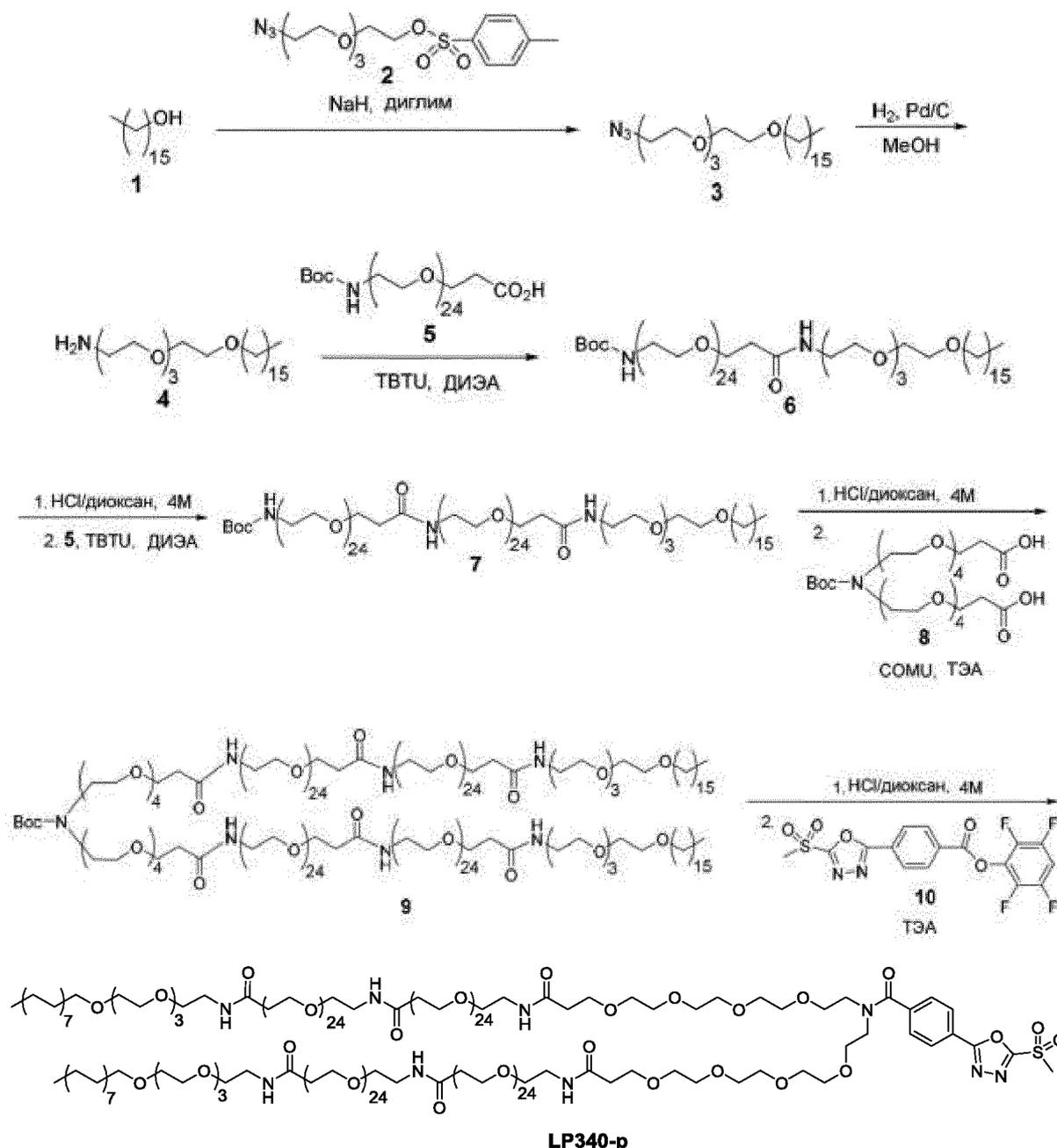


10 Соль аминокбис-ПЭГ₄-амидо-ПЭГ₂₃-амидо-ПЭГ₂₄-триазола-С₁₆ с ТФК 9 (5,89 г, 1,066 ммоль) растворяли в ТГФ (100 мл) и добавляли ТЭА (1,5 мл, 10,66 ммоль) и ТФФ-сульфон 10 (1,33 г, 3,20 ммоль). Через 22 ч ЖХ-МС указывала на степень превращения в продукт, составляющую 95%. Реакционную смесь концентрировали, повторно суспендировали в толуоле и повторно
15 концентрировали и затем очищали. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с использованием от 5% MeOH:95% ДХМ до 20%

MeOH:80% ДХМ. Продукт элюировался при 8% MeOH:92% ДХМ. Чистые фракции объединяли и получали 3,000 г (выход 49,5%) LP339-р в виде бежевого твердого вещества.

Синтез LP340-р

5



10 Гидрид натрия, 60% дисперсия в минеральном масле (1,93 г, 48,21 ммоль), помещали в сухую круглодонную колбу объемом 1 л, промывали с помощью МТБЭ (метил-трет-бутиловый эфир) и суспендировали в безводном диоксане (200 мл). Добавляли сухой гексадеканол 1 (11,2 г, 46,2 ммоль) и перемешивали при 50°C в течение 1 ч. Добавляли ПЭГ₃-тозилат 2 (15 г, 40,17 ммоль) и

реакционную смесь нагревали при 105°C в течение 17 ч. Реакционную смесь охлаждали в бане со льдом и добавляли H₂O (125 мл). Смесь экстрагировали с помощью МТБЭ и органический слой промывали с помощью H₂O, рассолом и сушили над Na₂SO₄. Соединение 3 очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки с 220 г SiO₂, элюент: растворитель А - гексан, растворитель В - EtOAc; В = 0-30%, 50 мин. Выход: 11,1 г, 64% . Рассчитано: ММ = 443,67. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 444,67 [M+H]⁺, 461,5 [M+NH₄]⁺, 466,54 [M+Na]⁺.

Азид 3 (11,1 г, 25 ммоль) и 10% Pd/C (1 г) в MeOH (70 мл) перемешивали в атмосфере водорода при давлении, равном 1 атм., в течение 17 ч. Реакционную смесь фильтровали, концентрировали и сушили в вакууме. Соединение 4 очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки с 80 г SiO₂, элюент: растворитель А - ДХМ, растворитель В - 20% MeOH в ДХМ; В = 0-50% за 50 мин. Выход: 4,66 г. Рассчитано: ММ = 417,7. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 418,1 [M+H]⁺.

ТВТУ (4,8 г, 14,9 ммоль) добавляли к суспензии амина 4 (5,94 г, 14,2 ммоль), Вос-(ПЭГ₂₄)-кислоты 5 (16,95 г, 13,6 ммоль) и ДИЭА (7,1 мл, 40,8 ммоль) в ДМФ (100 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч, концентрировали и оставшийся ДМФ удаляли путем проводимого 3 раза выпаривания с толуолом. Неочищенное соединение 6 растворяли в CHCl₃ (500 мл), промывали 1% раствором HCl, с помощью NaHCO₃, рассолом, сушили над Na₂SO₄ и непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Рассчитано: ММ = 1646,14. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1646,99 [M+H]⁺, 1664,99 [M+NH₄]⁺.

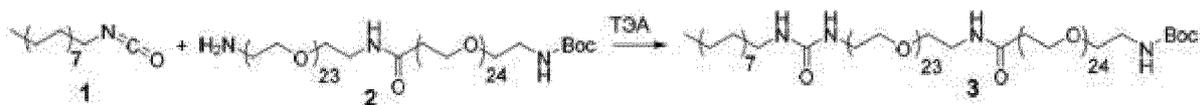
Соединение 6 (10,14 г, 6,16 ммоль) в 4 М растворе HCl в диоксане (45 мл) перемешивали в течение 50 мин. Реакционную смесь концентрировали и остаток сушили путем проводимого 2 раза выпаривания с толуолом. Полученный ПЭГ-амингидрохлорид с удаленной защитной группой растворяли в ДМФ (60 мл), затем добавляли ДИЭА (4,29 мл, 24,6 ммоль) и кислоту 5 (7,674 г, 6,157 ммоль), затем ТВТУ (2,175 г, 6,77 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали и остаток сушили путем проводимого 3 раза выпаривания с толуолом. Продукт, соединение 7, растворяли в CHCl₃ (500 мл), промывали 1% раствором HCl, с помощью NaHCO₃, рассолом и сушили над

Na₂SO₄. Соединение 7 непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Рассчитано: ММ = 2774,49. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1405,24 [M+2NH₄]²⁺, 1397,20 [M+H+Na]²⁺, 1388,67 [M+2H]²⁺.

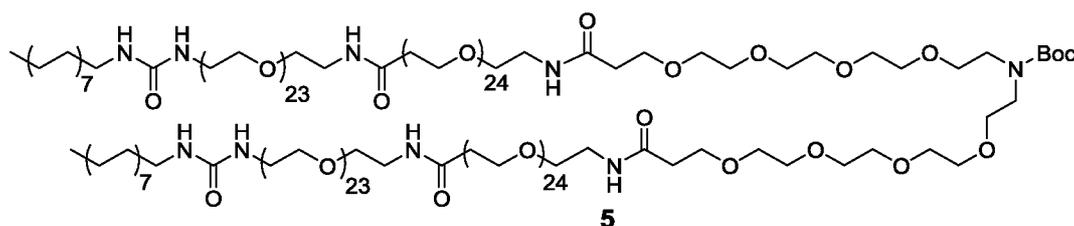
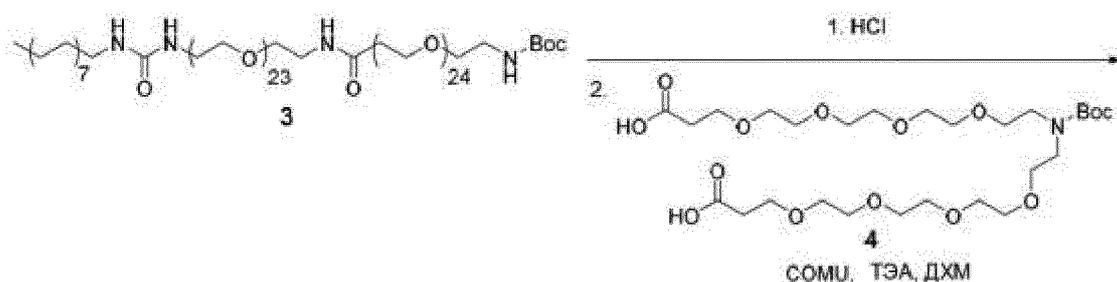
5 Соединение 7 (15,22 г, 5,49 ммоль) в 4 М растворе HCl в диоксане (55 мл) перемешивали в течение 50 мин. Реакционную смесь концентрировали и остаток сушили путем проводимого 2 раза выпаривания с толуолом. Полученный ПЭГ-амингидрохлорид с удаленной защитной группой растворяли в ДХМ (100 мл). Вос-аминобис(ПЭГ₄-кислоту) 8 (1,68 г, 2,74 ммоль) в ДХМ (15 мл), ТЭА (2,2 мл, 10 15,8 ммоль) и COMU (2,47 г, 5,76 ммоль) перемешивали в течение 3 мин и затем добавляли к раствору ПЭГ-амингидрохлорида с удаленной защитной группой. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч и растворитель удаляли. Остаток растворяли в хлороформе (300 мл), промывали 1% раствором HCl, с 15 помощью NaHCO₃, рассолом и сушили над Na₂SO₄. Соединение 9 очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки с SiO₂ (220 г), элюент: растворитель А - ДХМ, растворитель В - 20% MeOH в ДХМ; В = 0-100% за 50 мин. Выход: 9,75 г, (60%). Рассчитано: ММ = 5926,42. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1483,26 [M+3H+NH₄]⁴⁺, 1458,53,74 [M+4H]⁴⁺, 1186,91 [M+5H]⁵⁺.

20 Соединение 9 (9,75 г, 1,644 ммоль) в 4 М растворе HCl в диоксане (60 мл) перемешивали в течение 50 мин. Реакционную смесь концентрировали и остаток сушили путем проводимого 2 раза выпаривания с толуолом. Полученный амингидрохлорид растворяли в ТГФ (150 мл) и добавляли ТЭА (1,38 мл, 9,86 ммоль), затем сложный эфир, сульфон-ТФФ 10 (1,711 г, 4,11 ммоль). 25 Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч и растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе (300 мл), промывали 1% раствором HCl, рассолом и сушили над Na₂SO₄. LP340-р очищали с помощью CombiFlash® с использованием колонки с SiO₂ (120 г), элюент: растворитель А - ДХМ, растворитель В - 20% MeOH в ДХМ; В = 0-100% за 60 мин. Выход: 7,58 г, (75%). 30 Рассчитано: ММ = 6077,54. Найдено: МС (ЭР, в режиме положительных ионов): 1534,03 [M+H+Na+2NH₄]⁴⁺, 1227,47 [M+2H+Na+2NH₄]⁵⁺.

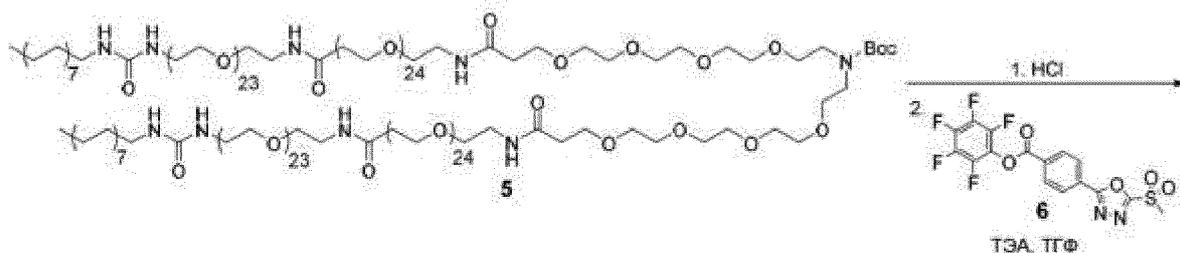
Синтез LP357-р

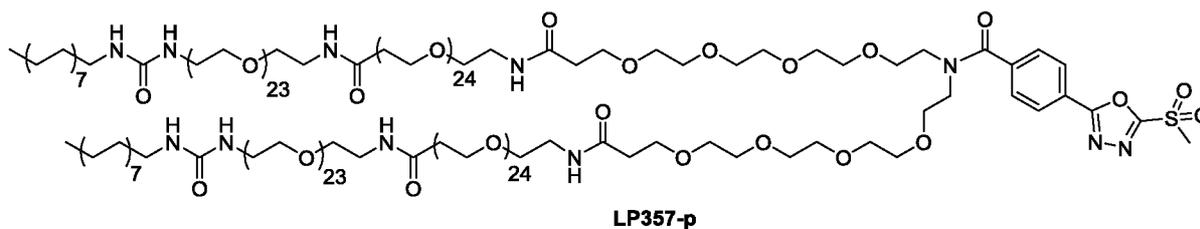


Вос-ПЭГ₄₇-NH₂ 2 (1 г, 0,435 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в 20 мл ДХМ. Добавляли гексадецилизоцианат 1 (140 мг, 0,522 ммоль, 1,2 экв.) и ТЭА (2,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 12 ч. ДХМ удаляли и соединение 3, 0,967 г (86,5%), очищали с помощью колонки, 24 г, с использованием в качестве подвижной фазы 0-20% MeOH/ДХМ.



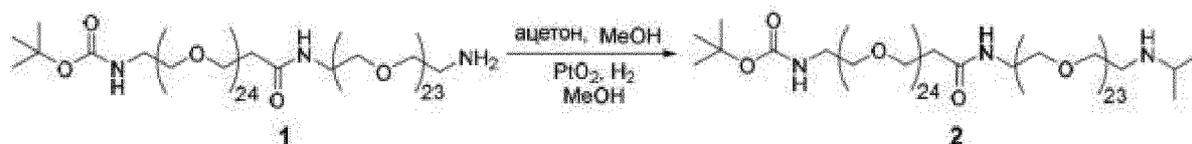
Соединение 3 (0,967 г, 0,376 ммоль) растворяли в 15 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор HCl в диоксане удаляли и полученный амин с удаленной защитной группой растворяли в ДХМ. Добавляли соединение 4 (110 мг, 0,179 ммоль), COMU (169 мг, 0,394 ммоль) и ТЭА (10,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли в вакууме. 15 Соединение 5 (0,8 г, 80,9% выход) очищали с помощью колонки, 24 г, с использованием в качестве подвижной фазы 0-20% MeOH/ДХМ.



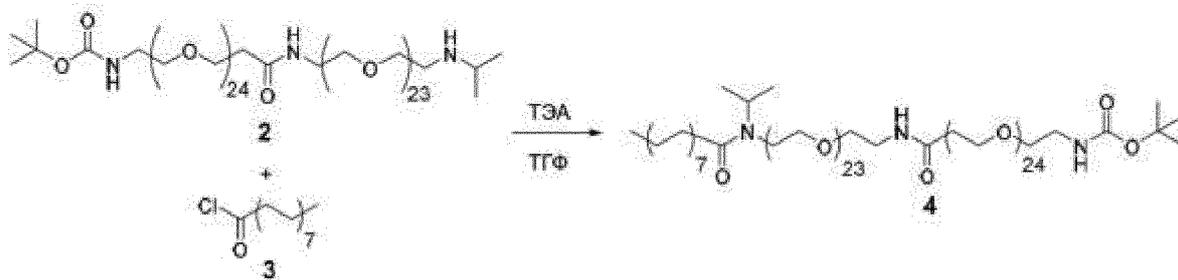


Соединение 5 (0,95 г, 0,172 ммоль) растворяли в 15 мл 4 н. раствора HCl в диоксане и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор HCl в диоксане удаляли в вакууме. Полученный амин с удаленной защитной группой растворяли в ТГФ, затем добавляли соединение 6 (0,15 г, 0,345 ммоль) и ТЭА (10,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли в вакууме. LP357-p (0,6 г, 61%) очищали с помощью колонки, 24 г, с использованием в качестве подвижной фазы 0-20% MeOH/ДХМ.

10 Синтез LP358-p

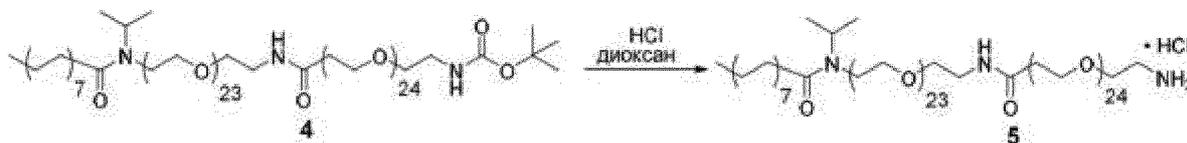


PtO₂ (0,3986 г) добавляли к раствору соединения 1 (4,00 г) в безводном MeOH и ацетоне. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода в течение 2 дней. Содержащий платину катализатор отфильтровывали с использованием целита® и диоксида кремния. Затем раствор концентрировали в вакууме и получали соединение 2, которое непосредственно использовали на следующей стадии без очистки. Выход: 3,99 г.

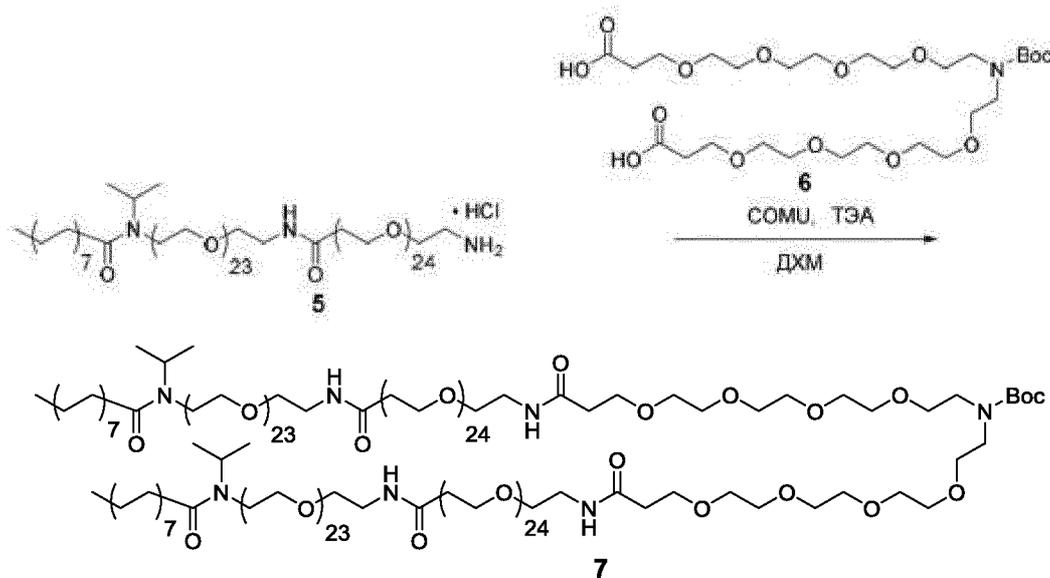


Соединение 2 (4,07 г) добавляли к раствору соединения 3 (0,53 г) и ТЭА (0,53 г) в ТГФ. Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС и/или ТСХ не указывала на полное превращение соединения 2. Реакцию останавливали с помощью MeOH. Неочищенный продукт очищали с помощью системы CombiFlash® с использованием жидкой загрузки в ДХМ (колонка: 80 г,

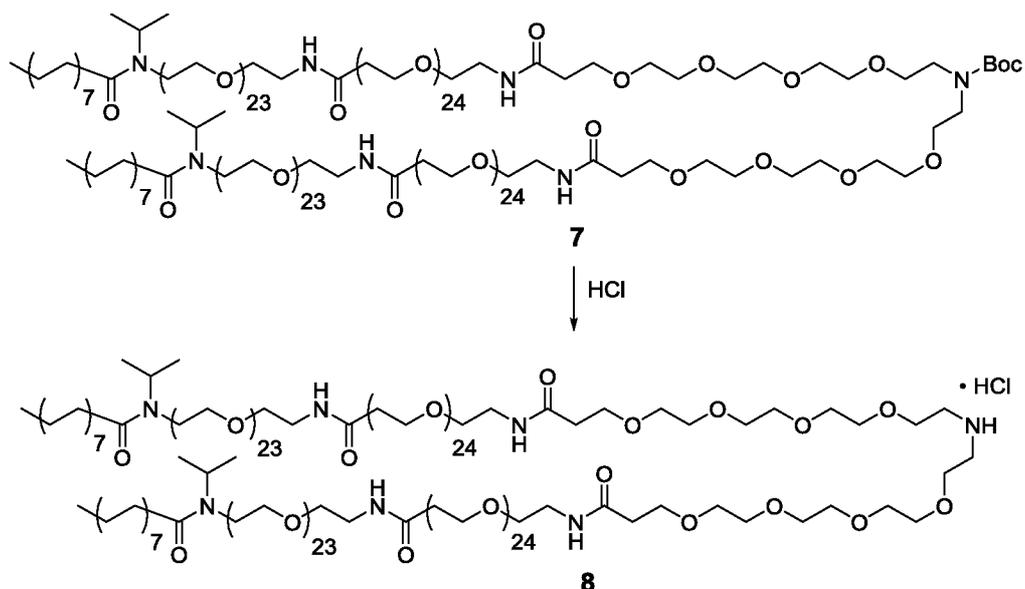
система растворителей: от ДХМ (А) до 20% МеОН (В), градиентный режим: от 5% В до 100% В за 60 мин). Соединение 4 элюировалось при 25% В. Выход: 2,92 г.



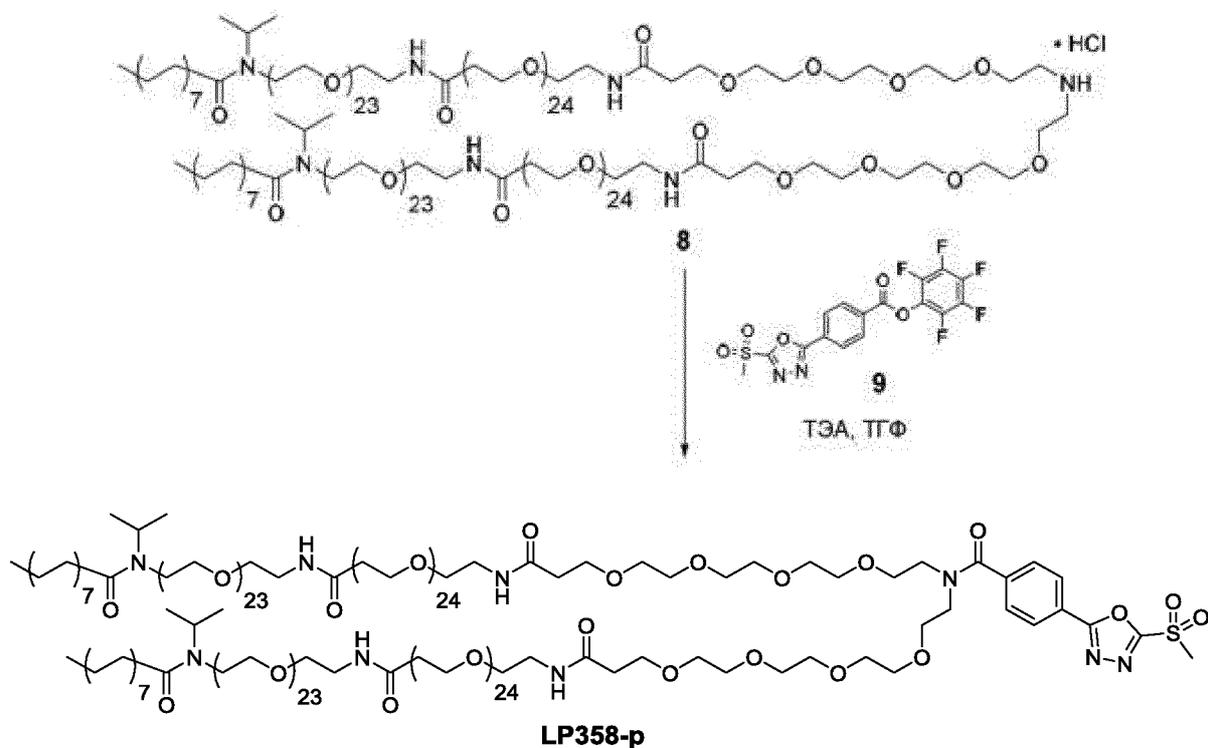
5 Соединение 4 (2,92 г при комнатной температуре) растворяли в растворе HCl в диоксане (4 М) (24,9 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение соединения 4. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и получали соединение 5 в виде белого порошкообразного вещества. Соединение 5 непосредственно использовали на
10 следующей стадии без дополнительной очистки.



Соединения 6 (0,32 г) и 5 (2,81 г), COMU (1,07 г) и ТЭА (2,08 мл) в ДХМ перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. За значением рН
15 следили для обеспечения нейтрализации HCl и поддержания щелочной реакции реакционной смеси. Реакционную смесь промывали 1 н. раствором HCl, насыщенным раствором NaHCO₃ и рассолом и ДХМ удаляли в вакууме. Соединение 7 очищали с помощью с помощью колонки, 80 г (система растворителей: ДХМ (А) и 20% МеОН (В), градиентный режим: 5% В в течение
20 5 мин, от 5% В до 100% В за 60 мин). Соединение 7 элюировалось при 45% В. Выход: 2,26 г.



Соединение 7 (2,26 г) при комнатной температуре растворяли в растворе HCl в диоксане (4 М) (25,5 мл). Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока ЖХ-МС не указывала на полное превращение соединения 7. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и получали соединение 8 в виде белого порошкообразного вещества. Соединение 8 непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.



10

Соединение 8 (2,22 г) и ТЭА (1,42 мл) растворяли в 50 мл безводного ТГФ и добавляли соединение 9 (0,35 г). Реакционную смесь перемешивали в течение

12 ч. Реакционную смесь концентрировали и неочищенное вещество LP358-р очищали двумя порциями с помощью диоксида кремния (колонки: 12 и 24 г) с использованием системы растворителей (EtOAc/гексаны, затем MeOH/ДХМ. Первый градиентный режим: (EtOAc/гексаны): 0% В в течение 3 мин, от 0% В до 100% В за 10 мин. Второй градиентный режим: (ДХМ/MeOH): 5% В в течение 5 мин, 15% В в течение 5 мин, от 15% В до 100% В за 20 мин). Продукт, LP358-р, элюировался при 30% В в ходе проведения второго градиентного режима. Содержащий сульфон реагент (т.е. соединение 9) извлекали в ходе проведения первого градиентного режима. Выход: 1,92 г.

10 Пример 5. Конъюгирование мостиковых групп и направленно действующих лигандов со средствами на основе РНКи

А. Конъюгирование мостиковых групп - активированных сложных эфиров

Приведенную ниже методику использовали для конъюгирования мостиковых групп, обладающих структурой ДБЦО-NHS или L1-L10, представленной в приведенной выше таблице 22, со средством на основе РНКи, содержащим функционализированную аминую смысловую цепь, такую как C₆-NH₂, NH₂-C₆ или (NH₂-C₆)_s, представленную в приведенной выше таблице 22. Подвергнутое отжигу средство на основе РНКи, высушенное путем лиофилизации, растворяли в ДМСО с добавлением 10% воды (об./об.%) при концентрации, равной 25 мг/мл. Затем к раствору добавляли 50-100 экв. ТЭА и 3 экв. мостика - активированного сложного эфира. Реакции в растворе давали протекать в течение 1-2 ч, при этом за протекание реакции следили с помощью ОФ-ВЭЖХ-МС (подвижная фаза А: 100 мМ ГФИП (гексафторизопропанол), 14 мМ ТЭА; подвижная фаза В: ацетонитрил, колонка: Waters™ XBridge C18, Waters Corp.).

Затем продукт осаждали путем добавления 12 мл ацетонитрила и 0,4 мл 3ФФ и твердое вещество центрифугировали и получали пеллету. Затем пеллету повторно растворяли в 0,4 мл 1×3ФФ и 12 мл ацетонитрила. Полученную пеллету сушили в высоком вакууме в течение 1 ч.

30 В. Конъюгирование направленно действующих лигандов с пропаргильными мостиками

До или после отжига функционализированную по 5'- или 3'-концу тридентатным содержащим алкин лигандом смысловую цепь конъюгировали с

лигандами интегрин $\alpha\nu\beta6$. В приведенном ниже примере описано конъюгирование лигандов интегрин $\alpha\nu\beta6$ с подвергнутому отжигу дуплексом. Готовили следующие исходные растворы: 0,5 М раствор трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТГТПА), 0,5 М раствор пентагидрата сульфата Cu(II) ($\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и 2 М раствор аскорбата натрия в деионизированной воде. Готовили 75 мг/мл раствор лиганда интегрин $\alpha\nu\beta6$ в ДМСО. В пробирку для центрифуги объемом 1,5 мл, содержащую функционализированный триалкиновыми фрагментами дуплекс (3 мг, 75 мкл, 40 мг/мл в деионизированной воде, примерно 15000 г/моль), добавляли 25 мкл 1 М раствора буфера Нерес, рН 8,5. После встряхивания добавляли 35 мкл ДМСО и раствор встряхивали. К реакционной смеси добавляли лиганд интегрин $\alpha\nu\beta6$ (6 экв в пересчете на дуплекс, 2 экв. в пересчете на алкин, примерно 15 мкл) и раствор встряхивали. С помощью индикаторной бумаги определяли значение рН и устанавливали, что значение рН равно примерно 8. В отдельной пробирке для центрифуги объемом 1,5 мл 50 мкл 0,5 М раствора ТГТПА смешивали с 10 мкл 0,5 М раствора $\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Через 5 мин в реакционный сосуд добавляли раствор ТГТПА/ Cu (7,2 мкл, 6 экв., ТГТПА: Cu = 5:1) и сосуд встряхивали. Затем в реакционный сосуд сразу добавляли 2 М раствор аскорбата (5 мкл, 50 экв. в пересчете на дуплекс, 16,7 экв. в пересчете на алкин) и сосуд встряхивали. После завершения реакции (обычно реакция завершалась через 0,5-1 ч) реакционную смесь сразу очищали с помощью анионообменной хроматографии при неденатурирующих условиях.

Пример 6. Конъюгирование предшественников липидов-модуляторов РК/PD

До или после проведения отжига и до или после конъюгирования один или большее количество направленно действующих лигандов, один или большее количество предшественников липидов-модуляторов РК/PD можно связать со средствами на основе РНКи, раскрытыми в настоящем изобретении. Ниже описана общая методика конъюгирования, использовавшаяся для связывания предшественников липидов-модуляторов РК/PD с конструкциями, приведенными в примерах, описанных в настоящем изобретении.

А. Конъюгирование содержащего малеинимид предшественника липида-модулятора РК/PD

Ниже описана общая методика, использовавшаяся для связывания содержащего малеинимид предшественника липида-модулятора РК/PD с функционализированной группой (C₆-SS-C₆) или (6-SS-6) смысловой цепью средства на основе РНКи, проводимая путем восстановления дисульфида с помощью дитиотреитола и последующего присоединения по Михаэлю тиола к содержащему малеинимид предшественнику липида-модулятора РК/PD: В сосуде функционализированную смысловую цепь растворяли в стерилизованной воде при концентрации, равной 50 мг/мл. Затем добавляли по 20 экв. 0,1 М раствора буфера Нерес, рН 8,5, и дитиотреитола. Реакции в смеси давали протекать в течение 1 ч, затем конъюгат осаждали из ацетонитрила и ЗФФ и твердые вещества центрифугировали и получали пеллету.

Пеллету помещали смесь ДМСО/вода состава 70/30 при концентрации твердых веществ, равной 30 мг/мл. Затем добавляли содержащий малеинимид предшественник липида-модулятора РК/PD в количестве, равном 1,5 экв. Реакции в смеси давали протекать в течение 30 мин. Продукт очищали с помощью АОБ-ВЭЖХ (анионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография, подвижная фаза А: 25 мМ Tris, рН = 7,2, 1 мМ ЭДТК, 50% ацетонитрила; подвижная фаза В: 25 мМ This, рН = 7,2, 1 мМ ЭДТК, 500 мМ NaBr, 50% ацетонитрила; неподвижная фаза: TSKgel-30; 1,5 см×10 см). Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя и остаток обессоливали с помощью вращающейся колонки ЗК с использованием 2×10 мл ионообменников в стерилизованной воде. твердый продукт сушили путем лиофилизации и хранили до последующего использования.

В. Конъюгирование содержащего сульфон предшественника липида-модулятора РК/PD

В сосуде функционализированную смысловую цепь растворяли в стерилизованной воде при концентрации, равной 50 мг/мл. Затем добавляли по 20 экв. 0,1 М раствора буфера Нерес, рН 8,5, и дитиотреитола. Реакции в смеси давали протекать в течение 1 ч, затем конъюгат осаждали из ацетонитрила и ЗФФ и твердые вещества центрифугировали и получали пеллету.

Пеллету помещали смесь ДМСО/вода состава 70/30 при концентрации твердых веществ, равной 30 мг/мл. Затем добавляли содержащий сульфон предшественник липида-модулятора РК/PD в количестве, равном 1,5 экв. Сосуд продували с помощью N₂ и нагревали при перемешивании при 40°C. Реакции в смеси давали протекать в течение 1 ч. Продукт очищали с помощью АОБ-ВЭЖХ (подвижная фаза А: 25 мМ This, рН = 7,2, 1 мМ ЭДТК, 50% ацетонитрила; подвижная фаза В: 25 мМ This, рН = 7,2, 1 мМ ЭДТК, 500 мМ NaBr, 50% ацетонитрила; неподвижная фаза: TSKgel-30; 1,5 см×10 см). Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя и остаток обессоливали с помощью вращающейся колонки ЗК с использованием 2×10 мл ионообменников в стерилизованной воде. твердый продукт сушили путем лиофилизации и хранили до последующего использования.

С. Конъюгирование содержащего азид предшественника липида-модулятора РК/PD

В стеклянный сосуд отвешивали 1 мол. экв. смолы TG-ТВТА, содержащей Cu(I). Сосуд продували с помощью N₂ в течение 15 мин. Затем в отдельном сосуде функционализированную смысловую цепь растворяли в стерилизованной воде при концентрации, равной 100 мг/мл. Затем в сосуд добавляли 2 экв. содержащего азид предшественника липида-модулятора РК/PD (50 мг/мл в ДМФ). Затем добавляли ТЭА, ДМФ и воду до обеспечения конечных условий проведения реакции: 33 мМ ТЭА, 60% ДМФ и 20 мг/мл конъюгированного продукта. Затем раствор шприцем переносили в сосуд со смолой. Продувку с помощью N₂ прекращали и сосуд герметизировали и помещали на плитку с перемешивающим устройством, работающую при 40°C. Реакции в смеси давали протекать в течение 16 ч. Смолу отфильтровывали с использованием фильтра с отверстиями размером 0,45 мкм.

Продукт очищали с помощью АОБ-ВЭЖХ (подвижная фаза А: 25 мМ This, рН = 7,2, 1 мМ ЭДТК, 50% ацетонитрила; подвижная фаза В: 25 мМ This, рН = 7,2, 1 мМ ЭДТК, 500 мМ NaBr, 50% ацетонитрила; неподвижная фаза: TSKgel-30; 1,5 см×10 см). Ацетонитрил удаляли с помощью роторного испарителя и остаток обессоливали с помощью вращающейся колонки ЗК с использованием 2×10 мл ионообменников в стерилизованной воде. твердый продукт сушили путем лиофилизации и хранили до последующего использования.

D. Конъюгирование содержащего алкин предшественника липида-модулятора РК/PD

Ниже описана общая методика, использовавшаяся для связывания активированного содержащего алкин предшественника липида-модулятора РК/PD с функционализированной группой (C₆-SS-C₆) или (6-SS-6) смысловой цепью средства на основе РНКи, проводимая путем восстановления дисульфида с помощью дитиотреитола и последующего добавления к содержащему алкин предшественнику липида-модулятору РК/PD: В сосуде 10 мг киРНК, содержащей функционализированную группой (C₆-SS-C₆) или (6-SS-6) смысловую цепь, растворяли в стерилизованной воде при концентрации, равной 50 мг/мл. Затем добавляли по 20 экв. 0,1 М раствора буфера Hepes, pH 8,5, и дитиотреитола (1 М раствор в стерилизованной воде). Реакции в смеси давали протекать в течение 1 ч, затем смесь очищали с помощью колонки Waters™ XBridge ВЕН С4 с использованием подвижной фазы А: 100 мМ ГФИП, 14 мМ и ТЭА, и подвижной фазы В: ацетонитрил, с использованием приведенных ниже условий, где выраженное в % количество В означает количество подвижной фазы В, остальное составляет подвижная фаза А.

| Время | В, % |
|-------|------|
| 0 | 3 |
| 8 | 70 |
| 10 | 90 |
| 11 | 90 |
| 11,1 | 3 |
| 13 | 3 |

Продукт один раз осаждали путем добавления 12 мл ацетонитрила и 0,4 мл 1×3ФФ и полученное твердое вещество центрифугировали и получали пеллету. Пеллету повторно растворяли в 0,4 мл 1×3ФФ и 12 мл ацетонитрила. Пеллету сушили в высоком вакууме в течение 1 ч.

Пеллету помещали в сосуд, содержащий смесь ДМСО/вода состава 70/30, при концентрации твердых веществ, равной 30 мг/мл. Затем добавляли содержащий алкин предшественник липида-модулятора РК/PD в количестве, равном 2 экв. в пересчете на количество киРНК. Затем добавляли 10 экв. ТЭА. Сосуд продували с помощью N₂ и реакционную смесь при перемешивании нагревали до 40°C. Реакции в смеси давали протекать в течение 1 ч. Продукт

очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ с использованием колонки, содержащей TSKgel-30 (выпускается фирмой Tosoh Biosciences), 1,5 см×10 см, и с использованием подвижной фазы А: 25 mM This, pH = 7,2, 1 mM ЭДТК, 50% ацетонитрила, и подвижной фазы В: 25 mM This, pH = 7,2, 1 mM ЭДТК, 500 mM NaBr, 50% ацетонитрила, с использованием приведенных ниже условий, где выраженное в % количество В означает количество подвижной фазы В, остальное составляет подвижная фаза А.

| Время | В, % |
|-------|------|
| 4 | 10 |
| 7 | 80 |
| 10,5 | 80 |
| 11 | 10 |
| 14 | 10 |

Фракции, содержащие продукт, собирали, и ацетонитрил удаляли с помощью роторного испарителя. Продукт обессоливали с помощью вращающейся колонки ЗК с использованием 2×10 мл ионообменников в стерилизованной воде. Затем продукт сушили путем лиофилизации и хранили до последующего использования.

Пример 7. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

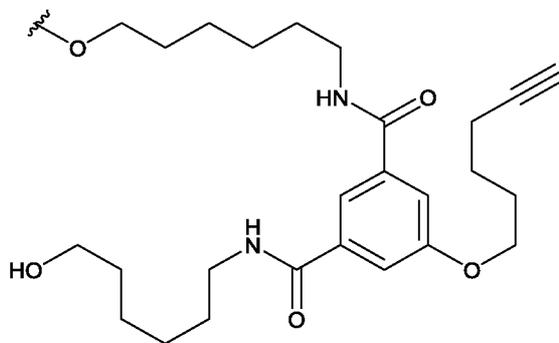
Направленно действующие на миостатин средства на основе РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с технологией с использованием фосфорамидита и твердой фазы по общим методикам, известным в данной области техники и обычно используемым для синтеза олигонуклеотидов, как это описано в примере 1, приведенном в настоящем изобретении. Средства на основе РНКи, использовавшиеся в этом и приведенных ниже примерах, обладали структурами, представленными в приведенной ниже Таблице 24.

Таблица 24. Дуплексы, использовавшиеся в приведенных ниже примерах

| Название дуплекса | Структура (5' ->3') | SEQ ID NO |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| AD06569 | АЦЦ: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc | 1 |
| | ЦЦ: (NH ₂ -C ₆)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)(C ₆ -SS-C ₆)dT | 2 |
| AD07724 | АЦЦ: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc | 3 |
| | ЦЦ: (NH ₂ -C ₆)s(invAb)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(invAb)uAlkdT | 4 |
| AD07909 | АЦЦ: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc | 5 |

| Название дуплекса | Структура (5'→3') | SEQ ID NO |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| | СЦ: (NH ₂ -C ₆)s(inv Ab)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(inv Ab)uAlk | 6 |
| AD07910 | АСЦ: cPrpusGfsusUfaCfagcaaGfaUfcAfuGfaCfsc | 7 |
| | СЦ: (NH ₂ -C ₆)s(inv Ab)sggucaugaUfCfUfugcuguaacaAlks(inv Ab) | 8 |
| AD08257 | АСЦ: cPrpusGfuUfacagcaaGfaUfcsAfsusGfsasCfsc | 9 |
| | СЦ: (NH ₂ -C ₆)s(inv Ab)sggucaugaUfCfUfugcuguaacas(inv Ab)(LA2) | 10 |

В приведенной выше Таблице 24 АСЦ обозначает антисмысловую цепь, СЦ обозначает смысловую цепь; а, с, г, I и u обозначают 2'-О-метиладенозин, -цитидин, -гуанозин, -инозин и -уридин соответственно; Af, Cf, Gf и Uf обозначают 2'-фтораденозин, -цитидин, -гуанозин и -уридин соответственно; s обозначает фосфоротиоатный мостик; (invAb) обозначает обращенный абазический дезоксирибозный остаток (см. таблицу 22); dT обозначает 2'-дезокситимидин-3'-фосфат; cPrp обозначает циклопропилфосфонат, см. таблицу 22; aAlk обозначает 2'-О-пропаргиладенозин-3'-фосфат, см. таблицу 22; cAlk обозначает 2'-О-пропаргилцитидин-3'-фосфат, см. таблицу 22; gAlk обозначает 2'-О-пропаргилгуанозин-3'-фосфат, см. таблицу 22; tAlk обозначает 2'-О-пропаргил-5-метилуридин-3'-фосфат, см. таблицу 22; uAlk обозначает 2'-О-пропаргилуридин-3'-фосфат, см. Таблицу 22; (C₆-SS-C₆) представлен в таблице 22; (NH₂-C₆)s представлен в таблице 22; и LA2 обладает следующей структурой:



где знак \sim обозначает положение присоединения к остальной части средства на основе РНКи.

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с

приведенными ниже группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

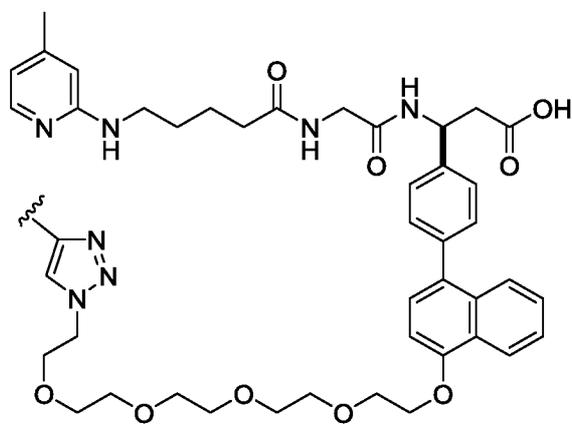
Таблица 25. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 7

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг AD06569-LP1 | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP1b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-nEm | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-LP1b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-LP33b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP28b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP56b | одна инъекция в день 1 |
| 10 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP89b | одна инъекция в день 1 |

5

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с малой молекулой - направленно действующим лигандом, соединением SM45b, или пептидом 1. После завершения реакции конъюгирования с пропаргильным мостиком, L4 (структура представлена в таблице 22), проводимой в соответствии с примером 5, лиганд, направленно действующий на $\alpha\upsilon\beta\delta$, соединение 45, обладало приведенной ниже структурой, оно обозначено в примерах, как SM45b:

10



15

где знак \sim обозначает положение присоединения к остальной части средства на основе РНКи. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом,

что оно содержало группу (C₆-SS-C₆) на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD.

Для групп 2 и 8-10 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, SM45, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи с использованием L4 в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для групп 4-7 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, пептид-1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2, 3 и 5-10 использовали липиды-модуляторы PK/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6. В случае группы 4, использующейся в качестве контрольной группы, проводили конъюгирование с N-этилмалеимидом (nEm).

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам (n = 4). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 26.

Таблица 26. Средние значения относительной экспрессии MSTN в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 7

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|----------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 0,795 | 0,126 | 0,893 | 0,108 | 0,940 | 0,058 |
| 2. AD06569-LP1b | 0,620 | 0,074 | 0,435 | 0,028 | 0,417 | 0,033 |
| 3. SM45b-(L4)-AD06569-LP1b | 0,296 | 0,040 | 0,170 | 0,023 | 0,173 | 0,020 |
| 4. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-nEm | 0,725 | 0,033 | 0,677 | 0,041 | 0,754 | 0,092 |
| 5. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP1b | 0,370 | 0,031 | 0,261 | 0,021 | 0,247 | 0,028 |
| 6. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | 0,435 | 0,101 | 0,304 | 0,075 | 0,326 | 0,043 |
| 7. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP33b | 0,456 | 0,042 | 0,271 | 0,021 | 0,296 | 0,031 |
| 8. SM45b-(L4)-AD06569-LP28b | 0,394 | 0,047 | 0,249 | 0,037 | 0,241 | 0,044 |

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|-----------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 9. SM45b-(L4)-AD06569-LP56b | 0,499 | 0,066 | 0,315 | 0,037 | 0,292 | 0,034 |
| 10. SM45b-(L4)-AD06569-LP89 | 0,310 | 0,034 | 0,218 | 0,056 | 0,173 | 0,025 |

5 Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 27 представлены результаты исследования.

Таблица 27. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 7

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,105 | 0,118 | 1,000 | 0,092 | 0,101 |
| 2. AD06569-LP1b | 0,171 | 0,067 | 0,110 | 0,175 | 0,041 | 0,053 |
| 3. SM45b-(L4)-AD06569-LP1b | 0,089 | 0,009 | 0,010 | 0,063 | 0,007 | 0,008 |
| 4. $\alpha\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-nEm | 0,462 | 0,041 | 0,046 | 0,446 | 0,063 | 0,073 |
| 5. $\alpha\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-LP1b | 0,118 | 0,020 | 0,023 | 0,099 | 0,017 | 0,021 |
| 6. $\alpha\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-LP29b | 0,174 | 0,034 | 0,042 | 0,126 | 0,045 | 0,070 |
| 7. $\alpha\beta\delta$ -пептид 1-AD06569-LP33b | 0,132 | 0,035 | 0,049 | 0,119 | 0,026 | 0,033 |
| 8. SM45b-(L4)-AD06569-LP28b | 0,110 | 0,022 | 0,028 | 0,088 | 0,014 | 0,016 |
| 9. SM45b-(L4)-AD06569-LP56b | 0,164 | 0,036 | 0,047 | 0,147 | 0,039 | 0,053 |
| 10. SM45b-(L4)-AD06569-LP89 | 0,101 | 0,021 | 0,027 | 0,096 | 0,012 | 0,014 |

10 Пример 8. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

15 В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 28. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 8

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP1 | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP90 | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP94 | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP93 | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP92 | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP91 | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP95 | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP5 | одна инъекция в день 1 |
| 10 | 2 мг/кг SM45b-(L4)-AD06569-LP87 | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу (NH₂-C₆)_s на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с малой молекулой - направленно действующим лигандом, соединением 45b. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом, что оно содержало группу (C₆-SS-C₆) на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD.

Для групп 2-10 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta6$, SM45, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи с использованием мостика 4 в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-10 использовали липиды-модуляторы PK/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам (n = 4). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с

помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже таблице 29.

Таблица 29. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 8

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,005 | 0,133 | 1,075 | 0,162 | 1,120 | 0,163 |
| 2. SM45b-(L4)-AD06569-LP1b | 0,238 | 0,029 | 0,160 | 0,025 | 0,149 | 0,022 |
| 3. SM45b-(L4)-AD06569-LP90b | 0,642 | 0,062 | 0,612 | 0,041 | 0,614 | 0,021 |
| 4. SM45b-(L4)-AD06569-LP94b | 0,479 | 0,057 | 0,300 | 0,021 | 0,331 | 0,033 |
| 5. SM45b-(L4)-AD06569-LP93b | 0,353 | 0,028 | 0,241 | 0,040 | 0,207 | 0,022 |
| 6. SM45b-(L4)-AD06569-LP92b | 0,385 | 0,021 | 0,279 | 0,044 | 0,242 | 0,009 |
| 7. SM45b-(L4)-AD06569-LP91b | 0,240 | 0,024 | 0,177 | 0,020 | 0,154 | 0,029 |
| 8. SM45b-(L4)-AD06569-LP95b | 0,467 | 0,022 | 0,347 | 0,046 | 0,315 | 0,097 |
| 9. SM45b-(L4)-AD06569-LP5b | 0,447 | 0,032 | 0,411 | 0,031 | 0,371 | 0,030 |
| 10. SM45b-(L4)-AD06569-LP87b | 0,445 | 0,064 | 0,399 | 0,077 | 0,376 | 0,061 |

Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже таблице 30 представлены результаты исследования.

Таблица 30. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 8.

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,237 | 0,311 | 1,000 | 0,070 | 0,075 |
| 2. SM45b-(L4)-AD06569-LP1b | 0,069 | 0,016 | 0,020 | 0,103 | 0,013 | 0,015 |
| 3. SM45b-(L4)-AD06569-LP90b | 0,490 | 0,035 | 0,037 | 0,477 | 0,041 | 0,045 |
| 4. SM45b-(L4)-AD06569-LP94b | 0,189 | 0,041 | 0,052 | 0,215 | 0,036 | 0,043 |
| 5. SM45b-(L4)-AD06569-LP93b | 0,097 | 0,013 | 0,016 | 0,142 | 0,006 | 0,006 |
| 6. SM45b-(L4)-AD06569-LP92b | 0,120 | 0,014 | 0,016 | 0,175 | 0,034 | 0,042 |
| 7. SM45b-(L4)-AD06569-LP91b | 0,072 | 0,015 | 0,020 | 0,100 | 0,019 | 0,024 |
| 8. SM45b-(L4)-AD06569- | 0,271 | 0,030 | 0,034 | 0,277 | 0,047 | 0,057 |

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| LP95b | | | | | | |
| 9. SM45b-(L4)-AD06569-LP5b | 0,191 | 0,028 | 0,032 | 0,249 | 0,025 | 0,028 |
| 10. SM45b-(L4)-AD06569-LP87b | 0,165 | 0,021 | 0,024 | 0,209 | 0,025 | 0,029 |

Пример 9. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 31. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 9

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP101b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP41b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP104b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP53b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP43b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP44b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP102b | одна инъекция в день 1 |
| 10 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP103b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом, что оно содержало группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце,

для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для групп 2-10 использовали лиганд интегрин $\alpha\beta6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-10 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам ($n = 4$). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 32.

Таблица 32. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 9

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|---------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 0,978 | 0,132 | 1,220 | 0,077 | 1,035 | 0,112 |
| 2. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,462 | 0,016 | 0,378 | 0,048 | 0,278 | 0,011 |
| 3. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP101b | 0,413 | 0,022 | 0,344 | 0,050 | 0,245 | 0,053 |
| 4. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP41b | 0,375 | 0,052 | 0,316 | 0,041 | 0,231 | 0,013 |
| 5. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP104b | 0,339 | 0,028 | 0,289 | 0,040 | 0,186 | 0,028 |
| 6. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP53b | 0,422 | 0,016 | 0,374 | 0,022 | 0,256 | 0,045 |
| 7. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP43b | 0,356 | 0,056 | 0,316 | 0,067 | 0,209 | 0,042 |
| 8. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP44b | 0,369 | 0,014 | 0,315 | 0,037 | 0,233 | 0,014 |
| 9. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP102b | 0,623 | 0,016 | 0,660 | 0,032 | 0,473 | 0,019 |
| 10. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP103b | 0,382 | 0,022 | 0,340 | 0,062 | 0,211 | 0,032 |

Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 33 представлены результаты исследования.

5 Таблица 33. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 9

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,140 | 0,162 | 1,000 | 0,082 | 0,089 |
| 2. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,306 | 0,093 | 0,134 | 0,215 | 0,059 | 0,082 |
| 3. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP101b | 0,288 | 0,043 | 0,050 | 0,130 | 0,020 | 0,023 |
| 4. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP41b | 0,238 | 0,042 | 0,051 | 0,140 | 0,037 | 0,051 |
| 5. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP104b | 0,187 | 0,034 | 0,042 | 0,126 | 0,017 | 0,019 |
| 6. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP53b | 0,249 | 0,042 | 0,051 | 0,123 | 0,028 | 0,036 |
| 7. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP43b | 0,196 | 0,040 | 0,051 | 0,111 | 0,036 | 0,054 |
| 8. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP44b | 0,238 | 0,037 | 0,044 | 0,144 | 0,009 | 0,010 |
| 9. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP102b | 0,526 | 0,076 | 0,089 | 0,326 | 0,024 | 0,026 |
| 10. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP103b | 0,239 | 0,050 | 0,064 | 0,133 | 0,012 | 0,013 |

Пример 10. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

10 В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, 15 приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 34. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 10

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | одна инъекция в день 1 |

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP54b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP93b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом, что оно содержало группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для групп 2 и 6-8 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2 и 6-7 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам ($n = 4$). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 35.

Таблица 35. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 10

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|----------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,017 | 0,062 | 0,950 | 0,062 | 1,064 | 0,086 |

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|--------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 2. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,432 | 0,061 | 0,280 | 0,036 | 0,303 | 0,029 |
| 6. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP54b | 0,468 | 0,053 | 0,274 | 0,034 | 0,266 | 0,011 |
| 7. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP93b | 0,550 | 0,256 | 0,388 | 0,217 | 0,352 | 0,060 |

5 Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 36 представлены результаты исследования.

Таблица 36. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 10

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|--------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,145 | 0,169 | 1,000 | 0,106 | 0,119 |
| 2. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,296 | 0,038 | 0,043 | 0,186 | 0,017 | 0,019 |
| 6. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP54b | 0,217 | 0,030 | 0,035 | 0,145 | 0,024 | 0,029 |
| 7. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP93b | 0,291 | 0,040 | 0,046 | 0,196 | 0,040 | 0,050 |

10 Пример 11. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

15 В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 37. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 11

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP42b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP61b | одна инъекция в день 1 |

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 5 | 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP48b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP49b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP47b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP45b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом, что оно содержало группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для групп 2-8 использовали лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-8 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам ($n = 4$). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 38.

Таблица 38. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 11

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|--------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 0,949 | 0,058 | 0,916 | 0,086 | 1,118 | 0,117 |
| 2. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,441 | 0,050 | 0,320 | 0,017 | 0,289 | 0,036 |
| 3. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP42b | 0,508 | 0,064 | 0,354 | 0,020 | 0,372 | 0,045 |
| 4. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP61b | 0,299 | 0,060 | 0,220 | 0,030 | 0,203 | 0,031 |
| 5. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP48b | 0,378 | 0,039 | 0,298 | 0,021 | 0,295 | 0,020 |
| 6. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP49b | 0,344 | 0,038 | 0,244 | 0,014 | 0,236 | 0,021 |
| 7. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP47b | 0,408 | 0,038 | 0,335 | 0,043 | 0,336 | 0,060 |
| 8. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP45b | 0,357 | 0,047 | 0,280 | 0,016 | 0,244 | 0,021 |

Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 39 представлены результаты исследования.

Таблица 39. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 11

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|--------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,093 | 0,103 | 1,000 | 0,200 | 0,250 |
| 2. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,194 | 0,017 | 0,019 | 0,150 | 0,015 | 0,016 |
| 3. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP42b | 0,216 | 0,016 | 0,018 | 0,189 | 0,022 | 0,024 |
| 4. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP61b | 0,115 | 0,019 | 0,023 | 0,104 | 0,023 | 0,029 |
| 5. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP48b | 0,166 | 0,024 | 0,028 | 0,125 | 0,008 | 0,009 |
| 6. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP49b | 0,111 | 0,013 | 0,014 | 0,107 | 0,009 | 0,010 |
| 7. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP47b | 0,171 | 0,028 | 0,033 | 0,148 | 0,023 | 0,027 |
| 8. $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP45b | 0,131 | 0,025 | 0,031 | 0,086 | 0,014 | 0,017 |

Пример 12. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 1,5 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем

изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 40. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 12

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -SM45-(L4)-AD06569-LP1b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP33b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP39b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP41b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP57b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP58b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP59b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP60b | одна инъекция в день 1 |
| 10 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP62b | одна инъекция в день 1 |
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -SM45-(L4)-AD06569-LP1b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 1,5 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP33b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализованную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом, что оно содержало группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для группы 2 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, соединение 45b, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи с использованием мостика 4 в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для групп 3-10 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-10 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше,

конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам (n = 4). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 41.

Таблица 41. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 12

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|--------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,177 | 0,088 | 1,174 | 0,178 | 1,023 | 0,065 |
| 2. мг/кг αβ6-SM45b-(L4)-AD06569-LP1b | 0,263 | 0,009 | 0,198 | 0,027 | 0,141 | 0,026 |
| 3. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP33b | 0,443 | 0,056 | 0,287 | 0,048 | 0,269 | 0,056 |
| 4. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP39b | 0,557 | 0,182 | 0,466 | 0,229 | 0,410 | 0,245 |
| 5. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP41b | 0,523 | 0,072 | 0,396 | 0,073 | 0,343 | 0,075 |
| 6. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP57b | 0,508 | 0,030 | 0,409 | 0,041 | 0,343 | 0,026 |
| 7. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP58b | 0,452 | 0,043 | 0,313 | 0,030 | 0,288 | 0,013 |
| 8. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP59b | 0,466 | 0,043 | 0,278 | 0,033 | 0,252 | 0,026 |
| 9. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP60b | 0,535 | 0,018 | 0,319 | 0,018 | 0,292 | 0,029 |
| 10. мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP62b | 0,435 | 0,052 | 0,346 | 0,045 | 0,258 | 0,042 |

Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 42 представлены результаты исследования.

Таблица 42. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 12

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,040 | 0,042 | 1,000 | 0,042 | 0,044 |
| 2. мг/кг αvβ6-SM45b-(L4)-AD06569-LP1b | 0,160 | 0,014 | 0,015 | 0,082 | 0,007 | 0,007 |
| 3. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP33b | 0,259 | 0,055 | 0,070 | 0,129 | 0,034 | 0,045 |
| 4. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP39b | 0,539 | 0,149 | 0,206 | 0,311 | 0,081 | 0,109 |
| 5. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP41b | 0,425 | 0,030 | 0,032 | 0,235 | 0,043 | 0,053 |
| 6. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP57b | 0,442 | 0,039 | 0,043 | 0,241 | 0,021 | 0,023 |
| 7. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP58b | 0,244 | 0,045 | 0,055 | 0,160 | 0,033 | 0,041 |
| 8. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP59b | 0,259 | 0,040 | 0,047 | 0,138 | 0,022 | 0,026 |
| 9. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP60b | 0,334 | 0,046 | 0,054 | 0,179 | 0,022 | 0,025 |
| 10. мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP62b | 0,297 | 0,050 | 0,060 | 0,193 | 0,050 | 0,068 |

Пример 13. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 43. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 13

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP41b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 2 мг/кг αvβ6-пептид 1-AD06569-LP106b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу (NH₂-C₆)_s на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с

направленно действующим лигандом. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом, что оно содержало группу (C₆-SS-C₆) на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

5 Для групп 2 и 4 использовали лиганд интегрина $\alpha\nu\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для групп 2 и 4 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

10 В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам (n = 4). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке 15 представлены в приведенной ниже Таблице 44.

20 Таблица 44. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 13

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,020 | 0,048 | 1,358 | 0,040 | 1,412 | 0,082 |
| 2. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP41b | 0,535 | 0,297 | 0,594 | 0,354 | 0,552 | 0,424 |
| 4. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP106b | 0,413 | 0,022 | 0,419 | 0,038 | 0,341 | 0,027 |

25 Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 45 представлены результаты исследования.

Таблица 45. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 13

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|-----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,180 | 0,219 | 1,000 | 0,109 | 0,123 |
| 2. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP41b | 0,260 | 0,123 | 0,233 | 0,188 | 0,107 | 0,250 |
| 4. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP106b | 0,203 | 0,020 | 0,022 | 0,122 | 0,015 | 0,017 |

5 Пример 14. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, 10 приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

15 Таблица 46. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 14

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD07724-LP107b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD07724-LP108b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD07724-LP109b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP110b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP111b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средства на основе РНКи - AD06569 и AD07724, содержащие нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином 20 реакционноспособную группу (NH₂-C₆)_s на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD06569 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу (C₆-SS-C₆) на 3'-

конец, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD. AD07724 синтезировали таким образом, что оно содержало содержащий концевой остаток uAlk (см. таблицу 22), для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD.

5 Для групп 2-9 использовали лиганд интегрина $\alpha\upsilon\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-9 использовали липиды-модуляторы PK/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в
10 соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам ($n = 4$). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из
15 правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке
20 представлены в приведенной ниже Таблице 47.

Таблица 47. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 14

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|-----------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,071 | 0,061 | 0,988 | 0,086 | 1,170 | 0,088 |
| 2. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,500 | 0,017 | 0,254 | 0,026 | 0,315 | 0,026 |
| 3. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD07724-LP107b | 0,804 | 0,026 | 0,595 | 0,061 | 0,753 | 0,008 |
| 4. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD07724-LP108b | 0,877 | 0,052 | 0,626 | 0,041 | 0,732 | 0,053 |
| 5. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD07724-LP109b | 0,859 | 0,100 | 0,610 | 0,059 | 0,709 | 0,079 |
| 8. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP110b | 0,476 | 0,045 | 0,306 | 0,023 | 0,317 | 0,040 |
| 9. $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP111b | 0,422 | 0,021 | 0,220 | 0,028 | 0,250 | 0,039 |

25 Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных

количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 48 представлены результаты исследования.

Таблица 48. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере

5 14

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,031 | 0,032 | 1,000 | 0,216 | 0,276 |
| 2. $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD06569-LP38b | 0,193 | 0,028 | 0,032 | 0,109 | 0,008 | 0,008 |
| 3. $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD07724-LP107b | 0,506 | 0,045 | 0,050 | 0,347 | 0,047 | 0,055 |
| 4. $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD07724-LP108b | 0,441 | 0,046 | 0,052 | 0,269 | 0,049 | 0,060 |
| 5. $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD07724-LP109b | 0,447 | 0,057 | 0,065 | 0,284 | 0,066 | 0,086 |
| 8. $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD06569-LP110b | 0,193 | 0,023 | 0,026 | 0,105 | 0,015 | 0,017 |
| 9. $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD06569-LP111b | 0,129 | 0,024 | 0,029 | 0,094 | 0,016 | 0,019 |

Пример 15. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

10 В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, 15 приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 49. Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 15

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD06569-LP38b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD07724-LP108b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD07909-LP108b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD07910-LP108b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD06569-LP143b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 6-AD06569-LP143b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta$ 6-пептид 1-AD06569-LP57b | одна инъекция в день 1 |

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 9 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 6-AD06569-LP130b | одна инъекция в день 1 |
| 10 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP124b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средства на основе РНКи - AD06569, AD07724, AD07909 и AD07910, содержащие нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD06569 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD. AD07724, AD07909 и AD07910 синтезировали таким образом, что они содержали концевой содержащий алкин нуклеотид (см. таблицу 22), для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD.

Для групп 2-6, 8 и 10 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для групп 7 и 9 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, пептид 6, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-10 использовали липиды-модуляторы PK/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам ($n = 4$). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей.

Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 50.

Таблица 50. Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 15

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|------------------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,087 | 0,059 | 1,011 | 0,075 | 1,036 | 0,095 |
| 2. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,453 | 0,020 | 0,317 | 0,030 | 0,272 | 0,018 |
| 3. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD07724-LP108b | 0,833 | 0,029 | 0,574 | 0,056 | 0,586 | 0,057 |
| 4. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD07909-LP108b | 0,792 | 0,108 | 0,587 | 0,062 | 0,543 | 0,077 |
| 5. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD07910-LP108b | 0,585 | 0,022 | 0,347 | 0,035 | 0,347 | 0,070 |
| 6. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP143b | 0,495 | 0,060 | 0,331 | 0,043 | 0,283 | 0,054 |
| 7. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 6-AD06569-LP143b | 0,406 | 0,003 | 0,286 | 0,024 | 0,255 | 0,048 |
| 8. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP57b | 0,437 | 0,064 | 0,265 | 0,037 | 0,241 | 0,022 |
| 9. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 6-AD06569-LP130b | 0,443 | 0,032 | 0,269 | 0,010 | 0,212 | 0,008 |
| 10. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP124b | 0,406 | 0,040 | 0,257 | 0,027 | 0,212 | 0,026 |

5

Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 51 представлены результаты исследования.

10

Таблица 51. Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 15

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,124 | 0,141 | 1,000 | 0,109 | 0,122 |
| 2. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP38b | 0,263 | 0,035 | 0,040 | 0,175 | 0,014 | 0,015 |
| 3. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD07724-LP108b | 0,435 | 0,021 | 0,022 | 0,317 | 0,023 | 0,025 |
| 4. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD07909-LP108b | 0,477 | 0,044 | 0,049 | 0,328 | 0,037 | 0,041 |
| 5. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD07910-LP108b | 0,229 | 0,029 | 0,033 | 0,130 | 0,037 | 0,051 |
| 6. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP143b | 0,228 | 0,045 | 0,056 | 0,170 | 0,032 | 0,039 |
| 7. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 6-AD06569-LP143b | 0,194 | 0,042 | 0,053 | 0,135 | 0,031 | 0,041 |
| 8. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP57b | 0,156 | 0,012 | 0,013 | 0,084 | 0,019 | 0,024 |
| 9. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 6-AD06569-LP130b | 0,183 | 0,046 | 0,061 | 0,112 | 0,035 | 0,052 |
| 10. $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -пептид 1-AD06569-LP124b | 0,166 | 0,031 | 0,039 | 0,100 | 0,019 | 0,023 |

Пример 16. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 1 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, указанными в таблице 52, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 52: Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 16

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP217b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP220b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP221b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP223b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP224b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP225b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 1 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD08257-LP226b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средства на основе РНКи - AD06569 и AD08257, содержащие нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN. AD0659 содержало функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)$ s на 5'-конце смысловой цепи для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD06569 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD. AD08257 содержало группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)$ s на 5'-конце смысловой цепи для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD08257 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу LA2 на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD.

Для групп 2-9 использовали лиганд интегрина $\alpha\nu\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-9 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам ($n = 4$). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 53.

Таблица 53: Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 16

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 0,902 | 0,078 | 0,989 | 0,071 | 0,969 | 0,100 |
| 2. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | 0,468 | 0,070 | 0,314 | 0,032 | 0,265 | 0,016 |
| 3. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP217b | 0,457 | 0,029 | 0,366 | 0,054 | 0,298 | 0,027 |
| 4. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP220b | 0,453 | 0,018 | 0,330 | 0,011 | 0,277 | 0,035 |
| 5. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP221b | 0,619 | 0,039 | 0,567 | 0,072 | 0,443 | 0,067 |
| 6. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP223b | 0,490 | 0,027 | 0,353 | 0,022 | 0,273 | 0,017 |
| 7. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP224b | 0,467 | 0,074 | - | - | 0,298 | 0,021 |
| 8. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP225b | 0,445 | 0,023 | - | - | 0,233 | 0,070 |
| 9. $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD08257-LP226b | 0,527 | 0,042 | 0,444 | 0,067 | 0,356 | 0,074 |

Ткани, извлеченные из трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 54 представлены результаты исследования.

Таблица 54: Относительная экспрессия в трехглавой мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 16

| Группа | Трехглавая мышца | | |
|--------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,047 | 0,050 |
| 2. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | 0,239 | 0,038 | 0,045 |
| 3. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP217b | 0,310 | 0,041 | 0,047 |
| 4. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP220b | 0,264 | 0,022 | 0,024 |
| 5. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP221b | 0,410 | 0,070 | 0,084 |
| 6. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP223b | 0,265 | 0,037 | 0,043 |
| 7. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP224b | 0,314 | 0,052 | 0,062 |
| 8. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP225b | 0,281 | 0,044 | 0,052 |
| 9. $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD08257-LP226b | 0,243 | 0,044 | 0,054 |

5 Пример 17. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель), 0,75 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, 10 приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в 5 которых вводили дозы, указанными в таблице 55, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24. 15

Таблица 55: Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 17

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP210b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP220b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP238b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP210b | одна инъекция в день 1 |

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 8 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP220b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 2 мг/кг $\alpha\upsilon\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP238b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу (NH₂-C₆)_s на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD06569 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу (C₆-SS-C₆) на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для групп 2-9 использовали лиганд интегрин $\alpha\upsilon\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-9 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам (n = 4). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 56.

Таблица 56: Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 17

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|----------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 0,966 | 0,094 | 0,903 | 0,033 | 1,065 | 0,089 |

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|-------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 2. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | 0,518 | 0,048 | 0,398 | 0,049 | 0,391 | 0,039 |
| 3. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP210b | 0,478 | 0,093 | 0,421 | 0,023 | 0,444 | 0,008 |
| 4. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP220b | 0,447 | 0,050 | 0,343 | 0,059 | 0,323 | 0,055 |
| 5. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP238b | 0,510 | 0,034 | 0,373 | 0,029 | 0,412 | 0,044 |
| 6. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | 0,479 | 0,028 | 0,329 | 0,031 | 0,310 | 0,023 |
| 7. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP210b | 0,444 | 0,026 | 0,305 | 0,049 | 0,295 | 0,033 |
| 8. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP220b | 0,453 | 0,055 | 0,296 | 0,023 | 0,285 | 0,028 |
| 9. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP238b | 0,410 | 0,073 | 0,304 | 0,027 | 0,290 | 0,021 |

5 Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 57 представлены результаты исследования.

Таблица 57: Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере 17

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,034 | 0,036 | 1,000 | 0,034 | 0,035 |
| 2. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | 0,350 | 0,091 | 0,122 | 0,251 | 0,070 | 0,096 |
| 3. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP210b | 0,278 | 0,049 | 0,059 | 0,199 | 0,027 | 0,031 |
| 4. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP220b | 0,211 | 0,023 | 0,026 | 0,155 | 0,017 | 0,019 |
| 5. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP238b | 0,304 | 0,024 | 0,027 | 0,214 | 0,015 | 0,017 |
| 6. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | 0,170 | 0,046 | 0,063 | 0,119 | 0,023 | 0,028 |
| 7. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP210b | 0,223 | 0,055 | 0,073 | 0,149 | 0,041 | 0,056 |
| 8. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP220b | 0,208 | 0,023 | 0,026 | 0,136 | 0,023 | 0,028 |
| 9. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP238b | 0,225 | 0,029 | 0,033 | 0,138 | 0,027 | 0,033 |

10 Пример 18. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля

растворитель), 0,75 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, или 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, указанными в Таблице 58, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

Таблица 58: Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 18

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD08257-LP240b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD08257-LP246b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 0,75 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP247b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 2 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD08257-LP240b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 2 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD08257-LP246b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 2 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-AD06569-LP247b | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средства на основе РНКи - AD06569 и AD08257, содержащие нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN. AD0659 содержало функционализированную амином реакционноспособную группу $(NH_2-C_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD06569 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу (C_6-SS-C_6) на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора PK/PD. AD08257 содержало группу $(NH_2-C_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD08257 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу LA2 на

3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для групп 2-9 использовали лиганд интегрина $\alpha\nu\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-9 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам ($n = 4$). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 59.

Таблица 59: Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 18.

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|-----------------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,112 | 0,078 | 1,193 | 0,044 | 1,204 | 0,084 |
| 2. 0,75 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | 0,642 | 0,078 | 0,440 | 0,039 | 0,408 | 0,042 |
| 3. 0,75 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD08257-LP240b | 0,662 | 0,121 | 0,488 | 0,028 | 0,444 | 0,070 |
| 4. 0,75 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD08257-LP246b | 0,614 | 0,082 | 0,479 | 0,078 | 0,418 | 0,051 |
| 5. 0,75 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP247b | 0,612 | 0,051 | 0,460 | 0,060 | 0,447 | 0,019 |
| 6. 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP29b | 0,449 | 0,033 | 0,332 | 0,034 | 0,285 | 0,012 |
| 7. 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD08257-LP240b | 0,482 | 0,061 | 0,398 | 0,037 | 0,355 | 0,050 |
| 8. 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD08257-LP246b | 0,558 | 0,038 | 0,427 | 0,041 | 0,382 | 0,019 |
| 9. 2 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP247b | 0,555 | 0,071 | 0,407 | 0,027 | 0,370 | 0,033 |

Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных

количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 60 представлены результаты исследования.

Таблица 60: Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной мышце в группах мышей, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере

5 18

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,102 | 0,114 | 1,000 | 0,118 | 0,134 |
| 2. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | 0,272 | 0,055 | 0,069 | 0,220 | 0,043 | 0,053 |
| 3. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD08257-LP240b | 0,358 | 0,055 | 0,065 | 0,256 | 0,041 | 0,049 |
| 4. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD08257-LP246b | 0,280 | 0,080 | 0,113 | 0,206 | 0,063 | 0,091 |
| 5. 0,75 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP247b | 0,271 | 0,032 | 0,037 | 0,189 | 0,023 | 0,027 |
| 6. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | 0,196 | 0,014 | 0,015 | 0,135 | 0,019 | 0,022 |
| 7. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD08257-LP240b | 0,210 | 0,033 | 0,040 | 0,135 | 0,034 | 0,046 |
| 8. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD08257-LP246b | 0,228 | 0,034 | 0,041 | 0,163 | 0,045 | 0,062 |
| 9. 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP247b | 0,183 | 0,024 | 0,028 | 0,138 | 0,035 | 0,047 |

Пример 19. Проводимое *in vivo* введение мышам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

10 В день 1 проведения исследования мышам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель, 2 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, 15 приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, или 2 мг/кг контрольного соединения, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

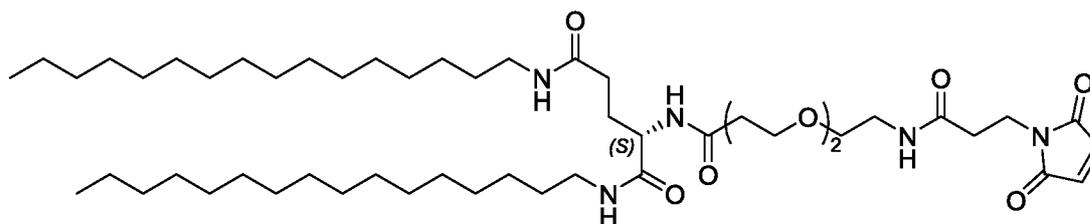
Таблица 61: Группы мышей, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 19

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 2 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-nEm | одна инъекция в день 1 |

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 4 | 2 мг/кг AD06569 | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-бис-С16 | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 2 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-AD06569-бис-ПЭГ ₄₇ | одна инъекция в день 1 |

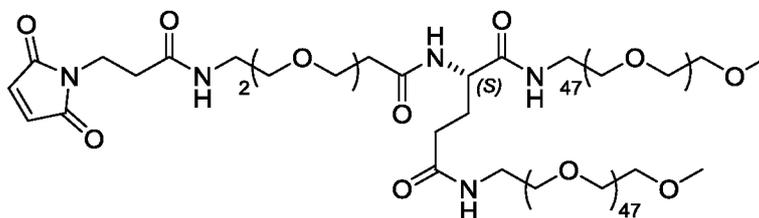
Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу (NH₂-C₆)_s на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с направленно действующим лигандом. AD06569 также синтезировали таким образом, что оно содержало группу (C₆-SS-C₆) на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для групп 2, 3, 5 и 6 использовали лиганд интегрин $\alpha\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для группы 2 использовали модулятор РК/PD, обладающий структурой, приведенной выше, конъюгированный с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6. Для группы 3 использовали кэпированный малеинимид, конъюгированный с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6. Для группы 4 использовали средство на основе РНКи с направленно действующим лигандом или модулятором РК/PD. Для группы 5 использовали модулятор РК/PD, содержащий бис-С₁₆, не содержащий фрагмент ПЭГ, расположенный рядом с липидом. Для группы 5 использовали средство на основе РНКи, 3'-конец смысловой цепи которого конъюгировали с содержащим малеинимид предшественником модулятора РК/PD, обладающего следующей структурой:



в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6. Для группы 6 использовали модулятор РК/PD, не содержащий липидный

фрагмент и содержащий фрагмент бис-ПЭГ₄₇. Для группы 6 использовали средство на основе РНКи, 3'-конец смысловой цепи которого конъюгировали с содержащим малеинимид предшественником модулятора РК/PD, обладающего следующей структурой:



5

в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) мышам (n = 4). У мышей отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения. Относительную экспрессию MSTN определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке мышей. Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке представлены в приведенной ниже Таблице 62.

10

Таблица 62: Средние значения относительной экспрессии в сыворотке мышей, использовавшихся в примере 19

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|------------------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,091 | 0,177 | 1,200 | 0,052 | 1,001 | 0,075 |
| 2. αvβ6-пептид 1-AD06569-LP29b | 0,492 | 0,073 | 0,353 | 0,055 | 0,289 | 0,026 |
| 3. αvβ6-пептид 1-AD06569-nEm | 0,857 | 0,182 | 0,634 | 0,123 | 0,587 | 0,087 |
| 4. AD06569 | 1,361 | 0,226 | 1,276 | 0,039 | 1,211 | 0,197 |
| 5. αvβ6-пептид 1-AD06569-бис-С16 | 0,634 | 0,060 | 0,470 | 0,091 | 0,379 | 0,072 |
| 6. αvβ6-пептид 1-AD06569-бис-ПЭГ ₄₇ | 0,752 | 0,059 | 0,585 | 0,094 | 0,516 | 0,082 |

15

Как показано в Таблице 62, использующейся в группе 2 фрагмент бис-ПЭГ, находящийся рядом с липидным фрагментом (т.е. LP 29b), обеспечивает улучшенное разрушение гена MSTN по сравнению с использующимся в группе 3 кэппированным малеинимидом, использующимся в группе 4 "контрольным" средством на основе РНКи, использующимся в группе 5 модулятором РК/PD, не содержащим группу ПЭГ, и использующимся в группе 6 модулятором РК/PD, не содержащим липид.

20

Пример 20. Проводимое *in vivo* введение макакам-крабоедам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

Направленно действующие на миостатин средства на основе РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с технологией с использованием фосфорамидита и твердой фазы по общим методикам, известным в данной области техники и обычно используемым для синтеза олигонуклеотидов, как это описано в примере 1, приведенном в настоящем изобретении. В дни 1, 7 и 28 проведения исследования приматам, макакам-крабоедам (*Macaca fascicularis*) (в настоящем изобретении называемые "крабоедами"), путем инъекции вводили 10 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы:

Таблица 63: Группы крабоедов, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 20

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 10 мг/кг $\alpha\beta 6$ -пептид 1-Mstn(AD06569)-LP29b | инъекции в дни 1, 7 и 28 |

В примере 20 синтезировали средство на основе РНКи, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с лигандом, направленно действующим на $\alpha\beta 6$, пептидом 1. Средство на основе РНКи дополнительно содержало дисульфидную функциональную группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце смысловой цепи для обеспечения конъюгирования с модулятором РК/PD, обладающим структурой LP29b, приведенной выше.

В каждой группе дозы вводили двум (2) крабоедам ($n = 2$). Образцы сыворотки отбирали в дни 28, 21, 14, 7 и в день 1 (до введения дозы). Затем обезьянам вводили соединения в соответствии с группами, в которых вводили дозы, указанными в таблице 22. Затем сыворотку отбирали в день 8, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57, день 64, день 71, день 78, день 85, день 99, день 113 и день 134. Для определения количества миостатина в сыворотке крабоедов проводили иммуноферментный анализ (ELISA) образцов

сыворотки. Средние значения количества миостатина в образцах сыворотки крабоедов группы 1 представлены в приведенной ниже Таблице 64.

Таблица 64: Средние значения количества белка-миостатина в сыворотке крабоедов группы 1, использовавшихся в примере 20, значения нормированы на значение, полученное в день 1

5

| День 28 | | День 21 | | День 14 | | День 7 | | День 1 | |
|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1,160 | 0,041 | 1,135 | 0,064 | 1,045 | 0,051 | 1,085 | 0,056 | 1,000 | 0,000 |
| День 8 | | День 15 | | День 22 | | День 29 | | День 36 | |
| Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 0,891 | 0,006 | 0,620 | 0,192 | 0,385 | 0,126 | 0,321 | 0,074 | 0,281 | 0,083 |
| День 43 | | День 50 | | День 57 | | День 64 | | День 71 | |
| Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 0,231 | 0,058 | 0,250 | 0,033 | 0,213 | 0,020 | 0,282 | 0,042 | 0,228 | 0,018 |
| День 78 | | День 85 | | День 99 | | День 113 | | День 134 | |
| Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 0,256 | 0,038 | 0,255 | 0,045 | 0,356 | 0,053 | 0,322 | 0,037 | 0,542 | 0,072 |

Как показано в Таблице 64, с использованием соединений, описанных в настоящем изобретении, можно обеспечить надежное и длительное разрушение целевых генов.

10 Пример 21. Проводимое *in vivo* введение макакам-крабоедам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

15 Направленно действующие на миостатин средства на основе РНКи, которые включали смысловую цепь и антисмысловую цепь, синтезировали в соответствии с технологией с использованием фосфорамидита и твердой фазы по общим методикам, известным в данной области техники и обычно
 20 использующимся для синтеза олигонуклеотидов, как это описано в примере 1, приведенном в настоящем изобретении. В день 1 проведения исследования приматам, макакам-крабоедам (*Macaca fascicularis*) (в настоящем изобретении называемые "крабоедами"), путем инъекции вводили 5 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного

в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы:

Таблица 65: Группы крабоедов, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 21

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | 5 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-Mstn(AD06569)-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 10 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-Mstn(AD06569)-LP29b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 20 мг/кг $\alpha\beta6$ -пептид 1-Mstn(AD06569)-LP29b | одна инъекция в день 1 |

5

В примере 20 синтезировали средство на основе РНКи, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу $(\text{NH}_2\text{-C}_6)_s$ на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с лигандом, направленно действующим на $\alpha\beta6$, пептидом 1. Направленно действующие на миостатин средства на основе РНКи дополнительно содержали дисульфидную функциональную группу $(\text{C}_6\text{-SS-C}_6)$ на 3'-конце смысловой цепи для обеспечения конъюгирования с модулятором РК/PD, обладающим структурой LP29b, приведенной выше.

10

В каждой группе дозы вводили двум (2) крабоедам ($n = 2$). Образцы сыворотки отбирали в дни 14, 7 и в день 1 (до введения дозы). Затем обезьянам вводили соединения в соответствии с группами, в которых вводили дозы, указанными в таблице 24. Затем сыворотку отбирали в день 8, день 15, день 22, день 29, день 36, день 43, день 50, день 57, день 64, день 71, день 92, день 106 и день 120. Для определения количества миостатина в сыворотке крабоедов проводили иммуноферментный анализ (ELISA) образцов сыворотки. Средние значения количества миостатина в образцах сыворотки крабоедов группы 1 представлены в приведенной ниже Таблице 66.

15

20

25

Таблица 66: Средние значения количества белка-миостатина в сыворотке крабоедов группы 1, использовавшихся в примере 20, значения нормированы на значение, полученное в день 1

| | День 14 | | День 7 | | День 1 | | День 8 | |
|--------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| Группа 1 (5 мг/кг) | 1,079 | 0,003 | 1,002 | 0,008 | 1,000 | 0,000 | 0,886 | 0,283 |

| | | | | | | | | |
|---------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Группа 2 (10 мг/кг) | 0,668 | 0,049 | 0,890 | 0,217 | 1,000 | 0,000 | 0,614 | 0,106 |
| Группа 3 (20 мг/кг) | 0,950 | 0,101 | 0,868 | 0,161 | 1,000 | 0,000 | 0,474 | 0,046 |
| | День 15 | | День 22 | | День 29 | | День 36 | |
| | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| Группа 1 (5 мг/кг) | 0,842 | 0,014 | 0,856 | 0,035 | 0,706 | 0,183 | 0,791 | 0,035 |
| Группа 2 (10 мг/кг) | 0,700 | 0,175 | 0,542 | 0,165 | 0,620 | 0,032 | 0,500 | 0,072 |
| Группа 3 (20 мг/кг) | 0,540 | 0,150 | 0,328 | 0,027 | 0,298 | 0,053 | 0,227 | 0,023 |
| | День 43 | | День 50 | | День 57 | | День 64 | |
| | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| Группа 1 (5 мг/кг) | 0,811 | 0,120 | 0,575 | 0,109 | 0,866 | 0,003 | 0,922 | 0,037 |
| Группа 2 (10 мг/кг) | 0,545 | 0,001 | 0,539 | 0,029 | 0,661 | 0,037 | 0,635 | 0,035 |
| Группа 3 (20 мг/кг) | 0,308 | 0,061 | 0,263 | 0,017 | 0,343 | 0,035 | 0,319 | 0,009 |
| | День 71 | | День 92 | | День 106 | | День 120 | |
| | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| Группа 1 (5 мг/кг) | 0,717 | 0,090 | 0,922 | 0,196 | 1,033 | 0,281 | 0,772 | 0,163 |
| Группа 2 (10 мг/кг) | 0,462 | 0,036 | 0,553 | 0,052 | 0,801 | 0,021 | 0,559 | 0,085 |
| Группа 3 (20 мг/кг) | 0,316 | 0,001 | 0,471 | 0,026 | 0,510 | 0,057 | 0,353 | 0,014 |

Как можно видеть из приведенных в Таблице 66 результатов, при увеличении дозы соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, наблюдается зависимый от дозы ответ.

5 Пример 22. Проводимое *in vivo* введение крысам триггеров на основе РНКи, направленно действующих на MSTN

10 В день 1 проведения исследования крысам путем инъекции вводили изотонический физиологический раствор (использующийся в качестве контроля растворитель) или 1 мг/кг (мг/кг) соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего средство на основе РНКи, описанное в настоящем изобретении, приготовленного в изотоническом физиологическом растворе, в соответствии с группами, в которых вводили дозы, где AD06569 обладает структурой, представленной в приведенной выше Таблице 24.

15 Таблица 67. Группы крыс, в которых вводили дозы, использовавшиеся в примере 22

| Группа | Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, содержащее средство на основе РНКи, и доза | Режим введения доз |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 | физиологический раствор | одна инъекция в день 1 |
| 2 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP238b | одна инъекция в день 1 |
| 3 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP357b | одна инъекция в день 1 |
| 4 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP358b | одна инъекция в день 1 |
| 5 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP241b | одна инъекция в день 1 |
| 6 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP339b | одна инъекция в день 1 |
| 7 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP340b | одна инъекция в день 1 |
| 8 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-LP247b | одна инъекция в день 1 |
| 9 | 1 мг/кг $\alpha\nu\beta 6$ -пептид 1-AD06569-nEm | одна инъекция в день 1 |

Синтезировали средство на основе РНКи - AD06569, содержащее нуклеотидную последовательность, направленно действующую на ген MSTN, и содержащее функционализированную амином реакционноспособную группу (NH₂-C₆)_s на 5'-конце смысловой цепи, для обеспечения конъюгирования с малой молекулой - направленно действующим лигандом, соединением 45b. Средство на основе РНКи также синтезировали таким образом, что оно содержало группу (C₆-SS-C₆) на 3'-конце, для обеспечения конъюгирования с предшественником липида-модулятора РК/PD.

Для групп 2-9 использовали лиганд интегрин $\alpha\nu\beta 6$, пептид 1, конъюгированный с 5'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 5. Для каждой из групп 2-8 использовали липиды-модуляторы РК/PD, обладающие структурами, приведенными выше, конъюгированные с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6. Для группы 3 использовали кэпированный малеинимид, конъюгированный с 3'-концом смысловой цепи в соответствии с методиками, описанными в приведенном выше примере 6.

В каждой группе дозы вводили четырем (4) крысам (n = 4). У крыс отбирали кровь и сыворотку собирали в дни 1, 8, 15 и 22. Мышей умерщвляли в день 22 проведения исследования и из икроножной мышцы и трехглавой мышцы выделяли все количество мРНК миостатина. Трехглавую мышцу извлекали из правой передней конечности. Каждый образец подвергали быстрой заморозке в пробирках Precellys и хранили в морозильнике при -80°C до завершения проведения исследований. Относительную экспрессию MSTN определяли с

помощью иммуноферментного анализа (ELISA) миостатина в сыворотке крыс.

Средние значения относительной экспрессии миостатина в сыворотке

представлены в приведенной ниже Таблице 68.

Таблица 68: Средние значения относительной экспрессии MSTN в

5 сыворотке крыс, использовавшихся в примере 22

| Группа | День 8 | | День 15 | | День 22 | |
|----------------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение | Среднее значение | Стандартное отклонение |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,068 | 1,000 | 0,038 | 1,000 | 0,087 |
| 2. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP238b | 0,804 | 0,012 | 0,679 | 0,129 | 0,785 | 0,017 |
| 3. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP357b | 0,665 | 0,061 | 0,718 | 0,024 | 0,814 | 0,031 |
| 4. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP358b | 0,683 | 0,063 | 0,747 | 0,143 | 0,792 | 0,104 |
| 5. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP241b | 0,723 | 0,052 | 0,826 | 0,066 | 0,862 | 0,086 |
| 6. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP339b | 0,749 | 0,044 | 0,898 | 0,082 | 0,889 | 0,054 |
| 7. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP340b | 0,764 | 0,184 | 0,726 | 0,129 | 0,729 | 0,155 |
| 8. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP247b | 0,803 | 0,082 | 0,709 | 0,091 | 0,691 | 0,050 |
| 9. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-nEm | 0,825 | 0,086 | 0,778 | 0,124 | 0,836 | 0,110 |

Ткани, извлеченные из икроножной мышцы и трехглавой мышцы, использовали в исследовании TaqMan для определения относительных количеств MSTN в этих тканях. В приведенной ниже Таблице 69 представлены результаты исследования.

10

Таблица 69: Относительная экспрессия в трехглавой мышце и икроножной

мышце в группах крыс, в которых вводили дозы, использовавшихся в примере

22

| Группа | Трехглавая мышца | | | Икроножная мышца | | |
|----------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность | Относительная экспрессия | Низкая погрешность | Высокая погрешность |
| 1. Физиологический раствор | 1,000 | 0,884 | 7,639 | 1,000 | 0,109 | 0,123 |
| 2. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP238b | 2,650 | 1,962 | 7,558 | 0,709 | 0,073 | 0,081 |
| 3. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP357b | 1,055 | 0,826 | 3,809 | 0,768 | 0,164 | 0,208 |
| 4. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP358b | 1,603 | 1,249 | 5,654 | 0,740 | 0,140 | 0,173 |
| 5. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP241b | 3,585 | 2,698 | 10,907 | 0,927 | 0,107 | 0,121 |
| 6. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP339b | 7,246 | 1,597 | 2,049 | 0,710 | 0,134 | 0,165 |
| 7. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP340b | 7,104 | 1,987 | 2,759 | 0,708 | 0,124 | 0,150 |
| 8. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-LP247b | 5,038 | 0,471 | 0,520 | 0,719 | 0,103 | 0,121 |
| 9. 1 мг/кг αβ6-пептид 1-AD06569-nEm | 5,698 | 1,786 | 2,602 | 0,676 | 0,141 | 0,178 |

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ

В формуле изобретения термины в единственном числе и термины во множественном числе могут означать один или более, чем один, если не указано иное или, если это иным образом не очевидно из контекста. Пункты формулы изобретения или описания, в которых между двумя или большим количеством элементов группы используют слово "или" считаются приемлемыми, если один, более, чем один, или все элементы группы содержатся, используются в заданном продукте или способе, или другим образом относятся к нему, если не указано иное или, если это иным образом не очевидно из контекста. В объем настоящего изобретения входят варианты осуществления, в которых только один элемент группы содержится, используется в заданном продукте или способе, или другим образом относится к нему. В объем настоящего изобретения входят варианты осуществления, в которых более, чем один, или все элементы группы содержатся, используются в заданном продукте или способе, или другим образом относятся к нему.

Кроме того, в объем настоящего изобретения входят все модификации, комбинации и преобразования, в которых одно или большее количество ограничений, элементов, условий или описательных терминов, перечисленных в одном или большем количестве перечисленных пунктов формулы изобретения, включены в другой пункт формулы изобретения. Так, например, любой пункт формулы изобретения, который является независимым от другого пункта формулы изобретения, можно модифицировать для включения одного или большего количества ограничений, указанных в любом другом пункте формулы изобретения, который является независимым от такого же основного пункта формулы изобретения. Если элементы представлены в виде перечней, например, в формате структур Маркуша, то также раскрыта каждая подгруппа элементов и любой элемент (элементы) можно удалить из группы. Следует понимать, что в целом, если указано, что настоящее изобретение или объекты настоящего изобретения включают конкретные элементы и/или характеристики, то некоторые варианты осуществления настоящего изобретения или объекты настоящего изобретения состоят или в основном состоят из таких элементов и/или характеристик. Для простоты такие варианты осуществления специально не описаны в настоящем изобретении. Следует также отметить, что термины

"включающий" и "содержащий" являются открытыми и позволяют включение дополнительных элементов или стадий. Если указаны диапазоны значений, то включены предельные значения. Кроме того, если не указано иное, или, если это иным образом не очевидно из контекста или понятно специалисту с общей подготовкой в данной области техники, значения, которые указанные в виде диапазонов, включают любое конкретное значение или поддиапазон, входящий в диапазоны, указанные в других вариантах осуществления настоящего изобретения, до 1/10 единицы измерения нижнего предельного значения диапазона, если из контекста явно не следует иное.

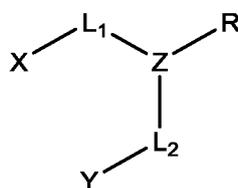
10 В настоящей заявке цитированы различные выданные патенты, опубликованные заявки на патенты, опубликованные в журналах статьи и другие публикации, все они включены в настоящее изобретение в качестве ссылки. В случае несоответствия между любой из включенных публикаций и настоящим описанием, определяющим является настоящее описание. Кроме того, любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения, который входит в 15 объем предшествующего уровня техники, может быть явно исключен из любого одного или большего количества пунктов формулы изобретения. Поскольку предполагается, что такие варианты осуществления известны специалисту с общей подготовкой в данной области техники, они могут быть исключены, даже 20 если исключение явно не указано в настоящем изобретении. Любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения может быть исключен из любого пункта формулы изобретения по любым причинам, независимо от того, связан ли он с наличием предшествующего уровня техники.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

25 Следует понимать, что, хотя настоящее изобретение представлено с помощью подробного описания, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие характеристики, преимущества и модификации входят в объем приведенной 30 ниже формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



5

(I)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

R обозначает $-L_A-R_Z$;

L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с Z;

R_Z включает средство на основе олигонуклеотида;

10

Z обозначает CH, фенил или N;

L_1 и L_2 каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и

X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

15

2. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, в котором L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ.

20

3. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, в котором L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

25

4. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-3, в котором L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ.

30

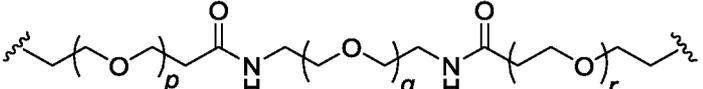
5. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-3, в котором L_1 и L_2 каждый независимо содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

6. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, в котором один из L_1 и L_2 содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ, а другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

5

7. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, в котором каждый L_1 и L_2 независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|-----------|-----------|
| Мостик 1 | |
| Мостик 2 | |
| Мостик 3 | |
| Мостик 4 | |
| Мостик 5 | |
| Мостик 6 | |
| Мостик 7 | |
| Мостик 8 | |
| Мостик 9 | |
| Мостик 10 | |
| Мостик 11 | |

| Название | Структура |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Мостик 12 |  |

где каждый p независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30;

каждый q независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30;

каждый r независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или Z; при условии, что

(i) в Мостике 1, 6 и 11: $p + q + r \geq 5$;

(ii) в Мостике 2, 3, 7, 8, 9 и 10: $p + q \geq 5$; и

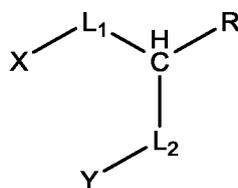
(iii) в Мостике 4 и 5: $p \geq 5$.

8. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 7, в котором каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и

каждый r независимо равен 2, 3, 4, 5 или 6.

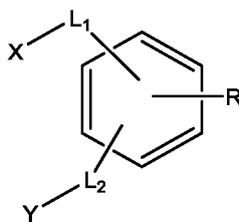
9. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где соединением формулы (I) является соединение формулы (Ia):



(Ia)

или его фармацевтически приемлемая соль.

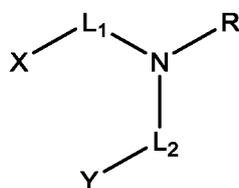
10. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где соединением формулы (I) является соединение формулы (Ib):



(Ib)

или его фармацевтически приемлемая соль.

- 5 11. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где соединением формулы (I) является соединение формулы (Ic):



(Ic)

или его фармацевтически приемлемая соль.

10

12. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-11, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает ненасыщенный липид.

- 15 13. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-12, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает насыщенный липид.

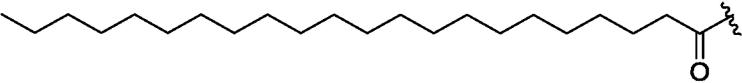
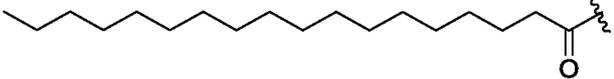
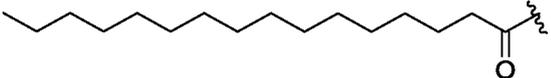
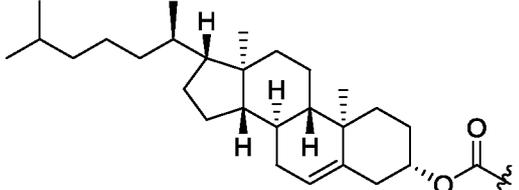
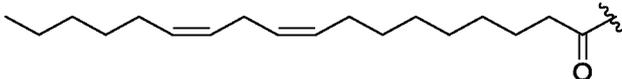
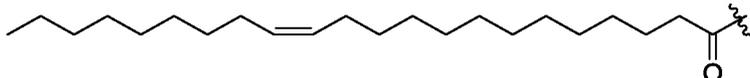
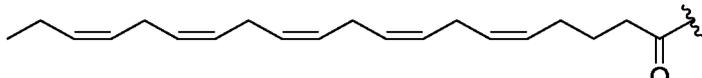
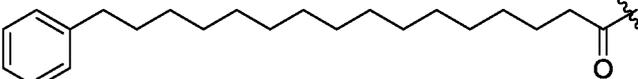
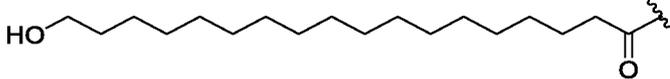
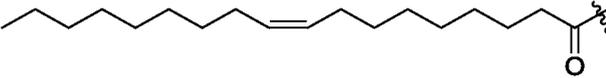
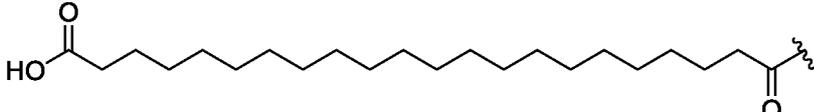
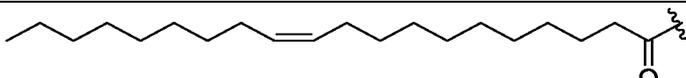
- 20 14. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-13, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает разветвленный липид.

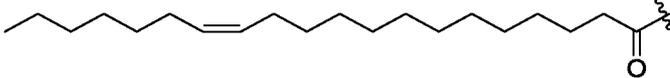
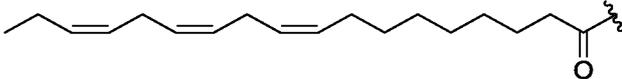
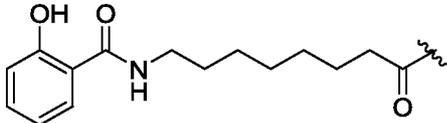
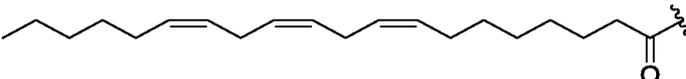
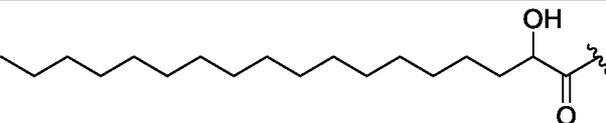
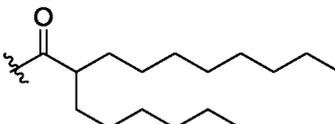
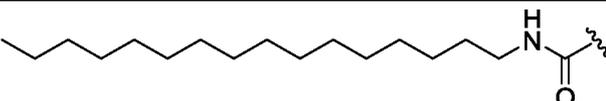
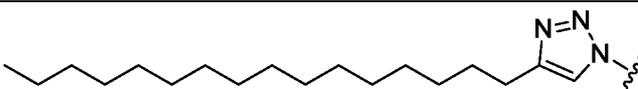
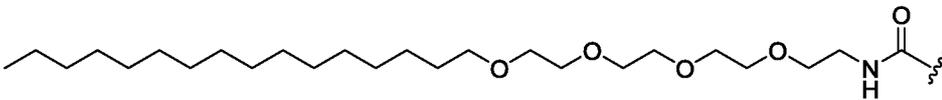
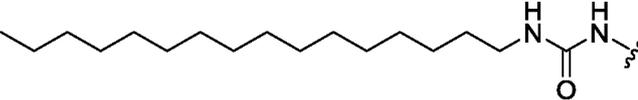
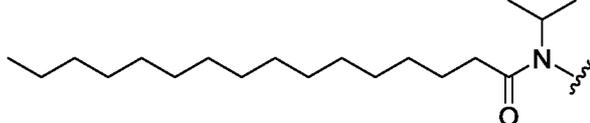
- 25 15. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-14, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид с линейной цепью.

16. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-15, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода.

5 17. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-16, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает холестерил.

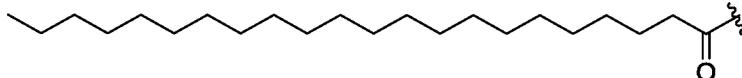
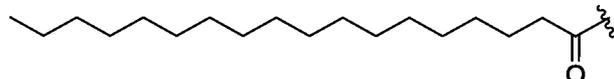
18. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-11, в котором по меньшей мере один из X или Y выбран из группы, состоящей из:

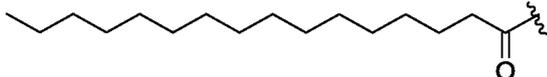
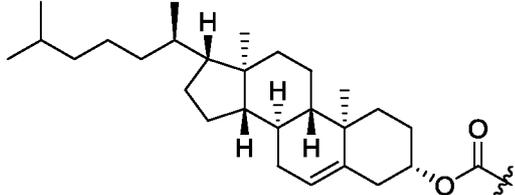
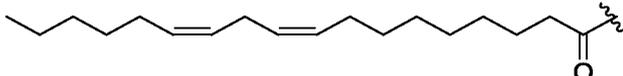
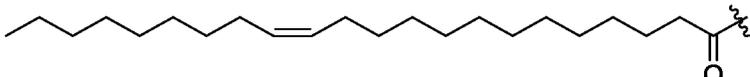
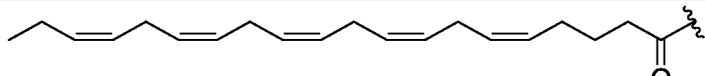
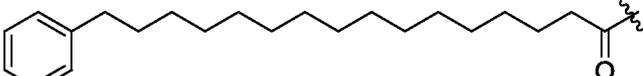
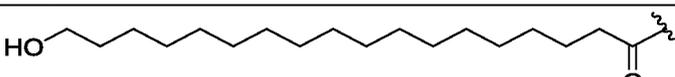
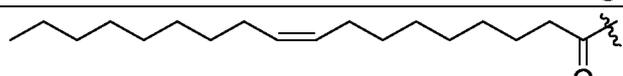
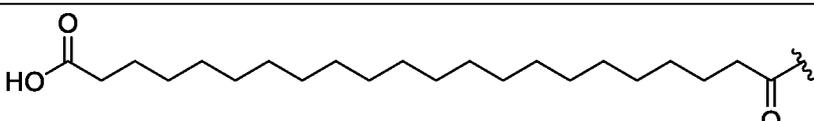
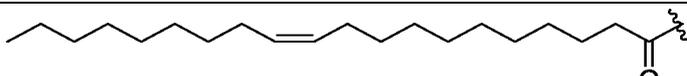
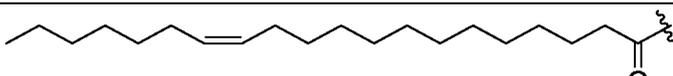
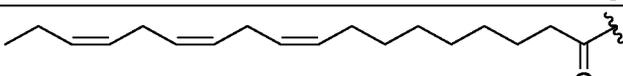
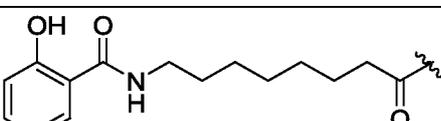
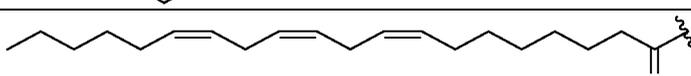
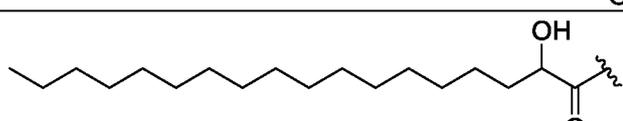
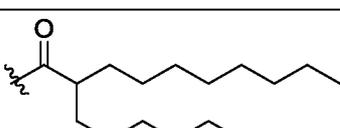
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |

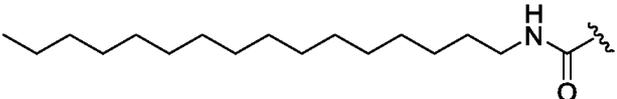
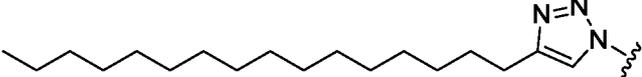
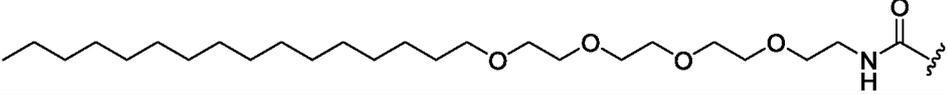
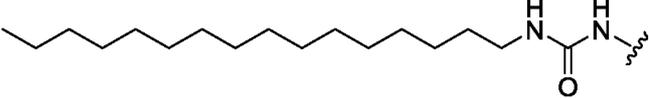
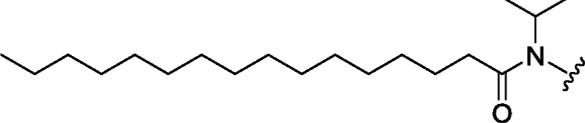
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁ или L₂.

19. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-11, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

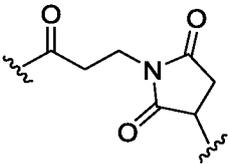
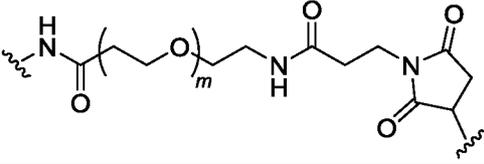
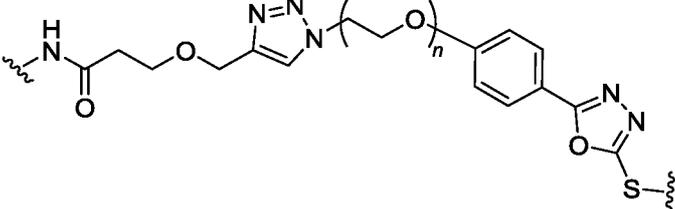
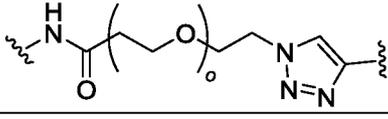
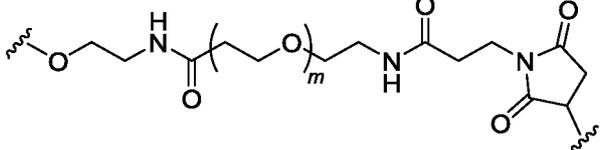
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |

| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |

| Название | Структура |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁ или L₂.

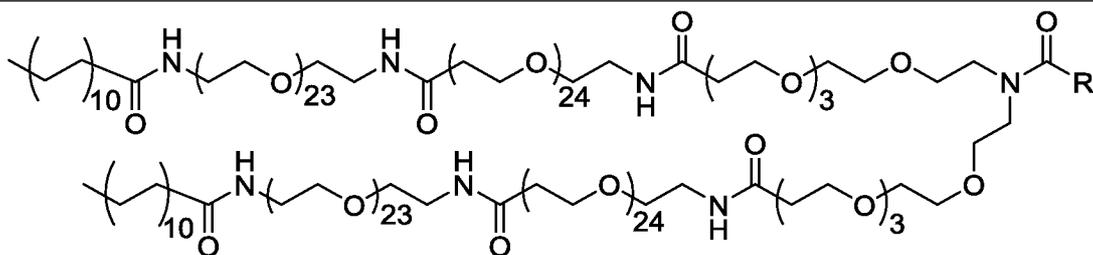
20. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, в котором L_A выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1 |  |
| Линкер 2 |  |
| Линкер 3 |  |
| Линкер 4 |  |
| Линкер 5 |  |

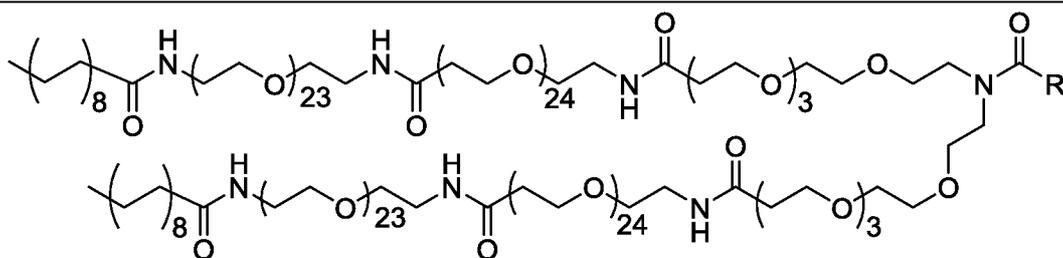
| Название | Структура |
|-----------|-----------|
| Линкер 6 | |
| Линкер 7 | |
| Линкер 8 | |
| Линкер 9 | |
| Линкер 10 | |
| Линкер 11 | |
| Линкер 12 | |
| Линкер 13 | |
| Линкер 14 | |

где каждый m , n , o и a независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и каждый знак обозначает положение присоединения к Z или R_Z .

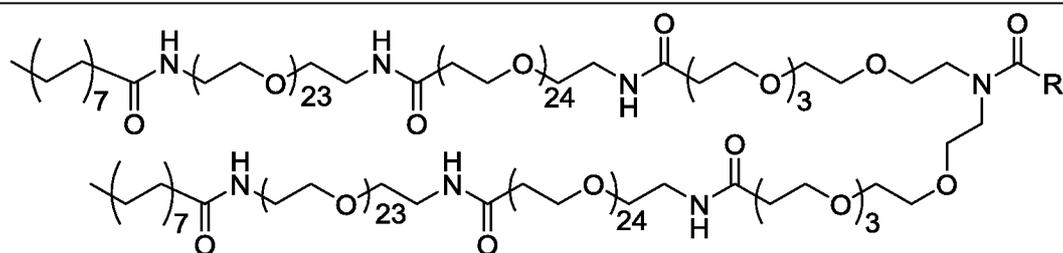
LP 1a



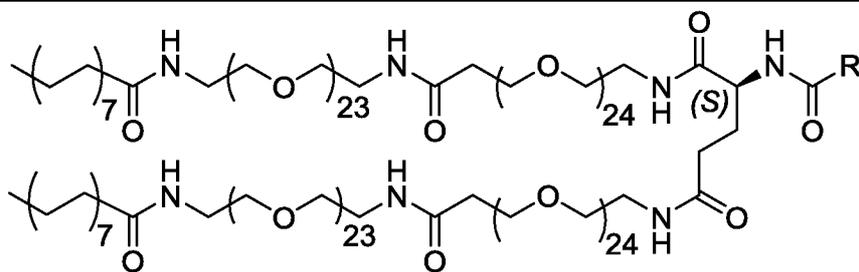
LP 28a



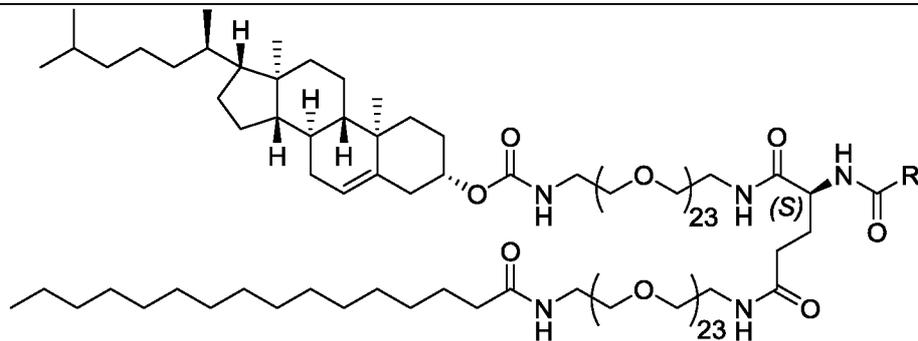
LP 29a



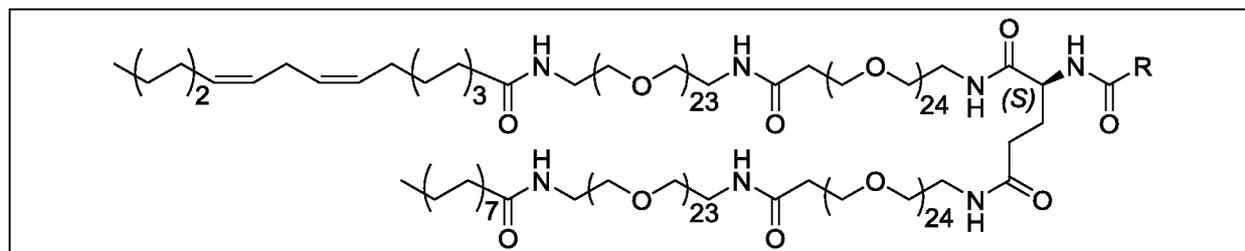
LP 38a



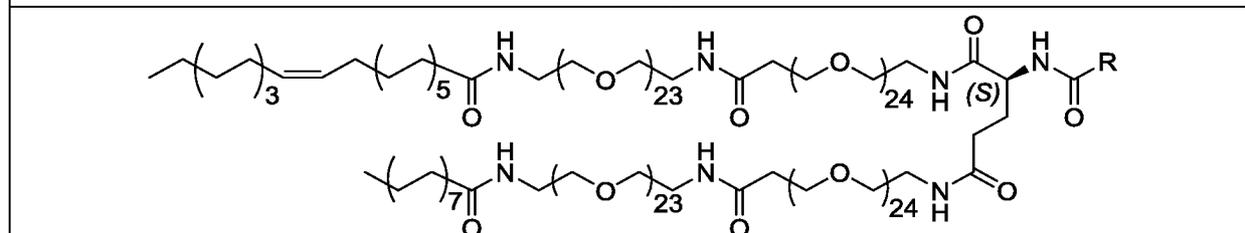
LP 39a



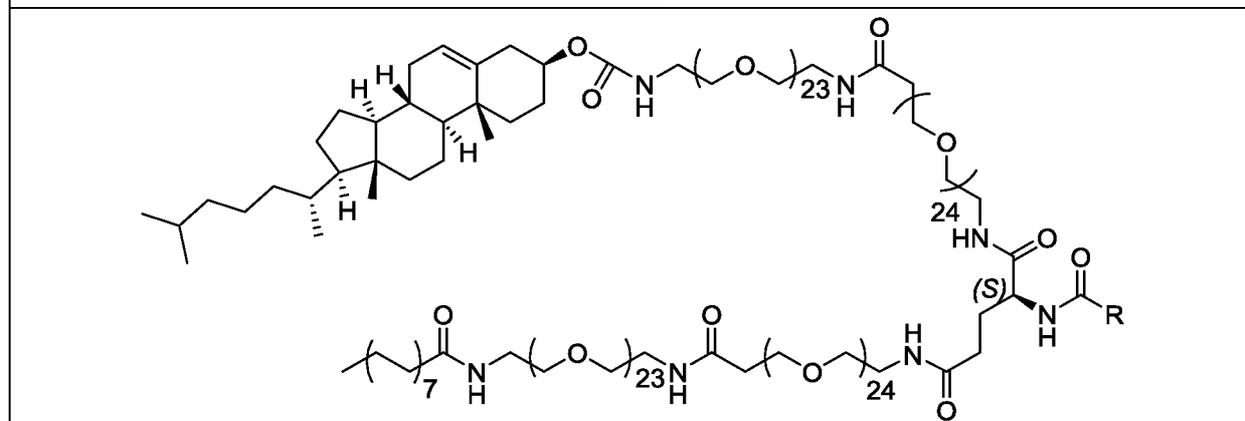
LP 43a



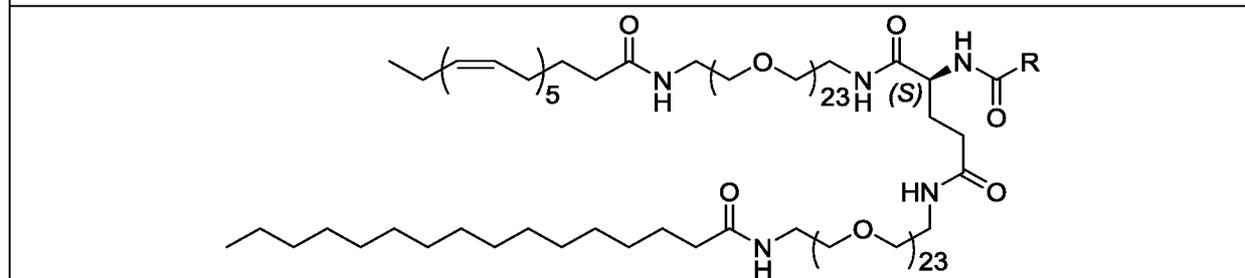
LP 44a



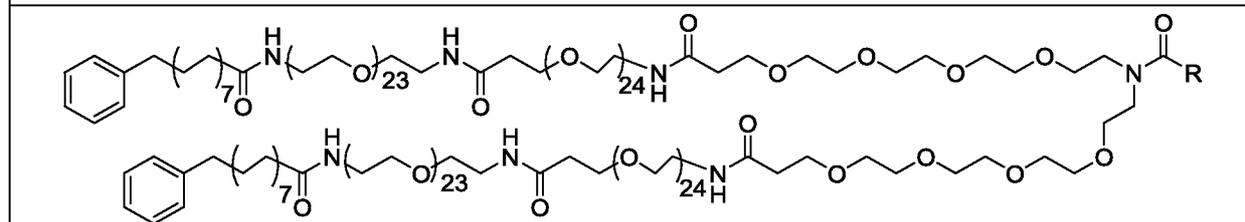
LP 45a



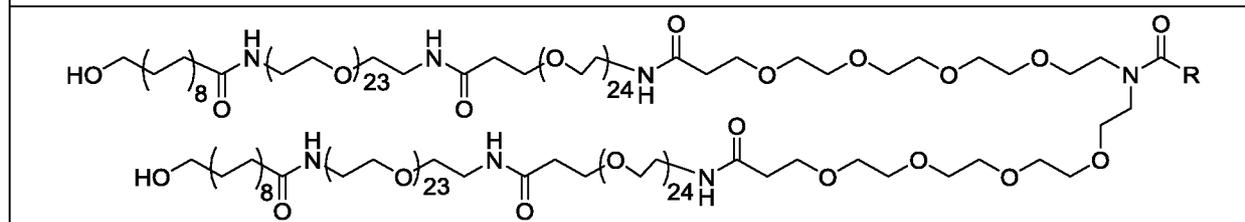
LP 47a



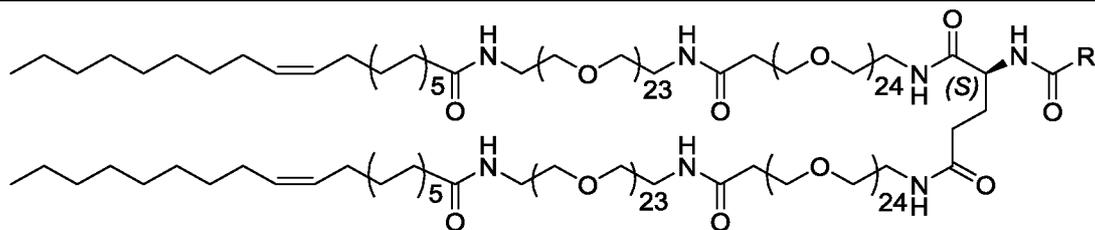
LP 48a



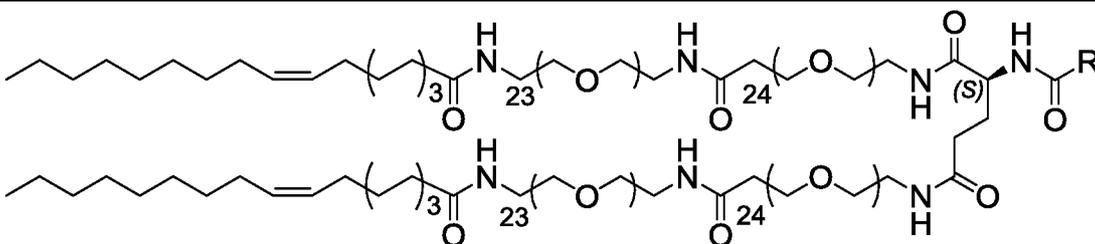
LP 49a



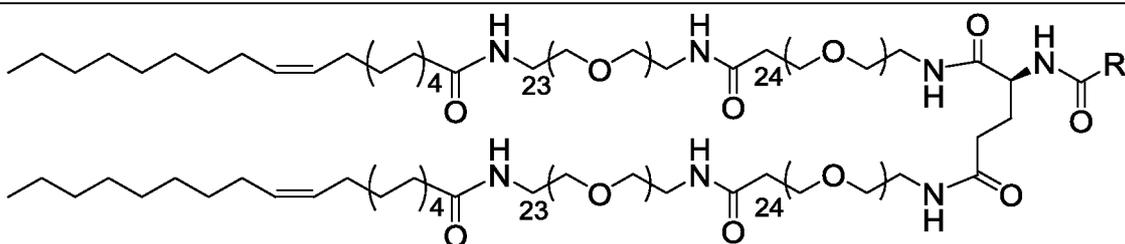
LP 53a



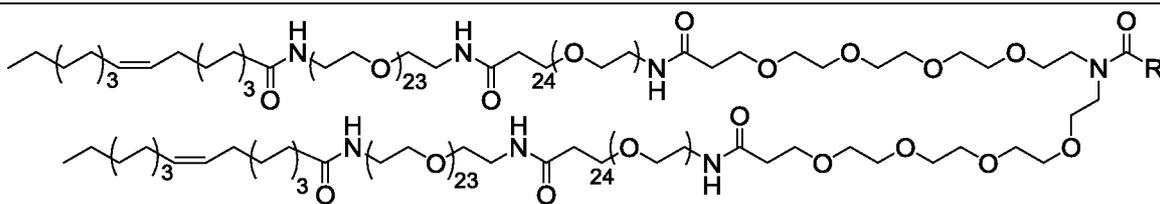
LP 54a



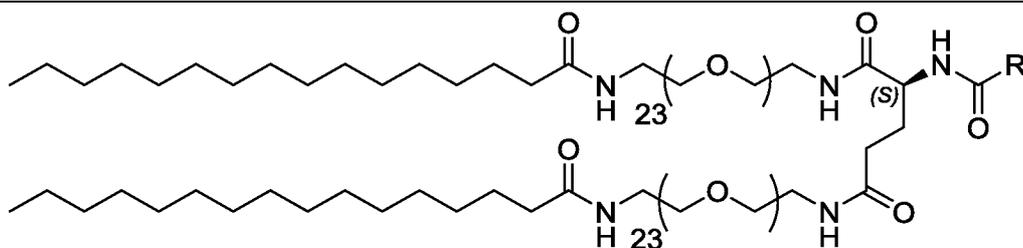
LP 55a



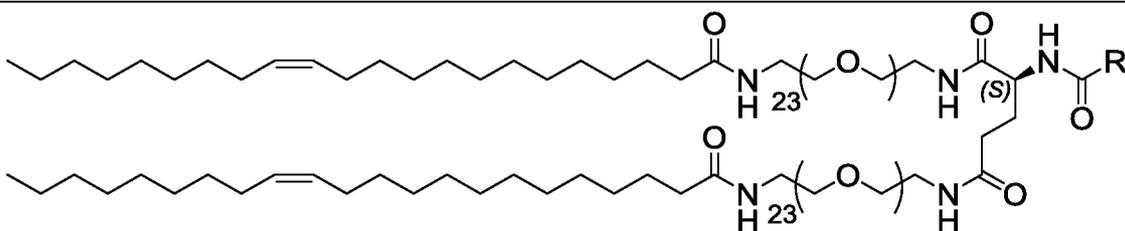
LP 56a



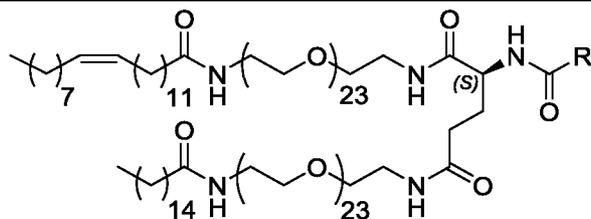
LP 57a



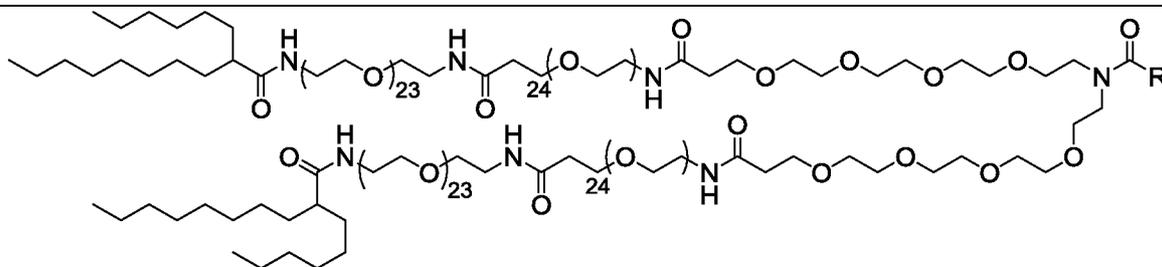
LP 58a



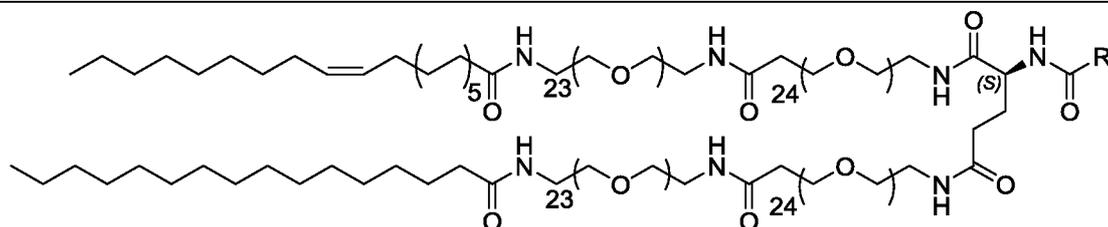
LP 59a



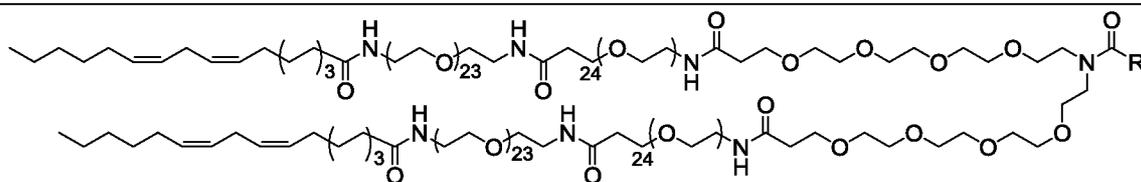
LP 61a



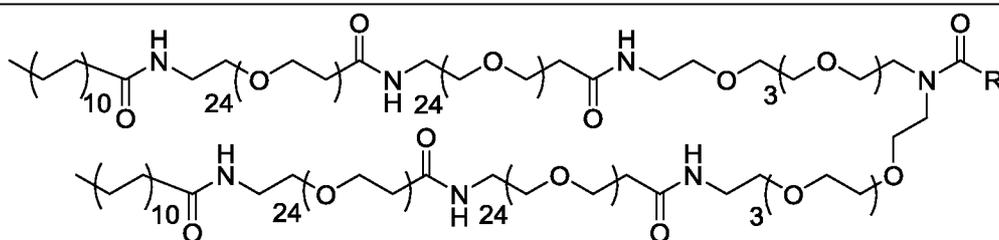
LP 62a



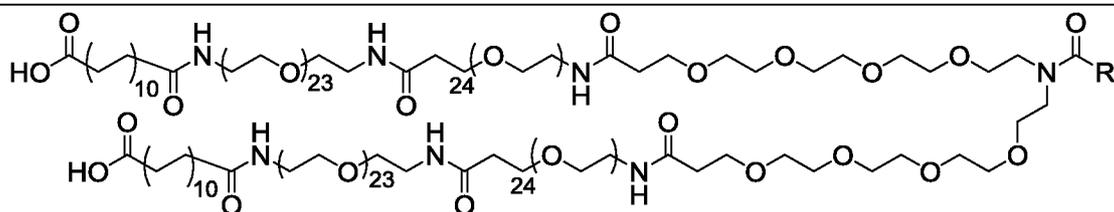
LP 87a



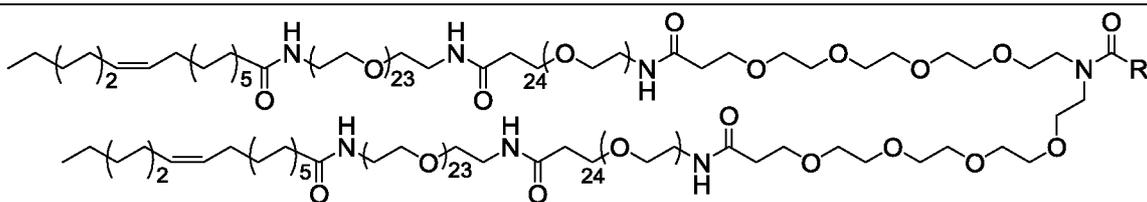
LP 89a



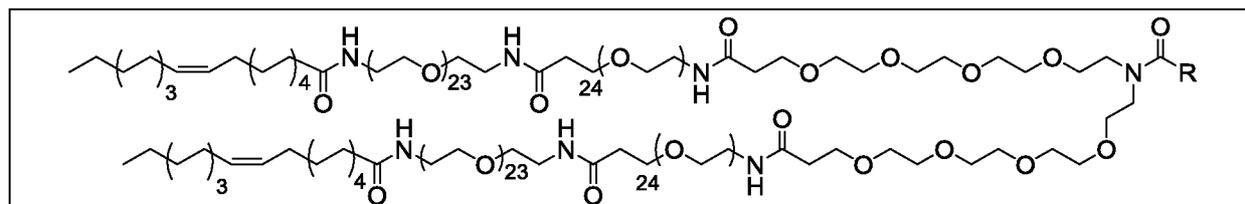
LP 90a



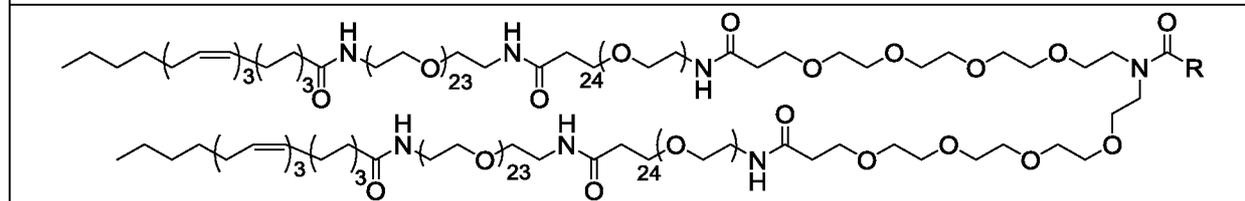
LP 92a



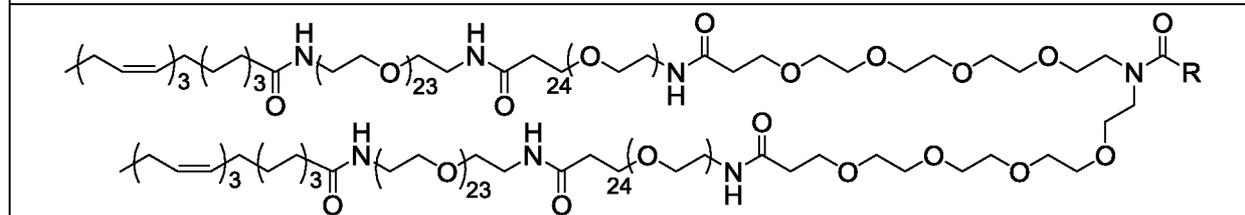
LP 93a



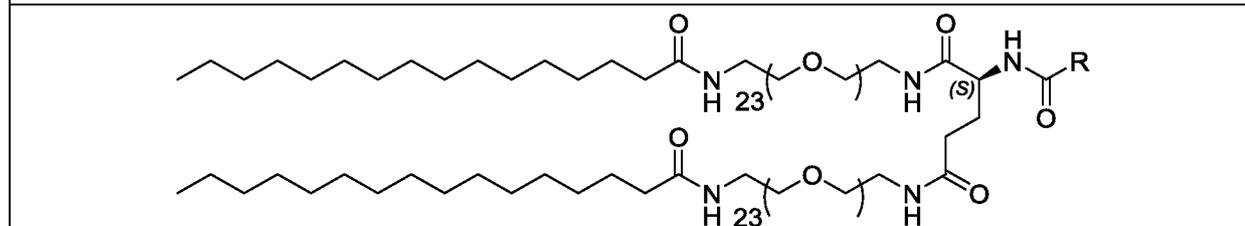
LP 94a



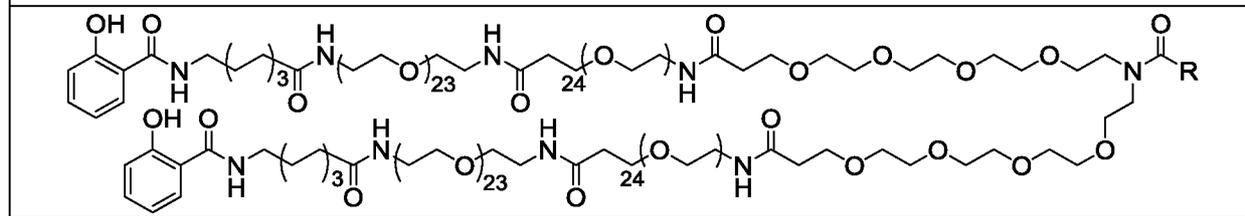
LP 95a



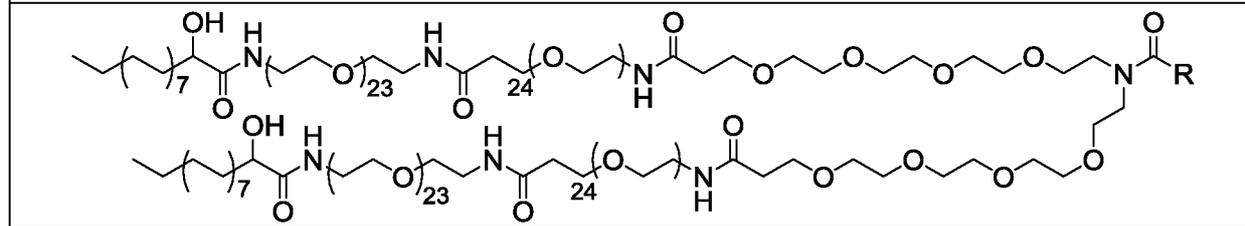
LP 101a



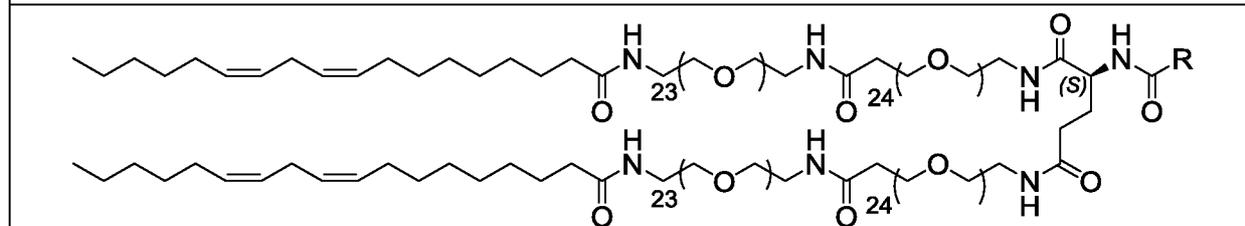
LP 102a



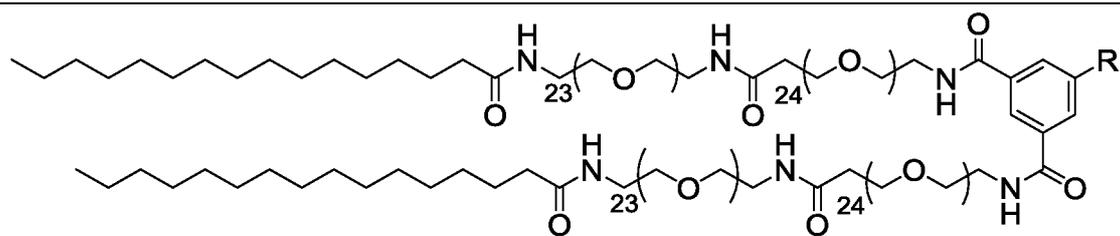
LP 103a



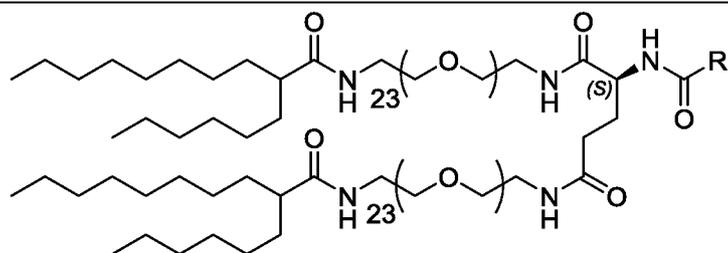
LP 104a



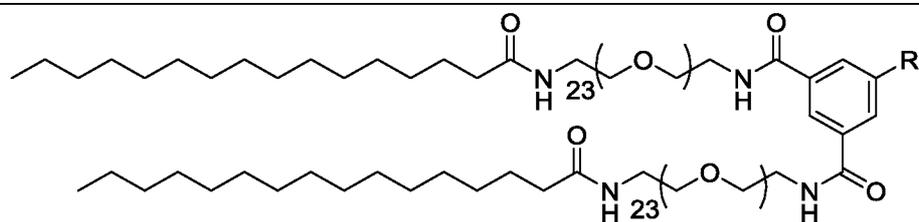
LP 110a



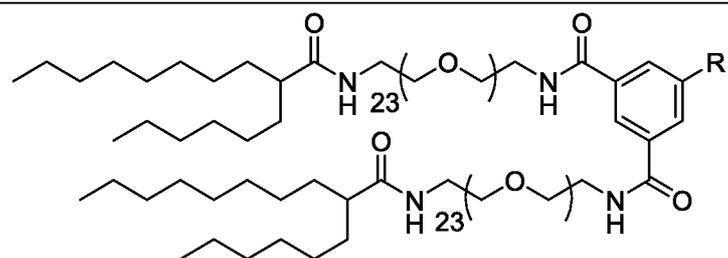
LP 111a



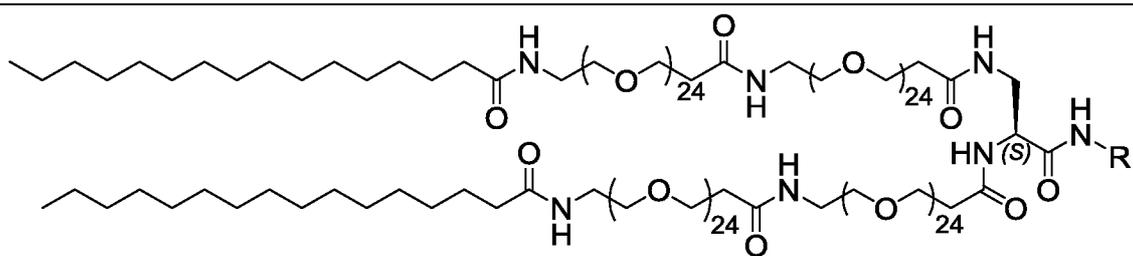
LP 124a



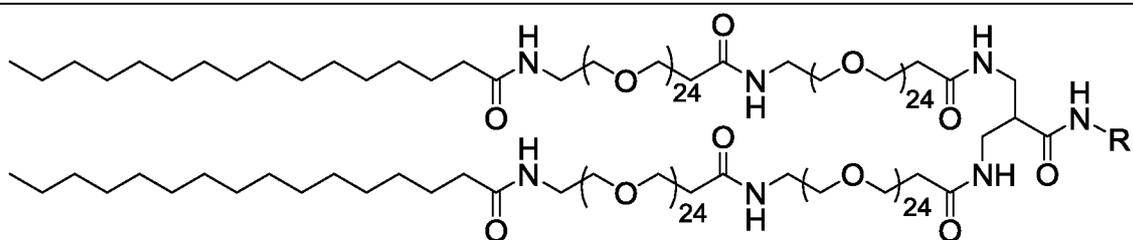
LP 130a



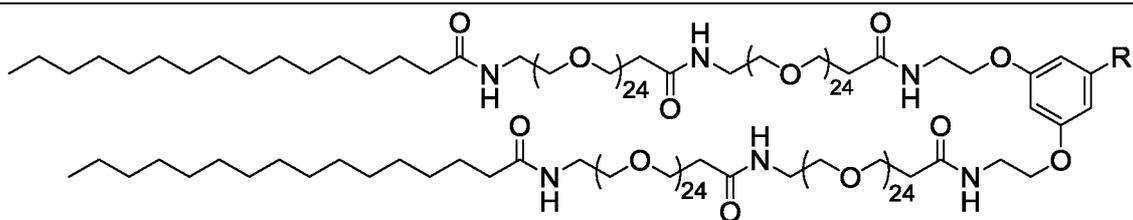
LP 210a



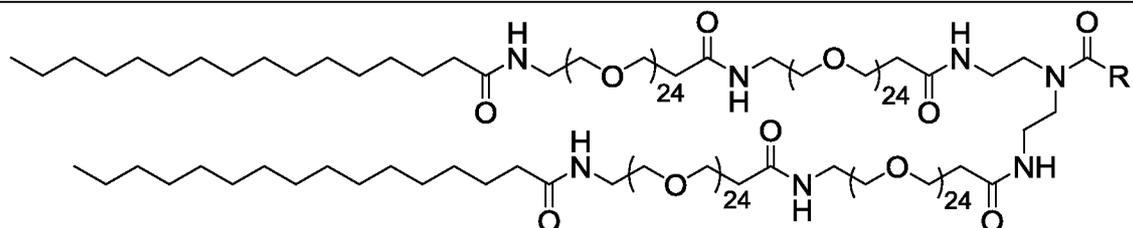
LP 217a



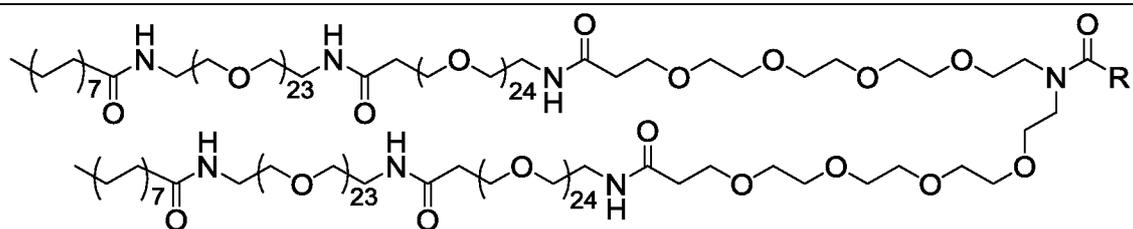
LP 220a



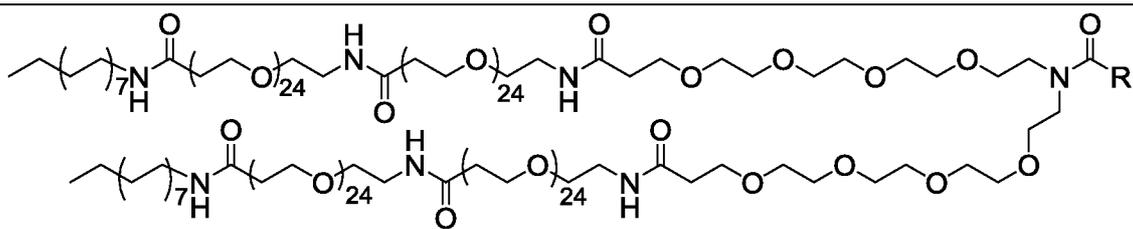
LP 223a



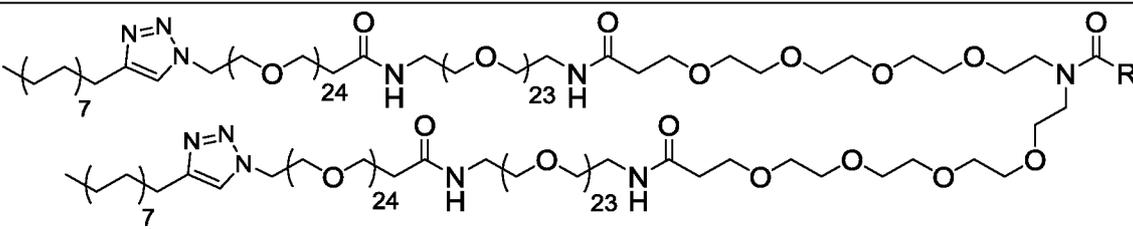
LP 225a



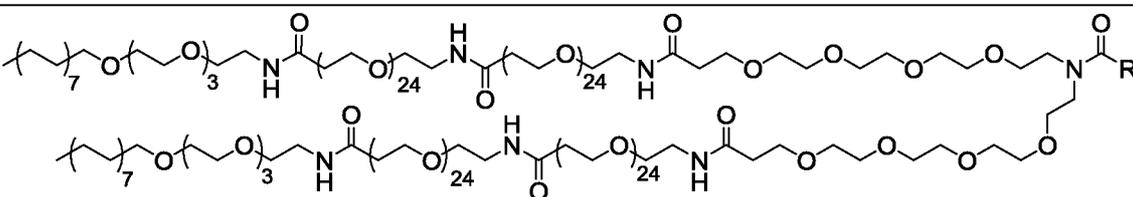
LP 246a



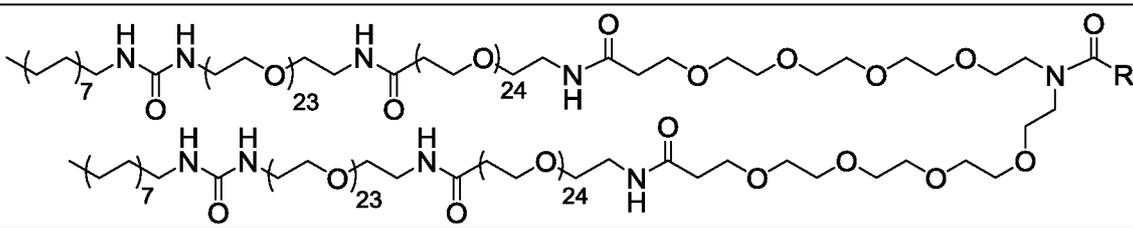
LP 339a



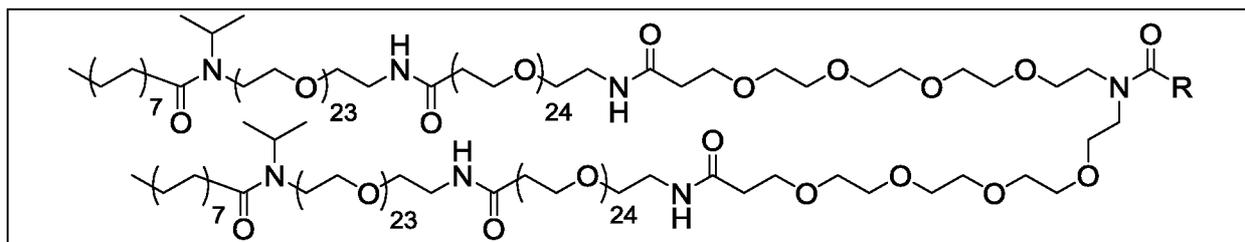
LP 340a



LP 357a



LP 358a

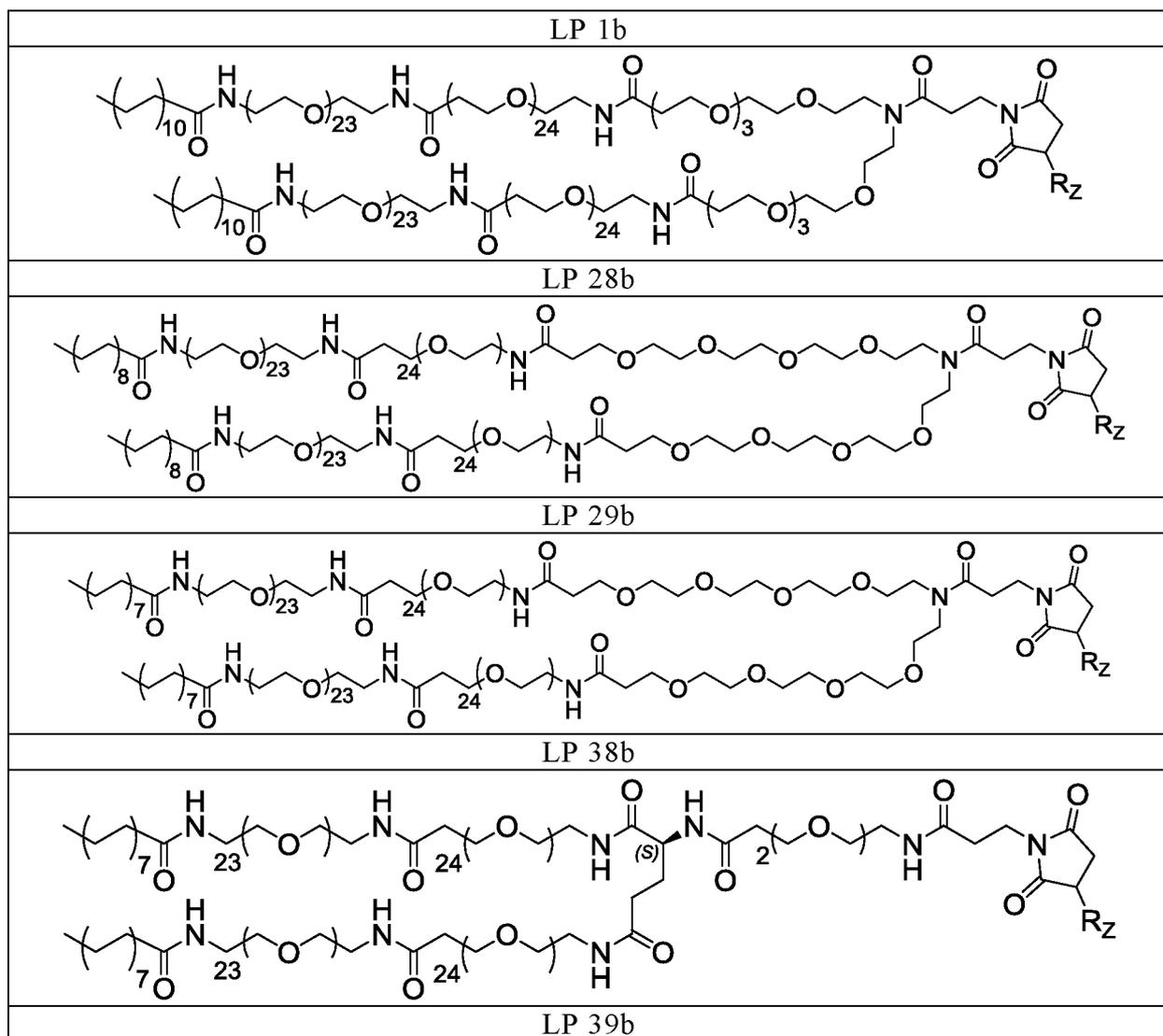


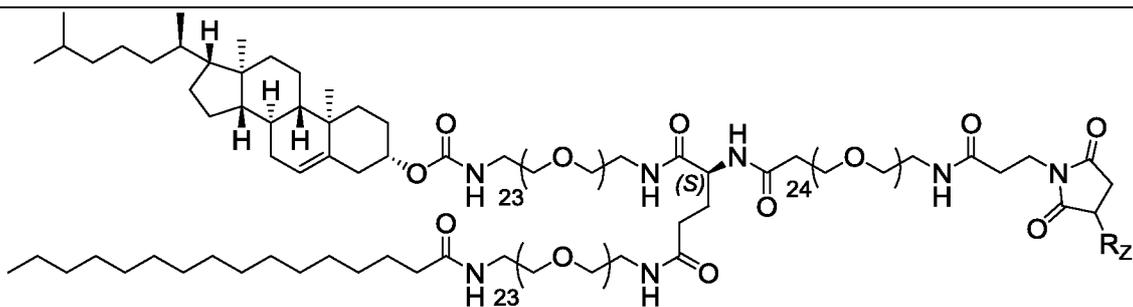
или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений,
где каждый R обозначает L_A-R_Z ;

L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с
5 остальной частью соединения; и

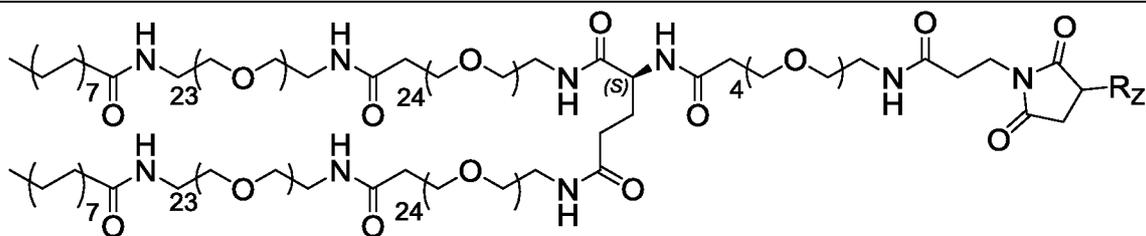
R_Z обозначает средство на основе олигонуклеотида.

26. Соединение, выбранное из следующих соединений:

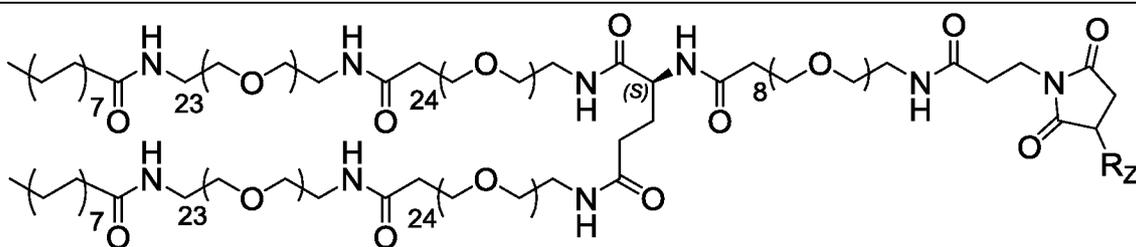




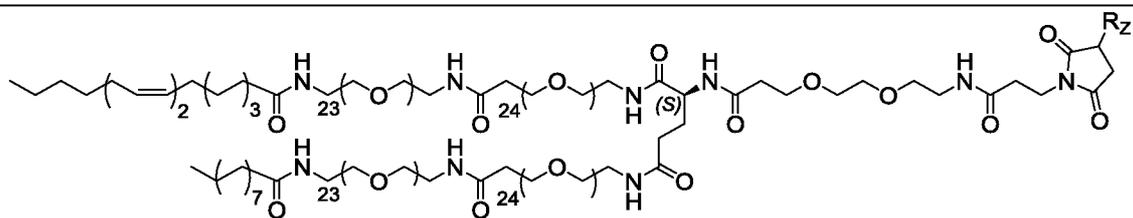
LP 41b



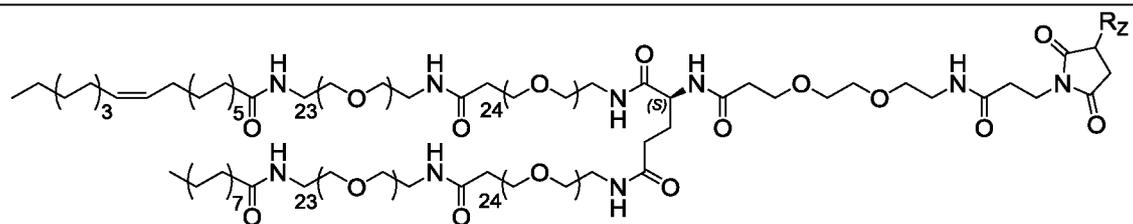
LP 42b



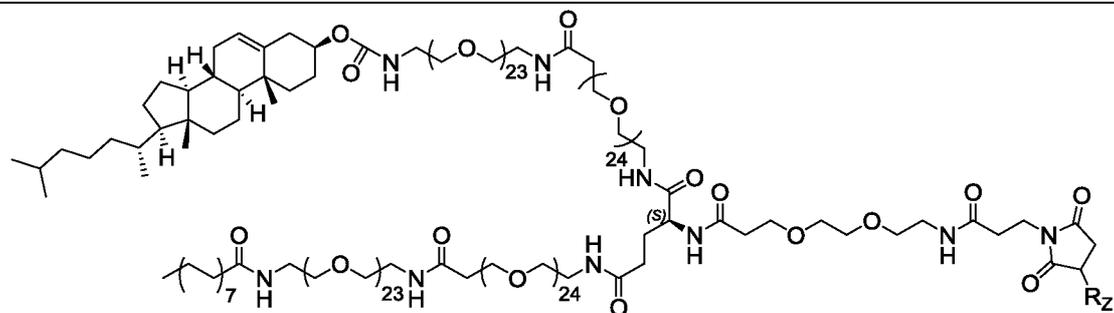
LP 43b



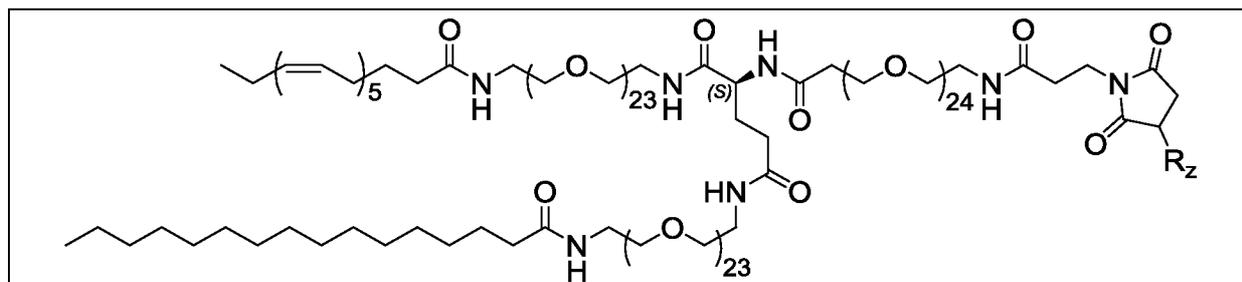
LP 44b



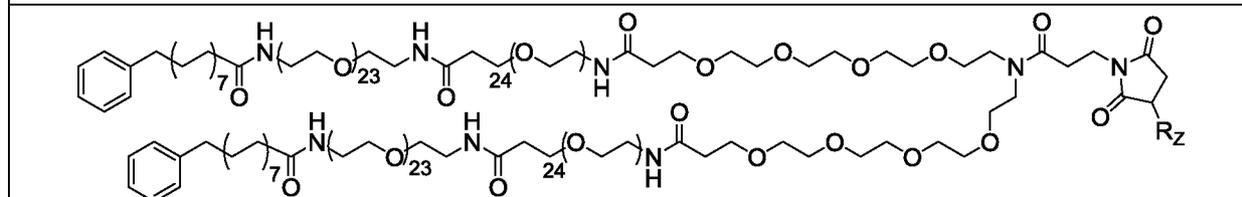
LP 45b



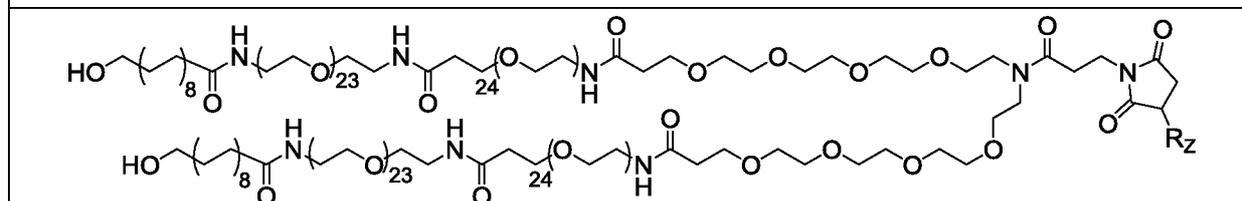
LP 47b



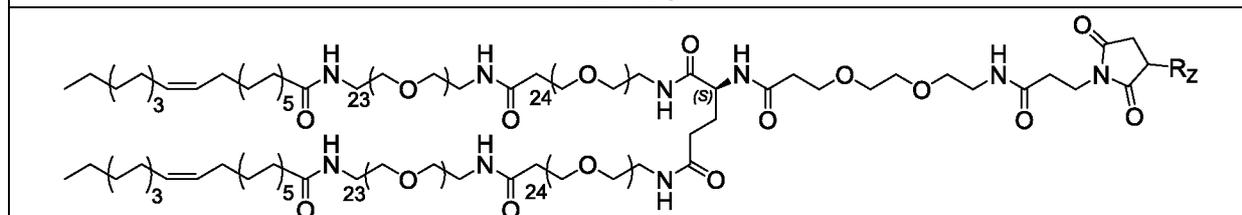
LP 48b



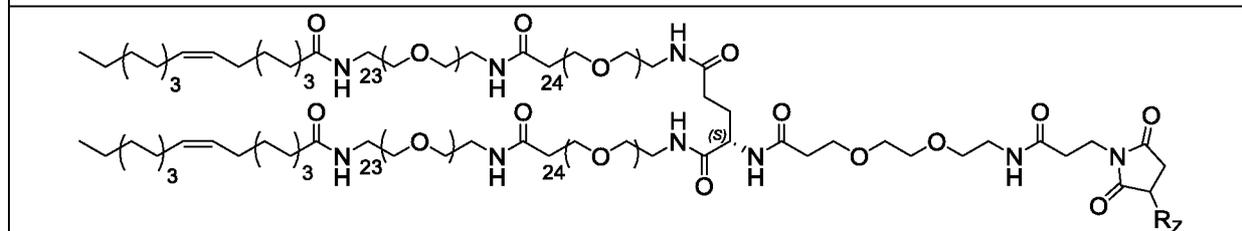
LP 49b



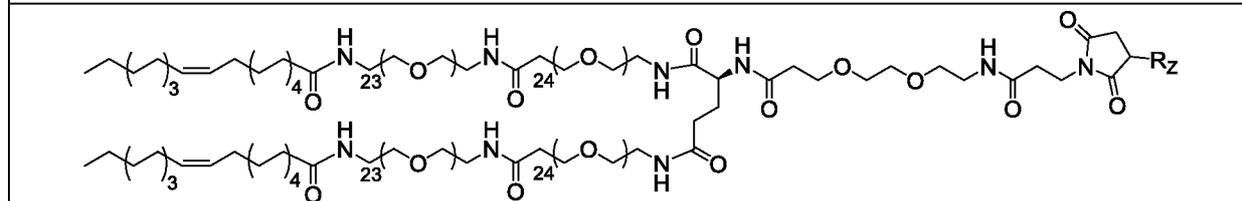
LP 53b



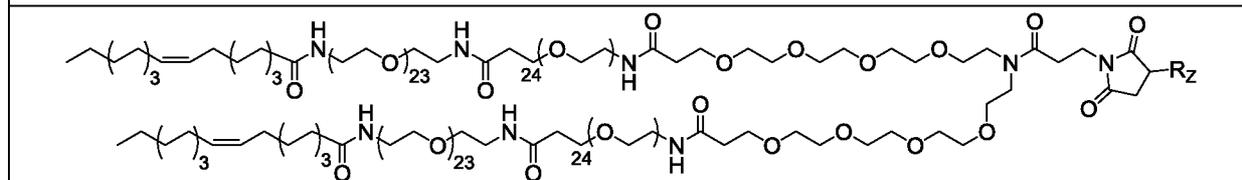
LP 54b



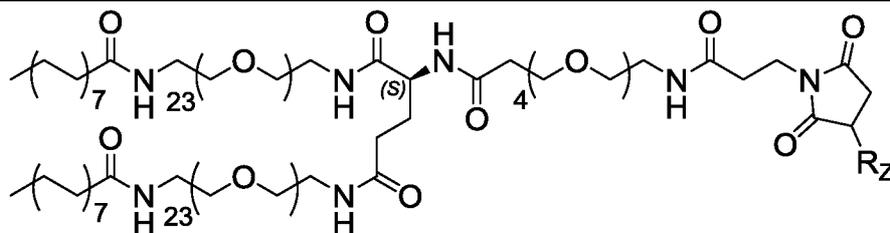
LP 55b



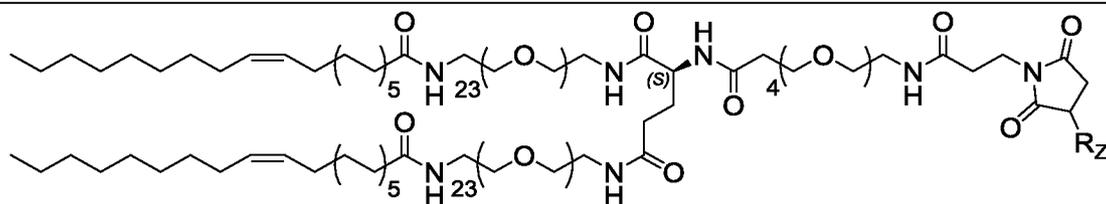
LP 56b



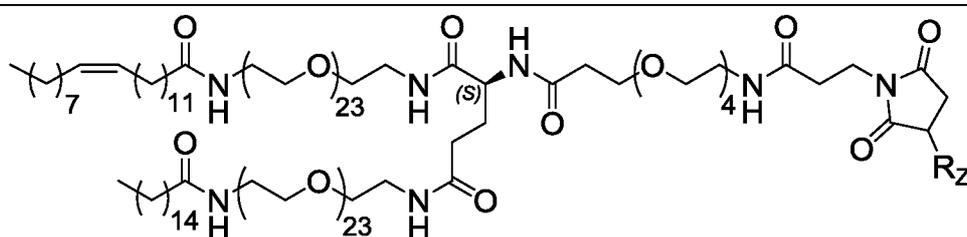
LP 57b



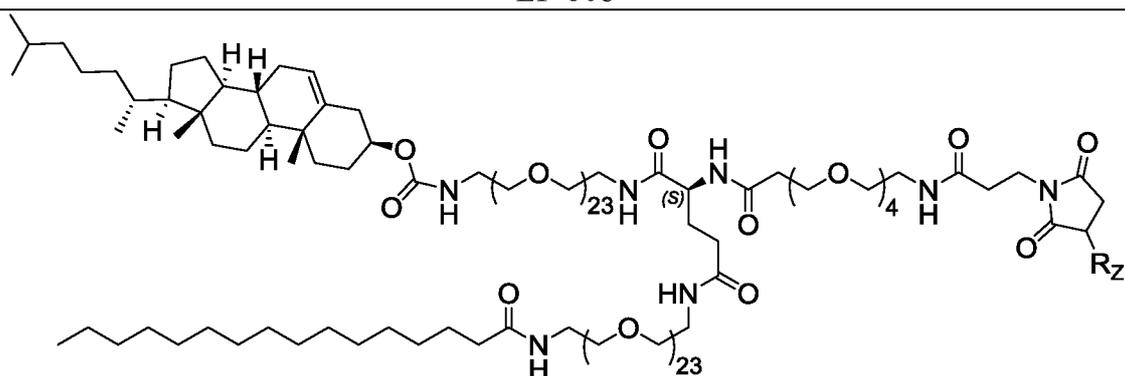
LP 58b



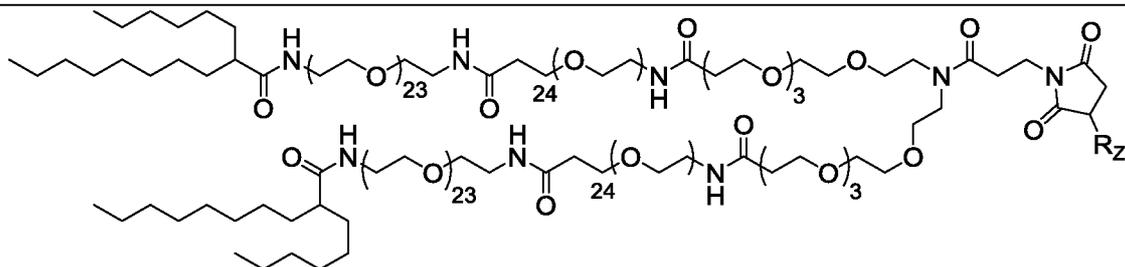
LP 59b



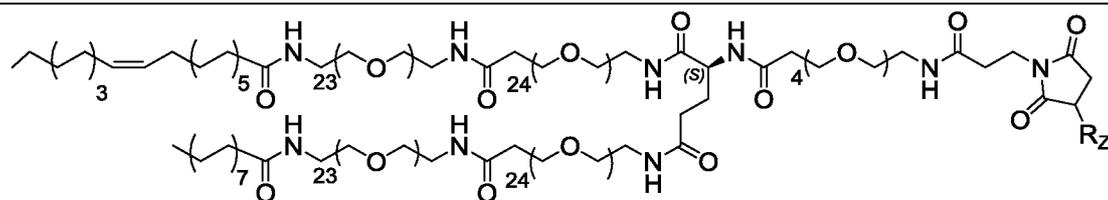
LP 60b



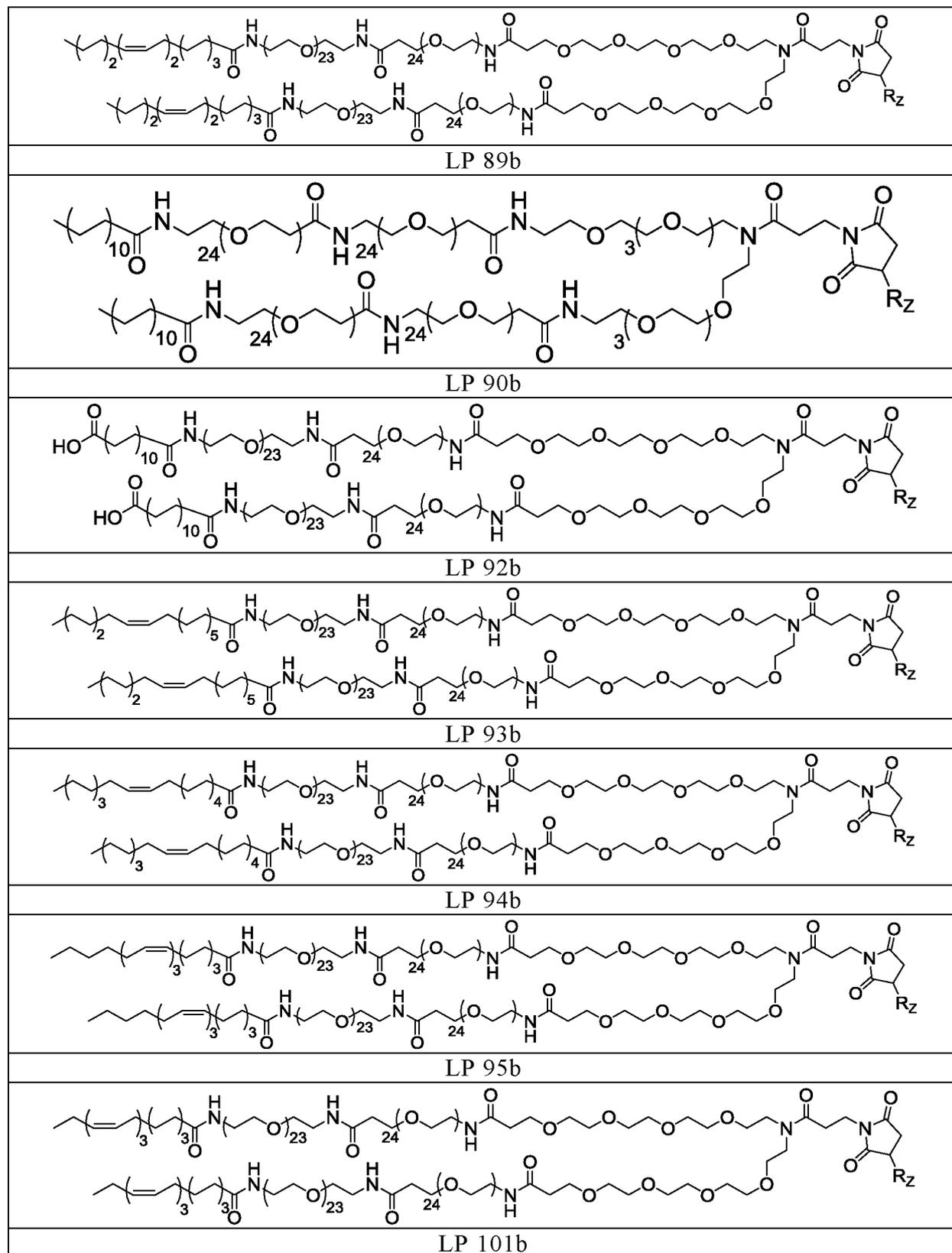
LP 61b

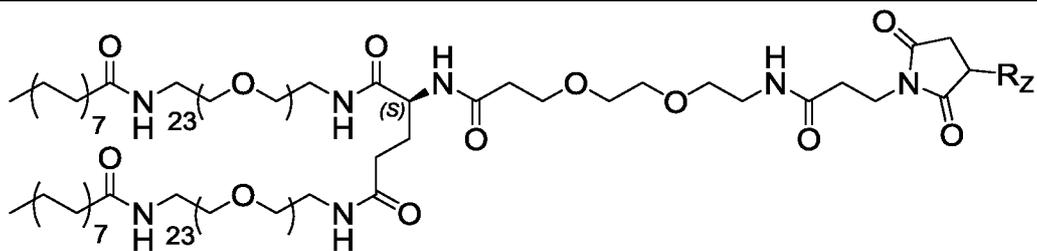


LP 62b

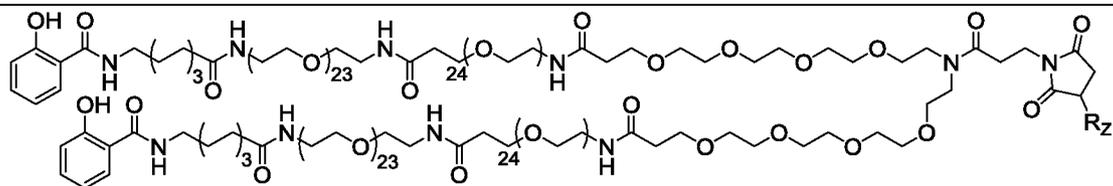


LP 87b

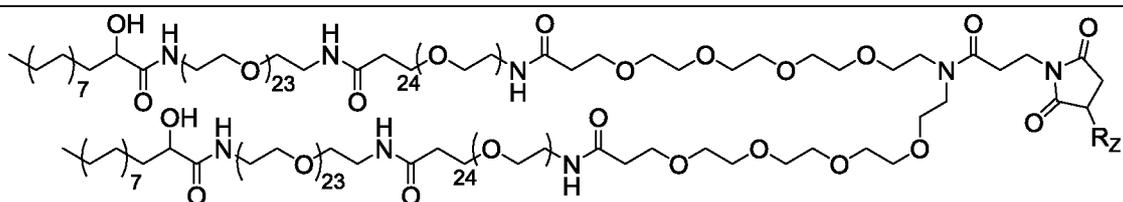




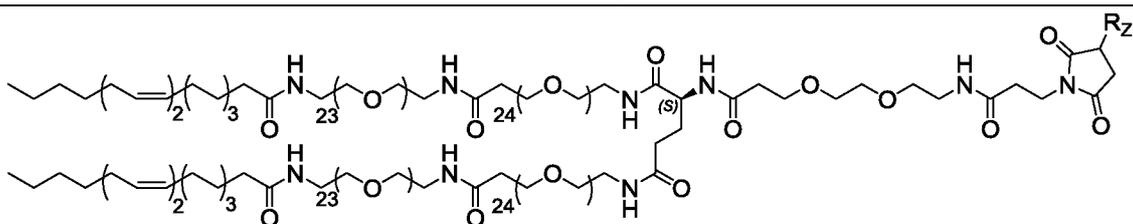
LP 102b



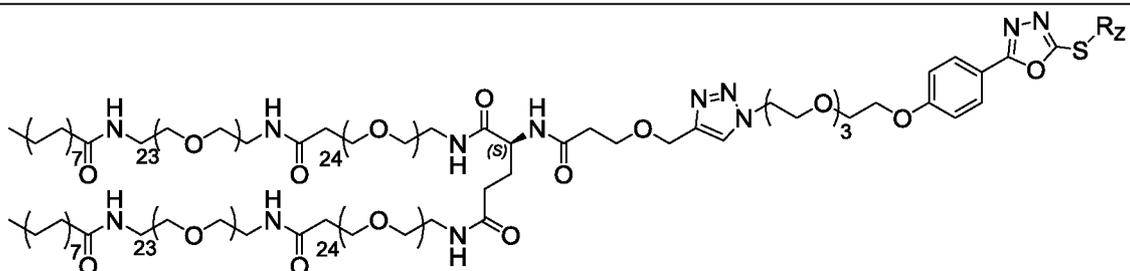
LP 103b



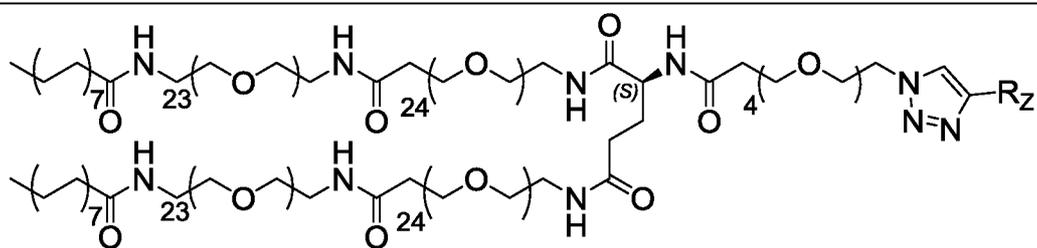
LP 104b



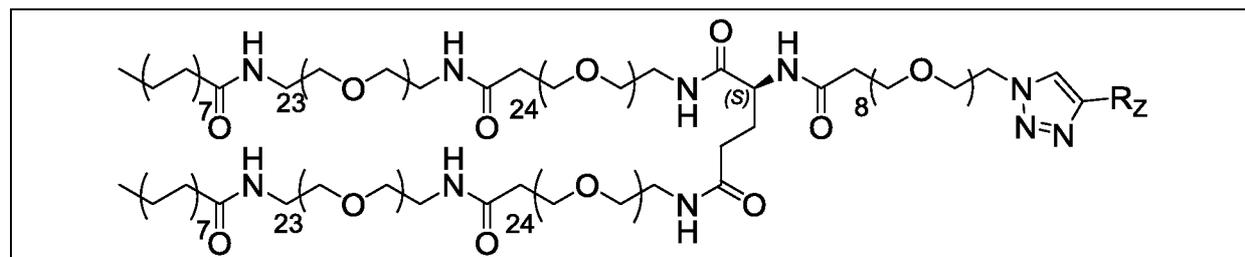
LP 106b



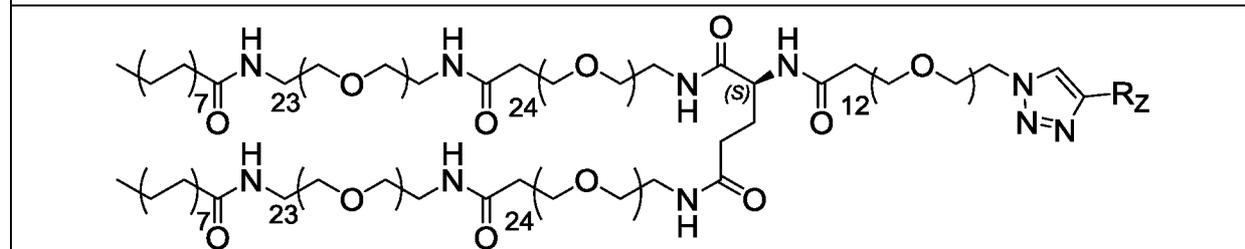
LP 107b



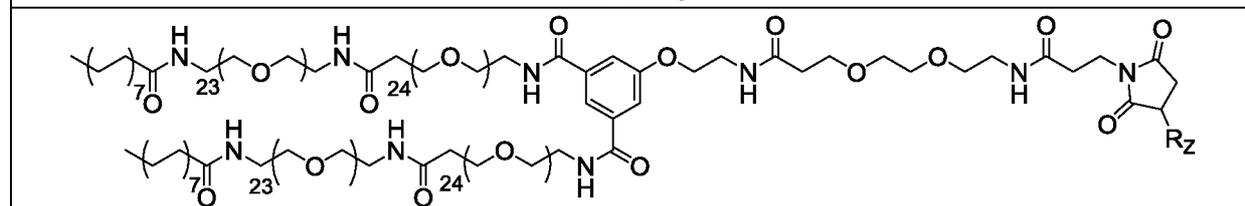
LP 108b



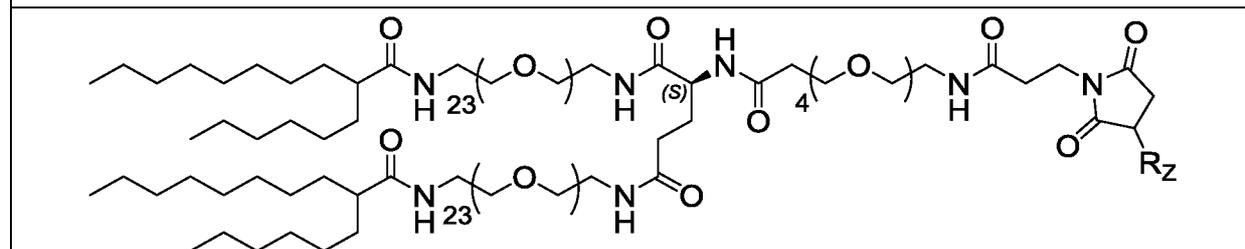
LP 109b



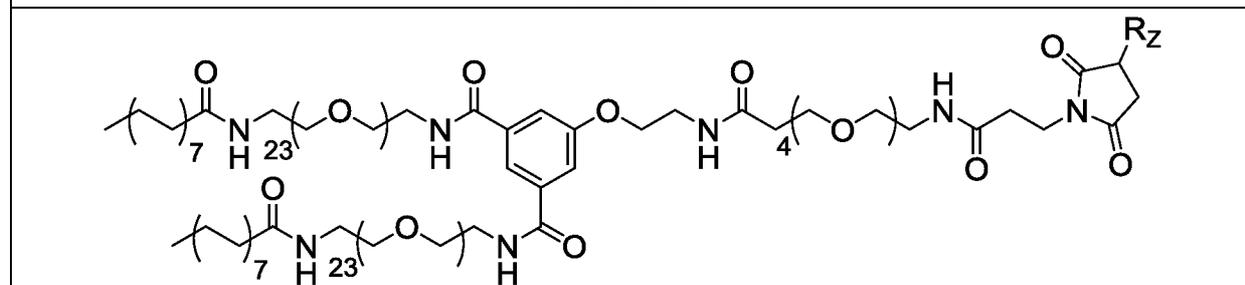
LP 110b



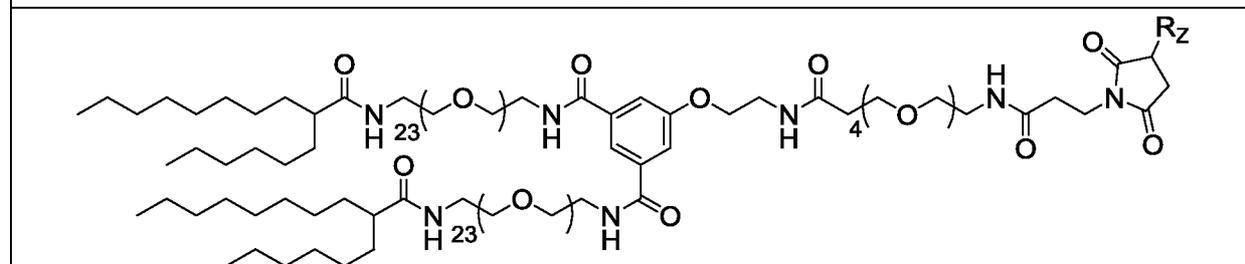
LP 111b



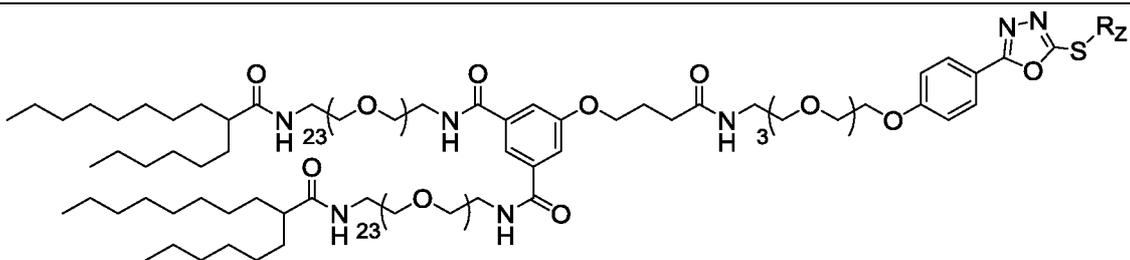
LP 124b



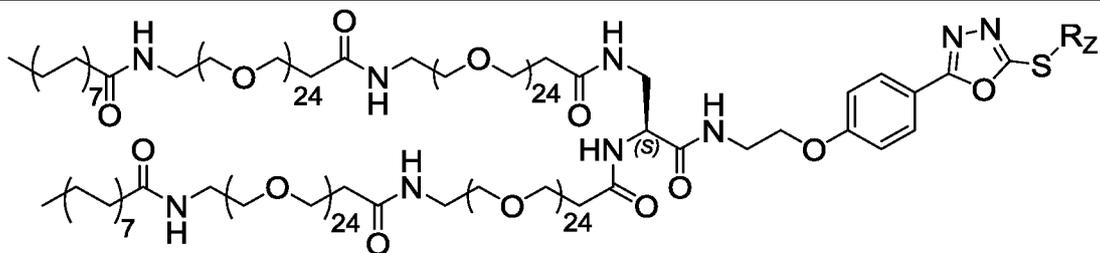
LP 130b



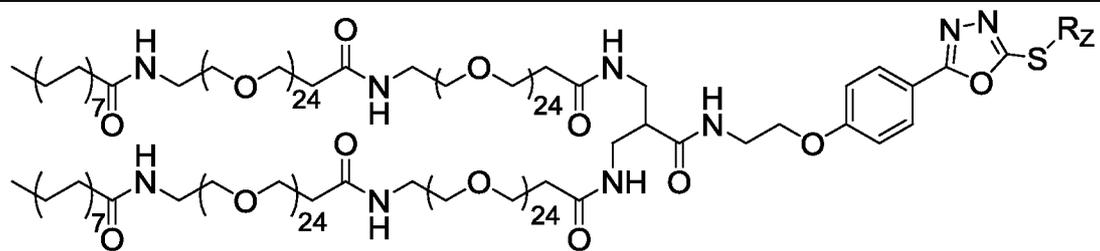
LP 143b



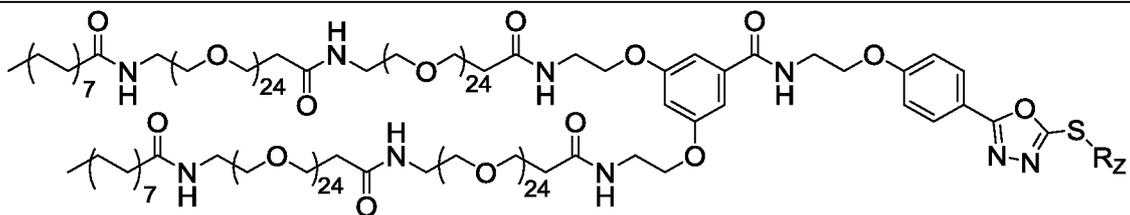
LP 210b



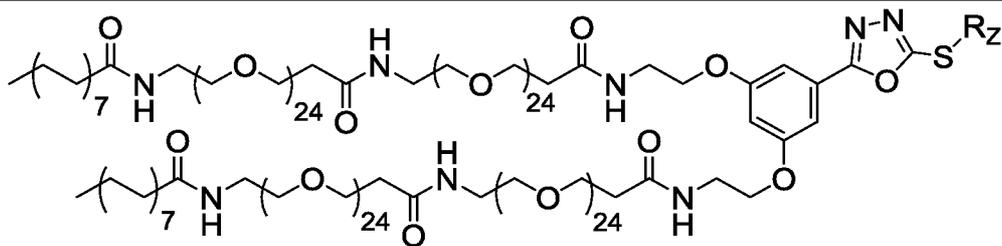
LP 217b



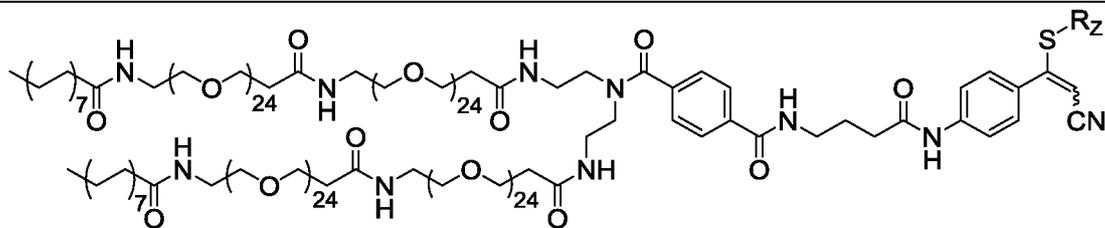
LP 220b



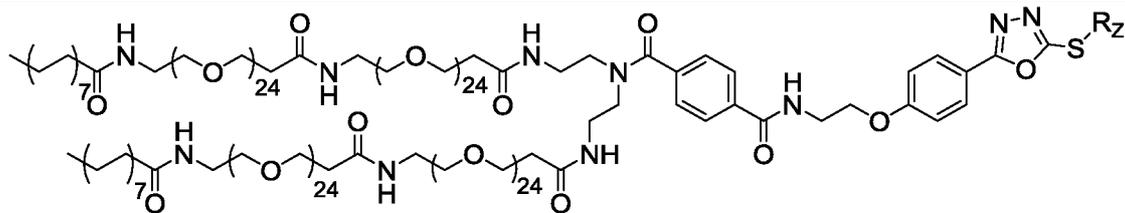
LP 221b



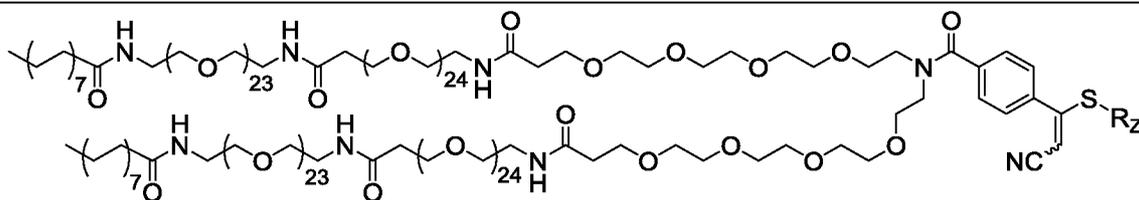
LP 223b



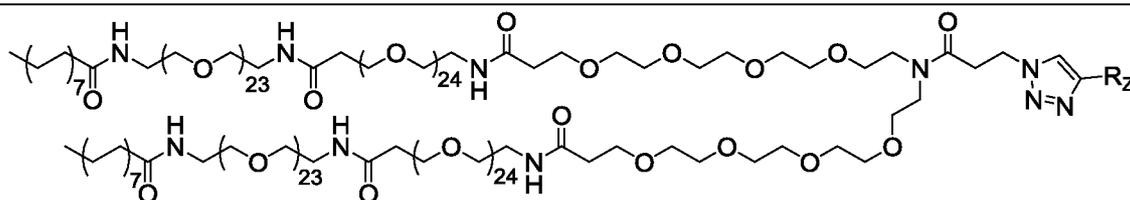
LP 224b



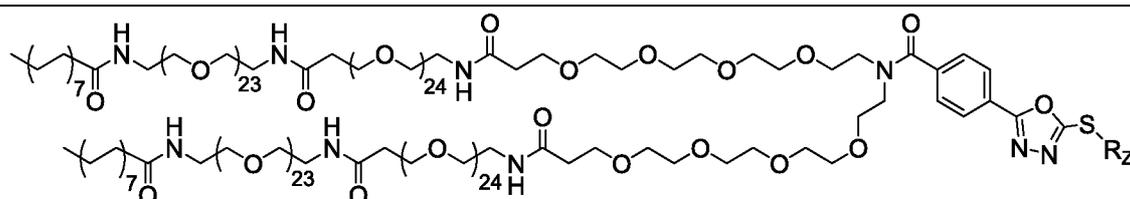
LP 225b



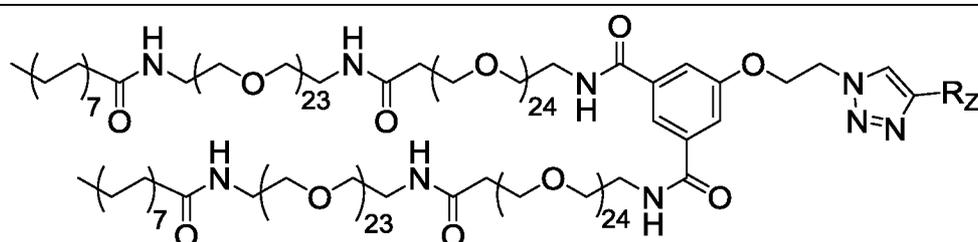
LP 226b



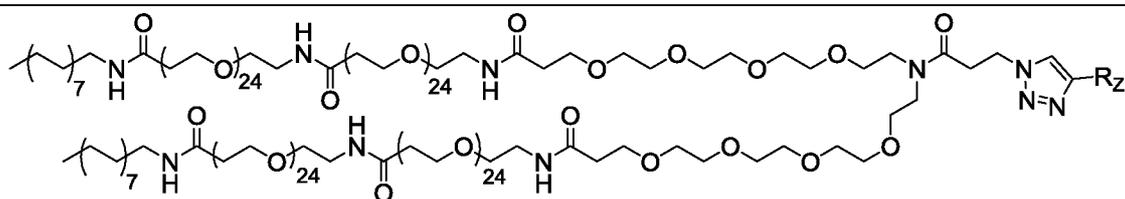
LP 238b



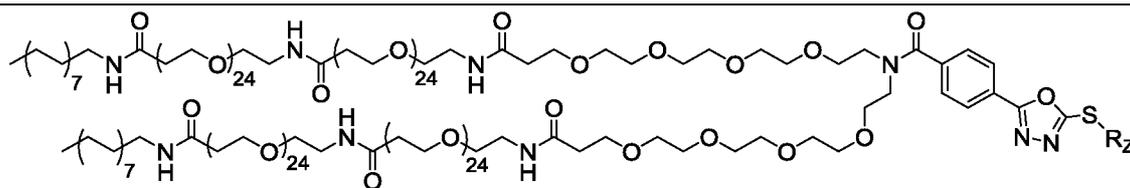
LP 240b



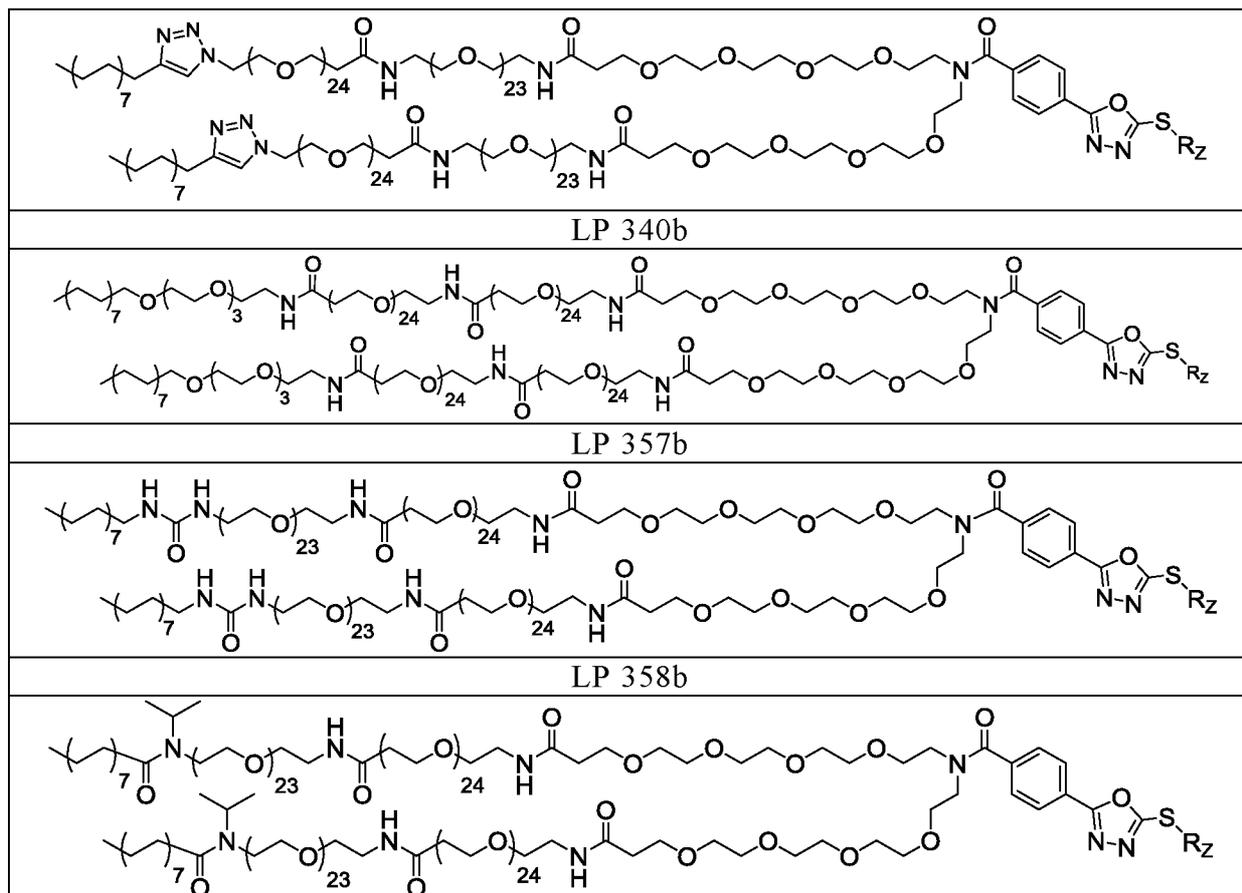
LP 246b



LP 247b



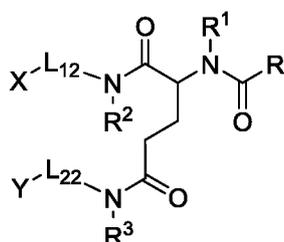
LP 339b



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений, где каждый R_Z включает средство на основе олигонуклеотида.

5 27. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-26, в котором средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

28. Соединение формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R обозначает $L_{A2}-R_Z$;

L_{A2} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с $C(O)-$;

R_Z включает средство на основе олигонуклеотида;

R^1 , R^2 и R^3 каждый независимо обозначает водород или C_1-C_6 -алкил;

5 L_{12} и L_{22} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и

X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

10 29. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 28, в котором L_{12} и L_{22} каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ.

15 30. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 28 или п. 29, в котором L_{12} и L_{22} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

20 31. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-30, в котором L_{12} и L_{22} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ.

25 32. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-30, в котором L_{12} и L_{22} каждый содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

33. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 28, в котором один из L_{12} и L_{22} содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ, а другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

30 34. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 28, в котором каждый L_{12} и L_{22} независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|----------|-----------|
|----------|-----------|

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 1-2 | |
| Мостик 2-2 | |

где p и q каждый независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; и

каждый знак  обозначает положение присоединения к X , Y , $-NR^2$ - или -

5 NR^3 -, при условии, что

(i) в мостике 1-2: $p + q \geq 5$, и

(ii) в мостике 2-2: $p \geq 5$.

10 35. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 34, в котором каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и каждый q равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

15 36. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-35, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает ненасыщенный липид.

20 37. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-36, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает насыщенный липид.

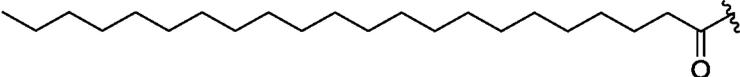
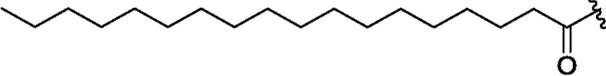
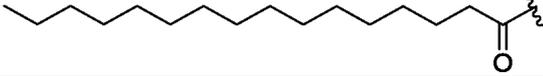
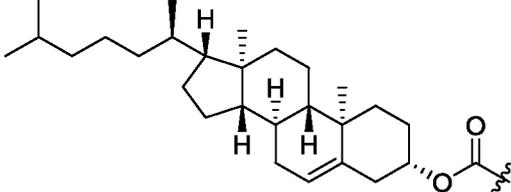
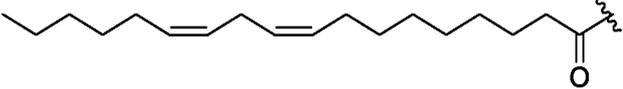
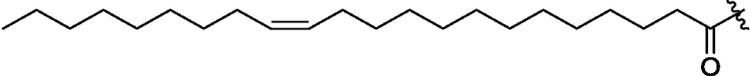
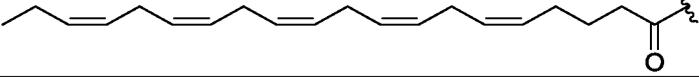
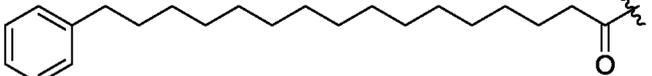
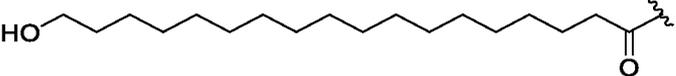
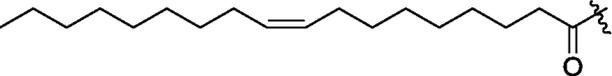
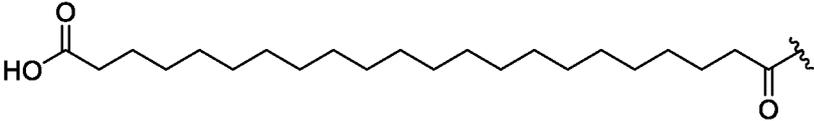
38. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-37, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает разветвленный липид.

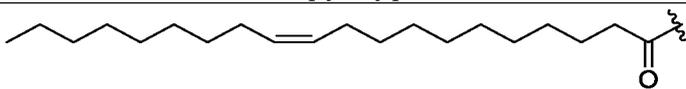
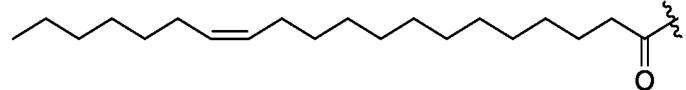
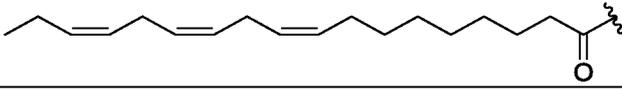
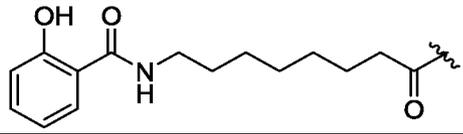
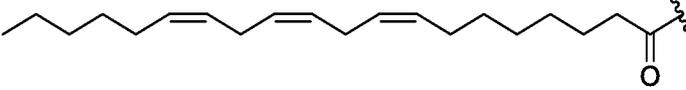
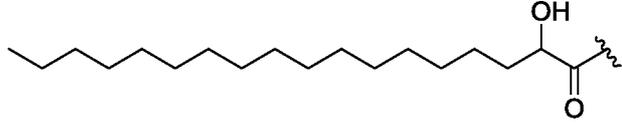
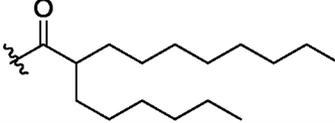
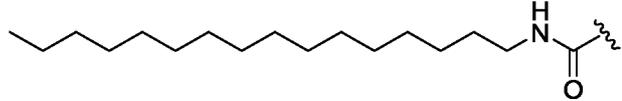
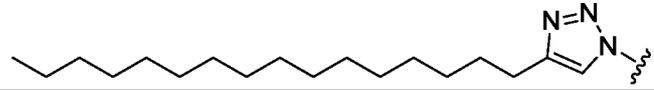
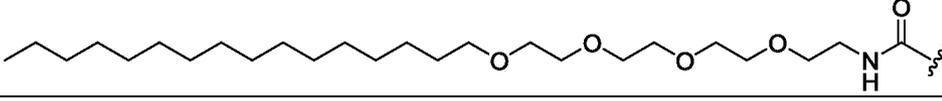
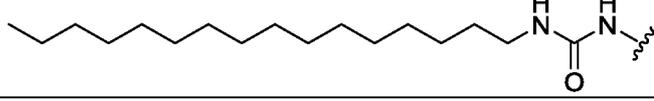
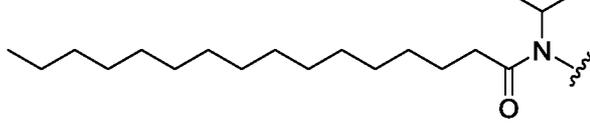
25 39. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-38, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид с линейной цепью.

40. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-39, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода.

5 41. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-40, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает холестерил.

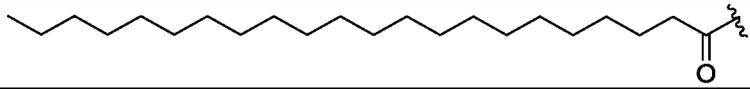
10 42. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-35, в котором по меньшей мере один из X или Y выбран из группы, состоящей из:

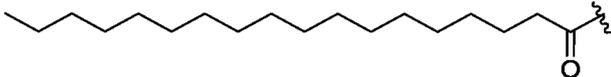
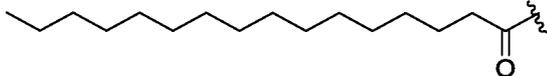
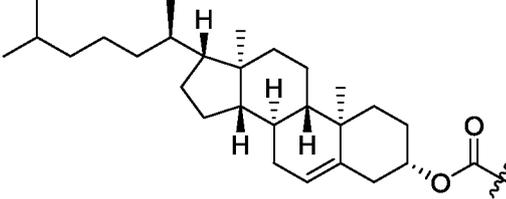
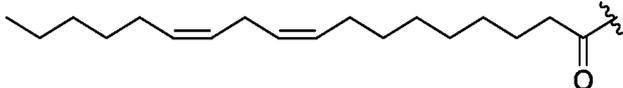
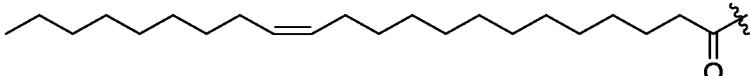
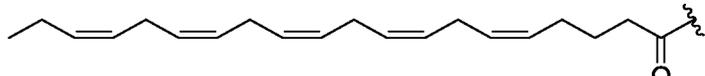
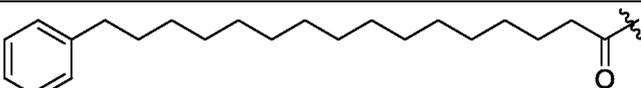
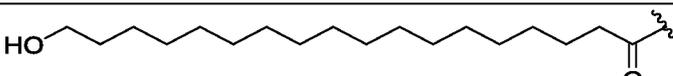
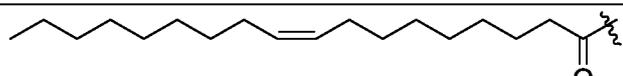
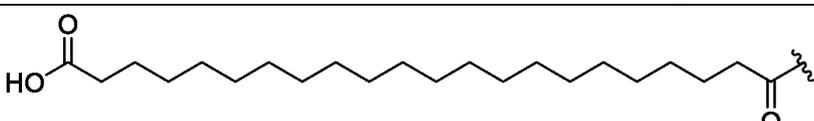
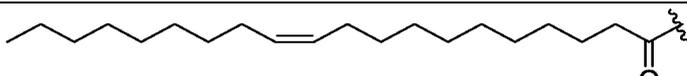
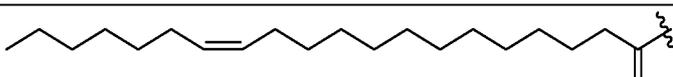
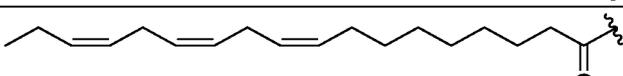
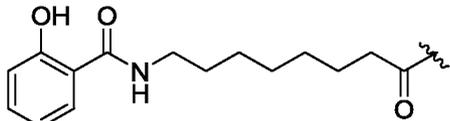
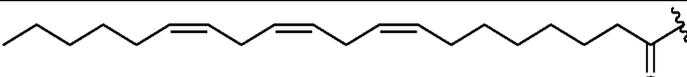
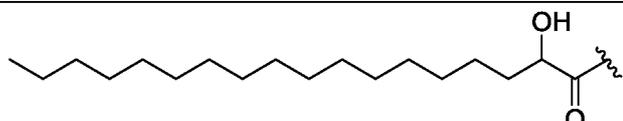
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |

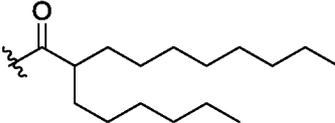
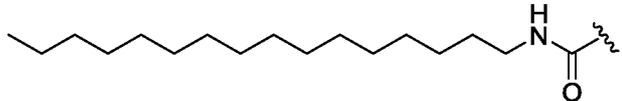
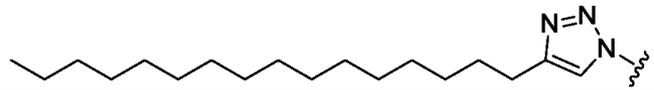
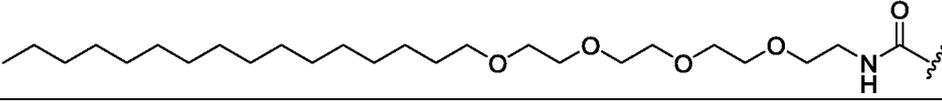
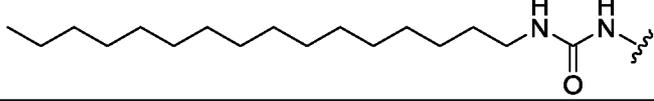
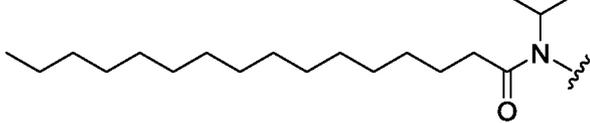
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где каждый знак  обозначает положение присоединения к L₁₂ или L₂₂.

43. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-35, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

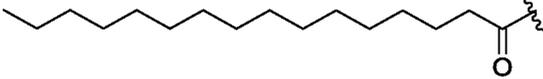
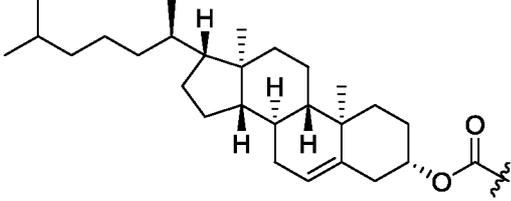
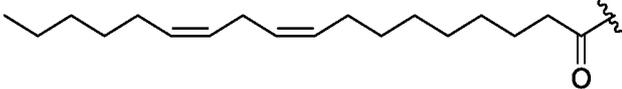
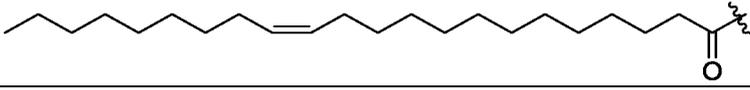
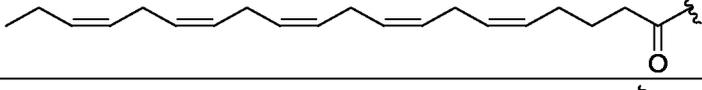
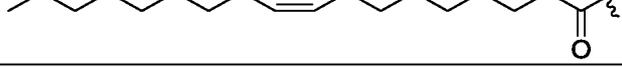
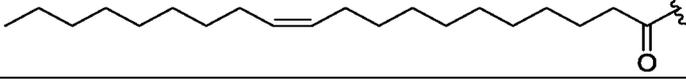
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |

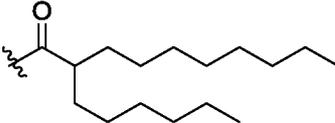
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |

| Название | Структура |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 19 |  |
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₂ или L₂₂.

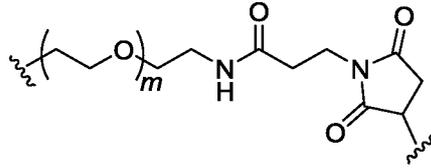
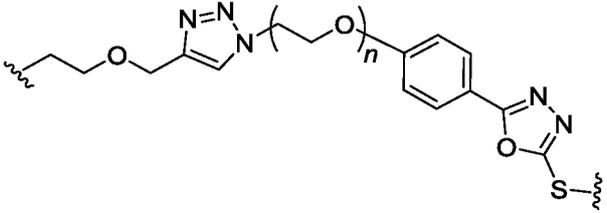
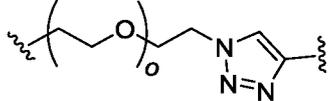
44. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 43, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 12 |  |

| Название | Структура |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 19 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₂ или L₂₂.

45. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-44, в котором L_{A2} выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1-2 |  |
| Линкер 2-2 |  |
| Линкер 3-2 |  |

5

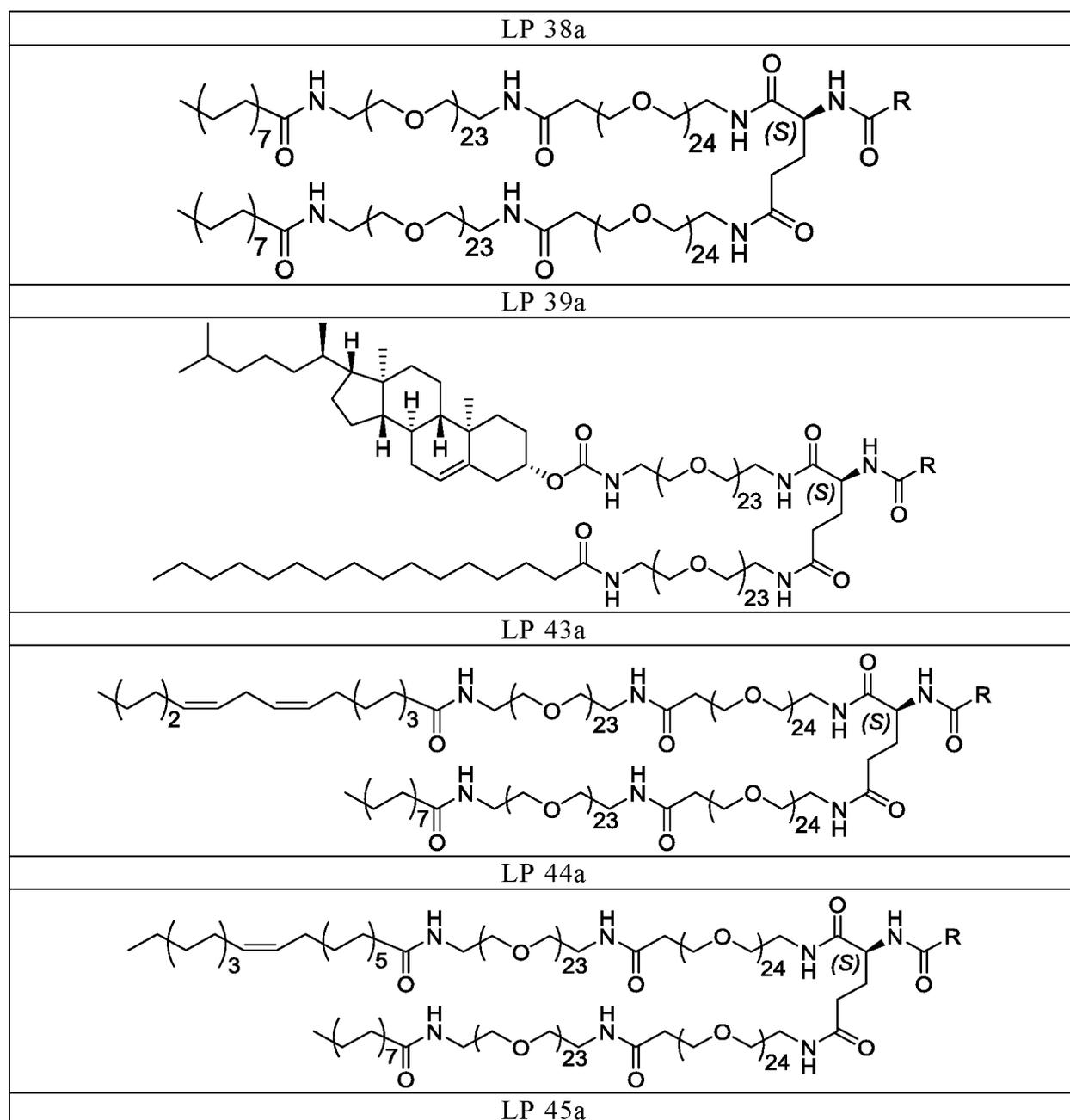
где каждый m, n и o независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и знак  обозначает положение присоединения к R_Z или -C(O)-.

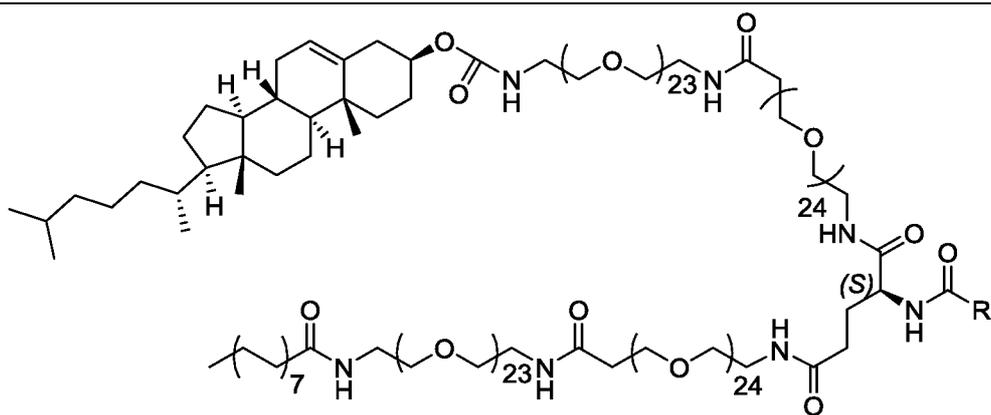
10 46. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 45, в котором m равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21, 22, 23 или 25; n равен 2, 3, 4 или 5; и o равен 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13.

15 47. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-46, в котором каждый R¹, R² и R³ независимо обозначает водород или C₁-C₃-алкил.

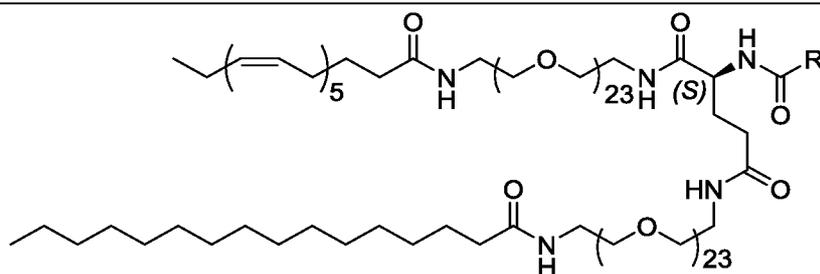
48. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-47, в котором каждый R^1 , R^2 и R^3 обозначает водород.

5 49. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 28, где соединение формулы (II) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

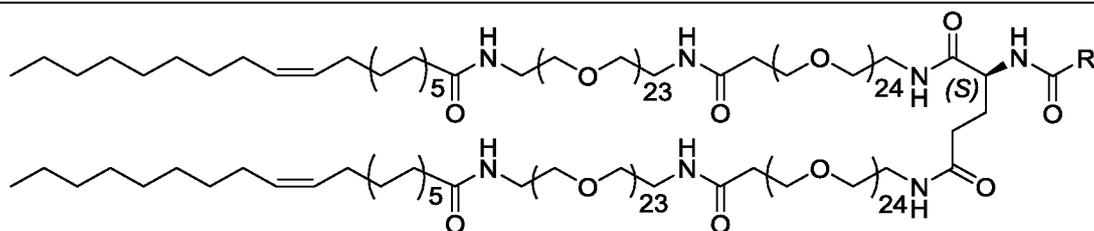




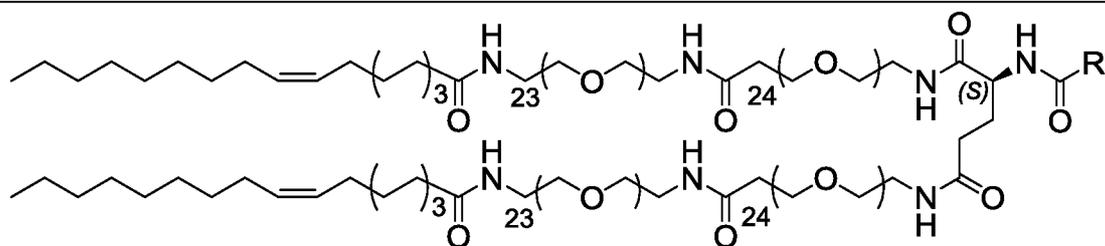
LP 47a



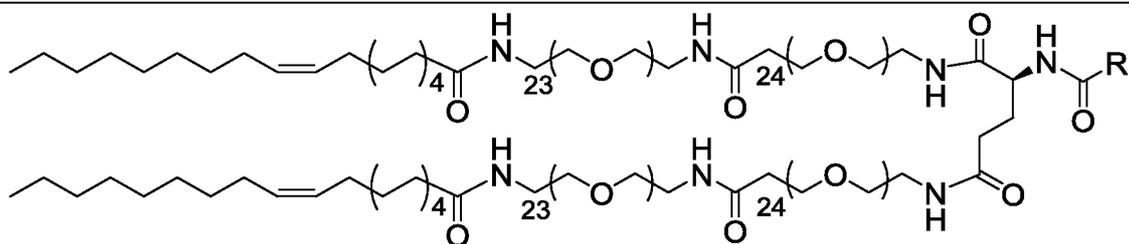
LP 53a



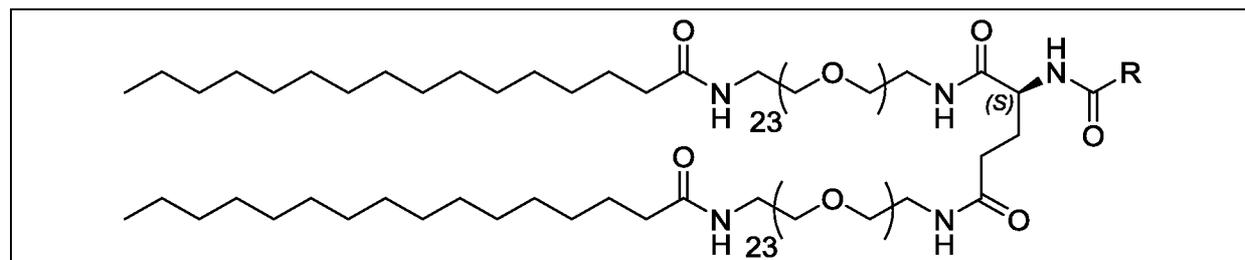
LP 54a



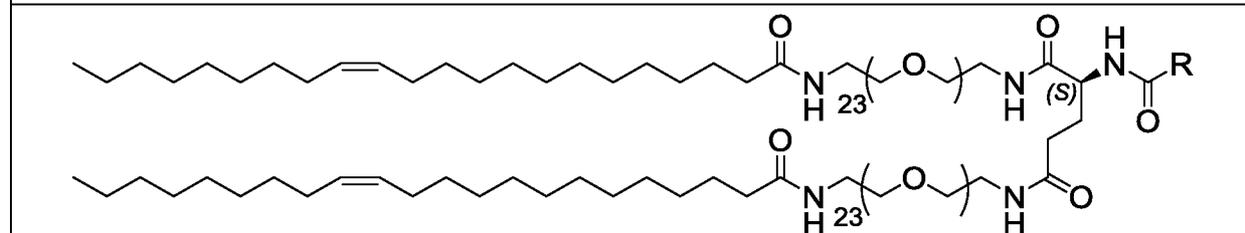
LP 55a



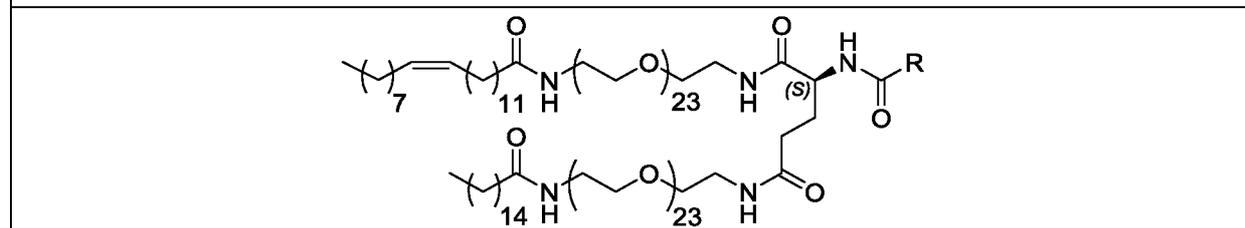
LP 57a



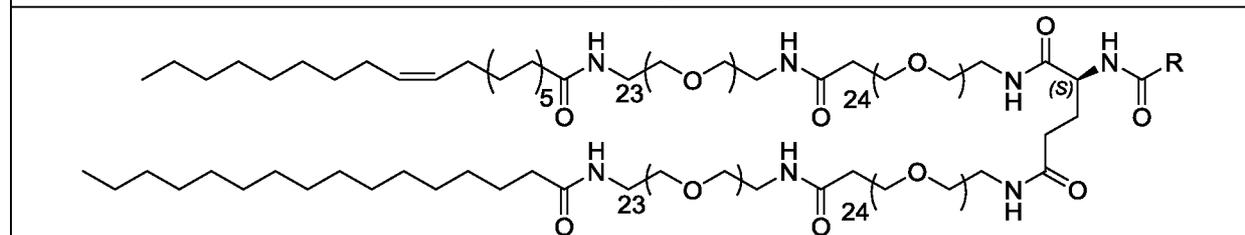
LP 58a



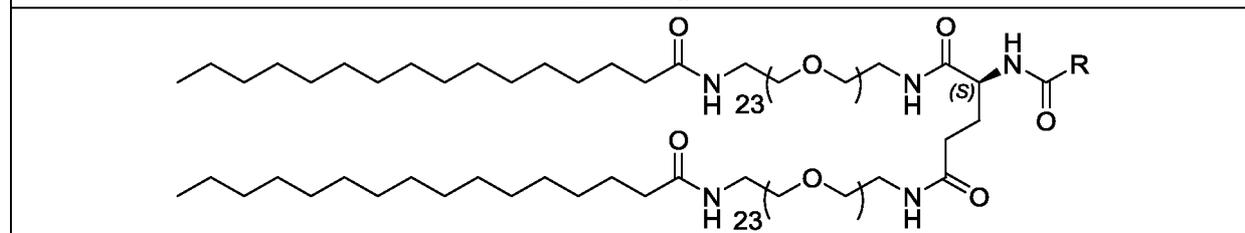
LP 59a



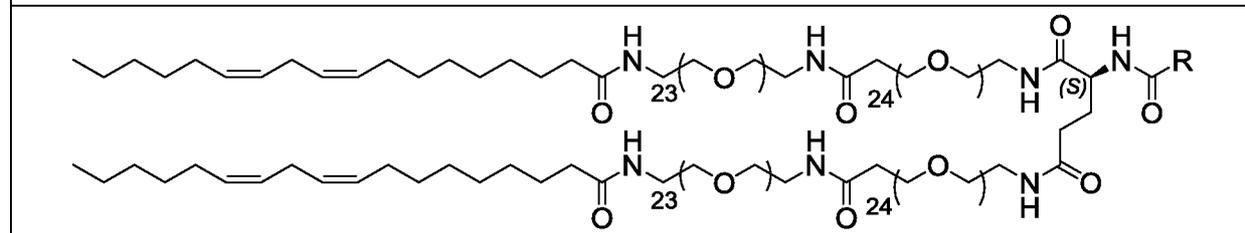
LP 62a



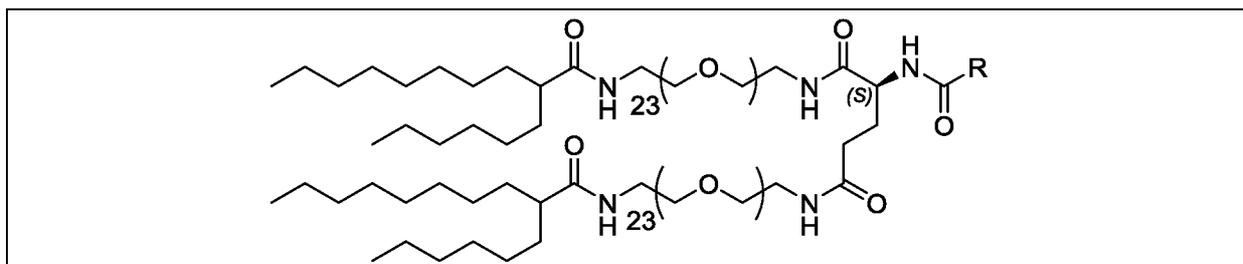
LP 101a



LP 104a

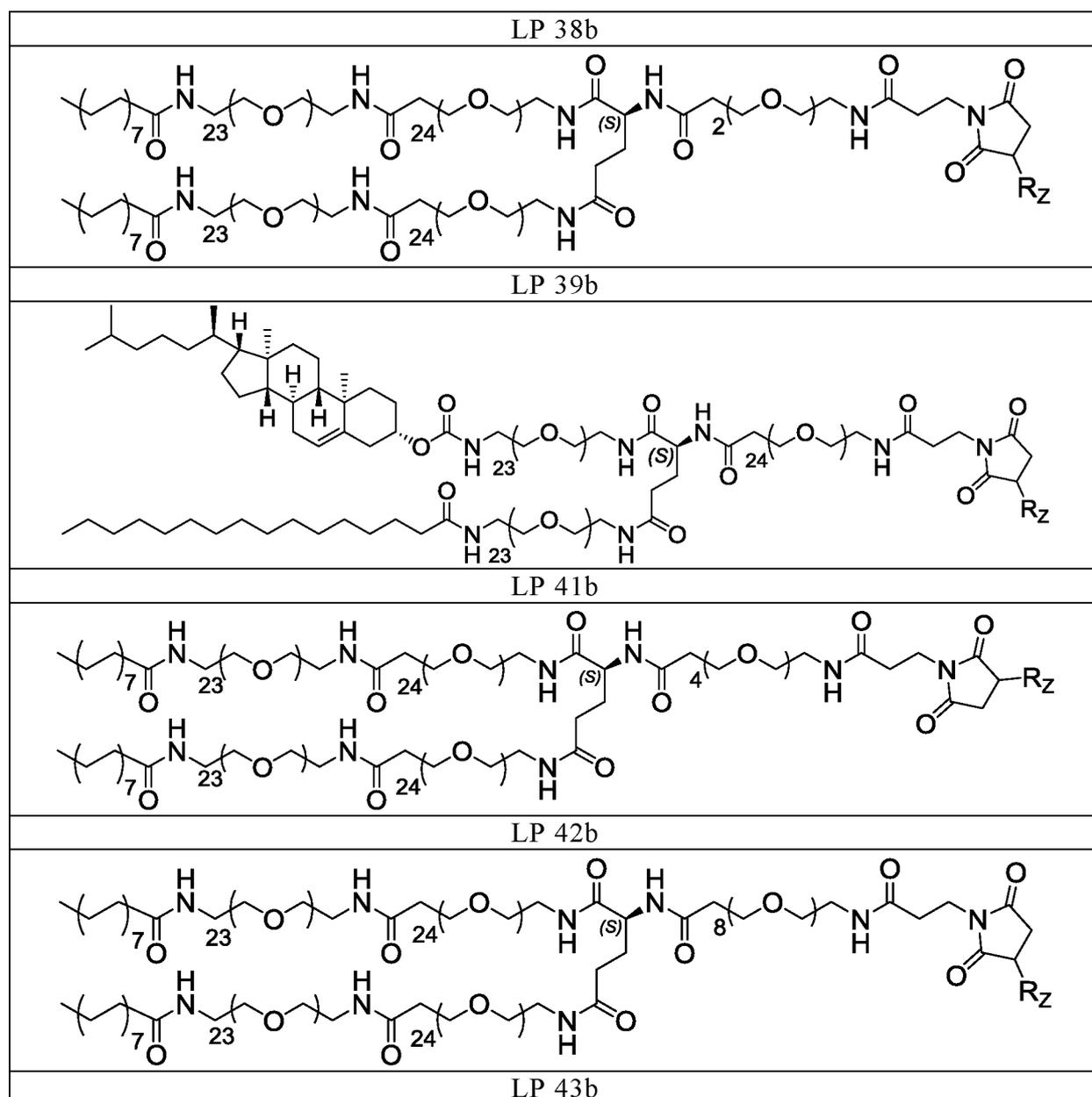


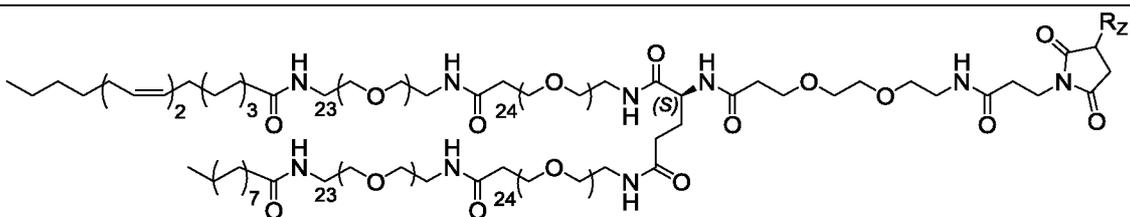
LP 111a



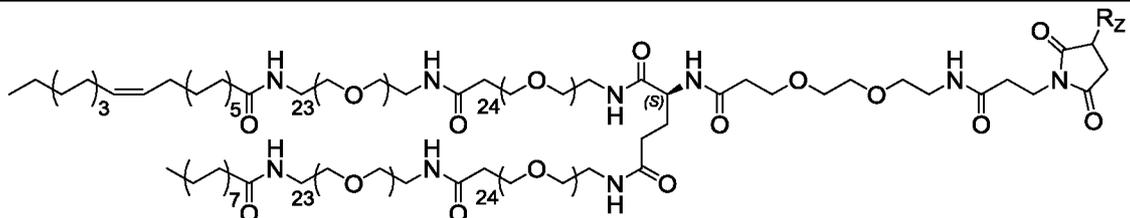
или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

50. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 28, где
5 соединение формулы (II) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

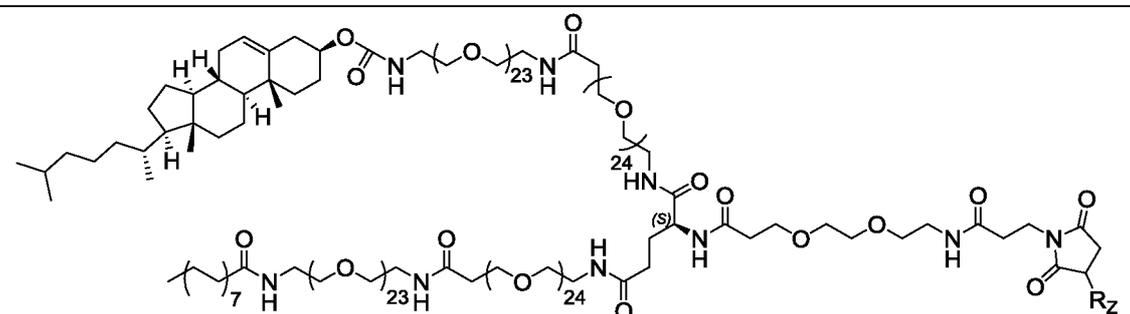




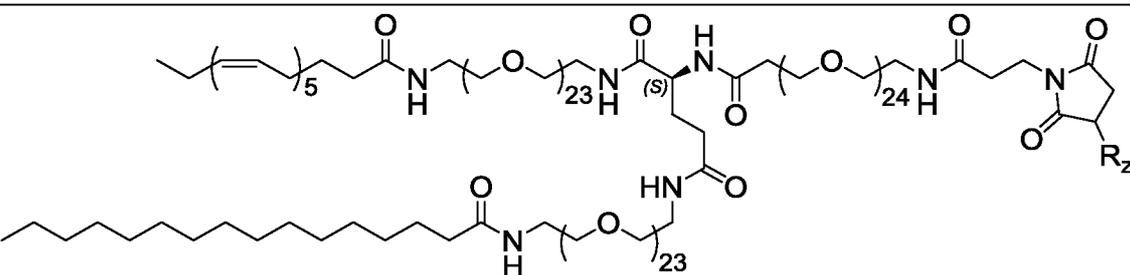
LP 44b



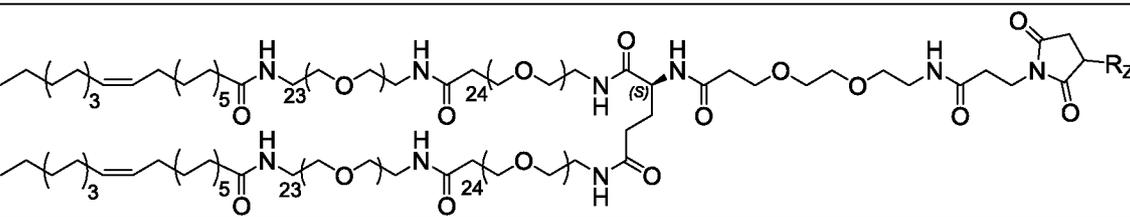
LP 45b



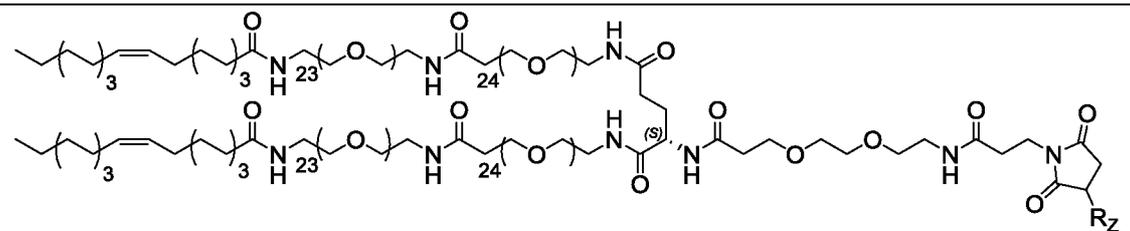
LP 47b



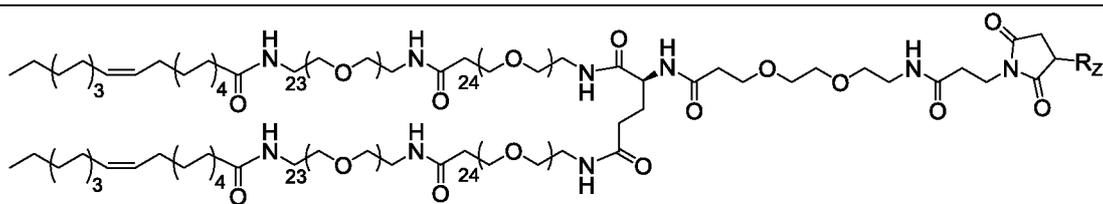
LP 53b



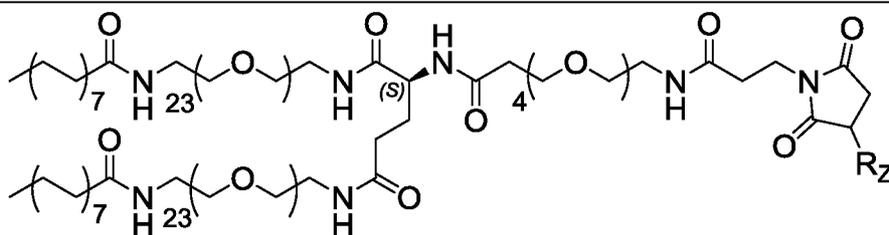
LP 54b



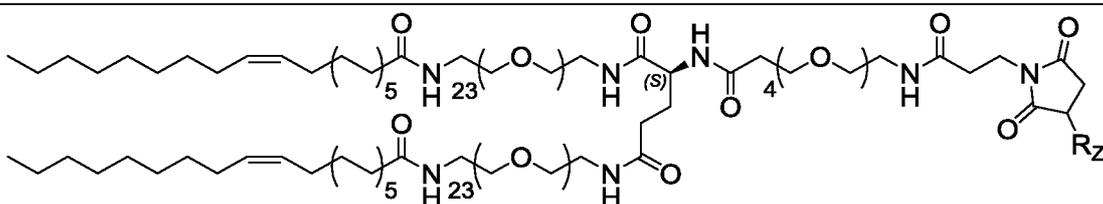
LP 55b



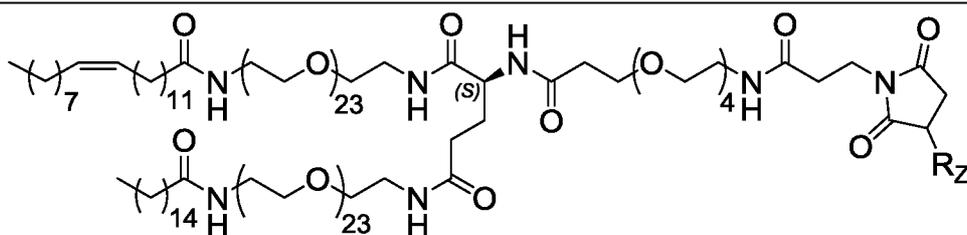
LP 57b



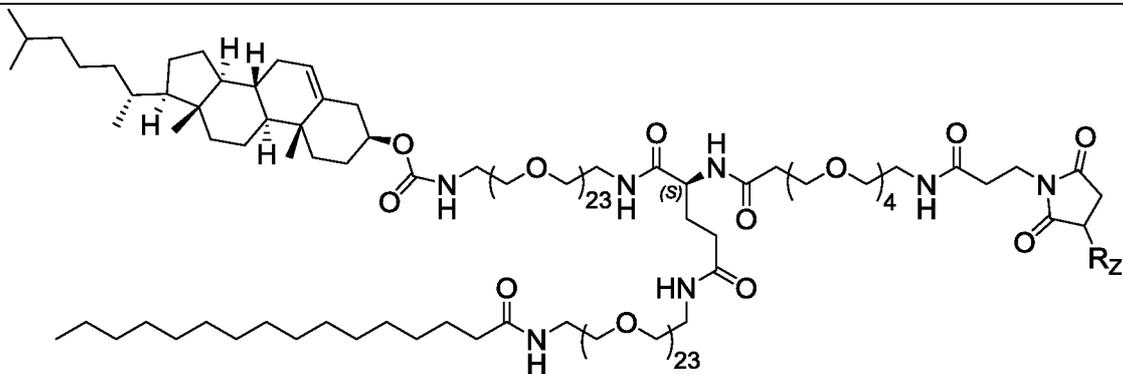
LP 58b



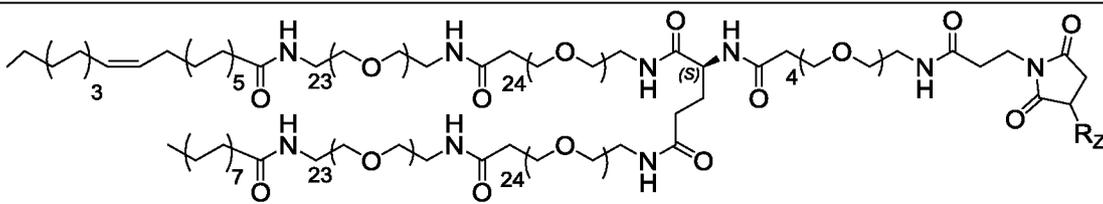
LP 59b



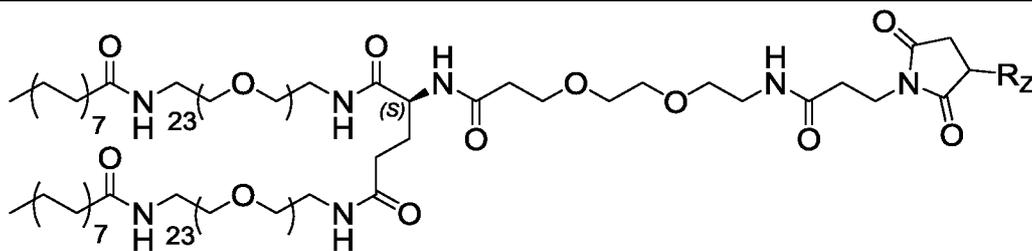
LP 60b



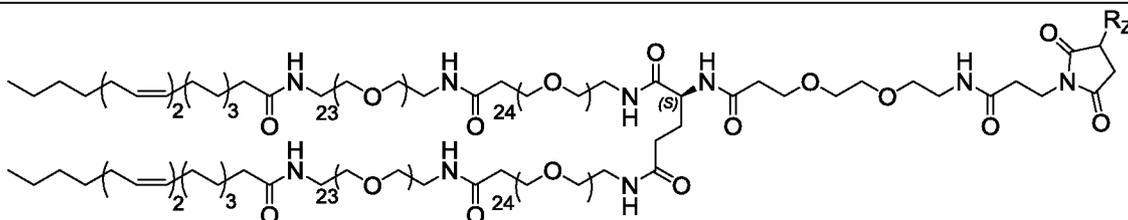
LP 62b



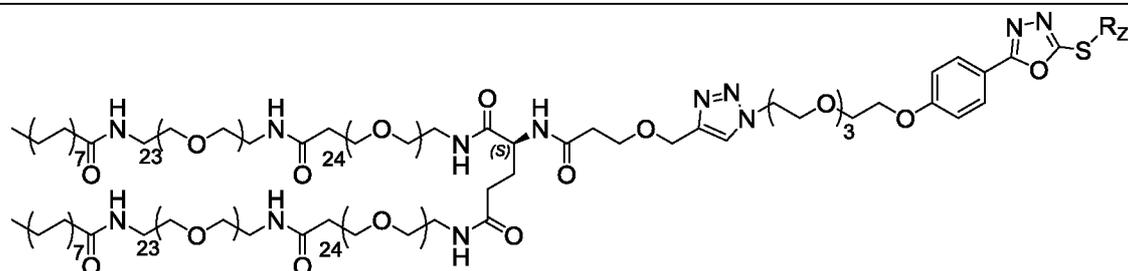
LP 101b



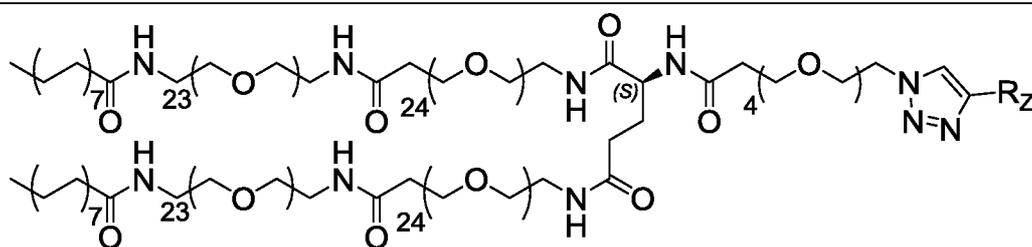
LP 104b



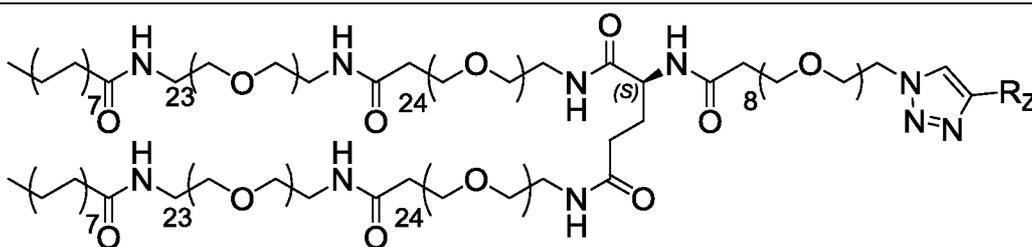
LP 106b



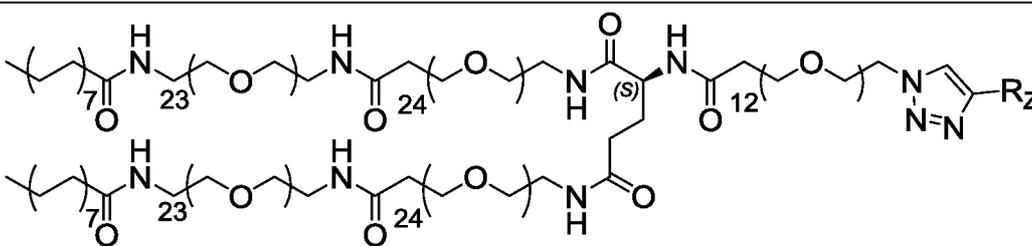
LP 107b



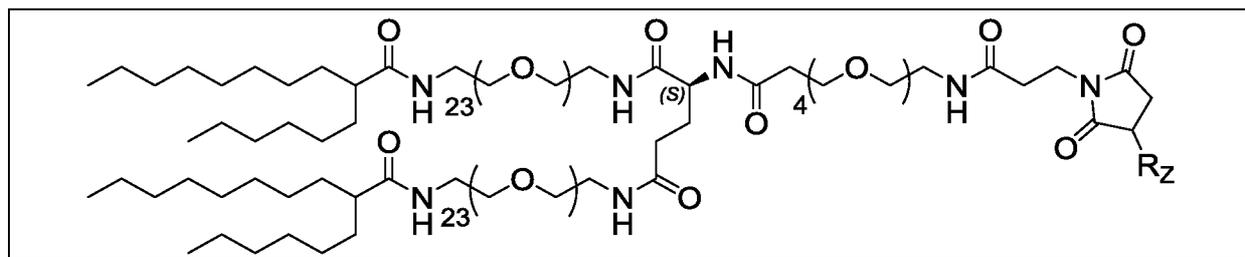
LP 108b



LP 109b



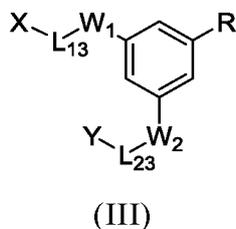
LP 111b



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

51. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 28-50, где средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

52. Соединение формулы (III):



10

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

R обозначает L_{A3} - R_Z ;

L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом;

15

R_Z включает средство на основе олигонуклеотида;

W_1 обозначает $-C(O)NR_1-$ или $-OCH_2CH_2NR_1C(O)-$, где R_1 обозначает водород или C_1 - C_6 -алкил;

W_2 обозначает $-C(O)NR_2-$ или $-OCH_2CH_2NR_2C(O)-$, где R_2 обозначает водород или C_1 - C_6 -алкил;

20

L_{13} и L_{23} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и

X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

53. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52, в котором L_{13} и L_{23} каждый независимо содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ.

5 54. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52 или п. 53, в котором L_{13} и L_{23} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

10 55. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-54, в котором L_{13} и L_{23} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ.

15 56. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-54, в котором L_{13} и L_{23} все содержат от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

20 57. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52, в котором один из L_{13} и L_{23} содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ, а другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

58. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52, в котором каждый L_{13} и L_{23} независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 1-3 | |
| Мостик 2-3 | |
| Мостик 3-3 | |

25 где p и q все независимо равны 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; и

каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y, W₁ или W₂;

при условии, что

(i) в мостике 1-3 и в мостике 3-3: $p + q \geq 5$; и

(ii) в мостике 2-3: $p \geq 5$.

5

59. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 58, в котором каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

10 60. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-59, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает ненасыщенный липид.

15 61. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-60, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает насыщенный липид.

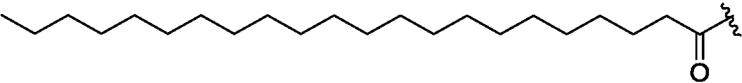
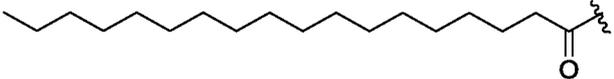
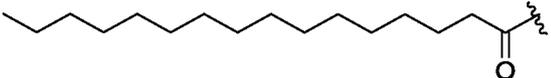
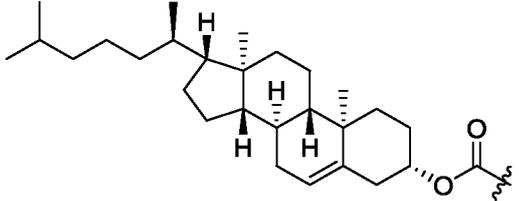
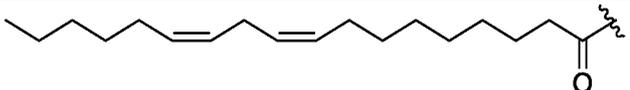
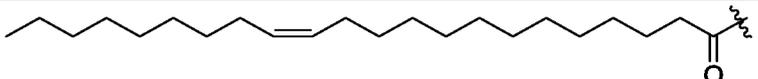
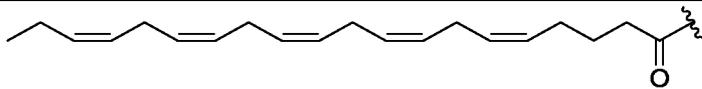
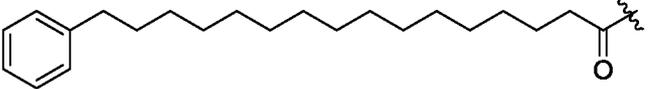
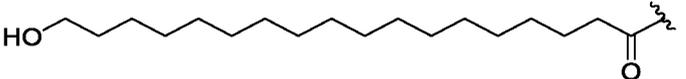
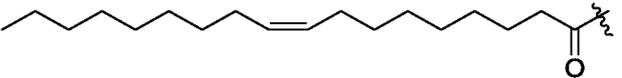
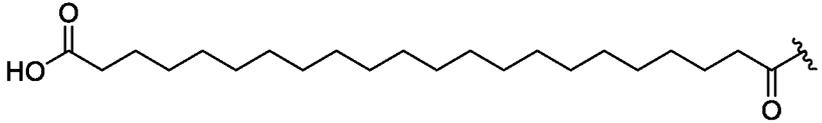
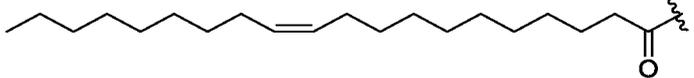
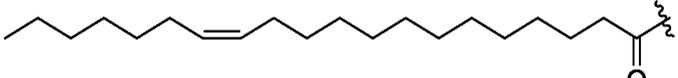
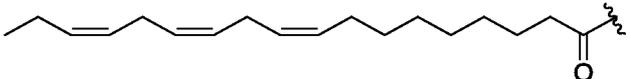
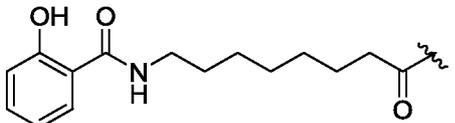
20 62. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-61, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает разветвленный липид.

25 63. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-62, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид с линейной цепью.

64. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-63, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода.

30 65. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-64, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает холестерил.

66. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-59, в котором по меньшей мере один из X или Y выбран из группы, состоящей из:

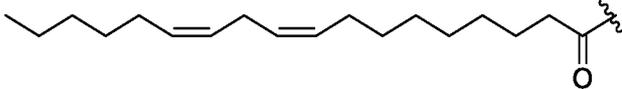
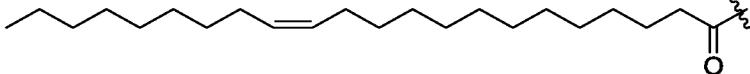
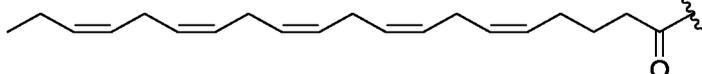
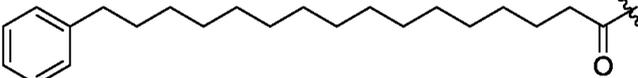
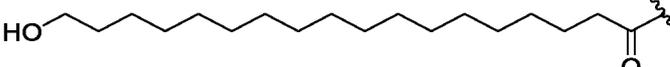
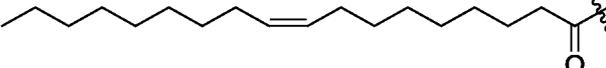
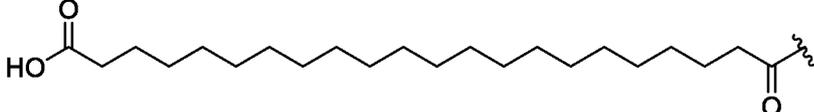
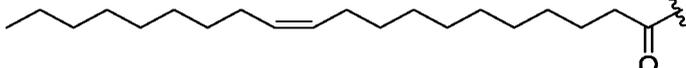
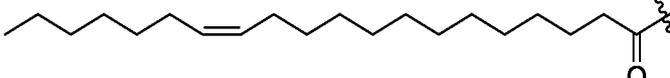
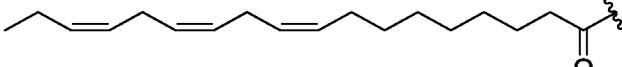
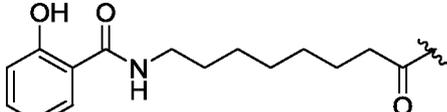
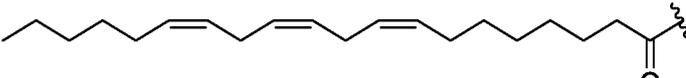
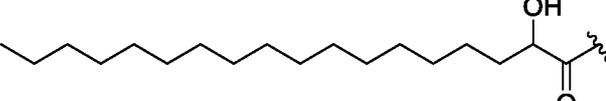
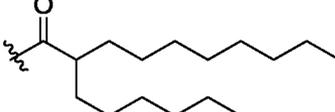
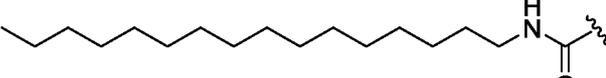
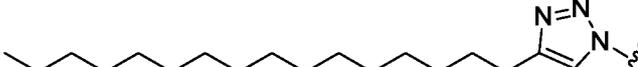
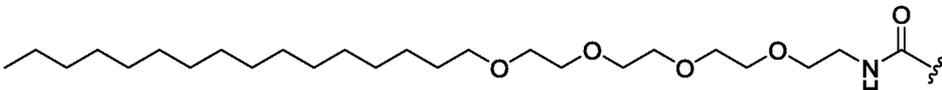
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |

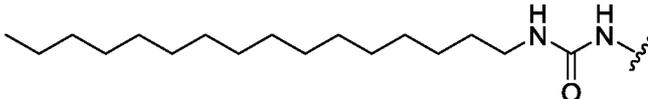
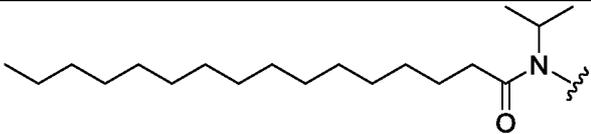
| Название | Структура |
|----------|-----------|
| Липид 17 | |
| Липид 18 | |
| Липид 19 | |
| Липид 20 | |
| Липид 21 | |
| Липид 22 | |
| Липид 23 | |
| Липид 24 | |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₃ или L₂₃.

67. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-59, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

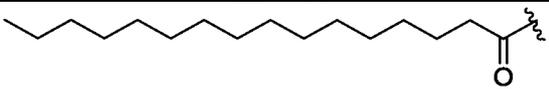
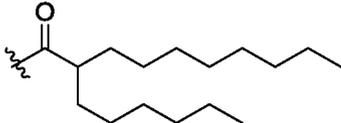
| Название | Структура |
|----------|-----------|
| Липид 1 | |
| Липид 2 | |
| Липид 3 | |
| Липид 4 | |

| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |

| Название | Структура |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

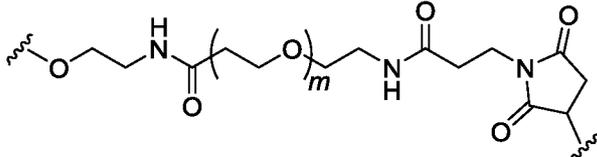
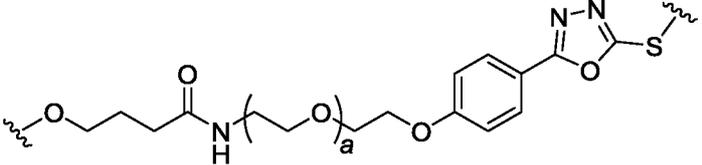
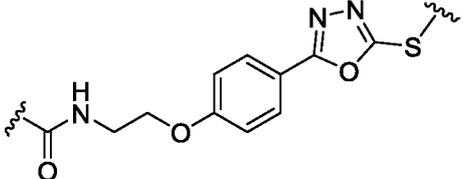
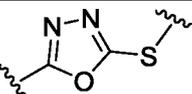
где знак  обозначает положение присоединения к L₁₃ или L₂₃.

68. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 67, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 3 |  |
| Липид 19 |  |

5 где знак  обозначает положение присоединения к L₁₃ или L₂₃.

69. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-68, в котором L_{A3} выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1-3 |  |
| Линкер 2-3 |  |
| Линкер 3-3 |  |
| Линкер 4-3 |  |

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Линкер 5-3 | |

где каждый m и a независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и

каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или фенильному кольцу в формуле (III).

70. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 69, в котором m равен 1, 2, 3, 4 или 5; и a равен 2, 3, 4 или 5.

10

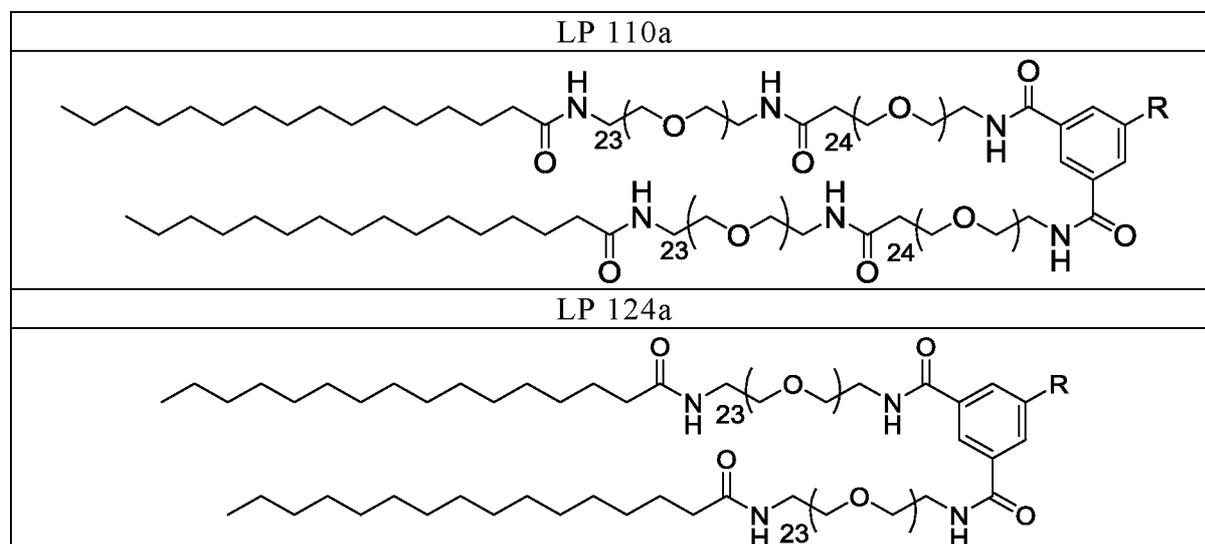
71. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-70, в котором каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил.

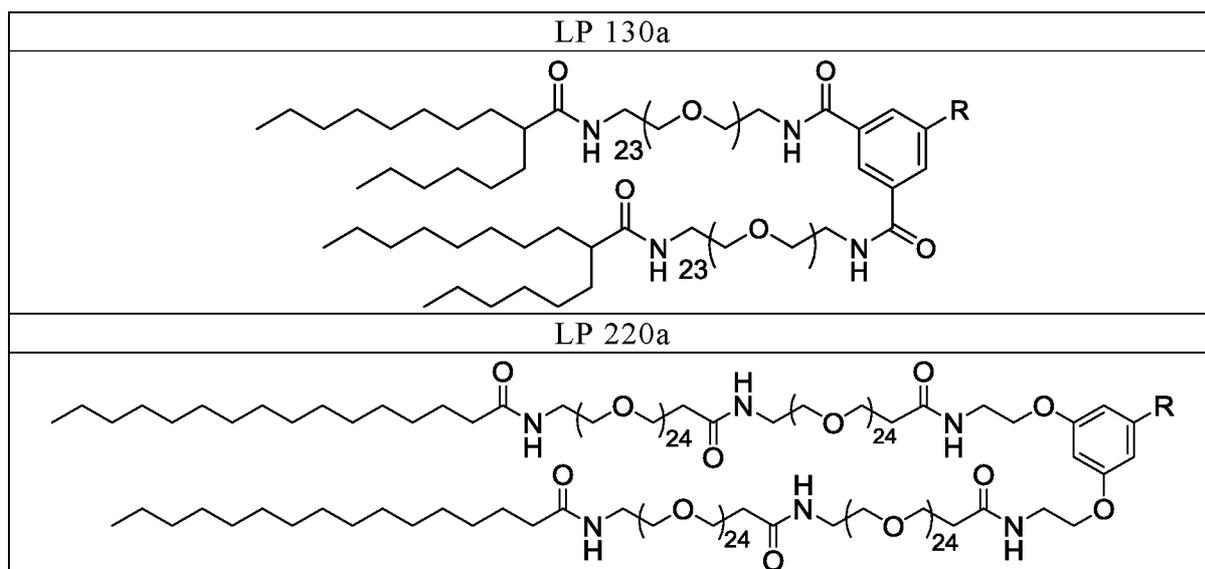
15

72. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-71, в котором каждый R^1 и R^2 обозначает водород.

73. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52, где соединение формулы (III) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

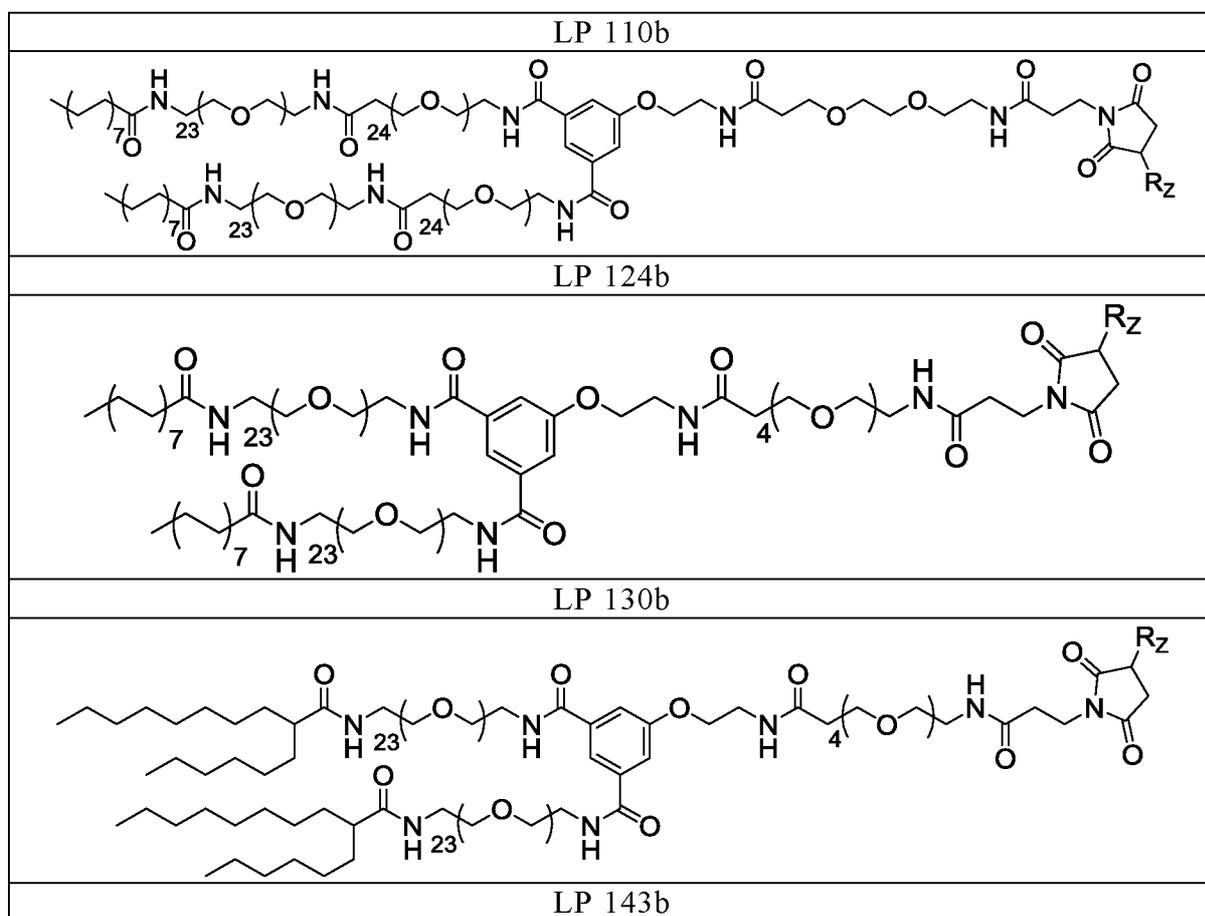
20

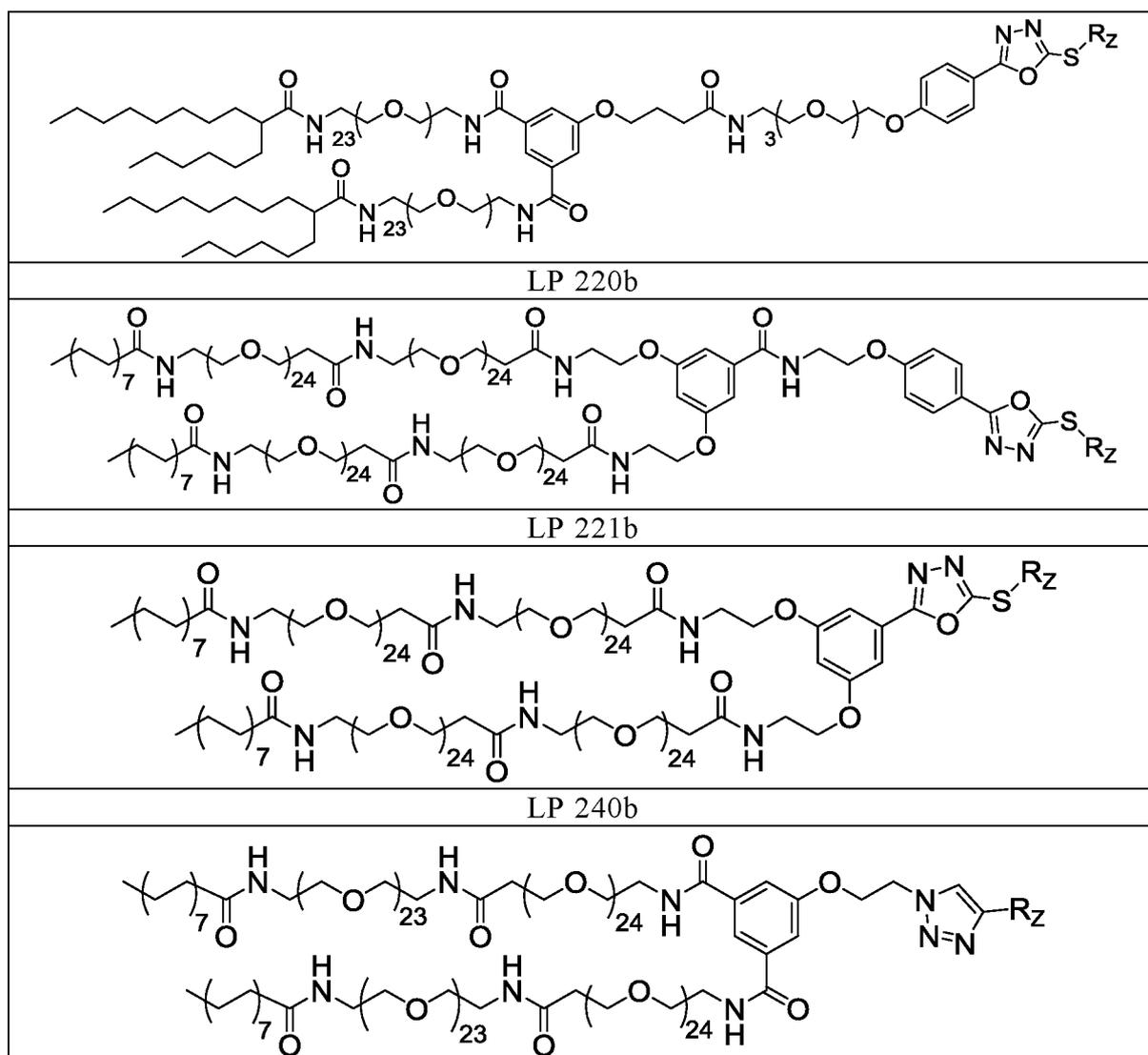




или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

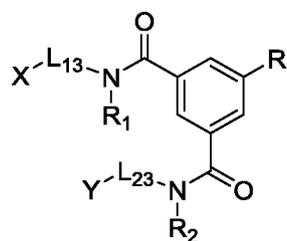
74. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52, где
 5 соединение формулы (III) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:





или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

75. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52, где соединением формулы (III) является соединение формулы (IIIa):



(IIIa)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой R обозначает $\text{L}_{A3}\text{-R}_Z$;

L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенильным кольцом;

R_Z включает средство на основе олигонуклеотида;

R_1 и R_2 каждый независимо обозначает водород или C_1 - C_6 -алкил;

5 L_{13} и L_{23} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и

X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

10 76. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 75, в котором каждый L_{13} и L_{23} независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 1-3 | |
| Мостик 2-3 | |

где p и q все независимо равны 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; и

15 каждый знак  обозначает положение присоединения к X , Y , $-NR^1$ - или $-NR^2$ -, при условии, что

(i) в мостике 1-3: $p + q \geq 5$, и

(ii) в мостике 2-3: $p \geq 5$.

20 77. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 75 или п. 76, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|----------|-----------|
| Липид 3 | |
| Липид 19 | |

где знак  обозначает положение присоединения к L_{13} или L_{23} .

78. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 75-77, в котором L_{A3} выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Линкер 1-3 | |
| Линкер 2-3 | |
| Линкер 5-3 | |

5 где каждый m и a независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и

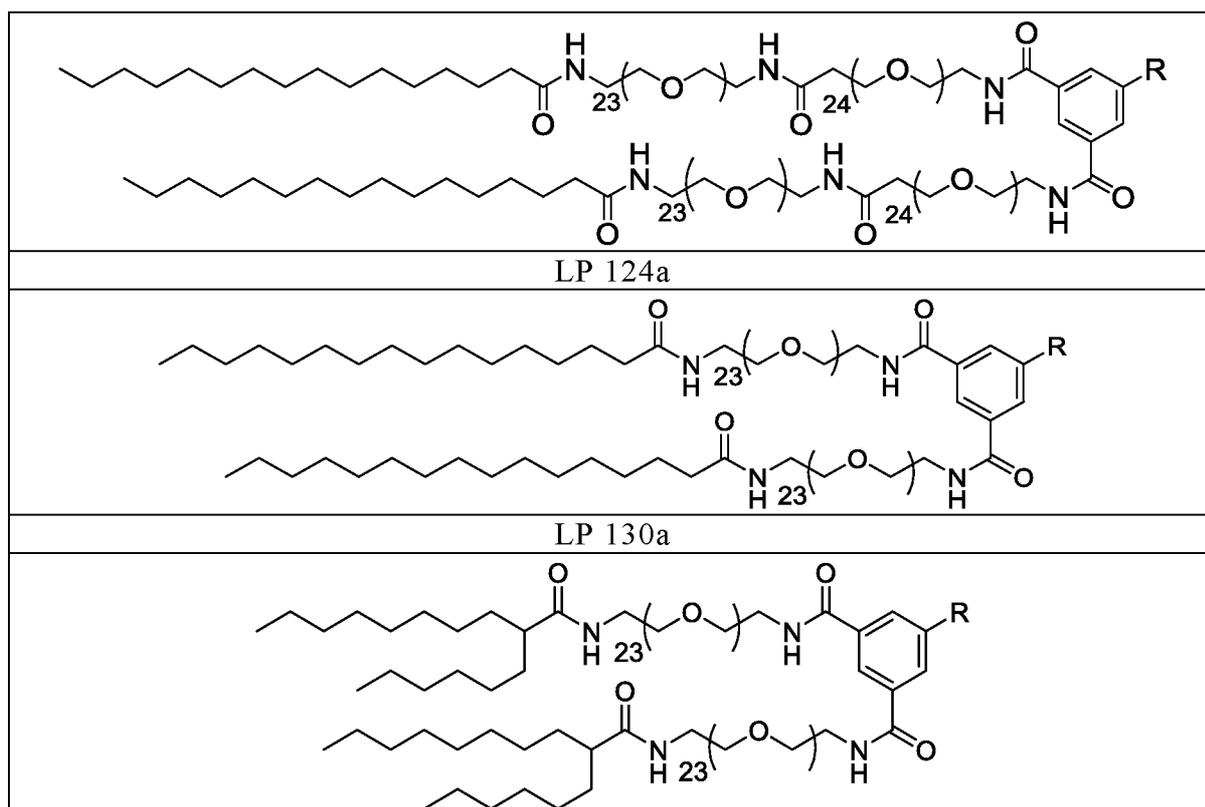
каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или фенильному кольцу в формуле (IIIa).

10 79. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 75-78, в котором каждый R^1 и R^2 независимо обозначает водород или C_1 - C_3 -алкил.

15 80. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 75-79, в котором каждый R^1 и R^2 обозначает водород.

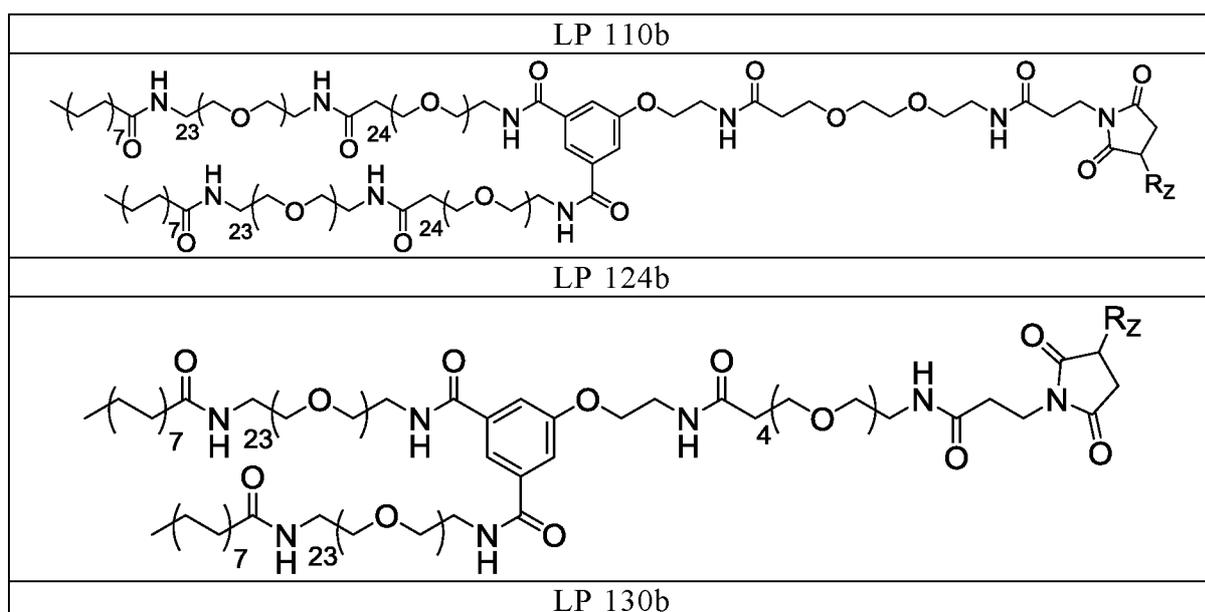
81. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 75, где соединение формулы (IIIa) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

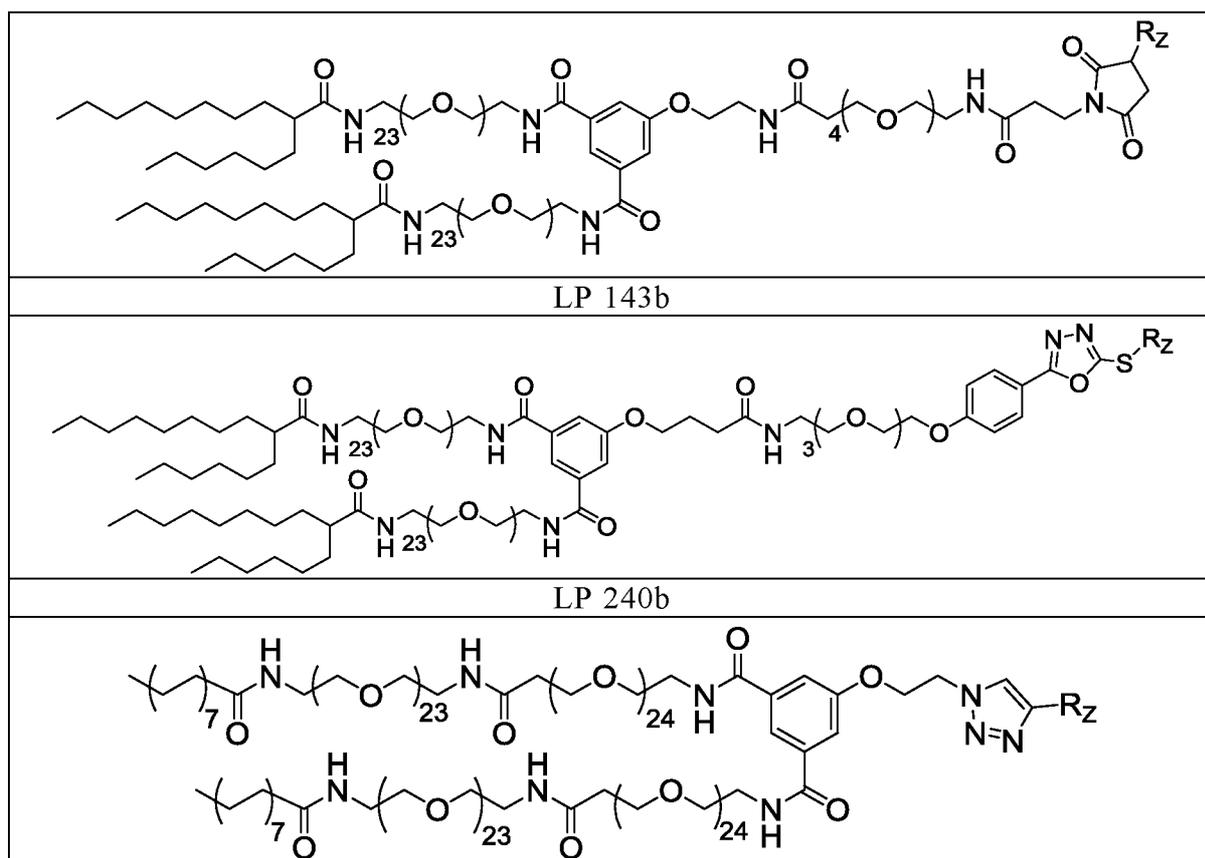
| |
|---------|
| LP 110a |
|---------|



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

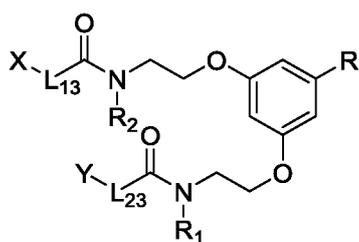
82. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 75, выбранное из группы, состоящей из следующих соединений:





или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

83. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 52, где соединением формулы (III) является соединение формулы (IIIb):



(IIIb)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

R обозначает L_{A3} -R_Z;

10 L_{A3} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с фенилом, содержащимся в формуле (IIIb);

R_Z включает средство на основе олигонуклеотида;

R₁ и R₂ все независимо выбраны из группы, включающей водород или C₁-C₆-алкил;

L_{13} и L_{23} каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и

X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

5

84. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 83, в котором каждый L_{13} и L_{23} обозначает

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 3-3 | |

10 где p и q каждый независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30; и

каждый знак обозначает положение присоединения к X, Y или -C(O)-, при условии, что в мостике 3-3: $p + q \geq 5$.

15 85. Соединение по п. 83 или п. 84, в котором каждый X и Y независимо обозначает:

| Название | Структура |
|----------|-----------|
| Липид 3 | |

где знак обозначает положение присоединения к L_{13} или L_{23} .

20 86. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 83-85, в котором L_{A3} выбран из группы, состоящей из:

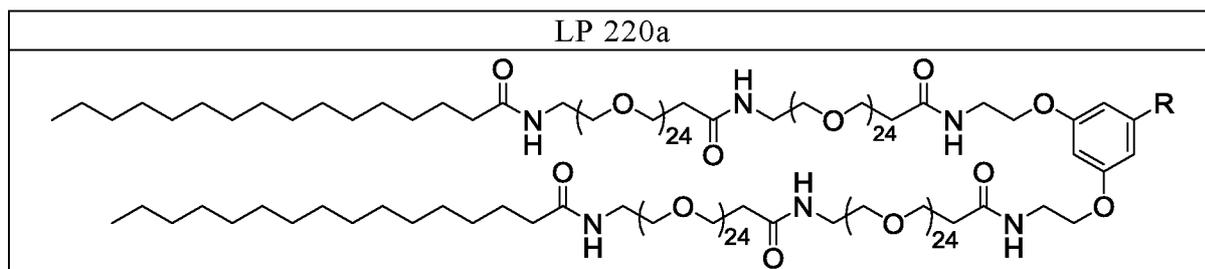
| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Линкер 3-3 | |
| Линкер 4-3 | |

где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или фенильному кольцу в формуле (IIIb).

5 87. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 83-86, в котором каждый R¹ и R² независимо обозначает водород или C₁-C₃-алкил.

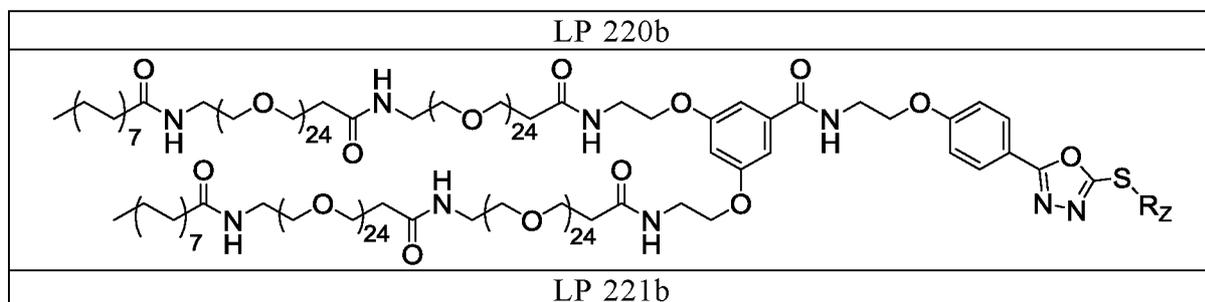
10 88. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 83-87, в котором каждый R¹ и R² обозначает водород.

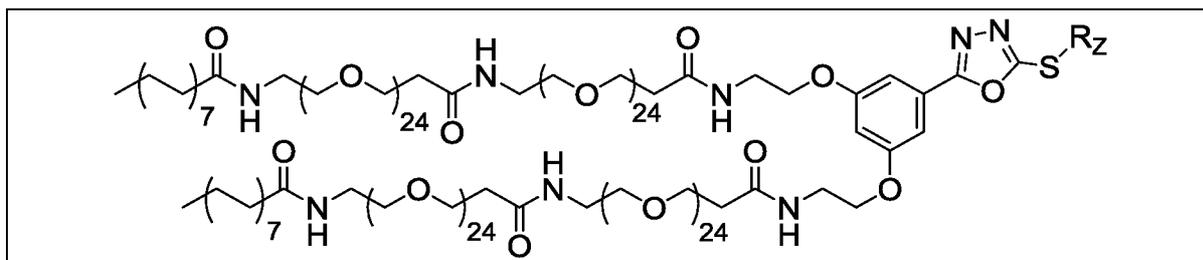
89. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 83, где соединение формулы (IIIb) выбрано из группы, состоящей из:



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

15 90. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 83, где соединение формулы (IIIb) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

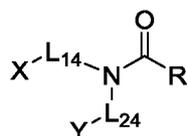




или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

91. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 52-90, в котором средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

92. Соединение формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

R обозначает L_{A4}-R_Z;

L_{A4} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с -C(O)-;

R_Z включает средство на основе олигонуклеотида;

L₁₄ и L₂₄ каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и

X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

93. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 92, в котором L₁₄ и L₂₄ каждый содержит от примерно 15 до примерно 100 звеньев ПЭГ.

94. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 92 или п. 93, в котором L₁₄ и L₂₄ каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

95. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-94, в котором L_{14} и L_{24} каждый независимо содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ.

5 96. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-94, в котором L_{14} и L_{24} каждый независимо содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

10 97. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 92, в которой один из L_{14} и L_{24} содержит от примерно 20 до примерно 30 звеньев ПЭГ и другой содержит от примерно 40 до примерно 60 звеньев ПЭГ.

98. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 92, в котором каждый L_{14} и L_{24} независимо выбран из группы, состоящей из:

| Название | Структура |
|------------|-----------|
| Мостик 1-4 | |
| Мостик 2-4 | |
| Мостик 3-4 | |
| Мостик 4-4 | |
| Мостик 5-4 | |

15 где каждый p независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30;

каждый q независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30;

20 каждый r независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

каждый знак  обозначает положение присоединения к X, Y или -N-C(O)- формулы (IV); при условии, что

(i) в мостике 1-4, мостике 2-4 и мостике 4-4: $p + q + r \geq 5$; и

(ii) в мостике 3-4: $p + q \geq 5$.

5

99. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 98, в котором каждый p независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

каждый q независимо равен 20, 21, 22, 23, 24 или 25; и

каждый r независимо равен 2, 3, 4, 5 или 6.

10

100. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-99, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает ненасыщенный липид.

15

101. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-100, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает насыщенный липид.

20

102. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-101, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает разветвленный липид.

25

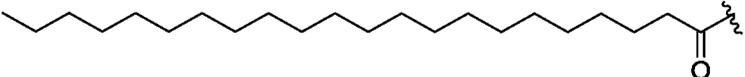
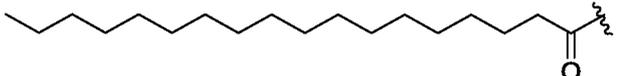
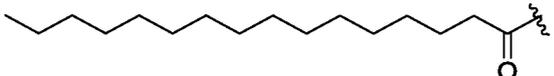
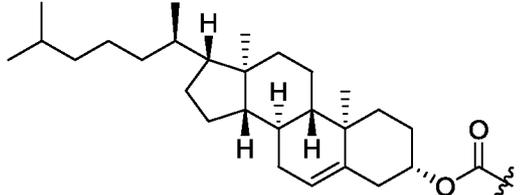
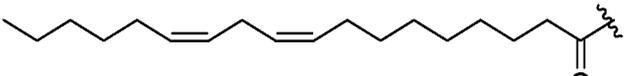
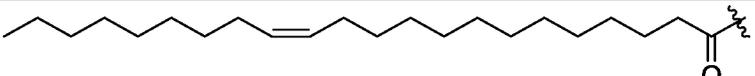
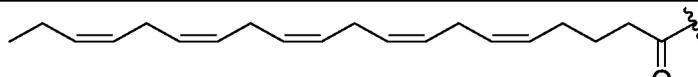
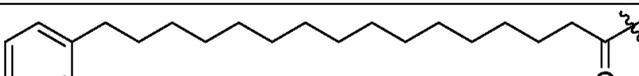
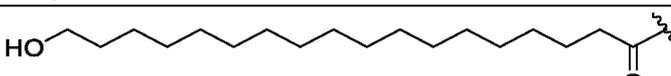
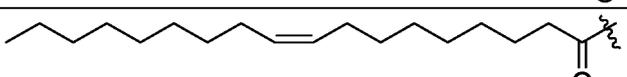
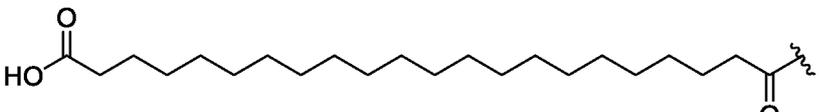
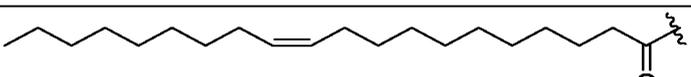
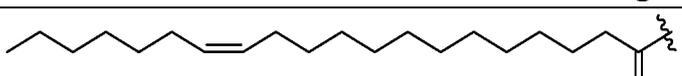
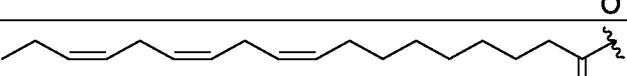
103. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-102, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид с линейной цепью.

30

104. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-103, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает липид, содержащий от примерно 10 до примерно 25 атомов углерода.

105. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-104, в котором по меньшей мере один из X или Y обозначает холестерил.

106. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-99, в котором по меньшей мере один из X или Y выбран из группы, состоящей из:

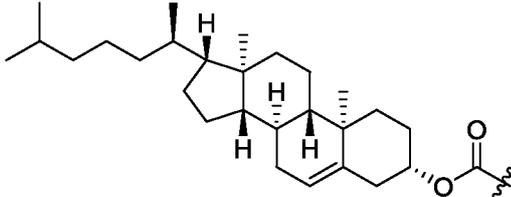
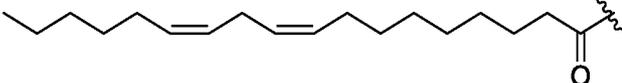
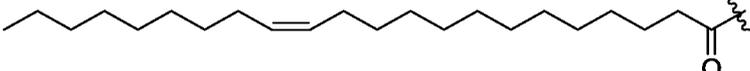
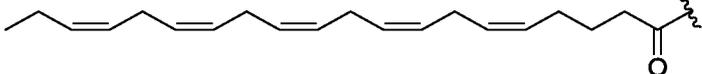
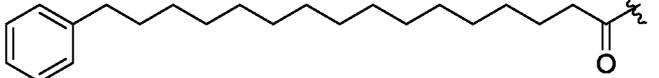
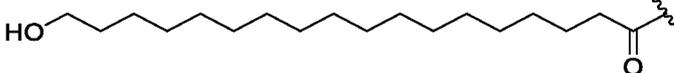
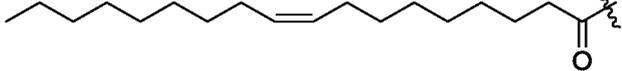
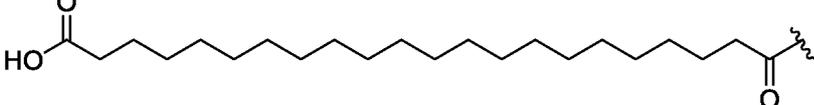
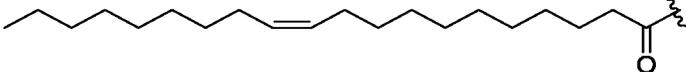
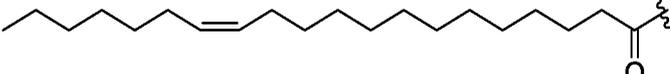
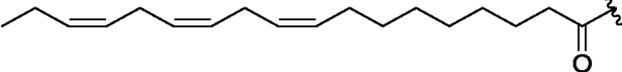
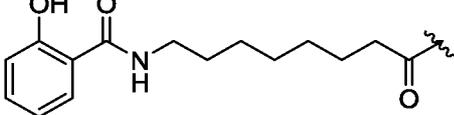
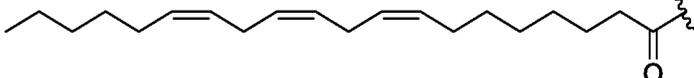
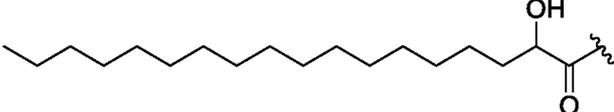
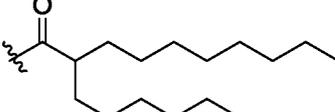
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |

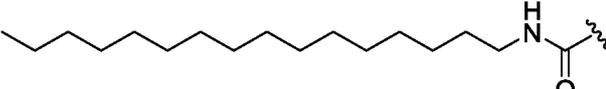
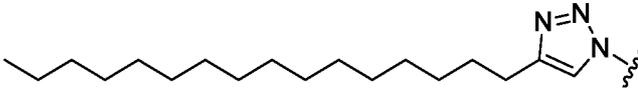
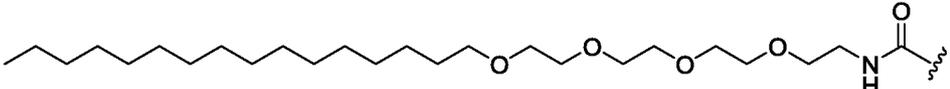
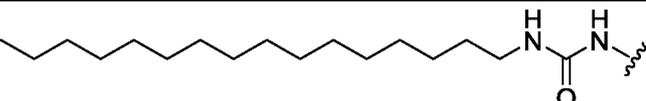
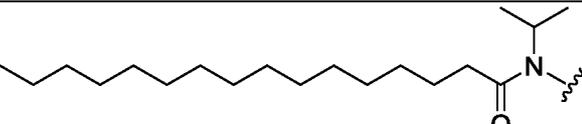
| Название | Структура |
|----------|-----------|
| Липид 16 | |
| Липид 17 | |
| Липид 18 | |
| Липид 19 | |
| Липид 20 | |
| Липид 21 | |
| Липид 22 | |
| Липид 23 | |
| Липид 24 | |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₄ или L₂₄.

107. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-99, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

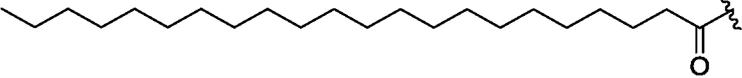
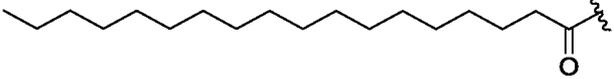
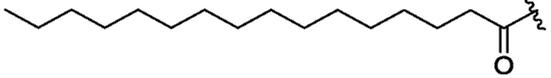
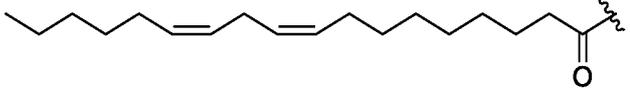
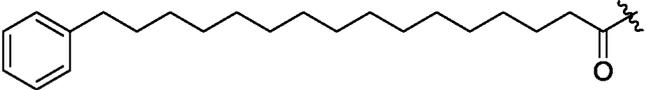
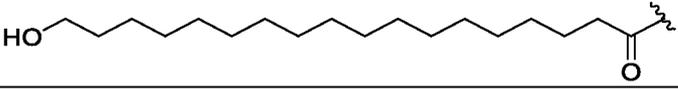
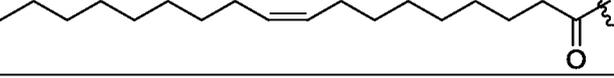
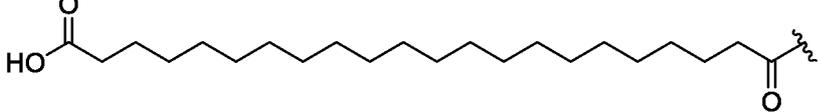
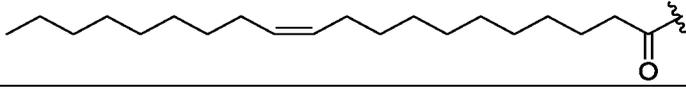
| Название | Структура |
|----------|-----------|
| Липид 1 | |
| Липид 2 | |
| Липид 3 | |

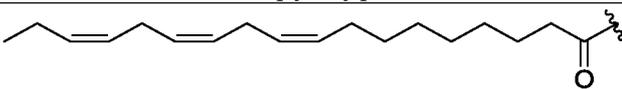
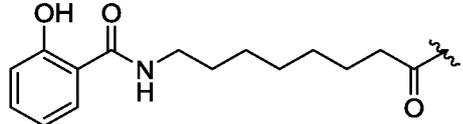
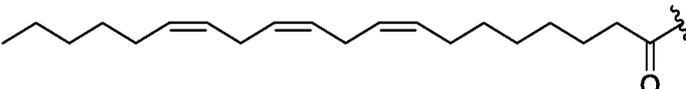
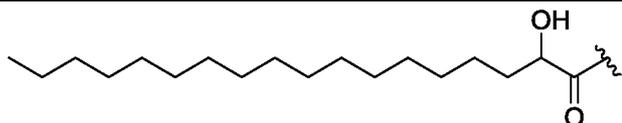
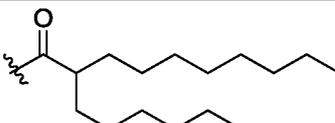
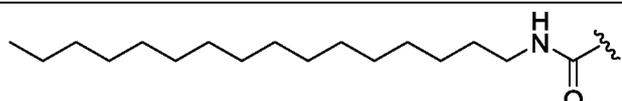
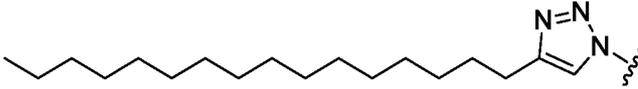
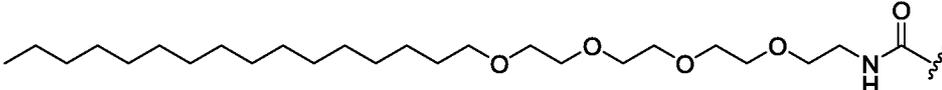
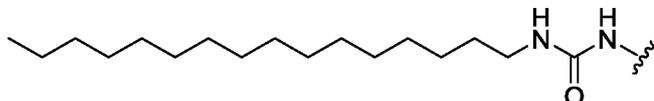
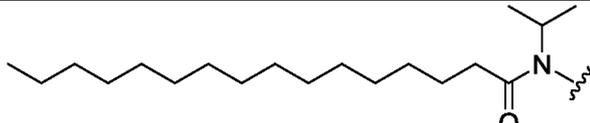
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 4 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 6 |  |
| Липид 7 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |
| Липид 14 |  |
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |

| Название | Структура |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₄ или L₂₄.

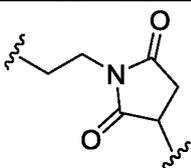
108. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 107, в котором каждый X и Y независимо выбран из группы, состоящей из:

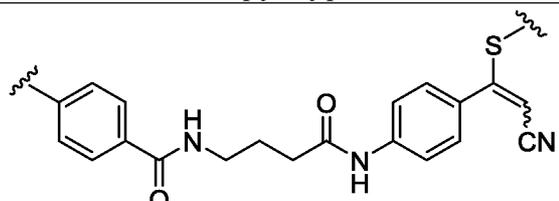
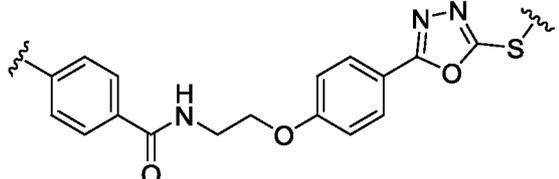
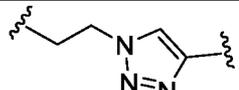
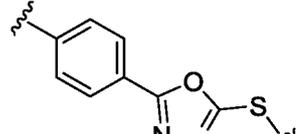
| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 1 |  |
| Липид 2 |  |
| Липид 3 |  |
| Липид 5 |  |
| Липид 8 |  |
| Липид 9 |  |
| Липид 10 |  |
| Липид 11 |  |
| Липид 12 |  |

| Название | Структура |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Липид 15 |  |
| Липид 16 |  |
| Липид 17 |  |
| Липид 18 |  |
| Липид 19 |  |
| Липид 20 |  |
| Липид 21 |  |
| Липид 22 |  |
| Липид 23 |  |
| Липид 24 |  |

где знак  обозначает положение присоединения к L₁₄ или L₂₄.

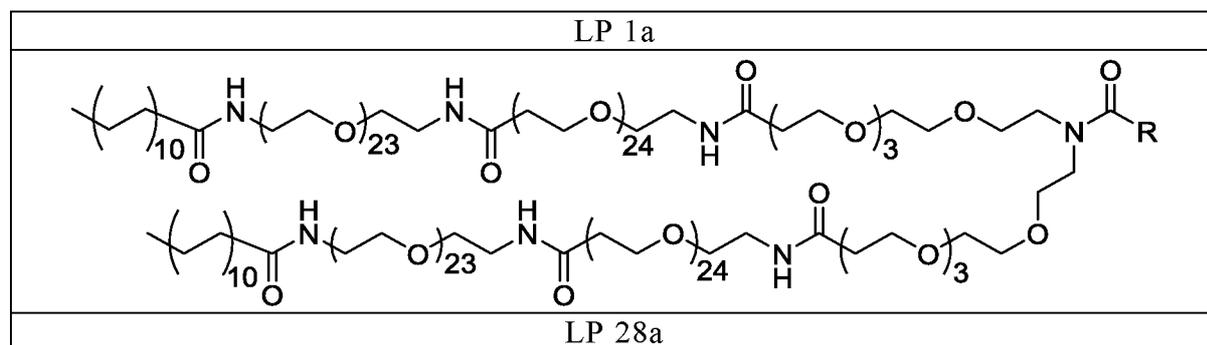
109. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-109, в котором L_{A4} выбран из группы, состоящей из:

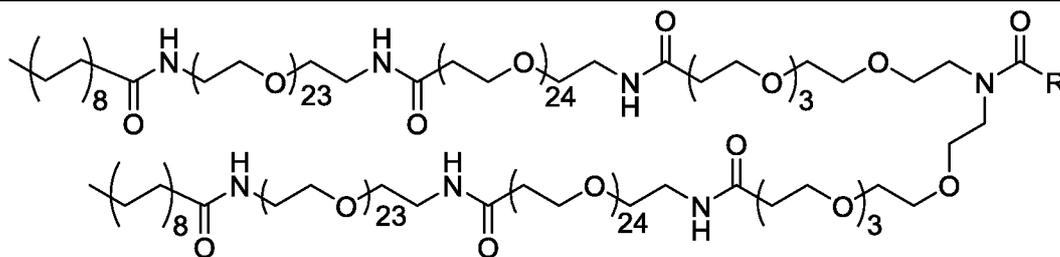
| Название | Структура |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1-4 |  |

| Название | Структура |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 2-4 |  |
| Линкер 3-4 |  |
| Линкер 4-4 |  |
| Линкер 5-4 |  |
| Линкер 6-4 |  |

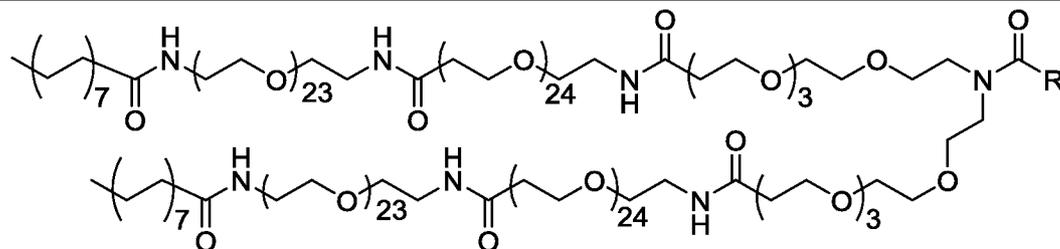
где каждый знак  обозначает положение присоединения к R_Z или -C(O)- в формуле (IV).

110. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 92, где
5 соединение формулы (IV) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

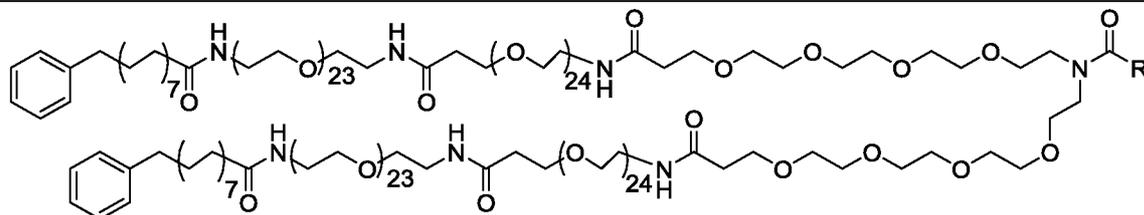




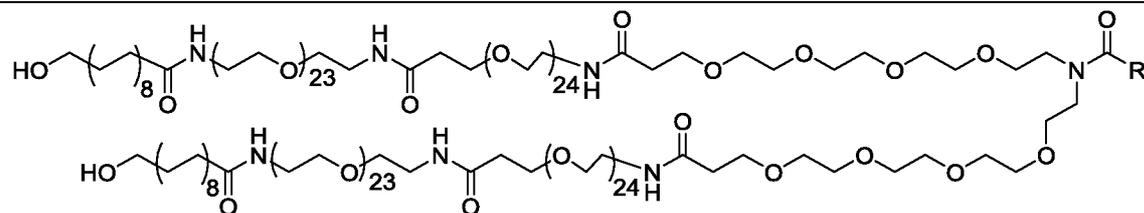
LP 29a



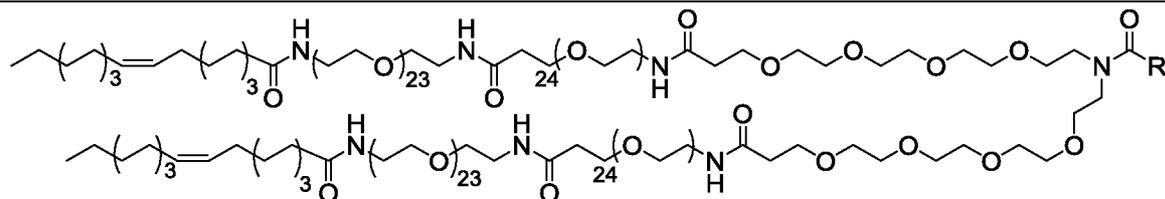
LP 48a



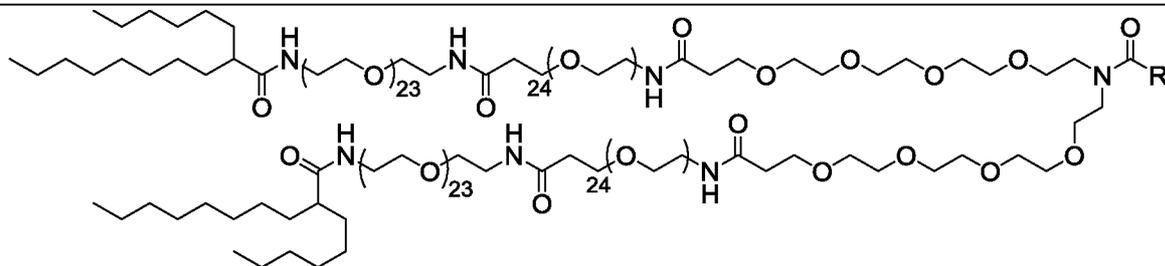
LP 49a



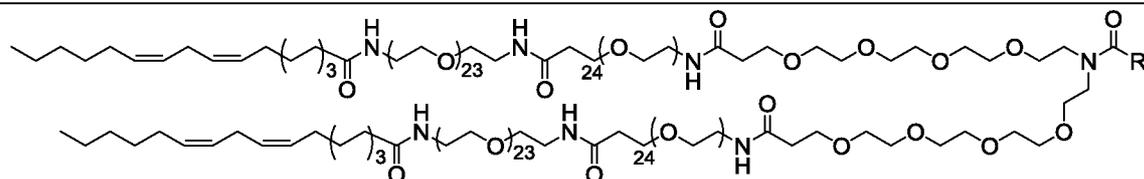
LP 56a



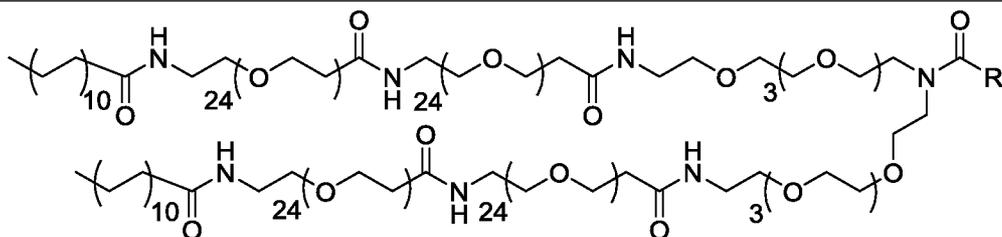
LP 61a



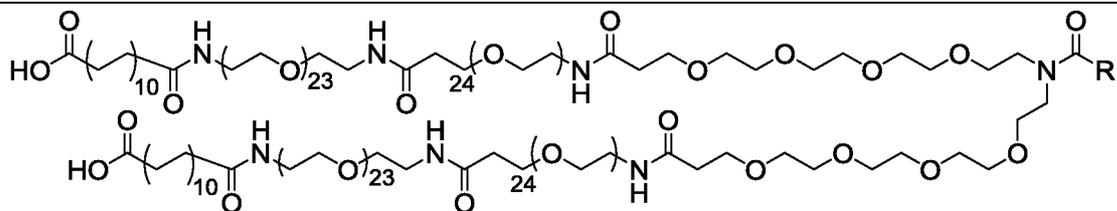
LP 87a



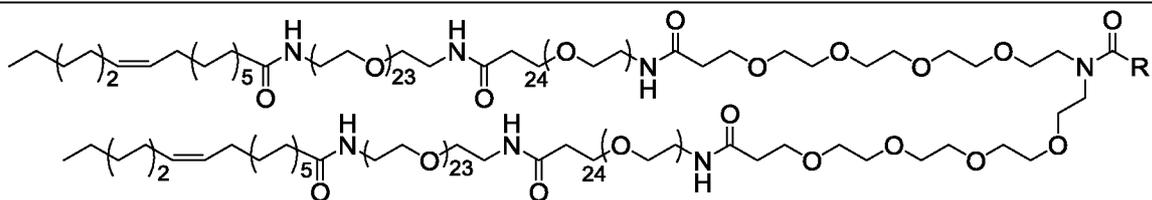
LP 89a



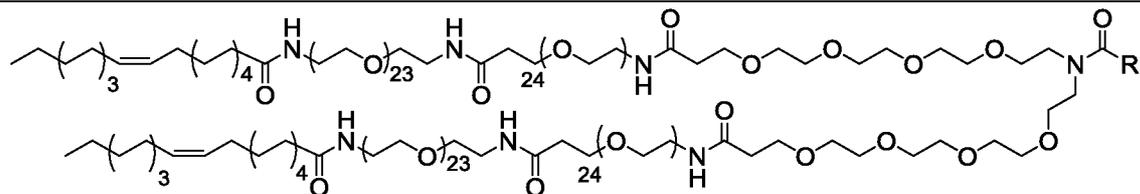
LP 90a



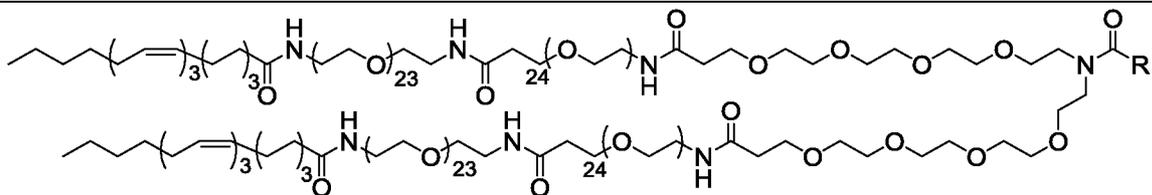
LP 92a



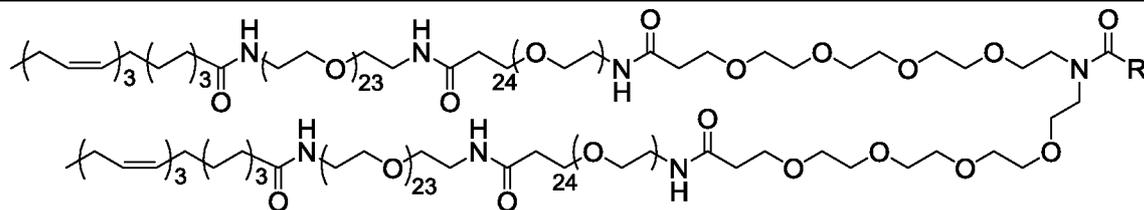
LP 93a



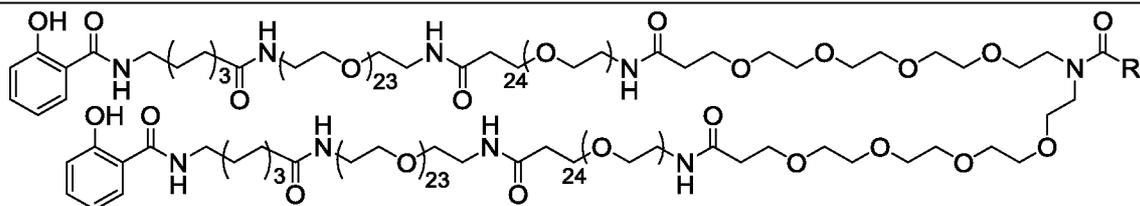
LP 94a



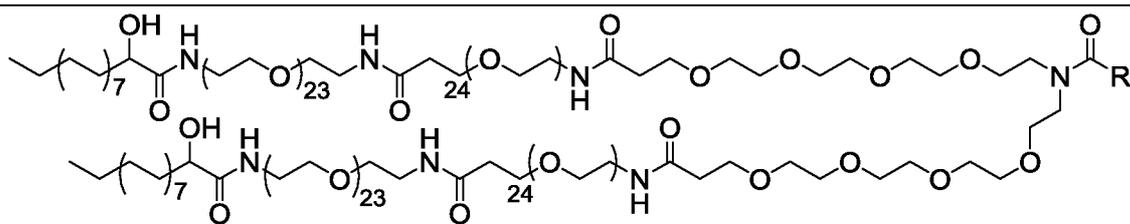
LP 95a



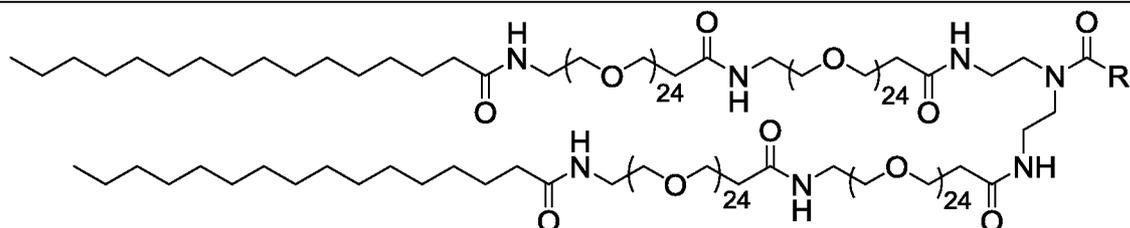
LP 102a



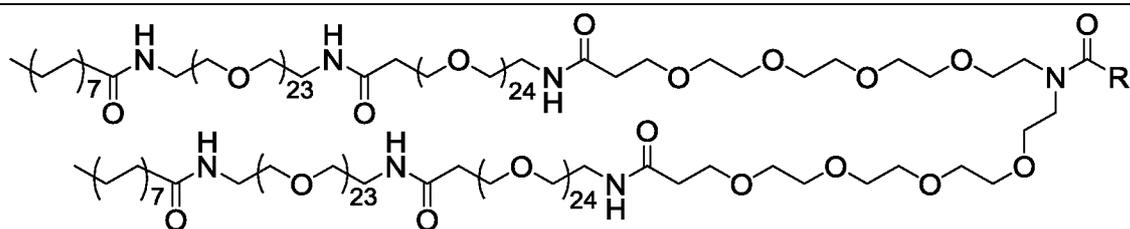
LP 103a



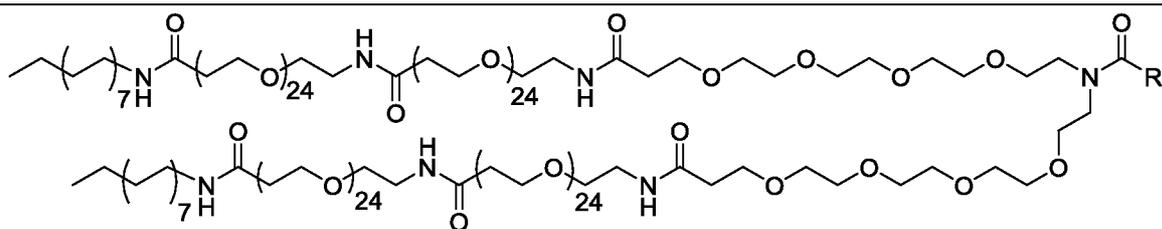
LP 223a



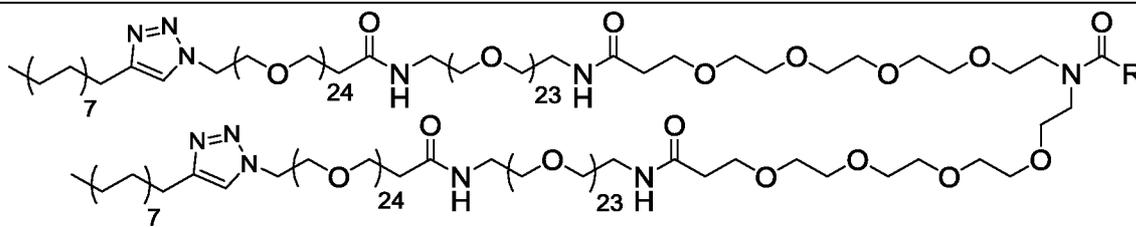
LP 225a



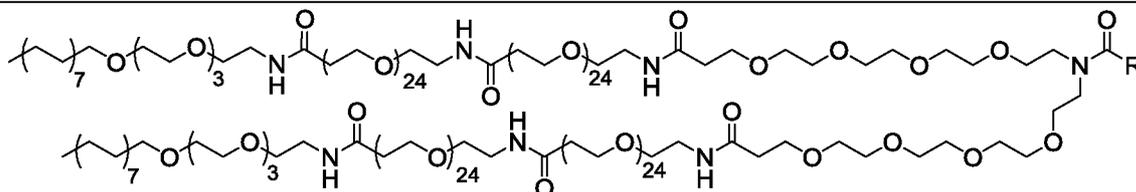
LP 246a



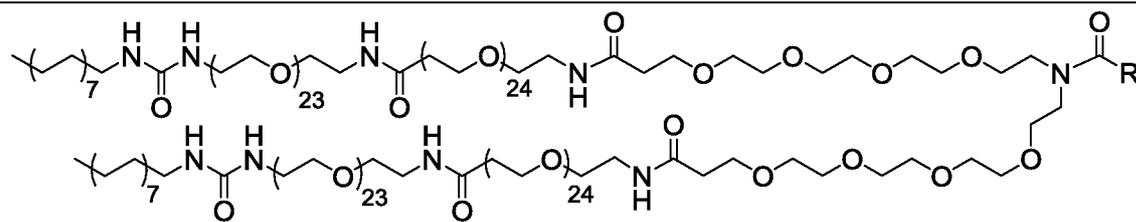
LP 339a



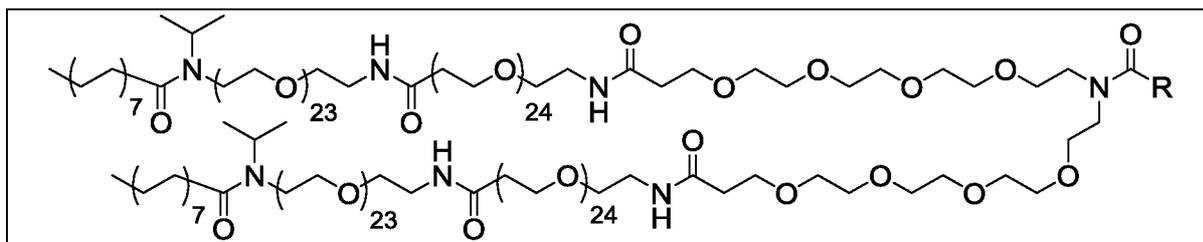
LP 340a



LP 357a

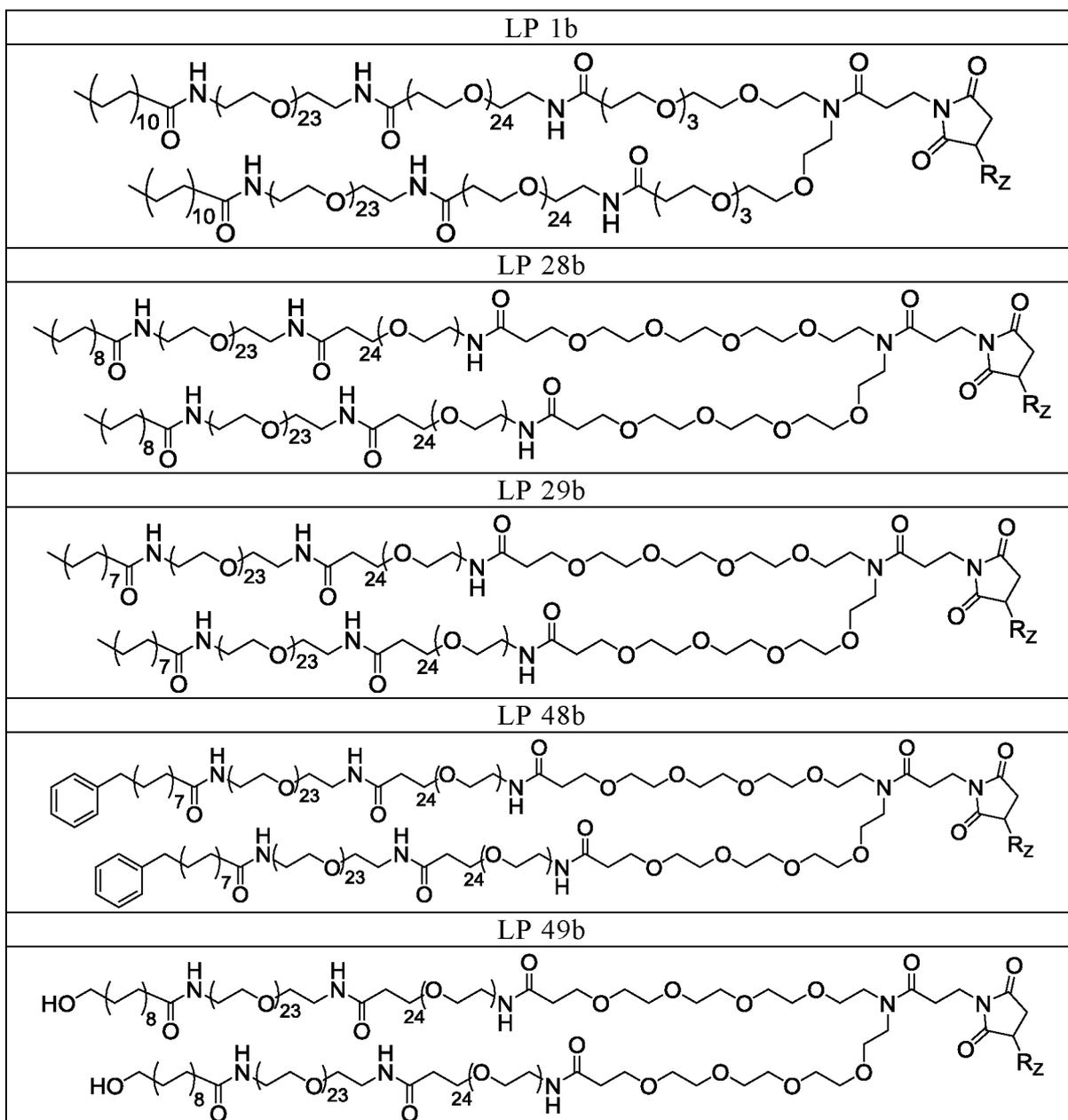


LP 358a

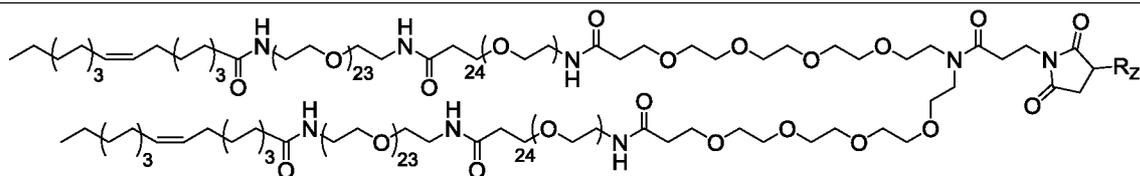


или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

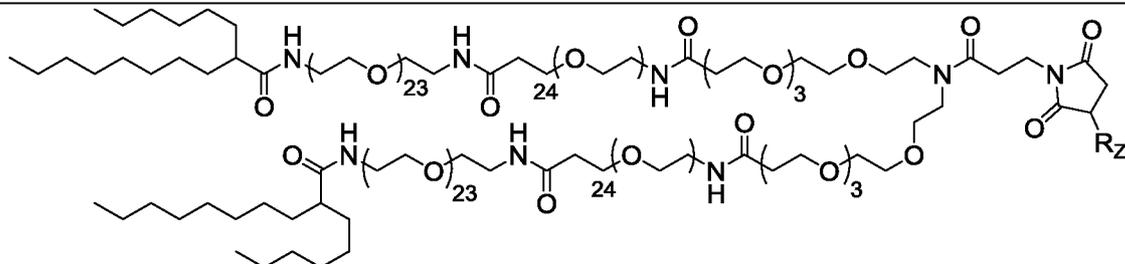
111. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 92, где
5 соединение формулы (IV) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:



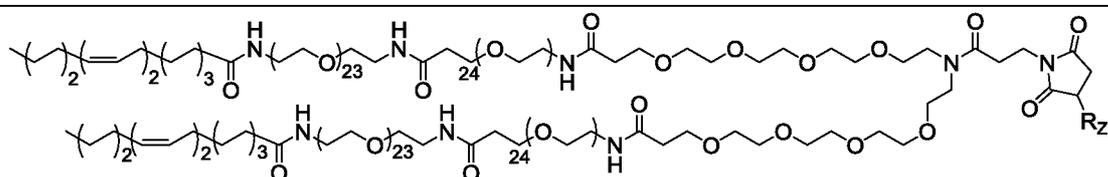
LP 56b



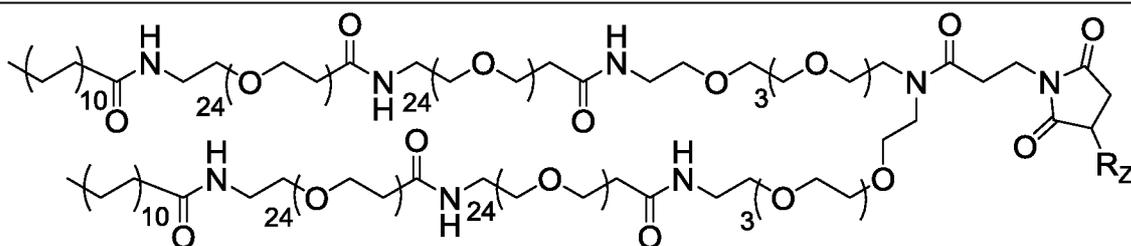
LP 61b



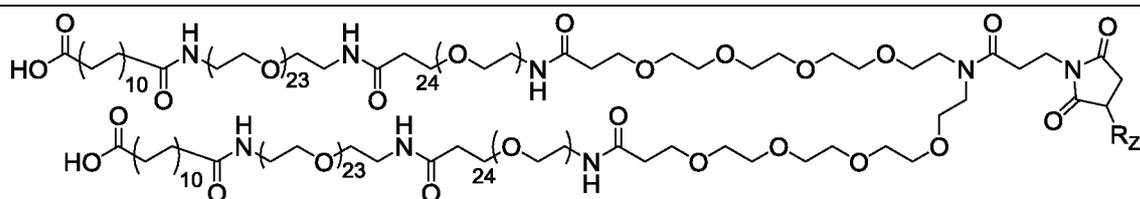
LP 87b



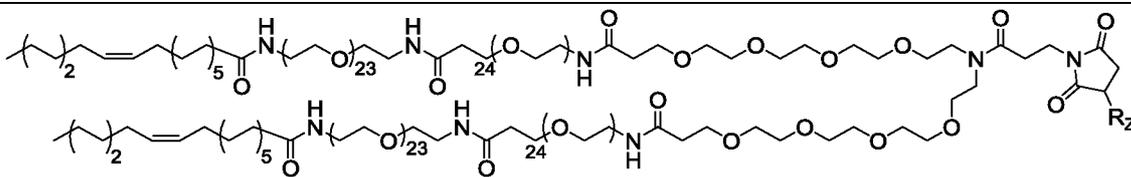
LP 89b



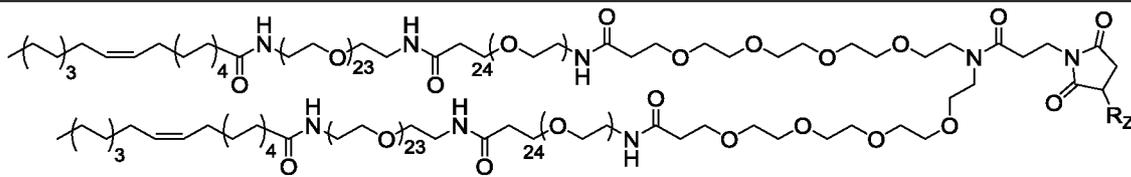
LP 90b



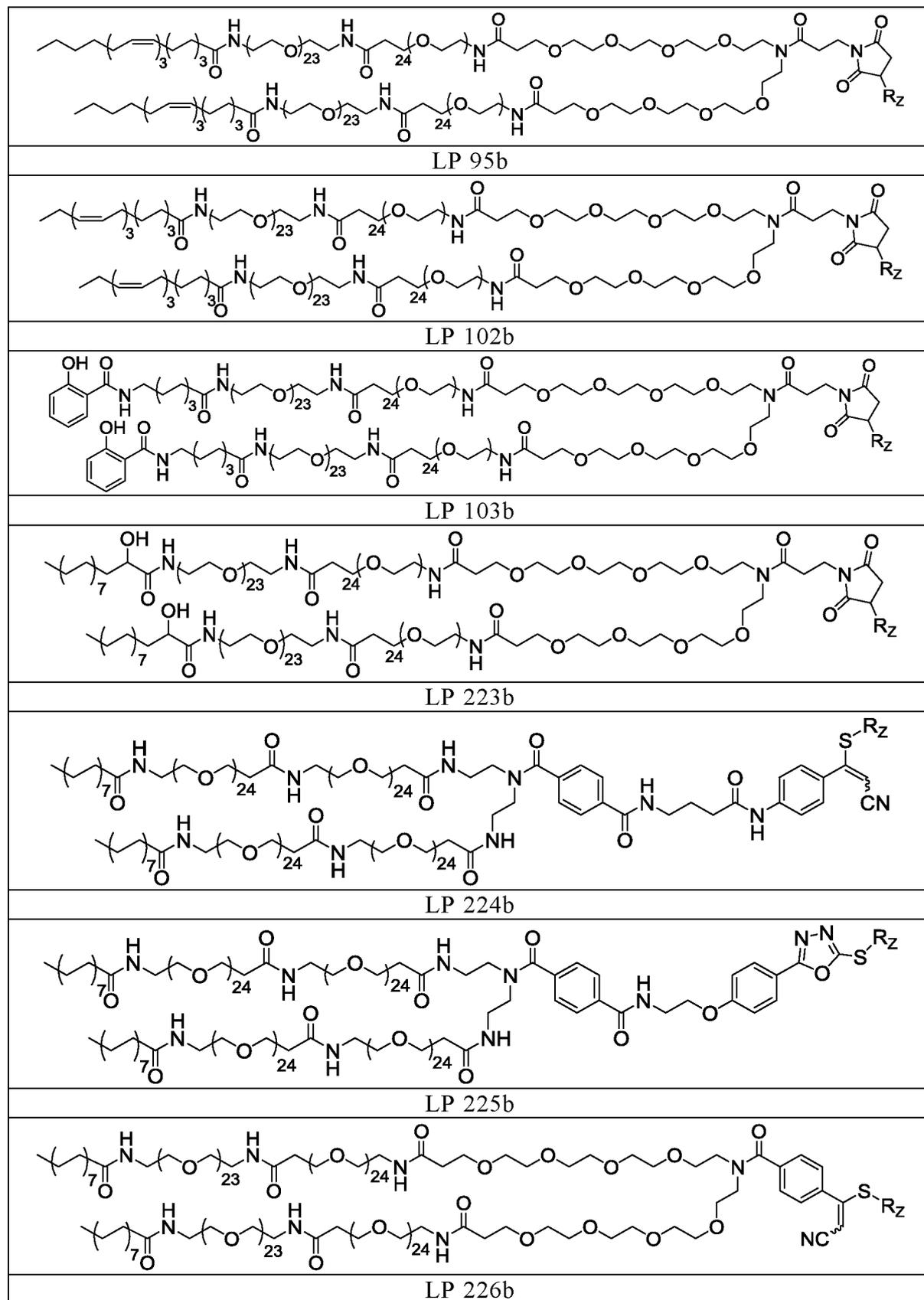
LP 92b

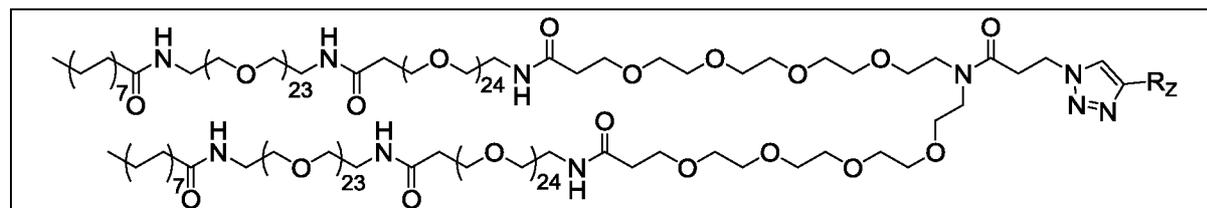


LP 93b

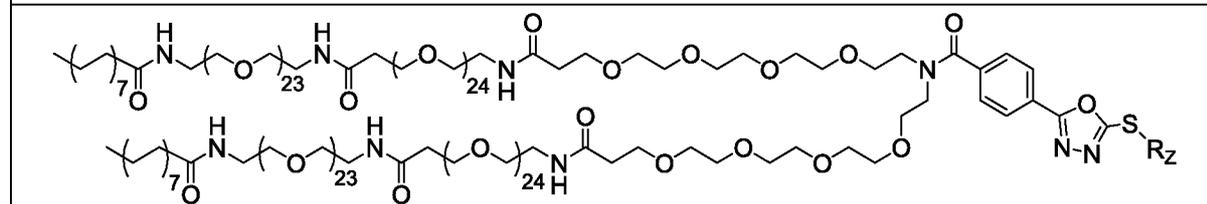


LP 94b

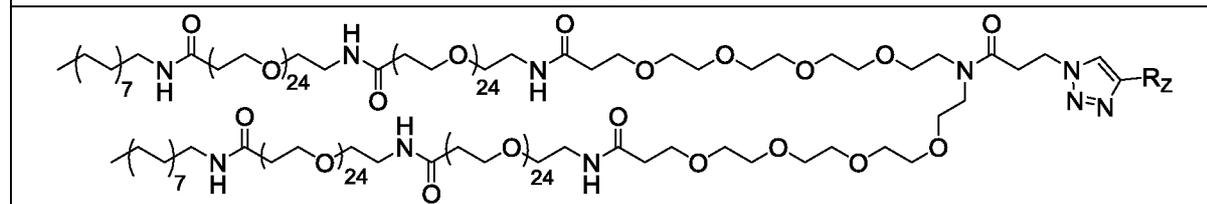




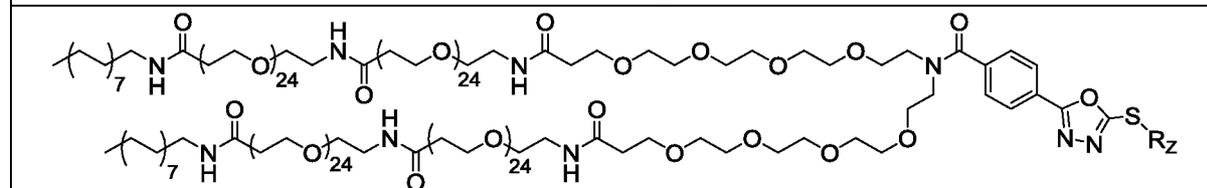
LP 238b



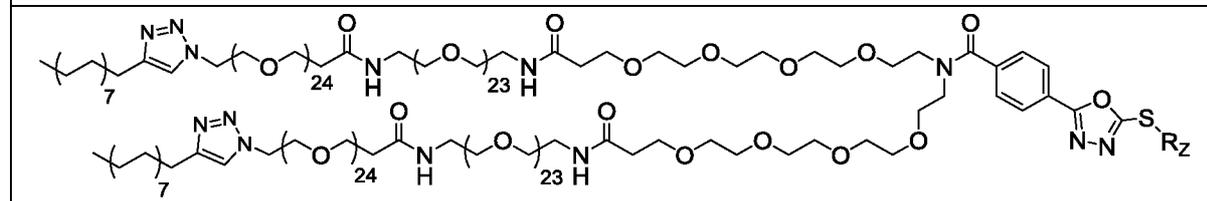
LP 246b



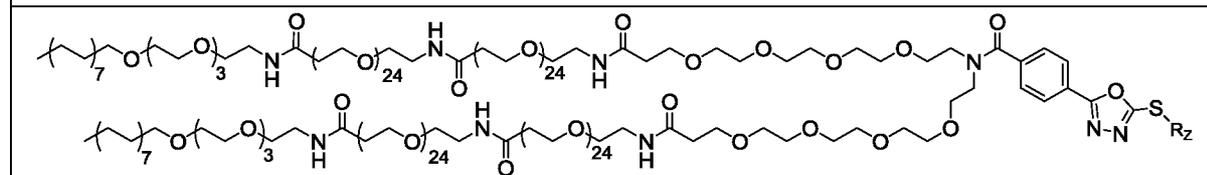
LP 247b



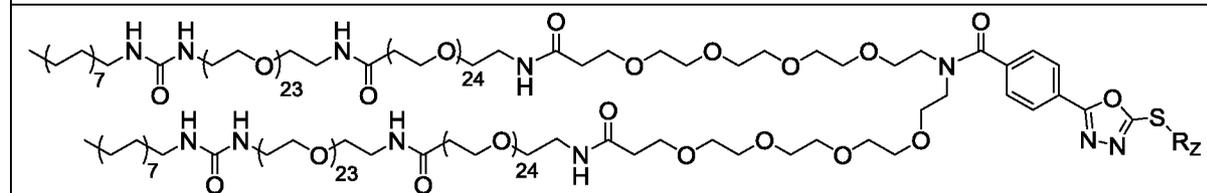
LP 339b



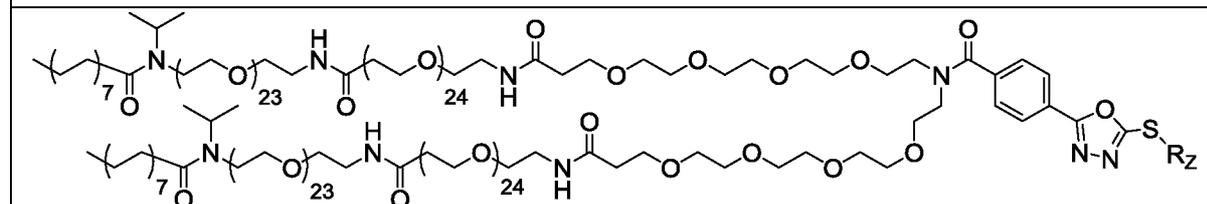
LP 340b



LP 357b



LP 358b



или фармацевтически приемлемая соль любого из этих соединений.

5 112. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 92-111, в котором средством на основе олигонуклеотида является средство на основе РНКи.

10 113. Способ уменьшения экспрессии целевого гена *in vivo*, включающий введение в клетку соединения или фармацевтически приемлемой соли по любому из п.п. 1-112, где соединение включает средство на основе РНКи по меньшей мере в основном комплементарно к целевому гену.

114. Способ по п. 113, где клеткой является клетка скелетной мышцы.

15 115. Способ по п. 113, где клеткой является адипоцит.

116. Способ по любому из п.п. 113-115, где клетка находится внутри субъекта.

20 117. Способ по п. 116, где у субъекта диагностировано заболевание или нарушение, которое лечат, предупреждают или облегчают его протекание путем уменьшения экспрессии целевого гена.

25 118. Способ по п. 117, где заболеванием или нарушением является мышечная дистрофия.

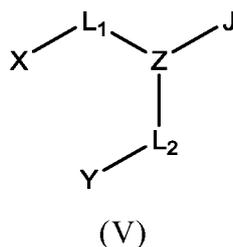
30 119. Способ по п. 118, где мышечная дистрофия выбрана из мышечной дистрофии Дюшенна, миотонической мышечной дистрофии, мышечной дистрофии Беккера, конечностно-поясной мышечной дистрофии, плече-лопаточно-лицевой дистрофии, наследственной мышечной дистрофии, окулофаренгиальной мышечной дистрофии, дистальной мышечной дистрофии и мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса.

120. Применение соединения по любому из п.п. 1-112 для лечения, предупреждения или облегчения протекания заболевания или нарушения.

5 121. Применение по п. 120, где заболеванием или нарушением является мышечная дистрофия.

10 122. Применение по п. 121, где мышечная дистрофия выбрана из мышечной дистрофии Дюшенна, миотонической мышечной дистрофии, мышечной дистрофии Беккера, конечностно-поясной мышечной дистрофии, плече-лопаточно-лицевой дистрофии, наследственной мышечной дистрофии, окулофаренгиальной мышечной дистрофии, дистальной мышечной дистрофии и мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса.

123. Соединение формулы (V):



или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

J обозначает $L_{A5}-R_X$;

L_{A5} обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_X с Z;

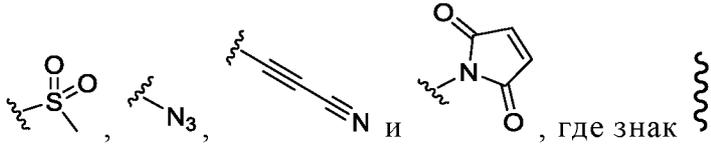
20 R_X обозначает реакционноспособный фрагмент для конъюгирования со средством на основе олигонуклеотида;

Z обозначает СН, фенил или N;

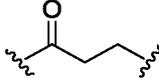
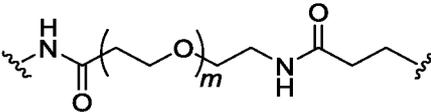
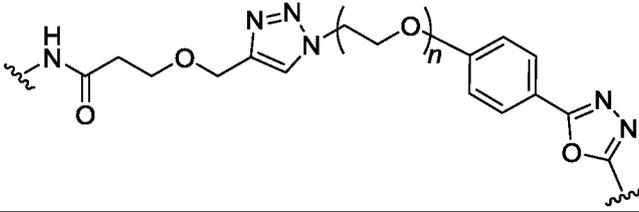
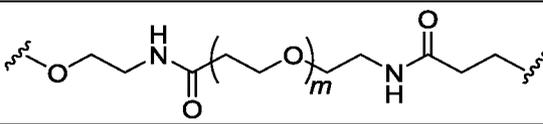
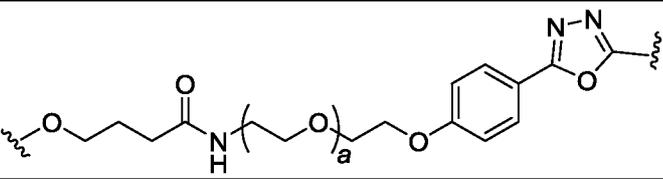
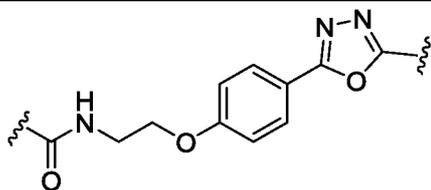
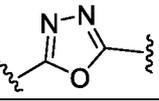
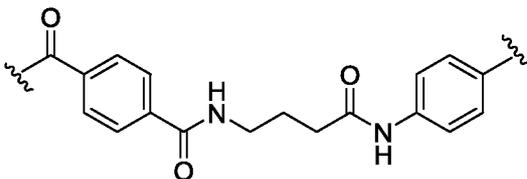
L_1 и L_2 каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей мере примерно 5 звеньев ПЭГ; и

25 X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10 до примерно 50 атомов углерода.

124. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 123, где R_X

выбран из группы, состоящей из , где знак  обозначает положение присоединения к L_{A5}.

5 125. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п. 123 или п. 124, в которой L_{A5} выбран из группы, состоящей из:

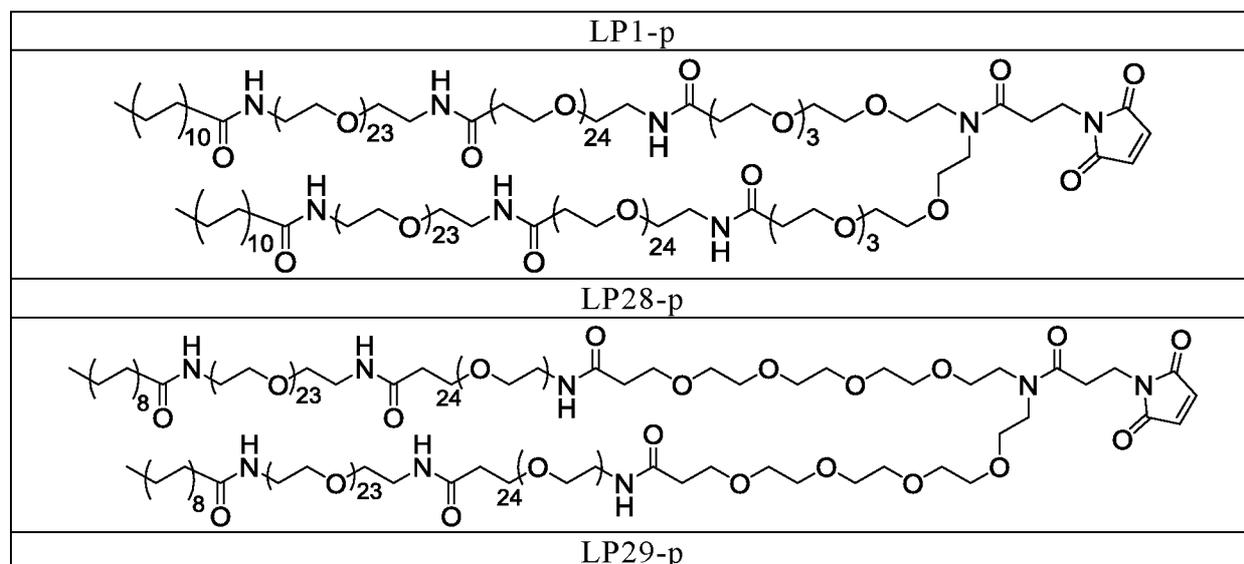
| Название | Структура |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Линкер 1-5 |  |
| Линкер 2-5 |  |
| Линкер 3-5 |  |
| Линкер 4-5 |  |
| Линкер 5-5 |  |
| Линкер 6-5 |  |
| Линкер 7-5 |  |
| Линкер 8-5 |  |
| Линкер 9-5 |  |

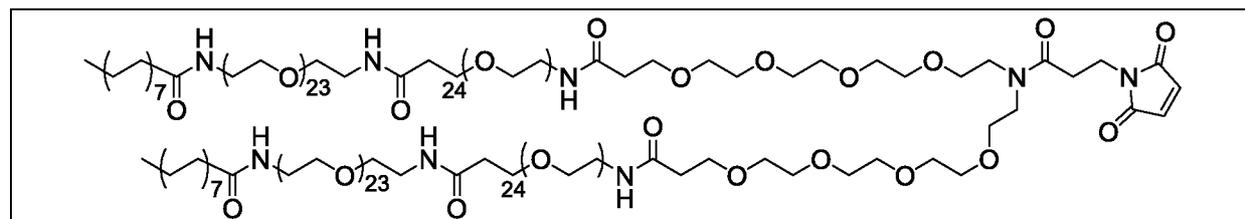
| Название | Структура |
|-------------|-----------|
| Линкер 10-5 | |
| Линкер 11-5 | |
| Линкер 12-5 | |
| Линкер 13-5 | |

где каждый m , n , o и a независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и каждый знак обозначает положение присоединения к Z или R_x .

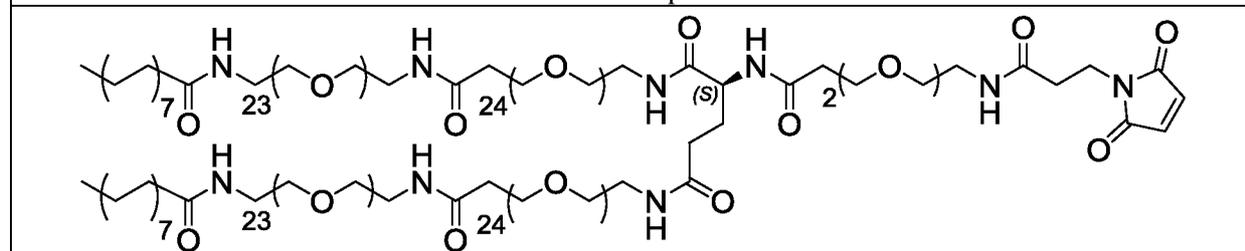
5

126. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из следующих соединений:

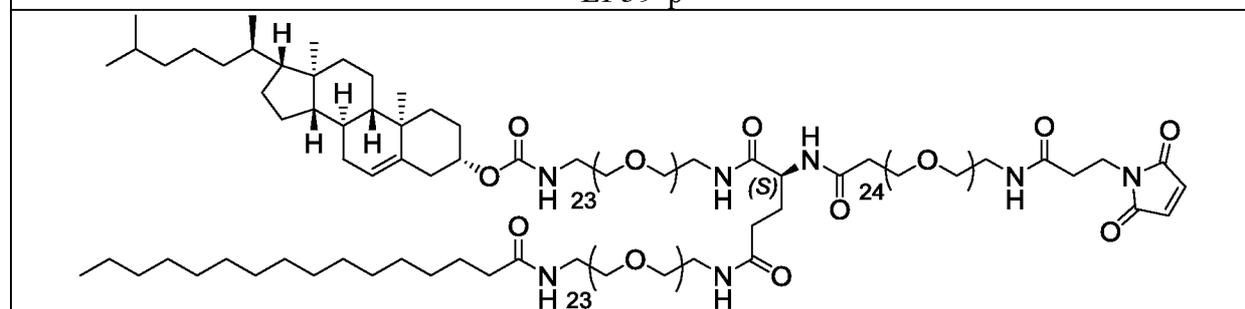




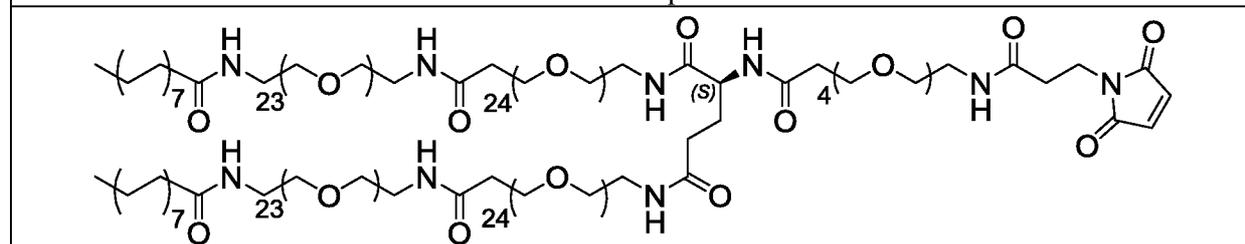
LP38-p



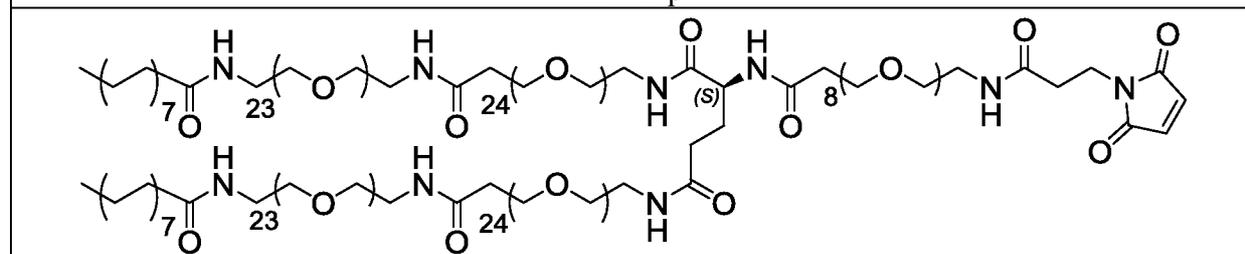
LP39-p



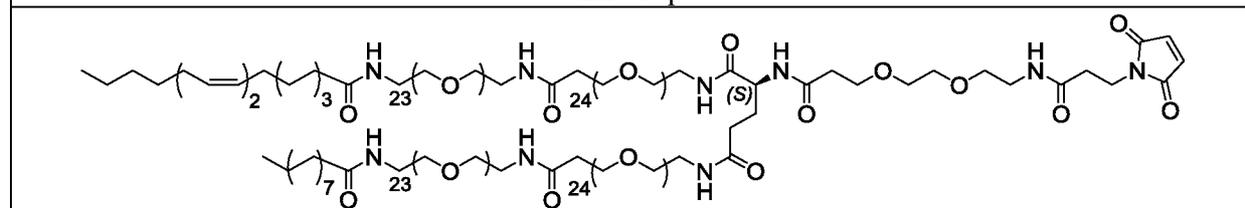
LP41-p



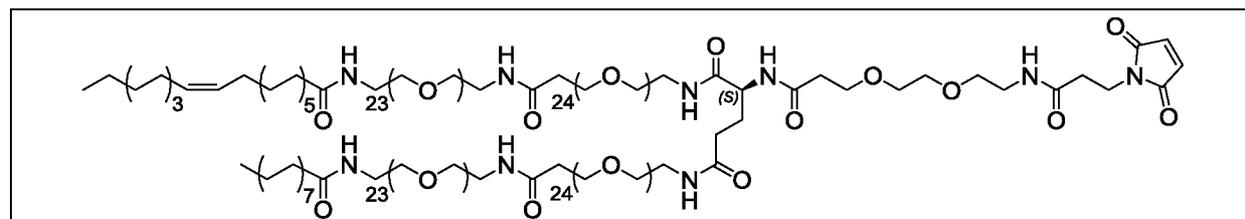
LP42-p



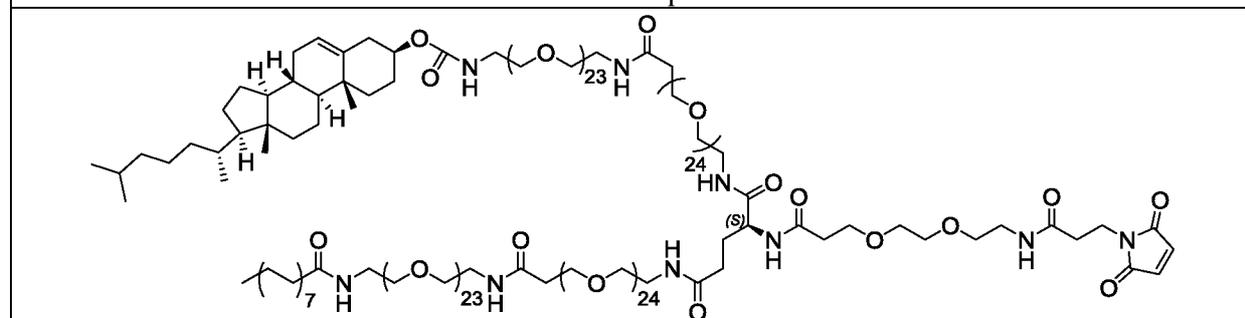
LP43-p



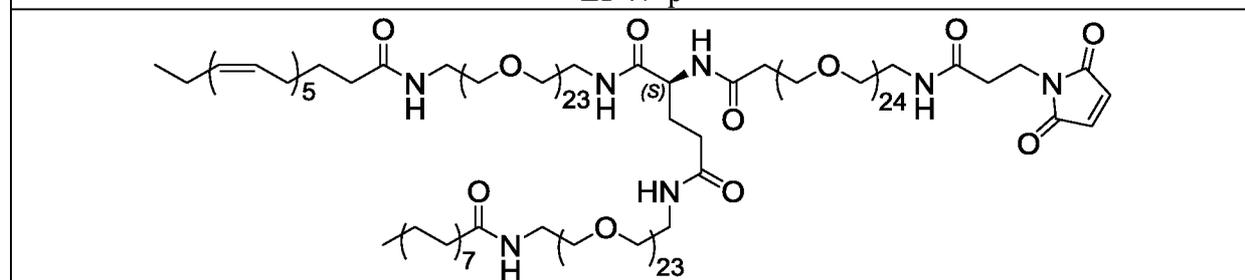
LP44-p



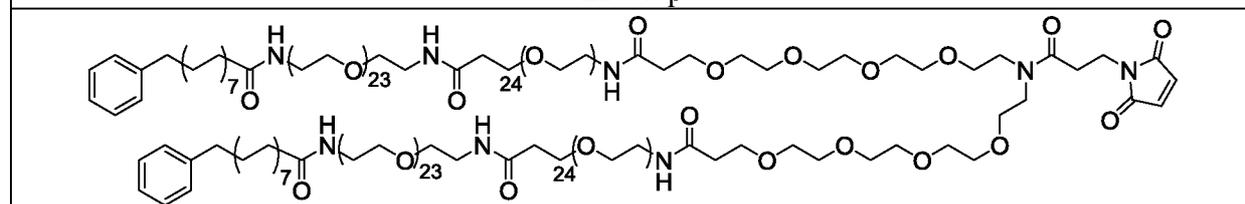
LP45-p



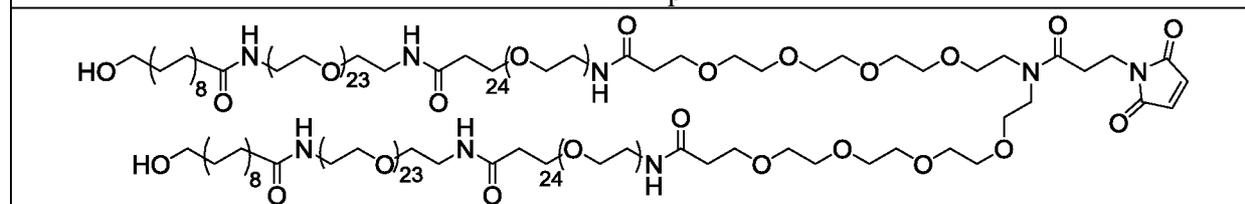
LP47-p



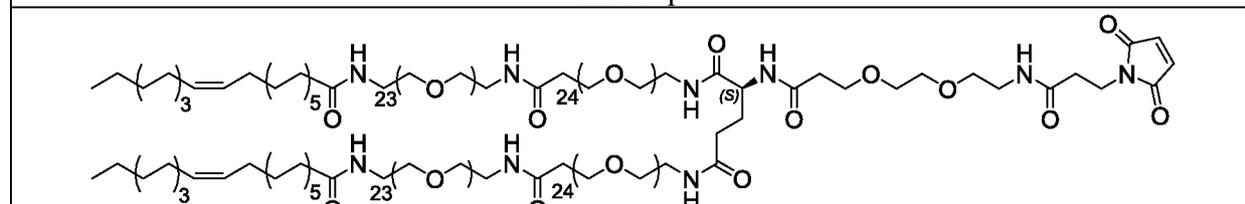
LP48-p



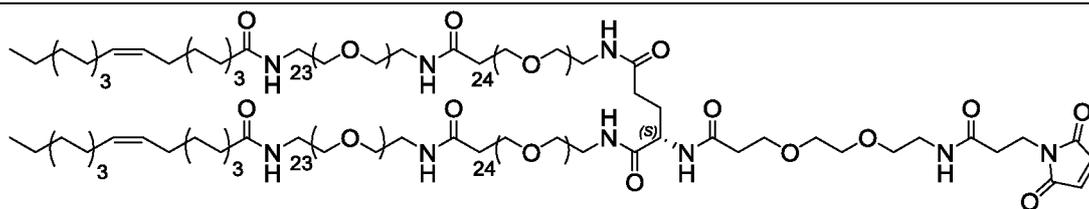
LP49-p



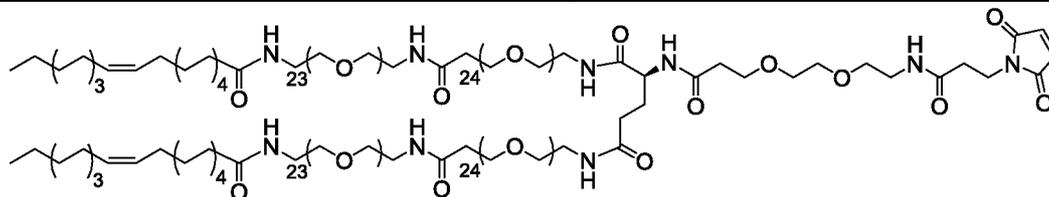
LP53-p



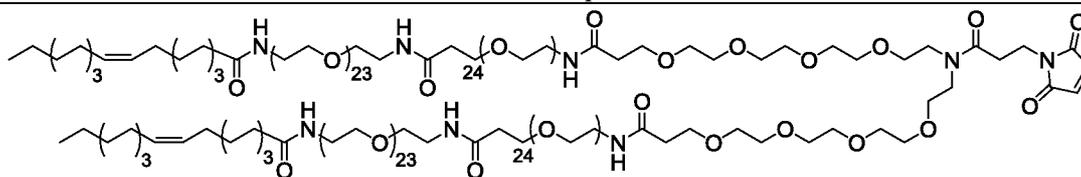
LP54-p



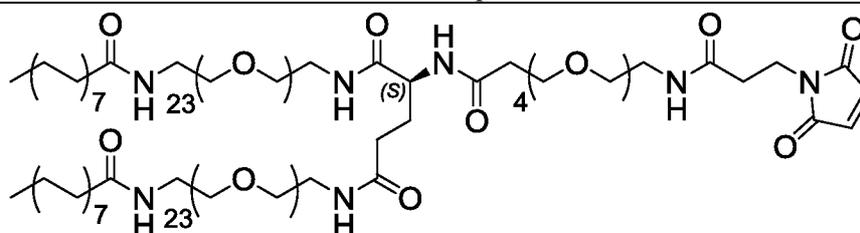
LP55-p



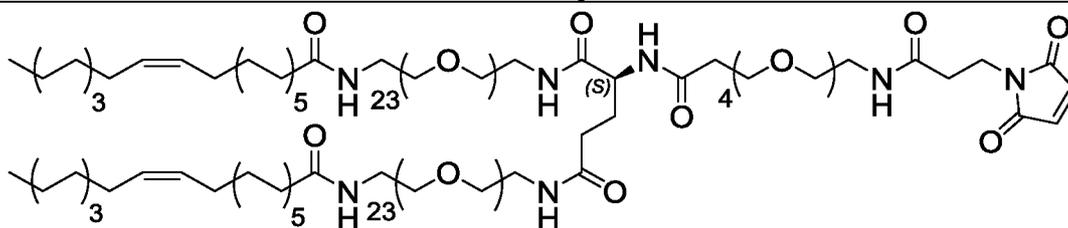
LP56-p



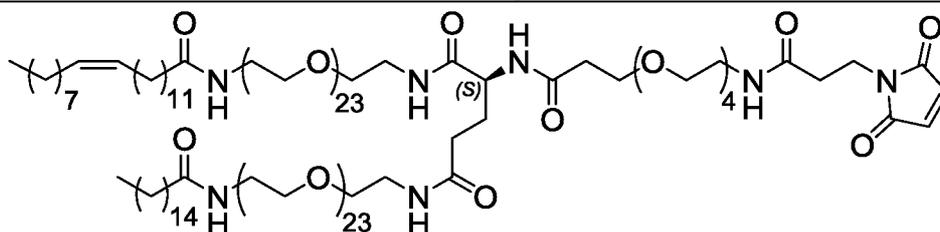
LP57-p



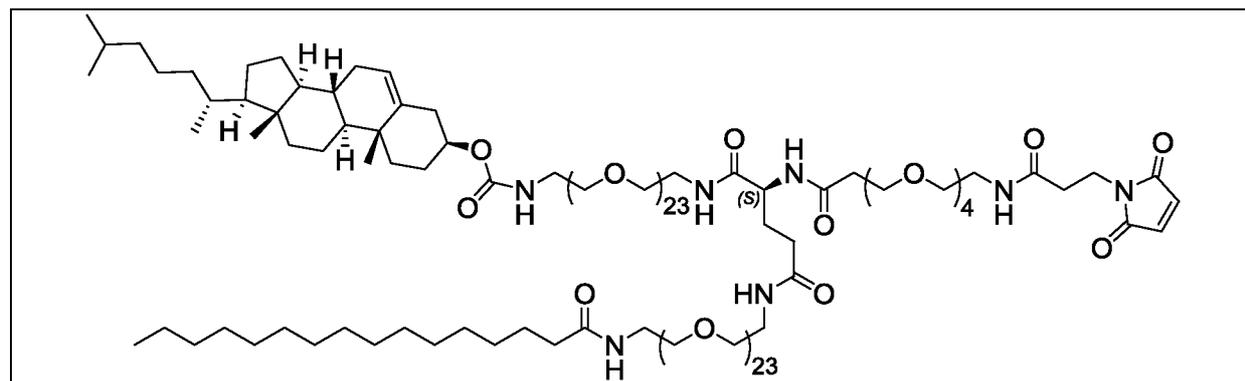
LP58-p



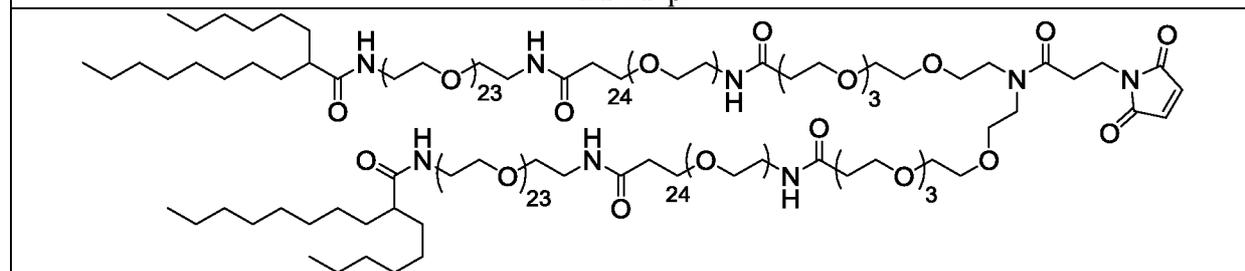
LP59-p



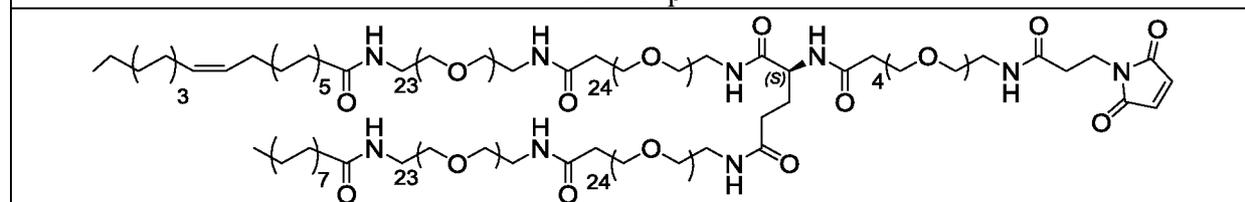
LP60-p



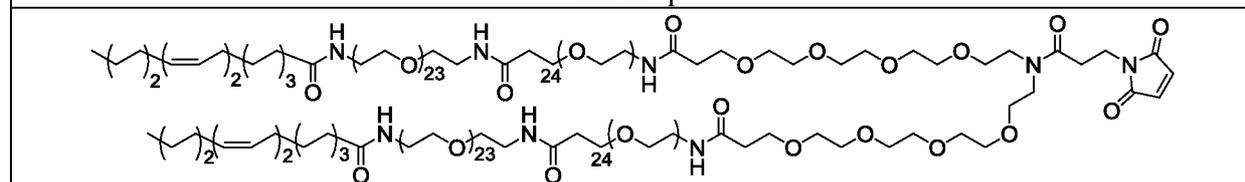
LP61-p



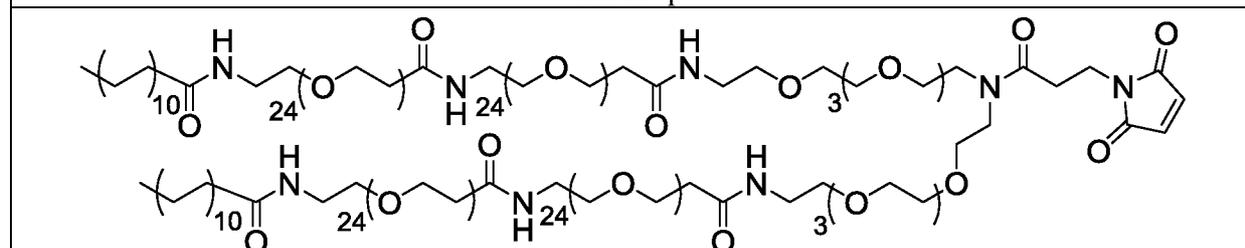
LP62-p



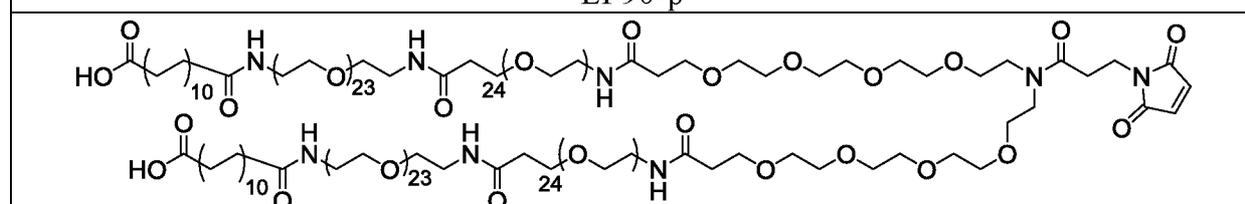
LP87-p



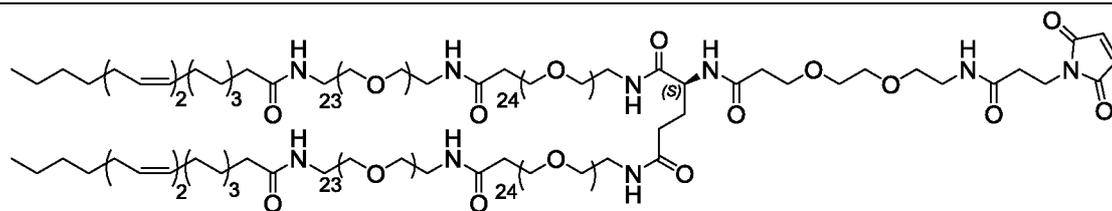
LP89-p



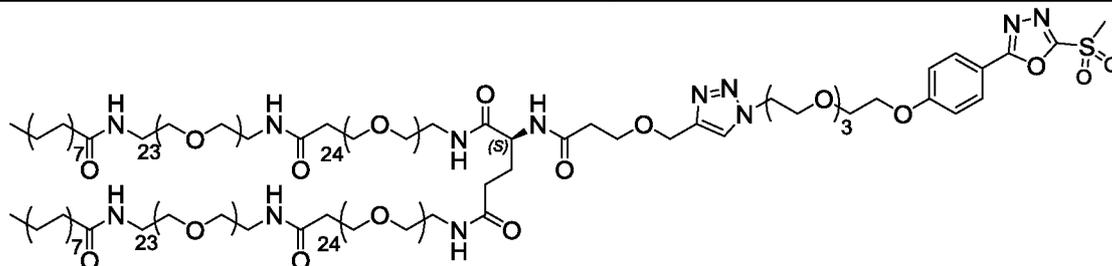
LP90-p



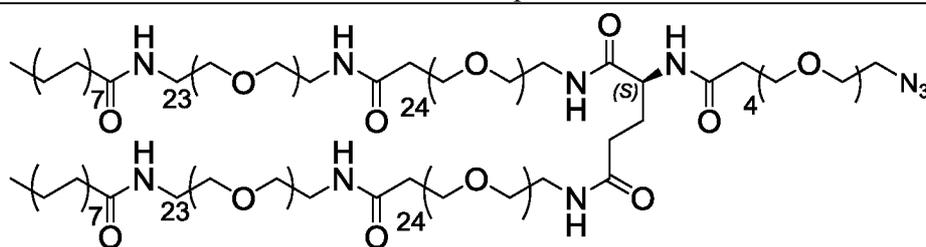
LP92-p



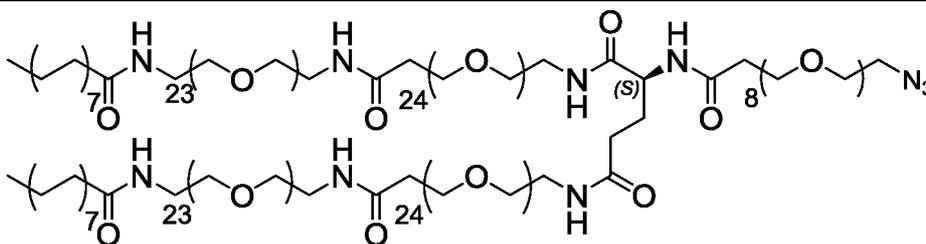
LP106-p



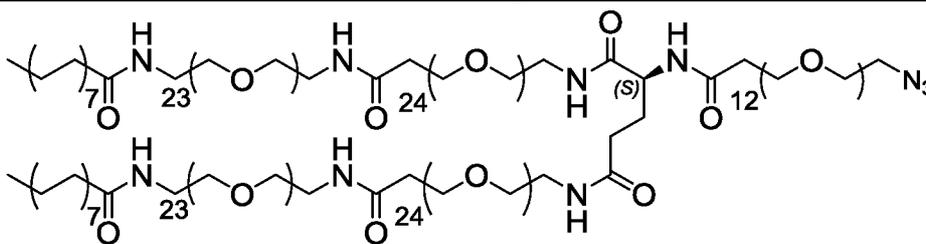
LP107-p



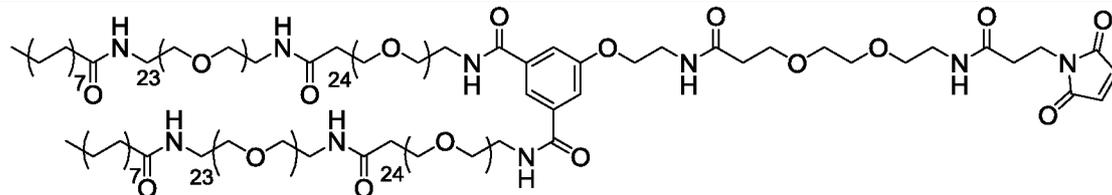
LP108-p



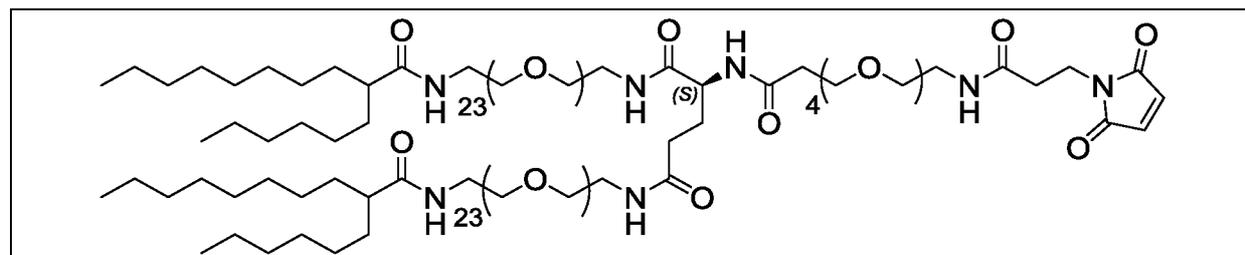
LP109-p



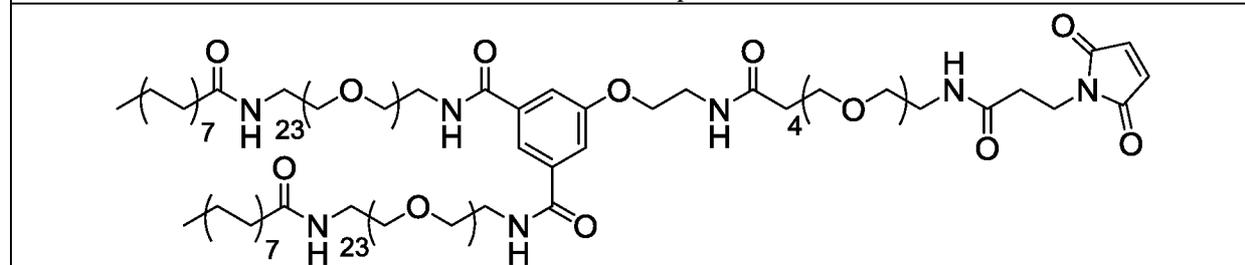
LP110-p



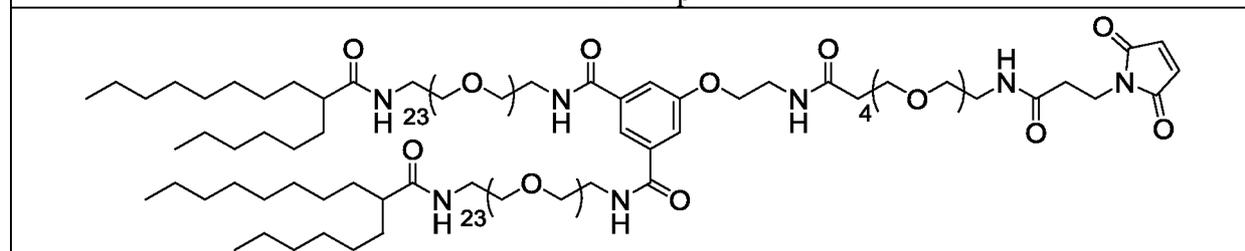
LP111-p



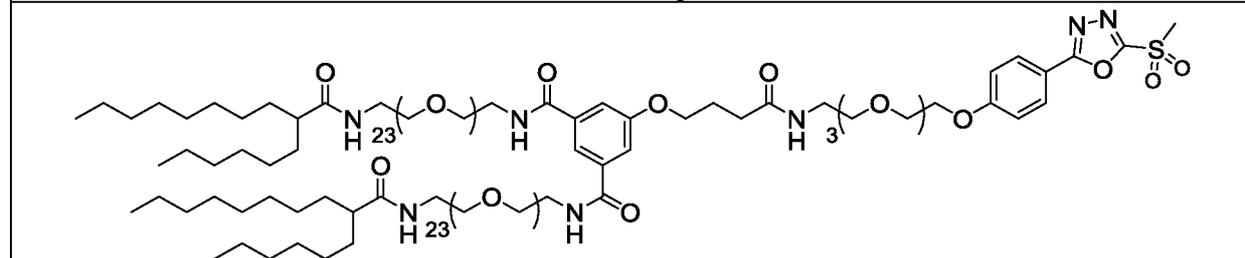
LP124-p



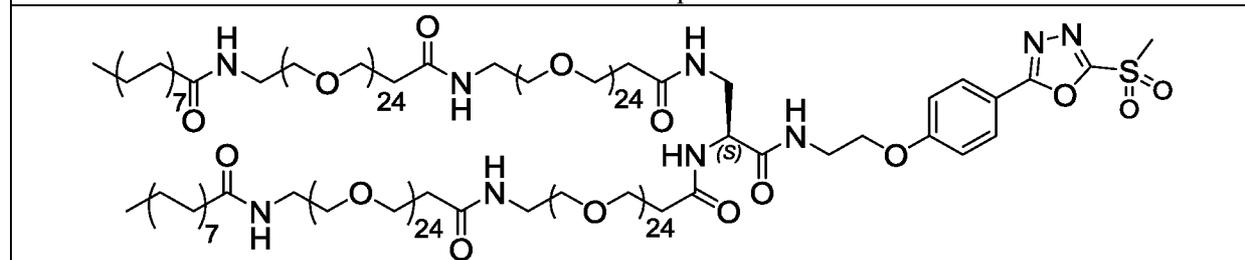
LP130-p



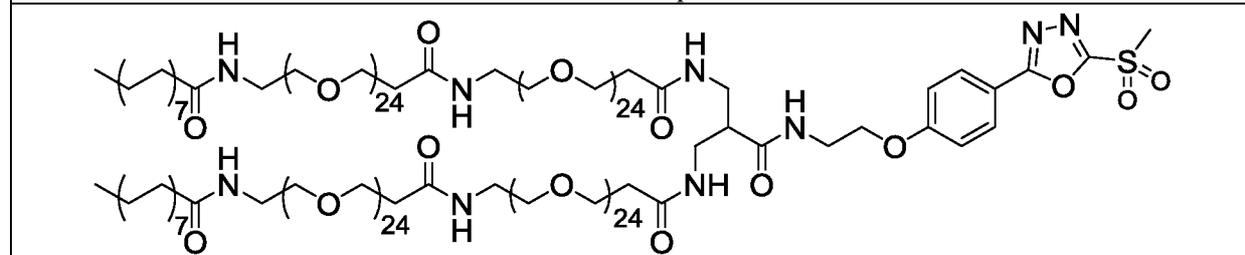
LP143-p



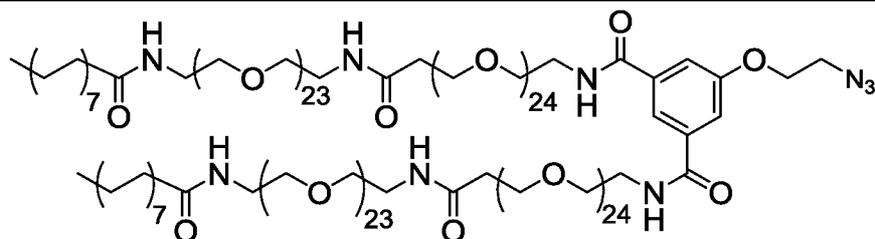
LP210-p



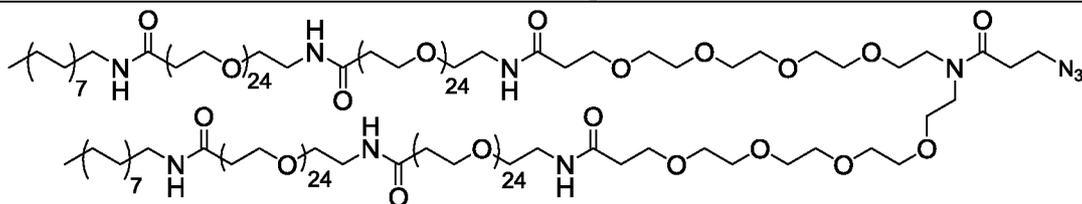
LP217-p



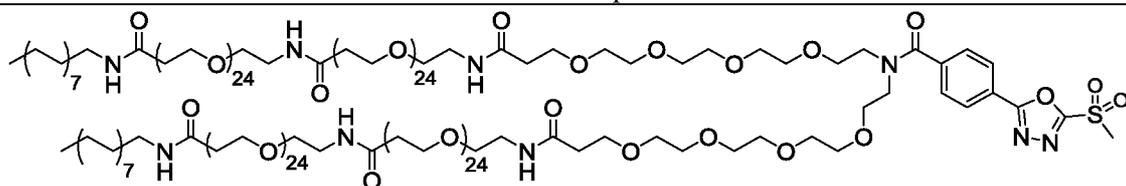
LP220-p



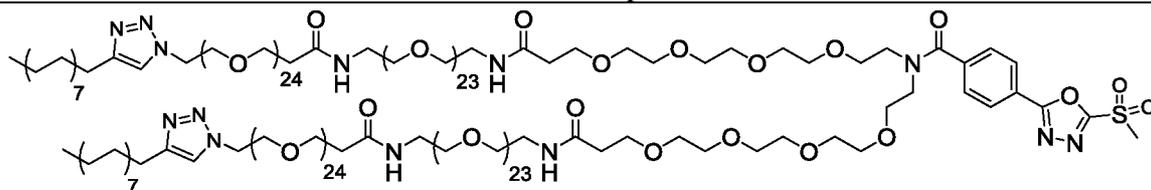
LP246-p



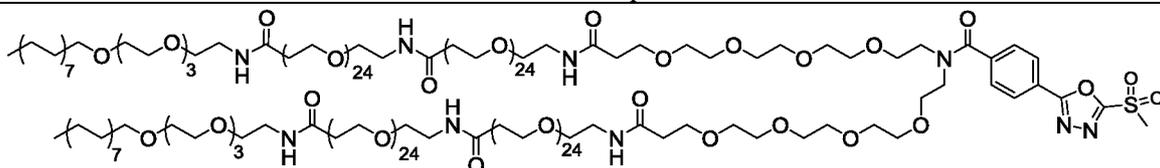
LP247-p



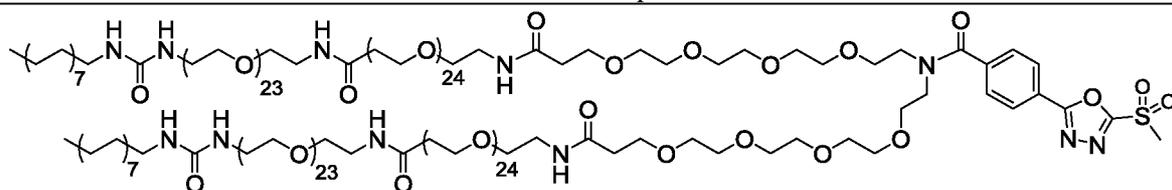
LP339-p



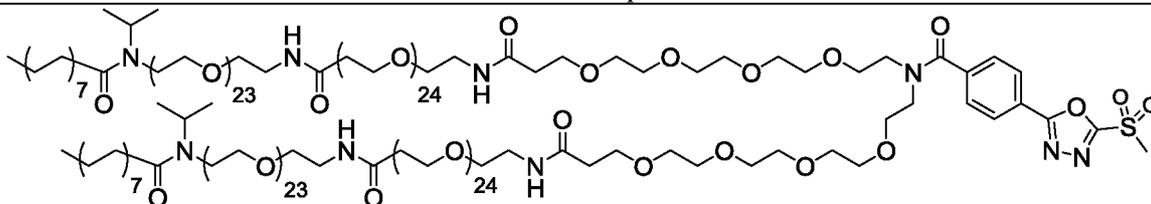
LP340-p



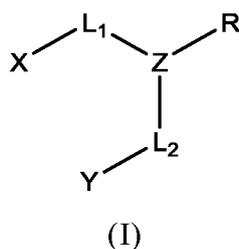
LP357-p



LP358-p



127. Способ получения соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, в которой

- 5 R обозначает L_A-R_Z ;
 L_A обозначает связь или двухвалентный фрагмент, соединяющий R_Z с Z;
 R_Z включает средство на основе олигонуклеотида;
Z обозначает CH, фенил или N;
 L_1 и L_2 каждый независимо обозначает мостики, содержащие по меньшей
10 мере 5 звеньев ПЭГ; и
X и Y каждый независимо обозначает липиды, содержащие от примерно 10
до примерно 50 атомов углерода;
где способ включает конъюгирование средства на основе РНКи,
содержащего первый реакционноспособный фрагмент, с соединением
15 содержащим липид и второй реакционноспособный фрагмент, с получением
соединения формулы (I).

128. Способ по п. 127, где первый реакционноспособный фрагмент выбран
из группы, состоящей из дисульфида и пропаргильной группы.

- 20 129. Способ по любому из п.п. 127 и 128, где второй реакционноспособный
фрагмент выбран из группы, состоящей из малеинимида, сульфона, азида и
алкина.

- 25 130. Способ по любому из п.п. 127-129, где соединение, содержащее липид,
представляет собой любое, выбранное из числа соединений по п. 126.