

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046244

(13) B1

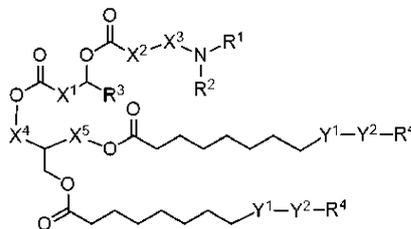
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента	(51) Int. Cl.	<i>C07D 205/04</i> (2006.01)
2024.02.20		<i>C07D 207/08</i> (2006.01)
(21) Номер заявки		<i>C07D 207/09</i> (2006.01)
202191559		<i>C07D 211/44</i> (2006.01)
(22) Дата подачи заявки		<i>C07D 211/62</i> (2006.01)
2019.12.05		<i>C07D 295/08</i> (2006.01)
		<i>C07C 219/04</i> (2006.01)
		<i>C07C 271/10</i> (2006.01)
		<i>A61P 43/00</i> (2006.01)
		<i>A61K 49/18</i> (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АМИНОВЫЕ ЛИПИДЫ

(31) 62/775,783	(56) WO-A1-2015095346
(32) 2018.12.05	WO-A1-2017173054
(33) US	
(43) 2021.08.24	
(86) PCT/US2019/064663	
(87) WO 2020/118041 2020.06.11	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)	
(72) Изобретатель: Скалли Стивен С., Маэтани Миках, Маджзоб Рэмзи (US)	
(74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)	

(57) В описании представлены ионизируемые аминные липиды и их фармацевтически приемлемые соли, применимые для доставки биологически активных агентов, например доставки биологически активных агентов в клетки для получения сконструированных клеток. Раскрытые в данном документе ионизируемые аминные липиды применимы в качестве ионизируемых липидов в составе композиций на основе липидных наночастиц.



(IA)

B1

046244

046244

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/775,783, поданной 5 декабря 2018 г., все содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

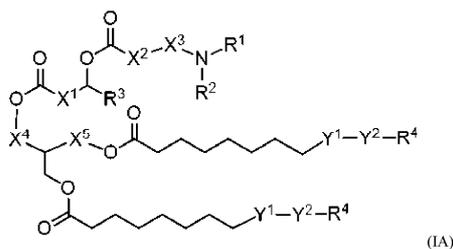
Липидные наночастицы, содержащие ионизируемые аминокислотные липиды, могут служить транспортными средствами для доставки биологически активных агентов, в частности полинуклеотидов, таких как РНК, мРНК и гидовых РНК в клетки. Композиции LNP, содержащие ионизируемые липиды, могут способствовать доставке олигонуклеотидных агентов через клеточные мембраны и могут использоваться для введения компонентов и композиций для редактирования генов в живые клетки. Биологически активные агенты, которые особенно трудно доставить в клетки, включают белки, лекарства на основе нуклеиновых кислот и их производные, в особенности лекарства, которые включают относительно большие олигонуклеотиды, такие как мРНК. Особый интерес представляют композиции для доставки многообещающих технологий редактирования генома в клетки, к примеру, для доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 (к примеру, мРНК, кодирующей нуклеазу, и ассоциированную гидовую РНК (гРНК)).

Необходимы композиции для доставки компонентов белка и нуклеиновой кислоты CRISPR/Cas в клетку, такую как клетка пациента. В частности, особый интерес представляют композиции для доставки мРНК, кодирующей белковый компонент CRISPR, и для доставки гидовых РНК CRISPR. Композиции с полезными свойствами для доставки *in vitro* и *in vivo*, которые могут стабилизировать и доставлять компоненты РНК, также представляют особый интерес.

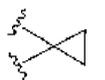
Краткое содержание

В настоящем документе представлены аминокислотные липиды, применимые для приготовления композиций липидных наночастиц (LNP). Такие композиции LNP могут обладать свойствами, полезными для доставки груза нуклеиновой кислоты, такого как компоненты редактирования генов CRISPR/Cas, в клетки.

В некоторых вариантах реализации настоящее описание относится к соединению, имеющему структуру формулы (IA):



где независимо для каждого случая



X^1 представляет собой C_{1-3} алкилен или

X^2 выбирают из O, NH, NMe и связи, при условии, что, когда X^2 представляет собой O, R^2 вместе с атомом азота и либо R^1 , либо атомом углерода X^3 образует 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

X^3 представляет собой C_{2-4} алкилен,

X^4 представляет собой C_1 алкилен или связь,

X^5 представляет собой C_1 алкилен или связь,

R^1 представляет собой C_{1-3} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой,

R^2 представляет собой C_{1-3} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой, или

R^2 и R^1 , или R^2 и атом углерода X^3 , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

Y^1 выбирают из связи, $-CH=CH-$, $-(C=O)O-$ и $-O(C=O)-$,

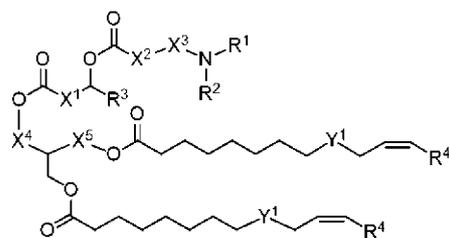
Y^2 выбирают из $-CH_2-CH=CH-$ и C_3-C_4 алкилена,

R^3 выбирают из H, C_{3-7} циклоалкила, C_8-C_{10} алкенила, и C_{3-18} алкила,

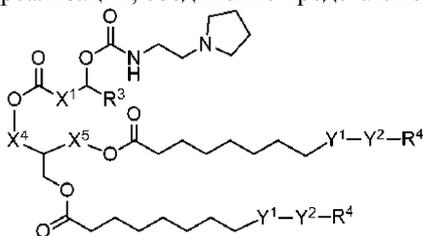
R^4 представляет собой C_{4-8} алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах реализации настоящее описание относится к соединению, имеющему структуру формулы (I):



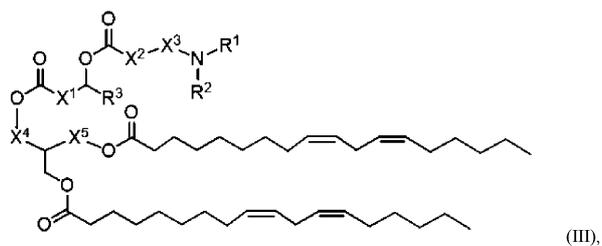
- где независимо для каждого случая,
 X^1 представляет собой C_{1-3} алкилен,
 X^2 выбирают из O, NH, NMe и связи, при условии, что, когда X^2 представляет собой O, R^2 вместе с атомом азота и либо R^1 , либо атомом углерода X^3 образует 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,
 X^3 представляет собой C_{2-4} алкилен,
 X^4 представляет собой C_1 алкилен или связь,
 X^5 представляет собой C_1 алкилен или связь,
 R^1 представляет собой C_{1-2} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой,
 R^2 представляет собой C_{1-2} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой, или R^2 и R^1 , или R^2 и атом углерода X^3 , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное или 6-членное кольцо,
 Y^1 выбирают из $-CH=CH-$, $-(C=O)O-$ и $-O(C=O)-$,
 R^3 выбирают из H, C_{5-7} циклоалкила, и C_{3-18} алкила,
 R^4 представляет собой C_{4-7} алкил, или его фармацевтически приемлемая соль.
 В определенных вариантах реализации, X^1 представляет собой линейный C_2 алкилен. В других вариантах реализации, X^1 представляет собой C_1 алкилен.
 В некоторых других вариантах реализации, X^2 представляет собой NH или O.
 В определенных вариантах реализации, X^3 представляет собой C_{2-3} алкилен.
 В некоторых других вариантах реализации, R^2 и атом углерода X^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-6-членное кольцо.
 В некоторых других вариантах реализации, R^2 представляет собой C_{1-2} алкил.
 В некоторых других вариантах реализации, R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-6-членное кольцо.
 В некоторых других вариантах реализации, R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо.
 В некоторых других вариантах реализации, R^1 представляет собой C_{1-2} алкил.
 В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой линейный C_{4-16} алкил.
 В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой разветвленный C_{6-10} алкил.
 В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой C_{5-7} циклоалкил.
 В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой C_{8-10} алкенил.
 В некоторых других вариантах реализации, R^4 представляет собой линейный C_{5-6} алкил.
 В некоторых других вариантах реализации, X^4 представляет собой связь.
 В некоторых других вариантах реализации, X^5 представляет собой C_1 алкилен.
 В определенных вариантах реализации, соединение представляет собой соединение формулы (IA); и Y^2-R^4 представляет собой $-CH_2-CH=CH-R^4$.
 В некоторых других вариантах реализации, Y^1 выбирают из связи, $-CH=CH-$ и $-O(C=O)-$.
 В определенных вариантах реализации, соединение представляет собой соединение формулы II:



(II),

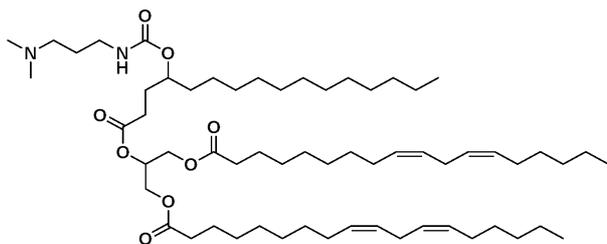
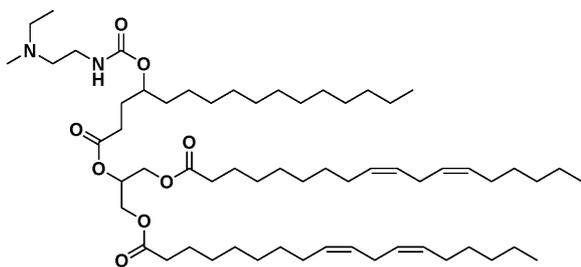
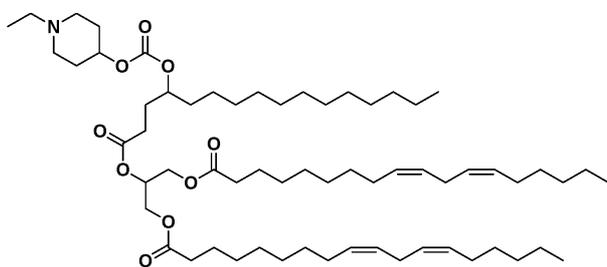
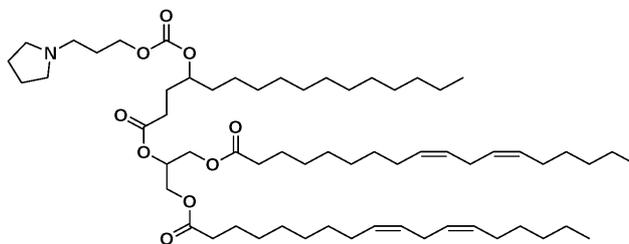
где переменные определены как для формулы (IA).

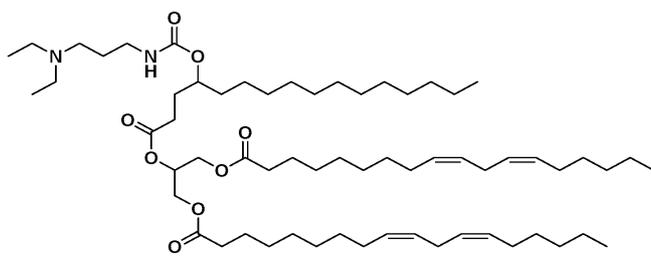
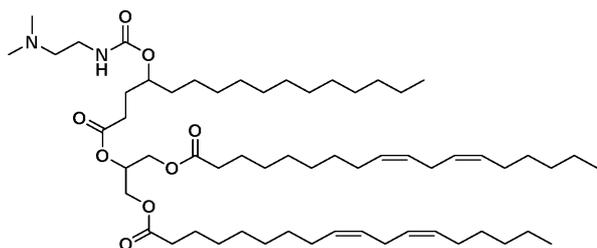
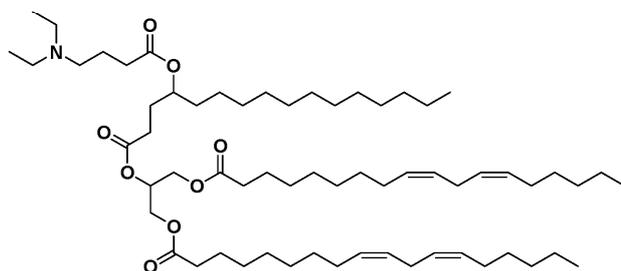
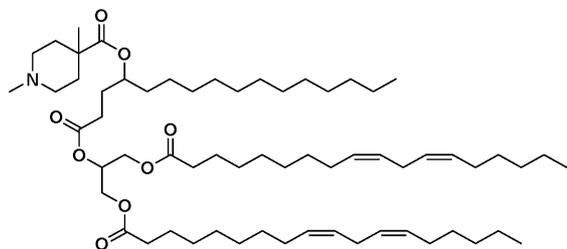
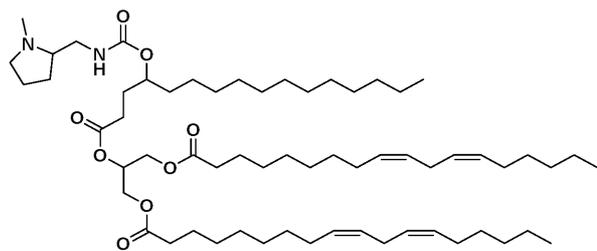
В определенных вариантах реализации, соединение представляет собой соединение формулы III;



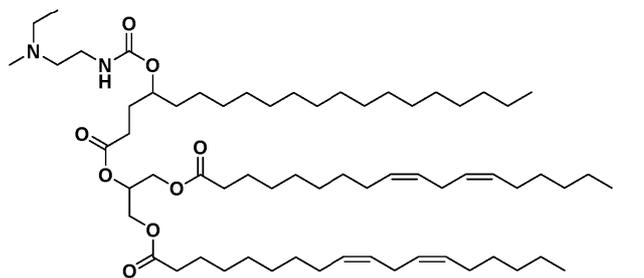
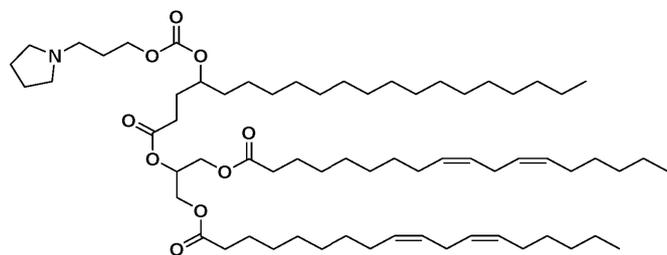
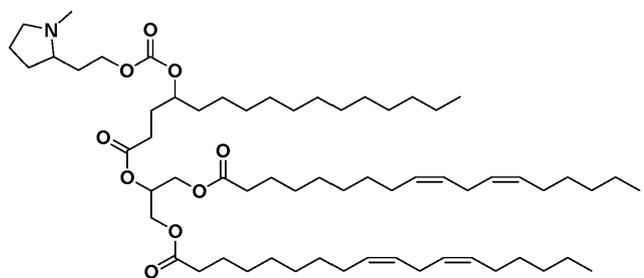
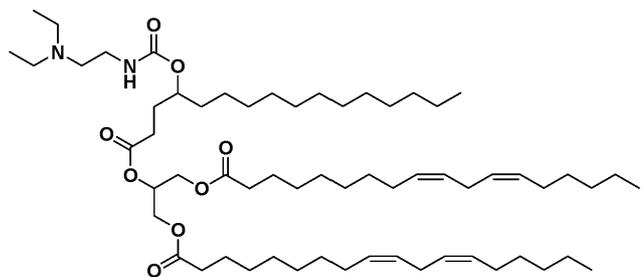
где переменные определены как для формулы (IA).

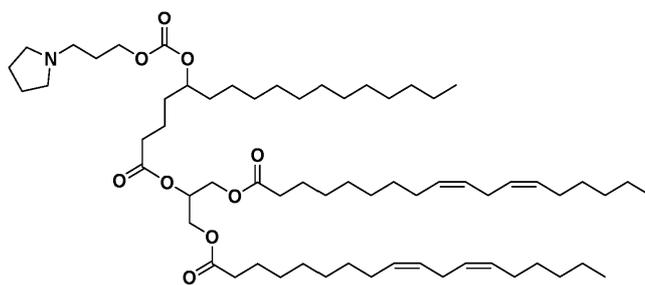
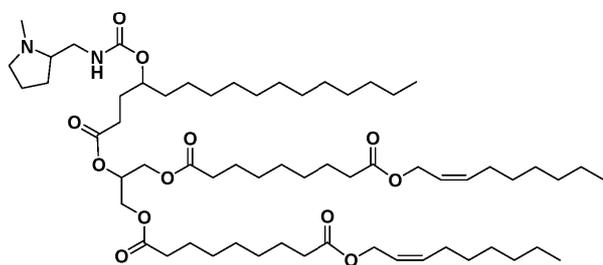
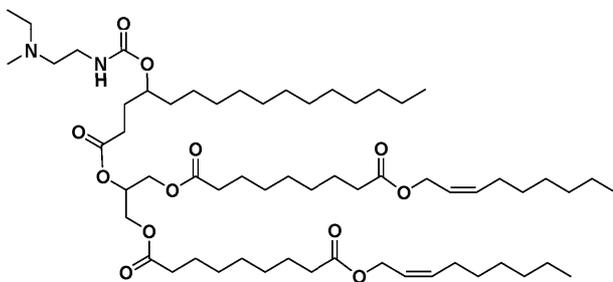
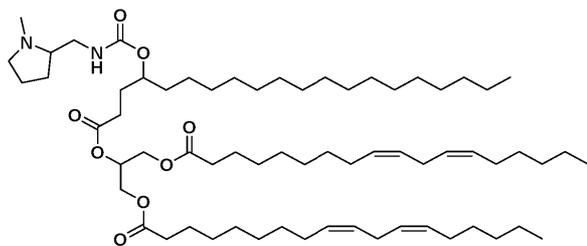
Типичные соединения формул (IA) или (I) включают:

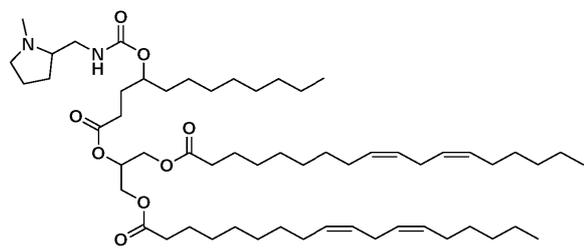
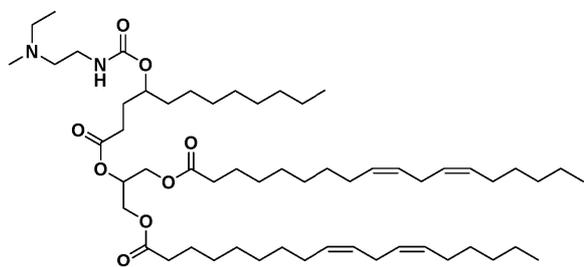
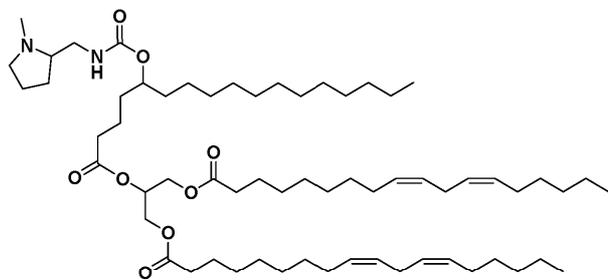
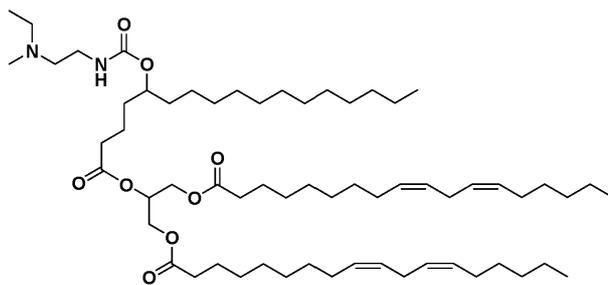


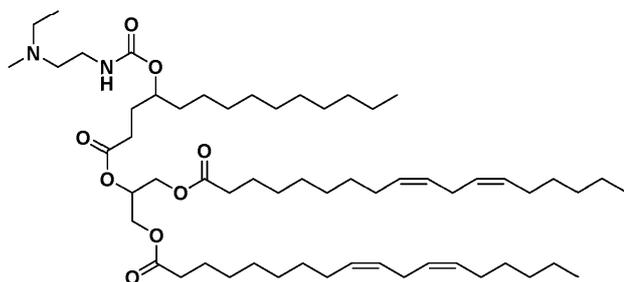
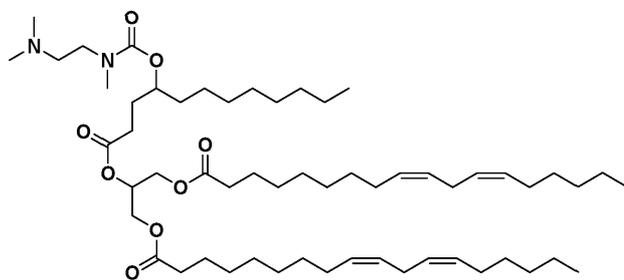
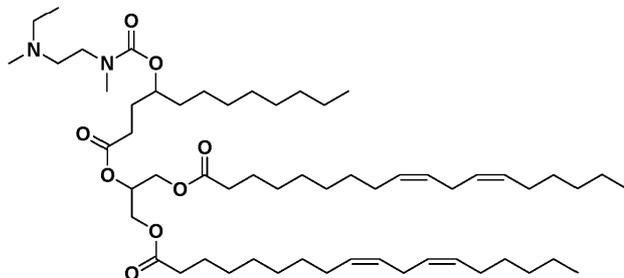
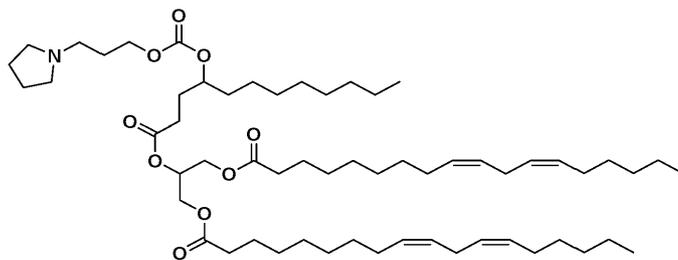


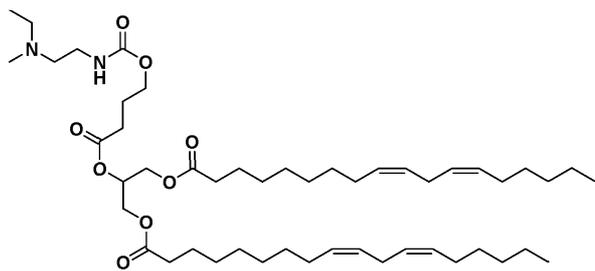
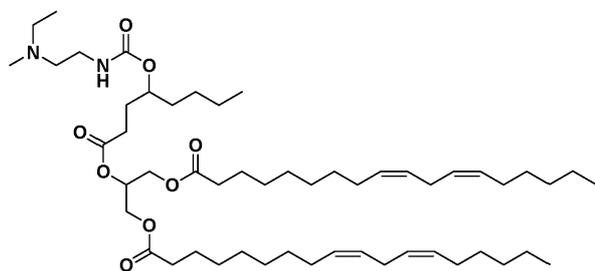
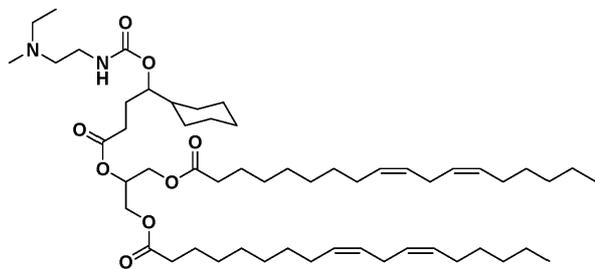
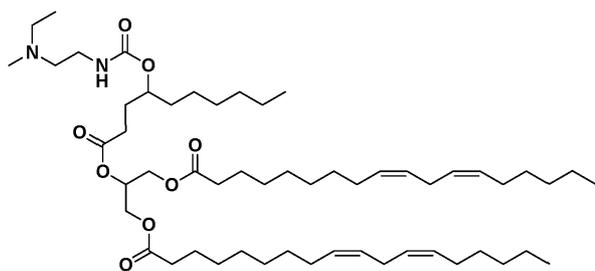
046244

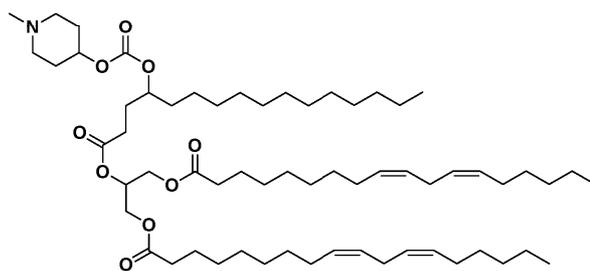
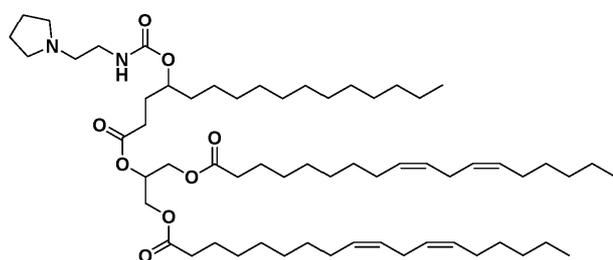
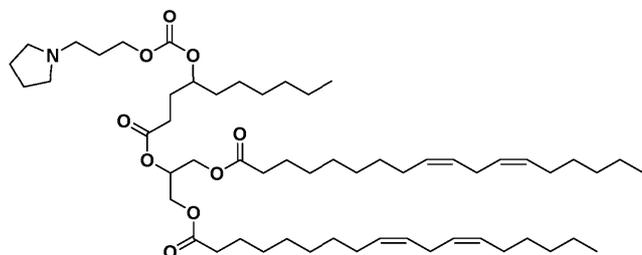
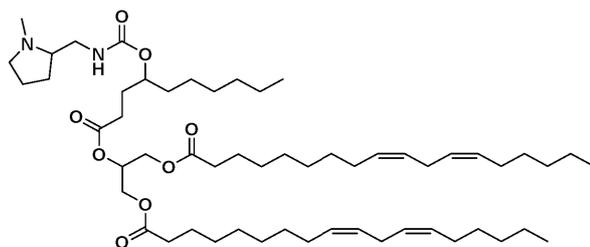


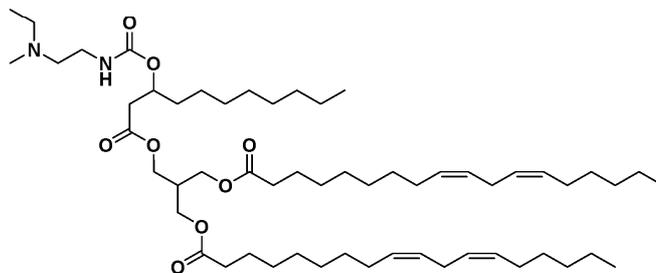
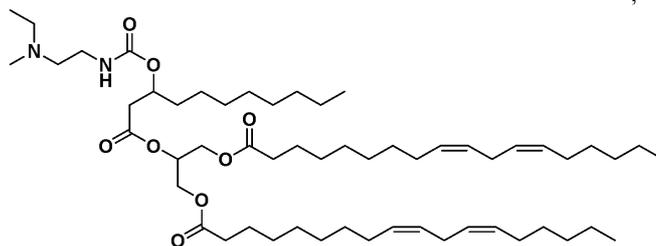
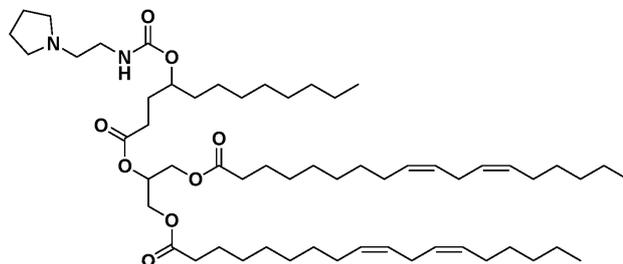
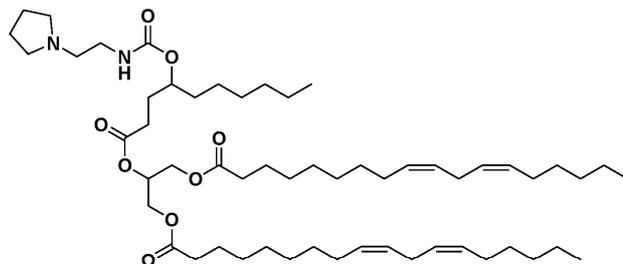
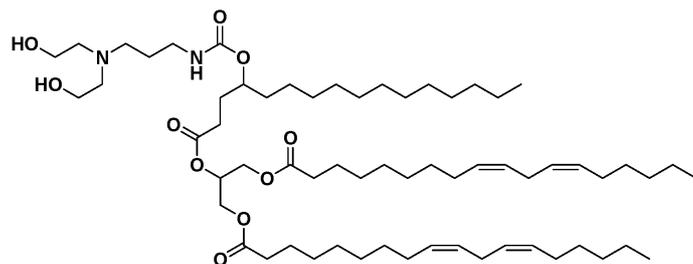


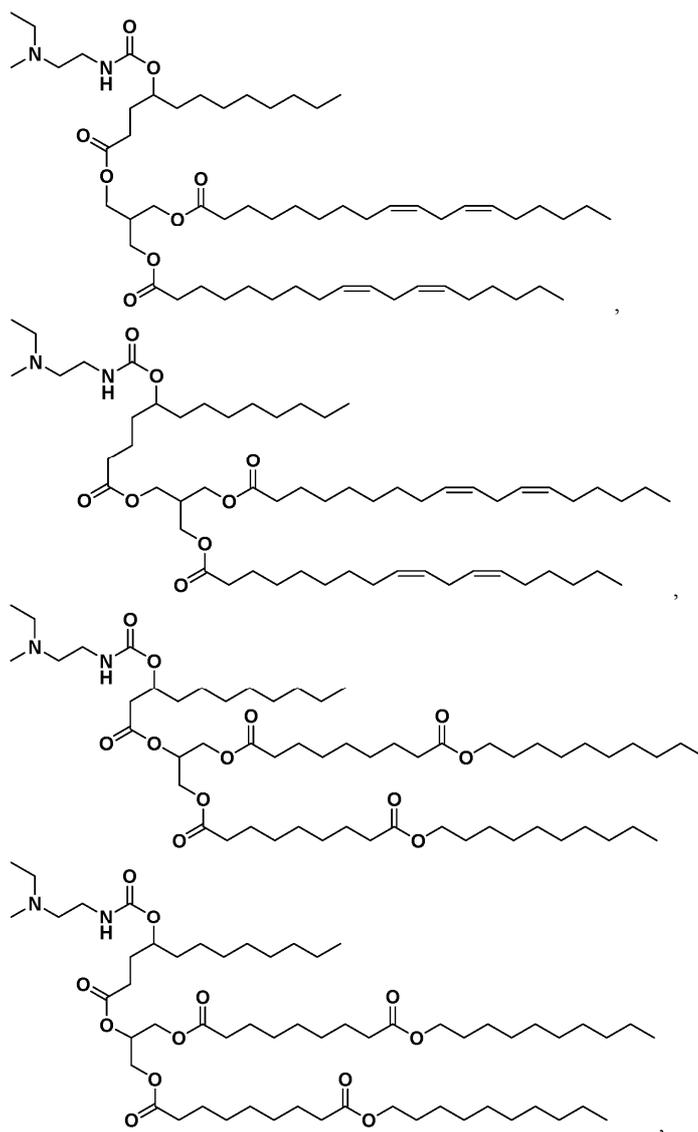


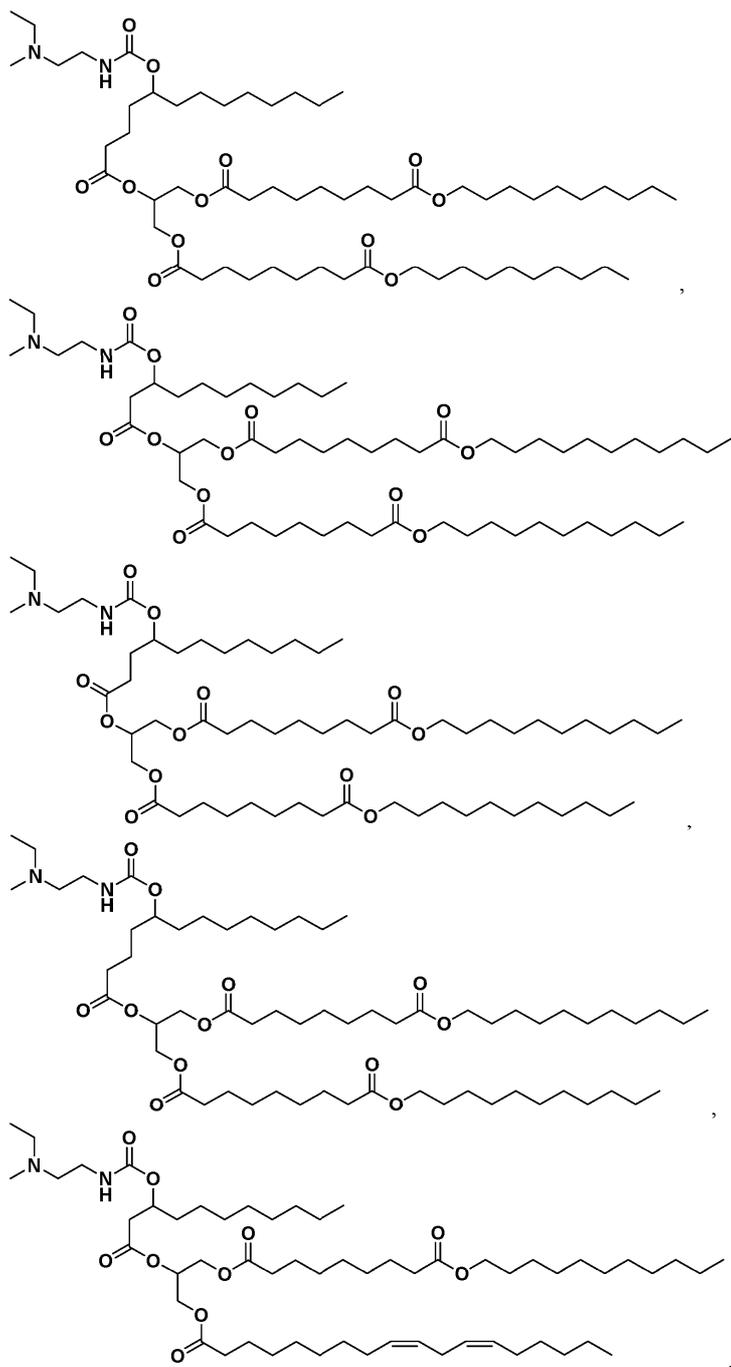


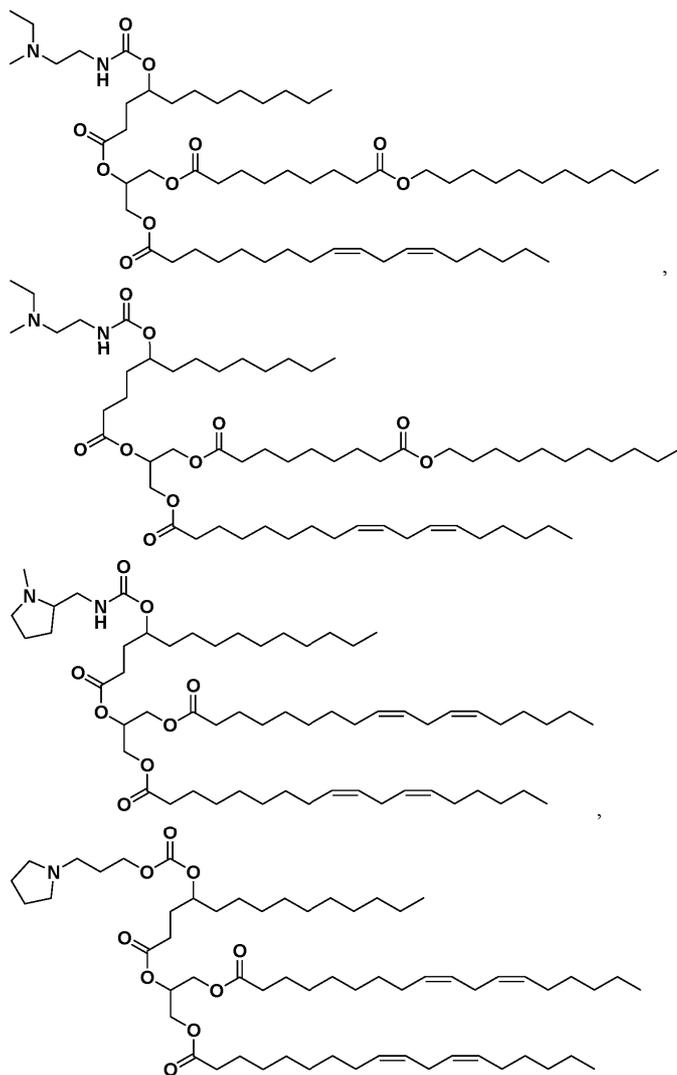


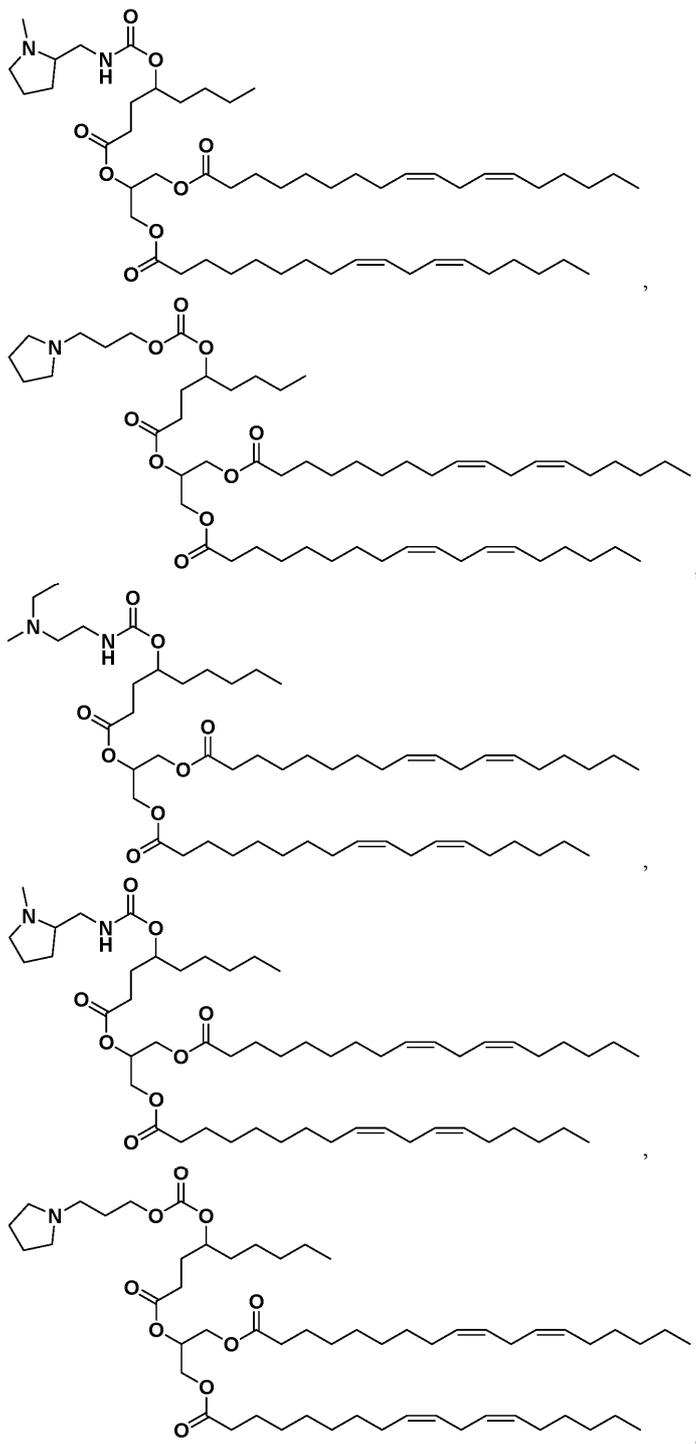


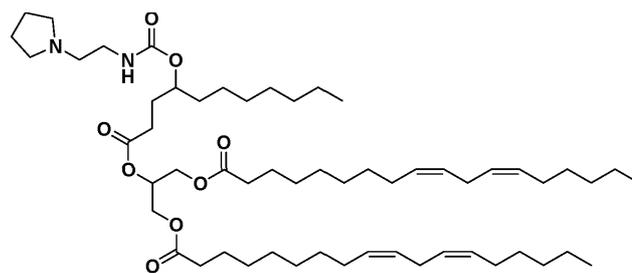
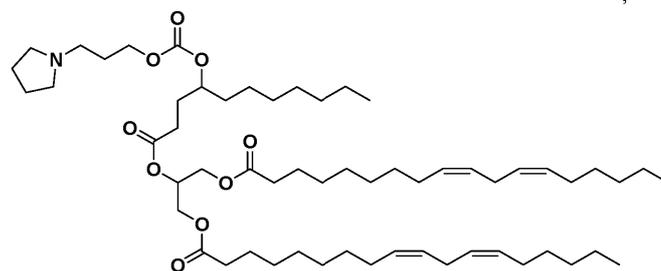
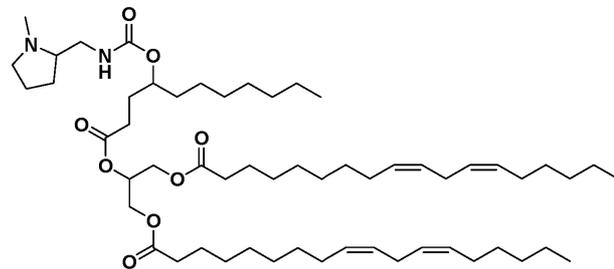
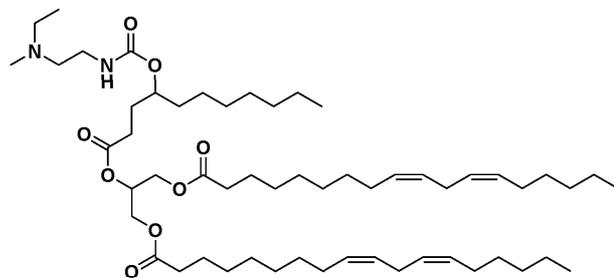
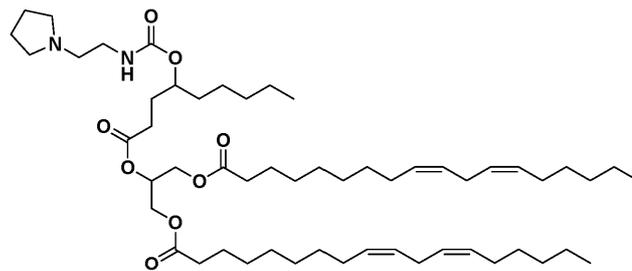


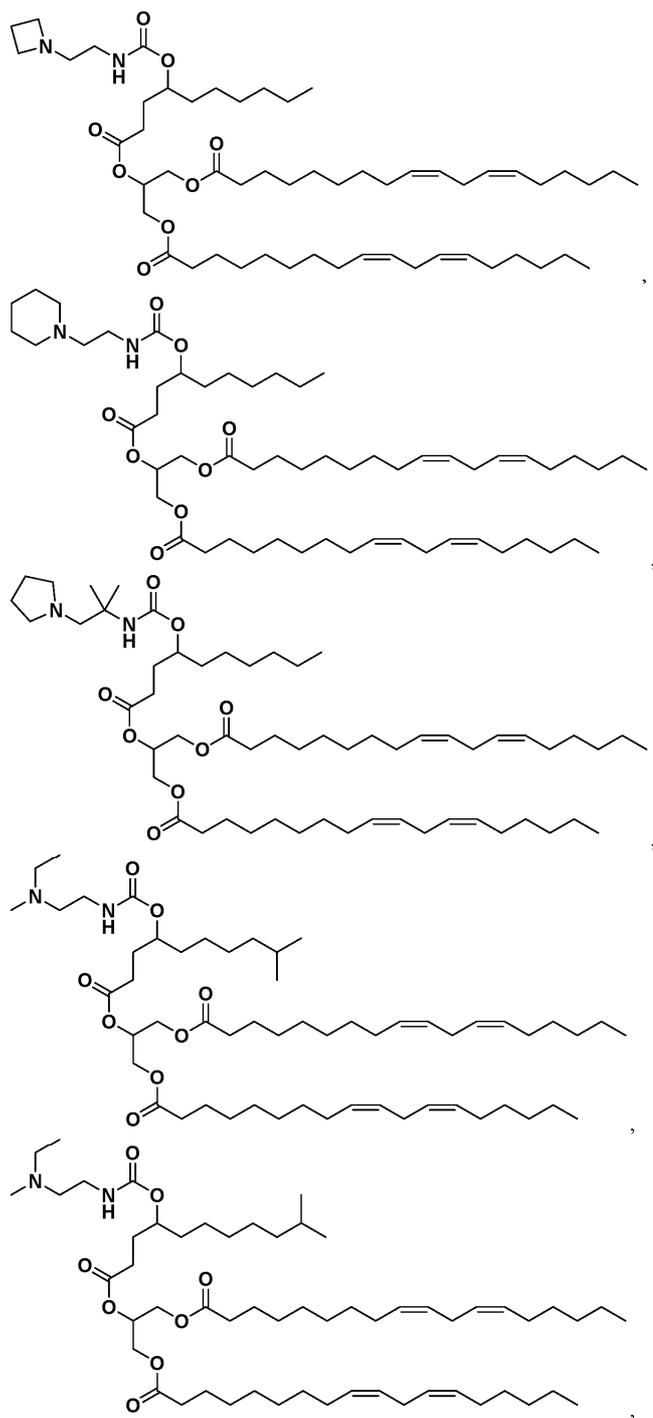


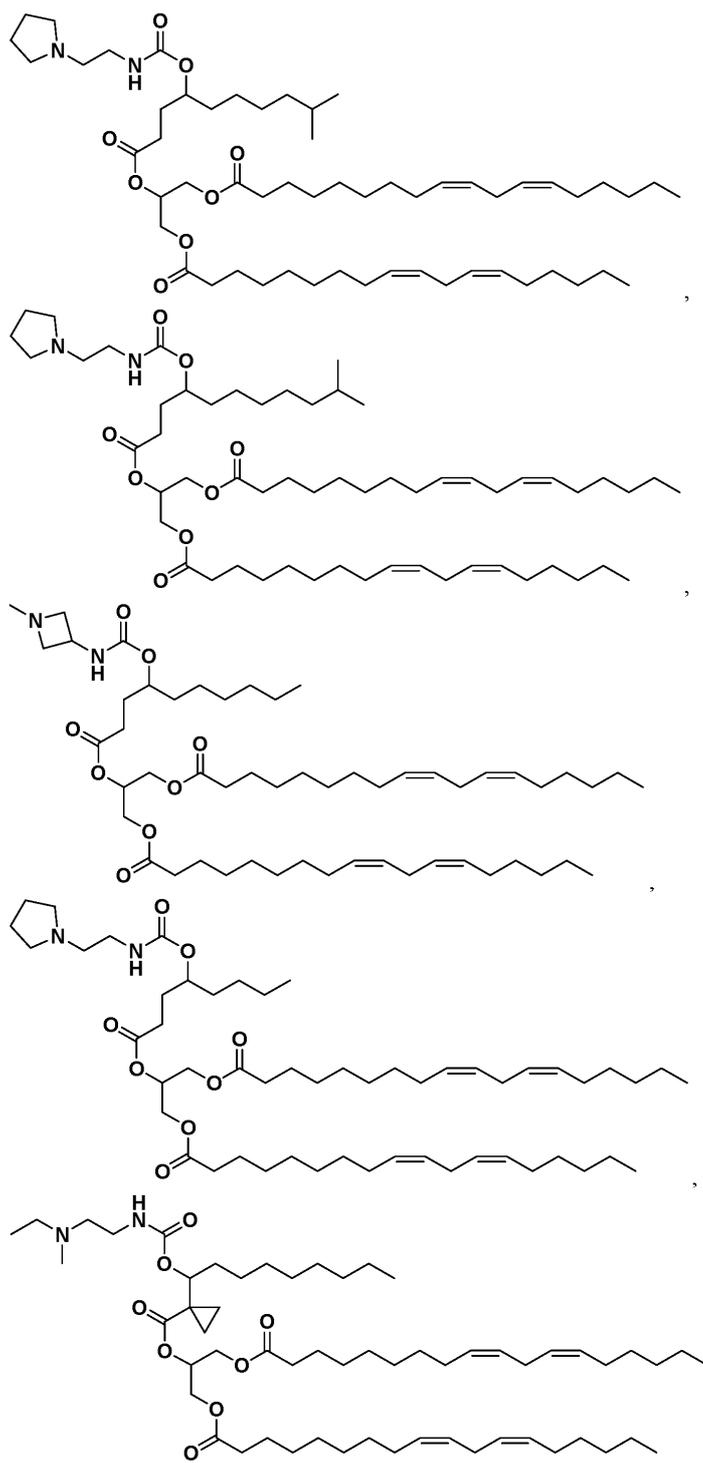


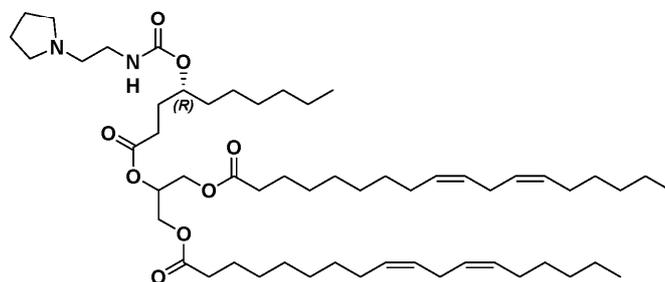
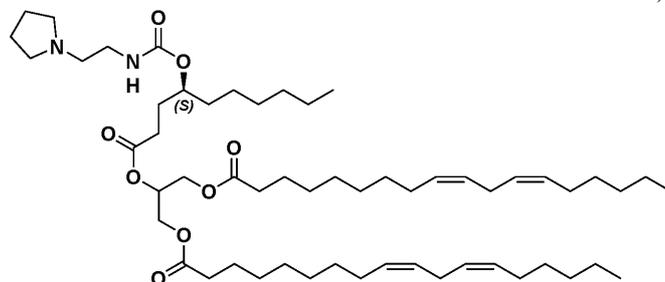
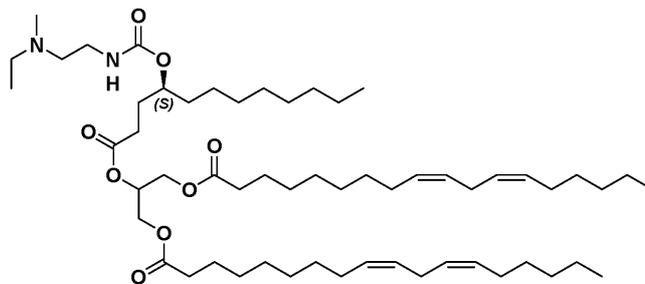
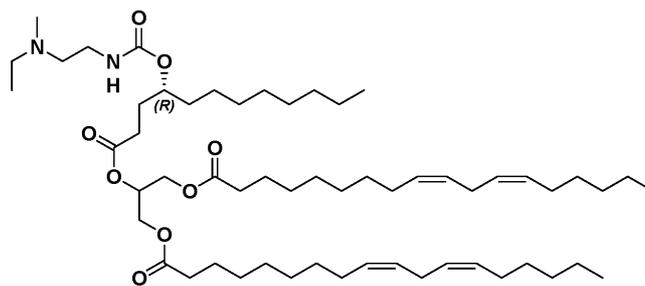


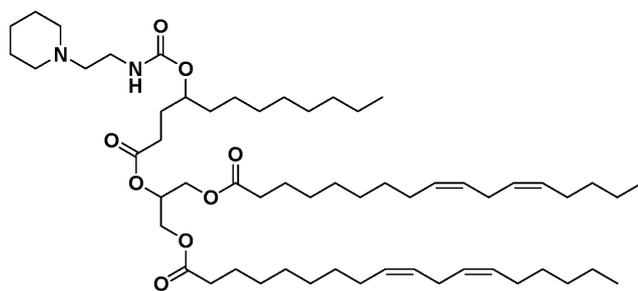
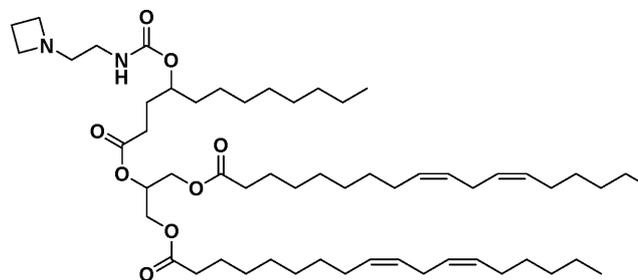
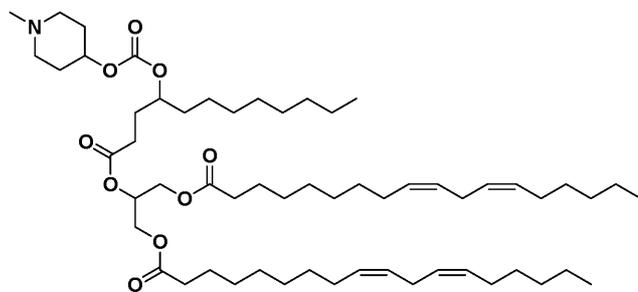
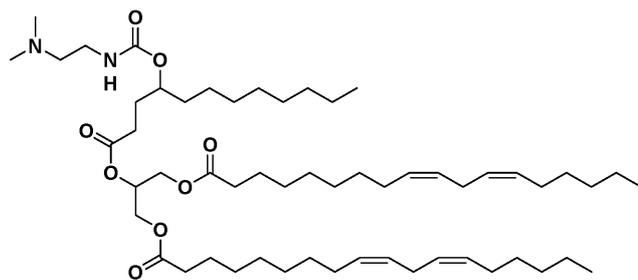


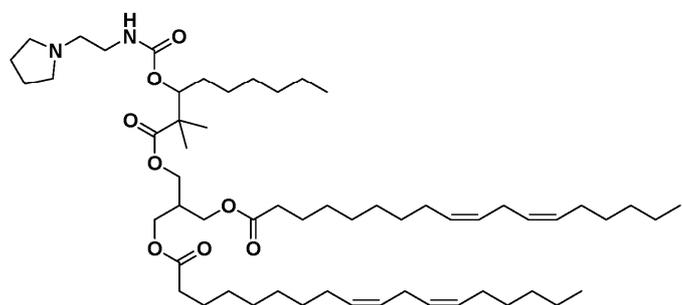
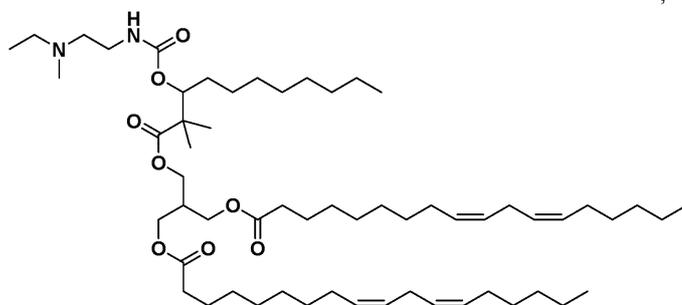
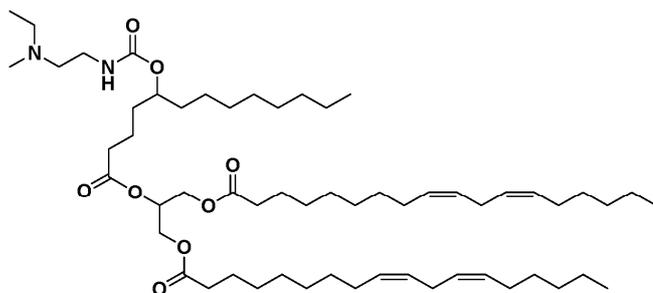
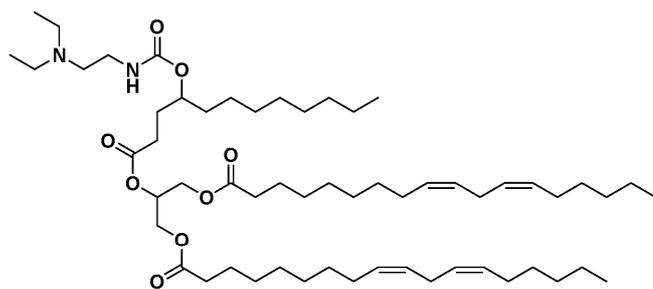


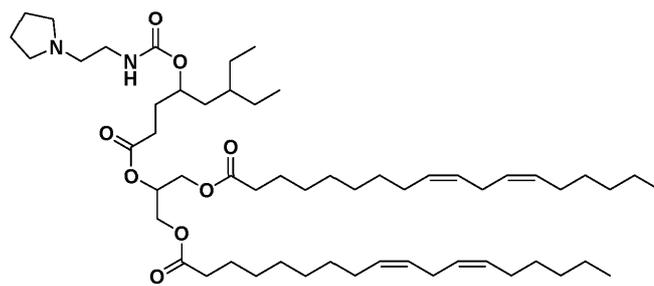
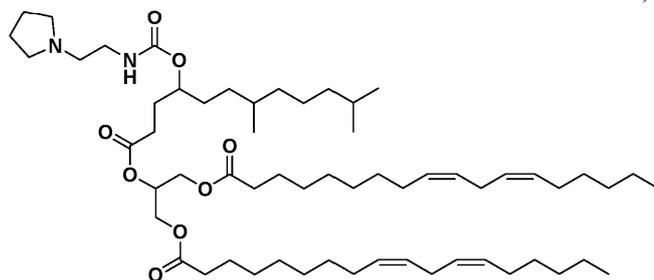
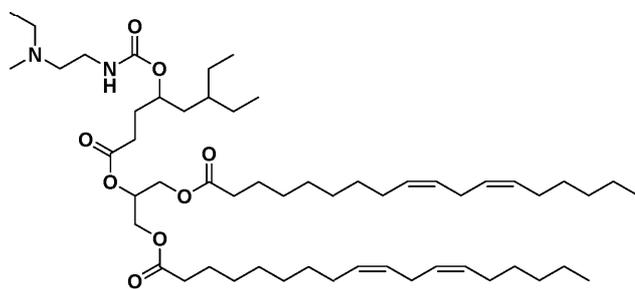
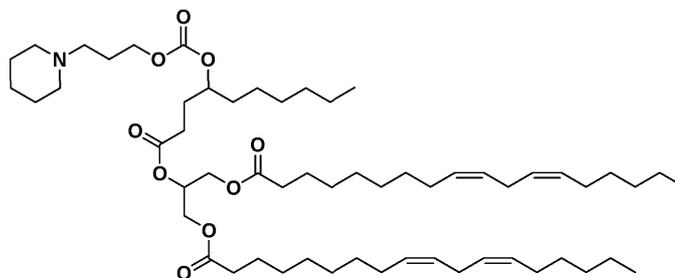
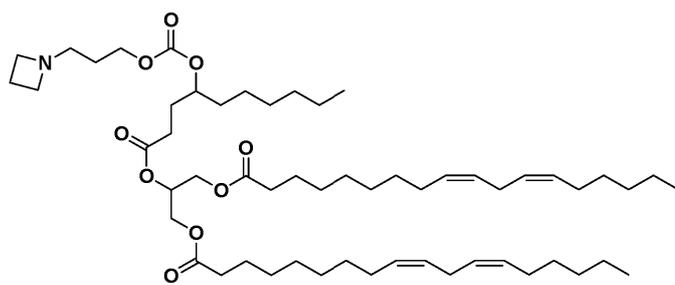


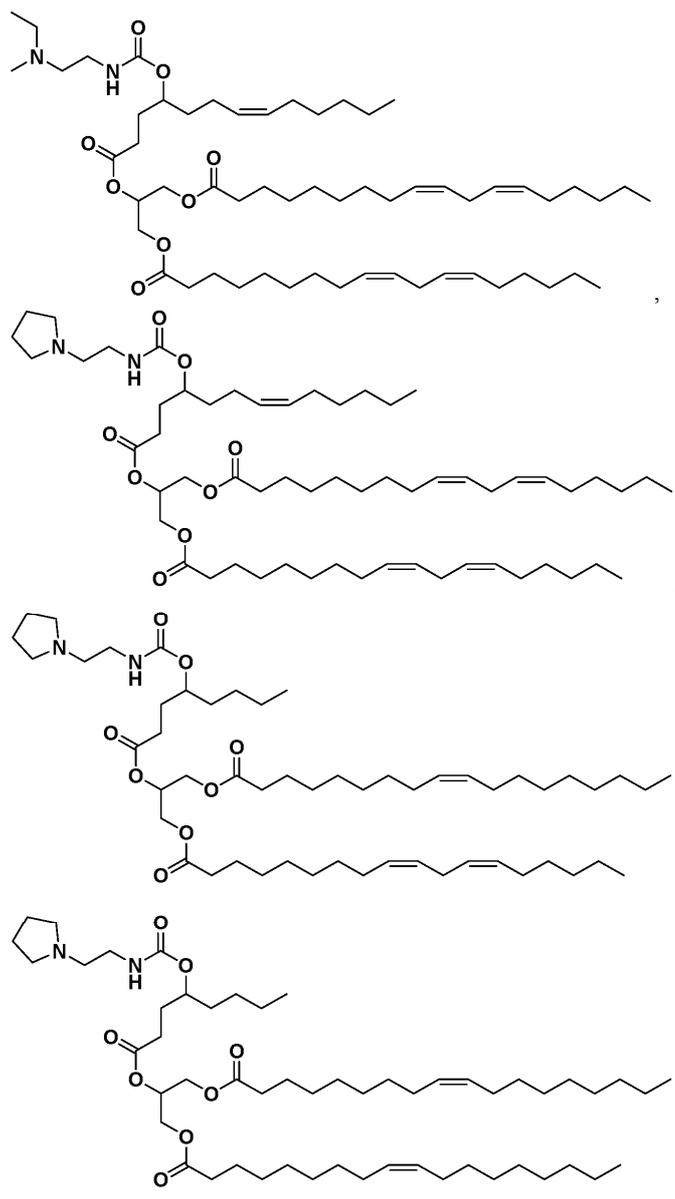


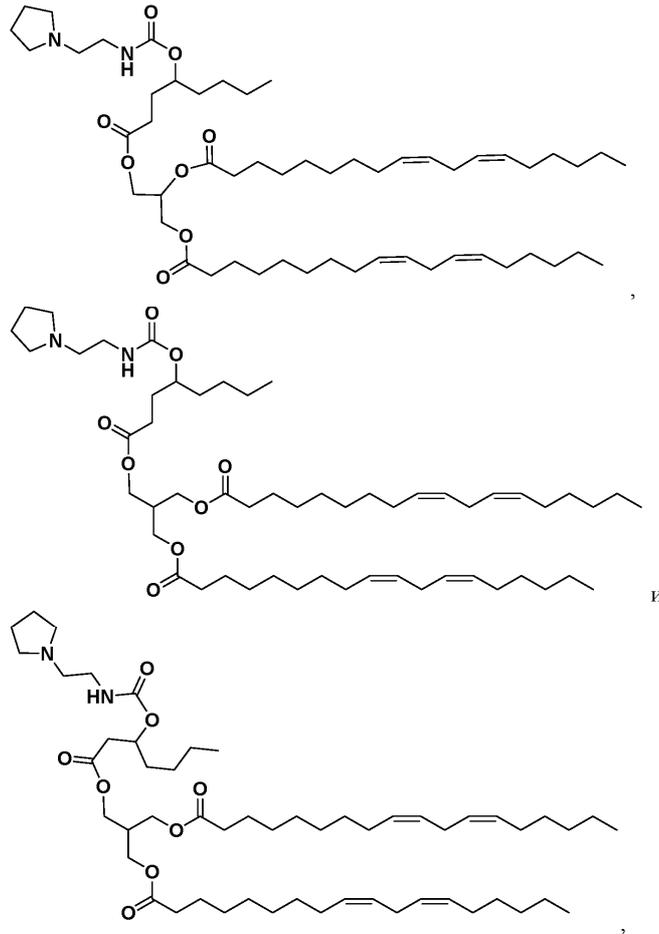












или их фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, изобретение относится к композиции липидных наночастиц (LNP), содержащей любое соединение, описанное в данном документе, в липидном компоненте.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной здесь композиции LNP, где липидный компонент дополнительно включает вспомогательный липид, липид полиэтиленгликоля (ПЭГ) и нейтральный липид.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной здесь композиции LNP, где композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной здесь композиции LNP, где композиция имеет отношение атомов азота/фосфорных групп (N/P) 3-10.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной здесь композиции LNP, где отношение N/P составляет 6 ± 1 .

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной здесь композиции LNP, дополнительно содержащая компонент РНК, причем компонент РНК содержит мРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной здесь композиции LNP, где РНК-компонент содержит последовательность, кодирующую РНК-направляемый связывающий ДНК агент, такой как мРНК нуклеазы Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к любой описанной здесь композиции LNP, где РНК-компонент включает гРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению композиции LNP для редактирования гена у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению композиции LNP для получения лекарственного средства для редактирования гена у субъекта.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А-1С показано редактирование *in vivo* в локусе TTR и соединения, протестированных в исследовании. На фиг. 1А показаны химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 1В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 1С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после родов.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки с использованием LNP, содержащих соединение формулы (IA) или контрольное соединение. Также показаны данные о реакции на дозу.

На фиг. 3А-3В показаны результаты после доставки с использованием LNP, содержащих соединение формулы (IA). Фиг. 3А представляет собой график, показывающий процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. Фиг. 3В представляет собой график, показывающий TTR сыворотки (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 4А-4С показано редактирование *in vivo* в локусе TTR и соединения, протестированных в исследовании. Фиг. 4А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 4В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 4С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после родов.

На фиг. 5А-5С показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 5А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 5В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 5С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после родов.

На фиг. 6А-6С показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 6А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 6В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 6С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 7А-7С показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 7А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 7В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 7С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 8А-8С показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 8А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений, где $n=1, 2$ или 3 . Фиг. 8В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 8С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 9А-9С показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 9А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 9В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 9С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 10А-10С показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 10А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 10В показывает процент изменения TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 10С показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 11А-11Д показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 11А и фиг. 11В иллюстрируют химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 11С показывает процент редактирования TTR в клетках печени мыши после доставки. На фиг. 11Д показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 12А-12В показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 12А показывает процент изменения TTR в клетках печени крысы после доставки. На фиг. 12В показаны уровни TTR в сыворотке (мкг/мл) после доставки.

На фиг. 13А-13В показаны соединения формулы (IA) и результаты доставки с использованием этих соединений. Фиг. 13А иллюстрирует химические структуры тестируемых соединений. Фиг. 13В показывает процент редактирования TTR в клетках HUH7 после доставки.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к липидам, в частности ионизируемым липидам, которые можно использовать для доставки биологически активных агентов, включая нуклеиновые кислоты, такие как РНК-компоненты CRISPR/Cas ("карго"), в клетку, а также к способам получения и использования таких композиций. Предоставлены липиды и их фармацевтически приемлемые соли, необязательно в виде композиций, содержащих липиды, включая композиции LNP. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP может содержать биологически активный агент, к примеру компонент РНК и липидный компонент, который включает соединение формулы (IA), (I), (II) или (III), как определено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения компонент РНК включает нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения липиды используются для доставки биологически активного агента, к примеру нуклеиновой кислоты, такой как мРНК, для клетки, такой как клетка печени. В некоторых вариантах осуществления компонент РНК включает гРНК и не-

обязательно мРНК, кодирующую нуклеазу Cas 2 класса, и необязательно гРНК или нуклеиновые кислоты, кодирующие гРНК. Также представлены методы редактирования генов и способы создания сконструированных клеток с использованием этих композиций.

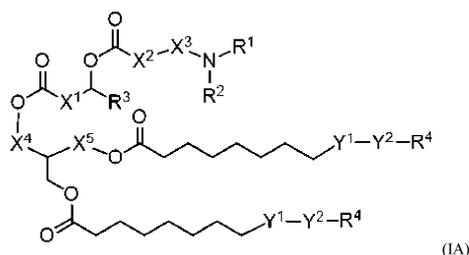
Композиции липидных наночастиц.

В настоящем документе раскрыты различные композиции LNP для доставки биологически активных агентов, таких как нуклеиновые кислоты, к примеру, мРНК и гРНК, включая карго CRISPR/Cas. Такие композиции LNP включают "ионизируемый аминный липид" вместе с нейтральным липидом, липидом ПЭГ и вспомогательным липидом. "Липидная наночастица" или "LNP" относится, без ограничения значения, к частице, которая включает множество (т.е. более одного) компонентов LNP, физически связанных друг с другом межмолекулярными силами.

Липиды.

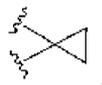
Изобретение обеспечивает липиды, которые можно использовать в композициях LNP.

В некоторых вариантах реализации настоящее описание относится к соединению, имеющему структуру формулы (IA):



(IA)

где независимо для каждого случая



X^1 представляет собой C_{1-3} алкилен или

X^2 выбирают из O, NH, NMe и связи, при условии, что, когда X^2 представляет собой O, R^2 вместе с атомом азота и либо R^1 , либо атомом углерода X^3 образует 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

X^3 представляет собой C_{2-4} алкилен,

X^4 представляет собой C_1 алкилен или связь,

X^5 представляет собой C_1 алкилен или связь,

R^1 представляет собой C_{1-3} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой,

R^2 представляет собой C_{1-3} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой, или

R^2 и R^1 , или R^2 и атом углерода X^3 , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

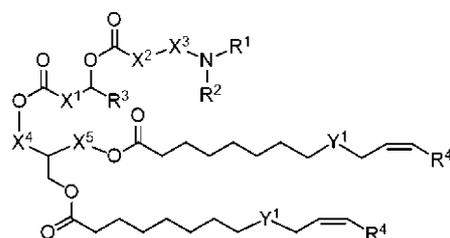
Y^1 выбирают из связи, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ и $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$,

Y^2 выбирают из $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ и C_3-C_4 алкилена,

R^3 выбирают из H, C_{5-7} циклоалкила, C_8-C_{10} алкенила, и C_{3-18} алкила,

R^4 представляет собой C_{4-8} алкил, или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах реализации настоящее описание относится к соединению, имеющему структуру формулы (I):



где независимо для каждого случая,

X^1 представляет собой C_{2-3} алкилен,

X^2 выбирают из O, NH, NMe и связи, при условии, что, когда X^2 представляет собой O, R^2 вместе с атомом азота и либо R^1 , либо атомом углерода X^3 образует 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

X^3 представляет собой C_{2-4} алкилен,

X^4 представляет собой C_1 алкилен или связь,

X^5 представляет собой C_1 алкилен или связь,

R^1 представляет собой C_{1-2} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой,

R^2 представляет собой C_{1-2} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой, или

R^2 и R^1 , или R^2 и атом углерода X^3 , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное или 6-членное кольцо,

Y^1 выбирают из $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ и $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$,

R^3 выбирают из H, C_{5-7} циклоалкила, и C_{3-18} алкила,

R^4 представляет собой C_{4-7} алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных вариантах реализации, X^1 представляет собой линейный C_2 алкилен. В других вариантах реализации, X^1 представляет собой C_1 алкилен.

В некоторых других вариантах реализации, X^2 представляет собой NH или O.

В определенных вариантах реализации, X^3 представляет собой C_{2-3} алкилен.

В некоторых других вариантах реализации, R^2 и атом углерода X^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-6-членное кольцо.

В некоторых других вариантах реализации, R^2 представляет собой C_{1-2} алкил.

В некоторых других вариантах реализации, R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-6-членное кольцо.

В некоторых других вариантах реализации, R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо.

В некоторых других вариантах реализации, R^1 представляет собой C_{1-2} алкил.

В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой линейный C_{4-16} алкил.

В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой разветвленный C_{6-10} алкил.

В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой C_{5-7} циклоалкил.

В некоторых других вариантах реализации, R^3 представляет собой C_{8-10} алкенил.

В некоторых других вариантах реализации, R^4 представляет собой линейный C_{5-6} алкил.

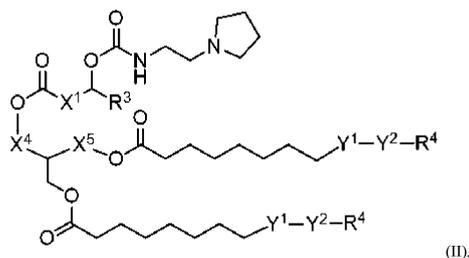
В некоторых других вариантах реализации, X^4 представляет собой связь.

В некоторых других вариантах реализации, X^5 представляет собой C_1 алкилен.

В определенных вариантах реализации, соединение представляет собой соединение формулы (IA); и Y^2-R^4 представляет собой $-CH_2-CH=CH-R^4$.

В некоторых других вариантах реализации, Y^1 выбирают из связи, $-CH=CH-$ и $-O(C=O)-$.

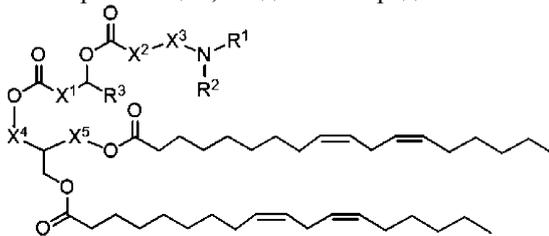
В определенных вариантах реализации, соединение представляет собой соединение формулы II:



(III),

где переменные определены как для формулы (IA).

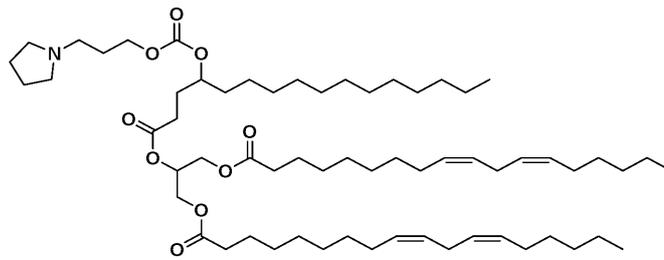
В определенных вариантах реализации, соединение представляет собой соединение формулы III;

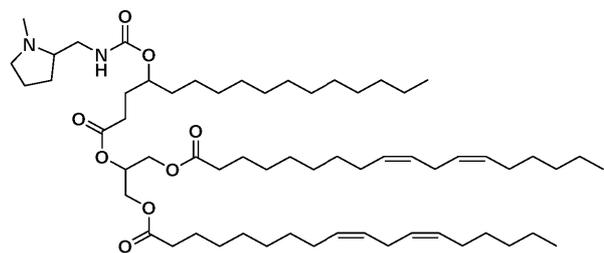
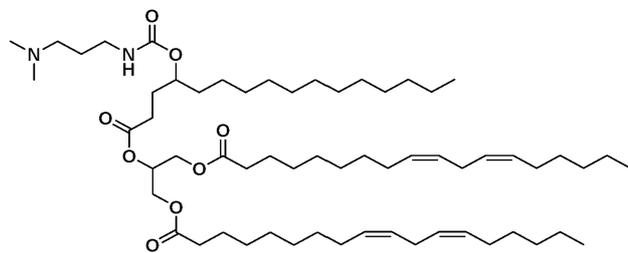
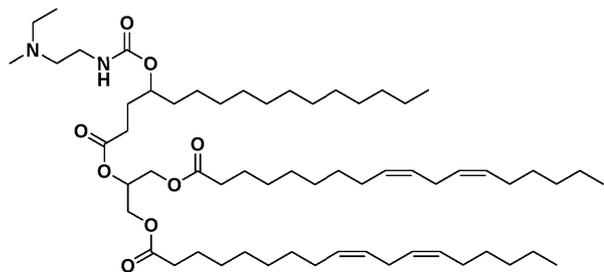
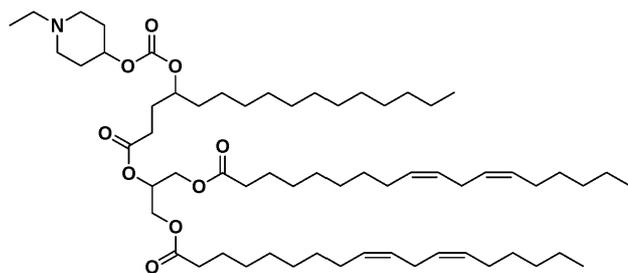


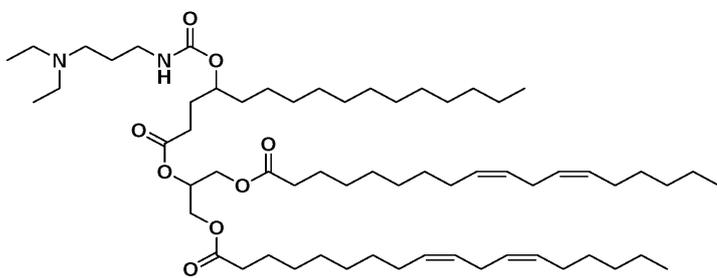
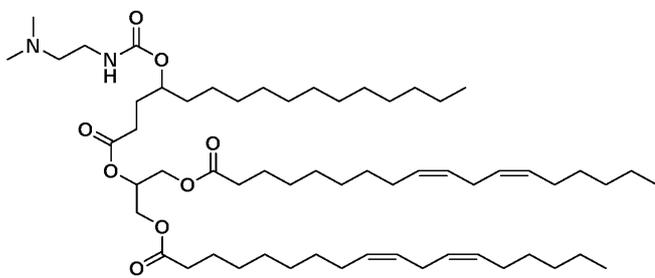
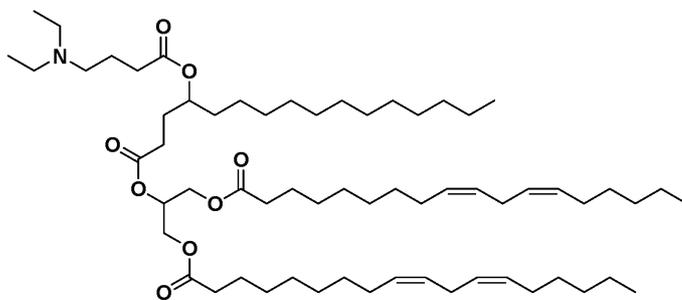
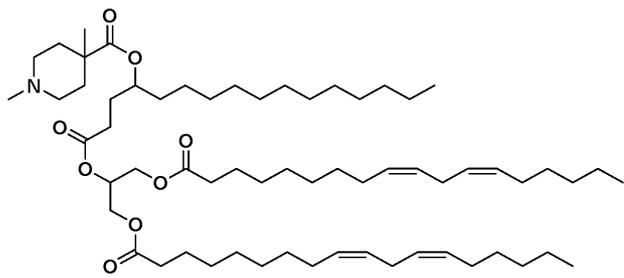
(III),

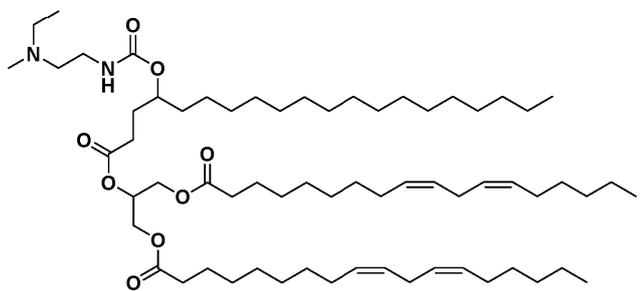
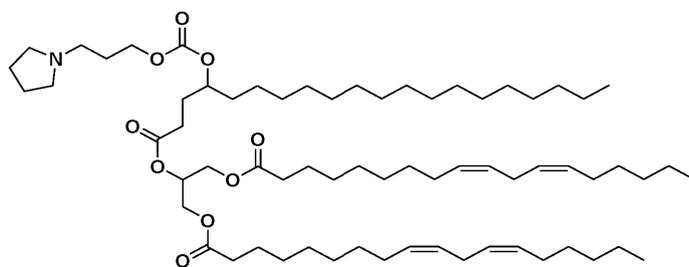
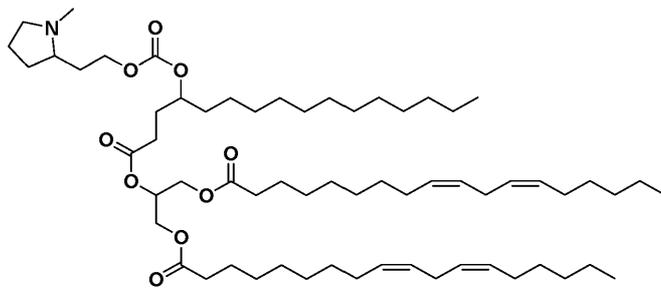
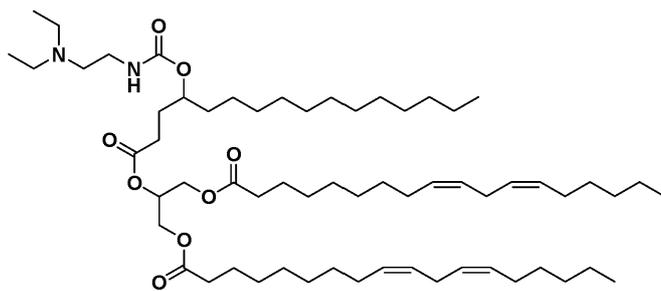
где переменные определены как для формулы (IA).

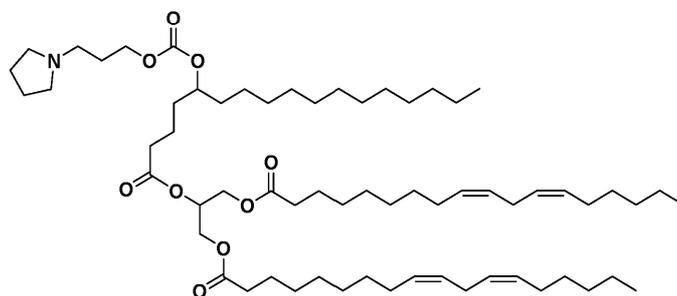
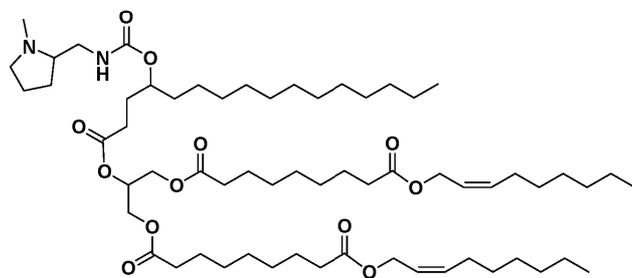
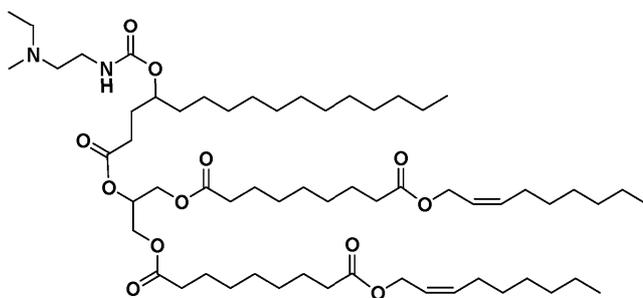
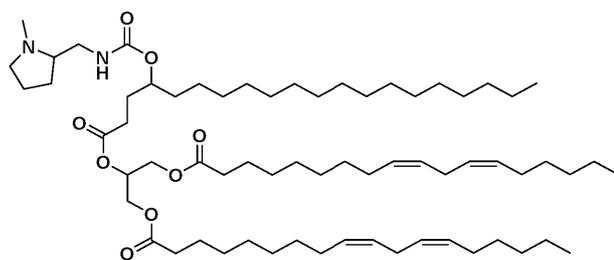
Типичные соединения формул (IA) или (I) включают:

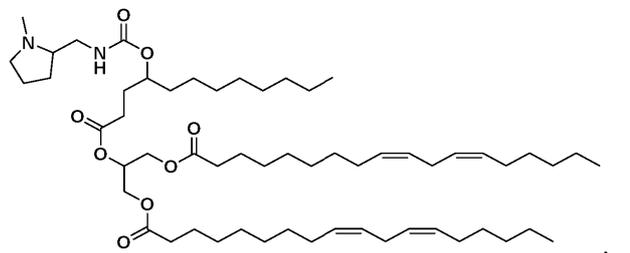
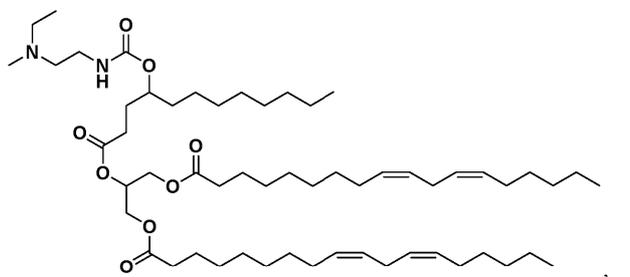
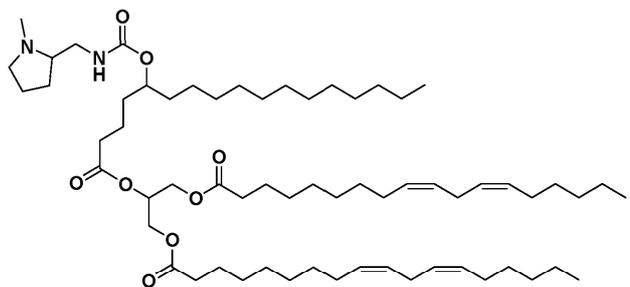
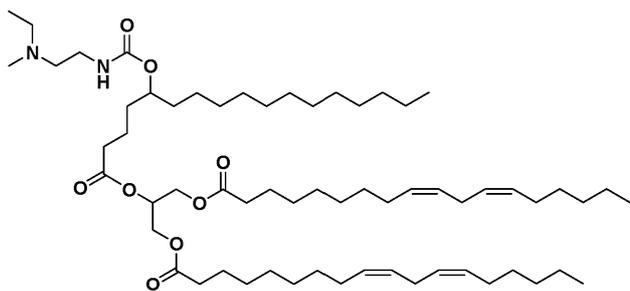


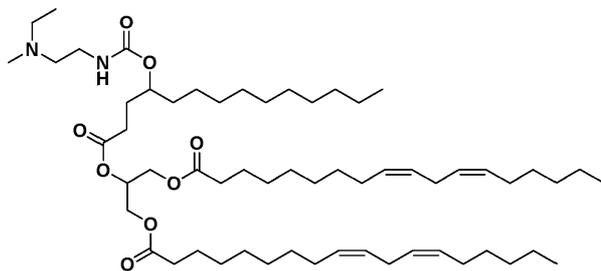
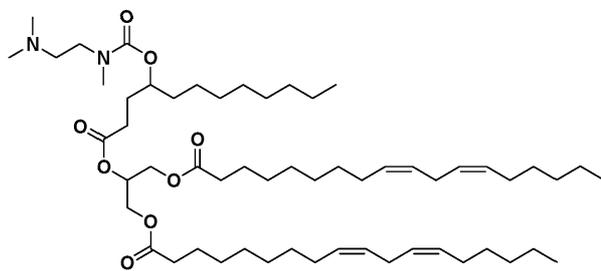
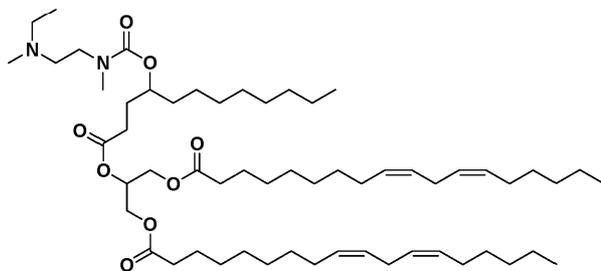
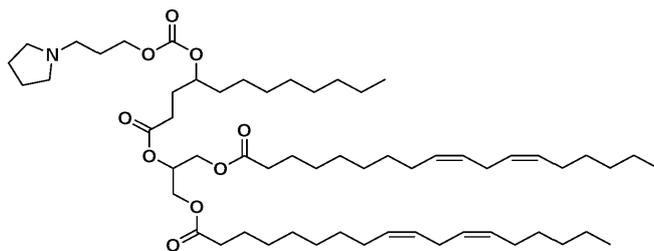


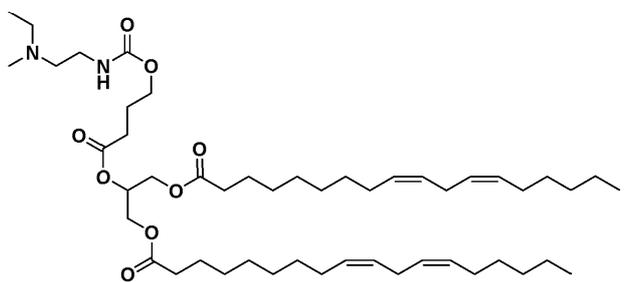
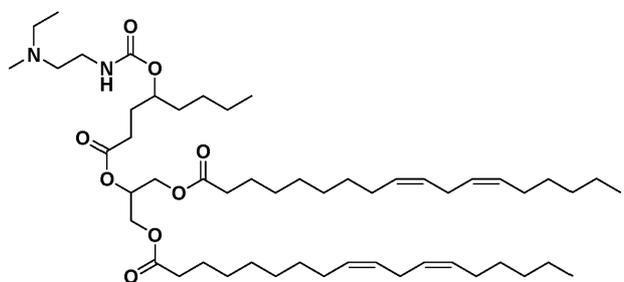
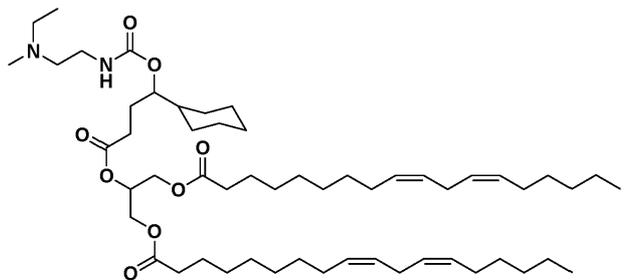
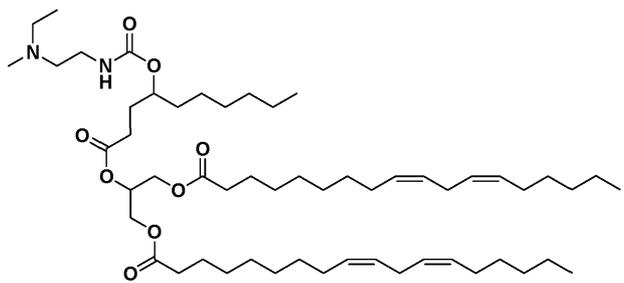


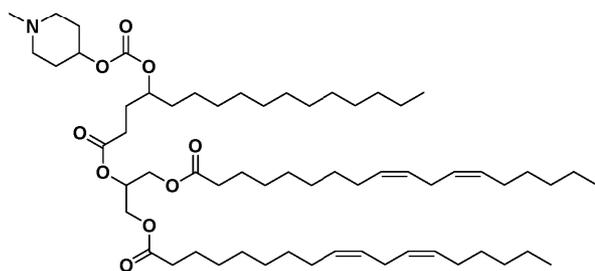
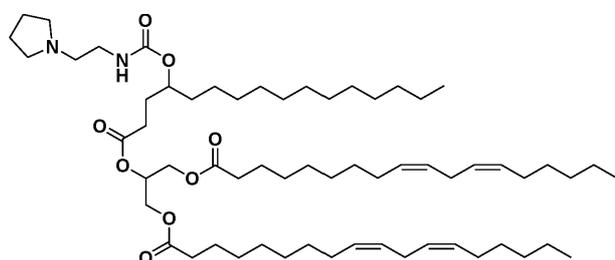
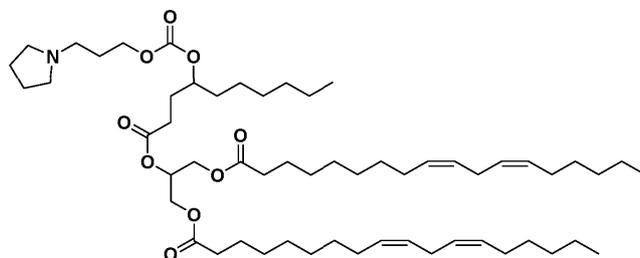
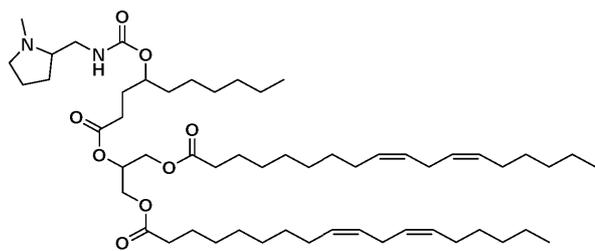


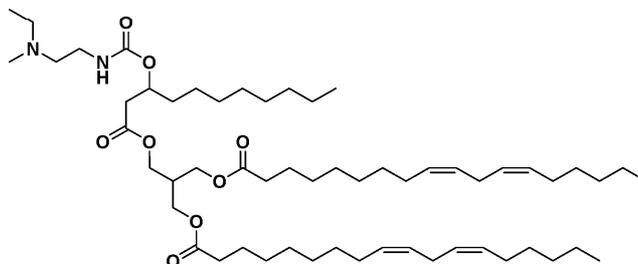
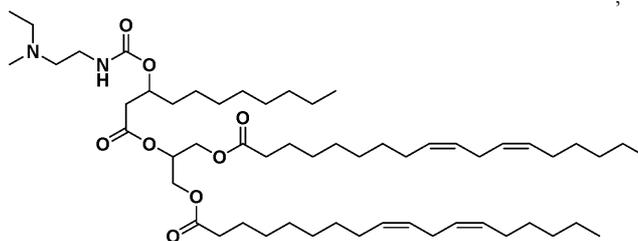
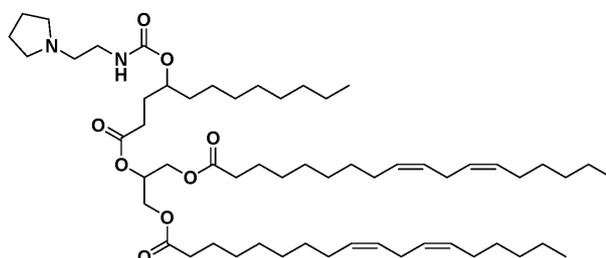
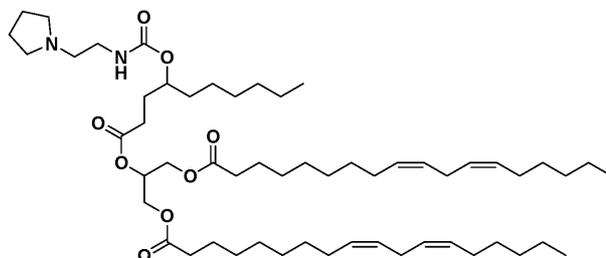
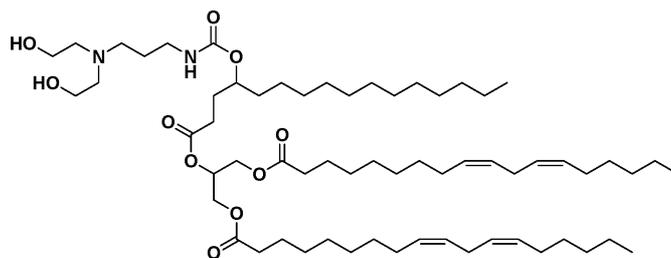


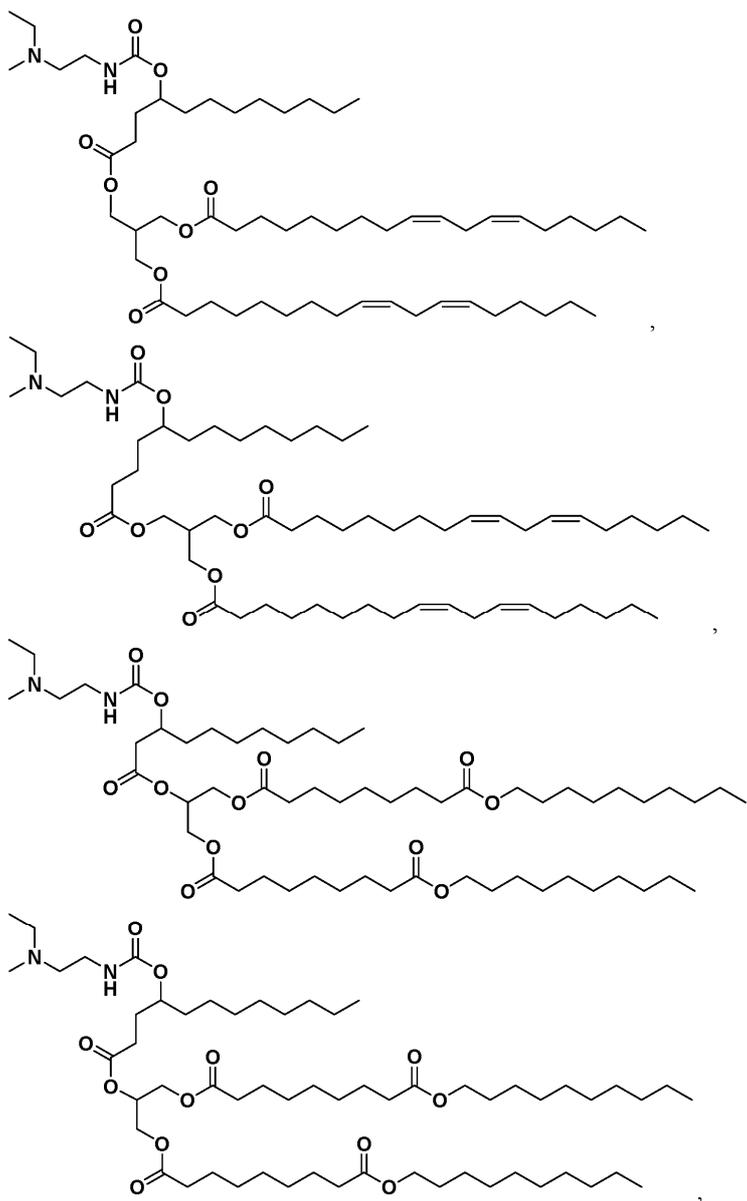


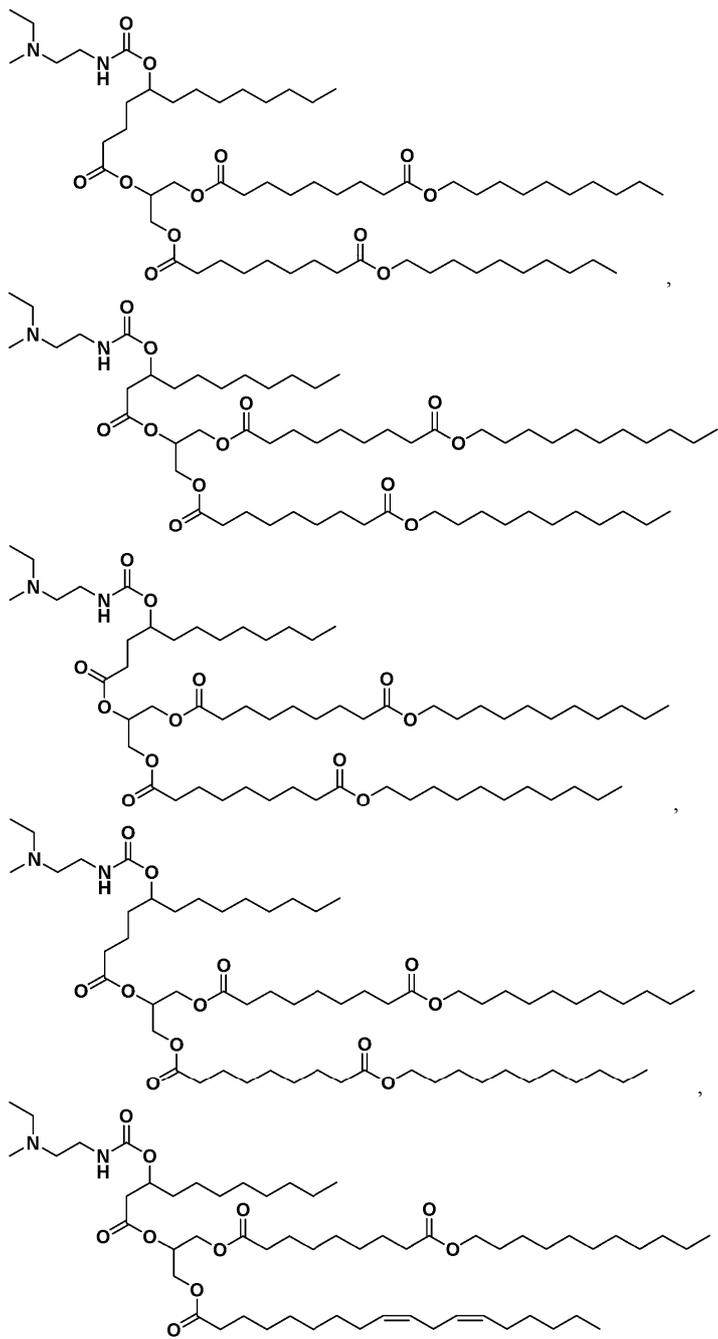


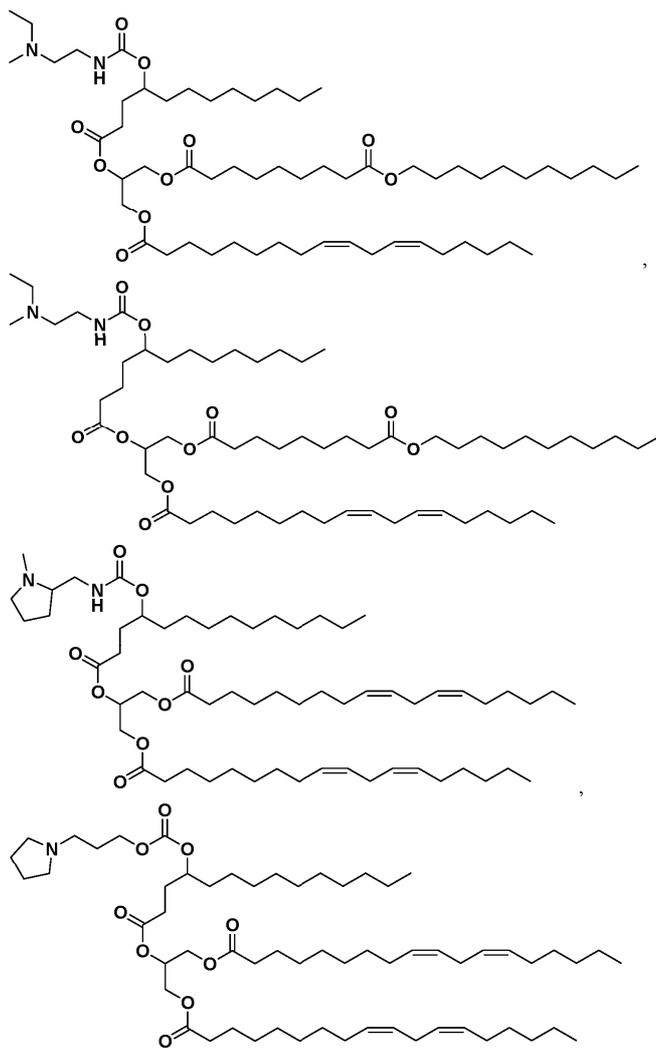


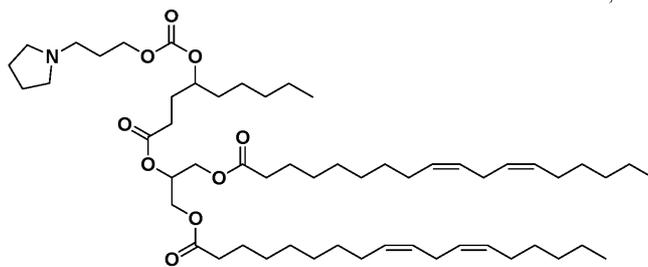
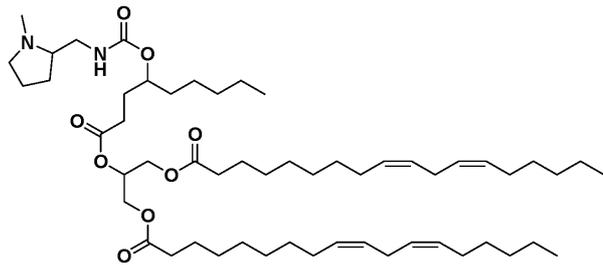
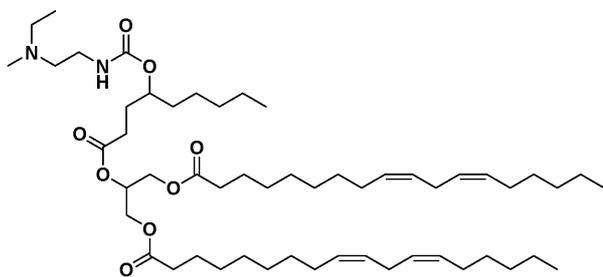
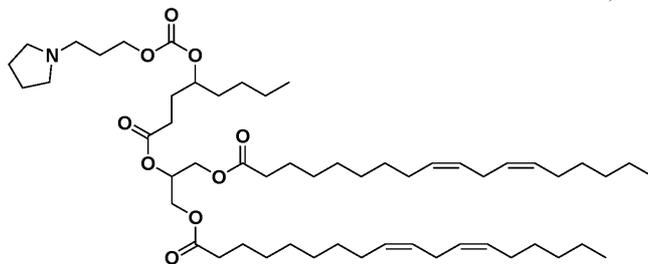
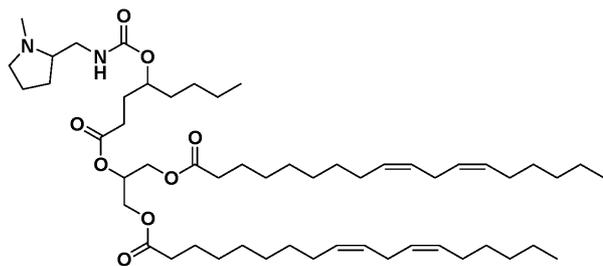


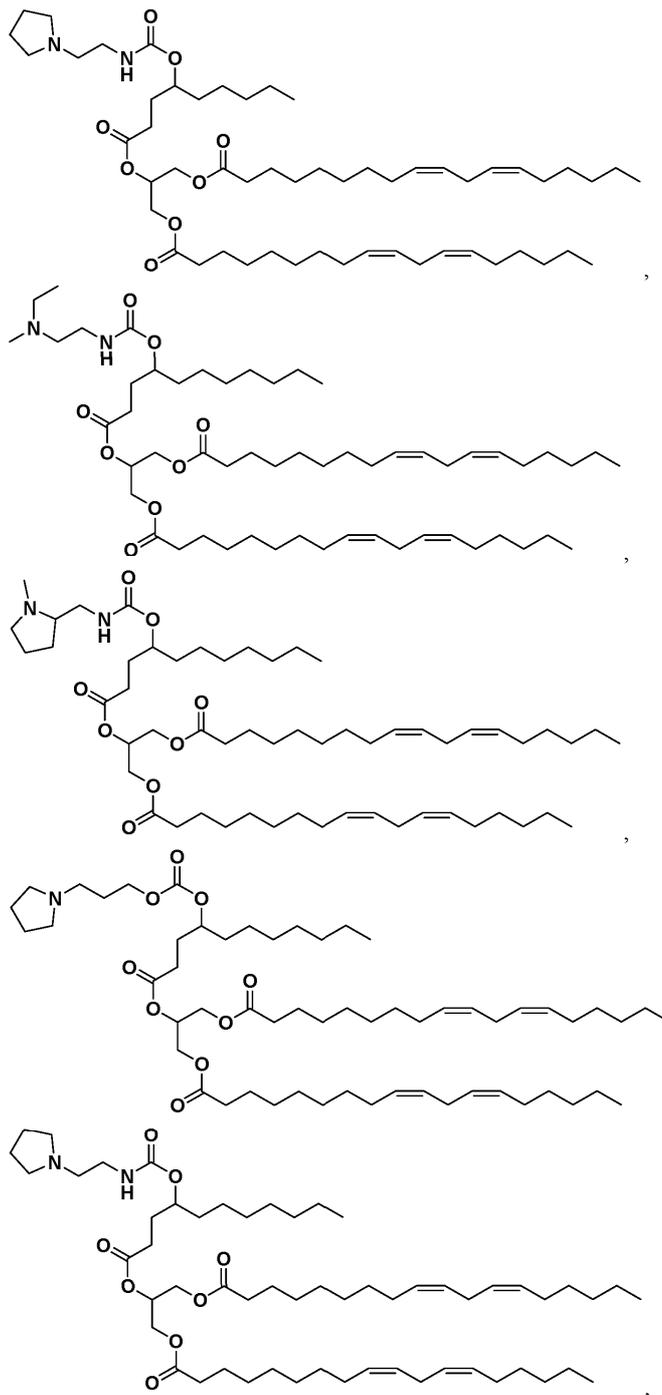


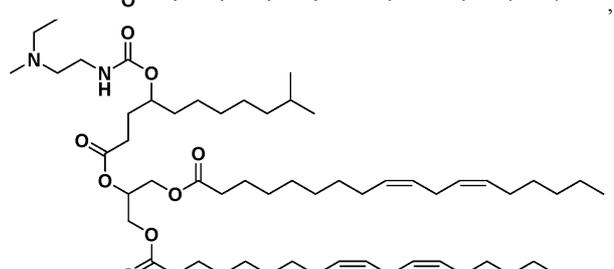
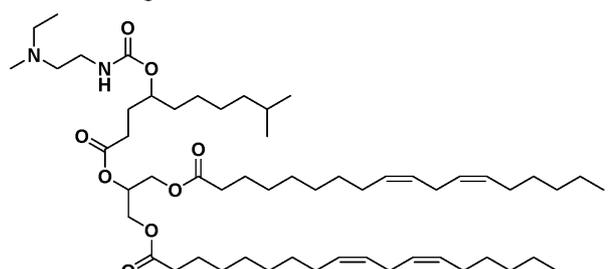
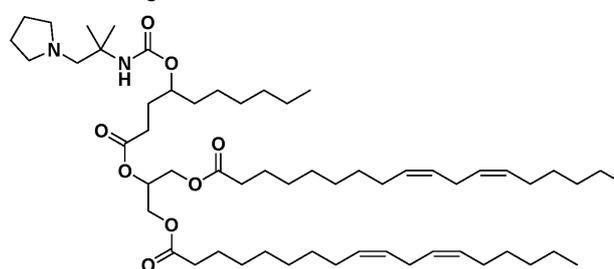
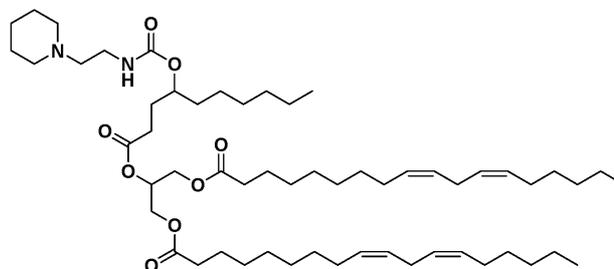
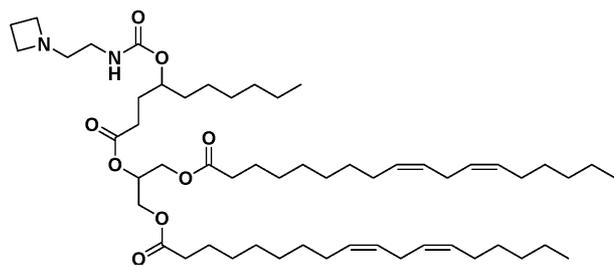


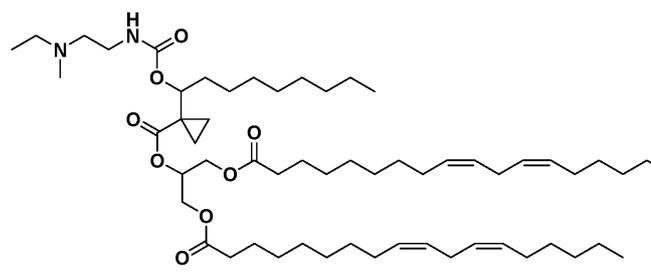
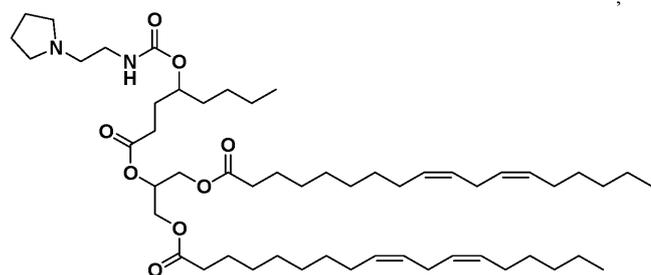
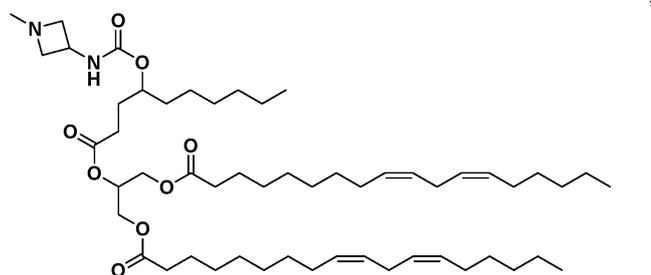
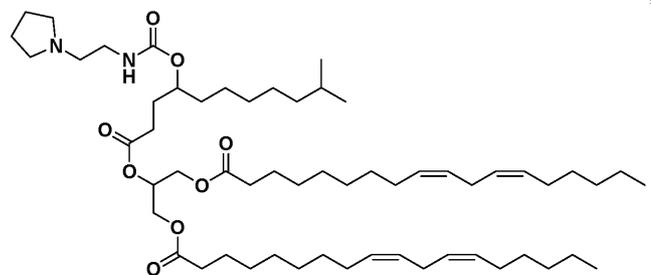
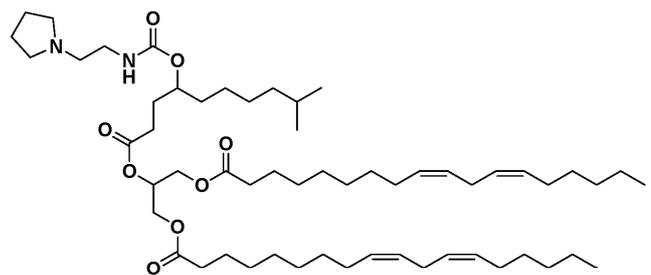


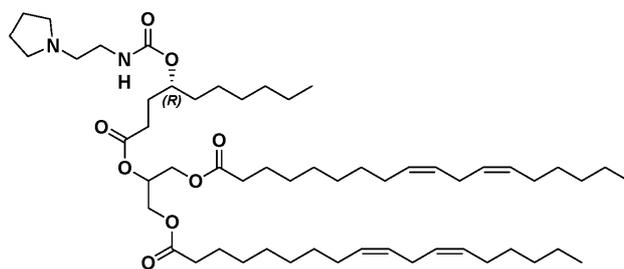
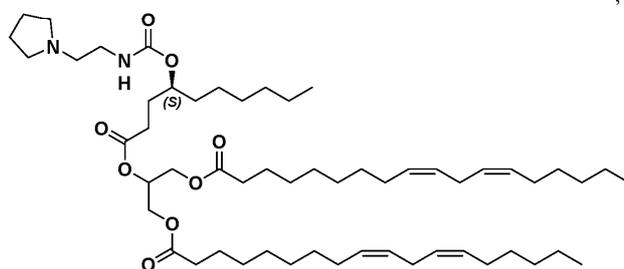
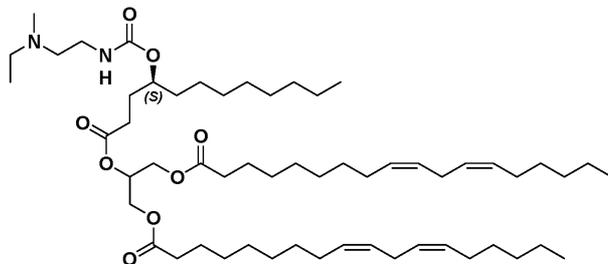
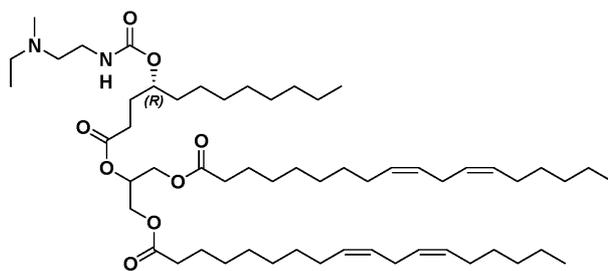


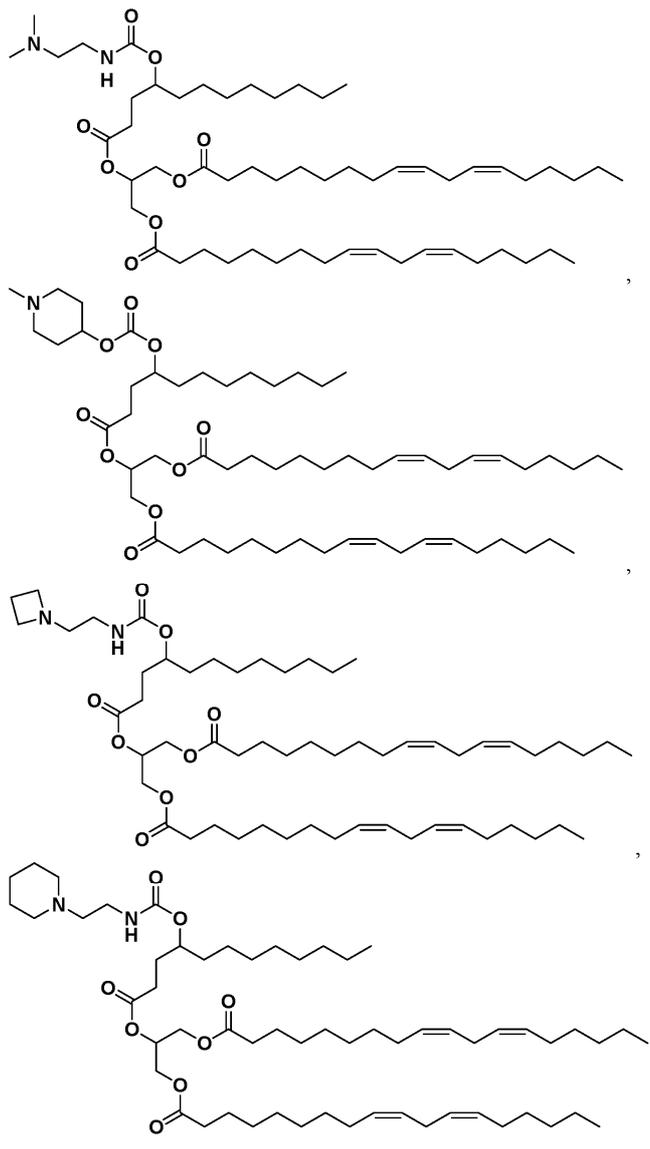


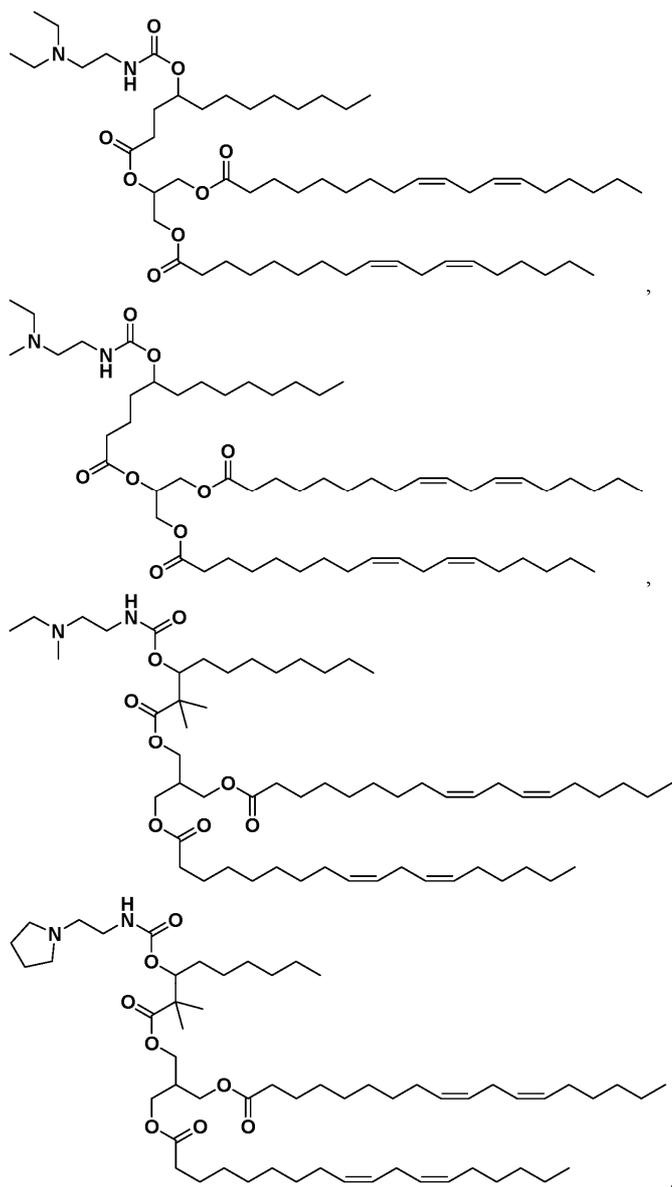


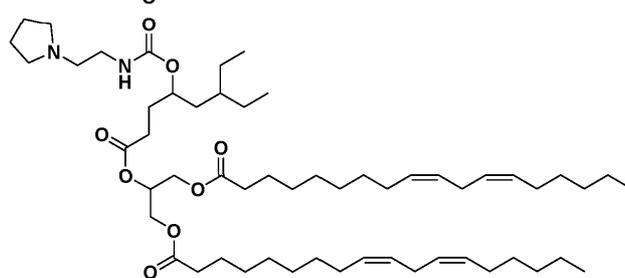
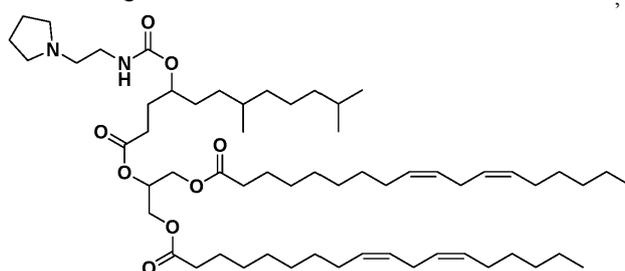
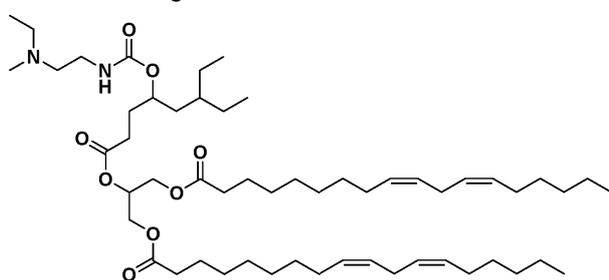
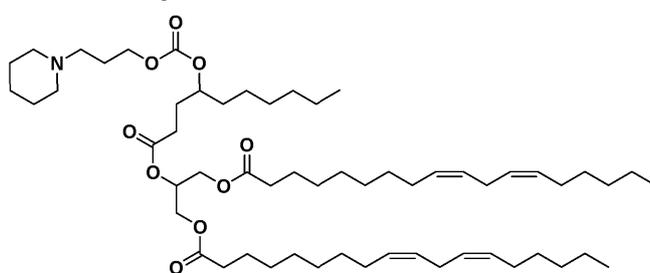
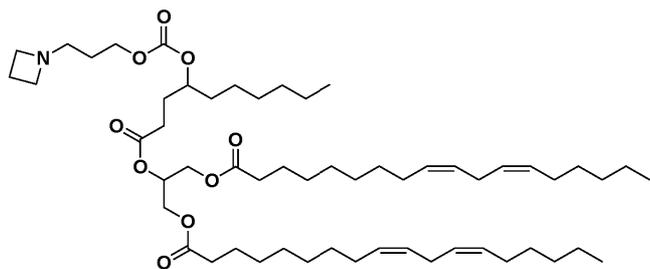


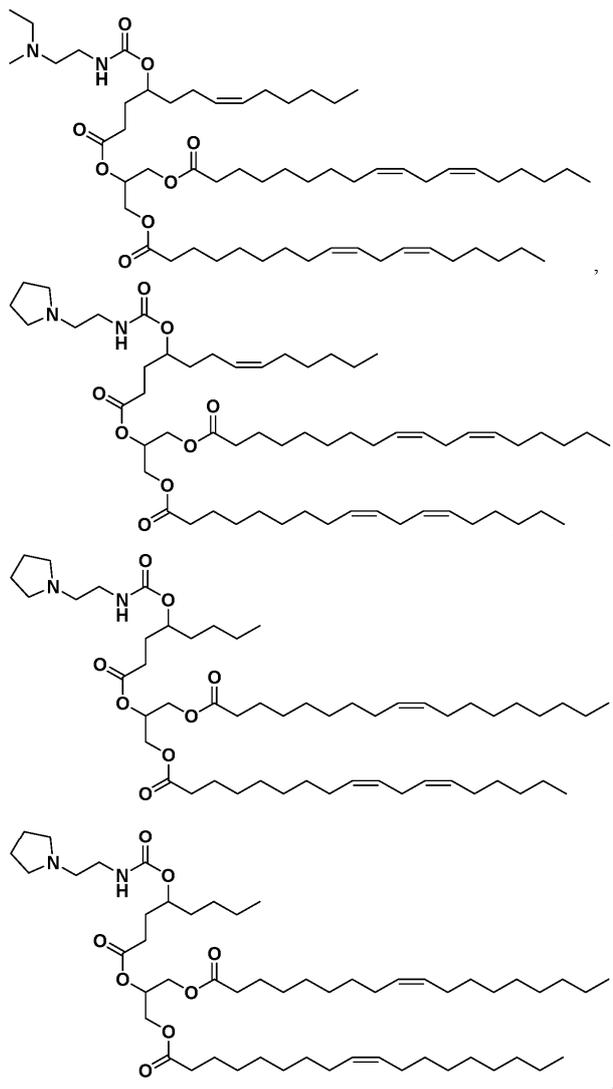


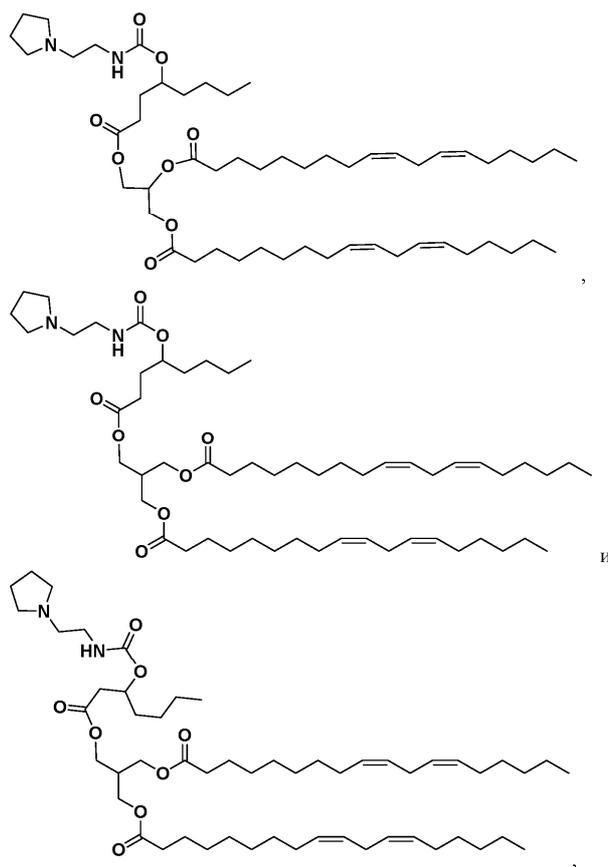












или их фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 75% соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) липидных композиций, составленных, как описано в настоящем документе, выводятся из плазмы субъекта в течение 8, 10, 12, 24, или через 48 часов, или через 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней после введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 50% липидных композиций, содержащих соединение формулы (IA), (I), (II) или (III), как раскрыто в настоящем документе, выводятся из плазмы субъекта в течение 8, 10, 12, 24, или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней после введения, что может быть определено, к примеру, путем измерения липида (к примеру, соединения формулы (IA), (I), (II) или (III)), РНК (к примеру, мРНК) или другого компонента в плазме. В некоторых вариантах осуществления изобретения измеряется инкапсулированный липид по сравнению со свободным липидом, РНК или нуклеиновой кислотой в липидной композиции.

Липидный клиренс можно измерить, как описано в литературе. См. Maier, M.A., et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78 ("Maier"). К примеру, в Maier системы LNP-миРНК, содержащие миРНК, нацеленные на люциферазы, вводили самцам мышей C57B1/6 в возрасте от шести до восьми недель в дозе 0,3 мг/кг путем внутривенной болюсной инъекции через боковую хвостовую вену. Образцы крови, печени и селезенки собирали через 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 и 168 ч после введения дозы. Мышей перфузировали физиологическим раствором перед забором тканей и обрабатывали образцы крови для получения плазмы. Все образцы были обработаны и проанализированы с помощью LC-MS. Кроме того, Maier описывает процедуру оценки токсичности после введения композиций LNP-миРНК. Например, миРНК, нацеленную на люциферазу, вводили самцам крыс Спрег-Дули в дозе 0, 1, 3, 5 и 10 мг/кг (5 животных в группе) путем однократной внутривенной болюсной инъекции в дозе 5 мл/кг. Через 24 ч из яремной вены находившихся в сознании животных получали около 1 мл крови и выделяли сыворотку. Через 72 ч после введения дозы всех животных умерщвляли для вскрытия трупа. Была проведена оценка клинических признаков, веса тела, химического состава сыворотки, веса органов и гистопатологии. Хотя Maier описывает способы оценки композиций миРНК-LNP, эти способы можно применять для оценки клиренса, фармакокинетики и токсичности введения липидных композиций, таких как композиции LNP настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидные композиции, в которых используются соединения формулы (IA), (I), (II) или (III), раскрытые в настоящем документе, демонстрируют повышенную скорость клиренса по сравнению с альтернативными ионизируемыми аминокислотными липидами. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения скорость клиренса представляет собой скорость клиренса липидов, к примеру скорость, с которой соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) выводится

из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения скорость очистки представляет собой скорость очистки карго (к примеру, биологически активного агента), к примеру скорость, с которой компонент карго удаляется из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения скорость клиренса представляет собой скорость клиренса РНК, к примеру скорость, с которой мРНК или гРНК удаляются из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения скорость выведения представляет собой скорость, с которой LNP выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения скорость клиренса представляет собой скорость, с которой LNP удаляется из ткани, такой как ткань печени или ткань селезенки. Желательно, чтобы высокая скорость выведения могла привести к профилю безопасности без существенных побочных эффектов и/или к снижению накопления LNP в кровообращении и/или в тканях.

Соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения могут образовывать соли в зависимости от pH среды, в которой они находятся. К примеру, в слабнокислой среде соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) могут быть протонированы и, таким образом, нести положительный заряд. И наоборот, в слабощелочной среде, такой как, к примеру, кровь, где pH составляет приблизительно 7,35, соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) могут не протонироваться и, таким образом, не иметь заряда. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения могут быть преимущественно протонированы при pH по меньшей мере около 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения могут быть преимущественно протонированы при pH по меньшей мере примерно 10.

Значение pH, при котором соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) преимущественно протонируется, связано с его собственным pKa. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения соль соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения имеет pKa в диапазоне от около 5,1 до около 8,0, более предпочтительно от около 5,5 до около 7,5, к примеру от около 6,1 до около 6,3. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения соль соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения имеет pKa в диапазоне от около 5,3 до около 8,0, к примеру, от около 5,6 до около 7,2, от около 5,7 до около 6,5. В других вариантах осуществления изобретения соль соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения имеет pKa в диапазоне от около 5,7 до около 6,4, к примеру, от около 5,8 до около 6,2. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения соль соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения имеет pKa в диапазоне от около 5,7 до около 6,5, к примеру, от около 5,8 до около 6,4. В качестве альтернативы соль соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) настоящего изобретения имеет pKa в диапазоне от около 5,8 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления изобретения pKa протонированной формы соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) составляет от около 5,5 до около 6,0. Соль соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) по настоящему изобретению может иметь pKa в диапазоне от около 6,0 до около 8,0, предпочтительно от около 6,0 до около 7,5. pKa соли соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) может быть важным фактором при составлении LNP, поскольку было обнаружено, что LNP, составленные с определенными липидами, имеющими диапазон pKa от около 5,5 до около 7,0 эффективны для доставки карго *in vivo*, к примеру в печень. Кроме того, было обнаружено, что LNP, составленные с определенными липидами, имеющими pKa в диапазоне от около 5,3 до около 6,4, эффективны для доставки *in vivo*, например в опухоли. См, например, WO 2014/136086.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к энантиобогащенному соединению формулы (IA), (I), (II) или (III). Уровень энантиобогащения соединения может быть выражен как энантиомерный избыток (ee). Соединение ee можно измерить делением разницы долей энантиомеров на сумму долей энантиомеров. К примеру, если обнаружено, что соединение содержит 98% (S)-энантиомер и 2% (R) энантиомер, то ee соединения составляет $(98-2)/(98+2)$ или 96%. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) имеет около 30% ee или больше, 40% ee или больше, 50% ee или больше, 60% ee или больше, 70% ee или больше, около 80% ee, около 85%, около 88% ee, около 90% ee, около 91%, около 92% ee, около 93%, около 94%, около 95%, около 96% ee, около 97% ee, около 98%, около 99% или выше, около 99% ee, даже если этот % ee больше, чем % ee исходного материала, к примеру 0% ee (рацемический). В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) является энантиобогащенным. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) является энантиочистым. В вариантах осуществления изобретения, где соединение имеет более одного стереоцентра, этот стереоцентр может быть обогащен существенным образом независимо от стереохимического расположения/обогащения любых других стереоцентров молекулы. К примеру, соединение, описанное здесь, может иметь 30% de или больше, 40% de или больше, 50% de или больше, 60% de или больше, 70% de или больше, 80% de или больше, 90% de или больше, 95% de или больше или даже 98% de или больше в конкретном стереоцентре.

Дополнительные липиды.

"Нейтральные липиды", подходящие для использования в липидной композиции настоящего изобретения, включают, к примеру, множество нейтральных, незаряженных или цвиттерионных липидов. Примеры нейтральных фосфолипидов, подходящих для использования в настоящем описании, включа-

ют, но не ограничиваются ими, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), фосфохолин (DOPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), фосфатидилхолин (PLPC), 1,2-дистеароил-сн-глицеро-3-фосфохолин (DAPC), фосфатидилэтанолламин (PE), яичный фосфатидилхолин (EPC), дилаурилоилфосфатидилхолин (DLPC), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), 1-миристоил-2-пальмитоил фосфатидилхолин (MPPC), 1-пальмитоил-2-миристоил фосфатидилхолин (PMPC), 1-пальмитоил-2-стеароил фосфатидилхолин (PSPC), 1,2-диарахидоил-сн-глицеро-3-фосфохолин (DBPC), 1-стеароил-2-пальмитоил фосфатидилхолин (SPPC), 1,2-дникосеноил-сн-глицеро-3-фосфохолин (DEPC), пальмитоилолеоил фосфатидилхолин (POPC), лизофосфатидил холин, диолеоил фосфатидилэтанолламин (DOPE), диолеоилфосфатидилхолин дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), димиристоил фосфатидилэтанолламин (DMPE), дипальмитоил фосфатидилэтанолламин (DPPE), пальмитоилолеоил фосфатидилэтанолламин (POPE), лизофосфатидилэтанолламин и их комбинации. В некоторых вариантах реализации нейтральный фосфолипид может быть выбирают из дистеароилфосфатидилхолина (DSPC) и димиристоил фосфатидил этаноламина (DMPE), предпочтительно дистеароилфосфатидилхолина (DSPC).

"Вспомогательные липиды" включают стероиды, стерины и алкил резорцины. Вспомогательные липиды, подходящие для использования в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, холестерин, 5-гептадецилрезорцин и гемисукцинат холестерина. В некоторых вариантах реализации вспомогательный липид может представлять собой холестерин или его производное, такое как гемисукцинат холестерина.

Липиды ПЭГ могут влиять на продолжительность существования наночастиц *in vivo* (к примеру, в крови). Липиды ПЭГ могут способствовать процессу приготовления, к примеру, уменьшая агрегацию частиц и контролируя размер частиц. Используемые здесь липиды ПЭГ могут модулировать фармакокинетические свойства LNP. Обычно липид ПЭГ включает липидный фрагмент и полимерный фрагмент на основе ПЭГ (иногда называемый поли(этиленоксидом)) (фрагмент ПЭГ). Липиды ПЭГ, подходящие для использования в липидной композиции с соединением формулы (IA), (I), (II) или (III) по настоящему изобретению, и информацию о биохимии таких липидов можно найти в Romberg et al., *Pharmaceutical Research* 25 (1), 2008, pp. 55-71 и Hoekstra et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52. Дополнительные подходящие липиды ПЭГ описаны, к примеру, в WO 2015/095340 (стр. 31, строчка 14 - стр. 37, строчка 6), WO 2006/007712 и WO 2011/076807 ("скрытые липиды").

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидный фрагмент может быть производным диацилглицерина или диацилгликамида, включая группы, содержащие диалкилглицерин или диалкилгликамидную группу, имеющую длину алкильной цепи, независимо содержащую от около C₄ до около C₄₀ насыщенных или ненасыщенных атомов углерода, где цепь может содержать один или несколько функциональных групп, таких как, к примеру, амид или сложный эфир. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина алкильной цепи составляет примерно от C₁₀ до C₂₀. Группа диалкилглицерина или диалкилгликамида может дополнительно содержать одну или несколько замещенных алкильных групп. Длины цепочек могут быть симметричными или асимметричными.

Если не указано иное, термин "ПЭГ" в контексте настоящего описания означает любой полиэтиленгликоль или другой полимер на основе простого полиалкиленового эфира, такой как необязательно замещенный линейный или разветвленный полимер этиленгликоля или этиленоксида. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент ПЭГ не замещен. Альтернативно, фрагмент ПЭГ может быть замещен, к примеру, одной или несколькими алкильными, алкокси, ацильными, гидроксильными или арильными группами. К примеру, фрагмент ПЭГ может включать сополимер ПЭГ, такой как ПЭГ-полиуретан или ПЭГ-полипропилен (см., к примеру, J. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992)); альтернативно, фрагмент ПЭГ может быть гомополимером ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу от около 130 до около 50000, к примеру от около 150 до около 30000, или даже от около 150 до около 20000. Точно так же фрагмент ПЭГ может иметь молекулярную массу от около 150 до около 15000, от около 150 до около 10000, от около 150 до около 6000, или даже от около 150 до около 5000. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу от около 150 до около 4000, от около 150 до около 3000, от около 300 до около 3000, от около 1000 до около 3000 или от около 1500 до около 2500.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фрагмент ПЭГ представляет собой "ПЭГ-2К", также называемый "ПЭГ 2000", который имеет среднюю молекулярную массу примерно 2000 дальтон. ПЭГ-2К представлен здесь следующей формулой (II), где n равно 45, что означает, что

средняя степень полимеризации включает около 45 субъединиц

$$\left[\text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \right]_n \text{OR} \quad (\text{II})$$

Однако могут быть использованы другие варианты осуществления ПЭГ, известные в данной области техники, включая, к примеру, те, в которых усредненная по числу степень полимеризации составляет около 23 субъединиц (n=23) и/или 68 субъединиц (n=68). В некоторых вариантах осуществления изобретения n может находиться в диапазоне от около 30 до около 60. В некоторых вариантах осуществления изобретения n может находиться в диапазоне от около 35 до около 55. В некоторых вариантах осуществ-

ления изобретения p может находиться в диапазоне от около 40 до около 50. В некоторых вариантах осуществления изобретения p может находиться в диапазоне от около 42 до около 48. В некоторых вариантах осуществления изобретения p может быть 45. В некоторых вариантах осуществления изобретения R может быть выбирают из H, замещенного алкила и незамещенного алкила. В некоторых вариантах осуществления изобретения R может быть незамещенным алкилом, таким как метил.

В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, липид ПЭГ может быть выбирают из ПЭГ-дилауроилглицерина, ПЭГ-димиристоилглицерина (ПЭГ-DMG) (номер по каталогу GM-020 от NOF, Токио, Япония), ПЭГ-дипальмитоилглицерина, ПЭГ-дистеароилглицерина (ПЭГ-DSPE) (номер по каталогу DSPE-020CN, NOF, Токио, Япония), ПЭГ-дилаурилглицамида, ПЭГ-димиристилглицамида, ПЭГ-дипальмитоилглицамида и ПЭГ-дистеароилглицамида, ПЭГ-холестерина(1-[8'-(Холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксаоктанил]карбамоил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль), ПЭГ-DMB (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль)эфир), 1,2-димиристоил-сн-глицеро-3-фосфозаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2k-DMG) (кат. № 880150P от Avanti Polar Lipids, Алабама, США), 1,2-дистеароил-сн-глицеро-3-фосфозаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2k-DSPE) (кат. № 880120C от Avanti Polar Lipids, Алабама, США), 1,2-дистеароил-сн-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (ПЭГ2k-DSG; GS-020, NOF Токио, Япония), поли(этиленгликоль)-2000-диметакрилат (ПЭГ2k-DMA) и 1,2-дистеарилноксипропил-3-амин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2k-DSA). В некоторых таких вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может быть ПЭГ2k-DMG. В некоторых вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может представлять собой ПЭГ2k-DSG. В других вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может быть ПЭГ2k-DSPE. В некоторых вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может представлять собой ПЭГ2k-DMA. В еще других вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может представлять собой ПЭГ2k-C-DMA. В некоторых вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может представлять собой соединение S027, раскрытое в WO2016/010840 (абзацы с [00240] по [00244]). В некоторых вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может представлять собой ПЭГ2k-DSA. В других вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может быть ПЭГ2k-C11. В некоторых вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может быть ПЭГ2k-C14. В некоторых вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может быть ПЭГ2k-C16. В некоторых вариантах осуществления изобретения липид ПЭГ может быть ПЭГ2k-C18.

Катионные липиды, подходящие для использования в липидной композиции согласно настоящему описанию, включают, но не ограничиваются ими, N,N-диолеил-N,N-диметиламмоний хлорид (DODAC), N,N-дистеарил-N,N-диметиламмоний бромид (DDAB), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTAP), 1,2-диолеил-3-диметиламмоний-пропан (DODAP), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA), 1,2-диолеилкарбамил-3-диметиламмоний-пропан (DOCDAP), 1,2-дилинеил-3-диметиламмоний-пропан (DLINDAP), дилаурил(C12:0) триметил аммоний пропан (DLTAP), Диоктадециламидоглицил спермин (DOGS), DC-Хои, диолеилокси-N-[2-(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминийтрифторацетат (DOSPA), 1,2-димиристилноксипропил-3-диметил-гидроксиэтил аммоний бромид (DMRIE), 3-диметиламино-2-(Холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадекадиенокси)пропан (CLinDMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 2-[5'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)-3'-оксапентокси)-3-диметил-1-(цис,цис-9',1'-2'-октадекадиенокси)пропан (CpLinDMA), N,N-диметил-3,4-диолеилоксибензиламин (DMOVA) и 1,2-N,N'-диолеилкарбамил-3-диметиламинопропан (DOcarbDAP). В одном варианте катионный липид представляет собой DOTAP или DLTAP.

Анионные липиды, подходящие для использования в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатиновую кислоту, N-додеканоил фосфатидил этаноламин, N-сукцинил фосфатидилэтанолламин, N-глутарил фосфатидилэтанолламин холестерин гемисукцинат (CHEMS) и лизилфосфатидилглицерин.

Липидные композиции.

Настоящее изобретение обеспечивает липидную композицию, содержащую по меньшей мере одно соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его соль (к примеру, его фармацевтически приемлемую соль) и по меньшей мере один другой липидный компонент. Такие композиции также могут содержать биологически активный агент, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими липидными компонентами. В некоторых вариантах реализации липидные композиции содержат липидный компонент и водный компонент, содержащий биологически активный агент.

В одном варианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один другой липидный компонент. В другом варианте осуществления изобретения липидная композиция дополнительно содержит биологически активный агент, необязательно в комбинации с одним или несколькими другими липидными компонентами. В другом варианте осуществления изобретения липидная композиция находится в форме липосом. В другом варианте осуществления изобретения липидная композиция находится в форме липидных наночастиц (LNP). В другом варианте осуществления изобретения липидная композиция подходит для доставки в печень.

В одном варианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль и другой липидный компонент. Такие другие липидные компоненты включают, но не ограничиваются, нейтральные липиды, вспомогательные липиды, липиды ПЭГ, катионные липиды и анионные липиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль, и нейтральный липид, к примеру DSPC, необязательно с одним или несколькими дополнительными липидными компонентами. В другом варианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль и вспомогательный липид, к примеру холестерин, необязательно с одним или несколькими дополнительными липидными компонентами. В дополнительном варианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль и липид ПЭГ, необязательно с одним или несколькими дополнительными липидными компонентами. В дополнительном варианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль и катионный липид, необязательно с одним или несколькими дополнительными липидными компонентами. В дополнительном варианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль и анионный липид, необязательно с одним или несколькими дополнительными липидными компонентами. В подварианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль, вспомогательный липид и липид ПЭГ, необязательно с нейтральным липидом. В следующем подварианте осуществления изобретения липидная композиция содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль, вспомогательный липид, липид ПЭГ и нейтральный липид.

Композиции, содержащие липиды Формулы (IA), (I), (II) или (III), или их фармацевтически приемлемые соли, или их липидные композиции, могут быть в различных формах, включая, но не ограничиваясь, агенты доставки, образующие частицы, включая микрочастицы, наночастицы и агенты трансфекции, которые используются для доставки различных молекул в клетки. Конкретные композиции эффективны для трансфекции или доставки биологически активных агентов. Предпочтительными биологически активными агентами являются РНК и ДНК. В дополнительных вариантах осуществления изобретения биологически активный агент выбирают из мРНК, гРНК и ДНК. гРНК может быть дгРНК или огРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения карго включает мРНК, кодирующую РНК-направляемый связывающий агент ДНК (к примеру, нуклеазу Cas, нуклеазу Cas 2 класса или Cas9), гРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую гРНК, или комбинацию мРНК и гРНК.

Типичные соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) для использования в вышеуказанных липидных композициях приведены в примерах 2-48, 50-97, 99-103 и 105-113.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 9. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение формулы (IA) представляет собой соединение 10.

В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 11. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 12. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 13. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 14. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 15. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 16. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 17. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 18. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 19. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 20.

В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 21. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 22. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 23. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 24. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 25. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 26. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (IA) представляет собой соединение 27. В некоторых вариантах реализации

В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 91. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 92. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 93. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 94. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 95. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 96. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 97. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 99. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 100.

В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 101. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 102. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 103. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 105. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 106. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 107. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 108. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 109. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 110.

В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 111. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 112. В некоторых вариантах реализации соединения формулы (IA) представляет собой соединение 113.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение не является соединением 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение не является соединением 49. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение не является соединением 114.

Композиции LNP.

Липидные композиции могут быть представлены в виде композиций LNP. Липидные наночастицы могут быть, к примеру, микросферами (включая однослойные и многослойные везикулы, к примеру, "липосомы" - липидные бислои ламеллярной фазы, которые в некоторых вариантах осуществления изобретения являются существенным образом сферическими, а в более конкретных вариантах осуществления изобретения могут включать водное ядро, к примеру, содержащее часть молекул РНК), дисперсной фазой в эмульсии, мицеллами или внутренней фазой в суспензии.

LNP имеют размер от около 1 до около 1000 нм, от около 10 до около 500 нм, от около 20 до около 500 нм, в дополнительном варианте осуществления изобретения от около 50 до около 400 нм, в дополнительном варианте осуществления изобретения от около 50 до около 300 нм, в дополнительном варианте осуществления изобретения от около 50 до около 200 нм, и в дополнительном варианте осуществления изобретения от около 50 до около 150 нм, и в другом дополнительном варианте осуществления изобретения от около 60 до около 120 нм. Предпочтительно LNP имеют размер от около 60 нм до около 100 нм. Средние размеры (диаметры) полностью сформированного LNP могут быть измерены динамическим светорассеянием на Malvern Zetasizer. Образец LNP разводят в фосфатно-солевом буфере (PBS) так, чтобы интенсивность излучения составляла примерно 200-400 кгц/с. Данные представлены как средневзвешенное значение показателя интенсивности.

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к липидным композициям, описанным в соответствии с соответствующими молярными соотношениями компонентов липидов в композиции. Все числа в мольных процентах даны как доли липидного компонента липидной композиции или, более конкретно, композиций LNP. В некоторых вариантах осуществления изобретения мол. % соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) может составлять от около 30 мол.% до около 70 мол.%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мол.% соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) может составлять по меньшей мере 30 мол.%, по меньшей мере 40 мол.%, по меньшей мере 50 мол. % или не менее 60 мол.%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мол.% нейтрального липида может составлять от около 0 мол.% до около 30 мол.%. В некоторых вариантах осуществления изобретения мол.% нейтрального липида может составлять от около 0 мол.% до около 20 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% нейтрального липида может составлять примерно 10 мол.%. В некоторых вариантах осуществления изобретения мол.% нейтрального липида может составлять примерно 9 мол.%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молярный процент вспомогательного липида может составлять от около 0 мол.% до около 80 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида может составлять от около 20 мол.% до около 60 мол.%. В некоторых вариантах осуществления изобретения молярный % вспомогательного липида может составлять от около 30 мол.% до около 50 мол.%. В некоторых вариантах осуществления изобретения мол.% вспомогательного липида может составлять от 30 мол.% до около 40 мол.% или от около 35 мол.% до около 45 мол.%. В некоторых вариантах осуществления изобретения молярный % вспомогательного липида регулируется в зависимости от концентрации соединения формулы (IA), (I), (II) или (III), нейтрального липида и/или

липида ПЭГ для обеспечения липидного компонента до 100 мол. %.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мол. % липида ПЭГ может составлять от около 1 мол. % до около 10 мол. %. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мол. % липида ПЭГ может составлять от около 1 мол. % до около 4 мол. %. В некоторых вариантах осуществления изобретения мол. % липида ПЭГ может составлять от около 1 мол. % до около 2 мол. %. В некоторых вариантах осуществления изобретения мол. % липида ПЭГ может составлять примерно 1,5 мол. %.

В различных вариантах осуществления изобретения композиция LNP содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его соль (такую как его фармацевтически приемлемая соль (к примеру, как раскрытая в настоящем документе)), нейтральный липид (к примеру, DSPC), вспомогательный липид (к примеру, холестерин) и липид ПЭГ (к примеру, ПЭГ2k-DMG). В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль (к примеру, как описанная в данном документе), DSPC, холестерин и липид ПЭГ. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения композиция LNP содержит липид ПЭГ, содержащий DMG, такой как ПЭГ2k-DMG. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения композиция LNP содержит соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль, холестерин, DSPC и ПЭГ2k-DMG.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидные композиции, такие как композиции LNP, содержат липидный компонент и компонент нуклеиновой кислоты, к примеру компонент РНК и молярное отношение соединения формулы (IA), (I), (II) или (III) к нуклеиновой кислоте. Варианты осуществления настоящего изобретения также предоставляют липидные композиции, имеющие определенное молярное соотношение между положительно заряженными аминогруппами фармацевтически приемлемых солей соединений формулы (IA), (I), (II) или (III) (N) и отрицательно заряженными фосфатными группами (P) нуклеиновой кислоты, подлежащей инкапсуляции. Это может быть математически представлено уравнением N/P. В некоторых вариантах осуществления изобретения липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать липидный компонент, который включает соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль; и компонент нуклеиновой кислоты, где отношение N/P составляет примерно от 3 до 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP может содержать липидный компонент, который включает соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль; и компонент РНК, в котором соотношение N/P составляет примерно от 3 до 10. К примеру, соотношение N/P может составлять около 4-7. В качестве альтернативы соотношение N/P может составлять около 6, к примеру 6 ± 1 или $6 \pm 0,5$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент содержит биологически активный агент. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент включает полипептид, необязательно в комбинации с нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент содержит нуклеиновую кислоту, такую как РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент представляет собой компонент нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения компонент нуклеиновой кислоты включает ДНК, и его можно назвать компонентом ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения компонент нуклеиновой кислоты включает РНК, и его можно назвать компонентом РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент, такой как компонент РНК, может содержать мРНК, такую как мРНК, кодирующая агент связывания ДНК, управляемый РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агент, связывающий ДНК, управляемый РНК, представляет собой нуклеазу Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент может содержать мРНК, кодирующую Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент может содержать гРНК. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую агент, связывающий ДНК, управляемый РНК, композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту гРНК, такую как гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент содержит агент связывания ДНК, управляемый РНК и гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент содержит мРНК нуклеазы Cas и гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения водный компонент содержит мРНК нуклеазы Cas 2 класса и гРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas 2 класса, соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль, вспомогательный липид, необязательно нейтральный липид и липид ПЭГ. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas 2 класса, вспомогательным липидом является холестерин. В других композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas 2 класса, нейтральным липидом является DSPC. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas 2 класса, например Cas9, липидом ПЭГ является ПЭГ2k-DMG. В конкретных композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas 2 класса, и соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых композициях композиция дополнительно содержит гРНК, такую как дгРНК или огРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидная композиция, такая как композиция LNP, может содержать гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция может содержать соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль, гРНК, вспомогательный липид, необязательно нейтральный липид и липид ПЭГ. В некоторых композициях LNP, содержащих гРНК, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих гРНК, нейтральный липид представляет собой DSPC. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, содержащих гРНК, липид ПЭГ представляет собой ПЭГ2k-DMG. В некоторых композициях гРНК выбрана из дгРНК и огРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидная композиция, такая как композиция LNP, содержит мРНК, кодирующую агент, связывающий ДНК, управляемый РНК, и гРНК, которая может быть огРНК, в водном компоненте и соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) в липидном компоненте. К примеру, композиция LNP может содержать соединение формулы (IA), (I), (II) или (III) или его фармацевтически приемлемую соль, мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, мРНК, вспомогательный липид, нейтральный липид и липид ПЭГ. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas и гРНК, вспомогательным липидом является холестерин. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas и гРНК, нейтральным липидом является DSPC. В дополнительных вариантах осуществления изобретения, содержащих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas и гРНК, липид ПЭГ представляет собой ПЭГ2k-DMG.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидные композиции, такие как композиции LNP, включают РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как мРНК Cas 2 класса и по меньшей мере одну гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP включает соотношение гРНК и мРНК РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как мРНК нуклеазы Cas 2 класса, примерно 1:1 или примерно 1:2. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение составляет от около 25:1 до около 1:25, от около 10:1 до около 1:10, от около 8:1 до около 1:8, от около 4:1 до около 1:4, или от около 2:1 до около 1:2.

Раскрытые здесь липидные композиции, такие как композиции LNP, могут включать матричную нуклеиновую кислоту, например шаблон ДНК. Матричная нуклеиновая кислота может быть доставлена с липидными композициями, содержащими соединение формулы (IA), (I), (II) или (III), или его фармацевтически приемлемой солью, в том числе в виде композиций LNP, или отдельно от них. В некоторых вариантах осуществления изобретения матричная нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной, в зависимости от желаемого механизма репарации. Матрица может иметь области гомологии с целевой ДНК, к примеру в последовательности ДНК-мишени и/или в последовательностях, примыкающих к ДНК-мишени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP образуются путем смешивания водного раствора РНК с липидным раствором на основе органического растворителя. Подходящие растворы или растворители включают или могут содержать: воду, PBS, Трис-буфер, NaCl, цитратный буфер, ацетатный буфер, этанол, хлороформ, диэтиловый эфир, циклогексан, тетрагидрофуран, метанол, изопропанол. К примеру, органический растворитель может быть 100% этанолом. Можно использовать фармацевтически приемлемый буфер, к примеру, для введения LNP in vivo. В некоторых вариантах осуществления изобретения буфер используется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне или выше pH 6,5. В некоторых вариантах осуществления изобретения буфер используется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, на уровне или выше pH 7,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция имеет pH в диапазоне от около 7,2 до около 7,7. В дополнительных вариантах осуществления изобретения композиция имеет pH в диапазоне от около 7,3 до около 7,7 или в диапазоне от около 7,4 до около 7,6. В дополнительных вариантах осуществления изобретения композиция имеет pH примерно 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 или 7,7. pH композиции можно измерить с помощью микрозонда pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения в композицию включен криопротектор. Неограничивающие примеры криопротекторов включают сахарозу, трегалозу, глицерин, DMSO и этиленгликоль. Примерные композиции могут включать до 10% криопротектора, такого как, к примеру, сахароза. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция может содержать трис-солевой раствор сахарозы (TSS). В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP может включать примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% криопротектора. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP может включать примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% сахарозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP может включать буфер. В некоторых вариантах осуществления изобретения буфер может содержать фосфатный буфер (PBS), Трис-буфер, цитратный буфер и их смеси. В некоторых примерных вариантах осуществления изобретения буфер содержит NaCl. В некоторых вариантах осуществления изобретения в буфере отсутствует NaCl. Примерные количества NaCl могут находиться в диапазоне от около 20 mM до около 45 mM. Примерные количества NaCl могут находиться в диапазоне от около 40 mM до около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество NaCl составляет около 45 mM. В некоторых вариантах осуществления изобретения буфер представляет собой Трис-буфер. Примерные количества Трис могут варьироваться от около 20 mM до около 60 mM. Примерные количества Трис могут варьироваться от около 40 mM до около 60 mM. В

некоторых вариантах осуществления изобретения количество Трис составляет около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения буфер содержит NaCl и Трис. Некоторые иллюстративные варианты осуществления композиций LNP содержат 5% сахарозы и 45 мМ NaCl в Трис-буфере. В других иллюстративных вариантах осуществления композиции содержат сахарозу в количестве примерно 5 мас./об.%, примерно 45 мМ NaCl и примерно 50 мМ Трис при pH 7,5. Количество соли, буфера и криопротектора можно варьировать таким образом, чтобы поддерживать осмоляльность всей композиции. К примеру, конечная осмоляльность может поддерживаться на уровне менее 450 мОсм/л. В дополнительных вариантах осуществления изобретения осмоляльность составляет от 350 до 250 мОсм/л. Некоторые варианты осуществления изобретения имеют конечную осмоляльность 300 ± 20 мОсм/л или 310 ± 40 мОсм/л.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется микрожидкостное смешение, Т-смешение или перекрестное смешение водного раствора РНК и липидного раствора в органическом растворителе. В некоторых вариантах осуществления изобретения скорость потока, размер соединения, геометрия соединения, форма соединения, диаметр трубки, растворы и/или концентрации РНК и липидов могут варьироваться. LNP или композиции LNP могут быть концентрированы или очищены, к примеру, с помощью диализа, центробежного фильтра, фильтрации в тангенциальном потоке или хроматографии. LNP могут храниться, к примеру, в виде суспензии, эмульсии или лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP хранится при 2-8°C, в некоторых вариантах осуществления изобретения композиция LNP хранится при комнатной температуре. В дополнительных вариантах осуществления изобретения композиция LNP хранится в замороженном виде, к примеру, при -20°C или -80°C. В других вариантах осуществления изобретения композиция LNP хранится при температуре в диапазоне от около 0°C до около -80°C. Композиции LNP можно разморозить перед использованием, к примеру, на льду, при комнатной температуре или при 25°C.

LNP могут быть, к примеру, микросферами (включая однослойные и многослойные везикулы, к примеру, "липосомы" - липидные бислои ламеллярной фазы, которые в некоторых вариантах осуществления изобретения являются существенным образом сферическими, и, в более конкретных вариантах реализации, могут содержать водное ядро, к примеру, включающее значительную часть молекул РНК), дисперсную фазу в эмульсии, мицеллы или внутреннюю фазу в суспензии.

Предпочтительные липидные композиции, такие как композиции LNP, являются биоразлагаемыми, поскольку они не накапливаются до цитотоксических уровней *in vivo* при терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции не вызывают врожденного иммунного ответа, который приводит к существенным побочным эффектам на уровне терапевтических доз. В некоторых вариантах осуществления изобретения представленные здесь композиции не вызывают токсичности на уровне терапевтических доз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP, раскрытые в настоящем документе, имеют индекс полидисперсности (PDI), который может находиться в диапазоне от около 0,005 до около 0,75. В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP имеют PDI, который может находиться в диапазоне от около 0,01 до около 0,5. В некоторых вариантах реализации LNP имеет PDI, который может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,4. В некоторых вариантах реализации LNP имеет PDI, который может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах реализации LNP имеет PDI, который может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах реализации LNP PDI может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,3. В некоторых вариантах реализации LNP имеет PDI, который может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,25. В некоторых вариантах реализации LNP PDI может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,2. В некоторых вариантах реализации LNP имеет PDI, который может составлять менее примерно 0,08, 0,1, 0,15, 0,2 или 0,4.

Раскрытые здесь LNP имеют размер (например, Z-средний диаметр) от около 1 до около 250 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 10 до около 200 нм. В дополнительных вариантах осуществления LNP имеют размер от около 20 до около 150 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 50 до около 150 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 50 до около 100 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 50 до около 120 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 60 до около 100 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 75 до около 150 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 75 до около 120 нм. В некоторых вариантах реализации LNP имеют размер от около 75 до около 100 нм. Если не указано иное, все упомянутые здесь размеры представляют собой средние размеры (диаметры) полностью сформированных наночастиц, измеренные динамическим светорассеянием на Malvern Zetasizer. Образец наночастиц разводят в фосфатно-солевом буфере (PBS) так, чтобы интенсивность излучения составляла приблизительно 200-400 кгц/с. Данные представлены как средневзвешенное значение показателя интенсивности (Z-средний диаметр).

В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP сформированы со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50% до около 100%. В некоторых вариантах реализации LNP сформированы со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50% до около 95%. В

некоторых вариантах реализации LNP сформированы со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 70% до около 90%. В некоторых вариантах реализации LNP сформированы со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 90% до около 100%. В некоторых вариантах реализации LNP сформированы со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 75% до около 95%.

Карго.

Груз, доставляемый с помощью композиции LNP, может быть биологически активным агентом. В некоторых вариантах реализации груз представляет собой или включает один или несколько биологически активных агентов, таких как мРНК, гидовая РНК, нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, шаблонная нуклеиновая кислота, РНК-направляемый связывающий ДНК агент, антитело (например, моноклональное, химерное, гуманизованное, нанотело и их фрагменты и т. д.), холестерин, гормон, пептид, белок, химиотерапевтические и другие типы противоопухолевых агентов, низкомолекулярный препарат, витамин, кофактор, нуклеозид, нуклеотид, олигонуклеотид, ферментативная нуклеиновая кислота, антисмысловая нуклеиновая кислота, триплекс-образующий олигонуклеотид, антисмысловой ДНК или РНК состав, химерный ДНК:РНК состав, аллозим, аптамер, рибозим, приманки и их аналоги, плазмиды и другие типы векторов, а также малая молекула нуклеиновой кислоты, РНКi агент, короткая интерферирующая нуклеиновая кислота (siNA), короткая интерферирующая РНК (миРНК), двухцепочечная РНК (dsРНК), микро-РНК (miРНК), короткая шпилечная РНК (shРНК) и "самореплицирующаяся РНК" (кодирующая репликазу ферментативная активность и способность управлять собственной репликацией или амплификацией *in vivo*) молекул, пептидная нуклеиновая кислота (PNA), заблокированный рибонуклеотид нуклеиновой кислоты (LNA), морфолин нуклеотид, нуклеиновая кислота треозы (TNA), нуклеиновая кислота гликоля (GNA), si-миРНК (малая внутренне сегментированная интерферирующая РНК) и iРНК (асимметричная интерферирующая РНК). Приведенный выше список биологически активных агентов является только примерным и не предназначен для ограничения. Такие соединения могут быть очищенными или частично очищенными, могут быть встречающимися в природе или синтетическими, и могут быть химически модифицированными.

Карго, доставляемый посредством композиции LNP, может представлять собой РНК, такую как молекула мРНК, кодирующая интересующий белок. К примеру, включена мРНК для экспрессии белка, такого как зеленый флуоресцентный белок (GFP), агент связывания ДНК, управляемый РНК, или нуклеаза Cas. Предлагаются композиции LNP, которые включают мРНК нуклеазы Cas, к примеру мРНК нуклеазы Cas 2 класса, которая обеспечивает экспрессию в клетке нуклеазы Cas 2 класса, такой как белок Cas9 или Cpf 1. Кроме того, карго может содержать одну или несколько гидовых РНК или нуклеиновых кислот, кодирующих гидовые РНК. Матричная нуклеиновая кислота, к примеру, для репарации или рекомбинации, также может быть включена в композицию, или матричная нуклеиновая кислота может быть использована в способах, описанных в данном документе. В подварианте осуществления карго содержит мРНК, которая кодирует *Streptococcus pyogenes* Cas9, необязательно, и гРНК *S. pyogenes*. В дополнительном подварианте осуществления изобретения карго включает мРНК, которая кодирует *Neisseria meningitidis* Cas9, необязательно, и pme гРНК.

"мРНК" относится к полинуклеотиду и включает открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (т.е. может служить субстратом для трансляции рибосомой и аминокислотными тРНК). мРНК может включать фосфатно-сахарный остов, включая остатки рибозы или их аналоги, к примеру, остатки 2'-метокси-рибозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения сахара фосфатно-сахарного остова мРНК состоят в основном из остатков рибозы, остатков 2'-метокси-рибозы или их комбинации. Как правило, мРНК не содержат значительного количества остатков тимидина (к примеру, 0 остатков или менее 30, 20, 10, 5, 4, 3 или 2 остатков тимидина; или менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% или 0,1% тимидина). мРНК может содержать модифицированные уридины в некоторых или во всех положениях уридина.

CRISPR/Cas карго.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытые композиции содержат мРНК, кодирующую агент связывания ДНК, управляемый РНК, такой как нуклеаза Cas. В конкретных вариантах осуществления изобретения раскрытые композиции содержат мРНК, кодирующую нуклеазу Cas 2 класса, такую как *S. Pyogenes* Cas9.

Используемый здесь термин "агент, связывающий ДНК, управляемый РНК", означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или субъединицу связывания ДНК такого комплекса, где активность связывания ДНК является специфичной для последовательности и зависит от последовательности РНК. Типичные ДНК-связывающие агенты, управляемые РНК, включают Cas- расщепления/никазы и их инактивированные формы ("ДНК-связывающие агенты dCas"). Используемый здесь термин "нуклеаза Cas" охватывает Cas- расщепления, Cas-никазы и агенты, связывающие ДНК dCas. Cas-расщепляющие/никазы и dCas ДНК-связывающие агенты включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и класс 2 Csa нуклеазы. В данном контексте "нуклеаза Cas 2 класса" представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей ак-

тивностью. Нуклеазы Cas 2 класса включают расщепления/никазы Cas 2 класса (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой ДНК-расщепляющей или никазной активностью, и ДНК-связывающие агенты класса 2 dCas, в которых активность расщепления/никазы является инактивированной. Нуклеазы Cas 2 класса включают, к примеру, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (к примеру, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (к примеру, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (к примеру, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (к примеру, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный домен нуклеазы. Последовательности Cpf1 Zetsche полностью включены в качестве ссылки. См., к примеру, Zetsche, Таблицы S1 и S3. См., к примеру, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

Используемый здесь термин "рибонуклеопротеин" (RNP) или "комплекс RNP" относится к гидовой РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas-нуклеаза, например, Cas-расщепление, Cas-никаза или ДНК-связывающий агент dCas (например, Cas9). В некоторых вариантах реализации гидовая РНК направляет РНК-направляемый связывающий агент ДНК, такой как Cas9, к целевой последовательности, а гидовая РНК гибридизируется с целевой последовательностью и связывается с ней; в случаях, когда агент представляет собой расщепление или никазу, за связыванием может следовать отщепление или удачная сочетаемость пар при скрещивании.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения карго для композиции LNP включает по меньшей мере одну гидовую РНК, содержащую гидовые последовательности, которые направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может быть нуклеазой (к примеру, нуклеазой Cas, такой как Cas9), к целевой ДНК. гРНК может направлять нуклеазу Cas или нуклеазу Cas 2 класса к целевой последовательности на целевой молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК связывается с нуклеазой Cas 2 класса и обеспечивает специфичность расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и нуклеаза Cas могут образовывать рибонуклеопротеин (RNP), к примеру, комплекс CRISPR/Cas, такой как комплекс CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas9 II типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas V типа, такой как комплекс Cpf1/гидовая РНК. Cas-нуклеазы и родственные гРНК могут быть спарены. Структуры каркаса гРНК, которые соединяются с каждой нуклеазой Cas 2 класса, различаются в зависимости от конкретной системы CRISPR/Cas.

"Гидовая РНК", "гРНК" и просто "гидовая" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения родственной гидовой нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. гРНК может быть либо сгРНК (также известной как CRISPR РНК), либо комбинацией сгРНК и тгРНК (также известной как tracrРНК). Гидовые РНК могут включать модифицированные РНК, как описано в данном документе. сгРНК и тгРНК могут быть связаны как одна молекула РНК (одиночная гидовая РНК, огРНК) или как две отдельные молекулы РНК (двойная гидовая РНК, дгРНК). "Гидовая РНК" или "гРНК" относится к каждому типу. тгРНК может быть природной последовательностью или последовательностью тгРНК с модификациями или вариациями по сравнению с встречающимися в природе последовательностями.

В данном контексте "гидовая последовательность" относится к последовательности в гидовой РНК, которая комплементарна к целевой последовательности и функционирует, чтобы направлять гидовую РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (к примеру, расщепления) с помощью РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. "Гидовая последовательность" также может называться "нацеливающей последовательностью" или "спейсерной последовательностью". Гидовая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, к примеру, в случае *Streptococcus pyogenes* (т.е. Spу Cas9) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут использоваться в качестве направляющих, к примеру, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая последовательность находится, к примеру, в гене или хромосоме и комплементарна к гидовой последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять примерно или по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными в области по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов. В других вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несоответствие. К примеру, гидовая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несоответствия, где общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несоответствия, где гидовая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая

область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, где гидовая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

Последовательности-мишени для РНК-направляемых ДНК-связывающих белков, таких как белки Cas, включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (т.е. заданную последовательность и обратный комплемент последовательности), поскольку субстратом нуклеиновой кислоты для белка Cas является двухцепочечный нуклеиновый кислота. Соответственно, когда говорится, что гидовая последовательность "комплементарна целевой последовательности", следует понимать, что гидовая последовательность может направлять гРНК на связывание с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, где гидовая последовательность связывает обратный комплемент целевой последовательности, гидовая последовательность идентична определенным нуклеотидам целевой последовательности (к примеру, целевая последовательность, не включающая PAM), за исключением замены U на T в гидовой последовательности.

Длина целевой последовательности может зависеть от системы CRISPR/Cas и используемых компонентов. К примеру, разные нуклеазы Cas 2 класса из разных видов бактерий имеют разную оптимальную длину целевой последовательности. Соответственно, последовательность нацеливания может включать 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, 35, 40, 45, 50 или более 50 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина целевой последовательности на 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов длиннее или короче гидовой последовательности природной системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas и каркас гРНК будут происходить из одной и той же системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 18-24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 19-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения оГРНК представляет собой "Cas9 оГРНК", способную опосредовать управляемое РНК расщепление ДНК белком Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения оГРНК представляет собой "оГРНК Cpf1", способную опосредовать управляемое РНК расщепление ДНК белком Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК содержит сгРНК и tracr-РНК, достаточные для образования активного комплекса с белком Cas9 и опосредованного РНК-направляемого расщепления ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК содержит сгРНК, достаточные для образования активного комплекса с белком Cpf1 и опосредованного РНК-направляемого расщепления ДНК. См. Zetsche 2015.

Некоторые варианты осуществления изобретения также предоставляют нуклеиновые кислоты, к примеру, кассеты экспрессии, кодирующие гРНК, описанную в данном документе. "Нуклеиновая кислота гидовой РНК" используется здесь для обозначения гидовой РНК (к примеру, оГРНК или дГРНК) и кассеты экспрессии гидовой РНК, которая представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или несколько гидовых РНК.

Модифицированные РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения липидные композиции, такие как композиции LNP, содержат модифицированные нуклеиновые кислоты, включая модифицированные РНК.

Модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды могут присутствовать в РНК, к примеру гРНК или мРНК. гРНК или мРНК, содержащие, к примеру, один или несколько модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называются "модифицированной" РНК для описания присутствия одного или нескольких неестественных и/или встречающихся в природе компонентов или конфигураций, которые используются вместо или в дополнение с каноническими вычетами A, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная РНК синтезируется с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, называемым здесь "модифицированной".

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать одно или несколько из: (i) изменения, к примеру, замены одного или обоих несвязывающих фосфатных атомов кислорода и/или одного или нескольких связывающих фосфатных атомов кислорода в связи фосфодиэфирного остова (примерная модификация остова); (ii) изменения, к примеру, замены составляющей сахара рибозы, к примеру 2'-гидроксила в сахаре рибозы (примерная модификация сахара); (iii) полной замены фосфатной части линкерами "дефосфо" (типичная модификация основной цепи); (iv) модификации или замены встречающегося в природе азотистого основания, в том числе неканоническим азотистым основанием (примерная модификация основания); (v) замены или модификации рибозо-фосфатного остова (примерная модификация скелета); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, к примеру, удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'-или 5'-кэпа могут включать сахар и/или модификацию основной цепи); и (vii) модификации или замены сахара (примерная модификация сахара).

Некоторые варианты осуществления изобретения включают модификацию мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Некоторые варианты осуществления изобретения содержат модификацию 5'-конца мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Некоторые варианты осуществления изобретения содержат мо-

дификацию 3'-конца мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Модифицированная РНК может содержать модификации на 5'-конце и 3'-конце. Модифицированная РНК может содержать один или несколько модифицированных остатков в неконцевых местах. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК включает по меньшей мере один модифицированный остаток. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК включает по меньшей мере один модифицированный остаток.

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации, к примеру, внутриклеточными нуклеазами или нуклеазами, обнаруженными в сыворотке. К примеру, нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, в одном аспекте РНК (к примеру, мРНК, гРНК), описанные в настоящем документе, могут содержать один или несколько модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, к примеру, для придания стабильности по отношению к внутриклеточным нуклеазам или нуклеазам на основе сыворотки. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь модифицированные молекулы гРНК могут проявлять сниженный врожденный иммунный ответ при введении в популяцию клеток как *in vivo*, так и *ex vivo*. Термин "врожденный иммунный ответ" включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, особенно интерферонов, и гибель клеток.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения РНК или нуклеиновая кислота в раскрытых композициях LNP содержит по меньшей мере одну модификацию, которая придает повышенную или улучшенную стабильность нуклеиновой кислоте, включая, к примеру, повышенную устойчивость к расщеплению нуклеазами *in vivo*. Используемые в данном документе термины "модификация" и "модифицированный", поскольку такие термины относятся к нуклеиновым кислотам, представленным в настоящем документе, включают по меньшей мере одно изменение, которое предпочтительно увеличивает стабильность и делает РНК или нуклеиновую кислоту более стабильной (к примеру, устойчивой к расщеплению нуклеазами), чем версия РНК или нуклеиновой кислоты дикого типа или встречающаяся в природе. В контексте настоящего описания термины "стабильный" и "стабильность" относятся к нуклеиновым кислотам настоящего изобретения и, в частности, в отношении РНК, относятся к повышенной или улучшенной устойчивости к деградации, к примеру, нуклеазами (т.е. эндонуклеазы или экзонуклеазы), которые обычно способны разрушать такую РНК. Повышенная стабильность может включать, к примеру, меньшую чувствительность к гидролизу или другому разрушению эндогенными ферментами (к примеру, эндонуклеазами или экзонуклеазами) или условиями в клетке или ткани-мишени, тем самым увеличивая или усиливая пребывание такой РНК или нуклеиновой кислоты в клетке-мишени, ткани, субъекте и/или цитоплазме. Стабилизированные молекулы РНК или нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, демонстрируют более длительные периоды полужизни по сравнению с их встречающимися в природе немодифицированными аналогами (к примеру, версией мРНК дикого типа). Также под терминами "модификация" и "модифицированный" подразумеваются термины, относящиеся к мРНК композиций LNP, раскрытых в данном документе, и изменения, которые улучшают или усиливают трансляцию нуклеиновых кислот мРНК, включая, к примеру, включение последовательностей, которые действуют в инициации трансляции белка (к примеру, консенсусной последовательности Козак). (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20):8125-48 (1987)).

В некоторых вариантах осуществления изобретения РНК или нуклеиновая кислота описанных здесь композиций LNP подвергли химической или биологической модификации, чтобы сделать ее более стабильной. Примеры модификаций РНК, такой как мРНК, включают истощение основания (к примеру, путем делеции или замены одного нуклеотида на другой) или модификацию основания, к примеру, химическую модификацию основания. Фраза "химические модификации", используемая в данном документе, включает модификации, которые вводят химические составы, которые отличаются от тех, которые наблюдаются в природных РНК или нуклеиновых кислотах, к примеру, ковалентные модификации, такие как введение модифицированных нуклеотидов (к примеру, нуклеотидных аналогов или включение боковых групп, которые в природе не встречаются в таких молекулах РНК или нуклеиновых кислот).

В некоторых вариантах осуществления модификации основной цепи фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или нескольких атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, к примеру, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированного фосфатного фрагмента модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация основной цепи фосфатной основной цепи может включать изменения, которые приводят либо к незаряженному линкеру, либо к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфата, гидрофосфонаты, фосфороамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из атомов кислорода без образования мостиков на один из вышеуказанных атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может иметь конфигурацию "R" (здесь Rp) или конфигурацию "S" (здесь Sp). Остов также можно модифицировать

путем замены мостикового кислорода (то есть кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) на азот (мостиковые фосфорамидаты), серу (мостиковые фосфотиоаты) и углерод (мостиковые метилен-фосфонаты). Замена может происходить либо у связующего кислорода, либо у обоих связывающих атомов кислорода. Фосфатная группа может быть заменена не содержащими фосфор соединителями в некоторых модификациях основной цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения заряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным фрагментом. Примеры фрагментов, которые могут заменять фосфатную группу, могут включать, без ограничения, к примеру, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиоэфир, линкер оксида этилена, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метилениметилимино, метиленигидразо, метиленидиметилгидразо и метилениоксиметилимино.

мРНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция или состав, раскрытые в настоящем документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую агент связывания ДНК, управляемый РНК, такой как нуклеаза Cas или нуклеаза Cas 2 класса, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения предоставляется, используется или вводится мРНК, содержащая ORF, кодирующую управляемый РНК связывающий ДНК агент, такой как нуклеаза Cas или нуклеаза Cas 2 класса. мРНК может содержать один или несколько из 5'-кэпа, 5'-нетранслируемой области (UTR), 3'-UTR и полиаденинового хвоста. мРНК может содержать модифицированную открытую рамку считывания, к примеру, для кодирования последовательности ядерной локализации или для использования альтернативных кодонов для кодирования белка.

мРНК в раскрытых композициях LNP может кодировать, к примеру, секретлируемый гормон, фермент, рецептор, полипептид, пептид или другой представляющий интерес белок, который обычно секретируется. В одном варианте осуществления изобретения мРНК может необязательно иметь химические или биологические модификации, которые, к примеру, улучшают стабильность и/или период полужизни такой мРНК или которые улучшают или иным образом облегчают продукцию белка.

Кроме того, подходящие модификации включают изменения в одном или нескольких нуклеотидах кодона, так что кодон кодирует ту же аминокислоту, но является более стабильным, чем кодон, обнаруженный в версии мРНК дикого типа. К примеру, была продемонстрирована обратная зависимость между стабильностью РНК и большим количеством остатков цитидинов (С) и/или уридинов (U), и было обнаружено, что РНК, лишенная остатков С и U, устойчива к большинству РНКаз (Heidenreich, et al., J. Biol. Chem. 269, 2131-8 (1994)). В некоторых вариантах осуществления изобретения количество остатков С и/или U в последовательности мРНК снижено. В другом варианте осуществления изобретения количество остатков С и/или U снижается путем замены одного кодона, кодирующего конкретную аминокислоту, на другой кодон, кодирующий ту же или родственную аминокислоту. Предполагаемые модификации нуклеиновых кислот мРНК также включают включение псевдоуридинов. Включение псевдоуридинов в нуклеиновую структуру мРНК может повысить стабильность и трансляционную способность, а также снизить иммуногенность *in vivo*. См., к примеру, Kariko, K., et al., Molecular Therapy 16 (11): 1833-1840 (2008). Замены и модификации мРНК могут быть выполнены способами, хорошо известными квалифицированному специалисту в данной области.

Ограничения на уменьшение количества остатков С и U в последовательности, вероятно, будут больше в кодирующей области мРНК по сравнению с нетранслируемой областью (т.е. вероятно, будет невозможно удалить все остатки С и U присутствующие в сообщении, сохраняя при этом способность сообщения кодировать желаемую аминокислотную последовательность). Однако вырожденность генетического кода дает возможность снизить количество остатков С и/или U, присутствующих в последовательности, при сохранении той же кодирующей способности (т.е. в зависимости от того, какая аминокислота кодируется кодоном, возможны несколько различных возможностей модификации последовательностей РНК).

Термин модификация также включает, к примеру, включение ненуклеотидных связей или модифицированных нуклеотидов в последовательности мРНК (к примеру, модификации одного или обоих 3'- и 5'-концов молекулы мРНК, кодирующей функционально секретлируемый белок или фермент). Такие модификации включают добавление оснований к последовательности мРНК (к примеру, включение поли-А-хвоста или более длинного поли-А-хвоста), изменение 3'-UTR или 5'-UTR, комплексообразование мРНК с агентом (к примеру, белком или комплементарной молекулой нуклеиновой кислоты), а также включение элементов, которые изменяют структуру молекулы мРНК (к примеру, образующие вторичные структуры).

Считается, что поли-А-хвост стабилизирует естественных посланников. Следовательно, в одном варианте осуществления длинный поли-А-хвост может быть добавлен к молекуле мРНК, что делает мРНК более стабильной. Поли-А-хвосты могут быть добавлены с использованием множества техник признанных в данной области. К примеру, длинные поли-А-хвосты могут быть добавлены к синтетической или транскрибируемой *in vitro* мРНК с использованием поли-А-полимеразы (Yokoe, et al., Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Вектор транскрипции также может кодировать длинные поли-А-хвосты. Кроме того, поли-А-хвосты могут быть добавлены путем транскрипции непосредственно из про-

дуктов PCR. В одном варианте длина поли А-хвоста составляет по меньшей мере примерно 90, 200, 300, 400 по меньшей мере 500 нуклеотидов. В одном варианте осуществления изобретения длину поли-А-хвоста регулируют для контроля стабильности модифицированной молекулы мРНК и, таким образом, транскрипции белка. К примеру, поскольку длина поли-А-хвоста может влиять на период полужизни молекулы мРНК, длину поли-А-хвоста можно отрегулировать, чтобы изменить уровень устойчивости мРНК к нуклеазам и, таким образом, контролировать временной ход экспрессии белка в клетке. В одном варианте осуществления изобретения стабилизированные молекулы мРНК являются достаточно устойчивыми к деградации *in vivo* (к примеру, нуклеазами), так что они могут быть доставлены в клетку-мишень без носителя для переноса.

В одном варианте осуществления изобретения мРНК может быть модифицирована путем включения 3' и/или 5' нетранслируемых (UTR) последовательностей, которые в природе не обнаруживаются в мРНК дикого типа. В одном варианте осуществления 3'-и/или 5'-фланкирующая последовательность, которая естественным образом фланкирует мРНК и кодирует второй неродственный белок, может быть включена в нуклеотидную последовательность молекулы мРНК, кодирующей терапевтический или функциональный белок, для ее модификации. К примеру, 3' или 5' последовательности из молекул мРНК, которые являются стабильными (к примеру, глобин, актин, GAPDH, тубулин, гистон или ферменты цикла лимонной кислоты), могут быть включены в 3' и/или 5' область смысловой молекулы нуклеиновой кислоты мРНК для увеличения стабильности молекулы смысловой мРНК. См., к примеру, US2003/0083272.

Более подробные описания модификаций мРНК можно найти в US2017/0210698A1, на страницах 57-68, содержание которого включено в настоящий документ.

Матричная нуклеиновая кислота.

Раскрытые здесь композиции и способы могут включать матричную нуклеиновую кислоту. Матрица может использоваться для изменения или вставки последовательности нуклеиновой кислоты в сайт-мишень или рядом с ним для РНК-направляемого ДНК-связывающего белка, такого как нуклеаза Cas, к примеру, нуклеаза Cas 2 класса. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы включают введение шаблона в ячейку. В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть предоставлен один шаблон. В других вариантах осуществления изобретения могут быть предоставлены два или более шаблонов, так что редактирование может происходить на двух или более целевых сайтах. К примеру, могут быть предоставлены разные шаблоны для редактирования одного гена в клетке или двух разных генов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шаблон можно использовать при гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения гомологичная рекомбинация может привести к интеграции матричной последовательности или части матричной последовательности в молекулу нуклеиновой кислоты-мишени. В других вариантах осуществления изобретения матрицу можно использовать в гомологически направленной репарации, которая включает инвазию цепи ДНК в сайт расщепления в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления изобретения гомологически направленная репарация может привести к включению матричной последовательности в отредактированную молекулу нуклеиновой кислоты-мишени. В еще других вариантах осуществления изобретения матрицу можно использовать при редактировании гена, опосредованном негомологичным соединением концов. В некоторых вариантах осуществления изобретения матричная последовательность не имеет сходства с последовательностью нуклеиновой кислоты рядом с сайтом расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения включен шаблон или часть последовательности шаблона. В некоторых вариантах осуществления изобретения матрица включает фланкирующие последовательности инвертированного концевого повтора (ITR).

В некоторых вариантах осуществления изобретения матричная последовательность может соответствовать, содержать или состоять из эндогенной последовательности клетки-мишени. Он также или альтернативно может соответствовать, содержать или состоять из экзогенной последовательности клетки-мишени. Используемый здесь термин "эндогенная последовательность" относится к последовательности, которая является нативной для клетки. Термин "экзогенная последовательность" относится к последовательности, которая не является нативной для клетки, или к последовательности, естественная локализация которой в геноме клетки находится в другом месте. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндогенная последовательность может быть геномной последовательностью клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндогенная последовательность может быть хромосомной или внехромосомной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндогенная последовательность может быть плазмидной последовательностью клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения матрица содержит ssДНК или dsДНК, содержащие фланкирующие последовательности обратного концевого повтора (ITR). В некоторых вариантах осуществления изобретения матрица представлена в виде вектора, плаزمиды, миникольца, нанокольца или продукта PCR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота очищается. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота очищается с использованием метода осаждения.

дения (к примеру, осаждения LiCl, осаждения спиртом или эквивалентного метода, к примеру, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота очищается с использованием метода на основе хроматографии, такого как метод на основе HPLC или эквивалентный метод (к примеру, как описано в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота очищается с использованием как метода осаждения (например, осаждение LiCl), так и метода на основе HPLC. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота очищается фильтрацией в тангенциальном потоке (TFF).

Соединения или композиции обычно, но не обязательно, включают один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей. Термин "эксципиент" включает любой ингредиент, отличный от соединения (соединений) настоящего изобретения, другого липидного компонента(ов) и биологически активного агента. Наполнитель может придавать композициям функциональные (к примеру, контроль скорости высвобождения лекарственного средства) и/или нефункциональные (к примеру, технологическая добавка или разбавитель) характеристики. Выбор наполнителя будет в значительной степени зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы.

Составы для парентерального введения обычно представляют собой водные или масляные растворы или суспензии. Если состав является водным, вспомогательные вещества, такие как сахара (включая, помимо прочего, глюкозу, маннит, сорбит и т.д.), соли, углеводы и буферные агенты (предпочтительно с pH от 3 до 9), но для некоторых применений они могут быть более подходящим составом со стерильным неводным раствором или в виде высушенной формы для использования в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная апиrogenная вода (WFI).

Хотя изобретения описаны вместе с проиллюстрированными вариантами осуществления изобретения, следует понимать, что они не предназначены для ограничения изобретений этими вариантами осуществления. Напротив, изобретения предназначены для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, включая эквиваленты конкретных признаков, которые могут быть включены в изобретение, как определено прилагаемой формулой изобретения.

Как предшествующее общее описание, так и подробное описание, а также следующие примеры являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают идеи. Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничение желаемого предмета. В случае, если любая литература, включенная посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в этом описании, это описание имеет преимущественную силу. Все диапазоны, указанные в приложении, охватывают конечные точки, если не указано иное.

Определения.

Следует отметить, что при использовании в этой заявке формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, к примеру, ссылка на "состав" включает множество композиций, а ссылка на "ячейку" включает множество ячеек и т.п. Использование "или" является включающим и означает "и/или", если не указано иное.

Если специально не указано в вышеприведенном описании, варианты осуществления в описании, которые повторяют "содержащие" различные компоненты, также рассматриваются как "состоящие из" или "состоящие существенным образом из" перечисленных компонентов; варианты осуществления в описании, которые повторяют "состоящие из" различных компонентов, также рассматриваются как "содержащие" или "состоящие существенным образом из" перечисленных компонентов; варианты осуществления изобретения в описании, которые рассказывают "о" различных компонентах, также рассматриваются как "при" перечисленных компонентах; и варианты осуществления в описании, которые повторяют "состоящие по существу из" различных компонентов, также рассматриваются как "состоящие из" или "содержащие" перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию этих терминов в формуле изобретения).

Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Измеренные и измеряемые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и погрешности, связанной с измерением. Используемые в этой заявке термины "примерно" и "приблизительно" имеют свои значения, понятные в данной области техники; использование одного по сравнению с другим не обязательно подразумевает разную область применения. Если не указано иное, цифры, используемые в этой заявке, с модифицирующим термином или без него, к примеру, "примерно" или "приблизительно", следует понимать как включающие нормальное расхождение и/или колебания, как будет принято во внимание квалифицирующим специалистом в соответствующей области. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "приблизительно" или "примерно" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) заявленного ссылочного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (кроме случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения).

Используемый здесь термин "установление контакта" означает установление физического соедине-

ния между двумя или более объектами. К примеру, контактирование клетки млекопитающего с композицией наночастиц означает, что клетка млекопитающего и наночастица созданы для совместной физической связи. Способы контактирования клеток с внешними объектами как *in vivo*, так и *ex vivo* хорошо известны в области биологии. К примеру, приведение в контакт композиции наночастиц и клетки млекопитающего, расположенной внутри млекопитающего, можно осуществлять различными путями введения (к примеру, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным и подкожным) и может включать различные количества композиций наночастиц. Более того, композиция наночастиц может контактировать с более чем одной клеткой млекопитающего.

Используемый здесь термин "доставка" означает доставку объекта адресату. К примеру, доставка терапевтического и/или профилактического средства субъекту может включать введение субъекту композиции наночастиц, включая терапевтическое и/или профилактическое средство (к примеру, внутривенным, внутримышечным, внутрикожным или подкожным путем). Введение композиции наночастиц в клетку млекопитающего или млекопитающего может включать контактирование одной или нескольких клеток с композицией наночастиц.

Используемый здесь термин "эффективность инкапсуляции" относится к количеству терапевтического и/или профилактического средства, которое становится частью композиции наночастиц, по отношению к начальному общему количеству терапевтического и/или профилактического средства, используемого при приготовлении композиции наночастиц. К примеру, если 97 мг терапевтического и/или профилактического средства инкапсулировано в композицию наночастиц из общих 100 мг терапевтического и/или профилактического средства, первоначально предоставленных в композицию, эффективность капсулирования может составлять 97%. Используемый здесь термин "инкапсуляция" может относиться к полному, существенному или частичному заключению, ограничению, окружению или заключению в оболочку.

В данном контексте термин "биоразлагаемый" используется для обозначения материалов, которые при введении в клетки разрушаются клеточными механизмами (к примеру, ферментативной деградацией) или гидролизом на компоненты, которые клетки могут повторно использовать или утилизировать без значительного токсического воздействия(й) на клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения компоненты, образующиеся при разложении биоразлагаемого материала, не вызывают воспаления и/или других неблагоприятных эффектов *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоразлагаемые материалы расщепляются ферментативно. Альтернативно или дополнительно в некоторых вариантах осуществления биоразлагаемые материалы разрушаются путем гидролиза.

В данном контексте "соотношение N/P" представляет собой молярное соотношение ионизируемых (в физиологическом диапазоне pH) атомов азота в липиде (к примеру, соединении формулы I) к фосфатным группам в РНК, к примеру, в композиции наночастиц, включающей липидный компонент и РНК.

Композиции также могут включать соли одного или нескольких соединений. Соли могут быть фармацевтически приемлемыми солями. Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к производным описанных соединений, в которых исходное соединение изменено путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму (например, путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ими, соли минеральных или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Типичные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспарат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, паноат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат, валератные соли и т.п. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п., а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, включая, помимо прочего, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли настоящего изобретения включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли настоящего изобретения можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную составляющую, обычными химическими методами. Обычно такие соли могут быть получены взаимодействием свободных кислотных или основных форм этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; обычно предпочтительны неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил являются предпочтительными. Списки подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.

H. Stahl and C G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, and Berge et al., *JouPHKI of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977), каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Используемый здесь термин "индекс полидисперсности" представляет собой соотношение, которое описывает однородность распределения частиц по размерам в системе. Небольшое значение, например, менее 0,3, указывает на узкое распределение частиц по размерам. В некоторых вариантах реализации индекс полидисперсности может быть меньше 0,1.

Используемый здесь термин "трансфекция" относится к введению вида (например, РНК) в клетку. Трансфекция может происходить, например, *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Используемый здесь термин "алкил" означает разветвленную или неразветвленную насыщенную углеводородную группу, содержащую от 1 до 24 атомов углерода, такую как метил, этил, *n*-пропил, изо-пропил, *n*-бутил, изобутил, *s*-бутил, *m*-бутил, *n*-пентил, изопентил, *s*-пентил, неопентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил, додецил, тетрадецил, гексадецил, эйкозил, тетракозил и т.п. Алкильная группа может быть циклической или ациклической. Алкильная группа может быть разветвленной или неразветвленной (т.е. линейной). Алкильная группа также может быть замещенной или незамещенной (предпочтительно незамещенной). Например, алкильная группа может быть замещена одной или несколькими группами, включая, помимо прочего, алкил, циклоалкил, алкокси, amino, простой эфир, галогенид, гидроксид, нитро, силлил, сульфоксо, сульфонат, карбоксилат или тиол, как описано здесь. Группа "низший алкил" представляет собой алкильную группу, содержащую от одного до шести (например, от одного до четырех) атомов углерода.

Используемый здесь термин "алкенил" относится к алифатической группе, содержащей по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, и предназначен для включения как "незамещенных алкенилов", так и "замещенных алкенилов", последний из которых относится к алкенильным фрагментам, имеющим заместители замена водорода на одном или нескольких атомах углерода алкенильной группы. Такие заместители могут встречаться у одного или нескольких атомов углерода, которые включены или не включены в одну или несколько двойных связей. Более того, такие заместители включают все заместители, предусмотренные для алкильных групп, как обсуждается ниже, за исключением случаев, когда стабильность является недопустимой. Например, предполагается, что алкенильная группа может быть замещена одной или несколькими алкильными, карбоциклическими, арильными, гетероциклическими или гетероарильными группами. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими, винил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), аллил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), циклопентил ($-\text{C}_5\text{H}_7$) и 5-гексенил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

"Алкиленовая" группа относится к двухвалентному алкильному радикалу, который может быть разветвленным или неразветвленным (т.е. линейным). Любая из вышеупомянутых одновалентных алкильных групп может быть превращена в алкилен путем отщепления второго атома водорода от алкила. Типичные алкилены включают C_{2-4} алкилен и C_{2-3} алкилен. Типичные алкиленовые группы включают, но не ограничиваются ими $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ и тому подобное. Алкиленовая группа также может быть замещенной или незамещенной. Например, алкиленовая группа может быть замещена одной или несколькими группами, включая, помимо прочего, алкил, арил, гетероарил, циклоалкил, алкокси, amino, простой эфир, галогенид, гидроксид, нитро, силлил, сульфоксо, сульфонат, сульфонамид, мочевины, амид, карбамат, сложный эфир, карбоксилат или тиол, как описано здесь.

Термин "алкенилен" включает двухвалентные, неразветвленные или разветвленные, ненасыщенные ациклические гидрокарбильные группы, имеющие по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод и, в одном варианте осуществления, отсутствие тройных связей углерод-углерод. Любая из вышеупомянутых одновалентных алкенильных групп может быть превращена в алкенилен путем отщепления второго атома водорода от алкенила. Типичные алкенилены включают C_{2-6} алкенилены.

Термин " C_{x-y} " при использовании в сочетании с химическим фрагментом, таким как алкил или алкилен, означает включение групп, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. Например, термин " C_{x-y} алкил" относится к замещенным или незамещенным насыщенным углеводородным группам, включая линейные и разветвленные алкильные и алкиленовые группы, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи.

Включение в описание изобретения сведений путем ссылки.

Содержание статей, патентов и патентных заявок, а также всех других документов и имеющейся в электронном виде информации, упомянутой или цитируемой здесь, настоящим включено в качестве ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана для включения по ссылке. Заявитель оставляет за собой право физически включать в эту заявку любые материалы и информацию из любых таких статей, патентов, патентных заявок или других физических и электронных документов.

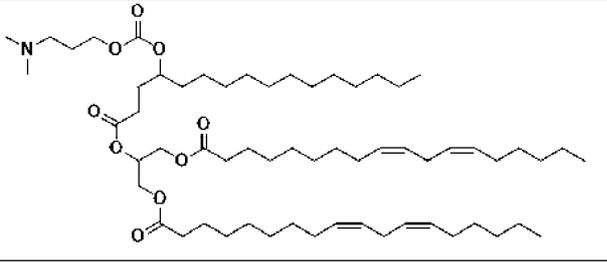
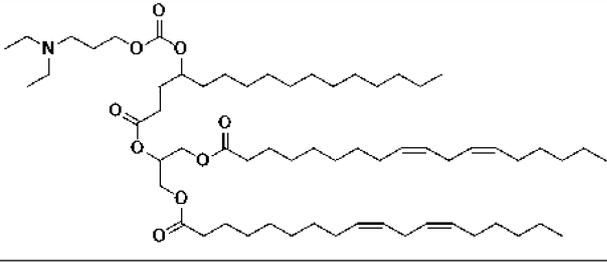
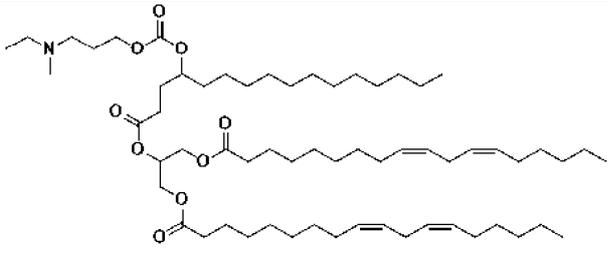
Примеры

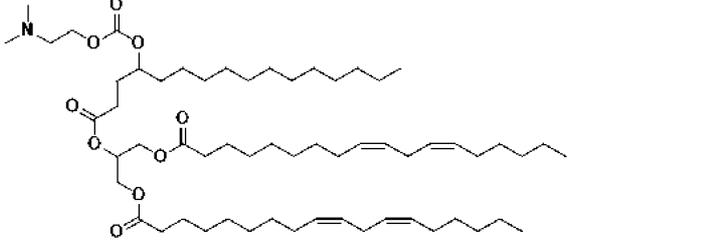
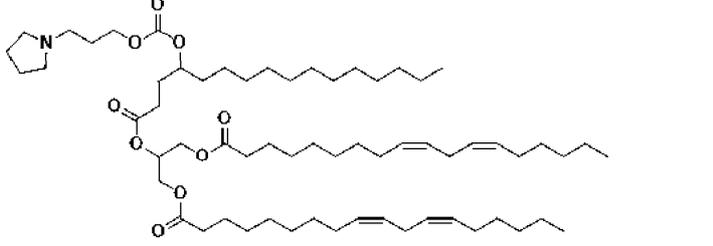
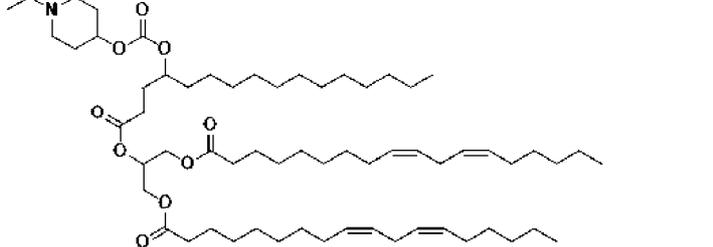
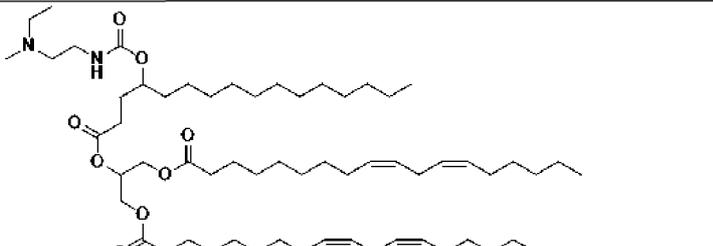
Основная информация.

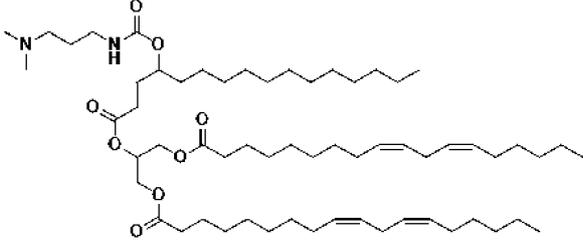
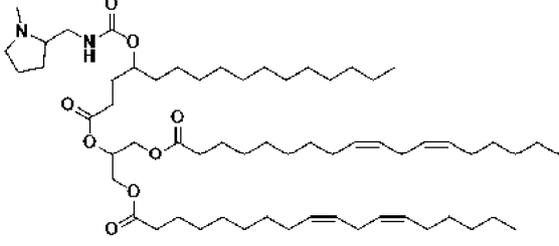
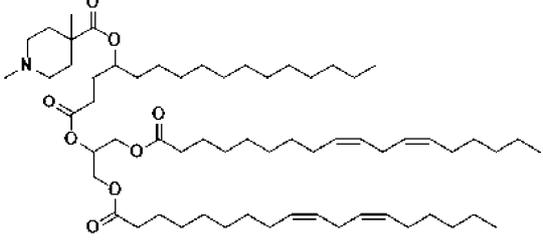
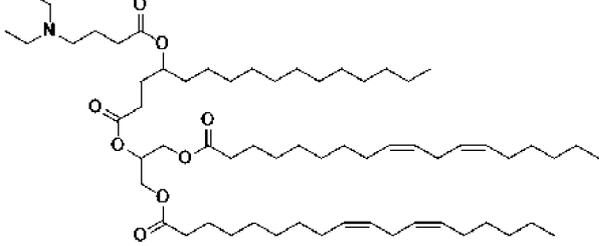
Все реагенты и растворители были приобретены и использованы в том виде, в каком они были получены от коммерческих поставщиков, или синтезированы в соответствии с указанными процедурами. Все промежуточные и конечные соединения очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле. Спектры ЯМР записывали на спектрометре Bruker или Varian 400 МГц, а данные ЯМР собирали в CDCl₃ при температуре окружающей среды. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (ppm) относительно CDCl₃ (7.26). Данные для ¹H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг, множественность (br=широкий, s=синглет, d=дублет, t=триплет, dd=дублет дублетов, dt=дублет триплетов, q=квартет, m=мультиплет, ddd=дублет дублетов дублетов, td=триплет дублетов, tt=триплет триплетов, tdd=триплет дублетов дублетов, dddd=дублет дублета дублетов дублетов), константа связи и интегрирование. Данные MS регистрировали на масс-спектрометре Waters SQD2 с источником ионизации электрораспылением (ESI). Чистоту конечных соединений определяли с помощью UPLC-MS-ELS с использованием прибора для жидкостной хроматографии Waters Acquity H-Class, оснащенного масс-спектрометром SQD2 с детекторами фотодиодной матрицы (PDA) и испарительного рассеяния света (ELS).

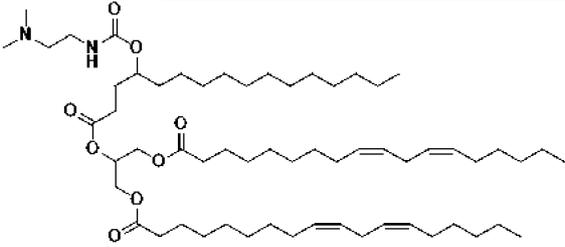
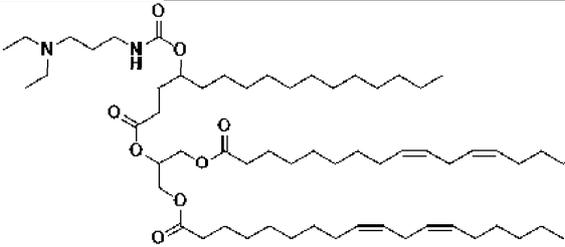
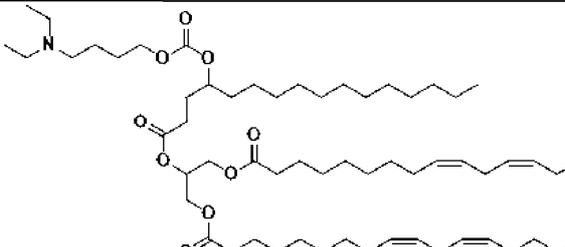
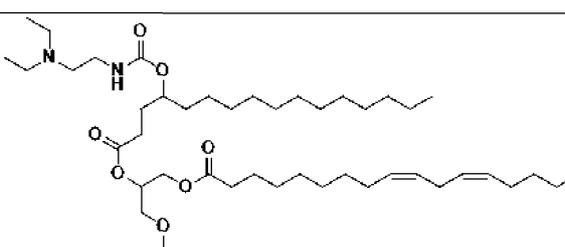
pKa каждого аминного липида определяли в соответствии с методом, описанным Jayaraman, et al. (Angewandte Chemie, 2012) со следующими адаптациями. pKa определяли для несформулированного аминного липида в этаноле. Исходные растворы липидов (2,94 мМ) разбавляли натрий-фосфатными буферами (0,1 М, Boston Bioproducts) с различным pH (диапазон pH: 4,5-9,0), получая конечную концентрацию липидов прилб. 100 мкМ. К тестовым образцам добавляли TNS {6-(п-толуидино)-2-нафталинсульфоновой кислоты натриевую соль}, инкубировали и измеряли интенсивность флуоресценции, используя длины волн возбуждения и испускания 321 нм и 448 нм, соответственно. Записанные данные были нормализованы, и соответствующие значения pKa были получены из сигмоидальной аппроксимации.

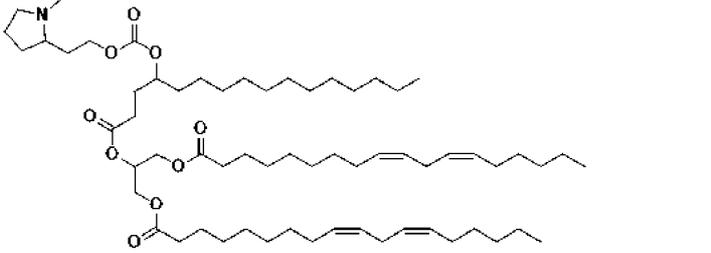
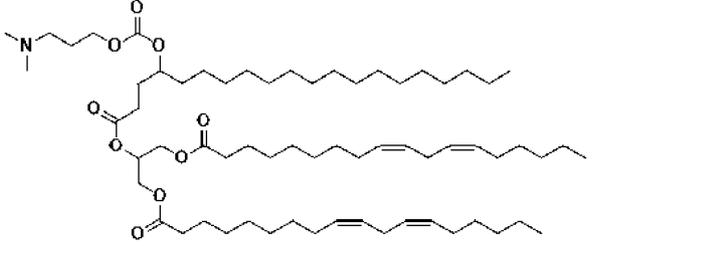
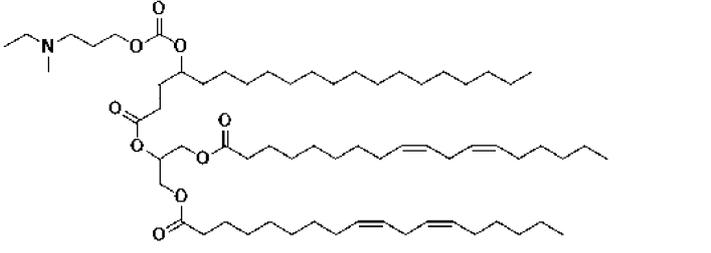
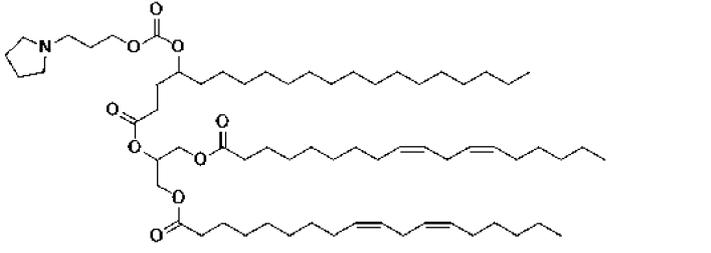
Таблица 1
Соединения

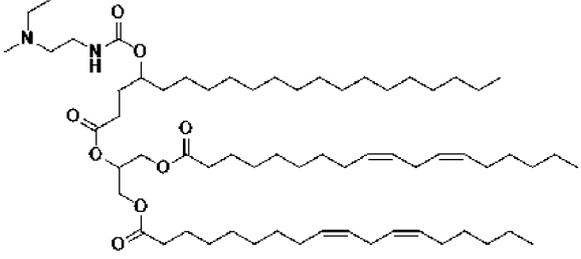
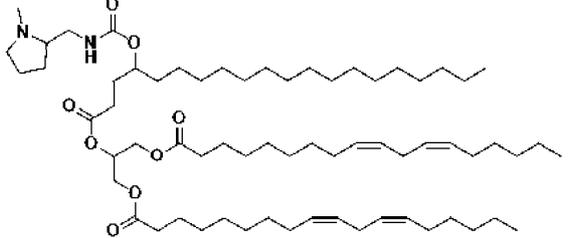
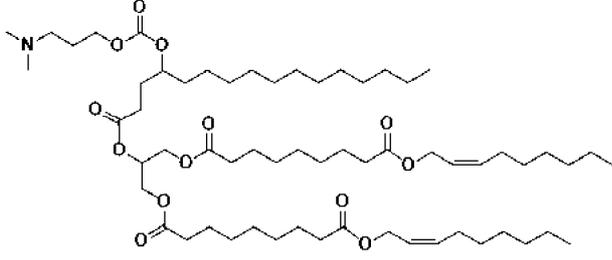
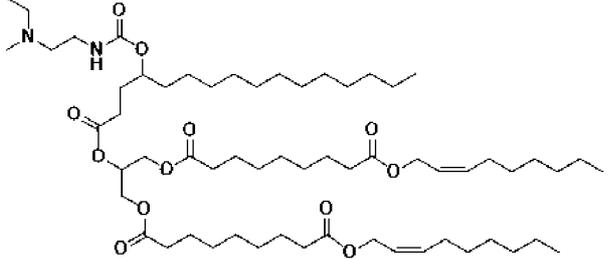
Соединение (pKa)	Структура
1 (6,35)	
2 (5,28)	
3 (5,89)	

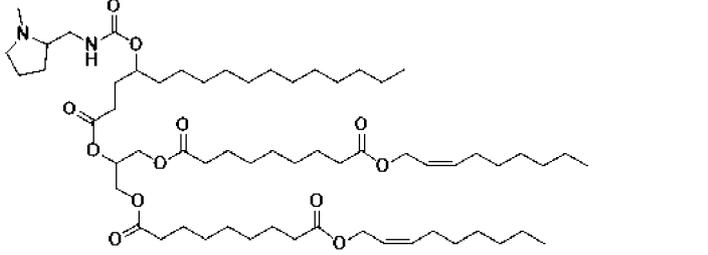
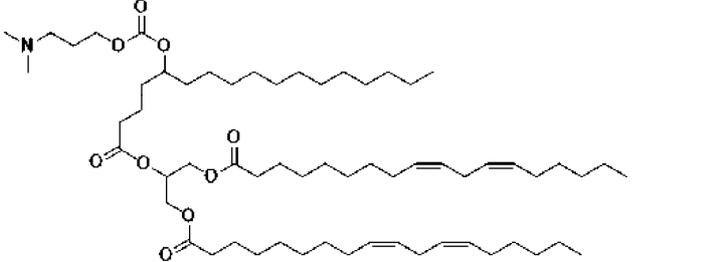
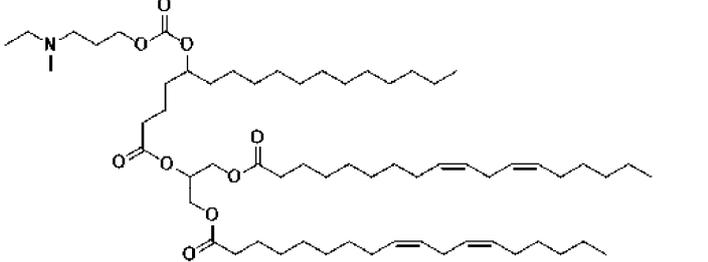
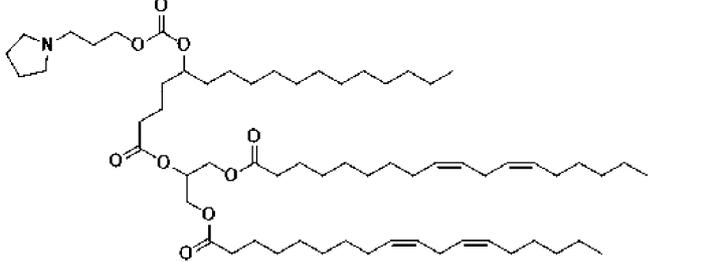
4 (<5)	
5 (6,25)	
6 (5,37)	
7 (6,36)	

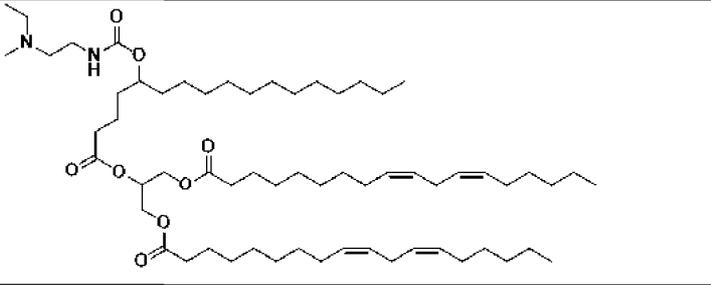
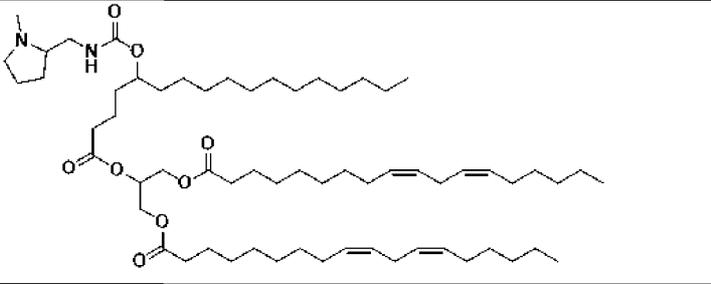
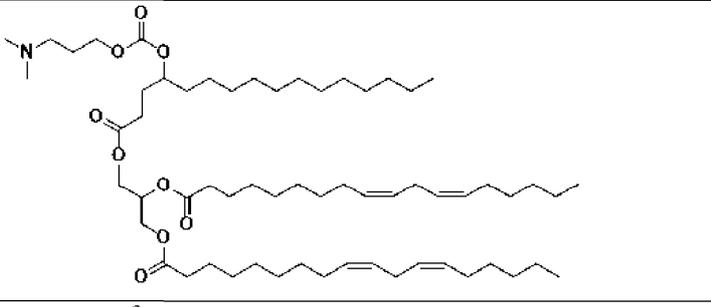
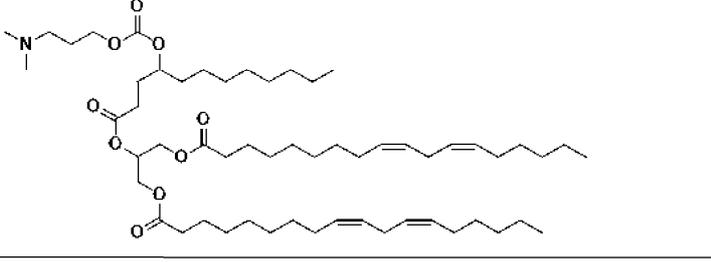
8 (7,54)	
9 (6,32)	
10 (6,05)	
11 (5,60)	

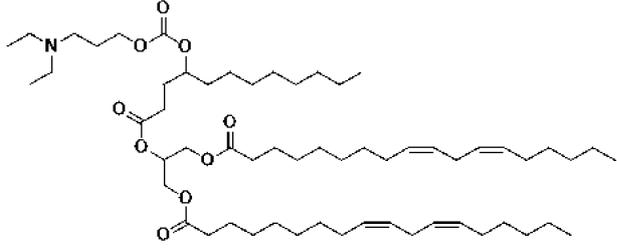
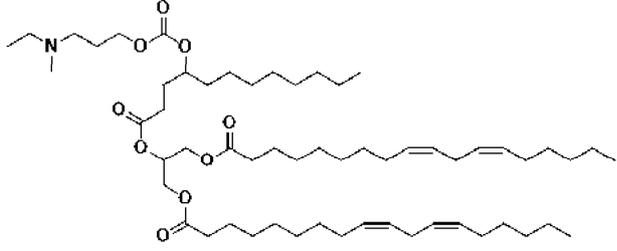
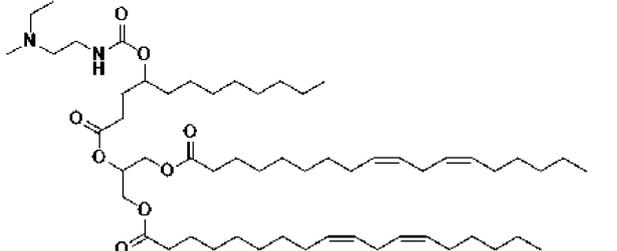
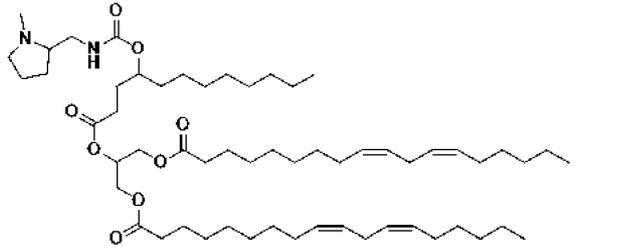
12 (6,82)	
13 (7,20)	
14 (5,91)	
15 (5,90)	

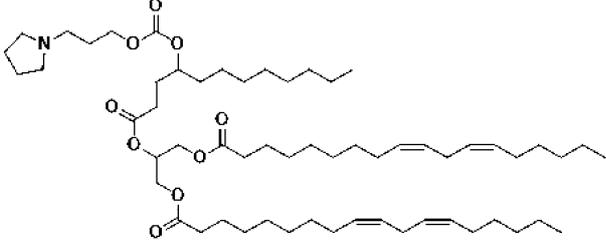
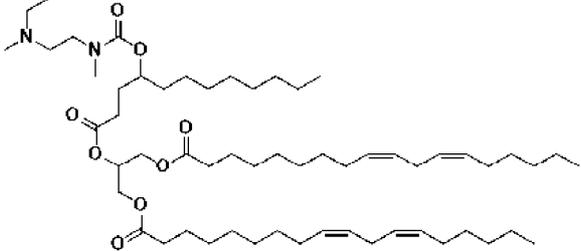
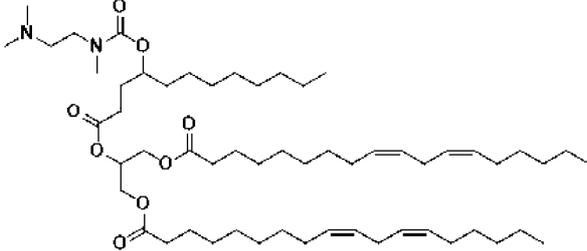
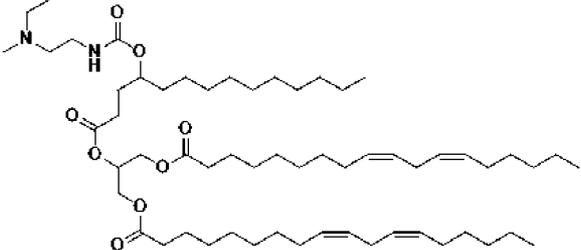
16 (5,72)	
17 (6,18)	
18 (5,83)	
19 (5,99)	

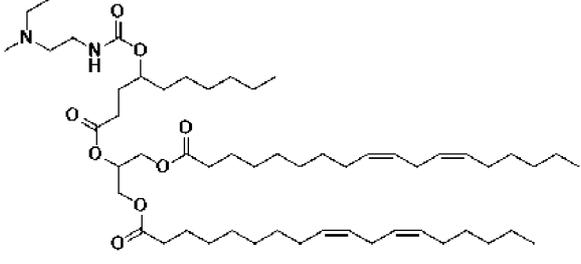
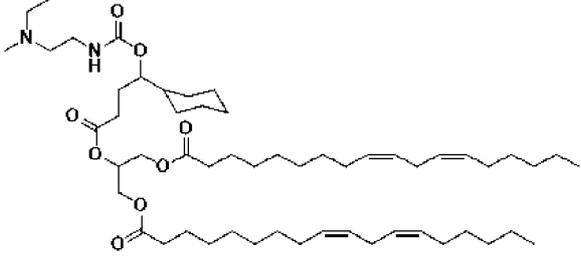
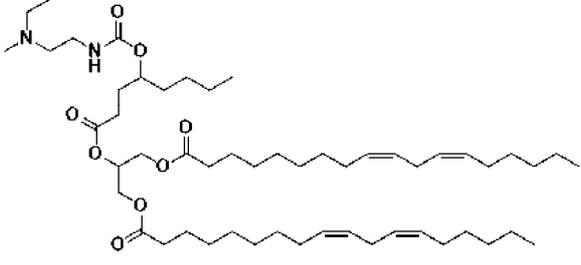
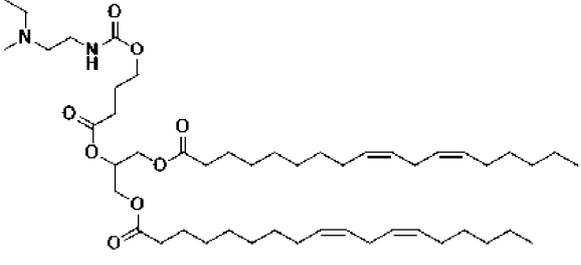
20 (6,17)	
21 (6,12)	
22 (6,06)	
23 (6,19)	

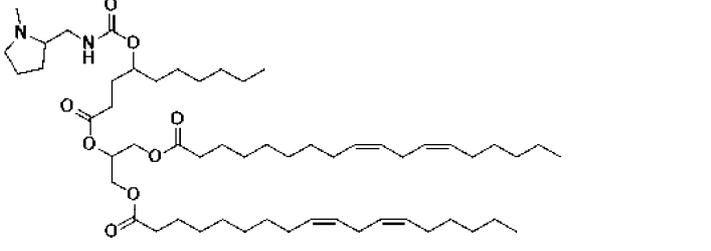
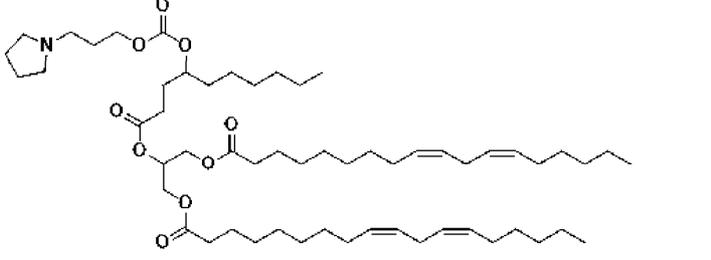
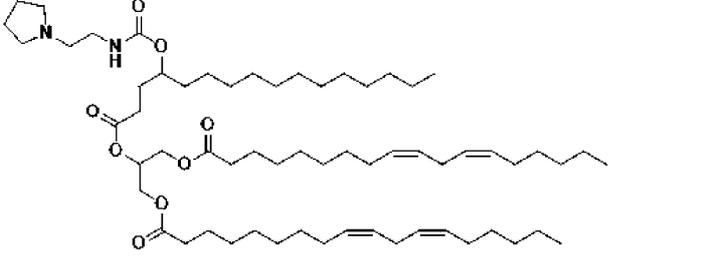
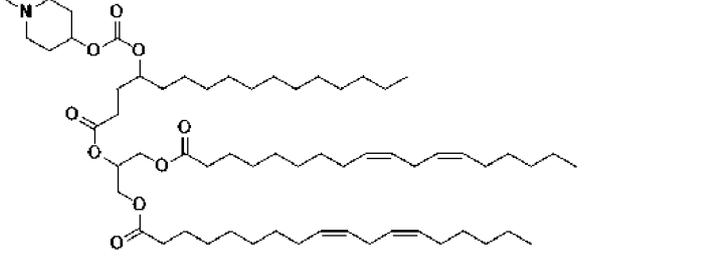
24 (6,10)	
25 (6,12)	
26 (5,82)	
27 (5,97)	

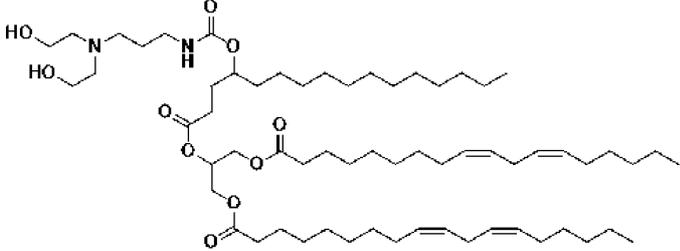
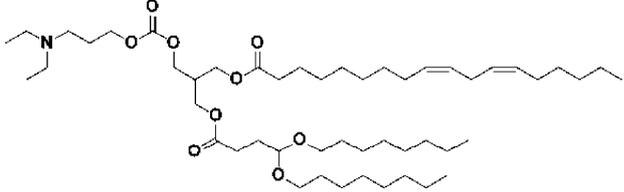
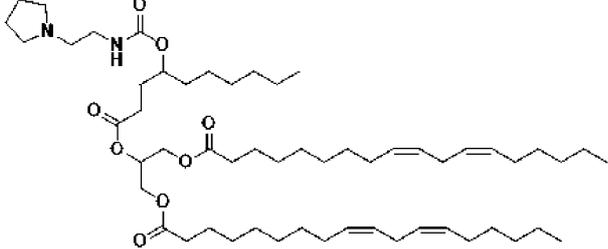
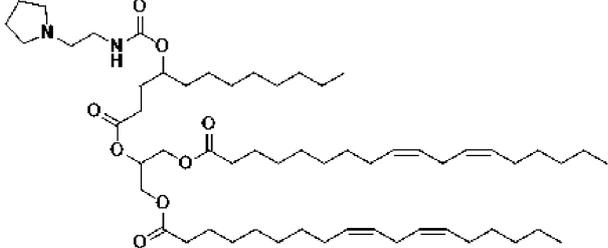
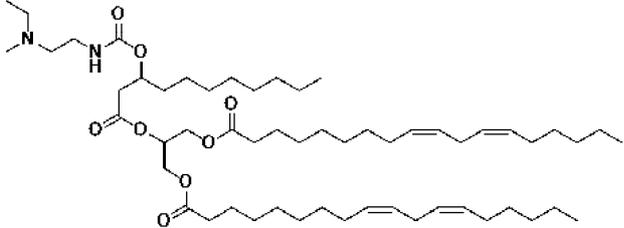
28 (6,06)	
29 (6,05)	
30 (6,53)	
31 Соединение 31 (6,28)	

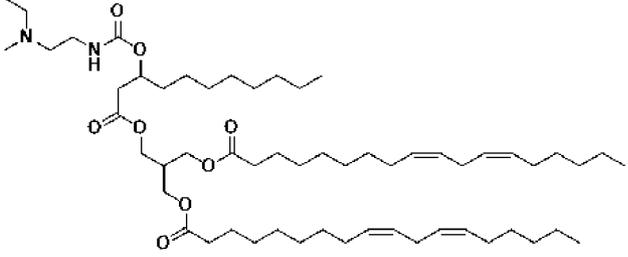
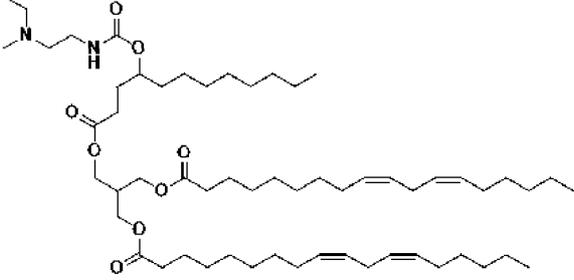
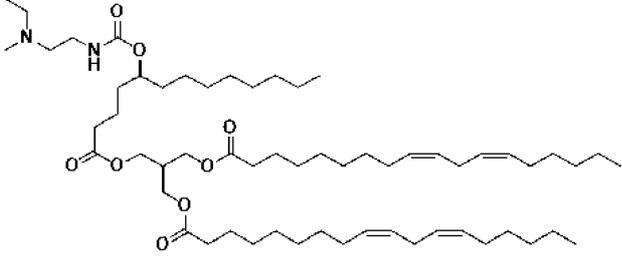
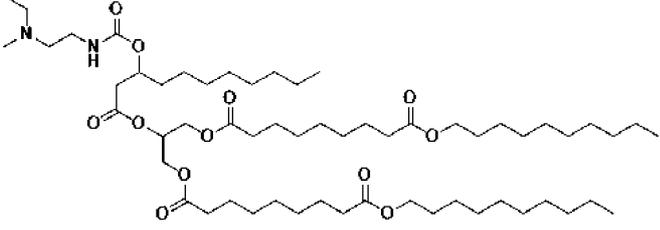
32 (5,64)	
33 (5,95)	
34 (6,36)	
35 (6,35)	

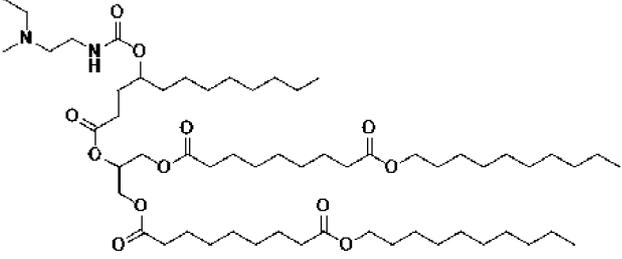
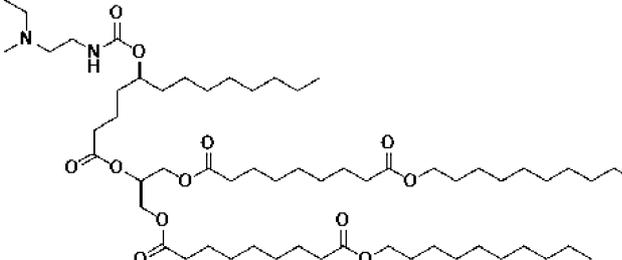
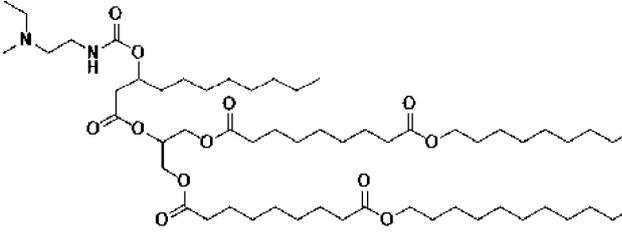
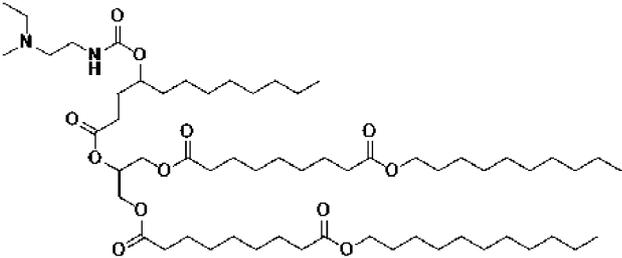
36 (6,13)	
37 (5,36)	
38 (5,62)	
39 (6,32)	

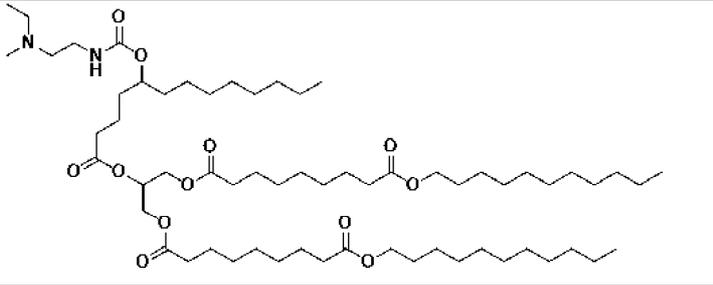
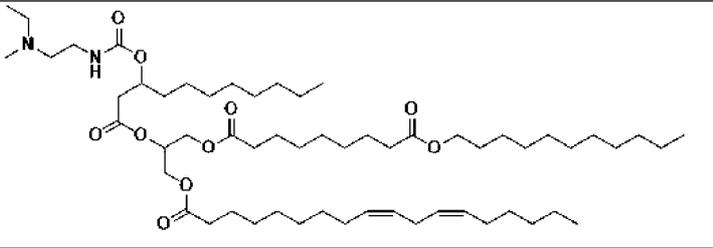
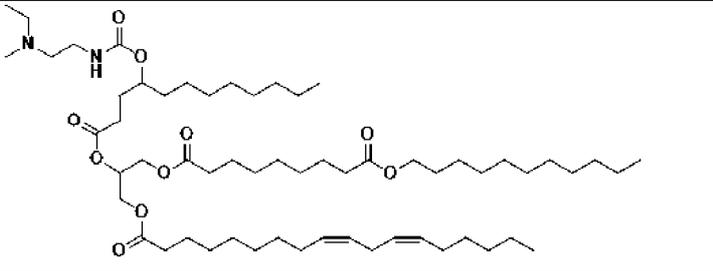
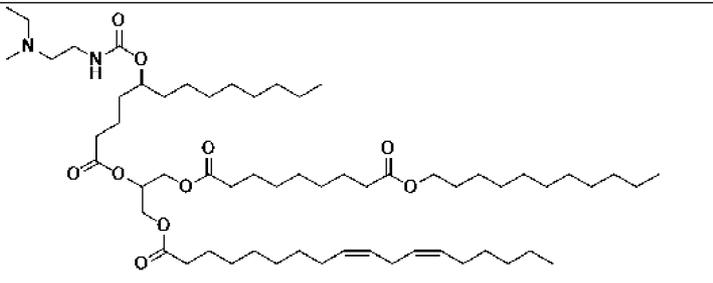
40 (6,34)	
41 (6,51)	
42 (6,52)	
43 (7,33)	

44 (6,45)	
45 (5,79)	
46 (6,16)	
f47 (5,99)	

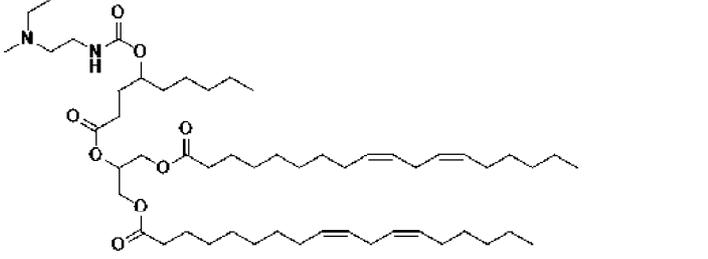
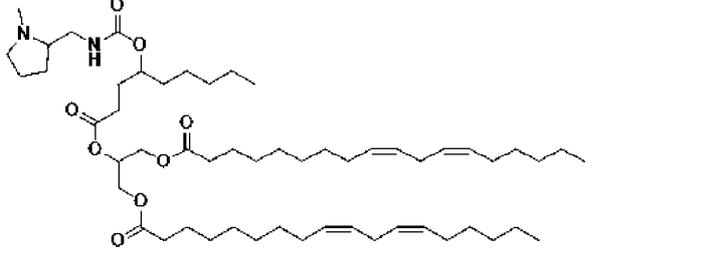
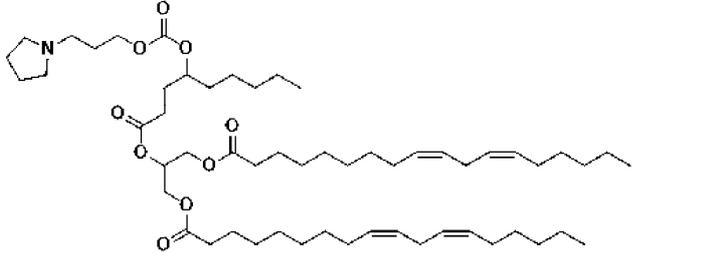
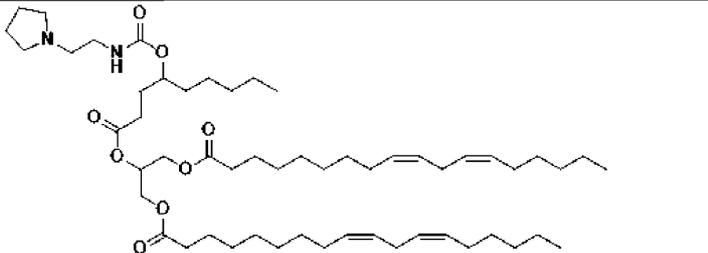
48 (ND)	
49	
50 (6,50)	
51 (6,37)	
52 (6,26)	

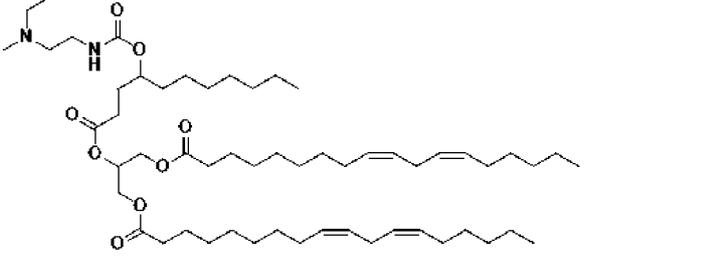
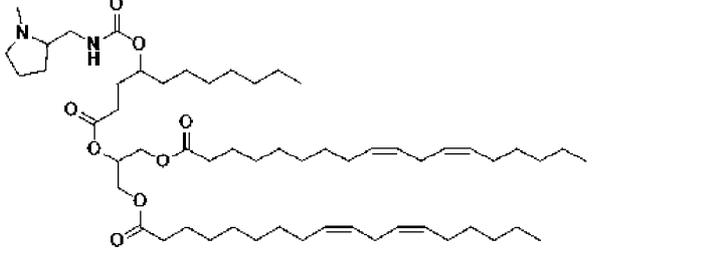
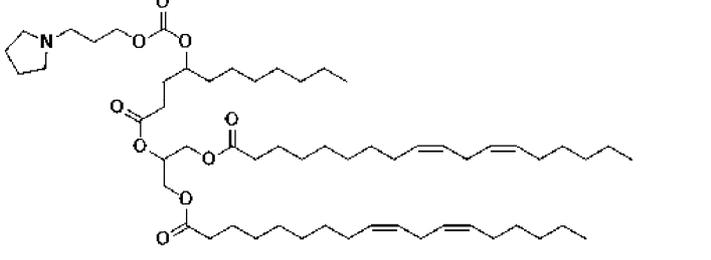
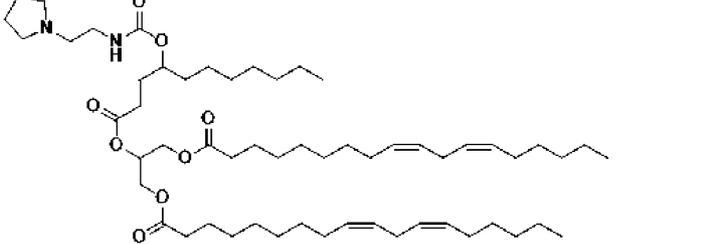
53 (6,29)	
54 (6,25)	
55 (6,43)	
56 (6,28)	

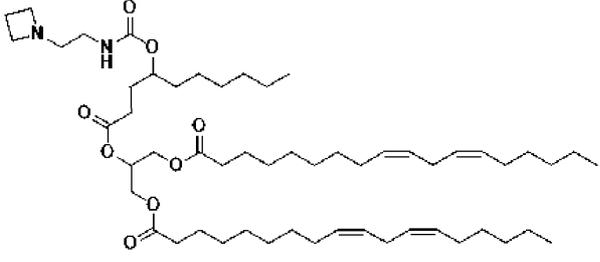
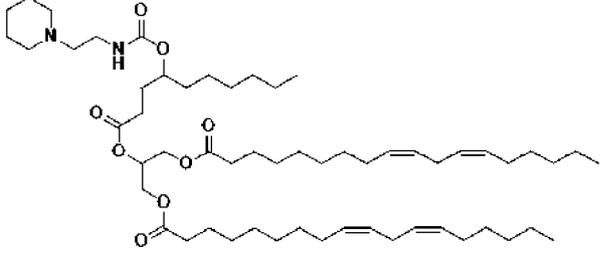
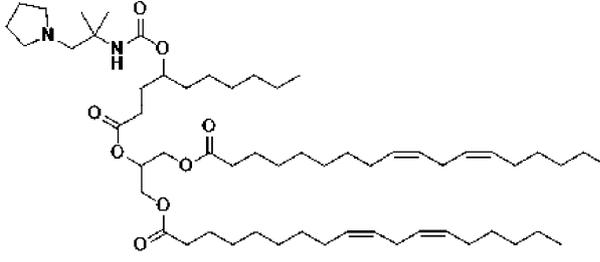
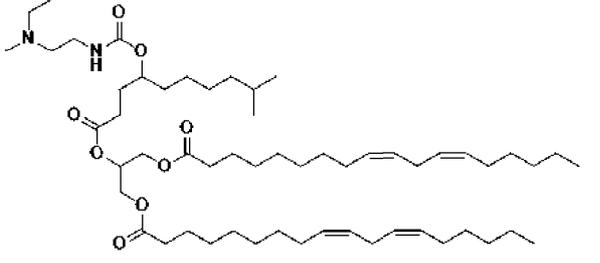
57 (6,18)	
58 (6,32)	
59 (6,34)	
60 (6,22)	

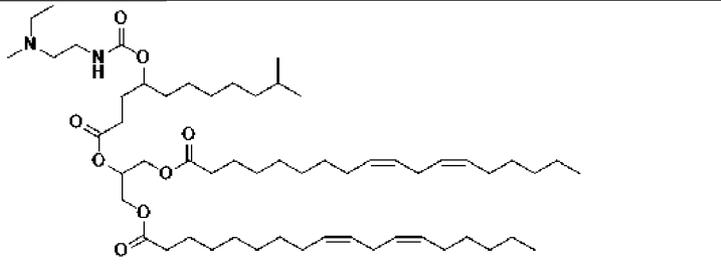
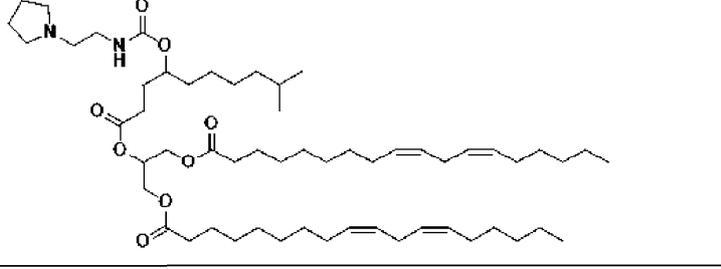
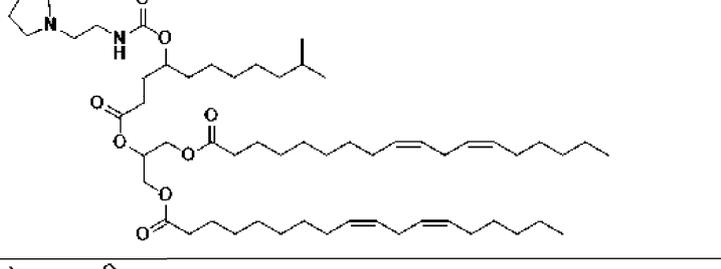
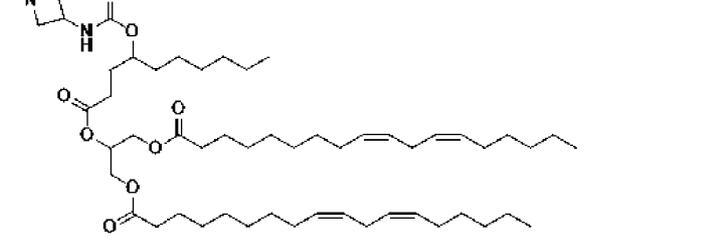
61 (6,29)	
62 (6,32)	
63 (6,32)	
64 (6,30)	

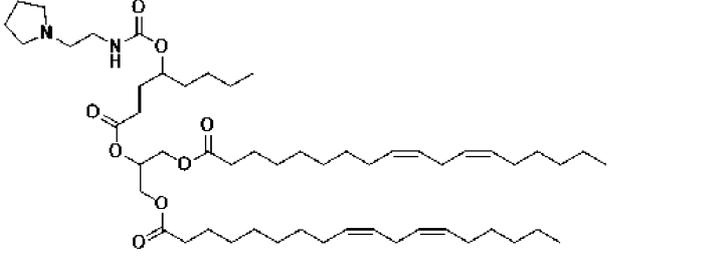
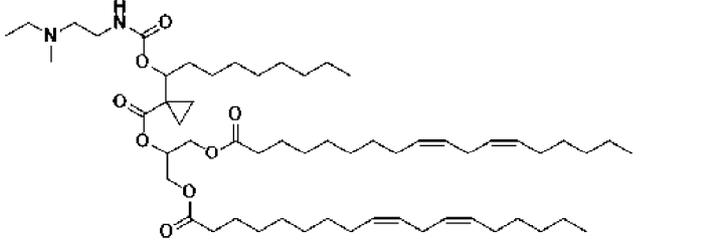
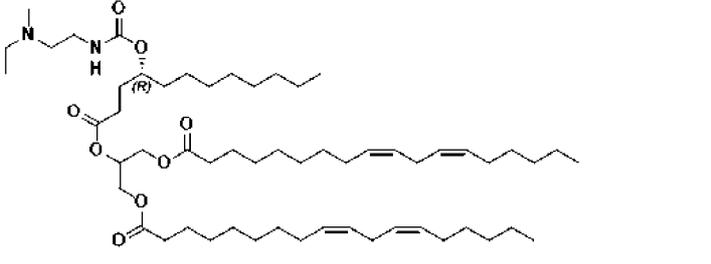
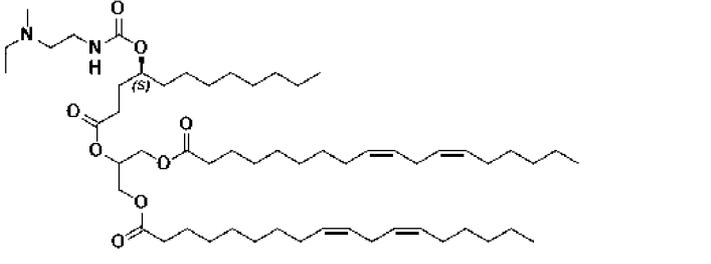
65 (6,37)	
66 (6,15)	
67 (6,43)	
68 (6,32)	

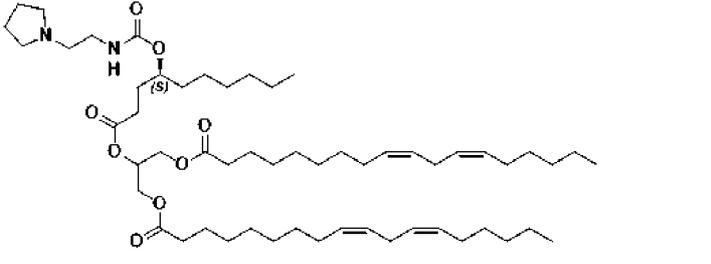
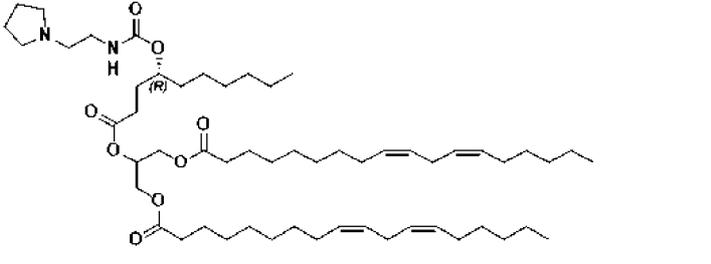
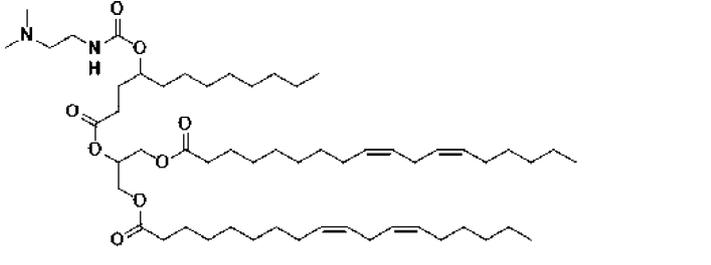
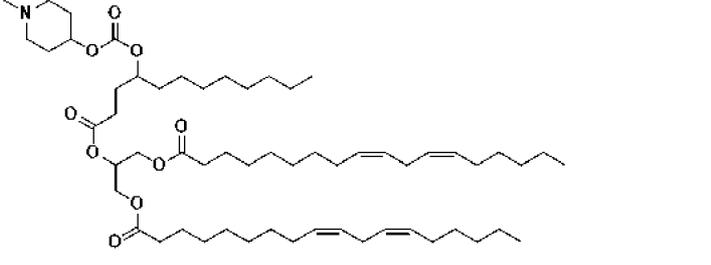
69 (6,44)	
70 (6,61)	
71 (6,28)	
72 (7,01)	

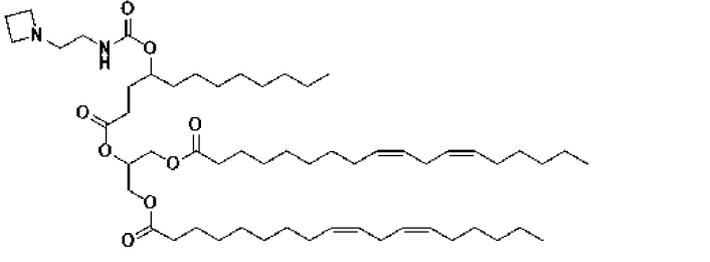
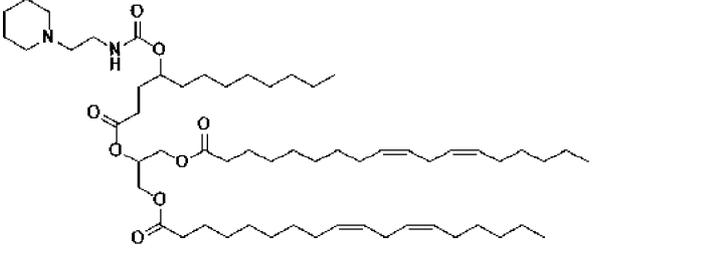
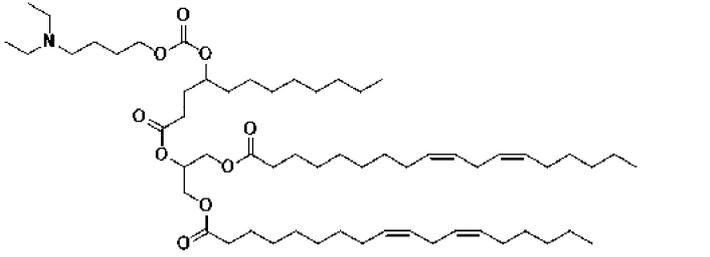
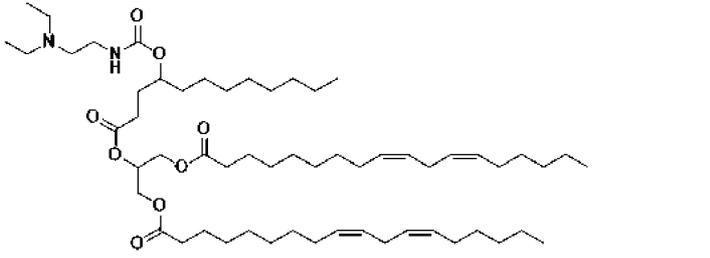
73 (6,41)	
74 (6,44)	
75 (6,17)	
76 (6,74)	

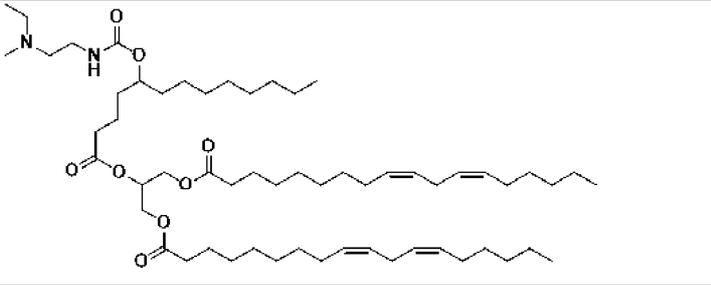
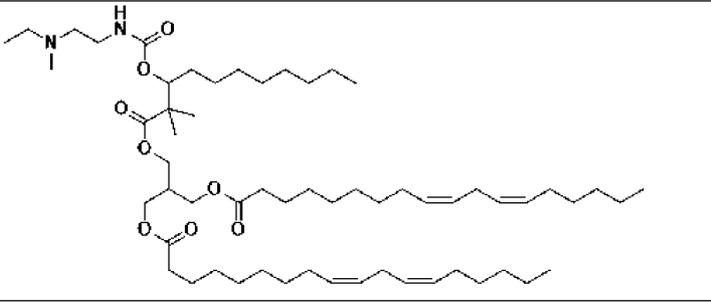
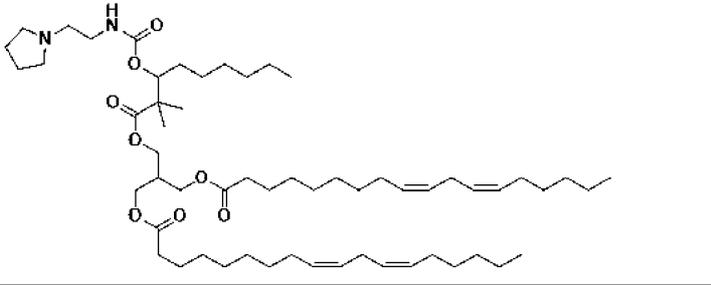
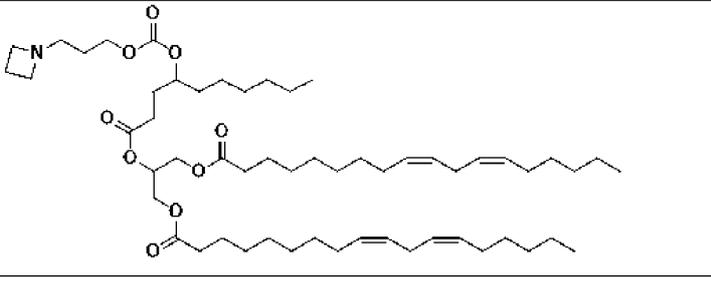
77 (7,23)	
78 (5,93)	
79 (4,96)	
80 (6,41)	

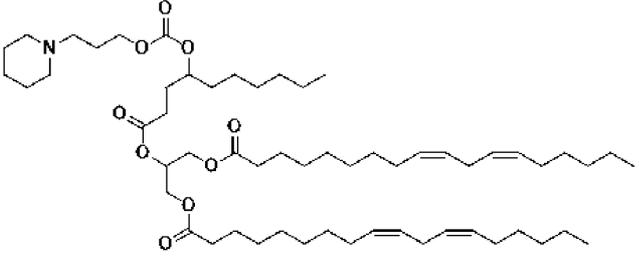
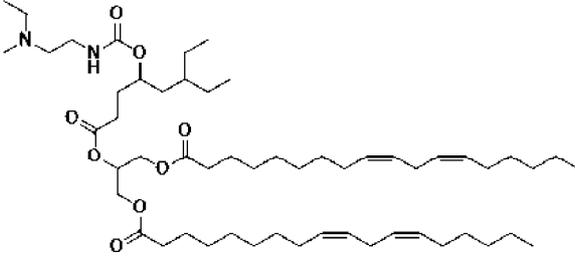
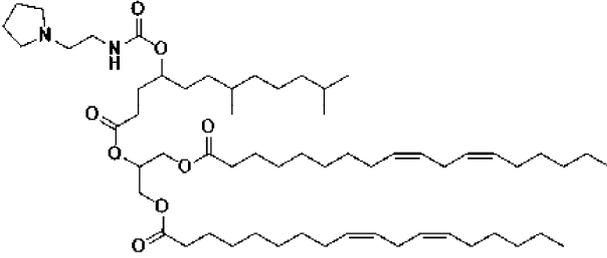
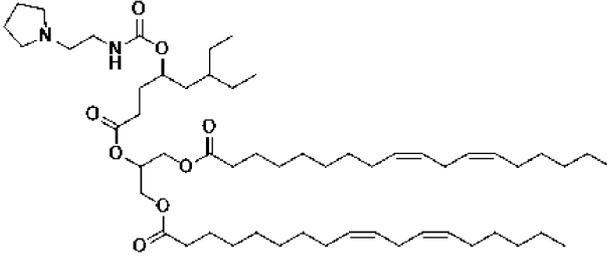
81 (6,42)	
82 (6,71)	
83 (6,61)	
84 (7,39)	

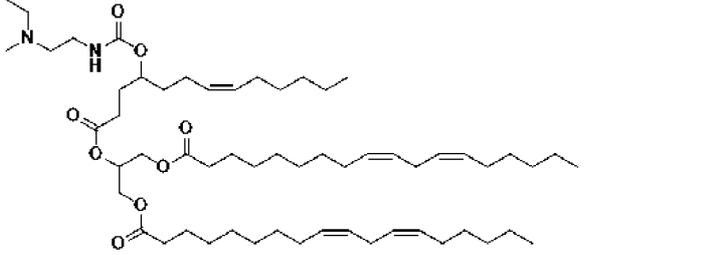
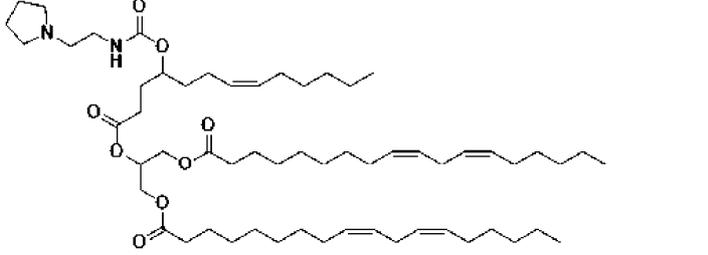
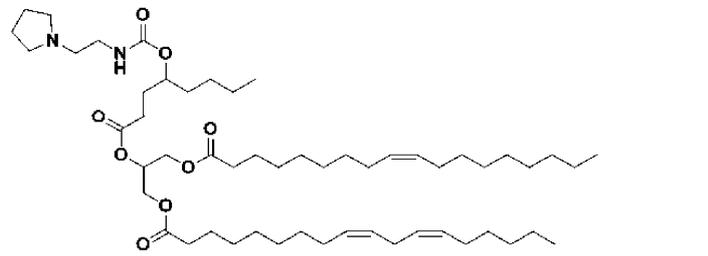
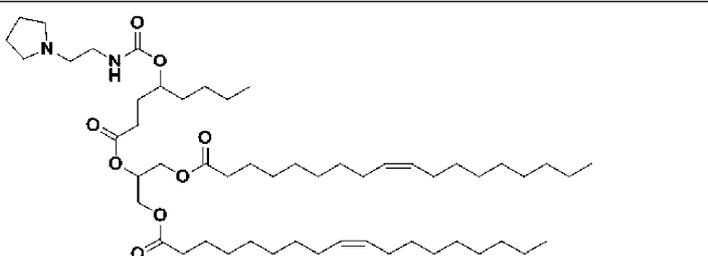
85 (7,02)	
86 (6,23)	
87 (ND)	
88 (ND)	

89 (6,76)	
90 (6,80)	
91 (6,48)	
92 (5,96)	

93 (6,96)	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)NCC1CCCN1CC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCC=CCCCCCCC</chem>
94 (5,80)	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)NCC1CCNCC1CC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCC=CCCCCCCC</chem>
95 (6,15)	 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)N(CC)CC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCC=CCCCCCCC</chem>
96 (6,14)	 <chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)N(CC)CC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCC(=O)OCCCCCCCC=CCCCCCCC</chem>

97 (6,38)	
99 (5,96)	
100 (6,60)	
101 (6,75)	

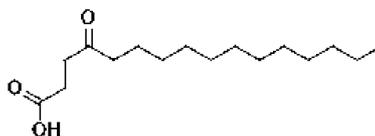
102 (5,16)	
103 (6,09)	
105 (6,53)	
106 (6,80)	

107 (6,35)	
108 (6,52)	
109 (6,91)	
110 (7,01)	

111 (7,02)	
112 (7,02)	
113 (7,02)	
114 (6,93)	

Пример 1 - сравнительное соединение 1.

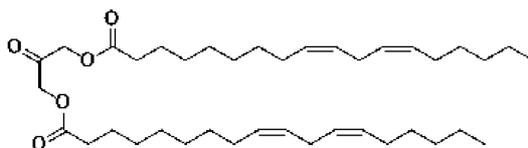
Промежуточное соединение 1a: 4-оксогексадекановая кислота



Раствор янтарного ангидрида (3,0 г, 1,0 эквив.) в ТГФ (0,1 М) охлаждали до -78°C с последующим добавлением додецилмагнийбромида (1,0 М раствор в гексане, 0,5 эквив.) по каплям в течение 5 мин. Реакцию поддерживали при -78°C в течение по крайней мере 18 ч, после чего ее гасили добавлением воды и 1 М HCl. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, и полученный водный слой трижды экстрагировали DCM. Объединенные слои DCM затем экстрагировали 2 раза 2 М NaOH, и объединенные водные слои подкисляли до pH 1 с помощью концентрированной HCl. Затем смесь экстрагировали 3 раза DCM. Объединенные слои DCM сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме с получением неочищенного материала. Неочищенный материал трижды растирали с гексаном, и полученный осадок фильтровали с получением продукта в виде белого твердого вещества (1,31 г, 33%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,72 (ddd, $J=7,0, 5,8, 1,1$ Гц, 2H), 2,67-2,60 (m, 2H), 2,44 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,59 (q, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,26 (d, $J=2,7$ Гц, 18H), 0,91-0,85 (m, 3H).

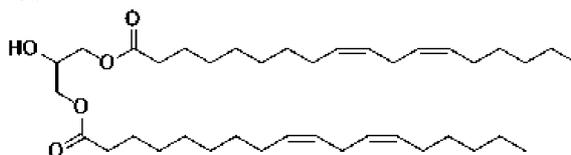
Промежуточное соединение 1b: 2-оксопропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору дигидроксиацетона (1,55 г, 1,0 экв.) в DCM (0,1 М) добавляли линолевую кислоту (2,05 экв.), DMAP (0,2 экв.), DIPEA (2,4 экв.) и EDCI (2,4 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре по меньшей мере 18 ч. По завершении смесь гасили добавлением воды, и органический слой промывали 1 раз 1 М HCl и 1 раз 5% NaHCO₃. Затем органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) до продукта в виде бесцветного масла (8,0 г, 75%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,28 (m, 8H), 4,75 (s, 4H), 2,82-2,74 (m, 4H), 2,42 (t, J=7,5 Гц, 4H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,67 (q, J=7,4 Гц, 4H), 1,40-1,24 (m, 28H), 0,95-0,86 (m, 6H).

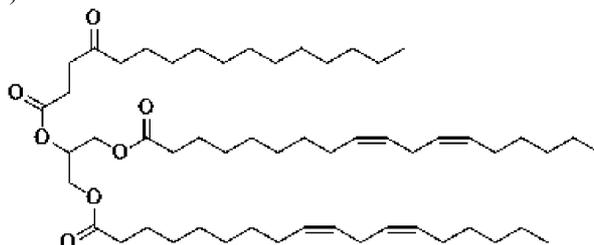
Промежуточное соединение 1c: 2-гидрокси-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноилокси]пропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат



Раствор промежуточного соединения 1b (8,1 г, 1,0 эквив.) в 4:2:1 ТГФ/вода/толуол (0,05-0,1 М) охлаждали до 0-5°C с последующим добавлением NaBH₄ (1,7 экв.). Реакционную смесь перемешивали по меньшей мере 1 ч при 0-25°C. По завершении смесь гасили добавлением воды и EtOAc, и смесь экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (5,9 г, 73%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,46-5,26 (m, 8H), 4,23-4,10 (m, 4H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,42 (d, J=4,8 Гц, 1H), 2,38-2,31 (m, 4H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,68-1,57 (m, 4H), 1,42-1,23 (m, 29H), 0,93-0,85 (m, 6H).

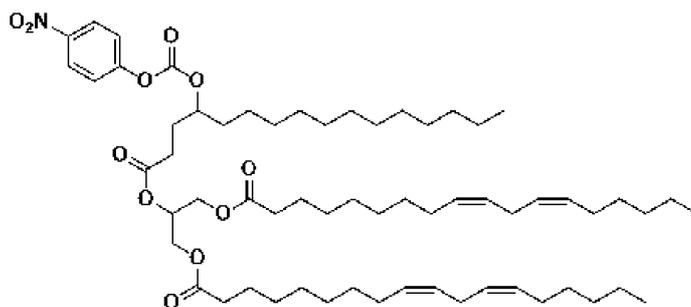
Промежуточное соединение 1d: 2-((4-оксогексадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 1c (1,0 эквив.) в DCM (0,2 М) добавляли промежуточное соединение 1a (1,0-1,2 эквив.), Et₃N или DIPEA (1,5-4,5 эквив.), DMAP (0,1-0,2 эквив.) и EDCI (1-2 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 12 ч, после чего гасили добавлением воды. Смесь промывали 1 раз 1 М HCl и 1 раз 5% NaHCO₃. Затем органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (780 мг, 79%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,45-5,28 (m, 8H), 5,24 (tt, J=5,9, 4,3 Гц, 1H), 4,29 (dd, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,15 (dd, J=11,9, 5,8 Гц, 2H), 2,84-2,74 (m, 4H), 2,71 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,59 (t, J=6,3 Гц, 2H), 2,43 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,32 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,60 (dd, J=14,7, 7,3 Гц, 6H), 1,44-1,20 (m, 49H), 0,88 (td, J=6,9, 4,3 Гц, 9H).

Промежуточное соединение 1e: 2-((4-оксогексадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

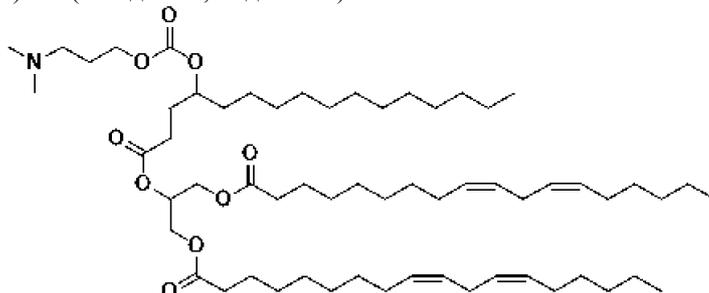


Раствор промежуточного соединения 1d (1,43 г, 1,0 эквив.) в 4:2:1 ТГФ/вода/толуол (0,05-0,1 М) охлаждали до 0-5°C с последующим добавлением NaBH_4 (5,0 экв.). Реакцию поддерживали при 0-25°C не менее 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой и EtOAc, и полученную двухфазную смесь экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением промежуточного спирта в виде бесцветного масла.

Полученный спирт немедленно ресольбилизировали в DCM (0,1 М) с последующим добавлением пиридина (2-3 эквив.) и 4-нитрофенилхлорформиата (1-1,5 эквив.). Реакционную смесь перемешивали не менее 1 ч при комнатной температуре. Смесь гасили добавлением воды и трижды экстрагировали DCM. Объединенные слои DCM сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (910 мг, 54%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,37-8,25 (m, 2H), 7,48-7,40 (m, 2H), 5,49-5,25 (m, 9H), 4,96-4,84 (m, 1H), 4,34 (dd, $J=12,0$, 4,3 Гц, 2H), 4,18 (dd, $J=11,9$, 5,7 Гц, 2H), 2,79 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,49 (dd, $J=8,4$, 6,7 Гц, 2H), 2,33 (tt, $J=7,6$, 4,2 Гц, 4H), 2,16-1,95 (m, 10H), 1,81-1,71 (m, 1H), 1,65 (ddq, $J=15,2$, 7,5, 4,8, 4,2 Гц, 6H), 1,50-1,13 (m, 50H), 0,90 (td, $J=6,8$, 3,7 Гц, 9H).

Соединение 1: 2-((4-(((3-(диметиламино)пропокси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

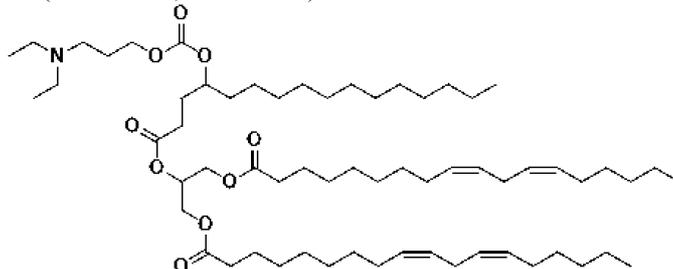


К раствору промежуточного соединения 1e (250 мг, 1,0 эквив.) в MeCN (0,1 М) добавляли пиридин (3,0 эквив.), 3-(диметиламино)пропан-1-ол (1,5-3,0 эквив.) и DMAP (1,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали не менее 2 ч при комнатной температуре. Затем к реакционной смеси добавляли гептан (0,1 М) и слой гептана промывали 3 раза MeCN. Объединенные слои MeCN трижды экстрагировали гептаном, а объединенные слои гептана промывали один последний раз MeCN. Затем гептан удаляли в вакууме и неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (MeOH/DCM) с получением продукта в виде бесцветного масла (100 мг, 41%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,46-5,22 (m, 9H), 4,72 (tdd, $J=7,5$, 5,3, 4,0 Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=12,0$, 4,4 Гц, 2H), 4,23-4,10 (m, 4H), 2,84-2,73 (m, 4H), 2,62-2,27 (m, 13H), 2,05 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 2,01-1,84 (m, 4H), 1,68-1,50 (m, 7H), 1,43-1,21 (m, 50H), 0,88 (td, $J=6,9$, 4,1 Гц, 9H). MS: 1001,2 m/z [M+H].

Пример 2 - соединение 2.

Соединение 2: 2-((4-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



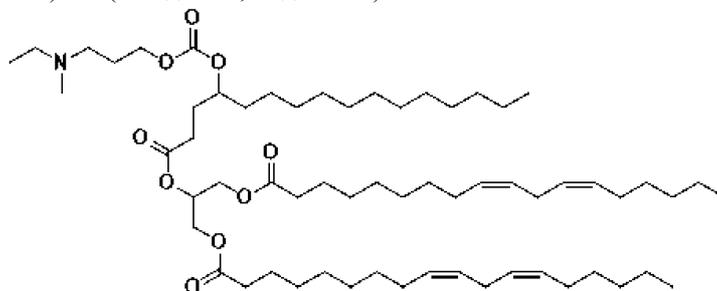
Соединение 2 было синтезировано с выходом 64% из промежуточного соединения 1e и 3-

(диэтиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,20 (m, 9H), 4,72 (tdd, $J=7,5, 5,3, 4,0$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,23-4,10 (m, 4H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,57-2,36 (m, 8H), 2,31 (td, $J=7,6, 1,3$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,97-1,77 (m, 4H), 1,61 (t, $J=7,4$ Гц, 6H), 1,40-1,21 (m, 49H), 1,01 (t, $J=7,1$ Гц, 6H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,1$ Гц, 9H). MS: 1029,7 m/z [M+H].

Пример 3 - соединение 3.

Соединение 3: 2-((4-(((3-(этил(метил)амино)пропокси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

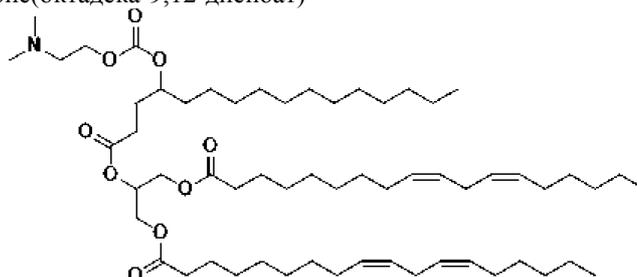


Соединение 3 было синтезировано с выходом 79% из промежуточного соединения 1e и 3-((метил)этиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,49-5,20 (m, 9H), 4,77-4,67 (m, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,16 (tdd, $J=11,9, 6,2, 2,5$ Гц, 4H), 2,77 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,70-2,37 (m, 7H), 2,37-2,25 (m, 7H), 2,13-1,82 (m, 12H), 1,69-1,48 (m, 7H), 1,42-1,20 (m, 46H), 1,14 (s, 2H), 0,88 (td, $J=6,8, 3,9$ Гц, 7H). MS: 1015,7 m/z [M+H].

Пример 4 - соединение 4.

Соединение 4: 2-((4-(((2-(диметиламино)этоксикарбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

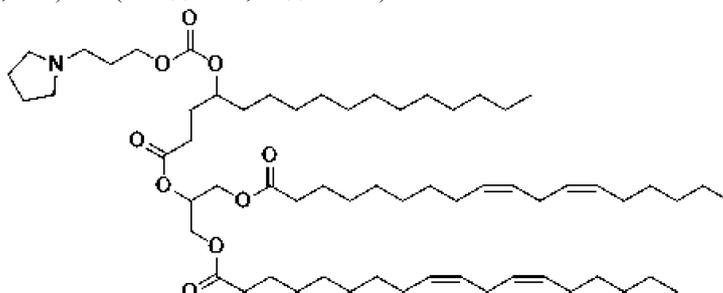


Соединение 4 было синтезировано с выходом 93% из промежуточного соединения 1e и 2-диметиламиноэтан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,31 (m, 8H), 5,25 (tt, $J=5,8, 4,3$ Гц, 1H), 4,73 (tdd, $J=7,6, 5,5, 4,0$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 4H), 4,14 (ddd, $J=11,9, 5,8, 3,4$ Гц, 2H), 2,77 (td, $J=6,0, 1,1$ Гц, 4H), 2,70 (d, $J=16,4$ Гц, 1H), 2,49-2,29 (m, 11H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,99-1,81 (m, 2H), 1,67-1,50 (m, 8H), 1,40-1,21 (m, 48H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,2$ Гц, 9H). MS: 987,6 m/z [M+H].

Пример 5 - соединение 5.

Соединение 5: 2-((4-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

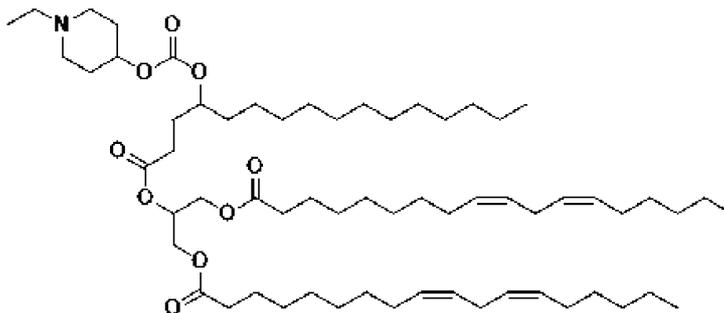


Соединение 5 было синтезировано с выходом 54% из промежуточного соединения 1e и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,21 (m, 9H), 4,72 (tdd, $J=7,3, 5,5, 4,2$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,17 (dddd, $J=15,3, 9,1, 7,3, 3,7$ Гц, 4H), 2,77 (td, $J=6,0, 1,1$ Гц, 4H), 2,57 (d, $J=8,8$ Гц, 6H), 2,40 (dt, $J=8,7, 6,5$ Гц, 2H), 2,31 (td, $J=7,6, 1,2$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,98-1,83 (m, 5H), 1,80 (p, $J=3,2$ Гц, 4H), 1,68-1,50 (m, 7H), 1,41-1,18 (m, 48H), 0,96-0,81 (m, 9H). MS: 1027,6 m/z [M+H].

Пример 6 - соединение 6.

Пример 6: 2-((4-(((1-этилпиперидин-4-ил)окси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

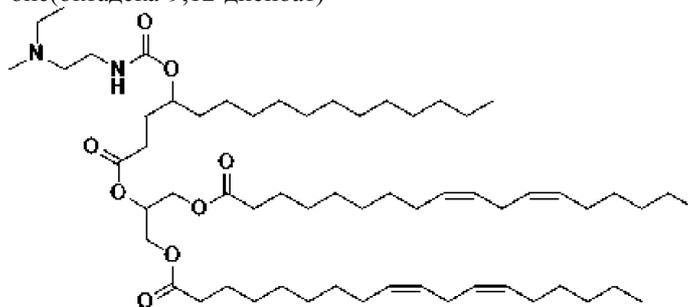


Соединение 6 было синтезировано с выходом 53% из промежуточного соединения 1e и 1-этилпиперидин-4-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,21 (m, 9H), 4,72 (tdd, $J=7,6, 5,3, 4,0$ Гц, 1H), 4,64 (d, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9, 5,8, 4,1$ Гц, 2H), 2,84-2,70 (m, 6H), 2,51-2,36 (m, 4H), 2,31 (td, $J=7,6, 1,4$ Гц, 4H), 2,24 (d, $J=23,1$ Гц, 2H), 2,11-1,93 (m, 11H), 1,92-1,73 (m, 4H), 1,70-1,52 (m, 8H), 1,43-1,21 (m, 48H), 1,09 (t, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,2$ Гц, 9H). MS: 1028,2 m/z [M+H].

Пример 7 - соединение 7.

Соединение 7: 2-((4-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

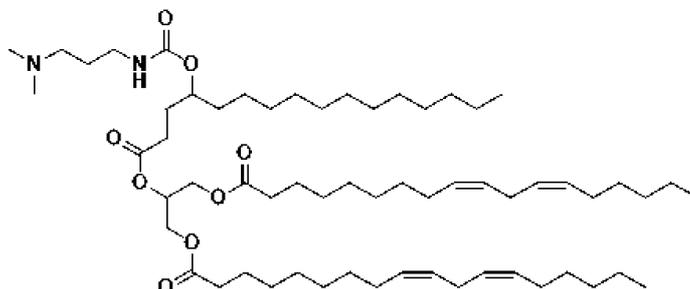


Соединение 7 было синтезировано с выходом 66% из промежуточного соединения 1e и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,47-5,08 (m, 10H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,4, 1,4$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,9, 3,3$ Гц, 2H), 3,24 (q, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,82-2,74 (m, 4H), 2,53-2,26 (m, 10H), 2,21 (s, 3H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,98-1,74 (m, 2H), 1,68-1,41 (m, 8H), 1,41-1,19 (m, 49H), 1,04 (t, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,95-0,82 (m, 9H). MS: 1001,1 m/z [M+H].

Пример 8 - соединение 8.

Соединение 8: 2-((4-(((3-(диметиламино)пропил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

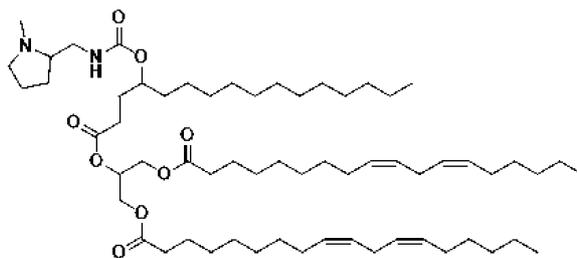


Соединение 8 синтезировали с выходом 55% из промежуточного соединения 1e и N1,N1-диметилпропан-1,3-диамина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,46 (t, $J=5,8$ Гц, 1H), 5,43-5,28 (m, 8H), 5,24 (tt, $J=5,8, 4,4$ Гц, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,5, 2,2$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 1,6$ Гц, 2H), 3,23 (h, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,82-2,73 (m, 4H), 2,48-2,20 (m, 14H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,97-1,42 (m, 12H), 1,42-1,20 (m, 48H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,1$ Гц, 9H). MS: 1000,6 m/z [M+H].

Пример 9 - соединение 9.

Соединение 9: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

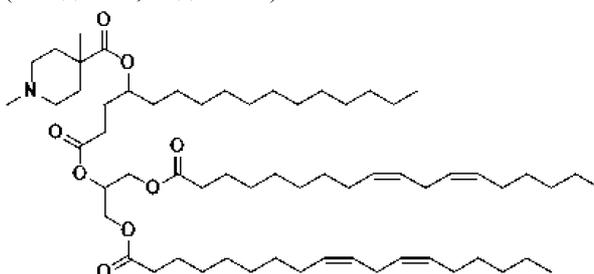


Соединение 9 было синтезировано с выходом 65% из промежуточного соединения 1e и (1-метилпирролидин-2-ил)метанамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 5,45-5,28 (m, 8H), 5,25 (ddd, $J=10,2, 5,8, 4,4$ Гц, 1H), 5,19-5,11 (m, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9, 5,9, 3,0$ Гц, 2H), 3,44-3,31 (m, 1H), 3,19-3,02 (m, 2H), 2,84-2,72 (m, 4H), 2,46-2,16 (m, 12H), 2,05 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,97-1,66 (m, 6H), 1,66-1,42 (m, 8H), 1,42-1,20 (m, 49H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,2$ Гц, 9H). MS: 1013,1 m/z [M+H].

Пример 10 - соединение 10.

Соединение 10: 2-(((4-(1,4-диметилпиперидин-4-карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



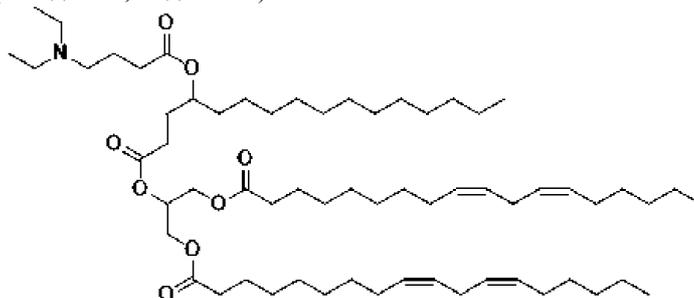
Раствор промежуточного соединения 1d (360 мг, 1,0 эквив.) в 4:2:1 ТГФ/вода/толуол (0,05 М) охлаждали до 0°C с последующим добавлением NaBH_4 (5,0 экв.). Реакцию поддерживали при 0°C в течение 18 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой и EtOAc , и полученную двухфазную смесь экстрагировали 3× EtOAc . Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (EtOAc /гексаны) с получением промежуточного спирта в виде бесцветного масла.

Полученный неочищенный спирт немедленно ресольubilizировали в DCM (0,1 М) с последующим добавлением 1,4-диметилпиперидин-4-карбоновой кислоты (1,0 экв.), DMAP (0,1 экв.), DIPEA (4,0 экв.) и EDCI (1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 16 ч в реакционную смесь добавляли дополнительно 1,4-диметилпиперидин-4-карбоновую кислоту (1,0 экв.), DMAP (0,05 эквив.), DIPEA (2,0 эквив.) и EDCI (1,5 эквив.) и реакционную смесь нагревали до 40°C. Еще через два часа реакцию гасили добавлением воды и DCM, и органический слой промывали 1 раз 1 М HCl, 1 раз 5% NaHCO_3 и 1 раз рассолом. Полученный органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (MeOH/DCM) с получением продукта в виде розового масла (94 мг, 22%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,46-5,22 (m, 9H), 4,92 (ddd, $J=11,6, 7,5, 4,7$ Гц, 1H), 4,30 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=12,0, 5,8, 1,9$ Гц, 2H), 2,82-2,74 (m, 4H), 2,67 (s, 2H), 2,41-2,25 (m, 9H), 2,14 (d, $J=14,2$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,98-1,78 (m, 3H), 1,66-1,49 (m, 9H), 1,43-1,18 (m, 50H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,3$ Гц, 9H).

Пример 11 - соединение 11.

Соединение 11: 2-(((4-(4-(диэтиламино)бутаноил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

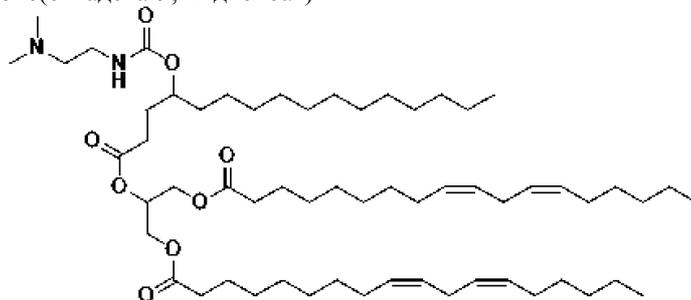


Соединение 11 было синтезировано с выходом 17% из промежуточного соединения 1d и 3-(диэтиламино)бутановой кислоты с использованием метода, применяемого для примера 10.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,46 (t, $J=5,8$ Гц, 1H), 5,43-5,28 (m, 8H), 5,24 (tt, $J=5,8, 4,4$ Гц, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,5, 2,2$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 1,6$ Гц, 2H), 3,23 (h, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,82-2,73 (m, 4H), 2,48-2,20 (m, 14H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,97-1,42 (m, 12H), 1,42-1,20 (m, 48H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,1$ Гц, 9H). MS: 1013,9 m/z [M+H].

Пример 12 - соединение 12.

Соединение 12: 2-((4-(((2-(диметиламино)этил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

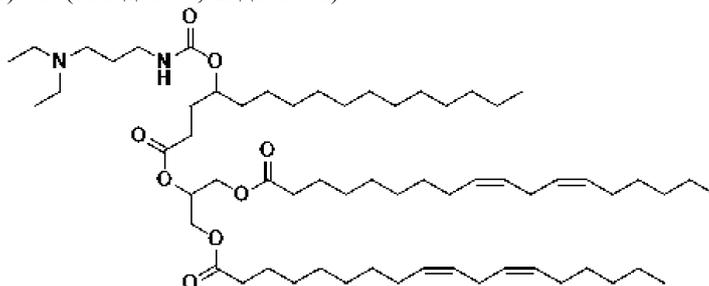


Соединение 12 было синтезировано с выходом 67% из промежуточного соединения 1e и N1,N1-диметилаэтан-1,2-диамина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,29 (m, 8H), 5,29-5,18 (m, 2H), 4,75 (s, 1H), 4,34-4,24 (m, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 3,6$ Гц, 2H), 3,25 (q, $J=5,8$ Гц, 2H), 2,77 (td, $J=6,2, 1,2$ Гц, 4H), 2,47-2,35 (m, 4H), 2,35-2,28 (m, 4H), 2,24 (s, 6H), 2,05 (q, $J=7,1$ Гц, 8H), 1,98-1,73 (m, 4H), 1,65-1,42 (m, 7H), 1,40-1,20 (m, 48H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,3$ Гц, 9H). MS: 987,2 m/z [M+H].

Пример 13 - соединение 13.

Соединение 13: 2-((4-(((3-(диэтиламино)пропил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

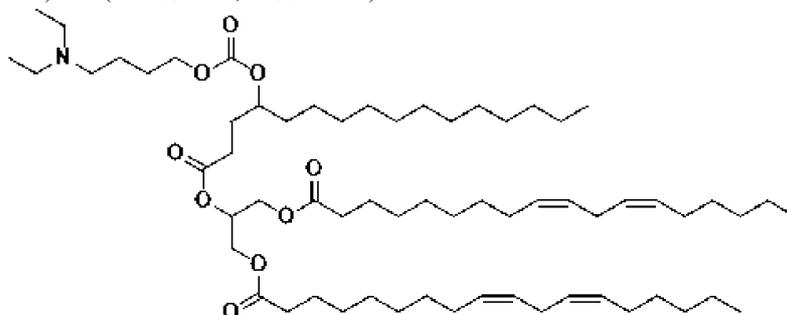


Соединение 13 было синтезировано с выходом 62% из промежуточного соединения 1e и N1,N1-диэтилпропан-1,3-диамина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,93 (s, 1H), 5,44-5,28 (m, 8H), 5,24 (ddd, $J=5,8, 4,5, 1,3$ Гц, 1H), 4,74 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,5, 2,7$ Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9, 5,8, 1,2$ Гц, 2H), 3,24 (tt, $J=13,2, 6,6$ Гц, 2H), 2,81-2,71 (m, 4H), 2,57 (d, $J=7,7$ Гц, 6H), 2,38 (ddd, $J=8,9, 6,8, 3,2$ Гц, 2H), 2,35-2,28 (m, 4H), 2,05 (q, $J=6,6$ Гц, 8H), 1,94-1,85 (m, 2H), 1,79 (dq, $J=14,8, 8,1$ Гц, 2H), 1,73-1,56 (m, 7H), 1,56-1,43 (m, 3H), 1,40-1,20 (m, 47H), 1,06 (t, $J=7,1$ Гц, 6H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,3$ Гц, 9H). MS: 1029,2 m/z [M+H].

Пример 14 - соединение 14.

Соединение 14: 2-((4-(((4-(диэтиламино)бутокси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



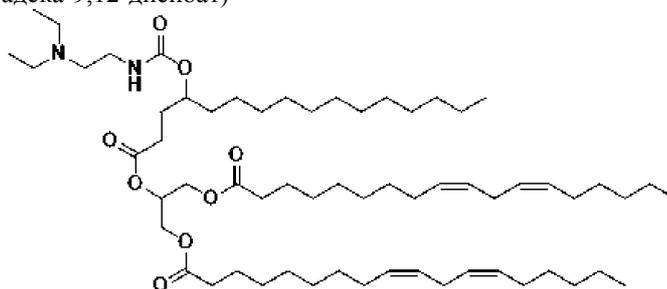
Соединение 14 синтезировали с выходом 60% из промежуточного соединения 1e и N1,N1-диметилаэтан-1,2-диамина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,30 (m, 9H), 5,28 (tt, $J=5,8, 4,3$ Гц, 1H), 4,78-4,69 (m, 1H), 4,31 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,22-4,09 (m, 4H), 2,79 (td, $J=6,1, 1,1$ Гц, 4H), 2,63 (q, $J=7,2$ Гц, 4H), 2,55 (t, $J=7,6$ Гц,

2H), 2,47-2,38 (m, 2H), 2,38-2,30 (m, 4H), 2,07 (q, J=7,1 Гц, 8H), 2,02-1,85 (m, 2H), 1,76-1,51 (m, 11H), 1,45-1,21 (m, 49H), 1,08 (t, J=7,2 Гц, 6H), 0,95-0,82 (m, 9H). MS: 1044,1 m/z [M+H].

Пример 15 - соединение 15.

Соединение 15: 2-((4-(((2-(диэтиламино)этил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

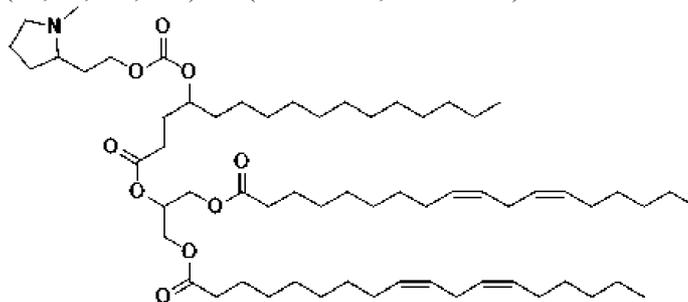


Соединение 15 было синтезировано с выходом 75% из промежуточного соединения 1e и N1,N1-диэтилэтан-1,2-диамина, используя метод, применяемый для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,29 (m, 9H), 5,25 (ddd, J=5,8, 4,4, 1,4 Гц, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (ddd, J=11,9, 4,4, 1,2 Гц, 2H), 4,14 (ddd, J=11,9, 5,8, 3,0 Гц, 2H), 3,23 (q, J=5,7 Гц, 2H), 2,80-2,73 (m, 4H), 2,57 (q, J=7,0 Гц, 6H), 2,38 (ddd, J=9,0, 6,6, 4,7 Гц, 2H), 2,34-2,28 (m, 4H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,90 (h, J=9,0, 7,9 Гц, 1H), 1,80 (p, J=7,3, 6,5 Гц, 1H), 1,66-1,44 (m, 7H), 1,40-1,20 (m, 53H), 1,03 (t, J=7,1 Гц, 6H), 0,88 (td, J=6,9, 4,3 Гц, 9H). MS: 1014,9 m/z [M+H].

Пример 16 - соединение 16.

Соединение 16: 2-((4-(((2-(1-метилпирролидин-2-ил)этокси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

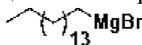


Соединение 16 было синтезировано с выходом 78% из промежуточного соединения 1e и 2-(1-метилпирролидин-2-ил)этан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,28 (m, 9H), 5,25 (tt, J=5,8, 4,3 Гц, 1H), 4,72 (qd, J=7,6, 4,6 Гц, 1H), 4,29 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,26-4,09 (m, 4H), 3,14 (t, J=8,8 Гц, 1H), 2,82-2,74 (m, 4H), 2,45-2,28 (m, 9H), 2,22 (td, J=11,5, 10,9, 6,0 Гц, 2H), 2,15-1,91 (m, 12H), 1,69-1,48 (m, 9H), 1,42-1,20 (m, 50H), 0,88 (td, J=6,9, 4,1 Гц, 9H). MS: 1027,9 m/z [M+H].

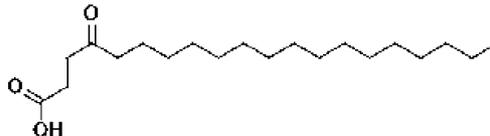
Пример 17 - соединение 17.

Промежуточное соединение 17a: гексадецилмагнийбромид



К раствору Mg (15,92 г, 2 эквив.) в ТГФ (300 мл) добавляли I₂ (0,01 экв.), затем к вышеуказанному по каплям при 80°C добавляли 1-бромгексадекан (1,0 экв.) в ТГФ (100 мл). Смесь перемешивали 6 ч при 80°C. Продукт получали с количественным выходом в виде коричневой жидкости и сразу использовали на следующей стадии.

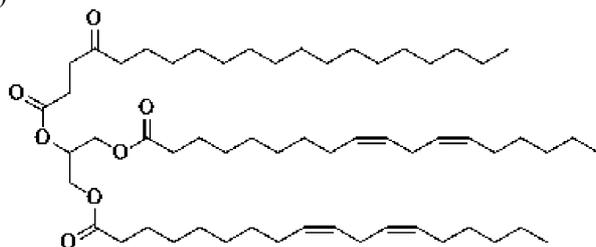
Промежуточное соединение 17b: 4-оксойкозановая кислота



Раствор янтарного ангидрида (54 г, 1,0 экв.) в ТГФ (1,2 М) охлаждали до -78°C с последующим добавлением промежуточного соединения 17a. Реакционную смесь выдерживали при -78°C в течение 12 ч перед тем, как вылить в насыщ. NH₄Cl и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические фазы промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Очистка колоночной хроматографией дала продукт в виде белого твердого вещества (4 г, 2%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,11 (t, J=6,7 Гц, 1H), 2,80-2,62 (m, 4H), 2,46 (t, J=7,5 Гц, 1H), 1,63 (dq, J=14,7, 7,1 Гц, 2H), 1,49-1,20 (m, 27H), 0,90 (t, J=6,7 Гц, 3H).

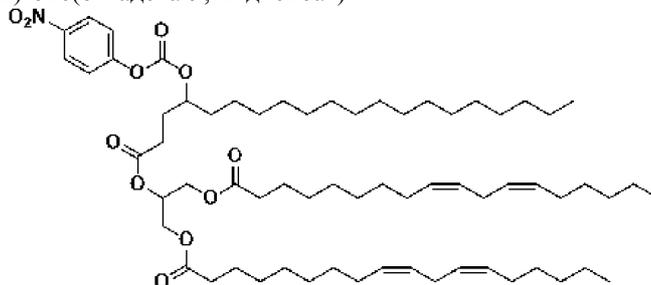
Промежуточное соединение 17с: 2-((4-оксоикозаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 17с было синтезировано с выходом 53% из промежуточного соединения 17b и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,21 (m, 9H), 4,29 (dt, $J=11,9, 4,1$ Гц, 2H), 4,14 (dd, $J=11,9, 5,9$ Гц, 2H), 4,06 (t, $J=6,8$ Гц, 1H), 2,73 (dt, $J=22,5, 6,5$ Гц, 6H), 2,67-2,54 (m, 4H), 2,42 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=6,9$ Гц, 9H), 1,61 (q, $J=7,9, 7,3$ Гц, 8H), 1,42-1,15 (m, 55H), 0,88 (td, $J=6,7, 4,0$ Гц, 9H).

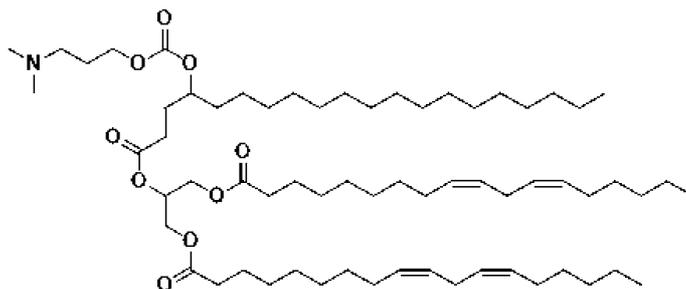
Промежуточное соединение 17d: 2-((4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)икозаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 17d было синтезировано с выходом 29% из промежуточного соединения 17с с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1е.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,33-8,24 (m, 2H), 7,43-7,34 (m, 2H), 5,45-5,23 (m, 8H), 4,92-4,82 (m, 1H), 4,31 (dd, $J=12,0, 4,3$ Гц, 2H), 4,20-4,09 (m, 2H), 2,76 (t, $J=6,3$ Гц, 4H), 2,47 (dd, $J=8,3, 6,7$ Гц, 2H), 2,30 (td, $J=7,6, 4,2$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=7,2$ Гц, 9H), 1,61 (ddt, $J=11,5, 7,4, 3,7$ Гц, 4H), 1,43-1,22 (m, 49H), 0,88 (td, $J=6,9, 3,8$ Гц, 9H).

Соединение 17: 2-((4-(((3-(диметиламино)пропокси)карбонил)окси)икозаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

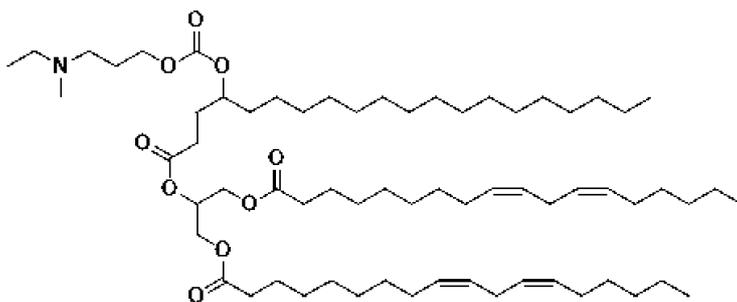


Соединение 17 было синтезировано с выходом 74% из промежуточного соединения 17d и 3-(диметиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,22 (m, 10H), 4,72 (tdd, $J=7,5, 5,4, 4,0$ Гц, 1H), 4,36-4,25 (m, 2H), 4,23-4,08 (m, 4H), 2,82-2,71 (m, 4H), 2,50-2,28 (m, 9H), 2,25 (s, 6H), 2,09-1,97 (m, 9H), 1,91-1,80 (m, 3H), 1,70-1,47 (m, 7H), 1,40-1,20 (m, 57H), 0,96-0,82 (m, 9H). MS: 1058,1 m/z [M+H].

Пример 18 - соединение 18.

Соединение 18: 2-((4-(((3-(этил(метил)амино)пропокси)карбонил)окси)икозаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

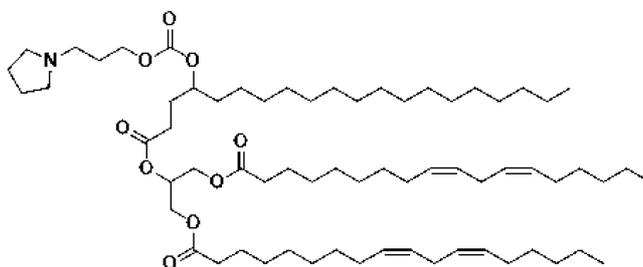


Соединение 18 было синтезировано с выходом 77% из промежуточного соединения 17d и 3-((метил)этиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,22 (m, 10H), 4,72 (qd, $J=7,7, 4,7$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=12,0, 4,4$ Гц, 2H), 4,20-4,10 (m, 4H), 2,83-2,73 (m, 4H), 2,51-2,36 (m, 6H), 2,35-2,28 (m, 4H), 2,24 (s, 3H), 2,10-1,99 (m, 9H), 1,91-1,82 (m, 3H), 1,66-1,52 (m, 6H), 1,42-1,19 (m, 60H), 1,06 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,1$ Гц, 9H). MS: 1072,3 m/z [M+H].

Пример 19 - соединение 19.

Соединение 19: 2-((4-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)икозаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

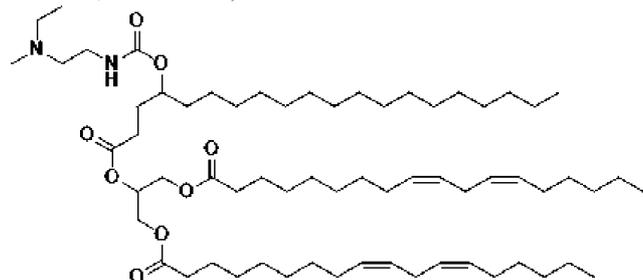


Соединение 19 было синтезировано с выходом 67% из промежуточного соединения 17d и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,22 (m, 9H), 4,72 (tt, $J=7,5, 4,5$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,24-4,10 (m, 4H), 2,83-2,72 (m, 4H), 2,57 (d, $J=8,3$ Гц, 6H), 2,40 (dt, $J=8,6, 6,7$ Гц, 2H), 2,31 (td, $J=7,6, 1,2$ Гц, 4H), 2,04 (dd, $J=8,5, 5,3$ Гц, 8H), 2,00-1,86 (m, 4H), 1,86-1,78 (m, 4H), 1,53 (ddt, $J=14,1, 8,3, 4,7$ Гц, 7H), 1,44-1,20 (m, 56H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,2$ Гц, 9H). MS: 1084,2 m/z [M+H].

Пример 20 - соединение 20.

Соединение 20: 2-((4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)икозаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

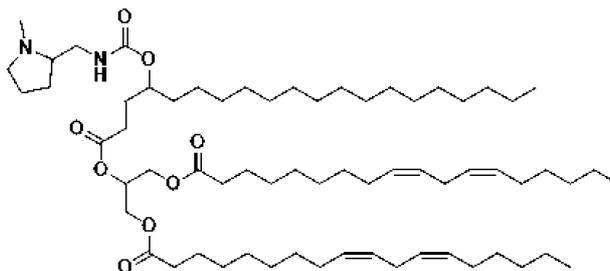


Соединение 20 было синтезировано с выходом 73% из промежуточного соединения 17d и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,17 (m, 10H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,4, 1,3$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 3,4$ Гц, 2H), 3,25 (d, $J=6,2$ Гц, 2H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,50-2,36 (m, 6H), 2,36-2,28 (m, 4H), 2,22 (s, 3H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,94-1,71 (m, 4H), 1,66-1,20 (m, 63H), 1,05 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,2$ Гц, 9H). MS: 1056,6 m/z [M+H].

Пример 21 - соединение 21.

Соединение 21: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)икозаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

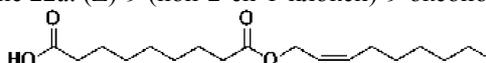


Соединение 21 было синтезировано с выходом 85% из промежуточного соединения 17d (1-метилпирролидин-2-ил)метанамина, используя метод, применяемый для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,30 (m, 8H), 5,29-5,18 (m, 2H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,21-4,07 (m, 2H), 3,46-3,30 (m, 1H), 3,11 (ddt, J=22,3, 8,9, 4,3 Гц, 2H), 2,80-2,72 (m, 4H), 2,45-2,15 (m, 12H), 2,04 (dd, J=8,5, 5,3 Гц, 9H), 1,96-1,77 (m, 4H), 1,71 (tq, J=8,4, 5,1, 4,0 Гц, 2H), 1,65-1,45 (m, 8H), 1,39-1,20 (m, 60H), 0,88 (td, J=6,9, 4,4 Гц, 9H). MS: 1068,8 m/z [M+H].

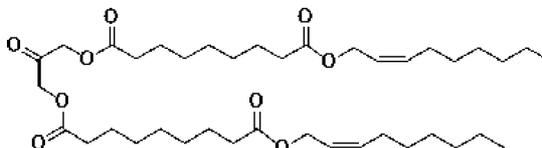
Пример 22 - соединение 22.

Промежуточное соединение 22a: (Z)-9-(нон-2-ен-1-илокси)-9-оксононановая кислота



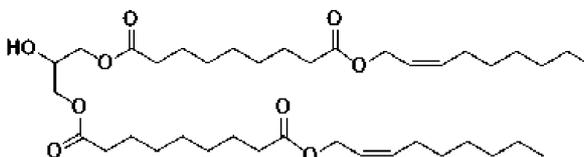
К раствору нонандиовой кислоты (25 г, 1,3 экв.) в THF (100 мл) при 0°C по каплям в течение одной минуты добавляли оксалилхлорид (1,0 экв.). Затем по каплям в течение одной минуты добавляли ДМФ (0,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин, затем при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C с последующим добавлением цис-2-нонен-1-ола (1,0 эквив.) в THF (100 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 5 мин, затем перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. По завершении реакционную смесь концентрировали в вакууме, суспендировали с DCM и фильтровали. Фильтрат концентрировали и очищали колоночной хроматографией (80 г, MeOH/DCM) с получением продукта в виде бледно-желтого масла (15 г, 47%), которое использовали непосредственно на последующих стадиях.

Промежуточное соединение 22b: 9,9'-ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)O'1,O1-(2-оксопропан-1,3-диил)ди(нонандиоат)



Промежуточное соединение 22b было синтезировано с выходом 73% путем объединения дигидроксиацетона и промежуточного соединения 22a с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1b.

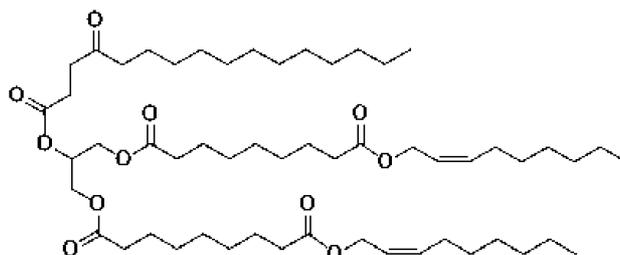
Промежуточное соединение 22c: O'1,O1-(2-гидроксипропан-1,3-диил)9,9'-ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)ди(нонандиоат)



Промежуточное соединение 22c было синтезировано с выходом 71% из промежуточного соединения 22b с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1c, за исключением того, что реакция завершилась через 45 мин.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,64 (dt, J=11,0, 7,3, 1,3 Гц, 2H), 5,52 (dt, J=10,9, 6,8, 1,5 Гц, 2H), 4,67-4,58 (m, 4H), 4,23-4,05 (m, 5H), 2,51 (d, J=4,6 Гц, 1H), 2,32 (dt, J=18,1, 7,6 Гц, 8H), 2,15-2,00 (m, 4H), 1,61 (td, J=10,0, 2,7 Гц, 8H), 1,42-1,20 (m, 28H), 0,93-0,83 (m, 6H).

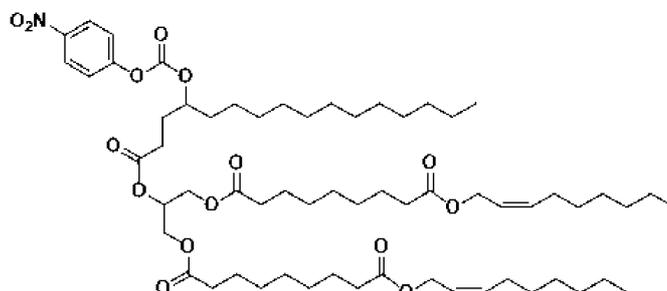
Промежуточное соединение 22d: 9,9'-ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)O'1,O1-(2-((4-оксогексадеканоил)окси)пропан-1,3-диил)ди(нонандиоат)



Промежуточное соединение 22d было синтезировано с выходом 38% из промежуточного соединения 22с и промежуточного соединения 1а, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 1d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,66 (dtt, $J=11,0, 7,3, 1,3$ Гц, 2H), 5,54 (dtt, $J=11,0, 6,9, 1,5$ Гц, 2H), 5,26 (tt, $J=5,9, 4,3$ Гц, 1H), 4,64 (dd, $J=6,9, 1,3$ Гц, 4H), 4,31 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,17 (dd, $J=11,9, 5,9$ Гц, 2H), 2,74 (t, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,68-2,56 (m, 2H), 2,45 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,33 (td, $J=7,6, 6,0$ Гц, 8H), 2,19-2,07 (m, 4H), 1,70-1,57 (m, 12H), 1,43-1,23 (m, 46H), 0,98-0,84 (m, 9H).

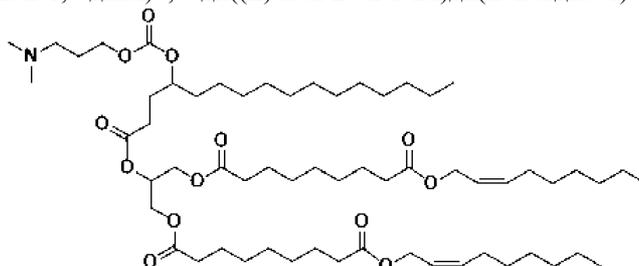
Промежуточное соединение 22е: $\text{O}'1, \text{O}1$ -2-((4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)-гексадеканоил)окси)пропан-1,3-диил)9,9'-ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)ди(нонандиоат)



Промежуточное соединение 22е было синтезировано с выходом 51% из промежуточного соединения 22d с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1е.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,38-8,31 (m, 1H), 8,31-8,24 (m, 2H), 7,54-7,47 (m, 1H), 7,44-7,36 (m, 2H), 5,64 (dtt, $J=11,0, 7,3, 1,3$ Гц, 2H), 5,51 (dtt, $J=11,0, 6,8, 1,5$ Гц, 2H), 5,26 (tt, $J=5,8, 4,3$ Гц, 1H), 4,86 (ddd, $J=11,8, 7,5, 4,8$ Гц, 1H), 4,65-4,57 (m, 4H), 4,36-4,25 (m, 2H), 4,21-4,10 (m, 2H), 2,50-2,44 (m, 2H), 2,30 (td, $J=7,5, 4,5$ Гц, 8H), 2,13-2,05 (m, 4H), 1,62 (d, $J=37,2$ Гц, 9H), 1,46-1,18 (m, 49H), 0,94-0,80 (m, 9H).

Соединение 22: $\text{O}'1, \text{O}1$ -2-((4-(((3-(диметиламино)пропокси)карбонил)окси)-гексадеканоил)окси)пропан-1,3-диил)9,9'-ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)ди(нонандиоат)

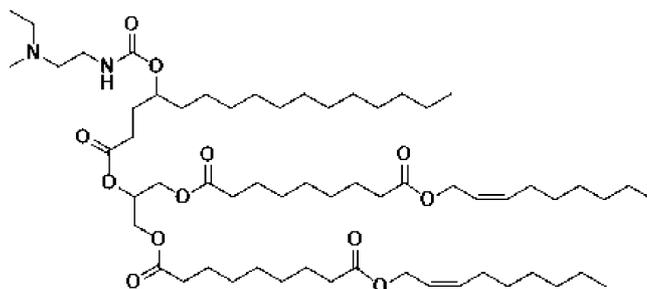


Соединение 22 синтезировали с выходом 54% из промежуточного соединения 22е и 3-(диметиламино)пропан-1-ола, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,71-5,58 (m, 2H), 5,52 (dtt, $J=10,9, 6,8, 1,5$ Гц, 2H), 5,25 (tt, $J=5,7, 4,4$ Гц, 1H), 4,72 (ddd, $J=11,7, 7,4, 4,5$ Гц, 1H), 4,62 (dd, $J=6,8, 1,3$ Гц, 4H), 4,34-4,25 (m, 2H), 4,25-4,08 (m, 4H), 2,39 (ddd, $J=12,9, 8,4, 6,4$ Гц, 4H), 2,34-2,21 (m, 13H), 2,09 (tdd, $J=7,4, 5,7, 1,5$ Гц, 4H), 2,02-1,67 (m, 7H), 1,69-1,51 (m, 11H), 1,42-1,19 (m, 45H), 0,97-0,78 (m, 8H). MS: 1065,7 m/z [M+H].

Пример 23 - соединение 23.

Соединение 23: $\text{O}'1, \text{O}1$ -2-((4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)гексадеканоил)окси)пропан-1,3-диил)9,9'-ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)ди(нонандиоат)

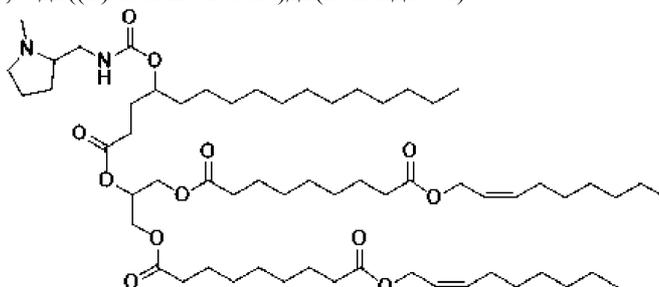


Соединение 23 было синтезировано с выходом 59% из промежуточного соединения 22е и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,72-5,59 (m, 2H), 5,52 (dt, $J=11,0$, 6,8, 1,5 Гц, 2H), 5,36-5,18 (m, 2H), 4,75 (s, 1H), 4,62 (dd, $J=6,9$, 1,2 Гц, 4H), 4,28 (dd, $J=11,9$, 4,4 Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9$, 5,8, 3,5 Гц, 2H), 3,35-3,20 (m, 2H), 2,56-2,43 (m, 4H), 2,38 (ddd, $J=8,7$, 6,6, 4,1 Гц, 2H), 2,34-2,19 (m, 11H), 2,10 (qd, $J=7,4$, 1,5 Гц, 4H), 1,96-1,72 (m, 3H), 1,63 (d, $J=6,9$ Гц, 11H), 1,41-1,18 (m, 48H), 1,07 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,93-0,81 (m, 9H). MS: 1065,2 m/z [M+H].

Пример 24 - соединение 24.

Соединение 24: O'1,O1-(2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)-окси)пропан-1,3-диил)9,9'-ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)ди(нонандиоат)

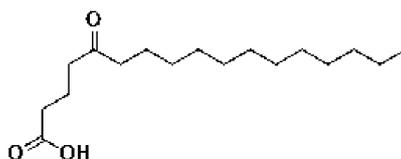


Соединение 24 синтезировали из промежуточного соединения 22е и (1-метилпирролидин-2-ил)метанамина с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,71-5,59 (m, 2H), 5,52 (dt, $J=10,9$, 6,8, 1,5 Гц, 2H), 5,24 (ddd, $J=8,8$, 5,8, 4,4 Гц, 2H), 4,76 (s, 1H), 4,62 (dd, $J=6,9$, 1,3 Гц, 4H), 4,28 (dd, $J=11,9$, 4,4 Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9$, 5,8, 3,2 Гц, 2H), 3,39 (q, $J=11,2$, 10,1 Гц, 1H), 3,10 (t, $J=14,0$ Гц, 2H), 2,50-2,20 (m, 15H), 2,10 (qd, $J=7,4$, 1,5 Гц, 4H), 1,97-1,67 (m, 6H), 1,61 (d, $J=7,3$ Гц, 12H), 1,41-1,18 (m, 47H), 0,97-0,79 (m, 9H). MS: 1076,7 m/z [M+H].

Пример 25 - соединение 25.

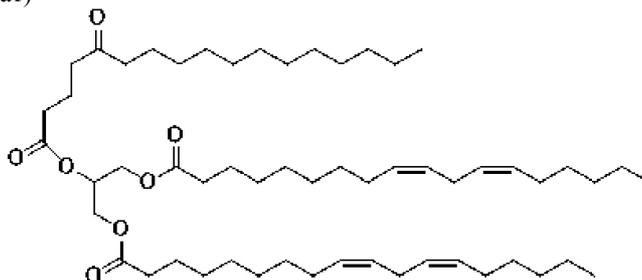
Промежуточное соединение 25а: 5-оксогептадекановая кислота



Промежуточное соединение 25а было синтезировано с выходом 64% из раствора глутарового ангидрида и додецилмагнийбромида с использованием метода, применяемого в Промежуточном соединении 1а.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,75 (t, $J=6,7$ Гц, 1H), 2,49 (t, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,44-2,35 (m, 4H), 1,90 (p, $J=7,2$ Гц, 2H), 1,56 (t, $J=7,3$ Гц, 2H), 1,26 (d, $J=4,0$ Гц, 19H), 0,88 (t, $J=6,7$ Гц, 3H).

Промежуточное соединение 25b: 2-((5-оксогептадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

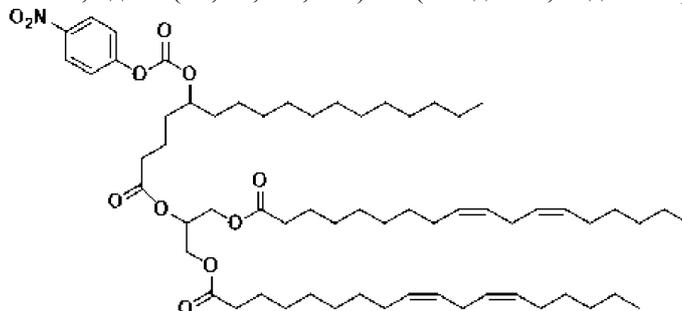


Промежуточное соединение 25b было синтезировано с выходом 55% из промежуточного соединения 25а и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для промежуточного

соединения 1d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,19 (m, 9H), 4,30 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,12 (dd, $J=11,9, 5,8$ Гц, 2H), 2,76 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,46 (t, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,42-2,24 (m, 8H), 2,04 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,88 (p, $J=7,2$ Гц, 2H), 1,57 (dp, $J=21,3, 7,2$ Гц, 6H), 1,43-1,18 (m, 41H), 0,87 (td, $J=6,8, 4,1$ Гц, 8H).

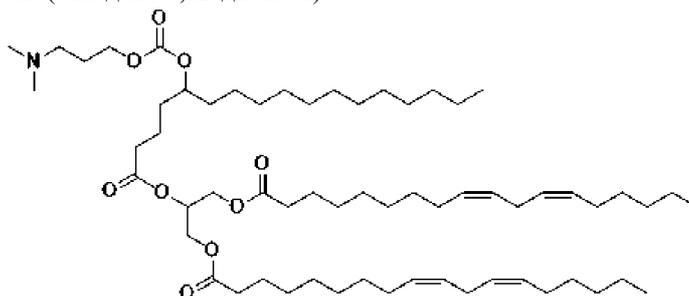
Промежуточное соединение 25с: 2-((5-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)гептадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 25с было синтезировано с выходом 23% из промежуточного соединения 25b с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1e.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,31-8,24 (m, 2H), 7,42-7,35 (m, 2H), 5,44-5,19 (m, 9H), 4,83 (q, $J=5,7$ Гц, 1H), 4,31 (ddd, $J=12,0, 4,4, 2,9$ Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9, 5,8, 2,1$ Гц, 2H), 2,76 (t, $J=6,3$ Гц, 4H), 2,34 (dt, $J=30,7, 7,0$ Гц, 6H), 2,04 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,80-1,52 (m, 14H), 1,29 (dd, $J=19,3, 12,3$ Гц, 44H), 0,88 (td, $J=6,8, 3,7$ Гц, 9H).

Соединение 25: 2-((5-(((3-(диметиламино)пропокси)карбонил)окси)гептадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

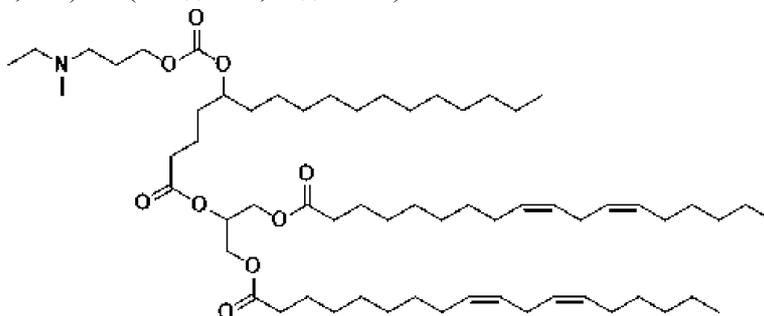


Соединение 25 было синтезировано с выходом 94% из промежуточного соединения 25с и 3-(диметиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,46-5,19 (m, 9H), 4,74-4,65 (m, 1H), 4,29 (ddd, $J=11,9, 4,4, 1,7$ Гц, 2H), 4,25-4,07 (m, 4H), 2,82-2,72 (m, 4H), 2,39-2,28 (m, 8H), 2,22 (s, 6H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,84 (dq, $J=8,2, 6,7$ Гц, 2H), 1,73-1,50 (m, 14H), 1,41-1,18 (m, 50H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,2$ Гц, 9H). MS: 1016,11 m/z [M+H].

Пример 26 - соединение 26.

Соединение 26: 2-((5-(((3-(этил(метил)амино)пропокси)карбонил)окси)гептадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



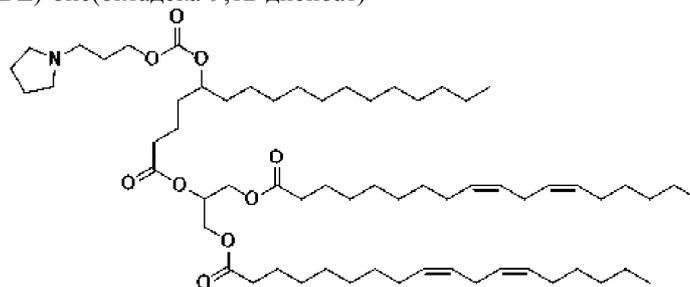
Соединение 26 было синтезировано с выходом 84% из промежуточного соединения 25с и 3-((метил)этиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,46-5,20 (m, 10H), 4,69 (dq, $J=7,5, 5,5$ Гц, 1H), 4,29 (ddd, $J=11,9, 4,4, 1,6$ Гц, 2H), 4,25-4,10 (m, 4H), 2,83-2,72 (m, 4H), 2,45-2,38 (m, 4H), 2,37-2,28 (m, 6H), 2,21 (s, 3H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,88-1,79 (m, 2H), 1,74-1,52 (m, 13H), 1,44-1,22 (m, 51H), 1,04 (t, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,1$ Гц, 9H). MS: 1030,1 m/z [M+H].

Пример 27 - соединение 27.

Соединение 27: 2-((5-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)гептадеканоил)окси)пропан-

1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

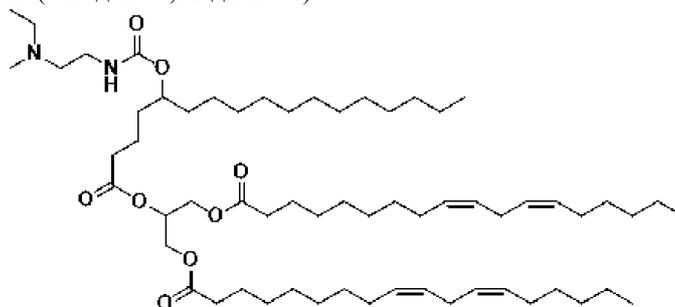


Соединение 27 было синтезировано с выходом 79% из промежуточного соединения 25с и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,21 (m, 10H), 4,69 (dt, $J=7,1, 5,3$ Гц, 1H), 4,29 (ddd, $J=11,9, 4,3, 1,6$ Гц, 2H), 4,25-4,10 (m, 4H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,52 (dd, $J=14,8, 7,1$ Гц, 6H), 2,33 (dt, $J=13,4, 7,2$ Гц, 6H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,89 (dq, $J=10,8, 6,8$ Гц, 2H), 1,82-1,74 (m, $J=3,8, 3,3$ Гц, 4H), 1,71-1,53 (m, 13H), 1,40-1,21 (m, 49H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,2$ Гц, 9H). MS: 1041,8 m/z [M+H].

Пример 28 - соединение 28.

Соединение 28: 2-((5-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)гептадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

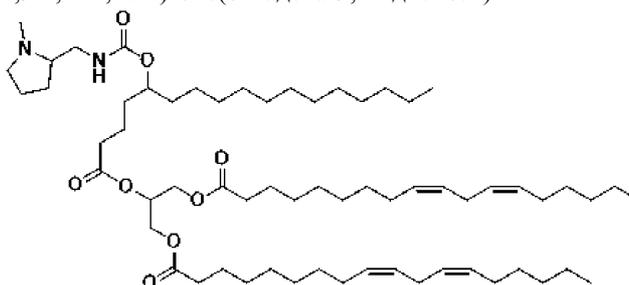


Соединение 28 было синтезировано с выходом 87% из промежуточного соединения 25с и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,21 (m, 10H), 5,12 (s, 1H), 4,80-4,65 (m, 1H), 4,29 (dt, $J=11,9, 4,5$ Гц, 2H), 4,19-4,09 (m, 2H), 3,24 (d, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,83-2,72 (m, 4H), 2,44 (dt, $J=14,6, 6,6$ Гц, 4H), 2,38-2,27 (m, 6H), 2,20 (s, 3H), 2,04 (dd, $J=7,8, 5,7$ Гц, 8H), 1,74-1,42 (m, 15H), 1,42-1,19 (m, 50H), 1,04 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,4$ Гц, 9H). MS: 1014,1 m/z [M+H].

Пример 29 - соединение 29.

Соединение 29: 2-((5-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)гептадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

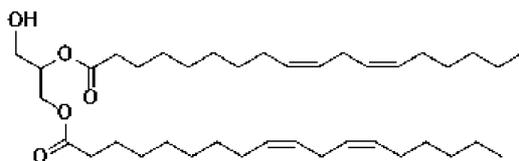


Соединение 29 было синтезировано с выходом 93% из промежуточного соединения 25с и (1-метилпирролидин-2-ил)метанамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,21 (m, 11H), 5,08 (d, $J=8,8$ Гц, 1H), 4,74 (s, 1H), 4,29 (dt, $J=11,9, 4,6$ Гц, 2H), 4,13 (ddd, $J=11,9, 5,8, 4,5$ Гц, 2H), 3,39 (q, $J=11,3, 10,6$ Гц, 1H), 3,08 (d, $J=25,9$ Гц, 2H), 2,82-2,73 (m, 4H), 2,39-2,18 (m, 12H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 9H), 1,91-1,82 (m, 1H), 1,62 (dddd, $J=27,4, 20,2, 13,2, 6,7$ Гц, 18H), 1,42-1,20 (m, 52H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,4$ Гц, 9H). MS: 1026,8 m/z [M+H].

Пример 30 - соединение 30.

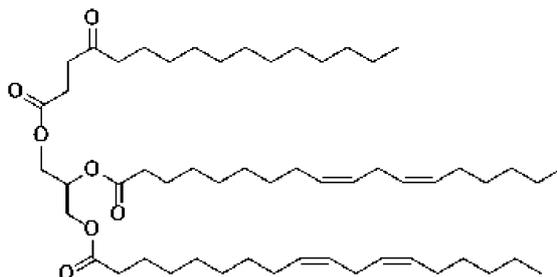
Промежуточное соединение 30а: 3-гидроксипропан-1,2-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору глицерина (1,59 г, 1,0 экв.) в DCM (0,1 М) добавляли линолеовую кислоту (2,05 экв.), DMAP (0,2 экв.), DIPEA (2,4 экв.), EDCI (2,4 экв.) и 1 мл DMF последовательно. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 65 часов. По завершении смесь гасили добавлением воды, и органический слой промывали 1 раз 1 М HCl и 1 раз 5% NaHCO₃. Затем органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) до продукта в виде бесцветного масла.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,28 (m, 8H), 5,13-5,04 (m, 1H), 4,32 (dd, J=11,9, 4,6 Гц, 1H), 4,23 (dd, J=11,9, 5,6 Гц, 1H), 3,73 (ddd, J=6,5, 5,0, 1,3 Гц, 2H), 2,82-2,73 (m, 4H), 2,33 (dt, J=8,8, 7,5 Гц, 4H), 2,03 (dq, J=13,1, 6,6 Гц, 9H), 1,69-1,57 (m, 4H), 1,44-1,23 (m, 29H), 0,96-0,83 (m, 6H).

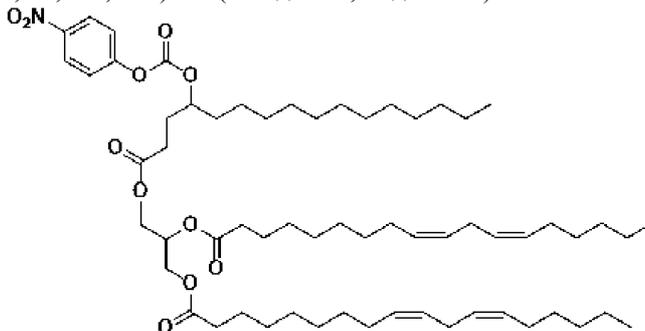
Промежуточное соединение 30b: 3-((4-оксогексадеканоил)окси)пропан-1,2-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 30b было синтезировано с выходом 66% из промежуточного соединения 30a и промежуточного соединения 1a с использованием метода, примененного в промежуточном соединении 1d.

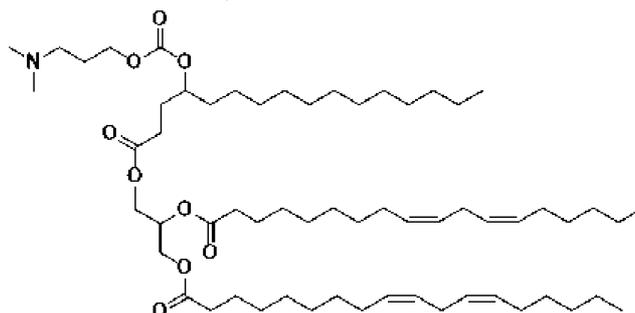
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,26 (m, 9H), 4,29 (ddd, J=11,8, 4,3, 2,1 Гц, 2H), 4,15 (ddd, J=11,9, 7,7, 6,0 Гц, 2H), 2,82-2,74 (m, 4H), 2,71 (td, J=6,3, 5,6, 2,4 Гц, 2H), 2,62-2,55 (m, 2H), 2,43 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,31 (td, J=7,6, 5,4 Гц, 4H), 2,05 (q, J=6,9 Гц, 8H), 1,66-1,54 (m, 8H), 1,41-1,19 (m, 47H), 0,88 (td, J=7,0, 4,4 Гц, 9H).

Промежуточное соединение 30c: 3-(((4-((4-нитрофенокси)карбонил)окси)гексадеканоил)-окси)пропан-1,2-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 30c было синтезировано с выходом 40% из промежуточного соединения 30b с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1e.

Соединение 30: 9-додецил-2-метил-7,12-диоксо-6,8,13-триокса-2-азагексадекан-15,16-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



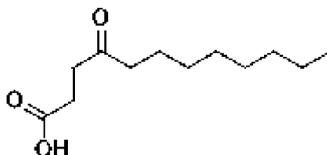
Соединение 30 было синтезировано с выходом 84% из промежуточного соединения 30c и 3-

((метил)этиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,20 (m, 8H), 4,76-4,67 (m, 1H), 4,29 (ddd, $J=11,9, 4,3, 1,7$ Гц, 2H), 4,22-4,11 (m, 4H), 2,77 (t, $J=6,7$ Гц, 4H), 2,45-2,28 (m, 8H), 2,22 (s, 6H), 2,05 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 2,00-1,79 (m, 4H), 1,69-1,51 (m, 6H), 1,40-1,17 (m, 48H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,8$ Гц, 8H). MS: 1002,2 m/z [M+H].

Пример 31 - соединение 31.

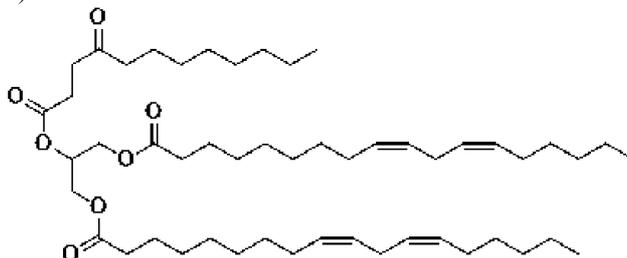
Промежуточное соединение 31a: 4-оксододекановая кислота



Промежуточное соединение 31a было синтезировано с выходом 9% из раствора янтарного ангидрида и октилмагнийбромида с использованием метода, применяемого в промежуточном соединении 1a.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,71 (t, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,62 (t, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,43 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,57 (p, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,26 (d, $J=3,6$ Гц, 10H), 0,87 (t, $J=6,7$ Гц, 3H).

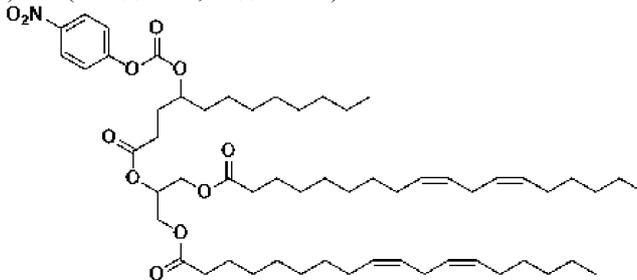
Промежуточное соединение 31b: 2-(((4-оксододеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 31b было синтезировано с выходом 38% из промежуточного соединения 31a и промежуточного соединения 1c с использованием метода, применяемого в промежуточном соединении 1d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,47-5,19 (m, 8H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,15 (dd, $J=11,9, 5,9$ Гц, 2H), 2,77 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,71 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,59 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,43 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,32 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,67-1,53 (m, 6H), 1,40-1,20 (m, 37H), 0,88 (td, $J=6,8, 5,0$ Гц, 9H).

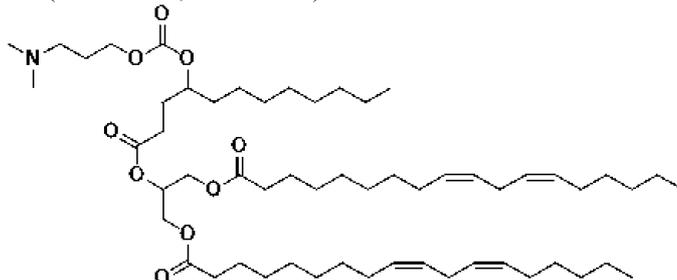
Промежуточное соединение 31c: 2-(((4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 31c было синтезировано с выходом 68% с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1e.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,26-8,16 (m, 2H), 7,40-7,30 (m, 2H), 5,39-5,05 (m, 9H), 4,80 (tdd, $J=7,5, 5,4, 4,0$ Гц, 1H), 4,49-4,04 (m, 4H), 2,77-2,63 (m, 4H), 2,45-2,18 (m, 6H), 2,08-1,85 (m, 10H), 1,74-1,46 (m, 6H), 1,41-1,11 (m, 40H), 0,81 (td, $J=6,9, 2,4$ Гц, 9H).

Соединение 31: 2-(((4-(((3-(диметиламино)пропокси)карбонил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



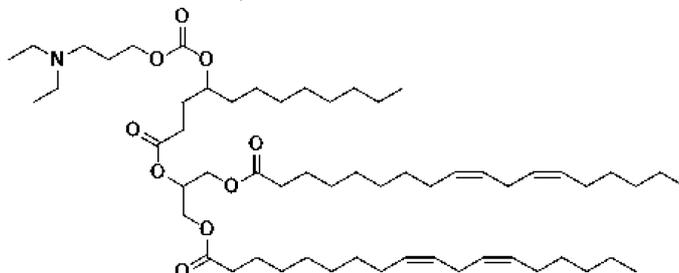
Соединение 31 было синтезировано с выходом 71% из промежуточного соединения 31c и 3-

(диметиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,22 (m, 9H), 4,72 (tdd, $J=7,4, 5,3, 4,0$ Гц, 1H), 4,34-4,26 (m, 2H), 4,23-4,10 (m, 4H), 2,82-2,72 (m, 4H), 2,45-2,36 (m, 4H), 2,31 (ddd, $J=8,0, 7,1, 1,2$ Гц, 4H), 2,25 (s, 6H), 2,05 (q, $J=6,6$ Гц, 8H), 1,99-1,91 (m, 1H), 1,91-1,82 (m, 3H), 1,67-1,53 (m, 6H), 1,40-1,21 (m, 41H), 0,94-0,82 (m, 9H). MS: 945,6 m/z [M+H].

Пример 32 - соединение 32.

Соединение 32: 2-((4-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

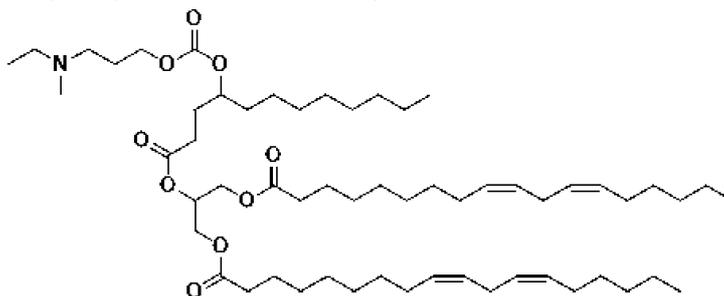


Соединение 32 было синтезировано с выходом 71% из промежуточного соединения 31с и 3-(диэтиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,28 (m, 9H), 5,25 (ddd, $J=5,8, 4,4, 1,5$ Гц, 1H), 4,72 (tdd, $J=7,6, 5,4, 4,0$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,25-4,08 (m, 5H), 2,77 (td, $J=6,1, 1,1$ Гц, 4H), 2,64-2,53 (m, 6H), 2,40 (dt, $J=8,7, 6,8$ Гц, 2H), 2,31 (ddd, $J=8,0, 7,2, 1,1$ Гц, 4H), 2,10-2,01 (m, 10H), 1,95 (dddd, $J=11,1, 9,2, 6,9, 3,5$ Гц, 1H), 1,91-1,81 (m, 3H), 1,69-1,49 (m, 7H), 1,39-1,20 (m, 42H), 1,05 (t, $J=7,2$ Гц, 6H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,9$ Гц, 9H). MS: 974,0 m/z [M+H].

Пример 33 - соединение 33.

Соединение 33: 2-((4-(((3-(этил(метил)амино)пропокси)карбонил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

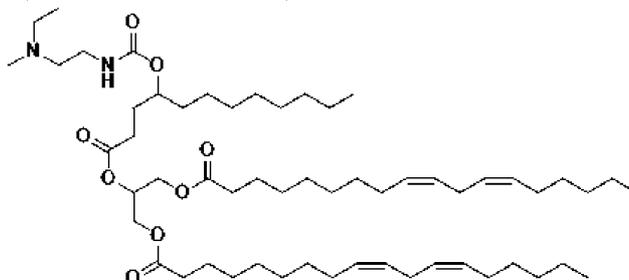


Соединение 33 было синтезировано с выходом 79% из промежуточного соединения 31с и 3-((метил)этиламино)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,21 (m, 10H), 4,72 (tdd, $J=9,5, 6,7, 4,1$ Гц, 1H), 4,38-4,25 (m, 2H), 4,25-4,10 (m, 4H), 2,77 (td, $J=6,2, 1,1$ Гц, 4H), 2,51-2,38 (m, 6H), 2,37-2,27 (m, 5H), 2,24 (d, $J=2,4$ Гц, 3H), 2,05 (q, $J=7,1$ Гц, 8H), 1,97-1,83 (m, 4H), 1,70-1,50 (m, 7H), 1,39-1,21 (m, 41H), 1,06 (t, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,94-0,84 (m, 9H). 960,1 m/z [M+H].

Пример 34 - соединение 34.

Соединение 34: 2-((4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



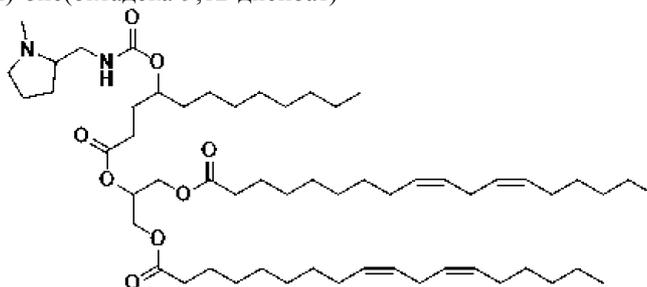
Соединение 34 было синтезировано с выходом 59% из промежуточного соединения 31с и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,13 (m, 10H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,4, 1,4$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 3,3$ Гц, 2H), 3,25 (q, $J=5,7$ Гц, 2H), 2,83-2,73 (m, 4H), 2,53-2,35 (m, 6H), 2,35-2,27 (m, 4H), 2,21 (d, $J=3,3$ Гц, 3H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,96-1,74 (m, 3H), 1,66-1,43 (m, 7H), 1,41-1,21 (m, 41H), 1,05

(t, J=7,1 Гц, 3H), 0,88 (td, J=6,9, 5,6 Гц, 9H). 944,7 m/z [M+H].

Пример 35 - соединение 35.

Соединение 35: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

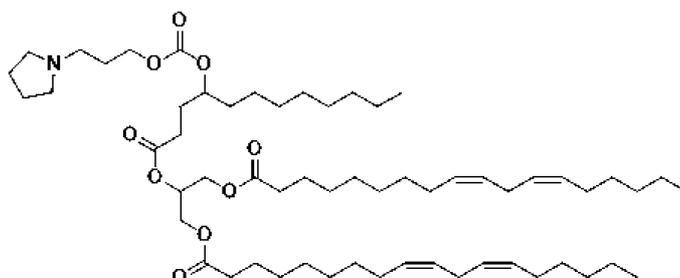


Соединение 35 было синтезировано с выходом 71% из промежуточного соединения 31с и (1-метилпирролидин-2-ил)метанамина с использованием метода, применяемого в примере 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,21 (m, 10H), 4,86-4,66 (m, 1H), 4,28 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,14 (ddd, J=11,9, 5,8, 3,1 Гц, 2H), 3,48-3,35 (m, 1H), 3,22-3,00 (m, 2H), 2,83-2,71 (m, 4H), 2,47-2,19 (m, 12H), 2,04 (q, J=6,9 Гц, 8H), 1,96-1,67 (m, 6H), 1,67-1,42 (m, 8H), 1,41-1,19 (m, 41H), 0,95-0,84 (m, 9H). 956,5 m/z [M+H].

Пример 36 - соединение 36.

Соединение 36: 2-((4-(((3-пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

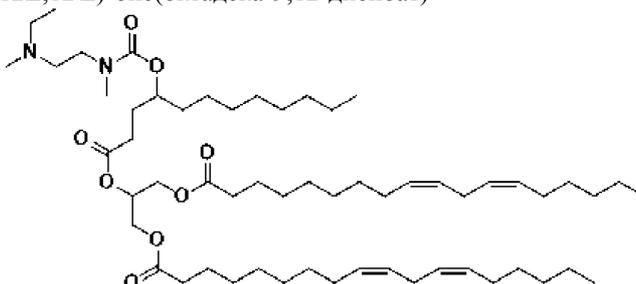


Соединение 36 было синтезировано с выходом 34% из промежуточного соединения 31с и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого в примере 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,22 (m, 9H), 4,72 (tdd, J=7,4, 5,4, 4,0 Гц, 1H), 4,29 (dd, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,25-4,08 (m, 4H), 2,82-2,72 (m, 4H), 2,67 (t, J=7,6 Гц, 5H), 2,47-2,27 (m, 6H), 2,09-1,91 (m, 11H), 1,91-1,80 (m, 4H), 1,68-1,47 (m, 7H), 1,47-1,19 (m, 42H), 0,88 (td, J=7,0, 4,8 Гц, 9H). 971,3 m/z [M+H].

Пример 37 - соединение 37.

Соединение 37: 2-((4-(((2-(этил(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

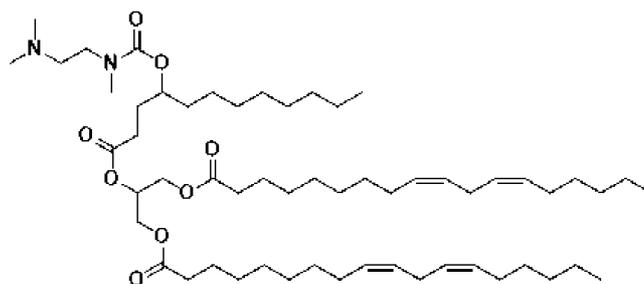


Соединение 37 было синтезировано с выходом 67% из промежуточного соединения 31с и N1,N2-диметилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого в примере 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,18 (m, 8H), 4,78 (s, 1H), 4,28 (dt, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,14 (dd, J=11,9, 5,8 Гц, 2H), 3,44-3,24 (m, 2H), 2,91 (d, J=8,1 Гц, 3H), 2,81-2,71 (m, 4H), 2,60-2,21 (m, 12H), 2,05 (q, J=6,9 Гц, 7H), 1,98-1,46 (m, 14H), 1,43-1,19 (m, 37H), 1,14-1,00 (m, 3H), 0,88 (td, J=7,0, 5,3 Гц, 8H). 958,6 m/z [M+H].

Пример 38 - соединение 38.

Соединение 38: 2-((4-(((2-(диметиламино)этил)(метил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

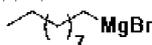


Соединение 38 было синтезировано с выходом 83% из промежуточного соединения 31с и N1,N1,N2-триметилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого в примере 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,19 (m, 8H), 4,78 (s, 1H), 4,28 (dt, $J=11,9, 4,1$ Гц, 2H), 4,14 (dd, $J=11,9, 5,8$ Гц, 2H), 3,37 (d, $J=23,8$ Гц, 2H), 2,91 (d, $J=6,8$ Гц, 3H), 2,82-2,72 (m, 4H), 2,54-2,21 (m, 13H), 2,04 (q, $J=6,7$ Гц, 7H), 1,95-1,44 (m, 14H), 1,42-1,21 (m, 37H), 0,88 (td, $J=7,0, 5,3$ Гц, 8H). 944,5 m/z [M+H].

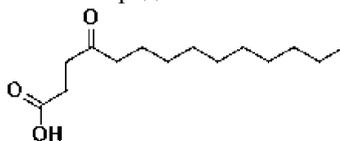
Пример 39 - соединение 39.

Промежуточное соединение 39а: бромид децилмагни



К раствору Mg (10,99 г, 2 эквив.) и I_2 (0,0001 экв.) в THF (250 мл) по каплям добавляли 1-бромодекан (1,0 экв.) при 80°C в течение 2 ч. После добавления смесь перемешивали при этой температуре в течение 2 ч. Неочищенный продукт децилмагнибромид получали в виде раствора черно-коричневого цвета, который немедленно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

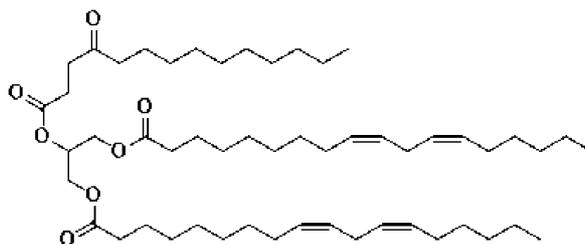
Промежуточное соединение 39b: 4-оксотетрадекановая кислота



Раствор янтарного ангидрида (45 г, 1,0 экв.) в THF (1,1 М) охлаждали до -78°C с последующим добавлением промежуточного соединения 39а. Реакционную смесь выдерживали при -78°C в течение 2 ч перед перемешиванием при 15°C в течение 16 ч. Затем реакцию гасили добавлением нас. NH_4Cl , разбавляли H_2O и экстрагировали EtOAc . Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Очистка колоночной хроматографией дала продукт в виде белого твердого вещества. (7,8 г, 7%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,74 (dd, $J=6,9, 5,2$ Гц, 2H), 2,70-2,63 (m, 2H), 2,46 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,67-1,54 (m, 2H), 1,29 (d, $J=5,2$ Гц, 14H), 0,90 (t, $J=6,8$ Гц, 3H).

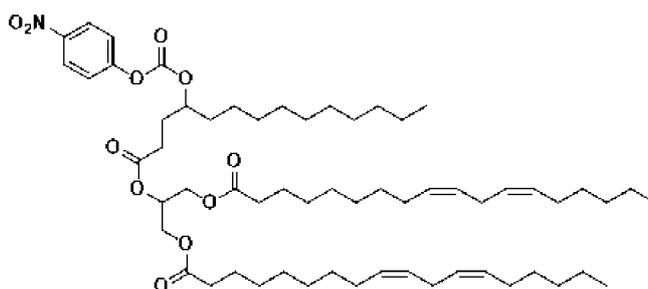
Промежуточное соединение 39с: 2-((4-оксотетрадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 39с было получено из промежуточных соединений 39b и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,18 (m, 9H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,14 (dd, $J=11,9, 5,9$ Гц, 2H), 2,74 (dt, $J=22,1, 6,8$ Гц, 6H), 2,66-2,56 (m, 2H), 2,43 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,59 (tq, $J=14,2, 7,5$ Гц, 7H), 1,41-1,18 (m, 44H), 0,88 (td, $J=6,9, 4,6$ Гц, 9H).

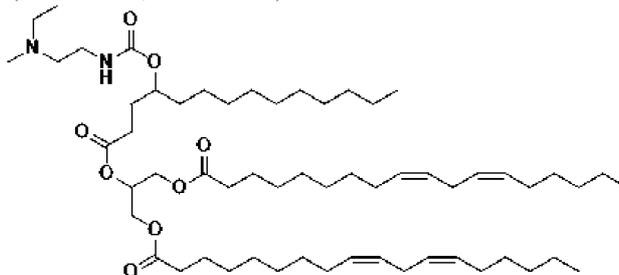
Промежуточное соединение 39d: 2-(((4-((4-нитрофенокси)карбонил)окси)тетрадеcanoил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 39с в MeOH (0,13 М) медленно добавляли NaBH_4 (2,5 экв.) при 5°C. Смесь перемешивали при этой температуре 2 ч. Реакционную смесь гасили добавлением H_2O , а затем дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии, чтобы получить бесцветное масло, которое немедленно восстанавливали в DCM (1 М) с последующим добавлением 4-нитрофенилхлороформата (1,5 эквив.) и пиридина (2 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч, после чего реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением промежуточного соединения 39d с выходом 31%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,33-8,22 (m, 2H), 7,46-7,33 (m, 2H), 5,43-5,23 (m, 9H), 4,31 (dd, $J=12,0$, 4,3 Гц, 2H), 4,15 (dd, $J=12,0$, 5,8 Гц, 2H), 2,76 (t, $J=6,3$ Гц, 4H), 2,47 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,30 (td, $J=7,6$, 4,2 Гц, 4H), 2,04 (q, $J=7,3$ Гц, 10H), 1,67 (dt, $J=47,7$, 6,1 Гц, 7H), 1,30 (tq, $J=14,3$, 4,9, 3,0 Гц, 53H), 0,88 (td, $J=6,8$, 3,5 Гц, 10H).

Соединение 39: 2-((4-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)тетрадеcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

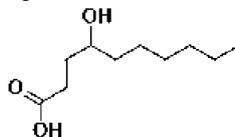


Соединение 39 было синтезировано с выходом 78% из промежуточного соединения 39d и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,49-5,17 (m, 9H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9$, 4,4 Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9$, 5,9, 3,3 Гц, 2H), 3,26 (q, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,77 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,52-2,27 (m, 10H), 2,23 (s, 3H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,95-1,42 (m, 14H), 1,42-1,18 (m, 40H), 1,05 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=6,8$, 4,5 Гц, 7H). 972,9 m/z [M+H].

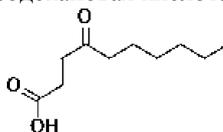
Пример 40 - соединение 40.

Промежуточное соединение 40a: 4-гидроксидекановая кислота



К раствору 5-гексилтетрагидрофуран-2-она (15 г, 1,0 экв.) в EtOH (240 мл) и H_2O (80 мл) добавляли NaOH (2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Смесь концентрировали для удаления EtOH. Затем доводили pH до 5 водн. 1 н. HCl и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенную органическую фазу промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде белого твердого вещества (48%).

Промежуточное соединение 40b: 4-оксидекановая кислота

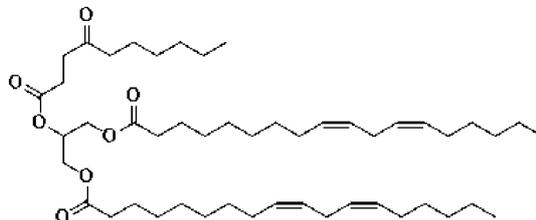


К раствору NaH_2PO_4 (17 экв.) и Na_2HPO_4 (2,4 экв.) в H_2O (1000 мл) добавляли промежуточное соединение 40a (10 г, 1,0 экв.). Затем к раствору добавляли NaClO (200 мл, 6-8% Cl). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Затем к смеси добавляли H_3PO_4 (200 мл, 85%) и силикагель (300

г). Смесь сушили при пониженном давлении и промывали 3 раза EtOAc. Органический слой концентрировали при пониженном давлении, получая сырой продукт. Неочищенный продукт очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде белого твердого вещества (80%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,70 (dd, $J=7,0, 5,3$ Гц, 2H), 2,63-2,58 (m, 2H), 2,43 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,58 (q, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,33-1,19 (m, 6H), 0,90-0,83 (m, 3H).

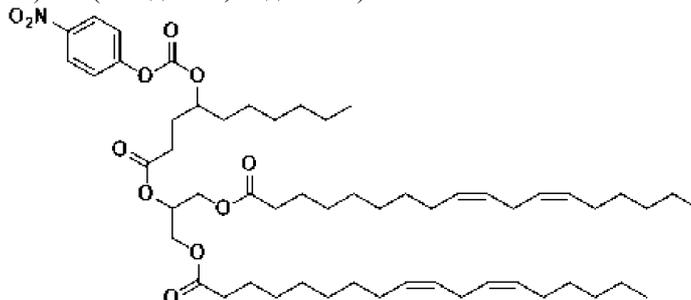
Промежуточное соединение 40с: 2-((4-оксодеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 40с было синтезировано с выходом 40% из промежуточного соединения 40b и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,28 (m, 8H), 5,24 (tt, $J=5,9, 4,3$ Гц, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,14 (dd, $J=11,9, 5,9$ Гц, 2H), 2,73 (dt, $J=22,4, 6,7$ Гц, 7H), 2,58 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,43 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,59 (q, $J=6,7$ Гц, 7H), 1,40-1,22 (m, 35H), 0,88 (td, $J=6,8, 4,0$ Гц, 9H).

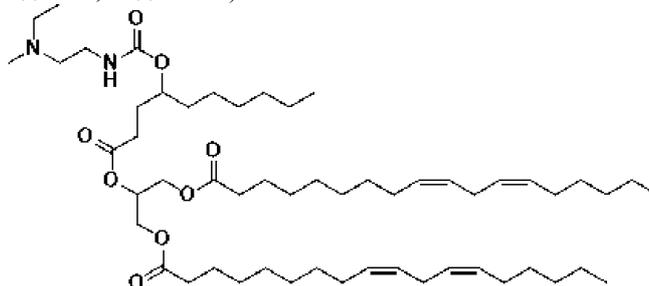
Промежуточное соединение 40d: 2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 40d было синтезировано с выходом 31% из промежуточного соединения 40с с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1е.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,37-8,27 (m, 2H), 7,43 (dd, $J=9,1, 5,9$ Гц, 2H), 5,45-5,24 (m, 9H), 4,34 (dd, $J=12,0, 4,3$ Гц, 2H), 4,18 (dd, $J=11,9, 6,0$ Гц, 2H), 2,79 (t, $J=6,3$ Гц, 4H), 2,49 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,41-2,30 (m, 4H), 2,07 (q, $J=6,9$ Гц, 9H), 1,83-1,58 (m, 7H), 1,48-1,12 (m, 37H), 1,00-0,82 (m, 9H).

Соединение 40: 2-(((4-((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

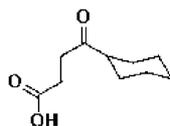


Соединение 40 было синтезировано с выходом 53% из промежуточного соединения 40d и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,19 (m, 9H), 4,76 (s, 1H), 4,32-4,22 (m, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,9, 3,4$ Гц, 2H), 3,26 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,5$ Гц, 4H), 2,57-2,36 (m, 6H), 2,36-2,27 (m, 4H), 2,23 (s, 3H), 2,05 (q, $J=6,6$ Гц, 8H), 1,98-1,42 (m, 15H), 1,41-1,19 (m, 35H), 1,06 (t, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=9,7, 8,2, 4,2$ Гц, 9H). MS: 916,7 m/z [M+H].

Пример 41 - соединение 41.

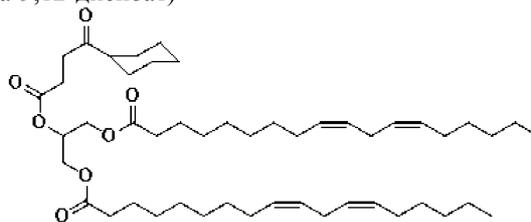
Промежуточное соединение 41а: 4-циклогексил-4-оксобутановая кислота



К раствору янтарного ангидрида (30 г, 1,0 экв.) в Et₂O (300 мл) добавляли CuI (0,1 экв.). Смесь охлаждали до -20°C. Затем к смеси добавляли циклогексилмагнийбромид (1,0 экв.). Реакционную смесь нагревали до 25°C и перемешивали в течение 14 ч. Реакцию гасили добавлением 1 М водн. HCl и перемешивали 15 мин. Затем реакционную смесь фильтровали, и фильтрат экстрагировали 3 раза DCM. Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бледно-розового твердого вещества (13%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,09 (s, 1H), 2,66 (dt, J=55,4, 6,5 Гц, 4H), 2,35 (td, J=10,8, 9,3, 5,2 Гц, 1H), 1,75 (ddd, J=43,2, 36,6, 11,9 Гц, 5H), 1,46-1,09 (m, 5H).

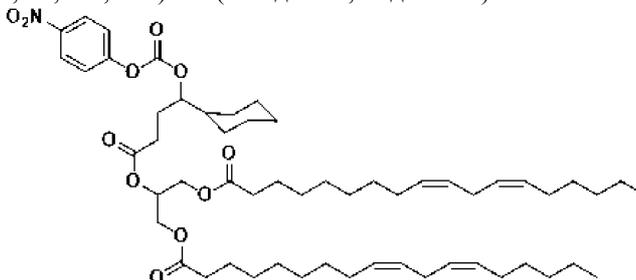
Промежуточное соединение 41b: 2-((4-циклогексил-4-оксобутаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 41b было синтезировано с выходом 34% из промежуточного соединения 41a и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,42-5,28 (m, 8H), 5,24 (ddd, J=10,2, 5,6, 4,2 Гц, 1H), 4,28 (dt, J=11,9, 4,6 Гц, 2H), 4,14 (ddd, J=11,9, 5,8, 2,3 Гц, 2H), 2,81-2,70 (m, 6H), 2,64-2,54 (m, 3H), 2,38-2,27 (m, 5H), 2,04 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,89-1,55 (m, 11H), 1,40-1,20 (m, 34H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 6H).

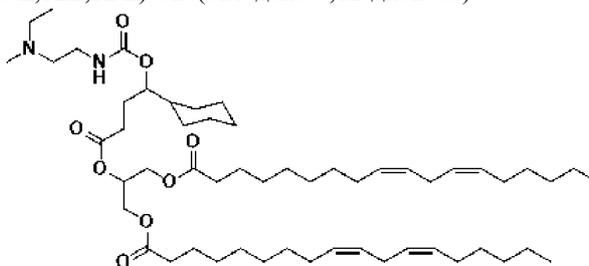
Промежуточное соединение 41с: 2-(((4-циклогексил-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)бутаноил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 41с было синтезировано с выходом 14% из промежуточного соединения 41b с использованием метода, применяемого для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,33-8,21 (m, 2H), 7,45-7,34 (m, 2H), 5,44-5,13 (m, 9H), 4,70 (ddd, J=9,3, 6,1, 3,4 Гц, 1H), 4,50 (dd, J=12,3, 3,9 Гц, 1H), 4,35-4,10 (m, 4H), 2,76 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,50-2,40 (m, 2H), 2,38-2,22 (m, 4H), 2,04 (q, J=6,9 Гц, 10H), 1,85-1,52 (m, 10H), 1,49-1,00 (m, 31H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 6H).

Соединение 41: 2-(((4-циклогексил-4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)бутаноил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

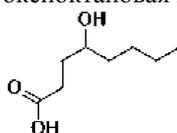


Соединение 41 синтезировали с выходом 60% из промежуточного соединения 41d и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 1е.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,45-5,09 (m, 9H), 4,60 (s, 1H), 4,28 (ddd, J=11,9, 4,5, 1,6 Гц, 2H), 4,15 (ddd, J=11,9, 5,8, 2,9 Гц, 2H), 3,25 (s, 2H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,54-2,15 (m, 12H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,99-0,95 (m, 50H), 0,93-0,80 (m, 6H). MS: 914,5 m/z [M+H].

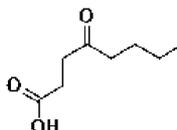
Пример 42 - соединение 42.

Промежуточное соединение 42а: 4-гидроксиоктановая кислота



Промежуточное соединение 42а было синтезировано с выходом 53% из 5-бутилтетрагидрофуран-2-она, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 39b.

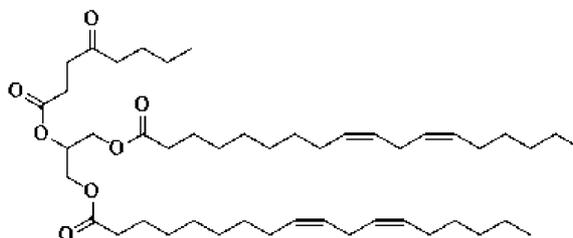
Промежуточное соединение 42b: 4-оксооктановая кислота



Промежуточное соединение 42b было синтезировано с выходом 61% из промежуточного соединения 42а, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 38b.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,65 (ddd, $J=7,0, 5,8, 1,1$ Гц, 2H), 2,56 (ddd, $J=7,1, 6,0, 1,2$ Гц, 2H), 2,38 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,56-1,44 (m, 2H), 1,30-1,17 (m, 2H), 0,84 (t, $J=7,3$ Гц, 3H).

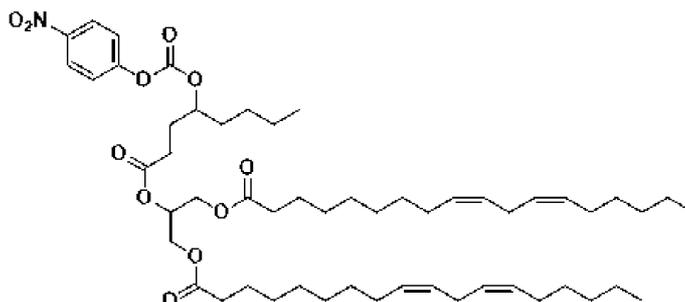
Промежуточное соединение 42с: 2-((4-оксооктаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 42с было синтезировано с выходом 29% из промежуточного соединения 42b и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,35 (tq, $J=18,2, 9,4, 7,6$ Гц, 8H), 5,24 (t, $J=5,3$ Гц, 1H), 4,28 (dd, $J=12,0, 3,9$ Гц, 2H), 4,14 (dd, $J=12,1, 5,8$ Гц, 2H), 2,74 (dt, $J=20,9, 6,7$ Гц, 6H), 2,59 (d, $J=6,6$ Гц, 2H), 2,43 (t, $J=7,6$ Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,7$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=7,0$ Гц, 8H), 1,60 (t, $J=7,5$ Гц, 8H), 1,31 (d, $J=14,1$ Гц, 29H), 0,88 (t, $J=6,9$ Гц, 9H).

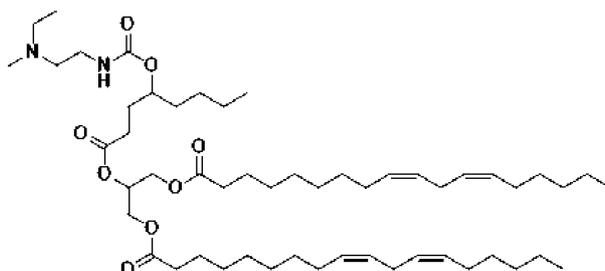
Промежуточное соединение 42d: 2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 42d было синтезировано с выходом 51% из промежуточного соединения 40с, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 1е.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,28 (dd, $J=7,8, 4,7$ Гц, 2H), 7,47-7,36 (m, 2H), 5,32 (dp, $J=19,8, 9,2$ Гц, 8H), 5,17 (s, 1H), 4,87 (d, $J=7,3$ Гц, 1H), 4,49 (d, $J=12,2$ Гц, 1H), 4,36-4,09 (m, 4H), 2,75 (d, $J=6,7$ Гц, 4H), 2,49 (dt, $J=23,8, 7,9$ Гц, 2H), 2,42-2,14 (m, 5H), 2,03 (q, $J=7,2$ Гц, 10H), 1,73 (s, 1H), 1,61 (dd, $J=23,8, 11,9$ Гц, 6H), 1,31 (d, $J=14,4$ Гц, 30H), 0,89 (tt, $J=9,5, 7,0, 2,7$ Гц, 9H).

Соединение 42: 2-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

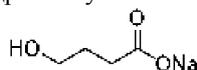


Соединение 42 было синтезировано с выходом 93% из промежуточного соединения 42d и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,10 (m, 11H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, J=11,9, 4,5, 1,3 Гц, 2H), 4,15 (ddd, J=11,8, 5,8, 3,3 Гц, 2H), 3,25 (s, 2H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,39 (ddd, J=8,7, 6,6, 4,3 Гц, 6H), 2,35-2,28 (m, 4H), 2,22 (s, 3H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,96-1,74 (m, 3H), 1,61 (s, 11H), 1,42-1,22 (m, 34H), 1,10-0,99 (m, 3H), 0,95-0,83 (m, 9H).

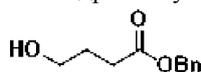
Пример 43 - соединение 43.

Промежуточное соединение 43a: 4-гидроксипуаноат натрия



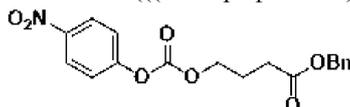
К смеси тетрагидрофуран-2-она (10 г, 1,0 экв.) в H₂O (100 мл) добавляли NaOH (4,0 экв.), смесь дегазировали и продували 3 раза N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 24 ч в атмосфере N₂. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (12 г, неочищенное).

Промежуточное соединение 43b: бензил-4-гидроксипуаноат



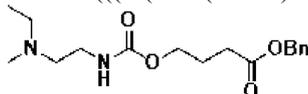
К смеси промежуточного соединения 43a (12 г, 1,0 эквив.) в ацетоне (100 мл) добавляли ТВАВ (0,05 эквив.) и бензилбромид (1,2 эквив.), смесь дегазировали и продували 3 раза N₂. Смесь перемешивали при 60°C в течение 12 ч в атмосфере N₂. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, и полученный остаток разбавляли EtOAc и промывали 1 раз каждый раз 1 н. NaH₂O₄, NaHCO₃ и H₂O. Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, а неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (43%).

Промежуточное соединение 43с: бензил-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)пуаноат



К смеси промежуточного соединения 43b (5 г, 1,0 эквив.) в DCM (150 мл) добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (1,0 эквив.), смесь дегазировали и продували 3 раза N₂. Реакционную смесь охлаждали до 0°C с последующим добавлением пиридина (2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, разбавляли гексаном и фильтровали. Фильтрат промывали 10 раз H₂O, и объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (32%).

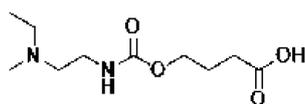
Промежуточное соединение 43d: бензил-4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)пуаноат



К смеси промежуточного соединения 43с (3 г, 1,0 эквив.) в MeCN (50 мл) добавляли N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамин (2,5 эквив.), пиридин (3,0 эквив.) и DMAP (1,0 эквив.). Смесь дегазировали и продували 3 раза N₂, и смесь перемешивали при 70°C в течение 12 ч в атмосфере N₂. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (56%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,33-7,23 (m, 4H), 5,24 (d, J=12,8 Гц, 1H), 5,05 (s, 2H), 4,04 (dt, J=12,9, 6,7 Гц, 2H), 3,19 (q, J=5,8 Гц, 2H), 3,00 (s, 1H), 2,39 (dt, J=10,4, 6,6 Гц, 6H), 2,13 (s, 3H), 1,89 (p, J=6,9 Гц, 2H), 0,98 (t, J=7,1 Гц, 3H).

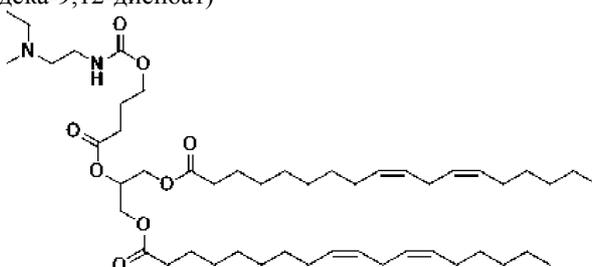
Промежуточное соединение 43e: 4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)бутановая кислота



В смесь Промежуточного соединения 43d (1,5 г, 1,0 эквив.) в MeOH (30 мл) добавляли Pd/C (10% масс, 0,05 экв.), смесь дегазировали и продували 3 раза H₂. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч в атмосфере H₂, после чего фильтрат концентрировали с получением неочищенного остатка, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 4,11 (t, J=6,3 Гц, 2H), 3,49 (t, J=6,0 Гц, 2H), 3,29-3,21 (m, 5H), 2,89 (s, 3H), 2,38 (t, J=7,2 Гц, 2H), 1,92 (p, J=6,7 Гц, 2H), 1,34 (t, J=7,3 Гц, 3H).

Соединение 43: 2-((4-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)бутаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

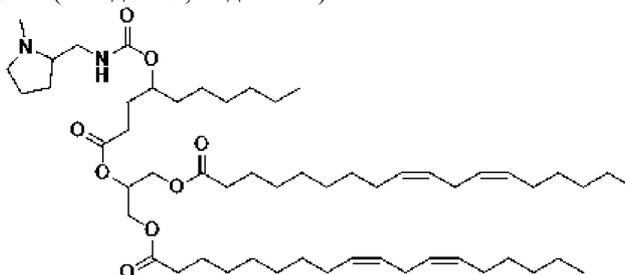


Соединение 43 было синтезировано с выходом 45% из промежуточного соединения 43 d и промежуточного соединения 1c, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 1d.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,22 (m, 9H), 4,29 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,18-4,06 (m, 4H), 3,25 (q, J=5,8 Гц, 2H), 2,76 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,43 (dt, J=10,5, 7,3 Гц, 6H), 2,31 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,20 (s, 3H), 2,04 (q, J=6,9 Гц, 8H), 1,95 (q, J=6,9 Гц, 2H), 1,59 (d, J=7,1 Гц, 7H), 1,40-1,22 (m, 26H), 1,04 (t, J=7,1 Гц, 3H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 6H).

Пример 44 - соединение 44.

Соединение 44: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

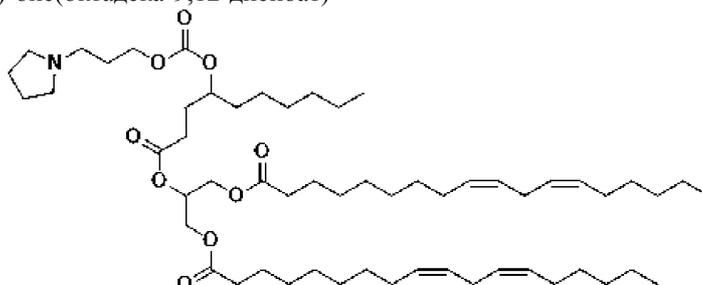


Соединение 44 было синтезировано с выходом 35% из промежуточного соединения 40d и (1-метилпирролидин-2-ил)метанамина, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 1e.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,20 (m, 9H), 5,16 (s, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,15 (ddd, J=11,9, 5,8, 3,0 Гц, 2H), 3,39 (s, 1H), 3,10 (d, J=27,2 Гц, 2H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,43-2,18 (m, 11H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,96-1,42 (m, 17H), 1,30 (dq, J=12,8, 8,8, 5,4 Гц, 36H), 0,92-0,83 (m, 9H). MS: 928,9 m/z [M+H].

Пример 45 - соединение 45.

Соединение 45: 2-((4-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



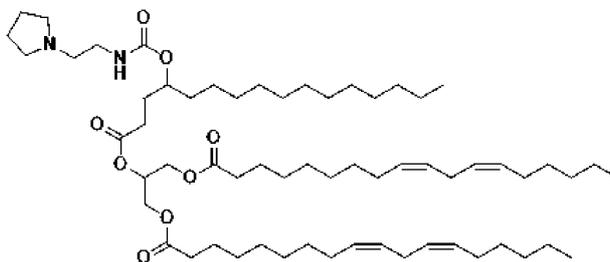
Соединение 45 было синтезировано с выходом 52% из промежуточного соединения 40d и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,21 (m, 9H), 4,72 (ddd, J=11,3, 8,8, 5,7 Гц, 1H), 4,29 (dd, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,25-4,10 (m, 4H), 2,81-2,74 (m, 4H), 2,59 (s, 5H), 2,40 (dt, J=8,6, 6,4 Гц, 2H), 2,36-2,27 (m, 4H),

2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,98-1,78 (m, 9H), 1,67-1,51 (m, 7H), 1,41-1,21 (m, 36H), 0,88 (td, J=7,0, 5,0 Гц, 9H). MS: 943,8 m/z [M+H].

Пример 46 - соединение 46.

Соединение 46: 2-(((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

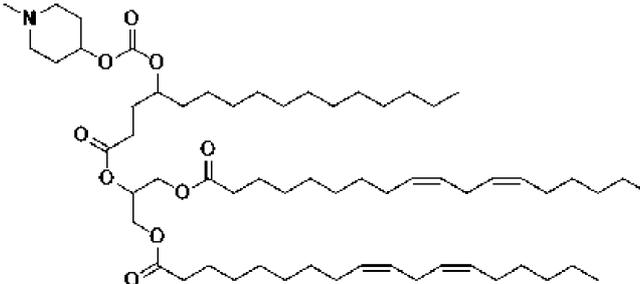


Соединение 46 было синтезировано с выходом 53% из промежуточного соединения 1e и 2- (пирролидин-1-ил)этан-1-амина с использованием метода, применяемого для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,55 (s, 1H), 5,46-5,21 (m, 9H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,15 (ddd, J=11,9, 5,8, 3,6 Гц, 2H), 3,35 (d, J=6,0 Гц, 2H), 2,81-2,60 (m, 9H), 2,39 (ddd, J=8,6, 6,7, 3,8 Гц, 2H), 2,31 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,84 (s, 7H), 1,66-1,19 (m, 55H), 0,88 (td, J=7,0, 4,3 Гц, 9H). MS: 1012,5 m/z [M+H].

Пример 47 - соединение 47.

Соединение 47: 2-(((4-(((1-метилпиперидин-4-ил)окси)карбонил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

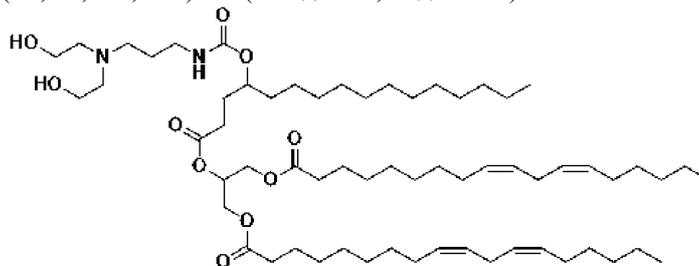


К раствору промежуточного соединения 1e (250 мг, 1,0 экв.) в MeCN (0,1 М) добавляли пиридин (3,0 экв.), 1-метилпиперидин-4-ол (1,5 экв.) и DMAP (1,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Добавляли дополнительную порцию 1-метилпиперидин-4-ола (3,0 экв.), и смесь нагревали до 50°C. Через 2 ч добавляли дополнительную порцию DMAP (1,0 экв.) и реакцию поддерживали еще 2 ч. По завершении к реакционной смеси добавляли гептан (0,1 М) и слой гептана промывали 3 раза MeCN. Объединенные слои MeCN трижды экстрагировали гептаном, а объединенные слои гептана промывали один последний раз MeCN. Затем гептан удаляли в вакууме и неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (MeOH/DCM) с получением продукта в виде бесцветного масла (62 мг, 32%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,20 (m, 9H), 4,77-4,60 (m, 2H), 4,29 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,14 (ddd, J=11,9, 5,8, 3,6 Гц, 2H), 2,83-2,66 (m, 6H), 2,46-2,26 (m, 11H), 2,08-1,71 (m, 18H), 1,71-1,47 (m, 8H), 1,40-1,21 (m, 47H), 0,88 (td, J=7,0, 4,2 Гц, 9H). MS: 1013,7 m/z [M+H].

Пример 48 - соединение 48.

Соединение 48: 2-(((4-(((3-(бис(2-гидроксиэтил)амино)пропил)карбамоил)окси)гексадеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



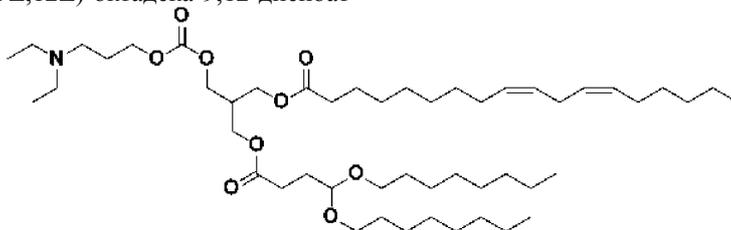
К раствору промежуточного соединения 1e (250 мг, 1,0 эквив.) в MeCN (0,1 М) добавляли пиридин (3,0 эквив.) и 2 - [(3-аминопропил)(2-гидроксиэтил)амино]этан-1-ол (1,5 эквив.). Реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре. По завершении к реакционной смеси добавляли гептан (0,1 М) и слой гептана промывали 3 раза MeCN. Объединенные слои MeCN трижды экстрагировали гептаном, а объединенные слои гептана промывали один последний раз MeCN. Затем гептан удаляли в вакууме

ме и неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (MeOH/DCM) с получением продукта в виде бесцветного масла (97 мг, 48%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,20 (m, 9H), 4,76 (s, 1H), 4,29 (ddd, $J=11,9, 4,6, 1,8$ Гц, 2H), 4,16 (dd, $J=11,9, 5,8$ Гц, 2H), 3,72 (t, $J=5,0$ Гц, 4H), 3,35-3,22 (m, 2H), 2,98-2,46 (m, 14H), 2,41-2,28 (m, 6H), 2,09-1,86 (m, 9H), 1,80 (dd, $J=14,2, 7,2$ Гц, 3H), 1,67-1,42 (m, 7H), 1,42-1,18 (m, 46H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,3$ Гц, 9H). MS: 1060,6 m/z [M+H].

Пример 49 - сравнительное соединение 49.

Соединение 49: 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропоксикарбонил)окси)метил)пропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат

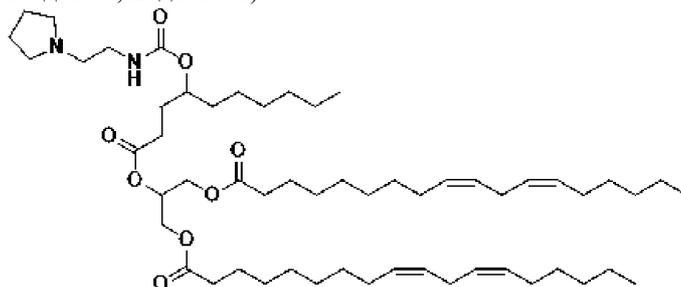


Соединение 49 синтезировали в соответствии со способами, описанными в WO 2015/095340 A1 (пример 13).

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 5,35 (m, 4H), 4,48 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 4,17 (m, 8H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,77 (t, $J=6,6$ Гц, 2H), 2,55 (q, $J=7,2$ Гц, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (t, $J=7,6$ Гц, 2H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,30 (m, 34H), 1,03 (t, $J=7,2$ Гц, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 853 m/z [M+H].

Пример 50 - соединение 50.

Соединение 50: 2-(((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

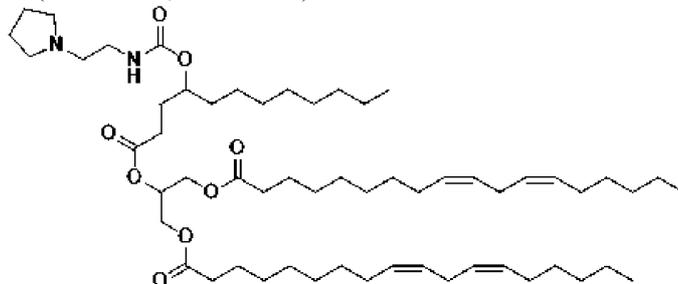


Соединение 50 было синтезировано с выходом 36% из промежуточного соединения 40d и 2-(пирролидин-1-ил)этан-1-амин с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,49-5,29 (m, 8H), 5,27-5,20 (m, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 3,8$ Гц, 2H), 3,35 (s, 2H), 2,83-2,44 (m, 10H), 2,39 (ddd, $J=8,4, 6,7, 3,3$ Гц, 2H), 2,36-2,25 (m, 4H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,98-1,43 (m, 15H), 1,42-1,20 (m, 33H), 0,89 (td, $J=6,1, 5,4, 0,9$ Гц, 9H). MS: 928,6 m/z [M+H].

Пример 51 - соединение 51.

Соединение 51: 2-(((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

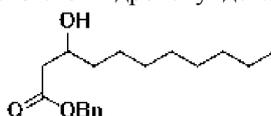


Соединение 51 было синтезировано с выходом 27% из промежуточного соединения 31c и 2-(пирролидин-1-ил)этан-1-амин с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,55 (s, 1H), 5,44-5,28 (m, 8H), 5,28-5,22 (m, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 3,9$ Гц, 2H), 3,37 (s, 2H), 2,83-2,51 (m, 10H), 2,39 (ddd, $J=8,4, 6,8, 3,1$ Гц, 2H), 2,35-2,27 (m, 4H), 2,05 (q, $J=6,7$ Гц, 8H), 1,97-1,41 (m, 17H), 1,41-1,20 (m, 40H), 0,94-0,84 (m, 9H). MS: 957,0 m/z [M+H].

Пример 52 - соединение 52.

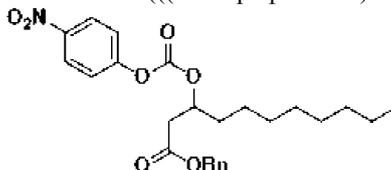
Промежуточное соединение 52a: бензил-3-гидроксиундеканоат



К раствору THF (150 мл) при 66°C в атмосфере N₂ по каплям добавляли Zn (22,99 г, 1,0 эквив.) и нонаналь (25 г, 1,0 эквив.). Затем к реакционной смеси медленно и осторожно по каплям добавляли бензил-2-бромацетат (50,00 г, 1,24 экв.). После полного добавления бензил-2-бромацетата смесь охлаждали и перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления ТГФ, и полученный остаток разбавляли водой и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (25 г, 49%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,33-7,24 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 3,95 (tt, J=7,7, 3,8 Гц, 1H), 2,75 (d, J=3,9 Гц, 1H), 2,56-2,35 (m, 2H), 1,54-1,11 (m, 18H), 0,81 (t, J=6,7 Гц, 3H).

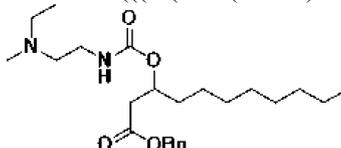
Промежуточное соединение 52b: бензил 3-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)ундеканоат



К раствору промежуточного соединения 52a (25 г, 1,0 эквив.) в DCM (250 мл) добавляли (4-нитрофенил)карбонилхлоридат (17,23 г, 1,0 эквив.) и пиридин (13,80 мл, 2,0 эквив.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. По завершении, реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM, и полученный остаток разбавляли водой и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (12 г, 31%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,31-8,01 (m, 4H), 7,28 (s, 5H), 5,22-5,14 (m, 2H), 5,13-5,01 (m, 4H), 2,68 (dd, J=14,8, 6,4 Гц, 3H), 1,75-1,64 (m, 2H), 1,30-1,19 (m, 18H), 0,80 (t, J=6,6 Гц, 3H).

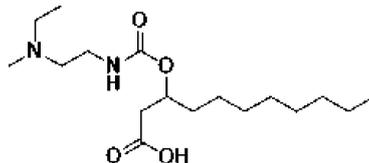
Промежуточное соединение 52c: бензил 3-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)ундеканоат



К раствору промежуточного соединения 52b (14 г, 1,0 эквив.) и N'-этил-N'-метилэтан-1,2-диамина (6,25 г, 2,0 эквив.) в MeCN (400 мл) добавляли пиридин (7,41 мл, 3,0 экв.) и DMAP (3,74 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. По завершении реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления MeCN, и полученный остаток разбавляли водой и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла. (6 г, 47%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,39-7,28 (m, 5H), 5,11 (s, 4H), 3,21 (h, J=6,8 Гц, 2H), 2,62 (td, J=14,4, 13,6, 6,4 Гц, 2H), 2,50-2,39 (m, 4H), 1,59 (h, J=8,2 Гц, 2H), 1,25 (d, J=16,1 Гц, 14H), 1,03 (t, J=7,2 Гц, 3H), 0,86 (t, J=6,7 Гц, 3H).

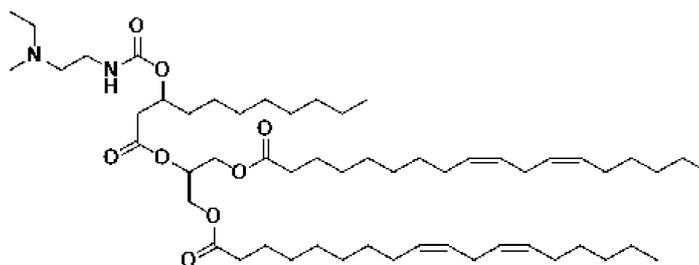
Промежуточное соединение 52d: 3-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)ундекановая кислота



К раствору промежуточного соединения 52c (6 г, 1,0 эквив.) в MeOH (60 мл) добавляли Pd/C (2 г, 10% мас./мас.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч в атмосфере H₂. Затем реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде коричневого масла.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 12,76 (s, 1H), 6,28 (t, J=5,8 Гц, 1H), 5,01 (p, J=6,1, 5,6 Гц, 1H), 3,30 (qq, J=13,8, 6,0 Гц, 2H), 2,70 (hd, J=12,1, 11,0, 5,4 Гц, 3H), 2,37 (d, J=14,1 Гц, 4H), 1,51 (ddq, J=21,6, 14,2, 6,7 Гц, 2H), 1,34-1,14 (m, 11H), 1,10 (t, J=7,1 Гц, 3H), 0,80 (t, J=6,7 Гц, 3H).

Соединение 52: 2-(((3-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)ундеканойл)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

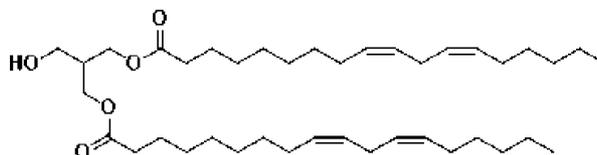


К раствору промежуточного соединения 52d (1,0-1,1 экв.) и промежуточного соединения 1с (1,0-1,1 экв.) в DCM (0,1-0,25 экв.) добавляли DMAP (0,25 экв.), DIPEA (3,5 экв.) и EDCI (1,5 экв.) последовательно. Реакционную смесь перемешивали при 23°C в течение не менее 16 ч. К реакционной смеси добавляли дополнительное количество DMAP (0,25 эквив.) и реакционную смесь перемешивали при 23°C в течение еще 6 ч. Затем реакцию гасили добавлением воды, промывали 1 раз 1 М HCl и 1 раз 5% NaHCO₃. Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Очистка колоночной хроматографией дала продукт в виде бесцветного масла (28%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,53-5,28 (m, 8H), 5,24 (s, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,28 (ddd, J=15,9, 11,9, 4,5 Гц, 2H), 4,15 (dt, J=13,4, 6,8 Гц, 2H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,59 (tt, J=15,9, 9,0 Гц, 6H), 2,37-2,14 (m, 6H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 7H), 1,59 (d, J=14,2 Гц, 12H), 1,46-0,97 (m, 42H), 0,96-0,81 (m, 9H). MS: 930,8 m/z [M+H].

Пример 53 - соединение 53.

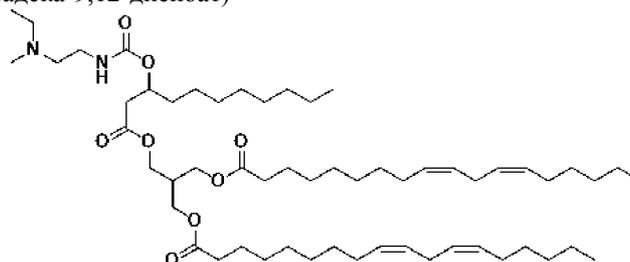
Промежуточное соединение 53а: 2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору линолевой кислоты (20 г, 1,0 экв.) и 2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диола (7,57 г, 1,0 экв.) в DCM (200 мл) добавляли EDCI (13,67 г, 1,0 экв.), DMAP (1,39 г, 0,16 экв.) и DIPEA (37,27 мл, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM, и полученный остаток разбавляли водой и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (6,3 г, 11%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 5,44-5,30 (m, 8H), 4,17 (qd, J=11,1, 6,0 Гц, 4H), 3,63 (d, J=6,0 Гц, 2H), 2,80 (t, J=6,1 Гц, 4H), 2,35 (t, J=7,4 Гц, 4H), 2,21 (h, J=6,0 Гц, 1H), 2,14-2,03 (m, 8H), 1,64 (p, J=7,4 Гц, 4H), 1,46-1,28 (m, 27H), 0,93 (t, J=6,7 Гц, 6H).

Соединение 53: 2-(11-метил-5-октил-3,7-диоксо-2,6-диокса-8,11-диазатридецил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

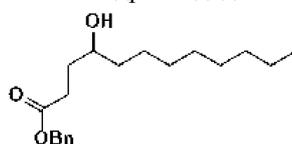


Соединение 53 было синтезировано с выходом 45% из промежуточного соединения 52d и промежуточного соединения 53а, используя метод, применяемый для соединения 52.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,48-5,24 (m, 8H), 5,07 (t, J=6,5 Гц, 1H), 4,20-4,07 (m, 6H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,62-2,46 (m, 4H), 2,45-2,37 (m, 2H), 2,34-2,15 (m, 6H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,43-0,97 (m, 43H), 0,95-0,83 (m, 9H). MS: 944,8 m/z [M+H].

Пример 54 - соединение 54.

Промежуточное соединение 54а: бензил-4-гидроксидодеканоат

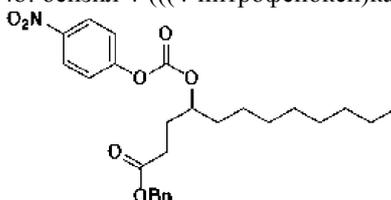


К раствору 5-октилтетрагидрофуран-2-она (20 г, 1,0 экв.) в воде (200-250 мл) добавляли NaOH (1,1 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 24 ч в атмосфере N₂. Затем реакционную смесь концен-

трировали при пониженном давлении для удаления растворителя - воды. Полученный неочищенный материал восстанавливали в ацетоне (200 мл) с последующим добавлением ТВАВ (0,05 экв.) и VnBr (1,2-1,5 экв.). Смесь нагревали до 60°C и перемешивали в течение 12 ч в атмосфере N₂. По завершении смесь концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток выливали в нас. раствор NaHCO₃. Продукт экстрагировали 3 раза EtOAc, и объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (20 г, 39%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,45-7,29 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 3,65-3,57 (m, 1H), 2,51 (td, J=7,2, 2,7 Гц, 2H), 1,86 (dtd, J=14,6, 7,4, 3,5 Гц, 1H), 1,71 (ddd, J=14,2, 8,6, 7,1 Гц, 1H), 1,61 (d, J=5,0 Гц, 1H), 1,52-1,17 (m, 17H), 0,88 (t, J=6,7 Гц, 3H).

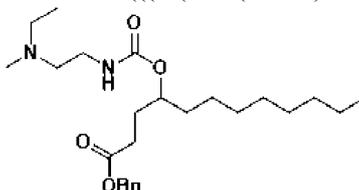
Промежуточное соединение 54b: бензил 4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)додеканоат



К раствору промежуточного соединения 54a (10 г, 1,0 эквив.) в DCM (80-100 мл) добавляли (4-нитрофенил)карбонилхлоридат (1,5 эквив.). Реакционную смесь дегазировали и продували 3 раза N₂ и охлаждали до 0°C перед добавлением пиридина (2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. По завершении смесь концентрировали при пониженном давлении, и полученный остаток восстанавливали в гексане и фильтровали. Полученный фильтрат промывали 3 раза водой, и органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (9 г, 29%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,27 (dd, J=9,8, 7,8 Гц, 2H), 7,50-7,30 (m, 8H), 5,12 (d, J=8,3 Гц, 2H), 4,87 (dtd, J=12,2, 7,3, 4,1 Гц, 1H), 2,50 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,16-2,06 (m, 1H), 1,99 (dq, J=14,8, 7,5 Гц, 1H), 1,73 (ddd, J=14,0, 12,0, 7,0 Гц, 1H), 1,63 (tt, J=8,6, 4,5 Гц, 1H), 1,45-1,19 (m, 12H), 0,94-0,84 (m, 3H).

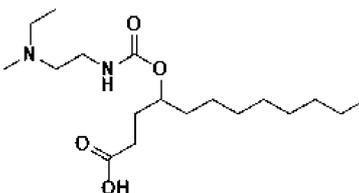
Промежуточное соединение 54c: бензил 4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)додеканоат



К раствору промежуточного соединения 54b (9 г, 1,0 эквив.) в MeCN (45-90 мл) добавляли N'-этил-N'-метилэтан-1,2-диамин (1,5-2,5 эквив.), пиридин (3-4 экв.) и DMAP (2,33 г, 1,0 экв.), и полученную смесь дегазировали и продували 3 раза N₂. Реакционную смесь нагревали до 70°C и перемешивали в течение 2 ч в атмосфере N₂. По завершении смесь концентрировали для удаления растворителя, и полученный остаток разбавляли EtOAc, промывали 3 раза нас. NaHCO₃ и 3 раза водой. Затем органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бледно-желтого масла (5 г, 60%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,38-7,22 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,69 (s, 1H), 3,16 (q, J=6,0 Гц, 2H), 2,45-2,27 (m, 6H), 2,13 (s, 3H), 1,95-1,71 (m, 2H), 1,40 (d, J=7,3 Гц, 2H), 1,34-1,09 (m, 13H), 0,96 (t, J=7,1 Гц, 3H), 0,80 (t, J=6,7 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 54d: 4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)додекановая кислота

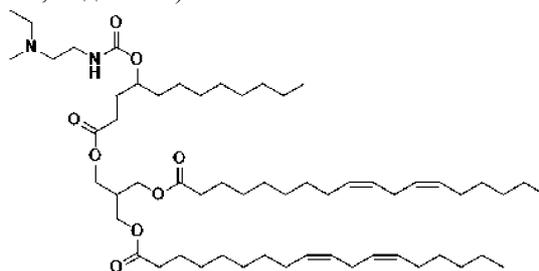


К раствору промежуточного соединения 54c (6 г, 1,0 эквив.) в MeOH (60 мл) добавляли Pd/C (1,8 г, 10% мас./мас.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере H₂. Затем реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде коричневого масла (3,2 г, 67%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 4,76 (dp, J=8,1, 4,1 Гц, 1H), 3,65 (dt, J=14,0, 7,0 Гц, 1H), 3,28-3,10 (m, 4H), 3,07 (ddd, J=11,3, 7,5, 2,1 Гц, 1H), 2,79 (s, 3H), 2,27 (ddd, J=14,0, 8,2, 4,4 Гц, 1H), 2,20-1,99 (m, 2H),

1,86-1,74 (m, 1H), 1,71-1,56 (m, 1H), 1,48 (dq, J=13,7, 7,6, 6,8 Гц, 1H), 1,31 (dd, J=14,1, 7,0 Гц, 14H), 0,94-0,83 (m, 3H).

Соединение 54: 2-(12-метил-6-октил-3,8-диоксо-2,7-диокса-9,12-дiazатетрадецил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

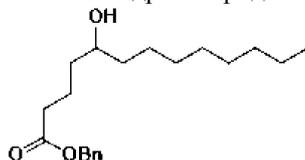


Соединение 54 было синтезировано с выходом 47% из промежуточного соединения 54d и промежуточного соединения 53a, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,26 (m, 8H), 4,75 (s, 1H), 4,12 (d, J=6,0 Гц, 6H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,55-2,34 (m, 6H), 2,34-2,19 (m, 6H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,97-1,70 (m, 4H), 1,61 (t, J=7,2 Гц, 10H), 1,41-1,00 (m, 43H), 0,94-0,82 (m, 9H). MS: 959,1 m/z [M+H].

Пример 55 - соединение 55.

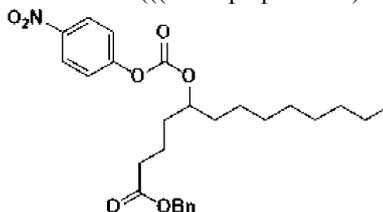
Промежуточное соединение 55a: бензил 5-гидрокситридеканоат



Промежуточное соединение 55a получали с выходом 25% из 6-октилтетрагидропиран-2-она, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 54a.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,34 (qt, J=9,5, 4,5 Гц, 5H), 5,11 (s, 2H), 3,57 (s, 1H), 2,39 (t, J=7,3 Гц, 2H), 1,85-1,65 (m, 2H), 1,60-1,11 (m, 18H), 0,98-0,80 (m, 3H).

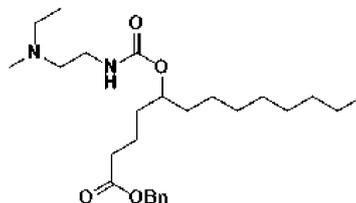
Промежуточное соединение 55b: бензил 5-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)тридеканоат



Промежуточное соединение 55b было получено с выходом 37% из промежуточного соединения 55a, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 54b.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,32-8,24 (m, 3H), 7,39 (dddd, J=20,3, 9,9, 5,7, 1,9 Гц, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,87-4,75 (m, 1H), 2,41 (t, J=6,8 Гц, 2H), 1,69 (dddt, J=33,5, 23,3, 14,2, 6,0 Гц, 6H), 1,51-1,01 (m, 13H), 0,87 (t, J=6,6 Гц, 3H).

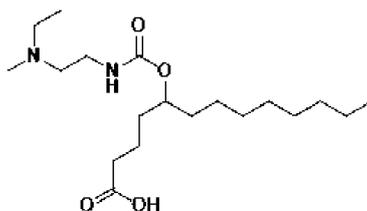
Промежуточное соединение 55c: бензил 5-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)тридеканоат



Промежуточное соединение 55c было получено с выходом 53% из промежуточного соединения 55b, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 54c.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,41-7,18 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,65 (p, J=6,5 Гц, 1H), 3,19 (q, J=6,4, 5,9 Гц, 2H), 2,49-2,23 (m, 6H), 2,16 (d, J=29,0 Гц, 3H), 1,69-1,54 (m, J=6,7 Гц, 2H), 1,44 (tt, J=13,6, 7,1 Гц, 4H), 1,37-1,05 (m, 14H), 0,98 (t, J=7,1 Гц, 3H), 0,80 (t, J=6,6 Гц, 3H).

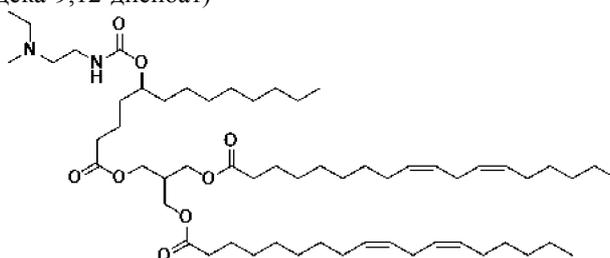
Промежуточное соединение 55d: 5-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)тридекановая кислота



К раствору промежуточного соединения 55с (2,2 г, 1,0 эквив.) в ТГФ (20 мл) добавляли Pd/C (2,5 г, 10% мас./мас.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере H₂. Затем реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде коричневого масла (1 г, 58%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 12,81 (s, 1H), 5,93-5,72 (m, 1H), 4,61 (q, J=7,1 Гц, 1H), 3,68-3,47 (m, 1H), 3,29-3,04 (m, 1H), 2,76 (tt, J=17,2, 9,1 Гц, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,34-2,06 (m, 2H), 1,85-0,87 (m, 22H), 0,80 (t, J=6,4 Гц, 3H).

Соединение 55: 2-(13-метил-7-октил-3,9-диоксо-2,8-диокса-10,13-диазапентадецил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

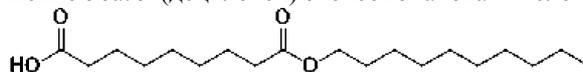


Соединение 55 было получено с выходом 58% из промежуточного соединения 53а и промежуточного соединения 55d, используя метод, применяемый для соединения 52.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,27 (m, 8H), 4,73 (s, 1H), 4,12 (d, J=6,0 Гц, 6H), 3,32 (s, 2H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,49 (d, J=45,9 Гц, 4H), 2,43-2,22 (m, 10H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,75-1,42 (m, 13H), 1,42-1,21 (m, 40H), 1,11 (s, 3H), 0,95-0,82 (m, 9H). MS: 972,8 m/z [M+H].

Пример 56 - соединение 56.

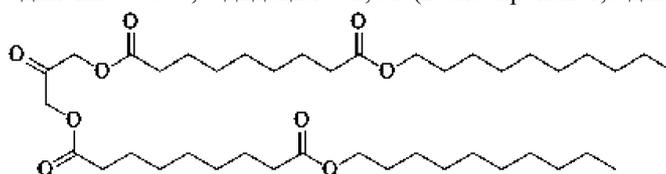
Промежуточное соединение 56а: 9-(децилокси)-9-оксононановая кислота



К смеси нонандиовой кислоты (90 г, 1,0 эквив.) в ТГФ (300-900 мл) при 0°C по каплям добавляли ДМФ (0,1-0,2 эквив.) и (COCl)₂ (1,0 экв.). Смесь дегазировали и продували 3 раза N₂, а затем смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. К реакционной смеси по каплям добавляли декан-1-ол (1,0 эквив.) при 0°C и перемешивали при 20°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, полученный раствор выливали в воду и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали рассолом, затем сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде белого твердого вещества (20 г, 6%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,05 (t, J=6,7 Гц, 2H), 2,34 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,29 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,62 (q, J=7,3 Гц, 6H), 1,41-1,15 (m, 19H), 0,88 (t, J=6,7 Гц, 3H).

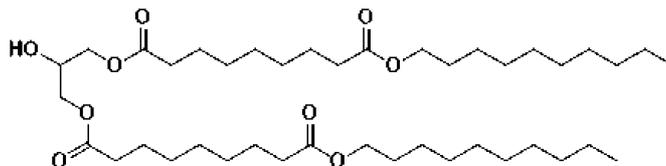
Промежуточное соединение 56b: 9,9'-дидецил О'1,О1-(2-оксопропан-1,3-диил)ди(нонандиоат)



К смеси 1,3-дигидроксипропан-2-она (1,37 г, 0,5 экв.), EDCI (1,0 экв.) и DMAP (1,0 экв.) в DCM (100-200 мл) добавляли промежуточное соединение 56а (1,0 экв.) порциями при 0°C, и смесь дегазировали и продували 3 раза N₂. Смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, полученный раствор выливали в воду и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали рассолом, затем сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде белого твердого вещества (10 г, 46%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,74 (d, J=2,1 Гц, 4H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 4H), 2,41 (t, J=7,5 Гц, 4H), 2,28 (t, J=7,5 Гц, 4H), 1,62 (d, J=8,8 Гц, 12H), 1,39-1,19 (m, 39H), 0,87 (t, J=6,7 Гц, 6H).

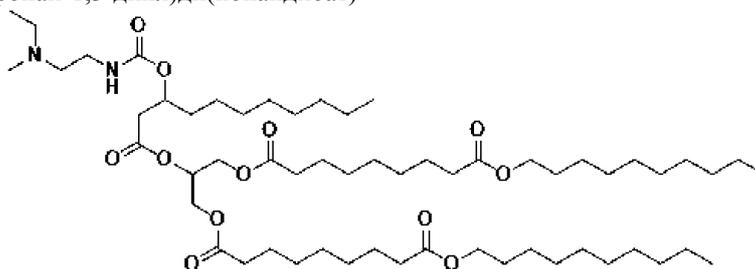
Промежуточное соединение 56с: 9,9'-дидецил О'1,О1-(2-гидроксипропан-1,3-диил)ди(нонандиоат)



К раствору промежуточного соединения 56b (13,4 г, 1,0 эквив.) в ТГФ/толуоле/воде (4:1:2, 0,4 М) при 0°C в атмосфере N₂ добавляли NaBH₄ (1,5 эквив.). Смесь перемешивали при 15-20°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. По завершении реакцию смесь разбавляли водой и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали рассолом, затем сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде белого твердого вещества (5,1 г, 38%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,15-4,03 (m, 5H), 3,98 (t, J=6,8 Гц, 4H), 2,44 (d, J=4,8 Гц, 1H), 2,25 (dt, J=24,2, 7,5 Гц, 8H), 1,55 (q, J=7,1 Гц, 12H), 1,22 (d, J=22,7 Гц, 38H), 0,81 (t, J=6,7 Гц, 6H).

Соединение 56: 9,9'-дидецил О'1,О1-(2-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)-ундеканоил)окси)пропан-1,3-диил)ди(нонандиоат)

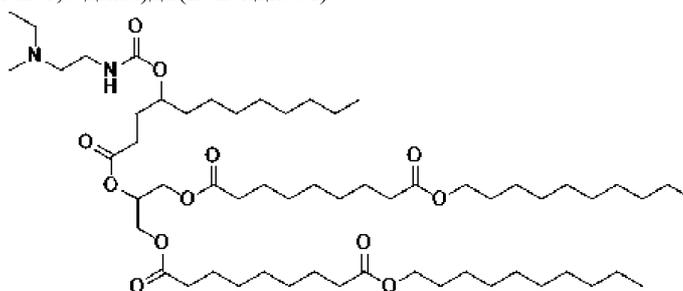


Соединение 56 было получено с выходом 36% из промежуточного соединения 52d и промежуточного соединения 56с, используя метод, применяемый для соединения 52.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,24 (t, J=5,2 Гц, 1H), 5,13-5,04 (m, 1H), 4,28 (ddd, J=14,5, 11,9, 4,5 Гц, 2H), 4,14 (ddd, J=11,9, 8,3, 5,8 Гц, 2H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 4H), 3,31 (s, 2H), 2,58 (qd, J=15,3, 6,4 Гц, 6H), 2,30 (dt, J=10,3, 7,6 Гц, 10H), 1,61 (dd, J=10,1, 4,1 Гц, 16H), 1,29 (dt, J=17,6, 3,3 Гц, 54H), 0,88 (td, J=6,9, 1,9 Гц, 9H). MS: 1027,2 m/z [M+H].

Пример 57 - соединение 57.

Соединение 57: 9,9'-дидецил О'1,О1-(2-(((4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)-додеканоил)окси)пропан-1,3-диил)ди(нонандиоат)

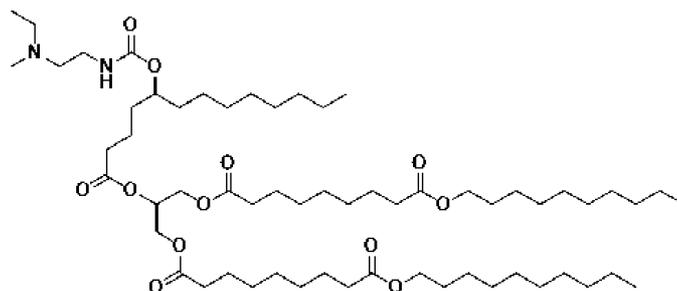


Соединение 57 было получено с выходом 55% из промежуточного соединения 54d и промежуточного соединения 56с, используя метод, применяемый для соединения 52.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,28-5,21 (m, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, J=11,8, 4,4, 1,2 Гц, 2H), 4,15 (ddd, J=11,9, 5,9, 4,6 Гц, 2H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 4H), 3,29 (s, 2H), 2,38 (ddd, J=8,6, 6,9, 2,7 Гц, 5H), 2,35-2,12 (m, 10H), 1,98-1,73 (m, 3H), 1,68-1,37 (m, 17H), 1,29 (dt, J=19,5, 4,1 Гц, 54H), 0,88 (td, J=6,9, 1,9 Гц, 9H). MS: 1040,8 m/z [M+H].

Пример 58 - соединение 58.

Соединение 58: 9,9'-дидецил О'1,О1-(2-(((5-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)-тридеканоил)окси)пропан-1,3-диил)ди(нонандиоат)

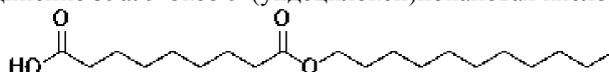


Соединение 58 было получено с выходом 60% из промежуточного соединения 55d и промежуточного соединения 56с, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,27-5,20 (m, 1H), 4,73 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,4, 2,8$ Гц, 2H), 4,13 (ddd, $J=11,9, 5,9, 2,6$ Гц, 2H), 4,05 (t, $J=6,7$ Гц, 4H), 3,31 (s, 2H), 2,39-2,09 (m, 12H), 1,62 (dq, $J=13,8, 7,2, 6,5$ Гц, 22H), 1,41-0,99 (m, 54H), 0,88 (td, $J=6,9, 2,0$ Гц, 9H). MS: 1055,0 m/z [M+H].

Пример 59 - соединение 59.

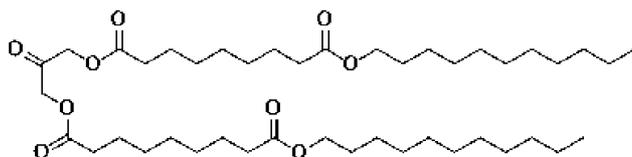
Промежуточное соединение 59а: 9-оксо-9-(ундецилокси)нонановая кислота



Промежуточное соединение 59а получали с выходом 41% из нонандиовой кислоты и ундекан-1-ола, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 56а.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,05 (t, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,31 (dt, $J=22,6, 7,5$ Гц, 4H), 1,62 (q, $J=7,1$ Гц, 6H), 1,40-1,18 (m, 23H), 0,87 (t, $J=6,7$ Гц, 3H).

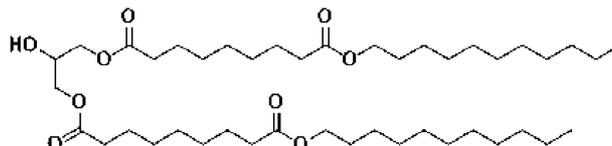
Промежуточное соединение 59b: O'1,O1-(2-оксопропан-1,3-диил) 9,9'-диундецил ди(нонандиоат)



Промежуточное соединение 59b получали с выходом 23% из 1,3-дигидроксипропан-2-она и промежуточного соединения 59а, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 56b.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 3,98 (t, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,35 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,22 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,57 (dt, $J=18,6, 6,9$ Гц, 6H), 1,36-1,12 (m, 23H), 0,89-0,76 (m, 3H).

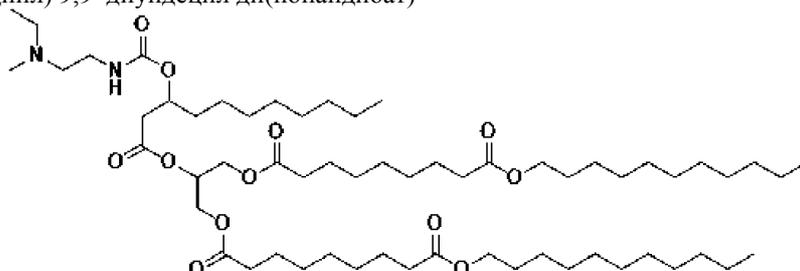
Промежуточное соединение 59с: O'1,O1-(2-(3-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)ундеканойл)-окси)пропан-1,3-диил) 9,9'-диундецил ди(нонандиоат)



Промежуточное соединение 59с было получено с выходом 47% из промежуточного соединения 59b с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 56с.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,23-4,00 (m, 9H), 2,52 (d, $J=4,7$ Гц, 1H), 2,31 (dt, $J=24,2, 7,5$ Гц, 8H), 1,62 (q, $J=7,0$ Гц, 13H), 1,29 (d, $J=23,9$ Гц, 43H), 0,88 (t, $J=6,7$ Гц, 6H).

Соединение 59: O'1,O1-(2-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)ундеканойл)-окси)пропан-1,3-диил) 9,9'-диундецил ди(нонандиоат)

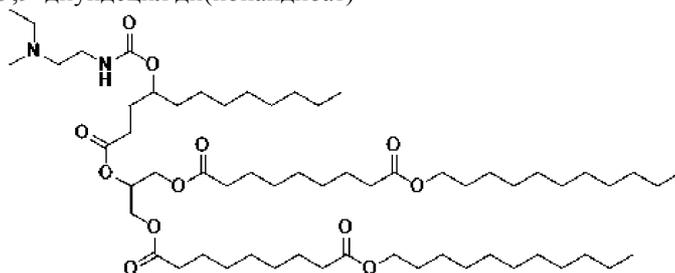


Соединение 59 получали с выходом 35% из промежуточного соединения 52d и промежуточного соединения 59с, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,23 (s, 1H), 5,08 (d, $J=6,5$ Гц, 1H), 4,28 (ddd, $J=15,0, 11,9, 4,5$ Гц, 2H), 4,14 (dt, $J=13,1, 6,7$ Гц, 2H), 4,05 (t, $J=6,8$ Гц, 4H), 2,58 (qd, $J=15,4, 6,6$ Гц, 4H), 2,30 (dt, $J=10,4, 7,5$ Гц, 10H), 1,60 (q, $J=7,7, 6,9$ Гц, 20H), 1,43-0,97 (m, 58H), 0,88 (td, $J=6,9, 1,9$ Гц, 9H). MS: 1054,9 m/z [M+H].

Пример 60 - соединение 60.

Соединение 60: O'1,O1-(2-((4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)-окси)пропан-1,3-диил) 9,9'-диундецил ди(нонандиоат)

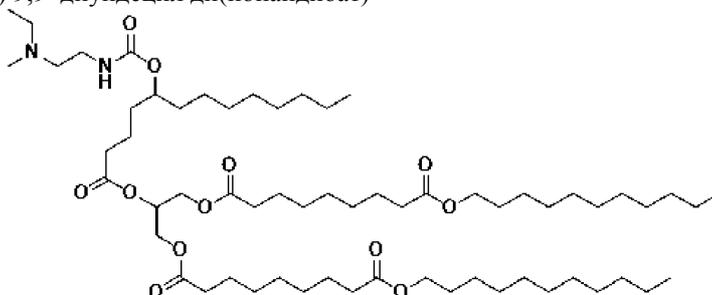


Соединение 60 было получено с выходом 79% из промежуточного соединения 54d и промежуточного соединения 59с, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,25 (p, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,5, 2,7$ Гц, 2H), 4,15 (dt, $J=11,7, 5,6$ Гц, 2H), 4,05 (t, $J=6,8$ Гц, 4H), 2,38 (t, $J=7,5$ Гц, 5H), 2,35-2,11 (m, 10H), 1,98-1,41 (m, 23H), 1,41-0,96 (m, 57H), 0,88 (td, $J=6,9, 1,8$ Гц, 9H). MS: 1068,9 m/z [M+H].

Пример 61 - соединение 61.

Соединение 61: O'1,O1-(2-((5-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)тридеcanoил)-окси)пропан-1,3-диил) 9,9'-диундецил ди(нонандиоат)

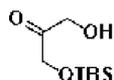


Соединение 61 было получено с выходом 61% из промежуточного соединения 55d и промежуточного соединения 59с, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,29-5,20 (m, 1H), 4,72 (d, $J=7,4$ Гц, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,4, 2,3$ Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9, 5,9, 2,0$ Гц, 2H), 4,05 (t, $J=6,8$ Гц, 4H), 2,82-2,13 (m, 15H), 1,82-1,39 (m, 21H), 1,39-0,97 (m, 56H), 0,88 (td, $J=6,9, 1,9$ Гц, 9H). MS: 1083,0 m/z [M+H].

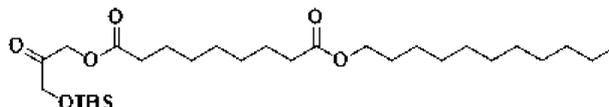
Пример 62 - соединение 62.

Промежуточное соединение 62a: 1-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-3-гидроксипропан-2-он



К смеси 1,3-дигидроксипропан-2-она (50 г, 1,0 экв.), имидазола (37,79 г, 1,0 экв.) в ТГФ (40 мл) при 0°C добавляли TBSCl (83,66 г, 1,0 экв.), и смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (15 г, 13%).

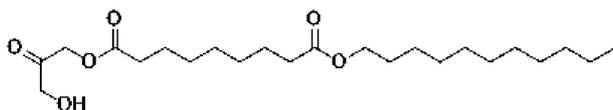
Промежуточное соединение 62b: 1-(3-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-2-оксипропил) 9-ундецилнонандиоат



К смеси промежуточного соединения 62a (10 г, 1,0 эквив.), EDCI (9,38 г, 1,0 эквив.) и DMAP (5,98 г, 1,0 эквив.) в DCM (300 мл) при 0°C добавляли промежуточное соединение 59a (16,76 г, 1,0 экв.), и смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM, и полученный остаток разбавляли водой. Неочищенный материал трижды экстрагировали EtOAc, и объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (11 г, 43%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,84 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 3,95 (t, $J=6,8$ Гц, 2H), 2,32 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,18 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,61-1,48 (m, 6H), 1,30-1,12 (m, 22H), 0,82 (s, 9H), 0,78 (t, $J=6,8$ Гц, 3H).

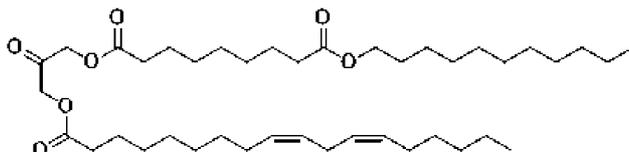
Промежуточное соединение 62c: 1-(3-гидрокси-2-оксипропил) 9-ундецилнонандиоат



К смеси промежуточного соединения 62b (11 г, 1,0 эквив.) в THF (50 мл) добавляли HF·пиридин (3,75 мл, 8,0 эквив.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. По завершении реакцию смесь разбавляли водой и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде белого твердого вещества (6 г, 70%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,70 (s, 2H), 4,30 (s, 2H), 3,98 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,95 (s, 1H), 2,36 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,22 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,57 (dt, J=20,3, 7,1 Гц, 6H), 1,37-1,10 (m, 22H), 0,81 (t, J=6,7 Гц, 3H).

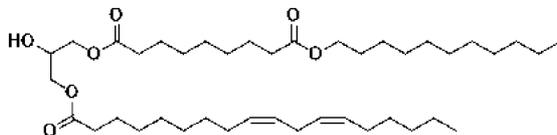
Промежуточное соединение 62d: 1-(3-(((9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноил)окси)-2-оксопропил) 9-ундецил нонандиоат



К раствору промежуточного соединения 62c (6 г, 1,0 эквив.) в DCM (100 мл) при 0°C добавляли EDCI (1,0 эквив.), DMAP (1,0 эквив.). Раствор дегазировали и продували 3 раза N₂ с последующим добавлением линолевой кислоты (4 мл, 1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N₂. По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM, и полученный остаток разбавляли водой. Неочищенный материал трижды экстрагировали EtOAc, и объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (7,5 г, 55%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,70 (s, 2H), 4,30 (s, 2H), 3,98 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,95 (s, 1H), 2,36 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,22 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,57 (dt, J=20,3, 7,1 Гц, 6H), 1,37-1,10 (m, 22H), 0,81 (t, J=6,7 Гц, 3H).

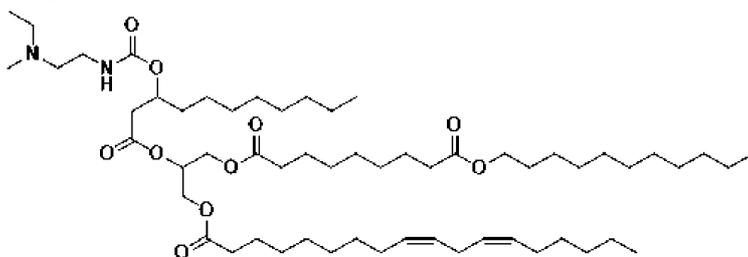
Промежуточное соединение 62e: 1-(2-гидрокси-3-(((9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноил)окси)пропил) 9-ундецил нонандиоат



К раствору промежуточного соединения 62d (7 г, 1,0 эквив.) в ТГФ/толуоле/воде (4:1:2, 0,04 М) при 0°C добавляли NaBH₄ (5 эквив.) и смесь перемешивали при 20°C в течение 5 часов в атмосфере N₂. По завершении смесь гасили насыщ. NH₄Cl при 5°C и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои дважды промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением остатка. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексагон) с получением продукта в виде бесцветного масла (6 г, 85%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,42-5,25 (m, 4H), 4,25-3,90 (m, 8H), 2,76 (t, J=6,4 Гц, 2H), 2,55 (s, 1H), 2,30 (dt, J=24,5, 7,6 Гц, 6H), 2,03 (q, J=6,8 Гц, 4H), 1,61 (q, J=7,0 Гц, 8H), 1,48-1,06 (m, 35H), 0,87 (td, J=6,8, 3,8 Гц, 6H).

Соединение 62: 1-(3-метил-13-(((9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноил)окси)метил)-9-октил-7,11-диоксо-8,12-диокса-3,6-дiazатетрадекан-14-ил) 9-ундецил нонандиоат



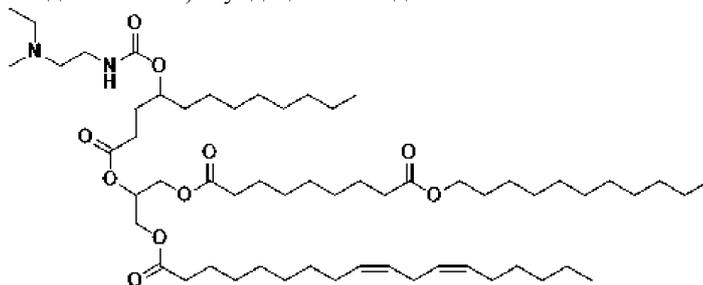
Соединение 62 получали с выходом 36% из промежуточного соединения 52d и промежуточного соединения 62e, используя метод, применяемый для соединения 52.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,47-5,28 (m, 4H), 5,23 (t, J=5,2 Гц, 1H), 5,14-5,04 (m, 1H), 4,28 (ddd, J=15,3, 11,9, 4,6 Гц, 2H), 4,14 (ddd, J=11,8, 7,5, 5,8 Гц, 2H), 4,05 (t, J=6,8 Гц, 2H), 3,38 (s, 2H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 2H), 2,58 (qd, J=15,2, 6,3 Гц, 5H), 2,37-2,22 (m, 7H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 4H), 1,62 (d, J=6,8 Гц, 14H), 1,48-

0,97 (m, 50H), 0,97-0,79 (m, 9H). MS: 992,3 m/z [M+H].

Пример 63 - соединение 63.

Соединение 63: 1-(3-метил-14-(((9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноил)окси)метил)-9-октил-7,12-диоксо-8,13-диокса-3,6-дизаапентадекан-15-ил) 9-ундецил нонандиоат

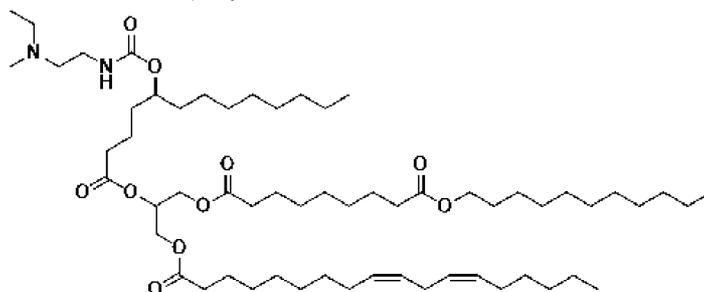


Соединение 63 было получено с выходом 79% из промежуточного соединения 54d и промежуточного соединения 62e, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,28 (m, 4H), 5,25 (ddd, $J=5,8, 4,5, 1,4$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 4,2$ Гц, 2H), 4,05 (t, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,31 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,70-2,12 (m, 15H), 2,05 (q, $J=6,9$ Гц, 4H), 1,97-1,72 (m, 3H), 1,61 (h, $J=6,5$ Гц, 12H), 1,40-1,19 (m, 47H), 1,11 (s, 3H), 0,96-0,81 (m, 9H). MS: 1006,9 m/z [M+H].

Пример 64 - соединение 64.

Соединение 64: 1-(3-метил-15-(((9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноил)окси)метил)-9-октил-7,13-диоксо-8,14-диокса-3,6-дизагексадекан-16-ил) 9-ундецил нонандиоат

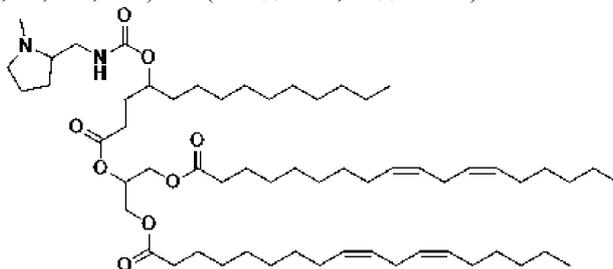


Соединение 64 было получено с выходом 79% из промежуточного соединения 55d и промежуточного соединения 62e, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,48-5,28 (m, 4H), 5,24 (h, $J=4,9, 4,4$ Гц, 1H), 4,73 (s, 1H), 4,29 (ddd, $J=11,9, 4,4, 3,3$ Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9, 5,9, 3,1$ Гц, 2H), 4,05 (t, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,31 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,67-2,11 (m, 14H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 4H), 1,73-1,41 (m, 17H), 1,41-0,95 (m, 50H), 0,94-0,82 (m, 9H). MS: 1021,0 m/z [M+H].

Пример 65 - соединение 65.

Соединение 65: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)тетрадеканоил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

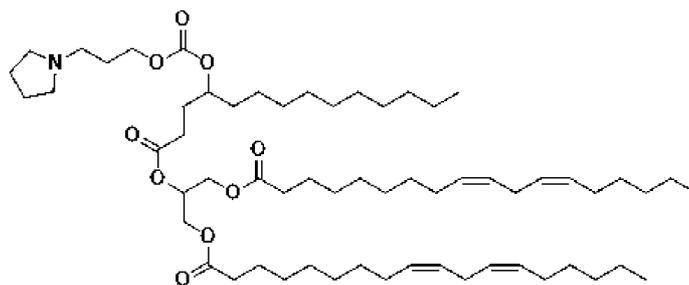


Соединение 65 было получено с выходом 75% из промежуточного соединения 39d и 1-(1-метилпирролидин-2-ил)метанамина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,28 (m, 8H), 5,25 (ddd, $J=10,2, 5,7, 4,4$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,20-4,11 (m, 2H), 3,45 (s, 1H), 3,21 (s, 2H), 2,82-2,74 (m, 4H), 2,46-2,24 (m, 9H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 2,01-1,42 (m, 16H), 1,41-1,20 (m, 45H), 0,88 (td, $J=7,0, 4,7$ Гц, 9H). MS: 984,9 m/z [M+H].

Пример 66 - соединение 66.

Соединение 66: 2-((4-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)тетрадеканоил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

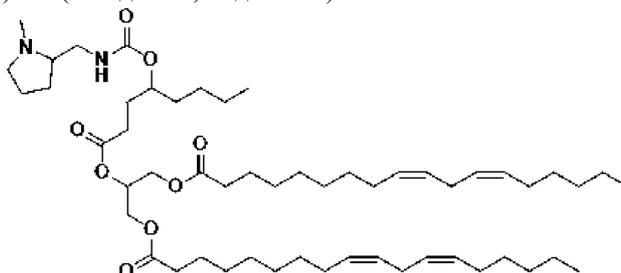


Соединение 66 было получено с выходом 65% из промежуточного соединения 39d и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,57-5,21 (m, 9H), 4,72 (dt, $J=12,2, 5,2$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,24-4,07 (m, 4H), 2,82-2,74 (m, 4H), 2,60 (d, $J=102,7$ Гц, 5H), 2,45-2,38 (m, 2H), 2,38-2,26 (m, 4H), 2,13-1,73 (m, 16H), 1,73-1,43 (m, 9H), 1,41-1,16 (m, 42H), 1,04-0,74 (m, 9H). MS: 999,4 m/z [M+H].

Пример 67 - соединение 67.

Соединение 67: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

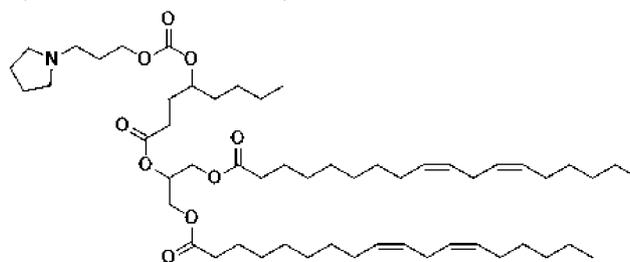


Соединение 67 было получено с выходом 50% из промежуточного соединения 42d и 1-(1-метилпирролидин-2-ил)метанамина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,08 (m, 9H), 4,77 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,8, 4,5, 1,8$ Гц, 2H), 4,20-4,12 (m, 2H), 3,48 (s, 1H), 3,33 (s, 2H), 2,77 (td, $J=6,1, 1,2$ Гц, 4H), 2,63-2,23 (m, 1ш), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 9H), 1,98-1,42 (m, 14H), 1,42-1,22 (m, 32H), 0,96-0,81 (m, 9H). MS: 900,0 m/z [M+H].

Пример 68 - соединение 68.

Соединение 68: 2-((4-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

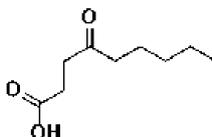


Соединение 68 было получено с выходом 43% из промежуточного соединения 42d и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,04 (m, 9H), 4,72 (tt, $J=7,4, 5,1$ Гц, 1H), 4,40-4,10 (m, 6H), 2,81-2,74 (m, 4H), 2,54 (d, $J=58,1$ Гц, 5H), 2,40 (ddd, $J=8,4, 6,8, 4,4$ Гц, 2H), 2,36-2,27 (m, 4H), 2,11-1,73 (m, 16H), 1,73-1,43 (m, 8H), 1,43-1,21 (m, 31H), 0,99-0,77 (m, 9H). MS: 915,7 m/z [M+H].

Пример 69 - соединение 69.

Промежуточное соединение 69а: 4-оксононановая кислота

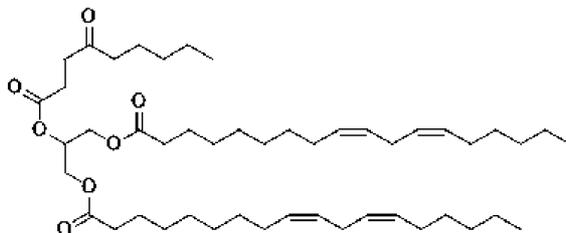


К смеси 5-пентилтетрагидрофуран-2-она (50 г, 1,0 эквив.) в 3:1 $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (500 мл) добавляли NaOH (2,0 эквив.) одной порцией при 15°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 15°C в течение 12 ч. По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении, и полученный остаток дважды экстрагировали DCM. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали, получая неочищенный остаток.

Затем неочищенный остаток восстанавливали в DCM (1 л) с последующим добавлением DMP (3 экв.) одной порцией при 15°C в N₂. Смесь перемешивали при 15°C в течение 4 ч. По завершении реакцию концентрировали при пониженном давлении, и раствор доводили до pH 3 с помощью 1 М HCl. Суспензию фильтровали и промывали H₂O. Полученный осадок на фильтре растворяли в EtOAc, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением продукта в виде белого твердого вещества (22 г, 45%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 2,72 (dd, J=7,0, 5,4 Гц, 2H), 2,63 (ddd, J=7,2, 5,9, 1,2 Гц, 2H), 2,44 (t, J=7,4 Гц, 2H), 1,64-1,54 (m, 2H), 1,36-1,20 (m, 4H), 0,89 (t, J=6,9 Гц, 3H).

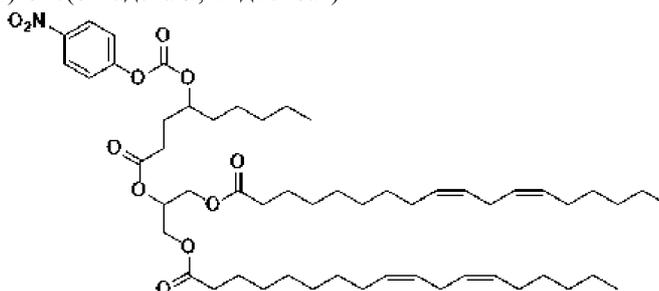
Промежуточное соединение 69b: 2-((4-оксоноаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 69b было синтезировано с выходом 74% из промежуточного соединения 69a и промежуточного соединения 1с, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 1d.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,46-5,16 (m, 9H), 4,29 (dd, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,14 (dt, J=11,8, 6,0 Гц, 2H), 2,74 (dt, J=21,5, 6,5 Гц, 6H), 2,59 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,43 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,32 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,04 (dd, J=8,6, 5,3 Гц, 8H), 1,60 (ddd, J=14,2, 8,4, 4,8 Гц, 6H), 1,50-1,06 (m, 32H), 0,89 (t, J=6,8 Гц, 9H).

Промежуточное соединение 69с: 2-(((4-((4-нитрофенокси)карбонил)окси)нонаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

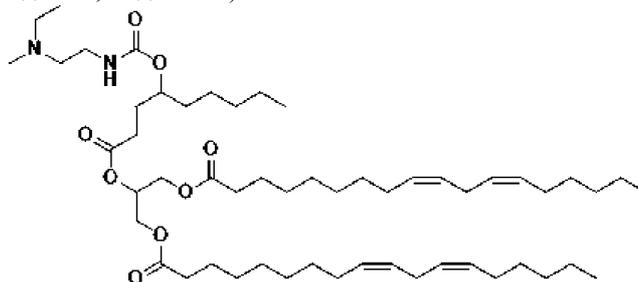


К раствору промежуточного соединения 69b (10 г, 1,0 экв.) в THF (300 мл), толуоле (150 мл) и H₂O (75 мл) добавляли NaBH₄ (5,0 экв.) при 5°C. Смесь перемешивали при 15°C в течение 3 ч в атмосфере N₂. По завершении к реакционной смеси добавляли Na₂SO₄ при 0°C, и полученную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией с получением промежуточного спирта в виде бесцветного масла.

Промежуточный продукт немедленно восстанавливали в DCM (80 мл) с последующим добавлением пиридина (1,67 экв.) и (4-нитрофенил)карбонилхлорида (2 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. По завершении реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (4,05 г, 33%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,26-8,19 (m, 2H), 7,40-7,28 (m, 2H), 5,43-5,11 (m, 9H), 4,80 (tt, J=7,5, 4,4 Гц, 1H), 4,25 (dd, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,09 (dd, J=11,9, 5,8 Гц, 2H), 2,70 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,40 (t, J=7,4 Гц, 2H), 2,33-2,16 (m, 4H), 1,97 (q, J=6,8 Гц, 10H), 1,67 (ddt, J=13,4, 9,9, 4,7 Гц, 1H), 1,55 (dtd, J=15,7, 8,4, 7,4, 4,8 Гц, 5H), 1,43-1,16 (m, 36H), 0,83 (q, J=6,8 Гц, 9H).

Соединение 69: 2-(((4-((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)нонаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

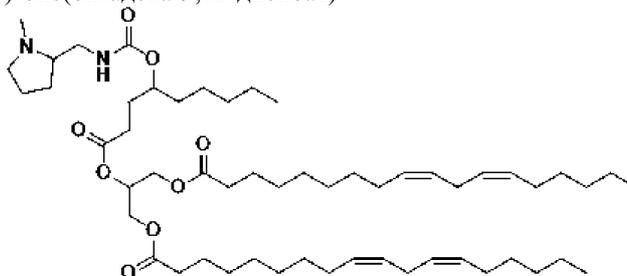


Соединение 69 было получено с выходом 77% из промежуточного соединения 69с и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,35 (pt, $J=8,8, 4,4$ Гц, 8H), 5,25 (p, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,76 (dt, $J=12,3, 6,7$ Гц, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,5$ Гц, 2H), 4,15 (dh, $J=11,4, 5,9$ Гц, 2H), 3,31 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,8$ Гц, 4H), 2,62-2,45 (m, 4H), 2,38 (dt, $J=9,0, 6,2$ Гц, 2H), 2,30 (q, $J=13,0, 10,4$ Гц, 8H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 9H), 1,91 (tt, $J=9,5, 4,5$ Гц, 1H), 1,81 (dt, $J=14,7, 7,8$ Гц, 1H), 1,65-1,43 (m, 7H), 1,40-1,17 (m, 36H), 1,09 (q, $J=8,8, 8,2$ Гц, 3H), 0,88 (q, $J=6,5$ Гц, 9H). MS: 902,6 m/z [M+H].

Пример 70 - соединение 70.

Соединение 70: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)нонаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

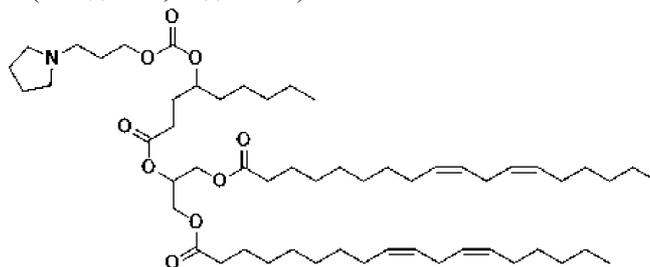


Соединение 70 было получено с выходом 62% из промежуточного соединения 69с и 1-(1-метилпирролидин-2-ил)метанамина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,29 (m, 8H), 5,25 (p, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,5$ Гц, 2H), 4,15 (dq, $J=11,7, 5,8$ Гц, 2H), 3,46 (d, $J=25,9$ Гц, 1H), 3,19 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,8$ Гц, 4H), 2,34 (dt, $J=31,1, 8,3$ Гц, 12H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 8H), 1,99-1,42 (m, 16H), 1,42-1,19 (m, 35H), 0,88 (q, $J=6,8$ Гц, 9H). MS: 914,4 m/z [M+H].

Пример 71 - соединение 71.

Соединение 71: 2-((4-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)нонаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

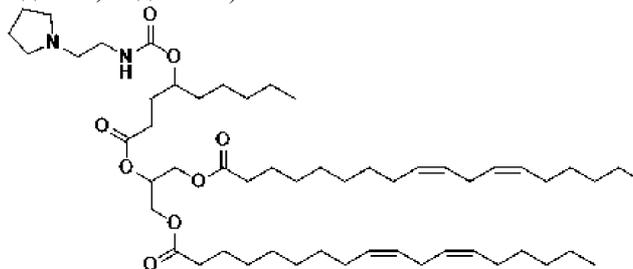


Соединение 71 было получено с выходом 78% из промежуточного соединения 69с и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 5,50-5,28 (m, 8H), 5,25 (p, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,72 (tt, $J=7,8, 4,5$ Гц, 1H), 4,36-4,26 (m, 2H), 4,23-4,11 (m, 4H), 2,77 (t, $J=6,7$ Гц, 4H), 2,41 (dt, $J=15,0, 9,0$ Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,5$ Гц, 5H), 2,05 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 2,00-1,75 (m, 9H), 1,72-1,48 (m, 8H), 1,43-1,20 (m, 35H), 1,00-0,75 (m, 9H). MS: 929,4 m/z [M+H].

Пример 72 - соединение 72.

Соединение 72: 2-((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)нонаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

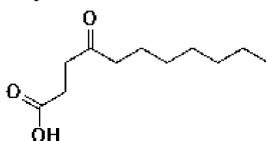


Соединение 72 получали с выходом 72% из промежуточного соединения 69с и 2-(пирролидин-1-ил)этан-1-амина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,49 (s, 1H), 5,34 (dtt, $J=18,0, 6,9, 3,9$ Гц, 8H), 5,25 (p, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (dt, $J=11,6, 5,4$ Гц, 2H), 3,40-3,27 (m, 2H), 2,80-2,50 (m, 11H), 2,45-2,35 (m, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 5H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 9H), 1,97-1,67 (m, 8H), 1,60 (q, $J=7,3$ Гц, 8H), 1,33 (d, $J=26,5$ Гц, 36H), 0,88 (q, $J=6,5$ Гц, 9H). MS: 914,7 m/z [M+H].

Пример 73 - соединение 73.

Промежуточное соединение 73а: 4-оксундекановая кислота

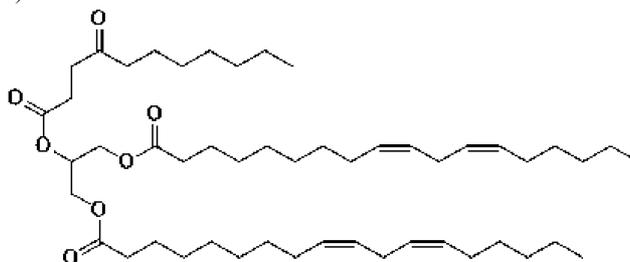


К раствору 5-гептилтетрагидрофуран-2-она (20 г, 1,0 экв.) в 2:1 EtOH/H₂O (400 мл) добавляли NaOH (1,1 экв.). Смесь дегазировали и продували 3 раза N₂, а затем смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N₂. По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и к полученному остатку добавляли 1 н. HCl до pH 3. Полученную суспензию фильтровали, и отфильтрованный осадок концентрировали при пониженном давлении с получением остатка.

Полученный остаток восстанавливали в DCM (200 мл) с последующим добавлением DMP (3 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч. По завершении смесь концентрировали при пониженном давлении, и полученный остаток разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (10 г, 46%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 2,65 (dd, J=7,0, 5,3 Гц, 2H), 2,56 (t, J=6,8 Гц, 2H), 2,37 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,51 (q, J=7,2 Гц, 2H), 1,27-1,13 (m, 8H), 0,86-0,76 (m, 3H).

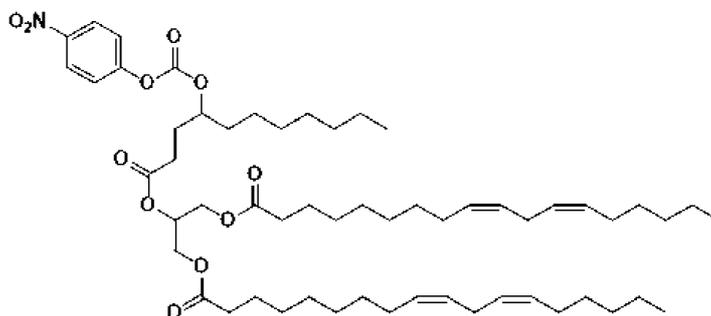
Промежуточное соединение 73b: 2-(((4-оксоундеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 73b было синтезировано с выходом 42% из промежуточного соединения 73 а и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1d.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,28 (dddd, J=12,3, 10,7, 8,7, 5,5 Гц, 8H), 5,21-5,15 (m, 1H), 4,22 (dd, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,13-4,05 (m, 2H), 2,70 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,64 (t, J=6,5 Гц, 2H), 2,52 (t, J=6,5 Гц, 2H), 2,36 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,25 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,02-1,95 (m, 8H), 1,53 (h, J=7,0 Гц, 6H), 1,33-1,16 (m, 37H), 0,81 (td, J=6,8,4,7 Гц, 9H).

Промежуточное соединение 73 с: 2-(((4-((4-нитрофенокси)карбонил)окси)ундеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



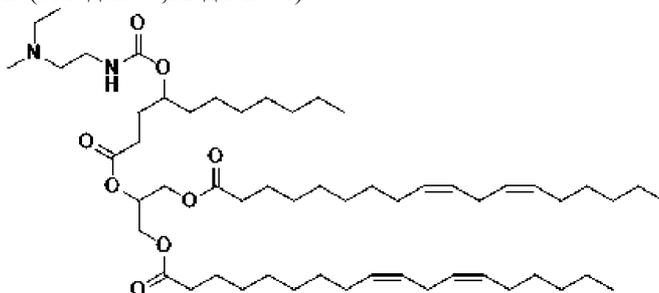
К раствору промежуточного соединения 73b (25 г, 1,0 экв.) в THF (500 мл), толуоле (125 мл) и H₂O (250 мл) при 0°C в атмосфере N₂ добавляли NaBH₄ (5,0 экв.). Смесь перемешивали при 5°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. По завершении остаток выливали в насыщенный раствор NH₄Cl и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением промежуточного спирта в виде бесцветного остатка.

Промежуточный продукт немедленно восстанавливали в DCM (100 мл) с последующим добавлением пиридина (2 экв.) и (4-нитрофенил)карбонилхлоридата (2 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в атмосфере N₂ в течение 5 ч, после чего реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток разбавляли гексаном и фильтровали. Фильтрат промывали 3 раза водой и 1 раз

рассолом, затем сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Очистка колоночной хроматографией дала продукт в виде бесцветного масла (5,2 г, 40%).

^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,28 (d, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,41 (dd, $J=8,6, 6,1$ Гц, 2H), 5,33 (tdd, $J=23,5, 11,3, 6,1$ Гц, 9H), 4,87 (tt, $J=7,7, 4,6$ Гц, 1H), 4,32 (dd, $J=12,0, 4,4$ Гц, 2H), 4,16 (dd, $J=12,0, 5,8$ Гц, 2H), 2,77 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,47 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,39-2,25 (m, 4H), 2,04 (q, $J=6,9$ Гц, 10H), 1,79-1,55 (m, 7H), 1,48-1,15 (m, 36H), 0,89 (t, $J=6,7$ Гц, 9H).

Соединение 73: 2-((4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)ундеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

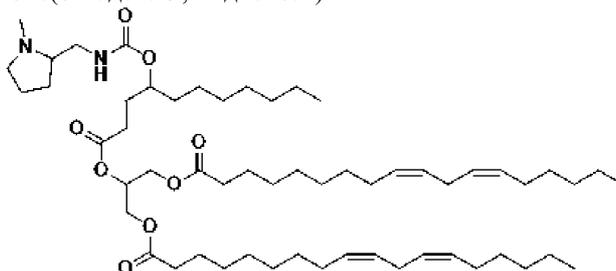


Соединение 73 получали с выходом 53% из промежуточного соединения 73с и (2-аминоэтил)(этил)метиламина, используя метод, примененный для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,47-5,27 (m, 8H), 5,24 (q, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (dt, $J=11,6, 5,4$ Гц, 2H), 3,31 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,7$ Гц, 4H), 2,61-2,35 (m, 6H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 7H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 8H), 1,90 (q, $J=11,5, 9,0$ Гц, 1H), 1,81 (dt, $J=14,5, 7,6$ Гц, 1H), 1,65-1,41 (m, 9H), 1,39-1,19 (m, 38H), 1,10 (s, 3H), 0,88 (q, $J=7,0$ Гц, 9H). MS: 930,3 m/z [M+H].

Пример 74 - соединение 74.

Соединение 74: 2-((4-(((1-метилпирролидин-2-ил)метил)карбамоил)окси)ундеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

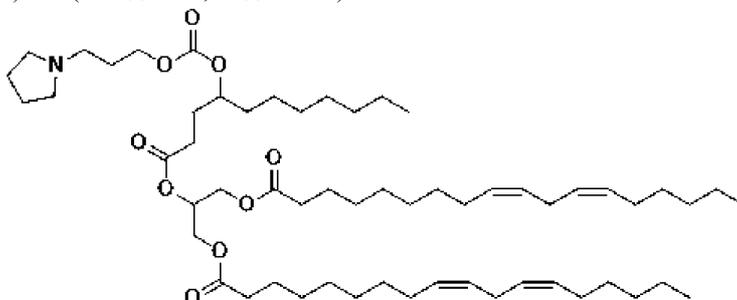


Соединение 74 было получено с выходом 55% из промежуточного соединения 73с и 1-(1-метилпирролидин-2-ил)метанамина, используя метод, примененный для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,34 (dt, $J=18,0, 6,9, 3,8$ Гц, 8H), 5,25 (p, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,81-4,72 (m, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (dt, $J=11,7, 5,2$ Гц, 2H), 3,43 (s, 1H), 3,17 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,8$ Гц, 4H), 2,34 (dt, $J=31,2, 8,3$ Гц, 11H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 8H), 1,99-1,43 (m, 16H), 1,43-1,13 (m, 39H), 0,88 (q, $J=7,7, 7,2$ Гц, 9H). MS: 942,8 m/z [M+H].

Пример 75 - соединение 75.

Соединение 75: 2-((4-(((3-(пирролидин-1-ил)пропокси)карбонил)окси)ундеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

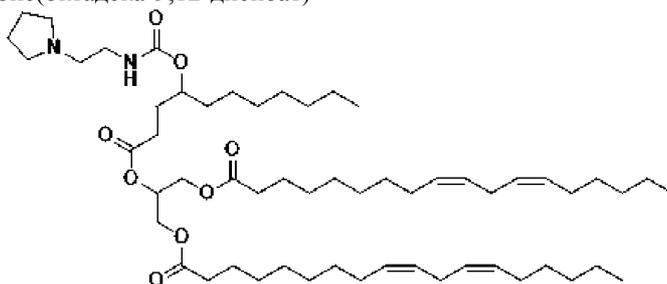


Соединение 75 было получено с выходом 73% из промежуточного соединения 73с и 3-(пирролидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, примененного для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,46-5,28 (m, 8H), 5,25 (p, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,72 (tt, $J=7,8, 4,5$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,22-4,11 (m, 4H), 2,77 (t, $J=6,8$ Гц, 4H), 2,45-2,37 (m, 2H), 2,31 (t, $J=7,5$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 8H), 2,01-1,91 (m, 3H), 1,91-1,78 (m, 5H), 1,67-1,50 (m, 9H), 1,39-1,22 (m, 39H), 0,88 (q, $J=6,6$ Гц, 9H). MS: 957,4 m/z [M+H].

Пример 76 - соединение 76.

Соединение 76: 2-((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)ундеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

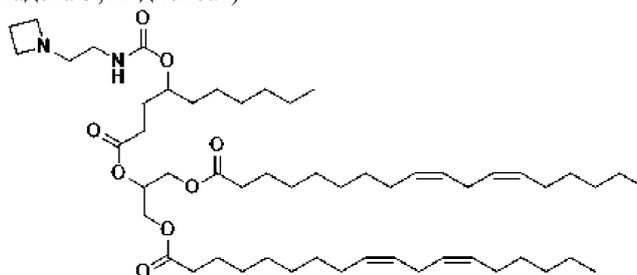


Соединение 76 было получено с выходом 81% из промежуточного соединения 73с и 2-(пирролидин-1-ил)этан-1-амин с использованием метода, примененного для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,56 (s, 1H), 5,46-5,28 (m, 8H), 5,25 (p, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (dt, $J=11,7, 5,5$ Гц, 2H), 3,43-3,31 (m, 2H), 2,77 (t, $J=6,7$ Гц, 1H), 2,45-2,35 (m, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 8H), 1,97-1,74 (m, 7H), 1,69-1,43 (m, 8H), 1,43-1,09 (m, 39H), 0,88 (q, $J=7,0$ Гц, 9H). MS: 943,2 m/z [M+H].

Пример 77 - соединение 77.

Соединение 77: 2-((4-(((2-(азетидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

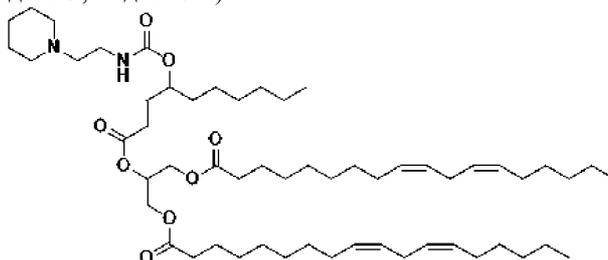


Соединение 77 было получено с выходом 36% из промежуточного соединения 40d и 2-(азетидин-1-ил)этан-1-амин с использованием метода, примененного для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,29 (m, 8H), 5,25 (h, $J=4,6, 4,1$ Гц, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,5, 1,9$ Гц, 2H), 4,15 (ddt, $J=11,9, 5,8, 3,6$ Гц, 2H), 3,74-3,54 (m, 3H), 3,48-3,38 (m, 1H), 3,31 (d, $J=6,3$ Гц, 1H), 2,86 (s, 1H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,41-2,26 (m, 7H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,97-1,87 (m, 2H), 1,87-1,77 (m, 2H), 1,60 (d, $J=7,2$ Гц, 8H), 1,44-1,15 (m, 37H), 0,96-0,84 (m, 9H). MS: 914,7 m/z [M+H].

Пример 78 - соединение 78.

Соединение 78: 2-((4-(((2-(пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

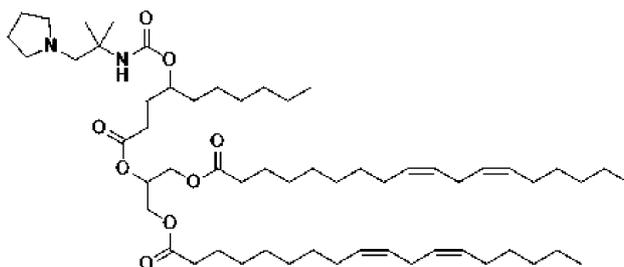


Соединение 78 было получено с выходом 60% из промежуточного соединения 40d и 2-(пиперидин-1-ил)этан-1-амин с использованием метода, примененного для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,47-5,28 (m, 8H), 5,25 (h, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,4, 1,3$ Гц, 2H), 4,15 (dt, $J=11,8, 5,7$ Гц, 2H), 3,42 (s, 2H), 2,80-2,72 (m, 4H), 2,44 (d, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,39 (ddd, $J=8,6, 6,9, 2,5$ Гц, 2H), 2,36-2,27 (m, 5H), 2,05 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,95-1,41 (m, 18H), 1,41-1,20 (m, 37H), 0,96-0,81 (m, 9H). MS: 942,4 m/z [M+H].

Пример 79 - соединение 79.

Соединение 79: 2-((4-(((2-(метил-1-(пирролидин-1-ил)пропан-2-ил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

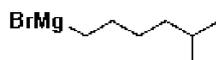


Соединение 79 было получено с выходом 48% из промежуточного соединения 40d и 2-метил-1-(пирролидин-1-ил)пропан-2-амина, используя метод, примененный для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,21 (m, 9H), 4,72 (s, 1H), 4,28 (ddt, $J=11,9, 4,4, 2,2$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 4,6$ Гц, 2H), 2,86-2,49 (m, 8H), 2,39 (td, $J=8,2, 7,4, 2,2$ Гц, 1H), 2,31 (td, $J=7,6, 1,8$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 2,00-1,45 (m, 17H), 1,45-1,03 (m, 41H), 0,98-0,77 (m, 9H). MS: 956,5 m/z [M+H].

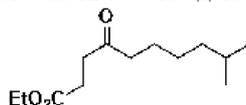
Пример 80 - соединение 80.

Промежуточное соединение 80a: (5-метилгексил)бромид магния.



К раствору Mg (1,63 г, 1,2 эквив.) и I_2 (0,1 эквив.) в ТГФ (100 мл) добавляли 1-бром-5-метилгексан (1,0 эквив.) при 15°C . Смесь перемешивали при 40°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Никаких дальнейших исследований. Реакционную смесь использовали непосредственно на следующей стадии. Бром(5-метилгексил) магний в ТГФ получали в виде серого раствора.

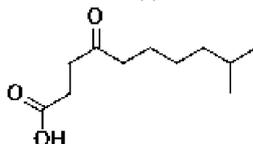
Промежуточное соединение 80b: этил 9-метил-4-оксодеcanoат



К раствору этил 4-хлор-4-оксобутаноата (16 г, 1,0 экв.) в ТГФ (150 мл) добавляли CuI (1,0 экв.) и промежуточное соединение 80a (2,0 экв.) при -78°C . Смесь перемешивали при -78°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . По завершении реакцию смесь гасили водой и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали 2 раза рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта (10 г, выход 45%) в виде бесцветного масла.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,06 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 2,64 (t, $J=6,6$ Гц, 2H), 2,50 (t, $J=6,8$ Гц, 2H), 2,38 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,55-1,45 (m, 3H), 1,28-1,15 (m, 6H), 1,15-1,06 (m, 2H), 0,79 (d, $J=6,6$ Гц, 6H).

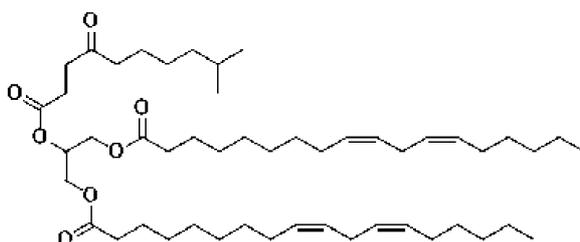
Промежуточное соединение 80c: 9-метил-4-оксодекановая кислота



К раствору промежуточного соединения 80b (10 г, 1,0 эквив.) в EtOH (100 мл) добавляли KOH (3,0 эквив.) при 20°C . Смесь перемешивали при 50°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Затем реакцию смесь концентрировали для удаления EtOH, и pH доводили до 5,5 с помощью HCl (1 M). Полученную смесь разбавляли водой и дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои дважды промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией с получением продукта (4,4 г, 50%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,71 (t, $J=6,8$ Гц, 2H), 2,63 (ddd, $J=7,0, 5,8, 1,1$ Гц, 2H), 2,44 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,53 (dq, $J=19,8, 7,0, 6,6$ Гц, 3H), 1,31-1,24 (m, 2H), 1,16 (dt, $J=8,6, 6,7$ Гц, 2H), 0,85 (d, $J=6,6$ Гц, 6H).

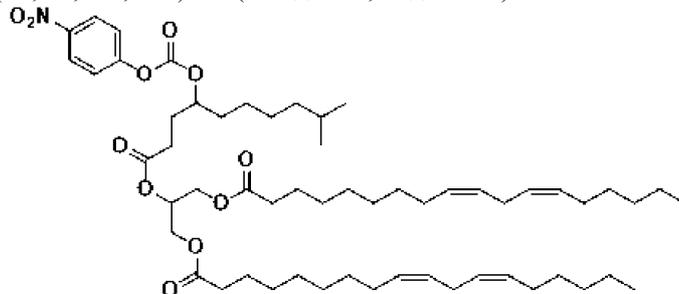
Промежуточное соединение 80d: 2-((9-метил-4-оксодеcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 80d было синтезировано с выходом 40% из промежуточного соединения 80с и промежуточного соединения 1с с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 1d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,28 (m, 8H), 5,24 (p, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,14 (dd, $J=11,9, 5,9$ Гц, 2H), 2,76 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,71 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,59 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,43 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,67-1,50 (m, 8H), 1,39-1,21 (m, 29H), 1,22-1,12 (m, 3H), 0,93-0,82 (m, 12H).

Промежуточное соединение 80e: 2-((9-метил-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)деcanoил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

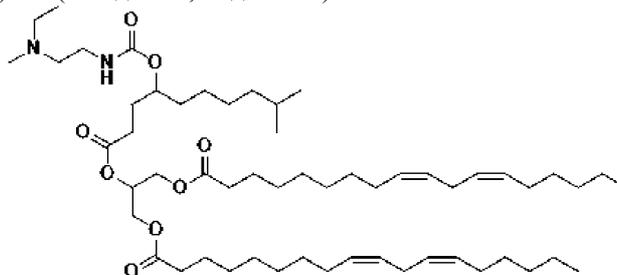


К раствору промежуточного соединения 80d (1,5 г, 1,0 экв.) в THF (30 мл), толуоле (15 мл) и H_2O (7,5 мл) добавляли NaBH_4 (5,0 экв.) при 0°C . Смесь перемешивали при 5°C в течение 5 ч. После полного восстановления реакцию смесь распределяли между THF и H_2O , и полученную органическую фазу отделяли, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением промежуточного спирта в виде желтого масла.

Полученное промежуточное соединение немедленно восстанавливали в DCM (10 мл) с последующим добавлением пиридина (2,0 эквив.) и (4-нитрофенил)карбонхлоридата (2,0 эквив.) при 0°C . Смесь перемешивали при 0°C в течение 5 ч. Затем реакцию смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,25-8,18 (m, 2H), 7,38-7,28 (m, 2H), 5,39-5,15 (m, 9H), 4,80 (tt, $J=7,1, 4,3$ Гц, 1H), 4,25 (dd, $J=12,0, 4,3$ Гц, 2H), 4,13-4,04 (m, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,40 (dd, $J=8,3, 6,6$ Гц, 2H), 2,33-2,19 (m, 4H), 2,05-1,85 (m, 10H), 1,67 (ddt, $J=14,6, 9,4, 4,8$ Гц, 1H), 1,52 (dddq, $J=32,6, 26,2, 13,2, 6,6, 6,1$ Гц, 8H), 1,37-1,17 (m, 30H), 1,11 (dt, $J=9,0, 6,5$ Гц, 2H), 0,94-0,66 (m, 12H).

Соединение 80: 2-(((4-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)-9-метилдеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

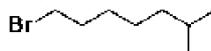


Соединение 80 получали с выходом 68% из промежуточного соединения 80e и (2-аминоэтил)этилметиламина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,22 (m, 9H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=12,0, 4,5, 1,5$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 4,7$ Гц, 2H), 3,37 (s, 3H), 2,77 (td, $J=6,0, 1,3$ Гц, 4H), 2,39 (ddd, $J=8,4, 6,9, 2,4$ Гц, 2H), 2,35-2,28 (m, 5H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,86 (ddt, $J=37,3, 14,4, 7,1$ Гц, 3H), 1,77-1,38 (m, 12H), 1,39-1,19 (m, 34H), 1,15 (d, $J=6,7$ Гц, 3H), 0,94-0,79 (m, 12H). MS: 929,9 m/z [M+H].

Пример 81 - соединение 81.

Промежуточное соединение 81a: 1-бром-6-метилгептан

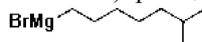


К раствору PPh_3 (66,97 г, 1,33 экв.) в DCM (300 мл) добавляли Br_2 (1,33 экв.) при 0°C . Затем одной порцией добавляли 6-метилгептан-1-ол (1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . По завершении реакцию смесь разбавляли H_2 и отделяли органическую фазу. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Добавляли пентан и выпавший в осадок оксид трифенилфосфина отфильтровывали. Органическую фазу концентрировали при пониженном давлении, получая остаток, который очищали колоночной

хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (30 г, 81%).

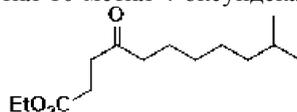
^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 3,41 (td, $J=6,9, 1,1$ Гц, 2H), 1,91-1,79 (m, 2H), 1,59-1,49 (m, 1H), 1,45-1,35 (m, 2H), 1,34-1,25 (m, 3H), 1,21-1,12 (m, 2H), 0,86 (dd, $J=6,6, 1,1$ Гц, 6H).

Промежуточное соединение 81b: (6-метилгептил)бромид магния.



К раствору Mg (4,53 г, 1,2 экв.) и I_2 (0,1 экв.) в THF (300 мл) добавляли промежуточное соединение 81a (1,0 экв.) при 15°C . Смесь перемешивали при 40°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Никаких дальнейших исследований. Реакционную смесь использовали непосредственно на следующей стадии. Бром (6-метилгептил) магний в ТГФ получали в виде серого раствора.

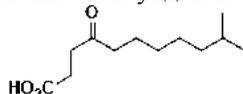
Промежуточное соединение 81c: этил-10-метил-4-оксундеканоат



К раствору этил 4-хлор-4-оксобутаноата (25 г, 1,0 эквив.) и CuI (1,0 эквив.) в ТГФ (200 мл) добавляли промежуточное соединение 81b (1,0 эквив.) при -78°C . Смесь перемешивали при -78°C в течение 5 ч в атмосфере N_2 . Затем реакционную смесь разбавляли водой и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои разделяли, промывали 2 раза рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (10 г, 27%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,06 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 2,64 (t, $J=6,6$ Гц, 2H), 2,50 (t, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,37 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,51 (q, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,43 (dq, $J=13,2, 6,6$ Гц, 1H), 1,26-1,15 (m, 7H), 1,14-1,04 (m, 2H), 0,79 (d, $J=6,6$ Гц, 6H).

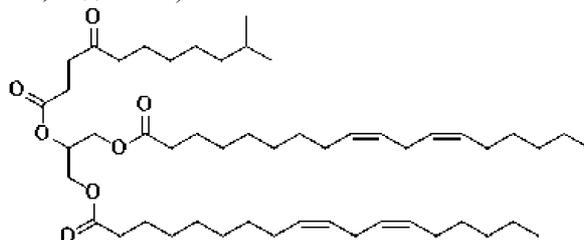
Промежуточное соединение 81d: 10-метил-4-оксундекановая кислота



Смесь Промежуточного соединения 81c (10 г, 1,0 эквив.) и KOH (3,0 эквив.) в EtOH (50 мл) дегазировали и продували 3 раза N_2 , а затем смесь перемешивали при 50°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Смесь концентрировали для удаления EtOH, затем доводили до pH 5,5 с помощью HCl (1 M). Затем реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали 3 раза EtOAc. Объединенные органические слои разделяли, промывали 2 раза рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (4 г, 45%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,65 (t, $J=6,1$ Гц, 2H), 2,56 (ddd, $J=7,1, 5,9, 1,2$ Гц, 2H), 2,37 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,51 (q, $J=7,3$ Гц, 2H), 1,42 (dt, $J=13,2, 6,6$ Гц, 1H), 1,20 (tt, $J=4,9, 2,5$ Гц, 4H), 1,14-1,05 (m, 2H), 0,79 (d, $J=6,6$ Гц, 6H).

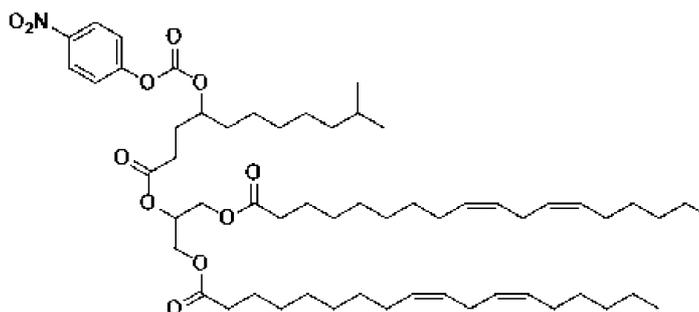
Промежуточное соединение 81e: 2-((10-метил-4-оксоундеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,2'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 81e было синтезировано с выходом 40% из промежуточного соединения 81d и промежуточного соединения 1c, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 1d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,39-5,20 (m, 8H), 5,17 (ddd, $J=10,1, 5,8, 4,3$ Гц, 1H), 4,21 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,07 (dd, $J=11,9, 5,9$ Гц, 2H), 2,69 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,64 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,52 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,36 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,24 (t, $J=7,5$ Гц, 4H), 1,97 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,66-1,46 (m, 7H), 1,33-1,13 (m, 35H), 1,08 (q, $J=6,9$ Гц, 2H), 0,84-0,77 (m, 12H).

Промежуточное соединение 81f: 2-((10-метил-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)ундеcanoил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

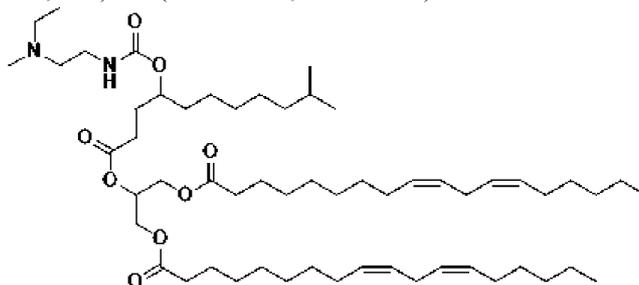


К раствору промежуточного соединения 81e (6 г, 1,0 экв.) в THF (120 мл), толуоле (30 мл) и H₂O (60 мл) добавляли NaBH₄ (5,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 5°C в течение 5 ч. После полного восстановления реакцию смесь распределяли между THF и H₂O, и полученную органическую фазу отделяли, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением промежуточного спирта в виде желтого масла.

Полученное промежуточное соединение немедленно восстанавливали в DCM (10 мл) с последующим добавлением пиридина (2,0 эквив.) и (4-нитрофенил)карбонхлорида (2,0 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Затем реакцию смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (4,3 г, 59%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,27-8,16 (m, 2H), 7,37-7,29 (m, 2H), 5,43-5,12 (m, 9H), 4,80 (s, 1H), 4,25 (dd, J=11,9, 4,4 Гц, 2H), 4,14-4,06 (m, 2H), 2,70 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,40 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,24 (td, J=7,5, 4,1 Гц, 4H), 2,05-1,88 (m, 9H), 1,71-1,62 (m, 1H), 1,62-1,47 (m, 6H), 1,45-0,97 (m, 35H), 0,89-0,66 (m, 12H).

Соединение 81: 2-(((4-(((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)-10-метилундеcanoил)окси)-пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

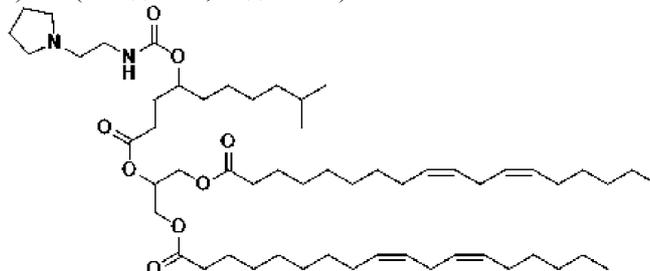


Соединение 81 получали с выходом 85% из промежуточного соединения 81f и (2-аминоэтил)этилметиламина, используя метод, применяемый для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,42-5,21 (m, 9H), 4,76 (s, 1H), 4,33-4,23 (m, 2H), 4,15 (dt, J=11,8, 5,7 Гц, 2H), 3,38 (d, J=40,4 Гц, 3H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,38 (t, J=7,7 Гц, 2H), 2,32 (td, J=7,6, 1,1 Гц, 5H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,96-1,78 (m, 3H), 1,68-1,43 (m, 12H), 1,43-1,20 (m, 36H), 1,14 (d, J=6,6 Гц, 3H), 0,93-0,80 (m, 12H). MS: 944,5 m/z [M+H].

Пример 82 - соединение 82.

Соединение 82: 2-((9-метил-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

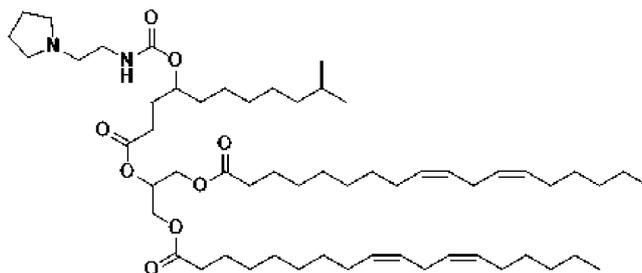


Соединение 82 получали с выходом 86% из промежуточного соединения 80e и 2-(пирролидин-1-ил)этан-1-амина, используя метод, применяемый для примера 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,87 (s, 1H), 5,43-5,23 (m, 9H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, J=12,0, 4,5, 2,6 Гц, 2H), 4,15 (ddd, J=11,9, 5,8, 4,6 Гц, 2H), 3,52-3,42 (m, 2H), 2,94 (s, 5H), 2,82-2,75 (m, 4H), 2,39 (ddd, J=8,4, 6,9, 2,0 Гц, 2H), 2,36-2,29 (m, 4H), 2,05 (q, J=6,8 Гц, 8H), 2,01-1,76 (m, 7H), 1,67-1,45 (m, 8H), 1,40-1,21 (m, 33H), 1,15 (s, 2H), 0,93-0,81 (m, 12H). MS: 942,3 m/z [M+H].

Пример 83 - соединение 83.

Соединение 83: 2-((10-метил-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)ундеcanoил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

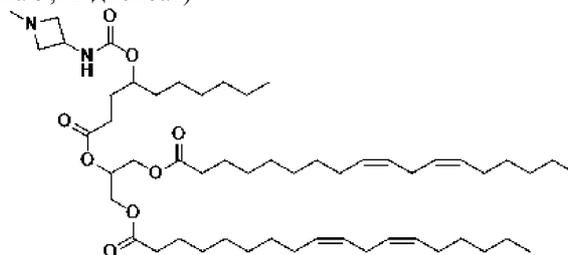


Соединение 83 было получено с выходом 87% из промежуточного соединения 81f и 2-(пирролидин-1-ил)этан-1-амина, используя метод, применяемый для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,99 (s, 1H), 5,45-5,19 (m, 9H), 4,76 (s, 1H), 4,28 (ddd, $J=11,9, 4,5, 3,2$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 4,7$ Гц, 2H), 3,50 (d, $J=6,3$ Гц, 2H), 2,99 (s, 5H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,39 (ddd, $J=8,2, 6,9, 1,8$ Гц, 2H), 2,35-2,28 (m, 4H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 2,02-1,77 (m, 7H), 1,66-1,43 (m, 8H), 1,41-1,20 (m, 35H), 1,14 (d, $J=6,7$ Гц, 2H), 0,95-0,81 (m, 12H). MS: 956,5 m/z [M+H].

Пример 84 - соединение 84.

Соединение 84: 2-((4-(((1-метилазетидин-3-ил)карбамоил)окси)деcanoил)-окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

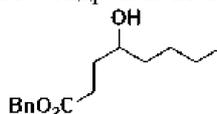


Соединение 84 было получено с выходом 87% из промежуточного соединения 40d и 1-метилазетидин-3-амина с использованием метода, применяемого для примера 1.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,28 (m, 8H), 5,23 (p, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,77 (d, $J=7,0$ Гц, 1H), 4,46 (s, 1H), 4,28 (dt, $J=10,9, 5,2$ Гц, 2H), 4,16 (ddd, $J=8,7, 5,6, 2,8$ Гц, 2H), 3,99 (s, 2H), 3,81 (s, 2H), 2,77 (t, $J=6,7$ Гц, 4H), 2,65 (s, 2H), 2,40-2,29 (m, 6H), 2,05 (q, $J=7,0$ Гц, 8H), 1,93 (dtd, $J=15,1, 7,6, 3,8$ Гц, 1H), 1,83 (q, $J=7,4$ Гц, 1H), 1,66-1,44 (m, 7H), 1,40-1,17 (m, 37H), 0,88 (q, $J=7,0$ Гц, 9H). MS: 900,4 m/z [M+H].

Пример 85 - соединение 85

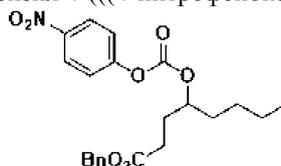
Промежуточное соединение 85a: бензил-4-гидроксиоктаноат



К раствору 5-бутилтетрагидрофуран-2-она (20 г, 1,0 экв.) в H_2O (50 мл) добавляли NaOH (5,63 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления H_2O .

Полученный остаток восстанавливали в ДМФ (100 мл) с последующим добавлением VnBr (14,08 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. Затем реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления ДМФ. Остаток разбавляли H_2O (150 мл) и экстрагировали 3× EtOAc, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (15 г, 43%).

Промежуточное соединение 85b: бензил 4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)октаноат

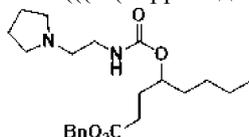


К смеси промежуточного соединения 85a (15 г, 1,0 эквив.) в DCM (150 мл) добавляли (4-нитрофенил)карбонилхлорид (32,21 г, 5,0 эквив.) в атмосфере N_2 , а затем в смесь был добавлен пиридин (5,16 мл, 2,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток разбавляли гексаном и фильтровали. Фильтрат промывали 3 раза H_2O . Органический слой промывали 1 раз соле-

вым раствором, сушили над Na_2SO_4 и фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (12 г, 48%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,31-8,17 (m, 2H), 7,42-7,30 (m, 6H), 5,13 (s, 2H), 4,87 (qd, $J=7,6$, 4,8 Гц, 1H), 2,50 (t, $J=7,4$ Гц, 2H), 2,11 (dtd, $J=15,3$, 7,8, 4,0 Гц, 1H), 2,00 (dt, $J=14,7$, 7,6 Гц, 1H), 1,82-1,69 (m, 1H), 1,63 (ddt, $J=14,3$, 8,5, 5,0 Гц, 1H), 1,45-1,27 (m, 4H), 1,01-0,83 (m, 3H).

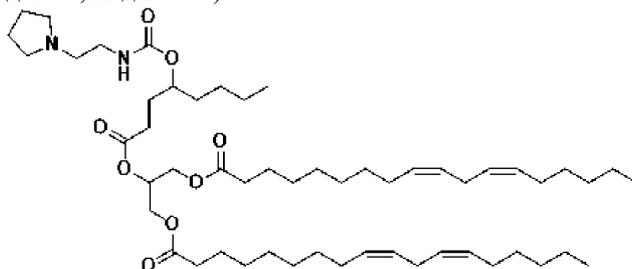
Промежуточное соединение 85с: бензил 4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)октаноат



К раствору промежуточного соединения 85b (4 г, 2,0 эквив.) и 2-пирролидин-1-илэтанамина (550 мг, 1,0 эквив.) в MeCN (20 мл) добавляли DMAP (59 мг, 0,1 эквив.), затем пиридин (1,17 мл, 3,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления MeCN (20 мл). Остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (1,8 г, 48%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,32-7,23 (m, 5H), 5,03 (d, $J=10,2$ Гц, 3H), 4,69 (s, 1H), 3,23 (dq, $J=18,7$, 5,9 Гц, 3H), 2,70 (s, 2H), 2,60-2,40 (m, 7H), 2,34 (td, $J=8,3$, 7,6, 2,7 Гц, 2H), 1,87 (d, $J=10,5$ Гц, 1H), 1,70 (t, $J=3,8$ Гц, 6H), 1,44 (d, $J=24,4$ Гц, 2H), 1,22 (q, $J=11,9$ Гц, 4H), 0,80 (t, $J=4,2$ Гц, 3H).

Соединение 85: 2-((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



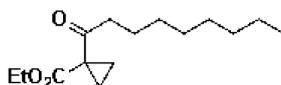
К раствору промежуточного соединения 85с (1,8 г, 1,0 эквив.) в ТГФ (9 мл) добавляли Pd/C (0,5 г, 10% мас./мас.) в атмосфере Ar. Смесь продували 3× H_2 , а затем смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере H_2 (15 фунтов на квадратный дюйм). Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении для удаления ТГФ.

Полученный неочищенный материал растворяли в DCM (10 мл) с последующим добавлением DMAP (65 мг, 0,16 эквив.), DIPEA (1,74 мл, 3,0 эквив.) и EDCI (638 мг, 1,0 эквив.). Затем добавляли промежуточное соединение 1с (2,05 г, 1,0 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM. Остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 2× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (1,1 г, 50%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,39-5,21 (m, 7H), 5,18 (p, $J=5,0$ Гц, 1H), 5,09 (s, 1H), 4,76-4,65 (m, 1H), 4,22 (dd, $J=12,0$, 4,4 Гц, 2H), 4,08 (ddd, $J=11,9$, 5,9, 3,4 Гц, 2H), 3,21 (q, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,51 (t, $J=6,1$ Гц, 2H), 2,43 (d, $J=5,8$ Гц, 4H), 2,32 (ddd, $J=8,9$, 6,6, 3,9 Гц, 2H), 2,25 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,98 (q, $J=6,9$ Гц, 7H), 1,91-1,66 (m, 6H), 1,63-1,35 (m, 8H), 1,25 (tq, $J=7,2$, 4,6, 3,6 Гц, 30H), 0,82 (t, $J=6,7$ Гц, 9H). MS: 900,4 m/z [M+H].

Пример 86 - соединение 86.

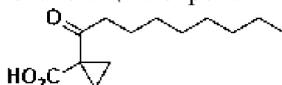
Промежуточное соединение 86а: этил 1-нонаноилциклопропан-1-карбоксилат



К раствору диэтилциклопропан-1,1-дикарбоксилата (15 г, 1,0 экв.) в ТГФ (200 мл) по каплям добавляли раствор бром(октил)магния (2 М, 40,28 мл, 1,0 экв.) при -78°C под N_2 . Реакционную смесь перемешивали при -78°C в течение 5 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь выливали в водн. NH_4Cl . Водную фазу экстрагировали 3 раза этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали рассолом, сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью другой порции колоночной хроматографии с получением продукта в виде бесцветного масла (20 г, 48%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,13 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 2,75 (t, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,57-1,49 (m, 2H), 1,35 (s, 4H), 1,21 (dd, $J=8,7, 5,5$ Гц, 16H), 0,81 (t, $J=6,9$ Гц, 6H).

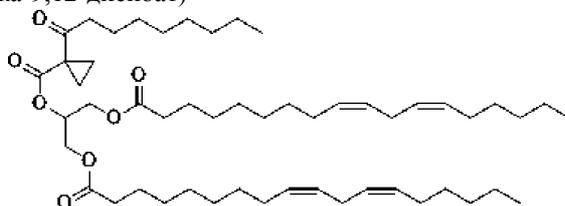
Промежуточное соединение 86b: 1-нонаноилциклопропан-1-карбоновая кислота



К раствору промежуточного соединения 86a (10 г, 1,0 эквив.) в EtOH (60 мл) и H_2O (30 мл) добавляли NaOH (2,36 г, 1,5 эквив.) и LiOH (1,41 г, 1,5 эквив.) под N_2 . Затем смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток доводили до pH 3, добавляя 2 н. HCl. Затем смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . Смесь экстрагировали 3 раза EtOAc. Объединенную органическую фазу промывали рассолом, сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Собранный продукт в виде бесцветного масла (5 г, 28%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,25 (t, $J=7,3$ Гц, 2H), 1,96 (q, $J=4,4$ Гц, 2H), 1,71 (q, $J=4,4$ Гц, 2H), 1,64-1,55 (m, 2H), 1,26 (d, $J=3,7$ Гц, 11H), 0,87 (t, $J=6,8$ Гц, 3H).

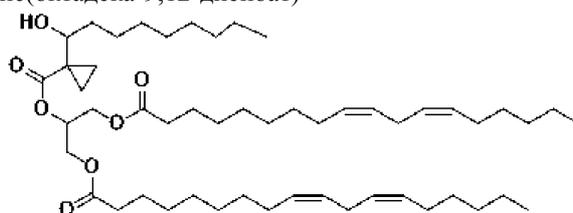
Промежуточное соединение 86c: 2-((1-нонаноилциклопропан-1-карбонил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 86b (6 г, 1,0 экв.), промежуточное соединение 1C (16,36 г, 1,0 эквив.), EDCI (6,10 г, 1,5 эквив.) и DMAP (324 мг, 0,1 эквив.) в DCM (60 мл) добавляли Et_3N (5,54 мл, 1,5 эквив.) при 0°C . Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Затем его выливали в воду и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенную органическую фазу промывали рассолом, сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (8 г, 37%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,28 (dt, $J=15,4, 10,8, 5,8$ Гц, 8H), 4,26 (dd, $J=12,1, 4,1$ Гц, 2H), 4,08 (dd, $J=12,0, 6,1$ Гц, 2H), 2,76 (t, $J=7,4$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,24 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,98 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,54 (p, $J=7,0$ Гц, 9H), 1,43-1,33 (m, 4H), 1,33-1,15 (m, 40H), 0,85-0,79 (m, 9H).

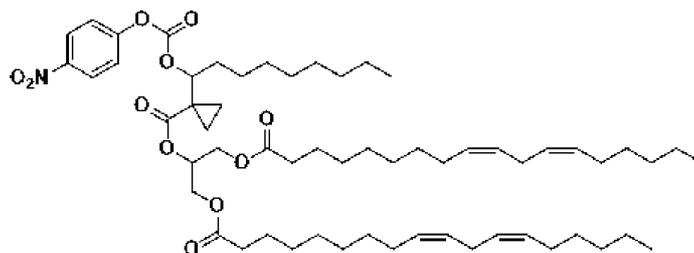
Промежуточное соединение 86d: 2-((1-(1-гидроксинонил)циклопропан-1-карбонил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Раствор промежуточного соединения 86c (8 г, 1,0 экв.) в 4:2:1 ТГФ/вода/толуол (0,05-0,1 М) охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$ с последующим добавлением NaBH_4 (5,0 экв.). Реакцию поддерживали при $0-25^\circ\text{C}$ не менее 2 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой и EtOAc, и полученную двухфазную смесь экстрагировали $3 \times$ EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (EtOAc/гексаны) с получением продукта в виде бесцветного масла (4 г, 50%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,33 (tdq, $J=20,3, 10,0, 5,6, 4,9$ Гц, 9H), 4,28 (dt, $J=12,0, 4,0$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=12,1, 8,0, 6,0$ Гц, 2H), 3,18-3,12 (m, 1H), 2,77 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,68 (s, 1H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,68-1,48 (m, 9H), 1,40-1,16 (m, 43H), 0,98 (ddd, $J=10,7, 6,7, 4,1$ Гц, 1H), 0,93-0,84 (m, 9H), 0,81 (ddd, $J=9,7, 6,8, 4,2$ Гц, 1H).

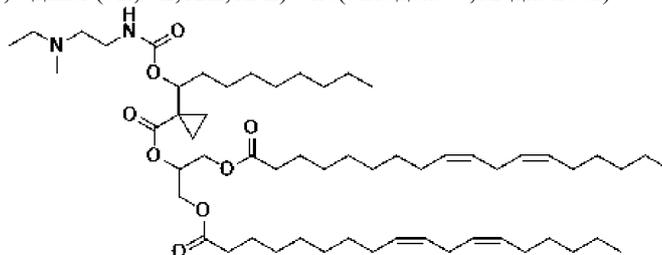
Промежуточное соединение 86e: 2-((1-(1-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)нонил)циклопропан-1-карбонил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 86d (4 г, 1,0 эквив.) в DCM (40 мл) добавляли (4-нитрофенил)карбонхлоридат (1,95 г, 2,0 эквив.), пиридин (781 мкл, 2,0 эквив.) при 0°C. Затем реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток восстанавливали петролейным эфиром и фильтровали. Фильтрат промывали H₂O. Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта (2,8 г, 59%) в виде бесцветного масла.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,25-8,16 (m, 2H), 7,36-7,26 (m, 2H), 5,27 (tdd, J=17,5, 8,5, 4,0 Гц, 9H), 4,84 (dd, J=9,1, 4,4 Гц, 1H), 4,24 (dt, J=11,9, 3,8 Гц, 2H), 4,08 (dd, J=11,8, 5,8 Гц, 2H), 2,70 (t, J=6,3 Гц, 4H), 2,23 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,02-1,93 (m, 8H), 1,82 (qd, J=9,4, 4,9 Гц, 1H), 1,69 (ddt, J=14,4, 10,0, 5,1 Гц, 1H), 1,53 (t, J=7,2 Гц, 5H), 1,35-1,16 (m, 41H), 1,07-1,01 (m, 1H), 0,95-0,89 (m, 1H), 0,81 (td, J=6,8, 3,8 Гц, 9H).

Соединение 86: 2-((1-(1-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)нонил)циклопропан-1-карбонил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

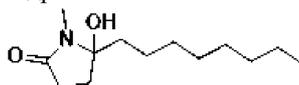


Соединение 86 было синтезировано с выходом 90% из промежуточного соединения 86e и N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, примененного в примере 1.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,53-5,22 (m, 9H), 4,75 (dd, J=8,7, 4,5 Гц, 1H), 4,29 (ddd, J=22,5, 11,8, 4,3 Гц, 2H), 4,14 (dd, J=11,9, 5,9 Гц, 2H), 3,30 (s, 2H), 2,77 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,54 (d, J=13,7 Гц, 4H), 2,38-2,21 (m, 7H), 2,05 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,60 (t, J=7,4 Гц, 4H), 1,40-1,17 (m, 40H), 1,12-1,00 (m, 4H), 0,91-0,85 (m, 9H). MS: 956,1 m/z [M+H].

Пример 87 - соединение 87.

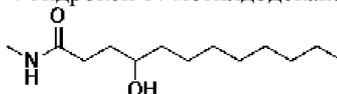
Промежуточное соединение 87a: 5-гидрокси-1-метил-5-октилпирролидин-2-он



К раствору 1-метилпирролидин-2,5-диона (20 г, 1,0 экв.) в ТГФ (150 мл) добавляли бром(октил)магний (1 M, 265 мл, 1,5 экв.) по каплям при 15°C под N₂. Смесь перемешивали при 15°C в течение 12 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь гасили добавлением NH₄Cl при 0°C. Затем его разбавляли H₂O и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (20 г, 50%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 3,75 (s, 1H), 2,68 (s, 3H), 2,43 (ddd, J=16,4, 10,0, 6,4 Гц, 1H), 2,24 (ddd, J=16,7, 10,0, 4,5 Гц, 1H), 2,13 (ddd, J=13,6, 10,0, 6,4 Гц, 1H), 1,93 (ddd, J=14,0, 10,0, 4,7 Гц, 1H), 1,73 (td, J=13,4, 3,7 Гц, 1H), 1,65-1,53 (m, 1H), 1,35-1,07 (m, 12H), 0,88-0,76 (m, 3H).

Промежуточное соединение 87b: 4-гидрокси-N-метилдодеканамид

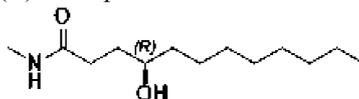


К раствору промежуточного соединения 87a (15 г, 1,0 экв.) в MeOH (150 мл) порциями добавляли NaBH₄ (4,99 г, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили добавлением NH₄Cl при 0°C, затем ее разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (8 г, 53%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,93 (s, 1H), 3,60-3,50 (m, 1H), 3,11 (s, 1H), 2,73 (d, J=4,8 Гц, 3H), 2,36-

2,20 (m, 2H), 1,78 (dddd, J=14,3, 7,7, 6,5, 3,1 Гц, 1H), 1,58 (ddt, J=13,8, 8,9, 6,7 Гц, 1H), 1,46-1,09 (m, 14H), 0,87-0,77 (m, 3H).

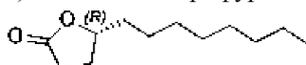
Промежуточные продукты 87с: (R)-4-гидрокси-N-метилдодеканамид



К раствору промежуточного соединения 87b (1,0 экв.) в Et₂O (0,2-1 М) добавляли Novozym 435 (0,89 экв.) и винилацетат (2,0 экв.). Смесь перемешивали при 40°C в течение 96 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией. Материал, собранный из колонки, трижды подвергали указанным выше условиям реакции с получением (R)-88с в виде желтого твердого вещества (выход 24%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,57 (s, 1H), 3,54 (tt, J=7,7, 3,6 Гц, 1H), 2,74 (d, J=4,8 Гц, 3H), 2,64 (d, J=4,6 Гц, 1H), 2,28 (td, J=6,9, 3,2 Гц, 2H), 1,79 (dtd, J=14,3, 7,0, 3,1 Гц, 1H), 1,60 (ddd, J=14,3, 8,8, 6,8 Гц, 2H), 1,47-1,12 (m, 14H), 0,87-0,74 (m, 3H).

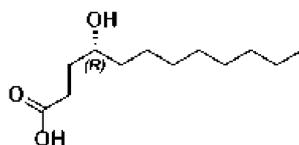
Промежуточное соединение 87d: (R)-5-октилдигидрофуран-2(3H)-он



К раствору промежуточного соединения 87d (1,0 экв.) в MeOH (0,1-1,0 М) добавляли NaOH (10 экв.). Смесь перемешивали при 80°C в течение не менее 2 ч, после чего добавляли HCl (1-2 М, 10,0 эквив.), и смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. Затем реакционную смесь разбавляли H₂O и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла.

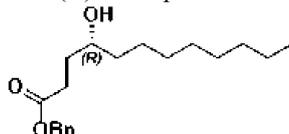
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,41 (p, J=6,9 Гц, 1H), 2,46 (dd, J=9,5, 6,8 Гц, 2H), 2,25 (dq, J=13,4, 6,7 Гц, 1H), 1,78 (dq, J=12,7, 9,3 Гц, 1H), 1,72-1,62 (m, 1H), 1,60-1,47 (m, 1H), 1,45-1,10 (m, 14H), 0,81 (t, J=6,6 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 87e: (R)-4-гидроксидодекановая кислота



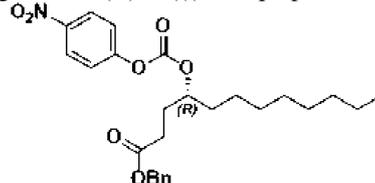
К раствору промежуточного соединения 87d (1,0 экв.) в H₂O (0,1-0,5 М) добавляли NaOH (1,0-1,5 экв.). Смесь перемешивали при 20°C не менее 12 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

Промежуточное соединение 88f: бензил (R)-4-гидроксидодеканоат



К раствору промежуточного соединения 87e (1,0 экв.) в ацетоне (0,3 М) добавляли VnBr (1,0-1,5 экв.) и ТВАВ (0,05 экв.). Смесь перемешивали при 60°C не менее 12 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток либо (1) очищали колоночной хроматографией, либо (2) разбавляли насыщ. NaHCO₃, трижды экстрагировали EtOAc, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали перед очисткой с помощью колоночной хроматографии. Оба метода дали продукт в виде желтого масла (выход 54%).

Промежуточное соединение 87g: бензил(R)-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)додеканоат

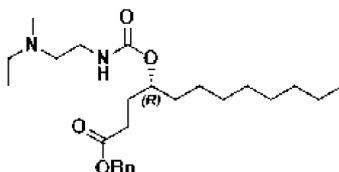


К раствору промежуточного соединения 87f (1,0 эквив.) и (4-нитрофенил)карбонхлоридата (3,0 эквив.) в DCM (0,3-1,2 М) добавляли пиридин (3,0 эквив.) при 0-20°C. Смесь перемешивали при 20°C не менее 1 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток либо (1) очищали колоночной хроматографией, либо (2) использовали на следующей стадии без допол-

нительной очистки. Продукт собирали в виде бледно-желтого масла (36%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,22-8,13 (m, 2H), 7,29 (d, $J=2,0$ Гц, 2H), 5,06 (s, 2H), 4,80 (tt, $J=7,6, 4,5$ Гц, 1H), 2,43 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,04 (ddt, $J=15,3, 7,8, 3,9$ Гц, 1H), 1,92 (dq, $J=14,8, 7,4$ Гц, 1H), 1,71-1,61 (m, 1H), 1,55 (ddd, $J=14,3, 9,1, 5,2$ Гц, 1H), 1,36-1,13 (m, 11H), 0,81 (t, $J=6,6$ Гц, 3H).

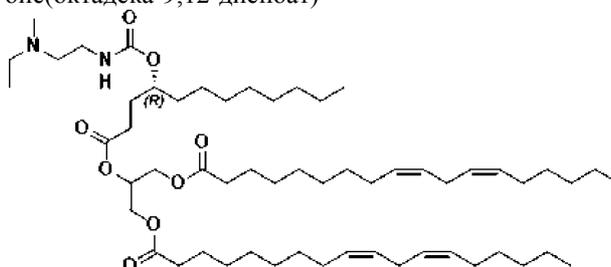
Промежуточное соединение 87h: бензил (R)-4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)-окси)додеканат



К раствору промежуточного соединения 87 г (1,0 эквив.) и N'-этил-N'-метилэтан-1,2-диамина (3,0 эквив.) в MeCN (0,1-0,2 M) добавляли пиридин (3,0 эквив.) и DMAP (1,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (88%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,60-7,23 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,77-4,64 (m, 1H), 3,15 (t, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,36 (ddt, $J=12,3, 8,2, 4,3$ Гц, 5H), 2,13 (s, 3H), 1,96-1,70 (m, 3H), 1,55-1,33 (m, 2H), 1,29-1,10 (m, 13H), 0,96 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,80 (t, $J=6,7$ Гц, 4H).

Соединение 87: 2-(((R)-4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)додеканойл)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 87h (1,0 эквив.) в ТГФ (0,1-0,3 M) добавляли Pd/C (10% мас./мас., 1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 15-20°C в течение 5 ч в атмосфере H_2 (15 фунтов на квадратный дюйм). По завершении реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка.

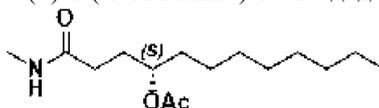
К раствору остатка и промежуточного соединения 1с (1,0 эквив.) в DCM (10 мл) добавляли EDCI (1,0 эквив.), DMAP (0,1 эквив.) и Et_3N (1,05 эквив.). Смесь перемешивали при 15-20°C в течение не менее 12 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM. Остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3x EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бледно-желтого масла (61%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,40-5,14 (m, 8H), 5,08 (s, 1H), 4,69 (s, 1H), 4,21 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,08 (ddd, $J=12,0, 5,9, 3,3$ Гц, 2H), 3,17 (q, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,43-2,28 (m, 5H), 2,24 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,14 (s, 3H), 1,98 (q, $J=6,8$ Гц, 7H), 1,79 (ddd, $J=42,6, 15,1, 7,5$ Гц, 3H), 1,53 (q, $J=7,6$ Гц, 8H), 1,33-1,06 (m, 37H), 0,97 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,81 (q, $J=6,3$ Гц, 9H).

MS: 944,1 m/z [M+H].

Пример 88 - соединение 88.

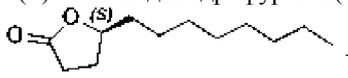
Промежуточное соединение 88a: (S)-1-(метиламино)-1-оксододекан-4-илацетат



Промежуточное соединение 88a было синтезировано с выходом 23% из промежуточного соединения 87b, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 87c.

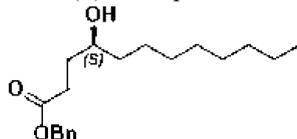
^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,81 (s, 1H), 4,79 (tq, $J=8,5, 3,8$ Гц, 1H), 2,73 (d, $J=4,8$ Гц, 3H), 2,17-2,03 (m, 2H), 1,98 (s, 3H), 1,95-1,63 (m, 3H), 1,56-1,36 (m, 2H), 1,19 (d, $J=8,4$ Гц, 11H), 0,81 (t, $J=6,8$ Гц, 3H).

Промежуточное соединение 88b: (S)-5-октилдигидрофуран-2(3H)-он



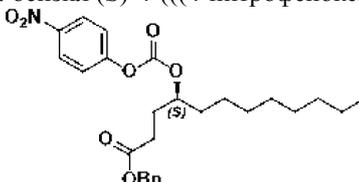
Промежуточное соединение 88b получали из промежуточного соединения 88a с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 87d.

Промежуточное соединение 88с: бензил (S)-4-гидроксидодеканоат



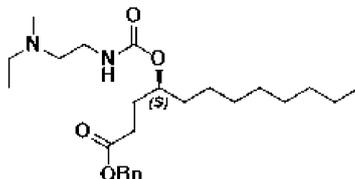
Промежуточное соединение 88с получали из промежуточного соединения 88b с использованием способов, используемых для промежуточного соединения 87е и 87f.

Промежуточное соединение 88d: бензил (S)-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)додеканоат



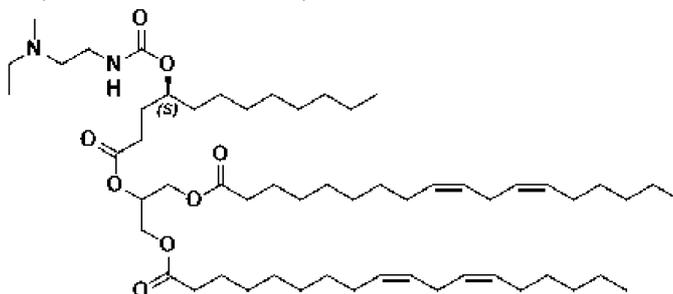
Промежуточное соединение 88d получали из промежуточного соединения 88с, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 88g.

Промежуточное соединение 88е: бензил (S)-4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)додеканоат



Промежуточное соединение 88е было синтезировано с выходом 47% из промежуточного соединения 88с, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 87h.

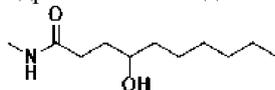
Соединение 88: 2-(((S)-4-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Соединение 88 было синтезировано с выходом 42% из промежуточного соединения 88d, используя метод, применяемый для соединения 87.

Пример 89 - соединение 89.

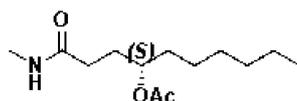
Промежуточное соединение 89а: 4-гидрокси-N-метилдеканамид



К смеси гидрохлорида метанамина (19,83 г, 2,0 экв.) в DCM (250 мл) добавляли AlMe_3 (2 М, 152,72 мл, 2,08 экв.) по каплям при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Затем этот раствор по каплям добавляли к раствору 5-гексилтетрагидрофуран-2-она (25 г, 1,0 эквив.) в DCM (100 мл) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь гасят, добавляя HCl (1 н.) при 0°C. Органический слой отделяли, а водный слой трижды экстрагировали DCM. Объединенную органическую фазу промывали 3 раза рассолом, сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (67%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 3,50 (td, $J=7,7, 3,8$ Гц, 1H), 2,70 (s, 3H), 2,29 (ddt, $J=25,9, 16,6, 6,8$ Гц, 2H), 1,77 (dddd, $J=13,3, 9,2, 6,8, 3,9$ Гц, 1H), 1,66-1,55 (m, 1H), 1,42 (h, $J=4,0$ Гц, 3H), 1,39-1,25 (m, 8H), 0,95-0,87 (m, 3H).

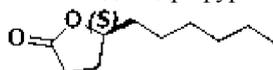
Промежуточное соединение 89b: (S)-1-(метиламино)-1-оксодекан-4-ил ацетат



Промежуточное соединение 89b было синтезировано с выходом 23% с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 87с.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,70 (s, 1H), 4,79 (tt, $J=8,4, 4,4$ Гц, 1H), 2,74 (d, $J=4,8$ Гц, 3H), 2,11 (dp, $J=21,3, 7,7, 7,2$ Гц, 2H), 1,98 (s, 3H), 1,86 (tdd, $J=13,6, 6,7, 3,2$ Гц, 1H), 1,81-1,70 (m, 1H), 1,45 (ddp, $J=19,0, 13,6, 6,6, 6,1$ Гц, 2H), 1,27-1,12 (m, 8H), 0,80 (t, $J=6,7$ Гц, 3H).

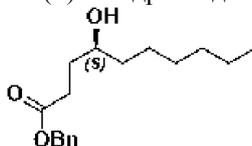
Промежуточное соединение 89с: (S)-5-гексилдигидрофуран-2(3H)-он



Промежуточное соединение 89с было синтезировано с выходом 78% из промежуточного соединения 89b с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 87d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,48 (ddd, $J=13,7, 7,5, 5,6$ Гц, 1H), 2,52 (dd, $J=9,5, 6,9$ Гц, 2H), 2,31 (dq, $J=13,4, 6,7$ Гц, 1H), 1,91-1,80 (m, 1H), 1,80-1,68 (m, 1H), 1,58 (dq, $J=13,8, 5,2$ Гц, 1H), 1,51-1,21 (m, 8H), 0,87 (t, $J=6,6$ Гц, 3H).

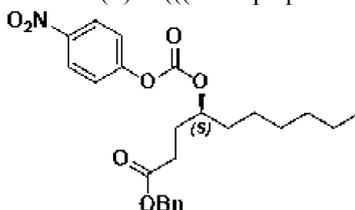
Промежуточное соединение 89d: бензил (S)-4-гидроксидеканоат



К раствору промежуточного соединения 89с (3 г, 1,0 эквив.) в EtOH (25 мл) и H_2O (5 мл) добавляли NaOH (1,1 эквив.) в атмосфере N_2 . Затем смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя.

Полученный остаток подвергали методу, использованному в промежуточном соединении 87f, с получением продукта в виде бесцветного масла (3 г, 50%).

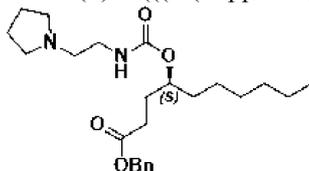
Промежуточное соединение 89е: бензил (S)-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)деcanoат



К раствору промежуточного соединения 89d (3 г, 1,0 эквив.) в DCM (30 мл) добавляли (4-нитрофенил)карбонилхлоридат (3,26 г, 1,5 эквив.) в атмосфере N_2 . Затем к смеси добавляли пиридин (1,74 мл, 2,0 эквив.) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток разбавляли гексаном и фильтровали. Фильтрат промывали 3 раза H_2O . Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (2 г, 42%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,23-8,13 (m, 2H), 7,37-7,18 (m, 7H), 5,39 (s, 1H), 5,03 (s, 2H), 4,47 (s, 1H), 4,00 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 2,42 (t, $J=7,1$ Гц, 2H), 2,00 (ddt, $J=15,0, 7,6, 3,8$ Гц, 1H), 1,85 (dt, $J=14,7, 7,3$ Гц, 1H), 1,57 (ddt, $J=21,1, 14,0, 6,8$ Гц, 2H), 1,35-1,16 (m, 8H), 0,91-0,75 (m, 3H).

Промежуточное соединение 89f: бензил (S)-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoат

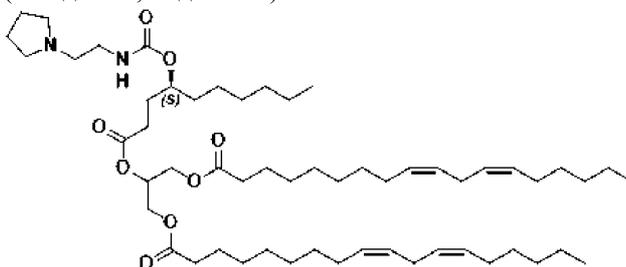


К раствору промежуточного соединения 89е (1,5 г, 1,0 экв.) в MeCN (15 мл) добавляли 2-пирролидин-1-илэтанамин (1,16 г, 3,0 экв.), пиридин (819 мкл, 3,0 экв.), DMAP (413 мг, 1,0 экв.) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 20°C в течение 5 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток разбавляли EtOAc и промывали 5 раз 1 н. NaHCO_3 и 3 раза H_2O . Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматогра-

фией с получением продукта в виде бледно-желтого масла (0,65 г, 41%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,41-7,26 (m, 5H), 5,11 (d, $J=1,1$ Гц, 2H), 4,73 (dd, $J=10,9, 5,7$ Гц, 1H), 3,26 (dd, $J=6,7, 1,7$ Гц, 2H), 2,79-2,57 (m, 7H), 2,41 (t, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,99-1,74 (m, 7H), 1,53 (s, 3H), 1,36-1,24 (m, 9H), 0,92-0,86 (m, 3H).

Соединение 89: 2-(((S)-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



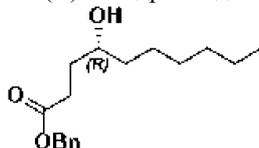
К суспензии Pd/C (10% мас./мас., 1,0-3,0 экв.) в ТГФ (0,2-0,5 М) добавляли промежуточное соединение 89f (1,0 экв.). Смесь перемешивали при 15-25°C в течение не менее 5 ч в атмосфере H_2 . Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде густого коричневого масла.

Коричневое масло немедленно восстанавливали в DCM (0,2-0,5 М) с последующим добавлением промежуточного соединения 1c (1,0 эквив.), EDCI (1,2 эквив.), DMAP (0,1-0,2 эквив.) и Et_3N (1,5 эквив.) при 0°C под N_2 . Смесь перемешивали при 20°C в течение не менее 12 ч в атмосфере N_2 . Смесь разбавляли H_2O и экстрагировали 3× EtOAc . Объединенную органическую фазу промывали рассолом, сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (23%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,49-5,22 (m, 8H), 5,18 (t, $J=5,0$ Гц, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,69 (s, 1H), 4,22 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,12-4,04 (m, 2H), 3,28-3,15 (m, 2H), 2,70 (t, $J=6,5$ Гц, 4H), 2,50 (d, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,44 (s, 3H), 2,32 (s, 2H), 2,25 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,98 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,83 (s, 1H), 1,70 (s, 5H), 1,38-0,94 (m, 37H), 0,81 (q, $J=6,6$ Гц, 9H). MS: 928,4 m/z [M+H].

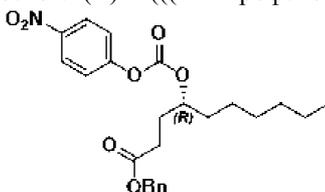
Пример 90 - соединение 90.

Промежуточное соединение 90a: бензил (R)-4-гидроксидеcanoат



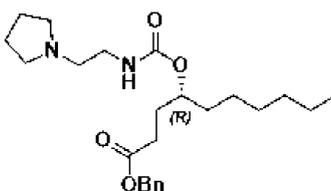
Промежуточное соединение 90a было синтезировано с выходом 27% из (5R)-5-гексилтетрагидрофуран-2-она, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 89d.

Промежуточное соединение 90b: бензил (R)-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)деcanoат



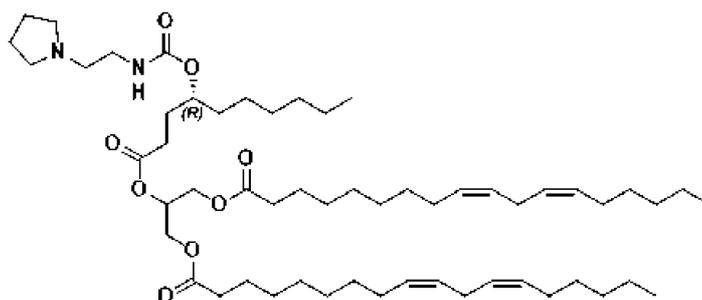
Промежуточное соединение 90b было синтезировано с выходом 57% из промежуточного соединения 90a с использованием метода, применяемого в промежуточном соединении 89e.

Промежуточное соединение 90c: бензил (R)-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoат



Промежуточное соединение 90c было синтезировано с выходом 47% из промежуточного соединения 90b с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 89f.

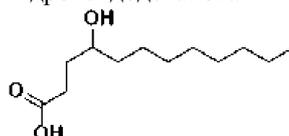
Соединение 90: 2-(((R)-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)деcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Соединение 90 было синтезировано с выходом 27% из промежуточного соединения 90с, используя метод, применяемый для соединения 89.

Пример 91 - соединение 91.

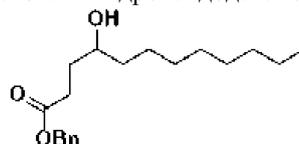
Промежуточное соединение 91а: 4-гидроксидодекановая кислота



К раствору 5-октилтетрагидрофуран-2-она (20 г, 1,0 экв.) в H₂O (200 мл) добавляли NaOH (4,03 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления H₂O. Это давало сырой продукт в виде белого твердого вещества (14 г, 65%).

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 3,55 (ddd, J=9,5, 7,5, 4,6 Гц, 1H), 2,19 (qdd, J=15,0, 9,3, 6,3 Гц, 2H), 1,69 (dddd, J=13,9, 9,4, 6,4, 4,4 Гц, 1H), 1,59 (dddd, J=14,0, 9,2, 7,7, 6,4 Гц, 1H), 1,46-1,30 (m, 3H), 1,23 (d, J=6,6 Гц, 1H), 0,86-0,77 (m, 3H).

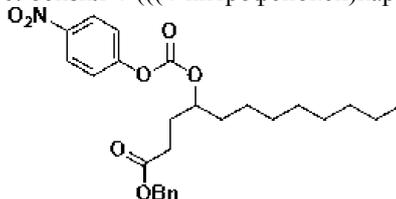
Промежуточное соединение 91b: бензил-4-гидроксидодеканоат



К раствору промежуточного соединения 91а (10 г, 1,0 экв.) в ДМФ (100 мл) добавляли BnBr (7,91 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. Смесь разбавляли H₂O и экстрагировали 2× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (5,7 г, 40%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,46-7,28 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 3,61 (h, J=4,6 Гц, 1H), 2,51 (td, J=7,3, 2,9 Гц, 2H), 1,86 (dtd, J=14,6, 7,4, 3,5 Гц, 1H), 1,76-1,59 (m, 3H), 1,42 (q, J=12,1, 9,1 Гц, 4H), 1,28 (d, J=11,9 Гц, 12H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 3H).

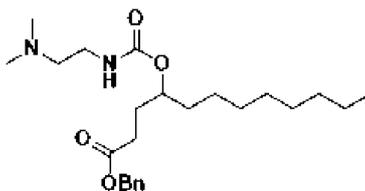
Промежуточное соединение 91с: бензил 4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)додеканоат



К раствору промежуточного соединения 91b (10 г, 1,0 эквив.) и (4-нитрофенил)карбонилхлорида (9,87 г, 1,05 эквив.) в DCM (100 мл) добавляли пиридин (3,95 мл, 1,5 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM. Остаток разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (7,5 г, 49%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,30-8,21 (m, 2H), 7,48-7,26 (m, 7H), 5,22 (d, J=69,6 Гц, 2H), 4,87 (tt, J=7,5, 4,5 Гц, 1H), 2,59-2,42 (m, 2H), 1,80-1,57 (m, 2H), 1,52-1,16 (m, 13H), 0,88 (t, J=6,6 Гц, 3H).

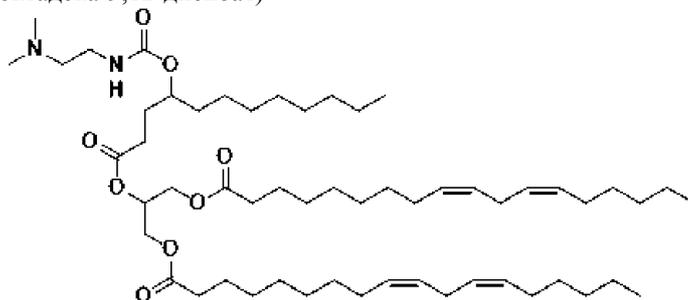
Промежуточное соединение 91d: бензил 4-(((2-(диметиламино)этил)карбамоил)окси)додеканоат



К раствору промежуточного соединения 91с (1,0 экв.) в MeCN (0,1-0,5 М) добавляли диамин или аминоксирт (N',N'-диметилэтан-1,2-диамин (2,0-3,0 экв.), пиридин (3,0 экв.) и DMAP (0,1 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 15-25°C в течение не менее 2 ч. По завершении реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении, разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали, получая остаток, который очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (79%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,46-7,28 (m, 5H), 5,08 (s, 1H), 4,76 (s, 1H), 3,23 (q, J=5,9 Гц, 2H), 2,40 (ddt, J=12,0, 8,9, 4,5 Гц, 4H), 2,21 (s, 7H), 1,94 (d, J=9,9 Гц, 1H), 1,82 (p, J=7,6 Гц, 1H), 1,61-1,40 (m, 3H), 1,39-1,16 (m, 14H), 0,87 (t, J=6,7 Гц, 3H).

Соединение 91: 2-((4-(((2-(диметиламино)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



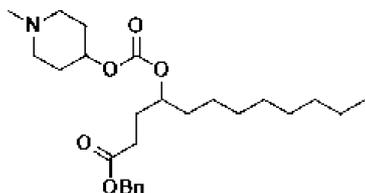
К раствору промежуточного соединения 91d в ТГФ (0,1-0,5 М) добавляли Pd/C (10% мас./мас.). Смесь перемешивали при 25°C в течение по меньшей мере 5 ч в атмосфере H₂ при давлении 15 фунтов на квадратный дюйм. Полученный продукт разбавляли в ТГФ и фильтровали для удаления твердого вещества. Фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением промежуточного соединения карбоновой кислоты в виде коричневого масла.

Из полученного масла впоследствии было синтезировано соединение 91с выходом 15% с использованием метода, применяемого в промежуточном соединении 90f.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,26 (m, 8H), 5,27-5,20 (m, 1H), 5,12 (s, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,28 (ddd, J=11,9, 4,5, 1,3 Гц, 2H), 4,14 (ddd, J=11,9, 5,8, 3,4 Гц, 2H), 3,24 (q, J=5,7 Гц, 2H), 2,77 (t, J=6,7 Гц, 4H), 2,44-2,35 (m, 4H), 2,31 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,22 (s, 6H), 2,04 (q, J=6,9 Гц, 8H), 1,97-1,84 (m, 2H), 1,80 (dt, J=14,9, 7,7 Гц, 1H), 1,67-1,42 (m, 8H), 1,42-1,14 (m, 39H), 0,88 (td, J=6,8, 5,2 Гц, 9H). MS: 930,4 m/z [M+H].

Пример 92 - соединение 92.

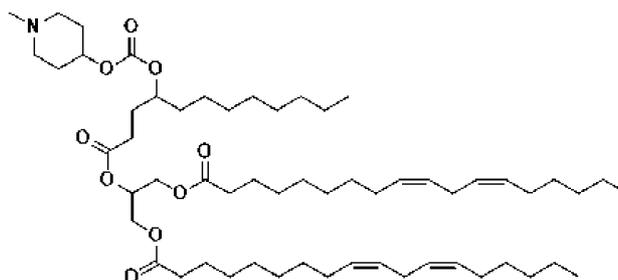
Промежуточное соединение 92а: бензил 4-(((1-метилпиперидин-4-ил)окси)карбонил)окси)-додеcanoат



Промежуточное соединение 92а было синтезировано с выходом 94% из промежуточного соединения 91с и 1-метилпиперидин-4-ола с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 91d.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,39-7,28 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,73 (dtd, J=11,8, 5,4, 4,6, 2,7 Гц, 1H), 4,62 (tt, J=8,6, 4,2 Гц, 1H), 2,68 (s, 2H), 2,48-2,37 (m, 2H), 2,29 (s, 5H), 2,01-1,84 (m, 4H), 1,78 (dtt, J=12,5, 8,2, 3,5 Гц, 2H), 1,67-1,58 (m, 1H), 1,58-1,46 (m, 1H), 1,27 (d, J=15,6 Гц, 13H), 0,87 (t, J=6,8 Гц, 3H).

Соединение 92: 2-((4-(((1-метилпиперидин-4-ил)окси)карбонил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

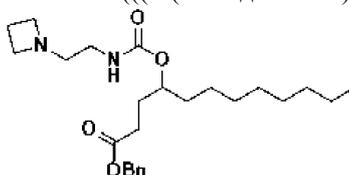


Соединение 92 синтезировали с выходом 28% из промежуточного соединения 92а, используя метод, применяемый для соединения 91.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,39-5,21 (m, 8H), 5,21-5,16 (m, 1H), 4,65 (d, $J=6,9$ Гц, 1H), 4,57-4,52 (m, 1H), 4,22 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,08 (ddd, $J=11,9, 5,8, 4,1$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,5$ Гц, 4H), 2,61 (s, 2H), 2,36-2,29 (m, 2H), 2,29-2,18 (m, 7H), 2,14 (s, 2H), 1,98 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,93-1,84 (m, 4H), 1,83-1,77 (m, 1H), 1,77-1,65 (m, 3H), 1,54 (t, $J=7,3$ Гц, 13H), 1,33-1,12 (m, 41H), 0,81 (td, $J=6,9, 5,3$ Гц, 9H). MS: 957,4 m/z [M+H].

Пример 93 - соединение 93.

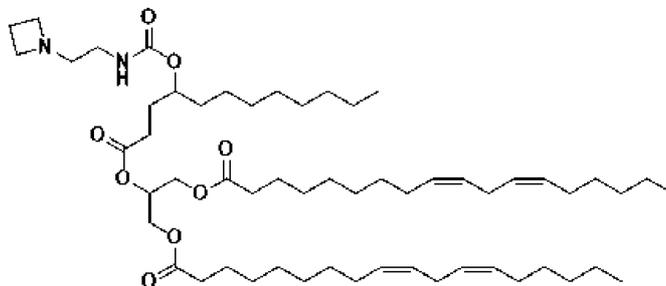
Промежуточное соединение 93 а: бензил 4-(((2-(азетидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)додеcanoат



Промежуточное соединение 93а синтезировали с выходом 80% из промежуточного соединения 91с и 2-(азетидин-1-ил)этанамин, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 92d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,49-7,26 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 5,04 (s, 1H), 4,74 (s, 1H), 3,20 (t, $J=7,0$ Гц, 4H), 3,11 (q, $J=5,8$ Гц, 2H), 2,50 (t, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,41 (ddd, $J=8,6, 6,7, 3,2$ Гц, 2H), 2,10-2,00 (m, 2H), 1,96-1,88 (m, 1H), 1,82 (d, $J=15,4$ Гц, 4H), 1,46 (d, $J=6,9$ Гц, 3H), 1,34-1,18 (m, 14H), 0,87 (t, $J=6,8$ Гц, 3H).

Соединение 93: 2-(((4-(((2-(азетидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

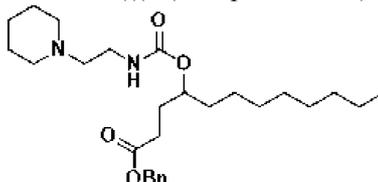


Соединение 93 синтезировали с выходом 18% из промежуточного соединения 93а, используя метод, применяемый для соединения 91.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,36-5,22 (m, 8H), 5,18 (p, $J=5,0$ Гц, 1H), 4,98 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 4,68 (s, 1H), 4,22 (ddd, $J=11,9, 4,5, 1,6$ Гц, 2H), 4,08 (ddq, $J=11,7, 5,8, 2,8$ Гц, 2H), 3,12 (t, $J=7,0$ Гц, 4H), 3,05 (q, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,43 (t, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,31 (ddd, $J=8,8, 6,6, 4,2$ Гц, 2H), 2,25 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,99 (dq, $J=10,0, 6,9$ Гц, 10H), 1,88-1,68 (m, 3H), 1,59-1,36 (m, 7H), 1,34-1,11 (m, 42H), 0,86-0,77 (m, 9H). MS: 942,1 m/z [M+H].

Пример 94 - соединение 94.

Промежуточное соединение 94а: бензил 4-(((2-(пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)додеcanoат

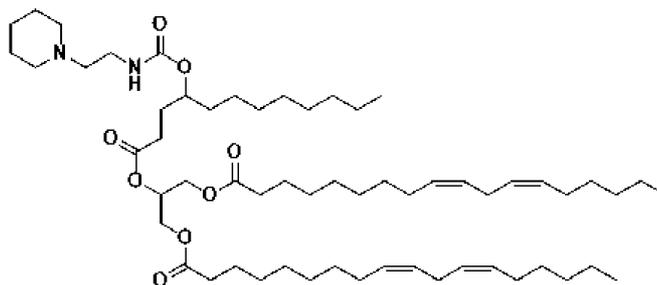


Промежуточное соединение 94а было синтезировано с выходом 68% из промежуточного соединения 91с и 2-(пиперидин-1-ил)этан-1-амин с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 91d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,38-7,28 (m, 5H), 5,10 (s, 3H), 4,75 (s, 1H), 3,22 (t, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,64 (s, 1H), 2,45-2,29 (m, 8H), 1,99-1,88 (m, 1H), 1,82 (dq, $J=15,0, 8,0$ Гц, 1H), 1,48 (dt, $J=53,9, 5,8$ Гц, 9H), 1,34-

1,17 (m, 12H), 0,86 (t, J=6,7 Гц, 3H).

Соединение 94: 2-((4-(((2-(пиперидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

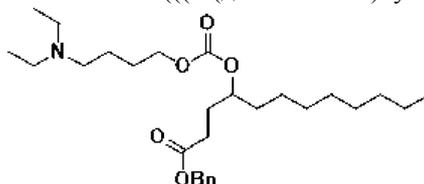


Соединение 94 было синтезировано с выходом 22% из промежуточного соединения 94а, используя метод, применяемый для соединения 91.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,29 (qq, J=11,7,6,7 Гц, 8H), 5,18 (p, J=5,1 Гц, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,69 (s, 1H), 4,22 (ddd, J=11,9, 4,5, 2,2 Гц, 2H), 4,08 (ddd, J=11,9, 5,9, 3,6 Гц, 2H), 3,18 (q, J=5,9 Гц, 2H), 2,70 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,39-2,18 (m, 12H), 1,98 (q, J=6,9 Гц, 8H), 1,91-1,79 (m, 1H), 1,79-1,68 (m, 1H), 1,61-1,33 (m, 15H), 1,33-1,10 (m, 42H), 0,81 (q, J=6,4 Гц, 9H). MS: 970,2 m/z [M+H].

Пример 95 - соединение 95.

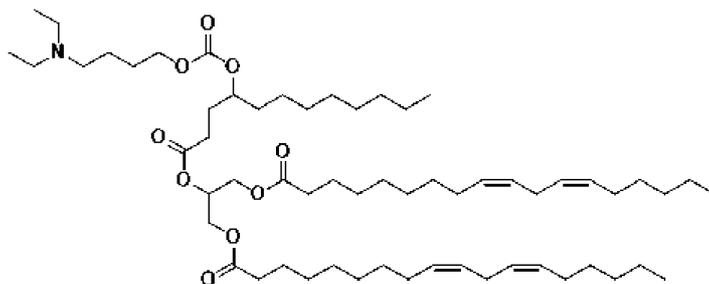
Промежуточное соединение 95а: бензил 4-(((4-(диэтиламино)бутоксикарбонил)окси)додеcanoат



Промежуточное соединение 95а было синтезировано с выходом 83% из промежуточного соединения 91с и 4-(диэтиламино)бутан-1-ола с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 92d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,44-7,28 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,72 (tdd, J=7,6, 5,4, 4,0 Гц, 1H), 4,11 (td, J=6,7, 3,8 Гц, 2H), 2,49 (q, J=7,1 Гц, 4H), 2,42 (dtd, J=7,7, 5,1, 4,4, 2,5 Гц, 4H), 1,99 (dddd, J=14,4, 8,9, 7,0, 4,1 Гц, 1H), 1,89 (dtd, J=14,7, 8,4, 6,5 Гц, 1H), 1,64 (ddt, J=17,4, 10,5, 6,2 Гц, 3H), 1,56-1,46 (m, 3H), 1,34-1,21 (m, 13H), 1,00 (t, J=7,1 Гц, 6H), 0,87 (t, J=6,8 Гц, 3H).

Соединение 95: 2-(((4-(((4-(диэтиламино)бутоксикарбонил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

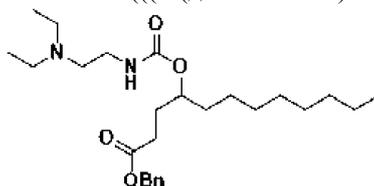


Соединение 95 было получено с выходом 27% из промежуточного соединения 95а, используя метод, применяемый для соединения 91.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,35 (qdd, J=10,6, 4,4, 1,7 Гц, 8H), 5,27-5,22 (m, 1H), 4,71 (tt, J=7,6, 2,7 Гц, 1H), 4,28 (dd, J=11,9, 4,3 Гц, 2H), 4,13 (dtt, J=10,4, 6,6, 3,7 Гц, 4H), 2,76 (t, J=6,6 Гц, 4H), 2,50 (q, J=7,2 Гц, 4H), 2,41 (ddd, J=15,2, 8,0, 6,4 Гц, 4H), 2,31 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,04 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,98-1,82 (m, 3H), 1,72-1,47 (m, 12H), 1,39-1,21 (m, 42H), 1,00 (t, J=7,1 Гц, 6H), 0,88 (td, J=6,8, 4,8 Гц, 9H). MS: 987,5 m/z [M+H].

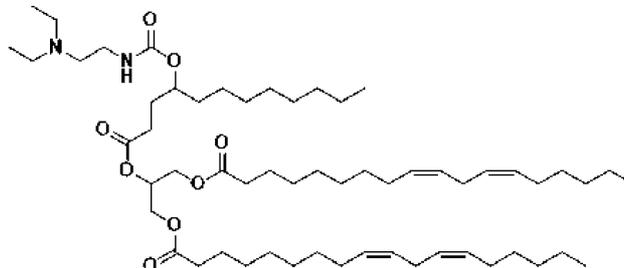
Пример 96 - соединение 96.

Промежуточное соединение 96а: бензил 4-(((2-(диэтиламино)этил)карбамоил)окси)додеcanoат



Промежуточное соединение 96а было синтезировано с выходом 58% из промежуточного соединения 91с и N,N'-диэтилэтан-1,2-диамина, используя метод, применяемый для промежуточного соединения 91d. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,28 (m, 5H), 5,19 (s, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,76 (s, 1H), 3,51 (s, 2H), 3,27-3,15 (m, 2H), 2,54 (dd, $J=8,7, 5,9$ Гц, 6H), 2,41 (ddd, $J=9,0, 6,9, 2,6$ Гц, 2H), 1,94 (d, $J=7,5$ Гц, 1H), 1,83 (p, $J=7,3$ Гц, 1H), 1,63-1,40 (m, 3H), 1,35-1,17 (m, 13H), 1,01 (t, $J=7,1$ Гц, 6H), 0,87 (t, $J=6,8$ Гц, 3H).

Соединение 96: 2-(((4-((2-диэтиламино)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

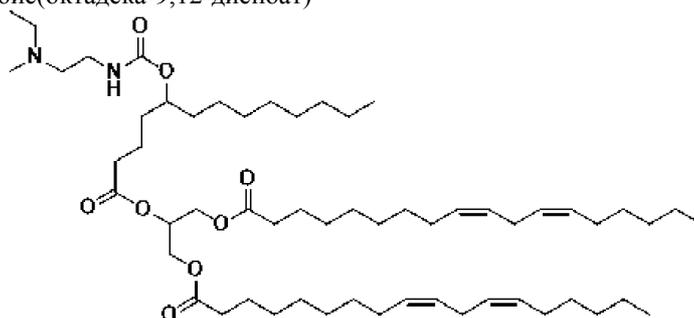


Соединение 96 было получено с выходом 42% из промежуточного соединения 96а, используя метод, применяемый для соединения 91.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,29 (qq, $J=11,4, 6,5$ Гц, 8H), 5,18 (p, $J=5,2$ Гц, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,69 (s, 1H), 4,21 (ddd, $J=11,8, 4,5, 2,0$ Гц, 2H), 4,08 (ddd, $J=12,0, 5,9, 2,7$ Гц, 2H), 3,12 (dt, $J=13,0, 6,3$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,5$ Гц, 4H), 2,45 (q, $J=7,3$ Гц, 6H), 2,28 (dt, $J=27,2, 8,0$ Гц, 6H), 1,98 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,83 (s, 1H), 1,78-1,68 (m, 1H), 1,54 (t, $J=7,2$ Гц, 9H), 1,35-1,11 (m, 42H), 0,81 (q, $J=6,3$ Гц, 9H). MS: 958,4 m/z [M+H].

Пример 97 - соединение 97.

Соединение 97: 2-(((5-((2-этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)тридеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

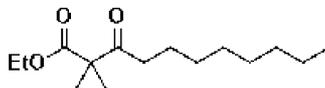


Соединение 96 было получено с выходом 75% из промежуточного соединения 55d и промежуточного соединения 1с, используя метод, применяемый для соединения 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,28 (m, 8H), 5,27-5,22 (m, 1H), 5,12 (d, $J=5,7$ Гц, 1H), 4,76-4,67 (m, 1H), 4,28 (dt, $J=11,9, 4,5$ Гц, 2H), 4,13 (ddd, $J=12,0, 5,9, 4,5$ Гц, 2H), 3,23 (h, $J=7,2, 6,2$ Гц, 2H), 2,76 (t, $J=6,6$ Гц, 4H), 2,43 (dt, $J=14,5, 6,6$ Гц, 4H), 2,35-2,27 (m, 6H), 2,19 (s, 3H), 2,04 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,71-1,46 (m, 13H), 1,40-1,19 (m, 42H), 1,03 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,92-0,83 (m, 9H). MS: 958,5 m/z [M+H].

Пример 98.

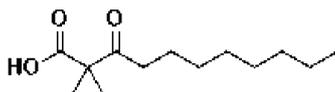
Промежуточное соединение 98а: этил-2,2-диметил-3-оксундеcanoат.



К раствору N-изопропилпропан-2-амина (20,0 мл, 1,0 эквив.) в ТГФ (1-3 М) добавляли n-BuLi (2,5 М, 56,60 мл, 1,0 эквив.) при -78°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при -78°C в течение 20 мин. Затем добавляли этил 2-метилпропаноат (18,96 мл, 1,0 эквив.) при -78°C . Смесь перемешивали при -78°C еще 20 мин. К вышеуказанному раствору по каплям добавляли нонаноилхлорид (26,60 мл, 1,0 эквив.) в ТГФ (200 мл). Смеси давали нагреться до 15°C и перемешивали при 15°C в течение 12 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь гасили добавлением ледяной воды, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3× EtOAc. Органическую фазу отделяли, промывали рассолом, сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (15 г, 41%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,11 (q, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,36 (t, $J=7,3$ Гц, 2H), 1,56-1,46 (m, 2H), 1,28 (s, 6H), 1,25-1,13 (m, 13H), 0,80 (t, $J=6,7$ Гц, 3H).

Промежуточное соединение 98b: 2,2-диметил-3-оксундекановая кислота.

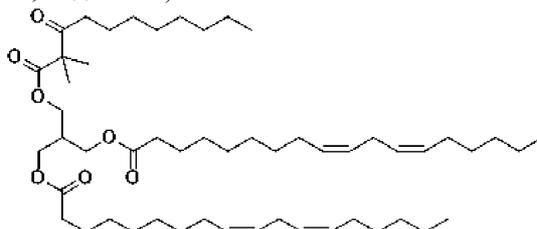


Смесь Промежуточного соединения 98a (15 г, 1,0 экв.), LiOH (2,10 г, 1,5 экв.), KOH (4,92 г, 1,5 экв.) в EtOH (120 мл) и H₂O (40 мл) дегазировали и продували 3 раза с N₂, а затем смесь перемешивали при 40°C в течение 3 часов в атмосфере N₂. Смесь концентрировали для удаления EtOH. Затем pH доводили до 5-6 с помощью HCl (1 M). Смесь распределяли между H₂O и EtOAc. Органическую фазу отделяли, промывали рассолом, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде желтого масла (5 г, 37%).

¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 2,46 (t, J=7,3 Гц, 2H), 1,58-1,47 (m, 2H), 1,33 (s, 6H), 1,20 (s, 10H), 0,81 (t, J=6,6 Гц, 3H).

Пример 99 - соединение 99.

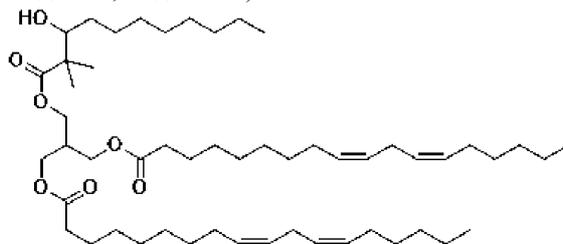
Промежуточное соединение 99a: 2-(((2,2-диметил-3-оксундеcanoил)окси)метил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 53a (12,16 г, 1,1 эквив.) в ТГФ (20 мл) добавляли промежуточное соединение 98b (4 г, 1,0 эквив.), DBAD (8,07 г, 2,0 эквив.) и PPh₃ (9,19 г, 2,0 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин. Затем смесь перемешивали при 15°C в течение 16 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь разбавляли H₂O и трижды экстрагировали EtOAc. Органическую фазу отделяли, промывали рассолом, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (3 г, 20%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,27 (dtt, J=10,8, 8,7, 6,1 Гц, 8H), 4,10 (d, J=6,0 Гц, 2H), 4,03 (d, J=6,0 Гц, 4H), 2,70 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,37 (t, J=7,3 Гц, 2H), 2,23 (t, J=7,6 Гц, 4H), 1,98 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,52 (tt, J=14,2, 7,4 Гц, 8H), 1,31-1,17 (m, 46H), 0,85-0,77 (m, 12H).

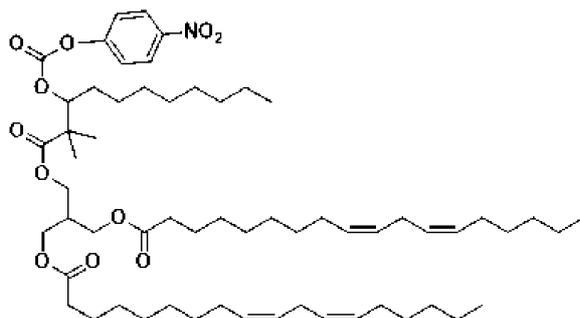
Промежуточное соединение 99b: 2-(((3-гидрокси-2,2-диметилундеcanoил)окси)метил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 99a (1,0 экв.) в 4:2:1 THF:H₂O:толуол (0,025-0,1 добавляли NaBH₄ (5,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 15°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь распределяли между THF и H₂O, и органическую фазу концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (33%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,41-5,25 (m, 8H), 4,20-4,07 (m, 7H), 3,63 (dd, J=10,2, 6,7 Гц, 1H), 2,76 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,40 (t, J=6,0 Гц, 2H), 2,30 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,04 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,59 (q, J=7,3 Гц, 6H), 1,40-1,22 (m, 40H), 1,16 (d, J=4,5 Гц, 6H), 0,88 (td, J=6,8, 4,0 Гц, 9H).

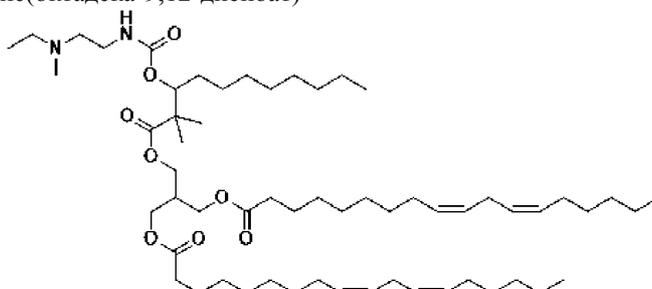
Промежуточное соединение 99c: 2-(((2,2-диметил-3-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)ундеcanoил)-окси)метил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 99b (1 г, 1,0 эквив.) и (4-нитрофенил)карбонхлорида (478 мг, 2,0 эквив.) в DCM (10 мл) добавляли пиридин (191 мкл, 2,0 эквив.) при 0°C. под N₂. Смесь перемешивали при 15-25°C в течение 5 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (0,8 г, 67%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,20 (d, J=8,8 Гц, 2H), 7,30 (d, J=8,9 Гц, 2H), 5,29 (dq, J=13,1, 7,1, 6,1 Гц, 8H), 5,03 (dd, J=10,4, 2,3 Гц, 1H), 4,08 (dd, J=6,0, 2,5 Гц, 6H), 2,69 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,35 (p, J=6,0 Гц, 1H), 2,23 (q, J=8,4, 7,7 Гц, 4H), 1,97 (q, J=6,9 Гц, 8H), 1,53 (h, J=7,1, 5,9 Гц, 8H), 1,36-1,12 (m, 56H), 0,85-0,77 (m, 12H).

Соединение 99: 2-(4,4,11-триметил-5-октил-3,7-диоксо-2,6-диокса-8,11-дiazатридецил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

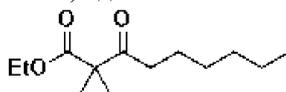


К раствору промежуточного соединения 99с (1,0 экв.) в MeCN (0,1 М) добавляли диамин (N'-этил-N'-метилэтан-1,2-диамин (3,0 экв.)), DMAP (1,0 экв.) и пиридин (3,0 экв.) при 0°C. Смесь перемешивали при 15°C в течение не менее 2 ч в атмосфере N₂. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Органическую фазу отделяли, промывали рассолом, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (66%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,28 (pt, J=11,5, 5,8 Гц, 8H), 4,90 (t, J=6,4 Гц, 1H), 4,11-4,02 (m, 5H), 3,17 (dt, J=13,4, 7,3 Гц, 2H), 2,70 (t, J=6,4 Гц, 4H), 2,37 (dq, J=12,3, 6,2 Гц, 5H), 2,23 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,14 (s, 3H), 1,98 (q, J=6,8 Гц, 7H), 1,54 (p, J=6,8 Гц, 4H), 1,37-1,06 (m, 49H), 0,97 (t, J=7,1 Гц, 3H), 0,81 (q, J=6,9 Гц, 9H). MS: 973,5 m/z [M+H].

Пример 100 - соединение 100.

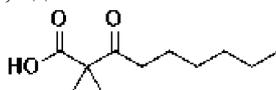
Промежуточное соединение 100а: этил-2,2-диметил-3-оксоноаноат



Промежуточное соединение 100а было синтезировано с выходом 26% из N-изопропилпропан-2-амина, этил 2-метилпропаноата и гептаоилхлорида с использованием метода, применяемого для промежуточного соединения 99а.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,14 (q, J=7,1 Гц, 2H), 2,40 (t, J=7,3 Гц, 2H), 1,60-1,47 (m, 2H), 1,36-1,14 (m, 13H), 0,84 (t, J=6,8 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 100b: 2,2-диметил-3-оксоноановая кислота

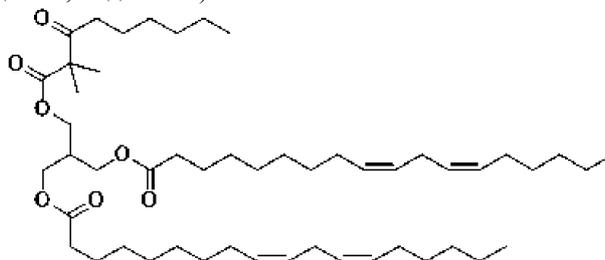


Смесь Промежуточного соединения 100а (20 г, 1,0 экв.), LiOH (3,15 г, 1,5 экв.), KOH (7,37 г, 1,5 экв.) в EtOH (6 мл) и H₂O (2 мл) перемешивали при 40°C в течение 4 ч в атмосфере N₂. Смесь концентрировали для удаления EtOH. Затем pH доводили до 5-6 с помощью HCl (1 М). Смесь распределяли между H₂O и EtOAc и дважды экстрагировали EtOAc. Органическую фазу отделяли, промывали рассолом,

сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (6 г, 34%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,53 (t, $J=7,3$ Гц, 2H), 1,58 (p, $J=7,2$ Гц, 2H), 1,40 (s, 6H), 1,34-1,23 (m, 6H), 0,92-0,81 (m, 3H).

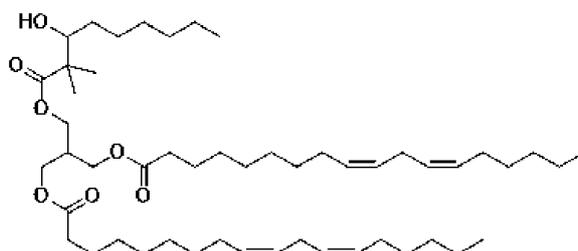
Промежуточное соединение 100с: 2-(((2,2-диметил-3-оксонаноил)окси)метил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 1с (19,06 г, 1,1 эквив.) в ТГФ (50 мл) добавляли PPh_3 (14,41 г, 2,0 эквив.) и DBAD (12,65 г, 2,0 эквив.) и промежуточное соединение 100b (5,5 г, 1,0 эквив.) при 0°C . Смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин, смеси давали возможность нагреться до 15°C и перемешивали при 15°C в течение 16 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь разбавляли H_2O и трижды экстрагировали EtOAc . Органическую фазу отделяли, промывали рассолом, сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (4 г, 18%).

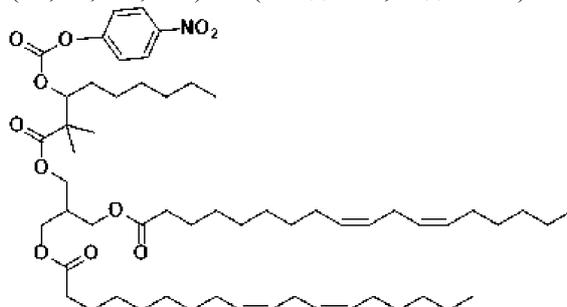
^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,28 (tt, $J=11,1, 5,4$ Гц, 8H), 4,10 (d, $J=6,0$ Гц, 2H), 4,05 (dd, $J=10,4, 6,0$ Гц, 4H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,34 (dt, $J=17,5, 6,6$ Гц, 3H), 2,23 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,98 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,61-1,44 (m, 8H), 1,39 (d, $J=14,2$ Гц, 3H), 1,35-1,14 (m, 41H), 0,85-0,76 (m, 9H).

Промежуточное соединение 100d: 2-(((3-гидрокси-2,2-диметилнонаноил)окси)метил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 100с (1,0 экв.) в 4:2:1 THF: H_2O :толуол (0,025-0,1 добавляли NaBH_4 (5,0 экв.) при 0°C . Смесь перемешивали при 5°C в течение 5 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь распределяли между THF и H_2O , и органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (20%).

Промежуточное соединение 100е: 2-(((2,2-диметил-3-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)нонаноил)окси)метил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

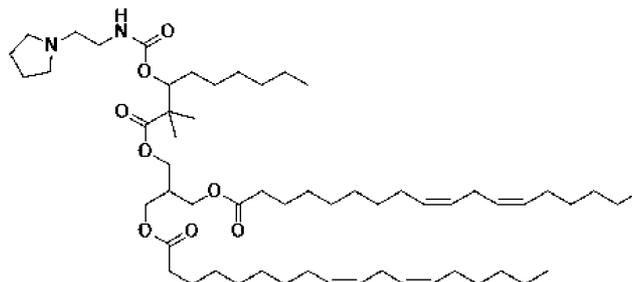


К раствору промежуточного соединения 100d (0,4 г, 1,0 эквив.) и (4-нитрофенил)карбонхлоридата (890 мг, 9,0 эквив.) в DCM (5 мл) добавляли пиридин (119 мкл, 3,0 эквив.) при 0°C . Смесь перемешивали при 15°C в течение 3 ч в атмосфере N_2 . Затем смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (0,2 г, 42%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,21 (dd, $J=9,3, 2,5$ Гц, 2H), 7,31 (dd, $J=9,4, 2,8$ Гц, 2H), 5,43-5,16 (m, 8H), 5,03 (dd, $J=10,3, 2,3$ Гц, 1H), 4,12-3,99 (m, 6H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,35 (h, $J=6,0$ Гц, 1H), 2,22 (t,

$J=7,6$ Гц, 4H), 1,97 (t, $J=6,9$ Гц, 7H), 1,63-1,47 (m, 6H), 1,40-1,12 (m, 41H), 0,82 (t, $J=6,7$ Гц, 9H).

Соединение 100: 2-(((2,2-диметил-3-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)нонаноил)окси)-метил)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

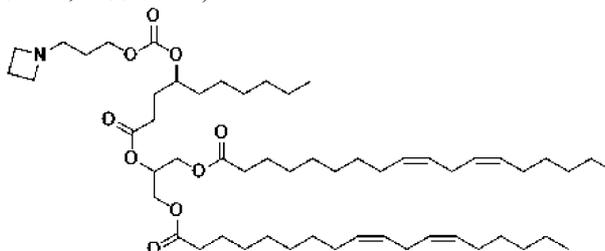


Соединение 100 синтезировали с выходом 90% из промежуточного соединения 100e и 2-пирролидин-1-илэтанамин, используя метод, примененный для соединения 99.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,28 (tdq, $J=17,2, 12,4, 5,8, 5,3$ Гц, 8H), 4,90 (t, $J=6,4$ Гц, 1H), 4,13-4,00 (m, 6H), 3,22 (ddq, $J=19,5, 12,8, 6,3, 5,8$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,51 (t, $J=6,3$ Гц, 2H), 2,44 (d, $J=6,0$ Гц, 4H), 2,34 (p, $J=6,0$ Гц, 1H), 2,23 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,98 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,70 (h, $J=7,5$ Гц, 4H), 1,54 (p, $J=7,0$ Гц, 4H), 1,41-1,06 (m, 44H), 0,81 (dt, $J=9,6, 6,7$ Гц, 9H). MS: 956,4 m/z [M+H].

Пример 101 - соединение 101.

Соединение 101: 2-(((4-(((3-(азетидин-1-ил)пропоксикарбонил)окси)деканойл)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

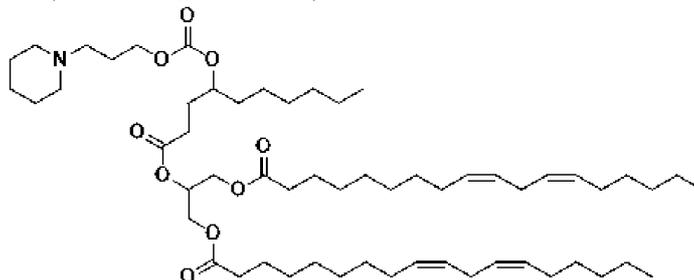


Соединение 101 было синтезировано с выходом 65% из промежуточного соединения 40d и 3-(азетидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, примененного для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,45-5,28 (m, 8H), 5,25 (tt, $J=5,8, 4,3$ Гц, 1H), 4,71 (ddd, $J=11,5, 7,6, 4,7$ Гц, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,3$ Гц, 2H), 4,15 (dddd, $J=13,3, 7,2, 5,5, 3,2$ Гц, 4H), 3,18 (t, $J=7,0$ Гц, 4H), 2,82-2,72 (m, 4H), 2,48 (t, $J=7,3$ Гц, 2H), 2,40 (dt, $J=8,8, 6,8$ Гц, 2H), 2,31 (td, $J=7,6, 1,2$ Гц, 4H), 2,10-1,99 (m, 10H), 1,99-1,84 (m, 2H), 1,77-1,50 (m, 15H), 1,42-1,21 (m, 37H), 0,88 (td, $J=6,9, 5,4$ Гц, 9H). MS: 929,3 m/z [M+H].

Пример 102 - соединение 102.

Соединение 102: 2-(((4-(((3-(пиперидин-1-ил)пропоксикарбонил)окси)деканойл)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

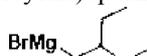


Соединение 102 было синтезировано с выходом 72% из промежуточного соединения 40d и 3-(пиперидин-1-ил)пропан-1-ола с использованием метода, примененного для примера 1.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,28 (m, 8H), 5,25 (ddd, $J=5,8, 4,3, 1,5$ Гц, 1H), 4,76-4,69 (m, 1H), 4,37-4,24 (m, 2H), 4,24-4,10 (m, 4H), 2,82-2,71 (m, 4H), 2,48-2,26 (m, 12H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 2,01-1,81 (m, 4H), 1,71-1,49 (m, 17H), 1,43 (s, 2H), 1,40-1,24 (m, 37H), 0,88 (td, $J=6,9, 5,0$ Гц, 9H). MS: 957,1 m/z [M+H].

Пример 103 - соединение 103.

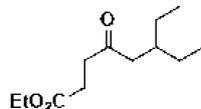
Промежуточное соединение 103а: (2-этилбутил)бромид магния.



К раствору Mg (1,1 эквив.) и I_2 (0,1 эквив.) в THF (0,4-0,5 М) по каплям добавляли 3-

(бромметил)пентан (1,0 эквив.). Смесь перемешивали при 40°C не менее 1 ч. Реакционную смесь использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

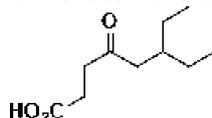
Промежуточное соединение 103b: этил-6-этил-4-оксооктаноат.



К раствору этил 4-хлор-4-оксобутаноата (1,0 экв.) в THF (0,3 М) добавляли CuI (1-2 экв.) и промежуточное соединение 103a (1-2 экв. экв.) при -78°C по каплям. Смесь перемешивали при -78°C не менее 1,5 ч. По завершении добавляли насыщенный NH₄Cl и реакционную смесь экстрагировали 3× EtOAc. Органический слой концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде коричневого масла (82%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,05 (q, J=7,1 Гц, 2H), 2,65 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,49 (d, J=13,1 Гц, 2H), 2,30 (d, J=6,8 Гц, 2H), 1,82-1,71 (m, J=6,5 Гц, 1H), 1,33-1,13 (m, 7H), 0,78 (t, J=7,4 Гц, 6H).

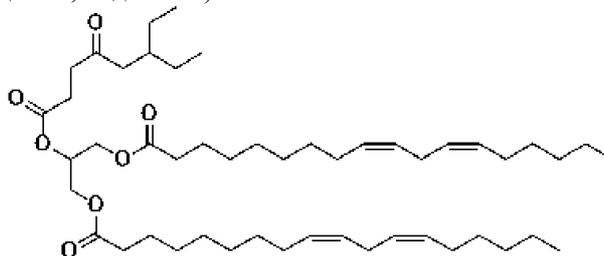
Промежуточное соединение 103c: 6-этил-4-оксооктановая кислота



К раствору промежуточного соединения 103c (1,0 эквив.) в 3:1 EtOH/H₂O (0,2 М) добавляли NaOH (1,5 эквив.), LiOH (1,5 эквив.). Смесь перемешивали при 40°C не менее 1 ч. По завершении pH реакции доводили до 3 с помощью 1 М HCl, реакционную смесь разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (46%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 2,69-2,60 (m, 2H), 2,56 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,30 (d, J=6,7 Гц, 2H), 1,75 (гепт, J=6,4 Гц, 1H), 1,22 (qr, J=13,8, 6,6 Гц, 4H), 0,78 (t, J=7,4 Гц, 6H).

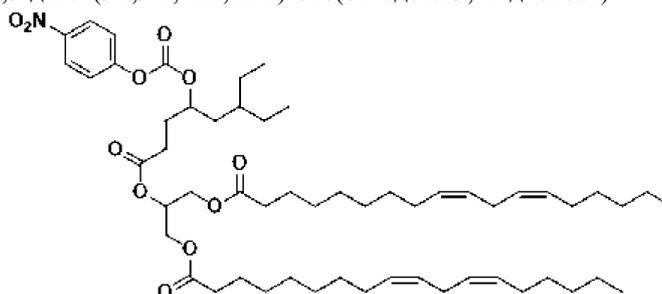
Промежуточное соединение 103d: 2-((6-этил-4-оксооктаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 103c (1,0 эквив.) в DCM (0,2-0,5 М) добавляли промежуточное соединение 1c (1,0 эквив.), EDCI (1,2 эквив.), DMAP (0,1-0,2 эквив.) и Et₃N (1,5 эквив.) при 0°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 20-25°C в течение не менее 12 ч в атмосфере N₂. Смесь разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенную органическую фазу сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде желтого масла (40%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,40-5,21 (m, 8H), 5,18 (p, J=5,0 Гц, 1H), 4,23 (dt, J=11,9, 5,0 Гц, 2H), 4,08 (dd, J=11,9, 5,9 Гц, 2H), 2,67 (dt, J=20,4, 6,5 Гц, 6H), 2,51 (td, J=6,5, 2,9 Гц, 2H), 2,32-2,22 (m, 5H), 1,98 (q, J=6,8 Гц, 8H), 1,75 (p, J=6,4 Гц, 1H), 1,53 (q, J=7,2 Гц, 4H), 1,35-1,09 (m, 31H), 0,80 (dt, J=16,7, 6,9 Гц, 12H).

Промежуточное соединение 103e: 2-((6-этил-4-((4-нитрофенокси)карбонил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

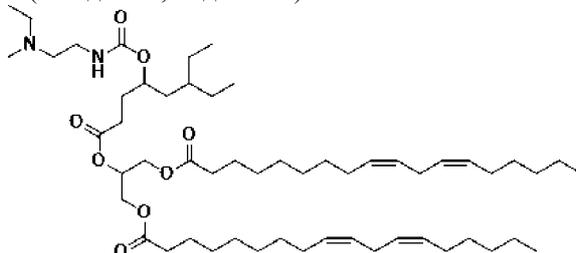


Промежуточное соединение 103e было синтезировано с выходом 46% из промежуточного соедине-

ния 103 d с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 1e.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,21 (d, $J=8,1$ Гц, 2H), 7,32 (d, $J=8,4$ Гц, 2H), 5,27 (tt, $J=14,1$, 7,8 Гц, 8H), 4,89 (p, $J=7,4$ Гц, 1H), 4,32-4,02 (m, 4H), 2,70 (t, $J=6,5$ Гц, 4H), 2,41 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,32-2,19 (m, 4H), 1,98 (q, $J=7,2$ Гц, 10H), 1,69-1,40 (m, 7H), 1,39-1,16 (m, 36H), 0,82 (t, $J=6,9$ Гц, 12H).

Соединение 103: 2-((6-этил-4-((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Соединение 103 было синтезировано с выходом 98% из промежуточного соединения 103e и N'-этил-N'-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, использованного в промежуточном соединении 91d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,42-5,21 (m, 8H), 5,18 (q, $J=5,0$ Гц, 1H), 5,07 (s, 1H), 4,79 (s, 1H), 4,21 (ddd, $J=11,8$, 4,4, 1,8 Гц, 2H), 4,08 (ddd, $J=11,9$, 5,8, 3,4 Гц, 2H), 3,17 (d, $J=6,2$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,44-2,27 (m, 6H), 2,24 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,13 (s, 3H), 1,98 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,84 (dq, $J=8,4$, 4,4 Гц, 1H), 1,71 (dd, $J=14,8$, 7,5 Гц, 1H), 1,58-1,43 (m, 8H), 1,29-1,16 (m, 38H), 0,96 (d, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,80 (ddd, $J=13,4$, 6,7, 3,7 Гц, 13H). MS: 916,3 m/z [M+H].

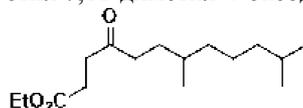
Пример 104.

Промежуточное соединение 104a: (3,7-диметилоктил)бромид магния



Промежуточное соединение 104a синтезировали из 1-бром-3,7-диметилоктана с использованием метода, примененного в промежуточном соединении 104a.

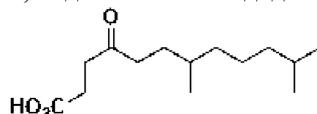
Промежуточное соединение 104b: этил 7,11-диметил-4-оксодеканоат



Промежуточное соединение 104b было синтезировано с выходом 66% из промежуточного соединения 104a с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 103b.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,11 (qd, $J=7,1$, 2,5 Гц, 2H), 2,71 (t, $J=6,6$ Гц, 2H), 2,56 (t, $J=6,6$ Гц, 2H), 2,49-2,35 (m, 2H), 1,68-1,54 (m, 1H), 1,49 (dq, $J=13,2$, 6,6 Гц, 1H), 1,43-1,31 (m, 2H), 1,24 (td, $J=8,0$, 7,1, 3,6 Гц, 6H), 1,10 (dddd, $J=16,9$, 9,9, 4,7, 2,0 Гц, 3H), 0,84 (d, $J=6,5$ Гц, 9H).

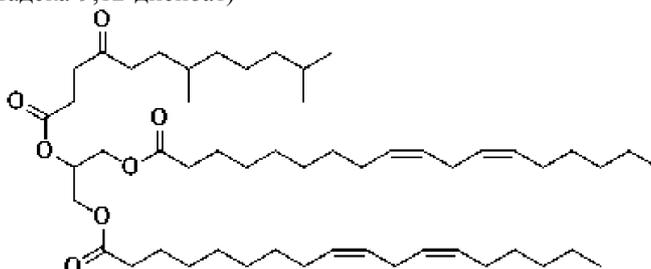
Промежуточное соединение 104c: 7,11-диметил-4-оксодекановая кислота



Промежуточное соединение 104c было синтезировано с выходом 51% из промежуточного соединения 104b с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 103c.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,72 (t, $J=6,1$ Гц, 2H), 2,63 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,50-2,36 (m, 2H), 1,61 (ddt, $J=11,8$, 9,0, 4,3 Гц, 1H), 1,51 (hept, $J=6,6$ Гц, 1H), 1,45-1,34 (m, 2H), 1,24 (ddt, $J=16,2$, 13,5, 4,2 Гц, 4H), 1,11 (ddt, $J=16,0$, 9,6, 5,9 Гц, 3H), 0,91-0,81 (m, 9H).

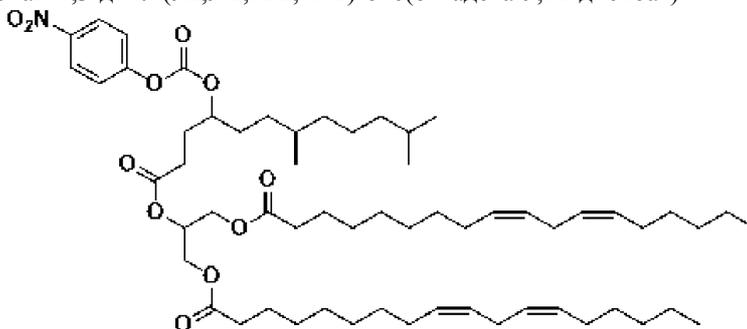
Промежуточное соединение 104d: 2-((7,11-диметил-4-оксодеканойл)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 104d было синтезировано с выходом 58% из промежуточного соединения 104c с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 103d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,41-5,28 (m, 8H), 5,24 (ddd, $J=10,2, 5,8, 4,3$ Гц, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,14 (dd, $J=11,9, 5,8$ Гц, 2H), 2,74 (dt, $J=17,5, 6,5$ Гц, 6H), 2,58 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,48-2,37 (m, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,04 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,60 (ddd, $J=10,0, 5,6, 2,6$ Гц, 6H), 1,54-1,47 (m, 1H), 1,42-1,19 (m, 34H), 1,10 (ddt, $J=19,6, 10,0, 6,9$ Гц, 4H), 0,93-0,80 (m, 15H).

Промежуточное соединение 104e: 2-((7,11-диметил-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)-додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

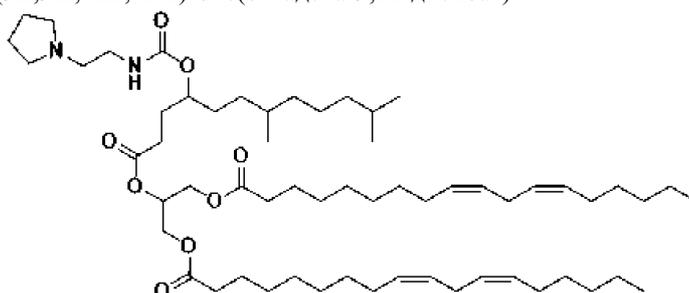


Промежуточное соединение 104e было синтезировано с выходом 58% из промежуточного соединения 104d с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 1e.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,27-8,11 (m, 2H), 7,36-7,29 (m, 2H), 5,36-5,16 (m, 9H), 4,78 (ddq, $J=12,5, 7,0, 3,4$ Гц, 1H), 4,25 (dd, $J=12,0, 4,3$ Гц, 2H), 4,12-4,05 (m, 2H), 2,70 (t, $J=6,3$ Гц, 4H), 2,40 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 2,24 (tt, $J=7,7, 4,0$ Гц, 4H), 2,07-1,88 (m, 10H), 1,72-1,48 (m, 7H), 1,44 (ddd, $J=13,3, 6,6, 1,3$ Гц, 1H), 1,39-1,14 (m, 34H), 1,06 (dtd, $J=8,6, 6,7, 4,7$ Гц, 3H), 0,86-0,76 (m, 15H).

Пример 105 - соединение 105.

Соединение 105: 2-((7,11-диметил-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)додеcanoил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

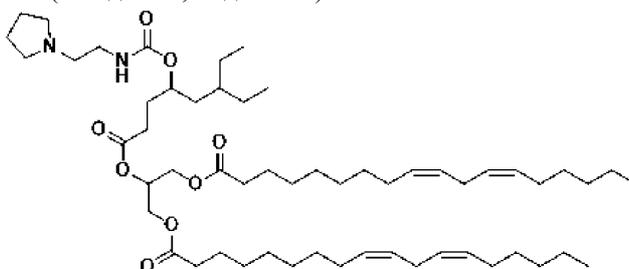


Соединение 105 было синтезировано с выходом 62% из промежуточного соединения 104e и 2-пирролидин-1-илэтанамин с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 91d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,38-5,22 (m, 8H), 5,22-5,15 (m, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,67 (s, 1H), 4,22 (dd, $J=12,0, 4,4$ Гц, 2H), 4,08 (ddd, $J=11,9, 5,9, 3,5$ Гц, 2H), 3,20 (t, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,51 (t, $J=6,1$ Гц, 2H), 2,43 (d, $J=5,9$ Гц, 4H), 2,32 (ddd, $J=9,2, 6,7, 3,7$ Гц, 2H), 2,25 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,98 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,84 (d, $J=7,5$ Гц, 1H), 1,77-1,66 (m, 5H), 1,54 (p, $J=7,1$ Гц, 7H), 1,44 (p, $J=6,6$ Гц, 3H), 1,35-1,10 (m, 34H), 1,10-0,96 (m, 5H), 0,86-0,74 (m, 15H). MS: 984,2 m/z [M+H].

Пример 106 - соединение 106.

Соединение 106: 2-((6-этил-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Соединение 106 было получено с выходом 78% из промежуточного соединения 103e и 2-пирролидин-1-илэтанамин с использованием метода, примененного в промежуточном соединении 91d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,28 (qt, $J=11,5, 6,0$ Гц, 8H), 5,19 (q, $J=5,0$ Гц, 1H), 4,79 (s, 1H), 4,22 (dd, $J=12,2, 4,5$ Гц, 2H), 4,08 (ddd, $J=11,8, 5,8, 3,5$ Гц, 2H), 3,22 (q, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,53 (t, $J=6,2$ Гц, 2H), 2,46 (s, 3H), 2,33 (dd, $J=9,6, 7,0$ Гц, 2H), 2,25 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 1,98 (q, $J=6,8$ Гц, 7H), 1,89-

1,80 (m, 2H), 1,76-1,61 (m, 7H), 1,60-1,45 (m, 6H), 1,34-1,16 (m, 33H), 0,87-0,72 (m, 12H). MS: 928,4 m/z [M+H].

Пример 107 - соединение 107.

Промежуточное соединение 107a: (Z)-1-бромонон-3-ен



К раствору PPh₃ (36,79 г, 1,33 экв.) в DCM (1 M) добавляли Br₂ (7,23 мл, 1,33 экв.) при 0°C. (Z)-нон-3-ен-1-ол (15 г, 1,0 эквив.) добавляли к реакционной смеси и смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Реакционную смесь гасили добавлением H₂O при 0°C и трижды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (15 г, 69%).

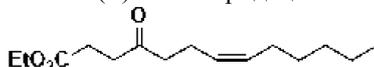
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,47-5,30 (m, 2H), 3,64 (t, J=6,7 Гц, 2H), 2,18-2,06 (m, 2H), 2,02 (q, J=6,7 Гц, 2H), 1,77 (s, 1H), 1,62 (p, J=6,9 Гц, 2H), 1,38-1,20 (m, 6H), 0,87 (t, J=6,8 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 107b: (Z)-нон-3-ен-1-илмагнийбромид



К суспензии Mg (2,13 г, 1,2 экв.) в THF (150 мл) добавляли I₂ (1,86 г, 0,1 экв.). Затем к смеси добавляли промежуточное соединение 107a (15 г, 1,0 эквив.) и смесь перемешивали при 45°C в течение 2 ч. Реакционную смесь использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

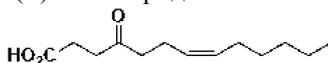
Промежуточное соединение 107c: этил (Z)-4-оксотридец-7-еноат



Промежуточное соединение 107c было синтезировано с выходом 75% из промежуточного соединения 107b с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 103b.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,43-5,23 (m, 2H), 4,10 (qd, J=7,1, 3,2 Гц, 3H), 2,69 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,55 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,47 (t, J=7,4 Гц, 2H), 2,30 (q, J=7,3 Гц, 2H), 2,01-1,95 (m, 2H), 1,34-1,18 (m, 11H), 0,86 (t, J=6,8 Гц, 3H).

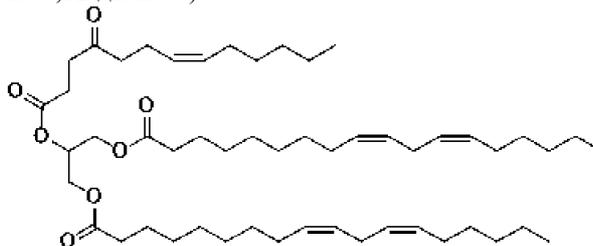
Промежуточное соединение 107d: (Z)-4-оксотридек-7-еновая кислота



Промежуточное соединение 107d было синтезировано с выходом 80% из промежуточного соединения 107c с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 103c.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,23 (ddt, J=34,8, 17,4, 7,8 Гц, 2H), 4,27-3,96 (m, 2H), 2,58 (t, J=6,1 Гц, 2H), 2,38 (t, J=7,4 Гц, 2H), 2,31-2,08 (m, 4H), 1,92 (q, J=6,9 Гц, 2H), 1,75 (s, 2H), 1,21 (dq, J=15,0, 9,2, 8,0 Гц, 6H), 0,80 (t, J=6,7 Гц, 3H).

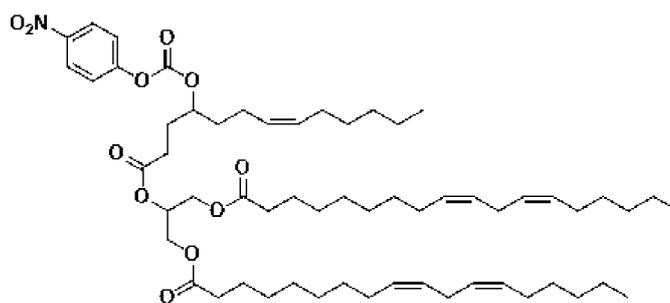
Промежуточное соединение 107e: 2-(((Z)-4-оксотридек-7-эноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 107e было синтезировано с выходом 80% из промежуточного соединения 107d и промежуточного соединения 1c с использованием метода, примененного в промежуточном соединении 104c.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,35-5,22 (m, 9H), 5,21-5,15 (m, 1H), 4,23 (dt, J=11,9, 4,8 Гц, 2H), 4,12-4,01 (m, 4H), 2,76-2,67 (m, 4H), 2,65 (t, J=6,5 Гц, 2H), 2,55-2,49 (m, 2H), 2,42 (t, J=7,5 Гц, 2H), 2,25 (t, J=7,6 Гц, 6H), 1,98 (q, J=7,2 Гц, 13H), 1,54 (p, J=7,6 Гц, 4H), 1,32-1,18 (m, 37H), 0,82 (td, J=7,0, 1,7 Гц, 9H).

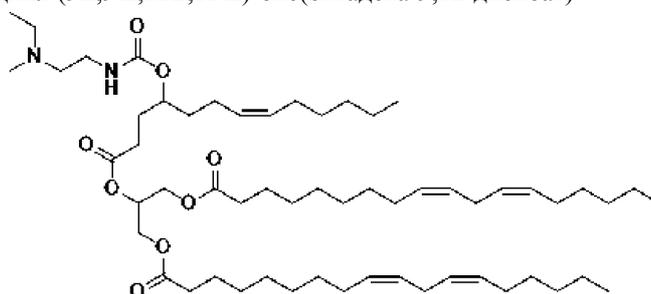
Промежуточное соединение 107f: 2-(((Z)-4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)тридек-7-эноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



Промежуточное соединение 107f было синтезировано с выходом 21% из промежуточного соединения 107e с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 1e.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,48-8,20 (m, 2H), 7,56-7,32 (m, 2H), 5,45-5,20 (m, 10H), 4,88 (tt, $J=7,9$, 4,6 Гц, 1H), 4,30 (ddd, $J=12,1$, 10,3, 4,5 Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9$, 5,8, 2,1 Гц, 2H), 2,74 (dt, $J=19,6$, 6,5 Гц, 5H), 2,59 (t, $J=6,5$ Гц, 1H), 2,48 (q, $J=7,1$ Гц, 2H), 2,41-2,24 (m, 5H), 2,15 (q, $J=7,7$ Гц, 1H), 2,09-1,96 (m, 10H), 1,61 (q, $J=12,7$, 9,4 Гц, 5H), 1,39-1,20 (m, 30H), 0,99-0,69 (m, 9H).

Соединение 107: 2-(((Z)-4-(((2-(этил(метил)этил)карбамоил)окси)тридек-7-эноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

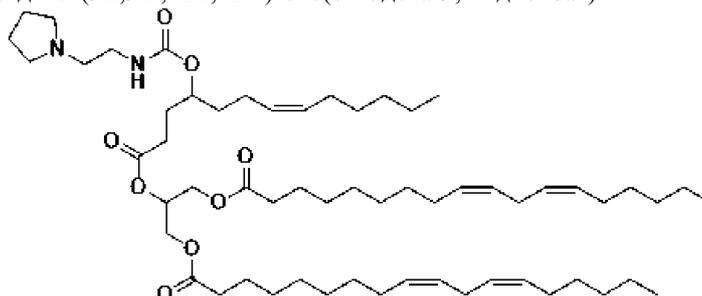


Соединение 107 было синтезировано с выходом 56% из промежуточного соединения 107f и N'-этил-N'-метилэтан-1,2-диамина с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 91d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,41-5,29 (m, 9H), 5,24 (p, $J=5,0$ Гц, 1H), 5,16 (d, $J=5,3$ Гц, 1H), 4,81-4,74 (m, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9$, 4,4 Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9$, 5,8, 3,3 Гц, 2H), 3,23 (q, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,76 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,48-2,36 (m, 6H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,20 (s, 3H), 2,02 (dq, $J=20,4$, 7,0 Гц, 12H), 1,96-1,87 (m, 2H), 1,81 (dd, $J=14,7$, 7,3 Гц, 1H), 1,65-1,55 (m, 7H), 1,39-1,22 (m, 35H), 1,03 (t, $J=7,1$ Гц, 3H), 0,88 (td, $J=7,0$, 2,3 Гц, 9H). MS: 955,3 m/z [M+H].

Пример 108 - соединение 108.

Соединение 108: 2-(((Z)-4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)тридек-7-эноил)окси)пропан-1,3-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

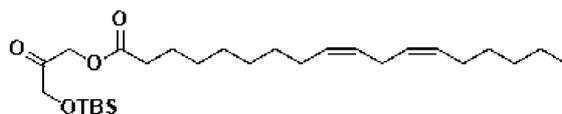


Соединение 108 было синтезировано с выходом 51% из промежуточного соединения 107f и 2-пирролидин-1-илэтанамин с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 91d.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,26 (m, 9H), 5,24 (q, $J=5,1$ Гц, 1H), 4,78 (tt, $J=8,6$, 4,6 Гц, 1H), 4,28 (dd, $J=11,9$, 4,4 Гц, 2H), 4,14 (ddd, $J=11,9$, 5,8, 3,5 Гц, 2H), 3,29 (q, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,76 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,66-2,50 (m, 5H), 2,39 (ddd, $J=9,6$, 6,7, 3,6 Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,01 (dq, $J=20,4$, 7,1 Гц, 12H), 1,87-1,72 (m, 5H), 1,59 (q, $J=7,3$ Гц, 6H), 1,40-1,15 (m, 31H), 0,88 (td, $J=6,9$, 2,2 Гц, 9H). MS: 967,3 m/z [M+H].

Пример 109 - соединение 109.

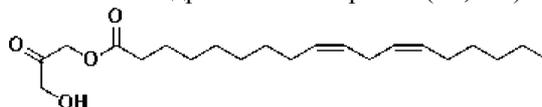
Промежуточное соединение 109a: 3-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-2-оксипропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат



Промежуточное соединение 109a было синтезировано с выходом 63% из промежуточного соединения 62a и линолевой кислоты с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 62b.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,31-5,19 (m, 4H), 4,84 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 2,67 (t, $J=6,7$ Гц, 2H), 2,32 (t, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,94 (q, $J=6,9$ Гц, 4H), 1,57 (q, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,31-1,13 (m, 15H), 0,80 (d, $J=15,1$ Гц, 12H).

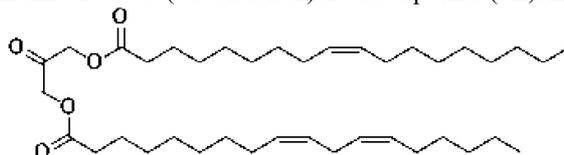
Промежуточное соединение 109b: 3-гидрокси-2-оксипропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат



К раствору промежуточного соединения 109a (1,0 экв.) в THF (180 мл) добавляли HF-пиридин (5,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления ТГФ. Остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (66%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,33 (dtd, $J=12,5, 10,3, 9,5, 5,6$ Гц, 4H), 4,74 (s, 1H), 4,36 (s, 1H), 2,76 (t, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,41 (t, $J=7,5$ Гц, 1H), 2,37-2,27 (m, 1H), 2,03 (q, $J=6,9$ Гц, 4H), 1,65 (p, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,41-1,24 (m, 14H), 0,87 (t, $J=6,7$ Гц, 3H).

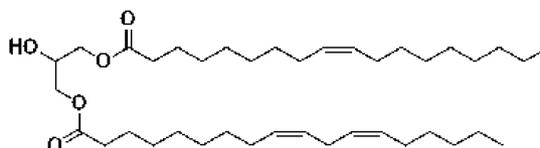
Промежуточное соединение 109c: 3-(олеоилокси)-2-оксипропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат



Промежуточное соединение 109c было синтезировано с выходом 50% из промежуточного соединения 109b и олеиновой кислоты с использованием метода, примененного в соединении 52.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,37-5,22 (m, 6H), 4,68 (s, 4H), 2,70 (t, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,35 (t, $J=7,5$ Гц, 4H), 2,02-1,91 (m, 8H), 1,60 (q, $J=7,3$ Гц, 4H), 1,33-1,17 (m, 33H), 0,81 (dt, $J=7,0, 3,3$ Гц, 6H).

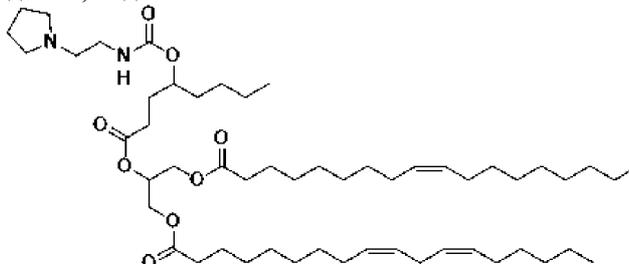
Промежуточное соединение 109d: 2-гидрокси-3-(олеоилокси)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат



Промежуточное соединение 109d было синтезировано с выходом 50% из промежуточного соединения 109c с использованием метода, примененного для промежуточного соединения 1c.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,37-5,21 (m, 6H), 4,15-4,00 (m, 4H), 2,70 (t, $J=6,3$ Гц, 2H), 2,28 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,04-1,89 (m, 8H), 1,56 (t, $J=7,4$ Гц, 4H), 1,23 (dt, $J=13,9, 7,0$ Гц, 34H), 0,82 (td, $J=6,8, 3,8$ Гц, 6H).

Соединение 109: 3-(олеоилокси)-2-(((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)октаноил)-окси)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат



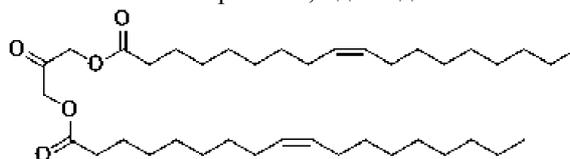
Соединение 109 синтезировали из промежуточного соединения 109d и промежуточного соединения 85с, используя метод, примененный для соединения 85.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,35 (tdd, $J=8,8, 6,5, 3,6$ Гц, 5H), 5,28-5,22 (m, 1H), 5,16 (s, 1H), 4,29 (dd, $J=11,9, 4,4$ Гц, 2H), 4,15 (ddd, $J=11,9, 5,8, 3,3$ Гц, 2H), 3,34-3,22 (m, 2H), 2,77 (t, $J=6,5$ Гц, 2H), 2,55 (d, $J=30,6$ Гц, 5H), 2,39 (ddd, $J=8,8, 6,6, 3,8$ Гц, 2H), 2,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,09-1,97 (m, 7H), 1,91 (d, $J=7,2$ Гц, 1H), 1,78 (d, $J=6,0$ Гц, 4H), 1,61 (t, $J=7,2$ Гц, 6H), 1,30 (td, $J=10,5, 9,4, 4,7$ Гц, 30H), 0,91-0,87 (m, 6H). MS:

902,3 m/z [M+H].

Пример 110 - соединение 110.

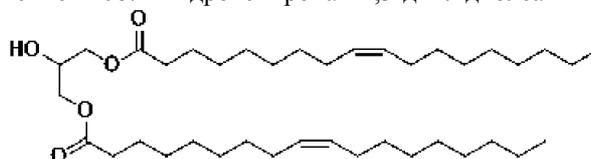
Промежуточное соединение 110a: 2-оксопропан-1,3-диил диолеат



К раствору 1,3-дигидроксипропан-2-она (5 г, 0,5 эквив.) в DCM (300 мл) добавляли DMAP (1,1 эквив.) и EDCI (1,0 эквив.). Затем в указанную выше смесь добавляли олеиновую кислоту (1,0 эквив.) и перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM. Остаток разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией, получая продукт в виде бесцветного масла (8 г, 12%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,34-5,21 (m, 4H), 4,68 (s, 4H), 2,35 (t, J=7,5 Гц, 4H), 1,94 (q, J=6,4 Гц, 8H), 1,60 (q, J=7,4 Гц, 4H), 1,31-1,14 (m, 38H), 0,89-0,75 (m, 6H).

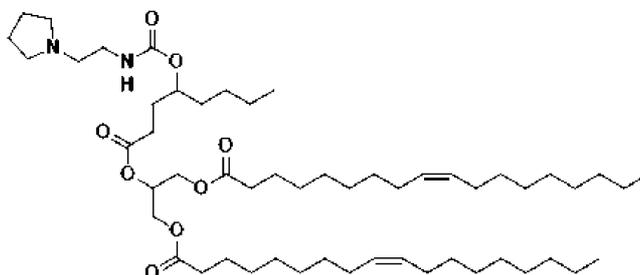
Промежуточное соединение 110b: 2-гидроксипропан-1,3-диил диолеат



Промежуточное соединение 110b было синтезировано с выходом 47% из промежуточного соединения 110a с использованием метода, используя метод применяемый в промежуточном соединении 1c.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,41-5,26 (m, 4H), 4,22-4,06 (m, 4H), 2,34 (t, J=7,6 Гц, 4H), 2,01 (q, J=6,4 Гц, 7H), 1,63 (p, J=7,2 Гц, 4H), 1,28 (d, J=14,2 Гц, 33H), 0,90-0,81 (m, 6H).

Соединение 110: 2-((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)октаноил)окси)пропан-1,3-диил диолеат

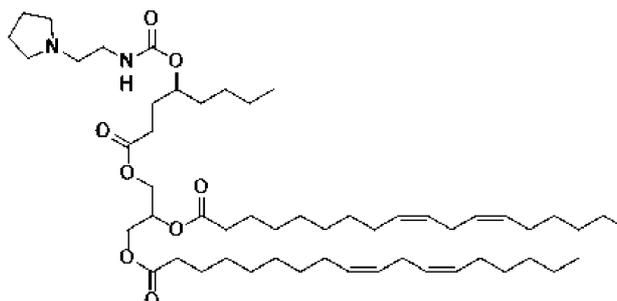


Соединение 110 было синтезировано из промежуточного соединения 110b и промежуточного соединения 85с, используя метод, применяемый для соединения 85.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,33-5,22 (m, 4H), 5,22-5,15 (m, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,69 (s, 1H), 4,28-4,17 (m, 2H), 4,08 (ddq, J=12,2, 6,4, 2,9 Гц, 2H), 3,21 (d, J=6,8 Гц, 2H), 2,51 (t, J=6,2 Гц, 2H), 2,43 (d, J=6,0 Гц, 4H), 2,32 (ddd, J=8,6, 6,6, 3,7 Гц, 2H), 2,24 (t, J=7,6 Гц, 4H), 1,94 (q, J=6,7 Гц, 8H), 1,87-1,78 (m, 1H), 1,70 (p, J=3,1 Гц, 5H), 1,61-1,36 (m, 9H), 1,22 (d, J=13,2 Гц, 45H), 0,82 (td, J=6,9, 3,7 Гц, 9H). MS: 904,2 m/z [M+H].

Пример 111 - соединение 111.

Соединение 111-3-((4-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)октаноил)окси)пропан-1,2-диил (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



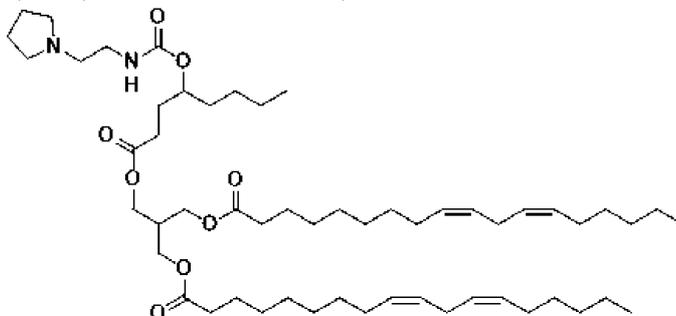
Соединение 111 было синтезировано из промежуточного соединения 85с и промежуточного соеди-

нения 30а, используя метод, примененный для соединения 85.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,43-5,27 (m, 8H), 5,24 (t, $J=5,2$ Гц, 1H), 5,14 (s, 1H), 4,74 (s, 1H), 4,27 (ddd, $J=12,2, 8,2, 4,2$ Гц, 2H), 4,18-4,09 (m, 2H), 3,27 (q, $J=5,9$ Гц, 2H), 2,75 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,57 (t, $J=6,2$ Гц, 2H), 2,50 (s, 4H), 2,37 (td, $J=8,9, 7,8, 3,5$ Гц, 2H), 2,30 (td, $J=7,5, 4,4$ Гц, 4H), 2,03 (q, $J=6,9$ Гц, 8H), 1,98-1,86 (m, 2H), 1,76 (h, $J=3,1$ Гц, 5H), 1,59 (tt, $J=9,8, 5,1$ Гц, 7H), 1,38-1,21 (m, 30H), 0,87 (t, $J=6,7$ Гц, 9H). MS: 900,1 m/z [M+H].

Пример 112 - соединение 112.

Соединение 112: 2-(((4-((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)октаноил)окси)метил)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

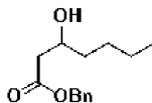


Соединение 112 было синтезировано из промежуточного соединения 86с и промежуточного соединения 53 а, используя метод, примененный для соединения 84.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,28 (m, 8H), 5,19 (s, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,12 (d, $J=5,9$ Гц, 6H), 3,29 (q, $J=6,1$ Гц, 2H), 2,77 (t, $J=6,4$ Гц, 4H), 2,64-2,49 (m, 6H), 2,38 (ddd, $J=10,1, 8,5, 4,8$ Гц, 3H), 2,30 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 2,05 (q, $J=6,8$ Гц, 8H), 1,90 (s, 2H), 1,86-1,72 (m, 6H), 1,61 (t, $J=7,3$ Гц, 7H), 1,32 (tq, $J=7,6, 4,9, 3,7$ Гц, 33H), 0,89 (t, $J=6,7$ Гц, 9H). MS: 914,1 m/z [M+H].

Пример 113 - соединение 113.

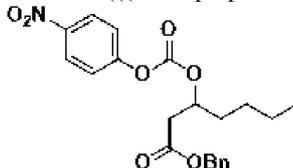
Промежуточное соединение 113а: бензил 3-гидроксигептаноат



Zn выливали в HCl (1 M) и перемешивали в течение 30 мин. Смесь фильтровали, и осадок промывали EtOH. Твердое вещество сушили при пониженном давлении, получая свежеприготовленный Zn. К суспензии Zn (15,18 г, 2,0 экв.) в THF (50 мл) по каплям добавляли пентаналь (1,0 экв.) и бензил-2-бромацетат (1,5 экв.) при 66°C в течение 0,5 часа. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (10 г, 36%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,34 (d, $J=4,1$ Гц, 5H), 5,14 (s, 2H), 4,01 (tt, $J=8,4, 3,6$ Гц, 1H), 2,87 (s, 1H), 2,59-2,41 (m, 2H), 1,57-1,47 (m, 1H), 1,43 (qd, $J=9,6, 8,9, 4,6$ Гц, 2H), 1,37-1,24 (m, 4H), 0,93-0,87 (m, 3H).

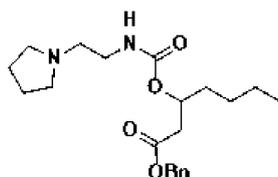
Промежуточное соединение 113b: бензил 3-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)гептаноат



К раствору промежуточного соединения 113а (8 г, 1,0 эквив.) и (4-нитрофенил)карбонхлорида (2,0 эквив.) в DCM (10 мл) добавляли пиридин (3,0 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM. Остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (8 г, выход 59%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,30-8,21 (m, 2H), 7,39-7,28 (m, 7H), 5,16 (d, $J=3,3$ Гц, 2H), 2,82-2,69 (m, 2H), 1,81-1,68 (m, 2H), 1,43-1,30 (m, 5H), 0,94-0,89 (m, 3H).

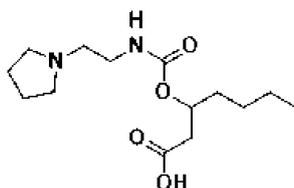
Промежуточное соединение 113с: бензил 3-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)гептаноат



К раствору промежуточного соединения 113b (0,5 г, 1,0 эквив.) и 2-пирролидин-1-илэтанамин (3,0 эквив.) в MeCN (10 мл) добавляли DMAP (0,1 эквив.) и пиридин (3,0 эквив.) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления MeCN. Остаток разбавляли H₂O и экстрагировали 3× EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (0,4 г, 85%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,36-7,20 (m, 5H), 5,05 (s, 2H), 3,17 (dt, J=13,3, 6,4 Гц, 2H), 2,56 (td, J=13,2, 11,4, 6,3 Гц, 2H), 2,50-2,37 (m, 6H), 1,72-1,63 (m, J=4,0, 3,5 Гц, 4H), 1,49 (s, 2H), 1,28-1,20 (m, 4H), 0,81 (q, J=4,2, 3,2 Гц, 3H).

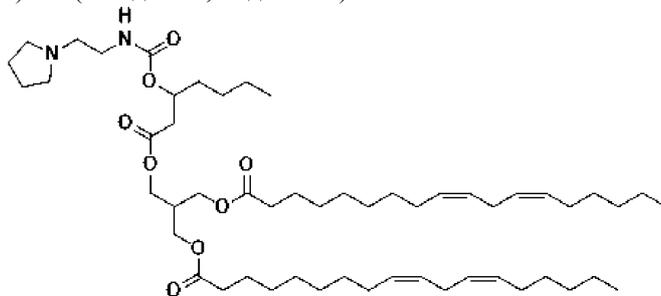
Промежуточное соединение 113d: 3-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)гептановая кислота



К раствору промежуточного соединения 113с (3,5 г, 1,0 эквив.) в ТГФ (10 мл) добавляли Pd/C (10% мас./мас.). Смесь продували 3 раза H₂, а затем смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере H₂. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая остаток. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (2 г, 75%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,00 (s, 1H), 6,46 (t, J=6,0 Гц, 1H), 5,02 (dt, J=10,0, 5,2 Гц, 1H), 3,43-3,25 (m, 3H), 2,92 (dt, J=21,7, 6,5 Гц, 6H), 2,37 (qd, J=14,9, 6,4 Гц, 2H), 1,87 (q, J=4,4, 2,9 Гц, 4H), 1,64-1,45 (m, 2H), 1,24 (h, J=7,7, 6,7 Гц, 4H), 0,88-0,75 (m, 3H).

Соединение 113: 2-(((3-(((2-(пирролидин-1-ил)этил)карбамоил)окси)гептаноил)окси)метил)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)

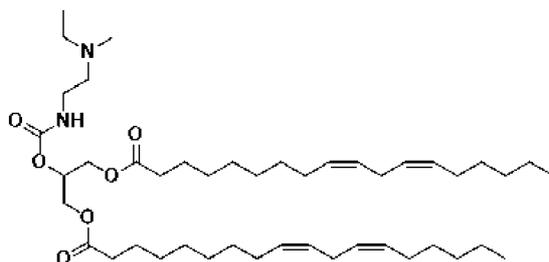


Соединение 113 синтезировали из промежуточного соединения 113с и промежуточного соединения 53а, используя метод, применяемый для соединения 52.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,37-5,18 (m, 8H), 5,00 (q, J=6,4 Гц, 1H), 4,06 (p, J=6,5, 6,1 Гц, 6H), 3,21 (p, J=7,3, 6,8 Гц, 2H), 2,70 (t, J=6,5 Гц, 4H), 2,55-2,39 (m, 7H), 2,32 (p, J=6,0 Гц, 1H), 2,23 (t, J=7,6 Гц, 4H), 1,98 (q, J=6,8 Гц, 7H), 1,76-1,63 (m, 5H), 1,54 (t, J=7,3 Гц, 6H), 1,33-1,15 (m, 30H), 0,82 (t, J=6,7 Гц, 9H). MS: 900,1 m/z [M+H].

Пример 114 - сравнительное соединение 114.

Соединение 114: 2-(((2-(этил(метил)амино)этил)карбамоил)окси)пропан-1,3-диол (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат)



К раствору промежуточного соединения 1с (250 мг, 1,0 эквив.) в DCM (2 мл) добавляли пиридин (3,0 эквив.) и 4-нитрофенилхлорформиат (1,1 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч, после чего реакцию гасили добавлением воды и экстрагировали 3 раза DCM. Органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный неочищенный остаток восстанавливали в MeCN (2 мл) с последующим добавлением пиридина (3,0 эквив.), N1-этил-N1-метилэтан-1,2-диамина (1,5 эквив.) и DMAP (1,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Затем к реакционной смеси добавляли гептан и слой гептана промывали 3 раза MeCN. Объединенные слои MeCN трижды экстрагировали гептаном, а объединенные слои гептана промывали один последний раз MeCN. Затем гептан удаляли в вакууме и неочищенный материал очищали колоночной хроматографией (MeOH/DCM), получая продукт в виде бесцветного масла (138 мг, 46%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,49-5,27 (m, 8H), 5,14 (p, J=5,0 Гц, 1H), 4,33-4,12 (m, 4H), 3,29 (q, J=5,7 Гц, 2H), 2,83-2,71 (m, 4H), 2,60-2,38 (m, 5H), 2,38-2,16 (m, 7H), 2,04 (q, J=6,9 Гц, 8H), 1,69-1,56 (m, 4H), 1,42-1,22 (m, 28H), 1,07 (t, J=7,2 Гц, 3H), 0,96-0,85 (m, 6H).

Пример 115 - Материалы и методы.

Композиции LNP.

LNP были приготовлены с использованием различных аминовых липидов в 4-компонентной липидной системе, состоящей из ионизируемого липида (к примеру, аминного липида), DSPC, холестерина и ПЭГ-2k-DMG. В исследованиях на процентное изменение печени у мышей мРНК Cas9 и химически модифицированная оРНК, нацеленная на мышиную последовательность, были составлены в LNP либо в соотношении 1:1 мас./мас., либо в соотношении 1:2 мас./мас.

Композиция LNP - поперечный поток.

Липидные компоненты растворяли в 100% этаноле с молярными соотношениями липидных компонентов, описанными ниже. Химически модифицированную оРНК и мРНК Cas9 объединяли и растворяли в 25 мМ цитрате, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация общего карго РНК составляла приблизительно 0,45 мг/мл. LNP были составлены с соотношением N/P около 6, с соотношением химически модифицированной оРНК:мРНК Cas9 либо 1:1, либо 1:2 мас./мас., как описано ниже.

LNP были сформированы путем смешивания липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивают через крестовину для смешивания с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивается с выходным потоком крестовины через встроенный тройник, (см., к примеру, WO2016010840, фиг. 2.) LNP выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре и затем разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). Разбавленные LNP концентрировали с использованием фильтрации в тангенциальном потоке на плоском картридже (Sartorius, 100 кДа MWCO), а затем заменяли буфер диафильтрацией на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (мас./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). В качестве альтернативы, окончательная замена буфера в TSS была завершена с помощью обессоливающих колонн PD-10 (GE). При необходимости композиции концентрировали центрифугированием на центробежных фильтрах Amicon 100 кДа (Millipore). Затем полученную смесь фильтровали с использованием стерильного 0,2 мкм фильтра. Конечный LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего использования.

Аналитика композиции LNP.

Динамическое рассеяние света ("DLS") используется для характеристики индекса полидисперсности ("pdi") и размера LNP настоящего изобретения. DLS измеряет рассеяние света, которое возникает в результате воздействия на образец источника света. PDI, как определено из измерений DLS, представляет собой распределение размера частиц (около среднего размера частиц) в популяции с совершенно однородной популяцией, имеющей PDI, равное нулю.

Электроферетическое рассеяние света используется для характеристики поверхностного заряда LNP при заданном pH. Поверхностный заряд или дзета-потенциал является мерой величины электростатического отталкивания/притяжения между частицами в суспензии LNP.

Фракционирование потока в поле с асимметричным потоком - многоугловое рассеяние света (AF4-MALS) используется для разделения частиц в составе по гидродинамическому радиусу, а затем для измерения молекулярных масс, гидродинамических радиусов и среднеквадратичных радиусов фракционированных частиц. Это позволяет оценить молекулярную массу и распределение по размерам, а также вторичные характеристики, такие как график Бурхарда-Стокмейера (соотношение среднеквадратичного ("среднеквадратичного") радиуса к гидродинамическому радиусу с течением времени, предполагая внутреннюю плотность ядра частицы) и график среднеквадратичной конформации (логарифм среднеквадратичного радиуса по сравнению с логарифмом молекулярной массы, где наклон полученной линейной аппроксимации дает степень компактности по сравнению с удлинением).

Анализ слежения за наночастицами (NTA, Malvern Nanosight) можно использовать для определения распределения частиц по размерам, а также концентрации частиц. Образцы LNP соответствующим образом разбавляют и вводят на предметное стекло микроскопа. Камера записывает рассеянный свет по мере того, как частицы медленно проникают через поле зрения. После того как видеофрагмент снят, анализ траектории движения наночастиц обрабатывает видеофрагмент, отслеживая пиксели и вычисляя коэффициент диффузии. Этот коэффициент диффузии можно перевести в гидродинамический радиус части-

цы. Прибор также подсчитывает количество отдельных частиц, подсчитанных в анализе, для определения концентрации частиц.

Криоэлектронная микроскопия ("cryo-EM") может использоваться для определения размера частиц, морфологии и структурных характеристик LNP.

Анализ состава липидов LNPs может быть определен с помощью жидкостной хроматографии с последующим обнаружением заряженного аэрозоля (LC-CAD). Этот анализ может обеспечить сравнение фактического содержания липидов с теоретическим содержанием липидов.

Композиции LNP анализируют на средний размер частиц, индекс полидисперсности (pdi), общее содержание РНК, эффективность инкапсуляции РНК и дзета-потенциал. Композиции LNP можно дополнительно охарактеризовать с помощью анализа липидов, AF4-MALS, NTA и/или cryo-EM. Средний размер частиц и полидисперсность измеряют методом динамического рассеяния света (DLS) с использованием прибора Malvern Zetasizer DLS. Образцы LNP были разбавлены буфером PBS перед измерением с помощью DLS. Z-средний диаметр, который является измерением среднего размера частиц на основе интенсивности, был представлен вместе со среднечисленным диаметром и pdi. Инструмент Malvern Zetasizer также используется для измерения дзета-потенциала LNP. Перед измерением образцы разбавляют 1:17 (50 мкл на 800 мкл) в 0,1X PBS, pH 7,4.

Анализ на основе флуоресценции (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) используется для определения концентрации общей и свободной РНК. Эффективность инкапсуляции рассчитывается как (Общая РНК - Свободная РНК)/Общая РНК. Образцы LNP соответствующим образом разбавляют 1× TE-буфером, содержащим 0,2% Triton-X 100, для определения общей РНК или 1× TE-буфером для определения свободной РНК. Стандартные кривые получают с использованием исходного раствора РНК, используемого для приготовления композиций, и его разбавления в буфере 1× TE ±0,2% Triton-X 100. Затем разбавленный краситель RiboGreen® (в соответствии с инструкциями производителя) добавляется к каждому из стандартов и образцов и инкубируется в течение примерно 10 мин при комнатной температуре в отсутствие света. Считывающее устройство для микропланшетов SpectraMax M5 (Molecular Devices) используется для считывания образцов с длинами волн возбуждения, авто отсечки и излучения, установленными на 488 нм, 515 нм и 525 нм соответственно. Суммарную РНК и свободную РНК определяют по соответствующим стандартным кривым.

Эффективность инкапсуляции рассчитывается как (Общая РНК - Свободная РНК)/Общая РНК. Ту же процедуру можно использовать для определения эффективности инкапсуляции компонента карго на основе ДНК. Для однопочечной ДНК можно использовать краситель Oligreen, а для двухпочечной ДНК - краситель Picogreen.

AF4-MALS используется для анализа распределения молекулярной массы и размера, а также вторичной статистики этих расчетов. LNPs разбавляют соответствующим образом и вводят в канал разделения AF4 с помощью автоматического пробоотборника HPLC, где они фокусируются, а затем элюируются с экспоненциальным градиентом поперечного потока через канал. Вся жидкость приводится в действие насосом HPLC и прибором Wyatt Eclipse. Частицы, выходящие из канала AF4, проходят через УФ-детектор, детектор многоугольного светорассеяния, детектор квазиупругого светорассеяния и детектор дифференциального показателя преломления. Необработанные данные обрабатываются с использованием модели Дебая для определения молекулярной массы и среднеквадратичного радиуса по сигналам детектора.

Липидные компоненты в LNPs количественно анализируются с помощью HPLC в сочетании с детектором заряженных аэрозолей (CAD). Хроматографическое разделение 4 липидных компонентов достигается обращенно-фазовой HPLC. CAD - это разрушающий масс-детектор, который обнаруживает все нелетучие соединения, и сигнал остается неизменным независимо от структуры анализируемого вещества.

Карго мРНК Cas9 и гРНК.

Карго мРНК Cas9 получали транскрипцией *in vitro*. Кепированная и полиаденилированная мРНК Cas9, содержащая 1× NLS (SEQ ID NO: 3) или последовательность из табл. 24 документа PCT/US2019/053423 (которая включена в настоящее описание в качестве ссылки), была получена путем транскрипции *in vitro* с использованием линейаризованной плазмидной ДНК-матрицы и T7 РНК полимеразы. К примеру, плазмидная ДНК, содержащая промотор T7 и область поли(А/Т) размером 100 нуклеотидов, может быть линейаризована путем инкубации при 37°C в течение 2 ч с XbaI в следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 ед./мкл XbaI. (NEB) и 1× реакционный буфер. XbaI можно инактивировать нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линейаризованная плаزمида может быть очищена от ферментов и буферных солей с использованием спин-колонки с силикагелем (Epoch Life Sciences) и проанализирована с помощью агарозного геля для подтверждения линейаризации. Реакция IVT для генерации модифицированной мРНК Cas9 может быть проведена путем инкубации при 37°C в течение 4 ч в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; по 2 mM каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метил псевдо-UTP (Trilink); 10 mM ARCA (Trilink); 5 ед./мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 ед./мкл ингибитора мышьяковой РНКазы (NEB); 0,004 ед./мкл неорганической пирофосфатазы E. coli (NEB);

и 1× реакционный буфер. После 4-часовой инкубации добавляли TURBO ДНКазу (ThermoFisher) до конечной концентрации 0,01 ед/мкл, и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 мин для удаления матрицы ДНК. мРНК Cas9 очищали методом преципитации LiCl.

огРНК в следующих примерах были синтезированы химическим путем.

Доставка LNP In Vivo.

В каждом исследовании использовали самок мышей CD-1 в возрасте 6-10 недель. Животных взвешивали и группировали в соответствии с массой тела для приготовления дозируемых растворов на основе среднего веса группы. LNP вводили через боковую хвостовую вену в объеме 0,2 мл на животное (приблизительно 10 мл на килограмм веса тела). За животными периодически наблюдали на предмет побочных эффектов в течение по меньшей мере 24 ч после введения дозы.

Для исследований по измерению редактирования *in vivo* в печени самкам мышей CD-1 вводили дозу 0,1 мг/кг массы тела, если не указано иное. Животных умерщвляли через 6 или 7 дней путем обескровливания через пункцию сердца под изофлорановой анестезией. Ткань печени собирали у каждого животного для выделения и анализа ДНК. Кровь собирали в пробирки с сепаратором сыворотки или в пробирки, содержащие забуференный цитрат натрия для плазмы, как описано здесь. Когорты мышей были измерены для редактирования с помощью секвенирования следующего поколения (NGS).

Секвенирование NGS.

Вкратце, для количественного определения эффективности редактирования в целевом участке генома была выделена геномная ДНК и использовано глубокое секвенирование для выявления присутствия вставок и делеций, внесенных редактированием гена.

Праймеры для PCR были сконструированы вокруг сайта-мишени (к примеру, B2M), и интересующая область генома была амплифицирована. Дополнительную PCR выполняли в соответствии с протоколами производителя (Illumina), чтобы добавить необходимый химический состав для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Считывания были сопоставлены с соответствующим эталонным геномом (к примеру, GRCh38) после исключения тех, которые имели низкие оценки качества. Полученные файлы, содержащие считывания, были сопоставлены с эталонным геномом (файлы BAM), где были выбраны считывания, которые перекрывали интересующую целевую область, и количество считываний дикого типа по сравнению с числом считываний, содержащих вставку, замену или удаление, было рассчитано.

Процент редактирования (к примеру, "эффективность редактирования" или "процент редактирования") определяется как общее количество считываний последовательности со вставками или удалениями по сравнению с общим количеством считываний последовательностей, включая дикий тип.

Транстиретиновый (TTR) ELISA-анализ.

Была собрана кровь и выделена сыворотка, как указано. Общие уровни мышинового TTR в сыворотке определяли с использованием набора ELISA для мышинового преальбумина (транстиретина) (Aviva Systems Biology, Cat. OKIA00111). Вкратце, сыворотки серийно разбавляли разбавителем для образцов из набора, к примеру до конечного разведения в 10 000 и/или 2500 раз. Затем разбавленный образец добавляли в планшеты для ELISA и затем проводили анализ в соответствии с инструкциями. Данные TTR сыворотки из групп лечения выражены в процентах от контрольных уровней носителя.

Пример 116 - оценка липидной эффективности путем редактирования *in vivo*.

Авторы изобретения оценили эффективность редактирования *in vivo* материалов, поставляемых с составами, включающими различные аминокислотные соединения. Редактирование измеряли с использованием либо G282 (SEQ ID NO: 1), который нацелен на ген TTR мыши, либо G650 (SEQ ID NO: 2), который нацелен на ген B2M мыши. Описанные выше липиды оценивали на эффективность в экспериментах по редактированию *in vivo*. LNP были составлены при соотношении огРНК к мРНК Cas9 1:1 и при соотношении N/P около 6. Молярные концентрации липидов в липидном компоненте LNP выражены как молярные% аминокислот/DSPC/холестерин/ПЭГ-2k-DMG, к примеру 50/10/38,5/1,5. Конечные LNP были охарактеризованы для определения эффективности инкапсуляции, индекса полидисперсности и среднего размера частиц в соответствии с аналитическими методами, приведенными выше. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК показан в табл. 2. Значения рКа следующих ионизируемых липидов также были измерены и представлены в табл. 1.

В эксперименте 9, представленном ниже, была протестирована серия соединений, которые основаны на соединении 7 и которые различаются включением либо C₆-циклоалкила, либо C₄₋₁₂-алкила в положение R³ формулы (1A), как показано на фиг. 1A. Как показано в табл. 3 и на фиг. 1B и 1C, все шесть испытанных соединений оказались эффективными для редактирования *in vivo*. Дополнительные группы R³ в серии соединений на основе соединения 7 также тестируются в примере 119 ниже.

Таблица 2
Аналитика состава

Соед. №.	Композиция соотношение (мол. %)	Инкапсу- лирование (%)	Z-Ave Размер (нм)	PDI	Num Ave Размер (нм)	Эксп.
1	50/10/38,5/1,5	99	79,25	0,085	57,00	1
3	50/10/38,5/1,5	98	83,58	0,042	67,38	1
7	50/10/38,5/1,5	98	87,93	0,052	70,97	1
8	50/10/38,5/1,5	98	94,18	0,066	71,54	1
9	50/10/38,5/1,5	97	83,72	0,049	67,39	1
30	50/10/38,5/1,5	98	116,20	0,040	97,58	1
49	50/9/38/3	99	86,06	0,033	71,23	1
5	50/10/38,5/1,5	97	88,86	0,003	73,37	2
6	50/10/38,5/1,5	98	68,98	0,075	50,12	2
10	50/10/38,5/1,5	98	68,38	0,079	51,46	2
49	50/9/38/3	98	75,34	0,052	59,17	2
11	50/10/38,5/1,5	98	92,55	0,063	70,42	3
12	50/10/38,5/1,5	98	73,87	0,051	56,58	3

046244

49	50/9/38/3	97	78,85	0,036	64,05	3
14	50/10/38,5/1,5	96	95,77	0,023	77,66	4
15	50/10/38,5/1,5	97	90,90	0,055	71,35	4
16	50/10/38,5/1,5	98	84,13	0,039	66,00	4
49	50/9/38/3	98	82,71	0,056	64,97	4
1	50/9/39,5/1,5	96	89,37	0,041	70,27	5
17	50/10/38,5/1,5	98	91,32	0,037	72,26	5
18	50/10/38,5/1,5	99	77,64	0,057	58,93	5
19	50/10/38,5/1,5	99	82,31	0,011	66,83	5
20	50/10/38,5/1,5	98	88,10	0,056	70,77	5
21	50/10/38,5/1,5	99	80,80	0,041	65,00	5
31	50/10/38,5/1,5	98	93,72	0,009	76,38	5
32	50/10/38,5/1,5	98	78,88	0,054	62,21	5
33	50/10/38,5/1,5	98	87,33	0,036	70,78	5
34	50/10/38,5/1,5	96	90,69	0,044	73,81	5
35	50/10/38,5/1,5	97	85,62	0,063	68,07	5
36	50/10/38,5/1,5	97	76,38	0,058	60,24	5
49	50/9/38/3	98	82,71	0,056	64,97	5
7	50/10/38,5/1,5	98	95,20	0,020	76,61	6
9	50/10/38,5/1,5	98	85,62	0,048	68,63	6
22	50/10/38,5/1,5	98	98,32	0,026	79,28	6
23	50/10/38,5/1,5	97	94,38	0,048	75,29	6
24	50/10/38,5/1,5	98	109,50	0,133	72,78	6
49	50/9/38/3	99	75,92	0,040	60,22	6
1	50/9/39,5/1,5	97	90,24	0,002	74,63	7
25	50/10/38,5/1,5	99	81,90	0,029	64,59	7
26	50/10/38,5/1,5	99	79,29	0,047	62,17	7
27	50/10/38,5/1,5	99	85,38	0,040	65,81	7
28	50/10/38,5/1,5	98	90,56	0,029	73,19	7
29	50/10/38,5/1,5	83	90,05	0,002	74,44	7
49	50/9/38/3	98	80,07	0,019	64,16	7
34	50/10/38,5/1,5	98	92,98	0,014	75,69	8
38	50/10/38,5/1,5	98	87,14	0,045	68,11	8
49	50/9/38/3	98	86,84	0,020	71,49	8

7	50/10/38,5/1,5	97	89,00	0,034	73,67	9
34	50/10/38,5/1,5	97	85,93	0,043	68,07	9
39	50/10/38,5/1,5	98	89,19	0,004	73,72	9
40	50/10/38,5/1,5	97	98,55	0,023	81,09	9
41	50/10/38,5/1,5	98	109,00	0,036	88,36	9
42	50/10/38,5/1,5	98	113,80	0,014	93,70	9
43	50/10/38,5/1,5	97	136,60	0,014	113,90	9
49	50/9/38/3	99	86,26	0,017	70,81	9
49	50/9/38/3	96	83,65	0,031	67,22	9
114	50/10/38,5/1,5	95	120,3	0,011	100,5	9
34	50/10/38,5/1,5	98	92,98	0,014	75,69	10
38	50/10/38,5/1,5	98	87,14	0,045	68,11	10
49	50/9/38/3	98	86,84	0,020	71,49	10
49	50/9/38/3	96	83,65	0,031	67,22	10

Табл. 3 показывает процент редактирования в печени мышей, измеренный NGS.

Таблица 3

Эффективность редактирования в печени мышей, обеспечивающая% образования делеции для экспериментов с G282 и G650 и уровни TTR в сыворотке для экспериментов с G282

Соединение №	Редактирование			Сыворотка TTR				Показатель	Эксп.
	Средний % делеции	SD	N	Сыворотка TTR (мкг/мл)	SD	Номер образца (n)	Сыворотка TTR (%TSS)		
TSS	0,1	0,1	4	884	113	5	100%	G282	1
1	13,1	8,2	5	671	201	5	76%	G282	1
3	23,7	8,5	5	691	182	5	78%	G282	1
7	45,3	8,3	5	270	132	5	31%	G282	1
8	0,1	0,1	5	745	97	5	84%	G282	1
9	44,1	13,3	5	339	184	5	38%	G282	1
30	10,4	4,8	5	841	89	5	95%	G282	1
49	33,5	8,9	5	388	103	5	44%	G282	1
TSS	0,1	0,1	5					G650	2
5	17,5	4,4	5					G650	2
6	0,4	0,1	5					G650	2

10	5,3	1,3	5					G650	2
49	10,2	2,8	4					G650	2
TSS	0,1	0,1	5					G650	3
11	9,2	1,2	5					G650	3
12	5,5	2,4	5					G650	3
49	15,7	5,5	5					G650	3
TSS	0,1	0,0	5					G650	4
14	20,6	8,7	5					G650	4
15	18,0	2,4	5					G650	4
16	10,1	1,7	5					G650	4
49	15,4	3,5	5					G650	4
TSS	0,2	0,1	5					G650	5
1	18,6	3,9	5					G650	5
17	12,3	4,4	5					G650	5
18	4,5	1,4	5					G650	5
19	13,0	4,1	5					G650	5
20	15,4	5,1	5					G650	5
21	12,1	1,4	5					G650	5
31	15,6	1,8	5					G650	5
32	11,6	2,0	5					G650	5
33	20,0	5,0	5					G650	5
34	44,8	8,3	5					G650	5
35	35,5	6,6	5					G650	5
36	30,0	8,4	5					G650	5
49	22,3	4,6	5					G650	5
TSS	0,0	0,0	5					G650	6
7	22,6	5,6	5					G650	6
9	20,3	2,0	5					G650	6
22	6,7	2,4	5					G650	6
23	7,3	2,0	5					G650	6
24	6,8	0,9	5					G650	6
49	11,4	2,2	5					G650	6
TSS	0,0	0,1	5					G650	7
1	3,2	0,8	5					G650	7

25	10,2	5,5	5					G650	7
26	5,2	1,4	5					G650	7
27	13,0	2,8	5					G650	7
28	17,8	2,5	5					G650	7
29	3,6	0,7	5					G650	7
49	20,5	4,3	5					G650	7
TSS	0,1	0	5	777	89	5	100%	G282	8
34	50,4	6,3	5	101	62	5	13%	G282	8
38	26,7	6,1	5	301	51	5	39%	G282	8
49	38,6	8,0	5	247	82	5	32%	G282	8
TSS	0,1	0,1	5	812	33	5	100%	G282	9
7	46,1	6,8	5	271	73	5	33%	G282	9
34	32,4	5,4	5	367	97	5	45%	G282	9
39	36,5	7,3	5	335	99	5	41%	G282	9
40	44,7	8,1	5	251	61	5	31%	G282	9
41	28,8	15,9	5	393	190	5	48%	G282	9
42	21,6	7,3	5	473	122	5	58%	G282	9
49	15,8	6,6	5	602	60	5	74%	G282	9
49	30,7	6,7	5	527	145	5	65%	G282	9
114	0,8	1,1	5	637	49	5	78%	G282	9
TSS	0,1	0	5	777	89	5	100%	G282	10
34	50,4	6,3	5	101	62	5	13%	G282	10
38	26,7	6,1	5	301	51	5	39%	G282	10
49	38,6	8,0	5	247	82	5	32%	G282	10
49	30,4	5,1	5	311	76	5	38%	G282	10

Пример 117 - доза-чувствительность редактирования в печени.

Чтобы оценить, было ли редактирование зависимым от дозы, эксперименты проводили *in vivo* при различных уровнях доз LNP. мРНК Cas9 Примера 115 получали в виде LNP с огРНК, нацеленной на TTR (G00282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP были составлены при соотношении огРНК и мРНК Cas9 1:1. LNP были составлены с использованием процедуры перекрестного потока с липидными молярными композициями, как описано в табл. 4, при соотношении N/P 6,0.

Композиции LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), общее содержание РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в примере 115.

Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК показан в табл. 4.

Таблица 4
Аналитика композиции

Номер соединения	Соотношение композиции (мол.%)	Инкапсуляция (%)	Z-средний размер (нм)	PDI	Числовой средний размер (нм)
7	50/10/38,5/1,5	97	85,09	0,033	68,39
9	50/10/38,5/1,5	97	74,83	0,033	59,99
49	50/9/38/3	98	84,93	0,007	69,51

Самкам мышей CD-1 вводили *i.v.* при 0,1 мг/кг массы тела или 0,3 мг/кг массы тела и оценивается для редактирования в печени. Результаты показаны на фиг. 2 и в табл. 5.

Таблица 5

Редактирование TTR печени и уровни TTR в сыворотке в зависимости от дозы

Номер соединения	Доза (мг/кг)	Средний % делеции	SD	N
TSS	n/a	0,4	0,1	5
7	0,1	49,1	8,9	5
7	0,3	69,4	0,8	5
9	0,1	50,6	6,5	5
9	0,3	64,5	3,8	5
49	0,1	26,8	5,7	5
49	0,3	60,6	5,9	5

Пример 118.

Для оценки масштабируемости дозирования эксперименты доза-ответ были проведены *in vivo*. мРНК Cas9 примера 115 получали в виде LNP с гРНК, нацеленной на TTR (G00282; SEQ ID NO: 1). Эти LNP были составлены, получены и проанализированы, как описано в примере 115, с использованием соотношения гРНК и мРНК Cas9 1:1 мас./мас. Компонентный состав этих LNP описан в табл. 6.

Таблица 6

Аналитика композиции

Номер соединения	Соотношение композиции (мол.%)	Инкапсуляция (%)	Z-средний размер (нм)	PDI	Числовой средний размер (нм)
Соединение 5	50/10/38,5/1,5	99	76,02	0,009	62,64
Соединение 34	50/10/38,5/1,5	98	86,45	0,015	71,97
Соединение 49	50/9/38/3	99	83,63	0,011	69,75

Самкам мышей CD-1 вводили *i.v.* при 0,1 мг/кг массы тела или 0,3 мг/кг массы тела и оценивается для редактирования в печени. Результаты показаны на фиг. 3А, фиг. 3В и в табл. 7.

Таблица 7

Редактирование и уровни TTR в сыворотке

Соединение Число	Доза (мг/кг)	Редактирование			Сыворотка TTR			
		Средний % делеции	SD	N	Сыворотка TTR (мкг/мл)	SD	N	% TSS
TSS	TSS	0,1	0,0	5	818	118	5	100%
5	0,1	26,1	2,2	5	549	33	5	67%
5	0,3	52,5	5,1	5	233	100	5	28%
34	0,1	54,9	4,6	4	170	55	4	21%
34	0,3	68,3	1,5	5	45	12	5	5%
49	0,1	50,0	11,5	5	254	107	4	31%
49	0,3	67,7	2,5	5	40	13	3	5%

Пример 119 - оценка эффективности доставки липидов путем редактирования *in vivo*.

Авторы изобретения оценили эффективность редактирования *in vivo* для материалов, поставляемых с составами с переменной длиной хвоста, в экспериментах по редактированию *in vivo*. LNP были составлены, как описано выше, с G502 (SEQ ID NO: 4), который нацелен на ген TTR мыши, который использовали для измерения редактирования. Составы содержали соотношение гРНК к мРНК Cas9 1:2. Характеристики конечных LNP показаны в табл. 8. Значения рКа ионизируемых липидов были измерены и показаны в табл. 1.

В эксперименте 4 тестировали ряд соединений на основе соединения 7, которые различаются включением C₅₋₁₂ алкила в положение R³ формулы (1А), как показано на фиг. 4А. Как показано в табл. 9 и на фиг. 4В и 4С, все пять испытанных соединений оказались эффективными для редактирования *in vivo*.

В эксперименте 8 тестировали ряд соединений на основе соединения 9, которые различаются включением C₅₋₁₂ алкила в положение R³ формулы (1А), как показано на фиг. 5А. В эксперименте 2 тестировалось соединение 287 этой серии, которое включает C₄-алкил в R³-положении. Как показано в табл. 9 и на фиг. 5В и 5С, все соединения в этой серии были эффективны для редактирования *in vivo*.

В эксперименте 3 тестировали ряд соединений на основе соединения 46, которые различаются включением C_{5-8} алкила в положение R^3 формулы (1A), как показано на фиг. 6A. Соединение 46 включает C_{12} -алкил в положении R^3 , и были протестированы соединения с различной длиной хвоста. Как показано в табл. 9 и на фиг. 6B и 6C, соединения с R^3 группами C_5 (соединение 72), C_6 (соединение 50), C_7 (соединение 76) и C_8 (соединение 51) были эффективны для редактирования *in vivo*.

В эксперименте 7 тестировали ряд соединений на основе соединения 5, которые различаются включением C_{5-10} -алкила в положение R^3 формулы (1A), как показано на фиг. 7A. В эксперименте 2 тестировалось соединение 66 этой серии, которое включает C_4 -алкил в положении R^3 . Соединение 5 включает C_{12} -алкил в положении R^3 , и в примерах 116 и 118 было показано, что оно эффективно для редактирования *in vivo*. Как показано в табл. 9 и на фиг. 7B и 7C, все дополнительные соединения, испытанные в этой серии, были эффективны для редактирования *in vivo*.

В эксперименте 1 тестировали серию соединений на основе соединения 34, которые изменяются в положениях X^1 и Y^1 формулы (1A), как показано на фиг. 8A. Соединение 52 и соединение 34 имеют общие дилинолевые группы в положении Y^1 и варьируются включением C_{0-1} алкиленовых групп в положение X^1 . Соединение 53, соединение 54 и соединение 55 имеют общие триольные группы в положении Y^1 и варьируются включением C_{0-2} алкиленовых групп в положение X^1 . Соединение 56, соединение 57 и соединение 58 имеют общие группы из 20 атомов в положении Y^1 и варьируются включением C_{0-1} алкиленовых групп в положение X^1 . Соединение 59, соединение 60 и соединение 61 имеют общую группу из 21 атома в положении Y^1 и варьируются включением C_{0-2} алкиленовых групп в положение X^1 . Соединение 62, соединение 63 и соединение 64 имеют общие гетерогенные линолевые и 21 атомные группы в положении Y^1 и варьируются включением C_{0-2} алкиленовых групп в положение X^1 . Как показано в табл. 9 и на фиг. 8B и 8C, все протестированные соединения были эффективны для редактирования *in vivo*.

В эксперименте 5 были протестированы серии соединений на основе соединения 50, которые изменяются в положениях X^2 формулы (1A), как показано на фиг. 9A. Как показано в табл. 9 и на фиг. 9B и 9C, все протестированные соединения были эффективны для редактирования *in vivo* при дозе 0,1 мг/кг.

В эксперименте 6 была протестирована серия соединений на основе соединения 34, как показано на фиг. 10A. Соединение 86 и соединение 99 отличаются от соединения 34 в положении X^1 формулы (1A). Соединение 103 отличается от соединения 34 в положении R^3 формулы (1A). Соединение 87 и соединение 88 представляют собой R- и S-этантимеры при атоме углерода между положениями R^3 и X^1 рацемического соединения 34. Данные представлены в табл. 9 и на фиг. 10B и 10C. Все соединения в этой серии, испытанные на мышах, были эффективны для редактирования *in vivo*.

В эксперименте 9 была протестирована серия соединений на основе соединения 50, как показано на фиг. 11A. Соединение 90 и соединение 89 представляют собой R- и S-энантимеры при атоме углерода между положениями R^3 и X^1 рацемического соединения 50. Соединение 100 и соединение 107 отличаются от соединения 50 и позиций R^3 и X^1 . Соединение 105, соединение 106 и соединение 108 отличаются от соединения 50 в положении R^3 . Данные представлены в табл. 9 и на фиг. 11B и 11C. Все соединения в этой серии, испытанные на мышах, были эффективны для редактирования *in vivo*.

Таблица 8
Аналитика композиции

Соединение №	Композиция соотношение (мол. %)	Инкапсуляция (%)	Z-средний размер (нм)	PDI	Числовой средний размер (нм)	Эксп.
49	50/9/38/3	98%	87,92	0,05	69,84	1
1	50/10/38,5/1,5	99%	68,63	0,04	54,84	1
34	50/10/38,5/1,5	98%	93,66	0,02	76,32	1
52	50/10/38,5/1,5	98%	90,75	0,03	74,35	1
53	50/10/38,5/1,5	99%	92,99	0,05	75,76	1
54	50/10/38,5/1,5	99%	94,16	0,04	75,05	1
55	50/10/38,5/1,5	97%	117,30	0,02	99,29	1
56	50/10/38,5/1,5	96%	112,50	0,03	91,81	1
57	50/10/38,5/1,5	98%	100,40	0,02	83,73	1
59	50/10/38,5/1,5	97%	109,90	0,03	88,36	1
60	50/10/38,5/1,5	97%	103,40	0,07	79,57	1
61	50/10/38,5/1,5	97%	102,00	0,06	79,7	1
62	50/10/38,5/1,5	97%	106,40	0,04	87,26	1
63	50/10/38,5/1,5	98%	106,00	0,04	82,18	1
64	50/10/38,5/1,5	97%	106,40	0,02	86,19	1
49	50/9/39,5/3	98%	88,36	0,014	73,13	2
44	50/9/39,5/1,5	99%	97,65	0,034	78,34	2
45	50/9/39,5/1,5	99%	102,70	0,021	85,54	2
67	50/9/39,5/1,5	99%	102,20	0,043	82,14	2
68	50/9/39,5/1,5	99%	122,30	0,051	100,4	2
49	50/9/38/3	93	77,07	0,03	63,19	3
50	50/10/38,5/1,5	98	94,33	0,02	76,57	3
51	50/10/38,5/1,5	98	96,78	0,02	80,57	3
72	50/10/38,5/1,5	98	106,80	0,02	88,38	3
76	50/10/38,5/1,5	98	94,32	0,01	78,11	3
49	50/9/38/3	98	81,83	0,026	66,26	4
7	50/10/38,5/1,5	98	87,61	0,002	73,07	4
39	50/10/38,5/1,5	98	89,83	0,015	73,52	4
40	50/10/38,5/1,5	97	101,10	0,027	81,51	4
69	50/10/38,5/1,5	96	108,90	0,017	88,76	4
73	50/10/38,5/1,5	97	95,81	0,029	76,59	4
49	50/10/38,5/1,5	98	83,00	0,03	65	5
50	50/10/38,5/1,5	98	103,00	0,06	77	5
77	50/10/38,5/1,5	98	104,00	0,08	78	5

78	50/10/38,5/1,5	97	91,00	0,13	59	5
79	50/10/38,5/1,5	98	75,00	0,09	55	5
84	50/10/38,5/1,5	99	91,00	0,03	75	5
49	50/9/38/3	99%	90,00	0,02	74	6
34	50/10/38,5/1,5	98%	89,00	0,03	73	6
86	50/10/38,5/1,5	98%	87,00	0,04	68	6
99	50/10/38,5/1,5	99%	79,00	0,03	64	6
103	50/10/38,5/1,5	91%	102,00	0,01	82	6
87	50/10/38,5/1,5	98%	83,00	0,06	63	6
88	50/10/38,5/1,5	98%	88,00	0,02	73	6
49	50/9/38/3	93	77,07	0,026	63,19	7
66	50/10/38,5/1,5	98	79,79	0,035	65,07	7
36	50/10/38,5/1,5	98	75,9	0,058	58,34	7
75	50/10/38,5/1,5	98	89,78	0,02	73,46	7
45	50/10/38,5/1,5	98	95,26	0,012	77,92	7
71	50/10/38,5/1,5	97	104,5	0,035	86,63	7
49	50/9/38/3	98%	84,47	0,026	69,01	8
9	50/10/38,5/1,5	98%	64,83	0,074	48,82	8
65	50/10/38,5/1,5	99%	69,67	0,056	52,04	8
35	50/10/38,5/1,5	99%	81,51	0,068	62,82	8
74	50/10/38,5/1,5	99%	92,14	0,024	74,58	8
44	50/10/38,5/1,5	99%	104,3	0,034	85,76	8
70	50/10/38,5/1,5	99%	124,2	0,018	102	8
49	50/9/38/3	98	87	0,04	70	9
50	50/10/38,5/1,5	97	98	0,04	78	9
90	50/10/38,5/1,5	98	99	0,02	81	9
89	50/10/38,5/1,5	98	88	0,01	73	9
100	50/10/38,5/1,5	99	102	0,05	83	9
105	50/10/38,5/1,5	99	80	0,02	64	9
106	50/10/38,5/1,5	99	91	0,01	74	9
107	50/10/38,5/1,5	98	89	0,03	72	9
108	50/10/38,5/1,5	99	89	0,03	73	9
49	50/9/38/3	0,98	90	0,04	75	10
34	50/10/38,5/1,5	0,98	95	0,03	77	10
91	50/10/38,5/1,5	0,98	97	0,01	82	10
92	50/10/38,5/1,5	0,98	67	0,06	51	10
93	50/10/38,5/1,5	0,98	103	0,01	86	10
94	50/10/38,5/1,5	0,98	70	0,06	53	10
95	50/10/38,5/1,5	0,98	105	0,01	88	10
51	50/10/38,5/1,5	0,98	98	0,02	82	10
96	50/10/38,5/1,5	0,98	89	0,03	73	10
97	50/10/38,5/1,5	0,98	92	0,03	75	10

Табл. 9 показывает процент редактирования в печени мышей, измеренный NGS.

Таблица 9

Эффективность редактирования в печени мышей, обеспечивающая% образования делеции для экспериментов с G502 и уровнем TTR в сыворотке

Соед. No.	Доза (мг/кг)	Редактирование			Сыворотка TTR				Эксп.
		% Редактирования	SD	N	Сыворотка TTR (мкг/мл)	SD	N	% TSS	
TSS	n/a	0,1	0,00	5	1076,77	368,43	5	100,00	1
49	0,1	37,58	10,65	5	501,07	107,20	5	46,53	1
1	0,1	28,82	9,24	5	522,07	212,60	5	48,49	1
34	0,1	64,95	4,74	5	101,04	45,14	5	9,38	1
52	0,1	60,14	8,13	5	186,42	92,64	5	17,31	1
53	0,1	61,50	4,89	5	150,43	53,66	5	13,97	1
54	0,1	57,22	5,81	5	197,28	90,55	5	18,32	1
55	0,1	15,86	7,12	5	783,74	94,62	5	72,79	1
56	0,1	16,94	2,41	5	750,53	94,88	5	69,70	1
57	0,1	50,76	11,63	5	264,64	112,65	5	24,58	1
59	0,1	10,28	6,63	5	868,93	145,85	5	80,70	1
60	0,1	23,88	12,59	5	651,52	199,20	5	60,51	1
61	0,1	9,40	1,17	5	877,31	93,63	5	81,48	1
62	0,1	23,74	9,69	5	623,37	138,65	5	57,89	1
63	0,1	6,53	2,41	5	902,96	96,13	5	83,86	1
64	0,1	5,84	1,04	5	919,42	90,82	5	85,39	1
TSS	n/a	0,24	0,05	5	1232,25	259,96	5	100,00	2
49	0,03	6,5	0,39	5	1128,34	197,52	5	91,56	2
4	0,03	8,6	1,00	5	900,69	291,61	5	73,09	2

046244

45	0,03	5,16	1,38	5	965,93	156,29	5	78,39	2
67	0,03	5,94	1,63	5	806	219,39	5	65,41	2
68	0,03	6,48	0,05	5	845,04	259,96	5	68,58	2
TSS	n/a	0,18	0,04	5	1161,07	311,28	5	100,00	3
49	0,03	5,02	2,30	5	960,376	129,68	5	82,71	3
49	0,1	30,66	10,27	5	544,37	183,72	5	46,89	3
50	0,03	37,54	24,51	5	528,43	165,52	5	45,51	3
50	0,1	65,56	3,59	5	160,42	44,32	5	13,82	3
51	0,03	38,8	5,98	5	447,172	44,70	5	38,51	3
51	0,1	65,62	4,90	5	108,258	49,36	5	9,32	3
72	0,03	27,72	10,69	5	777	191,77	5	66,92	3
72	0,1	53,06	8,34	5	306,856	39,10	5	26,43	3
76	0,03	27,32	14,64	5	939,50	171,63	5	69,72	3
76	0,1	63,08	6,07	5	148,554	67,25	5	12,79	3
TSS	n/a	0,24	0,05	5	690,45	84,84	5	100%	4
49	0,03	28,78	9,67	5	464,17	74,74	5	67%	4
49	0,1	56,82	4,70	5	154,53	60,30	5	22%	4
7	0,03	38,23	13,85	4	397,92	52,45	4	58%	4
7	0,1	66,72	5,63	5	66,59	45,44	5	10%	4
69	0,03	36,68	6,47	5	370,88	69,44	5	54%	4
69	0,1	67,38	5,13	4	85,93	27,44	4	12%	4
40	0,03	34,53	5,48	4	529,70	128,79	4	77%	4
40	0,1	69,44	2,12	5	64,65	21,93	5	9%	4
73	0,03	57,32	7,29	5	173,78	81,14	5	25%	4
73	0,1	70,76	2,03	5	30,62	14,97	5	4%	4
39	0,03	44,74	14,44	5	286,24	100,55	5	41%	4
39	0,1	66,66	4,44	5	39,85	20,49	5	6%	4
TSS	n/a	0,16	0,05	5	809,30	145,45	5	100	5
49	0,03	16,98	10,77	5	592,00	150,58	5	73,1	5
49	0,1	40,32	11,31	5	379,70	106,18	5	46,9	5
77	0,03	5,18	0,79	5	552,80	84,36	5	68,3	5
77	0,1	10,36	3,05	5	652,20	179,50	5	80,6	5
78	0,03	7	2,04	5	807,50	97,21	5	99,8	5
78	0,1	24,2	7,13	5	537,90	74,96	5	66,5	5

046244

79	0,03	0,58	0,19	5	703,50	195,81	5	86,9	5
79	0,1	3,34	1,51	5	812,20	203,80	5	100,4	5
84	0,03	11,24	3,37	5	649,70	161,07	5	80,3	5
84	0,1	18,86	9,21	5	592,10	98,42	5	73,2	5
50	0,03	23,92	3,08	5	567,70	202,13	5	70,1	5
50	0,1	49,6	14,63	5	241,90	104,88	5	29,9	5
TSS	n/a	0,1	0,07	5	964,34	179,38	5	100,00	6
49	0,03	3,28	1,05	5	969,91	131,91	5	100,57	6
49	0,1	26,88	6,84	5	609,23	222,39	5	63,17	6
34	0,03	19,66	3,87	5	820,73	196,33	5	85,10	6
34	0,1	50,82	2,43	5	306,74	84,07	5	31,80	6
86	0,03	9,62	5,42	5	897,846	166,96	5	93,10	6
86	0,1	50,7	6,45	5	277,696	38,44	5	28,80	6
99	0,03	10,2	4,30	5	891,268	228,52	5	92,42	6
99	0,1	37,12	6,54	5	413,382	113,60	5	42,87	6
103	0,03	20,16	7,23	5	696,58	103,62	5	72,23	6
103	0,1	51,98	7,53	5	280,156	106,56	5	29,05	6
87	0,03	16,08	4,23	5	773,57	157,56	5	80,21	6
87	0,1	51,78	6,51	5	321,386	85,50	5	33,33	6
88	0,03	20,66	9,33	5	723,87	105,48	5	75,06	6
88	0,1	57,32	7,41	5	322,566	132,08	5	33,45	6
TSS	n/a	0,16	0,05	5	1648,15	261,09	5	100	7
49	0,03	4,08	1,33	5	1459,99	292,22	5	88,584	7
49	0,1	27,5	8,04	5	860,90	343,62	5	52,234	7
66	0,03	27,64	8,25	5	901,24	307,33	5	54,682	7
66	0,1	55,26	4,08	5	324,25	115,30	5	19,674	7
36	0,03	9,96	0,82	5	1249,04	115,28	5	75,785	7
36	0,1	35,92	2,78	5	722,28	85,81	5	43,824	7
75	0,03	29,6	6,95	5	743,29	58,71	5	45,098	7
75	0,1	57,22	7,58	5	197,72	99,45	5	11,996	7
45	0,03	31,1	4,96	5	715,87	97,41	5	43,435	7
45	0,1	60,3	6,80	5	166,30	55,94	5	10,09	7
71	0,03	20,94	7,55	5	781,63	115,04	5	47,425	7
71	0,1	55,78	2,10	5	248,13	55,94	5	15,055	7

TSS	n/a	0,1	0,00	5	748,33	130,95	5	100,00	8
49	0,03	7,62	6,50	5	735,41	83,84	5	98,27	8
49	0,1	37,46	4,17	5	369,43	45,54	5	49,37	8
9	0,03	0,84	0,46	5	853,25	107,87	5	114,02	8
9	0,1	3,46	1,09	5	772,22	172,17	5	103,19	8
65	0,03	1,32	0,31	5	896,77	143,42	5	119,84	8
65	0,1	10,12	9,68	5	742,52	151,70	5	99,22	8
35	0,03	4,46	0,70	5	780,47	74,29	5	104,30	8
35	0,1	17,94	4,99	5	741,82	79,87	5	99,13	8
74	0,03	4,36	1,25	5	752,38	120,29	5	100,54	8
74	0,1	11,12	1,63	5	823,58	126,35	5	110,06	8
44	0,03	4,76	1,10	5	897,76	51,74	5	119,97	8
44	0,1	17,97	7,30	5	589,60	52,34	5	78,79	8
70	0,03	4,84	1,77	5	945,08	81,30	5	126,29	8
70	0,1	8,04	1,17	5	654,70	98,42	5	87,49	8
TSS	n/a	0,1	0,00	5	964,50	154,71	5	100	9
49	0,03	20,54	12,51	5	677,31	194,76	5	70,22	9
50	0,03	21,74	8,62	5	687,70	218,46	5	71,3	9
90	0,03	26,02	5,64	5	578,26	188,44	5	59,95	9
89	0,03	31,02	2,76	5	469,27	63,53	5	48,65	9
100	0,03	31,3	6,03	5	450,19	47,05	5	46,68	9
105	0,03	33,86	8,75	5	462,70	120,85	5	47,97	9
106	0,03	11,58	3,69	5	795,41	161,67	5	82,47	9
106	0,03	1,98	1,16	5	855,49	158,34	5	88,7	9
107	0,03	26,98	4,62	5	564,55	102,79	5	58,53	9
108	0,03	27	4,04	5	550,89	102,92	5	57,12	9
TSS	n/a	0,14	0,05	5	767,76	98,15	5	100%	10
49	0,03	10,33	2,15	4	704,2	126,26	4	92%	10
34	0,03	37,44	10,7	5	419,07	133,1	5	55%	10
91	0,03	22,7	6,77	5	681,26	63,6	5	89%	10
92	0,03	2,38	0,79	5	923,39	226,76	5	120%	10
93	0,03	12,68	1,94	5	765,38	95,14	5	100%	10
94	0,03	1,82	1,29	5	838,22	110,3	5	109%	10
95	0,03	37,96	13,54	5	589,77	283,04	5	77%	10
51	0,03	30,86	4,36	5	619,84	114,91	5	81%	10
96	0,03	28,04	3,67	5	540,39	120	5	70%	10
97	0,03	28,26	3,88	5	603,03	177,26	5	79%	10

Пример 120. Редактирование эффективности и переносимости липидов *in vivo*.

Чтобы оценить липидную эффективность, эксперименты доза-ответ проводили *in vivo*. мРНК Cas9 Примера 115 получали в виде LNP с гРНК, нацеленной на TTR (G00534; SEQ ID NO: 5). Эти LNP были составлены, получены и проанализированы, как описано в Примере 115, с использованием соотношения гРНК и Cas9 мРНК 1:2 мас./мас.

Компонентный состав этих LNP описан в табл. 10.

Таблица 10
Аналитика композиции

Соединение Число	Композиция	Инкапсуляция (%)	Z-Средний Размер (нм)	PDI	Числовой средний размер (нм)
49	50/9/38/3	97	87,84	0,028	69,85
34	50/10/38,5/1,5	93	96,43	0,052	76,08
45	50/10/38,5/1,5	95	101,00	0,052	83,48
50	50/10/38,5/1,5	87	98,55	0,050	79,18

Для эффективности самкам крыс Sprague Dawley вводили в/в при 0,1 мг/кг или 0,03 мг/кг. Через 6-7 дней после введения дозы крыс умерщвляли удушением CO₂. Кровь собирали в пробирки с сепаратором сыворотки. Биопсия печени обрабатывалась на гДНК и оценивалась на предмет редактирования методами NGS, описанными в примере 115. Результаты представлены в табл. 11 и на фиг. 12А и 12В. Для обеспечения переносимости самкам крыс Sprague Dawley вводили дозу 6 мг/кг, и через 24 ч после введения дозы животных умерщвляли удушением CO₂. Кровь собирали в пробирки с сепаратором сыворотки и отправляли внешнему CRO для количественного определения ферментов печени с помощью панели ферментов печени. Результаты представлены в табл. 12.

Таблица 11
Эффективность редактирования у крыс, обеспечивающая% образования делеции для экспериментов с G534 и уровни TTR в сыворотке

Соед. No.	Доза (мг/кг)	Редактирование			Сыворотка TTR				Гидовые (гРНК)	Эксп
		% Редакти рования	SD	N	Сыворот ка TTR (мкг/мл)	SD	N	% TSS		
TSS		0,1	0,00	5	845,3	70,69	5	100%	G534	1
49	0,03	4,76	1,49	5	790,9	82,94	5	94%	G534	1
49	0,1	25,62	14,18	5	669,5	181,13	5	79%	G534	1
34	0,03	21,22	6,54	5	514,2	119,36	5	61%	G534	1
34	0,1	53,9	7,17	5	188,9	112,67	5	22%	G534	1
45	0,03	10,76	8,80	5	910,4	73,77	5	110%	G534	1
45	0,1	48,16	2,90	5	270,7	109,71	5	32%	G534	1
50	0,03	26,9	9,04	5	581,7	76,89	5	69%	G534	1
50	0,1	62,6	1,04	5	116,6	24,78	5	14%	G534	1

Таблица 12
Результаты панели ферментов печени крыс

Соединение №	Дозы (мг/кг)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Креатинкиназа (U/L)	GGT (U/L)	ALP (U/L)	Билирубин Общий (мг/дл)
TSS		47	72	132,2	0	318,4	0,1
49	6	408,5	534,8	157,5	2	784,3	0,6
34	6	179,6	349,6	184,8	3,4	542	0,2
45	6	163,2	681	1103	2,4	439,8	0,3
50	6	250,8	820,8	272	11	508,6	0,4

Пример 121 - редактирование in vitro с помощью соединений алкильного ряда R³.

Ряд соединений на основе соединения 46, которые различаются включением C₄₋₁₂ алкила в положение R³ формулы (1А) (как показано на фиг. 13А), тестировали для редактирования in vitro. Клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы человека HUH7 (Японская коллекция исследовательского банка

клеток биоресурсов, каталожный JCRB0403) культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина. Клетки высевали при плотности 20000 клеток/лунку в 96-луночный планшет за 24 ч до трансфекции (~ 80% конfluence в время трансфекции). LNP были составлены при соотношении гРНК и мРНК Cas9 1:2 мас./мас., используя процедуру перекрестного потока с липидными молярными композициями, как описано в табл. 13, при соотношении N/P 6,0. Композиции LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), общее содержание РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в примере 115. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), общего содержания РНК и эффективности инкапсуляции РНК показан в табл. 13. LNP разводили в среде, инкубировали в течение 5 мин при 37°C и наносили пипеткой на клетки в дозе 2000 нг РНК на лунку. Каждое состояние исследовали в биологическом дубликате. Клетки собирали после трансфекции через 6 ч. Геномную ДНК экстрагировали с использованием 50 мкл/лунку раствора для экстракции ДНК ViscalAmp (Epicenter, Cat. QE09050) в соответствии с протоколом производителя. Все образцы ДНК были подвергнуты ПЦР и последующему NGS-анализу для редактирования в целевом локусе G000502, как описано выше. Как показано в табл. 14 и на фиг. 13B, все протестированные соединения были эффективны для редактирования *in vitro*.

Таблица 13

Аналитика композиции

Соединение №	Соотношение композиции (мол.%)	Z-Средний Размер [нм]	PDI	Среднее Число [нм]	%E
49	50/9/38/3	93,14	0,015	74,82	98
34	50/10/38,5/1,5	93,01	0,009	75,88	97
46	50/10/38,5/1,5	94,54	0,003	76,76	99
51	50/10/38,5/1,5	97,21	0,009	80	98
76	50/10/38,5/1,5	98,79	0,024	81,12	97
50	50/10/38,5/1,5	102,8	0,021	84,16	97
72	50/10/38,5/1,5	111,4	0,018	91,47	94
85	50/10/38,5/1,5	117,1	0,045	93,05	96

Таблица 14

Редактирование *in vitro*

Соединение №	Редактирование	SD
49	22,6	0,8
34	49,0	2,5
46	63,7	6,4
51	69,0	9,7
76	61,2	9,9
50	64,3	5,6
72	65,8	7,3
85	66,4	0,4

Таблица последовательности

Описание	Последовательность	SEQ ID No.
G00282 огРНК, нацеленная на TTR мыши	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	11
G00650	mG*mA*mC*AAGCACAGAAAGACCAGUUUAGAmG	22
огРНК, нацеленная на B2M человека	mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	
мРНК, кодирующая Cas9	GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGU CGUGUGUGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGC CACCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGA CGAAUACAAGGUCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCU GGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCU GAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAAACAGC AGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAG AUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCA GGAAAUUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGA CAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUU CGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAA GUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAAGAAGCUGGU CGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUA CCUGGCACUGGCACACAUGAUGAAGUUCAGAGGACA CUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAG CGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUCCAGAC AUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAG ACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGC ACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGG AAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAA CUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAA GCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCU GGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGA AAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCU GAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUA	33

CAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGUAU CGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGA AUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAU GGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAA CGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGAGAACU GCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCC GUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAU CCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCU GGCAAGAGGAAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAG AAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGA AGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU CAUCGAAAGAAUGACAACUUCGACAAGAACCUGCC GAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUA CGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAAGGU CAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUU CCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCU GCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCA GCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUU CGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAA GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACAACGAAGA AAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACU GACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAG ACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACGACAAGGU CAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUG GGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCU GAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCA GCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGA CAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAG CCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCC GGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGU CGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAA GCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAA	
--	--

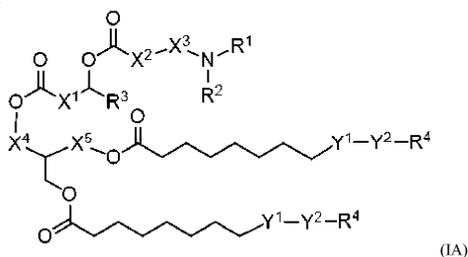
CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGA AAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAAC UGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACCCGGUCGAAA ACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACU ACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGG AACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCG ACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGA ACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAG UCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUCG UGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACA ACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAAC UGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCG AAACAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGCACAGAUCC UGGACAGCAGAAUGAACACAAAAGUACGACGAAAACG ACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGA AGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC AGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACC ACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAA CAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCG AAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCA GAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAA AGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCA UGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCCGUGAUCGAAACAAACG GAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAG ACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGC AGGUCAACAUCGUCAGAAGACAGAAGUCCAGACAG GAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGG ACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAG UCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAA AGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAAC UGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCG AAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAU	
---	--

	<p>ACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGC CGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAA AGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGG GAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACU UCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGG GAAGCCCAGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCG UCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCG AACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGG CAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACA ACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAG AAAACAUCAUCCACCUUGUUCACACUGACAAAACCUGG GAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAA UCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCC UGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGAC UGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAG GAGACGGAGGAGGAAGCCCAGGAAGAAGAGAAAGG UCUAGCUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCU ACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAUGAAGAUCAAU AGCUUAUUCUUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAA AGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUCUUUA AUCAUUUUGCCUCUUUUCUCUGUGCUCAAUUAAUA AAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG</p>	
<p>G000502 орПНК, нацеленная на TTR мыши</p>	<p>mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU</p>	<p>44</p>
<p>G000534 орПНК, нацеленная на TTR крысы</p>	<p>mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU</p>	<p>55</p>

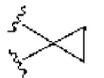
2'-О-метилловые модификации и фосфоротиоатные связи, как представлено ниже (m=2'-ОМе; *=фосфоротиоат).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы IA



где независимо для каждого случая



X^1 представляет собой C_{1-3} алкилен или

X^2 выбирают из O, NH, NMe и связи, при условии, что, когда X^2 представляет собой O, R^2 вместе с атомом азота и либо R^1 , либо атомом углерода X^3 образует 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

X^3 представляет собой C_{2-4} алкилен,

X^4 представляет собой C_1 алкилен или связь,

X^5 представляет собой C_1 алкилен или связь,

R^1 представляет собой C_{1-3} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой,

R^2 представляет собой C_{1-3} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой, или

R^2 и R^1 , или R^2 и атом углерода X^3 , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

Y^1 выбирают из связи, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ и $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$,

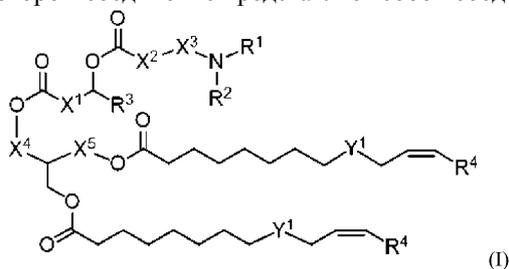
Y^2 выбирают из $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ и C_3-C_4 алкилена,

R^3 выбирают из H, C_{5-7} циклоалкила, C_8-C_{10} алкенила, и C_{3-18} алкила,

R^4 представляет собой C_{4-8} алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, в котором соединение представляет собой соединение формулы I



где независимо для каждого случая

X^1 представляет собой C_{2-3} алкилен,

X^2 выбирают из O, NH, NMe и связи, при условии, что, когда X^2 представляет собой O, R^2 вместе с атомом азота и либо R^1 , либо атомом углерода X^3 образует 4-членное, 5-членное или 6-членное кольцо,

X^3 представляет собой C_{2-4} алкилен,

X^4 представляет собой C_1 алкилен или связь,

X^5 представляет собой C_1 алкилен или связь,

R^1 представляет собой C_{1-2} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой,

R^2 представляет собой C_{1-2} алкил, необязательно замещенный гидроксильной группой, или

R^2 и R^1 , или R^2 и атом углерода X^3 , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное или 6-членное кольцо,

Y^1 выбирают из $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ и $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$,

R^3 выбирают из H, C_{5-7} циклоалкила, и C_{3-18} алкила,

R^4 представляет собой C_{4-7} алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1 или 2, где X^1 представляет собой C_2 алкилен.

4. Соединение по п.1, где X^1 представляет собой C_1 алкилен.

5. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X^2 представляет собой NH или O.

6. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X^3 представляет собой C_{2-3} алкилен.

7. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R^2 и атом углерода X^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-6-членное кольцо.

8. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R^2 представляет собой C_{1-2} алкил.

9. Соединение по любому из пп.1-6, где R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-6-членное кольцо.

10. Соединение по любому из пп.1-6, где R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное кольцо.

11. Соединение по любому из пп.1-8, где R^1 представляет собой C_{1-2} алкил.

12. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R^3 представляет собой линейный C_{4-16} алкил.

13. Соединение по любому из пп.1-11, где R^3 представляет собой разветвленный C_{6-10} алкил.

14. Соединение по любому из пп.1-11, где R^3 представляет собой C_{5-7} циклоалкил.

15. Соединение по любому из пп.1-11, где R^3 представляет собой C_{8-10} алкенил.

16. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R^4 представляет собой линейный C_{5-6} алкил.

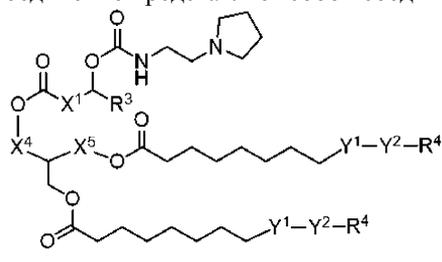
17. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X^4 представляет собой связь.

18. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X^5 представляет собой C_1 алкилен.

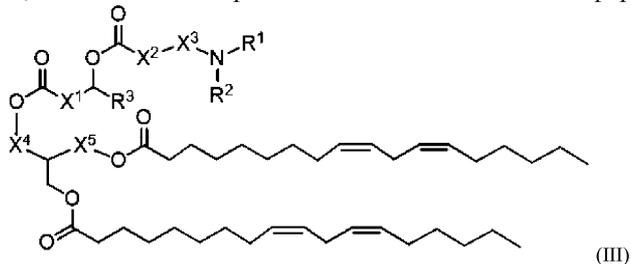
19. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где соединение представляет собой соединение формулы (IA); и Y^2-R^4 представляет собой $-CH_2-CH=CH-R^4$.

20. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Y^1 выбирают из связи, $-CH=CH-$ и $-O(C=O)-$.

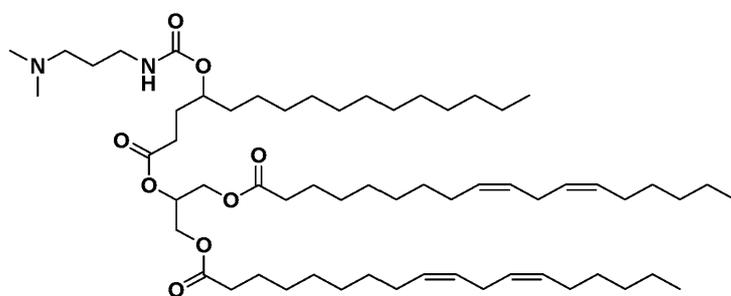
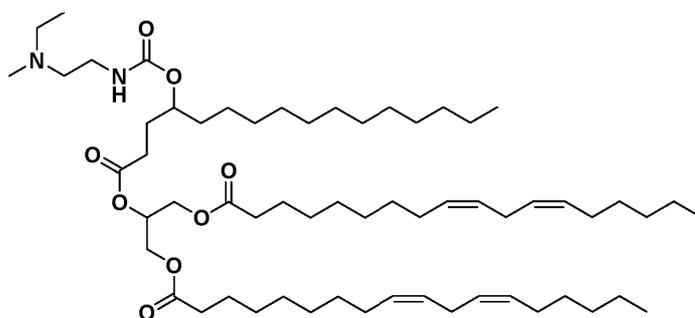
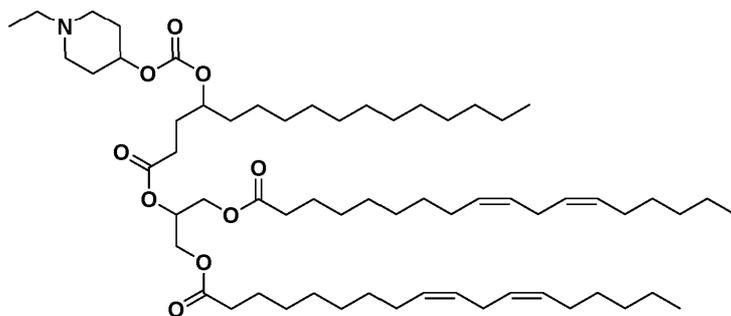
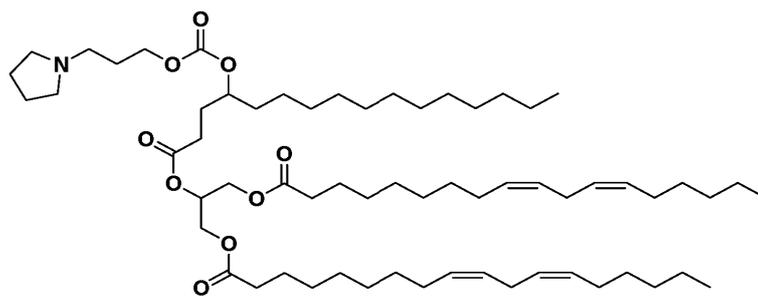
21. Соединение по п.1, где соединение представляет собой соединение формулы II:

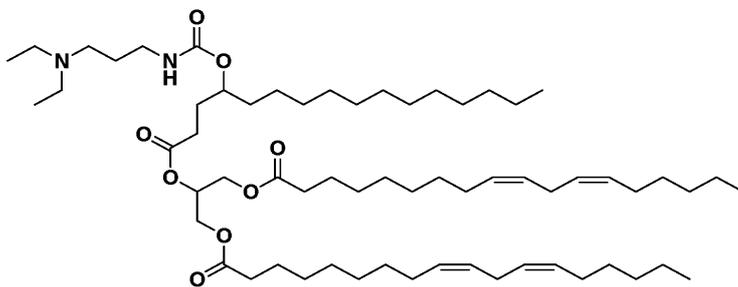
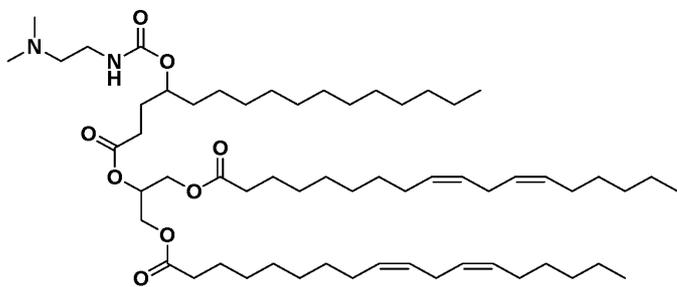
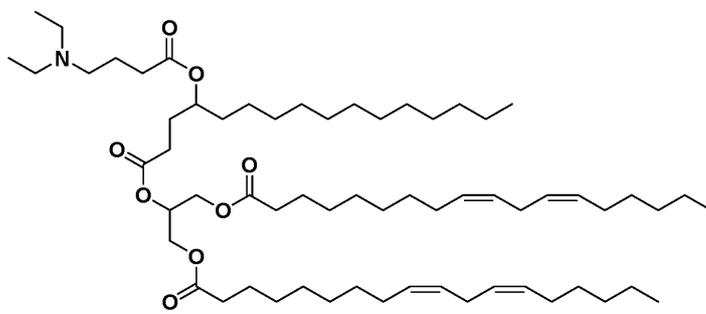
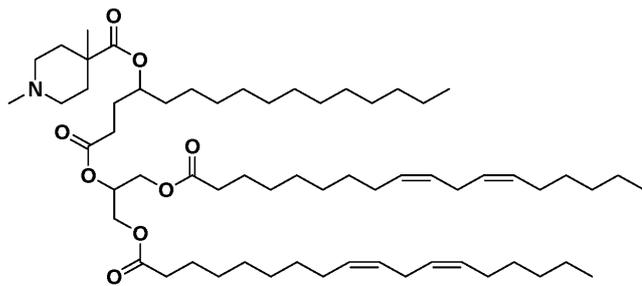
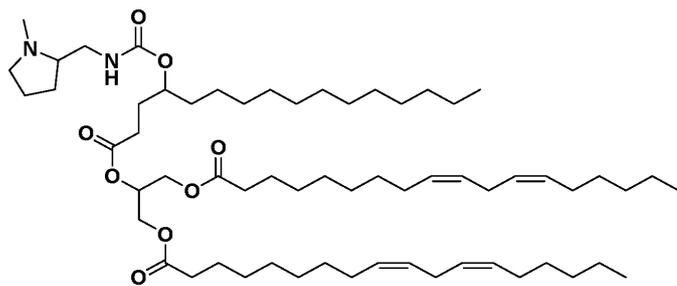


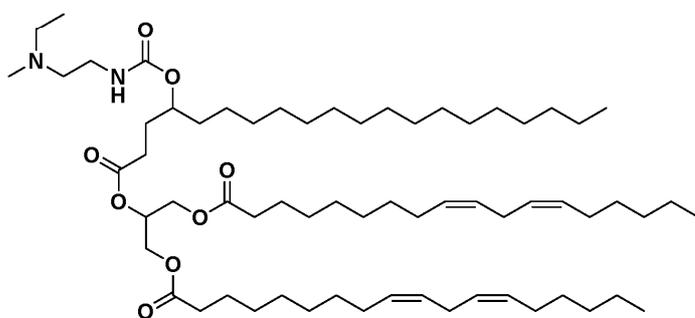
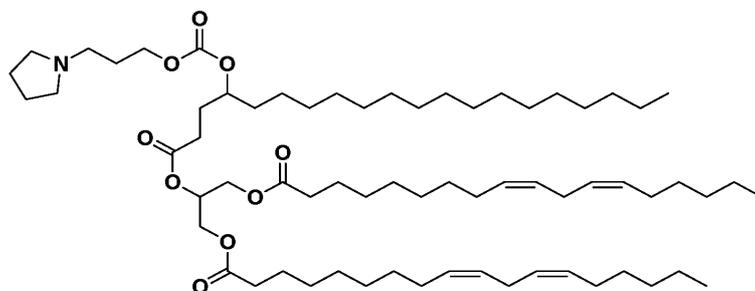
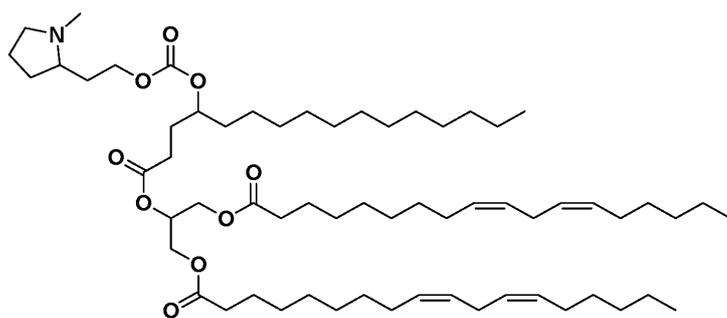
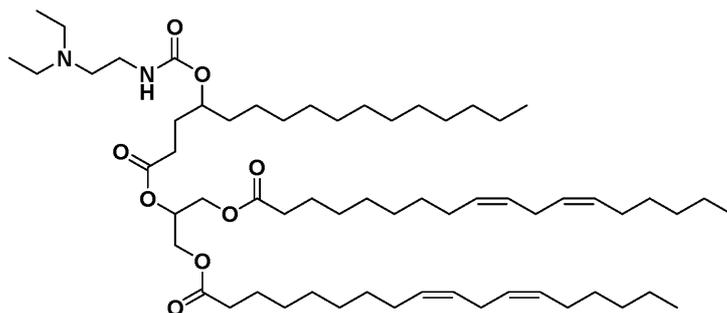
22. Соединение по п.1, где соединение представляет собой соединение формулы III

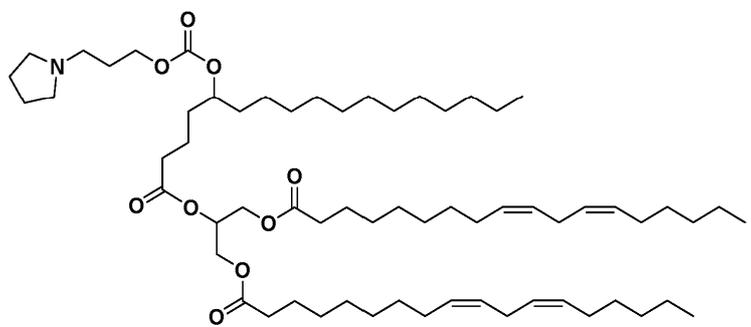
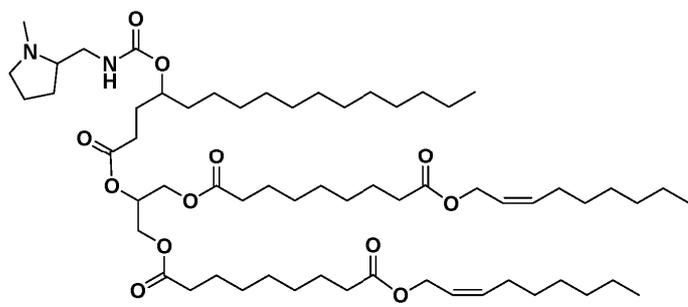
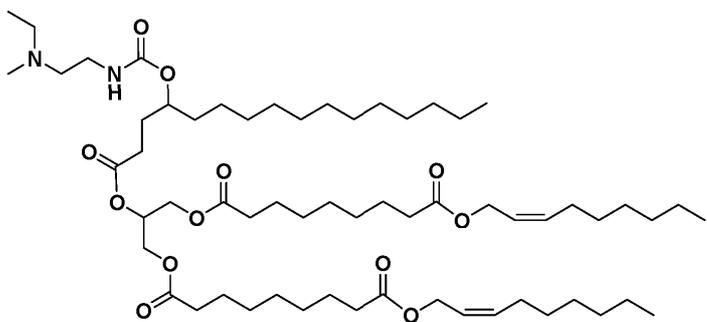
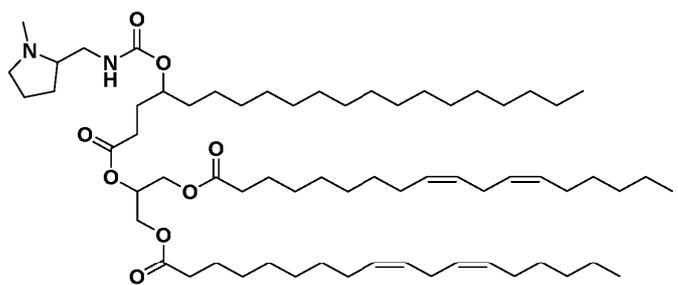


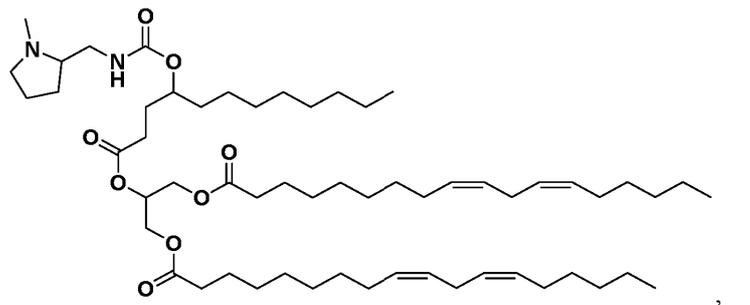
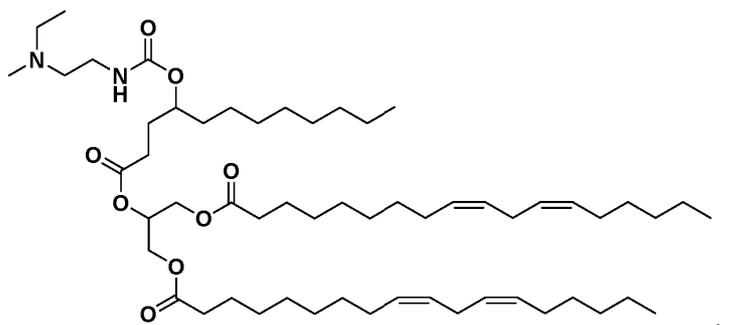
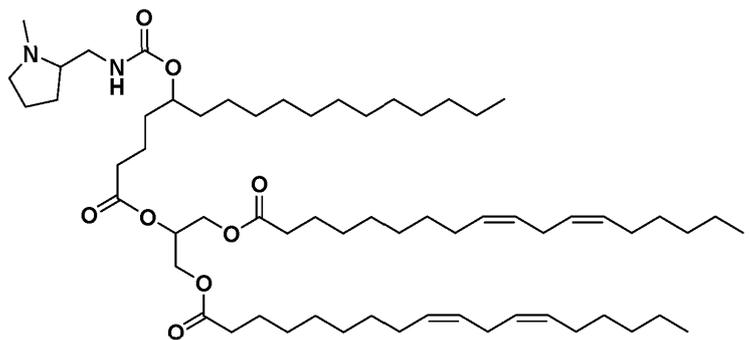
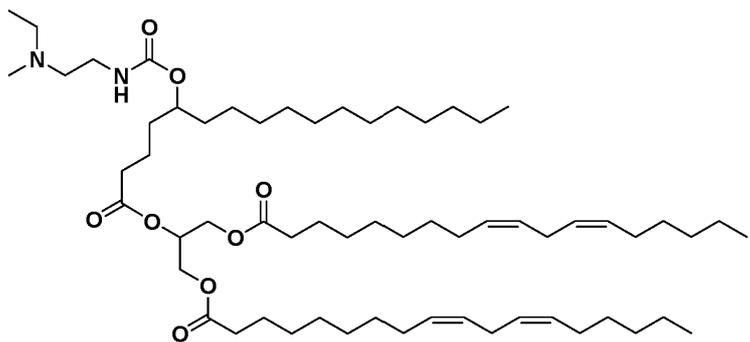
23. Соединение по п.1, где соединение выбирают из:

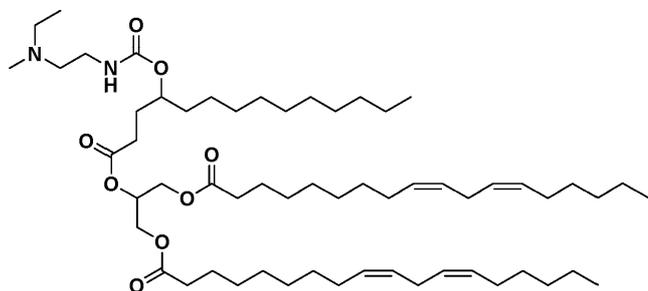
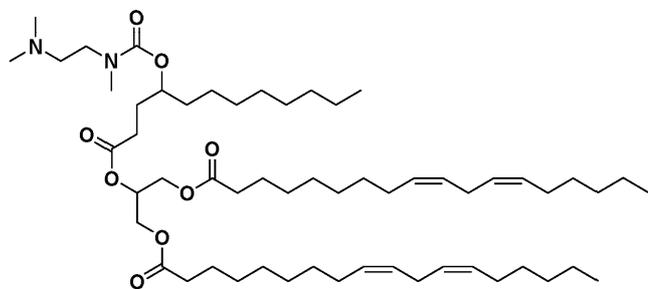
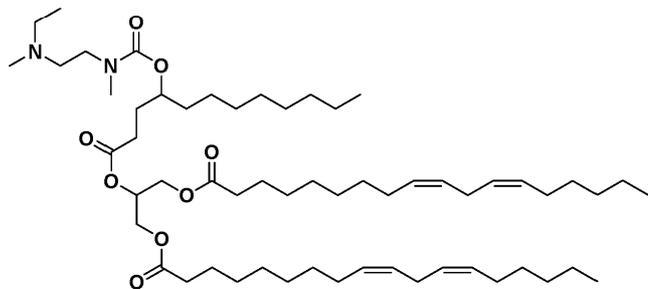
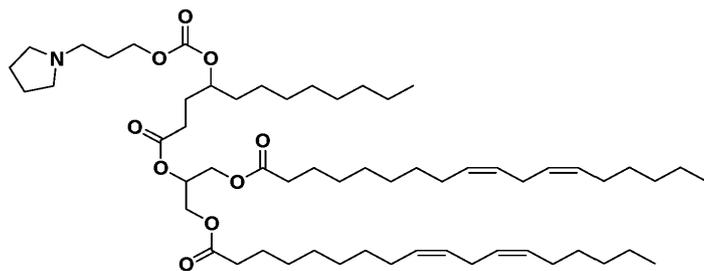


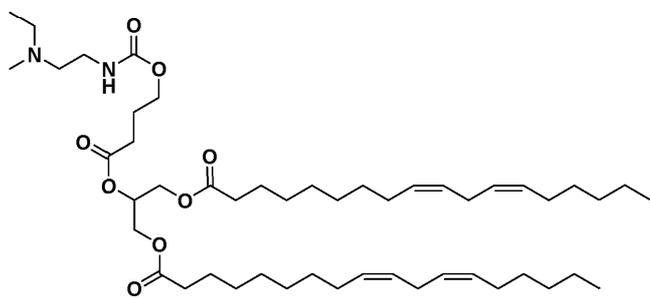
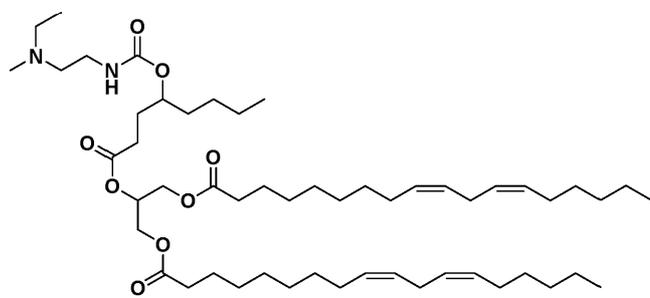
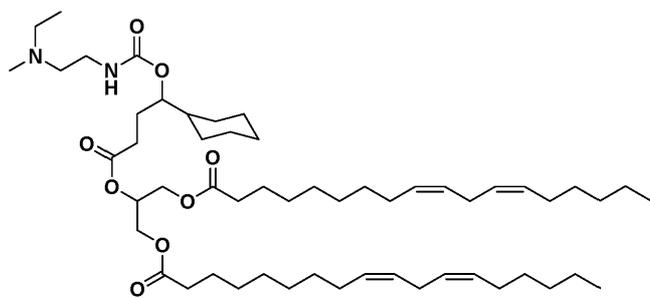
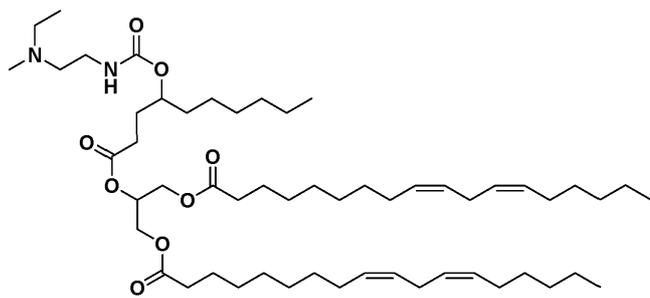


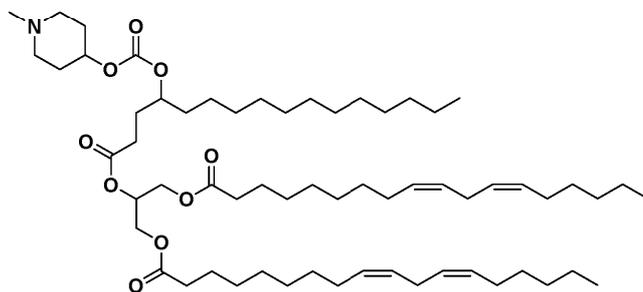
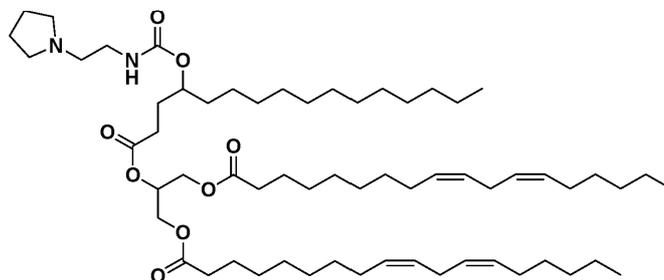
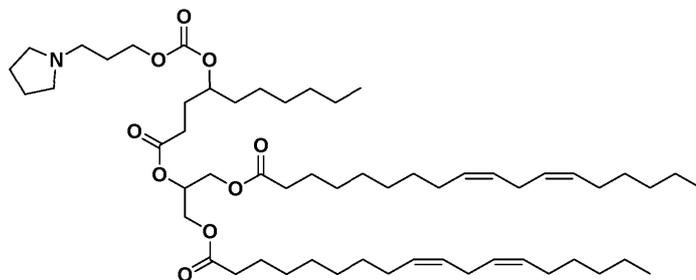
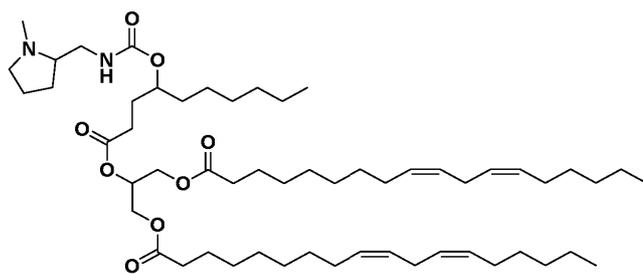


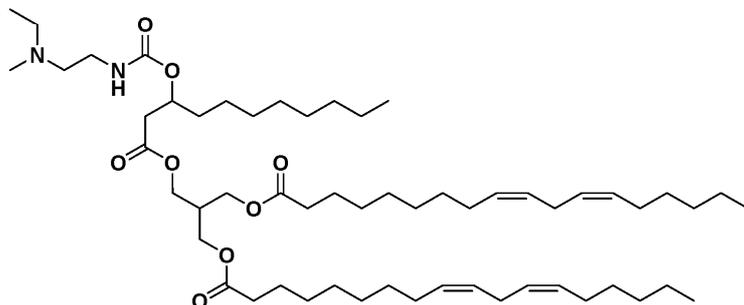
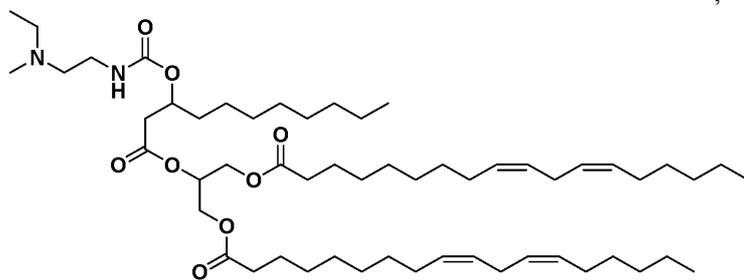
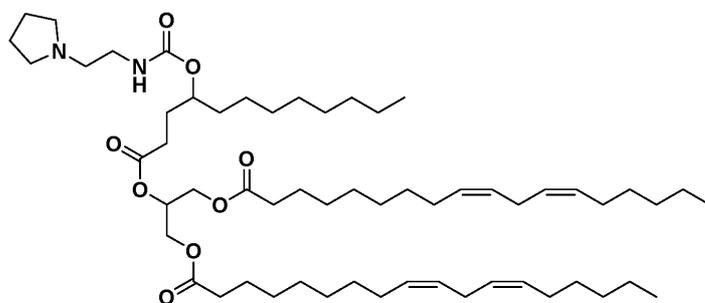
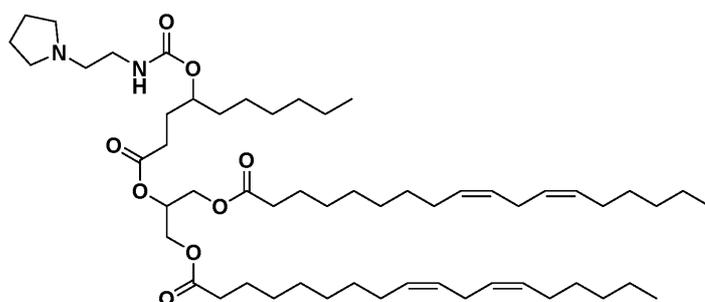
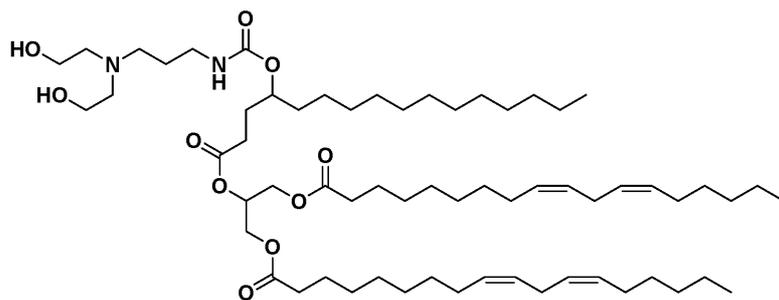


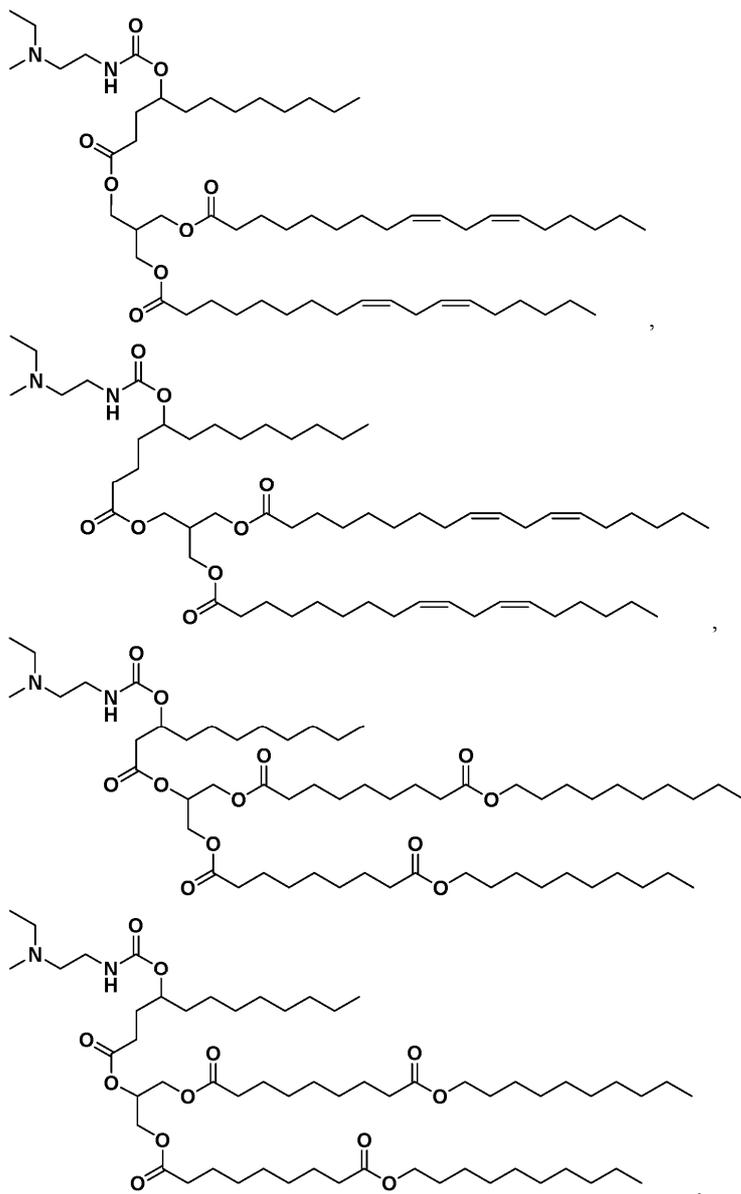


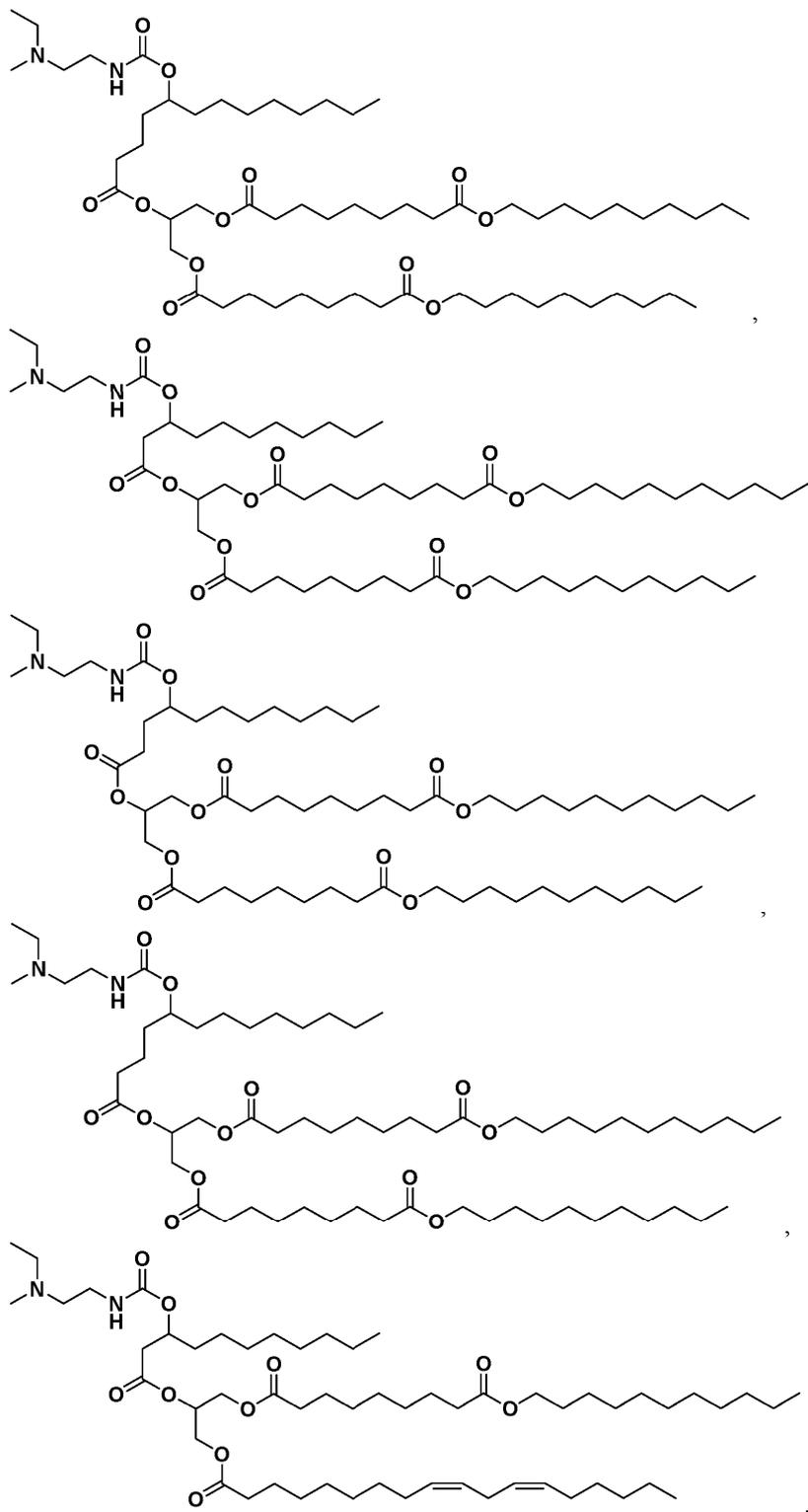


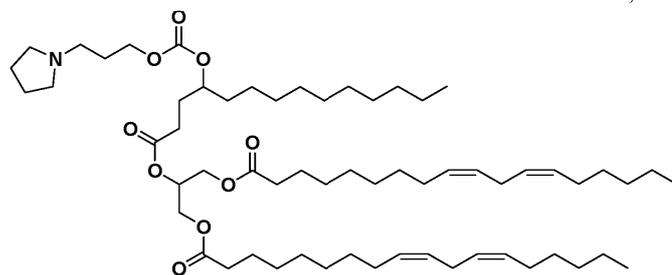
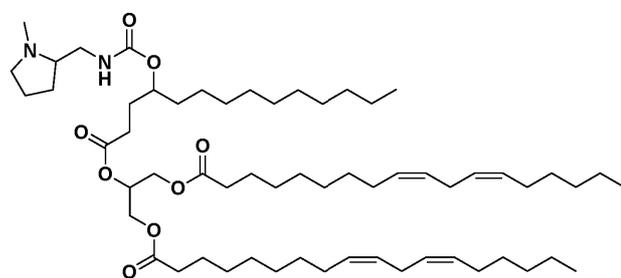
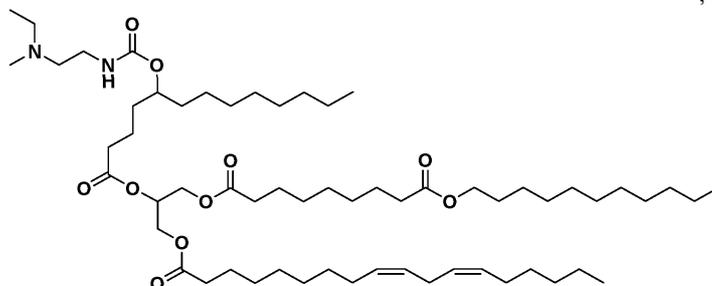
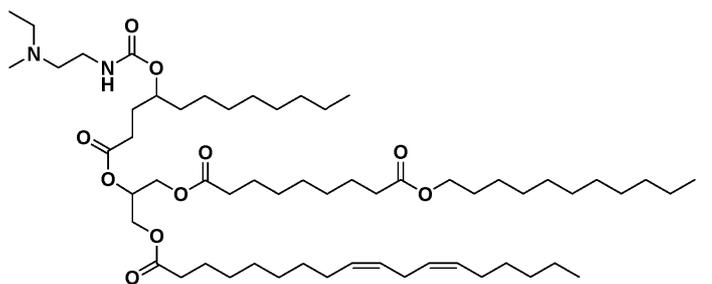


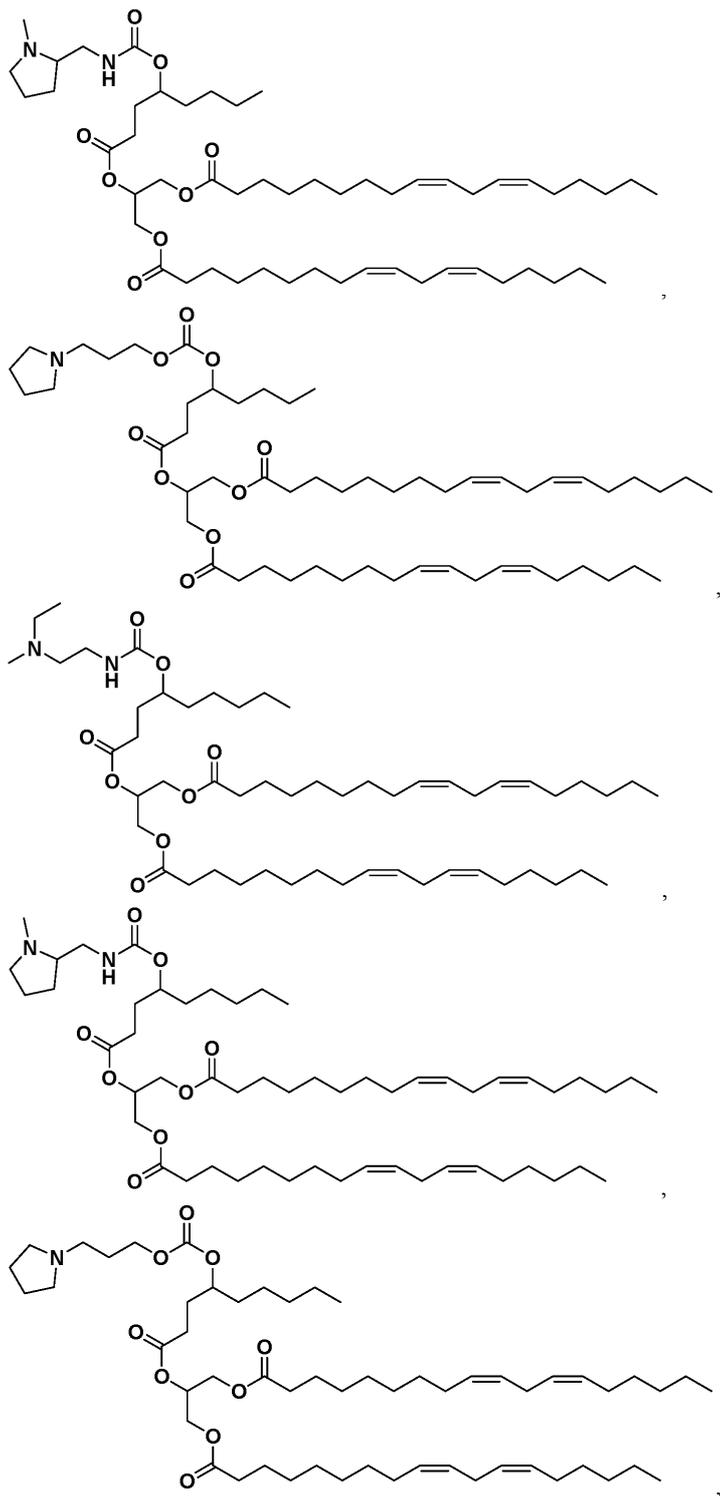


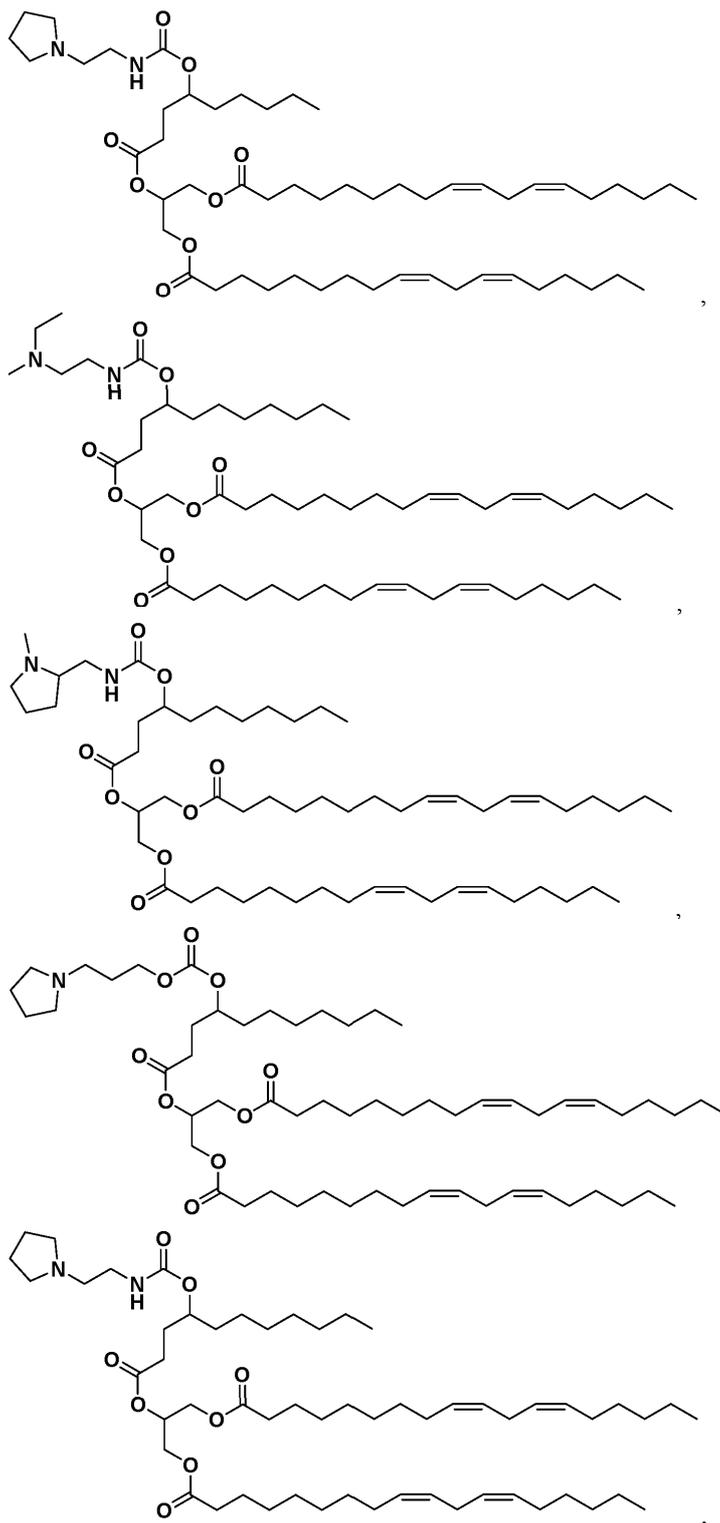


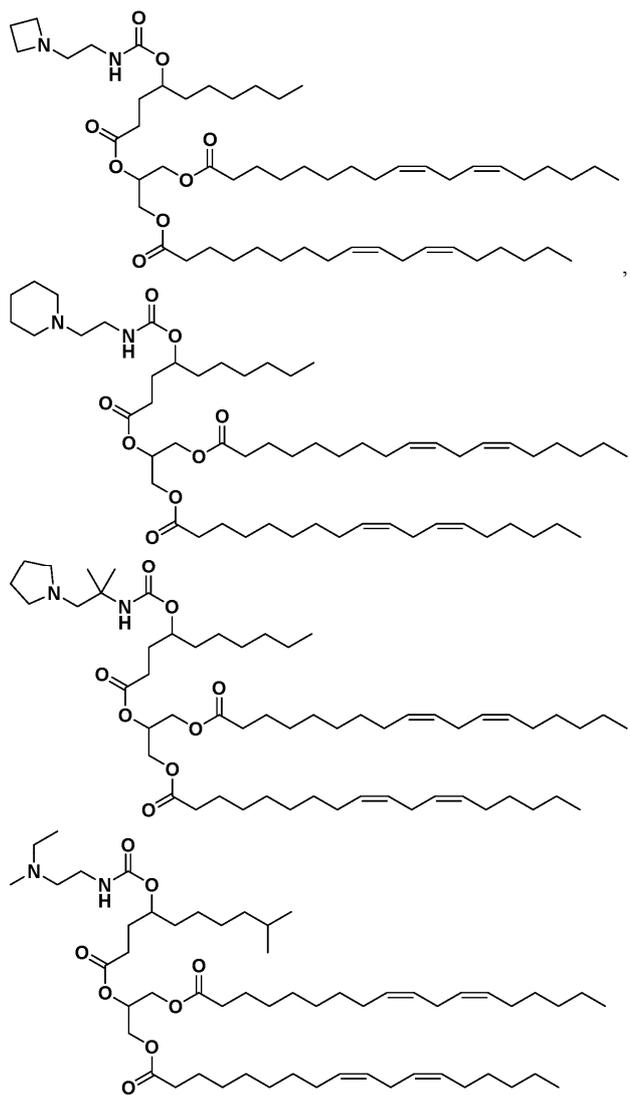


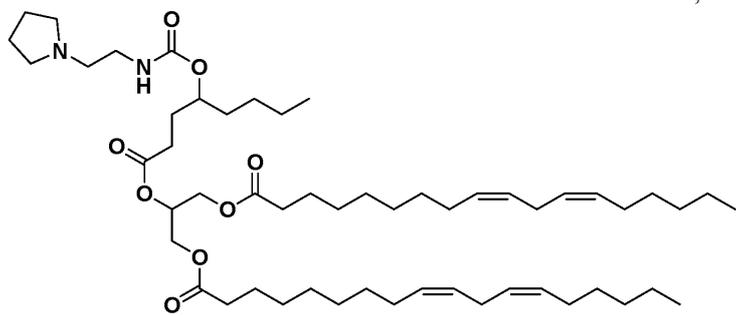
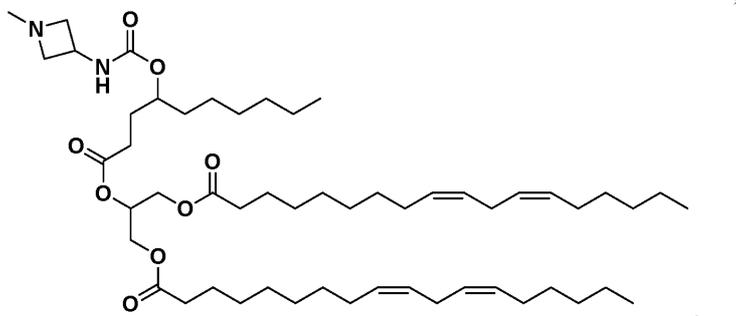
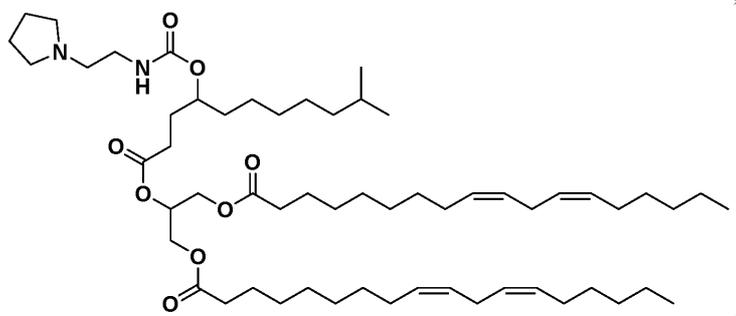
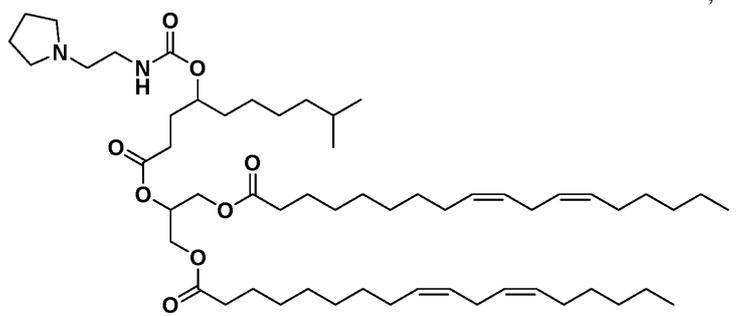
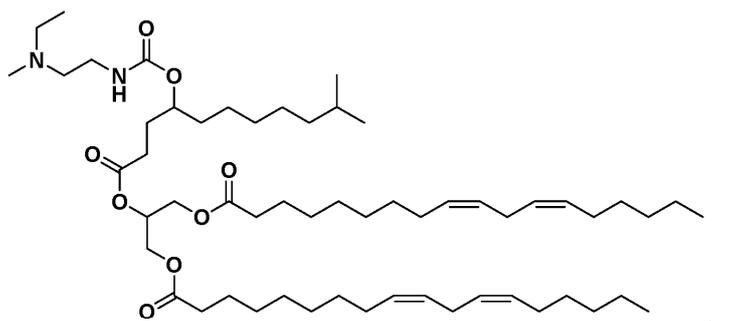


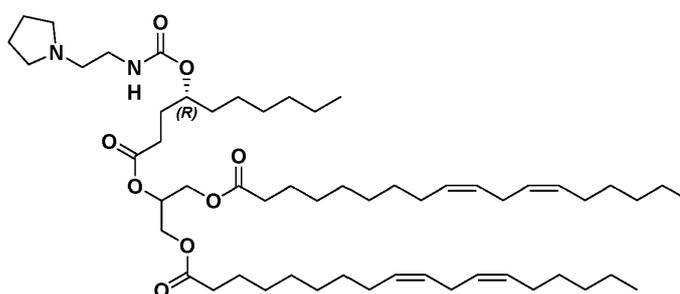
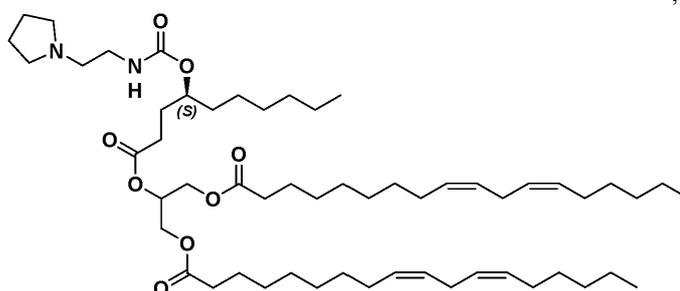
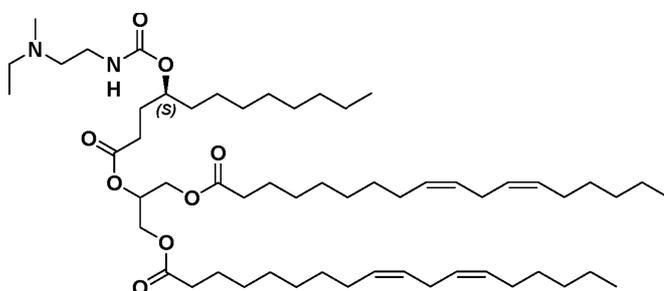
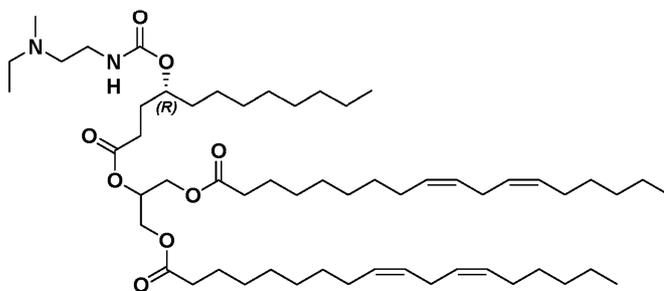
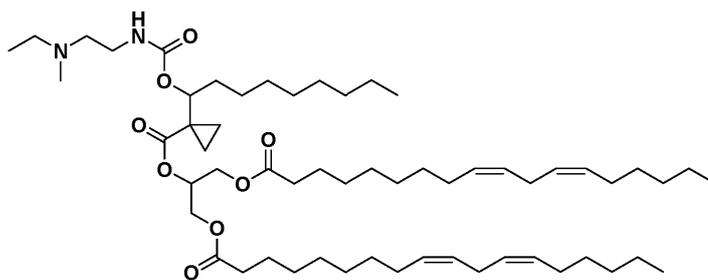


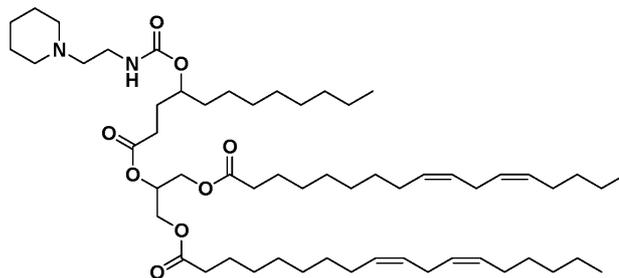
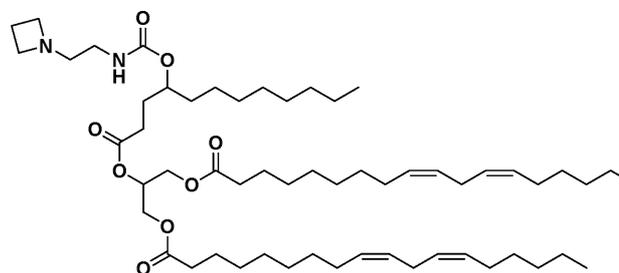
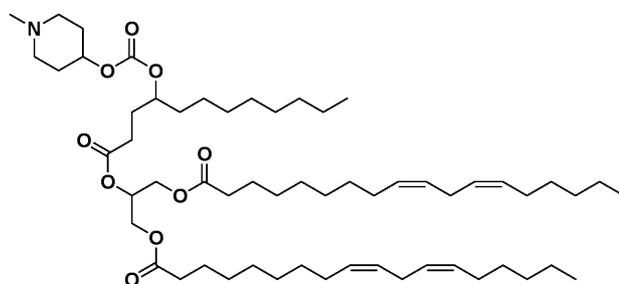
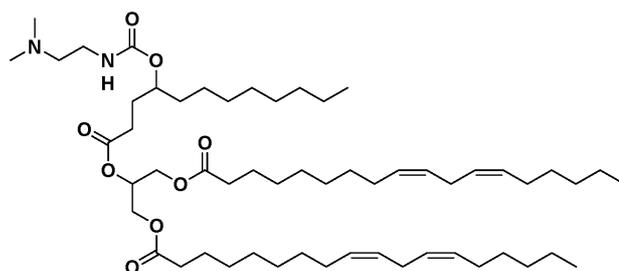


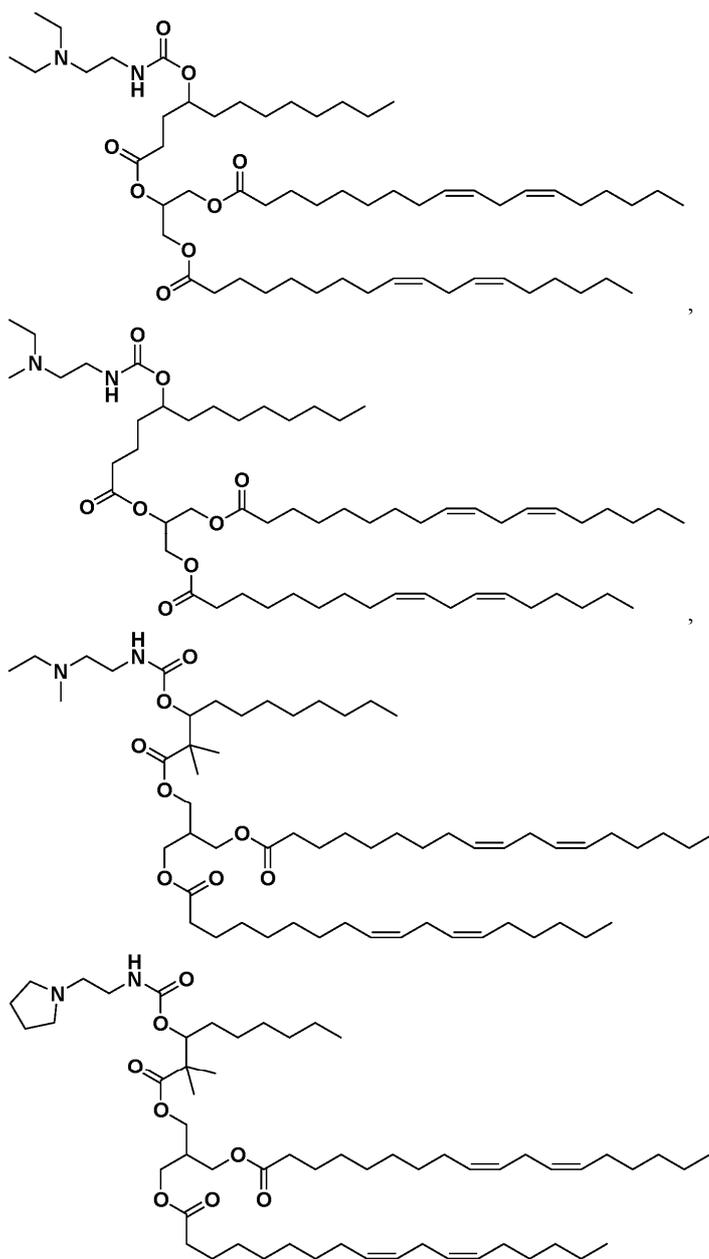


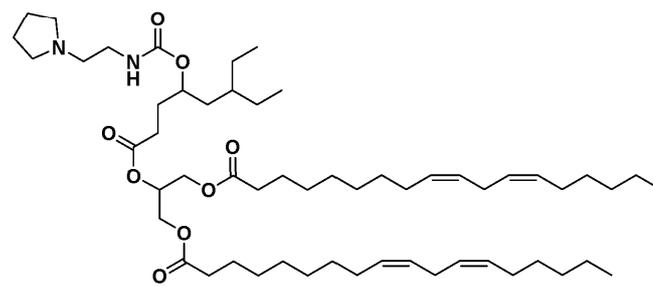
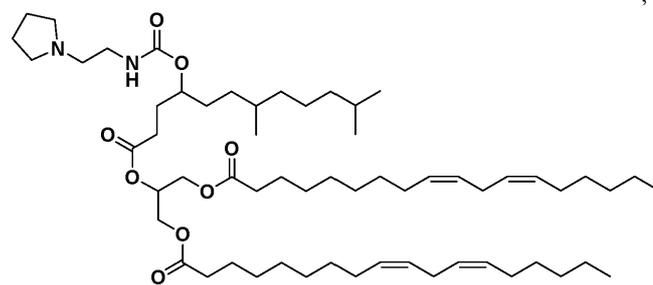
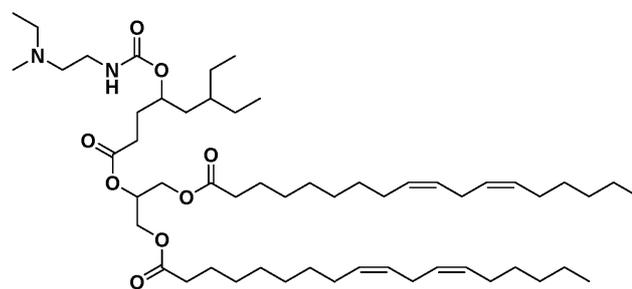
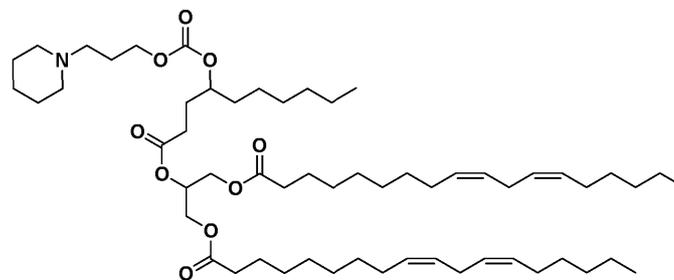
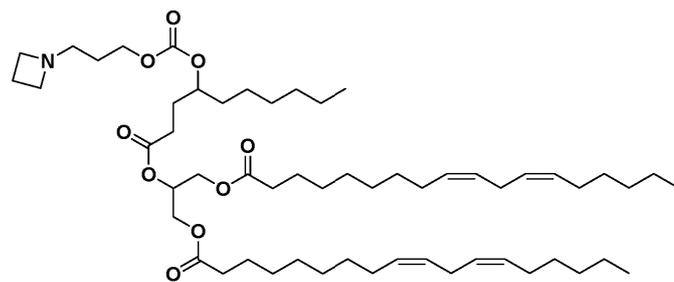


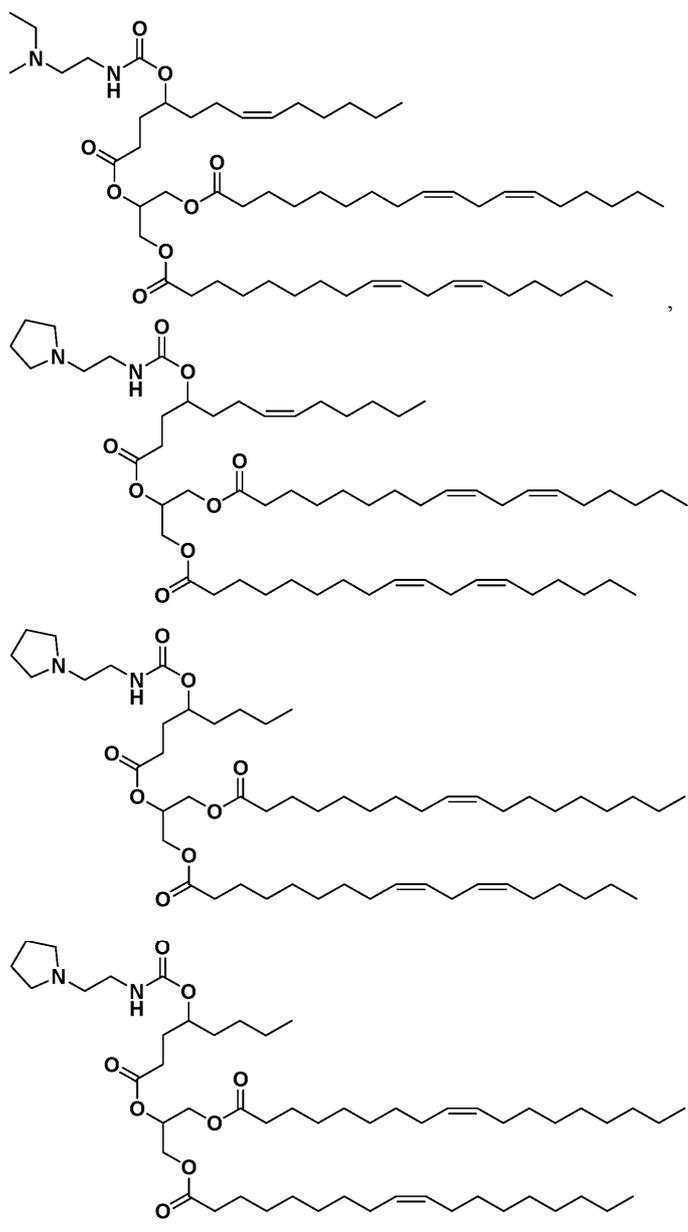


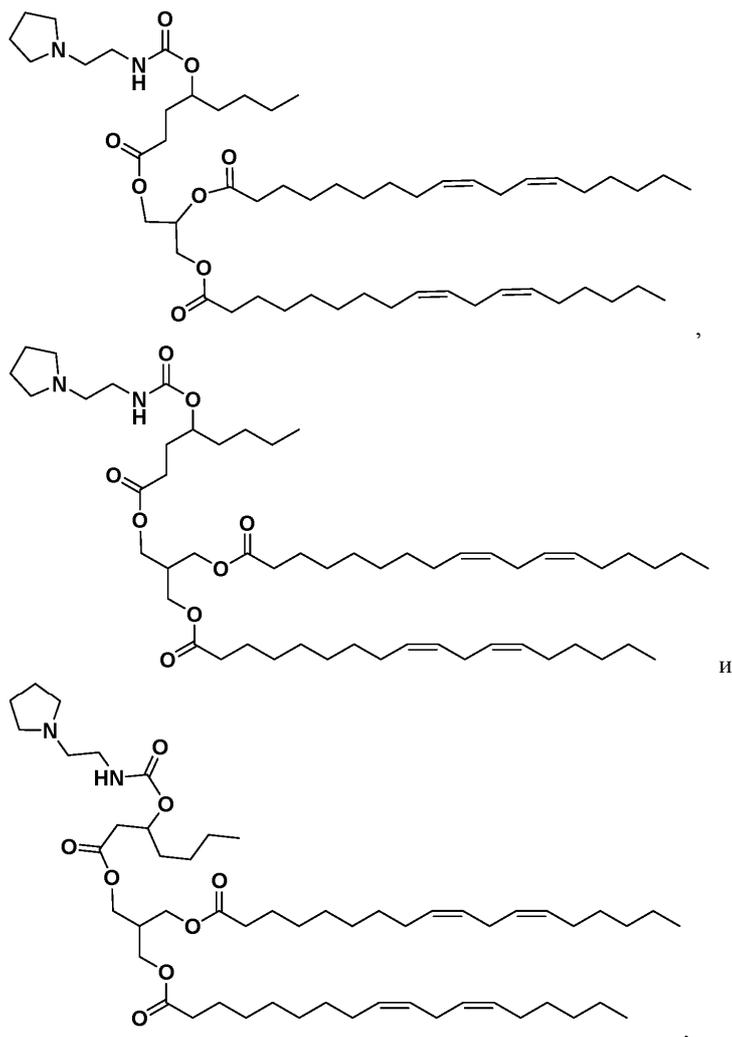












или его фармацевтически приемлемой соли.

24. Композиция липидных наночастиц (LNP), содержащая соединение по любому из предыдущих пунктов в липидном компоненте.

25. Композиция LNP по п.24, отличающаяся тем, что липидный компонент дополнительно включает вспомогательный липид, липид полиэтиленгликоля (ПЭГ) и нейтральный липид.

26. Композиция LNP по п.24 или 25, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит нуклеиновую кислоту.

27. Композиция LNP по п.26, отличающаяся тем, что композиция имеет отношение атомов азота/фосфорных групп (N/P) 3-10.

28. Композиция LNP по п.27, отличающаяся тем, что отношение N/P составляет 6 ± 1 .

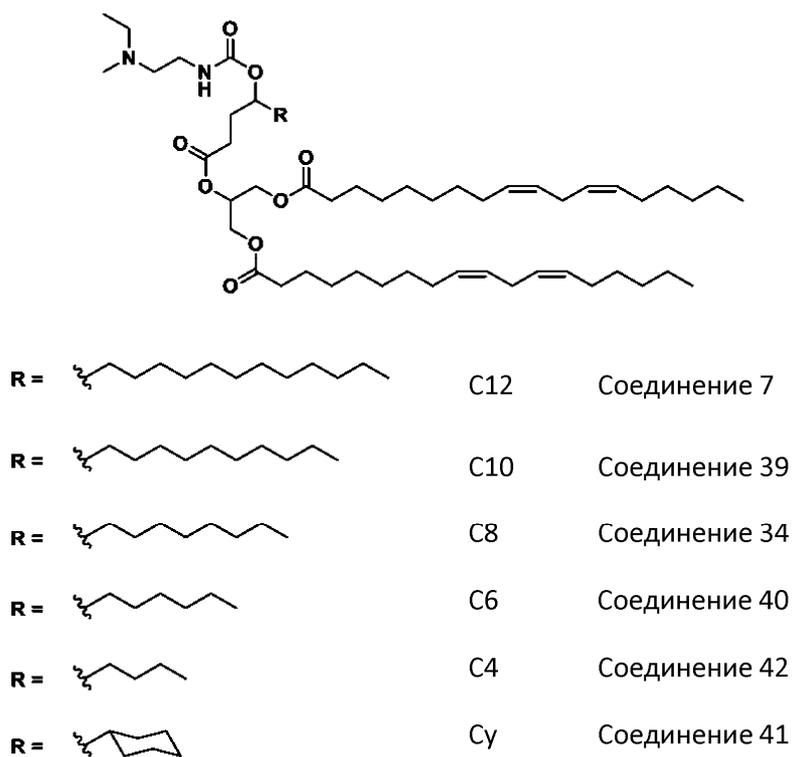
29. Композиция LNP по любому из пп.24-28, дополнительно содержащая компонент РНК, причем компонент РНК содержит мРНК.

30. Композиция LNP по п.29, отличающаяся тем, что РНК-компонент содержит последовательность, кодирующую РНК-направляемый связывающий ДНК агент, такой как мРНК нуклеазы Cas.

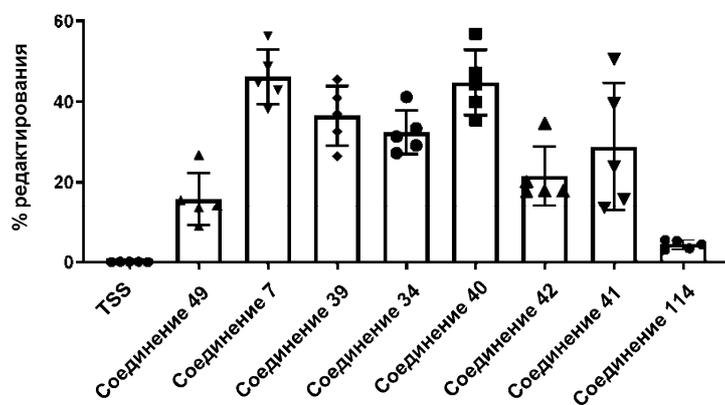
31. Композиция LNP по п.29 или 30, отличающаяся тем, что РНК-компонент включает гРНК.

32. Применение композиции LNP по любому из пп.24-31 для редактирования гена у субъекта.

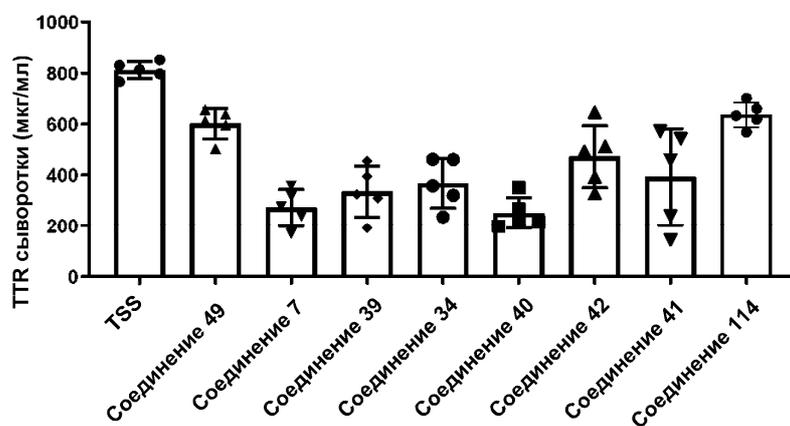
33. Применение композиции LNP по любому из пп.24-31 для получения лекарственного средства для редактирования гена у субъекта.



Фиг. 1А

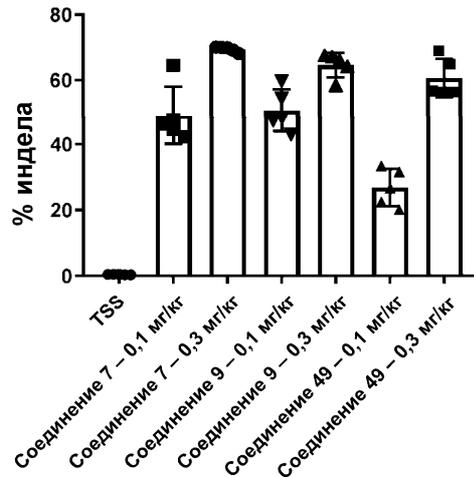


Фиг. 1В



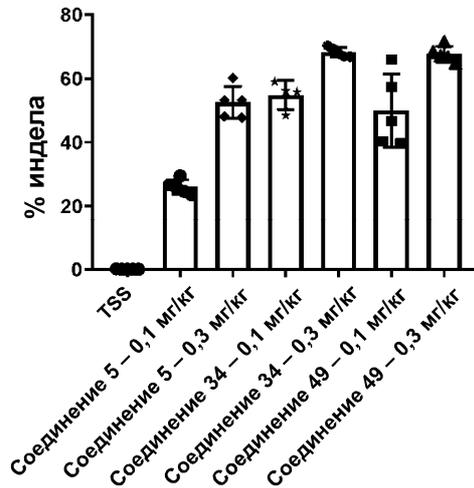
Фиг. 1С

Редактирование TTR в печени мыши



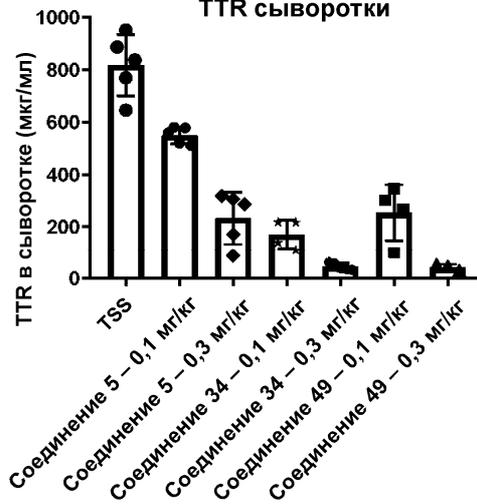
Фиг. 2

Редактирование TTR в печени мыши

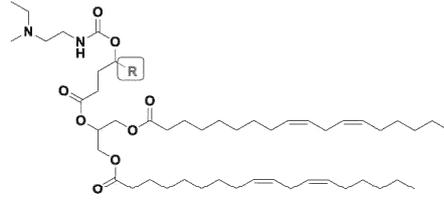


Фиг. 3А

TTR сыворотки

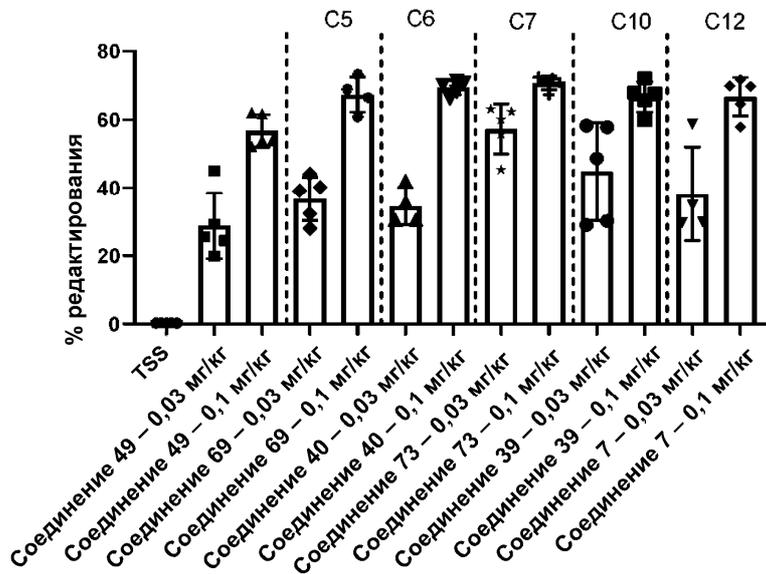


Фиг. 3В

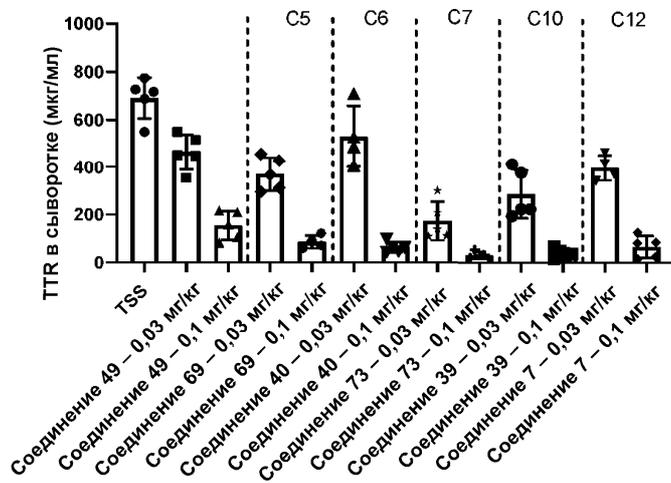


- R= C12 Соединение 7
- R= C10 Соединение 39
- R= C7 Соединение 73
- R= C6 Соединение 40
- R= C5 Соединение 69

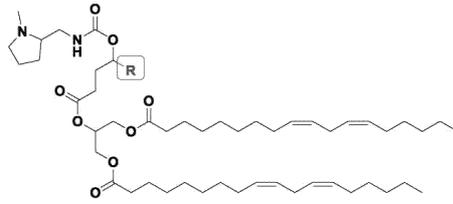
Фиг. 4А



Фиг. 4В

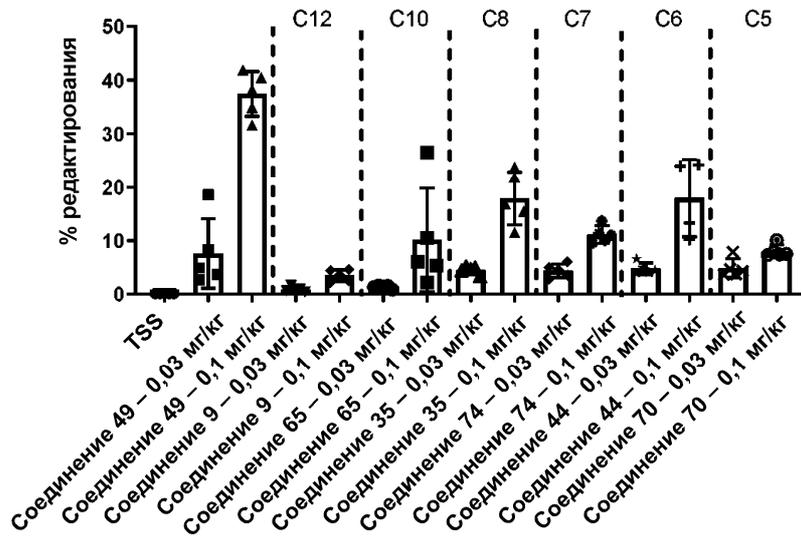


Фиг. 4С

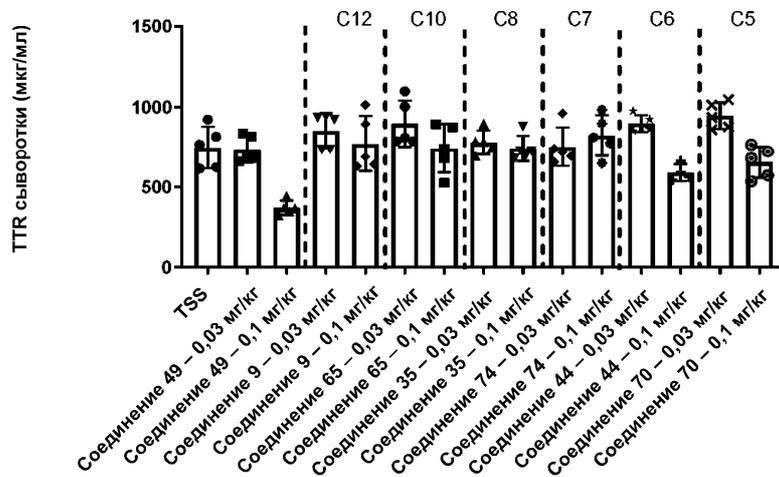


- R= C12 Соединение 9
- R= C10 Соединение 65
- R= C8 Соединение 35
- R= C7 Соединение 74
- R= C6 Соединение 44
- R= C5 Соединение 70

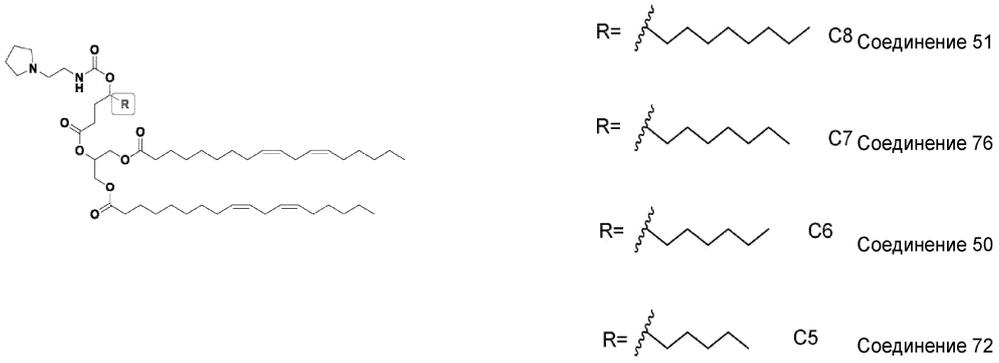
Фиг. 5А



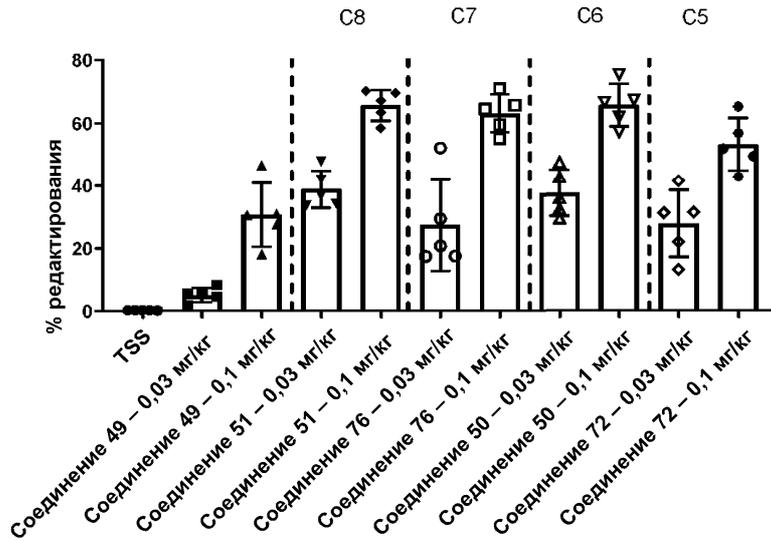
Фиг. 5В



Фиг. 5С

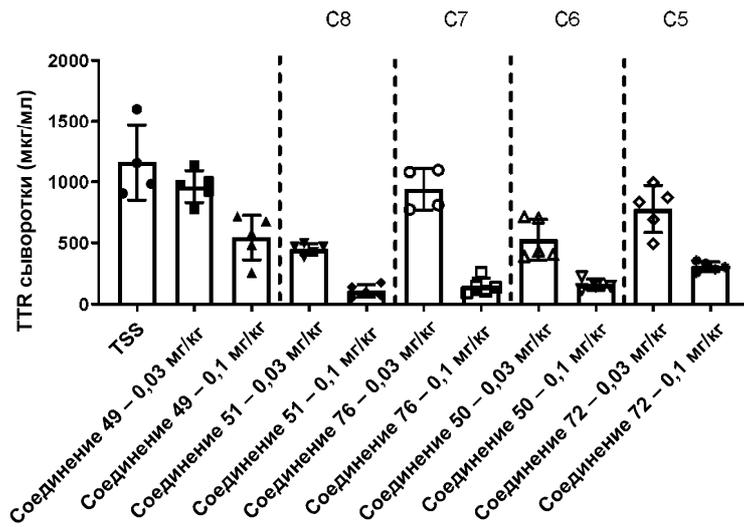


Фиг. 6А

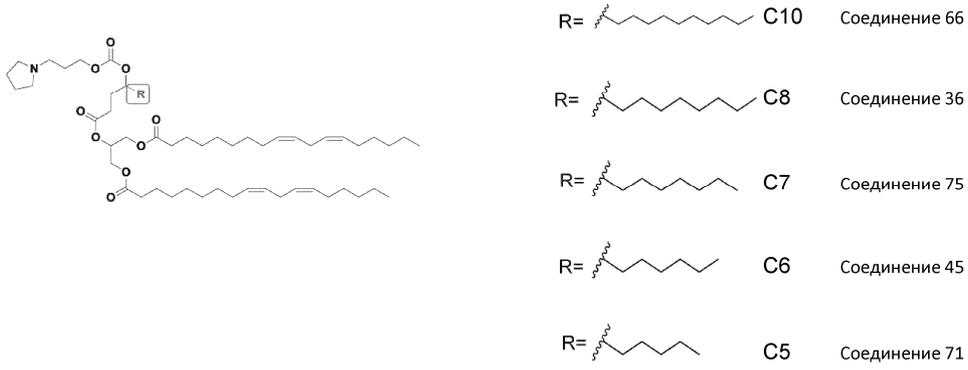


Фиг. 6В

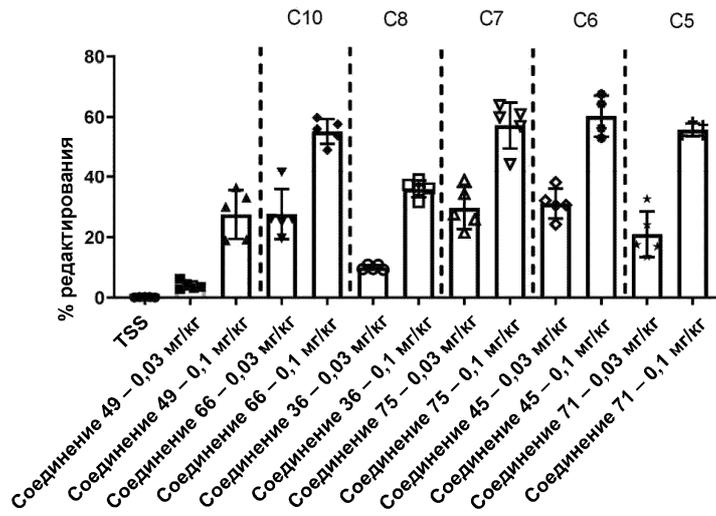
TTR сыворотки



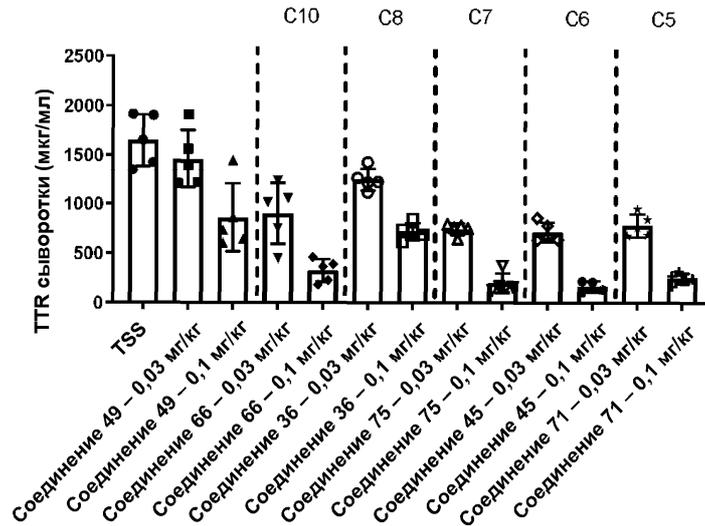
Фиг. 6С



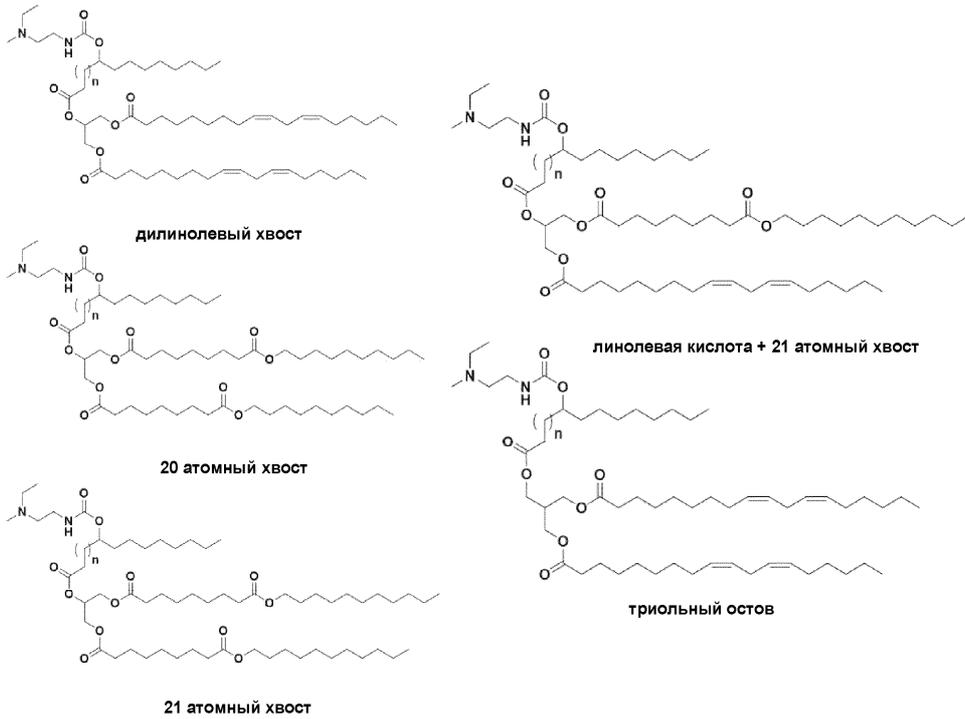
Фиг. 7А



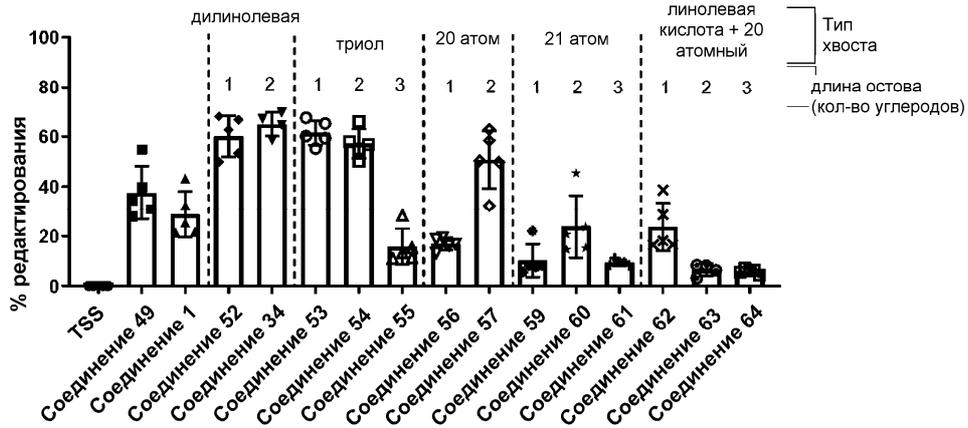
Фиг. 7В



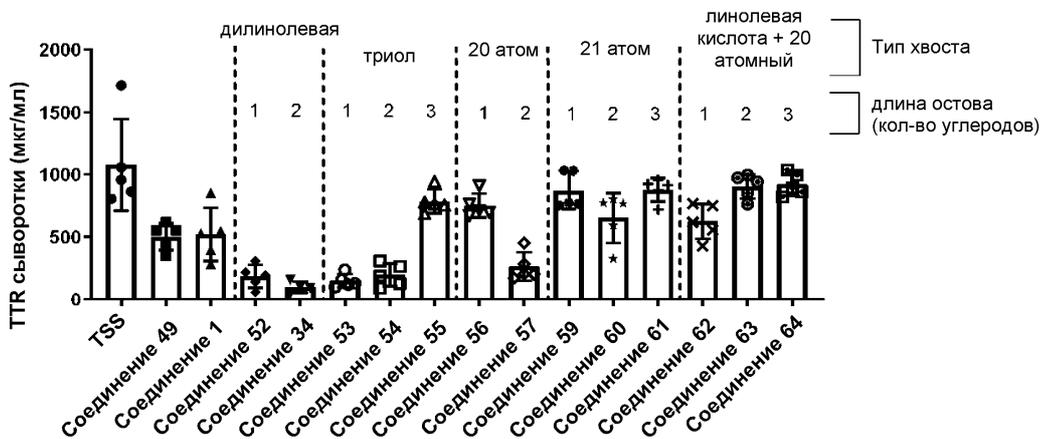
Фиг. 7С



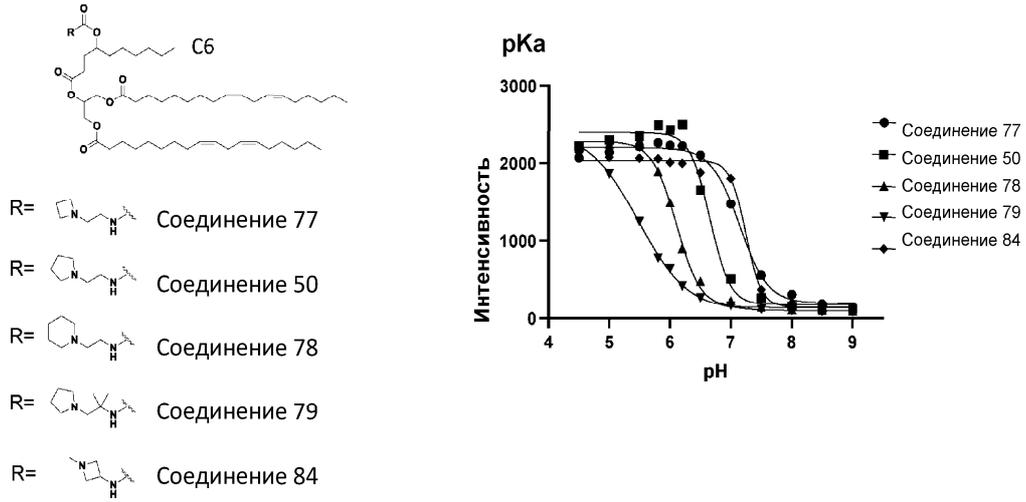
Фиг. 8А



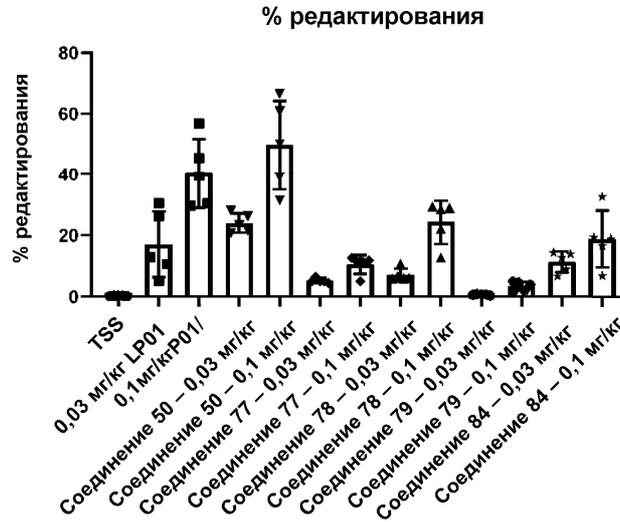
Фиг. 8В



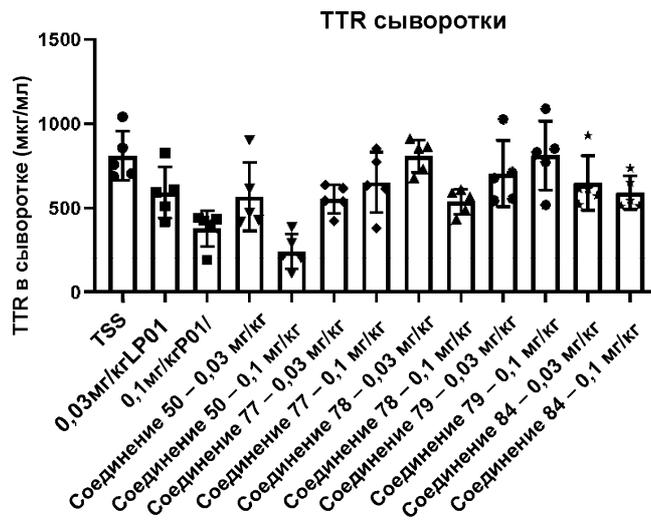
Фиг. 8С



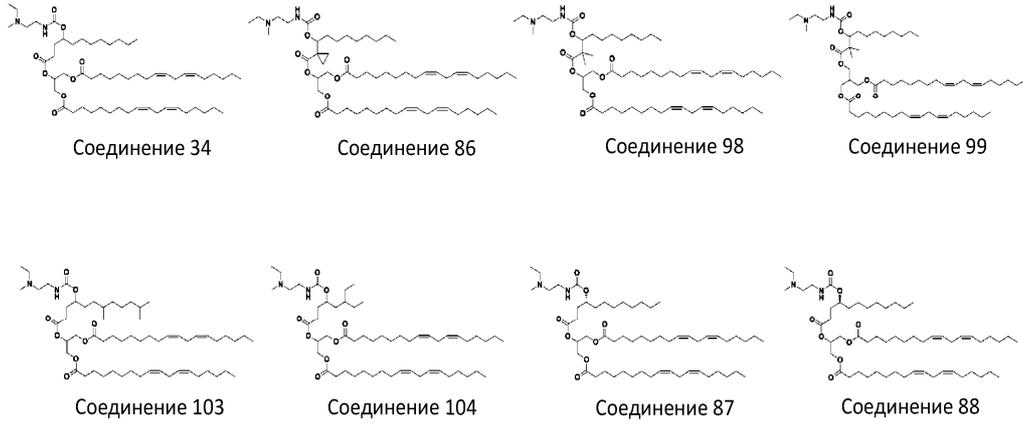
Фиг. 9А



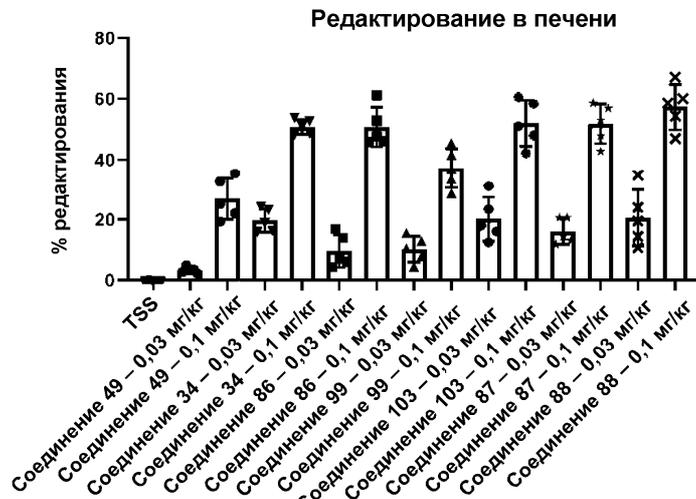
Фиг. 9В



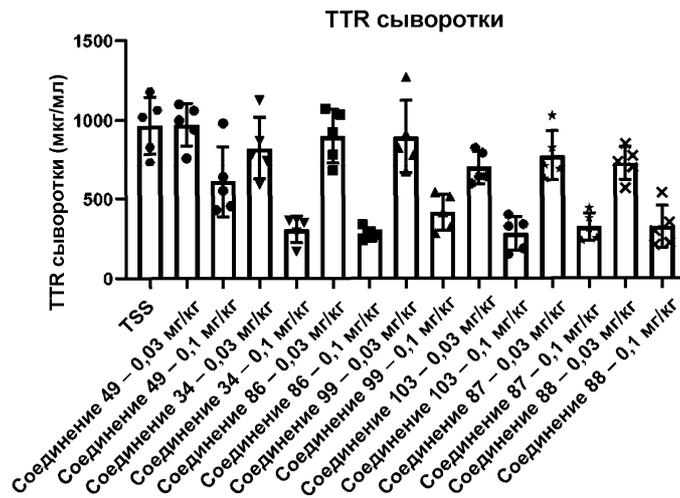
Фиг. 9С



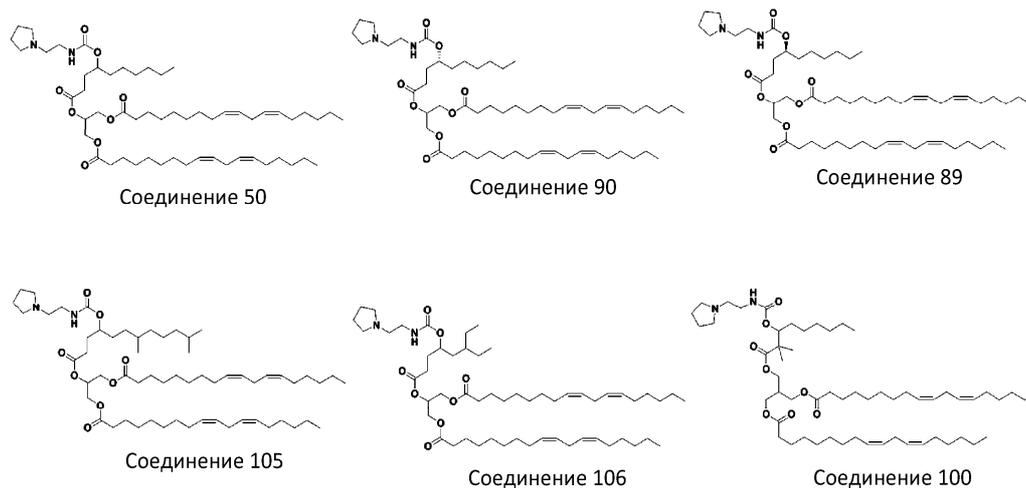
Фиг. 10А



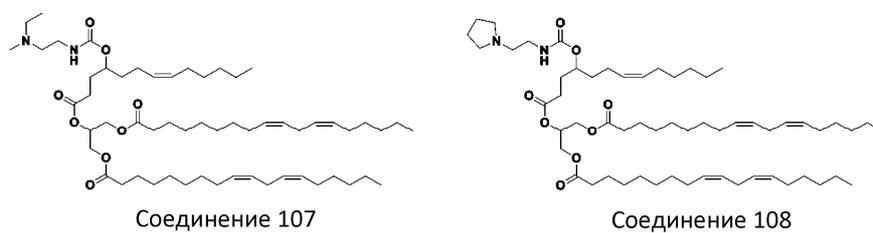
Фиг. 10В



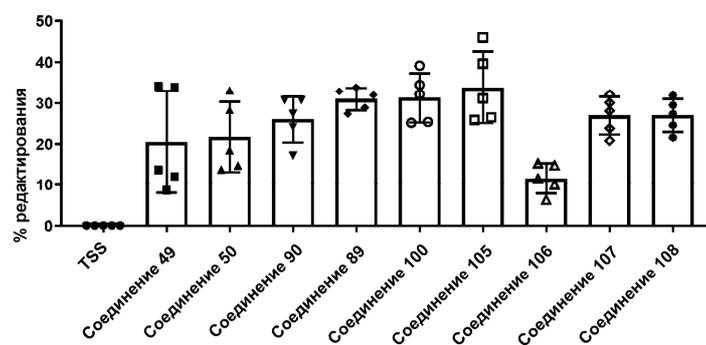
Фиг. 10С



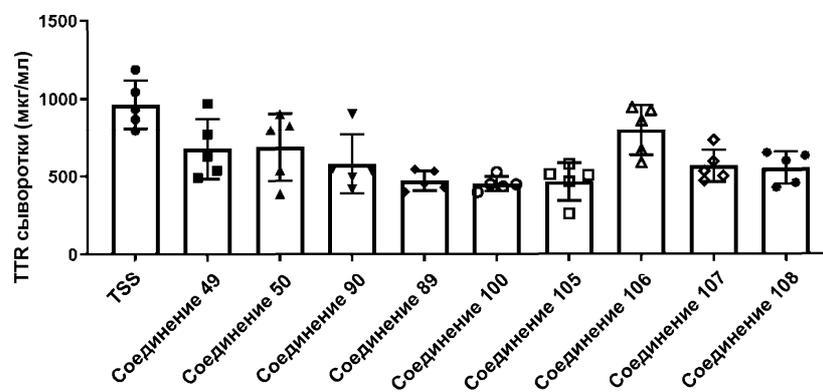
Фиг. 11А



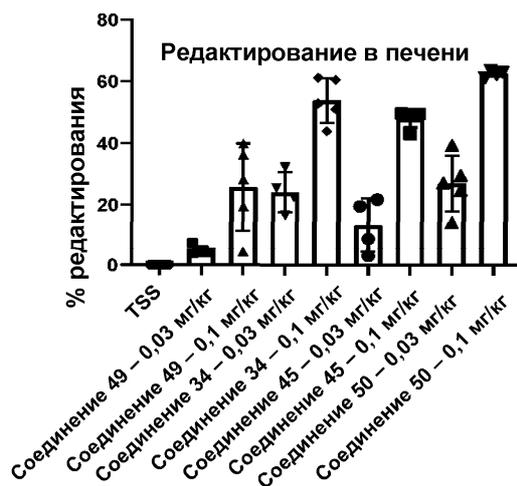
Фиг. 11В



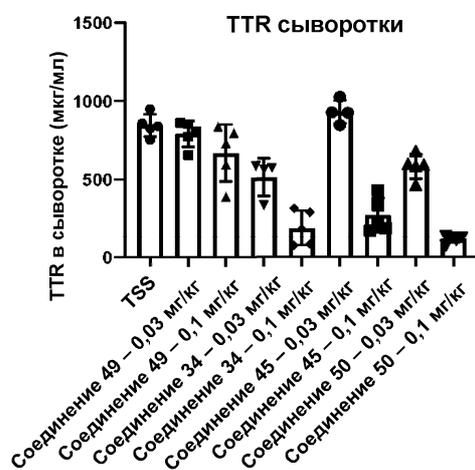
Фиг. 11С



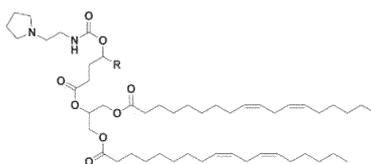
Фиг. 11D



Фиг. 12А

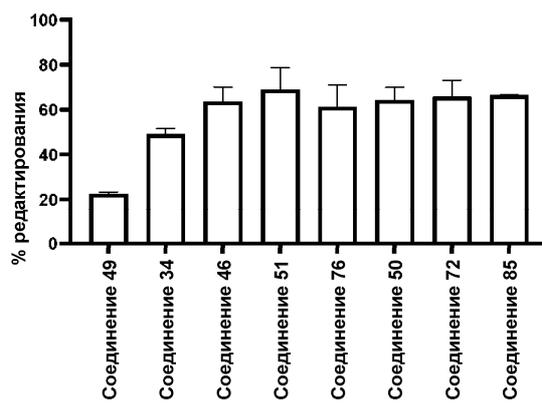


Фиг. 12В



- R = C12 Соединение 46
 R = C8 Соединение 51
 R = C7 Соединение 76
 R = C6 Соединение 50
 R = C5 Соединение 72
 R = C4 Соединение 85

Фиг. 13А



Фиг. 13В

