

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390668** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31

(22) Дата подачи заявки
2017.03.07

(51) Int. Cl. *C07H 5/06* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(54) НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ЛИГАНДЫ

(31) **62/383,221; 62/456,339**

(32) **2016.09.02; 2017.02.08**

(33) **US**

(62) **201891423; 2017.03.07**

(71) Заявитель:
**ЭРРОУХЭД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Ли Чжэнь, Пэй Тао, Глебоцкая
Агнешка, Лоулер Майкл, Флейц Фред,
Альтенхофер Эрих, Кумар Панкадж
(US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Описаны новые нацеливающие лиганды, которые могут быть связаны с соединениями, такими как терапевтические соединения, которые могут быть полезны для направления соединений к мишени *in vivo*. Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут служить для нацеливания ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, таких как агенты РНКи, в клетки печени для модуляции экспрессии генов. Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, при конъюгировании с терапевтическим соединением, могут применяться в различных приложениях, включая применение в терапевтических, диагностических, связанных с валидацией мишеней и в приложениях, связанных с геномными исследованиями. Композиции, включающие нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, будучи связанными с ингибирующими экспрессию олигомерными соединениями, способны опосредовать экспрессию нуклеотидных последовательностей-мишеней в клетках печени, таких как гепатоциты, что можно применять в ингибировании активности или экспрессии гена в клетке, ткани или организме.

A1

202390668

202390668

A1

НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ЛИГАНДЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США под серийным номером 62/383,221, поданной 2 сентября 2016 г., и предварительной заявки на патент США № 62/456,339, поданной 8 февраля 2017 г., содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Для получения терапевтического эффекта или возможности применения в диагностических целях многие соединения необходимо доставлять в определенные места (например, в клетку-мишень (клетки)). Это часто необходимо при попытках доставки терапевтического соединения *in vivo*. Кроме того, возможность эффективно доставлять соединение в определенное место может ограничить или в значительной

15 степени устранить нецелевые последствия (такие как побочные эффекты), которые могут быть вызваны введением соединения. Один из способов осуществления доставки соединения, такого как терапевтическое соединение, в желаемое место *in vivo*, основан на связывании или присоединении этого соединения к нацеливающему лиганду.

20 Одним из классов терапевтических соединений, которые можно нацеливать с применением нацеливающих лигандов, являются олигомерные соединения. Было показано, что олигомерные соединения, которые включают нуклеотидные последовательности, по меньшей мере частично комплементарные нуклеотидной последовательности-мишени, изменяют функцию и активность мишени как *in vitro* и *in*

25 *vivo*. Было показано, что при доставке в клетку, содержащую нуклеотидную последовательность - мишень (такую как мРНК), олигомерные соединения модулируют экспрессию мишени, что приводит к изменению транскрипции или трансляции нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых случаях олигомерное соединение может снижать экспрессию гена за счет ингибирования нуклеиновой кислоты - мишени и/или

30 запуска разрушения нуклеиновой кислоты-мишени.

Если нуклеиновая кислота-мишень представляет собой мРНК, одним из механизмов, по которому ингибирующее экспрессию олигомерное соединение может модулировать

экспрессию мРНК-мишени, представляет собой РНК-интерференцию. РНК-интерференция представляет собой биологический процесс, позволяющий РНК или РНК-подобным молекулам (таким как химически модифицированные РНК-молекулы) “глушить” экспрессию генов (осуществлять сайленсинг) путем разрушения. Считается, что посттрансляционный сайленсинг генов является эволюционно консервативным механизмом защиты клеток для предотвращения экспрессии чужеродных генов.

Было показано, что синтетические молекулы РНК и РНК-подобные молекулы вызывают РНК-интерференцию *in vivo*. Например, Elbashir et al. (*Nature* **2000**, *411*, 494-98) описывают РНКи, осуществляемую путем введения дуплексов синтетических 21-нуклеотидных молекул РНК в культивируемые клетки млекопитающих. Типы синтетических молекул РНК и РНК-подобных молекул, которые могут запускать ответный механизм РНКи, могут включать модифицированные нуклеотиды и/или одну или более связей, отличных от фосфодиэфирной связи.

Дополнительно, одноцепочечные молекулы РНК и РНК-подобные молекулы, которые могут также включать модифицированные нуклеотиды и/или одну или более связей, отличных от фосфодиэфирной связи, также могут изменять экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени, такой как мРНК-мишень.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

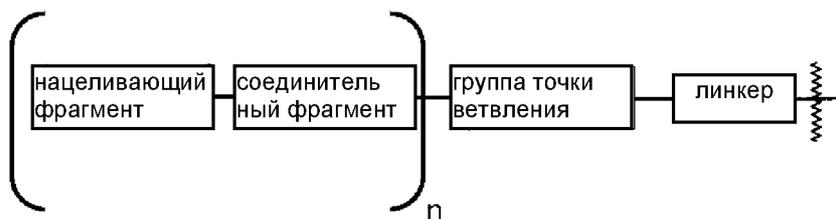
В настоящем документе раскрыты нацеливающие лиганды, которые могут улучшать доставку терапевтических соединений в конкретный сайт, например, конкретный орган или ткань в организме субъекта, такого как пациент-человек или животное. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, описанные в настоящем документе, могут улучшать нацеленную доставку ингибирующих экспрессию олигомерных соединений. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды могут улучшать доставку ингибирующих экспрессию олигомерных соединений в печень.

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают, состоят из или по существу состоят из одного или более нацеливающих фрагментов, одного или более соединительных фрагментов, одной или

более групп точки ветвления и одного или более линкеров. Линкеры, подходящий для применения в нацеливающих лигандах, раскрытых в настоящем документе, включают “жесткий” линкер, который может придавать достаточную стабильность и жесткость всему нацеливающему лиганду для снижения потенциальных взаимодействий между одним или большим числом нацеливающих фрагмент(ов) и терапевтическим соединением, к которому он или они присоединены. Дополнительно, “жесткие” линкеры, подходящие для применения в нацеливающих лигандах, раскрытых в настоящем документе, полезны для эффективного синтеза таких нацеливающих лигандов как фосфорамидитные соединения (также называемые в настоящем документе “фосфорамидит-содержащими соединениями”).

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают, состоят из или по существу состоят из одного или более нацеливающих фрагментов, одного или более соединительных фрагментов и одной или более групп точки ветвления с фрагментом, заменяющим линкер. Фрагмент, заменяющий линкер, включает, состоит из или по существу состоит из одной или более замещенных или незамещенных циклоалкильных, циклоалкенильных, арильных, гетероарильных или гетероциклических групп или их ковалентно связанных комбинаций, расположенных в пределах группы точки ветвления. Присутствие фрагмента, заменяющего линкер, в пределах группы точки ветвления придает свойства, аналогичные свойствам «жестких» линкеров, раскрытых в настоящем документе, обеспечивая достаточную стабильность и жесткость нацеливающему лиганду в целом. Дополнительно, группы точки ветвления с фрагментом, заменяющим линкер, подходящие для применения в нацеливающих лигандах, полезны для эффективного синтеза нацеливающих лигандов в форме фосфорамидитных соединений.

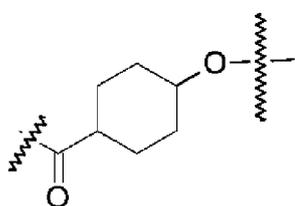
В настоящем документе раскрыты нацеливающие лиганды, содержащие, состоящие из, или состоящие по существу из структуры Формулы I:



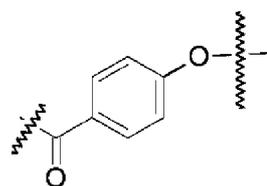
, содержащей линкер,

группу точки ветвления, один или более соединительных фрагментов и один или более нацеливающих фрагментов, где n представляет собой целое число от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 или 4), и при этом линкер представляет собой структуру, выбранную группы, состоящей из:

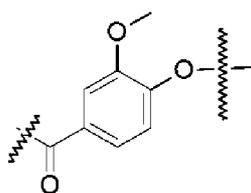
5



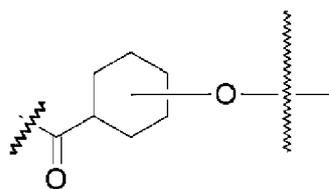
(Структура 1);



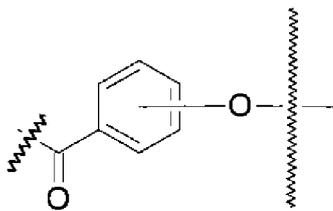
(Структура 2);



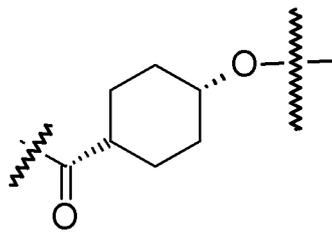
(Структура 3);



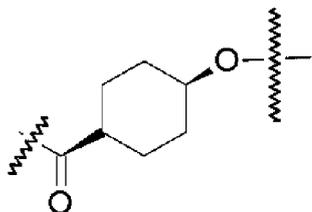
(Структура 4);



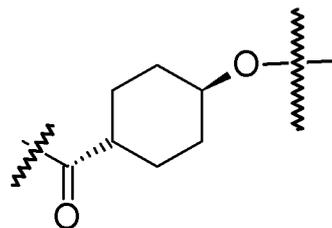
(Структура 5);



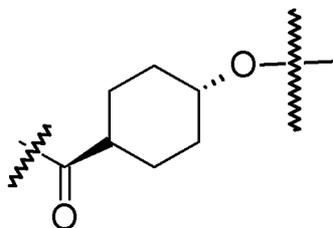
(Структура 6a);



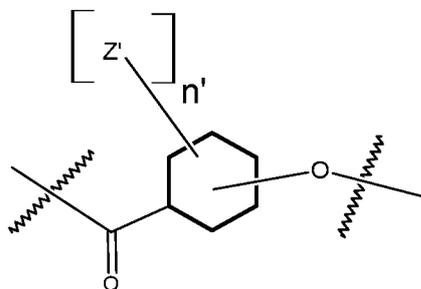
(Структура 6b);



(Структура 6c);

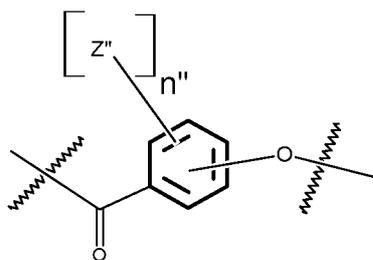


(Структура 6d);

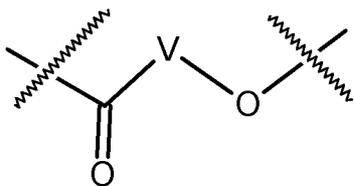


5 , где n' представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и, если присутствует, каждый Z' независимо выбран из группы, состоящей из: C1-C6 алкила, C2-C6 алкенила, C2-C6 алкинила, замещенного или незамещенного амина, карбоксила, C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 алкила, C1-C6 аминоалкила, замещенного C2-C6 алкенила, замещенного C2-C6 алкинила, замещенного C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 аминоалкила, галогена (например, F), гидроксила, амидо, замещенного амида, циано, замещенного или незамещенного кето, замещенного или незамещенного алкоксикарбонила, замещенного или незамещенного арилоксикарбонила, замещенного или незамещенного гетероарилоксикарбонила и сульфгидрила (Структура 7);

10



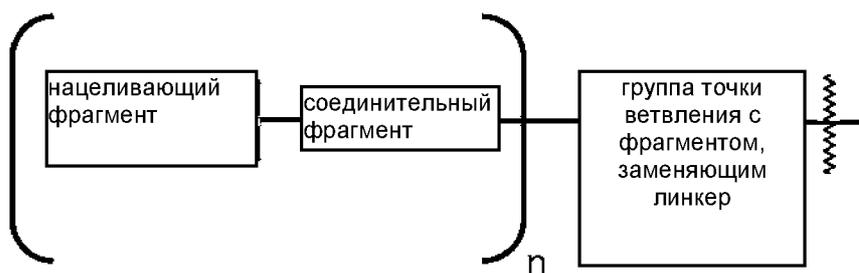
, где n'' представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 (например, 1, 2, 3 или 4), и, если присутствует, каждый Z'' независимо выбран из группы, состоящей из: C1-C6 алкила, C2-C6 алкенила, C2-C6 алкинила, C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 алкил, C1-C6 аминоалкила, замещенного C2-C6 алкенила, замещенного C2-C6 алкинила, замещенного или незамещенного амина, карбоксила, замещенного C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 аминоалкила, галогена (например, F), гидроксила, амидо, замещенного амида, циано, замещенного или незамещенного кето, замещенного или незамещенного алкоксикарбонила, замещенного или незамещенного арилоксикарбонила, замещенного или незамещенного гетероарилоксикарбонила и сульфгидрила (Структура 8); и



, где V содержит одну или больше таких групп как замещенный или незамещенный циклоалкил (например, циклогексил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогептил, циклооктил и т.д.), замещенный или незамещенный циклоалкенил (например, циклогексенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогептенил, циклооктенил, циклогексадиенил, циклопентадиенил, циклогептадиенил, циклооктадиенил и т.д.), замещенный или незамещенный арил (например, фенил, нафтил, бинафтил, антраценил и т.д.), замещенный или незамещенный гетероарил (например, пиридил, пиримидинил, пиррол, имидазол, фуран, бензофуран, индол и т.д.) или замещенный или незамещенный гетероциклил (например, тетрагидрофуран, тетрагидропиран, пиперидин, пирролидин и т.д.) или любые их ковалентно связанные комбинации. (Структура 9).

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды включают группу точки ветвления с фрагментом, заменяющим линкер.

В настоящем документе раскрыты нацеливающие лиганды, содержащие, состоящие из, или по существу состоящие из структуры Формулы II:



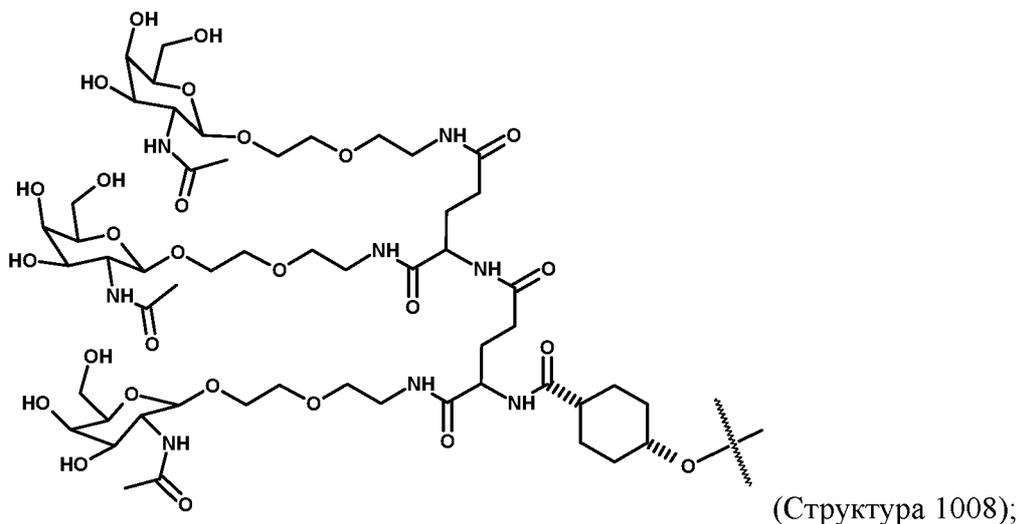
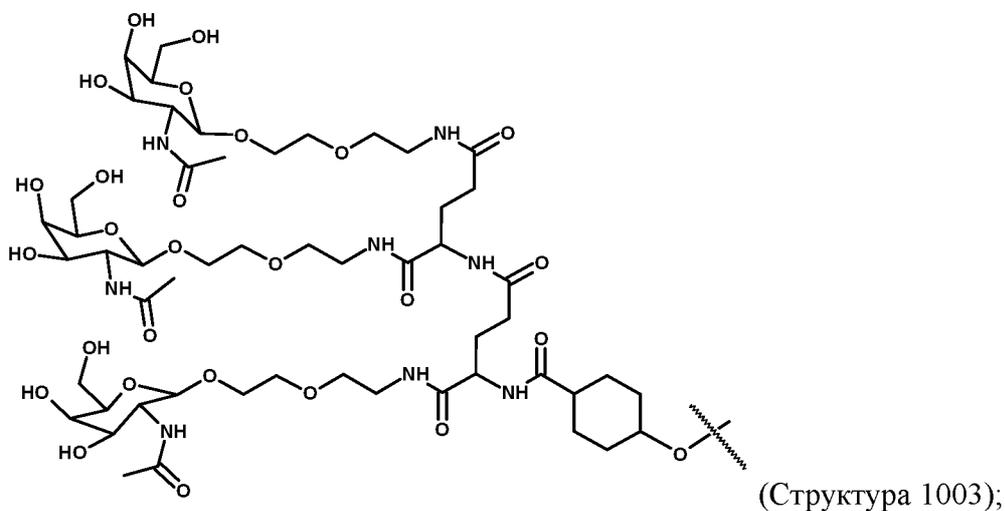
содержащей группу точки ветвления с фрагментом, заменяющим линкер, один или более соединительных фрагментов, и один или более нацеливающих фрагментов, где n представляет собой целое число от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 или 4), и при этом фрагмент, заменяющий линкер, включает одну или больше из таких групп, как замещенный или незамещенный циклоалкил (например, циклогексил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогептил, циклооктил и т.д.), замещенный или незамещенный циклоалкенил (например, циклогексенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогептенил, циклооктенил, циклогексаденил, циклопентаденил, циклогептаденил, циклооктаденил и т.д.), замещенный или незамещенный арил (например, фенил, нафтил, бинафтил, антраценил и т.д.), замещенный или незамещенный гетероарил (например, пиридил, пиримидинил, пиррол, имидазол, фуран, бензофуран, индол и т.д.) или замещенный или незамещенный гетероциклил (например, тетрагидрофуран, тетрагидропиран, пиперидин, пирролидин и т.д.) или любая их ковалентно связанная комбинация, и расположен группа точки ветвления.

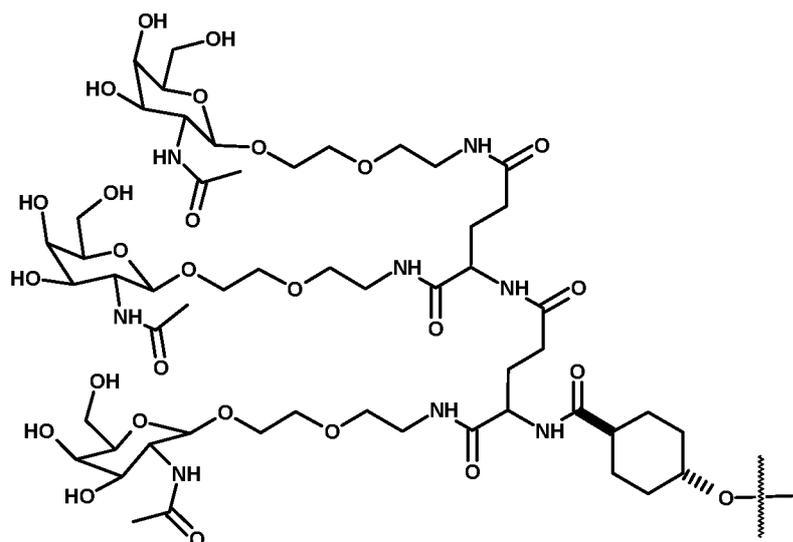
Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут быть соединены, напрямую или опосредовано, с соединением, таким как терапевтическое соединение, например, ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, например, с 3'- или 5'-концом ингибирующего экспрессию олигомерного соединения. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение включает один или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи, такой как двунитевый агент РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, соединены с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, соединены с агентом РНКи фосфатной,

фосфотиоатной или фосфонатной группой на 5'-конце смысловой нити двунитевого агента РНКи.

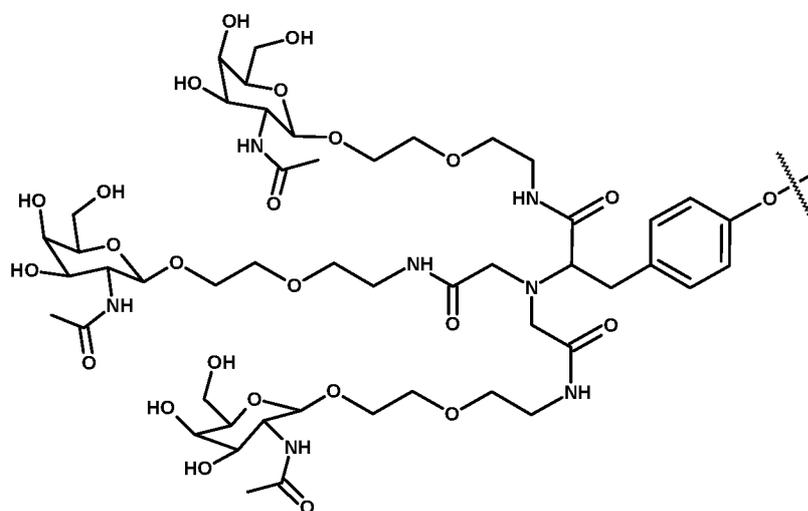
5 Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают один или более нацеливающих фрагментов. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, включают N-ацетилгалактозамин в качестве нацеливающего фрагмента.

10 В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, имеют структуры, представленные ниже:





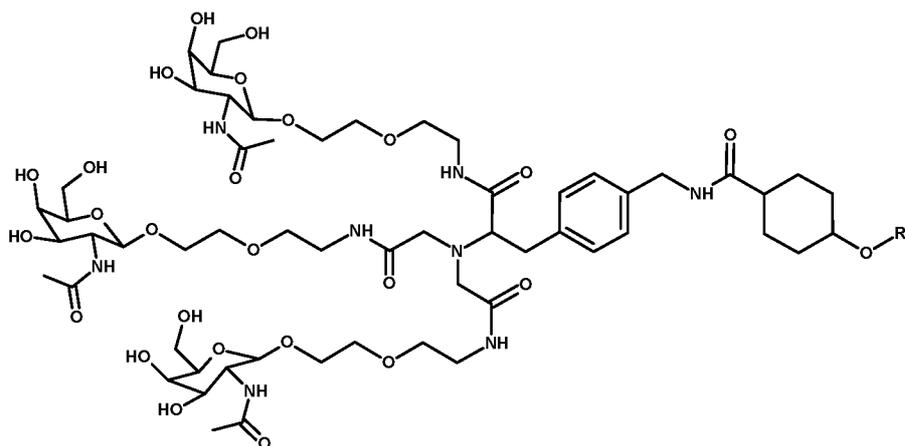
(Структура 1023); или



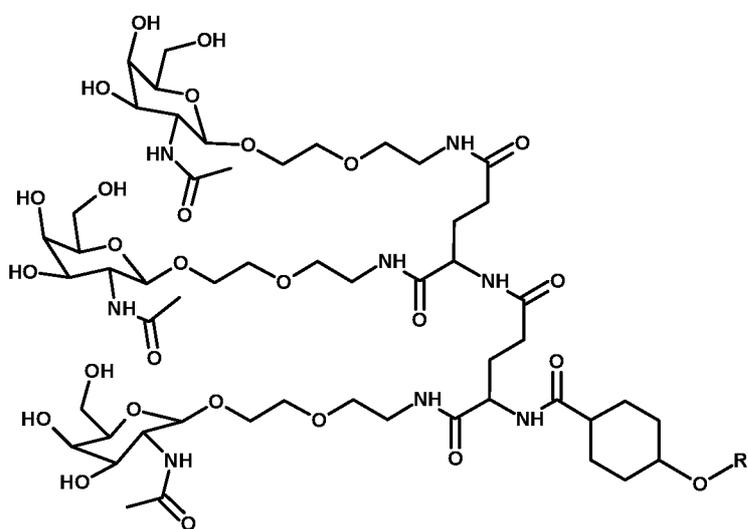
(Структура 1027).

5 В настоящем документе раскрыты композиции, включающие, состоящие из или по существу состоящие из нацеливающего лиганда и ингибирующего экспрессию олигомерного соединения. В настоящем документе раскрыты композиции, содержащие нацеливающий лиганд и агент РНКи.

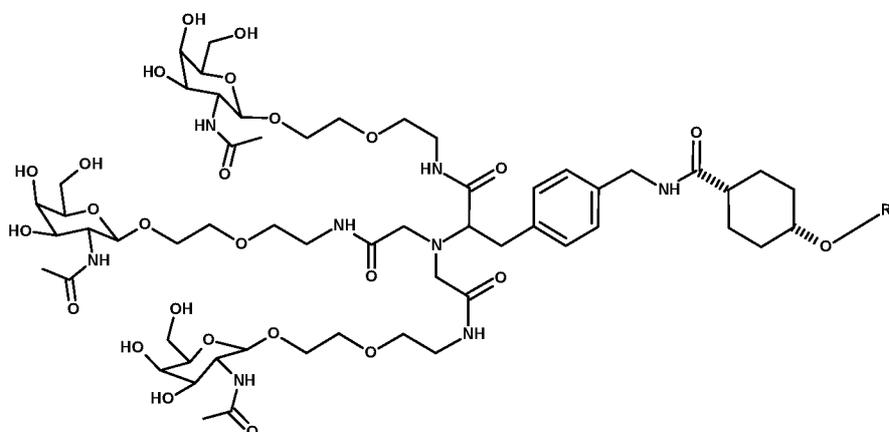
10 В некоторых вариантах реализации раскрытые в настоящем документе композиции, содержащие нацеливающий лиганд и агент РНКи, имеют структуру, представленную ниже:



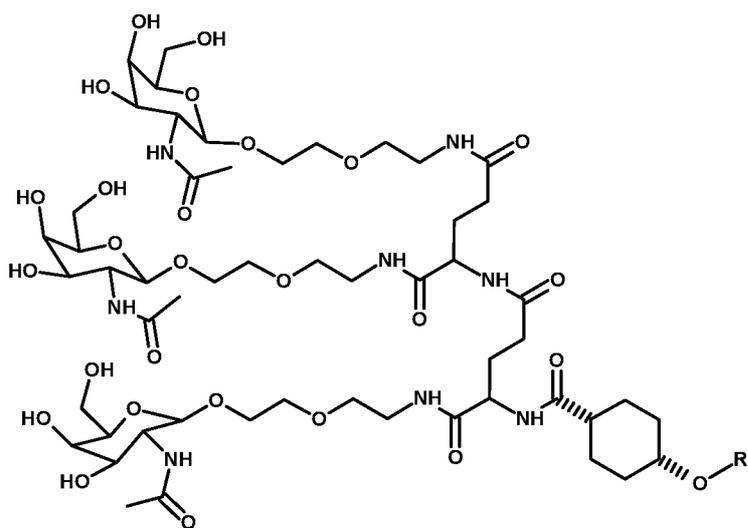
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1002a);



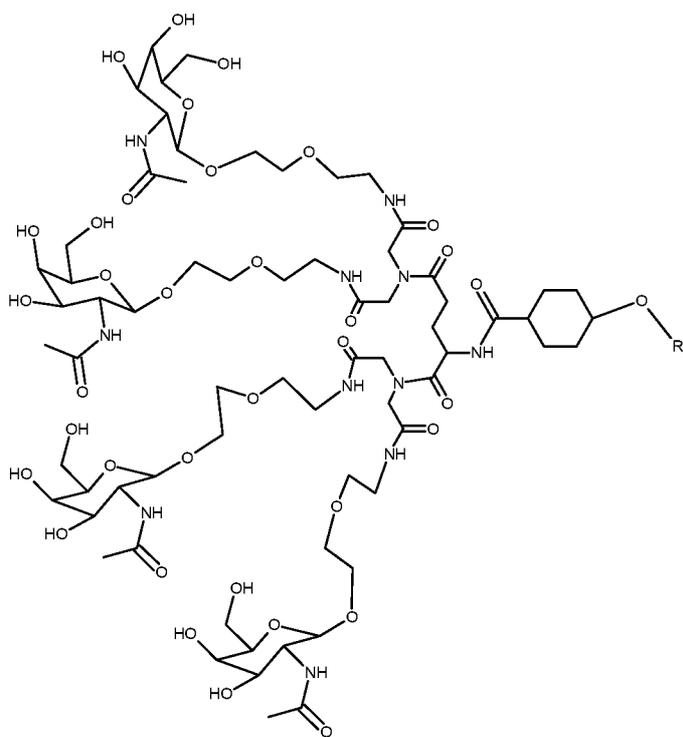
5 , где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1003a);



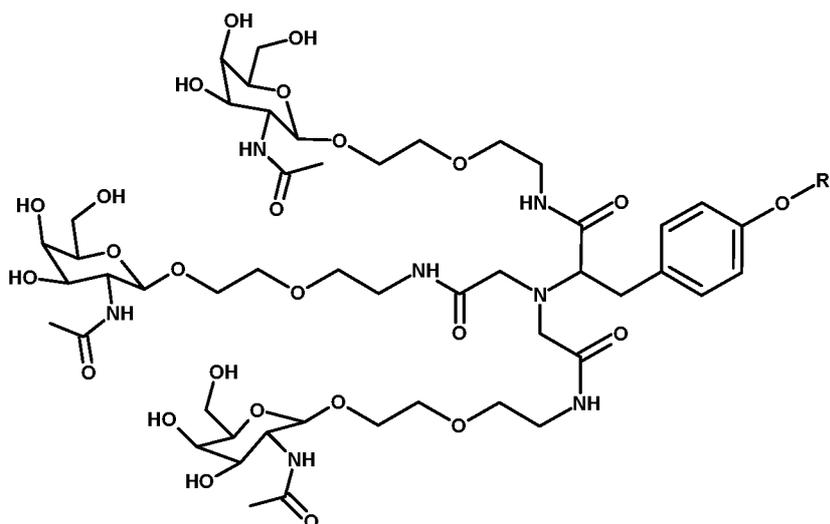
10 , где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1005a);



, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1008a);



5 , где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1012a); или

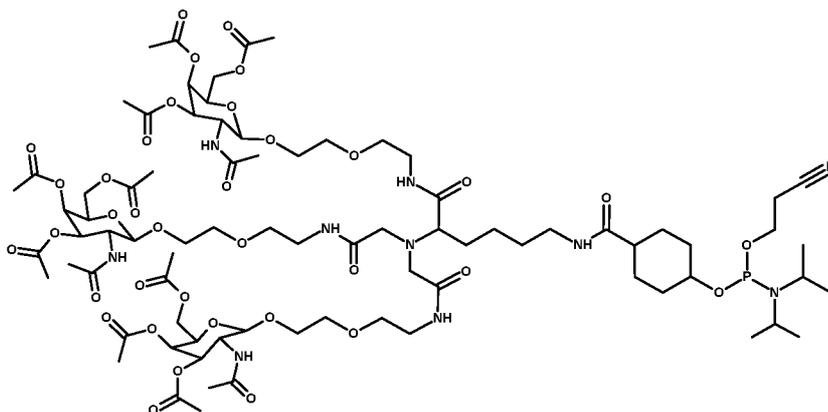


, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1027a).

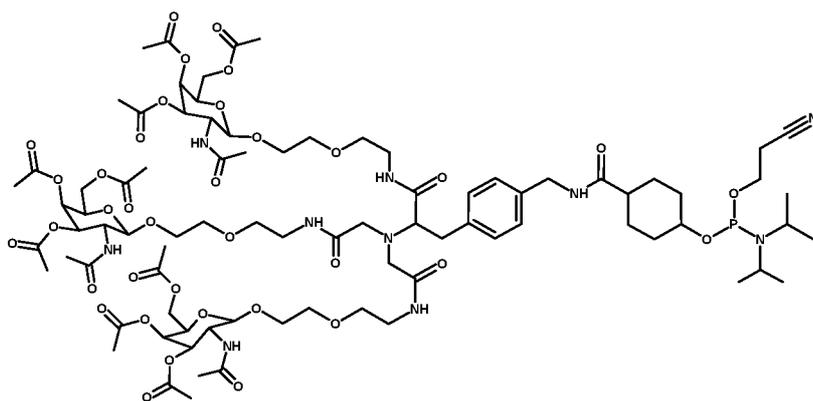
5 В настоящем документе раскрыты фосфоамидитные соединения, включающие нацеливающие лиганды.

В некоторых вариантах реализации фосфоамидитные соединения, включающие нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, имеют структуру, представленную ниже:

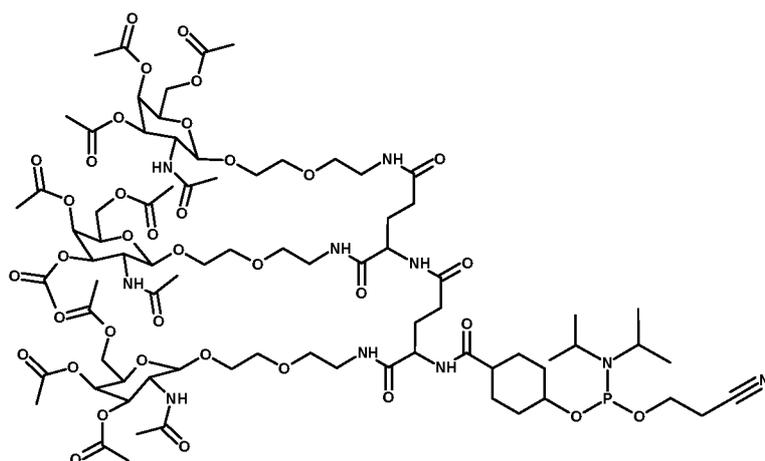
10



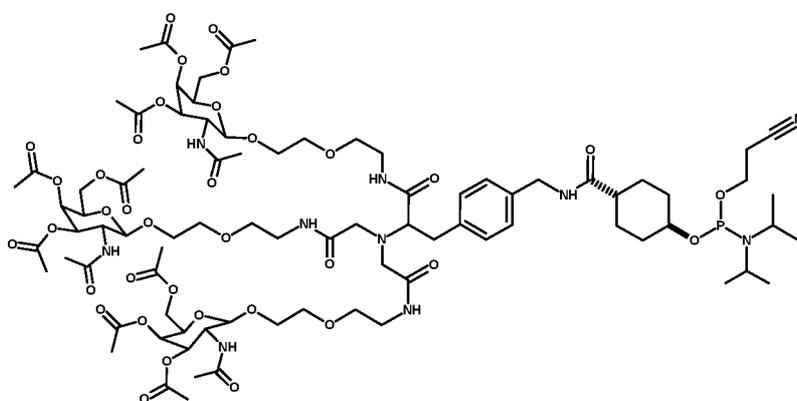
(Структура 1001b);



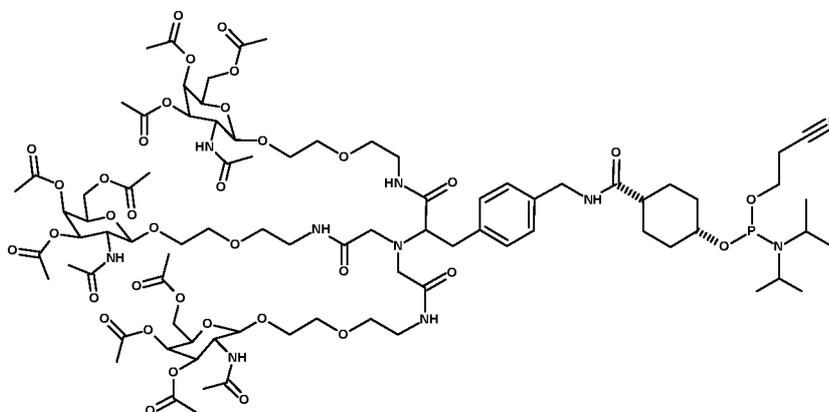
(Структура 1002b);



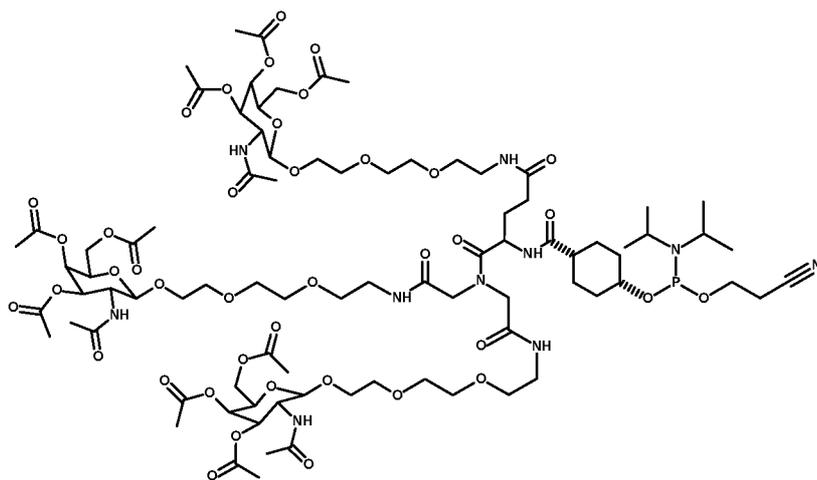
(Структура 1003b);



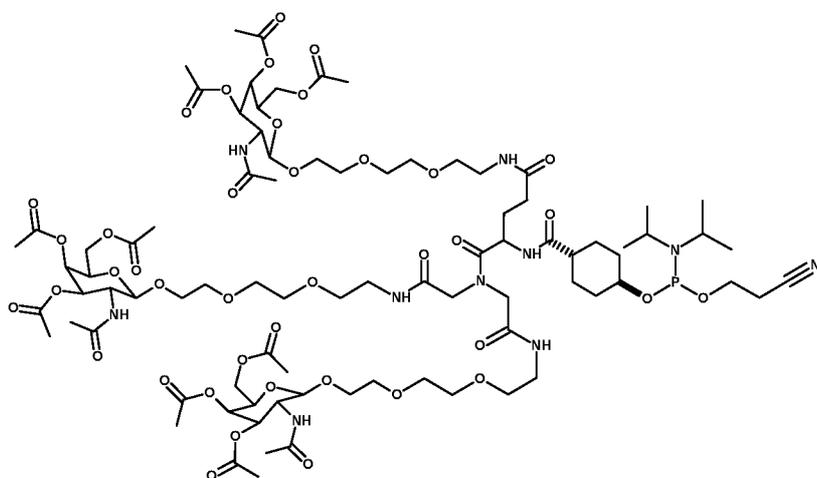
(Структура 1004b);



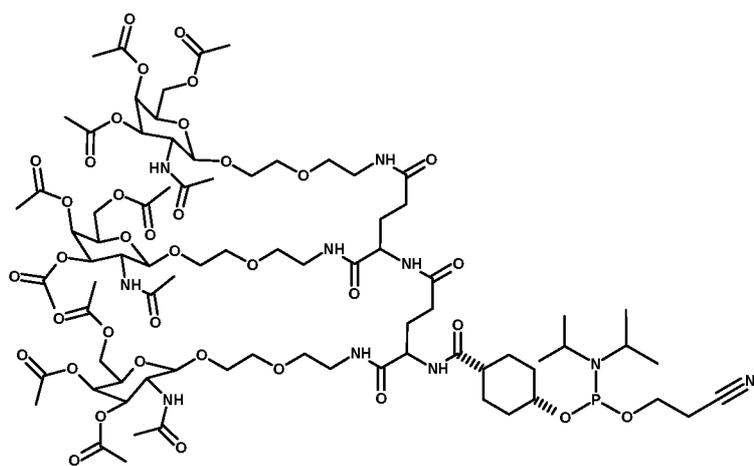
(Структура 1005b);



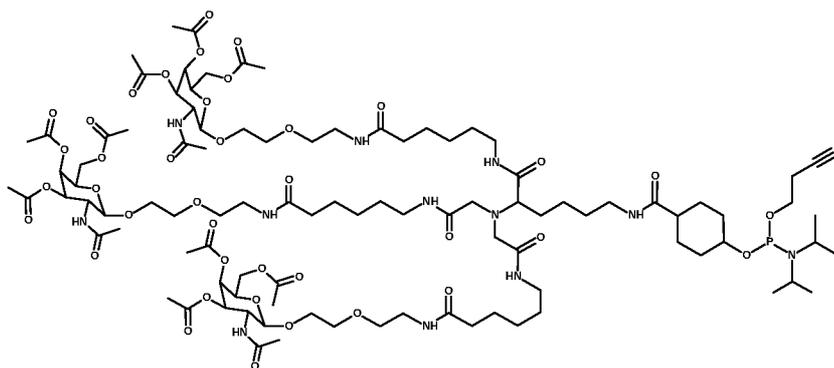
(Структура 1006b);



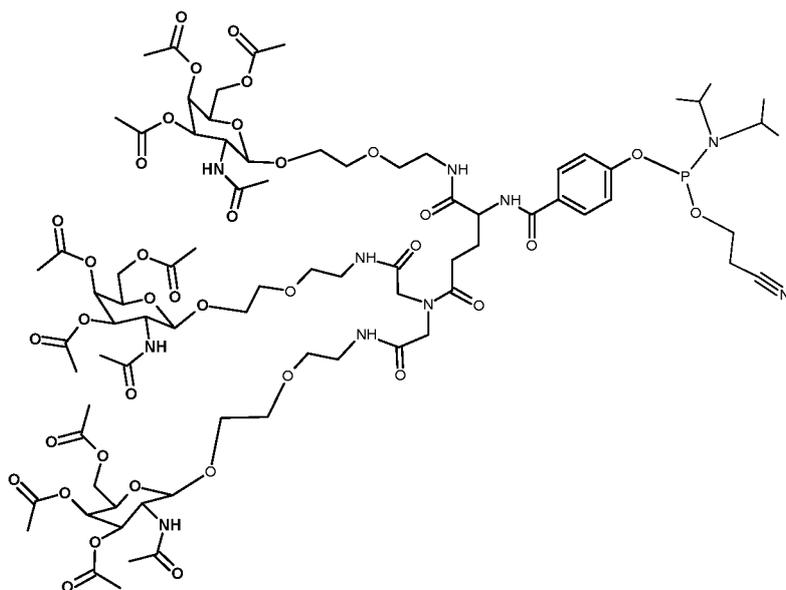
(Структура 1007b);



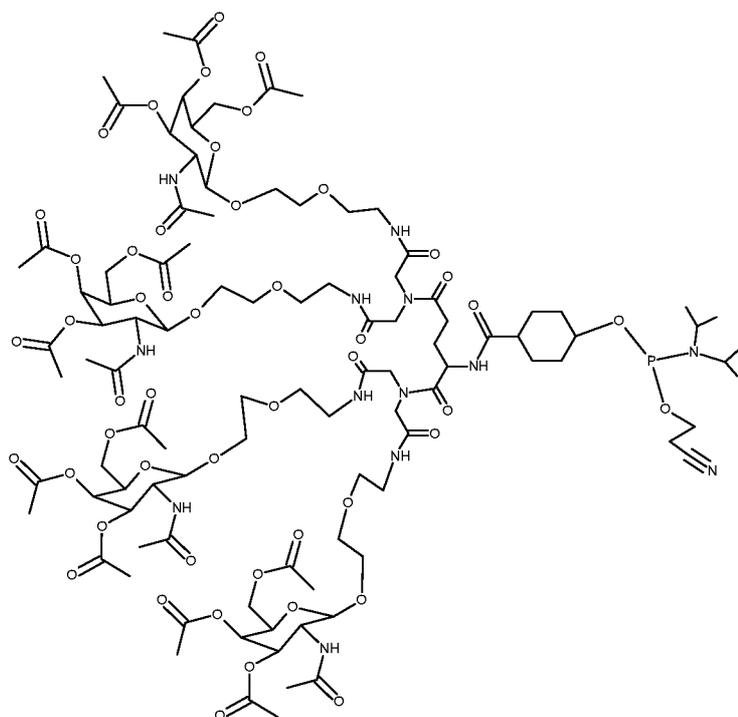
(Структура 1008b);



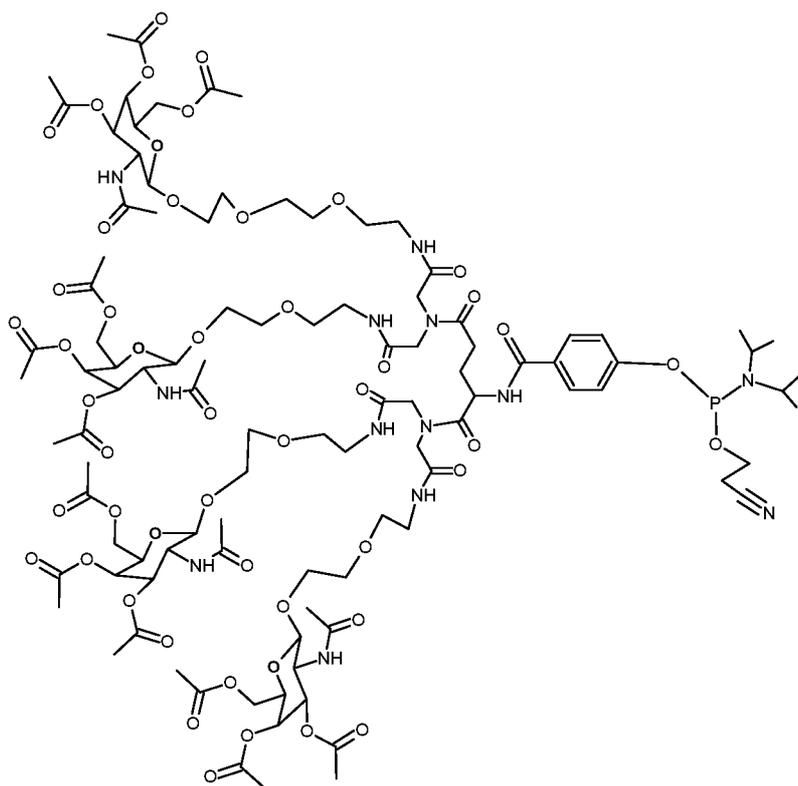
(Структура 1009b);



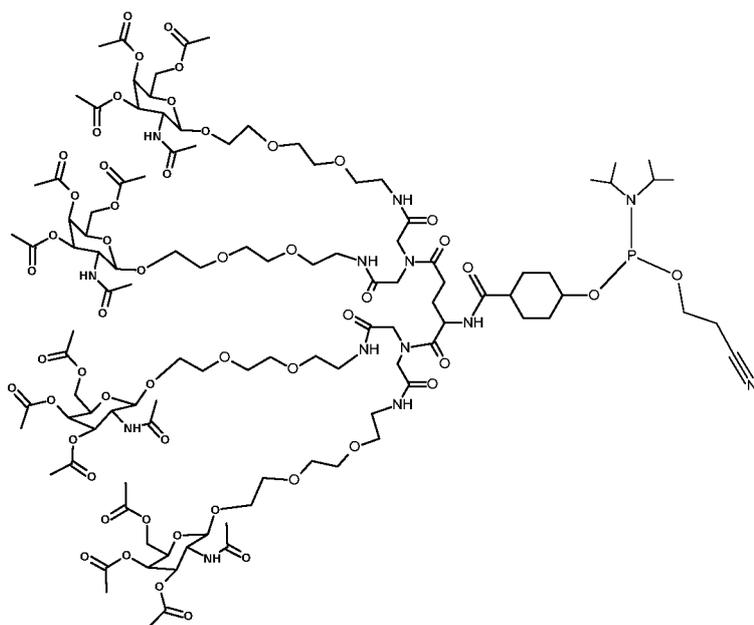
(Структура 1010b);



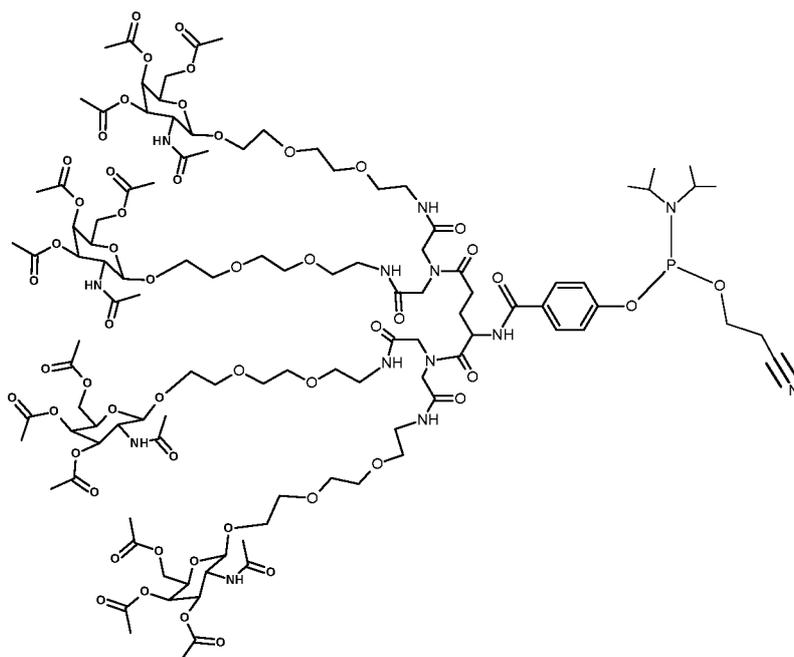
(Структура 1012b);



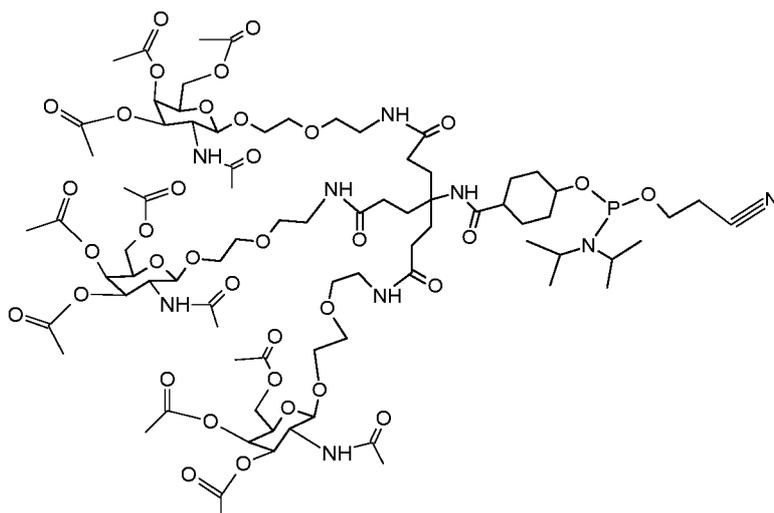
(Структура 1013b);



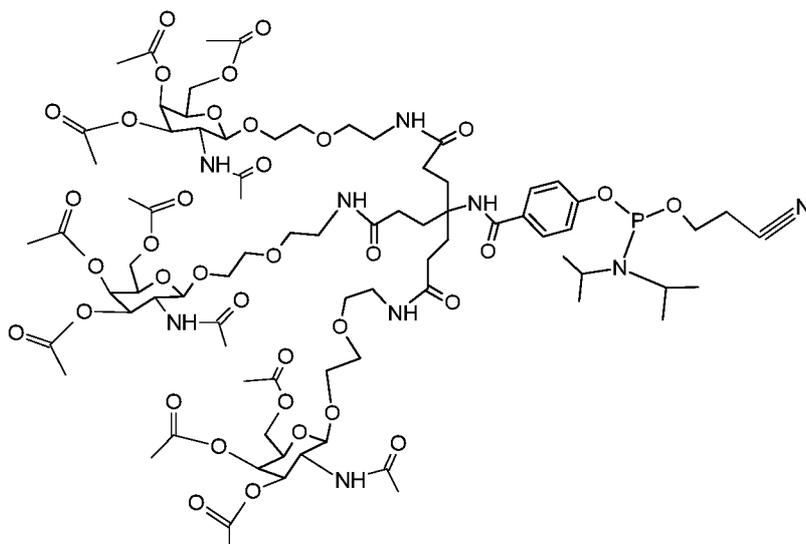
(Структура 1014b);



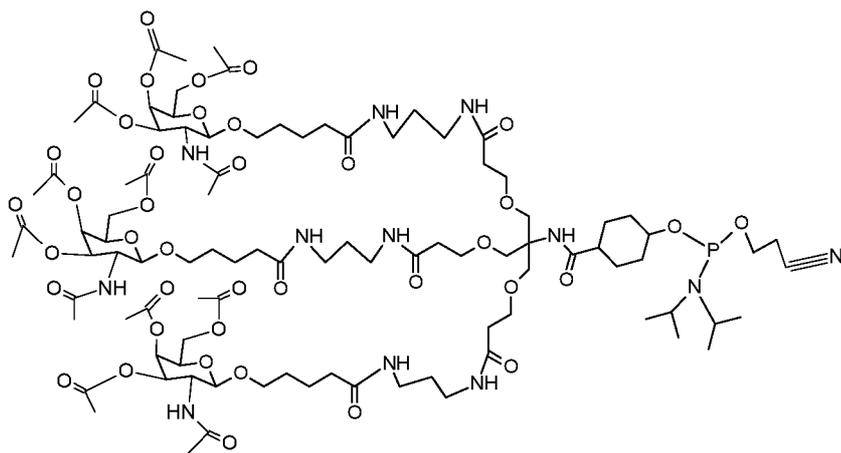
(Структура 1015b);



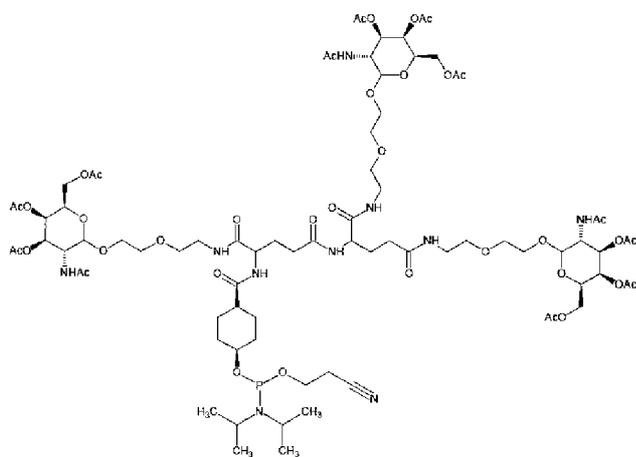
(Структура 1016b);



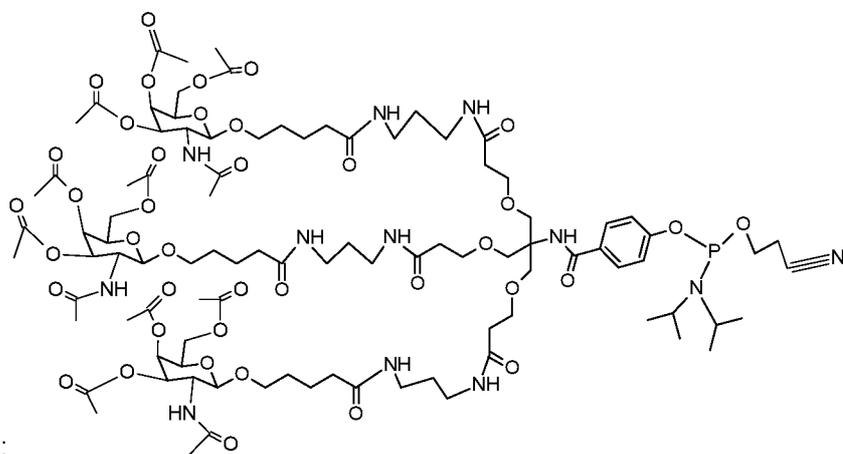
(Структура 1017b);



(Структура 1018b);

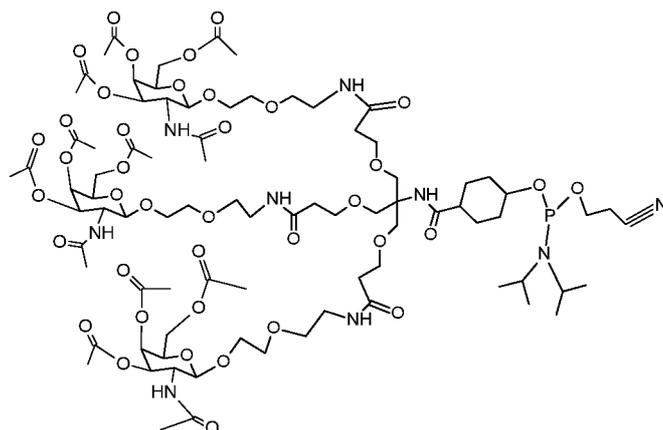


(Структура



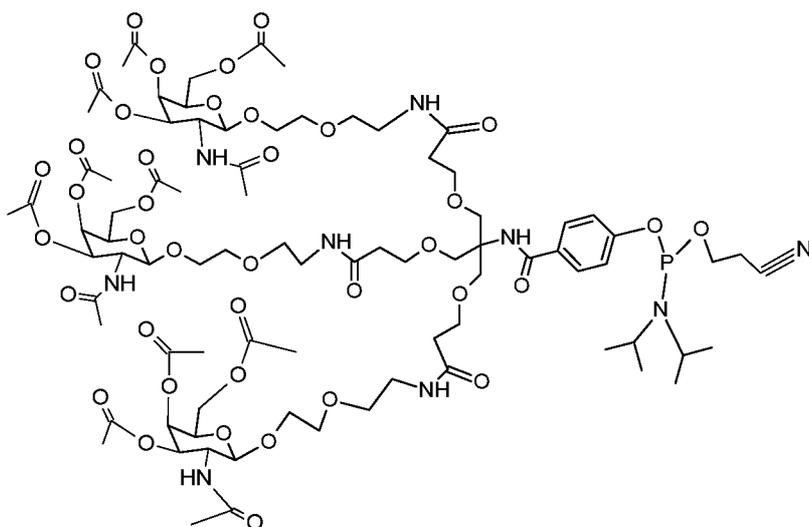
1019b);

(Структура

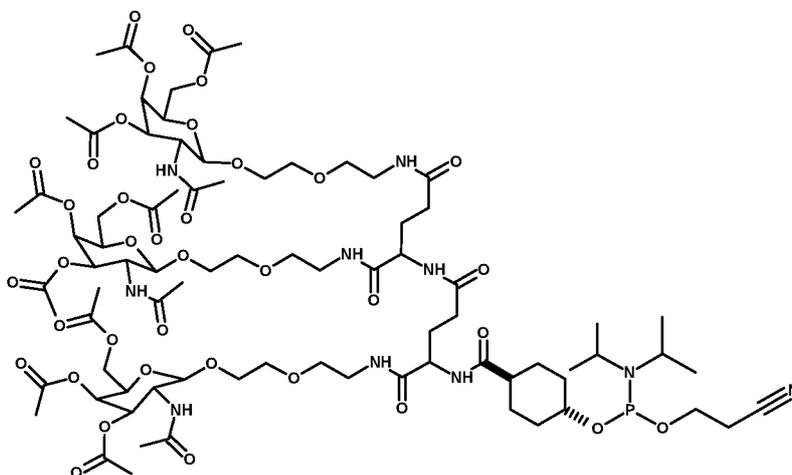


1020b);

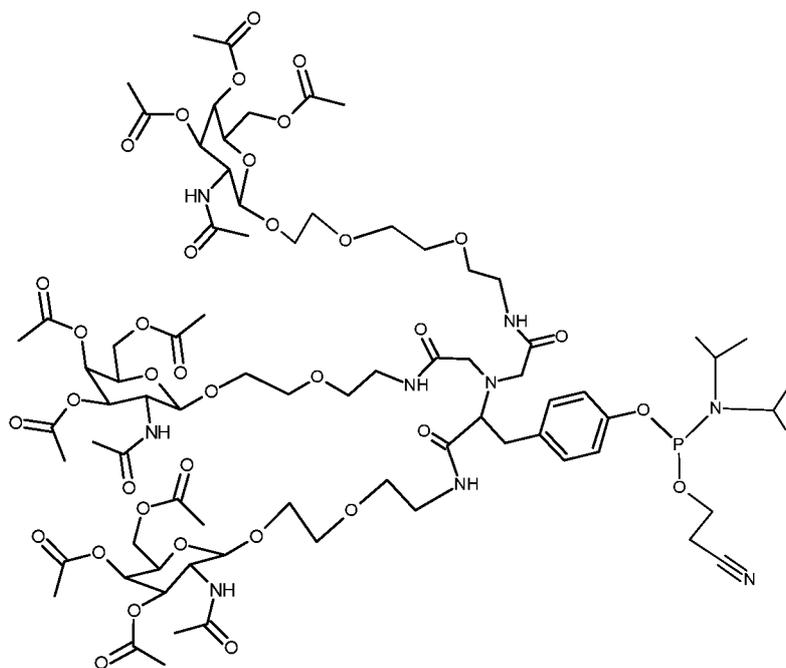
(Структура 1021b);



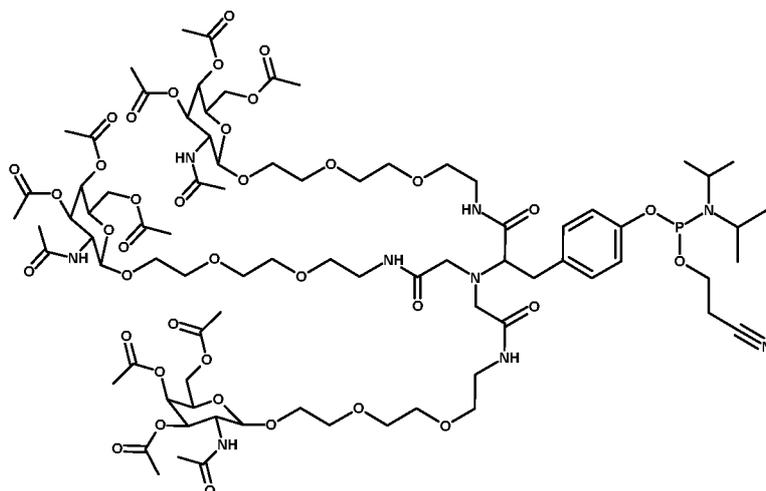
(Структура 1022b);



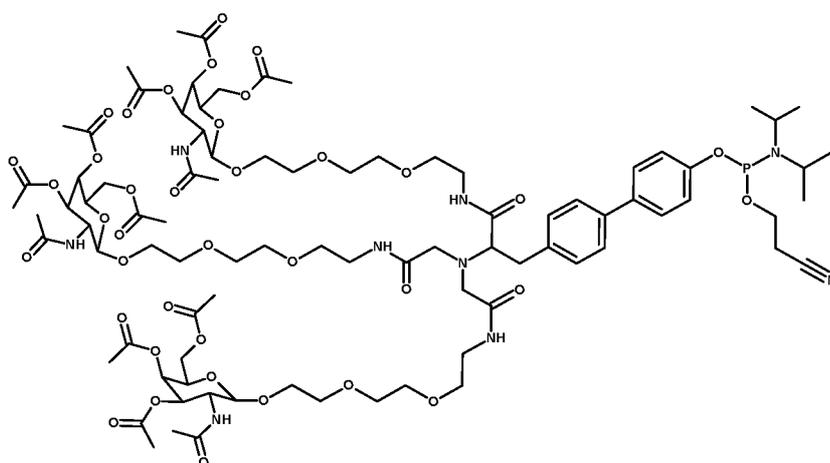
(Структура 1023b)



(Структура 1024b)

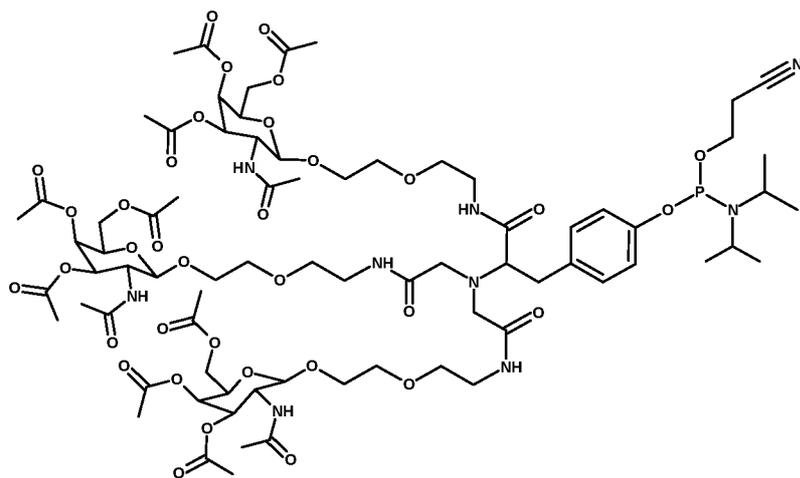


(Структура 1025b);



(Структура 1026b);

ИЛИ



(Структура 1027b).

Также раскрыты фармацевтические композиции, которые включают раскрытые в настоящем документе нацеливающие лиганды.

5

Раскрыты способы лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение соединения, включающие введение субъекту соединения, соединенного с нацеливающим лигандом, раскрытым в настоящем документе.

10 В настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, соединенного с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами.

15 В настоящем документе раскрыты способы доставки ингибирующего экспрессию олигомерного соединения в печень *in vivo*, включающий введение ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, связанного нацеливающим лигандом, раскрытым в настоящем документе, субъекту.

20 В настоящем документе раскрыты процессы или способы изготовления фосфорамидитного соединения, включающие нацеливающий лиганд, включающие (i) ковалентное связывание линкера с группой точки ветвления, и (ii) связывание линкера с атомом фосфора фосфорамидита путем осуществления реакции фосфитилирования с фосфорамидит-образующим реагентом с образованием фосфорамидитного
25 соединения.

В настоящем тексте термин “связанный” применительно к соединению между двумя молекулами означает, что две молекулы соединены ковалентной связью или что два молекулы соединены нековалентными связями (например, водородными связями или ионными связями). В некоторых примерах, где термин “связанный” относится к объединению двух молекул нековалентными связями, это объединение (ассоциация) двух разных молекул характеризуется K_D ниже 1×10^{-4} М (например, ниже 1×10^{-5} М, ниже 1×10^{-6} М, или ниже 1×10^{-7} М) в физиологически приемлемом буфере (например, фосфатном буферном растворе).

10

В настоящем тексте термин “связан напрямую” относится к первому соединению или группе, связанным со вторым соединением или группой без каких-либо расположенных между ними атомов или групп атомов. В настоящем тексте термин “связан опосредовано” относится к первому соединению, связанному со вторым соединением или группой через промежуточную группу, соединение или молекулу, такие как, например, линкерная (связывающая) группа. Если не указано иное, термин “связанный” в настоящем документе включает и “связанный напрямую” и “связанный опосредовано” в том виде как эти термины определены в настоящем документе.

15

В настоящем тексте “олигомерное соединение” представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую примерно 10-50 нуклеотидов или пар нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах реализации олигомерное соединение имеет последовательность нуклеотидных оснований, которая по меньшей мере частично комплементарна кодирующей последовательности в экспрессируемой нуклеиновой кислот-мишени или гене-мишени в клетке. В некоторых вариантах реализации олигомерные соединения, после доставки в клетку, экспрессирующую ген, способны ингибировать экспрессию соответствующего гена и называются в настоящем документе “ингибирующими экспрессию олигомерными соединениями”. Экспрессия гена может ингибироваться *in vitro* или *in vivo*. “Олигомерные соединения” включают следующие, но не ограничиваются ими: олигонуклеотиды, однонитевые олигонуклеотиды, однонитевые антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (киРНК, siRNA), дунитевые РНК (dsRNA, днРНК), микроРНК (miRNA, микроРНК), короткие шпилечные РНК (shRNA, кшРНК), рибозимы, молекулы, опосредующие РНК-интерференцию и дайсер-субстраты.

В настоящем тексте термин “олигонуклеотид” обозначает полимер из связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным.

В настоящем тексте термин “однонитевый олигонуклеотид” обозначает однонитевое олигомерное соединение, имеющее последовательность, которая по меньшей мере частично комплементарна мРНК-мишени, которое способно гибридизоваться с мРНК-мишени за счет водородных связей в нормальных физиологических условиях организма млекопитающего (или в сравнимых условиях *in vitro*). В некоторых вариантах реализации однонитевый олигонуклеотид представляет собой однонитевой антисмысловой олигонуклеотид.

В настоящем тексте “агент РНКи” обозначает агент, который содержит молекулу РНК-или РНК-подобного олигонуклеотида (например, химически модифицированного РНК-олигонуклеотида), которая способна нарушать или подавлять трансляцию матричной РНК-транскриптов (мРНК) мРНК-мишени последовательность-специфическим образом. В настоящем тексте агенты РНКи могут действовать по механизму РНК-интерференции (т.е., вызывая РНК-интерференцию за счет взаимодействия с

компонентами пути РНК-интерференции (РНК-индуцируемым комплексом выключения (сайленсинга) гена или RISC) клеток млекопитающего), или за счет любого альтернативного механизма(механизмов) или пути(путей). Хотя считается, что агенты РНКи, в том смысле как этот термин используется в настоящем документе, действуют в первую очередь по механизму РНК-интерференции, раскрытые агенты РНКи не связаны и не ограничены каким-либо конкретным путем или механизмом действия. агенты РНКи включают следующие, но не ограничиваются ими: однонитевые олигонуклеотиды, однонитевые антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (киРНК, siRNA), двунитевые РНК (dsRNA, днРНК), микроРНК (miRNA, микроРНК), короткие шпилечные РНК (shRNA, кшРНК) и дайсер-субстраты. Агенты РНКи, описанные в настоящем документе, состоят из олигонуклеотида, нить которого по меньшей мере частично комплементарна мРНК, на которую происходит нацеливание. В некоторых вариантах реализации агенты РНКи, описанные в настоящем документе, являются двунитевыми, и состоят из антисмысловой нити и смысловой нити, которая по меньшей мере частично комплементарна смысловой нити. агенты РНКи могут включать модифицированные нуклеотиды и/или одну или более связей, отличных от фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах реализации агенты РНКи, описанные в настоящем документе, являются однонитевыми.

В настоящем тексте термины “выключать”(сайленсинг), “снижать”, “ингибировать”, “подавлять” или “нокдаун” применительно к экспрессии данного гена, обозначают, что экспрессия этого гена, измеряемая по уровню РНК, транскрибируемой с гена, или уровню полипептида, белка или субъединицы белка, транслируемых с этой мРНК в клетке, группе клеток, ткани, органе или организме субъекта, в которых транскрибируется данный ген, снижается, когда эту клетку, группу клеток, орган или субъекта обрабатывают олигомерными соединениями, связанными с нацеливающими лигандами, описанными в настоящем документе, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или субъектом, которые не подвергали такой обработке.

В настоящем тексте термин “последовательность” или “нуклеотидная последовательность” обозначает последовательность или порядок нуклеотидных

оснований или нуклеотидов, описываемых последовательностью букв с использованием стандартной номенклатуры для нуклеотидов.

5 В настоящем тексте и если нет других указаний, термин “комплементарный” применительно к описанию первой нуклеотидной последовательности (*например*, смысловой нити Агента РНКи или мРНК-мишени) по отношению ко второй нуклеотидной последовательности (*например*, одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида или антисмысловой нити двухцепочечного агента РНКи), обозначает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего указанную первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться (образовывать водородные связи в паре оснований в физиологических условиях организма млекопитающего (или в сравнимых условиях *in vitro*)) и образовывать дуплекс или структуру типа двойной спирали в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. Комплементарные последовательности включают пары оснований по Уотсону-Крику и не Уотсон-Криковские пары оснований и включают природные или модифицированные нуклеотидов или миметики нуклеотидов, по меньшей мере, при условии выполнения приведенных выше требований к способности гибридизоваться.

20 В настоящем тексте “абсолютно комплементарный” или “полностью комплементарный” означает, что все (100%) нуклеотиды в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Непрерывная последовательность может включать всю первую или вторую нуклеотидную последовательность или ее часть.

30 В настоящем тексте “частично комплементарный” означает, что в гибридизованной паре последовательностей нуклеотидных оснований, по меньшей мере 70%, но не все основания в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида.

В настоящем тексте “по существу комплементарный” означает, что в гибридизованной паре последовательностей нуклеотидных оснований, по меньшей мере 85%, но не все

- основания в непрерывной последовательности первого полинуклеотида будут гибридизоваться с таким же числом оснований в непрерывной последовательности второго полинуклеотида. Термины “комплементарный”, “полностью комплементарный” и “по существу комплементарный” в настоящем тексте могут
- 5 применяться в отношении соответствия между смысловой нитью и антисмысловой нитью двунитевого агента РНКи, между антисмысловой нитью двунитевого агента РНКи и последовательностью мРНК-мишени или между последовательностью одонитевого антисмыслового олигонуклеотида и последовательностью мРНК-мишени.
- 10
- В настоящем тексте термины “лечить”, “лечение” и т.п., обозначают способы и меры, предпринимаемые для обеспечения снижения числа, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания у субъекта.
- 15
- В настоящем тексте фраза “введение в клетку” применительно к олигомерному соединению обозначает функциональную доставку этого олигомерного соединения в клетку. Фраза “функциональная доставка” означает, процесс доставки олигомерного соединения в клетку способом, который дает возможность олигомерному соединению проявлять ожидаемую биологическую активность, например, последовательность-
- 20 специфичное ингибирование экспрессии гена.
- Если не указано иное, использование символа  в настоящем документе означает, что что с ним могут быть связаны любая группа или группы, которые входят в объем раскрытого в настоящем документе соединения.
- 25
- В настоящем тексте термин “изомеры” относится к соединениям, имеющим одинаковую молекулярную формулу, но различающимся по природе или последовательности связей между атомами или расположением атомов в пространстве. Изомеры, которые различаются расположением атомов в пространстве, называются “стереоизомеры.” Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отражениями
- 30 друг друга, называются “диастереоизомеры”, а стереоизомеры, которые являются несовместимыми зеркальными отражениями, называются “энантиомерами”, или иногда оптическими изомерами. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется “хиральным центром”.

В настоящем тексте если для асимметричного центра не указано конкретно, что в структура имеет определенную конформацию, для каждой структуры, в которой присутствуют асимметричные центры могут порождать энантимеры, диастереомеры, или другие стереоизомерные конфигурации, предполагается, что каждая раскрытая в настоящем документе структура представляет все такие возможные изомеры, включая их оптически чистые и рацемические формы. Например, подразумевается, что раскрытые в настоящем документе структуры покрывают смеси диастереомеров, а также отдельные стереоизомеры.

10

Термин “замещенный” (содержащий заместители) в настоящем тексте означает, что любые один или более водородов на обозначенном атоме, обычно, атоме углерода, кислорода или азота, заменено любой группой, обозначенной в настоящем документе, при условии, что при этом не превышает обычная валентность обозначенного атома, и что эта замена дает стабильное соединение. Неограничивающие примеры заместителей включают C1-C6 алкил, C2-C6 алкенил, C2-C6 алкинил, циано, гидроксил, оксо, карбоксил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклил, гетероарил, арил, кето, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, гетероарилоксикарбонил или галоген (например, F, Cl, Br, I). Если заместитель представляет собой кето или оксо (*m.e.*, =O), то заменены два (2) водорода на указанном атоме. Двойные связи в кольце в настоящем тексте представляют собой двойные связи, образованные между двумя соседними атомами в кольце (например, C=C, C=N, N=N и т.д.).

15

20

25

30

Некоторые соединения, описанные в настоящем документе, могут существовать в таутомерной форме, которая также включена в объем настоящего описания. “Таутомеры” представляют собой соединения, структуры которых значительно различаются по расположению атомов, но которые существуют в легко и быстро устанавливаемом равновесии. Следует понимать, что соединения согласно настоящему описанию, могут быть изображены в виде различных таутомеров. Также следует понимать, что если соединения имеют таутомерные формы, предполагается, что все таутомерные формы включены в объем настоящего описания, и присвоенные соединениям названия не исключают никакую из таутомерных форм.

Соединения и фармацевтически приемлемые соли, раскрытые в настоящем документе, могут существовать в одной или более таутомерных формах, включая кетон - енол, амид - нитрил, лактам - лактим, амид – имидиновая кислотав гетероциелических кольцах (например, в азотистых основаниях гуанине, тимине и цитозине), амин - енамин и енамин - енамин, а также виде геометрических изомеров и их смесей. Кольцевая таутомерия, проявляемая глюкозой и другими сахарами, возникает в результате взаимодействия альдегидной группы (-CHO) в молекуле сахара с одной из гидроксигрупп (-OH) в той же молекуле, что приводит к образованию циклической (кольцевой) формы. Все такие таутомерные формы включены в объем настоящего изобретения. Таутомеры существуют в виде смесей группы таутомеров в растворе. Даже несмотря на то, что может быть приведено описание одного таутомера, настоящее изобретение включает все таутомеры соединения, раскрытого в настоящем документе. Концепцию таутомеров, которые могут превращаться друг в друга в результате таутомеризации, называют таутомерий. При таутомерии происходит одновременный сдвиг электронов и атома водорода.

Различные виды тауттимезации катализируются: Основанием: 1. депротонирование; 2. образование делокализованного аниона (например, енолят); 3. протонирование по различным положениям аниона; Кислотой: 1. протонирование; 2. образование делокализованного катиона; 3. депротонирование по различным соседним с катионом положениям.

В настоящем тексте термин “алкил” относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, линейной или разветвленной, содержащей от 1 до 10 атомов углерода, если не указано иное. Например, “С1-С6 алкил” включает алкильные группы, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейной или разветвленной конфигурации. В настоящем тексте термин “аминоалкил” относится к алкильной группе, такой как определено выше, замещенной по любому положению одной или более аминогруппами, если это допускается правилами валентности. Аминогруппы могут быть незамещенными, монозамещенными или дизамещенными.

В настоящем тексте термин “циклоалкил” обозначает насыщенную или ненасыщенную неароматическую углеводородную кольцевую группу, содержащую от 3 до 14 атомов углерода, если не указано иное. Примеры циклоалкильных групп включают, но не

ограничиваются ими, циклопропил, метилциклопропил, 2,2-диметилциклобутил, 2-этилциклопентил или циклогексил и т.д. Циклоалкилы могут включать несколько спиро- или конденсированных колец. Циклоалкильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными по любому положению, если это допускается правилами валентности.

В настоящем тексте термин “алкенил” относится к неароматическому углеводородному радикалу, который может быть линейным или разветвленным, содержащему по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь и от 2 до 10 атомов углерода сели не указано иное. В таких группах может содержаться до пяти углерод-углеродных двойных связей. Например, “C2-C6” определяется как алкенильный радикал, содержащий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими, этенил, пропенил, бутенил и циклогексенил. Линейный, разветвленный или циклический фрагмент алкенильной группы может содержать двойные связи и необязательно является моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенным по любому положению, если это допускается обычной валентностью. Термин “циклоалкенил” обозначает моноциклическую углеводородную группу, содержащую указанное количество атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

В настоящем тексте термин “алкинил” относится к углеводному радикалу, линейному или разветвленному, содержащему от 2 до 10 атомов углерода, если конкретно не указано иное, и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Может присутствовать до 5 углерод-углеродных тройных связей. Соответственно, “C2-C6 алкинил” обозначает алкинильный радикал, содержащий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: этинил, 2-пропинил и 2-бутинил. Линейная или разветвленная часть алкинильной группы может содержать тройные связи, как это допускают обычные требования валентности, и необязательно могут быть моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

В настоящем тексте “алкоксил” или “алкокси” относится к алкильной группе, определенной выше, с указанным числом атомов углерода, присоединенной

кислородным мостиком. Подразумевается, что C₁₋₆ алкокси включают C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ и C₆ алкокси-группы. Подразумевается, что C₁₋₈ алкокси включают C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇ и C₈ алкокси-группы. Примеры алкокси включают следующие, но не ограничиваются ими: метокси, этокси, н-пропокси, и-пропокси, н-бутокси, сек-
5 бутокси, трет-бутокси, н-пентокси, сек-пентокси, н-гептокси и н-октокси.

В настоящем тексте “кето” относится к любой алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, гетероциклической, гетероарильной или арильной группе, определенной в настоящем документе, присоединенной карбонильным
10 мостиком. Примеры кето-группы включают следующие, но не ограничиваются ими: алканоил (например, ацетил, пропионил, бутаноил, пентаноил, гексаноил), акленоил (например, акрилоил) алкиноил (например, этиноил, пропиноил, бутиноил, пентиноил, гексиноил), арилоил (например, бензоил), гетероарилоил (например, пирролоил, имидазолоил, хинолиноил, пиридиноил).

15 В настоящем тексте “алкоксикарбонил” относится к любой алкокси-группе, определенной выше, присоединенной карбонильным мостиком (т.е., -C(O)O-алкилу). Примеры алкоксикарбонильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: метоксикарбонил, этоксикарбонил, изо-пропоксикарбонил, н-пропоксикарбонил,
20 трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или н-пентоксикарбонил.

В настоящем тексте “арилоксикарбонил” относится к любой арильной группе, определенной в настоящем документе, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е., -C(O)O-арил). Примеры арилоксикарбонильных групп включают
25 следующие, но не ограничиваются ими: феноксикарбонил и нафтилоксикарбонил.

В настоящем тексте “гетероарилоксикарбонил” относится к любой гетероарильной группе, определенной в настоящем документе, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е., к -C(O)O-гетероарилу). Примеры
30 гетероарилоксикарбонильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: 2-пиридилоксикарбонил, 2-оксазолилоксикарбонил, 4-тиазолилоксикарбонил или пиримидинилоксикарбонил.

В настоящем тексте “арил” или “ароматический” обозначает любое стабильное моноциклическое или полициклическое углеводное кольцо, содержащее до 7 атомов в каждом кольце, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Примеры арильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: фенил, нафтил, антраценил, тетрагидронафтил, инданил и бифенил. В случае, когда арильный замечтитель является бициклическим и одно кольцо является неароматическим, предполагается, что присоединение происходит через ароматическое кольцо. Арильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

10

В настоящем тексте термин “гетероарил” представляет стабильное моноциклическое или полициклическое кольцо, включающие до 7 атомов в каждом кольце, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и содержит от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Примеры гетероарильных групп включают следующие, но не ограничиваются ими: акридинил, карбазолил, циннолинил, хиноксалинил, пирразолил, индолил, бензотриазолил, фуранил, тиенил, бензотиенил, бензофуранил, бензимидазолонил, бензоксазолонил, хинолинил, изохинолинил, дигидроизоиндолинил, имидазопиридинил, изоиндолинил, индазолил, оксазолил, оксадиазолил, изоксазолил, индолил, пиразинил, пиридазинил, пиридинил, пиридинил, пирролил, тетрагидрохинолинил. Также подразумевается, что “гетероарил” включает N-оксидное производное любого азот-содержащего гетероарила. В случаях, когда гетероарильный заместитель является бициклическим и одно кольцо является неароматическим или не содержит гетероатомов, предполагается, что присоединение происходит через ароматическое кольцо или кольцо, содержащее гетероатом. Гетероарильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

15

20

25

30

В настоящем тексте термин “гетероцикл”, “гетероциклический” или “гетероциклил” обозначает 3-14-членный ароматический или неароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, включая полициклические группы. В настоящем тексте термин “гетероциклический” также считается синонимом терминов “гетероцикл” и “гетероциклил”, и подразумевается, что они соответствуют определению, приведенному в настоящем документе. “Гетероциклил” включает вышеупомянутые гетероарилы, а также их

дигидро- и тетрагидро-аналоги. Примеры гетероциклических групп включают следующие, но не ограничиваются ими: азетидинил, бензимидазолил, бензофуранил, бензофуразанил, бензопиразолил, бензотриазолил, бензотиофенил, бензоксазолил, карбазолил, карболинил, циннолинил, фуранил, имидазолил, индолинил, индолил, индолазинил, индазолил, изобензофуранил, изоиндолил, изохинолил, изотиазолил, изоксазолил, нафтпиридилил, оксадиазолил, оксооксазолидинил, оксазолил, оксазолин, оксопиперазинил, оксопирролидинил, оксоморфолил, изоксазолин, оксетанил, пиранил, пиразинил, пиразолил, пиридазинил, пиридопиридинил, пиридазинил, пиридил, пиридилонил, пиримидил, пиримидинонил, пирролил, хиназолинил, хинолил, хиноксалинил, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиопиранил, тетрагидроизохинолинил, тетразолил, тетразолпиридил, тиадиазолил, тиазолил, тиенил, триазолил, 1,4-диоксанил, гексагидроазепенил, пиперазинил, пиперидинил, пиридин-2-онил, пирролидинил, морфолил, тиоморфолил, дигидробензимидазолил, дигидробензофуранил, дигидробензотиофенил, дигидробензоксазолил, дигидрофуранил, дигидроимидазолил, дигидроиндолил, дигидроизоксазолил, дигидроизотиазолил, дигидрооксадиазолил, дигидрооксазолил, дигидропиразинил, дигидропиразолил, дигидропиридинил, дигидропиримидинил, дигидропирролил, дигидрохинолинил, дигидротетразолил, дигидротиадиазолил, дигидротиазолил, дигидротиенил, дигидротриазолил, дигидроазетидинил, диоксидотиоморфолил, метилendioксибензоил, тетрагидрофуранил и тетрагидротиенил и их N-оксиды. Заместитель гетероцикла может присоединяться через атом углерода или через гетероатом. Гетероциклические группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, как это допускает обычная валентность.

Средний специалист в данной области легко поймет и оценит, что соединения и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут содержать некоторые атомы (например, Атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии, в зависимости от среды, в которые помещены это соединение или композиция. Соответственно в настоящем тексте раскрытые в нем структуры предусматривают, что некоторые функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут быть протонированы или депротонированы. Предусматривается, что настоящее раскрытие охватывает раскрытые соединения и композиции вне зависимости от их статуса

протонирования, определяемого рН среды, специалист в данной области легко это поймет.

5 В настоящем документе выражение “состоящий из” исключает любые элементы, этапы или ингредиенты, не указанные в пункте формулы изобретения. При применении в формуле изобретения настоящего документа выражение “состоящий по существу из” ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или этапами и материалами или этапами, которые не оказывают значительного влияния на основные и новые характеристики или характеристики заявленного изобретения.

10

Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое им обычно придает средний специалист в области, к которой принадлежит изобретение. Несмотря на то, что для реализации или исследования настоящего изобретения можно применять способы и материалы, схожие с теми, что описано в настоящем документе, или эквивалентные им, подходящие способы и материалы описаны ниже. Содержание всех публикаций, патентных заявок, патентов и других ссылок, отмеченных в настоящем описании, включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылок. В случае противоречий настоящее описание, включая определения, является более предпочтительным. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными, но не ограничивающими.

15
20

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут понятны из нижеследующих подробного описания и формулы изобретения.

25

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1 представляет собой ¹H-ЯМР-спектр соединения 11 (описано ниже в Примере 1 и имеет химическую структуру 1005b, описанную в настоящем документе).

30 **ФИГ. 1A** представляет собой ¹H-ЯМР-спектр структуры 1004b, раскрытой в настоящем документе (описаны ниже в Примере 1).

ФИГ. 2 представляет собой ^{31}P -ЯМР спектр соединения 19 (описано ниже в Примере 2 и имеет химическую структуру 1008b, описанную в настоящем документе.).

ФИГ. 2A представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 19.

5

ФИГ. 2B представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 14 (описано ниже в Примере 2).

10

ФИГ. 2C представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 15 (описано ниже в Примере 2).

ФИГ. 2D представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 16 (описано ниже в Примере 2).

15

ФИГ. 2E представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 17 (описано ниже в Примере 2).

ФИГ. 2F представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 18 (описано ниже в Примере 2).

20

ФИГ. 3 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 30 (описано ниже в Примере 3).

ФИГ. 4 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 38 (описано ниже в Примере 4).

25

ФИГ. 5 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 44 (описано ниже в Примере 5).

30

ФИГ. 6 представляет собой ^1H -ЯМР-спектр соединения 47 (описано ниже в Примере 6).

- ФИГ. 7** представляет собой фотографию фосфорамидит-содержащего соединения с ПЭГ-линкер-GalNAc во флаконе (в соответствии с описанием ниже в Примере 7).
- 5 **ФИГ. 8** представляет собой фотографию фосфорамидит-содержащего соединения со структурой 1008b во флаконе (в соответствии с описанием ниже в Примере 7).
- ФИГ. 9** представляет собой ^{31}P -ЯМР-спектр структуры ПЭГ-линкер-GalNAc (в соответствии с описанием ниже в Примере 8).
- 10 **ФИГ. 10** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка мышинового Фактора 12 (F12) у мышей дикого типа (в соответствии с описанием ниже в Примере 11).
- 15 **ФИГ. 11** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка мышинового Фактора 12 (F12) у мышей дикого типа (в соответствии с описанием ниже в Примере 12).
- 20 **ФИГ. 12** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни частиц липопротеина (a) (Lp(a)) у Lp(a)-трансгенных (Tg) мышей (в соответствии с описанием ниже в Примере 13).
- 25 **ФИГ. 13** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни apo(a) у apo(a)-трансгенных (Tg) мышей (в соответствии с описанием ниже в Примере 14).
- 30 **ФИГ. 14** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни частиц Lp(a) у Lp(a)-трансгенных мышей Tg (в соответствии с описанием ниже в Примере 15).
- ФИГ. 15** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка F12 у мышей дикого типа (в соответствии с описанием ниже в Примере 16).

- ФИГ. 16** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни частиц $Lp(a)$ у $Lp(a)$ -трансгенных мышей Tg (в соответствии с описанием ниже в Примере 17).
- 5 **ФИГ. 17** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни $apo(a)$ у трансгенных по $apo(a)$ мышей (Tg) (в соответствии с описанием ниже в Примере 18).
- 10 **ФИГ. 18** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни частиц $Lp(a)$ у $Lp(a)$ - трансгенных мышей (Tg) (в соответствии с описанием ниже в Примере 19).
- ФИГ. 19** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни $Lp(a)$ у яванских макаков (в соответствии с описанием ниже в Примере 20).
- 15 **ФИГ. 20** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка $cF12$ у яванских макаков (в соответствии с описанием ниже в Примере 21).
- 20 **ФИГ. 21** представляет собой график, иллюстрирующий нормированные уровни белка ААТ (Z -ААТ) у трансгенных мышей PiZ (в соответствии с описанием ниже в Примере 22).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем документе описаны нацеливающие лиганды, которые связаны с соединениями, такими как терапевтические или диагностические соединения. В некоторых вариантах реализации соединения, которые связаны с нацеливающими лигандами, описанными в настоящем документе, включают или состоят из терапевтических соединений, таких как ингибирующие экспрессию олигомерные соединения. Нацеливающие лиганды можно применять для нацеливания терапевтических соединений в желаемое положение нуклеиновой кислоты-мишени или гена-мишени. Также в настоящем документе раскрыты композиции, включающие нацеливающие лиганды и терапевтические соединения, такие как композиции,

25

30

включающие или состоящие из нацеливающих лигандов и ингибирующих экспрессию олигомерных соединений.

5 Новые нацеливающие лиганды, описанные в настоящем документе, обеспечивают некоторые преимущества по сравнению с известными ранее нацеливающими лигандами, для улучшения доставки терапевтических соединений. Эти преимущества включают, например, повышение простоты и эффективности изготовления, а также обеспечение эффективного нацеливания или биораспределения, достаточную стабильность *in vivo* и/или *in vitro*, и/или другие улучшения, желательные для доставки 10 терапевтического олигонуклеотидного продукта. Новые нацеливающие лиганды также особенно хорошо подходят для синтеза в форме фосфорамидитных соединений, что снижает затраты и трудоемкость изготовления, и способствует удобному присоединению нацеливающего лиганда к соединениям, в частности, ингибирующим экспрессию олигомерным соединениям (таким как агенты РНКи), при этом 15 обеспечивая близкие, или, в некоторых случаях, улучшенные доставку и/или эффективность терапевтического соединения.

Нацеливающие лиганды

20 Нацеливающие лиганды состоят из одной или более нацеливающей группы(групп) или нацеливающего фрагмента(фрагментов), которые могут служить для улучшения свойств фармакокинетики и биораспределения соединения, с которым они связаны, и улучшать клетко- или тканеспецифичное распределение и клеткоспецифическое поглощение конъюгированной композиции. В целом, нацеливающий лиганд способствует направленной доставке терапевтического соединения, с которым он 25 связан, в нужный сайт-мишень. В некоторых случаях, нацеливающий фрагмент может связываться с клеткой или клеточным рецептором и инициировать эндоцитоз, способствуя попаданию терапевтического соединения в клетку. Нацеливающий фрагмент может включать соединения, обладающие аффинностью к клеточным рецепторам или молекулам клеточной поверхности или антитела. Различные 30 нацеливающие лиганды, которые содержат нацеливающие фрагменты, могут быть связаны с терапевтическими агентами и другими соединениями для нацеливания агентов на клетки и конкретные (специфические) клеточные рецепторы. Типы нацеливающих фрагментов включают углеводы, холестерин и холестерильные группы, а также стероиды. Нацеливающие фрагменты, которые могут связываться с

клеточными рецепторами, включают сахараиды, такие как галактоза, производные галактозы (такие как N-ацетилгалактозамин), манноза и производные маннозы; другими углеводами; гликанами; гаптенами, витаминами, фолатом; биотином, аптамерами; и пептидами, такими как RGD-содержащие пептиды, инсулин, ЭФР и трансферрин.

Нацеливающие фрагменты, о которых известно, что они связываются с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR), особенно полезны для направления доставки олигомерных соединений в печень. Асиалогликопротеиновые рецепторы в больших количествах экспрессируются на клетках печени, включая гепатоциты. Нацеливающие фрагменты для клеточных рецепторов, которые нацеливают на ASGPR, включают галактозу и производные галактозы. В частности, кластеры производных галактозы, включая кластеры, состоящие из двух, трех или четырех N-ацетилгалактозаминов, (GalNAc или NAG), могут облегчать поглощение некоторых соединений клетками печени. Кластеры GalNAc, конъюгированные с олигомерными соединениями, служат для направления композиции в печень, где N-ацетилгалактозаминовые сахара могут связываться с асиалогликопротеиновыми рецепторами на поверхности клетки печени. Считается, что связывание с асиалогликопротеиновым рецептором запускает опосредуемый рецепторами эндоцитоз, облегчая таким образом попадание соединения внутрь клетки.

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут включать один, два, три, четыре или более четырех нацеливающих фрагментов. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или более четырех нацеливающих фрагментов, связанных с группой точки ветвления. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или более четырех нацеливающих фрагментов, связанных с группой точки ветвления, причем каждый нацеливающий фрагмент связан с группой точки ветвления соединительным фрагментом.

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или больше четырех нацеливающих фрагментов для асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR), связанных с группой

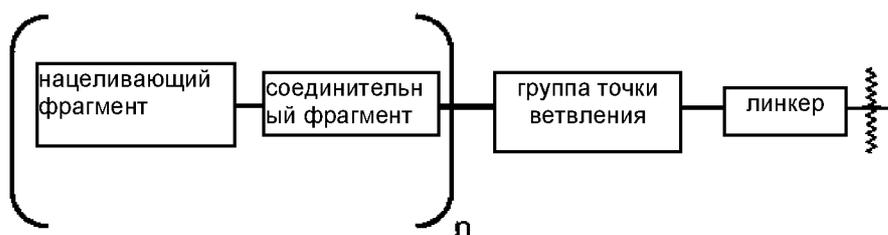
точки ветвления. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать ASGPR), связанных с группой точки ветвления, причем каждый нацеливающий фрагмент для ASGPR связан с группой точки ветвления соединительным фрагментом.

5

В некоторых вариантах реализации группа точки ветвления связана с линкером. В некоторых вариантах реализации группа точки ветвления включает фрагмент, заменяющий линкер, и группа точки ветвления связана с терапевтическим соединением. В некоторых вариантах реализации группа точки ветвления связана с олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации группа точки ветвления связана с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением .

10

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд представлен Формулой I:



, где n

15 представляет собой целое число от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 или 4) (Формула I). В некоторых вариантах реализации n в формуле I представляет собой целое число из диапазона 1-3, 1-2, 2-4, 2-3 или 3-4.

20 Линкер Формулы I представляет собой группу, которая включает один или более замещенных или незамещенных фрагментов, выбранных из следующих групп: циклоалкил, циклоалкенил, арил, гетероарил или гетероциклил, или их ковалентно соединенной комбинации (комбинаций), которая связывает группу точки ветвления на одном конце линкера с терапевтическим соединением (или с атомом фосфора фосфорамидита, если нацеливающий лиганд синтезируют в виде фосфорамидитного соединения) на другом конце линкера. В некоторых вариантах реализации одну или 25 более дополнительных групп, таких как расщепляемые фрагменты (такие как фосфатная группа или группа, содержащая дисульфидную связь) или группы, образующие фосфоротиоатную или фосфонатную связь (связи), встраивают между

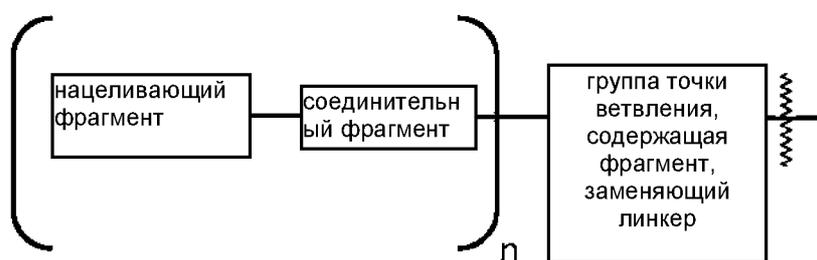
терапевтическим соединением и линкером. Линкеры являются “жесткими” в том смысле, что они придают достаточную стабильность и жесткость нацеливающему лиганду в целом, снижая взаимодействие между нацеливающим фрагментом (фрагментами) Формулы I и терапевтическим соединением, с которым оно соединено.

5 Это, в свою очередь, может улучшить взаимодействие нацеливающего фрагмента с сайтом-мишенью. Дополнительно, линкеры для применения в нацеливающих лигандах, раскрытые в настоящем документе, специально разработаны для синтеза нацеливающего лиганда(лигандов) в форме фосфорамидитных соединений, что обеспечивает эффективное связывание нацеливающего лиганда с 5'- концом олигомерного соединения.

Группа точки ветвления Формулы I представляет собой любую группу, которая дает возможность присоединения одного или более нацеливающих фрагментов (через один или более соединительных фрагментов) к линкеру.

15

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд представлен Формулой II:



, где n представляет собой

целое число от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 или 4). В некоторых вариантах реализации n в формуле II представляет собой целое число из диапазона 1-3, 1-2, 2-4, 2-3 или 3-4.

20

В формуле II группа точки ветвления представляет собой любую группу, которая дает возможность присоединения одного или более нацеливающих фрагментов (через один или более соединительных фрагментов) к терапевтическому соединению (или к атому фосфора фосфорамидита, если нацеливающий лиганд синтезируют в виде фосфоамидитного соединения) через фрагмент, заменяющий линкер. В настоящем тексте группа точки ветвления включает фрагмент, заменяющий линкер, если группа точки ветвления включает один или более замещенных или незамещенных групп циклоалкила, циклоалкенила, арила, гетероарила или гетероциклила), или их

25

комбинаций (включая конденсированные, в пределах группы точки ветвления, которые выполняют те же функции, что и жесткие линкеры Формулы I, раскрытые в настоящем документе.

- 5 Указанные один или более соединительных фрагментов Формулы I и II представляют собой группы, служащие спейсером, который может дополнительно увеличивать гибкость и/или длину связи между нацеливающим фрагментом и группой точки ветвления. Соединительный фрагмент является эффективным средством соединения нацеливающего фрагмента с группой точки ветвления. Для раскрытых в настоящем
- 10 документе нацеливающие лигандов существует по меньшей мере один соединительный фрагмент для каждого нацеливающего фрагмента. В некоторых вариантах реализации существует несколько (т.е., два или более) соединительных фрагментов между группой точки ветвления и нацеливающим фрагментом.
- 15 Нацеливающие фрагменты Формул I и II представляют собой группы, которые служат для улучшения фармакокинетических свойств или свойств биораспределения терапевтического соединения, с которым они связаны, и улучшения клетко- или
- 20 тканеспецифичное распределения и клеткоспецифического поглощения конъюгированной композиции. Нацеливающий фрагмент может включать соединения, обладающие аффинностью к клеточным рецепторам или молекулам клеточной поверхности или антитела. Типы нацеливающих фрагментов включают углеводы, холестерин и холестерильные группы, а также стероиды. Нацеливающие фрагменты, которые могут связываться с клеточными рецепторами, включают сахараиды, такие как
- 25 галактоза, производные галактозы (такие как N-ацетилгалактозамин), манноза и производные маннозы; другие углеводы; гликаны; гаптены, витамины, фолат; биотин, аптамеры; и пептиды, такие как RGD-содержащие пептиды, инсулин, ЭФР и трансферрин.

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут быть связаны с

30 терапевтическими соединениями. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с терапевтическим соединением дополнительным линкером и/или расщепляемым фрагментом, который в свою очередь связан с терапевтическим соединением. В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды лигированы с самим терапевтическим соединением.

В некоторых вариантах реализации терапевтическое соединение представляет собой олигомерное соединение. В некоторых вариантах реализации терапевтическое соединение представляет собой ингибирующее экспрессию олигомерное соединение. В
5 некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно
10 или опосредованно, с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно или опосредованно, с 3'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно или опосредованно, с 5'-концом или 3'-концом антисмысловой нити двунитевого
15 агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд соединен, непосредственно или опосредованно, с 5'-концом или 3'-концом одонитевого агента РНКи.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с двунитевым
20 агентом РНКи через фосфатную, фосфонатную, фосфоротиоатную или межнуклеозидную связывающую группу, на 5'-конце концевой нуклеозида смысловой нити двунитевого агента РНКи.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем
25 документе, включает расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент включает или состоит из фосфатной или другой межнуклеозидной соединительной группы, которая может расщепляться. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с терапевтическим соединением расщепляемым фрагментом.

30

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан с дополнительными группой или группами, которые включают расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд

связан с расщепляемым фрагментом, который, в свою очередь, связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением .

5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение. Фосфорамидитное соединение, включающее нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, может применяться для легкого присоединения нацеливающего лиганда к терапевтическому соединению или другим группам, с применением широко известных в данной области способов синтеза фосфорамидитов. В некоторых вариантах реализации фосфорамидитное соединение, 10 включающее связывающий лиганд, связано с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением с применением способов, общеизвестных в данной области. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд-содержащий фосфорамидит связан с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи.

15 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим лигандом, включает однонитевый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации однонитевый олигонуклеотид представляет собой однонитевый антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан непосредственно с однонитевым 20 антисмысловым олигонуклеотидом. В некоторых вариантах реализации дополнительные группы встроены между нацеливающим лигандом и однонитевым олигонуклеотидом.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, связанный с агентом РНКи, 25 включает один или более N-ацетилгалактозаминовых сахаров в качестве нацеливающего фрагмента или нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, включает соединительный 30 фрагмент, который включает полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент состоит из ПЭГ. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент включает ПЭГ, содержащий от 1 до 10 этиленгликолевых звеньев. В некоторых вариантах реализации соединительный

фрагмент включает ПЭГ, содержащий от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 этиленгликолевых звеньев.

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с любым из нацеливающих лигандов, раскрытых в настоящем документе, включает агент РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан, напрямую либо опосредованно, с агентом РНКи.
- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан напрямую с агентом РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд, раскрытый в настоящем документе, связан опосредованно с агентом РНКи, поскольку между агентом РНКи и линкером нацеливающего лиганда встроены дополнительная группа или группы. В некоторых вариантах реализации
- 15 второй линкер включен между линкером и терапевтическим соединением.

Линкеры

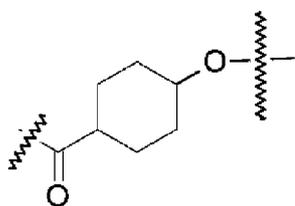
- Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, содержат линкер, как показано в формуле I, или, в альтернативном варианте, группа точки ветвления
- 20 включает фрагмент, заменяющий линкер, как показано в формуле II.

- Линкер представляет собой группу атомов, связанную с группой точки ветвления на одном конце (или к атому фосфора фосфорамидита, если нацеливающий лиганд синтезируют в виде фосфоамидитного соединения) на другом конце. В некоторых
- 25 вариантах реализации линкер связан с группой точки ветвления на одном конце, и лигирован на другом конце с группой или группами, которые далее лигированы с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации линкер напрямую связан с олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации линкер связан с расщепляемым фрагментом, который, в свою
- 30 очередь, связан с олигомерным соединением. Примеры расщепляемых фрагментов включают, например, фосфатные группы, группы, включающие дисульфидный фрагмент, и/или другие межнуклеотидные связи, которые могут расщепляться. В некоторых вариантах реализации линкер не связан с расщепляемым фрагментом. В

некоторых вариантах реализации линкер связан с фосфоротиоатной или фосфонатной группой.

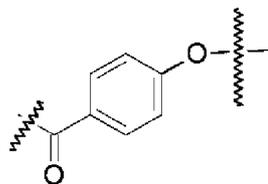
5 Для нацеливающих лигандов, раскрытых в настоящем документе, в соответствии с Формулой I, линкер представляет собой “жесткий” линкер. Жесткий представляет собой связывающую группу, которая включает один или более таких групп как замещенный или незамещенный циклоалкил, циклоалкенил, арил, гетероарил или гетероцикл, или их ковалентно связанная комбинация (комбинации).

10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



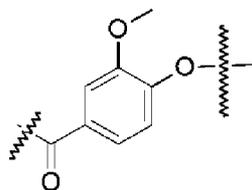
(Структура 1).

15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



(Структура 2).

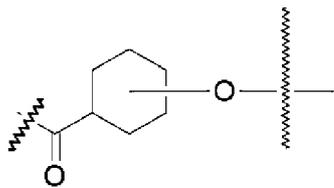
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



(Структура 3).

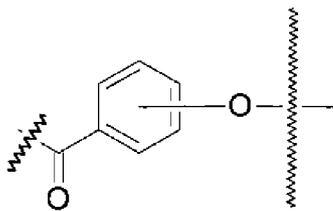
20

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



(Структура 4).

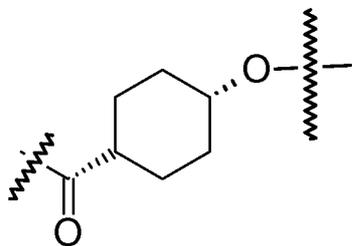
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



(Структура 5).

5

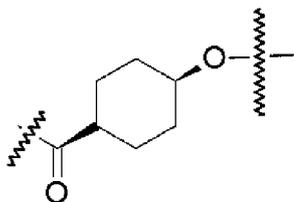
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



(Структура 6a)

10

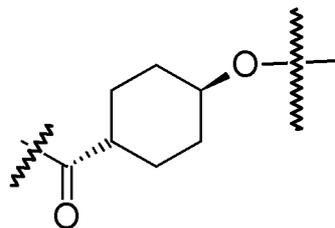
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



(Структура 6b).

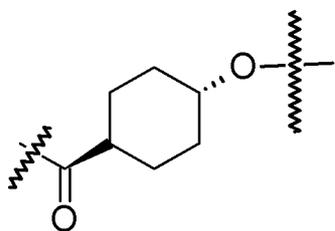
15

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



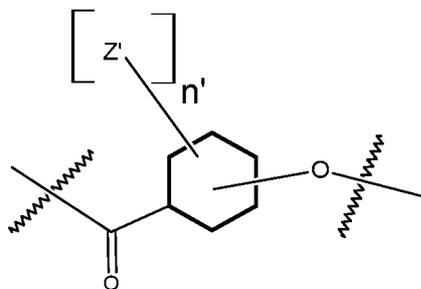
(Структура 6с).

5 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



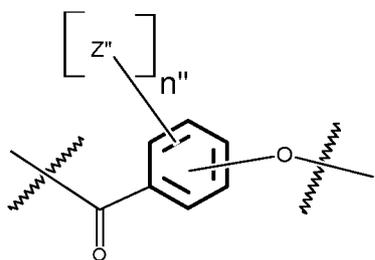
(Структура 6d).

10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



, где n' представляет собой целое число от 0 до 10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10), и каждый присутствующий Z' выбран независимо, и Z' независимо выбран из группы, состоящей из: C1-C6 алкила, C2-C6 алкенила, C2-C6 алкинила, замещенного или незамещенного амина, карбоксила, C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 алкила, C1-C6 аминоалкила, замещенного C2-C6 алкенила, замещенного C2-C6 алкинила, замещенного C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 аминоалкила, галогена (например, F), гидроксила, амидо, замещенного амида, циано, замещенного или незамещенного кето, замещенного или незамещенного алкоксикарбонил, замещенного или незамещенного арилоксикарбонила, замещенного или незамещенного гетероарилоксикарбонила и сульфгидрила (Структура 7).

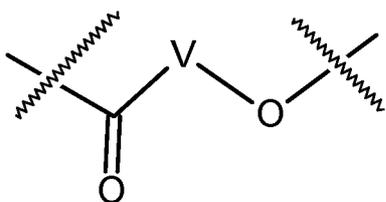
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



, где n'' представляет собой целое число от 0 до 4 (например,

- 5 1, 2, 3 или 4), и каждый присутствующий Z'' выбирают независимо, и Z'' независимо выбран из группы, состоящей из: C1-C6 алкила, C2-C6 алкенила, C2-C6 алкинила, C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 алкила, C1-C6 аминоалкила, замещенного C2-C6 алкенила, замещенного C2-C6 алкинила, замещенного или незамещенного amino, карбоксила, замещенного C1-C6 алкокси, замещенного C1-C6 аминоалкила, галогена
 10 (например, F), гидроксила, амидо, замещенного амида, циано, замещенного или незамещенного кето, замещенного или незамещенного алкоксикарбонила, замещенного или незамещенного арилоксикарбонила, замещенного или незамещенного гетероарилоксикарбонила и сульфгидрила (Структура 8).

- 15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд Формулы I включает линкер, имеющий следующую структуру, или состоит из него:



, где V включает или состоит из одной или более групп,

- таких как замещенный или незамещенный циклоалкил (например, циклогексил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогептил, циклооктил и т.д.),
 20 циклоалкенил (например, циклогексенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогептенил, циклооктенил, циклогексадиенил, циклопентадиенил, циклогептадиенил, циклооктадиенил и т.д.), арил (например, фенил, нафтил, бинафтил, антраценил и т.д.), гетероарил (например, пиридил, пиримидинил, пиррол, имидазол, фуран, бензофуран, индол и т.д.) или гетероциклил (например, тетрагидрофуран,
 25 тетрагидропиран, пиперидин, пирролидин и т.д.) или любая их ковалентно связанная комбинация. (Структура 9).

В некоторых вариантах реализации линкеры, подходящие для применения в нацеливающих лигандах, раскрытых в настоящем документе, получают из соединения, которое включает жесткую структуру с концевым фрагментом карбоновой кислоты (или ее активированного сложного эфира) на одном конце, и концевой спиртовой группировкой на другом конце. В некоторых вариантах реализации спиртовая группировка представляет собой вторичный спирт. В некоторых вариантах реализации спиртовая группировка представляет собой третичный спирт. В некоторых вариантах реализации спиртовая группировка представляет собой первичный спирт. Группировка карбоновой кислоты (или ее активированный сложный эфир) подходит для соединения с группой точки ветвления, а спиртовая группировка подходит для соединения с атомом фосфора фосфорамидита с применением реакции фосфитилирования с фосфорамидит-образующим реагентом. Пример реакции фосфитилирования с применением фосфорамидит-образующих реагентов описаны в разделе «Примеры» настоящего документа. Структуры линкеров, раскрытые в настоящем документе, подходят для получения нацеливающего лиганда в виде фосфорамидитного соединения.

В некоторых вариантах реализации линкер связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, которое представляет собой двунитевый агент РНКи. В некоторых вариантах реализации линкер связан с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации линкер связан с 3'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации линкер связан с 3'-концом антисмысловой нити двунитевого агента РНКи. В некоторых вариантах реализации линкер связан с 5'-концом антисмысловой нити двунитевого агента РНКи.

В некоторых вариантах реализации линкер связан с расщепляемым фрагментом. В некоторых вариантах реализации концевая фосфатная группа ингибирующего экспрессию олигомерного соединения может служить расщепляемым фрагментом. В некоторых вариантах реализации независимо выбранный расщепляемый фрагмент связан с линкером. В настоящем тексте расщепляемый фрагмент представляет собой группу, которая стабильна вне клетки, но после попадания в клетку-мишень расщепляется. Расщепляемые фрагменты расщепляются в определенных условиях,

таких как рН, или в присутствии определенных расщепляющих агентов, таких как молекулы, которые стимулируют деградацию, или окислительно-восстановительные агенты.

5 В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент может быть чувствительным к рН. Например, известно, что эндосомы и лизосомы в целом имеют более кислотный рН (рН приблизительно от 4.5 до 6.5), чем кровь человека (рН приблизительно от 7.35 до 7.45), и таким образом стимулируют расщепление расщепляемого фрагмента.

10

В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой фосфатную группу. Фосфатные группы могут расщепляться агентами, которые, как известно, разрешают или гидролизуют фосфатные группы.

15 В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, содержат группу точки ветвления, которая включает группу, заменяющую линкер, вместо линкера, как показано в формуле II. Если линкер заменяют фрагментом, заменяющим линкер, фрагмент, заменяющий линкер, представляет собой часть группы точки ветвления.

20

В некоторых вариантах реализации линкеры и фрагменты, заменяющие линкер, раскрытые в настоящем документе, допускают встраивание только одного изомера нацеливающего лиганда, что может дать дополнительные преимущества для олигонуклеотидных терапевтических продуктов.

25

Группы точки ветвления

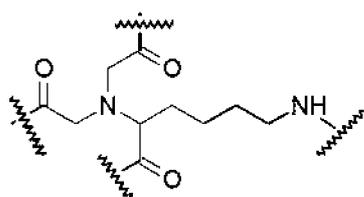
Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну группу точки ветвления. В некоторых вариантах реализации группа точки ветвления нацеливающих лигандов, раскрытых в настоящем документе, связана с линкером. В некоторых вариантах реализации группа точки ветвления связана с линкером на одном конце, и группа точки ветвления связана с одним или более соединительных фрагментов на другом конце(концах). В некоторых вариантах реализации группа точки ветвления связана с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением через дополнительную группу или группы. В некоторых

вариантах реализации группа точки ветвления включает фрагмент, заменяющий линкер, и связана с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

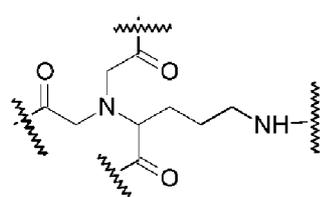
5 Группы точки ветвления, раскрытые в настоящем документе, может представлять собой любую группу, которая допускает присоединение одного или более нацеливающих фрагментов и дополнительно допускает присоединение к линкеру, раскрытому в настоящем документе, или, в альтернативном варианте, если группа точки ветвления содержит фрагмент, заменяющий линкер, группа точки ветвления может представлять собой любую группу, которая включает фрагмент, заменяющий линкер, который допускает присоединение к терапевтическому соединению, такому как ингибирующее экспрессию олигомерное соединение.

15 Для групп точки ветвления Формулы I, раскрытых в настоящем документе, перед конъюгированием с линкером, соединение группы точки ветвления, которое служит для получения группы точки ветвления, содержи один концевой амин для каждой необходимой связи с линкером, и одну концевую группировку карбоновой кислоты (или ее активированный сложный эфир) для каждой необходимой связи с соединительным фрагментом.

20 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает точку ветвления, имеющую структуру, выбранную из следующих:

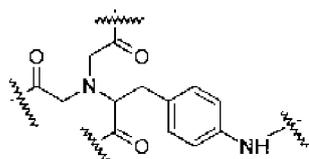


(Структура 201);

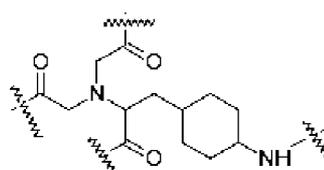


(Структура 202);

202);

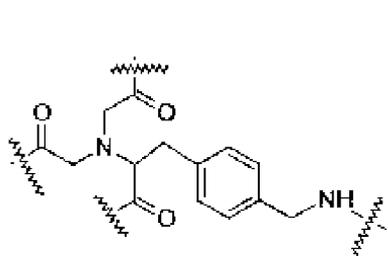


(Структура 203);

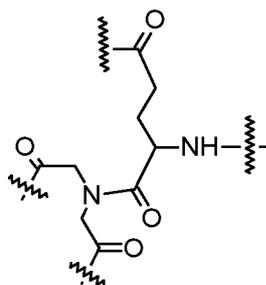


(Структура 204);

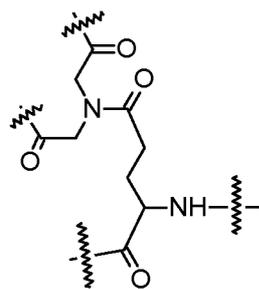
25 204);



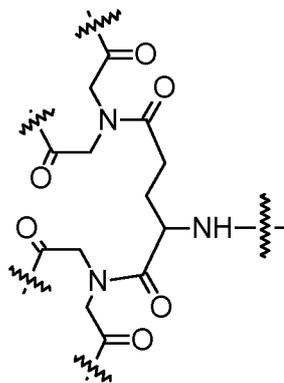
(Структура 205);



(Структура 206);

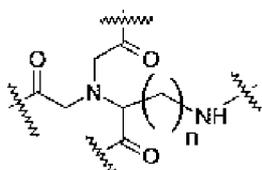


(Структура 207);



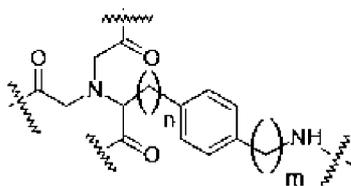
(Структура 208).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает точку ветвления,
5 имеющую следующую структуру:



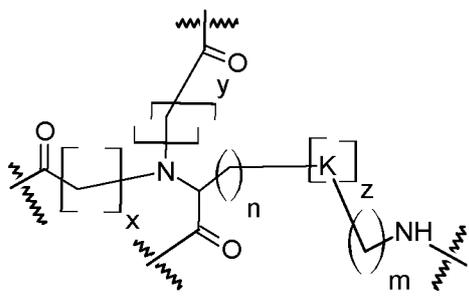
, где n представляет собой целое число от 1 до 20 (Структура 209).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает точку ветвления,
имеющую следующую структуру:



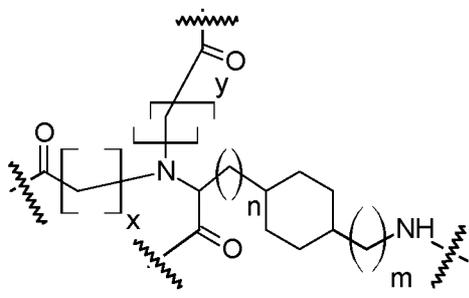
10 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) и n
представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) (Структура 210).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает точку ветвления,
15 имеющую структуру, представленную следующей формулой:



5 где m представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); n представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); x представляет собой целое число от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10); y представляет собой целое число от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); z представляет собой целое число от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 или 4); и K выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного циклоалкила (например, циклогексила, циклопропила, циклобутила, циклопентила, циклогептила, циклооктила и т.д.), замещенного или незамещенного циклоалкенила (например, циклогексенила, циклобутенила, циклопентенила, циклогептенила, циклооктенила, циклогексадиенила, циклопентадиенила, циклогептадиенила, циклооктадиенила и т.д.), замещенного или незамещенного арила (например, фенила, нафтила, бинафтила, антраценила и т.д.), замещенного или незамещенного гетероарила (например, пиридила, пиримидинила, 10 пиррола, имидазола, фурана, бензофурана, индола и т.д.), и замещенного или незамещенного гетероцикла (например, тетрагидрофурана, тетрагидропирана, пиперидина, пирролидина и т.д.) или их ковалентно связанных комбинаций (Структура 211).

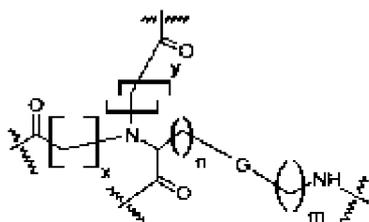
20 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает точку ветвления, имеющую следующую структуру:



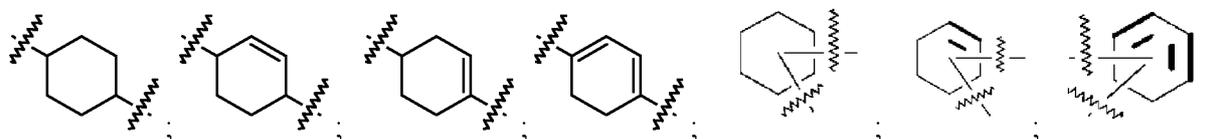
где m представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); n представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); x представляет собой целое число от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10); и y представляет собой целое число от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) (Структура 212).

- 5 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает точку ветвления, имеющую следующую структуру:

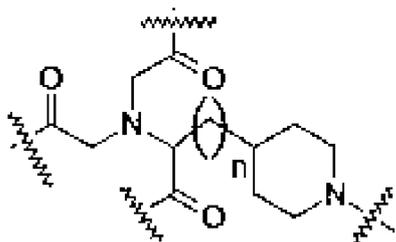


, где m представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); n представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); x представляет собой целое число от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10); y представляет собой целое число от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10); и G выбран из группы, состоящей из



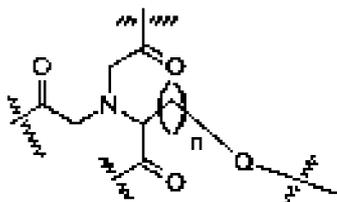
или любой замещенной или незамещенной циклической или гетероциклической структуры, имеющей размер 5, 6, 7, 8 или 9 атомов, например, таких как замещенный или незамещенный циклоалкил (например, циклогексил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогептил, циклооктил и т.д.), замещенный или незамещенный циклоалкенил (например, циклогексенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогептенил, циклооктенил, циклогексадиенил, циклопентадиенил, циклогептадиенил, циклооктадиенил и т.д.), замещенный или незамещенный арил (например, фенил, нафтил, бинафтил, антраценил и т.д.), замещенный или незамещенный гетероарил (например, пиридил, пиримидинил, пиррол, имидазол, фуран, бензофуран, индол и т.д.) или замещенный или незамещенный гетероциклил (например, тетрагидрофуран, тетрагидропиран, пиперидин, пирролидин и т.д.) (Структура 213).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, имеющую следующую структуру:



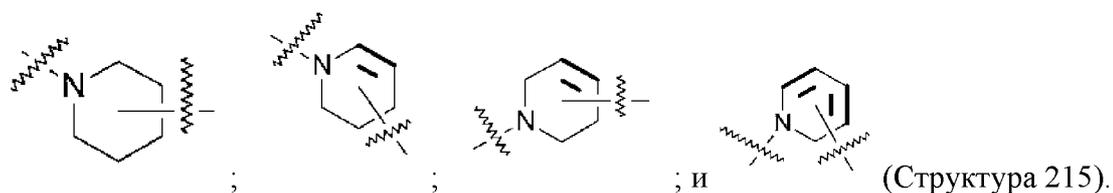
5 , где n представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) (Структура 214).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, имеющую следующую структуру:

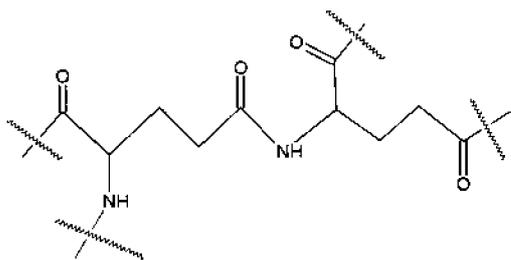


10 , где n представляет собой целое число от 0 до 20 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) и Q

выбран из группы, состоящей из:



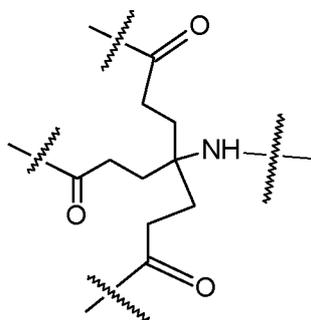
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, имеющую следующую структуру:



(Структура 216).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, имеющую следующую структуру:

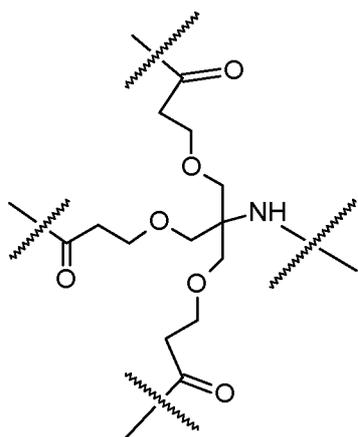
5



(Структура 217).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, имеющую следующую структуру:

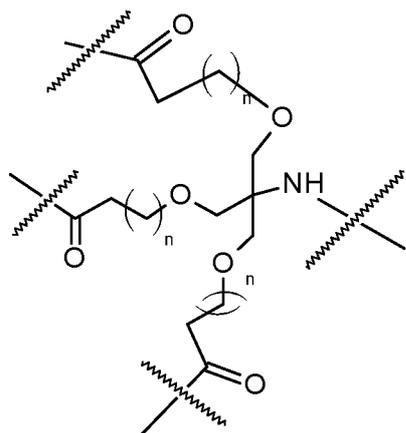
10



(Структура 218).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, имеющую следующую структуру:

15



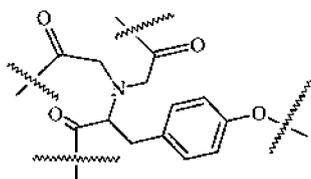
, где n представляет собой целое число, выбранное из чисел от 1 до 7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) (Структура 219). В некоторых вариантах реализации n в структуре 219 представляет собой 1. В некоторых вариантах реализации n в структуре 219 представляет собой 2. В некоторых вариантах реализации n в структуре 219 представляет собой 3. В некоторых вариантах реализации n в структуре 219 представляет собой 4. В некоторых вариантах реализации n в структуре 219 представляет собой 5. В некоторых вариантах реализации n в структуре 219 представляет собой 6. В некоторых вариантах реализации n в структуре 219 представляет собой 7.

10

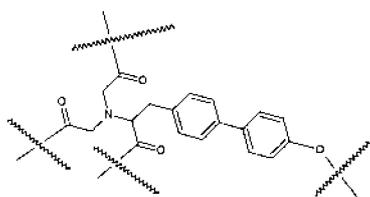
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, которая включает группу, заменяющую линкер.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает группу точки ветвления, которая включает фрагмент, заменяющий линкер, имеющий структуру, показанную ниже:

15



(Структура 220) или



(Структура 221).

Соединительные фрагменты (Tethers)

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, содержат один или более
5 дополнительных фрагментов. Соединительный фрагмент расположен в качестве связи
между группой точки ветвления и каждым нацеливающим фрагментом. В некоторых
вариантах реализации соединительный фрагмент связан напрямую с нацеливающим
лигандом на одном конце и напрямую с группой точки ветвления на другом конце. В
10 некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент связан напрямую с
нацеливающим лигандом на одном конце, и опосредованно с группой точки ветвления
на другом конце. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент связан
опосредованно с нацеливающим лигандом на одном конце и опосредованно с группой
точки ветвления на другом конце. В некоторых вариантах реализации нацеливающий
лиганд, описанный в настоящем документе, включает три соединительных фрагмента и
15 три нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации нацеливающий
лиганд, описанный в настоящем документе, включает четыре соединительных
фрагмента и четыре нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации
нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, включает один
соединительный фрагмент и один нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах
20 реализации нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, включает
множество соединительных фрагментов и множество нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации дополнительные соединительные фрагменты и
другие группы встроены между соединительным фрагментом и нацеливающим
25 фрагментом Формулы I или Формулы II. В некоторых вариантах реализации второй
соединительный фрагмент встроен между соединительным фрагментом и
нацеливающим фрагментом Формулы I или Формулы II. В некоторых вариантах
реализации второй соединительный фрагмент и третий соединительный фрагмент
встроены между соединительным фрагментом и нацеливающим фрагментом Формулы
30 I или Формулы II. В некоторых вариантах реализации второй, третий и четвертый
соединительный фрагменты встроены между соединительным фрагментом и
нацеливающим фрагментом Формулы I или Формулы II. Как раскрыто в настоящем
документе, присутствует по меньшей мере один соединительный фрагмент на каждый
нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации присутствует более

одного соединительного фрагмента на каждый нацеливающий фрагмент. Предполагается, что нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, охватывают все такие композиции.

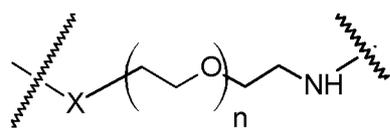
- 5 В некоторых вариантах реализации дополнительные группы могут быть встроены между соединительным фрагментом и группой точки ветвления Формулы I или Формулы II.

10 Как раскрыто в настоящем документе, соединительный фрагмент служит спейсером, который может дополнительно увеличивать гибкость и/или длину связи между нацеливающим фрагментом и группой точки ветвления, линкером и терапевтическим соединением. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент включает алкильные группы (включая циклоалкильные группы), алкенильные группы (включая циклоалкенильные группы), алкинильные группы, арильные группы, аралкильные

15 группы, аралкенильные группы или аралкинильные группы. В некоторых вариантах реализации соединительный фрагмент включает один или более гетероатомов, гетероциклов, гетероариллов, аминокислот, нуклеотидов или сахаридов.

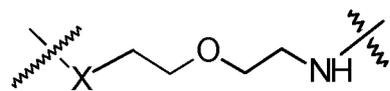
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный

20 фрагмент, имеющий следующую структуру:



, где n представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) и X представляет собой O, S или NH (Структура 301).

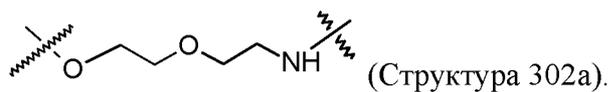
25 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:



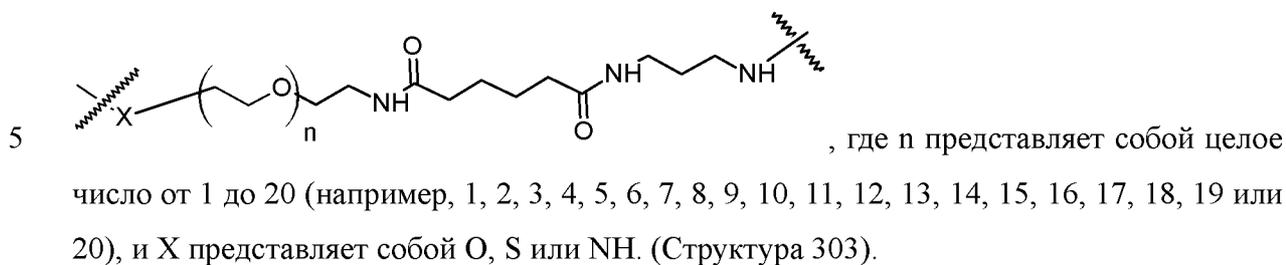
, где X представляет собой O, S или NH (Структура 302).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный

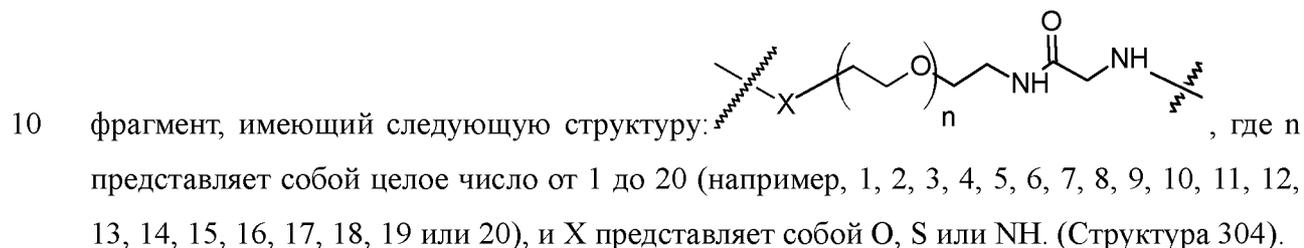
30 фрагмент, имеющий следующую структуру:



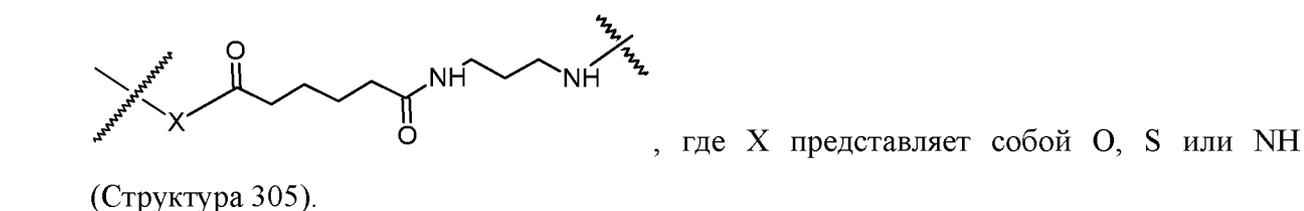
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный фрагмент, имеющий следующую структуру:



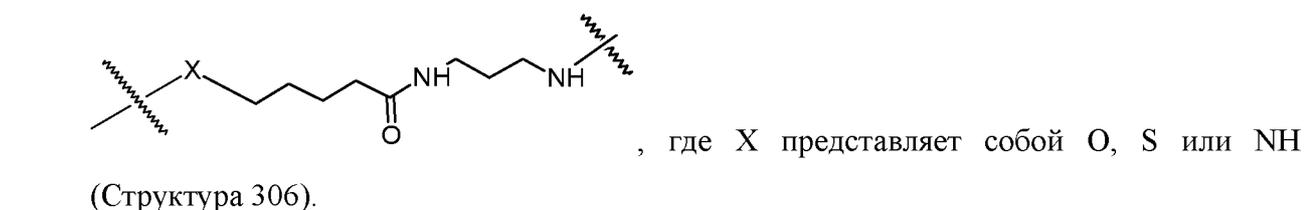
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный



В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный



В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает соединительный



В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает более одного типа соединительных фрагментов. В некоторых вариантах реализации соединительный

25

фрагмент действует как гибкий гидрофильный спейсер (см., например, U.S. 5,885,968; и Biessen et al. *J. Med. Chem.* **1995**, *39*, 1538-1546, оба эти источника полностью включены в настоящий текст посредством ссылки) и включает ПЭГ-спейсер. В других вариантах реализации ПЭГ-спейсер содержит от 1 до 20 этиленовых звеньев (от PEG₁ до PEG₂₀). Например, ПЭГ-спейсер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 этиленовых звеньев.

Нацеливающие фрагменты

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут содержать от одного до четырех, или более четырех нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд может представлять собой галактозный кластер. В настоящем тексте галактозный кластер включает нацеливающий лиганд, содержащий от двух до четырех производных галактозы на конце. В настоящем тексте термин производное галактозы включает и галактозу, и производные галактозы, характеризующиеся аффинностью к рецептору асиалогликопротеинов, равную или большую, чем аффинность галактозы. Производное галактозы представляет собой сахаридный сахар, представляющий собой один из видов нацеливающего фрагмента. Концевое производное галактозы связано с соединительным фрагментом через С-1 углерод сахара.

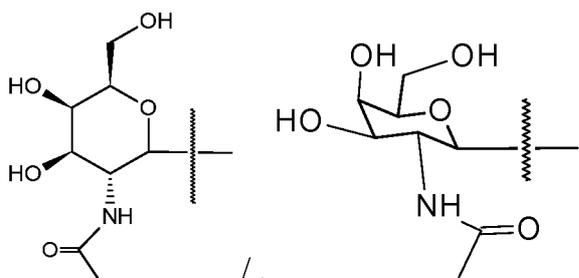
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд состоит из трех концевых галактозаминов или производных галактозамина (таких как N-ацетилгалактозамин), каждый из которых обладает аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает три концевых N-ацетилгалактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов. Например, каждая из Структур 1001, 1002, 1004 и 1008 представляют собой нацеливающие лиганды, содержащие три концевых N-ацетилгалактозамина в качестве нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации каждый нацеливающий фрагмент включает производное галактозамина, которое представляет собой N-ацетилгалактозамин. Другие сахариды, обладающие аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору, которые могут применяться в качестве нацеливающих фрагментов, могут быть

выбраны из списка, включающего: галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изо-бутаноилгалактозамин. Аффинности многочисленных производных галактозы к асиалогликопротеиновому рецептору изучены (см., например, Iobst, S.T., Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки) или могут быть легко определены с использованием методов, хорошо известных и широко применяемых в данной области.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент представляет собой фрагмент нацеливания на клетку.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент включает N-ацетилгалактозамин:



В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает три нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает четыре нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает один нацеливающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает два нацеливающих фрагмента. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает четыре или более нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий фрагмент включает одно или более из галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-ацетилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина или N-изо-бутаноилгалактозамина.

Например, в некоторых вариантах реализации N-ацетилгалактозаминовые нацеливающие фрагменты в любой из Структур 1001 - 1027 могут быть заменены

альтернативными нацеливающими фрагментами. Такие альтернативные нацеливающие фрагменты включают, например, галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин или N-изо-бутаноилгалактозамин.

5

Дополнительно, в некоторых вариантах реализации нацеливающие фрагменты в Структурах 1001 - 1027 могут быть заменены, например, другими углеводами; гликанами; гаптенами, витаминами, фолатом; биотином, аптамерами; и/или пептидами, такими как RGD-содержащие пептиды, инсулин, ЭФР и/или трансферрин.

10

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет форму N-ацетилгалактозаминового тримера. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет форму N-ацетилгалактозаминового тетрамера.

15 **Представительные структуры нацеливающих лигандов и фосфоамидитные соединения, включающие нацеливающие лиганды**

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут состоять из одного или более нацеливающих фрагментов, соединительных фрагментов (tethers), групп точки ветвления, и линкеров. Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут состоять из одного, двух, трех, четырех или более четырех нацеливающих фрагментов.

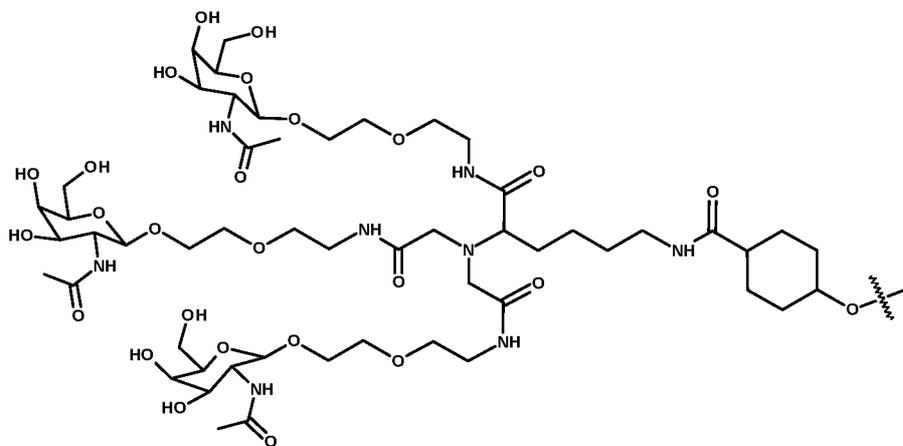
20

В некоторых вариантах реализации нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, синтезируют таким образом, чтобы они имели форму фосфоамидитного соединения. Фосфоамидиты широко применяются в химическом синтезе РНК и ДНК. В некоторых вариантах реализации фосфоамидит-содержащие нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, соединяют с 5'-концом смысловой нити двунитевого агента РНКи. Особенно полезным может быть получение нацеливающего лиганда в форме фосфоамидита, если нацеливающий лиганд связывают с 5'-концом ингибирующего экспрессию олигомерного соединения. Без намерения ограничения теорией, полагают, что получение нацеливающего лиганда в виде фосфоамидита, где нацеливающий лиганд связан с 5'-концом ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, дает возможность связывания нацеливающего лиганда как последнего компонента (что снижает стоимость изготовления), но также потенциально позволяет

30

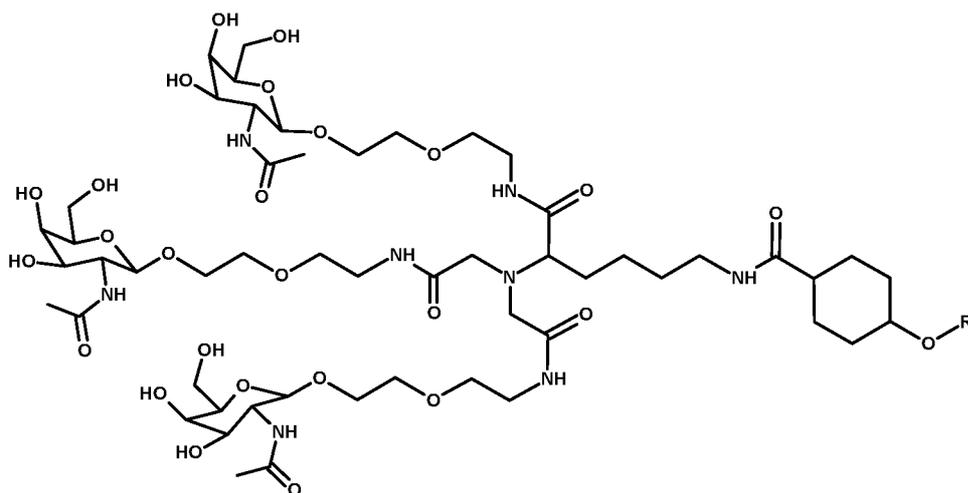
нацеливающему лиганду блокировать загрузку смысловой нити в RISC, если нацеливающий лиганд присоединен к 5'-концу смысловой нити двунитевого агента РНКи. Если ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи, нацеливающий лиганд можно получить в форме фосфорамидитного соединения, при этом нацеливающий лиганд связывают с 5'-концом смысловой нити агента РНКи.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1001).

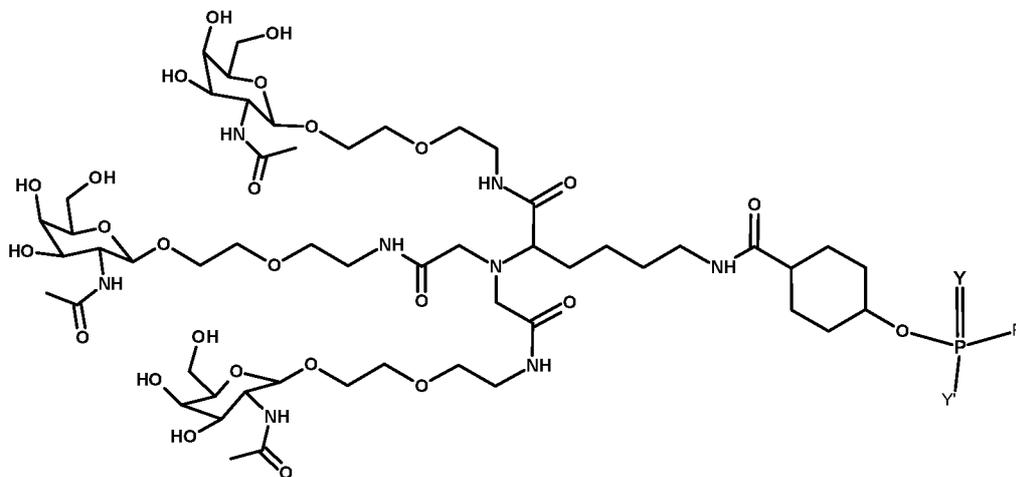
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R включает

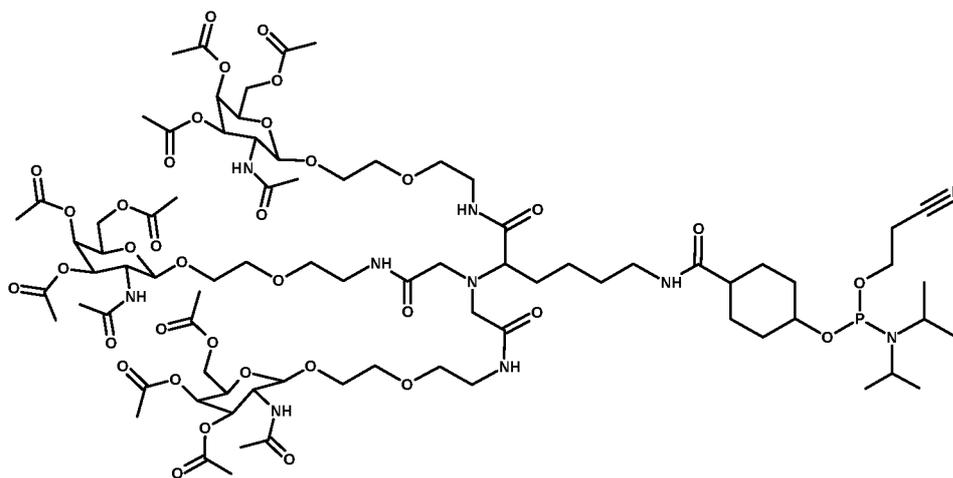
ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1001a).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



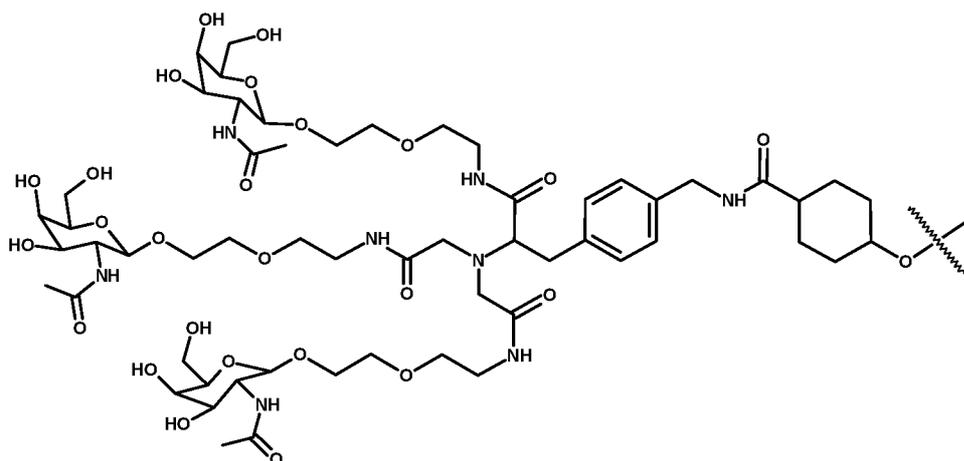
5 , где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1001a(i)).

10 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1001b).

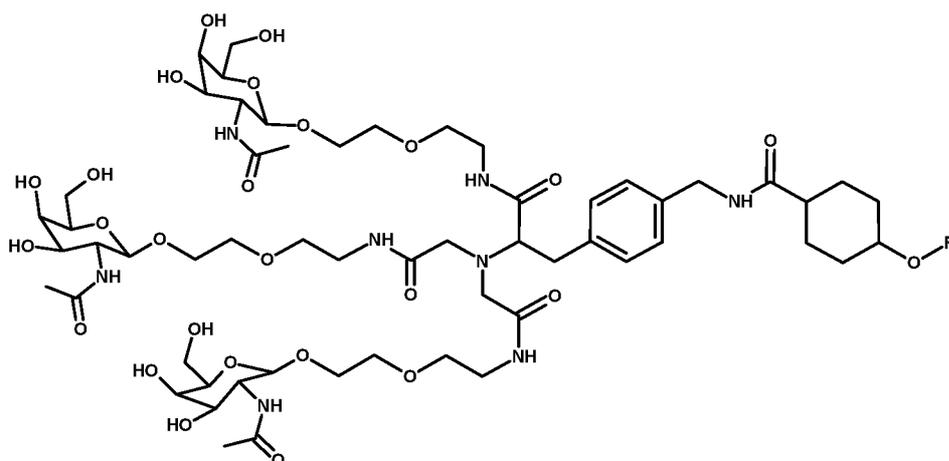
15 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура

1002).

5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

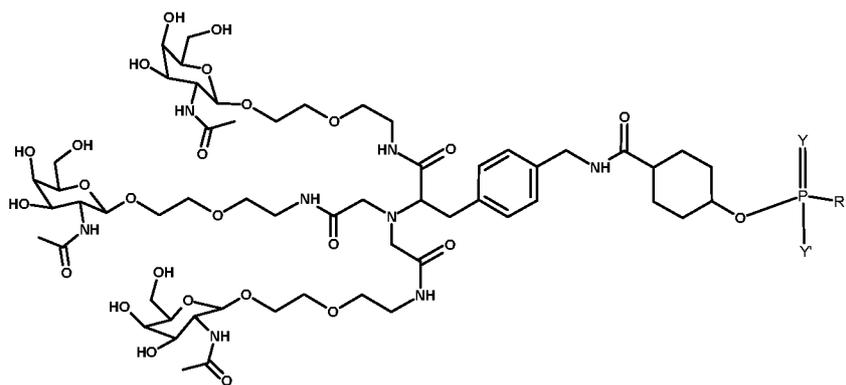


, где R включает

ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура

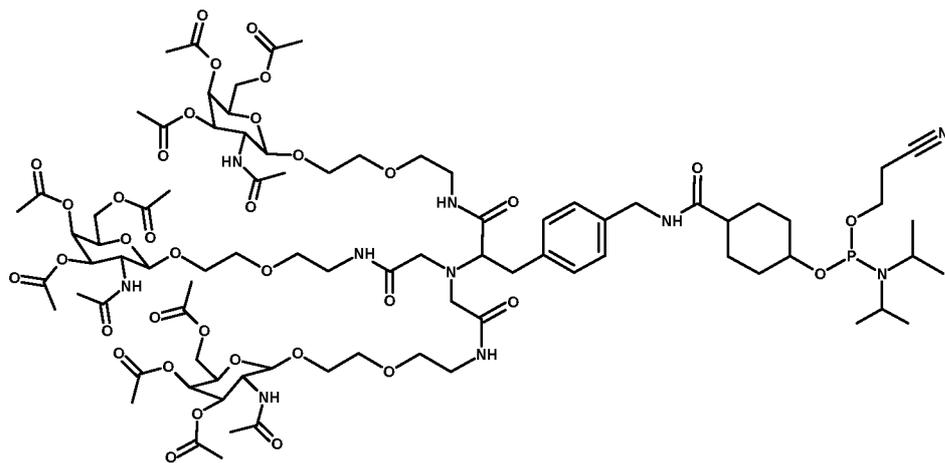
10 1002a).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1002a(i)).

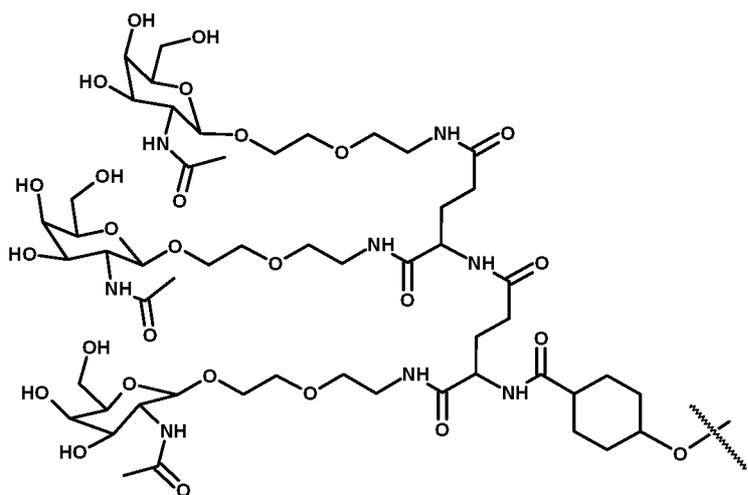
- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура

1002b).

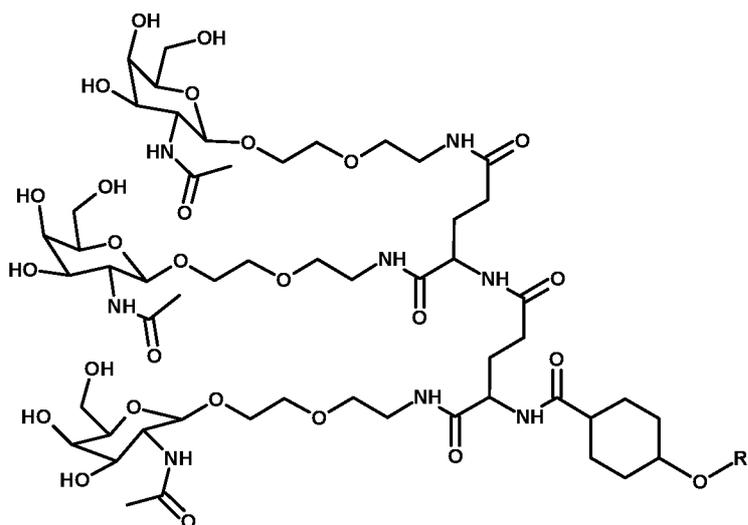
- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1003).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

5 ниже:



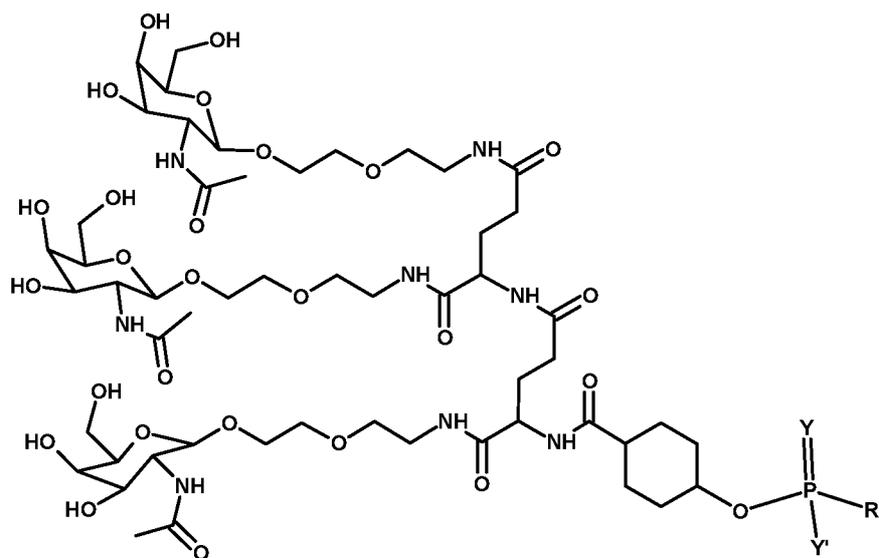
, где R включает ингибирующее

экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1003a).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

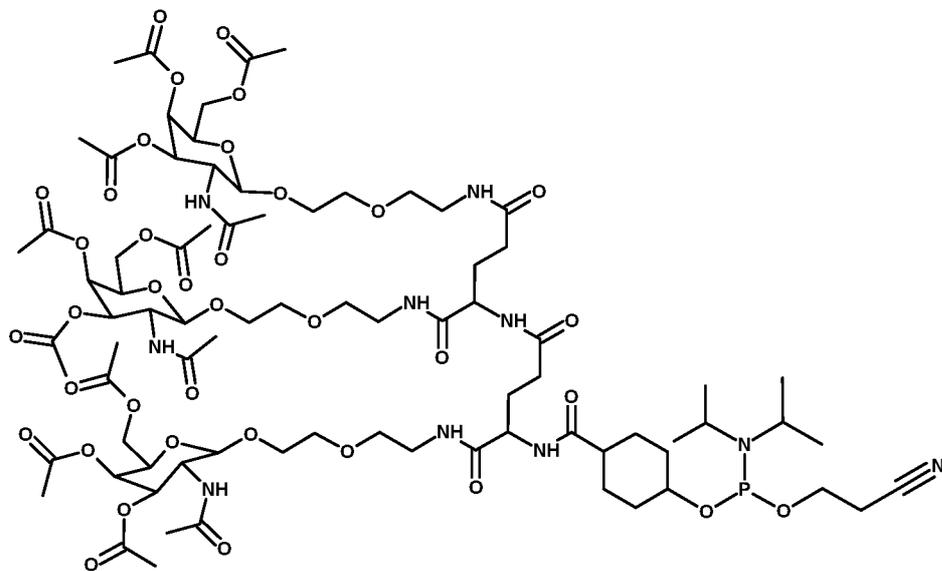
10

ниже:



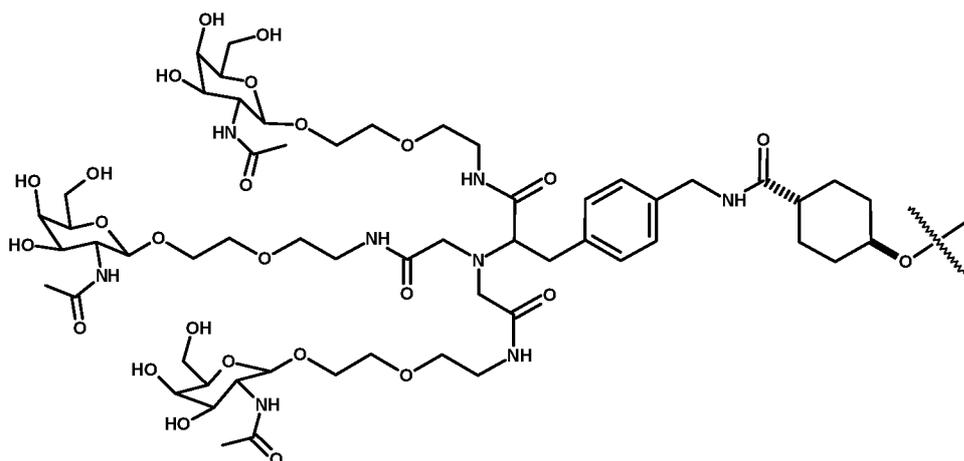
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1003a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



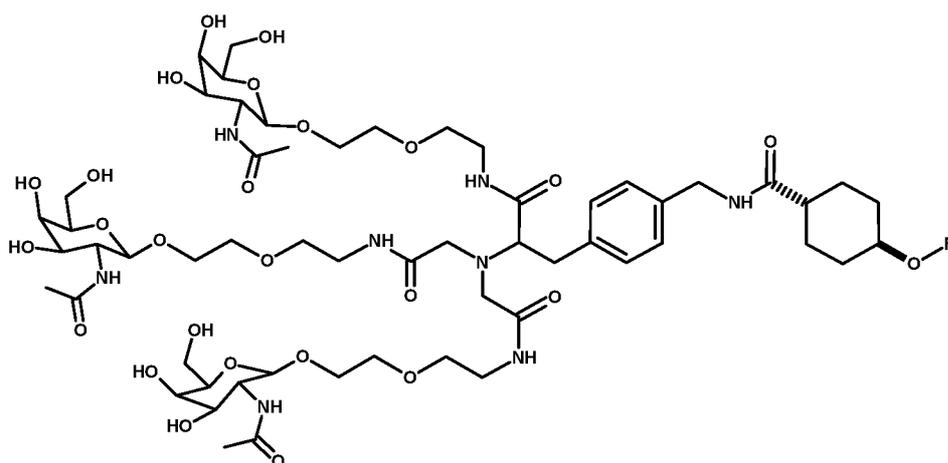
(Структура 1003b).

- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1004).

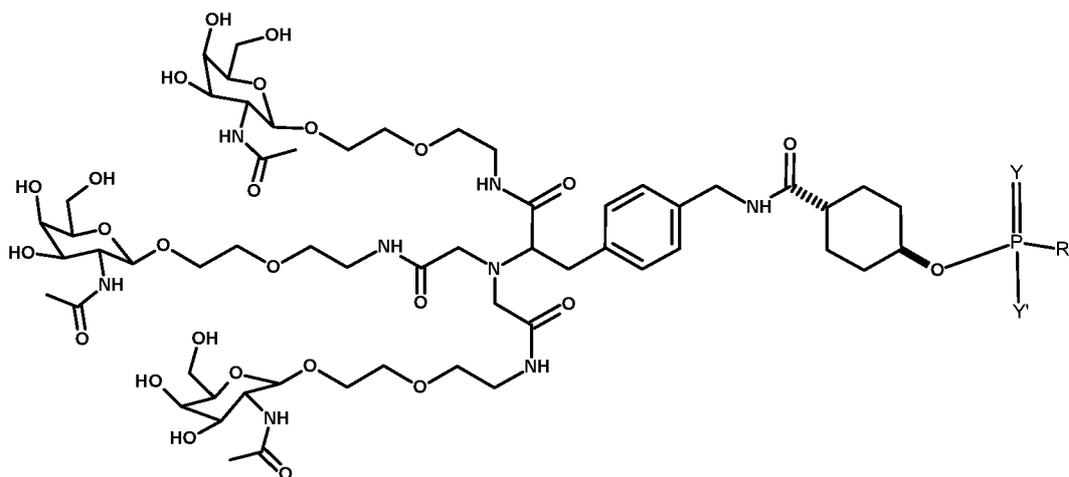
5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1004a).

10

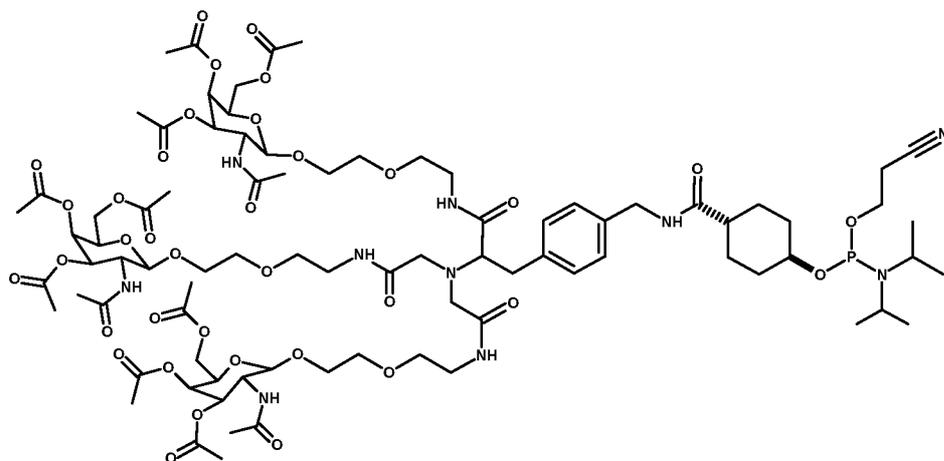
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1004a(i)).

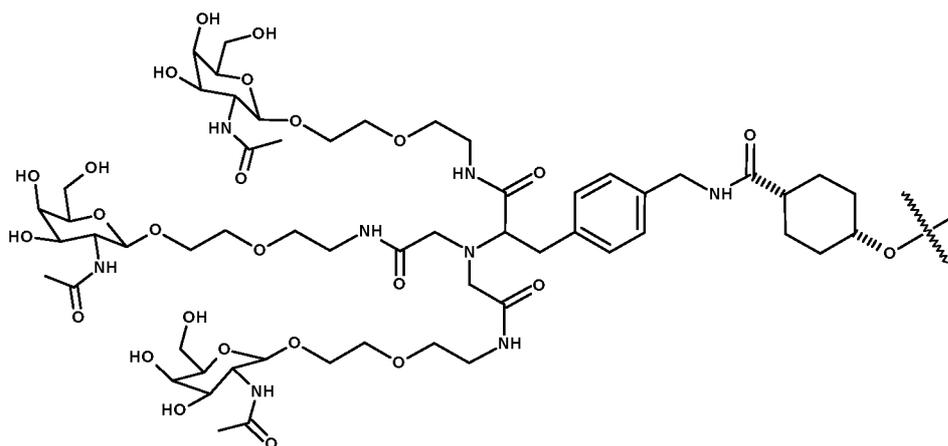
5

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



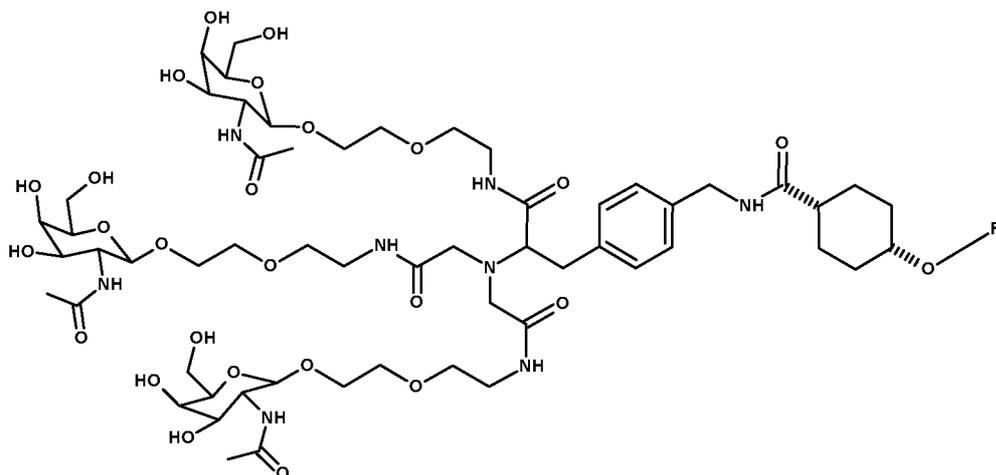
(Структура 1004b).

10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1005).

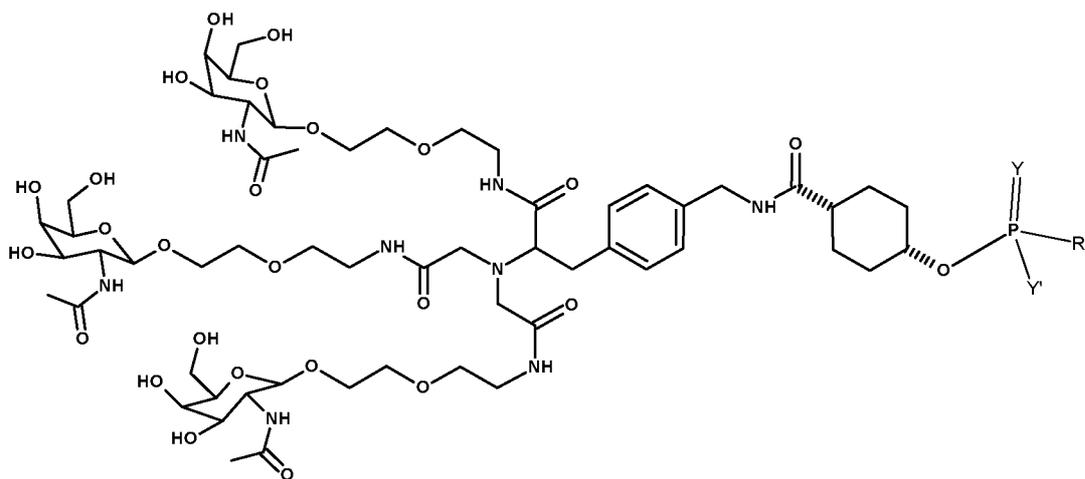
5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R

включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него.
(Структура 1005a).

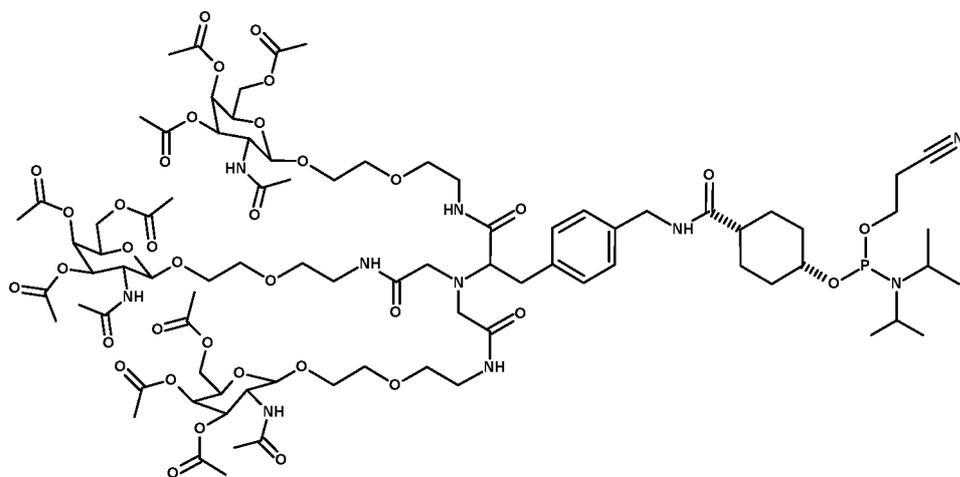
10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1005a(i)).

5

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:

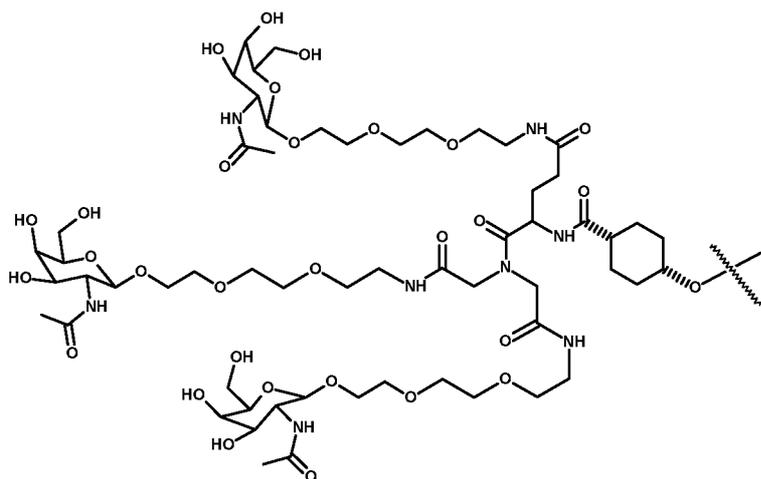


(Структура

1005b).

10

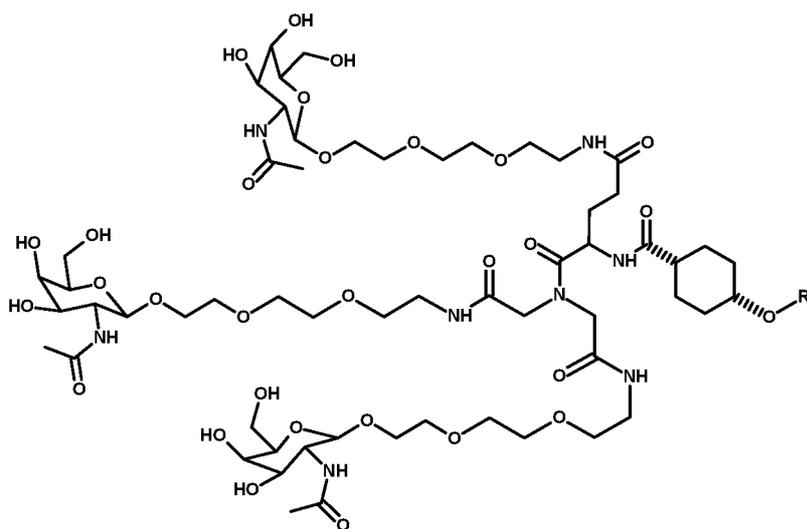
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1006).

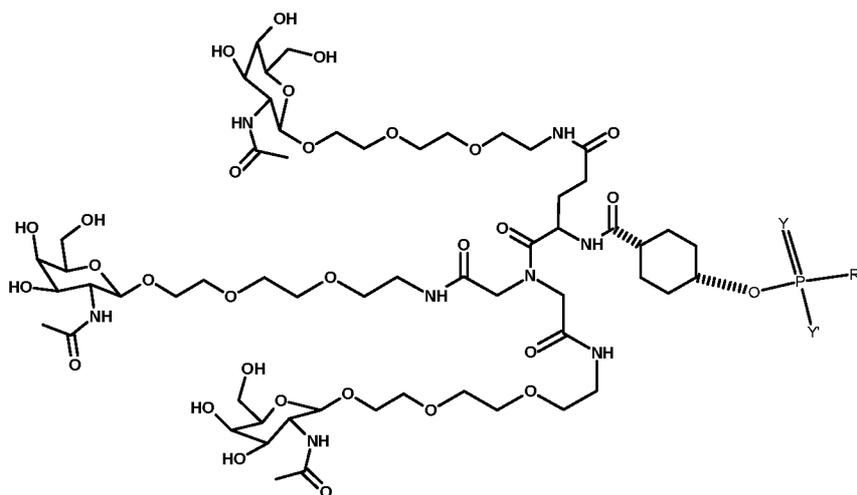
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

5 ниже:



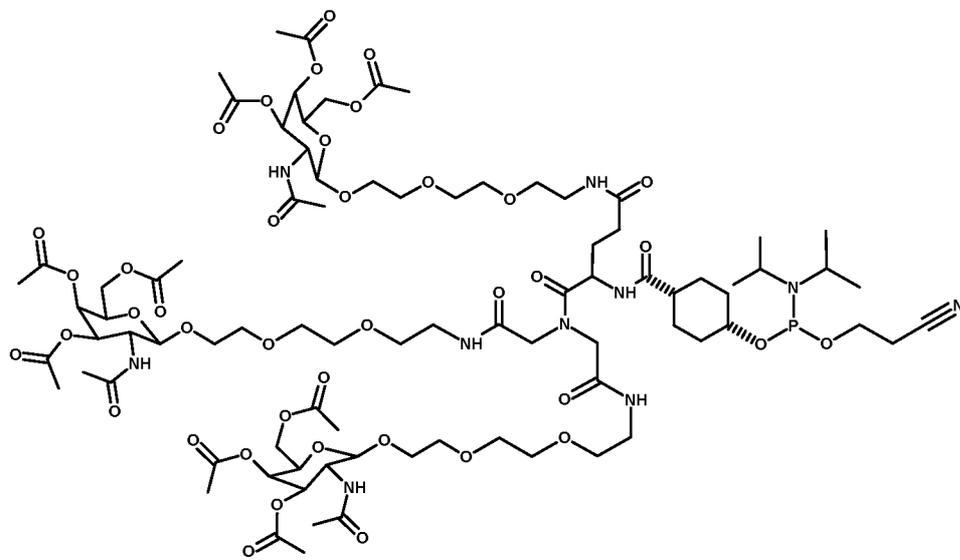
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1006a).

10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



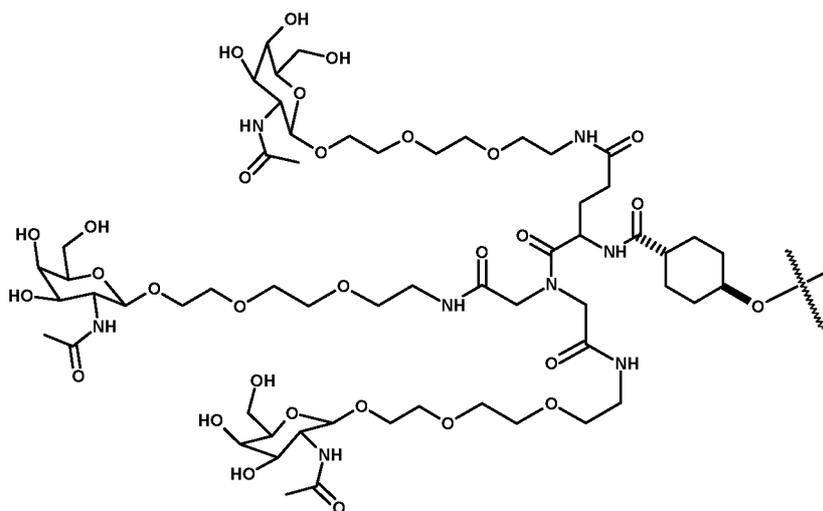
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1006a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1006b).

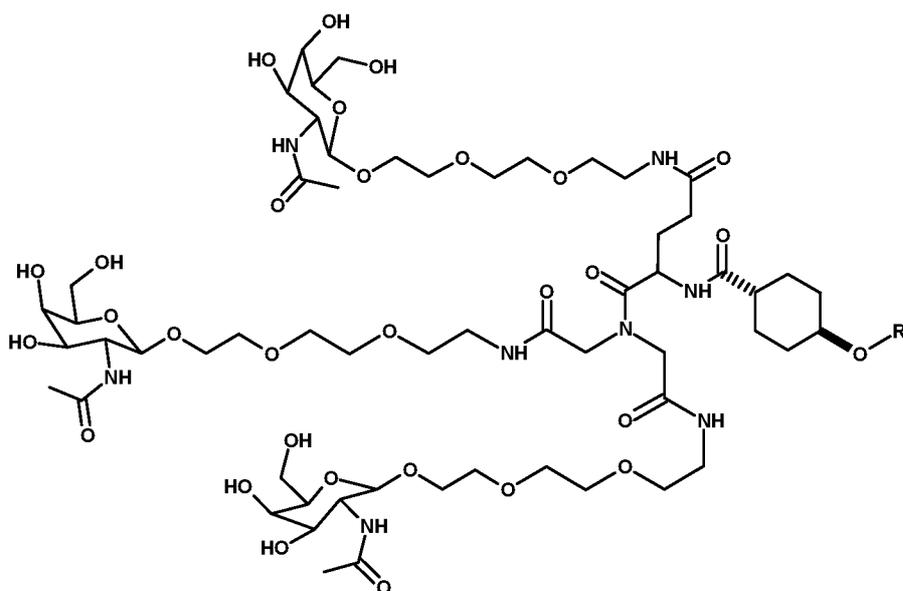
- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1007).

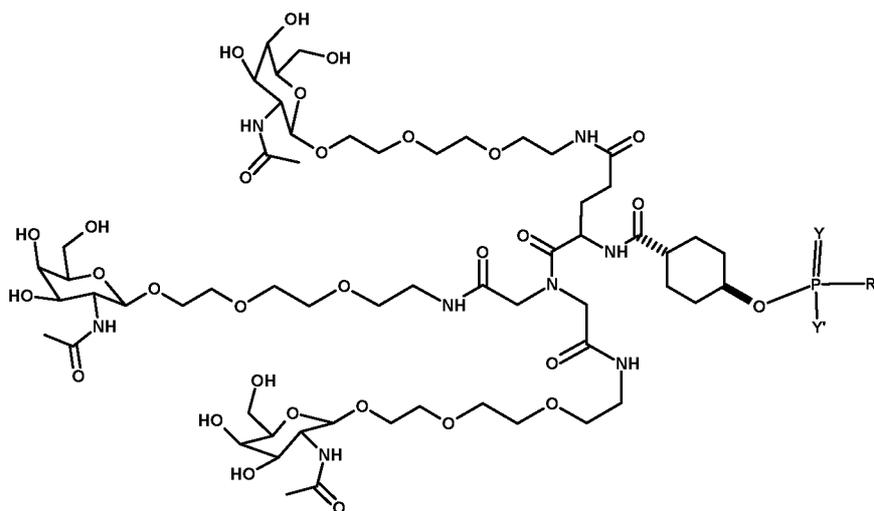
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

5 ниже:



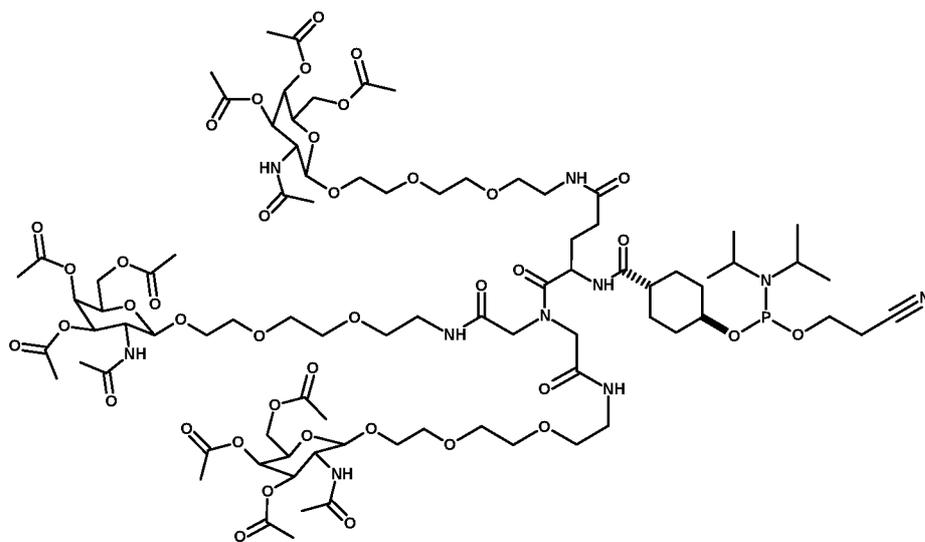
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1007a).

10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



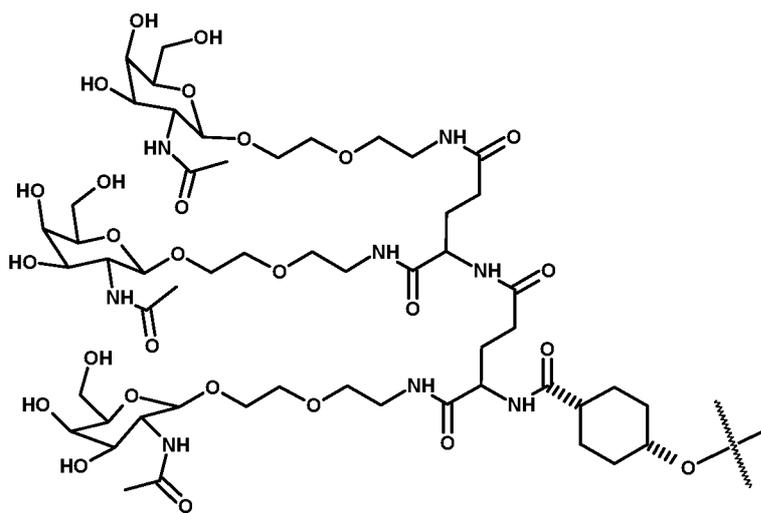
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1007a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1007b).

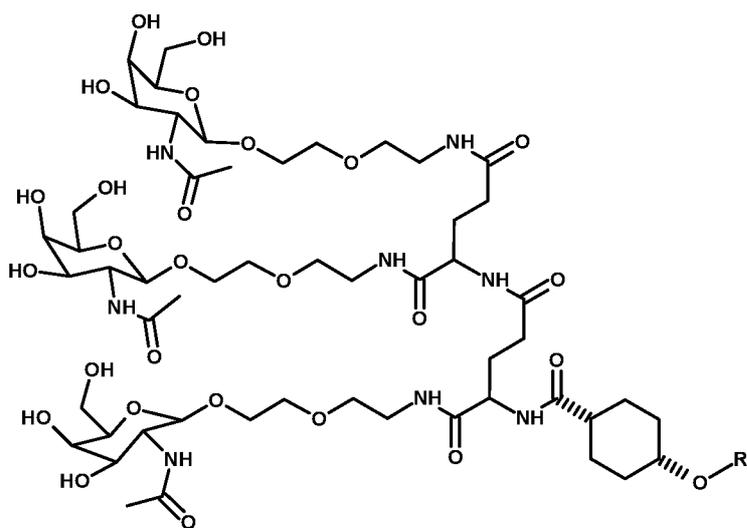
- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1008).

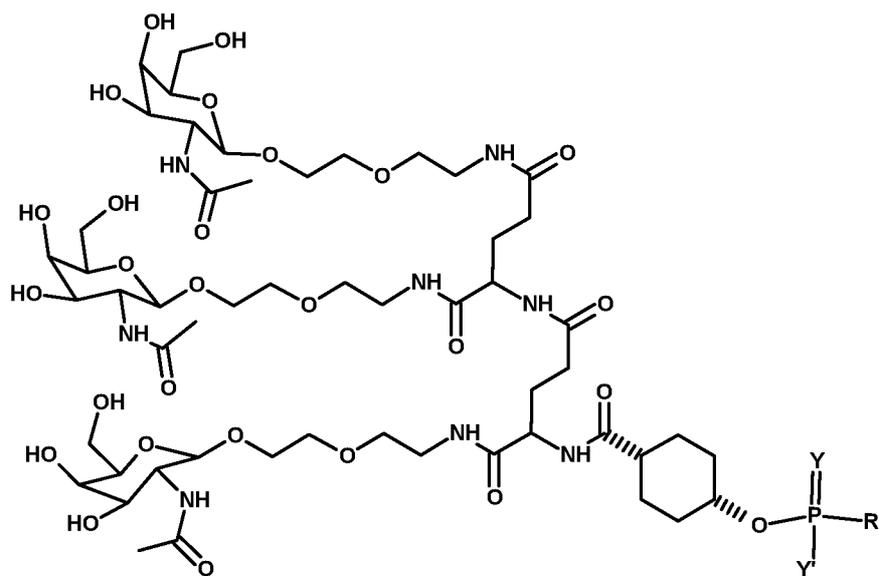
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

5 ниже:



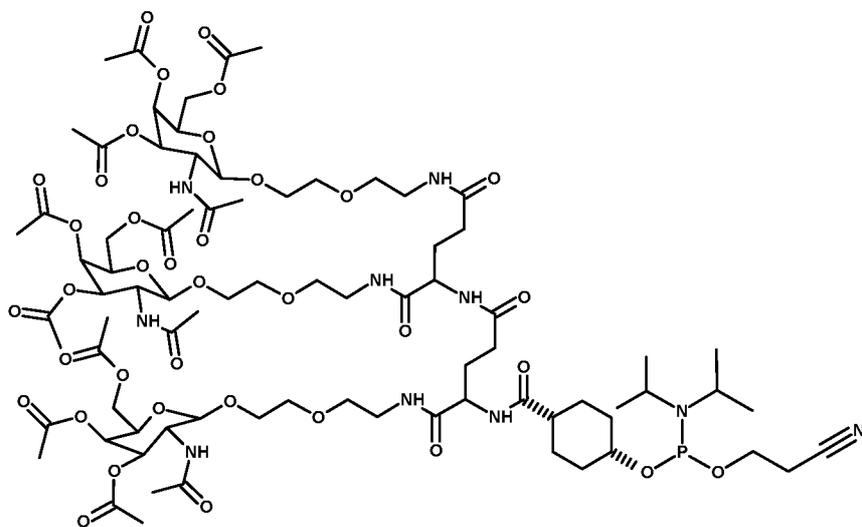
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1008a).

10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



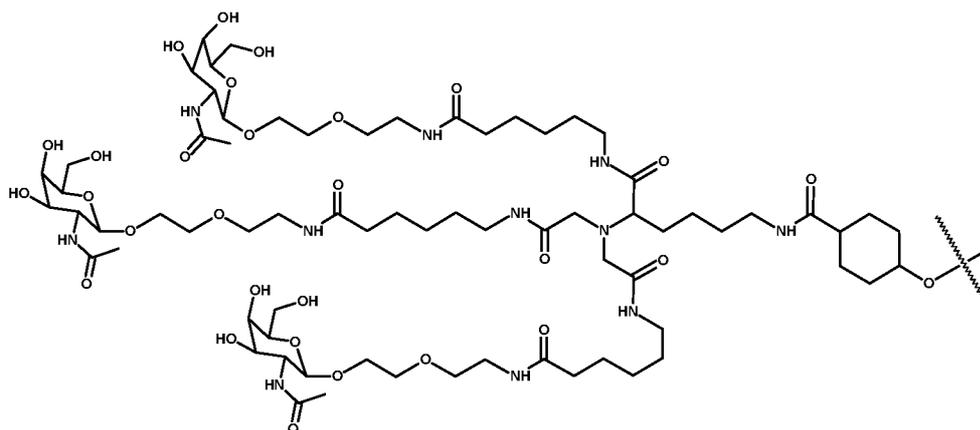
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1008a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1008b).

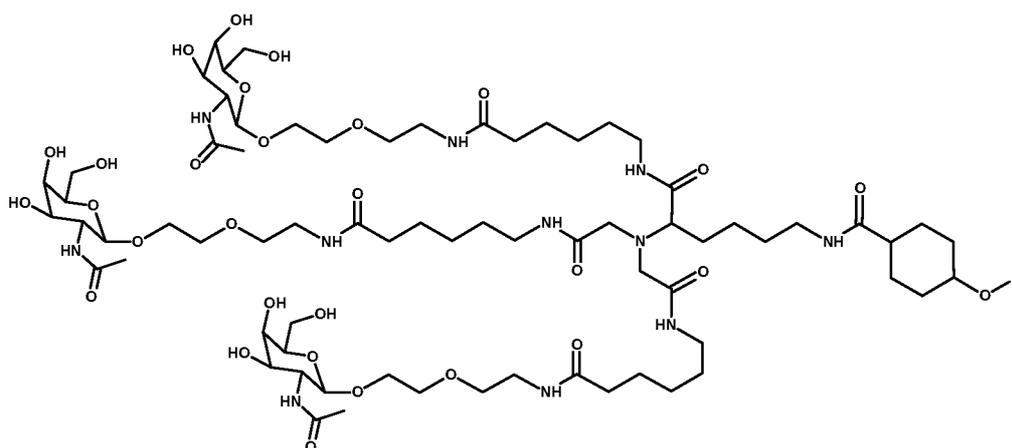
- 10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура

1009).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное
5 соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную
ниже:

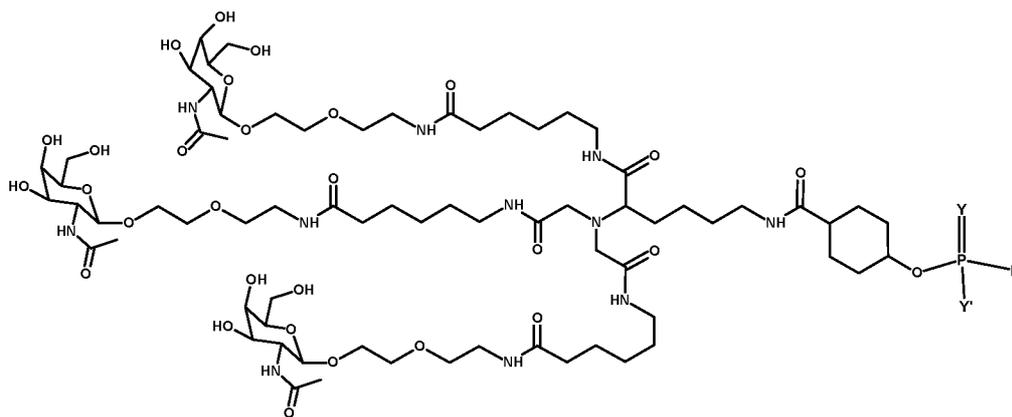


, где R

включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него.
(Структура 1009a).

10

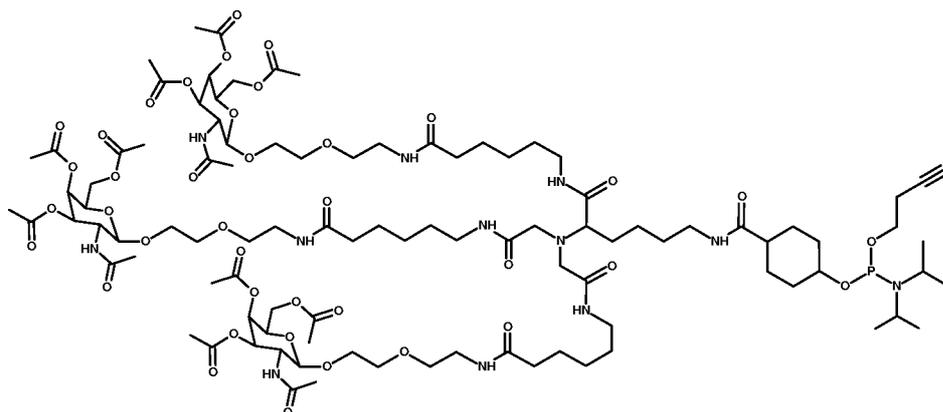
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное
соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную
ниже:



, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1009a(i)).

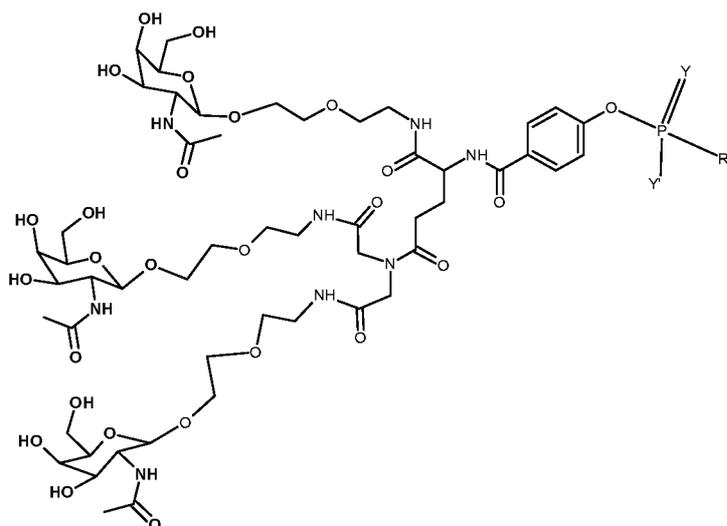
5

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



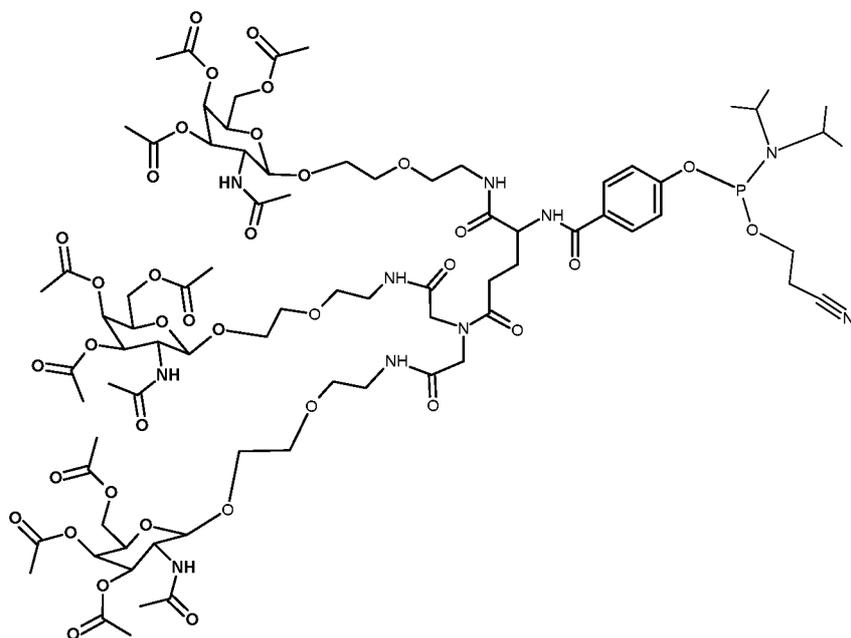
(Структура 1009b).

10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



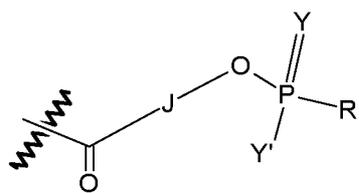
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1010a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



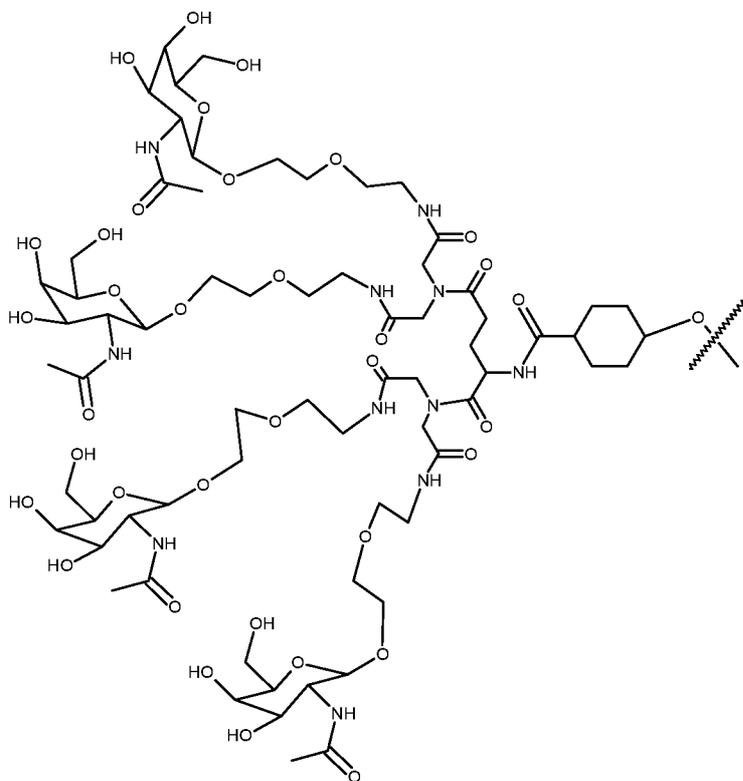
(Структура 1010b).

- 10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и включает структуру, представленную ниже:



5 , где J включает или состоит одной или более замещенных или незамещенных циклоалкильных, циклоалкенильных, арильных, гетероарильных или гетероциклических групп или их ковалентно соединенных комбинаций; Y представляет собой O или S; R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; и Y' представляет собой O', S' или NH' (Структура 1011).

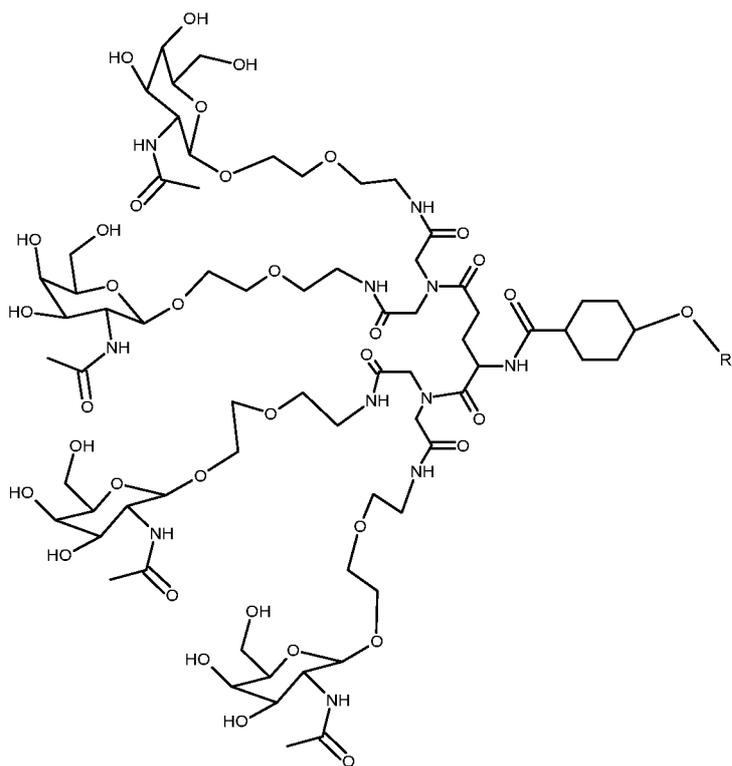
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1012).

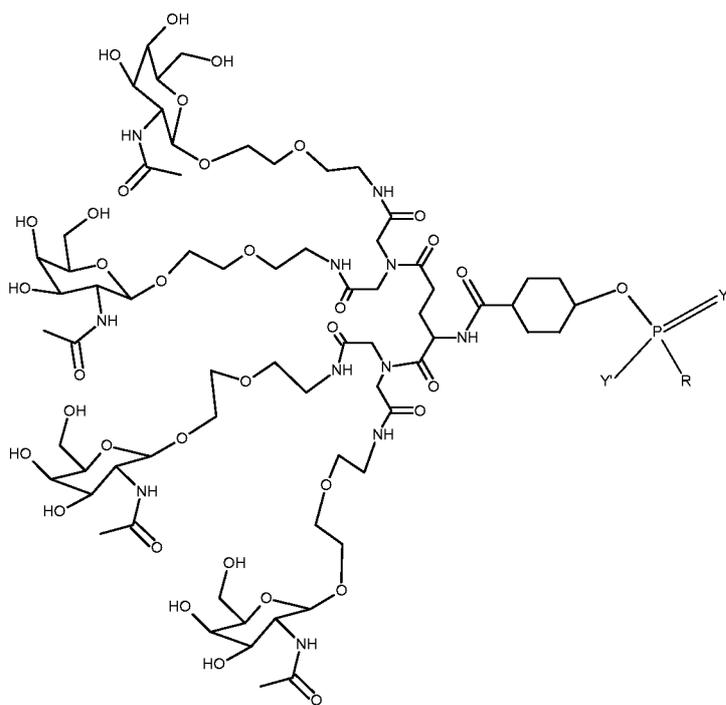
10

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



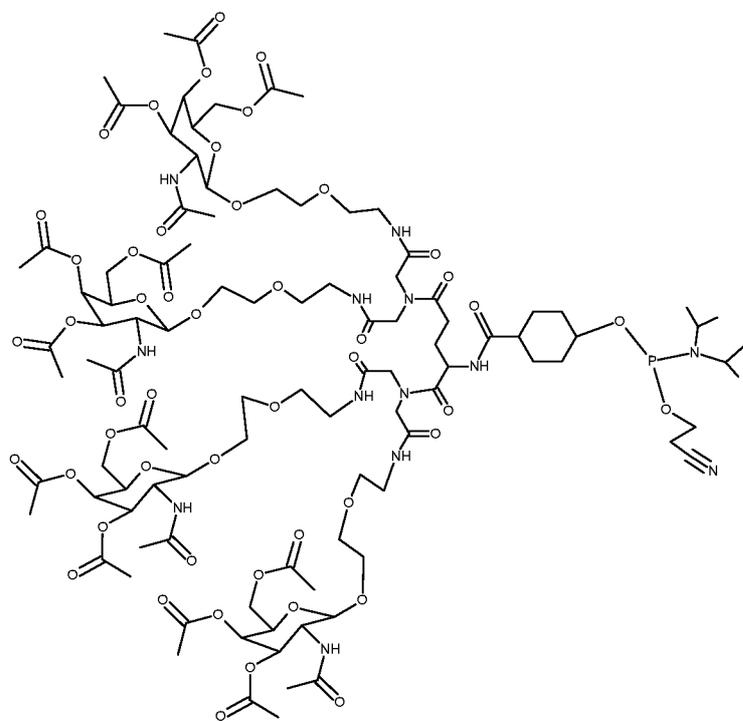
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1012a).

5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



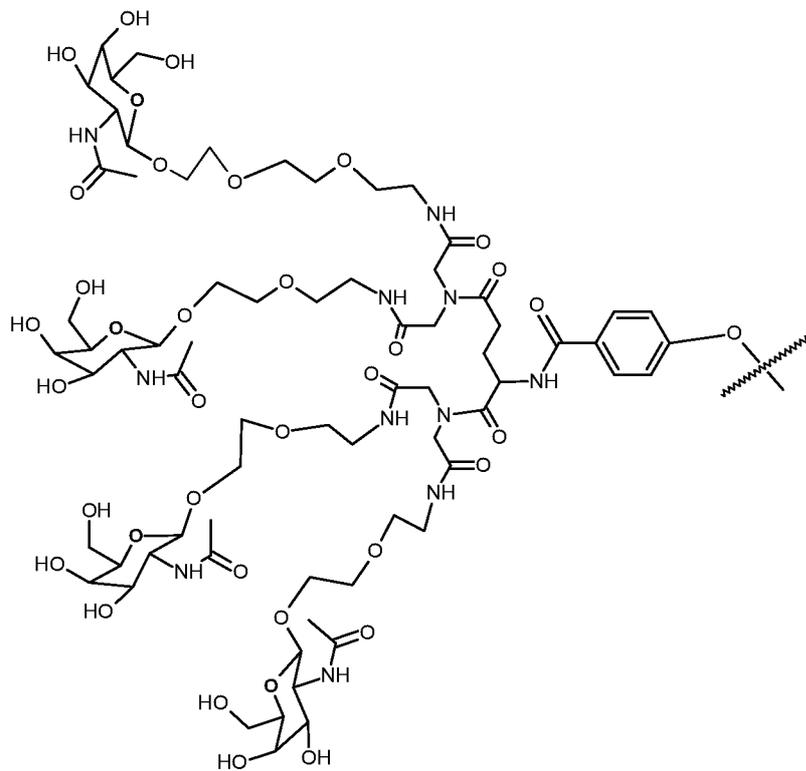
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1012a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



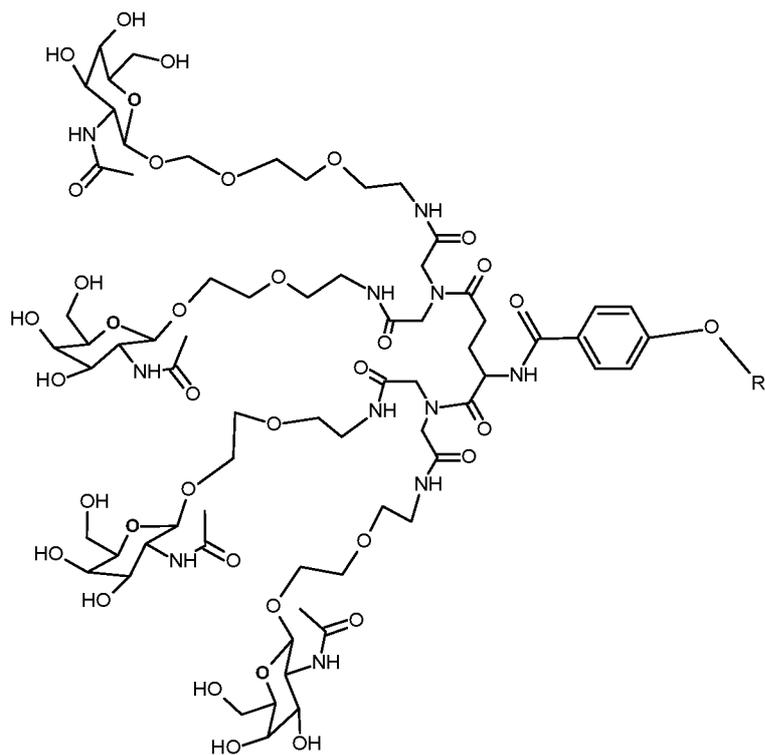
(Структура 1012b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



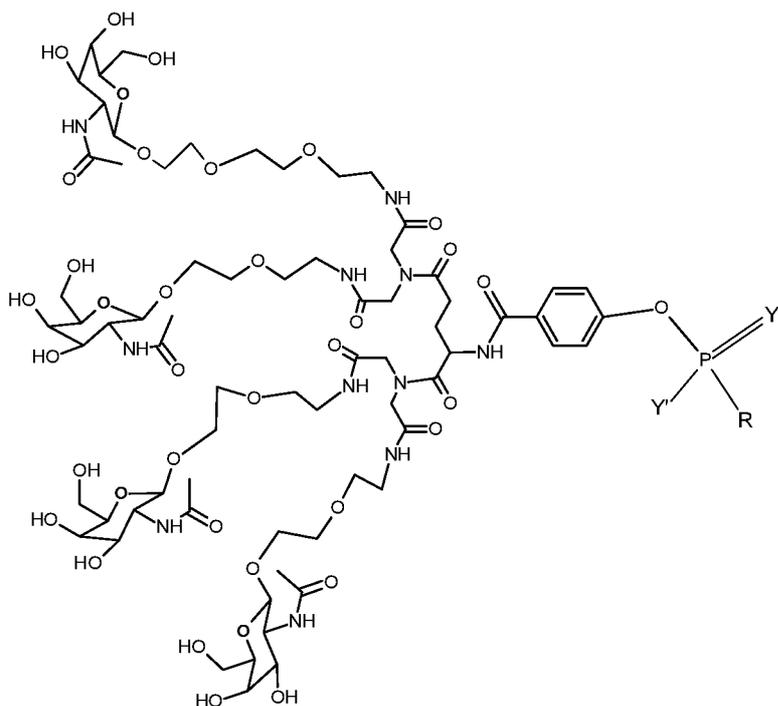
(Структура 1013).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



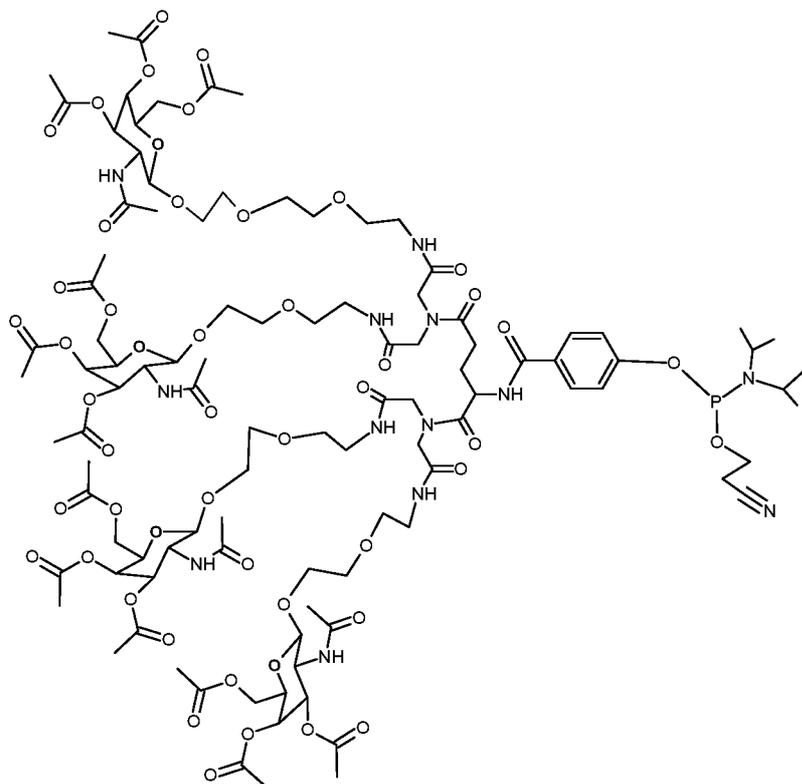
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1013a).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное
 5 соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную
 ниже:



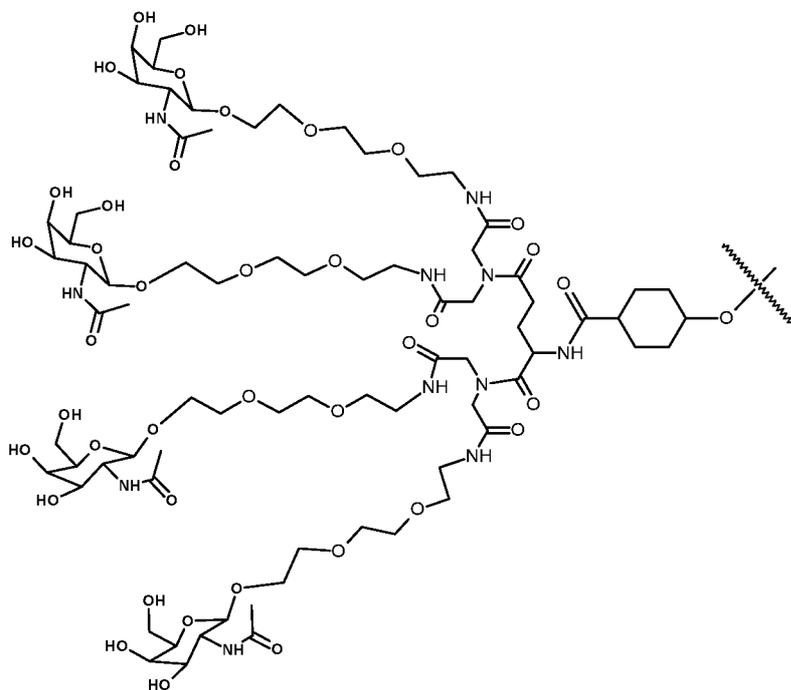
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O', S' или NH'. (Структура 1013a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1013b).

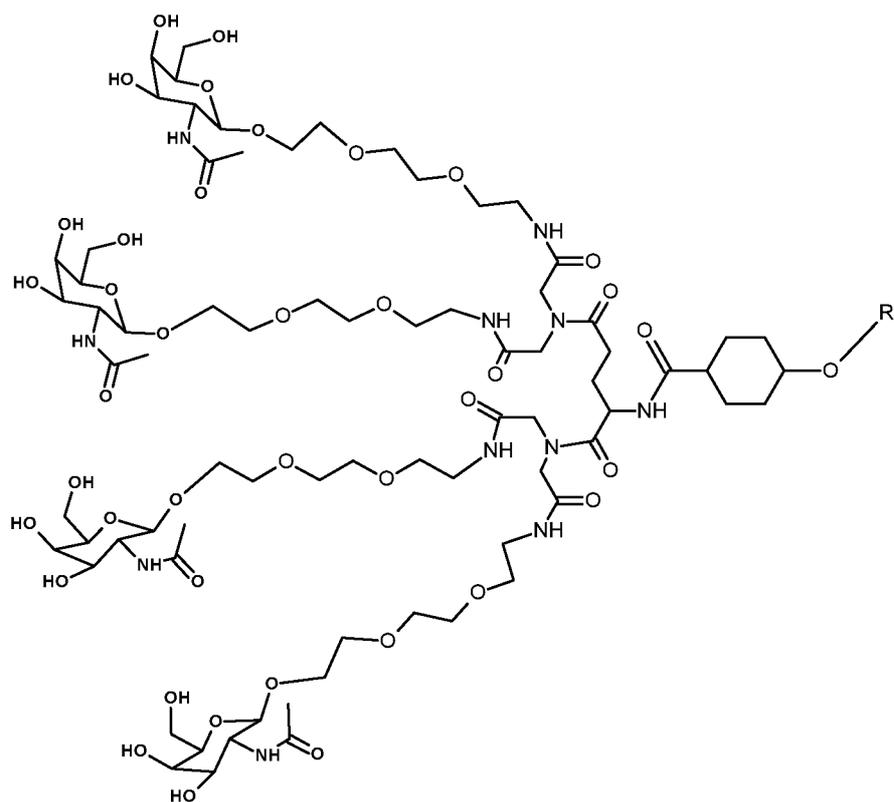
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1014).

5

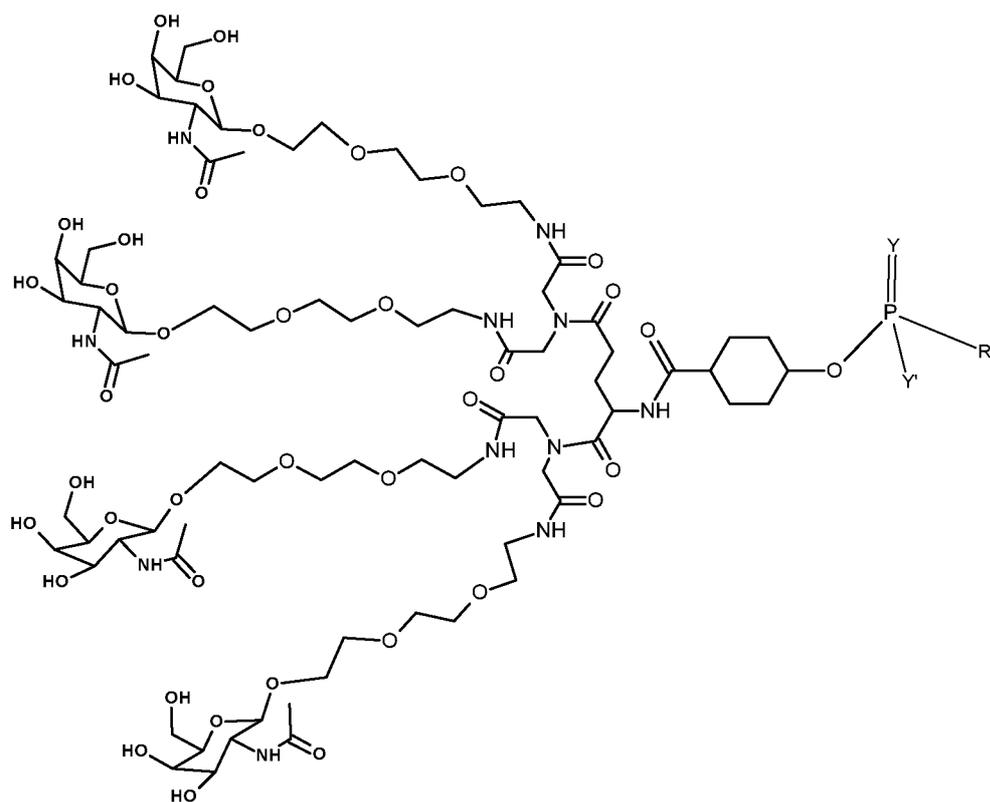
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R включает

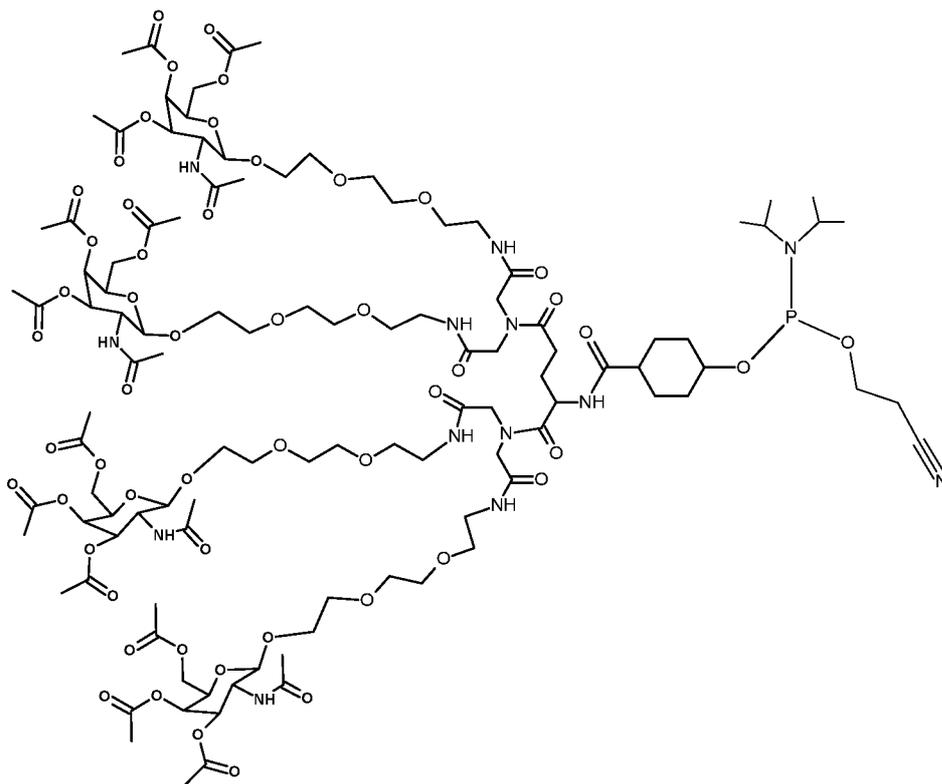
ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1014a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



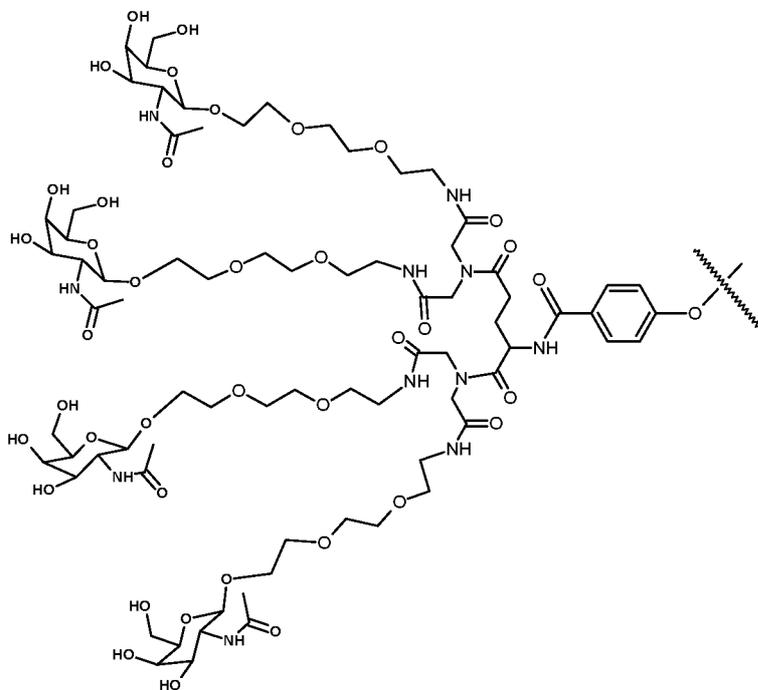
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1014a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



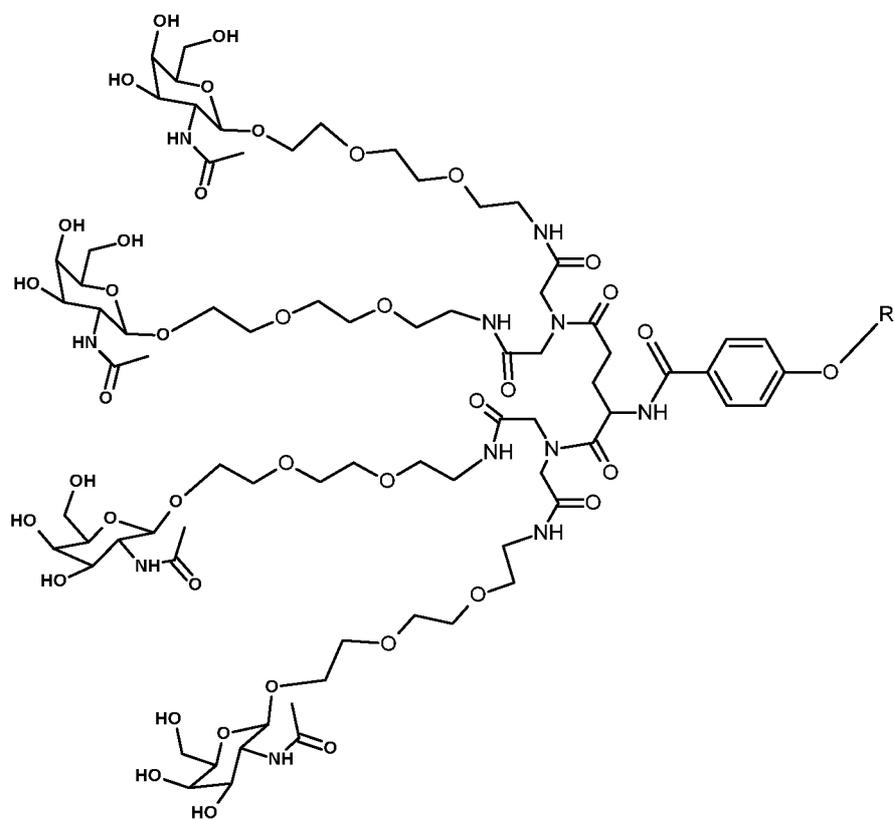
(Структура 1014b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1015).

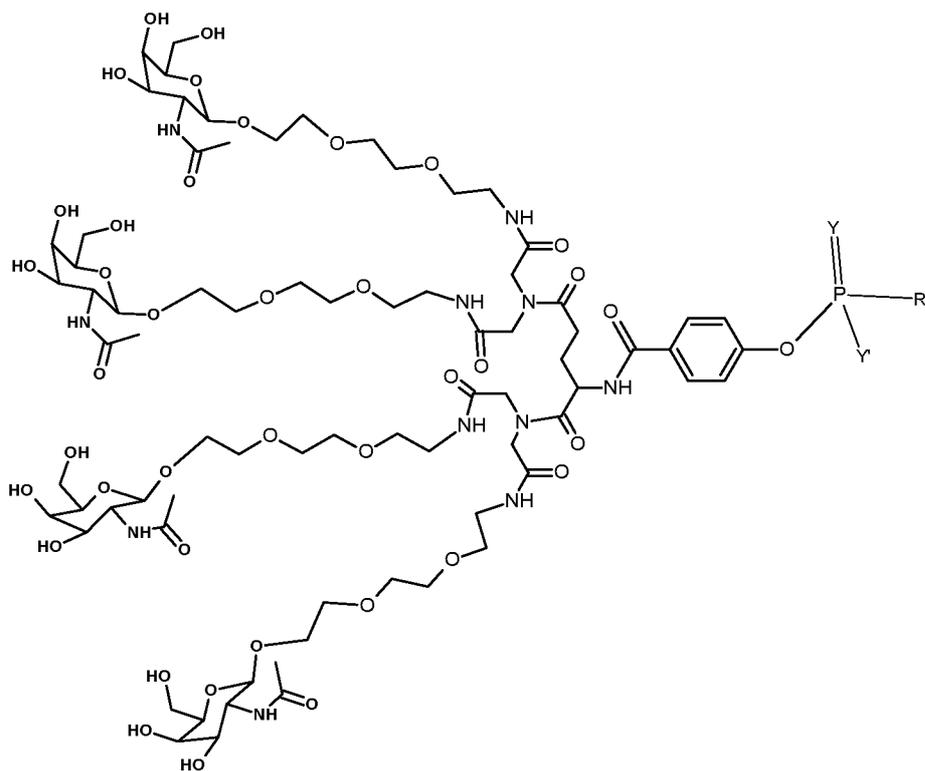
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R включает

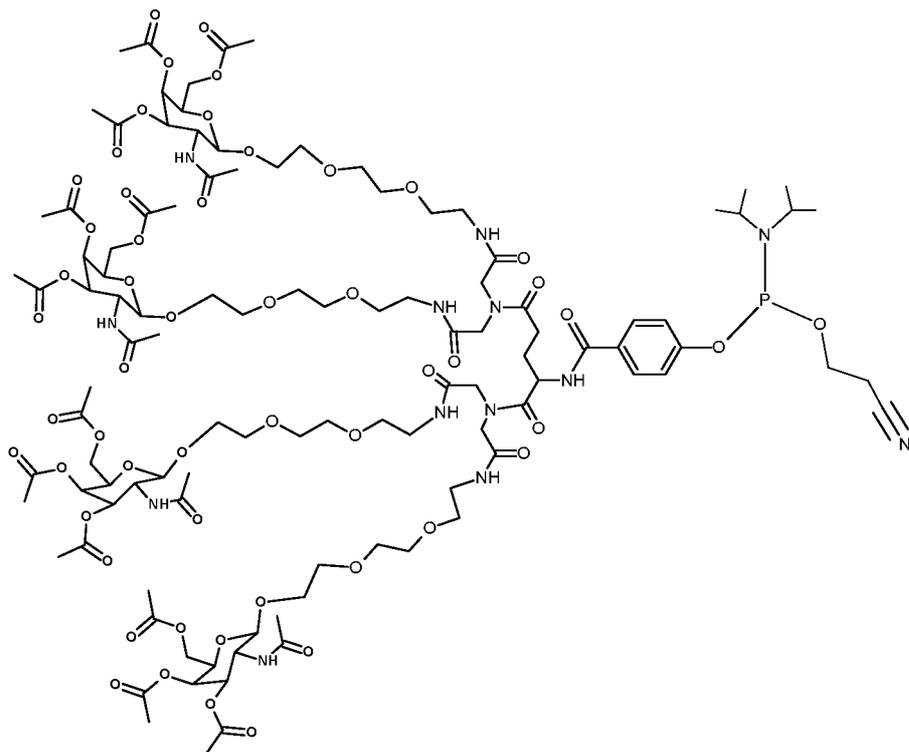
5 ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1015a).

10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



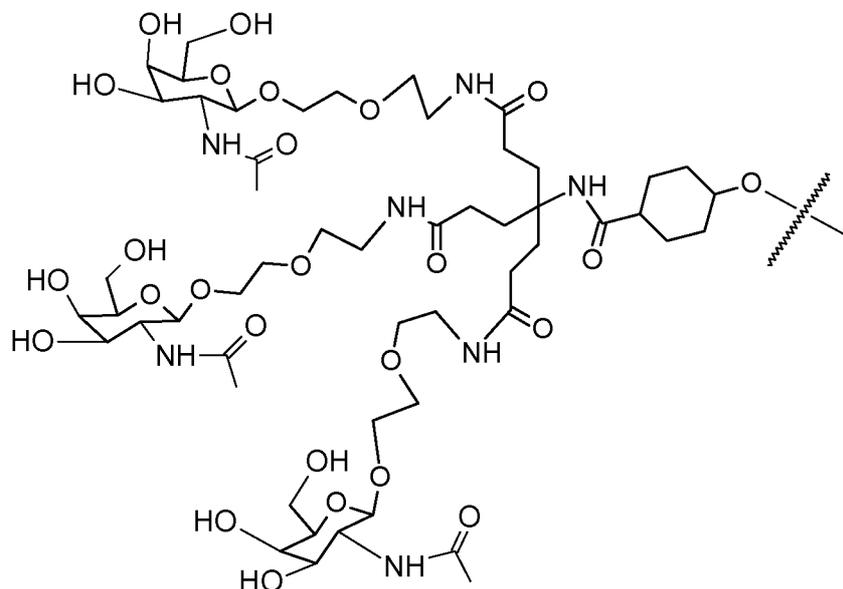
, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1015a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1015b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:

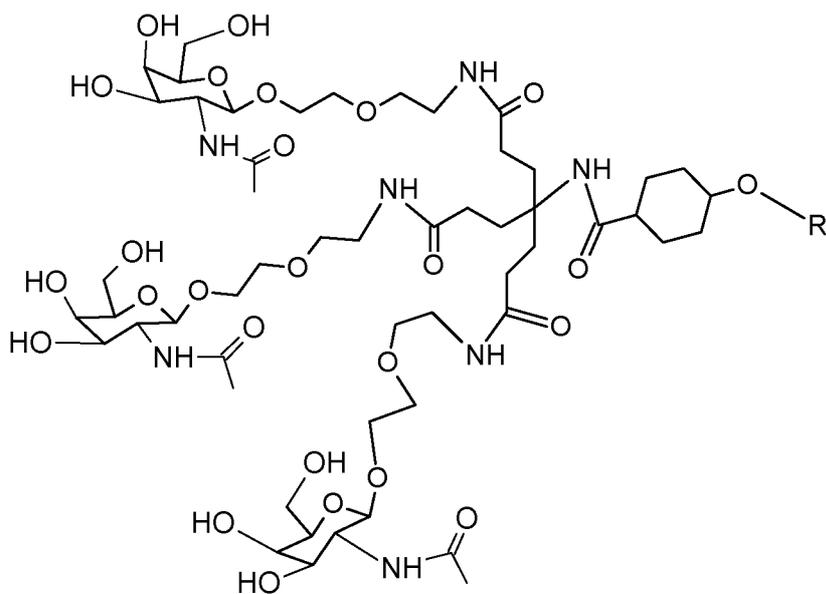


5

(Структура 1016).

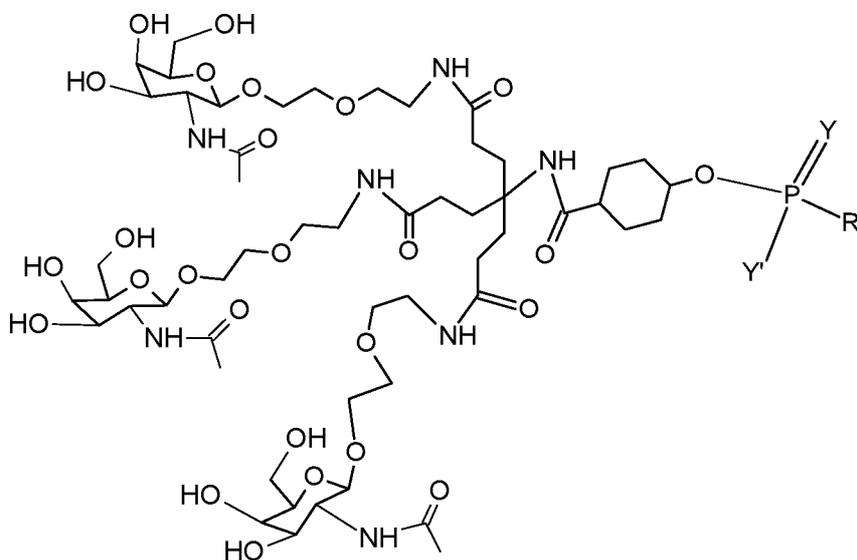
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

10



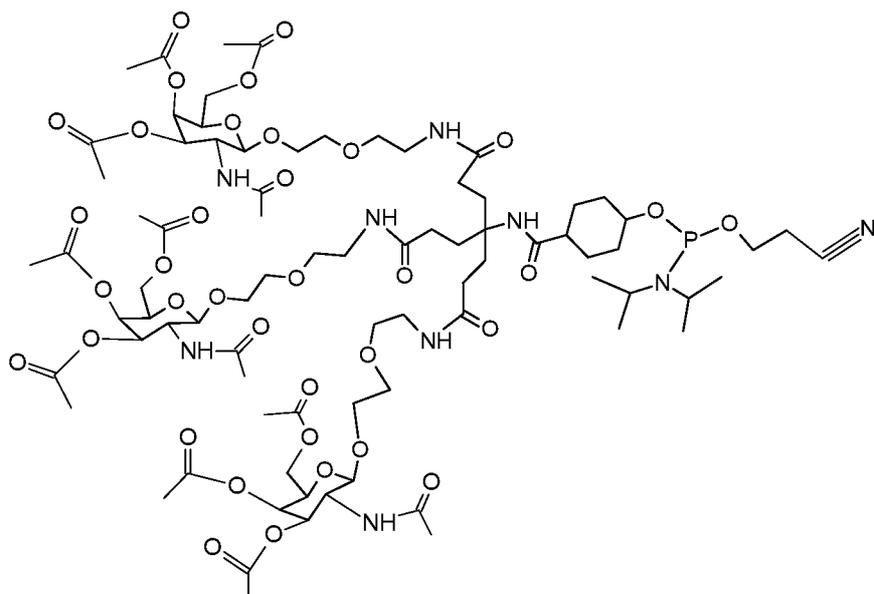
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1016a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



- , где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1016a(i)).

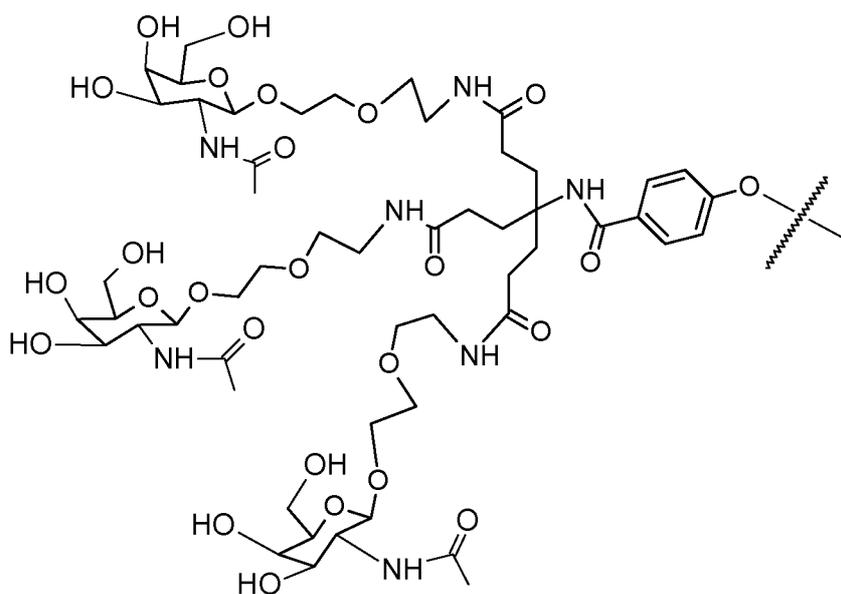
В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1016b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:

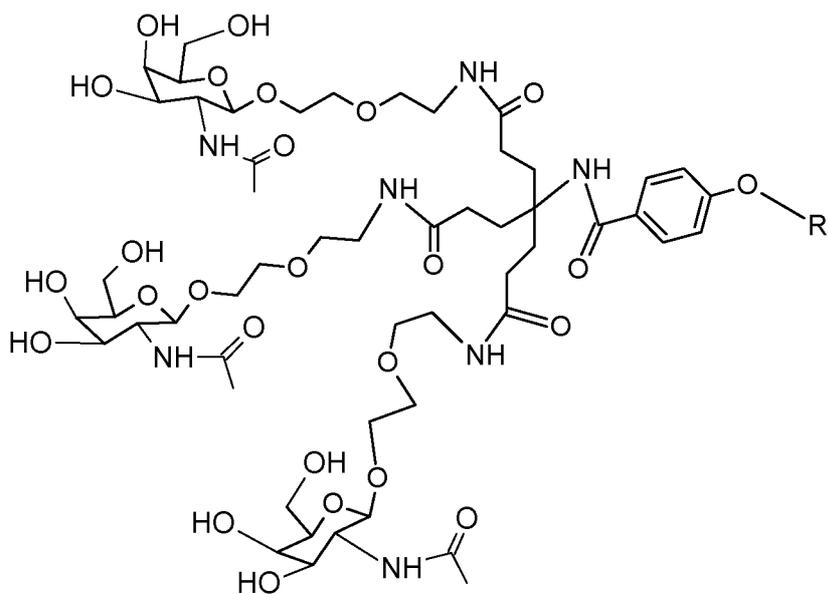
5



(Структура 1017).

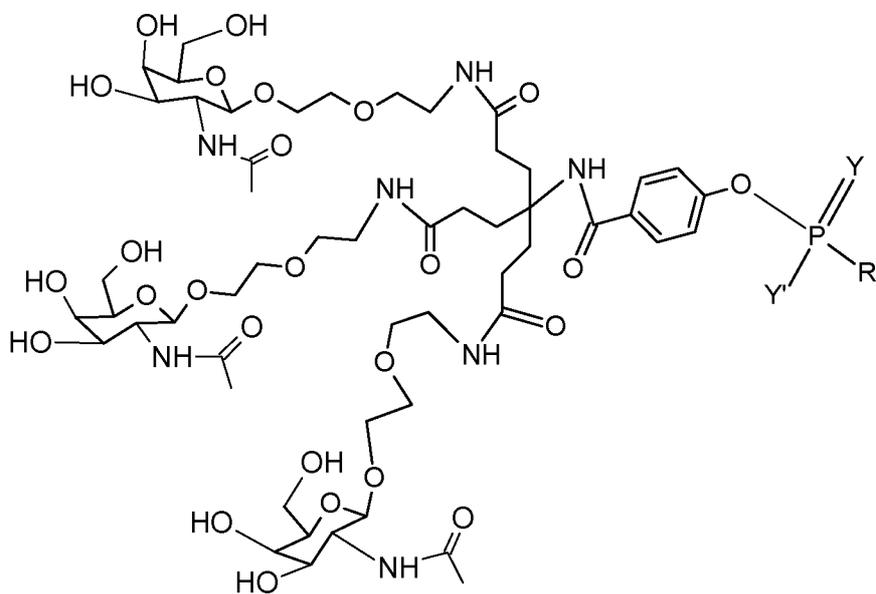
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

10



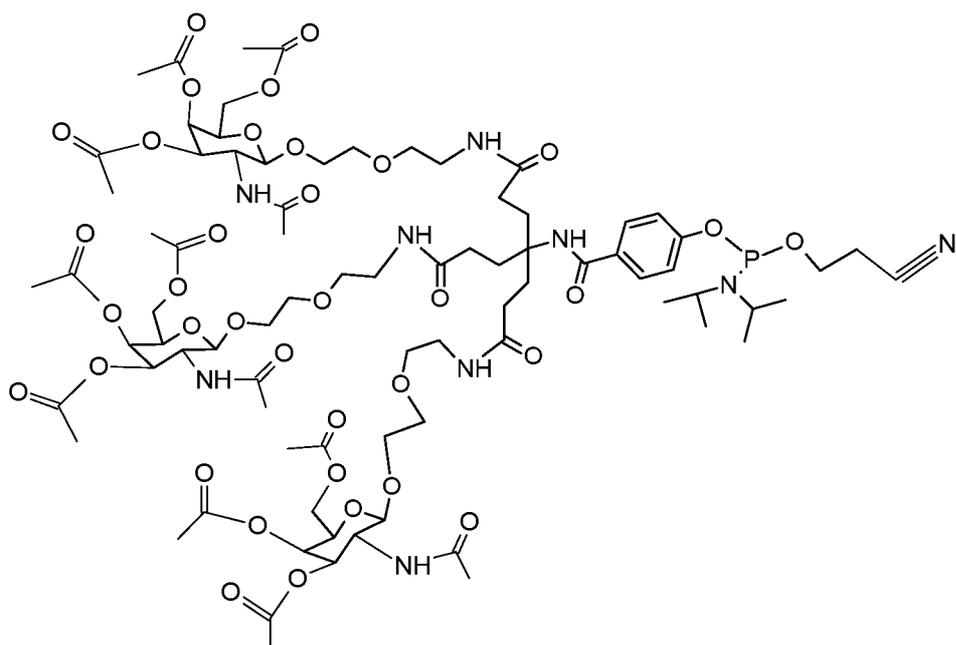
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1017a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



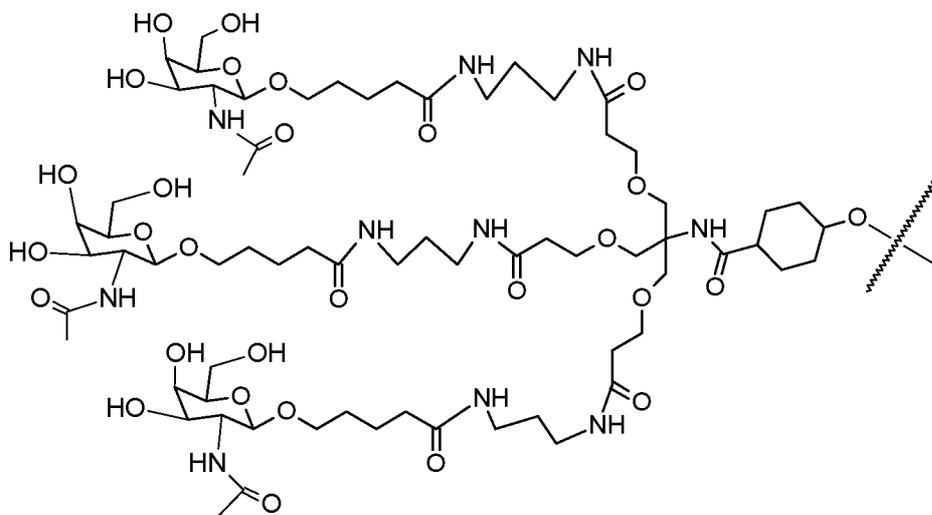
- , где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1017a(i)).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



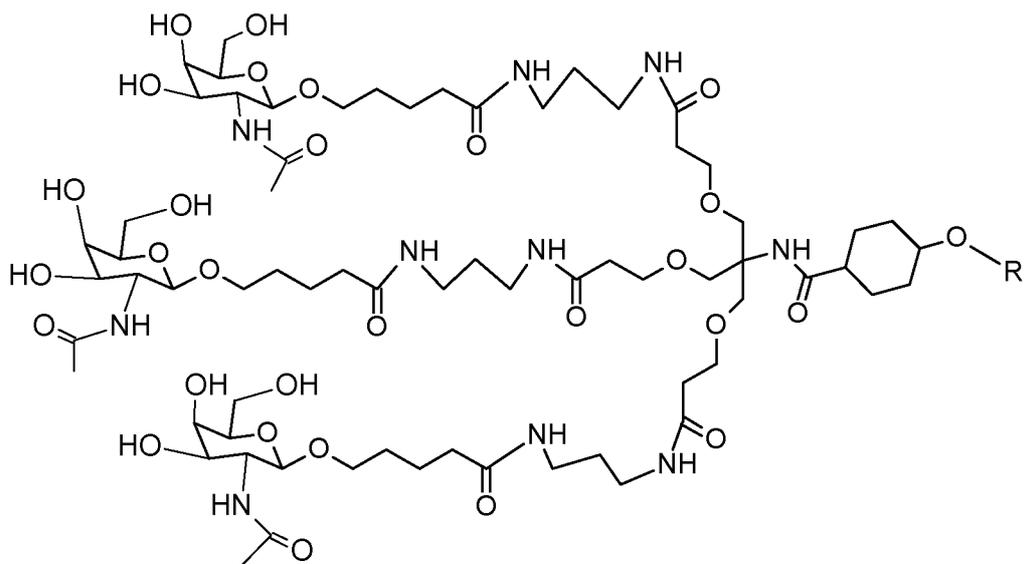
(Структура 1017b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



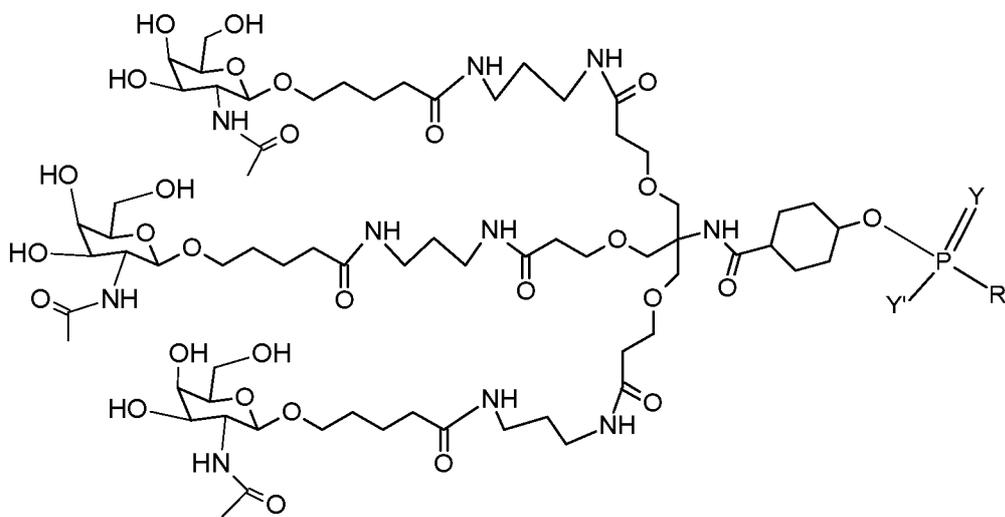
(Структура 1018).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



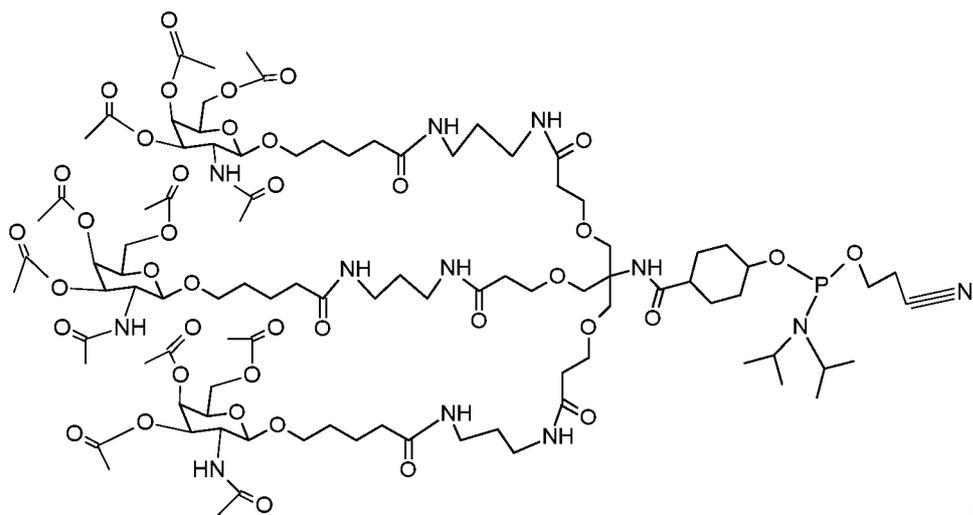
, где R
включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него.
(Структура 1018a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



- , где R состоит
из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет
10 собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1018a(i)).

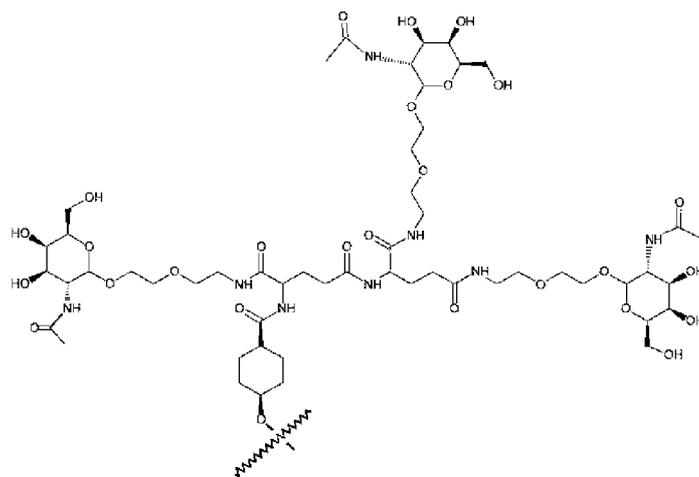
В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура

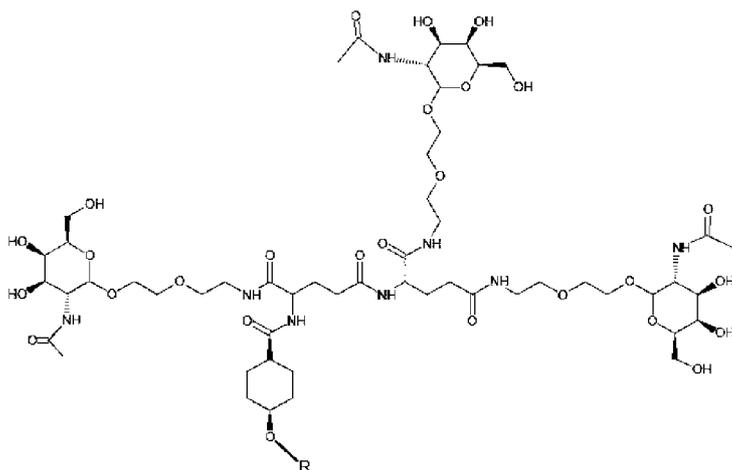
1018b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1019).

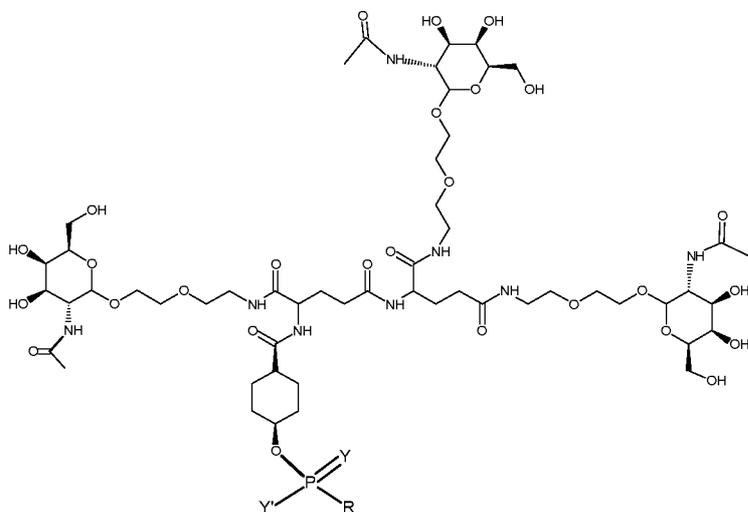
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R включает

ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1019a).

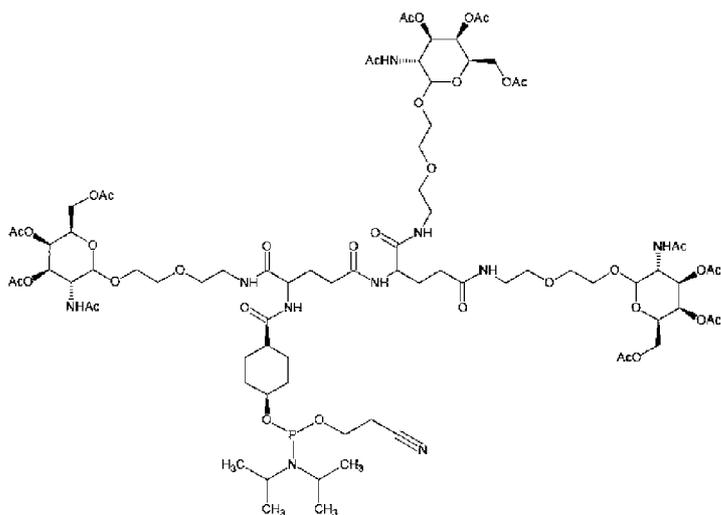
- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R состоит из или включает

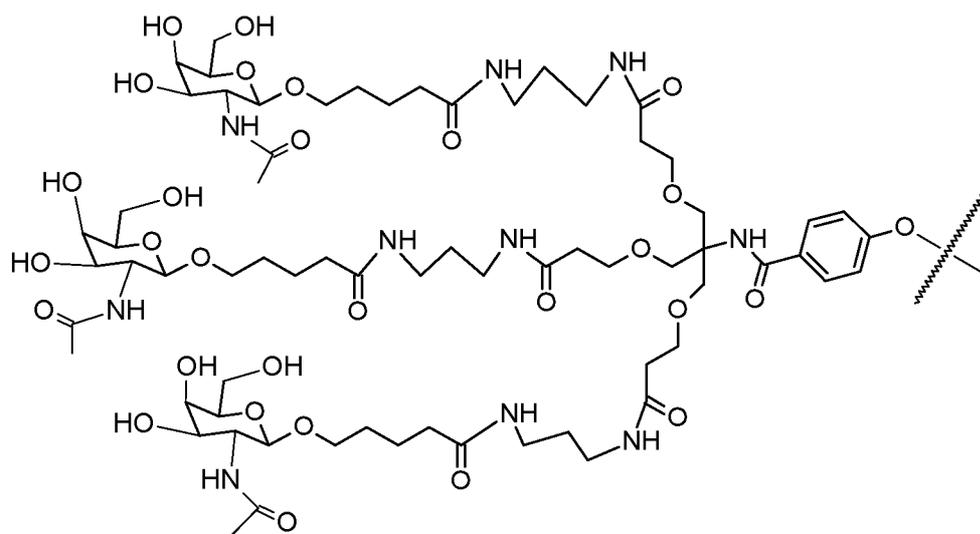
- 10 ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1019a(i)).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1019b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:

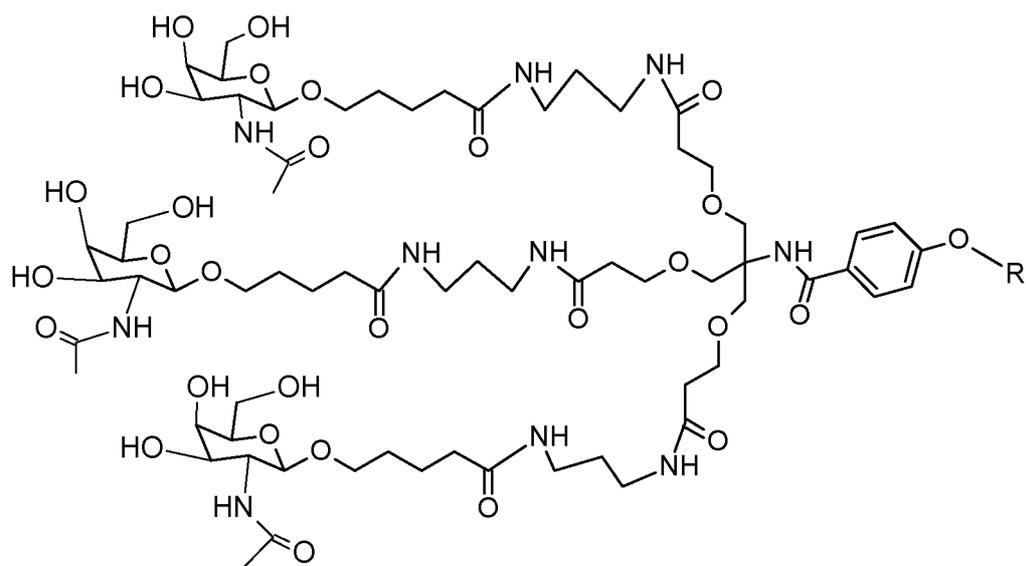


(Структура

1020).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

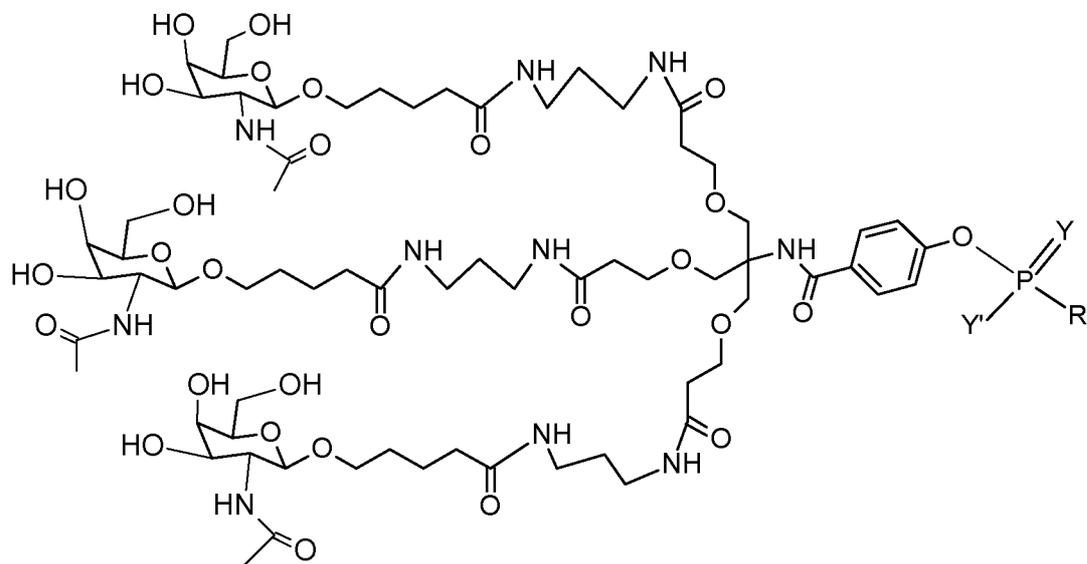
10



, где R

включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него.
(Структура 1020a).

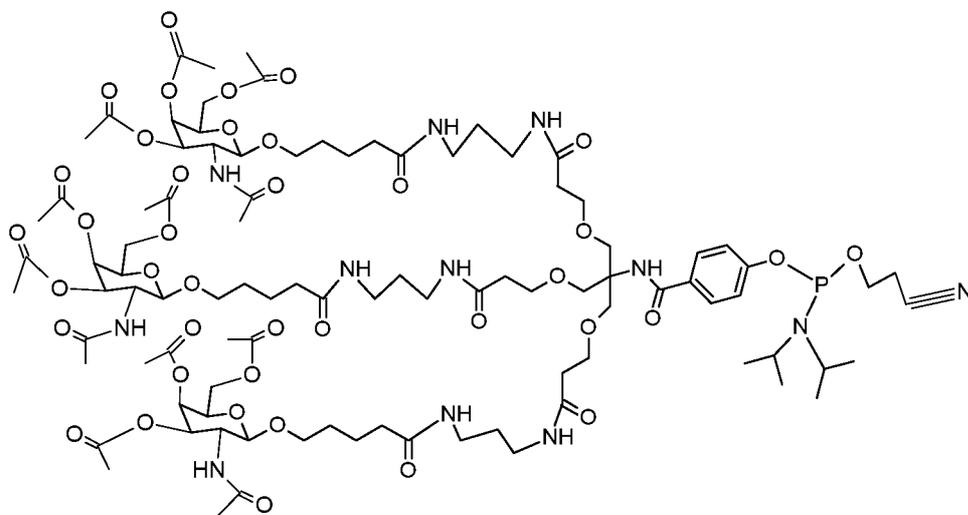
- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R

- 10 состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH. (Структура 1020a(i)).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:

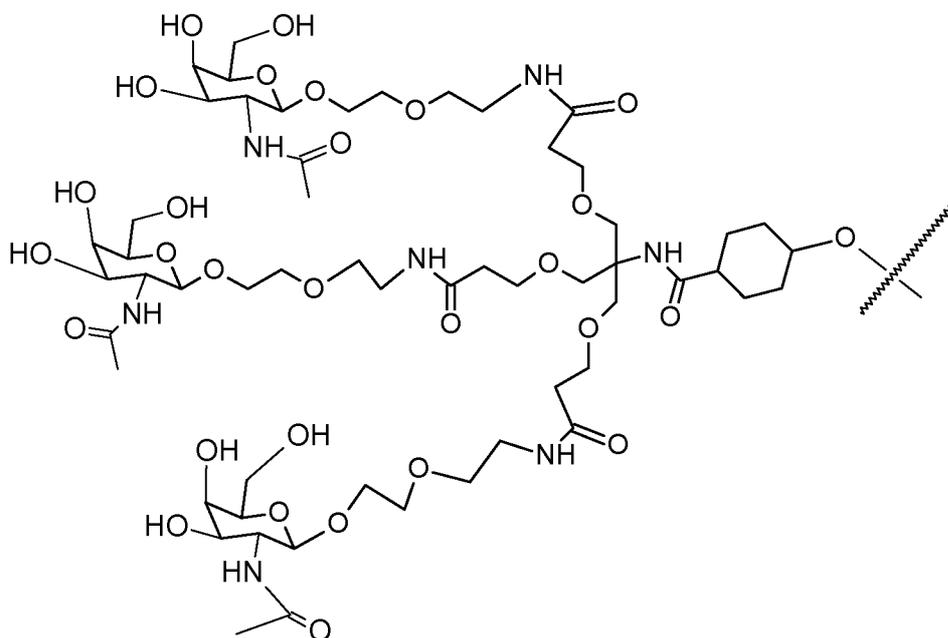


(Структура

1020b).

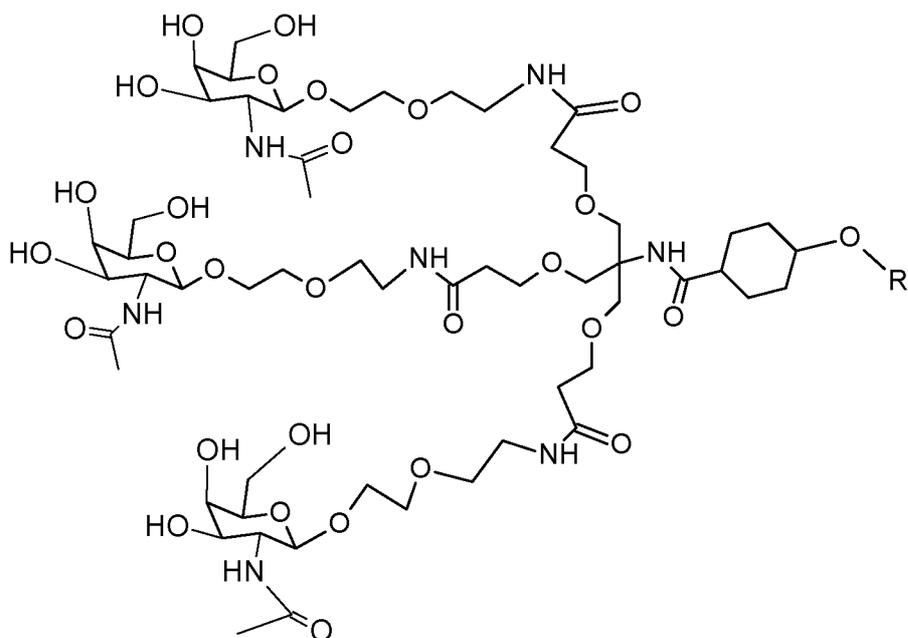
5

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1021).

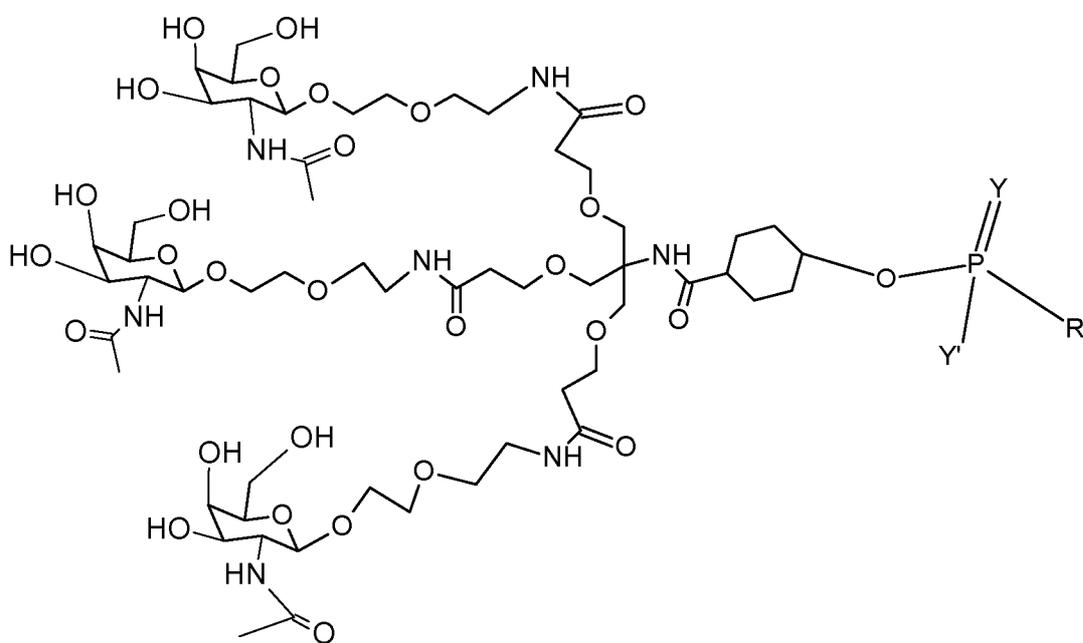
10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R включает

ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1021a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

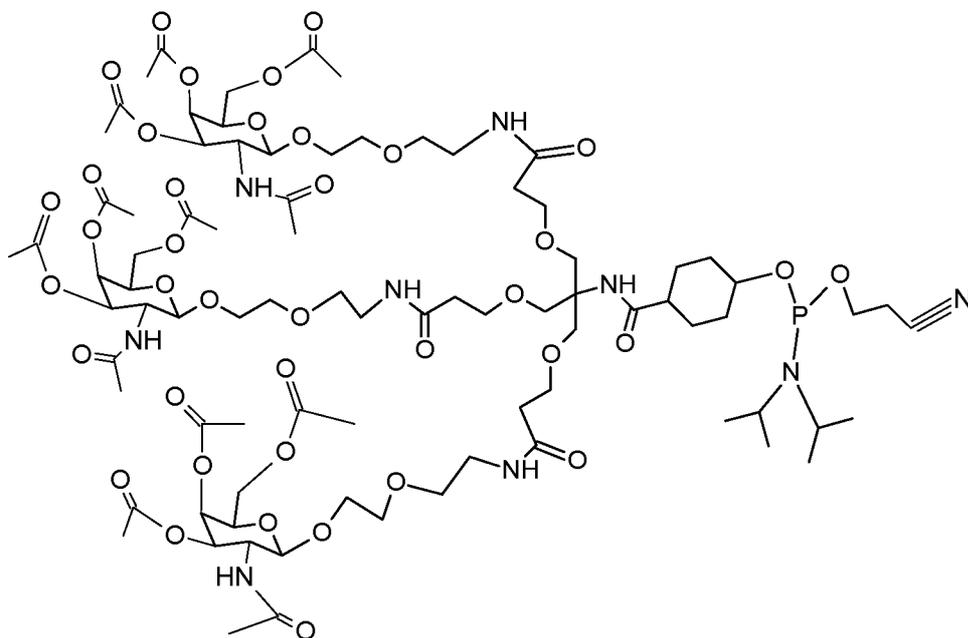


, где R

состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y

- 10 представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH. (Структура 1021a(i)).

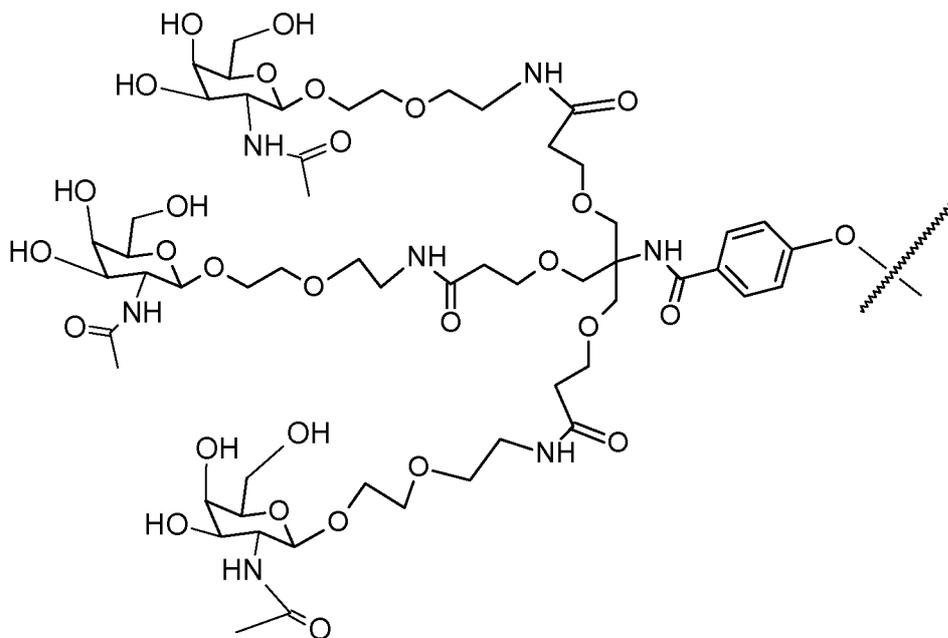
В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура

5 1021b).

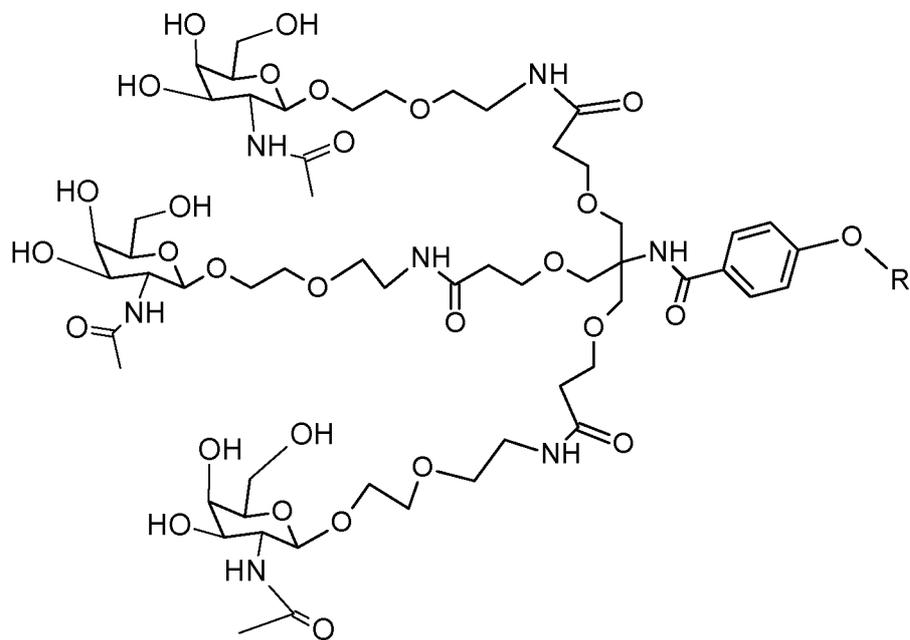
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1022).

10

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

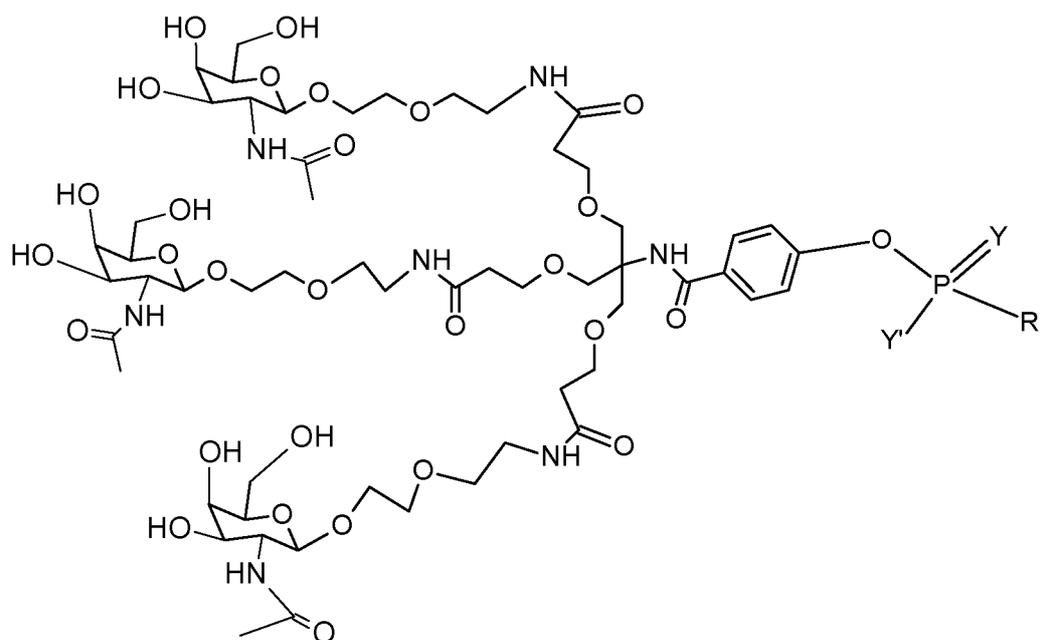


, где R включает

- 5 ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1022a).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

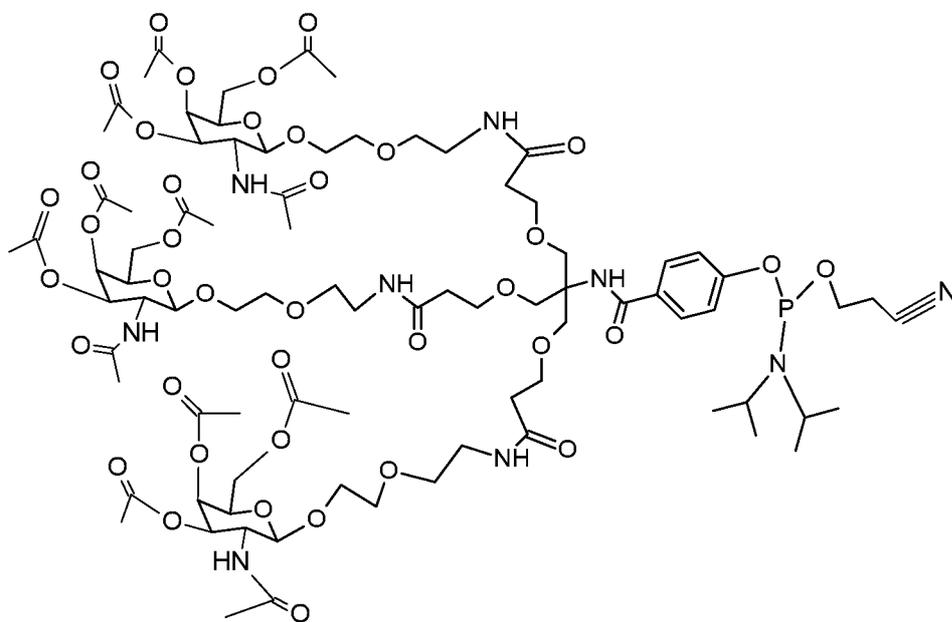
10



, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1022a(i)).

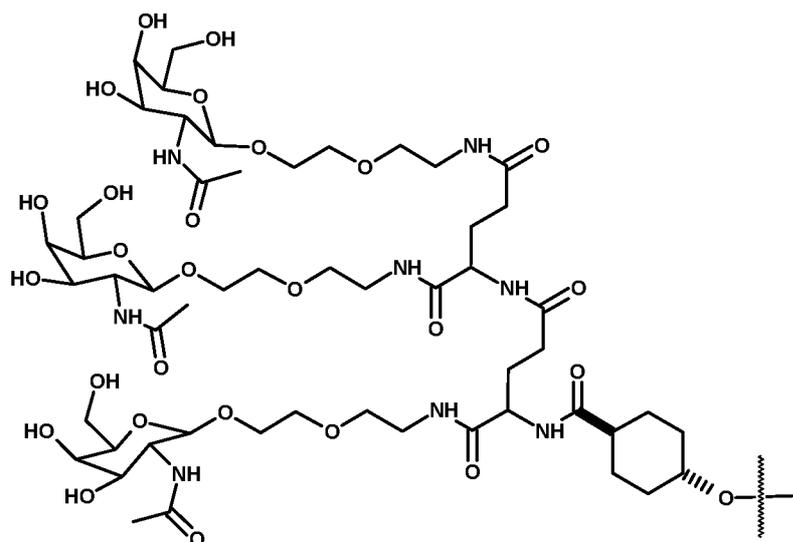
5

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1022b).

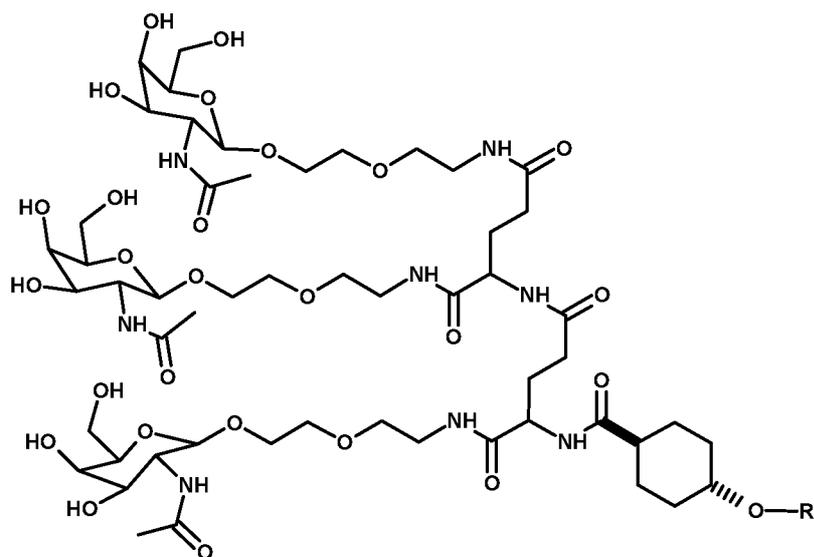
10 В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1023).

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную

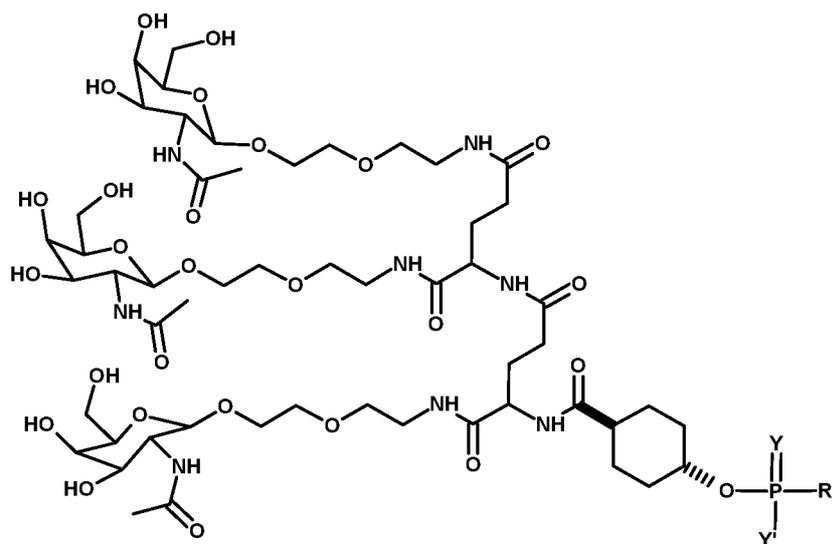
5 ниже:



, где R включает

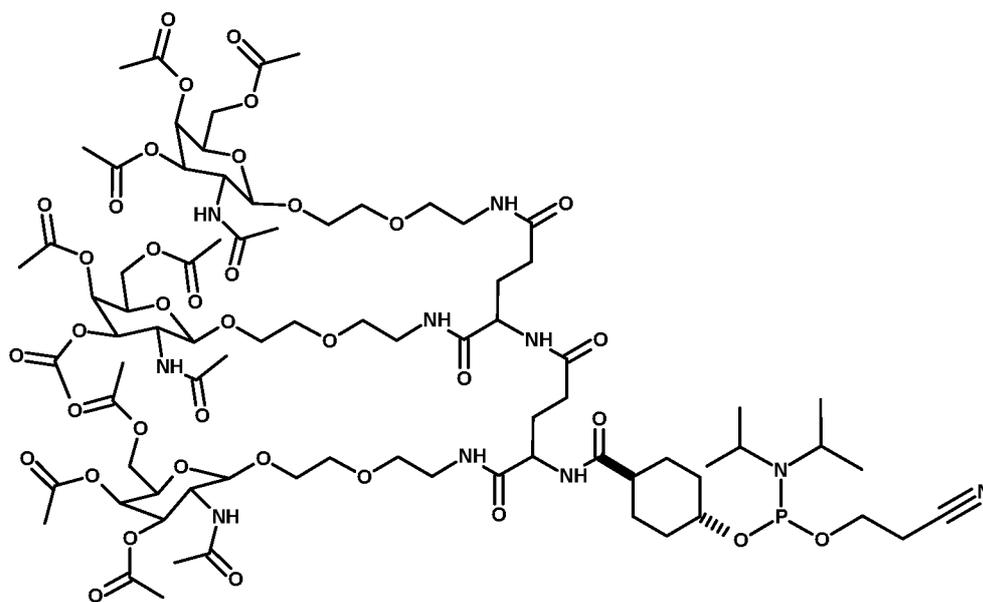
ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1023a).

10 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1023a(i)).

- 5 В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:

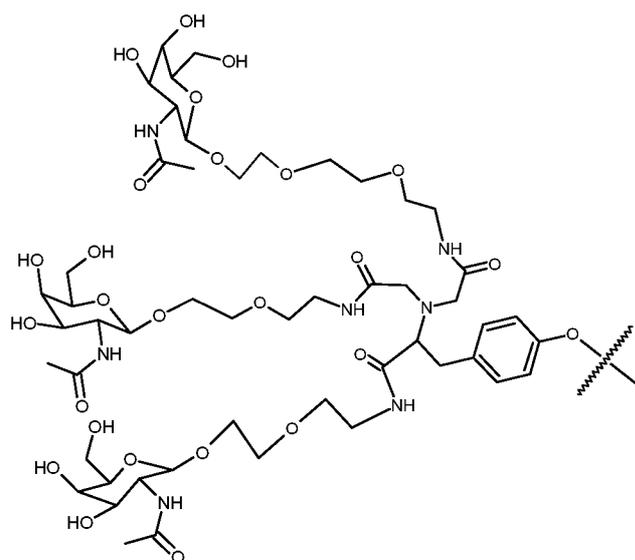


(Структура 1023b).

- 10 В некоторых вариантах реализации, раскрытых в настоящем документе, линкер нацеливающего лиганда может отсутствовать, при условии, что группа точки ветвления включает по меньшей мере одну арильную, циклоалкильную и/или гетероциклическую группу. В случае своего присутствия одна или более таких групп как арил, циклоалкил, и/или гетероциклил, расположенных в пределах группы точки

ветвления служат в качестве групп, заменяющей линкер. В некоторых вариантах реализации одна или более арильных, циклоалкильных и/или гетероциклических групп в пределах группы точки ветвления расположены между центральной точкой (точками) соединения группы точки ветвления и ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

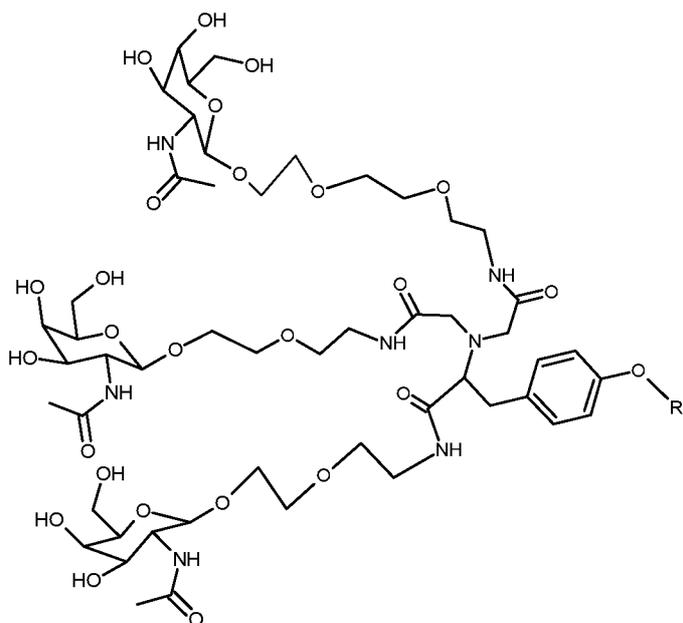
В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:



(Структура 1024).

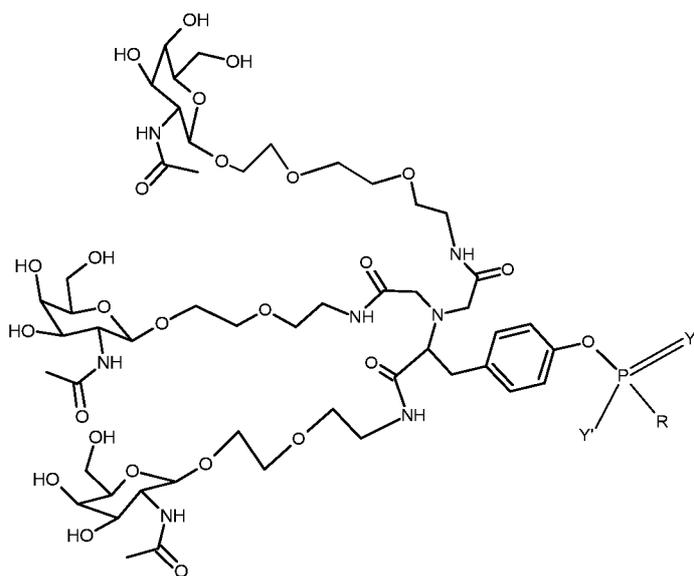
10

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1024a).

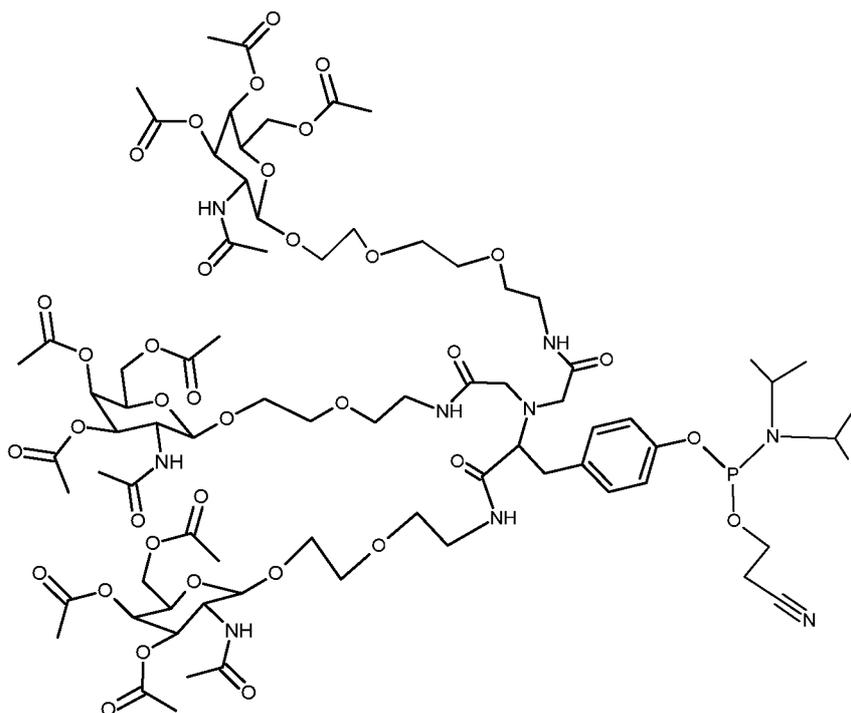
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



, где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O', S' или NH'. (Структура 1024a(i)).

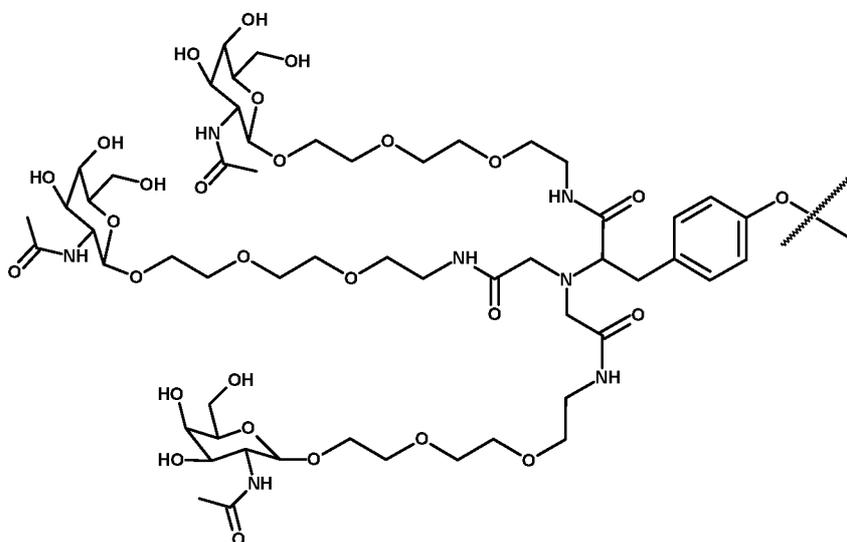
10

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1024b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:

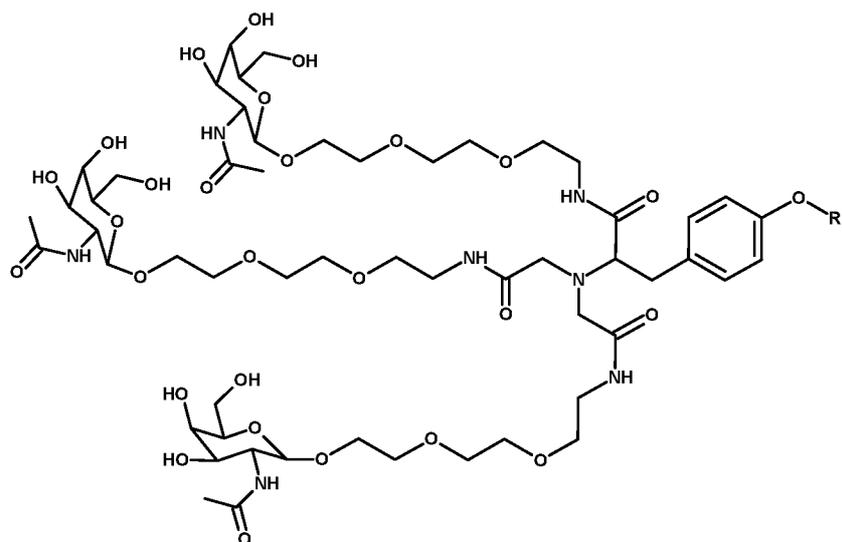


5

(Структура 1025).

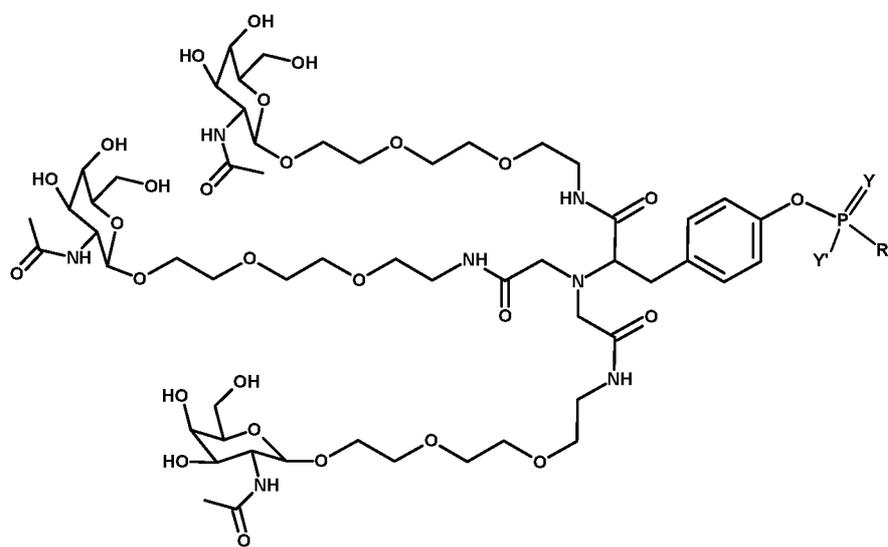
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

10



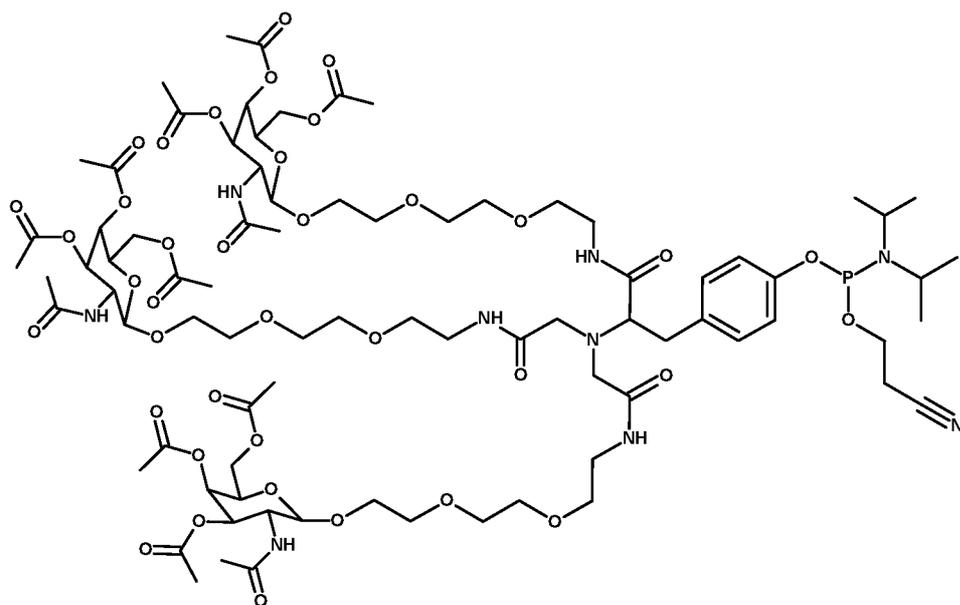
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1025a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



- , где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O, S или NH. (Структура 1025a(i)).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:

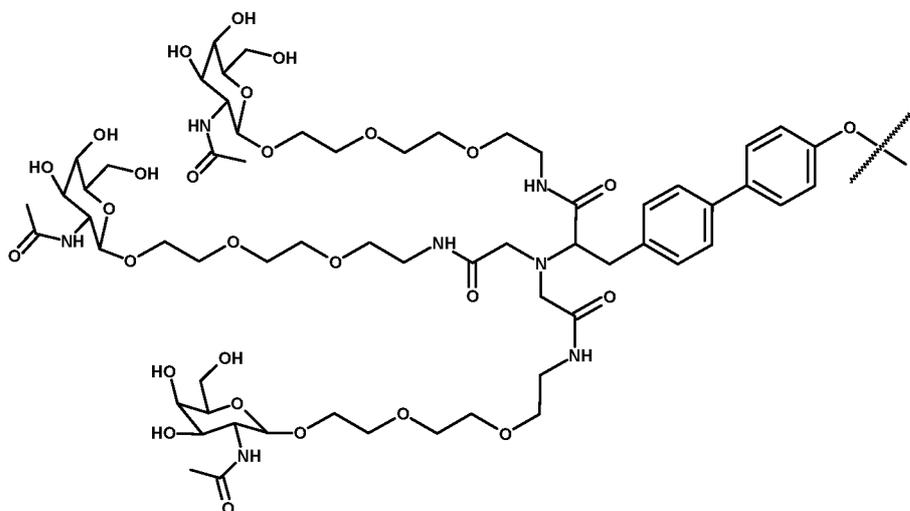


(Структура

1025b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:

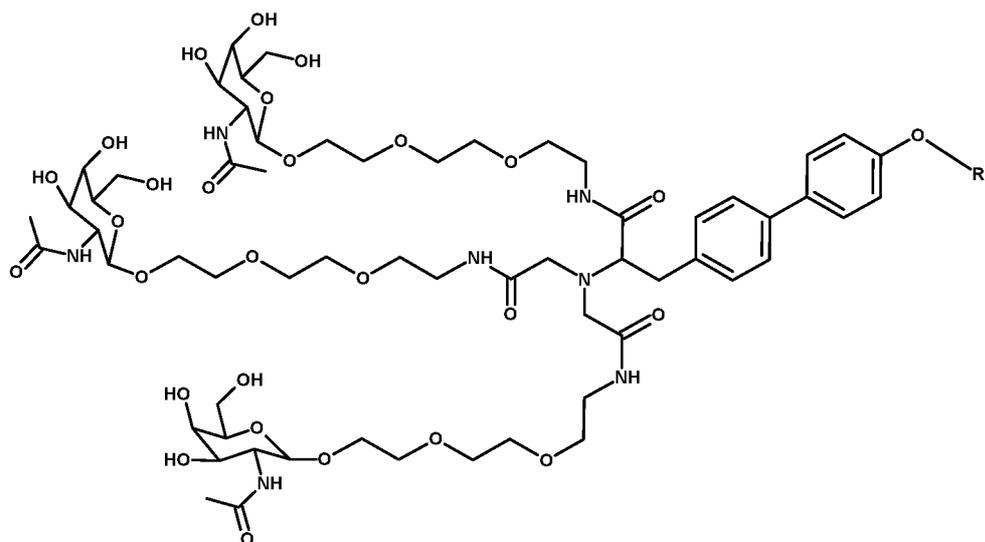
5



(Структура 1026).

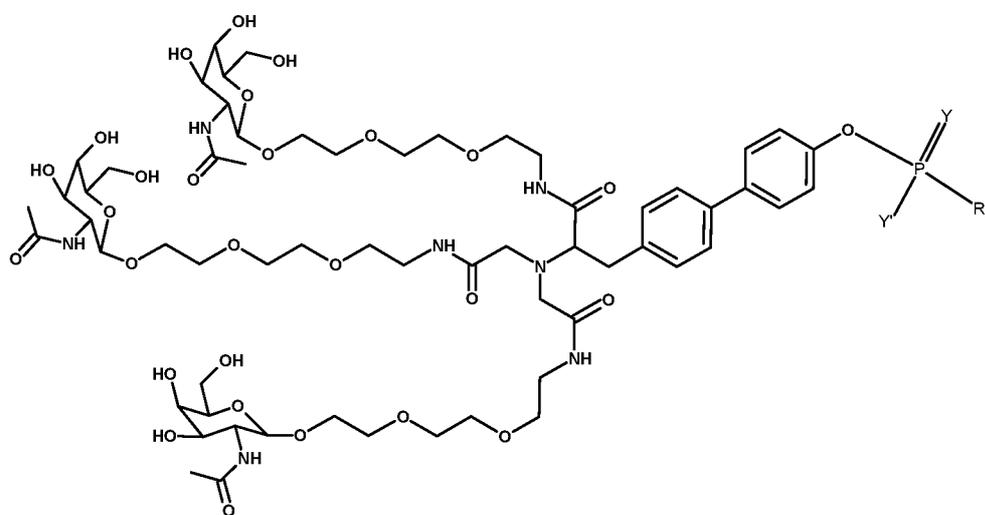
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

10



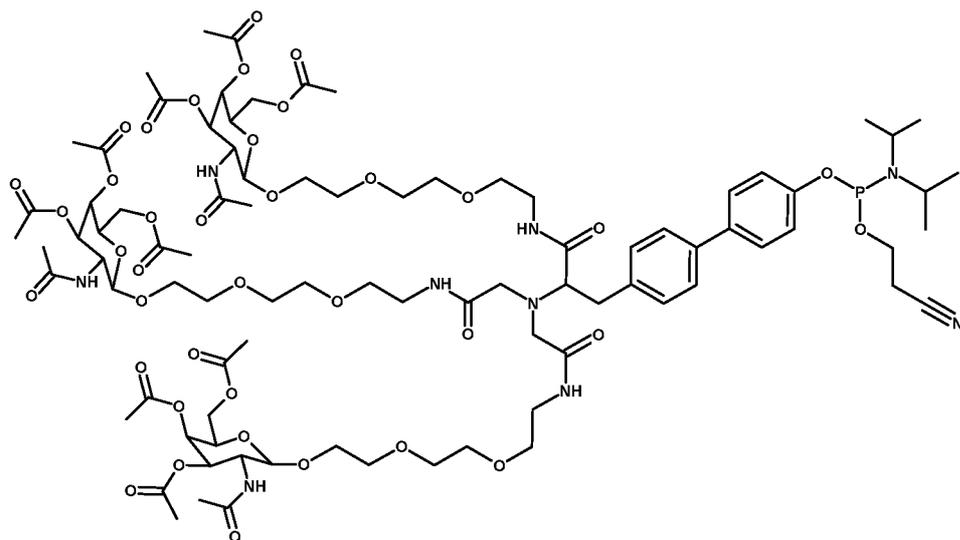
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1026a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



- 10 , где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1026a(i)).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:

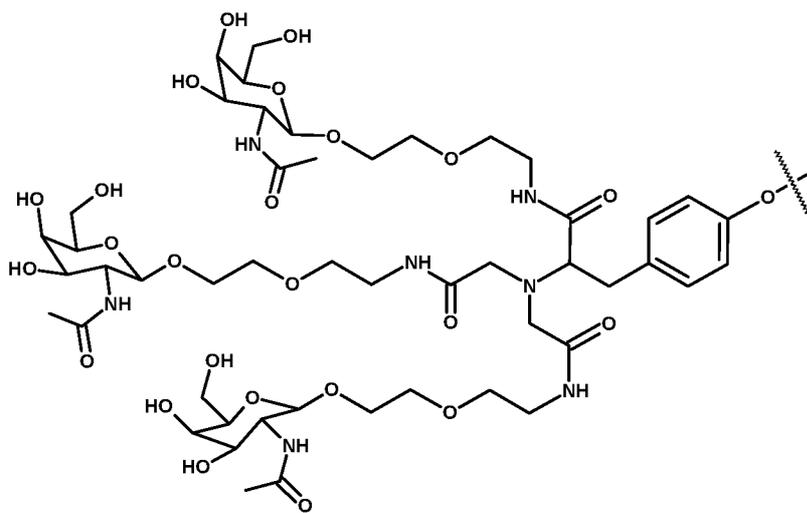


(Структура

1026b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет структуру, представленную ниже:

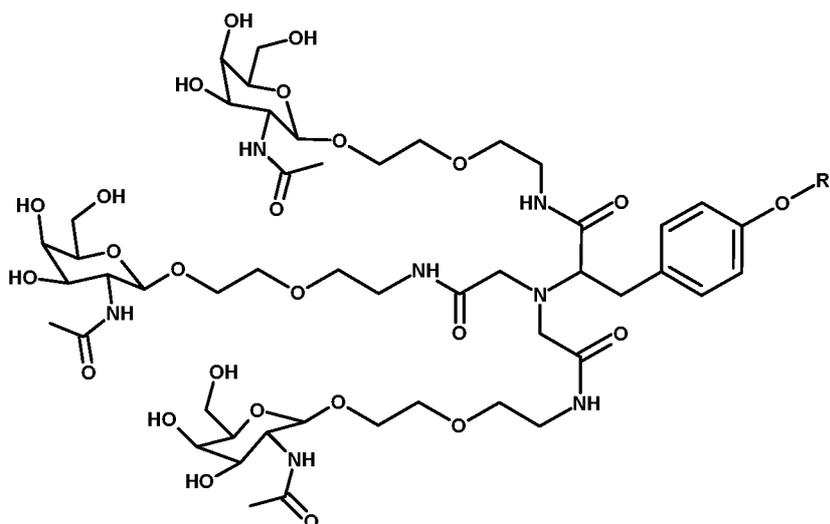
5



(Структура 1027).

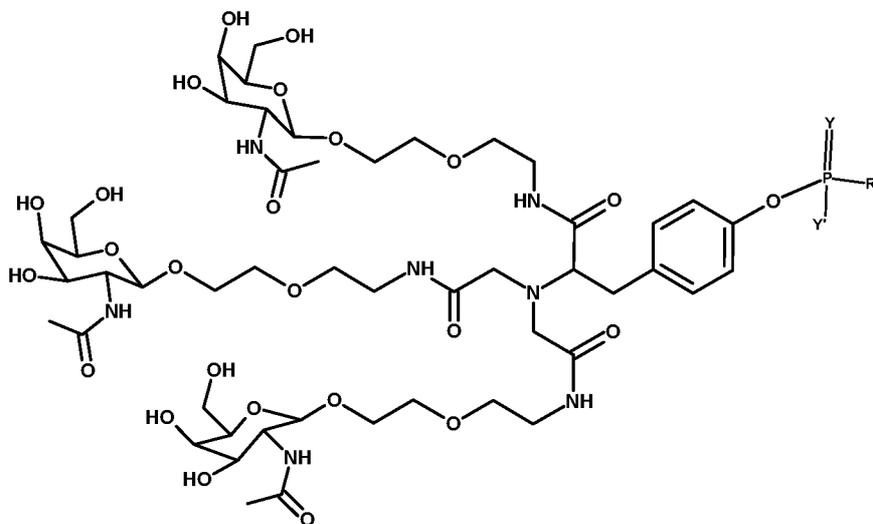
В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:

10



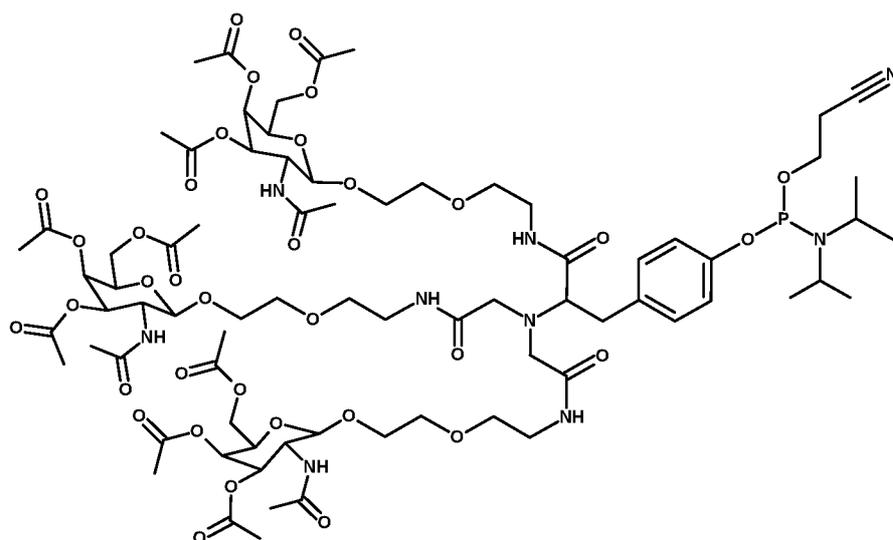
, где R включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или состоит из него. (Структура 1027a).

- 5 В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение связано с нацеливающим лигандом и имеет структуру, представленную ниже:



- , где R состоит из или включает ингибирующее экспрессию олигомерное соединение; Y представляет собой O или S; и Y' представляет собой O⁻, S⁻ или NH⁻. (Структура 1027a(i)).

В некоторых вариантах реализации связывающий лиганд представляет собой фосфорамидит-содержащее соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



(Структура 1027b).

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд имеет форму галактозного кластера. В настоящем тексте галактозный кластер включает Нацеливающий лиганд, содержащих от двух до четырех производных галактозы на конце. В настоящем тексте термин производное галактозы включает и галактозу, и производные галактозы, характеризующиеся аффинностью к рецептору асиалогликопротеинов, равную или большую, чем аффинность галактозы. Производное галактозы представляет собой сахаридный сахар, представляющий собой один из видов нацеливающего фрагмента.

10 Концевое производное галактозы может быть связан с соединительным фрагментом через С-1 углерод сахара.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд состоит из трех концевых галактозаминов или производных галактозамина (таких как N-ацетилгалактозамин), каждый из которых обладает аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает три концевых N-ацетилгалактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд состоит из четырех концевых галактозаминов или производных галактозамина (таких как N-ацетилгалактозамин), каждый из которых обладает аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд включает четыре концевых N-ацетилгалактозамина (GalNAc или NAG) в качестве нацеливающих фрагментов.

В некоторых вариантах реализации каждый нацеливающий фрагмент включает производное галактозамина, которое представляет собой N-ацетилгалактозамин. Другие сахараиды, обладающие аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору, которые могут применяться в качестве нацеливающих фрагментов, могут быть выбраны из списка, включающего: галактозу, галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-н-бутаноилгалактозамин и N-изо-бутаноилгалактозамин. Аффинности многочисленных производных галактозы к асиалогликопротеиновому рецептору изучены (см., например: Iobst, S.T., Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686) или могут быть легко определены с использованием методов, хорошо известных и широко применяемых в данной области.

Термины, обычно применяемые в данной области к трем концевым N-ацетилгалактозаминам, включают трехантенный, трехвалентный и тримерный (тример).

Термины, обычно применяемые в данной области в отношении четырех концевых N-ацетилгалактозаминов включают «тетраантенный», «тетравалентный» и «тетрамерный».

Олигомерные соединения

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, могут быть связаны с олигомерным соединением. В некоторых вариантах реализации олигомерное соединение представляет собой ингибирующее экспрессию олигомерное соединение. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи. В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой одонитевый олигонуклеотид. Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения можно синтезировать с применением способов, обычно применяемых в данной области.

Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения могут включать один или более модифицированных нуклеотидов. Нуклеотидное основание (или нуклеосахаридное основание) представляет собой гетероциклическое пиримидиновое или пуриновое соединение, такие соединения входят в состав всех нуклеиновых кислот и включают аденин (A), гуанин (G), цитозин (C), тимин (T) и урацил (U). В настоящем тексте термин “нуклеотид” может включать модифицированный нуклеотид или миметик нуклеотида, участок без азотистого основания или суррогатный заменяющий фрагмент. В настоящем тексте “модифицированный нуклеотид” представляет собой нуклеотид, миметик нуклеотида, участок без азотистого основания или суррогатный заменяющий фрагмент, отличный от рибонуклеотида (2'-гидроксилнуклеотида). В некоторых вариантах реализации модифицированный нуклеотид включает 2'-модифицированный нуклеотид (т.е., нуклеотид с группой, отличной от гидроксильной группы, в положении 2' пятичленного кольца сахара). Модифицированные нуклеотиды включают следующие, но не ограничиваются ими: 2'-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метилнуклеотиды (представленные в настоящем документе строчной буквой 'n' в нуклеотидной последовательности), 2'-дезоксидезокси-2'-фторнуклеотиды (представленные в настоящем документе как Nf, также обозначаемые в настоящем документе как 2'-фторнуклеотид), 2'-дезоксинуклеотиды (представленные в настоящем документе как dN), 2'-метоксиэтил (2'-О-2-метоксипропил) нуклеотиды, (представленные в настоящем документе как NM или 2'-MOE), 2'-аминонуклеотиды, 2'-алкилнуклеотиды, 3' - 3' связи (инвертированные) нуклеотиды (представленные в настоящем документе как invdN, invN, invn, invX), неприродные основания, включая нуклеотиды, закрытые нуклеотиды, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты, 2',3'-секонуклеотидные миметики (незакрытые аналоги нуклеосахаридных оснований, обозначенные в настоящем документе как N_{UNA} или NUNA), закрытые нуклеотиды (представленные в настоящем документе как N_{LNA} или NLNA), 3'-О-метокси (с межнуклеотидной связью по положению 2') нуклеотид (представленный в настоящем документе как 3'-OMen), 2'-F-арабинонуклеотиды (представленные в настоящем документе как NfANA или Nf_{ANA}), морфолиннуклеотиды, винилфосфонатдезоксирибонуклеотид (представленный в настоящем документе как vpdN), винилфосфонатнуклеотиды и нуклеотиды без нуклеозидного основания (представленные в настоящем документе как X или Ab). Не обязательно, чтобы все положения данного соединения были модифицированы одинаковым образом. Наоборот, можно ввести несколько модификаций в одно ингибирующее экспрессию олигомерное соединение или даже в

его единственный нуклеотид. Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения можно синтезировать и/или модифицировать средствами, известными в данной области. Модификация каждого нуклеотид независима от модификации других нуклеотидов.

5

Модифицированные нуклеос основания включают синтетические и природные нуклеос основания, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины, N-2-, N-6-, и O-6-замещенные пурины (например, 2-аминопропиладенин), 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, содержащие 6-метил и другие алкилы производные аденина и гуанина, содержащие 2-пропил и другие алкилы производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галоурацил, 5-галоцитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало-, 8--амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-замещенные урацилы и цитозины (например, 5-гало-урацилы и цитозины (например, 5-бромуррацил и 5-бромцитозин), 5-трифторметил урацил, 5-трифторметил цитозин), 7-метилгуанин, 7-метиладенин, 8-азагуанин, 8-азааденин, 7-дезазагуанин, 7-дезазааденин, 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

20

Для ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, описанных в настоящем документе, любые модифицированные нуклеотиды могут быть связаны фосфат-содержащими или не содержащими фосфат ковалентными связями. Модифицированные межнуклеозидные связи или каркасы включают следующие, но не ограничиваются ими: 5'-фосфоротиоатная группа (обозначаемая в настоящем документе как строчная 's' перед нуклеотидом, как в sN, sn, sNf или sdN), хиральные фосфоротиоаты, тиофосфат, фосфордитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкил-фосфотриэфиры, фосфонаты метила и других алкилов, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолино-связи, боранофосфаты, содержащие обычные 3'-5'-связи, 2'-5'-связанные аналоги боранофосфонатов и боранофосфонатов с инвертированной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. В некоторых вариантах реализации с

30

модифицированной межнуклеотидной связи или каркасе отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеотидные связи без атома фосфора включают следующие, но не ограничиваются ими: связи между сахарами на основе короткоцепочечных алкилов или циклоалкилов, смешанные связи между сахарами на основе гетероатома и алкила или циклоалкила, или одну или более связей между сахарами на основе короткоцепочечных гетероатомных фрагментов или циклоалкилов. В некоторых вариантах реализации модифицированные межнуклеозидные каркасы включают следующие, но не ограничиваются ими: силоксановые каркасы, сульфидные каркасы, сульфоксидные каркасы, сульфоновые каркасы, формацетиловые и тиоформацетиловые каркасы, метилен формацетиловые и тиоформацетиловые каркасы, алкен-содержащие каркасы, сульфаматные каркасы, метилениминовые и метиленигидразиновые каркасы, сульфонатные и сульфонамидные каркасы, амидные каркасы, и другие каркасы, содержащие смесь компонентов N, O, S и CH₂.

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи и включает смысловую нить и антисмысловую нить, которые по меньшей мере частично комплементарны (по меньшей мере на 70% комплементарны) друг другу. Антисмысловая нить содержит участок, имеющий последовательность, которая полностью комплементарна (на 100% комплементарна) или по меньшей мере по существу комплементарна (по меньшей мере на 85% комплементарна) последовательности мРНК-мишени. Длина каждой из смысловой и антисмысловой нитей двунитевого агента РНКи может составлять от 16 до 30 нуклеотидов в длину. Смысловая и антисмысловая нити могут иметь одну длину или разную длину. В некоторых вариантах реализации длина смысловой нити составляет примерно 19 нуклеотидов, а длина антисмысловой нити составляет примерно 21 нуклеотид. В некоторых вариантах реализации длина смысловой нити составляет примерно 21 нуклеотид, а длина антисмысловой нити составляет примерно 23 нуклеотидов. В других вариантах реализации длина каждой из смысловой и антисмысловой нитей составляет независимо 17-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации длина и антисмысловой нитей составляет 21-26 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации длина и смысловой, и антисмысловой нитей составляет 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации длина каждой из смысловой и антисмысловой нитей составляет независимо от 17 до 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации двунитевый агент РНКи содержит дуплекс длиной примерно 16,

17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов. Длина участка полной или по существу полной комплементарности между смысловой нитью и антисмысловой нитью составляет обычно 15-25 (например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов) и располагается на 5'-конце антисмысловой нити или вблизи от него.

5

Ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые конъюгируют с лигандами, раскрытыми в настоящем документе, необязательно и дополнительно включают 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дополнительных нуклеотидов (в виде удлинения) на 3'-конце, 5'-конце или и на 3'-, и на 5'-концах основных последовательностей. Эти дополнительные нуклеотиды, если они присутствуют могут быть или не быть комплементарны соответствующей последовательности в мРНК-мишени.

10

В некоторых вариантах реализации если двунитевый агент РНКи конъюгирован с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами, дополнительные нуклеотиды смысловой нити, если они присутствуют, могут быть или не быть идентичными соответствующей последовательности в мРНК-мишени. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой нити, если они присутствуют, могут быть комплиментарны или некомплементарны соответствующим дополнительным нуклеотидам смысловой нити, если таковые присутствуют.

20

Двунитевые агенты РНКи могут быть образованы путем соединения антисмысловой нити со смысловой нитью.

25

В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с агентом РНКи на 3' или 5' конце либо смысловой, либо антисмысловой нити агента РНКи. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с 5'- концом смысловой нити. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с 3'-концом смысловой нити. В некоторых вариантах реализации нацеливающий лиганд связан с агентом РНКи лабильной, расщепляемой или обратимой связью. В некоторых вариантах реализации лабильная, расщепляемая или обратимая связь является частью расщепляемого фрагмента, добавляемого между агентом РНКи и нацеливающим лигандом.

30

В некоторых вариантах реализации ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой однонитевый олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации однонитевый олигонуклеотид ингибирует экспрессию мРНК-мишени по механизму РНК-интерференции. В некоторых вариантах реализации однонитевые олигонуклеотиды снижают экспрессию нуклеиновой кислоты-мишени по механизму, отличному от РНК-интерференции.

В некоторых вариантах реализации уровень экспрессии гена и/или уровень мРНК мишени у субъекта, которому вводят описанный нацеливающий лиганд конъюгированный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, снижается на по меньшей мере примерно 5%, например, по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом до введения или субъектом, не получающим конъюгат с нацеливающим лигандом. Уровень экспрессии гена и/или уровень мРНК у субъекта может снижаться в клетке, группе клеток и/или ткани субъекта. В некоторых вариантах реализации уровень белка у субъекта, которому ввели нацеливающий лиганд, конъюгированный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, снижается на по меньшей мере примерно 5%, например, по меньшей мере примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом до введения конъюгата нацеливающего лиганда или субъектом, не получающим конъюгат с нацеливающим лигандом. Уровень белка у субъекта может снижаться в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или другой жидкости субъекта. Снижение экспрессии гена, уровней мРНК или белка можно оценивать любыми способами, известными в данной области. Снижение или уменьшение уровня мРНК и/или уровня белка обобщенно называется ингибированием, уменьшением или снижением экспрессии гена-мишени.

Конкретные ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые можно применять с раскрытыми нацеливающими лигандами, известны в данной области. В частности, многочисленные документы раскрывают ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые можно конъюгировать с нацеливающими лигандами, раскрытыми в настоящем документе, для доставки композиции в печень. Неограничивающие примеры включают в заявке на патент США под серийным

номером 15/281,309 с названием “Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of LPA” (“Композиции и способы для ингибирования гена LPA”), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является ген человеческого аполипопротеина(a) [LPA] (для ингибирования экспрессии белка apo(a), который является частью частицы липопротеина (a), и, соответственно, частицы липопротеина(a) (Lp(a))), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Ген apo(a) [LPA] экспрессируется у людей и приматов, отличных от человека, в основном в печени. Аналогично, например, в заявке на патент США под серийным номером 15/229,314 с названием “RNAi Therapy for Hepatitis B Virus Infection” (РНКи-терапия для лечения инфекции вирусом гепатита В”), которая также включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является вирус гепатита В, которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Вирус гепатита В представляет собой строго гепатотрофный, содержащий двунитевую ДНК вирус и относится к гепаднавирусам, принадлежащим к семейству *Hepadnaviridae*. Далее, в качестве еще одного примера, в заявке на патент США под серийным номером 15/229,314 с названием “Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of Factor XII” (“Композиции и способы для ингибирования экспрессии гена Фактора XII”), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения мишенью которых является ген Фактора XII (или Фактора 12, F12), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Фактор XII представляет собой сериновую протеазу, экспрессирующуюся в основном в печени и присутствующую в крови. Дополнительно, в качестве еще одного примера, в заявке на патент США под серийным номером 14/740,307 с названием “Compositions and Methods for Inhibiting Gene Expression of Alpha-1 AntiTrypsin” (“Композиции и способы для ингибирования экспрессии гена альфа-1 антитрипсина”), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты различные двунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является ген антитрипсина альфа-1 (или ААТ), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. ААТ представляет собой ингибитор протеаз, принадлежащий к надсемейству серпинов, и нормальный

белок ААТ синтезируется в основном гепатоцитами печени и секретируется в кровь. Далее, В публикации WO 2016/01123 с названием “Organic Compositions to Treat APOC3-Related Diseases” (“Органические композиции для лечения связанных с АРОС3 заболеваний”), которая полностью включена в настоящий документ посредством
5 ссылки, раскрыты различные дунитевые ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, мишенью которых является человеческий аполипопротеин III (АРОС3), которые подходят для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Аполипопротеин С-III представляет является компонентом липопротеинов, который, как считают, ингибирует поглощение богатых
10 триглицеридами частиц печенью. В данной области можно также найти дополнительные документы, в которых раскрыты различные терапевтические соединения, включая ингибирующие экспрессию олигомерные соединения, которые могут быть пригодны для применения с раскрытыми в настоящем документе нацеливающими лигандами. Они включают композиции, для которых было бы
15 желательно нацеливание в печень, но не ограничиваются ими.

Фармацевтические композиции и составы

Нацеливающие лиганды, раскрытые в настоящем документе, если они связаны с олигомерным соединением, можно применять для лечения субъекта (например,
20 человека или млекопитающего) с болезнью или нарушением, при котором было бы полезно введение этого соединения. В некоторых вариантах реализации раскрытые в настоящем документе нацеливающие лиганды, связанные с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, можно применять для лечения субъекта (например, человека) с болезнью или нарушением, при которых снижение или
25 ингибирование экспрессии мРНК-мишени было бы полезным. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любых одного или более ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, таких как агент РНКи, который связан с нацеливающим лигандом, раскрытым в настоящем документе. Субъект может представлять собой человека, пациента или пациента-человека. Субъект может быть
30 взрослым, подростком, ребенком или младенцем. Описанные фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением можно применять для обеспечения способов терапевтического лечения заболеваний. Такие способы включают введение

фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, человеку или животному.

5 Фармацевтические композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, могут снижать уровень мРНК-мишени в клетке, группе клеток, группе клеток, ткани или
организме субъекта, включая: введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе ингибирующего экспрессию олигомерного соединения, которое связано с нацеливающим лигандом, что
10 обеспечивает ингибирование экспрессии мРНК-мишени у субъекта. В некоторых вариантах реализации субъект предварительно идентифицирован как субъект с патологической повышающей регуляцией гена-мишени в клетке или ткани-мишени.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции включают по меньшей мере одно ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с
15 нацеливающим лигандом. Эти фармацевтические композиции особенно полезны в ингибировании экспрессии мРНК-мишени в клетке, группе клеток, ткани или организме - мишени. Фармацевтические композиции можно применять для лечения субъекта с болезнью или нарушением, при которых было бы полезно снижение уровня мРНК-мишени или ингибирование экспрессии гена-мишени. Фармацевтические
20 композиции можно применять для лечения субъекта с риском развития заболевания или нарушения, при котором было бы полезно снижение уровня мРНК-мишени или ингибирование экспрессии гена-мишени. В одном варианте реализации Способ включает введение композиции, включающей нацеливающий лиганд, описанный в настоящем документе, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным
25 соединением, таким как агент РНКи, субъекту, которого лечат. В некоторых вариантах реализации одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ (включая основы, носители, разбавители, и/или полимеры для доставки) добавляют в фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, благодаря чему получают
30 фармацевтические составы (препараты), подходящие для доставки человеку *in vivo* .

В некоторых вариантах реализации описанные фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд, связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, применяют для лечения или регуляции клинических

проявлений, связанных с экспрессией мРНК-мишени. В некоторых вариантах реализации терапевтически или профилактически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, предотвращении или регуляции. В некоторых вариантах реализации введение
5 любого из конъюгированных лигандов, ковалентно связанных с олигомерным соединением, можно применять для снижения числа, тяжести и/или частоты симптомов заболевания у субъекта.

Описанные фармацевтические композиции, включающие нацеливающий лиганд,
10 связанный с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением, могут применяться для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта с заболеванием, при котором снижение или ингибирование экспрессии мРНК-мишени могло бы принести пользу. В некоторых вариантах реализации субъекту вводят терапевтически эффективное количество одной или более фармацевтических
15 композиций, содержащих ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, такое как агент РНКи, связанный с нацеливающим лигандом, описанным в настоящем документе, что обеспечивает лечение указанного симптома. В других вариантах реализации субъекту вводят профилактически эффективное количество одного или более ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, что обеспечивает
20 предотвращение по меньшей мере одного симптома.

В некоторых вариантах реализации уровень экспрессии гена и/или уровень мРНК-мишени у субъекта, которому вводят ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим уменьшается на по меньшей мере примерно
25 5%, например, на по меньшей мере примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом, не получающим фармацевтическую композицию. Уровень экспрессии гена у субъекта может снижаться в клетке, группе клеток и/или ткани субъекта. В некоторых вариантах реализации снижается уровень мРНК. В других вариантах
30 реализации снижается уровень экспрессируемого белка. В некоторых вариантах реализации уровень белка у субъекта, которому вводят ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим лигандом, раскрытым в настоящем документе, снижается на по меньшей мере примерно 5%, например, на по меньшей мере примерно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%,

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по сравнению с субъектом, не получающим фармацевтическую композицию. Снижение экспрессии, уровней мРНК или уровней белка можно оценивать любыми способами, известными в данной области. Уменьшение или снижение уровня мРНК и/или уровня белка в целом называют в настоящем описании ингибированием, снижением или уменьшением экспрессии гена-мишени.

Путь введения представляет собой путь, которым ингибирующее экспрессию олигомерное соединение приводят в контакт с организмом. В целом, способы введения лекарственных средств и нуклеиновых кислот для лечения млекопитающего хорошо известны в данной области техники, и их можно использовать для введения композиций, описанных в настоящем документе. Ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с описанными в настоящем документе нацеливающими лигандами, можно вводить любым подходящим путем в препарате, специально предназначенном для конкретного пути. Соответственно, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции можно вводить путем инъекции, например, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутрь сустава или интраперитонеально (внутрибрюшинно). В некоторых вариантах реализации описаны фармацевтические композиции, и их можно вводить путем ингаляции.

Фармацевтические композиции, включающие ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, связанное с нацеливающим лигандом, описанным в настоящем документе, можно доставлять в клетку, группу клеток, ткань или субъекту с применением методик доставки олигонуклеотидов, известных в данной области техники. В целом, любой подходящий способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*), общепринятый в данной области техники, можно адаптировать для применения с описанными в настоящем документе композициями. Например, доставку можно осуществлять путем местного введения (например, путем прямой инъекции, имплантации или топического введения), системного введения или подкожного, внутривенного, перорального, интраперитонеального или парентерального способов, включая интракраниальное (например, внутрижелудочковое, внутривентрикулярное и интратекальное), внутримышечное, чрескожное введение, введение через дыхательные пути (в виде аэрозоля), интраназальное, ректальное или местное (включая

трансбуккальное и подъязычное) введение. В некоторых вариантах реализации композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

5 Соответственно, в некоторых вариантах реализации описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут включать одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в форме для введения субъекту.

10 В настоящем тексте фармацевтическая композиция или медикамент включает фармакологически эффективное количество фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных терапевтических соединений и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (вспомогательные вещества) представляют собой вещества, отличные от активного фармацевтического ингредиента (АФИ, 15 терапевтического продукта, например, F12 агента РНКи), которые специально свлючают в систему доставки лекарственного средства. Вспомогательные вещества не проявляют или не должны проявлять терапевтический эффект в предполагаемой дозировке. Вспомогательные вещества могут служить для а) улучшения 20 технологичности системы доставки лекарственных средств во время получения, б) защиты, поддержания или увеличения стабильности, биодоступности или применимости АФИ у пациента, с) облегчения идентификации продукта, и/или d) улучшения одного или более из общей безопасности, эффективности или доставки АФИ при хранении или применении. Фармацевтически приемлемое вспомогательное 25 вещество являться или не являться инертным веществом.

Вспомогательные вещества включают следующие, но не ограничиваются ими: усилители всасывания, антиадгезивы, противовспениватели, антиоксиданты, связующие, буферные вещества, носители, покрытия, красители, вещества, 30 улучшающие доставку, полимеры для доставки, декстран, декстросу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, объемообразующие вещества, наполнители, вкусоароматические вещества, скользящие вещества, увлажняющие вещества, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие вещества, матрицы с замедленным

высвобождением, подсластители, загустители, регуляторы тоничности, основы, водоотталкивающие вещества и смачивающие вещества.

5 Фармацевтические композиции, подходящие для применения для инъекций, включают стерильные водные растворы (для водорастворимых веществ) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Подходящие носители для внутривенного введения включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, шт. Нью-Джерси, США) или фосфатный буферный раствор (ФБР). Они должны быть стабильны в условиях изготовления и хранения и должны быть защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Походящую 10 текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно чтобы состав включал изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннитол, сорбит, и хлорид натрия. 15 Прологированного всасывания инъекционных композиций можно достичь путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина. 20

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в необходимое количество подходящего растворителя с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Обычно дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа перечисленных 25 выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, способу получения включают вакуумную сушку и сублимационную сушку, которые позволяют получить порошок активного ингредиента в комбинации с любым дополнительным желательным ингредиентом из их раствора, предварительно подвергнутого стерильной фильтрации. 30

Составы, подходящие для внутрисуставного введения, могут быть выполнены в форме стерильного водного препарата лекарственного средства, которое может быть в микрокристаллической форме, например, в форме водной микрокристаллической суспензии. Лизосомные составы или системы, включающие биodeградируемый полимер, также можно применять для подготовки лекарственного средства как для внутрисуставного введения, так и для введения в глаза.

Формы, подходящие для топического введения, включая лечение глаз, включают жидкие или полужидкие препараты, такие как линименты, лосьоны, гели, формы для нанесения, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, такие как кремы, мази или пасты; или растворы или суспензии, такие как капли. Формы для топического применения на поверхности кожи могут быть получены путем диспергирования лекарственного средства дерматологически приемлемым носителем, таким как лосьон, крем, мазь или мыло. Пригодны носители, способные образовывать пленку или слой на коже, позволяющие локализовать применение и снижающие перемещение. Для топического введения на внутренние поверхности тканей, агент может быть диспергирован в жидком тканевом адгезиве или другом веществе, о котором известно, что оно повышает адсорбцию на тканевой поверхности. Например, может быть полезным применение растворов гидроксипропилцеллюлозы или фибриногена/тромбина. В качестве альтернативы можно применять покрытия для тканей в покрытиях, такие как пектин-содержащие составы.

Для ингаляционных средств лечения можно применять ингаляцию порошка (самопропеллирующие составы или составы в форме спрея), для дозирования которых могут применяться аэрозольный баллон, небулайзер или атомайзер. Такие составы могут быть представлены в форме тонкого порошка для легочного введения из устройства для порошковой ингаляции или самопропеллирующих формах для введения порошка. В случае самопропеллирующих растворов или форм спрея, В случае самопропеллирующих растворов или форм спрея желаемого эффекта можно достичь либо за счет выбора клапана с желаемыми характеристиками распыления (*m.e.*, способного выдавать спрей с желаемым размером частиц) или за счет введения активного ингредиента в качестве суспендированного порошка в частицы контролируемого размера. Для введения путем ингаляции соединения можно также

вводить в форме аэрозольного спрея из контейнера или диспенсера, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера.

5 Системное введение также может осуществляться посредством введения через слизистые оболочки или трансдермальными средствами. Для введения через слизистые оболочки или трансдермального введения, в форме применяют пенетранты, подходящие для барьера, который нужно пересечь. Такие пенетранты общеизвестны в соответствующей области и включают, например, предназначенные для введения через 10 слизистые оболочки, детергенты и соли желчных кислот. Введение через слизистые оболочки можно осуществлять с применением назальных спреев или суппозиториев. Для трансдермального введения активные соединения обычно включают в состав мази, мазей, гелей или кремов, как широко известно в данной области.

Активные соединения можно объединять с носителями, которые будут защищать это 15 соединение от быстрого выведения из организма, такими как препараты с замедленным высвобождением, включая импланты и микроинкапсулированными системами доставки. Можно применять биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфирные и полимолочная кислота. Способы получения 20 таких составов будут понятны специалистам в данной области. Липосомные суспензии также можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно приготовить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

25 Композиции для перорального или парентерального применения могут быть выполнены в дозированной лекарственной форме для легкости введения и равномерности дозировки. Дозированная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, которые можно применять в качестве единиц дозировки для субъекта, которого лечат; каждая единица содержит заранее определенное количество 30 активного соединения, рассчитанное таким образом, чтобы обеспечить желаемый терапевтический эффект в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем. Свойства дозированных лекарственных форм согласно настоящему изобретению диктуются и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и терапевтического эффекта, который предполагается получить, и неотъемлемых

ограничений, связанных с объединением такого активного соединения с другими компонентами для лечения индивидуумов. Кроме того, введение можно осуществлять путем периодических инъекций болюса, или может быть более непрерывным с применением внутривенного, внутримышечного или интраперитонеального введения их внешнего резервуара (например, *мешка для внутривенного введения*).

В сочетании со способами согласно настоящему раскрытию можно рассматривать фармакогеномику (*т.е.*, исследование отношений между генотипом индивидуума и реакцией индивидуума на чужеродное соединение или лекарственное средство).

10 Различия в метаболизме терапевтических средств могут привести к тяжелым токсическим эффектам или провалу терапии в результате изменения соотношения между дозой и концентрацией в плазме фармакологически активного лекарственного средства. Соответственно, лечащий врач или клинический специалист может рассмотреть применение информации, полученной в соответствующих

15 фармакогеномных исследованиях, чтобы определить, вводить ли лекарственное средство, а также для подбора дозировки и/или терапевтической схемы лечения лекарственным средством.

Фармацевтическая композиция другие дополнительные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компонента включают следующие, но не ограничиваются ими: противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные агенты (например, антигистаминный препарат, дифенгидрамини т.д.). Также предусмотрено, что клетки, ткани или выделенные органы, которые экспрессируют

25 или содержат определенные в настоящем документе агенты РНКи, можно применять в качестве “фармацевтических композиций”. В настоящем тексте “фармакологически эффективное количество”, “терапевтически эффективное количество” или просто “эффективное количество” относится к такому количеству агента РНКи, которое обеспечивает предполагаемый фармакологический, терапевтический или

30 профилактический результат.

Обычно эффективное количество активного соединения будет лежать в диапазоне от приблизительно 0.1 до приблизительно 100 мг/кг массы тела/день, например, от приблизительно 1.0 до приблизительно 50 мг/кг массы тела/день. В некоторых

вариантах реализации эффективное количество активного соединения будет лежать в диапазоне от приблизительно 0.25 до приблизительно 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах реализации эффективное количество активного ингредиента будет лежать в диапазоне от приблизительно 0.5 до приблизительно 3 мг/кг массы тела на дозу. Вводимое количество также вероятно будет зависеть от таких переменных, как общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность доставляемого соединения, типа препарата лекарственного средства, наличие и тип вспомогательных веществ в составе и способ введения. Кроме того, следует понимать, что начальную вводимую дозировку можно увеличивать выше верхнего предела для быстрого достижения целевого уровня в крови или уровня в ткани, или начальная дозировка может быть ниже оптимального значения.

Для лечения заболевания или получения лекарственного средства или композиции для лечения заболевания фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, включающие ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, такое как агент РНКи, связанный с нацеливающим лигандом, можно объединять со вспомогательным веществом или со вторым терапевтическим агентом или средством лечения, включая перечисленные, но не ограничиваясь ими: второе или другое ингибирующее экспрессию олигомерное соединение, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела и/или вакцину.

Описанные нацеливающие лиганды, связанные с ингибирующими экспрессию олигомерными соединениями, и добавленные к фармацевтически приемлемым вспомогательным веществам или адъювантам, могут быть упакованы в комплекты (наборы), контейнеры, упаковки или дозирующие устройства. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть упакованы в предварительно наполненные шприцы или ампулы.

Ниже варианты реализации, предложенные выше, описаны посредством неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Следующие далее примеры не являются ограничивающими предназначены для иллюстрации некоторых вариантов реализации, раскрытых в настоящем тексте.

5

Ниже определены некоторые из сокращений, применяемых в описании экспериментальных подробностей синтеза примеров соединений, описанных ниже: ч или ч. = час(ы); мин = минута (минуты); моль = моль (моли); ммоль = миллимоль (миллимоли); М = молярный; мкМ = микромолярный; г = грамм (граммы); мкг = микрограмм (микрограммы); кТ или КТ = комнатная температура; л = литр (литры); мл = миллилитр (миллилитры); масс. = масса; Et₂O = диэтиловый эфир; ТГФ = тетрагидрофуран; ДМСО = диметилсульфоксид; EtOAc = этилацетат; Et₃N или ТЭА = триэтиламин; *i*-Pr₂NEt, или DIPEA, или DIEA = диизопропилэтиламин; CH₂Cl₂ или ДХМ = метиленхлорид; CHCl₃ = хлороформ; CDCl₃ = дейтерированный хлороформ хлороформ; CCl₄ = хлорид углерода; MeOH = метанол; EtOH = этанол; ДМФА = диметилформамид; Boc = *tert*-бутоксикарбонил; CBZ = бензилоксикарбонил; TBS = *t*-бутилдиметилсилил; TBSCl = *t*-бутилдиметилсилилхлорид; ТФУК = трифторуксусная кислоты; DMAP = 4-диметиламинопиридин; NaN₃ = азид натрия; Na₂SO₄ = сульфат натрия; NaHCO₃ = бикарбонат натрия; NaOH = гидроксид натрия; MgSO₄ = сульфат магния; K₂CO₃ = карбонат калия; KOH = гидроксид калия; NH₄OH = гидроксид аммония; NH₄Cl = хлорид аммония; SiO₂ = оксид кремния Pd-C = палладий на угле; HCl = хлороводород или соляная кислота; NMM = *N*-метилморфолин; H₂ = газообразный водород; KF = фторид калия; EDC-HCl = *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид гидрохлорид; MTBE = метил-*tert*-бутиловый эфир; MeOH = метанол; Ar = аргон; SiO₂ = оксид кремния R_T = время удерживания.

10

15

20

25

Дополнительно, в различных Таблицах в разделе Примеры ниже приведены примеры ингибирующих экспрессию олигомерных соединений, подходящих для применения с нацеливающими лигандами, раскрытыми в настоящем документе. Для обозначения модифицированных нуклеотидов для последовательностей, приведенных в таблицах ниже, используются следующие обозначения:

30

N = 2'-ОН (немодифицированный) рибонуклеотид (заглавная буква без f или d)

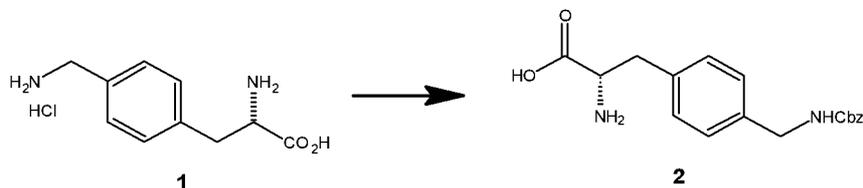
	n	=	2'-ОМе-модифицированный нуклеотид
	Nf	=	2'-фтор-модифицированный нуклеотид
	dN	=	2'-дезоксинуклеотиды
5	N _{UNA}	=	2',3'-секонуклеотидные миметики (незакрытые аналоги нуклеозидов)
	N _{LNA}	=	закрытый нуклеотид
	Nf _{ANA}	=	2'-F-арабинонуклеотид
	NM	=	2'-метоксиэтилнуклеотид
	X или Ab	=	рибоза без нуклеозидного основания
10	R	=	рибитол
	(invdN)	=	инвертированный дезоксирибонуклеотид (3'-3'-связанный нуклеотид)
	(invAb)	=	инвертированный нуклеотид без нуклеозидного основания
	(invX)	=	инвертированный нуклеотид без нуклеозидного основания
15	(invn)	=	инвертированный 2'-ОМе нуклеотид
	s	=	фосфоротиоат-связанный нуклеотид
	vpdN	=	винилфосфонатдезоксирибонуклеотид
	(3'OMe)	=	3'-ОМе нуклеотид
	(5Me-Nf)	=	5'-Me, 2'-фторнуклеотид
20	cPrp	=	циклопропил фосфонат

Раскрытые в настоящем документе соединения могут быть изготовлены с применением химических методик, известных специалистам в данной области.

25 **Пример 1. Синтез нацеливающих лигандов в форме фосфоамидит-содержащих соединений 1005b, 1004b и 1002b.**

Фосфоамидит-содержащие соединения, имеющие Структуру 1005b, Структуру 1004b и Структуру 1002b синтезировали в соответствие со следующей процедурой, с
 30 единственным отличием, заключающимся в том, что для синтеза соединения 1005b применяли 4-цис-гидроксициклогексанкарбоновую кислоту (соединение **8** в настоящем документе), для синтеза соединения Структуры 1004b применяли 4-транс-гидроксициклогексанкарбоновую кислоту (соединение **8a** в настоящем документе), а
 35 для синтеза соединения структуры 1002b применяли смесь 4-цис-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты (соединение **8** в настоящем документе) и 4-транс-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты (соединение **8a** в настоящем документе).

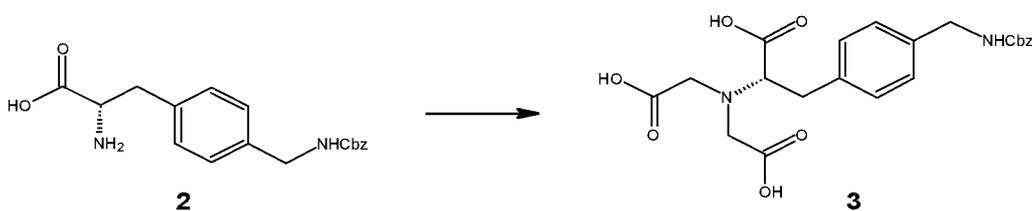
- 1) Получение 2-амино-3-[4-
({(бензилокси)карбонил}амино)метил]фенил]пропановой кислоты (соединение
2).



5

Основный карбонат меди (1.67 грамм (г), 7.59 ммоль) медленно добавляли к раствору соединения **1** (7.00 г, 30.34 ммоль) в воде (100 мл). Полученную смесь нагревали до 80 °С до видимого растворения. Полученный темно-синий раствор охлаждали до 25 – 30 °С, а затем обрабатывали гидроксидом натрия (1.21 г, 30.34 ммоль) в форме раствора в
10 воде (10 мл), что приводило к осаждению комплекса аминокислота-медь. Суспензию перемешивали в течение 1 ч при температуре окружающей среды, а затем по каплям обрабатывали раствором бензилхлорформиата (6.21 г, 36.41 ммоль) в ТГФ (20 мл) в течение 5 минут. Эту смесь перемешивали в течение 1 – 2 ч, затем фильтровали. Сырой остаток на фильтре растирали в EtOAc и фильтровали еще один раз для удаления воды.
15 Затем синие твердые вещества добавляли в колбу, содержащую 200 мл воды и обрабатывали 10 мл концентрированной HCl. Суспензию перемешивали в течение 18 ч, затем фильтровали и промывали водой, в результате чего получили 4.5 г соединения **2** в форме белого твердого вещества (45% выход, кажущаяся чистота 95). $R_T = 5.8$ мин.

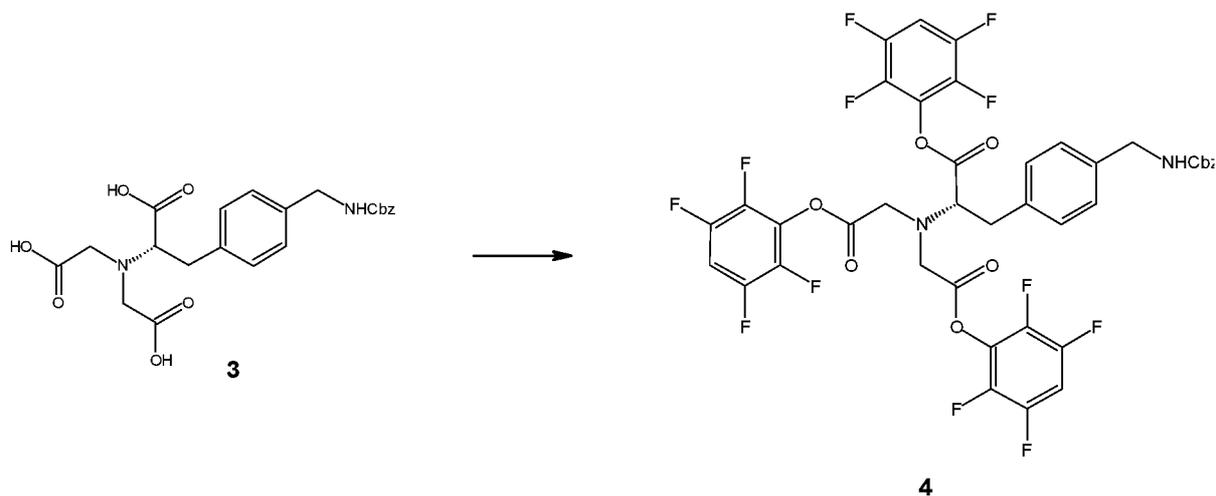
- 20 2) Получение содержащего три кислотные группы соединения (соединение **3**).



Суспензию соединения **2** (6.00 г, 18.27 ммоль) в 1.5M NaOH (100 мл) нагревали до 60 °С, после чего образовывался раствор. Затем этот раствор обрабатывали раствором бромуксусной кислоты (10.15 г, 73.20 ммоль), растворенной в 1.5M NaOH (20 мл).
25 Раствор перемешивали при 60 °С в течение 2 ч (**2** = NMT 5% согласно ВЭЖХ). После завершения реакции раствор охлаждали до 10 °С и добавляли 1M HCl добавляли до достижения pH = 1.7. Суспензии давали отстояться в течение 2 – 3 ч, а затем

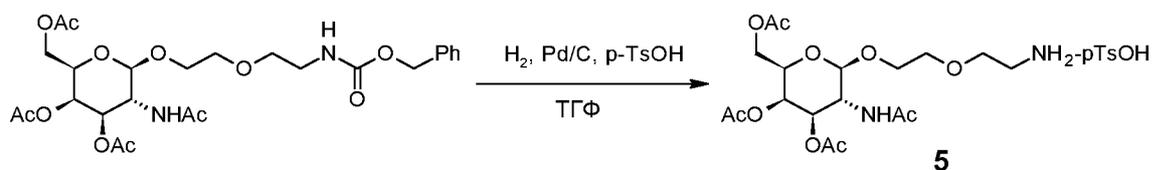
фильтровали и промывали деионизированной водой. Твердые вещества сушили под вакуумом с получением 3.01 г содержащего три кислотные группы соединения **3** (50 %, кажущаяся чистота 94). $R_T = 6.94$ мин.

5 3) Получение тетрафторфенольного эфира (соединение **4**).



Раствор соединения **3** (3.00 г, 6.75 ммоль) и 2,3,5,6-тетрафторфенола (3.99 г, 24.30 ммоль) в ДХМ (50 мл) охлаждали до 10 °С и обрабатывали *N*-(3-диметиламинопропил)-*N*'-этилкарбодиимида гидрохлоридом (4.66 г, 24.30 ммоль) порциями на протяжении 5 минут. Затем раствору давали нагреться до температуры окружающей среды в течение 20 минут и перемешивали в течение 3 ч. После завершения (**3** кажущаяся чистота < 10), Реакционную смесь промывали насыщенным бикарбонатом натрия (20 мл), а затем соевым раствором (20 мл) и концентрировали на роторном испарителе. Полученное масло очищали на флэш-колонки с применение градиента растворителя 5-20% EtOAc/гексан, в результате чего получали 2.6 г соединения **4** в виде бесцветного масла (40 %, кажущаяся чистота 94). $R_T = 12.99$ мин.

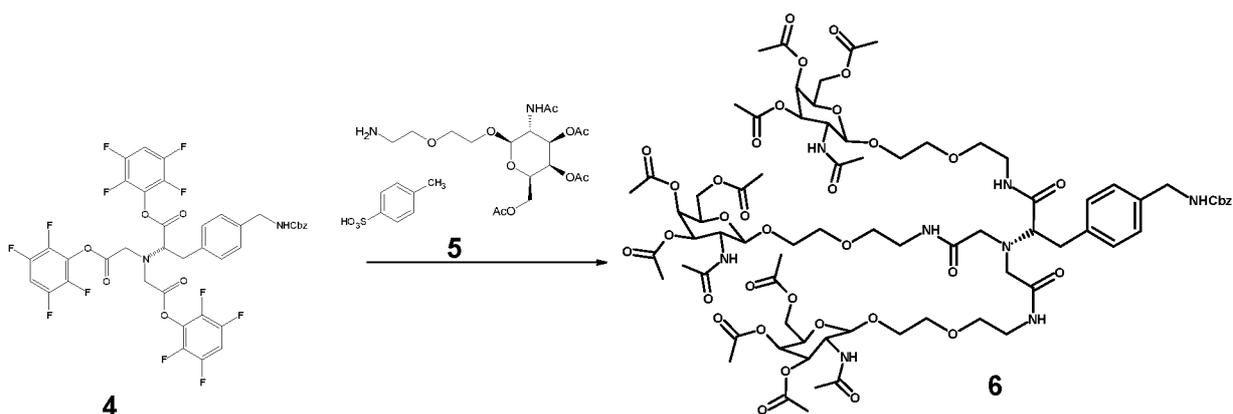
4) Получение аминтозилата (соединение **5**).



20 В реактор для работы под давлением соответствующего размера загружали (10 объемов) ТГФ, а затем Cbz-защищенный амин (1.0 экв., NAG-Z) и *p*-TsOH-H₂O (1.0 эквив.). Раствор дегазировали азотом три раза. Загружали 10% Pd/C (5.0 вес.%), а затем

трижды дегазировали азотом. Дегазировали азотом три раза. Закачивали водород до давления от 40 до 50 фунтов на кв. дюйм. Перемешивали при температуре от 20 до 30 °С в течение трех часов, затем трижды дегазировали азотом и брали образец для внутреннего положительного контроля (контрольное значение $\leq 0.5\%$ NAG-Z если оно не достигалось, то перемешивали в атмосфере H_2 при температуре от 40 до 50 фунтов/кв. дюйм в течение от 1 до 2, после чего повторяли анализ). Фильтровали через диатомовую землю для удаления катализатора, промывали ТГФ (4 объема). Концентрировали объединенные фильтраты и промывали под вакуумом до приблизительно 2 объемов поддерживая внутреннюю температуру ≤ 40 °С. Разбавляли дихлорметаном (3.8 объемов), а затем снова концентрировали до 2 объемов. Снова разбавляли ДХМ и повторно концентрировали, затем разбавляли дихлорметаном (3.8 объема). Образец для анализа по Карлу Фишеру (контрольное значение в анализе по КФ $\leq 0.05\%$, если это значение не достигается, что концентрирование и разбавление дихлорметаном необходимо повторить). После достижения контрольного значения в анализе по Карлу Фишеру раствор концентрировали с получением белого пенистого твердого вещества. Выход без коррекции составлял 100%. Можно также осуществить аналогичную реакцию, используя трифторуксусную кислоту вместо p -TsOH- H_2O , эту реакцию также можно использовать в этой процедуре вместо описанной.

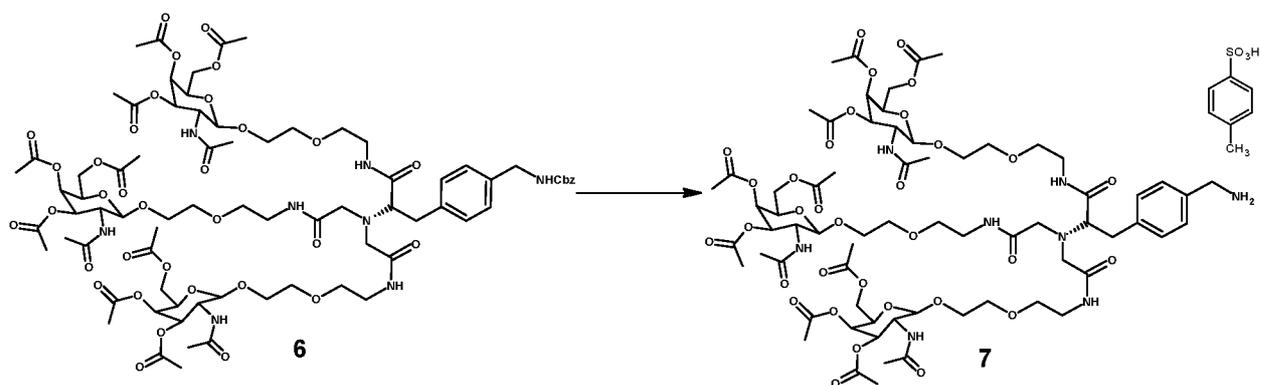
20 5) Получение три-NAG (соединение 6).



Активированный эфир **4** (2.15 г, 2.41 ммоль) и аминтозилат **5** (4.10 г, 6.75 ммоль) растворяли в дихлорметане (22 мл) и охлаждали до 10 °С. Раствор по каплям обрабатывали триэтиламино (1.37 г, 13.54 ммоль) в течение 5 минут, а затем давали нагреться до температуры окружающей среды и выдерживали в течение 2 ч. Реакционную смесь промывали насыщенным бикарбонатом натрия (10 мл), а затем

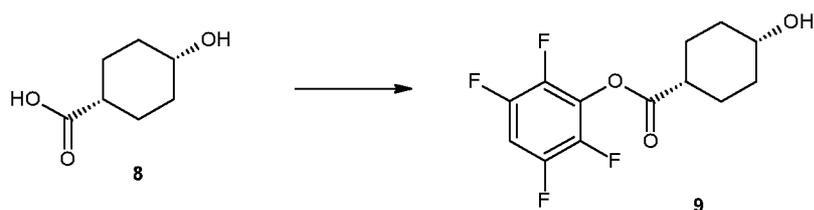
солевым раствором (10 мл). Раствор сушили при помощи сульфата магния, фильтровали и концентрировали на ротаторном испарителе, в результате чего получали бесцветное масло. После обработки ВЭЖХ показала присутствие ~10% дезацилированного соединения. Примесь повторно ацилировали путем перемешивания в чистом уксусном ангидриде (90 мл) и триэтиламине (6 мл) в течение 1 ч. Затем уксусный ангидрид удаляли при пониженном давлении, а полученное масло снова растворяли в дихлорметане и промывали водным бикарбонатом натрия. Раствор концентрировали с получением масла и очищали флэш-хроматографией с применением элюирования градиентом (2.5 – 25% MeOH/ДХМ), в результате чего получали 1.98 г соединения **6** в форме белого твердого вещества (47%, кажущаяся чистота 96). $R_T = 7.57$ мин; дезацилированная примесь = 7.18 мин.

б) Получение аминовой соли (соединение **7**).

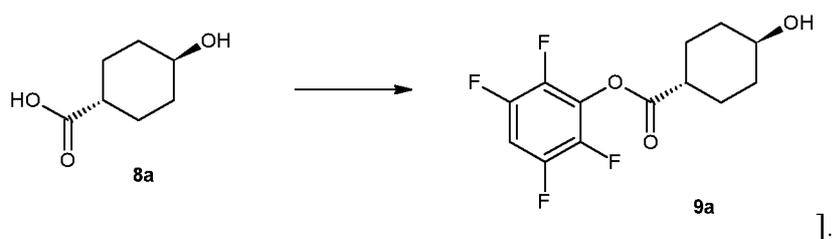


Защищенный амин **6** (1.98 г, 1.06 ммоль) и моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (202 мг, 1.06 ммоль) растворяли в абсолютном этаноле (30 мл) помещали в атмосферу азота. В колбу добавляли 5% палладий на угле (198 мг, 0.106 ммоль), помещали колбу в вакуум и перезаполняли водородом несколько раз. После помещения в атмосферу азота смесь оставляли для перемешивания при температуре окружающей среды. Реакцию считали завершившейся через 4 часа или когда ВЭЖХ переставала показывать присутствие исходного материала. Катализатор фильтровали через слой целита и пропускали фильтрат через мембранный фильтр с размером отверстий 0.2 микрона для удаления тонких частиц. Раствор концентрировали досуха при пониженном давлении, в результате чего получали 2.01 г соединение **7** в виде серого твердого вещества (100%, кажущаяся чистота 98). $R_T = 5.82$; п-толуолсульфоновая кислота $R_T = 2.4$ и 3.1 мин.

7) Получение активированного линкера (соединение **9** и **9a**).

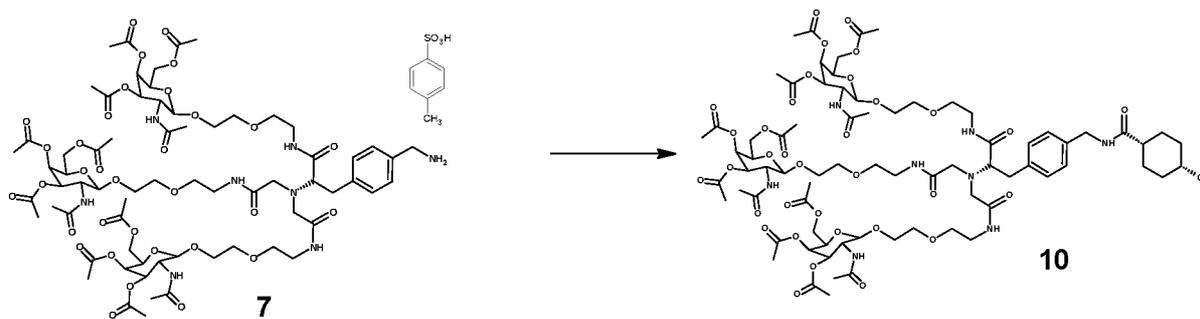


Цис-4-гидрокси циклогексилкарбоновую кислоту **8** (для синтеза структуры 1005) (4.00 г, 27.7 ммоль) и 2,3,5,6-тетрафторфенол (5.53 г, 33.3 ммоль) растворяли в 24 мл дихлорметана и охлаждали до 0 °С. Как отмечалось выше, в то время как цис-4-гидрокси циклогексилкарбоновая кислота (соединение **8**) используется в качестве линкера для получения структуры 1005, вместо цис-изомера можно использовать транс-4 гидрокси циклогексилкарбоновую кислоту (соединение **8b**), что обеспечит получение Структуры 1004b, при это для последующего синтеза используют одну процедуру:



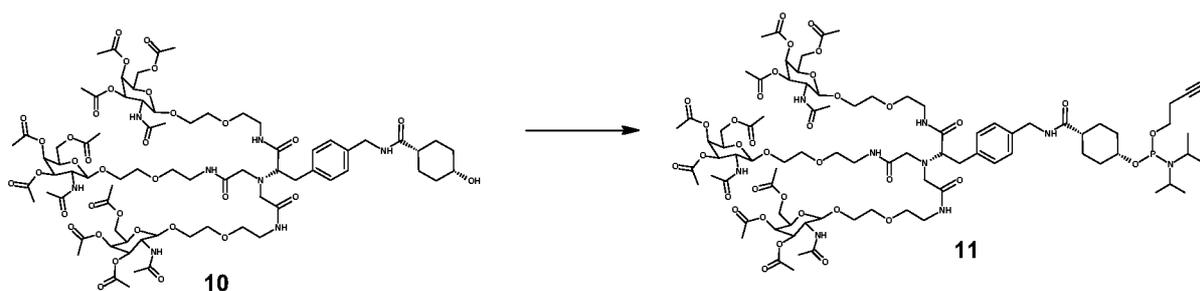
К этому раствору добавляли EDC-HCl (6.38 г, 33.3 ммоль). Раствору давали нагреться до 22 °С и перемешивали в течение 12 ч. Реакцию гасили насыщенным водным NaHCO₃ (50 мл) и разделяли слои. Органический слой промывали насыщенным соевым раствором (50 мл) и сушили при помощи Na₂SO₄. Осушающий агент фильтровали и концентрировали раствор об объема приблизительно 20 мл, после чего происходило медленное затвердевания (затравочные кристаллы ускоряют процесс). Твердые вещества суспендировали в смеси 5% МТВЕ/гексаны (50 мл) и фильтровали, в результате чего получали 5.6 г продукта **9** при выходе 69% и с чистотой 95%.

8) Связывание с линкером (Получение соединения **10**).



Аминовую соль NAG – соединение **7** (5.00 г, 2.88 ммоль) и 2,3,5,6-тетрафторфенил-*цис*-4-гидроксициклогексанкарбоксилат **9** (1.68 г, 5.77 ммоль) растворяли в 25 мл дихлорметана и охлаждали до 0 °С. К этому раствору добавляли триэтиламин (1.60 мл, 11.55 ммоль). Раствору давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 5 ч осуществляя мониторинг методом ВЭЖХ. Реакцию гасили насыщенным водным NaHCO₃ (35 мл) и разделяли слои. Органический слой промывали насыщенным солевым раствором (35 мл) и сушили при помощи Na₂SO₄. Осушающий агент фильтровали и концентрировали раствор и очищали флэш-хроматографией с применением элюирования градиентом (0 – 20% MeOH/ДХМ), которое давало 3.90 г соединения **10** в форме белого твердого материала (80%). R_T= 6.16 мин. В качестве альтернативы можно осуществить прямое присоединение линкера без применения тетрафторфенилового эфира как показано в Примере 2 ниже.

15 9) Получение соединения **11**.



Соединение **10** (1.87 г, 1.11 ммоль) растворяли в 20 мл дихлорметан и добавляли 2-цианоэтил, *N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфорамидит (0.84 г, 2.77 ммоль). Полученный раствор охлаждали до 5 °С. К этому раствору добавляли 4,5-дицианоимидиазол (0.026 г, 0.22 ммоль). Раствору давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 ч. Степень превращения проверяли методом ВЭЖХ (которая указывала на то, что осталось 2~% исходного материала). Добавляли дополнительное количество 2-цианоэтила, *N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфорамидита (0.14 г, 0.46 ммоль) и

перемешивали реакционную смесь в течение еще 2.5 ч (ВЭЖХ не показывала значительных изменений). Реакцию гасили насыщенным водным NaHCO_3 (20 мл) и разделяли слои. Органический слой промывали водным NaHCO_3 (20 мл) и насыщенным соевым раствором (2 x 20 мл) и сушили при помощи Na_2SO_4 .

5 Осушающий агент фильтровали и концентрировали раствор, в результате чего получали 2.34 г соединения **11** в форме белого твердого материала.

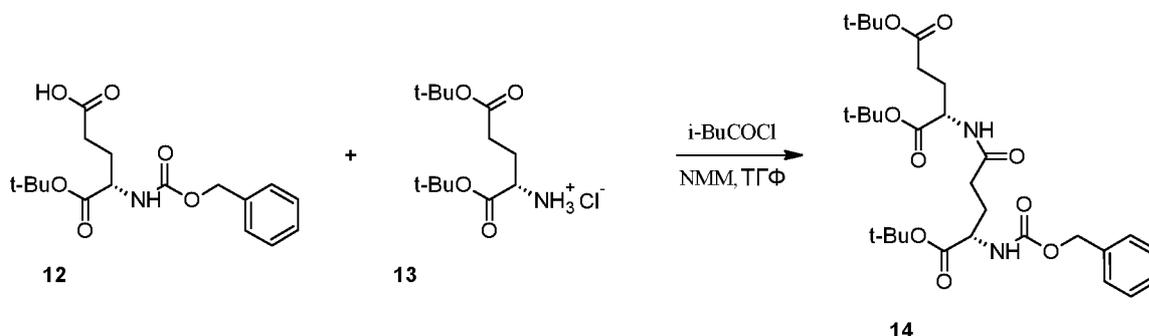
100 мг неочищенного соединения **11** очищали колоночной флэш-хроматографией: сначала заполненную гелем колонку элюировали 2% триэтиламин в дихлорметане в течение 30 мин, а затем загружали на колонку неочищенное соединение **11** и очищали с использованием элюирования градиентом (0 – 20% 2% триэтиламина: метанол/2% триэтиламин: дихлорметан). Конечный продукт - соединение **11** (химическая структура которого соответствовала Структуре 1005b, определенной в настоящем документе) элюировали в смеси 2% триэтиламин: дихлорметан (фракция 2), в результате чего
15 получали 80 мг белого твердого материала.

На Фин. 1 показан ^1H -ЯМР-спектр для соединения **11** (Структура 1005b в настоящем документе).

20 На Фиг. 1А показан ^1H -ЯМР-спектр транс-изомера соединения **11** (Структура 1004b в настоящем документе), полученный в соответствии с альтернативной процедурой синтеза согласно этапу 7, см. выше.

Пример 2. Синтез фосфоамидит-содержащего соединения с нацеливающим лигандом структуры 1008b.

1) Получение три-*tert*-бутил-*N*-[*N*-(Бензилоксикарбонил)-*L*- γ -глутамил]-*L*-глутамат (соединение **14**)



В продуктую азотом 250 мл трехгорлую круглодонную колбу, оборудованную термопарой, магнитной мешалкой, входом для азота и воронкой для порошка, добавляли соединение **12** (10.00 г, 29.64 ммоль), а затем ТГФ (100 мл, 10 об.).
10 Полученный раствор перемешивали, и добавляли *N*-метилморфолин (7.82 мл, 7.19 г, 71.15 ммоль, 2.4 эквивалентов) (тест реакционной смеси по Карлу Фишеру: 163 ppm).

Воронку для порошка заменяли резиновой перегородкой и охлаждали смесь при помощи ванны со льдом до 0 °С. Изобутил хлорформиат (iBuCOCl, 3.85 мл, 4.05 г, 29.64 ммоль, 1.0 эквивалентов) К реакционной смеси по каплям добавляли на протяжении 10 минут при помощи шприца, поддерживая температуру в сосуде ниже 4.0 °С. После добавления смесь перемешивали еще 40 минут и заменяли перегородку воронкой для порошка. К реакционной смеси добавляли соединение **13** (8.767 г, 29.64 ммоль, 1.0 эквивалентов) порциями на протяжении 15 минут, поддерживая температуру в сосуде ниже 4.0 °С (экзотермическое добавления). После добавления соединения **13** ванну со льдом и воронку для порошка удаляли и давали реакционной смеси нагреться до температуры окружающей среды на протяжении оставшихся этапов. Прозрачному, бесцветному раствору давали отстояться в течение 25 минут после добавления соединения **13**.

25 Образец реакционной смеси брали через 40 минут после начала добавления соединения **13** и исследовали процент превращения методом ОФ-ВЭЖХ. Было обнаружено, что осталось 23% соединения **12**, поэтому после 60 минут реакции

добавляли последовательно ещё $i\text{BuCOCl}$ (1.16 мл, 1.21 г, 30 мол.%) и соединения **13** (2.63 г, 30 мол.%) добавляли. Раствору давали выстояться в течение еще 60 минут, до тех пор пока ВЭЖХ не показывала > 99% преобразования в образце. Общее время реакции составляло 2.5 ч от начала первого добавления соединения **13**.

5

Реакционный раствор вливали в перемешиваемый раствор 0.5 М $\text{HCl}_{(\text{вод.})}$ (125 мл), охлаждали в ванне со льдом при 3 °С и перемешивали примерно 5 минут. Нейтрализованную реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (100 мл, 10 об.; проверяли водный слой на кислотность для полного удаления NMM), а органическую фазу промывали солевым раствором (100 мл, 10 об.), сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали через воронку из стекла с крупными порами в 500 мл круглодонную колбу и концентрировали *под вакуумом*, в результате чего получали густое бесцветное масло. Это масло растворяли в МТВЕ (100 мл, 10 об.) и концентрировали *под вакуумом*, после чего еще раз получали густое бесцветное масло.

10

К перемешиваемому маслу (~600 об./мин) добавляли гексаны (100 мл, 10 об.). В растворе появлялась белая муть, которая исчезала после перемешивания. Добавляли затравочные кристаллы и оставляли смесь перемешиваться в течение 40 минут; за это время медленно образовывались кристаллы.

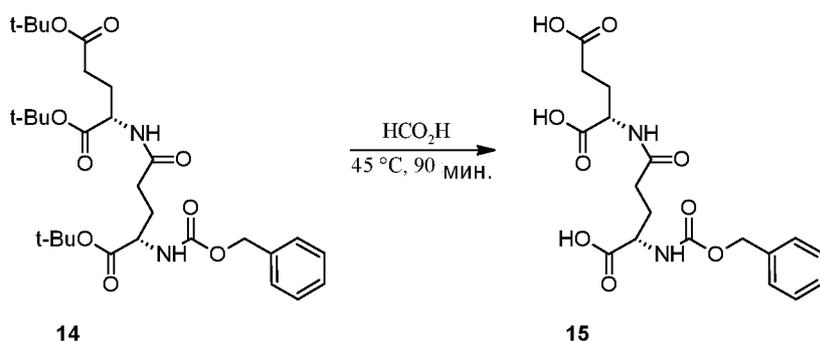
15

В течение 20 минут добавляли дополнительное количество гексанов (50 мл, 5 об.) добавляли. Через 40 минут суспензию фильтровали при помощи крупнопористой воронки, промывали 3х гексанами (~10 мл а каждом случае) и сушили воздухом в воронке в течение 1 ч, в результате чего получали соединение **14** в виде тонкого белого порошка (15.64 г, 91%).

20

На фигуре 2В показан ^1H -ЯМР-спектр для соединения **14**.

1) Получение *N*-[*N*-(Бензилоксикарбонил)-*L*- γ -глутамил]-*L*-глутаминовая кислота (соединение **15**)



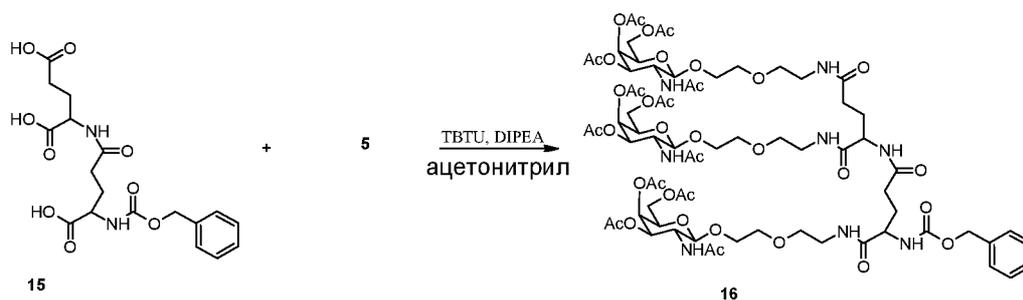
В 3000 мл трехгорлую круглодонную колбу, оборудованную верхнеприводной мешалкой, воронкой для порошка, термопарой и колбонагревателем, добавляли **14** (72.57 г, 125.4 ммоль) и муравьиную кислоту (аналитической чистоты, >95%, 1.45 л, 20 об. эквив.). Воронку для порошка заменяли пробкой со входом для N_2 , нагревали полученный раствор до 45°C и перемешивали в течение 1 ч, отслеживая ход реакции методом ОФ-ВЭЖХ. Реакцию признавали завершенной, когда оставалось меньше 2.0 % площади моно-*t*-бутиловых сложных эфиров.

Образец реакционной смеси брали через 60 минут после добавления муравьиной кислоты, и исследовали этот образец методом ОФ ВЭЖХ для определения процентной доли оставшихся моно-*t*-бутиловых сложных эфиров. Анализ показал, что через 90 минут осталось 1.8% моно-*t*-Бу сложных эфиром, и реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры.

Реакционную смесь разбавляли толуолом и ацетонитрилом (1500 мл а каждом случае), и концентрировали смесь *под вакуумом*. Удаляли муравьиную кислоту путем азеотропирования со смесью 1:1 ацетонитрил:толуол (~600 мл) и дважды с ацетонитрилом (~500 мл а каждом случае). Этот материал сушили в высоком вакууме в течение ночи, в результате чего получали белое вспененное твердое вещество (54.3 г, количественный выход, 96.8 % площади при 254 нм).

На Фигуре 2С показан ^1H -ЯМР-спектр для соединения **15**.

3) Получение три-NAG-бис-Glu-NHZ (соединение 16).



В круглодонную колбу объемом 1 л добавляли п-тозилатную соль NAG-амина (**5**, 59.19 г, 97.6 ммоль, 4.13 эквив.) и *Z*-бис-Glu-триацид (**15**, 10.01 г, 23.6 ммоль, с корректировкой по чистоте, 1.0 эквив.). Смесь растворяли в ацетонитриле (500 мл; показатель Карла Фишера для раствора = 1283 ppm) и концентрировали *под вакуумом* для азеотропического удаления воды. Остаток растворяли в свежем ацетонитриле (400 мл) и переносили в продутую азотом трехгорлую круглодонную колбу, имеющую мешалку и оборудованную термопарой. Содержание воды измеряли методом Карла Фишера (257 ppm).

К перемешиваемому раствору в атмосфере азота через воронку для порошка добавляли TBTU (28.20 г, 87.8 ммоль, 3.7 эквив.). По каплям при помощи шприца добавляли DIPEA (34.0 мл, 25.2 г, 8.0 эквив.) в течение 20 минут, поддерживая температуру реакции ниже 25 °С (в ходе добавления наблюдали экзотермический эффект, соответствующий 5 °С). Смесь перемешивали в течение 2 ч от начала добавления DIPEA, осуществляя мониторинг методом ВЭЖХ. На 78 минуте анализ показал полное поглощение исходного материала.

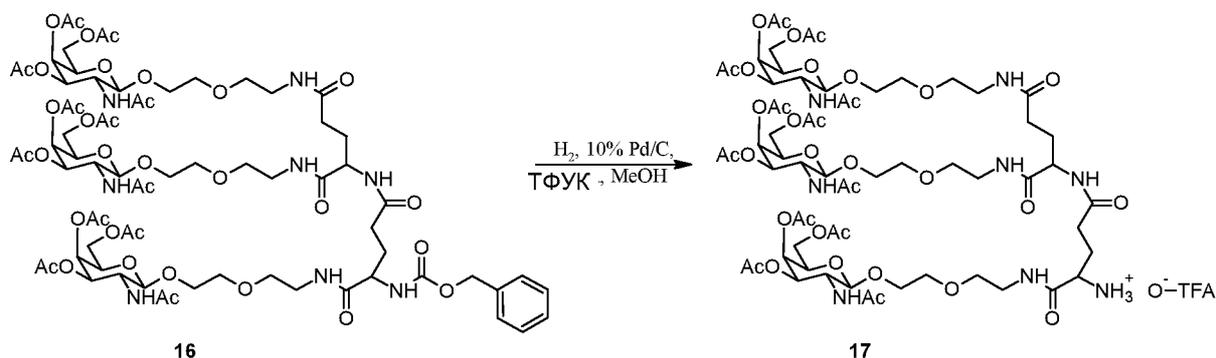
Через 2 ч удаляли растворитель *под вакуумом*. Полученное густое масло растворяли в дихлорметане (1000 мл) и промывали 1.0-нормальное HCl_(вод.) (3 x 500 мл) и насыщенным NaHCO_{3(вод.)} (3 x 500 мл). Органический слой сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали *под вакуумом*, в результате чего получали беловатое воскоподобное твердое вещество (33.5 г).

Проводили флэш-хроматографию на автоматизированной системе очистки ISCO CombiFlash с применением 330г колонки с силикагелем ISCO RediSep Rf Gold.

Неочищенный материал загружали в форме раствора в CHCl_3 (~200 мл). Понижающийся градиент Элюента А: CHCl_3 ; Элюент В: применяли MeOH и получали в общей сложности 36 фракций (250-500 мл в каждом случае). Фракции, содержащие продукт, концентрировали получали 18.75 г (97.0% чистоты) соединения **16**. Из смешанных фракций получали 12.2 г (чистота 78.8%) соединения **16**.

На Фигуре 2D показан ^1H -ЯМР-спектр для соединения **16**.

4) Получение три-NAG-бис-Glu-NH₂ (соединение **17**).



10

В 3-горную круглодонную колбу, оборудованную мешалкой, загружали метанол (200 мл, 13 объема). К перемешиваемому растворителю добавляли соединение **16** (15.44 г, 9.02 ммоль, с корректировкой по чистоте), а затем дополнительное количество метанола (200 мл, 13 об.) и трифторуксусной кислоты (1.40 мл, 18.1 ммоль, 2.0 эквив.). Смесь перемешивали примерно 10 минут. К этой смеси добавляли 10% Pd/C (50% влажный вес, 1.547 г, 10% масс./масс.). Свободное пространство продували газообразным водородом (баллон) и оставляли смесь перемешиваться при температуре окружающей среды в течение 2 ч, отслеживая ход реакции методом ОФ-ВЭЖХ.

20

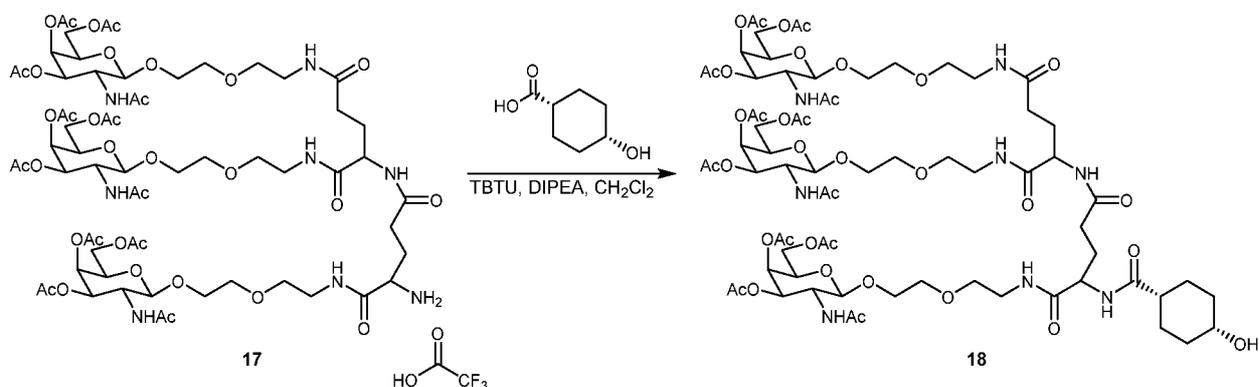
Через 75 минут брали образец реакционной смеси (100 мкл) и смешивали со смесью 1:1 ацетонитрил:H₂O (900 мкл) в шприцевом фильтре объемом 1мл (10 мм, 0.1 мкм мембрана из гидрофильного полипропилена). ВЭЖХ-хроматограмма показала площадь, соответствующую больше, чем 96% чистоте, без остатков исходного материала. Затем реакционную смесь продували азотом и фильтровали через слой целита в чистую 1000-мл круглодонную колбу. Реакционный сосуд споласкивали метанолом (50 мл) и дихлорметаном (50 мл), смывы также фильтровали. Слегка

25

мутный фильтрат частично концентрировали *под вакуумом*. Получали дополнительные смывы со слоя целита в метаноле (50 мл) и дихлорметане (50 мл); которые объединяли с остатком и фильтровали через 0.2мкм мембранный фильтр из гидрофильного полипропилена в другую чистую круглодонную колбу объемом 1000 мл. Мембрану споласкивали ацетонитрилом (50 мл) для азеотропического удаления побочного продукта – толуола. Раствор концентрировали *под вакуумом*, в результате чего получали соединение **17** (14.15 г, чистота 97.3% на основании площади в ВЭЖХ) в виде беловатого вспененного твердого вещества.

10 На Фиг. 2Е показан ^1H -ЯМР-спектр для соединения **17**.

5) Получение три-NAG-бис-Glu-NH-линкера (соединение **18**).



15 В трехгорлую круглодонную колбу объемом 500 мл, оборудованную магнитной мешалкой, термопарой и слоем азота, загружали соединение **17** (чистота 93.7%, 20.00 г, 11.4 ммоль) и дихлорметан (150 мл). К перемешиваемому раствору добавляли *цис*-4-гидроксициклогексан-1-карбоновую кислоту (1.730 г, 12.0 ммоль, 1.05 эквив.), а затем ТВТУ (2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния тетрафторборат, 4.036 г, 12.6 ммоль, 1.10 эквив.). Раствор охлаждали до $-9\text{ }^\circ\text{C}$ с использованием ванны со льдом и соевым раствором и добавляли по каплям DIPEA (6.97 мл, 5.17 г, 40.0 ммоль, 3.5 эквив.) в течение 7 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже $-5\text{ }^\circ\text{C}$. В ходе добавления наблюдали повышение температуры на $1.7\text{ }^\circ\text{C}$. После завершения добавления DIPEA реакционную смесь перемешивали при $-9\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 90 минут, после чего ВЭЖХ-анализ (метод В) показал полное поглощение **17**.

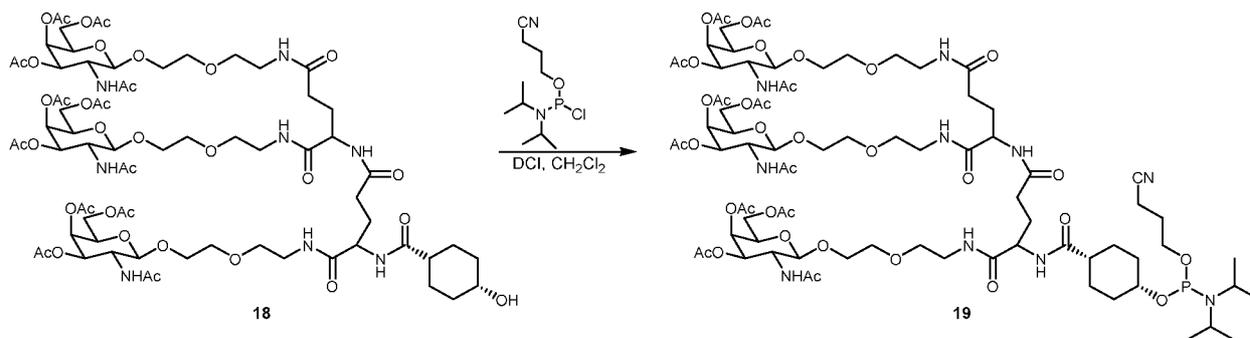
Через 110 минут реакцию гасили путем добавления насыщенного $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{вод.})}$ (400 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали дихлорметаном (2 x 200 мл).

- Объединенные органические слои промывали смесью 1:1 насыщенного $\text{NaHCO}_{3(\text{вод.})}$ и солевого раствора (400 мл), сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали *под вакуумом* до объема 125 мл. Для обеспечения растворимости использовали небольшое количество метанола. Полученное масло добавляли тонкой струйкой в круглодонную колбу объемом 3 мл, содержащую МТВЕ (1600 мл), в результате чего образовывался белый осадок. В суспензию добавляли смывы из колбы с исходным материалом, полученные с использованием дихлорметана (~20 мл) и МТВЕ (~200 мл), потом смеси давали отстояться в течение 1 ч, после чего подвергали ее вакуумной фильтрации с применением 600-мл воронки из пористого стекла.
- Влажный остаток на фильтре снова разбавляли МТВЕ (2 x 200 мл) в воронке, фильтровали, и сушили в высоковакуумном трубопроводе до постоянной массы, в результате чего получали неочищенное соединение **18** в виде белого порошка (16.22 г, нескорректированный выход 86%).
- Неочищенное соединение **18** (17.16 г, объединенное с предыдущей партией) очищали на автоматизированной системе очистки ISCO CombiFlash EZPrep с использованием 330г колонки с силикагелем ISCO RediSep Rf Gold. Неочищенный материал загружали в форме раствора в 8% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (~160 мл). Градиент элюента А: CH_2Cl_2 ; элюент В: 50% $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ использовали для получения 33 фракций. Фракции, содержащие продукт, концентрировали, в результате чего получали 10.13 г (чистота 98.1%, выход 59%) соединения **18**. Смешанные фракции объединяли, в результате чего получали еще 6.52 г (чистота 86.1%) соединения **18**, которое удавалось доочистить.

На Фиг. 2F показан ^1H -ЯМР-спектр для соединения **18**.

25

б) Получение нацеливающий лиганд фосфорамидит (соединение **19**)



Соединение **18** (13.0 г, 7.87 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (195 мл) и помещали в атмосферу азота. К этой смеси по каплям добавляли DIPEA (4.11 мл, 23.61 ммоль) и раствор 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфородиамидида (2.45 мл, 11.02 ммоль) в безводном дихлорметане (5 мл) в течение 5 минут. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, мониторинг осуществляли методом ВЭЖХ (оставалось <1% исходного материала).

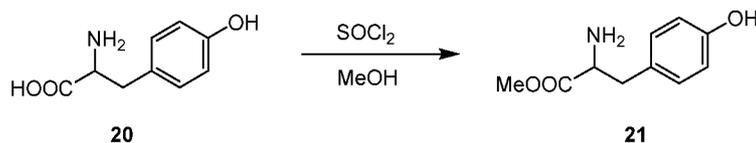
Реакцию гасили насыщенным водным NaHCO₃ (150 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщенным водным NaHCO₃ (1 x 150 мл) и соевым раствором (1 x 150 мл), и сушили при помощи Na₂SO₄. Осушающий агент фильтровали и концентрировали раствор и очищали флэш-хроматографией; при этом колонку сначала обрабатывали дихлорметаном (+1% триэтиламин) в течение 30 минут, а затем загружали на колонку неочищенный конечный продукт, соединение **19** (которое имело химическую структуру, соответствующее Структуре 1008 в настоящем документе) и очищали с использованием элюирования градиентом (0 – 20% MeOH (+1%ТЭА)/CH₂Cl₂ (+1%ТЭА)) в течение 30 мин. В результате получали 11.1 г соединения **19** в форме белого твердого материала (выход 76%, чистота 96.6%).

На Фиг. 2 показан ³¹P-ЯМР спектр для Соединения **19**. На Фигуре 2А показан ¹H-ЯМР-спектр для Соединения **19**. И Фиг. 2, и Фиг. 2А соответствуют структуре соединения **19** (Структура 1008b в настоящем документе).

Пример 3. Синтез фосфоамидит-содержащего соединения с нацеливающим лигандом структуры 1025.

25

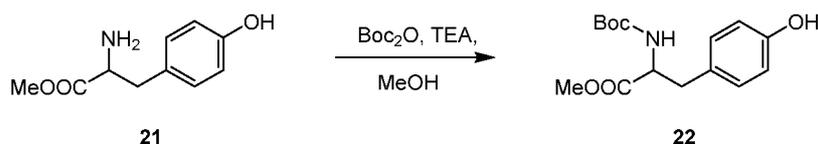
1) Получение соединения **21**.



К раствору соединения **20** (40 г, 221 ммоль, 1.00 экв.) в MeOH (350 мл) по каплям при 0 - 5 °C добавляли SOCl₂ (52.5 г, 442 ммоль, 32 мл, 2.00 экв.). Раствор нагревали до 60 °C и перемешивали в течение 16 ч. ТСХ (ДХМ/MeOH = 5/1 с 5 каплями HOAc, R_f = 0.43) показала поглощение исходного материала, а ЖХМС (ET12452-6-P1A) показала

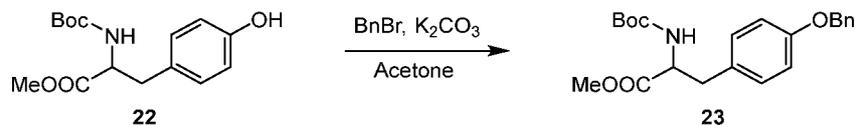
образование продукта. Эту смесь концентрировали под вакуумом, в результате чего получали неочищенное соединение **21** (52.4 г, без очистки) в форме белого твердого вещества. ^1H -ЯМР: (ET12452-6-p1c ДМСО- d_6 Bruker_V_400МГц) δ 9.45 (s, 1 H), 8.55 (br s, 3 H), 7.00 (br d, $J = 8.0$ Гц, 2 H), 6.72 (d, $J = 8.0$ Гц, 2 H), 4.17 (br s, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 3.01 (qd, $J = 14.2, 6.5$ Гц, 2 H).

2) Получение соединения **22**.



К раствору соединения **21** (52.4 г, 226 ммоль, 1.00 экв.) в MeOH (230 мл) добавляли ТЭА (68.7 г, 679 ммоль, 94 мл, 3.00 экв.), Boc_2O (59.2 г, 271 ммоль, 62.4 мл, 1.20 экв.) по каплям при 0 °С, смесь перемешивали при 0 °С в течение 0.5 ч, затем перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. ТСХ (Петролейный эфир/EtOAc = 1/1, $R_f = 0.80$) показала образование нового основного пятна и поглощение большей части исходного материала. Эту смесь концентрировали, затем очищали на колонке с силикагелем (петролейный эфир/EtOAc = 1:1), в результате чего получали соединение **22** (57.4 г, 86% выход) в форме белого твердого вещества. ^1H -ЯМР: (ET12452-8-p1g CDCl_3 Bruker_V_400МГц) δ 6.97 (d, $J = 8.5$ Гц, 2 H), 6.74 (br d, $J = 8.0$ Гц, 2 H), 5.65 (br s, 1 H), 5.01 (br d, $J = 8.0$ Гц, 1 H), 4.49 - 4.59 (m, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 2.92 - 3.09 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H).

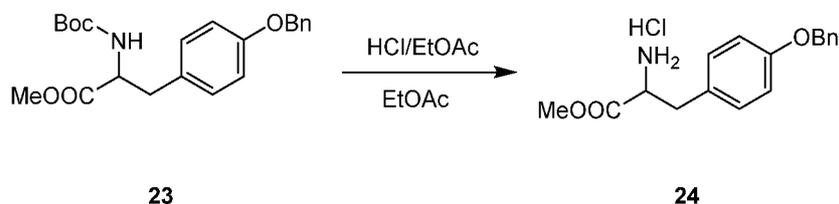
3) Получение соединения **23**.



К раствору соединения **22** (35 г, 119 ммоль, 1.00 экв.), растворенного в ацетоне (170 мл), добавляли K_2CO_3 (21.3 г, 154 ммоль, 1.30 экв.) и BnBr (24.3 г, 142 ммоль, 16.9 мл, 1.20 экв.), Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником (60 °С) в течение 14 ч. ТСХ (петролейный эфир/EtOAc = 3/1, $R_f = 0.80$) показала поглощение исходного материала и образование нового пятна. К этой смеси добавляли H_2O (500 мл) при 5 °С и перемешивали в течение 0.5 ч, затем фильтровали и промывали водой (H_2O , 80 мл*3), сушили под вакуумом, в результате чего получали соединение **23** (43 г, выход 88%, чистота 93%) в форме белого твердого вещества. ^1H -ЯМР: (ET12452-9-p1a CDCl_3

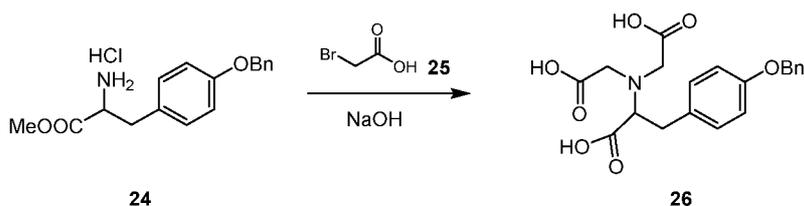
Bruker_B_400МГц) δ 7.31 - 7.46 (m, 5 H), 7.05 (d, $J = 8.5$ Гц, 2 H), 6.91 (d, $J = 9.0$ Гц, 2 H), 5.05 (s, 2 H), 4.97 (br d, $J = 8.0$ Гц, 1 H), 4.50 - 4.60 (m, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 2.96 - 3.11 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H).

5 4) Получение соединения **24**.



К раствору соединения **23** (43 г, 112 ммоль, 1.00 экв.) в EtOAc (215 мл) по каплям добавляли HCl/EtOAc (4 М, 215 мл, 7.71 экв.), смесь перемешивали в течение 9 ч при 25 °С. ТСХ (Петролейный эфир/EtOAc = 3/1, $R_f = 0.10$) показала поглощение
10 исходного материала и образование нового продукта. Эту смесь фильтровали и промывали этилацетатом (30 мл*3), сушили под вакуумом, в результате чего получали соединение **24** (35 г, выход 97%, чистота 99%) в форме белого твердого вещества. ^1H -
ЯМР: (ET12452-12-p1a MeOD Varian_D_400МГц) δ 7.40 - 7.45 (m, 2 H), 7.34 - 7.39 (m, 2 H), 7.29 - 7.33 (m, 1 H), 7.17 (d, $J = 8.8$ Гц, 2 H), 7.00 (d, $J = 8.8$ Гц, 2 H), 5.09 (s, 2 H),
15 4.26 (dd, $J = 7.3, 6.0$ Гц, 1 H), 3.81 (s, 3 H), 3.07 - 3.23 (m, 2 H).

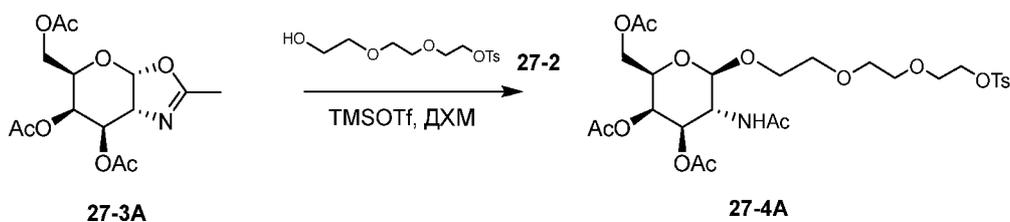
5) Получение соединения **26**.



Соединение **24** (15.5 г, 48.2 ммоль, 1.00 экв.) растворяли в CH_3CN (40 мл) и NaOH (1.5
20 М, 70.6 мл, 2.20 экв.), затем добавляли соединение **25** (13.4 г, 96.3 ммоль, 6.94 мл, 2.00 экв.) при 15 °С, проверка pH: ~ 2.5 . Затем добавляли 4 н. NaOH до pH = 13. Раствор нагревали при 70 °С. Через 30 мин pH падал ниже 6, его снова регулировали при помощи 4 н. NaOH (pH 11-13). Порциями (дважды) добавляли дополнительное количество соединения **25** (6.69 г, 48.2 ммоль, 3.47 мл, 1.00 экв.) и каждый раз pH
25 доводили до 11-13. Эту смесь нагревали при 70 °С в течение 14 ч. ЖХМС (ET12452-30-P1A, $R_t = 0.749$ мин) показала образование продукта. Эту смесь охлаждали до 15 °С, затем доводили pH до 1 при помощи 4н. HCl, фильтровали и промывали водой (H_2O ,

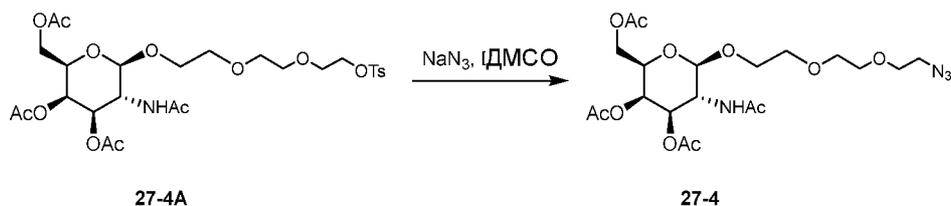
раствором (500 мл), сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали, в результате чего получали соединение **27-3А** (189 г, без очистки, чистота 92%) в виде коричневого масла. ^1H -ЯМР: (ET12452-28-p1c CDCl_3 Varian_D_400МГц) δ 6.00 (d, $J = 6.6$ Гц, 1 H), 5.47 (t, $J = 3.0$ Гц, 1 H), 4.91 (dd, $J = 7.5, 3.3$ Гц, 1 H), 4.17 - 4.28 (m, 2 H), 4.08 - 4.14 (m, 1 H), 3.97 - 4.03 (m, 1 H), 2.13 (s, 3 H), 2.05 - 2.09 (m, 9 H)

9) Получение соединения **27-4А**.



К смеси соединения **27-3А** (189 г, 574 ммоль, 1.00 экв.), соединения **7-2** (140 г, 460 ммоль, 0.80 экв.) и 4А молекулярных сит (150 г) в ДХМ (1.5 л) добавляли TMSOTf (63.8 г, 287 ммоль, 51.9 мл, 0.50 экв.) в атмосфере N_2 , смесь перемешивали при 25°C в течение 8 ч. ТСХ (ДХМ/MeOH = 20:1, $R_f = 0.46$) показала поглощение исходного материала, а ЖХМС (ET12452-35-P1A, $R_t = 0.76$ мин) показала образование продукта. Эту смесь фильтровали для удаления сит, затем нейтрализовали холодным водным раствором NaHCO_3 (1000 мл), экстрагировали дихлорметаном (800 мл*2), отделенные органические слои промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (800 мл), H_2O (800 мл*2) и солевым раствором (800 мл), сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Затем очищали на колонке с силикагелем (ДХМ/MeOH = 20:1), в результате чего получали соединение **27-4А** (285 г, 73% выход) в виде желтого масла. ^1H -ЯМР: (ET12452-35-p1g CDCl_3 Varian_D_400МГц) δ 7.81 (d, $J = 8.4$ Гц, 2 H), 7.37 (d, $J = 8.2$ Гц, 2 H), 6.30 (br d, $J = 9.5$ Гц, 1 H), 5.28 - 5.35 (m, 1 H), 5.08 (dd, $J = 11.2, 3.3$ Гц, 1 H), 4.81 (d, $J = 8.6$ Гц, 1 H), 4.09 - 4.29 (m, 5 H), 3.86 - 3.98 (m, 3 H), 3.68 - 3.81 (m, 3 H), 3.56 - 3.66 (m, 5 H), 2.46 (s, 3 H), 2.16 (s, 3 H), 2.04 (s, 3 H), 1.98 (s, 3 H), 1.95 (s, 3 H)

10) Получение соединения **27-4**.

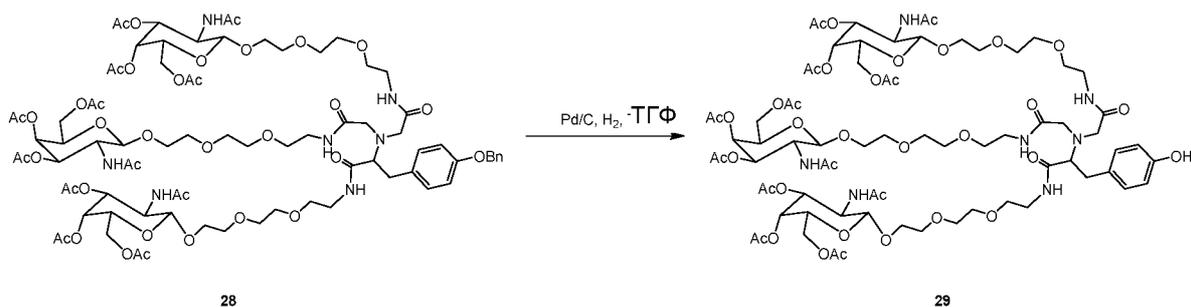


К раствору соединения **27-4А** (285 г, 450 ммоль, 1.00 экв.) в ДМСО (1.4 л) добавляли NaN_3 (38.1 г, 586 ммоль, 1.30 экв.) при 10°C , смесь перемешивали при 60°C в течение

ТЭА (12.1 г, 119 ммоль, 16.5 мл, 5.00 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору, содержащему соединение **27** (19.8 г, 23.8 ммоль, 1.00 экв.) и соединение **27А** (57 г, 119 ммоль, 5.00 экв.) в ДХМ (160 мл). Его перемешивали при 30 °С в течение 16 ч. ЖХМС (ЕТ12452-64-Р1А, Rt = 1.21 мин) показала образование продукта. Разбавляли дихлорметаном (100 мл) и промывали комбинацией насыщенный NaHCO₃/насыщенный солевой раствор (1:1, 2 x 80 мл). Органический слой сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, в результате чего получали неочищенный продукт в виде коричневого твердого вещества.

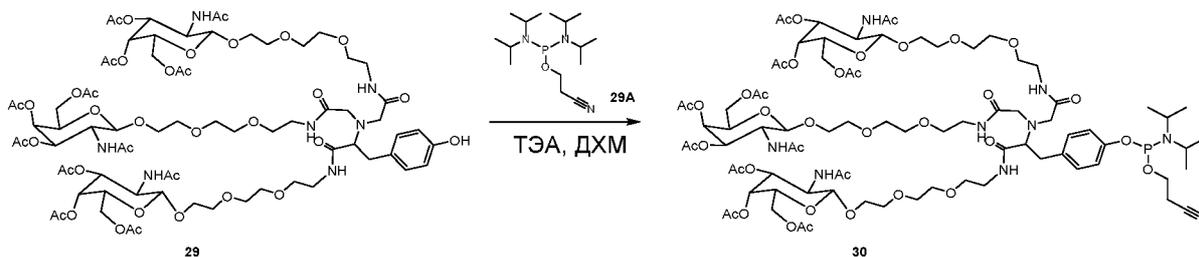
Неочищенный продукт растворяли в Ac₂O (42 мл), CH₃CN (62.5 мл) и Py (82.3 г, 1.04 моль, 84 мл, 23.96 экв.), смесь перемешивали при 25 °С в течение 12 ч. ВЭЖХ (ЕТ12452-65-Р1А, Rt = 2.54 мин) показала преобладание продукта. CH₃CN выпаривали, затем смесь разбавляли дихлорметаном (400 мл) и промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (100 мл*4). Органический слой отделяли и промывали комбинацией 0.1М HCl/насыщенный солевой раствор (1:1, 100 мл*4), сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали на колонке с силикагелем (ДХМ/MeOH = 10:1, Rf = 0.45), в результате чего получали продукт, который дополнительно очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Gemini C18 250*50мм*10 мкм; подвижная фаза: [вода(10мМ NH₄HCO₃)-ACN]; В%: 25%-55%, 23мин), в результате чего получали соединение **28** (28.8 г, выход 58%, чистота 98%) в виде желтого твердого вещества. ¹H-ЯМР: (ЕТ12452-65-p1j ДМСО, Varian_D_400МГц) δ 8.00 - 8.09 (m, 3 H), 7.81 (d, J = 9.0 Гц, 3 H), 7.29 - 7.45 (m, 5 H), 7.10 (d, J = 8.6 Гц, 2 H), 6.89 (d, J = 8.4 Гц, 2 H), 5.21 (d, J = 3.3 Гц, 3 H), 5.04 (s, 2 H), 4.97 (dd, J = 11.2, 3.3 Гц, 3 H), 4.54 (d, J = 8.4 Гц, 3 H), 4.02 (s, 9 H), 3.83 - 3.92 (m, 3 H), 3.73 - 3.81 (m, 3 H), 3.53 - 3.61 (m, 4 H), 3.44 - 3.52 (m, 17 H), 3.42 (br d, J = 4.4 Гц, 2 H), 3.35 - 3.40 (m, 6 H), 3.07 - 3.27 (m, 11 H), 2.74 - 2.87 (m, 2 H), 2.09 (s, 9 H), 1.99 (s, 10 H), 1.89 (s, 9 H), 1.77 (s, 9 H).

13) Получение соединения **29**.



К раствору соединения **28** (9.7 г, 5.48 ммоль, 1.00 экв.) в ТГФ (250 мл) добавляли сухой Pd/C (5.5 г, 5.48 ммоль), смесь перемешивали при 40 °С в течение 6.5 ч в атмосфере H₂ (50 фунтов/кв. дюйм). ТСХ (ДХМ/МеОН = 10:1, R_f = 0.3) показала поглощение исходного материала. 2 реакционные смеси, с которыми работали параллельно, фильтровали и промывали тетрагидрофураном (300 мл*4) и ДХМ (200 мл*3), концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex luna C18 250*50 мм*10 мкм; подвижная фаза: [вода(0.1% ТФУК)-АСН]; В%: 15%-45%, 20 мин) с партией ET12452-78, в результате чего получали соединение **29** (14 г, 63% выход) в форме белого твердого вещества. ¹H-ЯМР: (ET12452-80-p1j) ДМСО, Varian_D_400МГц) δ 9.19 (s, 1 H), 7.99 - 8.10 (m, 3 H), 7.83 (d, *J* = 9.3 Гц, 3 H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Гц, 2 H), 6.62 (d, *J* = 8.4 Гц, 2 H), 5.76 (s, 2 H), 5.21 (d, *J* = 3.3 Гц, 3 H), 4.97 (dd, *J* = 11.2, 3.3 Гц, 3 H), 4.54 (d, *J* = 8.6 Гц, 3 H), 4.03 (s, 9 H), 3.83 - 3.92 (m, 3 H), 3.73 - 3.81 (m, 3 H), 3.53 - 3.61 (m, 4 H), 3.44 - 3.52 (m, 16 H), 3.43 (br d, *J* = 4.4 Гц, 3 H), 3.36 - 3.39 (m, 3 H), 3.26 - 3.33 (m, 4 H), 3.05 - 3.24 (m, 9 H), 2.65 - 2.82 (m, 2 H), 2.10 (s, 9 H), 2.00 (s, 9 H), 1.89 (s, 9 H), 1.77 (s, 9 H).

14) Получение соединения **30**.



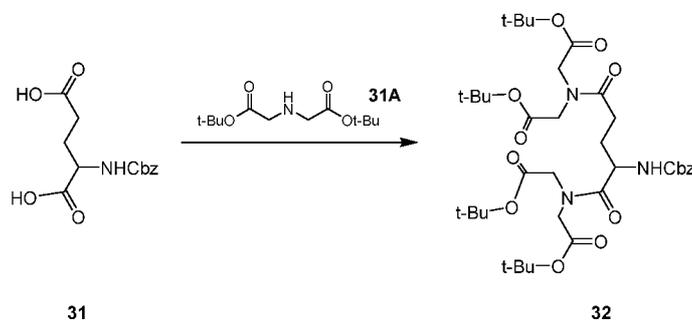
Соединение **29** (8 г, 4.77 ммоль, 1.00 экв.) растворяли в ДХМ (65 мл) и добавляли соединение **29А** (2.88 г, 9.54 ммоль, 3 мл, 2.00 экв.). Полученный раствор охлаждали до 5 °С. К этому раствору добавляли 2Н-тетразол (0.45 М, 11.7 мл, 1.10 экв.). Раствору давали нагреться до 15 °С и перемешивали в течение 3.5 ч. ТСХ (ДХМ/МеОН = 5:1, R_f = 0.52) показала поглощение исходного материала, а ВЭЖХ (ET12452-82-P1A, R_t = 2.69 мин) показала образование продукта. Разбавляли дихлорметаном (50 мл),

нейтрализовали при помощи NaHCO_3 (30 мл), водную фазу экстрагировали дихлорметаном (30 мл*2), объединенные органические слои промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (30 мл*2), H_2O (30 мл) и соевым раствором (30 мл*2), сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли дихлорметаном (30 мл), затем по каплям добавляли гексан (150 мл) при 0 °С и перемешивали в течение 15 мин, затем охлаждали, органический слой сливали и снова растворяли в дихлорметаном (30 мл) и добавляли по каплям гексан (150 мл) по каплям, эту процедуру повторяли 7 раз, сушили под вакуумом, в результате чего получали соединение **30** (5.5 г, 55% выход) в форме белого твердого вещества. ^1H -ЯМР: (ET12452-83-p1b ДМСО, Varian_D_400МГц) δ 7.97 - 8.09 (m, 3 H), 7.78 (d, $J = 9.3$ Гц, 3 H), 7.06 (d, $J = 8.2$ Гц, 2 H), 6.86 (d, $J = 8.2$ Гц, 2 H), 5.73 (s, 2 H), 5.18 (d, $J = 3.3$ Гц, 3 H), 4.94 (dd, $J = 11.1, 3.4$ Гц, 3 H), 4.51 (d, $J = 8.4$ Гц, 3 H), 3.99 (s, 9 H), 3.79 - 3.89 (m, 4 H), 3.70 - 3.78 (m, 4 H), 3.59 - 3.69 (m, 2 H), 3.49 - 3.58 (m, 4 H), 3.44 (s, 16 H), 3.40 (br d, $J = 4.2$ Гц, 3 H), 3.32 - 3.37 (m, 5 H), 3.24 - 3.28 (m, 1 H), 3.05 - 3.22 (m, 9 H), 2.78 (br t, $J = 5.8$ Гц, 4 H), 2.07 (s, 9 H), 1.96 (s, 9 H), 1.86 (s, 9 H), 1.74 (s, 9 H), 1.15 (d, $J = 6.8$ Гц, 6 H), 1.09 (d, $J = 6.8$ Гц, 6 H).

На Фигуре 3 показан ^1H -ЯМР-спектр для соединения **30** (Структура 1025b в настоящем документе).

Пример 4: Синтез фосфоамидит-содержащего соединения с нацеливающим лигандом структуры 1014b.

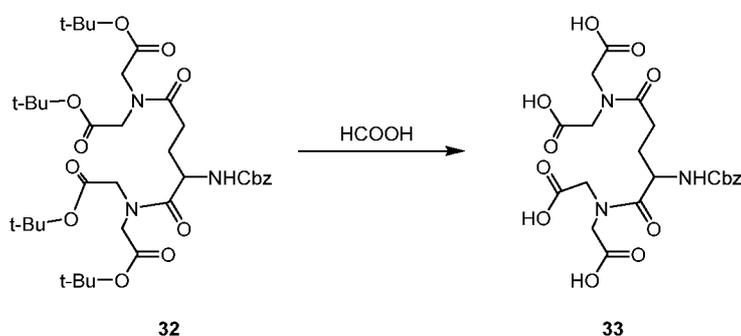
1) Получение соединения **32**.



Раствор соединения **31** (24.71 г, 87.85 ммоль, 1.00 экв.), соединения **31A**, EDCI (39.07 г, 203.82 ммоль, 2.32 экв.), пиридина (19.39 г, 245.11 ммоль, 19.79 мл, 2.79 экв.) в ацетонитриле (260.00 мл) перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. ТСХ (петролейный

эфир/этилацетат=1/1, целевой продукт; Rf=0.7) показала образование целевого продукта. Эту смесь добавляли в 300 мл EtOAc, промывали гидрокарбонатом натрия (NaHCO₃, 100 мл *2), 100 мл солевого раствора, сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, в результате чего получали остаток. Неочищенный продукт очищали при помощи колонки с силикагелем (петролейный эфир/этилацетат=100/1~3/1), в результате чего получали соединение **32** (60.00 г, 79.25 ммоль, выход 90.20%, чистота 97.19%) в виде желтого масла. ¹H-ЯМР: (ET12600-89-p1a ДМСО, Varian_D_400МГц) δ ppm 7.52 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.27-7.38 (m, 5H), 4.99 (s, 2H), 4.26-4.42 (m, 3H), 3.80-4.15 (m, 8H), 2.27 (br s, 2H), 1.78-1.88 (m, 1H), 1.66 (br dd, J = 14.4, 7.2 Гц, 1H), 1.37-1.41 (m, 35H)

2) Получение соединения **33**.



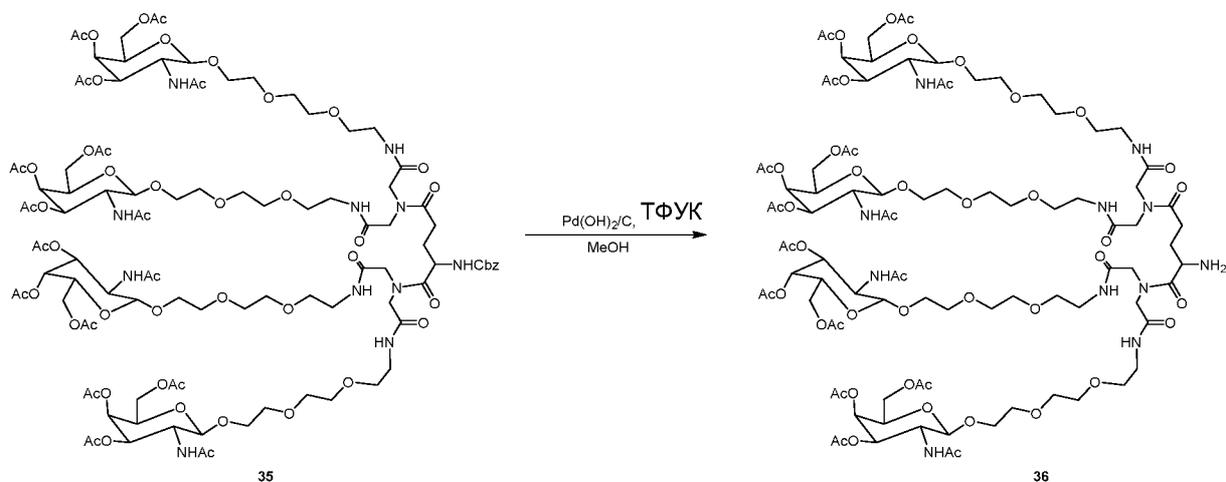
Раствор соединения **32** (45.00 г, 61.15 ммоль, 1.00 экв.) в муравьиной кислоты (800.00 мл) перемешивали при 45 °С в течение 6 ч. ЖХМС (et12600-90-p1a, МС=511) показала образование целевого продукта. Смесь концентрировали, в результате чего получали остаток. Остаток промывали 1000 мл дихлорметана, в результате чего получали соединение **33** (30.00 г, 54.71 ммоль, выход 89.47%, чистота 93.27%) в форме белого твердого вещества. ¹H-ЯМР: (ET12600-90-p1a ДМСО, Bruker_V_400МГц) δ 12.75 (br s, 3H), 7.53 (br d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.29-7.38 (m, 5H), 4.99 (d, J = 3.6 Гц, 2H), 4.27-4.38 (m, 2H), 4.12 (br s, 2H), 3.84-4.07 (m, 6H), 2.30 (br t, J = 7.2 Гц, 2H), 2.07 (s, 1H), 1.59-1.88 (m, 2H), 1.39 (t, J = 5.6 Гц, 1H).

3) Получение соединения **34**.

перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. ЖХМС (et12600-98-p1g) показала образование целевого продукта. Эту смесь вливали а 200 мл ДХМ, промывали 100 мл гидрокарбоната натрия (NaHCO₃), 100 мл солевого раствора, сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, в результате чего получали остаток.

5 Очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Gemini C18 250*50 10 мк; подвижная фаза: [вода(10мМ NH₄HCO₃)-ACN]; В%: 15%-45%, мин), в результате чего получали соединение **5** (11 г, 4.65 ммоль, выход 30.98%, чистота 99.5%) в виде желтого твердого вещества. ¹H-ЯМР: (ET12600-98-p1a1 ДМСО, Varian_D_400МГц) δ 8.65-8.71 (m, 1H), 8.51 (br s, 1H), 8.18-8.25 (m, 1H), 8.11 (br s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.8 Гц, 4H), 7.47 (br d, *J* = 7.6 Гц, 1H), 7.28-7.40 (m, 5H), 5.75 (s, 4H), 5.22 (d, *J* = 3.2 Гц, 4H), 4.95-5.03 (m, 6H), 4.55 (d, *J* = 8.4 Гц, 4H), 3.98-4.06 (m, 15H), 3.88 (dt, *J* = 11.2, 8.8 Гц, 7H), 3.78 (dt, *J*=10, 5.2 Гц, 5H), 3.54-3.62 (m, 6H), 3.46-3.53 (m, 25H), 3.41 (q, *J* = 5.6 Гц, 9H), 3.23 (br dd, *J* = 11.6, 5.6 Гц, 8H), 2.10 (s, 12H), 2.00 (s, 12H), 1.89 (s, 12H), 1.77 (s, 12H).

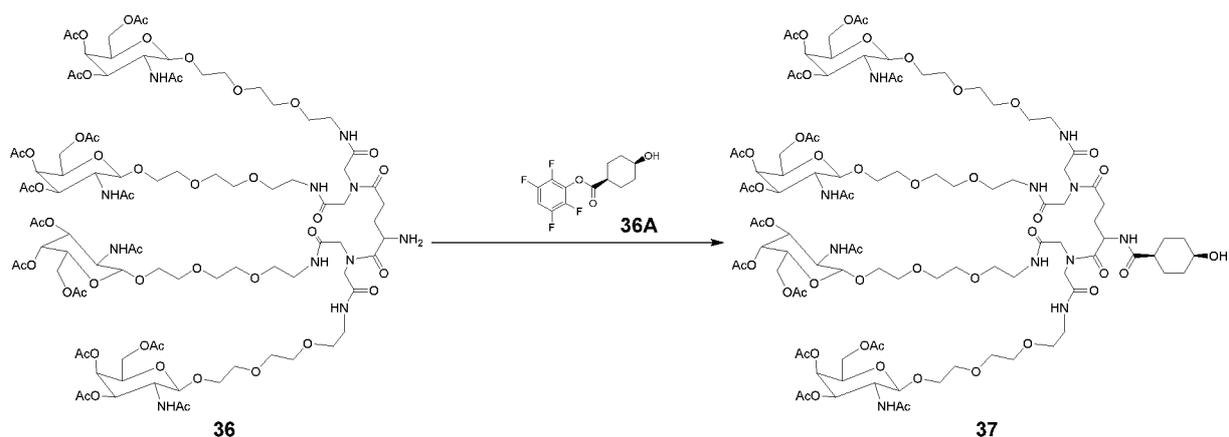
15 5) Получение соединения **36**.



К раствору соединения **35** (10 г, 4.25 ммоль, 1 экв.), ТФУК (484.52 мг, 4.25 ммоль, 314.62 мкл., 1 экв.) в MeOH (10 мл) добавляли 10% Pd(OH)₂/C (3.00 г), затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 4 ч в атмосфере H₂ (50 фунтов на кв. дюйм). ЖХМС (et12600-107-p1a, Rt=2.195) показала образование целевого продукта, смесь фильтровали и концентрировали, в результате чего получали соединение **36** (8 г, 3.60 ммоль, 84.84% выход) в виде желтого твердого вещества. ¹H-ЯМР: (ET12600-107-p1a ДМСО, Varian_D_400МГц) δ 8.68 (br t, *J* = 5.2 Гц, 1H), 8.46 (br t, *J* = 5.2 Гц, 1H), 8.21-

8.27 (m, 1H), 8.15 (br d, $J = 5.6$ Гц, 2H), 7.84 (br d, $J = 9.2$ Гц, 4H), 5.22 (d, $J = 3.2$ Гц, 4H), 4.98 (dd, $J = 11.2, 3.2$ Гц, 4H), 4.56 (d, $J = 8.4$ Гц, 4H), 4.24 (br s, 1H), 3.99-4.14 (m, 23H), 3.84-3.94 (m, 7H), 3.74-3.83 (m, 5H), 3.55-3.62 (m, 5H), 3.51 (s, 25H), 3.38-3.46 (m, 9H), 3.20-3.30 (m, 9H), 3.17 (d, $J = 5.2$ Гц, 14H), 2.11 (s, 12H), 2.00 (s, 13H), 1.89 (s, 12H), 1.78 (s, 12H).

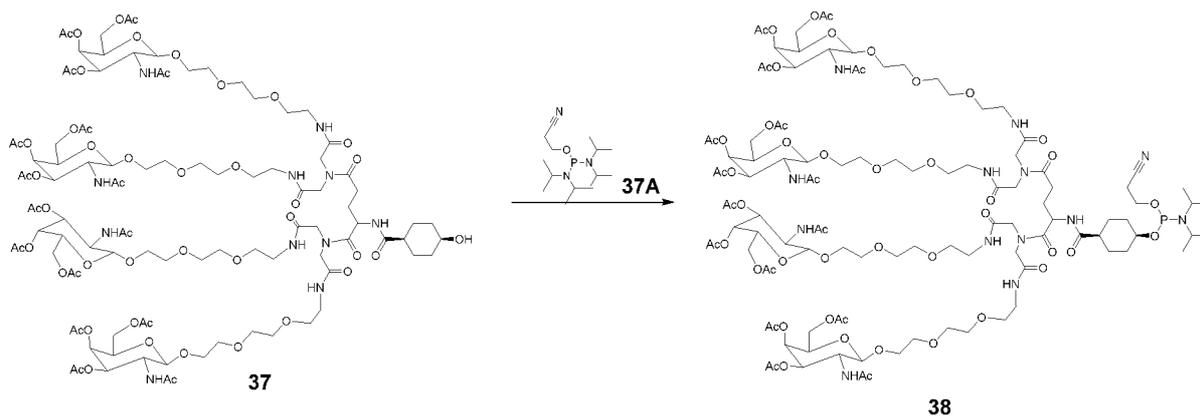
б) Получение соединения **37**.



Партии готовили параллельно. К раствору соединения **36** (2 г, 857.18 мкмоль, 1.00 экв., ТФУК), соединения **36А** (626.23 мг, 2.14 ммоль, 2.50 экв.) в ДХМ (6 мл) добавляли ТЭА (312.26 мг, 3.09 ммоль, 427.75 мкл, 3.60 экв.), затем смесь перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. ЖХМС показала образование целевого продукта. Все реакционные смеси объединяли, растворяли в 200 мл ДХМ, вливали в 30 мл NaHCO_3 , промывали 30 мл солевого раствора, сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали, в результате чего получали остаток. Очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Gemini C18 250*50 10мк; подвижная фаза: [вода(10мМ NH_4HCO_3)-ACN]; В%: 15%-45%, 20 мин), в результате чего получали соединение **37** (7.5 г, 3.20 ммоль, 93.27% выход) в форме белого твердого вещества. ^1H -ЯМР: (ET12600-111-p1a ДМСО, Varian_D_400МГц) δ 8.66 (s, 1H), 8.51 (br s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.91 (br d, $J = 7.2$ Гц, 1H), 7.80 (d, $J = 9.2$ Гц, 4H), 5.22 (d, $J = 3.2$ Гц, 4H), 4.98 (dd, $J = 11.2, 3.2$ Гц, 4H), 4.55 (d, $J = 8.4$ Гц, 4H), 4.47 (br s, 1H), 4.30 (s, 1H), 4.25 (d, $J = 3.2$ Гц, 1H), 4.03 (s, 11H), 3.97 (br s, 2H), 3.84-3.92 (m, 7H), 3.73-3.82 (m, 6H), 3.55-3.62 (m, 5H), 3.47-3.54 (m, 24H), 3.41 (q, $J = 5.6$ Гц, 9H), 3.23 (br dd, $J = 11.2, 5.6$ Гц, 8H), 2.19 (br s, 1H), 2.10 (s, 12H), 2.00 (s, 13H), 1.89 (s, 12H), 1.77 (s, 13H), 1.61 (br s, 3H), 1.40 (br d, $J = 11.2$ Гц, 4H).

25

8) Получение соединения **38**.



Объединяли соединение **37** (4.4 г, 1.88 ммоль, 1 экв.) в ДХМ (26.4 мл) и соединение **37A** (1.13 г, 3.75 ммоль, 1.19 мл, 2 экв.). Полученный раствор охлаждали до 5 °С. К этому раствору добавляли 2Н-тетразол (0.45 М, 4.59 мл, 1.1 экв.). Раствору давали нагреться до 20 °С и перемешивали в течение 2 ч. Эту смесь растворяли в 100 мл ДХМ, нейтрализовали 20 мл NaHCO₃, экстрагировали дихлорметаном (50 мл*2), промывали 20 миллилитрами NaHCO₃, 20 мл солевого раствора, сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, в результате чего получали остаток. Остаток растворяли дихлорметаном (25 мл, 0.2% ТЭА), затем по каплям добавляли гексан (125 мл, 0.2% ТЭА) при 0 °С и перемешивали в течение 15 мин, затем остужали, органический слой сливали, масло растворяли дихлорметаном (30 мл) еще раз и добавляли по каплям гексан (150 мл), эту процедуру повторяли 3 раза, сушили под вакуумом. К белому твердому веществу добавляли 20 мл ДХМ, сушили его под вакуумом при 30 °С, в результате чего получали **38** (4.8 г, 1.83 ммоль, 67.34% выход, 97.15% чистота) в форме белого твердого вещества. ЖХМС: [M-iPr₂N]⁺/2, 1222.8. ¹H-ЯМР: (ДМСО, Varian_400МГц) δ 8.67 (br s, 1H), 8.52 (br s, 1H), 8.20 (br s, 1H), 8.08 (br s, 1H), 7.98 (br d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.79 (br d, J = 9.2 Гц, 4H), 5.21 (d, J = 3.2 Гц, 4H), 4.98 (dd, J = 11.2, 3.2 Гц, 4H), 4.55 (d, J = 8.4 Гц, 4H), 4.47 (br s, 1H), 4.29 (br d, J = 17.6 Гц, 1H), 3.94-4.11 (m, 16H), 3.83-3.94 (m, 8H), 3.78 (br dd, J = 10.4, 5.2 Гц, 6H), 3.64-3.74 (m, 3H), 3.54-3.63 (m, 8H), 3.50 (br s, 26H), 3.36-3.44 (m, 9H), 3.14-3.29 (m, 9H), 2.75 (t, J = 5.6 Гц, 2H), 2.15-2.27 (m, 4H), 2.10 (s, 13H), 2.00 (s, 13H), 1.82-1.95 (m, 15H), 1.77 (s, 14H), 1.59-1.73 (m, 4H), 1.45 (br d, J = 14.4 Гц, 4H), 1.14 (d, J = 6.4 Гц, 12H).

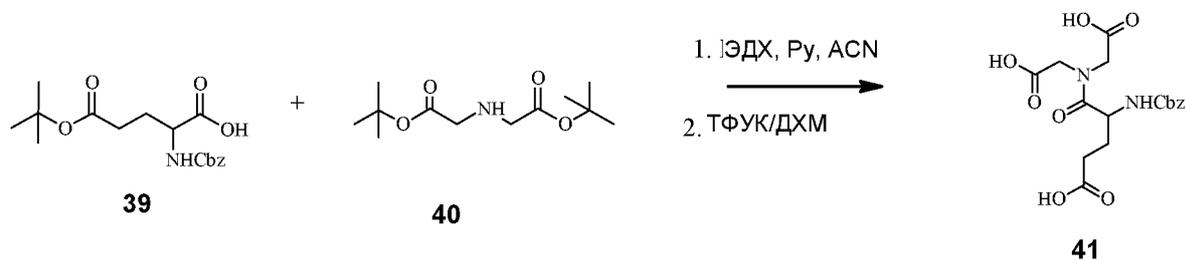
На Фигуре 4 показан ¹H-ЯМР-спектр для соединения **38** (Структура 1014b в настоящем документе).

Пример 5: Синтез нацеливающего лиганда, представляющего собой фосфорамидитное соединение структуры 1006b и 1007b.

Фосфорамидит-содержащее соединение Структуры 1006b и Структуры 1007b синтезировали в соответствии с одной процедурой, с одним отличием, заключающимся в том, что для синтеза структуры 1006b применяли 4-цис-гидроксициклогексанкарбоновую кислоту (соединение **8** в настоящем документе), а для синтеза структуры 1007b использовали 4-транс-гидроксициклогексанкарбоновую кислоту (соединение **8a** в настоящем документе).

10

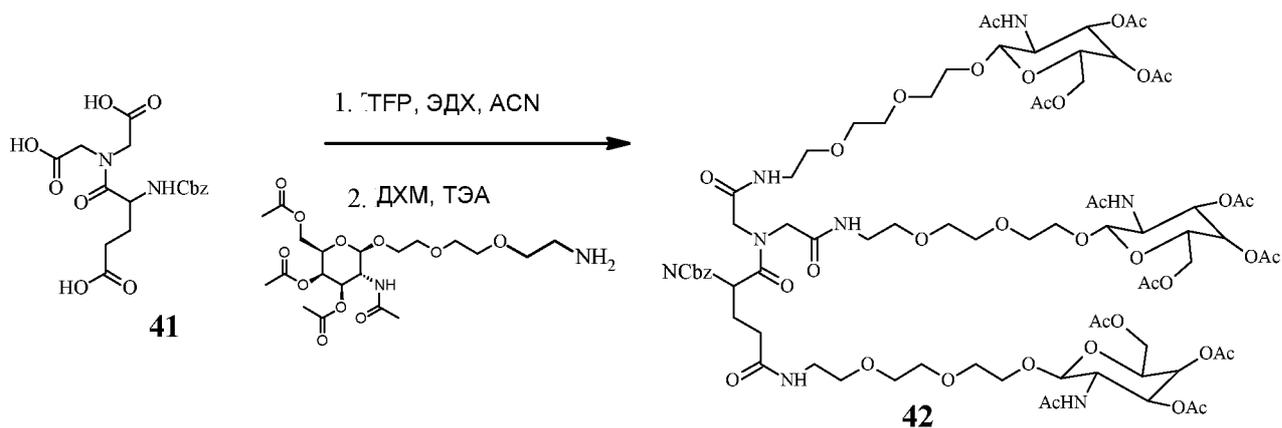
1) Получение соединения **41**.



Раствор Z-Glu-(OtBu)-OH **39** (445 мг, 1.32 ммоль), ди-трет-бутилиминодиацетата **40** (340 мг, 1.39 ммоль), ЭДХ (319 мг, 1.66 ммоль, 1.23 экв.) и Py (3 экв., 0.33 мл) в ацетонитриле (3 мл) перемешивали при к.т. в течение 1ч, разбавляли этилацетатом и промывали NaHCO₃ (2x). Органический слой сушили MgSO₄ и выпаривали. Затем неочищенный продукт растворяли в ДХМ (5 мл) и добавляли ТФУК (5 мл). Эту смесь перемешивали при к.т. в течение 16 ч, а затем выпаривали. Этилацетат добавляли и выпаривали 4x до образования пены/осадка. Неочищенное соединение **41** использовали без дополнительной обработки в этапе активации TFP (тетрафторфенолом). R_t = 3.78 мин, 90% чистота. ЖХМС (электрораспыление, M/z): 379.0 [M+H]⁺.

20

2) Получение соединения **42**.



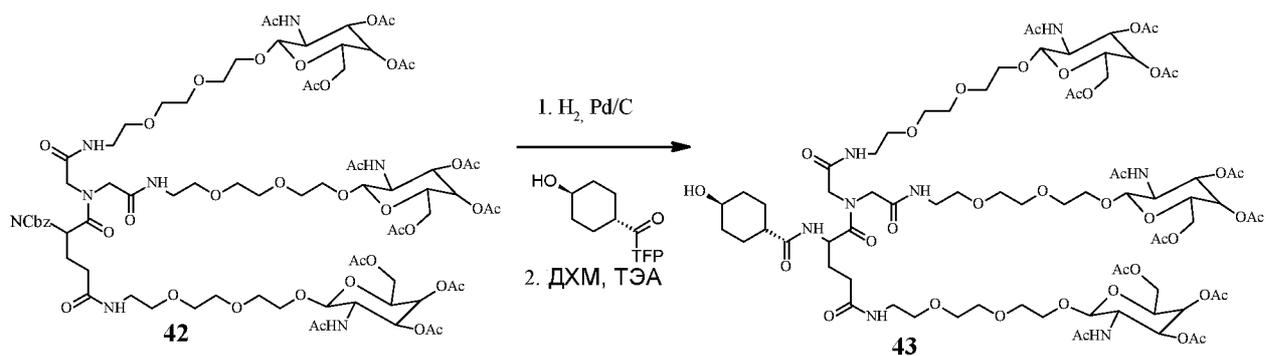
Раствор неочищенной трикислоты **41** (~1.30 ммоль), TFP (тетрафторфенол, 7экв., 9.10 ммоль, 1.51 г), ТЭА (4экв, 0.723 мл) и ЭДХ (3.3 экв., 4.29 ммоль, 0.82 г) в ацетонитриле (3.5 мл) перемешивали при к.т. в течение 1ч, разбавляли дихлорметаном (250 мл) и промывали насыщенным NaHCO_3 (2 x 100 мл). Органическую фазу сушили при помощи Na_2SO_4 , концентрировали и выливали на колонку с силикагелем. Полученный активированный три-тетрафторфеноловый эфир элюировали этилацетатом (AcOEt) в гексане (5-20%), в результате чего получали 550 мг продукта со следовыми количествами TFP. $R_t = 7.06$ мин.

10

ТЭА (400 мкл, 2.9 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору, содержащему три-тетрафторфеноловый эфир (540 мг, 0.642 ммоль) и $\text{GalNAc-Peg}_3\text{-NH}_2 \times \text{TsOH}$ (2.89 ммоль, 1.88 г) в ДХМ (6 мл). Его перемешивали при к.т. в течение 16 ч, разбавляли дихлорметаном (200 мл) и промывали насыщенным раствором NaHCO_3 /насыщенным солевым раствором (1:1, 2 x 150 мл). Органический слой сушили при помощи Na_2SO_4 , выпаривали с получением белого твердого вещества. Твердое вещество растворяли в ДХМ и выливали на колонку с силикагелем. Элюирование метанолом в ДХМ (0-10%) давало 748 мг с чистотой 95.4% и ~100 мг при 80% чистоте три-GalNAc **42**, 36% выход, после 2 этапов. ЖХМС (электрораспыление, M/z): 1777.5 $[\text{M}]^+$, $R_t = 4.67$ мин.

20

3) Получение соединения **43**.



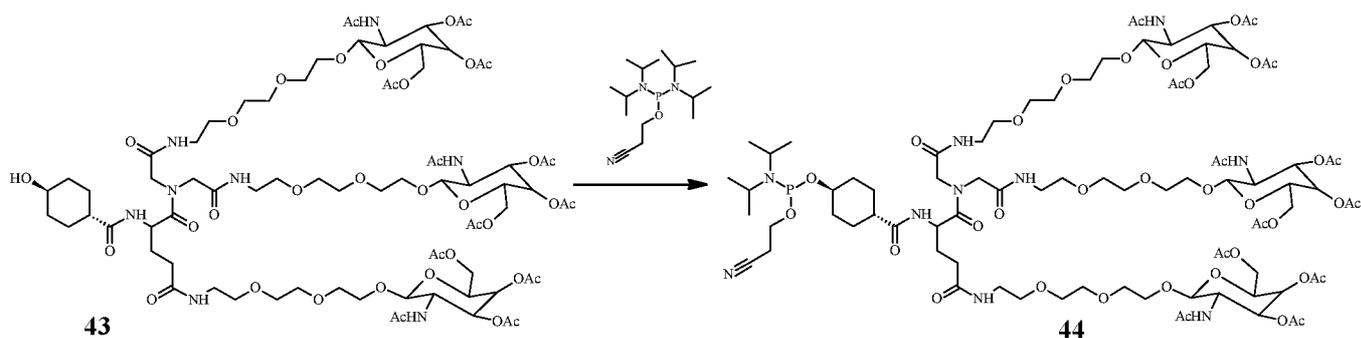
10% Pd/C, активированную матрицу (30 мг) добавляли к раствору Cbz -защищенного амина **42** (715 мг, 0.402 ммоль) и TsOH (74.5 мг, 0.402 ммоль) в ТГФ (4 мл) и ТФЭ (4 мл). Затем создавали атмосферу азота (баллон), откачивая атмосферу и заполняя водородом. Смесь перемешивали в атмосфере азота в течение 24ч, фильтровали через целит, промывали дихлорметаном (2 x 10 мл) и выпаривали, после чего в остатке получали спирт С в форме белого твердого вещества. ЖХМС (электрораспыление, M/z): 1644.2 [M+H]⁺, R_t = 4.67 мин.

10

Промежуточное соединение без защиты (0.4 ммоль) и TFP-эфир 4-гидроксициклогексанкарбоновой кислоты (350 мг, 1.20 ммоль) растворяли в ДХМ (2.5 мл) и добавляли ТЭА (3.5 экв., 0.195 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 16ч. Затем ее разбавляли дихлорметаном (100 мл), промывали смесью насыщенный NaHCO₃/насыщенный солевой раствор (1:1, 100млx2). Органическую фазу сушили при помощи Na₂SO₄, концентрировали и выливали на колонку с силикагелем. Продукт элюировали метанолом (MeOH) в ДХМ (2-20%), в результате чего получали 430 мг соединения **43** с чистотой более > 95%, при выходе 61%. R_t = 4.20 мин. ЖХМС: (электрораспыление, M/z): 1771.26 [M+H]⁺.

20

4) Получение соединения **44**.

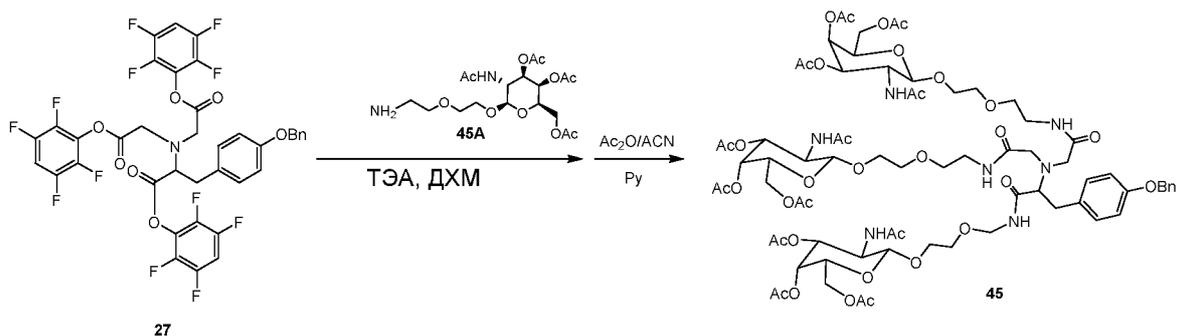


2-цианоэтил-N,N,N',N'-тетраизопропилфосфородиамидид (1.5 экв., 110 мкл., 0.343 ммоль) добавляли при 0 °С к перемешиваемому раствору спирта **43** (405 мг, 0.229 ммоль, высушенного под вакуумом) и тетразола (0.50 экв., 0.25 мл, 0.112 ммоль, 0.45M в ACN) в безводном ДХМ (2.4 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 1 и добавляли дополнительное количество тетразола (0.125 мл) и 2-цианоэтил-N,N,N',N'-тетраизопропилфосфородиамидида (0.10 мл). Продолжали перемешивать в течение 30 мин, затем смесь разбавляли дихлорметаном (200 мл) и промывали комбинацией насыщенным NaHCO₃/ насыщенный солевой раствор (1:1, 200 мл). Органический слой сушили при помощи Na₂SO₄/MgSO₄, выпаривали, затем растворяли в безводном ДХМ и выпаривали, после чего в остатке снова получали белое твердое вещество **44**, 408 мг, ВЭЖХ, чистота 92%, 83% выход. ЖХМС: (электрораспыление, M/z): 1870.4 [M-iPr₂N]⁺.

На Фигуре 5 показан ¹H-ЯМР-спектр для соединения **44** (Структура 1007b в настоящем документе).

Пример 6: Синтез фосфоамидит-содержащего соединения с нацеливающим лигандом структуры 1027b.

1) Получение соединения **45**.



ТЭА (5.3 ммоль, 0.735 мл, 4.00 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору, содержащему соединение **27** (1.1 г, 1.32 ммоль, 1.00 экв.) и соединение **45A** (3.20 г, 5.29 ммоль, 4.00 экв.) в ДХМ (9 мл). Смесь перемешивали при 30 °С в течение 16 ч. Разбавляли дихлорметаном (100 мл) и промывали комбинацией насыщенный

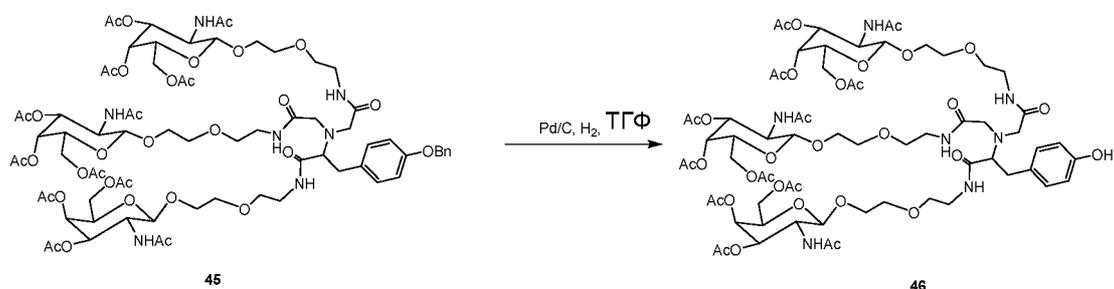
5 NaHCO_3 /насыщенный солевой раствор. Органический слой сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали, в результате чего получали неочищенный продукт в виде коричневого твердого вещества.

Неочищенный продукт растворяли в Ac_2O (3 мл), CH_3CN (6 мл) и Py (6 мл)

10 и перемешивали смесь при 25 °С в течение 16 ч. CH_3CN выпаривали, затем смесь разбавляли дихлорметаном и четырежды промывали насыщенным раствором NaHCO_3 . Органический слой отделяли и промывали комбинацией 0.1M HCl /насыщенный солевой раствор, сушили при помощи Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали при помощи колонки с силикагелем ($\text{ДХМ/MeOH} = 10:1$, $R_f = 0.45$), в

15 результате чего получали продукт **45** (1.47 г, выход 68%, чистота 96%) в форме белого твердого вещества.

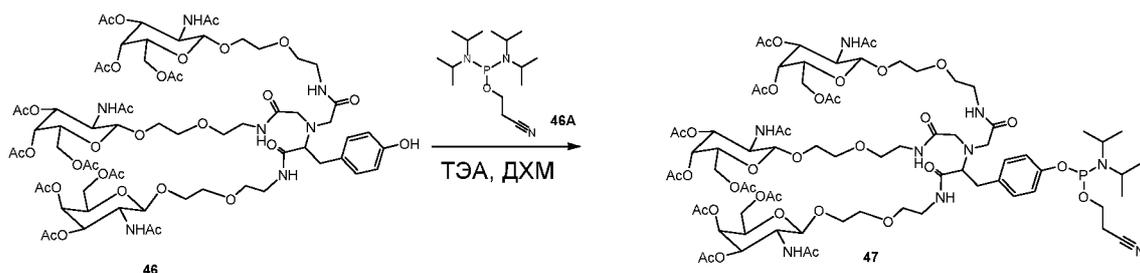
4) Получение соединения **46**.



20 К раствору соединения **45** (1.425 г, 0.871 ммоль, 1.00 экв.) в ТГФ/ТФЭ (1:1, 5 мл) добавляли 10% Pd/C (24мг) и перемешивали смесь при 40 °С в течение 30 ч в атмосфере H_2 . ТСХ ($\text{ДХМ/MeOH} = 10:1$, $R_f = 0.3$) показала поглощение исходного материала. Смесь фильтровали, промывали тетрагидрофураном (5 мл x 3), ДХМ (5

25 млx3) и концентрировали. Остаток очищали на колонке с силикагелем. Элюировали дихлорметаном/MeOH, в результате чего получали соединение **46** (1.013 г, выход 75%, чистота 95%) в форме белого твердого вещества. ЖХМС: (электрораспыление, M/z): 1547.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5) Получение соединения **47**.

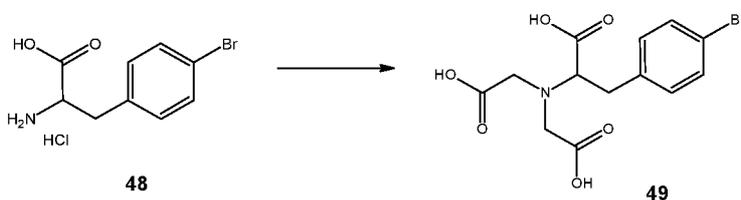


Соединение **46** (970 мг, 0.627 ммоль, 1.00 экв.) растворяли в ДХМ (4.2 мл) и добавляли соединение **46А** (0.941 ммоль, 0.298 мл, 1.5 экв.). Полученный раствор охлаждали до 5 °С и добавляли дицианоимидазол (DCI) (23.1 мг, 0.188 ммоль, 0.3 экв.). Раствору давали нагреться до 15 °С и перемешивали в течение 2 ч. ТСХ (ДХМ/MeOH = 5:1, R_f = 0.52) показала поглощение исходного материала, а ВЭЖХ показала образование продукта. Смесь разбавляли дихлорметаном (50 мл), промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (30 мл), H₂O (30 мл) и соевым раствором (30 мл), сушили при помощи Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли дихлорметаном (2 мл) и добавляли к гексану (120 мл). Белый осадок отфильтровывали, в результате чего получали соединение **47** (0.975 г, чистота 93%, 82% выход) в форме белого твердого вещества. ЖХМС: (электрораспыление, M/z): 1747.5 [M+H]⁺.

На Фиг. 6 показан ¹H-ЯМР-спектр для Соединения **47** (Структура 1027b в настоящем документе).

Пример 7. Синтез фосфоамидит-содержащего соединения с нацеливающим лигандом структуры 1026b.

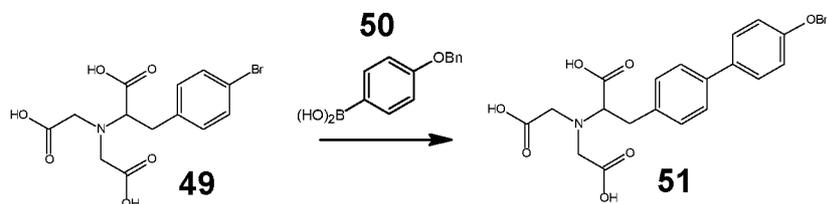
1) Получение три-кислоты **49**.



К раствору 4-бром-DL-фенилаланина гидрохлорида (5.0 г, 17.8 ммоль) в 1.5M NaOH (100 мл) добавляли бромуксусную кислоту (8.17 г, 58.8 ммоль). Раствор нагревали до 60 °С в течение 1 ч, поддерживая рН выше 12 путем добавления гранул гидроксида натрия. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до 15 °С и доводили рН до 1.75 - 2.00, выдерживали масляную суспензию в течение 2 ч до наблюдаемого образования твердого вещества, которое можно было фильтровать.

Твердые вещества фильтровали и несколько промывали водой, в результате чего выделяли белое твердое вещество (6.0 г, 93% выход).

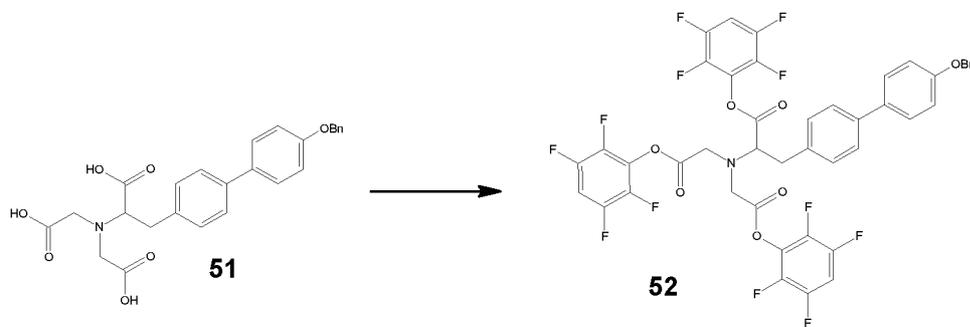
2) Получение биарильной три-кислоты **50**.



Арилбромид **49** (4.2 г, 11.6 ммоль) и бороновую кислоту **50** (2.8 г, 12.2 ммоль) растворяли в смеси 1:1 диметилформамид/вода (168 мл) и дегазировали в течение 10 минут. Раствор обрабатывали карбонат калия (8.0 г, 116.2 ммоль) и PdCl₂(dppf) (0.476 г, 0.6 ммоль), помещали реакционный сосуд в атмосферу азота и нагревали до 40 °С в течение 5 ч. После завершения реакции pH довели до 12 и водную фазу промывали 2 х (20 мл) этилацетатом. Затем pH довели до 1.75 – 2.00 и охлаждали до 15 °С. Полученные твердые вещества фильтровали и промывали водой несколько раз для удаления неорганических веществ, в результате чего получали **51** (4.8 г, 89% выход).

10

15 1) Получение три-тетрафторфенолового эфира **52**.

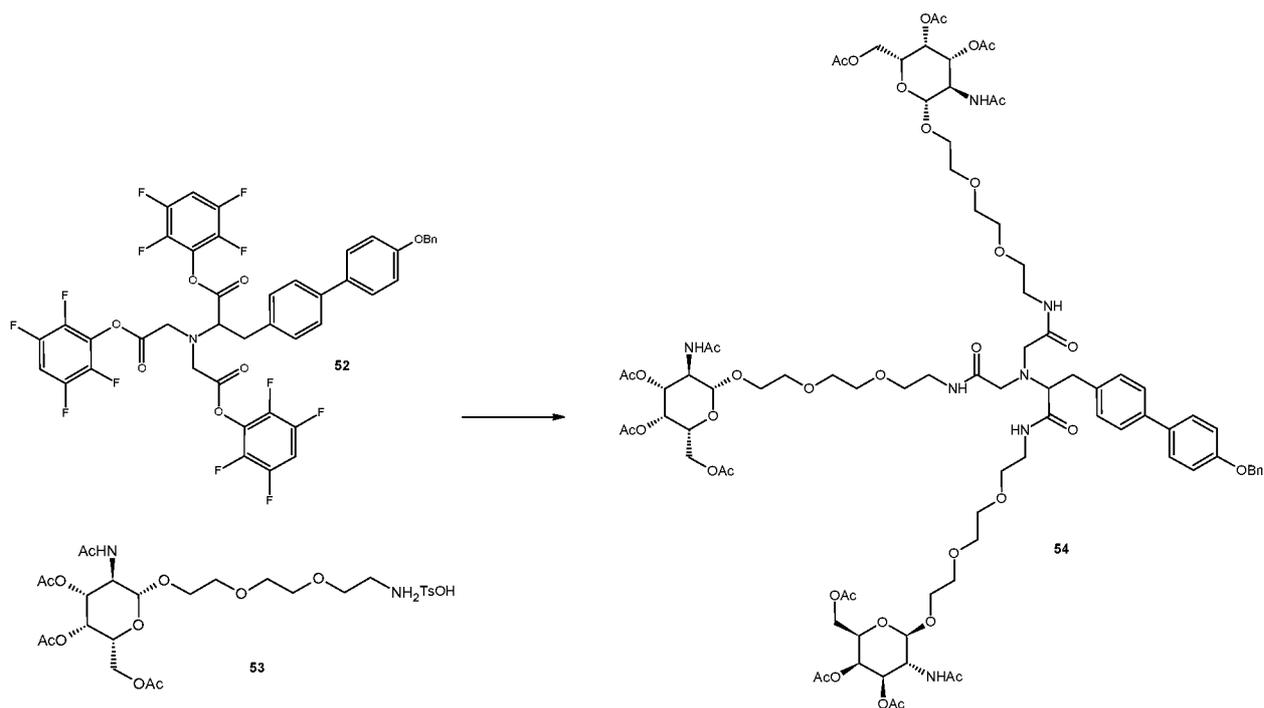


Суспензию содержащего три кислотные группы соединения **51** (5.0 г, 10.7 ммоль) и тетрафторфенола (6.5 г, 38.8 ммоль) в дихлорметане (50 мл) охлаждали до 0°С и обрабатывали EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) гидрохлоридом (7.45 г, 38.8 ммоль). Суспензию нагревали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 18 ч. После завершения реакции реакционную смесь промывали водой, органический слой концентрировали с получением масла и очищали на колонке с силикагелем, в результате чего получали тетрафторфеноловый эфир **52** (1.63 г, 16% выход).

20

25

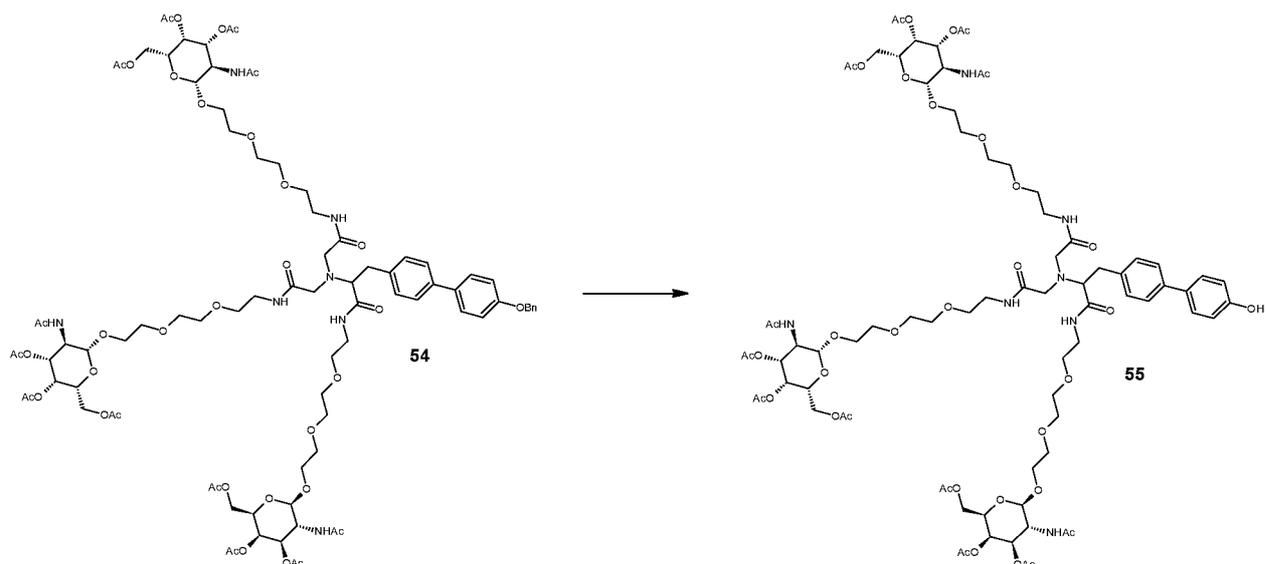
2) Получение три-NAG-защищенного спирта **54**.



5 Раствор три-тетрафторфенолового сложного эфира и **52** (1.00 г, 1.10 ммоль) NAG-аминтозилата **53** (2.15 г, 3.33 ммоль) в дихлорметане (5 мл) охлаждали до 0 °С и обрабатывали триэтиламинем (0.66 г, 6.6 ммоль). Раствору давали нагреться до температуры окружающей среды в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную смесь промывали водой и концентрировали с получением масла. Неочищенное масло растворяли в уксусном ангидриде (30 мл) и обрабатывали

10 раствором 1 мл триэтиламина. Через 3 ч органические вещества удаляли в высоком вакууме с получением масла **54** (1.7 г, 85% выход).

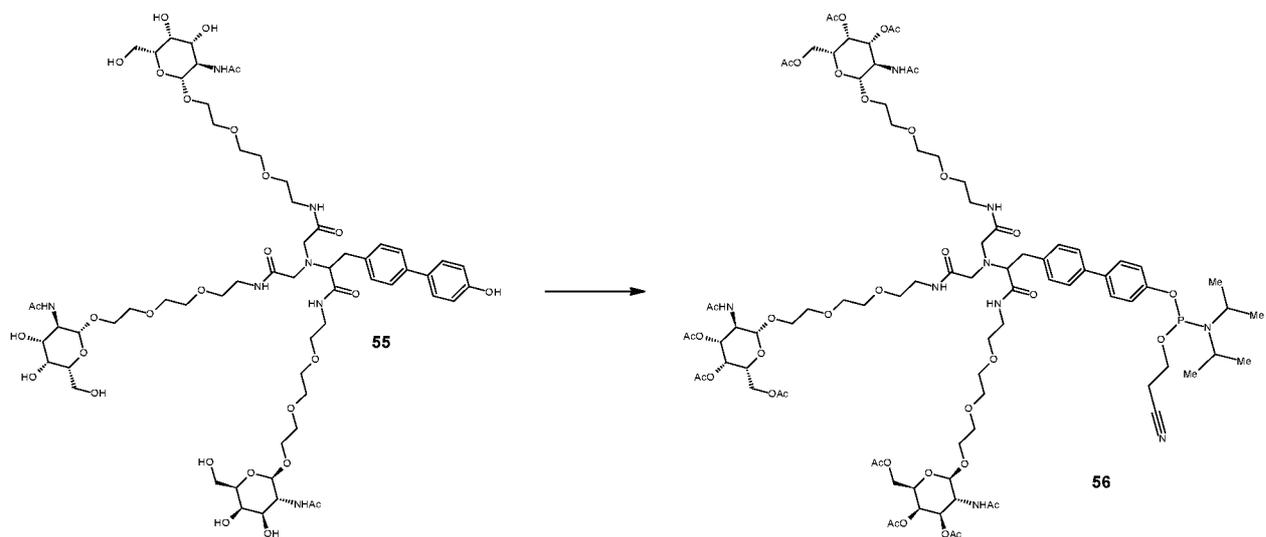
3) Получение фенолсодержащего соединения **55**.



Защищенный бензилом спирт **54** (2.0 г, 1.08 ммоль) растворяли в этаноле (23 мл) и помещали в атмосферу азота. К раствору добавляли 10% Pd/C (0.7 г, 30 мол.%). Суспензию перемешивали в течение 8 ч в условиях окружающей среды и удаляли катализатор через слой целита. Органические вещества удаляли в высоком вакууме, в результате чего получали белое твердое вещество **55** (1.4 г, 74% выход).

4) Получение соединения **56**.

10



15

Раствор фенолсодержащего соединения **55** (1.3 г, 0.74 ммоль) и фосфорамидитного реагента (0.364 мг, 1.11 ммоль) в дихлорметане (10 мл) охлаждали до 0 °С и обрабатывали 4,5-дицианоимидазолом, а затем давали нагреться до температуры окружающей среды в течение 2 ч. После завершения реакции реакционную смесь

промывали насыщенным бикарбонатом натрия (10 мл), а затем водой (10 мл), органический слой сушили при помощи сульфата натрия. Органические вещества концентрировали при пониженном давлении, в результате чего получали белое твердое вещество (1.4 г, 93% выход).

5

Соединение **56** из Примера 7 представляет собой структуру 1026b в настоящем документе.

Пример 8. Физические свойства фосфоамидит-содержащих соединений, содержащих нацеливающие лиганды.

10

Некоторые фосфоамидитные соединения, содержащие лиганд GalNAc, которые необязательно включают жесткую линкерную структуру, раскрытую в настоящем документе, проявили склонность в гелеобразованию во многих обычных растворителях. На прилагающейся фигуре 7 представлена фотография, иллюстрирующая поведение структуры GalNAc, содержащей те же нацеливающий фрагмент (N-ацетилгалактозамин), соединительный фрагмент и группу точки ветвления, что и структура 1008b, но включает ПЭГ-линкер вместо жесткого линкера из Структуры 1008b, раскрытой в настоящем документе. Фосфоамидитное соединение, содержащее ПЭГ-линкер-GalNAc выдерживали в течение 12 ч в смеси 3:1 ацетонитрил:DMFA при 0.1 М разбавлении на молекулярных ситах. ПЭГ-линкер--GalNAc демонстрирует значительное гелеобразование в этой высоко полярной системе растворителей. Для поддержания растворимости этого фосфоамидитного соединения, содержащего ПЭГ-линкер-GalNAc, необходимо использовать смесь ацетонитрил:DMFA с отношением до.

20
25

Предлагающаяся Фигура 8 представляет собой фотографию, на которой показано, что фосфоамидитное соединение Структуры 1008b полностью растворялось 0.05 М в ацетонитриле, и для этого не требовались высоко полярные растворители, такие как DMFA. В отличие от конструкций ПЭГ-линкер-GalNAc, для фосфоамидитных соединений, которые включают жесткий линкер в соответствии со структурой 1008b, отсутствует опасность, что для поддержания их растворимости потребуется высоко полярный растворитель. Даже при том, что во флаконе они растворялись в более низкой концентрации, это показывает, что структуры, содержащие жесткие линкеры, раскрытые в настоящем документе, обладают лучшей растворимостью в обычных

30

растворителях, часто применяемых для синтеза олигонуклеотидов, и не требуют высоко полярных растворителей для предотвращения гелеобразования.

Пример 9. Чистота фосфоамидит-содержащих соединений, содержащих нацеливающие лиганды.

5 Как отмечается выше в Примере 2, на Фиг. 2А показан ^{31}P -ЯМР спектр фосфоамидитного соединения Структуры 1008b. На Фиг. 2А показан единственный пик, демонстрирующий корректный сдвиг для фосфоамидита. На изображении отсутствуют другие пики, включая пики, связанные с гидролизом, что указывает на высокую чистоту соединения.

10 На Фиг. 9 показан ^{31}P -ЯМР-спектр структуры, содержащей ПЭГ линкер-GalNAc, которая, за исключением этого включает те же точку ветвления, соединительный фрагмент и нацеливающий фрагмент, что и структура 1008b. Химическая структура фосфоамидита, для которого был получен спектр, показанный на Фиг. 9, показан на Фиг. 9. На Фиг. 9 видны многочисленные пики примесей, которые включают примеси, по-видимому являющиеся побочными продуктами.

Пример 10. Синтез олигонуклеотидной композиции.

А. *Синтез.* агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфоамидитной теврдофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов. В зависимости от масштаба, с применением либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation). Синтез осуществляли на твердой подложке, выполненной из стекла с контролируемым размером пор (CPG, 500 Å или 600Å, полученной из Prime Synthesis, Aston, PA, США) Все РНК и 2'-модифицированные РНК-фосфоамидиты приобретали в Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, США). В частности, применяли следующие 2'-О-метил фосфоамидиты: (5'-О-диметокситритил-N⁶-(бензоил)-2'-О-метил-аденозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфоамидит, 5'-О-диметокси-тритил-N⁴-(ацетил)-2'-О-метил-цитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфоамидит, (5'-О-диметокситритил-N²-(изобутирил)-2'-О-метилгуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфоамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метилуридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфоамидит. 2'-дезоксид-2'-фтор-фосфоамидиты несли те же защитные группы, что и 2'-О-метил-РНК-амидиты. Нацеливающие лиганды, содержащие фосфоамидиты, растворяли в безводном дихлорметане или безводном

ацетонитриле (50 мМ), а другие амидиты растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ) и добавляли молекулярные сита (3Å). 5-бензилтио-1Н-тетразол (ВТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ, 250 мМ в ацетонитриле) применяли в качестве активирующего раствора. Значения времени связывания составляли 10 мин (РНК), 15 мин (нацеливающий лиганд), 90 сек (2'OMe) и 60 сек (2'F). Для введения фосфоротиоатных связей применяли 100 мМ раствор 3--фенил-1,2,4-дитиазолин-5-она (POS, полученный из PolyOrg, Inc., Leominster, MA, США) в безводном ацетонитриле .

10 *В. Отщепление и удаление защиты олигомера, связанного с подложкой.* После окончания твердофазного синтеза высушенную твердую подложку обрабатывали раствором 1:1 по объему 40 масс.% метиламин в воде и 28% раствором гидроксида аммония (Aldrich) в течение двух ч при 30°C. Раствор выпаривали и восстанавливали твердый остаток в воде в воде (см. ниже).

15 *С. Очистка.* Неочищенные олигомеры очищали анионо-обменной ВЭЖХ с применением колонки TKSgel SuperQ-5PW 13мк и системы Shimadzu LC-8 . Буфер А представлял собой 20 мМ Tris, 5 мМ ЭДТА, рН 9.0, и содержал 20% ацетонитрила, а буфер Б был таким же как буфер А, но с добавлением 1.5 М хлорида натрия. Регистрировали остаточное УФ при 260 нм. Соответствующие фракции объединяли, затем подвергали вытеснительной ВЭЖХ с применением колонки GE Healthcare XK 20 16/40, заполненная средой Sephadex G-25 с подвижным буфером из 100мМ бикарбоната аммония, рН 6.7 и 20% ацетонитрила.

25 *Д. Отжиг.* Комплементарные нити смешивали путем объединения эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с образованием агентов РНКи. Этот раствор помещали в термомиксер при 70°C, нагревали до 95°C, выдерживали при 95°C в течение 5 мин и медленно охлаждали до комнатной температуры. Некоторые агента РНК лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25°C. Концентрацию 30 дуплексов определяли путем измерения поглощения раствора на УФ-вид. спектрометре в 0.2× ФБР. Затем поглощение раствора при 260 нм умножали на коэффициент преобразования и коэффициент разбавления, определяя таким образом концентрацию дуплекса. Если не указано иное, во всех случаях коэффициент преобразования составлял 0.037 мг/(мл·см). Для некоторых экспериментов

коэффициент преобразования рассчитывали по экспериментально определенному коэффициенту экстинкции.

5 **Пример 11. Сравнение 3' и 5' сайтов присоединения смысловой цепи для нацеливающих GalNAc-лигандов с применением ингибирующих экспрессию F12 олигомерных соединений у мышей дикого типа.**

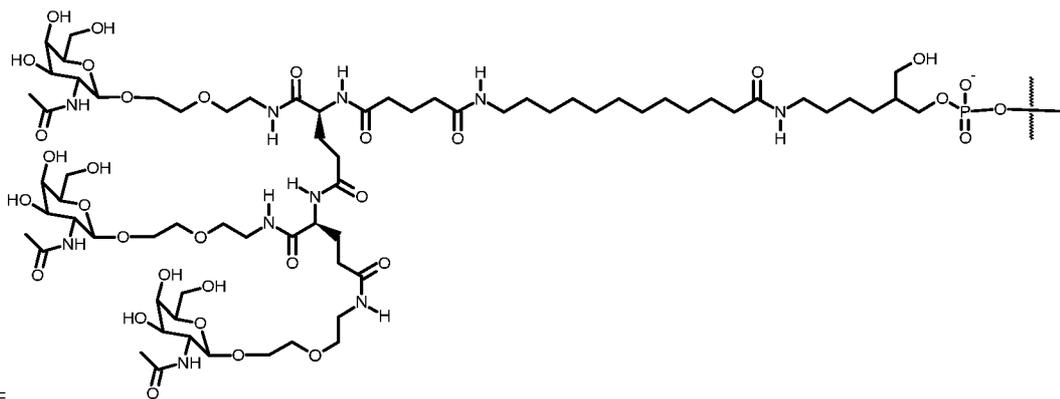
Для оценки различий в сайте прикрепления GalNAc-лигандов между 3'- и 5'-концами смысловой цепи получали ингибирующие экспрессию олигомерные соединения (двунитевых агентов для РНКи), направленные на F12 (называемые в настоящем документе агентами РНКи для F12), с последовательностями, представленными ниже в таблице 21:

Таблица 1. Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (дуплексные агенты РНКи) из Примера 11.

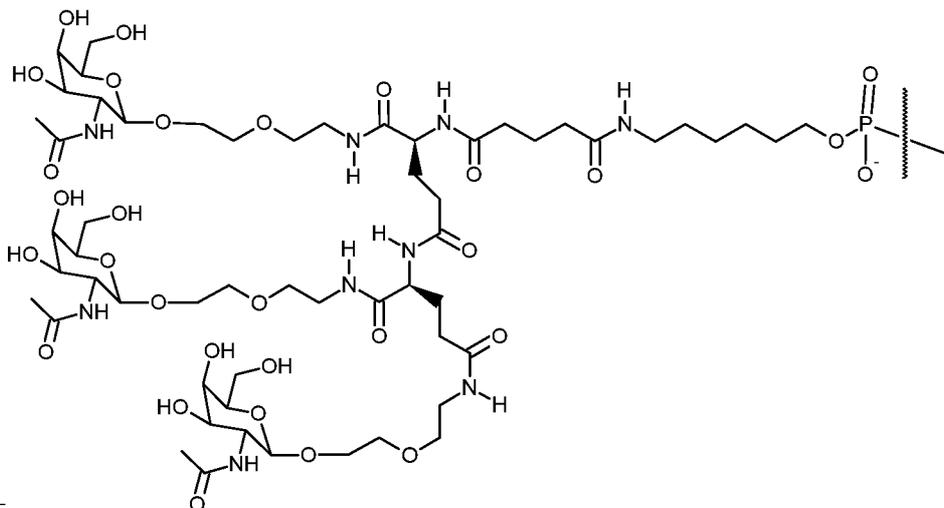
Идентификатор дуплекса: AD02803	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой нити: (AM03628-SS)	uAuAugscsccaagaAfaGfugaaagacca(NAG15)	1
Последовательность антисмысловой нити: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	2
Идентификатор дуплекса: AD02807	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой нити: (AM03632-SS)	(NAG18)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	3
Последовательность антисмысловой нити: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	4

15

В Таблице 1 выше использованы следующие обозначения:



(NAG15)=



(NAG18)=

5 Каждую цепь агентов РНКи для F12 синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твёрдофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с
 10 получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

Агенты РНКи для F12, связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG15) или (NAG18)), объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для
 15 подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

Агенты РНКи для F12, связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG15) или (NAG18)), доставляли посредством п/к инъекции. В день 1 делали п/к

инъекцию в складку кожи на спине между лопатками 200 мкг раствора/20г массы тела
мышы раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 3 мг/кг (миллиграммов
на килограмм – mрк) одного из двух агентов РНКи для F12 (AD02803 или AD02807) в
5 солевом буферном растворе. Использовали по три (3) мышы дикого типа на группу
лечения. Как показано выше, AD02803 включает (NAG15), присоединенный к 3'-концу
смысловой цепи, и AD 2807 включает (NAG18), присоединенный к 5'-концу
смысловой цепи.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на 8, 15, 22 и 29 дни для
10 мониторинга нокдауна. Нокдаун измеряли путем количественного определения
уровней циркулирующего белка F12 мышы (mF12) в сыворотке с применением
собственного анализа на mF12, разработанного на основе alphaLISA® (Perkin Elmer).
Экспрессию, соответствующую специфической дате взятия крови, нормировали по
соответствующему той же дате среднему значению для получавшей солевой раствор
15 контрольной группы.

На фиг. 10 представлены результаты указанного исследования. При минимальных
значениях (22 день) AD02803 продемонстрировал приблизительно 70% снижение
уровней циркулирующего F12, а AD02807 продемонстрировал снижение более, чем на
20 80%. Эти данные также указывают на различие продолжительности эффекта нокдауна,
так как на 29 AD02803 день у получавших лечение AD02803 мышей наблюдалось
более быстрое возвращение к базовым уровням по сравнению с получавшими лечение
AD2807 мышами. Эти данные подтверждают, что связывание GalNAc-лиганда на 5'-
конце смысловой цепи превосходит связывание на 3'-конце смысловой цепи.

25

**Пример 12. *Дополнительное сравнение 3' и 5' сайтов прикрепления смысловой
цепи для нацеливающих GalNAc-лигандов с применением ингибирующих
экспрессию F12 олигомерных соединений у мышей дикого типа.***

Для дополнительной оценки сайта присоединения GalNAc-лигандов на 3'- и 5'-концах
30 смысловой цепи двунитевых ингибирующих экспрессию олигомерных соединений
(двунитевых агентов РНКи), получали композиции, направленные на ген F12, с
последовательностями, представленными ниже в таблице 2:

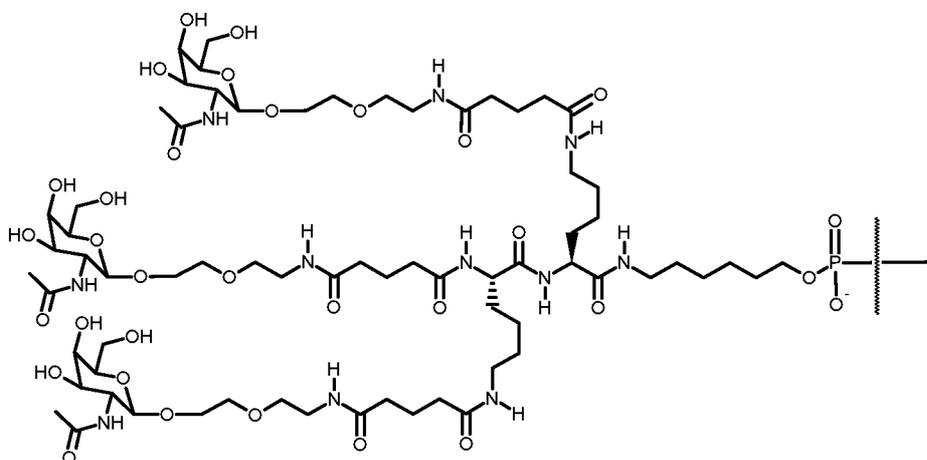
Таблица 2. Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (дуплексные агенты РНКи) из Примера 12.

Идентификатор дуплекса: AD02815	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой нити: (AM03640-SS)	(NAG20)uauaugscsccaagaAfaGfugaaagacc(inv dA)	5
Последовательность антисмысловой нити: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	6
Идентификатор дуплекса: AD02816	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой нити: (AM03641-SS)	uAuAugscsccaagaAfaGfugaaagacca(NAG20)	7
Последовательность антисмысловой нити: (AM03157-AS)	usGfsgucuuUfcAfcuuUfcuugggcsuscuAu	8

В таблице 2 выше использованы следующие обозначения:

5

(NAG20)=



10 Каждую цепь агентов РНКи для F12 синтезировали в соответствии с фосфорамидитной теврдофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с

получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

5 Агенты РНКи для F12, связанные с соответствующим лигандом GalNAc (а именно, (NAG20)) объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

10 Агенты РНКи для F12, связанные с соответствующим лигандом GalNAc (т.е., (NAG20), доставляли посредством п/к инъекции. В день 1 делали п/к инъекцию в складку кожи на спине между лопатками, вводя 200 мкг раствора/20г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо либо дозу 3 мг/кг (mpk) одного из двух агентов для РНКи (AD02815 или AD02816) в солевом буферном растворе. Использовали по три (3) мыши дикого типа на группу лечения. Как показано выше в Таблице 2, AD02815 включает (NAG20), присоединенный к 5'-концу смысловой нити, 15 и AD02816 включает (NAG20), присоединенный к 3'-концу смысловой нити.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на 8, 15, 22 и 29 дни для мониторинга нокдауна. Нокдаун измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего белка F12 мыши (mF12) в сыворотке с применением 20 собственного анализа на mF12, разработанного на основе alphaLISA® (Perkin Elmer). Экспрессию, соответствующую специфической дате взятия крови, нормировали по соответствующему той же дате среднему значению для получавшей солевой раствор контрольной группы.

25 На Фигуре 11 представлены результаты этого эксперимента. При минимальных значениях (22 день) AD02816 продемонстрировал приблизительно 60% снижение уровней циркулирующего белка F12, а для AD02815 наблюдалось 79% снижение. Указанные данные также указывают на различие продолжительности эффекта нокдауна. На 29 день у получавших лечение AD02816 мышей наблюдался 40% 30 нокдаун, тогда как у получавших лечение AD02815 мышей наблюдался 71% нокдаун относительно уровней для солевого раствора. Указанные данные подтверждают связывание GalNAc-лиганда на 5'-конце смысловой цепи.

Пример 13. Ингибирующие экспрессию Lp(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающими лигандами Структуры 1003 у трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей.

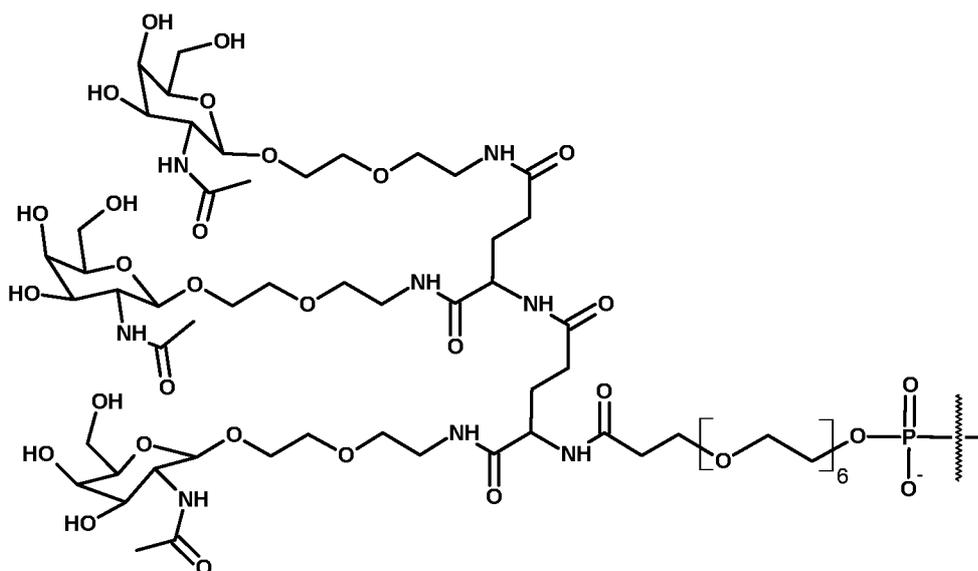
- 5 Получали ингибирующие экспрессию Lp (a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи для Lp(a)) с последовательностями, представленными ниже в таблице 3:

Таблица 3. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексные агенты РНКи) из Примера 13.

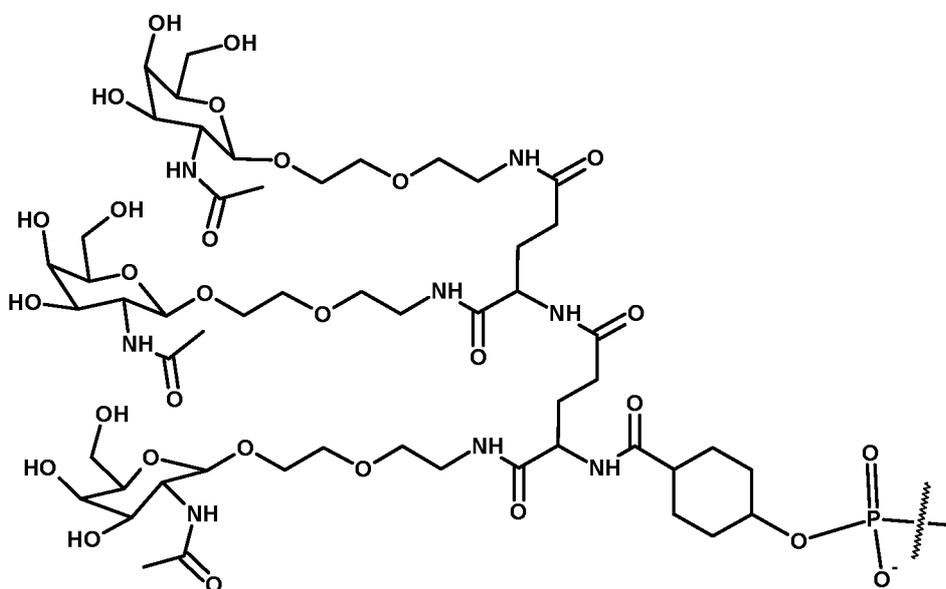
Идентификатор дуплекса: AD03547	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой нити: (AM04498-SS)	(NAG29)uaauaaasuuauucgaGfGfcucauucucsa(invAb)	9
Последовательность антисмысловой нити: (AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausuAUAUA	10
Идентификатор дуплекса: AD03549	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой нити: (AM04502-SS)	(NAG25)uaauaaasuuauucgaGfGfcucauucucsa(invAb)	11
Последовательность антисмысловой нити: (AM04507-AS)	usGfsasGfaAfuGfaGfccuCfgAfuAfausuAUAUA	12

10

В таблице 3 выше использованы следующие обозначения:



(NAG25)=



(NAG29)=

- 5 (NAG29) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1003 в настоящем документе.

Каждую цепь Lp(a) агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твёрдофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с

получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

5 Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей (Frazer KA et al 1995, Nature Genetics 9:424-431). Эти мыши с YAC, содержащей полный ген *LPA* (кодирующий белок apo(a)) с дополнительными последовательностями как в 5'-, так и в 3'-направлении, а также apoB-100 человека, продуцируя таким образом частицы гуманизированного Lp(a) (Callow MJ et al 1994, 10 PNAS 91:2130-2134).

Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG25) или (NAG29)) объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

15
Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG25) или (NAG29)) на 5'-конце смысловой нити, доставляли путем п/к инъекции. В день 1 делали п/к инъекцию в складку кожи на спине между лопатками и вводили 200 мкл раствора/20г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, 20 либо дозу 1 мг/кг (mpk) соответствующего агента РНКи для (AD03547 или AD03549) в солевом буферном растворе. Использовали по четыре (4) Lp(a) Tg-мыши на группу лечения.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 5, 11, 25 16, 22, 29 и 36 дни. Нокдаун определяли, рассчитывая уровни циркулирующих частиц Lp(a) в сыворотке. Уровни частиц Lp(a) измеряли на Cobas® Integra 400 (Roche Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормировки уровень Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии до дозирования у указанного животного (в данном случае – на уровень для 30 -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню». Затем экспрессию в конкретный момент времени нормировали по получавшей солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню» коэффициента для индивидуального животного на среднее значение «нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной

группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Ошибка эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

- 5 Результаты показаны на фиг. 12. AD03549 (NAG25) продемонстрировал 71% нокдаун при минимальных значениях (день 16), а AD03547 (NAG29) продемонстрировал 81% нокдаун при минимальных значениях (день 11). Для обоих триггеров наблюдались аналогичные кривые восстановления после минимальных значений, с менее чем 26% нокдауном на 36 день. Указанные данные подтверждают, что показанные GalNAc-лиганды отличались как сопоставимой начальной активностью нокдауна, так и сопоставимой продолжительностью нокдауна у Lp(a) Tg-мышей при однократном введении дозы 1 мг/кг.

15 **Пример 14. Нокдаун Lp(a) у трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей после введения ингибирующей экспрессию LP(a) олигомерных соединений (двунитевых агентов для РНКи), связанных с нацеливающим лигандом Структур 1002 и 1004.**

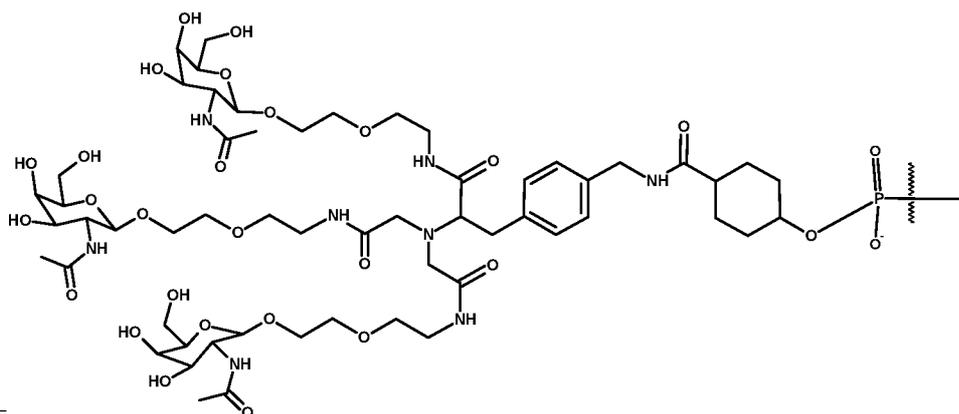
Получали ингибирующие экспрессию Lp(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи Lp(a)) с последовательностями, представленными ниже в таблице 4:

20 *Таблица 4.* Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 14.

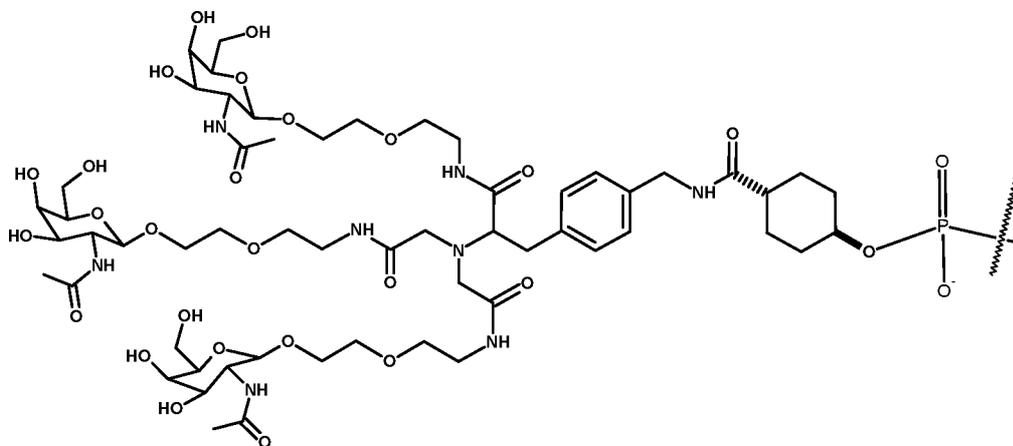
Идентификатор дуплекса: AD03536	5' → 3'	SE Q ID NO:
Последовательность в смысловой нити: (AM04496-SS)	(NAG25)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invAb)	13
Последовательность в антисмысловой нити: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	14
Идентификатор дуплекса: AD03538	5' → 3'	SE Q ID NO:
Последовательность	(NAG28)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invA	15

Б СМЫСЛОВОЙ НИТИ: (AM04499-SS)	b)	
Последовательность Б АНТИСМЫСЛОВОЙ НИТИ: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	16
Идентификатор дуплекса: AD03540	5' → 3'	SE Q ID NO:
Последовательность Б СМЫСЛОВОЙ НИТИ: (AM04500-SS)	(NAG30)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invA b)	17
Последовательность Б АНТИСМЫСЛОВОЙ НИТИ: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	18

В таблице 4 выше использованы следующие обозначения:



(NAG28) =



5 (NAG30)=

Дополнительно, (NAG25) представлен той же структурой, которая показана в примере 13 выше.

5 (NAG28) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1002 в настоящем документе. (NAG30) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1004 в настоящем документе. (NAG28) включает смесь цис- и транс-изомеров, а (NAG30) представлен исключительно транс-изомером.

10 Каждую цепь Lp(a) агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твердофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимоллярных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в
15 настоящем документе.

Аро(Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали Lp(a) Tg-мышей. Трансгенные по Аро(a) мыши (Frazer KA et al 1995, Nature Genetics 9:424-431) экспрессируют человеческий аро(a) с YAC, содержащей полный ген *LPA* (кодирующий белок аро(a)) с дополнительными последовательностями как 5', так и 3' (называемые далее "аро(a) Tg- мышами " или «мышами, трансгенными по аро(a)»).

25 Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG25), (NAG28) или (NAG30)) объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

30 Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG25), (NAG28) или (NAG30)) на 5'-конце смысловой нити, доставляли путем п/к инъекции. В день 1 делали п/к инъекцию в складку кожи на спине между лопатками и вводили 200 мкл раствора/20г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо 0.5 дозу мг/кг (mpk) агента РНКи (AD03536, AD03538 или AD03540) в солевом буферном растворе. Использовали по три (3) Lp(a) Tg-мышы на группу лечения.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 8, 15, 22, 29, 36 и 43 дни. Нокдаун определяли, рассчитывая уровни циркулирующих частиц Lp(a) в сыворотке. Уровни частиц Lp(a) измеряли на Cobas® Integra 400 (Roche
5 Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормирования уровень Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии до дозирования у указанного животного (в данном случае – на уровень для -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню». Затем экспрессию в специфический момент времени нормировали по получавшей
10 солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню» коэффициента для индивидуального животного на среднее значение «нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Ошибка эксперимента
15 представлена в виде стандартной ошибки среднего.

Результаты показаны на фиг. 13. Днем с самым низким уровнем был день 15 для всех исследованных агентов РНКи. В день с минимальными значениями AD03536 продемонстрировал 74% нокдаун белка apo(a), AD03538 продемонстрировал 74%
20 нокдаун белка apo(a), а AD03540 продемонстрировал 71% нокдаун белка apo(a). В день 29, все агенты РНКи продемонстрировали >48% уровни нокдауна белка apo(a), за исключением AD03536 (содержащего NAG25), который продемонстрировал 16% нокдаун. Эти данные указывают на то, что структуры, содержащие NAG, ведут себя в отношении исходной активности нокдауна аналогично агентам РНКи, содержащим
25 линкерные структуры NAG28 и NAG30, которые демонстрируют количественно больший нокдаун в день 29.

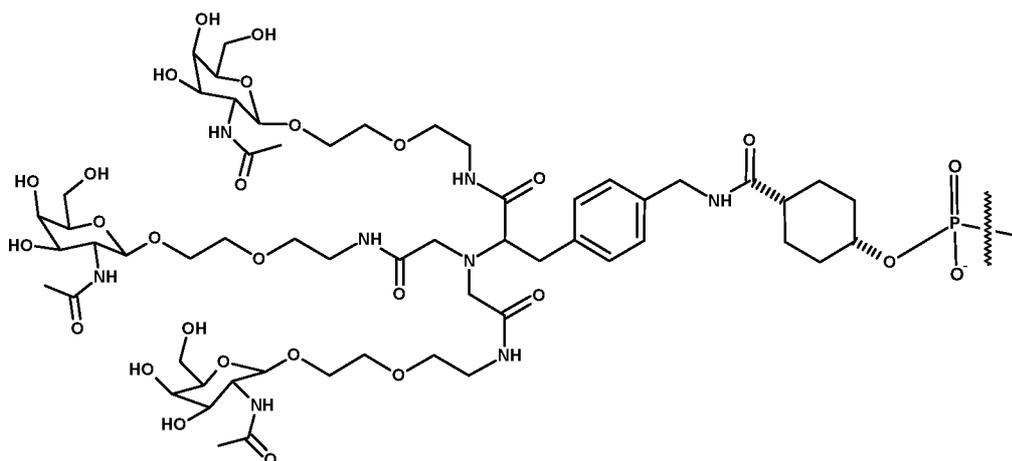
**Пример 15. Lp Нокдаун Lp(a) у трансгенных (Tg) по apo(a) мышей после введения ингибирующей экспрессию Lp(a) олигомерных соединений (двунитевых агентов для
30 РНКи), связанных с нацеливающим лигандом Структуры 1005 и 1008 .**

Ингибирующая экспрессию Lp(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи Lp(a)) получали с последовательностями, представленными ниже в таблице 5:

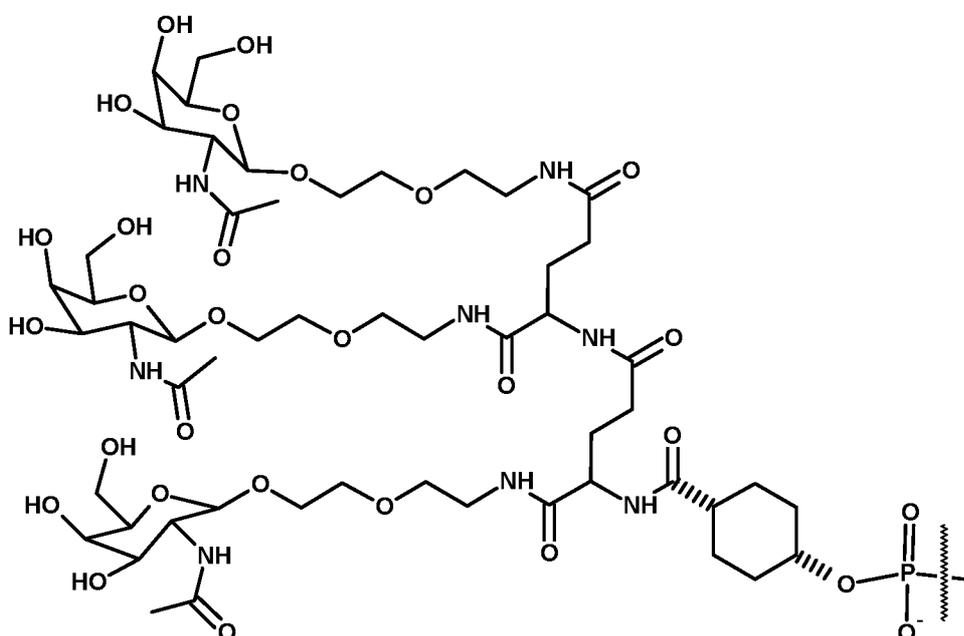
Таблица 5. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексные агенты РНКи) из Примера 15.

Идентификатор дуплекса: AD03536	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность в смысловой нити: (AM04496-SS)	(NAG25)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invAb)	19
Последовательность в антисмысловой нити: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	20
Идентификатор дуплекса: AD03629	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность в смысловой нити: (AM04611-SS)	(NAG31)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invAb)	21
Последовательность в антисмысловой нити: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	22
Идентификатор дуплекса: AD04170	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность в смысловой нити: (AM05341-SS)	(NAG37)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invAb)	23
Последовательность в антисмысловой нити: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	24

В таблице 5 выше использованы следующие обозначения:



(NAG31) =



(NAG37) =

- 5 Дополнительно, (NAG25) представляет собой ту же структуру, которая показана в Примере 13 выше.

(NAG31) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1005 в настоящем документе. (NAG37) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1008 в
10 настоящем документе.

Каждую цепь Lp(a) агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твёрдофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные
15 цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и

антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro)) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

- 5 Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей.

- 10 Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG25), (NAG31) или (NAG37)) объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

- 15 Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG25), (NAG31), или (NAG37), доставляли посредством п/к инъекции. В день 1 делали п/к инъекцию в складку кожи на спине между лопатками и вводили 200 мкл раствора/20г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 3 мг/кг (mpk) агента РНКи (AD03536, AD03629 или AD04170) в солевом буферном растворе. Использовали по четыре (4) Lp(a) Tg-мыши на группу лечения.

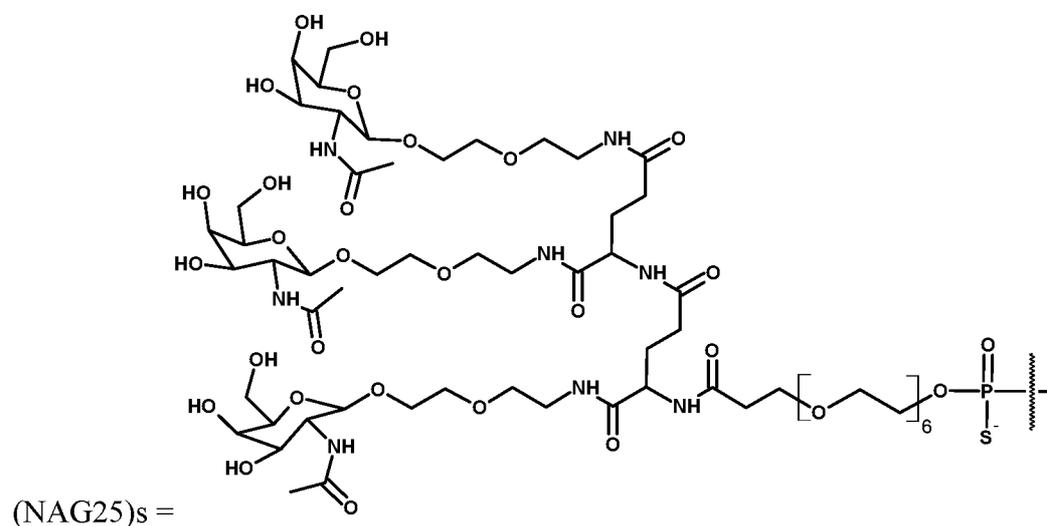
- 20 Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 8, 15, 22, 29, 36 и 43 дни. Нокдаун определяли, рассчитывая уровни циркулирующих частиц Lp(a) в сыворотке. Уровни частиц Lp(a) измеряли на Cobas® Integra 400 (Roche Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормирования уровень Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень
- 25 экспрессии до дозирования у указанного животного (в данном случае – на уровень для -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню». Затем экспрессию в конкретный момент времени нормировали по получавшей солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню»
- 30 коэффициента для индивидуального животного на среднее значение «нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Ошибка эксперимента представлена в виде стандартной ошибки среднего.

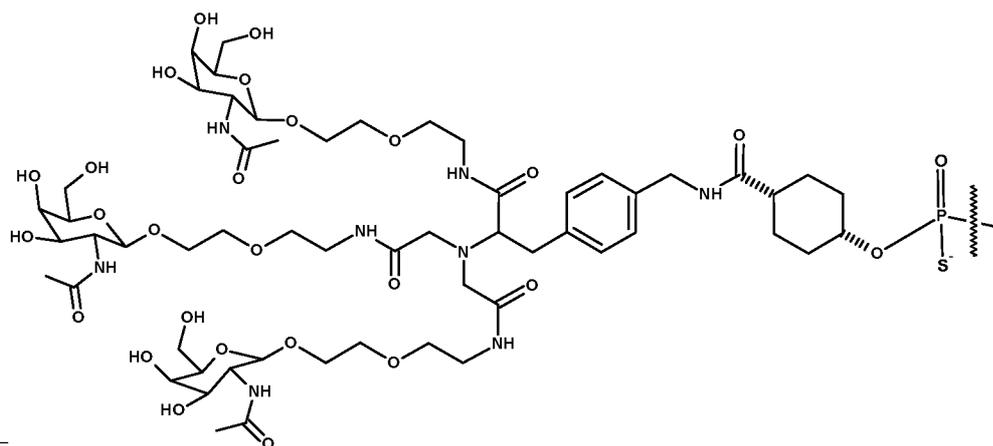
Полученные данные представлены на Фигуре 14. AD03536 продемонстрировал 95% нокдаун уровней Lp(a) в день минимальных значений (день 15) и сохранял 76% нокдаун в день 36. AD03629 продемонстрировал 97% нокдаун уровней Lp(a) в день минимальных значений (день 8) и сохранял 90% нокдаун в день 36. AD04170 демонстрировал 97% нокдаун уровней Lp(a) в день минимальных значений (день 8) и сохранял 78% нокдаун в день 36.

Пример 16. Нокдаун F12 после введения ингибирующих экспрессию F12 олигомерных соединений (двунитевых агентов РНКи), связанных с нацеливающими лигандами Структуры 1005, 1008, 1025 и 1027, у мышей дикого типа.

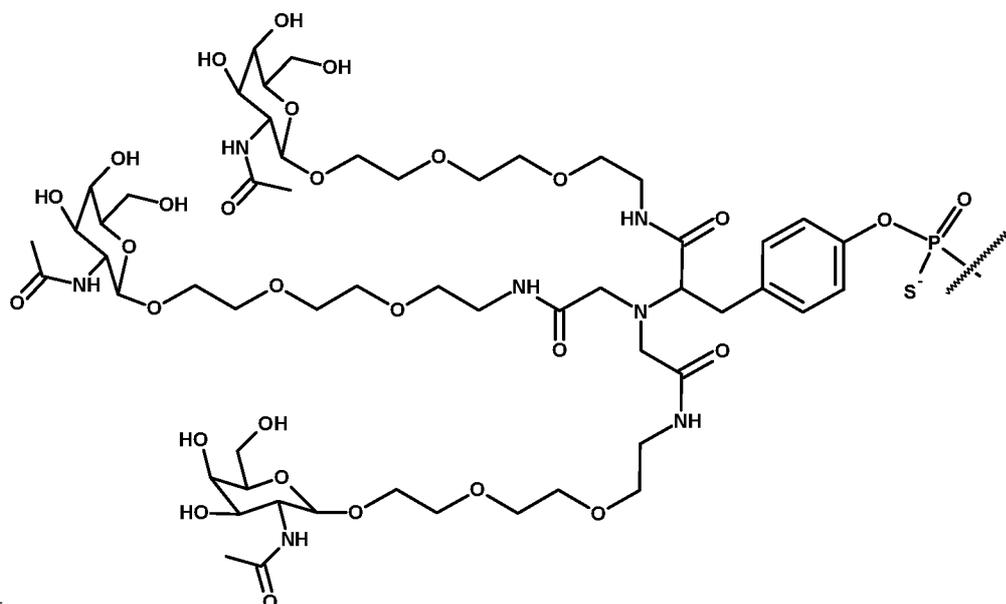
Получали ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи F12), которые конъюгировали по 5'-концу фосфоротиоатной связью с GalNAc-нацеливающими лигандами (NAG25)_s [AD04162]; (NAG37)_s [AD04623]; (NAG31)_s [AD04512]; (NAG33)_s [AD04650] или (NAG38)_s [AD04651]. Каждый из двунитевых агентов РНКи был нацелен на F12.

Для структур GalNAc-нацеливающих лигандов использовали следующие обозначения:

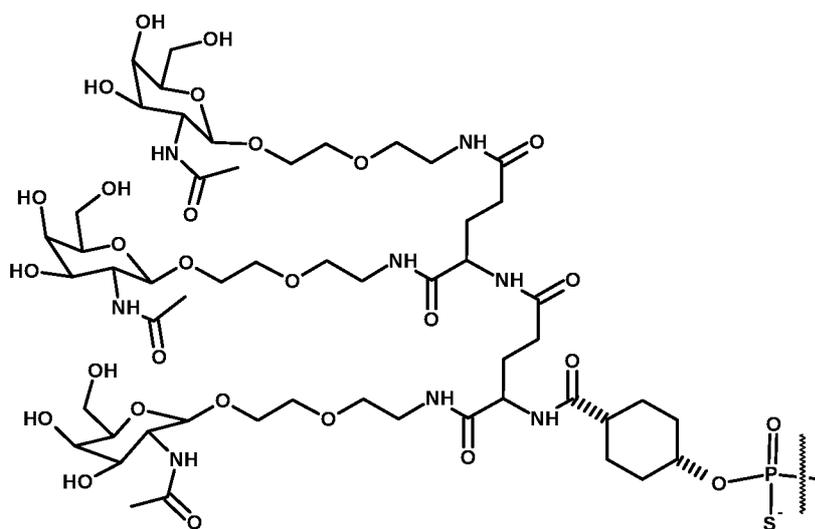




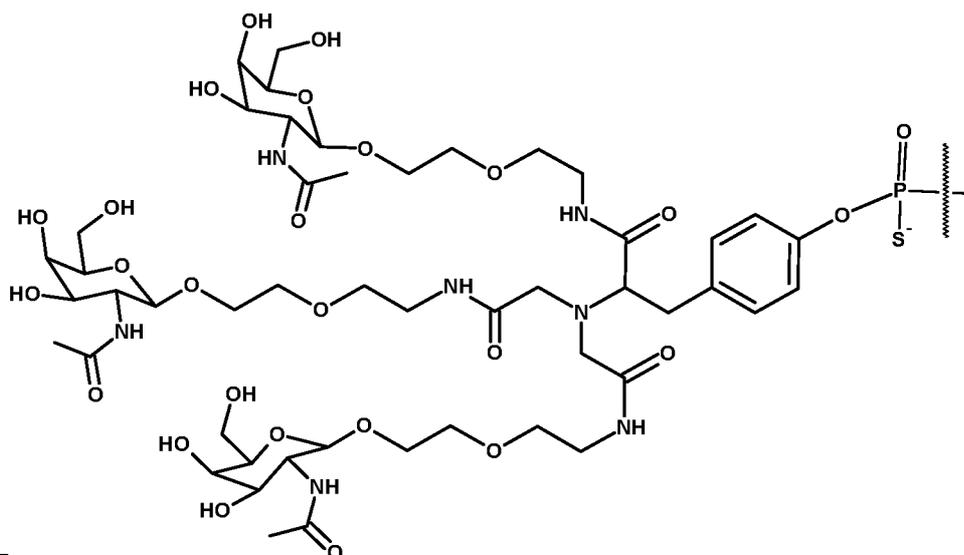
(NAG31)_s=



(NAG33)_s=



(NAG37)_s=



(NAG38)_s=

(NAG31)_s имеет химическую структуру, представленную Структурой 1005 в настоящем документе. (NAG33)_s имеет химическую структуру, представленную Структурой 1025 в настоящем документе. (NAG37)_s имеет химическую структуру, представленную Структурой 1008 в настоящем документе. (NAG38)_s имеет химическую структуру, представленную Структурой 1027 в настоящем документе. Последовательности и паттерны модификации были идентичными для AD04162, AD04623, AD04512, AD04650 и AD04651, с единственным различием, заключающимся в структуре GalNAc-нацеливающего лиганда, расположенного на 5'-конце смысловой нити каждого F12 агент РНКи, как показано ниже.

Каждую цепь агентов РНКи для F12 синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твердофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

Агенты РНКи для F12, конъюгированные с примерами GalNAc-нацеливающих лигандов (т.е., (NAG25)_s, (NAG31)_s, (NAG33)_s, (NAG37)_s или (NAG38)_s) объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

Агенты РНКи для F12, связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, (NAG25)s, (NAG31)s, (NAG33)s, (NAG37)s или (NAG38)s, доставляли посредством п/к инъекции. В день 1 делали п/к инъекцию в складку кожи на спине между лопатками, таким образом вводили 200 мкл раствора/20г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 1 мг/кг (mpk) одного из пяти дуплексов (AD04162, AD04623, AD04512, AD04650 и AD04651) в солевом буферном растворе. Использовали по четыре (4) мыши дикого типа на группу лечения. Как показано выше, AD04162 включает структуру (NAG25)s, AD04623 включает структуру (NAG37)s, AD04512 включает структуру (NAG31)s, AD04650 включает структуру (NAG33)s, и AD04651 включает структуру (NAG38)s. Все GalNAc-нацеливающие лиганды присоединяли на 5'-конце смысловой нити каждого примера агента РНКи.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали на -1 (до дозирования), 8, 15 и 22 для мониторинга нокдаун. Нокдаун измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего белка F12 мыши (mF12) в сыворотке с применением собственного анализа на mF12, разработанного на основе alphaLISA® (Perkin Elmer). Уровни mF12 для каждого животного в соответствующий момент времени делили на уровень экспрессии до лечения у указанного животного для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по уровню до дозирования». Затем экспрессию в специфический момент времени нормировали по получавшей солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по дню до дозирования» коэффициента для индивидуального животного на средний «нормированный по дню до дозирования» коэффициент для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Ошибка эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

Результаты этого исследования показаны на фиг. 15. Днем с минимальными значениями был 8 для всех исследуемых агентов агенты РНКи. В день минимальных значений AD04162 продемонстрировал 90% нокдаун mF12, AD04623 продемонстрировал 94% нокдаун mF12, AD04512 продемонстрировал 94% нокдаун mF12, AD04650 продемонстрировал 92% нокдаун mF12, и AD04651 продемонстрировал 87% нокдаун mF12. В день 2, все агенты РНКи

5 продемонстрировали >82% нокдаун уровней mF12, за исключением AD04162 (содержащим NAG25), который демонстрирует лишь 74% нокдаун. Эти данные указывают на то, что структуры, содержащие NAG, ведут себя в отношении исходной активности нокдауна аналогично агентам РНКи, содержащим жесткие линкерные структуры или фрагменты, заменяющие линкер, раскрытые в настоящем документе (а именно,, NAG31, NAG33, NAG37 и NAG38), демонстрируя численно более высокий нокдаун mF12 в день 22.

10 **Пример 17. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающими лигандами Структуры 1004 и 1005 у трансгенных (Tg) по Lp(a) мышей.**

Получали ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи Lp(a)) с последовательностями, представленными ниже в таблице 6:

15 *Таблица 6. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексы агентов РНКи) из примера 17.*

Идентификатор дуплекса: AD03629	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04611-SS)	(NAG31)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfгаусu(invAb)	25
Последовательность антисмысловой цепи: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	26
Идентификатор дуплекса: AD03540	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM04500-SS)	(NAG30)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfгаусu(invAb)	27

Последовательность антисмысловой цепи: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfaaAfgGfgGfcusu	28
--	-----------------------------------	----

В таблице 6, (NAG30) имеет ту же химическую структуру, которая показана в Примере 14 выше, а (NAG31) имеет ту же химическую структуру, которая показана в Примере 15 выше.

5

NAG30 имеет химическую структуру, представленную Структурой 1004 в настоящем документе. NAG31 имеет химическую структуру, представленную Структурой 1005 в настоящем документе.

10 Каждую цепь Lp(a) агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твердофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с
15 получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали трансгенных (Tg) по Lp(a)
20 мышей.

Агенты для РНКи Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, NAG30 или NAG31) объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

25

Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, NAG30 или NAG31) на 5'-конце смысловой нити, доставляли путем п/к инъекции. В день 1 делали п/к инъекцию в складку кожи на спине между лопатками и вводили 200 мкл раствора/20г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо

дозу 1 мг/кг (mpk) агента РНКи для Lp(a) (AD03629 или AD03540) в солевом буферном растворе. Использовали по четыре (4) трансгенных по Lp(a) мышей на группу лечения.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали в дни -1 (до дозирования), 8, 15, 22, 29, 36 и 43. Нокдаун определяли, рассчитывая уровни циркулирующих частиц Lp(a) в сыворотке. Уровни частиц Lp(a) измеряли на Cobas® Integra 400 (Roche Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормировки уровень Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии до дозирования у указанного животного (в данном случае – на уровень для -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню». Затем экспрессию в конкретный момент времени нормировали по получавшей солевой раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню» коэффициента для индивидуального животного на среднее значение «нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Ошибка эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

Результаты показаны на фиг. 16. Днем с минимальными значениями был день 15 для обоих исследованных агентов РНКи. AD03629 продемонстрировал 89% нокдаун уровней Lp(a) в день с наименьшими значениями, а AD03540 продемонстрировал 85% нокдаун уровней Lp(a) в день с наименьшими значениями. Оба агенты РНКи продемонстрировали близкие кривые восстановления до дня 36. Но в день 43, в то время как AD03540 продемонстрировал 16% нокдаун уровней Lp(a), AD03629 продемонстрировал 55% нокдаун уровней Lp(a).

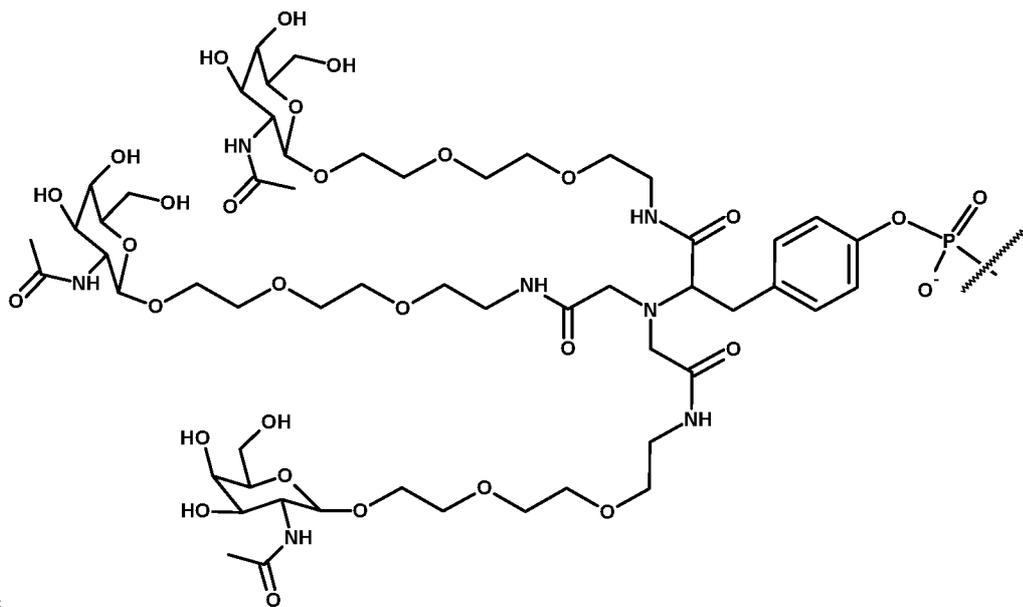
Пример 18. Нокдаун аполипопротеина(a) (apo(a)) у трансгенных (Tg) по apo(a) мышей после введения ингибирующей экспрессию LP(a) олигомерных соединений (двунитевых агентов для РНКи), связанных с нацеливающим лигандом Структуры 1007, 1025 и 1026.

Ингибирующую экспрессию Lp (a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи Lp(a)) получали с последовательностями, представленными ниже в таблице 7:

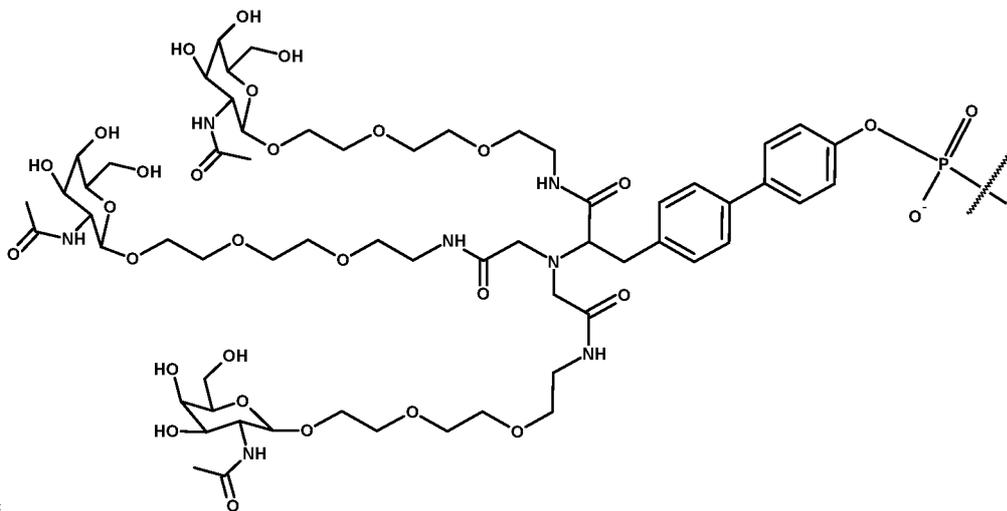
Таблица 7. Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 18.

Идентификатор дуплекса: AD03721	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность в смысловой нити: (AM04742-SS)	(NAG33)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfгаусu(invAb)	29
Последовательность в антисмысловой нити: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	30
Идентификатор дуплекса: AD03722	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность в смысловой нити: (AM04743-SS)	(NAG34)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfгаусu(invAb)	31
Последовательность в антисмысловой нити: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	32
Идентификатор дуплекса: AD03723	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность в смысловой нити: (AM04744-SS)	(NAG35)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfгаусu(invAb)	33
Последовательность в антисмысловой нити: (AM03972-AS)	usCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	34

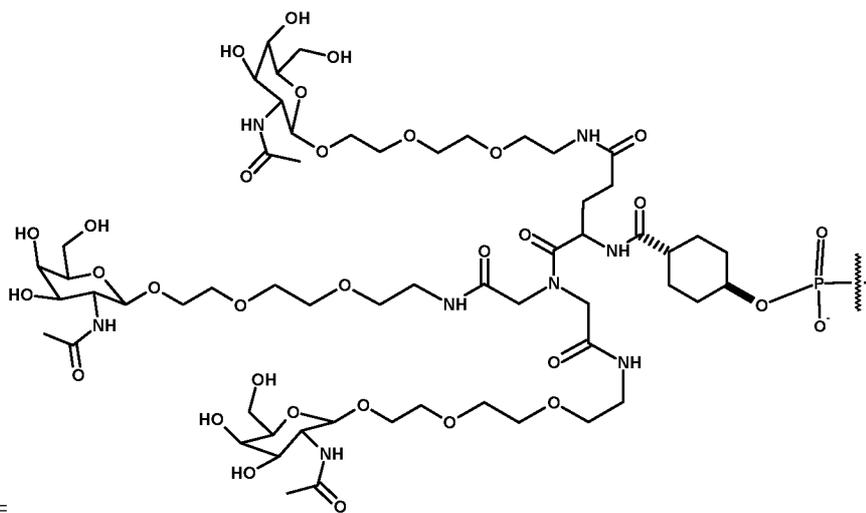
В таблице 7 выше использованы следующие обозначения:



(NAG33)=



(NAG34) =



(NAG35) =

(NAG33) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1025 в настоящем документе. (NAG34) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1026 в настоящем документе. (NAG35) имеет химическую структуру, представленную Структурой 1007 в настоящем документе.

5

Каждую цепь Lp(a) агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твердофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимоллярных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

Для оценки эффективности двунитевых агентов для РНКи с конъюгированными N-ацетил-галактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали трансгенных (Tg) по аро(a) мышей. Аро(a) Tg-мыши.

Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, NAG33, NAG34 или NAG35) объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

20

Агенты РНКи для Lp(a), связанные с соответствующими GalNAc-лигандами (а именно, NAG33, NAG34 или NAG35) вводили путем подкожной инъекции. В день 1 делали п/к инъекцию в складку кожи на спине между лопатками и вводили и вводили 200 мкл раствора/20г массы тела мыши раствора, содержащего либо солевой раствор, либо дозу 1 мг/кг (mpk) агента РНКи (AD03721, AD03722 или AD03723) в солевом буферном растворе. Использовали по три (3) Lp(a) Tg-мыши на группу лечения.

Образцы сыворотки от получавших лечение мышей брали в дни -1 (до дозирования), 8, 15, 22 и 29. Нокдаун определяли путем мониторинга уровней циркулирующего белка аро(a) в сыворотке с применением ИФА ELISA на аро(a) (Abscam). Для нормировки уровень аро(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии до лечения у указанного животного (в данном случае – на уровень для -1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по -1 дню». Затем экспрессию в специфический момент времени нормировали по получавшей солевой

раствор контрольной группе путем деления «нормированного по -1 дню» коэффициента для индивидуального животного на среднее значение «нормированного по -1 дню» коэффициента для всех мышей в получавшей солевой раствор контрольной группе. Таким образом получали уровень экспрессии в каждый момент времени, нормированный по уровню экспрессии в контрольной группе. Ошибку эксперимента представлена в виде стандартной ошибки среднего.

Полученные данные представлены на Фигуре 17. Днем с наименьшими значениями был день 15 для всех исследованных агентов РНКи. AD03721 продемонстрировал 91% нокдаун уровней белка аро(а) при наименьших значениях, AD03722 продемонстрировал 81% нокдаун уровней белка аро(а) при наименьших значениях, а AD03723 продемонстрировал 90% нокдаун уровней белка аро(а) при наименьших значениях. Наблюдали аналогичные траектории восстановления уровней белка аро(а) после лечения для мышей, получавших AD03721 и AD03723, с практически идентичными показателями нокдауна в каждый момент времени, а у мышей, получавших AD03722 наблюдали количественно более низкий нокдаун в каждый исследованный момент времени. Например, В день 29 у мышей, получавших AD03721, наблюдали 76% нокдаун уровней аро(а), а у мышей, получавших AD03723, наблюдали 83% нокдаун уровней аро(а), а у мышей, получавших AD03722, наблюдали 61% нокдаун уровней аро(а). Эти данные указывают на то, что все структуры NAG33, NAG34 и NAG35 проявляют активность нокдауна, причем агенты РНКи, содержащие структуры NAG33 и NAG35, демонстрируют количественно более высокий нокдаун в день 29.

Пример 19. Исследование зависимости доза-ответ ингибирующих экспрессию Lp(a) олигомерных соединений (двунитевых агентов РНКи), связанных с нацеливающими лигандами структуры 1008, вводимых в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг трансгенным по Lp(a) мышам.

Для оценки эффективности двунитевых агентов РНКи с конъюгированными N-ацетилгалактозаминовыми лигандами *in vivo* использовали трансгенных по Lp(a) мышей, описанных в настоящем документе. Получали агенты РНКи, направленные к Lp(a), имеющие идентификаторы дуплекса: AD04170, показанные выше в Примере 15. Как показано выше, идентификаторы дуплекса для Lp(a): AD04170 включает

нацеливающий лиганд (NAG37) (Структура 1008), присоединенный к 5'-концу смысловой нити.

5 Каждую цепь Lp(a) агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твердофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимольных растворов РНК (смысловой и антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в
10 настоящем документе.

Агенты РНКи для Lp(a), связанные с нацеливающим лигандом структуры 1008, объединяли с фармацевтически приемлемым буфером для подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники.

15
Агенты РНКи для Lp(a), связанные с нацеливающим лигандом структуры 1008, вводили путем подкожной (п/к) инъекции. В день 1 делали подкожную инъекцию в складку кожи на спине между лопатками по и таким образом вводили 200 мкл раствора/20 г массы тела мыши, содержащего дозу солевого раствора, 1 мг/кг (mpk) агента РНКи в солевом буферном растворе или 3 мг/кг (mpk) агента РНКи в солевом
20 буферном растворе.

Контрольные образцы сыворотки (до лечения) брали у мышей в день -1 до дозирования. Уровни частиц Lp(a) определяли на Cobas® Integra 400 (Roche
25 Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормировки уровни Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на уровень экспрессии у этого животного (в этом случае в день 1 (до дозирования)) для определения отношения экспрессии, «нормированного по уровню дню -1». Затем экспрессию в конкретный момент времени нормировали по контрольной группе,
30 получавшей солевой раствор, путем деления «нормированного по уровню дню -1» отношения для индивидуального животного на среднее отношение, «нормированное по дню -1» всех мышей в контрольной группе, получавшей солевой раствор. В результате получали экспрессию для каждого момента времени, нормированную по экспрессии в контрольной группе.

Ошибка эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

5 Результаты показаны на фиг. 18. Как показано на Фигуре 18, по-видимому имеет место дозозависимое отношение для агент РНКи для Lp(a) по всем моментам времени.

Пример 20: Ингибирующие экспрессию LP(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающими лигандами, имеющими структуры 1003 и 1004, у яванских макаков.

10 Получали ингибирующие экспрессию Lp(a) олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), имеющие последовательности, представленные ниже в Таблице 8:

Таблица 8. Ингибирующие экспрессию Lp(a) олигомерные соединения (дуплексные агенты РНКи) из Примера 20.

Идентификатор дуплекса: AD03668	5' → 3'	SE Q ID NO:
Последовательность в смысловой цепи: (AM04500-SS)	(NAG30)(invAb)GfcCfcCfuUfAfUfuGfuUfaUfaCfgausu(invAb)	35
Последовательность в антисмысловой нити: (AM04501-AS)	cPrpTMsCfsgsUfaUfaAfCfAfauaAfgGfgGfcusu	36

15 Агент РНКи для Lp(a) AD03547 является таким же как в Примере 13, и конъюгирован с (NAG29). Агент РНКи для Lp(a) AD3668 конъюгировали с (NAG30). (NAG30) имел химическую структуру, показанную в Примере 14. (NAG29), которая представлена структурой 1003 в настоящем документе. (NAG30) представлен структурой 1004 в настоящем документе.

20

Каждую цепь Lp(a) агенты РНКи синтезировали в соответствии с фосфорамидитной твёрдофазной технологией, применяемой в синтезе олигонуклеотидов, используя либо MerMade96E® (Bioautomation), либо MerMade12® (Bioautomation); комплементарные цепи смешивали путем комбинирования эквимоллярных растворов РНК (смысловой и

25 антисмысловой) в 0.2× ФБР (фосфатно-буферный раствор, 1×, Corning, Cellgro) с

получением дуплексов, используя способы, в целом описанные в примере 10 в настоящем документе.

5 Получали агенты РНКи для Lp(a), конъюгированные с нацеливающими лигандами, раскрытым в настоящем документе, имеющие структуру 1003 или структуру 1004, и объединяли с фармацевтически приемлемым буфером известным в данной области образом для подкожной (п/к) инъекции.

10 Контрольные образцы сыворотки (до лечения) брали у яванских макаков в дни перед инъекциями -14, -7 и 1 (до дозирования). Уровни частиц Lp(a) определяли на Cobas® Integra 400 (Roche Diagnostics) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормировки уровни Lp(a) для каждого животного в некоторый момент времени делили на среднее уровней экспрессии у этого животного (в этом случае в дни -14, -7 и день 1 (до дозирования)) для определения отношения экспрессии, «нормированного по
15 уровню до дозирования». Ошибка эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.

В день 1 приматам – яванским макакам (*Macaca fascicularis*) путем подкожной инъекции вводили агенты РНКи для Lp(a), связанные нацеливающие лиганды,
20 раскрытые в настоящем документе, вводили по 3 мг/кг либо агента РНКи для Lp(a) AD03668 или агента РНКи для Lp(a) AD03547. Использовали по две (2) обезьяны на группу лечения.

Результаты показаны на Фигуре 19. Триггеры РНКи для Lp(a), конъюгированные со структурой 1003 (AD03547) или структурой 1004 (AD03668), продемонстрировал
25 нокдаун у яванских макаков.

**Пример 21: Ингибирующие экспрессию F12 олигомерные соединения (Двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающим лигандом структуры 1008, у яванских
30 макаков.**

Получали агенты РНКи для F12 с различными последовательностями, направленными к F12, и связанные с нацеливающим лигандом GalNAc структуры 1008 [(NAG37)s] на 5'-конце смысловой цепи, и смешивали в фармацевтически приемлемом буфере для

подкожных (п/к) инъекций, известным в данной области техники. (NAG37)_s имеет химическую структуру, показанную в Примере 16, выше.

- 5 В день 1 приматам – яванским макаками (*Macaca fascicularis*) путем подкожной инъекции вводили 3 мг/кг одного из шести (6) различных агентов РНКи для Lp(a), имеющих различные структуры и различные паттерны модификации: AD04623, AD04624, AD04625, AD04626, AD04627 или AD04628. Соединения вводили двум (2) обезьянам на группу лечения.
- 10 Образцы сыворотки от получавших лечение яванских макаков брали на -7 и 1 день (до дозирования); и на 8, 15 и 22 дни для мониторинга нокдауна. Нокдаун измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего белка F12 яванского макака (сF12) уровни в сыворотке с применением набора для ИФА (ELISA) на F12 человека (Molecular Innovations). Уровни сF12 для каждого животного в соответствующий
- 15 момент времени делили на уровень экспрессии у указанного животного до лечения (среднее значение для -7 дня и 1 дня) для определения коэффициента экспрессии, «нормированного по уровню до дозирования». Ошибка эксперимента представлена в виде стандартного отклонения.
- 20 Результаты показаны на Фиг. 20. Каждый из агентов РНКи для F12, связанных NAG37 (Структура 1008), продемонстрировал нокдаун у яванских макаков, причем AD04625 AD04623 продемонстрировали максимальный нокдаун во всех точках измерения.

Пример 22. Ингибирующие экспрессию альфа-1-антитрипсина олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи), связанные с нацеливающими лигандами Структуры 1008 у трансгенных мышей PiZ.

Для оценки *in vivo* агентов для РНКи, направленных на ген альфа-1 антитрипсина (ААТ), использовали модель на трансгенных мышях PiZ (мыши PiZ). Мыши PiZ являются носителями мутантного аллеля ААТ человека PiZ и моделью дефицита

30 альфа-1-антитрипсина (ААТD) человека (Carlson et al., Journal of Clinical Investigation 1989). Получали ингибирующие экспрессию ААТ олигомерные соединения (двунитевые агенты РНКи) с последовательностями, представленными ниже в таблице 9:

Таблица 9. Ингибирующие экспрессию ААТ олигомерные соединения (дуплексы агентов для РНКи) из примера 22.

Идентификатор дуплекса: AD04663	5' → 3'	SEQ ID NO:
Последовательность смысловой цепи: (AM05968-SS)	(NAG37)s(invAb)sucaacaAfAfCfccuuugucus(invAb)	37
Последовательность антисмысловой нити: (AM05969-AS)	asAfsgsAfcAfaAfgGfgUfuUfgUfuGfausu	38

(NAG37)s имеет химическую структуру, показанную в примере 16 выше.

5

Получали агент РНКи для ААТ в фармацевтически приемлемом солевом буфере и подкожно (п/к) инъецировали мышам PiZ в складку кожи на спине между лопатками 200 мкл раствора/20 г массы тела мыши для оценки нокдауна генной экспрессии ААТ. Каждая мышь получала одну п/к дозу 2 мг/кг (mpk) AD04454. Дозы агента для РНКи ААТ вводили трем мышам (n = 3).

10

Образцы плазмы собирали и анализировали на уровни белка ААТ (Z-ААТ) на -1, 1 (до дозирования), 8 и 15 дни. Уровни ААТ нормировали по уровням ААТ в плазме на 1 день (до дозирования). Уровни белка измеряли путем количественного определения уровней циркулирующего в плазме Z-ААТ человека с применением набора для ИФА ELISA.

15

Средние нормированные уровни ААТ (Z-ААТ) показаны на фиг. 21. Наблюдался нокдаун при применении агента РНКи для ААТ, связанного с нацеливающим лигандом Структуры 1008, представленной в настоящем документе, у трансгенных по PiZ мышей.

20

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ

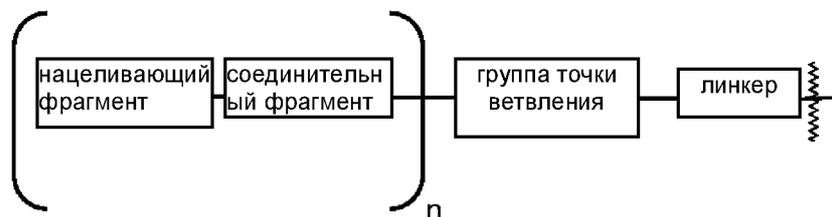
Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано вместе с его подробным описанием, описание выше предназначено для иллюстрации, а не для

25

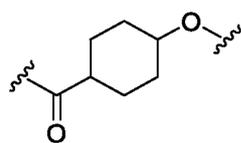
ограничения объема изобретения, которое определяется объемом прилагающейся формулы изобретения. Объем следующей ниже формулы изобретения включает другие аспекты, преимущества и модификации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

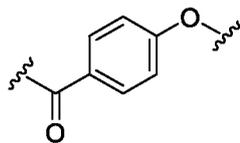
1. Нацеливающий лиганд, содержащий структуру Формулы I:



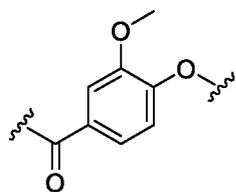
, или его фармацевтически приемлемая соль, содержащий линкер, группу точки ветвления, один или более соединительных фрагментов и один или более нацеливающих фрагментов, где n представляет собой целое число от 1 до 4, и при этом линкер представляет собой структуру, выбранную из группы, состоящей из:



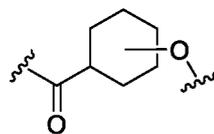
(Структура 1);



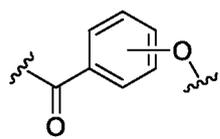
(Структура 2);



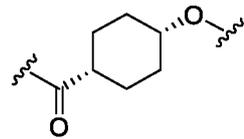
(Структура 3);



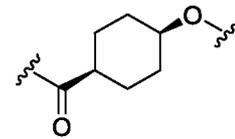
(Структура 4);



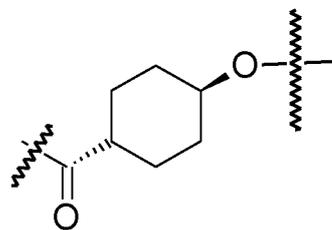
(Структура 5);



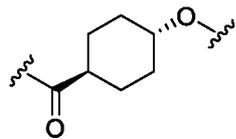
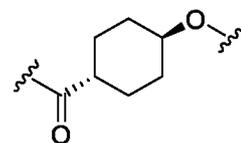
(Структура 6a);



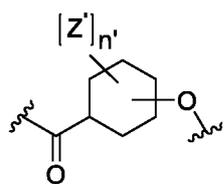
(Структура 6b);



(Структура 6c);

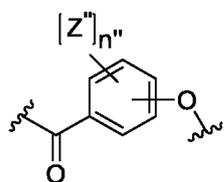


(Структура 6d);



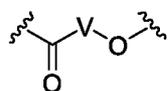
(Структуры 7)

где n' представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и, если присутствует, каждый Z' независимо выбран из группы, состоящей из: C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила, замещенного или незамещенного амина, карбоксила, C_1 - C_6 алкокси, замещенного C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 аминоалкила, замещенного C_2 - C_6 алкенила, замещенного C_2 - C_6 алкинила, замещенного C_1 - C_6 алкокси, замещенного C_1 - C_6 аминоалкила, галогена, гидроксила, амидо, замещенного амида, циано, замещенного или незамещенного кето, замещенного или незамещенного алкоксикарбонила, замещенного или незамещенного арилоксикарбонила, замещенного или незамещенного гетероарилоксикарбонила и сульфгидрила;



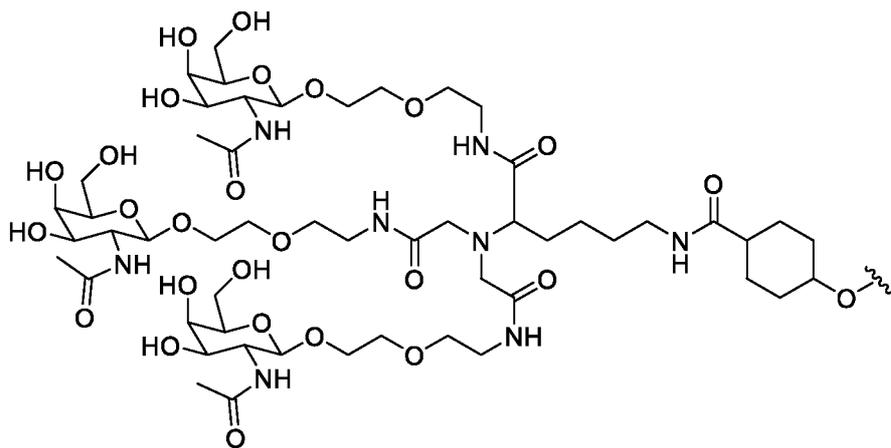
(структура 8), где n'' представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, и, если

присутствует, каждый Z'' независимо выбран из группы, состоящей из: C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила, C_1 - C_6 алкокси, замещенного C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 аминоалкила, замещенного C_2 - C_6 алкенила, замещенного C_2 - C_6 алкинила, замещенного или незамещенного амина, карбоксила, замещенного C_1 - C_6 алкокси, замещенного C_1 - C_6 аминоалкила, галогена, гидроксила, амидо, замещенного амида, циано, замещенного или незамещенного кето, замещенного или незамещенного алкоксикарбонила, замещенного или незамещенного арилоксикарбонила, замещенного или незамещенного гетероарилоксикарбонила и сульфгидрила; и

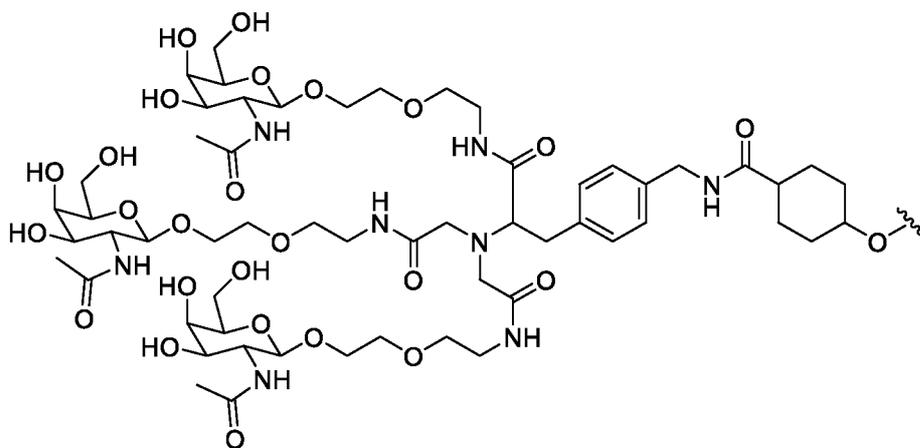


(Структура 9), где V содержит замещенный или незамещенный

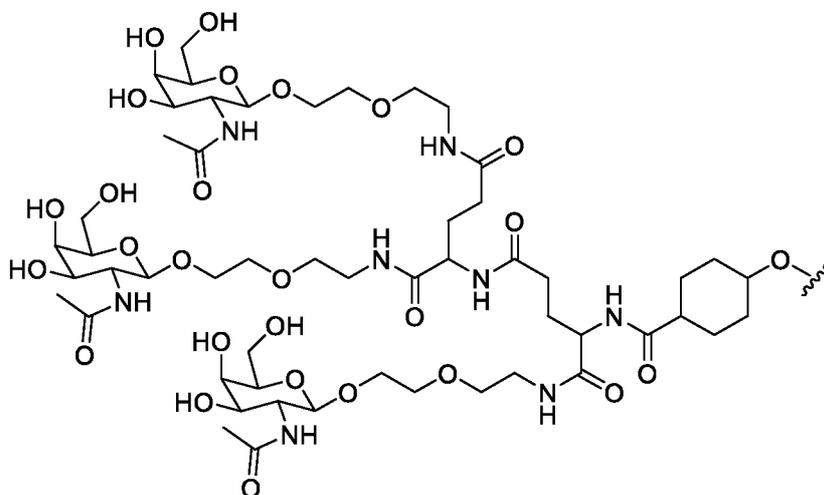
циклоалкил, замещенный или незамещенный циклоалкенил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил или замещенный или незамещенный гетероциклил или любую их ковалентно соединенную комбинацию; при условии, что указанный нацеливающий лиганд, содержащий структуру Формулы (I), не является нацеливающим лигандом или его фармацевтически приемлемой солью, содержащим структуру, выбранную из группы, состоящей из:



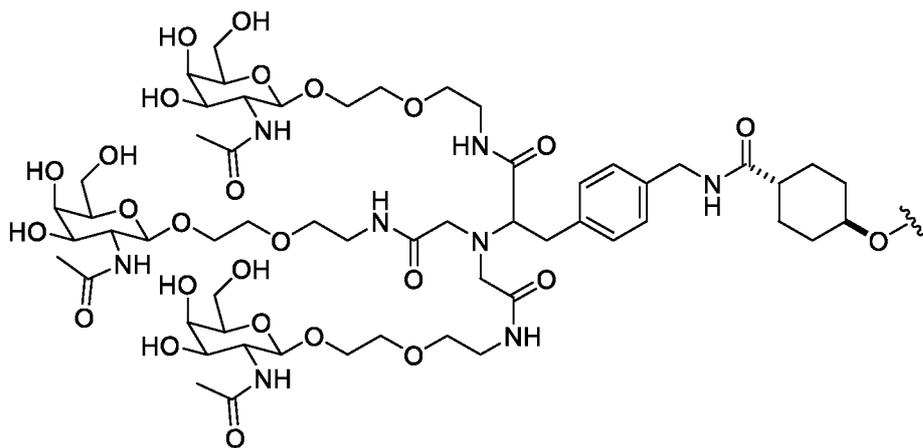
(Структура 1001);



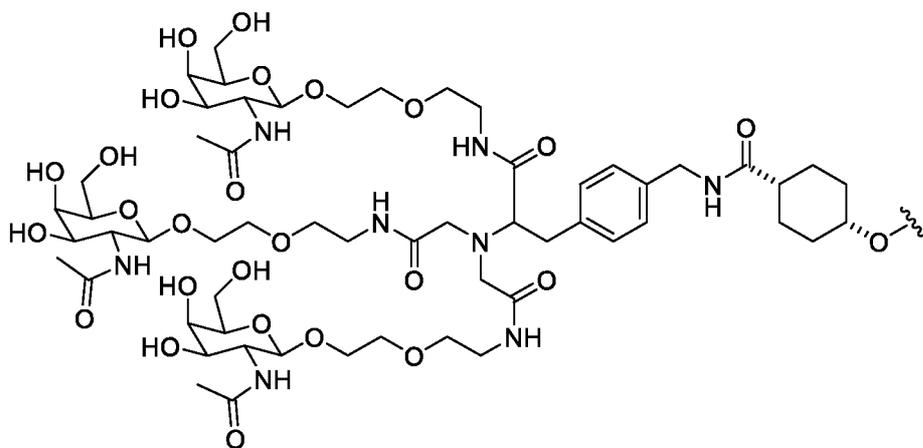
(Структура 1002);



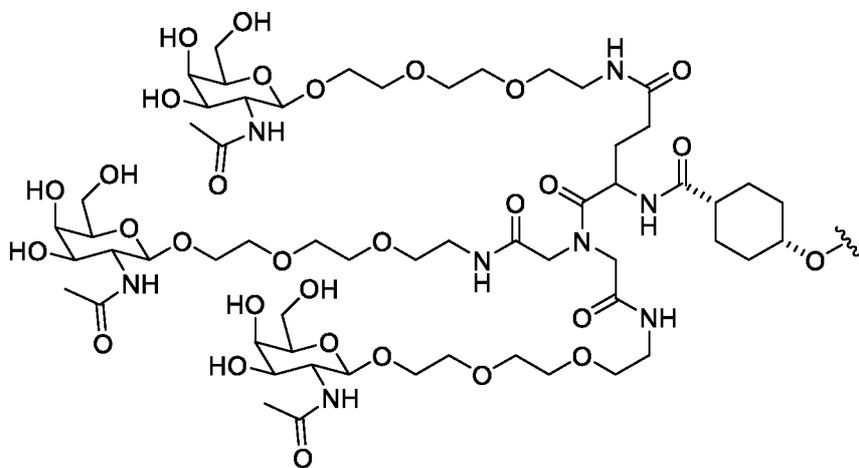
(Структура 1003);



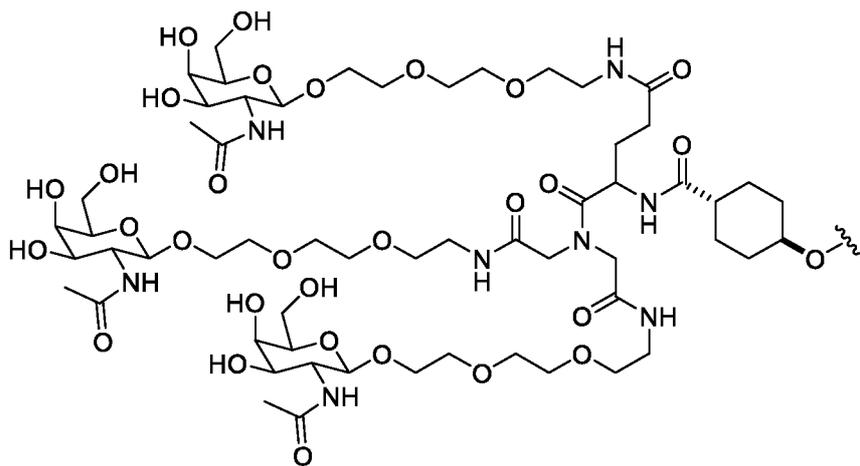
(Структура 1004);



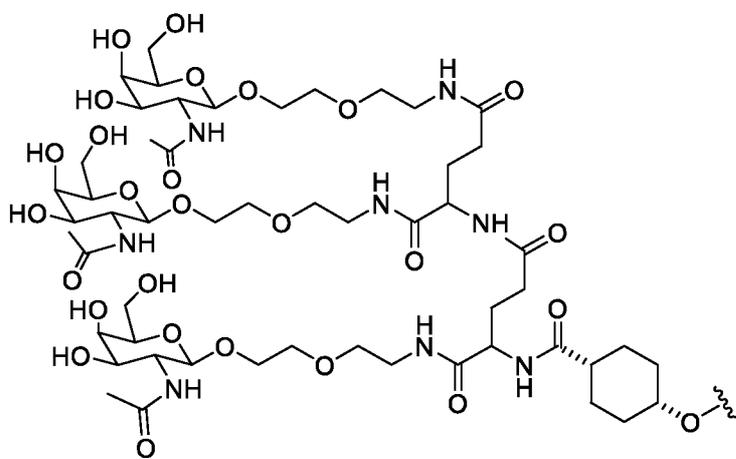
(Структура 1005);



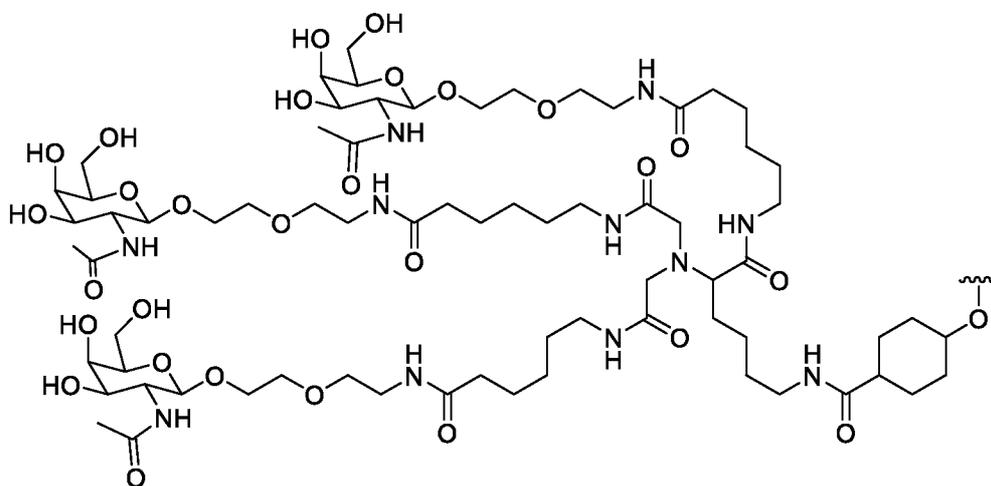
(Структура 1006);



(Структура 1007);

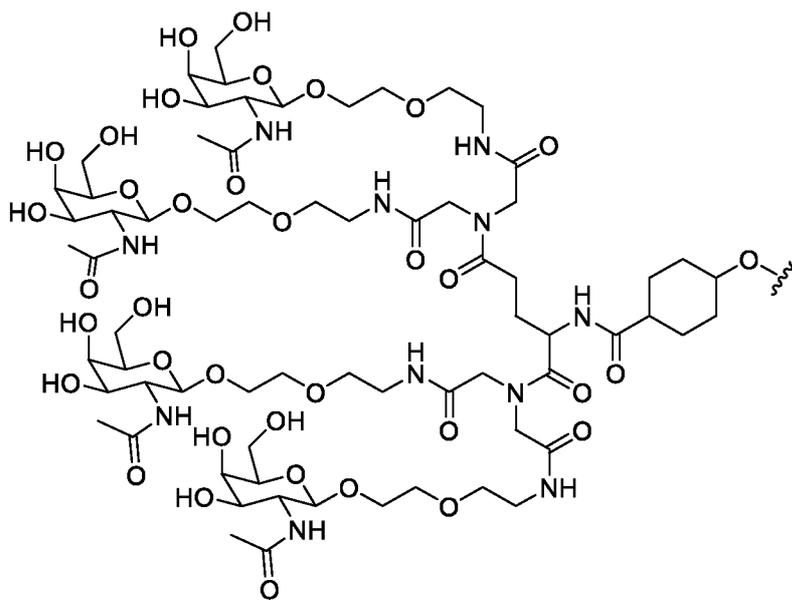


(Структура 1008);

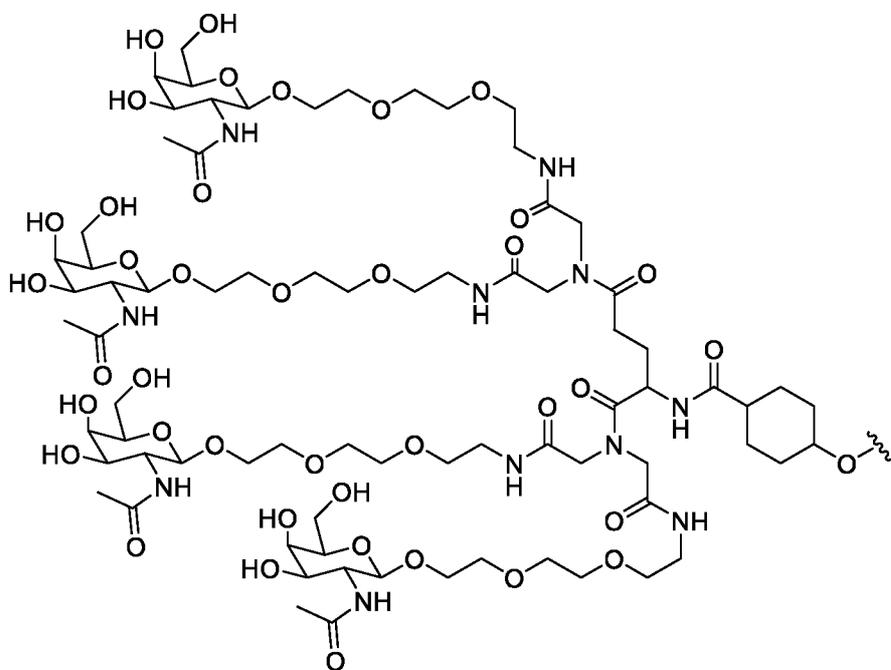


1009);

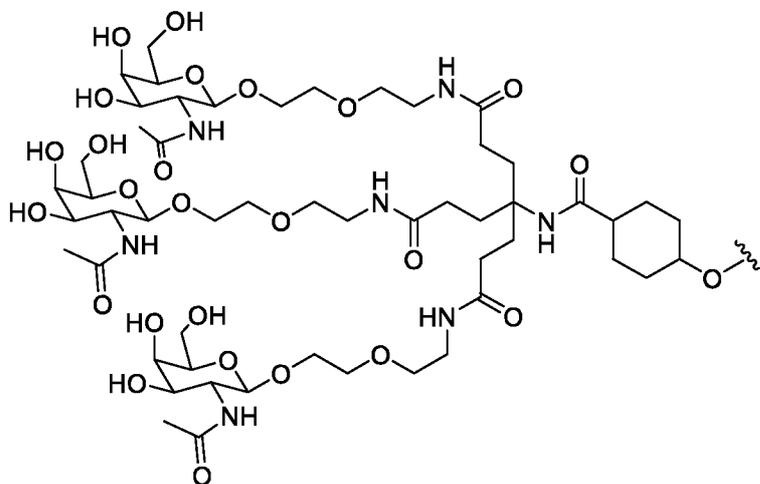
(Структура



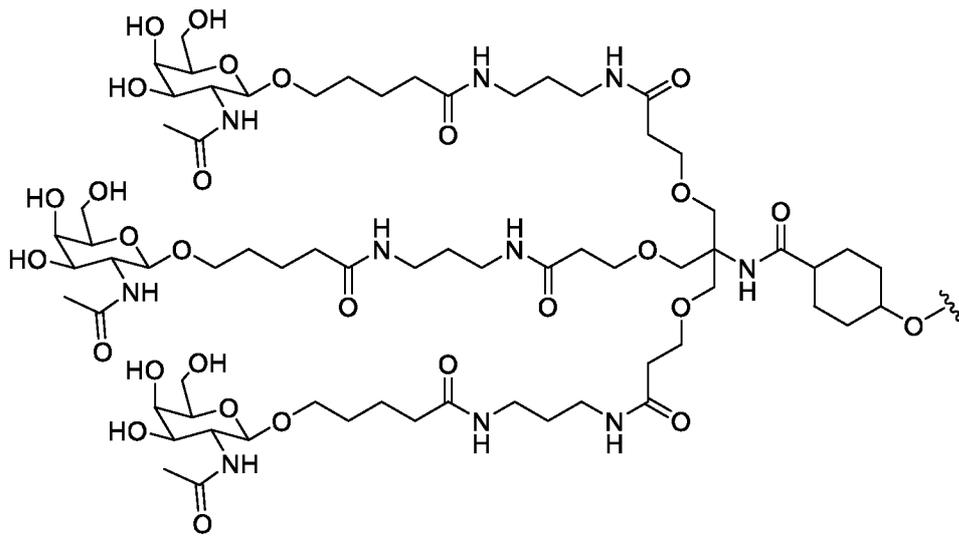
(Структура 1012);



(Структура 1014);

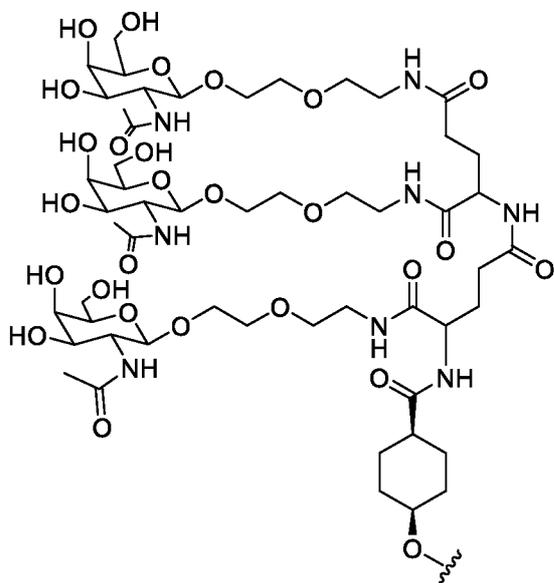


(Структура 1016);

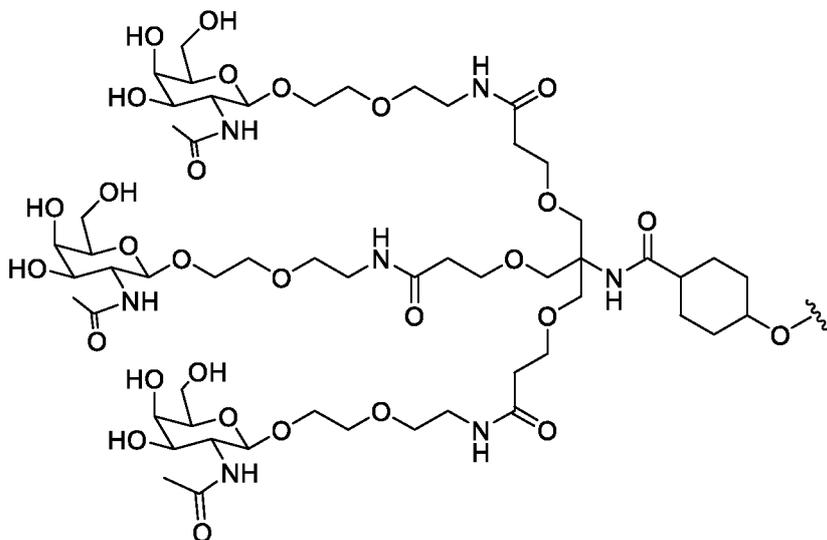


(Структура

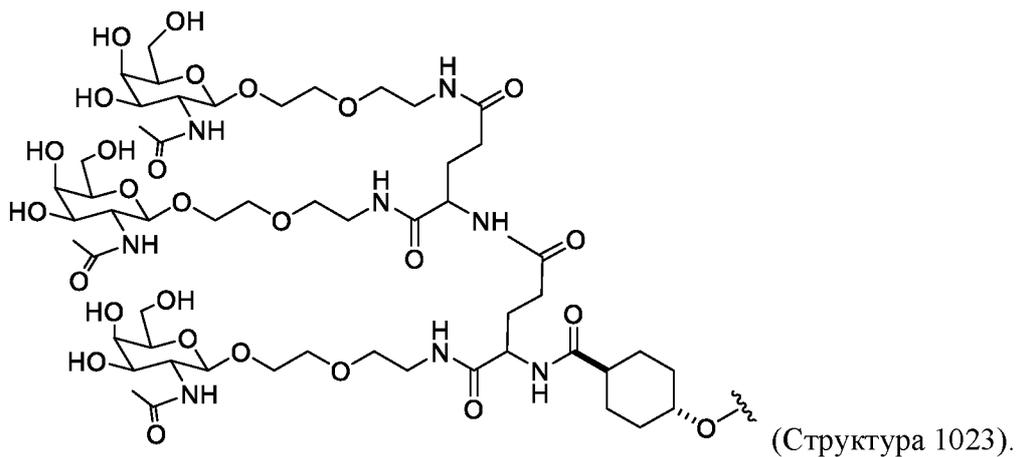
1018);



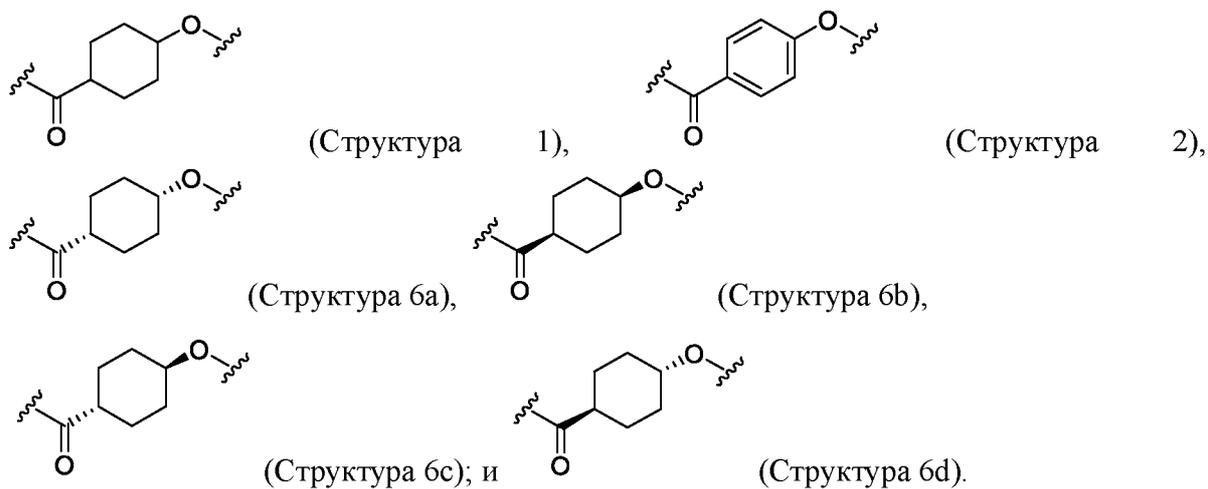
(Структура 1019);



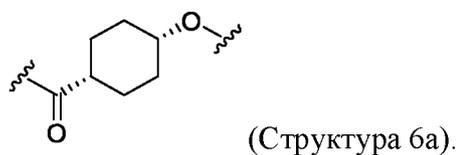
(Структура 1021); и



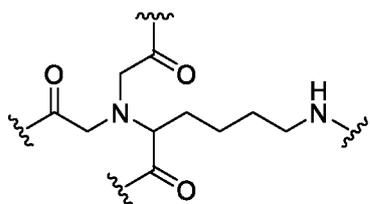
2. Нацеливающий лиганд по п. 1, или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой структуру, выбранную из группы, состоящей из:



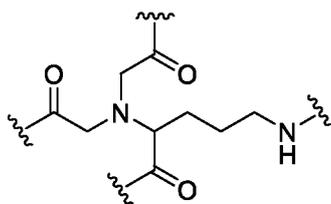
3. Нацеливающий лиганд по п. 1 или 2, или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой:



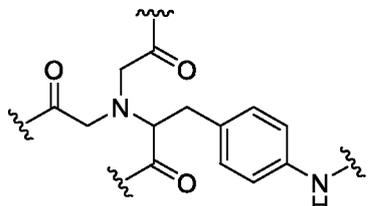
4. Нацеливающий лиганд по п. 1, или его фармацевтически приемлемая соль, где группа точки ветвления представляет собой структуру, выбранную из группы, состоящей из:



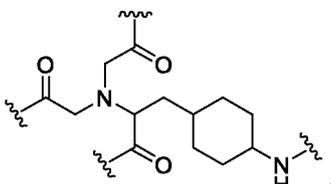
(Структура 201);



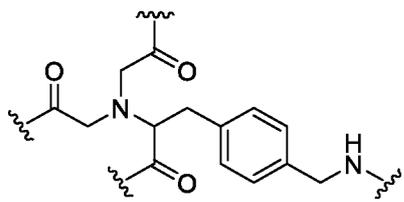
(Структура 202);



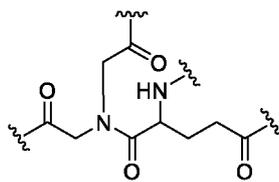
(Структура 203);



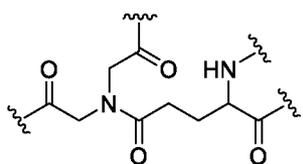
(Структура 204);



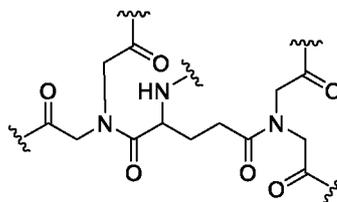
(Структура 205);



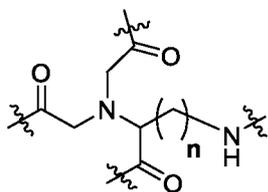
(Структура 206);



(Структура 207);

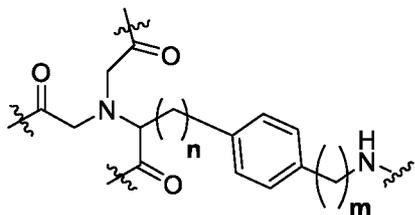


(Структура 208);



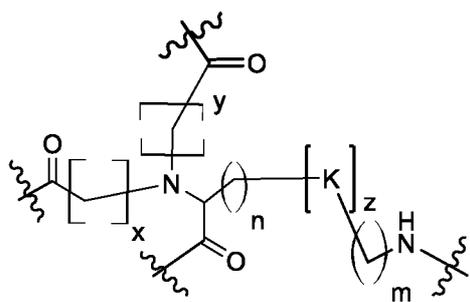
(Структура 209), где n в Структуре 209 представляет собой целое

число от 1 до 20;

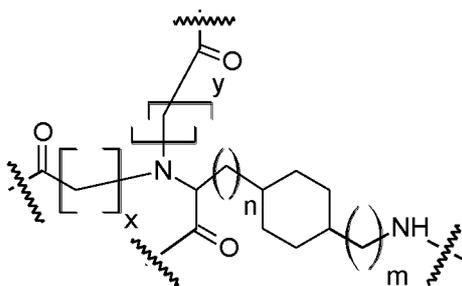


(Структура 210), где m в Структуре 210 представляет

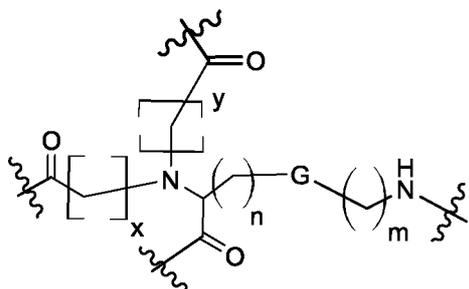
собой целое число от 0 до 20, и n в Структуре 210 представляет собой целое число от 0 до 20;



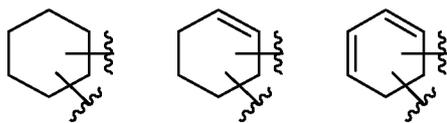
(Структура 211), причем m в Структуре 211 представляет собой целое число от 0 до 20; n в Структуре 211 представляет собой целое число от 0 до 20; x в Структуре 211 представляет собой целое число от 1 до 10; y в Структуре 211 представляет собой целое число от 1 до 10; z в Структуре 211 представляет собой целое число от 1 до 4; и K в Структуре 211 выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного циклоалкенила, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила и замещенного или незамещенного гетероциклила или любой их комбинации;



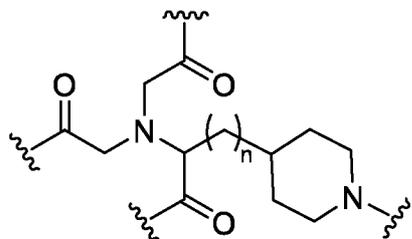
(Структура 212), где m в Структуре 212 представляет собой целое число от 0 до 20; n в Структуре 212 представляет собой целое число от 0 до 20; x в Структуре 212 представляет собой целое число от 1 до 10; и y в Структуре 212 представляет собой целое число от 1 до 10;



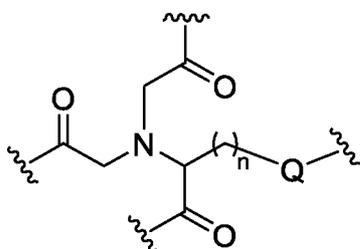
(Структура 213), где m в Структуре 213 представляет собой целое число от 0 до 20; n в Структуре 213 представляет собой целое число от 0 до 20; x в Структуре 213 представляет собой целое число от 1 до 10; y представляет собой целое число от 1 до 10; G в Структуре 213 выбран из группы,



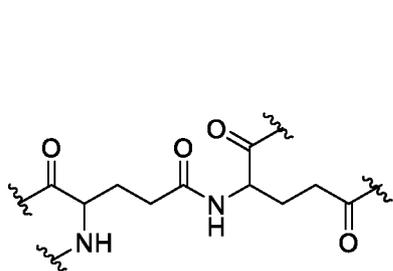
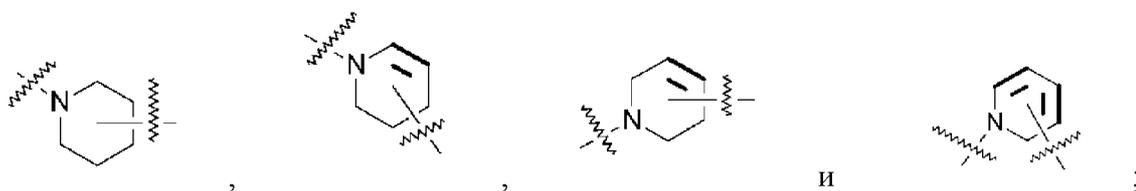
состоящей из , , ; или любого замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного циклоалкенила, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила или замещенного или незамещенного гетероциклила;



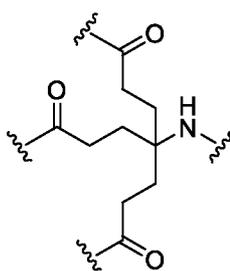
(Структура 214), где n в Структуре 214 представляет собой целое число от 0 до 20;



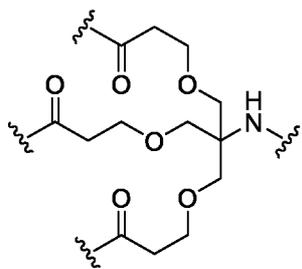
(Структура 215), где n в Структуре 215 представляет собой целое число от 0 до 20, и Q в Структуре 215 выбрана из группы, состоящей из:



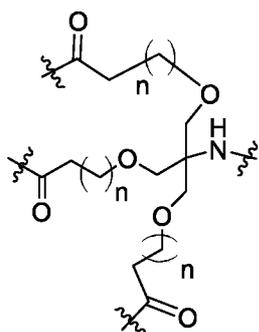
(Структура 216);



(Структура 217);

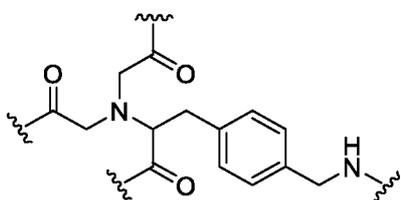


(Структура 218); и

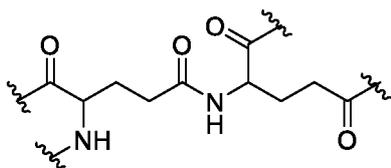


(Структура 219), где n в Структуре 219 представляет собой целое число, выбранное из чисел от 1 до 7.

5. Нацеливающий лиганд по п. 1, или его фармацевтически приемлемая соль, где группа точки ветвления представляет собой:

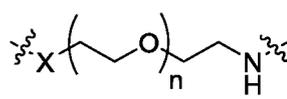


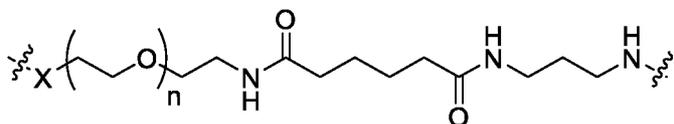
(Структура 205) или



(Структура 216).

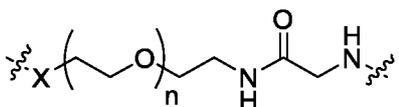
6. Нацеливающий лиганд по п. 1, или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый соединительный фрагмент независимо выбран из группы, состоящей

из:  (Структура 301), где n в Структуре 301 представляет собой целое число от 1 до 20, и X в Структуре 301 представляет собой O , S или NH ;



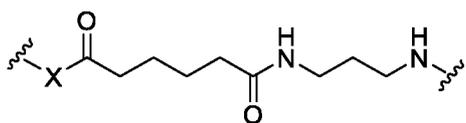
(Структура 303), где n в Структуре

303 представляет собой целое число от 1 до 20, и X в Структуре представляет собой O , S или NH ;



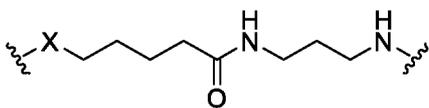
(Структура 304), где n в Структуре 304

представляет собой целое число от 1 до 20, и X в Структуре 304 представляет собой O , S или NH ;



(Структура 305), где X в Структуре 305

представляет собой O, S или NH; и



в Структуре 306, где X в Структуре

306 представляет собой O, S или NH.

7. Нацеливающий лиганд по п. 1, или его фармацевтически приемлемая соль, где нацеливающий фрагмент независимо выбран из группы, состоящей из: N-ацетилгалактозамина, галактозы, галактозамина, N-формилгалактозамина, N-пропионилгалактозамина, N-н-бутаноилгалактозамина и N-изо-бутаноилгалактозамина.

8. Нацеливающий лиганд по п. 7, или его фармацевтически приемлемая соль, где нацеливающий фрагмент представляет собой N-ацетилгалактозамин.

9. Нацеливающий лиганд по п. 1, или его фармацевтически приемлемая соль, где n в Формуле I представляет собой 3.

10. Нацеливающий лиганд по п. 1, где n в Формуле I представляет собой 4.

11. Нацеливающий лиганд по п. 1, или его фармацевтически приемлемая соль, где связывающий лиганд связан с ингибирующим экспрессию олигомерным соединением.

12. Нацеливающий лиганд по п. 11, или его фармацевтически приемлемая соль, где ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.

13. Нацеливающий лиганд по п. 12, или его фармацевтически приемлемая соль, где агент РНКи является двунитевым.

14. Нацеливающий лиганд по п. 13, или его фармацевтически приемлемая соль, где агент РНКи включает один или более модифицированных нуклеотидов.

15. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, содержащая агент РНКи, связанный с нацеливающим лигандом по п. 1.

16. Фармацевтическая композиция для введения терапевтического соединения в клетку млекопитающего, содержащая нацеливающий лиганд по п. 1, связанный с терапевтическим соединением.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где указанная клетка находится в организме субъекта.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, где субъект представляет собой человека.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 16-18, где терапевтический агент представляет собой ингибирующее экспрессию олигомерное соединение.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, где ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой двунитевый агент РНКи.

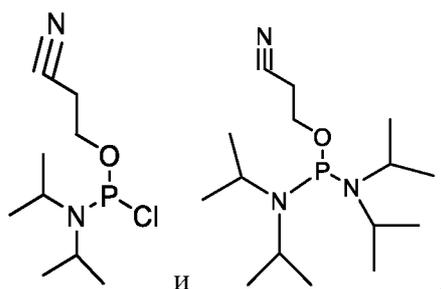
21. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение терапевтического соединения, содержащая нацеливающий лиганд по п. 1, связанный с терапевтическим соединением.

22. Способ получения фосфорамидит-содержащего соединения, содержащего нацеливающий лиганд по п. 1, или фармацевтически приемлемую соль его включающий:

(i) ковалентное связывание фрагмента карбоновой кислоты, или его активированного эфира, линкера с концевым амином, расположенным на группе точки ветвления, и

(ii) связывание линкера с атомом фосфора фосфорамидита посредством реакции фосфитилирования с фосфорамидит-образующим реагентом с получением фосфорамидит-содержащего соединения, которое включает нацеливающий лиганд.

23. Способ по п. 22, в котором фосфорамидитный реагент выбран из:

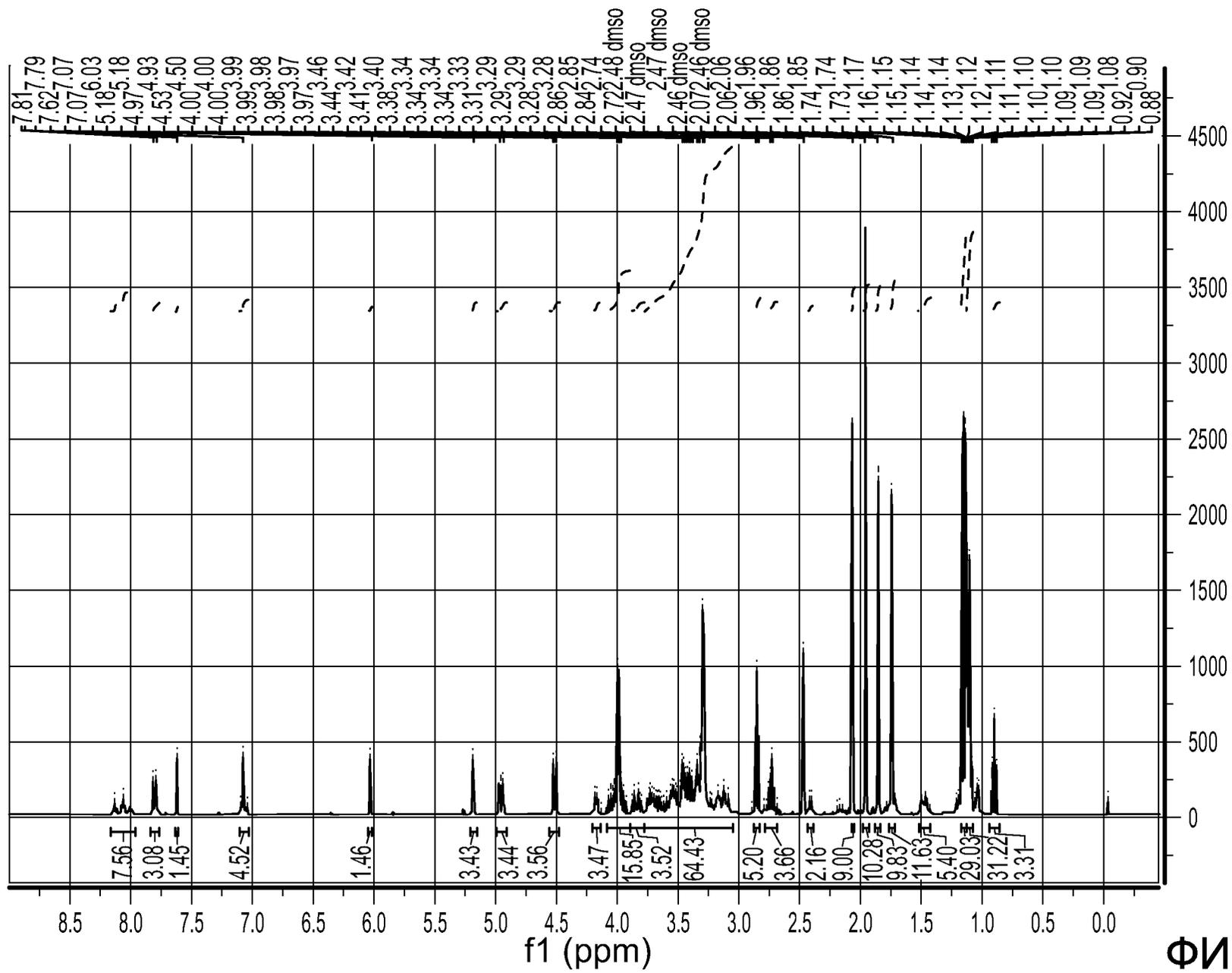


24. Нацеливающий лиганд по п. 1, связанный с терапевтическим агентом, для применения в качестве лекарственного средства.

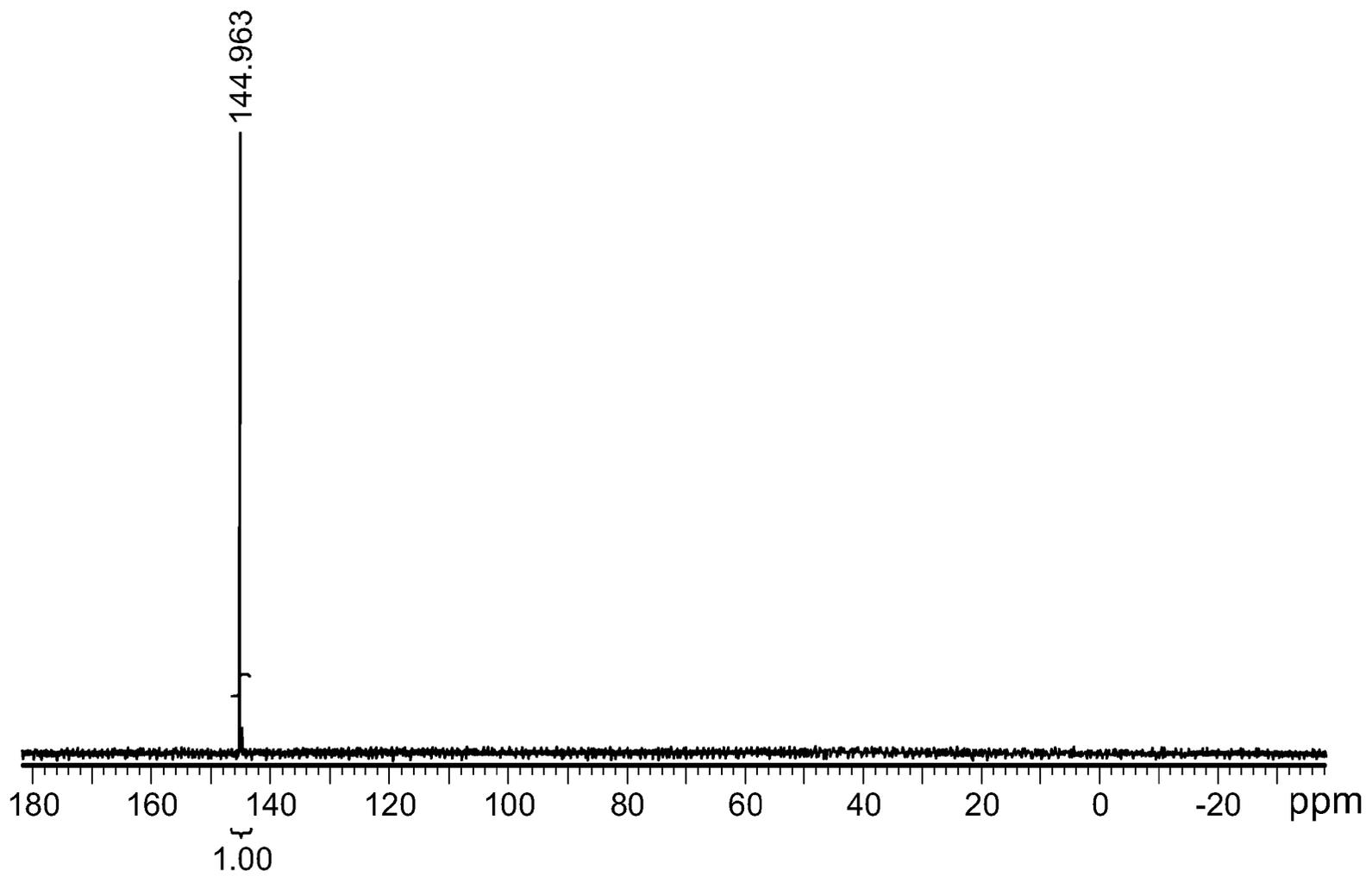
25. Нацеливающий лиганд по п. 1, связанный с терапевтическим агентом, для применения во введении терапевтического агента в клетку млекопитающего, для ингибирования экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, или для лечения заболевания или нарушения, при котором было бы полезно введение терапевтического агента.

26. Нацеливающий лиганд по п. 25, где терапевтический агент представляет собой ингибирующее экспрессию олигомерное соединение.

27. Нацеливающий лиганд по п. 26, где ингибирующее экспрессию олигомерное соединение представляет собой агент РНКи.

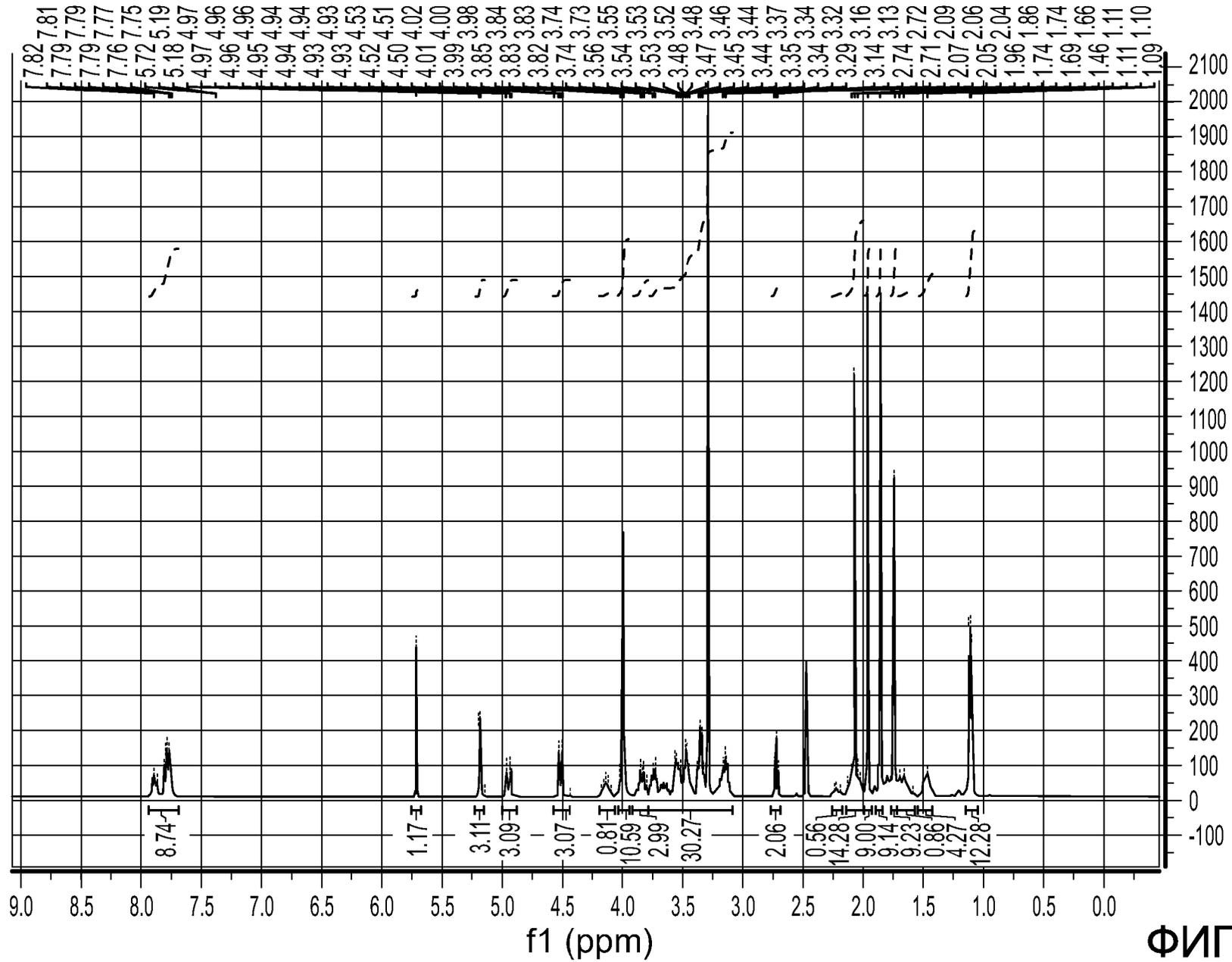


ФИГ. 1

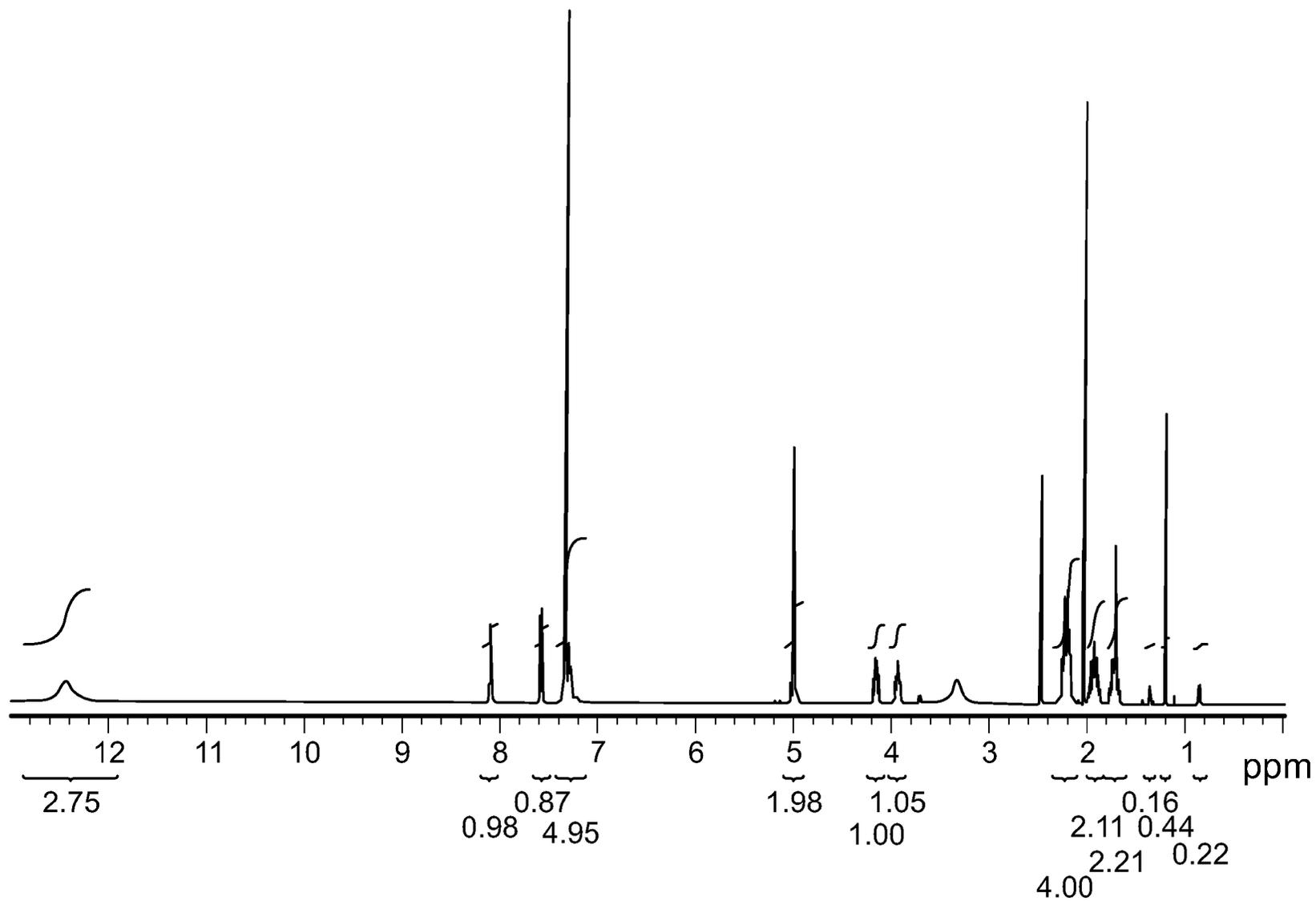


ФИГ. 2

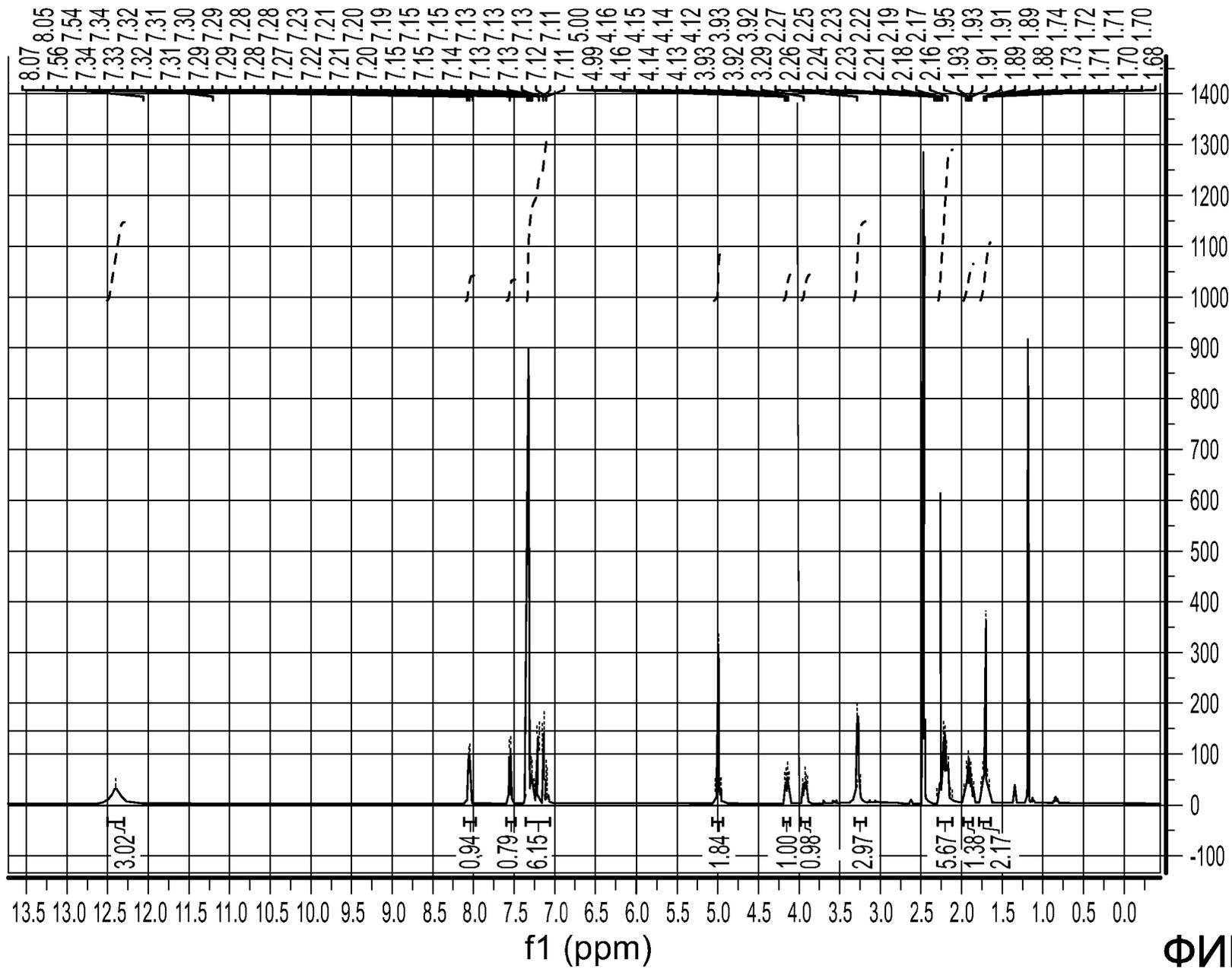
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



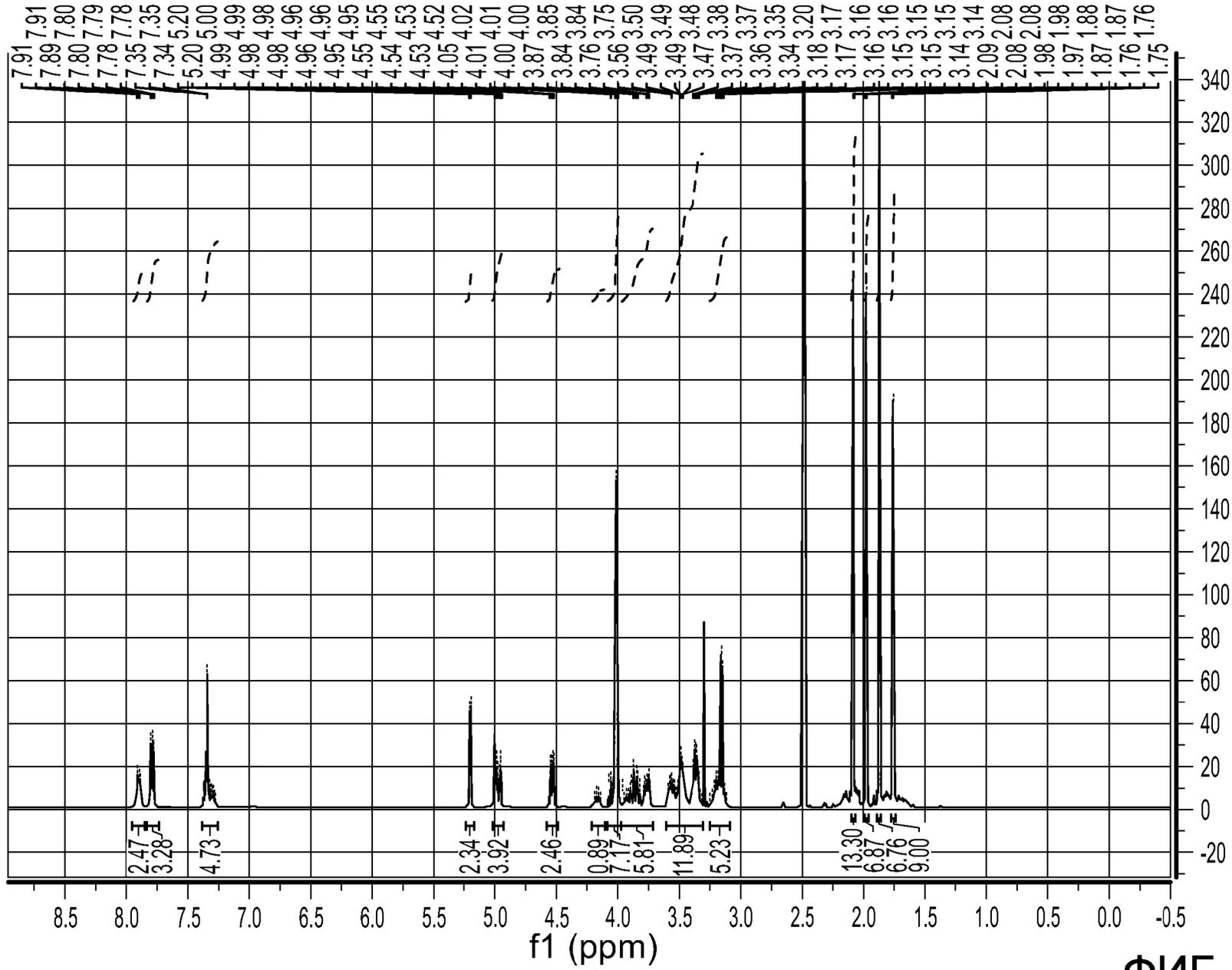
ФИГ. 2А



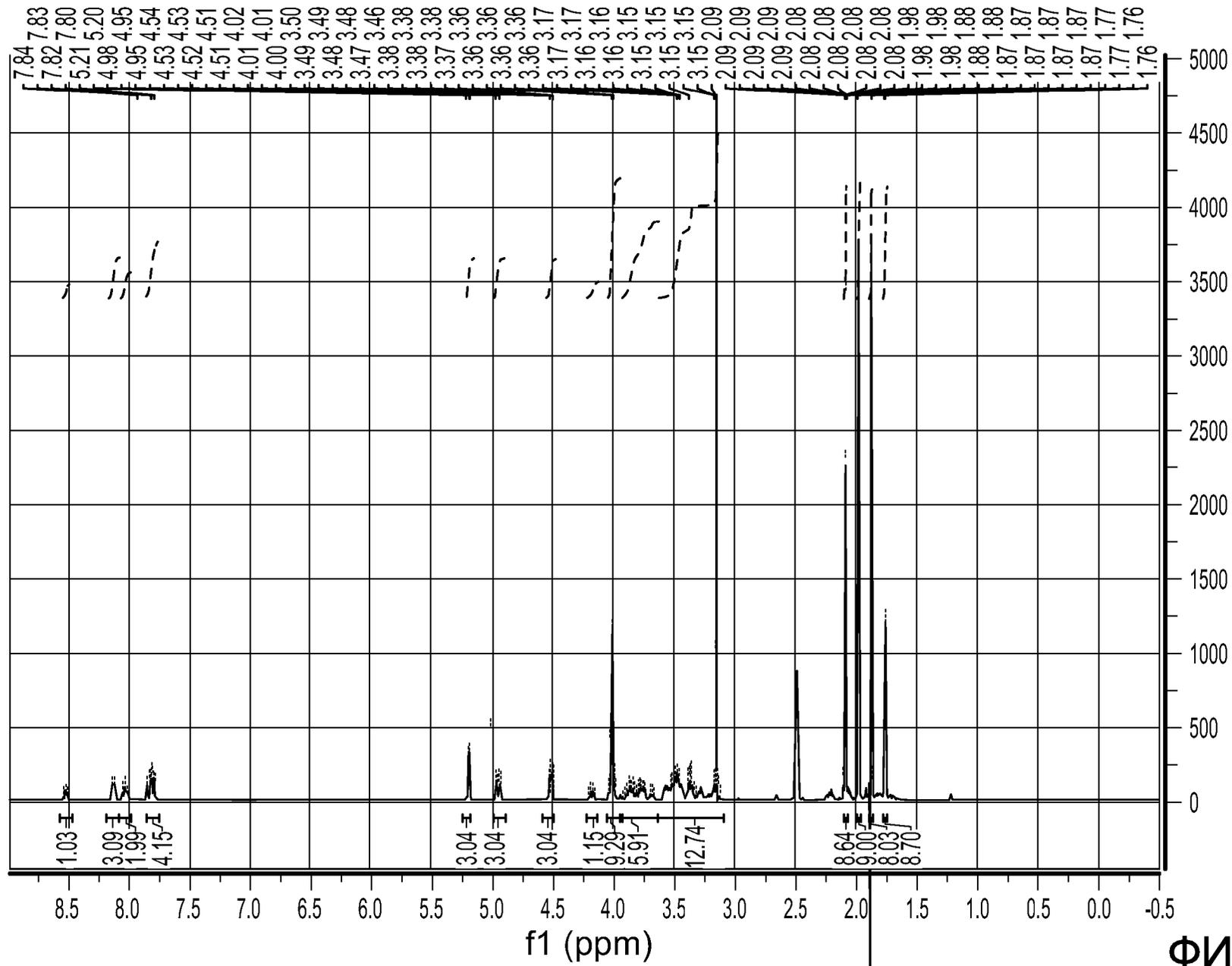
ФИГ. 2В



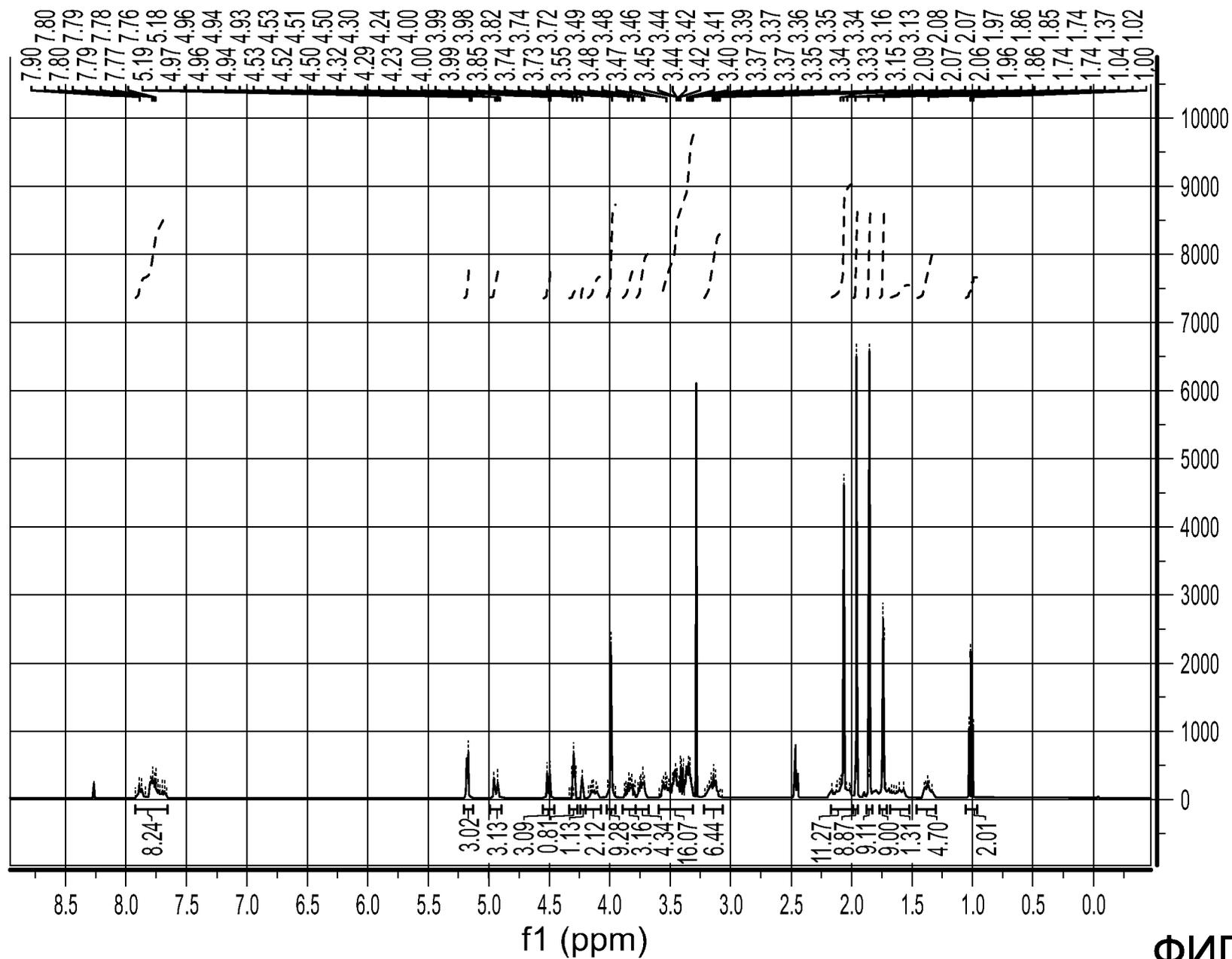
ФИГ. 2С



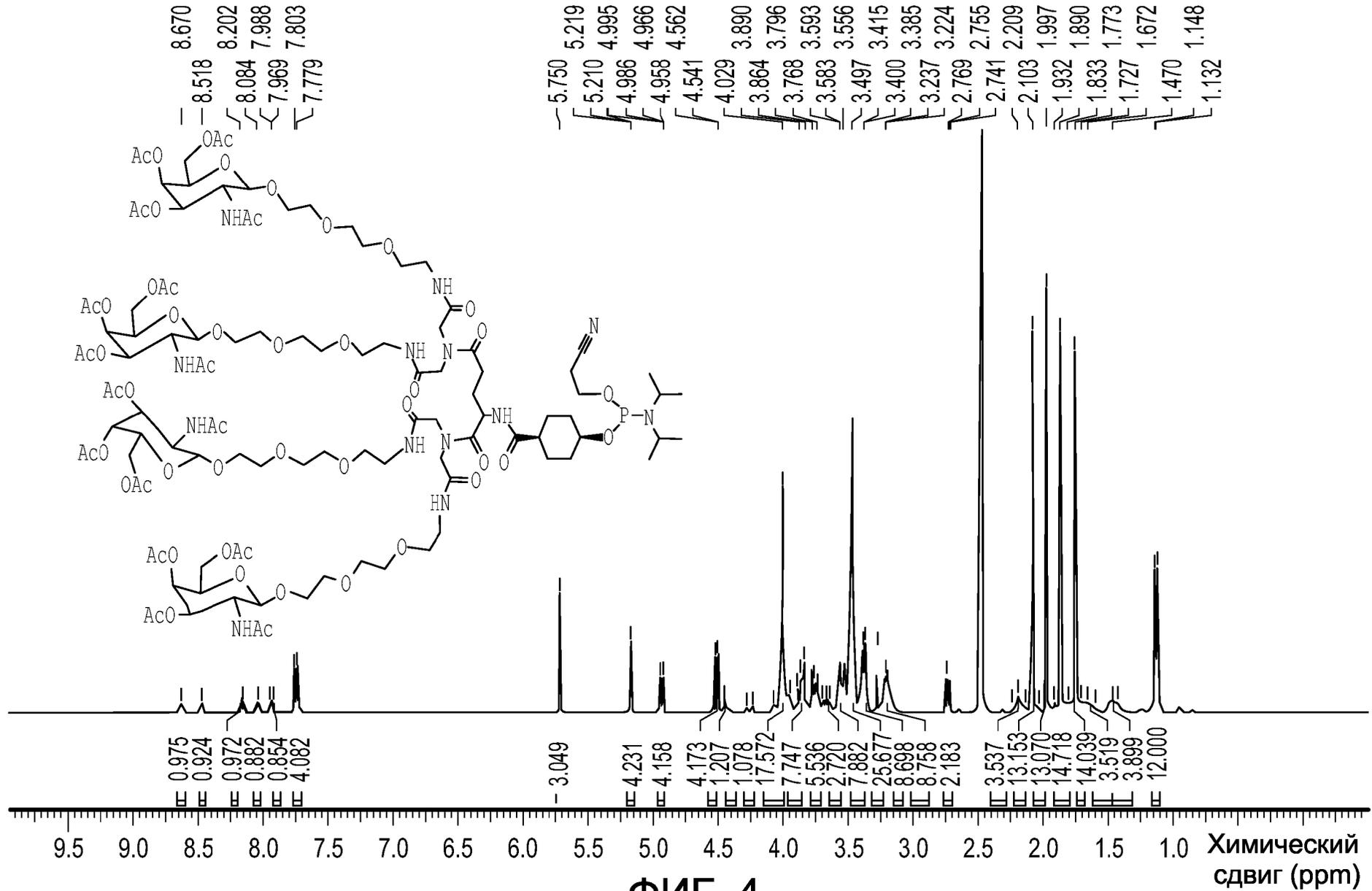
ФИГ. 2D

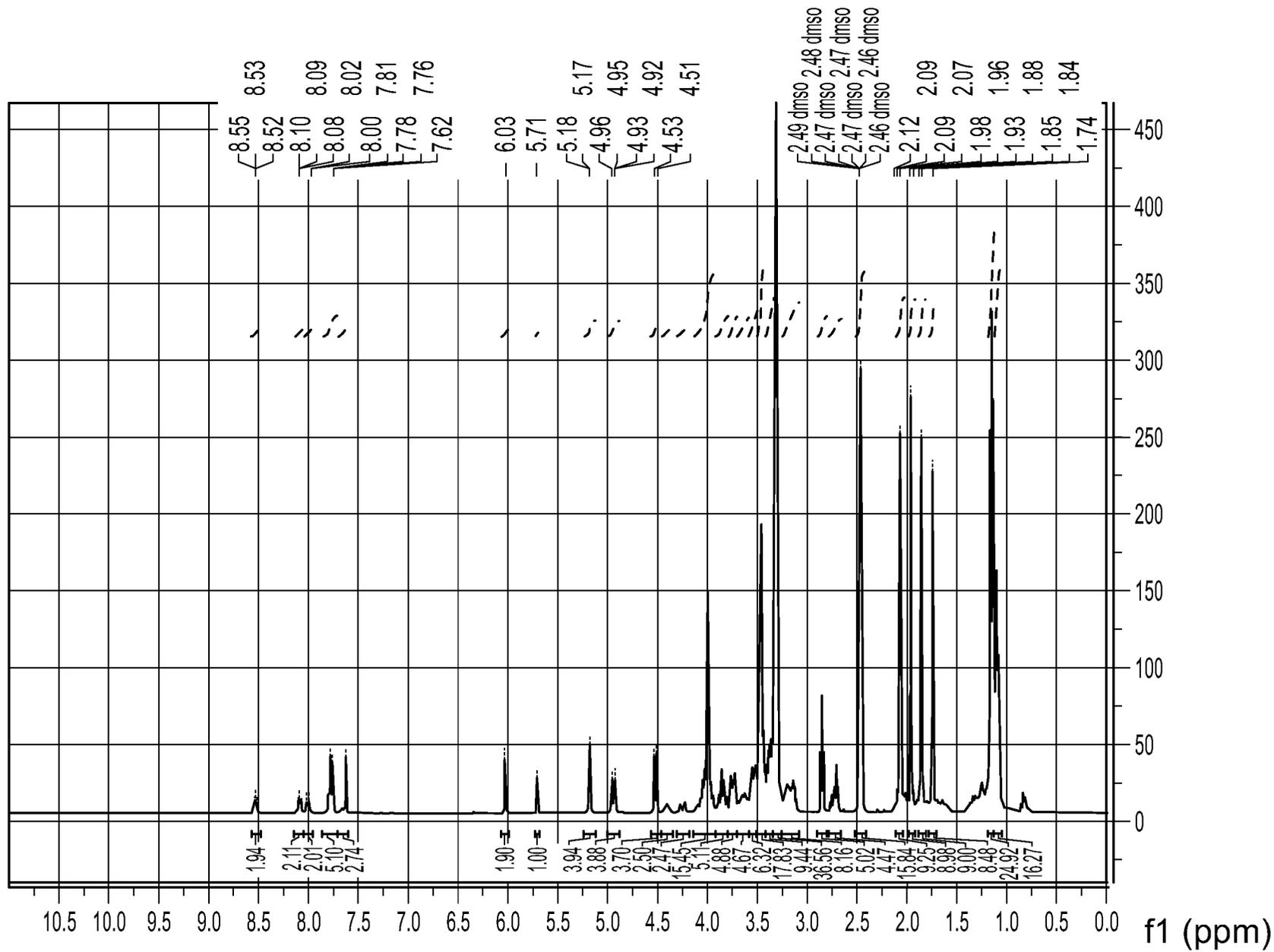


ФИГ. 2Е

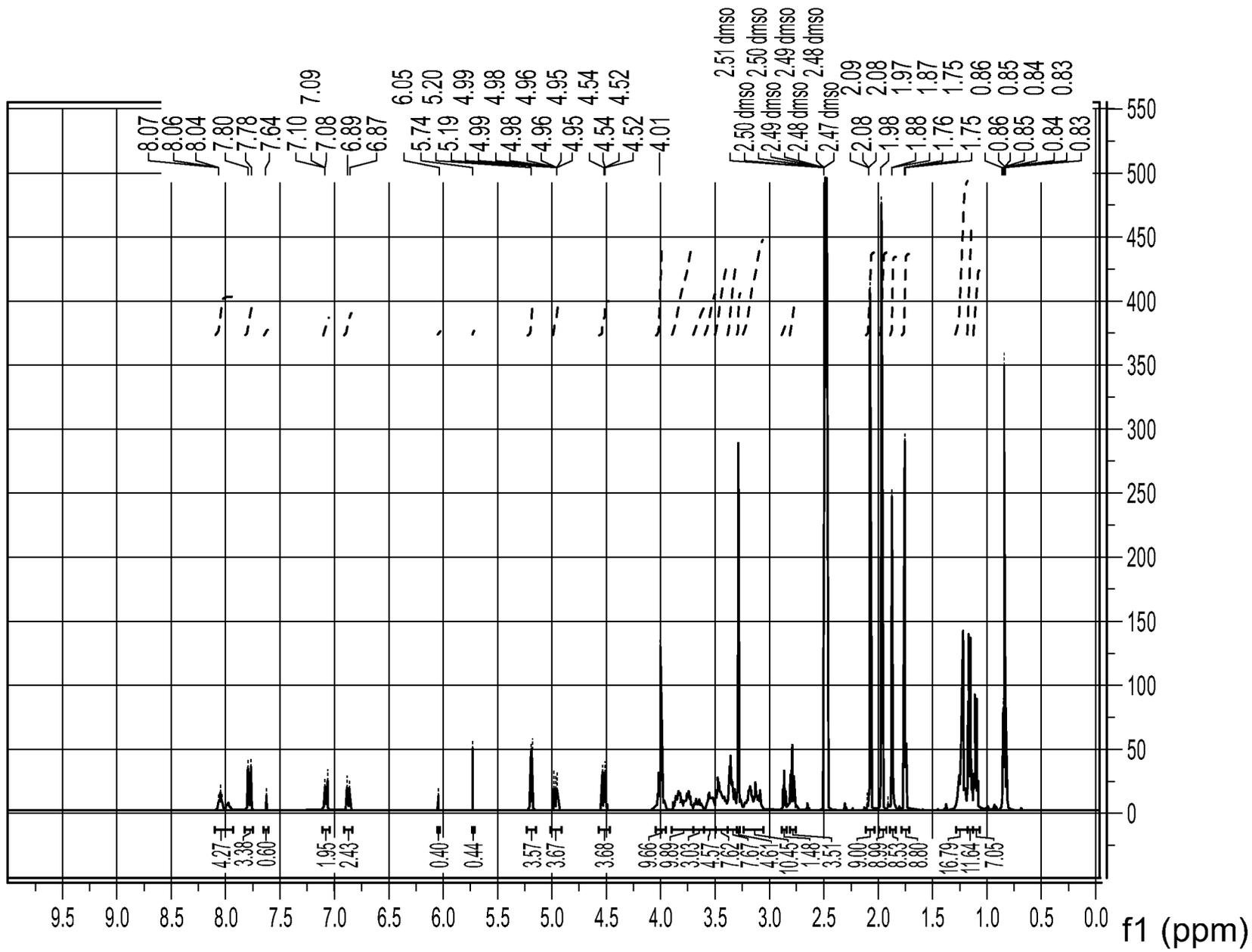


ФИГ. 2F





ФИГ. 5



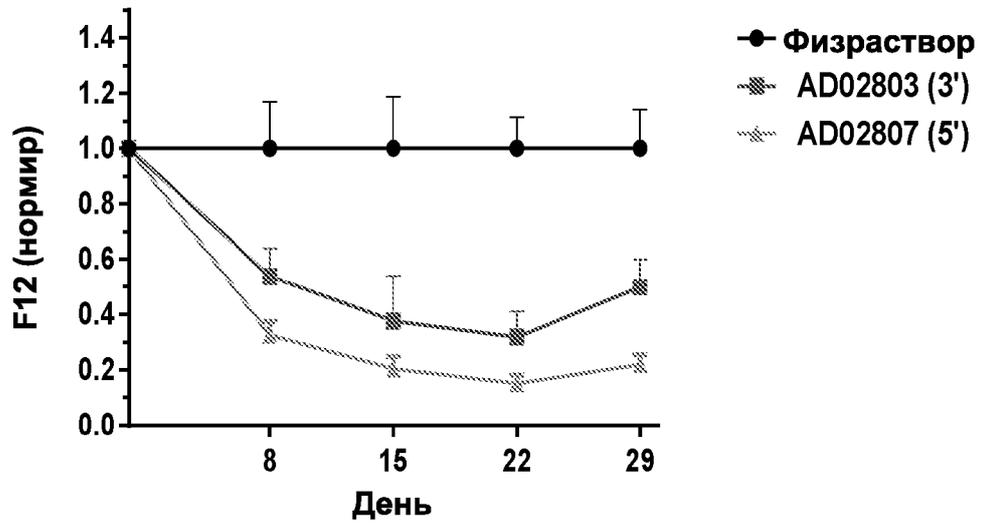
f1 (ppm) ФИГ. 6



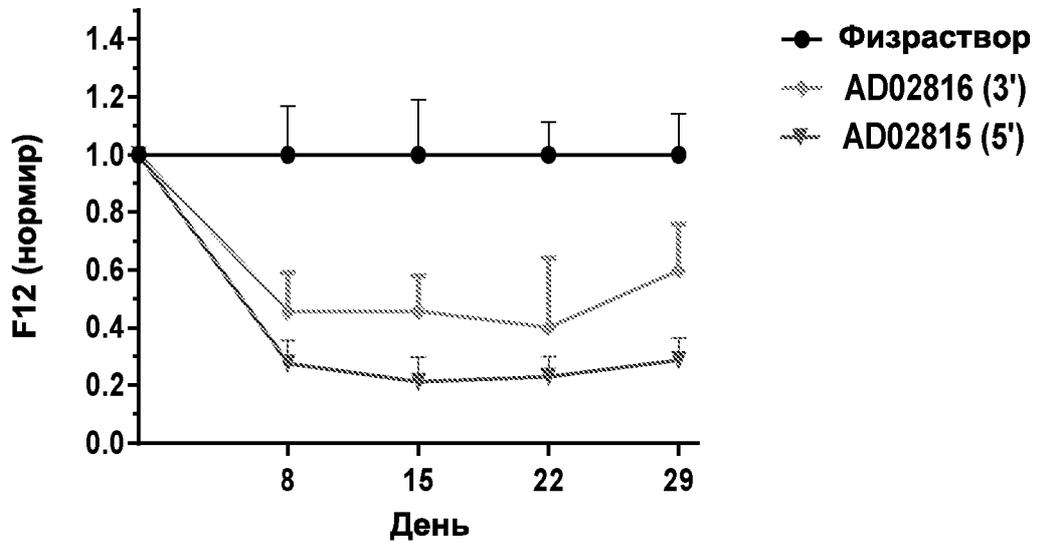
ФИГ. 7



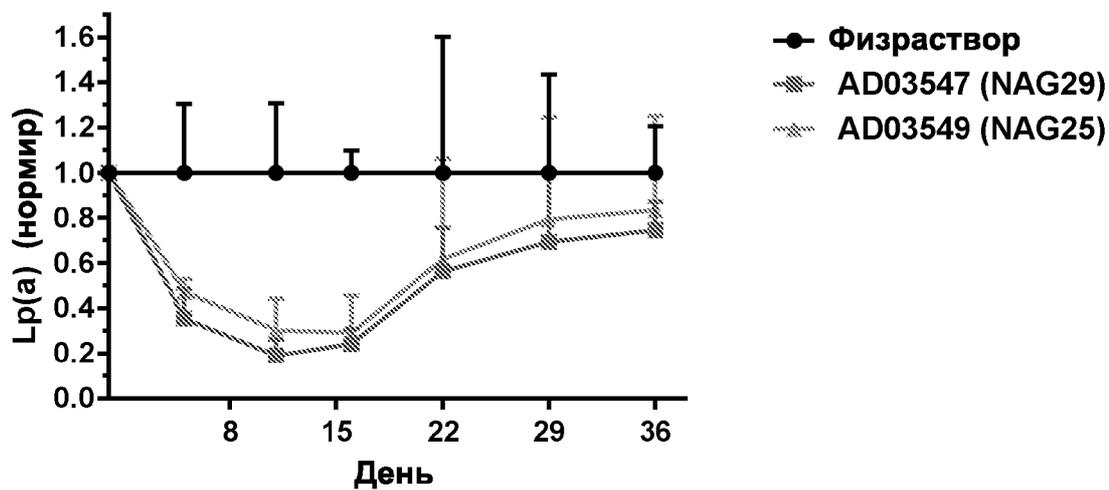
ФИГ. 8



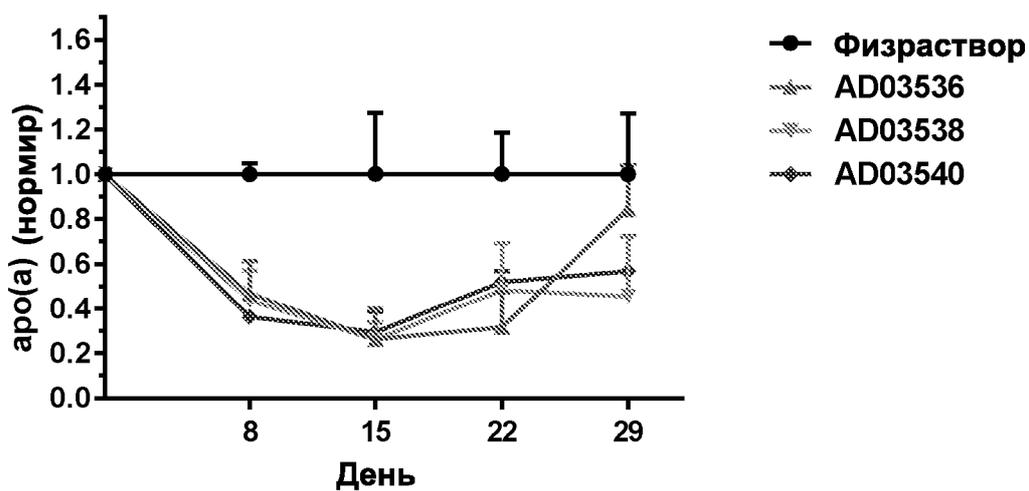
ФИГ. 10



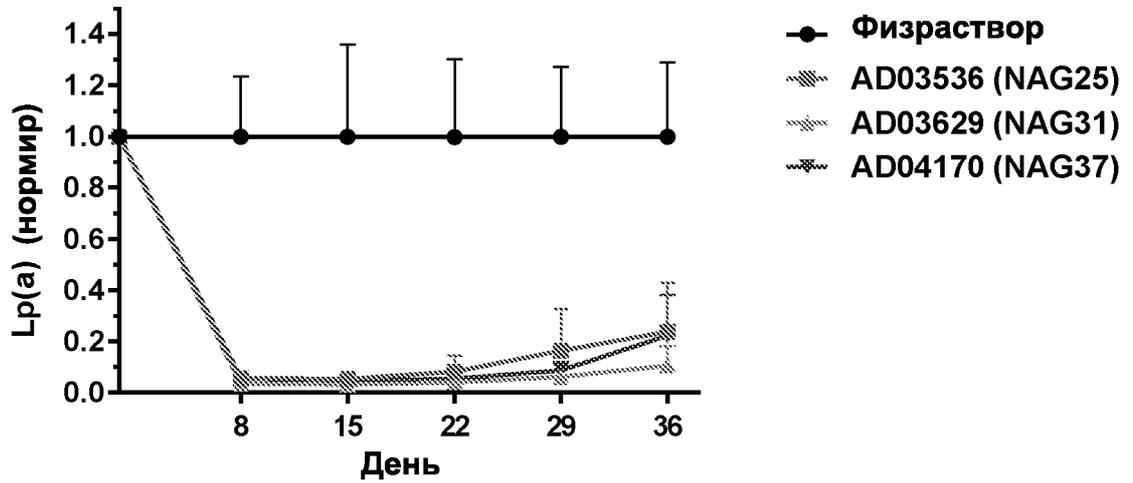
ФИГ. 11



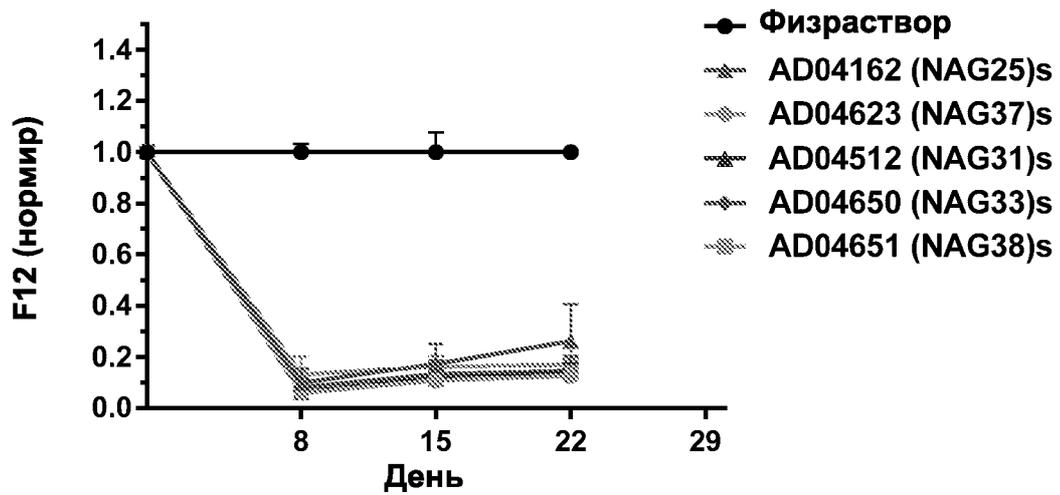
ФИГ. 12



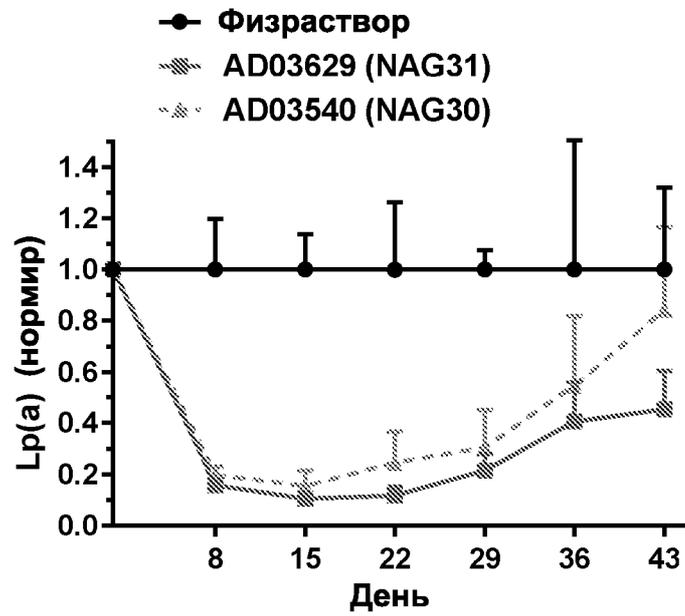
ФИГ. 13



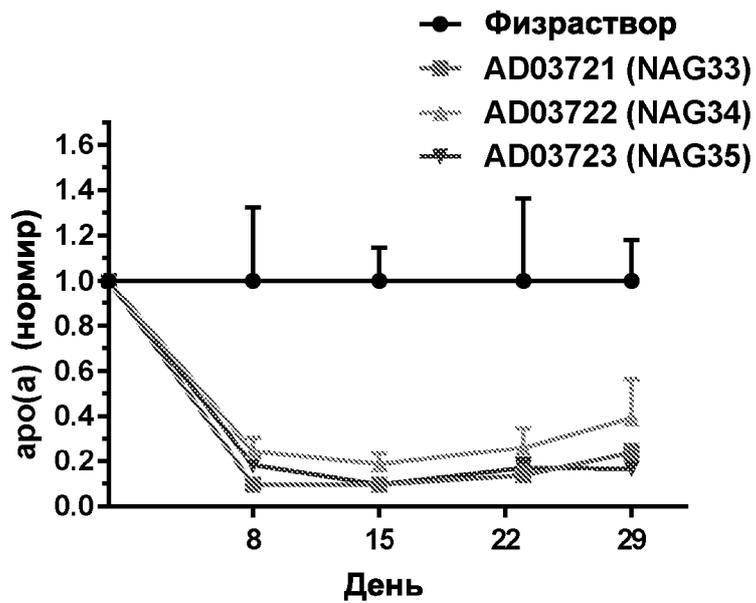
ФИГ. 14



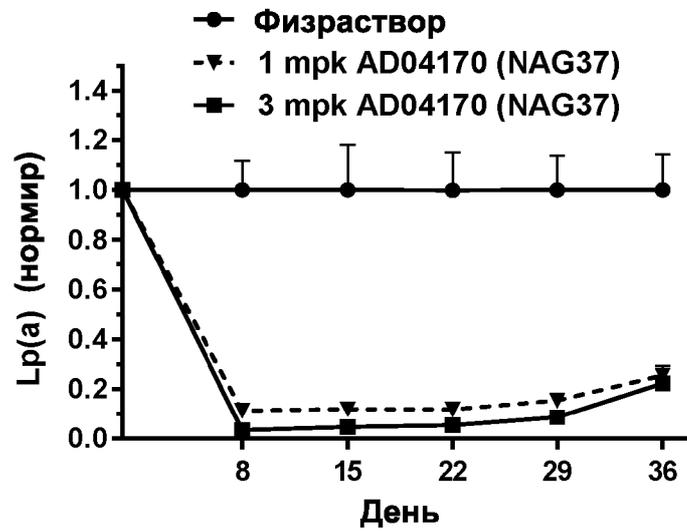
ФИГ. 15



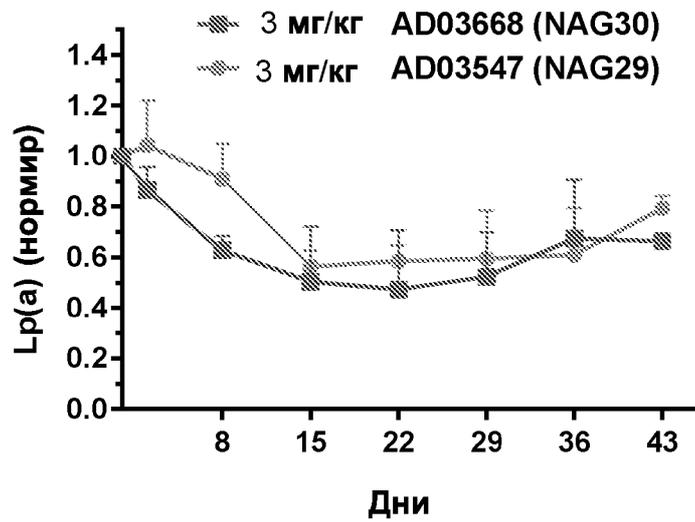
ФИГ. 16



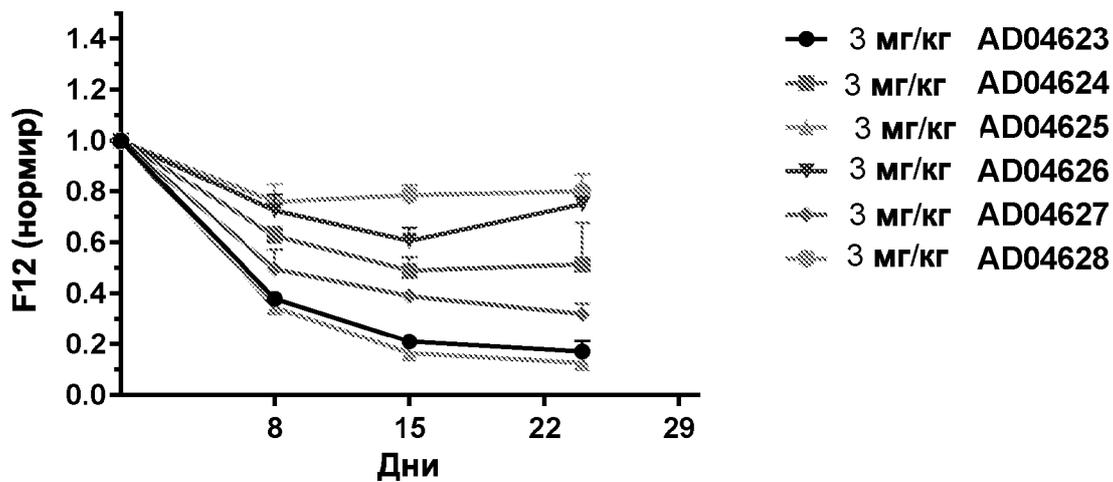
ФИГ. 17



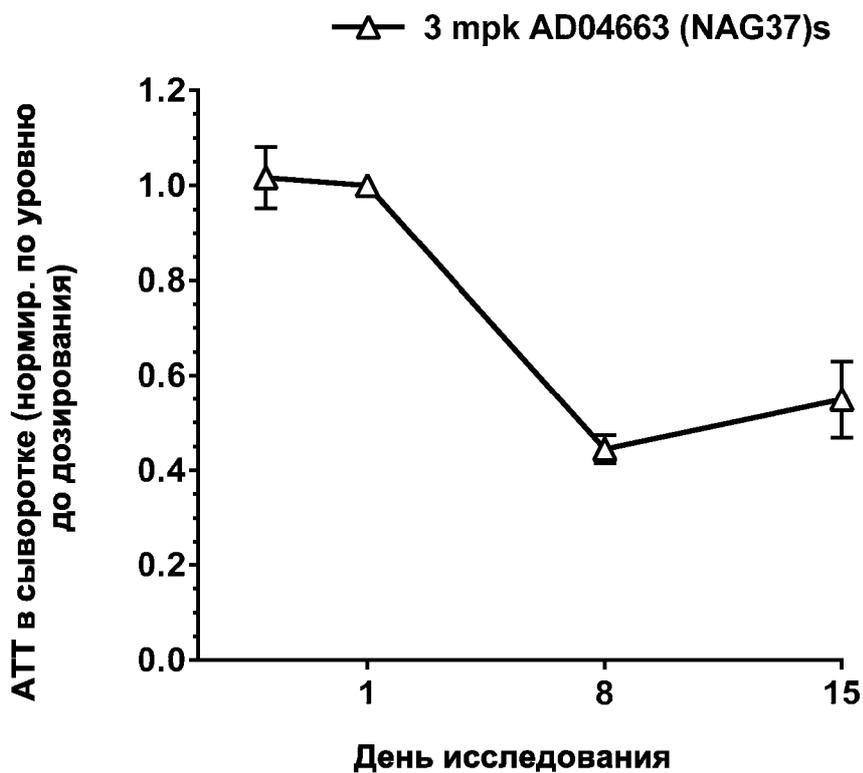
ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20



ФИГ. 21

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390668А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C07H 5/00, 5/06, 21/00, 21/02, 21/04, A61K 31/713, 31/7088, A61P 43/00, C12N 15/11, 15/113, 15/87

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, Reaxys

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	US 2016/0244752 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC) 25.08.2016, реферат, параграфы [0008], [0080], [0111], [0112], [0123]-[0126], [0143]-[0164]	1-27
X	NAIR Jayaprakash K. et al. Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. J. Am. Chem. Soc., 2014, 136(49), 16958-16961, реферат, фигуры 1, 4, схема 1, страницы 16958, 16961, последний абзац	1, 6-9, 11-27
A	US 2012/0165393 A1 (ARROWHEAD MADISON INC) 28.06.2012	1-27

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

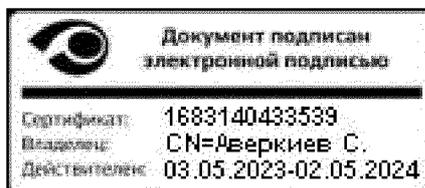
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 14 декабря 2023 (14.12.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202390668

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C07H 5/06 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

СПК:

C07H 5/06
C07H 21/02
C07H 21/04
A61K 31/713
A61P 43/00
C12N 15/11
C12N 15/87