

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393367 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.27

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.01

(54) КОНЬЮГАТ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЛИГАНДА, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 202110753225.4

(32) 2021.07.02

(33) CN

(86) PCT/CN2022/103275

(87) WO 2023/274395 2023.01.05

(71) Заявитель:
ТОЦЗЕ БИОТЕК (ШАНХАЙ) КО.,
ЛТД. (CN)

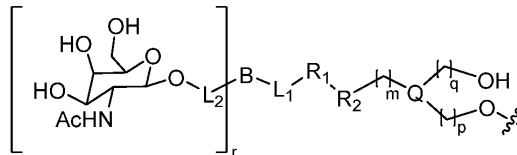
(72) Изобретатель:

Хуан Цзиньюй, Ло Минь, Инь Кэ, Хоу
Чжэ, Ли Юньфэй (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, способ его получения и его применения. В частности, предложен лиганд, имеющий структуру, представленную формулой (I). Предложенный лиганд обеспечивает хороший эффект ингибирования экспрессии посредством конъюгации с нуклеиновой кислотой.



202393367

A1

A1

202393367

КОНЬЮГАТ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЛИГАНДА, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к лиганду и способу его получения. Настоящее изобретение также относится к конъюгату нуклеиновой кислоты и лиганда, образованному путем связывания лиганда с нуклеиновой кислотой с помощью ковалентной связи. Доставка конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда может быть нацелена на гепатоциты, так что она может вызывать эффект РНК-интерференции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

РНК-интерференция является эффективным способом подавления экспрессии генов. Статистически, примерно более 80% белков, связанных с заболеваниями у людей, являются белками, не поддающимися воздействию лекарственных средств, поскольку на них не могут быть нацелены обычные низкомолекулярные лекарственные средства и биомакромолекулярные составы. Используя технологию РНК-интерференции, подходящие миРНК могут быть сконструированы в соответствии с мРНК (матричная РНК), кодирующими эти белки, для специфического нацеливания и разрушения мРНК-мишеней, таким образом, что ингибируется образование родственных белков. Поэтому миРНК имеют очень значительные перспективы для разработки лекарственных средств. Однако для достижения терапевтического эффекта РНК-интерференции *in vivo* необходимо доставлять молекулы миРНК к конкретным клеткам *in vivo*.

Одним из эффективных способов доставки лекарственных средств является конъюгация миРНК с нацеливающим лигандом, чтобы она могла проникать в клетки посредством эндоцитоза с использованием связывания нацеливающего лиганда с молекулой рецептора на поверхности клеточной мембраны. Например, асиалогликопротеиновые рецепторы (ASGPR) представляют собой рецепторы, специфически экспрессируемые гепатоцитами и на поверхности гепатоцитов характеризуются высокой численностью и быстрой внутриклеточной и внеклеточной трансформацией. Молекулы моносахаридов и полисахаридов, такие как галактоза, галактозамин и N-ацетилгалактозамин, обладают высоким сродством к ASGPR. Согласно литературным данным (YuanyuH, LIANG ZICAI L, Asialoglycoprotein Receptor and Its Application in Liver-targeted Drug Delivery, Prog. Biochem. Biophys. 2015; 42 (6)), РНК может быть эффективно доставлена в гепатоциты с использованием кластеров галактозамина (GalNAc); когда

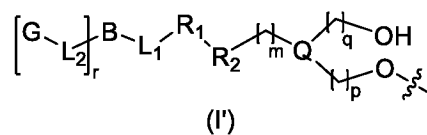
молекулы GalNAc сконструированы как трехвалентные или четырехвалентные кластеры, способность одновалентных или двухвалентных молекул GalNAc нацеливаться на гепатоциты может быть значительно улучшена.

Различные кластерные структуры и различные режимы соединения с РНК существенно влияют на активность миРНК *in vivo*. Более высокая активность означает лучший терапевтический эффект или более низкую дозировку лекарственного средства, и, кроме того, более низкая дозировка лекарственного средства, которая обеспечивает эквивалентный терапевтический эффект, означает более низкую токсичность. Таким образом, большое значение имеет разработка приемлемой ковалентной связи между нацеливающим лигандом и миРНК.

Настоящее изобретение относится к новой молекулярной структуре, в которой молекула GalNAc соединена с РНК, которая имеет более простую синтетическую структуру и обладает лучшей активностью доставки и лучшей активностью РНК-интерференции.

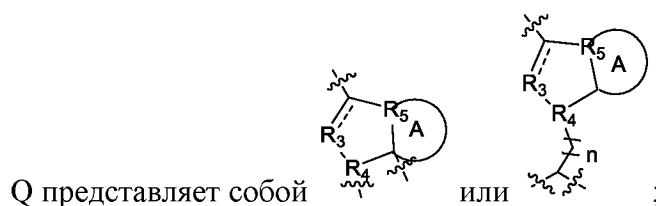
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ




В первом аспекте настоящее изобретение относится к лиганду, имеющему структуру, представленную формулой (I'),



где L_1 представляет собой C_1 - C_{30} алкильную цепь или C_1 - C_{30} алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или $\text{C}=\text{O}$;

R_1 и R_2 независимо представляют собой химические связи, $-\text{NR}_6-$, $-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{OC}(=\text{O})-$;



 представляет собой одинарную или двойную связь; когда  представляет собой одинарную связь, R_3 независимо представляет собой CR_7R_8 , NR_6 , O или S ; когда  представляет собой двойную связь, R_3 независимо представляет собой CR_9 или N ;

R_4 независимо представляет собой CR_9 или N ;

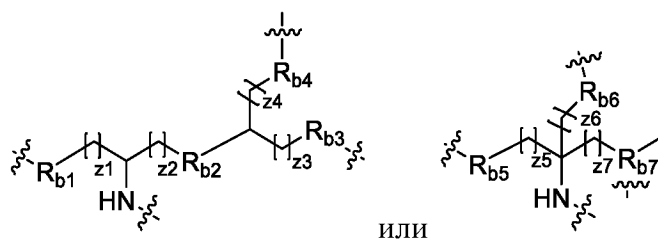
кольцо A отсутствует или представляет собой циклоалкил, гетероцикл, арил или гетероарил; когда кольцо A присутствует, R_5 независимо представляет собой CR_9 или N ; когда кольцо A отсутствует, R_5 независимо представляет собой CR_7R_8 , NR_6 или O ;

R_6 и R_9 независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ или $C(=O)NR'(R'')$, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, оксо, нитро, циано, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{3-7} циклоалкила, 3-12-членного гетероциклила, 5-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ и $C(=O)NR'(R'')$;

R_7 и R_8 независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ или $C(=O)NR'(R'')$, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, оксо, нитро, циано, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{3-7} циклоалкила, 3-12-членного гетероциклила, 5-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ и $C(=O)NR'(R'')$;

R' и R'' независимо представляют собой водород, дейтерий, гидроксид, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, оксо, нитро и циано;

m , n , p и q независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;



В представляет собой

или

R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} , R_{b4} , R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)O-$, $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$;

z_1 , z_2 , z_3 , z_4 , z_5 , z_6 , z_7 , z_8 и z_9 независимо представляют собой целые числа от 0 до 10;

L_2 представляет собой C_1-C_{30} алкильную цепь или C_1-C_{30} алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или $C=O$;

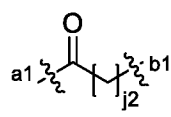
G представляет собой нацеливающий фрагмент, который связывается с клеточным рецептором;

г представляет собой целое число от 1 до 10.

В некоторых вариантах реализации определенные группы определены следующим образом, и неопределенные группы являются такими, как описано в любом из предшествующих вариантов реализации (далее именуемых «в некоторых вариантах реализации»); L_1 может представлять собой L_3 или $L_3-R_{10}-R_{11}-L_3$, где L_3 независимо представляет собой C_1-C_{12} алкильную цепь, $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$ или $-(CH_2)_{j3}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j4}-$; R_{10} и R_{11} независимо представляют собой химические связи, $-NR_{12}-$, $-C(=O)-$ или $-OC(=O)-$; R_{12} представляет собой водород или C_1-C_{12} алкил; j_1 , j_2 , j_3 и j_4 независимо представляют собой целые числа 0-10, предпочтительно 0-2 или 4-10, и более предпочтительно 0, 1, 2, 6, 7, 8, 9 или 10.

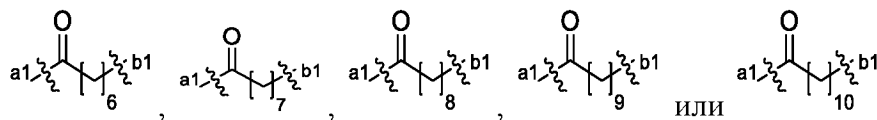
В некоторых вариантах реализации изобретения L_1 может представлять собой $-(CH_2)_{j1}-C(=O)-(CH_2)_{j2}-$, где j_1 и j_2 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_1 может представлять собой



, и j_1 и j_2 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения, при этом конец a_1 присоединен к B , а конец b_1 присоединен к R_1 .

В некоторых вариантах реализации изобретения L_1 может представлять собой



к B , а конец b_1 присоединен к R_1 .

В некоторых вариантах реализации R_1 может представлять собой химическую связь, и R_2 может представлять собой $C=O$.

В некоторых вариантах реализации R_1 может представлять собой химическую связь, и R_2 может представлять собой NR_6 , где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации R_1 может представлять собой химическую связь, и R_2 может представлять собой $-OC(=O)-$.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_1 может представлять собой NR_6 , и R_2 может представлять собой $C=O$, где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_1 может представлять собой NR_6 , и R_2 может представлять собой $-OC(=O)-$, где R_6 является таким, как определено в любом

из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_2 может представлять собой NR_6 , и R_1 может представлять собой $C=O$, где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_2 может представлять собой NR_6 , и R_1 может представлять собой $-OC(=O)-$, где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации R_6 может представлять собой водород или C_{1-6} алкил.

В некоторых вариантах реализации R_6 может представлять собой водород, метил, этил, пропил или изопропил.

В некоторых вариантах реализации R_6 может представлять собой водород.

В некоторых вариантах реализации R_7 и R_8 могут представлять собой водород.

В некоторых вариантах реализации R_9 может представлять собой водород.

В некоторых вариантах реализации, при наличии кольца А, кольцо А может представлять собой C_{6-10} арил, предпочтительно фенил.

В некоторых вариантах реализации m может быть равно 0 или 1.

В некоторых вариантах реализации m может быть равно 3.

В некоторых вариантах реализации n может быть равно 0 или 1.

В некоторых вариантах реализации p и q независимо равны 0 или 1.

В некоторых вариантах реализации p равно 1 и q равно 1.

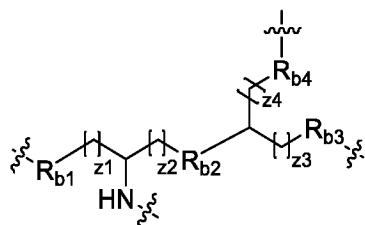
В некоторых вариантах реализации p равно 1 и q равно 0.

В некоторых вариантах реализации p равно 0 и q равно 1.

В некоторых вариантах реализации p равно 0 и q равно 0.

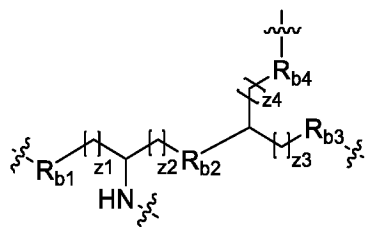
В некоторых вариантах реализации $z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$ и z_9 независимо могут представлять собой целые числа 0-4, предпочтительно 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой



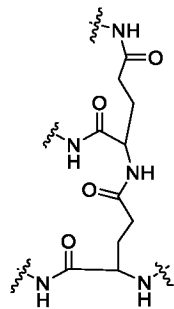
, где R_{b1}, R_{b2}, R_{b3} и R_{b4} независимо представляют собой $-C(=O)-$ или $-NHC(=O)-$; атом N присоединен к L_1 ; z_1, z_2, z_3 и z_4 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации В может представлять собой

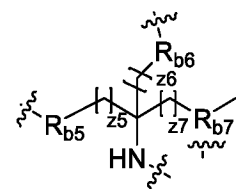
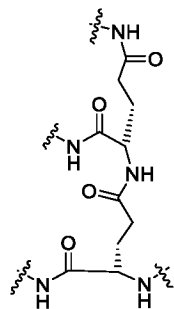


, где R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} и R_{b4} независимо представляют собой $-C(=O)-$ или $-NHC(=O)-$; атом N присоединен к L_1 ; R_{b1} , R_{b3} и R_{b4} идентичны; $z1$, $z2$, $z3$ и $z4$ являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

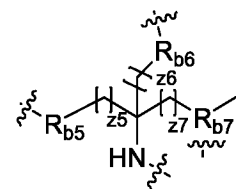
В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой



В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой

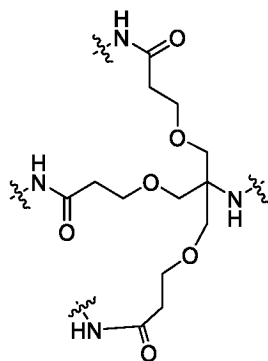


В некоторых вариантах реализации В может представлять собой , где R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N присоединен к L_1 ; $z5$, $z6$, $z7$, $z8$ и $z9$ являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.



В некоторых вариантах реализации В может представлять собой , где R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N присоединен к L_1 ; R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} являются идентичными; $z5$, $z6$, $z7$, $z8$ и $z9$ являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой



В некоторых вариантах реализации L_2 может представлять собой L_4 или $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$, где L_4 независимо представляет собой C_1-C_{12} алкильную цепь или $-(CH_2)_{j_5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_6}$; R_{13} и R_{14} независимо представляют собой химические связи, $-NR_{15}$ -, $-C(=O)-$ или $-OC(=O)-$; R_{15} независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} алкил; j_5 и j_6 независимо представляют собой целые числа 0-10, предпочтительно 0-6 и более предпочтительно 0, 1, 2, 3 или 4.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой $-(CH_2)_{j_5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_6}$, где j_5 и j_6 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой

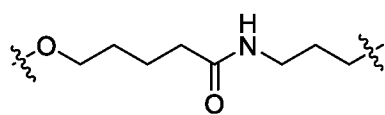
или

где атом О присоединен к G, а атом С присоединен к В; предпочтительно L_2 представляет собой

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой

где j_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения; атом О присоединен к G, а атом С присоединен к В.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой

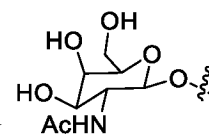


, где атом О присоединен к G, а атом С присоединен к В.

В некоторых вариантах реализации G может представлять собой фрагмент, нацеленный на рецептор асиалогликопротеина.

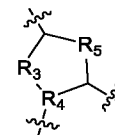
В некоторых вариантах реализации G может представлять собой галактозу,

галактозамин, N-формилгалактозамин, N-ацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-n-бутирилгалактозамин или N-изобутирилгалактозамин.



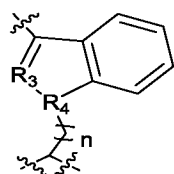
В некоторых вариантах реализации G может представлять собой

В некоторых вариантах реализации г может быть равно 3, 4, 5 или 6, например, 3.

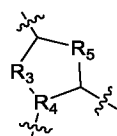


В некоторых вариантах реализации Q может представлять собой

или

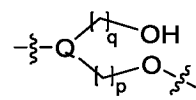


, предпочтительно



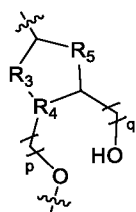
, где R₃, R₄, R₅ и n являются такими, как определено

в любом из предшествующих вариантов реализации.

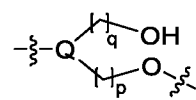


В некоторых вариантах реализации изобретения

может представлять

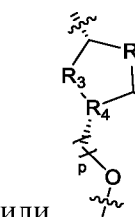
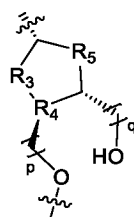
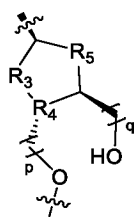
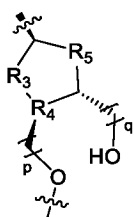


собой , где R₃, R₄, R₅, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

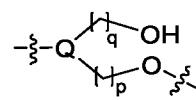


В некоторых вариантах реализации изобретения

может представлять

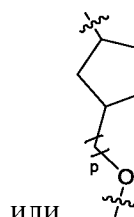
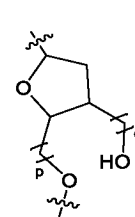
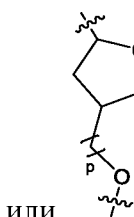
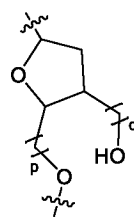
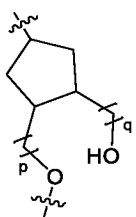


собой , или , где R₃, R₄, R₅, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

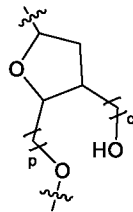


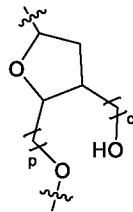
В некоторых вариантах реализации изобретения

может представлять

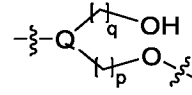


собой , или , и

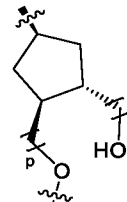
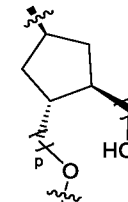
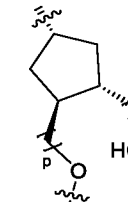
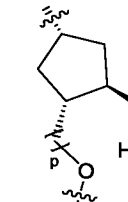
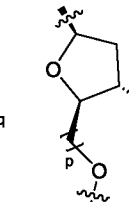
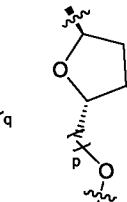
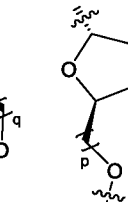
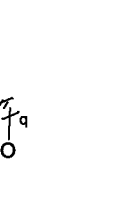


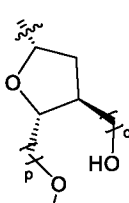
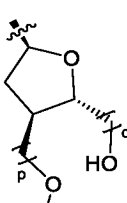
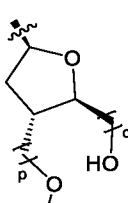
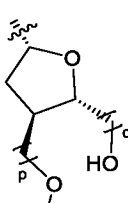
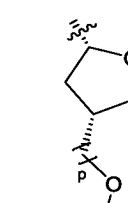
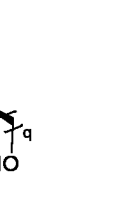

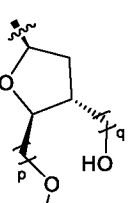
более предпочтительно , где p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

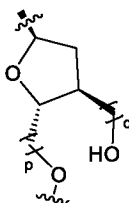
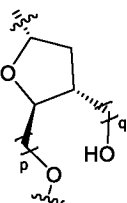
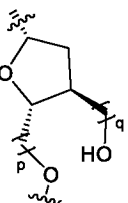
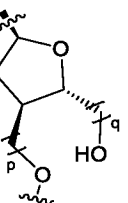
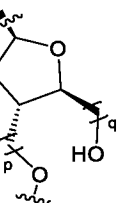
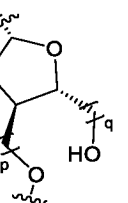
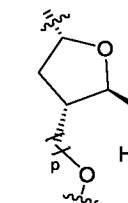
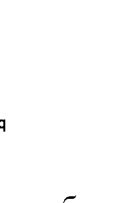
В некоторых вариантах реализации изобретения


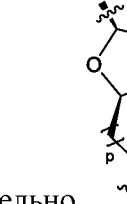
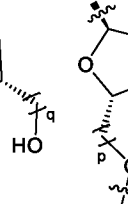
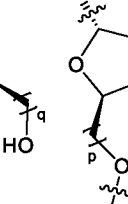
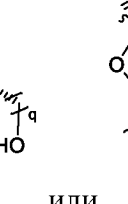
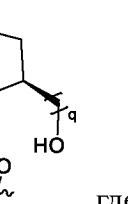





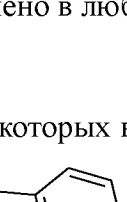
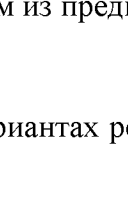
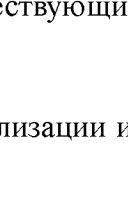
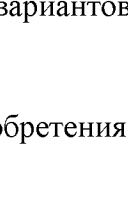
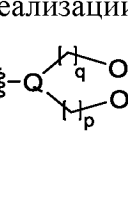
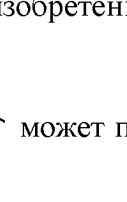

может представлять

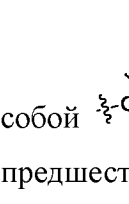
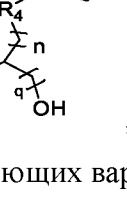
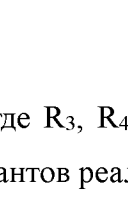
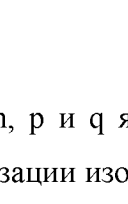
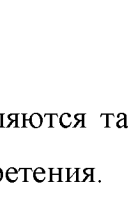
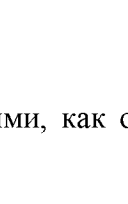
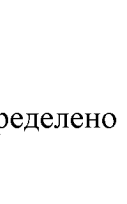
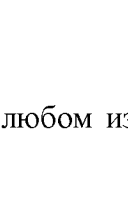
с собой , , , , , , , ,

, , , , , , , ,

или , , , , , , , ,

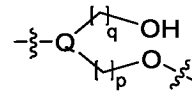
или , , , , , , , ,

предпочтительно , , , , , , , ,

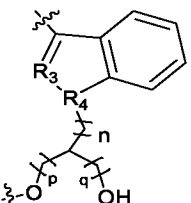
или , , , , , , , ,

где p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

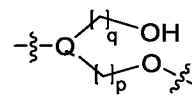
В некоторых вариантах реализации изобретения



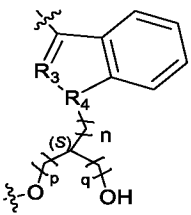
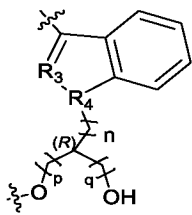
может представлять

с собой , где R_3 , R_4 , n , p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

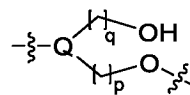
В некоторых вариантах реализации изобретения



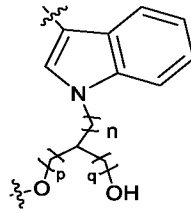
может представлять

с собой  или , где R₃, R₄, R₅, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

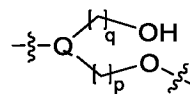
В некоторых вариантах реализации изобретения



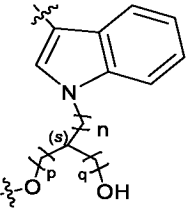
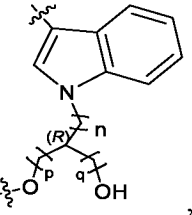
может представлять

с собой , где n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

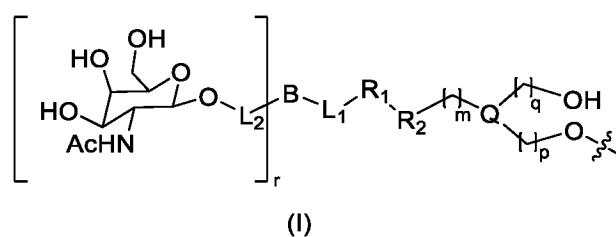
В некоторых вариантах реализации изобретения



может представлять

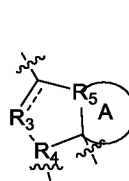
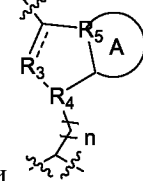
с собой  или , где n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В настоящем изобретении предложен лиганд, имеющий структуру, представленную формулой (I),



где L₁ представляет собой C₁-C₃₀ алкильную цепь или C₁-C₃₀ алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или C=O;

R₁ и R₂ независимо представляют собой химические связи, -NR₆-, -C(=O)- или -OC(=O)-;

Q представляет собой  или  ;

--- представляет собой одинарную или двойную связь; когда --- представляет собой одинарную связь, R_3 независимо представляет собой CR_7R_8 , NR_6 , O или S; когда --- представляет собой двойную связь, R_3 независимо представляет собой CR_9 или N;

R_4 независимо представляет собой CR_9 или N;

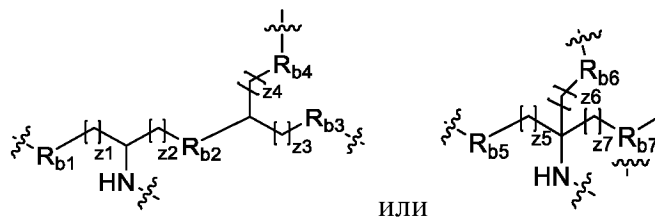
кольцо A отсутствует или представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; когда кольцо A присутствует, R_5 независимо представляет собой CR_9 или N; когда кольцо A отсутствует, R_5 независимо представляет собой CR_7R_8 , NR_6 или O;

R_6 и R_9 независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ или $C(=O)NR'(R'')$, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо-, нитро-, циано-, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{3-7} циклоалкила, 3-12-членного гетероциклила, 5-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ и $C(=O)NR'(R'')$;

R_7 и R_8 независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ или $C(=O)NR'(R'')$, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо-, нитро-, циано-, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{3-7} циклоалкила, 3-12-членного гетероциклила, 5-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ и $C(=O)NR'(R'')$;

R' и R'' независимо представляют собой водород, дейтерий, гидроксигруппу, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо-, нитро- и циано-

m , n , p и q независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;



В представляет собой

или

R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} , R_{b4} , R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-$, $-NHC(=O)-$,

$-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{z8}-\text{O}-$ или $-\text{NHC}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{z9}-\text{O}-$;

$z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$ и z_9 независимо представляют собой целые числа от 0 до 10;

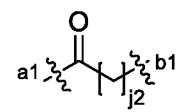
L_2 представляет собой C_1-C_{30} алкильную цепь или C_1-C_{30} алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или $\text{C}=\text{O}$;

r представляет собой целое число от 1 до 10.

В некоторых вариантах реализации L_1 может представлять собой L_3 или $L_3-\text{R}_{10}-\text{R}_{11}-L_3$, где L_3 независимо представляет собой C_1-C_{12} алкильную цепь, $-(\text{CH}_2)_{j1}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{j2}-$ или $-(\text{CH}_2)_{j3}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-4}-(\text{CH}_2)_{j4}-$; R_{10} и R_{11} независимо представляют собой химические связи, $-\text{NR}_{12}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{OC}(=\text{O})-$; R_{12} представляет собой водород или C_1-C_{12} алкил; j_1, j_2, j_3 и j_4 независимо представляют собой целые числа 0-10, предпочтительно 0-2 или 4-10 и более предпочтительно 0, 1, 2, 6, 7, 8, 9 или 10.

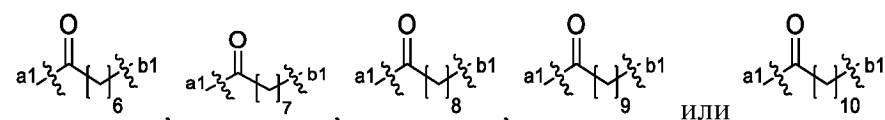
В некоторых вариантах реализации изобретения L_1 может представлять собой $-(\text{CH}_2)_{j1}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{j2}-$, где j_1 и j_2 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_1 может представлять собой



, и j_1 и j_2 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения, при этом конец a_1 присоединен к B , а конец b_1 присоединен к R_1 .

В некоторых вариантах реализации изобретения L_1 может представлять собой



к B , а конец b_1 присоединен к R_1 .

В некоторых вариантах реализации R_1 может представлять собой химическую связь, и R_2 может представлять собой $\text{C}=\text{O}$.

В некоторых вариантах реализации R_1 может представлять собой химическую связь, и R_2 может представлять собой NR_6 , где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации R_1 может представлять собой химическую связь, и R_2 может представлять собой $-\text{OC}(=\text{O})-$.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_1 может представлять собой NR_6 , и R_2 может представлять собой $\text{C}=\text{O}$, где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_1 может представлять собой NR_6 , и R_2 может представлять собой $-OC(=O)-$, где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_2 может представлять собой NR_6 , и R_1 может представлять собой $C=O$, где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения R_2 может представлять собой NR_6 , и R_1 может представлять собой $-OC(=O)-$, где R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации R_6 может представлять собой водород или C_{1-6} алкил.

В некоторых вариантах реализации R_6 может представлять собой водород, метил, этил, пропилен или изопропил.

В некоторых вариантах реализации R_6 может представлять собой водород.

В некоторых вариантах реализации R_7 и R_8 могут представлять собой водород.

В некоторых вариантах реализации R_9 может представлять собой водород.

В некоторых вариантах реализации, при наличии кольца А, кольцо А может представлять собой C_{6-10} арил, предпочтительно фенил.

В некоторых вариантах реализации m может быть равно 0 или 1.

В некоторых вариантах реализации m может быть равно 3.

В некоторых вариантах реализации n может быть равно 0 или 1.

В некоторых вариантах реализации p и q независимо равны 0 или 1.

В некоторых вариантах реализации p равно 1 и q равно 1.

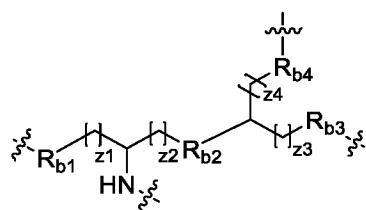
В некоторых вариантах реализации p равно 1 и q равно 0.

В некоторых вариантах реализации p равно 0 и q равно 1.

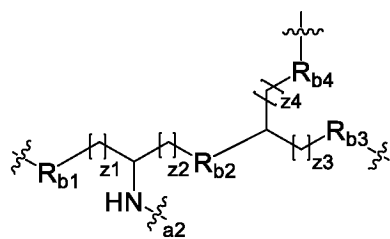
В некоторых вариантах реализации p равно 0 и q равно 0.

В некоторых вариантах реализации $z_1, z_2, z_3, z_4, z_5, z_6, z_7, z_8$ и z_9 независимо могут представлять собой целые числа 0-4, предпочтительно 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой

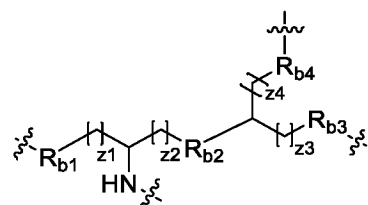


, где R_{b1}, R_{b2}, R_{b3} и R_{b4} независимо представляют собой $-C(=O)-$ или $-NHC(=O)-$; атом N присоединен к L_1 ; z_1, z_2, z_3 и z_4 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения (например

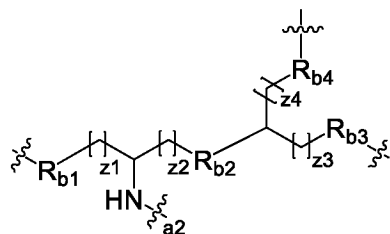


, где атом N на конце a2 присоединен к L₁).

В некоторых вариантах реализации В может представлять собой

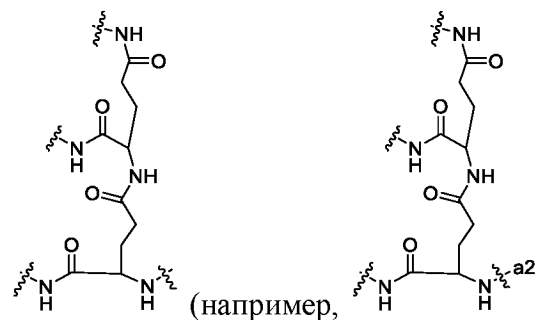


, где R_{b1}, R_{b2}, R_{b3} и R_{b4} независимо представляют собой -C(=O)- или -NHC(=O)-; атом N присоединен к L₁; R_{b1}, R_{b3} и R_{b4} идентичны; z₁, z₂, z₃ и z₄ являются такими, как определено в любом из предыдущих вариантов реализации (например



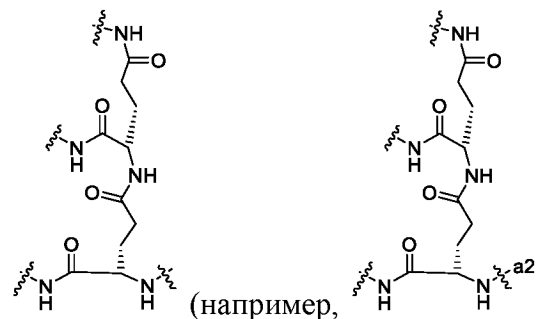
, где атом N на конце a2 присоединен к L₁).

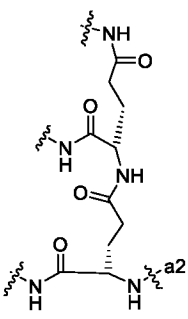
В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой



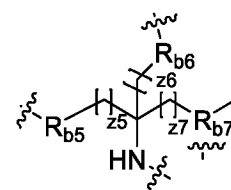
(например, , где атом N на конце a2 присоединен к L₁).

В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой

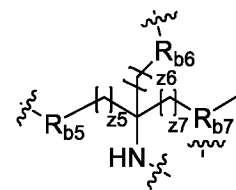


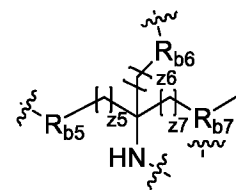
(например, , где атом N на конце a2 присоединен к L₁).

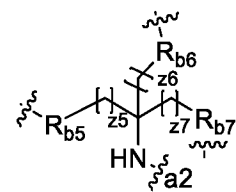
В некоторых вариантах реализации В может представлять собой

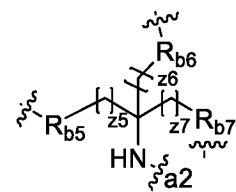


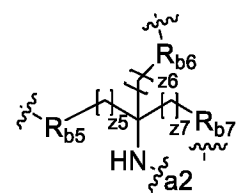
где R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N присоединен к L_1 ; z_5 , z_6 , z_7 , z_8 и z_9 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

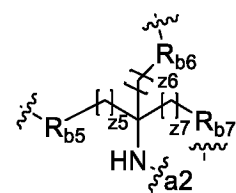


В некоторых вариантах реализации В может представлять собой , где R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N присоединен к L_1 ; R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} являются идентичными; z_5 , z_6 , z_7 , z_8 и z_9 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

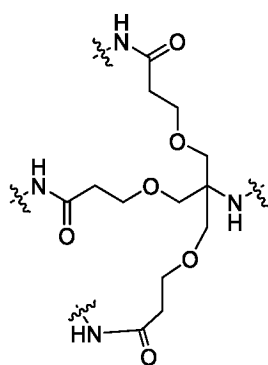


В некоторых вариантах реализации В может представлять собой , где R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N на конце a_2 присоединен к L_1 ; z_5 , z_6 , z_7 , z_8 и z_9 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

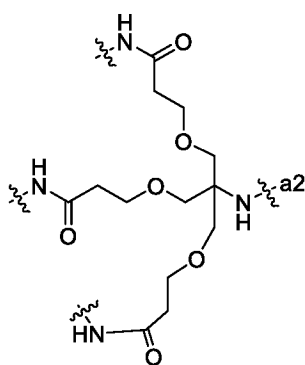


В некоторых вариантах реализации В может представлять собой , где R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ или $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$; атом N на конце a_2 присоединен к L_1 ; R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} являются идентичными; z_5 , z_6 , z_7 , z_8 и z_9 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации изобретения В может представлять собой



(например,



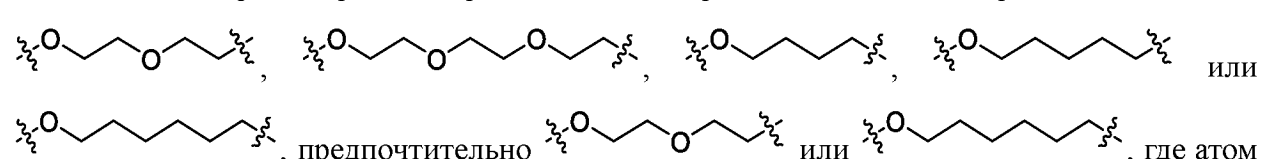
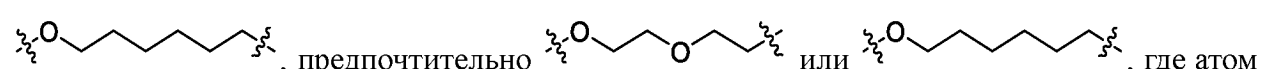
, где атом N на конце a_2 присоединен

к L_1).

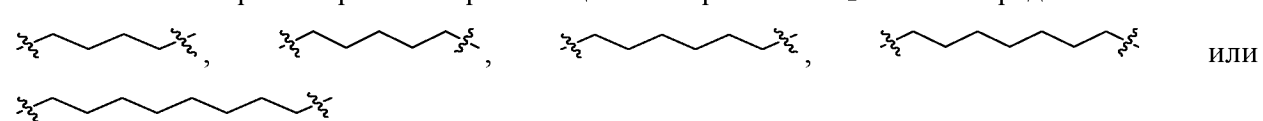
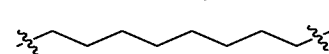
В некоторых вариантах реализации L_2 может представлять собой L_4 или $L_4-R_{13}-R_{14}$ -

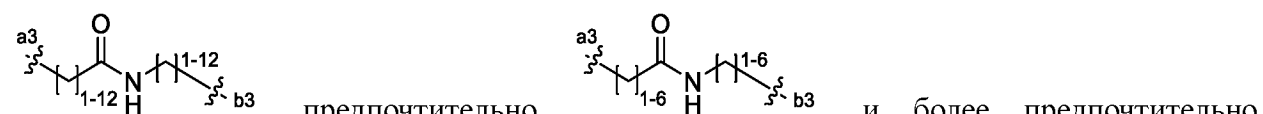

L_4 , где L_4 независимо представляет собой C_1 - C_{12} алкильную цепь или $-(CH_2)_{j_5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_6}-$; R_{13} и R_{14} независимо представляют собой химические связи, $-NR_{15}-$, $-C(=O)-$ или $-OC(=O)-$; R_{15} независимо представляет собой водород или C_1 - C_{12} алкил, j_5 и j_6 независимо представляют собой целые числа 0-10, предпочтительно 0-6 и более предпочтительно 0, 1, 2, 3 или 4.

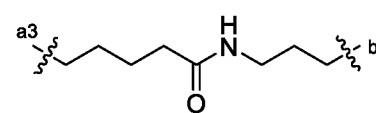
В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой $-(CH_2)_{j_5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_6}-$, где j_5 и j_6 являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой  или , где атом О присоединен к G, а атом С присоединен к В.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой C_1 - C_{12} алкильную цепь.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой  или .

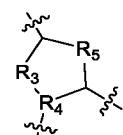
В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой , предпочтительно , где конец a_3 присоединен к О, а конец b_3 присоединен к В.

В некоторых вариантах реализации изобретения L_2 может представлять собой , где конец a_3 присоединен к О, а конец b_3 присоединен к В.

В некоторых вариантах реализации L_2 может представлять собой .

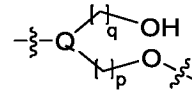
В некоторых вариантах реализации g может составлять 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения Q может представлять собой

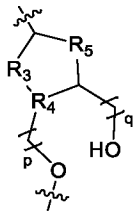
, где R_3 , R_4 и R_5 являются такими, как определено в любом из предшествующих

вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения

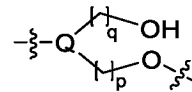


может представлять

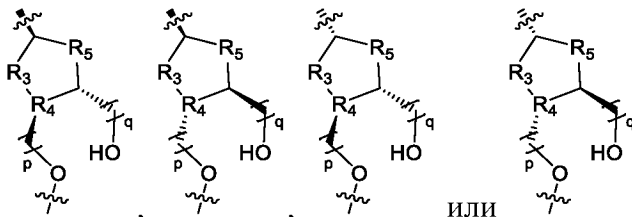


собой , где R₃, R₄, R₅, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения

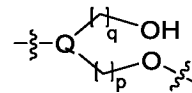


может представлять

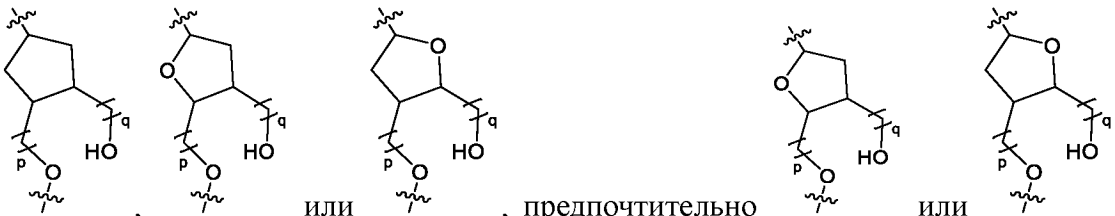


собой , или , где R₃, R₄, R₅, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

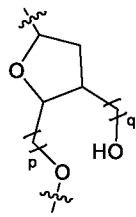
В некоторых вариантах реализации изобретения



может представлять

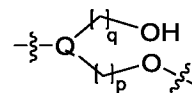


собой , или , предпочтительно или , и

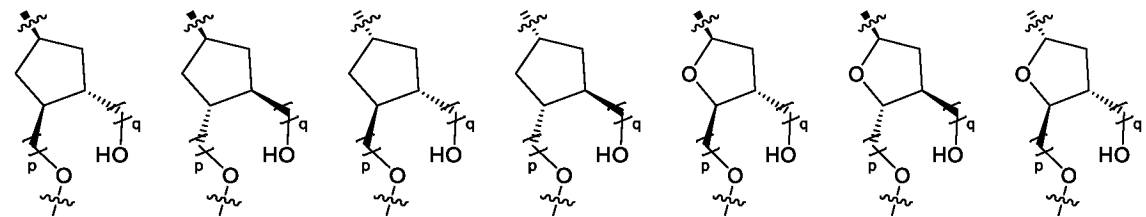


более предпочтительно , где p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

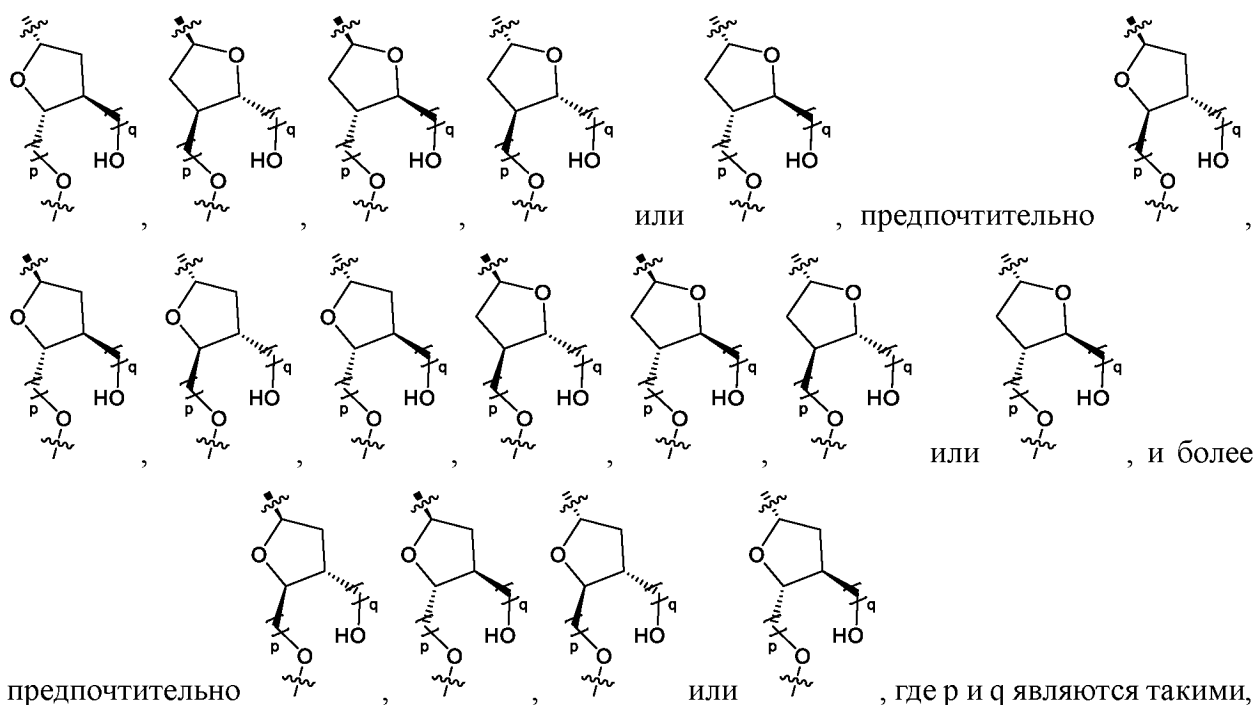
В некоторых вариантах реализации изобретения



может представлять



собой , , , , , , ,

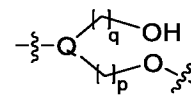


как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации $-R_1-R_2-$ может представлять собой $-C(=O)-NR_6-$, где атом С предпочтительно присоединен к L_1 , и R_6 является таким, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации m может быть равно 1.

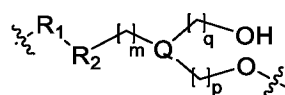
В некоторых вариантах реализации m может быть равно 1;



может

представлять собой , предпочтительно ; р и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации.

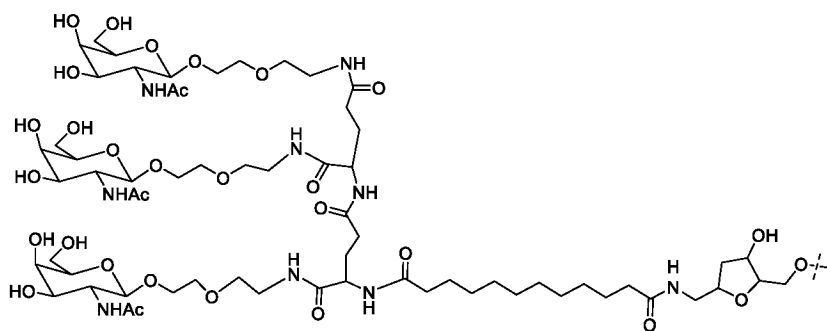
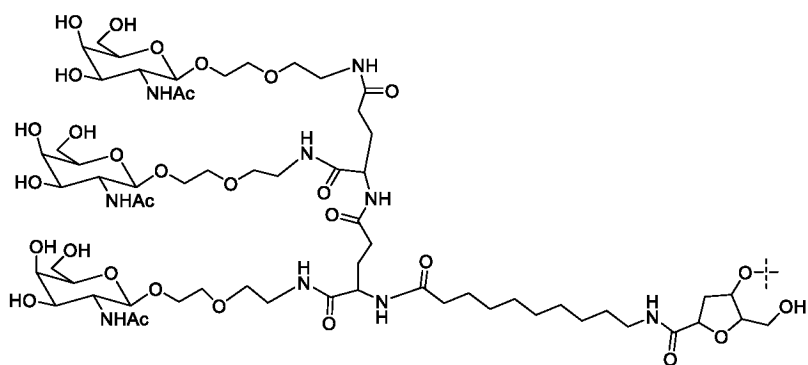
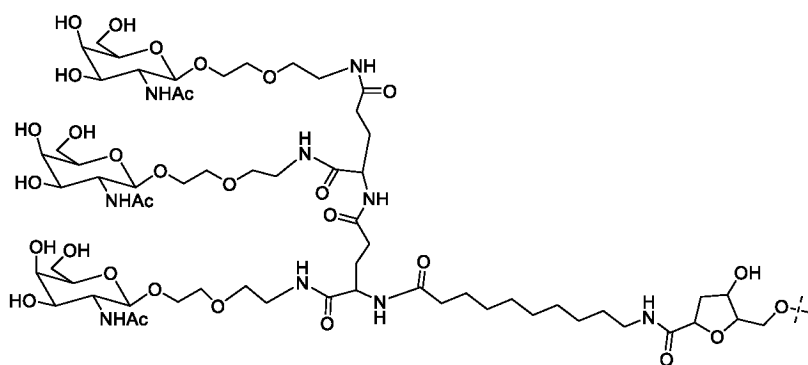
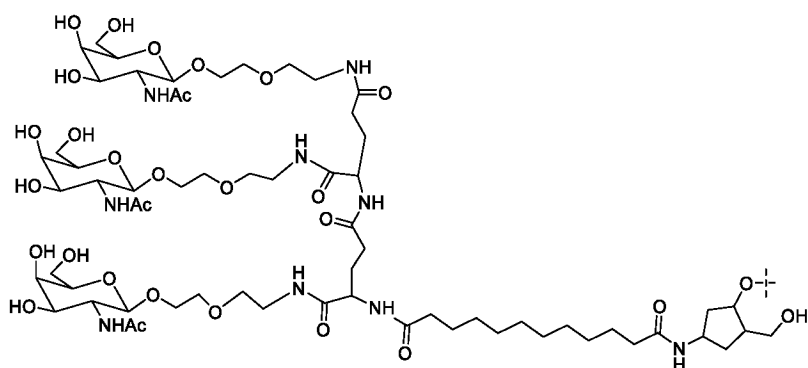
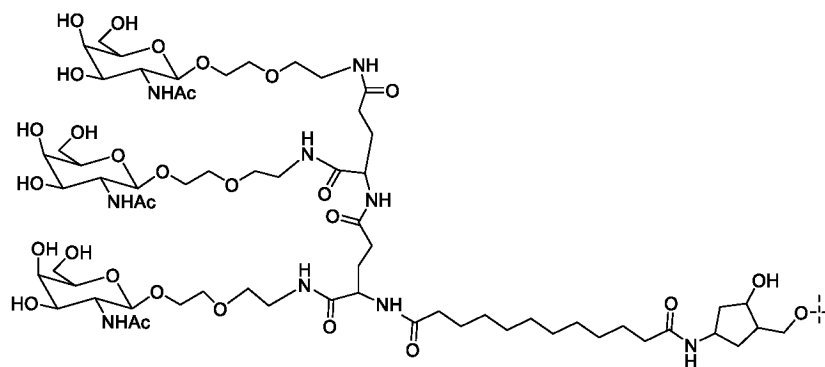
В некоторых вариантах реализации

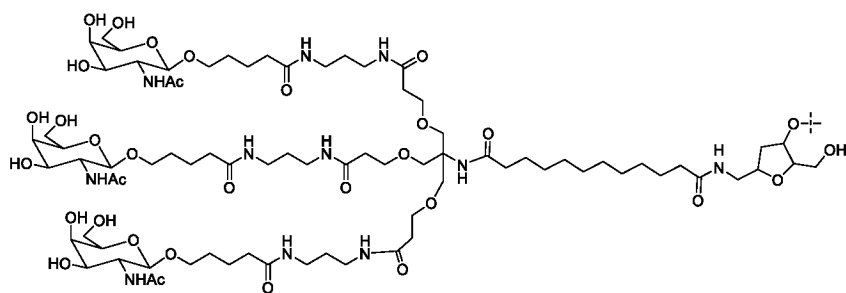
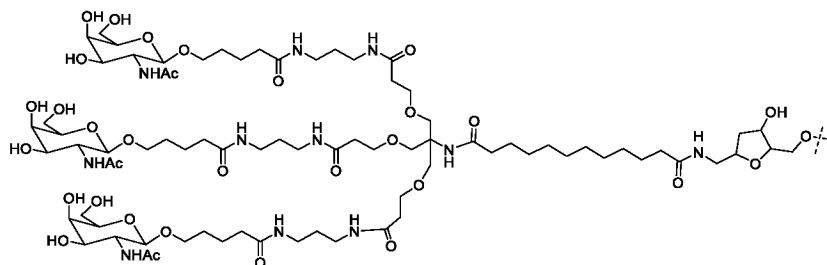
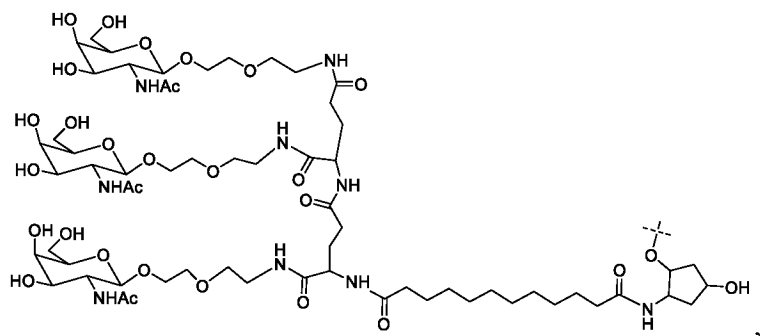
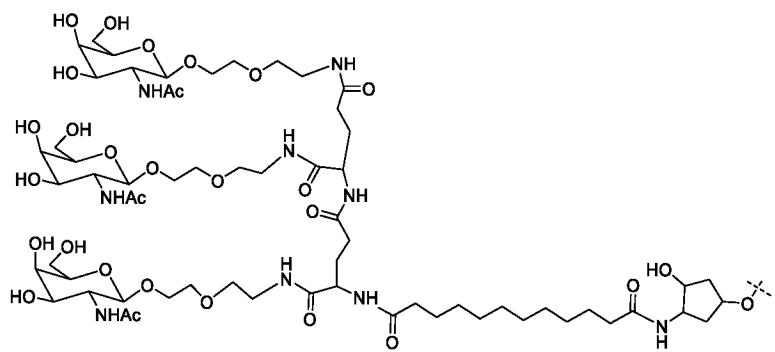
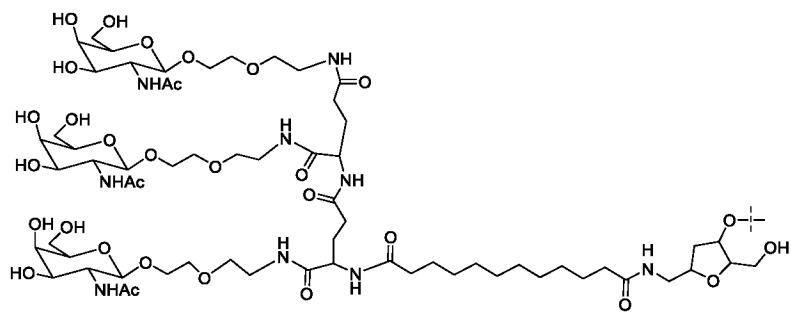


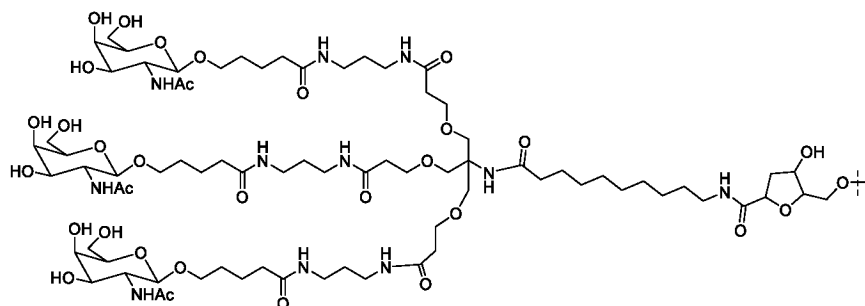
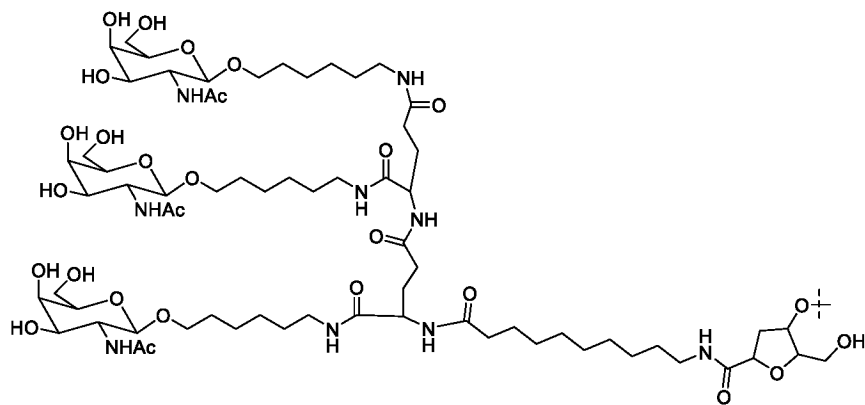
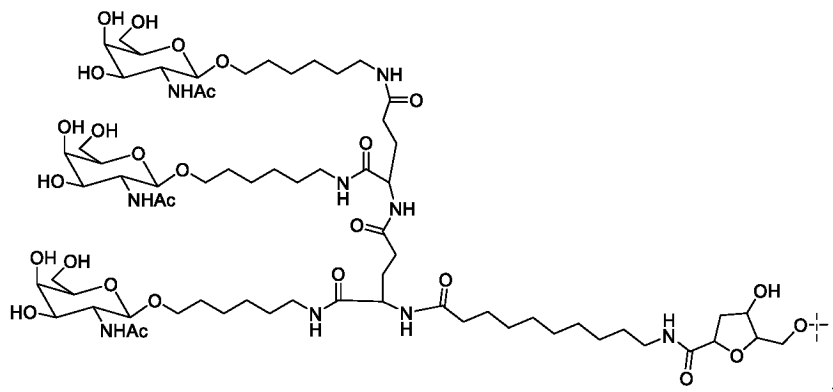
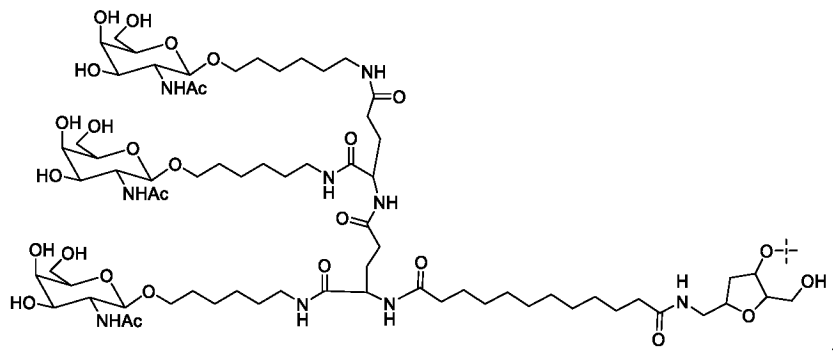
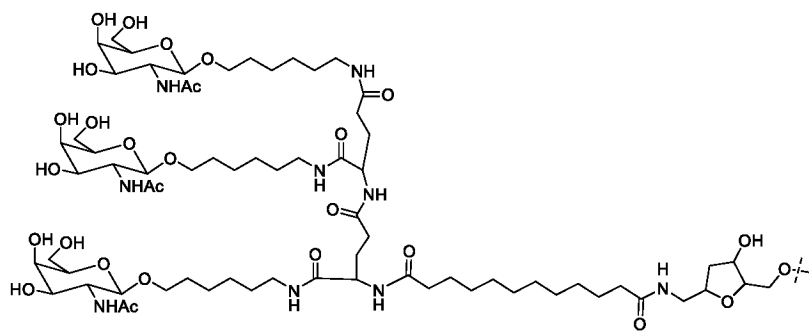
может представлять собой



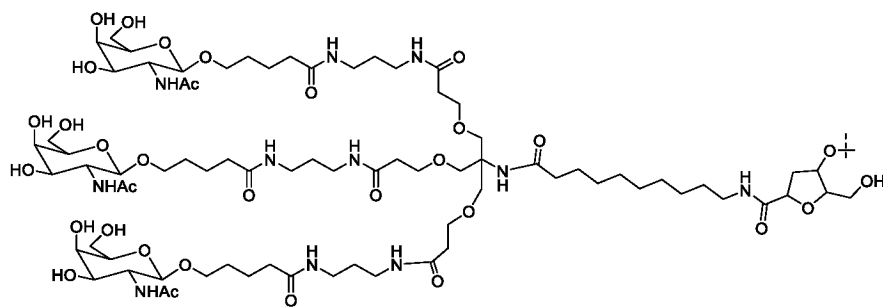
В некоторых вариантах реализации лиганд может представлять собой любую из следующих структур:



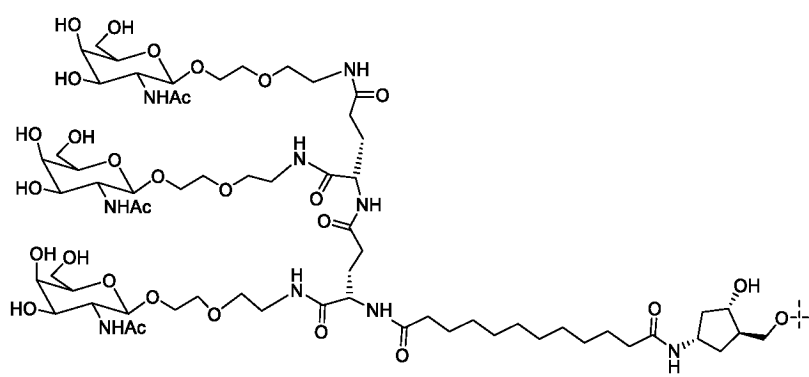
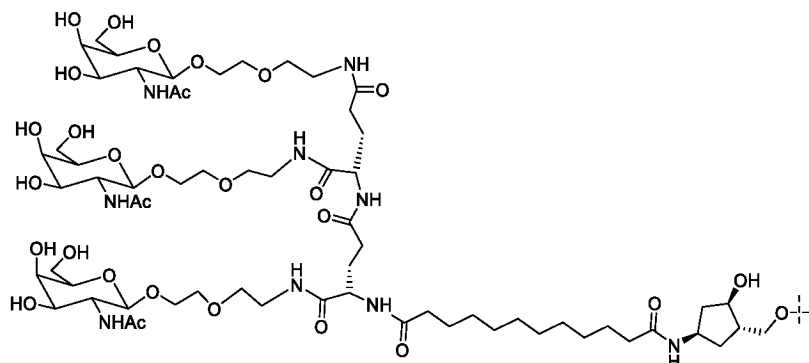
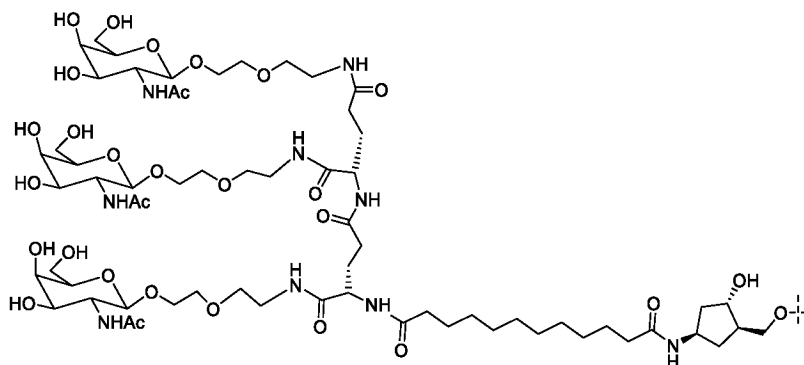


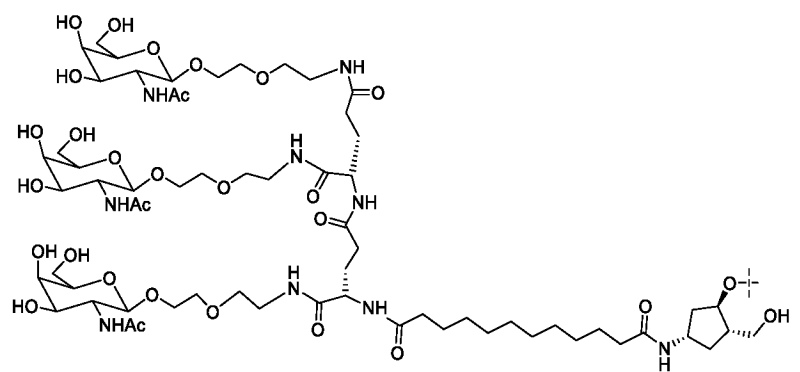
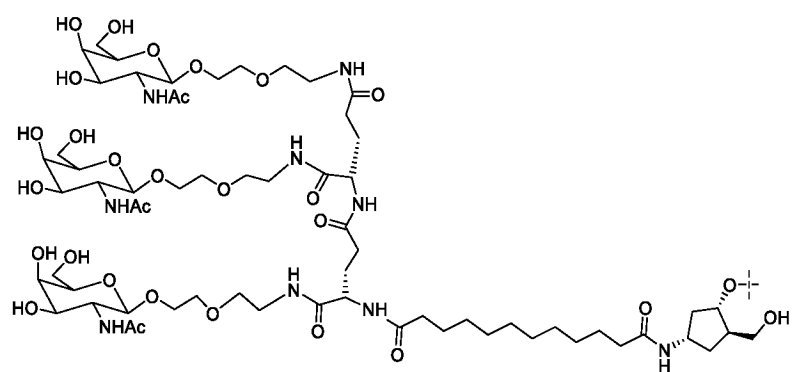
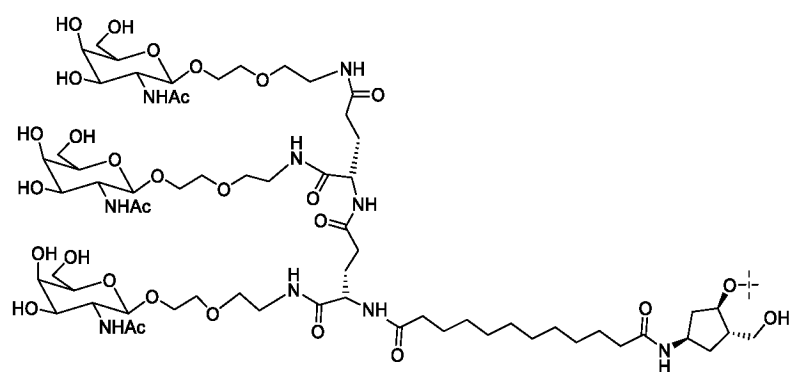
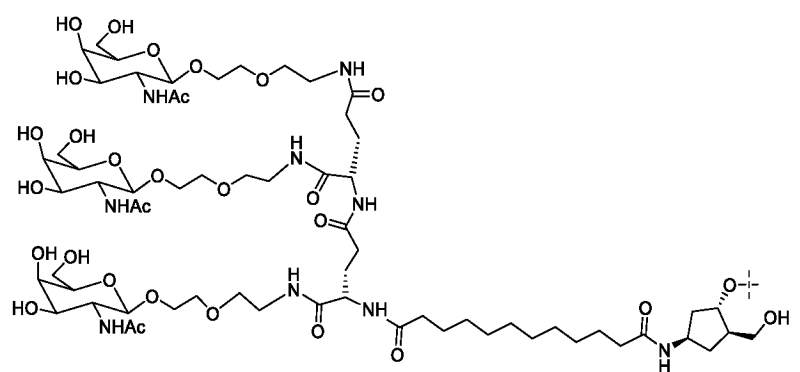
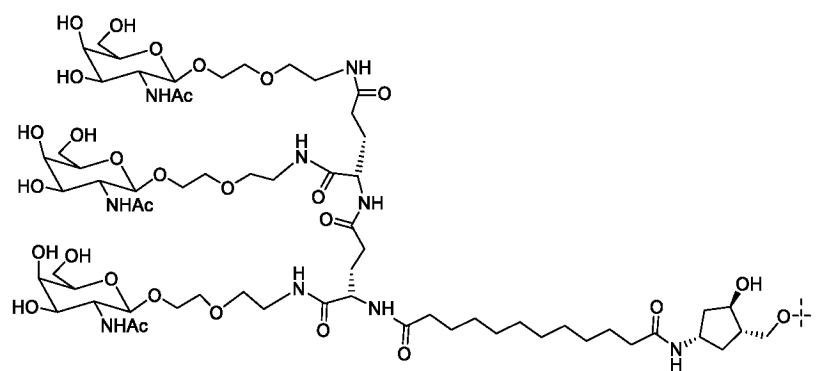


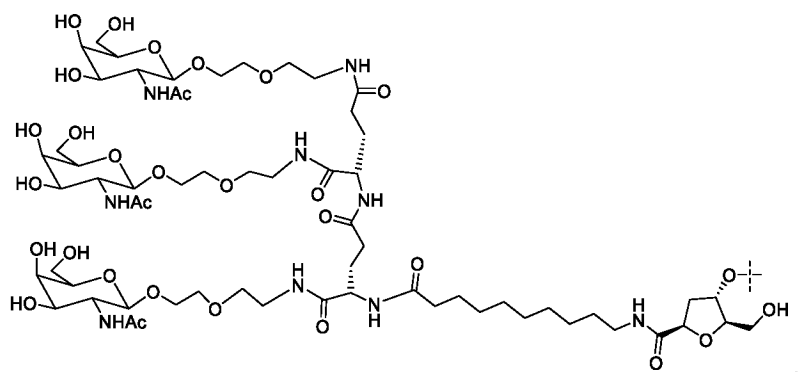
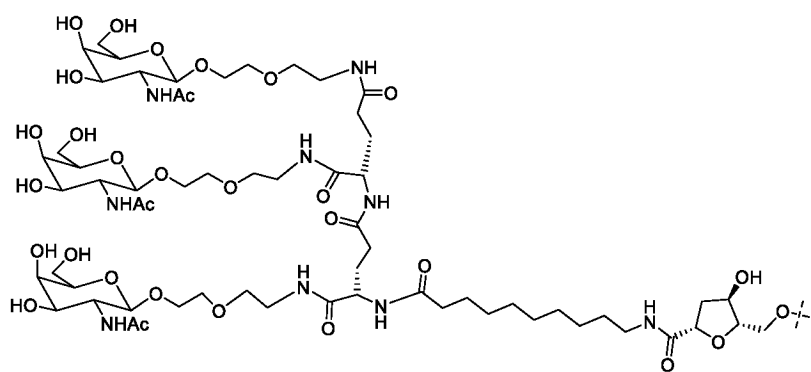
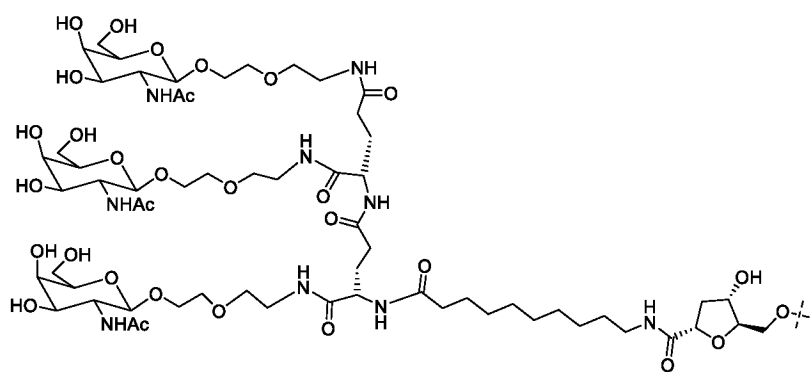
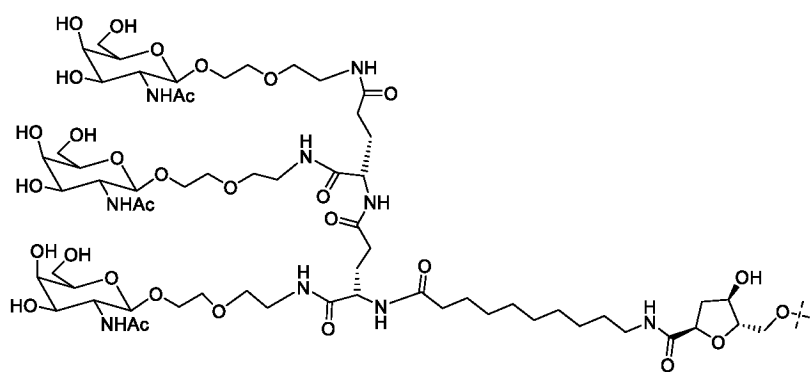
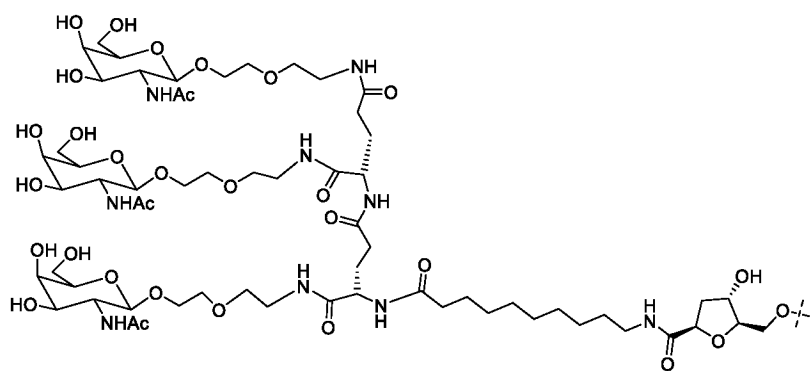
ИЛИ

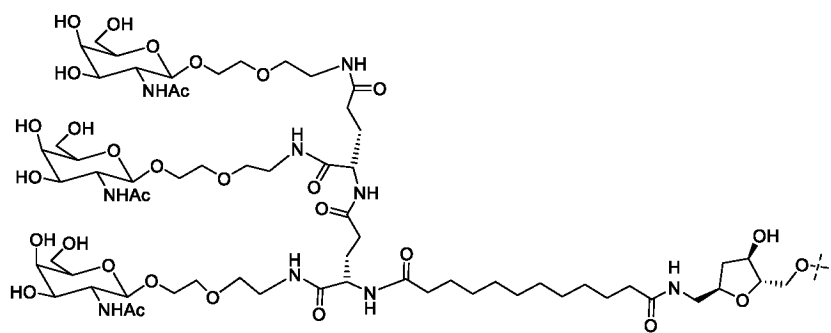
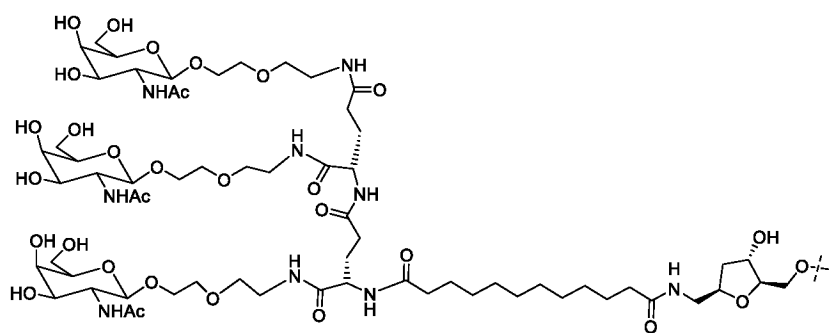
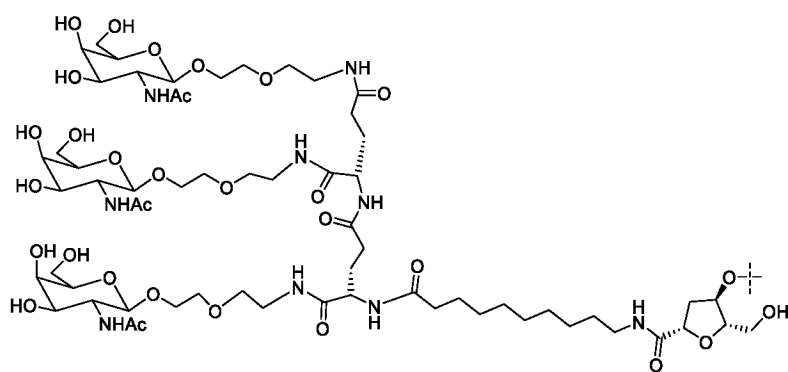
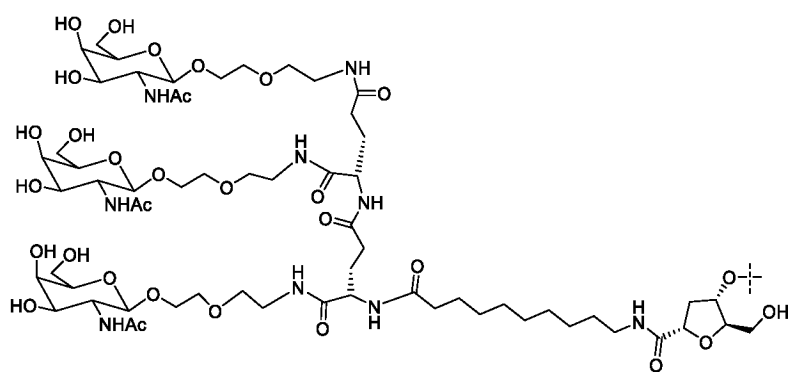
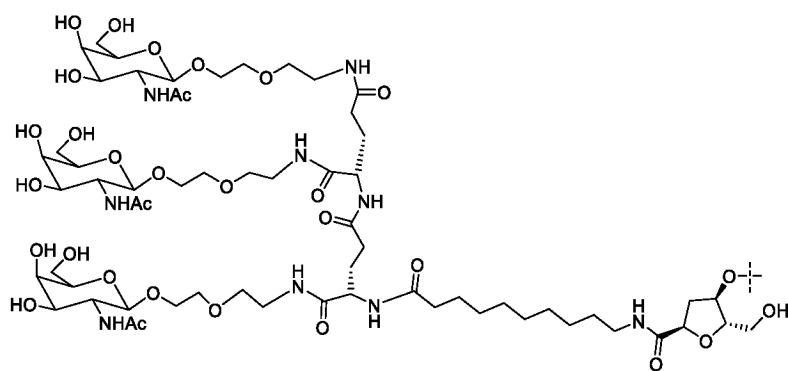


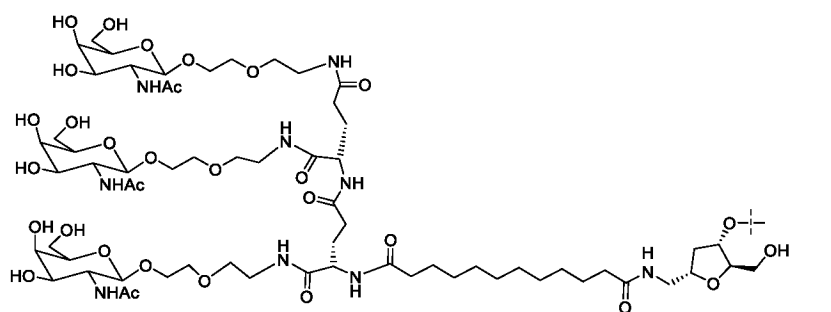
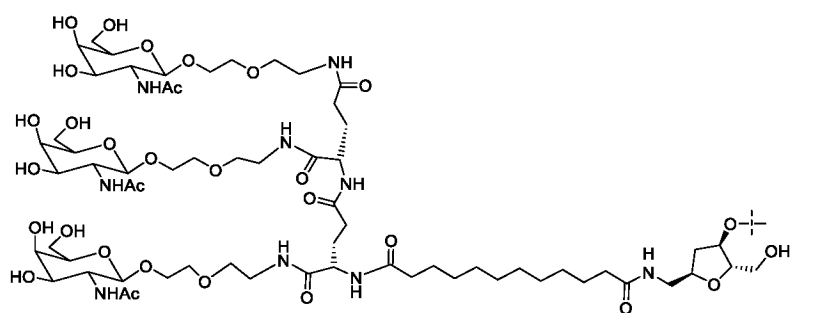
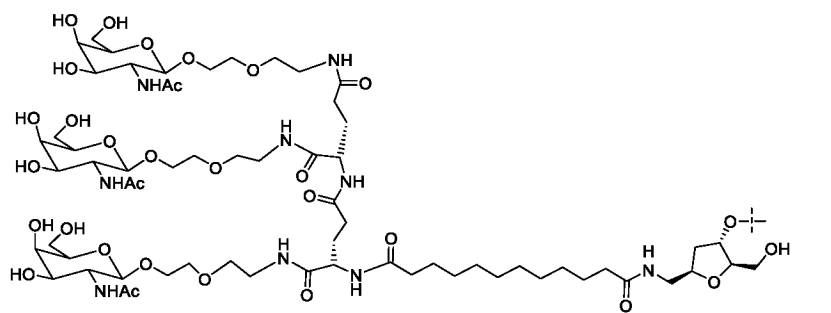
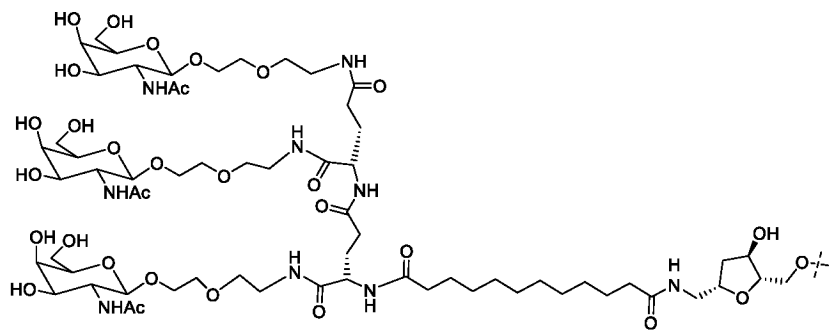
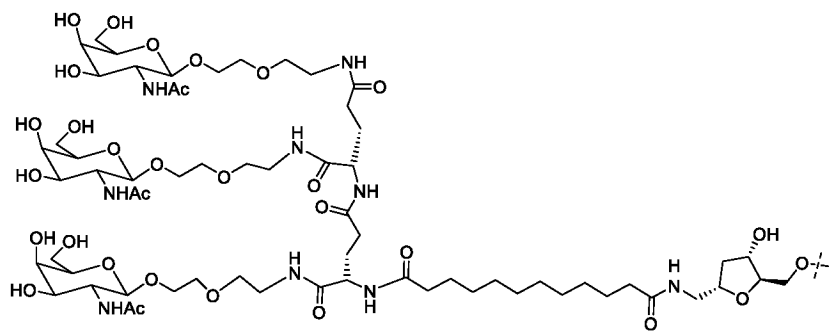
В некоторых вариантах реализации лиганд может представлять собой любую из следующих структур:

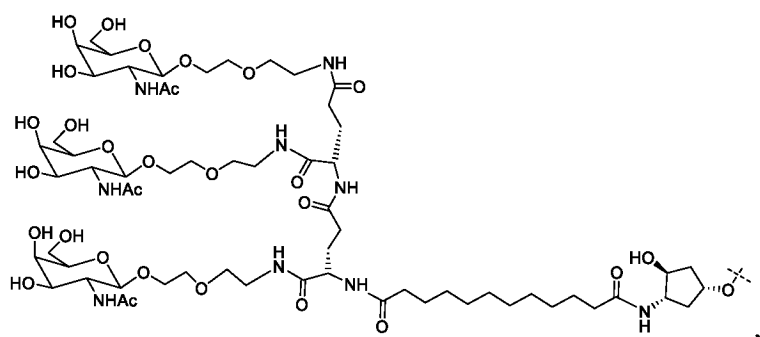
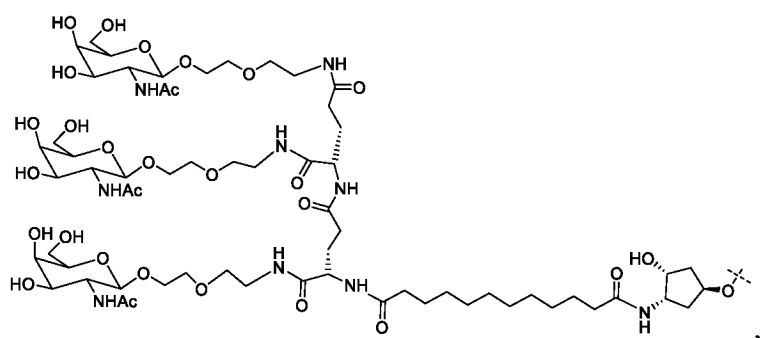
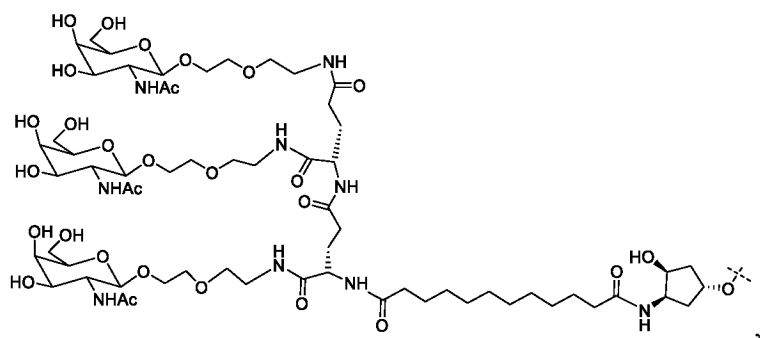
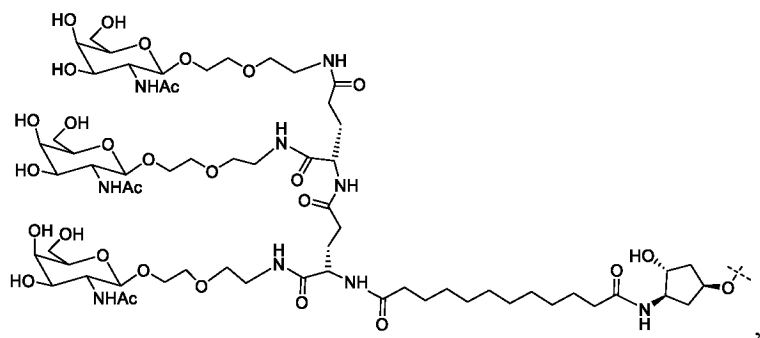
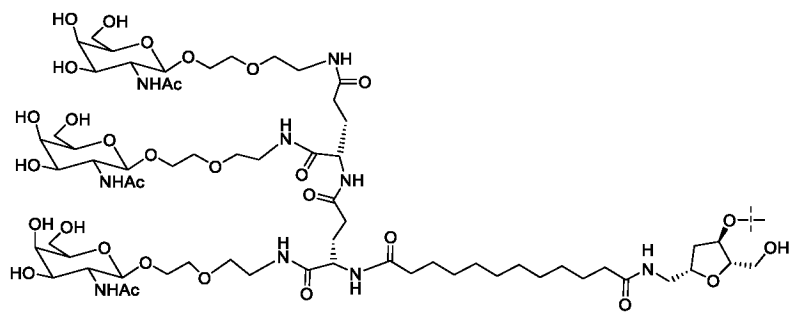


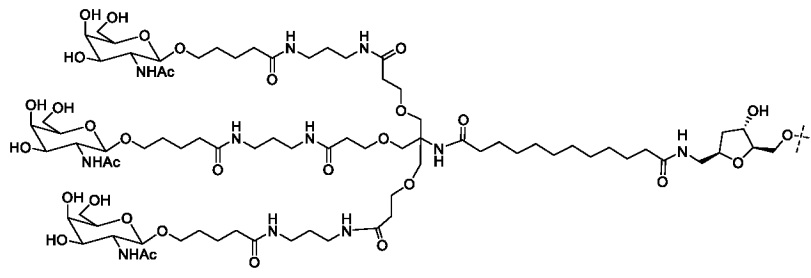
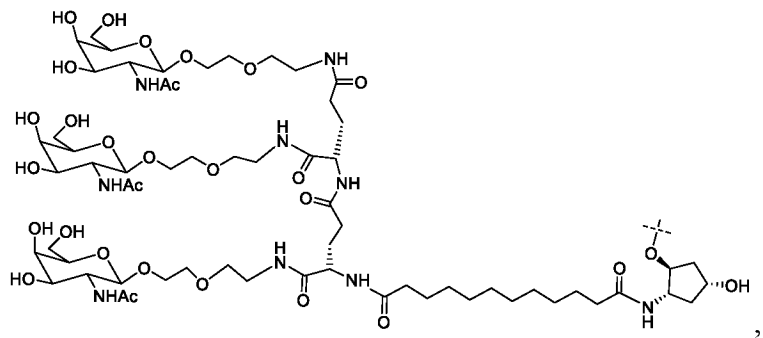
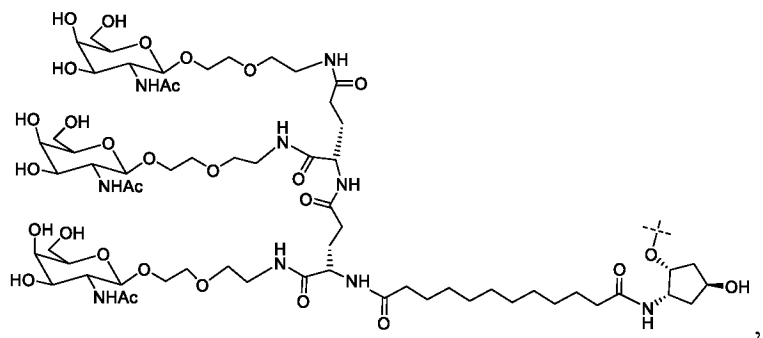
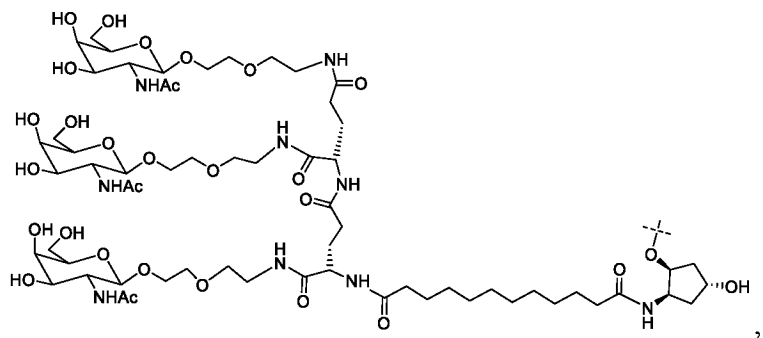
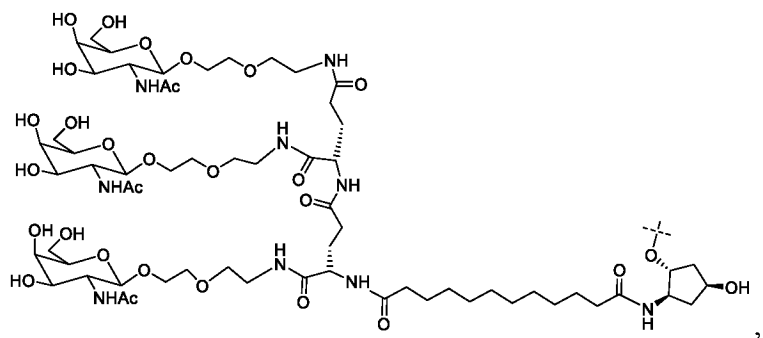


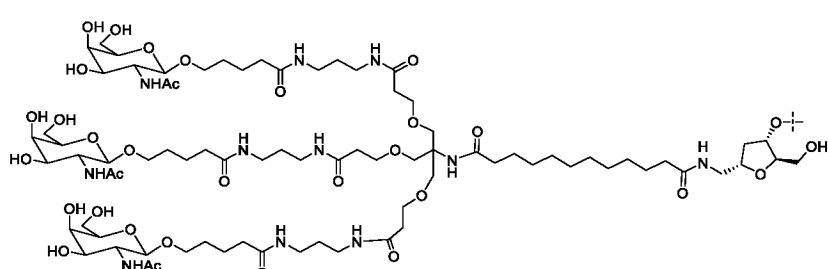
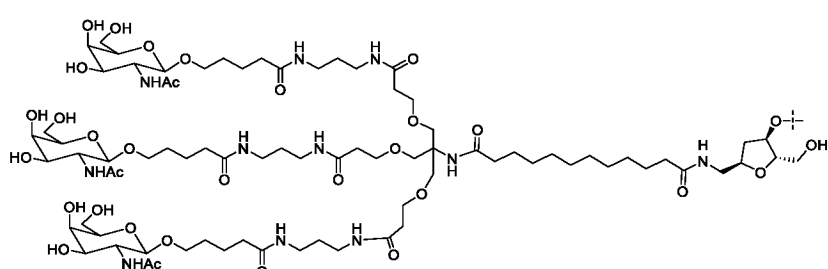
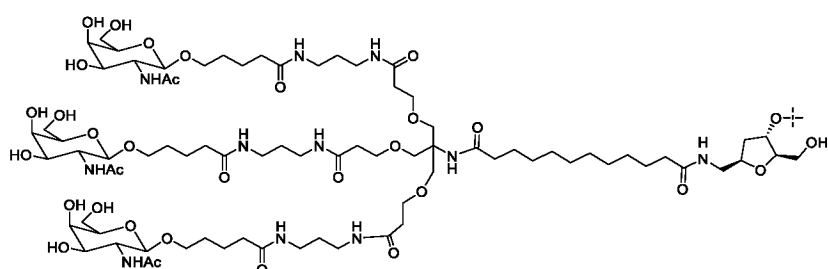
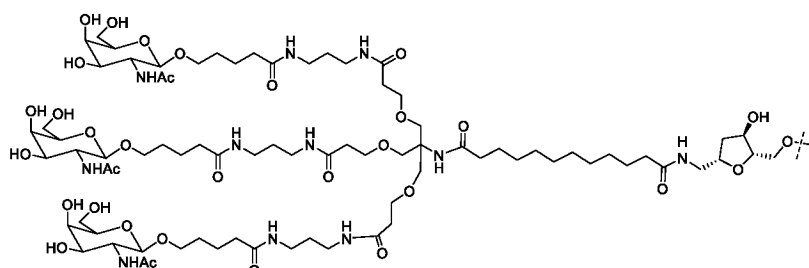
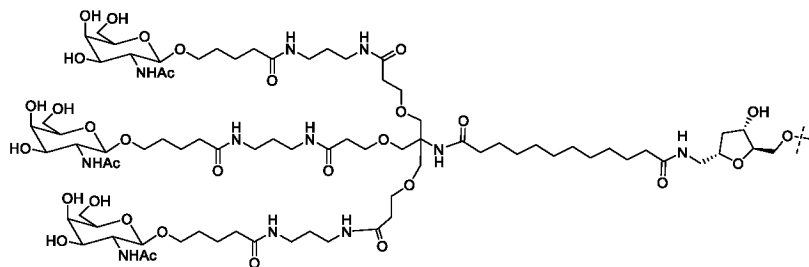
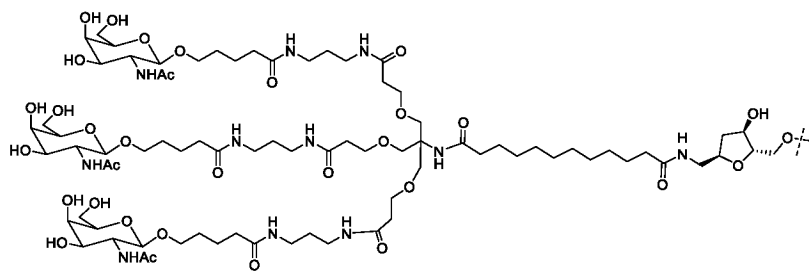


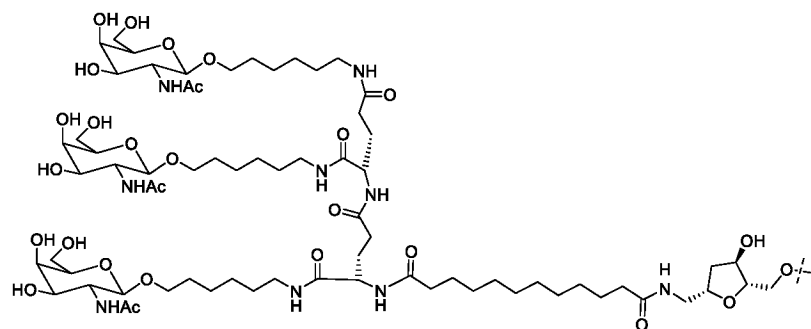
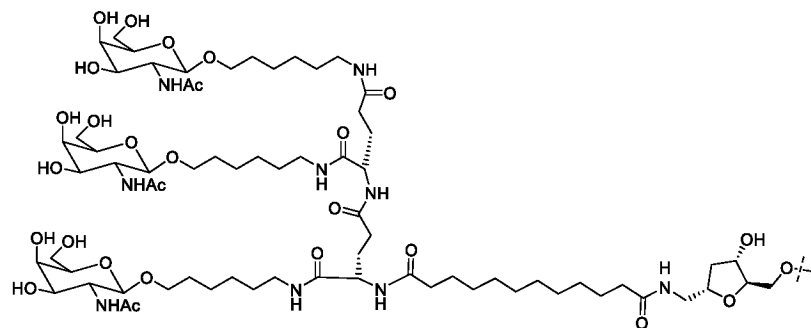
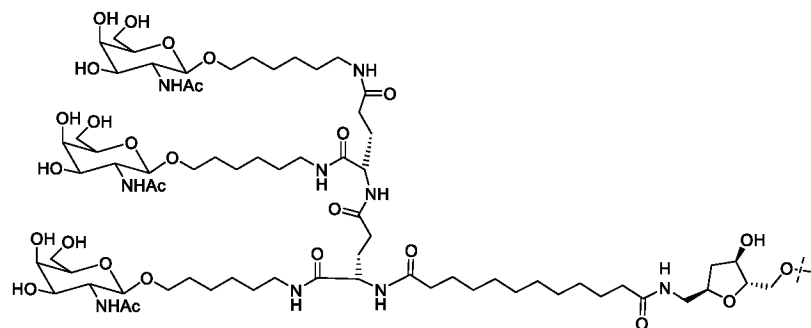
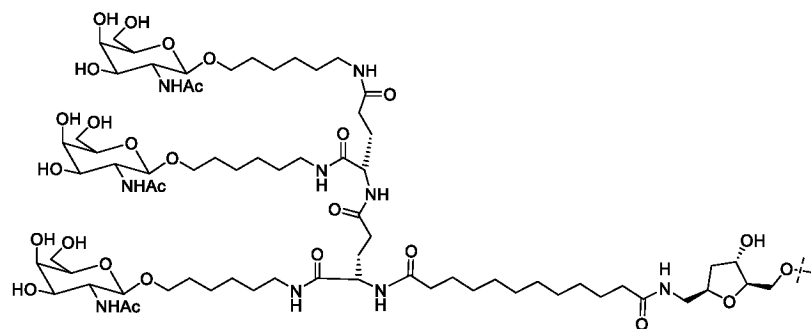
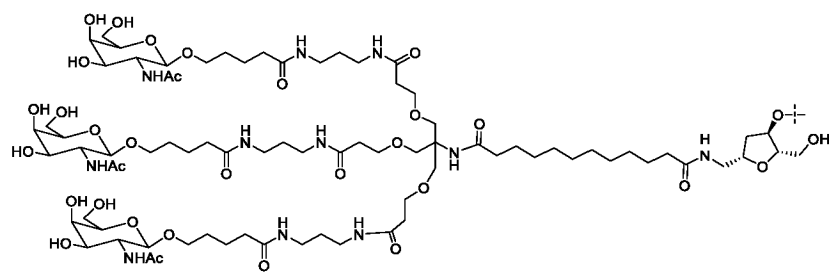


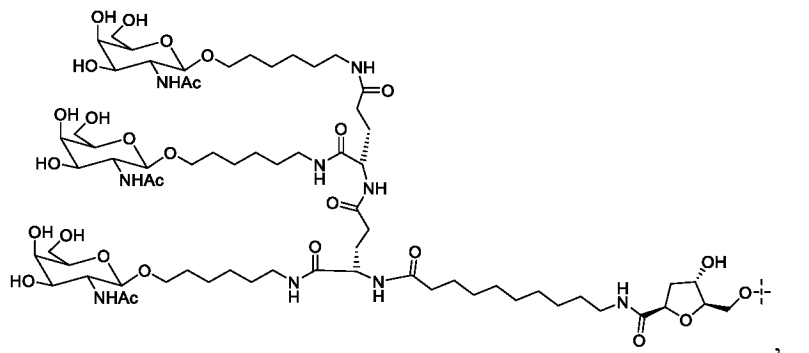
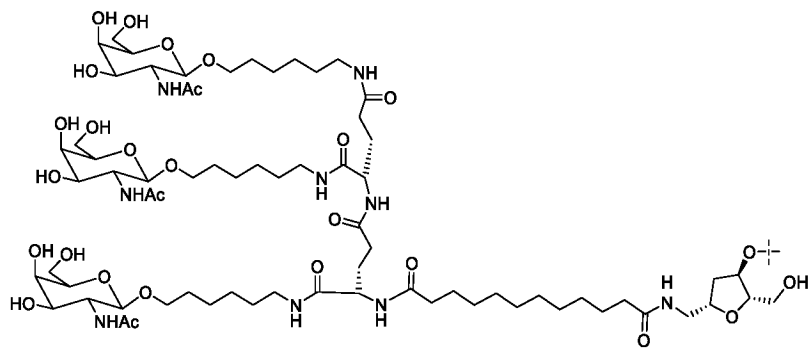
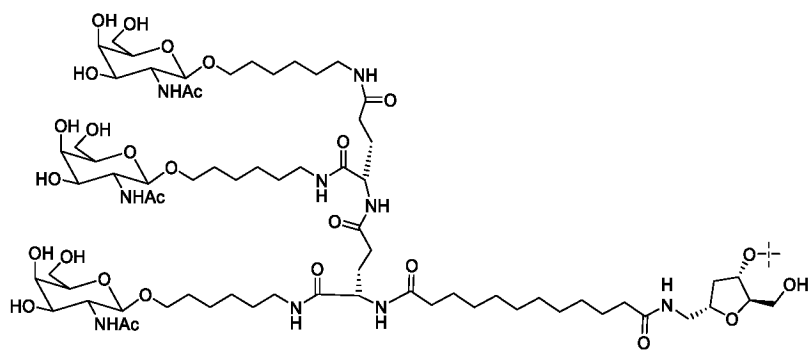
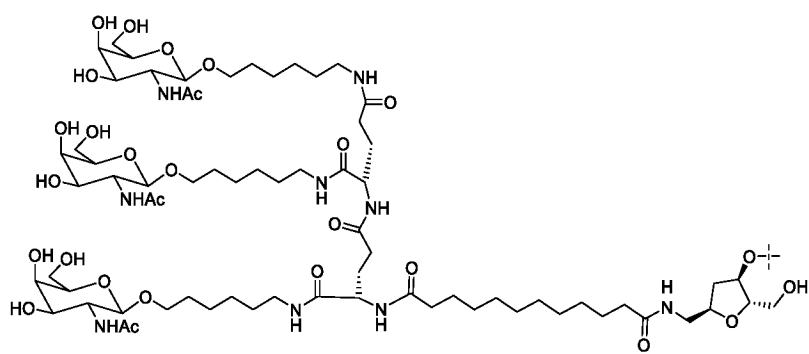
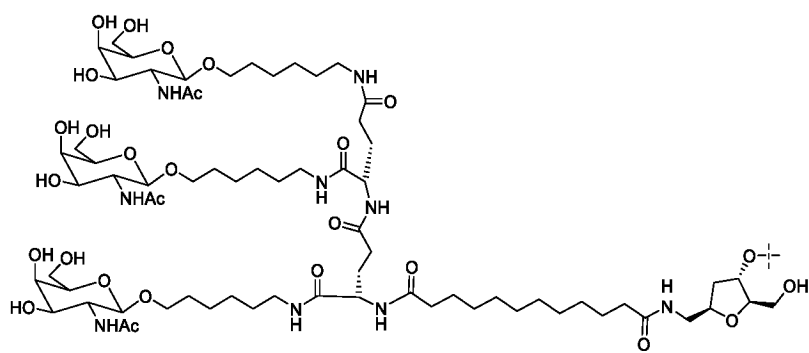


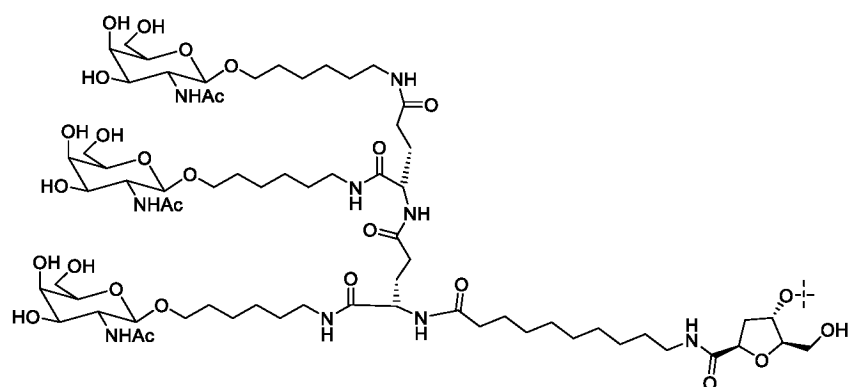
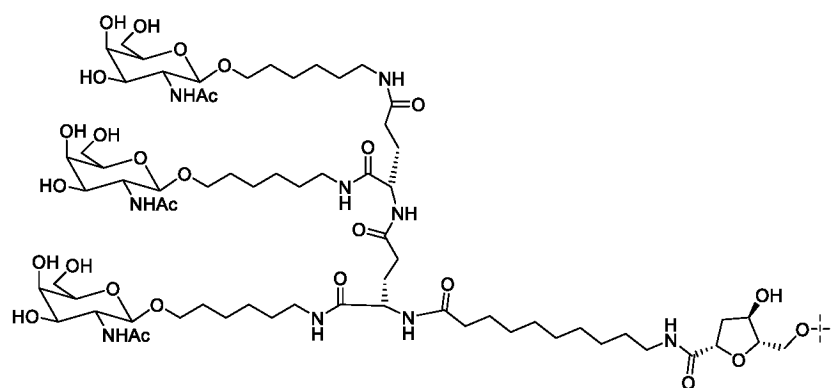
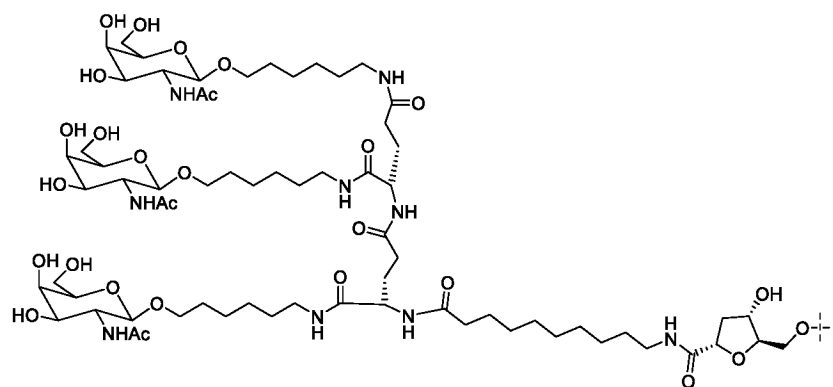
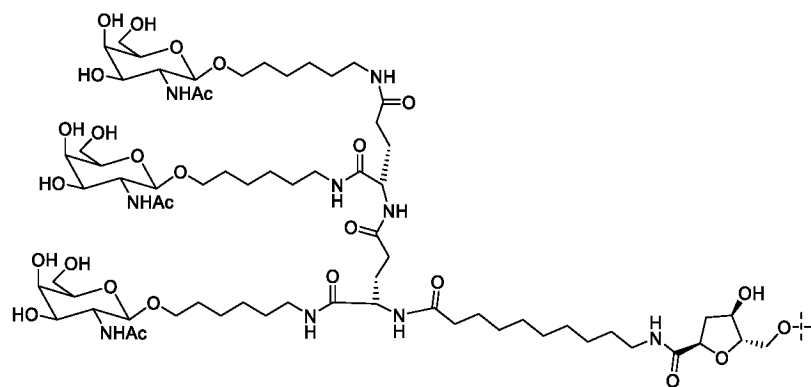


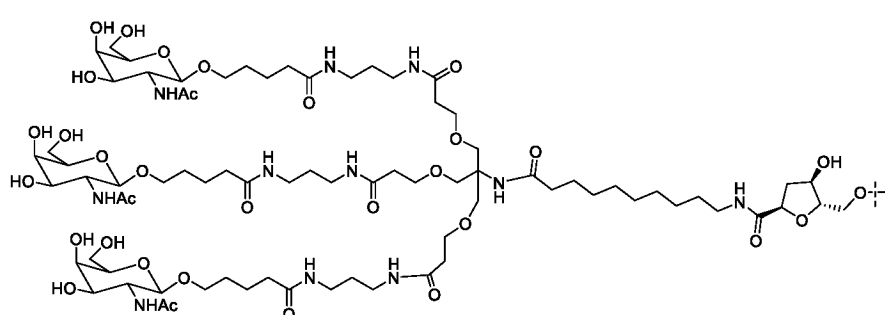
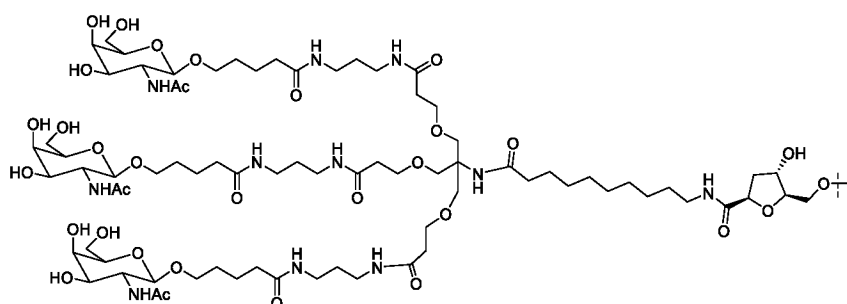
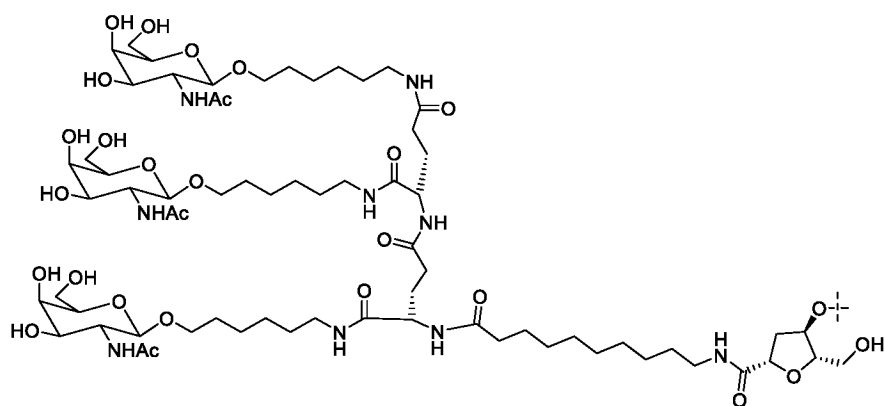
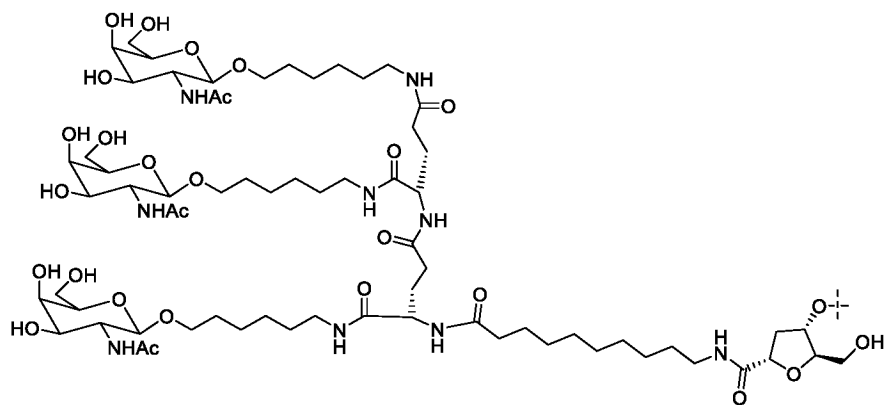
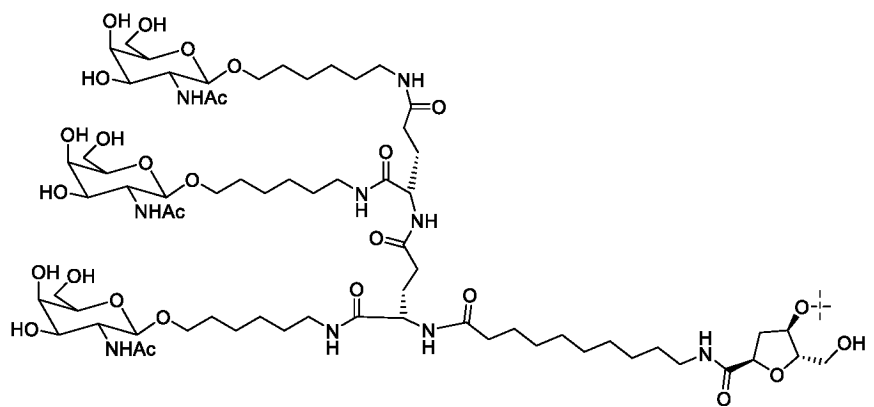


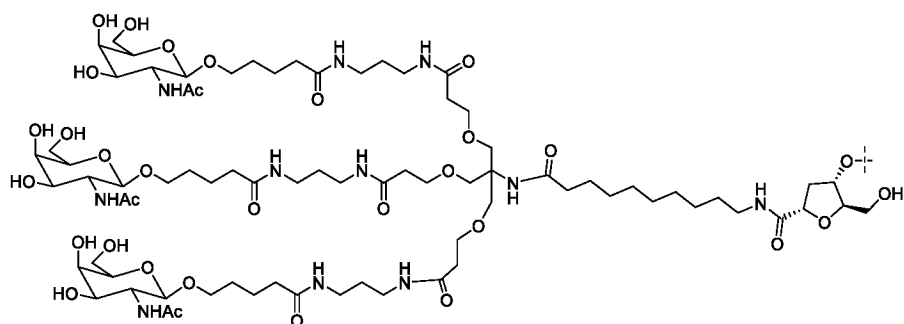
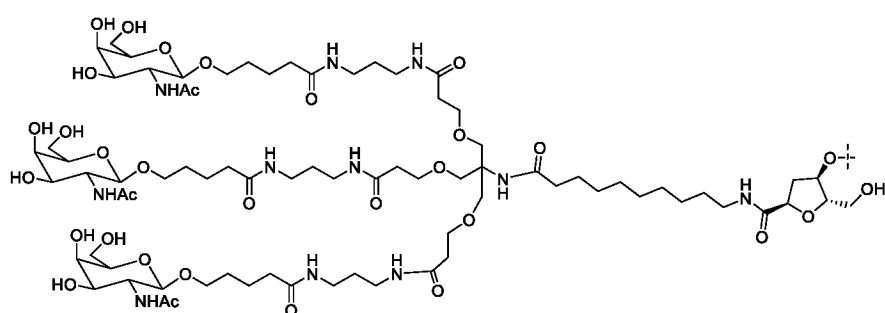
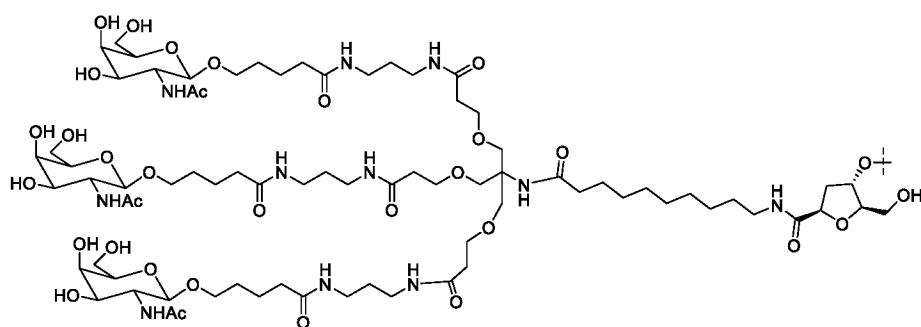
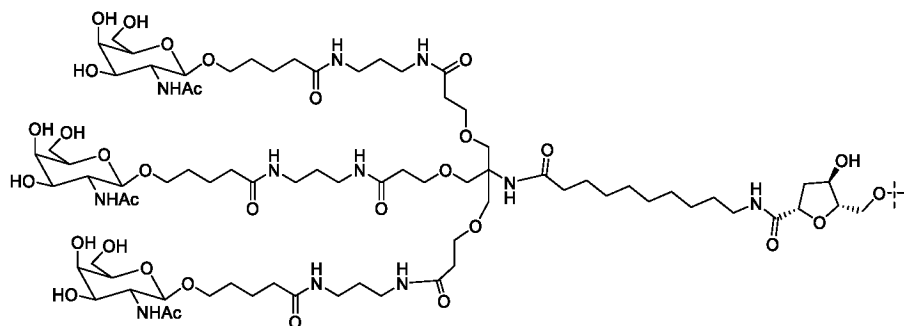
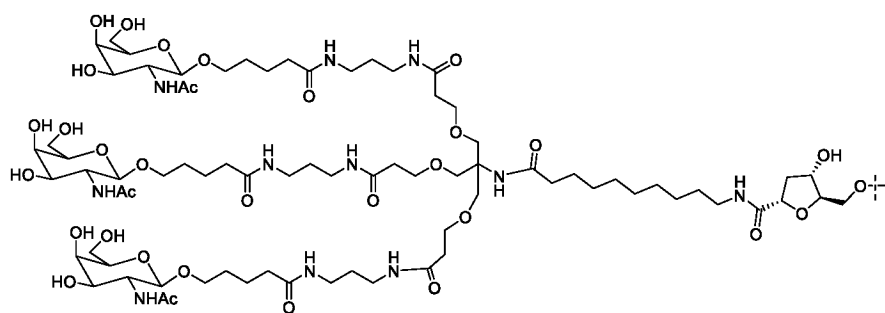




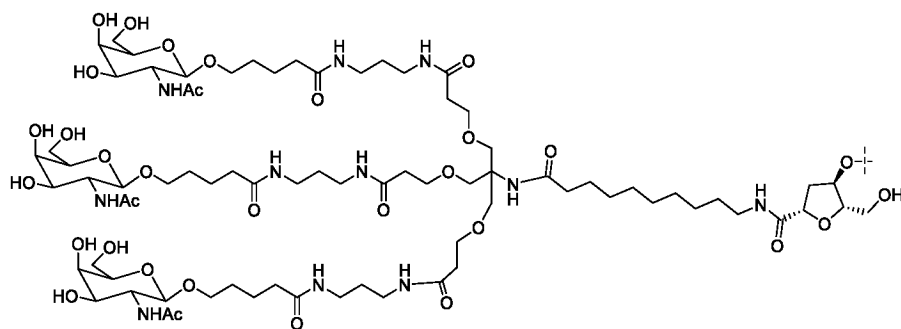






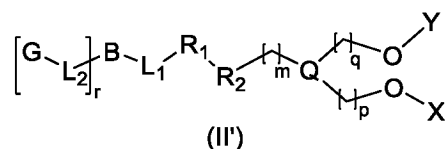


ИЛИ

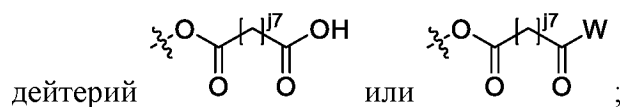


В некоторых вариантах реализации изобретения группа N-ацетилгалактозамина в указанном выше лиганде может быть заменен на N-трифторацетилгалактозамин, N-пропионилгалактозамин, N-n-бутирилгалактозамин или N-изобутирилгалактозамин.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к соединению, представленному формулой (II'),



где X представляет собой гидрокси защитную группу; Y представляет собой водород,



$j7$ равен 1, 2, 3 или 4;

W представляет собой макромолекулярное соединение;

G представляет собой нацеливающий фрагмент, который связывается с клеточным рецептором;

L_1 , R_1 , R_2 , Q, B, L_2 , m, p, q и r являются такими, как определено в любом из вариантов реализации лиганда, имеющего структуру, представленную формулой (I').

В некоторых вариантах реализации защитная группа гидрокси может представлять собой сложноэфирную защитную группу, алкоксиметильную защитную группу, алкильную защитную группу, силильную защитную группу или арильную защитную группу, предпочтительно арильную защитную группу, более предпочтительно MMTg и DMTg и еще более предпочтительно DMTg.

В некоторых вариантах реализации изобретения $j7$ может быть равно 2.

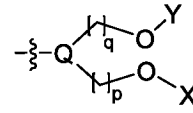
В некоторых вариантах реализации G может представлять собой фрагмент, нацеленный на рецептор асиалогликопротеина.

В некоторых вариантах реализации G может представлять собой триацетат N-ацетилгалактозамина, триацетат N-трифторацетилгалактозамина, триацетат N-пропионилгалактозамина, триацетат N-n-бутирилгалактозамина или триацетат N-

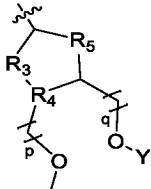
изобутирилгалактозамина, предпочтительно триацетат N-ацетилгалактозамина.

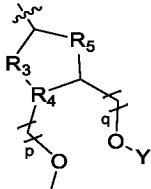
В некоторых вариантах реализации изобретения макромолекулярное соединение может представлять собой смолу, предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотетильную смолу.

В некоторых вариантах реализации изобретения

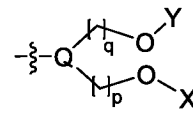


может представлять

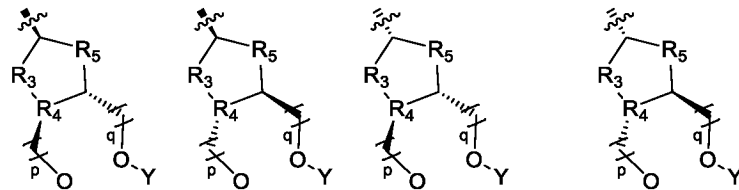


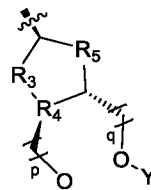
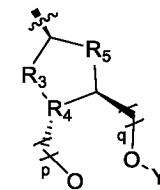
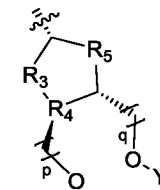
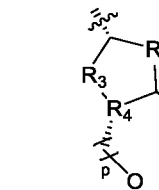
собой , где R₃, R₄, R₅, X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения

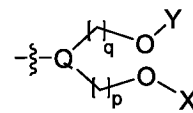


может представлять

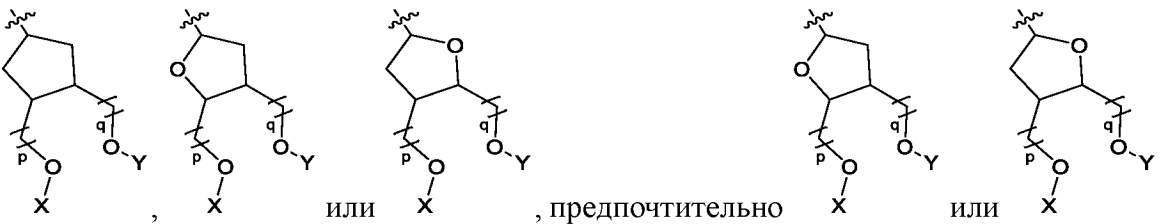


собой , ,  или , где R₃, R₄, R₅, X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения

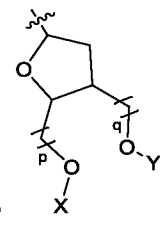


может представлять

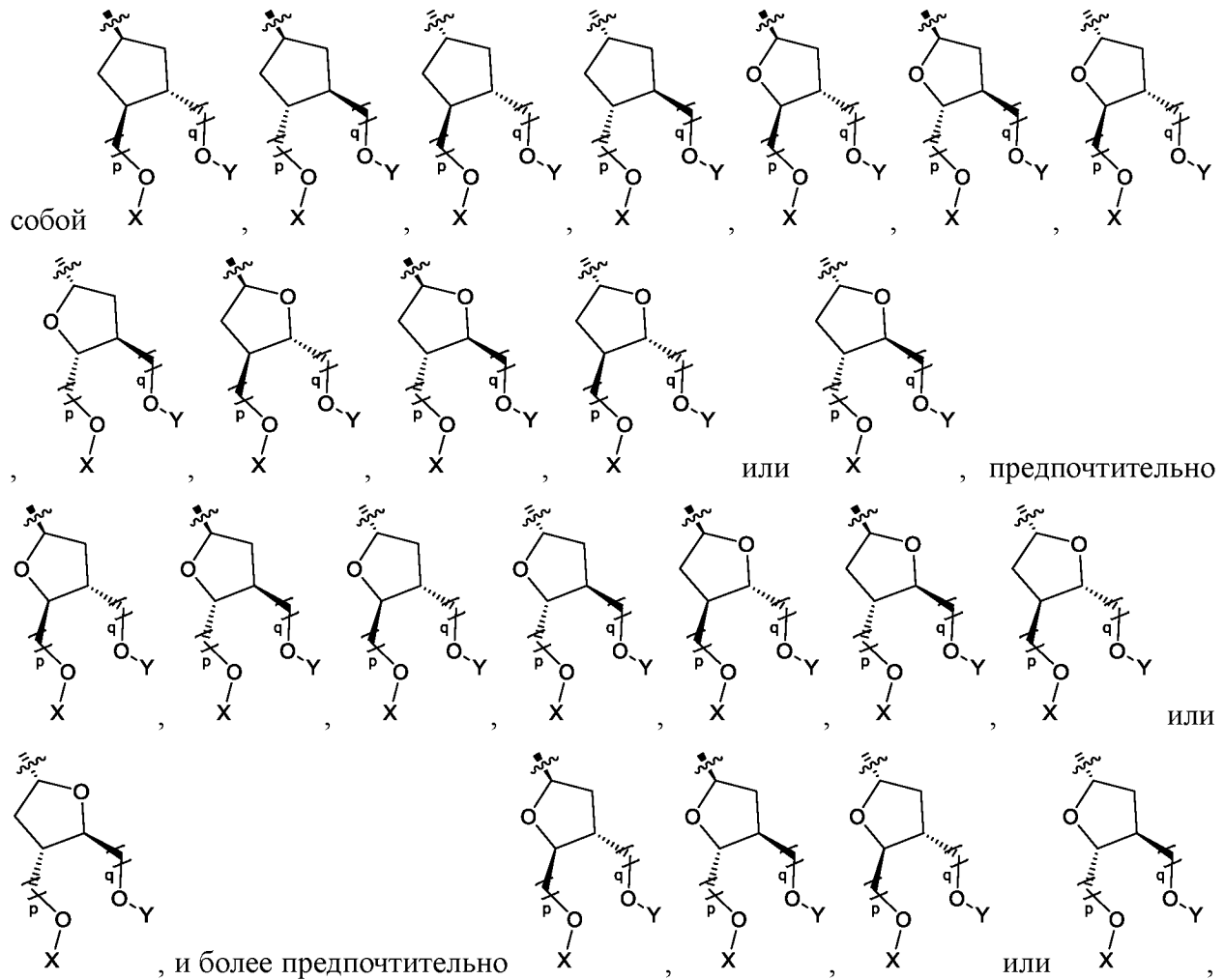


собой ,  или , предпочтительно  или 

или

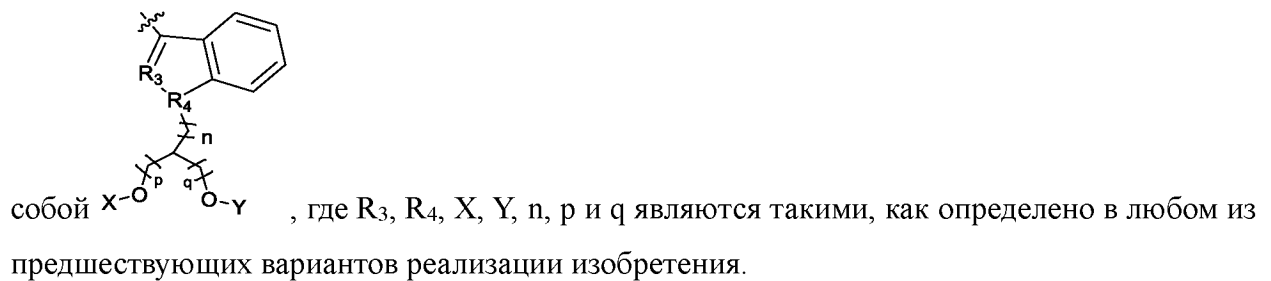
, и более предпочтительно , где X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения



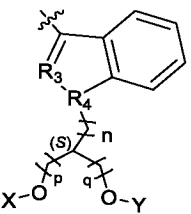
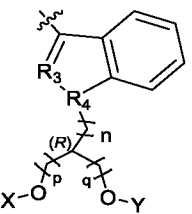
где X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения

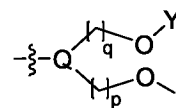


В некоторых вариантах реализации изобретения

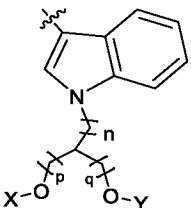


с собой  или , где R₃, R₄, X, Y, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

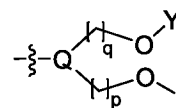
В некоторых вариантах реализации изобретения



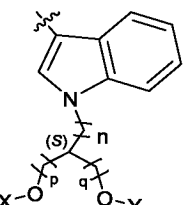
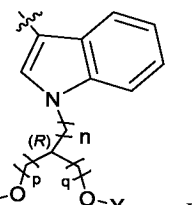
может представлять

с собой , где X, Y, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

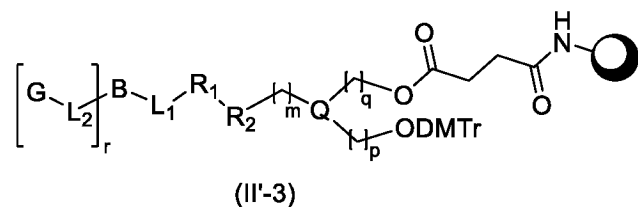
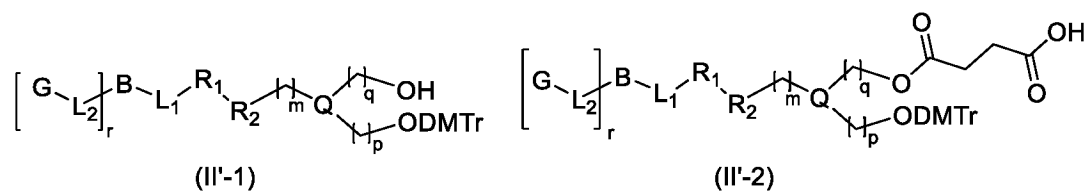
В некоторых вариантах реализации изобретения



может представлять

с собой  или , где X, Y, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

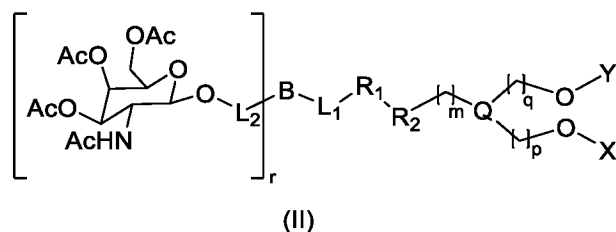
В некоторых вариантах реализации соединения может представлять собой соединение, представленное формулой (II'-1), (II'-2) или (II'-3),



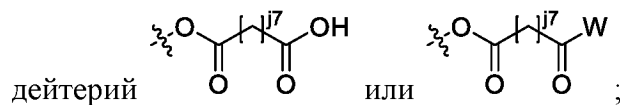
где ◯ представляет собой смолу, предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотильную смолу; L₁, R₁, R₂, Q, B, L₂, G, m, p, q и r являются такими, как определено в любом из вариантов реализации соединения,

представленного формулой (II').

В настоящем изобретении предложено соединение, представленное формулой (II),



где X представляет собой защитную группу гидрокси; Y представляет собой водород,



j_7 равен 1, 2, 3 или 4;

W представляет собой макромолекулярное соединение;

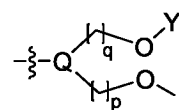
L_1 , R_1 , R_2 , Q, B, L_2 , m, p, q и г являются такими, как определено в любом из вариантов реализации лиганда, имеющего структуру, представленную формулой (I).

В некоторых вариантах реализации гидрокси-защитная группа может представлять собой сложноэфирную защитную группу, алкоксиметильную защитную группу, алкильную защитную группу, силильную защитную группу или арильную защитную группу, предпочтительно арильную защитную группу, более предпочтительно MMTg и DMTg и еще более предпочтительно DMTg.

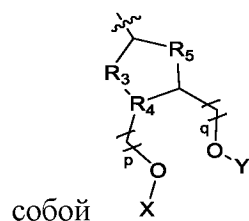
В некоторых вариантах реализации изобретения j_7 может быть равно 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения макромолекулярное соединение может представлять собой смолу, предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминометильную смолу.

В некоторых вариантах реализации изобретения

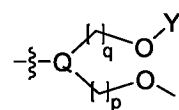


может представлять

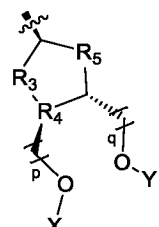
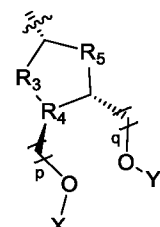
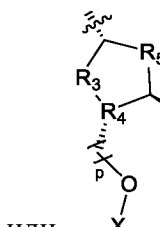


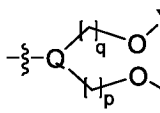
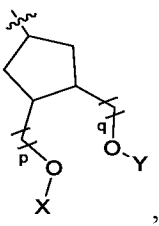
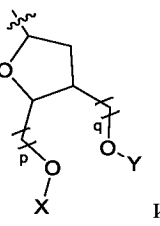
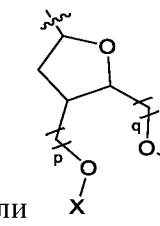
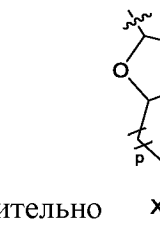
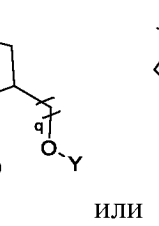
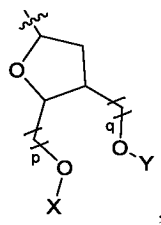
собой , где R_3 , R_4 , R_5 , X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

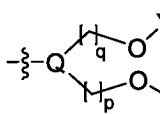
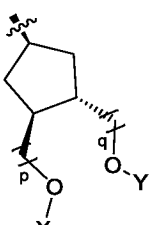
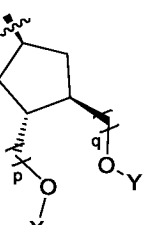
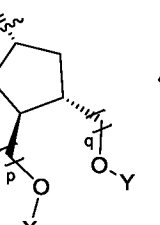
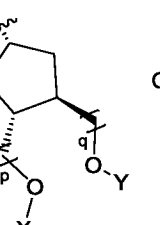
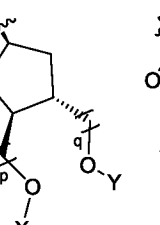
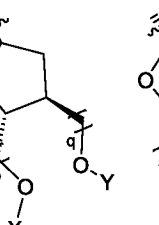
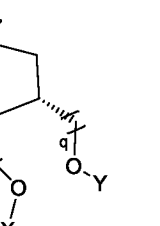
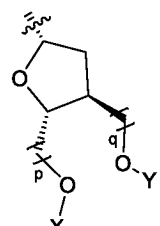
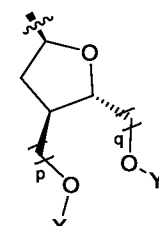
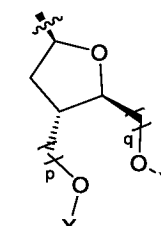
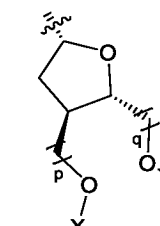
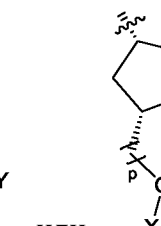
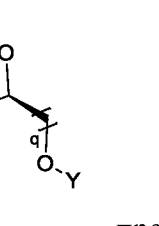

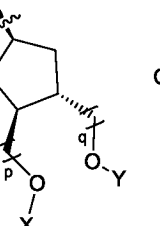
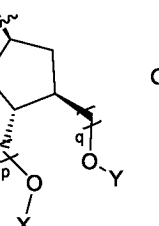
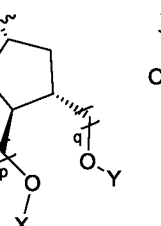
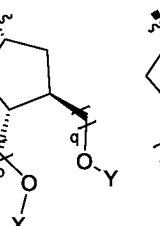
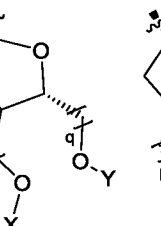
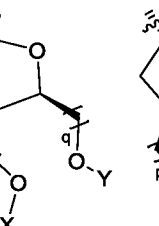
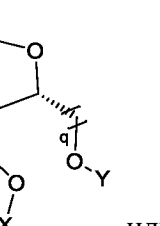
В некоторых вариантах реализации изобретения

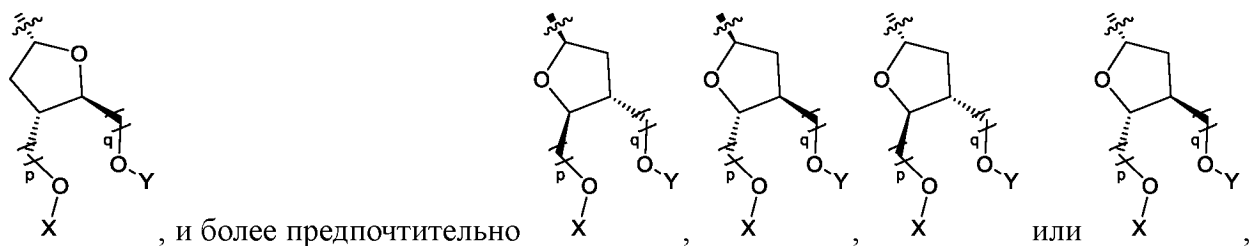


может представлять

с собой  ,  ,  или  , где R3, R4, R5, X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

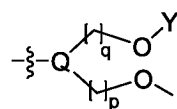
В некоторых вариантах реализации изобретения  может представлять собой  ,  или  , предпочтительно  или  , и более предпочтительно  , где X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

В некоторых вариантах реализации изобретения  может представлять собой  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  или



где X, Y, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

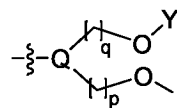
В некоторых вариантах реализации изобретения



может представлять

собой $X-O$ --- $O-Y$, где R_3 , R_4 , X, Y, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

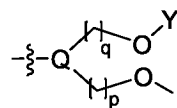
В некоторых вариантах реализации изобретения



может представлять

собой $X-O$ --- $O-Y$ или $X-O$ --- $O-Y$, где R_3 , R_4 , X, Y, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

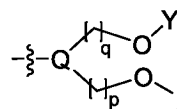
В некоторых вариантах реализации изобретения



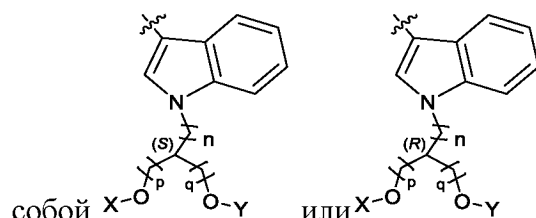
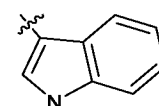
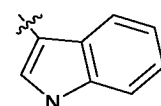
может представлять

собой $X-O$ --- $O-Y$, где X, Y, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

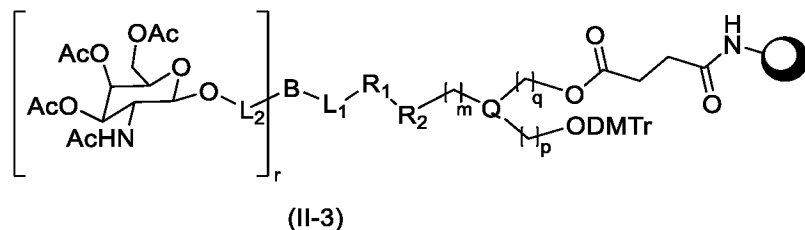
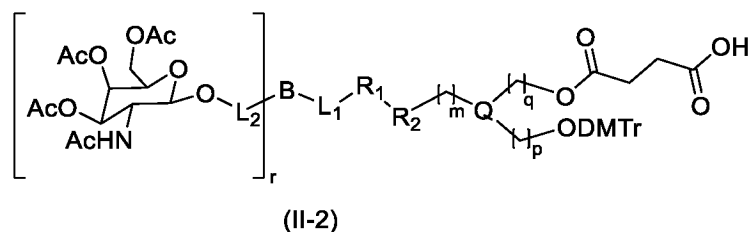
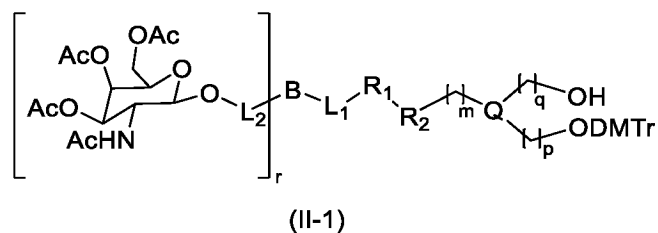
В некоторых вариантах реализации изобретения




может представлять


 собой $X-O$  $-O-Y$ или $X-O$  $-O-Y$, где X, Y, n, p и q являются такими, как определено в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения.

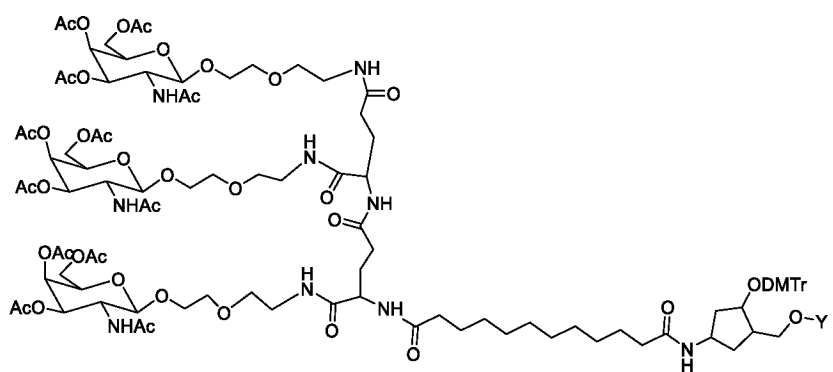
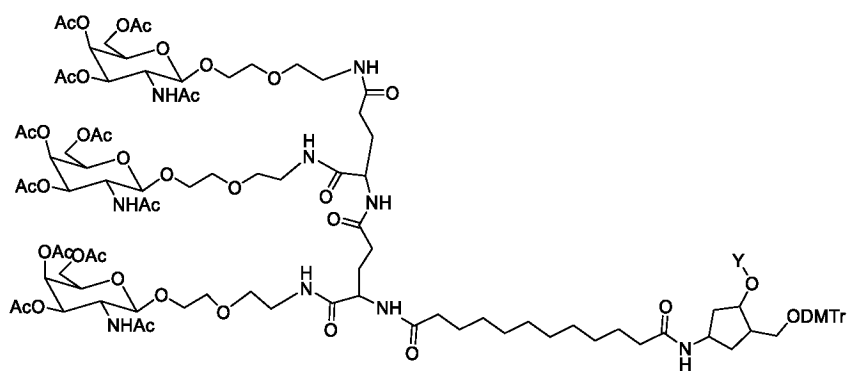
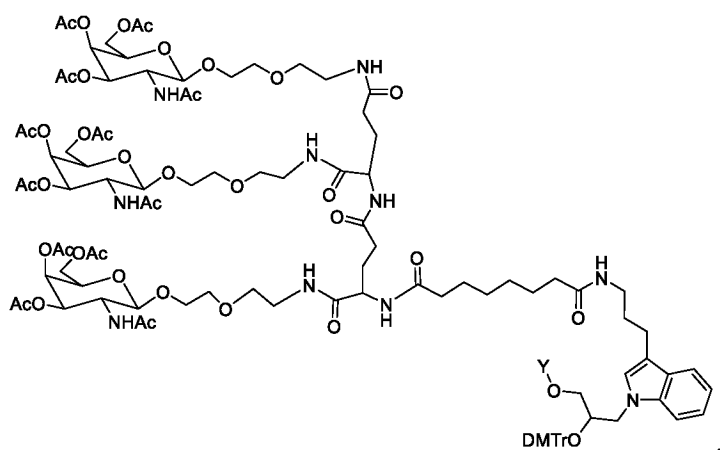
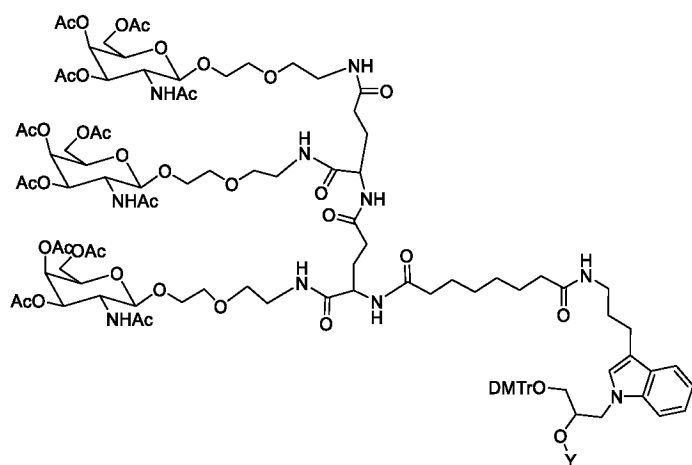
В некоторых вариантах реализации соединение может представлять собой соединение, представленное формулой (II-1), (II-2) или (II-3),

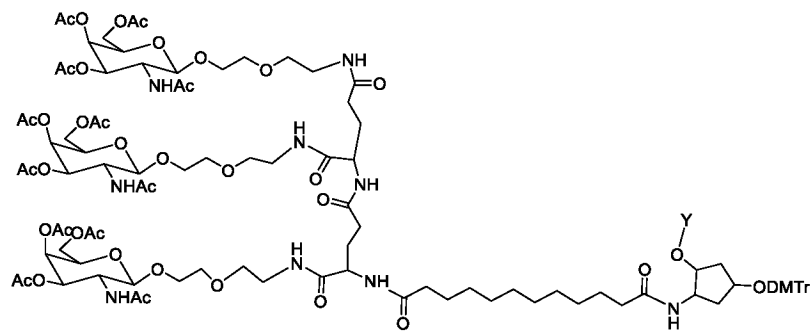
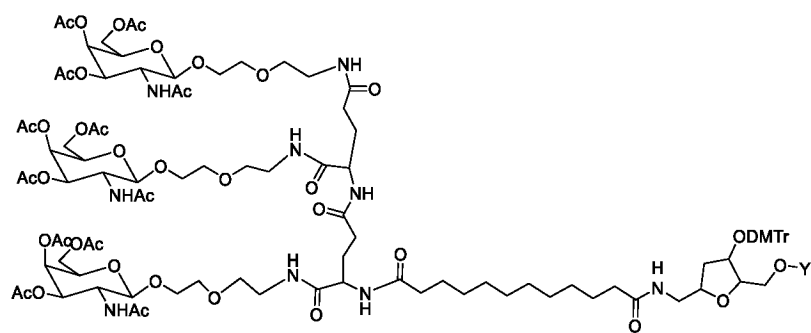
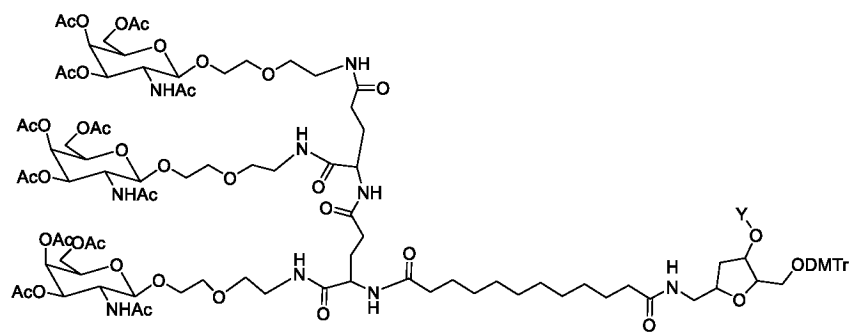
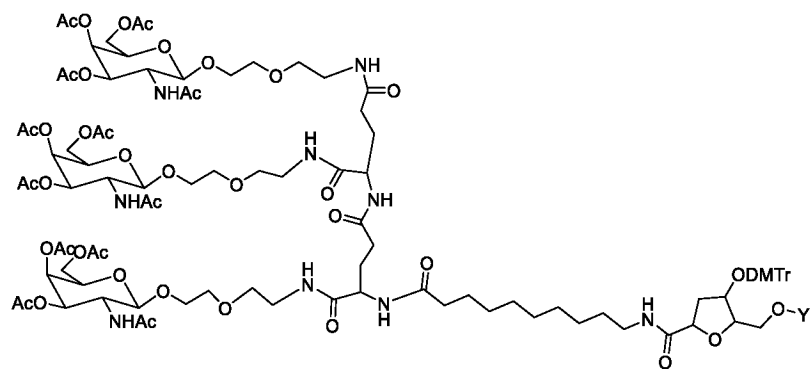
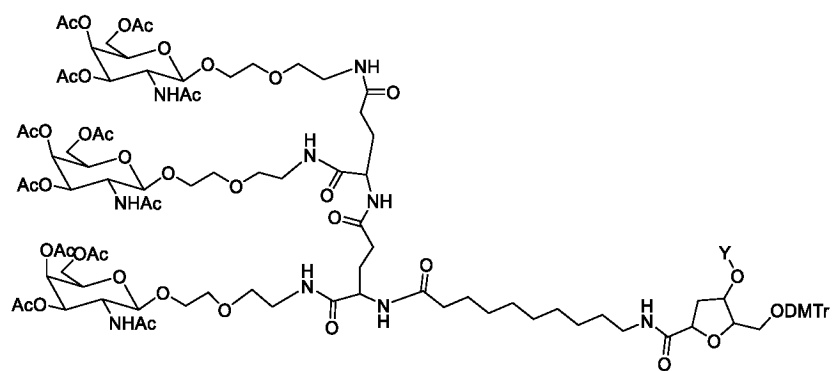


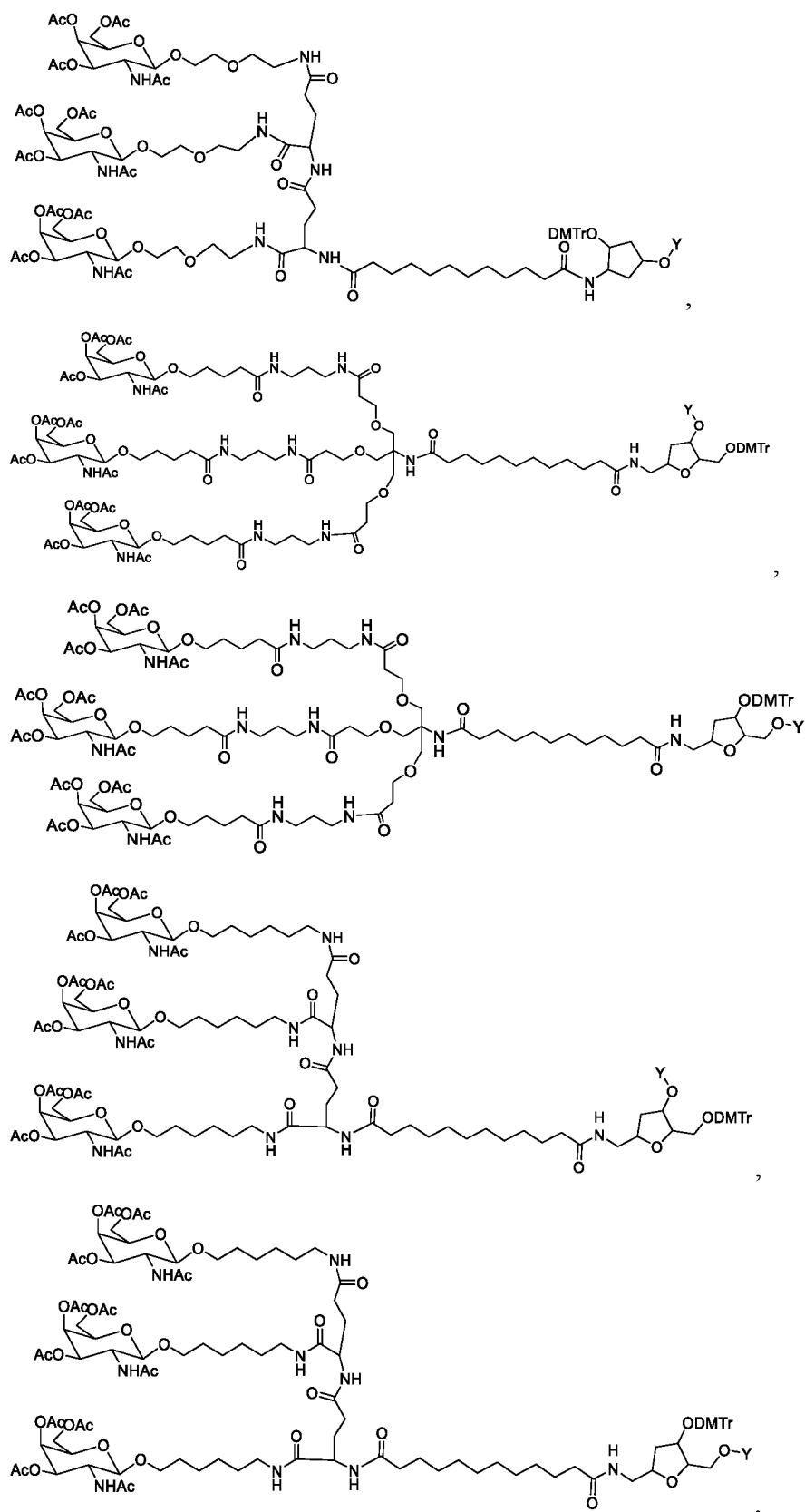
или

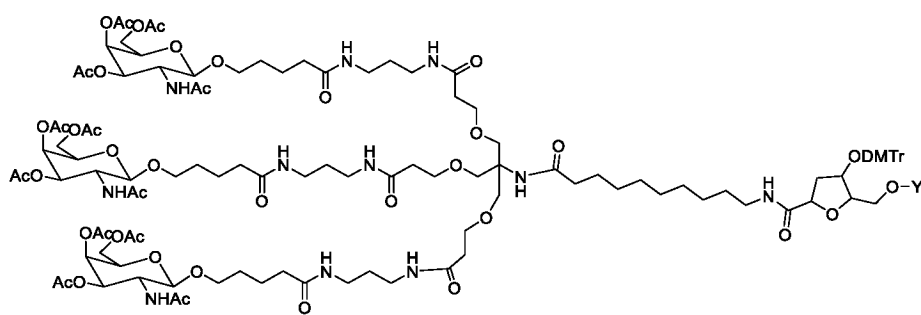
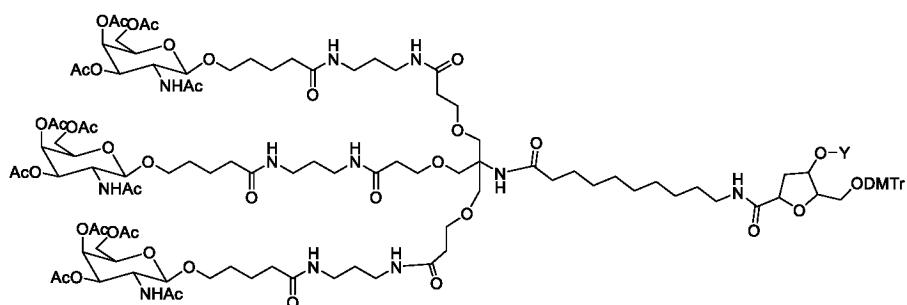
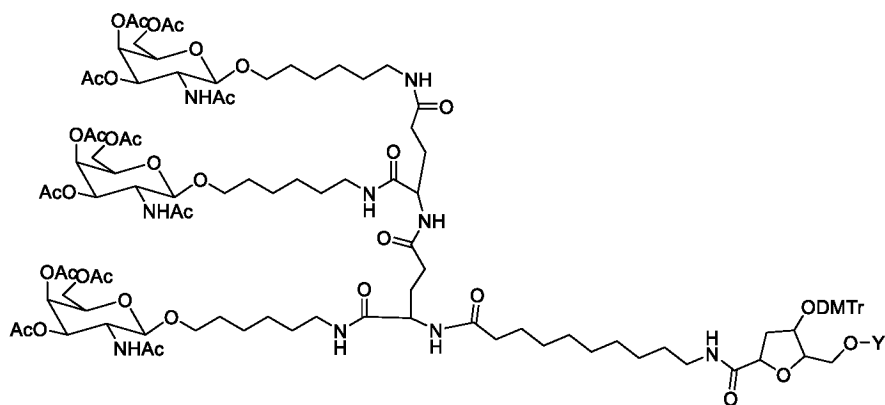
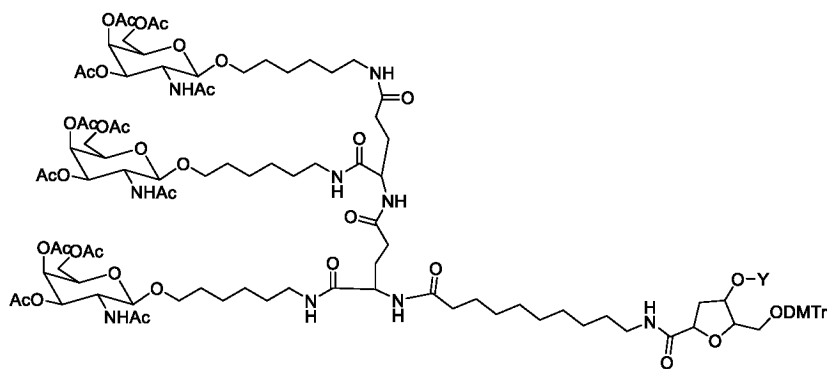
где  представляет собой смолу, предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотетильную смолу; L_1 , R_1 , R_2 , Q, B, L_2 , m, p, q и r являются такими, как определено в любом из вариантов реализации соединения, представленного формулой (II).

В некоторых вариантах реализации указанное соединение может иметь любую из следующих структур:



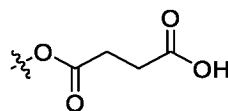




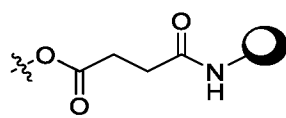



ИЛИ

где Y представляет собой водород или



или, Y представляет собой

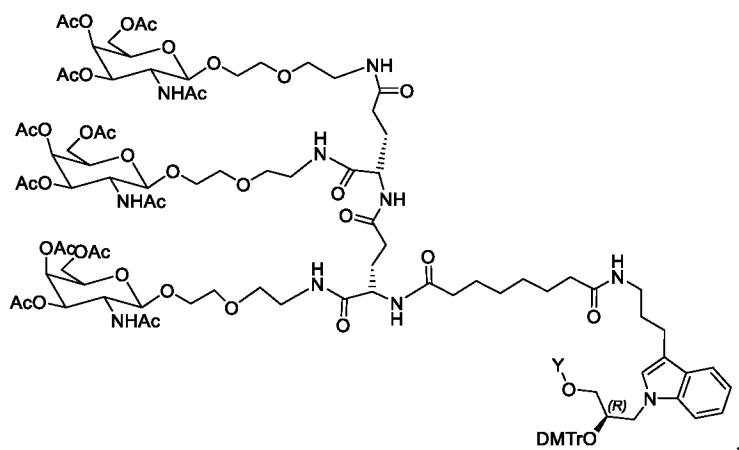
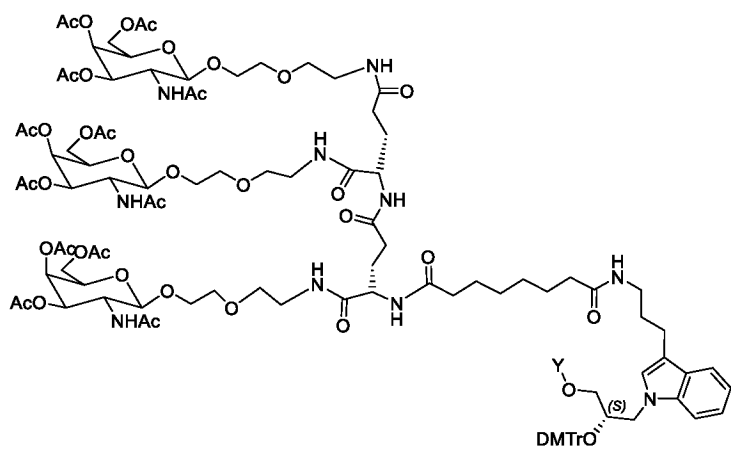
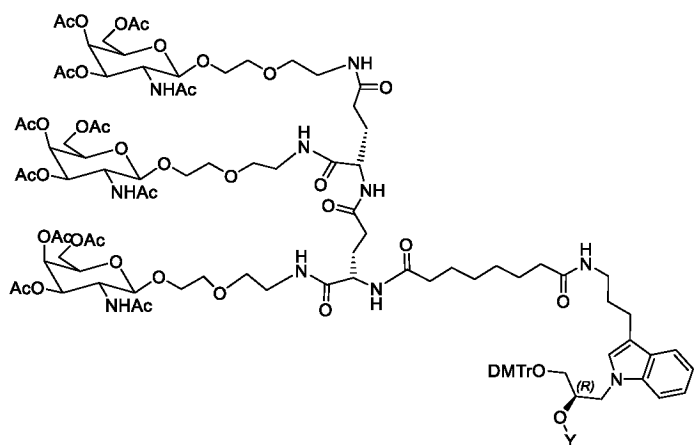
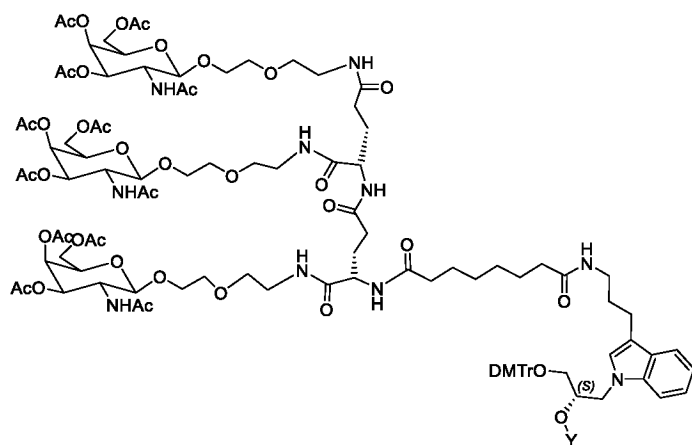


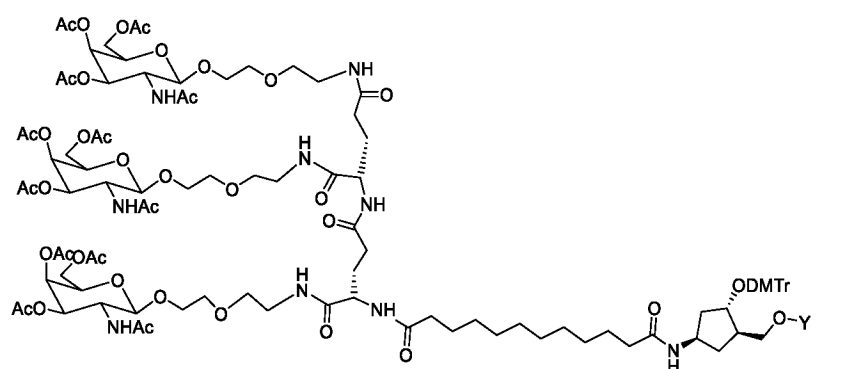
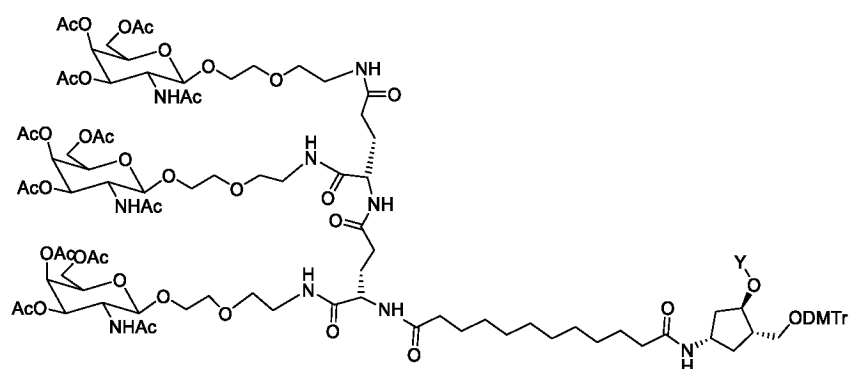
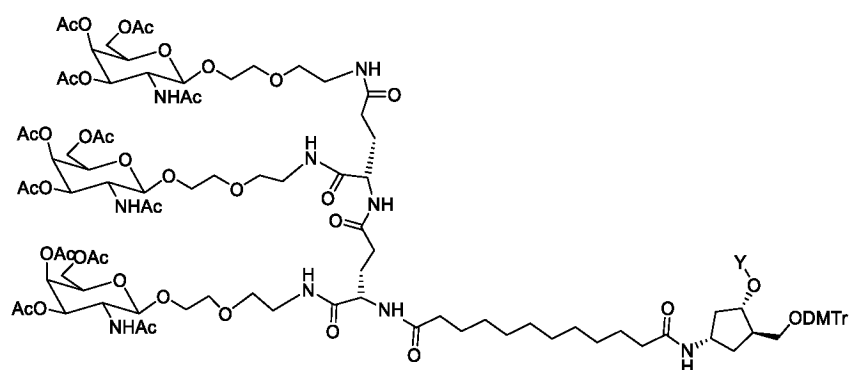
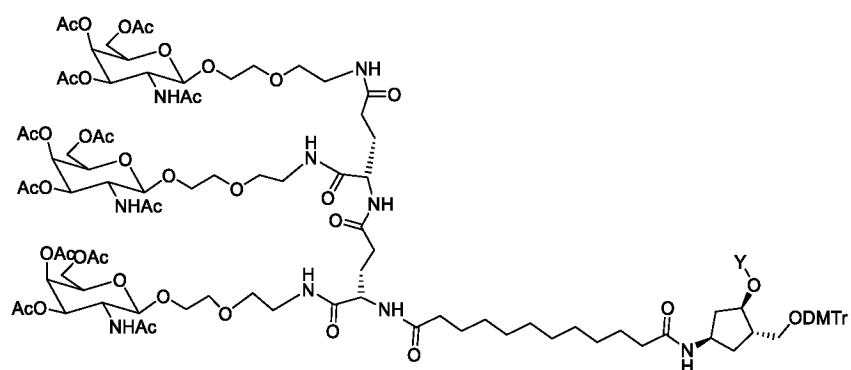
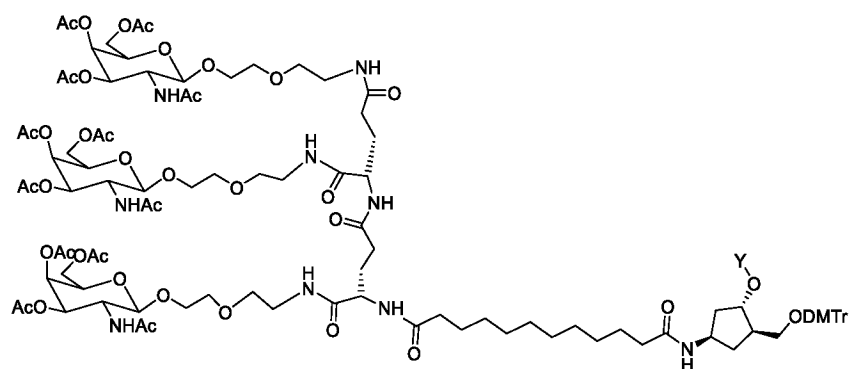
, где  представляет собой смолу,

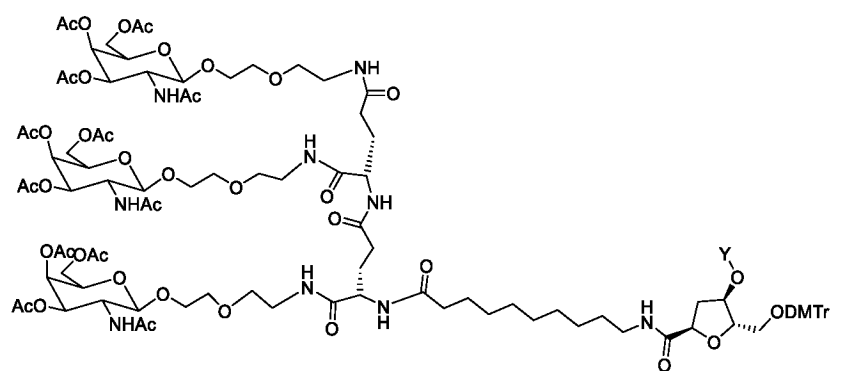
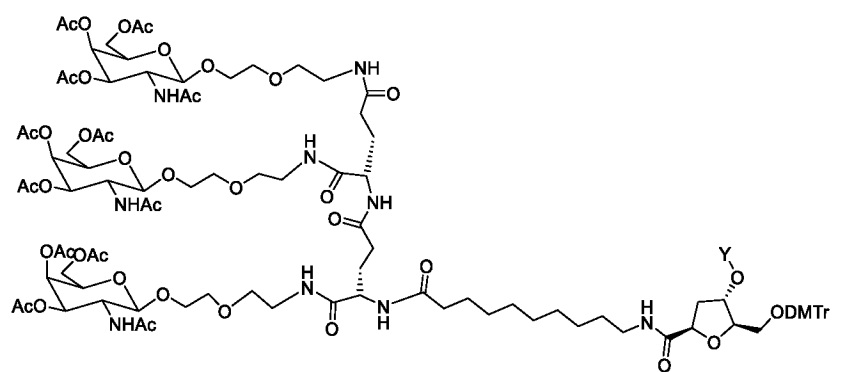
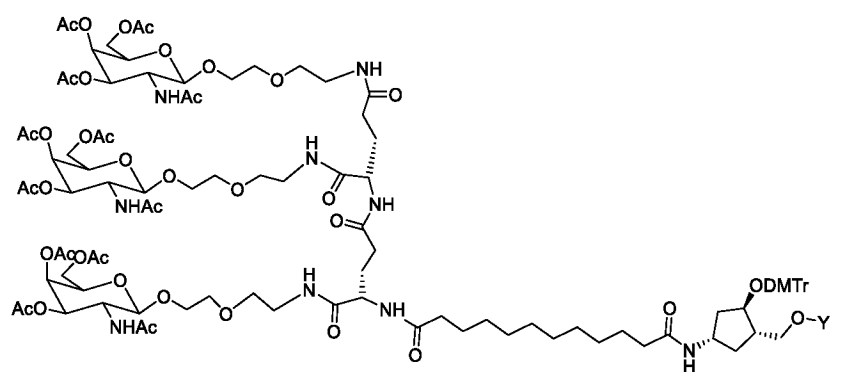
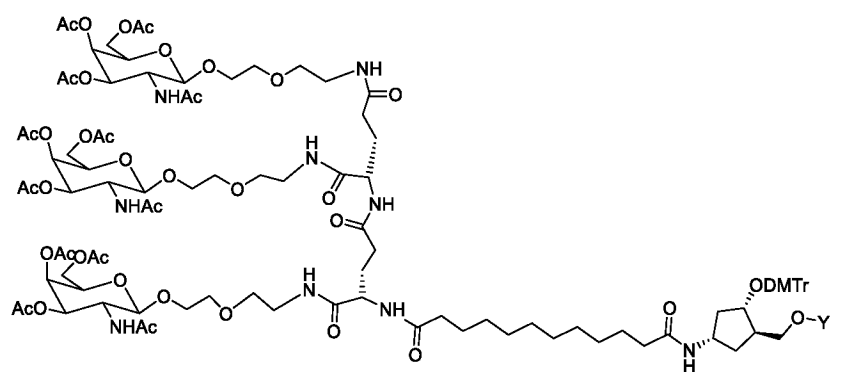
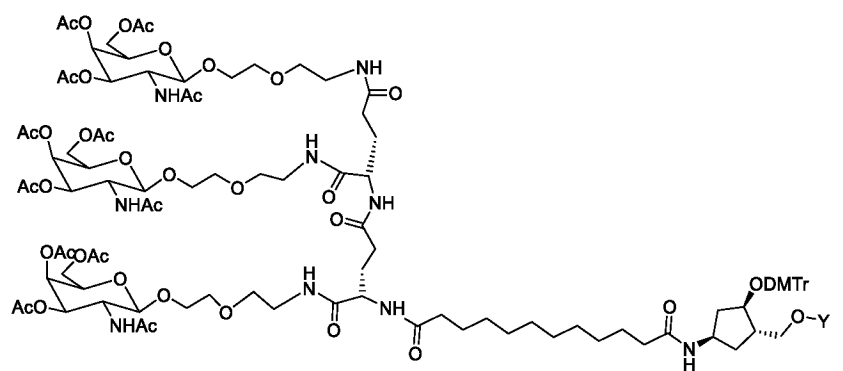
предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотильную смолу.

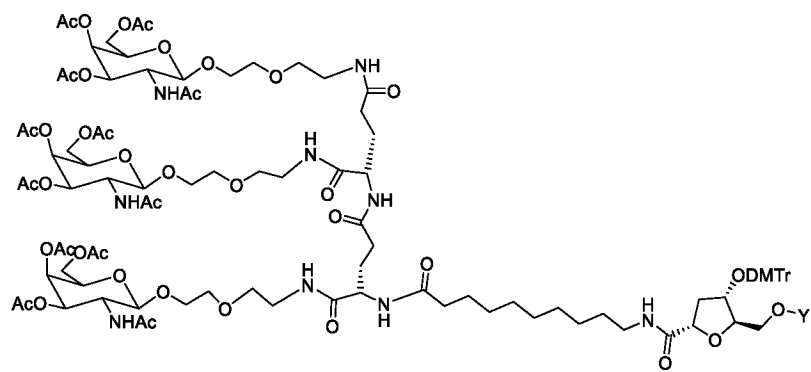
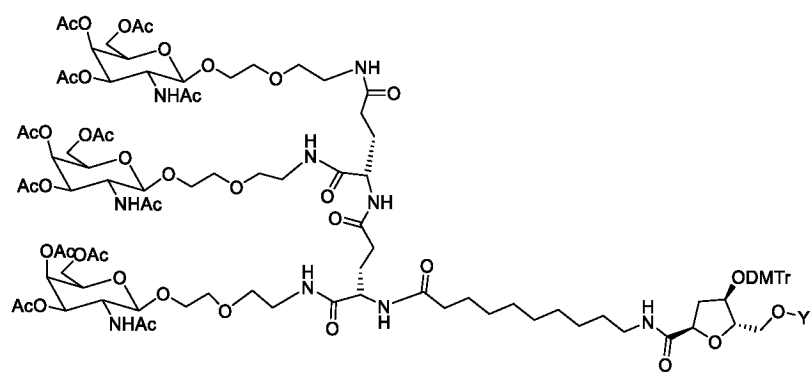
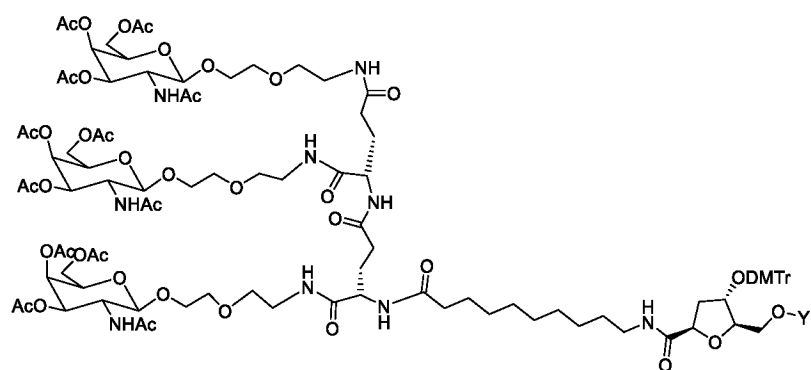
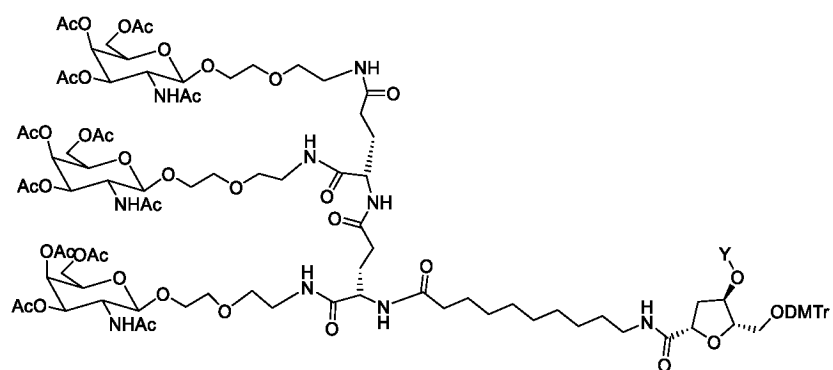
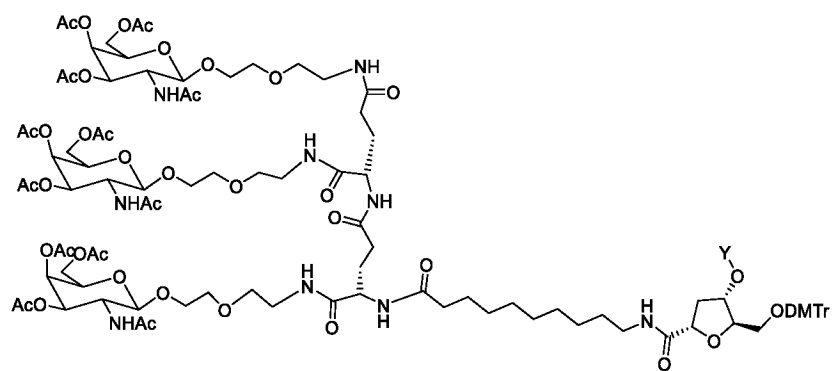
В некоторых вариантах реализации указанное соединение может иметь любую из

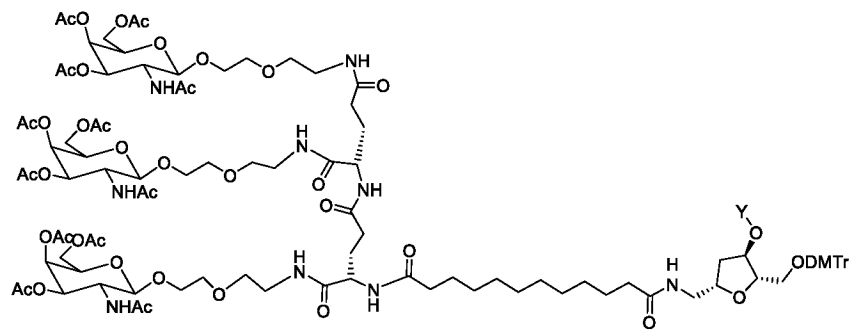
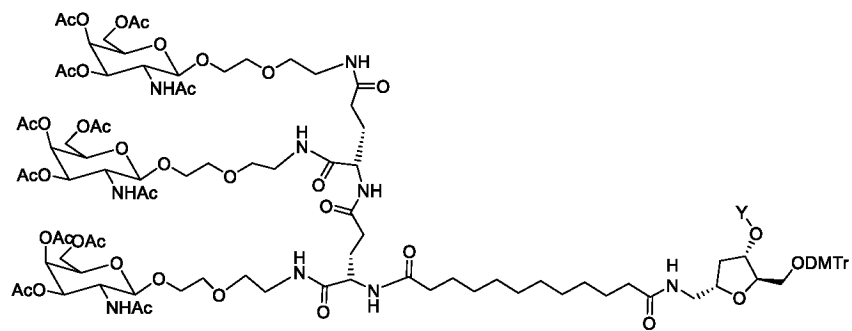
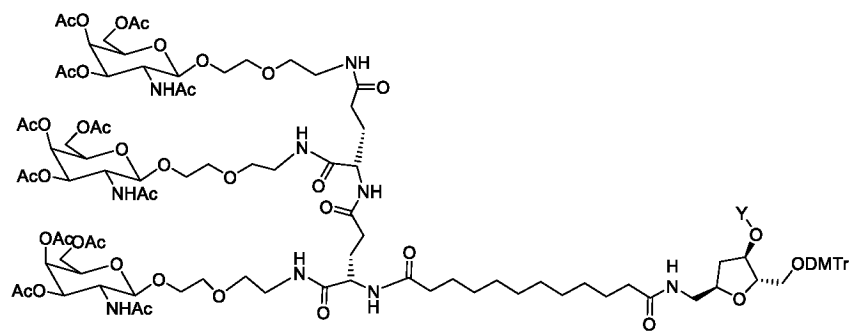
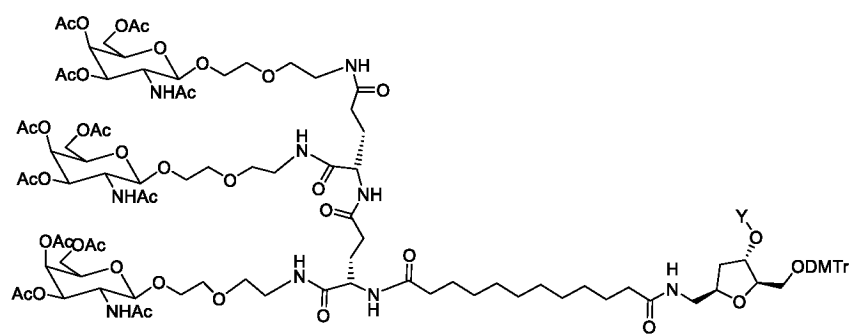
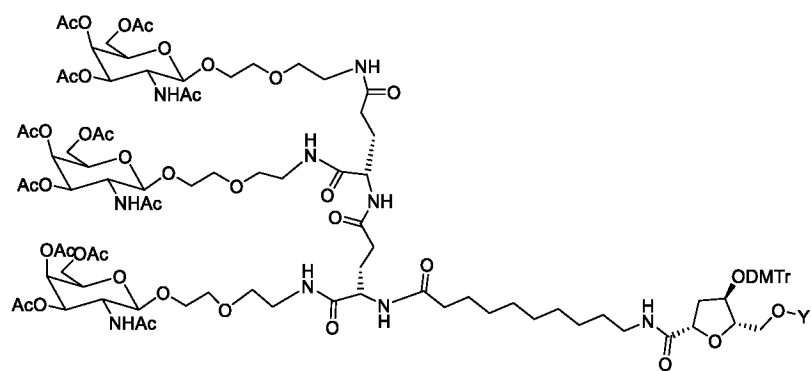
следующих структур:

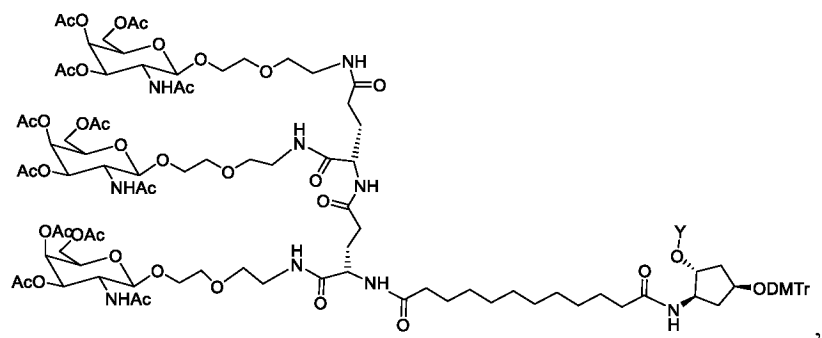
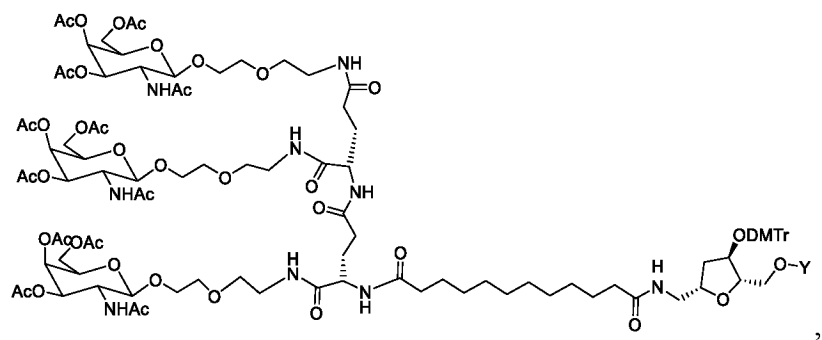
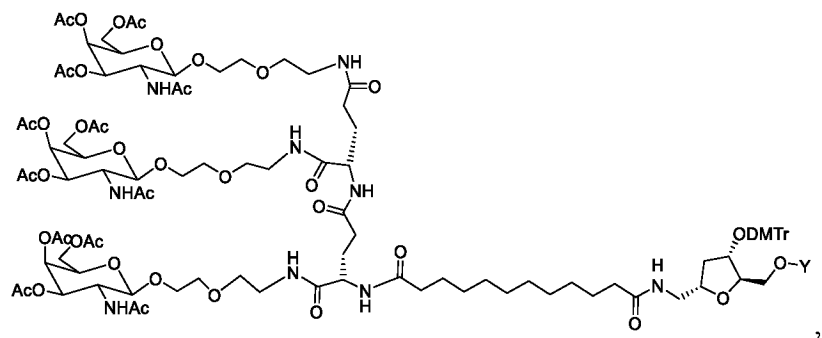
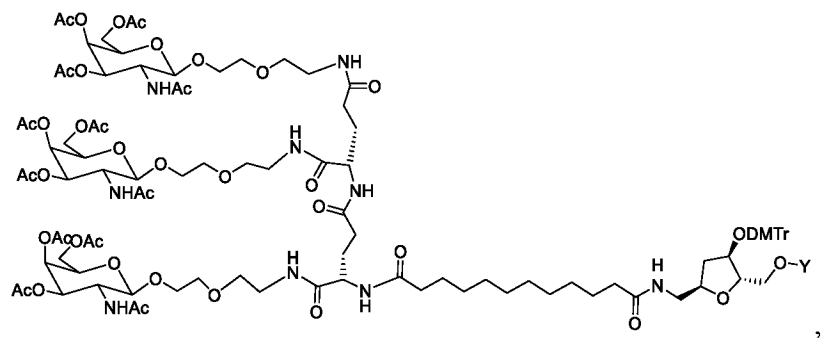
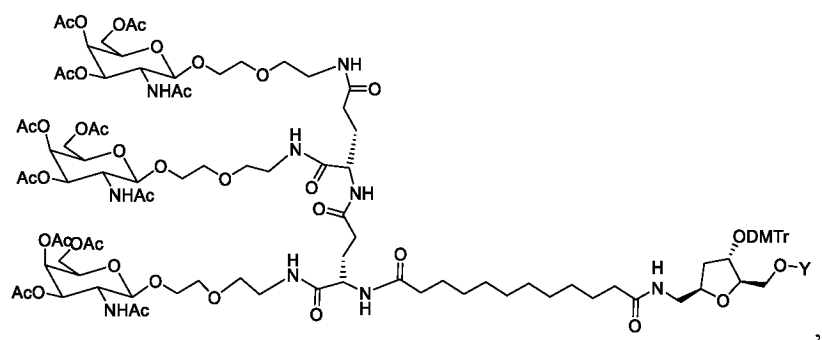


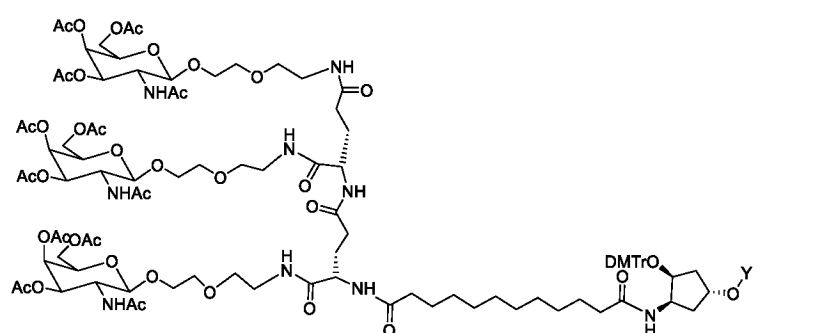
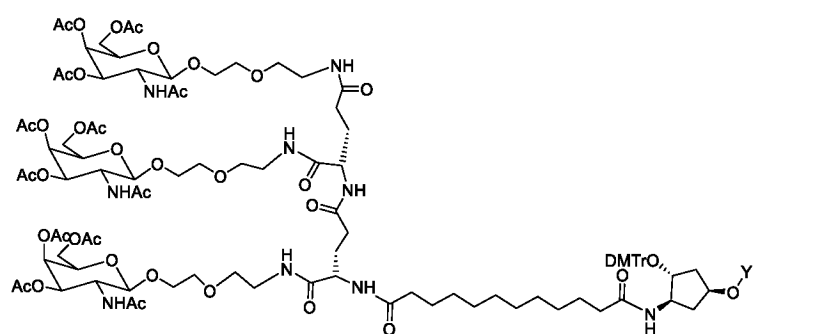
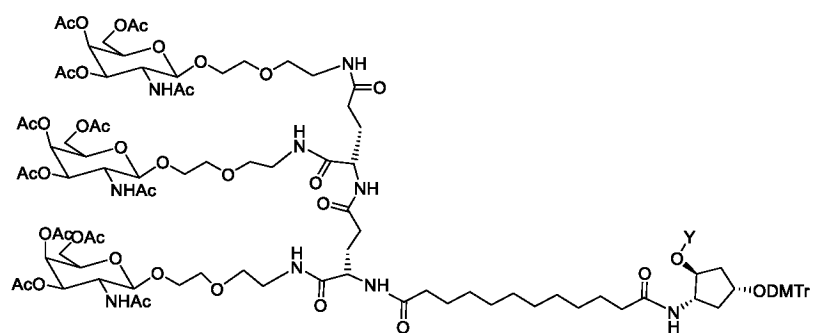
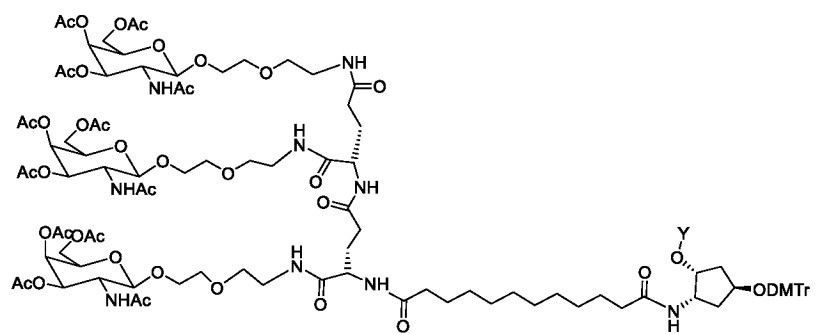
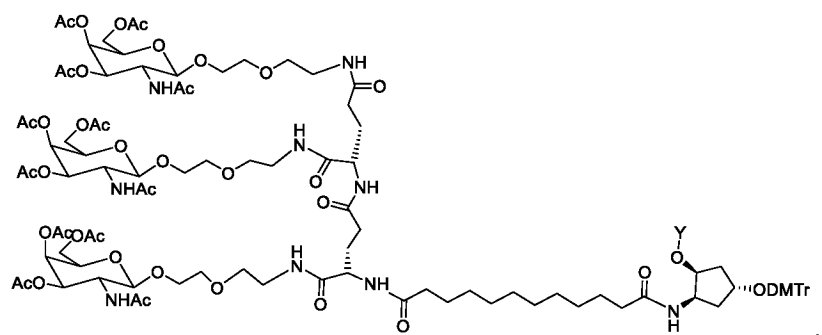


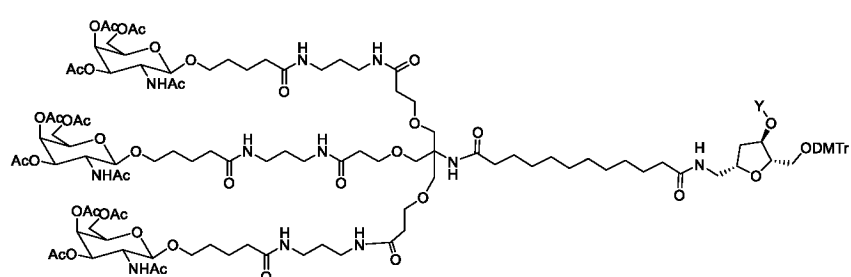
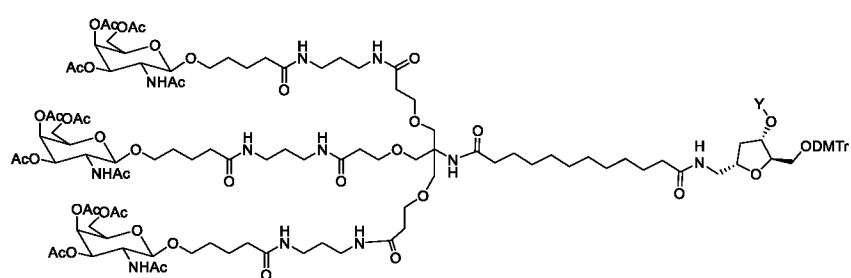
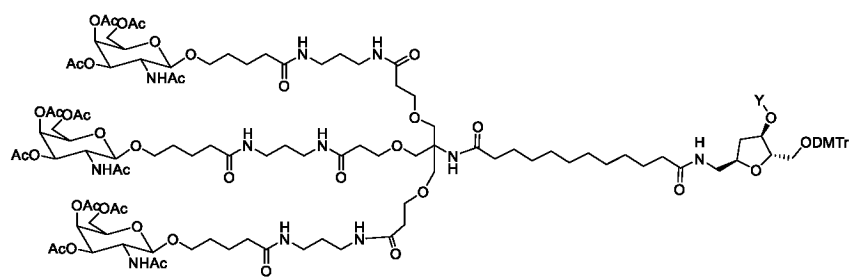
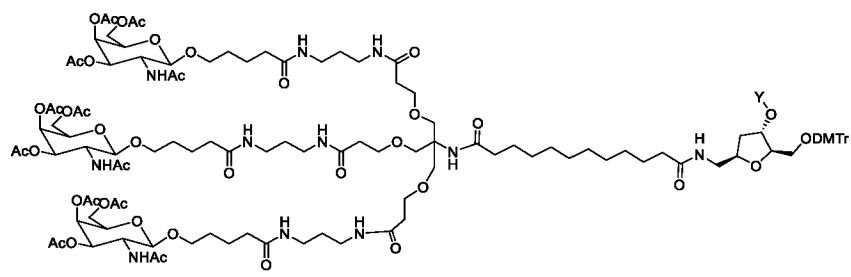
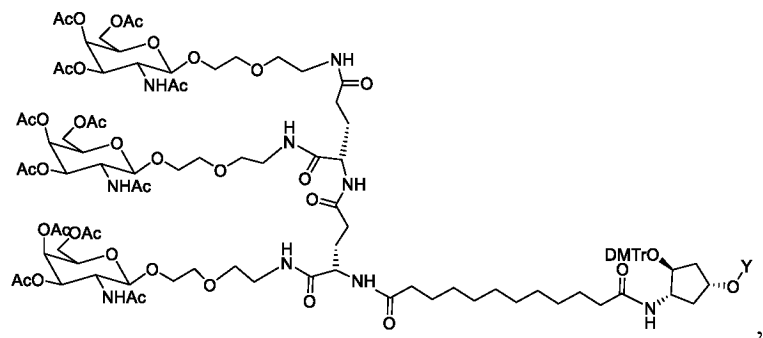
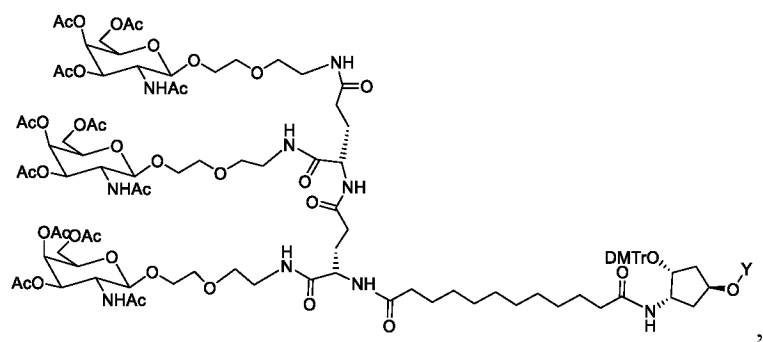


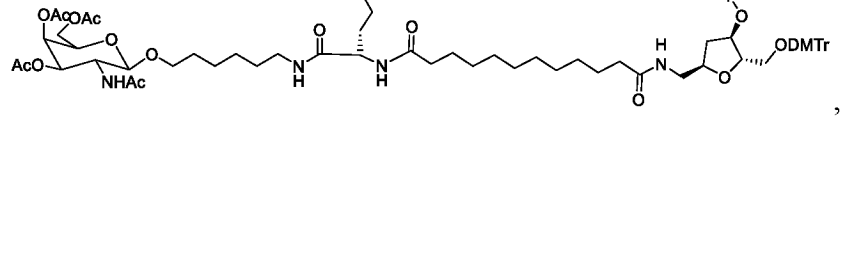
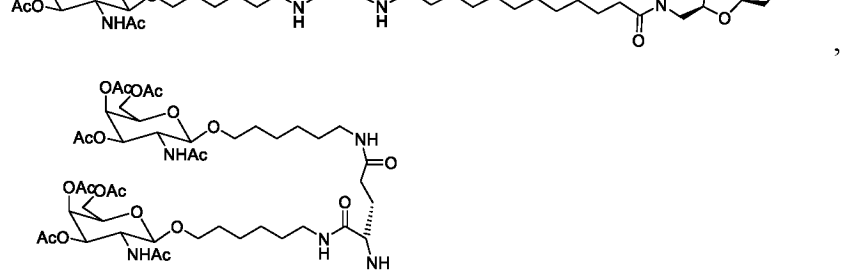
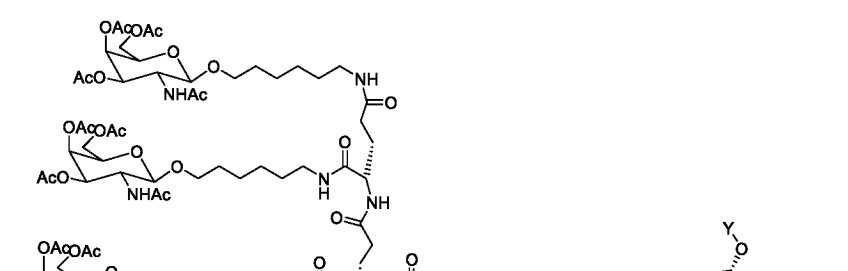
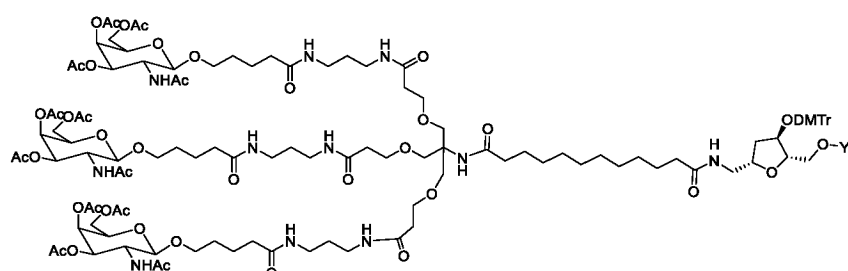
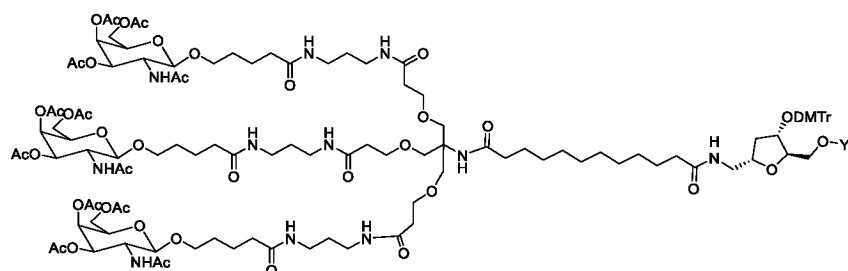
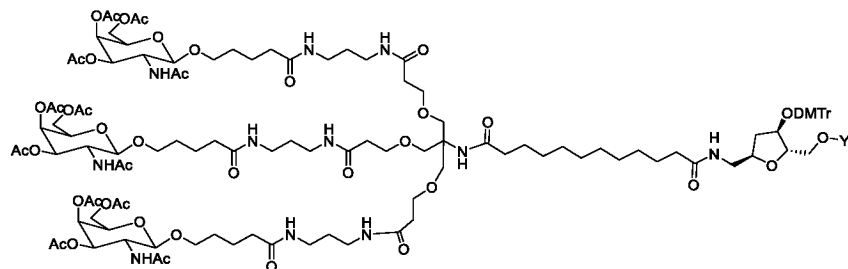
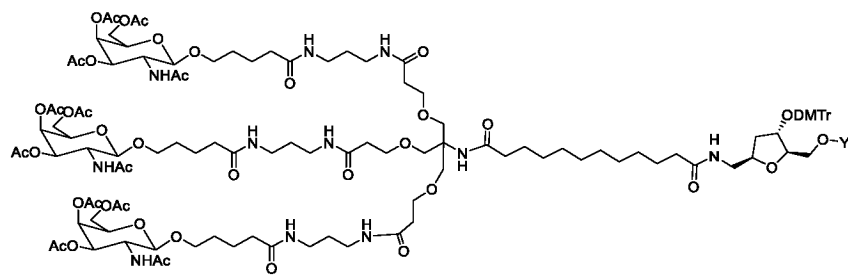


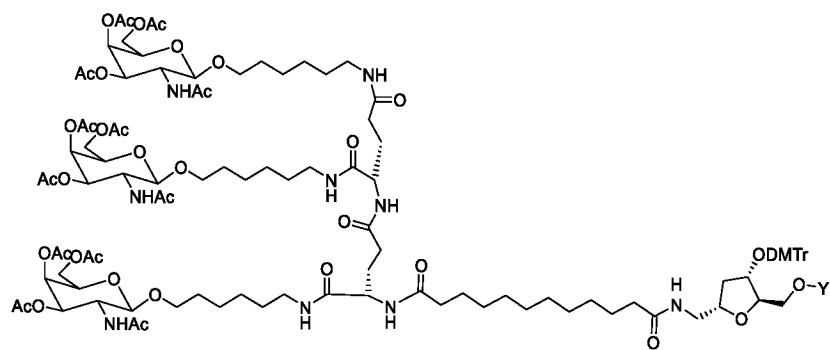
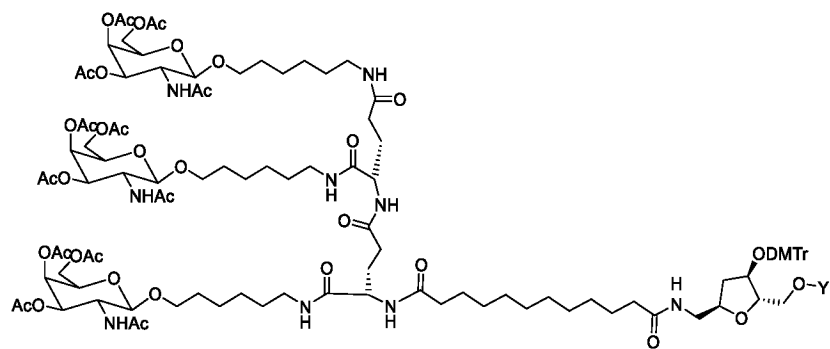
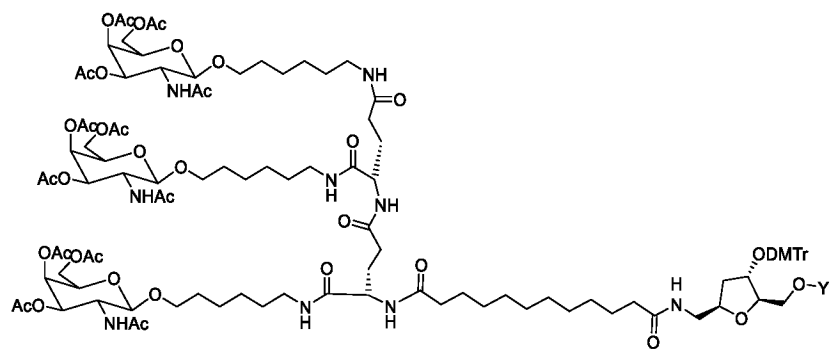
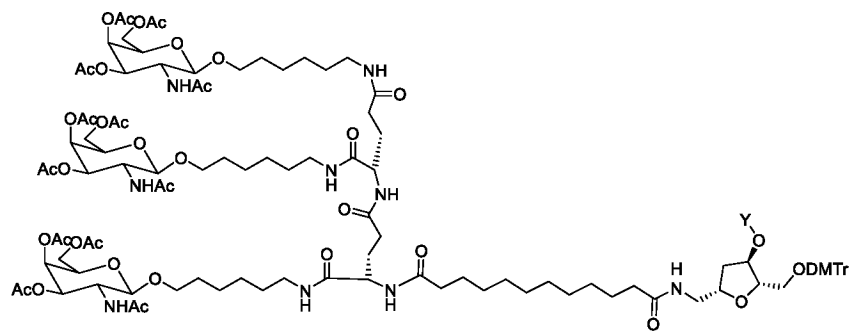
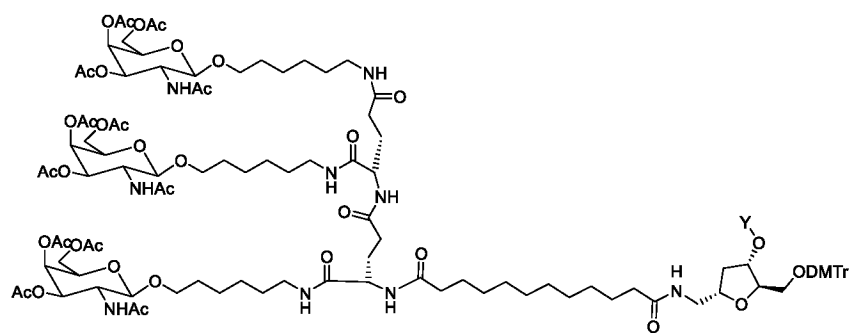


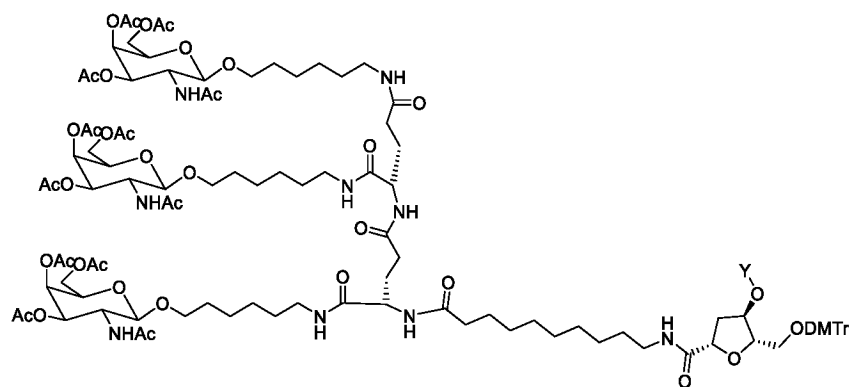
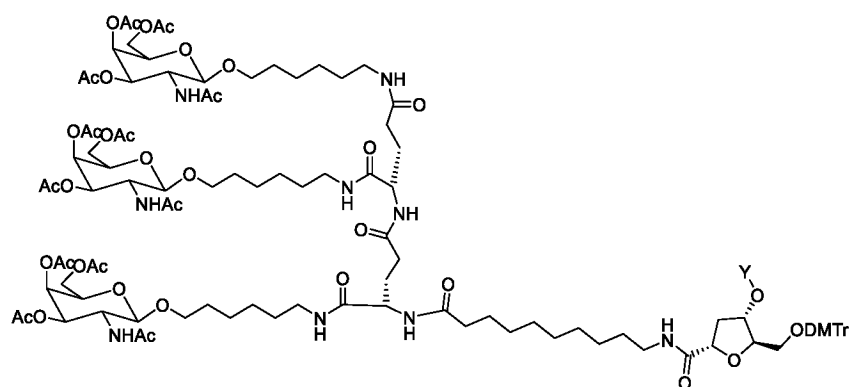
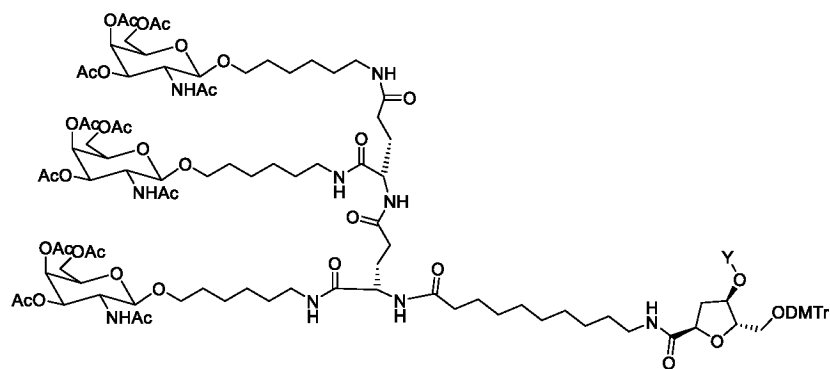
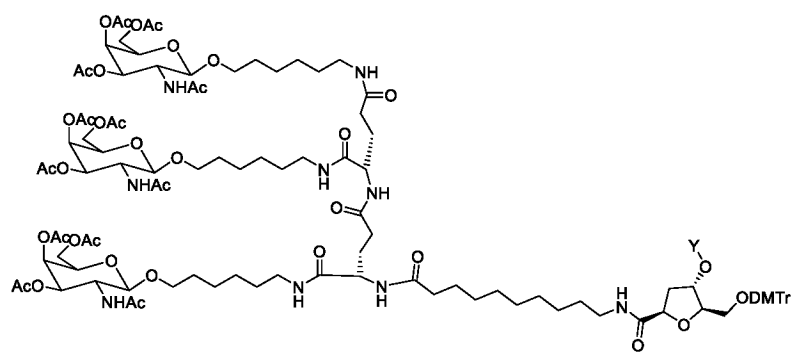
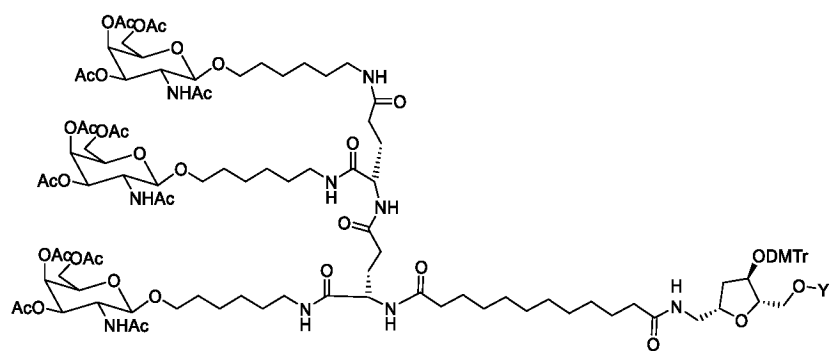


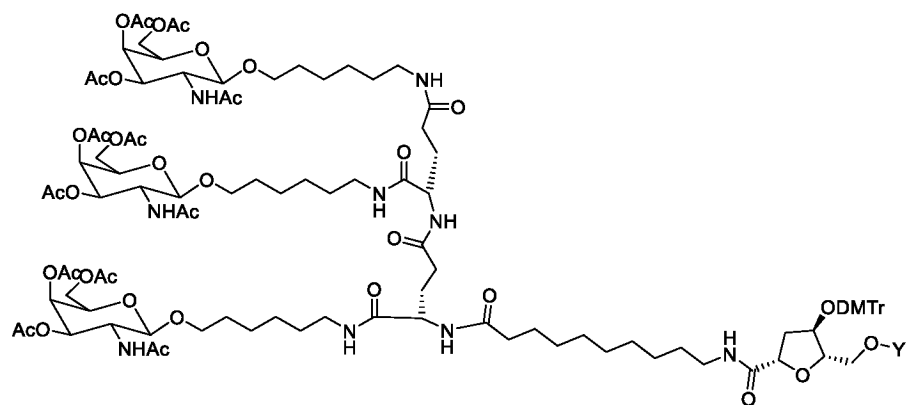
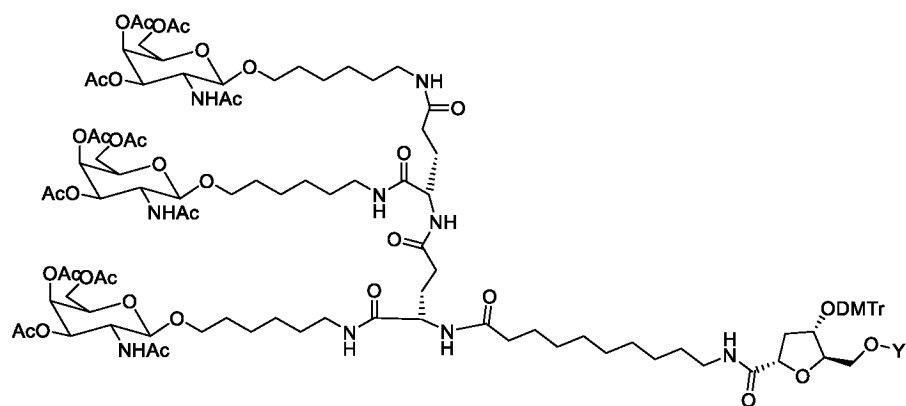
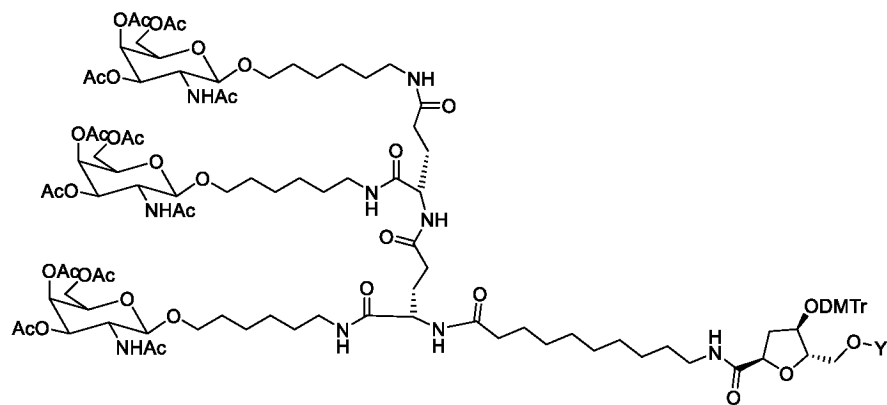
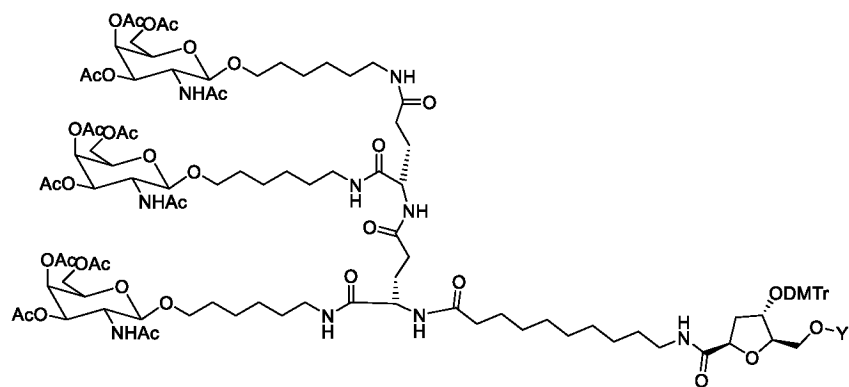


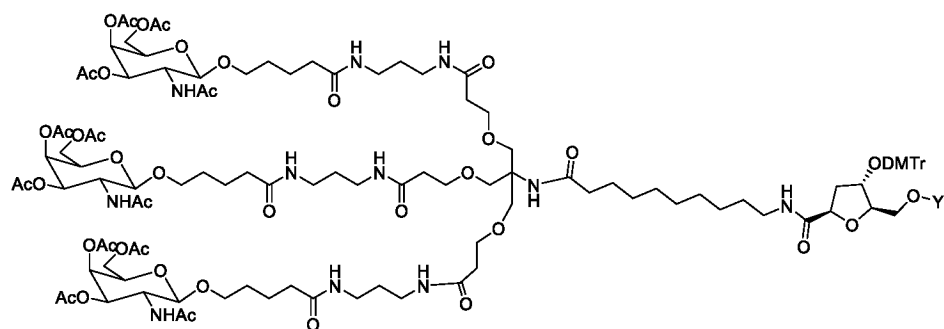
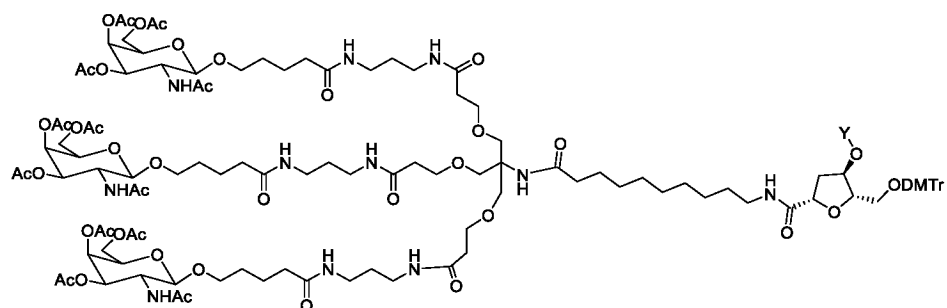
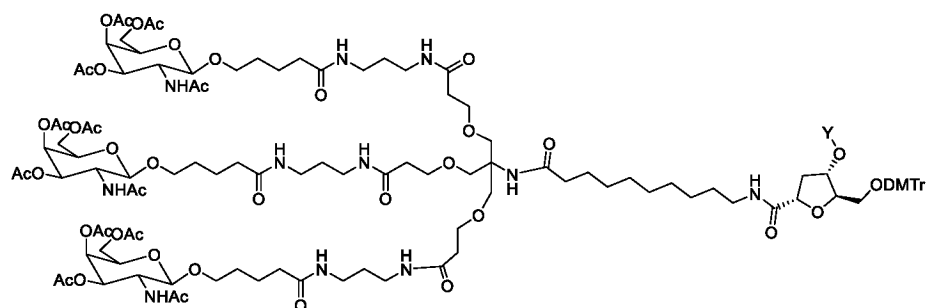
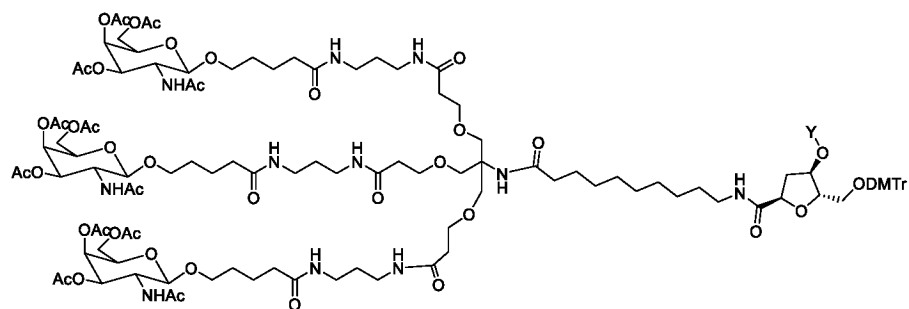
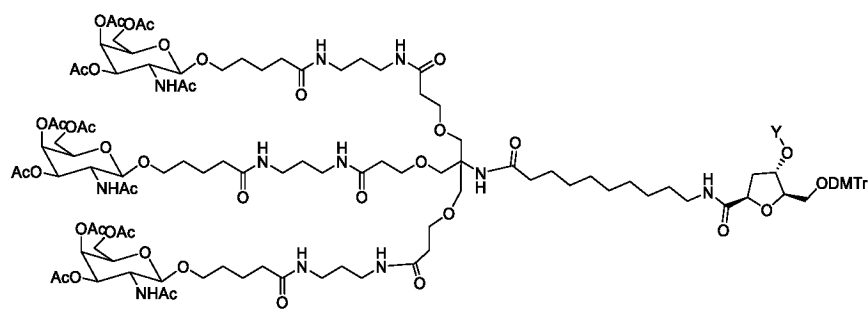


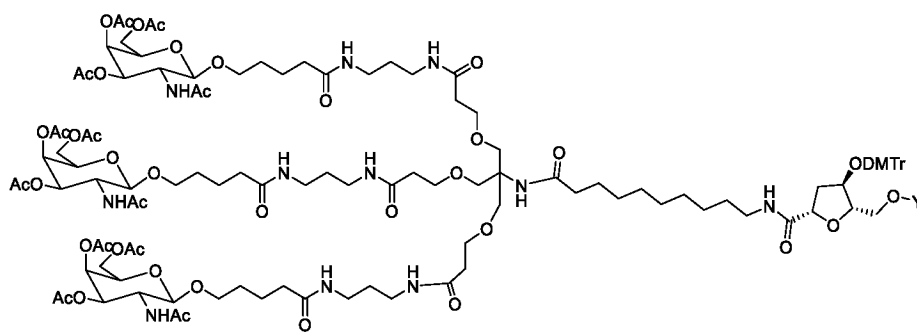
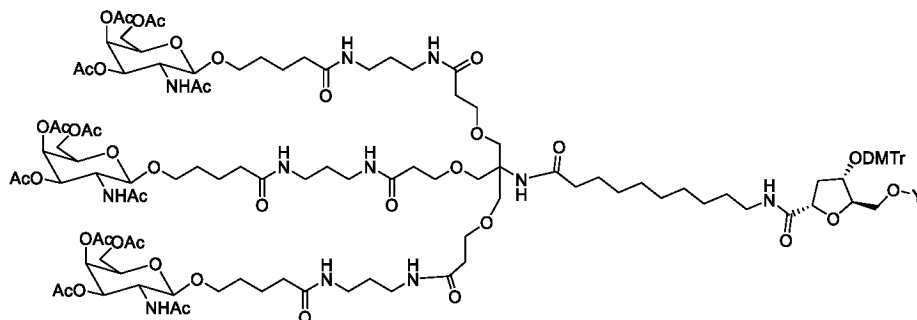
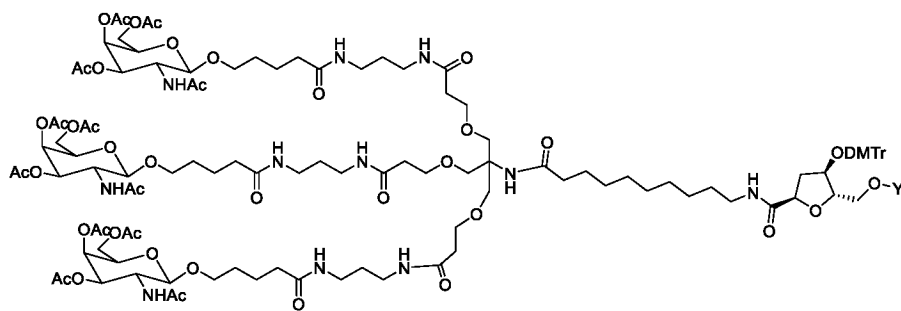






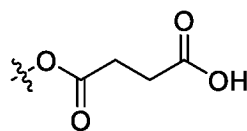




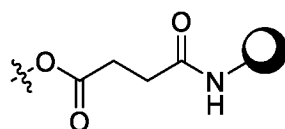



ИЛИ

где Y представляет собой водород или



или, Y представляет собой



, где  представляет собой смолу,

предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотетильную смолу.

В некоторых вариантах реализации изобретения группа триацетата N-ацетил-галактозамина в соединении, описанном выше, может быть заменен триацетатом N-трифторацетилгалактозамина, триацетатом N-пропионилгалактозамина, триацетатом N-n-бутирилгалактозамина или триацетатом N-изобутирилгалактозамина.

В настоящем изобретении предложен конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, содержащий нуклеиновую кислоту и один или более лигандов, описанных выше, где лиганды конъюгированы с концом нуклеиновой кислоты, и лиганды идентичны или различны.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота и лиганды могут быть связаны сложными фосфоэфирными группами, тиофосфатными группами или группами фосфоновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота может включать, но не ограничивается ими: олигонуклеотиды, одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микроРНК, короткие шпилечные РНК (кшРНК), рибозимы, интерферирующие молекулы РНК и субстраты фермента Дайсера.

В некоторых вариантах реализации 3'-конец нуклеиновой кислоты может быть конъюгирован с лигандом.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота может представлять собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах реализации одноцепочечная нуклеиновая кислота может представлять собой смысловую цепь миРНК.

В некоторых вариантах реализации одноцепочечная нуклеиновая кислота может представлять собой антисмысловую цепь миРНК.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Двухцепочечная нуклеиновая кислота может содержать по меньшей мере одну дуплексную область, в которой первая цепь нуклеиновой кислоты по меньшей мере частично комплементарна второй цепи нуклеиновой кислоты, где:

(1) ни один из концов первой цепи нуклеиновой кислоты не конъюгирован с лигандом; и 5'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгирован с лигандом, и 3'-конец не конъюгирован с лигандом; или 3'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгирован с лигандом, и 5'-конец не конъюгирован с лигандом; или как 3'-конец, так и 5'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами;

(2) ни один из концов второй цепи нуклеиновой кислоты не конъюгирован с лигандом; и 5'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты конъюгирован с лигандом, и 3'-конец не конъюгирован с лигандом; или 3'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты конъюгирован с лигандом, и 5'-конец не конъюгирован с лигандом; или как 3'-конец, так и 5'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами;

(3) оба 5'-конца первой цепи нуклеиновой кислоты и второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами, и ни один из 3'-концов не конъюгирован с лигандом; или оба 3'-конца первой цепи нуклеиновой кислоты и второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами, и ни один из 5'-концов не конъюгирован с лигандом; или и 3'-

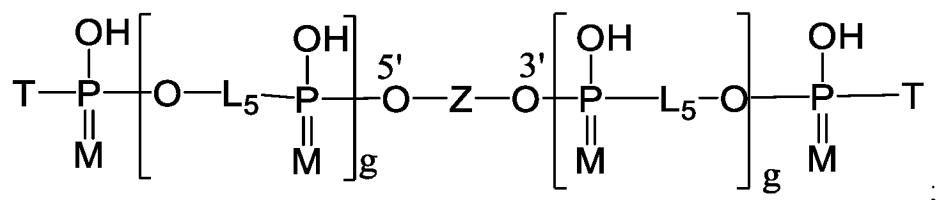
концы, и 5'-концы первой цепи нуклеиновой кислоты и второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами; или и 3'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты, и 5'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами, и ни 5'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты, ни 3'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты не конъюгированы с лигандом; или и 5'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты, и 3'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами, и ни 3'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты, ни 5'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты не конъюгирован с лигандом;

(4) и 3'-конец, и 5'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами, и либо 5'-конец, либо 3'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгирован с лигандом; или и 3'-конец, и 5'-конец второй цепи нуклеиновой кислоты конъюгированы с лигандами, и либо 5'-конец, либо 3'-конец первой цепи нуклеиновой кислоты конъюгирован с лигандом.

В некоторых вариантах реализации двухцепочечная нуклеиновая кислота может представлять собой миРНК.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота может содержать один или более модифицированных нуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда может представлять собой следующую структуру или ее фармацевтически приемлемую соль:



где Т представляет собой лиганд, описанный выше, и каждый Т является идентичным или различным;

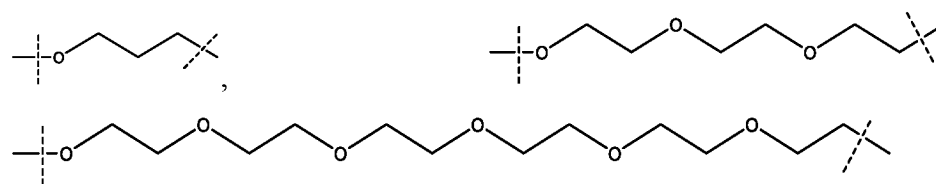
L₅ независимо представляет собой C₁-C₃₀ алкильную цепь или C₁-C₃₀ алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или C=O;

М независимо представляет собой O или S;

g независимо представляет собой целое число 0-4;

—^{5'}O—Z—^{3'}O— представляет собой нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах реализации изобретения L₅ может представлять собой



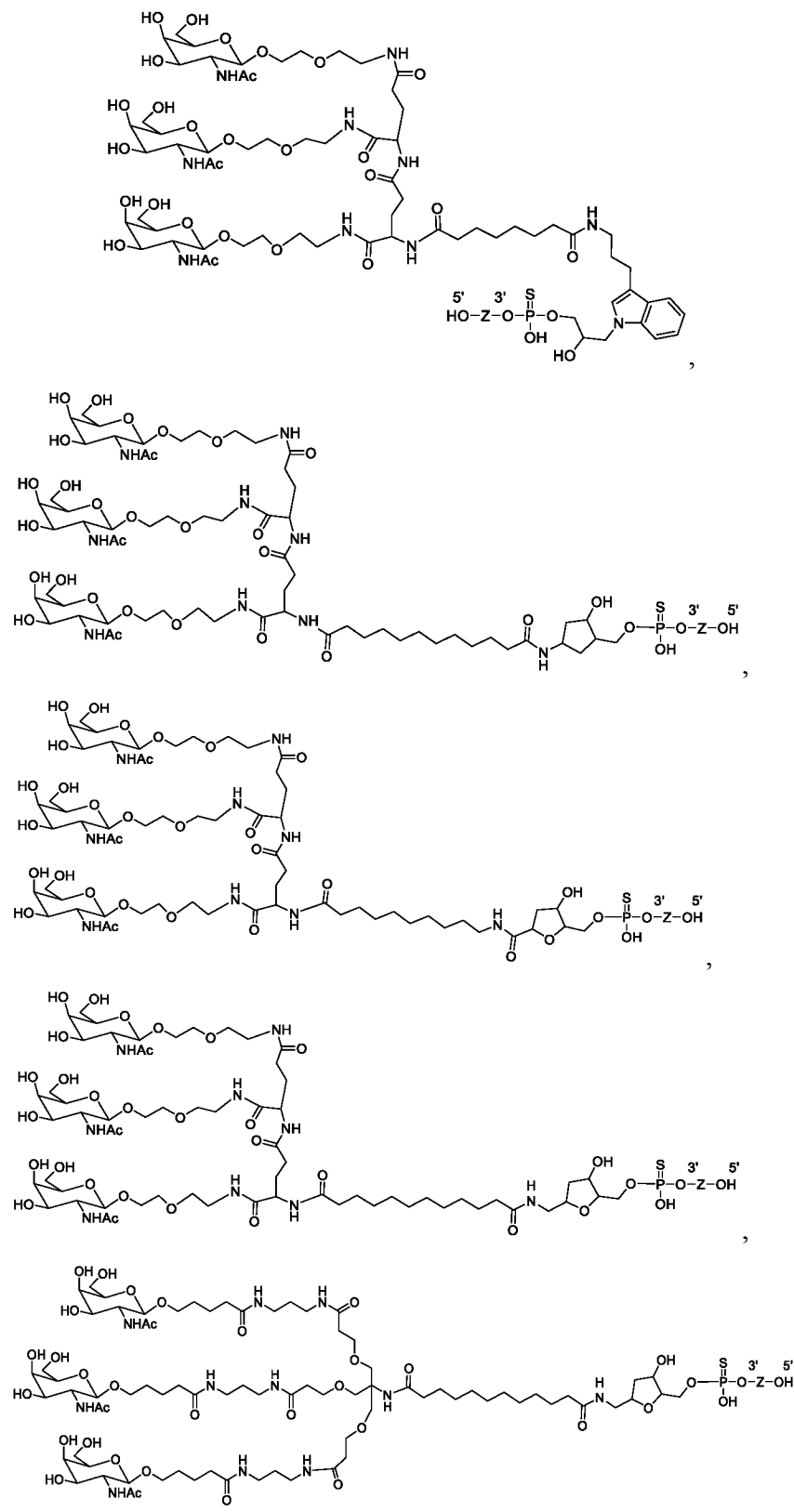
или

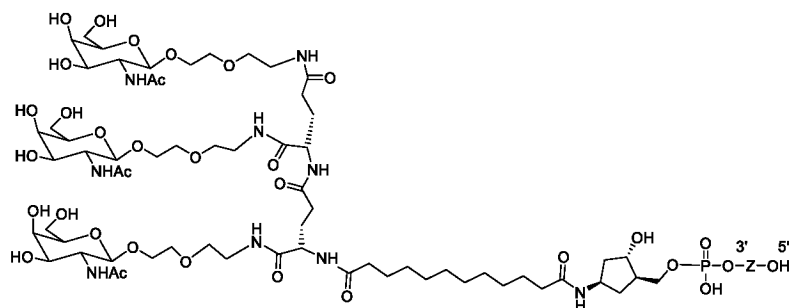
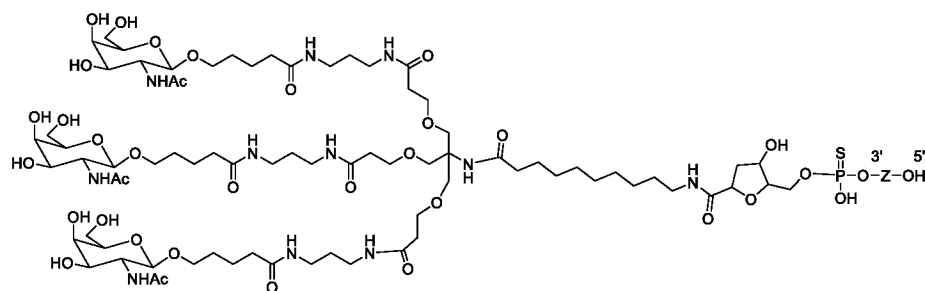
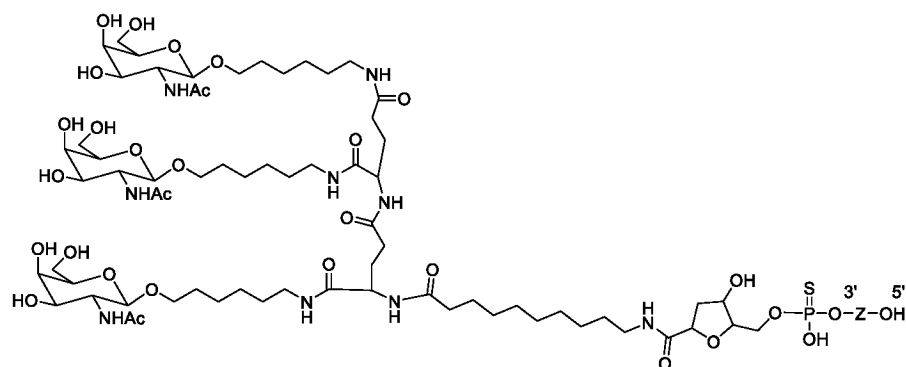
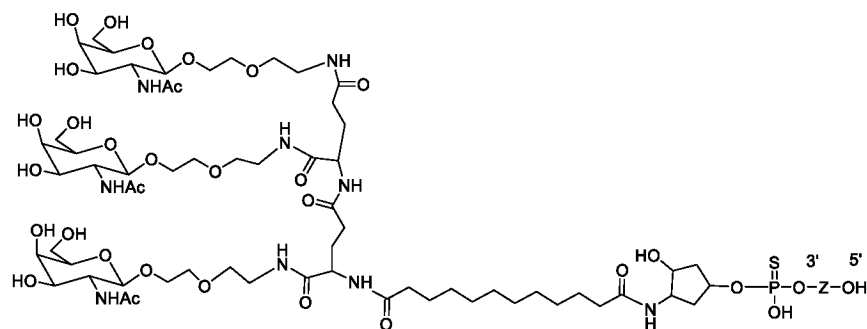
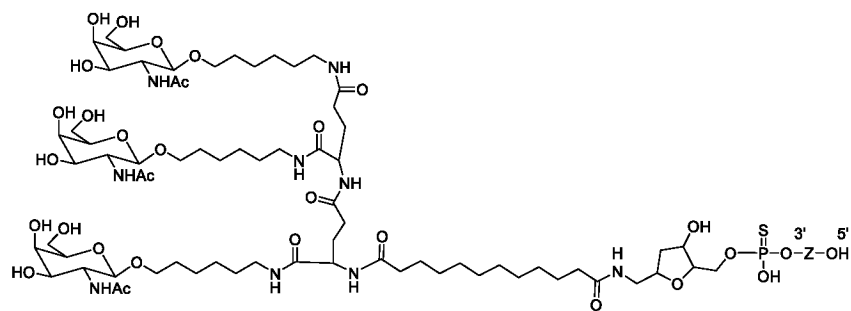
В некоторых вариантах реализации g может быть равно 0 или 1.

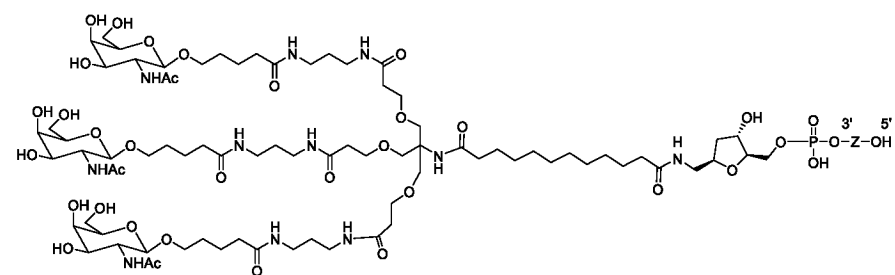
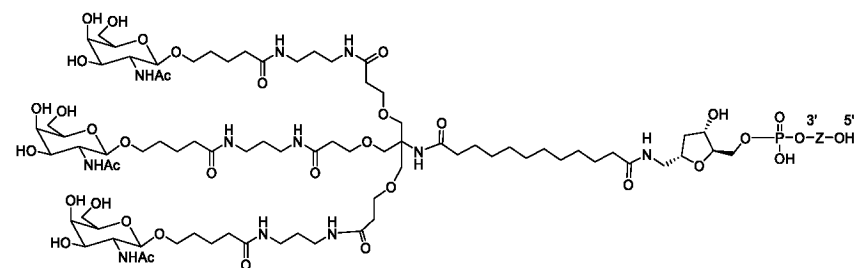
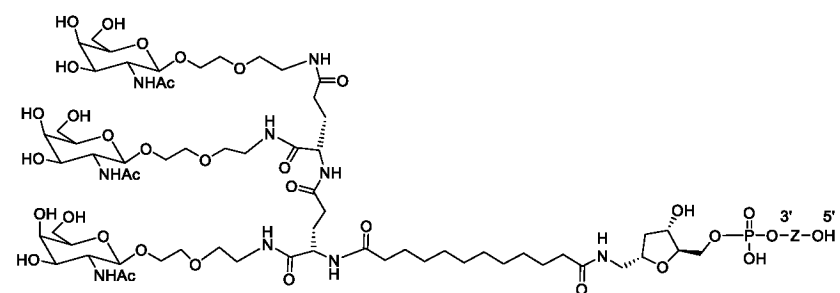
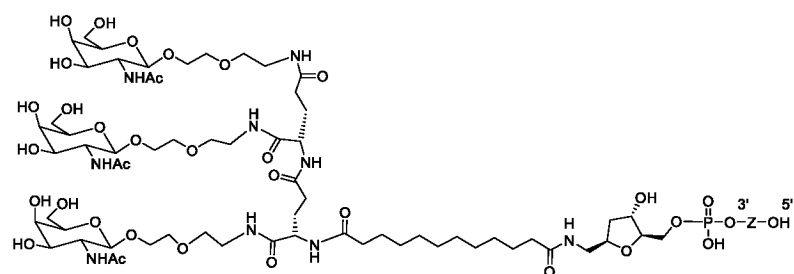
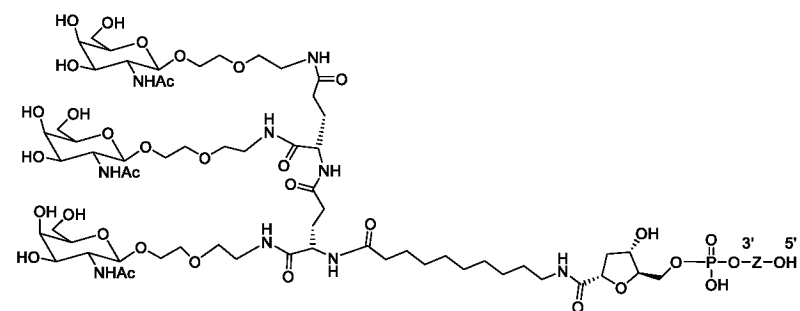
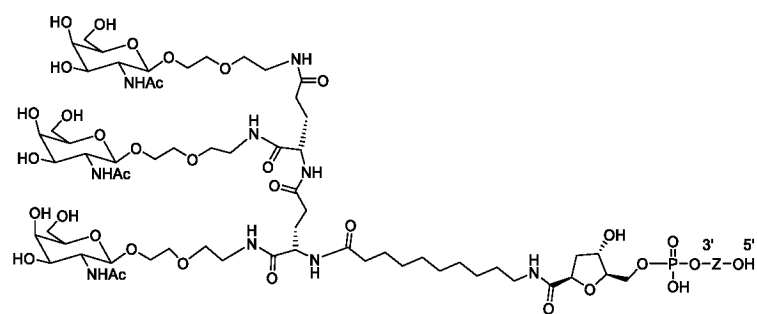
В некоторых вариантах реализации g может быть равно 0.

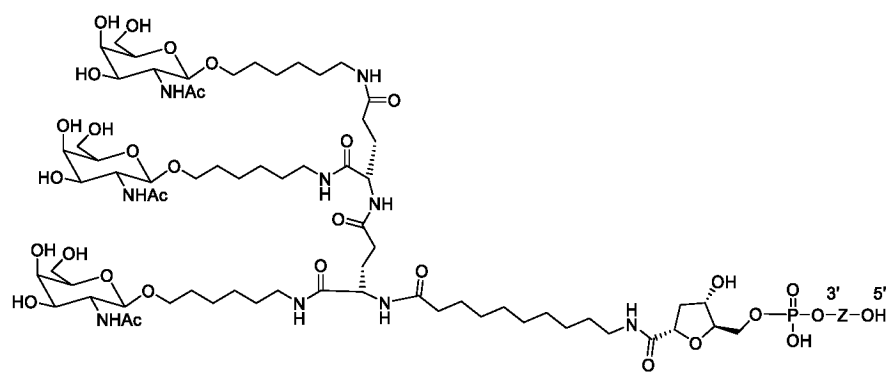
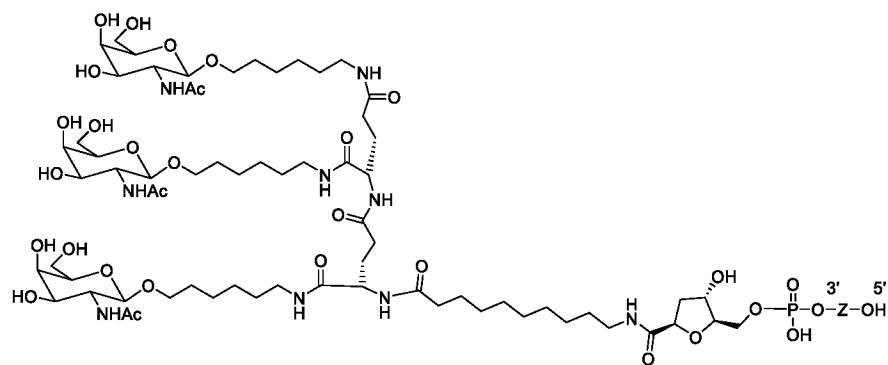
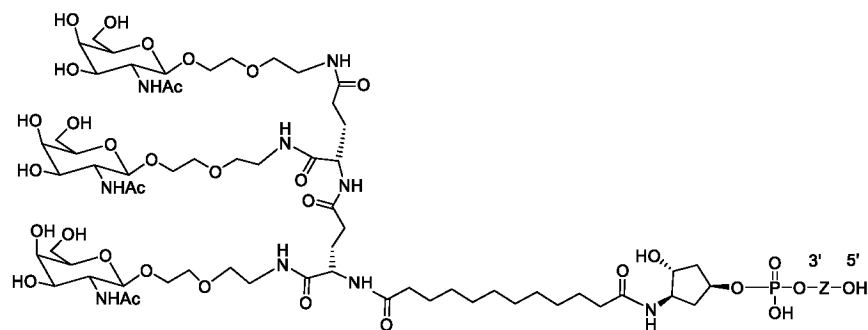
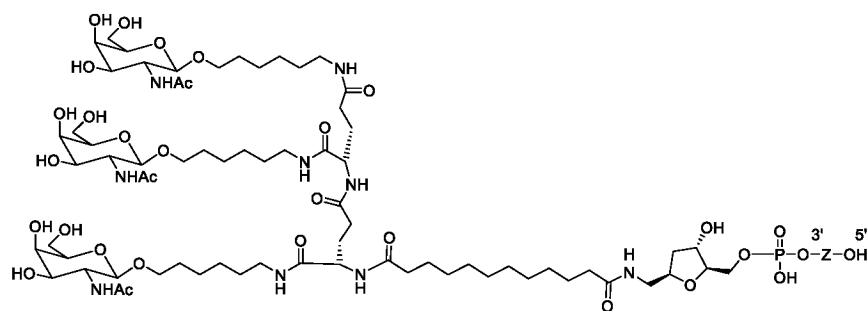
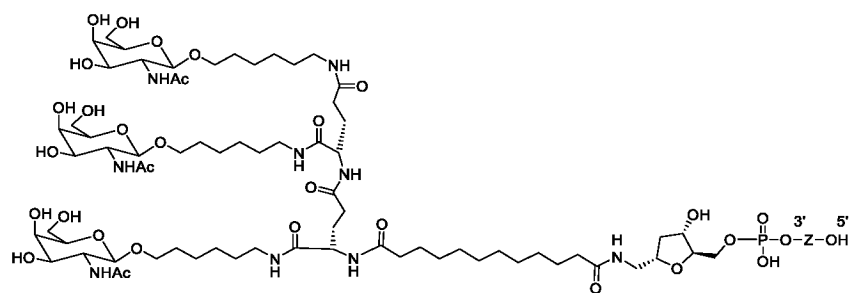
В некоторых вариантах реализации M может представлять собой S .

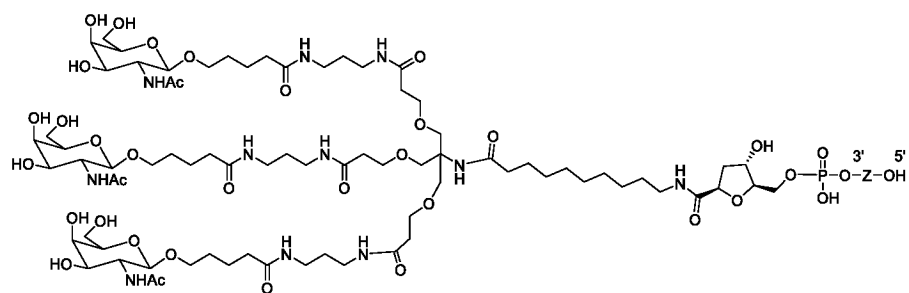
В некоторых вариантах реализации конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда может представлять собой любую из следующих структур или их фармацевтически приемлемую соль:



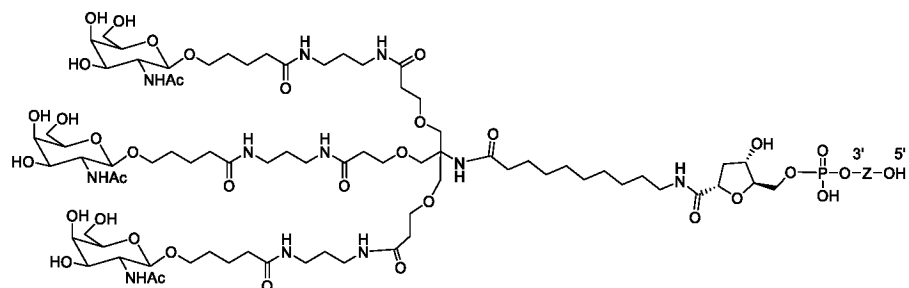




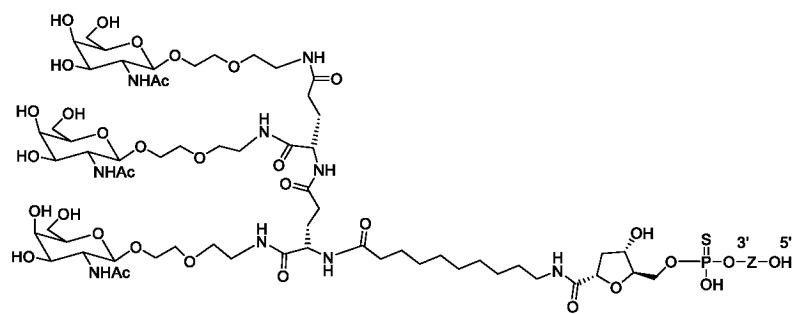
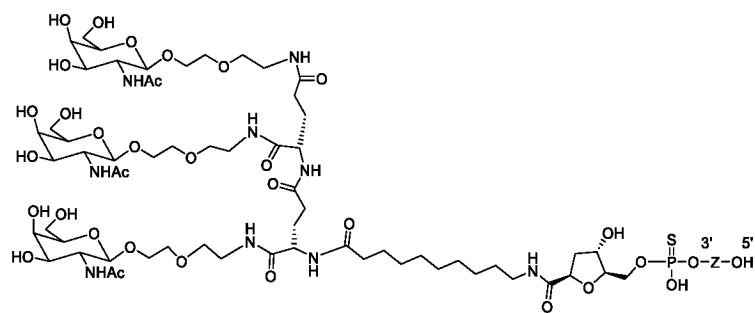
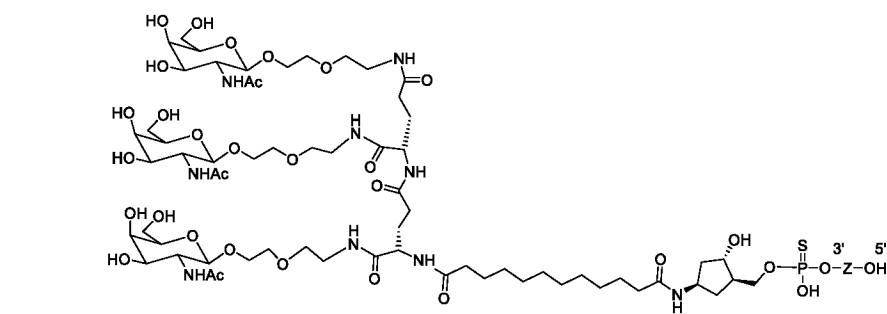


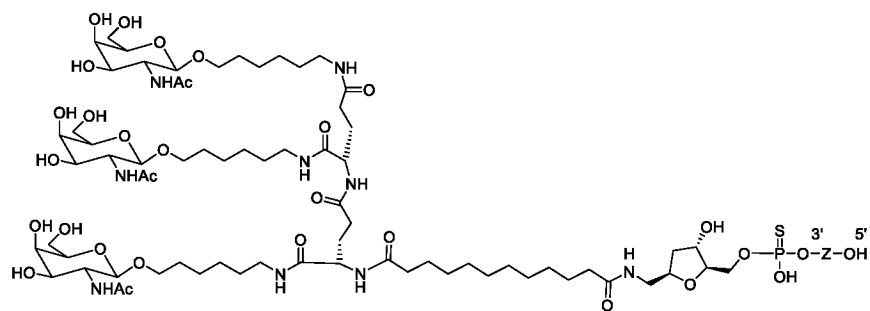
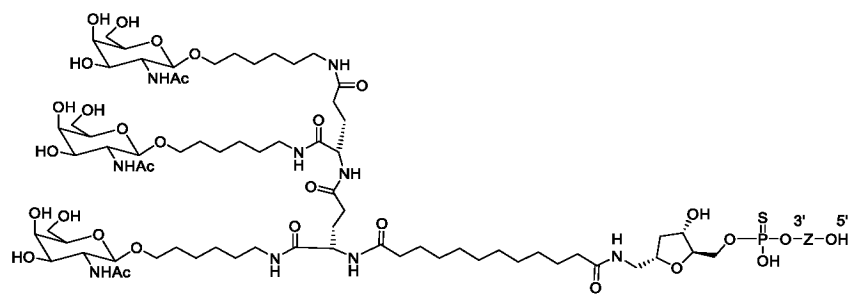
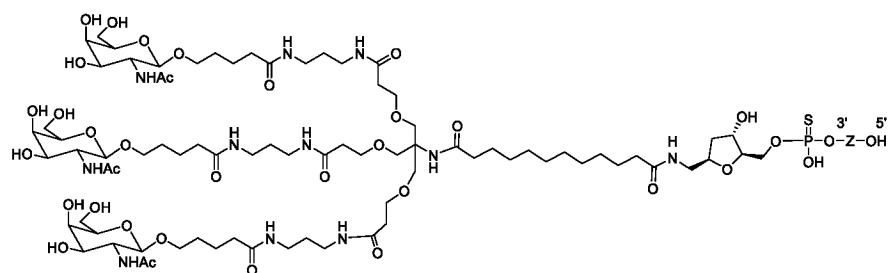
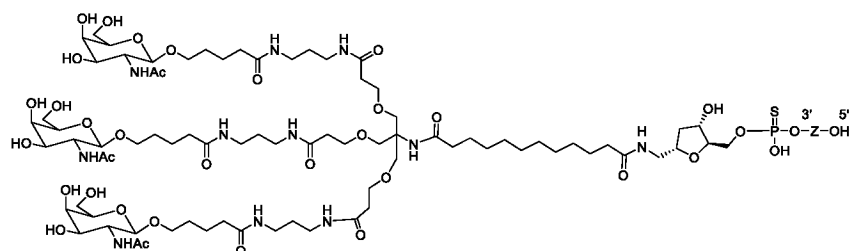
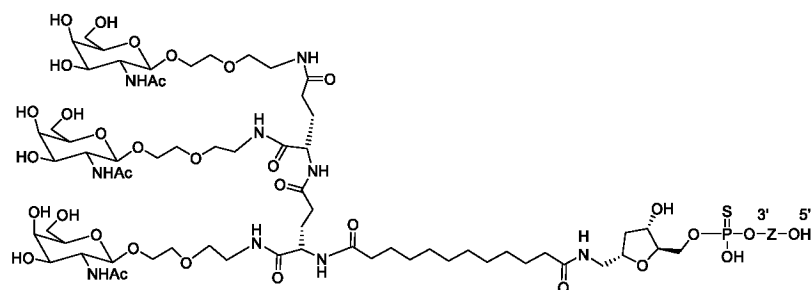
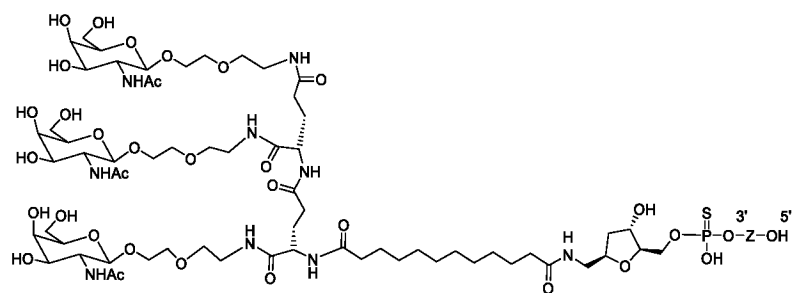


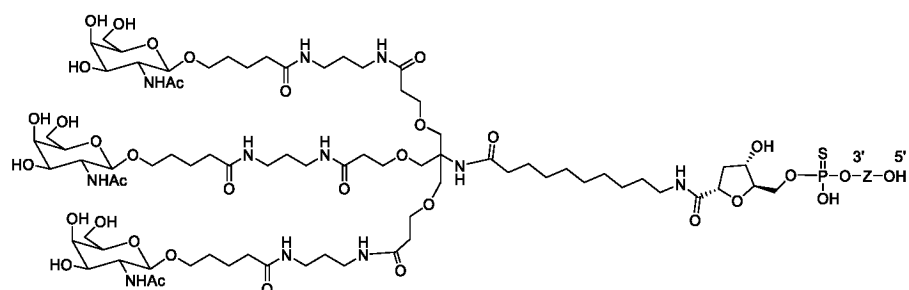
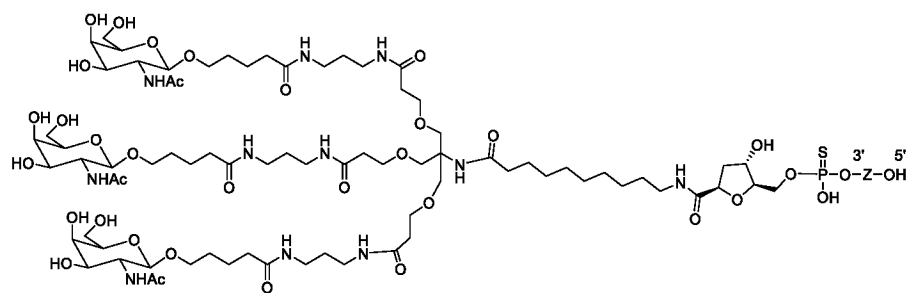
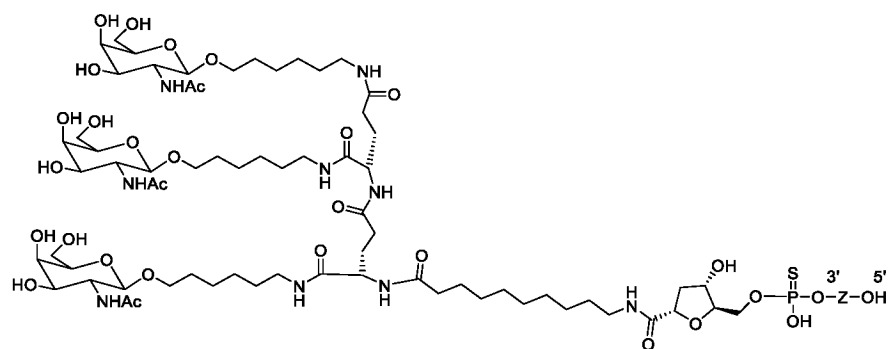
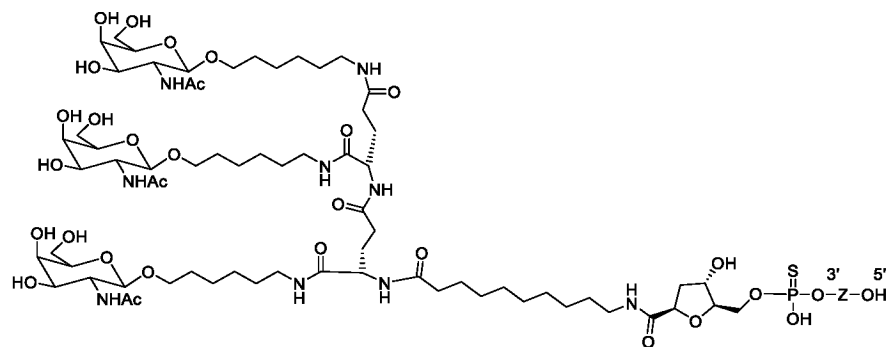
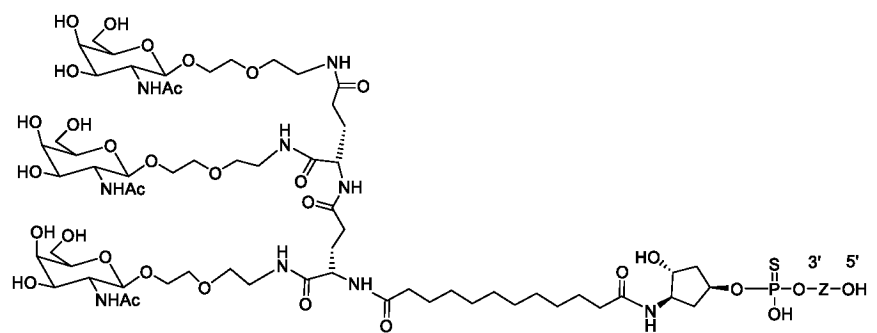
ИЛИ

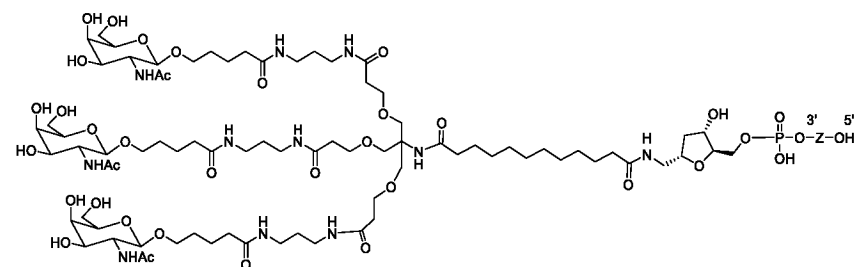
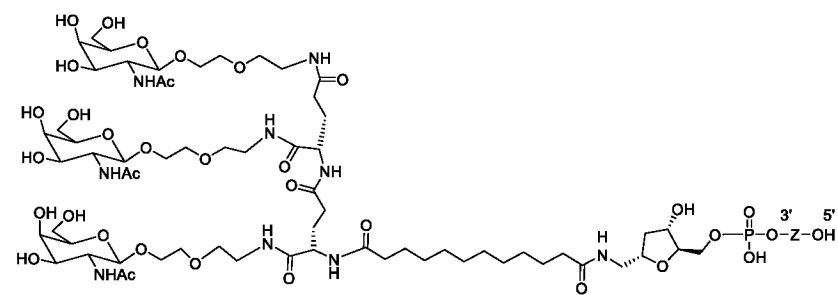
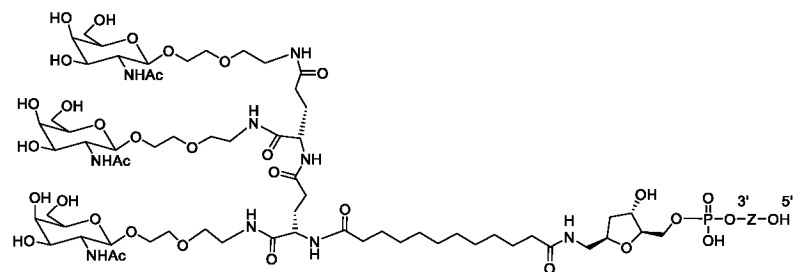
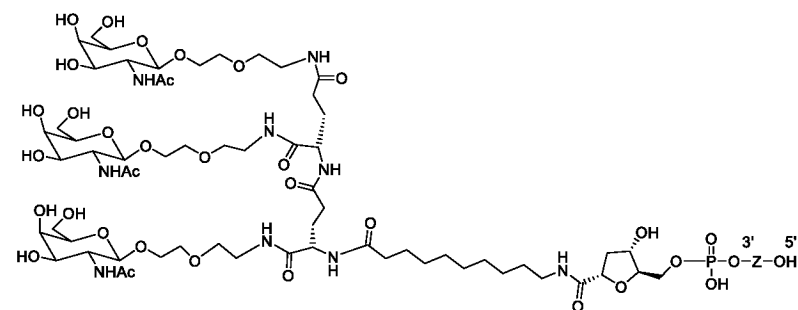
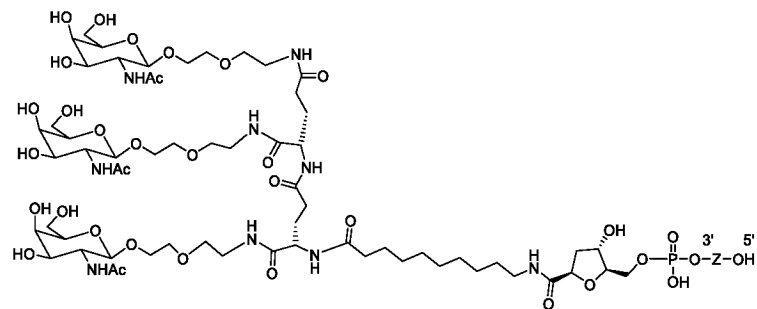
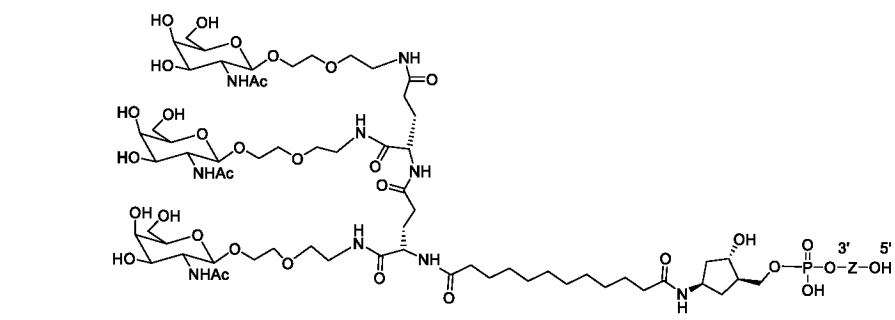


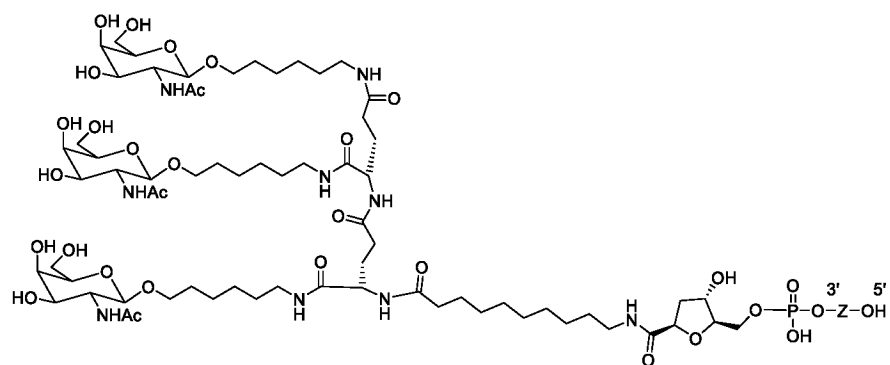
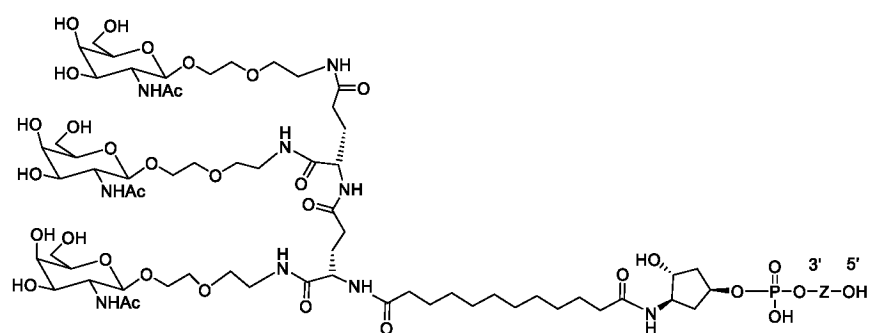
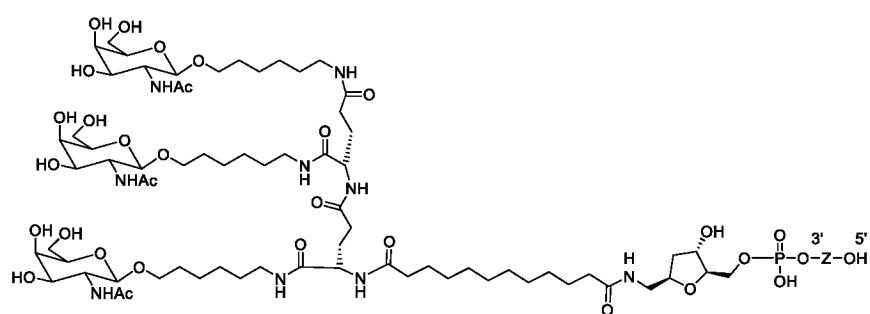
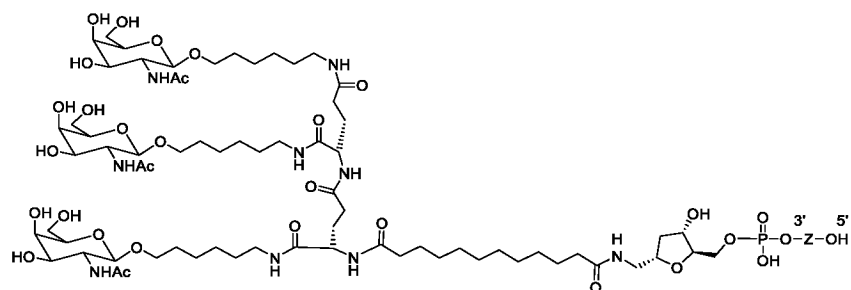
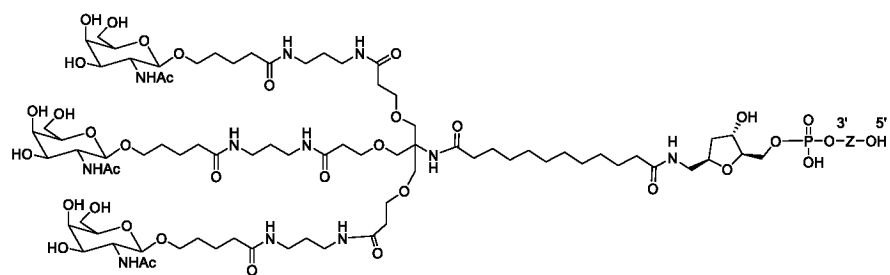
В некоторых вариантах реализации конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда может представлять собой любую из следующих структур или их фармацевтически приемлемую соль:

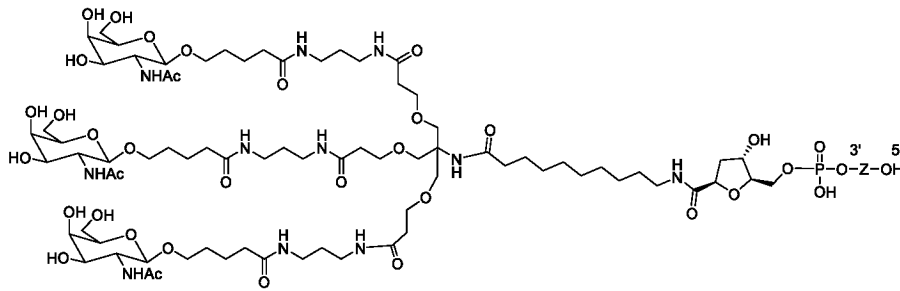
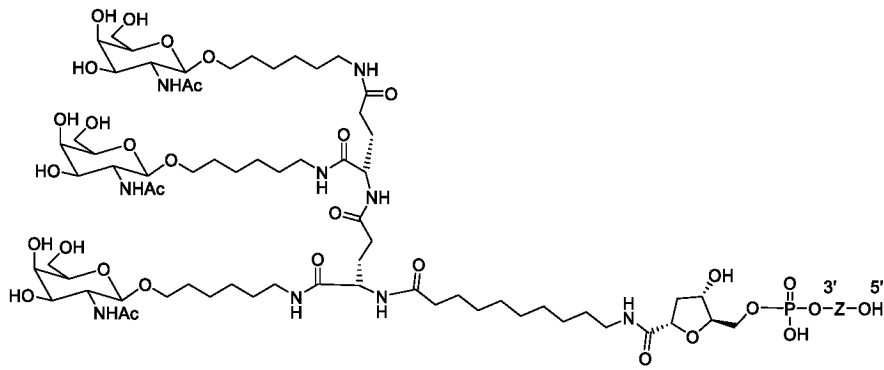




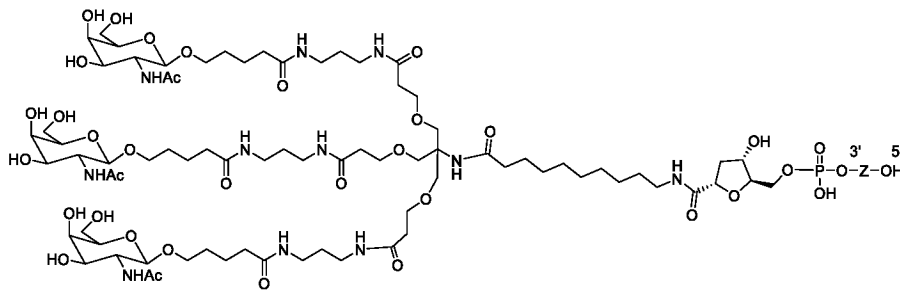








ИЛИ



В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемая соль может представлять собой обычную соль в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими: соли натрия, соли калия, соли аммония, соли аминов и т. д.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к агенту РНКи, содержащему описанный выше конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда.

В некоторых вариантах реализации агент РНКи может включать, но не ограничивается ими: одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микроРНК, короткие шпилечные РНК (кшРНК) и субстраты Dicer.

В некоторых вариантах реализации агент РНКи может представлять собой миРНК.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, описанный выше, или агент РНКи, описанный выше, и одно или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтически приемлемые эксципиенты могут представлять собой, например, переносчики, носители, разбавители и/или полимеры для доставки.

В некоторых вариантах реализации конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда или

агент РНКи может присутствовать в терапевтически эффективном количестве.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная доза композиции может составлять 0,001-1000 мг.

В некоторых вариантах реализации конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда или агент РНКи может присутствовать в количестве 0,01-99,99%, или 0,1-99,9%, или 0,5-99,5%, предпочтительно 1-99% и более предпочтительно 2-98% в расчете на общую массу композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтически приемлемые эсципиенты могут присутствовать в количестве 0,01-99,99%, или 0,1-99,9%, или 0,5-99,5%, предпочтительно 1-99% и более предпочтительно 2-98% в расчете на общую массу композиции.

В некоторых вариантах реализации, когда конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция, раскрытые в настоящем описании, находится в контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда или агент РНКи, описанные выше, ингибируют экспрессию целевого гена, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, как измерено, например, с помощью скрининга активности psiCHECK и анализа репортерных генов люциферазы, других способов, таких как PCR (полимеразная цепная реакция) или способы на основе разветвленной ДНК (рДНК), или способы на основе белков, такие как иммунофлуоресцентный анализ, например, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В некоторых вариантах реализации конъюгат, или агент РНКи, или фармацевтическая композиция, описанные выше, при контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, приводит к остаточной экспрессии мРНК целевого гена в процентах не более 99%, не более 95%, не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 75%, не более 70%, не более 65%, не более 60%, не более 55%, не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30%, не более 25%, не более 20%, не более 15% или не более 10%, как измерено, например, с помощью скрининга активности psiCHECK и анализа репортерного гена люциферазы, других способов, таких как способы, основанные на PCR или способы

на основе разветвленной ДНК (рДНК), или способы на основе белков, такие как иммунофлуоресцентный анализ, например, вестерн-блоттинг или проточная цитометрия.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда, описанного выше, или агента РНКи, описанного выше, или композиции, описанной выше, для получения лекарственного средства для лечения заболевания у пациента. Заболевание предпочтительно представляет собой гепатогенное заболевание.

Настоящее изобретение относится к конъюгату нуклеиновой кислоты и лиганда, или агенту, или композиции РНКи для лечения заболевания у пациента, где конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция являются такими, как описано выше. Заболевание предпочтительно представляет собой гепатогенное заболевание.

Настоящее изобретение относится к конъюгату нуклеиновой кислоты и лиганда или агенту или композиции РНКи для ингибирования экспрессии мРНК у пациента, где конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция являются такими, как описано выше.

Настоящее изобретение относится к лиганду, конъюгату нуклеиновой кислоты и лиганда или, агенту РНКи, или композиции для доставки *in vivo* олигомерного соединения, ингибирующего экспрессию, в печень, где лиганд, конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция являются такими, как описано выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у пациента, включающему введение пациенту конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда, или агента РНКи, или композиции, описанных выше. Заболевание предпочтительно представляет собой гепатогенное заболевание. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция может присутствовать в терапевтически эффективном количестве.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования экспрессии мРНК у пациента, включающему введение пациенту конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда, или агента РНКи, или композиции, описанных выше. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция может присутствовать в терапевтически эффективном количестве.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу доставки *in vivo* ингибирующего экспрессию олигомерного соединения в печень, включающему введение пациенту конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда, или агента РНКи, или композиции,

описанных выше. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция может присутствовать в терапевтически эффективном количестве.

Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция, и способы, описанные в настоящем документе, могут снижать уровень целевой мРНК в клетке, группе клеток, ткани или субъекте, включая: введение субъекту терапевтически эффективного количества олигомера, ингибирующего экспрессию, описанного в настоящем документе. Олигомер, ингибирующий экспрессию, связан с нацеливающим лигандом, тем самым ингибируя экспрессию целевой мРНК у субъекта. Лиганд является таким, как описано выше.

В некоторых вариантах реализации субъект ранее был идентифицирован как имеющий патогенную активацию целевого гена в целевой клетке или целевой ткани.

Пациент, описанный в настоящем описании, относится к субъекту, имеющему заболевание или патологическое состояние, которое выиграло бы от снижения или ингибирования экспрессии целевой мРНК.

Доставка может осуществляться путем местного введения (например, прямой инъекцией или имплантацией) или системного введения, или пероральным, ректальным или парентеральным путем. Парентеральные пути включают, но не ограничиваются ими, подкожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, трансдермальное введение, ингаляционное введение (например, аэрозоль), введение через слизистую оболочку (например, сублингвальное или интраназальное введение), внутричерепное введение и т. д.

В некоторых вариантах реализации конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция, предложенные в настоящем изобретении, могут быть введены путем инъекции, например, внутривенной, внутримышечной, внутрикожной, подкожной, внутридуральной или внутрибрюшинной инъекции.

В некоторых вариантах реализации конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, или агент РНКи, или композиция, предложенные в настоящем изобретении, могут быть упакованы в набор.

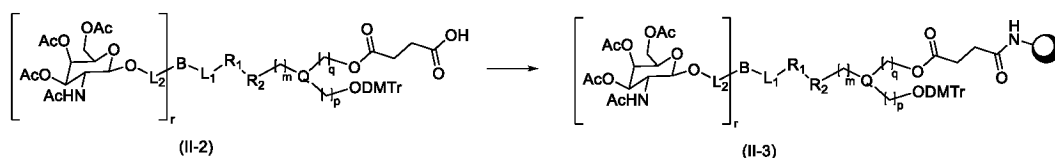
В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение дополнительно относится к клетке, содержащей конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда или агент РНКи, описанные выше.

Настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда, включающему следующие стадии: взятие соединения, представленного формулой (II-3) или формулой (II'-3), описанных выше, в качестве исходного и присоединение нуклеозидных мономеров один за другим в направлении 3'-5' в порядке

расположения нуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации каждый раз при присоединении мономера включены четыре реакции - снятие защиты, связывание, кэпирование и окисление или сульфуризация; после присоединения последнего мономера последовательность нуклеиновой кислоты, присоединенную к твердофазной подложке, расщепляли, снимали защиту, очищали, обессоливали и затем лиофилизировали с получением конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда.

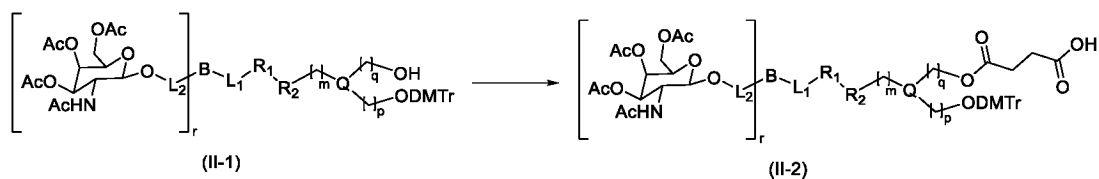
В настоящем изобретении предложен способ получения соединения, представленного формулой (II-3), описанного выше, включающий следующую стадию: конъюгирование соединения, представленного формулой (II-2), описанного выше, с макромолекулярным соединением с получением соединения, представленного формулой (II-3),



где L_1 , R_1 , R_2 , Q , B , L_2 , m , p , q , r и  являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах реализации условия и процедуры для конъюгации могут быть обычными в данной области техники.

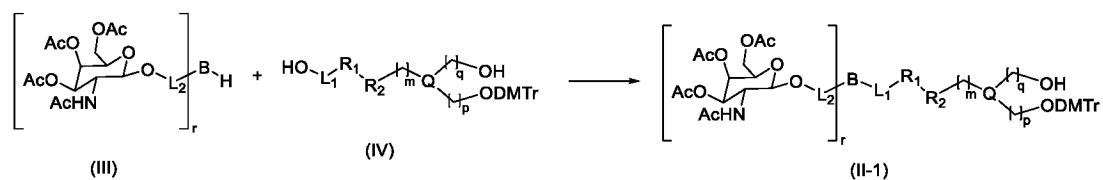
В некоторых вариантах реализации соединение, представленное формулой (II-2), может быть получено на следующей стадии: подвержение соединения, представленного формулой (II-1), описанной выше, следующей реакции с янтарным ангидридом в растворителе под действием щелочи с получением соединения, представленного формулой (II-2);



L_1 , R_1 , R_2 , Q , B , L_2 , m , p , q и r являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах реализации условия и процедуры для реакции могут быть обычными в данной области техники для таких реакций.

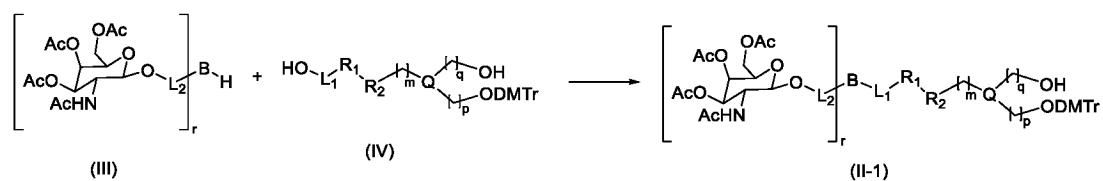
В некоторых вариантах реализации соединение, представленное формулой (II-1), может быть получено путем следующей стадии: подвержение соединения, представленного формулой (III), следующей реакции с соединением, представленным формулой (IV), с получением соединения, представленного формулой (II-1);



L_1 , R_1 , R_2 , Q , B , L_2 , m , p , q и $г$ являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах реализации условия и процедуры для реакции могут быть обычными в данной области техники для таких реакций.

В настоящем изобретении предложен способ получения соединения, представленного формулой (II-1), включающий следующую стадию: подвергание соединения, представленного формулой (III), следующей реакции с соединением, представленным формулой (IV), с получением соединения, представленного формулой (II-1);



L_1 , R_1 , R_2 , Q , B , L_2 , m , p , q и $г$ являются такими, как определено выше.

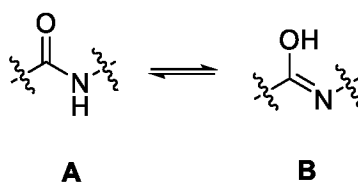
В некоторых вариантах реализации условия и процедуры для реакции могут быть обычными в данной области техники для таких реакций.

Определение терминов

В другом аспекте, где настоящее изобретение не определяет конкретную конфигурацию, соединения по настоящему изобретению могут существовать в конкретных геометрических или стереоизомерных формах. Настоящее изобретение рассматривает все такие соединения, включая цис- и транс-изомеры, (-)- и (+)-энантиомеры, (R)- и (S)-энантиомеры, диастереомеры, (D)-изомер, (L)-изомер и рацемические смеси и другие их смеси, такие как энантиомерно или диастереомерно обогащенные смеси, все из которых находятся в пределах объема настоящего изобретения. Дополнительные асимметричные атомы углерода могут присутствовать в заместителях, таких как алкильная группа. Все такие изомеры и их смеси включены в объем настоящего изобретения.

Соединения и промежуточные соединения по настоящему изобретению также могут существовать в различных таутомерных формах, и все такие формы включены в объем настоящего изобретения. Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам с различными энергиями, которые могут взаимно конвертироваться через низкий энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как таутомеры переноса протонов) включают взаимную конверсию посредством миграции

протонов, такую как кето-енол и имин-энамин, изомеризацию лактам-лактима. Пример лактамно-лактимного равновесия присутствует между А и В, как показано ниже.



Все соединения в настоящем изобретении могут быть изображены как форма А или форма В. Все таутомерные формы находятся в пределах объема настоящего изобретения. Номенклатура соединений не исключает каких-либо таутомеров.

Соединения по настоящему изобретению могут быть асимметричными; например, соединения имеют один или более стереоизомеров. Если не указано иное, все стереоизомеры включают, например, энантиомеры и диастереомеры. Соединения по настоящему изобретению, содержащие асимметричные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активной чистой форме или в рацемической форме. Оптически активная чистая форма может быть выделена из рацемической смеси или синтезирована с использованием хиральных исходных материалов или хиральных реагентов.

Оптически активные (R)- и (S)-энантиомеры и D-и L-изомеры могут быть получены с помощью хирального синтеза, хиральных реагентов или других обычных методов. Если требуется один энантиомер определенного соединения по настоящему изобретению, его можно получить путем асимметричного синтеза или дериватизации с хиральным вспомогательным веществом, при этом полученную смесь диастереомеров разделяли, а вспомогательную группу расщепляли с получением чистого желаемого энантиомера. Альтернативно, когда молекула содержит основную функциональную группу (например, амино) или кислотную функциональную группу (например, карбоксил), соли диастереомеров образуются с соответствующей оптически активной кислотой или основанием с последующим разрешением диастереомеров обычными способами, известными в данной области техники, и чистые энантиомеры получали путем восстановления. Кроме того, разделение энантиомеров и диастереомеров обычно осуществляли с помощью хроматографии с использованием хиральной стационарной фазы, необязательно в комбинации с химической дериватизацией (например, образованием карбамата из аминов).

Настоящее изобретение также включает меченые изотопами соединения, которые идентичны указанным в настоящем документе, но имеют один или более атомов, замещенных атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличающиеся от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Примеры изотопов,

которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, йода и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{123}I , ^{125}I и ^{36}Cl .

Если не указано иное, когда положение конкретно назначено дейтерием (D), положение следует рассматривать как дейтерий с содержанием, которое по меньшей мере в 1000 раз превышает естественное содержание дейтерия (которое составляет 0,015%) (то есть по меньшей мере 10% включения дейтерия). Соединения примеров содержат дейтерий, имеющий содержание, которое превышает естественное содержание по меньшей мере в 1000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 2000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 3000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 4000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 5000 раз, превышает естественное содержание по меньшей мере в 6000 или более раз. Настоящее изобретение дополнительно включает различные дейтерированные формы соединения формулы (I). Каждый доступный атом водорода, соединенный с атомом углерода, может быть независимо замещен атомом дейтерия. Специалисты в данной области техники могут синтезировать дейтерированные формы соединения формулы (I) согласно соответствующей литературе. Коммерчески доступные дейтерированные исходные материалы могут быть использованы для получения дейтерированных форм соединения формулы (I), или они могут быть синтезированы с использованием обычных методов с дейтерированными реагентами, включая, но не ограничиваясь, дейтерированный боран, тридейтерированный боран в тетрагидрофуране, дейтерированный алюмогидрид лития, дейтерированный йодэтан, дейтерированный йодметан и тому подобное.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что событие или обстоятельство, описанное далее, может, но необязательно, иметь место, и что такое описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «C₁₋₆ алкил, необязательно замещенный галогеном или циано» означает, что галоген или циано могут присутствовать, но необязательно, и описание включает случаи, когда алкил замещен галогеном или циано, и случаи, когда алкил не замещен галогеном или циано.

В химической структуре соединения по настоящему изобретению связь « \diagup » представляет собой неопределенную конфигурацию; то есть, если хиральные изомеры существуют в химической структуре, связь « \diagup » может быть « \cdots » или « \diagdown », или включает обе конфигурации « \cdots » и « \diagdown ». Хотя все вышеуказанные структурные формулы представлены в виде специфических изомерных форм для простоты, настоящее изобретение может включать все изомеры, такие как таутомеры, ротамеры, геометрические изомеры, диастереомеры, рацематы и энантиомеры. В химической структуре соединения по

настоящему изобретению связь «//» не указывает конфигурацию, то есть конфигурация для связи «//» может быть конфигурацией E или конфигурацией Z, или включает в себя как конфигурацию E, так и конфигурацию Z.

Термин «композиция» относится к смеси лекарственного средства, содержащего одно или более соединений, описанных в настоящем документе, или их физиологически фармацевтически приемлемых солей или предшественников, и других химических компонентов, а также других компонентов, таких как физиологически фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Композиция предназначена для облегчения введения в организм, что облегчает абсорбцию активного ингредиента, тем самым осуществляя биологическую активность.

Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» включает, но не ограничивается ими, любое вспомогательное вещество, носитель, эксципиент, скользящее вещество, подсластитель, разбавитель, консервант, красящее вещество/краситель, ароматизатор, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующее вещество, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель или эмульгатор, который был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США как приемлемый для применения у людей или животных.

Если не указано иное, «соединение», «лиганд», «конъюгат» и «конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда» согласно настоящему изобретению могут каждый независимо существовать в форме соли, смешанных солей или несолевого формы (например, свободной кислоты или свободного основания). Если они существуют в форме соли или смешанных солей, они могут представлять собой фармацевтически приемлемую соль.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» включает фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты и фармацевтически приемлемые соли присоединения основания.

«Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты» относится к солям, которые способны сохранять биологическую эффективность свободных оснований без каких-либо нежелательных эффектов и которые образуются с неорганическими или органическими кислотами. Соли неорганических кислот включают, но не ограничиваются, гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, нитраты, фосфаты и т.д.; соли органических кислот включают, но не ограничиваются ими, формиаты, ацетаты, 2,2-дихлорацетаты, трифторацетаты, пропионаты, капроаты, каприлаты, капраты, ундеценаты, гликоляты, глюконаты, лактаты, себацинаты, адипаты, глутараты, малонаты, оксалаты, малеаты, сукцинаты, фумараты, тартраты, цитраты, пальмитаты, стеараты, олеаты, циннаматы,

лаураты, малаты, глутаматы, пироглутаматы, аспартаты, бензоаты, мезилаты, бензолсульфонаты, пара-толуолсульфонаты, альгинаты, аскорбаты, салицилаты, 4-аминосалицилаты, нападисилаты, и т.д. Эти соли могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники.

«Фармацевтически приемлемая соль присоединения основания» относится к солям, которые способны сохранять биологическую эффективность свободных кислот без каких-либо нежелательных эффектов и которые образуются с неорганическими основаниями или органическими основаниями. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, но не ограничиваются ими, соли натрия, соли калия, соли лития, соли аммония, соли кальция, соли магния, соли железа, соли цинка, соли меди, соли марганца, соли алюминия и т.д. Предпочтительными неорганическими солями являются соли аммония, соли натрия, соли калия, соли кальция и соли магния; натриевые соли являются предпочтительными. Соли, полученные из органических оснований, включают, но не ограничиваются ими, соли следующих веществ: первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как аммиак, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, диметилэтанолламин, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, пурин, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы и др. Предпочтительные органические основания включают изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин. Эти соли могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники.

Термин «алкил» относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая представляет собой линейную или разветвленную группу, содержащую от 1 до 30 атомов углерода, предпочтительно алкильную группу, содержащую от 1 до 12 атомов углерода, более предпочтительно алкильную группу, содержащую от 1 до 10 атомов углерода, более предпочтительно алкильную группу, содержащую от 1 до 6 атомов углерода, и более предпочтительно алкильную группу, содержащую от 1 до 4 атомов углерода. Неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-

метилпентил, 2,3-диметилбутил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-этилпентил, 3-этилпентил, н-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-этилгексил, 3-этилгексил, 4-этилгексил, 2-метил-2-этилпентил, 2-метил-3-этилпентил, н-нонил, 2-метил-2-этилгексил, 2-метил-3-этилгексил, 2,2-диэтилпентил, н-децил, 3,3-диэтилгексил, 2,2-диэтилгексил и их различные разветвленные изомеры, и т. п. Более предпочтительно представляет собой алкильную группу, которая содержит от 1 до 6 атомов углерода; неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил и т.п. Алкил может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель может быть замещен в любой доступной точке присоединения, и заместитель предпочтительно представляет собой одну или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио, оксо, карбоксильной и карбоксилатной группы.

Термин «алкилен» относится к остатку молекулы алкана после удаления 2 атомов водорода, включая линейные и разветвленные иленовые группы от 1 до 20 атомов углерода. Неограничивающие примеры алкилена, содержащего от 1 до 6 атомов углерода, включают метилен (-CH₂-), этилен (например, -CH₂CH₂- или -CH(CH₃)-), пропилен (например, -CH₂CH₂CH₂- или -CH(CH₂CH₃)-) и бутилен (например, -CH₂CH₂CH₂CH₂-). Если не указано иное, алкилен может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель может быть замещен в любой доступной точке присоединения, предпочтительно в одной или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из дейтерия, арила, гетероарила и галогена.

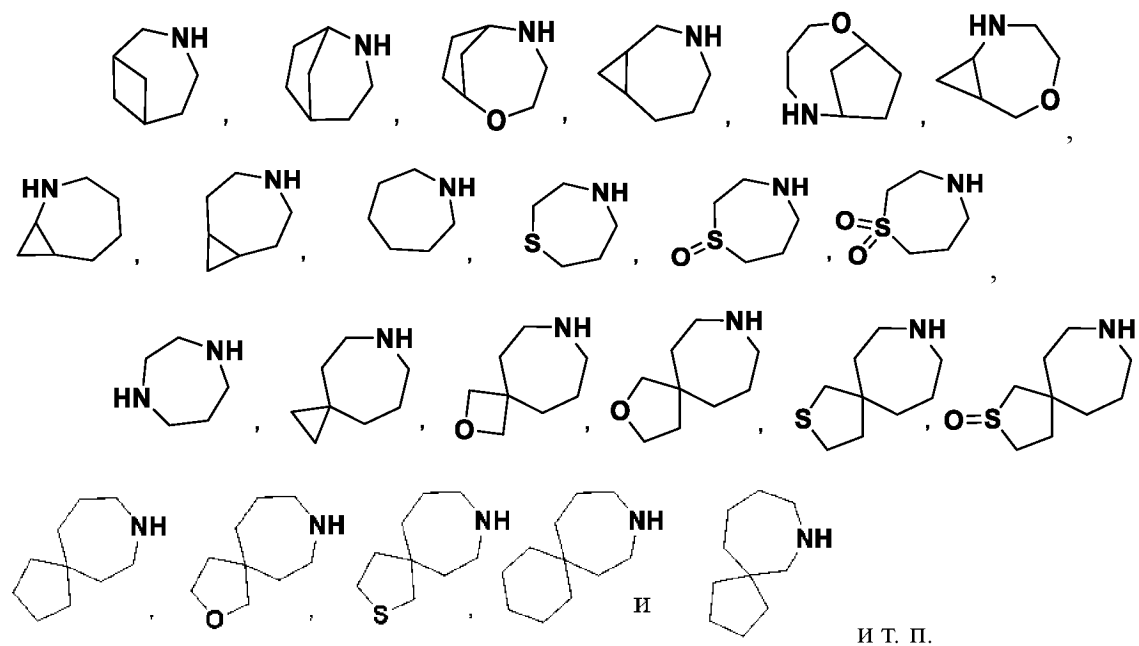
Термин «циклоалкил» или «карбоцикл» относится к насыщенному или частично ненасыщенному, моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю. Циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 3 до 7 атомов углерода. Неограничивающие примеры моноциклического циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексаденил и т. д. Полициклический

циклоалкил включает спироциклоалкил, конденсированный циклоалкил и мостиковый циклоалкил. Циклоалкил может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель может быть замещен в любой доступной точке присоединения, предпочтительно в одной или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксогруппы, нитрогруппы, цианогруппы, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членный арил или гетероарил необязательно замещены одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксогруппы, нитрогруппы и цианогруппы.

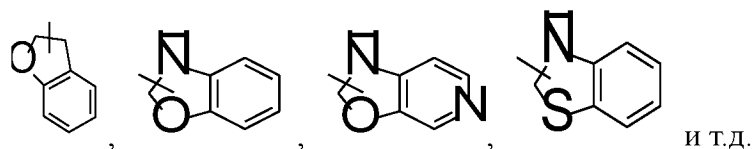
Циклоалкильное кольцо может быть конденсировано с арильным или гетероарильным кольцом, где кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой циклоалкил; неограничивающие примеры включают инданил, тетрагидронафтил, бензоциклогептил и т. д. Циклоалкил может быть необязательно замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксогруппы, нитрогруппы, цианогруппы, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила необязательно замещены одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксогруппы, нитрогруппы и цианогруппы.

Термин «гетероциклоалкил» или «гетероцикл» относится к насыщенному или частично ненасыщенному, моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю, который содержит от 3 до 20 кольцевых атомов, один или более из которых представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и S(O)_m (где m представляет собой целое число от 0 до 2), но не содержит кольцевой фрагмент -O-O-, -O-S- или -S-S-, а другие кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Он предпочтительно содержит от 3 до 12 кольцевых атомов, 1-4 из которых представляют собой гетероатомы; более предпочтительно, он содержит от 3 до 7 кольцевых атомов. Неограничивающие примеры моноциклического гетероциклоалкила включают пирролидинил, имидазолидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидроотиенил, дигидроимидазолил, дигидрофуранил, дигидропиразолил, дигидропирролил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, гомопиперазинил и т. д. Полициклический

гетероциклоалкил включает спирогетероцикл, конденсированный гетероцикл и мостиковый гетероциклоалкил. Неограничивающие примеры «гетероциклоалкила» включают:



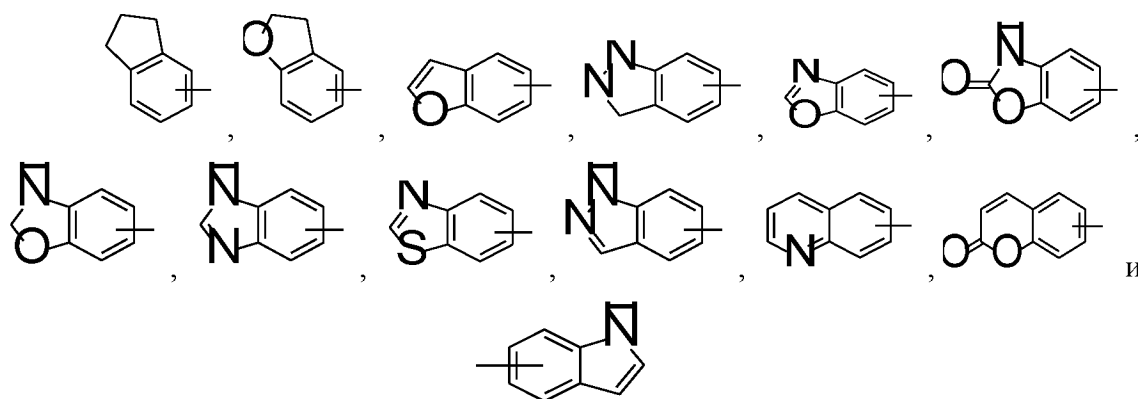
Гетероциклоалкильное кольцо может быть конденсировано с арильным или гетероарильным кольцом, где кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой гетероциклоалкил; неограничивающие примеры включают:



Гетероциклоалкил может быть необязательно замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксогруппы, нитрогруппы, цианогруппы, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила необязательно замещены одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксогруппы, нитрогруппы и цианогруппы.

Термин «арил» относится к 6-14-членной, предпочтительно 6-12-членной полностью углеродной моноциклической или конденсированной полициклической (т.е., кольца, имеющие общую пару соседних атомов углерода) группе, имеющей сопряженную π-электронную систему, такой как фенил и нафтил. Арильное кольцо может быть конденсировано с гетероарильным, гетероциклоалкильным или циклоалкильным кольцом,

где кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой арильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:

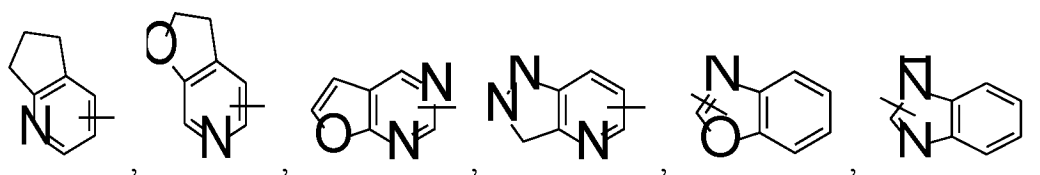


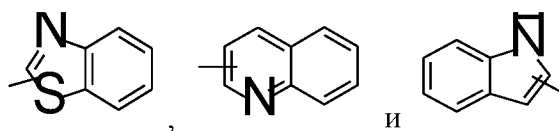
Арил может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро, циано, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила необязательно замещены одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро и циано.

Термин «гетероарил» относится к гетероароматической системе, содержащей от 1 до 4 гетероатомов и от 5 до 14 кольцевых атомов, где гетероатомы выбраны из группы, состоящей из кислорода, серы и азота. Гетероарил предпочтительно является 5-12-членным, и более предпочтительно 5- или 6-членным. Например, его неограничивающие примеры включают: имидазолил, фуранил, тиенил, тиазолил, пиразолил, оксазолил, изоксазолил, пирролил, тетразолил, пиридилил, пиримидинил, триадиазол, пиразинил, триазолил,

индазолил, бензимидазолил, , и тому подобное.

Гетероарильное кольцо может быть конденсировано с арильным, гетероциклическим или циклоалкильным кольцом, где кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой гетероарил; его неограничивающие примеры включают:

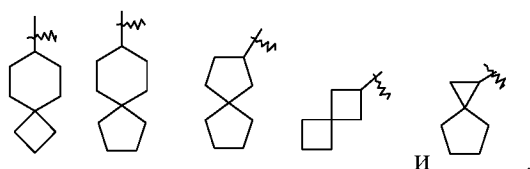




Гетероарил может быть необязательно замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксо-, нитро-, циано-, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси-, C_{2-6} алкенилокси-, C_{2-6} алкинилокси-, C_{3-6} циклоалкокси-, 3-6-членного гетероциклоалкокси-, C_{3-8} циклоалкенилокси- и 5-6-членного арила или гетероарила, где C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси-, C_{2-6} алкенилокси-, C_{2-6} алкинилокси-, C_{3-6} циклоалкокси-, 3-6-членного гетероциклоалкокси-, C_{3-8} циклоалкенилокси- и 5-6-членного арила или гетероарила необязательно замещены одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксигруппы, оксо-, нитро- и циано-.

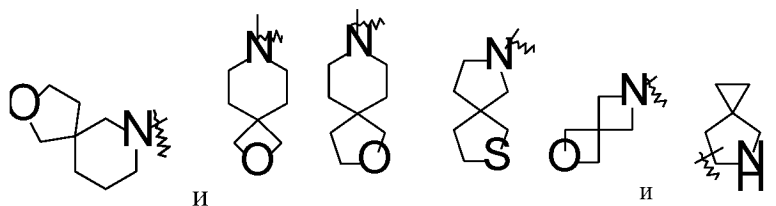
Термин «спиро» относится к соединениям, в которых два кольца имеют один общий атом.

Термин «спироциклоалкил» относится к 5-20-членной полициклической группе, в которой моноциклические кольца имеют один общий атом углерода (называемый спироатомом). Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной π -электронной системы. Он предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с количеством спироатомов, общих между кольцами, спироциклоалкил может представлять собой моноспироциклоалкил, биспироциклоалкил или полиспироциклоалкил. Предпочтительны моноспироциклоалкил и биспироциклоалкил. Более предпочтительным является 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/5-членный или 5-членный/6-членный моноспироциклоалкил. «Спирокарбоцикл» относится к кольцевой системе в спироциклоалкиле. Неограничивающие примеры спироциклоалкила включают:



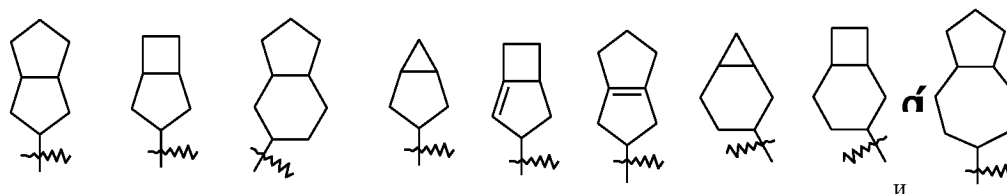
Термин «спирогетероциклил» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклильной группе, в которой моноциклические кольца имеют общий один атом (называемый спироатомом), где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), а остальные кольцевые атомы представляют собой углерод. Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не

имеет полностью сопряженной π -электронной системы. Он предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с количеством спироатомов, общих между кольцами, спирогетероцикл может представлять собой моноспирогетероцикл, биспирогетероцикл или полиспирогетероцикл. Предпочтительны моноспирогетероцикл и биспирогетероцикл. Более предпочтительным является 4-членный/4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/5-членный или 5-членный/6-членный моноспирогетероцикл. «Спирогетероцикл» относится к кольцевой системе в спирогетероцикле. Неограничивающие примеры спирогетероцикла включают:



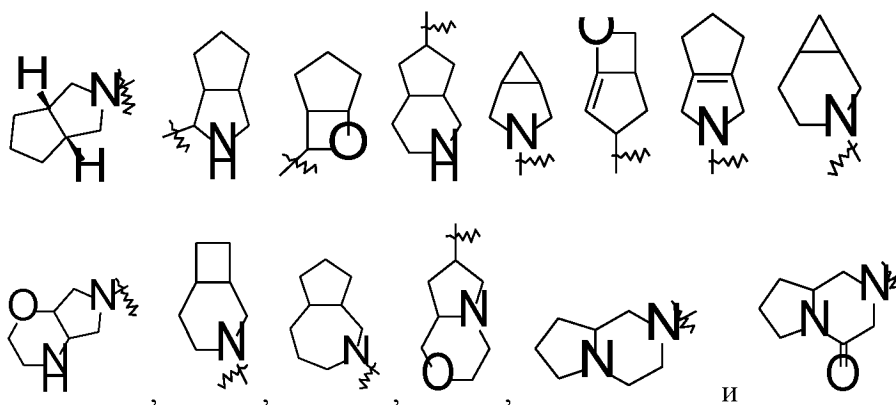
Термин «конденсированный» относится к соединениям, полученным путем слияния двух или более колец имеющих два общих соседних атома.

Термин «конденсированный циклоалкил» относится к 5-20-членной полностью углеродной полициклической группе, в которой каждое кольцо в системе имеет общую пару соседних атомов углерода с другими кольцами в системе, где одно или более колец могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно из них не имеет полностью сопряженной π -электронной системы. Он предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В зависимости от количества составляющих колец, конденсированный циклоалкил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим конденсированным циклоалкилом, предпочтительно бициклическим или трициклическим конденсированным циклоалкилом и более предпочтительно 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным бициклоалкилом. Неограничивающие примеры конденсированного циклоалкила включают:



Термин «конденсированный гетероцикл» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклической группе, в которой каждое кольцо в системе имеет пару соседних атомов с другими кольцами в системе, где одно или более колец могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно из них не имеет полностью сопряженной π -электронной системы; один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы,

выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), а другие кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Он предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В зависимости от количества составляющих колец, конденсированный гетероцикл может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим конденсированным гетероциклом, предпочтительно бициклическим или трициклическим конденсированным гетероциклом и более предпочтительно 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным бициклическим конденсированным гетероциклом. «Конденсированный гетероцикл» относится к кольцевой системе в конденсированном гетероцикле. Неограничивающие примеры конденсированного гетероцикла включают:



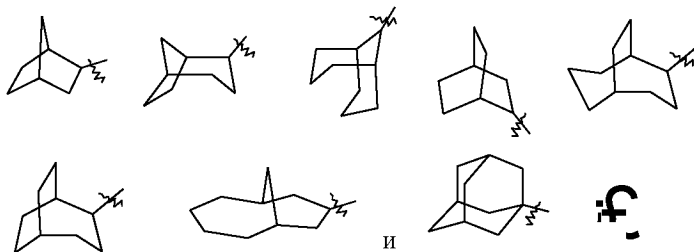
Термин «конденсированный гетероарил» может представлять собой ненасыщенную ароматическую конденсированную кольцевую структуру, содержащую 5-14 кольцевых атомов (включая по меньшей мере один гетероатом), образованную путем соединения двух или более циклических структур, которые имеют два общих атома, включая случай, когда атом углерода, атом азота и атом серы могут быть замещены оксо, предпочтительно «5-12-членным конденсированным гетероарилом», «7-12-членным конденсированным гетероарилом», «9-12-членным конденсированным гетероарилом» и тому подобное, например, бензофуранил, бензоизотиафуранил, бензотиенил, индолил, изоиндолил, бензоксазолил, бензимидазолил, индазолил, бензотриазолил, хинолил, 2-хинолинонил, 4-хинолинонил, 1-изохинолинил, изохинолинил, акридинил, фенантридинил, бензопиридазинил, фталазинил, хиназолинил, хиноксалинил, феназинил, птеридинил, пуринил, нафтиридинил, феназинил, фенотиазинил и тому подобное. «Конденсированное гетероароматическое кольцо» относится к кольцевой системе в конденсированном гетероариле.

Конденсированный гетероарил может быть необязательно замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну

или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из: алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио, карбоксила и карбоксилатной группы.

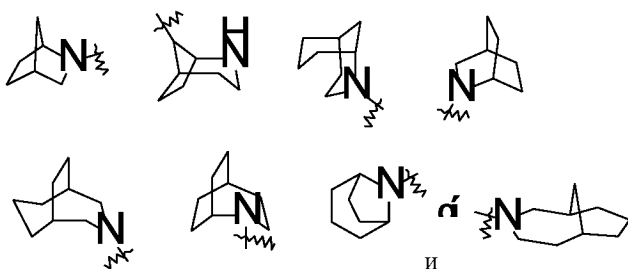
Термин «мостиковый» относится к структуре, образованной двумя или более циклическими структурами, разделяющими два несмежных кольцевых атома.

Термин «мостиковый циклоалкил» относится к 5-20-членной полностью углеродной полициклической группе, в которой любые два кольца имеют два общих атома углерода, которые непосредственно не связаны. Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной π -электронной системы. Он предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с количеством составляющих колец, мостиковый циклоалкил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим мостиковым циклоалкилом, предпочтительно бициклическим, трициклическим или тетрациклическим мостиковым циклоалкилом и более предпочтительно бициклическим или трициклическим мостиковым циклоалкилом. Неограничивающие примеры мостикового циклоалкила включают:



Термин «мостиковый гетероциклический» относится к 5-14-членной полициклической гетероциклической группе, в которой любые два кольца имеют два общих атома, которые непосредственно не связаны. Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной π -электронной системы, где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), а другие кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Он предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с количеством составляющих колец, мостиковый гетероциклический может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим мостиковым гетероциклическим, предпочтительно бициклическим, трициклическим или тетрациклическим мостиковым гетероциклическим и более предпочтительно бициклическим или трициклическим

мостиковым гетероциклом. Неограничивающие примеры мостикового гетероцикла включают:



Термин «алкокси» относится к -O-(алкилу) и -O-(незамещенному циклоалкилу), где алкил является таким, как определено выше. Неограничивающие примеры алкокси включают: метокси, этокси, пропокси, бутокси, циклопропилокси, циклобутокси, циклопентилокси и циклогексилокси. Алкокси может быть необязательно замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более из следующих групп, независимо выбранных из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро, циано, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила, где C₁₋₆ алкил, C₁₋₆ алкокси, C₂₋₆ алкенилокси, C₂₋₆ алкинилокси, C₃₋₆ циклоалкокси, 3-6-членного гетероциклоалкокси, C₃₋₈ циклоалкенилокси и 5-6-членного арила или гетероарила необязательно замещены одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, дейтерия, гидроксид, оксо, нитро и циано. Аналогично, определения «алкинилокси», «алкенилокси», «циклоалкокси», «гетероциклоалкокси» и «циклоалкенилокси» аналогичны приведенному выше определению «алкокси».

Термин «замещен» означает, что один или более, предпочтительно вплоть до 5, более предпочтительно от 1 до 3 атомов водорода в группе независимо замещены соответствующим количеством заместителей. Само собой разумеется, что заместитель находится только в своем возможном химическом положении, и специалисты в данной области техники смогут определить (экспериментально или теоретически) возможное или невозможное замещение без особых усилий.

«Замещенный одним или более» означает, что он может быть замещен одним заместителем или несколькими заместителями. В случае замены множеством заместителей может существовать множество идентичных заместителей или одна комбинация или множество комбинаций различных заместителей.

Термин «связь», «соединение» или «присоединение», когда он относится к взаимосвязи между двумя молекулами, означает, что две молекулы связаны ковалентной

связью или что две молекулы связаны нековалентной связью (например, водородной связью или ионной связью), и включает прямую связь и косвенную связь.

Термин «непосредственно связанный» означает, что первое соединение или группа соединены со вторым соединением или группой без какого-либо атома или группы атомов, расположенных между ними. Термин «косвенно связанный» означает, что первое соединение или группа соединены со вторым соединением или группой промежуточной группой, соединением или молекулой (например, линкерной группой).

Термин «гидрокси» относится к -ОН.

Термин «галоген» относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Термин «галогеналкил» относится к алкильной группе, замещенной галогеном, где алкильная группа является такой, как определено выше.

Термин «циано» относится к -CN.

Термин «нитро» относится к -NO₂.

Термин «оксо» относится к группе =O. Например, атом углерода соединен с атомом кислорода посредством двойной связи с образованием кетонной или альдегидной группы.

Термин «амино» относится к -NH₂.

Термин «циано» относится к -CN.

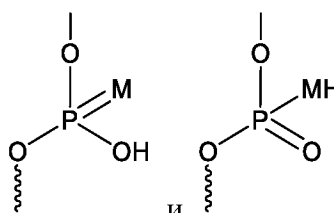
Термин «карбоксил» относится к -C(O)ОН.

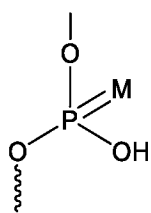
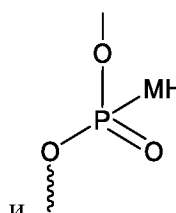
Термин «альдегид» относится к -CHO.

В настоящем изобретении термины «содержать» и «включать» могут быть заменены на «состоять из».

В настоящем изобретении «сложная фосфоэфирная группа» и «фосфатная связь» используются взаимозаменяемо и включают сложные фосфомоноэфиры, сложные фосфодиэфиры или сложные фосфотриэфиры. «Сложная фосфоэфирная группа» в «фосфоротиоатной группе» также имеет такое же значение. Если не указано иное, природная межнуклеотидная сложная фосфоэфирная группа представляет собой фосфодиэфирную группу.

В настоящем изобретении тиофосфатная группа относится к фосфодиэфирной группе, модифицированной путем замены одного немостового атома кислорода атомом



серы, и используется взаимозаменяемо с  и  (M представляет собой атом S).

В контексте РНК-опосредованного сайленсинга генов в настоящем документе

смысловая цепь (также называемая SS или SS цепь) миРНК относится к цепи, которая содержит последовательность, идентичную или по существу идентичную последовательности мРНК-мишени; антисмысловая цепь (также называемая AS или AS цепь) миРНК относится к цепи, имеющей последовательность, комплементарную последовательности мРНК-мишени.

В настоящем изобретении «5'-область» смысловой или антисмысловой цепи, то есть «5'-конец», используется взаимозаменяемо. Например, нуклеотиды в положениях 2-8 5'-области антисмысловой цепи могут быть заменены нуклеотидами в положениях 2-8 5'-конца антисмысловой цепи. Аналогично, «3'-область», «3'-конец» смысловой или антисмысловой цепи также используются взаимозаменяемо.

В данном контексте термины «комплементарный» и «обратно комплементарный» используются взаимозаменяемо и имеют значение, хорошо известное специалистам в данной области техники, то есть в двухцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты основания одной цепи соединены взаимодополняющим образом с основаниями другой цепи. В ДНК пуриновое основание аденин (А) всегда спаривается с пиримидиновым основанием тимин (Т) (или урацил (U) в РНК), а пуриновое основание гуанин (С) всегда спаривается с пиримидиновым основанием цитозин (G). Каждая пара оснований содержит пурин и пиримидин. Когда аденины одной цепи всегда соединяются с тиминами (или урацилами) другой цепи, а гуанины всегда соединяются с цитозинами, две цепи считаются комплементарными друг другу, и последовательности цепей могут быть выведены из последовательностей их комплементарных цепей. Соответственно, «несоответствие» в данной области техники означает, что в двухцепочечной нуклеиновой кислоте основания в соответствующих положениях не спариваются комплементарным образом.

В данном контексте «химическая модификация» или «модификация» означает структуру, которая имеет химические различия по сравнению с природным аналогом, включая все изменения, внесенные химическими способами, такие как добавление или удаление химических фрагментов или замена одного химического фрагмента другим.

В контексте настоящего изобретения Vz представляет собой бензоил; MMTt представляет собой метоксифенилбензгидрил; DMTr представляет собой диметокситритил.

В данном контексте термин «основание» охватывает любые известные основания ДНК и РНК и аналоги оснований, такие как пурины или пиримидины, которые также включают природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и природные аналоги.

Если не указано иное, в контексте настоящего изобретения буквы C, G, U, A и T в верхнем регистре представляют базовые компоненты нуклеотида; буква d в нижнем

регистре указывает, что правый нуклеотид, примыкающий к букве d, представляет собой дезоксирибонуклеотид; буква m в нижнем регистре указывает, что левый нуклеотид, примыкающий к букве m, представляет собой метокси-модифицированный нуклеотид; буква f в нижнем регистре указывает, что левый нуклеотид, примыкающий к букве f, представляет собой фтор-модифицированный нуклеотид; буква s в нижнем регистре указывает, что два нуклеотида, примыкающие к букве s, связаны фосфоротиоатной группой.

В данном контексте термин «фтор-модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, в котором гидроксигруппа в 2'-положении рибозильной группы нуклеотида замещена фтором; нуклеотид, модифицированный метокси, относится к нуклеотиду, в котором 2'-гидроксигруппа рибозильной группы замещена метоксигруппой.

В данном контексте термин «ингибирование» используется взаимозаменяемо с терминами «снижение», «сайленсинг», «подавляющая регуляция», «подавление» и другими аналогичными терминами и включает любой уровень ингибирования. Ингибирование может быть оценено с точки зрения снижения абсолютного или относительного уровня одной или более из этих переменных относительно контрольного уровня. Контрольный уровень может быть любым типом контрольного уровня, используемого в данной области техники, таким как базовый уровень до введения дозы или уровень, определенный из аналогичного необработанного или контрольного (например, только буферный контроль или контроль инертного агента) обработанного субъекта, клетки или образца. Например, оставшийся уровень экспрессии мРНК может быть использован для характеристики степени ингибирования экспрессии гена-мишени миРНК; например, остаточный уровень экспрессии мРНК составляет не более 99%, не более 95%, не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 75%, не более 70%, не более не более 65%, не более 60%, не более 55%, не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30%, не более 25 %, не более 20 %, не более 15 % или не более 10 %. Ингибирование экспрессии целевого гена может быть измерено с использованием системы анализа люциферазы Dual-Glo®: считывают значение хемилюминесценции Firefly и значение хемилюминесценции Renilla и вычисляли относительное значение $\text{Соотношение} = \text{Ren}/\text{Fir}$; в настоящем изобретении отношение остаточного уровня экспрессии мРНК (или остаточной активности%) = $\frac{\text{Соотношение (группа, обработанная миРНК)}}{\text{Соотношение (контрольная группа, не содержащая миРНК)}}$ и скорость ингибирования (%) = $100\% - \text{остаточный уровень экспрессии мРНК (\%)}$.

«Эффективное количество», «эффективная доза», «эффективное терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции, необходимому

для получения любого одного или более полезных или желаемых терапевтических результатов. Для превентивного применения полезные или желаемые результаты включают устранение или снижение риска, снижение тяжести или задержки начала расстройства, включая биохимию, гистологию и/или поведенческие симптомы расстройства, их осложнения и промежуточные патологические фенотипы, которые появляются во время прогрессирования расстройства. Для терапевтических применений полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как снижение частоты возникновений различных состояний, связанных с целевым геном, целевой мРНК или целевым белком по настоящему изобретению, или облегчение одного или более симптомов состояния, снижение дозы других агентов, необходимых для лечения состояния, усиление терапевтического эффекта другого агента и/или задержка прогрессирования состояний, связанных с целевым геном, целевой мРНК или целевым белком по настоящему изобретению у пациента. Эффективное количество также относится к количеству, достаточному для обеспечения или облегчения диагностики. Эффективное количество для конкретного пациента или ветеринарного субъекта может варьироваться в зависимости от таких факторов, как расстройство, подлежащее лечению, общее состояние здоровья пациента, способ, и путь, и дозировка введения, а также тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или режим введения, чтобы избежать значительных побочных эффектов или токсических эффектов.

В данном контексте термины «объект», «пациент», «субъект» и «индивидуум» используются взаимозаменяемо и включают людей или животных, не являющихся людьми, например, млекопитающих, например, людей или обезьян.

В некоторых вариантах реализации при доставке олигомерного соединения в экспрессирующую ген клетку олигомерное соединение может ингибировать экспрессию основных генов и упоминается в настоящем документе как «олигомерное соединение, ингибирующее экспрессию». Он может ингибировать экспрессию генов *in vitro* или *in vivo*. «Олигомерное соединение» включает, но не ограничивается ими: олигонуклеотиды, одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микроРНК, короткие шпилечные РНК (кшРНК), рибозимы, интерферирующие молекулы РНК и субстраты фермента Dicer.

Если не указано иное, символ $\frac{3}{2}$, используемый в настоящем документе, означает, что он может быть связан с любой группой или группами в соответствии с объемом изобретения, описанного в настоящем документе.

В данном контексте первая цепь может называться антисмысловой цепью, а вторая

цепь может называться смысловой цепью. Термины первая цепь и антисмысловая цепь или вторая цепь и смысловая цепь следует считать взаимозаменяемыми.

«Агент РНКи», используемый в настоящем изобретении, относится к агенту, который содержит РНК или РНК-подобную (например, химически модифицированную РНК) олигонуклеотидную молекулу, которая способна разрушать или ингибировать транскрипцию и трансляцию целевой матричной РНК (мРНК) последовательностью, специфичной для конкретной последовательности. В настоящем изобретении агенты РНКи могут действовать через механизм РНК-интерференции (то есть индуцировать РНК-интерференцию посредством взаимодействия с механизмом пути РНК-интерференции (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга или RISC) клеток млекопитающих) или действовать любыми другими механизмами или путями. Агенты РНКи включают, но не ограничиваются ими: одноцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микроРНК, короткие шпилечные РНК (кшРНК) и субстраты Dicer.

Агенты РНКи, описанные в настоящем документе, содержат олигонуклеотид, имеющий цепь, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой мРНК.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показаны уровни экспрессии мРНК в TTR (транстиретин) через 7 дней после введения конъюгатов TRD002218, TRD007203, TRD007204 и TRD007205.

На фиг. 2 показаны уровни экспрессии мРНК в TTR через 28 дней после введения конъюгатов TRD002218, TRD007203, TRD007204 и TRD007205.

На фиг. 3 показана ингибирующая активность GalNAc-конъюгированной миРНК против экспрессии гена mTTR в первичных мышечных гепатоцитах в тестовом примере 6.

На фиг. 4 показана ингибирующая активность *in vivo* GalNAc-конъюгированной миРНК против гена mTTR мыши в тестовом примере 7.

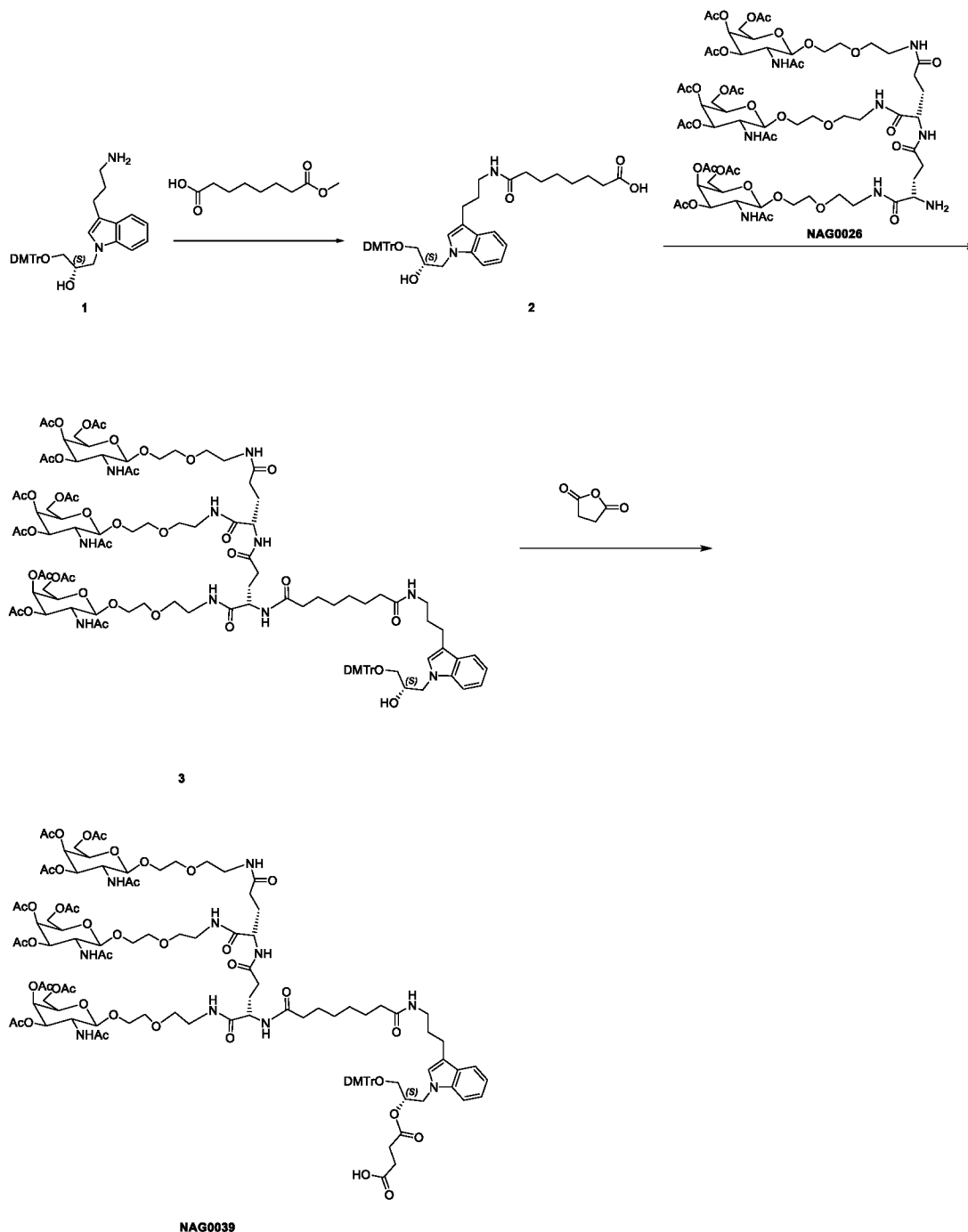
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые, однако, не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Экспериментальные процедуры без условий, указанные в примерах настоящего изобретения, как правило, проводили в соответствии с общепринятыми условиями или в соответствии с условиями, рекомендованными производителем исходных материалов или коммерческих продуктов. Если источник реагента не указан, реагент получали от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии качества/чистоты для применения в

молекулярной биологии.

Соединения NAG0024 и NAG0026 были приобретены у WuXi AppTec (Tianjin) Co., Ltd. Если не указано иное, все реагенты, используемые в следующих примерах, являются коммерчески доступными.

Пример получения 1: Синтез Соединения NAG0039



Соединение 2

К раствору соединения 1 (1,00 г, 1,82 ммоль) в сухом ТГФ (тетрагидрофуран) (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота последовательно добавляли DIEA (диизопропилэтиламин) (469 мг, 3,63 ммоль), молекулярное сито 3А, монометилсуберат (342 мг, 1,82 ммоль), DCC (1,3-дициклогексилкарбодиимид) (487 мг, 2,36 ммоль) и НОВт

(гидроксibenзотриазол) (319 мг, 2,36 ммоль). Смесь оставляли реагировать в течение ночи при 40 °С. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали, очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O (MeCN - ацетонитрил)) и лиофилизировали с получением промежуточного соединения (1,14 г, 1,58 ммоль, выход 87%).

Промежуточное соединение (1,14 г, 1,58 ммоль) растворяли в ТГФ (3 мл) и MeOH (3 мл) и по каплям добавляли раствор NaOH (126 мг, 3,16 ммоль) в воде (3 мл). Реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Большую часть органического растворителя удаляли при пониженном давлении, а затем остаток очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением соединения 2 (851 мг, 1,17 ммоль, натриевая соль, 74% выхода).

Соединение 3

К раствору соединения NAG0026 (863 мг, 0,566 ммоль) в сухом ТГФ (15 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота последовательно добавляли DIEA (146 мг, 1,13 ммоль), молекулярное сито 3А, соединение 2 (400 мг, 0,566 ммоль), DCC (140 мг, 0,679 ммоль) и HOBT (92 мг, 0,679 ммоль). Смесь оставляли реагировать в течение ночи при 45 °С. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали, очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) и лиофилизировали с получением соединения 3 (918 мг, 0,415 ммоль, выход 73%).

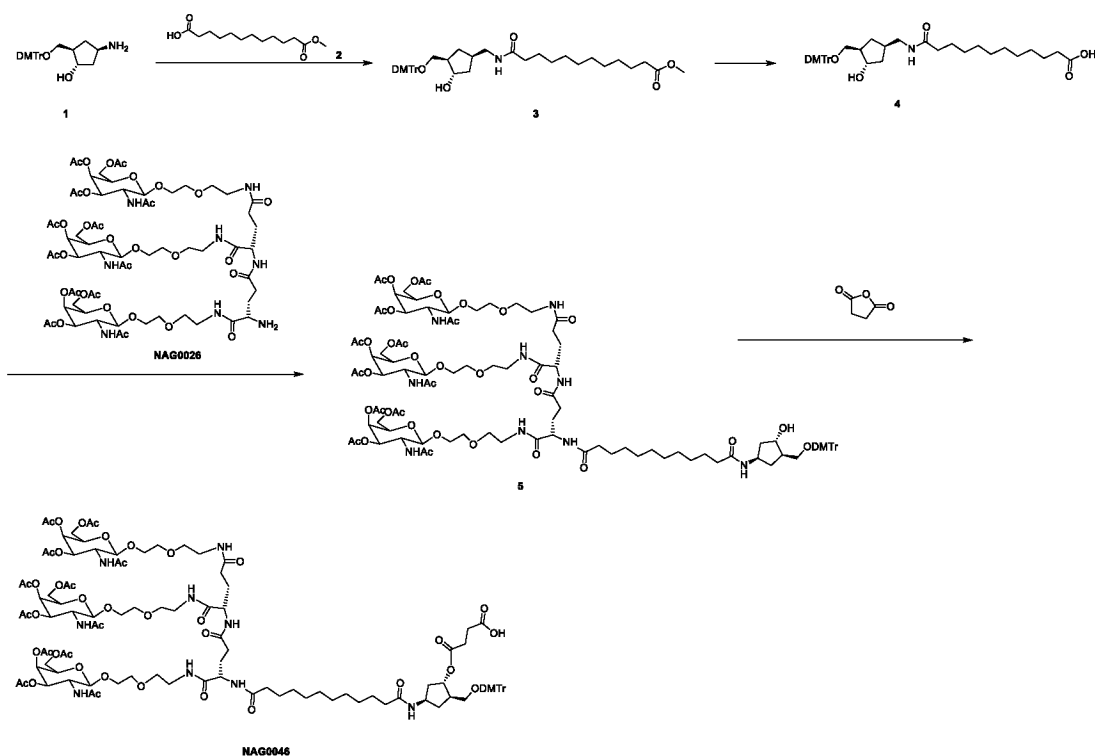
Соединение NAG0039

К раствору соединения 3 (400 мг, 0,181 ммоль) в пиридине при комнатной температуре добавляли молекулярное сито 3А, янтарный ангидрид (36 мг, 0,361 ммоль) и DMAР (4-диметиламинофенол) (22 мг, 0,181 ммоль). Смесь оставляли реагировать в течение ночи при 45 °С в атмосфере азота. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали при пониженном давлении, отделяли и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением неочищенного продукта (248 мг). Две партии неочищенного продукта объединяли и разделяли с помощью препаративной ВЭЖХ (Высокоэффективная жидкостная хроматография) (колонок: Xbridge 150×50 мм, 5 мкм; подвижная фаза: А: 0,1% NH₃H₂O + 0,005% FA в воде; В: MeCN; градиент: 20% В-95% В за 9 минут) с получением соединения NAG0039 (240 мг, 0,104 ммоль, выход 33%).

МС (ESI (ионизаций электроспреем)) m/z = 2312,3 [M-1]⁻, рассчитано: 2313,0.

NMR ¹H (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 7,63-6,59 (m, 27H), 5,40-5,22 (m, 4H), 5,16-5,02 (m, 3H), 4,74-4,57 (m, 3H), 4,45-3,05 (m, 47H), 2,70-1,96 (m, 57H), 1,63-1,27 (m, 11H).

Пример получения 2: Синтез Соединения NAG0046



Соединение 3

К растворителю ДХМ (5 мл) в атмосфере азота добавляли соединение 2 (203 мг, 0,830 ммоль), DIEA (0,206 мл, 1,246 ммоль) и НАТУ (O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний гексафторфосфат) (237 мг, 0,623 ммоль). Смесь перемешивали при 20 °С и затем добавляли соединение 1 (200 мг, 0,415 ммоль) в систему, описанную выше. После добавления смесь оставляли реагировать при 20 °С в течение 1 часа в атмосфере азота. К реакционному раствору добавляли H₂O (10 мл) и экстрагировали смесь ДХМ (жихлорметан) (3 × 20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (ДХМ:MeOH (100:0-90:10)) с получением соединения 3 (250 мг, выход 82%).

ЖХ-МС: хроматографические условия 10-80АВ_2 мин, время удерживания 1,534 мин; MS (ESI) m/z = 682,6 [M+Na]⁺.

¹H NMR (400 МГц, CDCl₃) δ 7,42 (d, J = 7,0 Гц, 1H), 7,34-7,29 (m, 6H), 7,21-7,17 (m, 2H), 6,86 (d, J = 9,0 Гц, 4H), 4,44 (br d, J = 7,5 Гц, 1H), 4,31-4,08 (m, 1H), 4,01-3,84 (m, 1H), 3,82 (d, J = 2,0 Гц, 6H), 3,69 (d, J = 2,3 Гц, 3H), 3,17-3,06 (m, 1H), 2,36-2,25 (m, 3H), 2,19-1,97 (m, 4H), 1,57-1,54 (m, 3H), 1,47 (d, J = 6,8 Гц, 4H), 1,28 (br d, J = 6,8 Гц, 10H).

Соединение 4

Соединение 3 (250 мг, 0,348 ммоль) растворяли в MeOH (1 мл) и H₂O (0,5 мл) и затем добавляли LiOH (146 мг, 3,48 ммоль). Смесь оставляли реагировать при комнатной

температуре в течение 12 часов. Реакционный раствор очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии с получением соединения 4 (166 мг, выход 71%).

ЖХ/МС (Жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией): хроматографические условия 10-80CD_3 мин, время удерживания 1,353 мин; MS (ESI) m/z = 668,6 [M+Na]⁺.

ВЭЖХ: хроматографические условия 10-80CD_6 мин, время удерживания 1,897 мин.

¹H NMR (400 МГц, CD₃OD) δ млн⁻¹ 7,45 (d, J = 7,2 Гц, 2H), 7,34-7,27 (m, 6H), 7,24-7,19 (m, 1H), 6,92-6,83 (m, 4H), 4,32 (q, J = 8,0 Гц, 1H), 4,13-4,02 (m, 1H), 3,80 (s, 6H), 3,21-3,14 (m, 1H), 3,13-3,06 (m, 1H), 2,37-2,28 (m, 1H), 2,14 (td, J = 7,5, 15,6 Гц, 5H), 1,99-1,89 (m, 1H), 1,72-1,70 (m, 1H), 1,59-1,50 (m, 4H), 1,36-1,23 (m, 13H).

Соединение 5

Соединение NAG0026 (120 мг, 0,079 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (2 мл) и безводном ДМФА (диметилформамид) (2 мл) и добавляли молекулярное сито 3А (50 мг). Затем последовательно добавляли соединение 4 (54 мг, 0,084 ммоль), НОВt (28 мг, 0,205 ммоль), DCC (39 мг, 0,189 ммоль) и DIEA (0,08 мл, 0,472 ммоль). Реакционный раствор оставляли реагировать при 40 °С в течение 20 часов. После завершения реакции, как показано с помощью ЖХ-МС, реакционный раствор гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением соединения 5 (90 мг, выход 53%).

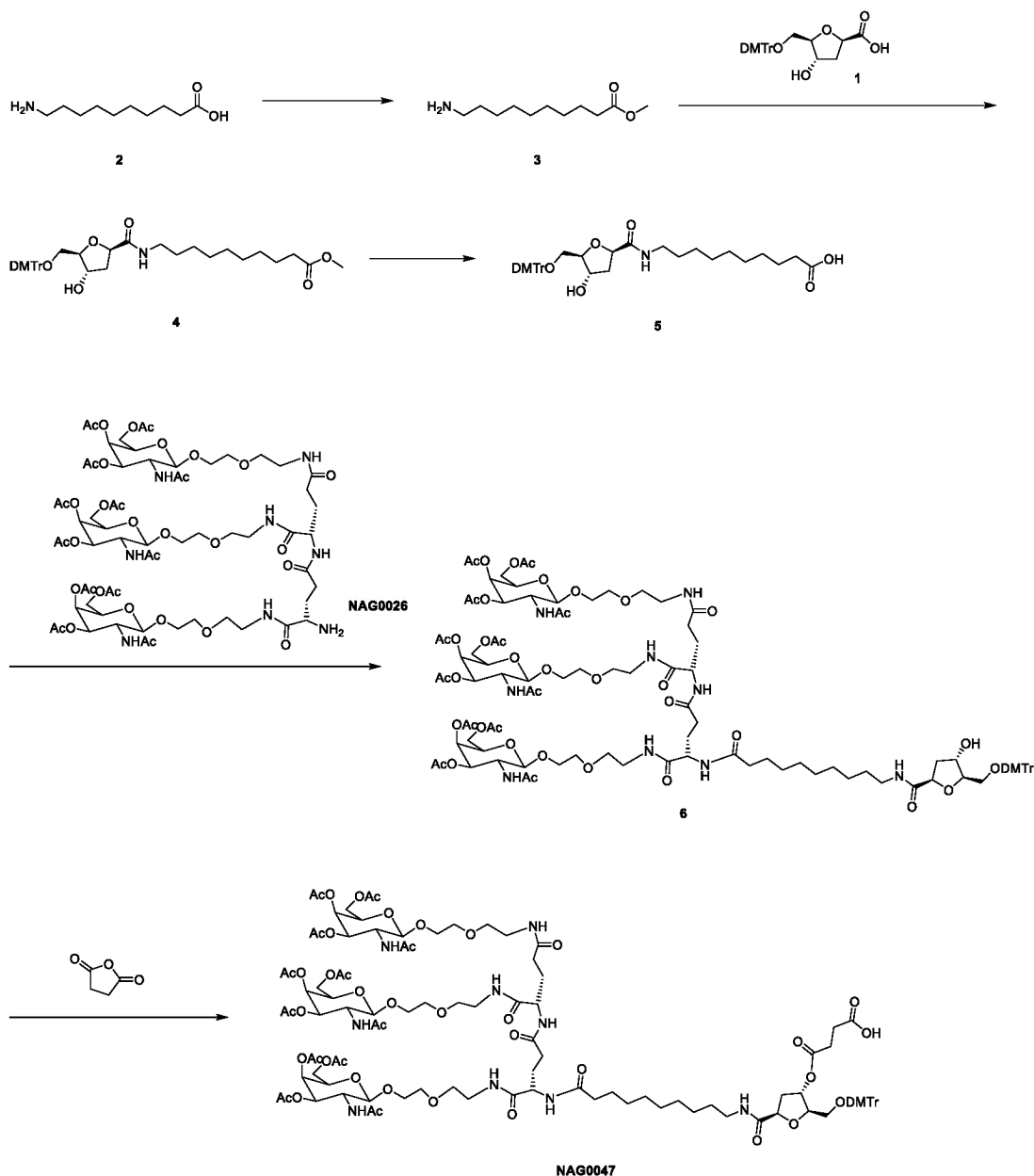
Соединение NAG0046

Соединение 5 (90 мг, 0,042 ммоль) растворяли в безводном пиридине (3 мл) и добавляли молекулярное сито 3А (50 мг), ДМАП (диметиламинопиридин) (26 мг, 0,209 ммоль) и янтарный ангидрид (42 мг, 0,364 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °С в течение 48 часов. ЖХ-МС показала, что было израсходовано около 50% исходного материала. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, H₂O/MeCN, элюирование от 5% до 70%) с получением NAG0046 (30 мг).

MS (ESI) m/z равно 2251,4 [M-1]⁻, рассчитано: 2252,0.

¹H NMR (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 7,50-7,14 (m, 14H), 6,89 (d, J = 8,6 Гц, 7H), 6,56 (d, J = 7,8 Гц, 1H), 5,32 (d, J = 3,4 Гц, 3H), 5,09 (t, J = 12,5 Гц, 4H), 4,65 (dd, J = 8,6, 4,8 Гц, 3H), 4,32-3,11 (m, 52H), 2,54 (t, J = 6,8 Гц, 3H), 2,32 (d, J = 7,6 Гц, 16H), 2,14-2,04 (m, 17H), 1,89 (d, J = 2,9 Гц, 10H), 1,75 (dt, J = 14,6, 7,9 Гц, 4H), 1,62-1,49 (m, 5H), 1,29 (s, 13H).

Пример получения 3: Синтез Соединения NAG0047



Соединение 3

К раствору соединения 2 (300 мг, 1,60 ммоль) в MeOH (10 мл) при 0 °С в атмосфере азота по каплям добавляли SOCl_2 (0,581 мл, 8,009 ммоль). Смесь перемешивали при 60 °С в течение 3 часов. Реакционный раствор концентрировали с получением соединения 3 (0,32 г, 1,510 ммоль, выход 95%).

$^1\text{H NMR}$: (400 МГц, CD_3OD) δ мл $^{-1}$ 3,75-3,59 (m, 3H), 2,93 (t, $J = 7,2$ Гц, 2H), 2,33 (t, $J = 7,4$ Гц, 2H), 1,64 (td, $J = 7,0, 14,4$ Гц, 4H), 1,48-1,27 (m, 10H).

Соединение 4

К раствору соединения 1 (250 мг, 0,538 ммоль) в ТГФ (25 мл) при 0 °С в атмосфере азота последовательно добавляли DIEA (0,267 мл, 1,61 ммоль), молекулярное сито 4А (500 мг), соединение 3 (271 мг, 1,08 ммоль), DCC (333 мг, 1,61 ммоль) и HOBT (218 мг, 1,61 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °С в течение 5 часов. После

завершения реакции реакционный раствор гасили H₂O (50 мл) и экстрагировали EtOAc (100 мл × 3). Объединенные органические фазы промывали насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали, концентрировали и затем очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-80% EtOAc/PE) с получением соединения 4 (420 мг, 0,486 ммоль, выход 90%).

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80CD_7 мин, время удерживания 5,586 мин; MS (ESI) m/z = 670,3 [M+Na]⁺.

¹H NMR: (400 МГц, CD₃OD) δ мл⁻¹ 7,44 (d, J = 7,6 Гц, 2H), 7,36-7,29 (m, 6H), 7,28-7,22 (m, 1H), 6,89 (d, J = 8,8 Гц, 4H), 4,53 (t, J = 7,8 Гц, 1H), 4,35-4,27 (m, 1H), 4,02 (q, J = 4,0 Гц, 1H), 3,86-3,74 (m, 6H), 3,66 (s, 3H), 3,52-3,42 (m, 1H), 3,33-3,30 (m, 1H), 3,29-3,23 (m, 1H), 3,18 (td, J = 7,0, 13,5 Гц, 1H), 3,00 (td, J = 7,0, 13,5 Гц, 1H), 2,33-2,22 (m, 3H), 2,14 (ddd, J = 5,8, 7,8, 13,3 Гц, 1H), 1,92-1,82 (m, 2H), 1,73 (td, J = 3,6, 13,2 Гц, 2H), 1,66-1,53 (m, 3H), 1,43-1,26 (m, 7H).

Соединение 5

К раствору соединения 4 (420 мг, 0,486 ммоль) в ТГФ (5 мл) и H₂O (2 мл) при 20 °С добавляли LiOH (82 мг, 1,95 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 20 °С в течение 15 часов. После завершения реакции реакционный раствор концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением соединения 5 (236 мг, 0,155 ммоль, выход 32%, соль лития).

ЖХ/МС: хроматографические условия 0-60CD_7 мин, время удерживания 3,950 мин; MS (ESI) m/z = 656,4 [M+Na]⁺.

Соединение 6

Соединение NAG0026 (236 мг, 0,155 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (3 мл) и добавляли молекулярное сито 3А (100 мг). Затем последовательно добавляли соединение 5 (98 мг, 0,155 ммоль), HOBT (25 мг, 0,186 ммоль), DCC (41 мг, 0,201 ммоль) и DIEA (0,08 мл, 0,464 ммоль). Реакционный раствор оставляли реагировать при 40 °С в течение 16 часов. После завершения реакции, как показано с помощью ЖХ-МС, реакционный раствор гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали и затем очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением соединения 6 (160 мг, 0,075 ммоль, 48% выхода).

Соединение NAG0047

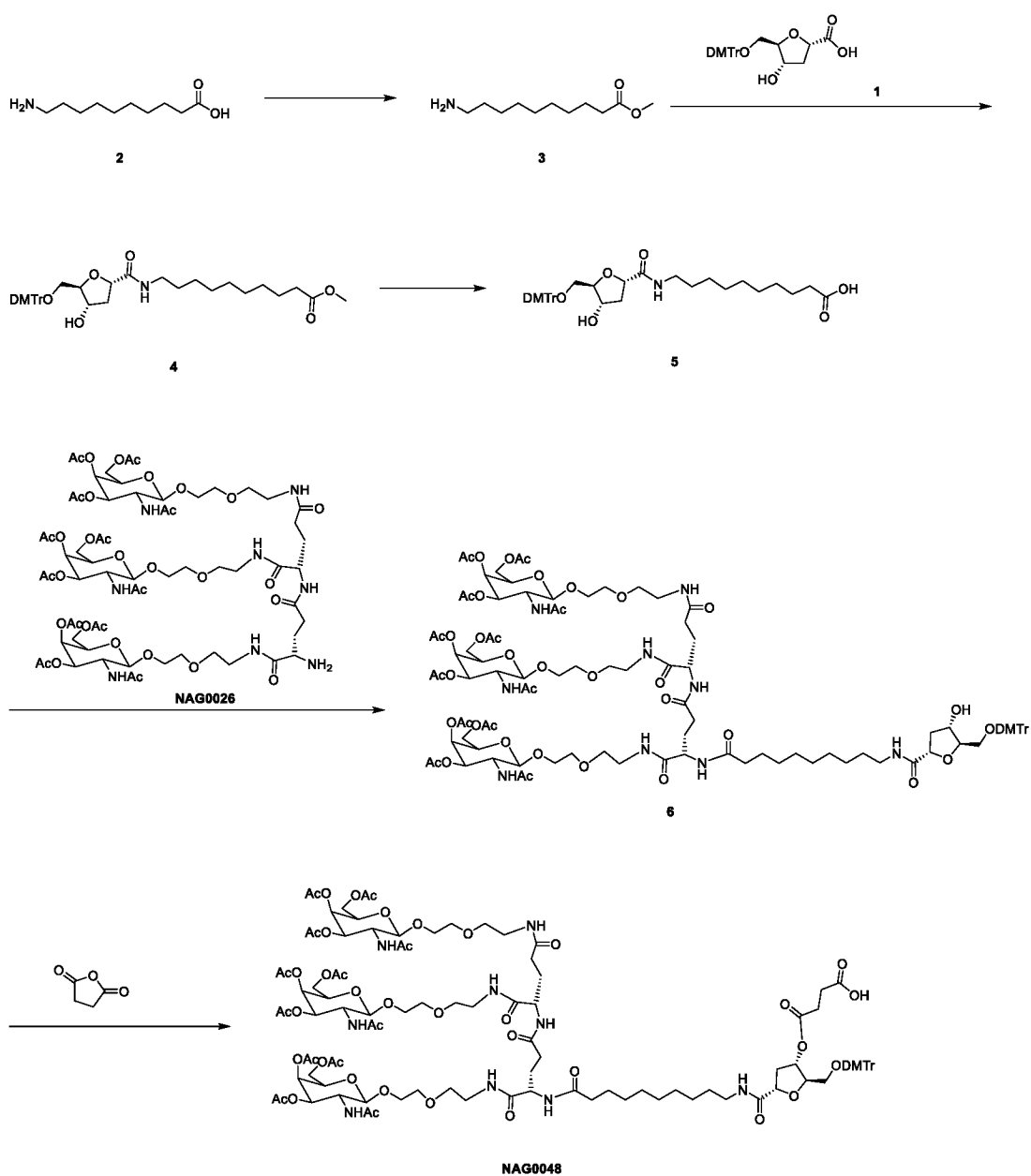
Соединение 6 (160 мг, 0,075 ммоль) растворяли в безводном пиридине (3 мл) и последовательно добавляли молекулярное сито 3А (100 мг), ДМАП (46 мг, 0,374 ммоль) и янтарный ангидрид (75 мг, 0,747 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °С в

течение 48 часов. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением NAG0047 (80 мг).

МС (ESI) $m/z = 2239,1$ [M-1], рассчитано: 2240,0.

¹H NMR (400 МГц, Ацетонитрил-d₃) δ 7,53-7,09 (m, 14H), 6,89 (dd, J = 7,2, 5,1 Гц, 8H), 5,31 (dt, J = 3,2, 1,5 Гц, 3H), 5,22-5,05 (m, 4H), 4,70-4,61 (m, 3H), 4,44 (dd, J = 9,7, 6,7 Гц, 1H), 4,29 (dq, J = 14,6, 7,6 Гц, 2H), 4,18-3,84 (m, 16H), 3,80 (s, 6H), 3,69 (dd, J = 11,2, 4,3 Гц, 3H), 3,64-3,03 (m, 24H), 2,57 (h, J = 2,3 Гц, 5H), 2,36-2,27 (m, 7H), 2,24-2,16 (m, 4H), 2,11 (s, 3H), 2,01-1,96 (m, 22H), 1,88 (q, J = 2,9, 2,2 Гц, 8H), 1,56 (s, 2H), 1,24 (d, J = 17,7 Гц, 13H).

Пример получения 4: Синтез Соединения NAG0048



Соединение 3

К раствору соединения 2 (500 мг, 2,67 ммоль) в MeOH (10 мл) при 0 °C в атмосфере азота по каплям добавляли SOCl₂ (0,968 мл, 13,3 ммоль). Смесь перемешивали при 60 °C в течение 12 часов. Реакционный раствор концентрировали с получением соединения 3 (550 мг, 2,46 ммоль, 92%).

¹H NMR: (400 МГц, CD₃OD) δ млн⁻¹ 3,69-3,62 (m, 3H), 2,94 (s, 2H), 2,33 (t, J = 7,2 Гц, 2H), 1,73-1,57 (m, 4H), 1,46-1,31 (m, 10H).

Соединение 4

К раствору соединения 1 (250 мг, 0,538 ммоль) в ТГФ (25 мл) при 0 °C в атмосфере азота последовательно добавляли DIEA (0,267 мл, 1,614 ммоль), молекулярное сито 4A (500 мг), соединение 3 (271 мг, 1,08 ммоль), DCC (333 мг, 1,61 ммоль) и HOBT (218 мг, 1,61 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °C в течение 5 часов. После завершения реакции реакционный раствор гасили H₂O (50 мл) и экстрагировали EtOAc (100 мл × 3). Объединенные органические фазы промывали насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали, концентрировали и затем очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-80% EtOAc/PE) с получением соединения 4 (350 мг, 0,486 ммоль, выход 90%).

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80CD_7 мин, время удерживания 5,670 мин; MS (ESI) m/z = 670,3 [M+Na]⁺.

¹H NMR: (400 МГц, CD₃OD) δ млн⁻¹ 7,45 (d, J = 7,4 Гц, 2H), 7,36-7,27 (m, 6H), 7,25-7,19 (m, 1H), 6,90-6,85 (m, 4H), 4,50 (dd, J = 4,6, 9,0 Гц, 1H), 4,27 (td, J = 3,0, 5,6 Гц, 1H), 4,20-4,14 (m, 1H), 3,80 (s, 6H), 3,68-3,62 (m, 3H), 3,53-3,43 (m, 1H), 3,27-3,18 (m, 3H), 3,16-3,09 (m, 1H), 2,54 (ddd, J = 5,8, 8,8, 13,2 Гц, 1H), 2,31 (t, J = 7,4 Гц, 2H), 2,08 (td, J = 4,0, 13,2 Гц, 1H), 1,91-1,82 (m, 2H), 1,73 (td, J = 3,6, 13,2 Гц, 2H), 1,67-1,50 (m, 5H), 1,39-1,32 (m, 2H), 1,27-1,12 (m, 3H).

Соединение 5

К раствору соединения 4 (350 мг, 0,486 ммоль) в ТГФ (5 мл) и H₂O (2 мл) при 20 °C добавляли LiOH (82 мг, 1,95 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 20 °C в течение 15 часов. После завершения реакции реакционный раствор непосредственно концентрировали с получением соединения 5 (300 мг, 0,469 ммоль, выход 96%).

ЖХ/МС: хроматографические условия 0-60CD_7 мин, время удерживания 4,081 мин; MS (ESI) m/z = 656,4 [M+Na]⁺.

Соединение 6

Соединение NAG0026 (300 мг, 0,197 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (5 мл) и добавляли молекулярное сито 3A (100 мг). Затем последовательно добавляли соединение 5 (125 мг, 0,197 ммоль), HOBT (32 мг, 0,236 ммоль), DCC (53 мг, 0,256 ммоль) и DIEA (0,10 мл,

0,590 ммоль). Реакционный раствор оставляли реагировать при 40 °С в течение 16 часов. После завершения реакции, как показано с помощью ЖХ-МС, реакционный раствор гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением соединения 6 (260 мг, выход 62%).

Соединение NAG0048

Соединение 6 (260 мг, 0,121 ммоль) растворяли в безводном пиридине (4 мл) и последовательно добавляли молекулярное сито 3А (100 мг), ДМАП (30 мг, 0,242 ммоль) и янтарный ангидрид (73 мг, 0,726 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °С в течение 48 часов. ЖХ-МС показала, что было израсходовано около 70% исходного материала. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением NAG0048 (170 мг, выход 62%).

МС (ESI) $m/z = 2239,1$ [M-1]⁻, рассчитано: 2240,0.

¹H NMR (400 МГц, Ацетонитрил-d₃) δ 7,68 (s, 3H), 7,51-7,17 (m, 12H), 7,11-6,85 (m, 7H), 5,31 (dt, J = 2,5, 1,3 Гц, 3H), 5,18-5,04 (m, 4H), 4,74-4,53 (m, 4H), 4,30 (d, J = 4,9 Гц, 3H), 4,21-3,93 (m, 12H), 3,79 (s, 9H), 3,69 (dt, J = 10,4, 4,7 Гц, 3H), 3,62-3,14 (m, 22H), 3,09 (dd, J = 10,1, 4,4 Гц, 2H), 2,91 (d, J = 7,2 Гц, 1H), 2,46 (s, 6H), 2,28 (ddt, J = 28,8, 20,0, 7,2 Гц, 8H), 2,11 (s, 3H), 2,01-1,96 (m, 18H), 1,90-1,87 (m, 8H), 1,54 (d, J = 25,2 Гц, 4H), 1,37-1,18 (m, 16H).

Пример получения 5: Синтез Соединения NAG0049



Соединение 3

Соединение 2 (293 мг, 1,20 ммоль) растворяли в ДХМ (3 мл) и добавляли DIEA (0,298 мл, 1,80 ммоль) и НАТУ (457 мг, 1,20 ммоль). Затем добавляли соединение 1 (300 мг, 0,601 ммоль, из Примера получения 7). Смесь оставляли реагировать при 20 °С в течение 1 часа. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном (60 мл) и водой (60 мл). Органическую фазу трижды промывали водой (60 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (PE:EtOAc = 0:1) с получением соединения 3 (300 мг, выход 90%).

ЖХ/МС: хроматографические условия 30-90CD_3 мин, время удерживания 2,225 мин; МС (ESI) $m/z = 698,4 [M+Na]^+$.

Соединение 4

Соединение 3 (300 мг, 0,444 ммоль) растворяли в ТГФ (3 мл) и H₂O (1 мл) и добавляли LiOH·H₂O (75 мг, 1,78 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 20 °С в течение 12 часов. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, растворяли в воде (5 мл) и метаноле (5 мл) и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением соединения 4 (212

мг, 100% выход).

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80CD_3 мин, время удерживания 1,333 мин; МС (ESI) $m/z = 684,3 [M+Na]^+$.

ВЭЖХ: хроматографические условия 10-80CD_6 мин, время удерживания 1,853 мин.

$^1\text{H NMR}$: (400 МГц, CD_3OD) δ млн $^{-1}$ 7,47-7,38 (m, 2H), 7,35-7,25 (m, 6H), 7,24-7,17 (m, 1H), 6,86 (d, $J = 8,8$ Гц, 4H), 4,30-4,17 (m, 2H), 3,99-3,88 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,42-3,33 (m, 2H), 3,16-3,04 (m, 2H), 2,18-2,05 (m, 4H), 1,92-1,70 (m, 2H), 1,65-1,46 (m, 4H), 1,36-1,17 (m, 12H).

Соединение 5

Соединение NAG0026 (300 мг, 0,197 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (3 мл) и добавляли молекулярное сито 3А (100 мг). Затем последовательно добавляли соединение 4 (143 мг, 0,216 ммоль), НОВт (32 мг, 0,236 ммоль), DCC (53 мг, 0,256 ммоль) и DIEA (0,1 мл, 0,590 ммоль). Реакционный раствор оставляли реагировать при 40 °С в течение 16 часов. После завершения реакции, как показано с помощью ЖХ-МС, реакционный раствор гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали и затем очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$, элюирование от 5% до 80%) с получением соединения 5 (110 мг, выход 28%).

Соединение NAG0049

Соединение 5 (110 мг, 0,051 ммоль) растворяли в безводном пиридине (3 мл) и последовательно добавляли молекулярное сито 3А (100 мг), ДМАП (31 мг, 0,255 ммоль) и янтарный ангидрид (51 мг, 0,510 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °С в течение 48 часов. ЖХ-МС показала, что было израсходовано около 50% исходного материала. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$, элюирование от 5% до 70%) с получением NAG0049 (45 мг, выход 39%).

МС (ESI) $m/z = 2267,0 [M-1]^-$, рассчитано: 2268,0.

$^1\text{H NMR}$ (400 МГц, $\text{CH}_3\text{CN-d}_3$) δ 7,62-6,40 (m, 22H), 5,31 (s, 3H), 5,21-5,02 (m, 4H), 4,64 (dd, $J = 8,7, 6,2$ Гц, 3H), 4,16 (s, 2H), 4,13-3,94 (m, 14H), 3,79 (s, 10H), 3,72-3,38 (m, 24H), 3,32-3,11 (m, 5H), 2,56 (t, $J = 3,4$ Гц, 4H), 2,34-2,20 (m, 16H), 1,99 (d, $J = 11,3$ Гц, 24H), 1,41 (d, $J = 127,6$ Гц, 21H).

Пример получения 6: Синтез Соединения NAG0050



Соединение 3

Соединение 2 (435 мг, 1,780 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) и добавляли DIEA (0,441 мл, 2,67 ммоль) и NATU (677 мг, 1,78 ммоль). Затем добавляли соединение 1 (400 мг, 0,890 ммоль, из Примера получения 8). Смесь оставляли реагировать при 20 °С в течение 1 часа. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном (60 мл) и водой (60 мл). Органическую фазу трижды промывали водой (60 мл × 3), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (PE:EtOAc = 0:1) с получением соединения 3 (600 мг, выход 90%).

ЖХ/МС: хроматографические условия 30-90CD_3 мин, время удерживания 2,745

мин; МС (ESI) $m/z = 698,4 [M+Na]^+$.

1H NMR: (400 МГц, CD_3OD) δ мл n^{-1} 7,46-7,38 (m, 2H), 7,35-7,24 (m, 6H), 7,22-7,16 (m, 1H), 6,90-6,78 (m, 4H), 4,29-4,21 (m, 2H), 4,02-3,95 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,66-3,62 (m, 3H), 3,41 (s, 1H), 3,18-3,04 (m, 2H), 2,36-2,17 (m, 5H), 1,71-1,50 (m, 5H), 1,39-1,25 (m, 14H).

Соединение 4

Соединение 3 (600 мг, 0,799 ммоль) растворяли в ТГФ (3 мл) и H_2O (1 мл) и добавляли $LiOH \cdot H_2O$ (134 мг, 3,20 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 20 °С в течение 12 часов. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, растворяли в воде (5 мл) и метаноле (5 мл) и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/ H_2O) с получением соединения 4 (460 мг, 100% выход, соль лития).

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80CD_3 мин, время удерживания 1,346 мин; МС (ESI) $m/z = 684,3 [M+Na]^+$.

ВЭЖХ: хроматографические условия 10-80CD_6 мин, время удерживания 1,879 мин.

1H NMR: (400 МГц, CD_3OD) δ мл n^{-1} 7,47-7,39 (m, 2H), 7,35-7,24 (m, 6H), 7,22-7,15 (m, 1H), 6,91-6,79 (m, 4H), 4,31-4,18 (m, 2H), 4,02-3,95 (m, 1H), 3,78 (s, 6H), 3,44-3,33 (m, 2H), 3,18-3,04 (m, 2H), 2,35-2,27 (m, 1H), 2,24-2,10 (m, 4H), 1,70-1,51 (m, 5H), 1,31-1,23 (m, 12H).

Соединение 5

Соединение NAG0026 (300 мг, 0,197 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (3 мл) и добавляли молекулярное сито 3А (100 мг). Затем последовательно добавляли соединение 4 (143 мг, 0,216 ммоль), $NOBt$ (32 мг, 0,236 ммоль), DCC (53 мг, 0,256 ммоль) и DIEA (0,1 мл, 0,590 ммоль). Реакционный раствор оставляли реагировать при 40 °С в течение 16 часов. После завершения реакции, как показано с помощью ЖХ-МС, реакционный раствор гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали и затем очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, $H_2O/MeCN$, элюирование от 5% до 80%) с получением соединения 5 (300 мг, выход 73%).

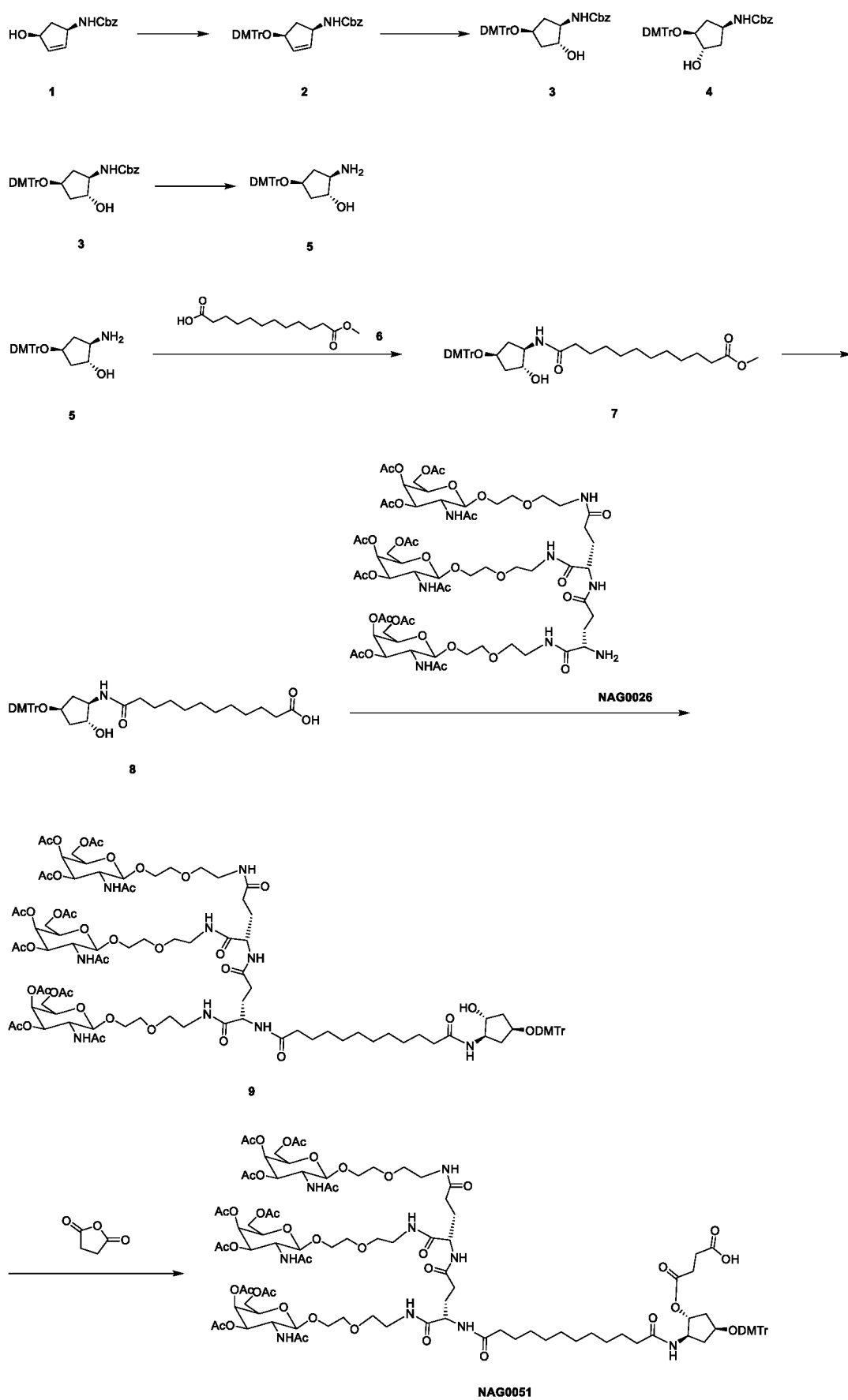
Соединение NAG0050

Соединение 5 (310 мг, 0,143 ммоль) растворяли в безводном пиридине (5 мл) и последовательно добавляли молекулярное сито 3А (100 мг), ДМАП (87 мг, 0,714 ммоль) и янтарный ангидрид (143 мг, 1,429 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °С в течение 48 часов. ЖХ-МС показала, что было израсходовано около 50% исходного материала. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, $H_2O/MeCN$, элюирование от 5% до 70%) с получением NAG0050 (140 мг, выход 43%).

МС (ESI) $m/z = 2267,1 [M-1]^-$, рассчитано: 2268,0.

^1H NMR (400 МГц, $\text{CH}_3\text{CN-d}_3$) δ 7,54-7,14 (m, 14H), 6,97-6,64 (m, 8H), 5,32 (d, $J = 3,4$ Гц, 3H), 5,21-5,04 (m, 4H), 4,71-4,60 (m, 3H), 4,30 (d, $J = 6,8$ Гц, 3H), 4,17-3,95 (m, 14H), 3,93-3,84 (m, 3H), 3,79 (s, 7H), 3,74-3,65 (m, 3H), 3,63-3,08 (m, 26H), 2,57 (d, $J = 2,0$ Гц, 6H), 2,46-2,28 (m, 8H), 2,20 (dt, $J = 15,1, 7,4$ Гц, 5H), 2,11 (s, 2H), 2,01-1,97 (m, 16H), 1,90-1,88 (m, 9H), 1,65-1,55 (m, 4H), 1,39-1,20 (m, 14H).

Пример получения 7: Соединение NAG0051



Соединение 2

К растворителю дихлорметану (100 мл) добавляли соединение 1 (5,00 г, 21,4 ммоль) и ТЕА (8,04 мл, 57,9 ммоль). DMTrCl (9,08 г, 26,8 ммоль) медленно добавляли в

вышеуказанную систему при перемешивании при 0 °С. После добавления смесь нагревали до 25 °С и оставляли реагировать в течение 12 часов. К реакционному раствору добавляли насыщенный раствор бикарбоната натрия (100 мл) и экстрагировали смесь ДХМ (100 × 3). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (PE:EtOAc 100:0-70:30) с получением соединения 2 (12 г, выход 94%).

ЖХ-МС: хроматографические условия 5-95AB_1,5 мин, время удерживания 1,166 мин; МС (ESI) $m/z = 558,1 [M+Na]^+$.

$^1\text{H NMR}$: (400 МГц, CDCl_3) δ мл $^{-1}$ 7,52-7,47 (m, 2H), 7,42-7,35 (m, 8H), 7,34-7,27 (m, 3H), 7,26-7,19 (m, 1H), 6,89-6,81 (m, 4H), 5,68 (d, $J = 5,6$ Гц, 1H), 5,18-5,08 (m, 3H), 4,83 (br d, $J = 9,2$ Гц, 1H), 4,55-4,42 (m, 2H), 3,82 (s, 6H), 2,43-2,29 (m, 1H), 1,39-1,32 (m, 2H).

Соединение 3

Соединение 2 (6,00 г, 10,1 ммоль) добавляли к растворителю ТГФ (100 мл) и NH_3THF (1 М, 20,2 мл, 20,2 ммоль) добавляли к вышеуказанной системе при 0 °С. После добавления смесь оставляли реагировать при 20 °С в течение 12 часов. Затем смесь охлаждали до 0 °С и медленно последовательно добавляли EtOH (6 мл) и NaOH (20 мл, 60,0 ммоль) при 0 °С. Наконец, H_2O_2 (20 мл, 33,4 ммоль) медленно добавляли по каплям к реакционному раствору при 0 °С. Затем реакционный раствор медленно нагревали до 20 °С и оставляли реагировать в течение 12 часов. Реакционный раствор фильтровали и добавляли H_2O (200 мл) и EtOAc (200 мл). Смесь экстрагировали EtOAc (3 × 200 мл), и органическую фазу промывали насыщенным раствором Na_2SO_3 (100 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (ДХМ/MeOH) с получением неочищенного продукта (3,5 г), и продукт разделяли с помощью основной препаративной хроматографии (колонка: Xbridge 150 × 50 мм, 5 мкм; подвижная фаза: А: 0,1% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ + 0,005% FA в воде; В: MeCN; градиент: 20% В-95% В за 9 мин) с получением соединения 3 (850 мг, выход 15%) и соединения 4 (800 мг, выход 14%).

Соединение 3

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80AB_7 мин, время удерживания 4,214 мин; МС (ESI) $m/z = 576,3 [M+Na]^+$.

$^1\text{H NMR}$: (400 МГц, CDCl_3) δ мл $^{-1}$ 7,31-7,23 (m, 6H), 7,23-7,19 (m, 5H), 7,12-7,08 (m, 3H), 6,79-6,73 (m, 4H), 5,12 (s, 1H), 5,01 (s, 2H), 4,13 (s, 2H), 4,01-3,95 (m, 1H), 3,75-3,71 (m, 6H), 2,48-2,27 (m, 1H), 2,12-1,84 (m, 2H), 1,57 (br d, $J = 14,6$ Гц, 1H).

Соединение 4

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80AB_7 мин, время удерживания 4,305

мин; МС (ESI) $m/z = 576,3 [M+Na]^+$.

$^1\text{H NMR}$: (400 МГц, CDCl_3) δ млн $^{-1}$ 7,37-7,33 (m, 1H), 7,31-7,19 (m, 11H), 7,15-7,08 (m, 2H), 6,78-6,69 (m, 4H), 5,08-4,98 (m, 3H), 4,39-4,05 (m, 2H), 3,71 (m, 6H), 3,54-3,36 (m, 1H), 2,37-1,97 (m, 1H), 1,87-1,65 (m, 2H), 1,14-0,99 (m, 1H).

Соединение 5

Pd/C 5% (300 мг, 0,141 ммоль) добавляли к раствору соединения 3 (600 мг, 1,030 ммоль) в EtOAc (10 мл). Реакционный раствор оставляли реагировать при 20 °C в течение 2 часов в атмосфере водорода (15 фунтов на квадратный дюйм). Реакционный раствор фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, и неочищенный продукт отделяли с помощью основной препаративной хроматографии (колонка: Xbridge 150 × 50 мм, 5 мкм; подвижная фаза: А: 0,1% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ + 0,005% FA в воде; В: MeCN; градиент: 20% В-95% В в течение 9 мин) с получением соединения 5 (301 мг, выход 70%).

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80CD_3 мин, время удерживания 2,444 мин; МС (ESI) $m/z = 839,5 [2M+H]^+$.

ВЭЖХ: хроматографические условия 10-80CD_7 мин, время удерживания 4,100 мин.

$^1\text{H NMR}$: (400 МГц, CD_3OD) δ млн $^{-1}$ 7,49-7,44 (m, 2H), 7,34 (d, $J = 8,8$ Гц, 4H), 7,32-7,26 (m, 2H), 7,24-7,18 (m, 1H), 6,91-6,82 (m, 4H), 4,22-4,11 (m, 1H), 3,85-3,81 (m, 1H), 3,79 (s, 6H), 2,78-2,68 (m, 1H), 1,90-1,83 (m, 1H), 1,73-1,65 (m, 1H), 1,41-1,33 (m, 1H), 1,29-1,25 (m, 1H).

Соединение 7

Соединение 6 (233 мг, 0,953 ммоль), NATU (272 мг, 0,715 ммоль) и DIEA (0,236 мл, 1,430 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) и добавляли соединение 5 (200 мг, 0,477 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 25 °C в течение 1 часа. Добавляли H_2O (20 мл) и экстрагировали смесь ДХМ (20 мл × 3). Органические фазы объединяли, сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и остаток отделяли с помощью колоночной хроматографии (PE/EtOAc = 1/1-1/2) с получением соединения 7 (290 мг).

ЖХ/МС: хроматографические условия 10-80CD_3 мин, время удерживания 2,834 мин; МС (ESI) $m/z = 668,4 [M+Na]^+$.

$^1\text{H NMR}$: (400 МГц, CDCl_3) δ млн $^{-1}$ 7,49-7,44 (m, 2H), 7,41-7,30 (m, 6H), 7,25-7,18 (m, 1H), 6,89-6,79 (m, 4H), 4,30-4,07 (m, 2H), 3,87-3,79 (m, 7H), 3,73-3,64 (m, 4H), 2,8-2,80 (m, 7H), 2,32 (t, $J = 7,6$ Гц, 2H), 2,24-2,13 (m, 2H), 2,01-1,89 (m, 1H), 1,80-1,75 (m, 1H), 1,65-1,60 (m, 5H), 1,58 (s, 4H), 1,20-1,10 (m, 1H).

Соединение 8

Соединение 7 (290 мг, 0,404 ммоль) растворяли в ТГФ (10 мл) и H_2O (5 мл) и

добавляли LiOH (51 мг, 1,212 ммоль). Смесь оставляли реагировать при 25 °С в течение 3 часов. ТСХ (ДХМ/MeOH = 10/1) показала, что около 20% исходного материала не было израсходовано, и, таким образом, было добавлено дополнительно 50 мг LiOH. Смесь оставляли реагировать при 25 °С в течение 12 часов, и ТСХ (ДХМ/MeOH = 10/1) показала, что исходный материал был полностью израсходован. Реакционный раствор концентрировали и остаток отделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии (H₂O/CH₃CN = 5/1-3/1) с получением соединения 8 (217 мг).

ЖХ/МС: хроматографические условия 5-95CDN_1,5 мин, время удерживания 0,879 мин; МС (ESI) m/z = 630,3 [M-H]⁺.

ВЭЖХ: хроматографические условия 10-80CD_7 мин, время удерживания 2,677 мин.

¹H NMR: (400 МГц, CD₃OD) δ млн⁻¹ 7,50-7,44 (m, 2H), 7,38-7,32 (m, 4H), 7,32-7,27 (m, 2H), 7,24-7,19 (m, 1H), 6,91-6,85 (m, 4H), 4,25-4,14 (m, 1H), 4,02-3,96 (m, 1H), 3,80 (s, 6H), 3,73-3,65 (m, 1H), 2,20-2,10 (m, 4H), 1,97-1,86 (m, 1H), 1,75-1,70 (m, 1H), 1,66-1,53 (m, 4H), 1,51-1,41 (m, 1H), 1,37-1,26 (m, 13H).

Соединение 9

Соединение NAG0026 (300 мг, 0,197 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (4 мл) и добавляли молекулярное сито 3А (100 мг). Затем последовательно добавляли соединение 8 (137 мг, 0,217 ммоль), НОВt (32 мг, 0,236 ммоль), DCC (53 мг, 0,256 ммоль) и DIEA (0,10 мл, 0,591 ммоль). Реакционный раствор оставляли реагировать при 40 °С в течение 16 часов. Реакционный раствор гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали и затем очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, H₂O/MeCN, элюирование от 5% до 80%) с получением соединения 9 (330 мг).

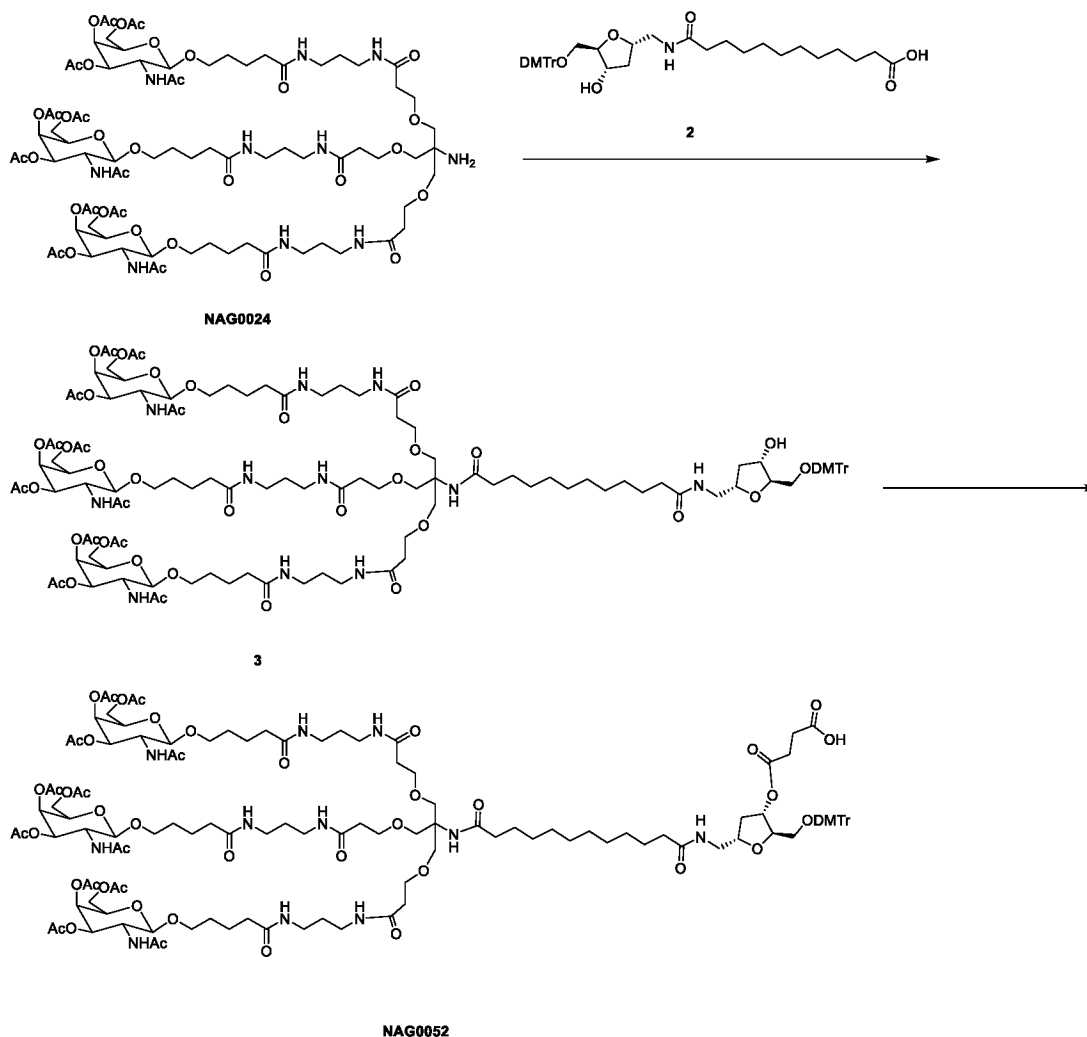
Соединение NAG0051

Соединение 9 (330 мг, 0,154 ммоль) растворяли в безводном пиридине (5 мл) и последовательно добавляли молекулярное сито 3А (100 мг), ДМАП (94 мг, 0,771 ммоль) и янтарный ангидрид (154 мг, 1,543 ммоль). Реакционный раствор перемешивали при 50 °С в течение 48 часов. ЖХ-МС показала, что было израсходовано около 60% исходного материала. Реакционный раствор фильтровали, концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, H₂O/MeCN, элюирование от 5% до 70%) с получением NAG0051 (190 мг).

МС (ESI) m/z = 2237,3 [M-1]⁻, рассчитано: 2238,0.

¹H NMR (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 7,54-7,16 (m, 14H), 7,01-6,53 (m, 8H), 5,32 (d, J = 5,1 Гц, 3H), 5,20-4,89 (m, 4H), 4,65 (q, J = 7,2 Гц, 3H), 4,38-3,20 (m, 52H), 2,51-2,44 (m, 4H), 2,36-2,20 (m, 20H), 2,02-1,97 (m, 20H), 1,64-1,20 (m, 22H).

Пример получения 8: Синтез NAG0052



Соединение 3

Соединение NAG0024 (271 мг, 0,151 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (2 мл) и безводном ДМФА (4 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота и добавляли молекулярное сито 3А. Затем последовательно добавляли соединение 2 (100 мг, 0,151 ммоль), НОВт (25 мг, 0,181 ммоль), DCC (38 мг, 0,181 ммоль) и DIEA (39 мг, 0,302 ммоль). Реакционный раствор оставляли реагировать при 45 °С в течение 16 часов. После завершения реакции, как показано с помощью ЖХ-МС, реакционный раствор гасили водой и фильтровали. Фильтрат концентрировали и затем очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O) с получением соединения 3 (210 мг, выход 57%).

Соединение NAG0052

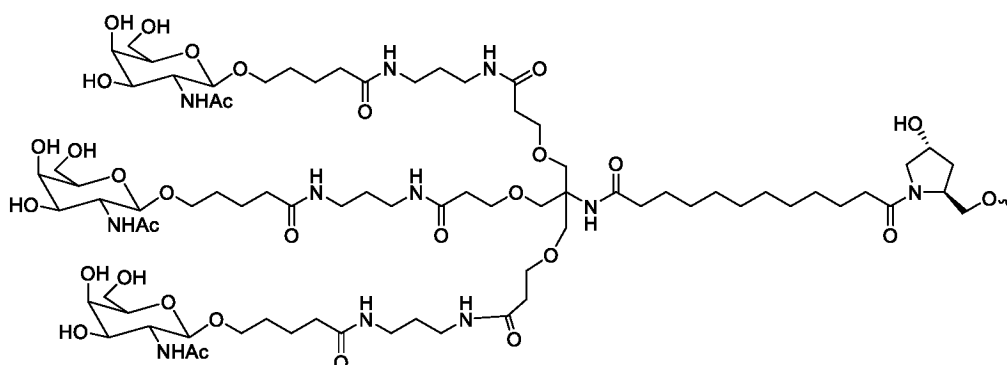
Соединение 3 (230 мг, 0,094 ммоль) растворяли в пиридине (5 мл) при комнатной температуре и добавляли молекулярное сито. Добавляли ДМАП (12 мг, 0,283 ммоль) и янтарный ангидрид (28 мг, 0,283 ммоль). Смесь перемешивали при 50 °С в течение 16 ч в атмосфере азота. Анализ ЖХ-МС показал, что реакция была завершена. Реакционный

раствор фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка Boston C18, 0-100% MeCN/H₂O), а затем очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Xbridge 150 × 50 мм, 5 мкм; подвижная фаза: А: 0,1% NH₃H₂O + 0,005% FA в воде; В: MeCN; градиент: 20% В-95% В за 9 мин) с получением соединения NAG0052 (123 мг, 0,048 ммоль, выход 51%).

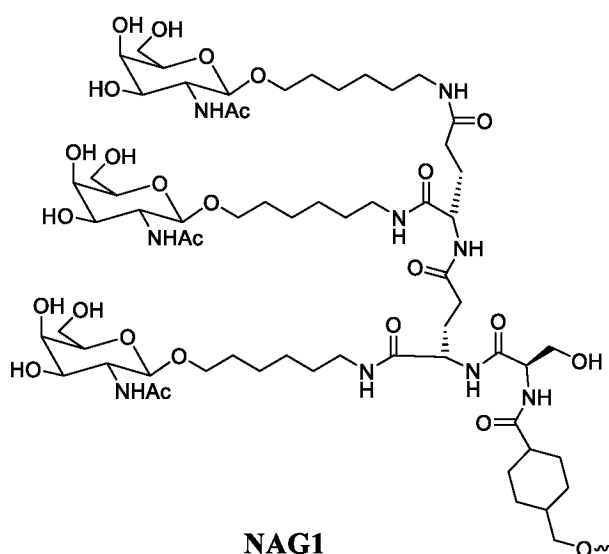
МС (ESI) m/z = 2535,3 [M-1]⁻, рассчитано: 2536,2.

¹H NMR (400 МГц, CH₃CN-d₃) δ 7,48-7,43 (m, 2H), 7,37-7,12 (m, 11H), 7,00-6,85 (m, 10H), 6,66 (s, 1H), 5,31 (dd, J = 3,4, 1,1 Гц, 3H), 5,20-5,13 (m, 1H), 5,05 (dd, J = 11,3, 3,4 Гц, 3H), 4,56 (d, J = 8,5 Гц, 3H), 4,30 (dd, J = 7,7, 5,3 Гц, 1H), 4,18-3,93 (m, 14H), 3,79 (s, 10H), 3,65 (q, J = 4,7, 3,6 Гц, 13H), 3,56-3,07 (m, 24H), 2,56 (s, 6H), 2,37 (t, J = 5,8 Гц, 10H), 2,17 (t, J = 7,5 Гц, 9H), 2,02-1,96 (m, 20H), 1,88 (s, 8H), 1,82-1,73 (m, 2H), 1,60 (dt, J = 15,0, 7,3 Гц, 16H), 1,27 (s, 13H).

Пример получения 9: Синтез L96 и NAG1



L96



NAG1

L96 получали согласно способу, описанному в патентной заявке WO2014025805A1, и NAG1 получали согласно способу, описанному в патентной заявке WO2021254360A1. Эти патентные заявки полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Пример получения 10: Синтез конъюгатов нуклеиновой кислоты и лиганда

1. Приготовление смолы с подложкой

Соединение NAG0050, содержащее группу карбоновой кислоты (140 мг, 0,062 ммоль), растворяли в безводном ДМФА (3 мл). После полного растворения субстрата последовательно добавляли безводный ацетонитрил (4 мл), DIEA (0,03 мл, 0,154 ммоль, 2,5 экв.) и HBTU (О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруний гексафторфосфат) (35 мг, 0,093 ммоль, 1,5 экв.). После того, как реакционный раствор хорошо перемешивали, добавляли макропористую аминотетильную смолу (476 мг, загрузка холостого раствора 0,41 ммоль/г, целевая загрузка 0,1 ммоль/г). Реакционный раствор встряхивали на шейкере (температура: 25 °С; скорость вращения: 200 об/мин) в течение ночи. Реакционный раствор фильтровали. Осадок на фильтре промывали ДХМ, а затем безводным ацетонитрилом. Твердое вещество собирали и сушили под вакуумом в течение ночи.

Затем твердое вещество диспергировали в безводном ацетонитриле (5 мл) и последовательно добавляли пиридин (0,18 мл), DMAP (3 мг), NMI (0,12 мл) и CapB1 (2,68 мл). Реакционный раствор встряхивали на шейкере (температура: 25 °С; скорость вращения: 200 об/мин) в течение 2 ч. Реакционный раствор фильтровали. Осадок на фильтре промывали безводным ацетонитрилом. Твердое вещество собирали и сушили под вакуумом в течение ночи с получением смолы с подложкой. Нагрузку измеряли при 0,1 ммоль/г.

Соединения NAG0051 и NAG0052 подвергали одинаковым условиям реакции с получением смолы с подложкой.

2. Для NAG0050-NAG0052, который был присоединен к смоле, смолу использовали в качестве начала, и нуклеозидные мономеры присоединяли один за другим в направлении 3'-5' в порядке расположения нуклеотидов. Каждый раз, когда присоединяли нуклеозидный мономер, участвовали четыре реакции - защита, связывание, кэпирование и окисление или сульфуризация.

Модели прибора: твердофазный синтезатор Biolytic Dr. Oligo 48, универсальная колонка для синтеза Biosomma Embed™ CPG Frits DS0200 и 96-луночная колонка для обессоливания планшетов Biosomma DC189650 (80 мг).

Таблица 1. Реагенты, используемые в синтезе конъюгатов мРНК

Реагент	Композиция	Спецификация	Применение	Изготовитель
ACT	0,6 М ETT в ACN	4 л	Катализатор	Kroma
Cap A	N-метилимидазол:ацетонитрил 2:8	4 л		Kroma

Сар В1	Уксусный ангидрид:ацетонитрил 40:60	4 л	Реагент для кэппинга	Кroma
Сар В2	Пиридин:ацетонитрил 60:40	4 л		Кroma
OXD	50 нМ йод в пиридин:вода 90:10	4 л	Окислитель	Кroma
DCA	Дихлоруксусная кислота в дихлорметане (3% об./об.)	1 кг	Защитный реагент для удаления ДМТ	Кroma
Ацетонитрил	Содержание воды меньше 20 ч./млн (около 10 ч./млн в реальности)	4 л	Растворитель	Кroma
PADS (дифенил ацетилди сульфид)	После смешивания равного объема триметилпиридина и ацетонитрила готовят 0,05 М раствор PADS		Сульфурюю щий реагент	Кroma
Триметил пиридин				Кroma

Условия синтеза:

Нуклеозидные мономеры получали в виде 0,05 М растворов в ацетонитриле. Условия для каждой реакции снятия защиты были одинаковыми: температура составляла 25 °С; время реакции составляло 3 минуты; реагент для снятия защиты представлял собой DCA; и объем инъекции составлял 180 мкл.

Условия для каждой реакции сочетания были одинаковыми: температура составляла 25 °С; время реакции составляло 3 минуты; объем введения нуклеозидных мономеров составлял 90 мкл; и объем введения катализатора АСТ составлял 110 мкл.

Условия для каждой реакции кэпирования были одинаковыми: температура составляла 25 °С; время реакции составляло 2 минуты; кэпирующий реагент представлял собой 1:1 (молярное соотношение) смешанный раствор СарА и СарВ (СарВ1:СарВ2 1:1); и объем введения кэпирующего реагента составлял 180 мкл.

Условия для каждой реакции окисления были одинаковыми: температура составляла 25 °С; время реакции составляло 3 минуты; и объем введения окисляющего реагента OXD составлял 180 мкл.

Условия для каждой реакции сульфуризации были одинаковыми: температура составляла 25 °С; время реакции составляло 4 минуты; сульфурюющий реагент

представлял собой 0,05 М раствор PADS в пиридилацетонитриле; и объем введения сульфурлирующего реагента составлял 180 мкл.

3. После присоединения последнего нуклеозидного мономера последовательность нуклеиновой кислоты, присоединенную к твердофазной подложке, расщепляли, снимали защиту, очищали, обессоливали, а затем лиофилизировали с получением смысловой цепи и антисмысловой цепи, где:

3-1. Условия расщепления и снятия защиты: Синтезированную нуклеотидную последовательность, присоединенную к подложке, добавляли к смешанному раствору аммиачной воды и этанола (3:1) до тех пор, пока объем не составлял 0,8 мл. Реакцию проводили при 50 °С в течение 15 часов. Оставшуюся подложку удаляли фильтрованием и супернатант концентрировали под вакуумом досуха.

3-2. Условия очистки и обессоливания: обессоливание проводили с использованием 96-луночной колонки для обессоливания планшета Biosomma DC189650 (80 мг). К конкретным условиям относятся:

3-2-1. Подготовка образца

0,1 М ТЕАА (триэтиламинацетат) добавляли к образцу олигонуклеотида до тех пор, пока объем не составлял 0,8 мл.

3-2-2. Активация 96-луночного планшета

Активация: 0,8 мл ацетонитрила добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета для активации.

Уравновешивание: 96-луночный планшет уравновешивали 0,8 мл раствора ТЕАА (рН 7,0).

3-2-3. Процесс очистки:

0,8 мл раствора, содержащего олигонуклеотиды, пропускали через обессоливающую колонку; 96-луночный планшет дважды промывали 0,8 мл 6,5% аммиачной воды для удаления неудачных последовательностей; 96-луночный планшет дважды промывали 0,8 мл деионизированной воды для удаления соли; 96-луночный планшет промывали 3 раза 0,8 мл 3% трифторуксусной кислоты для удаления ДМТ, и наблюдали, что адсорбционный слой становился оранжево-красным; 96-луночный планшет промывали 0,8 мл 0,1 М ТЕАА; 96-луночный планшет дважды промывали 0,8 мл деионизированной воды для удаления трифторуксусной кислоты и остаточной соли; элюирование проводили с 0,6 мл 20% ацетонитрила, и собирали элюат и лиофилизировали.

Способ обнаружения: С помощью ЖХМС Waters Acquity UPLC-SQD2 (колонка: ACQUITY UPLC BEH C18) определяли чистоту смысловых и антисмысловых цепей, описанных выше, и анализировали их молекулярную массу. Найденные значения

согласуются с рассчитанными значениями, что указывает на то, что синтезированные были смысловыми и антисмысловыми цепями, 3'-концы которых конъюгированы с молекулами конъюгации.

4. Процедура отжига:

Смысловые и антисмысловые нити, синтезированные на стадии 3, растворяли в воде для инъекций с образованием растворов 1000 нг/мкл, и растворы смешивали в эквимольном соотношении на приборе для КПЦР (количественная полимеразная цепная реакция) (Applied Biosystems QuantStudio 6&7 Pro), нагревали при 90 °C в течение 10 мин, выдерживали в течение 3 мин после каждого снижения на 5 °C и, наконец, выдерживали при 25 °C в течение 10 мин, так что они образовывали двухцепочечную структуру через водородные связи. Найденные значения согласуются с рассчитанными значениями, что свидетельствует о том, что синтезированные конъюгаты миРНК представляли собой сконструированные двухцепочечные последовательности нуклеиновых кислот с конъюгированными молекулами. миРНК имеют смысловые и антисмысловые цепи, показанные в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2

Конъюгат лиганда нуклеиновой кислоты №	смысловая цепь конъюгата миРНК №	антисмысловая цепь конъюгата миРНК №
TRD002218	TJR4373-SS	TJR0414-AS
TRD007203	TJR013483S	TJR0414-AS
TRD007204	TJR013484S	TJR0414-AS
TRD007205	TJR013485S	TJR0414-AS

Таблица 3. Последовательности нуклеиновых кислот смысловой и антисмысловой цепей

		Направление последовательности 5'-3'
Смысловая цепь	TJR4373-SS	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am-L96
	TJR013483S	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams-NAG0050'
	TJR013484S	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams-NAG0051'

	TJR013485S	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAms Ams-NAG0052'
Антисмысловая цепь	TJR0414- AS	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm

Структуры вышеуказанных конъюгатов следующие:

смысловая цепь конъюгата миРНК №	Структура
TJR4373-SS	
TJR013483S	
TJR013484S	
TJR013485S	

Конъюгат TRD002218 использовали в качестве эталонного положительного соединения.

Экспериментальный пример 1

В этом эксперименте эффективность ингибирования конъюгатов миРНК по настоящему изобретению, которые были конъюгированы с различными структурами, исследовали *in vivo* в отношении уровня экспрессии мРНК целевого гена.

Самцов мышей C57BL/6 в возрасте от шести до восьми недель случайным образом разделяли на группы по 6, по 3 мыши на временную точку. Этим группам мышей вводили конъюгаты по настоящему изобретению (3 конъюгата: TRD007203, TRD007204 и TRD007205), эталонный положительный конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда TRD002218 и PBS (фосфатно-солевой буферный раствор).

Всем животным вводили одну подкожную инъекцию в соответствии с их массой тела. Дозы конъюгатов миРНК (на основе миРНК) составляли 1 мг/кг, а объем составлял 5 мл/кг. Мышей умерщвляли через 7 дней и 28 дней после введения, и потом их печень собирали и хранили с РНК (Sigma Aldrich). Затем ткань печени гомогенизировали с использованием тканевого гомогенизатора, а общую РНК экстрагировали из ткани печени с использованием набора для экстракции тканевой РНК (FireGen Biomedicals, FG0412), следуя процедуре, описанной в инструкциях. Общая РНК была обратно транскрибирована в кДНК, а уровень экспрессии мРНК TTR в ткани печени измеряли с помощью количественной PCR с флуоресценцией в реальном времени. В методе количественной PCR с флуоресценцией в качестве внутреннего эталонного гена использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), а уровни экспрессии мРНК TTR и GAPDH измеряли с использованием праймеров-зондов Taqman для TTR и GAPDH, соответственно.

Таблица 4. Группирование соединений, используемых в испытании *in vivo* на мышях

№ соединения	Доза	Количественное определение мРНК	Количество животных	Примечание
PBS	-	Д7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD002218	1 мг/кг подкожно	Д7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD007203	1 мг/кг подкожно	Д7, 28	6	3 мыши на временную точку
TRD007204	1 мг/кг	Д7, 28	6	3 мыши на

	ПОДКОЖНО			временную точку
TRD007205	1 мг/кг ПОДКОЖНО	Д7, 28	6	3 мыши на временную точку

Таблица 5. Последовательности праймеров обнаружения

Название праймера	Прямой праймер
mTTR-F	GGGAAGACCGCGGAGTCT
mTTR-R	CAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACAAA
mTTR-P	5`6-FAM-CTGCACGGGCTCACCACAGATGA-3`BHQ1
mGAPDH-F	CGGCAAATTCAACGGCACAG
mGAPDH-R	CCACGACATACTCAGCACCG
mGAPDH-P	5`TET-ACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACT-3`BHQ2

Уровень экспрессии мРНК TTR рассчитывали в соответствии с приведенным ниже уравнением:

Экспрессия мРНК TTR = [(экспрессия мРНК TTR в тестовой группе /экспрессия мРНК GAPDH в тестовой группе)/(экспрессия мРНК TTR в контрольной группе /экспрессия мРНК GAPDH в контрольной группе)]×100%.

Эффективность ингибирования конъюгатов мРНК по настоящему изобретению, которые конъюгированы с различными структурами, против уровня экспрессии мРНК целевого гена *in vivo* через 7 дней и 28 дней после введения показана на фиг. 1 и фиг. 2, соответственно. Как видно из результатов на фиг. 1, как конъюгат TRD007203 NAG0050, так и конъюгат TRD007205 NAG0052 хорошо ингибировали экспрессию мРНК TTR через 7 дней после введения, и конъюгат TRD007203 NAG0050 оказывал значительно лучший эффект, чем конъюгат TRD002218 из L96, что указывает на то, что он может опосредовать более эффективную доставку мРНК. Как видно из фиг. 2, через 28 дней после введения конъюгат TRD007203 NAG0050, конъюгат TRD007204 NAG0051 и конъюгат TRD007205 NAG0052 оказывали лучшее ингибирующее действие на уровень экспрессии мРНК целевого гена, чем конъюгат TRD002218 из L96, и превосходство конъюгата TRD007203 NAG0050 является наиболее значительным.

Пример получения 11: Синтез конъюгатов нуклеиновой кислоты и лиганда

Следующие конъюгаты миРНК синтезировали со ссылкой на процедуры Примера получения 10. миРНК имеют смысловые и антисмысловые цепи, показанные в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Соединения нуклеиновых кислот

Ген	№ конъюгата миРНК	смысловая цепь конъюгата миРНК №	антисмысловая цепь конъюгата миРНК №
FXI	TRD008002	TJR014937S	TJR013318A
	TRD008003	TJR014938S	TJR013314A
ANGPTL3	TRD008004	TJR014939S	TJR013287A
	TRD008005	TJR014940S	TJR013288A
	TRD008006	TJR014941S	TJR013289A
MARC1	TRD008024	TJR014963S	TJR014959A
	TRD008025	TJR014964S	TJR014960A
	TRD008026	TJR014965S	TJR014961A
	TRD008027	TJR014966S	TJR014962A
	TRD6233	TJR12296-SS	TJR12338-AS
	TRD6238	TJR12301-SS	TJR12343-AS
	TRD6253	TJR12316-SS	TJR12358-AS

В качестве эталонных положительных соединений использовали конъюгаты TRD6233, TRD6238 и TRD6253.

Таблица 7. Последовательности нуклеиновых кислот смысловой и антисмысловой цепей

	№	Направление последовательности 5'-3'
Смысловая цепь	TJR014937S	CmsUmsUm GmCfAm AfCfAf AmAmGm AmCmAm UmUmUm Am-NAG0052'
	TJR014938S	UmsCmsAm GmGfAm UfGfAf UmUmUm UmCmUm UmAmUm Um-NAG0052'
	TJR014939S	GmsAmsAm GmAfGm CfAfAf CmUmAm AmCmUm AmAmCm Um-NAG0052'
	TJR014940S	AmsGmsGm UmAfAm AfGfAf AmUmAm UmGmUm

		CmAmCm Um-NAG0052'
	TJR014941S	AmsGmsUm GmAfAm GfCfAf AmUmCm UmAmAm UmUmAm Um-NAG0052'
	TJR014963S	GmsUmsAm UmGfUm CfCfUf GmGmAm AmUmAm UmUmAm Am-NAG0052'
	TJR014964S	AmsCmsAm AmGfAm CfAfGf GmAmUm UmCmUm GmAmAm Am-NAG0052'
	TJR014965S	CmsUmsCm UmAfAm GfAfUf CmUmGm AmUmGm AmAmGm Um-NAG0052'
	TJR014966S	AmsGmsUm UmGfAm CfUfAf AmAmCm UmUmGm AmAmAm Am-NAG0052'
	TJR12296-SS	GmsUmsAm UmGfUm CfCfUf GmGmAm AmUmAm UmUmAm Am-NAG1
	TJR12301-SS	AmsCmsAm AmGfAm CfAfGf GmAmUm UmCmUm GmAmAm Am-NAG1
	TJR12316-SS	CmsUmsCm UmAfAm GfAfUf CmUmGm AmUmGm AmAmGm Um-NAG1
АнтиСМЫ СЛОВАЯ ЦЕПЬ	TJR013318A	UmsAfsAm AfUmGf U(036)CmUm UfUmGf UmUfGm CfAmAf GmsCmsGm
	TJR013314A	UmsAfsUm AfAmGf A(036)AmAm AfUmCf AmUfCm CfUmGf AmsAmsAm
	TJR013287A	AmsGfsUm UfAmGf U(036)UmAm GfUmUf GmCfUm CfUmUf CmsUmsAm
	TJR013288A	AmsGfsUm GfAmCf A(036)UmAm UfUmCf UmUfUm AfCmCf UmsCmsUm
	TJR013289A	AmsUfsAm AfUmUf A(036)GmAm UfUmGf CmUfUm CfAmCf UmsAmsUm
	TJR014959A	UmsUfsAm AfUmAf U(036)UmCm CfAmGf GmAfCm AfUmAf CmsGmsGm
	TJR014960A	UmsUfsUm CfAmGf A(036)AmUm CfCmUf GmUfCm UfUmGf UmsCmsAm
	TJR014961A	AmsCfsUm UfCmAf U(036)CmAm GfAmUf CmUfUm AfGmAf GmsUmsUm

TJR014962A	UmsUfsUm UfCmAf A(036)GmUm UfUmAf GmUfCm AfAmCf UmsUmsCm
TJR12338-AS	UmsUfsAm AfUmAf U(036)UmCf CmAmGf GmAfCm AfUmAf CmsGmsGm
TJR12343-AS	UmsUfsUm CfAmGf A(036)AmUf CmCmUf GmUfCm UfUmGf UmsCmsAm
TJR12358-AS	AmsCfsUm UfCmAf U(036)CmAf GmAmUf CmUfUm AfGmAf GmsUmsUm

036 представляет собой модификацию (-)hmpNA(A) (изменение оснований с последовательностью), описанную в WO2022028462A1.

Пример испытания 2. Целевая активность миРНК-последовательности psiCHECK 11 в точке концентрации

Последовательности миРНК в Таблице 6 подвергали *in vitro* моделированию на молекулярном уровне скрининга активности мишени в клетках HEK293A (Nanjing Cobioer) с использованием 11 концентраций.

Соответствующие целевые последовательности миРНК конструировали из генов FXI, ANGPTL3 и MARC1 человека и встраивали в плазмиды psiCHECK-2 (Sangon Biotech Co., Ltd.). Плазмиды содержали ген люциферазы рениллы и ген люциферазы светлячка. Плазмиды представляли собой системы двойных генов репортеров. Целевую последовательность миРНК вставляли в область 3' UTR (3'-нетранслируемая область) гена люциферазы рениллы. Активность миРНК для последовательности-мишени отражалась путем измерения экспрессии люциферазы рениллы после калибровки люциферазой светлячка. В измерении использовалась система анализа репортера двойной люциферазы (Promega, E2940).

Клетки HEK293A культивировали при 37 °C с 5% CO₂ в среде с высоким содержанием глюкозы DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. За 24 часа до трансфекции клетки HEK293A инокулировали на 96-луночный планшет, каждая лунка которого содержала 100 мкл среды, с плотностью 8×10³ клеток на лунку.

Клетки совместно трансфицировали миРНК и соответствующими плазмидами с использованием Lipofectamine2000 (ThermoFisher, 11668019); использовали 0,2 мкл Lipofectamine2000 и 20 нг плазмид на лунку. Для плазмид целевой последовательности было установлено в общей сложности 11 точек концентрации миРНК. Самая высокая конечная концентрация в точке концентрации составляла 20 нМ, и проводили 3-кратное серийное

разведение. Через 24 часа после трансфекции целевые уровни определяли с использованием Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, E2940). Данные анализировали с использованием GraphPad Prism5, и результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8. Результаты скрининга на предмет целевой активности последовательности миРНК psi-CHECK

№ конъюгата миРНК	Проценты остаточной экспрессии мРНК целевого гена (GSCM) (среднее) при различных концентрациях миРНК					
	20 нМ	6,6667 нМ	2,2222 нМ	0,7407 нМ	0,2469 нМ	0,0823 нМ
TRD008002	6,4%	5,9%	6,5%	7,8%	9,7%	15,0%
TRD008003	3,9%	3,4%	3,8%	4,1%	5,1%	9,2%
TRD008004	5,4%	4,9%	4,0%	5,6%	6,8%	17,5%
TRD008005	5,5%	3,7%	3,7%	5,0%	5,5%	12,7%
TRD008006	4,2%	3,1%	3,3%	3,8%	5,7%	10,6%
TRD008024	26,91%	20,16%	18,02%	16,21%	17,50%	25,18%
TRD008025	24,41%	21,09%	22,07%	18,86%	20,28%	29,57%
TRD008026	10,66%	10,26%	9,51%	11,47%	15,20%	24,28%
TRD008027	20,33%	15,44%	15,61%	14,39%	15,31%	27,01%
№ конъюгата миРНК	Проценты остаточной экспрессии мРНК целевого гена (GSCM) (среднее) при различных концентрациях миРНК					Значение GSCM IC ₅₀ (нМ)
	0,0274 нМ	0,0091 нМ	0,0030 нМ	0,0010 нМ	0,0003 нМ	
TRD008002	34,7%	74,2%	93,6%	98,7%	93,7%	0,0179
TRD008003	20,2%	54,0%	77,3%	96,3%	88,0%	0,0099
TRD008004	38,0%	73,3%	97,3%	102,2%	84,5%	0,0196
TRD008005	33,6%	69,4%	112,9%	124,6%	103,1%	0,0157
TRD008006	23,5%	51,2%	75,9%	89,2%	88,7%	0,0093
TRD008024	44,20%	71,85%	99,14%	95,71%	100,03%	0,0204
TRD008025	48,80%	88,00%	100,83%	98,83%	100,45%	0,0267
TRD008026	49,72%	99,29%	103,55%	104,57%	100,83%	0,0288
TRD008027	47,05%	81,86%	114,93%	122,14%	100,28%	0,0238

Результаты показывают, что лиганд NAG0052 по настоящему изобретению при конъюгации с миРНК различных структурных последовательностей может эффективно

ингибировать экспрессию мРНК гена-мишени в клетках.

Тестовый пример 3. Ингибирование FXI, ANGPTL3, MACR1 человека в первичных гепатоцитах человека (PHH) миРНК

миРНК в Таблице 6 подвергали скринингу активности первичных гепатоцитов человека (PHH) в первичных гепатоцитах человека (PHH, Novabiosis) с использованием 5 или 7 концентраций.

Первичные гепатоциты человека (PHH) криоконсервировали в жидком азоте, и за 24 часа до трансфекции первичные гепатоциты человека (PHH) оттаивали и затем инокулировали в 96-луночный планшет, каждая лунка которого содержала 80 мкл среды, с плотностью 3×10^4 клеток на лунку. Для трансфекции миРНК использовали Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150). Конечные концентрации градиента трансфекции миРНК для эксперимента с 7 точками концентрации составляли 10 нМ, 2 нМ, 0,4 нМ, 0,08 нМ, 0,016 нМ, 0,0032 нМ и 0,00064 нМ. Конечные концентрации градиента трансфекции миРНК для эксперимента с 5 точками концентрации составляли 5 нМ, 0,625 нМ, 0,0781 нМ, 0,00977 нМ и 0,00122 нМ. Через 24 часа обработки экстракцию общей РНК клеток проводили с использованием набора для экстракции клеточной РНК с высокой пропускной способностью (FireGen, FG0417), обратную транскрипцию проводили с использованием набора для обратной транскрипции РНК (Takara, 6210A), а уровни мРНК FXI, ANGPTL3 и MACR1 человека определяли с использованием набора Q-PCR для зонда Taqman (ThermoFisher, 4444964). Уровни мРНК FXI, ANGPTL3 и MACR1 человека корректировали в соответствии с внутренним эталонным уровнем экспрессии гена GAPDH. Праймеры зонда Taqman показаны в таблице 9. Обработку данных проводили с использованием способа $2^{-\Delta\Delta Ct}$, и результаты выражали как оставшиеся проценты экспрессии мРНК FXI, ANGPTL3 и MACR1 человека по сравнению с клетками, подвергшимися контрольной обработке миРНК. Результаты скорости ингибирования IC_{50} показаны в Таблице 10 и Таблице 11.

$\Delta\Delta Ct = [(целевой \text{ ген экспериментальной группы } Ct - \text{ внутренний эталон экспериментальной группы } Ct) - (целевой \text{ ген контрольной группы } Ct - \text{ внутренний эталон контрольной группы } Ct)]$.

Уровень ингибирования (%) = $(1 - \text{остаточное значение экспрессии целевого гена}) \times 100\%$.

Таблица 9. Праймеры Taqman

Название праймера	Последовательность праймера
-------------------	-----------------------------

hFXI-PF	TTTGCTGGGAGAGGGTGTTG
hFXI-PR	TACAAACACCAAGCCCCTTCA
hFXI-P	CCAGCATGCTTCCTCCACAGTAACACG
hANG3-PF1-MGB	TTACTGGCAATGTCCCAATG
hANG3-PR1-MGB	TGAAGTGTCCTTTTGTCTTTGTGA
hANG3-P1-MGB	ACAAAGATTTGGTGTTTTC
hMARC1-PF	GCTCAGGAGGATGGTTGTGTAGT
hMARC1-PR	GAAGGAGCACTCCGTCATTAGC
hMARC1-P	CCCTGGATCCTTGCCATTCCCCTC
hGAPDH-PF1-MGB	GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC
hGAPDH-PR1-MGB	TTGACGGTGCCATGGAATTT
hGAPDH-P1-MGB	TTACATGTTCCAATATGATTCC

Таблица 10. Многодозовая ингибирующая активность миРНК в клетках РНН

№ конъюгата миРНК	Проценты остаточной экспрессии мРНК целевого гена (РНН) (среднее) при различных концентрациях миРНК							Значения IC ₅₀ (нМ)
	10 нМ	2 нМ	0,4 нМ	0,08 нМ	0,016 нМ	0,0032 нМ	0,00064 нМ	
TRD008002	16,61 %	23,16 %	34,70 %	38,35 %	52,77%	91,37%	105,17 %	0,0295
TRD008003	19,15 %	25,65 %	39,67 %	42,81 %	55,62%	80,31%	91,47%	0,0465
TRD008004	4,27%	6,24%	7,34%	15,42 %	41,23%	68,30%	81,65%	0,0098
TRD008005	5,85%	5,66%	8,71%	24,52 %	47,34%	88,18%	84,60%	0,0176
TRD008006	6,52%	5,99%	8,44%	10,76 %	33,06%	58,39%	63,74%	0,0066
TRD008024	12,72 %	8,30%	8,86%	9,68%	19,98%	36,58%	65,77%	0,0015
TRD008025	9,63%	9,62%	9,93%	20,08 %	28,44%	38,41%	55,92%	0,0011
TRD008026	7,44%	9,15%	10,37 %	15,59 %	33,72%	53,33%	68,26%	0,0044

Таблица 11. Многодозовая ингибирующая активность миРНК в клетках РНН

№ конъюгата миРНК	Проценты остаточной экспрессии мРНК MARC1 (РНН) (среднее) при различных концентрациях миРНК					Значения IC ₅₀ (нМ)
	5 нМ	0,63 нМ	0,078 нМ	0,0098 нМ	0,0012 нМ	
TRD6233	5,70%	6,45%	н/д (нет данных)	44,32%	76,77%	0,0074
TRD6238	6,46%	12,07%	29,28%	63,63%	118,05%	0,0186
TRD6253	7,90%	12,13 %	33,85%	56,02%	65,52%	0,0206

Результаты показывают, что лиганд NAG0052 по настоящему изобретению при конъюгации с миРНК различных структурных последовательностей может эффективно ингибировать экспрессию мРНК гена-мишени на первичных гепатоцитах человека. Конъюгаты TRD008024, TRD008025 и TRD008026 NAG0052 продемонстрировали лучшую ингибирующую активность в отношении клеток РНН, чем конъюгаты TRD6233, TRD6238 и TRD6253 NAG1.

Тестовый пример 4. Ингибирование FXI в первичных гепатоцитах яванских макак (PCH) с помощью миРНК - 7 точек концентрации ингибирующей активности

2 миРНК FXI в Таблице 6 подвергали скринингу активности обратной трансфекции в первичных гепатоцитах обезьян (PCH, Milestone) с использованием 7 концентраций. Начальная конечная концентрация для трансфекции каждого образца миРНК составляла 10 нМ, и проводили 5-кратное серийное разведение для получения 7 точек концентрации.

Первичные гепатоциты обезьян (PCH) криоконсервировали в жидком азоте, и перед трансфекцией первичные гепатоциты обезьян (PCH) оттаивали, а затем инокулировали в 96-луночный планшет, каждая лунка которого содержала 90 мкл среды, с плотностью 3×10^4 клеток на лунку. Для трансфекции миРНК использовали Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150), а конечные концентрации градиента для трансфекции миРНК составляли 10 нМ, 2 нМ, 0,4 нМ, 0,08 нМ, 0,016 нМ, 0,0032 нМ и 0,00064 нМ. Через 24 часа обработки экстракцию общей РНК клеток проводили с использованием набора для экстракции клеточной РНК с высокой пропускной способностью (FireGen, FG0417), обратную транскрипцию проводили с использованием набора для обратной транскрипции РНК (Takara, 6210A), а уровень мРНК FXI обезьян определяли с использованием набора для Q-PCR с зондом Taqman (ThermoFisher, 4444964). Уровень мРНК FXI обезьяны корректировали в соответствии с уровнем внутреннего эталонного гена GAPDH. Праймеры

зонда Taqman показаны в таблице 12. Обработку данных проводили с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$, и результаты выражали как оставшиеся проценты экспрессии мРНК FXI обезьяны по сравнению с клетками, подвергшимися контрольной обработке миРНК. Результаты скорости ингибирования IC₅₀ показаны в таблице 13.

$\Delta\Delta C_t = [(\text{целевой ген экспериментальной группы } C_t - \text{внутренний эталон экспериментальной группы } C_t) - (\text{целевой ген контрольной группы } C_t - \text{внутренний эталон контрольной группы } C_t)]$.

Уровень ингибирования (%) = (1 - остаточное значение экспрессии целевого гена) × 100%.

Таблица 12. Праймеры для зондов Taqman обезьяны

Название праймера	Последовательность праймера
mkFXI-V1-PF1	CTGGATATTGTTGCTGTGAAAGGT
mkFXI-V1-PR1	CCTTCGTTGCAAGATGCTTGA
mkFXI-V1-P1	CTGTGCACCAATGCCGTCGCG
mkGAPDH-PF1-MGB	AGTCAGCCGCATTTTCTCTTG
mkGAPDH-PR1-MGB	AAATCCGTTGACTCCGACCTT
mkGAPDH-P1-MGB	ATCGCCAGCGCATC

Таблица 13. Многодозовая ингибирующая активность миРНК в РСН

№ конъюгата миРНК	Проценты остаточной экспрессии мРНК целевого гена (НСН) (среднее) при различных концентрациях миРНК							Значения IC ₅₀ (нМ)
	10 нМ	2 нМ	0,4 нМ	0,08 нМ	0,016 нМ	0,0032 нМ	0,0006 нМ	
TRD008002	11,69 %	29,29 %	48,51 %	49,83 %	42,10 %	47,34 %	76,09 %	0,0398
TRD008003	6,83%	9,29%	51,01 %	33,91 %	55,43 %	65,33 %	71,83 %	0,0369

Результаты показывают, что конъюгаты TRD008002 и TRD008003 NAG0052 обладают очень хорошей ингибирующей активностью в отношении FXI в клетках РСН.

Тестовый пример 5. Ингибирование человеческого ANGPTL3 в клетках Huh7 с помощью миРНК - ингибирующая активность по 7 точкам концентрации

миРНК в Таблице 6 подвергали скринингу активности клеток Huh7 в клетках Huh7 (Nanjing Cobioer) с использованием 7 концентраций. Начальная конечная концентрация для

трансфекции каждого образца миРНК составляла 10 нМ, и проводили 5-кратное серийное разведение для получения 7 точек концентрации.

Клетки НЕКНuh7 культивировали при 37 °С с 5% CO₂ в среде с высоким содержанием глюкозы DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. За 24 часа до трансфекции клетки Нuh7 инокулировали на 96-луночный планшет, каждая лунка которого содержала 100 мкл среды, с плотностью 10000 клеток на лунку. Для трансфекции миРНК использовали Lipofectamine RNAi MAX (ThermoFisher, 13778150), а конечные концентрации для трансфекции миРНК составляли 10 нМ, 2 нМ, 0,4 нМ, 0,08 нМ, 0,016 нМ, 0,0032 нМ и 0,00064 нМ. Через 24 часа обработки экстракцию общей РНК клеток проводили с использованием набора для экстракции клеточной РНК с высокой пропускной способностью (FireGen, FG0417), обратную транскрипцию проводили с использованием набора для обратной транскрипции РНК (Takara, 6210A), а уровень мРНК ANGPTL3 человека определяли с использованием набора для Q-PCR с зондом Taqman (ThermoFisher, 4444964). Уровень мРНК ANGPTL3 человека корректировали в соответствии с уровнем внутреннего эталонного гена GAPDH. Обработку данных проводили с использованием способа $2^{-\Delta\Delta Ct}$, и результаты выражали как оставшиеся проценты экспрессии мРНК ANGPTL3 человека по сравнению с клетками, подвергшимися контрольной обработке миРНК. Результаты скорости ингибирования IC₅₀ показаны в таблице 14.

$$\Delta\Delta Ct = [(\text{целевой ген экспериментальной группы } Ct - \text{внутренний эталон экспериментальной группы } Ct) - (\text{целевой ген контрольной группы } Ct - \text{внутренний эталон контрольной группы } Ct)].$$

Уровень ингибирования (%) = (1 - остаточное значение экспрессии целевого гена) × 100%.

Таблица 14. Многодозовая ингибирующая активность миРНК против ANGPTL3 человека в Нuh7

№ конъюгата миРНК	Проценты остаточной экспрессии мРНК целевого гена (Нuh7) (среднее) при различных концентрациях миРНК							Значения IC ₅₀ (нМ)
	10 нМ	2 нМ	0,4 нМ	0,08 нМ	0,016 нМ	0,0032 нМ	0,00064 нМ	
TRD00800 4	20,41 %	29,83 %	38,24 %	66,52 %	91,40 %	100,41 %	102,12 %	0,1995
TRD00800 5	18,80 %	25,78 %	28,90 %	57,12 %	77,19 %	93,56%	95,33%	0,1047

TRD00800	19,14	30,21	37,88	61,27	83,49	98,09%	99,08%	0,1738
6	%	%	%	%	%			

Результаты показывают, что конъюгаты TRD008004, TR008005 и TRD008006 NAG0052 проявляют эффективную ингибирующую активность против ANGPTL3 в клетках Huh7.

Пример получения 12: Синтез конъюгатов нуклеиновой кислоты и лиганда

Следующие конъюгаты миРНК синтезировали для тестовых примеров 6 и 7 со ссылкой на процедуры получения примера 10. миРНК имели смысловые и антисмысловые цепи, показанные в таблице 15.

Таблица 15

№ конъюгата миРНК	SS цепь (5'-3')	AS цепь (5'-3')
S-1	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am -NAG1	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm
S-L96	CmsAmsGm UmGfUm UfCfUf UmGmCm UmCmUm AmUmAm Am -L96	UmsUfsAm UmAmGf AmGmCm AmAmGm AmAfCm AfCmUm GmsUmsUm

Тестовый пример 6. Ингибирование экспрессии мРНК в первичных гепатоцитах с помощью миРНК, конъюгированных с группой молекул галактозамина

Свежие первичные гепатоциты выделяли у мышей с использованием метода, описанного Severgini et al. (Cytotechnology. 2012;64(2):187-195).

После выделения первичные гепатоциты инокулировали в 24-луночный планшет по 100000 клеток на лунку. Испытуемые соединения миРНК добавляли в конечных концентрациях 50 нМ, 10 нМ, 2 нМ, 0,4 нМ, 0,08 нМ, 0,016 нМ, 0,0032 нМ и 0,00064 нМ. Впоследствии первичные гепатоциты культивировали при 37 °C с 5% CO₂ в течение 24 ч. Через 24 часа уровень экспрессии мРНК mTTR определяли с использованием метода qPCR (количественная PCR).

На фиг. 3 показаны уровни ингибирования различных концентраций конъюгатов миРНК S-1 (конъюгированных с NAG1) и S-L96 (конъюгированных с L96) против мРНК.

Как показано на фиг. 3, S-1 демонстрировал превосходную эффективность ингибирования экспрессии гена *mTTR*. Значение IC_{50} контрольной группы S-L96 составляло 0,280 нМ, тогда как значение IC_{50} S-1 составляло 0,131 нМ. Это указывает на то, что миРНК, конъюгированная с NAG1, была свободно поглощена первичными гепатоцитами *in vitro* с лучшей эффективностью, чем контрольная группа: конъюгация NAG1 может более эффективно опосредовать проникновение миРНК в первичные гепатоциты. В тестовом примере 3 миРНК, конъюгированные с NAG0052, продемонстрировали более сильную ингибирующую активность против экспрессии гена-мишени, чем миРНК, конъюгированные с NAG1. В целом, данные указывают на то, что конъюгаты NAG0052 обладают лучшей ингибирующей активностью, чем конъюгат L96.

Тестовый пример 7. *In vivo* ингибирование экспрессии мРНК с помощью миРНК, конъюгированных с группой молекул галактозамина

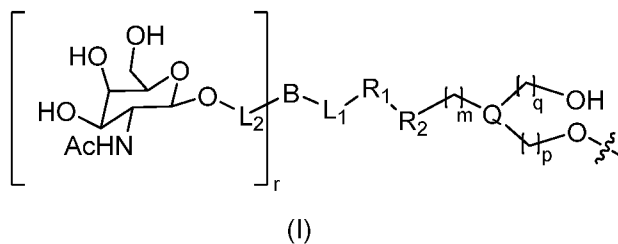
8-недельным мышам C57BL/6 (Joinnbio, SPF (свободные от специфической патогенной микрофлоры), самка) вводили подкожно миРНК, конъюгированные группой молекулы галактозамина, описанные выше. На 1 день 100 мкл раствора, содержащего PBS (называемого группой имтации, т.е. контрольной группой) или дозу (1 мг/кг или 0,2 мг/кг) соответствующей миРНК, конъюгированной группой молекул галактозамина (S-L96 или S-1), составленной в PBS, вводили подкожно в рыхлую кожу на шее и плече мышей. В каждой группе 6 мышей получали инъекции.

Через три дня после введения мышам умерщвляли путем смещения шейных позвонков, а уровни экспрессии мРНК *mTTR* в ткани печени мышам определяли с помощью qPCR.

На фиг. 4 показаны уровни экспрессии мРНК в ткани печени мыши после введения различных доз S-1 и S-L96, соответственно. Как показано на фиг. 4, S-1 демонстрировал превосходную эффективность ингибирования экспрессии гена *mTTR*. S-1 показал лучшую активность, чем контрольная группа S-L96 при введении с 1 мг/кг и 0,2 мг/кг. В тестовом примере 3 миРНК, конъюгированные с NAG0052, продемонстрировали более сильную ингибирующую активность против экспрессии гена-мишени, чем миРНК, конъюгированные с NAG1. В целом, данные указывают на то, что конъюгаты NAG0052 обладают лучшей ингибирующей активностью, чем конъюгат L96.

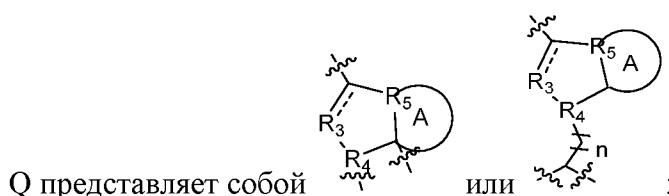
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лиганд, имеющий структуру, представленную формулой (I),



где L_1 представляет собой C_1 - C_{30} алкильную цепь или C_1 - C_{30} алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или $C=O$;

R_1 и R_2 независимо представляют собой химические связи, $-NR_6-$, $-C(=O)-$ или $-OC(=O)-$;



представляет собой одинарную или двойную связь; когда представляет собой одинарную связь, R_3 независимо представляет собой CR_7R_8 , NR_6 , O или S; когда представляет собой двойную связь, R_3 независимо представляет собой CR_9 или N;

R_4 независимо представляет собой CR_9 или N;

кольцо A отсутствует или представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; когда кольцо A присутствует, R_5 независимо представляет собой CR_9 или N; когда кольцо A отсутствует, R_5 независимо представляет собой CR_7R_8 , NR_6 или O;

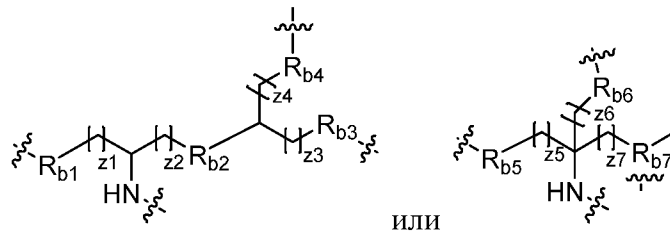
R_6 и R_9 независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ или $C(=O)NR'(R'')$, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, оксо, нитро, циано, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, C_{3-7} циклоалкила, 3-12-членного гетероциклила, 5-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ и $C(=O)NR'(R'')$;

R_7 и R_8 независимо представляют собой водород, дейтерий, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, SR' , $S(=O)R'$, $S(=O)_2R'$, $S(=O)_2NR'(R'')$, $NR'(R'')$, $C(=O)R'$, $C(=O)OR'$ или $C(=O)NR'(R'')$, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одной или более группами,

выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, оксо, нитро, циано, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ алкокси, C₃₋₇ циклоалкила, 3-12-членного гетероциклила, 5-12-членного арила, 5-12-членного гетероарила, SR', S(=O)R', S(=O)₂R', S(=O)₂NR'(R''), NR'(R''), C(=O)R', C(=O)OR' и C(=O)NR'(R'');

R' и R'' независимо представляют собой водород, дейтерий, гидроксид, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, оксо, нитро и циано;

m, n, p и q независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;



В представляет собой

или

R_{b1}, R_{b2}, R_{b3}, R_{b4}, R_{b5}, R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой -C(=O)-, -NHC(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)-(CH₂)_{z8}-O- или -NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-;

z₁, z₂, z₃, z₄, z₅, z₆, z₇, z₈ и z₉ независимо представляют собой целые числа от 0 до 10;

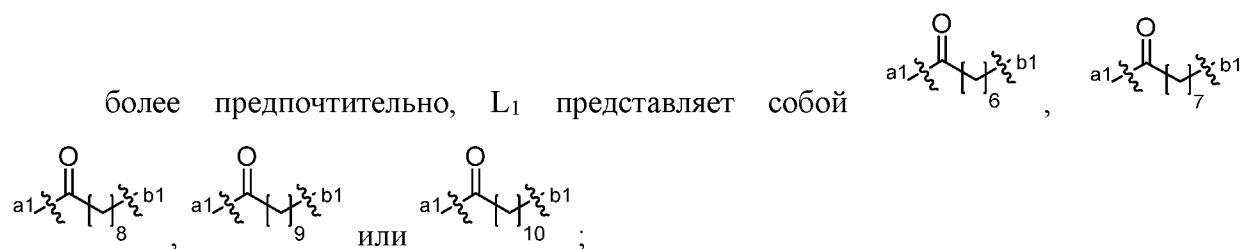
L₂ представляет собой C₁-C₃₀ алкильную цепь или C₁-C₃₀ алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота или C=O;

r представляет собой целое число от 1 до 10.

2. Лиганд по п. 1, где L₁ представляет собой L₃ или L₃-R₁₀-R₁₁-L₃, где L₃ независимо представляет собой C₁-C₁₂ алкильную цепь, -(CH₂)_{j1}-C(=O)-(CH₂)_{j2}- или -(CH₂)_{j3}-(CH₂CH₂O)₁₋₄-(CH₂)_{j4}-; R₁₀ и R₁₁ независимо представляют собой химические связи, -NR₁₂-, -C(=O)- или -OC(=O)-; R₁₂ представляет собой водород или C₁-C₁₂ алкил; j₁, j₂, j₃ и j₄ независимо представляют собой целые числа 0-10, предпочтительно 0-2 или 4-10 и более предпочтительно 0, 1, 2, 6, 7, 8, 9 или 10.

3. Лиганд по п. 2, где L₁ представляет собой -(CH₂)_{j1}-C(=O)-(CH₂)_{j2}-,

предпочтительно, L₁ представляет собой ;



где конец a_1 присоединен к V , и конец b_1 присоединен к R_1 .

4. Лиганд по любому из пп. 1-3, где R_1 и R_2 представляют собой любую из следующих комбинаций:

комбинация 1: R_1 представляет собой химическую связь, и R_2 представляет собой $C=O$;

комбинация 2: R_1 представляет собой химическую связь, и R_2 представляет собой NR_6 ;

комбинация 3: R_1 представляет собой химическую связь, и R_2 представляет собой $-OC(=O)-$;

комбинация 4: R_1 представляет собой NR_6 , и R_2 представляет собой $C=O$;

комбинация 5: R_1 представляет собой NR_6 , и R_2 представляет собой $-OC(=O)-$;

комбинация 6: R_2 представляет собой NR_6 , и R_1 представляет собой $C=O$; и

комбинация 7: R_2 представляет собой NR_6 , и R_1 представляет собой $-OC(=O)-$.

5. Лиганд по любому из пп. 1-4, где R_6 представляет собой водород или C_{1-6} алкил, предпочтительно водород, дейтерий, метил, этил, пропил или изопропил и более предпочтительно водород;

и/или R_7 и R_8 представляют собой водород;

и/или R_9 представляет собой водород.

6. Лиганд по любому из пп. 1-5, где m равно 0 или 1.

7. Лиганд по любому из пп. 1-6, где p и q могут представлять собой любую из следующих комбинаций:

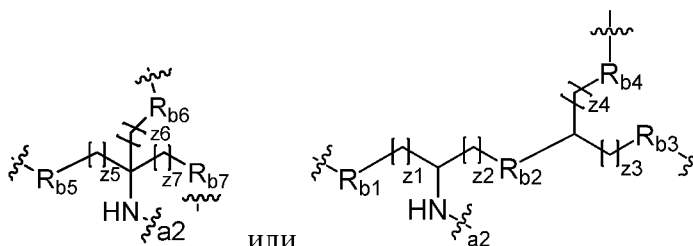
комбинация 1: $p = 1$ и $q = 1$;

комбинация 2: $p = 1$ и $q = 0$;

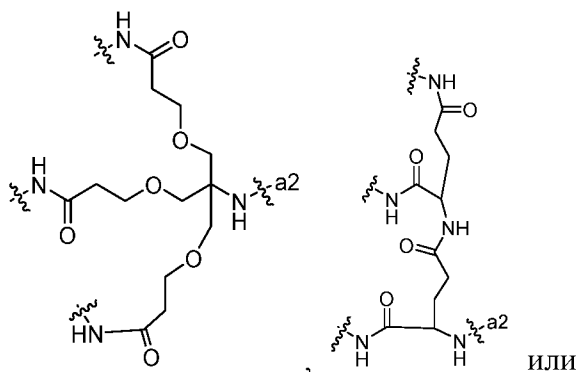
комбинация 3: $p = 0$ и $q = 1$; и

комбинация 4: $p = 0$ и $q = 0$.

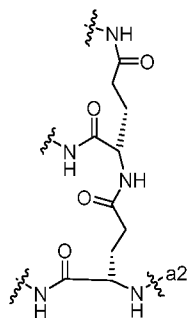
8. Лиганд по любому из пп. 1-7, где



В представляет собой ; R_{b1} , R_{b2} , R_{b3} , R_{b4} , R_{b5} , R_{b6} и R_{b7} независимо представляют собой $-C(=O)-$ или $-NHC(=O)-$; атом N на конце a_2 присоединен к L_1 ;



предпочтительно, В представляет собой

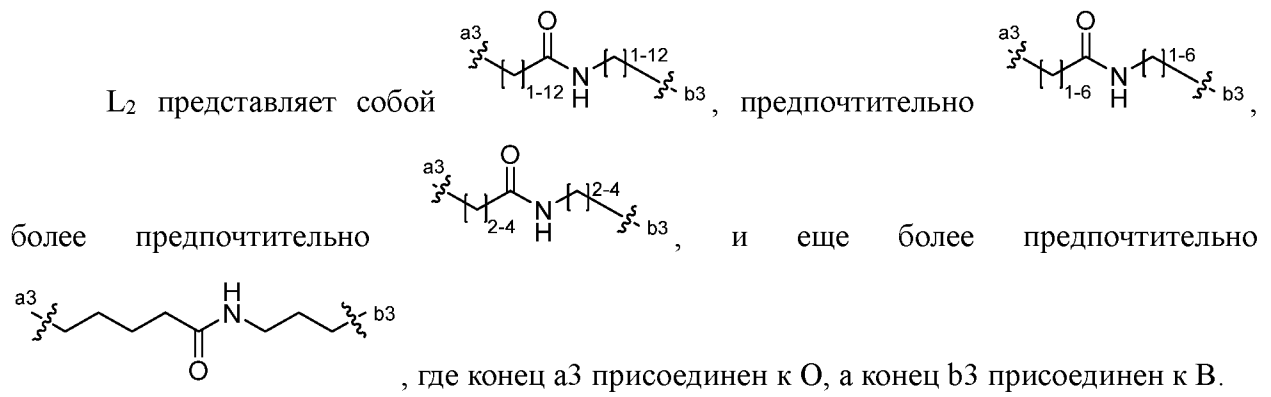


9. Лиганд по любому из пп. 1-8, где

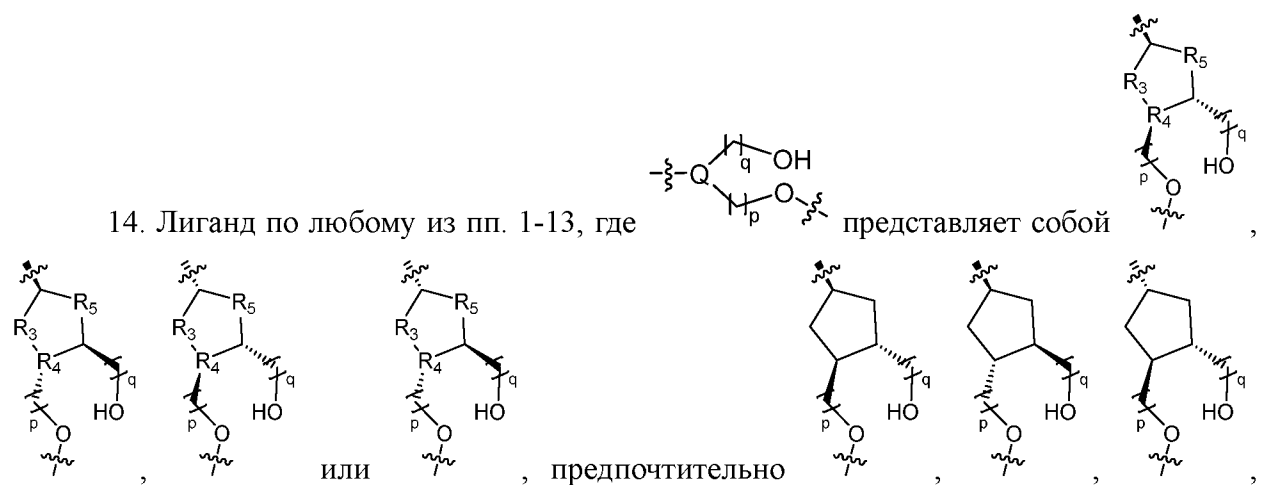
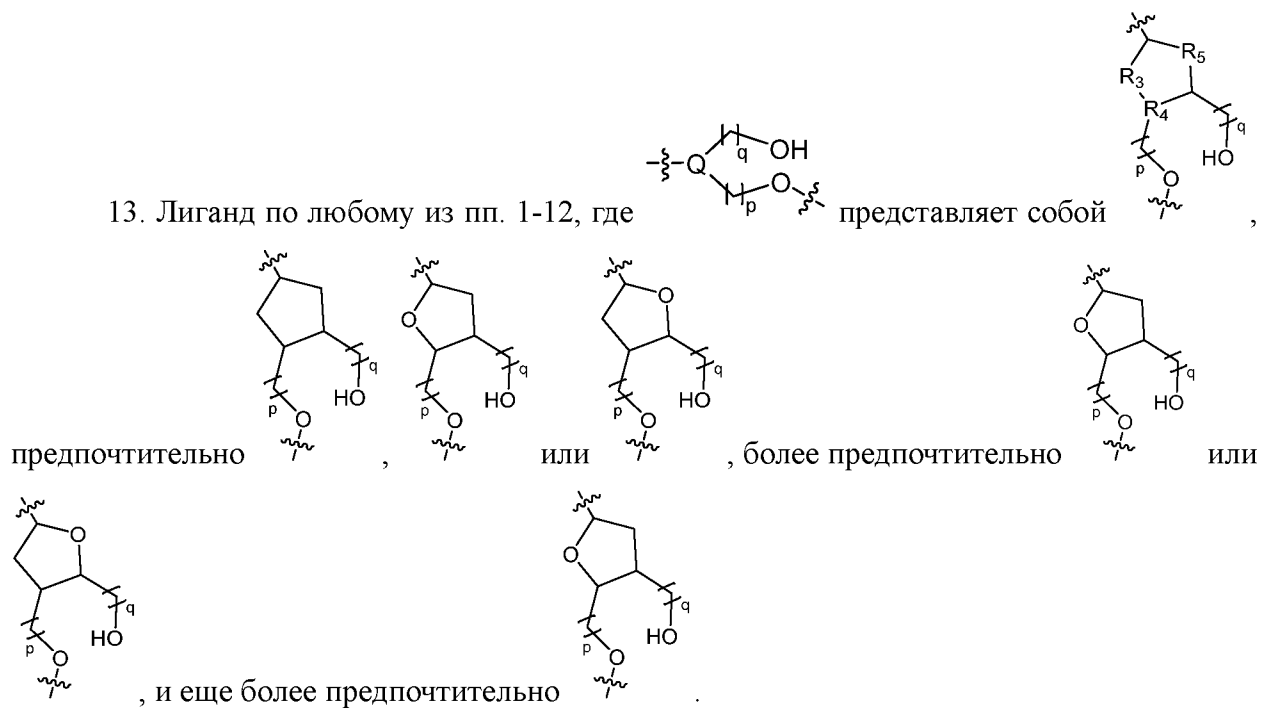
L_2 представляет собой L_4 или $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$, где L_4 независимо представляет собой C_1-C_{12} алкильную цепь или $-(CH_2)_{j_5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_6}-$; R_{13} и R_{14} независимо представляют собой химические связи, $-NR_{15}-$, $-C(=O)-$ или $-OC(=O)-$; R_{15} независимо представляет собой водород или C_1-C_{12} алкил; j_5 и j_6 независимо представляют собой целые числа 0-10, предпочтительно 0-6 и более предпочтительно 0, 1, 2, 3 или 4.

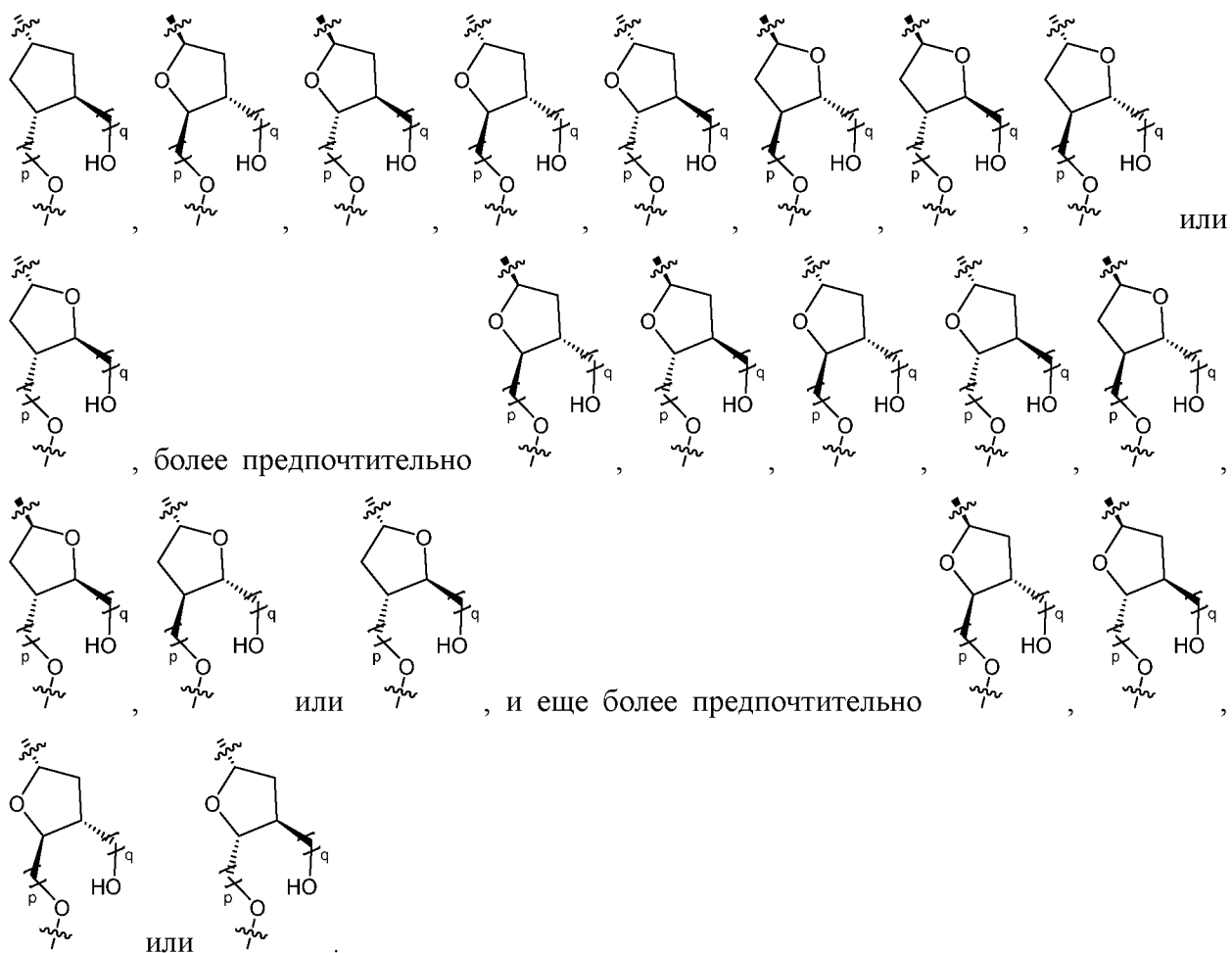
10. Лиганд по п. 9, где L_2 представляет собой $-(CH_2)_{j_5}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_6}-$, предпочтительно

11. Лиганд по п. 9, где

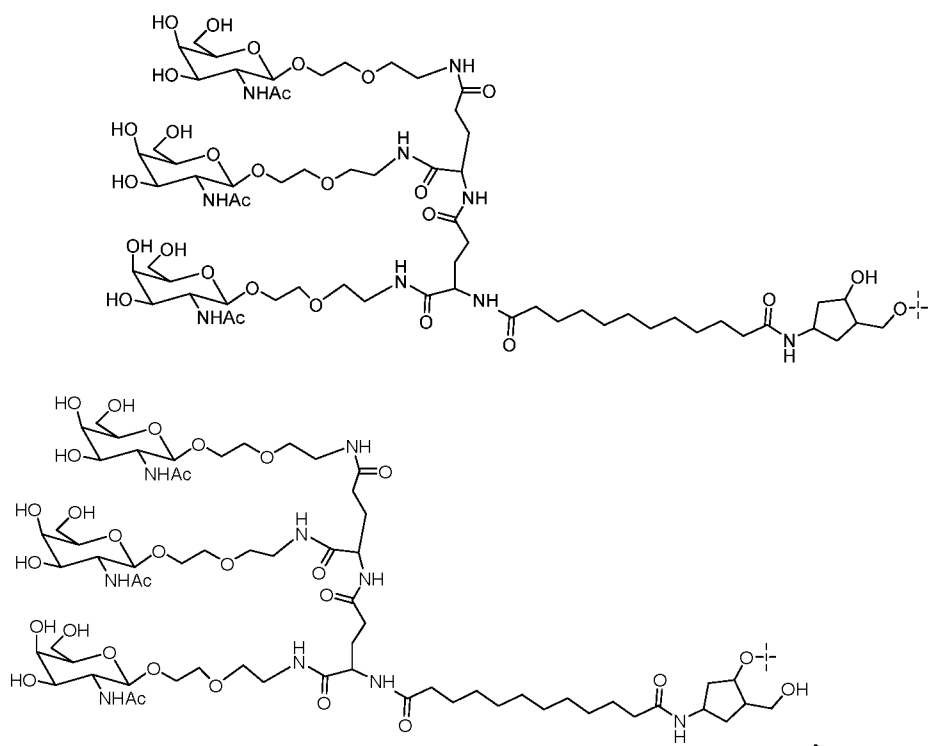


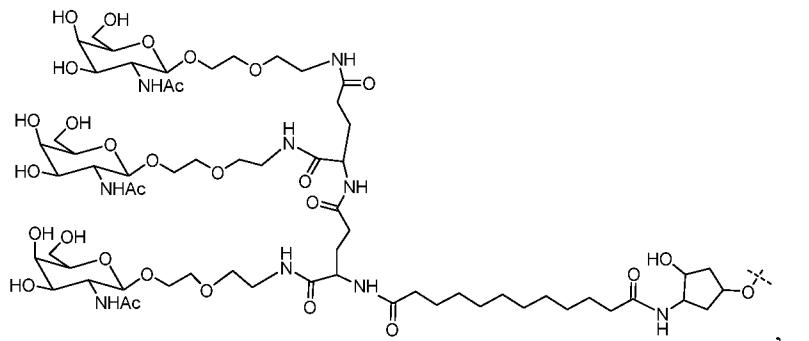
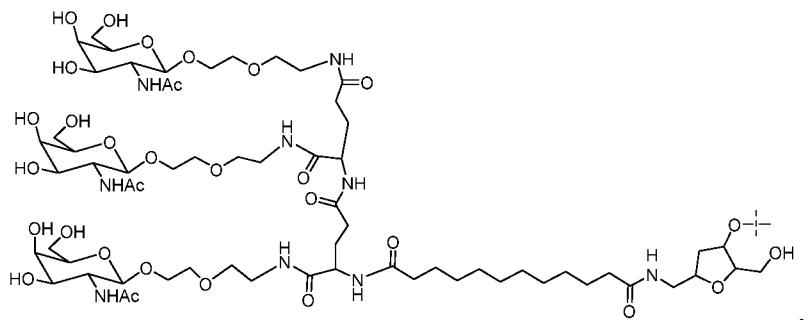
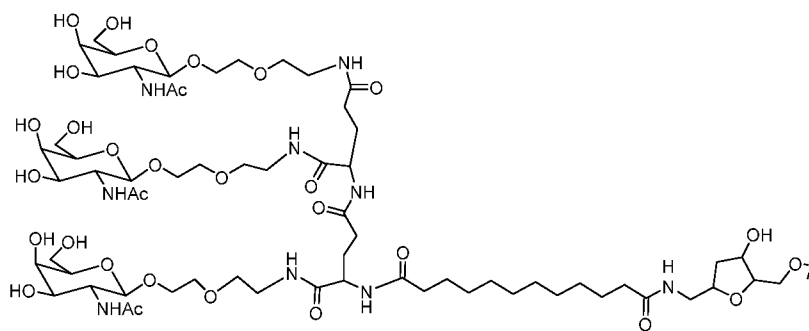
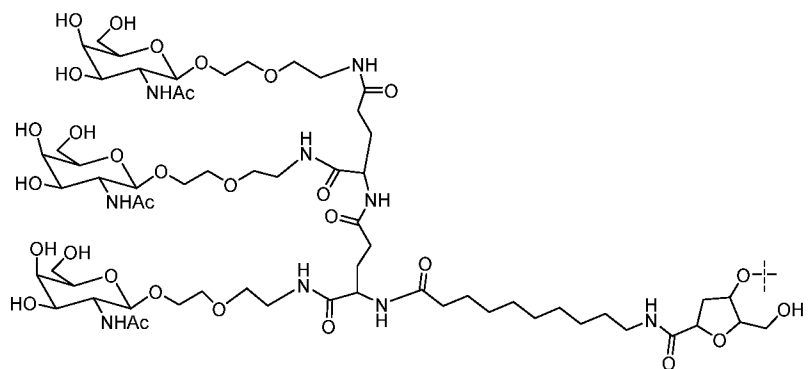
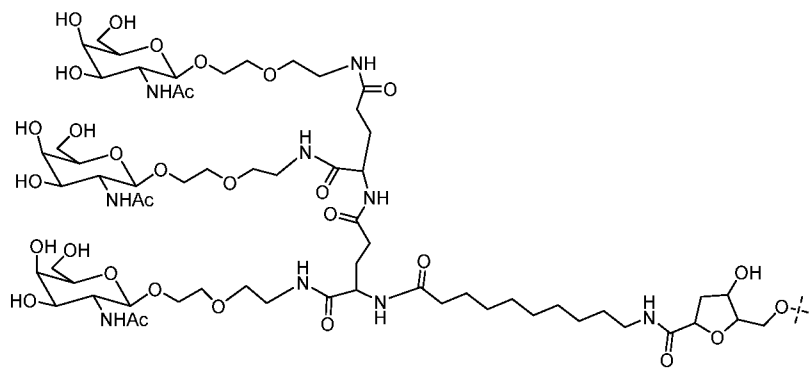
12. Лиганд по любому из пп. 1-11, где r равно 3.

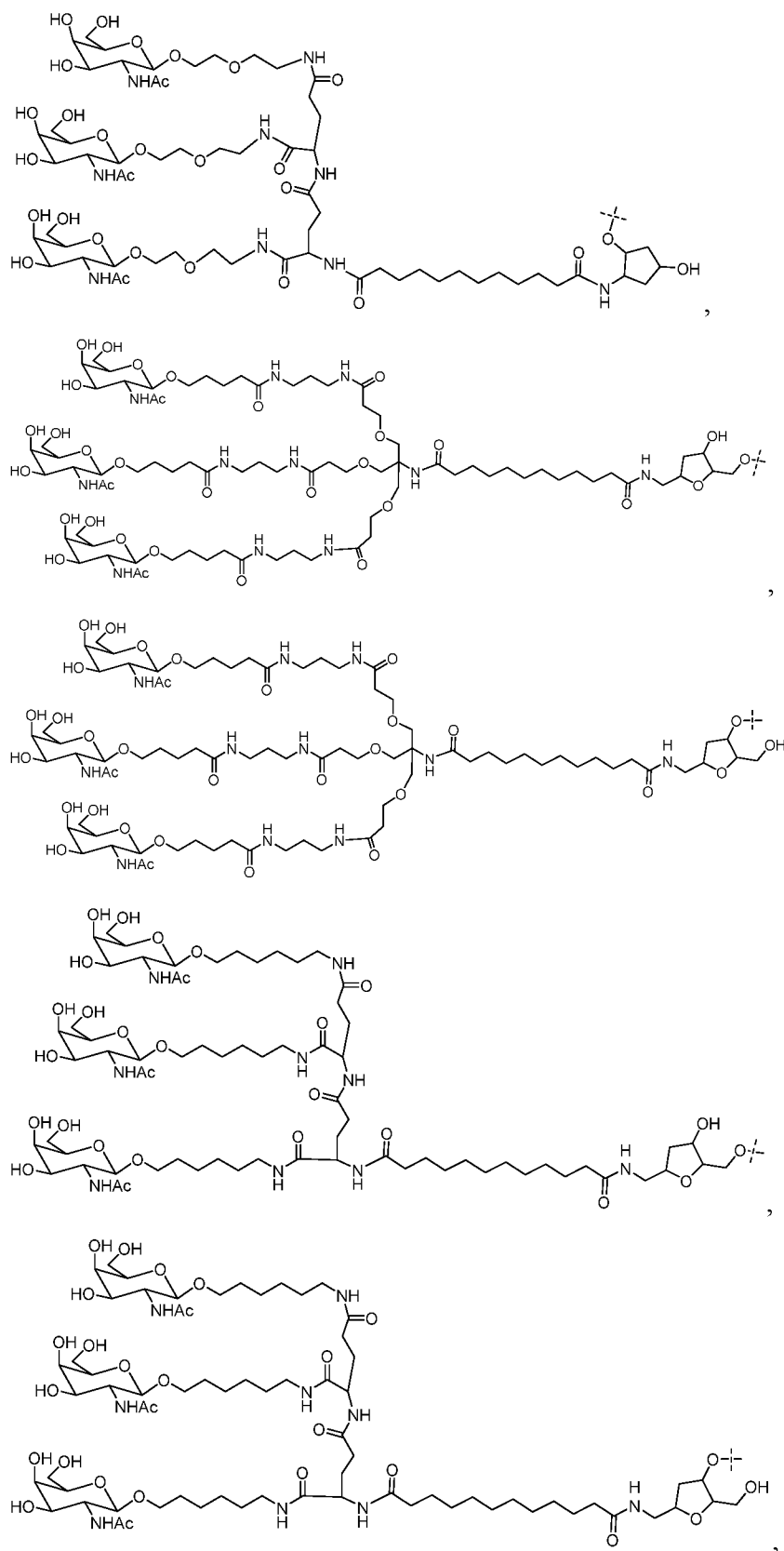


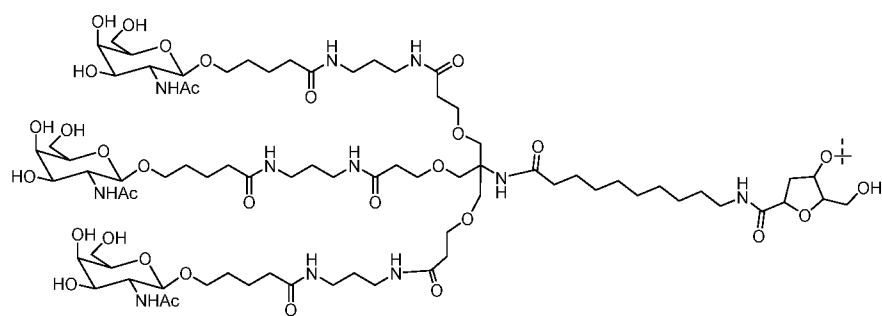
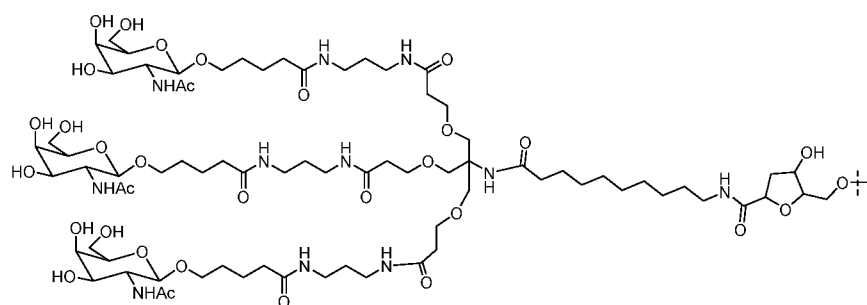
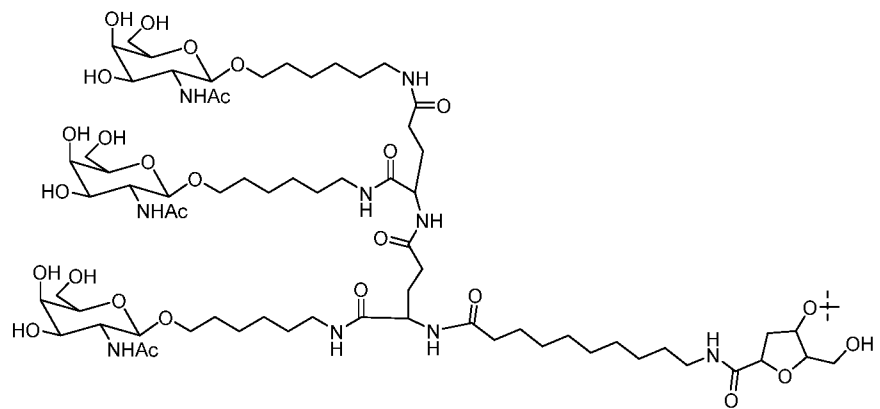
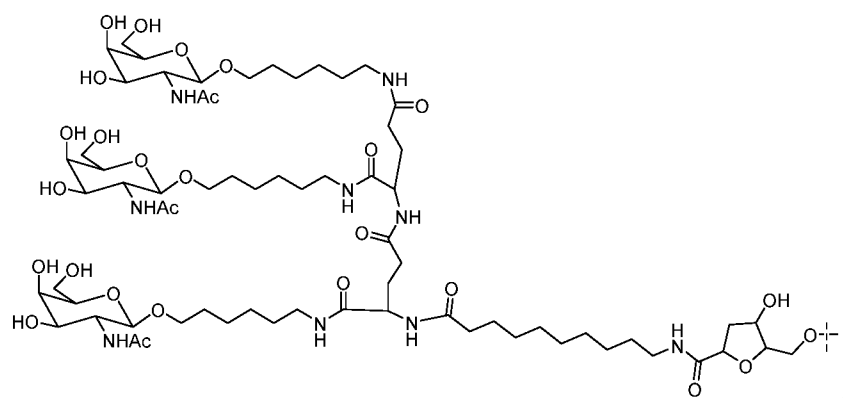


15. Лиганд по любому из пп. 1-14, где лиганд представляет собой любую из следующих структур:



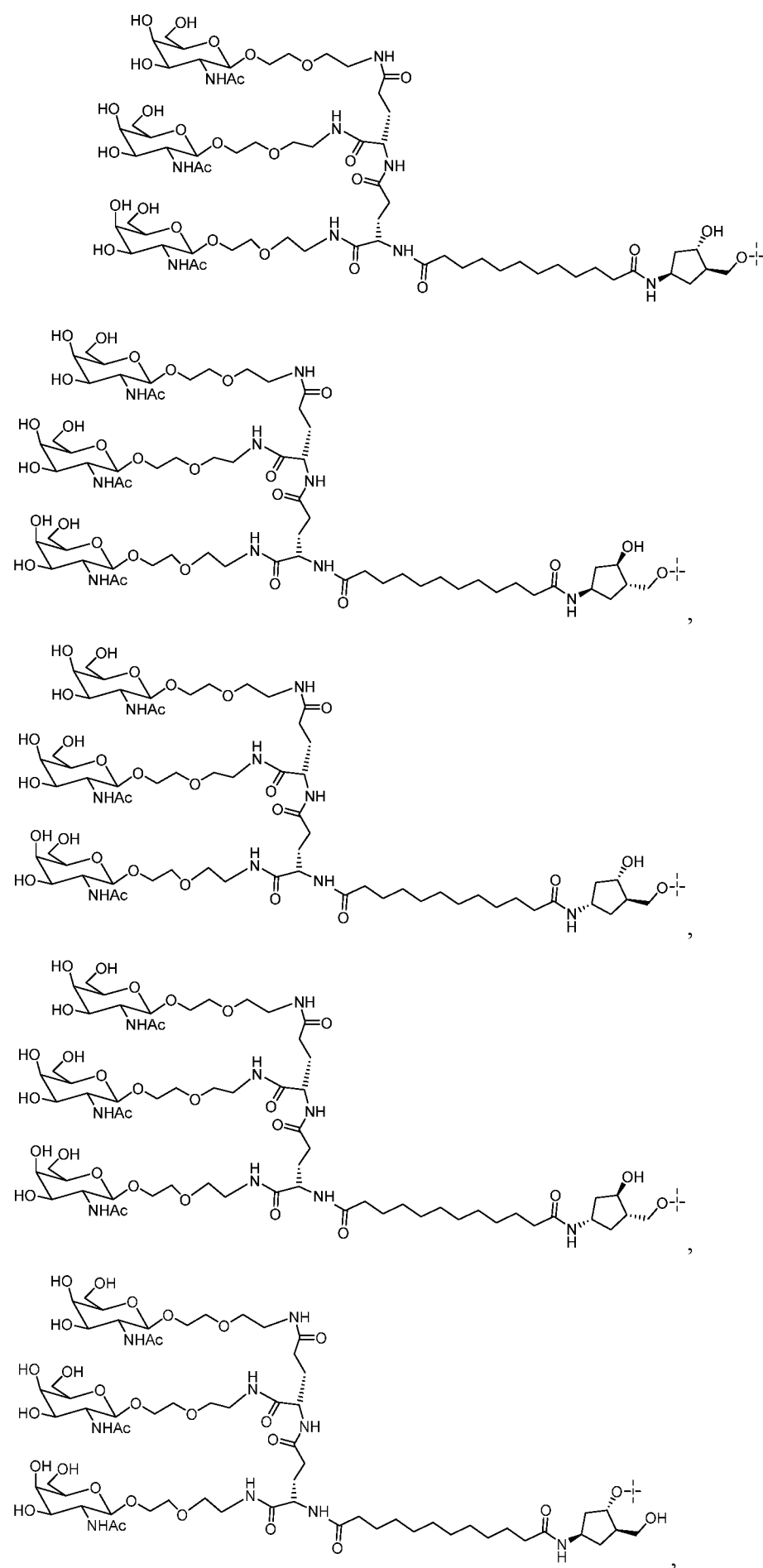


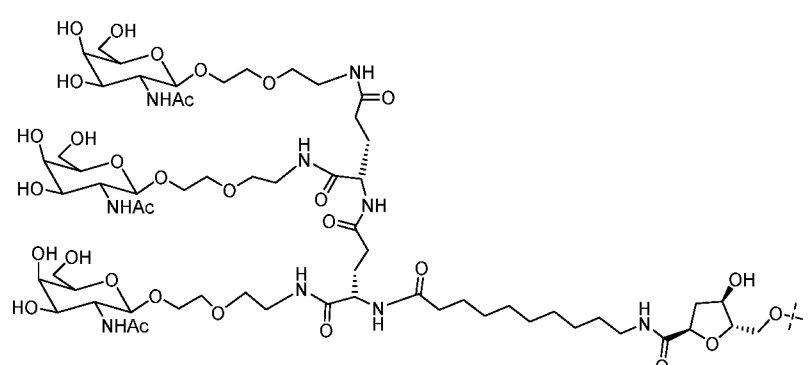
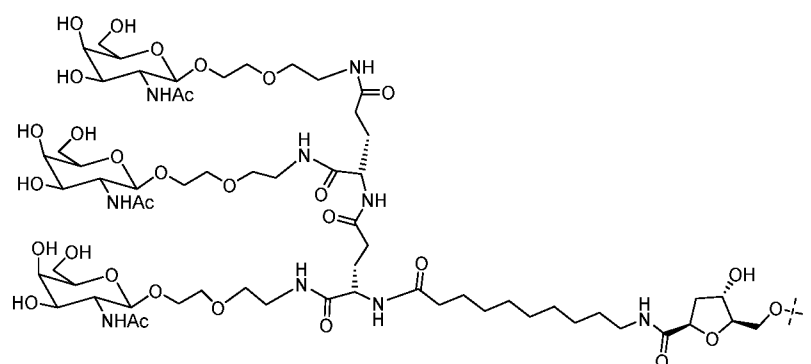
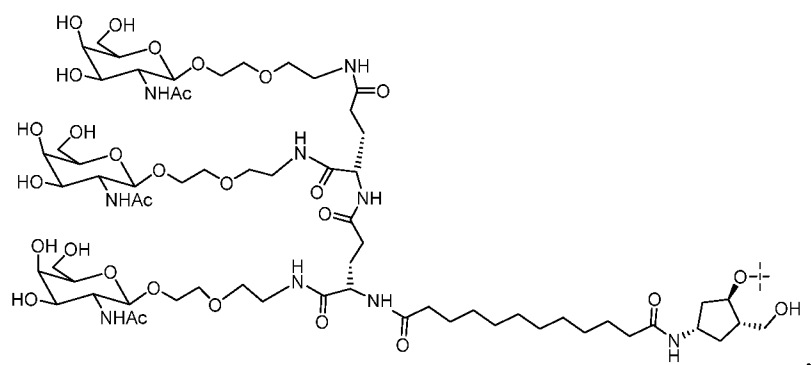
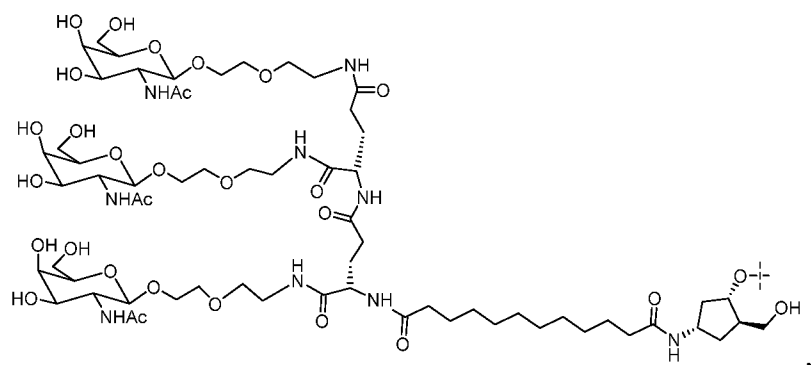
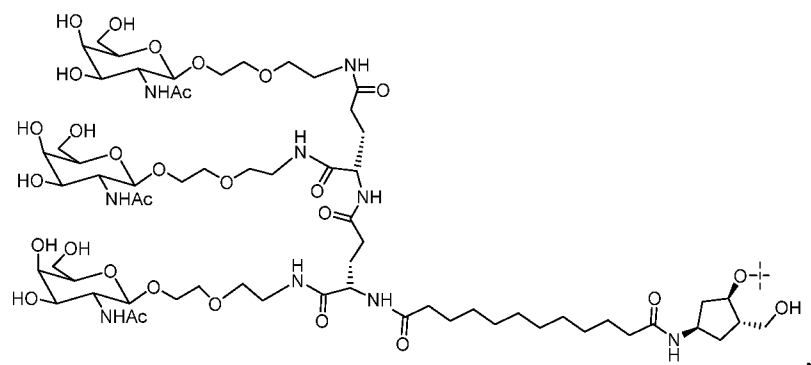


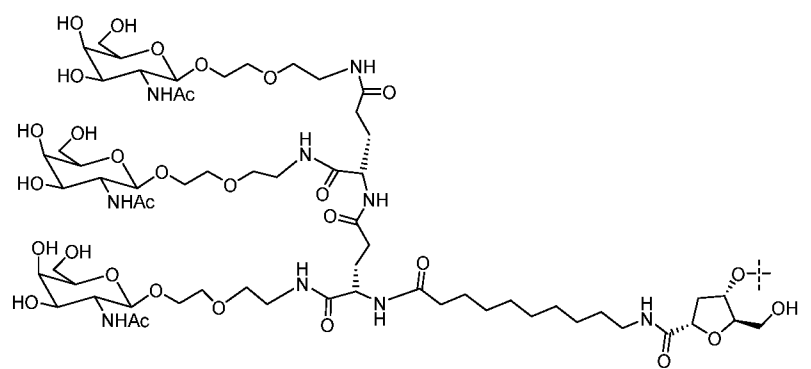
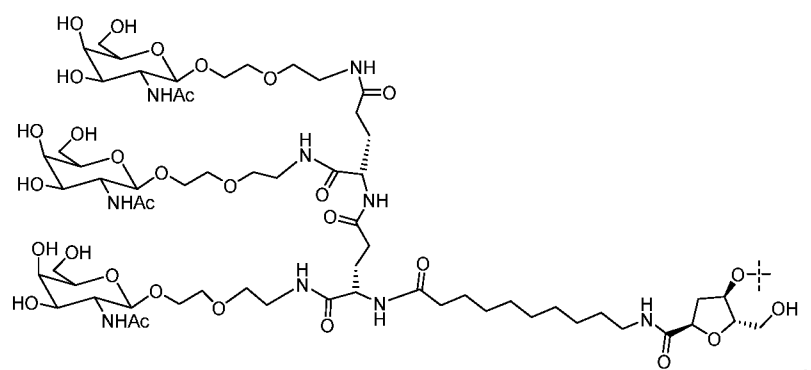
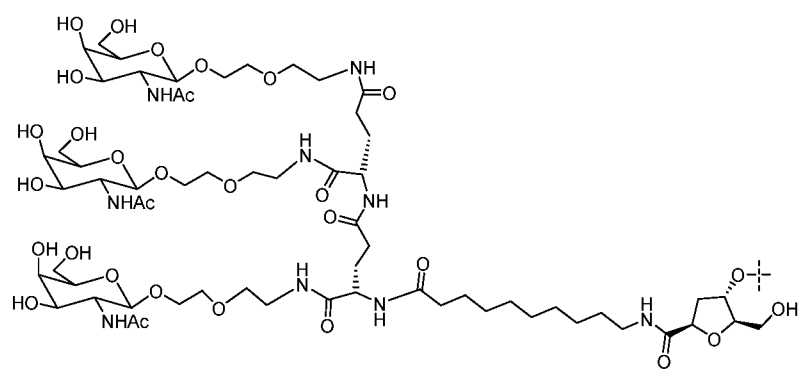
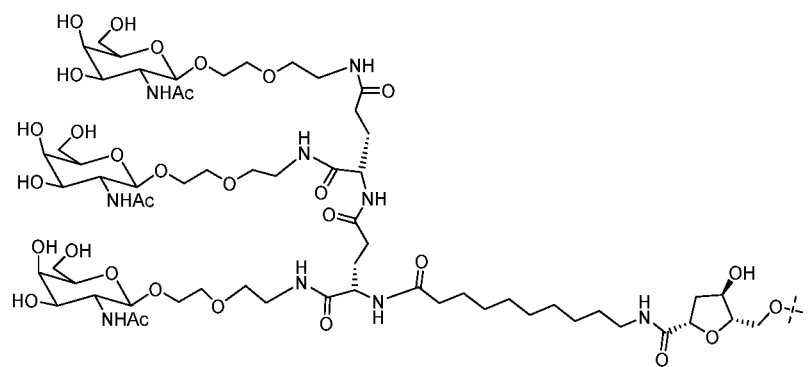
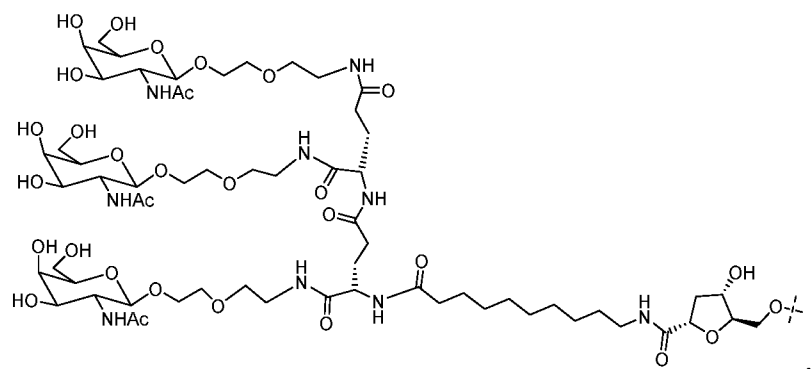


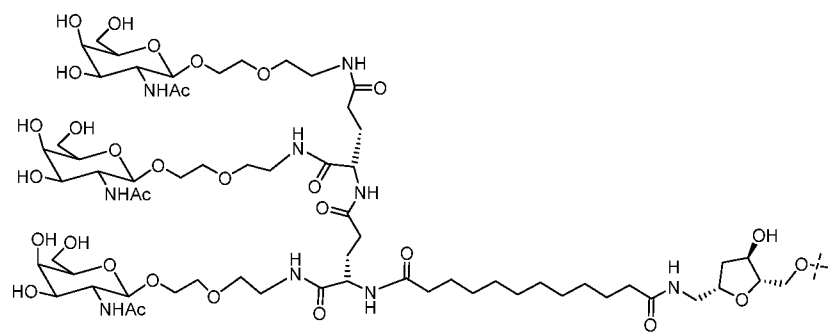
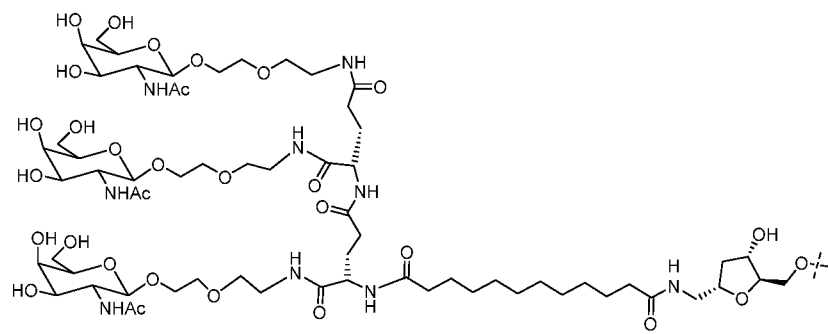
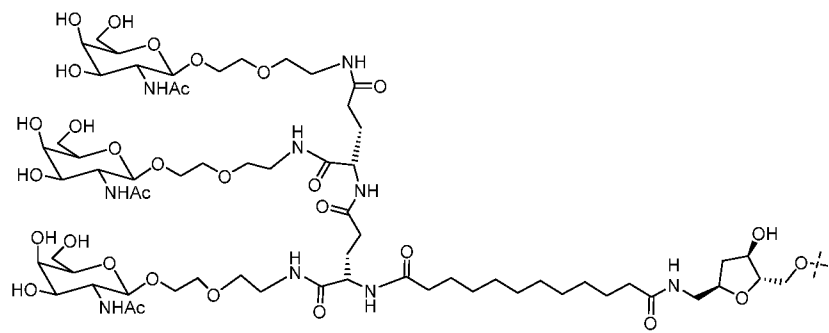
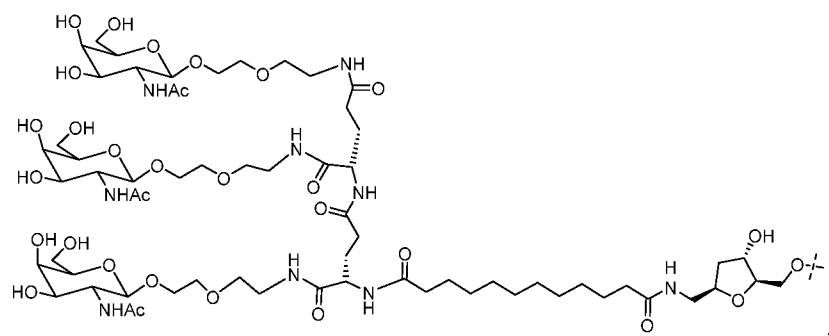
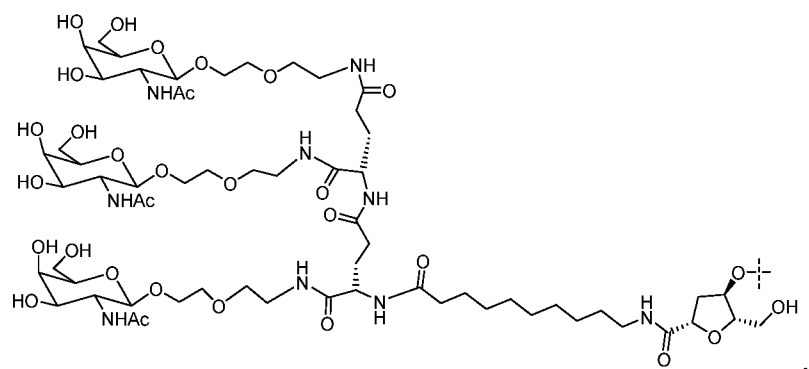
ИЛИ

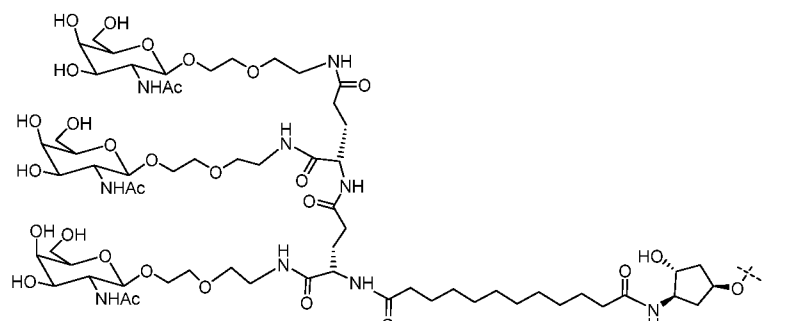
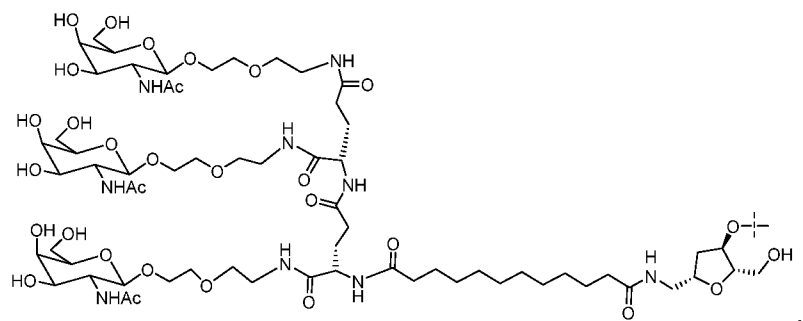
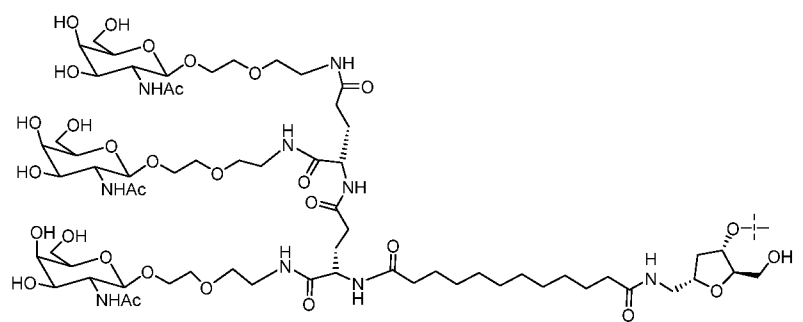
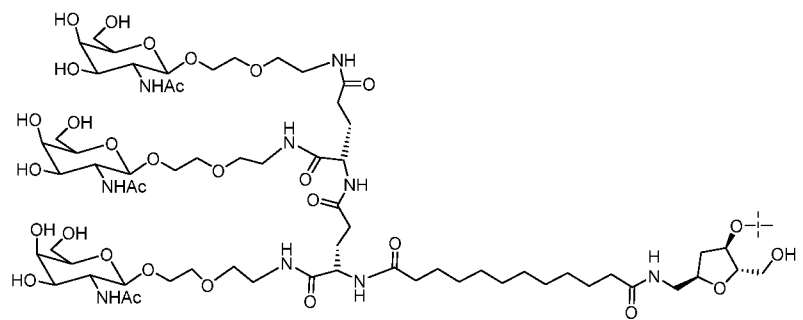
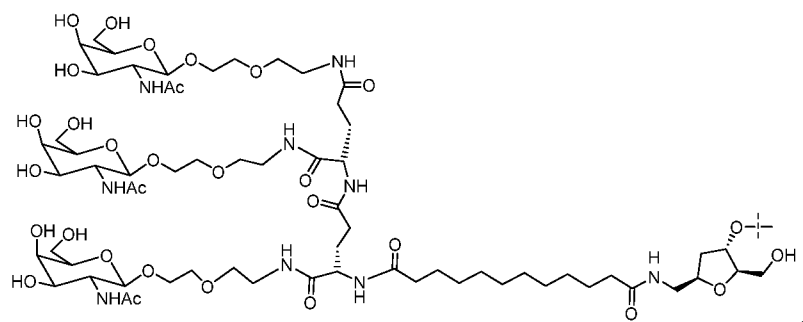
16. Лиганд по любому из пп. 1-15, где лиганд представляет собой любую из следующих структур:

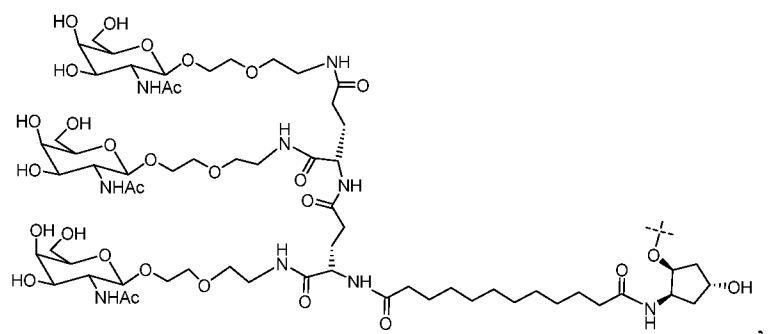
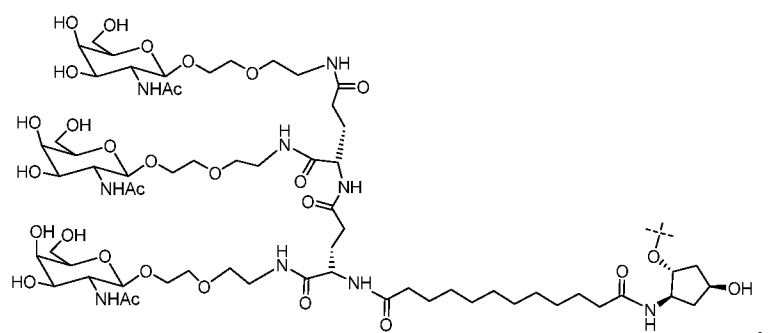
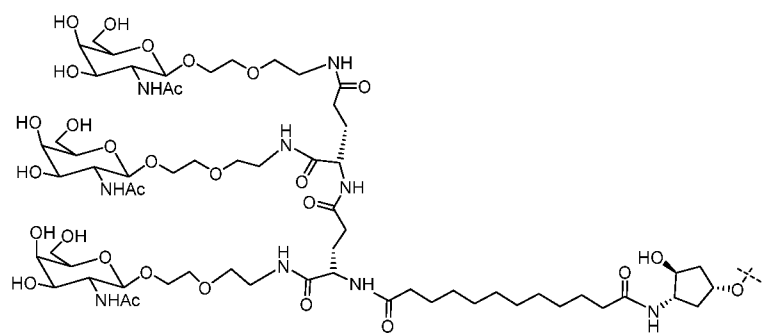
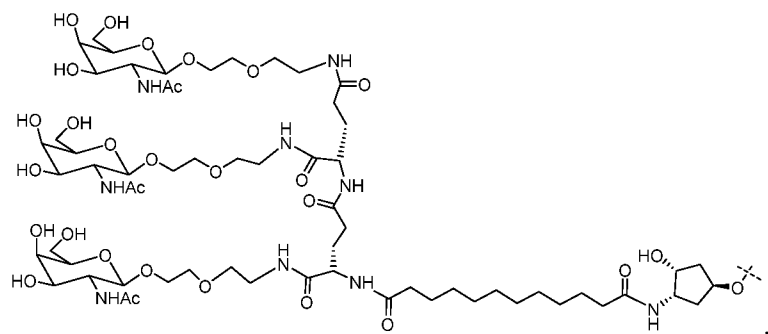
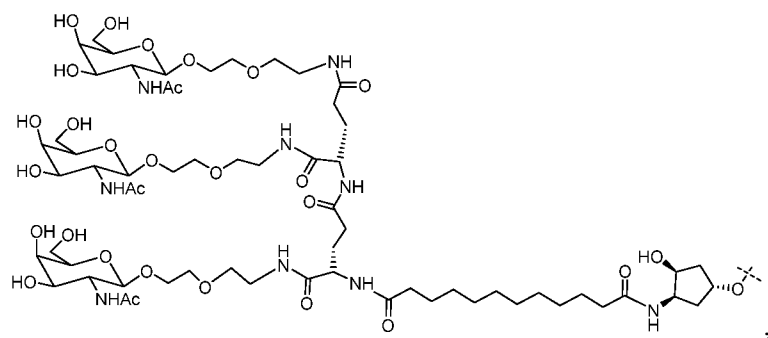


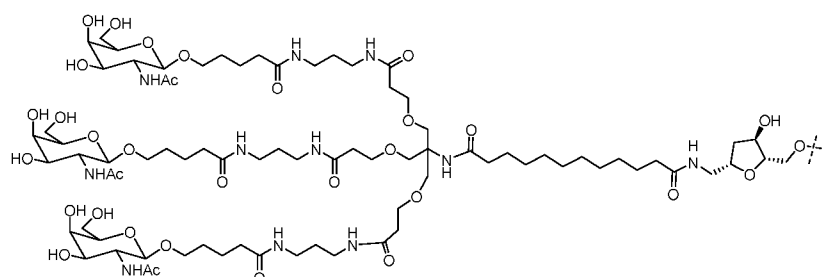
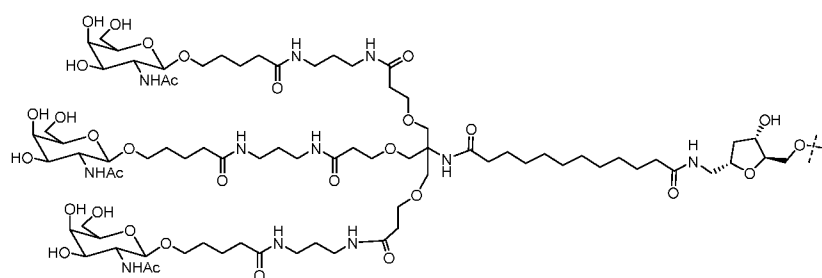
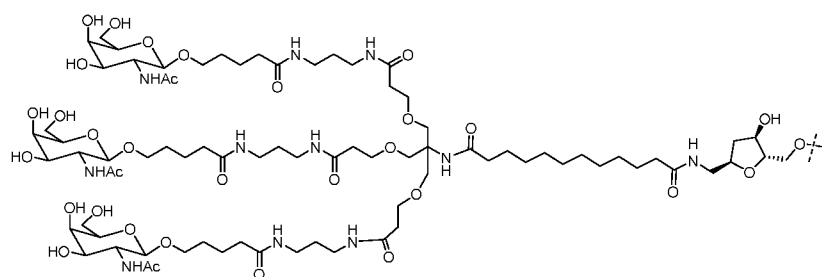
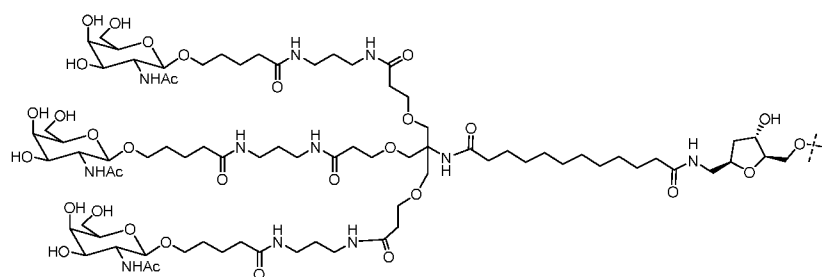
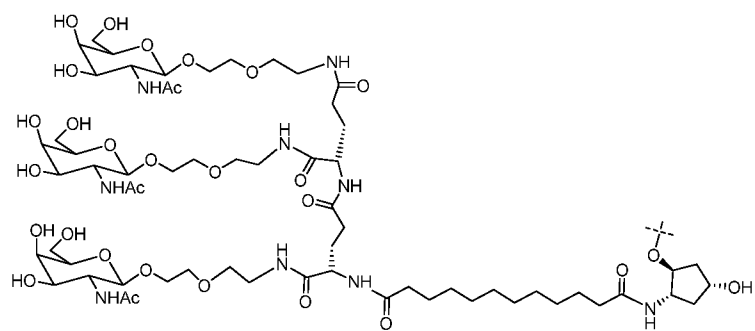
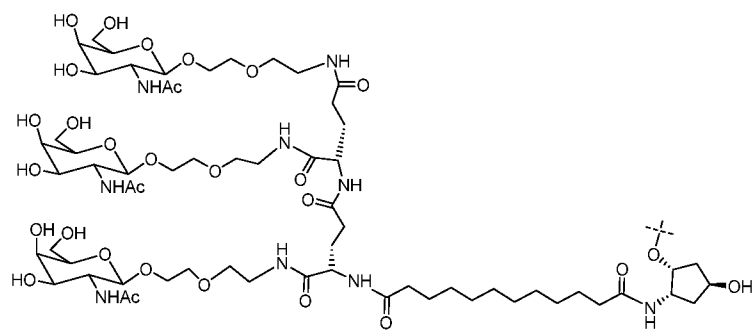


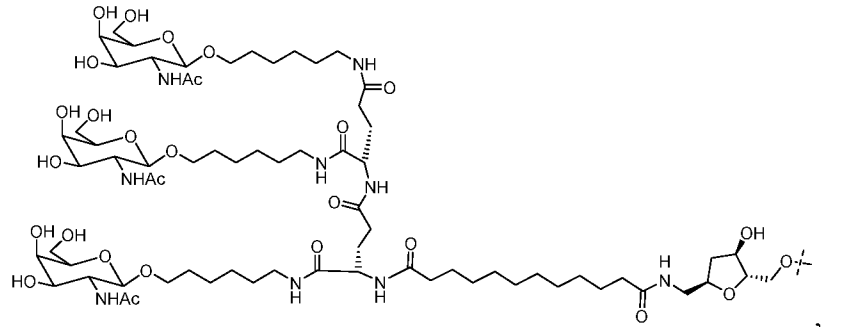
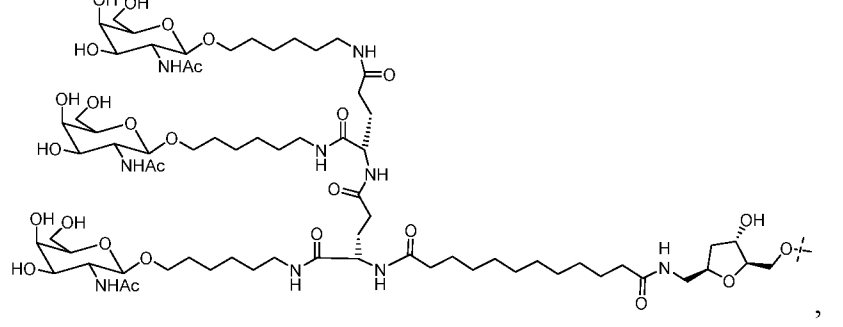
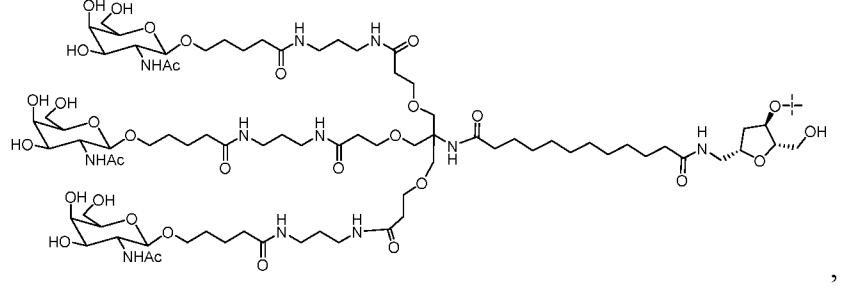
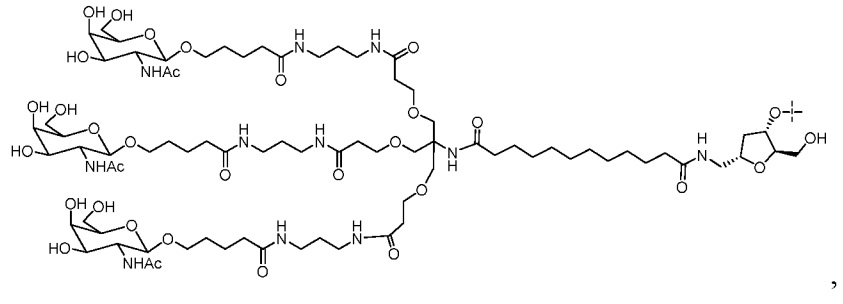
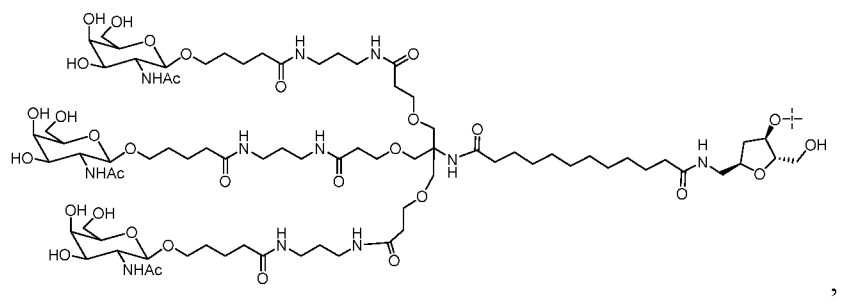
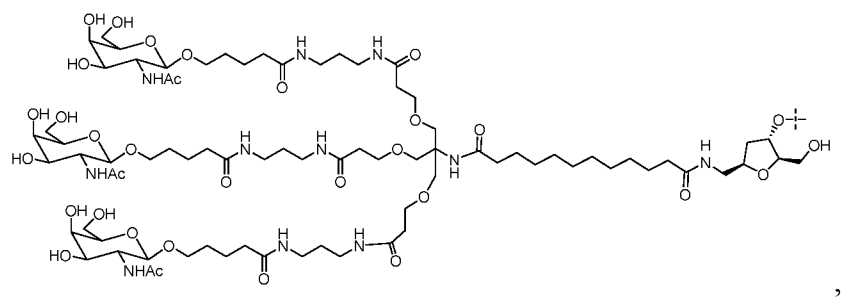


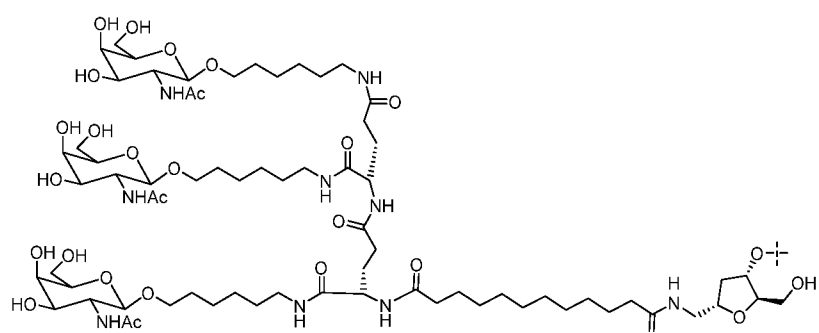
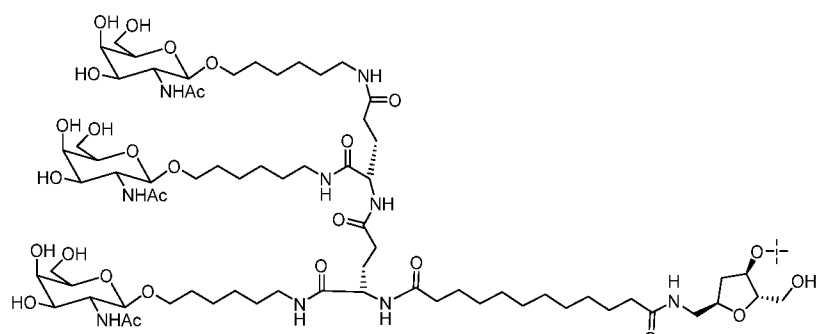
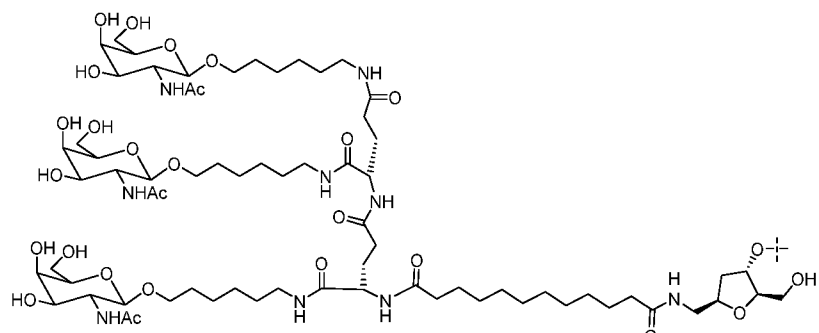
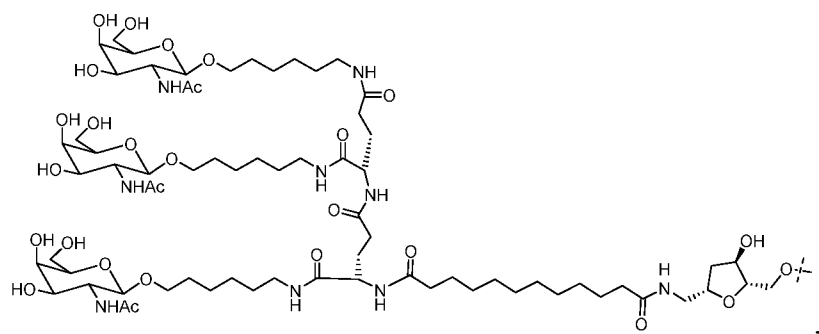
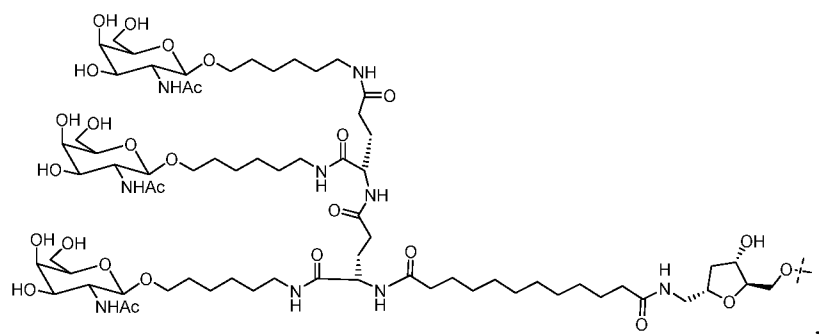


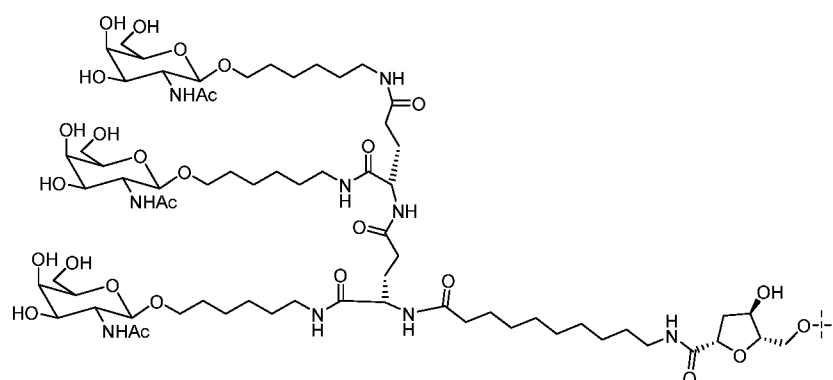
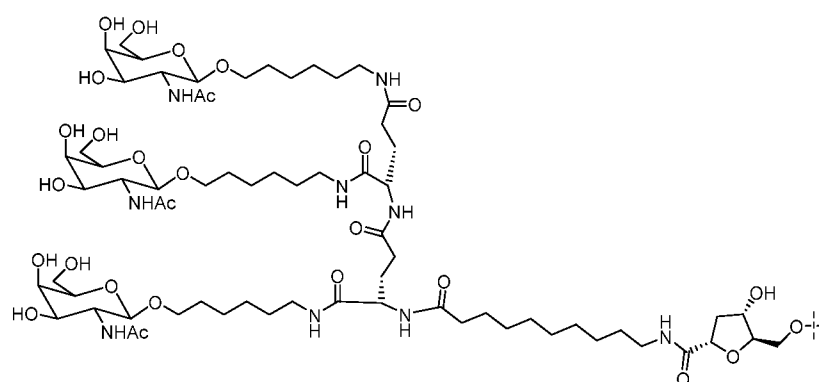
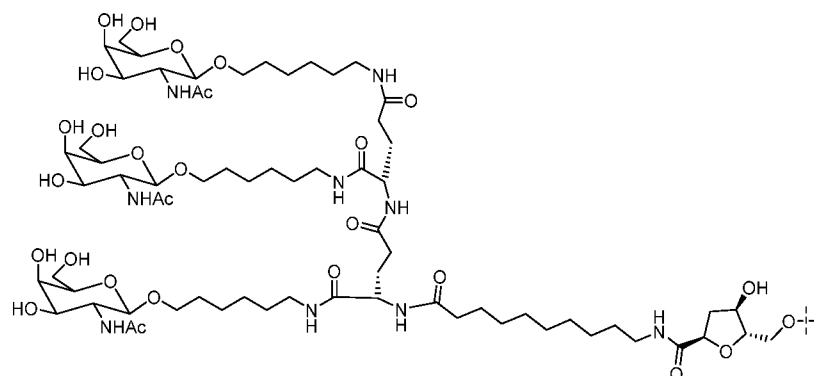
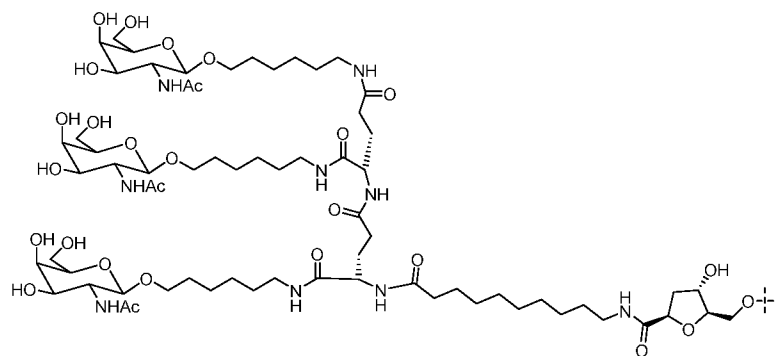
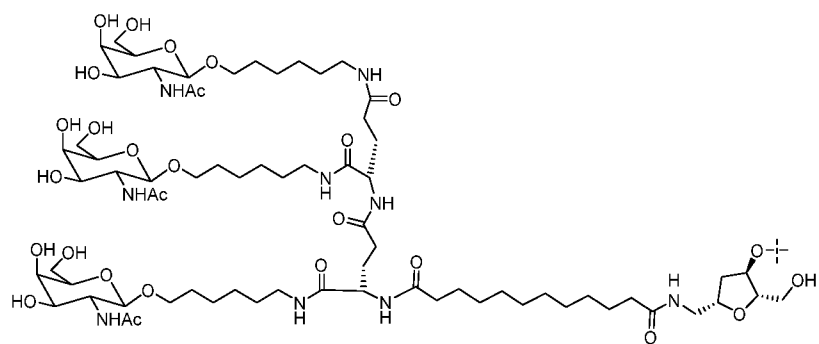


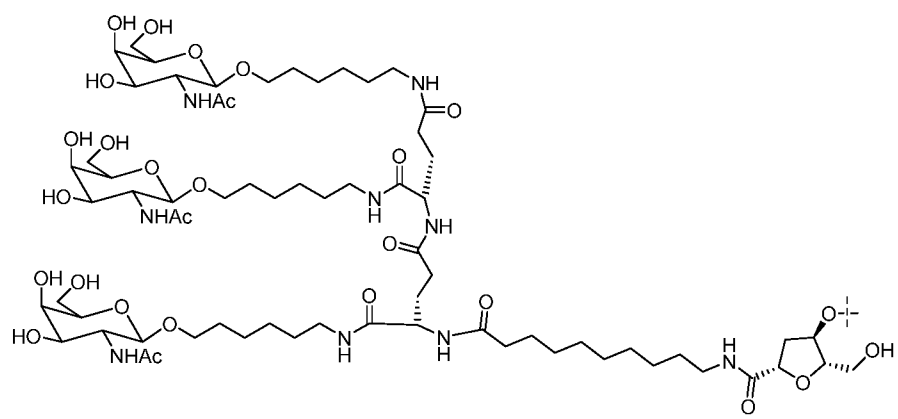
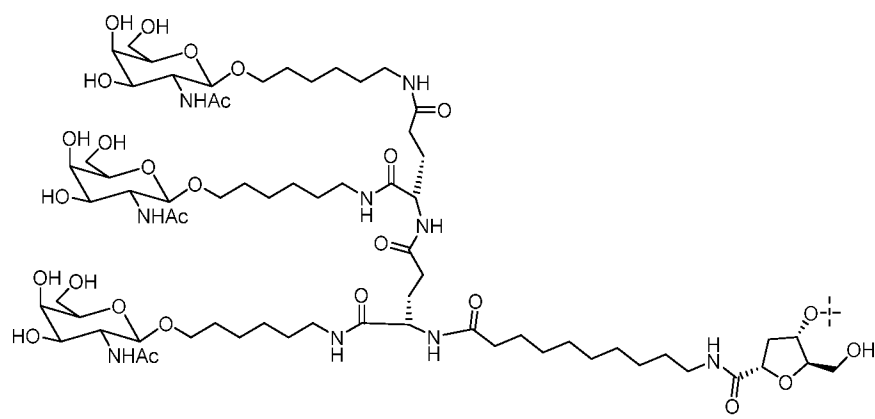
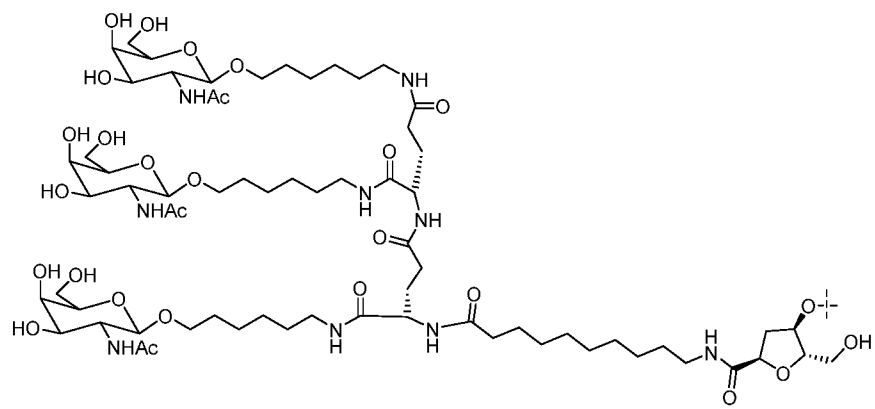
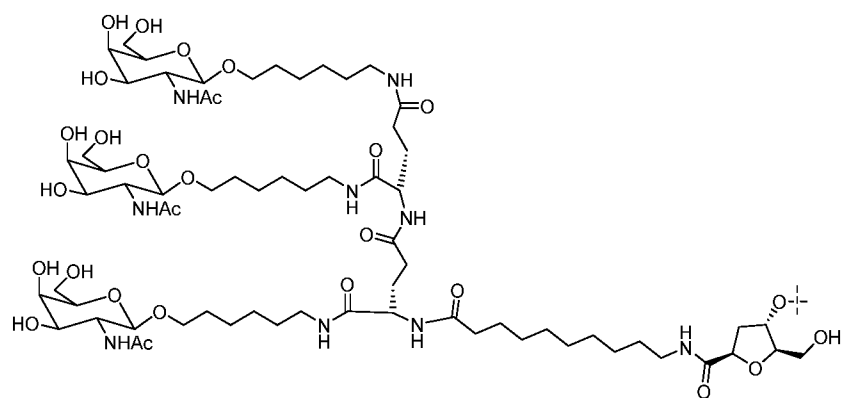


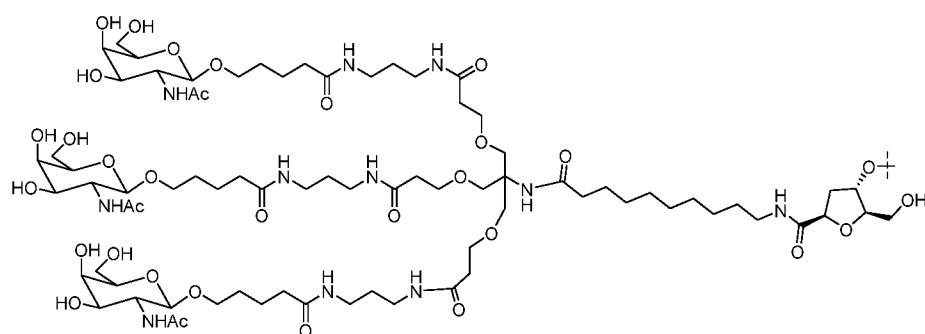
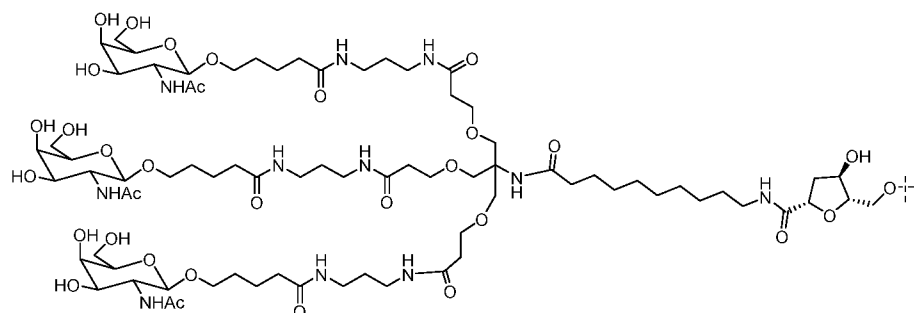
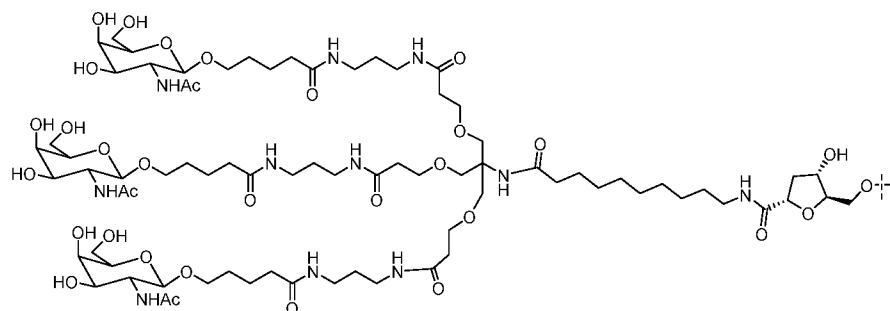
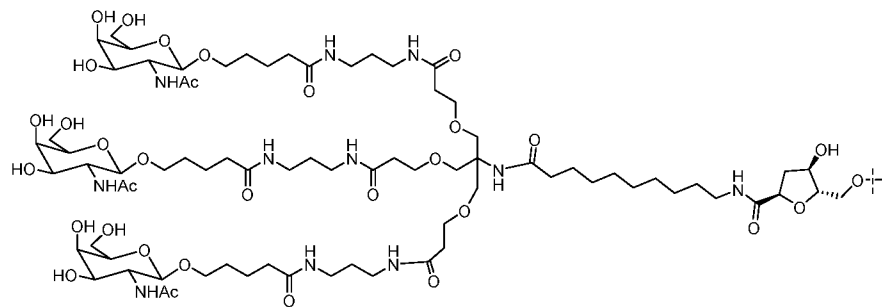
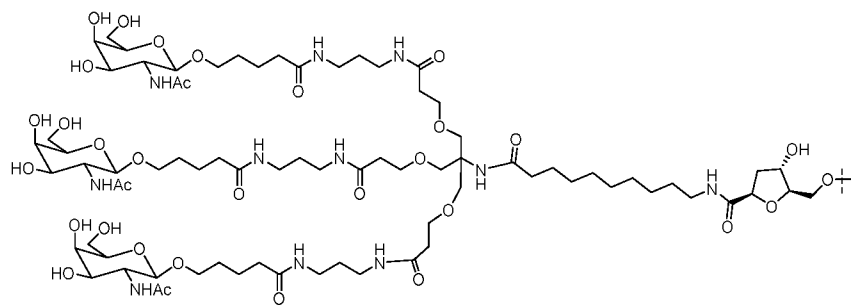


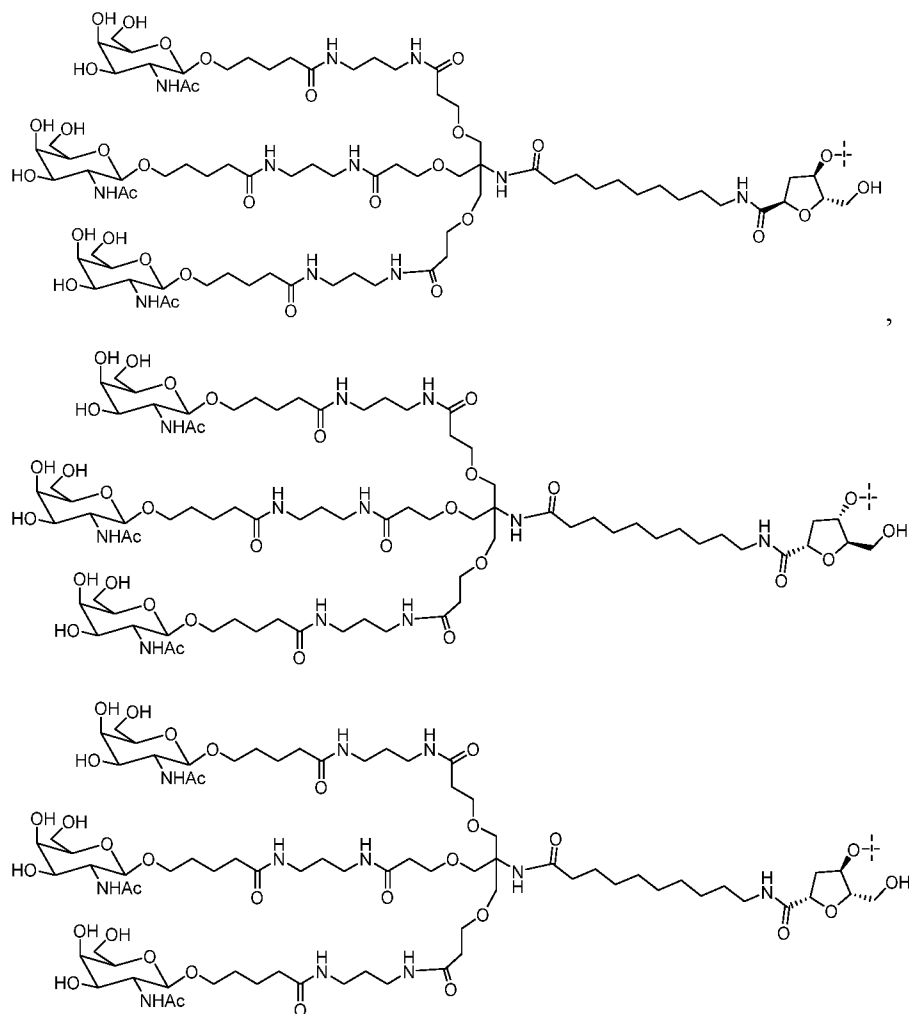






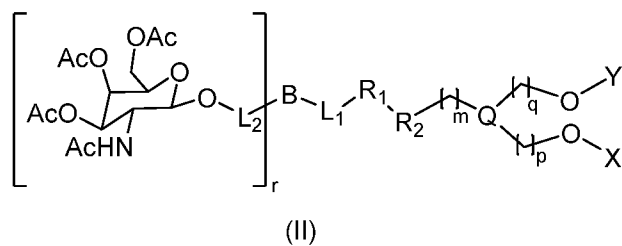






ИЛИ

17. Соединение, представленное формулой (II),



где X представляет собой защитную группу гидроксид, и защитная группа гидроксид предпочтительно представляет собой сложноэфирную защитную группу, алкоксиметильную защитную группу, алкильную защитную группу, силильную защитную группу или арильную защитную группу, более предпочтительно MMTg и DMTg и более предпочтительно DMTg;

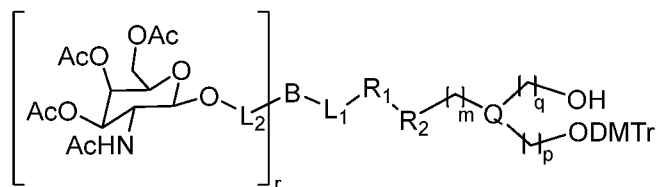
Y представляет собой водород, дейтерий, или ;
j7 равно 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 2;

W представляет собой макромолекулярное соединение, предпочтительно смолу,

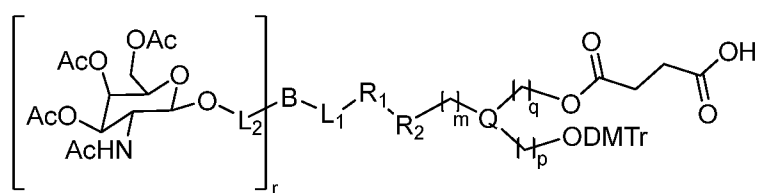
более предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотетильную смолу;

L_1 , R_1 , R_2 , Q , B , L_2 , m , p , q и r являются такими, как определено в любом из пп. 1-16.

18. Соединение по п. 17, представляющее собой соединение, представленное формулой (II-1), (II-2) или (II-3),

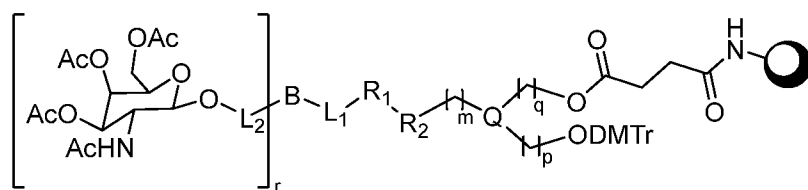


(II-1)




(II-2)

ИЛИ

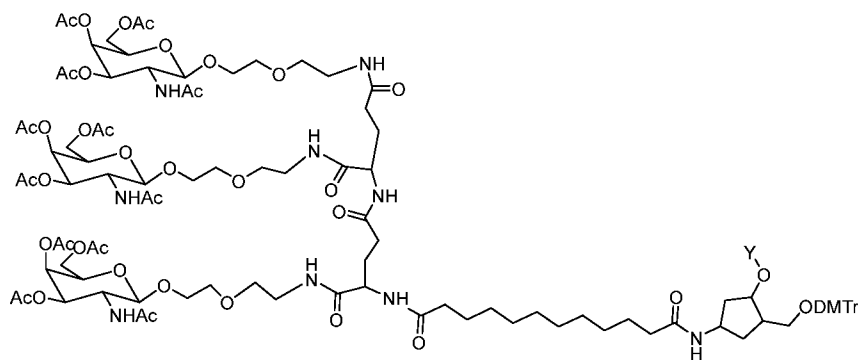


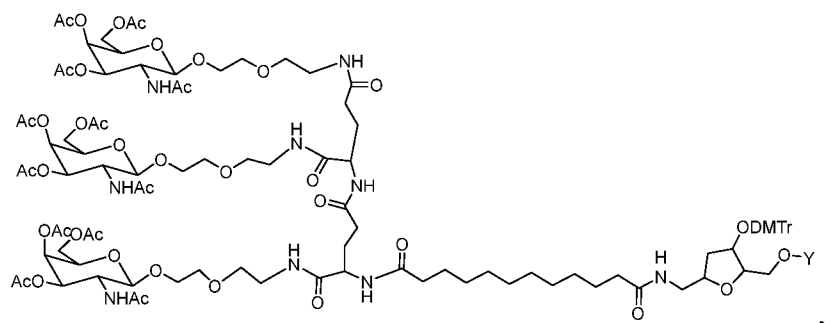
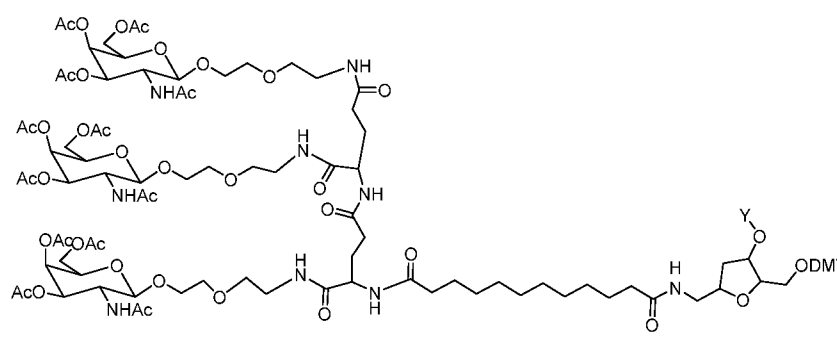
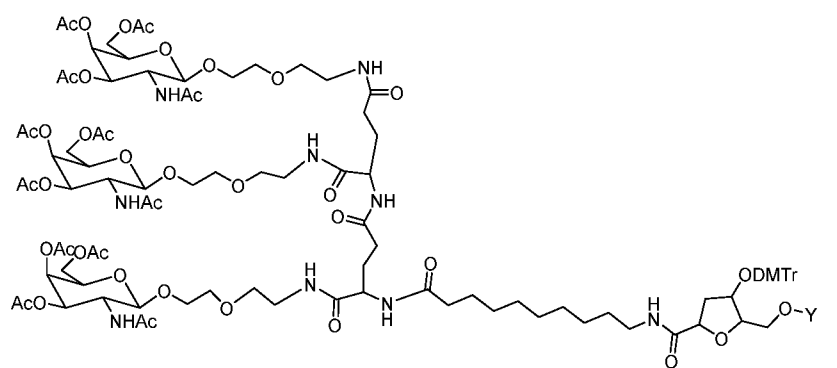
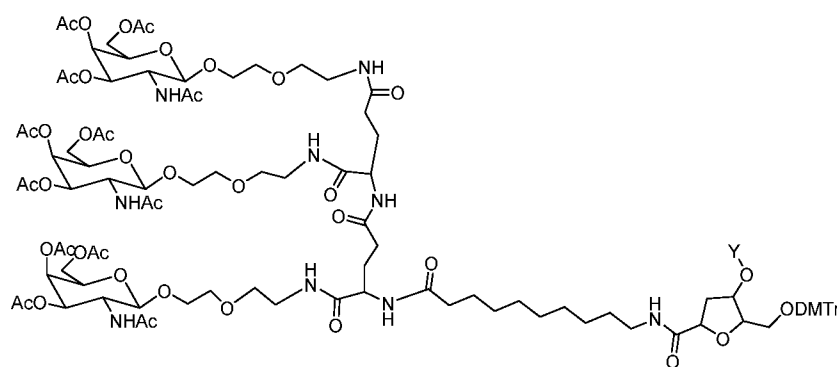
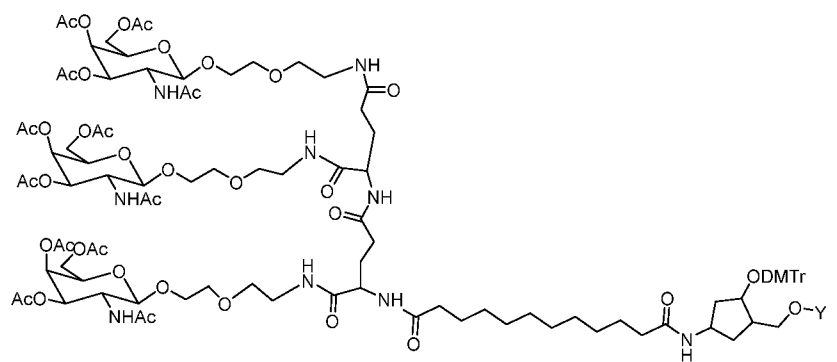
(II-3)

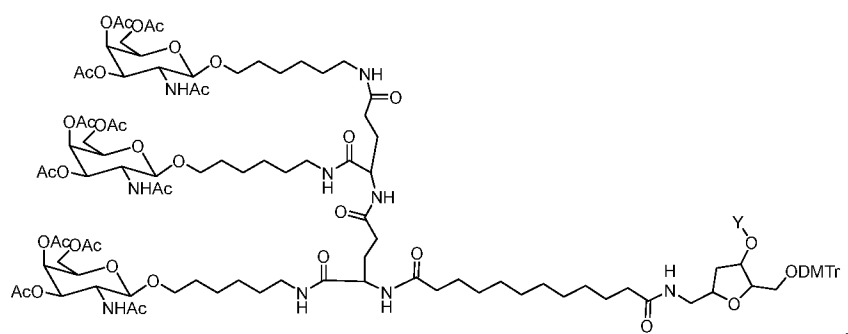
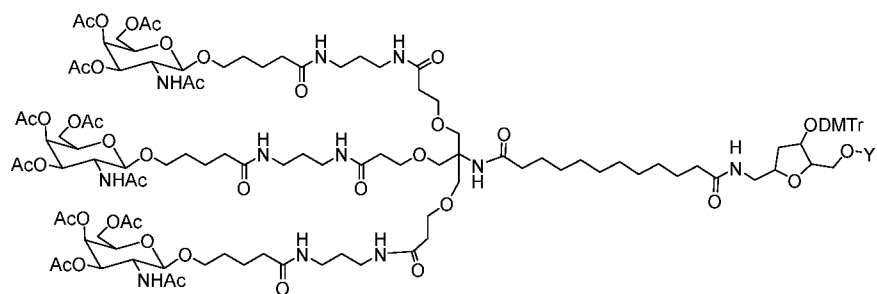
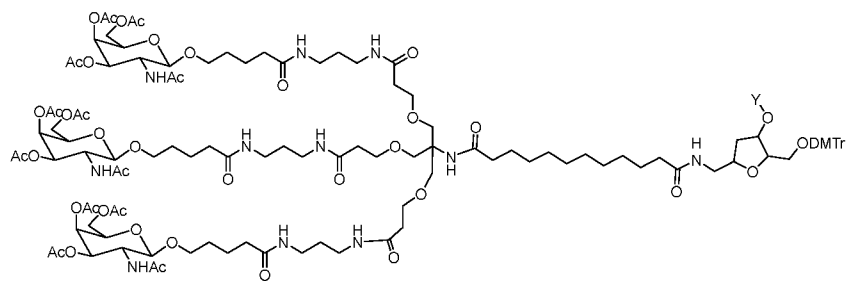
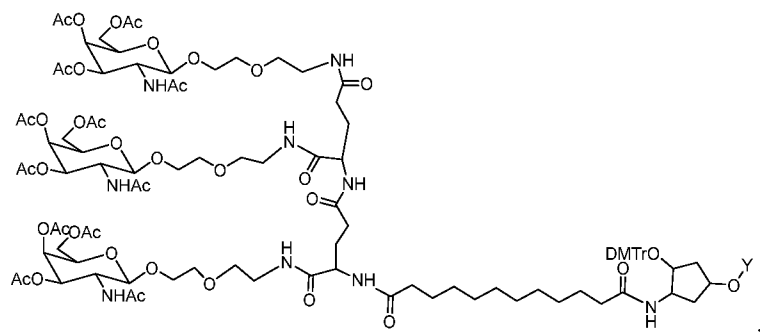
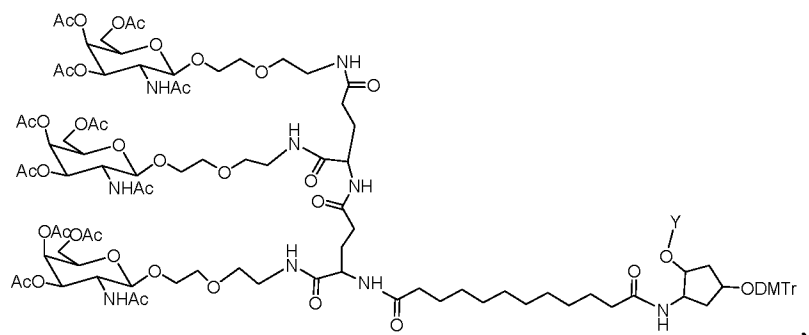
где  представляет собой смолу, предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотетильную смолу;

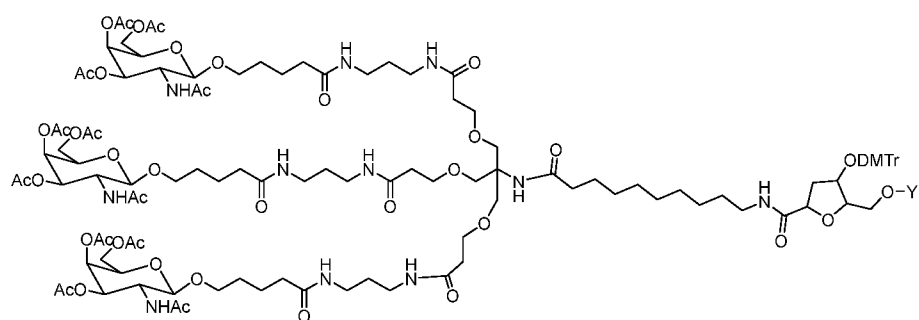
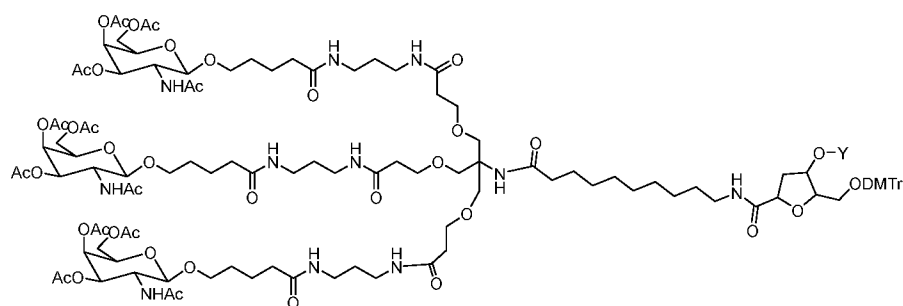
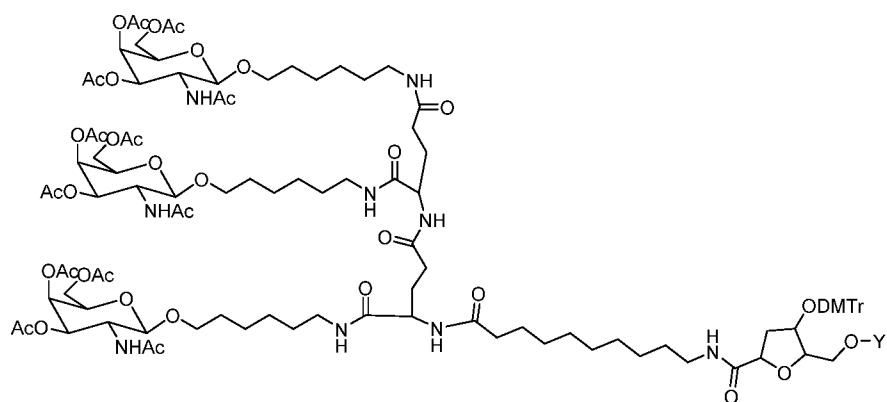
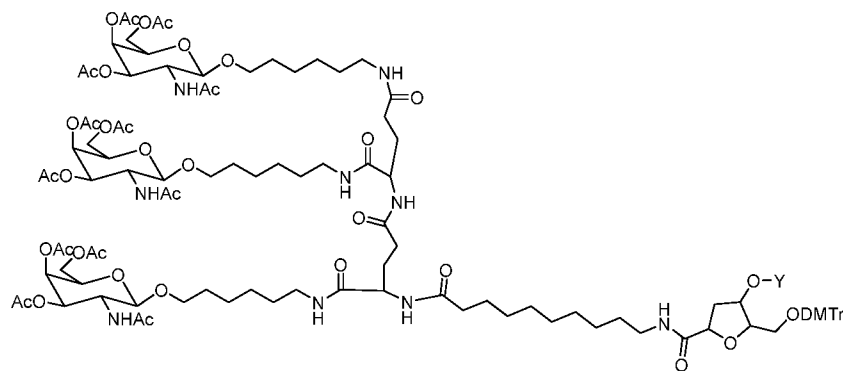
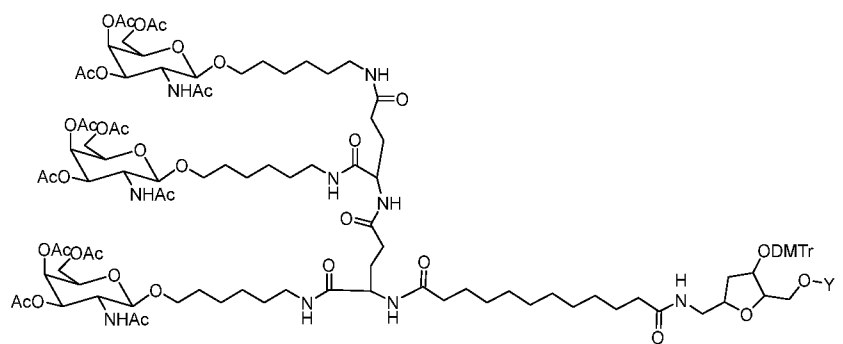
L_1 , R_1 , R_2 , B , L_2 , m , p , q и r являются такими, как определено в любом из пп. 1-16.

19. Соединение по п. 17 или 18, представляющее собой любую из следующих структур:



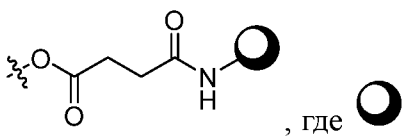





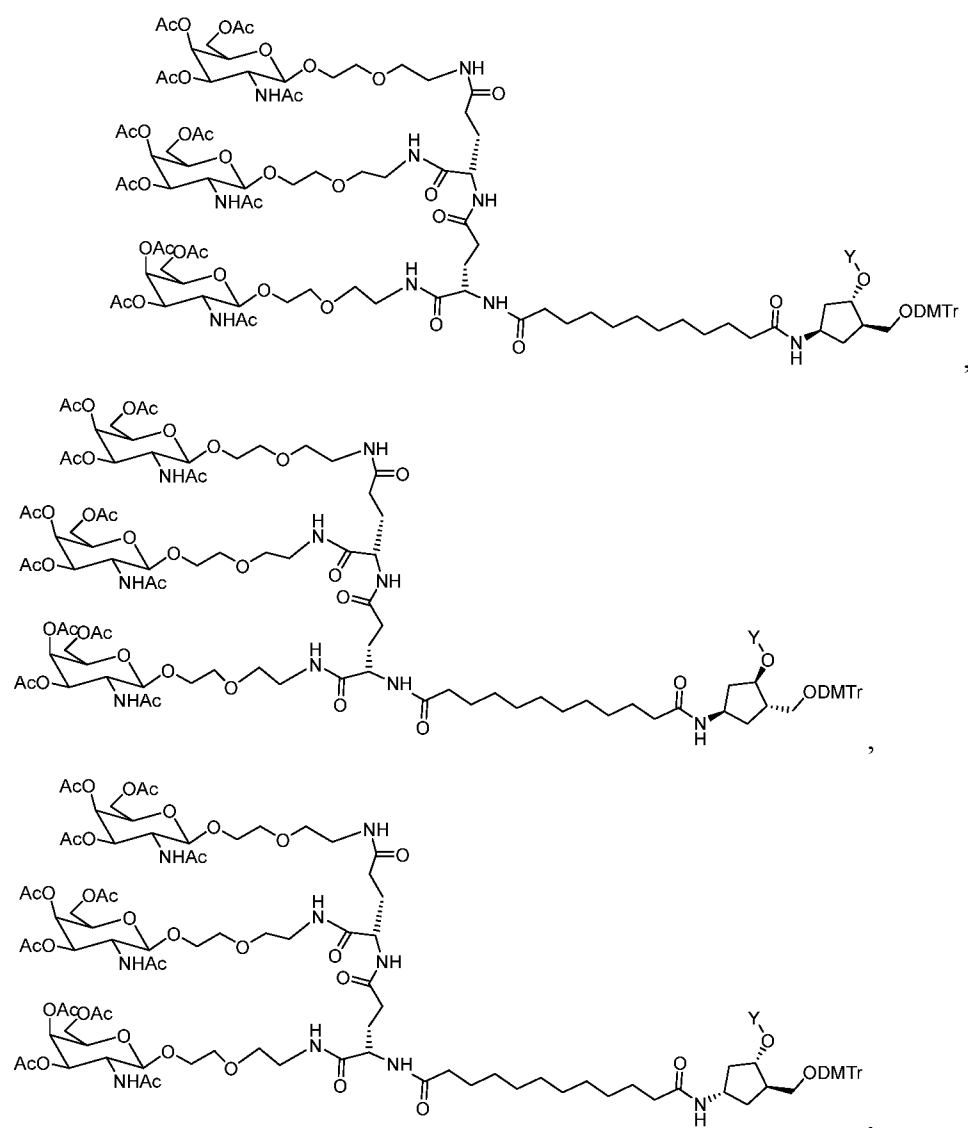


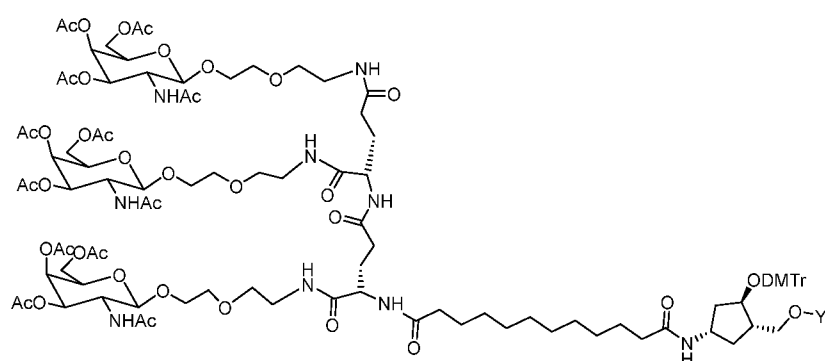
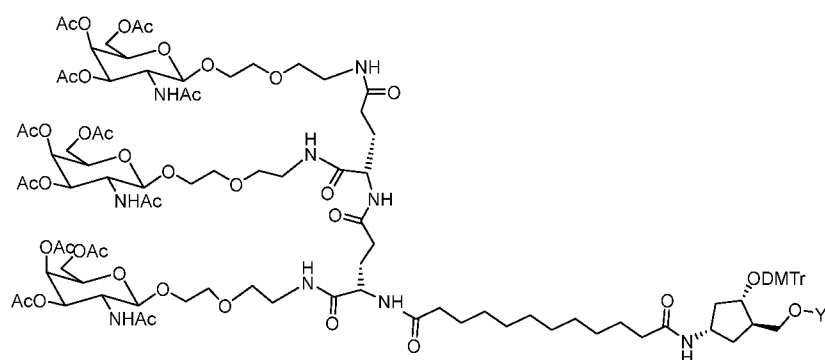
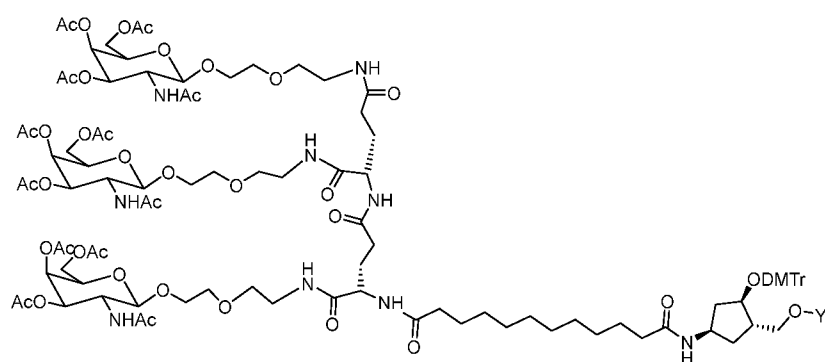
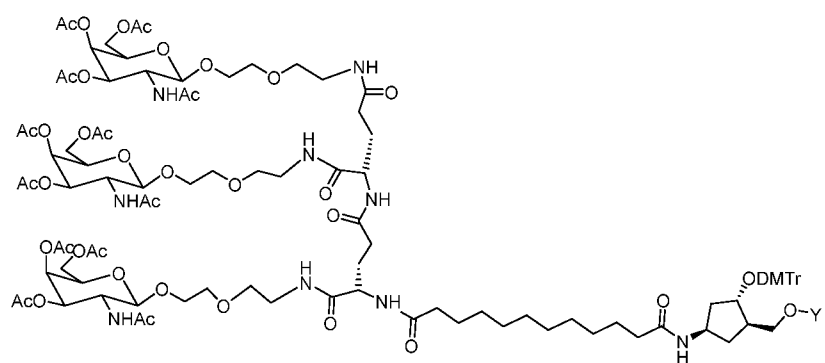
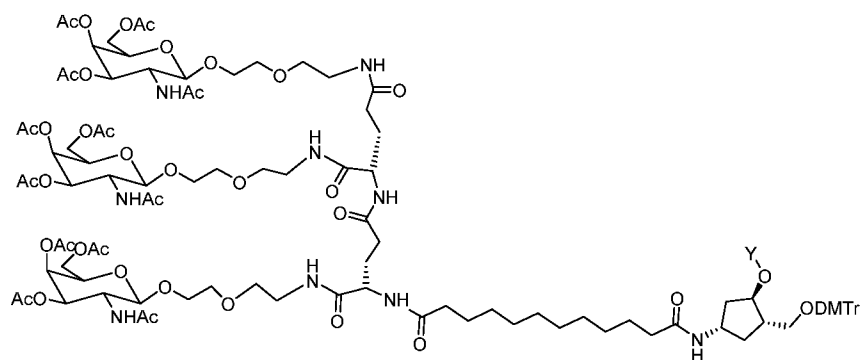
ИЛИ

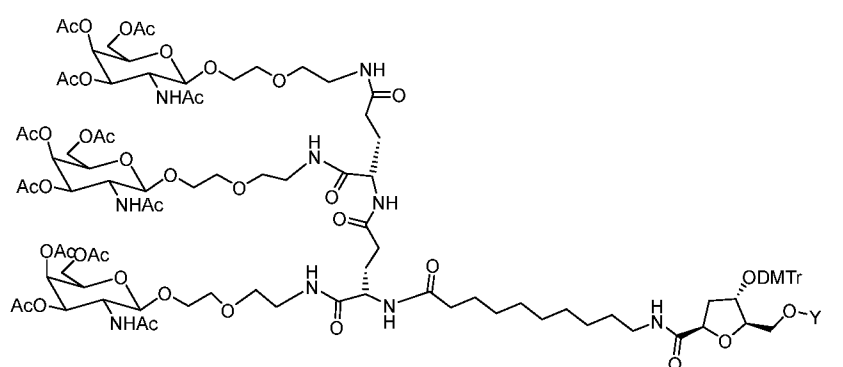
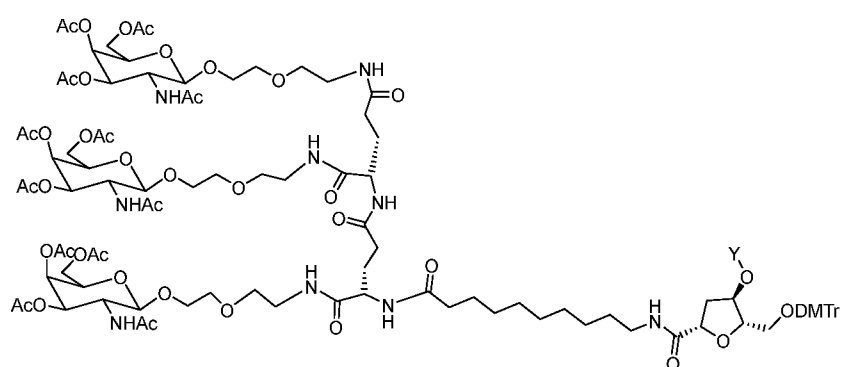
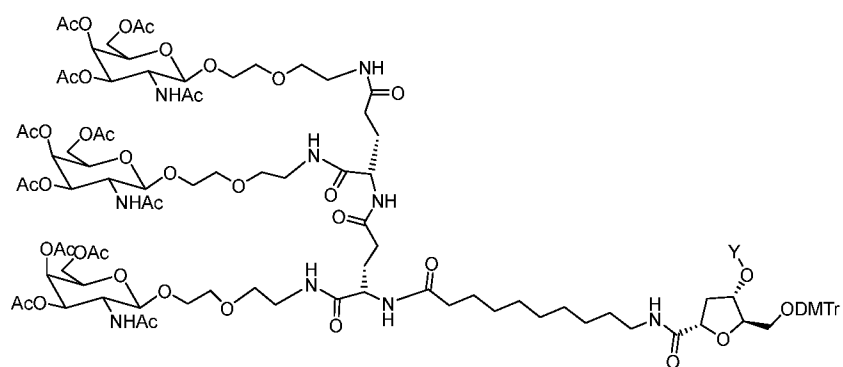
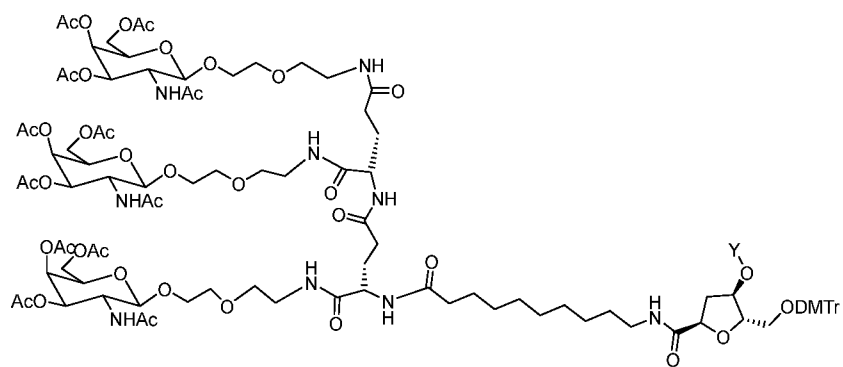
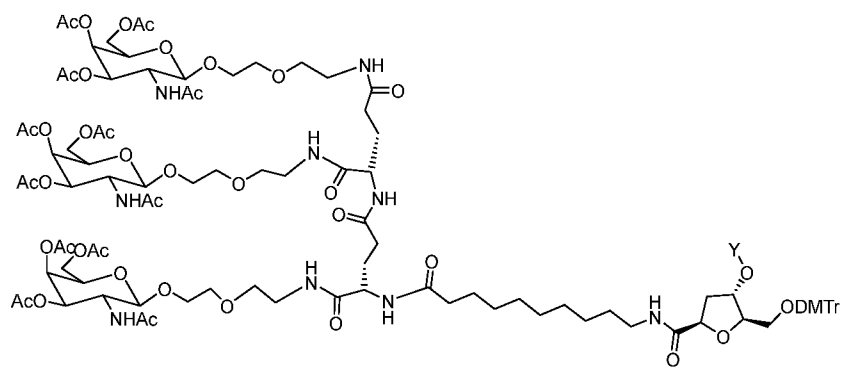


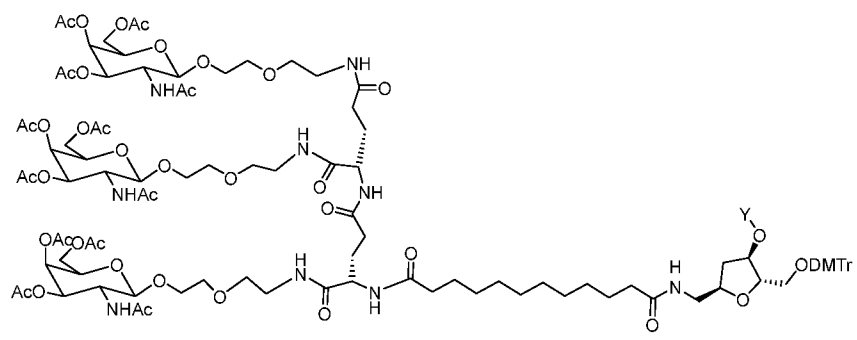
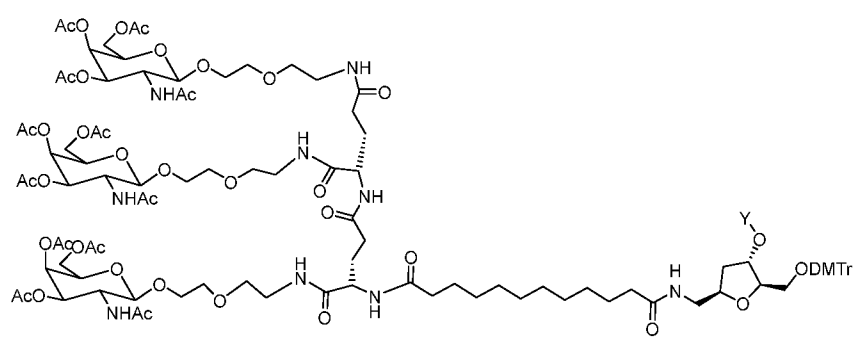
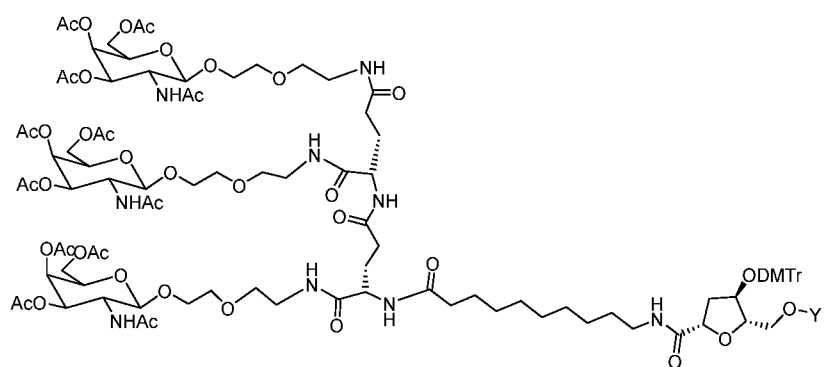
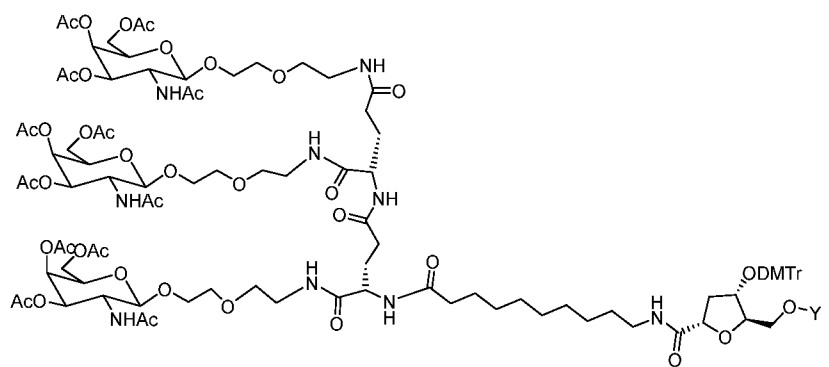
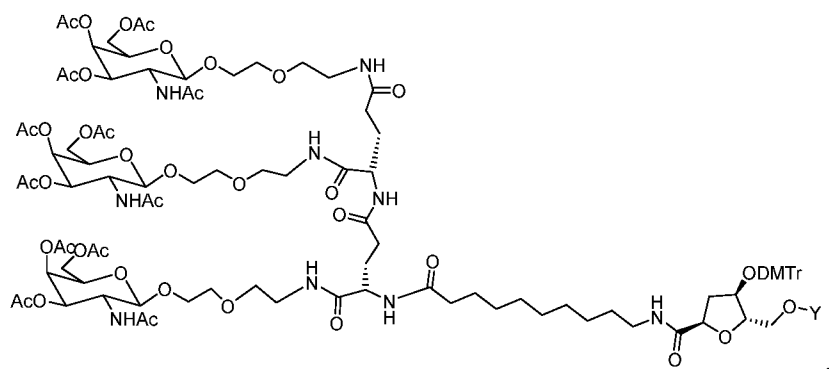
или, Y представляет собой  , где  представляет собой смолу, предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотимильную смолу.

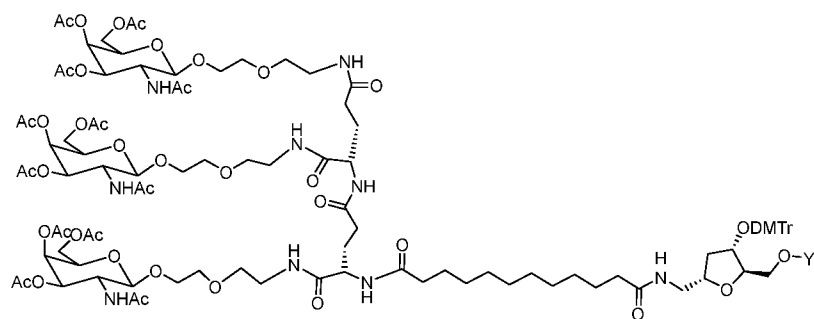
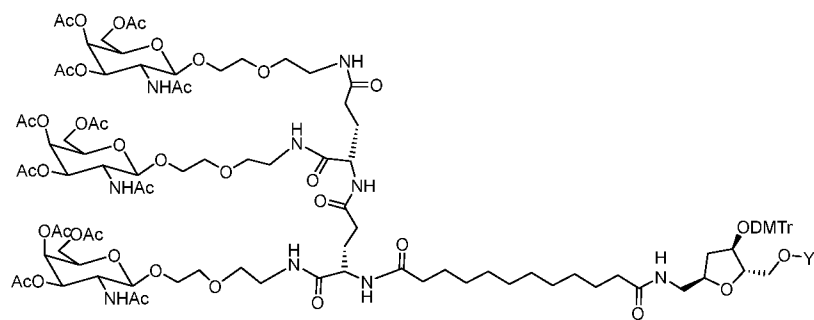
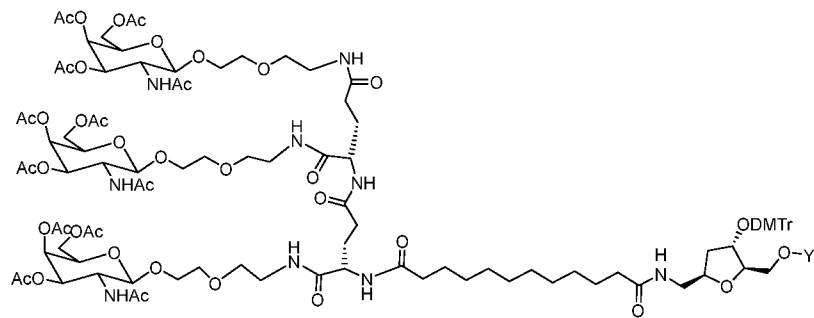
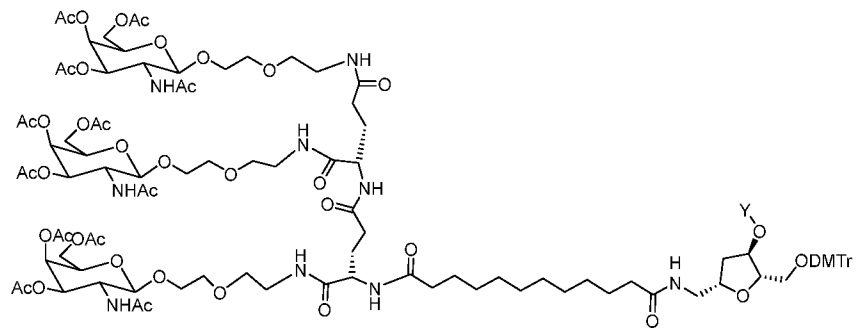
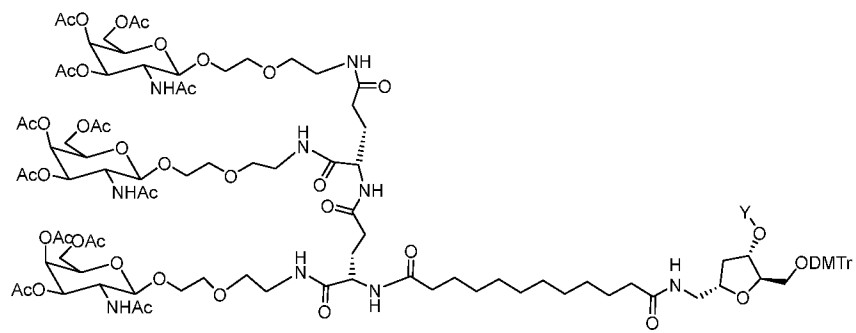
20. Соединение по любому из пп. 17-19, представляющее собой любую из следующих структур:

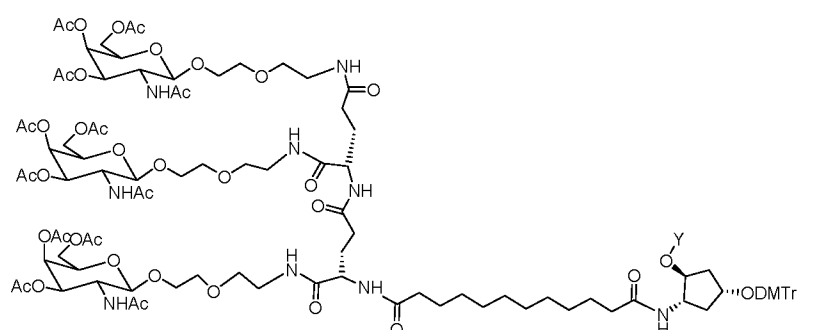
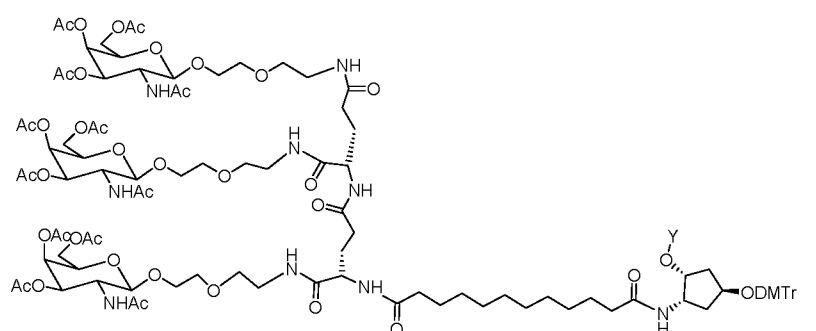
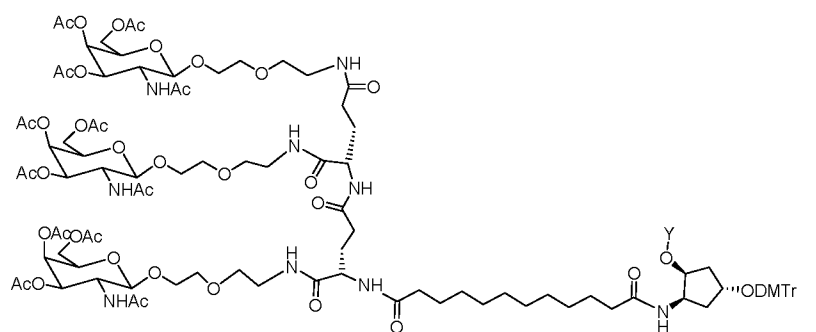
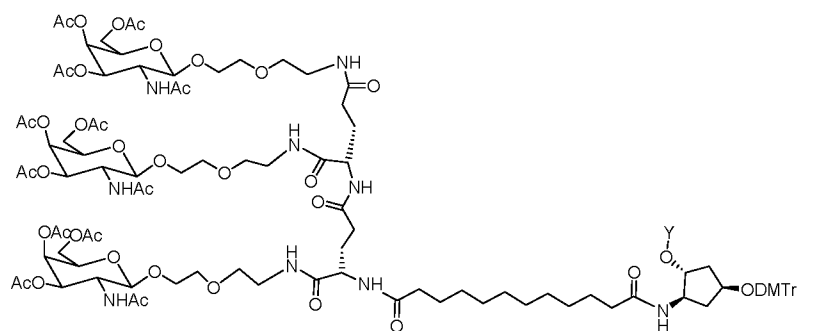
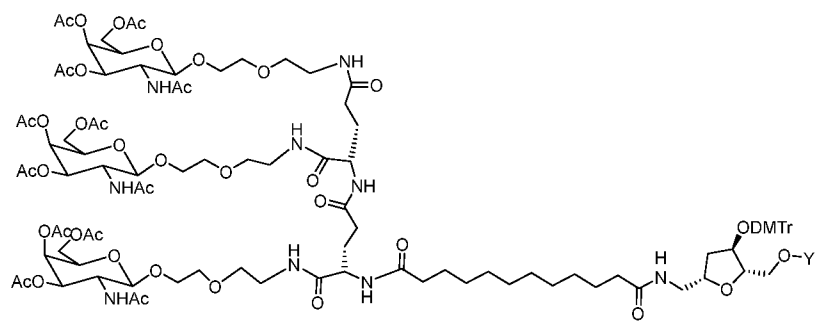


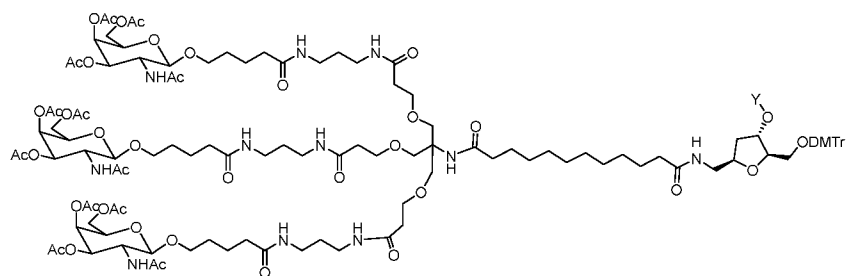
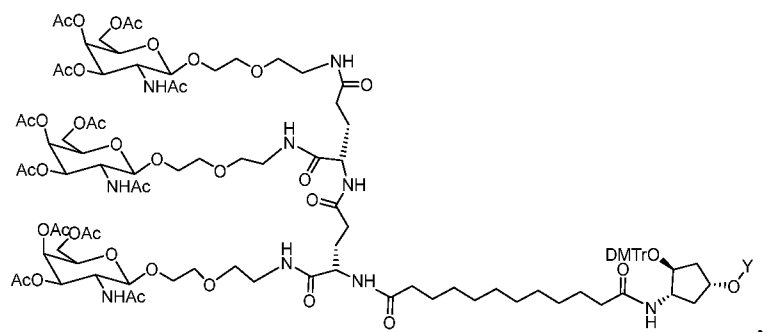
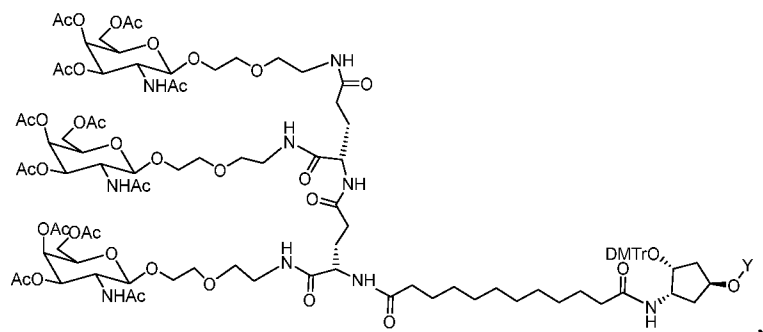
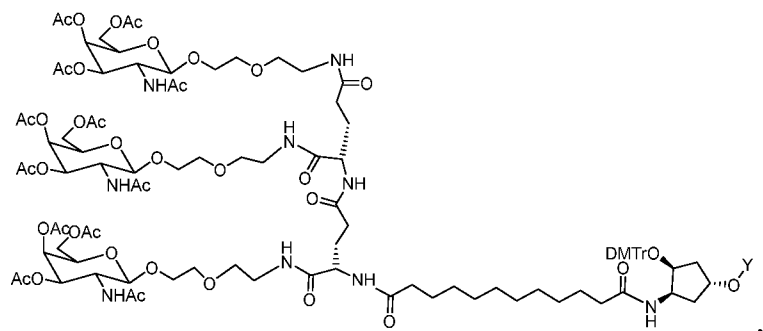
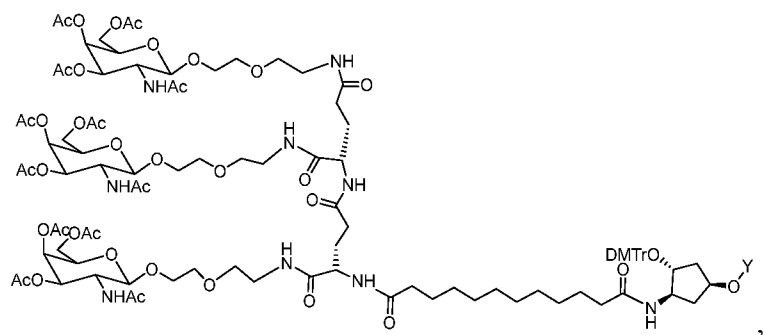


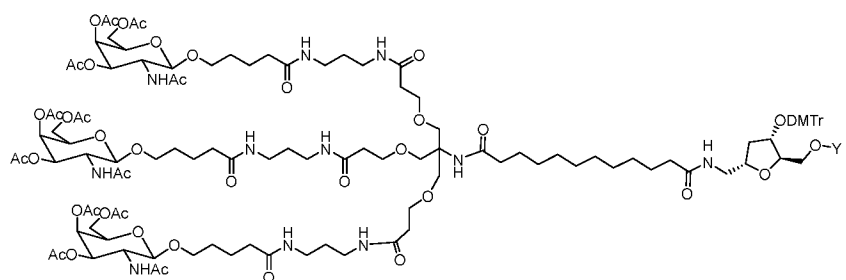
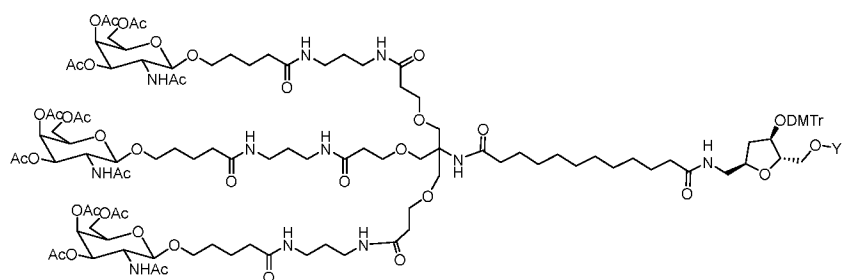
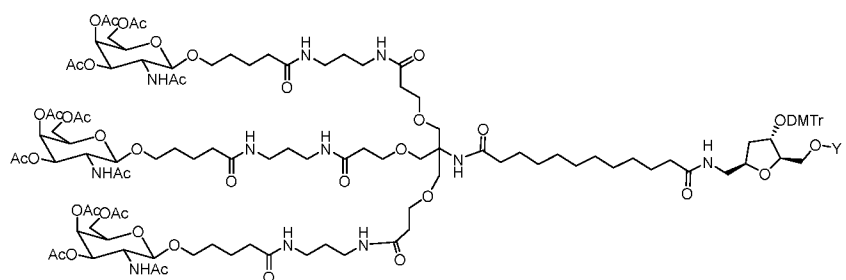
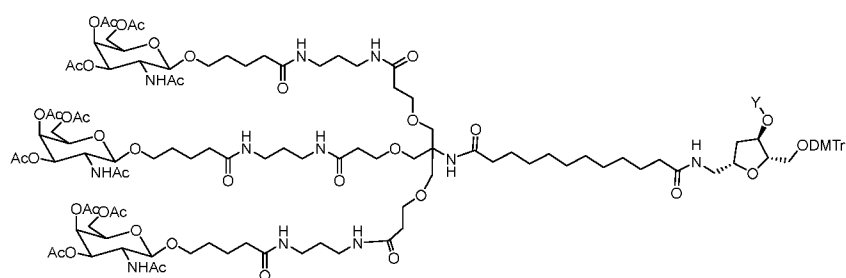
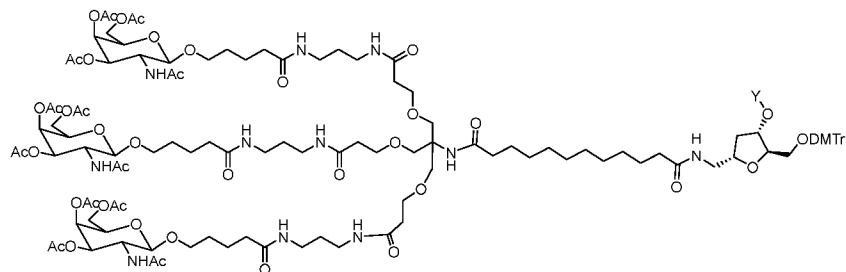
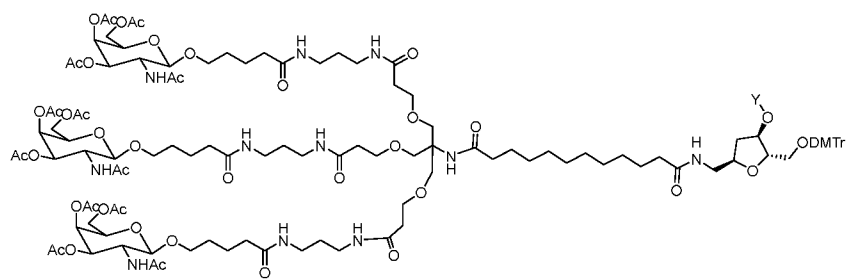


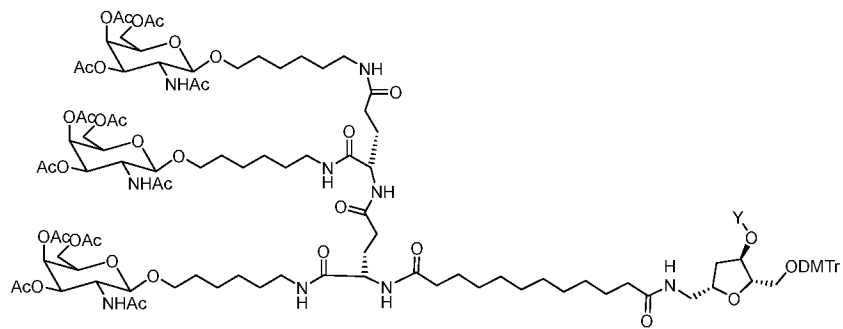
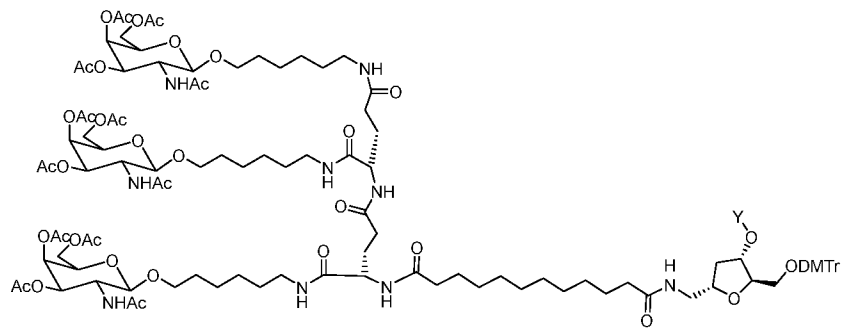
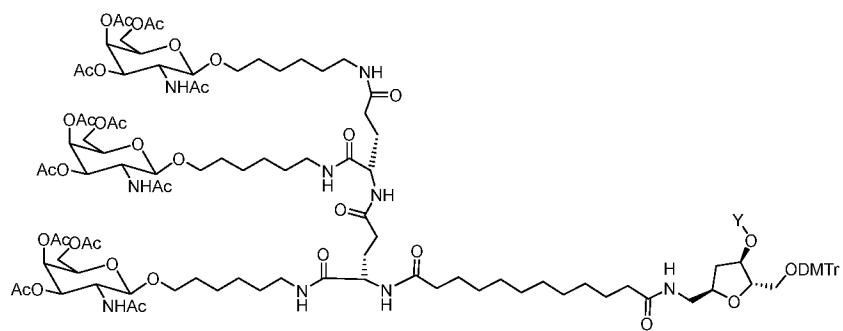
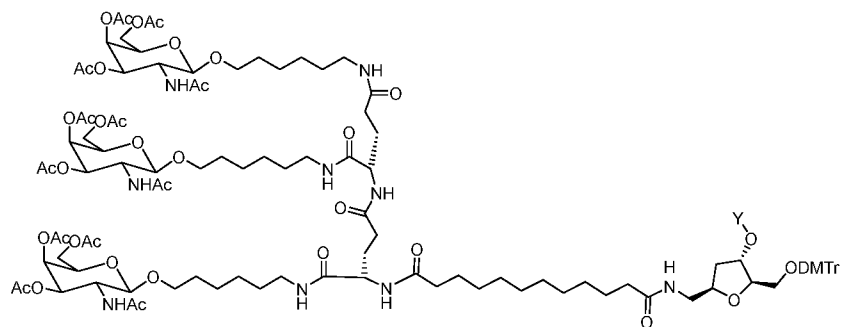
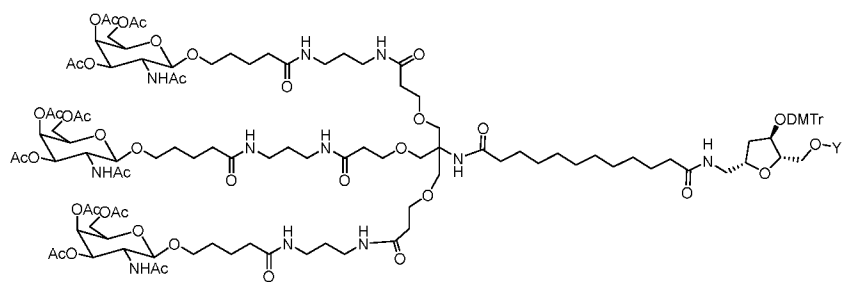


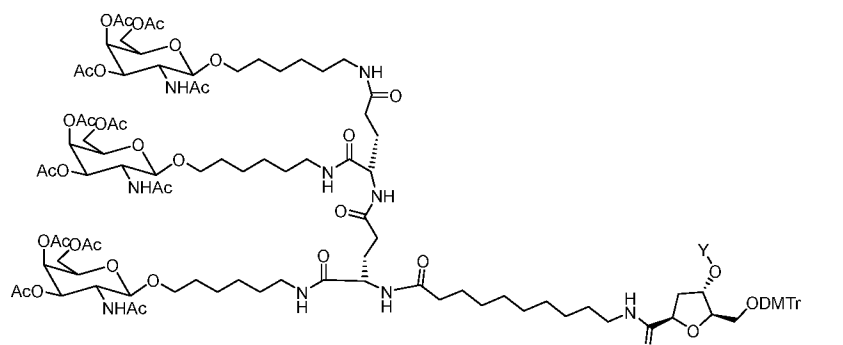
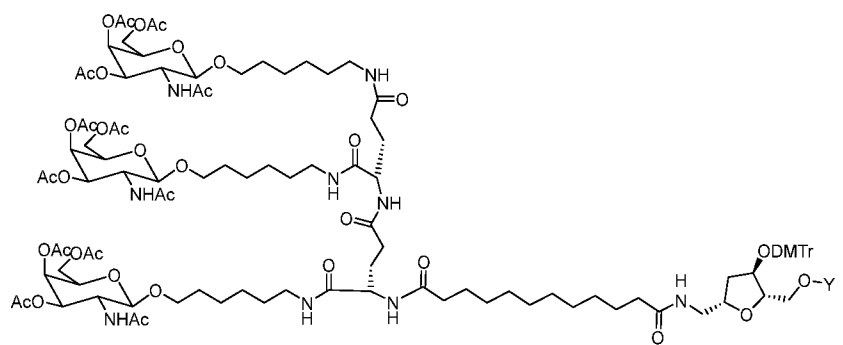
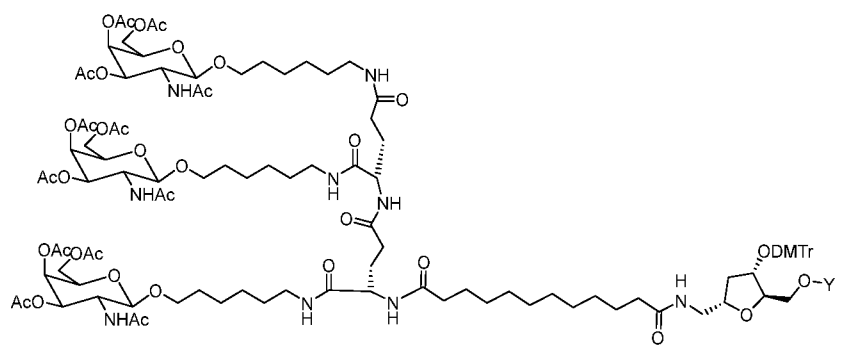
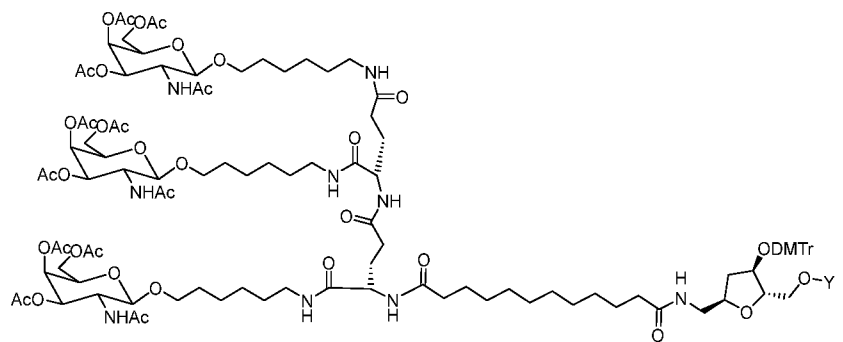
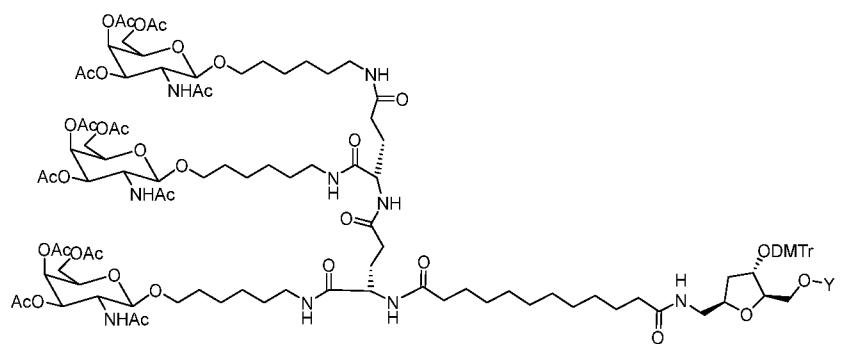


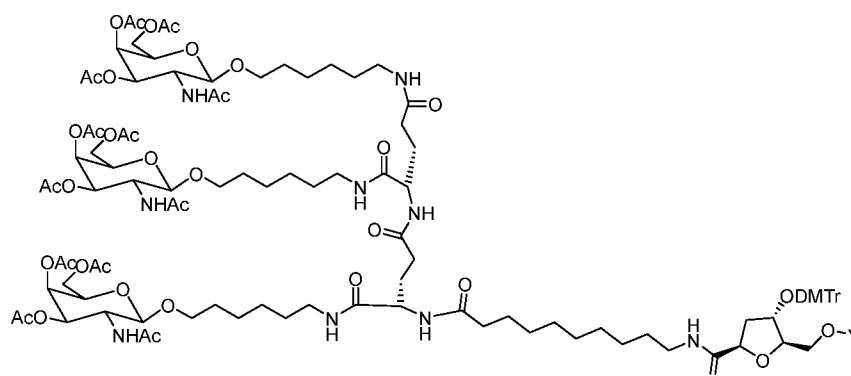
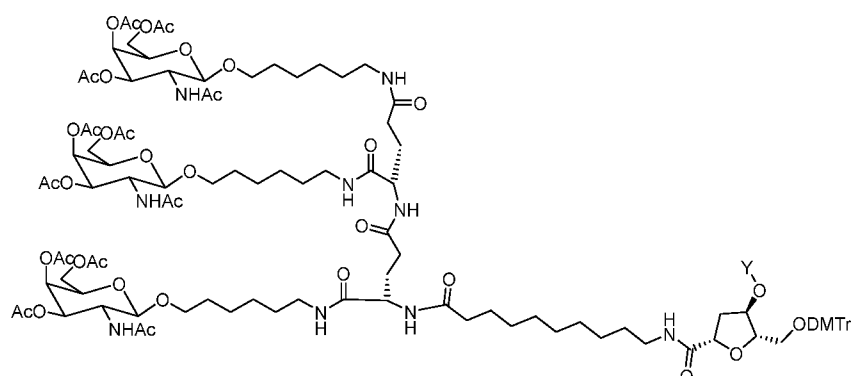
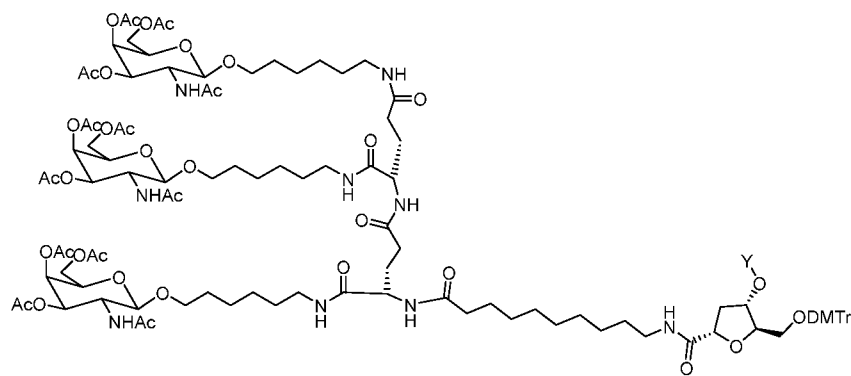
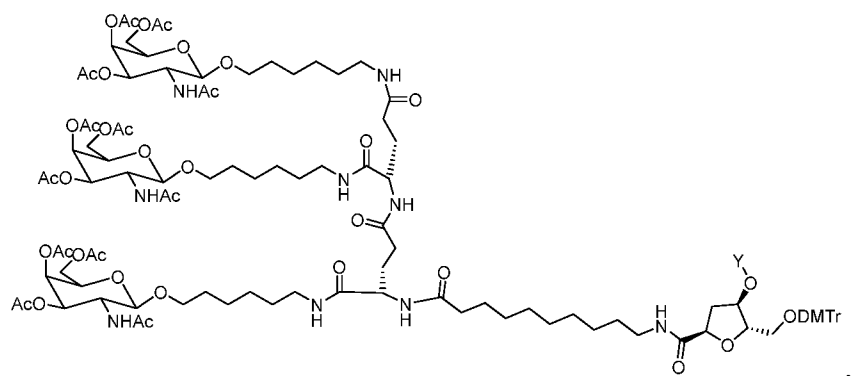


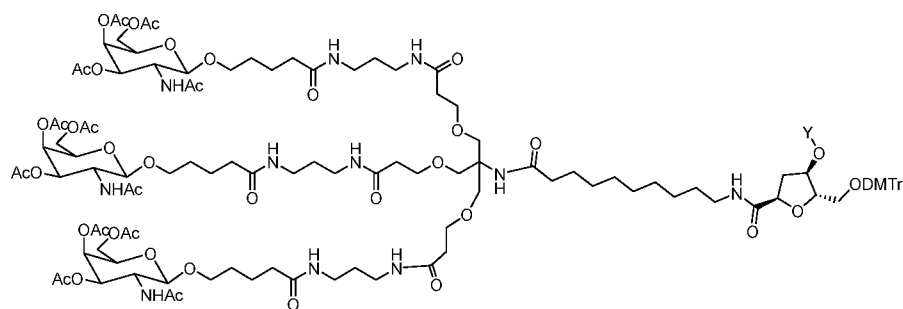
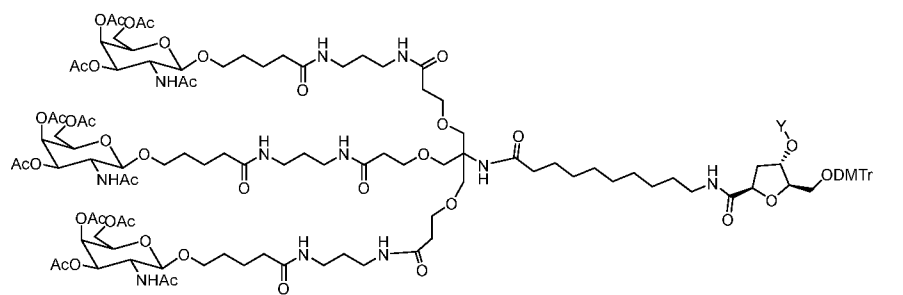
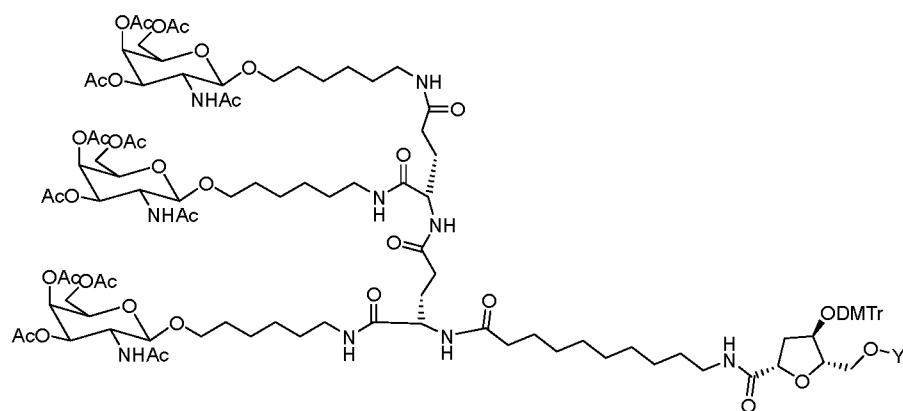
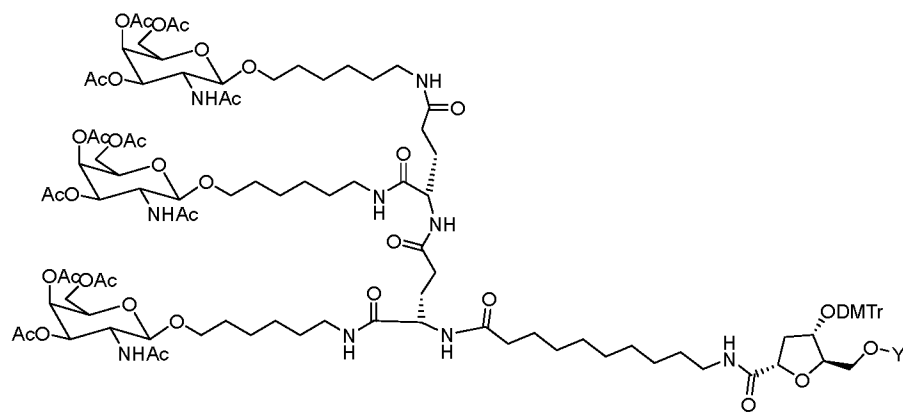
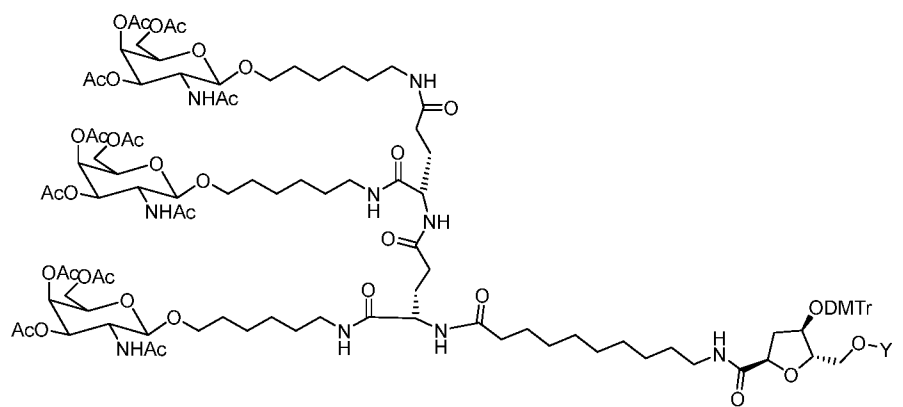


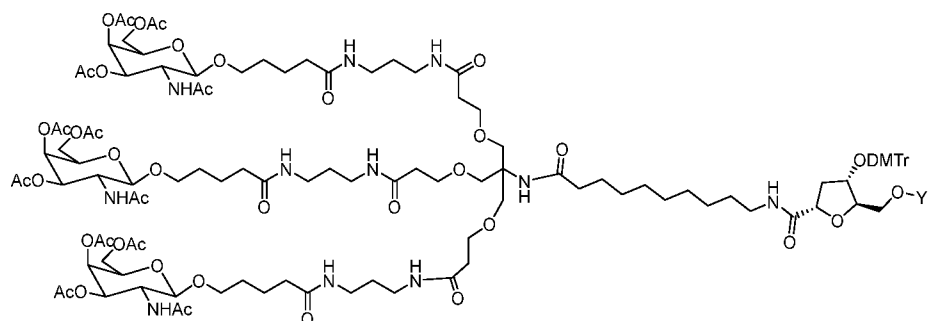
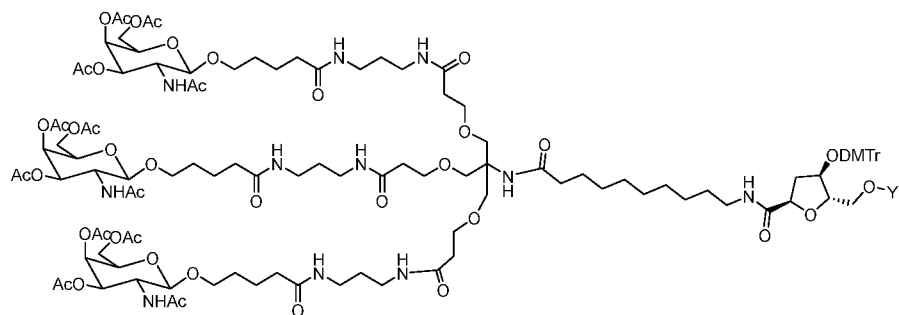
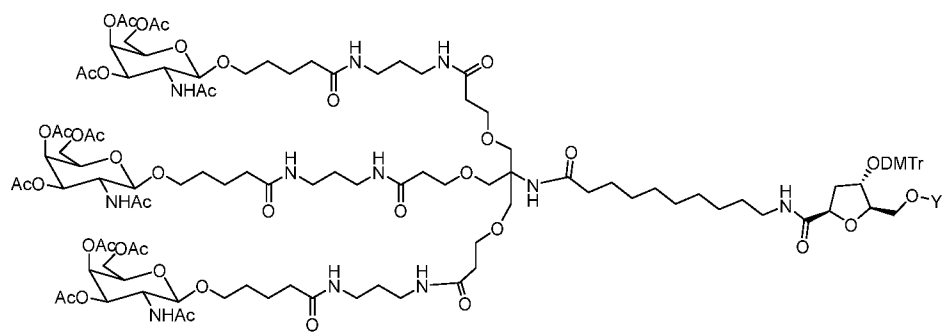
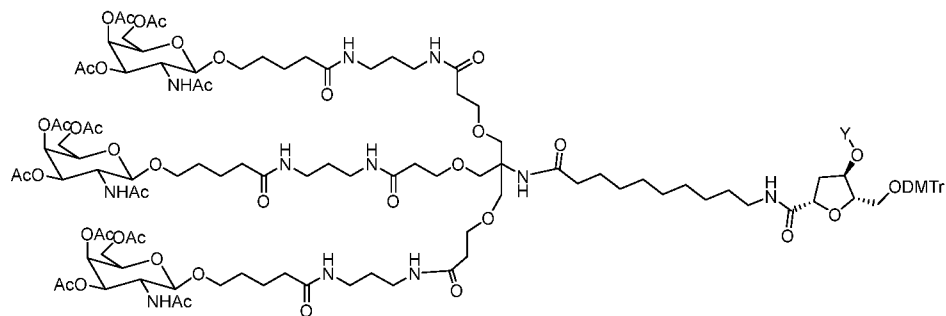
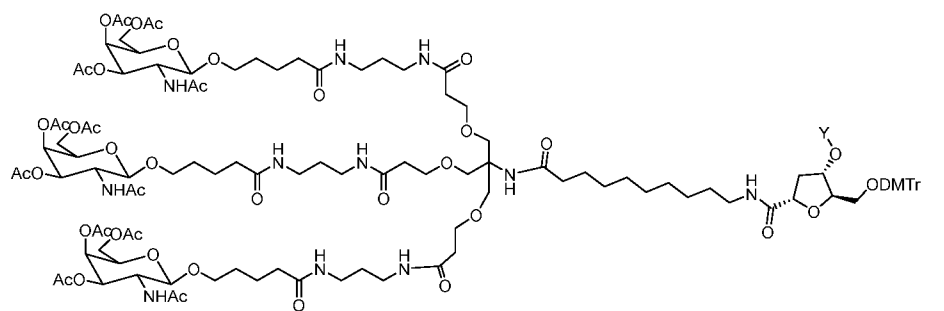




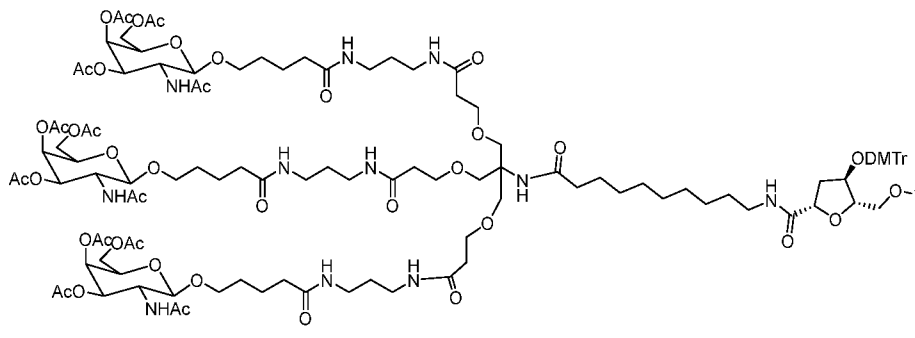




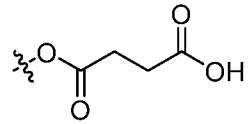




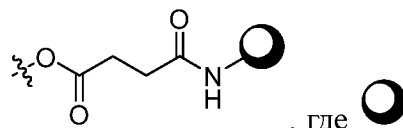
ИЛИ




где Y представляет собой водород или



или, Y представляет собой



, где  представляет собой смолу, предпочтительно макропористую смолу и более предпочтительно макропористую аминотимильную смолу.

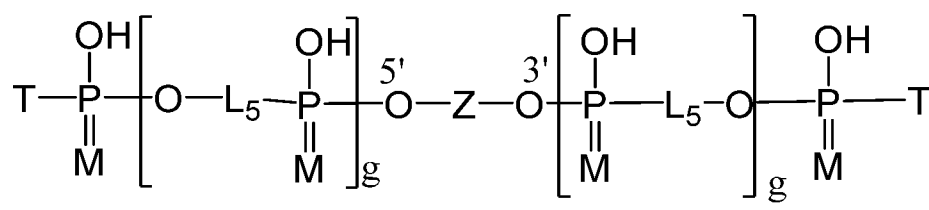
21. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда, содержащий нуклеиновую кислоту и один или более лигандов по любому из пп. 1-16, где лиганды конъюгированы с концом нуклеиновой кислоты, и лиганды являются идентичными или различными.

22. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда по п. 21, где нуклеиновая кислота и лиганды связаны фосфосложноэфирными группами, фосфоротиоатными группами или группами фосфоновой кислоты;

и/или 3'-конец нуклеиновой кислоты конъюгирован с лигандом;

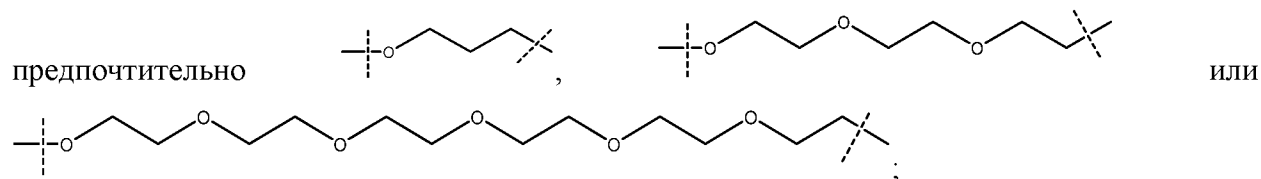
и/или нуклеиновая кислота представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту, предпочтительно смысловую цепь мРНК.

23. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда по п. 21 или 22, где конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда представляет собой любую из следующих структур или его фармацевтически приемлемую соль:



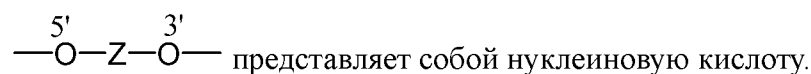
где T представляет собой лиганд по любому из пп. 1-16, и каждый T является идентичным или различным;

L_5 независимо представляет собой C_1 - C_{30} алкильную цепь или C_1 - C_{30} алкильную цепь, прерванную одним или более атомами кислорода, серы или азота, или $C=O$,

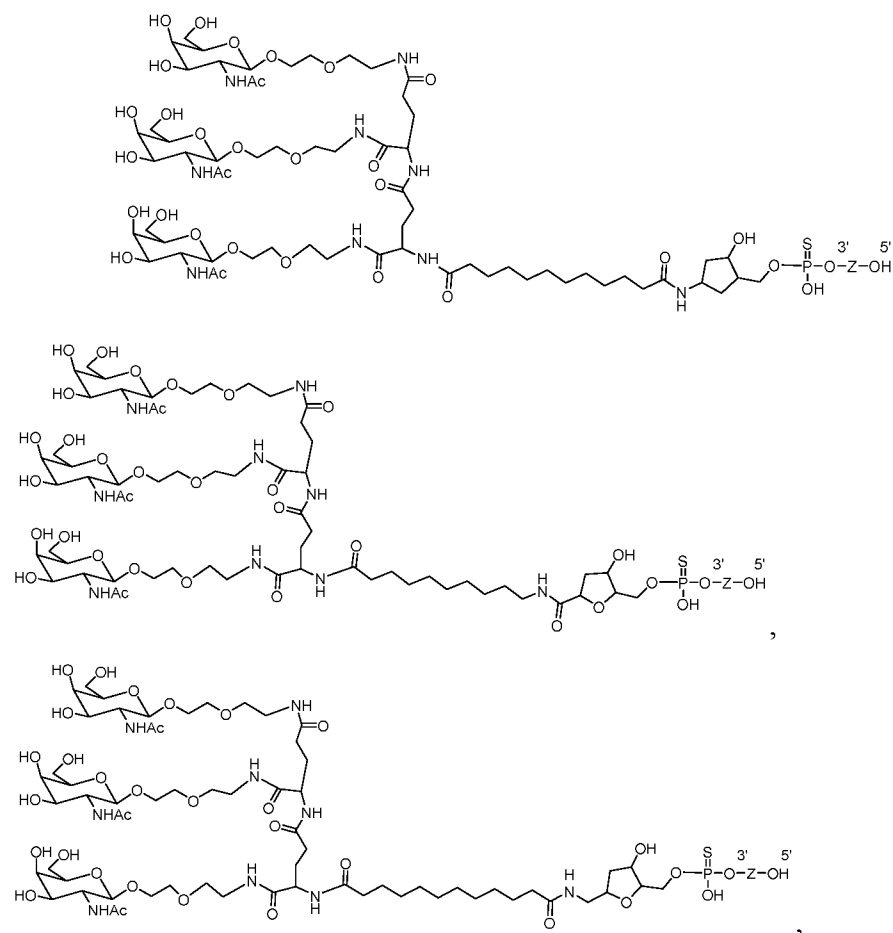


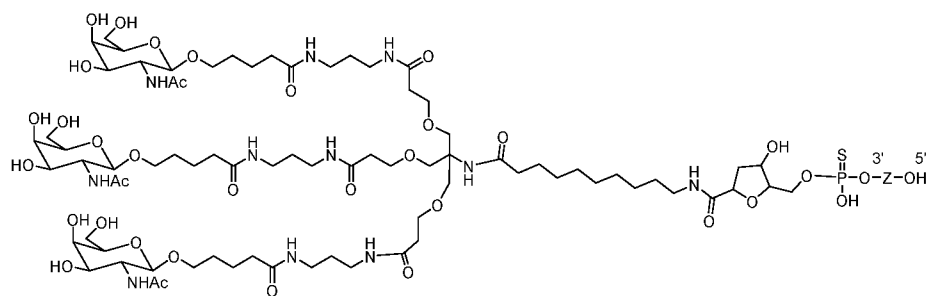
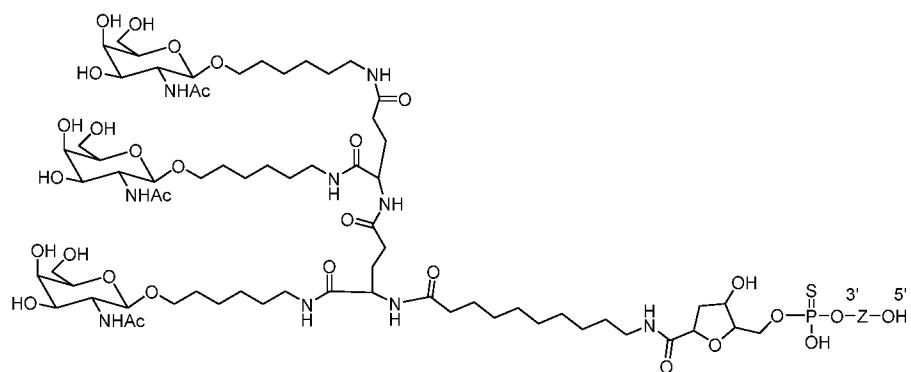
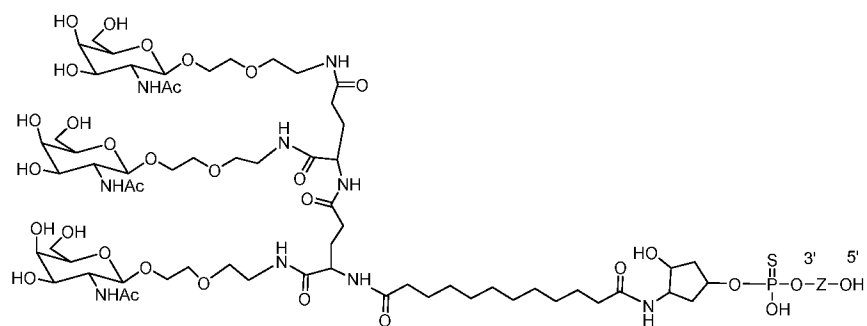
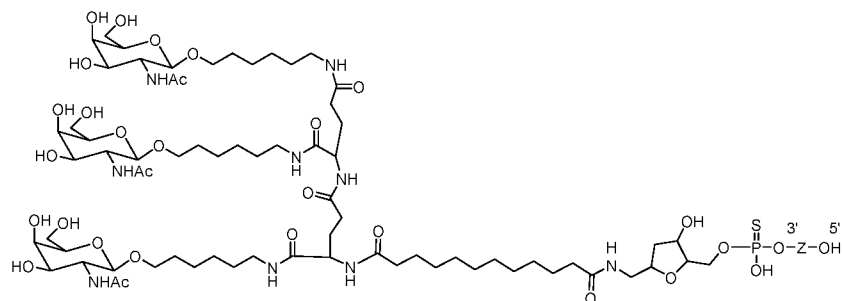
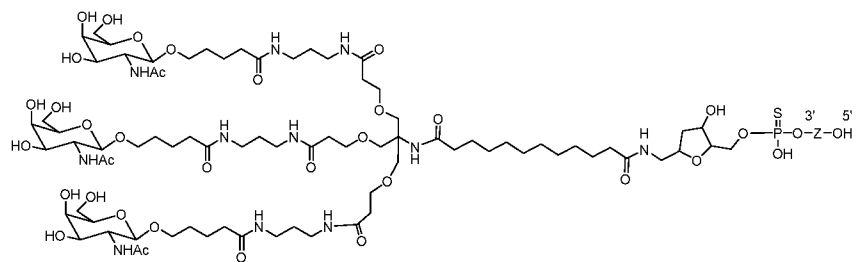
M независимо представляет собой O или S ;

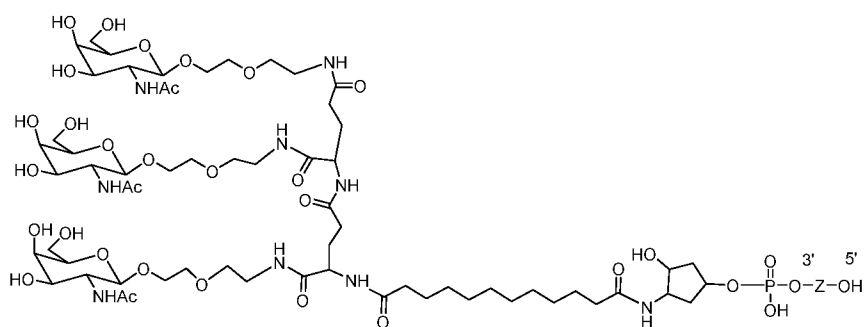
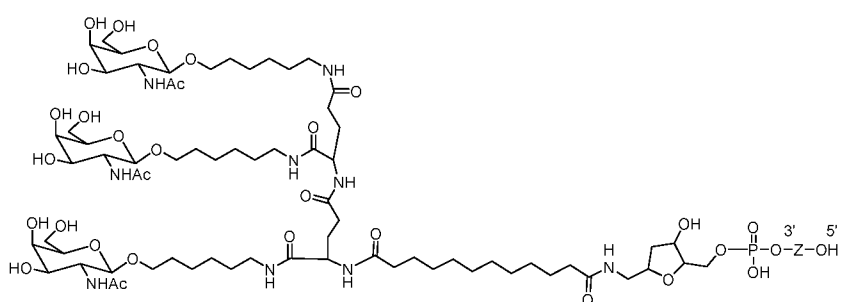
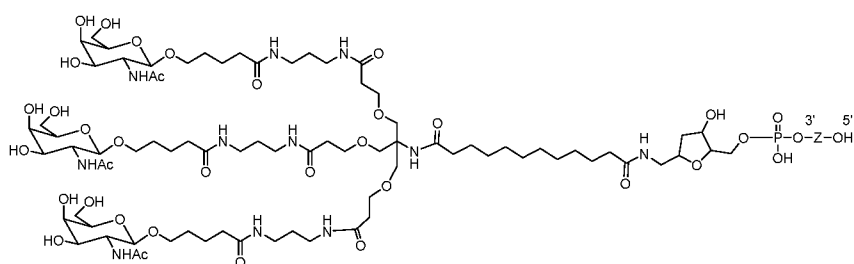
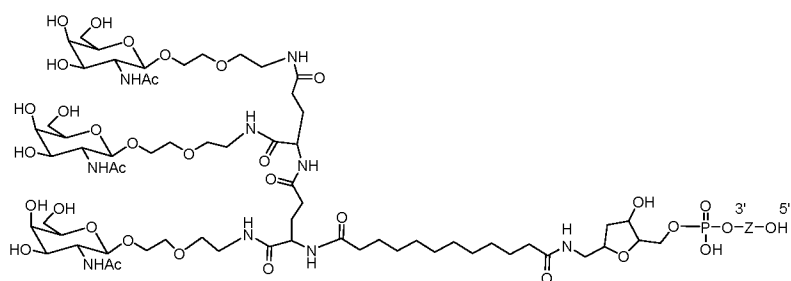
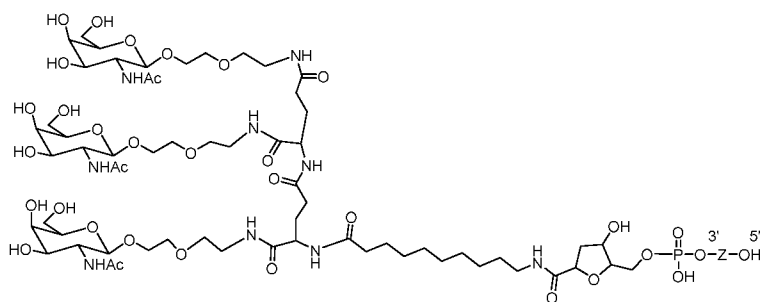
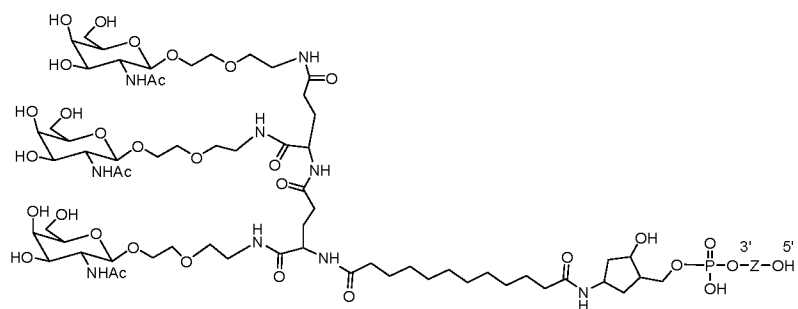
g независимо представляет собой целое число 0-4, предпочтительно 0 или 1 и более предпочтительно 0;

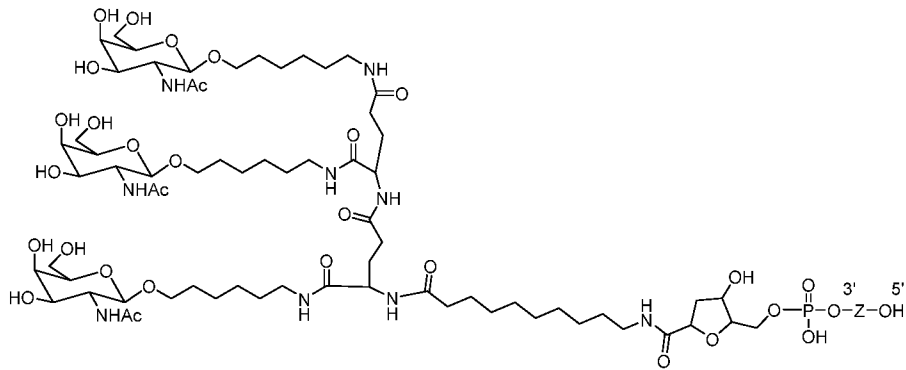


24. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда по любому из пп. 21-23, где конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда представляет собой любую из следующих структур или ее фармацевтически приемлемую соль:

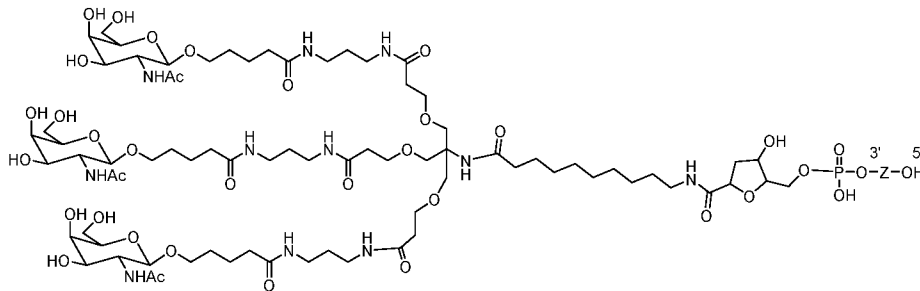




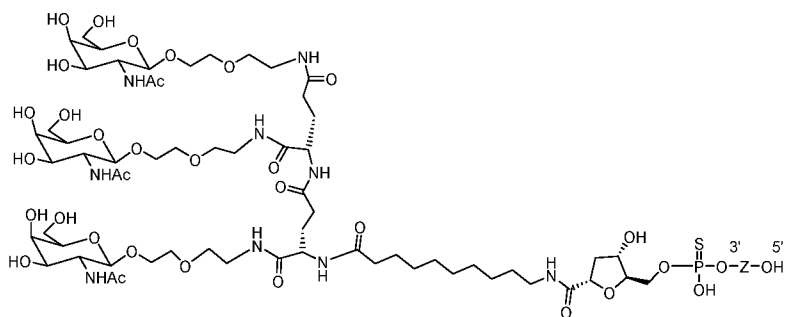
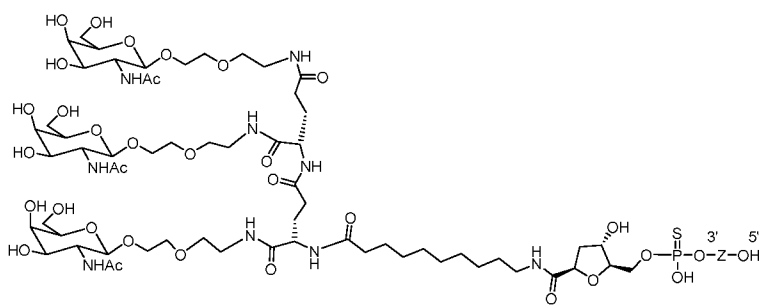
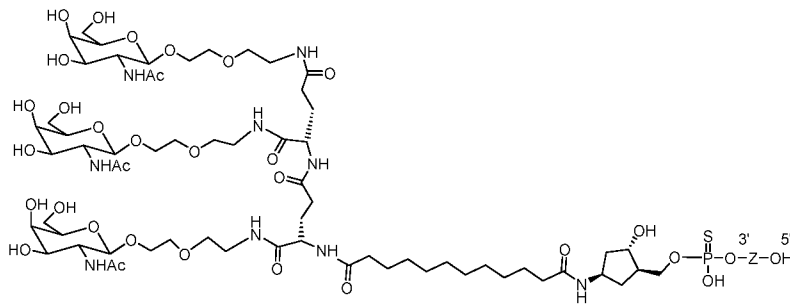


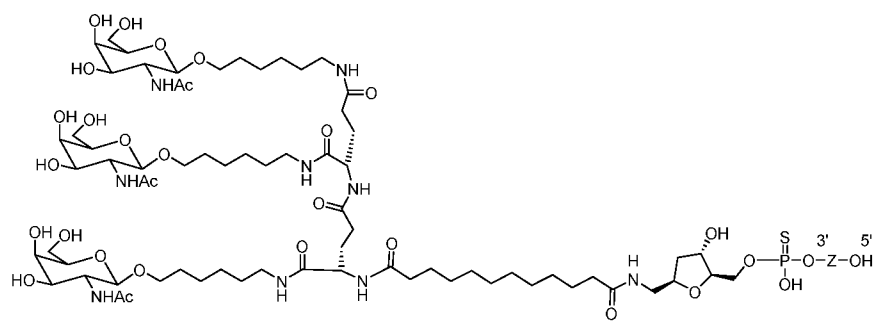
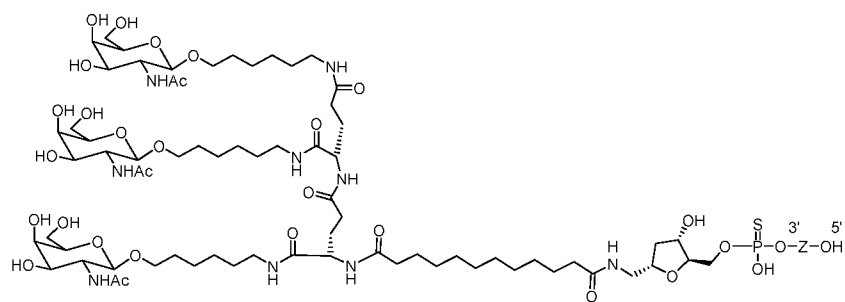
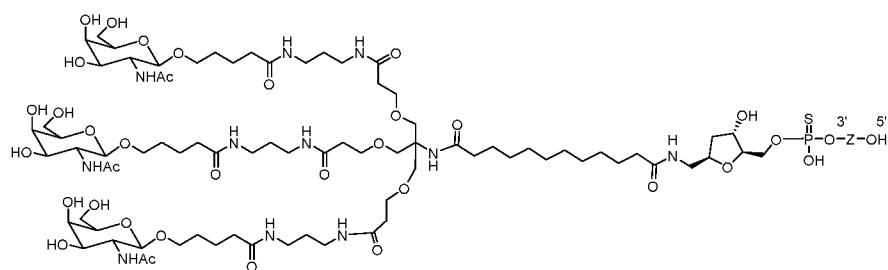
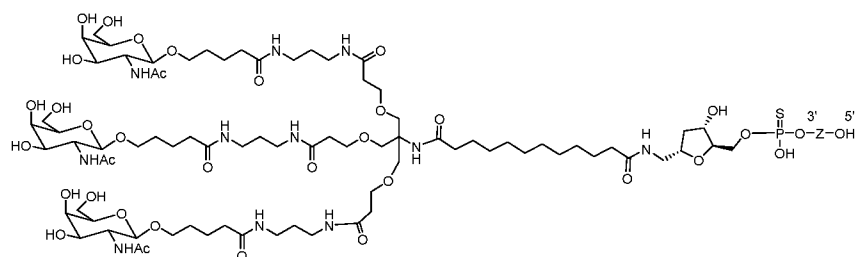
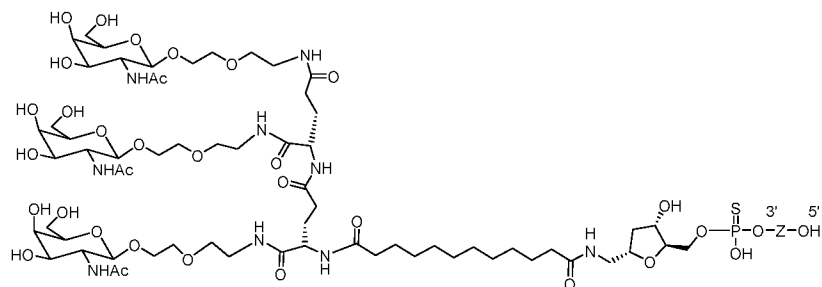
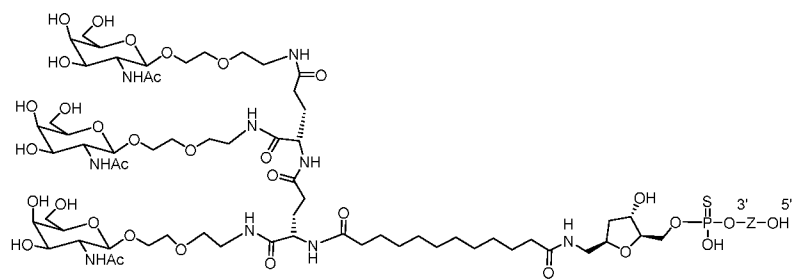


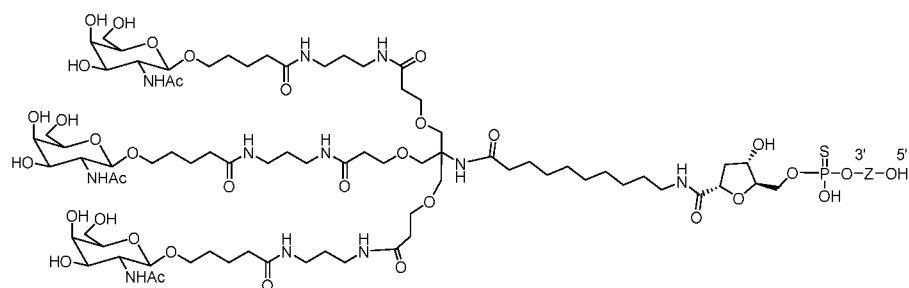
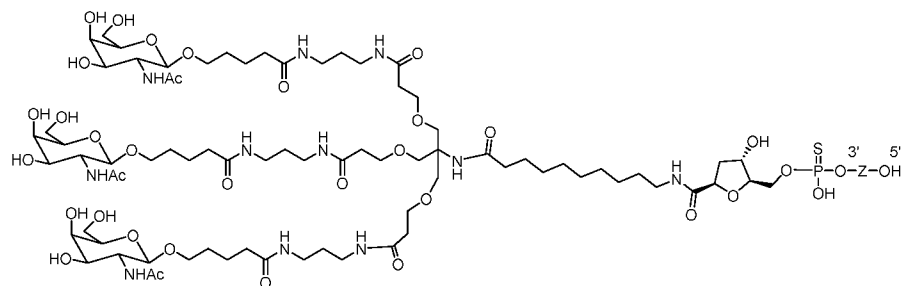
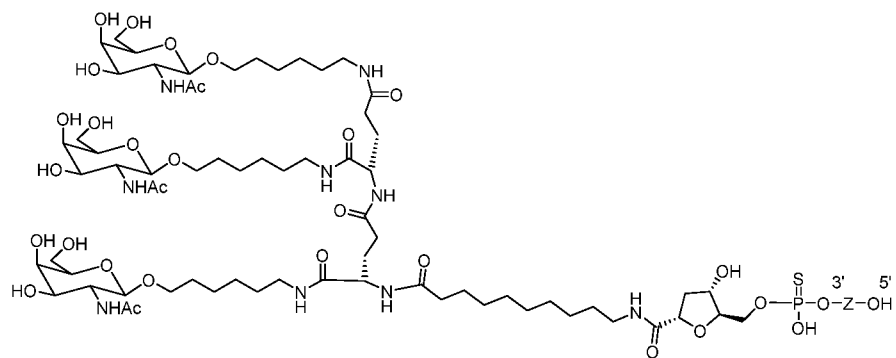
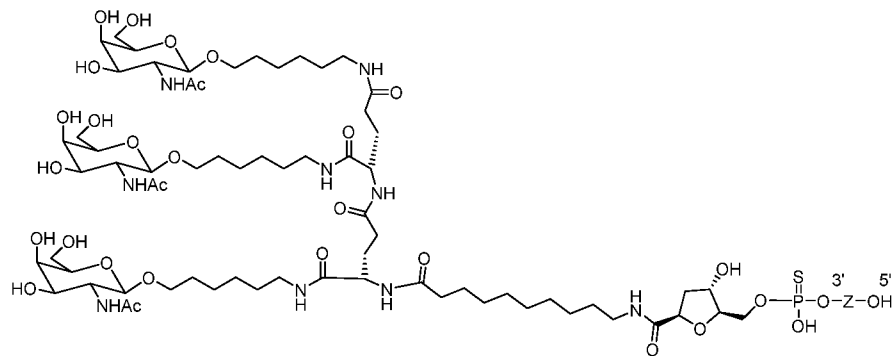
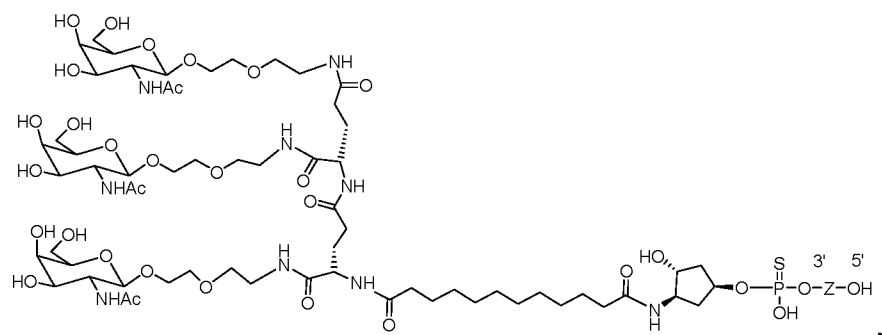
ИЛИ

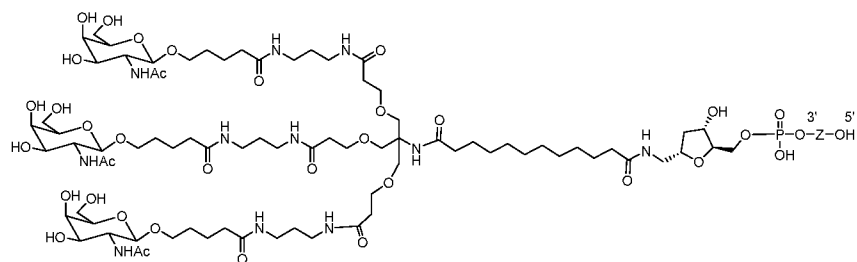
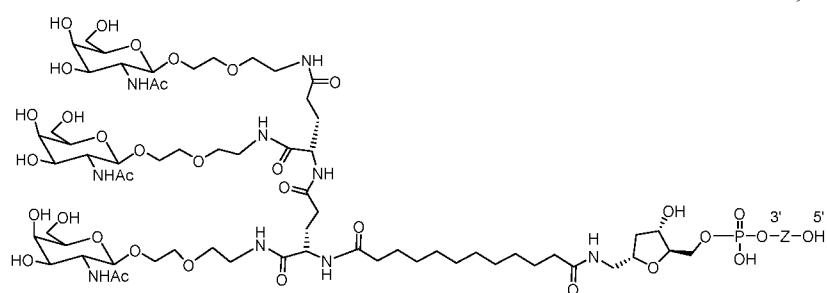
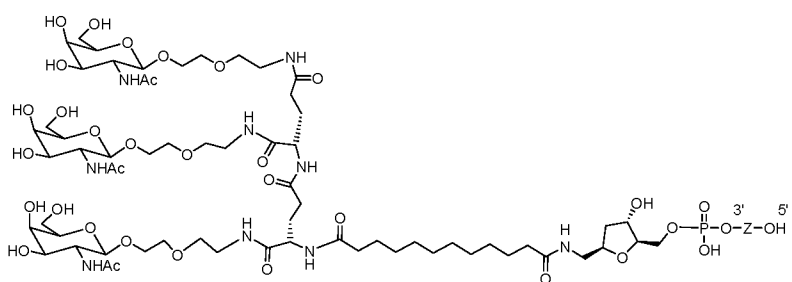
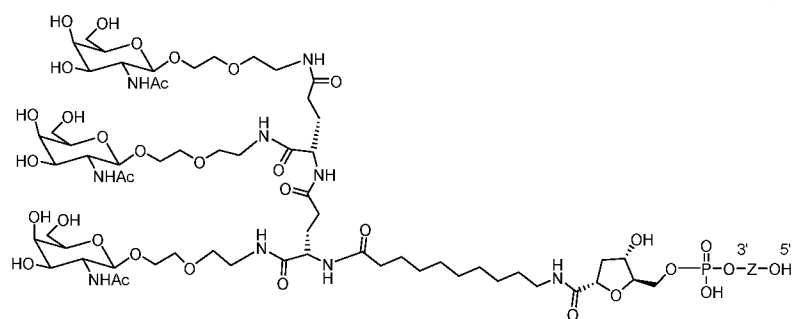
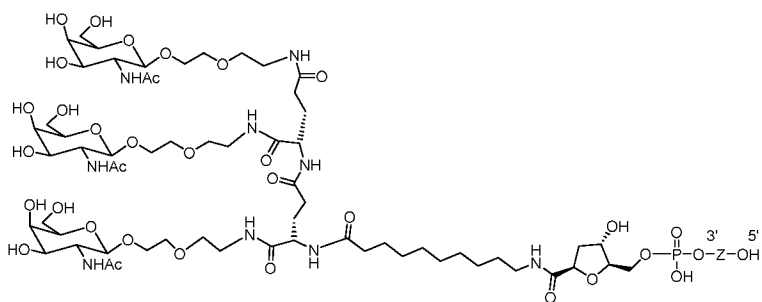
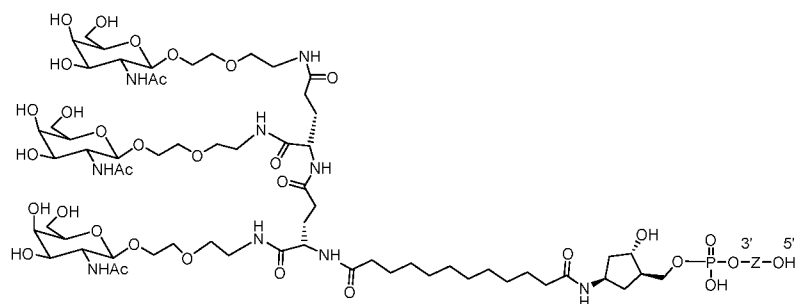


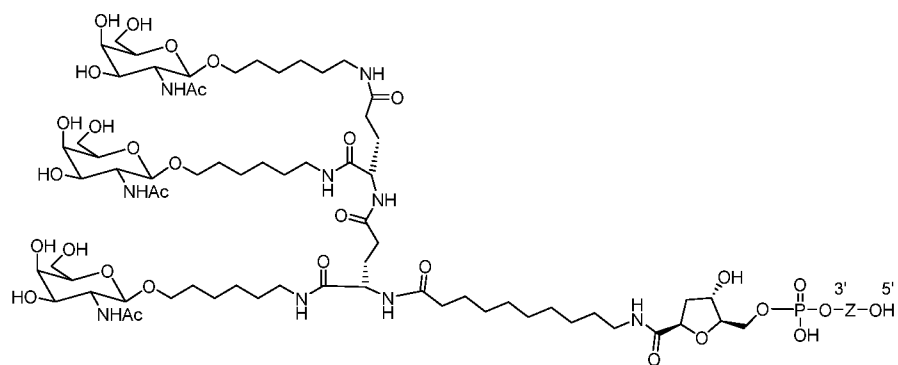
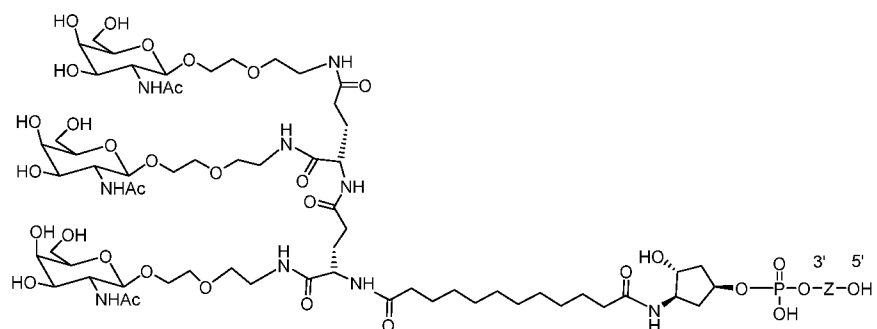
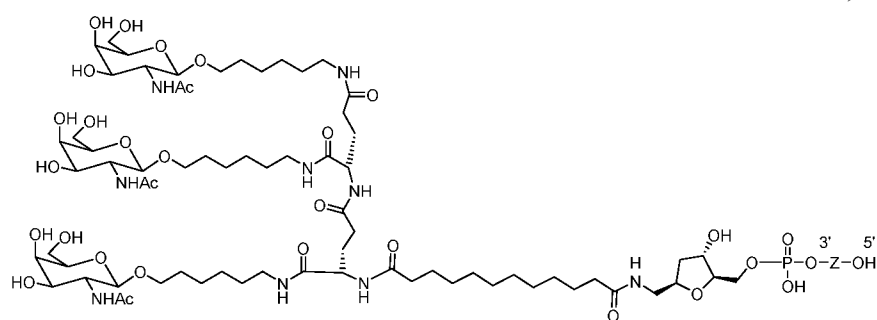
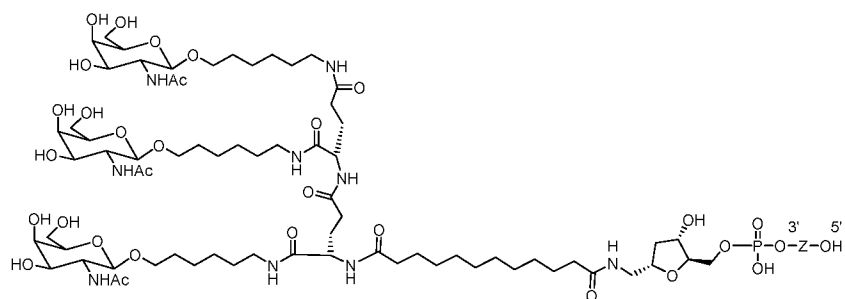
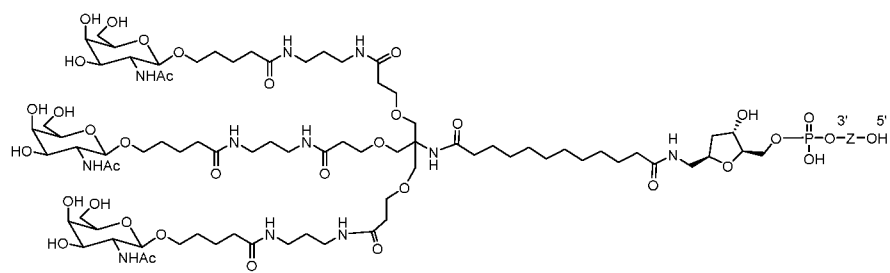
25. Конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда по любому из пп. 21-24, где конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда представляет собой любую из следующих структур или его фармацевтически приемлемую соль:

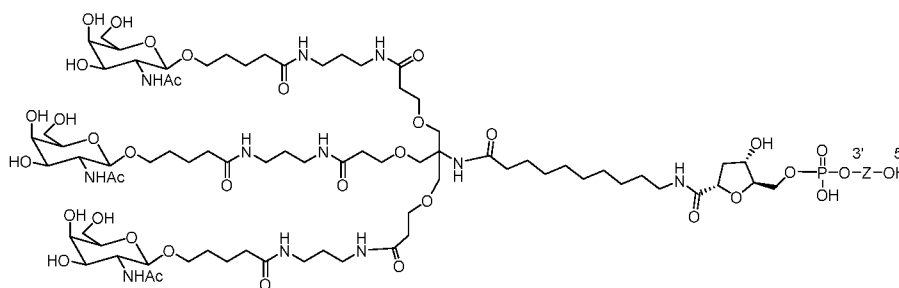
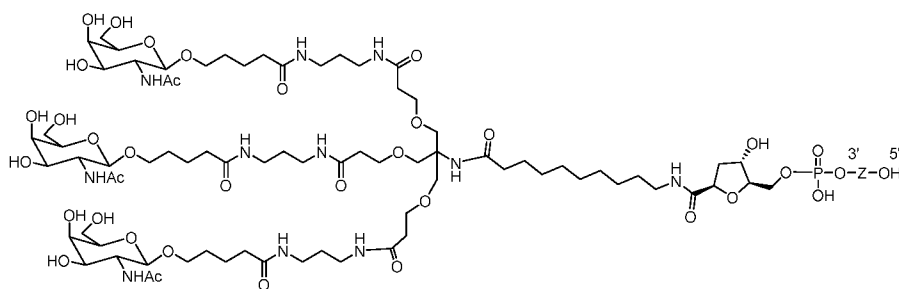
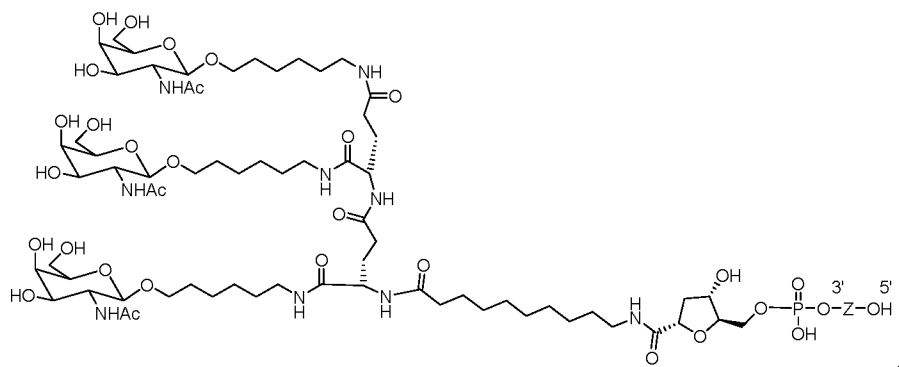












ИЛИ

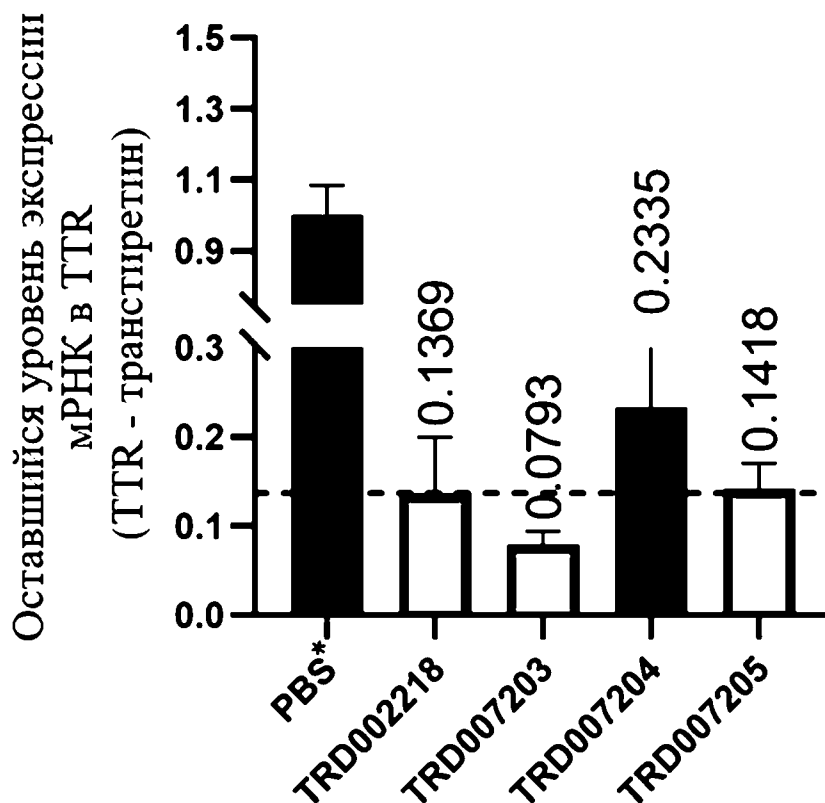
26. Агент РНКи, содержащий конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда по любому из пп. 21-25, где агент РНКи предпочтительно представляет собой миРНК.

27. Композиция, содержащая конъюгат нуклеиновой кислоты и лиганда по любому из пп. 21-25 или агент РНКи по п. 26, и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

28. Применение конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда по любому из пп. 21-25, или агента РНКи по п. 26, или композиции по п. 27 для получения лекарственного средства для лечения заболевания у пациента, где заболевание предпочтительно представляет собой гепатогенное заболевание.

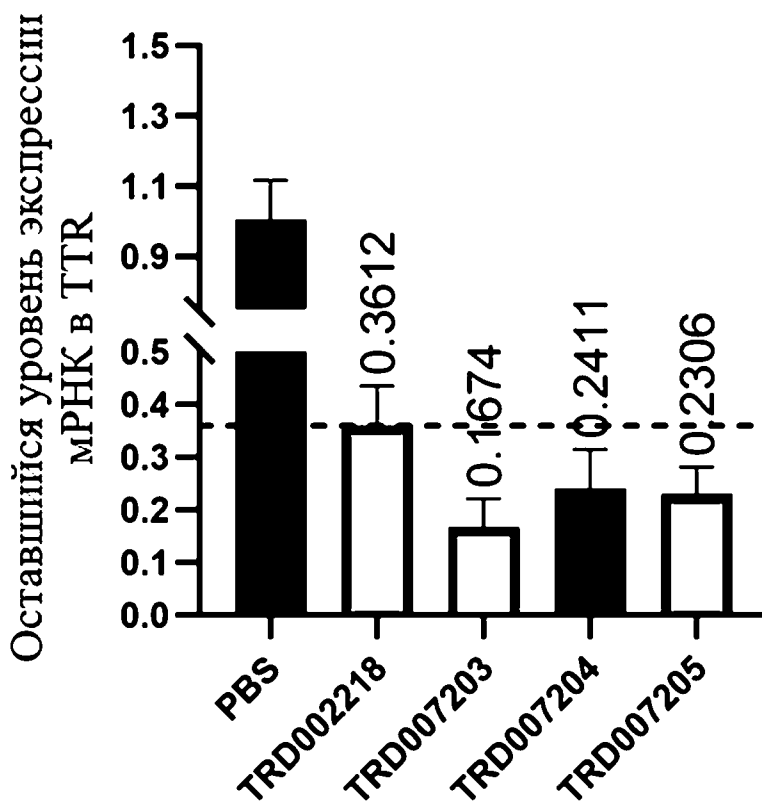
29. Способ ингибирования экспрессии мРНК у пациента или доставки ингибирующего экспрессию олигомерного соединения в печень *in vivo*, включающий введение пациенту конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда по любому из пп. 21-25, или агента РНКи по п. 26, или композиции по п. 27.

30. Способ получения конъюгата нуклеиновой кислоты и лиганда по любому из пп. 21-25, включающий следующие стадии: взятие соединения по любому из пп. 17-20 в качестве исходного и присоединение нуклеозидных мономеров один за другим в направлении 3'-5' в порядке расположения нуклеотидов.

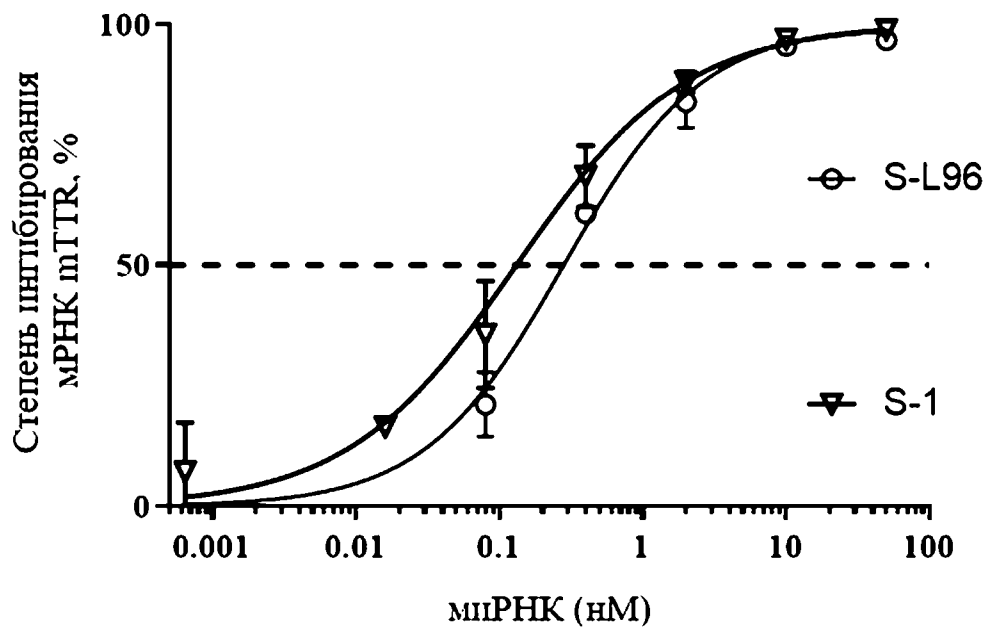


*PBS - фосфатно-солевой буферный раствор

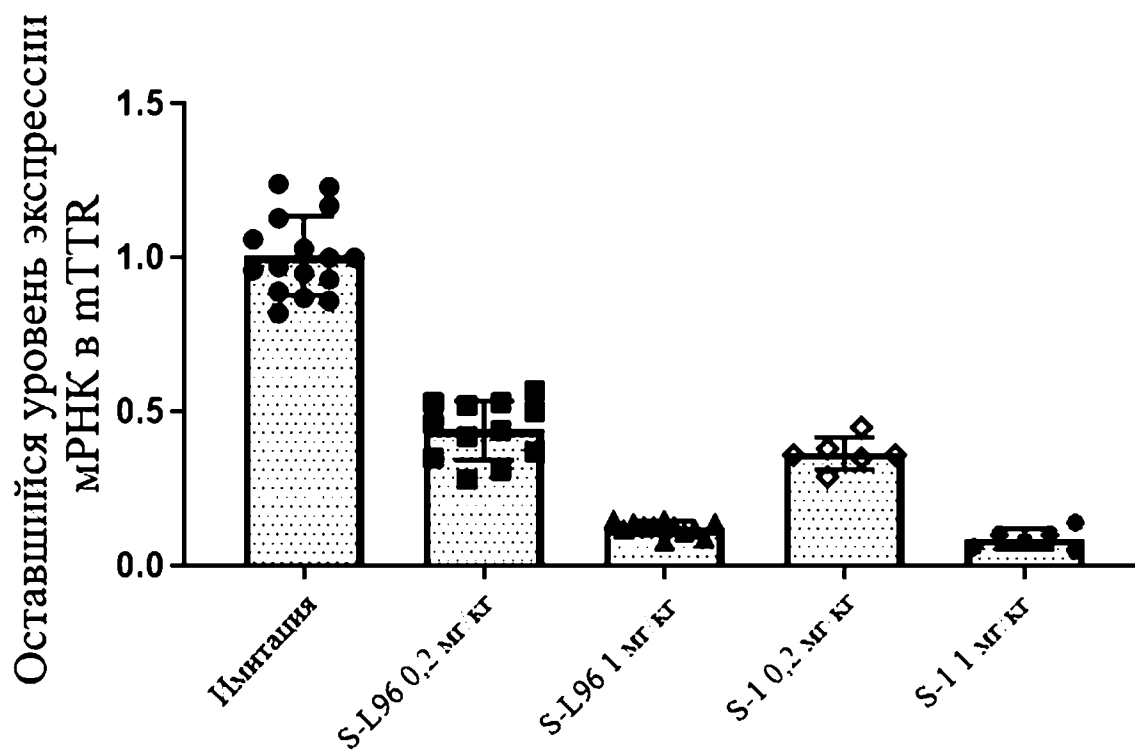
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4