

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393397 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.19

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 47/54 (2017.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.22

(54) НОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/214,555

(32) 2021.06.24

(33) US

(86) PCT/US2022/034500

(87) WO 2022/271806 2022.12.29

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Антонеллис Патрик Джозеф, Лакнер
Грегори Лоренс, Уилсон Такако (US)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Гизатуллин
Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым соединениям, содержащим новые фрагменты доставки для доставки олигонуклеотидов, которые подходят для лечения заболевания, предпочтительно заболеваний печени.

A1

202393397

202393397

A1

НОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

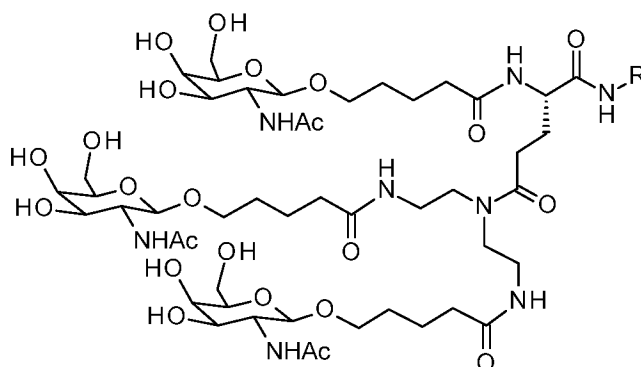
Настоящее изобретение относится к новым соединениям, содержащим новые фрагменты доставки для доставки олигонуклеотидов, которые подходят для лечения заболевания, предпочтительно заболеваний печени.

5 Соединения, содержащие олигонуклеотиды, позволяют нацеливать гены на специфичность последовательности для персонализированного лечения множества различных типов заболеваний, связанных с нарушением регуляции гена. Соединения, содержащие олигонуклеотиды, проявляют различные механизмы действия в зависимости от конкретного типа используемых олигонуклеотидов. Например, соединение РНК-интерференции (РНКи), включающее антисмысловые олигонуклеотиды
10 (АСО) и малые интерферирующие РНК (миРНК), можно использовать для нокаутного гена. Напротив, другие соединения, содержащие олигонуклеотид, могут активировать ген с использованием олигонуклеотида, например, с короткой активирующей РНК (каРНК). При доставке олигонуклеотидов в необходимую ткань пациента экспрессия гена может быть подавлена, активирована или скорректирована.

15 Доставка олигонуклеотидов с использованием фрагментов доставки, содержащих N-ацетилгалактозамин (GalNAc), для нацеливания рецептора асиалогликопротеина на клетки печени является одним из способов доставки в необходимую ткань. Иллюстративное соединение, содержащее GalNAc, представляет собой одобренную FDA миРНК, которая нацелена на ген ALAS1 для лечения острой печеночной порфирии. Несмотря на существование таких коммерческих
20 соединений, остается потребность в обеспечении альтернативных или улучшенных фрагментов для доставки олигонуклеотидов в печень или другие ткани и улучшенные терапевтические соединения, содержащие фрагмент доставки и один или более олигонуклеотидов, таких как терапевтические миРНК.

Более конкретно, существует потребность в обеспечении соединения, содержащего
25 фрагмент доставки и один или более олигонуклеотидов, причем такое соединение демонстрирует одно или более из следующего: улучшение воздействия на ткани, соответствующее улучшение воздействия на печень; улучшение отношения воздействия в печени и почках, улучшение нокдауна; улучшение стойкого ответа; улучшения фармакокинетического профиля, меньшее количество нецелевых эффектов, улучшение профиля токсичности, улучшение профиля безопасности и/или
30 улучшение процесса синтеза, например, без ограничения процесс синтеза с меньшим количеством стадий, процесс, который производит меньше продуктов разложения, процесс синтеза, который обеспечивает получение соединения с улучшенным профилем безопасности или эффективности, процесс, который обеспечивает улучшенный выход, или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фрагмент доставки формулы
35 I:



Соединения, описанные в настоящем документе, содержащие формулу I, могут иметь модификации или добавления, или делеции одного или более атомов в формуле I, или соединения могут
5 содержать дополнительные фрагменты. Например, одна или более алкильных цепей в формуле I могут быть удлинены или сокращены, или соединение, содержащее формулу I, может дополнительно содержать один или более олигонуклеотидов. Соединения, описанные в настоящем документе, содержащие формулу I, пригодны, например, для доставки одного или более олигонуклеотидов в клетку, которая содержит рецептор для одного или более фрагментов N-
10 ацетилгалактозамина (GalNAc, также N-GalNAc или галнак), такой как рецептор асиалогликопротеина (ASPGR), который обычно связывает три фрагмента GalNAc. Соответственно, соединения, содержащие формулу I, можно использовать для предпочтительного связывания с клетками печени, которые экспрессируют ASPGR, тем самым облегчая проникновение соединений в клетки печени. Поскольку ASPGR также присутствует на жировой ткани, соединения формулы I,
15 таким образом, можно использовать для доставки олигонуклеотидов в жировые клетки, которые экспрессируют ASPGR.

В одном варианте осуществления представлено соединение, содержащее формулу I, где R содержит две присоединенные молекулы водорода. В другом варианте осуществления представлено соединение формулы I, где R содержит метильную группу. В другом варианте осуществления
20 предложена формула I, где R содержит защитную группу. В другом варианте осуществления предложена формула I, где R представляет собой соединение, содержащее один или более олигонуклеотидов. В подходящем дополнительном варианте осуществления фрагмент доставки, содержащий формулу I, доставляет один или более олигонуклеотидов в ткань печени посредством связывания с внеклеточным рецептором ASPGR и обеспечивает проникновение олигонуклеотидов в
25 клетки, которые включают ткань печени.

Фрагмент доставки, содержащий формулу I, можно использовать для доставки олигонуклеотидов для диагностических или терапевтических целей. Один или более олигонуклеотидов могут
30 содержать нуклеотиды ДНК или РНК, или нуклеозиды ДНК или РНК, или любую их комбинацию, и могут содержать один или более, или все модифицированные нуклеотиды или модифицированные связи.

Олигонуклеотиды, описанные в данном документе, предназначены для нацеливания, то есть связывания или отжига с определенными последовательностями ДНК или РНК в клетке для регуляции экспрессии генов. В одном варианте осуществления представлено соединение, содержащее формулу I, где R представляет собой олигонуклеотид для снижения экспрессии 5 целевого транскрипта. В дополнительном варианте осуществления соединение, содержащее формулу I, где R представляет собой олигонуклеотид для снижения экспрессии целевого транскрипта, который дополнительно снижает экспрессию белка. В другом варианте осуществления снижение экспрессии целевого транскрипта или целевого белка составляет около 99, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55 или 50 процентов. В дополнительном варианте осуществления снижение 10 экспрессии является продолжительным в течение около трех недель, около одного месяца, около полутора месяцев, около двух месяцев, около трех месяцев, около четырех месяцев, около пяти месяцев или около шести месяцев.

Специалисту в данной области будет понятно, что одно или более несоответствий могут присутствовать между олигонуклеотидом и целевой нуклеотидной последовательностью и по- 15 прежнему функционировать для регуляции экспрессии генов. Соответственно, в одном варианте осуществления олигонуклеотид на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71 или 70 процентов идентичен целевой последовательности. Олигонуклеотиды также могут иметь выступы из 1-10, 1-5, или 1-3, или 3, 2, или 1 остатка(-ов) на 5' или 3' конце. 5'- или 3'-концы могут быть дополнительно модифицированы, например, без 20 ограничения азидным остатком или фосфатной группой. Подходящие модификации известны в данной области.

Специалисту в данной области будет понятно, что 2'-модификации остатков сахара, например, рибозы, могут повышать стабильность и период полувыведения препарата. Данные модификации включают без ограничения модификацию 2'-фтор или 2'-метокси вместо 2'-ОН- 25 группы немодифицированного сахара. Специалисту в данной области будет понятно, что изменения в основной цепи олигонуклеотида также могут повышать его стабильность и период полувыведения. Данные модификации основной цепи включают замену фосфодиэфирной связи на фосфортиоатную (PS) связь.

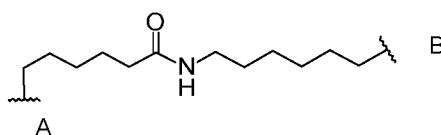
Соответственно, в контексте данного документа олигонуклеотид (или мультимер или 30 олигомер, используемые в данном документе взаимозаменяемо) означает цепь, состоящую по меньшей мере из четырех нуклеотидных или нуклеозидных остатков, и может содержать модифицированные или немодифицированные основания и/или модифицированные или немодифицированные связи. Нуклеотидные остатки могут быть соединены фосфодиэфирными связями или модифицированными связями (при отсутствии фосфата остатки, как правило, называются нуклеозидами, как известно в данной области). Нуклеотидные или нуклеозидные 35 остатки могут быть модифицированы по одному или более атомам в пиримидиновом или пуриновом кольце, или по одному или более атомам в сахарном остатке, или по одному или более атомам связи между кольцом и сахарным основанием. Модификации также могут быть сделаны на

5'- или 3'-конце олигонуклеотидной нити, и в настоящем документе они называются олигонуклеотидами, если из контекста не ясно иное.

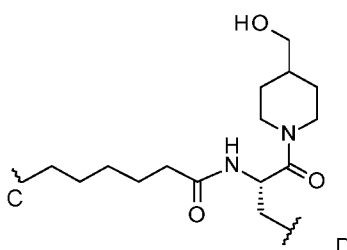
В определенных вариантах осуществления один или более олигонуклеотидов содержат малую интерферирующую РНК (миРНК), малую (также называемую короткой) активирующую РНК (каРНК), микроРНК (мРНК), короткую шпильчатую РНК (кшРНК), одиночную направляющую РНК (онРНК) или антисмысловую олигонуклеотид (АСО). В подходящем варианте один или более олигонуклеотидов содержат миРНК. В другом подходящем варианте осуществления один или более олигонуклеотидов представляют собой миРНК, содержащую смысловую и антисмысловую нить.

В некоторых вариантах осуществления R конъюгирован с формулой I посредством линкера. Подходящие линкеры известны в данной области. В одном варианте осуществления линкер содержит алкильную цепь, предпочтительно C₁₋₁₀. В следующем варианте осуществления линкер показан ниже как линкер 1, формула II. В другом варианте осуществления линкер содержит пиперидин. В следующем подходящем варианте осуществления линкер показан ниже как линкер 2, формула III.

15



Формула II



Формула III

20

В варианте осуществления линкер 1 (формула II), точка присоединения А, или линкер 2 (формула III), точка присоединения С, конъюгирован с формулой I. В варианте осуществления линкер 1, точка присоединения А, конъюгирован с формулой I, а точка присоединения В конъюгирована с R. В варианте осуществления линкер 2, точка присоединения С, конъюгирован с формулой I, а точка присоединения D конъюгирована с R. В варианте осуществления линкер 1, точка присоединения А, конъюгирован с формулой I, а точка присоединения В конъюгирована с фосфатной группой, которая конъюгирована с R. В варианте осуществления линкер 2, точка присоединения С, конъюгирована с формулой I, а точка присоединения D конъюгирована с фосфатной группой, которая конъюгирована с R.

30

Специалисту в данной области будет понятно, что линкер может находиться на 5'- или 3'-конце олигонуклеотида или может быть присоединен к одному из внутренних нуклеотидных или нуклеозидных оснований. Специалисту в данной области также будет понятно, что линкер может быть связан или конъюгирован с 5'- или 3'-концом олигонуклеотида. Специалисту в данной области

также будет понятно, что размещение фрагмента доставки, такого как фрагменты доставки, содержащие формулу I, независимо от того, через линкер или нет, на 5'-конце олигонуклеотиду может потребоваться преодолеть потенциальную неэффективную загрузку Ago2 или другое препятствие активности комплекса RISC. Например, для фрагмента доставки, содержащего формулу I, связанного или непосредственно конъюгированного с миРНК, содержащей смысловую и антисмысловую цепь, размещение фрагмента доставки на 5'-конце антисмысловой цепи может создавать трудности для загрузки Ago2 и предотвращать эффективный нокдаун. В подходящем варианте осуществления один или более олигонуклеотидов содержат миРНК, содержащую смысловую и антисмысловую цепь, а фрагмент доставки, содержащий формулу I, присутствует на 3'-конце смысловой цепи. В дополнительном варианте осуществления фрагмент доставки, содержащий формулу I, конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи через линкер. В еще одном варианте осуществления линкер имеет кольцевую структуру, предпочтительно пиперидиновое кольцо. В еще одном варианте осуществления линкер содержит линкер 2.

Соответственно, в одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению содержат один или более олигонуклеотидов, в которых рибоза по меньшей мере одного нуклеотида модифицирована 2'-фторгруппой или 2'-метоксигруппой. В другом варианте осуществления один или более олигонуклеотидов имеют одну или более модифицированных или замещенных фосфодиэфирных связей. В дополнительном варианте осуществления одна или более замещенных фосфодиэфирных связей представляют собой PS-связь. В еще одном варианте осуществления один или более олигонуклеотидов содержат по меньшей мере один нуклеотид, модифицированный 2'-фтор- или 2'-метоксигруппой, и основная цепь имеет одну или более модифицированных или замещенных фосфодиэфирных связей, предпочтительно PS-связь.

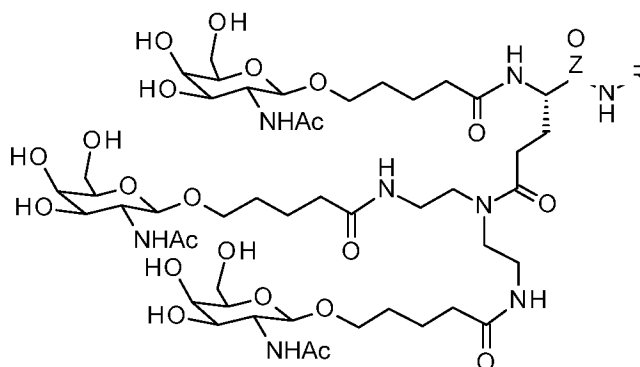
В других вариантах осуществления соединений, раскрытых в настоящем документе, один или более олигонуклеотидов содержат миРНК, содержащую смысловую цепь и антисмысловую цепь. В дополнительном варианте осуществления каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи имеют длину от 15 до 40 нуклеотидов. В другом варианте осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь отжигаются и необязательно содержат один или более выступающих 5'- или 3'-нуклеотидов, один или более тупых концов 5' или 3' или комбинацию того и другого.

В другом варианте осуществления соединений, раскрытых в настоящем документе, 5'- или 3'-концы дополнительно модифицированы. В дополнительном варианте осуществления 5'-конец антисмысловой нити необязательно фосфорилирован. В дополнительном варианте осуществления нуклеотид или нуклеозид на 5'-конце антисмысловой цепи содержит 5'-винилфосфонатную модификацию.

Соединения, описанные в настоящем документе, содержащие формулу I и один или более олигонуклеотидов, подходят для лечения заболеваний печени или с участием жировой ткани. В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция для введения соединений, содержащих формулу I и один или более нуклеотидов, для применения в терапии или лечении заболевания. Один вариант осуществления представляет собой соединения, содержащие

формулу I и один или более олигонуклеотидов, или их фармацевтические композиции для применения в терапии. Дополнительный вариант осуществления представляет собой терапию заболеваний печени. Альтернативный вариант осуществления относится к заболеваниям, связанным с жировой тканью, таким как нарушение регуляции генов в жировых клетках. Другой вариант осуществления представляет собой способ лечения заболевания печени, включающий введение соединения, раскрытого в данном документе, предпочтительно соединения, содержащего формулу I, и одного или более олигонуклеотидов, предпочтительно вводимого в эффективном количестве, или фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов. Другой вариант осуществления представляет собой соединение, раскрытое в данном документе, предпочтительно соединение формулы I и один или более олигонуклеотидов, или его фармацевтическую композицию для применения в производстве лекарственного препарата, подходящего для лечения заболевания печени.

В другом варианте осуществления представлено соединение, содержащее формулу IV:



15

Формула IV:

где Z представляет собой твердую подложку, смолу или гранулу.

Фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, включают один или более носителей, разбавителей и вспомогательных веществ, которые совместимы с соединениями и другими компонентами композиции или состава и не оказывают вредного воздействия на пациента. Примеры фармацевтических композиций и способов их получения приведены в “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, Loyd, V., *et al.* Eds., 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012.

В контексте данного документа термин «эффективное количество» означает количество, которое эффективно для лечения расстройства или заболевания.

В контексте данного документа «область комплементарности» означает нуклеотидную последовательность нуклеиновой кислоты (например, ds-олигонуклеотида), которая достаточно комплементарна антипараллельной нуклеотидной последовательности для обеспечения гибридизации между двумя последовательностями нуклеотидов в соответствующих условиях гибридизации (например, в фосфатном буфере, в клетке и т.д.). В некоторых вариантах

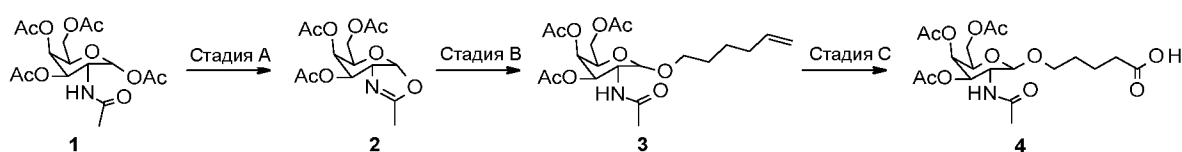
25

осуществления олигонуклеотид в данном документе включает нацеливающую последовательность, имеющую область комплементарной целевой последовательности мРНК.

Фрагмент доставки, содержащий формулу I, может быть изготовлен посредством следующих неограничивающих стадий и схем синтеза.

- 5 Некоторые сокращения определены следующим образом: «1,2-DCE» означает 1,2-дихлорэтан; «ДХМ» означает дихлорметан; «DIEA» означает N,N-диизопропилэтиламин; «DMF» означает N,N-диметилформамид; «DMAP» означает 4-диметиламинопиридин; «DMTCI» означает 4,4'-диметокситритилхлорид; «DPP4» означает дипептидилпептидазу; «EDC» означает 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; «EtOAc» означает этилацетат; «GalNAc» означает N-ацетилгалактозамин; «HATU» означает 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-
10 b]пиридиний-3-оксида гексафторфосфат; «HBT» означает O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруния гексафторфосфат; «HOBt» означает гидрат 1-гидроксibenзотриазола; «HPRT» означает гипоксантингуанинфосфорибосилтрансферазу; «IPA» означает изопропанол и изопропиловый спирт; «LDHD» означает лактатдегидрогеназу-A; «MeCN» означает ацетонитрил;
15 «MeOH» означает метанол или метиловый спирт; «MWC0» означает отсечку молекулярной массы; «NHS» означает N-гидроксисукцинимид; «OD» означает оптическую плотность; «PBS» означает фосфатно-буферный солевой раствор; «PhSiH₃» означает фенилсилан; «PTS» означает портативную систему испытания эндотоксина; «миРНК» означает малую интерферирующую рибонуклеиновую кислоту; «TEA» означает триэтиламин; «TFA» означает трифторуксусную кислоту; «ТГФ» означает
20 тетрагидрофуран; «ТСХ» означает тонкослойную хроматографию; и «TMP» означает 2,2,6,6-тетраметилпиперидин.

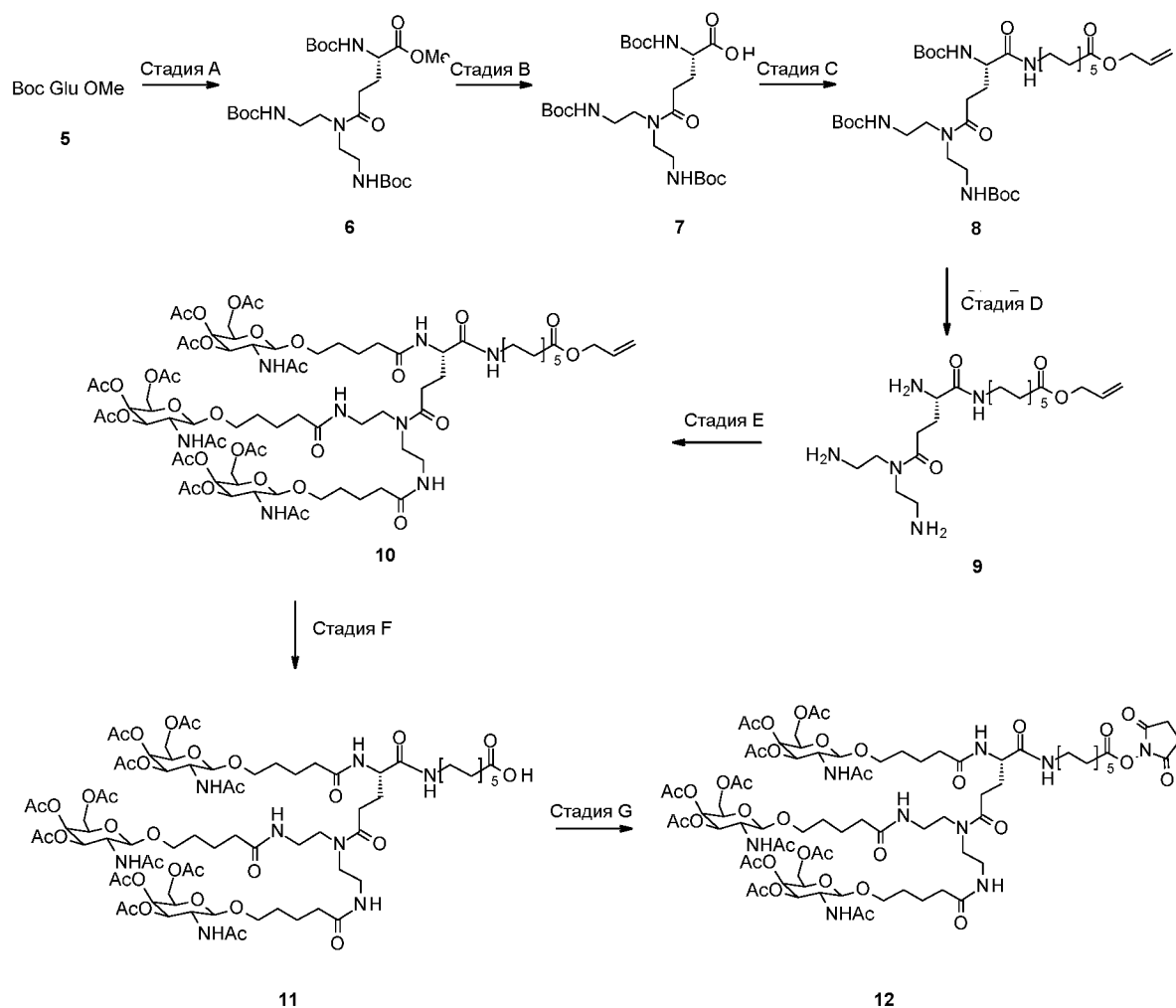
Схема 1



25

- На схеме 1, стадии А, показана циклизация соединения (1) с использованием триметилтрифторметансульфоната в таком растворителе, как 1,2-DCE, с получением соединения (2). На стадии В показано добавление к соединению (2) гекс-5-ен-1-ола с использованием триметилсилилтрифторметансульфоната в растворителе, таком как 1,2-DCE, с получением соединения
30 (3). На стадии С показано окисление соединения (3) с использованием соответствующего окислителя, такого как перйодат натрия, с катализатором, таким как хлорид рутения (III), с получением соединения (4).

Схема 2



На схеме 2, стадии А, показано амидное сочетание между соединением (5) и *трет*-бутил-*N*-[2-[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этиламино]этил]карбаматом с использованием НВТУ и НОВт с соответствующим основанием, таким как DIEA, в растворителе, таком как DMF, с получением соединения (6). На стадии В изображен основной гидролиз соединения (6) с использованием основания, такого как водный раствор NaOH, в системе растворителей THF и MeOH с получением соединения (7). На стадии С показано амидное сочетание соединения (7) с гидрохлоридом аллил-11-аминоундеканоата с использованием НАТУ с соответствующим основанием, таким как DIEA, в растворителе, таком как DMF, с получением соединения (8). На стадии D показано снятие защитных кислотных групп с соединения (8) с использованием TFA в таком растворителе, как DCM, с получением соединения (9). На стадии E показано амидное сочетание между соединением (9) и соединением (4) с использованием EDC и НОВт в таком растворителе, как DCM, с получением соединения (10). На стадии F показано снятие защитных групп с соединения (10) с использованием тетракис(трифенилфосфин)палладия и PhSiH₃ в таком растворителе, как DCM, с получением соединения (11). На стадии F показано сочетание

соединения (11) с NHS с использованием EDC в растворителе, таком как DCM, с получением соединения (12).

Схема 3

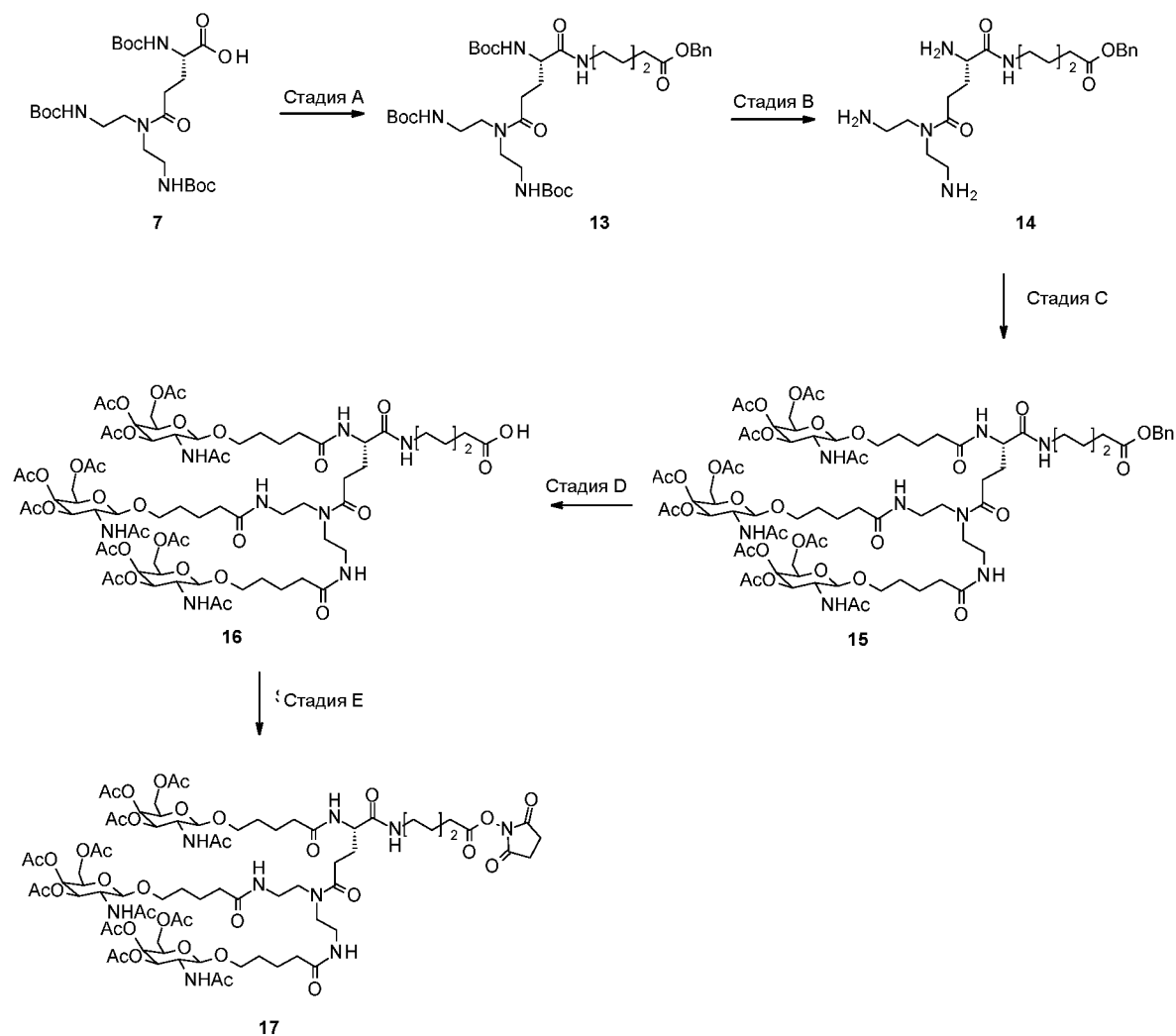


Схема 3, стадии А-С, по существу аналогичны схеме 2, стадии С-Е, что начинается с соединения (7) с получением соединений (13), (14) и (15). На стадии D показано гидрирование соединения (15) с использованием палладия на угле в растворителе, таком как MeOH, с получением соединения (16). Стадия E по существу аналогична получению на стадии G схемы 2 с получением соединения (17).

Схема 4

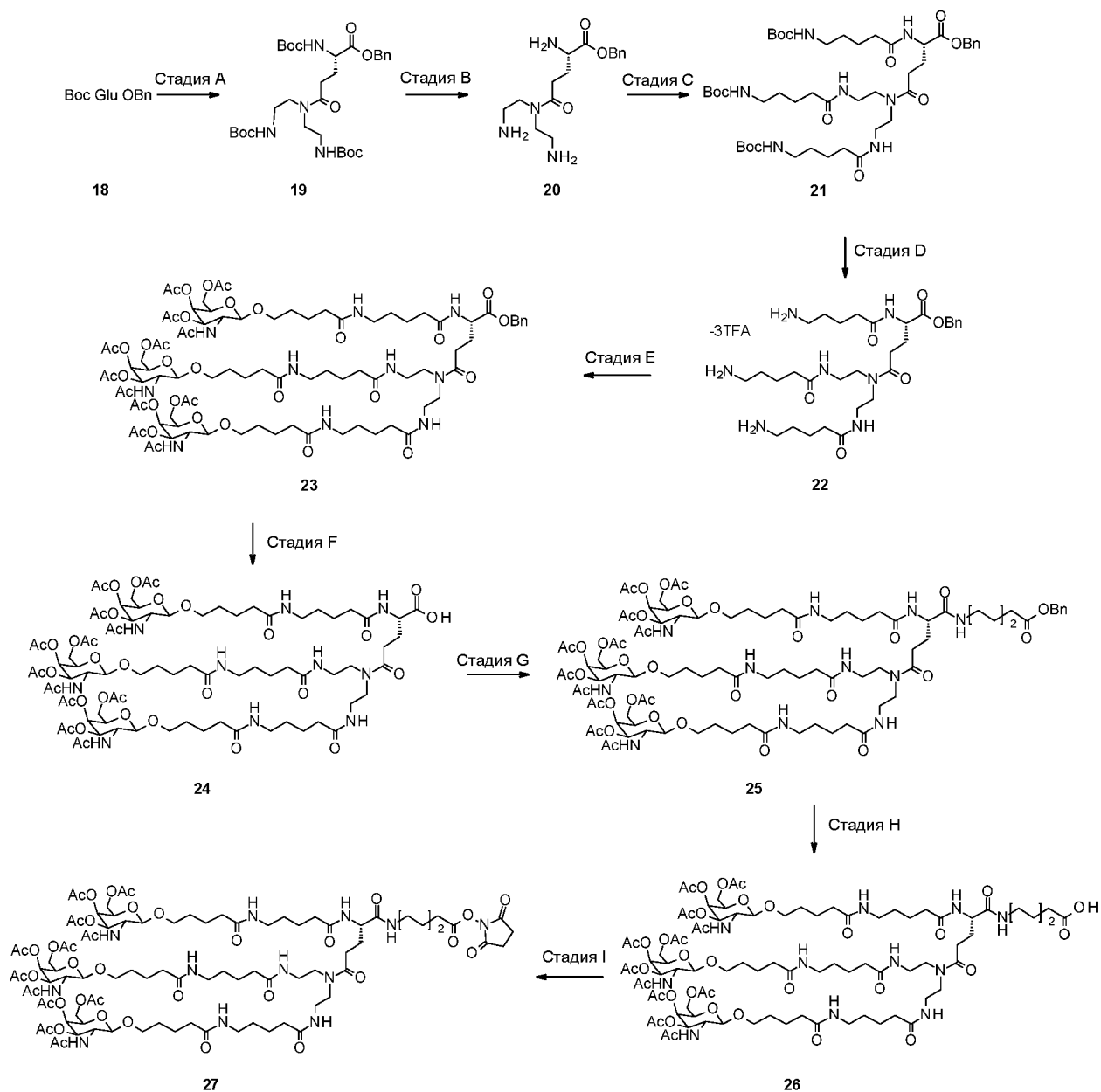
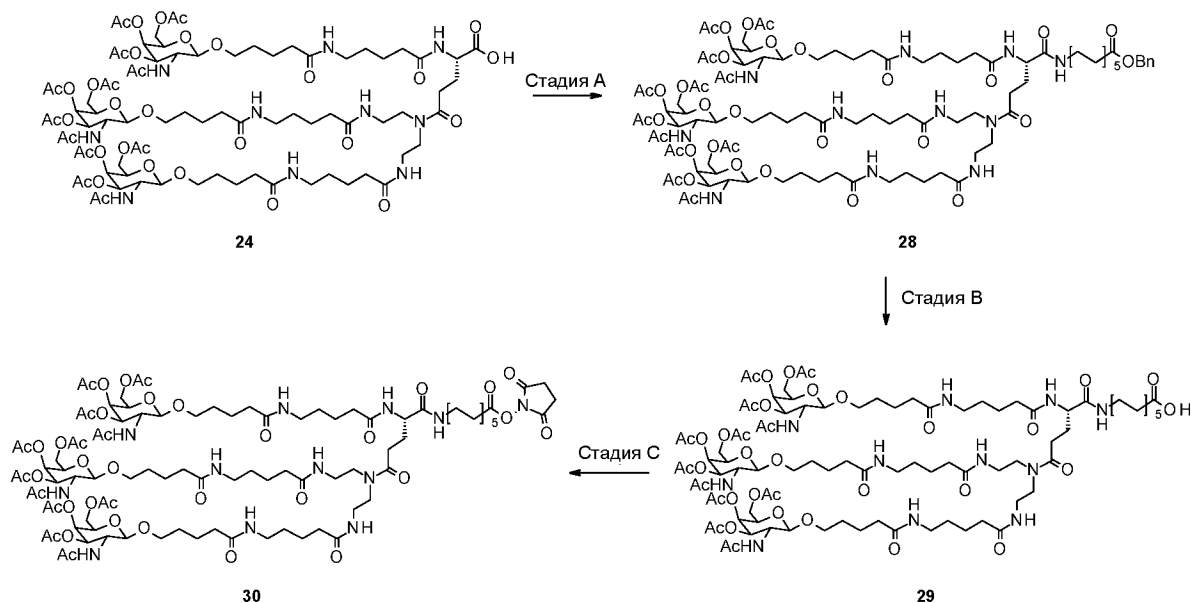


Схема 4, стадии А-I, состоит из серии амидных сочетаний и снятий защитных групп с использованием способов, по существу аналогичных тем, которые найдены в схемах 2 и 3, начиная с соединения (18) с получением соединения (27).

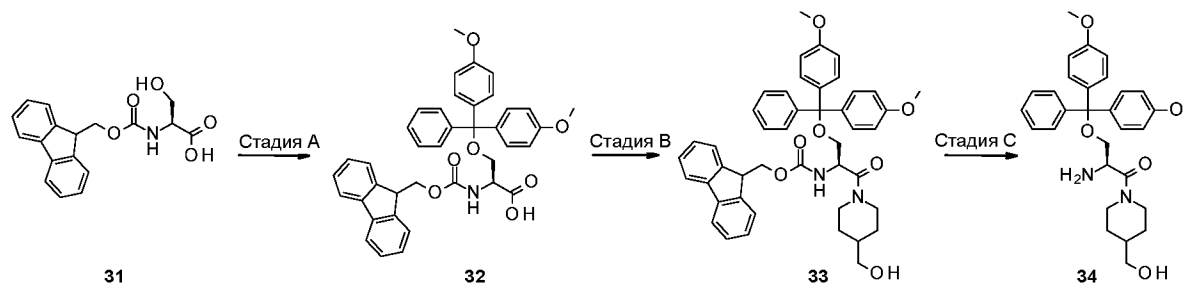
Схема 5



На схеме 5, в стадиях А-С, изображены способы, по существу аналогичные тем, которые представлены на схеме 4, в стадиях G-I, начиная с соединения (24), с получением соединения (30).

5

Схема 6



На схеме 6, стадии А, изображена защита соединения (31) с использованием DMTC1 с подходящим основанием, таким как DIEA, в растворителе, таком как DCM, с получением соединения (32). На стадии В показано амидное сочетание соединения (32) и пиперидин-4-илметанола с использованием HBTU и HOBT с TMP в растворителе, таком как DCM, с получением соединения (33). Снятие защитных групп с соединения (33) с использованием 20% пиперидина в DMF с получением соединения (34) показано на стадии С.

15

Схема 7

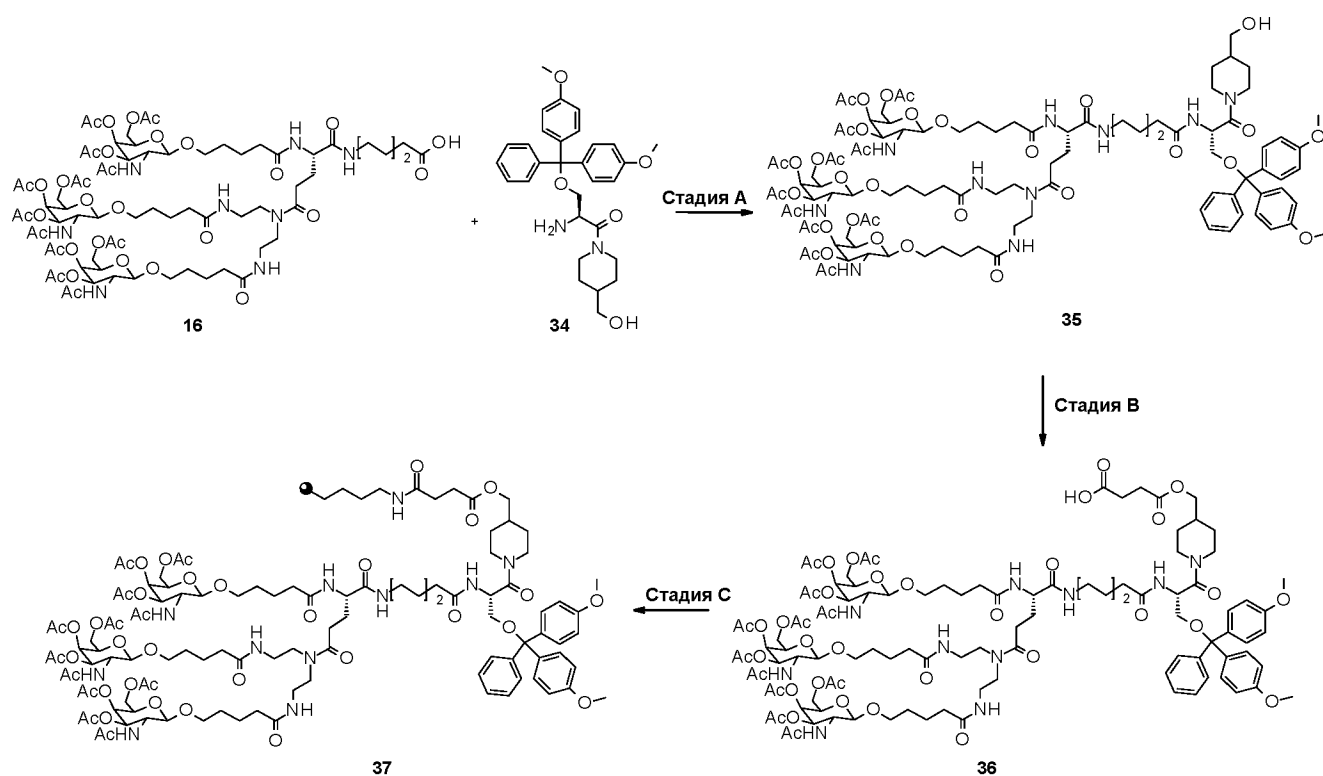
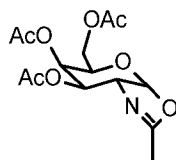


Схема 7, стадия А, по существу аналогична схеме 2, стадия А, и обеспечивает получение соединения (35) в результате сочетания соединений (16) и (34). Стадия В демонстрирует образование соединения (36) посредством добавления янтарного ангидрида к соединению (35) в подходящем растворителе, таком как DCM, с системой оснований TEA и DMAP. На стадии С показана загрузка соединения (36) на смолу с использованием 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфата и основания, такого как DIEA, в системе растворителей, такой как MeCN и DCM, с получением соединения (37).

10

Получение 1

(6,7-Диацетокси-2-метил-5,6,7,7а-тетрагидро-3аН-пирано[3,2-d]оксазол-5-ил)метилацетат



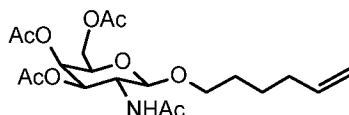
15

К раствору (5-ацетидамо-3,4,6-триацетокситетрагидропиран-2-ил)метилацетата (9,00 г, 23,1 ммоль) в 1,2-DCE (46 мл) добавляли триметилсилилтрифторметансульфонат (6,5 мл, 35 ммоль). Смесь нагревали до 50°C и перемешивали в течение 18 часов. После этого смесь разбавляли DCM (200 мл), промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (200 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (200 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя с использованием 0-10%

MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (6,434 г, 84%). ЭР/МС масса/заряд 330 (M+H).

Получение 2

(5-ацетамидо-3,4-диацетокси-6-гекс-5-енокситетрагидропиран-2-ил)метилцетат



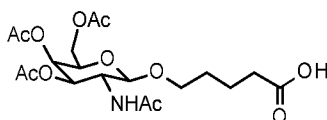
5

К раствору (6,7-диацетокси-2-метил-5,6,7,7а-тетрагидро-3аН-пирано [3,2-d]оксазол-5-ил)метилацетата (30,43 г, 92,42 ммоль) в 1,2-DCE (231 мл) добавляли гекс-5-ен-1-ол (22,2 мл, 185 ммоль), а затем активированные порошкообразные молекулярные сита 4Å (15,6 г). Суспензию перемешивали при температуре окружающей среды в течение 30 минут, а затем добавляли триметилсилилтрифторметансульфонат (19 мл, 101,9 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После этого раствор фильтровали через диатомовую землю и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя с использованием 30-100% EtOAc/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения (34,76 г, 86%). ЭР/МС масса/заряд 430,4 (M+H).

15

Получение 3

5-[3-Ацетамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил) тетрагидропиран-2-ил]оксипентановая кислота



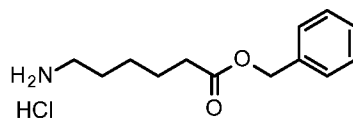
20

Раствор (5-ацетамидо-3,4-диацетокси-6-гекс-5-енокситетрагидропиран-2-ил)метилцетата (34,76 г, 80,93 ммоль) в MeCN (174 мл) и DCM (174 мл) охлаждали до 0°C. Добавляли раствор периодата натрия (22,4 г, 104,7 ммоль) и продолжали перемешивание при 0°C в течение 10 минут. После этого добавляли хлорид рутения (III) (270 мг, 1,3 ммоль) и перемешивали смесь при нагревании до температуры окружающей среды. После перемешивания в течение 2 часов добавляли дополнительный периодат натрия (66 г, 308,4 ммоль) и перемешивание продолжали в течение 18 часов. После этого смесь экстрагировали 3:1 CH₂Cl₂:IPA (2 × 500 мл), промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (1 л), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя с использованием 0-40% MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (29,75 г, 82%). ЭР/МС масса/заряд 448,4 (M+H).

30

Получение 4

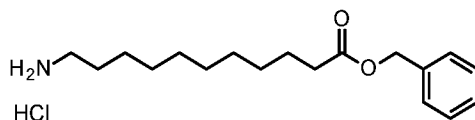
Бензил-6-аминогексаноата гидрохлорид



К суспензии 6-аминогексановой кислоты (5,00 г, 38,1 ммоль) в THF (38 мл) добавляли бензиловый спирт (47 мл, 453,7 ммоль) и охлаждали смесь до 0°C. По каплям добавляли тионилхлорид (8,6 мл, 120 ммоль) и перемешивали смесь в течение 18 часов при нагревании до температуры окружающей среды. После этого добавляли эфир (166 мл) и реакционный сосуд переносили в морозильную камеру при -20°C в течение 1 часа. После этого твердый осадок собирали посредством фильтрации с получением указанного в заголовке соединения (8,57 г, 81%). ЭР/МС масса/заряд 222 (M+H).

Получение 5

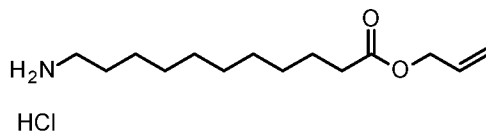
10 Бензил-11-аминоундеканоата гидрохлорид



Указанное в заголовке соединение получали из 11-аминоундекановой кислоты по существу аналогично способу получения 4. ЭР/МС масса/заряд 292,2 (M+H).

Получение 6

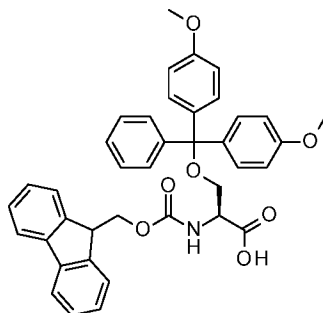
15 Аллил-11-аминоундеканоата гидрохлорид



В сосуд загружали 11-аминоундекановую кислоту (9,00 г, 44,7 ммоль) в аллиловом спирте (42 мл) и смесь охлаждали до 0°C. Добавляли тионилхлорид (6,5 мл, 89,4 ммоль) и смесь перемешивали в течение 18 часов при нагревании до температуры окружающей среды. После этого смесь концентрировали *in vacuo* и к остатку добавляли эфир (200 мл) с получением белой суспензии. Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 10 минут и собирали твердый осадок посредством фильтрации с получением продукта (12,0 г, 97%). ЭР/МС масса/заряд 242,2 (M+H).

Получение 7

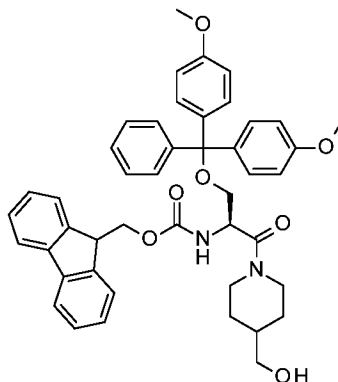
(2S)-3-[бис(4-метоксифенил)-фенилметокси]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)пропановая кислота



5 К перемешиваемому раствору (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-
гидроксипропановой кислоты (40 г, 0,122 моль) в сухом DCM (400 мл) добавляли DIEA (64 мл,
0,366 моль) при 0°C в инертной атмосфере. К нему медленно добавляли раствор DMTCI (49,6 г,
0,146 моль) в DCM (200 мл). Полученную реакционную смесь доводили до температуры
окружающей среды и перемешивали в течение 16 часов. После этого реакционную смесь разбавляли
10 водой (12,5 об.) и экстрагировали DCM (25 об.). Органический слой сушили над безводным
сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный неочищенный продукт
промывали 10% EtOAc/гексана (12,5 об.) и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке
соединения в виде бледно-коричневого твердого вещества (62 г, неочищенное). Данный материал
использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ТСХ: 5% MeOH/CH₂Cl₂ (*R_f*: 0,5)
15 УФ, 254 нМ.

Получение 8

9H-Флуорен-9-илметил-N-[(1S)-1-[[бис(4-метоксифенил)-фенилметокси]метил]-2-[4-(гидроксиметил)-1-пиперидил]-2-оксоэтил]карбамат



20 К перемешиваемому раствору (2S)-3-[бис(4-метоксифенил)-фенилметокси]-2-(9H-флуорен-
9-илметоксикарбониламино)пропановой кислоты (62 г, 0,103 моль) в DCM (750 мл) медленно
добавляли НВТУ (78,3 г, 0,206 моль), НОВт (27,9 г, 0,206 моль) и пиперидин-4-илметанол (15,4 г,
0,134 моль), а затем ТМР (15 мл, 0,113 моль) при 0°C в инертной атмосфере. Полученную

реакционную смесь доводили до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 4 часов. После этого реакционную смесь разбавляли водой (8 об.) и экстрагировали DCM (15 об.).

Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя

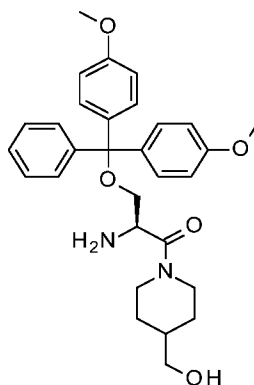
5 смесью 20-40% EtOAc/гексана и 1% MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (40 г, 52% за две стадии). ¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 7,88 (шир. д, J = 7,5 Гц, 2H), 7,79 - 7,59 (м, 3H), 7,45 - 7,12 (м, 13H), 6,92 - 6,76 (м, 4H), 4,79 - 4,44 (м, 2H), 4,32 (шир. д, J = 11,4 Гц, 2H), 4,20 (шир. с, 2H), 3,71 (s, 6H), 3,21 (шир. с, 4H), 2,99 - 2,79 (м, 1H), 2,69 (шир. с, 2H), 1,81 - 1,43 (м, 3H), 1,08 - 0,73 (м, 2H).

10

Получение 9

(2S)-2-Амино-3-[бис(4-метоксифенил)-фенилметокси]-1-[4-(гидроксиметил)-1-пиперидил]пропан-1-

он

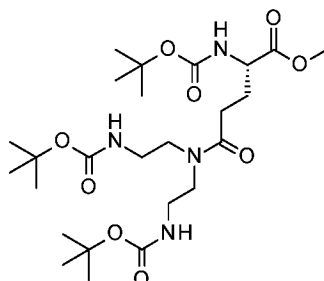


15 Раствор 20% пиперидина в DMF (400 мл) медленно добавляли к 9H-флуорен-9-илметил-N-[(1S)-1-[[бис(4-метоксифенил)-фенилметокси]метил]-2-[4-(гидроксиметил)-1-пиперидил]-2-оксоэтил]карбамату (40 г, 0,055 моль) при 0°C в инертной атмосфере. Полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. После этого смесь разбавляли водой (15 об.) и экстрагировали EtOAc (30 об.). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток

20 очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя смесью 1-8% MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения в виде грязно-белого твердого вещества (13 г, 47%). ЭР/МС масса/заряд 1009,5 (2M+H).

Получение 10

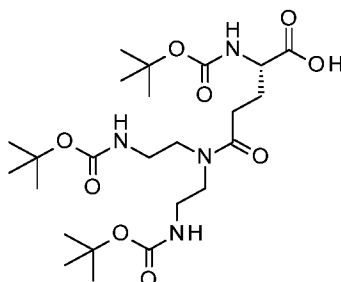
Метил(2S)-5-[бис[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноат



- 5 В колбу, содержащую (S)-4-(*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-метокси-5-оксопентановую кислоту (7,00 г, 26,8 ммоль) и НОВт (4,16 г, 30,8 ммоль), добавляли DMF (179 мл) и (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия гексафторфосфат (11,7 г, 30,9 ммоль). Добавляли DIEA (14 мл, 80,3 ммоль) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 5 минут. По истечении данного времени трет-бутил-N-[2-[2-(трет-
- 10 бутоксикарбониламино)этиламино]этил]карбамат (8,94 г, 29,5 ммоль) добавляли одной порцией и продолжали перемешивание при температуре окружающей среды. После перемешивания в течение 18 часов смесь разбавляли EtOAc (400 мл), промывали водой (2 × 400 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (400 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя с
- 15 использованием 40-100% EtOAc/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения (13,01 г, 89%). ЭР/МС масса/заряд 547,40 (M+H).

Получение 11

(2S)-5-[бис[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-бутоксикарбониламино)-5-оксопентановая кислота

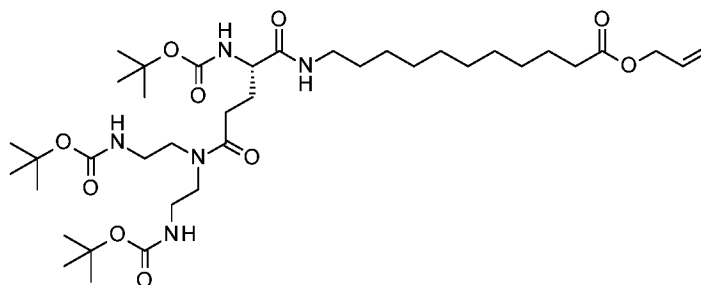


- 20 В колбу загружали метил(2S)-5-[бис[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноат (13,01 г, 23,8 ммоль), THF (120 мл) и MeOH (120 мл). Добавляли 1 н. NaOH (71 мл, 71 ммоль) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 1 час смесь концентрировали *in vacuo* и повторно растворяли в воде (300 мл). Добавляли 5 н. HCl (12 мл) для доведения pH до 4. Смесь экстрагировали DCM (3 × 300 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (1 л), сушили над

сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (12,41 г, 98%). ЭР/МС масса/заряд 531,60 (М-Н).

Получение 12

Аллил-11-[[[(2S)-5-[бис[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-
5 бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноил]амино]ундеканوات

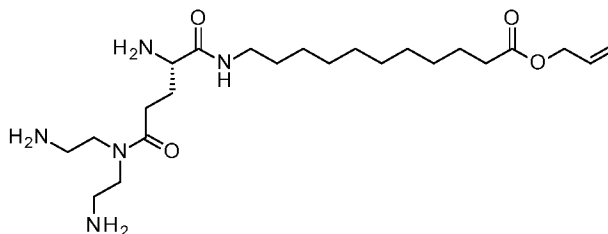


В колбу, содержащую (2S)-5-[бис[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-
бутоксикарбониламино)-5-оксопентановую кислоту (500 мг, 0,94 ммоль) и аллил-11-
аминоундеканата гидрохлорид (313 мг, 1,13 ммоль), добавляли DMF (6,25 мл) и (1-
10 [бис(диметиламино)метилден]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат (428 мг,
1,12 ммоль). После добавления DIEA (0,5 мл, 3 ммоль) смесь перемешивали при температуре
окружающей среды в течение 18 часов. После этого смесь разбавляли EtOAc (200 мл), промывали
водой (3 × 200 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (200 мл), сушили над
сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали флэш-
15 хроматографией на силикагеле, элюируя с использованием 40-100% EtOAc/гексаны, с получением
указанного в заголовке соединения (687 мг, 97%). ¹Н ЯМР (DMSO-*d*₆) δ 7,78-7,64 (м, 1Н), 6,98-6,7
(м, 2Н), 5,96-5,84 (м, 1Н), 5,31-5,25 (м, 1Н), 5,23-5,17 (м, 1Н), 4,56-4,50 (м, 2Н), 3,88-3,67 (м, 1Н),
3,30-3,19 (м, 4Н), 3,11-2,91 (м, 6Н), 2,35-2,12 (м, 4Н), 1,88-1,65 (м, 2Н), 1,58-1,47 (м, 2Н), 1,46-1,30 (м,
30Н), 1,30-1,18 (м, 12Н).

20

Получение 13

Аллил(*S*)-11-(2-амино-5-(бис(2-аминоэтил)амино)-5-оксопентанамидо)ундеканوات

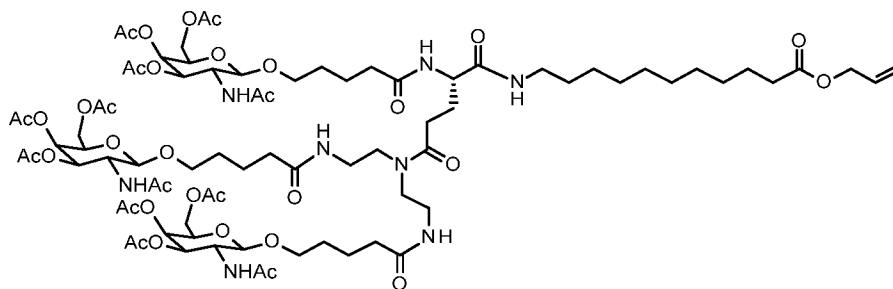


К раствору аллил-11-[[[(2S)-5-[бис[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-
бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноил]амино]ундеканата (687 мг, 0,91 ммоль) в DCM (15 мл)
25 добавляли TFA (15 мл). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 1,5 часа смесь
концентрировали в вакууме. Остаток поглощали MeOH и наносили на ионообменный картридж.

Картридж элюировали MeOH (150 мл), а затем 7 н. NH₃/MeOH (150 мл). Основную фракцию концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения (410 мг, 99%). ЭР/МС масса/заряд 456,4 (M+H).

Получение 14

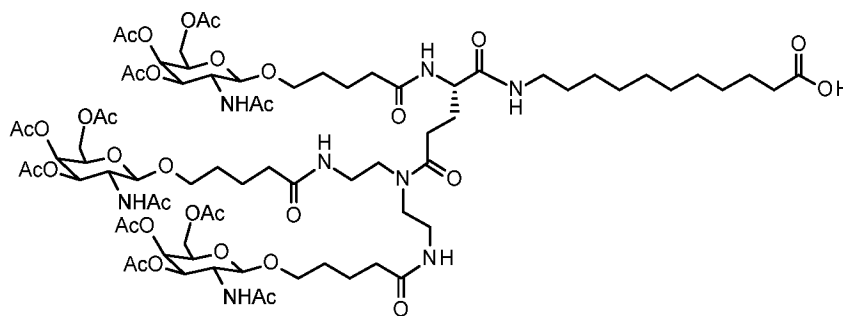
5 Аллил-11-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]ундеканоеат



10 В колбу загружали 5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентановую кислоту (489 мг, 1,09 ммоль) и аллил(S)-11-(2-амино-5-(бис(2-аминоэтил)амино)-5-оксипентаноиламино)ундеканоеат (150 мг, 0,33 ммоль). Добавляли DCM (3,35 мл) с последующим добавлением 1-гидроксибензотриазола моногидрата (164 мг, 1,07 ммоль) и 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорида (206 мг, 1,07 ммоль). Смесь
15 перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После этого раствор разбавляли EtOAc (100 мл), промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (2 × 100 мл), насыщенным водным раствором NH₄Cl (100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл). Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя с использованием 0-
20 10% MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (424 мг, 74%). ЭР/МС масса/заряд 872,80 [M+2H]/2

Получение 15

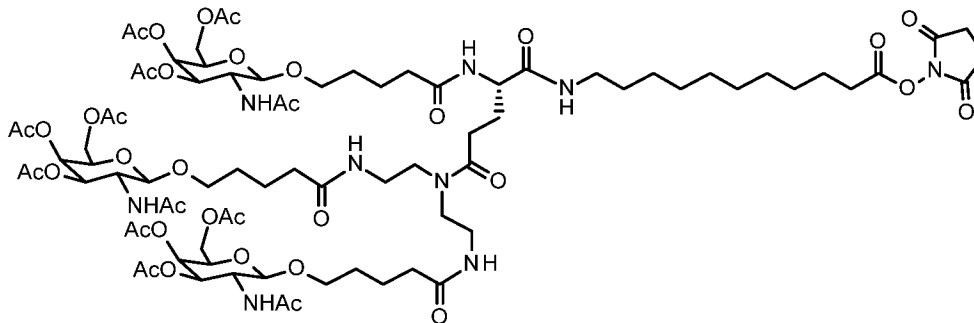
11-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]ундекановая кислота



К раствору аллил-11-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]окпентааноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентааноиламино]этил]амино]-5-оксопентаоил]амино]ундеканоата (354 мг, 0,20 ммоль) в DCM (2 мл) добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (29 мг, 0,02 ммоль), а затем PhSiH₃ (51 мкл, 0,41 ммоль). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 часов, после чего ее разбавляли насыщенным водным раствором NaHCO₃ (100 мл). Добавляли 1 н. NaOH (15 мл) для доведения pH до около 10. Водный раствор промывали DCM (3 × 100 мл), а затем подкисляли концентрированной HCl (5 мл), а затем водным раствором 5 н. HCl (15 мл). Водный слой экстрагировали DCM (100 мл) и органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя с использованием 0-20% MeOH/DCM, с получением указанного в заголовке соединения (151 мг, 44%). ЭР/МС масса/заряд 852,60 [M+2H]²⁺.

15 Получение 16

(2,5-Диоксопирролидин-1-ил)11-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентааноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентааноиламино]этил]амино]-5-оксопентаоил]амино]ундеканоат

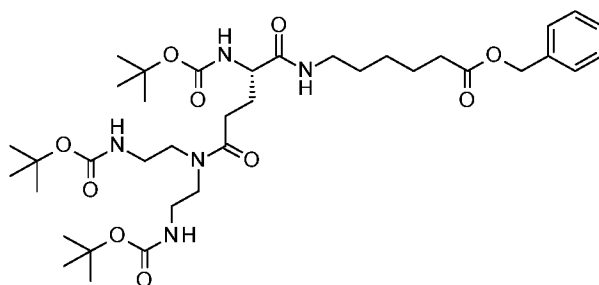


20 В реакционный флакон добавляли 11-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]окпентааноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентааноиламино]этил]амино]-5-оксопентаоил]амино]ундекановую кислоту (50 мг, 0,03 ммоль), n-гидроксисукцинимид (5 мг,

0,04 ммоль) и 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодимидгидрохлорид (8 мг, 0,04 ммоль). Добавляли DCM (0,3 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 18 часов смесь загружали непосредственно на картридж с силикагелем, и неочищенную смесь очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя 0-10% MeOH/DCM, с получением 5 указанного в заголовке соединения (49 мг, 93%). ЭР/МС масса/заряд 901,40 [M+2H]²⁺

Получение 17

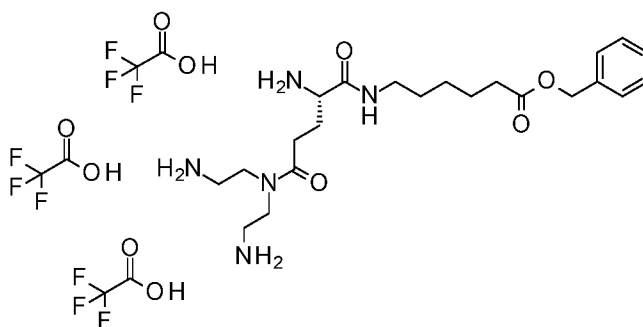
Бензил-6-[[[(2S)-5-[бис[2-(трет-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноил]амино]гексаноат



10 Указанное в заголовке соединение получали из (2S)-5-[бис[2-(трет-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-оксопентановой кислоты и бензил-6-аминогексаноата гидрохлорида посредством способа, по существу аналогичного способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд 736,40 (M+H).

Получение 18

15 Бензил-6-[[[(2S)-2-амино-5-[бис(2-аминоэтил)амино]-5-оксопентаноил]амино]гексаноат-трис(трифторуксусная кислота)

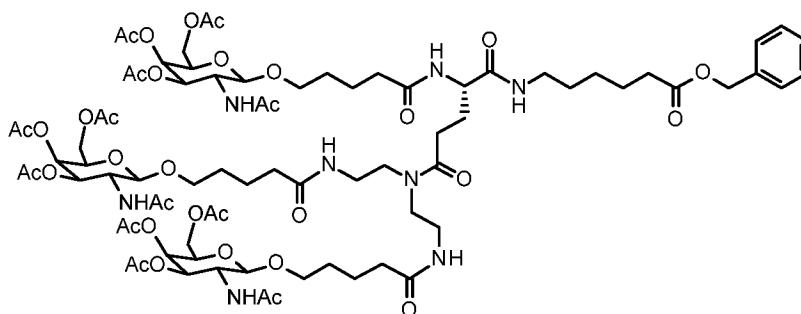


20 К раствору бензил-6-[[[(2S)-5-[бис[2-(трет-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноил]амино]гексаноата (15,47 г, 21,02 ммоль) в DCM (105 мл) добавляли TFA (16 мл, 210,2 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. После этого добавляли дополнительное количество TFA (16 мл, 210,2 ммоль) и продолжали перемешивание в течение дополнительных 2 часов. По истечении указанного времени концентрировали смесь в вакууме. Полученный остаток подвергали азеотропной перегонке с толуолом (2 × 30 мл). Полученное масло дополнительно сушили в вакуумной печи при 40°C в

течение 4 часов с получением указанного в заголовке соединения (28,08 г, выход 58% для остаточного толуола, 99%). ЭР/МС масса/заряд 436,40 (M+H). Соединение растворяли в 70 мл DMF с получением 0,3 М раствора, который использовали на следующей стадии.

Получение 19

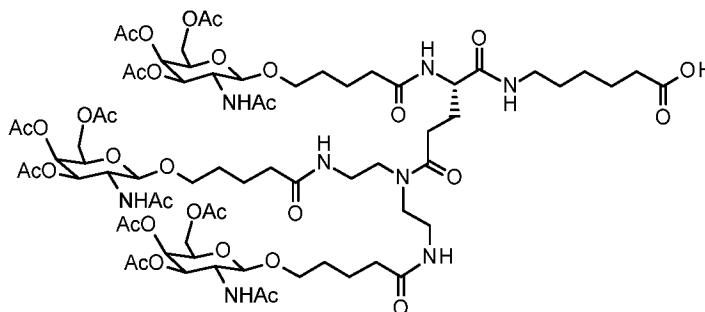
- 5 Бензил-6-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]гексаноат



- 10 Указанное в заголовке соединение получали из 5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентановой кислоты и бензил-6-[[[(2S)-2-амино-5-[бис(2-аминоэтил)амино]-5-оксипентаноил]амино]гексаноата трис-трифторуксусной кислоты и посредством способа, по существу аналогичного способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд 862 [M+2H]/2

- 15 Получение 20

- 6-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]гексановая кислота

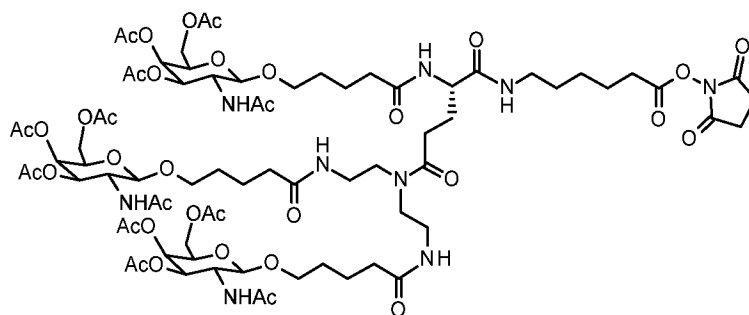


- 20 Палладий на угле (1,90 г, 0,89 ммоль, 5 масс. %, 50% влажности) помещали в круглодонную колбу, сосуд вакуумировали и трижды заполняли азотом. Шприцем добавляли раствор бензил-6-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-

(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]гексаноата (15,41 г, 8,94 ммоль) в MeOH (178 мл). Колбу вакуумировали и заполняли 1 атм водорода, и смесь перемешивали при температуре окружающей среды под давлением 1 атм в течение 18 часов. По истечении данного времени смесь фильтровали через диатомовую землю и фильтрат концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения (13,85 г, 95%). ЭР/МС масса/заряд 817,2 [M+2H]/2

Получение 21

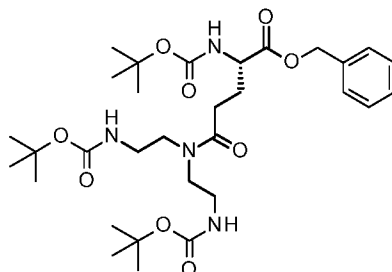
(2,5-Диоксопирролидин-1-ил)6-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]гексаноат



Указанное в заголовке соединение получали из 6-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]гексановой кислоты посредством способа, по существу аналогичного способу получения 16. ЭР/МС масса/заряд 866,20 [M+2H]/2

Получение 22

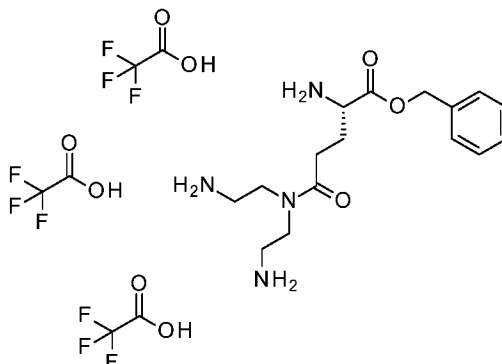
Бензил(2S)-5-[бис[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-бутоксикарбониламино)-5-оксипентаноат



Указанное в заголовке соединение получали из *трет*-бутил N-[2-[2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этиламино]этил]карбамата и (4S)-5-бензилокси-4-(*трет*-бутоксикарбониламино)-5-оксипентановой кислоты посредством способа, по существу аналогичного способу получения 12. ЭР/МС масса/заряд 623,6 (M+H).

Получение 23

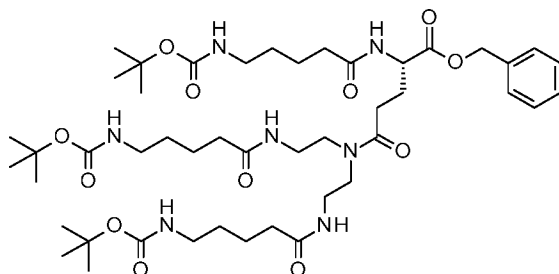
Бензил(2S)-2-амино-5-[бис(2-аминоэтил)амино]-5-оксопентаноат-трис(трифторуксусная кислота)



Указанное в заголовке соединение получали из бензил(2S)-5-[бис[2-(*трет*-
5 бutoксикарбониламино)этил]амино]-2-(*трет*-butoксикарбониламино)-5-оксопентаноата
посредством способа, по существу аналогичного способу получения 18. ЭР/МС масса/заряд 323,2
(M+H).

Получение 24

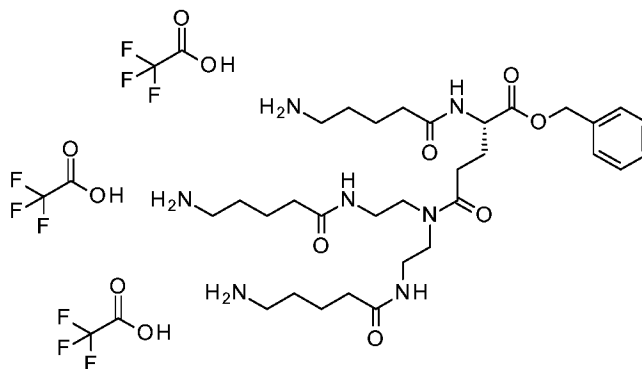
10 Бензил(2S)-5-[бис[2-[5-(*трет*-butoксикарбониламино)пентаноиламино]этил]амино]-2-[5-(*трет*-
butoксикарбониламино)пентаноиламино]-5-оксопентаноат



15 Указанное в заголовке соединение получали из 5-(*трет*-butoксикарбониламино)пентановой
кислоты и бензил(2S)-2-амино-5-[бис(2-аминоэтил)амино]-5-оксопентаноата-трис(трифторуксусная
кислота) посредством способа, по существу аналогичного способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд
920,6 (M+H).

Получение 25

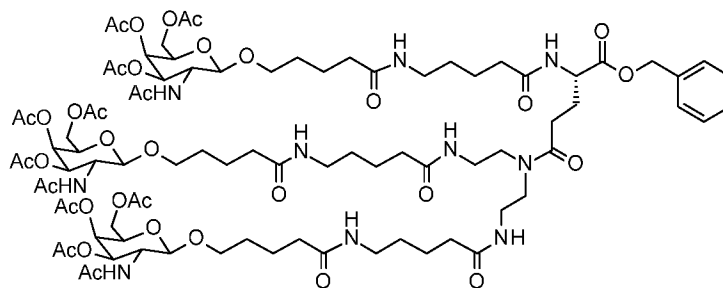
Соль бензил(2S)-2-(5-аминопентаноиламино)-5-[бис[2-(5-аминопентаноиламино)этил]амино]-5-оксопентаноат-трис(трифторуксусная кислота)



5 Указанное в заголовке соединение получали из бензил(2S)-5-[бис[2-[5-(*трет*-бутоксикарбониламино)пентаноиламино]этил]амино]-2-[5-(*трет*-бутоксикарбониламино)пентаноиламино]-5-оксопентаноата посредством способа, по существу аналогичного способу получения 18. ЭР/МС масса/заряд 620,4 (M+H).

Получение 26

10 Бензил(2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноат

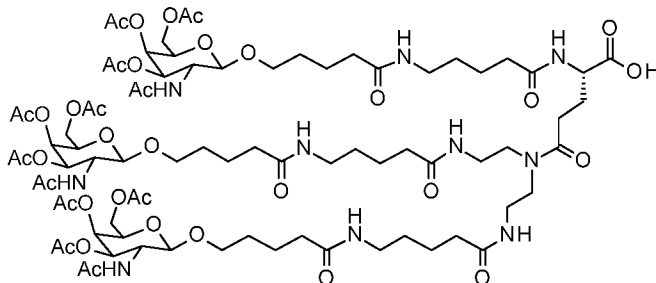


15 Указанное в заголовке соединение получали из 5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентановой кислоты и бензил(2S)-2-(5-аминопентаноиламино)-5-[бис[2-(5-аминопентаноиламино)этил]амино]-5-оксопентаноат-трис(трифторуксусная кислота) и посредством способа, по существу аналогичного способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд 954,80 [M+2H]/2

Получение 27

20 (2S)-2-[5-[5-[3-Ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-

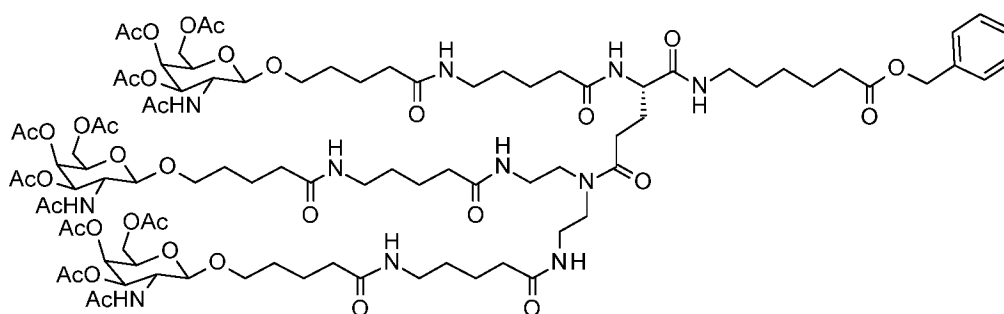
(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-
оксипентановая кислота



В круглодонную колбу загружали палладий на угле (467 мг, 0,22 ммоль, 5 масс. %, 50%
5 влажности) и колбу вакуумировали и три раза заполняли азотом. Шприцем добавляли раствор
бензил(2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-
ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-
(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-
оксипентаноата (4,19 г, 2,20 ммоль) в MeOH (44 мл). Колбу вакуумировали и заполняли 1 атм
10 водорода и перемешивали смесь при температуре окружающей среды под давлением 1 атм. Через 2
часа смесь фильтровали через диатомовую землю и фильтрат концентрировали *in vacuo* с
получением указанного в заголовке соединения (3,99 г, 99%). ЭР/МС масса/заряд 909,6 [M+2H]/2

Получение 28

Бензил-6-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-
ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-
15 (ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-
оксипентаноил]амино]гексаноат

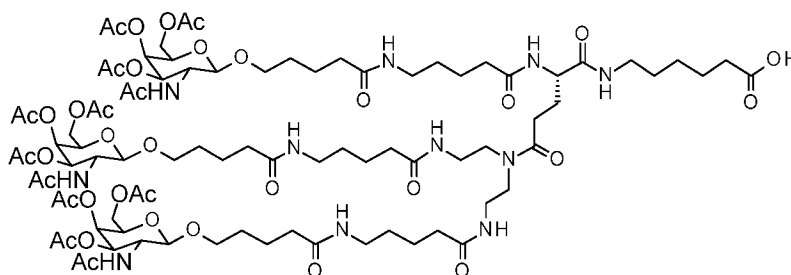


Указанное в заголовке соединение получали из (2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-
20 (ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-
ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-
ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентановой кислоты и бензил-6-
аминогексаноата гидрохлорида и по существу аналогично способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд
1011,6 [M+2H]/2

Получение 29

6-[[*(2S)*-2-[5-[5-[3-Ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]гексановая кислота

5



В круглодонную колбу загружали палладий на угле (24 мг, 0,01 ммоль, 5% по массе, 50% влажности) и колбу вакуумировали и заполняли азотом. Раствор бензил-6-[[*(2S)*-2-[5-[5-[3-

10

ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-

15

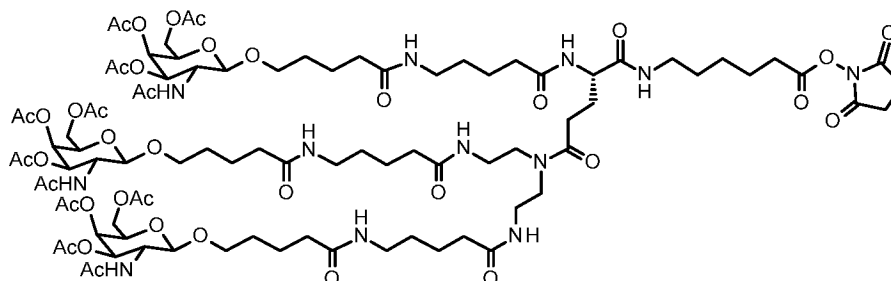
оксопентаноил]амино]гексаноата (222 мг, 0,11 ммоль) в MeOH (2,2 мл) добавляли шприцем, а затем три капли уксусной кислоты. Колбу вакуумировали и заполняли 1 атм водорода, и смесь перемешивали в 1 атм при температуре окружающей среды. Через 5 часов колбу продували азотом и смесь фильтровали через диатомовую землю. Концентрировали фильтрат в вакууме с

получением указанного в заголовке соединения (180 мг, 85%). ЭР/МС масса/заряд 966,2 [M+2H]²⁺

Получение 30

(2,5-Диоксопирролидин-1-ил)6-[[*(2S)*-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]гексаноат

20



Указанное в заголовке соединение получали из 6-[[*(2S)*-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-

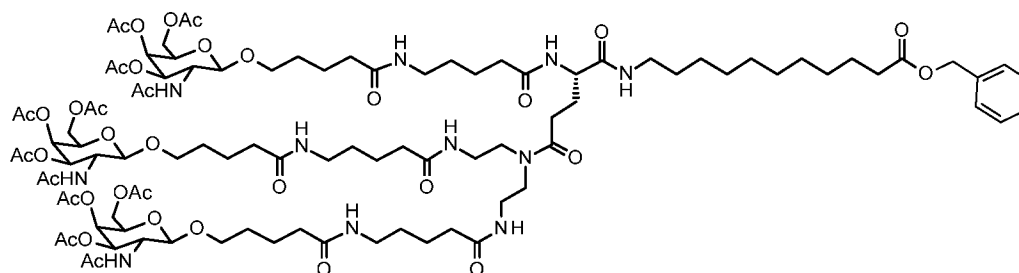
25

ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]гексановой кислоты

посредством способа, по существу аналогичного способу получения 16. ЭР/МС масса/заряд 1014,6 [M+2H]/2

Получение 31

Бензил-11-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]ундеканоеат

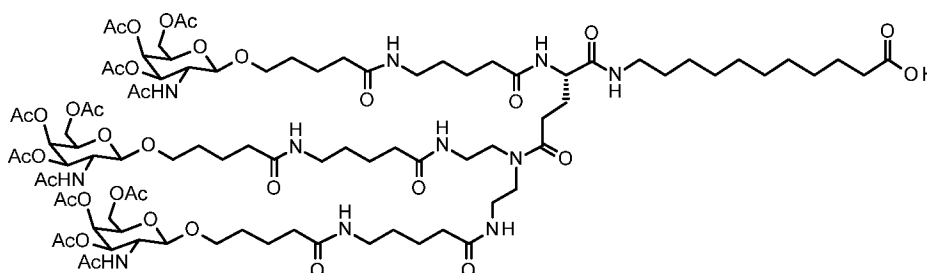


Указанное в заголовке соединение получали из (2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентановой кислоты и бензил-11-аминоундеканоеата гидрохлорида посредством способа, по существу аналогичного способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд 1046,6 [M+2H]/2

15

Получение 32

11-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-Ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]ундекановая кислота



20

В круглодонную колбу добавляли палладий на угле (35 мг, 0,02 ммоль, 5 масс. %, 50% влажный) и колбу в три раза заполняли азотом. Раствор бензил-11-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]ундеканоеата (285 мг, чистота 80%, 0,11 ммоль) добавляли шприцем. Сосуд вакуумировали и заполняли 1 атм водорода, а

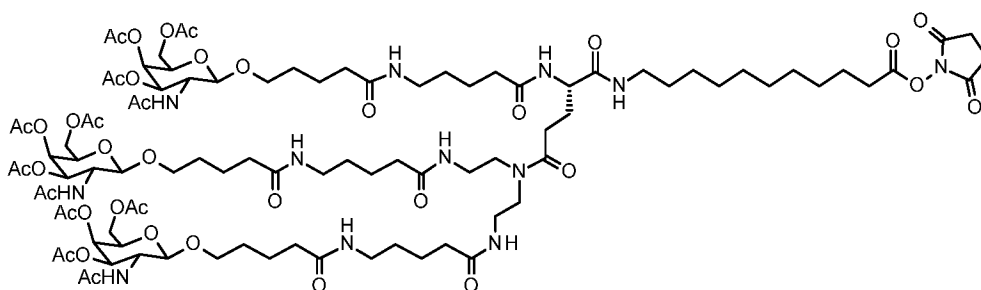
25

затем перемешивали смесь при температуре окружающей среды под давлением 1 атм. После перемешивания в течение 3 часов колбу продували азотом и смесь фильтровали через диатомовую землю. Фильтрат концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (213 мг, чистота 79%, 77%). ЭР/МС масса/заряд 1001,20 [M+2H]/2

5

Получение 33

(2,5-Диоксопирролидин-1-ил)11-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]ундекановат



10

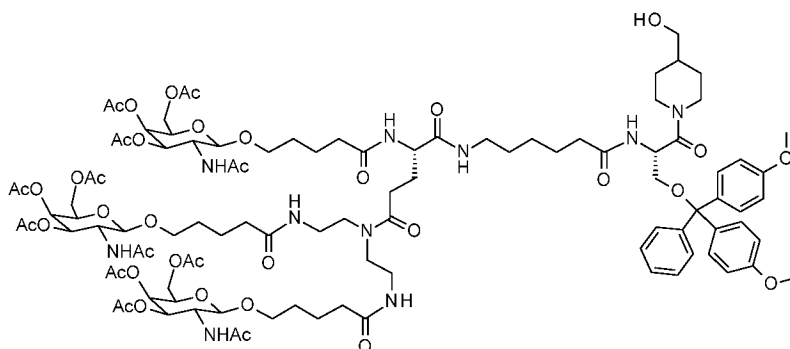
Указанное в заголовке соединение получали из 11-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]ундекановой кислоты посредством способа, по существу аналогичного способу получения 16. ЭР/МС масса/заряд 1050 [M+2H]/2

15

Получение 34

[5-Ацетиамидо-6-[5-[2-[[[(4S)-4-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[[[6-[[[(1S)-1-[[бис(4-метоксифенил)фенилметокси]метил]-2-[4-(гидроксиметил)-1-пиперидил]-2-оксоэтил]амино]-6-оксогексил]амино]-5-оксопентаноил]-[2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]этиламино]-5-оксопентокси]-3,4-диацетокситетрагидропиран-2-ил]метилацетат

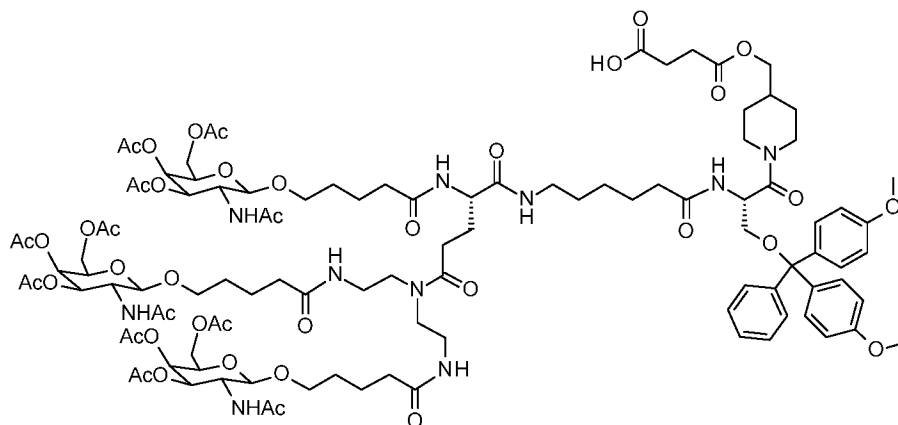
20



Указанное в заголовке соединение получали из 6-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]гексановой кислоты и (2S)-2-амино-3-[бис(4-метоксифенил)фенилметокси]-1-[4-(гидроксиметил)-1-пиперидил]пропан-1-она по существу аналогично способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд 1059,2 [M-2H]/2

Получение 35

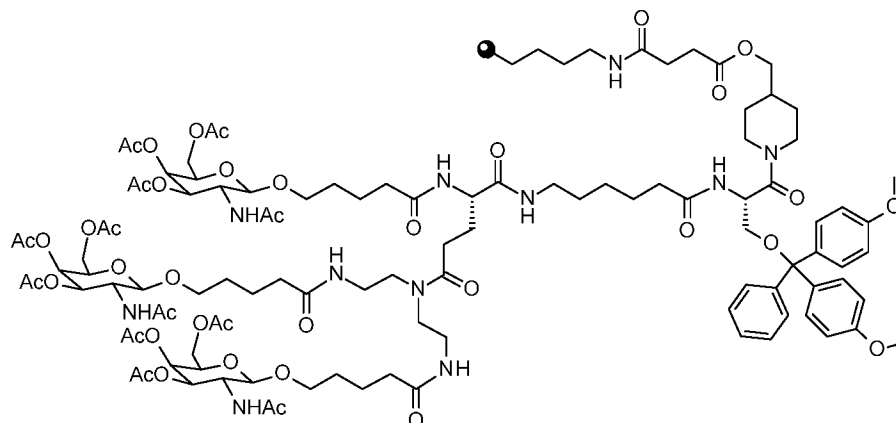
4-[[1-[(2S)-2-[6-[[[(2S)-2-[5-[3-Ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]гексаноиламино]-3-[бис(4-метоксифенил)фенилметокси]пропаноил]-4-пиперидил]метокси]-4-оксобутановая кислота



К раствору [5-ацетиамидо-6-[5-[2-[[[(4S)-4-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[[6-[[[(1S)-1-[[бис(4-метоксифенил)фенилметокси]метил]-2-[4-(гидроксиметил)-1-пиперидил]-2-оксоэтил]амино]-6-оксогексил]амино]-5-оксипентаноил]-[2-[5-[3-ацетиамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]этиламино]-5-оксипентокси]-3,4-диацетокситетрагидропиран-2-ил]метилацетата (1,194 г, 0,56 ммоль) в DCM (11 мл) добавляли янтарный ангидрид (113 мг, 1,13 ммоль), TEA (0,4 мл, 3 ммоль) и DMAP (213 мг, 1,69 ммоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. По истечении данного времени смесь разбавляли насыщенным раствором NH₄Cl (200 мл) и экстрагировали DCM (3 × 200 мл) и CHCl₃:IPA (3:1) (200 мл). Органические слои объединяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя смесью 0-40% MeOH/DCM, и полученный продукт сушили в вакуумной печи при 40°C в течение 3 часов с получением указанного в заголовке соединения (1,081 г, 86%). ЭР/МС масса/заряд 1109,60 [M-2H]/2

Получение 36

Загрузка смолы

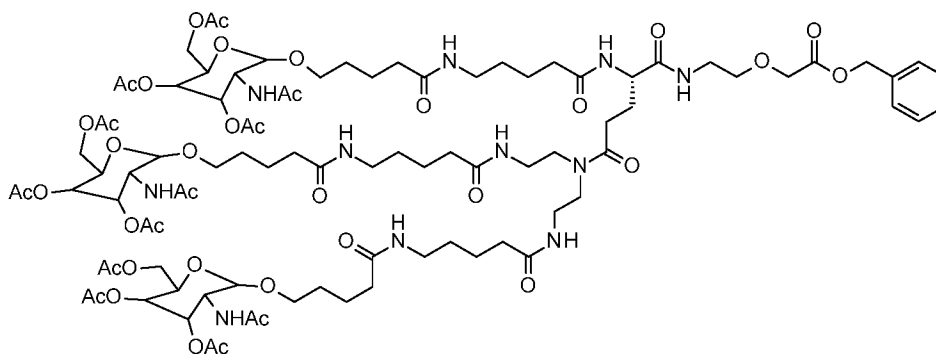


Раствор 4-[[1-[(2S)-2-[6-[[[(2S)-2-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-
5 (ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[3-ацетидамо-4,5-
диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]этил]амино]-5-
оксопентаноил]амино]гексаноиламино]-3-[бис(4-метоксифенил)фенилметокси]пропаноил]-4-
10 пиперидил]метокси]-4-оксобутановой кислоты (1,00 г, 0,61 ммоль) в MeCN (6 мл) и DCM (1 мл)
переносили в картридж для загрузки смолы. В сосуд добавляли 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-
тетраметилуруния гексафторфосфат (386 мг, 0,97 ммоль) и DIEA (0,25 мл, 0,48 ммоль) и картридж
встряхивали при температуре окружающей среды в течение 5 минут. По истечении данного
времени добавляли стеклянную смолу с контролируемым размером пор 1000 Å LCAA (5,39 г,
загрузка 90 мкмоль/г, приобретенную у ChemGenes) и смесь встряхивали при температуре
окужающей среды в течение 18 часов. По истечении данного времени картридж осушали
15 отсасыванием и смолу промывали встряхиванием с DCM (10 мл) в течение 10 минут. Картридж
осушали и процедуру промывания и осушения повторяли с использованием смеси 10%
MeOH/DCM (10 мл) и Et₂O (10 мл). После осушения добавляли раствор уксусного ангидрида
(6,4 мл), пиридина (20 мл) и TEA (0,22 мл) и картридж встряхивали в течение 2 часов. По
истечении данного времени картридж осушали и повторяли описанную выше процедуру
20 промывки и осушения с использованием DCM (10 мл), 10% MeOH/DCM (10 мл) и диэтилового
эфира (10 мл). После осушения смолу сушили под вакуумом в течение 30 минут. Загрузку смолы
определяли с использованием стандартного тритилового анализа. Рассчитанная загрузка смолы
составляла 34,7 мкмоль/г.

Получение 37

Бензил-2-[2-[[*(2S)*]-2-[5-[5-[3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]ацетат

5



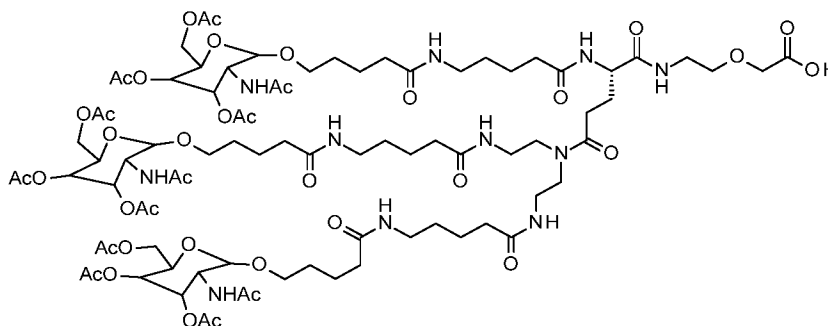
Указанное в заголовке соединение получали из *(2S)*-2-[5-[5-[3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентановой кислоты и бензил-2-(2-аминоэтокси)ацетата гидрохлорида по существу аналогично способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд 1005,2 (M+2H/2)

10

Получение 38

2-[2-[[*(2S)*]-2-[5-[5-[3-Ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]уксусная кислота

15



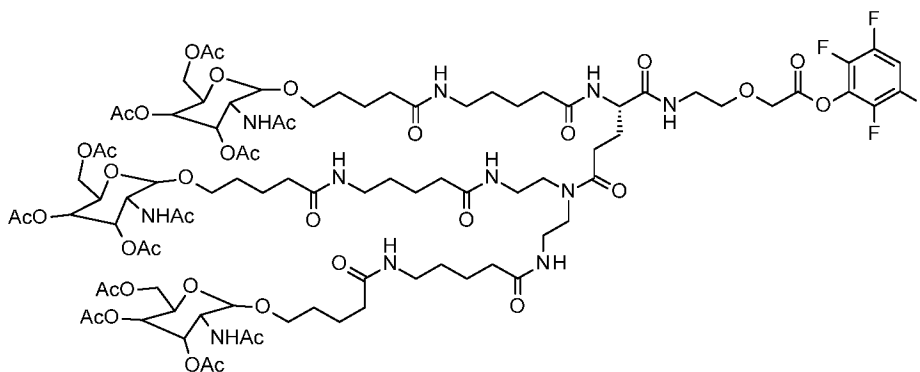
Бензил-2-[2-[[*(2S)*]-2-[5-[5-[3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетиламино-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]ацетат (0,120 ммоль, 240 мг) объединяли с 5% Pd/C (1,17 ммоль, 124 мг) в MeOH (12,0 мл). Смесь гидрировали на шейкере Парра (температура окружающей среды,

20

10 фунтов на квадратный дюйм) в течение 48 минут, фильтровали через диатомовую землю и концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения в виде серого твердого вещества (187 мг, 82%). ЭР/МС масса/заряд 960,0 (M+2H/2)

Получение 39

5 (2,3,5,6-Тетрафторфенил)2-[2-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]ацетат



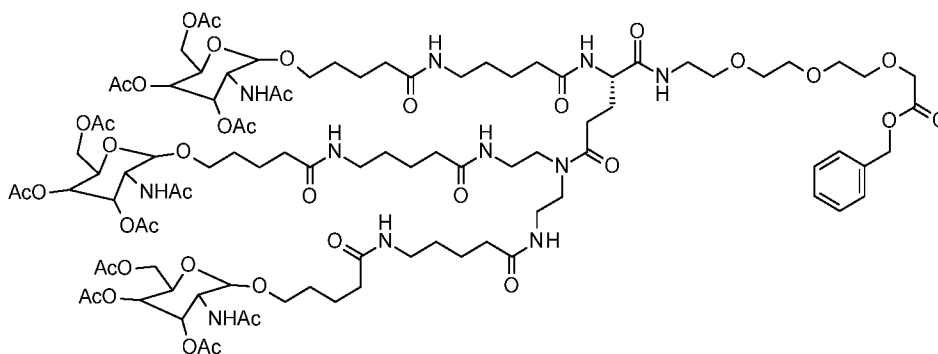
10 К смеси 2-[2-[[[(2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]уксусной

15 кислоты (0,096 ммоль, 184 мг) и DIEA (0,765 ммоль, 140 мкл) в DCM (3,0 мл) по капле добавляли (2,3,5,6-тетрафторфенил)2,2,2-трифторацетат (0,383 ммоль, 100 мг). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь очищали непосредственно флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью MeOH/DCM от 0% до 50%, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества желтовато-коричневого цвета (197 мг, 99%). ЭР/МС масса/заряд 1034,0 (M+2H/2)

Получение 40

Бензил-2-[2-[2-[2-[[(2S)]-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]этокси]этокси]ацетат

5



Указанное в заголовке соединение получали из (2S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-

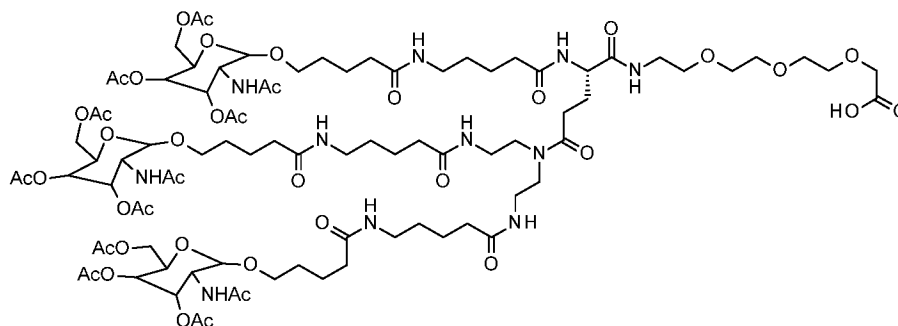
ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентановой кислоты и бензил-2-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этокси]ацетата гидрохлорида по существу аналогично способу получения 10. ЭР/МС масса/заряд 1049,0 (M+2H/2)

10

Получение 41

2-[2-[2-[2-[[(2S)]-2-[5-[5-[3-Ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]этокси]этокси]уксусная кислота

15



Бензил-2-[2-[2-[2-[[(2S)]-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]этокси]этокси]ацетат (0,118 ммоль, 247 мг) объединяли с 5% Pd/C

20

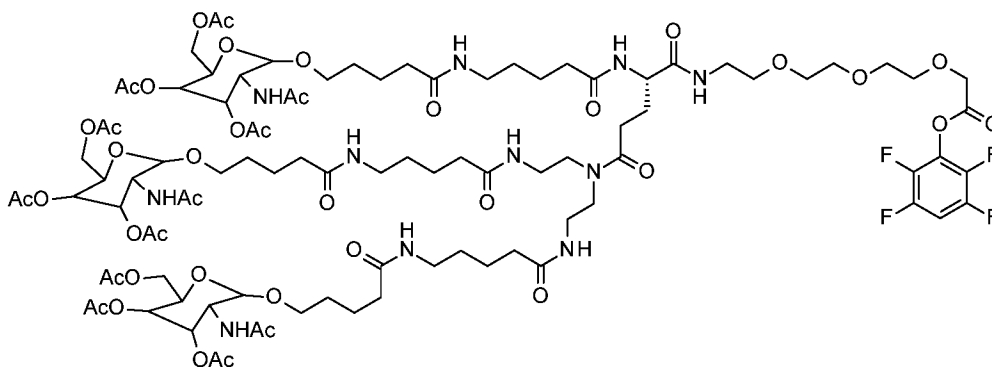
(1,17 ммоль, 124 мг) в MeOH (12,0 мл). Смесь гидрировали на шейкере Парра (температура окружающей среды, 10 фунтов на квадратный дюйм) в течение 1 часа, фильтровали через диатомовую землю и концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения в виде серого твердого вещества (227 мг, 96%). ЭР/МС масса/заряд 1004,0 (M+2H/2)

5

Получение 42

(2,3,5,6-Тетрафторфенил)2-[2-[2-[2-[[2(S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]этокси]этокси]этокси]ацетат

10



15

К смеси 2-[2-[2-[2-[[2(S)-2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]-5-[бис[2-[5-[5-[3-ацетидамо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]оксипентаноиламино]пентаноиламино]этил]амино]-5-оксипентаноил]амино]этокси]этокси]этокси]уксусной кислоты (0,111 ммоль, 222 мг) и DIEA (0,883 ммоль, 154 мкл) в DCM (3,0 мл) по капле добавляли (2,3,5,6-тетрафторфенил)2,2,2-трифторацетат (0,443 ммоль, 116 мг). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь очищали непосредственно флэш-хроматографией на силикагеле, элюируя смесью MeOH/DCM от 0% до 50%, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества желтовато-коричневого цвета (174 мг, 73%). ЭР/МС масса/заряд 1078,2 (M+2H/2)

20

Пример 1

Протокол конъюгации

Для синтеза смысловых цепей, конъюгированных с GalNAc, сначала синтезировали смысловую цепь с функциональной группой 3' C6-NH₂ с использованием стандартной химии фосфорамидита. Получали исходный раствор лиганда GalNAc-эфира NHS (10 ммоль/л в ацетонитриле; 1 экв.). Боратный буфер (10% об./об. 20x) добавляли к олигонуклеотиду смысловой нити C6-NH₂ в пробирке Эшпендорфа, затем добавляли лиганд GalNAc (5 экв.). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 16 часов. По истечении данного времени смесь переносили в пробирку Falcon емкостью 15 мл,

25

добавляли гидроксид аммония (28 мас.%) и смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Затем аммиак удаляли *in vacuo*. Остаток очищали посредством ионообменной хроматографии. Условия: растворитель А: 15% MeCN/20 mM NaH₂PO₄, растворитель В: 15% MeCN/20 mM NaH₂PO₄ 1 M NaBr; 35-55% В при 5 CV при 8 мл/мин., температура колонки 60°C. Необходимые

5 фракции объединяли и обессоливали с использованием центрифуги Эшпендорфа или колонки для обессоливания. После обессоливания материал извлекали и измеряли наружный диаметр и объем для определения концентрации.

Альтернативно, конъюгацию осуществляли в 5'-положении смысловой цепи посредством иммобилизации лиганда GalNAc на микропористой полистироловой смоле или стекле с

10 контролируемой пористостью и синтеза с использованием общепринятых способов твердофазного синтеза олигонуклеотидов с 5'-СЕ β-цианоэтил)фосфорамидитами.

Альтернативно, лиганд GalNAc преобразовывали в подходящий фосфорамидит и доставляли в 5'-положение смысловой цепи с использованием стандартной химии фосфорамидита.

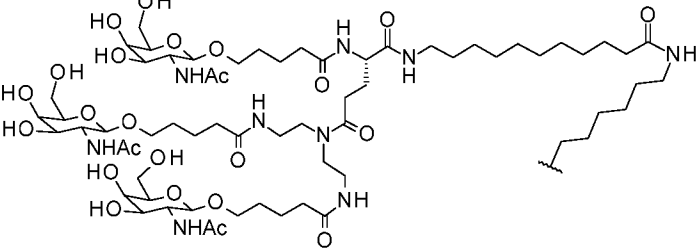
Пример 2. Отжиг

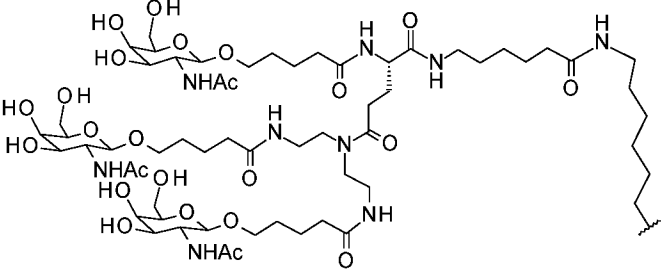
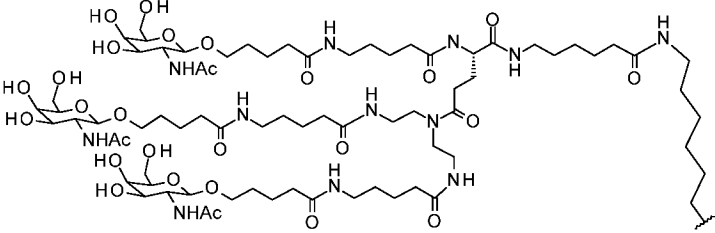
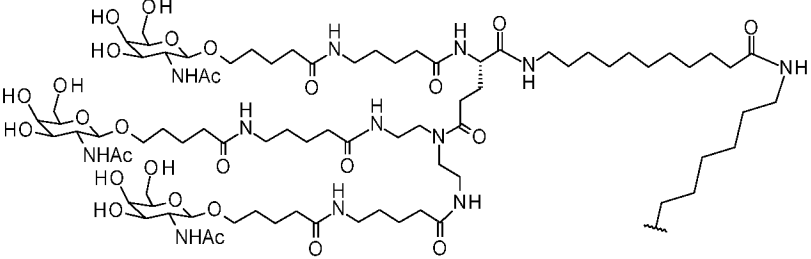
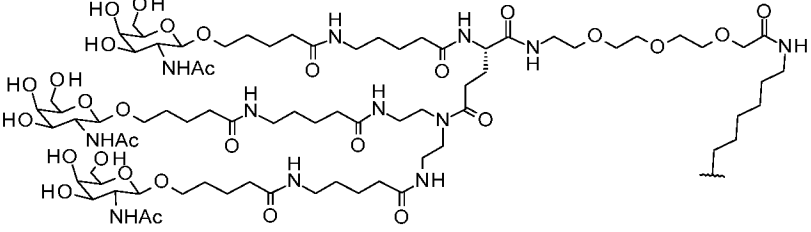
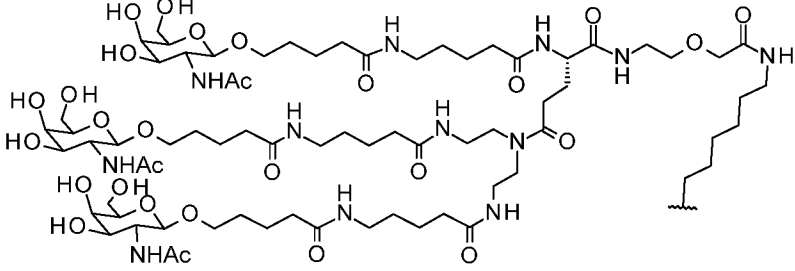
15 Для создания дуплексов миРНК смысловой и антисмысловой цепи выполняли следующие процедуры. В пробирку Falcon, содержащую конъюгат смысловой цепи олигонуклеотида-GalNAc, добавляли соответствующий антисмысловый олигонуклеотид (1 экв.) и перемешивали в течение 10 секунд перед центрифугированием через блок фильтра Amicon 100K MWCO для удаления

20 частиц. Фильтрат выделяли и концентрировали в вакууме на испарителе Genevac. Остаток восстанавливали в 1x PBS, фильтровали через фильтр 0,2 мкм и измеряли OD и объем для определения концентрации.

Испытание на эндотоксин проводили с использованием лизата амебоцитов Limulus на приборе Endosafe®-nexgen PTS.

25 Таблица 1 – Иллюстративные молекулы, синтезированные с использованием вышеупомянутых протоколов конъюгации и отжига.

Идентификатор молекулы	Лиганд, присоединенный к 3'-концу смысловой нити	миРНК
1		LDHA

Идентификатор молекулы	Лиганд, присоединенный к 3'-концу смысловой нити	миРНК
2		LDHA
3		LDHA
4		LDHA
5		LDHA
6		LDHA

Пример 3. Общая процедура синтеза олигонуклеотидов с использованием CPG-функционализованного GalNAc

Синтез олигонуклеотидов проводили на приборе Mermade 12 с использованием фосфорамидитной химии. Смысловые цепи синтезировали из предварительно функционализованной твердой подложки GalNAc, а антисмысловые цепи синтезировали с

использованием стандартной подложки, предварительно загруженной первым нуклеотидом олигопоследовательности. Олигогруппы расщепляли и снимали защиту с использованием концентрированного раствора гидроксида аммония (28% по массе) и очищали посредством ионообменной хроматографии в условиях, описанных выше. Обессоливание, отжиг и испытание на эндотоксины проводили, как описано выше.

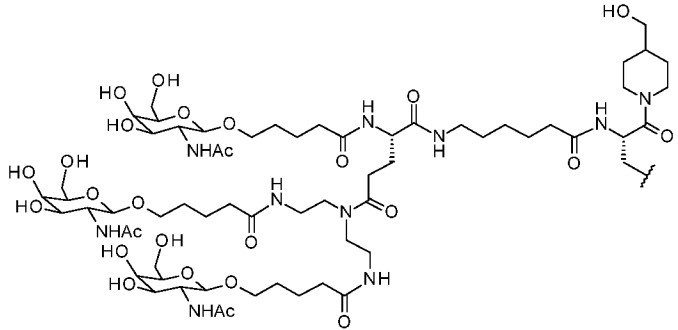
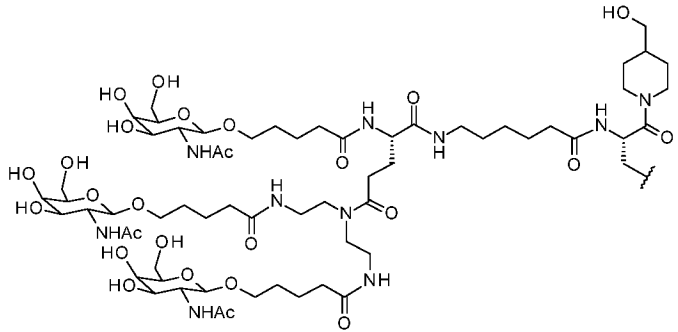
Ген	Антисмысловая нить от 5' до 3'	Смысловая нить от 5' до 3'
HPRT	[Phos]mA*fU*mAmAmAfAmUmCmUmAmCmAmGfUmCfAmUmAmGmGmA*mA*mU	mU*mC*mCmUmAmUfGmAfCfUfGmUmAmGmAmUmUmUmU*mA*mU
LDHA	[Phos]mA*fC*mGmUmAfGmGmUmCmAmAmGmAfUmAfUmCmCmAmCmU*mG*mG	mA*mG*mUmGmGmAfUmAfUfCfUmUmGmAmCmCmUmAmC*mG*mU
DPP4	[Phos]mA*fA*mUmAmAfGmGmAmGmGmUmAmCfUmCfAmAmCmUmUmG*mU*mU	mC*mA*mAmGmUmUfGmAfGfUfAmCmCmUmCmCmUmUmA*mU*mU

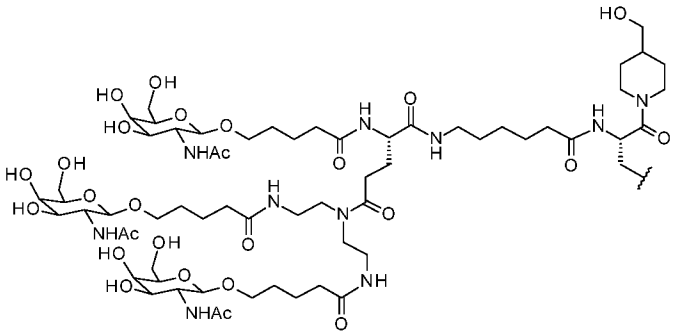
Ключ – [Phos] указывает на фосфорилированный 5'-остаток; m указывает на 2'-группу О-Ме рибозы на нуклеотидном/нуклеозидном основании, которая пишется сразу после m; f указывает на 2'-фторгруппу рибозы на нуклеотидном/нуклеозидном основании, которая написана сразу после f; и * указывает на модифицированную связь, представляющую собой фосфоротиоат (PS).

10

Пример 4

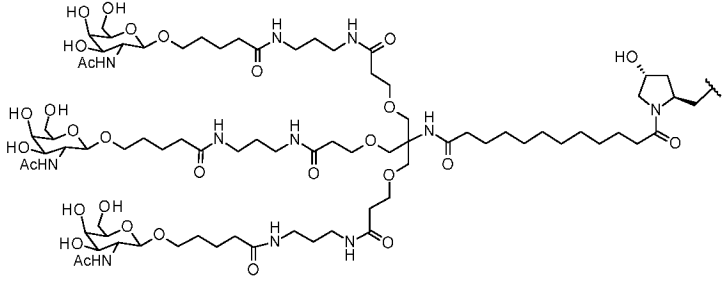
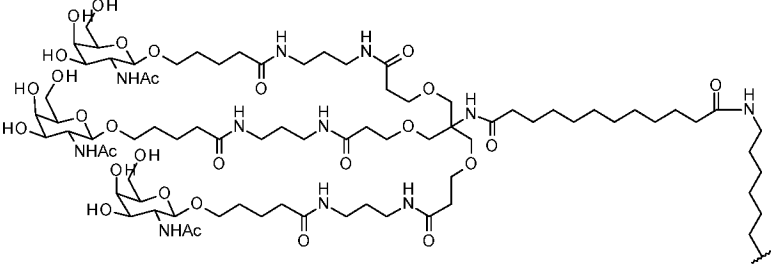
Таблица 2 - Иллюстративные молекулы, синтезированные с использованием вышеупомянутой процедуры синтеза олигонуклеотидов с использованием CPG, функционализированного GalNAc, и протоколов отжига.

Идентификатор молекулы	Лиганд, присоединенный к 3'-концу смысловой нити	миРНК
7		HPRT
8		LDHA

Идентификатор молекулы	Лиганд, присоединенный к 3'-концу смысловой нити	миРНК
9		DPP4

Пример 5

Таблица 3 – Контроли GalNAc

Идентификатор молекулы	Лиганд, присоединенный к 3'-концу смысловой нити	миРНК
Контроль GalNAc I		LDHA
Контроль GalNAc II		LDHA

5

Пример 6. Биологические анализы

Оценка нокдауна гена миРНК-конъюгатов GalNAc-LDHA in vivo

Животные

10 Всех животных содержали индивидуально в помещении с контролируемой температурой (24°C) и 12-часовым/12-часовым циклом света/темноты. Протоколы для животных одобрены Eli Lilly и ComIranу IACUC. Самцов мышей C57BL/6 (Envigo) в возрасте приблизительно 8 недель взвешивали и случайным образом распределяли по массе тела на группы лечения по 6 животных в каждой группе. Животных обрабатывали либо PBS, либо конъюгатом миРНК посредством

подкожной инъекции. Через четырнадцать дней после введения дозы животных умерщвляли, ткани печени быстро иссекали и быстро замораживали в жидком азоте.

Выделение РНК и количественная РВ-ПЦР в реальном времени

Общую РНК выделяли из образцов печени с использованием реагента TRIzol (Ambion) и набора для очистки общей РНК PureLink Pro 96 (Invitrogen). Один микрограмм РНК использовали для синтеза кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости (Applied Biosystems). Количественную ПЦР в реальном времени выполняли на системах ПЦР в реальном времени Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems). Значения СТ нормализовали по RPLP0 (Mm01974474_gH, Applied Biosystems), а относительную экспрессию LDHA (Mm03646738_gI, Applied Biosystems) рассчитывали посредством способа ΔΔСТ. Кратное изменение рассчитывали посредством нормализации относительной экспрессии у животных, получавших среду-носитель.

Таблица 4 Нокдаун мРНК LDHA в первичных гепатоцитах мыши

Пример	Отн. IC50 (нМ)	% отн. макс.
1	4,01 (1,30, n=2)	95,0 (0,00, n=2)
2	2,30 (0,0105, n=2)	95,3 (0,354, n=2)
3	2,21 (0,313, n=2)	96,9 (0,547, n=2)
4	3,89 (3,11, n=2)	95,7 (0,155, n=2)
5	1,70 (0,0561, n=2)	97,1 (1,02, n=2)
6	1,47 (0,251, n=2)	98,3 (0,320, n=2)
Контроль GalNAc I	1,85 (0,218, n=2)	99,7 (0,128, n=2)
Контроль GalNAc II	4,70 (1,77, n=2)	96,0 (0,00, n=2)

Таблица 5 - данные нокдауна *in vivo*

Пример	Сред. % KD	Станд. ошибка
1	52,6	5,52
2	76,4	1,21
3	55,7	3,09
4	52,7	5,46
5	56,2	4,11
6	51,5	4,30
Контроль GalNAc I	41,2	2,29
Контроль GalNAc II	42,8	7,70

24-часовой скрининг воздействия GalNAc-LDA миРНК на ткань

Животные

Всех животных содержали индивидуально в помещении с контролируемой температурой (24°C) и 12-часовым/12-часовым циклом света/темноты. Протоколы для животных одобрены E11 Lilly и ComIranu IACUC. Самцов мышей C57BL/6 (Envigo) в возрасте приблизительно 8 недель взвешивали и случайным образом распределяли по массе тела на группы лечения по 5 животных в каждой группе. Животных обрабатывали либо средой-носителем PBS, либо конъюгатом миРНК посредством подкожной инъекции. Через двадцать четыре часа после введения дозы животных умерщвляли, образцы плазмы собирали посредством пункции сердца, ткани печени/почек быстро иссекали и быстро замораживали в жидком азоте. Концентрации миРНК и метаболитов в тканях определяли с использованием ПНК-гибридизации и анализа анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с флуоресцентным обнаружением.

Таблица 6 - Воздействие на печень

Пример	Сред. 5'-ОН метаболит (нг/г)	Станд. ошибка 5'ОН метаболита (нг/г)	Сред. 5'-n-1 метаболит (нг/г)	Станд. ошибка 5'-n-1 метаболита (нг/г)
1	4299,1	825,6	2 095,9	382,5
2	9809,5	1 199,8	5 074,1	559,3
3	3786,9	417,5	2 272,2	242,3
4	3847,0	439,6	1 973,7	187,6
5	5480,4	1 042,9	3 285,7	611,2
6	5079,1	569,8	3 059,2	340,6
Контроль GalNAc I	6258,6	797,23	3729,3	441,2
Контроль GalNAc II	3723,2	526,2	2019,3	301,2

Таблица 7 - Воздействие на почки

Пример	Сред. 5'-ОН метаболит (нг/г)	Станд. ошибка 5'ОН метаболита (нг/г)	Сред. 5'-n-1 метаболит (нг/г)	Станд. ошибка 5'-n-1 метаболита (нг/г)
1	396,1	21,7	195,3	10,8
2	144,3	7,9	47,3	3,9
3	121,6	47,8	47,6	21,9
4	247,5	46,5	107,6	22,9
5	293,6	21,5	115,8	9,1
6	315,4	15,5	123,2	5,5
Контроль GalNAc I	1334,4	87,8	586,8	41,3
Контроль GalNAc II	285	42,6	134,5	25,4

Пример 7. Нокдаун мышинных генов in vitro

Мышечные первичные гепатоциты (МРН) выделяли перед исследованием и помещали на планшеты Corning по 15 тыс. на лунку, и в каждую лунку добавляли конъюгаты миРНК в PBS. Эксперименты по реакции на дозу проводили с использованием 1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1,37, 0,46, 0,15, 0,05 и 0,017 нМ конечной концентрации дуплекса, конъюгированного с GalNAc, в первичных гепатоцитах мыши.

РНК выделяли непосредственно из высевных клеток с использованием набора Quick-RNA 96 от Zymo Research. Окончательно очищенную и элюированную РНК использовали немедленно или хранили в замороженном виде. кДНК синтезировали из очищенной РНК с использованием Fast Advanced RT Master Mix от Invitrogen и системы ПЦР в реальном времени QuantStudio 7 Flex (Life Technologies), инкубируя при 37°C в течение 30 минут, при 95°C в течение 5 минут и выдержке при 4°C. кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени с использованием системы ПЦР в реальном времени QuantStudio 7 Flex (Life Technologies) с использованием следующих параметров: 50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 10 минут, 40 циклов по 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 1 минуты.

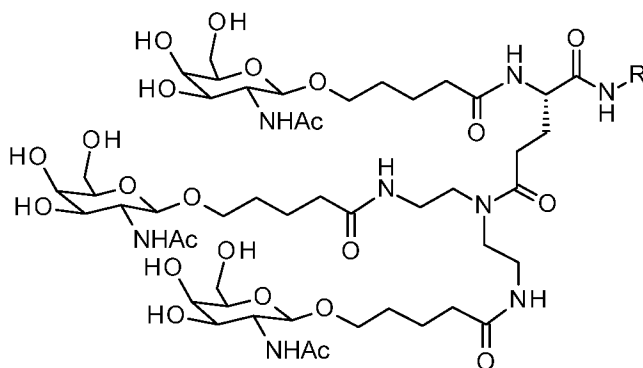
Результаты анализа РВ-ПЦР для следующих мышинных генов-мишеней HPRT, LDHA и DPP4 (Life Technologies) и расчеты IC₅₀ показаны в таблице 8. Уровни выключения представляют собой относительный нокдаун по сравнению с одной средой-носителем и далее нормализуются по мышинному Rplp0 (Life Technologies) для сравнения между образцами. IC₅₀ рассчитывали с использованием 4-параметрической модели с использованием XLFit. Данные результаты демонстрировали эффективный нокдаун фрагмента доставки, описанный в данном документе, с 80-97% нокдауном трех различных генов.

Таблица 8 - Данные IC₅₀ и максимального процента нокдауна в первичных гепатоцитах мыши с миРНК, конъюгированными с новым фрагментом доставки, содержащим GalNAc, раскрытым в настоящем документе

Пример	Идентификатор дуплекса	IC ₅₀ (нМ)	Макс. нокдаун (%)
7	HPRT-GalNAc1	1,9	97,17
8	LDHA-GalNAc1	6,03	99,54
9	DPP4-GalNAc1	4,79	81,8

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее формулу I, конъюгированное с R:



5

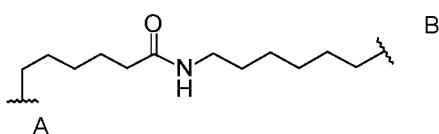
Формула I;

где R необязательно конъюгирован с формулой I посредством линкера, и где R содержит антисмысловую нить, и при этом антисмысловая нить содержит область комплементарности к представляющему интерес гену, и при этом антисмысловая нить имеет длину от 15 до 40 нуклеотидов.

10

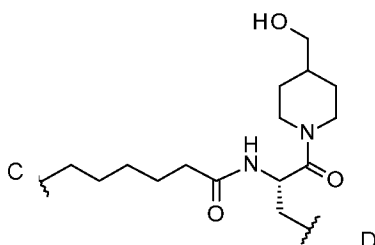
2. Соединение по п. 1, в котором формула I конъюгирована с R посредством линкера.
3. Соединение по п. 2, в котором линкер включает линкер формулы II, имеющий точки присоединения A и B, или линкер содержит формулу III, имеющую точки присоединения C и D:

15



Формула II;

или

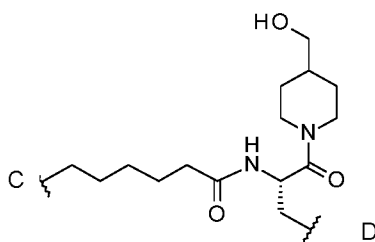


Формула III:

20

где точка присоединения A или точка присоединения C конъюгированы с формулой I.

4. Соединение по п. 2 или п. 3, в котором линкер дополнительно содержит фосфатную группу в точке присоединения В или точке присоединения D, и при этом фосфатная группа конъюгирована с R.
5. Соединение по любому из пп. 2–4, в котором линкер включает линкер формулы III, имеющий точки присоединения С и D:



Формула III:

где точка присоединения С конъюгирована с формулой I.

6. Соединение по любому из пп. 1–5, в котором область комплементарности к представляющему интерес гену имеет длину по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов.
7. Соединение по любому из п. 6, в котором R дополнительно содержит смысловую нить, и при этом смысловая нить и антисмысловая нить образуют область комплементарности по меньшей мере из 15 нуклеотидов.
8. Соединение по п. 7, в котором формула I конъюгирована с смысловой нитью или антисмысловой нитью.
9. Соединение по п. 7 или п. 8, в котором формула I конъюгирована с антисмысловой нитью.
10. Соединение по п. 7 или п. 8, в котором формула I конъюгирована со смысловой нитью.
11. Соединение по п. 10, в котором формула I конъюгирована с 3'-концевым нуклеотидом смысловой нити.
12. Соединение по любому из пп. 7-11, в котором смысловая нить и антисмысловая нить образуют область комплементарности длиной по меньшей мере 18 нуклеотидов.
13. Соединение по любому из пп. 7-12, в котором антисмысловая нить образует со смысловой нитью область комплементарности длиной по меньшей мере 15 нуклеотидов.
14. Соединение по любому из пп. 7–13, в котором каждая смысловая нить и антисмысловая нить имеет длину от 18 до 23 нуклеотидов.

15. Соединение по любому из пп. 7-14, в котором каждая смысловая нить и антисмысловая нить имеет длину от 21 до 23 нуклеотидов.
16. Соединение по любому из пп. 7-15, в котором антисмысловая цепь содержит 3'-выступ из двух нуклеотидов.
- 5 17. Соединение по любому из пп. 7-16, в котором смысловая нить или антисмысловая нить содержит один или более модифицированных нуклеотидов.
18. Соединение по любому из пп. 7-17, в котором один или более модифицированных нуклеотидов представляют собой модифицированный 2'-фтором нуклеотид, модифицированный 2'-О-метилом нуклеотид, модифицированный 2'-О-алкилом нуклеотид или модифицированный О-метоксиэтилом нуклеотид.
- 10 19. Соединение по любому из пп. 7-18, в котором смысловая нить содержит один или более модифицированных нуклеотидов, и при этом каждый из нуклеотидов смысловой нити представляет собой модифицированный нуклеотид.
20. Соединение по любому из пп. 7-19, в котором антисмысловая нить содержит один или более модифицированных нуклеотидов, и при этом каждый из нуклеотидов антисмысловой нити представляет собой модифицированный нуклеотид.
- 15 21. Соединение по любому из пп. 7-20, в котором смысловая или антисмысловая нить содержит одну или более модифицированных межнуклеотидных связей.
22. Соединение по любому из пп. 7-21, в котором одна или более модифицированных межнуклеотидных связей представляют собой фосфоротиоатную связь.
- 20 23. Соединение по любому из пп. 7-22, в котором 5'-нуклеотид антисмысловой нити фосфорилирован или содержит аналог фосфата.
24. Соединение по любому из пп. 7-23, в котором 5'-нуклеотид антисмысловой нити содержит винилфосфонатную группу.
- 25 25. Соединение по любому из пп. 7-24, в котором смысловая нить и антисмысловая нить представляют собой миРНК.