

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490958 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.24

(51) Int. Cl. C07D 498/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.24

(54) НОВЫЕ ЛИПИДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ СЕГМЕНТОВ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(31) 63/271,960

(72) Изобретатель:

(32) 2021.10.26

Линдфорс Леннарт (SE), Улкоски
Дэвид, Кришнамурти Венката Р. (US)

(33) US

(86) PCT/IB2022/060200

(74) Представитель:

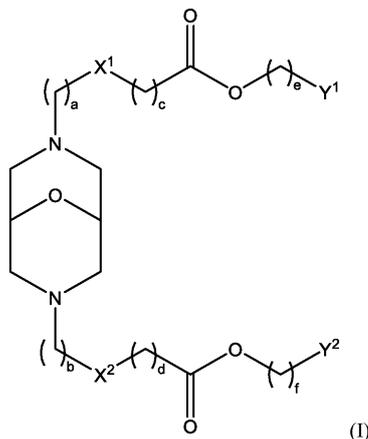
(87) WO 2023/073534 2023.05.04

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(71) Заявитель:

АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

(57) В данном документе раскрыты соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, где X¹, Y¹, X², Y², a, b, c, d, e и f определены в настоящем документе. Также раскрыты липидные наночастицы, содержащие соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль; фармацевтические составы, содержащие множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или их фармацевтически приемлемую соль и сегмент нуклеиновой кислоты; а также способы доставки сегмента нуклеиновой кислоты, включающие введение множества липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и сегмент нуклеиновой кислоты.



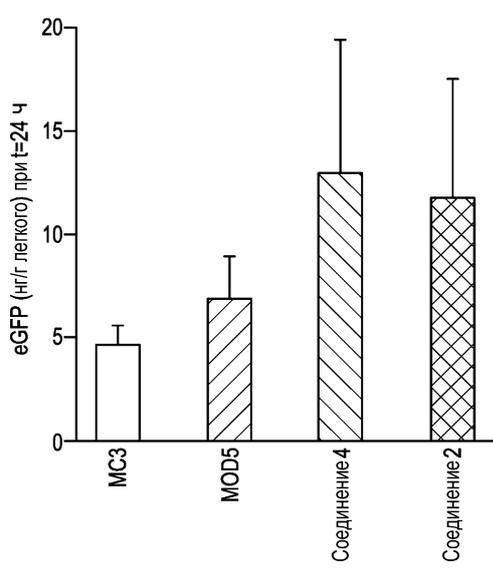
(I)

A1

202490958

202490958

A1



НОВЫЕ ЛИПИДЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ СЕГМЕНТОВ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 63/271960, поданной 26 октября 2021 г., которая включена в данный документ в полном объеме ссылкой для всех целей.

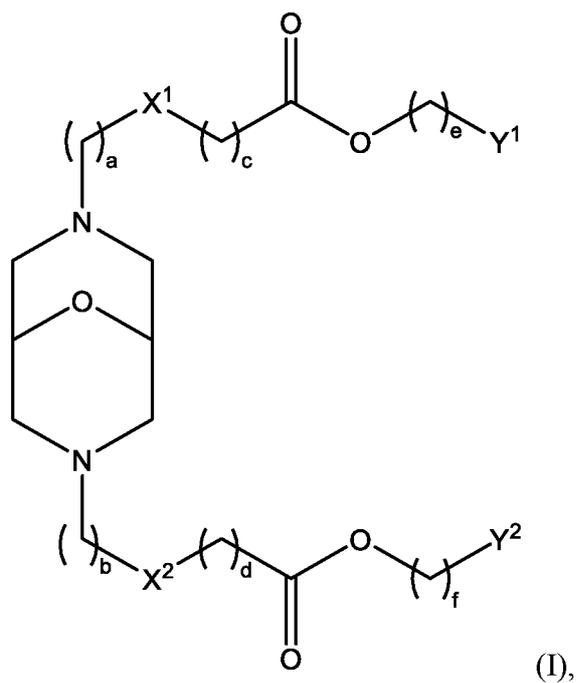
Уровень техники

Сегменты нуклеиновой кислоты, такие как олигонуклеотиды (например, РНК, например, матричные РНК [мРНК] и небольшие интерферирующие РНК [миРНК], антисмысловые олигонуклеотиды [АСО] и ДНК), имеют широкий потенциал в качестве новых терапевтических методов лечения различных заболеваний и расстройств. Тем не менее, существуют нерешенные проблемы, связанные с применением олигонуклеотидных препаратов. Типичные препараты включают инкапсуляцию олигонуклеотида в липидную наночастицу (ЛНЧ). ЛНЧ-составы обычно включают (а) ионизируемый или катионный липидный или полимерный материал, содержащий третичный или четвертичный амин для инкапсуляции полианионной мРНК; (b) цвиттерионный липид, подобный липидам в клеточной мембране; (с) холестерин для стабилизации липидного бислоя ЛНЧ; и (d) полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липид для придания наночастице гидратирующего слоя, улучшения коллоидной стабильности и снижения абсорбции белка. (См. Kowalski и др., *Molecular Therapy*, 27(4), (2019), 710-728).

В 2018 году FDA одобрило первую РНК-интерференционную терапию - патисиран - для лечения полинейропатии у людей с наследственным транстиретиновым амилоидозом, доставку которого осуществляют внутривенно с использованием ЛНЧ, включающей ионизируемый липид (DLin-МС3-DMA, [МС3]). МС3, однако, может быть не наиболее подходящим для всех систем доставки, в зависимости от целевого органа, предполагаемого пути доставки и требуемого терапевтического окна. В ходе исследований на двух токсикологических испытательных видах - крысах и обезьянах - была зарегистрирована дозолимитирующая токсичность, которая была связана с рецептурой ЛНЧ на основе МС3, а не с доставляемым препаратом. (См. Sedic и др., *Vet. Pathol.* 55(2), (2018), 341-354). В последнее время технология липидных наночастиц также успешно применяется для получения первых одобренных продуктов мРНК для профилактической вакцинации против вируса SARS-COV-2 (см., например, L. Schoenmaker и др., *International Journal of Pharmaceutics*, 601, (2021), May 120586). Тем не менее, есть необходимость в разработке новых ионизируемых липидов для использования в липидных наночастицах для доставки олигонуклеотидных терапевтических средств.

Сущность изобретения

В некоторых вариантах осуществления раскрыто соединение формулы (I):



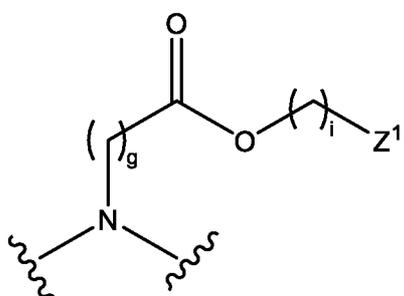
или его фармацевтически приемлемая соль, где

каждый a и b независимо принимают значения 3, 4 или 5;

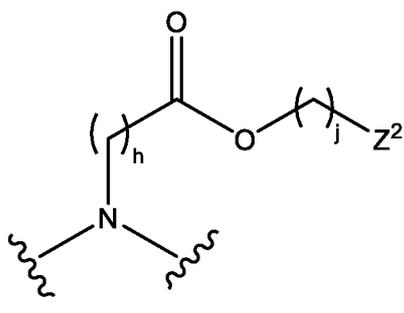
каждый c и d независимо принимают значения 1, 2 или 3;

каждый e и f независимо принимают значения 0, 1 или 2;

X^1 представляет собой метилен или



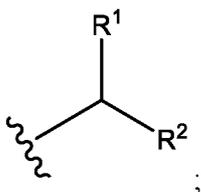
X^2 представляет собой метилен или



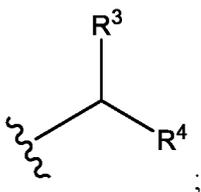
каждый g и h независимо представляют собой 1, 2 или 3;

каждый i и j независимо представляют собой 0, 1 или 2;

каждый Y^1 и Y^2 независимо представляют собой неразветвленный алкил C_{7-10} , неразветвленный алкенил C_{7-10} или



каждый Z^1 и Z^2 независимо представляют собой неразветвленный алкил C_{7-10} , неразветвленный алкенил C_{7-10} или



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} ; и
каждый R^3 и R^4 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

В некоторых вариантах осуществления раскрыта липидная наночастица, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт фармацевтический состав, содержащий множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и сегмент нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтического состава, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт фармацевтический состав, как описано в данном документе, для применения в лечении заболевания или расстройства.

Краткое описание графических материалов

На **ФИГ. 1** показана экспрессия eGFP в легких у крыс через 24 часа после внутритрахеального введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, MOD5, соединение 4 и соединение 2.

На **ФИГ. 2** показана концентрация БАЛ нейтрофила в БАЛ (бронхоальвеолярном лаваже) крысы через 24 часа после введения в организм рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, MOD5, соединение 4 и соединение 2.

На **ФИГ. 3** показана экспрессия eGFP в легких у крыс через 24 часа после внутритрахеального введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ и соединение 1.

На **ФИГ. 4** показана концентрация БАЛ нейтрофила в БАЛ крысы через 24 часа после введения в организм рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ и соединение 1.

На **ФИГУРАХ 5А** и **5В** показана экспрессия eGFP по результатам ИГХ в обоих макрофагах и эпителиальных клетках типа 1 после внутритрахеального введения рецептур ЛНЧ, содержащих соединение 1.

На **ФИГ. 6** показан уровень eGFP в легких у крыс через 5 и 24 часа после ингаляционного введения рецептуры ЛНЧ, содержащей соединение 1.

На **ФИГ. 7** показана концентрация БАЛ нейтрофила в БАЛ крысы через 24 часа после ингаляционного введения в организм рецептур ЛНЧ, содержащих соединение 1.

На **ФИГ. 8** показана экспрессия eGFP в печени мыши через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

На **ФИГ. 9** показана экспрессия eGFP в селезенке мыши через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

На **ФИГ. 10** показана экспрессия eGFP в легких мыши через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

На **ФИГ. 11** показана экспрессия eGFP в почке мыши через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

На **ФИГ. 12** показана экспрессия eGFP в сердце мыши через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

На **ФИГ. 13** показана экспрессия белка люциферазы в печени мыши через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

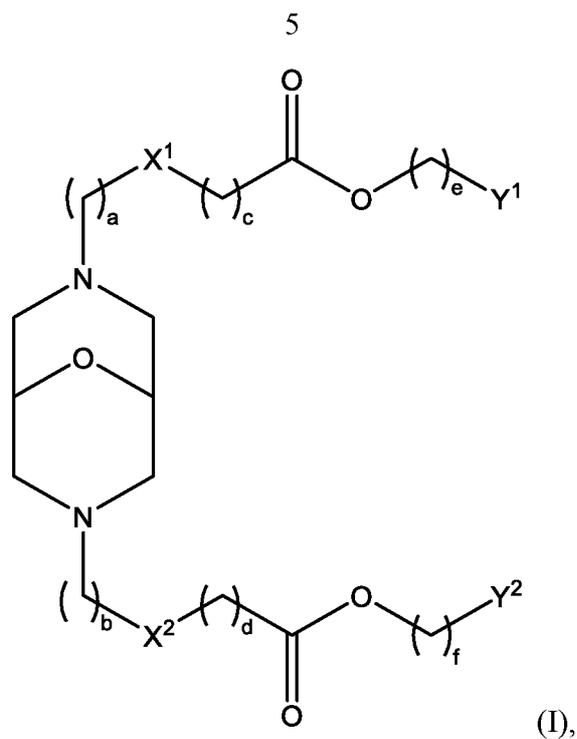
На **ФИГ. 14** показаны изображения IVIS (система визуализации *in vivo*) сердца, легких, селезенки и печени мышей через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2, соединение 3.

На **ФИГ. 15** показана концентрация белка hEP0 в плазме крови мыши через 6 часов после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

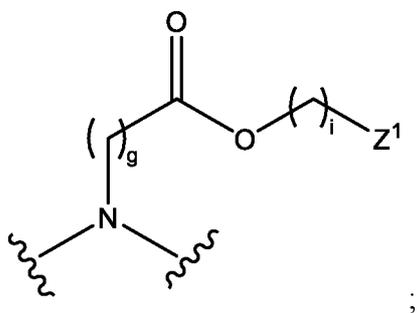
На **ФИГ. 16** показана средняя экспрессия Luc в коре головного мозга и стриатуме у LoxP Luc-репортерной мыши после введения в стриатум рецептур ЛНЧ, содержащих MOD5 и соединение 5.

Подробное описание

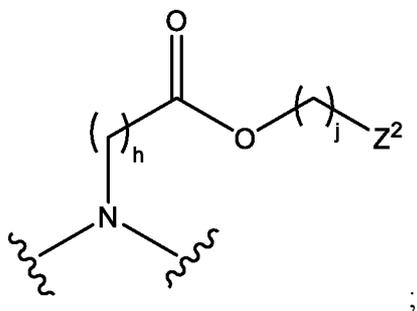
В некоторых вариантах осуществления раскрыто соединение формулы (I):



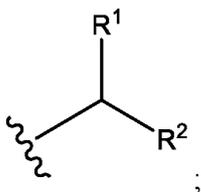
или его фармацевтически приемлемая соль, где
 каждый a и b независимо принимают значения 3, 4 или 5;
 каждый c и d независимо принимают значения 1, 2 или 3;
 каждый e и f независимо принимают значения 0, 1 или 2;
 X¹ представляет собой метилен или



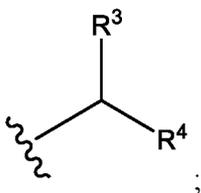
X² представляет собой метилен или



каждый g и h независимо представляют собой 1, 2 или 3;
 каждый i и j независимо представляют собой 0, 1 или 2;
 каждый Y¹ и Y² независимо представляют собой неразветвленный алкил C₇₋₁₀,
 неразветвленный алкенил C₇₋₁₀ или



каждый Z^1 и Z^2 независимо представляют собой неразветвленный алкил C_{7-10} ,
неразветвленный алкенил C_{7-10} или



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} ; и
каждый R^3 и R^4 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

В некоторых вариантах осуществления формулы (I), X^1 и X^2 представляют собой метилен.

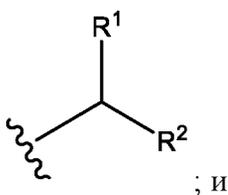
В некоторых вариантах осуществления формулы (I), оба a и b принимают значения 4, а оба c и d равны 2.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) оба e и f равны 0.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I),

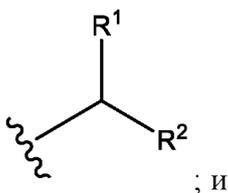
Y^1 представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} или неразветвленный алкенил C_{7-10} ;

Y^2 представляет собой



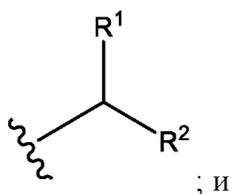
каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) каждый Y^1 и Y^2 независимо представляют собой



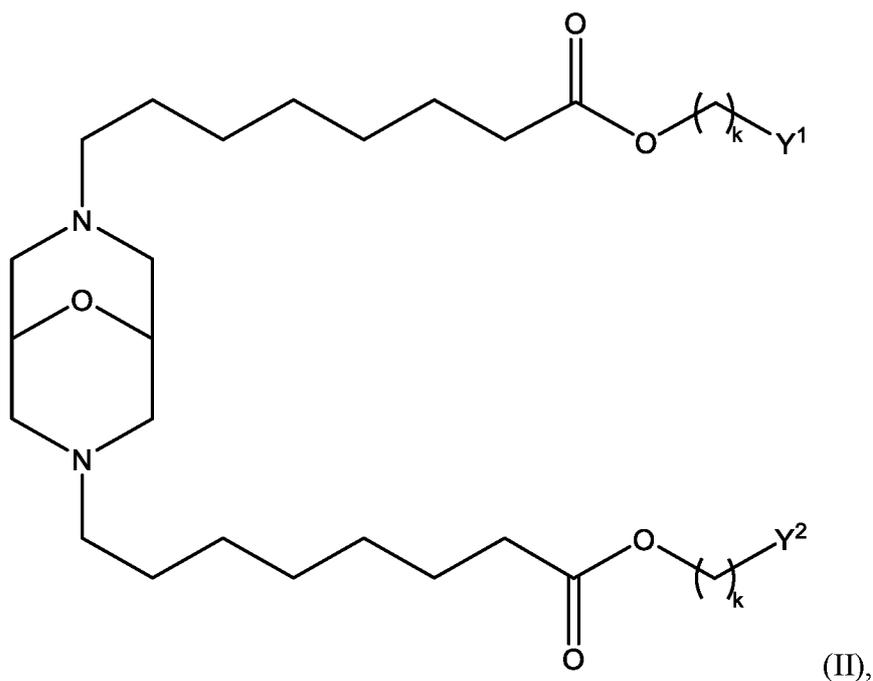
каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) каждый e и f независимо принимают значения 1 или 2. В некоторых других вариантах осуществления формулы (I) каждый Y^1 и Y^2 независимо принимают значения



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (II):

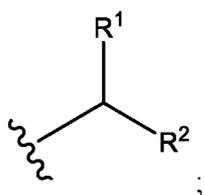


где

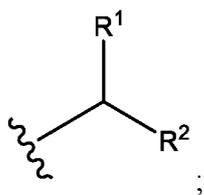
k принимает значения 0, 1 или 2;

Y^1 представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} , неразветвленный алкенил C_{7-10}

или



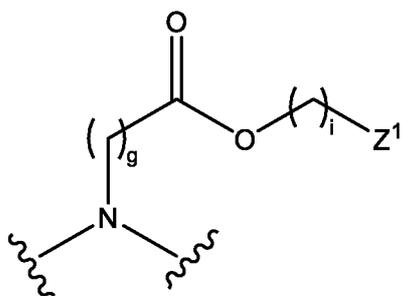
Y^2 представляет собой



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

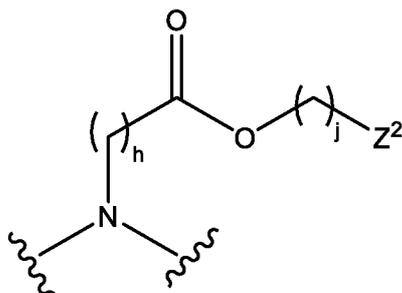
В некоторых вариантах осуществления формулы (I),

X^1 представляет собой



; и

X^2 представляет собой



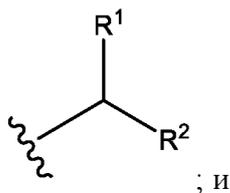
В некоторых вариантах осуществления формулы (I), оба a и b принимают значения 4, а оба c и d равны 2.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) каждый e и f независимо принимают значения 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) оба g и h равны 2.

В некоторых вариантах формулы (I) оба i и j равны 1.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) каждый Y^1 и Y^2 независимо представляют собой



; и

каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой гептадекан-9-ил-8-(7-(8-(нонилокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой гептадекан-9-ил-(Z)-8-(7-(8-(нон-2-ен-1-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой 3-гептилдодецил-8-(7-(8-((3-октилдecil)окси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой ди(гептадекан-9-ил)-8,8'-((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)диоктаноат или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой тетракис(2-октилдецил)-3,3',3'',3'''-((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил)бис(азанетриил))тетрапропионат или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой гептадекан-9-ил-8-(7-(8-(нонилокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой гептадекан-9-ил-(Z)-8-(7-(8-(нон-2-ен-1-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой 3-гептилдодецил-8-(7-(8-((3-октилундecil)окси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат.

В некоторых вариантах осуществления соединением формулы (I) представляет собой ди(гептадекан-9-ил)-8,8'-((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)диоктаноат.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой тетракис(2-октилдецил)-3,3',3'',3'''-((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил)бис(азанетриил))тетрапропионат.

В данном контексте термин «C_{i-j}» указывает на диапазон числа атомов углерода, где *i* и *j* являются целыми числами, а диапазон числа атомов углерода включает конечные точки (т.е. *i* и *j*) и каждую целую точку между ними, и где *j* больше, чем *i*. Например, C₇₋₁₀ указывает на диапазон от семи до десяти атомов углерода, включая семь атомов углерода, восемь атомов углерода, девять атомов углерода и десять атомов углерода.

Применяемый в данном документе термин «алкил», либо как часть другого термина, либо при использовании независимо, относится к насыщенную углеводородную цепь. В одном варианте осуществления упомянутая выше насыщенная углеводородная цепь представляет собой неразветвленный алкил, в котором атомы углерода соединены в одну непрерывную цепь без ответвлений. Термин «C_{i-j} алкил» относится к алкилу, содержащему от *i* до *j* атомов углерода. Например, алкил C₇₋₁₀ относится к алкилу, содержащему от 7 до 10 атомов углерода.

Используемый здесь термин «алкенил», как в составе другого термина, так и используемый независимо, относится к ненасыщенной углеводородной цепи, содержащей

по меньшей мере одну двойную связь. В одном варианте осуществления упомянутая выше ненасыщенная углеводородная цепь представляет собой неразветвленный алкенил, в котором атомы углерода соединены в одну непрерывную цепь без ответвлений. Термин «С_i-j алкенил» относится к алкенилу с числом атомов углерода от i до j. Например, алкенил C₇₋₁₀ относится к алкенилу, содержащему от 7 до 10 атомов углерода. В одном варианте осуществления алкенильная группа C₇₋₁₀ содержит одну двойную связь.

В некоторых вариантах осуществления раскрыто соединение формулы (I). В некоторых вариантах осуществления раскрыта фармацевтически приемлемая соль соединения формулы (I). Термин «фармацевтически приемлемая соль» включает соли присоединения кислоты, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединения формулы (I), и которые обычно не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения. Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут образовываться с помощью неорганических кислот и органических кислот, например, ацетатная, аспартатная, бензоатная, безилатная, бромидная/гидробромидная, бикарбонатная/карбонатная, бисульфатная/сульфатная, камфорсульфонатная, хлоридная/гидрохлоридная, хлортеофиллонатная, цитратная, этандисульфонатная, фумаратная, глюцептатная, глюконатная, глюкуронатная, гиппуратная, гидройодидная/йодидная, изотионатная, лактатная, лактобионатная, лаурилсульфатная, малатная, малеатная, малонатная, манделатная, мезилатная, метилсульфатная, нафтоатная, напсилатная, никотинатная, нитратная, октадеcanoатная, олеатная, оксалатная, пальмитатная, пальмоатная, фосфатная/гидрофосфатная/дигидрофосфатная, полигалактуронатная, пропионатная, стеаратная, сукцинатная, субсалицилатная, сульфатная/гидросульфатная, тартратная, тозилатная и трифторацетатная соли. Неорганические кислоты, из которых можно получать соли, включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. Органические кислоты, из которых можно получать соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, трифторуксусную кислоту, сульфосалициловую кислоту и т. п.

В некоторых вариантах осуществления раскрыты липидные наночастицы (ЛНЧ), содержащие соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления раскрыты липидные наночастицы (ЛНЧ),

содержащие соединения формулы (I). Термин «липидная наночастица» включает в себя наноструктурное электронно-плотное ядро, полученное путем микрофлюидного смешивания липидосодержащих растворов в этаноле с водными растворами. Липидные наночастицы, раскрываемые в настоящем документе, могут быть изготовлены из любых материалов, используемых в традиционной технологии наночастиц, например, ионизируемых липидов, нейтральных липидов, стероидов и полимер-конъюгированных липидов, при условии, что суммарный заряд наночастицы равен примерно нулю.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) представляет собой ионизируемый липид, подходящий для липидных наночастиц. Другие неограничивающие примеры ионизируемых липидов, которые можно сочетать с соединением формулы (I) в липидной наночастице, включают, например, липиды, содержащие положительный заряд в кислотной шкале физиологического диапазона pH, например 1,2-дидолилеил-3-диметиламинопропан (DLin-DMA), дидолилеилметил-4-диметиламинобутират (DLin-MC3-DMA, (см., например, патент США № 8158601), 2-дидолилеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-KC2-DMA) Merck-32 (см., например, WO 2012/018754), Acuitas-5 (см., например, WO 2015/199952), KL-10 (см., например, публикацию заявки на патент США 2012/0295832), C12-200 (см., например, К.Т. Love и др., PNAS, 107: 1864 (2009)) и тому подобное. Содержание ионизируемых липидов может быть в пределах от примерно 5% до примерно 90%, например, от примерно 10% до примерно 80%, например, от примерно 25% до примерно 75%, например, от примерно 40% до примерно 60%, от примерно 40% до примерно 50%. например, примерно 45% или примерно 50%, молярных процентов от общего содержания липидов в липидных наночастицах.

Термин «нейтральный липид» включает липиды, которые имеют нулевой заряд при физиологическом pH, например, липиды, которые существуют в незаряженной форме или нейтральной цвиттерионной форме при физиологическом pH, такие как дистеароил-фосфатидилхолин (DSPC), диолеоил-фосфатидилэтанолламин (DOPE), дипальмитоил-фосфатидилхолин (DPPC), димиристоил-фосфатидилхолин (DMPC) и т.п. и их комбинации. Содержание нейтральных липидов может быть в пределах от примерно 1% до примерно 50%, например, от примерно 5% до примерно 20%, например, от 7,5% до примерно 12,5%, например, примерно 10% молярных процентов от общего содержания липидов в липидных наночастицах. В некоторых вариантах осуществления нейтральным липидом является DSPC. В некоторых вариантах осуществления нейтральным липидом является DOPE. В некоторых вариантах осуществления нейтральным липидом является DPPC. В некоторых вариантах осуществления нейтральным липидом является DMPC.

Термин «стерин» включает холестерин и тому подобное. Содержание стерина может быть в пределах от примерно 10% до примерно 90%, например, от примерно 20% до примерно 50%, например, примерно 35%-45%, например, примерно 38,5% молярных процентов от общего содержания липидов в липидных наночастицах. В некоторых вариантах осуществления стерином является холестерин.

Термин «полимер-конъюгированный липид» включает липиды, которые содержат липидную часть и полимерную часть, такие как пегилированные липиды, содержащие как липидную часть, так и полиэтиленгликольную часть. Неограничивающие примеры включают димиристоил-фосфатидилэтаноламин-поли (этиленгликоль) 2000 (DMPE-PEG2000), DPPE-PEG2000, DMG-PEG2000, DPG-PEG2000, PEG2000-с-DOMG, PEG2000-с-DOPG и тому подобное. Подходящая для применения молекулярная масса поли(этиленгликоля) может быть в пределах от примерно 500 и примерно 10000 Да или от примерно 1000 до примерно 5000 Да. В некоторых вариантах осуществления полимер-конъюгированным липидом является DMPE-PEG2000. В некоторых вариантах осуществления полимер-конъюгированным липидом является DPPE-PEG2000. В некоторых вариантах осуществления полимер-конъюгированным липидом является DMG-PEG2000. В некоторых вариантах осуществления полимер-конъюгированным липидом является DPG-PEG2000. В некоторых вариантах осуществления полимер-конъюгированным липидом является PEG2000-с-DOMG. В некоторых вариантах осуществления полимер-конъюгированным липидом является PEG2000-с-DOPG. Содержание полимер-конъюгированных липидов может быть в пределах от примерно 0% до примерно 20%, например, от примерно 0,5% до примерно 5%, например, от 1% до примерно 2%, например, примерно 1,5% молярного процента от общего содержания липидов в липидных наночастицах.

По меньшей мере в одном варианте осуществления настоящего изобретения липидные наночастицы можно получать путем объединения нескольких липидных компонентов. Например, липидные наночастицы можно получать, объединяя соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стерин, нейтральный липид и полимер-конъюгированный липид в молярном соотношении 50:40-х:10:х, относительно общего содержания липидов. Например, липидные наночастицы можно получать, объединяя соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стерин, нейтральный липид и полимер-конъюгированный липид в молярном соотношении 50:37:10:3 (моль/моль), или, например, молярном соотношении 50:38.5:10:1,5 (моль/моль), или, например, 50:39.5:10:0,5 (моль/моль), или 50:39.75:10:0,25 (моль/моль).

В другом варианте осуществления липидную наночастицу можно получать, используя соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стерин (такой как холестерин), нейтральный липид (такой как DSPC) и полимер-конъюгированный липид (такой как DMPE-PEG2000) в молярном соотношении примерно 50:38,5:10:1,5 (моль/моль) относительно общего содержания липидов. Еще одним неограничивающим примером является липидная наночастица, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стерин (такой как холестерин), нейтральный липид (такой как DSPC) и полимер-конъюгированный липид (такой как DMPE-PEG2000) в молярном соотношении примерно 47,7:36,8:12,5:3 (моль/моль) относительно общего содержания липидов. Еще одним неограничивающим примером является липидная наночастица, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стерин (такой как холестерин), нейтральный липид (такой как DSPC) и полимер-конъюгированный липид (такой как DMPE-PEG2000) в молярном соотношении примерно 52,4:40,4:6,4:0,8 (моль/моль) относительно общего содержания липидов. В другом варианте осуществления неограничивающим примером является липидная наночастица, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стерин (такой как холестерин), нейтральный липид (такой как DSPC) и полимер-конъюгированный липид (такой как DMPE-PEG2000) в молярном соотношении примерно 53,5:41,2:4,6:0,7 (моль/моль) относительно общего содержания липидов. Еще одним неограничивающим примером является липидная наночастица, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, стерин (такой как холестерин), нейтральный липид (такой как DSPC) и полимер-конъюгированный липид (такой как DMPE-PEG2000) в молярном соотношении примерно 30:50:19:1 (моль/моль) относительно общего содержания липидов.

Выбор нейтральных липидов, стерин и/или полимер-конъюгированных липидов, которые содержат липидные наночастицы, а также относительное молярное соотношение таких липидов, может определяться характеристиками выбранного(-ых) липида(-ов), характером предполагаемых клеток-мишеней и характеристиками сегмента нуклеиновой кислоты, подлежащего доставке. Например, в некоторых вариантах осуществления молярный процент соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли в липидной наночастице может быть больше, чем примерно 10%, больше, чем примерно 20%, больше, чем примерно 30%, больше, чем примерно 40%, больше, чем примерно 50%, больше, чем примерно 60% или больше, чем примерно 70% от общего содержания липидов. Молярный процент нейтрального липида в липидной наночастице может быть больше, чем примерно 5%, больше, чем примерно 10%, больше, чем примерно 20%,

больше, чем примерно 30% или больше, чем примерно 40% от общего содержания липидов. Молярный процент стерина в наночастице может быть больше, чем примерно 10%, больше, чем примерно 20%, больше, чем примерно 30% или больше, чем примерно 40% от общего содержания липидов. Молярный процент полимер-конъюгированного липида в липидной наночастице может быть больше, чем примерно 0,25%, например, больше, чем примерно 1%, больше, чем примерно 1,5%, больше, чем примерно 2%, больше, чем примерно 5% или больше, чем примерно 10% от общего содержания липидов.

Согласно настоящему раскрытию, липидные наночастицы могут содержать каждое из следующего: соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, нейтральные липиды, стерин и/или полимер-конъюгированные липиды в любой желаемой полезной ориентации. Например, ядро наночастицы может содержать соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, отдельно или в сочетании с другим ионизируемым липидом, стерин и один или несколько слоев, содержащих нейтральные липиды и/или полимер-конъюгированные липиды, могут затем окружать ядро. Например, согласно одному варианту осуществления, ядро липидной наночастицы может содержать ядро, содержащее соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, и стерин (например, холестерин) в любом определенном соотношении, окруженный нейтральным липидным монослоем (например, DSPC) любой определенной толщины, дополнительно окруженный внешним полимер-конъюгированным липидным монослоем любой определенной толщины. В таких примерах сегмент нуклеиновой кислоты может быть включен либо в ядро, либо в последующие слои в зависимости от характера предполагаемых клеток-мишеней и характеристик сегмента нуклеиновой кислоты, подлежащего доставке. Ядро и внешние слои могут дополнительно содержать другие компоненты, обычно включаемые в липидные наночастицы, известные в данной области техники. Кроме того, специалисту в данной области техники понятно, что липосомы являются носителями для доставки и имеют структуру везикулы, которая отличается от липидных наночастиц, как описано в настоящем документе. Везикулы липосомы состоят из липидного бислоя, который принимает форму полый сферы, охватывающей водную фазу. Например, липосомы содержат пластинчатую фазу, в то время как структуры липидных наночастиц непластинчатые.

Кроме того, молярный процент компонентов липидной наночастицы (например, соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, нейтральных липидов, стерина, и/или полимер-конъюгированных липидов), которые содержат

липидные наночастицы, могут быть выбраны с целью обеспечить конкретный физический параметр общей липидной наночастицы, такой как площадь поверхности одного или нескольких липидов. Например, молярный процент соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, нейтральных липидов, стерина и/или полимер-конъюгированных липидов, которые содержат липидные наночастицы, могут быть выбраны для получения площади поверхности в расчете на нейтральный липид, например, DSPC. В качестве неограничивающего примера молярный процент соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, нейтральных липидов, стерина и/или полимер-конъюгированных липидов можно определять для получения площади поверхности в расчете на DSPC от примерно 1,0 нм² до примерно 2,0 нм², например, примерно 1,2 нм².

Согласно настоящему раскрытию, липидные наночастицы могут дополнительно содержать сегмент нуклеиновой кислоты, который может быть связан с поверхностью липидных наночастиц и/или инкапсулирован внутри тех же липидных наночастиц.

Термин «сегмент нуклеиновой кислоты» означает любой один или несколько сегментов нуклеиновой кислоты, выбранных из антисмысловых олигонуклеотидов, ДНК, мРНК, миРНК, комплекса Cas9-гидовая-РНК или их комбинации. Сегменты нуклеиновой кислоты в данном документе могут быть дикого типа или модифицированы. По крайней мере в одном варианте осуществления липидные наночастицы могут содержать множество разных сегментов нуклеиновой кислоты. В еще одном варианте осуществления сегмент нуклеиновой кислоты, дикого типа или модифицированный, кодирует полипептид, представляющий интерес. Модифицированный сегмент нуклеиновой кислоты включает сегменты нуклеиновой кислоты с химическими модификациями любой части структуры, выполненными таким образом, что сегмент нуклеиновой кислоты становится искусственным, т.е. не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления сегмент нуклеиновой кислоты представляет собой РНК. В некоторых вариантах осуществления сегмент нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК. В некоторых вариантах осуществления сегмент нуклеиновой кислоты представляет собой модифицированную мРНК.

Термин «терапевтически эффективное количество» в данном контексте относится к количеству сегмента нуклеиновой кислоты, которое достаточно для модуляции экспрессии белка в ткани-мишени и/или клеточном типе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество сегмента нуклеиновой кислоты представляет собой количество, достаточное для лечения заболевания или расстройства, которое связано с белком, экспрессируемым сегментом нуклеиновой кислоты.

По крайней мере в одном варианте осуществления массовое отношение общей липидной фазы к сегменту нуклеиновой кислоты находится в пределах от примерно 40:1 до примерно 1:1, например, примерно 10:1. Это соответствует примерно молярному соотношению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и мономера нуклеиновой кислоты в размере примерно 3:1. В еще одном примере массовое отношение общей липидной фазы к сегменту нуклеиновой кислоты находится в пределах от примерно 30:1 до примерно 1:1, например, примерно 20:1, что соответствует примерно молярному соотношению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и мономера нуклеиновой кислоты в размере примерно 6:1. Однако относительное молярное отношение липидной фазы и/или компонентов липидной фазы к мономеру нуклеиновой кислоты может зависеть от природы предполагаемых клеточных мишеней и характеристик сегмента нуклеиновой кислоты и, таким образом, не ограничиваться вышеуказанными вариантами осуществления. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли к мономеру нуклеиновой кислоты составляет от примерно 2,75:1 до 6:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли к мономеру нуклеиновой кислоты составляет примерно 2,75:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли к мономеру нуклеиновой кислоты составляет примерно 3:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли к мономеру нуклеиновой кислоты составляет примерно 5,5:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли к мономеру нуклеиновой кислоты составляет примерно 6:1.

В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы имеют z-средний диаметр частиц ($\langle d \rangle_z$) примерно 200 нм или меньше, например, меньше или равен примерно 100 нм или, например, меньше или равен примерно 75 нм. По меньшей мере, в одном варианте осуществления настоящего изобретения липидные наночастицы имеют z-средний диаметр частиц в пределах от примерно 50 нм до примерно 100 нм, например, от примерно 60 нм до примерно 90 нм, от примерно 70 нм до примерно 80 нм, например, примерно 75 нм.

В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы характеризуются эффективностью инкапсуляции (%EE) сегментов нуклеиновой кислоты примерно 80% или выше, например, выше, чем примерно 90%, например, в пределах от примерно 95% до

100%. В данном контексте термин «эффективность инкапсуляции» относится к соотношению инкапсулированного сегмента нуклеиновой кислоты в липидных наночастицах к общему содержанию сегмента нуклеиновой кислоты в составе липидных наночастиц, измеренному путем лизиса липидных наночастиц с использованием поверхностно-активного вещества (ПАВ), например, Triton X-100.

Фармацевтические составы настоящего раскрытия могут дополнительно содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает соединения, материалы, составы и/или лекарственные формы, которые по здравому медицинскому заключению пригодны для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

Фармацевтические составы могут быть в форме, подходящей для парентерального введения. Например, подходящее парентеральное введение включает, но не ограничивается этим, подкожное введение, внутримышечное введение и внутривенное введение. Фармацевтические составы могут быть в форме, подходящей для интратрахеальной инстилляцией, бронхиальной инстилляцией и/или ингаляцией. Фармацевтические жидкие составы можно распылять с применением инертных газов для ингаляции. Распыляемые суспензии приспособлены для вдыхания непосредственно из распыляющего устройства, или распыляющее устройство может быть прикреплено к маскам для лица или дыхательному аппарату с перемежающимся положительным давлением.

Количество сегмента нуклеиновой кислоты, которое комбинируется с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями для получения одной лекарственной формы, обязательно будет варьироваться в зависимости от субъекта, проходящего лечение, и конкретного пути введения. Для получения дополнительной информации о путях введения и режимах дозирования читатель отсылается к главе 25.3 в томе 5 «Comprehensive Medicinal Chemistry» (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990 г.

В одном варианте в настоящем раскрытии предложен способ введения субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтических составов, содержащих множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и терапевтически эффективное количество сегмента нуклеиновой кислоты.

Термин «субъект» включает теплокровных млекопитающих, например, приматов, коров, свиней, овец, собак, кошек, кроликов, крыс и мышей. В некоторых вариантах

осуществления субъектом является примат, например, человек. В некоторых вариантах осуществления субъект нуждается в лечении (например, субъект получит биологическую или медицинскую пользу от лечения).

Липидные наночастицы, раскрываемые в настоящем документе, могут также служить в качестве носителей для доставки лекарственных средств для селективной доставки сегментов нуклеиновой кислоты в клетки-мишени и целевые ткани, таких как антисмысловые олигонуклеотиды, ДНК, мРНК, миРНК, комплекс Cas9-гидовая-РНК. Таким образом, один вариант осуществления изобретения представляет собой способ доставки сегмента нуклеиновой кислоты в клетку, который включает приведение клетки в контакт *in vitro* или *in vivo* с фармацевтическим составом, содержащим множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и терапевтически эффективное количество сегмента нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления сегмент нуклеиновой кислоты модулирует экспрессию, например, путем увеличения или уменьшения экспрессии или путем повышения или понижения экспрессии полипептида.

В другом варианте осуществления предложен способ доставки терапевтически эффективного количества сегмента нуклеиновой кислоты субъекту, нуждающемуся в нем, включая введение субъекту фармацевтического состава, содержащего множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и терапевтически эффективное количество сегмента нуклеиновой кислоты.

Фармацевтические составы, содержащие множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и сегмент нуклеиновой кислоты, раскрываемый в данном документе, можно применять для лечения широкого спектра расстройств и заболеваний, характеризующихся недостаточной экспрессией полипептида у субъекта, сверхэкспрессией полипептида у субъекта и/или отсутствием/наличием полипептида у субъекта. Соответственно, раскрыты способы лечения субъекта, страдающего болезнью или расстройством, включающие введение субъекту фармацевтического состава, содержащего множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и терапевтически эффективное количество сегмента нуклеиновой кислоты.

Дополнительно раскрыто применение фармацевтического состава, содержащего множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и терапевтически эффективное количество сегмента нуклеиновой кислоты, для лечения заболевания или расстройства.

Дополнительно раскрыта фармацевтический состав для применения в лечении заболевания или расстройства, где фармацевтический состав содержит множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и терапевтически эффективное количество сегмента нуклеиновой кислоты.

Дополнительно раскрыты способы модулирования экспрессии белка в клетках, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтического состава, содержащего множество липидных наночастиц, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую ее соль и сегмент нуклеиновой кислоты. По крайней мере в одном варианте осуществления экспрессия белка может быть увеличена примерно в 2 раза в продолжение вплоть до 24 часов. В другом варианте осуществления экспрессия белка может быть увеличена примерно в 3 раза в продолжение вплоть до 72 часов.

Примеры

Общие способы

¹H ЯМР: 300 МГц; датчик: 5 мм широкополосный жидкостный датчик BBFO с ATM+Z PABBO BB-1H/D; магнит: ULTRASHIELD™ 300; прибор: AVANCE III 300; автоматический пробоотборник: SampleXpress™ 60; программное обеспечение: TopSpin 3. 400 МГц; датчик: 5 мм широкополосный жидкостный датчик BBFO с ATM+Z PABBO BB-1H/D; магнит ASCEND™ 400; прибор AVANCE III 300; автоматический пробоотборник SampleXpress™ 60; программное обеспечение: TopSpin 3. Все спектры были откалиброваны с TMS в качестве внутреннего опорного значения.

¹H ЯМР: 500 МГц; датчик: Датчик Bruker SMART 5 мм с ATM+Z PABBO 500S1-BBF-H-D; магнит: ASCEND™ 500; Консоль: AVANCE Neo 500; автоматический пробоотборник: SampleXpress™ 60; программное обеспечение: TopSpin 4. Протонные химические сдвиги выражены в миллионных долях (ppm или м.д., δ шкала) относительно остаточного протия в ЯМР растворителе (хлороформ-*d*: δ 7,26, Метанол-*d*4: δ 3,31, DMSO-*d*6: Δ 2,50).

Данные представлены следующим образом: Химический сдвиг, множественность (s = синглет, d = дублет, t = триплет, q = квартет, dd = дублет дублетов, dt = дублет триплетов, m = мультиплет, br = широкий, app = кажущийся), интеграция, и константа взаимодействия (*J*) в герцах (Гц).

ЖХ-МС: Прибор Shimadzu LCMS-2020 в сочетании с детектором DAD, детектором ELSD и 2020EV MC; колонка Shim-pack XR-ODS C18 (50 x 3,0 мм, 2,2 мкм); элюент А вода (0,05% TFA), элюент В MeCN (0,05% TFA); градиент 5-95% В за 2,00 мин, выдержка 0,70 мин (метод А) или 60-95% В за 1,00 мин, выдержка 1,70 мин (метод В); расход 1,20

мл/мин; обнаружение с помощью фотодиодной матрицы (PDA) (SPD-M20A) 190-400 нм. Масс-спектрометр в режиме ESI (электрораспылительная ионизация).

СВЭЖХ-МС проводили с использованием масс-спектрометра Waters Acquity UPLC и Waters SQD (температура колонки 30°C, УФ-обнаружение = 210-400 нм, масс-спектр. = ESI с положительным/отрицательным переключением) с расходом 1 мл/мин с градиентом растворителя от 2 до 98% В за 1,5 мин (общее время работы с уравниванием обратно к исходным условиям 2 мин), где А = 0,1% муравьиной кислоты в воде и В = 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (для работы с кислотами) или А = 0,1% гидроксида аммония в воде и В = ацетонитрил (для работы с основаниями). Для анализа кислот использовали колонку Waters Acquity HSS Т3, 1,8 мм, 2,1 x 30 мм, для анализа оснований использовали колонку с Waters Acquity ВЕН С18, 1,7 мм, 2,1 x 30 мм.

ВЭЖХ: Прибор Shimadzu LCMS-2020 в сочетании с детектором DAD, детектором CAD; колонка Ascentis Express C18 (100 x 4,6 мм), 2,7 мкм; подвижная фаза А вода (0,05% TFA), подвижная фаза В MeCN; градиент 10-95% В за 4,00 мин, выдерживание 8 мин или, как указано, расход 1,50 мл/мин; чистота выражена как % площади.

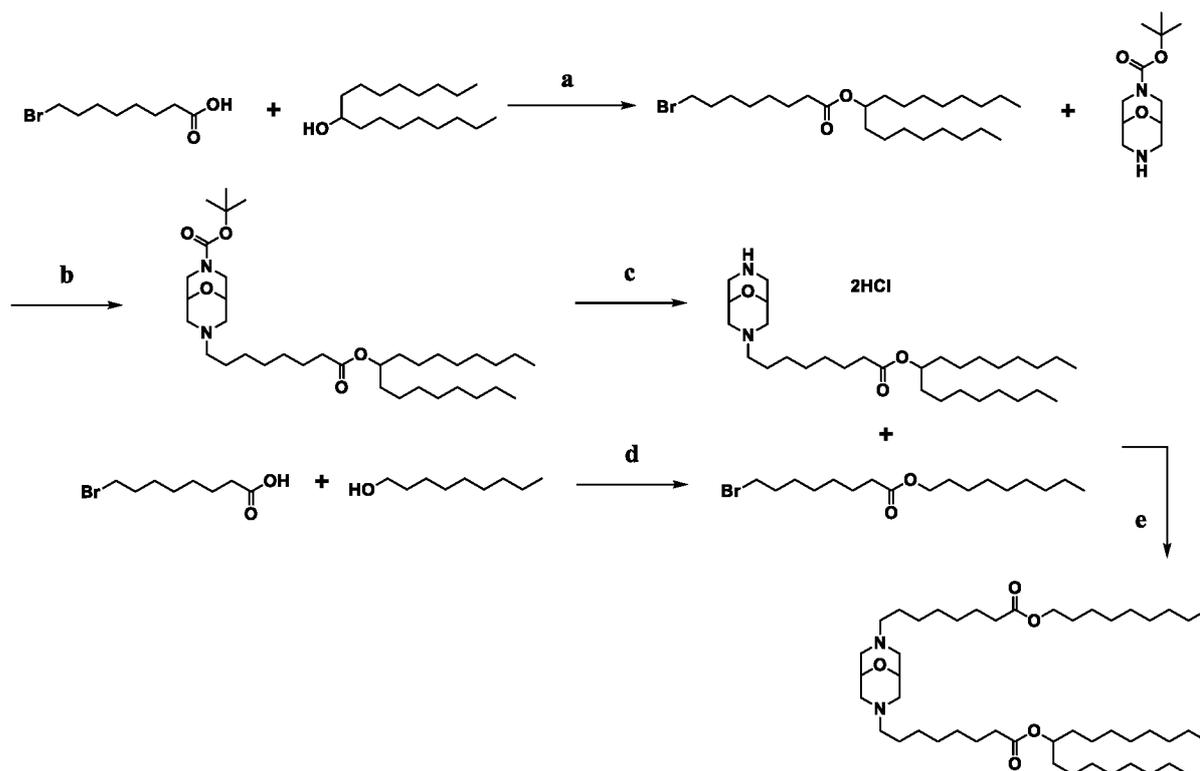
Препаративная ВЭЖХ: прибор с бинарным градиентным модулем Waters 2545, пробоотборником Waters 2767, детектор УФ/видимый диапазон Waters 2489, детектор 2 Waters SQ. Метод А: колонка XSelect CSH Prep C18 OBD Column, 19 x 250 мм, 5 мкм; подвижная фаза А вода (0,05% TFA), подвижная фаза В MeCN; расход 25 мл/мин, градиент, как указано. Способ В: колонка SunFire C18 OBD, 19 x 250 мм, 5 мкм; подвижная фаза А вода (0,05% TFA), подвижная фаза В MeCN; расход 60 мл/мин, градиент, как указано.

Сокращения

1,2-DCE	1,2-дихлорэтан
ACN	ацетонитрил
CPME	циклопентилметилловый эфир
DCM	дихлорметан;
DMSO	диметилсульфоксид
DI EA	N,N-диизопропилэтиламин
DIPEA	N,N-диизопропилэтиламин
DMAP	N,N-диметиламинопиридин
$\langle d \rangle_N$	среднечисловой диаметр частиц
$\langle d \rangle_z$	z-средний диаметр частиц
EDC	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

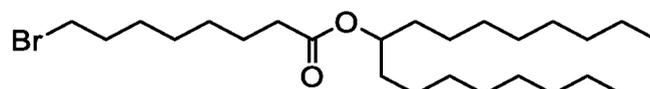
EE%	эффективность инкапсуляции
EtOAc	этилацетат;
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
KI	йодид калия
МСЗ	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконт-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат
NMP	N-метил-2-пирролидон
PDI	коэффициент полидисперсии
PE	петролейный эфир (30-50)
PBS	фосфатно-буферный физраствор
к.т.	комнатная температура
TEA	триэтиламин
THF	тетрагидрофуран
СВЭЖХ	сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография
Z-pot	дзета-потенциал

Пример 1. Синтез соединения 1



Реагенты. А) EDC, DIPEA, DMAP, DCM; б) K_2CO_3 , KI, ACN; в) 4M HCl, диоксан; д) EDC, DIPEA, DMAP, DCM; е) DIPEA, KI, ACN

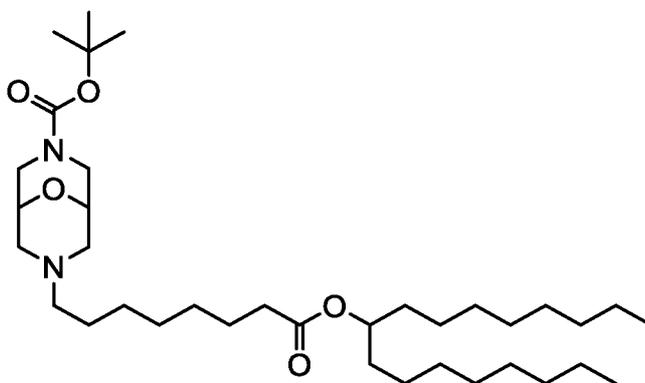
Промежуточное соединение 1: Гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат



Стадия а:

EDC (0,785 г, 4,09 ммоль) добавляли одной порцией в перемешиваемую смесь 8-бромоктановой кислоты (0,522 г, 2,34 ммоль), гептадекан-9-ола (0,5 г, 1,95 ммоль), DMAP (0,048 г, 0,39 ммоль) и DIPEA (1,396 мл, 7,99 ммоль) в DCM (15 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (50 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 20% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат (0,714 г, 79%) в виде бесцветного масла. 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (6H, t), 1,27 - 1,70 (36H, m), 1,77 - 1,94 (2H, m), 2,21 - 2,37 (2H, t), 3,41 (2H, t), 4,78 - 4,95 (1H, m).

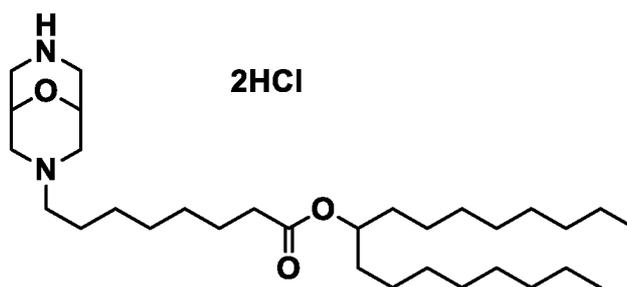
Промежуточное соединение 2: Трет-бутил-7-(8-(гептадекан-9-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилат

*Стадия b:*

Гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат (0,808 г, 1,75 ммоль) (промежуточное соединение 1) добавляли по каплям в перемешиваемую смесь трет-бутил-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилата гидрохлорида (0,386 г, 1,46 ммоль), карбоната калия (0,423 г, 3,06 ммоль) и йодида калия в (0,048 г, 0,29 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при температуре 80°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (100 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным Na₂CO₃ (100 мл) и насыщенным водным NaCl (100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии

на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и 1% NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая трет-бутил-7-(8-(гептадекан-9-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилат (0,747 г, 84%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 22°C) 0,88 (6H, t), 1,20 - 1,67 (47H, m), 2,02 - 2,19 (2H, m), 2,22 - 2,31 (2H, t), 2,35 - 2,49 (2H, m), 2,77 - 2,96 (2H, m), 3,18 - 3,38 (2H, m), 3,68 - 3,83 (2H, m), 3,92 - 4,17 (2H, m), 4,87 (1H, m).

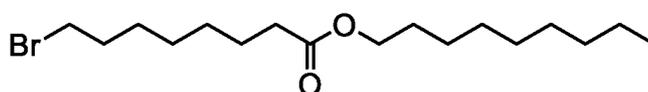
Промежуточное соединение 3: Гептадекан-9-ил-8-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата дигидрохлорид



Стадия с:

HCl (2,250 мл, 9,00 ммоль) в диоксане по каплям добавляли в перемешиваемую смесь трет-бутил-7-(8-(гептадекан-9-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилата (0,548 г, 0,90 ммоль) (промежуточное соединение 2) в диоксане (10 мл) при 0°C в атмосфере аргона. Полученную смесь нагревали и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Продукт реакции концентрировали при пониженном давлении досуха и промывали диоксаном (3 x 50 мл), получая гептадекан-9-ил-8-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата дигидрохлорид (0,472 г, 96%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, МЕТАНОЛ-d₄, 27°C) 0,90 (6H, t), 1,29 (38H, m), 2,24 - 2,39 (2H, t), 3,49 - 3,59 (3H, t), 4,85 - 4,91 (1H, m).

Промежуточное соединение 4: Нонил-8-бромоктаноат

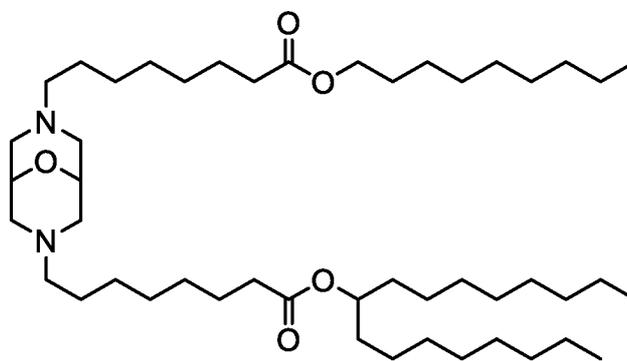


Стадия d:

EDC (2,79 г, 14,56 ммоль) добавляли в одной порцией в перемешиваемый раствор 8-бромоктановой кислоты (2,320 г, 10,40 ммоль), нонан-1-ола (1,205 мл, 6,93 ммоль), DMAP (0,169 г, 1,39 ммоль) и DIPEA (2,54 мл, 14,56 ммоль) в DCM (15 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (100 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (100 мл) и

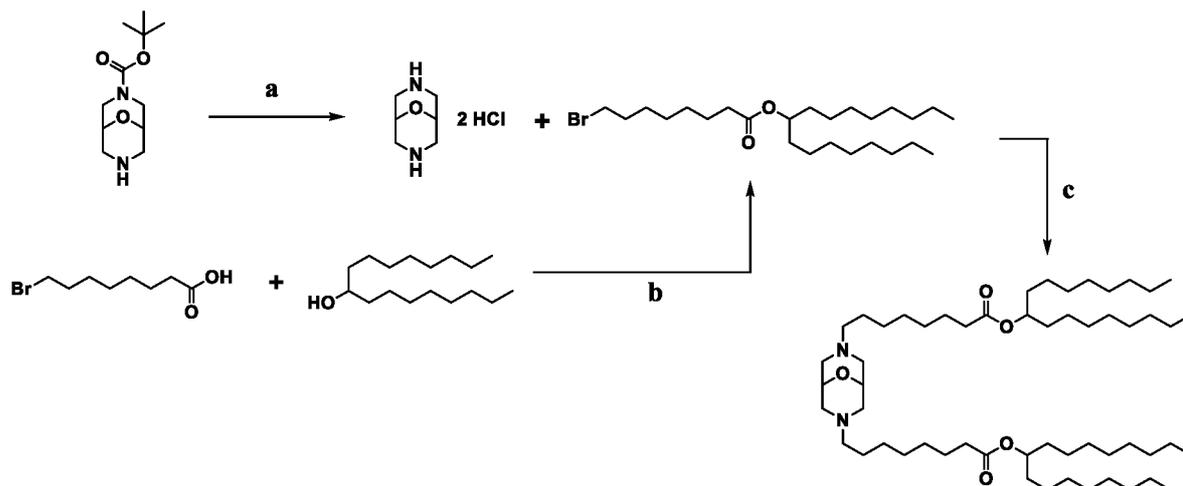
насыщенным водным NaCl (100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 20% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая нонил-8-бромоктаноат (1,580 г, 65,2%) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,82 - 0,95 (3H, t), 1,23 - 1,51 (18H, m), 1,56 - 1,69 (4H, m), 1,80 - 1,92 (2H, m), 2,30 (2H, t), 3,33 - 3,48 (2H, t), 4,07 (2H, t).

Соединение 1: Гептадекан-9-ил-8-(7-(8-(нонилокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат



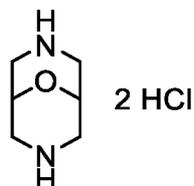
Стадия e:

Нонил 8-бромоктаноат (0,144 г, 0,41 ммоль) (промежуточное соединение 4) добавляли по каплям в перемешиваемую смесь гептадекан-9-ил-8-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата дигидрохлорида (0,2 г, 0,34 ммоль) (промежуточное соединение 3) и DIPEA (0,486 мл, 2,78 л) в ацетонитриле (5 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при температуре 80°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (50 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток дважды очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и 1% NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая гептадекан-9-ил-8-(7-(8-(нонилокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат (0,119 г, 44,5%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, МЕТАНОЛ-d₄, 27°C) 0,90 (9H, t), 1,23 - 1,43 (48H, m), 1,48 - 1,68 (14H, m), 2,24 - 2,34 (8H, m), 2,41 - 2,52 (4H, br d), 2,87 (4H, br d), 3,83 - 3,92 (2H, m), 4,07 (2H, s), 4,88 (1H, m). UPLC, МС обнаружение (ES+) ([M+H]⁺) = 777,8 Da; RT ELSD = 1,91 мин.

Пример 2. Синтез соединения 2

Реагенты. а) 4М HCl, диоксан; б) EDC, DIPEA, DMAP, DCM; с) DIPEA, KI, ACN

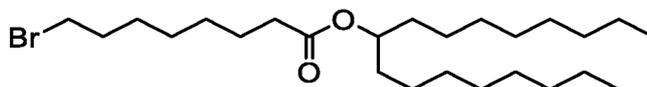
Промежуточное соединение 1: 9-окса-3,7-диазацикло[3.3.1]нонана дигидрохлорид



Стадия а:

HCl (2 мл, 65,83 ммоль) добавляли по каплям в перемешиваемую смесь трет-бутил-9-окса-3,7-диазацикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилата гидрохлорида (0,3 г, 1,13 ммоль) в 1,4-диоксане (8 мл) под аргоном. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре до образования осадка. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха, получая 9-окса-3,7-диазацикло[3.3.1]нонан (0,220 г, 97%) в виде белого порошка. ¹H ЯМР (500 МГц, МЕТАНОЛ-d₄, 27°C) 3,51 (8H, m), 4,41 (2H, br t).

Промежуточное соединение 2: Гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат

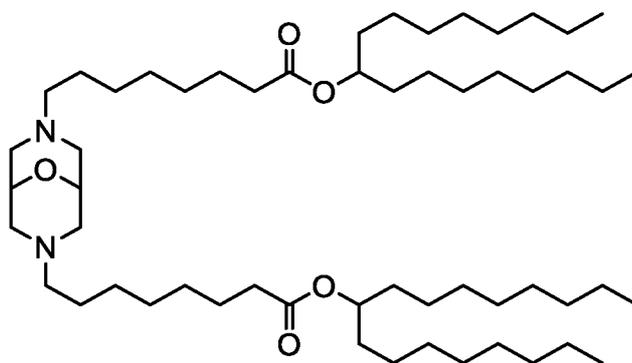


Стадия б:

EDC (0,785 г, 4,09 ммоль) добавляли одной порцией в перемешиваемую смесь 8-бромоктановой кислоты (0,522 г, 2,34 ммоль), гептадекан-9-ола (0,5 г, 1,95 ммоль), DMAP (0,048 г, 0,39 ммоль) и DIPEA (1,396 мл, 7,99 ммоль) в DCM (15 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным

NaHCO₃ (50 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 20% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат (0,714 г, 79%) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (6H, t), 1,27 - 1,70 (36H, m), 1,77 - 1,94 (2H, m), 2,21 - 2,37 (2H, t), 3,41 (2H, t), 4,78 - 4,95 (1H, m).

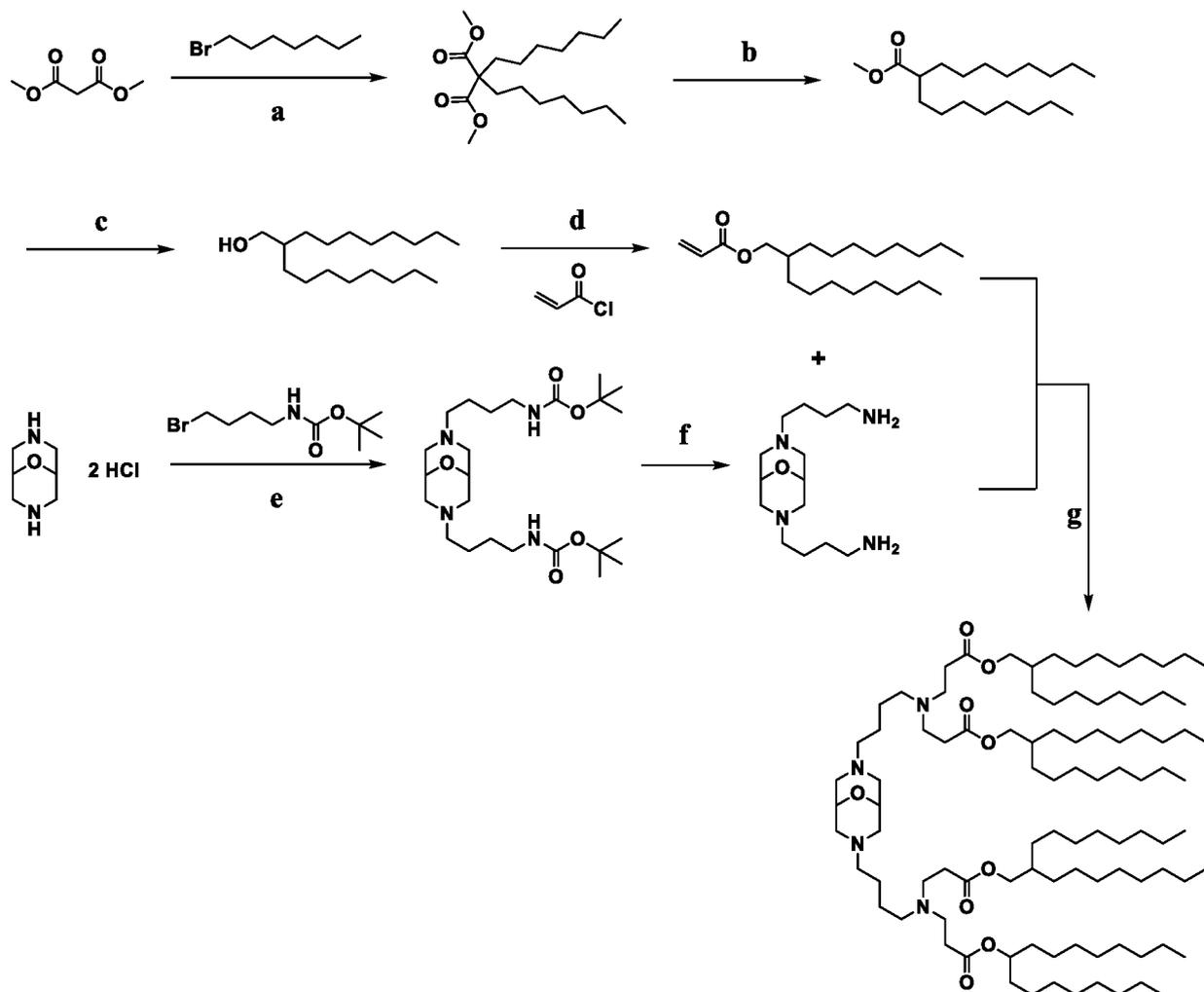
Соединение 2: Ди(гептадекан-9-ил)-8,8'-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)диоктаноат



Стадия с:

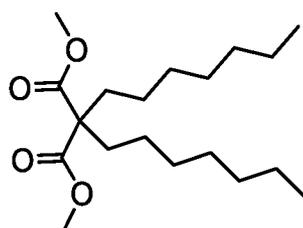
Гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат (0,285 г, 0,62 ммоль) (промежуточное соединение 2) по каплям добавляли в перемешиваемую смесь 9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана дигидрохлорида (0,04 г, 0,20 ммоль) (промежуточное соединение 1), DIPEA (0,142 мл, 0,82 ммоль) и йодида калия (6,60 мг, 0,04 мл) в ацетонитриле (5 мл) при 25°C под аргоном. Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным Na₂CO₃ (50 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и 1% NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая ди(гептадекан-9-ил)-8,8'-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)диоктаноат (0,062 г, 34,9%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (12H, t), 1,15 - 1,72 (76H, m), 2,28 (8H, m), 2,41 - 2,50 (4H, m), 2,76 - 2,84 (4H, m), 3,88 (2H, br s), 4,87 (2H, m). UPLC, MS обнаружение (ES+) ([M+H]⁺) = 890,2; RT ELSD = 2,27 мин.

Пример 3. Синтез соединения 3



Реагенты. а) NaH, DMF; б) LiCl, H₂O, DMSO; в) LiAlH₄, THF; д) акрилоилхлорид, TEA, DCM; е) DIPEA, KI, ACN; ф) HCl, диоксан; г) TEA, IPA.

Промежуточное соединение 1: Диметил-2,2-диоктилмалонат

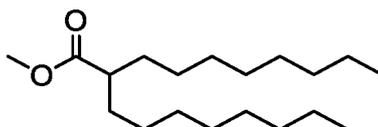


Стадия а:

Гидрид натрия (3,48 г, 87,05 ммоль) медленно суспендировали в безводном DMF под азотом и смесь охлаждали до 0°C. Диметилмалонат (4,33 мл, 37,85 ммоль) и 1-бромоктан (19,61 мл, 113,54 ммоль) в DMF (по 25 мл каждый) добавляли последовательно и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. После завершения реакции добавляли воду (250 мл) и водный слой экстрагировали, используя (Et₂O) (3 x 100 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали водой (100 мл) и насыщенным водным NaCl (100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄,

отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 50% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая диметил-2,2-диоктилмалонат (8,89 г, 65,9%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,85 - 0,92 (6H, s), 1,27 (24H, m), 1,77 - 1,93 (4H, m), 3,62 - 3,77 (6H, s).

Промежуточное соединение 2; метил 2-октилдеcanoат



Стадия b:

Смесь диметил-2,2-диоктилмалоната (9,2 г, 25,80 ммоль) (промежуточное соединение 1), хлорида лития (1,422 г, 33,54 ммоль) и воды (0,604 г, 33,54 ммоль) в DMSO (80 мл) перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 24 ч. После охлаждения до комнатной температуры добавляли воду (150 мл), чтобы погасить реакцию. Реакционную смесь экстрагировали, используя (Et₂O) (3 x 50 мл). Объединенные органические слои последовательно промывали водой (3 x 50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 50% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая метил 2-октилдеcanoат (7,30 г, 95%) в виде желтой жидкости. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (6H, t), 1,18 - 1,71 (28H, m), 2,28 - 2,39 (1H, m), 3,68 (3H, s).

Промежуточное соединение 3: 2-октилдекан-1-ол

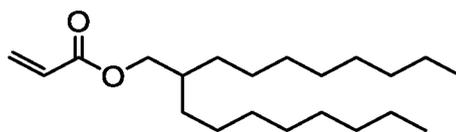


Стадия c:

К раствору метил-2-октилдеcanoата (7,3 г, 24,45 ммоль) (промежуточное соединение 2) в THF (100 мл) по каплям при 0°C добавляли гидрид лития алюминия (14,67 мл, 29,35 ммоль). Затем реакции давали нагреться и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. По завершении реакции добавляли 3M HCl (50 мл), чтобы погасить реакцию. Реакционную смесь разбавляли водой (100 мл) и DCM (100 мл). Слои разделяли и водный слой экстрагировали, используя (DCM) (3 x 50 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным NaCl (100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄,

отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 40% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая 2-октилдекан-1-ол (4,56 г, 68,9%) в виде желтой жидкости. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (6H, t), 1,16 - 1,39 (28H, m), 1,42 - 1,50 (1H, m), 3,55 (2H, br s).

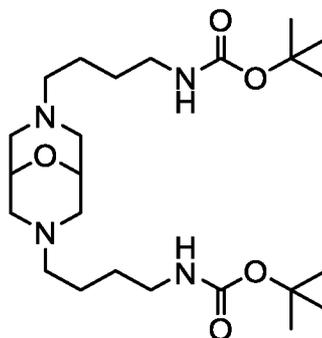
Промежуточное соединение 4: 2-октилдецилакрилат



Стадия d:

Акрилоилхлорид (0,358 мл, 4,44 ммоль) по каплям добавляли в перемешиваемую смесь 2-октилдекан-1-ола (1 г, 3,70 ммоль) (промежуточное соединение 3) и TEA (2,113 мл, 15,16 ммоль) в DCM (20 мл) при 0°C под аргоном. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и разбавляли, используя DCM (100 мл), и промывали насыщенным водным NaCl (100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая 2-октилдецилакрилат (0,850 г, 70,8%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (6H, t), 1,23 - 1,35 (28H, m), 1,61 - 1,75 (1H, m), 4,07 (2H, d), 5,82 (1H, d), 6,13 (1H, dd), 6,40 (1H, d).

Промежуточное соединение 5: Ди-трет-бутил ((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил))дикарбамат

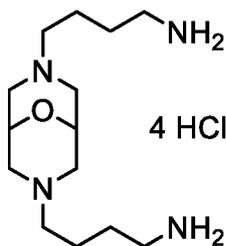


Стадия e:

Трет-бутил (4-бромобутил)карбамат (0,502 г, 1,99 ммоль) добавляли в одной порцией в перемешиваемую смесь 9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана дигидрохлорида (0,1 г, 0,50 ммоль), DIPEA (0,521 мл, 2,98 ммоль) и йодида калия (0,017 г, 0,10 ммоль) в ацетонитриле

(5 мл) под азотом. Полученную смесь перемешивали при температуре 80°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (50 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и 1% NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая ди-трет-бутил-((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил))дикарбамат (0,095 г, 40,6%) в виде бледно-желтого масла. 1H ЯМР (500 МГц, МЕТАНОЛ-*d*₄) δ ppm 1,4 (18H, s) 1,5 - 1,6 (8H, m) 2,3 (4 H, m) 2,4 - 2,6 (4H, m) 3,0 - 3,1 (8H, m) 3,8 - 3,9 (2H, m) 4,8 (2H, m).

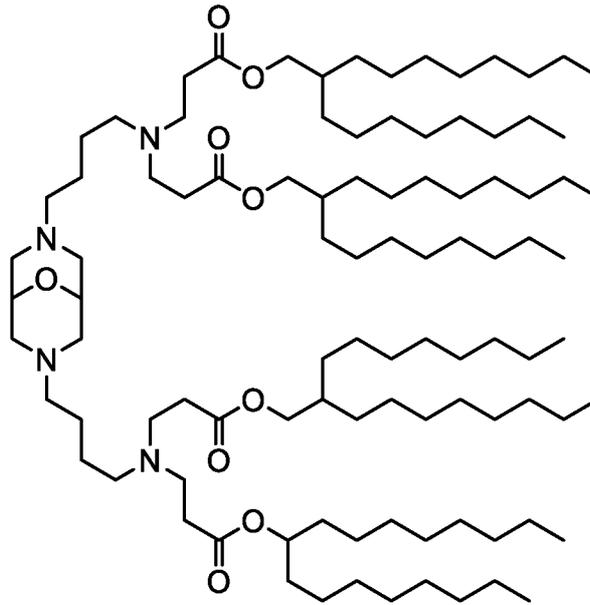
Промежуточное соединение 6: 4,4'-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-1-амин) тетрагидрохлорид



Стадия f:

Раствор HCl в диоксане (4M, 10,30 ммоль, 2,58 мл) добавляли к ди-трет-бутил-((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил))дикарбамату (0,097 г, 0,21 ммоль) (промежуточное соединение 5) в инертной атмосфере и перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. После упаривания в ротационном испарителе реакционный остаток разбавляли диоксаном (4 мл) и дважды удаляли растворитель при пониженном давлении. Твердое вещество концентрировали при пониженном давлении досуха, получая 4,4'-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-1-амин) тетрагидрохлорид в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР (500 МГц, МЕТАНОЛ-*d*₄) δ ppm 1,7 (4H, m) 1,7 - 1,8 (4H, m) 2,7 - 2,8 (4H, m) 2,9 - 3,0 (8H, m) 3,3 - 3,3 (2H, m) 3,5 (4H, br d) 4,1 (2H, br s).

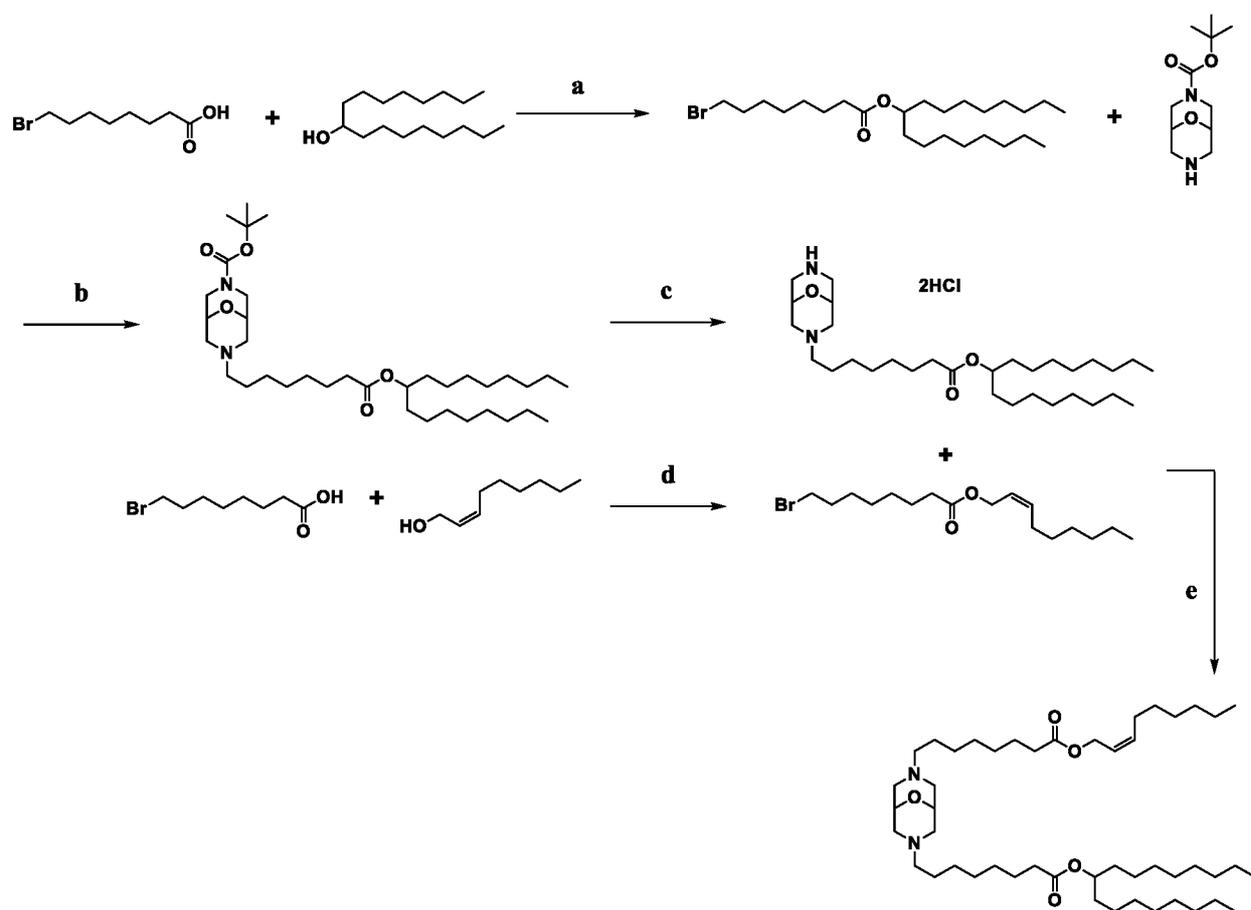
Соединение 3: Тетракис(2-октилдецил) 3,3',3'',3'''-(((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил)бис(азанетрил))тетрапропионат



Стадия g:

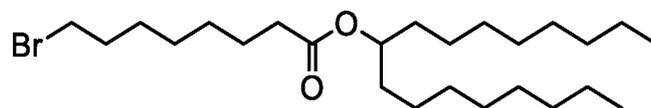
2-октилдецилакрилат (0,468 г, 1,44 ммоль) (промежуточное соединение 4) добавляли одной порцией в перемешиваемую смесь 4,4'-((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-1-амин) тетрагидрохлорида (0,05 г, 0,12 ммоль) (промежуточное соединение 5) и TEA (0,134 мл, 0,96 ммоль) в *i*PrOH (4 мл). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение 3 дней. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (50 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали досуха при пониженном давлении, получая тетракис(2-октилдецил)-3,3',3'',3'''-(((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил))бис(азанетриил)тетрапропионат (0,027 г, 14,06%) в виде масла оранжевого цвета. 1H ЯМР (500MHz, МЕТАНОЛ-d₄, 27°C) 0,84 - 0,99 (24H, t), 1,21 - 1,41 (116H, m), 1,46 - 1,56 (4H, m), 1,66 (8H, m), 2,43 - 2,52 (10H, m), 2,73 - 2,82 (10H, m), 2,98 - 3,08 (4H, m), 3,42 - 3,52 (4H, m), 4,00 (8H, d), 4,18 (2H, br s). МС обнаружение (ES⁺) ([M+H]⁺) = 1568,4.

Пример 4. Синтез соединения 4



Реагенты. А) EDC, DIPEA, DMAP, DCM; б) K_2CO_3 , KI, ACN; с) 4М HCl, диоксан; д) EDC, DIPEA, DMAP, DCM; е) DIPEA, KI, ACN

Промежуточное соединение 1: Гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат

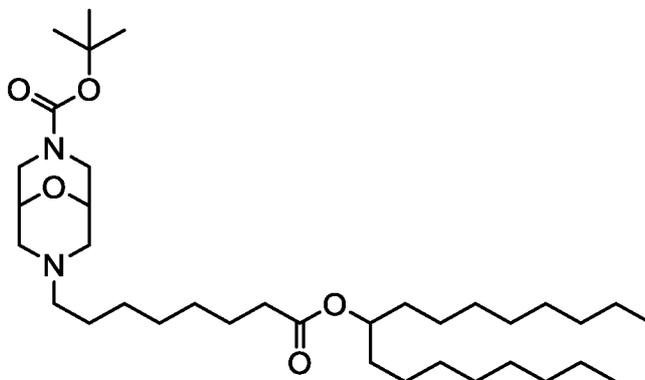


Стадия а:

EDC (0,785 г, 4,09 ммоль) добавляли одной порцией в перемешиваемую смесь 8-бромоктановой кислоты (0,522 г, 2,34 ммоль), гептадекан-9-ола (0,5 г, 1,95 ммоль), DMAP (0,048 г, 0,39 ммоль) и DIPEA (1,396 мл, 7,99 ммоль) в DCM (15 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным $NaHCO_3$ (50 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na_2SO_4 , отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 20% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат (0,714 г, 79%) в виде бесцветного масла. 1H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-

d, 27°C) 0,89 (6H, t), 1,27 - 1,70 (36H, m), 1,77 - 1,94 (2H, m), 2,21 - 2,37 (2H, t), 3,41 (2H, t), 4,78 - 4,95 (1H, m).

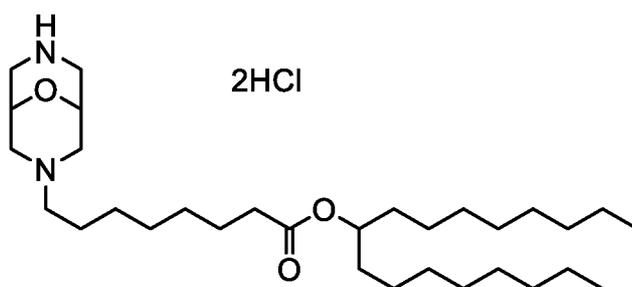
Промежуточное соединение 2: Трет-бутил-7-(8-(гептадекан-9-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилат



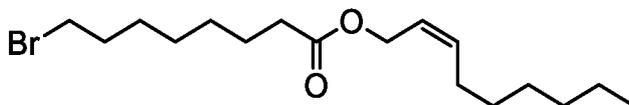
Стадия b:

Гептадекан-9-ил-8-бромоктаноат (0,808 г, 1,75 ммоль) (промежуточное соединение 1) добавляли по каплям в перемешиваемую смесь трет-бутил-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилата гидрохлорида (0,386 г, 1,46 ммоль), карбоната калия (0,423 г, 3,06 ммоль) и йодида калия в (0,048 г, 0,29 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при температуре 80°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (100 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным Na₂CO₃ (100 мл) и насыщенным водным NaCl (100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и 1% NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая трет-бутил-7-(8-(гептадекан-9-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилат (0,747 г, 84%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500 МГц, ХЛОРОФОРМ-d, 22°C) 0,88 (6H, t), 1,20 - 1,67 (47H, m), 2,02 - 2,19 (2H, m), 2,22 - 2,31 (2H, t), 2,35 - 2,49 (2H, m), 2,77 - 2,96 (2H, m), 3,18 - 3,38 (2H, m), 3,68 - 3,83 (2H, m), 3,92 - 4,17 (2H, m), 4,87 (1H, m).

Промежуточное соединение 3: Гептадекан-9-ил-8-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата дигидрохлорид

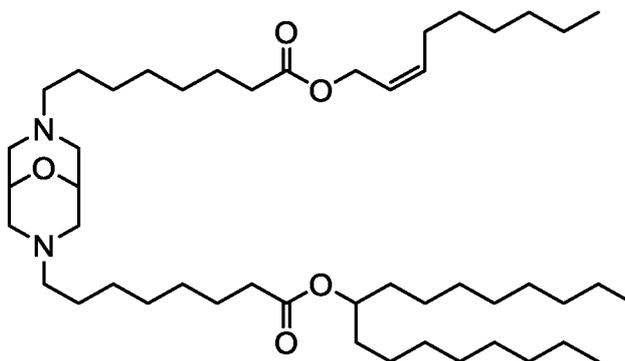
*Стадия с:*

HCl (2,250 мл, 9,00 ммоль) в диоксане по каплям добавляли в перемешиваемую смесь трет-бутил-7-(8-(гептадекан-9-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-карбоксилата (0,548 г, 0,90 ммоль) (промежуточное соединение 2) в диоксане (10 мл) при 0°C в атмосфере аргона. Полученную смесь нагревали и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Продукт реакции концентрировали при пониженном давлении досуха и промывали диоксаном (3 x 50 мл), получая гептадекан-9-ил-8-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата дигидрохлорид (0,472 г, 96%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, МЕТАНОЛ-d₄, 27°C) 0,90 (6H, t), 1,29 (38H, m), 2,24 - 2,39 (2H, t), 3,49 - 3,59 (3H, t), 4,85 - 4,91 (1H, m).

Промежуточное соединение 4: (Z)-нон-2-ен-1-ил-8-бромоктаноат*Стадия d:*

EDC (2,83 г, 14,76 ммоль) добавляли одной порцией в перемешиваемую смесь 8-бромоктановой кислоты (2,353 г, 10,55 ммоль), DIPEA (3,68 мл, 21,09 ммоль), (Z)-нон-2-ен-1-ола (1 г, 7,03 ммоль) и DMAP (0,172 г, 1,41 ммоль) в DCM (15 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (100 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (100 мл) и насыщенным водным NaCl (100 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали досуха при пониженном давлении, получая (Z)-нон-2-ен-1-ил-8-бромоктаноат (1,930 г, 79%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,79 - 0,95 (3H, t), 1,21 - 1,50 (14H, m), 1,58 - 1,69 (2H, m), 1,72 - 1,93 (2H, m), 2,11 (2H, m), 2,31 (2H, t), 3,31 - 3,65 (2H, t), 4,63 (2H, d), 5,48 - 5,73 (2H, m).

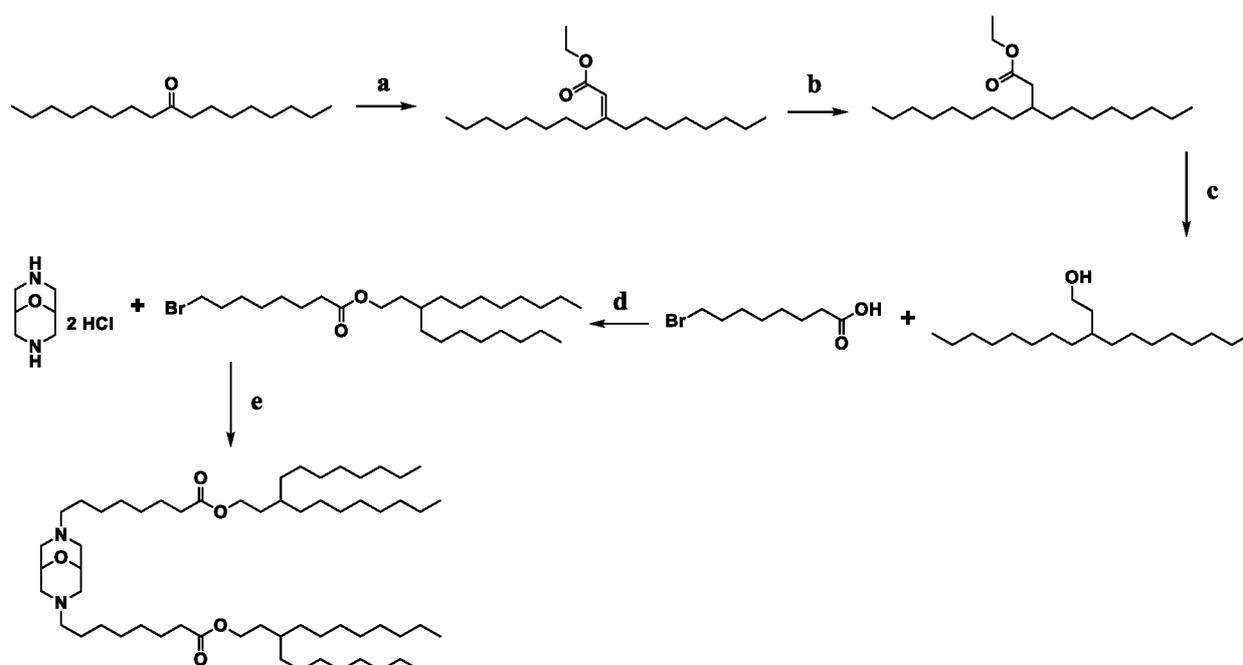
Соединение 4: Гептадекан-9-ил-(Z)-8-(7-(8-(нон-2-ен-1-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат



Стадия e:

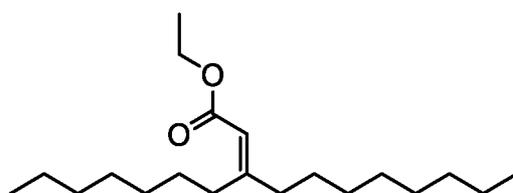
Гептадекан-9-ил-8-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата дигидрохлорид (промежуточное соединение 3), растворенный в ацетонитриле/СРМЕ 1:1 (10 мл) и добавляли DIPEA (0,212 мл, 1,21 ммоль) при 20°C под азотом. Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 30 минут. (Z)-нон-2-ен-1-ил-8-бромоктаноат (0,123 г, 0,35 ммоль) (промежуточное соединение 4) добавляли по каплям в перемешиваемый раствор в атмосфере азота. Полученную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 18 часов в атмосфере азота. Реакционную смесь концентрировали досуха при пониженном давлении и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (50 мл) и насыщенным водным хлоридом натрия (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали досуха при пониженном давлении, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и 1% NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении, получая гептадекан-9-ил-(Z)-8-(7-(8-(нон-2-ен-1-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноат (0,214 г, 93%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, МЕТАНОЛ-d₄) 0,86 - 1,00 (9H, t), 1,23 - 1,46 (44H, m), 1,56 (8H, m), 1,64 (4H, m), 2,15 (2H, q), 2,24 - 2,38 (8H, m), 2,51 (4H, br d), 2,92 (4H, br d), 3,91 (2H, br s), 4,64 (2H, d), 4,88 - 4,93 (1H, m), 5,49 - 5,71 (2H, m). UPLC, МС обнаружение (ES⁺) ([M+H]⁺) = 776,0 Da; RT ELSD = 1,88 мин.

Пример 5. Синтез соединения 5



Реагенты. а) триэтилфосфоацетат, NaH, THF; б) Pt(IV)O₂, H₂, CHCl₃/MeOH; с) LiAlH₄, THF; д) EDC, DIPEA, DMAP, DCM; е) DIPEA, KI, ACN

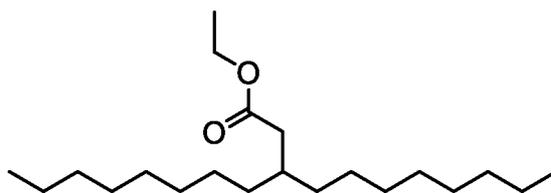
Промежуточное соединение 1: Этил-3-октилундец-2-еноат



Стадия а:

Триэтилфосфоацетат (12,59 мл, 62,88 ммоль) медленно добавляли в перемешиваемый раствор гидрида натрия (2,51 г, 62,88 ммоль) в THF (50 мл) при 0°C под азотом. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут. Гептадекан-9-он (2 г, 7,86 ммоль) добавляли в перемешиваемую смесь и нагревали до 30°C под азотом. Полученную смесь перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 18 часов. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь гасили водой (100 мл), экстрагировали, используя EtOAc (3 x 50 мл), объединенные органические слои сушили над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении досуха, получая желтое масло. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 40% EtOAc в гексанах. Для определения чистоты каждой фракции использовали ¹H ЯМР. Объединенные продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая этил-3-октилундец-2-еноат (1,850 г, 72,5%) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d) 0,89 (6H, t), 1,21 - 1,53 (27H, m), 2,13 (2H, t), 2,53 - 2,65 (2H, t), 4,15 (2H, q), 5,62 (1H, s).

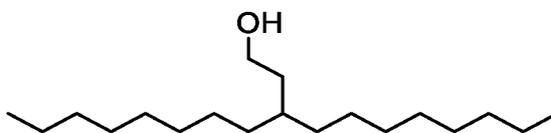
Промежуточное соединение 2: Этил-3-октилундеканоат



Стадия b:

Этил 3-октилундец-2-еноат (2,0 г, 6,16 ммоль) (промежуточное соединение 1) и оксид платины (IV) (0,028 г, 0,12 ммоль) в $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (5:1) (30 мл) перемешивали под давлением водорода, равным атмосферному, из баллона в течение 16 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 40% EtOAc в гексанах. Разделение было затруднено из-за перекрытия с исходным материалом - гептадекан-9-оном. Для определения чистоты каждой фракции использовали ^1H ЯМР. Объединенные продуктовые фракции концентрировали при пониженном давлении досуха, получая этил 3-октилундеcanoат (1,540 г, 77%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,83 - 0,95 (6H, t), 1,16 - 1,39 (31H, m), 1,79 - 1,92 (1H, br t), 2,22 (2H, d), 4,13 (2H, q).

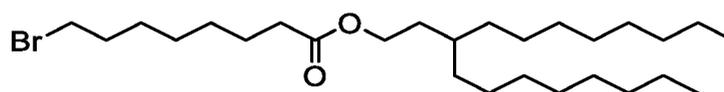
Промежуточное соединение 3: 3-октилундекан-1-ол



Стадия c:

Гидрид лития алюминия (7,75 мл, 7,75 ммоль) медленно добавляли в перемешиваемый раствор этил-3-октилундеcanoата (2,3 г, 7,04 ммоль) (промежуточное соединение 2) в ТГФ (20 мл) при 0°C под азотом. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. После завершения реакции ее охлаждали до 0°C и гасили, используя 3M HCl (100 мл), экстрагировали, используя EtOAc (3 x 50 мл), объединенные органические слои сушили над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали досуха при пониженном давлении, получая желтое масло. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 40% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали досуха при пониженном давлении, получая 3-октилундекан-1-ол (1,354 г, 67,6%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (6H, t), 1,18 - 1,36 (28H, m), 1,38 - 1,46 (1H, br t), 1,53 (2H, q), 3,67 (2H, t).

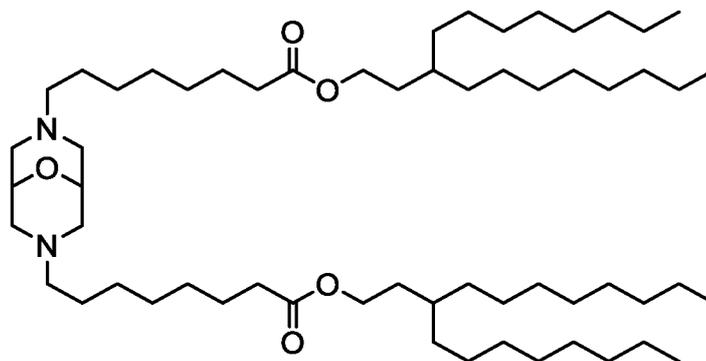
Промежуточное соединение 4: 3-октилундецил-8-бромоктаноат



Стадия d:

EDC (0,707 г, 3,69 ммоль) добавляли одной порцией в перемешиваемую смесь 8-бромоктановой кислоты (0,470 г, 2,11 ммоль), DIPEA (0,645 мл, 3,69 ммоль), 3-октилундекан-1-ола (0,5 г, 1,76 ммоль) (промежуточное соединение 3) и DMAP (0,043 г, 0,35 ммоль) в DCM (10 мл) под аргоном. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным NaHCO₃ (100 мл) и насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали досуха при пониженном давлении, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% EtOAc в гексанах. Продуктовые фракции концентрировали досуха при пониженном давлении, получая 3-октилундецил-8-бромоктаноат (0,545 г, 63,3%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,83 - 0,98 (6H, t), 1,20 - 1,49 (35H, m), 1,53 - 1,70 (4H, m), 1,79 - 1,92 (2H, m), 2,30 (2H, t), 3,41 (2H, t), 4,03 - 4,15 (2H, t).

Соединение 5: Бис(3-октилундецил)-8,8'-(9-окса-3,7-диазацикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)диоктаноат



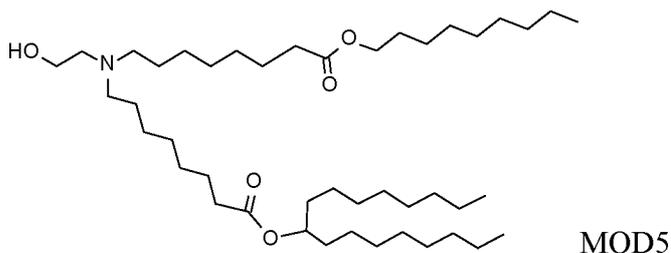
Стадия e:

3-Октилундецил-8-бромоктаноат (0,302 г, 0,62 ммоль) (промежуточное соединение 4) добавляли по каплям в перемешиваемую смесь 9-окса-3,7-дизабацикло[3.3.1]нонана дигидрохлорида (0,04 г, 0,20 ммоль), DIPEA (0,142 мл, 0,82 ммоль) и йодида калия (6,60 мг, 0,04 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) при 25°C под аргоном. Полученную смесь перемешивали при температуре 80°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении досуха и повторно растворяли в EtOAc (50 мл), а затем последовательно промывали насыщенным водным Na₂CO₃ (50 мл) и

насыщенным водным NaCl (50 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали досуха при пониженном давлении, получая неочищенный продукт. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле, градиент элюирования от 0 до 100% (20% MeOH и 1% NH₄OH в DCM) в DCM. Продуктовые фракции концентрировали досуха при пониженном давлении, получая бис(3-октилундецил)-8,8'-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)диоктаноат (0,054 г, 28,6%) в виде бледно-желтого масла. ¹H ЯМР (500MHz, ХЛОРОФОРМ-d, 27°C) 0,89 (12H, t), 1,16 - 1,69 (80H, m), 1,73 - 1,85 (2H, m), 2,20 - 2,26 (4H, br t), 2,26 - 2,31 (4H, t), 2,40 - 2,52 (4H, m), 2,82 (4H, br d), 3,82 - 3,94 (2H, br t), 4,09 (4H, t). UPLC, MS обнаружение (ES+) ([M+H]⁺) = 945,7; RT ELSD = 2,43 мин.

Пример 6. Получение рецептур липидных наночастиц (ЛНЧ), содержащих мРНК eGFP

ЛНЧ были получены с использованием микрофлюидной установки, NanoAssemblr (Precision NanoSystems Inc.). Не вдаваясь в подробности, исходные липиды растворяли в этаноле и смешивали в соответствующих молярных соотношениях для получения концентрации липидов 12,5 мМ. Размер ЛНЧ определяли по данным динамического светорассеяния (DLS) с использованием Zetasizer Nano ZS производства Malvern Instruments Ltd. Численно-взвешенные распределения частиц по размерам рассчитывали по показателю преломления частиц, равному 1,45. Характеристики ЛНЧ приведены в таблице 1. Липидный раствор в этаноле (99,5%) получали с четырьмя разными липидными компонентами: ионизируемым липидом, т.е. MC3, MOD5, соединением 1, соединением 2 или соединением 4; холестерином (Sigma-Aldrich); DSPC (дистеароил фосфатидилхолин, Avanti Polar lipids Inc); и полимер-конъюгированным липидом. Соотношение липидов - ионизируемый липид/холестерин/DSPC/полимер-конъюгированный липид во всех экспериментах было (50/38,5/10/1,5 мол.%). Суммарная концентрация липидов во всех экспериментах составляла 12,5 мМ. MOD5 представляет собой ионизируемый липид со структурой, показанной ниже, и более подробное описание можно найти в Sabnis и др., Mol Therapy, Vol 26, 6, 2018, 1509-1519.



Раствор мРНК eGFP (приобретенный у TriLink Biotechnologies) в цитратном буфере получали смешиванием мРНК, растворенной в воде MilliQ, цитратного буфера 100 мМ (pH

3) и воды MilliQ для получения 50 мМ раствора цитрата. Растворы мРНК и липидов смешивали в системе микрофлюидного смешивания NanoAssembler (Precision Nanosystems, Vancouver, BC, Канада) при соотношении смешивания Aq:EtOH = 3:1 и постоянным расходом 12 мл/мин. мРНК в цитратном буферном растворе получали таким образом, что на момент смешивания соотношение между атомами азота на ионизируемых атомах липидов и фосфора (отношение N/P) на цепи мРНК составляло либо 3:1, либо 5:1 (см. таблицу 1). ЛНЧ подвергали диализу в течение ночи против 500× объема образца, используя диализные кассеты Slide-A-Lyzer G2 производства компании Thermo Scientific с отсекаемой молекулярной массой 10 К.

Первые 0,2-0,35 мл и последние 0,05-0,1 мл приготовленной суспензии ЛНЧ отбрасывали, а остальную часть объема брали в качестве фракции образца. Размер наночастиц липидов мРНК определяли по измерениям динамического рассеяния света, используя Zetasizer Nano ZS производства Malvern Instruments Ltd, получая непосредственно z-средний диаметр частиц. Численно-взвешенные распределения и средние величины частиц были рассчитаны с использованием показателя преломления частиц, равного 1,45.

Инкапсуляцию и концентрацию мРНК определяли с помощью анализа Ribo-Green. Инкапсуляция во всех образцах обычно составляла 90-99%. Конечную концентрацию мРНК и процентную эффективность инкапсуляции (%EE) измеряли с помощью набора Quant-it Ribogreen Assay Kit (ThermoFischer Scientific Inc.) с использованием Triton-X100 для разрушения ЛНЧ. Эффективность инкапсуляции мРНК определяли по следующему уравнению:

$$\%EE = \left[1 - \left(\frac{\text{non-encapsulated mRNA}}{\text{encapsulated mRNA}} \right) \right] \times 100$$

В таблице 1 приведена краткая характеристика рецептур ЛНЧ, включающих МС3, MOD5, соединения 1, соединение 2 или соединение 4.

Таблица 1. Характеристики рецептур ЛНЧ

Рецептура №	Ионизируемый липид	Отношение N/P	Полимер-конъюгированный липид	%EE	<d> _N (нм)	<d> _Z (нм)
1	Соединение 1	3	DMPE-PEG2000,	99	40	59
2	Соединение 2	5	DMPE-PEG2000,	99	35	50
3	Соединение 4	3	DMPE-PEG2000,	97	32	48
4	МС3,	3	DMPE-PEG2000,	99	66	84
5	MOD5,	3	DMPE-PEG2000,	98	58	76

DMPE-PEG2000 представляет собой димиристоилфосфатидил этаноламин-поли (этиленгликоль) 2000 (получен от NOF Corporation).

DMG-PEG2000 представляет собой 1,2-димиристоил-гас-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000.

Пример 7. Внутритрахеальное введение *in vivo* рецептур ЛНЧ-eGFP мРНК крысам

Исследование *in-vivo* проводили на аккредитованном AAALAC объекте для животных в AstraZeneca, Гётеборг, Швеция, по одобрению Комитета Гётеборга по этике обращения с экспериментальными животными (№ 82-2015). Приобретенных самцов крыс Wistar Han (Charles River Germany Limited) по прибытии содержали в клетках группами по 4 животных на древесной стружке, с диетой (рацион для крыс и мышей R70 (Lantmännen, Стокгольм, Швеция), и питьевую воду им давали без ограничения. В начале дозирования возраст животных был примерно в 10 недель. Целевую температуру окружающей среды поддерживали при 19–24°C при относительной влажности 40–70% с 12-часовым циклом свет/темнота. Животным дали акклиматизироваться к условиям обитания не менее чем 5 дней до проведения каких-либо экспериментальных процедур. Животные, получавшие ингаляционную дозу, дополнительно находились в условиях процедуры ограничения вдоха в течение не более 5 дней до начала дозирования путем постепенного увеличения продолжительности воздействия ограничительной процедуры до максимально ожидаемой продолжительности в соответствующем исследовании.

Рецептура ЛНЧ соединения 1 с мРНК eGFP вводили путем однократного ингаляционного введения или однократного внутритрахеального введения при целевой дозе eGFP в легких в размере 0,02 мг/кг. Группу такого же размера использовали в качестве плацебо-контроля, где животных подвергали воздействию фосфатно-буферного физиологического раствора путем ингаляции или внутритрахеального приспособления. Уровни экспрессии eGFP в легких крыс через 24 часа после внутритрахеального введения были показаны на ФИГ. 3, и концентрации БАЛ нейтрофила в БАЛ крысы через 24 часа после внутритрахеального введения были показаны на ФИГ. 4. Уровни экспрессии eGFP в легких у крыс через 5 часов и 24 часа после ингаляционного введения были показаны на ФИГ. 6, а концентрации БАЛ нейтрофила в БАЛ крысы через 24 часа после ингаляционного введения были показаны на ФИГ. 7. Кроме того, иммуногистохимическое (ИНС) исследование указывает на экспрессию eGFP не только в макрофагах, но и в эпителиальных клетках 1 типа (см. фигуры 5А и 5В).

Каждую рецептуру ЛНЧ МС3, MOD5, соединения 2 и соединения 4 с мРНК eGFP, как описано в примере 6, вводили путем однократного внутритрахеального введения при целевой дозе eGFP в легких 0,1 мг/кг. Группу такого же размера использовали в качестве

плацебо-контроля, где на животных воздействовали фосфатно-буферным физиологическим раствором с помощью внутритрахеального приспособления. Уровни экспрессии eGFP в легких у крыс через 24 часа были показаны на ФИГ. 1, и концентрации БАЛ нейтрофилов в БАЛ крысы через 24 часа были показаны на ФИГ. 2.

Ингаляционная доза

Аэрозоль создавали с помощью Aerogen Solo Vibrating mesh Nebuliser (Galway Ireland). В небулайзер заполняли 5,6 мл среды-носителя или мРНК eGFP в рецептуре ЛНЧ и распыляли с расходом примерно 60 мкл/мин в продолжение всего дозирования. Крыс помещали в удерживающее устройство для грызунов, а затем помещали на разработанную в AstraZeneca систему ингаляционного дозирования. За животными наблюдали с помощью экспериментальной процедуры на наличие любых признаков вредного воздействия после дозирования со стороны клинических наблюдений или аномального изменения массы тела. Через 24 часа после последней дозы крыс умерщвляли путем седации изофлураном, а затем разрезанием поллой вены и удалением сердца.

Интратрахеальное дозирование

Крыс анестезировали смесью изофлурана (воздух/кислород и 3,5% изофлуран), помещали в положение лежа на спине под углом 30-40°, а затем в трахею вводили мРНК eGFP в рецептуре ЛНЧ или среду-носитель, используя модифицированную металлическую канюлю с болюсом наверху. После введения дозы крыс помещали в клетки в положении лежа на спине головой вверх до тех пор, пока они не приходили в сознание. За животными наблюдали с помощью экспериментальной процедуры на наличие любых признаков вредного воздействия после дозирования со стороны клинических наблюдений или аномального изменения массы тела. Через 24 часа после последней дозы крыс умерщвляли путем седации изофлураном, а затем разрезанием поллой вены и удалением сердца.

Отбор проб БАЛ

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) выполняли вручную путем перфузии целого легкого. После вскрытия трахеи вставляли полиэтиленовую трубку (PE120) и ее пришивали шелковой хирургической нитью 1-0. Трубку подсоединяли к шприцу, предварительно заполненному 4 мл PBS при комнатной температуре, и PBS медленно вводили в легкое. Жидкость собирали медленной аспирацией в шприц. Эту процедуру выполняли дважды. Конечную жидкость БАЛ переносили в пробирку (4 мл, полипропилен [ПП]).

Пробирки с образцами БАЛ взвешивали, принимая 1 грамм равным 1 мл. БАЛ охлаждали на льду до центрифугирования (Hettich ROTANTA 46R, 1200 об/мин, 10 мин,

4°C). После центрифугирования надосадочную жидкость собирали и распределяли в 96-луночные планшеты (0,15 мл/лунку, 5 планшетов) и хранили на сухом льду (0,1 мл/лунку). Планшеты хранили при температуре не выше -75°C для дальнейшего анализа. Клеточный осадок повторно суспендировали в 0,5 мл PBS, хранили на льду и немедленно приступали к подсчету клеток. Общее и дифференциальное количество ячеек будет подсчитываться с помощью автоматизированной системы SYSMEX XT-1800i Vet (Sysmex, Kobe Япония).

Сбор органов

Правые легочные доли отрезали и иссекали, нелегочную ткань обрезали, освобождали от сгустков крови и промывали физиологическим раствором. Правые доли отделяли, используя хирургическую нить, иссекали и промывали в PBS, чтобы удалить всю кровь. Верхнюю и среднюю доли взвешивали и собирали в пробирки Preellys емкостью 7 мл для анализа мРНК eGFP. Нижнюю и заднебазальную доли взвешивали и собирали в пробирки Preellys емкостью 7 мл для анализа белка eGFP). Все образцы правых долей замораживали в жидком азоте. Образцы сохраняли хранили при температуре не выше -80°C до последующей обработки для анализа. Левую долю раздували формалином и помещали в избыток формалина в контейнер с пластиковой крышкой.

Пример 8. Внутривенное введение *in vivo* мышам рецептур ЛНЧ с eGFP мРНК

В соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU вся работа была выполнена в соответствии со стандартами этики и условий содержания животных в соответствии с лицензией проекта в Великобритании, рассмотренной и одобренной органом по защите животных и этической экспертизе (AWERB). Самки мышей BALB/c дикого типа (в возрасте 6-8 недель) приобретали у Charles River, Великобритания и размещали в помещениях для животных в AstraZeneca. Всем мышам вводили по 100 мкл рецептур ЛНЧ с МСЗ, соединением 2 и соединением 3, которые получали с помощью процедур, аналогичных описанным в примере 6, описание которых приведены в таблице 2. Рецептуры ЛНЧ, содержащие 0,4 мг/кг мРНК eGFP, вводили путем внутривенной инъекции в хвостовую вену. Мышей умерщвляли через 24 часа после введения и извлекали следующие органы: печень, селезенку, легкие, почки и сердце. Органы собирали в криопробирки и быстро замораживали. Уровни экспрессии eGFP в органах мыши через 24 часа показаны на фигурах 8 (печень), 9 (селезенка), 10 (легкое), 11 (почка) и 12 (сердце).

Таблица 2. Характеристики рецептур ЛНЧ

Рецептура №	Ионизируемый липид	Отношение N/P	Полимер-конъюгированный липид	%EE	<d> _N (нм)	<d> _Z (нм)
-------------	--------------------	---------------	-------------------------------	-----	-----------------------	-----------------------

6	Соединение 2	6	DMPE-PEG2000,	98	62	91
7	Соединение 3	6	DMPE-PEG2000,	97	120	143
8	МСЗ,	6	DMPE-PEG2000,	99	45	65

Гомогенизация тканей

Гомогенизация органов/тканей и лизис клеток проводили перед ELISA. Не вдаваясь в подробности, органы/ткани размораживали на льду и промывали 1x DPBS для удаления всей крови. Органы/ткани разрезали на ломтики примерно по 100-200 мг и переносили в пробирку вместимостью 2 мл, содержащую 0,5-1 мл 1X холодного буфера PTR для клеточной экстракции (из комплекта ELISA ab171581) с ингибиторами протеазы и фосфатазы (ThermoFisher 78445) и шарик размером 5 мм из нержавеющей стали (Qiagen). Образцы органов/тканей гомогенизировали в течение 3 минут в Tissue Lyser II (Qiagen) с частотой 30 1/сек, а затем переносили в чистые пробирки и инкубировали на льду в течение 20 минут. Затем образцы центрифугировали в течение 20 минут при 18000 g при температуре 4°C, и осветленные гомогениаты переносили в чистую пробирку, отбирали аликвоту и хранили при температуре -80°C до дальнейшего использования.

Количественная оценка eGFP в органах с помощью *ex vivo* ELISA

Уровни экспрессии eGFP в печени, селезенке, легких, почках и сердце измеряли с помощью комплекта GFP SimpleStep ELISA® Kit (ab171581) в соответствии с инструкциями производителя. Все реагенты уравнивали до комнатной температуры перед использованием. Подготавливали следующие буферы: Буфер для извлечения клеток 1X PTR с ингибиторами протеазы и фосфатазы (ThermoFisher 78445), буфер для промывки 1X PT, разбавитель антител 1X, коктейль антител и стандартную кривую EGFP. Там, где необходимы дальнейшие разведения тканевых гомогенатов, их проводили в холодном буфере для клеточной экстракции 1x PTR. Затем в соответствующие лунки добавляли по 50 мкл разбавленных образцов и стандартов eGFP, после чего добавляли 50 мкл коктейля антител. Затем планшет герметизировали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на встряхивающем устройстве для планшетов, установленном на 400 об/мин. После инкубирования каждую лунку промывали 3 раза по 350 мкл промывочного буфера 1X PT. После последнего этапа промывки излишки жидкости удаляли путем промакивания планшета чистым бумажным полотенцем. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата TMB, планшет покрывали алюминиевой фольгой и инкубировали в течение 10 минут на встряхивающем устройстве для планшетов, установленном на 400 об/мин. Наконец, по 100 мкл стоп-раствора добавляли в каждую лунку, планшет встряхивали в течение 1 мин и абсорбцию при 450 нм регистрировали с помощью считывателя микропланшетов enVision (Perkin Elmer). Стандартную кривую eGFP

согласовывали с сигмоидальной кривой 4PL, используя графическую панель Prism 9 и из кривой экстраполировали нг eGFP белка.

Количество eGFP нормализовали по общему белку в ткани, как определено анализом BCA (Pierce 23225) в соответствии с инструкциями производителя. Не вдаваясь в подробности, 25 мкл разбавленных тканевых гомогенатов или стандартов BSA добавляли в соответствующие лунки, после чего добавляли по 200 мкл рабочего реагента в каждую лунку и содержимое быстро смешивали в течение 30 сек на встряхивающем устройстве для планшетов. Затем планшет накрывали и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 минут. После охлаждения планшета до комнатной температуры регистрировали поглощение при 562 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов enVision (Perkin Elmer). Общий белок (мг) экстраполировали из стандартной кривой BSA. Данные представлены в виде среднего нг eGFP/мг тканевого белка \pm SD.

Пример 9. Внутривенное введение *in vivo* мышам рецептур ЛНЧ с комбинацией hEPO и мРНК люциферазы

Получение рецептур липидных наночастиц (ЛНЧ), содержащих hEPO и мРНК люциферазы:

Раствор мРНК hEPO (человеческого EPO) и мРНК люциферазы (оба приобретены у TriLink Biotechnologies) смешивали в соотношении 1:1 в цитратном буфере путем смешивания мРНК, растворенной в безнуклеазной воде, 100 мм цитратном буфере (pH 3) и воде, не содержащей нуклеаз, для получения 50 мм цитратного раствора. Растворы липидов в этаноле (99,5%) получали в соответствии с процедурами, аналогичными описанным в примере 6, с четырьмя различными липидными компонентами: ионизируемым липидом, т.е. MC3 или соединением 2 или соединением 3; холестерином (Sigma-Aldrich); DSPC (дистеароилфосфатидил холин, Avanti Polar Lipids Inc); и DMPE-PEG2000 (димиристоил фосфатидил этаноламин-поли(этиленгликоль) 2000, NOF Corporation). Характеристики ЛНЧ приведены в таблице 3. Суммарная концентрация липидов во всех экспериментах составляла 12,5 мМ. Растворы мРНК и липидов смешивали в системе микрофлюидного смешивания NanoAssembler (Precision Nanosystems, Vancouver, BC, Канада) при соотношении смешивания Aq:EtOH = 3:1 и постоянным расходом 12 мл/мин. На момент смешивания молярное соотношение ионизируемых липидных и фосфорных атомов в цепи мРНК было равно 6. Первые 0,2-0,35 мл и последние 0,05-0,1 мл приготовленной суспензии ЛНЧ отбрасывали, а остальную часть объема брали в качестве фракции образца. Объем образца немедленно переносили в кассету для диализа G2 Slide-A-lyzer (10000 MWCO, ThermoFischer Scientific Inc.) и

подвергали диализу против PBS в течение ночи при температуре 4°C (pH7,4). Объем буфера PBS составлял 500-1000x объема фракции образца. На следующий день из кассеты отбирали образец с помощью шприца и иглы. Затем иглу заменили фильтром на 0,2 мкм для шприца и образец стерилизовали в стерильной трубке. Из этой пробы 10 мкл разбавляли, используя 990 мкл буфера PBS pH 7,4, и измеряли усредненный размер частиц по интенсивности на Malvern Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Inc., Westborough, Массачусетс, США) и коэффициенту полидисперсии (PDI). Конечную концентрацию мРНК и процентную эффективность инкапсуляции (%EE) измеряли с помощью набора Quant-it Ribogreen Assay Kit (ThermoFischer Scientific Inc.) с использованием Triton-X100 для разрушения ЛНЧ.

Таблица 3. Характеристики рецептур ЛНЧ

Рецептура №	Ионизируемый липид	Отношение N/P	Полимер-конъюгированный липид	%EE	<d> _N (нм)	<d> _Z (нм)
9	Соединение 2	6	DMPE-PEG2000,	98	46	63
10	Соединение 3	6	DMPE-PEG2000,	97	48	72
11	МС3,	6	DMPE-PEG2000,	98	49	65

Эксперимент на животных:

Эксперименты проводили на мышах дикого типа (WT) и нокаутных LDLr мышах (KO). Все эксперименты проводили в соответствии с предписанием для содержания животных в Швеции и были одобрены комитетом по этике в отношении лабораторных животных в Гетеборге, Швеция. Равное количество самцов и самок C57bl6 *LDLR* ^{-/-} мышей и их однопометников дикого типа были выведены по месту исследования внутри компании. Двадцать C57bl6 *LDLR* ^{-/-} и 40 мышей дикого типа были включены в исследование (N ≥ 5 в каждой группе). Использованные животные имели среднюю массу тела 25 г. Животным вводили внутривенно 0,15 мг/кг hEPO мРНК + 0,15 мг/кг Luc mRNA, совместно использованных в рецептурах ЛНЧ, описанных выше (0,3 мг/кг суммарной мРНК), или с PBS в качестве контроля. Образцы крови отбирали в пробирки с EDTA при t=6ч из хвостовой вены и при t=24ч из ретроорбитального сплетения перед умерщвлением. Мышам вводили подкожно 5 мг/кг субстрата люциферина (биолюциферин RediJect D-Luciferin Bioluminescent Substrate от PerkinElmer) за 20 минут до умерщвления. Сердце, легкие, селезенку и печень собрали сразу после умерщвления и получали их изображение с помощью IVIS Spectrum (PerkinElmer). Суммарную люминесценцию каждого органа количественно оценивали с помощью LivingImage (PerkinElmer). Полученные изображения IVIS показаны на ФИГ. 14. Для анализа hEPO образцы крови

центрифугировали и для анализа плазмы использовали набор Human Erythropoietin Quantikine IVD ELISA Kit (R&D System). Данные представлены в виде hEPO в нг/мл, а образцы анализировали в трипликатах. На ФИГ. 13 показана экспрессия белка люциферазы в печени WT (дикого типа) и КО мышей через 24 часа после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3, в то время как на ФИГ. 15 показана концентрация белка hEPO в плазме мышей WT и КО через 6 часов после внутривенного введения рецептур ЛНЧ, содержащих МСЗ, соединение 2 и соединение 3.

Пример 10. Внутривенное введение *in vivo* мышам рецептур ЛНЧ с мРНК люциферазы

Рецептуры MOD5 и соединения 5 (AZ8608) ЛНЧ, содержащие мРНК люциферазы, были получены процедурами, аналогичными описанным в примерах 6 и 9, где липидные компоненты представляют собой MOD5/холестерин/DSPC/DMPE-PEG = 50/38,5/10/1,5 мол.%; и соединение 5/холестерин/DSPC/DMPE-PEG = 42,5/40/16/1,5 мол.%. Характеристики ЛНЧ приведены в таблице 4.

Репортерные мыши (LoxP Luc), содержащие кассету экспрессии люциферазы, индуцируемую ферментом - циклической рекомбиназой (Cre), были получены путем стандартного трансгеназа добавления генов путем случайной интеграции. До введения ЛНЧ репортерным мышам LoxP Luc делали анестезию изофлураном 4,0/1,5 O₂ i. Мышам вводили 2 единицы (20 мкл) разбавленного Comforion Vet (10 мг/мл; 100 мкг/мышь) подкожно под кожу шеи инсулиновым шприцем (BD U-100). Затем шерсть выбривали и череп промывали тампоном Descutan (4% хлоргексидина), прежде чем поместить животных на стереотаксическую доску с нагревательной подушкой. Мыши были правильно раскреплены, череп был приведен в горизонтальное положение и покрыт пластиковой пленкой с открытым отверстием над черепом. Во время операции выполняли разрез 6-8 мм в средней линии черепа, осушали область вокруг брегмы перед размещением сверла в этом положении после вычисления правильных координат. Одно или два небольших отверстия были просверлены через кость черепа с каждой стороны средней линии, и насос был прикреплен шприцем Гамильтона к стереотаксическому приспособлению. Шприц помещали над отверстием, медленно опускали на нужную глубину и впрыскивали 5 мкл раствора ЛНЧ в каждое отверстие с расходом 0,5 мкл/мин на насосе при впрыске. Мышам вводили по 1,7 мг РНК (Cas9 м РНК/гРНК1/гРНК2 50/25/25 масс./масс.) с 2 инъекциями по 5 мл на мышь в стриатум головного мозга (по одной на полушарие). Инжектор оставляли на месте в течение 3 минут после каждой инъекции, прежде чем медленно поднимали шприц и извлекали насос и шприц. Чтобы

закрывать кожу над просверленными отверстиями применяли 2-3 шва (хирургическая нить Polysorb 6-0) вместе с тканевым клеем, который наносили вдоль разреза. За животными наблюдали и взвешивали ежедневно. За процессом их восстановления и заживление ран внимательно следили в течение 3-5 дней. Через 7 дней выполняли *ex vivo* анализ люциферазы головного мозга обоих полушарий. На ФИГ. 16 показан средний уровень экспрессии Luc в коре головного мозга и стриатуме у Luc-репортерной мыши LoxP после внутристриатального введения рецептур ЛНЧ, содержащих MOD5 и соединение 5.

Таблица 4. Характеристики рецептур ЛНЧ

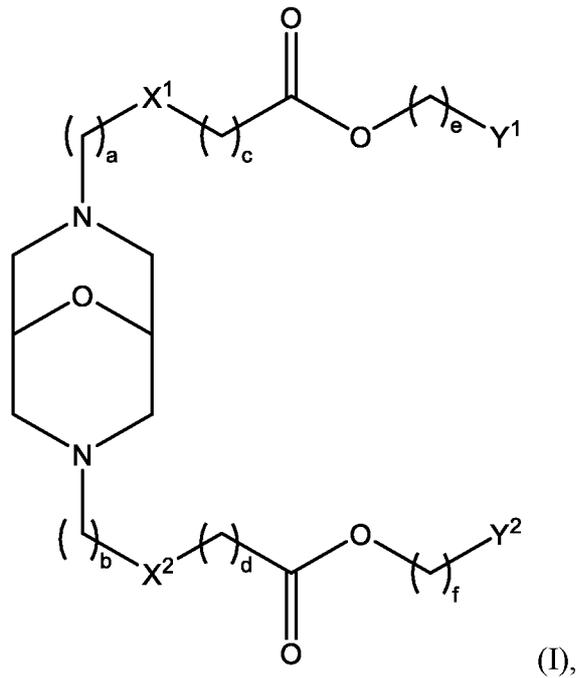
Рецептура №	Ионизируемый липид	Отношение N/P	Полимер-конъюгированный липид	%EE	<d> _N (нм)	<d> _Z (нм)
12	Соединение 5	2	DMPE-PEG2000,	96	51	70
13	MOD5,	3	DMPE-PEG2000,	86	57	74

Экстракция белка и анализ люциферазы

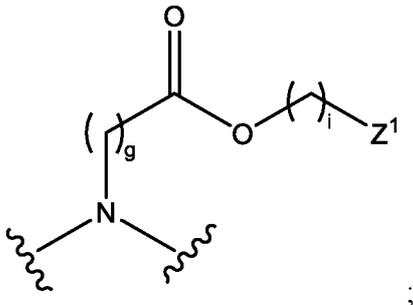
Через неделю после введения ЛНЧ мышей-репортеров LoxP Luc умерщвляли, весь мозг иссекали и стриатум и кору отделяли, взвешивали, помещали в отдельные пробирки и замораживали до дальнейшего анализа. Чтобы измерить ЛНЧ-опосредованные функциональные уровни доставки, из тканей мозга мыши извлекали белок был с помощью Qiagen TissueLyser в соответствии с рекомендациями производителя. Ткани измельчали и гомогенизировали пестиком, приводимым в движение, и центрифугировали для удаления нерастворимых остатков тканей из суспензий. Надосадочные жидкости переносили в отдельные пробирки и концентрацию белка определяли с помощью экспериментов по Брэдфорду. Для анализа люциферазы в микропланшет (белый OptiPlate-96) добавляли 20 мкл каждого надосадочной жидкости и в каждую лунку добавляли по 100 мкл D-люциферина. Образцы перемешивали и полученный сигнал люминесценции измеряли в люминометре. Сигнал люминесценции нормализовали по весу ткани.

Формула изобретения

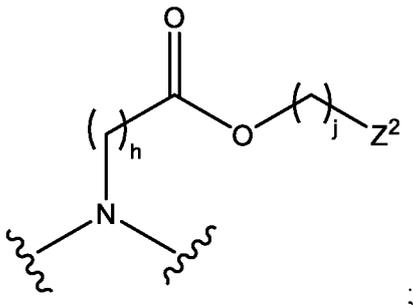
1. Соединение формулы (I),



или его фармацевтически приемлемая соль, где
 каждый a и b независимо принимают значения 3, 4 или 5;
 каждый c и d независимо принимают значения 1, 2 или 3;
 каждый e и f независимо принимают значения 0, 1 или 2;
 X^1 представляет собой метилен или

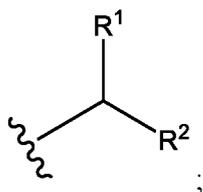


X^2 представляет собой метилен или

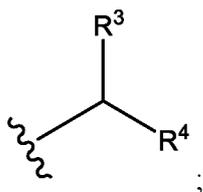


каждый g и h независимо представляют собой 1, 2 или 3;
 каждый i и j независимо представляют собой 0, 1 или 2;

каждый Y^1 и Y^2 независимо представляют собой неразветвленный алкил C_{7-10} ,
неразветвленный алкенил C_{7-10} или

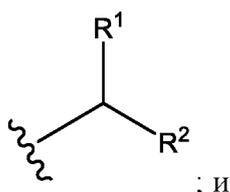


каждый Z^1 и Z^2 независимо представляют собой неразветвленный алкил C_{7-10} ,
неразветвленный алкенил C_{7-10} или



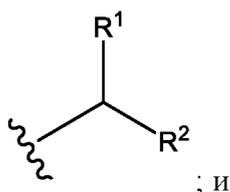
каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} ; и
каждый R^3 и R^4 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

2. Соединение по п. 1, где оба X^1 и X^2 представляют собой метилен.
3. Соединение по п. 1 или п. 2, где оба a и b принимают значения 4; a оба c и d равны 2.
4. Соединение любого из пп. 1-3, где оба e и f равны 0.
5. Соединение по любому из пп. 1-4, где Y^1 представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} или неразветвленный алкенил C_{7-10} ; Y^2 представляет собой



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

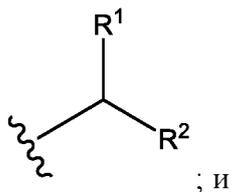
6. Соединение по любому из пп. 1-4, где каждый из Y^1 и Y^2 независимо представляет собой



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

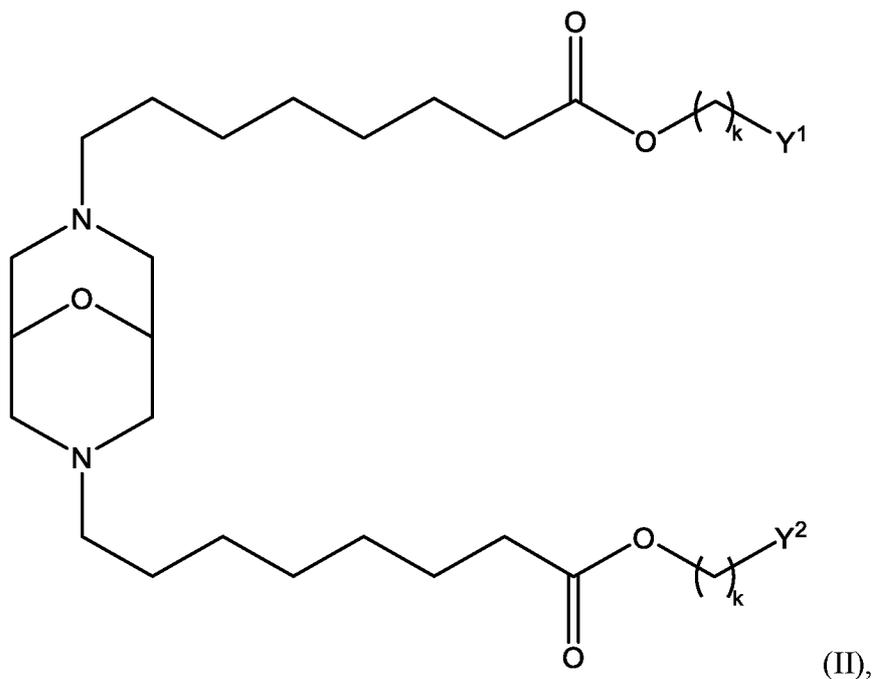
7. Соединение по любому из пп. 1-3, где каждый из e и f независимо принимает значение 1 или 2.

8. Соединение по п. 7, где каждый из Y^1 и Y^2 независимо представляет собой



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

9. Соединение по любому из пп. 1-6 и 8, которое имеет формулу (II):

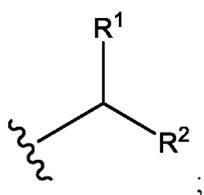


где

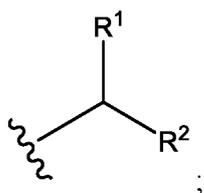
k принимает значения 0, 1 или 2;

Y^1 представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} , неразветвленный алкенил C_{7-10}

или



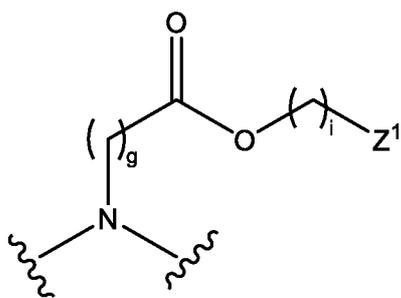
Y^2 представляет собой



каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

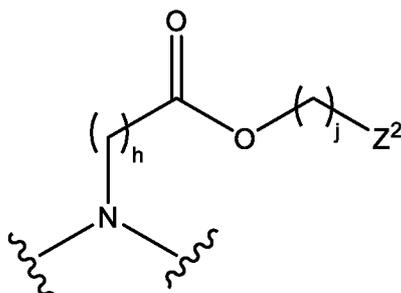
10. Соединение по п. 1, где

X^1 представляет собой

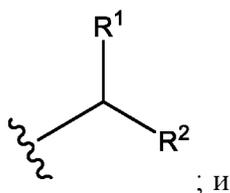


; и

X^2 представляет собой



11. Соединение по п. 10, где оба a и b принимают значения 4; a оба c и d равны 2.
12. Соединение по п. 10 или п. 11, где каждый из e и f независимо принимает значение 1 или 2.
13. Соединение по любому из пп. 10-12, где оба g и h равны 2.
14. Соединение по любому из пп. 10-13, где оба i и j равны 1.
15. Соединение по любому из пп. 10-14, где каждый из Y^1 и Y^2 независимо представляет собой



; и

каждый R^1 и R^2 независимо представляет собой неразветвленный алкил C_{7-10} .

16. Соединение по п. 1, где соединение выбрано из:
- гептадекан-9-ил-8-(7-(8-(нонилокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата;
- гептадекан-9-ил-(Z)-8-(7-(8-(нон-2-ен-1-илокси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата;
- 3-гептилдодецил-8-(7-(8-((3-октилундецил)окси)-8-оксооктил)-9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3-ил)октаноата;
- ди(гептадекан-9-ил)-8,8'-(9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)диоктаноата; и
- тетракис(2-октилдецил) 3,3',3'',3'''-(((9-окса-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-3,7-диил)бис(бутан-4,1-диил)бис(азанетриил))тетрапропионата;

или его фармацевтически приемлемой соли.

17. Липидная наночастица, содержащая соединение любого из пп. 1-16, или его фармацевтически приемлемую соль.

18. Липидная наночастица по п.17, дополнительно содержащая по меньшей мере один нейтральный липид, по меньшей мере один стерин и по меньшей мере один полимер-конъюгированный липид.

19. Липидная наночастица по п.18, где нейтральный липид выбран из дистеароил-фосфатидилхолина (DSPC), диолеоил-фосфатидилэтаноламина (DOPE), дипальмитоил-фосфатидилхолина (DPPC), димиристоил-фосфатидилхолина (DMPC) или их комбинаций.

20. Липидная наночастица по п. 18 или п. 19, где стерин представляет собой холестерин.

21. Липидная наночастица любого из пп. 18, 19 и 20, где полимер-конъюгированный липид выбран из DMPE-PEG2000, DPPE-PEG2000, DMG-PEG2000, DPG-PEG2000, PEG2000-с-DOMG, PEG-C-DOPG или их комбинаций.

22. Липидная наночастица любого из пп. 17-21, где липидная наночастица дополнительно содержит дистеароил-фосфатидилхолин (DSPC), холестерин и DMPE-PEG2000.

23. Липидная наночастица любого из пп. 17-22, дополнительно содержащая терапевтическое средство.

24. Липидная наночастица по п.23, где терапевтическое средство представляет собой сегмент нуклеиновой кислоты.

25. Липидная наночастица по п.24, где сегмент нуклеиновой кислоты представляет собой РНК.

26. Липидная наночастица по п.25, где РНК представляет собой модифицированную мРНК.

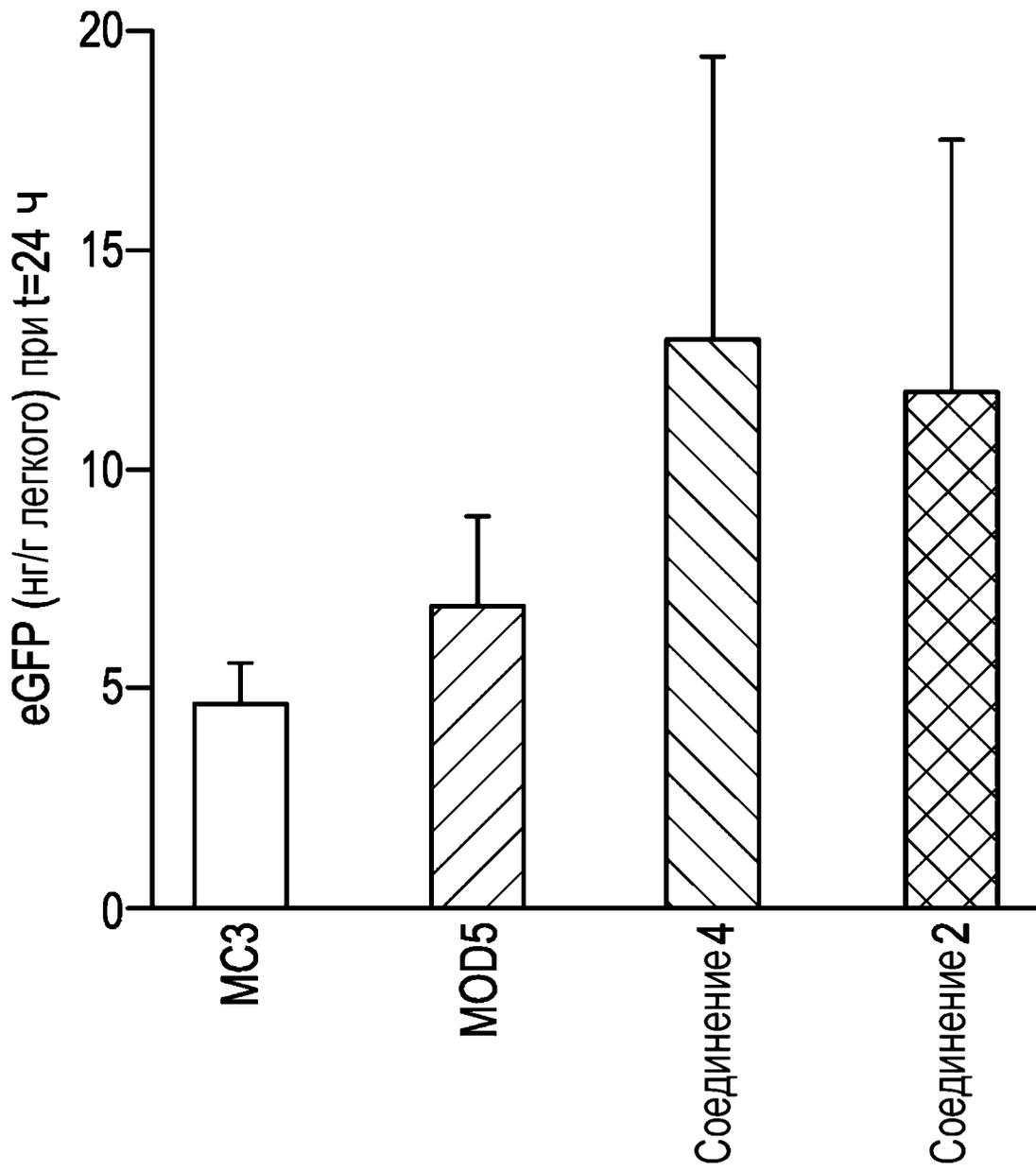
27. Фармацевтический состав, содержащий множество липидных наночастиц любого из пп. 23-26.

28. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтического состава по п. 27.

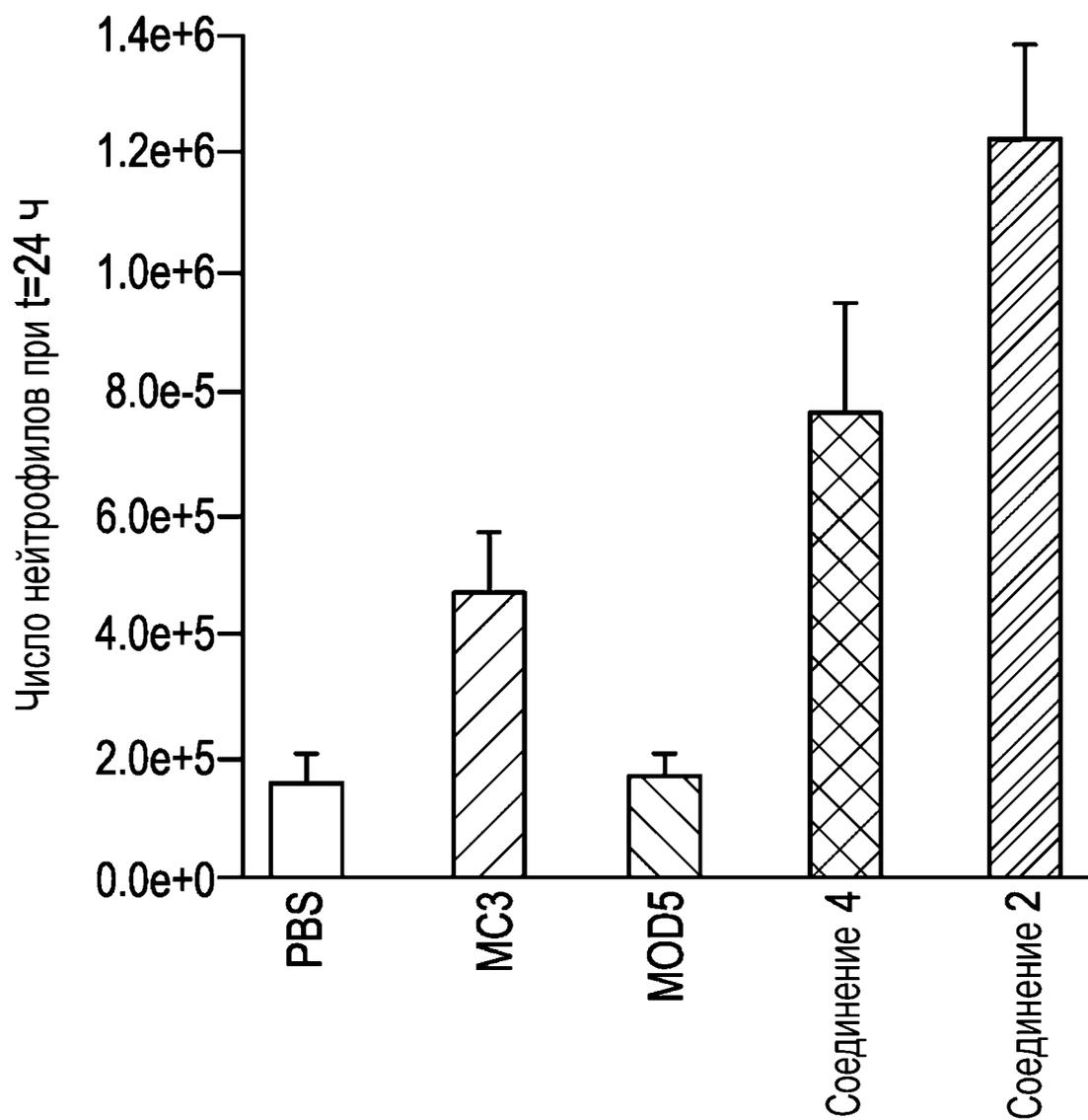
29. Применение фармацевтического состава по п. 28 для лечения заболевания или расстройства.

30. Фармацевтический состав по п. 27 для применения в лечении заболевания или расстройства.

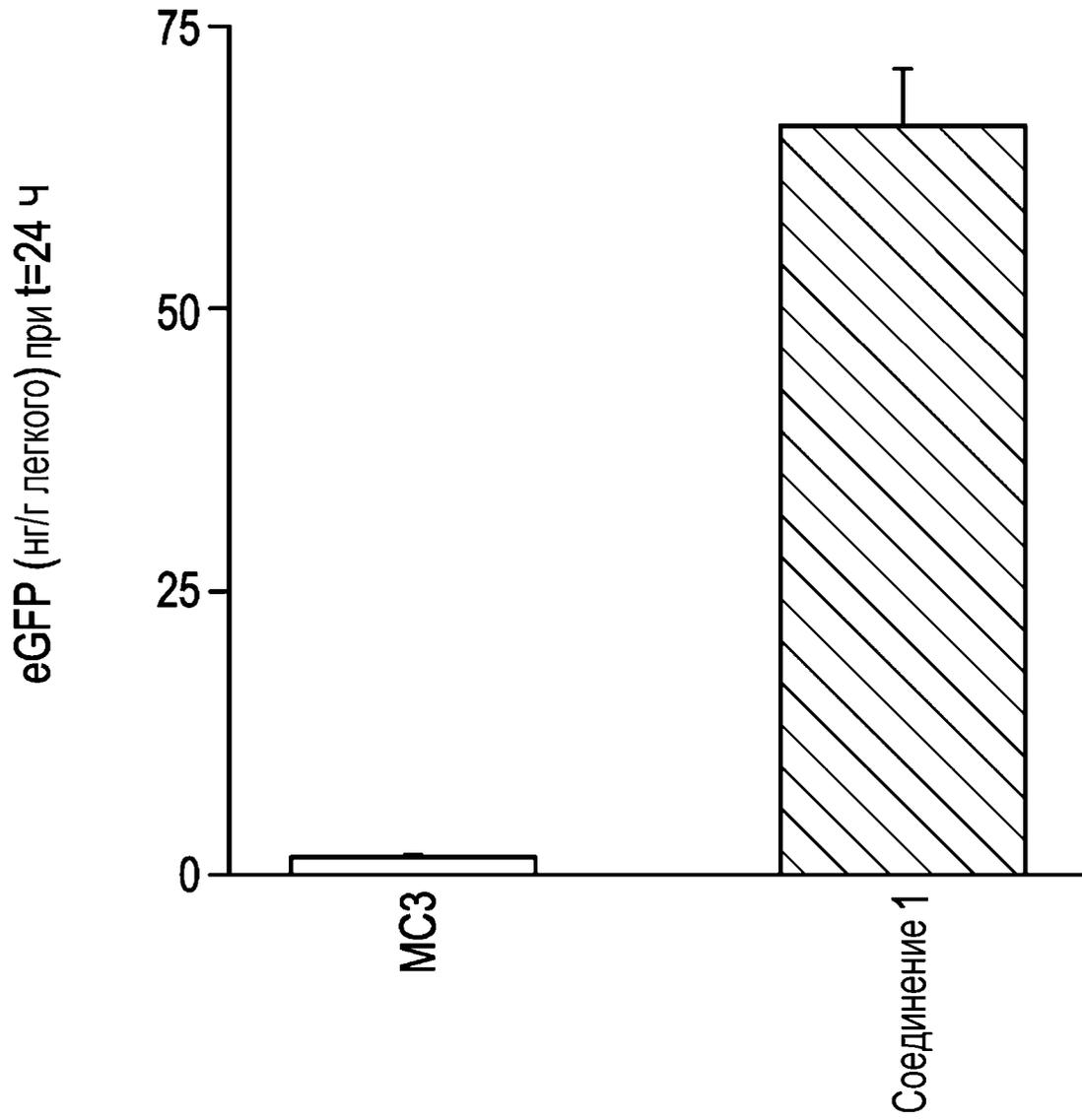
ФИГ. 1



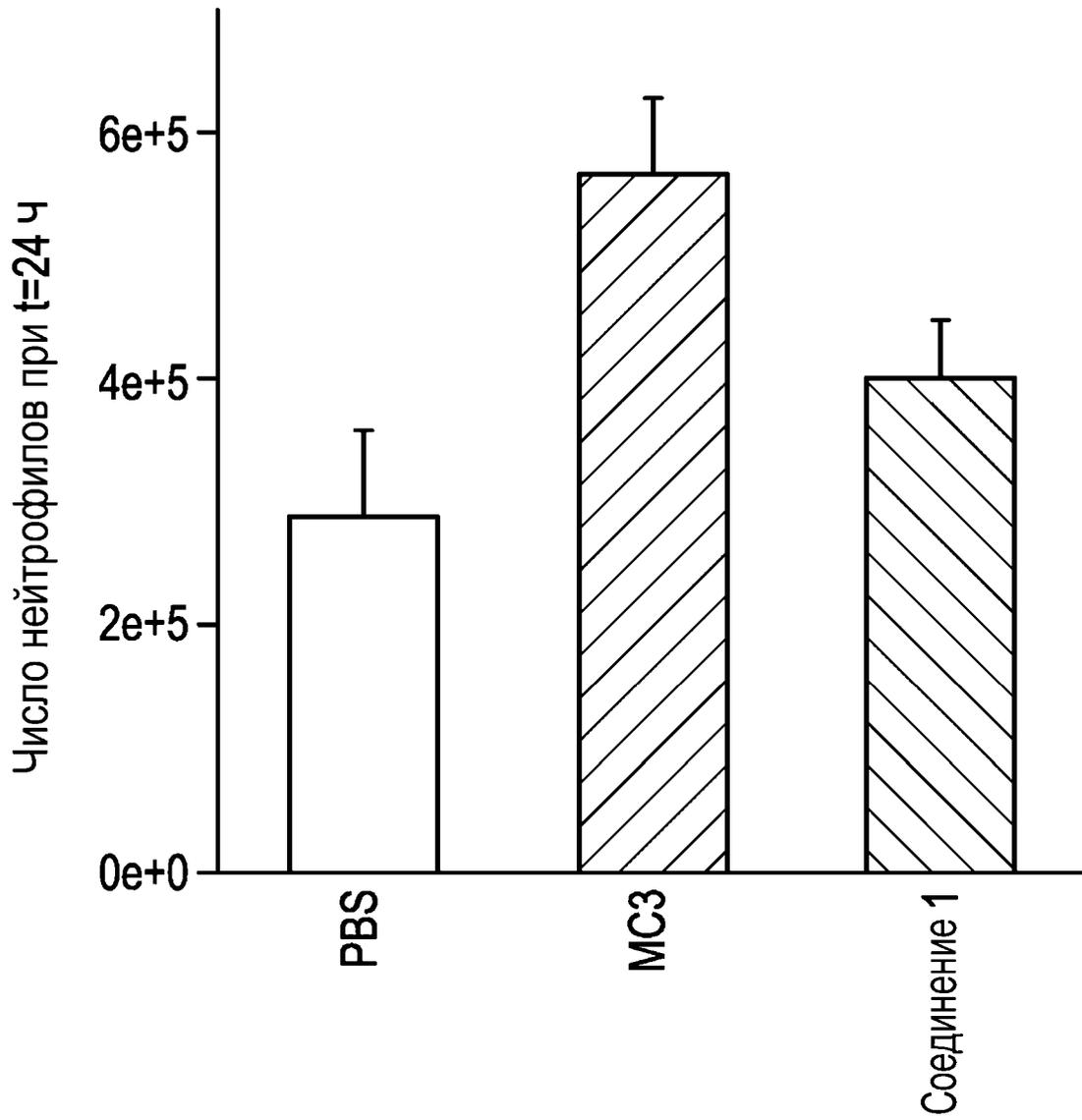
ФИГ. 2



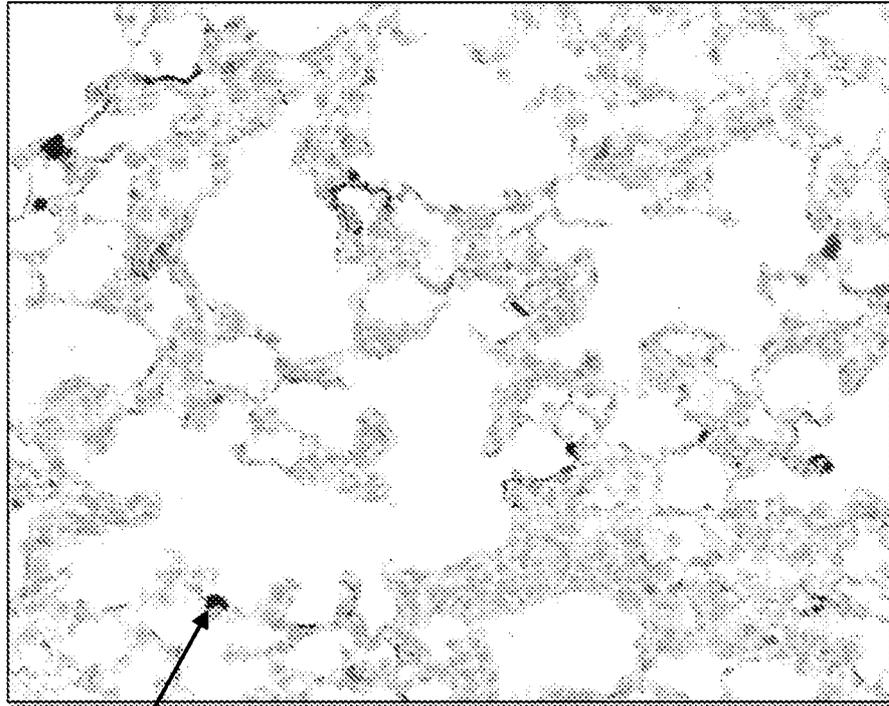
ФИГ. 3



ФИГ. 4

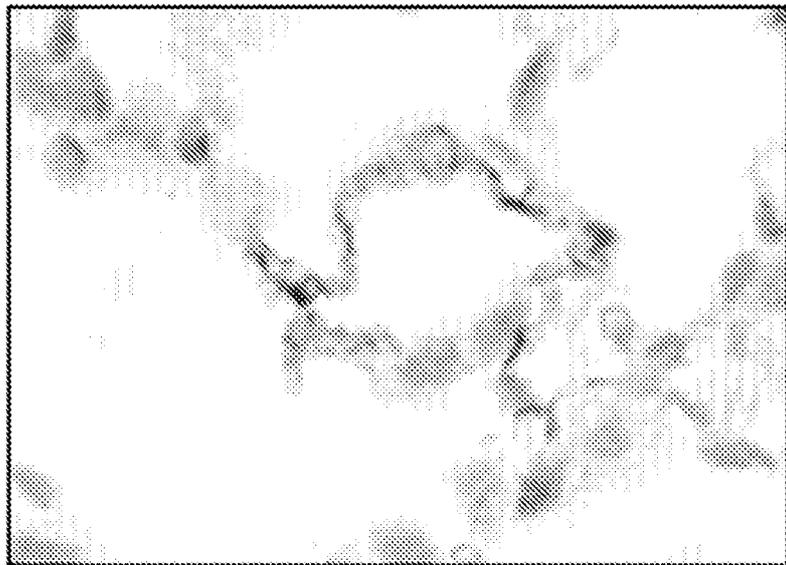


ФИГ. 5А



макрофаг

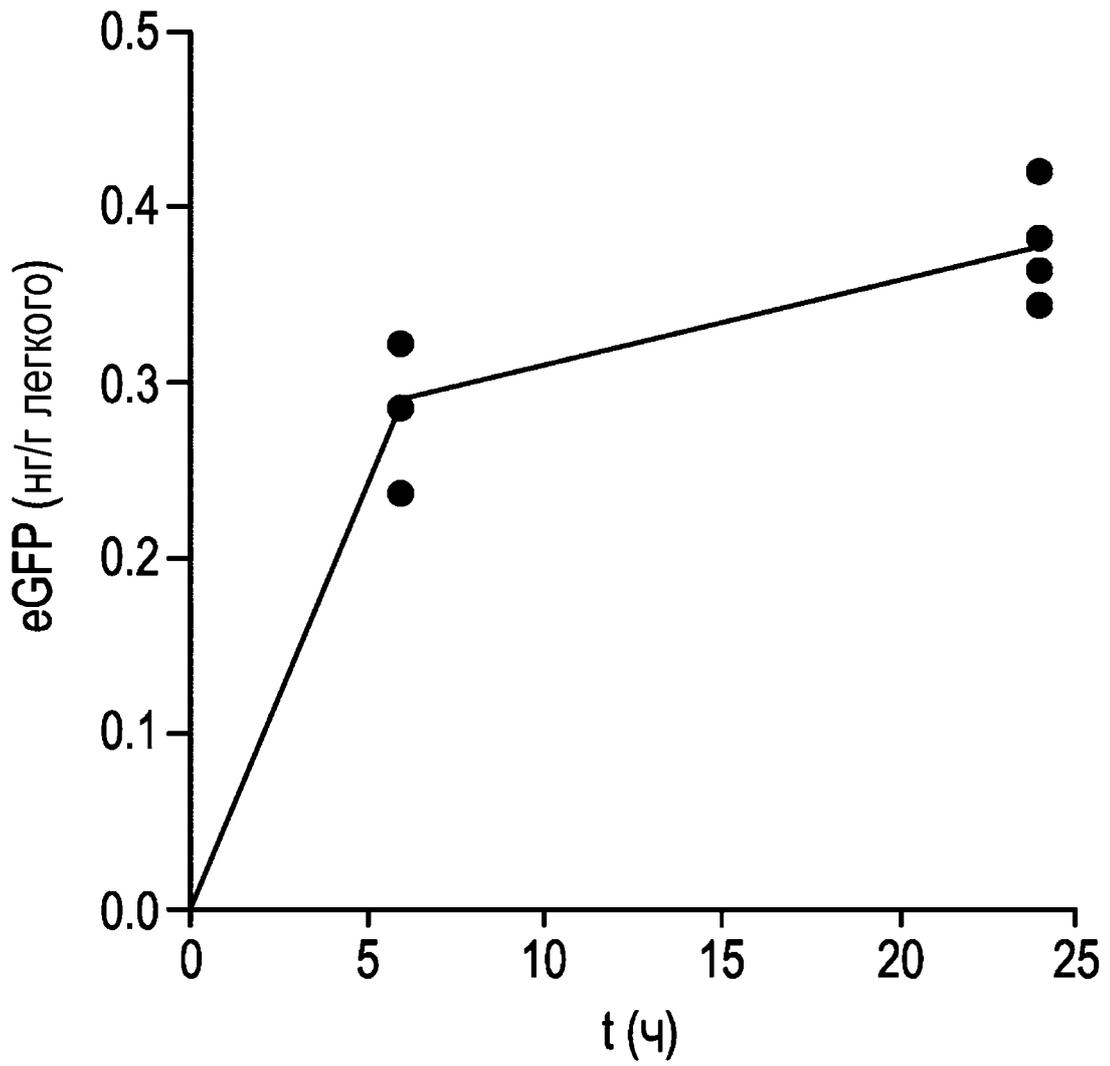
ФИГ. 5В



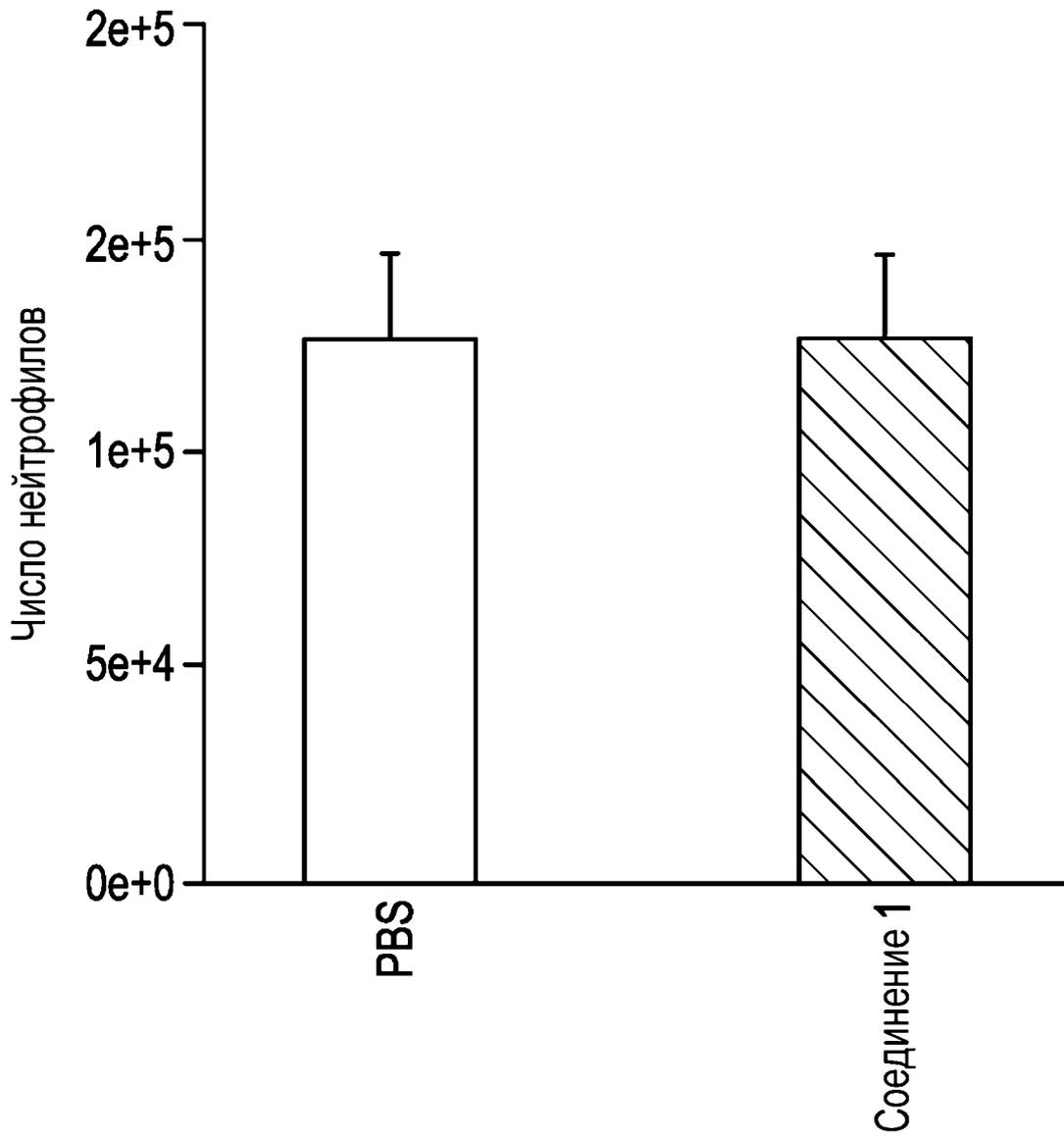
Тип 1 эпителиальных клеток

ФИГ. 6

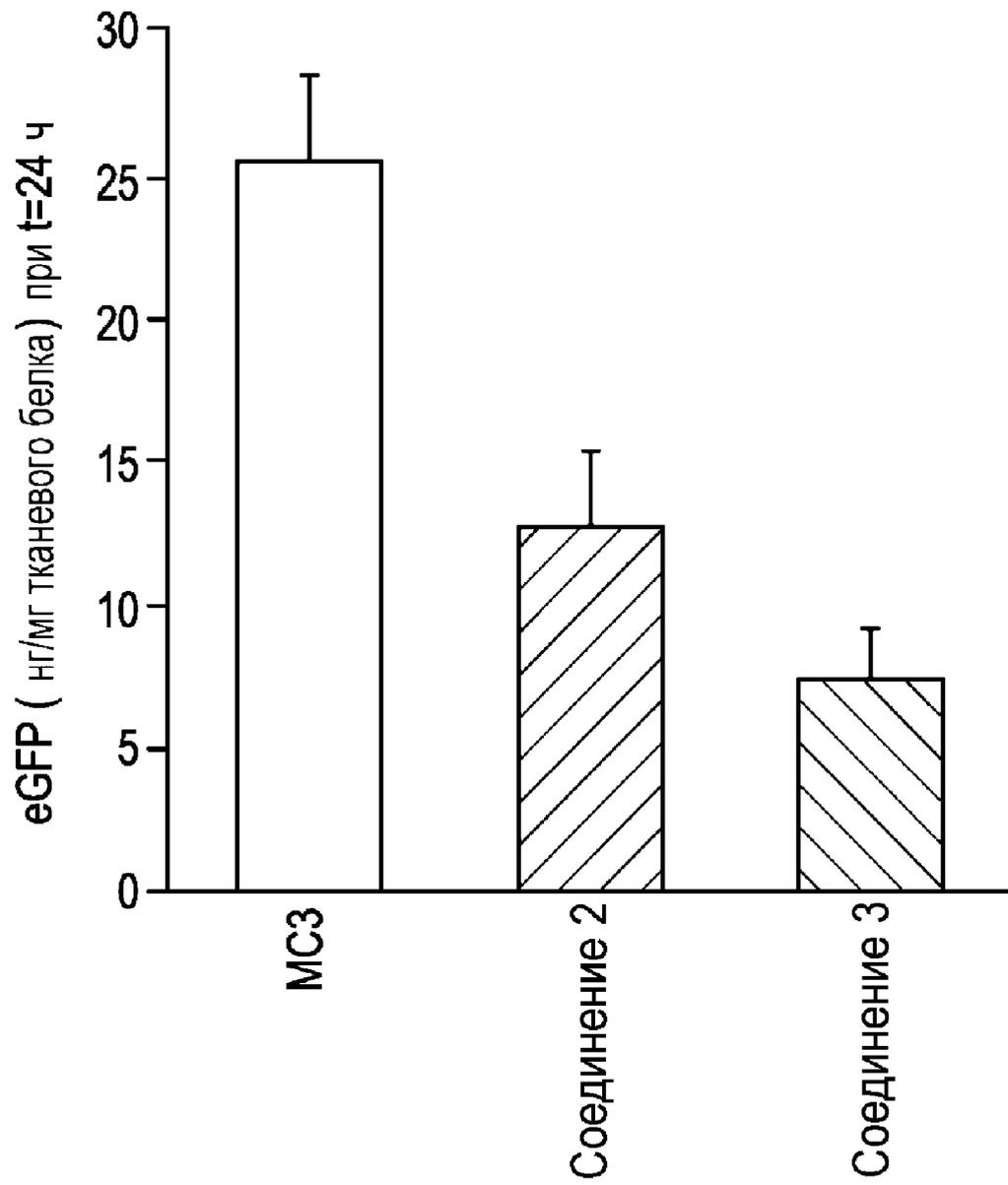
Соединение 1



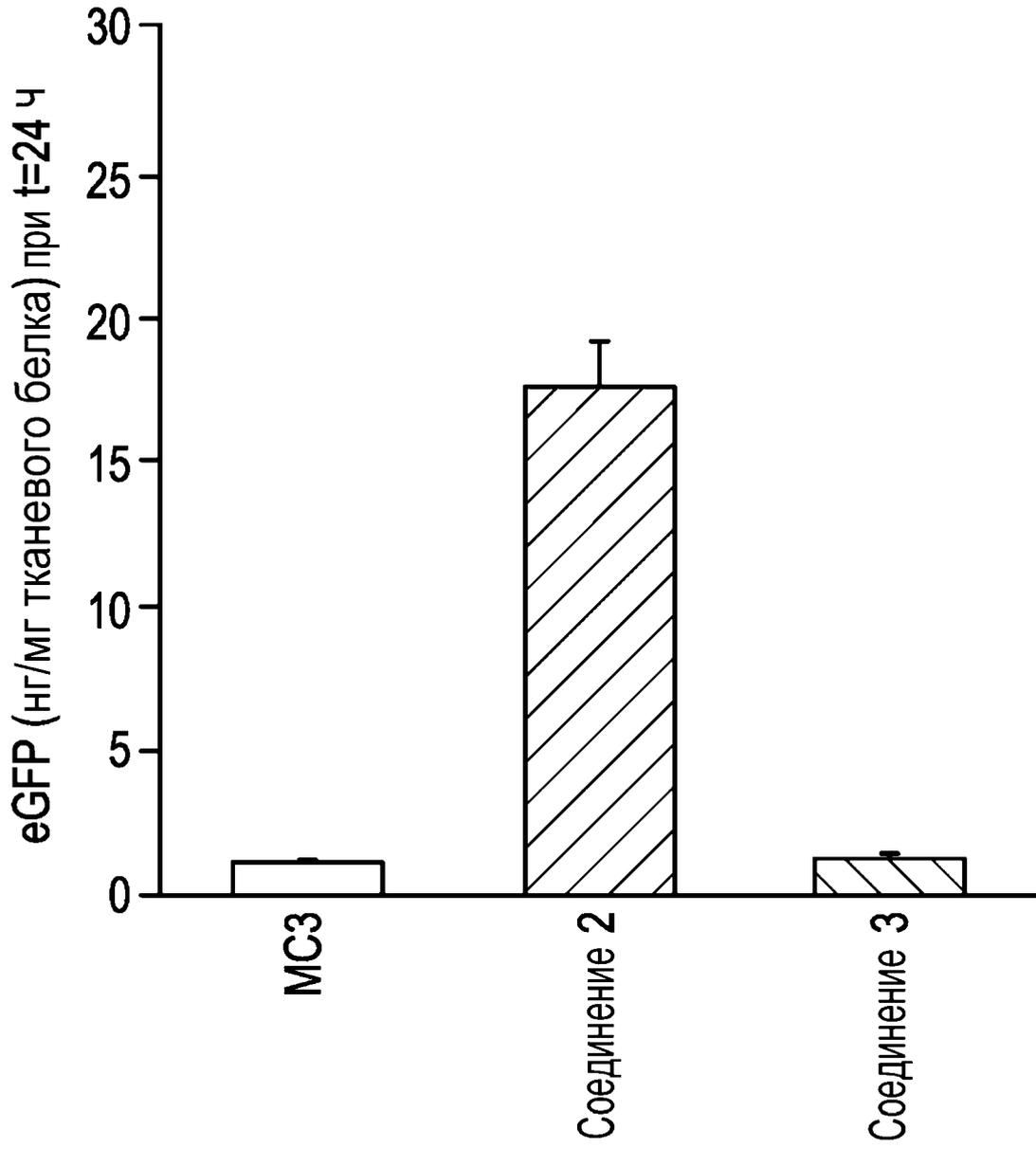
ФИГ. 7



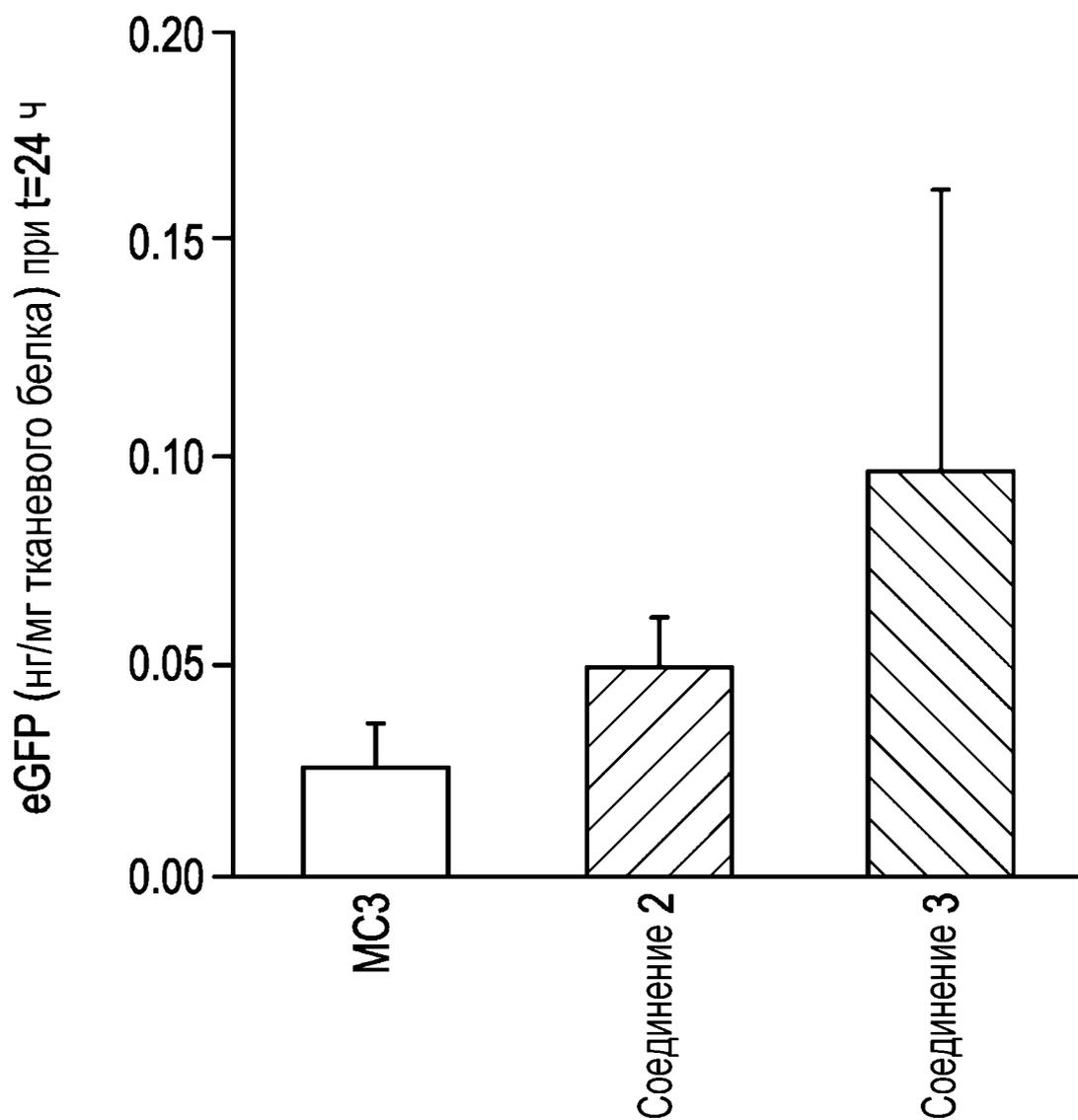
ФИГ. 8



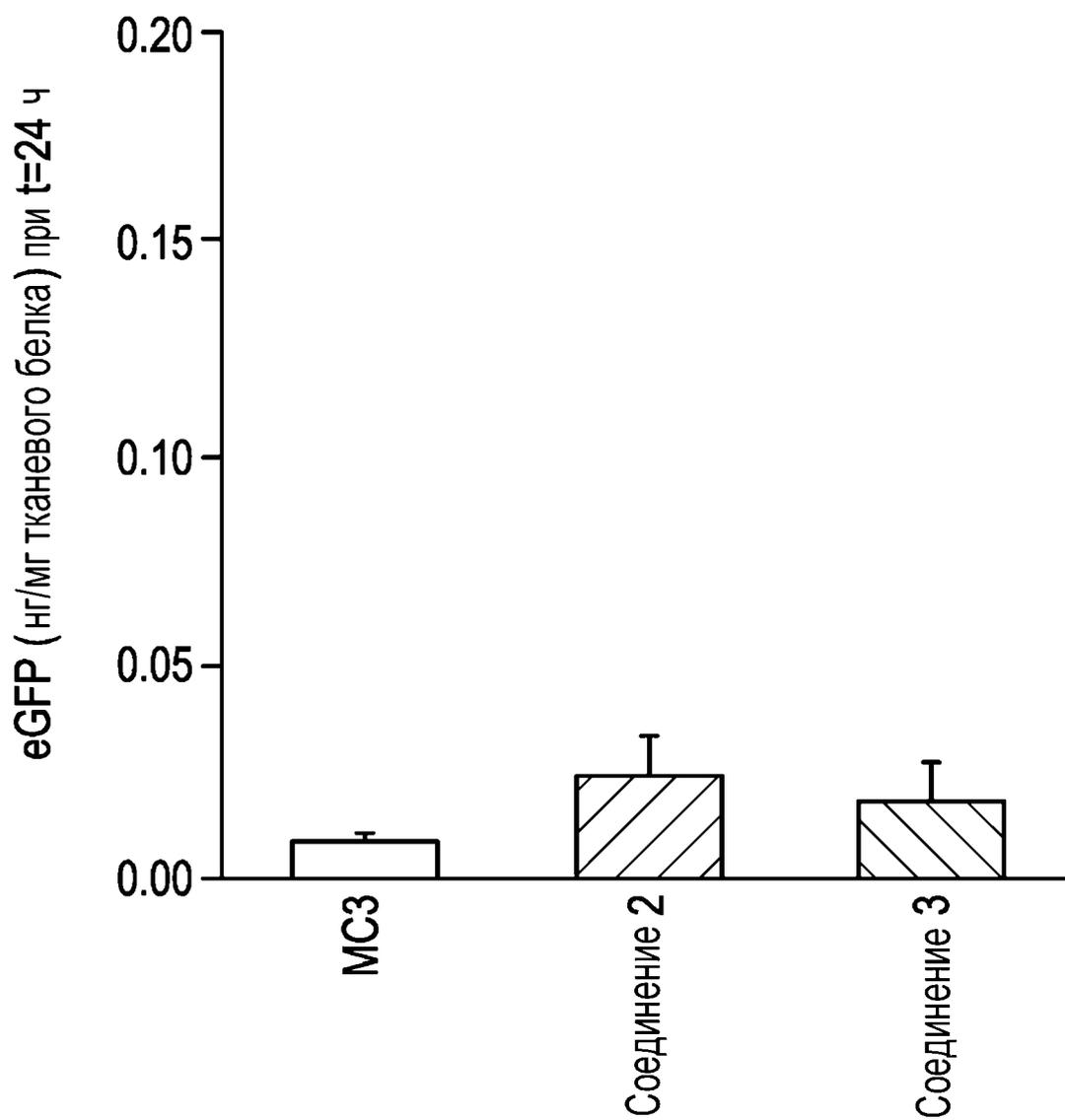
ФИГ. 9



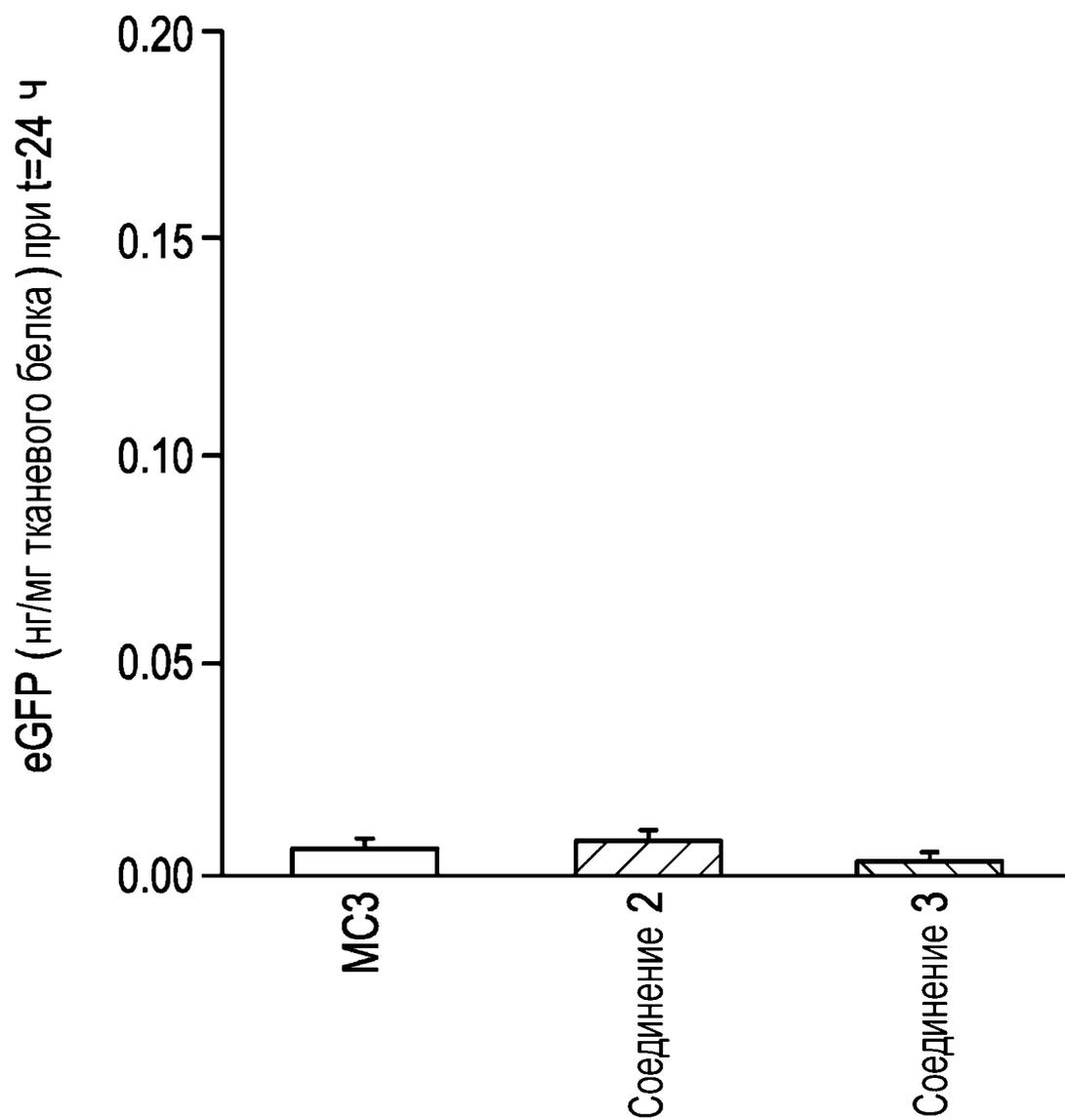
ФИГ. 10



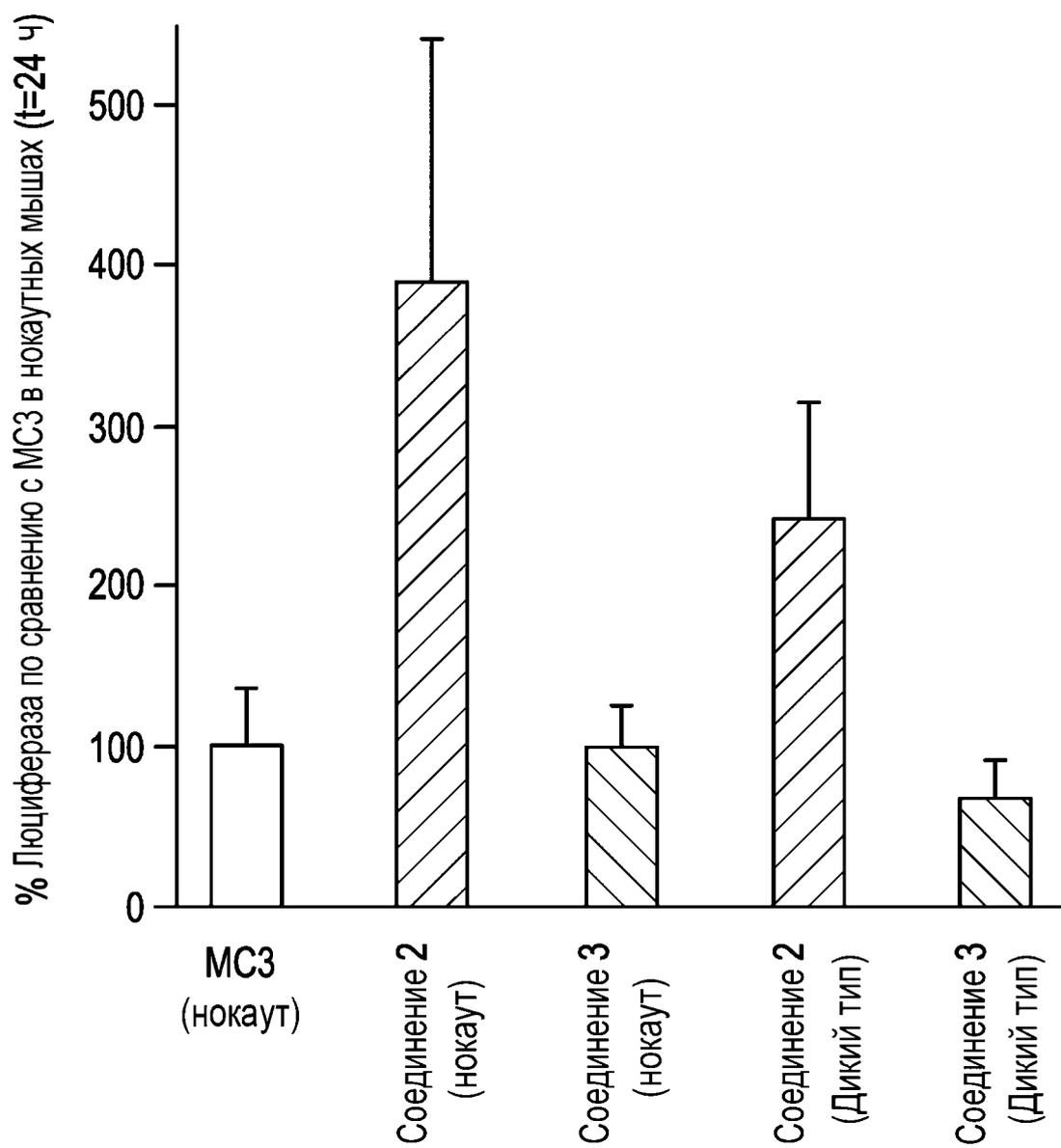
ФИГ. 11



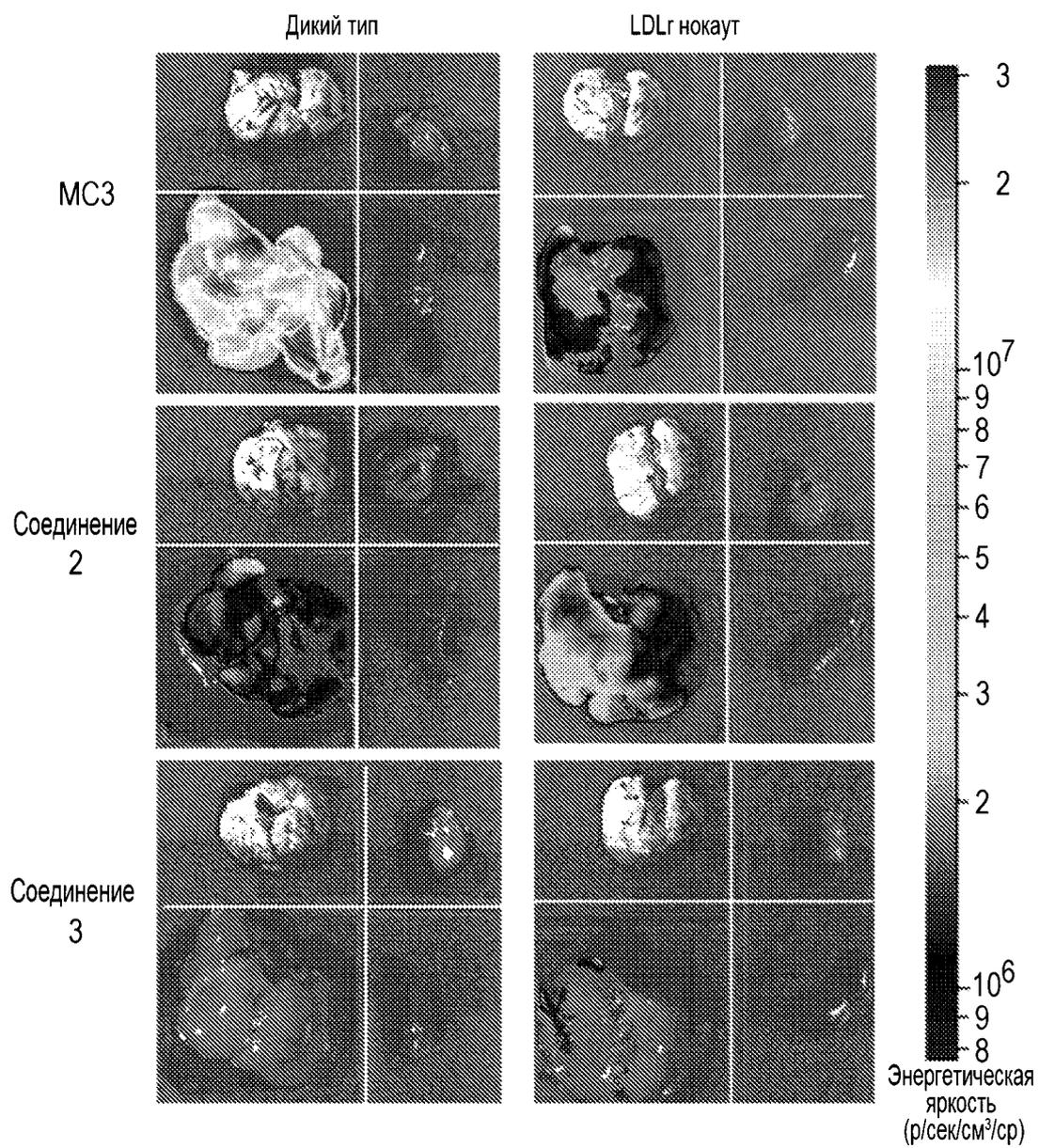
ФИГ. 12



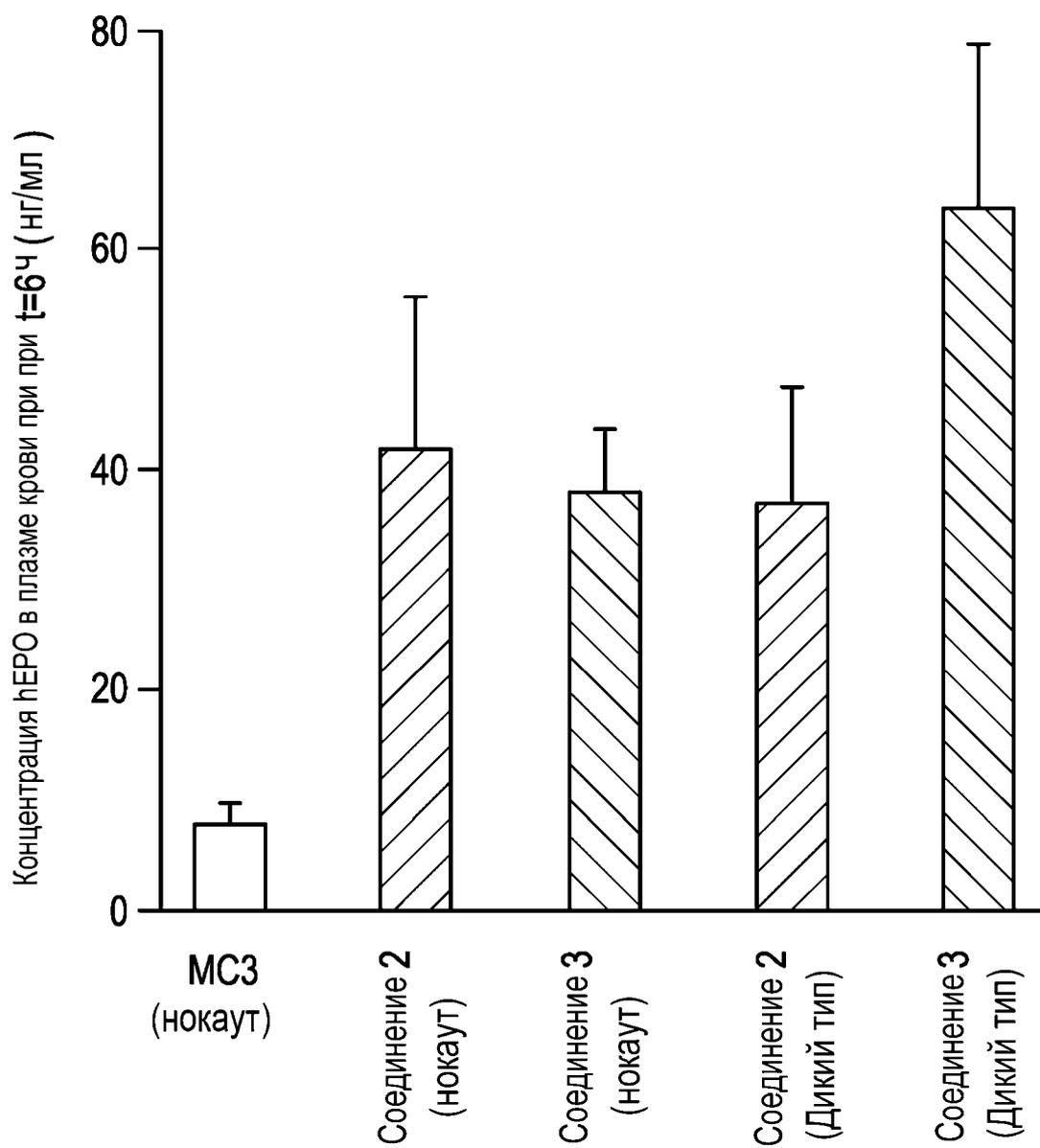
ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16

