

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201790916** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2017.08.31**

(51) Int. Cl. *C07H 21/02* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2013.09.26**

---

(54) **НОВЫЕ ЛИГАНДЫ RIG-I И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

---

(31) **12186444.1**

(32) **2012.09.27**

(33) **EP**

(62) **201590629; 2013.09.26**

(71) Заявитель:

**РАЙНИШЕ ФРИДРИХ-  
ВИЛЬХЕЛЬМС-УНИВЕРЗИТЕТ  
БОНН (DE)**

(72) Изобретатель:

**Гольдек Марион, Ван Ден Борн  
Яспер, Людвиг Янос, Шуберт-Вагнер  
Кристине (DE)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Настоящее изобретение предлагает новые трифосфат-модифицированные олигонуклеотиды, которые можно использовать в качестве лигандов RIG-I, а также новый способ синтеза и очистки, позволяющий получать продукт с высоким выходом и чистотой, подходящей для фармацевтических применений.

**201790916**  
**A1**

**201790916**

**A1**

## НОВЫЕ ЛИГАНДЫ RIG-I И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает новые трифосфат-модифицированные олигонуклеотиды, которые можно использовать в качестве лигандов RIG-I, а также новый способ синтеза и очистки, позволяющий получать продукт с высоким выходом и чистотой, подходящей для фармацевтических применений.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Schlee et al., *Immunity*, 2009, 31, 25-34 описывают двухцепочечные РНК с тупыми концами, несущие 5'-О-трифосфатный фрагмент на одной из цепей, которые действуют как мощные стимуляторы иммунной системы путем связывания геликазы RIG-I. Таким образом, существует потребность в простом и эффективном способе получения трифосфат-модифицированных олигонуклеотидов с высокой степенью чистоты, подходящей для фармацевтического применения.

Способы присоединения трифосфатных групп или их аналогов к группе 5'-ОН нуклеозидных соединений хорошо известны в данной области. Ludwig J. et al., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635 раскрывают способ трифосфорилирования в растворе с получением 5'-О-трифосфатов нуклеозидов и их аналогов с использованием 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-она в качестве фосфитилирующего реагента. Gaur R.K. et al., 1992, *Tetrahedron Letters*, 33, 3301-3304 описывают применение указанного способа на твердой фазе для синтеза 2'-О-метилрибонуклеозид-5'-О-трифосфатов и их Р<sub>α</sub>-тио-аналогов. В патенте США 6900308 В2 описан твердофазный синтез модифицированных нуклеозид-5'-О-трифосфатов как потенциальных противовирусных соединений, а в патентах США 7285658, 7598230 и 7807653 раскрываются трифосфатные аналоги нуклеозидов с модификациями в сахаре, нуклеотидном основании и в трифосфатном фрагменте.

В WO96/40159 описан способ получения кэпированных молекул РНК или аналогов РНК, где олигонуклеотид, представляющий собой РНК или аналог РНК, подвергают взаимодействию с фосфитилирующим реагентом, таким как 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-он или его производное, с замещением в цикле. Полученное

промежуточное соединение подвергают взаимодействию с фосфатом или пирофосфатом, или его солью, окисленным или гидролизированным. Ди- или трифосфорилированные РНК или аналоги РНК кэпируют путем взаимодействия с активированным  $m^7G$  три-, ди- или монофосфатом или его аналогом.

В WO 2009/060281 описаны иммуностимулирующие аналоги олигорибонуклеотидов, содержащие модифицированные олигофосфатные фрагменты, а также способы получения таких соединений. Указанные способы включают в себя синтез олигонуклеотида на твердом носителе, взаимодействие нуклеотида, присутствующего на 5'-конце олигонуклеотида, с фосфитилирующим реагентом, таким как 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-он, в подходящем растворителе и в присутствии основания, взаимодействие фосфитилированного олигонуклеотида с пирофосфатом или аналогом пирофосфата, окисление олигонуклеотида окисляющим реагентом и удаление защитной группы с олигонуклеотида с получением модифицированного олигонуклеотида, содержащего трифосфат или аналог трифосфата.

Электрофорез в полиакриламидном геле, описанный в WO 96/40159, можно использовать только для мелкомасштабного разделения. Разрешающая способность ионообменной хроматографии для 5'-моно-, ди- и трифосфорилированных продуктов более длинных олигорибонуклеотидов является ограниченной. Необходимость денатурирующих условий делает разделение трудоемкой задачей (Sproat, 1999; Zlatev, 2010; WO 2009/060281), кроме того, продукты обычно загрязнены n-1, n-2 последовательностями и их моно- и дифосфатами, т.е., являются недостаточно чистыми. Учитывая чувствительность лигандов RIG-I к точным терминальным структурам, указанные методы очистки не являются оптимальными для фармакологических приложений.

Таким образом, существует настоятельная потребность в новых трифосфорилированных олигонуклеотидах и их аналогах, в частности, обладающих селективностью в отношении RIG-I, а также в способах получения таких соединений.

Следовательно, настоящее изобретение предлагает новые 5'-трифосфорилированные олигонуклеотиды и их аналоги, которые



Термин "олигонуклеотид" в контексте настоящей заявки охватывает соединения, содержащие несколько, например, по меньшей мере, четыре структурных элемента, представляющих собой нуклеотиды или аналоги нуклеотидов. Предпочтительно олигонуклеотид содержит 6-100, например, 20-40 структурных элементов. Структурные элементы, представляющие собой нуклеотиды или аналоги нуклеотидов, могут содержать субъединицы из нуклеозидов или аналогов нуклеозидов, соединенные межсубъединичными связями. Нуклеозидные субъединицы включают в себя дезоксирибонуклеозидные субъединицы, рибонуклеозидные субъединицы и/или их аналоги, в частности, аналоги нуклеозидов, модифицированные по сахарному остатку и/или нуклеотидному основанию. Кроме того, олигонуклеотиды могут содержать структурные элементы, отличные от нуклеотидов, и/или другие концевые модификации и/или модификации боковых цепей.

В предпочтительных субъединицах, модифицированных по остатку сахара, 2'-ОН рибонуклеозидной субъединицы замещают группой, выбранной из OR, R, галогена, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub> или CN, где R обозначает C<sub>1-6</sub> алкил, C<sub>2-6</sub> алкенил или C<sub>2-6</sub> алкинил, а галоген представляет собой F, Cl, Br или I. В других предпочтительных субъединицах, модифицированных по остатку сахара, рибоза может быть замещена, например, другим сахаром, например, пентозой, такой как арабиноза. Указанную модификацию сахара можно сочетать с описанными выше модификациями 2'-ОН, например, с получением 2'-фторарабинонуклеозидных субъединиц. Другие предпочтительные субъединицы, модифицированные по остатку сахара, включают в себя замкнутые нуклеозиды (LNA) или 2',3'-секонуклеозиды (UNA). В предпочтительных модифицированных по нуклеотидному основанию нуклеозидных структурных элементах вместо стандартного нуклеотидного основания используют нестандартное, например, не встречающееся в природе, нуклеотидное основание. Примеры нестандартных нуклеотидных оснований включают в себя производные урацила или цитозина, модифицированные по 5 положению, такие как 5-(2-амино)пропилурацил или 5-бром урацил; гипоксантин; 2,6-диаминопурин; производные аденина или гуанина, модифицированные

по 8 положению, такие как 8-бромгуанин; дезануклеозиды, такие как 7-дезагуанин или 7-дезааденин; O- и N-алкилированные нуклеотидные основания, такие как N<sup>6</sup>-метиладенин или N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-диметиладенин. Другие подходящие аналоги нуклеотидов могут быть выбраны из универсальных нуклеотидных аналогов, таких как 5-нитроиндол.

Межсубъединичная связь может представлять собой фосфодиэфирную связь, или модифицированную связь, такую как фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, метилфосфонатная, фосфорамидатная, боранофосфатная, или другая модифицированная связь, известная специалистам в данной области техники.

Олигонуклеотид может быть выбран из дезоксирибонуклеотидов, рибонуклеотидов и аналогов олигонуклеотидов. Дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или аналоги олигонуклеотидов могут быть химически модифицированы по нуклеозидной и/или рибозной субъединице, дезоксирибонуклеотида, рибонуклеотида и/или аналога олигонуклеотида. Аналоги дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов могут содержать, по меньшей мере, одну дезоксирибонуклеозидную или рибонуклеозидную субъединицу и, по меньшей мере, одну модифицированную нуклеозидную субъединицу и/или, по меньшей мере, одну модифицированную межсубъединичную связь, например, такую, как описано выше. Аналоги олигонуклеотидов также могут содержать в своей структуре модифицированные нуклеозидные субъединицы.

Олигонуклеотид может представлять собой одноцепочечную молекулу или двухцепочечную молекулу. Двухцепочечные олигонуклеотиды могут содержать полностью или частично комплементарные цепи. Двухцепочечные молекулы могут содержать тупые концы или, по меньшей мере, один липкий конец, например 5'- или 3'-липкий конец. Если липкие концы присутствуют, они предпочтительно располагаются на дистальном конце молекулы (по отношению к трифосфату/аналогу трифосфата). Двухцепочечные олигонуклеотиды также могут содержать шпилечную структуру, в которой дуплекс закрыт петлей на дистальном конце (по отношению к трифосфату/аналогу трифосфата). Петля может содержать нуклеотидные и/или не нуклеотидные структурные элементы,

например, диольные структурные элементы, включающие в себя этиленгликольные фрагменты, такие как три(этилен)гликоль или гекса(этиленгликоль)гликоль; пропан-1,3-диол; додекан-1,12-диол; или 3,12-диокса-7,8-дителитетрадекан-1,14-диол.

В предпочтительном варианте осуществления двухцепочечные молекулы содержат тупые концы, в особенности, на ближнем конце (по отношению к трифосфату/аналогу трифосфата).

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления олигонуклеотид является двухцепочечным, причем длина каждой отдельной цепи составляет, по меньшей мере, 19 нуклеотидов. Двухцепочечный олигонуклеотид указанной длины с тупыми концами является особенно предпочтительным. В соответствии со следующим предпочтительным вариантом осуществления каждая цепь олигонуклеотида содержит в длину, по меньшей мере, от 19 до 50 нуклеотидов, от 19 до 30 нуклеотидов, от 20 до 30 нуклеотидов, от 22 до 28 нуклеотидов, особенно предпочтительно от 22 до 26 нуклеотидов.

Олигонуклеотид может содержать другие концевые модификации и/или модификации боковых цепей, которые могут включать в себя, например, ковалентное присоединение фрагментов, специфичных к определенным клеткам. Указанные фрагменты могут стимулировать клеточное или клеточно-специфическое поглощение и включают в себя, например, липиды, витамины, гормоны, пептиды, олигосахариды и их аналоги. Специфичные фрагменты, например, можно присоединить к модифицированным нуклеотидным основаниям или ненуклеотидным структурным элементам с помощью способов, известных специалистам в данной области.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления модификации обеспечивают и/или повышают селективность олигонуклеотида к определенной мишени. В особенно предпочтительном варианте осуществления обеспечивается и/или повышается селективность олигонуклеотида в отношении RIG-I. Методы определения селективности конкретного олигонуклеотида в отношении RIG-I описаны подробно в данном документе (см. раздел Примеры) и/или известны специалистам в данной области.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом

осуществления химические модификации поддерживают или повышают химическую стабильность олигонуклеотида. Специалистам в данной области техники известны методы определения химической стабильности конкретного олигонуклеотида. Такие способы также описаны, например, в разделе Примеры.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления химические модификации олигонуклеотидов независимо выбраны из группы, включающей в себя галогенирование, например, F-галогенирование, 2'-O-алкилирование, например, 2'-O-метилование, и/или введение фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В частности, F-галогенирование и введение фосфотиоатных связей повышают устойчивость олигонуклеотида, тогда как 2'-O-метилование обеспечивает или повышает селективность олигонуклеотида в отношении RIG-I. 2'-O-метилование также позволяет изменить иммуногенность РНК. В предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотид содержит только один или два участка 2'-O-метилования на цепь, более предпочтительно один участок 2'-O-метилования на цепь.

Замена 2'-F является особенно предпочтительной. Гидроксильную группу в 2'-положении рибозы заменяют на фтор. Замены 2'-F в РНК, в частности, приводят к повышенной стабильности, обусловленной устойчивостью к расщеплению нуклеазой. В другом варианте осуществления 2'-фтор-замещение может, например, усиливать RIG-I-зависимую стимуляцию иммунной системы.

В соответствии с настоящим описанием фосфотиоатные соединения, как правило, представляют собой соединения, полученные в результате замены межнуклеотидных связей на фосфотиоатные.

Фосфотиоат-модифицированные соединения, несущие модификацию в концевом фрагменте олигонуклеотида, являются особенно предпочтительными. В процессе фосфотиоатной модификации не участвующий в связывании атом кислорода мостикового фосфата основной цепи нуклеиновой кислоты заменяют на атом серы. Такая замена значительно снижает расщепление нуклеазами по данному положению и приводит к повышению

стабильности нуклеотидной цепи.

В особенно предпочтительном варианте олигонуклеотид настоящего изобретения подвергают F-галогенированию, метилированию, например, 2'-O-метилированию, а также введению фосфоротиоатных связей, в частности, на концевом фрагменте олигонуклеотида.

Идентификационные параметры конкретного олигонуклеотида зависят от последовательности и длины олигонуклеотида и могут быть определены для каждого конкретного олигонуклеотида. Специалистам в данной области техники хорошо известно, как осуществить такое определение.

Как указано выше, такие методы определения RIG-I-селективности и/или стабильности конкретного олигонуклеотида подробно описаны в настоящей заявке.

Олигонуклеотид формулы (I) или (IV) содержит группу трифосфат/аналог трифосфата. В данной группе  $V_1$ ,  $V_3$  и  $V_5$  независимо выбраны из O, S и Se. Предпочтительно  $V_1$ ,  $V_3$  и  $V_5$  обозначают O.  $V_2$ ,  $V_4$  и  $V_6$  в каждом случае независимо выбраны из OH,  $OR^1$ , SH,  $SR^1$ , F,  $NH_2$ ,  $NHR^1$ ,  $N(R^1)_2$  и  $BH_3^+M^+$ . Предпочтительно  $V_2$ ,  $V_4$  и  $V_6$  обозначают OH.  $R^1$  может представлять собой  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{2-6}$  алкинил,  $C_{2-6}$  ацил или циклическую группу, такую как  $C_{3-8}$  цикло(гетеро)алкильная группа,  $C_{3-8}$  цикло(гетеро)алкенильная группа, фенил или  $C_{5-6}$  гетероарильная группа, где гетероатомы выбраны из N, O и S. Кроме того, два  $R^1$  вместе с атомом азота, с которым они связаны, могут образовывать цикл, например, 5- или 6-членный цикл.  $R^1$  может также содержать заместители, такие как галоген, например, F, Cl, Br или I, O(галоген) $C_{1-2}$  алкил и, в случае циклических групп, (галоген) $C_{1-2}$  алкил.  $M^+$  может обозначать неорганический или органический катион, такой как катион щелочного металла, или катион аммония или амина.

$W_1$  может обозначать O или S. Предпочтительно  $W_1$  обозначает O.  $W_2$  может обозначать O, S, NH или  $NR^2$ . Предпочтительно  $W_2$  обозначает O.  $W_3$  может обозначать O, S, NH,  $NR^2$ ,  $CH_2$ ,  $CHNaI$  или  $C(Hal)_2$ . Предпочтительно  $W_3$  обозначает O,  $CH_2$  или  $CF_2$ .  $R^2$  может быть выбран из группы, описанной выше для  $R^1$ . Hal может

представлять собой F, Cl, Br или I.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ,  $V_5$ ,  $V_6$ ,  $W_1$ ,  $W_2$  и  $W_3$  обозначают O.

Группу, представляющую собой трифосфат/аналог трифосфата, предпочтительно присоединяют к концу олигонуклеотида. Предпочтительно указанную группу присоединяют к 5'-концу олигонуклеотида, в частности, по 5'-ОН 5'-концевого сахарного остатка.

Как указано в данном описании, Z обозначает улавливаемый маркер или H. Улавливаемый маркер Z можно функционально определить с помощью ряда приемлемых примеров, как описано ниже. Общее правило может включать в себя следующие положения: Z должен обеспечивать удобную очистку, и он должен удаляться в условиях, совместимых с требованиями стабильности рррРНК. Специалист в данной области может определить без лишней усилий, удовлетворяет ли данный маркер функциональному определению, или нет. Таким образом, специалистам в данной области известны такие улавливаемые маркеры, сведения о которых также можно получить, например, из примеров, подробно описанных в настоящей заявке.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления улавливаемый маркер Z выбран из длинноцепочечного алифатического остатка, партнера по нековалентному высокоаффинному связыванию, реакционноспособной химической группы, Q или  $\text{NHC}_2\text{-C}_{24}$  алкила, где Q предпочтительно выбран из группы, включающей в себя H, аминокислоты, аналоги аминокислот,  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$  алкил, предпочтительно  $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$  алкил, пептиды и липиды. Однако в соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления Z обозначает децил, т.е.  $\text{C}_{10}$  алкил.

Улавливаемый маркер Z в соответствии с настоящим изобретением представляет собой фрагмент, способный нековалентно или ковалентно взаимодействовать с улавливающим реагентом в условиях, которые позволяют проводить отделение соединения, содержащего улавливаемый маркер, например, олигонуклеотида (I), из других соединений, которые не содержат улавливаемый маркер. Предпочтительно улавливающий реагент

представляет собой иммобилизованный реагент или реагент, который можно подвергать иммобилизации.

Подходящие улавливаемые маркеры включают в себя длинноцепочечные, такие как C8-24, предпочтительно C13-24, более предпочтительно C13-C14 алифатические алкильные остатки, например, октадецил, или другие липидные/липофильные остатки, такие как, например, холестерин, токоферол или тритил, и их производные. Однако в соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления Z обозначает остаток децила. В данном случае содержащий трифосфат фрагмент можно улавливать и очищать на твердой фазе методом стандартной хроматографии на обращенной фазе, такого как ОФ-ВЭЖХ, или гидрофобной хроматографии (HIC). Улавливаемый маркер также может представлять собой перфторалкильный фрагмент, такой как 4-(1H,1H,2H,2H-перфтордецил)бензильный или 3-(перфтороктил)пропильный остаток, позволяющий специфически улавливать модифицированный олиготрифосфат на фтор-аффинном носителе, например, поставляемом Fluorous Technologies, Inc.

В другом варианте осуществления улавливаемый маркер может представлять собой первый член пары, способной к нековалентному высокоаффинному связыванию, такой как биотин, или аналог биотина, такой как дентиобиотин, гаптен или антиген, который обладает высоким сродством (например, с константой связывания  $10^{-6}$  л/моль или менее) к улавливающему реагенту, который представляет собой второй член пары, способной к нековалентному высокоаффинному связыванию, такой как стрептавидин, авидин или антители.

В следующем варианте осуществления улавливаемый маркер может представлять собой первый член пары, способной к ковалентному связыванию, который может образовывать ковалентную связь с улавливающим реагентом, который представляет собой второй член пары, способной к ковалентному связыванию, где ковалентное связывание может быть обратимым или необратимым. В данном варианте осуществления улавливаемый маркер Z может представлять собой реакционноспособный химический фрагмент, такой как азидная или алкинильная группа, способная ковалентно

взаимодействовать с улавливающим реагентом, содержащим комплементарную реакционноспособную группу, например, алкинильный или азидный фрагмент, соответственно, в случае реакции 3+2 циклоприсоединения Хьюстена (так называемая "клик-реакция", катализируемая  $\text{Cu(I)}$ , или ее вариант, который протекает в отсутствие ионов  $\text{Cu(I)}$  с использованием сильно напряженного цикла, присутствующего, например, в производных циклооктина). Конкретным примером Z-Y-X в таком случае является пропаргиламино.

В другом варианте осуществления улавливаемый маркер может представлять собой химический фрагмент, который содержит дополнительную нуклеофильную группу, такую как вторая аминогруппа в реагенте типа  $\text{NH}_2\text{-Y-XH}$ . Затем можно использовать широкий спектр подходящих электрофильных реагентов Z, таких как хлорформиат холестерина или N-гидроксисукцинимидные активированные эфиры биотина, обеспечивающие введение концевой группы в то время, как олигонуклеотид прикреплен к твердой фазе, что значительно расширяет сферу реакции присоединения концевой группы.

В предпочтительном варианте осуществления улавливаемый маркер представляет собой длинноцепочечный алкильный остаток, перфторалкильный фрагмент, азидную или алкинильную группу.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения олигонуклеотид может содержать второй улавливаемый маркер в другом положении, например, на 3'-конце. Первый и второй улавливаемые маркеры предпочтительно выбирают так, чтобы можно было провести очистку посредством двух независимых методов, позволяющих выделить вещество с очень высокой степенью чистоты. Например, первый улавливаемый маркер может представлять собой липофильную группу, которая взаимодействует с соответствующим хроматографическим носителем, а второй улавливаемый маркер может представлять собой биотин, который взаимодействует со стрептавидином.

Второй улавливаемый маркер удобно вводить во время синтеза олигонуклеотидов с использованием модифицированного SPG (стеклянный носитель с контролируемым размером пор).

Y обозначает химическую связь или линкер, такой как алкилен, предпочтительно C1-6-алкиленовый линкер, более предпочтительно C2-5-алкиленовый линкер, или аралкиленовый линкер, необязательно содержащий гетероатомы или группы, содержащие гетероатомы, такие как O, S, NH, C=O или C=S, и/или необязательно содержащий связи C=C или C≡C. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления Y представляет собой связь.

В другом предпочтительном варианте осуществления линкер представляет собой полиалкиленоксид, предпочтительно поли-C2-C6-алкиленоксид, более предпочтительно поли-C2-C3-алкиленоксид. Среднечисленная молекулярная масса линкера может находиться в диапазоне 30-800 г/моль, предпочтительно 40-450 г/моль, более предпочтительно 40-250 г/моль. Линкер может представлять собой  $[-CH_2CHR_4-O-]_n$ , где  $n=1-10$ , предпочтительно  $n=1-7$ , более предпочтительно  $n=2-5$ , и еще более предпочтительно  $n=3$ . R4 может представлять собой H или C1-6-алкил. Другие предпочтительные варианты Y показаны на фигуре 4. В предпочтительном варианте осуществления R4 обозначает H.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления,

X обозначает NH или O,

Y обозначает  $-K-((CHR_1)_m-CH_2-O)_n-R-$ , или

$-(O-(CHR_3)_{m3}-CH_2)_{n1}-(O-(CHR_2)_{m2}-CH_2)_{n2}-(O-(CHR_1)_{m1}-CH_2)_{n3}-$ , и

K обозначает O или NH,

$m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$  и  $m_3$  независимо обозначают число от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 8, более предпочтительно от 1 до 5, и еще более предпочтительно от 1 до 3,

$n$ ,  $n_1$ ,  $n_2$  и  $n_3$  независимо обозначают число от 0 до 20, предпочтительно от 0 до 10, более предпочтительно от 0 до 5, и еще более предпочтительно от 0 до 3, и

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> независимо обозначают H, C<sub>1-6</sub> алкил, C<sub>2-6</sub> алкенил, C<sub>2-6</sub> алкинил, C<sub>2-C6</sub>-ацил или циклическую группу, где каждая из указанных групп может быть необязательно замещена, и

R обозначает C<sub>1-6</sub> алкил, C<sub>2-6</sub> алкенил, C<sub>2-6</sub> алкинил, C<sub>2-C6</sub>-ацил или циклическую группу, где каждая из указанных групп

может быть необязательно замещена. Предпочтительно R обозначает  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ .

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления Y имеет указанные выше значения,  $R_1$  и  $R_2$  обозначают H,  $n_1$  равен 0, а  $n_2$  и  $n_3$  равны 1. Другие предпочтительные варианты осуществления можно найти на фиг. 4.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления Y имеет указанные выше значения,  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  обозначают H, а  $n_1$ ,  $n_2$  и  $n_3$  равны 1.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления X обозначает NH, K обозначает NH, а Y обозначает  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ , где n имеет указанные выше значения, а K дополнительно замещен холестерином-С(O)-, тритилом, или их производными.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления олигонуклеотида формулы (I), X обозначает NH или O, Y обозначает связь, а Z обозначает  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкил или H, предпочтительно  $\text{C}_{10}$ , Q или  $\text{NHC}_2\text{-C}_{24}$  алкил, где Q выбран из группы, включающей в себя H, аминокислоты, аналоги аминокислот,  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$  алкил, предпочтительно  $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$  алкил, пептиды и липиды, а  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ,  $V_5$ ,  $V_6$ ,  $W_1$ ,  $W_2$  и  $W_3$  обозначают O.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления олигонуклеотида формулы (I), X обозначает NH или O, Y обозначает связь, Z обозначает децил или H, а  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ,  $V_5$ ,  $V_6$ ,  $W_1$ ,  $W_2$  и  $W_3$  предпочтительно обозначают O.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые носители, разбавители и/или адъюванты. Используемый здесь термин "носитель" включает в себя носители, наполнители и/или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клеток или млекопитающих в используемых дозах и концентрациях. Как правило физиологически приемлемые носители представляют собой водные забуференные растворы или липосомы. Примеры физиологически приемлемых носителей включают в себя буферы, такие как

фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот (однако для получения композиции настоящего изобретения предпочтительно используют фосфатный буфер); антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, низкомолекулярные (содержащие менее чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, такие как глюкоза, манноза или декстрины, огеливающие средства, такие как EDTA, сахара, спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN, полиэтилен или полиэтиленгликоль. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления соединения настоящего изобретения растворяют в стерильной деионизированной воде.

Такой состав и/или такую композицию настоящего изобретения можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, в частности, человеку, в дозе, достаточной для лечения конкретных состояний, с помощью подходящих способов. Например, состав и/или композицию настоящего изобретения можно получить в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемые носители, разбавители и/или адъюванты. Терапевтическую эффективность и токсичность можно определить стандартными способами. Фармацевтическую композицию можно вводить системно, например, внутривенно, внутримышечно или внутривенно, или местно, например, интраназально, подкожно, внутрикожно или интратекально. Дозы вводимых состава и/или композиции, как правило, зависят от субъекта, подлежащего лечению, и от характерных особенностей субъекта, таких как масса субъекта, возраст субъекта, тип и степень тяжести заболевания или повреждения, подлежащего лечению, а также от способа введения и решения лечащего врача.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят внутрикожно. Особенно предпочтительно вводить композицию внутрикожно посредством татуировки, микроиглы и/или

микроигольного пластыря.

Соединение настоящего изобретения предпочтительно растворяют и разбавляют до желаемой концентрации, используя стерильную деионизированную воду (очищенную воду), затем наносят на выбритую, продезинфицированную этанолом кожу с помощью пипеточного устройства и вводят в кожу путем татуировки.

В случае татуировки, например, водную фармацевтическую композицию настоящего изобретения вводят в кожу с помощью машинки для нанесения (медицинской) татуировки, оборудованной насадкой для нескольких игл (такой как 9-игольная одноразовая насадка).

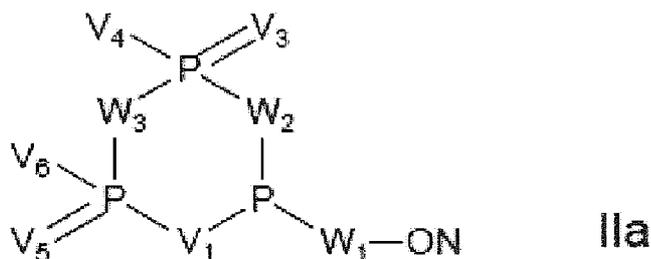
Типичную процедуру нанесения татуировки проводят следующим образом: фармацевтическую композицию на водной основе наносят пипеткой на выбритую и очищенную этанолом кожу, после чего ее вводят в насадку для нескольких игл татуировочной машинки путем осторожного размещения работающего кончика иглы (работает со скоростью, соответствующей, например, 100-120 Гц, в частности, 100 Гц) в верхней части капли водной фармацевтической композиции. После того, как капля водной фармацевтической композиции полностью адсорбируется работающим кончиком иглы, и, следовательно, помещается между работающими иглами, работающий кончик осторожно перемещают назад и вперед по коже, удерживая заполненный игольный наконечник точно под углом 90 градусов к коже. С помощью данного метода водную фармацевтическую композицию полностью татуируют в кожу. Татуировка 50-100 мкл водной фармацевтической композиции на участке кожи 2-4 квадратных сантиметров обычно занимает 10-15 секунд. Преимущество такого способа введения по сравнению с однократной стандартной внутрикожной болюсной инъекцией заключается в том, что водную фармацевтическую композицию равномерно вводят на большом участке кожи, при этом композиция более равномерно и более точно распределяется на ткани-мишени: при использовании 9-игольного наконечника при 100 Гц в течение 10 секунд, данный метод обеспечивает 9000 внутрикожных инъекций, равномерно распределенных в обрабатываемой коже.

Конечно, специалист в данной области техники может модифицировать и корректировать данную процедуру, в зависимости от пациента или части тела, подлежащей обработке. Процедуру микроигольного введения можно проводить аналогично процедуре татуировки. Но при микроигольном введении наконечник для татуировки заменяют наконечником для микроиглы, что делает внутрикожное введение более поверхностным. Как правило, фармацевтическую композицию на водной основе наносят пипеткой на выбритую и очищенную этанолом кожу, а затем вводят внутрикожно при помощи наконечника для микроигл аналогично процедуре татуировки. При применении микроигл отсутствует необходимость предварительной адсорбции фармацевтической композиции между микроиглами.

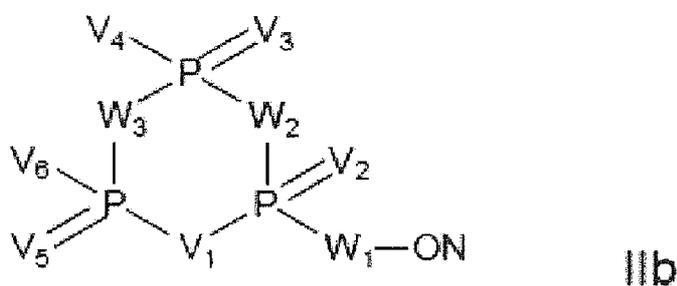
Кроме того, для чрезкожной/внутрикожной доставки можно использовать микроигольные пластыри, покрытые или иным образом несущие фармацевтическую композицию. Специфическое преимущество данного способа заключается в том, что внутрикожное введение фармацевтической композиции может безопасно осуществлять сам реципиент без необходимости посещения больницы и/или медицинского вмешательства специалиста по татуировке/микроигольному введению. Данный способ значительно повышает гибкость схем лечения, позволяет использовать высоко персонализированные схемы лечения, уменьшить боль, связанную с обработкой, и снизить стоимость лечения. Указанные пластыри могут включать в себя, без ограничения, растворяющиеся или не растворяющиеся микроигольные пластыри, обеспечивающие контролируемое по времени, пролонгированную или болюсную чрезкожную доставку фармацевтической композиции.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения олигонуклеотида по любому из пп.1-15, включающему в себя следующие стадии:

(а) взаимодействие соединения формулы (IIa)

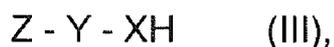


где V1, V3, V5, V4, V6, W1, W2, W3 и ON имеют указанные выше значения, и где ON защищен, по меньшей мере, одной защитной группой, с окисляющим реагентом с получением соединения формулы (IIb)



где V1, V3, V5 и V2, V4, V6, W1, W2, W3 и ON имеют указанные выше значения, и где ON защищен, по меньшей мере, одной защитной группой,

(b) взаимодействие соединения формулы (IIb) с улавливающим реагентом формулы (III)



где X, Z, и Y имеют указанные выше значения, и где X предпочтительно обозначает O, с получением продукта реакции, содержащего олигонуклеотид формулы (I),

(c) удаление, по меньшей мере, одной защитной группы с ON и

(d) приведение в контакт продукта реакции, полученного на стадии (b), с улавливающим реагентом, способным взаимодействовать с улавливаемым маркером, где приведение в контакт осуществляют в условиях, обеспечивающих отделение олигонуклеотида (I) от других веществ, содержащихся в указанном продукте реакции.

Вариант осуществления, в котором X обозначает O, является особенно предпочтительным.

Олигонуклеотид ON, используемый в способе настоящего изобретения, содержит, по меньшей мере, одну защитную группу. В соответствии с настоящим изобретением защитные группы используются, в частности, для защиты групп 2'-ОН рибозной субъединицы используемого олигонуклеотида. Специалистам в данной области техники известны защитные группы, подходящие для синтеза, в особенности, специалистам, работающим в области синтеза нуклеотидов. Предпочтительно использовать защитные группы в положении 2'-ОН рибозной субъединицы олигонуклеотида. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в 2'-положении рибозной субъединицы используют защитные группы, чувствительные к фториду.

Особенно предпочтительными являются защитные группы 2'-O-TBDMS или 2'-O-TOM. В особенно предпочтительном варианте осуществления используют защитную группу TBDMS.

В частности, в процессе синтеза соединений, в которых X=O и которые обладают повышенной стабильностью связывания Z-Y-X-PPP, удаление защитных групп с 2'-ОН можно проводить в широком диапазоне условий.

Все реагенты, обычно используемые для удаления защитных групп, можно использовать для отщепления защитной группы TBDMS. Например, можно использовать следующие реагенты:

(a) триэтиламинтригидрофторид, необязательно в сочетании с полярным растворителем,

(b) триалкиламин, триэтиламинтригидрофторид и полярный растворитель,

(c) пиридин-HF и другие аддукты гидрофторида и органических азотистых оснований,

(d) фторид аммония,

(e) фторид тетра-н-бутиламмония,

(f) фторид тетраметиламмония, другие фториды тетраалкиламмония и их сочетания.

Стадию (c) предпочтительно проводят в условиях, которые не вызывают разрушение трифосфатного фрагмента, например, как

подробно описано ниже.

Стадия (а) способа настоящего изобретения включает в себя взаимодействие циклических фрагментов  $P(V)-P(V)-P(III)$  формулы (IIa) с окисляющим реагентом. Соединение формулы (IIa) можно получить с помощью стандартных методов, описанных в Ludwig et al., 1989, выше и Gaur et al., 1992, выше, а именно, путем взаимодействия 5'-концевой ОН-группы олигонуклеотида с трифункциональным фосфитилирующим реагентом, таким как 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-он, в подходящих условиях, например, в присутствии основания (такого как пиридин или диизопропилметиламин) и в подходящем растворителе, таком как диоксан или дихлорметан, с последующим взаимодействием с пиродифосфатом ( $W_3=O$ ) или модифицированным пиродифосфатом ( $W_3$  отличается от O и обозначает, например,  $CH_2$ ,  $CCl_2$ ,  $NH$  или  $CF_2$ ). Предпочтительно три-н-бутиламмониевую соль пиродифосфата или модифицированного пиродифосфата используют в ДМФ. Затем полученное циклическое промежуточное соединение  $P(III)-P(V)$  (IIa) окисляют в безводных условиях, например, пероксидом, таким как трет-бутилгидропероксид, гидропероксид кумола, (10-камфорсульфонил)оксазиридин. Альтернативно можно использовать комплекс фенилацетилдисульфида ( $V_2=S$ ) или боран-диизопропилэтиламина ( $V_2=BN_3$ ), соответственно, с получением соответствующего циклического соединения формулы (IIb), содержащего на 5'-конце трифосфат/аналог трифосфата. Информацию по данной реакции также можно найти в WO 96/40159 или WO 2009/060281, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Стадию (а) реакции можно проводить, используя олигонуклеотид в растворе, или олигонуклеотид, присоединенный к твердой фазе, такой как органическая смола или стекло, такое как SPG. Олигонуклеотид может дополнительно содержать защитные группы, например, защитные группы для сахарных остатков или нуклеотидных оснований, хорошо известные специалистам в данной области. Предпочтительные примеры защитных групп включают в себя 2-цианоэтил для межнуклеозидной фосфодиэфирной или фосфоротиоатной связи, трет-бутилдиметилсилил,

триизопротилсилилоксиметил или бис(ацетоксиэтокси)метил для 2'-гидроксильной группы рибозы, 4-трет-бутилфеноксиацетил или феноксиацетил, ацетил, изобутирил, бензоил для экзоциклической аминогруппы нуклеотидных оснований. Более предпочтительно стадию (а) проводят, используя олигонуклеотид, присоединенный к твердой фазе.

На стадии (b) способа настоящего изобретения соединения (IIb) подвергают взаимодействию с улавливающим реагентом формулы (III),



где X обозначает группу, выбранную из NH, NR<sup>3</sup> или O, а X и Y имеют указанные выше значения. R<sup>3</sup> имеет значения, описанные выше для R<sup>1</sup>.

В частности, если X обозначает O, для раскрытия цикла можно использовать реагент с ограниченной нуклеофильностью, такой как деканол (см. фиг. 1, стадия 4). Такую стадию можно проводить при комнатной температуре, например, в течение 48 ч, с превращением циклотрифосфата в целевой сложный γ-эфир трифосфата.

На стадии (с) удаляют защитные группы с ON.

При проведении стадии (с), например, указанные выше реагенты (а) и (b) для удаления защитных групп можно использовать в условиях, включающих в себя, если X=O, время реакции от 20 мин до 180 мин, более предпочтительно от 60 мин до примерно 150 мин, в частности, примерно 120 мин, температуру реакции 60-70°C, в частности, примерно 65°C. Если X=NH, такие реакции исключаются вследствие разной стабильности связывания, или могут проводиться лишь в значительно худших условиях реакции, например, в течение 40 ч при комнатной температуре.

Стадия (d) способа настоящего изобретения включает в себя приведение в контакт продукта реакции, полученного на стадии (b), с улавливающим реагентом, способным взаимодействовать с улавливаемым маркером Z в условиях, обеспечивающих отделение

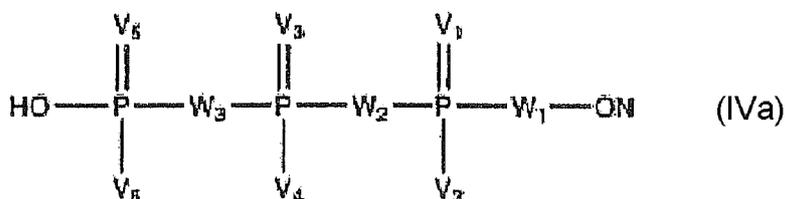
олигонуклеотида (I), содержащего улавливаемый маркер, от других веществ, содержащихся в продукте реакции. Перед стадией (d) олигонуклеотид (I), присоединенный к твердой фазе, отделяют от твердой фазы и подвергают частичному или полному удалению защитных групп. Улавливающий реагент предпочтительно иммобилизуют на подходящей подложке, такой как хроматографический носитель. Чтобы обеспечить отделение олигонуклеотида (I), содержащего улавливаемый маркер, от веществ, не содержащих улавливаемый маркер, продукты реакции, полученные на стадии (b), отщепляют от твердой фазы и подвергают удалению защитных групп, если это необходимо, после чего их разделяют, предпочтительно, с использованием хроматографического метода разделения, основанного на взаимодействии улавливаемого маркера Z с улавливающим реагентом. С помощью стадии разделения чистоту олигонуклеотида (I), которая обычно находится в диапазоне 25-70% по отношению к неочищенному веществу, в зависимости от длины и сложности последовательности, можно повысить до 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95% или более. Для исследования токсичности желательно, чтобы чистота составляла >85%, тогда как на последней стадии клинических испытаний чистота должна находиться в диапазоне, составляющем, по меньшей мере, 90-95%. Таким образом, настоящее изобретение предлагает способ получения рррРНК с высокой степенью чистоты, необходимой для проведения клинических испытаний на людях.

На стадии (d) улавливаемый маркер и способный взаимодействовать с ним улавливающий реагент предпочтительно выбирают из (i) гидрофобной или фторированной группы и хроматографического материала, обладающего сродством к гидрофобным или фторированным группам, такого как обращенная фаза или носитель, обладающий сродством к фтору; (ii) первого партнера по нековалентному высокоаффинному связыванию и второго комплементарного партнера по нековалентному высокоаффинному связыванию, (iii) первого партнера по ковалентному связыванию и второго комплементарного партнера по ковалентному связыванию,

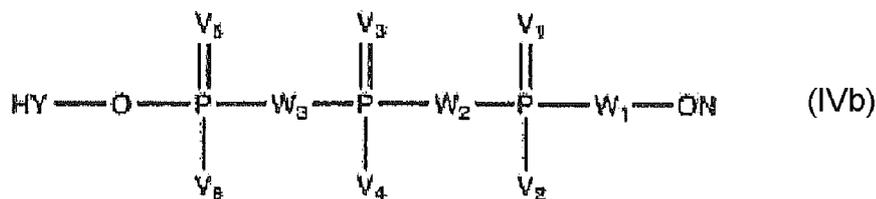
где первый партнер и второй партнер образуют ковалентные связи.

Улавливаемый маркер функционально определяют ниже с помощью ряда приемлемых примеров. Общее правило может включать в себя следующие положения: Z должен обеспечивать удобную очистку, и он должен удаляться в условиях, совместимых с требованиями стабильности rppРНК.

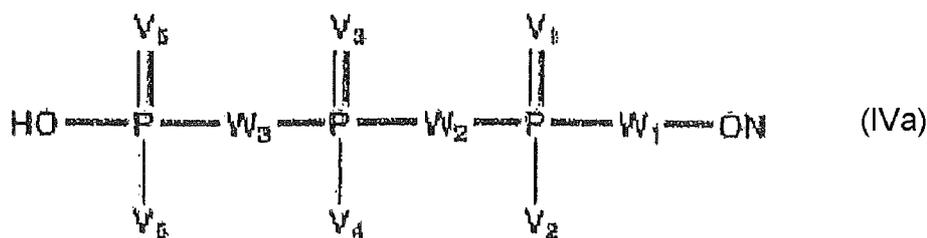
Кроме того, способ может дополнительно включать в себя стадию (e) удаления улавливаемого маркера с получением олигонуклеотида формулы (IV). В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, если X=O, получают соединение формулы (IV)a или (IV)b,



или



а если X=NH, получают соединение формулы (IV)a



Стадия (e) должна быть совместимой с требованиями стабильности конечного продукта, содержащего трифосфат, а также с требованиями стабильности межрибонуклеотидной связи. Такие требования могут включать в себя расщепление в слабокислой среде, если X обозначает NH, расщепление ионами серебра, если X

обозначает S, расщепление тиолом, таким как дитиотреитол, приводящее к удалению тирана, если Y-X-P содержит -S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-P.

В других вариантах осуществления улавливаемый маркер Z не удаляют или удаляют не полностью. В таких вариантах осуществления маркер-содержащий олигонуклеотид можно использовать, например, в качестве фармацевтического средства.

В указанных вариантах осуществления реагент Z-Y-XH должен быть выбран из подгруппы Z-остатков, функционально совместимых со структурными требованиями воспринимающего элемента RIG-I. Например, известно, что этим требованиям отвечает сочетание Z=децил-октадецил, Y=связь, X=NH или O.

Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие трифосфат/аналог трифосфата, полученные по способу настоящего изобретения, сугубо подходят для фармацевтического применения вследствие их высокой чистоты. В особенно предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотид (I) или (IV) является активатором геликазы RIG-I. Конкретные примеры подходящих активаторов RIG-I раскрыты в Schlee et al., 2009, выше, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки.

#### ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На фигуре 1 показано схематическое изображение синтеза сложноэфирных трифосфатных производных олигонуклеотидов.

На фигуре 2 показаны результаты анализа продуктов синтеза децил-О-pppРНК 24-мер (последовательность РНК: 5'-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU) методами ОФ-ВЭЖХ и ESI-ЖХ/МС.

(А) Хроматограммы ОФ-ВЭЖХ

а) неочищенной реакционной смеси, содержащей 48% децил-О-pppРНК (время удерживания=14 мин),

б) чистой децил-О-pppРНК.

Колонка: Hamilton PRP-14, 1×250, 10 мкм.

Градиент: 0-100% В в течение 18 мин, А=100 мМ ТЕАВ; В=80% метанол, 100 мМ ТЕАВ.

(В) ESI-МС профиль чистой децил-О-pppРНК

зарегистрированный с использованием ОФ-ЖХ/МС (МВ рассчитанный: 7987, обнаруженный: 7968).

На фигуре 3 показана очистка реакционной смеси, содержащей децил-О-pppРНК, в масштабе 1 мкмоль методом полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ: децильный маркер обеспечивает эффективное отделение целевого продукта (фракция 3) от побочных продуктов, не содержащих маркера, включающих в себя последовательности, образовавшиеся в результате неполного синтеза, полноразмерную нефосфорилированную ОН-РНК и недериватизированную pppРНК.

Колонка: Hamilton PRP-17×250 мм, 10 мкм.

Градиент: 0-80% В в течение 50 мин, А=100 мМ ТЕАВ; В=80% метанол, 100 мМ ТЕАВ.

Фигура 4: Особенно предпочтительные варианты Y.

Фигура 5: Скрининг 2'-О-метилирования позволяет выявить положения, отвечающие за селективность в отношении RIG-I.

Фигура 6: Метилирование делает дуплекс RIG-I специфичным и высоко активным.

Фигура 7: Концевые фосфоритоаты увеличивают иммуногенность селективного дуплекса.

Фигура 8: Отдельные замены 2'-фтор повышают активационный потенциал дуплекса в отношении RIG-I.

Фигура 9: Многократная модификация ОН дц-РНК ОН-GFP2 приводит к сильному увеличению активационного потенциала в отношении RIG-I.

Фигура 10: Повышение иммуногенности в результате модификаций скелета может передаваться трифосфорилированному дуплексу.

Фигура 11: Показана схема способа настоящего изобретения с использованием диэтиленгликольмонобутилового эфира в качестве примера алкилполиэтиленгликоля как нуклеофильного реагента, используемого для раскрытия цикла.

Фигура 12: Очистка методом ОФ-ВЭЖХ реакционной смеси С4-DEG-pppРНК, содержащей 45% С4-DEG-pppРНК (пик соответствует объему градиента 88,4 мл) и 50% pppРНК (пик соответствует 77,5 мл) Колонка: Hamilton PRP-17×250 мм, 10 мкм, скорость потока 3

мл/мин.

Градиент: 1-80% В в течение 50 мин, А=0,1 М ТЕАВ; В=80% метанол, 0,1 М ТЕАВ.

Фигура 13: Спектр C4-DEG-pppРНК, полученный методом MALDI-TOF после очистки ВЭЖХ. Надлежащий массовый пик соответствует  $m/z$  7972,6 (А).

На фигуре 14 показана схема синтеза pppРНК с использованием липофильного полиэфирного композитного маркера.

На фигуре 15 показаны очистка ВЭЖХ и результаты MALDI, относящиеся к фиг. 14 (последовательность РНК 5'-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU).

(А) ОФ-ВЭЖХ очистка C11-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NHpppРНК.

Колонка: Hamilton PRP-14, 1×250 мм, 10 мкм.

Градиент: 0-80% В в течение 50 мин; А=100 мМ ТЕАВ, В=80% метанол, 100 мМ ТЕАВ.

(В) MALDI-спектр неочищенной реакционной смеси после обессоливания демонстрирует присутствие C11-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NHpppРНК (МВ 8214,8).

(С) MALDI-спектр продукта гидролиза при рН=3,8 очищенной C11-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NHpppРНК (МВ 7832,6).

На фигуре 16 показана схема синтеза холестерил-меченной pppРНК с необязательным отщеплением соответствующей pppРНК.

На фигуре 17 показаны очистка и анализ холестерил-меченной pppРНК (последовательность РНК: 5'-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU):

(А) ОФ-ВЭЖХ очистка холестерил-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-ppp-РНК

Колонка: Hamilton PRP-14, 1×250 мм, 10 мкм.

Градиент: 0-10% В в течение 5 мин, 10% В в течение 9 минут, 10-100% В в течение 33 мин; А=50 мМ ТЕАВ, В=95% метанол, 50 мМ ТЕАВ.

(В) ОФ-ВЭЖХ анализ чистой холестерил-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-ppp-РНК.

Колонка: Hamilton PRP-14, 1×250 мм, 10 мкм.

Градиент: 0-100% В в течение 18 мин, 100% В в течение 4

мин; А=50 мМ ТЕАВ, В=95% метанол, 50 мМ ТЕАВ.

(С) MALDI-спектр чистой холестерил-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-ppp-РНК.

Пик pppРНК (7827,3 Да) обусловлен PN-расщеплением в процессе ионизации.

#### **ПРИМЕРЫ**

##### Пример 1: Получение 5'-децил-О-трифосфата РНК

Как указано на схеме (фигура 1), процесс синтеза децил-О-трифосфата РНК включает в себя следующие стадии:

##### 1-4) 5'-Децил-О-трифосфат РНК

Связанную с носителем, полностью защищенную 5'ОН-РНК (1 мкмоль) сушат в течение 3 ч под вакуумом в колонке для синтеза, а затем промывают безводной смесью пиридин/диоксан (1:3, об/об, 4 мл). В атмосфере аргона свежеполученный 1 М раствор 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-она в безводном диоксане (100 мкл, 100 мкмоль) вводят в колбу, содержащую 2 мл безводной смеси пиридин/диоксан (1:3, об/об). Полученный 50 мМ фосфитилирующий раствор вводят в колонку для синтеза и медленно перемещают назад и вперед во время реакции, продолжающейся 30 мин. Затем получают раствор пирофосфата тетра(три-н-бутиламмония) путем смешивания 0,5 М раствора пирофосфата бис(три-н-бутиламмония) в ДМФ (1 мл, 0,5 ммоль) и три-н-бутиламина (238 мкл, 1 ммоль). Раствор пирофосфата пропускают через колонку и после вытеснения из колонки и отбрасывания избытка фосфитилирующего реагента оставшийся раствор пирофосфата продавливают вперед и назад с помощью двух шприцев. Через 10 мин колонку промывают безводным ацетонитрилом (3 мл). 5,5 М раствор трет-бутилгидропероксида в декане (300 мкл) растворяют в безводном ацетонитриле (2 мл) и приводят в контакт с носителем для синтеза. Через 15 мин колонку промывают безводным ацетонитрилом (6 мл). Затем гомогенный раствор N-метилимидазола (240 мкл, 3 ммоль), три-н-бутиламина (250 мкл, 1,1 ммоль) и N-децилового спирта (2 мл, 10,5 ммоль) многократно продавливают назад и вперед через колонку и оставляют взаимодействовать в течение 48 ч, чтобы достичь превращения циклотрифосфата в децил-О-трифосфат. Колонку промывают

безводным ацетонитрилом (6 мл) и обрабатывают 0,1 М раствором бикарбоната триэтиламмония (ТЕАВ, 2 мл) в течение 20 мин, чтобы гидролизовать непрореагировавший циклотрифосфат и избежать неспецифической дериватизации при последующей процедуре удаления защитных групп. После очередной стадии промывки безводным ацетонитрилом (9 мл) носитель для синтеза сушат в потоке аргона.

#### 5-6) Удаление защитных групп и очистка

5'-децил-О-трифосфат олигонуклеотида приводят в контакт со свежеприготовленным 40% водным раствором метиламина и концентрированным водным раствором аммиака (АМА, 1:1, об/об, 2 мл) с помощью двух шприцев. После расщепления в течение 30 мин раствор переносят в чистый флакон с завинчивающейся пробкой и носитель промывают АМА (1 мл). Объединенный раствор и раствор для промывания нагревают в течение 10 мин при 65°C. После охлаждения на льду раствор упаривают досуха и остаток сушат путем совместного упаривания с абсолютным этанолом. Защитные группы 2'-О-TBDMS можно удалить путем обработки тригидрофторидом триэтиламина (ТЕА.3HF) без значительной потери фрагмента модифицированного трифосфата. Децил-О-трифосфат олигонуклеотида повторно растворяют в свежеприготовленном растворе N-метилпирролидона/триэтиламина/ТЕА.3HF (NMP/ТЕА/ТЕА.3HF, 6:4:3, об/об, 325 мкл) и раствор нагревают при 65°C в течение 2 ч. Альтернативно для удаления защитных групп можно использовать раствор ТЕА.3HF в ДМСО (1:1, об/об, 600 мкл). После полного удаления защитных групп децил-О-трифосфат олигонуклеотида осаждают из раствора для удаления защитных групп н-бутанолом и очищают методом ВЭЖХ. Липофильный децильный маркер позволяет отделить децил-О-трифосфат от примесей, которые не содержат данный маркер, с помощью хроматографии на обращенной фазе. Продукт реакции наносят на колонку PRP-1 7×250 мм и разделяют в линейном градиенте от 0 до 100% буфера В в течение 50 мин при скорости потока 3 мл/мин. Буфер А представляет собой 100 мМ ТЕАВ, а буфер В представляет собой 100 мМ ТЕАВ в 80% метаноле. Фракции, содержащие продукт,

собирают, упаривают и обессоливают путем многократного совместного упаривания с метанолом. Остаток растворяют в воде и превращают в натриевую соль путем осаждения этанолом в присутствии 0,3 М хлорида натрия.

Пример 2: Получение 5'-pppРНК гамма 2-(2-бутоксидокси)этилового эфира (C4-DEG-pppРНК)

Схема реакции, описанная в примере 2, показана на фиг. 11.

Стадия 1: 203 мг (1 ммоль) 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-она растворяют в 1 мл сухого диоксана во флаконе с перегородкой емкостью 10 мл в атмосфере аргона.

Стадия 2: Колонку для синтеза, содержащую полностью защищенную РНК, детитрилированную и тщательно промытую ацетонитрилом, сушат в вакууме в течение 12 ч. Содержимое колонки тщательно промывают путем многократного всасывания и выталкивания 2 мл раствора безводного диоксана в пиридине 3:1 (об/об) в атмосфере аргона.

Стадия 3: Во флакон вначале добавляют 2 мл смеси пиридин/диоксан, 3:1 об/об, и затем 100 мкл 1 М раствор 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-она в сухом диоксане с получением 50 мМ раствора фосфитилирующего реагента, такого как 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-он, в смеси диоксан/пиридин, 3:1 (об/об). Раствор гомогенизируют путем осторожного встряхивания. Иницируют реакцию, пропуская раствор 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-она из флакона через колонку для синтеза.

В процессе реакции в колонку для синтеза многократно засасывают с последующим выталкиванием раствор, содержащий 2-хлор-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-он, чтобы обеспечить тесный контакт и тщательное перемешивание с РНК, иммобилизованной на твердой фазе. Время реакции 30 мин обычно позволяет достичь почти количественного превращения свободной группы 5'-ОН олигомера, связанного с носителем, в диапазоне 20-40 нт.

Стадия 4: После протекания реакции в течение 30 мин диоксан/пиридиновый раствор, содержащий избыток фосфитилирующего реагента, выдавливают в контейнер для отходов, заполняют новый шприц перемешанной на вортексе смесью 1 мл 0,5

М раствора  $(\text{Bu}_3\text{NH})_2$  пирофосфата в сухом ДМФА и 238 мкл (1 ммоль) сухого  $\text{Bu}_3\text{N}$  с получением 0,5 М раствора  $(\text{Bu}_3\text{N})_4$  пирофосфата. Данный раствор продавливают через колонку, тем самым заменяя диоксан/пиридиновый раствор. Большой избыток пирофосфата обеспечивает количественное превращение промежуточного соединения в циклический ангидрид P(III)-P(V) IIA.

Стадия 5: Колонку промывают 3 мл  $\text{CH}_3\text{CN}$ , чтобы удалить DMF и избыток P*i*, после чего реактор колонки заполняют сухим  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Стадия 6: 300 мкл трет- $\text{BuOOH}$  (5,5 М раствор в декане, Sigma-Aldrich) растворяют в 2 мл безводного  $\text{CH}_3\text{CN}$  с получением примерно 0,7 М гомогенного раствора. Осуществляют контактирование носителя для синтеза с данным раствором в течение 15 мин с получением окисленного P(V) циклического ангидрида I**i**.

Стадия 7: Колонку промывают 3 мл сухого  $\text{CH}_3\text{CN}$ , чтобы удалить лишнюю перекись, и заполняют ее сухим  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Стадия 8: 2 мл сухого 2-(2-бутоксипропан-1-ил)этанола (монобутиловый эфир диэтиленгликоля), содержащего 0,1 М N-метилимидазол и 0,1 М три-*n*-бутиламин, приводят в контакт с носителем в колонке. Время контакта CPG со спиртом должно составлять, по меньшей мере, 48 часов при комнатной температуре.

Стадия 9: Колонку тщательно промывают 9 мл ацетонитрила и затем осуществляют контактирование колонки с 2 мл 0,1 М раствора TEAB (триэтиламмония бикарбоната) в воде в течение 1 часа, чтобы гидролизовать непрореагировавший циклотрифосфат.

Стадия 10 - Первая стадия удаления защитных групп: 1 мл раствора для удаления защитных групп (40% водный раствор метиламина/конц. водный раствор аммиака 1:1 об/об, реагент АМА) пропускают через носитель 2-3 раза. После контактирования в течение 30 мин раствор переносят в новый флакон. Носитель промывают таким же объемом раствора для удаления защитных групп АМА и объединяют смывы. Объединенные раствор и смывы нагревают в течение 10 мин при 65°C. После охлаждения на льду раствор

концентрируют до объема 300–500 мкл и затем упаривают досуха.

Стадия 11 - Удаление защитных групп 2'-O-TBDMS: Остаток сушат путем добавления 300 мкл сухого этанола и совместного упаривания, добавляют 1 мл сухого 1 М раствора TBAF (тетра-н-бутиламмония фторид) в ТГФ, плотно закрывают и помещают на шейкер, где держат в течение 16 ч. Реакцию гасят добавлением 1 мл стерильного 1 М водного раствора TEAB (триэтиламмония бикарбонат), после чего реакционную смесь обессоливают на колонке NARTM-25 (для очистки нуклеиновых кислот), используя стерильную воду в качестве элюента. На данной стадии иногда необходимо провести фильтрацию через стерильный фильтр с размером пор 2 мкм. УФ-поглощающие фракции объединяют и упаривают до объема 150 мкл, затем добавляют 100 мл 1 М TEAB, рН 8, и полученный раствор хранят в замороженном состоянии при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения очистки методом ВЭЖХ.

Стадия 12 - Очистка методом ВЭЖХ: Продукт реакции из реакционной смеси 1-микромольного масштаба, полученной на стадии 11, загружают в колонку 7×25 мм PRP-1 (Hamilton). Очистку проводят с использованием линейного градиента буфера В от 0 до 80% в течение 50 мин при скорости потока 3 мл/мин. Буфер А представляет собой 100 мМ раствор TEAB, а буфер В представляет собой 100 мМ раствор TEAB в смеси метанол/вода 8:2 об/об. Типичный пример очистки молекулы, содержащей 24 мономера, показан на фиг. 3. Сочетание 4-атомного алкильного маркера и остатка диэтиленгликоля является достаточным для практически полного отделения от rrrРНК. Фракции, соответствующие пику при 88,4 мл, объединяют, упаривают на ротормном испарителе и обессоливают путем нескольких совместных упариваний с сухим метанолом.

### Пример 3

Дериватизация rrrРНК с использованием липофильных полиэфирных композитных маркеров с предварительно полученными липофильными полиэфирными аминами

В примере 3 используют липофильные полиэфирные амины структуры ZY-N для получения ZYNHrrrРНК.

Часть А: Экономичный крупномасштабный способ получения липофильного полиэфирного амина

Данную процедуру, которую можно проводить без колоночной флэш-хроматографии, обычно применяют для синтеза моноамидов из водорастворимых диаминов и метиловых эфиров липофильных карбоновых кислот.

Синтез N-лаурил-4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамина (соединение 3, фиг.14.): 4,7,10-триокса-1,13-тридеканdiamин (43,8 мл, 200 ммоль) растворяют в 32,5 мл метанола. Медленно при перемешивании добавляют метиловый эфир лауриновой кислоты (4,92 мл, 20 ммоль), после чего закрытую колбу держат при комнатной температуре в течение 5 дней. Метанол удаляют из реакционной смеси на ротационном испарителе и остаток растворяют в 100 мл этилацетата. Избыток диамина удаляют путем экстракции водой (2\*120 мл) и затем концентрированным раствором хлорида натрия (2\*100 мл). Этилацетатную фазу упаривают и остаточное масло кристаллизуют при стоянии при -20°C с получением 6,8 г (17 ммоль) чистого N-лаурил 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамина.

Часть В: Реакции открытия цикла на CPG-связанном циклотрифосфате РНК с использованием N-лаурил-4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамина

CPG-связанный циклотрифосфат РНК (соединение 4, фиг. 14) синтезируют по способу, включающему в себя стадии 1-7, описанные в предыдущем примере 2. Реакцию открытия цикла в циклотрифосфате РНК, иммобилизованном на твердой фазе, проводят с использованием 0,08 М раствора N-лаурил-4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамина в ацетонитриле. Раствор ацетонитрила приводят в контакт с CPG и держат в течение 3 часов при комнатной температуре, после чего носитель промывают 10 мл сухого ацетонитрила и продувают сухим аргоном. Отсоединение от носителя, удаление защитных групп и последующую обработку методом ВЭЖХ проводят в точном соответствии со стадиями 10-12 примера 2. Продукт 5 элюируют при концентрации метанола 75% (фиг. 15). Спектральный анализ реакционной смеси методом MALDI

подтверждает структуру соединения 5 (МВ 8214,8 Да, фиг. 15b).

Кроме того, маркер очистки можно удалить с получением соответствующего трифосфата олигонуклеотида: 100 нмоль н-лаурил-замещенного гамма амида (соединение 5, фиг. 14) растворяют в 400 мкл буфера для удаления защитных групп, рН 3,8, в пробирке Эппендорфа объемом 2 мл, которую затем герметично закрывают и нагревают при 60°C в течение 70 мин. В данных условиях происходит количественное расщепление фосфорамидатной связи соединения 5 при отсутствии деградации трифосфатного фрагмента. Реакционную смесь охлаждают на льду и затем добавляют 14 мкл стерильного 5М раствора NaCl и 1,2 мл абсолютного этанола. Осадок собирают центрифугированием, промывают холодным этанолом, сушат на Speed Vac, растворяют в стерильной воде и хранят в замороженном состоянии при -20°C.

Спектральный анализ методом MALDI подтверждает предполагаемый МВ продукта rrrРНК (МВ 7832 Да, фиг. 15c).

#### Пример 4:

Способ дериватизации rrrРНК в колонке с использованием липофильных полиэфирных композитных маркеров

Пример 4 представляет собой двухстадийную процедуру дериватизации в колонке иммобилизованного олигонуклеотида НУННrrrРНК с получением ZУННrrrРНК

Получение холестерил-меченного трифосфата РНК (Chl-CONH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-rrr-РНК, соединение 4, фиг. 16)

Конъюгирование липофильного холестерильного маркера с трифосфатом РНК позволяет эффективно отделять продукт маркер-rrrРНК от немеченных примесей методом ОФ-ВЭЖХ. Схема реакции получения холестерил-меченного трифосфата РНК показана на фиг. 16. На первой стадии связанную с носителем, полностью защищенную 5'ОН-РНК превращают в промежуточное соединение циклический трифосфат (соединение 2, фиг. 16) по способу, описанному в стадиях 1-7 примера 2. Затем колонку промывают безводным ацетонитрилом (3 мл). 176 мкл 2,2'-(этилендиокси)диэтиламина (соединение 1, фиг. 16; 1,2 ммоль) растворяют в безводном ацетонитриле (1 мл) и полученный раствор

приводят в контакт с носителем в колонке. Через 3 мин колонку промывают безводным ацетонитрилом (3 мл) и безводным дихлорметаном (6 мл). Затем амино-модифицированный трифосфат (т.е. соединение 3, фиг. 16) обрабатывают предварительно полученным раствором хлорформиата холестерина (36 мг, 80 мкмоль), N,N-диизопропилэтиламина (13,9 мкл, 40 мкмоль) и 4-диметиламинопиридина (4,9 мг, 40 мкмоль) в безводном дихлорметане (5 мл) в течение 15 мин. Колонку промывают безводным дихлорметаном (3 мл) и безводным ацетонитрилом (6 мл) и сушат в потоке аргона. Чтобы осуществить отсоединение от носителя и удаление защитных групп, производное олигонуклеотида приводят в контакт со свежеприготовленным 40% водным раствором метиламина и концентрированным водным раствором аммиака (АМА, 1:1, об/об, 2 мл) с использованием двух шприцев. После реакции отсоединения, проводимой в течение 30 мин, раствор переносят во флакон с завинчивающейся крышкой, нагревают в течение 10 мин при 65°C и упаривают досуха. Остаток сушат путем совместного упаривания с абсолютным этанолом и обрабатывают 1 М раствором фторида тетра-н-бутиламмония в ТГФ (1 мл, 1 ммоль) при встряхивании в течение 16 ч. После обессоливания на колонке NAP-25 холестерил-меченный трифосфат олигонуклеотида, с которого удалены все защитные группы, очищают методом ВЭЖХ, используя колонку с обращенной фазой (Hamilton PRP-1, 4,1×250 мм, фиг. 17А). Соединение 4 элюируют при концентрации метанола 95%, после чего предполагаемую структуру подтверждают методом MALDI (МВ 8370,6 Да, фиг. 17С).

Иногда холестерильный маркер удаляют путем кислого гидролиза при рН 3,8 и 60°C с получением соответствующего трифосфата олигонуклеотида (соединение 5, фиг. 16), используя способ, описанный в примере 3.

Пример 5: Систематическое введение 2'-О-метилования позволяет получить RIG-I-селективный дуплекс РНК

Список сокращений и их расшифровка приведены в конце текста данной заявки.

Собственная РНК организма характеризуется наличием

множества модификаций, которые могут оказывать влияние на функции РНК (тРНК и рРНК). Следовательно, 2'-О-метилирование может привести к изменению иммуногенности РНК. Поэтому селективный лиганд RIG-I не должен содержать более одного 2'-О-метилирования на цепь. Указанные свойства дуплекса РНК обеспечивают путем сочетания соответственно метилированных смысловой и антисмысловой цепей.

Скрининг 2'-О-метилирования позволяет выявить положения, отвечающие за селективность в отношении RIG-I (фиг. 5). Проводят полный скрининг 2'-О-метилирования смысловой (А) и антисмысловой (В) цепей ОН-GFP2. Каждое положение модифицируют отдельно путем 2'-О-метилирования и полученные продукты используют для стимуляции RIG-I, TLR7 или TLR8. Чтобы осуществить стимуляцию RIG-I, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) блокируют хлорохином и стимулируют путем липофекции дуплекса. IFN $\alpha$  измеряют через 20 ч после стимуляции методом ELISA. В случае TLR7 и TLR8 скринингу подвергают только соответствующую одну цепь, стимуляторную способность которой определяют на неблокированных PBMC. Одиночные цепи трансфицируют путем образования комплексов с поли-L-аргинином и через 20 ч после трансфекции методом ELISA измеряют IFN $\alpha$ , чтобы определить активацию TLR7, и IL12p70, чтобы определить активацию TLR8. 100% индукция GFP2 в случае смысловой цепи соответствует 3085 пг/мл IFN $\alpha$  для RIG-I, 2758 пг/мл IFN $\alpha$  для TLR7 и 1206 пг/мл IL12p70 для TLR8. В случае антисмысловой цепи 100% GFP2 соответствует 2342 пг/мл IFN $\alpha$  для RIG-I, 1831 пг/мл IFN $\alpha$  для TLR7 и 3018 пг/мл IL12p70 для TLR8. Анализ влияния введения 2'-О-метилирования в конкретных положениях приведен в виде таблицы (фиг. 5). Эффекты нормализуют по немодифицированной цепи, используемой в качестве контроля. Белый=никаких изменений, желтый=уменьшение стимуляции иммунной системы, красный=отсутствие стимуляции иммунной системы, зеленый=увеличение стимуляции иммунной системы.

Кроме того, существуют данные, что метилирование в некоторых положениях делает дуплекс RIG-I специфичным и высоко активным.

Фиг. 6: (А) Антисмысловую цепь метилируют по положениям, не оказывающим влияния на активацию RIG-I, и полученный дуплекс используют для стимуляции хлорохин-блокированных PBMC в концентрации 0,8 мкг/мл. IFN $\alpha$  измеряют методом ELISA через 20 ч после стимуляции. 100% ON-GFP2 соответствует 2729 пг/мл IFN $\alpha$ . (В) Смысловые и антисмысловые цепи, содержащие 2'-О-метилирование в разных сочетаниях положений, гибридизуют и используют для стимуляции PBMC. В случае стимуляции RIG-I их блокируют хлорохином и трансфицируют липофектаминоом, в случае стимуляции TLR7 и TLR8 используют неблокированные PBMC, которые трансфицируют комплексами дуплексов с поли-L-аргинином. 100% IVT-2 соответствуют 4861 пг/мл IFN $\alpha$  для RIG-I, 100% 9,2S соответствует 1975 пг/мл IFN $\alpha$  для TLR7 и 771 пг/мл IL12p70 для TLR8. На (А) и (В) показаны средние значения  $\pm$  SEM от 3 доноров.

Пример 6: Повышение активации RIG-I путем вставки РНК-стабилизирующих модификаций

Терапия с помощью миРНК включает в себя введение в организм коротких фрагментов дцРНК, которые ингибируют образование определенного белка в клетках-мишенях. Проблемой, связанной с применением данной формы терапии, является высокая нестабильность дуплексов миРНК. РНК может легко разрушаться экзонуклеазами и эндонуклеазами в сыворотке в процессе транспортировки в клетки-мишени.

Вполне вероятно, что значительная часть экзогенной РНК, используемой в терапевтических целях, дегенерирует в сыворотке и цитозоле субъекта, которому ее вводят.

Показано, что все модификации 5'-РТО оказывают положительное влияние на иммунную активность дуплекса, и что сочетание 5'РТО в смысловой и антисмысловой цепях приводит к максимальному увеличению активности (s15/as3 по сравнению с s15 РТО/as3 РТО; фиг. 7В). Следовательно, применение таких модификаций скелета РНК в RIG-I-селективных лигандах можно рассматривать как оказывающее благоприятное действие.

В частности, можно продемонстрировать, что 5'-фосфоротиоаты повышают иммуногенность селективного дуплекса.

Фиг. 7: (А) РВМС блокируют хлорохином и стимулируют дуплексами в концентрации 0,8 мкг/мл. Через 20 ч после стимуляции измеряют IFN $\alpha$  методом ELISA. 100% IVT2 соответствует 6138 пг/мл IFN $\alpha$ . (В) Указанные дуплексы титруют и используют для стимуляции RIG-I. РВМС блокируют хлорохином и трансфицируют дуплексами с использованием липофектамина. Через 20 ч после стимуляции в супернатанте измеряют IFN $\alpha$  методом ELISA. 100% 50 нм 3P-GFP2 соответствует 16044 пг/мл IFN $\alpha$ . Результаты показаны в виде среднего значения  $\pm$ SEM от 4 доноров.

При разработке терапевтических миРНК проблему стабильности в сыворотке решают путем введения модификаций другого вида: введение в РНК 2'-фтор-замен приводит к повышению стабильности РНК, обусловленному увеличением устойчивости к нуклеазам. Однако было отмечено, что 2'-фтор-замены могут активировать RIG-I-зависимую стимуляцию иммунной системы.

В частности, показано, что 5'-фосфоротиоаты увеличивают иммуногенность селективного дуплекса.

Однако в соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что отдельные 2'-фтор-замены увеличивают RIG-I-активирующий потенциал дуплекса.

В смысловой (А) и антисмысловой (В) цепях дуплекса каждое положение модифицируют по отдельности путем замены 2'-фтор (фиг. 8). Полученные дуплексы используют для стимуляции РВМС в концентрации 0,8 мкг/мл. Чтобы определить активацию RIG-I, РВМС блокируют и трансфицируют с использованием липофектамина, для стимуляции TLR7 и TLR8 используют неблокированные РВМС, которые трансфицируют дуплексами в комплексе с поли-L-аргинином. Через 20 ч после стимуляции измеряют уровни цитокинов методом ELISA. 100% GFP2 в случае смысловой цепи соответствует 2407 пг/мл IFN $\alpha$  для RIG-I, 3281 пг/мл для пихтового TLR7 и 1990 пг/мл для TLR8. В случае антисмысловой цепи 100% GFP2 соответствует 4512 пг/мл IFN $\alpha$  для RIG-I, 4691 пг/мл IFN $\alpha$  для TLR7 и 1997 пг/мл IL12p70 для TLR8. Результаты приведены в виде средних значений  $\pm$  SEM от 4 доноров.

Таким образом, очень важно получить дуплекс, обладающий максимально возможной активностью, которая могла бы

компенсировать потерю РНК. В предыдущих абзацах было описано, как модификации РНК можно идентифицировать путем селективного связывания РТО и 2'-фтор-замен, приводящих к увеличению активности дуплекса.

Пример 7: Сочетание всех модификаций позволяет получить лиганд RIG-I, обладающий высокой иммуногенностью

Чтобы проверить, приводит ли сочетание связывания РТО или 2'-фтор-замен с 2'-О-метилованием к повышению селективности, указанные модификации поэтапно объединяют в дуплексе.

РВМС блокируют хлорохином и используют для стимуляции RIG-I. Используют дуплексы, полученные путем введения разных модификаций в OH-GFP2, а активацию RIG-I определяют через 20 часов после стимуляции путем измерения IFN $\alpha$  методом ELISA (фиг. 9). Дуплексы, несущие совокупность модификаций, сравнивают либо с OH-GFP2 (A), либо с трифосфорилированным ЗР-GFP2 (B). 100% IVT 4 соответствует 21305 пг/мл IFN $\alpha$ . Результаты приведены в виде средних значений  $\pm$  SEM от 2 доноров.

Вначале в исходную РНК OH-GFP2 вводят 2'-О-метилование s15/as3 (OH-GFP2 oMet15S/oMet3as, фиг.9) и затем сравнивают его с модификациями 5'-РТО в смысловой и антисмысловой цепях (OH-GFP2 РТО 5', фиг. 9A). Затем оба типа модификаций объединяют в дуплексе (OH-GFP2oMet15/oMet3 РТО, фиг. 9). И наконец, получают дуплекс, который дополнительно содержит три 2'-фтор-замены в положениях 7 и 23 смысловой цепи и в положении 13 антисмысловой цепи (OH-GFP2oMet15/3-F23/13-РТО, фиг. 9A). Сравнительное титрование указанных двойных цепей РНК демонстрирует, что на сегодняшний день олигонуклеотид OH-GFP2oMet15/3-F23/13-РТО, несущий несколько модификаций, превосходит другие дуплексы по активности. Чтобы лучше оценить активность дуплекса, его титруют и сравнивают с немодифицированным трифосфатом дуплекса (фиг. 9B). Обнаружено, что введение модификации позволяет изменить олигонуклеотид так, так чтобы его иммунная активность оставалась сравнимой с активностью его трифосфатного эквивалента (ЗР-GFP2, фиг. 9B).

Пример 8: Элементы можно переносить на систему ЗР-дцРНК

Полную разработку RIG-I-селективного лиганда осуществляют

на уровне ОН последовательности GFP2. Хотя активность можно сильно увеличить путем соответствующих модификаций, трифосфорилирование лиганда дополнительно повышает его активность.

До сих пор было не ясно, можно ли просто переносить модификации с соответствующим позиционированием в систему 3P-GFP2.

Чтобы найти ответ на этот вопрос, получают дуплексы, которые содержат модификации, повышающие активность: в смысловой цепи 2'-О-метилирование по 15 основанию, 2'-фтор-замены по 7 и 23 основаниям и присоединение двух РТО на 5'- и 3'-концах (2S2F, фиг. 10). В антисмысловой цепи объединяют 2'-О-метилирование по 3 основанию, 2'-фтор-замену по 13 основанию и присоединение двух 5'-РТО. Поскольку в смысловой цепи близость трифосфата препятствует присоединению двух 5'-РТО, дополнительно получают мульти-модифицированную смысловую цепь, не содержащую 5'-РТО (1S2F, фиг. 10).

Чтобы оценить повышение активности в результате трифосфорилирования, для каждого дуплекса получают 5'-гидроксильную и 5'-трифосфатную формы (ОН и 3P, фиг. 10), которые сравнивают друг с другом путем стимуляционного титрования на РВМС.

Фиг. 10: (А) Синтезируют мультимодифицированные дуплексы, содержащие и не содержащие трифосфат. Титрование дозы проводят на РВМС, заблокированных хлорохином. Через 20 ч после стимуляции активацию иммунной системы измеряют методом ELISA по уровню IFN $\alpha$ . Результаты приведены в виде средних значений  $\pm$  SEM от 4 доноров. (В) На основе кривых титрования рассчитывают биологические значения EC50.

Обнаружено, что мультимодифицированные ОН-дуплексы, независимо от наличия на одном или двух концах РТО, могут достигать пределов активности немодифицированного ОН-GFP2 (ОН Multi 1S2F, ОН Multi 2S2F, ОН-GFP2, фиг. 10). Дополнительное введение 5'-трифосфата в смысловой цепи приводит к дополнительному увеличению активности в 5 раз по сравнению с гидроксил-содержащими комплексами (3P-Multi 1S2F, 3P-Multi

2S2F, фиг. 10).

В результате было обнаружено, что разные модификации, приводящие к повышению активности, можно сочетать с трифосфорилированием олигонуклеотида с достижением положительного эффекта.

Прогрессивное увеличение уровня селективности (2'-О-метилирование) исходного дуплекса ОН-GFP2, увеличение активности путем стабилизирующих модификаций (присоединение РТО и 2'-фтор-замены) и средства к связывающему карману (трифосфат), приводит к получению активного и селективного лиганда RIG-I (3P-Multi 1S2f).

И наконец, путем вставки специфических модификаций можно получить 3P-дцРНК с максимальным повышением иммунностимулирующей активности. Такое увеличение иммуногенности позволяет поддерживать дозу лекарственного средства на низком уровне и компенсировать потери РНК, которые происходят в период от введения лекарственного средства до его проникновения в клетку.

#### Олигонуклеотиды РНК

GFP2s oMet1	G <sub>m</sub> ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2s oMet2	GA <sub>m</sub> CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2s oMet23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU <sub>m</sub> U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA A	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
GFP2s oMet24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU <sub>m</sub> CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2as oMet1	G ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C <sub>m</sub> UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>

GFP2as oMet2	GA CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU <sub>m</sub> GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2as oMet23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA <sub>m</sub> A	
GFP2as oMet24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA <sub>m</sub>	
OH-GFP2 multi oMet	G AC G CUGAC C C U GAAGUUCA UCUU C <sub>m</sub> UG <sub>m</sub> C <sub>m</sub> GACUG <sub>m</sub> G <sub>m</sub> A <sub>m</sub> CUUCAAGU <sub>m</sub> AGAA <sub>m</sub>	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s20/as12	GACGCUGACCCU GAAGUUCA <sub>m</sub> UCUU CUGCGACUGGG <sub>m</sub> CUUCAAGU AGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s20/as19	GACGCUGACCCUGAAGUUC A <sub>m</sub> UCUU CUGCGACUGGGACUUCAAG <sub>m</sub> U AGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s15/as12	GACGCUGACCCU GAA <sub>m</sub> GUUCAUCUU CUGCGACUGGG <sub>m</sub> CUU CAAGUAGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s15/as19	GACGCUGACCCUGAA <sub>m</sub> GUUC AUCUU CUGCGACUGGGACUU CAAG <sub>m</sub> UAGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s20/as3	GAC GCUGACCCUGAAGUUCA <sub>m</sub> UCUU CUG <sub>m</sub> CGACUGGGACUUCAAGU AGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s15/as3	GAC GCUGACCCUGAA <sub>m</sub> GUUCAUCUU CUG <sub>m</sub> CGACUGGGACUU CAAGUAGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s3/as12	GAC <sub>m</sub> GCUGACCCU GAAGUUCAUCUU CUG CGACUGGG <sub>m</sub> CUUCAAGUAGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s3/as19	GAC <sub>m</sub> GCUGACCCUGAAGUUC AUCUU CUG CGACUGGGACUUCAAG <sub>m</sub> UAGAA	N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
Fs1	G <sub>F</sub> ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fs2	GA <sub>F</sub> CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fs23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU <sub>F</sub> U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA A	N <sub>F</sub> = 2'-F
Fs24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU <sub>F</sub> CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas1	G AC <sub>F</sub> GCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C <sub>F</sub> UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas2	GA CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU <sub>F</sub> GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA <sub>F</sub> A	N <sub>F</sub> = 2'-F
Fas24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA <sub>F</sub>	

3P-GFP2	PPP-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
s15/as3 PTO	GAC GCUGACCCUGAA <sub>m</sub> GUUCAUC U U CUG <sub>m</sub> CGACUGGGACUU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	* = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s15 PTO/as3	G* <sub>A</sub> * <sub>C</sub> GCUGACCCUGAA <sub>m</sub> GUUCAUCUU C U G <sub>m</sub> CGACUGGGACUU CAAGUAGAA	* = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
s15 PTO/as3 PTO	G* <sub>A</sub> * <sub>C</sub> GCUGACCCUGAA <sub>m</sub> GUUCAUC U U C U G <sub>m</sub> CGACUGGGACUU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	* = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
OH-GFP2 PTO 5'	G* <sub>A</sub> * <sub>C</sub> CGCUGACCCUGAAGUUCAUC U U C U GCGACUGGGACUUCAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	* = PTO
OH-GFP2 oMet15/oMet3 PTO	G* <sub>A</sub> * <sub>C</sub> GCUGACCCUGAA <sub>m</sub> GUUCAUC U U C U G <sub>m</sub> CGACUGGGACUU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	* = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
OH-GFP2 F23s/13as	GACGCUGACCCUG AAGUUCAUCU <sub>F</sub> U CUGCGACUGGGAC <sub>F</sub> UUCAAGUAGA A	N <sub>F</sub> = 2'-F
OH-GFP2oMet15/3 F23/13 PTO	G* <sub>A</sub> * <sub>C</sub> GCUG <sub>F</sub> ACCCUG AA <sub>m</sub> GUUCAUC U <sub>F</sub> U C U G <sub>m</sub> CGAC UGGGAC <sub>F</sub> UU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	N <sub>F</sub> = 2'-F * = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
3P-GFP2 1S2F	PPP-GAC GCUG <sub>F</sub> ACCCUG AA <sub>m</sub> GUUCAUC* <sub>F</sub> * <sub>U</sub> CUG <sub>m</sub> CGAC UGGGAC <sub>F</sub> UU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	N <sub>F</sub> = 2'-F * = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
OH-GFP2 1S2F	GAC GCUG <sub>F</sub> ACCCUG AA <sub>m</sub> GUUCAUC* <sub>F</sub> * <sub>U</sub> CUG <sub>m</sub> CGAC UGGGAC <sub>F</sub> UU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	N <sub>F</sub> = 2'-F * = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
3P-GFP2 2S2F	PPP-G* <sub>A</sub> * <sub>C</sub> GCUG <sub>F</sub> ACCCUG AA <sub>m</sub> GUUCAUC* <sub>F</sub> * <sub>U</sub> C U G <sub>m</sub> CGAC UGGGAC <sub>F</sub> UU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	N <sub>F</sub> = 2'-F * = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>
OH-GFP2 2S2F	G* <sub>A</sub> * <sub>C</sub> GCUG <sub>F</sub> ACCCUG AA <sub>m</sub> GUUCAUC* <sub>F</sub> * <sub>U</sub> C U G <sub>m</sub> CGAC UGGGAC <sub>F</sub> UU CAAGUAG* <sub>A</sub> * <sub>A</sub>	N <sub>F</sub> = 2'-F * = PTO N <sub>m</sub> = 2'-OCH <sub>3</sub>

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> РАЙНИШЕ ФРИДРИХ-ВИЛЬХЕЛЬМС-УНИВЕРЗИТЕТ БОНН

<120> НОВЫЕ ЛИГАНДЫ RIG-I И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

<130> 201590629

<140> PCT/EP2013/070117

<141> 2013-09-26

<150> EP 12 186 444.1

<151> 2012-09-27

<160> 77

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 24

<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> нуклеотид несущий децил-О-ppp

<400> 1  
gacgagacc cagaagucac ucuu 24

<210> 2

<211> 24

<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<400> 2  
gacgagacc cagaagucac ucuu 24

<210> 3

<211> 24

<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> нуклеотид несущий холестерил-ppp

<400> 3  
gacgagacc cagaagucac ucuu 24

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <400> 4  
 gacgugacc cugaaguca ucuu 24  
  
 <210> 5  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 5  
 aagaugaacu ucagggucag cguс 24  
  
 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <400> 6  
 gacgugacc cugaaguca ucuu 24  
  
 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 7  
 aagaugaacu ucagggucag cguс 24  
  
 <210> 8  
 <211> 24

<212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23)..(23)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <400> 8  
 gacgugacc cugaaguca ucuu 24  
  
 <210> 9  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 9  
 аагаугааси усагггисаг сгис 24  
  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <400> 10  
 gacgugacc cugaaguca ucuu 24  
  
 <210> 11  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 11  
 аагаугааси усагггисаг сгис 24  
  
 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>

<223> Синтетический  
 <400> 12  
 gascsigacc sigaaquca usuu 24

<210> 13  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> Синтетический

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
 <400> 13  
 aagaugaacu usagggisag cguс 24

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> Синтетический

<400> 14  
 gascsigacc sigaaquca usuu 24

<210> 15  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> Синтетический

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23)..(23)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
 <400> 15  
 aagaugaacu usagggisag cguс 24

<210> 16  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
 <220>  
 <223> Синтетический

<400> 16  
 gascsigacc sigaaquca usuu 24

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <400> 17  
 аагаугаасу усагггисаг сгус 24  
  
 <210> 18  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 18  
 гасгсигасс сигаагуиса усuu 24  
  
 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <400> 19  
 аагаугаасу усагггисаг сгус 24  
  
 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 20  
 гасгсигасс сигаагуиса усuu 24  
  
 <210> 21  
 <211> 24

<212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(5)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(21)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(22)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
 <400> 21  
 аагаугаасу усагггисаг сгус  
  
 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 22  
gacgcugacc cugaaguuca ucuu 24

<210> 23  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(13)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 23  
aagaugaacu ucagggucag cguс 24

<210> 24  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (20)..(20)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 24  
gacgcugacc cugaaguuca ucuu 24

<210> 25  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 25  
aagaugaacu ucagggucag cguс 24

<210> 26  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 26  
gacgugacc cugaaguca ucuu 24

<210> 27  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(13)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 27  
aagaugaacu ucagggucag cguс 24

<210> 28  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 28  
gacgugacc cugaaguca ucuu 24

<210> 29  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 29

аагаугааси усaгггусaг сгус

24

<210> 30  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (20)..(20)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 30  
гасгусигасс сугаагууса усuu

24

<210> 31  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 31  
аагаугааси усaгггусaг сгус

24

<210> 32  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 32  
гасгусигасс сугаагууса усuu

24

<210> 33  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
<400> 33  
аагаугааси усагггисаг сгус 24

<210> 34  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный  
  
<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
<400> 34  
гасгсигасс сигаагуиса усuu 24

<210> 35  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный  
  
<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(13)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
<400> 35  
аагаугааси усагггисаг сгус 24

<210> 36  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный  
  
<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me  
  
<400> 36  
гасгсигасс сигаагуиса усuu 24

<210> 37  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 37  
аагаугааси усагггисаг сгус

24

<210> 38  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 38  
гасгсигасс сигаагуиса усии

24

<210> 39  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<400> 39  
аагаугааси усагггисаг сгус

24

<210> 40  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(2)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 40

gacgcugacc cugaaguuca ucuu 24

<210> 41  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<400> 41  
aagaugaacu ucagggucag cguс 24

<210> 42  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(23)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 42  
gacgcugacc cugaaguuca ucuu 24

<210> 43  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<400> 43  
aagaugaacu ucagggucag cguс 24

<210> 44  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (24)..(24)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 44  
gacgcugacc cugaaguuca ucuu 24

<210> 45

<211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 45  
 аагаугааси усагггисаг сгис 24

<210> 46  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 46  
 гасгсигасс сигаагууса усuu 24

<210> 47  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(24)  
 <223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F  
  
 <400> 47  
 аагаугааси усагггисаг сгис 24

<210> 48  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический  
  
 <400> 48  
 гасгсигасс сигаагууса усuu 24

<210> 49  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Синтетический

<220>  
 <221> misc\_feature

<222> (23)..(23)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 49  
аагаугааси усагггисаг сгис 24

<210> 50  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<400> 50  
гасгсигасс сигаагуиса усии 24

<210> 51  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(2)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 51  
аагаугааси усагггисаг сгис 24

<210> 52  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<400> 52  
гасгсигасс сигаагуиса усии 24

<210> 53  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 53

aагаугааси усaгггусaг сгус 24

<210> 54  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> Синтетический

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> нуклеотид несущий трифосфат

<400> 54  
 гасгсигасс сигаагууса усuu 24

<210> 55  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> Синтетический

<400> 55  
 аагаугааси усaгггусaг сгус 24

<210> 56  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> Синтетический

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 56  
 гасгсигасс сигаагууса усuu 24

<210> 57  
 <211> 24  
 <212> РНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> Синтетический

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 57  
аагаугааси усагггисаг сгис

24

<210> 58  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 58  
гасгсигасс сугаагууса усии

24

<210> 59  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 59  
аагаугааси усагггисаг сгис

24

<210> 60  
<211> 24  
<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)..(3)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 60

gacgugacc cugaaguca ucuu

24

<210> 61

<211> 24

<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)..(3)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>

<221> misc\_feature

<222> (22)..(22)

<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 61

aagaugaacu ucagggucag cgu

24

<210> 62

<211> 24

<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<400> 62  
gacgugacc cugaaguuca ucuu

24

<210> 63  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<400> 63  
aagaugaacu ucagggucag cugc

24

<210> 64  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 64  
gacgugacc cugaaguuca ucuu

24

<210> 65

<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 65  
аагаугааси усагггисаг сгис

24

<210> 66  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(23)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 66  
гасгсигасс сигаагуиса усии

24

<210> 67  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 67  
аагаугааси усагггисаг сгис

24

<210> 68

<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(23)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 68  
gacgcgacc cugaagucа ucuu

24

<210> 69  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)

<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 69

аагаугааси усаgggгисаg сгус

24

<210> 70

<211> 24

<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> нуклеотид несущий трифосфат

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<220>

<221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..(24)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<400> 70

гасгсигасс сугаагууса усии

24

<210> 71

<211> 24

<212> РНК

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>

<221> misc\_feature

<222> (2)..(3)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>

<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 71  
аагаугаасу усаgggгусаg сгус

24

<210> 72  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(23)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(24)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(24)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(23)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 72  
гасгсигасс сугаагууса усuu

24

<210> 73  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 73  
аагаугааси усaggгисаg сгис

24

<210> 74  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> нуклеотид несущий трифосфат

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(23)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(24)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(23)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 74  
gacgcugacc cugaaguuca ucuu

24

<210> 75  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 75  
aagaugaacu ucagggucag cguc

24

<210> 76  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)

<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(23)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(24)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (23)..(23)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<400> 76  
gacgcugacc cugaaguuca ucuu

24

<210> 77  
<211> 24  
<212> РНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> Синтетический

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(2)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2)..(3)  
<223> нуклеотиды связанные фосфотиоатом

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> нуклеотид являющийся модифицированным 2'-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> нуклеотид несущий модифицированный 2'-O-Me

<400> 77  
aagaugaacu ucagggucag cguac

24



четыре структурных элемента, представляющих собой нуклеотиды или аналоги нуклеотидов.

2. Модифицированный олигонуклеотид по п. 1, где V1, V2, V3, V4, V5, V6, W1, W2 и W3 обозначают O.

3. Модифицированный олигонуклеотид по п. 1 или 2, где Z обозначает длинноцепочечный алифатический остаток, один из партнеров по нековалентному высокоаффинному связыванию, выбранный из биотина, дитиобиотина, гаптена и антигена; реакционноспособный химический фрагмент, выбранный из азидной или алкинильной группы, способной ковалентно взаимодействовать с улавливающим реагентом, содержащим комплементарную реакционноспособную группу; Q или  $\text{NHC}_2\text{-C}_{24}$  алкил,

а Q выбран из группы, включающей в себя H, аминокислоты, аналоги аминокислот,  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$  алкил,  $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$  алкил, пептиды и липиды.

4. Модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 1-3, где олигонуклеотид выбран из группы, включающей в себя одноцепочечные или двухцепочечные дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и аналоги олигонуклеотидов, которые необязательно могут быть химически модифицированными по нуклеозиду и/или рибозному остатку дезоксирибонуклеотида, рибонуклеотида или аналога олигонуклеотида.

5. Модифицированный олигонуклеотид по п. 4, где олигонуклеотид является двухцепочечным, причем длина каждой цепи составляет, по меньшей мере, 19 нуклеотидов.

6. Модифицированный олигонуклеотид по пп. 4 или 5, где химические модификации поддерживают, обуславливают или повышают селективность олигонуклеотида, в частности селективность олигонуклеотида в отношении RIG-I и/или, где химические модификации поддерживают или повышают химическую стабильность олигонуклеотида.

7. Модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 4-6, где химические модификации независимо выбраны из группы, включающей в себя галогенирование, 2'-O-алкилирование, и/или введение, по меньшей мере, одной фосфотриоатной межнуклеотидной связи.

8. Модифицированный олигонуклеотид по п.7, где химические модификации независимо выбраны из F-галогенирования, 2'-O-алкилирования по меньшей мере одной фосфоротиоатной межнуклеотидной связи.

9. Модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 1-8, где

X обозначает NH,

Y обозначает  $-K-(CH_2-CH_2-O)_n$ ,

K обозначает NH,

n независимо обозначают число от 0 до 20, и, где K дополнительно замещен холестерином-C(O)- или тритилом.

10. Модифицированный олигонуклеотид по любому из пп.1-8, в котором Y выбран из

$-O-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-$ ,

$-O-((CH_2)_m-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-$ ,

$-O-((CHR)_m-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-$ ,

$-O-(CH_2-CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-$ ,

$-O-((CH_2)_m-CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-$  и

$-O-((CHR)_m-CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-$ .

11. Модифицированный олигонуклеотид по любому из п.п. 1-8, где

a)  $R_1$  и  $R_2$  обозначают H и  $n_1=0$ ,  $n_2=1$  и  $n_3=1$  или

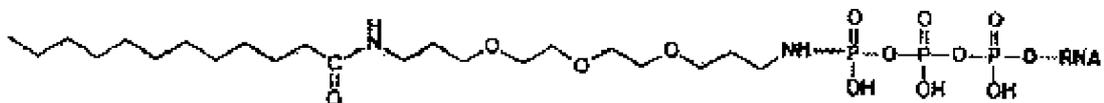
b)  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  обозначают H и  $n_1$ ,  $n_2$  и  $n_3$  равны 1.

12. Модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 1-11, где

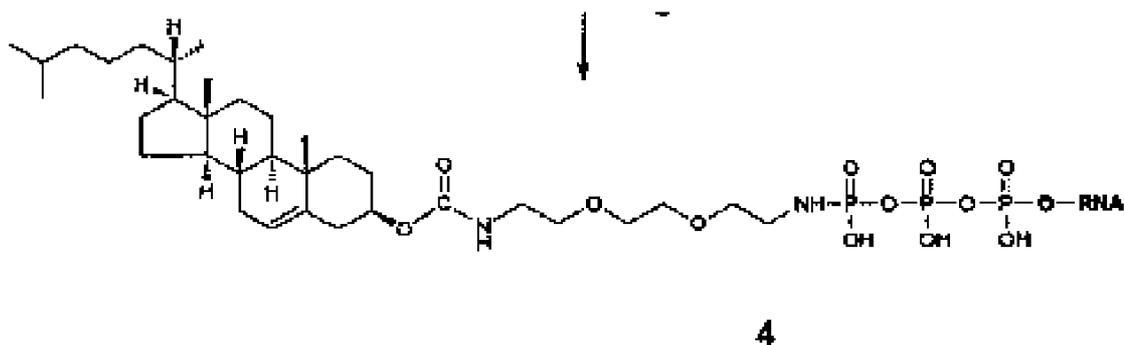
Z обозначает  $C_1-C_{12}$  алкил,  $C_{10}$  и Q или  $NHC_2-C_{24}$  алкил, где Q выбран из группы, включающей в себя H, аминокислоты, аналоги аминокислот,  $C_1-C_{24}$  алкил,  $C_{12}-C_{24}$  алкил, пептиды и липиды, и

$V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ,  $V_5$ ,  $V_6$ ,  $W_1$ ,  $W_2$  и  $W_3$  обозначают O.

13. Модифицированный олигонуклеотид, где модифицированный олигонуклеотид представлен формулой (5)



или формулой (4)



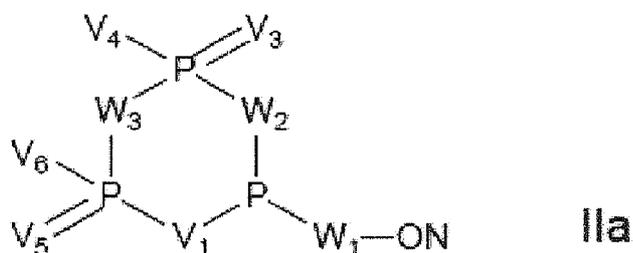
14. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 1-13.

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, предназначенная для внутрикожного введения.

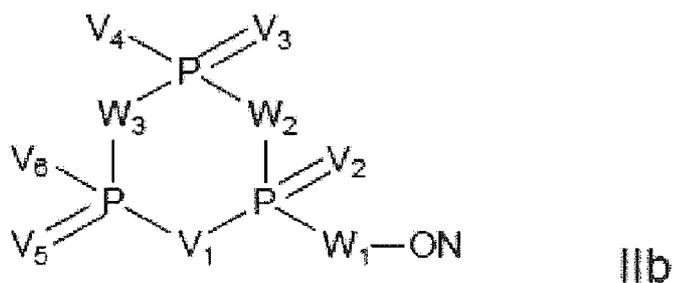
16. Фармацевтическая композиция по п. 15, предназначенная для введения путем татуировки, посредством микроигл и/или микроигольных пластырей.

17. Способ получения олигонуклеотида по любому из пп. 1-13, включающий в себя следующие стадии:

(а) взаимодействие соединения формулы (IIa)

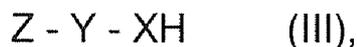


где V1, V3, V5, V4, V6, W1, W2, W3 и ON имеют указанные выше значения, и где ON защищен, по меньшей мере, одной защитной группой, с окисляющим реагентом с получением соединения формулы (IIb)



где V1, V3, V5 и V2, V4, V6, W1, W2, W3 и ON имеют указанные выше значения, и где ON защищен, по меньшей мере, одной защитной группой,

(b) взаимодействие соединения формулы (IIb) с улавливающим реагентом формулы (III)

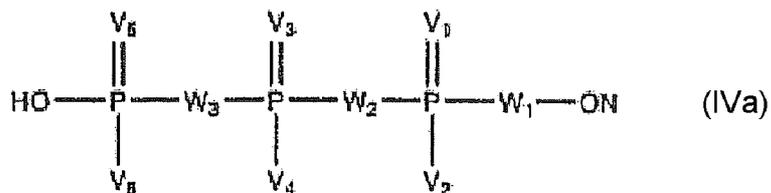


где X, Z, и Y имеют указанные выше значения, и где X предпочтительно обозначает O, с получением продукта реакции, содержащего олигонуклеотид формулы (I),

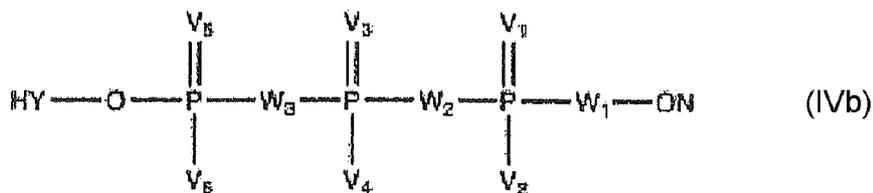
(c) удаление, по меньшей мере, одной защитной группы с ON и

(d) приведение в контакт продукта реакции, полученного на стадии (b), с улавливающим реагентом, способным взаимодействовать с улавливаемым маркером, где приведение в контакт осуществляют в условиях, обеспечивающих отделение олигонуклеотида (I) от других веществ, содержащихся в указанном продукте реакции; и, необязательно, дополнительные стадии:

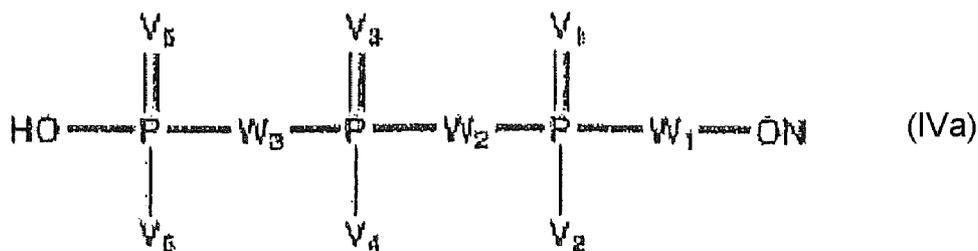
(e) удаления улавливаемого маркера с получением олигонуклеотида, причем, если X=O, получают соединение формулы (IV)a или (IV)b,



или



а если  $\text{X}=\text{NH}$ , получают соединение формулы (IV)а



где улавливаемый маркер и улавливающий реагент, способные взаимодействовать друг с другом, выбирают из:

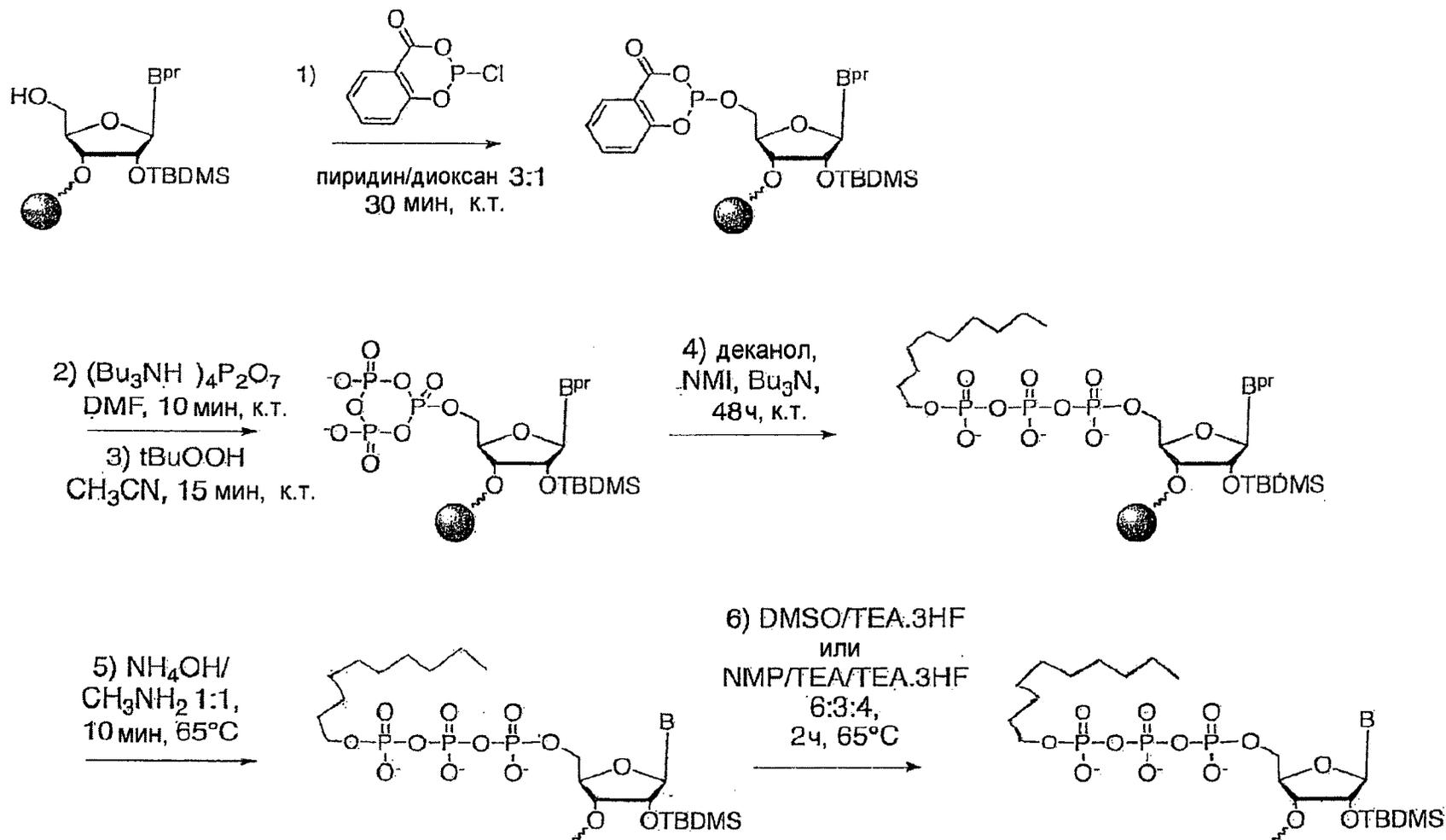
(i) гидрофобной или фторированной группы и хроматографического материала, обладающего сродством к гидрофобным или фторированным группам, такого как обращенная фаза или носитель, обладающий сродством к фтору;

(ii) первого партнера из пары по нековалентному связыванию и второго партнера из пары по нековалентному связыванию, и

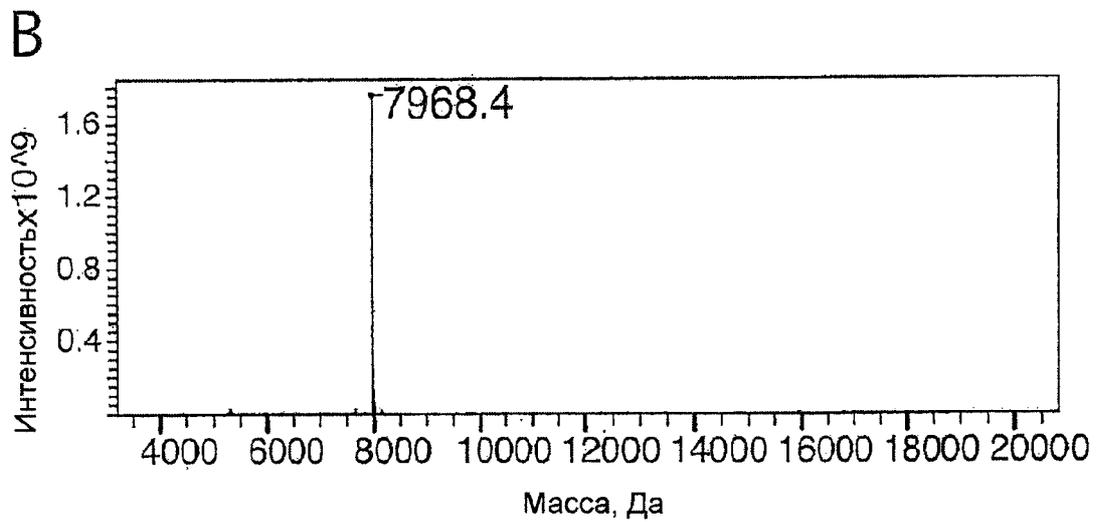
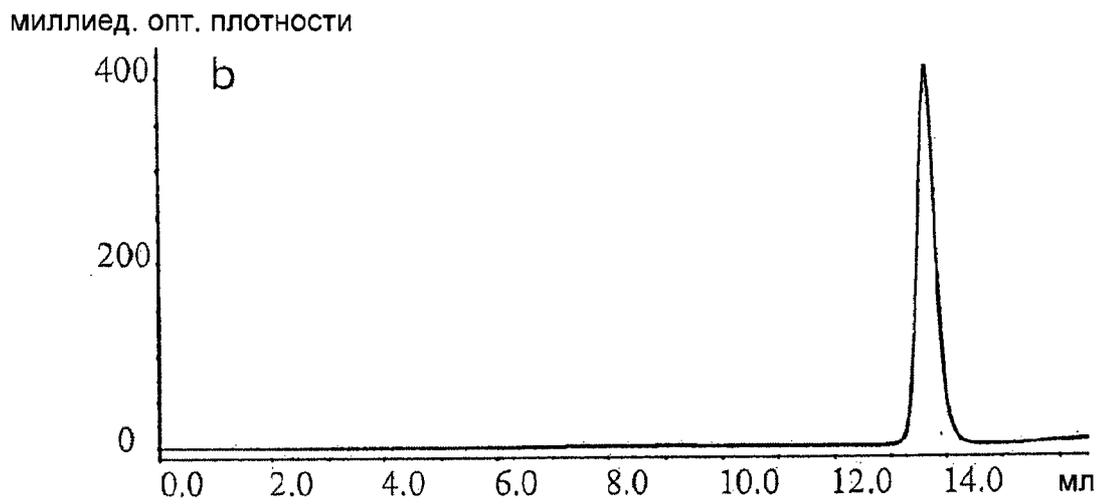
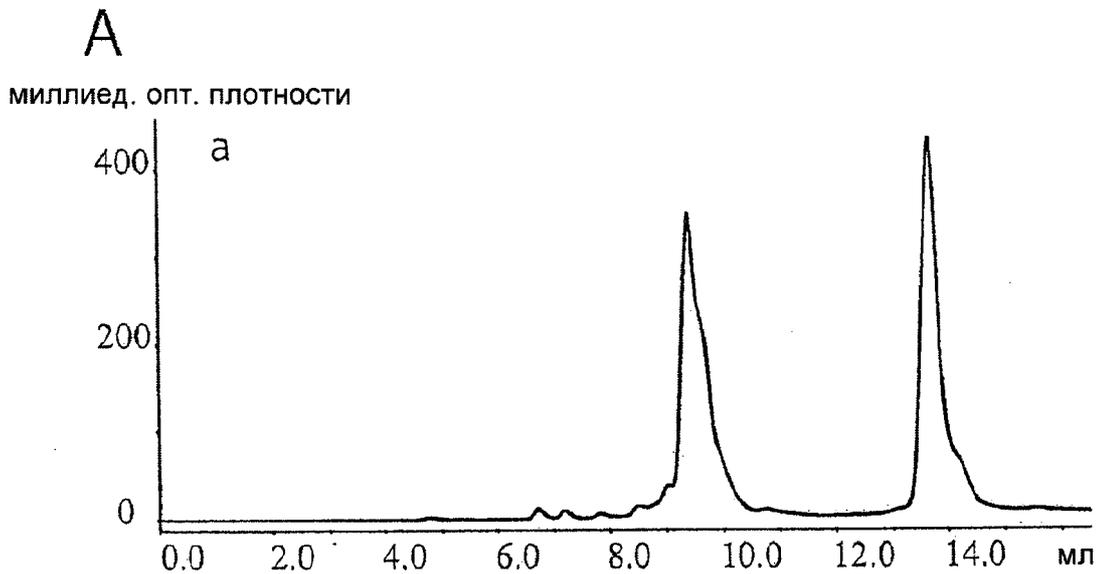
(iii) первого партнера из пары по ковалентному связыванию и второго партнера из пары по ковалентному связыванию, где первый партнер и второй партнер образуют ковалентные связи.

По доверенности

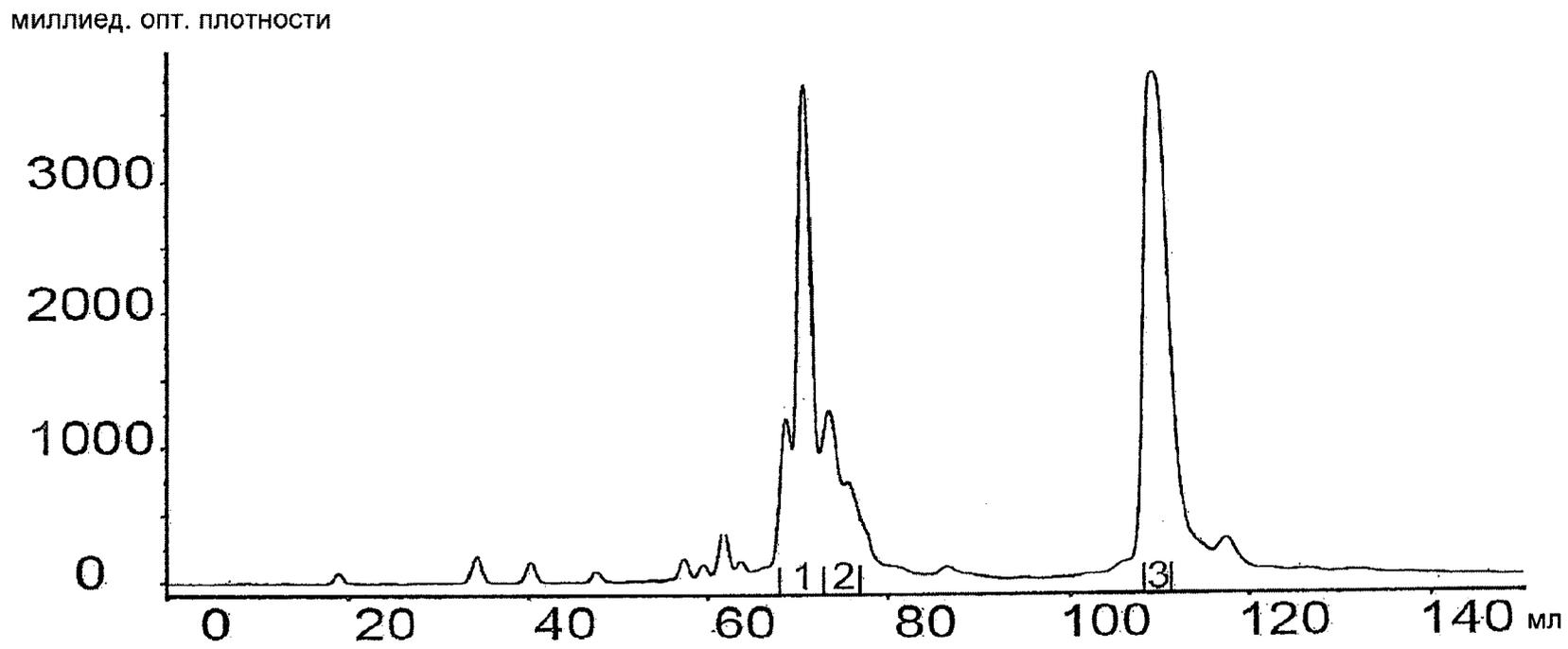
Фиг. 1



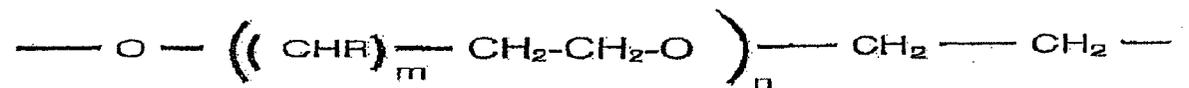
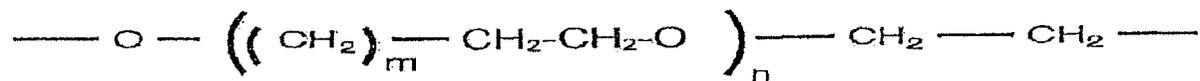
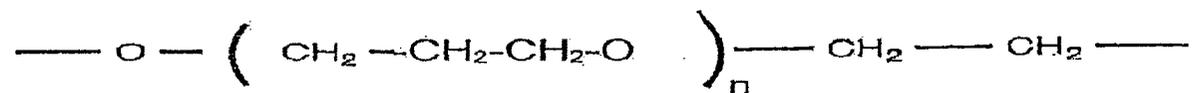
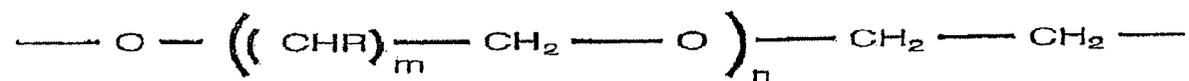
Фиг.2



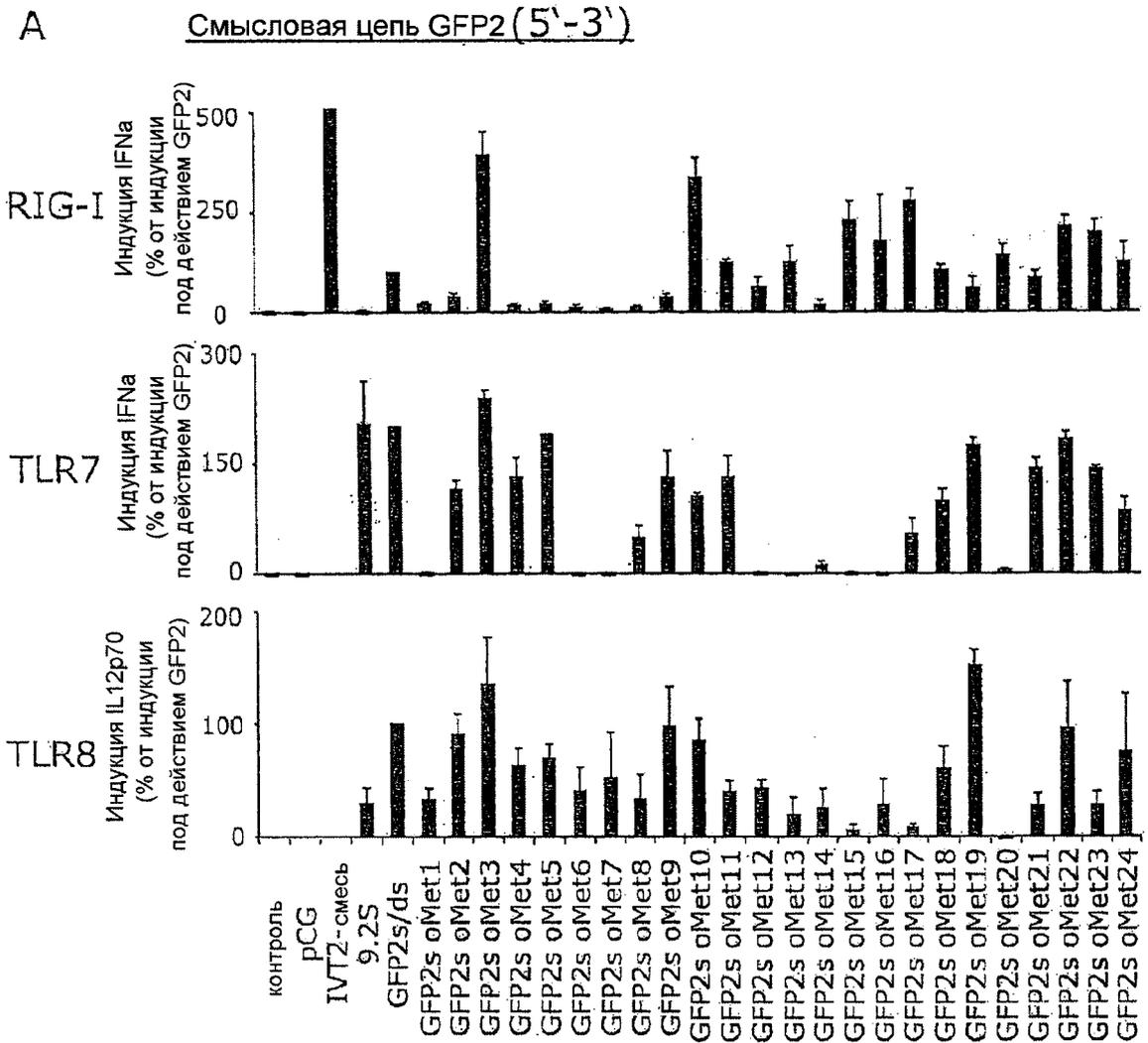
Фиг.3



Фиг.4



Фиг.5

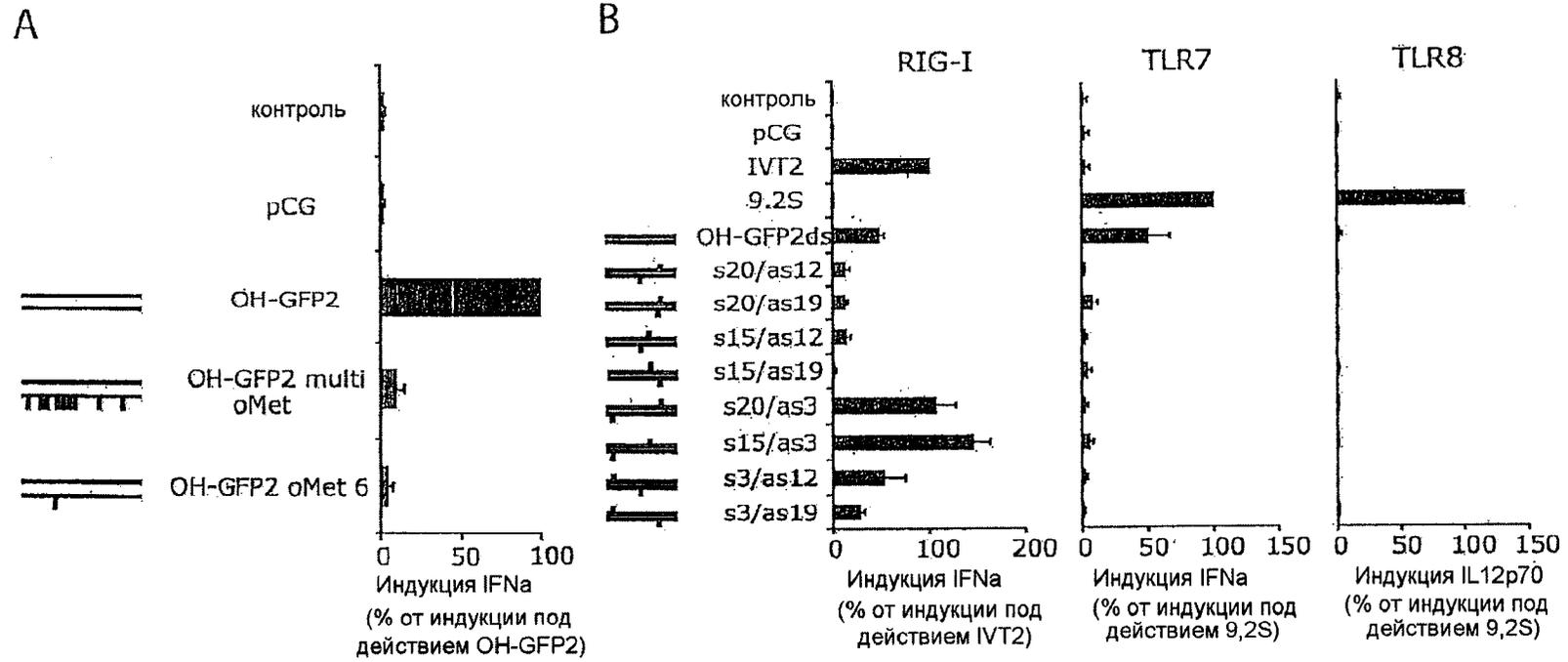


Смысловая цепь GFP2 (5'-3')

	U	G		G				G		C	U	G		G		U	C	A	U		U	U	
	A	C	G	C				C	C	C							C		U	C	U	C	
	A	C	G	C		G		C	C	C						U				C	C	U	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

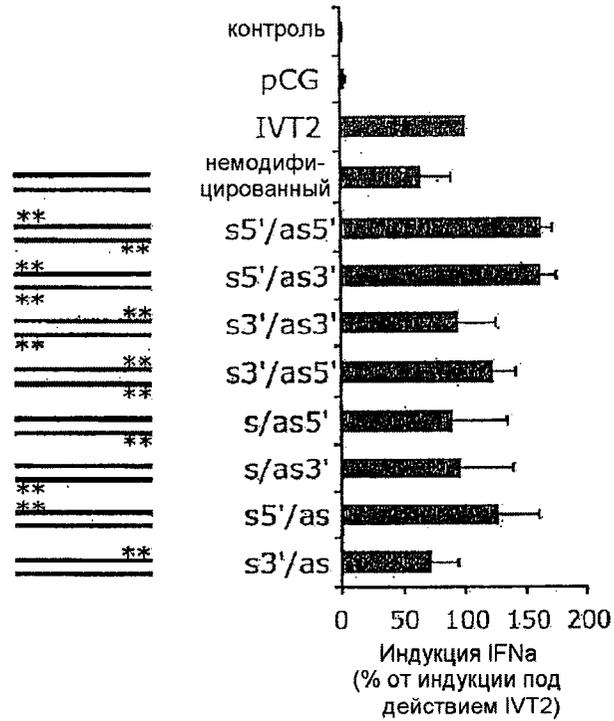


Фиг.6

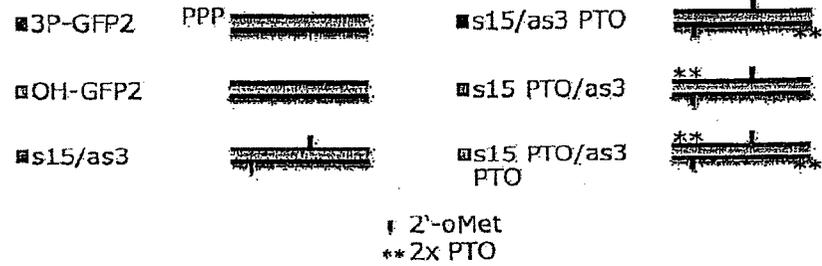
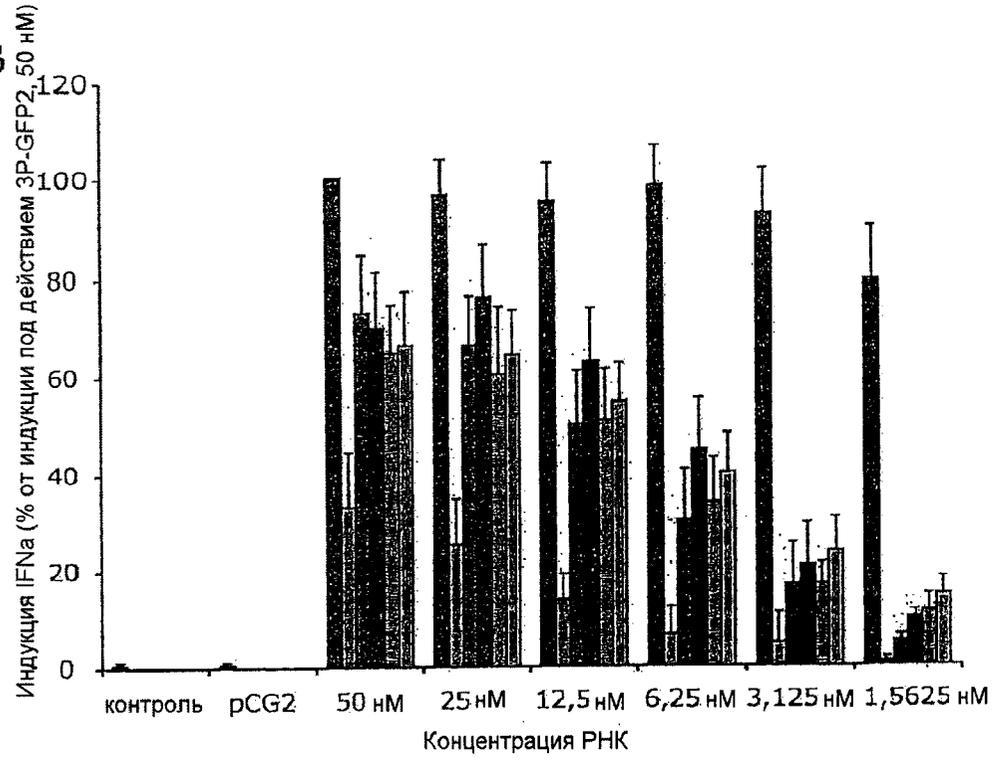


Фиг.7

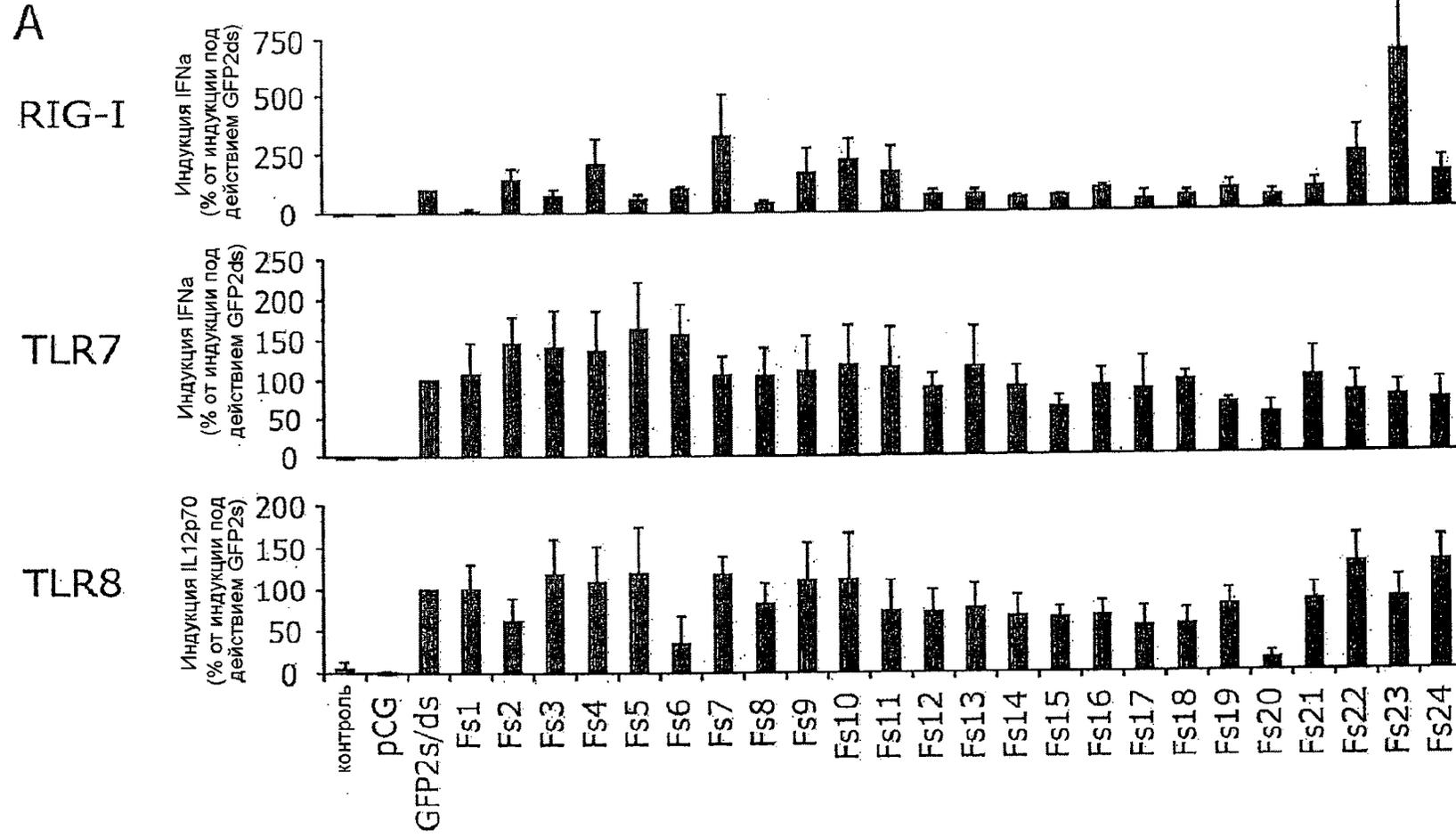
A



B

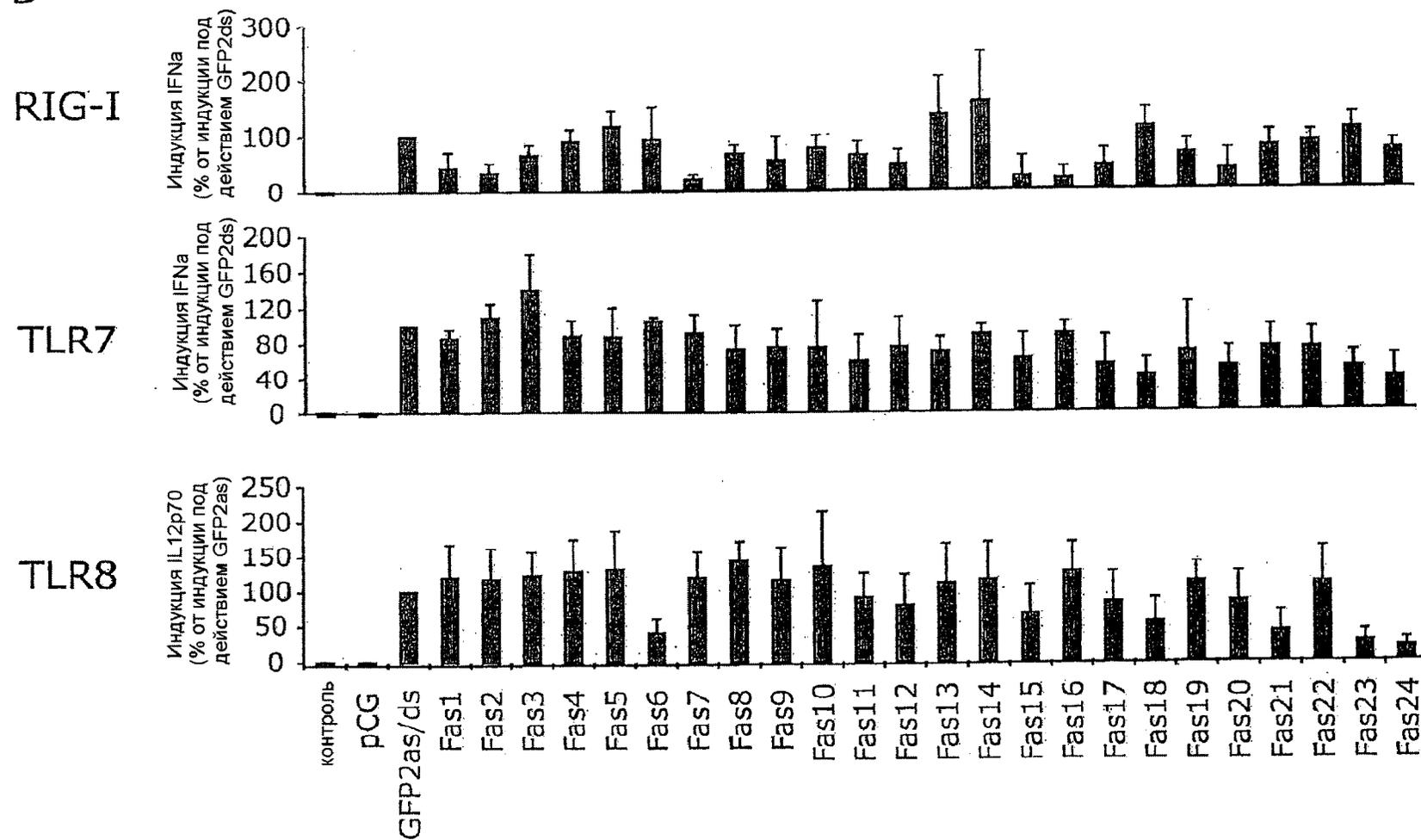


Фиг.8



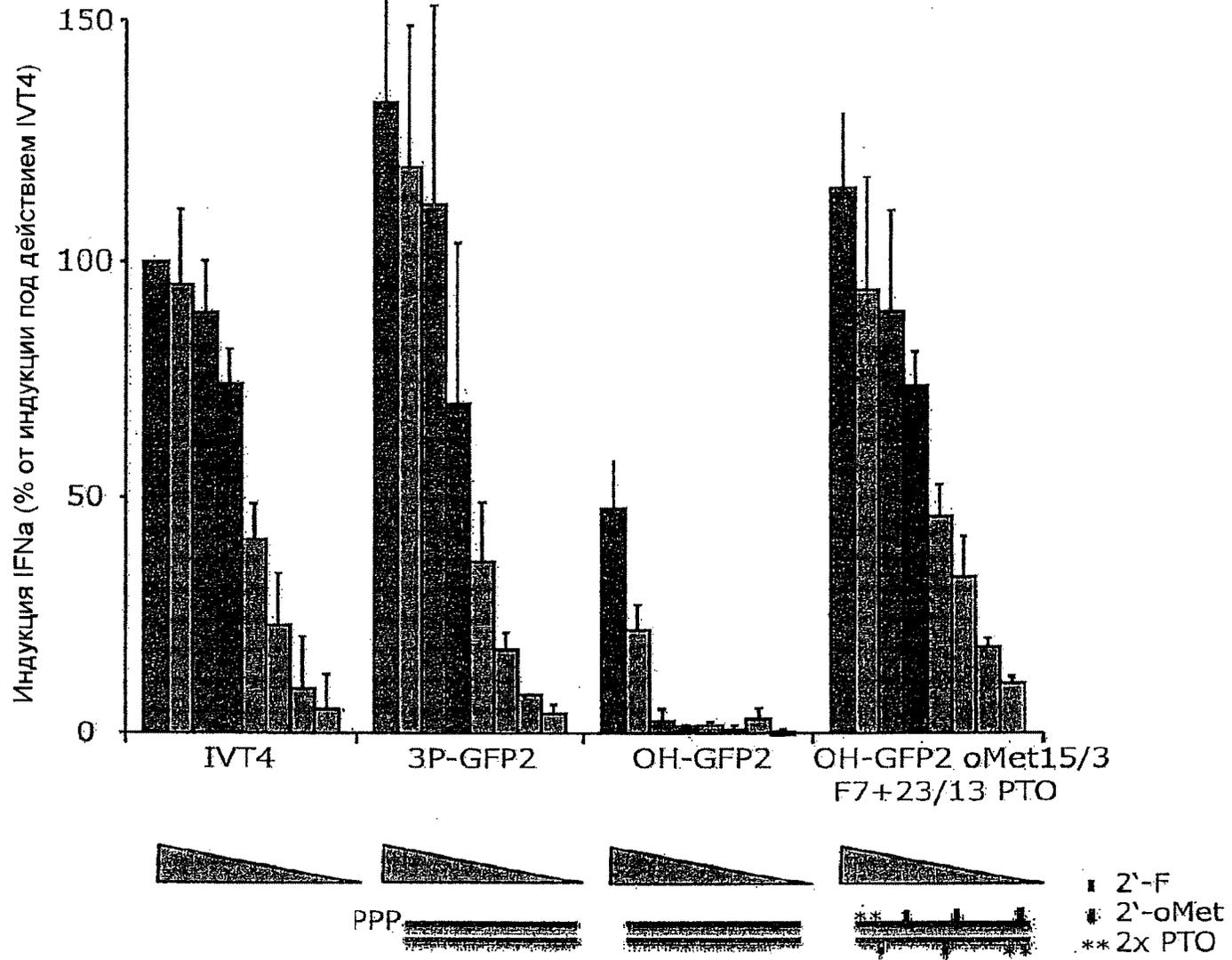
Фиг.8 (продолжение)

В

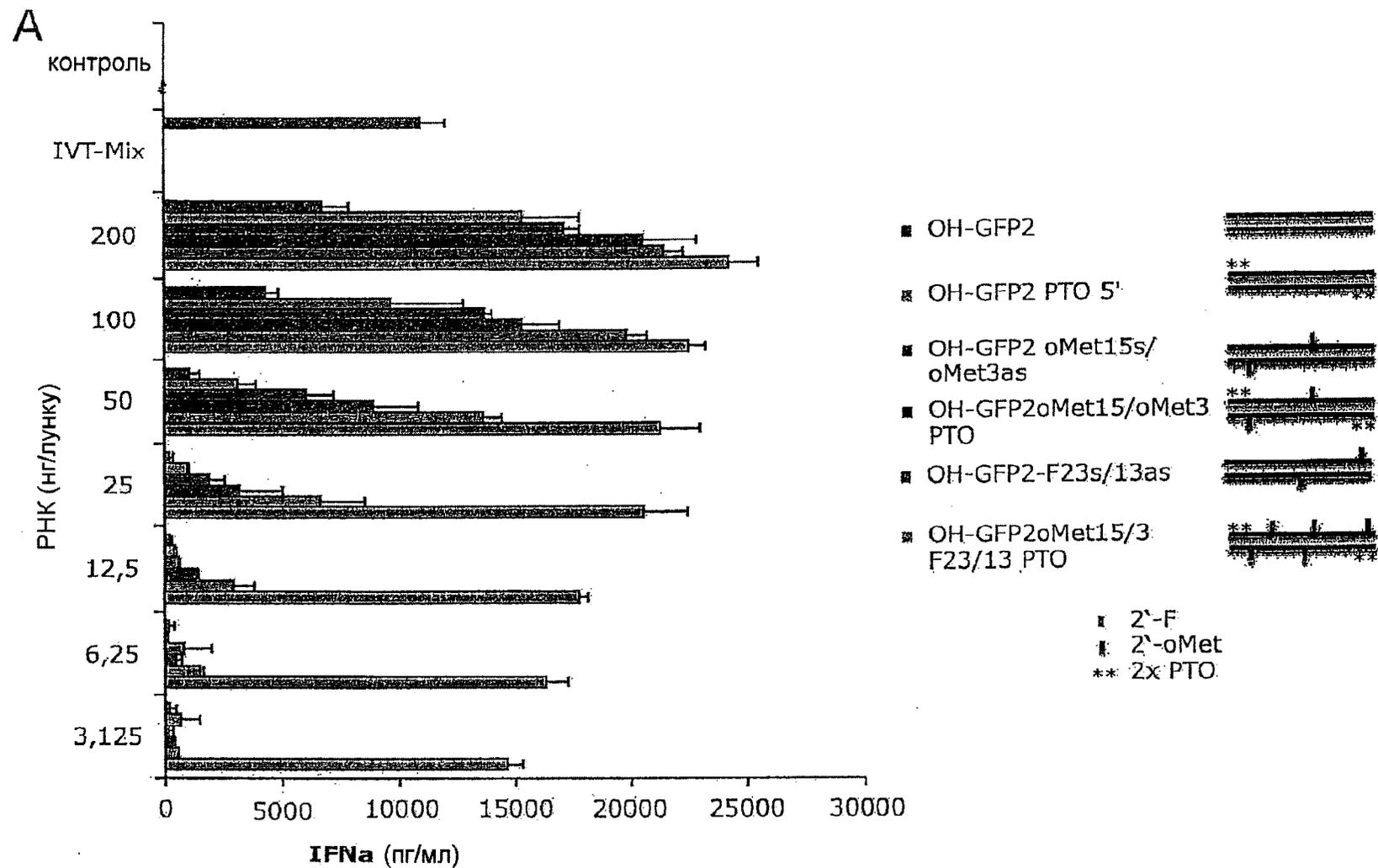


Фиг.9

В

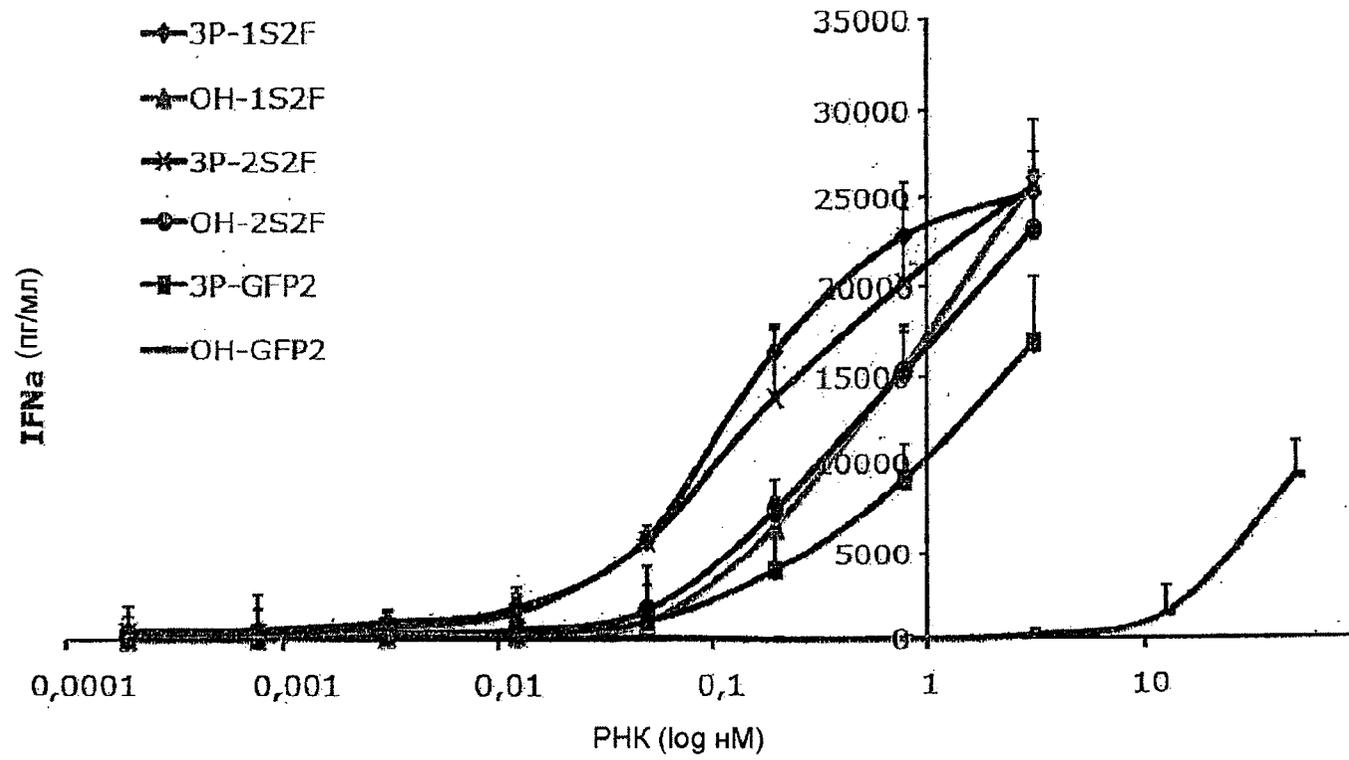


ФИГ.9 (продолжение)

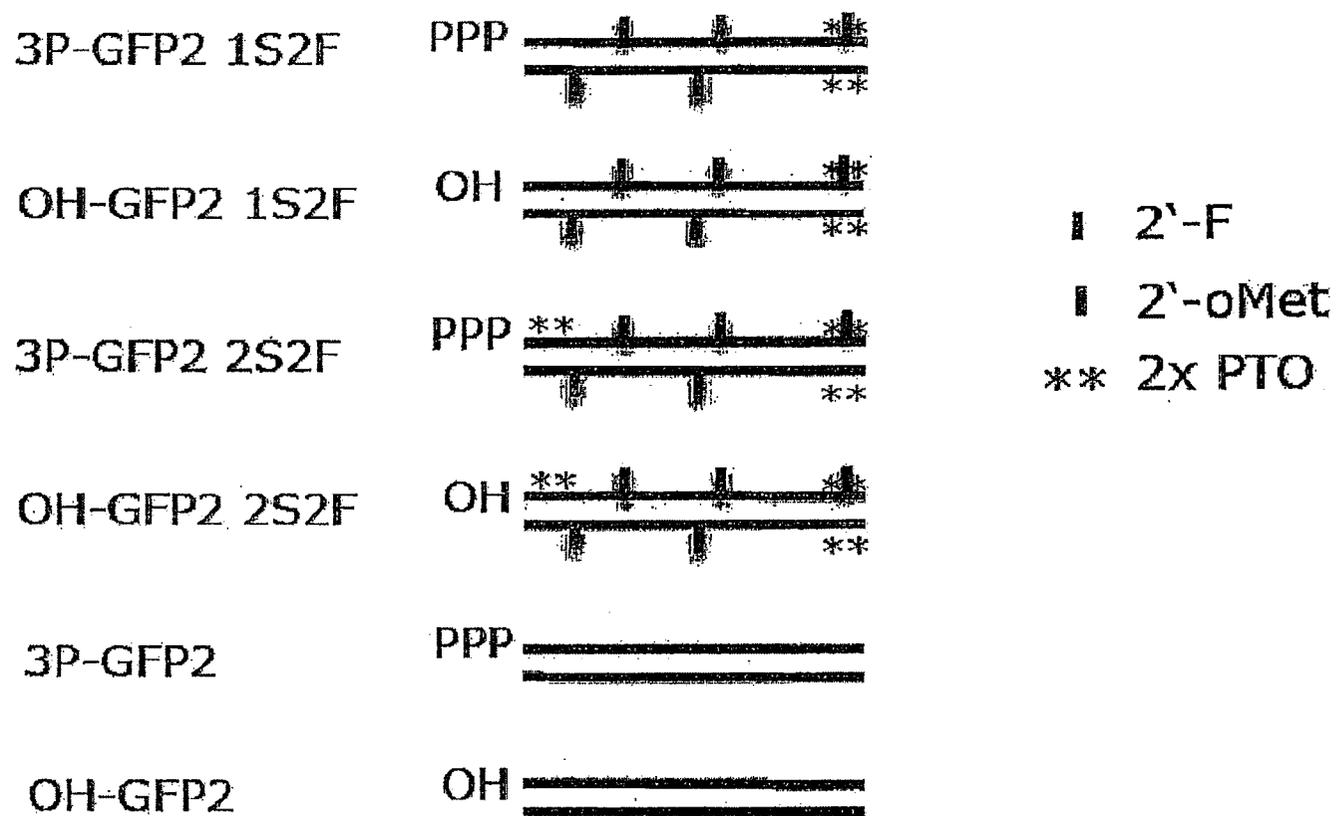


Фиг.10

A

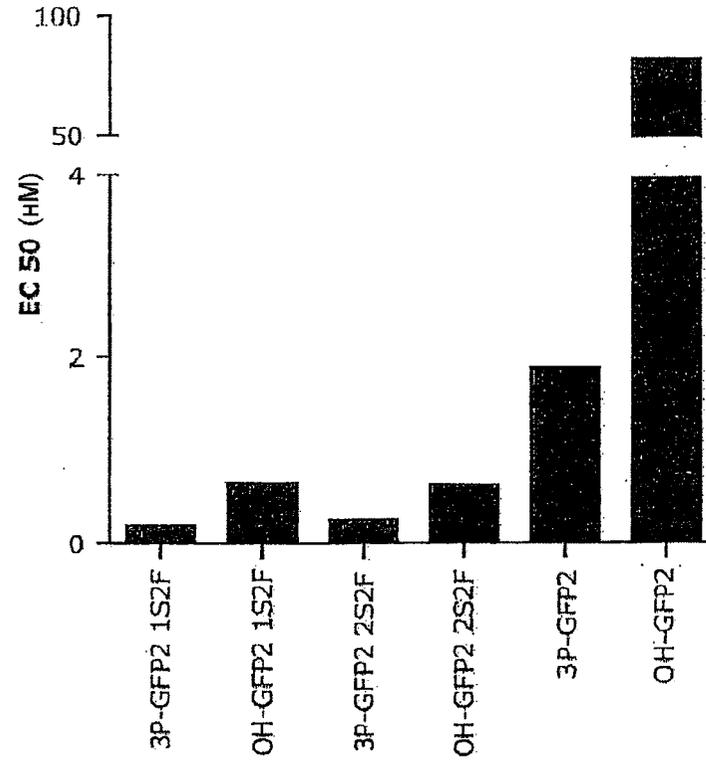


Фиг. 10 (продолжение)

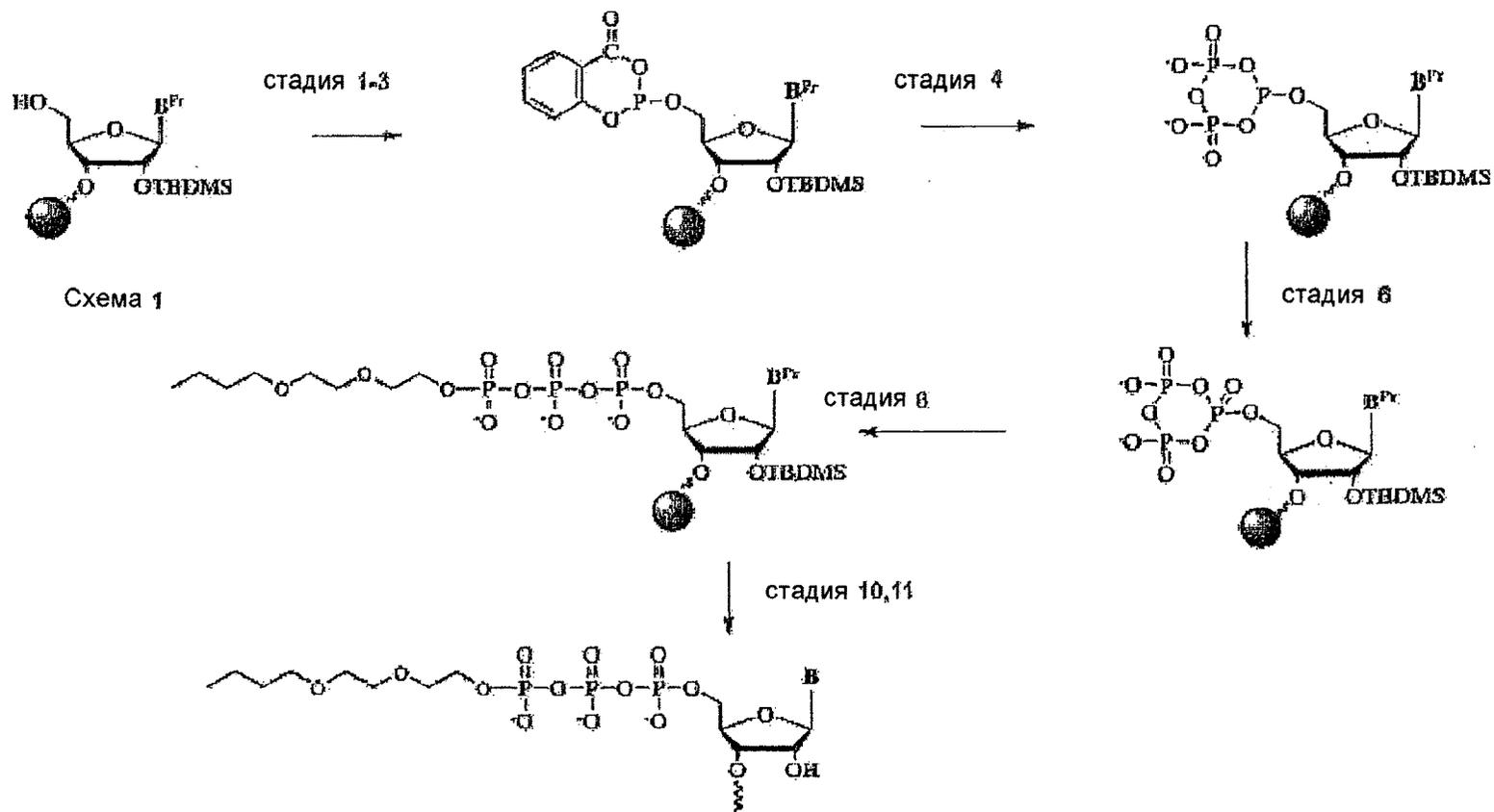


Фиг.10 (продолжение)

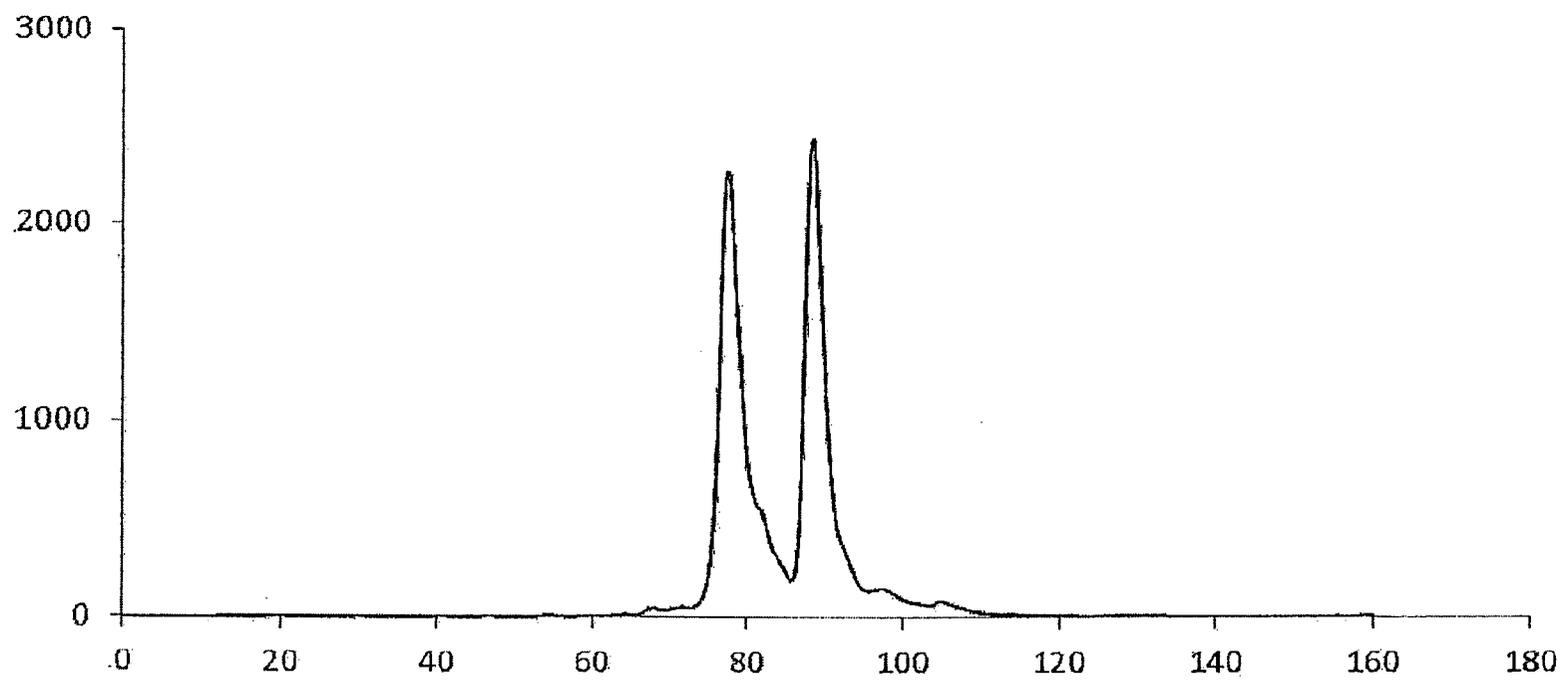
B



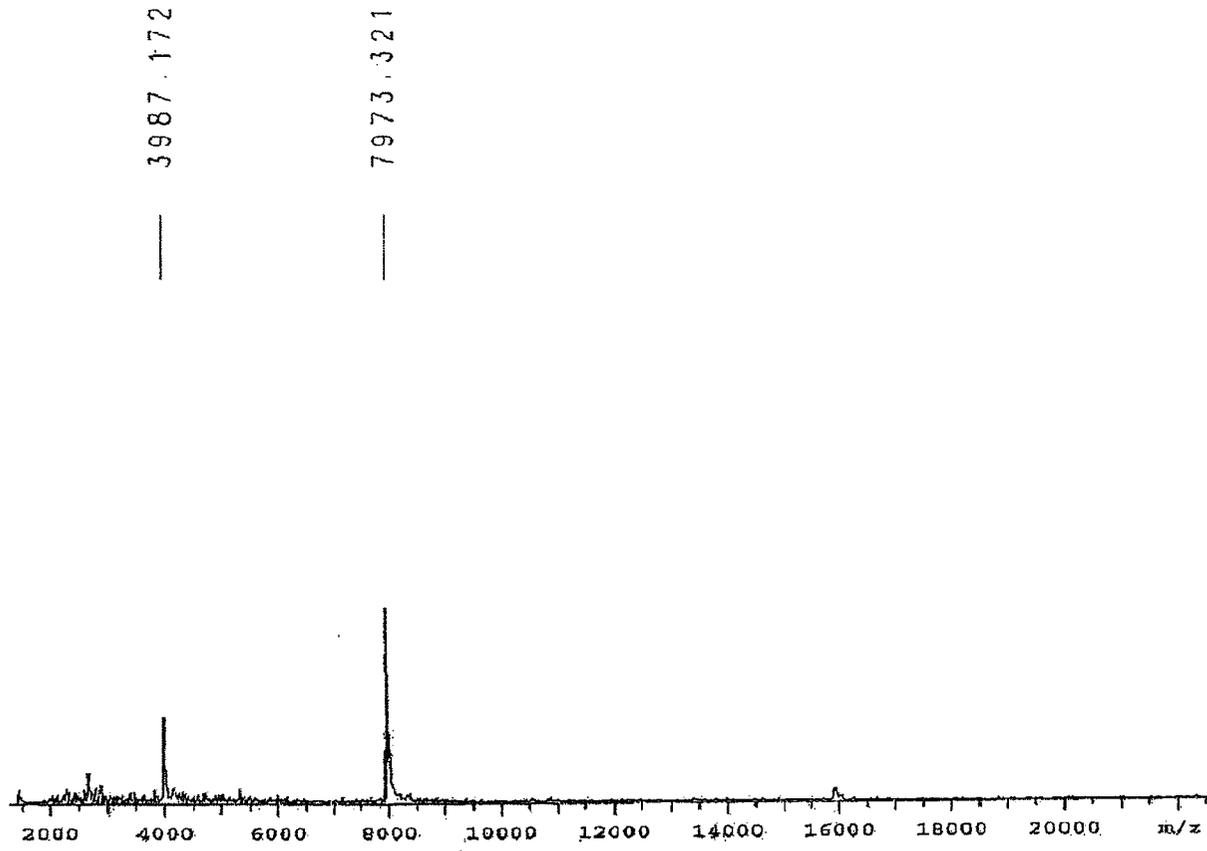
Фиг.11



Фиг.12



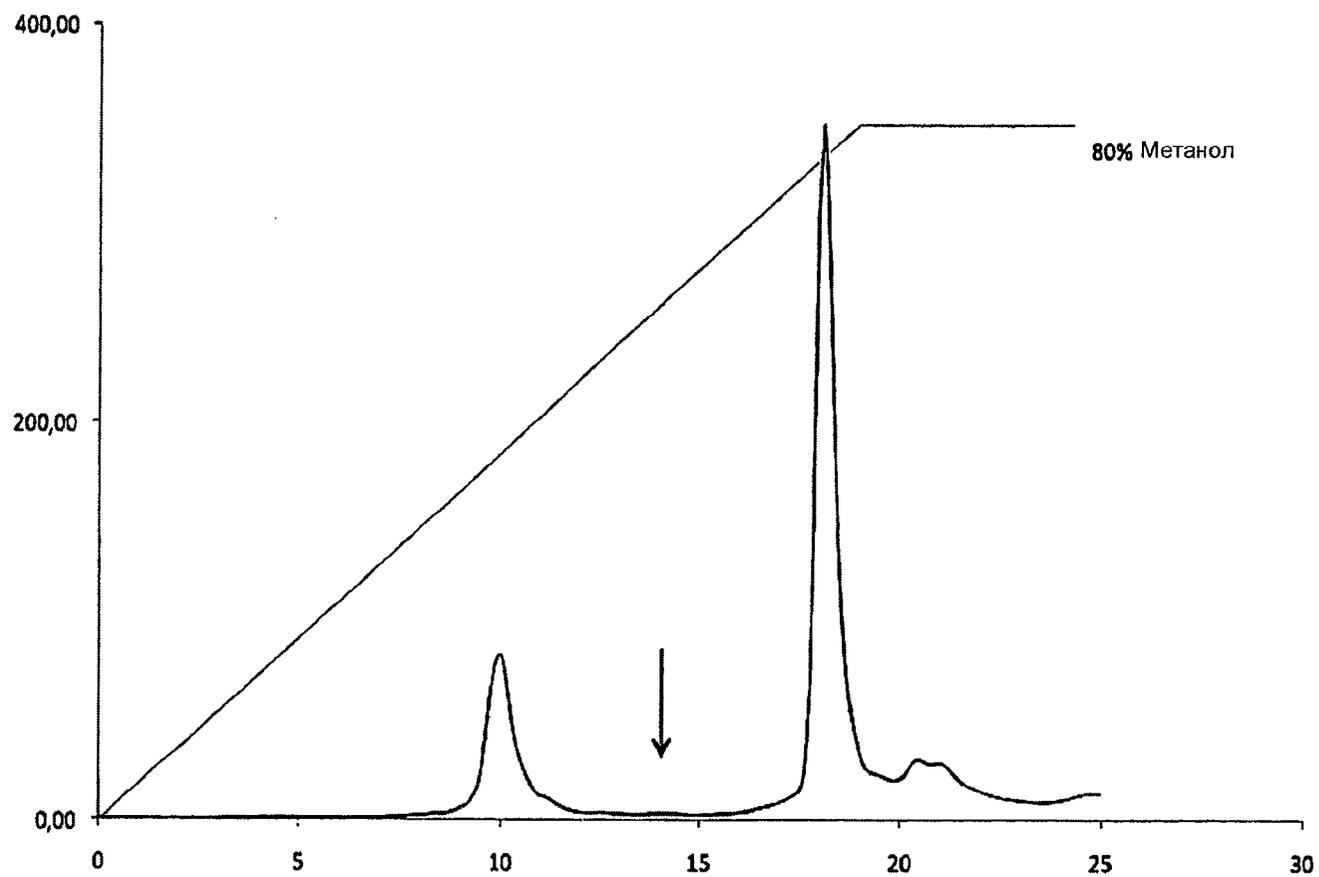
Фиг.13





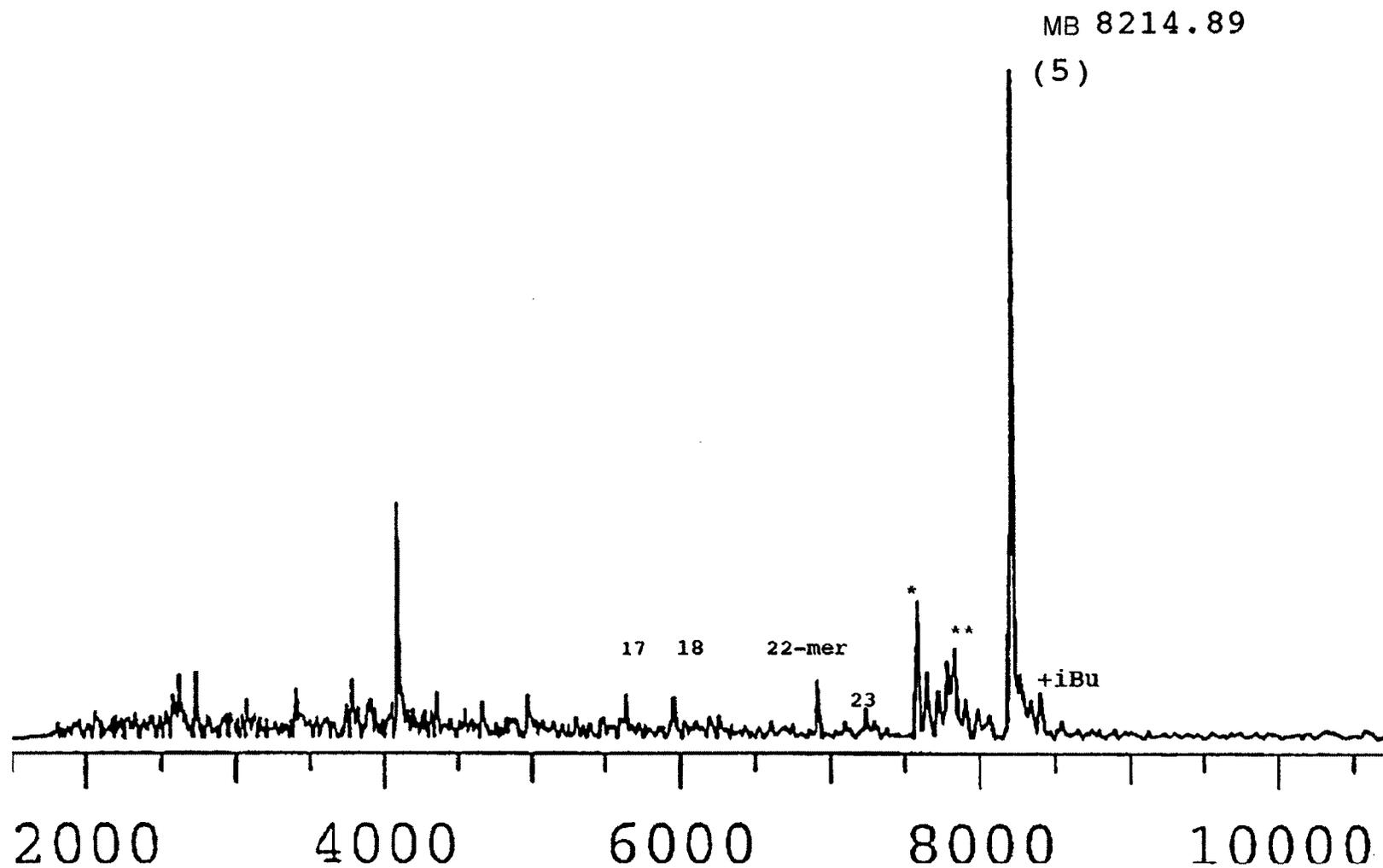
Фиг.15

A



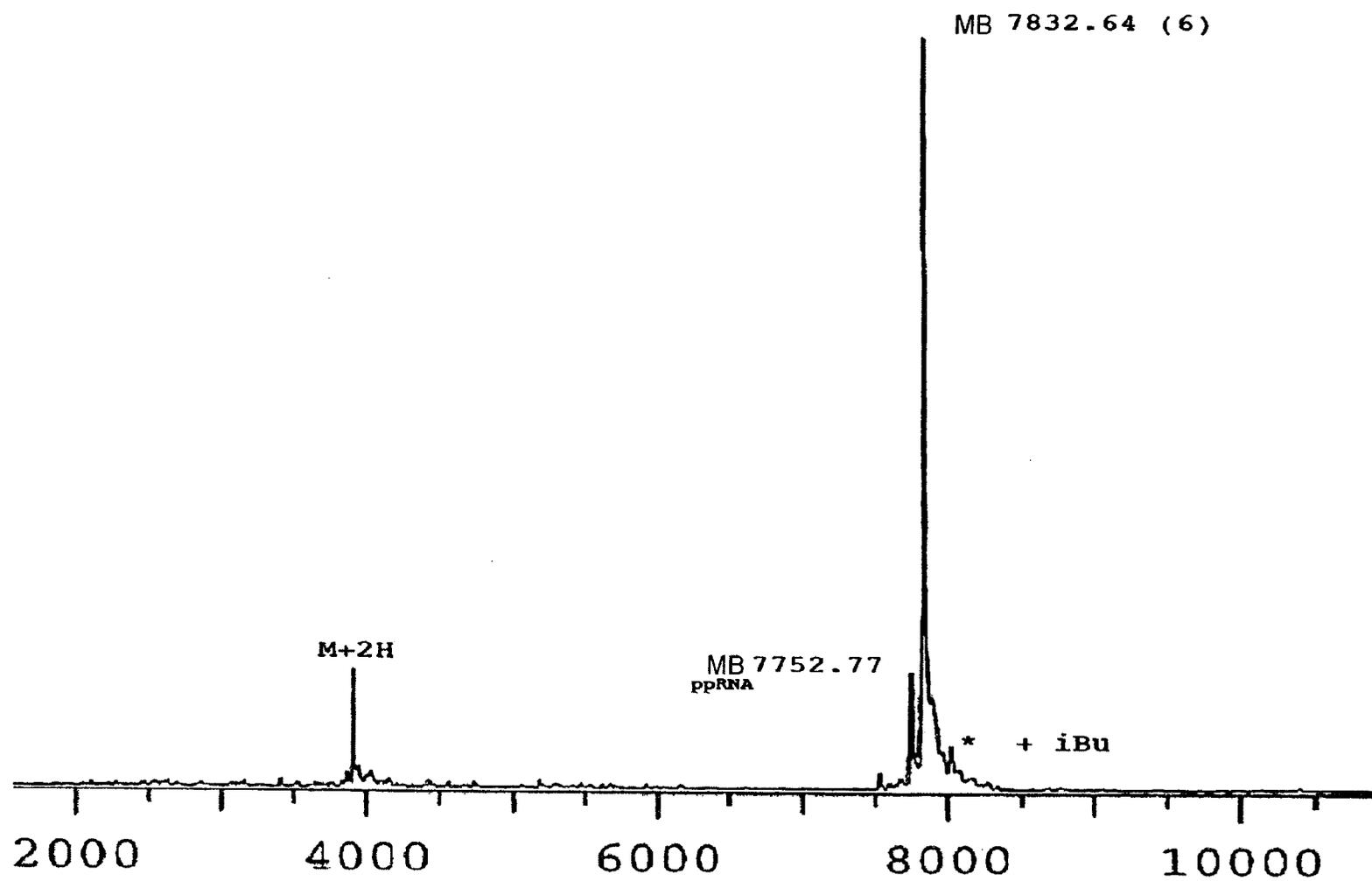
Фиг.15 (продолжение)

B

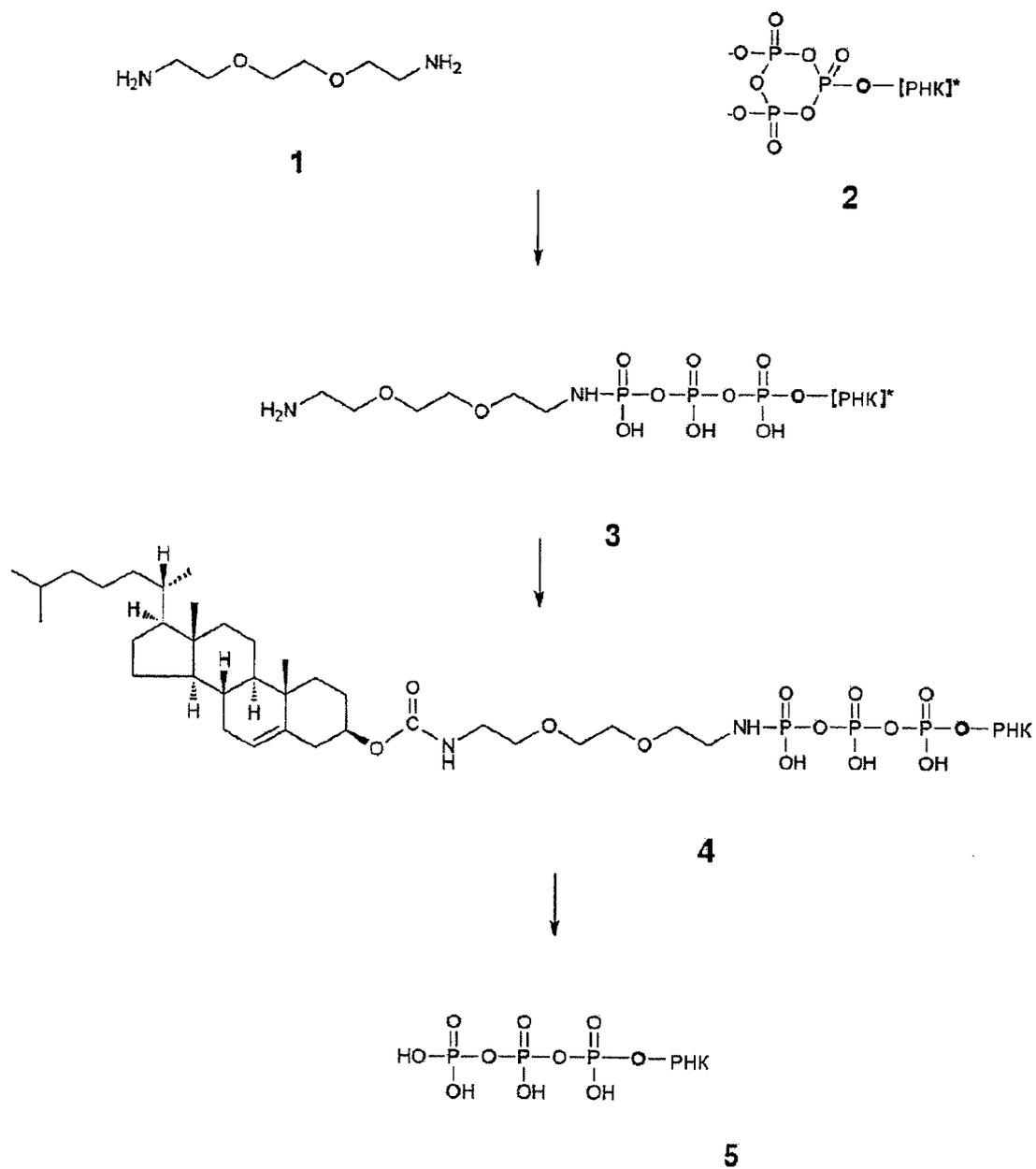


Фиг.15 (продолжение)

с



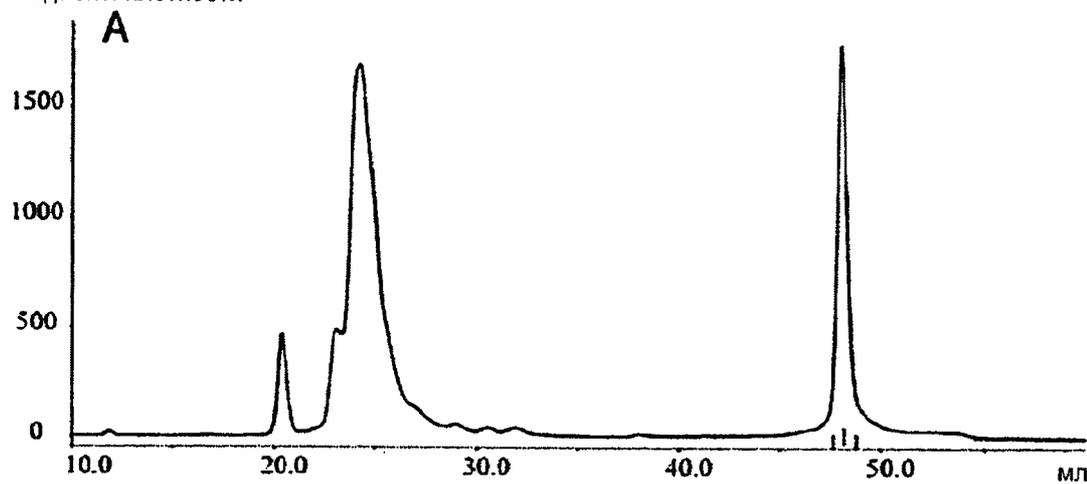
22/24



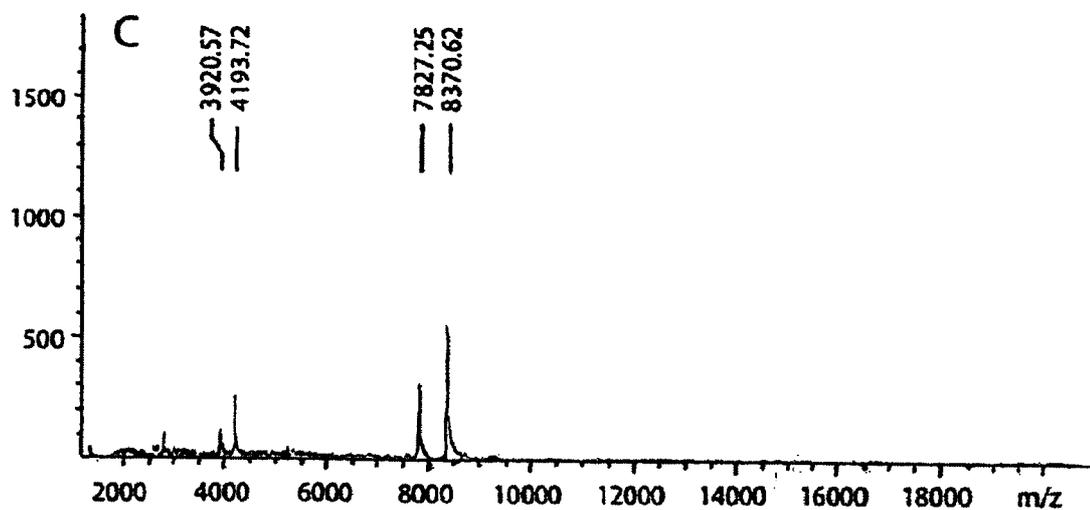
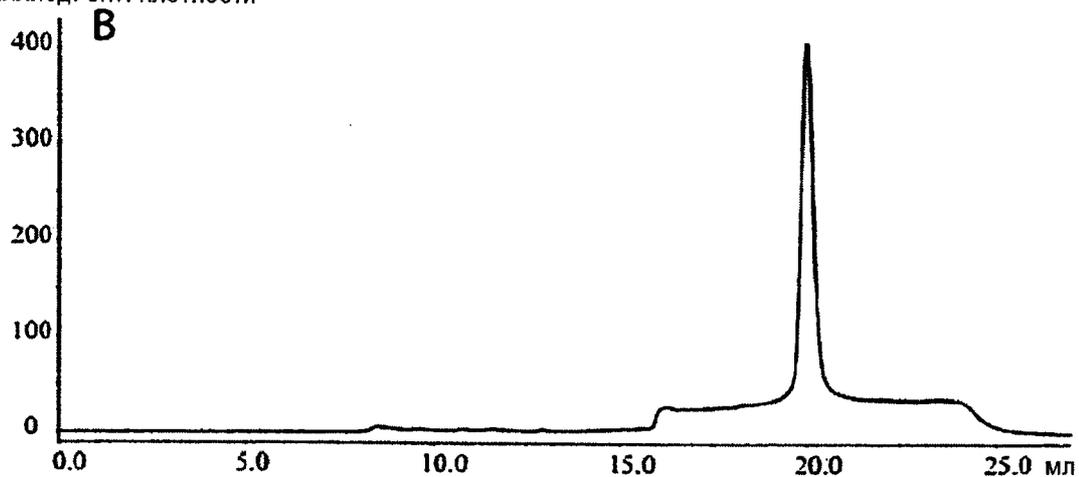
Фиг. 16

Фиг.17

Миллиед. опт. плотности



Миллиед. опт. плотности



**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 54013PWO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2013/070117	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 26 September 2013 (26-09-2013)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 27 September 2012 (27-09-2012)
Applicant  RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/070117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07H21/02 A61K31/713  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07H  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/060281 A2 (COLEY PHARM GMBH [DE]; DEBELAK HARALD [DE]; UHLMANN EUGEN [DE]) 14 May 2009 (2009-05-14) cited in the application figure 2 claim 1 page 43  -----  -/--	1-3,5,6, 8-11, 14-17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  7 November 2013	Date of mailing of the international search report  14/11/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Nikolai, Joachim

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/070117

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEBEDEV A V ET AL: "PREPARATION OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDE 5'-TRIPHOSPHATES USING SOLID SUPPORT APPROACH", NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS, TAYLOR & FRANCIS, PHILADELPHIA, PA, USA, vol. 20, no. 4-7, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1403-1409, XP009081703, ISSN: 1525-7770, DOI: 10.1081/NCN-100002565 page 1405	1-3,5,6,8,9,11,14,15
X	----- IVAN ZLATEV ET AL: "Efficient Solid-Phase Chemical Synthesis of 5'-Triphosphates of DNA, RNA, and their Analogues", ORGANIC LETTERS, vol. 12, no. 10, 21 May 2010 (2010-05-21), pages 2190-2193, XP055005331, ISSN: 1523-7060, DOI: 10.1021/o11004214 table 2	1-3,5,6,8,9,11,14,15
X	----- WO 2011/028218 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; ZLATEV) 10 March 2011 (2011-03-10) page 31 - page 33; table 1	1-3,5,6,8,9,11,14,15
X	----- MARTIN SCHLEE ET AL: "Recognition of 5' Triphosphate by RIG-I Helicase Requires Short Blunt Double-Stranded RNA as Contained in Panhandle of Negative-Strand Virus", IMMUNITY, vol. 31, no. 1, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 25-34, XP055032801, ISSN: 1074-7613, DOI: 10.1016/j.immuni.2009.05.008 cited in the application the whole document	1-3,6-11,14,15
X,P	----- EP 2 508 530 A1 (UNIV BONN [DE]) 10 October 2012 (2012-10-10)  claim 1; compound 24d	1-6,8,9,11-14,18-20
X,P	----- WO 2012/130886 A1 (UNIV BONN [DE]; LUDWIG JANOS [DE]; GOLDECK MARION [DE]; SPROAT BRIAN []) 4 October 2012 (2012-10-04) claim 1; compound 24d	1-6,8,9,11-14,18-20
	-----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2013/070117
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009060281	A2	14-05-2009	
		AU 2008326187 A1	14-05-2009
		CA 2704853 A1	14-05-2009
		EP 2207787 A2	21-07-2010
		JP 2011502979 A	27-01-2011
		US 2010260788 A1	14-10-2010
		US 2013164333 A1	27-06-2013
		WO 2009060281 A2	14-05-2009
-----			
WO 2011028218	A1	10-03-2011	NONE
-----			
EP 2508530	A1	10-10-2012	
		AU 2012234296 A1	10-10-2013
		CA 2830980 A1	04-10-2012
		EP 2508530 A1	10-10-2012
		WO 2012130886 A1	04-10-2012
-----			
WO 2012130886	A1	04-10-2012	
		AU 2012234296 A1	10-10-2013
		CA 2830980 A1	04-10-2012
		EP 2508530 A1	10-10-2012
		WO 2012130886 A1	04-10-2012
-----			