

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202092912 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.05.27

(51) Int. Cl. C07H 21/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.05.30

(54) ЛИПИДНО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СПОСОБЫ

(31) 62/678,013; 62/793,597

(72) Изобретатель:  
Зукков Артур, Туччи Фабио (US)

(32) 2018.05.30; 2019.01.17

(33) US

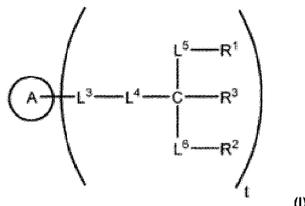
(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(86) PCT/US2019/034724

(87) WO 2019/232255 2019.12.05

(71) Заявитель:  
ДиТиЭкс ФАРМА, ИНК. (US)

(57) В данной заявке описаны, среди прочего, липидно-модифицированные соединения нуклеиновой кислоты, имеющие следующие структуру, их получение и их применение.



A1

202092912

202092912

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566171EA/092

### ЛИПИДНО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СПОСОБЫ

#### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет относительно Предварительной заявки на патент США № 62/678013, поданной 30 мая 2018 г., и Предварительной заявки на патент США № 62/793597, поданной 17 января 2019 г., полное содержание которых включены в настоящую заявку для всех целей.

ССЫЛКА НА ПРИЛОЖЕНИЕ «ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ», ТАБЛИЦУ ИЛИ ПЕРЕЧЕНЬ КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ КАК ФАЙЛ В ФОРМАТЕ ASCII

[2] Перечень последовательностей записан в файле 052974-502001WO\_ST25.TXT, созданном 23 мая 2019 г., 3449 байт, машинный формат IBM-PC, операционная система MS Windows, включен в настоящую заявку посредством ссылки.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

##### Область техники

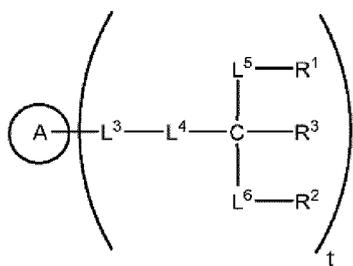
[3] Настоящее изобретение относится к области биологически активных соединений нуклеиновой кислоты. Более конкретно, настоящее изобретение относится к липидно-модифицированным соединениям нуклеиновой кислоты, их получению и их применению.

##### Уровень техники

[4] Доставка терапевтических нуклеиновых кислот в клетки остается сложной областью исследований. Таким образом, существует потребность в улучшенных соединениях нуклеиновой кислоты и стратегии введения таких соединений в клетки.

#### РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[5] В настоящей заявке предложены, *среди прочего*, составы или липидно-модифицированные соединения нуклеиновой кислоты, имеющие следующую структуру:



[6] А представляет собой олигонуклеотид, нуклеиновую кислоту, полинуклеотид, нуклеотид или его аналог, или нуклеозид, или его аналог. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой нуклеиновую кислоту. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой полинуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой нуклеотид или его аналог. В вариантах воплощения изобретения А представляет

собой нуклеозид или его аналог.

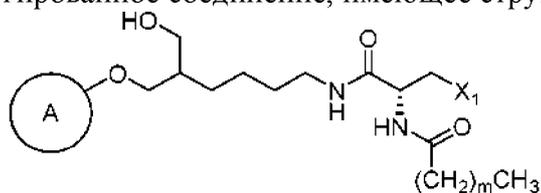
[7]  $L^3$  и  $L^4$  независимо представляют собой связь,  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ ,  $-OPO_2O-$ , замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен.

[8]  $L^5$  представляет собой  $-L^{5A}-L^{5B}-L^{5C}-L^{5D}-L^{5E}-$  и  $L^6$  представляет собой  $-L^{6A}-L^{6B}-L^{6C}-L^{6D}-L^{6E}-$ .  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$ ,  $L^{5C}$ ,  $L^{5D}$ ,  $L^{5E}$ ,  $L^{6A}$ ,  $L^{6B}$ ,  $L^{6C}$ ,  $L^{6D}$  и  $L^{6E}$  независимо представляют собой связь,  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-NHC(O)NH-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ , замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен.

[9]  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой незамещенный  $C_1-C_{25}$  алкил, при этом по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой незамещенный  $C_9-C_{19}$  алкил; и  $R^3$  представляет собой водород,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-C(O)H$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)OH$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-OC(O)H$ ,  $-N_3$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил.

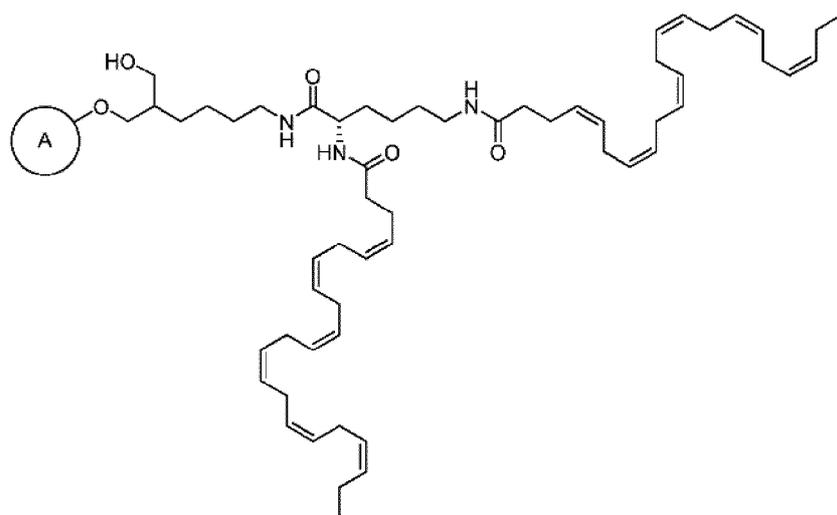
[10]  $t$  равно целому числу от 1 до 5.

[11] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы I:



или его фармацевтически приемлемая соль, при этом: A, X1 и m имеют любое из значений, представленных в настоящей заявке.

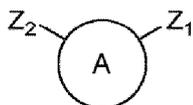
[12] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы II:



II

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом А имеет любое из значений, представленных в настоящей заявке.

[13] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы III:



III

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом: А, Z<sub>1</sub> и Z<sub>2</sub> имеют любое из значений, представленных в настоящей заявке.

[14] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложена клетка, содержащая соединение, раскрытое и описанное в настоящей заявке.

[15] В вариантах реализации изобретения, в данной заявке представлен способ введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в клетку *in vitro*, включающий приведение клетки в контакт с соединением, как раскрыто и описано в данной заявке в условиях несвязанного поглощения.

[16] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложен способ введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида *ex vivo*, включающий контактирование клетки с соединением, раскрытым и описанным в настоящей заявке, в условиях несвязанного поглощения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[17] **ФИГ. 1** иллюстрирует структуры ДНА-конъюгированных синтезированных миРНК.

[18] **ФИГ. 2** иллюстрирует структуры DTx-01-08-конъюгированных синтезированных миРНК.

[19] **ФИГ. 3** иллюстрирует структуры синтезированных PTEN миРНК с

присоединенными C10 - C22 насыщенными жирными кислотами.

[20] **ФИГ. 4** иллюстрирует структуры C16 LCFA-конъюгированных синтезированных миРНК.

[21] **ФИГ. 5** иллюстрирует структуры РТЕН миРНК синтезированных с LCFA конъюгацией в обоих 3' и 5' положениях.

[22] **ФИГ. 6** иллюстрирует структуры РТЕН миРНК синтезированных с конъюгированными C16 LCFA, содержащими концевые COOH группы.

[23] **ФИГ. 7** иллюстрирует структуры DTx-01-08-конъюгированных DTxO-0038, DTxO-0033 и DTxO-0034 синтезированных миРНК.

[24] **ФИГ. 8** иллюстрирует структуры DTxO-0003 миРНК конъюгированных с мотивом, имеющим один или более ненасыщенных LCFA.

[25] **ФИГ. 9** иллюстрирует структуры DTxO-0003 миРНК конъюгированных с мотивом, имеющим жесткий линкер.

[26] **ФИГ. 10** иллюстрирует структуры DTxO-0003 миРНК конъюгированных с мотивом, имеющим три LCFA.

[27] **ФИГ. 11** иллюстрирует структуры DTxO-0003 миРНК или DTxO-0038 миРНК, конъюгированных с DTx-01-08 мотивом, на 5' конце сопровождающей цепи или 3' конце направляющей цепи.

[28] **ФИГ. 12А** иллюстрирует структуры DTxO-0003 миРНК конъюгированных с DTx- 01-50, DTx-01-51, DTx-01-52, DTx-01-53, DTx-01-54 или DTx-01-55 мотивом.

[29] **ФИГ. 12В** иллюстрирует структуры DTxO-0003 миРНК, конъюгированных с DTx- 03-50, DTx-03-51, DTx-03-52, DTx-03-53, DTx-03-54 или DTx-03-55 мотивом.

[26] **ФИГ. 12С** иллюстрирует структуры DTxO-0003 миРНК, конъюгированных с DTx- 06-50, DTx-06-51, DTx-06-52, DTx-06-53, DTx-06-54 или DTx-06-55 мотивом.

[30] **ФИГ. 13** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках НЕК293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 7, 8, 26 и 1 в течение 48 часов.

[31] **ФИГ. 14** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках НЕК293 после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 7, 8, 26 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[32] **ФИГ. 15** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVES после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 7, 8, 26 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[33] **ФИГ. 16** иллюстрирует сравнение влияния конъюгата, содержащего жесткую линкерную структуру, или конъюгата, содержащего три LCFA, на экспрессию РТЕН мРНК после трансфекции соединений в клетки НЕК293 в течение 48 часов.

[34] **ФИГ. 17** иллюстрирует сравнение влияния конъюгата, содержащего жесткую линкерную структуру, или конъюгата, содержащего три LCFA, на экспрессию РТЕН мРНК

после несвязанного поглощения соединений в клетках HUVEC в течение 48 часов.

[35] **ФИГ. 18** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 9 и 1 в течение 48 часов.

[36] **ФИГ. 19** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 9 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[37] **ФИГ. 20** иллюстрирует влияние соединений с фрагментом конъюгата, присоединенным к 5' концу или 3' концу сопровождающей цепи двух различных миРНК после трансфекции в клетки HEK293 в течение 48 часов.

[38] **ФИГ. 21** иллюстрирует влияние соединений с фрагментом конъюгата, присоединенным к 5' концу или 3' концу сопровождающей цепи двух различных миРНК после несвязанного поглощения в клетки HUVEC в течение 48 часов.

[39] **ФИГ. 22** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 25, 24 и 1 в течение 48 часов.

[40] **ФИГ. 23** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетки NIH3T3 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 25, 24 и 1 в течение 48 часов.

[41] **ФИГ. 24** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 25, 24 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[42] **ФИГ. 25** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 25, 24 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 96 часов.

[43] **ФИГ. 26** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 25, 24 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[44] **ФИГ. 27** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 25, 24 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 96 часов.

[45] **ФИГ. 28** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках NIH3T3 после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 25, 24 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[46] **ФИГ. 29** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках NIH3T3 после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 25, 24 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 96 часов.

[47] **ФИГ. 30** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 20, 21 и 23 в течение 48 часов.

[48] **ФИГ. 31** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 1, 2, 20, 21 и 23 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[49] **ФИГ. 32** иллюстрирует сравнение влияния конъюгатов, содержащих насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, на экспрессию PTEN мРНК после трансфекции в клетки HEK293.

[50] **ФИГ. 33** иллюстрирует сравнение влияния конъюгатов содержащих насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты на экспрессию PTEN мРНК, после несвязанного поглощения в клетки HUVEC.

[51] **ФИГ. 34** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 10, 11, 12 и 1 в течение 48 часов.

[52] **ФИГ. 35** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 13, 14, 15 и 1 в течение 48 часов.

[53] **ФИГ. 36** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 10, 11, 12 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[54] **ФИГ. 37** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 13, 14, 15 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[55] **ФИГ. 38** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 16, 17, 18 и 1 в течение 48 часов.

[56] **ФИГ. 39** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HEK293 после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 16, 17, 18 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[57] **ФИГ. 40** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в дифференцированных клетках SH-SY5Y после того, как клетки были

подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 16, 17, 18 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[58] **ФИГ. 41** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 16, 17, 18 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[59] **ФИГ. 42** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 16, 17, 18 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 96 часов.

[60] **ФИГ. 43** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в первичных крысиных нейронах после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 16, 17, 18 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 96 часов.

[61] **ФИГ. 44** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в первичных крысиных нейронах после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 16, 17, 18 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 7 дней.

[62] **ФИГ. 45A** иллюстрирует процент экспрессии VEGFR1 относительно контроля PBS в клетках HUVEC после трансфекции при различных концентрациях Соединений 3 и 1 в течение 48 часов.

[63] **ФИГ. 45B** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVEC после трансфекции при различных концентрациях Соединений 3 и 1 в течение 48 часов.

[64] **ФИГ. 46A** иллюстрирует процент VEGFR2 относительно контроля PBS в клетках HUVEC после трансфекции при различных концентрациях Соединений 5 и 1 в течение 48 часов.

[65] **ФИГ. 46B** иллюстрирует процент PTEN относительно контроля PBS в клетках HUVEC после трансфекции при различных концентрациях Соединений 5 и 1 в течение 48 часов.

[66] **ФИГ. 47** иллюстрирует процент VEGFR1 мРНК экспрессии относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 4 и 3 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[67] **ФИГ. 48** иллюстрирует процент VEGFR2 мРНК экспрессии относительно контроля PBS в клетках HUVEC после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 6 и 5 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[68] **ФИГ. 49** иллюстрирует процент HTT мРНК экспрессии относительно контроля PBS в недифференцированных клетках SH-SY5Y после трансфекции при различных

концентрациях Соединений 29, 28, 27, 2 и 1 в течение 48 часов.

[69] **ФИГ. 50** иллюстрирует процент НТТ мРНК экспрессии относительно контроля PBS в недифференцированных клетках SH-SY5Y после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 29, 28, 27, 2 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[70] **ФИГ. 51** иллюстрирует процент НТТ мРНК экспрессии относительно контроля PBS в дифференцированных клетках SH-SY5Y после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 29, 28, 27, 2 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[71] **ФИГ. 52** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в дифференцированных 3T3L1 адипоцитах после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[72] **ФИГ. 53** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в трабекулярной сетке после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[73] **ФИГ. 54** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в дифференцированных первичных человеческих клетках скелетной мускулатуры после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 96 часов.

[74] **ФИГ. 55** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в первичных человеческих гепатоцитах после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 1, 2, 7, 8 и 9 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[75] **ФИГ. 56** иллюстрирует процент PTEN мРНК экспрессии Соединений 1, 2, 7, 8 и 9 относительно контроля PBS в первичных человеческих адипоцитах через 7 дней после инкубации.

[76] **ФИГ. 57** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в дифференцированных первичных человеческих клетках скелетной мускулатуры после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 1, 2, 7, 8 и 9 в условиях несвязанного поглощения в течение 96 часов.

[77] **ФИГ. 58** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в первичных человеческих звездчатых клетках после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 1, 2, 7, 8 и 9 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[78] **ФИГ. 59** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК относительно контроля PBS в человеческих Т-клетках после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2 и 9 в условиях несвязанного

поглощения в течение 96 часов.

[79] **ФИГ. 60** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединения 2 и Соединения 37, в различных дозах, мышам.

[80] **ФИГ. 61** иллюстрирует количественную гибридизацию *in situ* (RNAscope) через семь дней после интравитреальной инъекции Соединения 2 крысам. (ONL, внешний ядерный слой; INL, внутренний ядерный слой; GCL, ганглиарный слой; 10x, 10x увеличение; 40x, 40x увеличение).

[81] **ФИГ. 62** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединения 2 крысам.

[82] **ФИГ. 63** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК после трансфекции of конъюгированного (Соединение 2) и неконъюгированного (Соединение 30) PTEN миРНК в клетки HEK293 в различных дозах в течение 48 часов.

[83] **ФИГ. 64** иллюстрирует процент экспрессии мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединения 2 и 33 мышам. (1 Way ANOVA, Tukey Post-hoc; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ , N.S., не значимо).

[84] **ФИГ. 65** иллюстрирует процент экспрессии HTT мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединений 2 и 29 мышам. (1 Way ANOVA, Tukey Post-hoc; \* $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ , N.S., не значимо).

[85] **ФИГ. 66** иллюстрирует процент экспрессии VEGFR2 мРНК после трансфекции of неконъюгированного VEGFR2 миРНК, Соединений 31 и 32, в клетки BEND в различных дозах в течение 48 часов.

[86] **ФИГ. 67** иллюстрирует процент экспрессии VEGFR2 мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединений 2, 34 и 35 мышам. (1 Way ANOVA, Tukey Post-hoc; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , N.S., не значимо).

[87] **ФИГ. 68** иллюстрирует процент экспрессии VEGFR2 мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединений 2 и 34 крысам. (1 Way ANOVA, Tukey Post-hoc; \*\*\*\*  $p < 0,001$ , N.S., не значимо).

[88] **ФИГ. 69** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединений 2, 20, 21 и 1 мышам. (1 Way ANOVA, Tukey Post-hoc; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , N.S., не значимо).

[89] **ФИГ. 70** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединений 11, 12, 2, 13 и 1 мышам. (1 Way ANOVA, Tukey Post-hoc; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , N.S., не значимо).

[90] **ФИГ. 71** иллюстрирует процент экспрессии PTEN мРНК через семь дней после интравитреальной инъекции Соединений 1 и 2 мышам.

[91] **ФИГ. 72** иллюстрирует экспрессию PTEN мРНК в печени через семь дней после подкожного (SQ) либо внутривенного (IV) введения Соединения 33 мышам C57B1/6.

[92] **ФИГ. 73** иллюстрирует экспрессию PTEN мРНК в тканях мышц, сердца, жира, легкого, печени, почек и селезенки через семь дней после внутривенного введения Соединения 33 мышам C57B1/6.

[93] **ФИГ. 74** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках НЕК293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 12, 54, 55 и 1 в течение 48 часов.

[94] **ФИГ. 75** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках НЕК293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 2, 13, 56, 57 и 1 в течение 48 часов.

[95] **ФИГ. 76** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках НЕК293 после трансфекции при различных концентрациях Соединений 12, 13, 58, 59 и 1 в течение 48 часов.

[96] **ФИГ. 77** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVES после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 12, 54, 55 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[97] **ФИГ. 78** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVES после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 2, 13, 56, 57 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[98] **ФИГ. 79** иллюстрирует процент экспрессии РТЕН мРНК относительно контроля PBS в клетках HUVES после того, как клетки были подвергнуты воздействию различных концентраций Соединений 12, 13, 58, 59 и 1 в условиях несвязанного поглощения в течение 48 часов.

[99] **ФИГ. 80** иллюстрирует структуры Соединений 72-83, имеющие различные комбинации фрагментов насыщенных и ненасыщенных длинноцепочечных жирных кислот, конъюгированными на 3' конце сопровождающей цепи миРНК.

[100] **ФИГ. 81** иллюстрирует структуры Соединений 84-95, имеющие различные комбинации фрагментов насыщенных и ненасыщенных длинноцепочечных жирных кислот, конъюгированными на 3' конце сопровождающей цепи миРНК.

[101] **ФИГ. 82** иллюстрирует структуры Соединений 96-107, имеющие различные комбинации фрагментов насыщенных и ненасыщенных длинноцепочечных жирных кислот, конъюгированными на 3' конце сопровождающей цепи миРНК.

[102] **ФИГ. 83** иллюстрирует структуры Соединений 108-113, имеющие различные комбинации фрагментов насыщенных и ненасыщенных длинноцепочечных жирных кислот, конъюгированными на 3' конце миРНК.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Определения

[103] Если не указано иное, все технические термины, научные термины, аббревиатуры, химические структуры и химические формулы, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое является общепринятым специалистами в данной области техники. Приведенные в настоящей заявке химические структуры и формулы построены в соответствии со стандартными правилами химической валентности,

известными в химической области. Все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, на которые имеются ссылки в настоящей заявке, полностью включены посредством ссылки, если не указано иное. Если не указано иное, используются обычные методы масс-спектропии, ЯМР, ВЭЖХ, химии белков, биохимии, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии. Кроме того, использование термина «включая», а также других форм, таких как «включать», «включает» и «включенный», не является ограничивающим. Как используется в данном описании, в переходной фразе или в основной части формулы, термины «содержит» и «содержащий» следует интерпретировать как имеющие неограниченное значение. То есть термины следует интерпретировать как взаимозаменяющие синонимы словосочетания "имеющий по меньшей мере" или "включая по меньшей мере". При использовании в контексте процесса, термин «включающий» означает, что процесс включает по меньшей мере перечисленные этапы, но может включать дополнительные этапы. При использовании в контексте соединения, композиции или устройства, термин «содержащий» означает, что соединение, композиция или устройство включает по меньшей мере перечисленные особенности или компоненты, но также может включать дополнительные функции или компоненты.

[104] Если группы-заместители определены их общепринятыми химическими формулами, записанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые могут быть получены в результате написания структуры справа налево, например,  $-\text{CH}_2\text{O}-$  эквивалентен  $-\text{OCH}_2-$ .

[105] Термин «алкил», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, прямую (т.е. неразветвленную) или разветвленную углеродную цепь (или углерод) или их комбинацию, которая может быть полностью насыщенной, моно- или полиненасыщенной, и могут содержать одно-, двух- и многовалентные радикалы. Алкил может содержать определенное количество атомов углерода (например,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  означает от одного до десяти атомов углерода). Алкил - это нециклизованная цепь. Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают без ограничений такие группы, как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, метил, гомологи и изомеры, например, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и т.п. Ненасыщенная алкильная группа - это группа, имеющая одну или более двойных или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают без ограничений винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2- (бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3- (1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил и высшие гомологи и изомеры. Алкокси представляет собой алкил, присоединенный к остальной части молекулы через кислородный линкер (-O-). Алкильный фрагмент может быть алкенильным фрагментом. Алкильный фрагмент может быть алкинильным фрагментом. Алкильный фрагмент может быть полностью насыщенным.

Алкенил может содержать более одной двойной связи и/или одну или более тройных связей в дополнение к одной или более двойным связям. Алкинил может содержать более одной тройной связи и/или одну или более двойных связей в дополнение к одной или более

тройным связям.

[106] В вариантах воплощения изобретения термин «циклоалкил» означает моноциклическую, бициклическую или полициклическую циклоалкильную кольцевую систему. В вариантах воплощения изобретения моноциклические кольцевые системы представляют собой циклические углеводородные группы, содержащие от 3 до 8 атомов углерода, где такие группы могут быть насыщенными или ненасыщенными, но не ароматическими. В вариантах воплощения изобретения циклоалкильные группы полностью насыщены. Примеры моноциклических циклоалкилов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил и циклооктил. ициклические циклоалкильные кольцевые системы представляют собой мостиковые моноциклические кольца или конденсированные бициклические кольца. В вариантах воплощения изобретения мостиковые моноциклические кольца содержат моноциклическое циклоалкильное кольцо, где два несмежных атома углерода моноциклического кольца связаны алкиленовым мостиком между одним и тремя дополнительными атомами углерода (т.е. мостиковая группа формы  $(\text{CH}_2)_w$ , где  $w$  равно 1, 2 или 3). Типичные примеры бициклических кольцевых систем включают без ограничений бицикло[3.1.1]гептан, бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[2.2.2]октан, бицикло[3.2.2]нонан, бицикло[3.3.1]нонан и бицикло[4.2.1]нонан. В вариантах воплощения изобретения конденсированные бициклические циклоалкильные кольцевые системы содержат моноциклическое циклоалкильное кольцо, конденсированное либо с фенилом, либо с моноциклическим циклоалкилом, либо с моноциклическим циклоалкенилом, моноциклическим гетероциклилом или моноциклическим гетероарилом. В вариантах воплощения изобретения мостиковый или конденсированный бициклический циклоалкил присоединен к фрагменту исходной молекулы через любой атом углерода, содержащийся в моноциклическом циклоалкильном кольце. В вариантах воплощения изобретения циклоалкильные группы необязательно замещены одной или двумя группами, которые независимо представляют собой оксо или тиа. В вариантах воплощения изобретения конденсированный бициклический циклоалкил представляет собой 5- или 6-членное моноциклическое циклоалкильное кольцо, конденсированное с фенильным кольцом, 5- или 6-членным моноциклическим циклоалкилом, 5- или 6-членным моноциклическим циклоалкенилом, 5- или 6-членным моноциклическим гетероциклилом или 5- или 6-членным моноциклическим гетероарилом, при этом конденсированный бициклический циклоалкил необязательно замещен одной или двумя группами, которые независимо представляют собой оксо или тиа. В вариантах воплощения изобретения полициклические циклоалкильные кольцевые системы представляют собой моноциклическое циклоалкильное кольцо (основное кольцо), конденсированное с любой (i) одной кольцевой системой, выбранной из группы, состоящей из бициклического арила, бициклического гетероарил, бициклического циклоалкил, бициклического циклоалкенил и бициклического гетероциклил; или (ii) две другие кольцевые системы, независимо выбранные из группы, состоящей из фенила, бициклического арила, моноциклического или

бициклический гетероарил, моноциклический или бициклический циклоалкил, моноциклический или бициклический циклоалкенил и моноциклический или бициклический гетероциклил. В вариантах воплощения изобретения полициклический циклоалкил присоединен к фрагменту исходной молекулы через любой атом углерода, содержащийся в основном кольце. В вариантах воплощения изобретения полициклические циклоалкильные кольцевые системы представляют собой моноциклическое циклоалкильное кольцо (основное кольцо), конденсированное с любой (i) одной кольцевой системой, выбранной из группы, состоящей из бициклического арила, бициклического гетероарила, бициклического циклоалкила, бициклического циклоалкенила и бициклического гетероциклила; или (ii) две другие кольцевые системы, независимо выбранные из группы, состоящей из фенила, моноциклического гетероарила, моноциклического циклоалкила, моноциклического циклоалкенила и моноциклического гетероциклила. Примеры полициклических циклоалкильных групп включают без ограничений тетрадекагидрофенантренил, пергидрофенотиазин-1-ил и пергидрофеноксазин-1-ил.

[107] В вариантах воплощения изобретения циклоалкил представляет собой циклоалкенил. Термин «циклоалкенил» употребляется в своем обычном значении. В вариантах воплощения изобретения циклоалкенил представляет собой моноциклическую, бициклическую или полициклическую циклоалкенильную кольцевую систему. В вариантах воплощения изобретения моноциклические циклоалкенильные кольцевые системы представляют собой циклические углеводородные группы, содержащие от 3 до 8 атомов углерода, где такие группы являются ненасыщенными (т.е. содержат по меньшей мере одну кольцевую двойную углеродную углеродную связь), но не ароматическими. Примеры моноциклических циклоалкенильных кольцевых систем включают циклопентенил и циклогексенил. В вариантах воплощения изобретения бициклические циклоалкенильные кольца представляют собой мостиковые моноциклические кольца или конденсированные бициклические кольца. В вариантах воплощения изобретения мостиковые моноциклические кольца содержат моноциклическое циклоалкенильное кольцо, где два несмежных атома углерода моноциклического кольца связаны алкиленовым мостиком между одним и тремя дополнительными атомами углерода (т.е. мостиковая группа формы  $((\text{CH}_2)_w$ , где  $w$  равно 1, 2 или 3). Типичные примеры бициклических циклоалкенилов включают без ограничений норбоменил и бицикло [2.2.2]окт-2-енил. В вариантах воплощения изобретения конденсированные бициклические циклоалкенильные кольцевые системы содержат моноциклическое циклоалкенильное кольцо, конденсированное с либо фенил, моноциклический циклоалкил, моноциклический циклоалкенил, моноциклический гетероциклил, либо моноциклический гетероарил. В вариантах воплощения изобретения мостиковый или конденсированный бициклический циклоалкенил присоединен к исходному молекулярному фрагменту через любой атом углерода, содержащийся в моноциклическом циклоалкенильном кольце. В вариантах воплощения изобретения циклоалкенильные группы необязательно замещены одной или двумя группами, которые

независимо представляют собой оксо или тиа. В вариантах воплощения изобретения полициклические циклоалкенильные кольца содержат моноциклическое циклоалкенильное кольцо (основное кольцо), конденсированное с любой (i) одной кольцевой системой, выбранной из группы, состоящей из бициклического арила, бициклического гетероарила, бициклического циклоалкила, бициклического циклоалкенила и бициклического гетероциклила; или (ii) двумя кольцевыми системами, независимо выбранными из группы, состоящей из фенила, бициклического арила, моноциклического или бициклического гетероарила, моноциклического или бициклического циклоалкила, моноциклического или бициклического циклоалкенила и моноциклического или бициклического гетероциклила. В вариантах воплощения изобретения полициклический циклоалкенил присоединен к фрагменту исходной молекулы через любой атом углерода, содержащийся в основном кольце. В вариантах воплощения изобретения полициклические циклоалкенильные кольца содержат моноциклическое циклоалкенильное кольцо (основное кольцо), конденсированное с (i) одной кольцевой системой, выбранной из группы, состоящей из бициклического арила, бициклического гетероарила, бициклического циклоалкила, бициклического циклоалкенила и бициклического гетероциклила; или (ii) двумя кольцевыми системами, независимо выбранными из группы, состоящей из фенила, моноциклического гетероарила, моноциклического циклоалкила, моноциклического циклоалкенила и моноциклического гетероциклила.

[108] В вариантах воплощения изобретения гетероциклоалкил представляет собой гетероциклил. Термин «гетероциклил», в контексте данного документа, означает моноциклический, бициклический или полициклический гетероцикл. Гетероциклический моноциклический гетероцикл представляет собой 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членное кольцо, содержащее по меньшей мере один гетероатом, независимо выбранный из группы, состоящей из O, N и S, где кольцо является насыщенным или ненасыщенным, но не ароматическим. 3- или 4-членное кольцо содержит 1 гетероатом, выбранный из группы, состоящей из O, N и S. 5-членное кольцо может содержать ноль или одну двойную связь и один, два или три гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. 6- или 7-членное кольцо содержит ноль, одну или две двойные связи и один, два или три гетероатома, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Гетероциклический моноциклический гетероцикл соединен с остатком исходной молекулы через любой атом углерода или любой атом азота, содержащийся в гетероциклическом моноциклическом гетероцикле. Типичные примеры гетероциклильных моноциклических гетероциклов включают без ограничений азетидинил, азепанил, азиридинил, диазепанил, 1,3-диоксанил, 1,3-диоксоланил, 1,3-дитиоланил, 1,3-дитианил, имидазолинил, имидазолидинолидил, изотиазолинил, изотиазолинил, изоксазолинил, изоксазолидинили, морфолинили, оксадиазолинил, оксадиазолидинил, оксазолинил, оксазолидинил, пиперазинил, пиперидинил, пиранил, пиразолинил, пиразолидинили, пирролинил, пирролидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидроотиенил, тиadiaзолинил, тиadiaзолидинил, тиазолинил, тиазолидинил, тиоморфолинил, 1,1-диоксидотиоморфолинил (тиоморфолин сульфен),

тиопиранил и тритианил. Гетероциклический бициклический гетероцикл представляет собой моноциклический гетероцикл, конденсированный с фенилом, моноциклическим циклоалкилом, моноциклическим циклоалкенилом, моноциклическим гетероциклом или моноциклическим гетероарилом. Гетероциклический бициклический гетероцикл связан с исходной молекулярной группой через любой атом углерода или любой атом азота, содержащийся в моноциклической гетероциклической части бициклической кольцевой системы. Типичные примеры бициклических гетероциклов включают без ограничений 2,3-дигидробензофуран-2-ил, 2,3-дигидробензофуран-3-ил, индолин-1-ил, индолин-2-ил, индолин-3-ил, 2,3-дигидробензотиен-2-ил, декагидрохинолинил, декагидолинил, изохинохинолин, октагидро 1Н индолил и октагидробензофуранил. В вариантах воплощения изобретения гетероциклические группы необязательно замещены одной или двумя группами, которые независимо представляют собой оксо или тиа. В некоторых вариантах воплощения изобретения бициклический гетероцикл представляет собой 5- или 6-членное моноциклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с фенильным кольцом, 5- или 6-членный моноциклический циклоалкил, 5- или 6-членный моноциклический циклоалкенил, 5- или 6-членный моноциклический гетероцикл или 5-членный моноциклический циклоалкил или 6-членный моноциклический гетероарил, при этом бициклический гетероцикл необязательно замещен одной или двумя группами, которые независимо представляют собой оксо или тиа. Мультициклические гетероциклические кольцевые системы представляют собой моноциклическое гетероциклическое кольцо (основное кольцо), конденсированное с (i) одной кольцевой системой, выбранной из группы, состоящей из бициклического арила, бициклического гетероарила, бициклического циклоалкила, бициклического циклоалкенила и бициклического гетероцикла; или (ii) две другие кольцевые системы, независимо выбранные из группы, состоящей из фенила, бициклического арила, моноциклического или бициклического гетероарила, моноциклического или бициклического циклоалкила, моноциклического или бициклического циклоалкенила и моноциклического или бициклического гетероцикла. Мультициклический гетероцикл присоединен к фрагменту исходной молекулы через любой атом углерода или атом азота, содержащийся в основном кольце. В вариантах воплощения изобретения полициклические гетероциклические кольцевые системы представляют собой моноциклическое гетероциклическое кольцо (основное кольцо), конденсированное с любой (i) одной кольцевой системой, выбранной из группы, состоящей из бициклического арила, бициклического гетероарила, бициклического циклоалкила, бициклического циклоалкенила и бициклического гетероцикла; или (ii) двумя другими кольцевыми системами, независимо выбранными из группы, состоящей из фенила, моноциклического гетероарила, моноциклического циклоалкила, моноциклического циклоалкенила и моноциклического гетероцикла. Примеры полициклических гетероциклических групп включают без ограничений 10Н-фенотиазин-10-ил, 9,10-дигидроакридин-9-ил, 9,10-дигидроакридин-10-ил, 10Н-феноксазин-10-ил, 10, 11-дигидро-5Н-добензо [b, f]азепин-5-

ил, 1,2,3,4-тетрагидропиридо [4,3-g] изохинолин-2-ил, 12Н-бензо [b] феноксазин-12 -ил и додекагидро-1Н-карбазол-9-ил.

[109] Термин «алкилен», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, двухвалентный радикал, производный от алкила, как проиллюстрировано, без ограничений,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ . Обычно алкильная (или алкиленовая) группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, причем в данном случае предпочтительны группы, содержащие 10 или меньше атомов углерода. «Низший алкил» или «низший алкилен» представляют собой алкильную или алкиленовую группы с более короткой цепью, обычно имеющую восемь или меньше атомов углерода. Термин «алкенилен», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, двухвалентный радикал, производный от алкена.

[110] Термин «гетероалкил», сам по себе или в сочетании с другим термином, означает, если не указано иное, стабильную прямую или разветвленную цепь или их комбинации, включая по меньшей мере один атом углерода и по меньшей мере один гетероатом (например, O, N, S, Si или P), и при этом азот и атомы серы необязательно могут быть окислены, а гетероатом азота необязательно может быть кватернизован. Гетероатом(ы) (например, O, N, S, Si или P) может быть помещен в любое внутреннее положение гетероалкильной группы или в положение, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Гетероалкил - это нециклизованная цепь. Примеры включают без ограничений:  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  и  $-\text{CN}$ . До двух или трех гетероатомов могут быть последовательными, как, например,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  и  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Гетероалкильный фрагмент может включать один гетероатом (например, O, N, S, Si или P). Гетероалкильный фрагмент может включать два необязательно различных гетероатома (например, O, N, S, Si или P). Гетероалкильный фрагмент может включать три необязательно различных гетероатома (например, O, N, S, Si или P). Гетероалкильный фрагмент может включать четыре необязательно различных гетероатома (например, O, N, S, Si или P). Гетероалкильный фрагмент может включать пять необязательно различных гетероатомов (например, O, N, S, Si или P).

Гетероалкильный фрагмент может включать вплоть до 8 необязательно различных гетероатома (например, O, N, S, Si или P). Термин «гетероалкенил», сам по себе или в сочетании с другим термином, означает гетероалкил, включающий по меньшей мере одну двойную связь. Гетероалкенил необязательно может включать более одной двойной связи и/или одну или более тройных связей в дополнение к одной или более двойным связям. Термин «гетероалкинил», сам по себе или в комбинации с другим термином, означает гетероалкил, включающий по меньшей мере одну тройную связь. Гетероалкинил может необязательно включать более одной тройной связи и/или одну или более двойных связей в дополнение к одной или более тройным связям.

[111] Аналогичным образом термин «гетероалкилен», сам по себе или как часть

другого заместителя, означает двухвалентный радикал, производный от гетероалкила, как проиллюстрировано, без ограничений,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ . Для гетероалкиленовых групп гетероатомы также могут занимать один или оба конца цепи (например, алкиленокси, алкилендиокси, алкиленамино, алкилендиамино и т.п.). Кроме того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связывающих групп ориентация связывающей группы не подразумевается направлением, в котором написана формула связывающей группы. Например, формула  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  представляет оба  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  и  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ . Как описано выше, гетероалкильные группы в контексте настоящего описания включают те группы, которые присоединены к остальной части молекулы через гетероатом, такой как  $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{SR}'$ , и/или  $-\text{SO}_2\text{R}'$ . При указании «гетероалкил» с последующим перечислением конкретных гетероалкильных групп, таких как  $-\text{NR}'\text{R}''$  или подобных, следует понимать, что термины гетероалкил и  $-\text{NR}'\text{R}''$  не являются избыточными или взаимоисключающими. Скорее, конкретные гетероалкильные группы указаны для большей ясности. Таким образом, термин «гетероалкил» не следует интерпретировать в настоящей заявке как исключая определенные гетероалкильные группы, такие как  $-\text{NR}'\text{R}''$  или подобные.

[112] Термины «циклоалкил» и «гетероциклоалкил», сами по себе или в сочетании с другими терминами, означают, если не указано иное, циклические версии «алкила» и «гетероалкила» соответственно. Циклоалкил и гетероциклоалкил не являются ароматическими. Кроме того, в случае гетероциклоалкила гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединен к остальной части молекулы. Примеры циклоалкила включают без ограничений циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и тому подобное. Примеры гетероциклоалкила включают без ограничений 1- (1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиен-2-ил, тетрагидротиен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил и тому подобное. «Циклоалкилен» и «гетероциклоалкилен», отдельно или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, производный от циклоалкила и гетероциклоалкила, соответственно.

[113] Термин «гало» или «галоген», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или йода. Кроме того, подразумевается, что такие термины, как «галогеналкил», включают моногалогеналкил и полигалогеналкил. Например, термин «гало( $\text{C}_1-\text{C}_4$ )алкил» включает без ограничений фторметил, дифторметил, трифторметил, 2,2,2-трифторэтил, 4-хлорбутил, 3-бромпропил и т.п.

[114] Термин «ацил» означает, если не указано иное,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ , где R представляет собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил.

[115] Термин «арил» означает полиненасыщенный ароматический углеводородный заместитель, который может представлять собой одно кольцо или множество колец (предпочтительно от 1 до 3 колец), конденсированных вместе (т.е. конденсированный кольцевой арил) или связаны ковалентно. Конденсированный кольцевой арил относится к нескольким кольцам, конденсированным вместе, при этом по меньшей мере одним из конденсированных колец является арильное кольцо. Термин «гетероарил» относится к арильным группам (или кольцам), которые содержат по меньшей мере один гетероатом, такой как N, O или S, в которых атомы азота и серы необязательно окислены, а атом (ы) азота необязательно кватернизированы. Таким образом, термин «гетероарил» включает гетероарильные группы с конденсированным кольцом (то есть множество колец, конденсированных вместе, при этом по меньшей мере одно из конденсированных колец представляет собой гетероароматическое кольцо). Конденсированный с 5,6 кольцом гетероарил относится к двум конденсированным вместе кольцам, в которых одно кольцо имеет 5 членов, а другое кольцо - 6 членов, и при этом по меньшей мере одно кольцо является гетероарильным кольцом. Аналогично, 6,6-конденсированное кольцо гетероарилена относится к двум конденсированным вместе кольцам, в которых одно кольцо имеет 6 членов, а другое кольцо - 6 членов, и при этом по меньшей мере одно кольцо является гетероарильным кольцом. А 6,5-конденсированное кольцо гетероарилена относится к двум конденсированным вместе кольцам, при этом одно кольцо имеет 6 членов, а другое кольцо - 5 членов, и при этом по меньшей мере одно кольцо является гетероарильным кольцом. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы через углерод или гетероатом. Неограничивающие примеры арильных и гетероарильных групп включают фенил, нафтил, пирролил, пиразолил, пиридазинил, триазинил, пиримидинил, имидазолил, пиразинил, пуринил, оксазолил, изоксалил, тиазолил, фурил, тиенил, пиридил, пиримидил, бензотиазолил, бензоксазоил, бензимидазолил, бензофуран, изобензофуранил, индолил, изоиндолил, бензотиофенил, изохинолил, хиноксалинил, хинолил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-бифенил, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4- имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4- изоксалил, 5-изоксалил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3- тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждой из вышеуказанных кольцевых систем арила и гетероарила выбирают из группы приемлемых заместителей, описанной ниже. «Арилен» и «гетероарилена», отдельно или как часть другого заместителя, означают двухвалентный радикал, производный от арила и гетероарила. соответственно. Заместитель гетероарильной группы может быть связан -О- с кольцом гетероатомного азота.

[116] Spiroциклические кольца представляют собой два или более колец, в которых соседние кольца происходят через один атом. Отдельные кольца в spiroциклических

кольцах могут быть одинаковыми или разными. Отдельные кольца в спироциклических кольцах могут быть замещенными или незамещенными и могут иметь заместители, отличные от других индивидуальных колец в наборе спироциклических колец. Возможные заместители для отдельных колец внутри спироциклических колец являются возможными заместителями для того же кольца, если они не являются частью спироциклических колец (например, заместители для циклоалкильных или гетероциклоалкильных колец). Спиروциклические кольца могут быть замещенным или незамещенным циклоалкиленом, замещенным или незамещенным циклоалкиленом, замещенным или незамещенным гетероциклоалкиленом или замещенным или незамещенным гетероциклоалкиленом, а отдельные кольца в группе спироциклических колец могут быть любыми из непосредственно предшествующего списка, включая все кольца одного типа (например, все кольца, представляющие собой замещенный гетероциклоалкилен, при этом каждое кольцо может быть одинаковым или различным замещенным гетероциклоалкиленом). Когда речь идет о спироциклической кольцевой системе, гетероциклические спироциклические кольца означают спироциклические кольца, в которых по меньшей мере одно кольцо представляет собой гетероциклическое кольцо и при этом каждое кольцо может быть отдельным кольцом. Когда речь идет о спироциклической кольцевой системе, замещенные спироциклические кольца означают, что по меньшей мере одно кольцо является замещенным, и каждый заместитель может необязательно отличаться от другого.

[117] Символ «~» обозначает место присоединения химического фрагмента к остатку молекулы или химической формулы.

[118] Термин «оксо», в контексте данного документа, означает кислород, который связан двойной связью с атомом углерода.

[119] Термин «алкиларилен» представляет собой ариленовый фрагмент, ковалентно связанный с алкиленовым фрагментом (также называемый в настоящей заявке алкиленовым линкером). В вариантах воплощения изобретения алкилариленовая группа имеет формулу:



или

[120] Алкиленовый фрагмент может быть замещен (например, группой заместителя) на алкиленовом фрагменте или ариленовом линкере (например, на атомах углерода 2, 3, 4 или 6) на галоген, оксо,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-Br_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-CHO$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2CH_3$ ,  $-SO_3H$ ,  $OSO_3H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ , замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_5$  алкил или замещенный или незамещенный 2-5 членный гетероалкил). В вариантах воплощения изобретения алкиларилен незамещен.

[121] Каждый из приведенных выше терминов (например, «алкил», «гетероалкил», «циклоалкил», «гетероциклоалкил», «арил» и «гетероарил») включает как замещенные, так и незамещенные формы указанного радикала. Предпочтительные заместители для каждого типа радикала приведены ниже.

[122] Заместители для алкильного и гетероалкильного радикалов (включая те группы, которые часто называют алкиленом, алкенилом, гетероалкиленом, гетероалкенилом, алкинилом, циклоалкилом, гетероциклоалкилом, циклоалкенилом и гетероциклоалкенилом) могут быть одной или более из нескольких групп, выбранных из, без ограничений,  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ , -галоген,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $-NR'-C(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-NR'NR''R'''$ ,  $-ONR'R''$ ,  $-NR'C(O)NR''NR''''R''''$ ,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-NR'SO_2R''$ ,  $-NR'C(O)R''$ ,  $-NR'C(O)-OR''$ ,  $-NR'OR''$ , в количестве в диапазоне от нуля до  $(2m'+1)$ , где  $m'$  представляет собой общее количество атомов углерода в таком радикале.  $R$ ,  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$  каждый независимо относится к водороду, замещенным или незамещенным гетероалкильным, замещенным или незамещенным циклоалкильным, замещенным или незамещенным гетероциклоалкильным, замещенным или незамещенным арильным (например, арилу, замещенному 1-3 галогенами), замещенным или незамещенным гетероарильным, замещенным или незамещенным алкильным, алкокси или тиоалкокси группам, или арилалкильным группам. Когда соединение, описанное в настоящей заявке, включает более одной группы  $R$ , например, каждая из групп  $R$  выбрана независимо, как и каждая группа  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$ , если присутствует более одной из этих групп. Когда  $R'$  и  $R''$  присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 4-, 5-, 6- или 7-членного кольца. Например,  $-NR'R''$  включает без ограничений 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из приведенного выше обсуждения заместителей специалист в данной области поймет, что термин «алкил» включает группы, включающие атомы углерода, связанные с группами, отличными от водородных групп, такими как галогеналкил (например,  $-CF_3$  и  $-CH_2CF_3$ ) и ацил (например,  $-C(O)CH_3$ ,  $-C(O)CF_3$ ,  $-C(O)CH_2OCH_3$  и т.п.).

[123] Подобно заместителям, описанным для алкильного радикала, заместители для арильной и гетероарильной групп варьируются и выбираются, например, из:  $-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ , -галоген,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR''C(O)R'$ ,  $-NR'-C(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-NR'NR''R'''$ ,  $-ONR'R''$ ,  $-NR'C(O)NR''NR''''R''''$ ,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-R'$ ,  $-N_3$ ,  $-CH(PH)_2$ , ФТОРО(C1-C4)алкокси и фторо(C1-C4)алкил,  $-NR'SO_2R''$ ,  $-NR'C(O)R''$ ,  $-NR'C(O)-OR''$ ,  $-NR'OR''$ , количестве от нуля до общего числа открытых валентностей ароматической кольцевой системы; и где  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$  предпочтительно независимо выбирают из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила и замещенного или незамещенного гетероарила. Если соединение, описанное в настоящей заявке, включает более одной группы  $R$ , например, каждая из групп  $R$  независимо выбрана из каждой из групп  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$ , когда присутствует более одной из этих групп.

[124] Заместители для колец (например, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, гетероарил, циклоалкилен, гетероциклоалкилен, арилен или гетероарилен) могут быть

изображены как заместители на кольце, а не на конкретном атоме кольца (обычно имеет название плавающий заместитель). В таком случае заместитель может быть присоединен к любому из кольцевых атомов (в соответствии с правилами химической валентности), а в случае конденсированных колец или спироциклических колец заместитель, изображенный как связанный с одним членом конденсированных колец или спироциклических колец (плавающий заместитель в одном кольце), может быть заместителем в любом из конденсированных колец или спироциклических колец (плавающий заместитель в нескольких кольцах). Когда к кольцу присоединен заместитель, но не к конкретному атому (плавающий заместитель), а нижний индекс для заместителя является целым числом больше единицы, множество заместителей могут находиться на одном и том же атоме, одном кольце, разных атомах, разных конденсированных кольцах, разных спироциклических кольцах и каждый заместитель необязательно может быть различным. Если место присоединения кольца к остальной части молекулы не ограничено одним атомом (плавающий заместитель), местом присоединения может быть любой атом кольца, а в случае конденсированного кольца или спироциклического кольца, любой атом любого из конденсированных колец или спироциклических колец, при соблюдении правил химической валентности. Если кольцо, конденсированные кольца или спироциклические кольца содержат один или более кольцевых гетероатомов, а кольцо, конденсированные кольца или спироциклические кольца показаны с еще одним плавающим заместителем (включая, помимо прочего, места присоединения к оставшейся части молекулы), плавающие заместители могут быть связаны с гетероатомами. Когда кольцевые гетероатомы показаны связанными с одним или более атомами водорода (например, кольцевой азот с двумя связями с кольцевыми атомами и третьей связью с водородом) в структуре или формуле с плавающим заместителем, если гетероатом связан с плавающим заместителем, следует понимать, что заместитель замещает водород, в соответствии с правилами химической валентности.

[125] Два или более заместителя необязательно могут быть соединены с образованием арильных, гетероарильных, циклоалкильных или гетероциклоалкильных групп. Такие так называемые кольцевые заместители обычно, хотя и не обязательно, присоединены к циклической основной структуре. В одном варианте воплощения изобретения образующие кольцо заместители присоединены к соседним членам основной структуры. Например, два образующих кольцо заместителя, присоединенные к соседним членам циклической основной структуры, создают конденсированную кольцевую структуру. В другом варианте воплощения изобретения заместители, образующие кольцо, присоединены к единственному члену основной структуры. Например, два образующих кольцо заместителя, присоединенные к одному члену циклической основной структуры, создают спироциклическую структуру. В еще одном варианте воплощения изобретения образующие кольцо заместители присоединены к несмежным членам основной структуры.

[126] Два заместителя у соседних атомов арильного или гетероарильного кольца могут необязательно образовывать кольцо формулы  $-TC(O)-(CRR')q-U-$ , при этом T и U

независимо представляют собой  $-NR-$ ,  $-O-$ ,  $-CRR'$ , или одинарная связь, и  $q$  равно целому числу от 0 до 3. Альтернативно, два заместителя на соседних атомах арильного или гетероарильного кольца могут быть необязательно заменены заместителем формулы  $-A-(CH_2)_r-B-$ , при этом  $A$  и  $B$  независимо представляют собой  $-CRR'$ ,  $-O-$ ,  $-NR-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NR'$ , или одинарная связь, и  $R$  представляет собой целое число от 1 до 4. Одна из одинарных связей образованного таким образом нового кольца может быть необязательно замещена двойной связью. Альтернативно, два заместителя у соседних атомов арильного или гетероарильного кольца могут быть необязательно замещены заместителем формулы  $-(CRR')_s-X'-(C''R''R''')_d-$ , где  $s$  и  $d$  независимо равны целым числам от 0 до 3, а  $X'$  представляет собой  $-O-$ ,  $-NR'$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$  или  $-S(O)_2NR'$ . Заместители  $R$ ,  $R'$ ,  $R''$  и  $R'''$  предпочтительно независимо выбирают из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила и замещенного или незамещенного гетероарила.

[127] В контексте данного документа, термины «гетероатом» или «кольцевой гетероатом» включают кислород (O), азот (N), серу (S), фосфор (P) и кремний (Si).

[128] «Группа-заместитель» в контексте настоящего описания означает группу, выбранную из следующих фрагментов:

оксо, галоген,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CHF_2$ ,  $-CHCl_2$ ,  $-CHBr_2$ ,  $-CHI_2$ ,  $-CH_2F$ ,  $-CH_2Cl$ ,  $-CH_2Br$ ,  $-CH_2I$ ,  $-CN$ ,  $-N_3$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SCH_3$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_4H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHSO_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCCl_3$ ,  $-OCBr_3$ ,  $-OCl_3$ ,  $-OCHF_2$ ,  $-OCHCl$ ,  $-OCHBr_2$ ,  $-OCHI_2$ ,  $-OCH_2F$ ,  $-OCH_2Cl$ ,  $-OCH_2Br$ ,  $-OCH_2I$ , незамещенного алкила (например,  $C_1$ - $C_8$  алкила,  $C_1$ - $C_6$  алкила или  $C_1$ - $C_4$  алкила), незамещенного гетероалкила (например, 2-8 гетероалкила, 2-6 членного гетероалкила или 2-4 членного гетероалкила), незамещенного циклоалкила (например,  $C_1$ - $C_6$  циклоалкила,  $C_3$ - $C_6$  циклоалкила или  $C_5$ - $C_6$  циклоалкила), незамещенного гетероциклоалкила (например, 3-8 членного гетероциклоалкила, 3-6 членного гетероциклоалкила или 5-6 членного гетероциклоалкила), незамещенного арила (например,  $C_6$ - $C_{10}$  арила,  $C_{10}$  арила или фенила) или незамещенного гетероарила (например, 5-10 членного гетероарила, 5-9 членного гетероарила или 5-6 членного гетероарила), и

алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(i) оксо, галогена,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CHF_2$ ,  $-CHCl_2$ ,  $-CHBr_2$ ,  $-CHI_2$ ,  $-CH_2F$ ,  $-CH_2Cl$ ,  $-CH_2Br$ ,  $-CH_2I$ ,  $-CN$ ,  $-N_3$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SCH_3$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_4H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHSO_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCCl_3$ ,  $-OCBr_3$ ,  $-OCl_3$ ,  $-OCHF_2$ ,  $-OCHCl$ ,  $-OCHBr_2$ ,  $-OCHI_2$ ,  $-OCH_2F$ ,  $-OCH_2Cl$ ,  $-OCH_2Br$ ,  $-OCH_2I$ , незамещенного алкила (например,  $C_1$ - $C_8$  алкила,  $C_1$ - $C_6$  алкила или  $C_1$ - $C_4$  алкила), незамещенного гетероалкила (например, 2-8 членного гетероалкила, 2-6 членного гетероалкила или 2-4 членного гетероалкила), незамещенного циклоалкила (например,  $C_3$ - $C_6$  циклоалкила,  $C_3$ - $C_6$  циклоалкила или  $C_5$ - $C_6$  циклоалкила),

незамещенного гетероциклоалкила (например, 3-8 членного гетероциклоалкила, 3-6 членного гетероциклоалкила или 5-6 членного гетероциклоалкила), незамещенного арила (например, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> арила, C<sub>10</sub> арила или фенила) или незамещенного гетероарила (например, 5-10 членного гетероарила, 5-9 членного гетероарила или 5-6 членного гетероарила), и

(ii) алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из:

(а) оксо, галогена, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>, -CHCl<sub>2</sub>, -CHBr<sub>2</sub>, -CHI<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>Br, -CH<sub>2</sub>I, -CN, -N<sub>3</sub>, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -SCH<sub>3</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>4</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, -OCF<sub>3</sub>, -OCCL<sub>3</sub>, -OCBR<sub>3</sub>, -OCI<sub>3</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, -OCHCB, -OCHBR<sub>2</sub>, -OCHI<sub>2</sub>, -OCH<sub>2</sub>F, -OCH<sub>2</sub>Cl, -OCH<sub>2</sub>Br, -OCH<sub>2</sub>I, незамещенного алкила (например, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила), незамещенного гетероалкила (например, 2-8 членного гетероалкила, 2-6 членного гетероалкила или 2-4 членного гетероалкила), незамещенного циклоалкила (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила), незамещенного гетероциклоалкила (например, 3-8 членного гетероциклоалкила, 3-6 членного гетероциклоалкила или 5-6 членного гетероциклоалкила), незамещенного арила (например, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> арила, C<sub>10</sub> арила или фенила) или незамещенного гетероарила (например, незамещенного 5-10 членного гетероарила, 5-9 членного гетероарила или 5-6 членного гетероарила), и

(б) алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, замещенного по меньшей мере одним заместителем, выбранным из: оксо, галогена, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>, -CHCl<sub>2</sub>, -CHBr<sub>2</sub>, -CHI<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>Br, -CH<sub>2</sub>I, -CN, -N<sub>3</sub>, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -SCH<sub>3</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>4</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>H, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHOH, -OCF<sub>3</sub>, -OCCL<sub>3</sub>, -OCBR<sub>3</sub>, -OCI<sub>3</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, -OCHCB, -OCHBR<sub>2</sub>, -OCHI<sub>2</sub>, -OCH<sub>2</sub>F, -OCH<sub>2</sub>Cl, -OCH<sub>2</sub>Br, -OCH<sub>2</sub>I, незамещенного алкила (например, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила), незамещенного гетероалкила (например, 2-8 членного гетероалкила, 2-6 членного гетероалкила или 2-4 членного гетероалкила), незамещенного циклоалкила (например, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила), незамещенного гетероциклоалкила (например, 3-8 членного гетероциклоалкила, 3-6 членного гетероциклоалкила или 5-6 членного гетероциклоалкила), незамещенного арила (например, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> арила, C<sub>10</sub> арила или фенила) или незамещенного гетероарила (например, 5-10 членного гетероарила, 5-9 членного гетероарила или 5-6 членного гетероарила).

[129] “Ограниченный размером заместитель” или “ограниченная размером группа-заместитель”, в контексте данного документа, означают группу, выбранную из всех заместителей, описанных выше для “группы-заместителя”, при этом каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2-20 членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкил, каждый

замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3-8 членный гетероциклоалкил, каждый замещенный или незамещенный арил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_6-C_{10}$  арил, и каждый замещенный или незамещенный гетероарил представляет собой замещенный или незамещенный 5-10 членный гетероарил.

[130] “Низший заместитель” или “ группа-низший заместитель”, в контексте данного документа, означают группу, выбранную из всех заместителей, описанных выше для “группы-заместителя,” при этом каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_8$  алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2-8 членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_3-C_7$  циклоалкил, каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3-7 членный гетероциклоалкил, каждый замещенный или незамещенный арил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_6-C_{10}$  арил, и каждый замещенный или незамещенный гетероарил представляет собой замещенный или незамещенный 5-9 членный гетероарил.

[131] В вариантах воплощения изобретения замещенный или незамещенный фрагмент (например, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил. замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен, и/или замещенный или незамещенный гетероарилен) представляет собой незамещенный (например, представляет собой незамещенный алкил, незамещенный гетероалкил, незамещенный циклоалкил, незамещенный гетероциклоалкил, незамещенный арил. незамещенный гетероарил. незамещенный алкилен, незамещенный гетероалкилен, незамещенный циклоалкилен, незамещенный гетероциклоалкилен, незамещенный арилен, и/или незамещенный гетероарилен, соответственно). В вариантах воплощения изобретения замещенный или незамещенный фрагмент (например, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил. замещенный или незамещенный гетероарил. замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен, и/или замещенный или незамещенный гетероарилен) представляет собой замещенный (например, представляет собой замещенный алкил, замещенный гетероалкил, замещенный циклоалкил, замещенный гетероциклоалкил, замещенный арил. замещенный гетероарил. замещенный алкилен,



заместителей и группами низших заместителей, каждая группа-заместитель, ограниченная размером группа-заместитель, и/или группа-низший заместитель может быть необязательно другой. В вариантах воплощения изобретения если замещенный фрагмент замещен несколькими группами, выбранными из групп заместителей, ограниченные размером группы-заместители и группы низших заместителей; каждая группа-заместитель, ограниченная размером группа-заместитель, и/или группа-низший заместитель может быть другой.

[136] В вариантах воплощения изобретения соединений в настоящей заявке каждый замещенный или незамещенный алкил может быть замещен (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенным  $C_1-C_{20}$  алкилом, при этом каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный 2-20 членный гетероалкил, при этом каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный  $C_3-C_8$  циклоалкил, при этом каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный 3-8 членный гетероциклоалкил, каждый замещенный или незамещенный арил представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный  $C_6-C_{10}$  арил и/или каждый замещенный или незамещенный гетероарил представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный 5-10 членный гетероарил. В вариантах воплощения изобретения настоящей заявки, каждый замещенный или незамещенный алкилен представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкилен, при этом каждый замещенный или незамещенный гетероалкилен представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный 2-20 членный гетероалкилен, при этом каждый замещенный или незамещенный циклоалкилен представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный  $C_3-C_8$  циклоалкилен, при этом каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный 3-8 членный гетероциклоалкилен, при этом каждый замещенный или незамещенный арилен



представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный 5-9 членный гетероарилен. В вариантах воплощения изобретения соединение представляет собой химические формулы, указанные в разделе Примеры, Фигурах или Таблицах, приведенных ниже.

[138] Некоторые соединения, предлагаемые в настоящей заявке, обладают асимметричными атомами углерода (оптическими или хиральными центрами) или двойными связями; энантимеры, рацематы, диастереомеры, таутомеры, геометрические изомеры, стереоизометрические формы, которые могут быть определены с точки зрения абсолютной стереохимии как (R)- или (S)- или как (D)- или (L)- для аминокислот, и отдельные изомеры включены в объем настоящего изобретения. Предложенные в настоящей заявке соединения не включают известные в данной области техники, как слишком нестабильные для синтеза и/или выделения. Предложенные в настоящей заявке соединения находятся в рацемической и оптически чистой формах. Оптически активные (R)- и (S)- или (D)- и (L)-изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов или могут быть разделены с использованием обычных методик. Когда соединения, описанные в настоящей заявке, содержат олефиновые связи или другие центры геометрической асимметрии, и если не указано иное, предполагается, что соединения включают геометрические изомеры E и Z.

[139] В контексте данного документа, термин «изомеры» относится к соединениям, имеющим одинаковое количество и вид атомов и, следовательно, одинаковую молекулярную массу, но различающиеся в отношении структурного расположения или конфигурации атомов.

[140] Термин «таутомер», в контексте данного документа, относится к одному из двух или более структурных изомеров, которые существуют в равновесии и которые легко превращаются из одной изомерной формы в другую.

[141] Специалисту в данной области техники будет очевидно, что определенные соединения, предлагаемые в заявке, могут существовать в таутомерных формах, причем все такие соединения таутомерных форм входят в объем настоящего изобретения.

[142] Если соединения, описанные в настоящей заявке, имеют по меньшей мере один хиральный центр, они могут существовать в виде индивидуальных энантимеров и диастереомеров или в виде смесей таких изомеров, включая рацематы. Разделение индивидуальных изомеров или селективный синтез индивидуальных изомеров осуществляется с помощью различных методов, которые хорошо известны специалистам в данной области. Если не указано иное, все такие изомеры и их смеси включены в объем соединений, раскрытых в настоящей заявке. Если не указано иное, структуры, изображенные в настоящей заявке, также должны включать все стереохимические формы структуры; т.е. конфигурации (R) и (S) для каждого асимметричного центра. Следовательно, отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные и диастереомерные смеси настоящих соединений, обычно признанные специалистами

стабильными, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

[143] Если не указано иное, структуры, изображенные в настоящей заявке, также включают соединения, которые отличаются только наличием одного или более изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие настоящие структуры, за исключением замены водорода дейтерием или тритием, замены фторида на  $^{18}\text{F}$  или замены углерода углеродом, обогащенным  $^{13}\text{C}$  или  $^{14}\text{C}$ , находятся в пределах объема настоящего изобретения.

[144] Соединения, предложенные в настоящей заявке, могут также содержать неприродные пропорции атомных изотопов у одного или более атомов, составляющих такие соединения. Например, соединения могут быть помечены радиоактивными изотопами, такими как, например, тритий ( $^3\text{H}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ) или углерод-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Все изотопные вариации, предложенные в настоящей заявке, радиоактивные или нет, включены в настоящее изобретение.

[145] Следует отметить, что во всей заявке альтернативы записаны в группах Маркуша, например, каждое положение аминокислоты содержит более одной возможной аминокислоты. В частности, предполагается, что каждый член группы Маркуша следует рассматривать отдельно, тем самым составляя другой вариант воплощения изобретения и группу Маркуша не следует рассматривать как единое целое.

[146] Термин «аналог» используется в соответствии с его обычным значением в химии и биологии и относится к химическому соединению, которое структурно похоже на другое соединение (т.е. так называемое «реперное» соединение), но отличается по составу, например, замещением одного атома на атом другого элемента или в присутствии конкретной функциональной группы, или замещением одной функциональной группы на другую функциональную группу, или абсолютной стереохимией одного или более хиральных центров реперного соединения. Соответственно, аналог представляет собой соединение, которое похоже или сравнимо по функциям и внешнему виду, но не по структуре или происхождению, с реперным соединением.

[147] Формы единственного числа в настоящей заявке означают один или более. Кроме того, фраза «замещенный на [n]», в контексте данного документа, означает, что указанная группа может быть замещенной одним или более из любых или всех названных заместителей. Например, если группа, такая как алкильная или гетероарильная группа, является «замещенной незамещенным  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$  алкилом или незамещенным от 2 до 20 членным гетероалкилом», то группа может содержать один или более незамещенных  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$  алкилов, и/или один или более незамещенных от 2 до 20 членных гетероалкилов.

[148] Если фрагмент замещен заместителем R, группа может называться «R-замещенный». Если фрагмент представляет собой R-замещенный, фрагмент замещен по меньшей мере одним заместителем R, и каждый заместитель R необязательно отличается. Если конкретная группа R присутствует в описании химического рода (например, в формуле (I)), римский десятичный символ может использоваться для различения каждого появления этой конкретной группы R. Например, если присутствует множество

заместителей  $R^{13}$ , каждый заместитель  $R^{13}$  можно обозначить как  $R^{13.1}$ ,  $R^{13.2}$ ,  $R^{13.3}$ ,  $R^{13.4}$  и т.д., при этом каждый из  $R^{13.1}$ ,  $R^{13.2}$ ,  $R^{13.3}$ ,  $R^{13.4}$  и т.д. определяется в рамках определения  $R^{13}$  и необязательно различным образом. Формы единственного числа в настоящей заявке означают один или более. Кроме того, фраза «замещенный на [n]», в контексте данного документа, означает, что указанная группа может быть замещенной одним или более из любых или всех названных заместителей. Например, если группа, такая как алкильная или гетероарильная группа, является «замещенной незамещенным  $C_1$ - $C_{20}$  алкилом или незамещенным от 2 до 20 членным гетероалкилом», группа может содержать один или более незамещенных  $C_1$ - $C_{20}$  алкилов и/или один или более незамещенных от 2 до 20 членных гетероалкилов.

[149] Описание Соединений, предложенных в настоящей заявке, ограничивается принципами химического связывания, известными специалистам в данной области. Соответственно, если группа может быть замещена одним или более заместителями из ряда, такие замещения выбираются так, чтобы соответствовать принципам химической связи и образовывать соединения, которые по своей природе не являются нестабильными и/или были бы известны одному из специалистов в данной области, поскольку они могут быть нестабильными в условиях окружающей среды, таких как водные, нейтральные и некоторые известные физиологические условия. Например, гетероциклоалкил или гетероарил присоединяется к остальной части молекулы через кольцевой гетероатом в соответствии с принципами химической связи, известными специалистам в данной области, что позволяет избежать образования нестабильных по своей природе соединений.

[150] Термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединения, которые не являются биологически или иным образом нежелательными для использования в фармацевтике. Во многих случаях соединения в настоящей заявке способны образовывать кислые и/или основные соли благодаря наличию amino и/или карбоксильных групп или групп, им подобных. Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли могут быть образованы с неорганическими кислотами и органическими кислотами. Неорганические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. Органические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту и т.п. Фармацевтически приемлемые основные аддитивные соли могут быть образованы с неорганическими и органическими основаниями. Неорганические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, натрий, калий, литий, аммоний, кальций, магний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий и т.п.; особенно предпочтительными являются соли аммония, калия,

натрия, кальция и магния. Органические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины, основные ионообменные смолы и т.п., в частности, такие как изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин и этаноламин. Многие такие соли известны в данной области, как описано в WO 87/05297, Johnston et al., опубликованной 11 сентября 1987 г. (полностью включена в данную заявку путем ссылки).

[151] «Приведение в контакт» используется в его простом обычном значении и относится к процессу позволения, по крайней мере, двум различным видам (например, химическим соединениям, биомолекулам или клеткам), стать достаточно близкими, чтобы реагировать, взаимодействовать, или физически касаться. Например, приведение в контакт включает процесс, позволяющий соединению стать достаточно проксимальным по отношению к клетке для связывания с рецептором на поверхности клетки.

[152] В контексте данного документа, «контактирование с клеткой» относится к состоянию, при котором соединение или другая смесь химически связанных веществ находится в прямом контакте с клеткой или находится достаточно близко, чтобы вызвать желаемый биологический эффект в клетке.

[153] Термин «условия несвязанного поглощения», в контексте данного документа, относится к условиям, при которых немодифицированные олигонуклеотиды по существу не попадают в клетку. Например, такими условиями несвязанного поглощения могут быть условия, при которых присутствует небольшое количество или совсем отсутствуют реагенты для трансфекции, методы электропорации или другие условия, используемые для содействия проникновению соединения в клетки. Условиями несвязанного поглощения могут быть условия, при которых мРНК, лишенные липидной конъюгации, по существу не проникают в клетки, такие как инкубация в стандартной среде в стандартных условиях для конкретного типа клеток. Примером стандартных условий среды для несвязанного поглощения может быть фетальная бычья сыворотка (FBS) в диапазоне от 0,5% до 10%, например от 1% до 5%. В других примерах стандартная среда не содержит сыворотки..

[154] Термин «активатор» относится к соединению, композиции или веществу, способному детектируемо повышать экспрессию или активность данного гена или белка. Например, активатор может увеличивать экспрессию или активность на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с контролем в отсутствие активатора.

[155] Указанные в данном документе термины «ингибирование», «ингибировать», «подавление» и т.п. означают негативное влияние (например, уменьшение) активности или функции по сравнению с активностью или функцией в отсутствие ингибитора. В вариантах воплощения изобретения ингибирование означает негативное воздействие (например, снижение) на концентрацию или уровни биомолекулы, такой как белок или мРНК, по сравнению с концентрацией или уровнем биомолекулы в отсутствие ингибитора. Например, ингибирование включает снижение уровня экспрессии мРНК в клетке. В вариантах воплощения изобретения ингибирование относится к снижению активности

конкретной биомолекулы-мишени, такой как белок-мишень или мРНК-мишень. Таким образом, ингибирование включает по меньшей мере частичное или полное блокирование стимуляции, снижение, предотвращение или задержку активации, или инактивацию, десенсибилизацию или подавление передачи сигнала или ферментативной активности или количества биомолекулы. В вариантах воплощения изобретения ингибирование относится к снижению активности целевой биомолекулы в результате прямого взаимодействия (например, ингибитор связывается с целевым белком). В вариантах воплощения изобретения ингибирование относится к снижению активности целевой биомолекулы в результате непрямого взаимодействия (например, ингибитор связывается с белком, который активирует целевой белок, тем самым предотвращая активацию целевого белка).

[156] Термин «ингибитор» также относится к соединению, композиции или веществу, способному детектируемо снижать экспрессию или активность данного гена или белка. Например, ингибитор может снижать экспрессию или активность на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора. Ингибиторы включают, например, синтетические или биологические молекулы, такие как олигонуклеотиды.

[157] Термины «экспрессия» и «генная экспрессия», в контексте данного документа, относятся к этапам трансляции нуклеиновой кислоты в белок, включая экспрессию мРНК и экспрессию белка. Экспрессия может быть обнаружена с использованием обычных методов обнаружения нуклеиновых кислот или белков (например, ПЦР, ELISA, Саузерн блоттинг, Вестерн блоттинг, проточная цитометрия, FISH (флуоресцентная гибридизация in situ), иммунофлуоресценция, иммуногистохимия).

[158] «Эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для того, чтобы соединение достигло заявленной цели относительно отсутствия соединения (например, для достижения эффекта, для которого оно вводится, лечения заболевания, снижения активности фермента, увеличения активности фермента, уменьшения сигнального пути или уменьшения одного или более симптомов заболевания или состояния). «Количество, снижающее активность», в контексте данного документа, означает количество антагониста, необходимого для снижения активности фермента по сравнению с отсутствием антагониста. «Количество, нарушающее функцию», в контексте данного документа, означает количество антагониста, необходимого для нарушения функции фермента или белка по сравнению с отсутствием антагониста.

[159] Термин «клетка» используется в настоящей заявке в обычном смысле, понимаемом специалистом в данной области. Клетка может быть прокариотической или эукариотической. Прокариотические клетки включают без ограничений бактерии. Эукариотические клетки включают без ограничений дрожжевые клетки, клетки растений и клетки животных, включая клетки человека. Клетка может быть идентифицирована хорошо известными в данной области методами, включая, например, наличие неповрежденной мембраны, окрашивание определенным красителем, способность производить потомство или, в случае гаметы, способность объединяться со второй гаметой, произвести

жизнеспособное потомство. В вариантах воплощения изобретения клетка может быть происходить из иммортализованной клеточной линии. В вариантах воплощения изобретения клетка может быть первичной клеткой. В вариантах воплощения изобретения клетка находится *in vitro*. В вариантах воплощения изобретения клетка находится *in vivo*. В вариантах воплощения изобретения клетка является *ex vivo*.

[160] Термин “*in vivo*”, используемый в настоящей заявке, означает процесс, происходящий в теле субъекта.

[161] Термин “*субъект*”, используемый в настоящей заявке, означает человека или животное, не являющееся человеком, выбранное для лечения или терапии. В вариантах воплощения изобретения субъектом является человек.

[162] Термин «*ex vivo*», используемый в настоящей заявке, означает процесс, который происходит *in vitro* в изолированной ткани или клетках, где обработанная ткань или клетки содержат первичные клетки. Как известно в данной области техники, любая среда, используемая в этом процессе, может быть водной и нетоксичной, чтобы не сделать ткань или клетки нежизнеспособными. В вариантах воплощения изобретения процесс *ex vivo* происходит *in vitro* с использованием первичных клеток.

[163] Термин «введение» означает предоставление фармацевтического агента или композиции субъекту и включает в себя введение, выполняемое медицинским работником, и самостоятельное введение.

[164] Термин «терапия» означает применение одной или более конкретных процедур, используемых для улучшения по меньшей мере одного показателя, заболевания или состояния. В вариантах воплощения конкретной процедурой является введение одного или более фармацевтических агентов.

[165] Термин «модулировать» используется в настоящей заявке в обычном смысле, общепринятом в данной области, и, таким образом, относится к действию изменения или варьирования одного или более свойств. Например, в контексте воздействия модулятора на целевую молекулу, модулировать означает изменять, увеличивая или уменьшая свойство или функцию целевой молекулы или количества целевой молекулы. Модулятор заболевания уменьшает симптом, причину или характеристику целевого заболевания.

[166] Термин «нуклеиновая кислота», «олигонуклеотид» и «полинуклеотид» относятся к соединениям, содержащим по меньшей мере два нуклеотидных мономера, ковалентно связанных друг с другом. Термин включает одноцепочечные и двухцепочечные нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды и полинуклеотиды, включая одноцепочечную ДНК, двухцепочечную ДНК, одноцепочечную РНК, двухцепочечную РНК, одноцепочечные и двухцепочечные молекулы, содержащие как нуклеотиды ДНК и РНК, так и их модифицированные версии. Олигонуклеотиды относятся к полимерам с более короткой длиной и обычно имеют приблизительно от 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50 или более нуклеотидов в длину до приблизительно 100 нуклеотидов в длину. Нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды обычно представляют собой нуклеотидные полимеры большей длины, например, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000,

7000, 10000. «Остаток» ануклеиновой кислоты, олигонуклеотида или полинуклеотида относится к нуклеотидному мономеру этого соединения. «Остаток» и «мономер» используются как синонимы в настоящей заявке. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид можно использовать для подавления РНК. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид может содержать ДНК, заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA), бициклические нуклеиновые кислоты (BNA) или фосфородиамидат-морфолиноолигомер (PMO), или его модификацию и т.п. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает один или больше 2'-О-метоксиэтильных остатков, 2'-О-метильных остатков, и/или 2'-фторо остатков. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид содержит фосфоротионатные связи.

[167] Неограничивающие примеры олигонуклеотидов включают двухцепочечные олигонуклеотиды, модифицированные двухцепочечные олигонуклеотиды, одноцепочечные олигонуклеотиды, модифицированные одноцепочечные олигонуклеотиды, антисмысловые олигонуклеотиды, миРНК, миРНКмимики, структуры типа петля-на-стебле, одноцепочечные миРНК, RNaseH олигонуклеотиды, анти-микроРНК олигонуклеотиды, стерические блокирующие олигонуклеотиды, направляющие РНК CRISPR и аптамеры.

[168] Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, экзон, интрон, межгенную ДНК (включая без ограничений гетерохроматическую ДНК), информационную РНК (мРНК), длинную некодирующую РНК, транспортную РНК, рибосомную РНК, рибозим, кДНК, рекомбинантный полинуклеотид, разветвленный полинуклеотид, плазмиду, вектор, выделенную ДНК последовательности и выделенная РНК последовательности. Полинуклеотиды, применимые в способах настоящего изобретения, могут включать последовательности природных нуклеиновых кислот и их варианты, последовательности искусственных нуклеиновых кислот или комбинацию таких последовательностей.

[169] «Нуклеозид», в контексте данного документа, относится к гликозильному соединению, состоящему из азотистого основания и 5-членного кольцевого сахара (например, рибозы или дезоксирибозы). Нуклеозиды могут содержать основания, такие как А, С, G, Т, U или их аналоги. Нуклеозиды могут быть модифицированы по основанию и/или сахару. В варианте воплощения изобретения нуклеозид представляет собой дезоксирибонуклеозид. В другом варианте воплощения изобретения нуклеозид представляет собой рибонуклеозид.

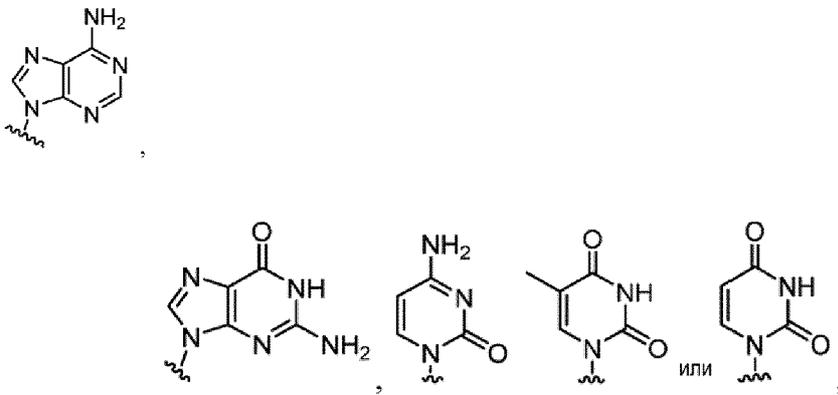
[170] «Нуклеотид», в контексте данного документа, относится к нуклеозид-5'-полифосфатному соединению или его структурному аналогу, который может быть включен (например, частично включен в виде нуклеозид-монофосфата или его производного) полимеразой нуклеиновой кислоты для удлинения растущей цепи нуклеиновой кислоты (например, праймером). Нуклеотиды могут содержать основания, такие как А, С, G, Т, U или их аналоги, и могут содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более фосфатов в фосфатной группе. Нуклеотиды могут быть модифицированы по одному или более из основания, сахара или

фосфатной группы. Нуклеотид может иметь присоединенный лиганд либо напрямую, либо через линкер. В варианте воплощения изобретения нуклеотидом является дезоксирибонуклеотид. В другом варианте воплощения изобретения нуклеотидом является рибонуклеотид.

[171] В контексте данного документа, «аналог нуклеотида» означает аналог А, G, C, T или U (то есть аналог нуклеотида, содержащий основание А, G, C, T или U), содержащий фосфатную группу, которая может распознаваться ДНК или РНК-полимеразой (в зависимости от того, что применимо) и включаться в цепь ДНК или РНК (в зависимости от того, что подходит). Примеры аналогов нуклеотидов включают без ограничений 7-дезаденин, 7-деза-гуанин, аналоги дезоксинуклеотидов, показанные в настоящей заявке, аналоги, в которых метка прикреплена через расщепляемый линкер в 5-положении цитозина или тимина или в положении 7 деаза-аденина или деаза-гуанина, и аналоги, в которых малый химический фрагмент используется для блокирования группы -ОН в 3'-положении дезоксирибозы. Аналоги нуклеотидов и секвенирование ДНК на основе ДНК-полимеразы также описаны в патенте США № 6664079, который включен в данную заявку в качестве ссылки во всей полноте для всех целей.

[172] Термины «основание», в контексте олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот или полинуклеотидов, и «нуклеиновое основание», в контексте данного документа, относятся к соединению пурина или пиримидина или его производному, которое может быть составной частью нуклеиновой кислоты (т.е. ДНК или РНК, или их производные). В вариантах воплощения изобретения азотистое основание является производным встречающегося в природе основания ДНК или РНК (например, аналог основания). В вариантах воплощения изобретения азотистое основание представляет собой производное встречающегося в природе основания ДНК или РНК (например, аналог основания), которое может быть необязательно замещено. В вариантах воплощения изобретения азотистое основание является гибридирующим основанием. В вариантах воплощения изобретения азотистое основание представляет собой гибридирующее основание, которое может быть необязательно замещенным. В вариантах воплощения изобретения нуклеотидное основание гибридуется с комплементарным основанием. В вариантах воплощения изобретения азотистое основание способно образовывать по меньшей мере одну водородную связь с комплементарным азотистым основанием (например, водородные связи аденина с тимином, водородные связи аденина с урацилом или пары гуанина с цитозином). Неограничивающие примеры азотистого основания включают цитозин или его производное (например, аналог цитозина), гуанин или его производное (например, аналог гуанина), аденин или его производное (например, аналог аденина), тимин или его производное (например, аналог тимина), урацил или его производное (например, аналог урацила), гипоксантин или его производное (например, аналог гипоксантина), ксантин или

его производное (например, аналог ксантина), 7-метилгуанин или его производное (например, аналог 7-метилгуанина), деаза-аденин или его производное (например, аналог деаза-аденина), деаза-гуанин или его производное (например, деаза-гуанин), деаза-гипоксантин или его производное, 5, 6-дигидроурацил или его производное (например, аналог 5,6-дигидроурацила), 5-метилцитозин или его производное (например, аналог 5-метилцитозина) или 5-гидроксиметилцитозин или его производное (например, аналог 5-гидроксиметилцитозина) фрагментов. В вариантах воплощения изобретения нуклеотидное основание представляет собой аденин, гуанин, гипоксантин, ксантин, теобромин, кофеин, мочевую кислоту или изогуанин, которые могут быть необязательно замещенными или модифицированными. В вариантах воплощения изобретения нуклеозид представляет собой



которые могут быть необязательно заменены или модифицированы.

[173] Олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды могут включать неспецифические последовательности. В контексте данного документа, термин «неспецифическая последовательность» относится к последовательности, которая содержит ряд остатков, которые не предназначены для комплементарности любой другой последовательности или только частично комплементарны ей. В качестве примера, две цепи двухцепочечного олигонуклеотида могут гибридизоваться таким образом, что в результате образуются один или более коротких (например, двух) выступающих нуклеотидов на одном или обоих концах дуплекса. В качестве другого примера, неспецифическая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность остатков нуклеиновой кислоты, которая не функционирует как ингибирующая нуклеиновая кислота при контакте с клеткой или организмом.

[174] Термин «двухцепочечный олигонуклеотид», в контексте данного документа, относится к олигонуклеотиду с последовательностью азотистых оснований, которая достаточно комплементарна для образования дуплексной структуры. Двухцепочечные олигонуклеотиды могут содержать структуры, образованные гибридизацией первого олигонуклеотида со вторым комплементарным олигонуклеотидом. Двухцепочечные олигонуклеотиды могут быть полностью комплементарными по длине обоих олигонуклеотидов. Альтернативно, двухцепочечный олигонуклеотид может иметь

короткий нуклеотидный выступ на одном или обоих концах дуплексной структуры. Такие двухцепочечные олигонуклеотиды включают миРНК и мимики микроРНК. Двухцепочечные олигонуклеотиды могут также включать одиночный олигонуклеотид достаточной длины и самокомплементарности для образования дуплексной структуры. Такие двухцепочечные олигонуклеотиды включают структуры «петля-на-стебле». Двухцепочечный олигонуклеотид может включать одну или более модификаций в отношении встречающегося в природе конца, сахара, азотистых оснований и/или межнуклеозидной связи.

[175] Термин «модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид», в контексте данного документа, относится к двухцепочечному олигонуклеотиду, содержащему одну или более модификаций относительно встречающегося в природе конца, сахара, азотистых оснований и/или межнуклеозидной связи. В случае двухцепочечного олигонуклеотида, содержащего два отдельных комплементарных олигонуклеотида, одна или обе цепи могут содержать одну или более модификаций в отношении встречающегося в природе конца, сахара, азотистых оснований и/или межнуклеозидной связи.

[176] Термины «малая интерферирующая РНК», «короткая интерферирующая РНК», «сайленсирующая РНК» и «миРНК» используются взаимозаменяемо в настоящей заявке для обозначения класса двухцепочечных олигонуклеотидов, которые препятствуют экспрессии определенных генов посредством облегчения распада мРНК перед трансляцией, то есть через маршрут интерференции РНК. МиРНК содержат направляющую цепь, которая комплементарна мРНК-мишени и включена в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), и сопровождающую цепь, которая комплементарна направляющей цепи и обычно разрушается. Обычно молекулы миРНК имеют длину приблизительно 15-50 нуклеотидов, а более типично - 20-30 нуклеотидов в длину, 20-25 нуклеотидов в длину или 24-29 нуклеотидов в длину. В вариантах воплощения изобретения миРНК имеют длину приблизительно 18-25 нуклеотидов. МиРНК может включать одну или более модификаций относительно встречающегося в природе конца, сахара, азотистых оснований и/или межнуклеозидной связи.

[177] Термин «мимик микроРНК», в контексте данного документа, относится к синтетической версии встречающейся в природе микроРНК. Мимик микроРНК включает направляющую цепь, которая комплементарна одной или более мРНК-мишеням, и сопровождающую цепь, которая комплементарна направляющей цепи. Во встречающихся в природе микроРНК направляющая цепь обычно только частично комплементарна своим мРНК-мишеням, а направляющая цепь лишь частично комплементарна направляющей цепи. Мимик микроРНК может содержать последовательности азотистых оснований, на 100% идентичные природным микроРНК, или может содержать последовательности азотистых оснований, менее чем на 100% идентичные природным микроРНК. Например, мимик микроРНК может содержать цепь-пассажира, которая на 100% комплементарна направляющей цепи. Мимик микроРНК может включать одну или более модификаций в отношении встречающегося в природе конца, сахара, азотистых оснований и/или

межнуклеозидной связи.

[178] Термин «одноцепочечный олигонуклеотид», в контексте данного документа, относится к олигонуклеотиду, который не гибридизуется с комплементарной цепью. Одноцепочечный олигонуклеотид может включать одну или более модификаций в отношении встречающегося в природе конца, сахара, азотистых оснований и/или межнуклеозидной связи. Одноцепочечные олигонуклеотиды включают антисмысловые олигонуклеотиды. Одноцепочечные олигонуклеотиды также включают аптамеры, которые представляют собой одноцепочечные олигонуклеотиды, которые образуют четко определенную вторичную структуру.

[179] Термин «модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид», в контексте данного документа, относится к одноцепочечному олигонуклеотиду, который не гибридизуется с комплементарной цепью и содержит одну или более модификаций, касающихся встречающегося в природе конца, сахара, азотистого основания и/или межнуклеозидной связи. Модифицированные одноцепочечные олигонуклеотиды включают модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды и аптамеры.

[180] «Антисмысловой олигонуклеотид», в контексте настоящей заявки, представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, который комплементарен и, таким образом, способен селективно гибридизоваться по меньшей мере с частью конкретной нуклеиновой кислоты-мишени, а также способен снижать транскрипцию нуклеиновой кислоты-мишени (например, мРНК из ДНК), снижать трансляцию нуклеиновой кислоты-мишени (например, мРНК), изменять сплайсинг транскриптов или иное вмешательство в эндогенную активность нуклеиновой кислоты-мишени. Обычно антисмысловые олигонуклеотиды имеют длину от 15 до 25 оснований. Антисмысловой олигонуклеотид может включать одну или более модификаций встречающегося в природе конца, сахара, азотистых оснований и/или межнуклеозидной связи. Антисмысловые олигонуклеотиды включают без ограничений анти-микроРНК олигонуклеотиды (олигонуклеотиды, комплементарные микроРНК), стерические блокирующие олигонуклеотиды (олигонуклеотиды, препятствующие активности РНК-мишени без разрушения РНК-мишени) и олигонуклеотиды RNaseH (олигонуклеотиды, химически модифицированные для того, чтобы вызывать опосредованный RNaseH распад РНК-мишени).

[181] Нуклеиновая кислота, олигонуклеотид или полинуклеотид «модифицируются», если одна или более концевых, фосфодиэфирных связей, сахаров или оснований изменяются от их природной формы (например, изменяются по сравнению с обычной формой в ДНК или РНК, изменяются с образованием аналога нуклеотида). Например, нуклеиновая кислота модифицируется, если одна или более ее фосфодиэфирных связей заменены фосфорамидатной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, боранофосфонатной или ()-метилфосфорамидитной связью (см., например, Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press). Модифицированные нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды и полинуклеотиды включают те, которые имеют положительный остов; неионные скелеты и нерибозные скелеты, такие

как те, что описаны в патентах США №№ 5235033 и 5034506 и в Главах 6 и 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui & Cook, eds. Модифицированные нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды и полинуклеотиды также включают нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды и полинуклеотиды, один или более остатков которых содержат химически измененный сахар рибозы, такой как 2'-О-метил-рибоза, 2'-дезоксигуанидин-2'-фтор-рибоза и рибоза, «заблокированная» ковалентной связью между 2' и 4' атомами углерода. Остатки «бициклической нуклеиновой кислоты» или «BNA» содержат ковалентную связь между 2' гидроксильной группой сахарного кольца, соединенной с 4' углеродным атомом сахарного кольца, что по существу «фиксирует» структуру в жесткую конформацию. Остаток бициклической нуклеиновой кислоты, содержащий метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') мостик между 2' гидроксильной группой и 4' углеродом рибозы, является «запертой нуклеиновой кислотой» или «LNA». Остаток бициклической нуклеиновой кислоты, содержащий мостик 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2', представляет собой «затрудненный этильный» или «сEt» остаток. Остаток «незапертой нуклеиновой кислоты» или «UNA» представляет собой производное ациклического нуклеозида, в котором отсутствует связь между 2' углеродом и 3' углеродом сахарного кольца. Кроме того, модифицированные нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды и полинуклеотиды могут быть модифицированы на одном или обоих из 5' конца и 3' конца. Например, олигонуклеотид может содержать 5'- (Е)-винилфосфонатную группу на конце. Модификации нуклеиновых кислот могут быть выполнены по разным причинам, например, для увеличения стабильности и периода полужизни (или полураспада) таких молекул в физиологической среде или для предотвращения иммунной стимуляции.

[182] В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид может состоять, состоять по существу из или содержать одиночную цепь запертых нуклеиновых кислот (LNA) или их модификацию. В вариантах воплощения олигонуклеотид может состоять, состоять по существу из или содержать одиночную цепь фосфородиамидатморфолиноолигомера (РМО) или его модификации. В вариантах воплощения олигонуклеотид может составлять не менее 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA), или фосфородиамидат-морфолиноолигомер (РМО), или его модификация и т.п., или олигонуклеотид может содержать некоторое количество ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA) или фосфородиамидатморфолино олигомера (РМО) или его модификацию и т.п. в диапазоне, определяемом любым из двух предыдущих значений. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид может составлять не менее 1 и не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4% от 2'-О-метоксиэтила/фосфоротиоата (МОЕ).

[183] Термин «комплемент», в контексте данного документа, относится к нуклеотиду (например, РНК или ДНК) или последовательности нуклеотидов, способной к

спариванию оснований с комплементарным нуклеотидом или последовательностью нуклеотидов. Как описано в настоящей заявке и широко известно в данной области техники, комплементарный (соответствующий) нуклеотид аденозина представляет собой тимидин, а комплементарный (соответствующий) нуклеотид гуанозина является цитозином. Таким образом, комплемент может включать последовательность нуклеотидов, которая спаривается с соответствующими комплементарными нуклеотидами второй последовательности нуклеиновой кислоты. Нуклеотиды комплемента могут частично или полностью совпадать с нуклеотидами второй последовательности нуклеиновой кислоты. Если нуклеотиды комплемента полностью соответствуют каждому нуклеотиду второй последовательности нуклеиновой кислоты, комплемент образует пары оснований с каждым нуклеотидом второй последовательности нуклеиновой кислоты. Если нуклеотиды комплемента частично совпадают с нуклеотидами второй последовательности нуклеиновой кислоты, только некоторые из нуклеотидов комплемента образуют пары оснований с нуклеотидами второй последовательности нуклеиновой кислоты. Примеры комплементарных последовательностей включают кодирующую и не кодирующую последовательности, при этом не кодирующая последовательность содержит нуклеотиды, комплементарные кодирующей последовательности, и, таким образом, образует комплемент кодирующей последовательности. Еще одним примером комплементарных последовательностей являются смысловые и антисмысловые последовательности, поскольку данная смысловая последовательность содержит нуклеотиды, комплементарные антисмысловой последовательности и, таким образом, образует комплемент антисмысловой последовательности.

[184] Как описано в настоящей заявке, комплементарность последовательностей может быть частичной, в которой только некоторые из нуклеиновых кислот совпадают согласно спариванию оснований, или полной, если все нуклеиновые кислоты совпадают согласно спариванию оснований. Таким образом, две последовательности, которые комплементарны друг другу, могут иметь определенный процент нуклеотидов, которые участвуют в спаривании азотистых оснований (т.е. приблизительно 60% комплементарности, предпочтительно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более высокая степень комплементарности в указанной области).

[185] «Гибридизация» будет означать гибридизацию одной одноцепочечной нуклеиновой кислоты (такой как праймер) с другой нуклеиновой кислотой на основе хорошо понятого принципа комплементарности последовательностей. В варианте воплощения изобретения другая нуклеиновая кислота представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту. Склонность к гибридизации между нуклеиновыми кислотами зависит от температуры и ионной силы их  $milieu$ , длины нуклеиновых кислот и степени комплементарности. Влияние этих параметров на гибридизацию описано, например, в Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989). В контексте данного документа, гибридизация праймера или продукта удлинения ДНК, соответственно, может быть расширена путем создания

фосфодиэфирной связи с доступным нуклеотидом или нуклеотидным аналогом, способным при этом образовывать фосфодиэфирную связь.

[186] Конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает «варианты сплайсинга». Точно так же конкретный белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, включает любой белок, кодируемый сплайс-вариантом этой нуклеиновой кислоты. «Варианты сплайсинга» представляют собой продукты альтернативного сплайсинга гена. После транскрипции исходный транскрипт нуклеиновой кислоты может быть сплайсирован таким образом, что различные (альтернативные) продукты сплайсинга нуклеиновых кислот кодируют разные полипептиды. Механизмы получения вариантов сплайсинга различаются, но включают альтернативный сплайсинг экзонов. Альтернативные полипептиды, полученные из одной и той же нуклеиновой кислоты путем сквозной транскрипции, также охватываются этим определением. Любые продукты реакции сплайсинга, включая рекомбинантные формы продуктов сплайсинга, включены в это определение. Пример вариантов сращивания калиевых каналов рассмотрен в Leicher, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273(52):35095-35101 (1998).

[187] Термины «идентичный» или процент «идентичности», в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые одинаковы (т.е. идентичность составляет как минимум 60 или не менее 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или в пределах диапазона, определенного любым из двух предыдущих значений, идентичность в пределах указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области), измеренных с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BIAST или BIAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или путем ручного выравнивания и визуальной проверки (см., например, веб-сайт NCBI или подобный). Данное определение также относится или может применяться к дополнению тестовой последовательности. Определение также включает последовательности, которые имеют делеции и/или добавления, а также те, которые имеют замены. Как описано ниже, предпочтительные алгоритмы могут учитывать пропуски, вставки и т.п. Выравнивание для целей определения процентной идентичности последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BIAST, BIAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей, могут быть определены известными методами.

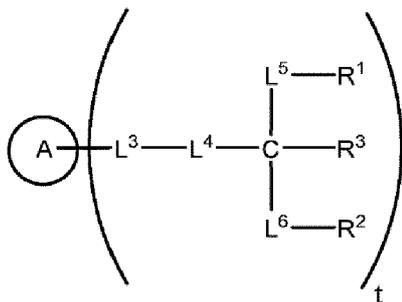
[188] Для сравнения последовательностей, обычно одна последовательность действует как эталонная, с которой сравниваются тестовые последовательности. При

использовании алгоритма сравнения последовательностей тестовые и эталонные последовательности вводятся в компьютер, при необходимости назначаются координаты подпоследовательностей и параметры программы алгоритма последовательности. Предпочтительно можно использовать параметры программы по умолчанию. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичностей последовательностей для тестовых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы.

[189] «Окно сравнения», в контексте данного документа, соотносится с сегментом любого из числа смежных позиций, выбранных из группы, состоящей из от 10 до 600, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 200, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в которых последовательность может быть сравнена с реперной последовательностью с таким же количеством смежных положений после того, как две последовательности оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии в соответствии со Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), посредством алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), методом поиска подобия согласно Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), посредством компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или ручным выравниванием и визуальным осмотром (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 приложение)).

#### Соединения и способы

[190] В аспекте, среди прочего, представлены соединения или липидно-модифицированные олигонуклеотидные соединения, имеющие следующую структуру:



[191] А представляет собой олигонуклеотид, нуклеиновую кислоту, полинуклеотид, нуклеотид или его аналог или нуклеозид или его аналог. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой нуклеиновую кислоту. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой полинуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой нуклеотид или его аналог. В вариантах воплощения изобретения А представляет

собой нуклеозид или его аналог.

[192]  $L^3$  и  $L^4$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен.

[193]  $L^5$  представляет собой -L<sup>5A</sup>-L<sup>5B</sup>-L<sup>5C</sup>-L<sup>5D</sup>-L<sup>5E</sup>- и  $L^6$  представляет собой -L<sup>6A</sup>-L<sup>6B</sup>-L<sup>6C</sup>-L<sup>6D</sup>-L<sup>6E</sup>-.  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$ ,  $L^{5C}$ ,  $L^{5D}$ ,  $L^{5E}$ ,  $L^{6A}$ ,  $L^{6B}$ ,  $L^{6C}$ ,  $L^{6D}$  и  $L^{6E}$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен.

[194]  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>25</sub> алкил, при этом по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой незамещенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкил, при этом по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой незамещенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил.

[195]  $R^3$  представляет собой водород, -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, -C(O)H, -C(O)NH<sub>2</sub>, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)OH, -OC(O)H, -N<sub>3</sub>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил.

[196]  $t$  равно целому числу от 1 до 5.

[197] В вариантах воплощения изобретения  $t$  равно 1. В вариантах воплощения изобретения  $t$  равно 2. В варианте воплощения изобретения  $t$  равно 3. В вариантах воплощения изобретения  $t$  равно 4. В варианте воплощения изобретения  $t$  равно 5.

[198] В вариантах воплощения изобретения А представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид или одноцепочечный олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид, модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения А представляет собой модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид.

[199] В вариантах воплощения изобретения А представляет собой миРНК, мимик микроРНК, структуру типа петля-на-стебле, одноцепочечную миРНК, олигонуклеотид RNaseH, анти-микроРНК олигонуклеотид, стерический блокирующий олигонуклеотид,

CRISPR направляющую РНК, или аптамер.

[200] В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода 3' концевому нуклеотида двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода 3' концевому нуклеотида двухцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода 3' концевому нуклеотида одноцепочечного олигонуклеотида.

[201] В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода 5' концевому нуклеотида двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного нуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода 5' концевому нуклеотида двухцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода 5' концевому нуклеотида одноцепочечного олигонуклеотида.

[202] В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 2' атому углерода нуклеотида двухцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к 2' атому углерода нуклеотида одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения 2' углерод представляет собой 2' углерод во внутреннем нуклеотиде.

[203] В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к нуклеиновому основанию двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к нуклеиновому основанию двухцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения один  $L^3$  присоединен к нуклеиновому основанию одноцепочечного олигонуклеотида.

[204] В вариантах воплощения изобретения  $L^3$  и  $L^4$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен. В вариантах воплощения изобретения  $L^3$  независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен. В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-











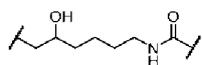




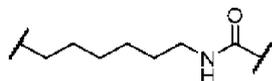


представляет собой  $-L^7-NH-C(O)-$  или  $-L^7-C(O)-NH-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой замещенный пентилен. В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой  $-L^7-NH-C(O)-$  или  $-L^7-C(O)-NH-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой гидроксид(ОН)-замещенный пентилен. В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой  $-L^7-NH-C(O)-$  или  $-L^7-C(O)-NH-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой незамещенный пентилен. В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой  $-L^7-NH-5 C(O)-$  и  $L^7$  независимо представляет собой гидроксид(ОН)-замещенный пентилен. В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой  $-L^7-NH-C(O)-$  и  $L^7$  независимо представляет собой гидроксиметил-замещенный пентилен. В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой  $-L^7-NH-C(O)-$  и  $L^7$  независимо представляет собой незамещенный пентилен.

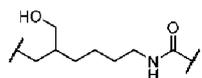
[223] В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



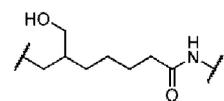
В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



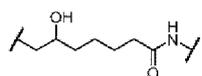
В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



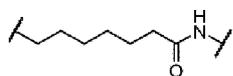
В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



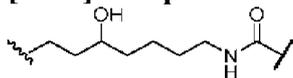
В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



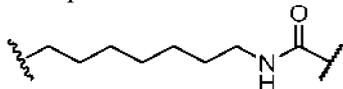
В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



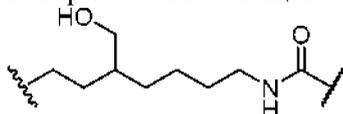
[0224] В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой



В вариантах воплощения изобретения  $L^4$  независимо представляет собой







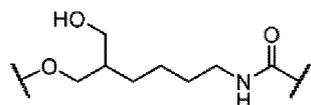




$C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой замещенный  $C_3-C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой гидроксид(ОН)-замещенный  $C_3-C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой гидроксиметил-замещенный  $C_3-C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой незамещенный  $C_3-C_8$  алкилен.

[234] В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_5-C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой замещенный  $C_5-C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой гидроксид(ОН)-замещенный  $C_5-C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой гидроксиметил-замещенный  $C_5-C_8$  алкилен. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой незамещенный  $C_5-C_8$  алкилен.

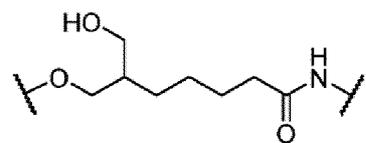
[235] В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой

или

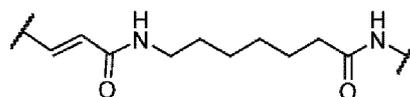
В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой

В вариантах воплощения

изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



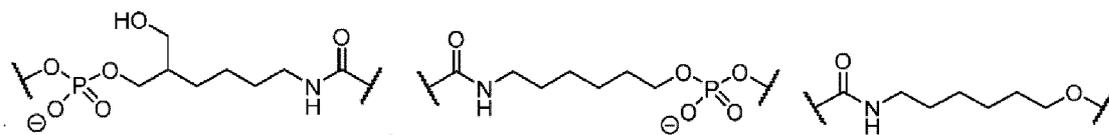
[236] В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-OPO_2-O-L^7-NH-C(O)-$  или  $-OPO_2-O-L^7-C(O)-NH-$ . В вариантах воплощения изобретения  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,



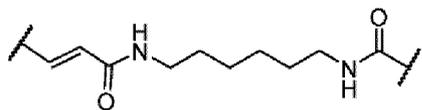


независимо представляет собой  $-OPO_2-O-L^7-NH-C(O)-$ ; и  $L^7$  независимо представляет собой незамещенный  $C_5-C_8$  алкилен.

[243] В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой

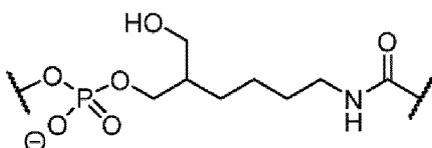


или



В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо

представляет собой

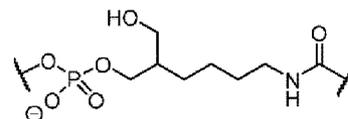


и присоединен к 3' атому углерода

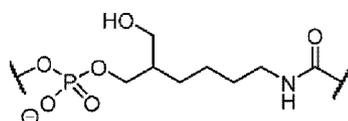
двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах

воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой

и присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$



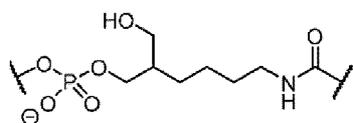
независимо представляет собой



и присоединен ко 2' атому

углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В

вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



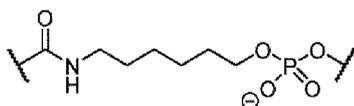
и присоединен к нуклеотидному основанию двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида. В вариантах воплощения

изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой

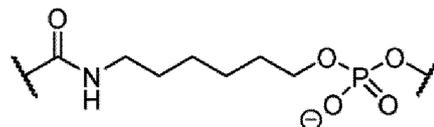
и присоединен к 3' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного

олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения  $-L^3-L^4-$  независимо представляет

собой



и присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного









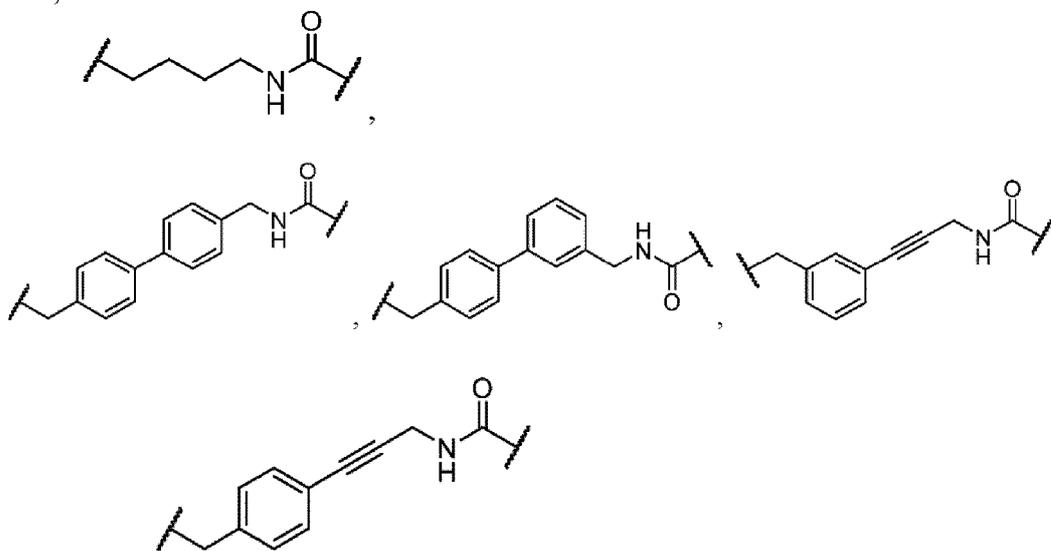






независимо представляет собой связь или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен. В вариантах воплощения изобретения L<sup>6E</sup> независимо представляет собой связь или -NHC(O)-.

[0256] В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup> независимо представляет собой связь,



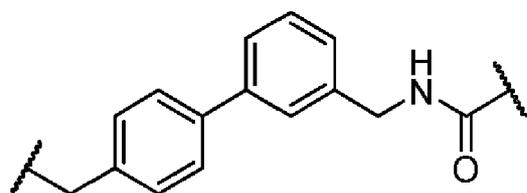
В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup> независимо представляет собой связь. В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup> независимо

представляет собой

В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup>

независимо представляет собой

В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup> независимо представляет собой



В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup>

независимо представляет собой

В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup> независимо представляет собой

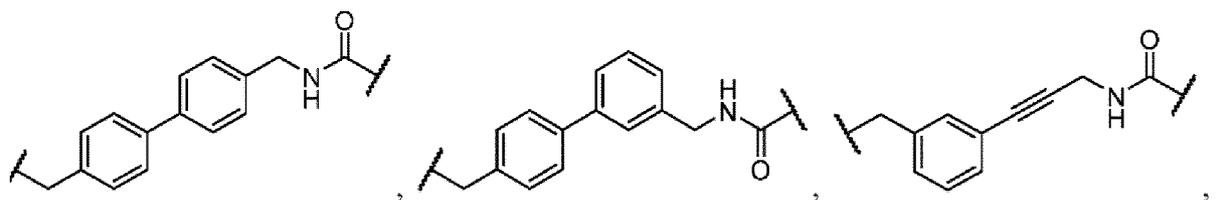




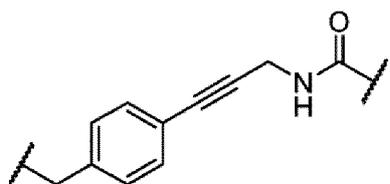




связь,

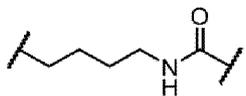


или



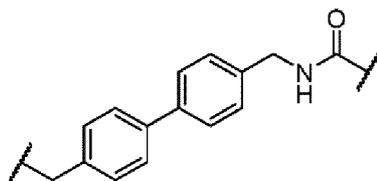
В вариантах воплощения изобретения L<sup>5</sup> независимо представляет собой связь. В вариантах воплощения изобретения L<sup>5</sup> независимо

представляет собой



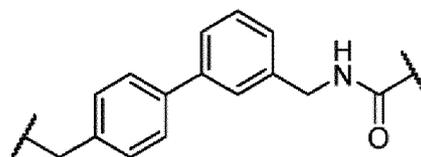
В вариантах воплощения изобретения L<sup>5</sup>

независимо представляет собой

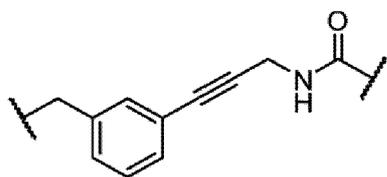


В вариантах воплощения

изобретения L<sup>5</sup> независимо представляет собой

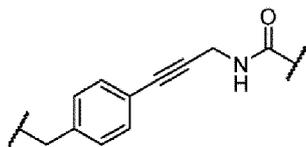


В вариантах воплощения изобретения L<sup>5</sup> независимо представляет собой



В вариантах воплощения изобретения L<sup>5</sup> независимо

представляет собой



[268] В вариантах воплощения изобретения R<sup>1</sup> представляет собой незамещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>25</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>17</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>). В вариантах воплощения изобретения R<sup>1</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный алкил





C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный C<sub>13</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный C<sub>1</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный C<sub>13</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный C<sub>1</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный C<sub>13</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный ненасыщенный C<sub>1</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный ненасыщенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный ненасыщенный C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный ненасыщенный C<sub>13</sub>-C<sub>19</sub> алкил.

[275] В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой миРНК. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой мимик микроРНК. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой структуру типа петля-на-стебле. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой одноцепочечную миРНК. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид RNaseH. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой анти-микроРНК олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой стерический блокирующий олигонуклеотид. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой аптамер. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой CRISPR направляющую РНК.

[276] В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

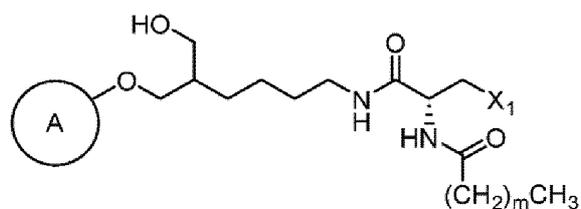
[277] В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает нуклеотидный аналог.

[278] В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает остаток запертой нуклеиновой кислоты (LNA), остаток затрудненного этила (сEt), остаток бициклической нуклеиновой кислоты (BNA), остаток незапертой нуклеиновой кислоты (UNA), мономер фосфородиамидатморфолино олигомера (PMO), мономер пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), остаток 2'-О-метил (2'-OMe), 2'-О-метоксиэтильный остаток,

2'-дезоксидезокси-2'-фторо остаток, 2'-О-метокси этил/фосфоротиоатный остаток, фосфорамидат, фосфородиамидат, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфонокарбоновую кислоту, фосфонокарбонксилат, фосфоноуксусную кислоту, фосфономуравьиную кислоту, метил фосфонат, фосфонат бора или О-метилфосфоамидит. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает остаток бициклической нуклеиновой кислоты (BNA). В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой запертую нуклеиновую кислоту (LNA). В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты (BNA) представляет собой остаток затрудненного этила (сEt). В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает остаток незапертой нуклеиновой кислоты (UNA). В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает мономер фосфородиамидатморфолино олигомера (PMO). В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает мономер пептидной нуклеиновой кислоты (PNA). В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает 2'-О-метил (2'-OMe) остаток. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает 2'-О-метоксиэтильный остаток. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает 2'-дезоксидезокси-2'-фторо остаток. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает 2'-О-метокси этил/фосфоротиоатный остаток. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфорамидат. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфородиамидат. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфоротиоат. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфородитиоат. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфонокарбоновую кислоту. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфонокарбонксилат. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфоноуксусную кислоту. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфономуравьиную кислоту.

В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает метил фосфонат. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает фосфонат бора. В вариантах воплощения изобретения олигонуклеотид включает О-метилфосфоамидит.

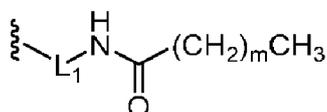
[279] В вариантах воплощения изобретения настоящей заявки, предложены соединения, имеющее структуру Формулы I:



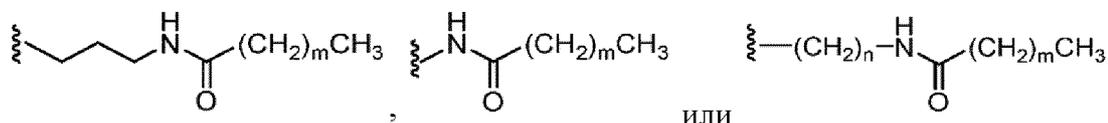
I

или их фармацевтически приемлемая соль, при этом А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный

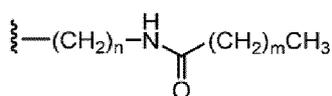
одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид являются конъюгированными с липид-содержащим фрагментом на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида,



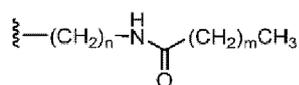
$\text{X}_1$  представляет собой  $\text{---} \text{L}_1 \text{---} \text{N} \text{---} \text{C} \text{---} (\text{CH}_2)_m \text{CH}_3$ , где  $\text{L}_1$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n-$ ,  $-(\text{CH}_2)_n \text{L}_2 (\text{CH}_2)_n-$  или связь;  $\text{L}_2$  представляет собой  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ , и при этом каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 10 до 18, и при этом каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 1 до 6. В вариантах воплощения изобретения  $\text{X}_1$  представляет собой:



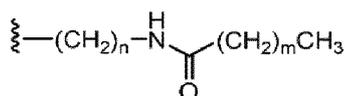
В вариантах воплощения изобретения  $\text{X}_1$  представляет собой



, при этом каждый  $m$  равен 10 и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения

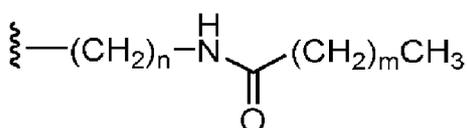


изобретения  $\text{X}_1$  представляет собой , при этом каждый  $m$  равен 11 и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения  $\text{X}_1$  представляет собой

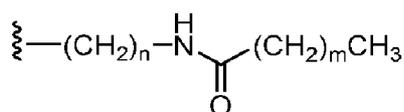


, при этом каждый  $m$  равен 12 и  $n$  равен 3.

В вариантах воплощения изобретения  $\text{X}_1$  представляет собой



, при этом каждый  $m$  равен 13 и  $n$  равен 3. В вариантах



воплощения изобретения  $\text{X}_1$  представляет собой , при этом

каждый  $m$  равен 14 и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения  $\text{X}_1$  представляет

с собой  $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , при этом каждый  $m$  равен 15 и  $n$  равен 3. В вариантах

воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой  $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , при этом каждый  $m$  равен 16 и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет

с собой  $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , при этом каждый  $m$  равен 17 и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой

$\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , при этом каждый  $m$  равен 18 и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой

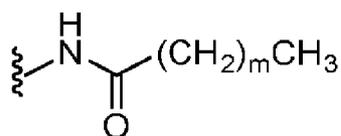
$\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , и каждый  $m$  равен 10. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой

$\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , и каждый  $m$  равен 11. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой

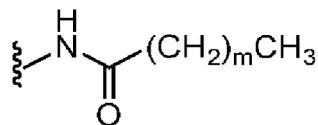
$\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , и каждый  $m$  равен 12. В вариантах воплощения

изобретения  $X_1$  представляет собой  $\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , и каждый  $m$  равен 13. В

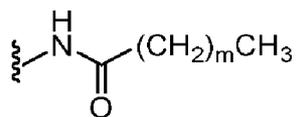
вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой  $\text{---N}(\text{H})\text{---C}(\text{O})\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$  , и каждый  $m$  равен 14. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой



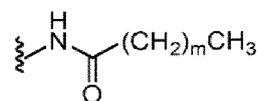
и каждый  $m$  равен 15. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$



представляет собой и каждый  $m$  равен 16. В вариантах воплощения

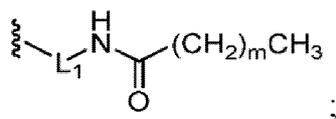


изобретения  $X_1$  представляет собой и каждый  $m$  равен 17. В

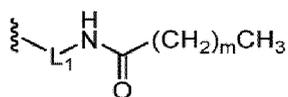


вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой и каждый  $m$  равен 18.

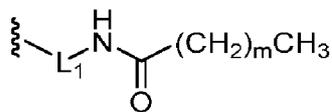
**[0280]** В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой



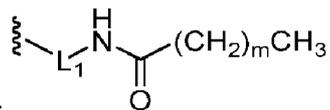
$L_1$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_3\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_5-$  и каждый  $m$  равен 10. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой



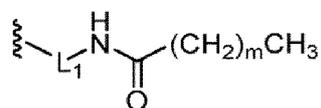
$L_1$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_3\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_5-$  и каждый  $m$  равен 11. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$



представляет собой  $L_1$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_3\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_5-$  и каждый  $m$  равен 12. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$



представляет собой  $L_1$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_3\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_5-$  и каждый  $m$  равен 13. В вариантах воплощения изобретения  $X_1$  представляет собой

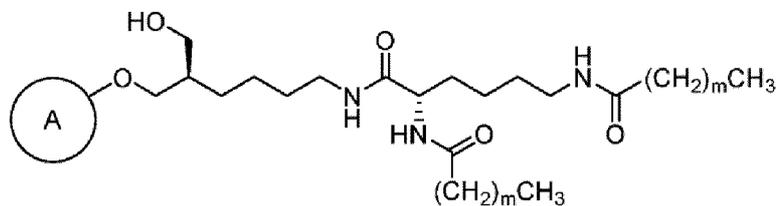


$L_1$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_3\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_5-$  и каждый  $m$  равен



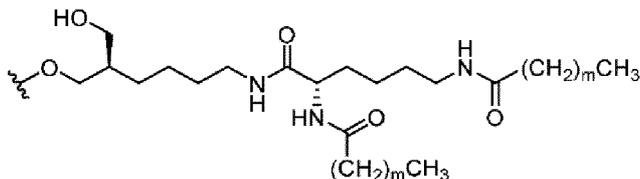
представляет собой целое число 12-14. В вариантах воплощения изобретения  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_3C(=O)NH(CH_2)_s-$ ; и каждый  $m$  равен 14. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 14.

[282] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложены соединения, имеющие структуру Формулы Ia:



Ia

или их фармацевтически приемлемая соль, при этом **A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид являются конъюгированными с липид-содержащим фрагментом на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, и при этом  $m$  равен целому числу от 10 до 18. Часть вышеприведенной Формулы Ia, представленная формулой:

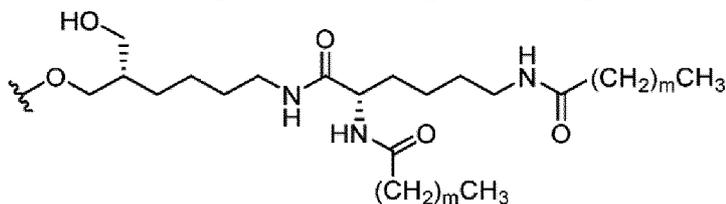


является частью липид-содержащего фрагмента Формулы Ia.

[283] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложены соединения, имеющие структуру Формулы Ib:

set

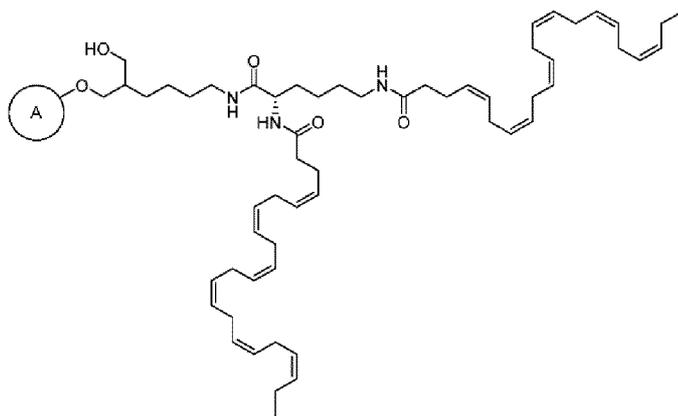
или их фармацевтически приемлемая соль, при этом **A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид являются конъюгированными с липид-содержащим фрагментом на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, и при этом  $m$  равен целому числу от 10 до 18. Часть вышеприведенной Формулы Ib, представленная формулой:



является частью липид-содержащего фрагмента Формулы Ib.

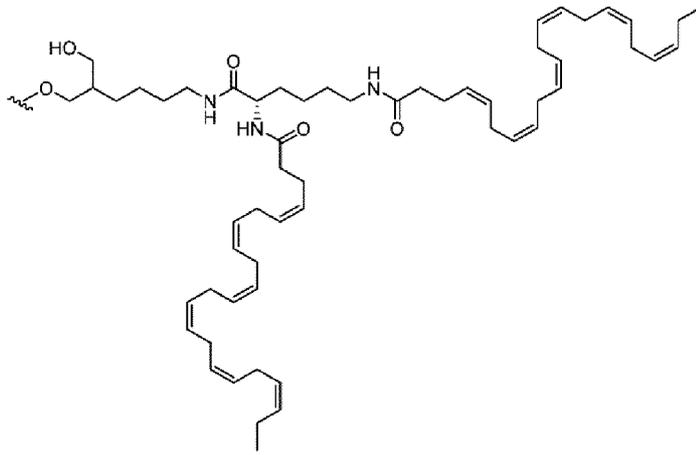
[284] В вариантах воплощения соединений, имеющих структуры Формул I, Ia или Ib, каждый  $m$  равен целому числу от 12 до 16. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен целому числу от 12 до 14. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 10,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 11,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 12,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 13,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 14,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 15,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 16,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 17,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения каждый  $m$  равен 18,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[285] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы II:



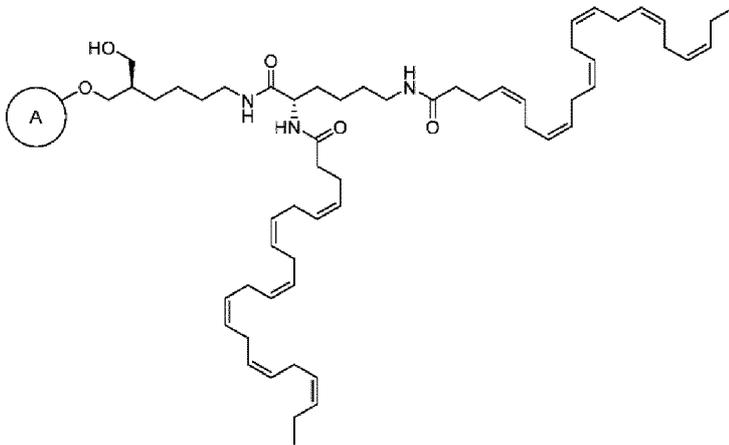
II

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом A представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида. Часть вышеприведенной Формулы II, представленная формулой:



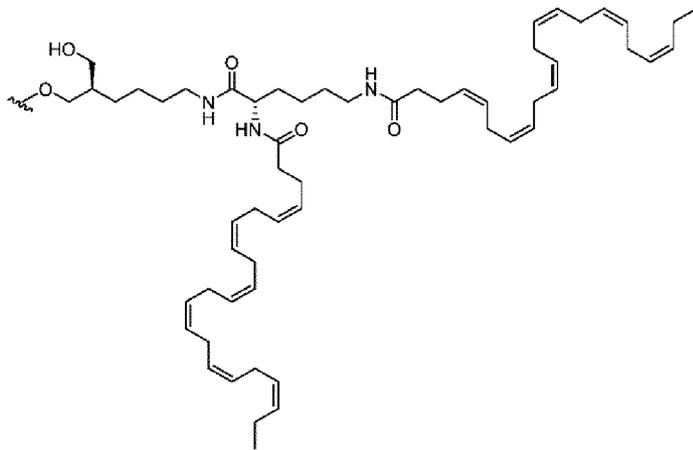
является частью липид-содержащего фрагмента Формулы II.

[286] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы IIIa:



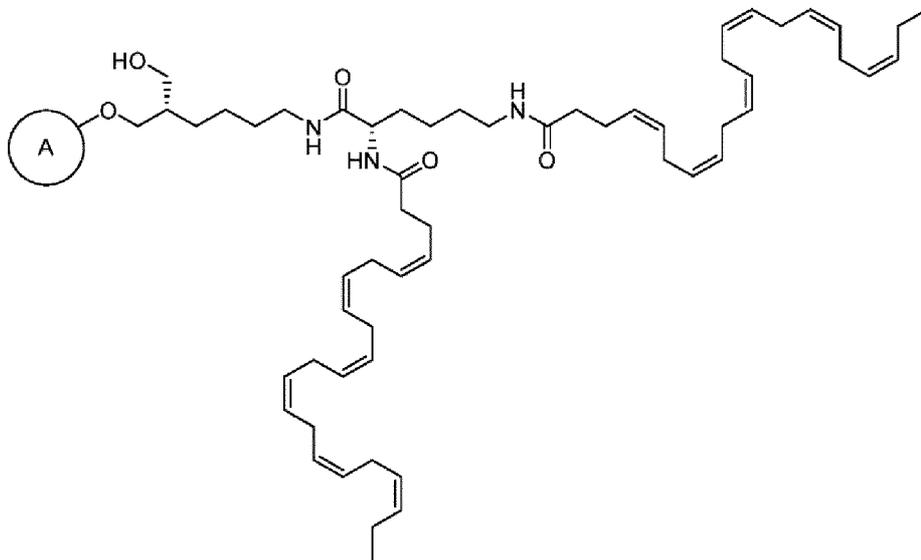
IIIa

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом **A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида. Часть вышеприведенной Формулы IIIa, представленная формулой:



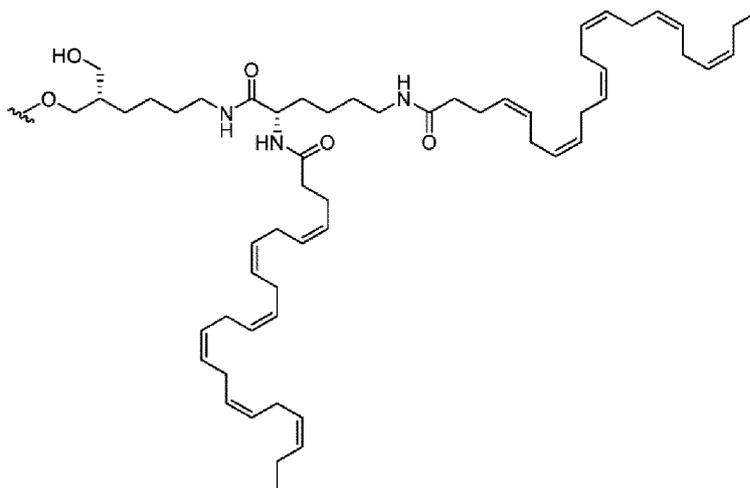
является частью липид-содержащего фрагмента Формулы Па.

[287] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы Пб:



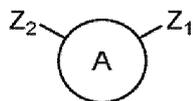
**Пб**

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом **А** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида. Часть вышеприведенной Формулы Пб, представленная формулой:



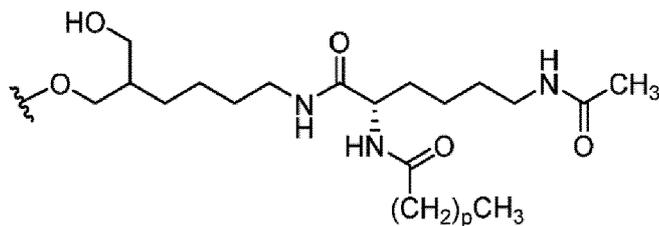
является частью липид-содержащего фрагмента Формулы **IIb**.

[288] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы **III**:

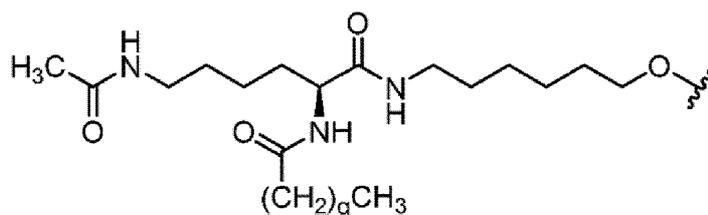


### III

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом **A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с  $Z_1$  на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, где  $Z_1$  представляет собой

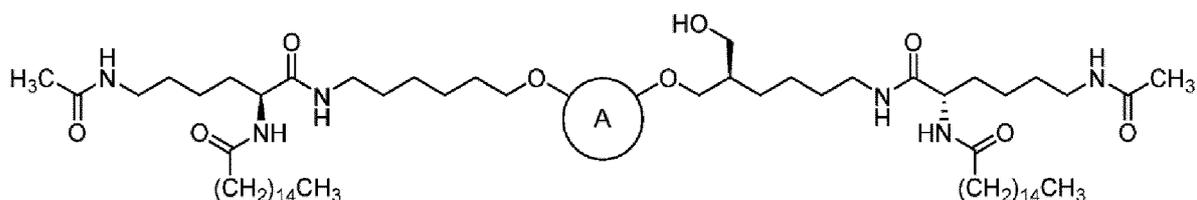


при этом **p** равно целому числу от 10 до 18, и при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с  $Z_2$  на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, где  $Z_2$  представляет собой



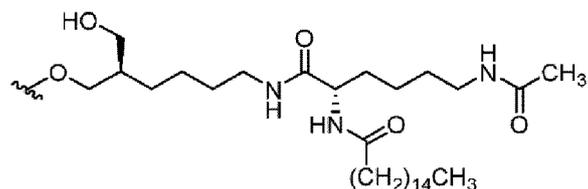
при этом  $q$  равно целому числу от 10 до 18. В вариантах воплощения  $p$  равно 14 и  $q$  равно 14.

[289] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы IIIa:



IIIa

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом **A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован



с липид-конъюгированным соединением

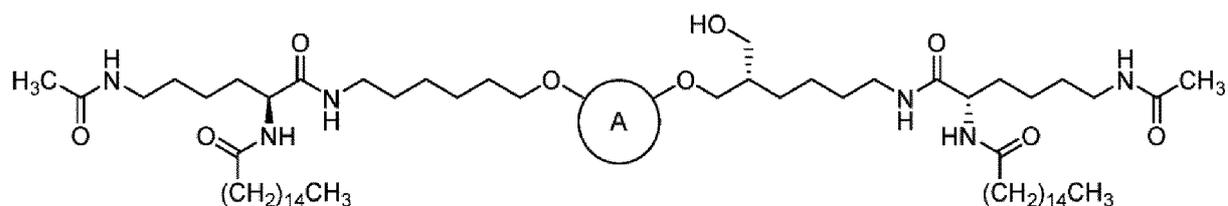
на 3'

конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, и при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным фрагментом



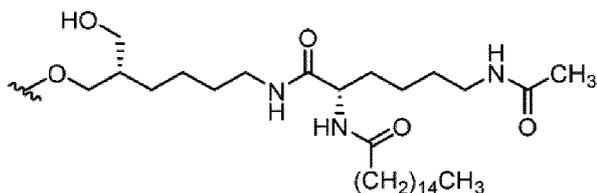
на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида.

[290] В вариантах воплощения настоящего изобретения предложено липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы IIIb:

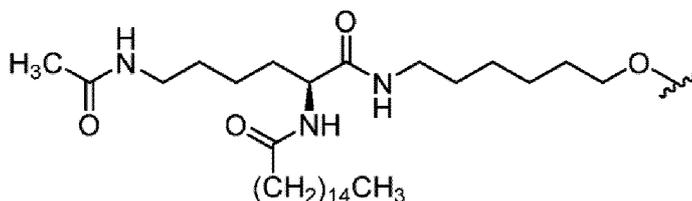


IIIb

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом



на 3' конце модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, и при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным фрагментом



на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида.

[291] В вариантах воплощения изобретения L<sub>1</sub> представляет собой связь, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sub>1</sub> представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12

членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L_1$  представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), или замещенный (например, замещенный группой-заместителем, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L_1$  представляет собой незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный). В вариантах воплощения изобретения, если  $L_1$  замещен,  $L_1$  замещен, например, группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если  $L_1$  замещен,  $L_1$  замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если  $L_1$  замещен,  $L_1$  замещен группой-низшим заместителем.

[292] В вариантах воплощения изобретения  $L_1$  представляет собой связь. В вариантах воплощения изобретения  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  или  $-(CH_2)_nL_2(CH_2)_n-$ . В вариантах воплощения изобретения  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$ . В вариантах воплощения изобретения  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_nL_2(CH_2)_n-$ . В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 1-6. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 1-5. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 1-4. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 1-3. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 1-2. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 1. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 2. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 3. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 4. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 5. В вариантах воплощения изобретения  $n$  равен 6.

[293] В вариантах воплощения изобретения каждое появление  $n$  (т.е.  $n'$  и  $n''$ ) может быть одинаковым или различным. В вариантах воплощения изобретения каждое появление (т.е.  $n'$  и  $n''$ ) может быть одинаковым. В вариантах воплощения изобретения каждое появление  $n$  (т.е.  $n'$  и  $n''$ ) может быть различным. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 1-6. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 1-5. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 1-4. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 1-3. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 1-2. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 1. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 2. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 3. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 4. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 5. В вариантах воплощения изобретения  $n'$  представляет собой 6. В вариантах воплощения изобретения  $n''$  представляет собой 1-6. В вариантах воплощения изобретения  $n''$  представляет собой 1-5. В вариантах воплощения изобретения  $n''$  представляет собой 1-4. В вариантах воплощения изобретения  $n''$  представляет собой 1-3. В вариантах воплощения изобретения  $n''$

представляет собой 1-2. В вариантах воплощения изобретения n" представляет собой 1. В вариантах воплощения изобретения n" представляет собой 2. В вариантах воплощения изобретения n" представляет собой 3. В вариантах воплощения изобретения n" представляет собой 4. В вариантах воплощения изобретения n" представляет собой 5. В вариантах воплощения изобретения n" представляет собой 6.

[294] В вариантах воплощения изобретения m равен 10-18. В вариантах воплощения изобретения m равен 10-17. В вариантах воплощения изобретения m равен 10-16. В вариантах воплощения изобретения m равен 10-15. В вариантах воплощения изобретения m равен 10-14. В вариантах воплощения изобретения m равен 10-13. В вариантах воплощения изобретения m равен 10-12. В вариантах воплощения изобретения m равен 10-11. В вариантах воплощения изобретения m равен 10. В вариантах воплощения изобретения m равен 11. В вариантах воплощения изобретения m равен 12. В вариантах воплощения изобретения m равен 13. В вариантах воплощения изобретения m равен 14. В вариантах воплощения изобретения m равен 15. В вариантах воплощения изобретения m равен 16. В вариантах воплощения изобретения m равен 17. В вариантах воплощения изобретения m равен 18.

[295] В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -C(=O)NH-, -C(=O)O-, -OC(=O)O-, -NHC(=O)O-, -NHC(=O)NH-, -C(=S)NH-, -C(=O)S-, -NH-, O (кислород) или S (сера). В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -C(=O)NH-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -C(=O)O-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -OC(=O)O-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -NHC(=O)O-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -NHC(=O)NH-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -C(=S)NH-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -C(=O)S-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой -NH-. В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой O (кислород). В вариантах воплощения изобретения L<sub>2</sub> представляет собой S (сера).

[296] L<sup>3</sup> независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-

6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>3</sup> независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>3</sup> независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>3</sup> замещен, L<sup>3</sup>, например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>3</sup> замещен, L<sup>3</sup> замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>3</sup> замещен, L<sup>3</sup> замещен группой-низшим заместителем.

[297] L<sup>4</sup> независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-





(например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^5$  независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если  $L^5$  замещен,  $L^5$ , например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^5$  замещен,  $L^5$  замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^5$  замещен,  $L^5$  замещен группой-низшим заместителем.

[299]  $L^{5A}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^{5A}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8

членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>5A</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5A</sup> замещен, L<sup>5A</sup>, например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5A</sup> замещен, L<sup>5A</sup> замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5A</sup> замещен, L<sup>5A</sup> замещен группой-низшим заместителем.

[300] L<sup>5B</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например,

замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^{5B}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^{5B}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{5B}$  замещен,  $L^{5B}$ , например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{5B}$  замещен,  $L^{5B}$  замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{5B}$  замещен,  $L^{5B}$  замещен группой-низшим заместителем.

[301]  $L^{5C}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6





(например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5D</sup> замещен, L<sup>5D</sup>, например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5D</sup> замещен, L<sup>5D</sup> замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5D</sup> замещен, L<sup>5D</sup> замещен группой-низшим заместителем.

[303] L<sup>5E</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>5E</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями,

ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>5E</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5E</sup> замещен, L<sup>5E</sup>, например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5E</sup> замещен, L<sup>5E</sup> замещен ограниченной размер группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>5E</sup> замещен, L<sup>5E</sup> замещен группой-низшим заместителем.

[304] L<sup>6</sup> независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размер группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>6</sup> независимо представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -



размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^{6A}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^{6A}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{6A}$  замещен,  $L^{6A}$ , например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{6A}$  замещен,  $L^{6A}$  замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{6A}$  замещен,  $L^{6A}$  замещен группой-низшим заместителем.

[306]  $L^{6B}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-



членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6B</sup> замещен, L<sup>6B</sup>, например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6B</sup> замещен, L<sup>6B</sup> замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6B</sup> замещен, L<sup>6B</sup> замещен группой-низшим заместителем.

[307] L<sup>6C</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>6C</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен

(например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>6C</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6C</sup> замещен, L<sup>6C</sup>, например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6C</sup> замещен, L<sup>6C</sup> замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6C</sup> замещен, L<sup>6C</sup> замещен группой-низшим заместителем.

[308] L<sup>6D</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>6D</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-

низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения L<sup>6D</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6D</sup> замещен, L<sup>6D</sup>, например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6D</sup> замещен, L<sup>6D</sup> замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если L<sup>6D</sup> замещен, L<sup>6D</sup> замещен группой-низшим заместителем.

[309] L<sup>6E</sup> представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкилен (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или

незамещенный арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^{6E}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), замещенный (например, замещенный группой-заместителем, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения  $L^{6E}$  представляет собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), незамещенный гетероалкилен (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкилен (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), незамещенный гетероциклоалкилен (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный или 5-6 членный), незамещенный арилен (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или незамещенный гетероарилен (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{6E}$  замещен,  $L^{6E}$ , например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{6E}$  замещен,  $L^{6E}$  замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если  $L^{6E}$  замещен,  $L^{6E}$  замещен группой-низшим заместителем.

[310] В вариантах воплощения изобретения  $L^7$  независимо представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкилен (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ). В вариантах воплощения изобретения  $L^7$  независимо представляет собой замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-











C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный разветвленный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный разветвленный насыщенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный разветвленный ненасыщенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил. В вариантах воплощения изобретения R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный неразветвленный ненасыщенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил.

[328] В вариантах воплощения изобретения R<sup>3</sup> представляет собой водород, -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, -C(O)H, -C(O)NH<sub>2</sub>, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)OH, -OC(O)H, -N<sub>3</sub>, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероалкил (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный циклоалкил (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный гетероциклоалкил (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) или незамещенный арил (например, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем), или незамещенный гетероарил (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения R<sup>3</sup> представляет собой водород, -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, -C(O)H, -C(O)NH<sub>2</sub>, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)OH, -OC(O)H, -N<sub>3</sub>, замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероалкил (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) циклоалкил (например, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероциклоалкил (например,

3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) арил (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или замещенный (например, замещенный группами-заместителями, ограниченной размером группой-заместителем или группой-низшим заместителем) гетероарил (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный).

В вариантах воплощения изобретения  $R^3$  представляет собой водород,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-C(O)H$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)OH$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-OC(O)H$ ,  $-N_3$ , незамещенный алкил (например,  $C_1-C_{20}$ ,  $C_1-C_{12}$ ,  $C_1-C_8$ ,  $C_1-C_6$ ,  $C_1-C_4$  или  $C_1-C_2$ ), незамещенный гетероалкил (например, 2-20 членный, 2-12 членный, 2-8 членный, 2-6 членный, 4-6 членный, 2-3 членный или 4-5 членный), незамещенный циклоалкил (например,  $C_3-C_{10}$ ,  $C_3-C_8$ ,  $C_3-C_6$ ,  $C_4-C_6$  или  $C_5-C_6$ ), незамещенный гетероциклоалкил (например, 3-10 членный, 3-8 членный, 3-6 членный, 4-6 членный, 4-5 членный или 5-6 членный), незамещенный арил (например,  $C_6-C_{12}$ ,  $C_6-C_{10}$  или фенил), или незамещенный гетероарил (например, 5-12 членный, 5-10 членный, 5-9 членный или 5-6 членный). В вариантах воплощения изобретения, если  $R^3$  замещен,  $R^3$ , например, замещен группами-заместителями. В вариантах воплощения изобретения, если  $R^3$  замещен,  $R^3$  замещен ограниченной размером группой-заместителем. В вариантах воплощения изобретения, если  $R^3$  замещен,  $R^3$  замещен группой-низшим заместителем.

[329] В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит мотив, описанный в настоящей заявке, в том числе в любых аспектах, вариантах воплощения изобретения, формуле изобретения, фигурах (например, ФИГ. 1-83, особенно ФИГ. 1-12 и ФИГ. 80-83), таблицах (например, Таблице 1), примерах или схемах (например, схемах I, II и III). В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит мотив, выбранный из любого из мотивов в Таблице 1, приведенной ниже. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-01 мотив, приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-03 мотив, приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-06 мотив, приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-07 мотив, приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-08 мотив, приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-09 мотив, приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-11 мотив, приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-









приведенный в Таблице 1. В вариантах воплощения изобретения липидно-модифицированное соединение нуклеиновой кислоты содержит DTx-01-101 мотив, приведенный в Таблице 1.

[330] В вариантах воплощения соединений, имеющих структуру Формул **I, Ia, Ib, II, Pa, Pb, III, Ша или Шб**, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на любом из его 3' концов с липид-содержащей частью фрагмента соединения. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 3' конце его направляющей цепи с липид-содержащей частью фрагмента. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 3' конце его сопровождающей цепи с липид-содержащей частью фрагмента.

[331] В вариантах воплощения соединений, имеющих структуру Формул **I, Ia, Ib, II, Pa, Pb, III, Ша или Шб**, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на любом из его 5' концов с липид-содержащей частью фрагмента соединения. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 5' конце его направляющей цепи с липид-содержащей частью фрагмента. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 5' конце его сопровождающей цепи с липид-содержащей частью фрагмента.

[332] В вариантах воплощения соединений, имеющих структуру Формул **I, Ia, Ib, II, Pa или Pb**, конъюгация на 3' конце происходит через фосфодиэфирную связь. В вариантах воплощения соединений, имеющих структуру Формул **I, Ia, Ib, II, Pa или Pb**, конъюгация на 5' конце происходит через фосфодиэфирную связь.

[333] В вариантах воплощения Формул **III, Ша или Шб** А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид,  $Z_1$  конъюгирован на 3' конце сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида, и  $Z_2$  конъюгирован на 5' конце сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида.

[334] В вариантах воплощения Формул **III, Ша или Шб** А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид,  $Z_1$  конъюгирован на 3' конце направляющей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида, и  $Z_2$  конъюгирован на 5' конце сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида.

[335] В вариантах реализации изобретения, в данной заявке представлены способы введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в клетку *in vitro* путем введения клетки в условиях несвязанного поглощения в контакт с липид-конъюгированным соединением Формул **I, Ia, Ib, II, Pa, Pb, III, Ша или Шб**, или его соответствующей фармацевтически приемлемой солью. В вариантах воплощения изобретения соединение находится в прямом контакте с клеткой. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку млекопитающего. В вариантах воплощения

изобретения клетка представляет собой человеческую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой мышиную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой фибробластную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку NIH3T3. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку почки. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку HEK293. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой эндотелиальную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку HUVEC. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой жировую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой дифференцированную 3T3L1 клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой макрофагальную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку RAW264.7. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой нейронную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой первичный крысиный нейрон. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку SH-SY5Y. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой мышечную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку трабекулярной сетки. В вариантах воплощения изобретения клетка может быть получена из иммортализованной линии клеток. В вариантах воплощения изобретения клетка может быть получена из первичных клеток. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой жировую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой человеческую жировую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку печени. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой человеческую клетку печени. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой Т клетку.

[336] В вариантах воплощения изобретения настоящей заявки, предложены способы введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в клетку *in vivo* путем интравитреальной инъекции липид-конъюгированного соединения **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb** или его соответствующей фармацевтически приемлемой соли. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку глаза. В вариантах воплощения изобретения глазная клетка представляет собой фоторецептор, биполярную клетку, ганглиозную клетку, горизонтальную клетку, амакриновую клетку, эпителиальную клетку роговицы, клетку эндотелия роговицы, клетку стромы роговицы. В вариантах воплощения изобретения клетка эпителия кишечника представляет собой базальную клетку, крылатую клетку или плоскоклеточную клетку.

[337] В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложены способы введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в клетку *in vivo* путем интратекального введения. В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложены способы введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в клетку путем

внутрижелудочкового введения.

[338] В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложены способы введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в клетку *in vivo* путем контактного системного введения липид-конъюгированного соединения **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb, или** его соответствующей фармацевтически приемлемой соли.

[339] В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложены способы введения любого из липид-конъюгированных соединений **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb, или** его фармацевтически приемлемой соли, в клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка находится *in vitro*. В вариантах воплощения изобретения клетка находится *ex vivo*. В вариантах воплощения изобретения клетка находится *in vivo*.

[340] В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложены способы введения субъекту любого из липид-конъюгированных соединений **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb, или** его соответствующей фармацевтически приемлемой соли. Субъект может иметь заболевание или расстройство глаза, мозга, печени, почек, сердца, жировой ткани, легких, мышц или селезенки.

[341] В вариантах воплощения изобретения заболеванием или нарушением глаз является блефарит, катаракта, халязион, конъюнктивит, диабетическая ретинопатия, сухой глаз, глаукома, кератит, кератоконус, дегенерация желтого пятна, глазная аллергия, глазная гипертензия, пингвекула, пресбиопия, птериgium, ретинобластома, субконъюнктивальное кровоизлияние или увеит.

[342] В вариантах воплощения изобретения заболеванием или нарушением является неврологическое заболевание или нарушение, метаболическое заболевание или нарушение, воспалительное заболевание или нарушение. В вариантах воплощения изобретения у субъекта имеется рак.

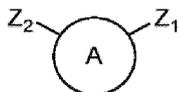
[343] В любом из вариантов воплощения изобретения, связанных с введением *in vivo* или субъекту, введение представляет собой системное введение, которое может включать без ограничений подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение и пероральное введение. В любом из вариантов воплощения изобретения, связанных с введением *in vivo* или субъекту, введение является местным, что может включать без ограничений интравитреальное введение, интратекальное введение и внутрижелудочковое введение.

[344] В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложен способ введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида *ex vivo*, включающий контактирование клетки с соединением **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb, или** его соответствующей фармацевтически приемлемой соли в условиях несвязанного поглощения. В вариантах воплощения изобретения клетки представляют собой нейроны, ТВМ клетки, скелетные мышечные клетки, жировые клетки или клетки печени.

[345] В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложена клетка, содержащая соединение, имеющее структуру **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb, или** его соответствующую фармацевтически приемлемую соль. В вариантах воплощения

изобретения клетка представляет собой клетку млекопитающего. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой человеческую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой мышиную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой фибробластную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку NIH3T3. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку почки. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку HEK293. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой эндотелиальную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку HUVEC. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой жировую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой дифференцированную клетку 3T3L1. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой макрофагальную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку RAW264.7. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой нейронную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой первичный крысиный нейрон. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку SH-SY5Y. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой мышечную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку трабекулярной сетки. В вариантах воплощения изобретения клетка может быть получена из иммортализованной линии клеток. В вариантах воплощения изобретения клетка может быть получена из первичных клеток. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой жировую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой человеческую жировую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой клетку печени. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой человеческую клетку печени. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой первичную человеческую жировую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой первичную HUVEC клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой первичную человеческую клетку печени.

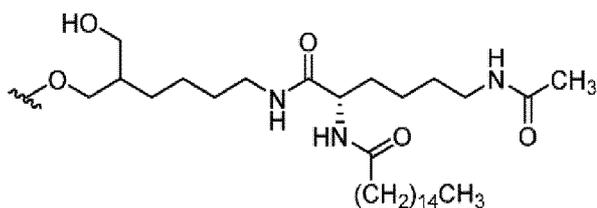
[346] В вариантах воплощения изобретения клетка содержит соединение, имеющее структуру Формулы III:



### III

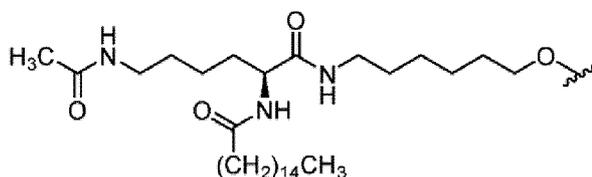
или его фармацевтически приемлемую соль, при этом А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный

олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с  $Z_1$  на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, при этом  $Z_1$  представляет собой

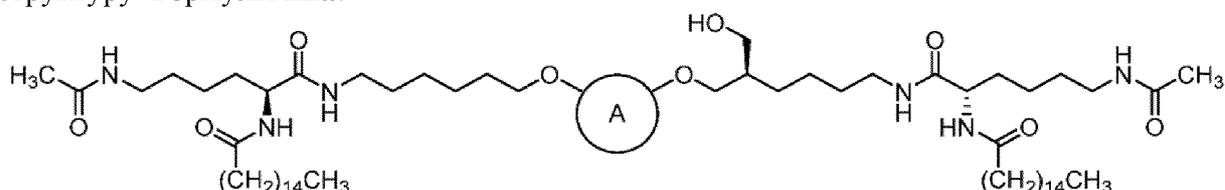


и

при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с  $Z_2$  на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, при этом  $Z_2$  представляет собой

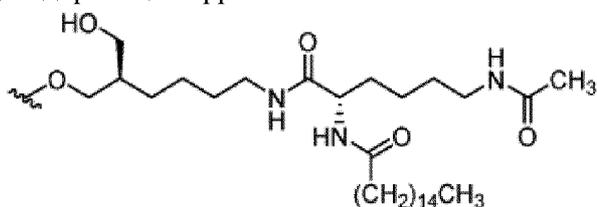


[0347] В вариантах воплощения изобретения клетка содержит соединение, имеющее структуру Формулы IIIa:

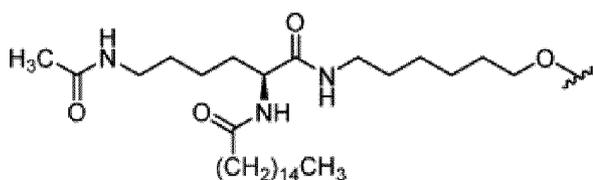


IIIa

или его фармацевтически приемлемую соль, при этом  $A$  представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом

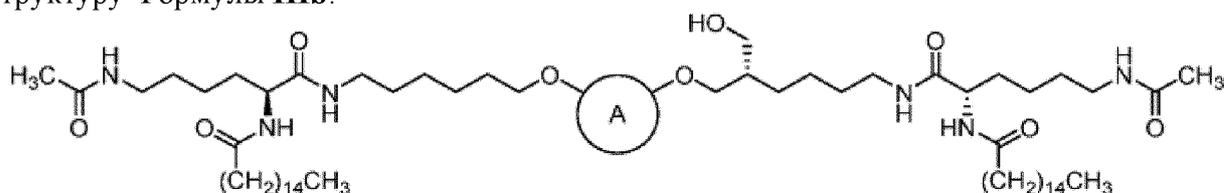


на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным фрагментом



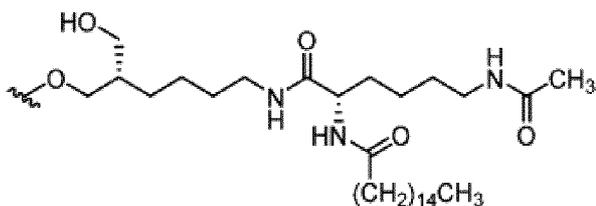
на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида.

[0348] В вариантах воплощения изобретения клетка содержит соединение, имеющее структуру Формулы IIIb:

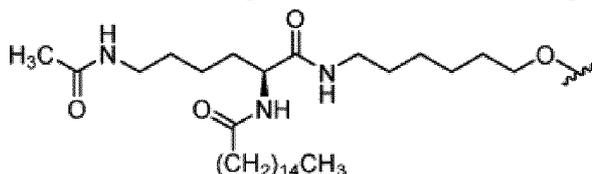


IIIb

или его фармацевтически приемлемую соль, при этом А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом



на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, и при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным фрагментом



на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида.

[349] В вариантах воплощения клетки, содержащей соединение, имеющее структуру Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb, клетка представляет собой клетку млекопитающего. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой человеческую клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой эндотелиальную клетку. В вариантах воплощения изобретения клетка представляет собой HUVEC клетку.

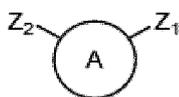
[350] В вариантах воплощения клетки, содержащей соединение, имеющее структуру **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb**, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на любом из его 3' концов с липид-содержащей частью фрагмента соединения. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 3' конце его направляющей цепи с липид-содержащей частью фрагмента. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 3' конце его сопровождающей цепи с липид-содержащей частью фрагмента.

[351] В вариантах воплощения клетки, содержащей соединение, имеющее структуру **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb**, конъюгация происходит через фосфодиэфирную связь.

[352] В вариантах воплощения клетки, содержащей соединение, имеющее структуру **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb**, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на любом из его 5' концов с липид-содержащей частью фрагмента соединения. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 5' конце его направляющей цепи с липид-содержащей частью фрагмента. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 5' конце его сопровождающей цепи с липид-содержащей частью фрагмента.

[353] В вариантах воплощения клетки, содержащей соединение, имеющее структуру **Формул I, Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb**, конъюгация происходит через фосфодиэфирную связь.

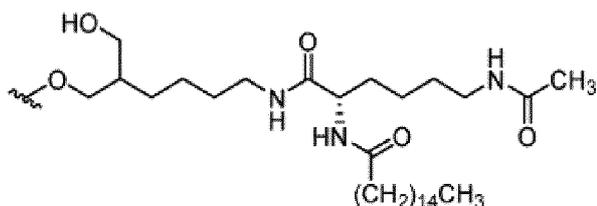
[354] В вариантах реализации изобретения, в данной заявке представлены способы введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены, клетку NIH3T3, клетку RAW264.7, клетку HEK293 или клетку SH-SY5Y *in vitro*, включающие приведение клетки в условиях несвязанного поглощения в контакт с соединением, имеющим структуру **Формулы Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa или IIIb**, или его соответствующей фармацевтически приемлемой солью. В вариантах реализации способа, соединение может представлять собой:



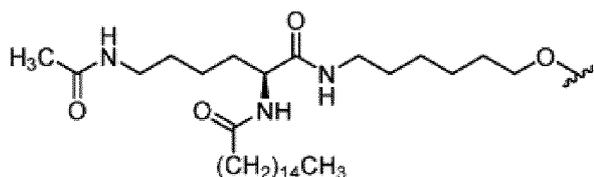
### III

или его фармацевтически приемлемую соль, при этом **A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с **Z<sub>1</sub>** на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, при этом **Z<sub>1</sub>** представляет

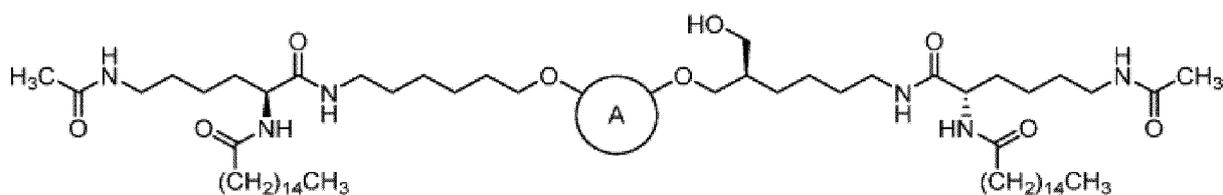
собой



и при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с  $Z_2$  на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, при этом  $Z_2$  представляет собой

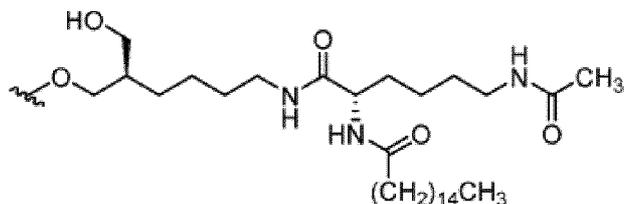


[355] В вариантах воплощения способа соединение может представлять собой:

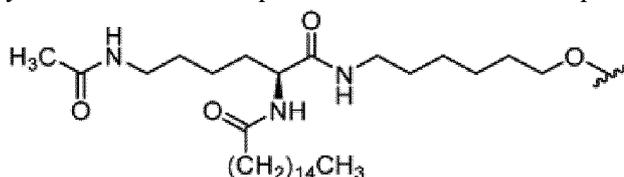


**IIIa**

или его фармацевтически приемлемую соль, при этом **A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом

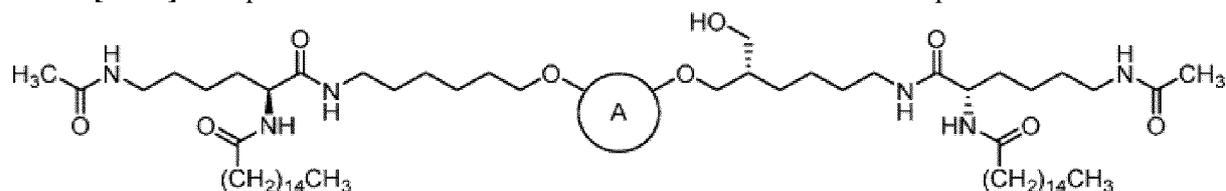


на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, и при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным фрагментом

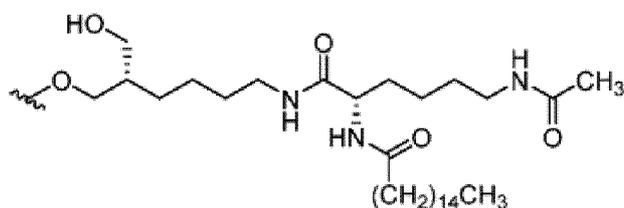


на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида.

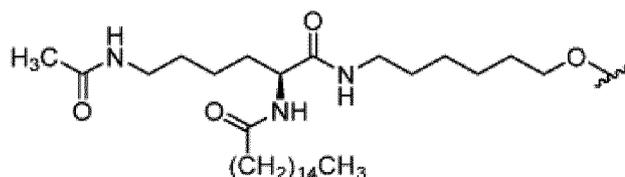
[0356] В вариантах воплощения способа соединения может представлять собой:



или его фармацевтически приемлемую соль, при этом А представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным фрагментом



на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, и при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным фрагментом



на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида.

[357] В вариантах реализации способов введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены, клетку NIH3T3, клетку RAW264.7, клетку HEK293 или клетку SH-SY5Y *in vitro*, включающих приведение клетки в условиях несвязанного поглощения в контакт с соединением, имеющим структуру Формулы III, Ша, или IIIb, где модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на любом из его 3' концов с липид-содержащей частью фрагмента соединения. В вариантах реализации изобретения, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 3' конце его направляющей цепи с липид-содержащей частью фрагмента. В вариантах реализации изобретения, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 3'

конце его сопровождающей цепи с липид-содержащей частью фрагмента.

[358] В вариантах реализации способов введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены, клетку NIH3T3, клетку RAW264.7, клетку HEK293 или клетку SH- SY5Y *in vitro*, включающих приведение клетки в условиях несвязанного поглощения в контакт с соединением, имеющим структуру **Формулы III, IIIa, или IIIb**, конъюгация происходит через фосфодиэфирную связь.

[359] В вариантах реализации способов введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены, клетку NIH3T3, клетку RAW264.7, клетку HEK293 или клетку SH- SY5Y *in vitro*, включающих приведение клетки в условиях несвязанного поглощения в контакт с соединением, имеющим структуру **Формулы III, IIIa, или IIIb**, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на любом из его 5' концов с липид-содержащей частью фрагмента соединения. В вариантах реализации изобретения, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 5' конце его направляющей цепи с липид-содержащей частью фрагмента. В вариантах реализации изобретения, модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид конъюгирован на 5' конце его сопровождающей цепи с липид-содержащей частью фрагмента.

[360] В вариантах реализации способов введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены, клетку NIH3T3, клетку RAW264.7, клетку HEK293 или клетку SH- SY5Y *in vitro*, включающих приведение клетки в условиях несвязанного поглощения в контакт с соединением, имеющим структуру **Формулы III, IIIa, или IIIb**, конъюгация происходит через фосфодиэфирную связь.

[361] В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой малую интерферирующую РНК (миРНК). В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой мимик микроРНК.

[362] В вариантах воплощения изобретения модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид направлен на информационную РНК. В вариантах воплощения изобретения модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид RNaseH, зависимый от RNaseH, для расщепления мРНК, которой он комплементарен. В вариантах воплощения изобретения модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид представляет собой одноцепочечный миРНК. В вариантах воплощения изобретения модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид направлен на микроРНК. В вариантах воплощения изобретения модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид направлен на длинную некодирующую РНК.

[363] В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь. В некоторых таких вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный



неионный каркас.

[365] В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-О-метильный остаток. В вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один 2'-О-метильный остаток присутствует на направляющей цепи, сопровождающей цепи, или как на направляющей цепи, так и на сопровождающей цепи. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-дезоксид-2'-фторо остаток. В вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один 2'-дезоксид-2'-фторо остаток присутствует на направляющей цепи, сопровождающей цепи, или как на направляющей цепи, так и на сопровождающей цепи. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит 2'-О-метил остатка чередующиеся с 2'-дезоксид-2'- фторо остатками. В вариантах воплощения изобретения такие чередующиеся остатки присутствуют на направляющей цепи, сопровождающей цепи, или как на направляющей цепи, так и на сопровождающей цепи. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит три 2'-О-метилных остатка на сопровождающей цепи и три 2'-дезоксид-2'-фторо остатка на направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения каждый остаток в модифицированном двухцепочечном олигонуклеотиде представляет собой либо 2'-О-метил остаток, либо 2'-дезоксид-2'-фторо остаток. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один остаток, при этом рибоза заперта ковалентной связью между 2' и 4' атомами углерода, т.е. остаток представляет собой остаток бициклической нуклеиновой кислоты (BNA). В вариантах воплощения изобретения бициклическая нуклеиновая кислота является остатком запертой нуклеиновой кислоты (LNA). В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой остаток затрудненного этила (сEt), также известного как сEt остаток. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит остаток незапертой нуклеиновой кислоты (UNA). В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит не-рибозный каркас. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA), например сEt, UNA или фосфородиамидат морфолино олигомер (PMO), или их модификацию. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь, содержащую не менее чем 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA), например сEt, UNA или фосфородиамидат морфолино олигомер (PMO), или их модификацию и т.п., или олигонуклеотид может содержать количество ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA), например сEt, UNA или фосфородиамидат

морфолино олигомер (РМО), или их модификацию и т.п. в диапазоне, определенном любым из двух предыдущих значений. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь, содержащую не менее чем 1% и не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4% of 2'-О-метокси этил/фосфоротиоата (МОЕ).

[366] В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой миРНК, содержащую 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой мимик микроРНК, содержащий 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид представляет собой одноцепочечную миРНК, содержащую 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце.

[367] Любые модифицированные одноцепочечные олигонуклеотиды, описанные в настоящей заявке, могут содержать одну или более модификаций нуклеозидных сахаров, выбранных из 2'-О-метокси этильного остатка, остатка бициклической нуклеиновой кислоты, 2'-О-метильного остатка и 2'-фторо остатка. В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой запертую нуклеиновую кислоту. В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой сEt остаток. Любая из модифицированных одноцепочечных нуклеиновых кислот (например, олигонуклеотидов), раскрытых в настоящей заявке, может содержать одну или более фосфоротиоатных связей. В вариантах воплощения изобретения каждая связь модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь.

[368] В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой малую интерферирующую РНК (миРНК). В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой мимик микроРНК.

[369] В вариантах воплощения изобретения одноцепочечный олигонуклеотид направлен на информационную РНК. В вариантах воплощения изобретения одноцепочечный олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид RNaseH, зависимый от RNaseH, для расщепления мРНК, которой он комплементарен. В вариантах воплощения изобретения одноцепочечный олигонуклеотид представляет собой одноцепочечную миРНК. В вариантах воплощения изобретения одноцепочечный олигонуклеотид направлен на микроРНК. В вариантах воплощения изобретения одноцепочечный олигонуклеотид направлен на длинную некодирующую РНК.

[370] В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид



изобретения по меньшей мере один 2'-О-метильный остаток присутствует на направляющей цепи, на сопровождающей цепи, или как на направляющей цепи, так и на сопровождающей цепи. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-дезокси-2'-фторо остаток. В вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один 2'-дезокси-2'-фторо остаток присутствует на направляющей цепи, на сопровождающей цепи, или как на направляющей цепи, так и на сопровождающей цепи. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит 2'-О-метильный остаток, чередующийся с 2'-дезокси-2'-фторо остатком. В вариантах воплощения изобретения такие чередующиеся остатки присутствуют на направляющей цепи, на сопровождающей цепи, или как на направляющей цепи, так и на сопровождающей цепи. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит три 2'-О-метильных остатка на сопровождающей цепи и три 2'-дезокси-2'-фторо остатка на направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения каждый остаток в двухцепочечном олигонуклеотиде представляет собой либо 2'-О-метильный остаток, либо 2'-дезокси-2'-фторо остаток. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один остаток, при этом рибоза заперта ковалентной связью между 2' и 4' атомами углерода, т.е. остаток представляет собой остаток бициклической нуклеиновой кислоты (BNA). В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты является запертой нуклеиновой кислотой (LNA). В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой остаток затрудненного этила (сEt), также известного как сEt остаток. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид включает остаток незапертой нуклеиновой кислоты (UNA). В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит не-рибозный каркас. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA), например сEt, UNA или фосфородиамидат морфолино олигомер (PMO), или их модификацию. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь, содержащую не менее чем 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA), например сEt, UNA или фосфородиамидат морфолино олигомер (PMO), или их модификацию и т.п., или олигонуклеотид может содержать количество ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот (LNA), бициклических нуклеиновых кислот (BNA), например сEt, UNA или фосфородиамидат морфолино олигомер (PMO), или их модификацию и т.п. в диапазоне, определенном любым из двух предыдущих значений. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь, содержащую не менее чем 1 и не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4% 2'-О-метокси этил/фосфотиоата (МОЕ).

[373] В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид содержит 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой миРНК, содержащую 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой мимик микроРНК содержащую 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце направляющей цепи. В вариантах воплощения изобретения одноцепочечный олигонуклеотид содержит 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце олигонуклеотида. В вариантах воплощения изобретения одноцепочечный олигонуклеотид представляет собой одноцепочечную миРНК, содержащую 5'-(Е)-винилфосфонатную группу на 5' конце.

[374] Любые одноцепочечные олигонуклеотиды, раскрытые в настоящей заявке, могут содержать одну или более модификаций нуклеозидных сахаров, выбранных из 2'-О-метокси этильных остатков, остатков бициклической нуклеиновой кислоты, 2'-О-метильных остатков и 2'-фторо остатков. В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой остаток запертой нуклеиновой кислоты. В вариантах воплощения изобретения остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой сEt остаток. Любая из одноцепочечных нуклеиновых кислот (например, олигонуклеотидов), раскрытых в настоящей заявке, может содержать одну или более фосфоротиоатных связей. В вариантах воплощения изобретения каждая связь одноцепочечного олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь.

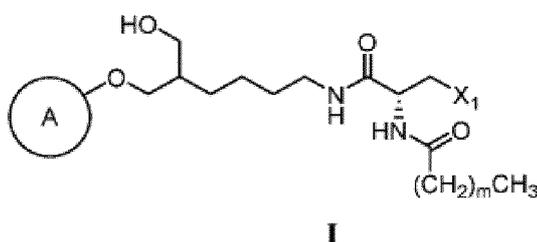
[375] В вариантах воплощения изобретения соединение, как раскрыто и описано в настоящей заявке, может действовать как ингибитор. В вариантах воплощения изобретения соединение, как раскрыто и описано в настоящей заявке, может действовать как ингибитор генной экспрессии. В вариантах воплощения изобретения соединение, как раскрыто и описано в настоящей заявке, может действовать как ингибитор экспрессии белка. В вариантах воплощения изобретения соединение или композиция, содержащая соединение, как раскрыто и описано в настоящей заявке, может действовать как ингибитор генной экспрессии в присутствии активатора генной экспрессии. В вариантах воплощения изобретения соединение, как раскрыто и описано в настоящей заявке, может действовать как ингибитор экспрессии белка в присутствии активатора генной экспрессии. В вариантах воплощения изобретения соединение или композиция, содержащая соединение, как раскрыто и описано в настоящей заявке, может действовать как ингибитор экспрессии белка в присутствии активатора экспрессии белка. В вариантах воплощения изобретения соединение, как раскрыто и описано в настоящей заявке, может действовать как ингибитор *in vitro* или *ex vivo*. В вариантах воплощения изобретения соединение может действовать как ингибитор *in vitro* с использованием первичной клетки. В вариантах воплощения изобретения соединение может действовать как ингибитор *in vitro* с использованием иммортализованной клетки. В вариантах воплощения изобретения соединение может понижать экспрессию или активность на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более, или в

диапазоне, определенном любым из двух предыдущих значений по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора. В вариантах воплощения изобретения соединение может понижать экспрессию или активность на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более, или в диапазоне, определенном любым из двух предыдущих значений по сравнению с контролем в присутствии активатора генной экспрессии. В вариантах воплощения изобретения соединение может понижать экспрессию или активность на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более, или в диапазоне, определенном любым из двух предыдущих значений по сравнению с контролем в присутствии активатора экспрессии белка.

#### Варианты воплощения изобретения

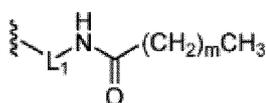
[376] Варианты воплощения Р

[377] **Вариант воплощения Р1.** Липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы I:



или его фармацевтически приемлемая соль, при этом:

**A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным соединением на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида;



**X<sub>1</sub>** представляет собой

**L<sub>1</sub>** представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n-$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{L}_2(\text{CH}_2)_n-$  или связь;

**L<sub>2</sub>** представляет собой  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{C}(=\text{S})\text{NH}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{NH}-$ , O (кислород), S (сера), и при этом каждый **m** независимо представляет собой целое число от 10 до 18, и при этом каждый **n** независимо представляет собой целое число от 1 до 6.

[378] **Вариант воплощения Р2.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Р1, отличающееся тем, что каждый **m** равен 10, **L<sub>1</sub>** представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n-$  и **n** равен 3.

[379] **Вариант воплощения Р3.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Р1, отличающееся тем, что каждый **m** равен 11, **L<sub>1</sub>** представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n-$  и **n** равен 3.

[380] **Вариант воплощения Р4.** Соединение в соответствии с вариантом

воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 12,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[381] **Вариант воплощения P5.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 13,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[382] **Вариант воплощения P6.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 14,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[383] **Вариант воплощения P7.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 15,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[384] **Вариант воплощения P8.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 16,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[385] **Вариант воплощения P9.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 17,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[386] **Вариант воплощения P10.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 18,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[387] **Вариант воплощения P11.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 12 до 16 и каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 1 до 6.

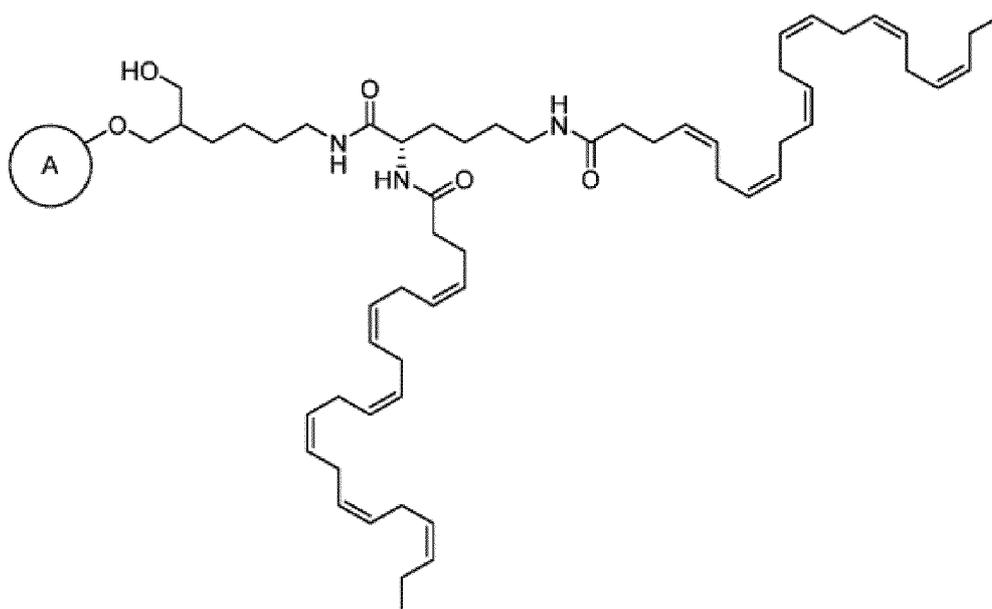
[388] **Вариант воплощения P12.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 12 до 14 и каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 1 до 6.

[389] **Вариант воплощения P13.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что  $L_1$  представляет собой связь и каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 12 до 16.

[390] **Вариант воплощения P14.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P1, отличающееся тем, что  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_3C(=O)NH(CH_2)_5-$  и каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 12 до 16.

[391] **Вариант воплощения P15.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P13 или P14, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 14.

[392] **Вариант воплощения P16.** Липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы II:

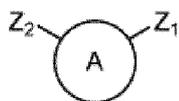


II

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом:

**A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным соединением на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида.

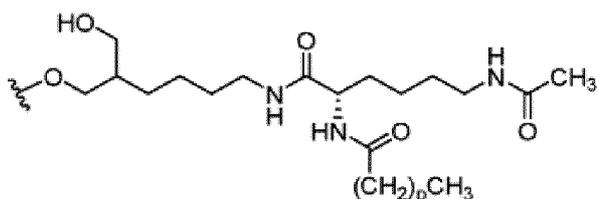
**[0393] Вариант воплощения P17.** Липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы III



III

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом:

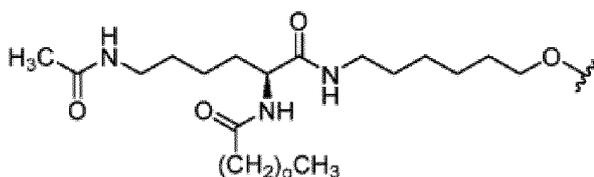
**A** представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с **Z<sub>1</sub>** на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, где **Z<sub>1</sub>** представляет собой



при этом  $p$  равно целому числу от 10 до 18,

и

при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с  $Z_2$  на 5' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 5' конце модифицированного одноцепочечного олигонуклеотида, где  $Z_2$  представляет собой



при этом  $q$  равно целому числу от 10 до 18.

[394] **Вариант воплощения P18.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P17, отличающееся тем, что  $p$  равно 14 и  $q$  равно 14.

[395] **Вариант воплощения P19.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения P1-P18, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь.

[396] **Вариант воплощения P20.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения P1-P19, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-О-метил остаток.

[397] **Вариант воплощения P21.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения P1-P20, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-дезоксидезокси-2'-фторо остаток.

[398] **Вариант воплощения P22.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения P1-P21, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот (LNA), мостиковых нуклеиновых кислот (BNA) или фосфородиамидат морфолино олигомера (PMO), или их модификации.

[399] **Вариант воплощения P23.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P22, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь запертых нуклеиновых кислот (LNA) или их модификации.

[400] **Вариант воплощения P24.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения P22, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид содержит одиночную цепь фосфородиамидат морфолино олигомера

**(РМО) или его модификации.**

[401] **Вариант воплощения P25.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения **P1-P24**, отличающееся тем, что липидный фрагмент присоединен к 3' концу сопровождающей цепи.

[402] **Вариант воплощения P26.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения **P1-P25**, отличающееся тем, что олигонуклеотид содержит не менее чем **60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98** или 99% ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот(LNA), мостиковых нуклеиновых кислот (BNA) или фосфородиамидат морфолино олигомера (РМО), или их модификации, или олигонуклеотид может содержать количество ДНК, миРНК, мРНК, запертых нуклеиновых кислот(LNA), мостиковых нуклеиновых кислот (BNA), или фосфородиамидат морфолино олигомера (РМО), или их модификации в диапазоне, определенном любым из двух предыдущих значений.

[403] **Вариант воплощения P27.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения P1-P25, отличающееся тем, что олигонуклеотид содержит не менее чем 1 и не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4% 2'-О-метокси этил/фосфоротиоата (МОЕ).

[404] **Вариант воплощения P28.** Клетка, содержащая соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения P1-P27.

[405] **Вариант воплощения P29.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения **P28**, отличающаяся тем, что клетка представляет собой первичную клетку.

[406] **Вариант воплощения P30.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения **P29**, отличающаяся тем, что клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены (HUVEC), жировую клетку, макрофагальную клетку, нейронную клетку, мышечную клетку или дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку.

[407] **Вариант воплощения P31.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения P30, отличающаяся тем, что клетка представляет собой человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены.

[408] **Вариант воплощения P32.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения **P28**, отличающаяся тем, что клетка представляет собой иммортализованную клетку.

[409] **Вариант воплощения P33.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения P32, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку ИНЗТЗ, дифференцированную клетку 3T3L1, клетку RAW264.7 или клетку SH-SY5Y.

[410] **Вариант воплощения P34.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения **P28** или **P30**, отличающаяся тем, что клетка представляет собой жировую клетку или клетку печени.

[411] **Вариант реализации P35.** Способ введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида в клетку *in vitro*, включающий приведение клетки в

контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов реализации P1 - P27 в условиях несвязанного поглощения.

[412] **Вариант воплощения P36.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P35, отличающийся тем, что способ проводят *ex vivo* и клетка представляет собой первичную клетку.

[413] **Вариант воплощения P37.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P36, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены (HUVEC), жировую клетку, макрофагальную клетку, нейронную клетку, крысиный нейрон, мышечную клетку или дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку.

[414] **Вариант воплощения P38.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P36, отличающийся тем, что клетка представляет собой человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены.

[415] **Вариант воплощения P39.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P35, отличающийся тем, что клетка представляет собой иммортализованную клетку.

[416] **Вариант воплощения P40.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P39, отличающийся тем, что клетка представляет собой клетку ИНЗТЗ, дифференцированную клетку 3T3L1, клетку RAW264.7 или клетку SH-SY5Y.

[417] **Вариант воплощения P41.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P35 или P37, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку или клетку печени.

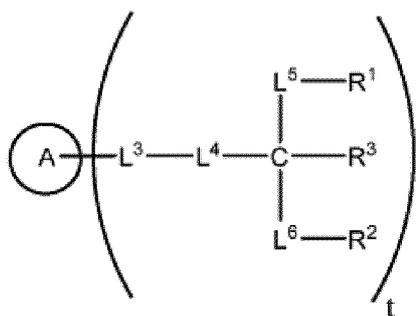
[418] **Вариант реализации P42.** Способ введения модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида *ex vivo*, включающий: получение клеток; и приведение клеток в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов реализации P1 - P27 в условиях несвязанного поглощения.

[419] **Вариант воплощения P43.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P42, отличающийся тем, что клетки представляют собой нейроны, клетки ТВМ, скелетные мышечные клетки, жировые клетки или клетки печени.

[420] **Вариант воплощения P44.** Способ в соответствии с вариантом воплощения P42, отличающийся тем, что клетки представляют собой человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены.

[421] Варианты воплощения Q

[422] **Вариант воплощения Q1.** Соединение имеющее структуру:



при этом

A представляет собой олигонуклеотид;

$L^3$  и  $L^4$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен;

$L^5$  представляет собой -L<sup>5A</sup>-L<sup>5B</sup>-L<sup>5C</sup>-L<sup>5D</sup>-L<sup>5E</sup>-;

$L^6$  представляет собой -L<sup>6A</sup>-L<sup>6B</sup>-L<sup>6C</sup>-L<sup>6D</sup>-L<sup>6E</sup>-;

$L^{5A}$ ,  $L^{5B}$ ,  $L^{5C}$ ,  $L^{5D}$ ,  $L^{5E}$ ,  $L^{6A}$ ,  $L^{6B}$ ,  $L^{6C}$ ,  $L^{6D}$  и  $L^{6E}$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен;

$R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>25</sub> алкил, при этом по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой незамещенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил;

$R^3$  представляет собой водород, -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, -C(O)H, -C(O)NH<sub>2</sub>, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)OH, -OC(O)H, -N<sub>3</sub>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил; и

t равно целому числу от 1 до 5.

[423] **Вариант воплощения Q2.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q1, отличающееся тем, что t равно 1.

[424] **Вариант воплощения Q3.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q1, отличающееся тем, что t равно 2.

[425] **Вариант воплощения Q4.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q1, отличающееся тем, что t равно 3.

[426] **Вариант воплощения Q5.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q4, отличающееся тем, что A представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид или одноцепочечный олигонуклеотид.

[427] **Вариант воплощения Q6.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q5, отличающееся тем, что олигонуклеотид A является

модифицированным.

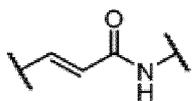
[428] **Вариант воплощения Q7.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q5-Q6, отличающееся тем, что один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

[429] **Вариант воплощения Q8.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q5-Q7, отличающееся тем, что один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

[430] **Вариант воплощения Q9.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q5-Q8, отличающееся тем, что один  $L^3$  присоединен к нуклеотидному основанию двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

[431] **Вариант воплощения Q10.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q9, отличающееся тем, что  $L^3$  и  $L^4$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

[432] **Вариант воплощения Q11.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q10, отличающееся тем, что  $L^3$  независимо представляет собой



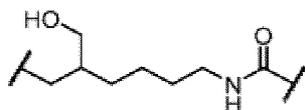
[433] **Вариант воплощения Q12.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q10, отличающееся тем, что  $L^3$  независимо представляет собой -OPO<sub>2</sub>-O-.

[434] **Вариант воплощения Q13.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q10, отличающееся тем, что  $L^3$  независимо представляет собой -O-.

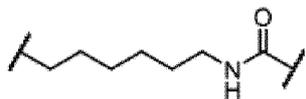
[435] **Вариант воплощения Q14.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q13, отличающееся тем, что  $L^4$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

[436] **Вариант воплощения Q15.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q13, отличающееся тем, что  $L^4$  независимо представляет собой -L<sup>7</sup>-NH-C(O)- или -L<sup>7</sup>-C(O)-NH-, при этом L<sup>7</sup> представляет собой замещенный или незамещенный алкилен.

[437] **Вариант воплощения Q16.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q13, отличающееся тем, что  $L^4$  независимо представляет собой



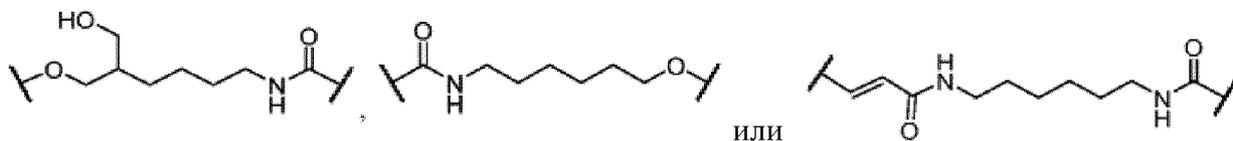
[438] **Вариант воплощения Q17.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q13, отличающееся тем, что  $L^4$  независимо представляет собой



[439] **Вариант воплощения Q18.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q17, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$  или  $-O-L^7-C(O)-NH-$ , при этом  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

[440] **Вариант воплощения Q19.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q17, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ , при этом  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_5-C_8$  алкилен.

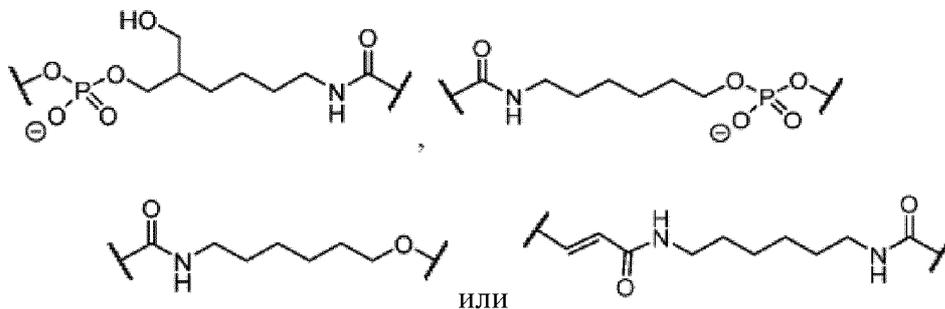
[441] **Вариант воплощения Q20.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q17, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



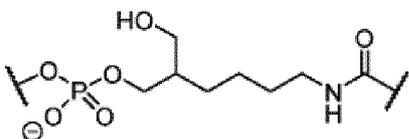
[442] **Вариант воплощения Q21.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q17, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-OPO_2-O-L^7-NH-C(O)-$  или  $-OPO_2-O-L^7-C(O)-NH-$ , при этом  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный алкилен.

[443] **Вариант воплощения Q22.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q17, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-OPO_2-O-L^7-NH-C(O)-$ , при этом  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_5-C_8$  алкилен.

[444] **Вариант воплощения Q23.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q17, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



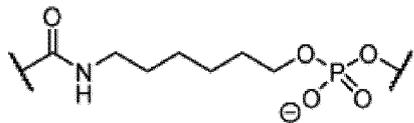
[445] **Вариант воплощения Q24.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q17, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



и присоединен к 3' атому углерода двухцепочечного

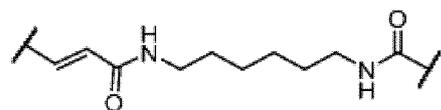
олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

**[446] Вариант воплощения Q25.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q24, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



и присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида от одноцепочечного олигонуклеотида.

**[447] Вариант воплощения Q26.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q25, отличающееся тем, что  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



и присоединен к нуклеотидному основанию двухцепочечной нуклеиновой кислоты или одноцепочечной нуклеиновой кислоты.

**[448] Вариант воплощения Q27.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q26, отличающееся тем, что  $R^3$  независимо представляет собой водород.

**[449] Вариант воплощения Q28.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q27, отличающееся тем, что  $L^6$  независимо представляет собой  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ , замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

**[450] Вариант воплощения Q29.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q27, отличающееся тем, что  $L^6$  независимо представляет собой  $-NHC(O)-$ .

**[451] Вариант воплощения Q30.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q27, отличающееся тем, что

$L^{6A}$  независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен;

$L^{6B}$  независимо представляет собой связь,  $-NHC(O)-$  или незамещенный арилен;

$L^{6C}$  независимо представляет собой связь, незамещенный алкилен или незамещенный арилен;

$L^{6D}$  независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен; и

$L^{6E}$  независимо представляет собой связь или  $-NHC(O)-$ .

**[452] Вариант воплощения Q31.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q27, отличающееся тем, что

$L^{6A}$  независимо представляет собой связь или незамещенный  $C_1-C_8$  алкилен;

$L^{6B}$  независимо представляет собой связь,  $-NHC(O)-$  или незамещенный фенилен;

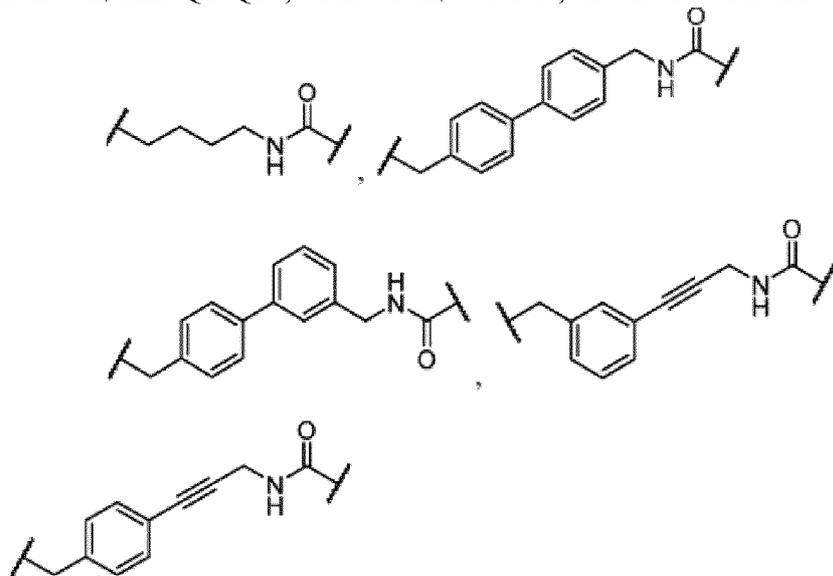
$L^{6C}$  независимо представляет собой связь, незамещенный  $C_2-C_8$  алкинилен или незамещенный фенилен;

$L^{6D}$  независимо представляет собой связь или незамещенный  $C_1-C_8$  алкилен; и

$L^{6E}$  независимо представляет собой связь или  $-NHC(O)-$ .

**[453] Вариант воплощения Q32.** Соединение в соответствии с одним из вариантов

воплощения Q1-Q27, отличающееся тем, что L<sup>6</sup> независимо представляет собой связь,



ИЛИ

[454] **Вариант воплощения Q33.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q32, отличающееся тем, что L<sup>5</sup> независимо представляет собой -NHC(O)-, -C(O)NH-, замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

[455] **Вариант воплощения Q34.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q32, отличающееся тем, что L<sup>5</sup> независимо представляет собой -NHC(O)-.

[456] **Вариант воплощения Q35.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q32, отличающееся тем, что

L<sup>5A</sup> независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен;

L<sup>5B</sup> независимо представляет собой связь, -NHC(O)- или незамещенный арилен;

L<sup>5C</sup> независимо представляет собой связь, незамещенный алкилен или незамещенный арилен;

L<sup>5D</sup> независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен; и

L<sup>5E</sup> независимо представляет собой связь или -NHC(O)-.

[457] **Вариант воплощения Q36.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q32, отличающееся тем, что

L<sup>5A</sup> независимо представляет собой связь или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен;

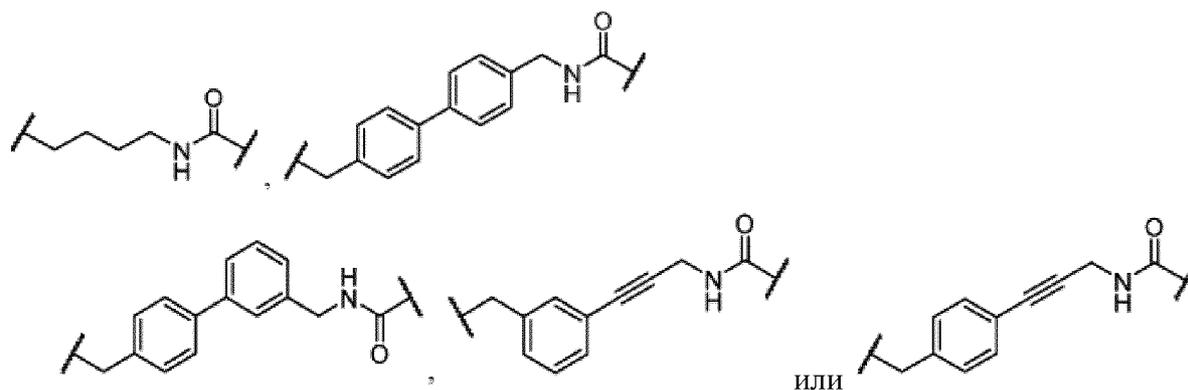
L<sup>5B</sup> независимо представляет собой связь, -NHC(O)- или незамещенный фенилен;

L<sup>5C</sup> независимо представляет собой связь, незамещенный C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинилен или незамещенный фенилен;

L<sup>5D</sup> независимо представляет собой связь или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен; и

L<sup>5E</sup> независимо представляет собой связь или -NHC(O)-.

[458] **Вариант воплощения Q37.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q32, отличающееся тем, что L<sup>5</sup> независимо представляет собой связь,



[459] **Вариант воплощения Q38.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.

[460] **Вариант воплощения Q39.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.

[461] **Вариант воплощения Q40.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.

[462] **Вариант воплощения Q41.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_{15}$  алкил.

[463] **Вариант воплощения Q42.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.

[464] **Вариант воплощения Q43.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.

[465] **Вариант воплощения Q44.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.

[466] **Вариант воплощения Q45.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{15}$  алкил.

[467] **Вариант воплощения Q46.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.

[468] **Вариант воплощения Q47.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q37, отличающееся тем, что  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.

[469] **Вариант воплощения Q48.** Соединение в соответствии с одним из вариантов



неразветвленный насыщенный C<sub>15</sub> алкил.

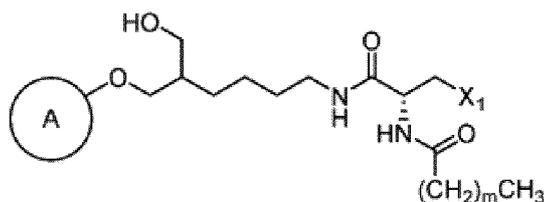
[483] **Вариант воплощения Q62.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q61, отличающееся тем, что олигонуклеотид представляет собой миРНК, мимик микроРНК, структуру типа петля-на-стебле, одностороннюю миРНК, олигонуклеотид RNaseH, анти-микроРНК олигонуклеотид, стерический блокирующий олигонуклеотид, CRISPR направляющую РНК или аптамер.

[484] **Вариант воплощения Q63.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1 - Q62, отличающееся тем, что олигонуклеотид является модифицированным.

[485] **Вариант воплощения Q64.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q62, отличающееся тем, что олигонуклеотид содержит нуклеотидный аналог.

[486] **Вариант воплощения Q65.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q1-Q63, отличающееся тем, что олигонуклеотид содержит запертой остаток нуклеиновой кислоты (LNA), остаток юциклической нуклеиновой кислоты (BNA), остаток затрудненного этила (сEt), остаток незапертой нуклеиновой кислоты (UNA), мономер фосфородиамидатморфолино олигомера (РМО), мономер пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), 2'-О-метил (2'-ОМе) остаток, 2'-О-метоксиэтильный остаток, 2'-дезокси-2'-фторо остаток, 2'-О-метокси этил/фосфоротиоатный остаток, фосфорамидат, фосфородиамидат, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфонокарбоновую кислоту, фосфонокарбонксилат, фосфоноуксусную кислоту, фосфономуравьиную кислоту, метил фосфонат, фосфонат бора или О- метилфосфоамидит.

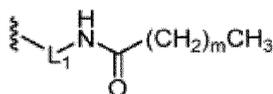
[487] **Вариант воплощения Q66.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q1, отличающееся тем, что соединение представляет собой липид-конъюгированное соединение имеющее структуру Формулы I:



I

или его фармацевтически приемлемая соль, при этом:

A представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, при этом модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-конъюгированным соединением на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированный одноцепочечной нуклеиновой кислоты;



X<sub>1</sub> представляет собой

$L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)_nL_2(CH_2)_n-$  или связь;

$L_2$  представляет собой  $-C(=O)NH-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-OC(=O)O-$ ,  $-NHC(=O)O-$ ,  $-NHC(=O)NH-$ ,  $-C(=S)NH-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-NH-$ , O (кислород) или S (сера), и при этом каждый  $m$  независимо равен целому числу от 10 до 18 и каждый  $n$  независимо равен целому числу от 1 до 6.

[488] **Вариант воплощения Q67.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 10,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[489] **Вариант воплощения Q68.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 11,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[490] **Вариант воплощения Q69.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 12,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[491] **Вариант воплощения Q70.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 13,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[492] **Вариант воплощения Q71.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 14,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[493] **Вариант воплощения Q72.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 15,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[494] **Вариант воплощения Q73.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 16,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[495] **Вариант воплощения Q74.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 17,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[496] **Вариант воплощения Q75.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 18,  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n-$  и  $n$  равен 3.

[497] **Вариант воплощения Q76.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  независимо равен целому числу от 12 до 16 и каждый  $n$  независимо равен целому числу от 1 до 6.

[498] **Вариант воплощения Q77.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что каждый  $m$  независимо равен целому числу от 12 до 14 и каждый  $n$  независимо равен целому числу от 1 до 6.

[499] **Вариант воплощения Q78.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что  $L_1$  представляет собой связь и каждый  $m$

независимо равен целому числу от 12 до 16.

[500] **Вариант воплощения Q79.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66, отличающееся тем, что  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_3C(=O)NH(CH_2)_5-$  и каждый  $m$  независимо равен целому числу от 12 до 16.

[501] **Вариант воплощения Q80.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q78-Q79, отличающееся тем, что каждый  $m$  равен 14.

[502] **Вариант воплощения Q81.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q66-Q80, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь.

[503] **Вариант воплощения Q82.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q66-Q81, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-О-метильный остаток.

[504] **Вариант воплощения Q83.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q66-Q82, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-дезоксид-2'-фторо остаток.

[505] **Вариант воплощения Q84.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q66-Q83, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит остаток бициклических нуклеиновых кислот (BNA).

[506] **Вариант воплощения Q85.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q84, отличающееся тем, что олигонуклеотидный остаток бициклической нуклеиновой кислоты представляет собой остаток запертой нуклеиновой кислоты (LNA) или остаток затрудненного этила (cEt).

[507] **Вариант воплощения Q86.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q66-Q84, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит мономер фосфородиамидатморфолино олигомера (PMO).

[508] **Вариант воплощения Q87.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q66-Q86, отличающееся тем, что модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид представляет собой миРНК или мимик микроРНК.

[509] **Вариант воплощения Q88.** Соединение в соответствии с вариантом воплощения Q87, отличающееся тем, что липидный фрагмент присоединен к 3' концу сопровождающей цепи миРНК или мимика микроРНК.

[510] **Вариант воплощения Q89.** Соединение в соответствии с одним из вариантов воплощения Q66-Q86, отличающееся тем, что А представляет собой антисмысловый олигонуклеотид.

[511] **Вариант воплощения Q90.** Клетка, содержащая соединение в соответствии с

любым из вариантов воплощения Q1-Q89.

[512] **Вариант воплощения Q91.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения Q90, отличающаяся тем, что клетка представляет собой первичную клетку.

[513] **Вариант воплощения Q92.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения Q91, отличающаяся тем, что клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены (HUVEC), жировую клетку, макрофагальную клетку, нейронную клетку, мышечную клетку или дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку.

[514] **Вариант воплощения Q93.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения Q92, отличающаяся тем, что клетка представляет собой человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены.

[515] **Вариант воплощения Q94.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения Q90, отличающаяся тем, что клетка представляет собой иммортализованную клетку.

[516] **Вариант воплощения Q95.** Клетка в соответствии с вариантом воплощения Q94, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку ИНЗТЗ, дифференцированную клетку 3T3L1, клетку RAW264.7 или клетку SH-SY5Y.

[517] **Вариант воплощения Q96.** Клетка в соответствии с одним из вариантов воплощения Q90-Q92, отличающаяся тем, что клетка представляет собой жировую клетку или клетку печени.

[518] **Вариант реализации Q97.** Способ введения нуклеотида в клетку, где способ включает приведение указанной клетки в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов реализации Q1 - Q89.

[519] **Вариант реализации Q98.** Способ введения нуклеотида в клетку *in vitro*, включающие приведение клетки в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов реализации Q1 - Q89 в условиях несвязанного поглощения.

[520] **Вариант воплощения Q99.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q98, отличающийся тем, что способ проводят *ex vivo* и клетка представляет собой первичную клетку.

[521] **Вариант воплощения Q100.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q99, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены (HUVEC), жировую клетку, макрофагальную клетку, нейронную клетку, крысиный нейрон, мышечную клетку или дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку.

[522] **Вариант воплощения Q101.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q99, отличающийся тем, что клетка представляет собой человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены.

[523] **Вариант воплощения Q102.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q98, отличающийся тем, что клетка представляет собой иммортализованной клетки.

[524] **Вариант воплощения Q103.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q102, отличающийся тем, что клетка представляет собой клетку NIH3T3, дифференцированную клетку 3T3L1, клетку RAW264.7 или клетку SH-SY5Y.

[525] **Вариант воплощения Q104.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q98 или Q100, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку или клетку печени.

[526] **Вариант реализации Q105.** Способ введения нуклеотида в клетку *ex vivo*, включающий: получение клеток; и приведение клеток в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов реализации Q1 - Q89 в условиях несвязанного поглощения.

[527] **Вариант воплощения Q106.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q105, отличающийся тем, что клетки представляют собой нейроны, клетки ТВМ, скелетные мышечные клетки, жировые клетки или клетки печени.

[528] **Вариант воплощения Q107.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q105, отличающийся тем, что клетки представляют собой человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены.

[529] **Вариант реализации Q108.** Способ введения нуклеотида в клетку *in vivo*, включающие приведение клетки в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов реализации Q1 - Q89.

[530] **Вариант воплощения Q109.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q108, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, жировую клетку, макрофагальную клетку, нейронную клетку, мышечную клетку или скелетную мышечную клетку.

[531] **Вариант реализации Q110.** Способ включающий приведение клетки в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов реализации Q1 - Q89.

[532] **Вариант реализации Q111.** Способ в соответствии с вариантом реализации Q110, где приведение в контакт происходит *in vitro*.

[533] **Вариант реализации Q112.** Способ в соответствии с вариантом реализации Q110, где приведение в контакт происходит *ex vivo*.

[534] **Вариант реализации Q113.** Способ в соответствии с вариантом реализации Q110, где приведение в контакт происходит *in vivo*.

[535] **Вариант воплощения Q114.** Способ, включающий введение субъекту соединения в соответствии с любым из вариантов воплощения Q1-Q89.

[536] **Вариант воплощения Q115.** Способ в соответствии с вариантом воплощения Q114, отличающийся тем, что у субъекта имеется заболевание или расстройство глаза, печени, почки, сердца, жировой ткани, легкого, мышцы или селезенки.

[537] **Вариант воплощения Q116.** Соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения Q1-Q89 для использования в терапии.

[538] **Вариант воплощения Q117.** Соединение в соответствии с любым из

вариантов воплощения **Q1-Q89** для использования при получении медикамента.

[539] **Вариант реализации Q118.** Способ введения нуклеотида в клетку в организме субъекта, где способ включает введение указанному субъекту соединения в соответствии с любым из вариантов реализации **Q1 - Q89**.

[540] **Вариант воплощения Q119.** Клетка, содержащая соединение в соответствии с любым из вариантов воплощения **Q1-Q89**.

[541] **Вариант реализации Q120.** Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и соединение в соответствии с любым из вариантов реализации **Q1 - Q89**.

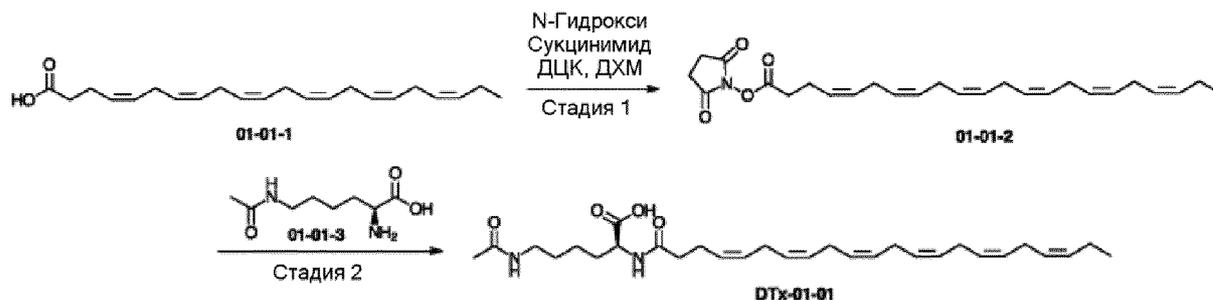
#### ПРИМЕРЫ

[542] Следующие ниже примеры будут дополнительно характеризовать настоящее изобретение и используются только в целях иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие данное изобретение.

[543] Соединения, раскрытые в настоящей заявке, могут быть синтезированы способами, описанными ниже, или путем модификации этих способов. Способы модификации методологии включают, среди прочего, температуру, растворитель, реагенты и т.д., известные специалистам в данной области. В общем, во время любого из процессов получения соединений, описанных в настоящей заявке, может быть необходимо и/или желательно защитить чувствительные или реакционноспособные группы на любой из рассматриваемых молекул. Это может быть достигнуто с помощью обычных защитных групп, таких как описанные в *Protective Groups in Organic Chemistry* (ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973); и P.G.M. Green, T.W. Wutts, *Protecting Groups in Organic Synthesis* (3rd ed.) Wiley, New York (1999), которые обе полностью включены в данную заявку посредством ссылки. Защитные группы могут быть удалены на подходящей последующей стадии с использованием способов, известных в данной области. Превращения синтетической химии, полезные для синтеза применимых соединений, известны в данной области и включают, например, описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, 1989, или L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 1995, которые обе полностью включены в данную заявку посредством ссылки. Маршруты, показанные и описанные в настоящей заявке, являются только иллюстративными и не предназначены и не должны толковаться как ограничивающие объем формулы изобретения каким-либо образом. Специалисты в данной области смогут распознать модификации раскрытых синтезов и разработать альтернативные маршруты на основе раскрытий в настоящей заявке; все такие модификации и альтернативные маршруты входят в объем формулы изобретения.

Синтезы липидных мотивов

#### Синтез DTx-01-01



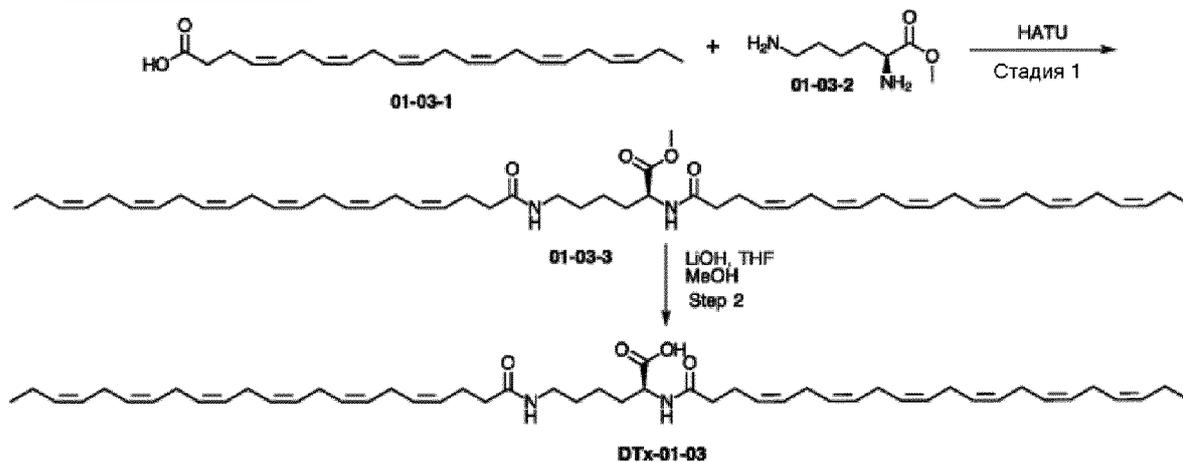
#### Стадия 1. Синтез Промежуточного соединения 01-01-2

[544] К перемешиваемому раствору **01-01-1** (5,0 г, 0,015 моль) в ДХМ (500 мл) при КТ добавляли ДМАП (0,17 г, 0,0015 моль), ДЦК (4,86 г, 0,016 моль), с последующим добавлением N-гидрокси сукцинимид (1,92 г, 0,016 моль). Полученую в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь фильтровали через шоттовскую воронку. Фильтрат выпаривали с получением неочищенного **01-01-2** в виде бледно-желтой жидкости (6,0 г, 92,5%), которую использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки.

#### Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-01

[545] К перемешиваемому раствору **01-01-3** (1,3 г, 0,006 моль) в ДМФ (20 мл) при КТ медленно добавляли  $\text{Et}_3\text{N}$  (3 мл, 0,020 моль) и затем **01-01-2** (2,93 г, 0,007 моль). Полученую в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и затем экстрагировали  $\text{EtOAc}$ . Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **DTx-01-01**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (3%  $\text{MeOH}$  в ДХМ) с получением липидного мотива **DTx-01-01** в виде вязкой бурой жидкости (1,3 г, 51%). ЖХ-МС  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 499,4; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  0,92 (t,  $J=7,6$  Гц, 3H), 1,24-1,66 (m, 10H), 1,82 (s, 3H), 2,02-2,33 (m, 7H), 2,73-2,98 (m, 9H), 3,94 (br s, 1H), 5,27-5,34 (m, 10H), 7,70 (br s, 1H), 7,78 (br s, 1H).

#### Синтез DTx-01-03



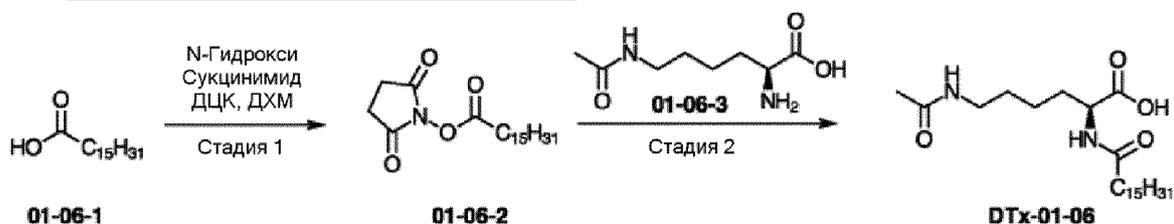
### Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-03-3

[546] К перемешиваемому раствору **01-03-1** (15 г, 0,045 моль) в ДМФ (300 мл) при КТ добавляли медленно ДИПЭА (39,86 мл, 0,11 моль), НАТУ (17,1 г, 0,045 моль) и **01-03-2** (3,6 г, 0,022 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **01-03-3**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (20% EtOAc в петролейном эфире) с получением **01-03-3** в виде вязкой, бледно-коричневой жидкости (11,2 г, 63,7%).

### Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-03

[547] К перемешиваемому раствору **01-03-3** (10 г, 0,012 моль) в MeOH (100 мл) при 0°C добавляли медленно LiOH (1,07 г, 0,025 моль) в воде (50 мл). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 4 часа в реакционную смесь добавляли по каплям ледяную воду. Смесь подкисляли 1,5 М HCl и затем экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **DTx-01-03**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (3% MeOH в ДХМ) с получением липидного мотива **DTx-01-03** в виде вязкой, бледно-коричневой жидкости (7,5 г, 77%). ЖХ-МС  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 767,5; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0,954 (t, J= 3,6 Гц, 6H), 1,23-1,66 (m, 8H), 1,99-2,33 (m, 12H), 2,69-2,82 (m, 22H), 4,13 (t, J= 3,6 Гц, 1H), 5,25-5,36 (m, 22H), 7,76 (t, J=5,2 Гц, 1H), 8,03 (d, J= 7,6 Гц, 1H), 12,5 (br s, 1H).

### Синтез липидного мотива DTx-01-06



### Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-06-2

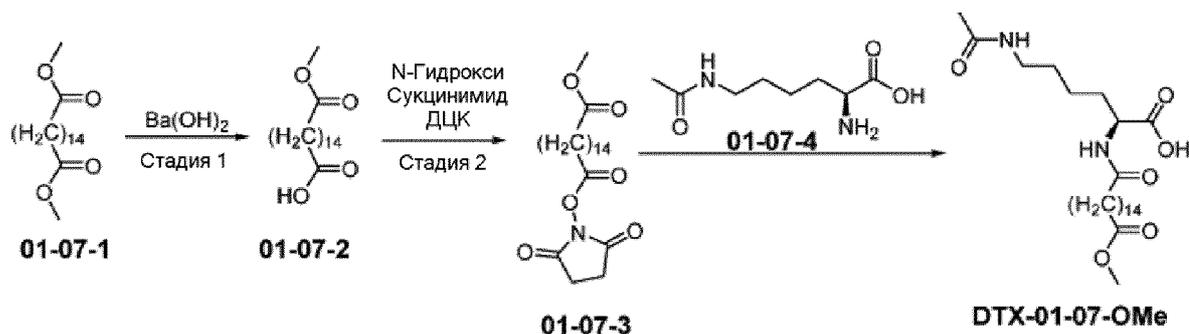
[548] К перемешиваемому раствору линейной жирной кислоты **01-06-1** (5,0 г, 0,018 моль) в ДХМ (100 мл) при КТ добавляли ДМАП (0,208 г, 0,0018 моль), ДЦК (5,22 г, 0,018 моль) и затем N-гидроксисукцинимид (2,07 г, 0,018 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь фильтровали через шоттовскую воронку. Фильтрат выпаривали с получением неочищенного **01-06-2** в виде грязно-белого твердого вещества (6,0 г, 88%), который использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки.

### Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-06

[0549] К перемешиваемому раствору **01-06-3** (1,02 г, 0,054 моль) в ДМФ (40 мл) при КТ медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (2,3 мл, 0,016 моль) и **01-06-2** (2 г, 0,047 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и затем экстрагировали EtOAc. Соединенный органический экстракт

промывали охлажденной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **DTx-01-06**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (3% MeOH в ДХМ) с получением липидного мотива **DTx-01-06** в виде грязно-белого твердого вещества (2,0 г, 88%). МС (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 427,4; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0,97 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H), 1,36-1,77 (m, 31H), 1,83 (s, 3H), 2,09 (t,  $J=6,4$  Гц, 2H), 2,98 (d,  $J=6,0$  Гц, 2H), 5,57 (d,  $J=8,0$  Гц, 2H), 7,79 (br s, 1H), 7,97 (d,  $J=7,6$  Гц, 1H).

#### Синтез метилового эфира липидного мотива DTx-01-07 (DTx-Q1-07-QMe)



#### Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-07-2

[550] К перемешиваемому раствору **01-07-1** (15 г, 0,063 моль) в MeOH (100 мл) при КТ добавляли медленно  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (20 г, 0,063 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой. Гашеную реакционную смесь подкисляли 1,5 М HCl и затем экстрагировали EtOAc. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **01-07-2**. Очистка при помощи колоночной хроматографии (15% EtOAc в петролейном эфире) привела к получению **01-07-2** в виде грязно-белого твердого вещества (15,2 г, 79,5%).

#### Стадия 2: Синтез Промежуточного соединения 01-07-3

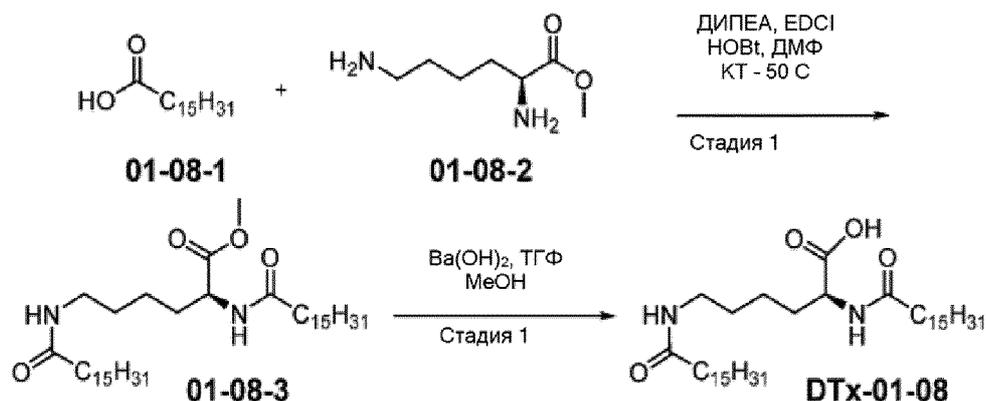
[551] К перемешиваемому раствору **01-07-2** (5,0 г, 0,016 моль) в ДХМ (500 мл) при КТ добавляли ДМАП (0,182 г, 0,0016 моль) и ДЦК (4,98 г, 0,016 моль), с последующим добавлением N-гидрокси сукцинимид (2,1 г, 0,016 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь фильтровали через шоттовскую воронку. Фильтрат выпаривали с получением неочищенного **01-07-3** в виде светло-желтой жидкости (5,0 г, 75%), который использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки.

#### Стадия 3: Синтез липидного мотива DTx-01-07

[552] К перемешиваемому раствору **01-07-4** (0,94 г, 0,005 моль) в ДМФ (40 мл) при КТ добавляли медленно  $\text{Et}_3\text{N}$  (2,12 мл, 0,015 моль) и затем **01-07-3** (2,0 г, 0,005 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и затем экстрагировали EtOAc. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **DTx-01-07-QMe**,

который очищали при помощи колоночной хроматографии (3% MeOH в ДХМ) с получением метилового сложного эфира липидного мотива **DTx-01-07** (т.е., **DTx-01-07-OMe**) в виде грязно-белого твердого вещества (2.0 г, 84%). ЖХ-МС  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 471.4; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 1,47-1,67 (m, 30H), 1,77 (s, 3H), 2,09 (t,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,28 (d,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,99 (q,  $J=6,4$  Гц, 2H), 3,57 (s, 3H), 4,11 (t,  $J=4,8$  Гц, 1H), 7,79 (br s, 1H), 7,97 (d,  $J=7,6$  Гц, 1H).

#### Синтез липидного мотива DTx-01-08



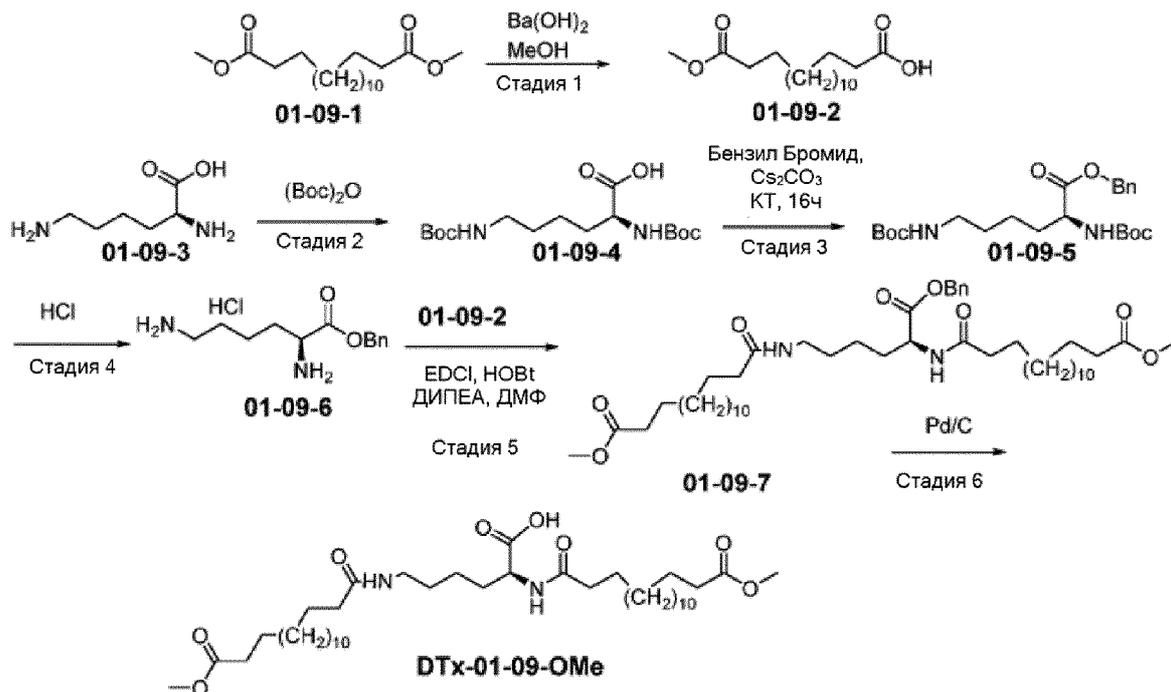
#### Стадия 1: Синтез Соединения 01-08-3

[553] К перемешиваемому раствору линейной жирной кислоты **01-08-1** (25,58 г, 0,099 моль) в ДМФ (500 мл) при КТ добавляли ДИПЭА (42,66 мл, 0,245 моль) и соединение **01-08-2** (8,0 г, 0,049 моль), с последующим добавлением EDCI (18,97 г, 0,099 моль) и HOBT (13,37 г, 0,099 моль). Полученую в результате смесь перемешивали при 50 °С. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и затем выпаривали с получением неочищенного **01-08-3**, который затем перекристаллизовывали (20% МТВЕ в петролейном эфире) с получением **01-08-3** в виде грязно-белого твердого вещества (18 г, 56%).

#### Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-08

[554] К перемешиваемому раствору **01-08-3** (10 г, 0,0156 моль) в MeOH и ТГФ (1:1; 200 мл) при КТ медленно добавляли Ba(OH)<sub>2</sub> (9,92 г, 0,031 моль, растворенный в MeOH). Полученую в результате смесь перемешивали при КТ. Через 6 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и затем подкисляли 1,5 М HCl. Смесь фильтровали и осадок перекристаллизовывали (МТВЕ в петролейном эфире) с получением липидного мотива **DTx-01-08** в виде грязно-белого твердого вещества (7,2 г, 74,2%). МС (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 623,6; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,868 (m, 6H), 1,25-1,69 (m, 58H), 2,03 (t,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,11 (t,  $J=7,6$  Гц, 2H), 2,99 (q,  $J=8,4$  Гц, 2H), 4,15-4,20 (m, 1H), 7,42 (br s, 1H), 7,65 (d,  $J=7,6$  Гц, 1H), 12,09 (br s, 1H).

#### Синтез метилового эфира липидного мотива DTx-01-09 (DTx-Q1-09-QMe)



Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-09-2

[555] К перемешиваемому раствору **01-09-1** (15 г, 0,063 моль) в  $\text{MeOH}$  (100 мл) при КТ добавляли медленно  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (20 г, 0,063 моль). Полученую в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой, подкисляли 1,5 М  $\text{HCl}$  и экстрагировали  $\text{EtOAc}$ . Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **01-09-2**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (15%  $\text{EtOAc}$  в петролейном эфире) с получением продукта **01-09-2** в виде грязно-белого твердого вещества (15,2 г, 79,5%).

Стадия 2: Синтез Промежуточного соединения 01-09-4

[556] К перемешиваемому раствору **01-09-3** (15 г, 0,102 моль) в 1,4-диоксане (100 мл) и воде (50 мл) при КТ медленно добавляли  $\text{NaHCO}_3$  (18,98 г, 0,226 моль) и  $\text{VOC}$  ангидрид (49,2 мл, 0,226 моль). Полученую в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **01-09-4**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (30%  $\text{EtOAc}$  в петролейном эфире) с получением **01-09-4** в виде вязкой, бледно-желтой жидкости (20 г, 56%).

Стадия 3: Синтез Промежуточного соединения 01-09-5

[557] К перемешиваемому раствору **01-09-4** (15 г, 0,043 моль) в  $\text{DMF}$  (150 мл) при КТ добавляли медленно  $\text{CS}_2\text{CO}_3$  (14 г, 0,043 моль) и бензилбромид (5,6 мл, 0,047 моль). Полученую в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям экстрагировали  $\text{EtOAc}$ . Соединенный органический

экстракт промывали ледяной водой, насыщенным соевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **01-09-5**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (18% EtOAc в петролейном эфире) с получением **01-09-5** в виде вязкой, бесцветной жидкости (15,2 г, 77%).

Стадия 4: Синтез Промежуточного соединения 01-09-6

[558] К перемешиваемому раствору **01-09-5** (10 г, 0,022 моль) в 1,4-диоксане (50 мл) при КТ медленно добавляли 4 М HCl в 1,4-диоксане (23 мл, 0,091 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь концентрировали при сниженном давлении. Остаток очищали путем растирания в диэтиловом эфире, с получением **01-09-6** в виде грязно-белого твердого вещества (15,2 г, 79,5%).

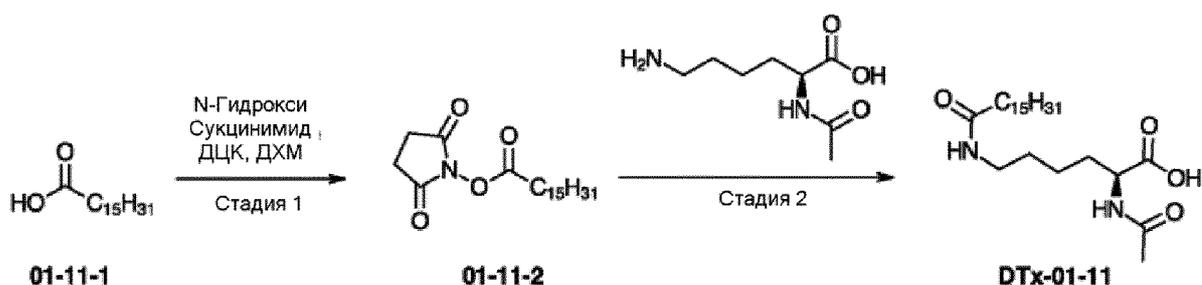
Стадия 5: Синтез Промежуточного соединения 01-09-7

[559] К перемешиваемому раствору **01-09-6** (7,0 г, 0,025 моль) в ДМФ (100 мл) при КТ добавляли медленно ДИПЭА (22,4 мл, 0,128 моль), **01-09-2** (15,05 г, 0,05 моль), EDCI (9,5 г, 0,05 моль) и HOBT (6,75 г, 0,05 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при 50 °C. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным соевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем выпаривали с получением неочищенного **01-09-7**. Перекристаллизация (МТВЕ в петролейном эфире) привела к получению **01-09-7** в виде грязно-белого твердого вещества (10 г, 49,7%)

Стадия 6: Синтез липидного мотива DTx-01-09

[560] К перемешиваемому раствору **01-09-7** (10 г, 0,099 моль) в ТГФ (100 мл) и EtOAc (100 мл) при КТ добавляли 10% Pd/C (1,0 г). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ под давлением водорода 3 кг/см<sup>2</sup>. Через 16 часов смесь фильтровали через целит и фильтрат выпаривали с получением неочищенного **DTx-01-09-OMe**. Перекристаллизация (20% МТВЕ в петролейном эфире) привела к получению метилового сложного эфира липидного мотива **DTx-01-09** (т.е., **DTx-01-09-OMe**) в виде светло-желтого твердого вещества (5,3 г, 60%). ЖХ-МС  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 711,5; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,23-1,52 (m, 55H), 2,01 (t, J= 9,6 Гц, 2H), 2,08-2,11 (m, 2H), 2,28 (t, J= 9,6 Гц, 4H), 2,99 (q, J= 8,4 Гц, 2H), 3,57 (s, 6H), 4,11-4,12 (m, 1H), 7,72 (t, J= 5,2 Гц, 1H), 7,96 (d, J=7,6Гц, 1H).

#### Синтез липидного мотива DTx-01-11



Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-11-2

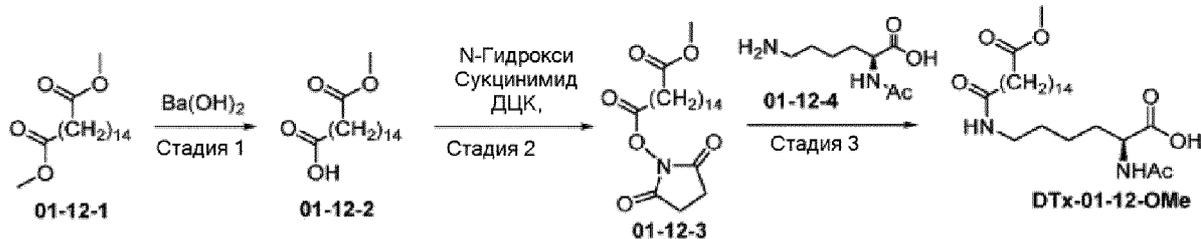
[561] К перемешиваемому раствору линейной жирной кислоты **01-11-1** (5,0 г, 0,018

моль) в ДХМ (100 мл) при КТ добавляли ДМАП (0,208 г, 0,0018 моль) и ДЦК (5,22 г, 0,018 моль), с последующим добавлением N-гидроксисукцинимид (2,07 г, 0,018 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь фильтровали через шоттовскую воронку. Выпаривание фильтрата привело к получению неочищенного 01-11-2 в виде грязно-белого твердого вещества (6,0 г, 88%), которое непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

*Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-11*

[562] К перемешиваемому раствору **01-11-3** (2,05 г, 0,01 моль) в ДМФ (80 мл) при КТ медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (4,6 мл, 0,032 моль) и **01-11-2** (4,0 г, 0,01 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой по каплям и затем экстрагировали EtOAc. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и затем выпаривали с получением неочищенного **DTx-01-11**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (3% MeOH в ДХМ) с получением липидного мотива **DTx-01-11** в виде грязно-белого твердого вещества (3,1 г, 66,5%). МС (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 427,4; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 0,85 (t, J= 6,8 Гц, 3H), 1,23-1,73 (m, 31H), 1,83 (s, 3H), 2,02 (t, J=7,2 Гц, 2H), 3,00 (q, J=6,0Hz, 2H), 4,10 (dd, J= 8,4, 4,4 Гц, 2H), 7,74 (d, J= 5,2 Гц, 1H), 8,07 (br s, 1H), 12,45 (br s, 1H).

Синтез метилового сложного эфира липидного мотива DTx-01-12 (DTx-01-12-OMe)



*Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-12-2*

[0563] К перемешиваемому раствору **01-12-1** (15 г, 0,063 моль) в MeOH (100 мл) при КТ добавляли медленно Ba(OH)<sub>2</sub> (20 г, 0,063 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой, подкисляли 1,5 М HCl и экстрагировали EtOAc. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и затем выпаривали с получением неочищенного **01-12-2**. Очистка при помощи колоночной хроматографии (15% EtOAc в петролейном эфире) привела к получению **01-12-2** в виде грязно-белого твердого вещества (15,2 г, 79,5%).

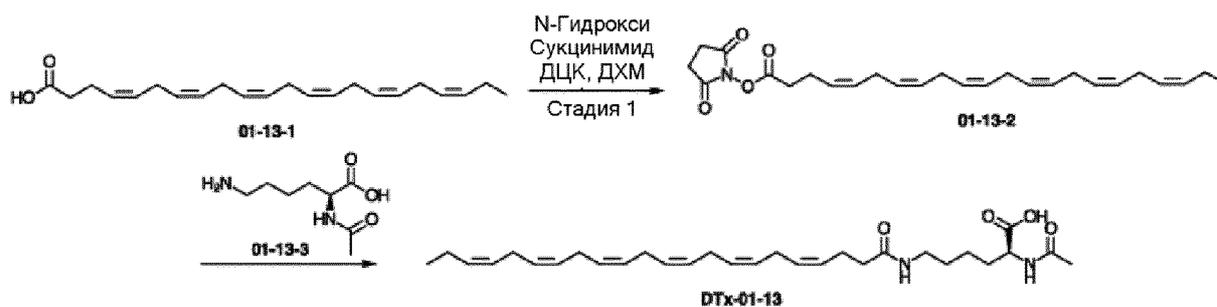
*Стадия 2: Синтез Промежуточного соединения 01-12-3*

[564] К перемешиваемому раствору **01-12-2** (5,0 г, 0,016 моль) в ДХМ (500 мл) при КТ добавляли ДМАП (0,182 г, 0,0016 моль) и ДЦК (4,98 г, 0,016 моль), с последующим добавлением N-гидроксисукцинимид (2,1 г, 0,016 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь фильтровали через шоттовскую

воронку. Фильтрат выпаривали с получением неочищенного **01-12-3** в виде бледно-желтой жидкости (5,0 г, 75%), которую непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. *Стадия 3: Синтез липидного мотива DTx-01-12*

[565] К перемешиваемому раствору **01-12-4** (0,94 г, 0,005 моль) в ДМФ (40 мл) при КТ добавляли медленно Et<sub>3</sub>N (2,12 мл, 0,015 моль), **01-12-3** (2,0 г, 0,05 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакцию смесь гасили ледяной водой по каплям и экстрагировали EtOAc. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и затем выпаривали с получением неочищенного **DTx-O1-12-OMe**. Очистка при помощи колоночной хроматографии (3% MeOH в ДХМ) привела к получению метилового сложного эфира липидного мотива **DTx-01-12** (т.е., **DTx-O1-12-OMe**) в виде грязно-белого твердого вещества (1,5 г, 63,2%). ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>: 471.4; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 1,22-1,66 (m, 3OH), 1,83 (s, 3H), 2,01 (t, J = 7,6 Гц, 2H), 2,27 (d, J = 7,2 Гц, 2H), 2,99 (q, J = 6,4 Гц, 2H), 3,57 (s, 3H), 4,10 (t, J = 4,8 Гц, 1H), 7,72 (t, J = 5,2 Гц, 1H), 8,06 (d, J = 8,0 Гц, 1H), 12,47 (br s, 1H).

#### Синтез липидного мотива DTx-01-13



#### Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-13-2

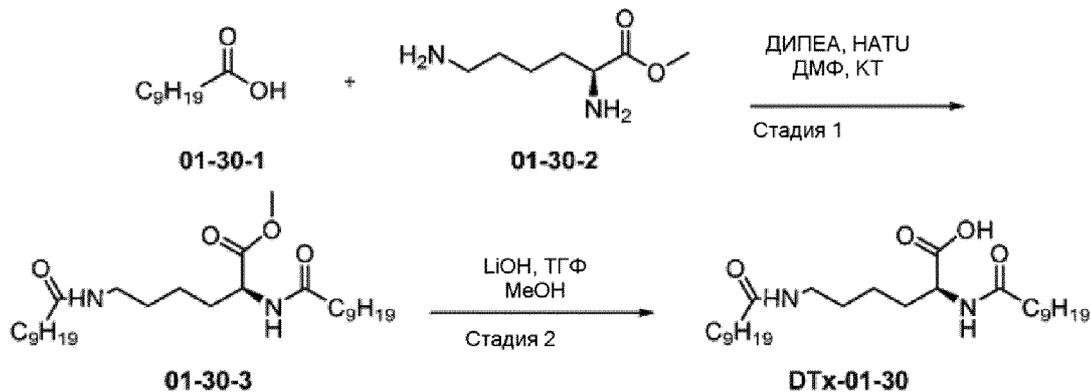
[566] К перемешиваемому раствору **01-13-1** (5,0 г, 0,015 моль) в ДХМ (500 мл) при КТ добавляли ДМАП (0,17 г, 0,0015 моль) и ДЦК (4,86 г, 0,016 моль), с последующим добавлением N-гидроксисукцинимид (1,92 г, 0,016 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакцию смесь фильтровали через шоттовскую воронку и фильтрат выпаривали с получением неочищенного **01-13-2** в виде светло-желтой жидкости (6,0 г, 92,5%). Неочищенный промежуточный продукт использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

#### Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-13

[567] К перемешиваемому раствору **01-13-3** (1,3 г, 0,006 моль) в ДМФ (20 мл) при КТ медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (3 мл, 0,020 моль) и **01-13-2** (2,93 г, 0,007 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакцию смесь гасили ледяной водой по каплям и экстрагировали EtOAc. Соединенный органический экстракт промывали ледяной водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и затем выпаривали с получением неочищенного **DTx-01-13**, который очищали при помощи колоночной хроматографии (3% MeOH в ДХМ) с получением липидного мотива **DTx-01-**

**13** в виде вязкой бурой жидкости (2,1 г, 61%). ЖХ-МС  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 499,4; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0,90 (t,  $J=7,2$  Гц, 3H), 1,22-1,67 (m, 7H), 1,75 (s, 3H), 1,98-2,27 (m, 7H), 2,73-2,95 (m, 9H), 2,96 (dd,  $J=12,4, 6,4$  Гц, 2H), 4,06-4,09 (m, 1H), 5,23-5,37 (m, 10H), 7,79 (brs, 1H), 7,91 (t,  $J=7,6$  Гц, 1H).

Синтез липидного мотива DTx-01-30



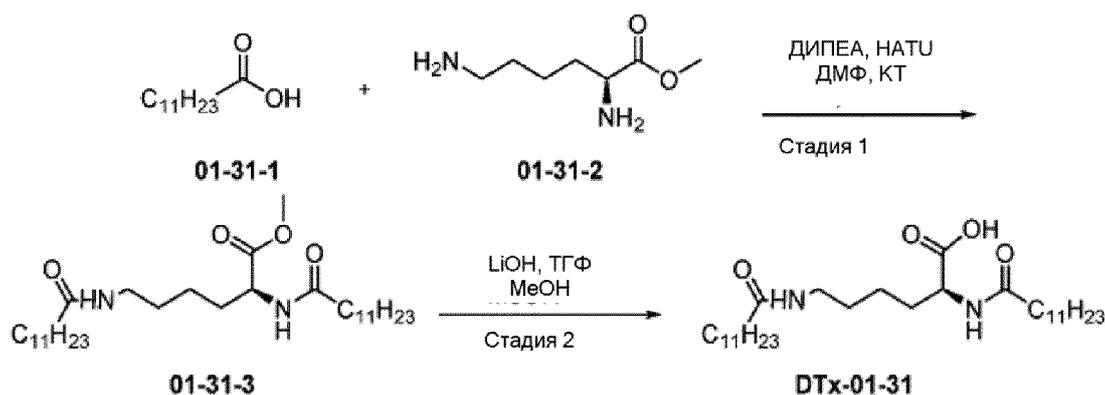
Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-30-3

[568] К перемешиваемому раствору **01-30-2** (3 г, 0,01 моль) в ДМФ (50 мл) при КТ добавляли медленно ДИПЭА (13,8 мл, 0,077 моль), линейной жирной кислоты **01-30-1** (4,4 г, 0,0154 моль) и НАТУ (5,87 г, 0,0154 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой. Осадок выделяли фильтрованием и затем высушивали в вакууме с получением **01-30-3** в виде грязно-белого твердого вещества (3,2 г, 53,15%).

Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-30

[569] К перемешиваемому раствору **01-30-3** (3,2 г, 0,0068 моль) в MeOH (30 мл), ТГФ (30 мл) и воде (3 мл), добавляли LiOH Н<sub>2</sub>O (0,86 г, 0,0251 моль). Полученную в результате реакционную смесь перемешивали 16 часов. Затем, реакционную смесь концентрировали в вакууме и затем нейтрализовали 1,5 N HCl. Осадок выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали в вакууме с получением неочищенного **DTx-01-30**. Перекристаллизация (80% ДХМ в гексане) привела к получению липидного мотива **DTx-01-30** в виде грязно-белого твердого вещества (2,2 г, 73,3%). ЖХ-МС  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 455,5; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0,88-0,92 (t,  $J=7,2$  Гц, 6H), 1,17-1,55 (m, 33H), 1,64 (t,  $J=7,0$  Гц, 1H), 2,00 (t,  $J=7,2$  Гц, 2H), 2,06-2,10 (m, 2H), 2,97-2,99 (m, 2H), 4,11 (t,  $J=8,4$  Гц, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,96 (d,  $J=7,6$  Гц, 1H), 12,47 (br s, 1H).

Синтез Липидного мотива DTx-01-31



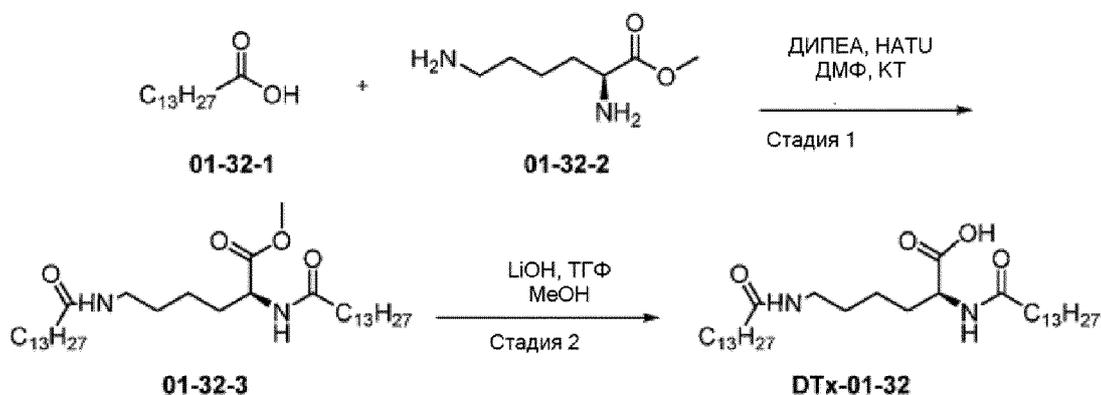
Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-31-3

[570] К перемешиваемому раствору **01-31-2** (3 г, 0,0128 моль) в ДМФ (50 мл) при КТ добавляли медленно ДИПЭА (13,8 мл, 0,077 моль), линейной жирной кислоты **01-31-1** (3,1 г, 0,0154 моль) и НАТУ (5,87 г, 0,0154 моль). Полученую в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой. Твердые вещества выделяли фильтрованием и высушивали в вакууме с получением **01- 01-3** в виде грязно-белого твердого вещества (3,4 г, 50,7%).

Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-31

[571] К перемешиваемому раствору **01-01-3** (3 г, 0,0057 моль) в MeOH (10 мл), ТГФ (10 мл) и воде (3 мл), добавляли LiOH H<sub>2</sub>O (0,8 г, 0,0019 моль). Реакционную смесь перемешивали 16 часов. Затем, реакционную смесь концентрировали в вакууме и затем нейтрализовали 1,5 N HCl. Осадок, твердое вещество, выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали в вакууме, с получением неочищенного **DTx-01-31**. Перекристаллизация (80% ДХМ в гексане) привела к получению липидного мотива **DTx-01-31** в виде грязно-белого твердого вещества (2,3 г, 79,3%). ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>: 511,5; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, 20 ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 0,86-0,90 (t, J= 7,2 Гц, 6H), 1,33-1,54 (m, 42H), 1,64 (t, J= 7,9 Гц, 1H), 1,98- 2,08 (m, 4H), 2,96 (t, J= 6,3 Гц, 2H), 4,02-4,18 (m, 1H), 7,71-7,79 (m, 2H).

Синтез Липидного мотива DTx-01-32



Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-32-3

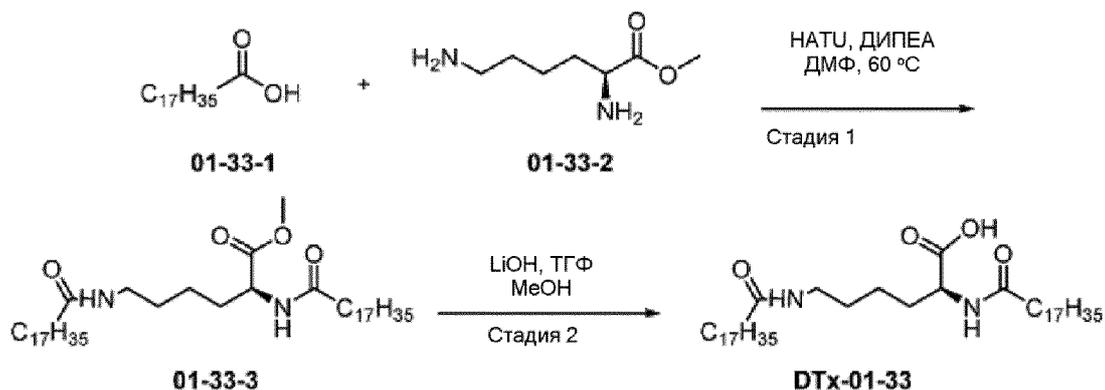
[572] К перемешиваемому раствору **01-32-2** (3 г, 0,01 моль) в ДМФ (50 мл) при КТ добавляли медленно ДИПЭА (13,8 мл, 0,077 моль), линейной жирной кислоты **01-32-1** (4,4

г, 0,0154 моль) и НАТУ (5,87 г, 0,0154 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при 60 °С. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой, твердые вещества выделяли фильтрованием и твердые вещества высушивали в вакууме с получением **01-32-3** в виде грязно-белого твердого вещества (3,5 г, 53,2%).

*Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-32*

[573] К перемешиваемому раствору **01-32-3** (3,5 г, 0,0051 моль) в MeOH (10 мл), ТГФ (10 мл) и воде (3 мл), добавляли LiOH H<sub>2</sub>O (0,8 г, 0,0154). Реакционную смесь перемешивали 16 часов. Затем, реакционную смесь концентрировали в вакууме и нейтрализовали 1,5 N HCl. Твердые вещества выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали в вакууме, с получением неочищенного **DTx-01-32**. Перекристаллизация (80% ДХМ в гексане) привела к получению липидного мотива **DTx-01-32** в виде грязно-белого твердого вещества (2,3 г, 79,3%). ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>: 567,2; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, TFA-d): δ 0,87- 0,98 (m, 6H), 1,20-1,58 (m, 41H), 1,74-1,92 (m, 8H), 2,18-2,21 (m, 2H), 2,73 (t, J= 7,6 Гц, 2H), (t, J= 7,6 Гц, 2H), 3,60 (t, J= 7,8 Гц, 2H).

Синтез Липидного мотива DTx-01-33



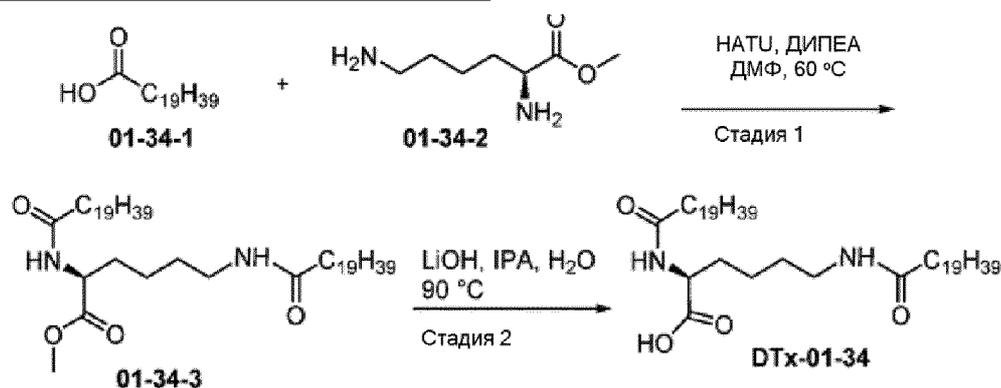
Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-33-3

[574] К перемешиваемому раствору **01-33-2** (5 г, 0,0312 моль) в ДМФ (100 мл) при КТ добавляли медленно ДИПЭА (32 мл, 0,1872 моль), линейной жирной кислоты **01-33-1** (26,6 г, 0,0936 моль) и НАТУ (41,5 г, 0,1092 моль) медленно при КТ. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой. Неочищенный **01-33-3** выделяли фильтрованием из реакционной смеси и высушивали в вакууме. Очистка путем растирания ТГФ привела к получению **01-33-3** в виде грязно-белого твердого вещества (8,5 г, 39,5%).

Стадия 2: Синтез липидного мотива DTx-01-33

[575] К перемешиваемому раствору **01-33-3** (5 г, 0,0072 моль) в MeOH (75 мл), ТГФ (75 мл) и воде (3 мл), добавляли LiOH H<sub>2</sub>O (0,60 г, 0,0144 моль). Реакционную смесь перемешивали 16 часов. Затем, реакционную смесь концентрировали в вакууме и нейтрализовали 1,5 N HCl. Твердые вещества фильтовали, промывали водой и высушивали в вакууме, с получением неочищенного **DTx-01-33**. Перекристаллизация (IPA) привела к получению липидного мотива **DTx-01-33** в виде грязно-белого твердого вещества (2,3 г, 47%). ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>: 680; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, TFA-d): δ 1,10-1,18 (m, 6H), 1,62-1,80 (m, 57H), 2,06-2,20 (m, 8H), 2,49-2,50 (m, 2H), 2,96-3,01 (m, 2H), 3,32-3,35 (m, 2H), 3,87-

3,98 (m, 2H).

Синтез Липидного мотива DTx-01-34

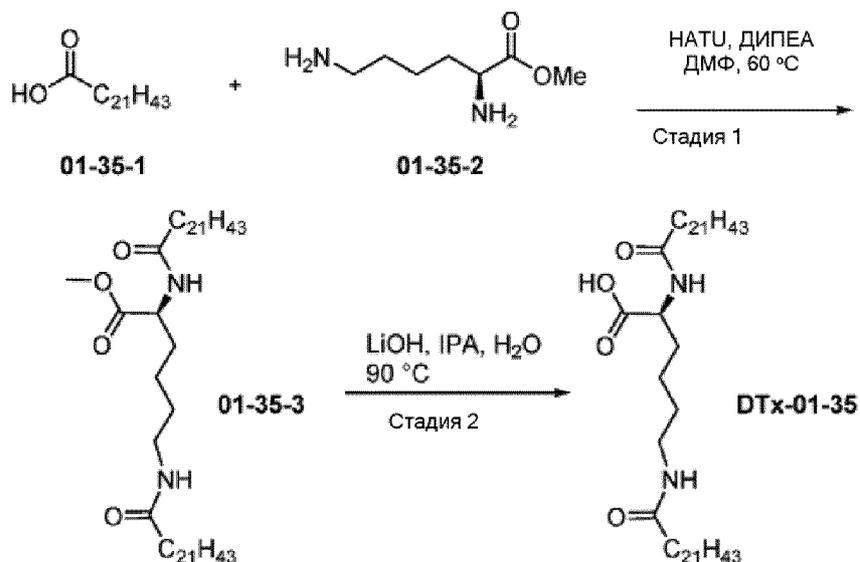
Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-34-3

[576] К перемешиваемому раствору **01-34-2** (5 г, 0,0312 моль) в ДМФ (100 мл) при КТ добавляли медленно ДИПЭА (32 мл, 0,1872 моль), линейную жирную кислоту **01-34-1** (29,2 г, 0,0936 моль) и HATU (41,5 г, 0,1092 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при 50 °С. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой, твердые вещества выделяли фильтрованием и затем твердые вещества высушивали в вакууме. Очистка твердых веществ путем растирания с ТГФ привела к получению **01-34-3** в виде грязно-белого твердого вещества (10 г, 43%).

Стадия 2: Синтез Липидного мотива DTx-01-34

[577] К перемешиваемому раствору **01-34-3** (5 г, 0,0066 моль) в 9:1 IPA:вода (150 мл) добавляли LiOH H<sub>2</sub>O (0,56 г, 0,0133 моль). Реакционную смесь перемешивали при 90 °С. Через 1 час реакционную смесь концентрировали в вакууме и затем нейтрализовали 1,5 N HCl. Осадок выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали в вакууме. Перекристаллизация (IPA) осадка привела к получению липидного мотива **DTx-01-34** в виде грязно-белого твердого вещества (3,2 г, 65%). ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>: 736,2; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, TFA-d): δ 1,13-1,17 (m, 6H), 1,48-1,79 (m, 65H), 2,05-2,19 (m, 8H), 2,48-2,49 (m, 2H), 2,95-2,96 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,85-3,96 (m, 2H).

Синтез Липидного мотива DTx-01-35



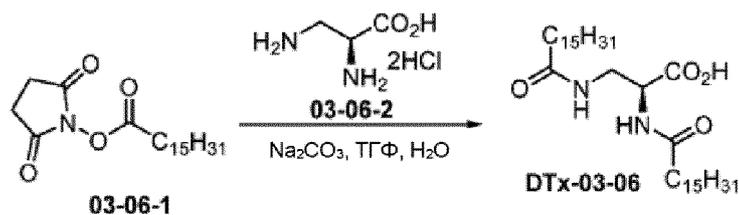
#### Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 01-35-3

[578] К перемешиваемому раствору 01-35-2 (5 г, 0,0312 моль) в ДМФ (100 мл) при КТ добавляли 10 медленно ДИПЭА (32 мл, 0,872 моль), линейной жирной кислоты 01-35-1 (31,8 г, 0,0936 моль) и NATU (41,5 г, 0,1092 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при 60 °С. Через 16 часов реакционную смесь гасили ледяной водой, твердые вещества выделяли фильтрованием и затем твердые вещества высушивали в вакууме. Очистка твердых веществ путем растирания с ТГФ привела к получению 01-35-3 в виде грязно-белого твердого вещества (7 г, 28%).

#### Стадия 2: Синтез Липидного мотива DTx-01-35

[579] К перемешиваемому раствору 01-35-3 (5 г, 0,0062 моль) в 9:1 IPA:вода (150 мл) добавляли LiOH H<sub>2</sub>O (0,52 г, 0,0124 моль). Реакционную смесь перемешивали при 90 °С. Через 1 час реакционную смесь концентрировали в вакууме и затем нейтрализовали 1,5 N HCl. Твердые вещества выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали в вакууме, с получением неочищенного DTx-01-35. Перекристаллизация в IPA привела к получению липидного мотива DTx-01-35 в виде грязно-белого твердого вещества (3,1 г, 63%). ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>: 792,2; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, TFA-d): δ 1,06-1,22 (m, 6H), 1,49-1,88 (m, 73H), 1,99- 2,29 (m, 8H), 2,49-2,51 (m, 2H), 2,95-3,10 (m, 2H), 3,32-3,34 (m, 2H), 3,86-3,90 (m, 2H).

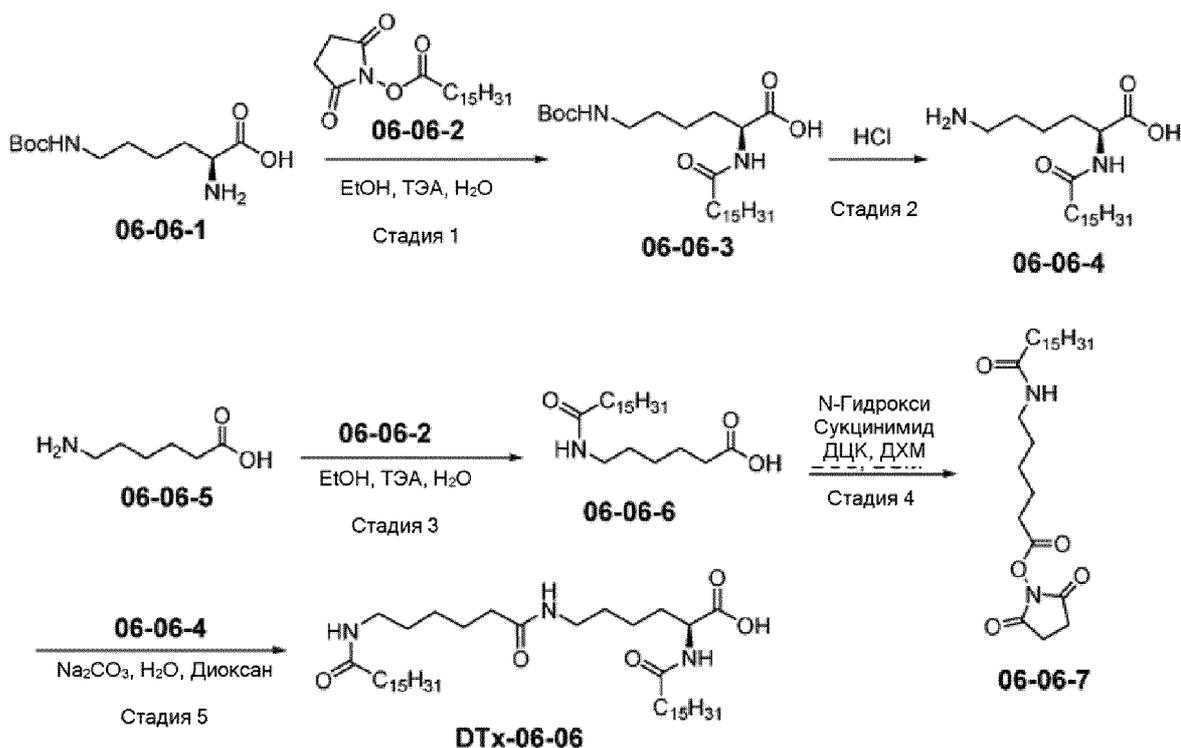
#### Синтез Липидного мотива DTx-03-06



[580] К перемешиваемому раствору 03-06-2 (1,2 г, 0,0068 моль) в 65% водн. EtOH (40 мл) при КТ медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (4,75 мл, 0,034 моль) и NHS-линейную жирную

кислоту **03-06-1** (6,0 г, 0,170 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при 75 °С. Через 16 часов реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl. Осадок выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали. Очистка осадка путем растирания с ДХМ привела к получению липидного мотива **DTx-03-06** в виде грязно-белого твердого вещества (2,3 г, 57%). ЖХ-МС  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 581,5; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, TFA-d):  $\delta$  0,78-0,82 (m, 6H), 1,21-1,40 (m, 49H), 1,62-1,79 (m, 4H), 2,35-2,46 (m, 2H), 2,96-2,30 (m, 2H), 3,89-4,03 (m, 2H).

### Синтез Липидного мотива DTx-06-06



Стадия 1: Синтез Промежуточного соединения 06-06-3

[581] К перемешиваемому раствору **06-06-1** (4,6 г, 0,0169 моль) в 65% водн. EtOH (60 мл) при КТ медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (5,9 мл, 0,042 моль) и NHS-линейную жирную кислоту **06-06-2** (6 г, 0,00186 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при 75 °С. Через 16 часов реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl. Осадок выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали. Очистка осадка при помощи колоночной хроматографии (3% MeOH в ДХМ) привела к получению **06-06-3** в виде грязно-белого твердого вещества (5,0 г, 62%).

Стадия 2: Синтез Промежуточного соединения 06-06-4

[582] К перемешиваемому раствору **06-06-3** (7 г, 0,014 моль) в 1,4-диоксане (50 мл) при КТ медленно добавляли 4 M HCl в 1,4-диоксане (50 мл). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь концентрировали при сниженном давлении с получением неочищенного **06-06-4**, который растирали с диэтиловым эфиром с получением **06-06-4** в виде грязно-белого твердого вещества (4,5 г, 81%).

Стадия 3: Синтез Промежуточного соединения 06-06-6

[583] К перемешиваемому раствору **06-06-5** (5 г, 0,038 моль) в 65% водн. EtOH (40 мл) при КТ медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (13,3 мл, 0,095 моль) и NHS-линейную жирную кислоту **06-06-2** (13 г, 0,038 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при 75 °С. Через 16 часов реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl. Осадок выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали с получением **06-06-6** в виде грязно-белого твердого вещества (4,2 г, 30%).

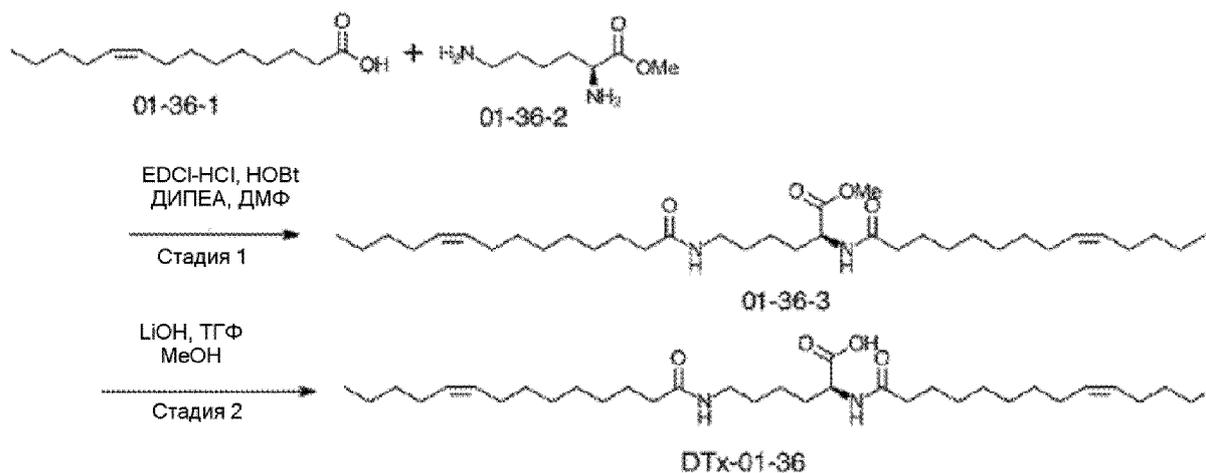
Стадия 4: Синтез Промежуточного соединения 06-06-7

[584] К перемешиваемому раствору **06-06-6** (3,8 г, 0,010 моль) в ДХМ (80 мл) при КТ добавляли ДМАП (0,12 г, 0,001 моль) и ДЦК (2,1 г, 0,010 моль), с последующим добавлением N-гидроксисукцинимид (1,17 г, 0,010 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ 16 часов. Затем реакционную смесь фильтровали через шоттовскую воронку и затем фильтрат выпаривали с получением неочищенного **06-06-7** в виде грязно-белого твердого вещества (4,7 г, 100%), который использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки.

Стадия 5: Синтез Липидного мотива DTx-06-06

[585] К перемешиваемому раствору **06-06-4** (4 г, 0,009 моль) в 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 мл) и 1,4-диоксане (100 мл) при КТ добавляли медленно **06-06-7** (4,5 г, 0,096 моль). Полученную в результате смесь перемешивали при КТ. Через 16 часов реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl. Осадок выделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали. Очистка осадка путем растирания с MeOH привела к получению липидного мотива **DTx-06-06** в виде грязно-белого твердого вещества (2,3 г, 32%). ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>: 737,6; <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, TFA-d): δ 0,77-0,79 (m, 6H), 1,22-1,52 (m, 51H), 1,68-1,81 (m, 11H), 2,10-2,18 (m, 2H), 2,50-2,67 (m, 5H), 2,94-2,98 (m, 2H), 3,49-3,60 (m, 4H).

Синтез Липидного мотива DTx-01-36



[586] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору **01-36-1** (0,73 г, 0,0032 моль) в ДМФ (6 мл) добавляли ДИПЭА (1,16 мл, 0,0064 моль), **01-36-2** (0,3 г, 0,0013 моль) с последующим добавлением EDCI (0,543 г, 0,0028 моль), HOBT (0,382 г, 0,0028 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали ДХМ.

Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3%  $\text{MeOH}$  в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **01-36-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (0,54 г, 61%).

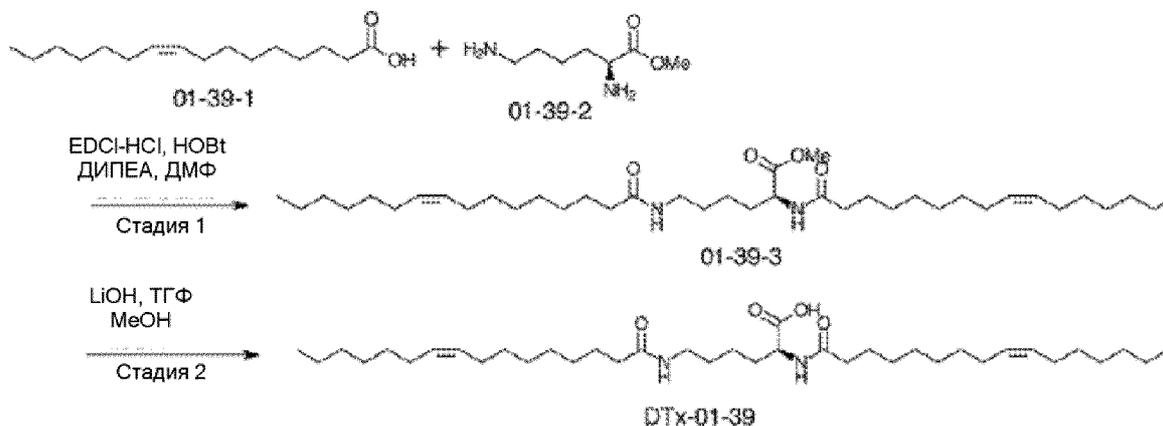
[587] *Стадия 2*: К перемешиваемому раствору соединения **01-36-3** (0,5 г, 0,0009 моль) в  $\text{MeOH}$ , ТГФ (10 мл; 1:1) и  $\text{H}_2\text{O}$  (0,25 мл) добавляли  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (0,071 г, 0,0018 моль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N  $\text{HCl}$ . Осажденное твердое вещество экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3%  $\text{MeOH}$  в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **DTx-01-36** в виде грязно-белого твердого вещества. (0,35 г, 73%)

Аналитические данные для DTx-01-36

[588]  $^1\text{H}$ -ЯМР- (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  0,84 (t,  $J= 6,8$  Гц, 6H), 1,27-1,66 (m, 35H), 1,98 -

2,10 (m, 12H), 2,93-2,99 (m, 2H), 4,08-4,14 (m, 1H), 5,27-5,35 (m, 4H), 7,71 (t,  $J= 5,2$  Гц, 1H), 7,96 (d,  $J= 7,6$  Гц, 1H), 12,49 (bs, 1H). ЖХ-МС: 563,5 (M+).

#### Синтез Липидного мотива DTx-01-39



[589] *Стадия 1*: К перемешиваемому раствору соединения **01-39-1** (2,04 г, 0,0080 моль) в ДМФ (20 мл) добавляли ДИПЭА (2,96 мл, 0,016 моль), соединение **01-39-2** (0,75 г, 0,0032) с последующим добавлением EDCI (1,35 г, 0,0070 моль), HOBT (0,95 г, 0,0070 моль) при КТ. Полученую в результате смесь перемешивали при 50°C в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали с получением неочищенного product который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3%  $\text{MeOH}$  в ДХМ в качестве элюента с

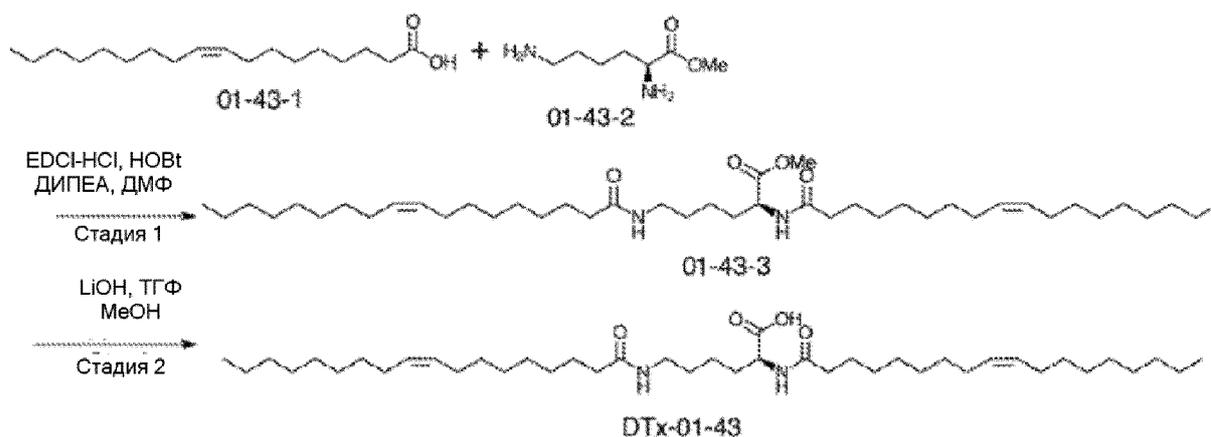
получением продукта **01-39-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (1,9 г, 79%)

[590] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **01-39-3** (1,5 г, 0,0023 моль) в MeOH, ТГФ (30 мл; 1:1) и H<sub>2</sub>O (3 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,194 г, 0,0046 моль) и реакцию контролировали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакцию контролировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl. Осажденное твердое вещество экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **DTx-01-39** в виде желтого твердого вещества. (1,2 г, 82%)

Аналитические данные для DTx-01-39

[591] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0,83 (t, J= 6,8 Гц, 6H), 1,23-1,78 (m, 42H), 1,96-2,08 (m, 12H), 2,98 (d, J= 5,6 Гц, 2H), 4,08- 4,10 (m, 1H), 5,28-5,31 (m, 4H), 7,71 (t, J=5,2 20 Гц, 1H), 7,95 (d, J= 8,4 Гц, 1H), 12,43 (bs, 1H). ЖХ-МС: 619,5 (M+1).

Синтез Липидного мотива DTx-01-43



[592] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **01-43-1** (3,5 г, 0,0107 моль) в ДМФ (50 мл) добавляли ДИПЭА (3,9 мл, 0,021 моль), дигидрохлорид соединения **01-43-2** (1 г, 0,0043 моль) с последующим добавлением EDCI (1,8 г, 0,0094 моль), HOBT (1,2 г, 0,0094 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **01-43-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (2,6 г, 88,7%)

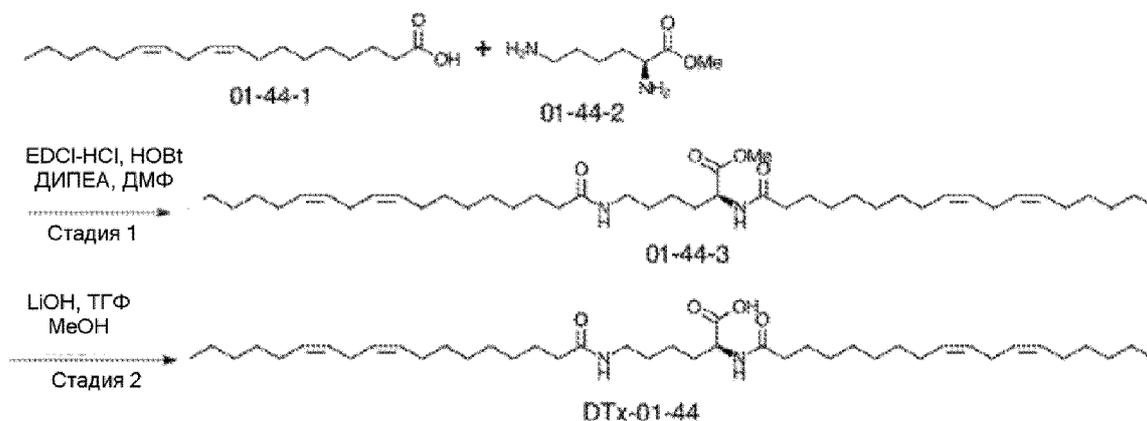
[593] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **01-43-3** (2,5 г, 0,0036 моль) в MeOH, ТГФ (40 мл; 1:1) и H<sub>2</sub>O (2 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,297 г, 0,0072 моль) и реакцию контролировали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакцию контролировали в вакууме с получением

неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl. Осажденное твердое вещество экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **DTx-01-43** в виде грязно-белого твердого вещества. (2,1 г, 90,6%)

Аналитические данные для DTx-01-43

[594] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 0,83 (t, J= 6,8 Гц, 6H), 1,05-1,65 (m, 48H), 1,96-2,16 (m, 14H), 2,98-2,99 (m, 2H), 4,11-4,16 (m, 1H), 5,29-5,37 (m, 4H), 7,71 (bs, 1H), 7,92 (d, J= 6,4 Гц, 1H). ЖХ-МС: 676,5 (M+1).

#### Синтез Липидного мотива DTx-01-44



[595] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **01-44-1** (5,1 г, 0,0018 моль) в ДМФ (50 мл) добавляли ДИПЭА (6,7 мл, 0,036 моль), соединение **01-44-2** (1,7 г, 0,0072 моль) с последующим добавлением EDCI (3,06 г, 0,016 моль), HOBT (2,16 г, 0,016 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **01-44-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (5 г, 85%)

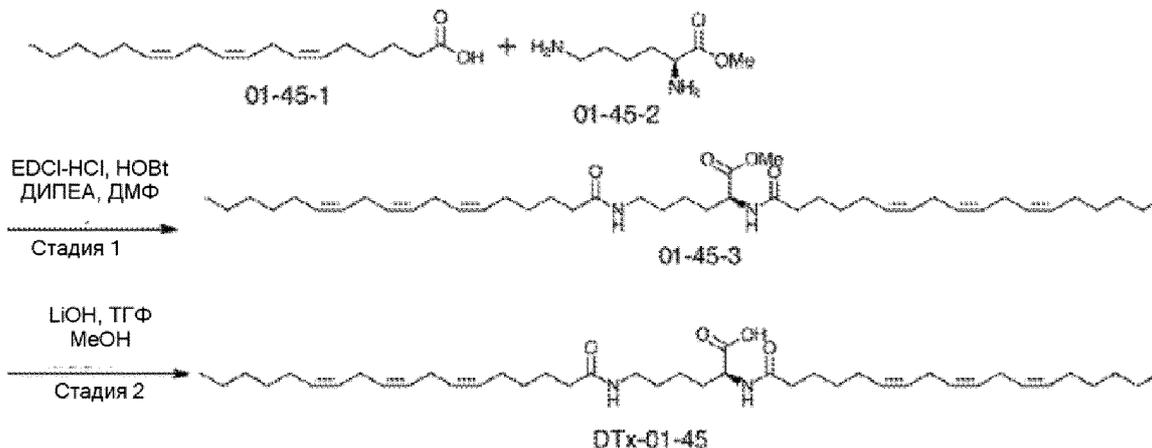
[596] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **01-44-3** (5 г, 0,0072 моль) в MeOH, ТГФ (150 мл; 1:1) и H<sub>2</sub>O (3 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,60 г, 0,0144 моль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl. Осажденное твердое вещество экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с

получением продукта **DTx-01-44** в виде бледно-желтой вязкой жидкости. (2,2 г, 45%)

Аналитические данные для DTx-01-44

[597] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 0,86 (t, J= 5,2 Гц, 6H), 1,25-1,70 (m, 38H), 2,01-2,18 (m, 12H), 2,73 (t, J= 6,4 Гц, 4H), 2,98-3,00 (m, 2H), 4,12-4,24 (m, 1H), 5,29-5,36 (m, 20 8H), 7,72 (t, J= 5,2 Гц, 1H), 7,95 (d, J= 8,0 Гц, 1H), 12,45 (bs, 1H). ЖХ-МС: 672,6 (M+).

#### Синтез Липидного мотива DTx-01-45



[598] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **01-45-1** (0,656 г, 0,0023 моль) в ДМФ (5 мл) добавляли ДИПЭА (1,00 мл, 0,0053 моль), дигидрохлорид соединения **04-45-2** (0,25 г, 0,0011 моль) с последующим добавлением EDCI (0,45 г, 0,0023 моль), HOBT (0,318 г, 0,0023 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **01-45-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (0,61 г, 83,56%)

[599] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **04-45-3** (0,6 г, 0,0008 моль) в MeOH, ТГФ (12 мл; 1:1) и H<sub>2</sub>O (0,6 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,074 г, 0,0018 моль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl. Осажденное твердое вещество экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **DTx-01-45** в виде грязно-белого твердого вещества. (0,55 г, 94,8%)

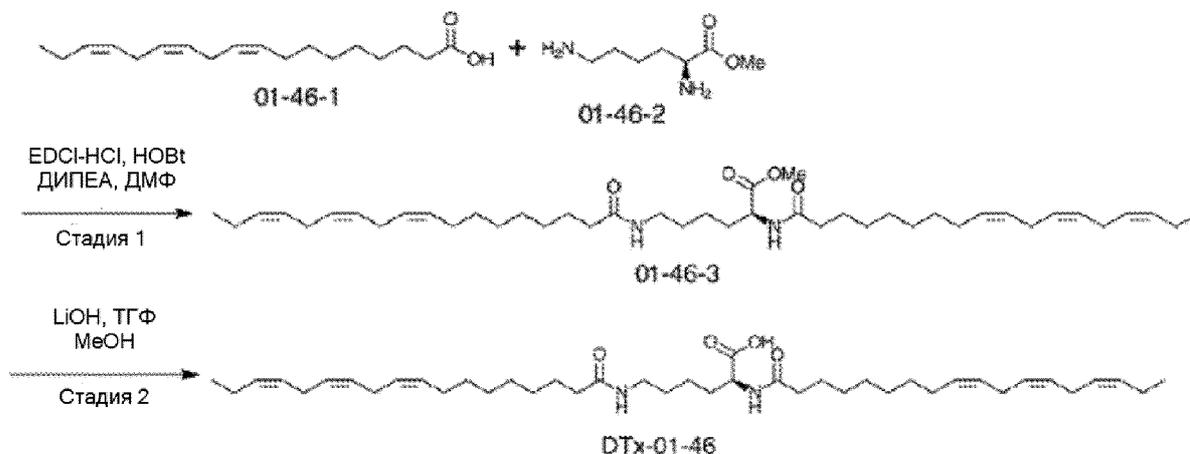
[600] Аналитические данные для DTx-01-45

[601] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 0,86 (t, J= 6,0 Гц, 6H), 1,27-1,50 (m, 26H),

2,01 -

2,10 (m, 12H), 2,77-2,80 (m, 8H), 2,96-2,98 (m, 2H), 3,98-4,01 (m, 1H), 5,32-5,37 (m, 12H), 7,61 (bs, 1H), 7,75 (bs, 1H). ЖХ-МС: 668,4 (M+1).

#### Синтез DTx-01-46



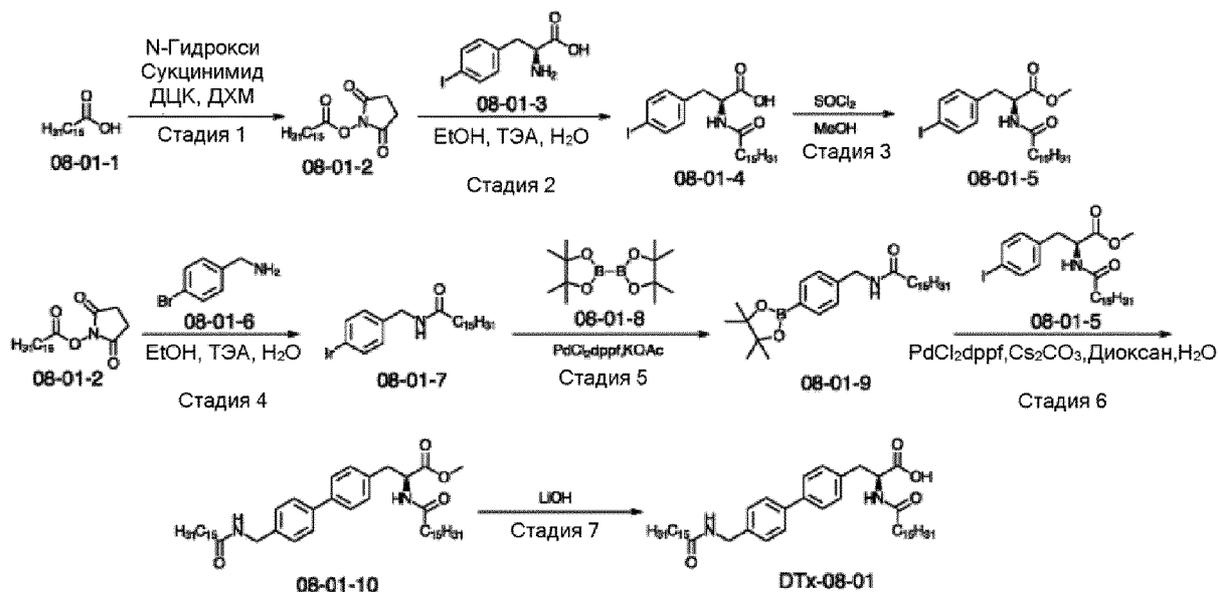
[602] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **01-46-1** (2,00 г, 0,0071 моль) в ДМФ (20 мл) добавляли ДИПЭА (2,6 мл, 0,0143 моль), соединение **01-46-2** (0,67 г, 0,0029 моль) с последующим добавлением EDCI (1,20 г, 0,0063 моль), HOBT (0,085 г, 0,0063 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **01-46-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (1,8 г, 78%)

[603] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **01-46-3** (2,4 г, 0,0035 моль) в MeOH, ТГФ (75 мл; 1:1) и  $\text{H}_2\text{O}$  (2,5 мл) добавляли  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (0,0288 г, 0,0070 моль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl. Осажденное твердое вещество экстрагировали ДХМ. Соединенный органический экстракт промывали водой, насыщенным солевым раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **DTx-01-46** в виде бледно-желтой вязкой жидкости. (1,5 г, 64%)

Аналитические данные для DTx-01-46

[604]  $^1\text{H}$ -ЯМР- (400 МГц, ДМСO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0,91 (t,  $J=7,6$  Гц, 6H), 1,24-1,68 (m, 31H), 2,01-2,10 (m, 10H), 2,78 (t,  $J=6,0$  Гц, 4H), 2,88-2,99 (m, 3H), 5,27-5,36 (m, 1H), 5,29-5,36 (m, 12H), 7,71 (t,  $J=5,2$  Гц, 1H), 7,96 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H). ЖХ-МС: 668,6 (M+1).

#### Синтез DTx-08-01



[605] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **08-01-1** (10 г, 0,0389 моль) в ДХМ (200 мл) добавляли ДМАП (0,47 г, 0,0038 моль), ДЦК (8,04 г, 0,0389 моль) с последующим добавлением N-гидроксисукцинимид (4,48 г, 0,0389 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь фильтровали через шоттовскую воронку, фильтрат выпаривали с получением неочищенного product **08-01-02** в виде грязно-белого твердого вещества который использовали непосредственно для следующей стадии. (10 г, 72%)

[606] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **08-01-2** (10 г, 0,0283 моль) в 65% водн. этаноле (100 мл) добавляли Et<sub>3</sub>N (11,8 мл, 0,0849 моль), соединение **08-01-3** (10,6 г, 0,0368 моль) медленно при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при 75°C в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали с получением продукта **08-01-4** в виде грязно-белого твердого вещества. (11 г, 73%)

[607] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **08-01-4** (11 г, 0,0207 моль) в метаноле (110 мл) медленно добавляли тионил хлорид (44 мл) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который растирали с диэтиловым эфиром с получением неочищенного соединения **08-01-5** в виде грязно-белого твердого вещества. (9 г, 80%)

[608] *Стадия 4:* К перемешиваемому раствору соединения **08-01-2** (5 г, 0,0141 моль) в 65% водн. этанола (50 мл) медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (6 мл, 0,0424 моль), соединение **08-01-6** (3,3 г, 0,0184 моль) при РТ. Полученную в результате смесь перемешивали при 75°C в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой

и высушивали с получением продукта **08-01-7** в виде грязно-белого твердого вещества. (5,1 г, 85%)

[609] *Стадия 5:* К перемешиваемому раствору соединения **08-01-7** (5 г, 0,0117 моль) в диоксане (100 мл) добавляли **08-01-8** ((4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксобонолан) (4,4 г, 0,0176 моль)) и АсОК (3,4 г, 0,0353 моль). После дегазации азотом, Pd(dppl)CL<sub>2</sub> (0,48 г, 0,0005 моль) добавляли в реакционную смесь. Полученную в результате смесь перемешивали при 90°C в течение 12 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь фильтровали через целитную подложку и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **01-08-9** в виде коричневого твердого вещества. (4,8 г, 86%)

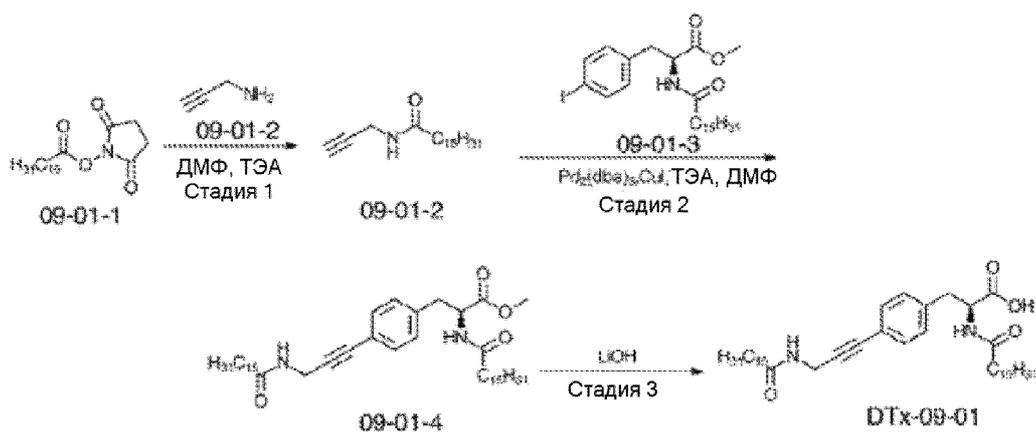
[610] *Стадия 6:* К перемешиваемому раствору соединения **01-08-5** (4,5 г, 0,0082 моль) в диоксане (90 мл) и воде (9 мл) добавляли соединение **01-08-9** (4,68 г, 0,0099 моль) и CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,1 г, 0,0248 моль). После дегазации азотом, Pd(dppl)CL<sub>2</sub> (0,67 г, 0,0008 моль) добавляли к реакционной смеси. Полученную в результате смесь перемешивали при 90°C в течение 3 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь фильтровали через целитную подложку и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **01-08-10** в виде коричневого твердого вещества. (1 г, 14,2%)

[611] *Стадия 7:* К перемешиваемому раствору соединения **01-08-10** (1 г, 0,0013 моль) в MeOH, ТГФ (6,5 мл; 13 мл) и H<sub>2</sub>O (6,5 мл) добавляли LiOH.H<sub>2</sub>O (0,16 г, 0,0039 моль) и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 3 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме. Полученный в результате продукт нейтрализовали 1,5 N HCl, твердое вещество, которое осадили, фильтровали, промывали водой и высушивали в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением очищенного **DTx-08-01** в виде грязно-белого твердого вещества (0,5 г, 51%).

Аналитические данные для DTx-08-01

[612] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d1): δ 0,78-0,79 (m, 6H), 1,08-1,49 (m, 48H), 1,49-1,50 (m, 2H), 1,72-1,83 (m, 2H), 2,69-2,71 (m, 2H), 5,77-2,82 (m, 2H), 3,41 (d, J= 14,8 Гц, 1H), 3,53 (d, J= 14,4 Гц, 1H), 4,66 (s, 2H), 5,16 -5,18 (m, 1H), 7,23 (d, J= 8,0 Гц, 2H), 7,33 (d, J=8,0 Гц, 2H), 7,58 (t, J= 2,4 Гц, 4H). ЖХ-МС: 748,6 (M+1).

Синтез DTx-09-01



[613] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **09-01-1** (10 г, 0,0283 моль) в ДМФ (100 мл) медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (11,7 мл, 0,0849 моль), соединение **09-01-2** (2,02 г, 0,0368 моль) при КТ. Полученую в результате смесь перемешивали при 50°C в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали с получением продукта **09-01-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (4,5 г, 55%)

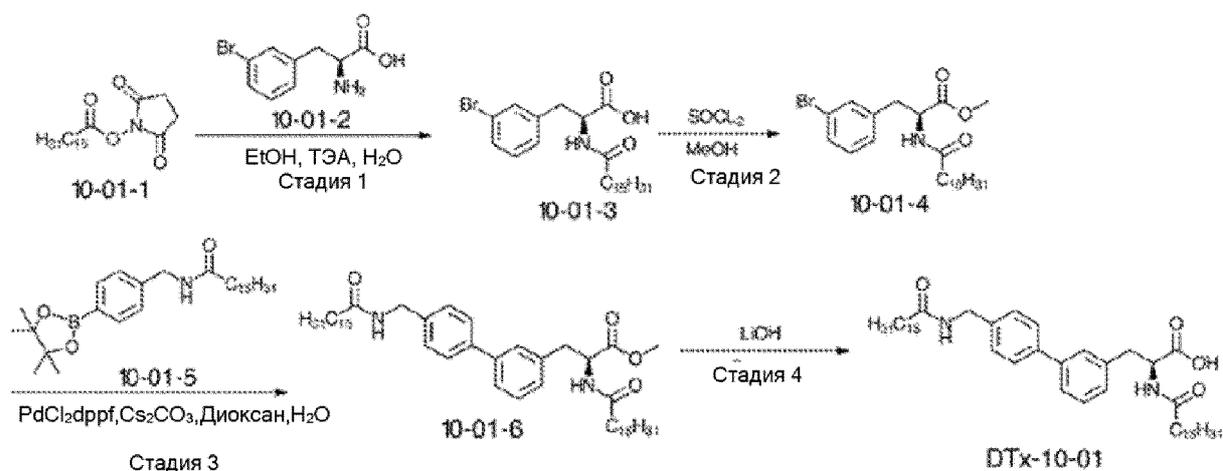
[614] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **09-01-4** (5 г, 0,092 моль) в ДМФ (50 мл) добавляли соединение **09-01-3** (3,5 г, 0,0119 моль), TEA (15 мл) и CuI (0,20 г, 0,0011 моль). После дегазации азотом, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,67 г, 0,0007 моль) добавляли к реакционной смеси. Полученную в результате смесь перемешивали при 50°C в течение 3 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь фильтровали через целитную подложку и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 25% EtOAc в гексане в качестве элюента с получением продукта **09-01-5** в виде грязно-белого твердого вещества. (1 г, 15,6%)

[615] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **09-01-5** (1 г, 0,0014 моль) в MeOH, ТГФ (6,5 мл; 13 мл) и H<sub>2</sub>O (6,5 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,17 г, 0,0042 моль) и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 2 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **DTx-09-01** в виде бледно-коричневато-белого твердого вещества (0,5 г, 51%).

Аналитические данные для DTx-09-01

[616] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d1): δ 0,89-0,92 (m, 6H), 1,20-1,40 (m, 49H), 1,67-1,70 (m, 2H), 1,82-1,86 (m, 2H), 2,71-2,75 (m, 2H), 5,91-2,95 (m, 2H), 3,47 (d, J= 14,8 Гц, 1H), 3,61 (d, J= 14,8 Гц, 1H), 4,52 (s, 2H), 7,25 (d, J= 8,0 Гц, 2H), 7,50 (d, J= 8,0 Гц, 2H). ЖХ-МС:

696,5 (M+I).

**Синтез DTx-10-01**

[617] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **10-01-1** (5 г, 0,0141 моль) в 65% водн. этанола (50 мл) медленно добавляли Et<sub>3</sub>N (10 мл, 0,0707 моль), соединение **10-01-2** (3,45 г, 0,0141 моль) при КТ. Полученую в результате смесь перемешивали при 75°C в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали с получением продукта **10-01-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (5,5 г, 80,6%)

[618] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **10-01-3** (5,5 г, 0,0113 моль) в метаноле (550 мл) добавляли тионил хлорид (22 мл) медленно при КТ. Полученую в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь концентрировали при сниженном давлении с получением неочищенного продукта который растирали с диэтиловым эфиром с получением неочищенного соединения **10-01-4** в виде грязно-белого твердого вещества (4,3 г, 76%).

[619] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **10-01-4** (4,3 г, 0,0086 моль) в диоксане (90 мл) и воду (9 мл) добавляли соединение **10-01-5** (4,5 г, 0,00952 моль) и CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,46 г, 0,0259 моль). После дегазации азотом, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0,7 г, 0,0008 моль) добавляли к реакционной смеси. Полученую в результате смесь перемешивали при 90°C в течение 3 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь фильтровали через целитную подложку и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **10-01-6** в виде коричневого твердого вещества. (1,1 г, 16,68%)

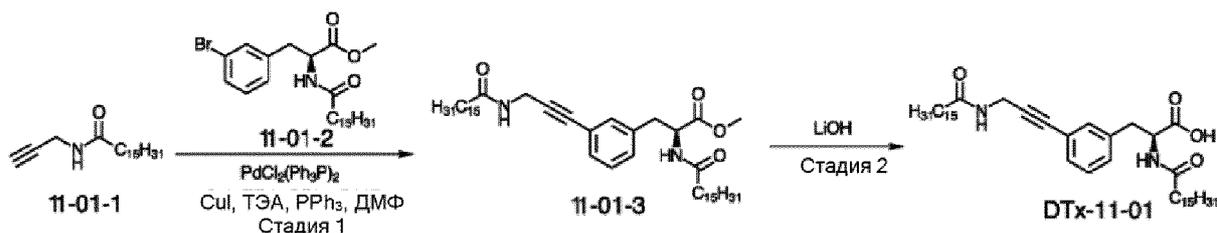
[620] *Стадия 4:* К перемешиваемому раствору соединения **10-01-6** (1,1 г, 0,0014 моль) в MeOH, ТГФ (6,5 мл; 13 мл) и H<sub>2</sub>O (6,5 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,18 г, 0,0042 моль) и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 3 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме. Полученный в

результате продукт нейтрализовали 1,5 N HCl, твердое вещество, которое осадили, фильтровали, промывали водой и высушивали в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением очищенного **DTx-10-01** в виде грязно-белого твердого вещества (0,7 г, 64%).

Аналитические данные для DTx-10-01

[0621] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-dl):  $\delta$  0,78-0,80 (m, 6H), 1,13-1,45 (m, 50H), 1,73-1,75 (m, 2H), 2,39-2,43 (m, 1H), 2,70-2,74 (m, 2H), 3,14-3,20 (m, 1H), 3,46-3,51 (m, 2H), 4,68 (s, 2H), 5,17- 5,20 (m, 1H), 7,17 (d,  $J = 7,2$  Гц, 1H), 7,33-7,43 (m, 4H), 7,50 (d,  $J = 7,6$  Гц, 1H), 7,57-7,58 (m, 2H). ЖХ-МС: 748,5 (M+1)

### Синтез DTx-11-01



[622] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **11-01-1** (2,68 г, 0,0091 моль) в ДМФ (35 мл) в запаянной пробирке добавляли соединение **11-01-2** (3,5 г, 0,0070 моль), TEA (18 мл), PPh<sub>3</sub> (0,18 г, 0,0007 моль) и CuI (0,16 г, 0,0008 моль). После дегазации азотом, PdCl<sub>2</sub>(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub> (0,39 г, 0,0005 моль) добавляли к реакционной смеси. Полученную в результате смесь перемешивали при 110°C в течение 3 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь фильтровали через целитную подложку и концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 25% EtOAc в гексане в качестве элюента с получением продукта **11-01-3** в виде грязно-белого твердого вещества. (1 г, 20%)

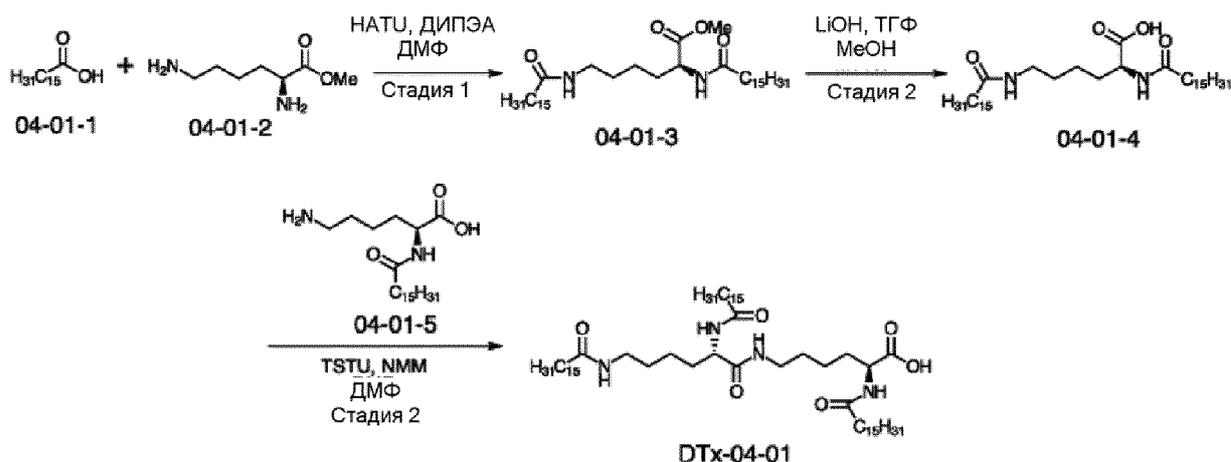
[623] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **11-01-3** (1 г, 0,0014 моль) в MeOH, ТГФ (6,5 мл; 13 мл) и H<sub>2</sub>O (6,5 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,17 г, 0,0042 моль) и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 2 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали в вакууме с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт подвергали дополнительной очистке при помощи колоночной хроматографии с использованием 3% MeOH в ДХМ в качестве элюента с получением продукта **DTx-11-01** в виде бледно-коричневатого твердого вещества (0,7 г, 71%).

Аналитические данные для DTx-11-01

[624] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-dl):  $\delta$  0,87-0,90 (m, 6H), 1,31-1,47 (m, 48H), 1,65-1,68 (m, 2H), 1,81-1,85 (m, 2H), 2,71-2,74 (m, 2H), 2,89-2,95 (m, 2H), 3,42 (d,  $J = 14,8$  Гц, 1H), 3,57 (d,  $J = 14,8$  Гц, 1H), 4,50 (s, 2H), 5,20-5,24 (m, 1H), 7,25 (d,  $J = 7,6$  Гц, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,39 (t,

$J = 8,0$  Гц, 1H), 7,47 (d,  $J = 7,6$  Гц, 1H). ЖХ-МС: 696,5 (M+1).

Синтез DTx-04-01



[625] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **04-01-2** (5 г, 0,021 моль) в ДМФ (100 мл) медленно добавляли ДИПЭА (19,7 мл, 0,107 моль), соединение **04-01-1** (13,73 г, 0,053 моль) NATU (12,23 г, 0,032 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь гасили ледяной водой и фильтровали твердое вещество, высушивали твердое вещество в вакууме с получением продукта **04-01-3** в виде грязно-белого твердого вещества (9,1 г, 67%).

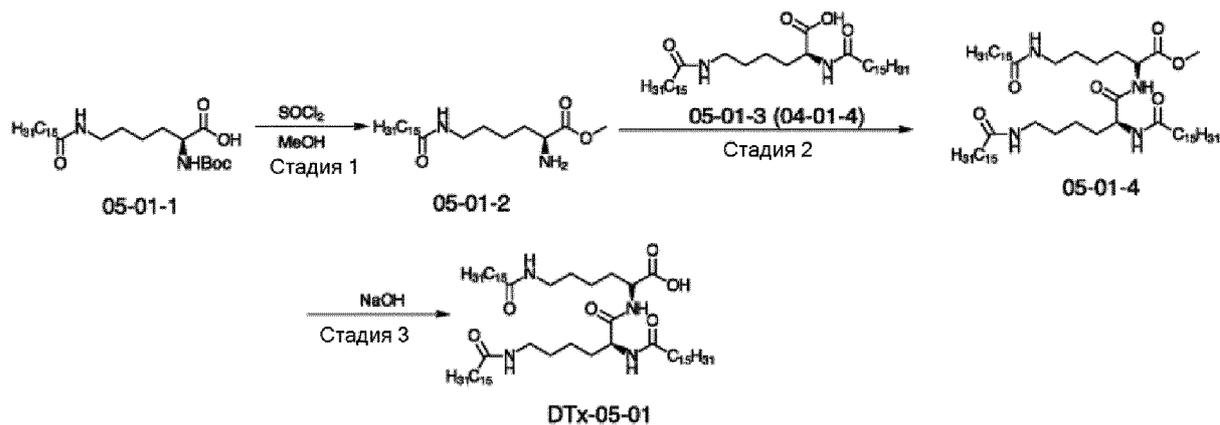
[626] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **04-01-3** (5 г, 0,0078 моль) в MeOH, ТГФ (100 мл; 1:1) и H<sub>2</sub>O (5 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (0,660 г, 0,0157 моль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением неочищенного продукта, который нейтрализовали 1,5 N HCl, твердое вещество, которое осадил, фильтровали, промывали водой и высушивали в вакууме с получением продукта **04-01-4** в виде грязно-белого твердого вещества (3,9 г, 80%).

[627] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **04-01-4** (3,0 г, 0,0048 моль) в ДМФ (60 мл) добавляли NMM (15 мл), с последующим добавлением TSTU (2,18 г, 0,0096 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Соединение **5** (3,69 г, 0,0096 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **DTx-04-01** в виде грязно-белого твердого вещества. (2,8 г, 58%).

Аналитические данные для DTx-04-01

[628] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d): δ 1,09-1,13 (m, 9H), 1,57-2,16 (m, 84H), 2,38-2,44 (m, 3H), 2,77-2,94 (m, 4H), 3,18-3,31 (m, 5H), 3,69-3,81 (m, 5H), 4,87-4,92 (m, 1H). ЖХ-МС: 990,8 (M+1).

Синтез DTx-05-01



[629] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **05-01-1** (5 г, 0,0103 моль) в метаноле (50 мл) медленно добавляли тионил хлорид (3,8 мл, 0,0516 моль) при 0 °С. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Полученую в результате смесь выпаривали и растирали с диэтиловым эфиром с получением соединения **05-01-2** в виде грязно-белого твердого вещества который использовали непосредственно для следующей стадии (3,5 г, 85%).

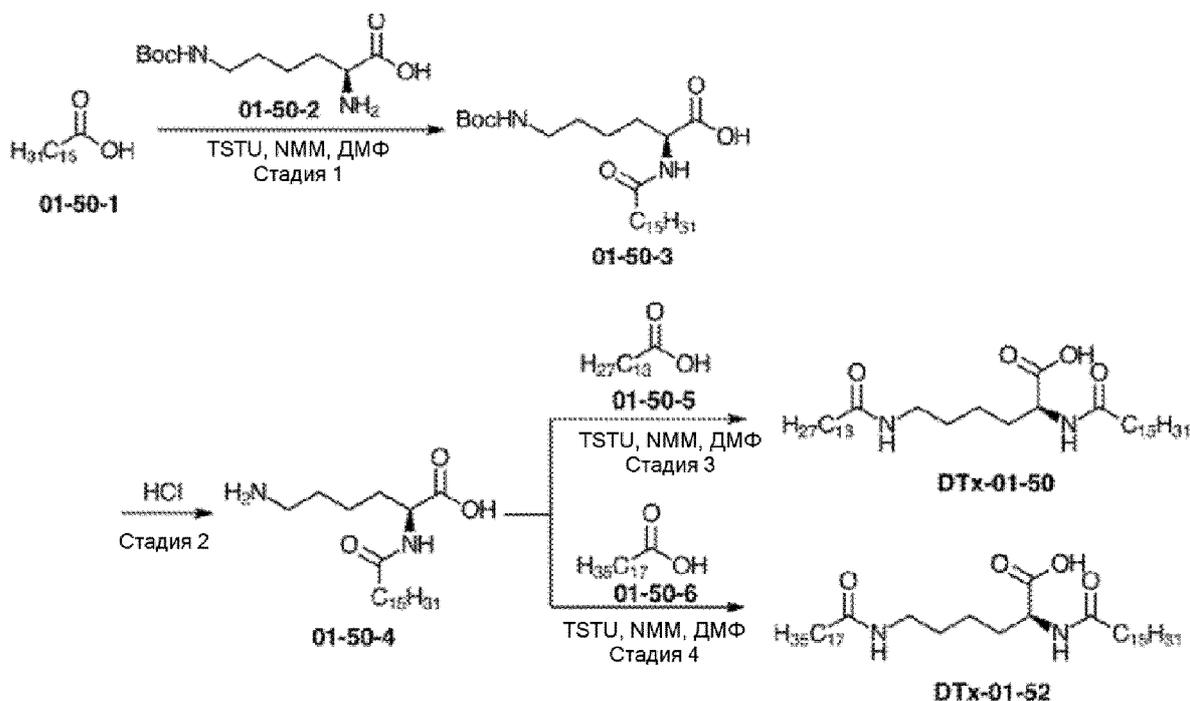
[630] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **05-01-2** (2,89 г, 0,0067 моль) в ДМФ (35 мл) медленно добавляли ДИПЭА (1,55 мл, 0,0084 моль), соединение **05-01-3** (3,5 г, 0,0056 моль) и НВТУ (2,12 г, 0,0056 моль) при 0 °С. Полученную в результате смесь перемешивали при 50 °С в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали с получением соединения **05-01-4** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (3,2 г, 69%).

[631] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **05-01-4** (3.2 г, 0,0031 моль) в MeOH, ТГФ (60 мл, 1:1) and H<sub>2</sub>O (3 мл) добавляли NaOH (0.25 г, 0.0062 моль) and реакцию смесь перемешивали при 50°C в течение 16 часов. Реакцию контролировали при помощи ЖХ-МС, реакцию смесь концентрировали и нейтрализовали 1,5 N HCl. The осажденное твердое вещество фильтовали, промывали водой and высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением **DTx-05-01** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (2,3 г, 73%).

Аналитические данные для DTx-05-01

[632] <sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d): δ 0,87-0,89 (m, 9H), 1,60-1,80 (m, 76H), 1,94-2,14 (m, 15H), 2,55-2,59 (m, 2H), 2,70-2,75 (m, 4H), 3,59-3,60 (m, 4H), 4,73-4,76 (m, 1H). ЖХ-МС: 990,8 (M+).

Синтез DTx-01-50 & DTx-01-52



[633] *Стадия 1.* К перемешиваемому раствору **01-50-1** (5,0 г, 0,019 моль) в ДМФ (50 мл) добавляли NMM (25 мл), с последующим добавлением TSTU (6,46 г, 0,021 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. **01-50-2** (7,2 г, 0,029 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Остаток нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **01-50-3** в виде коричневого твердого вещества. (9,1 г, 96%).

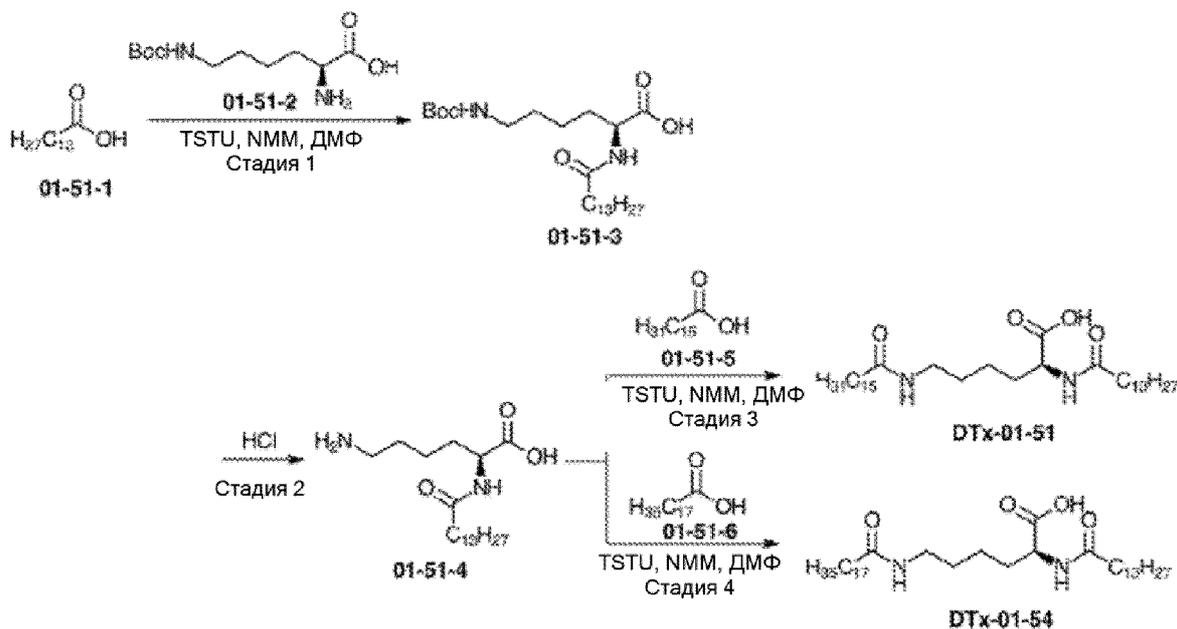
[634] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **01-50-3** (9,1 г, 0,018 моль) в 1,4 диоксане (45 мл) медленно добавляли 4 M HCl в диоксане (45 мл) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при сниженном давлении с получением неочищенного продукта который растирали с диэтиловым эфиром с получением неочищенного соединения **01-50-4** в виде грязно-белого твердого вещества (6,5 г, 82%).

[635] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **01-50-5** (1,5 г, 0,0065 моль) в ДМФ (45 мл) добавляли NMM (23 мл), с последующим добавлением TSTU (2,17 г, 0,0072 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. **01-50-4** (3,32 г, 0,0078 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Остаток нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **DTx-01-50** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (2,1 г, 53%). **ЖХ-МС:** 595.5 (M+1). **<sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d):**  $\delta$  0,93-0,95 (m, 6H), 1,38-1,65 (m, 44H), 1,65-1,69 (m, 2H), 1,84-2,06 (m, 7H), 2,20-2,24 (m, 1H), 2,67 (t, J = 7,6 Гц, 2H), 2,82 (t, J = 7,9 Гц, 2H), 3,68 (t, J = 6,8 Гц, 2H), 4,93 (t, J = 8,0 Гц, 1H).

[636] *Стадия 4:* К перемешиваемому раствору соединения **6** (1,5 г, 0,0052 моль) в ДМФ (45 мл) добавляли NMM (23 мл), с последующим добавлением TSTU (1,74 г, 0,0058 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали 5 при КТ в течение 2 часов. Соединение **4** (2,66 г, 0,0063 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Остаток нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **DTx-01-52** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (2,2 г, 64%). **ЖХ-МС:** 652,5 (M+1).

**<sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d):**  $\delta$  0,93-0,94 (m, 6H), 1,37-1,59 (m, 52H), 1,66-1,68 (m, 2H), 1,84-2,05 (m, 7H), 2,20-2,23 (m, 1H), 2,67 (t,  $J=7,3$  Гц, 2H), 2,81 (t,  $J=7,5$  Гц, 2H), 3,69 (t,  $J=6,2$  Гц, 2H), 4,92 (t,  $J=4,9$  Гц, 1H).

#### Синтез DTx-01-51 & DTx-01-54



[637] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору **01-51-1** (5,0 г, 0,021 моль) в ДМФ (50 мл) добавляли NMM (25 мл), с последующим добавлением TSTU (7,25 г, 0,024 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Соединение **01-51-2** (8,09 г, 0,032 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Остаток нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **01-51-3** в виде коричневого твердого вещества. (9 г, 90%).

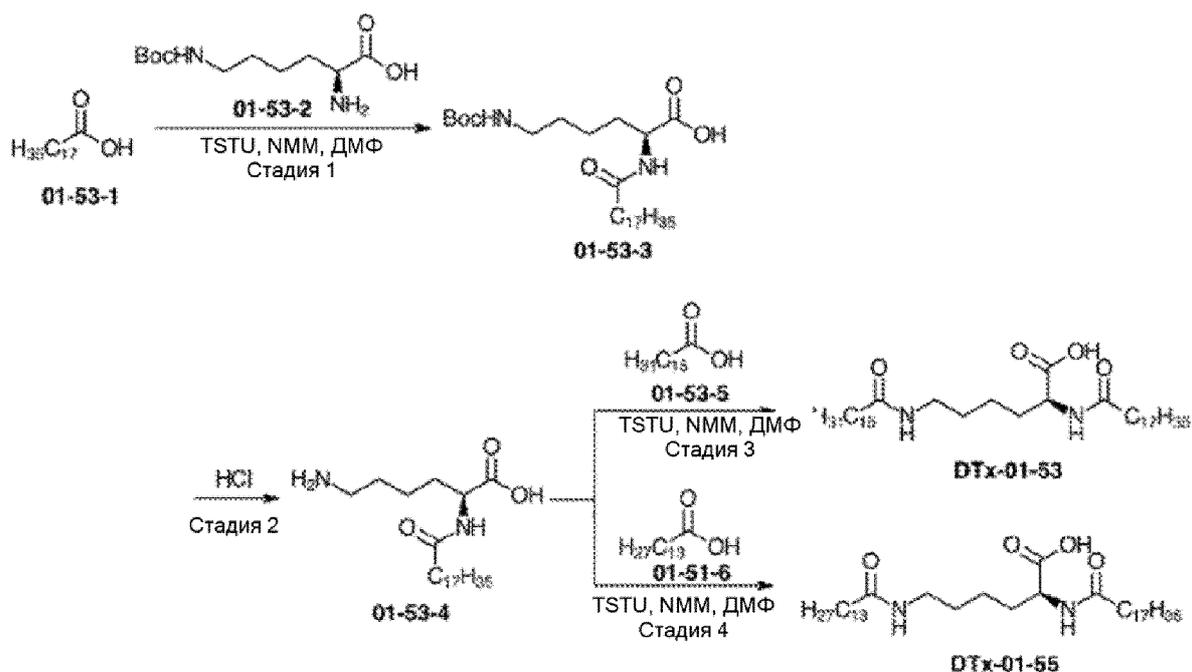
[638] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **01-51-3** (9 г, 0,014 моль) в 1,4 диоксане (45 мл) медленно добавляли 4 M HCl в диоксане (45 мл) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при сниженном давлении с получением неочищенного продукта который растирали с диэтиловым эфиром с получением неочищенного соединения **01-51-4** в виде грязно-белого твердого вещества (6,6 г, 81%).

[639] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **01-51-5** (1,5 г, 0,0058 моль) в ДМФ (45 мл) добавляли NMM (23 мл), с последующим добавлением TSTU (1,93 г, 0,0064 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Соединение **01-51-4** (2,76 г, 0,0070 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Остаток нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **DTx-01-51** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (2,4 г, 68%). **ЖХ-МС:** 595,5 (M+1). **<sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d):**  $\delta$  0,89-0,92 (m, 6H), 1,34-1,50 (m, 44H), 1,63-1,65 (m, 2H), 1,81-2,08 (m, 7H), 2,20-2,21 (m, 1H), 2,63 (t,  $J=7,3$  Гц, 2H), 2,78 (t,  $J=7,4$  Гц, 2H), 3,65 (t,  $J=6,4$  Гц, 2H), 4,89 (t,  $J=7,1$  Гц, 1H).

[640] *Стадия 4:* К перемешиваемому раствору соединения **01-51-6** (1,5 г, 0,0052 моль) в ДМФ (45 мл) добавляли NMM (23 мл), с последующим добавлением TSTU (1,74 г, 0,0058 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Соединение **01-51-4** (2,49 г, 0,0063 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Остаток нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **DTx-01-54** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (2,2 г, 66%). **ЖХ-МС:** 624,6 (M+1).

[0642] **<sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d):**  $\delta$  0,89-0,90 (m, 6H), 1,32-1,57 (m, 49H), 1,62-1,64 (m, 2H), 1,74-1,99 (m, 6H), 2,14-2,18 (m, 1H), 2,61 (t,  $J=7,6$  Гц, 2H), 2,76 (t,  $J=7,6$  Гц, 2H), 3,62 (t,  $J=7,0$  Гц, 2H), 4,85 -4,88 (m, 1H).

#### Синтез DTx-01-53 & DTx-01-55



[643] *Стадия 1:* К перемешиваемому раствору соединения **1** (5,0 г, 0,017 моль) в ДМФ (50 мл) добавляли NMM (25 мл), с последующим добавлением TSTU (5,82 г, 0,019 моль) при

КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Соединение **2** (5,18 г, 0,021 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем 5 перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **3** в виде коричневого твердого вещества. (8,6 г, 95%).

[644] *Стадия 2:* К перемешиваемому раствору соединения **3** (8,6 г, 0,016 моль) в 1,4 диоксане (43 мл) медленно добавляли 4 M HCl в диоксане (43 мл) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали при сниженном давлении с получением неочищенного продукта, который растирали с диэтиловым эфиром с получением неочищенного соединения **4** в виде грязно-белого твердого вещества (7 г, 93%).

[645] *Стадия 3:* К перемешиваемому раствору соединения **5** (1,5 г, 0,0058 моль) в ДМФ (45 мл) добавляли NMM (23 мл), с последующим добавлением TSTU (1,94 г, 0,0064 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Соединение **4** (3,15 г, 0,0070 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 часов и затем концентрировали. Реакционную смесь нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **DTx-01-53** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (2,2 г, 57%). **ЖХ-МС:** 652,6 (M+). **<sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d):**  $\delta$  0,82-0,85 (m, 6H), 1,27-1,50 (m, 52H), 1,54-1,58 (m, 2H), 1,73-1,94 (m, 7H), 2,07-2,14 (m, 1H), 2,56 (t, J= 8,0 Гц, 2H), 2,71 (t, J= 8,0 Гц, 2H), 3,58 (t, J=6,8Hz,2H), 4,81-4,84 (m, 1H).

[646] *Стадия 4:* К перемешиваемому раствору соединения **6** (1,5 г, 0,0065 моль) в ДМФ (45 мл) добавляли NMM (23 мл), с последующим добавлением TSTU (2,17 г, 0,0072 моль) при КТ. Полученную в результате смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Соединение **4** (3,53 г, 0,0078 моль) добавляли к реакционной смеси при 0°C и затем перемешивали при 70°C в течение 5 ч и затем концентрировали. Остаток нейтрализовали 1,5 N HCl, осажденное твердое вещество фильтровали, промывали водой и высушивали. Неочищенный продукт растирали с MeOH с получением продукта **DTx-01-55** в виде бледно-коричневого твердого вещества. (2,3 г, 56%). **ЖХ-МС:** 624,6 (M+).

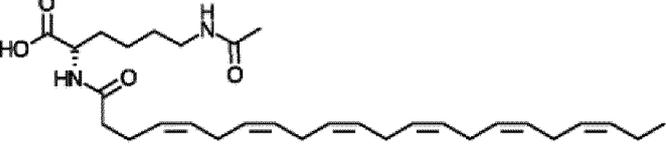
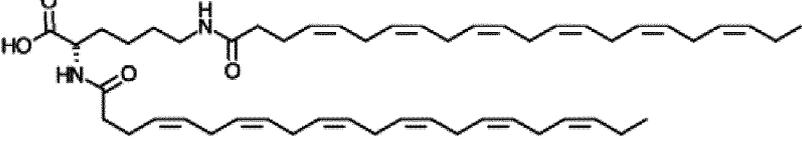
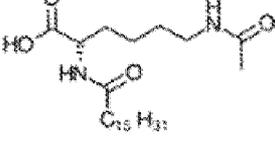
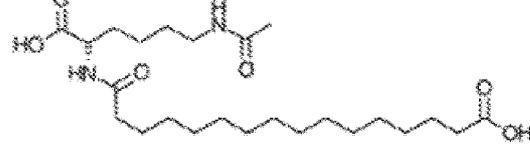
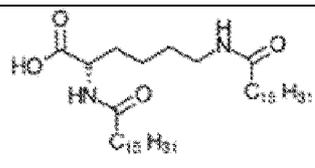
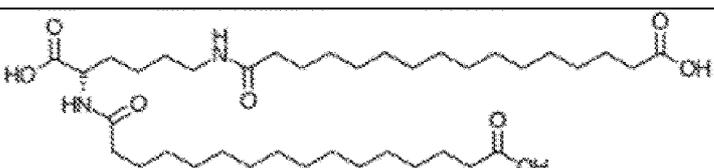
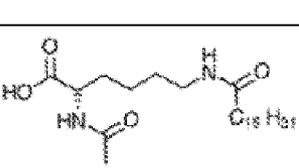
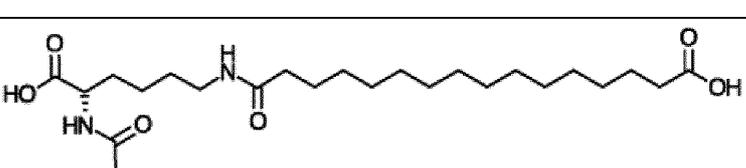
[0647] **<sup>1</sup>H-ЯМР- (400 МГц, TFA-d):**  $\delta$  0,90-0,93 (m, 6H), 1,35-1,49 (m, 48H), 1,60-1,63 (m, 2H), 1,77-2,02 (m, 7H), 2,17-2,21 (m, 1H), 2,64 (t, J= 7,6 Гц, 2H), 2,78 (t, J= 7,7 Гц, 2H), 3,65 (t, J= 7,0 Гц, 2H), 4,88-4,91 (m, 1H).

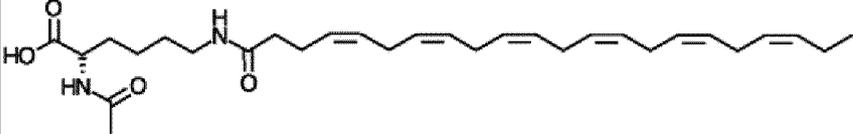
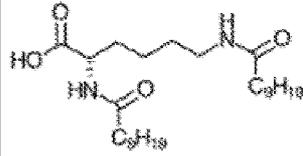
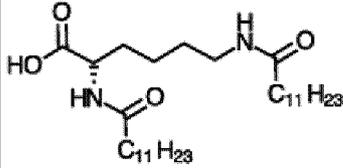
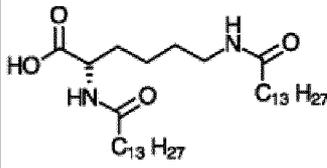
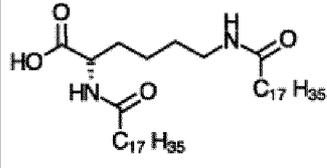
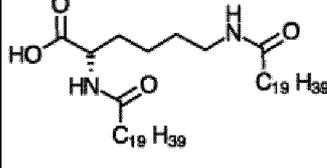
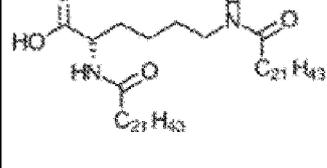
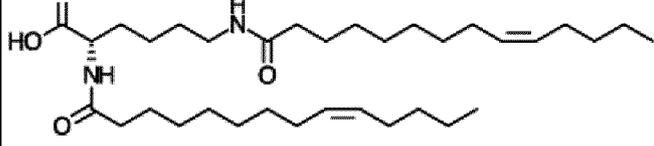
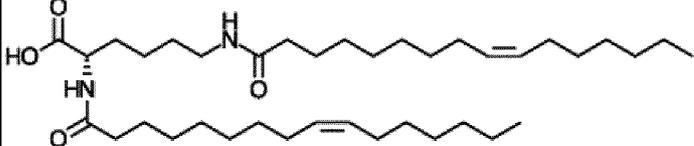
[0648] Мотивы, представленные в приведенных выше схемах синтеза, а также дополнительные мотивы, перечислены в Таблице 1.

[0649] Синтез определенных мотивов приводит к получению мотива, содержащего защитную группу сложного эфира. Например, синтез мотив DTx-01-12 приводит к получению DTx-01-12-OMe, метилового сложного эфира DTx-01-12. После

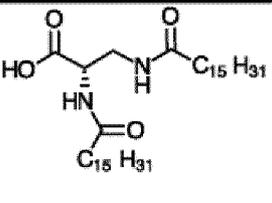
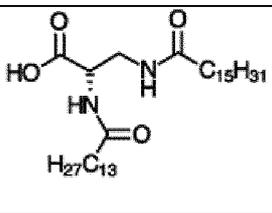
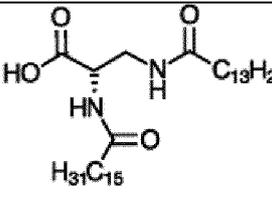
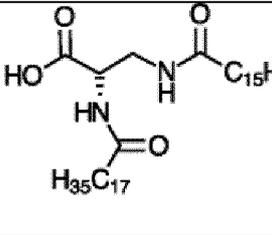
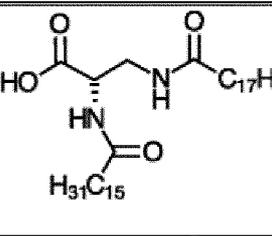
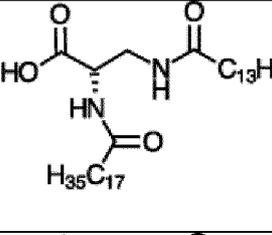
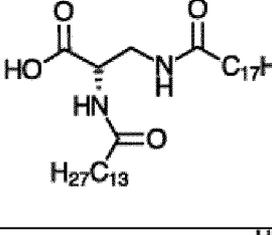
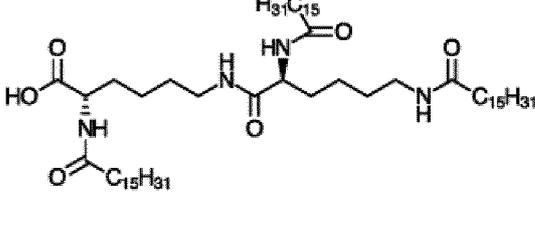
конъюгирования с соединением нуклеиновой кислоты, защитная группа сложного сложного эфира удаляется и больше не присутствует в липидном мотиве. Таким образом, как показано в Таблице 1, Фигурах с 1 по 12 и Фигурах с 80 по 83, эти определенные мотивы показаны без защитной группы сложного метилового эфира **15**.

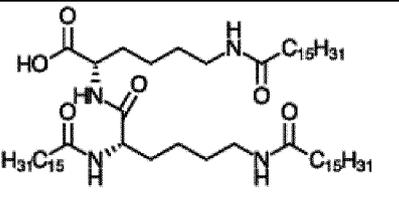
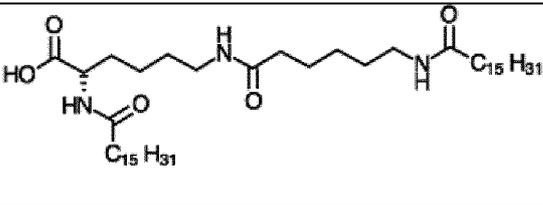
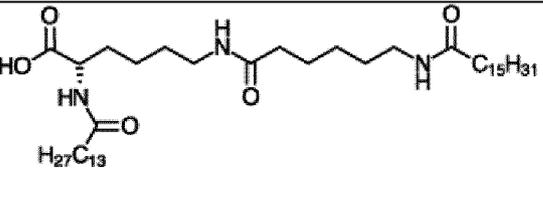
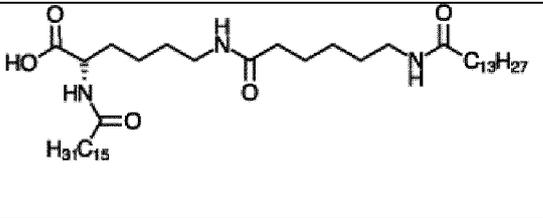
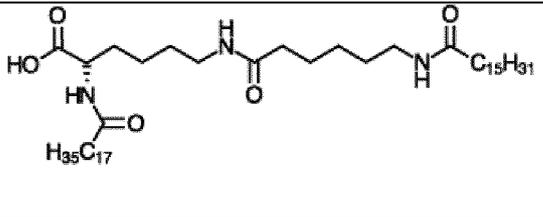
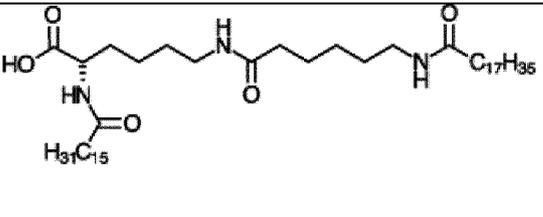
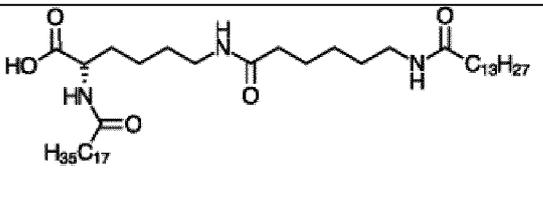
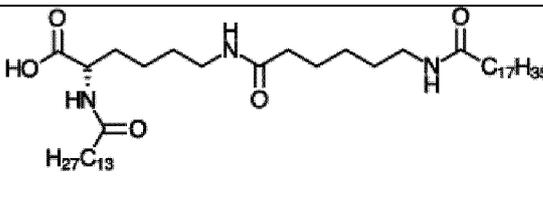
Таблица 1: Мотивы DTx

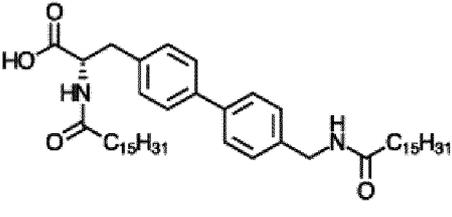
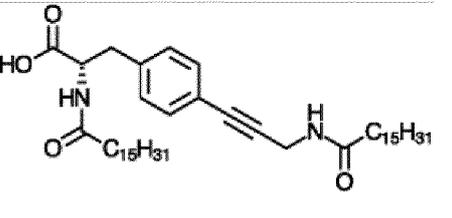
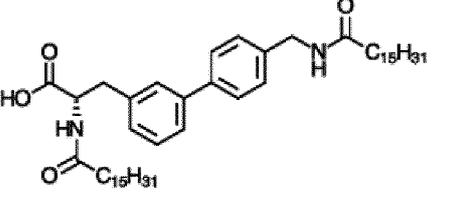
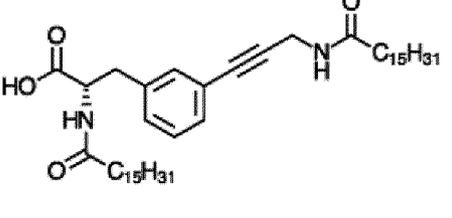
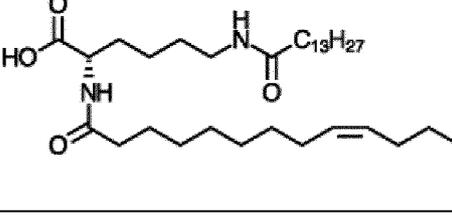
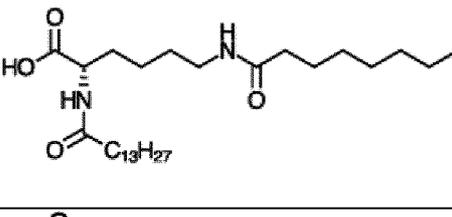
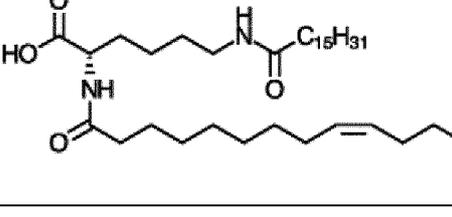
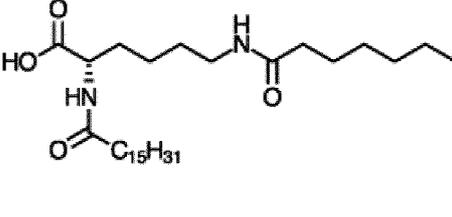
Название мотива	Структура
DTx-01-01	
DTx-01-03	
DTx-01-06	
DTx-01-07	
DTx-01-08	
DTx-01-09	
DTx-01-11	
DTx-01-12	

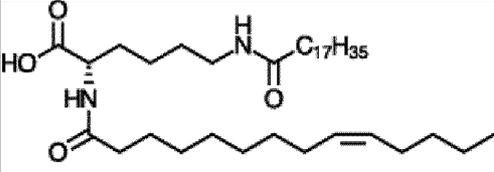
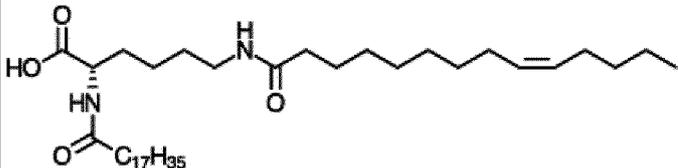
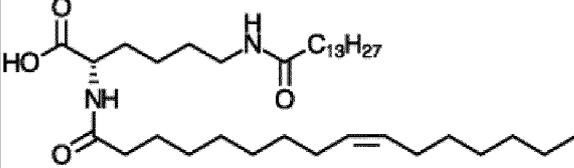
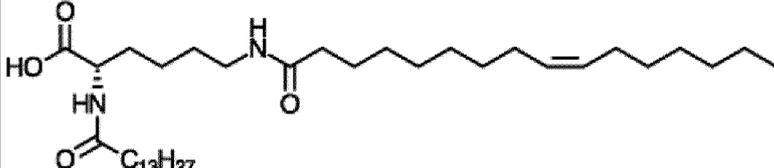
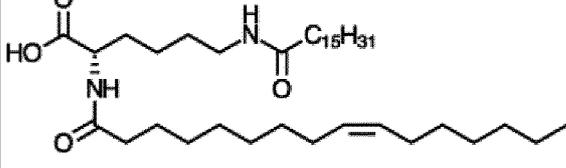
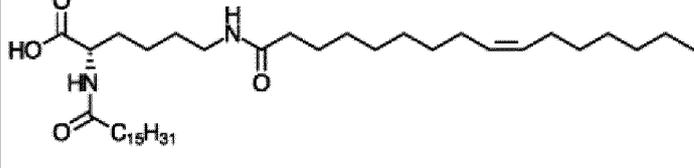
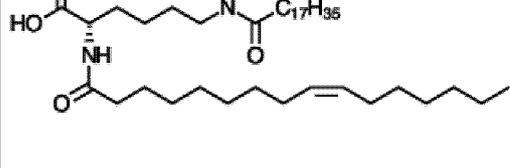
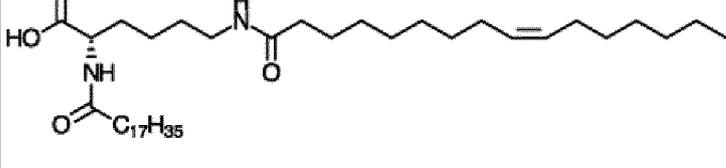
DTx-01-13	
DTx-01-30	
DTx-01-31	
DTx-01-32	
DTx-01-33	
DTx-01-34	
DTx-01-35	
DTx-01-36	
DTx-01-39	

DTx-01-43	
DTx-01-44	
DTx-01-45	
DTx-01-46	
DTx-01-50	
DTx-01-51	
DTx-01-52	
DTx-01-53	
DTx-01-54	
DTx-01-55	

DTx-03-06	
DTx-03-50	
DTx-03-51	
DTx-03-52	
DTx-03-53	
DTx-03-54	
DTx-03-55	
DTx-04-01	

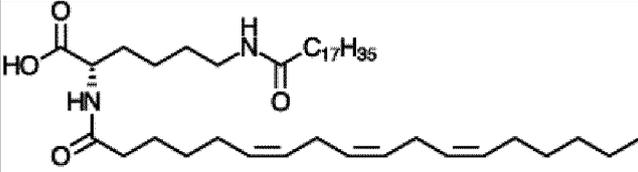
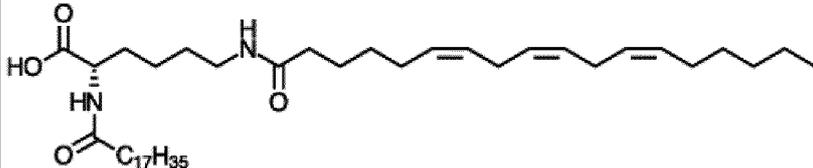
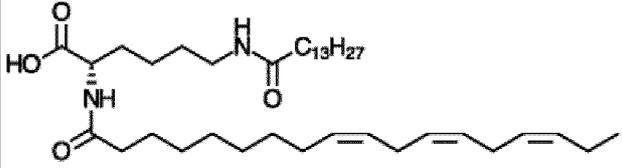
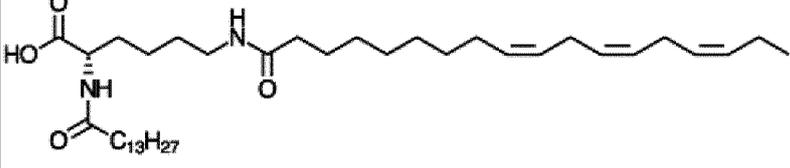
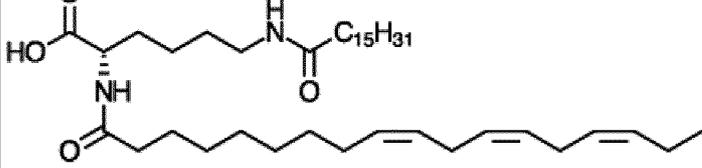
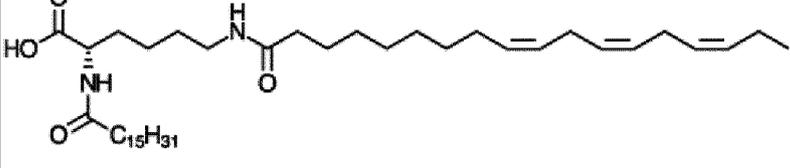
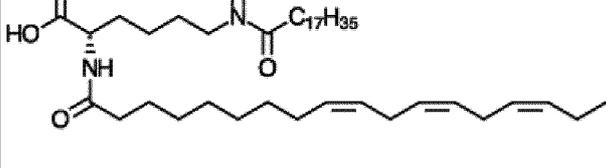
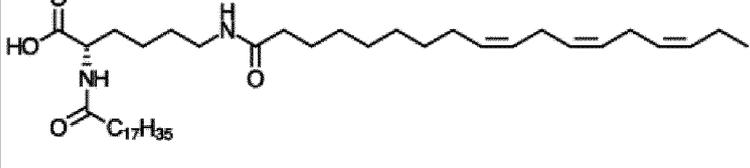
DTx-05-01	
DTx-06-06	
DTx-06-50	
DTx-06-51	
DTx-06-52	
DTx-06-53	
DTx-06-54	
DTx-06-55	

DTx-08-01	
DTx-09-01	
DTx-10-01	
DTx-11-01	
DTx-01-60	
DTx-01-61	
DTx-01-62	
DTx-01-63	

DTx-01-64	
DTx-01-65	
DTx-01-66	
DTx-01-67	
DTx-01-68	
DTx-01-69	
DTx-01-70	
DTx-01-71	

DTx-01-72	
DTx-01-73	
DTx-01-74	
DTx-01-75	
DTx-01-76	
DTx-01-77	
DTx-01-78	
DTx-01-79	

DTx-01-80	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
DTx-01-81	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
DTx-01-82	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
DTx-01-83	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
DTx-01-84	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
DTx-01-85	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
DTx-01-86	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>
DTx-01-87	 <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H](CCCCCCCC)NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC</chem>

DTx-01-88	
DTx-01-89	
DTx-01-90	
DTx-01-91	
DTx-01-92	
DTx-01-93	
DTx-01-94	
DTx-01-95	

DTx-01-96	
DTx-01-97	
DTx-01-98	
DTx-01-99	
DTx-01-100	
DTx-01-101	

Конъюгация липидных мотивов и модифицированных двухцепочечных олигонуклеотидов

[0650] Как описано на Схемах I, II и III ниже, различные липидные мотивы конъюгировали с миРНК с использованием низкомолекулярных линкеров. В Таблице 2 ниже представлены миРНК, выбранные для экспериментов. В приведенных последовательностях обозначения «m», «f» и «\*» обозначают 2-О-метильные остатки, 2'-дезоксидезокси-2'-фторо остатки и фосфоротиоатные связи соответственно.

Таблица 2: Используемые молекулы миРНК

Название миРНК	Свойства миРНК	
Соединение 1 (DTxO-0003)	Мишень PTEN	Сопровождающая последовательность (5' - 3') fG mA fU mG fA mU fG mU fU fU fG mA fA mA fC mU fA mU

		fu*T*T (SEQ ID NO: 1)
		<i>Направляющая последовательность (5' - 3')</i> P04-mA fA mU fA mG fU mU fU mC mA mA fA mC fA mU fC mA fU mC*T*T (SEQ ID NO: 2)
<b>Соединение 3</b> <b>(DTxO-0016)</b>	<i>Мишень</i> VEGFR1	<i>Сопровождающая последовательность (5' - 3')</i> fG mC fU mA fC mU fC mG fU fU fA mA fU mU fA mU fC mA fA*T*T (SEQ ID NO: 3)
		<i>Направляющая последовательность (5' - 3')</i> P04-mU fU mG fA mU fA mA fU mU mA mA fC mG fA mG fU mA fG mC*T*T (SEQ ID NO: 4)
<b>Соединение 5</b> <b>(DTxO-0021)</b>	<i>Мишень</i> VEGFR2	<i>Сопровождающая последовательность (5' - 3')</i> fC mC fA mA fA mU fU mC fC fA fU mU fA mU fG mA fC mA fA*T*T (SEQ ID NO: 5)
		<i>Направляющая последовательность (5' - 3')</i> P04-mU fU mG fU mC fA mU fA mA mU mG fG mA fA mU fU mU fG mG*T*T (SEQ ID NO: 6)
<b>Соединение 27</b> <b>(DTxO-0037)</b>	<i>Мишень</i> HTT	<i>Сопровождающая последовательность (5' - 3')</i> fC*mA*fG mU fA mA fA mG fA mG fA mU fU*mA*fA (SEQ ID NO: 7)
		<i>Направляющая последовательность (5' - 3')</i> P04-mU*fU*mA fA mU fC mU fC mU fU mU fA mC*fU*mG*fA*mU*fA*mU*fA (SEQ ID NO: 8)
<b>Соединение 30</b> <b>(DTxO-0038)</b>	<i>Мишень</i> PTEN	<i>Сопровождающая последовательность (5' - 3')</i> fA*mC*fC mU fG mA fU mC fA mU fU mA fU mA fG mA fU*mA*£A (SEQ ID NO: 9)
		<i>Направляющая последовательность (5' - 3')</i> P04- eT*fU*mA fU mC fU mA fU mA fA mU fG mA fU mC fA mG fG mU *T *T (SEQ ID NO: 10)
<b>Соединение 31</b> <b>(DTxO-0033)</b>	<i>Мишень</i> VEGFR2	<i>Сопровождающая последовательность (5' - 3')</i> fC*mC*£A mA fA mU fU mC fC fA fU mU fA mU fG mA fC mA fA*T*T (SEQ ID NO: 5)
		<i>Направляющая последовательность (5' - 3')</i> P04- mU*fU*mG fU mC fA mU fA mA mU mG fG mA fA mU fU mU fG mG*T*T (SEQ ID NO: 6)

<b>Соединение 32</b> (DTxO-0034)	<i>Мишень</i>	<i>Сопровождающая последовательность (5' - 3')</i> fG*mG*fU mU fG mU fA mG fG fA fU mA fU mA fG mG fA mU f(j)*T*T (SEQ ID NO: 10)
	VEGFR2	<i>Направляющая последовательность (5' - 3')</i> P04- mA*fA*mU fC mC fU mA fU mA mU mC fC mU fA mC fA mA fC mC*T*T (SEQ ID NO: 11)

[0651] В Таблице 3 перечислены липидно-модифицированные соединения нуклеиновой кислоты. Схема синтеза I, II или III указана как подходящая для каждого соединения. Были получены определенные соединения, на что указывает наличие данных в столбце «ЖХ-МС m/z (M+H)<sup>+</sup>» в Таблице 3. Соединения в дополнение к полученным соединениям показаны в Таблице 3. Структуры липидно-модифицированных соединений нуклеиновой кислоты также проиллюстрированы на Фигурах с 1 по 12 и с 80 по 83.

Таблица 3: Липидно-модифицированные соединения нуклеиновой кислоты

Липидно-модифицированная нуклеиновая кислота	Цепь	5' Модификация	3' Модификация	миРНК	ЖХ-МС m/z (M+H) <sup>+</sup>	Синтез
<b>Соединение 2</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-08	Соединение 1	7636,1	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-		6864,1	
<b>Соединение 4</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-08	Соединение 3	7557,8	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-		6962,6	
<b>Соединение 6</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-08	Соединение 5	7563,3	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-		6956,2	
<b>Соединение 7</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-06	Соединение 1	7441,8	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-		6866,1	
<b>Соединение 8</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-11	Соединение	7441,2	Схема I

	<i>дающая</i>			1		
	<i>Направляющая</i>	-	-		6866,1	
<b>Соединение 9</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	DTx-01-06	DTx-01-06	Соединение	8029,5	Схема II
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6864,3	
<b>Соединение 10</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-30	Соединение	7468,5	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6866,2	
<b>Соединение 11</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-31	Соединение	7525,7	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6866,2	
<b>Соединение 12</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-32	Соединение	7581,4	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6866,2	
<b>Соединение 13</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-33	Соединение	7694,6	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6864,0	
<b>Соединение 14</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-34	Соединение	7749,8	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6864,0	
<b>Соединение 15</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-35	Соединение	7806,5	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6864,0	
<b>Соединение 16</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-01	Соединение	7514,3	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6866,2	

	<i>лющая</i>					
<b>Соединение 17</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-03	Соединение	7780,8	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1	6866,2	
<b>Соединение 18</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-13	Соединение	7513,2	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1	6866,2	
<b>Соединение 20</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-03-06	Соединение	7595,0	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1	6866,2	
<b>Соединение 21</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-06-06	Соединение	7751,1	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1	6866,2	
<b>Соединение 22</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	DTx-01-11	DTx-01-11	Соединение	8029,5	Схема II
	<i>Направляю щая</i>			1	6864,3	
<b>Соединение 23</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-07	Соединение	7471,5	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1	6864,1	
<b>Соединение 24</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	DTx-01-09	-	Соединение	7667,4	Схема III
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1	6866,8	
<b>Соединение 25</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-09	Соединение	7697,3	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1	6866,8	
<b>Соединение</b>	<i>Сопровожд</i>	-	DTx-01-12	Соединение	7471,9	Схема I

<b>26</b>	<i>дающая</i>	-	-	1	-	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	-	6866,1	
<b>Соединение 28</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-13	Соединение	5699,3	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	27	6621,5	
<b>Соединение 29</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-08	Соединение	5824,0	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	27	6621,5	
<b>Соединение 33</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-08	Соединение	7040,7	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	30	6977,5	
<b>Соединение 34</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-08	Соединение	7595,0	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	31	6986,1	
<b>Соединение 35</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-08	Соединение	7765,6	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	32	6833,1	
<b>Соединение 38</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-36	Соединение	7578,1	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6866,0	
<b>Соединение 39</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-39	Соединение	7633,4	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6866,0	
<b>Соединение 40</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-43	Соединение	7690,7	Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1	6866,0	

	<i>щая</i>					
<b>Соединение 41</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-44	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 42</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-45	Соединение 1	7682,0	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-		6866,0	
<b>Соединение 43</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-46	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 44</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-08-01	Соединение 1	7762,2	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-		6866,0	
<b>Соединение 45</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-09-01	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 46</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-10-01	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 47</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-11-01	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 48</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-04-01	Соединение 1	8005,0	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-		6866,0	
<b>Соединение</b>	<i>Сопровожд</i>	-	DTx-05-01	Соединение		Схема I

49	дающая			1		
	Направляющая	-	-			
Соединение 50	Сопровожд дающая	DTx-01-08	-	Соединение	7607,8	Схема III
	Направляющая	-	-	1	6866,0	
Соединение 51	Сопровожд дающая	DTx-01-08	-	Соединение	7009,7	Схема III
	Направляющая	-	-	30	6976,5	
Соединение 52	Сопровожд дающая	-	-	Соединение		Схема I
	Направляющая	-	DTx-01-08	1		
Соединение 53	Сопровожд дающая	-	-	Соединение		Схема I
	Направляющая	-	DTx-01-08	30		
Соединение 54	Сопровожд дающая	-	DTx-01-50	Соединение	7608,8	Схема I
	Направляющая	-	-	1	6864,7	
Соединение 55	Сопровожд дающая	-	DTx-01-51	Соединение	7610,2	Схема I
	Направляющая	-	-	1	6864,7	
Соединение 56	Сопровожд дающая	-	DTx-01-52	Соединение	7666,3	Схема I
	Направляющая	-	-	1	6864,7	
Соединение 57	Сопровожд дающая	-	DTx-01-53	Соединение	7665,1	Схема I
	Направляющая	-	-	1	6864,7	

	<i>щая</i>					
	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-54		7636,3	Схема I
<b>Соединение 58</b>	<i>Направляю щая</i>	-	-	Соединение 1	6864.7	
<b>Соединение 59</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-55	Соединение 1	7636.5	Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-		6864.7	
<b>Соединение 60</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-03-50	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 61</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-03-51	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 62</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-03-52	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 63</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-03-53	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 64</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-03-54	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 65</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-03-55	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение</b>	<i>Сопровожд</i>	-	DTx-06-50	Соединение		Схема I

66	<i>дающая</i>			1		
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение</b> 67	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-06-51	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		
<b>Соединение</b> 68	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-06-52	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		
<b>Соединение</b> 69	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-06-53	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		
<b>Соединение</b> 70	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-06-54	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		
<b>Соединение</b> 71	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-06-55	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		
<b>Соединение</b> 72	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-60	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		
<b>Соединение</b> 73	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-61	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		
<b>Соединение</b> 74	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-62	Соединение		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-	1		

	<i>щая</i>					
	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-63			Схема I
<b>Соединение 75</b>	<i>Направляю щая</i>	-	-	Соединение 1		
<b>Соединение 76</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-64</b>	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 77</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-65</b>	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 78</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-66</b>	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 79</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-67</b>	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 80</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-68</b>	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 81</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-69</b>	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 82</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-70</b>	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение</b>	<i>Сопровожд</i>	-	<b>DTx-01-71</b>	Соединение		Схема I

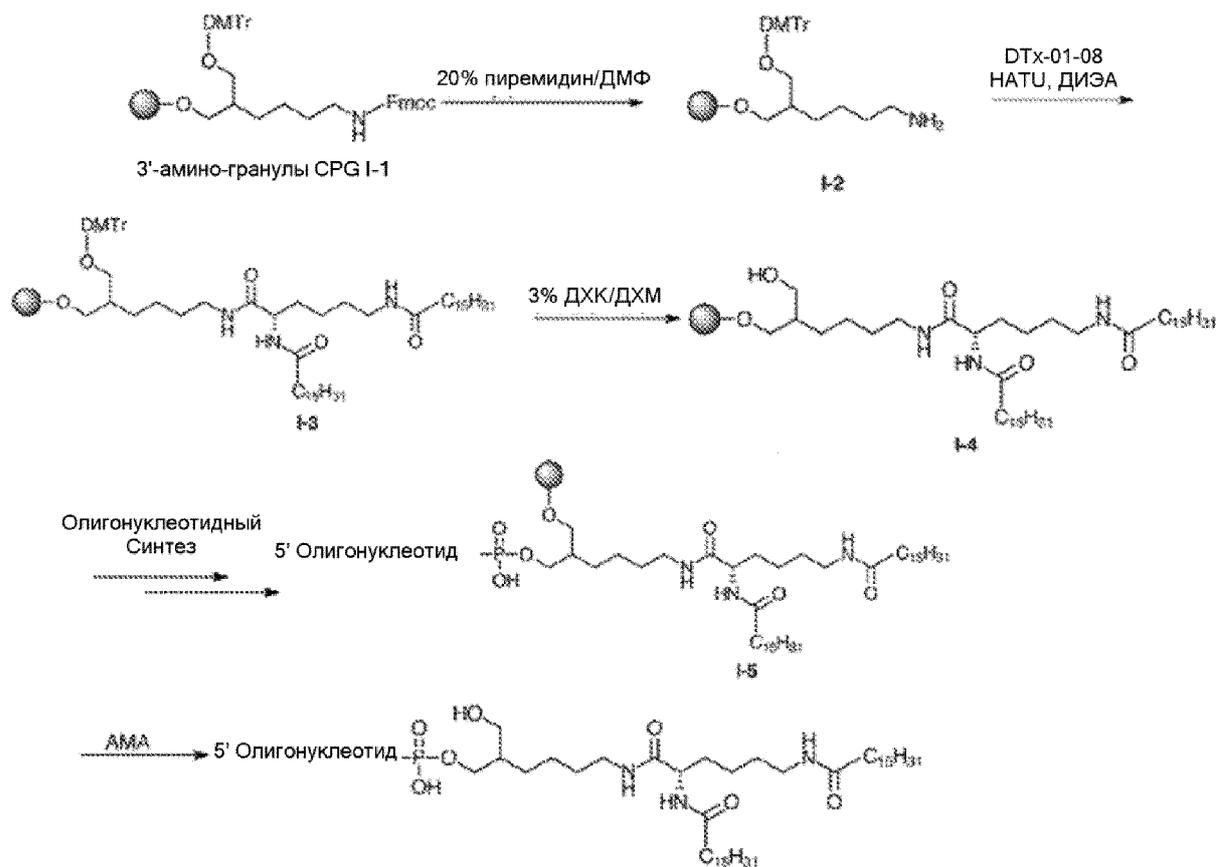
<b>83</b>	<i>дающая</i>			<b>1</b>		
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 84</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-72</b>	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	<b>1</b>		
<b>Соединение 85</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	<b>DTx-01-73</b>	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	<b>1</b>		
<b>Соединение 86</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-74	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 87</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-75	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 88</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-76	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 89</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-77	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 90</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-78	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 91</b>	<i>Сопровожд дающая</i>	-	DTx-01-79	Соединение		Схема I
	<i>Направляю</i>	-	-	1		

	<i>щая</i>					
	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-80			
<b>Соединение 92</b>	<i>Направляющая</i>	-	-	Соединение 1		Схема I
<b>Соединение 93</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-81	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 94</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-82	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 95</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-83	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 96</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-84	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 97</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-85	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 98</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-86	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 99</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-87	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-88	Соединение		Схема I

<b>100</b>	<i>аюющая</i>			1		
	<i>Направляю щая</i>	-	-			
<b>Соединение 101</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-89	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 102</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-90	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 103</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-91	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 104</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-92	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 105</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-93	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 106</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-94	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 107</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-95	Соединение		Схема I
	<i>Направляю щая</i>	-	-	1		
<b>Соединение 108</b>	<i>Сопровожд аюющая</i>	-	DTx-01-96	Соединение		Схема I
	<i>Направляю</i>	-	-	1		

	<i>щая</i>					
	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-97			Схема I
<b>Соединение 109</b>	<i>Направляющая</i>	-	-	Соединение 1		
<b>Соединение 110</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-98	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 111</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-99	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 112</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-100	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			
<b>Соединение 113</b>	<i>Сопровождающая</i>	-	DTx-01-101	Соединение 1		Схема I
	<i>Направляющая</i>	-	-			

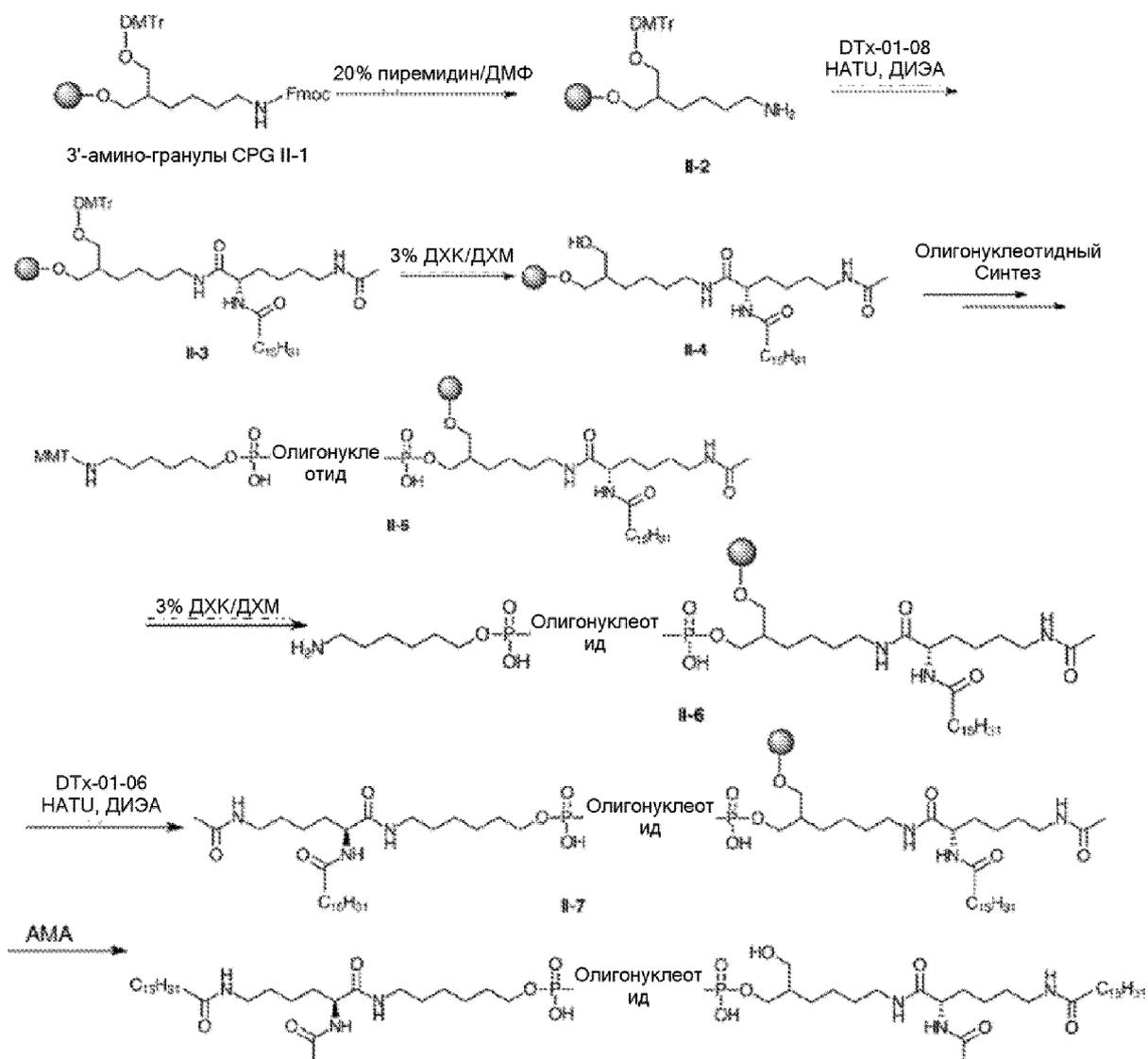
СХЕМА I: Конъюгация липидных мотивов с 3' концом сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида



## Соединение 2

[652] Схема I, приведенная выше, иллюстрирует получение сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида, конъюгированного с липидным фрагментом на 3' конце сопровождающей цепи, с использованием в качестве примера сопровождающей цепи **Соединения 2**. Таким образом, 3'-амино-гранулы CPG **I-1** (Glen Research, каталожный № 20-2958), модифицированные ДМТ и Fmoc-защищенным линкером C7, показанные выше, были обработаны 20% пиперидином/ДМФ с получением Fmoc-защищенных амино C7 CPG гранул **I-2**. Липидный мотив DTx-01-08 затем сочетали с **I-2** с использованием NATU и ДИЭА в ДМФ с получением нагруженных липидами CPG гранул **I-3**, которые были обработаны 3% дихлоруксусной кислотой (ДХК) в ДХМ для удаления защитных групп ДМТ с получением **I-4**. Олигонуклеотидный синтез сопровождающей цепи миРНК DTxO-0003 на **I-4** был проведен с помощью стандартной фосфорамидитаной химии с получением затем модифицированных олигонуклеотид-связанных CPG гранул **I-5**. На этом этапе, если применимо, гранулы **I-5**, содержащие липидные мотивы, защищенные сложным метиловым эфиром (например, DTx-01-07-OMe, DTx-01-09-OMe и DTx-01-12-OMe), были омылены до их соответствующей карбоновой кислоты с использованием 0,5 М LiOH в смеси метанол/вода 3:1 об./об. Последующая обработка **I-5** АМА [гидроксид аммония (28%)/метиламин (40%) (1:1, об./об.)] привела к отщеплению DTx-01-08-конъюгированного модифицированного олигонуклеотида от гранул. Сопровождающую цепь **Соединения 2** очищали при помощи ОФ-ВЭЖХ и характеризовали при помощи MALDI-TOF MS с использованием пика  $[M+H]$ .

СХЕМА II: Конъюгация липидных мотивов как с 3', так и с 5' концами сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида

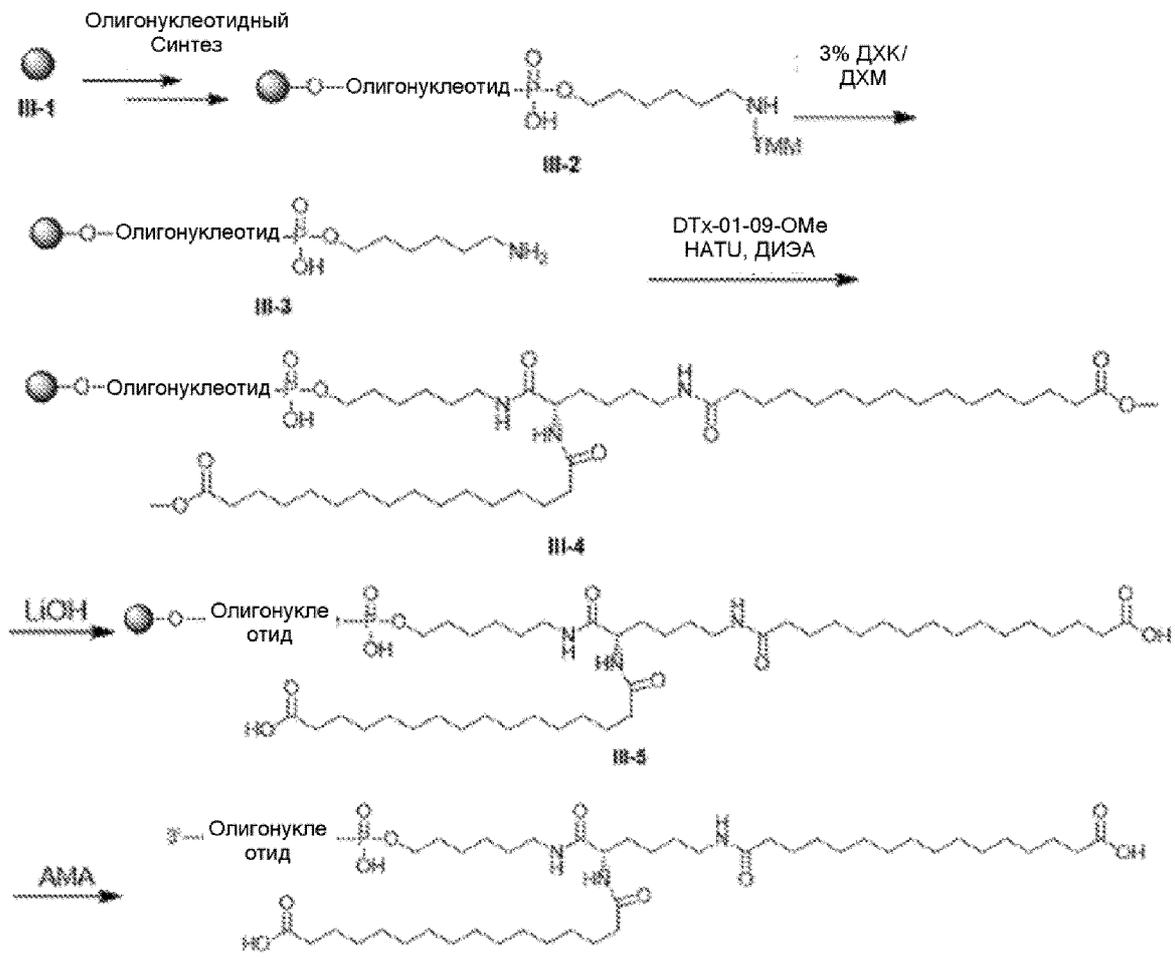


**Соединение 9**

[653] Схема II, приведенная выше, иллюстрирует получение сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида, конъюгированного с липидными фрагментами как на 3', так и на 5' концах сопровождающей цепи с использованием сопровождающей цепи **Соединения 9** в качестве примера. Таким образом, 3'-аминогруппы CPG II-1 (Glen Research, каталожный № 20-2958), модифицированные ДМТ и Fmoc-защищенным линкером C7, показанные выше, были обработаны 20% пиперидином/ДФФ с получением Fmoc-защищенных амино C7 гранул CPG II-2. Липидный мотив DTx-01-06 затем сочетали с II-2 с использованием NATU и ДИЭА в ДМФ для получения нагруженных липидами CPG гранул II-3, которые обрабатывали 3% дихлоруксусной кислотой (ДХК) в ДХМ для удаления защитной группы ДМТ с получением II-4. Олигонуклеотидный синтез сопровождающей цепи миРНК DTxO-0003 был проведен на II-4 с помощью стандартной фосфорамидитной химии. В последнем нуклеотидном связывании автоматизированной

последовательности использовали нуклеотид, модифицированный ММТ-защищенным линкером С6, показанным выше (Glen Research, каталожный № 10-1906), с получением модифицированных олигонуклеотид-связанных СРГ гранул **III-5**. После удаления ММТ при помощи 3% дихлоруксусной кислотой (ДХК) в ДХМ **III-6** сочетали с DTx-01-16 с использованием НАТУ и ДИЭА в ДМФ с получением **III-6**. Последующая обработка **III-6** АМА [гидроксид аммония (28%)/метиламин (40%) (1:1, об./об.)] привела к отщеплению DTx-01-06-конъюгированного модифицированного олигонуклеотида от гранул. Сопровождающую цепь **Соединения 9** очищали при помощи ОФ-ВЭЖХ и характеризовали при помощи MALDI-TOF МС с использованием пика [M+H].

СХЕМА III: Конъюгация липидных мотивов с 5' концом сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида



#### Соединение 24

[654] Схема III, приведенная выше, иллюстрирует получение сопровождающей цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида, конъюгированного с липидным фрагментом на 5' конце сопровождающей цепи, с использованием сопровождающей цепи **Соединения 24** в качестве примера. Таким образом, олигонуклеотидный синтез сопровождающей цепи мРНК DTxO-0003 был проведен на СРГ гранулах **III-1** (Glen Research, к № 20-5041-xx) с помощью стандартной фосфорамидитной химии. В последнем нуклеотидном связывании автоматизированной

последовательности использовали нуклеотид, модифицированный ММТ-защищенным линкером С6, проиллюстрированным выше (Glen Research, каталожный № 10-1906), с получением модифицированных олигонуклеотид-связанных СРG гранул **III-2**. После удаления ММТ при помощи 3% дихлоруксусной кислоты (ДХК) в ДХМ **III-2** сочетали с DTx-01-09-OMe с использованием НАТУ и ДИЭА в ДМФ с получением **III-4**. **III-4** омыляли 0,5 М Li OH в смеси метанол/вода 3: 1 об./об. с получением **III-5**. Последующая обработка **III-5** АМА [гидроксид аммония (28%)/метиламин (40%) (1:1, об./об.)] приводила к отщеплению DTx-01-09-конъюгированного модифицированного олигонуклеотида от гранул. Сопровождающую цепь **Соединения 24** очищали при помощи ОФ-ВЭЖХ и характеризовали при помощи MALDI-TOF МС с использованием пика [M+H].

#### ОБРАЗОВАНИЕ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

[655] Для каждой сопровождающей цепи, синтезированной с помощью Схем I, II или III и перечисленных выше, комплементарная направляющая цепь была получена с помощью стандартной фосфорамидитной химии, очищена с помощью ОФ-ВЭЖХ и охарактеризована с помощью MALDI-TOF МС с использованием пика [M+H]. Двойную спираль формировали путем смешивания эквимольных эквивалентов сопровождающей цепи и направляющей цепи, нагревания до 90 ° С в течение 5 минут, а затем медленного охлаждения до комнатной температуры. Образование двойной цепи подтверждено неденатурированным PAGE.

Конъюгация липидных мотивов с модифицированными одноцепочечными олигонуклеотидами

[656] В Таблице 4 ниже представлен модифицированный антисмысловой олигонуклеотид, выбранный для экспериментов. В данной последовательности обозначение «е» обозначает 2'-О-метоксиэтильный остаток, а оставшиеся остатки представляют собой 2'-дезоксидные остатки, и обозначение «\*» обозначает фосфоротиоатные связи.

Таблица 4: Антисмысловые молекулы

Антисмысловое название	Антисмысловые свойства	
Соединение 37	Мишень PTEN	<i>Антисмысловая последовательность (5' - 3')</i> eC*eT*eG*eC*eT*A*G*C*C*T*C*T*G*G*A*eT*eT*eT*eG*eA (SEQ ID NO: 13)

Биологические данные

Общие процедуры и методы

[657] В вариантах реализации изобретения, в данной заявке представлены способы приведения клетки в контакт с соединением или композицией, содержащей соединение, как описано в данной заявке. В вариантах реализации изобретения в данной заявке представлены методы оценки экспрессии мРНК относительно контроля PBS в клетке после воздействия на указанную клетку соединения или композиций, как описано в данной

заявке. В вариантах реализации изобретения клетка представляет собой первичную клетку животного, например млекопитающего, или человека. В вариантах реализации изобретения клетка получена от человека.

[658] В вариантах воплощения настоящего изобретения, предложен способ совместного введения соединения и/или композиции, представленных в настоящей заявке, с дополнительным соединением и/или композицией в клетку. Под «совместным введением» подразумевается, что два или более агента могут быть обнаружены в клетке одновременно, независимо от того, когда и как они фактически вводятся. В одном варианте воплощения изобретения агенты вводят одновременно. В одном из таких вариантов воплощения изобретения совместное введение осуществляется путем объединения агентов в единичную (стандартную) форму. В другом варианте воплощения изобретения агенты вводят последовательно. В одном варианте воплощения изобретения агенты вводят одним и тем же маршрутом, например в условиях несвязанного поглощения или трансфекции. В другом варианте воплощения изобретения агенты вводятся различными маршрутами, например, один вводится путем трансфекции, а другой вводится в условиях несвязанного поглощения.

[659] Следующие примеры, конечно, не следует рассматривать как конкретно ограничивающие. Варианты этих примеров в объеме формулы изобретения входят в компетенцию специалиста в данной области техники, и их рассматривают как входящие в объем вариантов воплощения изобретения, как описано и заявлено в настоящей заявке. Читатель поймет, что квалифицированный специалист, имея в запасе настоящее раскрытие и навыки в данной области техники, сможет подготовить и использовать данное изобретение без исчерпывающих примеров.

#### Культура клеток

[660] HEK293, NIH3T3 и Bend.3 клетки были приобретены от ATCC, а RAW264.7 клетки и SH-SY5Y клетки - от Sigma-Aldrich. HEK293, NIH3T3 и RAW264.7 клетки культивировали в DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (FBS), 2 mM L-глутамин, IX заменимых аминокислот, 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина, в увлажненном 37 °C инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Недифференцированные SH-SY5Y клетки культивировали в DMEM/F12 (1:1) среде, содержащей 10% FBS 2 mM L-глутамин, IX заменимых аминокислот, 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина, в увлажненном 37 °C инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (“поддерживающая среда”).

[661] SH-SY5Y клетки дифференцировали путем высевания 5000 клетки/лунка в поддерживающей среде в 96-луночной планшете. Через 24-48 часа после высевания среду замещали средой для дифференцировки, состоящей из среды Neurobasal, дополненной 2 mM L-глутамин, добавкой B27 и 10 мкМ полностью-транс-ретиноевой кислоты (ATRA). Клетки дифференцировали за 4 дня до начала экспериментов несвязанного поглощения.

[662] 3T3L1 клетки были приобретены от Sigma-Aldrich, и их хранили в 10% FCS (фетальная телячья сыворотка). Для дифференцировки, конфлюэнтные 3T3L1 клетки,

которые высевали на 96 луночные покрытые коллагеном планшеты, культивировали в течение 5 дней в среде для дифференцировки (DMEM/F12, содержащая 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 1,5 мкг/мл инсулина, 1 мкМ дексаметазона, 500 мкМ IBMX и 1 мкМ росиглитазона). Среда для дифференцировки замещали поддерживающей средой (DMEM/F12 среде, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина и 1,5 мкг/мл инсулина). Поддерживающую среду замещали каждые 2 дня после этого. Эксперименты несвязанного поглощения начали через 10 дней после дифференцировки.

[663] HUVEC клетки были приобретены от Cell Applications (San Diego, CA) и культивированы в их запатентованные HUVEC клеточные среды, содержащие 2% сыворотки, 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина.

[664] Первичные нейроны коры головного мозга крысы, клетки человеческого тела и первичные человеческие клетки скелетной мускулатуры были получены от Cell Applications (San Diego, CA). Их культивировали и/или дифференцировали в запатентованных средах в соответствии с инструкциями, предоставленными поставщиком. В некоторых случаях запатентованные среды были получены без FBS. FBS добавляли обычно до концентрации 2%.

[665] Первичные человеческие адипоциты от нежирных доноров были получены от ZenBio в 96-луночных планшетах. Их культивировали в ZenBio запатентованных средах, содержащих 2% FBS.

[666] Первичные человеческие гепатоциты были получены от Thermo Fisher, их размораживали и высевали при 10000 клеток на лунку в запатентованных средах для высевания Thermo Fisher. Через шесть часов после высевания среду для высевания удаляли и замещали на запатентованную поддерживающую среду Thermo Fisher.

[667] Первичные человеческие звездчатые клетки были приобретены от ZenBio и культивированы в запатентованной ростовой среде ZenBio для человеческих звездчатых клеток (каталожный № HSGM-500).

[668] Первичные человеческие Т-клетки были приобретены от Cell Applications в 96-луночных планшетах при плотности 20000 клеток/лунка и культивированы в запатентованной среде для экспансии Т-клеток Cell Applications с пониженным содержанием Cellastim (0,25 г/мл).

[669] Первичные человеческие скелетные мышечные клетки были приобретены от Cell Applications и культивированы в Cell Applications запатентованных ростовых средах скелетных мышечных клеток. Для дифференцировки 10000 клеток высевали в каждую лунку 96-луночных планшетов в ростовой среде скелетных мышечных клеток. После достижения конfluence скелетную среду для дифференцировки добавляли для запуска дифференцировки в мышечные трубочки.

#### Трансфекционные эксперименты

[670] За 24 часа до трансфекции клетки HEK293, клетки NIH3T3 и клетки SH-SY5Y были посеяны в 96 лунок при 10000 клеток/лунка, 20000 клеток/лунка и 10000 клеток/лунка

соответственно в 90 мкл среды, свободной от антибиотиков. Олигонуклеотиды или олигонуклеотидные конъюгаты разбавляли в PBS до 100 раз от желаемой конечной концентрации. Отдельно Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) разводили как 1:66,7 в средах, не содержащих добавки (например, FBS, антибиотик и т.д.). Затем 100х олигонуклеотид в PBS связывали в комплекс с RNAiMAX путем добавления 1 части олигонуклеотида в PBS к 9 частям липофектамин/среда. После инкубации в течение 20 минут 10 мкл комплексов олигонуклеотид:RNAiMAX добавляли в клетки, содержащие 90 мкл среды, свободной от антибиотиков, высеянные за 24 часа до этого. Комплексы удаляли через 24 часа и замещали средой, содержащей антибиотика. РНК выделяли через 48 часов после трансфекции.

[671] HUVEC клетки трансфицировали с использованием липофектамина RNAiMAX посредством обратной трансфекции. Олигонуклеотид или олигонуклеотидные конъюгаты разбавляли в PBS до 100 раз от желаемой конечной концентрации. Отдельно липофектамин RNAiMax разбавляли как 1:66,7 в средах, не содержащих добавки (например, FBS, антибиотик и т.д.). Затем 100х олигонуклеотид в PBS был связан в комплекс с RNAiMAX путем добавления 1 части олигонуклеотида в PBS к 9 частям липофектамин/среда. Олигонуклеотид и RNAiMAX инкубировали в течение 20 минут. Между тем, клетки HUVEC помещали в 96-луночные планшеты при 10000 клеток на лунку в 90 мкл среды, свободной от антибиотиков, и сразу же добавляли в среду 10 мкл олигонуклеотид:RNAiMAX комплексы. Комплексы удаляли через 24 часа после выращивания и замещали средой, содержащей антибиотика. РНК выделяли через 48 часов после трансфекции.

[672] За 24 часа до трансфекции клетки BENDA высевали в 96-луночные планшеты при концентрации 10000 клеток/лунка в 90 мкл среды, свободной от антибиотиков. Клетки трансфицировали с использованием Cytofect (Cell Applications) в соответствии с инструкциями производителя. Как указано выше, комплексы удаляли через 24 часа и замещали средой, содержащей антибиотика. РНК выделяли через 48 часов после трансфекции.

Эксперименты несвязанного поглощения

[673] Клетки HEK293 высевали при 20000 клеток/лунка, клетки HUVEC - на 10000 клеток/лунка, первичные человеческие клетки - на 10000 клеток/лунка и первичные человеческие клетки скелетных мышц - на 10000 клеток/лунка на 96 лунках, покрытых коллагеном. Первичные человеческие клетки скелетных мышц дифференцировали в течение 3 дней в запатентованной среде для дифференцировки, поставляемой Cell Applications. Первичные нейроны и адипоциты поставлялись производителем, Cell Applications или ZenBio, в виде дифференцированных клеток в 96-луночных планшетах. Клетки NIH3T3 высевали при 15000 клеток/лунка на обработанных тканевой культурой 96-луночных планшетах. Т-клетки поставлялись поставщиком в 96-луночных планшетах, содержащих 20000 клеток на лунку.

[674] На следующий день после высевания для HEK293, HUVEC, трабекулярной

сетки, клеток NIH3T3 и клеток печени среду удаляли и клетки дважды промывали PBS, содержащим кальций и магний. Для скелетных мышечных клеток, дифференцированных клеток SH-SY5Y и адипоцитов 3T3L1 удаление среды и промывание PBS проводили через 4, 4 и 11 дней соответственно после начала дифференцировки. Для адипоцитов и первичных нейронов удаление среды и отмывку PBS выполняли через 1 день после получения от Cell Applications или ZenBio. После последней промывки все типы клеток инкубировали с соединениями при различных уровнях в их предпочтительной среде, содержащей 2% сыворотки, в течение 48 часов, если не указано иное. В некоторых случаях производитель не разглашал концентрацию сыворотки в запатентованных составах. Для экспериментов с клетками HEK293, NIH3T3 и HUVEC с 96-часовыми временными точками среда, содержащая соединение, была удалена через 48 часов и замещена полной средой, свободной от соединений. Для первичных клеток, отличных от HUVEC, соединения были включены при замещении среды. РНК выделяется через 48, 96 часов или 7 дней после обработки. Для адипоцитов, первичных нейронов и Т-клеток удаление среды и промывание PBS проводили через 1 день после обработки.

#### Выделение РНК, обратная транскрипция и количественный ПЦР

[675] РНК выделяли при помощи набора RNeasy 96 (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Ее обратно транскрибировали с кДНК с использованием случайных праймеров и высокоэффективного набора обратной транскрипции кДНК (ThermoFisher Scientific) в термоциклере SimpliAmp (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Количественный ПЦР производили с использованием ген-специфичных праймеров (ThermoFisher Scientific; IDTDNA), зондов TaqMan (ThermoFisher Scientific; IDTDNA) и быстрого универсального ПЦР мастер-микса TaqMan (ThermoFisher scientific) на StepOnePlus ПЦР системе в режиме реального времени (ThermoFisher scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа количественного ПЦР, PTEN или FLT1 мРНК экспрессию нормализовали до экспрессии либо 18s рРНК, либо HPRT1 мРНК («гены домашнего хозяйства») с использованием метода относительного КТ в соответствии с лучшими практиками, предложенными в Nature Protocols (Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. NatProtoc 3, 1101-1108 (2008)).

#### Интравитреальная инъекция

[676] Через 7 дней акклиматизации мышей или крыс взвешивали накануне исследования и распределяли по группам в зависимости от массы тела. В день начала исследования мышей анестезировали инъекционной анестезией 100 мг/кг кетамина и 5 мг/кг ксилазина внутривентриально. Глубокую анестезию подтверждали защемлением пальца ноги. В один или оба глаза делали инъекцию интравитреально под диссекционным микроскопом до 1 мкл (у мышей) или до 5 мкл (у крыс) рассматриваемых соединений с использованием шприца Гамильтона. После инъекции антибиотик (например, тетрацилин) помещали в глаз. Затем животному давали возможность восстановиться после анестезии в домашней клетке на грелке с рециркуляцией воды. Рефлекс выпрямления подтверждали

перед удалением грелки и перед возвращением животного в комнату содержания. Через семь дней после инъекции мышей или крыс умерщвляли удушением  $\text{CO}_2$  с последующим вторичным подтверждением эвтаназии путем смещения шейки матки. Затем глаза были удалены, а интересующие участки препарированы и подготовлены для выделения РНК. Рассматриваемые участки были помещены в RNALater сразу после вскрытия. Через 24 часа ткань в RNALater была заморожена и хранилась при минус 80 градусах Цельсия до выделения РНК. Перед выделением РНК и после оттаивания RNALater удаляли и ткань промывали 2 раза в PBS. Затем был добавлен тризол, и РНК выделялась с использованием набора RNeasy 96 в соответствии с инструкциями производителя.

#### RNAscope (количественная гибридизация in situ)

[677] Как указано выше, мышам делали инъекции интравитреально. Через семь дней после инъекции мышей умерщвляли и удаляли глаза. Затем глаза фиксировали формалином, заливали парафином и делали срезы толщиной 5 мкм. Гибридизацию РНК in situ для мРНК домовых мышей PTEN проводили вручную с использованием набора реагентов RNAscope®2.5 HD Red (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Newark, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, фиксированные формалином, залитые в парафин (FFPE) срезы ткани предварительно обрабатывали нагреванием в течение 15 минут при 100 градусах Цельсия и протеазой плюс в течение 15 минут при 40 градусах Цельсия перед гибридизацией с мишенями олигонуклеотидами. Затем преамплификатор, амплификатор и AP-меченые олигонуклеотиды были последовательно гибридизованы с последующим образованием хромогенного преципитата. Качество каждого образца проверяли на целостность РНК с помощью зонда RNAscope®, специфичного для РНК PPIV, и на фон с помощью зонда, специфичного для бактериальной РНК dapB. Сигнал специфического окрашивания РНК был идентифицирован как красные пунктирные точки. Образцы контрастно окрашивали при помощи гематоксилина Гилла. Изображения светлого поля были получены с помощью цифрового слайд-сканера AperioAT2, оснащенного объективом с 40-кратным увеличением.

#### Исследования системной доставки

[678] После акклиматизации в течение 7 дней мышей взвешивали накануне исследования и распределяли по группам в зависимости от массы тела. В день начала исследования мышам вводили PBS или рассматриваемое соединение посредством внутривенной или подкожной инъекции. Мышей умерщвляли удушением  $\text{CO}_2$  с последующим вторичным подтверждением эвтаназии путем смещения шейки матки через семь дней после однократной инъекции или через семь дней после первой дозы при повторных инъекциях. Затем интересующие ткани удаляли и сразу после вскрытия вводили 30-300 мг в RNALater. Через 24 часа ткань извлекали из RNALater, промокали насухо и измельчали в тризол в пробирках, содержащих лизирующие гранулы матрицы D от MPBioMedical. Ткань гомогенизировали с использованием системы MPBio FastPrep-24. Затем проводили экстракцию хлороформом, добавляя 0,2 мл на 1 мл тризола. Образцы тщательно перемешивали, центрифугировали на максимальной скорости в

микроцентрифуге при 4 градусах Цельсия в течение 15 минут и в водном слое. Затем РНК осаждали, добавляя к водной фазе 1,5 об. абсолютного этанола. Осажденную РНК затем очищали путем использования набора RNeasy 96 от Qiagen в соответствии с инструкциями производителя, замещая буфер RLT буфером RW1.

### Результаты

Выбор PTEN в качестве миРНК мишени для подтверждения концепции/подтверждения того, что конъюгация LCFA не влияет на активность миРНК

[679] PTEN был выбран в качестве мишени миРНК, потому что он повсеместно экспрессируется во всех клетках и тканях и является мишенью, которая обычно используется для характеристики новых технологий доставки миРНК и антисмысловых молекул. Чтобы подтвердить, что конъюгация длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) не влияет на способность PTEN мРНК встраиваться в комплекс RISC, каждая из LCFA-конъюгированных PTEN мРНК, т.е. Соединения 2, 7- 18, 20, 21, 23-26, 33, 38, 39, 40, 42, 44, 48, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58 и 59 (см. **ФИГ. 1-12А**) и неконъюгированные PTEN миРНК (Соединение 1) трансфицировали в клетки HEK293 и/или NIH3T3. Каждая из РНК выделялась через 24-48 часов, а PTEN миРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. Независимо от мотива LCFA, сайта конъюгации на миРНК (т.е. 5' или 3') или количества сайтов, конъюгированных с миРНК, все соединения сохраняли свою способность ингибировать экспрессию PTEN миРНК после трансфекции (см. **ФИГ. 13,16,18,20,22,23,30,32,34,35,38, 74,75 и 76**). Хотя каждое соединение демонстрировало некоторый ингибирующий эффект при введении в клетки с реагентом для трансфекции, наблюдались различия в активности между тестируемыми соединениями, которые были связаны, например, с природой конъюгата LCFA или отсутствием реагента для трансфекции. Некоторые из этих эффектов более подробно представлены в следующих примерах.

#### *Влияние количества и положения LCFA*

[680] Соединения 2, 7 и 8 дают представление о конъюгации двух C16 LCFA с одним сайтом конъюгации миРНК, позволяя оценить поглощение и активность миРНК, относительно конъюгации одной C16 LCFA (см. **ФИГ. 4**). Лизиновый каркас использовали для конъюгации одной или двух LCFA в один липидный мотив, а линкер C7 использовали для присоединения липидного мотива к PTEN миРНК. Соединение 2 содержит C16 LCFA, присоединенную к каждой из аминокислотных групп  $\alpha$  и  $\beta$  лизина. Соединение 7 содержит C16 LCFA, присоединенную к  $\alpha$ -аминогруппе лизина, и ацетильную группу, присоединенную к  $\beta$ -аминогруппе лизина. Соединение 8 содержит C16 LCFA, присоединенную к  $\beta$ -аминогруппе лизина, и ацетильную группу, присоединенную к  $\alpha$ -аминогруппе лизина. Эти соединения инкубировали вместе с неконъюгированным PTEN миРНК (Соединение 1) с клетками HEK293 или HUVES в течение 48 часов в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли через 48 часов, а PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. В обоих типах клеток Соединение 2 ингибировало экспрессию PTEN мРНК более мощно и эффективно, чем Соединение 7, Соединение 8 или Соединение 1 (см. **ФИГ.14 и 15**). Эти

данные демонстрируют, что конъюгация двух C16 LCFA с одним сайтом конъюгации миРНК позволяет миРНК поглощение и активность более эффективно, чем конъюгация одной C16 LCFA.

[681] Для оценки эффектов присутствия трех LCFA были созданы конъюгированные мотивы, содержащие три цепи жирных кислот (**ФИГ. 10**). Соединение 48 было выбрано для тестирования *in vitro* как в условиях трансфекции, так и в условиях несвязанного поглощения.

[682] Соединения 2 и 48 трансфицировали в клетки НЕК293. Соединение 1, неконъюгированный миРНК РТЕН, также трансфицировали в клетки НЕК293. Клетки, обработанные PBS, служили контролем. РНК выделяли из клеток через 48 часов после этого, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. Активность Соединения 48 была относительно аналогичной, а возможно, и меньшей, чем у Соединений 1 и 2 (**ФИГ. 16**).

[683] Чтобы оценить активность тех же соединений в условиях несвязанного поглощения, те же соединения инкубировали с клетками HUVEC в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли из клеток через 48 часов после этого, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. После несвязанного поглощения Соединение 48 было заметно менее эффективным по отношению к Соединению 2. Соединение 1 не оказывало эффекта на экспрессию РТЕН мРНК в этих условиях несвязанного поглощения (**ФИГ. 17**).

[684] Эти данные демонстрируют, что в данном контексте, хотя конъюгированный фрагмент с тремя LCFA C16 более эффективен, чем конъюгация одной C16 LCFA (по сравнению с соединениями 7 и 8 на **ФИГ. 14 и 15**), он заметно менее эффективен, чем конъюгированный фрагмент с двумя C16 LCFA для обеспечения поглощения и активности миРНК.

[685] Соединение 9 дает представление об относительном расположении каждой из двух конъюгированных C16 LCFA на миРНК, позволяя определить поглощение и активность (см. **ФИГ. 5**). Как подробно описано выше, Соединение 2 содержит C16 LCFA, присоединенную к каждой из  $\alpha$ - и  $\beta$ -аминогрупп лизина (см. **ФИГ. 4**). Соединение 9 в положении 3' РНК РТЕН содержит линкер С7, ковалентно связанный с лизиновым каркасом, с C16 LCFA, присоединенной к  $\alpha$ -аминогруппе лизина, и ацетильной группой, присоединенной к  $\beta$ -аминогруппе лизина. В положении 5' Соединение 9 содержит линкер С6, ковалентно связанный с лизиновым каркасом, с LCFA C16, присоединенной к  $\alpha$ -аминогруппе лизина, и ацетильной группой, присоединенной к  $\beta$ -аминогруппе лизина. Соединение 2, Соединение 9, и неконъюгированная РТЕН миРНК (Соединение 1) инкубировали с клетками HUVEC в течение 48 часов в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли и РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. Соединение 2 было приблизительно в 10 раз более эффективным в ингибировании экспрессии РТЕН мРНК, ответственной за Соединение 9 (см. **ФИГ. 19**). Эти данные демонстрируют, что контекст, в котором две C16 LCFA являются конъюгированными с одним и тем же миРНК,

влияет на поглощение и активность миРНК.

Конъюгация - 3' или 5' конца сопровождающей цепи

[686] В соединениях, описанных в настоящей заявке, например Соединении 2, фрагмент конъюгата был присоединен к 3'-концу сопровождающей цепи миРНК DTxO-0003 PTEN. Чтобы понять, влияет ли сайт конъюгации фрагмента DTx-01-08 на сопровождающую цепь миРНК, сайт конъюгации варьировали. В Соединениях 50 и 51 DTx-01-08 был конъюгирован с 5'-концевой цепью двумя разными PTEN миРНК, DTxO-0003 и DTxO-0038 соответственно. Эти соединения были протестированы как в условиях трансфекции, так и в условиях несвязанного поглощения.

[687] Относящиеся к DTxO-0003 Соединения 1 (неконъюгированная DTxO-0003 миРНК), Соединение 2 (DTxO-0003 с конъюгатом на 3'-конце сопровождающей цепи) и соединение 50 (DTxO-0003 с конъюгатом на 5'-конце сопровождающей цепи) были трансфицированы в клетки HEK293. Относящиеся к DTxO-0038 Соединение 30 (неконъюгированный DTxO-0038), Соединение 33 (DTxO-0038 с конъюгатом на 3'-конце сопровождающей цепи) и соединение 51 (DTxO-0038 с конъюгатом на 5'-конце сопровождающей цепи) также трансфицировали в клетки HEK293. Клетки, обработанные PBS, служили контролем. РНК выделяли из клеток через 48 часов после этого, а PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. Соединение 50 было таким же активным, как Соединения 1 (неконъюгированный DTxO-0003) и 2 (DTxO-0003 с конъюгатом на 3'-конце сопровождающей цепи), и Соединение 51 было таким же активным, как Соединения 30 (неконъюгированный DTxO-0038) и 33 (DTxO-0038 с конъюгатом на 3'-конце сопровождающей цепи) (см. **ФИГ. 20**).

[688] Эти же соединения были протестированы в эксперименте несвязанного поглощения в клетках HUVEC. Клетки, обработанные PBS, служили контролем. РНК выделяли из клеток через 48 часов после этого, а PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. В этом эксперименте в клетках HUVEC как Соединение 2, так и Соединение 50 ингибировали экспрессию PTEN мРНК, тогда как Соединение 1 не оказывало никакого эффекта (см. **ФИГ. 21**). Аналогично, Соединение 33 и Соединение 51 ингибировали экспрессию PTEN мРНК, тогда как Соединение 30 не ингибировало.

[689] Эти данные показывают, что конъюгация на 5' или 3' конце сопровождающей цепи, аналогичным образом способствует поглощению и активности миРНК.

Влияние открытых фрагментов COOH

[690] Для исследования конъюгатов LCFA-миРНК с экспонированными группами COOH, которые могут быть доступны для взаимодействия рецептор/транспортёр, были синтезированы Соединения 24-26. (см. **ФИГ. 6**). Соединение 24 и Соединение 25, каждое, содержат две C16 LCFA с конечными открытыми COOH, по одной присоединенной к каждой из аминокислотных групп  $\alpha$  и  $\beta$  лизинового каркаса. Мотив жирной кислоты Соединения 24 конъюгирован на 5'-конце PTEN миРНК через линкер С6. Мотив жирной кислоты

Соединения 25 конъюгирован на 3' конце PTEN миРНК через линкер С7. Подобно Соединению 25, Соединение 26 конъюгировано на 3' конце PTEN миРНК через линкер С7 и содержит лизиновый каркас; однако Соединение 26 содержит С16 LCFA с открытой COOH, присоединенную к  $\beta$ -аминогруппе лизина, и ацетильной группой, присоединенной к  $\alpha$ -аминогруппе лизина. Эти соединения, Соединение 2, и неконъюгированная PTEN миРНК (Соединение 1) инкубировали на HEK293, NIH3T3 или HUVEC клетках в течение 48 или 96 часов в средах, содержащих 2% сыворотки, в анализах несвязанного поглощения. РНК выделяли, а PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. Во всех трех типах клеток Соединение 2 ингибировало экспрессию PTEN мРНК намного сильнее и эффективнее, чем любые Соединения 24-26 (см. **ФИГ. 14, 15, 24-29**). Соединения 24-26 оказывали незначительное влияние на ингибирование экспрессии PTEN мРНК или не оказывали никакого эффекта. В меньшей степени в клеточных линиях и условиях, оцененных в этих экспериментах *in vitro*, эти LCFA-конъюгированные миРНК с открытой группой(ами) COOH не способствовали поглощению и активности миРНК.

[691] Подобно Соединению 26, мотив жирных кислот Соединения 23 конъюгирован на 3' конце PTEN миРНК через линкер С7 и содержит лизиновый каркас; однако Соединение 23 содержит С16 LCFA с открытой группой COOH, присоединенной к  $\alpha$ -аминогруппе лизина, и ацетильной группой, присоединенной к  $\beta$ -аминогруппе лизина. Активность этого соединения оценивалась в отдельном эксперименте несвязанного поглощения в клетках HUVEC. Соединение 23 вместе с Соединением 2 и Соединением 1 инкубировали с клетками HUVEC в течение 48 часов. Затем была выявлена РНК, а PTEN мРНК количественно определена с помощью QT-ПЦР. Соединение 23 и Соединение 1 практически не ингибировали экспрессию PTEN мРНК, тогда как Соединение 2 дозозависимо ингибировало экспрессию PTEN мРНК (**ФИГ. 31**).

#### Влияние длины LCFA

[692] Чтобы понять влияние длины цепи жирных кислот на поглощение и активность миРНК, были синтезированы Соединения 10-15 (см. **ФИГ. 3**). Каждое из Соединений 10-15 содержало лизиновый каркас для конъюгирования двух LCFA в один липидный мотив и линкер С7 для присоединения липидного мотива к PTEN миРНК. Соединения 10-15 содержат С10, С12, С14, С18, С20 или С22 LCFA соответственно, присоединенные к аминогруппам лизина. Эксперименты по трансфекции подтвердили, что Соединения 10-15 ингибируют экспрессию PTEN мРНК в клетках HEK293 (см. **ФИГ. 32 и 33**). Для определения их активности в условиях несвязанного присоединения, Соединения 10-15, Соединение 2 и неконъюгированный PTEN миРНК (Соединение 1) инкубировали на HUVEC клетки в течение 48 часов в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли, а PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. Соединения 2 и Соединение 12 ингибировали экспрессию PTEN мРНК сильнее, чем Соединение 10, Соединение 11, Соединение 13 и Соединение 14 (см. **ФИГ. 34 и 35**). По меньшей мере в клетках HUVEC, Соединение 2 было более эффективным, чем Соединение 12. Эти данные демонстрируют, что длина жирных кислот влияет на поглощение и активность миРНК со снижением

активности насыщенных жирных кислот с короче чем 12 атомов углерода и длиннее чем 18, если такие жирные кислоты конъюгированы с миРНК через раскрытый линкер C7 и лизин.

[693] Как описано в настоящей заявке, в экспериментах несвязанного поглощения активны соединения, содержащие две насыщенные LCFA C14, две насыщенные LCFA C16 или две LCFA C18. Чтобы понять, обеспечивают ли соединения, содержащие определенные комбинации насыщенных LCFA C14, C16 и C18, поглощение и активность целлюлозы, были разработаны Соединения 54-59 (см. **ФИГ. 12А**). Эксперименты по трансфекции подтвердили, что Соединения 54-59 ингибируют экспрессию РТЕН мРНК в клетках НЕК293 (см. **ФИГ. 74, 75 и 76**). Для определения их активности в условиях несвязанного поглощения Соединения 54-59, Соединение 2, Соединение 12-13 и неконъюгированная РТЕН миРНК (Соединение 1) инкубировали с клетками HUVES в течение 48 часов в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. Соединение 54 и Соединение 55 ингибировали экспрессию РТЕН мРНК так же или немного более эффективно, чем Соединение 2 и Соединение 12 (**ФИГ. 77**). Соединение 56 и Соединение 57 ингибировали экспрессию РТЕН мРНК в большей степени, чем Соединение 13, но были немного менее эффективными для ингибирования экспрессии РТЕН мРНК, чем Соединение 2 (**ФИГ. 78**). Активность как Соединения 58, так и Соединения 59 оказалась такой же или немного большей, чем эффективность ингибирования экспрессии РТЕН мРНК у Соединения 12, но менее эффективной для ингибирования экспрессии РТЕН мРНК, связанной с Соединением 13 (**ФИГ. 79**). Соединение 1 оказало незначительное влияние на ингибирование экспрессии РТЕН мРНК или не имело никакого эффекта (**ФИГ. 77, 78 и 79**). Эти данные демонстрируют, что конъюгация определенных комбинаций насыщенных жирных кислот может использоваться для повышения поглощения и активности миРНК. Удивительно, что соединения, содержащие либо LCFA C14 или C16, либо LCFA C18, более эффективны, чем соединения, содержащие две идентичные LCFA C18.

*Влияние конъюгации мотивов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты*

[694] Как описано в настоящей заявке, соединения, содержащие две насыщенные LCFA C14, две насыщенные LCFA C16 или две насыщенные C18 LCFA, активны в экспериментах несвязанного поглощения. Чтобы понять, влияет ли степень насыщения на поглощение и активность миРНК, были разработаны соединения, содержащие РТЕН миРНК, связанные с конъюгированным фрагментом, содержащим ненасыщенный LCFA (**ФИГ. 8**). Соединение 38 содержит две ненасыщенные LCFA C14, Соединение 39 содержит две ненасыщенные LCFA C16, а Соединения 40 и 42 каждое содержат по две ненасыщенные LCFA C18. LCFA Соединения 40 каждая имеет одну ненасыщенную связь углерод-углерод, а LCFA Соединения 42 каждая имеет три ненасыщенные связи углерод-углерод.

[695] Соединения 38, 39, 40 и 42 оценивали в условиях трансфекции в клетках НЕК293. Соединения 1, 2, 12 и 13 были включены для сравнения активности. Клетки, обработанные PBS, служили контролем. РНК выделяли из клеток через 48 часов после

этого, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. После трансфекции каждый ненасыщенный конъюгат LCFA был так же эффективен в репрессии экспрессии РТЕН мРНК, отвечающей эквивалентной длине насыщенного конъюгата LCFA (ср. Соединение 12-38; 2-39; и 13-40 и 42 на **ФИГ. 36**).

[696] Для оценки активности тех же соединений в условиях несвязанного поглощения, соединения инкубировали с клетками HUVEC в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли из клеток через 48 часов после этого, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. После несвязанного поглощения наблюдались различия в активности различных соединений (**ФИГ. 33**). Как видно из различий в снижении экспрессии РТЕН мРНК, ненасыщенный конъюгат LCFA C14 Соединение 38, ненасыщенный конъюгат LCFA C16 Соединение 39 и ненасыщенный конъюгат LCFA C18 Соединение 42 были менее эффективны в отношении их соответствующих насыщенных LCFA такой же длины. (Сравните Соединения 12-38; 2-39; и 13-42). Исключением из этой тенденции является Соединение 40, ненасыщенный конъюгат LCFA C18, который так же активен, как и насыщенный конъюгат LCFA C18 Соединение 13.

[697] Эти данные демонстрируют, что степень насыщения и длина LCFA влияют на поглощение и активность миРНК.

миРНК поглощение и активность Соединения 2 относительно ДНА

[698] Подчеркивая способность ДНА специфически направлять нейроны, исследования продемонстрировали, что высокие дозы ДНА-конъюгированных миРНК способствовали нокдауну хантингтиновых мРНК в головном мозге. Были синтезированы РТЕН миРНК, конъюгированные с одним или двумя ДНА (см. Соединения 16-18 на **ФИГ. 1**). Как указано выше, линкер C7 и лизиновый каркас использовали для ковалентного присоединения жирных кислот к миРНК. Соединение 17 содержит ДНА, присоединенную к каждой из аминокислот лизина. Соединение 16 содержит ДНА, присоединенную к α-аминогруппе лизина, и ацетильную группу, присоединенную к β-аминогруппе лизина, тогда как Соединение 18 содержит ДНА, присоединенную к β-аминогруппе лизина, и ацетильную группу, присоединенную к α-аминогруппе лизина. Эти соединения, Соединение 2 и неконъюгированная РТЕН миРНК (Соединение 1) инкубировали на НЕК293 и дифференцированных SH-SY5Y клетках в течение 48 часов в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. В обоих типах клеток Соединение 2 было более эффективным в отношении ингибирования экспрессии РТЕН мРНК, чем любое из ДНА-конъюгированных Соединений 16-18 (см. **ФИГ. 39 и 40**). В клетке НЕК293 Соединение 17, содержащее 2 ДНА, было более эффективным, чем соединения, содержащие только ДНА. В клетках SH-SY5Y Соединение 17 в наивысшей дозе проявляло большую активность, чем соединения, содержащие только ДНА, но эффект был небольшим.

[699] Аналогичный эксперимент был проведен в клетках HUVEC, за исключением

того, что соединения инкубировали в течение 48 и 96 часов в 2% сыворотке. Соединение 2 было более эффективным в отношении ингибирования экспрессии PTEN мРНК в клетках HUVEC, чем любое из ДНА-конъюгированных Соединений 16-18 как через 48, так и через 96 часов (см. **ФИГ. 41 и 42**). Соединение 17 показало некоторое ингибирование экспрессии PTEN мРНК при максимальной дозе при 96-часовой обработке.

[700] Соединения 16-18, Соединение 2 и неконъюгированная PTEN миРНК (Соединение 1) также инкубировали на первичных кортикальных нейронах крысы в течение 96 часов и 7 дней (см. **ФИГ. 43 и 44**). Через 96 часов Соединение 2 было более эффективным при ингибировании экспрессии PTEN мРНК, чем любое из ДНА-конъюгированных Соединений 16-18. Фактически, Соединения 16-18 в качестве лунки, как и контрольное Соединение 1, проявляли незначительную ингибирующую активность, если вообще проявляли ее. После 7 дней инкубации все соединения дозозависимо ингибировали экспрессию PTEN мРНК; однако Соединение 2 было приблизительно на порядок эффективнее, чем Соединения 16-18 или контрольное Соединение 1. Эти данные демонстрируют, что конъюгация двух LCFA C16 с миРНК способствует поглощению и активности миРНК более эффективно, чем конъюгация одного или двух ДНА через НЕК293 клетки, клетки HUVEC, клетки SH-SY5Y и крысиные первичные кортикальные нейроны.

Конъюгация DTx-01-08 мотива позволяет поглощение и активность других миРНК

[701] Неконъюгированные миРНК с мишенями FLT1 (VEGFR1) и KDR (VEGFR2) мРНК, Соединений 3 и 5, были идентифицированы и их ингибирующая активность подтверждена через 48 часов после трансфекции в клетки HUVEC (см. **ФИГ. 45 и 46**). Как и в случае с Соединением 2, лизиновый каркас использовали для конъюгирования двух LCFA C16 в один мотив жирной кислоты, а линкер C7 использовали для присоединения мотива жирной кислоты к рассматриваемой миРНК с получением VEGFR1-миРНК Соединения 4 и VEGFR2 миРНК Соединения 6 (см. **ФИГ. 2**).

[702] Чтобы подтвердить, что мотив DTx-01-08 активировал поглощение миРНК VEGFR1 в клетках, Соединение 4 и неконъюгированный миРНК VEGFR1 (Соединение 3) инкубировали с клетками HUVEC в течение 48 часов в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли, а экспрессию VEGFR1 мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. Соединение 4 ингибировало экспрессию VEGFR1, тогда как Соединение 3 оказывало незначительное влияние или не имело никакого эффекта (см. **ФИГ. 47**).

[703] Аналогичным образом, для подтверждения того, что мотив DTx-01-08 активировал поглощение VEGFR2 ми РНК в клетках, Соединение 6 и неконъюгированную VEGFR2 ми РНК (Соединение 5) инкубировали с клетками HUVEC в течение 48 часов в бессывороточной среде. Затем была выделена РНК, и экспрессия VEGFR2 мРНК количественно определена с помощью QT-ПЦР. Соединение 6 ингибировало экспрессию VEGFR2, тогда как Соединение 5 оказывало незначительное влияние или не имело никакого эффекта (см. **ФИГ. 48**).

[704] В другом примере была получена известная миРНК, направленная на НТТ

мРНК, в настоящей заявке называемая Соединением 27, и его ингибирующая активность подтверждена через 48 часов после трансфекции в клетки SH-SY5Y (см. **ФИГ. 49**). Как и в случае с Соединением 2, лизиновый каркас использовали для конъюгации двух LCFA C16 в один мотив жирной кислоты, а линкер C7 использовали для присоединения мотива жирной кислоты к миРНК НТТ с получением Соединения 29 (см. **ФИГ. 2**). Соединение 28 было синтезировано с использованием того же НТТ миРНК, линкера C7 и лизинового каркаса, но с ДНА, присоединенной к  $\beta$ -аминогруппе лизина, и ацетильной группой, присоединенной к  $\alpha$ -аминогруппе лизина (см. **ФИГ. 1**). Оба соединения, Соединение 29 и Соединение 28, ингибировали экспрессию НТТ мРНК так же эффективно, как неконъюгированное миРНК Соединение 27 после трансфекции в клетки SH-SY5Y (**ФИГ. 49**). Соединение 29, Соединение 28, Соединение 27, Соединение 2 и Соединение 1 инкубировали как с недифференцированными, так и с дифференцированными клетками SH-SY5Y в течение 48 часов в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли, а экспрессию НТТ мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. В обоих условиях Соединение 29 дозозависимо ингибировало экспрессию НТТ мРНК (см. **ФИГ. 50 и 51**). Напротив, Соединение 28, Соединение 27, Соединение 2 и Соединение 1 практически не ингибировали экспрессию НТТ мРНК. Эти данные демонстрируют, что мотив DTx-01-08, вероятно, будет обеспечивать поглощение и активность любого миРНК, конъюгированного с ним в 3' положении. Эти данные также дают дополнительные доказательства того, что мотив DTx-01-08 превосходит ДНА.

Активность Соединения 2 в других клеточных типах

[705] Была оценена способность Соединения 2 ингибировать экспрессию PTEN мРНК после инкубации либо на дифференцированных адипоцитах 3T3L1, либо на дифференцированных первичных человеческих клетках скелетных мышц, либо на первичных человеческих клетках трабекулярной сетки. Как Соединение 2, так и неконъюгированная PTEN миРНК (Соединение 1) инкубировали на дифференцированных адипоцитах 3T3L1 в течение 48 часов и на первичных человеческих клетках трабекулярной сетки в течение 96 часов. РНК выделяли, а PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. Соединение 2 ингибировало экспрессию PTEN мРНК во всех трех типах клеток, тогда как Соединение 1, неконъюгированная PTEN миРНК, оказывало незначительное влияние или не оказывало никакого влияния (см. **ФИГ. 52-54**).

[706] Оценивали эффект количества C16 LCFA в конъюгированной части. Оценивали способность Соединения 2 (две C16 LCFA), а также Соединения 7 (одна C16 LCFA; DTx-01-06 мотив), Соединения 8 (одна C16 LCFA; DTx-01-11 мотив), Соединения 9 (две C16 LCFA, оценивали одну на 5'-конце сопровождающей цепи и одну на 3'-конце сопровождающей цепи) и Соединения 1 (неконъюгированное) ингибировать экспрессию PTEN мРНК после инкубации на первичных человеческих гепатоцитах и первичных человеческих адипоцитах. Все соединения инкубировали на гепатоцитах в течение 48 часов и адипоцитах в течение 7 дней. Затем была выявлена РНК, а PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР. В гепатоцитах все соединения дозозависимо

ингибировали экспрессию PTEN мРНК. Соединение 2 было значительно более эффективным, чем неконъюгированное Соединение 1 или Соединение 7, Соединение 8 и Соединение 9 (**ФИГ. 55**). В адипоцитах, опять же, все соединения дозозависимо ингибировали экспрессию PTEN мРНК. Соединение 2 и Соединение 9 были более эффективными, чем Соединение 7, Соединение 8 или Соединение 1 в отношении ингибирования экспрессии PTEN мРНК. Соединение 2 оказалось немного более эффективным, чем Соединение 9, в отношении ингибирования экспрессии PTEN мРНК после инкубации на адипоцитах (**Фиг. 56**).

[707] Оценивалась способность Соединения 2, а также Соединения 7, Соединения 8, Соединения 9 и Соединения 1 ингибировать экспрессию PTEN мРНК после инкубации на дифференцированных первичных человеческих клетках, скелетной мышце и первичной человеческой клетке. Все соединения инкубировали на дифференцированных мышечных клетках в течение 96 часов и клетках в течение 48 часов. Затем РНК выделяли и PTEN мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. В обоих типах клеток Соединение 2 было значительно более эффективным при ингибировании экспрессии PTEN мРНК, чем неконъюгированное Соединение 1 или конъюгированные соединения Соединение 7, Соединение 8 и Соединение 9 (см. **ФИГ. 57 и 58**). Соединение 2 и Соединение 9 также инкубировали на человеческие Т-клетки в течение 96 часов. Соединение 2 было значительно более эффективным в репрессии экспрессии PTEN мРНК, чем Соединение 9. (см. **Фиг. 59**).

#### Дополнительные двойные-С16 примеры

[708] Чтобы исследовать эффект относительного позиционирования двух С16 LCFA в конъюгированной части, дополнительные молекулы, Соединения 20 и 21, были синтезированы с одним мотивом, содержащим две С16 LCFA, конъюгированные с 3'-концом олигонуклеотида. В случае Соединения 20, LCFA С16 были разработаны так, чтобы быть ближе друг к другу, чем те, которые представлены в Соединении 2, а в случае Соединения 21 - дальше друг от друга, чем в Соединении 2. Трансфекция Соединения 20, Соединения 21 и Соединения 2 в клетки НЕК293 продемонстрировала, что все 3 соединения были активны при ингибировании экспрессии PTEN мРНК (**Фиг. 30**). Эксперименты по несвязанному поглощению клетками HUVES, в которых Соединение 2, Соединение 20, Соединение 21 и Соединение 1 (неконъюгированный PTEN мРНК) инкубировали в среде в течение 48 часов, показали, что Соединение 20 и Соединение 21 были одинаково эффективными при ингибировании экспрессии PTEN мРНК в виде Соединения 2. Соединение 1 оказывает незначительное влияние или не оказывает никакого влияния на ингибирование экспрессии PTEN мРНК в клетках HUVES (**ФИГ. 31**).

[709] Поскольку расстояние между сайтами связывания двух С16 LCFA в контексте структурно гибких линкеров, по-видимому, не оказывает заметного влияния на активность конъюгированных фрагментов, синтезированы соединения со структурно жесткими линкерами (**ФИГ. 9**). Соединение 44 было выбрано для тестирования *in vitro* как в условиях трансфекции, так и в условиях несвязанного поглощения.

[710] Соединениями 2 и 44 трансфицировали в клетки HEK293. Соединение 1, неконъюгированная миРНК РТЕН, также трансфицировали в клетки HEK293. Клетки, обработанные PBS, служили контролем. РНК выделялись из клеток через 48 часов после этого, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. После трансфекции конъюгаты миРНК РТЕН, Соединения 1, 2 и 44 были одинаково эффективны при ингибировании экспрессии РТЕН мРНК. **(ФИГ. 16)**

[711] Чтобы оценить активность тех же соединений в условиях несвязанного поглощения, те же соединения инкубировали с клетками HUVEC в среде, содержащей 2% сыворотки. РНК выделяли из клеток через 48 часов после этого, а РТЕН мРНК количественно определяли с помощью QT-ПЦР и нормализовали по гену домашнего хозяйства. После несвязанного поглощения Соединение 2 продемонстрировало наибольшую эффективность, что было измерено по снижению экспрессии РТЕН мРНК, связанной с жестким липидом, содержащим Соединение 44, и неконъюгированным Соединением 1 **(ФИГ. 17)**.

[712] Эти данные показывают, что структурный контекст, в котором две С16 LCFA представлены клеткам, значительно влияет на поглощение и активность миРНК.

Конъюгация DTx-01-08 мотива позволяет активность и поглощение в сетчатке

[713] Для оценки активности и поглощения сетчаткой Соединение 2 вводили мышам или крысам с помощью интравитреальной инъекции.

[714] Мышам C57BL/6 вводили интравитреальной инъекцией либо PBS, либо 70 пмоль, 700 пмоль или 7000 пмоль Соединения 2 (DTx-01-08-конъюгированных миРНК направленных РТЕН). В качестве контроля ранее опубликованный неконъюгированный модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, мишень которого соединен с РТЕН, Соединение 37, вводили в дозе 7000 пмоль. (Butler et al., Diabetes, 2002, 51(4): 1028- 1034). Через семь дней после инъекции мышей умерщвляли и их сетчатку выделяли. РНК выделяли из сетчатки и экспрессию РТЕН мРНК количественно определяли относительно гена домашнего хозяйства с помощью QT-ПЦР. В отношении PBS Соединение 2 дозозависимо ингибировало экспрессию РТЕН мРНК в сетчатке и было более эффективным, чем неконъюгированное модифицированное одноцепочечное Соединение 37 (см. **ФИГ. 60**).

[715] Чтобы понять типы клеток сетчатки, в которых экспрессия РТЕН ингибируется после воздействия Соединения 2, крысам Brown Norway вводили интравитреальной инъекцией либо PBS, либо 7000 пмоль Соединения 2. Через семь дней после введения дозы глаза собирали и количественную гибридизацию *in situ* выполняли с помощью RNAscope, чтобы понять типы клеток сетчатки, в которых Соединение 2 ингибирует экспрессию РТЕН мРНК (см. **ФИГ. 61**). В отношении PBS Соединение 2 ингибировало экспрессию РТЕН, о чем свидетельствует значительное уменьшение количества розовых точек (транскриптов РТЕН мРНК) во всех типах клеток в сетчатке, включая внешний ядерный слой, внутренний ядерный слой и ганглиозный ядерный слой (см. **ФИГ. 61**).

[716] Также оценивали активность Соединения 2 у крыс. Крысам Brown Norway

вводили интравитреальной инъекцией либо PBS, либо 210 пмоль, либо 2100 пмоль Соединения 2.

Через семь дней после инъекции крыс умерщвляли и их сетчатку выделяли. РНК выделяли из сетчатки и экспрессию PTEN мРНК количественно определяли относительно гена домашнего хозяйства с помощью QT-ПЦР. В отношении PBS соединение 2 дозозависимо ингибировало экспрессию PTEN мРНК в сетчатке. (см. **ФИГ. 62**).

Конъюгация DTx-01-08 мотива позволяет активность миРНК для различения мишеней после интравитреальной инъекции

[717] Чтобы проверить эффекты конъюгации мотива DTx-01-08 в контексте различных миРНК, дополнительные последовательности миРНК были синтезированы и конъюгированы с мотивом DTx-01-08. Соединения представляли собой Соединение 30, ранее опубликованный миРНК с PTEN, отличный от миРНК Соединения 2 (Prakash et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26 (9): 2194-2197) и соединение 27 (Nikan et al., *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2016, 5, e344). Для подтверждения активности Соединения 30 клетки HEK293 трансфицировали Соединением 2 и Соединением 30. Как Соединение 2, так и Соединение 30 ингибировали экспрессию PTEN мРНК, причем Соединение 2 демонстрировало большую активность (**ФИГ. 63**). Соединение 27 ингибирует экспрессию HTT мРНК в клетках SH-SY5Y (**ФИГ. 49**).

[718] Соединение 30 (PTEN) и Соединение 27 (HTT) конъюгировали с DTx-01-08 с образованием Соединения 33 (PTEN) и Соединения 29 (HTT). Мышам C57BL/6 вводили интравитреальной инъекцией либо PBS, либо 70 пмоль, либо 700 пмоль Соединения 2 и 70 пмоль или 700 пмоль Соединения 33. Через семь дней после инъекции мышей умерщвляли и сетчатку глаза выделяли. РНК выделяли из сетчатки, проводили QT-ПЦР и количественно определяли экспрессию PTEN мРНК относительно гена домашнего хозяйства с помощью QT-ПЦР. Оба соединения дозозависимо ингибировали экспрессию PTEN мРНК, зависящую от PBS. (**ФИГ. 64**).

[719] В аналогичном эксперименте мышам C57BL/6 вводили интравитреальной инъекцией либо PBS, либо 700 пмоль Соединения 29, либо 700 пмоль Соединения 2. РНК выделяли из сетчатки, проводили QT-ПЦР и количественно определяли экспрессию HTT мРНК относительно гена домашнего хозяйства. Относительно PBS или конъюгата миРНК, мишенями которого является PTEN, Соединение 2, конъюгат миРНК, мишень HTT, Соединение 29, значительно ингибировал экспрессию HTT мРНК в сетчатке через 7 дней после интравитреальной инъекции. (**ФИГ. 65**).

[720] Также были протестированы две разные миРНК направленные на VEGFR2 мРНК. Неконъюгированные версии миРНК, Соединение 31 и Соединение 32, были трансфицированы вместе с PTEN миРНК Соединением 1 в клетки BEND. РНК выделяли через 48 часов и экспрессию VEGFR2 оценивали с помощью QT-ПЦР. Соединение 31 и Соединение 32 дозозависимо ингибировали экспрессию VEGFR2, зависящую от PBS. Как и ожидалось, PTEN-направленное миРНК Соединение 1 не влияло на экспрессию VEGFR2 мРНК. (**ФИГ. 66**). Затем каждое из Соединений 31 и 32 конъюгировали с DTx-01-

08 с образованием Соединения 34 и Соединения 35 соответственно. Мышам C57BL/6 затем вводили интравитреальной инъекцией либо PBS, либо 700 пмоль Соединения 34, либо 700 пмоль Соединения 35, либо 700 пмоль Соединения 2 (также конъюгированного миРНК направленного PTEN). Через семь дней после инъекции мышей умерщвляли и их сетчатку выделяли. РНК выделяли из сетчатки, а экспрессия VEGFR2 мРНК количественно определена относительно гена домашнего хозяйства. В отношении PBS и конъюгата миРНК, направленного на мишень PTEN, Соединение 2, Соединение 34 и Соединение 35 значительно ингибировали экспрессию VEGFR2 мРНК (**ФИГ. 67**). Соединение 34 также оценивали у крыс. PBS, 700 или 3500 пмоль Соединения 34 и 2100 пмоль Соединения 2 вводили интравитреально в глаза крысы. Через семь дней после инъекции крыс умерщвляли и сетчатку глаза выделяли. РНК выделяли из сетчатки и экспрессию VEGFR2 мРНК количественно оценивали относительно гена домашнего хозяйства с помощью QT-ПЦР. Связанное с PBS и конъюгатом миРНК, направленным на PTEN, Соединение 2, Соединение 34 значительно ингибировало экспрессию VEGFR2 мРНК (**ФИГ. 68**).

#### Двойные-С16 мотивы активны In Vivo

[721] Также были протестированы соединения, сконструированные с одним мотивом, содержащим две С16 LCFA, конъюгированные на 3'-конце цепи PTEN направленной миРНК. В случае Соединения 20, С16 были разработаны так, чтобы быть ближе друг к другу, чем в Соединении 2, а в случае Соединения 21, - дальше друг от друга, чем в Соединении 2. (**ФИГ. 4**).

[722] Соединение 20, Соединение 21, Соединение 2 и Соединение 1, каждое, вводили в глаза мышей C57BL/6 в дозе 210 пмоль посредством интравитреальной инъекции. PBS вводили в качестве контроля. Через семь дней после инъекции мышей умерщвляли и их сетчатку выделяли. РНК выделяли из сетчатки и экспрессию PTEN мРНК количественно определяли относительно гена домашнего хозяйства с помощью QT-ПЦР. Относительно PBS и Соединения 1 (неконъюгированный миРНК PTEN), которые существенно не ингибировали экспрессию PTEN мРНК в этом эксперименте, каждый из конъюгатов миРНК PTEN, Соединение 20, Соединение 21 и Соединение 2 значительно ингибировали экспрессию PTEN мРНК (**ФИГ. 69**).

#### Влияние длины LCFA In Vivo

[723] Ряд Соединений был разработан для оценки того, может ли конъюгация нескольких насыщенных LCFA различной длины способствовать поглощению и активности более эффективно, чем две насыщенные LCFA С16, конъюгированные с PTEN миРНК в Соединении 2. Нерасщепляемый линкер С7/лизин был использован для ковалентного связывания насыщенной LCFA длиной от 12 до 18 атомов углерода с PTEN миРНК. По две из каждой насыщенных LCFA С12, С14 и С18 были присоединены к аминогруппам лизина с образованием Соединения 11, Соединения 12 и Соединения 13 соответственно. (см. **ФИГ. 3**). Как продемонстрировано в настоящей заявке, эксперименты по трансфекции подтвердили, что Соединения 11-13 ингибируют экспрессию PTEN мРНК в аналогичной степени в клетках HEK293 (**ФИГ. 34** и **ФИГ. 35**). Мышам C57BL/6 вводили

интравитреальной инъекцией либо воду, либо 700 пмоль Соединения 2, Соединения 11, Соединения 12, Соединения 13 или Соединения 1. Соединение 13 не растворяли в PBS и, таким образом, растворяли в воде. Чтобы сравнить данные для каждого соединения, в этом эксперименте каждое соединение было солюбилизировано в воде. Через семь дней после инъекции мышей умерщвляли и их сетчатку выделяли. РНК выделяли из сетчатки, проводили QT-ПЦР и количественно оценивали экспрессию PTEN мРНК относительно гена домашнего хозяйства. Соединение 2, Соединение 11, Соединение 12 и Соединение 13, все, ингибировали экспрессию PTEN мРНК более эффективно, чем PBS или Соединение 1 (неконъюгированный миРНК PTEN) (ФИГ. 70). Как и в экспериментах с несвязанным поглощением *in vitro* и *ex vivo* (ФИГ. 36 и 37), Соединение 2 и Соединение 12 оказались немного более эффективными в подавлении экспрессии PTEN мРНК, чем Соединение 11 и Соединение 13 (ФИГ. 70).

[724] Было замечено, что в этом эксперименте Соединение 1 было немного более активным, чем в других экспериментах (см., например, ФИГ. 69). Хотя солюбилизация в воде может увеличивать поглощение и/или иметь неблагоприятные эффекты *in vivo*, в этом эксперименте соответствующие уровни экспрессии PTEN мРНК в соединениях согласуются с предыдущими экспериментами, и, таким образом, тот факт, что соединения были солюбилизированы в воде, не оказывает существенное влияние на относительный результат. Важно отметить, что наблюдалась корреляция между активностью *in vitro* и *in vivo*.

[725] Для подтверждения преимущества конъюгированного миРНК над неконъюгированным миРНК и того, что наблюдаемое ингибирование экспрессии PTEN мРНК не связано с солюбилизацией Соединений в воде, был проведен дополнительный эксперимент на мышах по интравитреальной инъекции. Мышам C57B1/6 вводили интравитреальной инъекцией либо PBS, либо Соединение 1, растворенное в PBS, либо Соединение 2, растворенное в PBS. Соединение 1 тестировали при дозе 700 пмоль, а Соединение 2 тестировали при дозах 70 пмоль, 210 пмоль и 700 пмоль. Через семь дней после инъекции мышей умерщвляли и их сетчатку выделяли. РНК выделяли из сетчатки, проводили QT-ПЦР и количественно оценивали экспрессию PTEN мРНК относительно гена домашнего хозяйства. Соединение 2 ингибирует экспрессию PTEN мРНК дозозависимым образом и более эффективно, чем PBS или Соединение 1. (ФИГ. 71).

Конъюгация DTx-01-08 мотива позволяет активность миРНК для различения мишеней после системного введения

[726] Мышам подкожно или внутривенно вводили разовую дозу либо PBS, либо 1, 3, 10 или 30 мг/кг PTEN-направленной миРНК, конъюгированной с мотивом DTx-01-08, Соединение 33. Печень собирали через 7 дней после инъекции, РНК выделяли и подвергали обратной транскрипции. Затем была проведена QT-ПЦР для количественной оценки экспрессии PTEN мРНК, ответственной за ген домашнего хозяйства. Соединение 33 дозозависимо ингибировало экспрессию PTEN мРНК в печени в ответ на PBS как после подкожного, так и после внутривенного введения (ФИГ. 72). Было проведено

дополнительное исследование, чтобы понять, способно ли Соединение 33 подавлять экспрессию РТЕН мРНК в тканях за пределами печени. Мышам С57В1/6 внутривенно вводили 5 инъекций через день по 3 дозы либо PBS, либо 30 мг/кг Соединения 33. Через семь дней после первой дозы ткани собирали, РНК выделяли и подвергали обратной транскрипции. Затем выполняли QT-ПЦР для оценки экспрессии РТЕН мРНК относительно гена домашнего хозяйства. Соединение 33 ингибирует экспрессию РТЕН мРНК в мышцах, сердце, жировой ткани, легких, печени, почках и селезенке (ФИГ. 73).

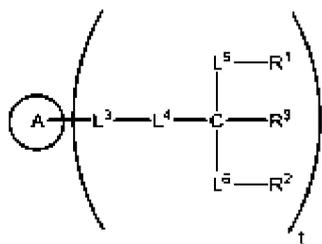
[727] Вкратце, результаты экспериментов по трансфекции и несвязанному поглощению демонстрируют, что конъюгация миРНК в 3' положении с двумя LCFA длиной между 12 и 18 атомами углерода значительно способствует поглощению и активности миРНК. Эксперименты показывают, что эта повышенная способность проникать в клетку не зависит ни от типа клетки, ни от конкретного миРНК. Удивительно, но при инкубации на нейронную клетку, миРНК, конъюгированные с мотивом С16 DTx-01-08, обеспечивали значительно большее поглощение и активность, чем миРНК, конъюгированные с одним или более ДНА, подтвержденный экспериментальный подход к мишени для нейронов ЦНС.

[728] Повышенное поглощение и активность миРНК наблюдали для миРНК, предназначенных для различных мРНК, миРНК, имеющих разные мотивы модификации нуклеозидного сахара, демонстрируя, что улучшенное поглощение и активность не зависят от нуклеотидной последовательности и химической модификации миРНК, на которую конъюгирован липидный фрагмент. Важно отметить, что мотив DTx-01-08 и другие липидные мотивы улучшали поглощение миРНК *in vivo* после местного или системного введения.

[729] Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано со ссылкой на варианты воплощения изобретения и примеры, следует понимать, что многочисленные и различные модификации могут быть сделаны без отступления от сущности настоящего изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее структуру:



где

A представляет собой олигонуклеотид;

$L^3$  и  $L^4$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, -OPO<sub>2</sub>-O-, замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен;

$L^5$  представляет собой - $L^{5A}$ - $L^{5B}$ - $L^{5C}$ - $L^{5D}$ - $L^{5E}$ -;

$L^6$  представляет собой - $L^{6A}$ - $L^{6B}$ - $L^{6C}$ - $L^{6D}$ - $L^{6E}$ -;

$L^{5A}$ ,  $L^{5B}$ ,  $L^{5C}$ ,  $L^{5D}$ ,  $L^{5E}$ ,  $L^{6A}$ ,  $L^{6B}$ ,  $L^{6C}$ ,  $L^{6D}$ , и  $L^{6E}$  независимо представляют собой связь, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, -NHC(O)-, -NHC(O)NH-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)NH-, замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, замещенный или незамещенный циклоалкилен, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен, замещенный или незамещенный арилен или замещенный или незамещенный гетероарилен;

$R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>25</sub> алкил, где по меньшей мере один из  $R^1$  и  $R^2$  представляет собой незамещенный C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> алкил;

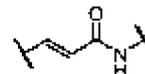
$R^3$  представляет собой водород, -NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, -C(O)H, -C(O)NH<sub>2</sub>, -NHC(O)H, -NHC(O)OH, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)OH, -OC(O)H, -N<sub>3</sub>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный гетероарил; и

t представляет целое число от 1 до 5.

2. Соединение по пункту 1, где t представляет собой 1.
3. Соединение по пункту 1, где t представляет собой 2.
4. Соединение по пункту 1, где t представляет собой 3.
5. Соединение по пункту 1, где A представляет собой двухцепочечный олигонуклеотид, или одноцепочечный олигонуклеотид.
6. Соединение по пункту 1, где олигонуклеотид A является модифицированным.
7. Соединение по пункту 5, где один  $L^3$  присоединен к 3' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.
8. Соединение по пункту 5, где один  $L^3$  присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

9. Соединение по пункту 5, где один  $L^3$  присоединен к нуклеотидному основанию двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

10. Соединение по пункту 1, где  $L^3$  и  $L^4$  независимо представляют собой связь,  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-NHC(O)NH-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ ,  $-OPO_2-O-$ , замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.



11. Соединение по пункту 1, где  $L^3$  независимо представляет собой

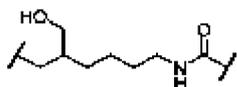
12. Соединение по пункту 1, где  $L^3$  независимо представляет собой  $-OPO_2-O-$ .

13. Соединение по пункту 1, где  $L^3$  независимо представляет собой  $-O-$ .

14. Соединение по пункту 1, где  $L^4$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

15. Соединение по пункту 1, где  $L^4$  независимо представляет собой  $-L^7-NH-C(O)-$  или  $-L^7-C(O)-NH-$ , где  $L^7$  представляет собой замещенный или незамещенный алкилен.

16. Соединение по пункту 1, где  $L^4$  независимо представляет собой



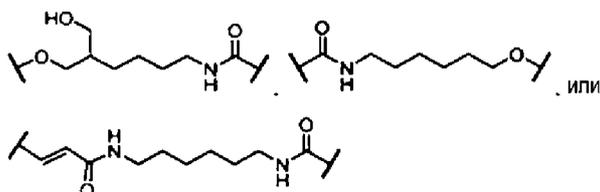
17. Соединение по пункту 1, где  $L^4$  независимо представляет собой



18. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$  или  $-O-L^7-C(O)-NH-$ , где  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный алкилен, замещенный или незамещенный гетероалкилен, или замещенный или незамещенный гетероалкиленилен.

19. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-O-L^7-NH-C(O)-$ , где  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_5-C_8$  алкилен.

20. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой

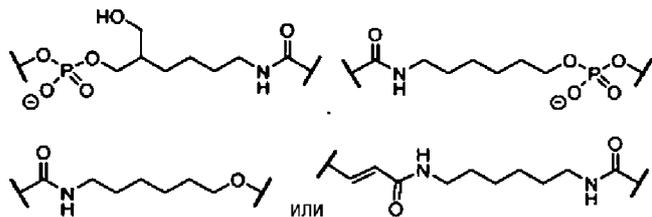


21. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-OPO_2-O-L^7-NH-C(O)-$  или  $-OPO_2-O-L^7-C(O)-NH-$ , где  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный алкилен.

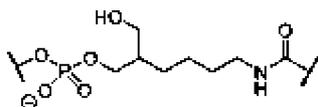
22. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой  $-OPO_2-O-L^7-$

NH- C(O)-, где  $L^7$  независимо представляет собой замещенный или незамещенный  $C_5$ - $C_8$  алкилен.

23. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой

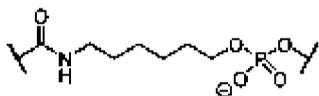


24. Соединение по пункту 1, где an  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



и присоединен к 3' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

25. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



и присоединен к 5' атому углерода двухцепочечного олигонуклеотида или одноцепочечного олигонуклеотида.

26. Соединение по пункту 1, где  $-L^3-L^4-$  независимо представляет собой



и присоединен к нуклеотидному основанию двухцепочечной нуклеиновой кислоты или одноцепочечной нуклеиновой кислоты.

27. Соединение по пункту 1, где  $R^3$  независимо представляет собой водород.

28. Соединение по пункту 1, где  $L^6$  независимо представляет собой  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ , замещенный или незамещенный алкилен, или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

29. Соединение по пункту 1, где  $L^6$  независимо представляет собой  $-NHC(O)-$ .

30. Соединение по пункту 1, где

$L^{6A}$  независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен;

$L^{6B}$  независимо представляет собой связь,  $-NHC(O)-$ , или незамещенный арилен;

$L^{6C}$  независимо представляет собой связь, незамещенный алкилен, или незамещенный арилен;

$L^{6D}$  независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен; и

$L^{6E}$  независимо представляет собой связь или  $-NHC(O)-$ .

31. Соединение по пункту 1, где

$L^{6A}$  независимо представляет собой связь или незамещенный  $C_1$ - $C_8$  алкилен;

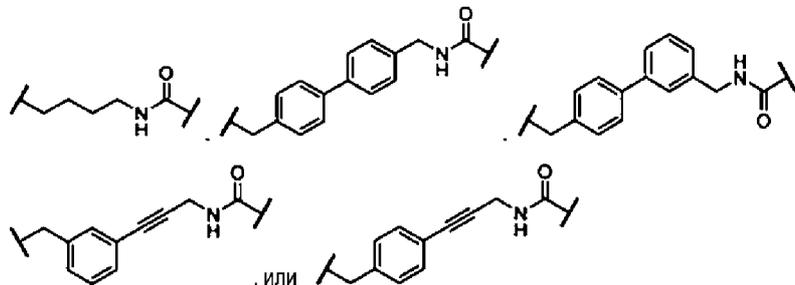
$L^{6B}$  независимо представляет собой связь,  $-NHC(O)-$ , или незамещенный фенилен;

$L^{6C}$  независимо представляет собой связь, незамещенный  $C_2-C_8$  алкинилен, или незамещенный фенилен;

$L^{6D}$  независимо представляет собой связь или незамещенный  $C_1-C_8$  алкилен; и

$L^{6E}$  независимо представляет собой связь или  $-NHC(O)-$ .

32. Соединение по пункту 1, где  $L^6$  независимо представляет собой связь,



33. Соединение по пункту 1, где  $L^5$  независимо представляет собой  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ , замещенный или незамещенный алкилен, или замещенный или незамещенный гетероалкилен.

34. Соединение по пункту 1, где  $L^5$  независимо представляет собой  $-NHC(O)-$ .

35. Соединение по пункту 1, где

$L^{5A}$  независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен;

$L^{5B}$  независимо представляет собой связь,  $-NHC(O)-$ , или незамещенный арилен;

$L^{5C}$  независимо представляет собой связь, незамещенный алкилен, или незамещенный арилен;

$L^{5D}$  независимо представляет собой связь или незамещенный алкилен; и  $L^{5E}$  независимо представляет собой связь или  $-NHC(O)-$ .

36. Соединение по пункту 1, где

$L^{5A}$  независимо представляет собой связь или незамещенный  $C_1-C_8$  алкилен;

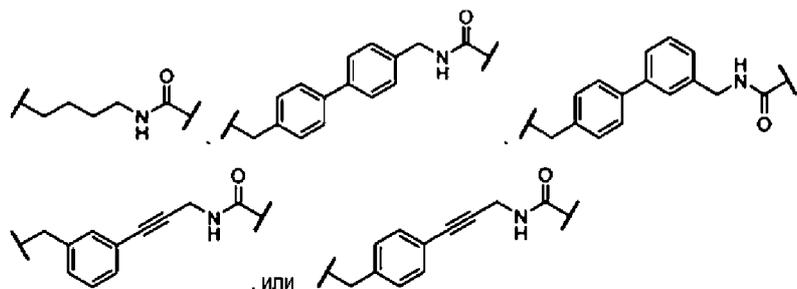
$L^{5B}$  независимо представляет собой связь,  $-NHC(O)-$ , или незамещенный фенилен;

$L^{5C}$  независимо представляет собой связь, незамещенный  $C_2-C_8$  алкинилен, или незамещенный фенилен;

$L^{5D}$  независимо представляет собой связь или незамещенный  $C_1-C_8$  алкилен; и

$L^{5E}$  независимо представляет собой связь или  $-NHC(O)-$ .

37. Соединение по пункту 1, где  $L^5$  независимо представляет собой связь,



38. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_1-C_{17}$  алкил.

39. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_{11}-C_{17}$  алкил.

40. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.
41. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный  $C_{15}$  алкил.
42. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.
43. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.
44. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.
45. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{15}$  алкил.
46. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.
47. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.
48. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.
49. Соединение по пункту 1, где  $R^1$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_{15}$  алкил.
50. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.
51. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.
52. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.
53. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный  $C_{15}$  алкил.
54. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.
55. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.
56. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.
57. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный  $C_{15}$  алкил.
58. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_1$ - $C_{17}$  алкил.
59. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_{11}$ - $C_{17}$  алкил.
60. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_{13}$ - $C_{17}$  алкил.
61. Соединение по пункту 1, где  $R^2$  представляет собой незамещенный неразветвленный насыщенный  $C_{15}$  алкил.
62. Соединение по пункту 1, где олигонуклеотид представляет собой миРНК, мимик микроРНК, структуру типа петля-на-стебле, одноцепочечную миРНК, олигонуклеотид

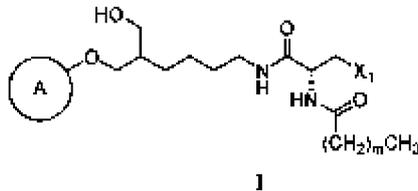
РНКазаН, анти-микроРНК олигонуклеотид, стерический блокирующий олигонуклеотид, CRISPR направляющую РНК, или аптамер.

63. Соединение по пункту 1, где олигонуклеотид является модифицированным.

64. Соединение по пункту 1, где олигонуклеотид содержит нуклеотидный аналог.

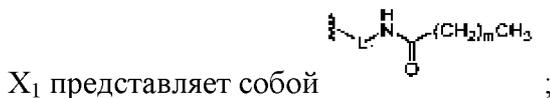
65. Соединение по пункту 1, где олигонуклеотид содержит остаток запертой нуклеиновой кислоты (LNA), остаток бициклической нуклеиновой кислоты (BNA), остаток затрудненного этила (сEt), остаток незапертой нуклеиновой кислоты (UNA), мономер фосфородиамидатморфолино олигомера (PMO), мономер пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), 2'-О-метил (2'-ОМе) остаток, 2'-О-метоксиэтильный остаток, 2'-дезоксид-2'-фторо остаток, 2'-О-метокси этил/фосфоротиоатный остаток, фосфорамидат, фосфородиамидат, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфонокарбовую кислоту, фосфонокарбонсилат, фосфоноуксусную кислоту, фосфономуравьиную кислоту, метил фосфонат, фосфонат бора, или О-метилфосфоамидит.

66. Соединение по пункту 1, где соединение представляет собой липид-конъюгированное соединение, имеющее структуру Формулы I:



или его фармацевтически приемлемую соль, где:

A представляет собой модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид, где модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид конъюгирован с липид-содержащим фрагментом на 3' конце одной цепи модифицированного двухцепочечного олигонуклеотида или на 3' конце модифицированной одноцепочечной нуклеиновой кислоты;



$L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_n$ ,  $-(CH_2)_nL_2(CH_2)_n$ , или связь;

$L_2$  представляет собой  $-C(=O)NH-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-OC(=O)O-$ ,  $-NHC(=O)O-$ ,  $-NHC(=O)NH-$ ,  $-C(=S)NH-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-NH-$ , O (кислород), или S (сера), где каждый m независимо представляет собой целое число от 10 до 18, и где каждый n независимо представляет собой целое число от 1 до 6.

67. Соединение по пункту 66, где каждый m представляет собой 10,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ , и n представляет собой 3.

68. Соединение по пункту 66, где каждый m представляет собой 11,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ , и n представляет собой 3.

69. Соединение по пункту 66, где каждый m представляет собой 12,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ , и n представляет собой 3.

70. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  представляет собой 13,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ -, и  $n$  представляет собой 3.
71. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  представляет собой 14,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ -, и  $n$  представляет собой 3.
72. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  представляет собой 15,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ -, и  $n$  представляет собой 3.
73. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  представляет собой 16,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ -, и  $n$  представляет собой 3.
74. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  представляет собой 17,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ -, и  $n$  представляет собой 3.
75. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  представляет собой 18,  $L_1$  представляет собой  $(CH_2)_n$ -, и  $n$  представляет собой 3.
76. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  независимо представляет собой целое число 12-16; и где каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 1 до 6 .
77. Соединение по пункту 66, где каждый  $m$  независимо представляет собой целое число 12-14; и где каждый  $n$  независимо представляет собой целое число от 1 до 6 .
78. Соединение по пункту 66, где  $L_1$  представляет собой связь; и каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 12 до 16.
79. Соединение по пункту 66, где  $L_1$  представляет собой  $-(CH_2)_3C(=O)NH(CH_2)_5-$  и каждый  $m$  независимо представляет собой целое число от 12 до 16.
80. Соединение по пункту 78, где каждый  $m$  представляет собой 14.
81. Соединение по пункту 66, где модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь.
82. Соединение по пункту 66, где модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-О-метильный остаток.
83. Соединение по пункту 66, где модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-дезокси-2'-фторо остаток.
84. Соединение по пункту 66, где модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит остаток бициклических нуклеиновых кислот (BNA).
85. Соединение по пункту 84, где олигонуклеотидный остаток бициклических нуклеиновых кислот представляет собой остаток запертой нуклеиновой кислоты (LNA) или остаток затрудненного этила (сEt).
86. Соединение по пункту 66, где модифицированный двухцепочечный олигонуклеотид или модифицированный одноцепочечный олигонуклеотид содержит мономер фосфородиамидатморфолино олигомера (PMO).
87. Соединение по пункту 66, где модифицированный двухцепочечный

олигонуклеотид представляет собой миРНК или мимик микроРНК.

88. Соединение по пункту 87, где липидный фрагмент присоединен к 3' концу сопровождающей цепи миРНК или мимика микроРНК.

89. Соединение по пункту 66, где А представляет собой антисмысловый олигонуклеотид.

90. Клетка, содержащая соединение по пункту 1.

91. Клетка по пункту 90, где клетка представляет собой первичную клетку.

92. Клетка по пункту 91, где клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены (HUVEC), липоцит, макрофагальную клетку, нейронную клетку, мышечную клетку, или дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку.

93. Клетка по пункту 92, где клетка представляет собой человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены.

94. Клетка по пункту 90, где клетка представляет собой иммортализованную клетку.

95. Клетка по пункту 94, где клетка представляет собой клетку NIH3T3, дифференцированную клетку 3T3L1, клетку RAW264.7 или клетку SH-SY5Y.

96. Клетка по пункту 90, где клетка представляет собой жировую клетку или клетку печени.

97. Способ введения олигонуклеотида в клетку, включающий контактирование указанной клетки с соединением по пункту 1.

98. Способ введения олигонуклеотида в клетку *in vitro*, включающий контактирование клетки с соединением по пункту 1 в условиях несвязанного поглощения.

99. Способ по пункту 98, отличающийся тем, что способ проводят *ex vivo* и клетка представляет собой первичную клетку.

100. Способ по пункту 99, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены (HUVEC), липоцит, макрофагальную клетку, нейронную клетку, крысиный нейрон, мышечную клетку или дифференцированную первичную человеческую скелетную мышечную клетку.

101. Способ по пункту 99, отличающийся тем, что клетка представляет собой человеческую эндотелиальную клетку пупочной вены.

102. Способ по пункту 98, отличающийся тем, что клетка представляет собой иммортализованную клетку.

103. Способ по пункту 102, отличающийся тем, что клетка представляет собой клетку NIH3T3, дифференцированную клетку 3T3L1, клетку RAW264.7 или клетку SH-SY5Y.

104. Способ по пункту 98, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку или жировую клетку печени.

105. Способ введения олигонуклеотида в клетку *ex vivo*, включающий: получение

клеток; и контактирование клеток с соединением по пункту 1 в условиях несвязанного поглощения.

106. Способ по пункту 105, отличающийся тем, что клетки представляют собой нейроны, ТВМ клетки, скелетные мышечные клетки, жировые клетки или клетки печени.

107. Способ по пункту 105, отличающийся тем, что клетки представляют собой человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены.

108. Способ введения олигонуклеотида в клетку *in vivo*, включающий контактирование клетки с соединением по пункту 1.

109. Способ по пункту 108, отличающийся тем, что клетка представляет собой жировую клетку, клетку печени, фибробластную клетку, эндотелиальную клетку, клетку почки, липоцит, макрофагальную клетку, нейронную клетку, мышечную клетку, или скелетную мышечную клетку.

110. Способ, включающий контактирование клетки с соединением по пункту 1.

111. Способ по пункту 110, отличающийся тем, что приведение в контакт происходит *in vitro*.

112. Способ по пункту 110, отличающийся тем, что приведение в контакт происходит *ex vivo*.

113. Способ по пункту 110, отличающийся тем, что приведение в контакт происходит *in vivo*.

114. Способ, включающий введение субъекту соединения по пункту 1.

115. Способ по пункту 114, отличающийся тем, что у субъекта имеется заболевание или расстройство глаза, печени, почки, сердца, жировой ткани, легкого, мышцы или селезенки.

116. Соединение по пункту 1 для применения в терапии.

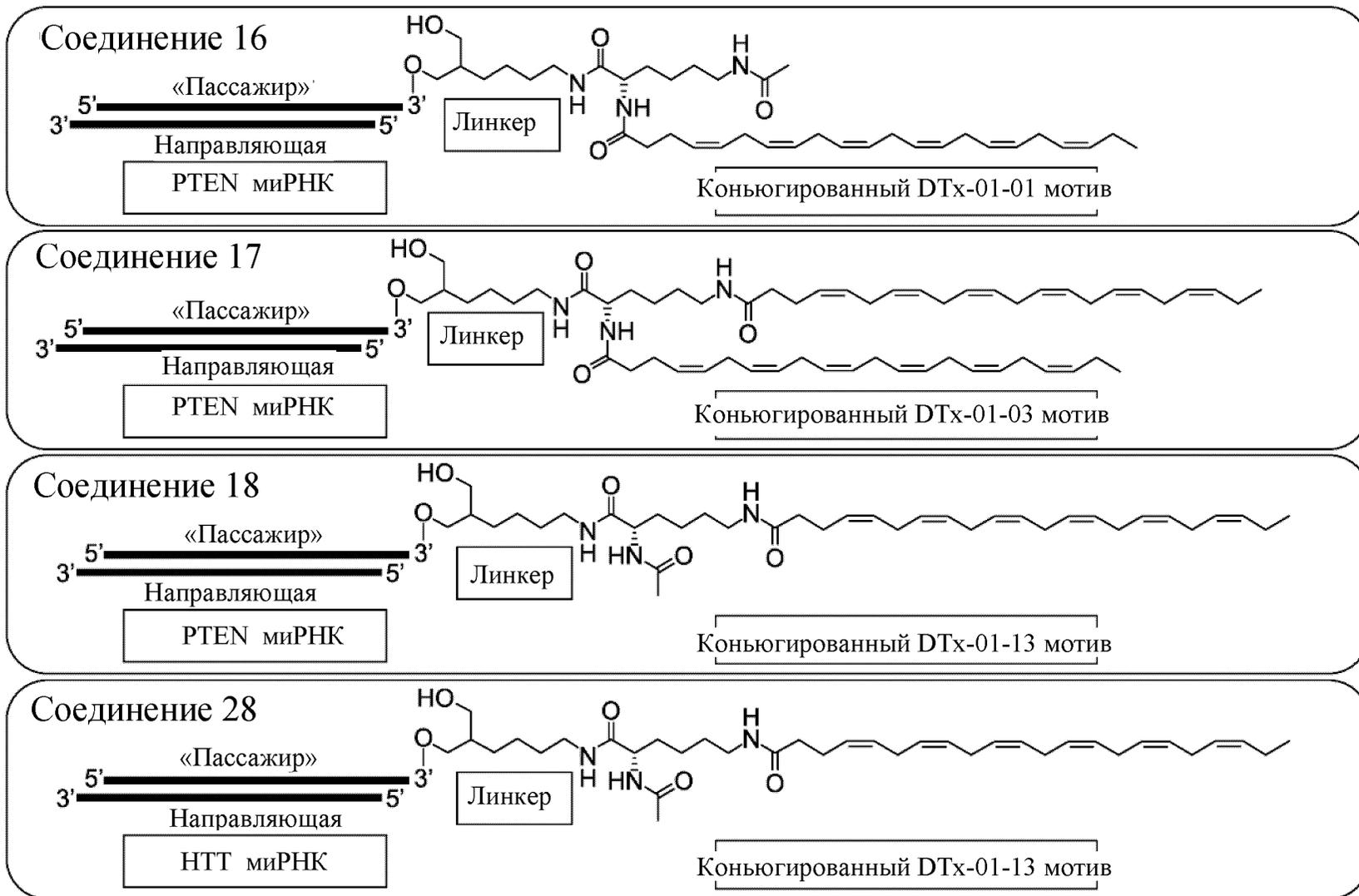
117. Соединение по пункту 1 для применения для получения лекарственного средства.

118. Способ введения олигонуклеотида в клетку в организме субъекта, включающий введение указанному субъекту соединения по пункту 1.

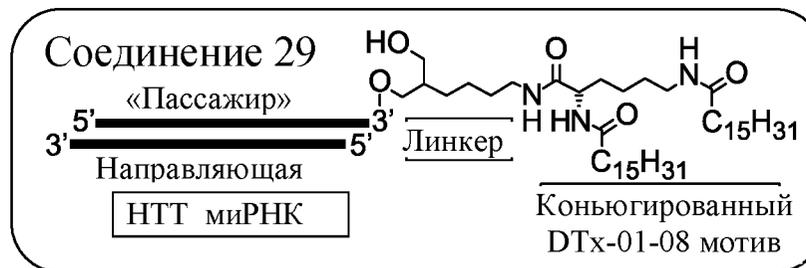
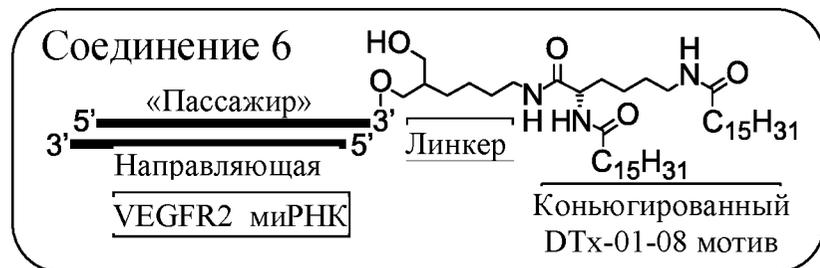
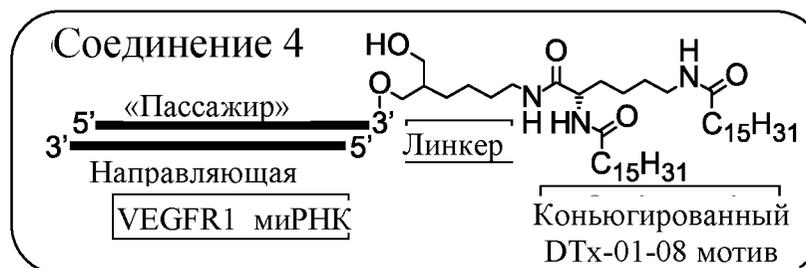
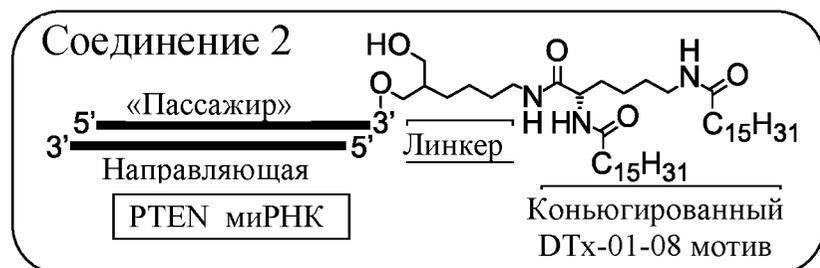
119. Клетка, содержащая соединение по пункту 1.

120. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и соединение по пункту 1.

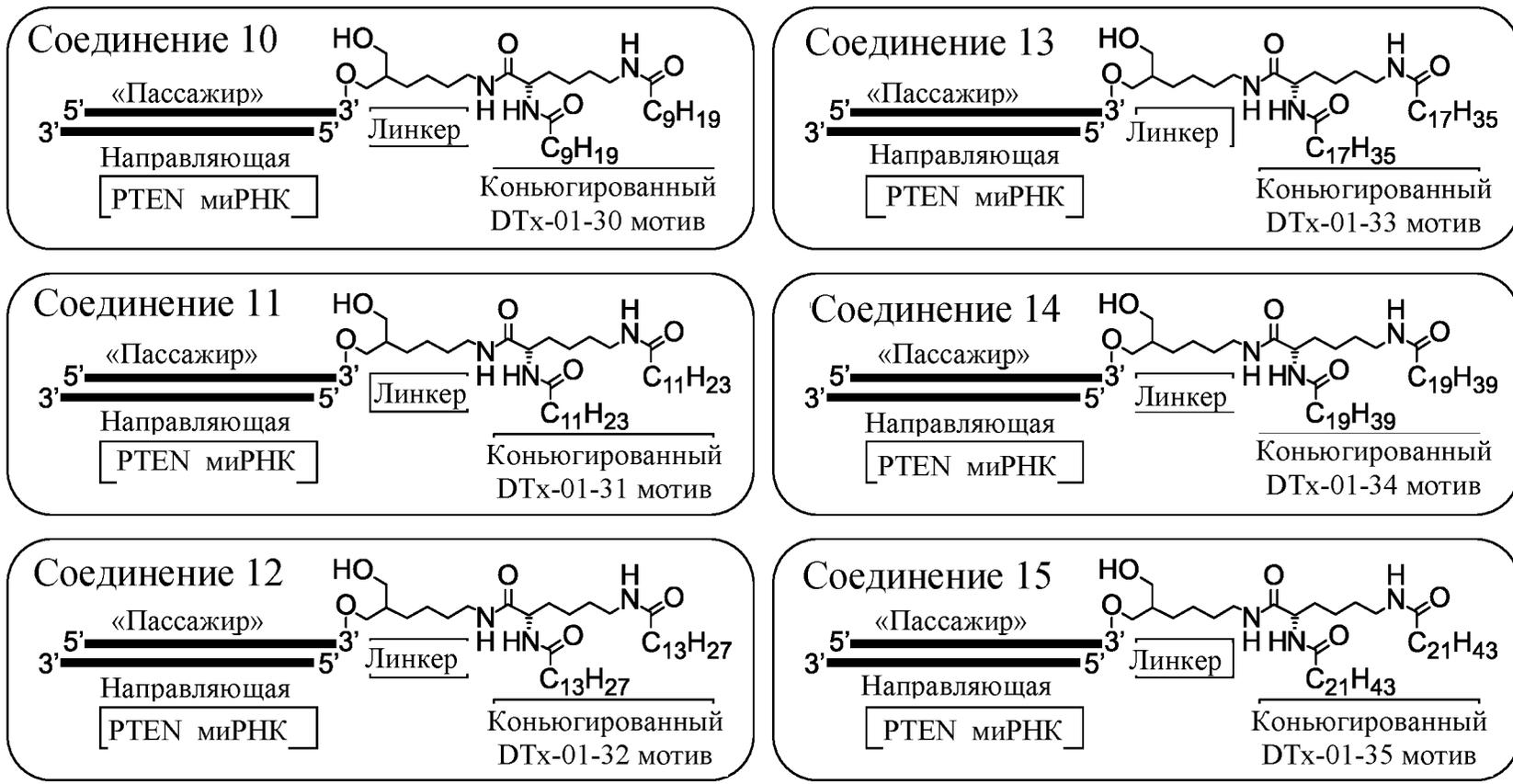
По доверенности



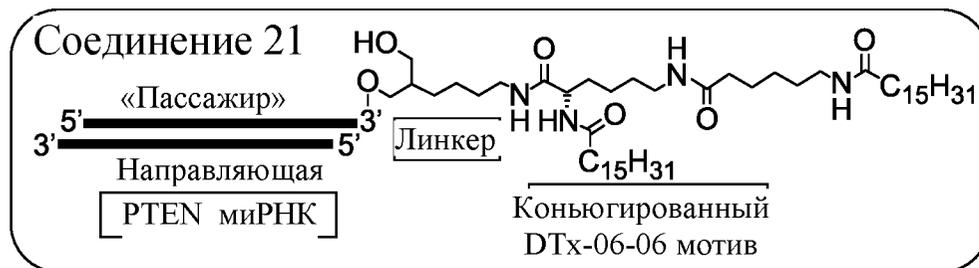
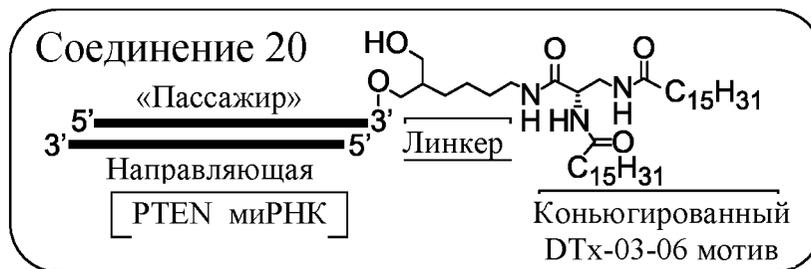
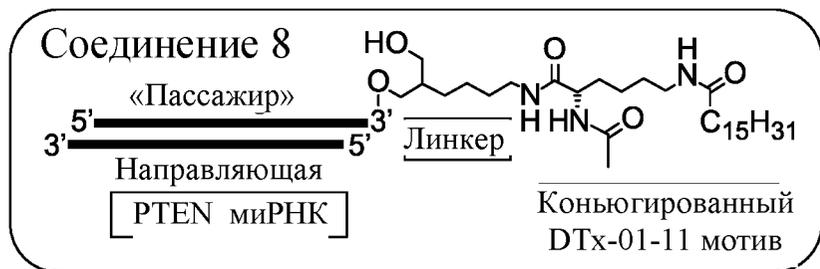
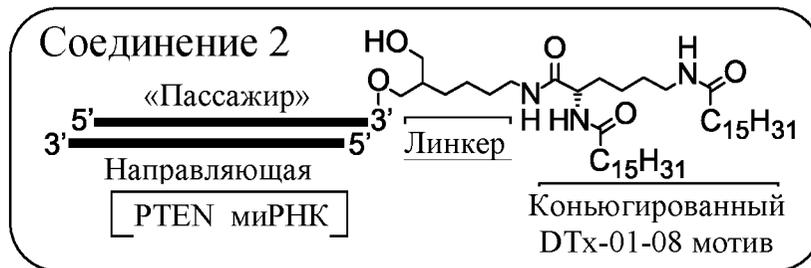
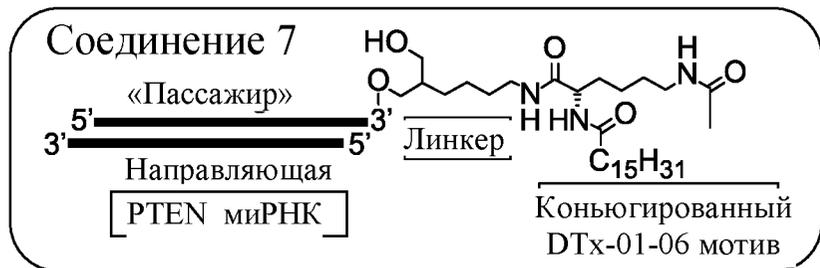
**ФИГ. 1**



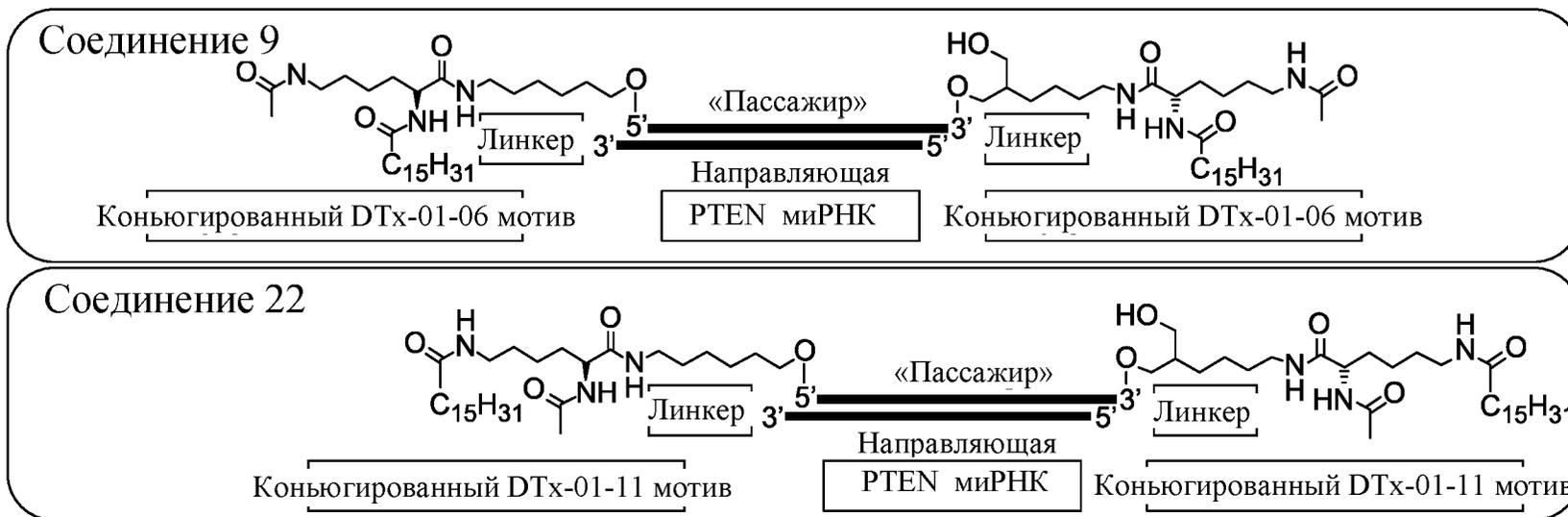
ФИГ. 2



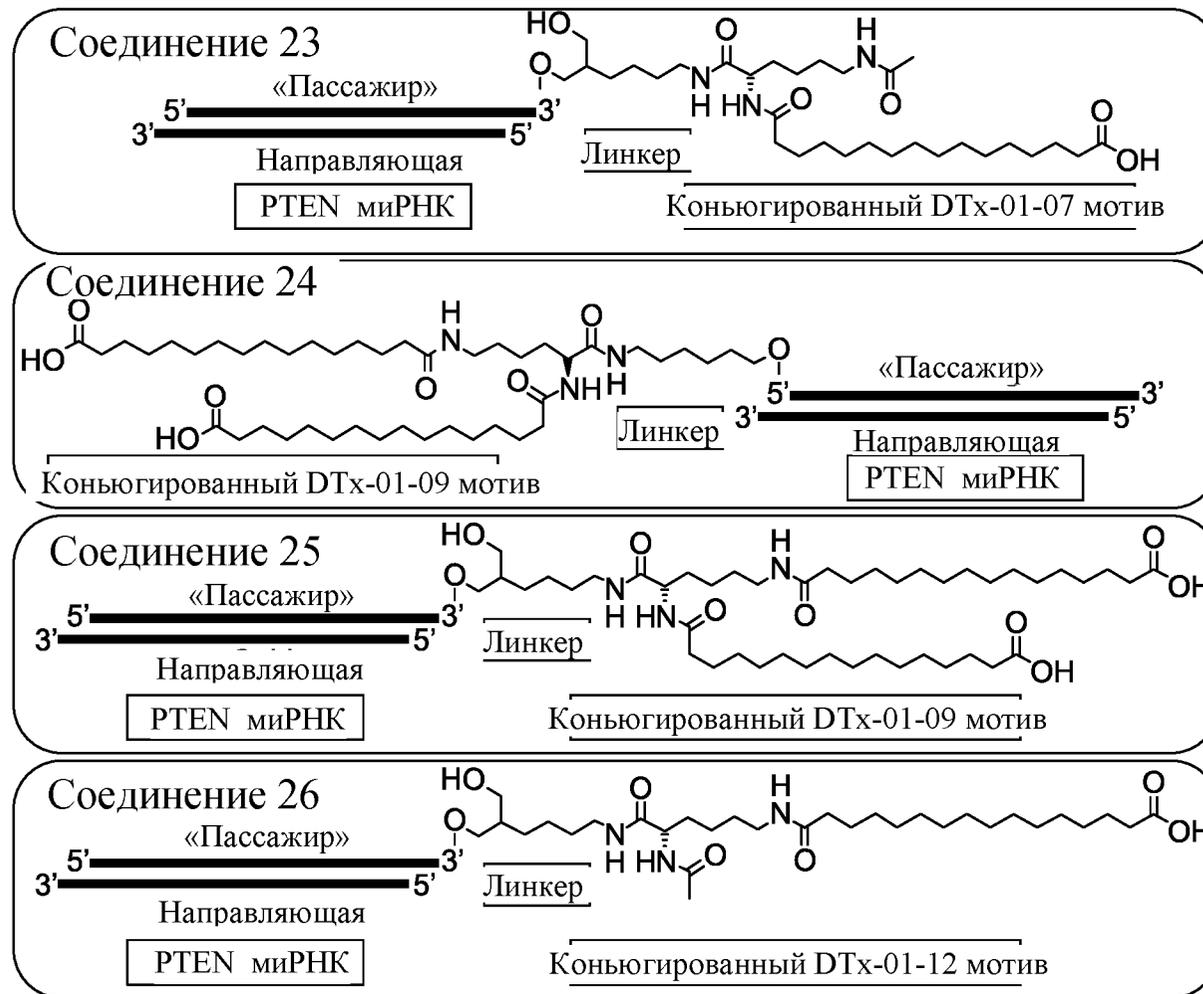
ФИГ. 3



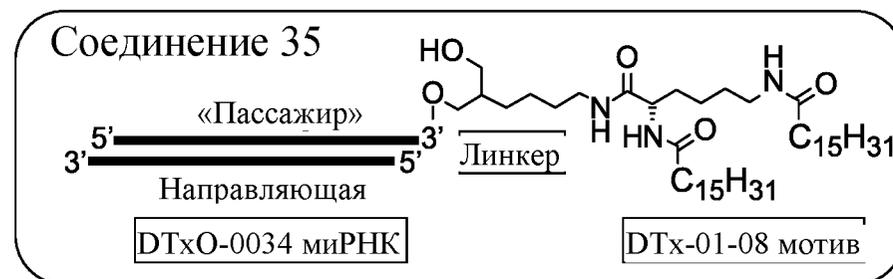
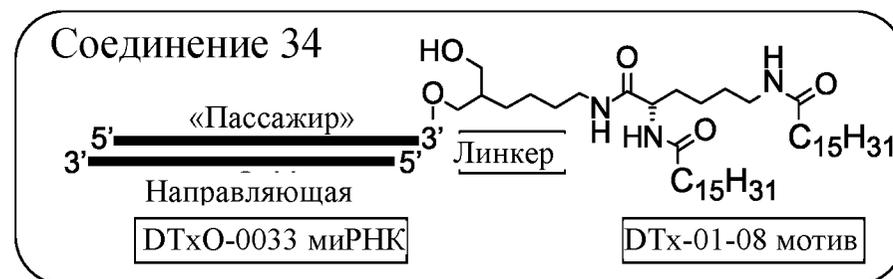
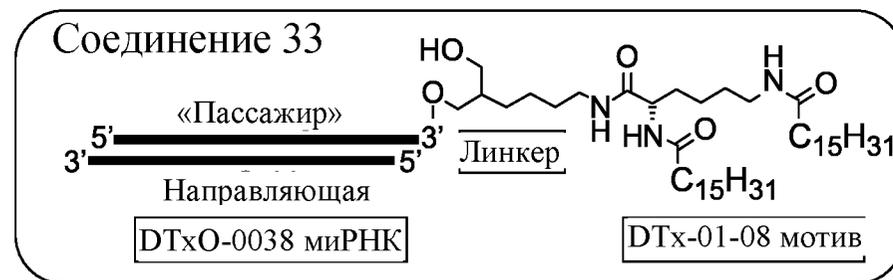
ФИГ. 4



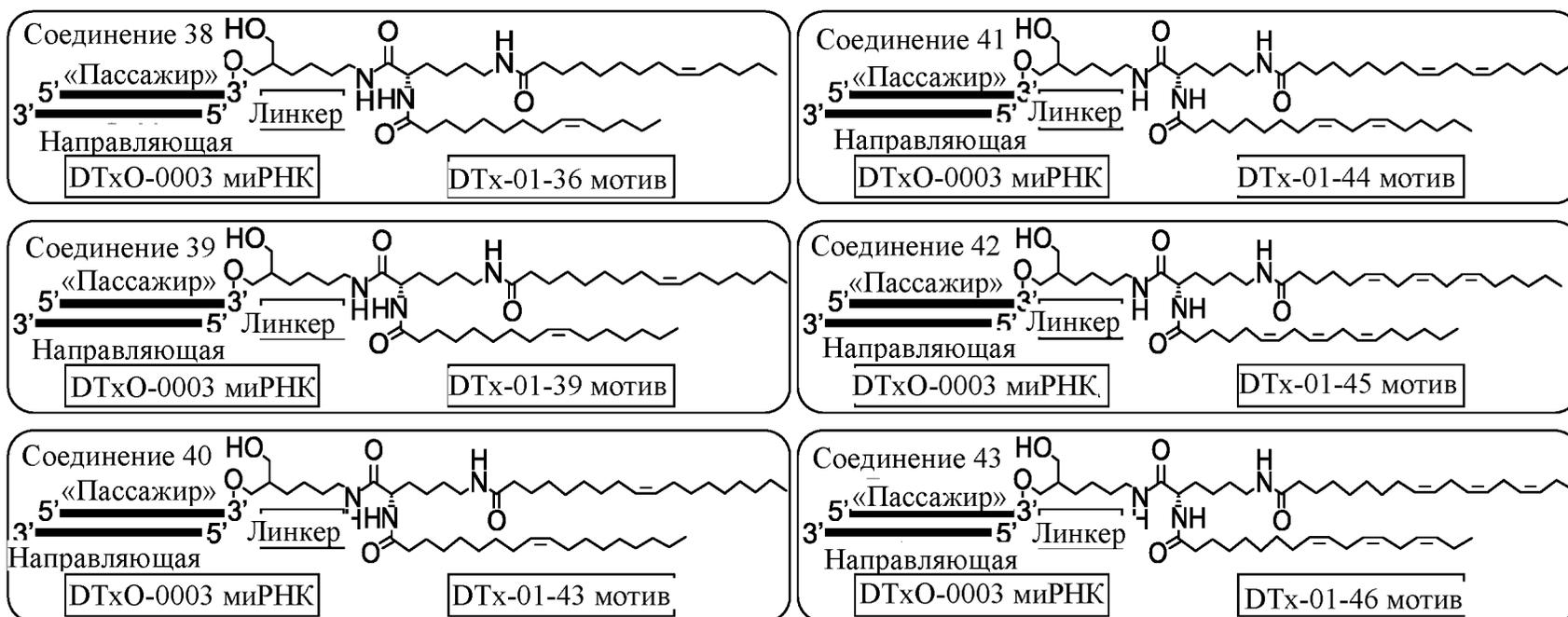
ФИГ. 5



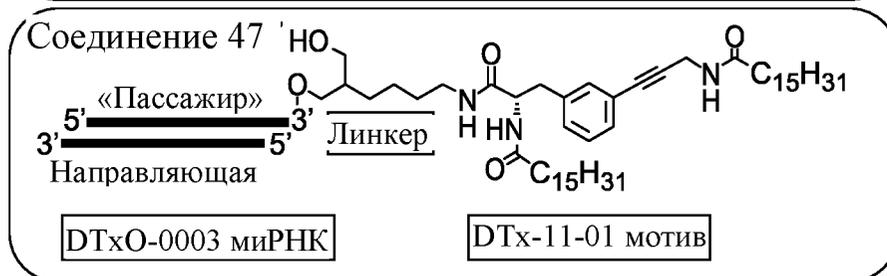
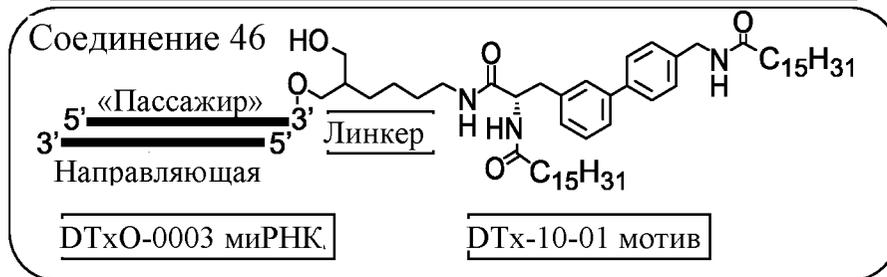
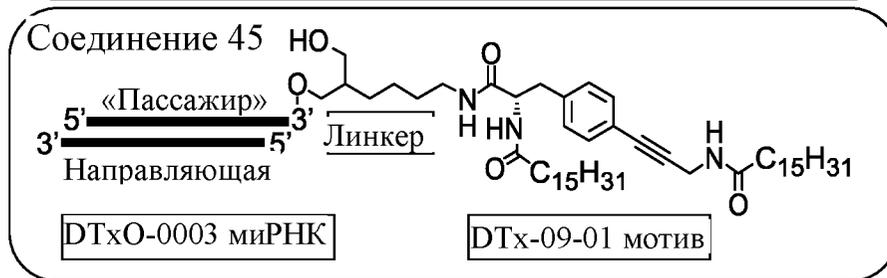
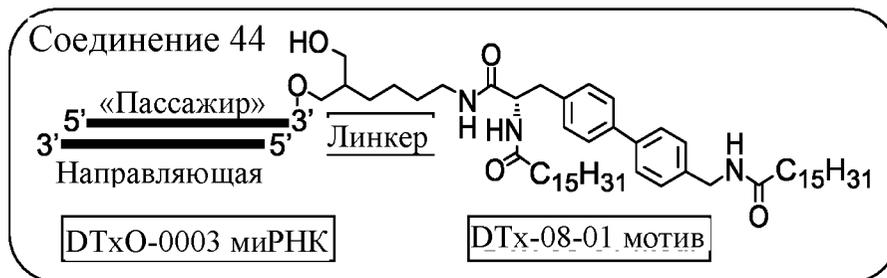
**ФИГ. 6**



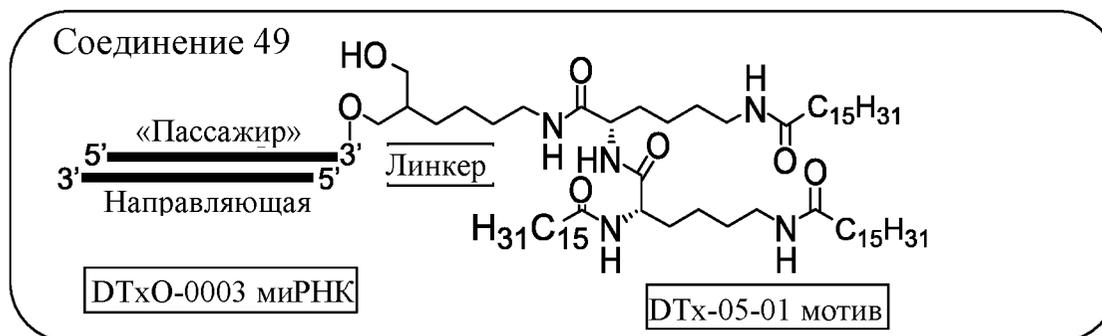
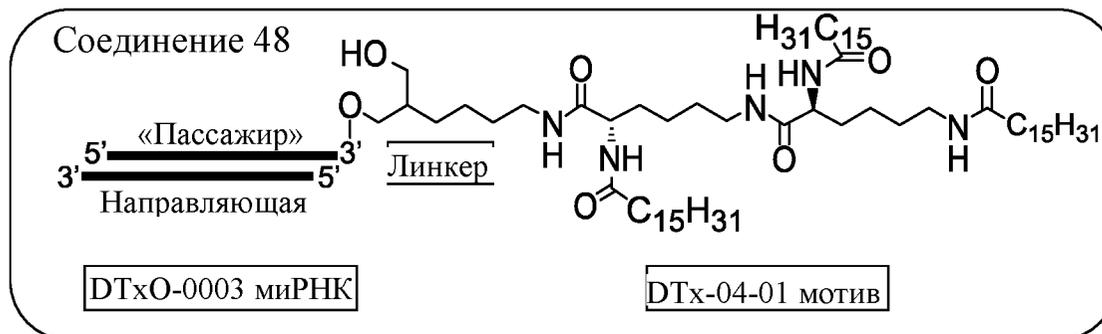
ФИГ. 7



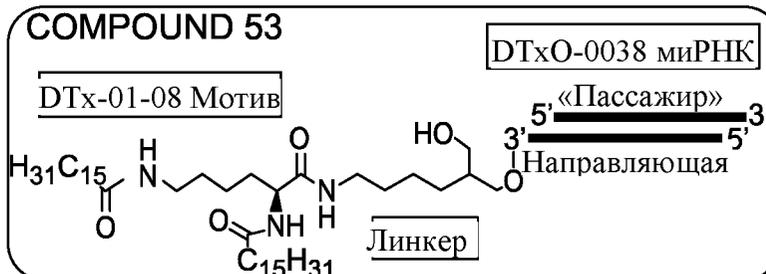
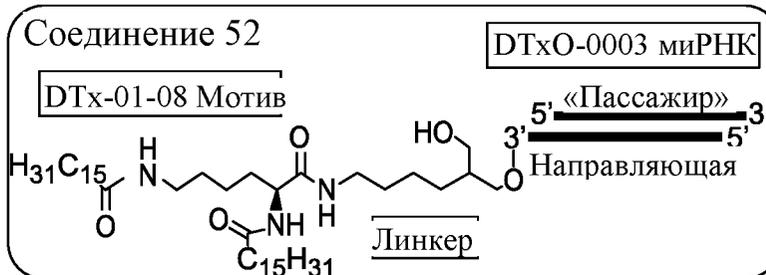
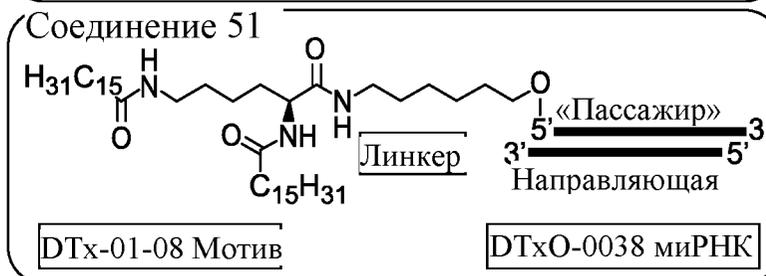
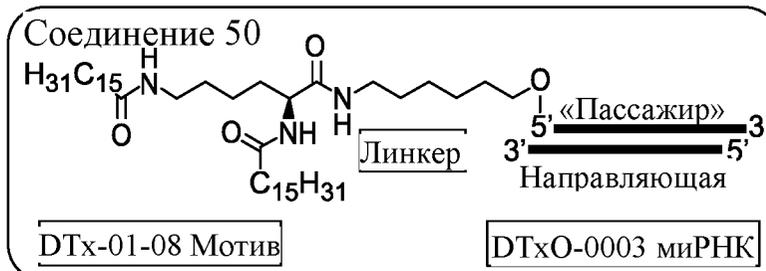
ФИГ. 8



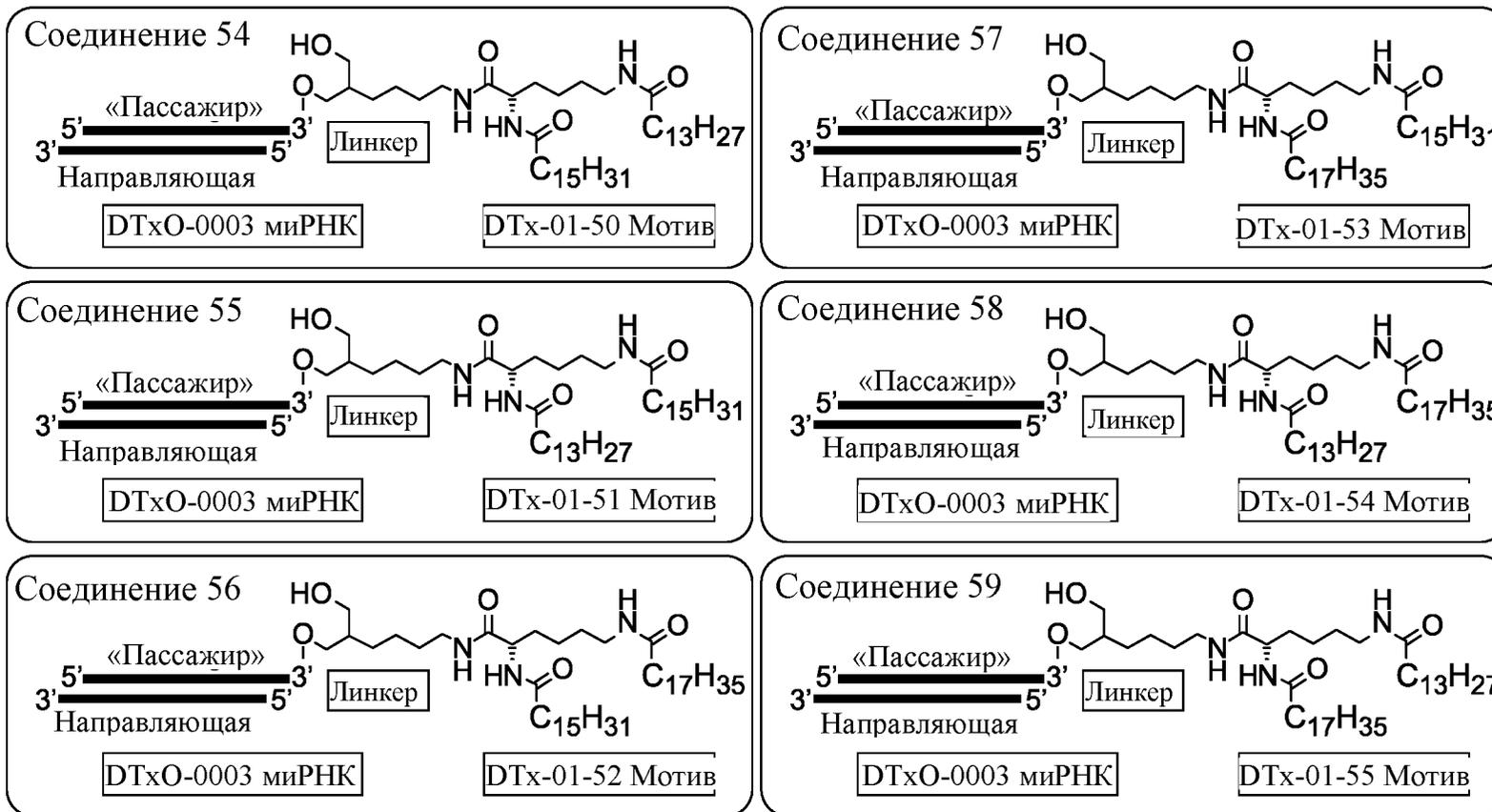
ФИГ. 9



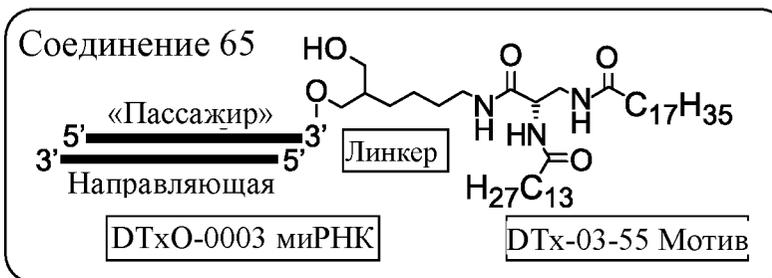
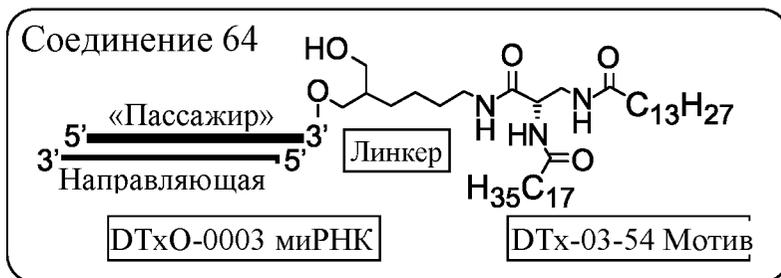
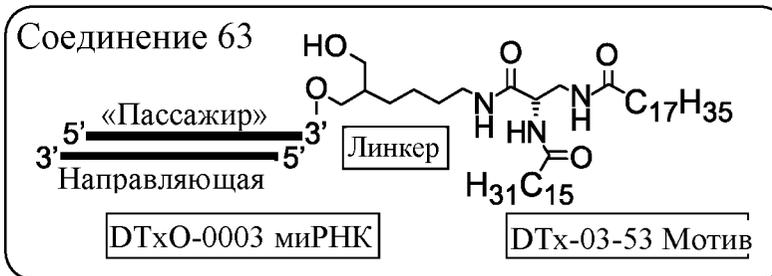
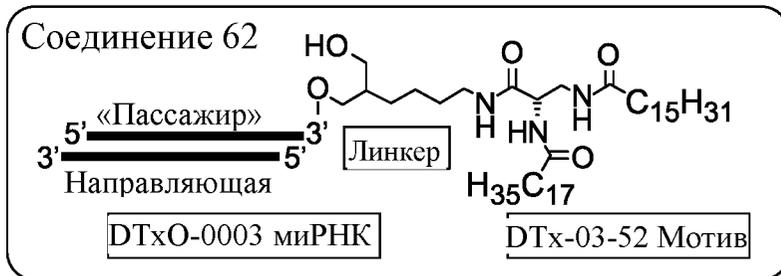
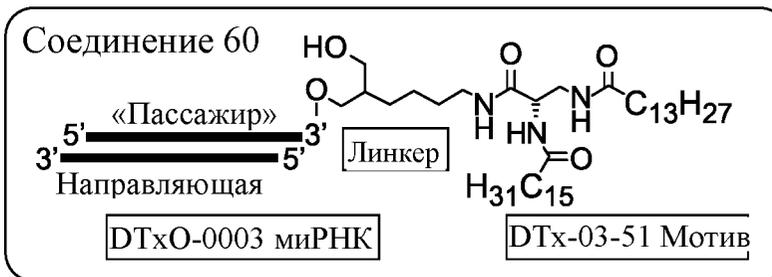
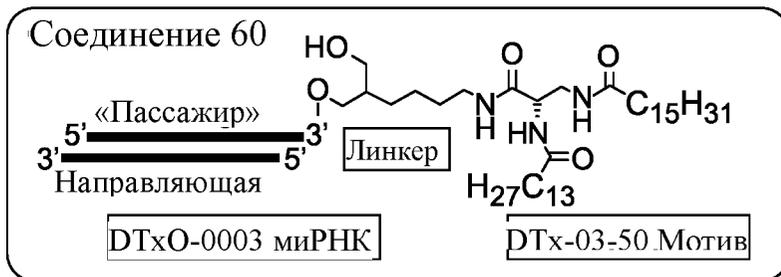
ФИГ. 10



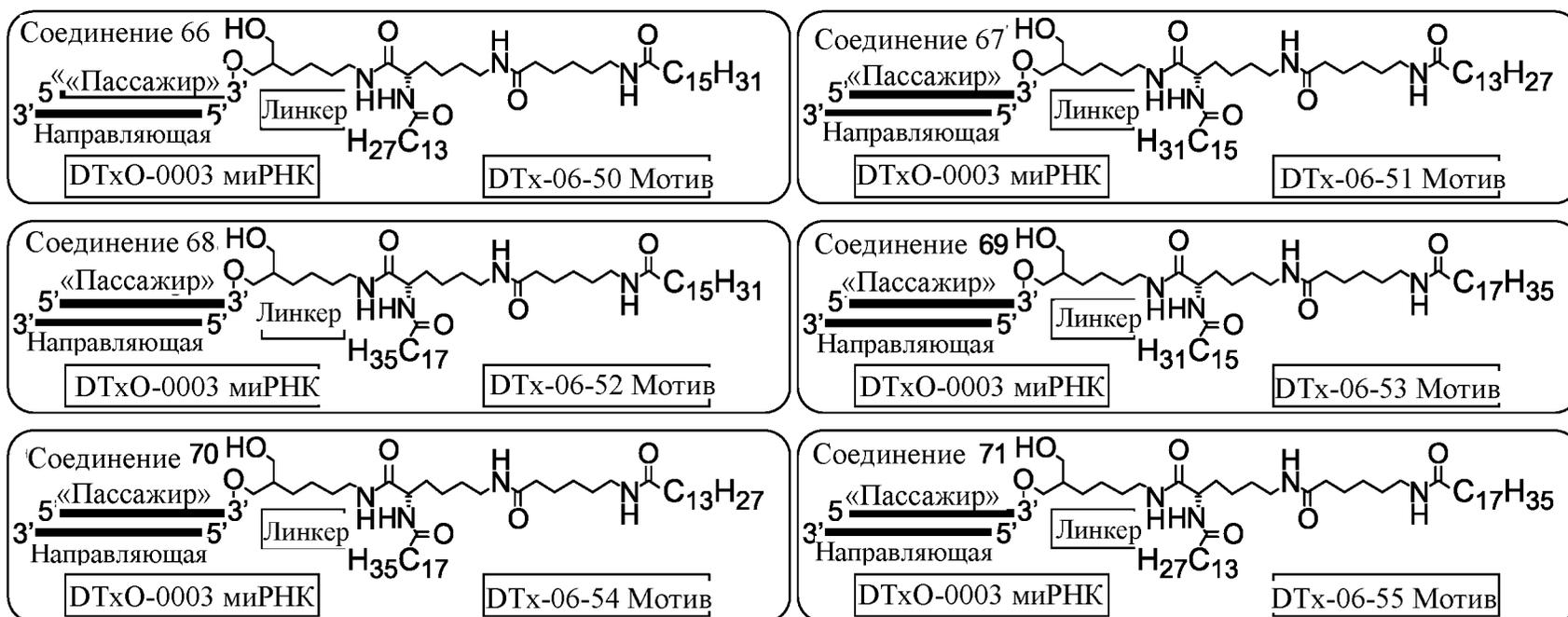
ФИГ. 11



ФИГ. 12А

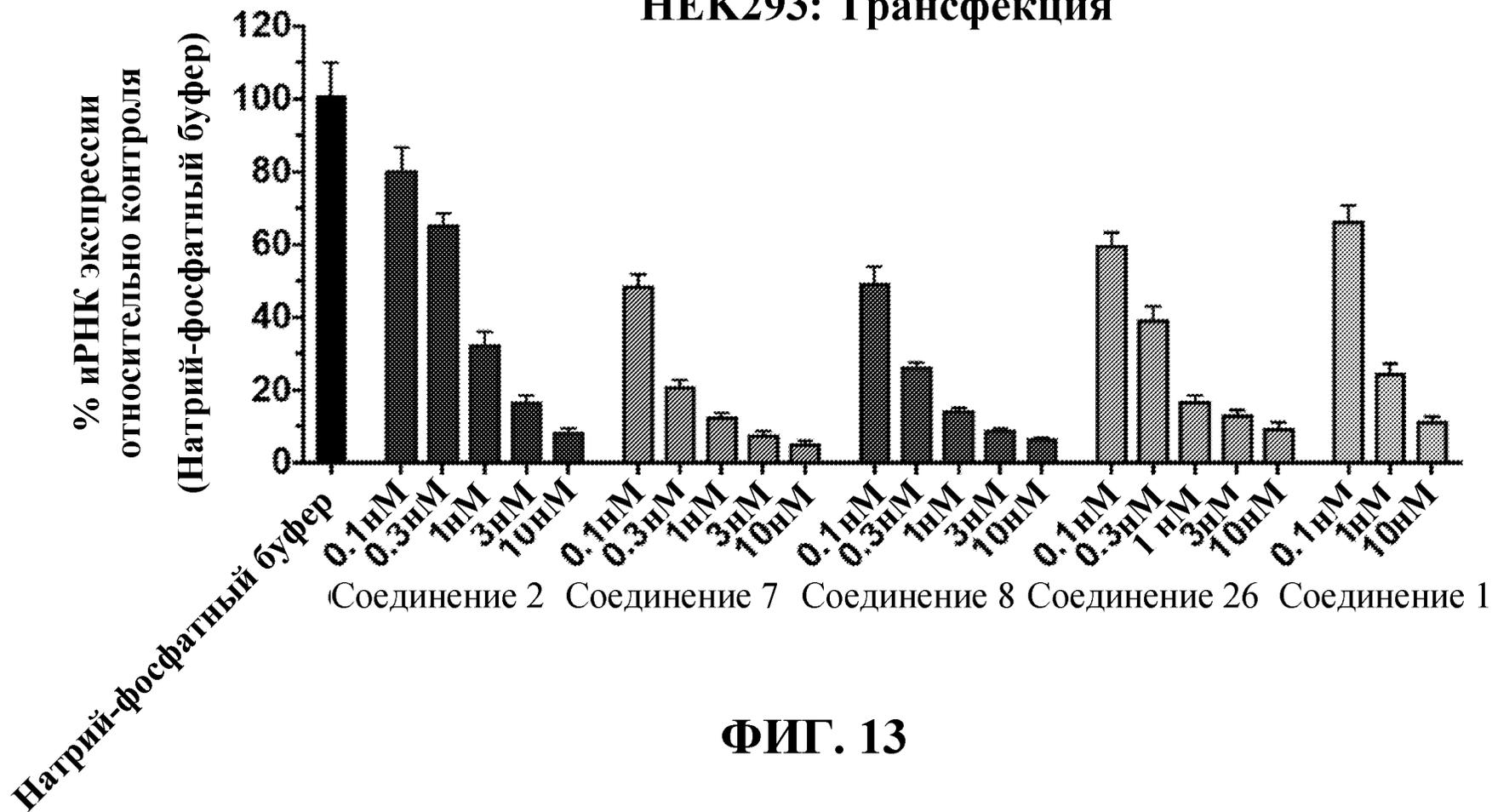


ФИГ. 12В

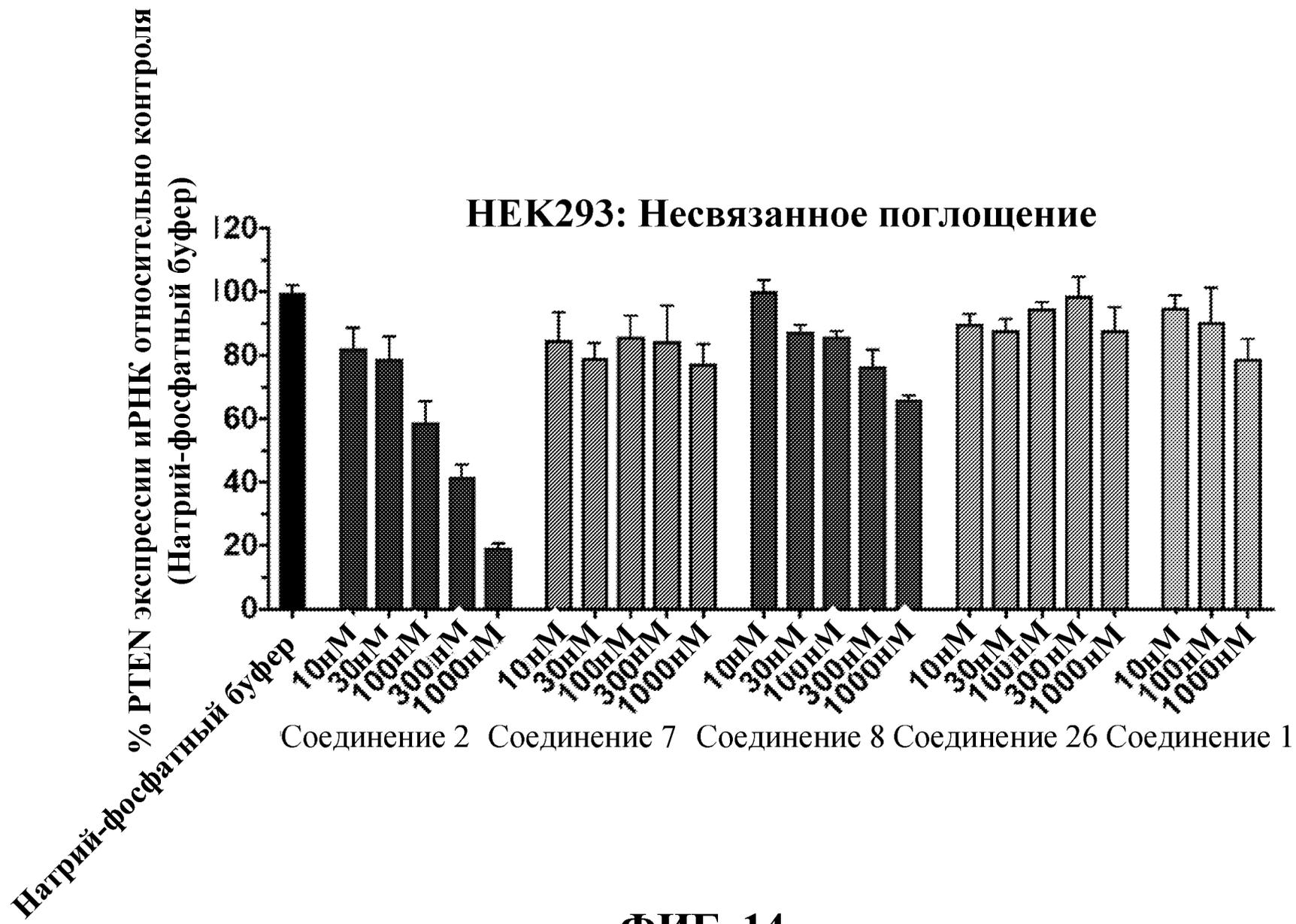


ФИГ. 12С

# HEK293: Трансфекция

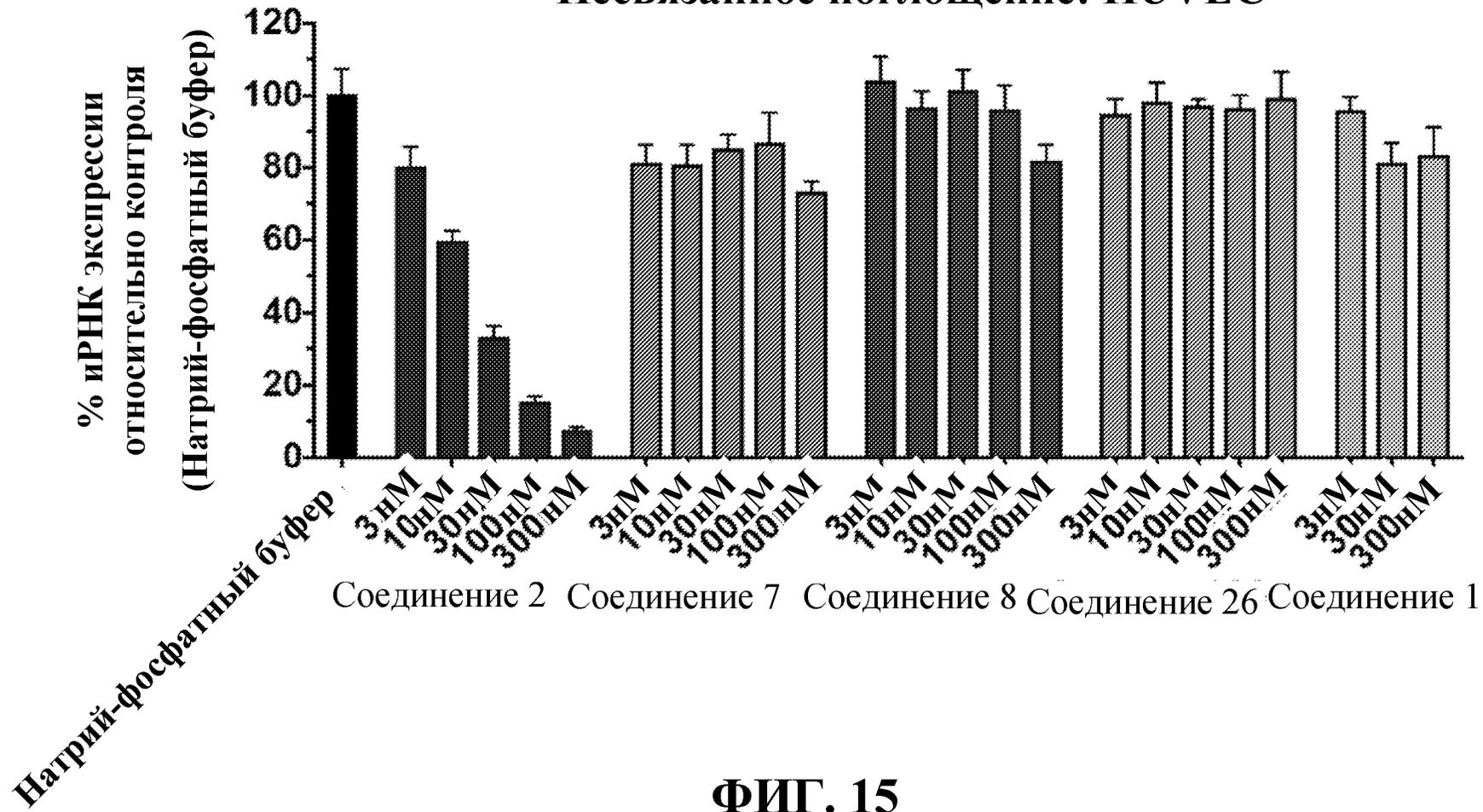


ФИГ. 13

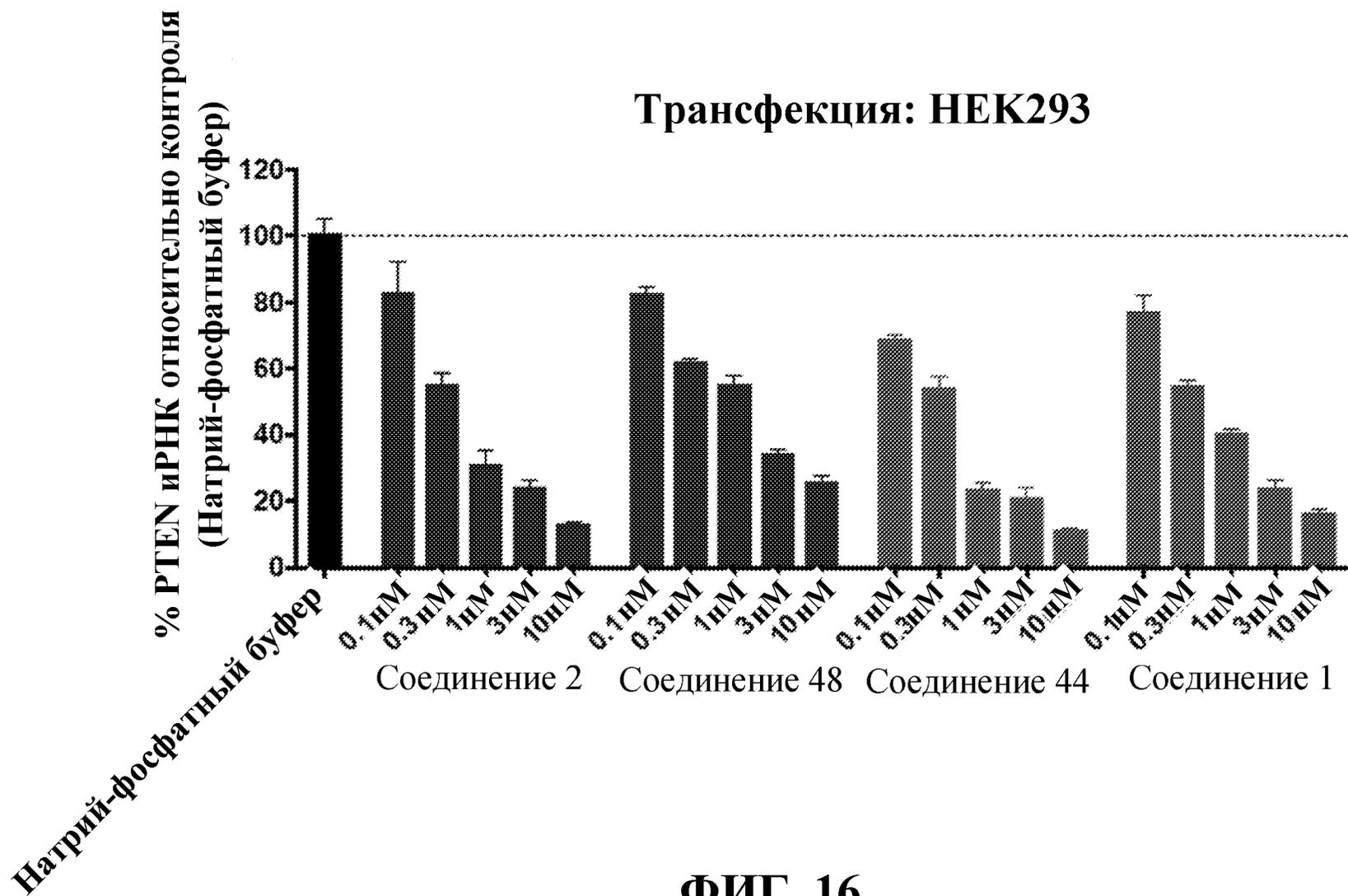


**ФИГ. 14**

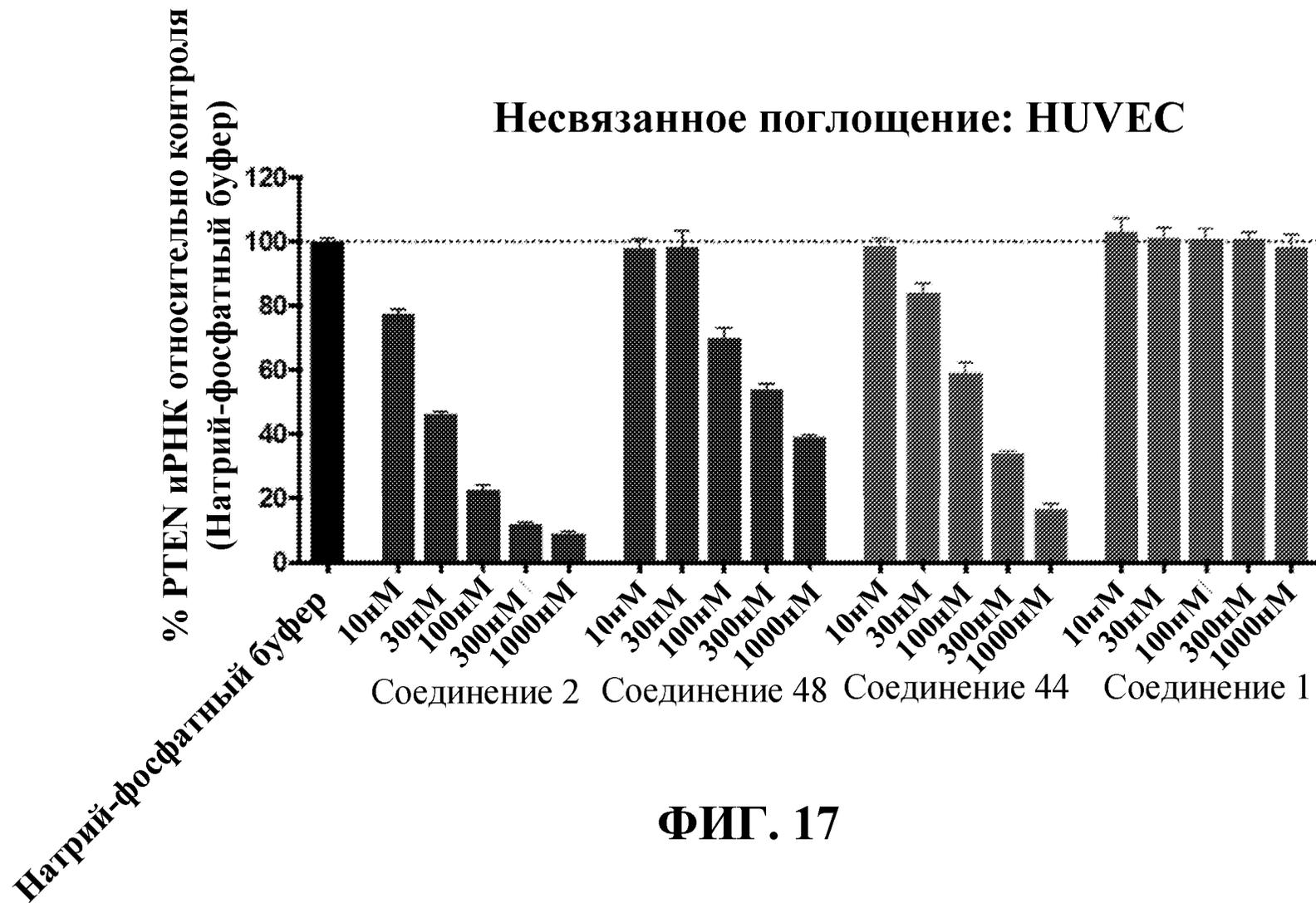
### Несвязанное поглощение: HUVES



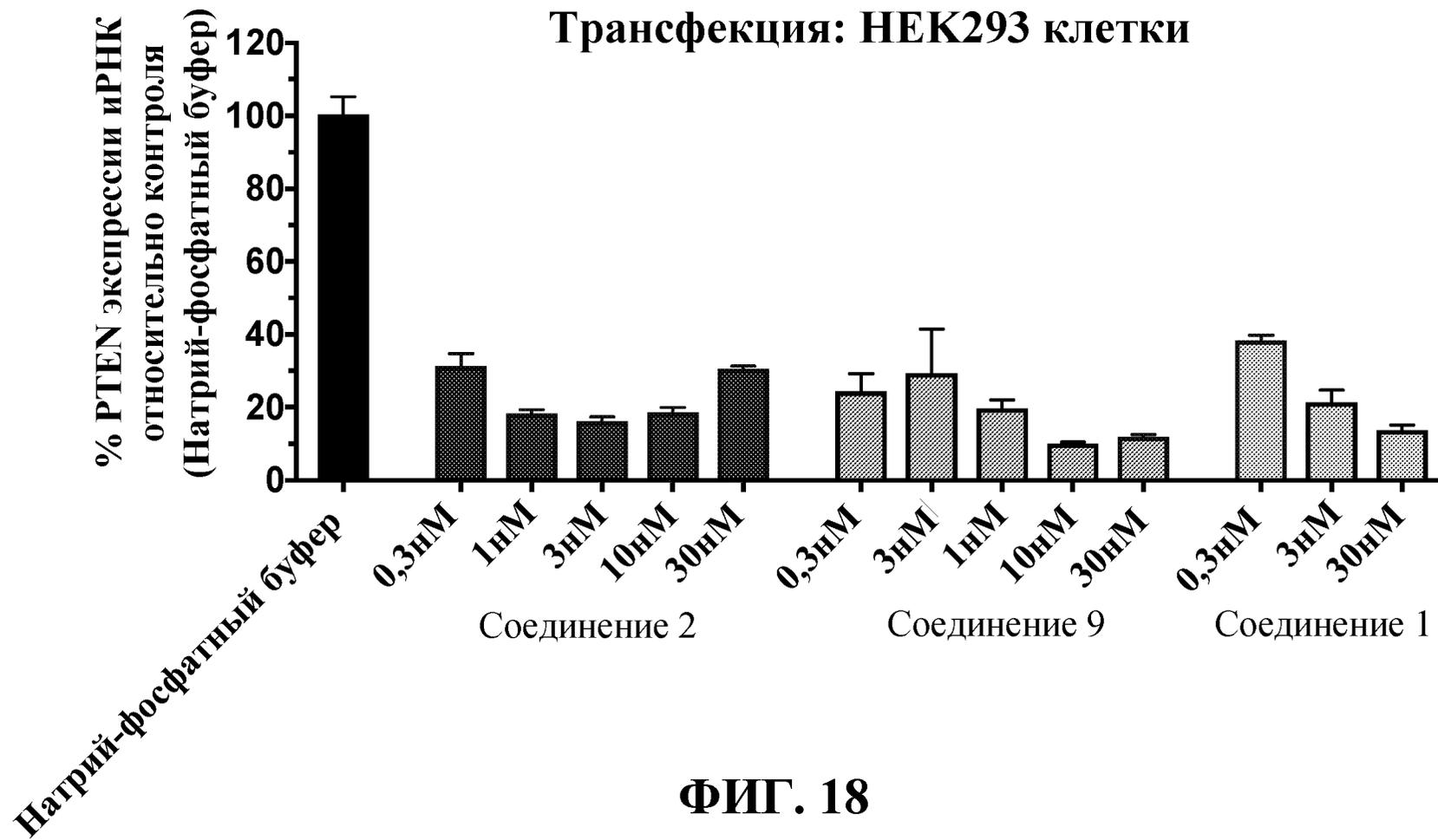
### Трансфекция: HEK293

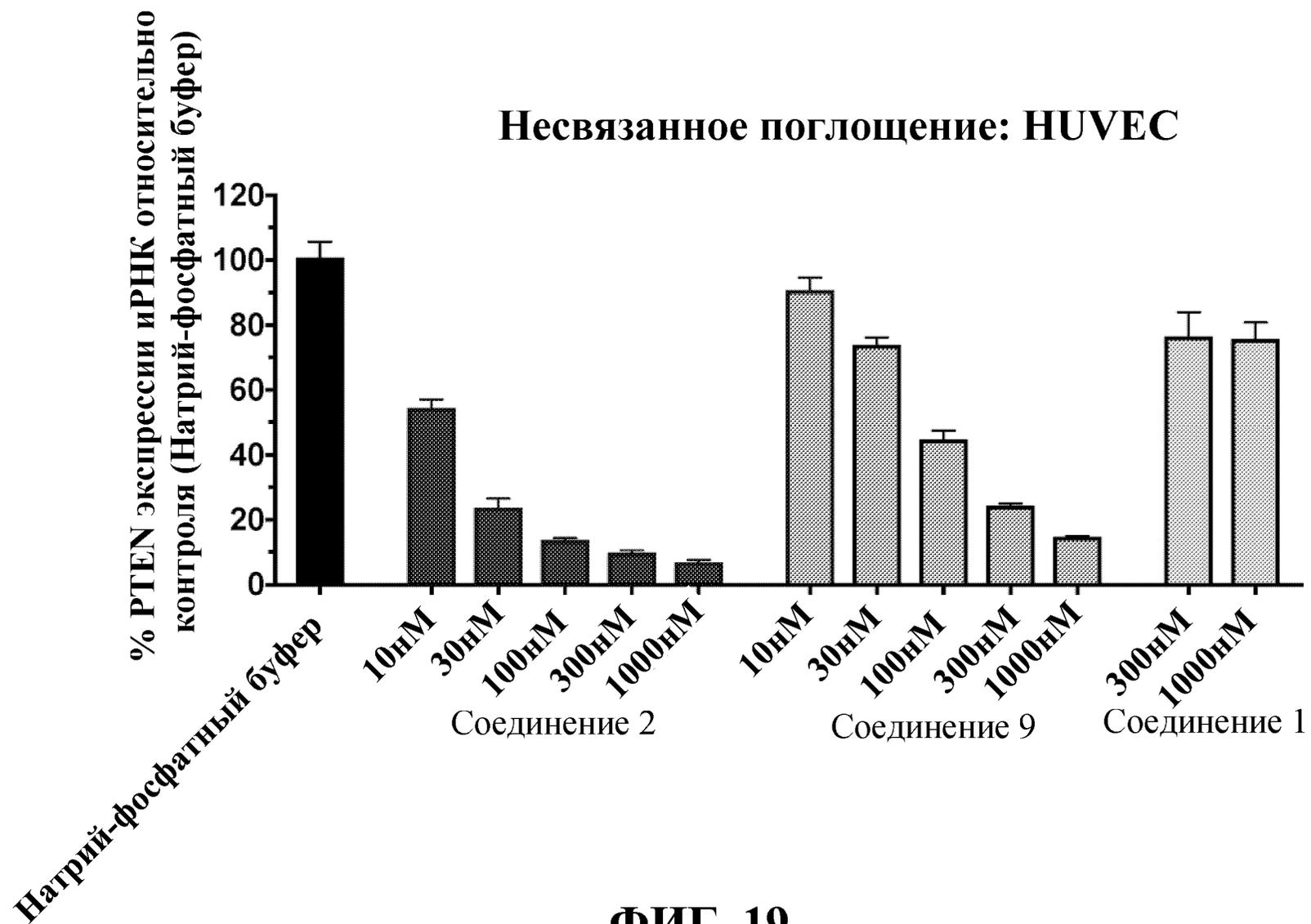


ФИГ. 16



**ФИГ. 17**

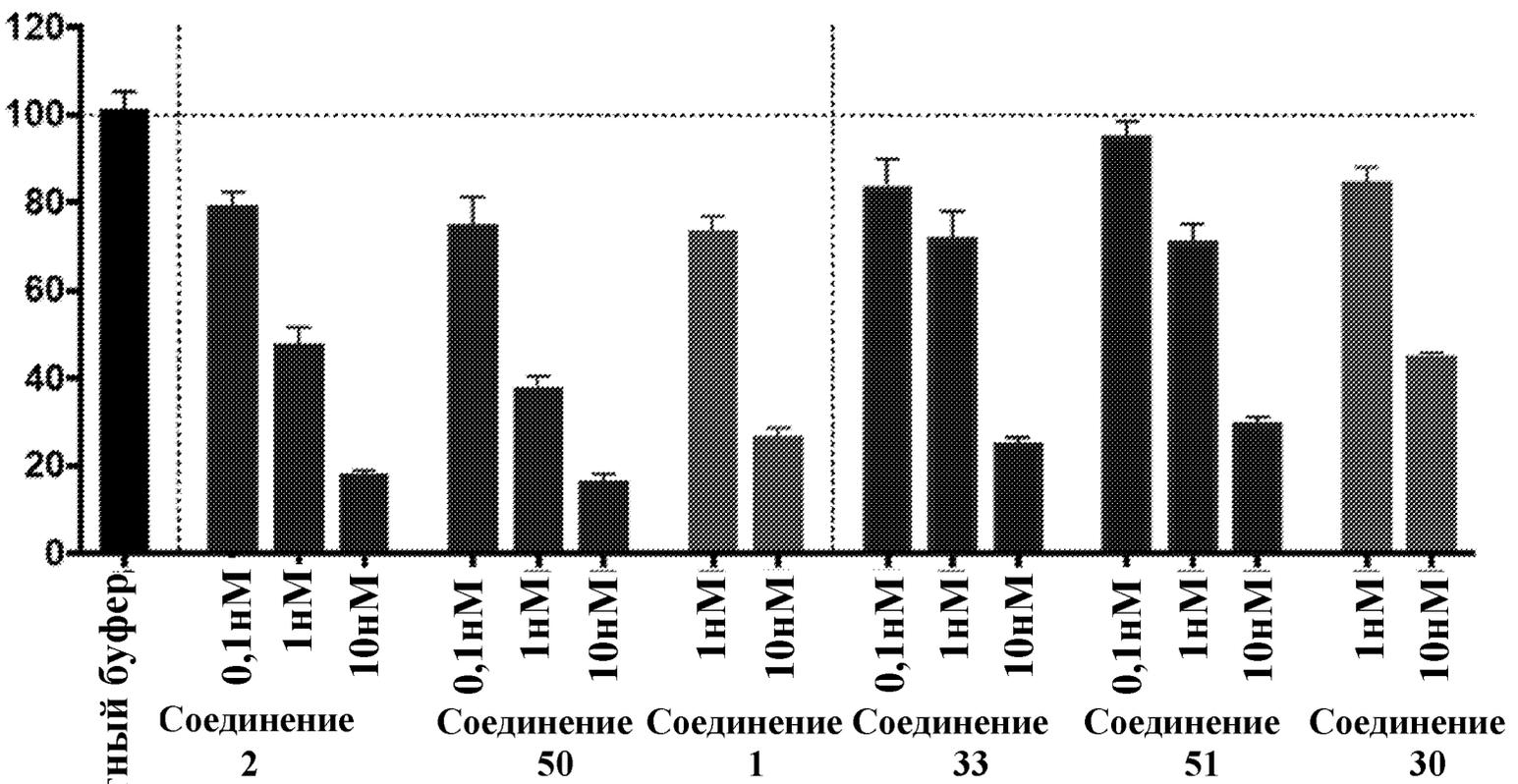




ФИГ. 19

% RTEN экспрессии иРНК относительно  
контроля (Натрий-фосфатный буфер)

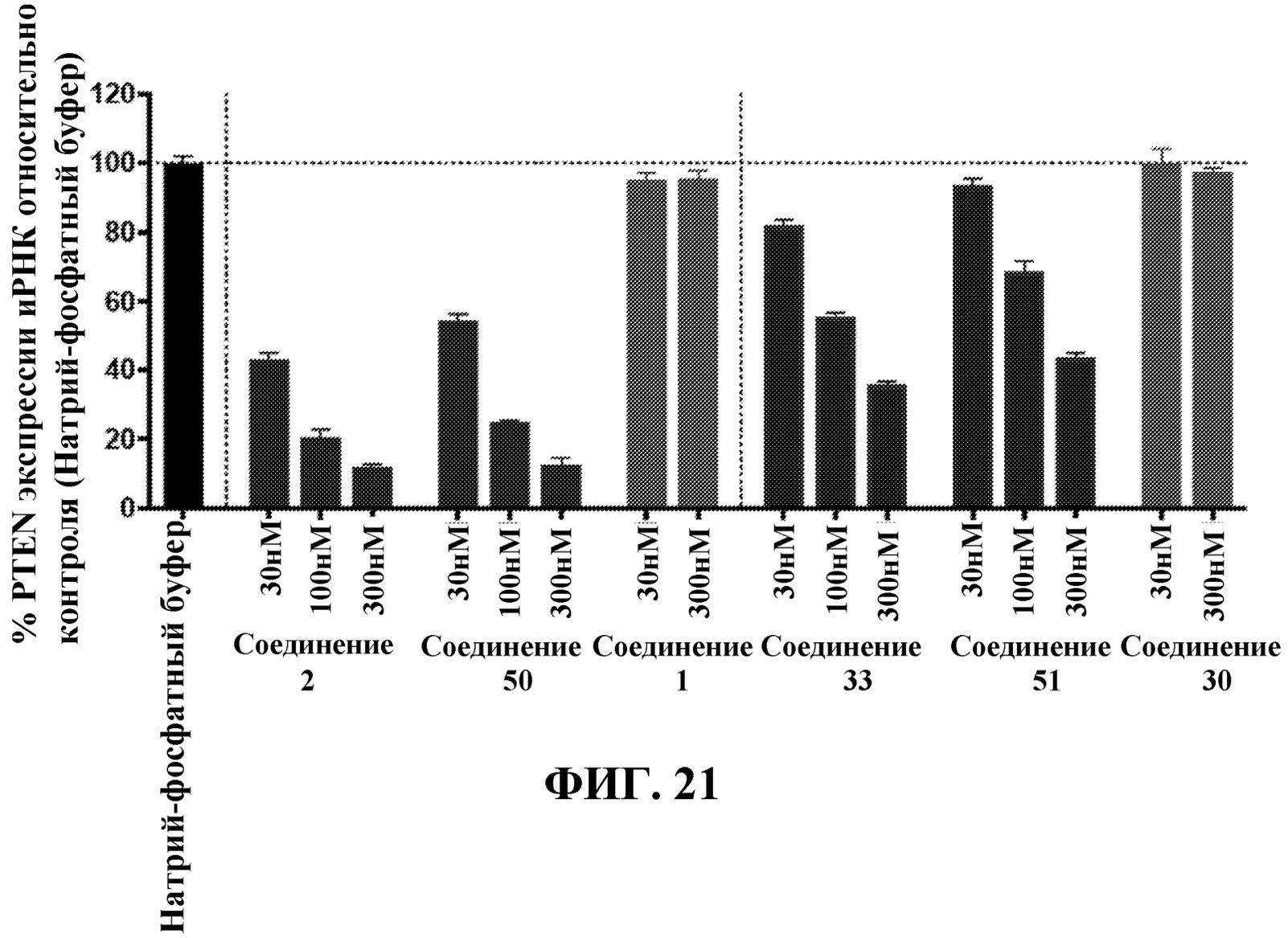
### Трансфекция: НЕК293



Натрий-фосфатный буфер

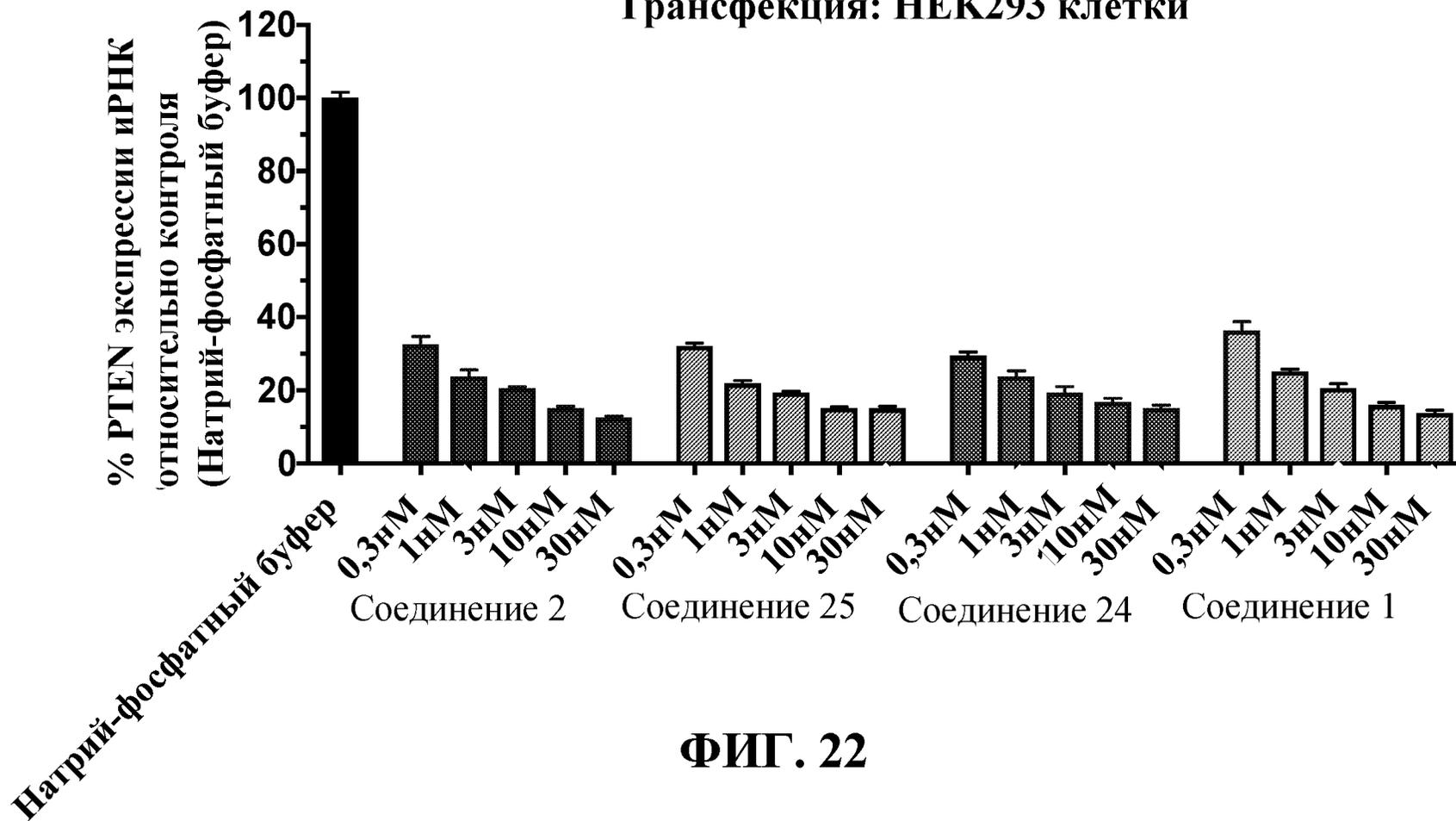
ФИГ. 20

# Несвязанное поглощение: HUVES

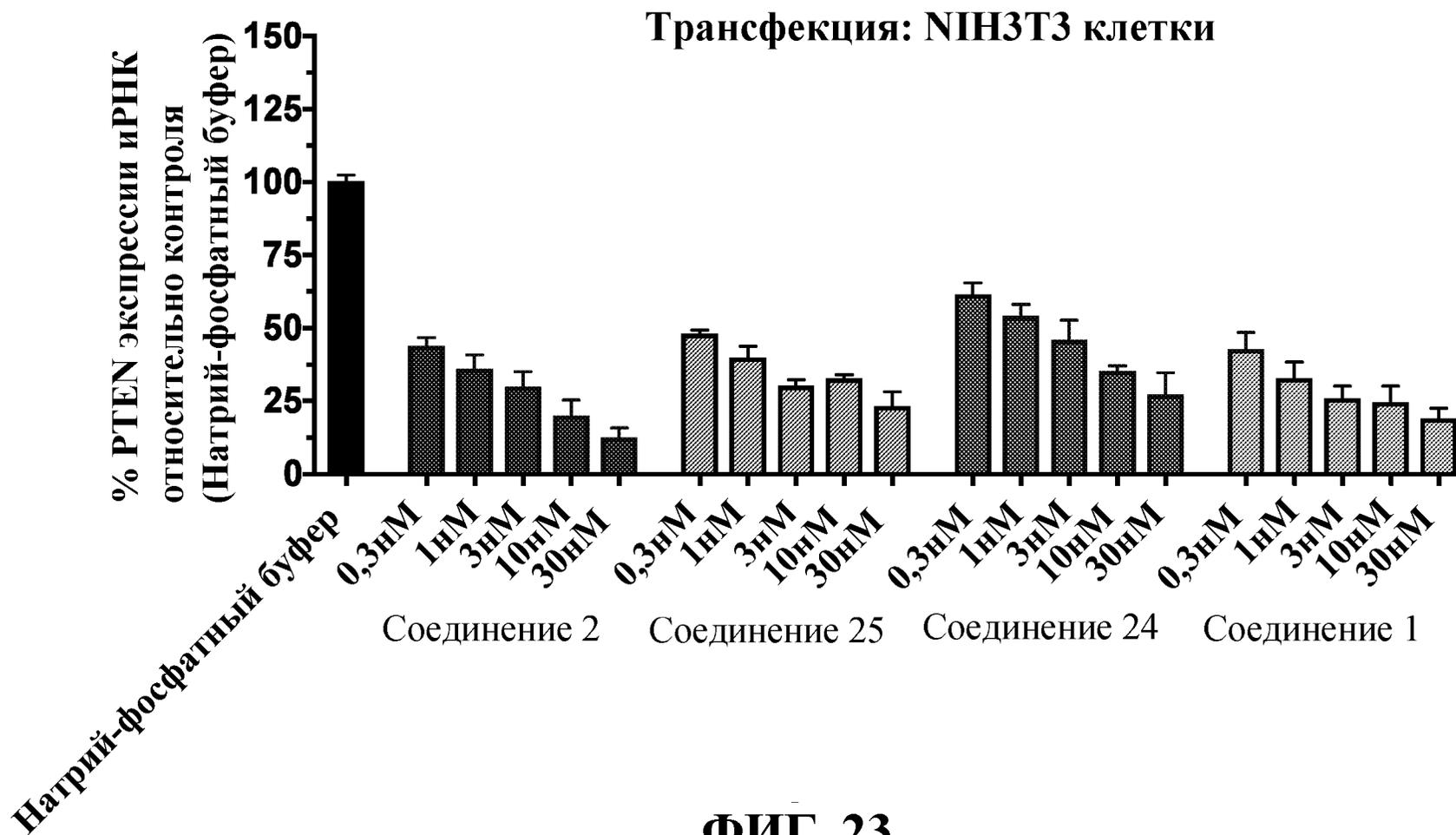


ФИГ. 21

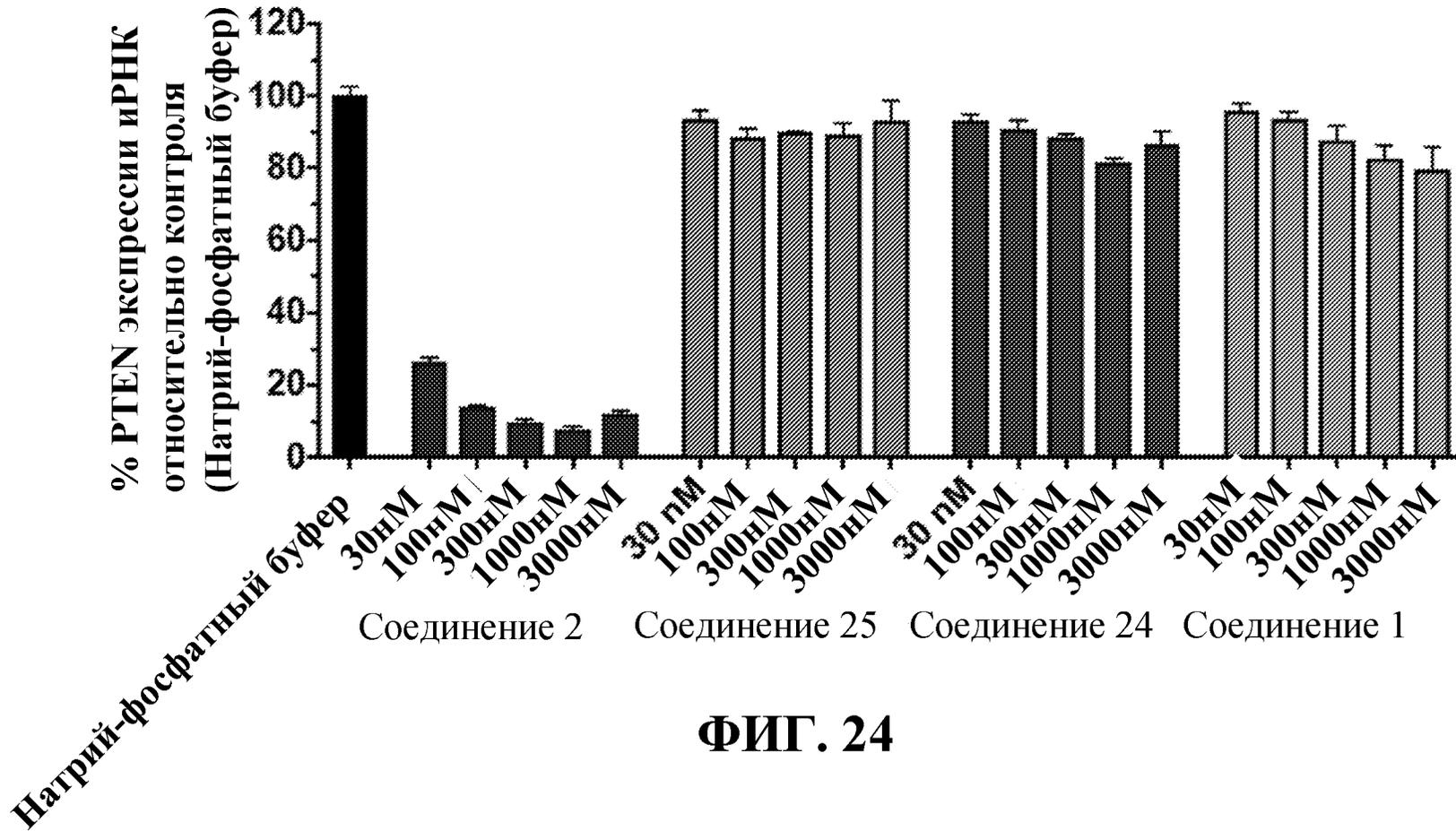
Трансфекция: НЕК293 клетки



ФИГ. 22

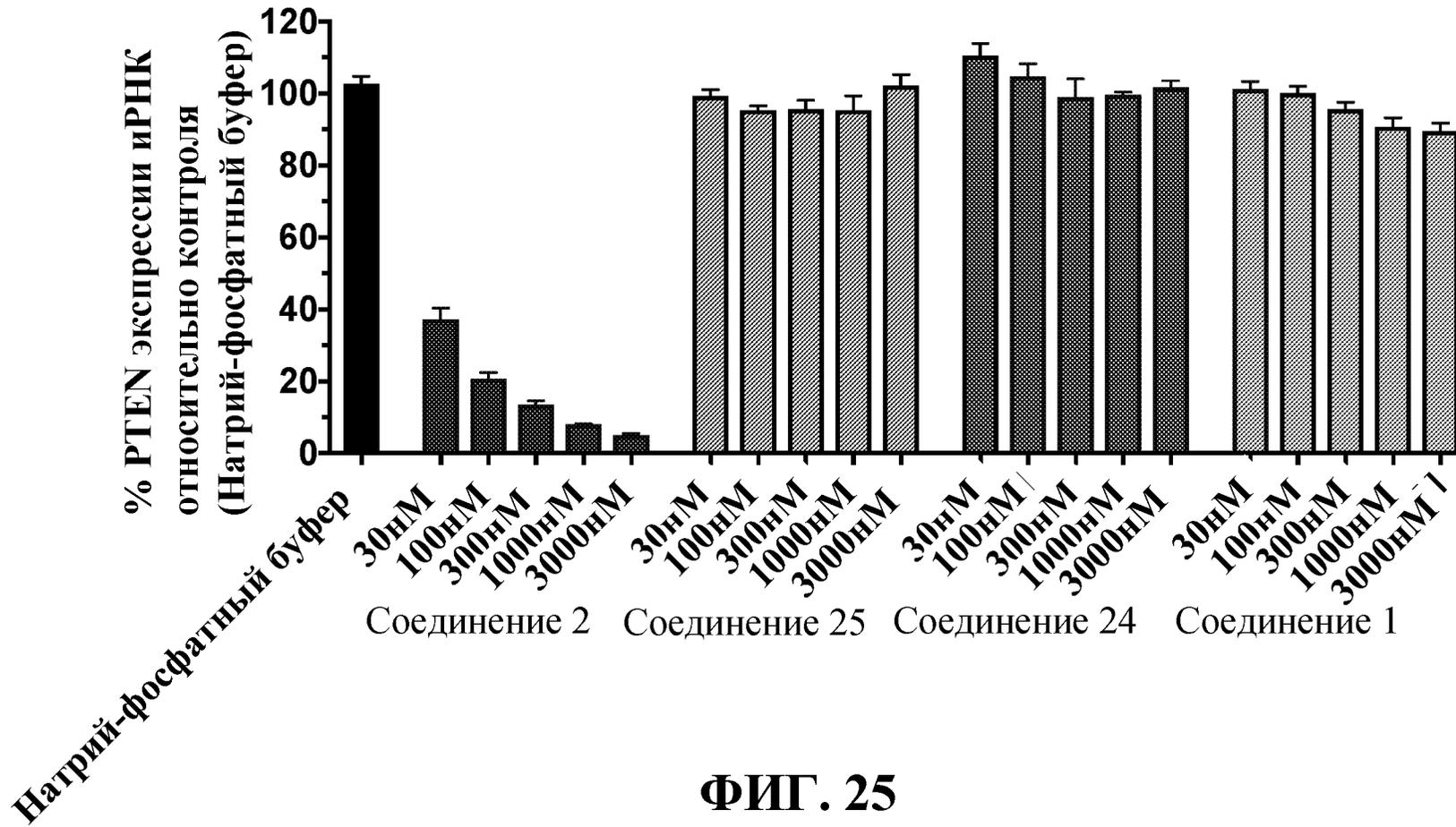


Несвязанное поглощение: HUVES (48 часов)

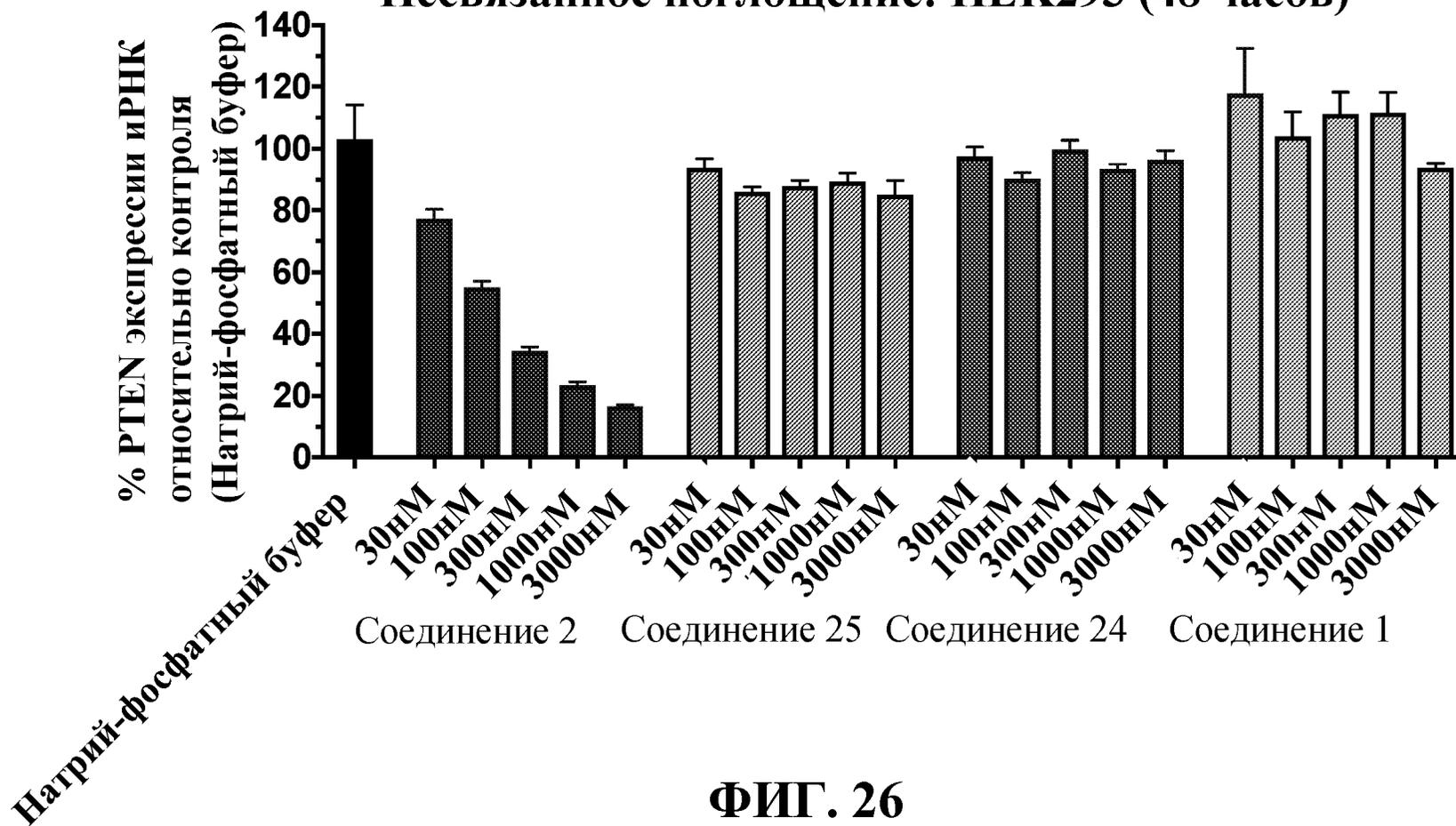


ФИГ. 24

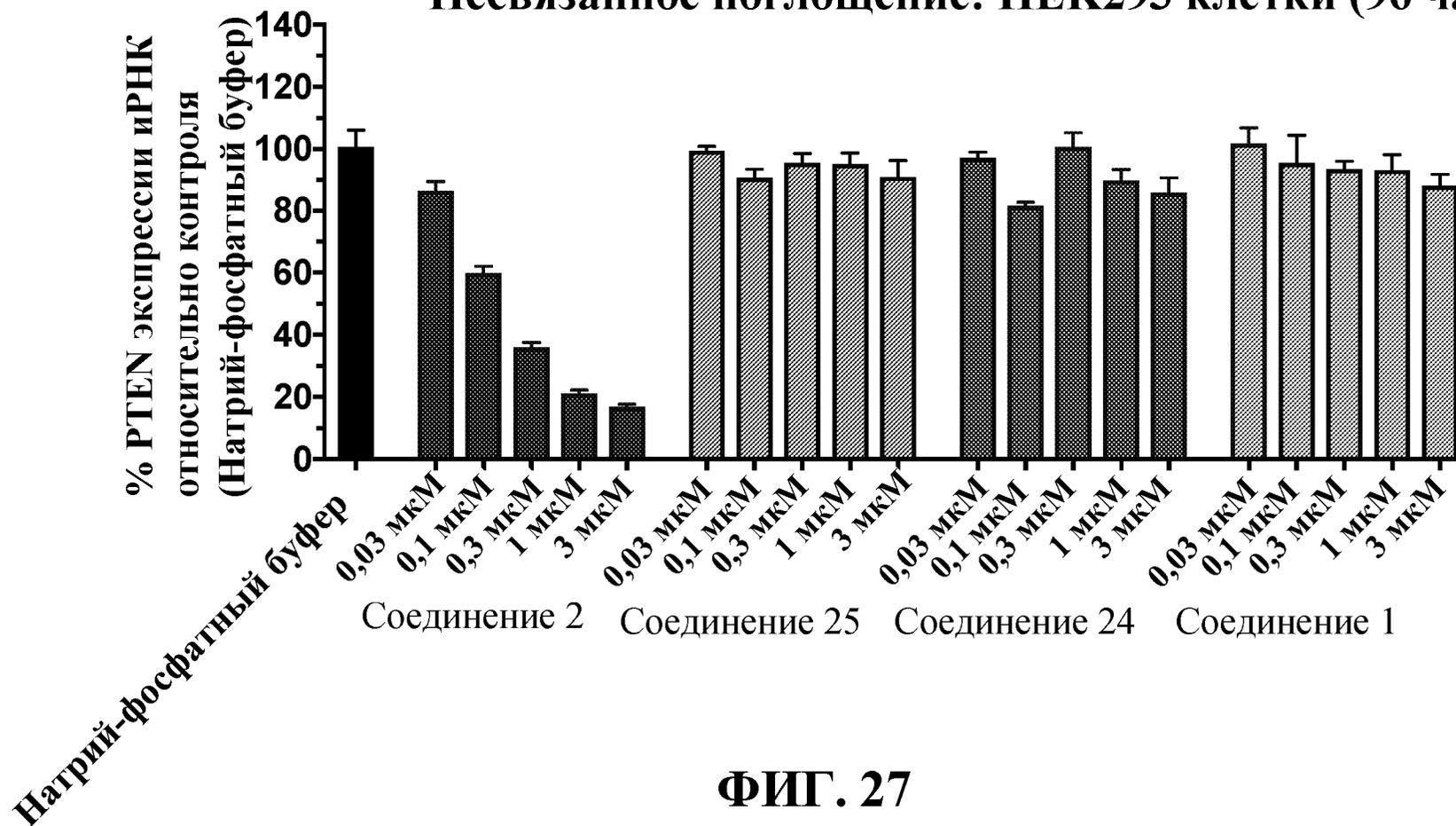
Несвязанное поглощение: HUVES (96 часов)



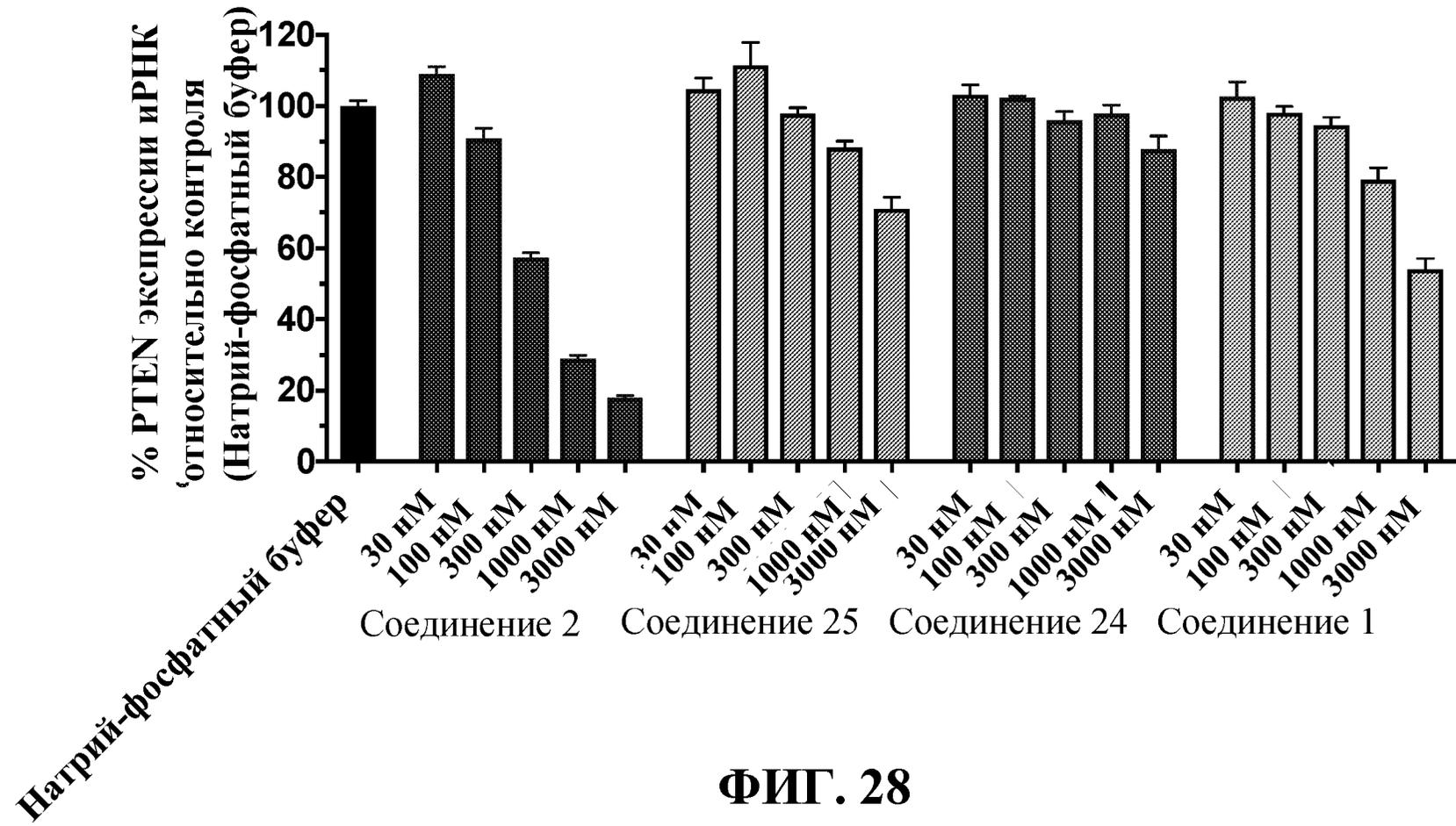
### Несвязанное поглощение: НЕК293 (48 часов)



Несвязанное поглощение: НЕК293 клетки (96 часов)



Несвязанное поглощение: NIH3T3 клетки (48 часов)

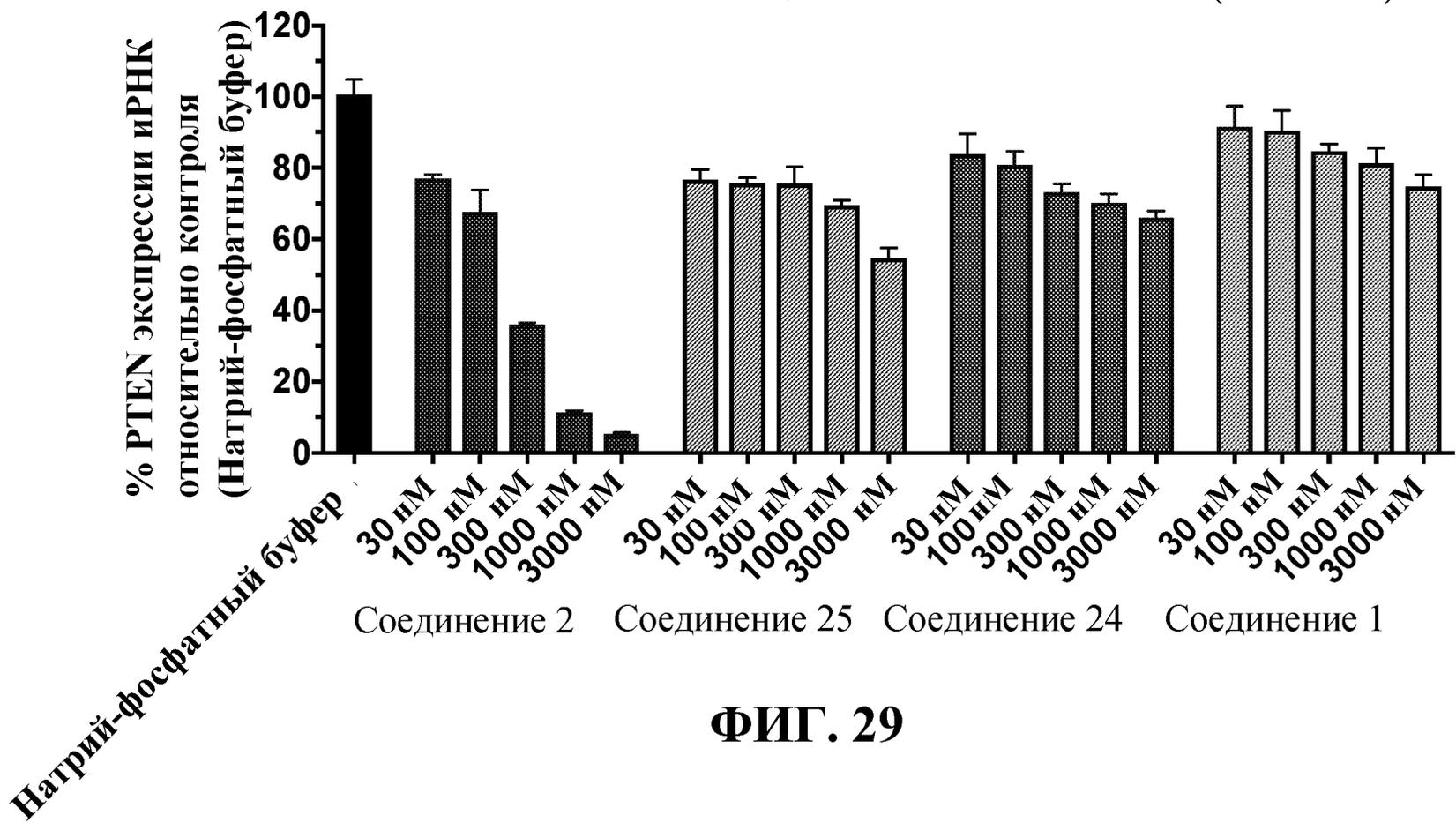


30/85

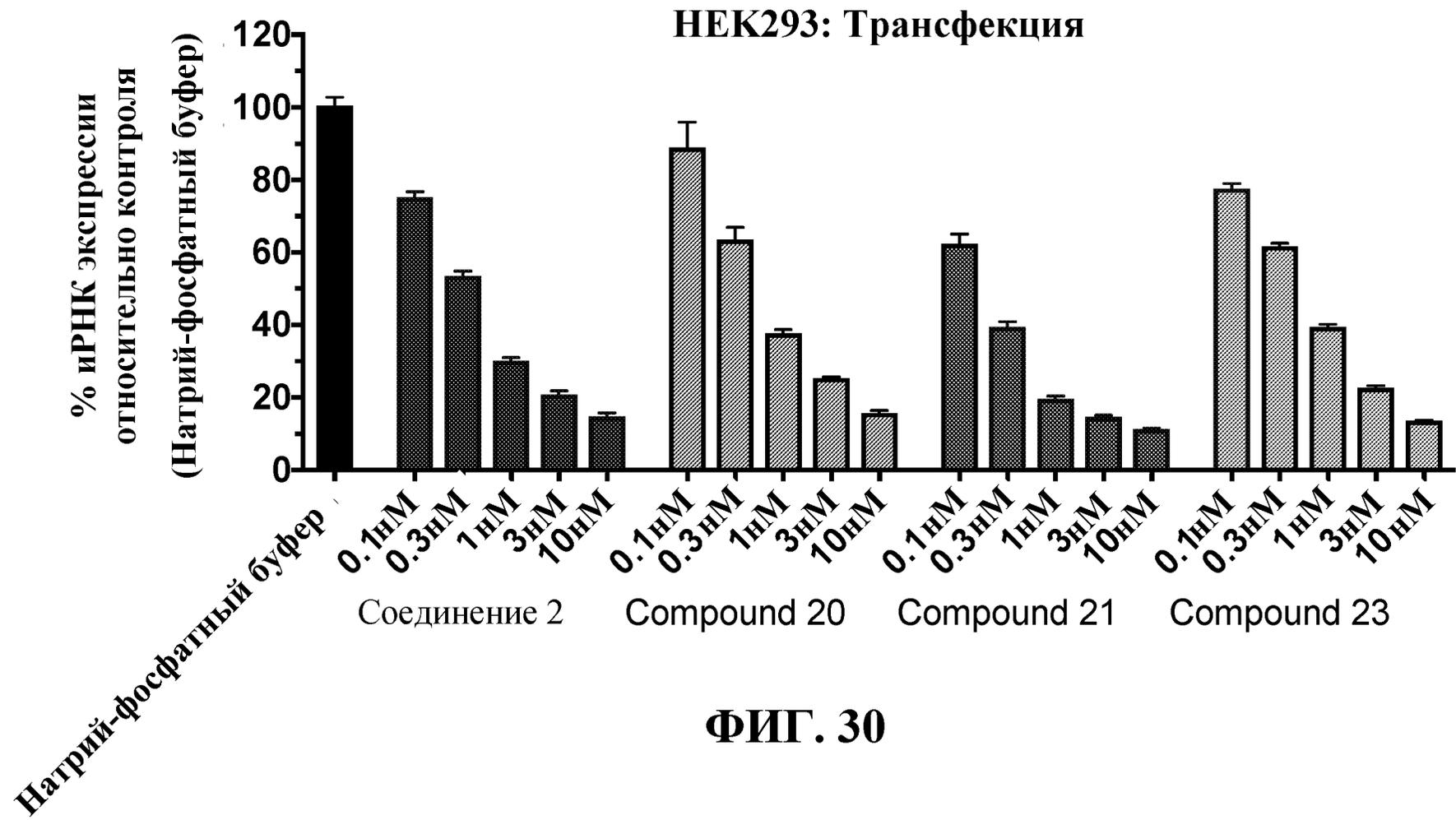
ФИГ. 28

нМ

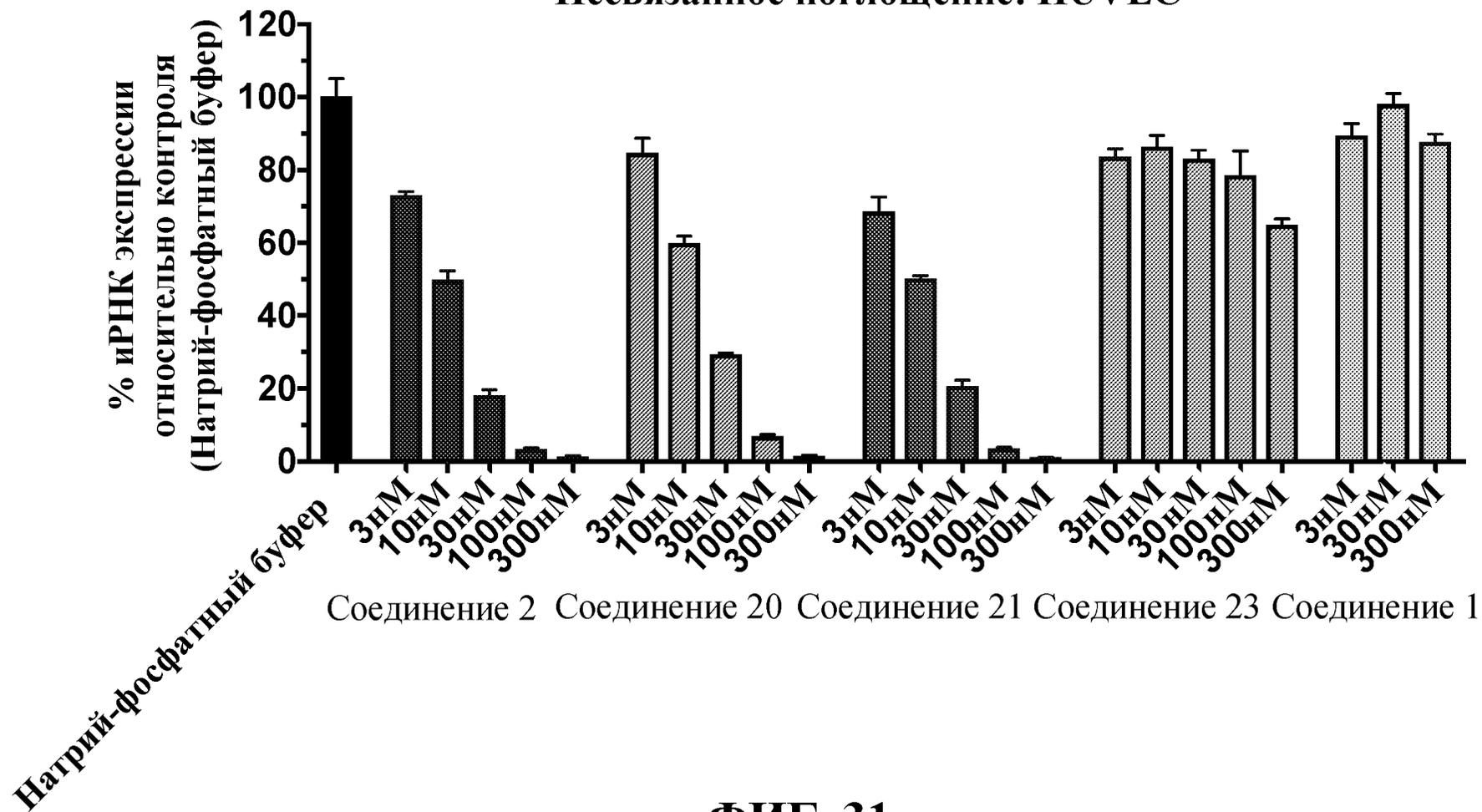
Несвязанное поглощение: NIH3T3 клетки (96 часов)



ФИГ. 29

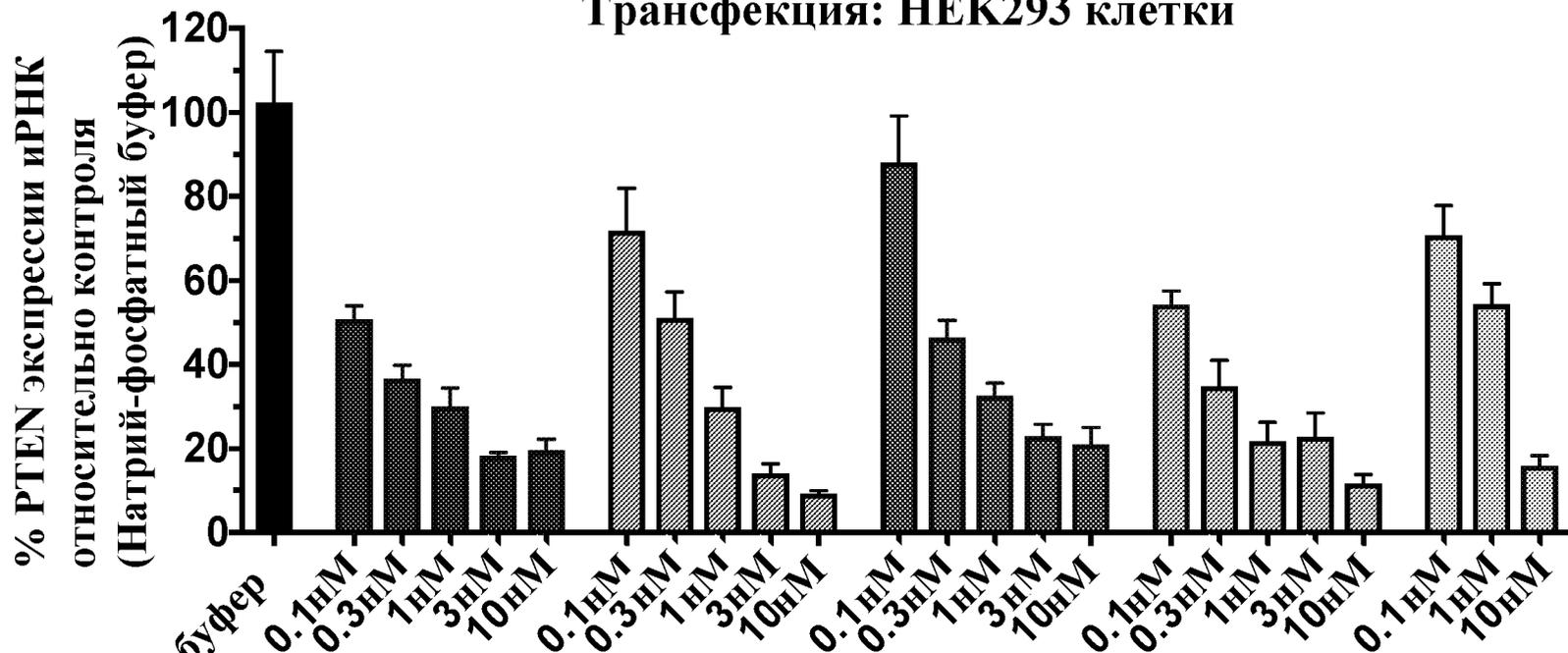


### Несвязанное поглощение: HUVEC



ФИГ. 31

Трансфекция: HEK293 клетки

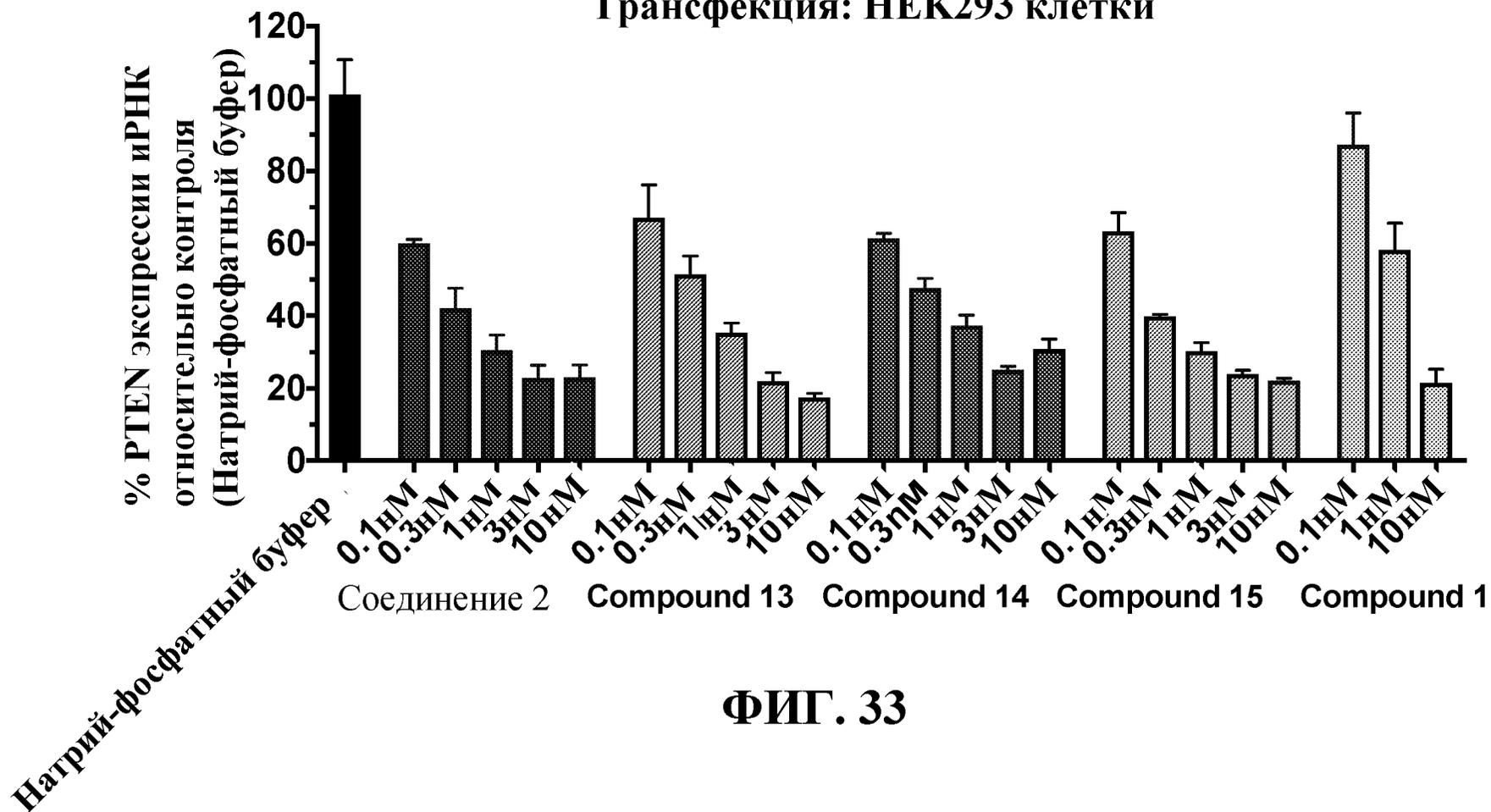


Соединение 2 Соединение 10 Соединение 11 Соединение 12 Соединение 1

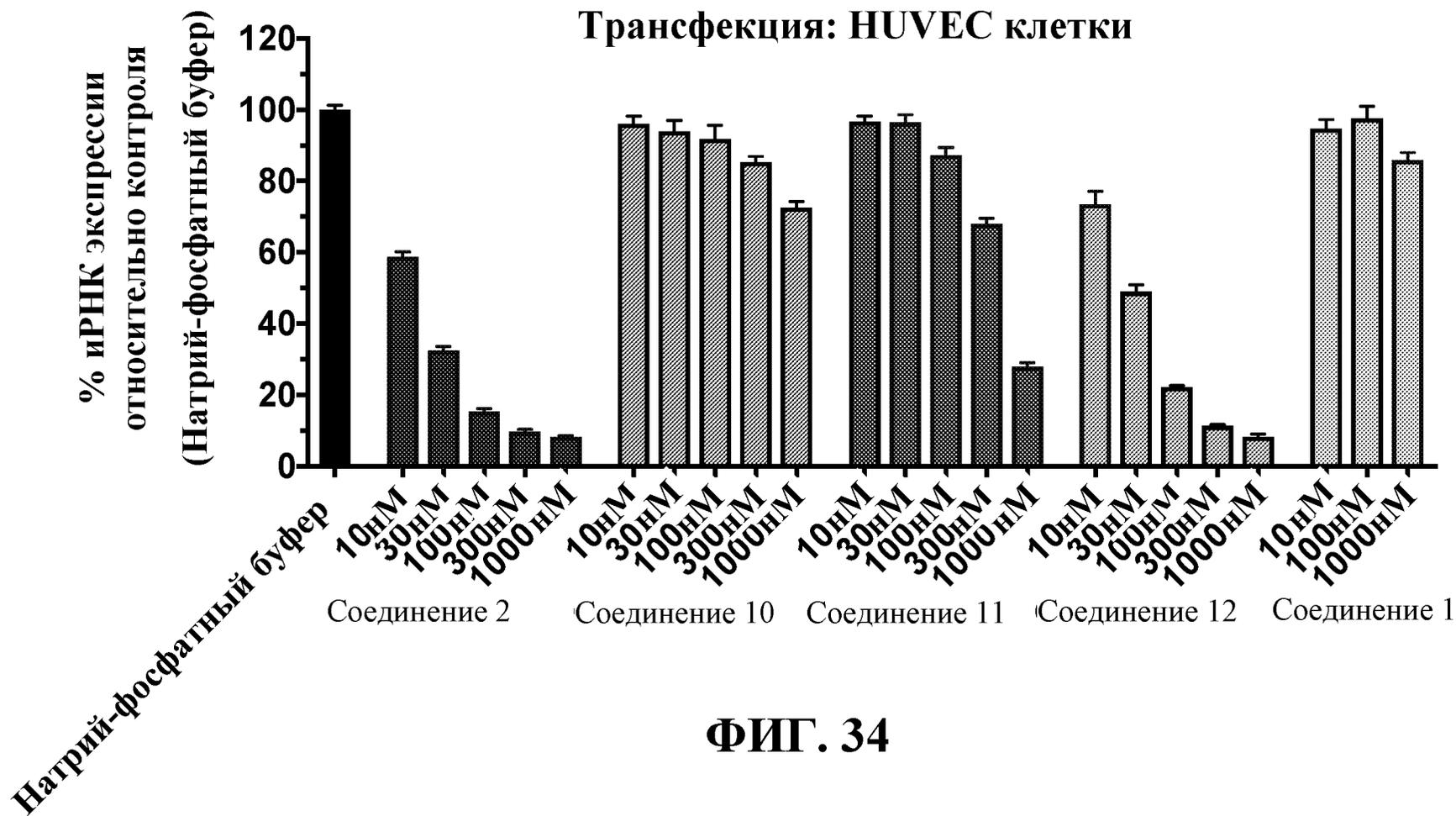
Натрий-фосфатный буфер  
относительно контроля  
(Натрий-фосфатный буфер)

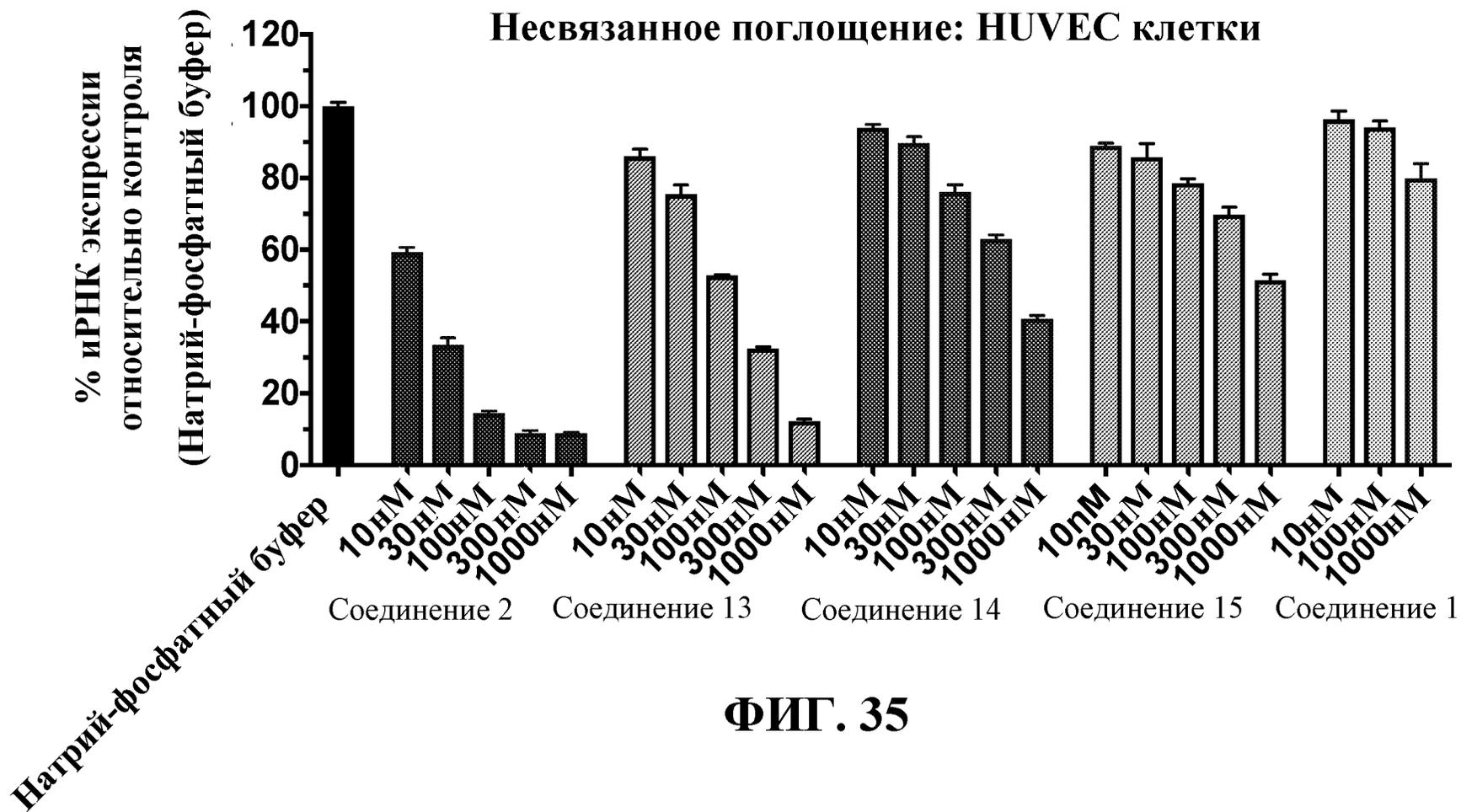
ФИГ. 32

Трансфекция: НЕК293 клетки

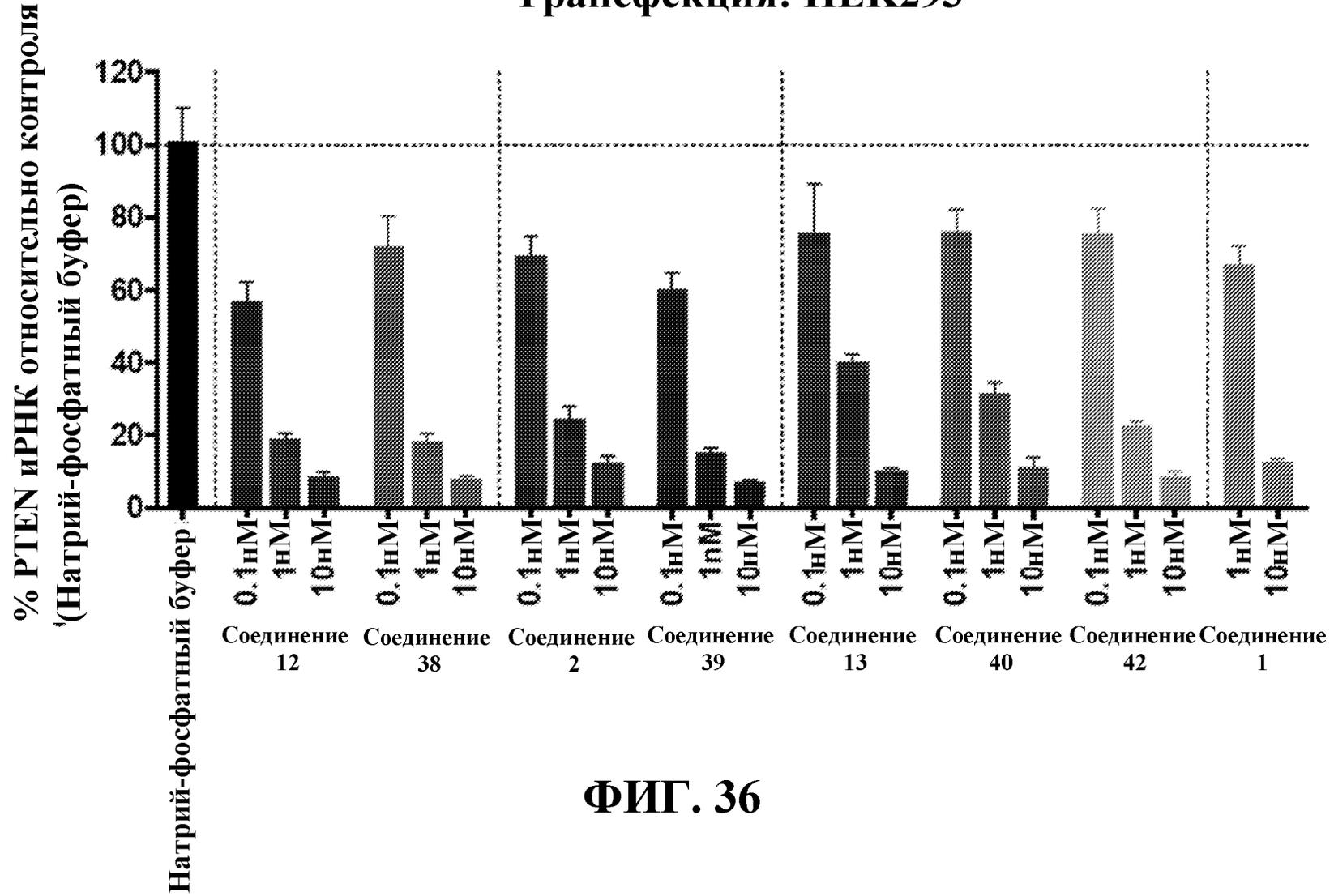


ФИГ. 33



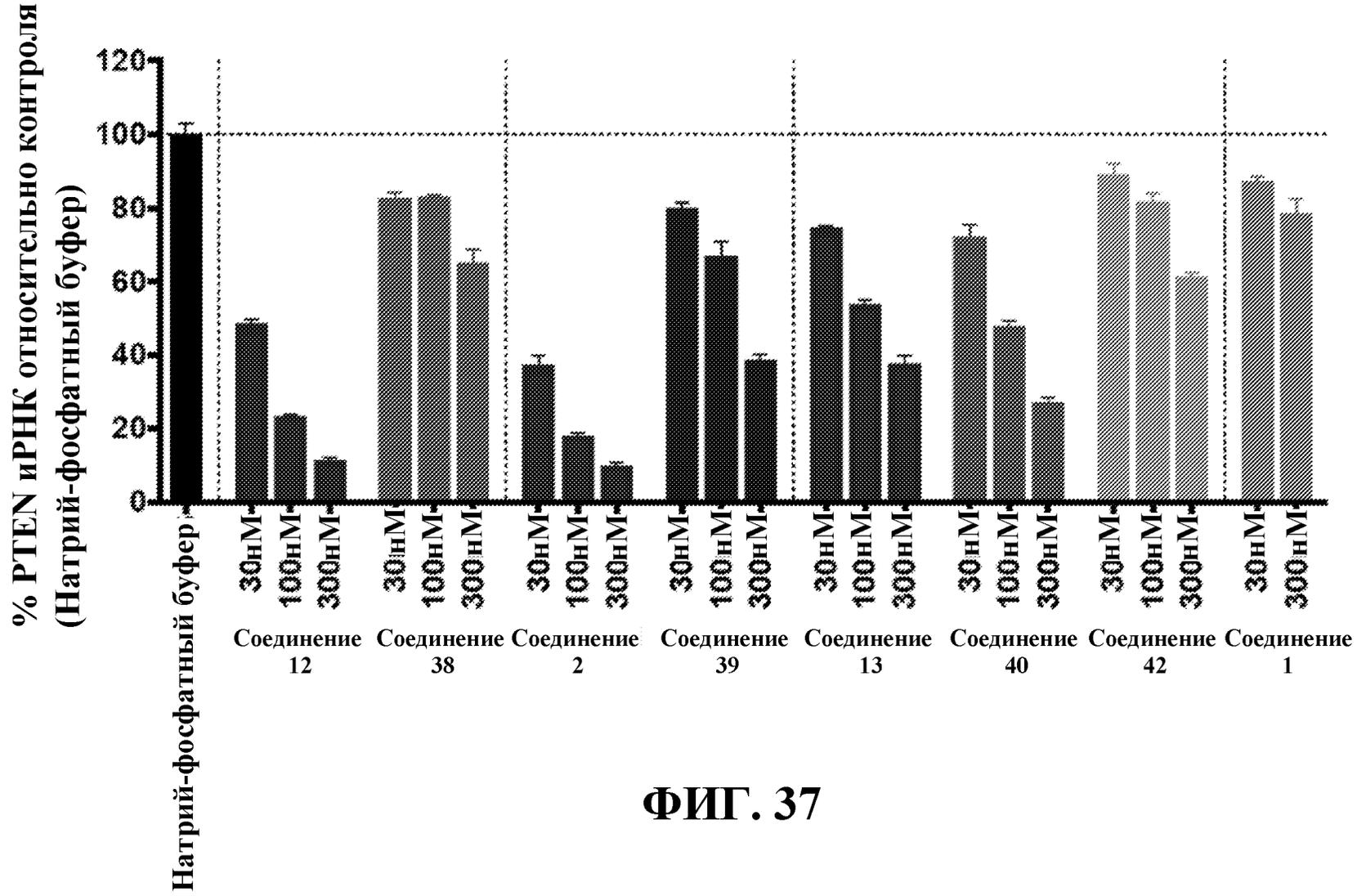


# Трансфекция: НЕК293



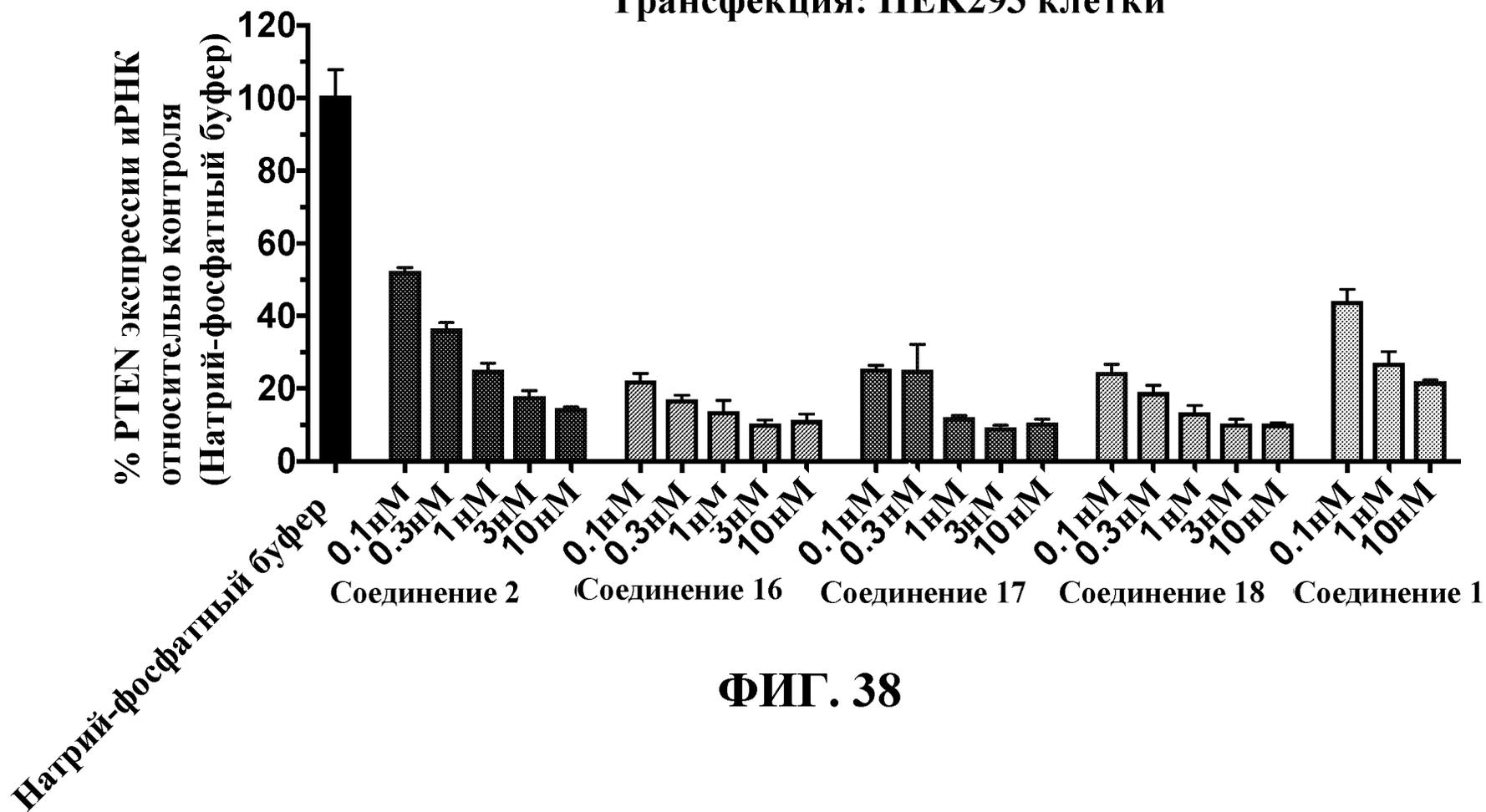
ФИГ. 36

# Несвязанное поглощение: HUVES



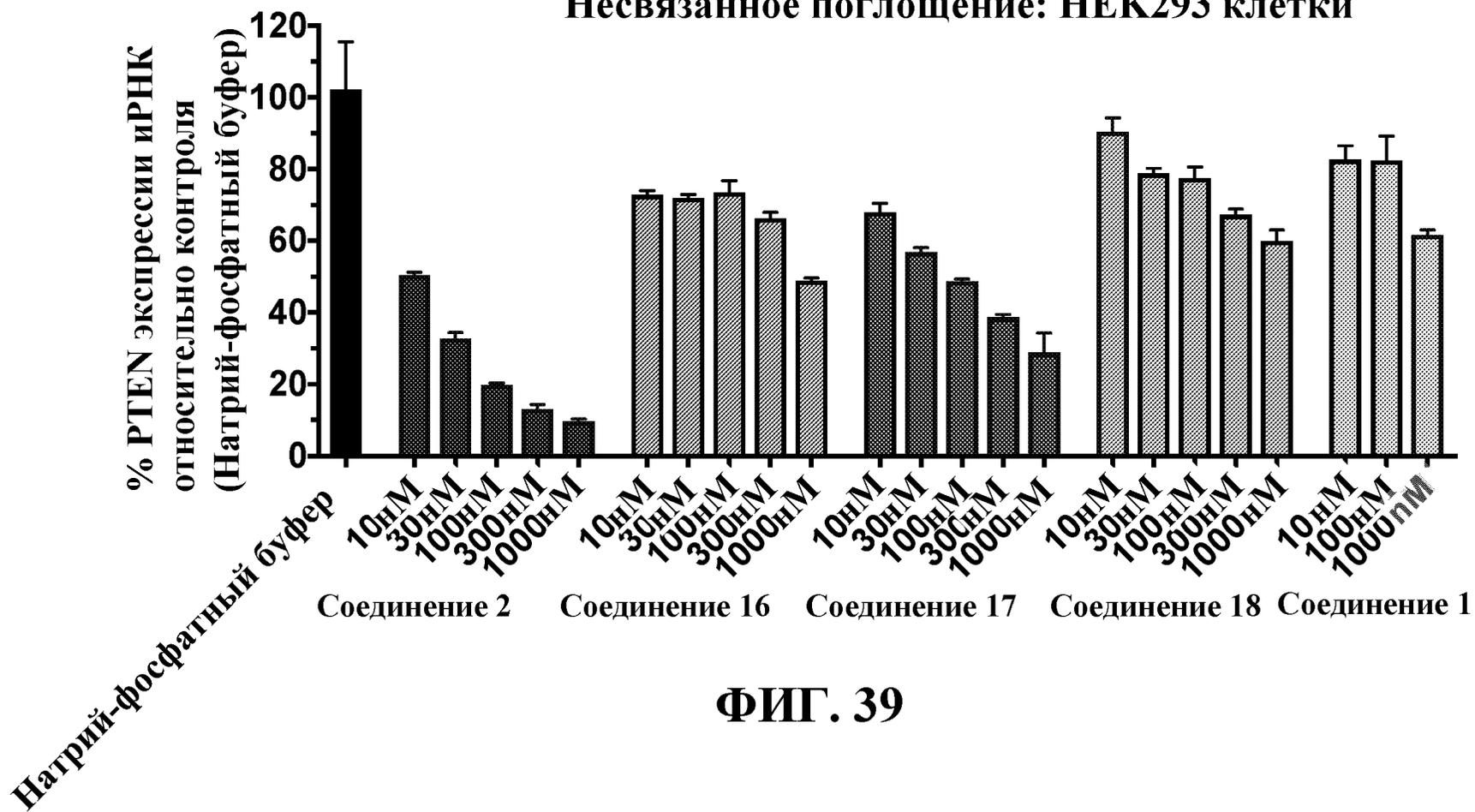
ФИГ. 37

### Трансфекция: НЕК293 клетки



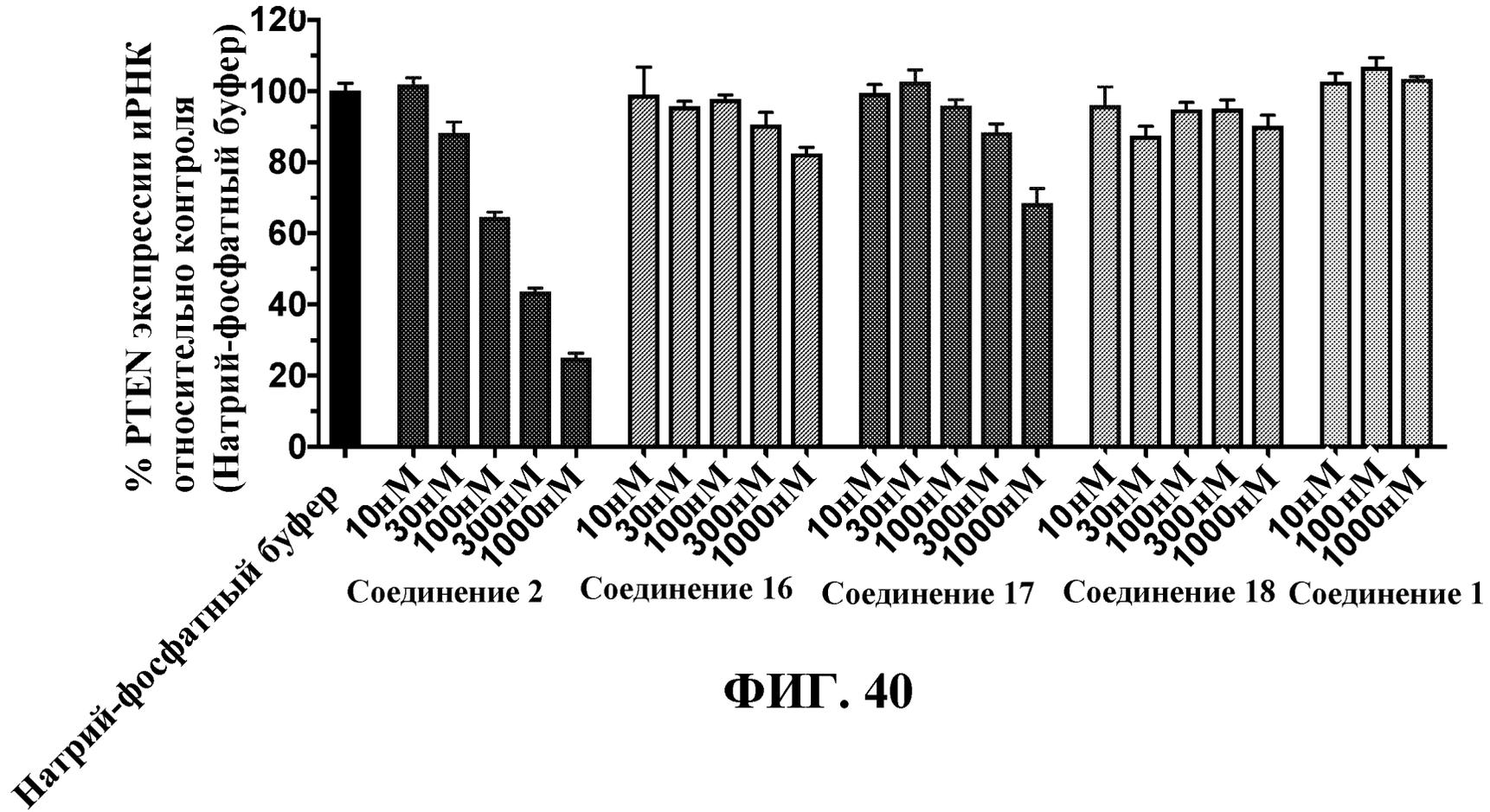
ФИГ. 38

Несвязанное поглощение: НЕК293 клетки



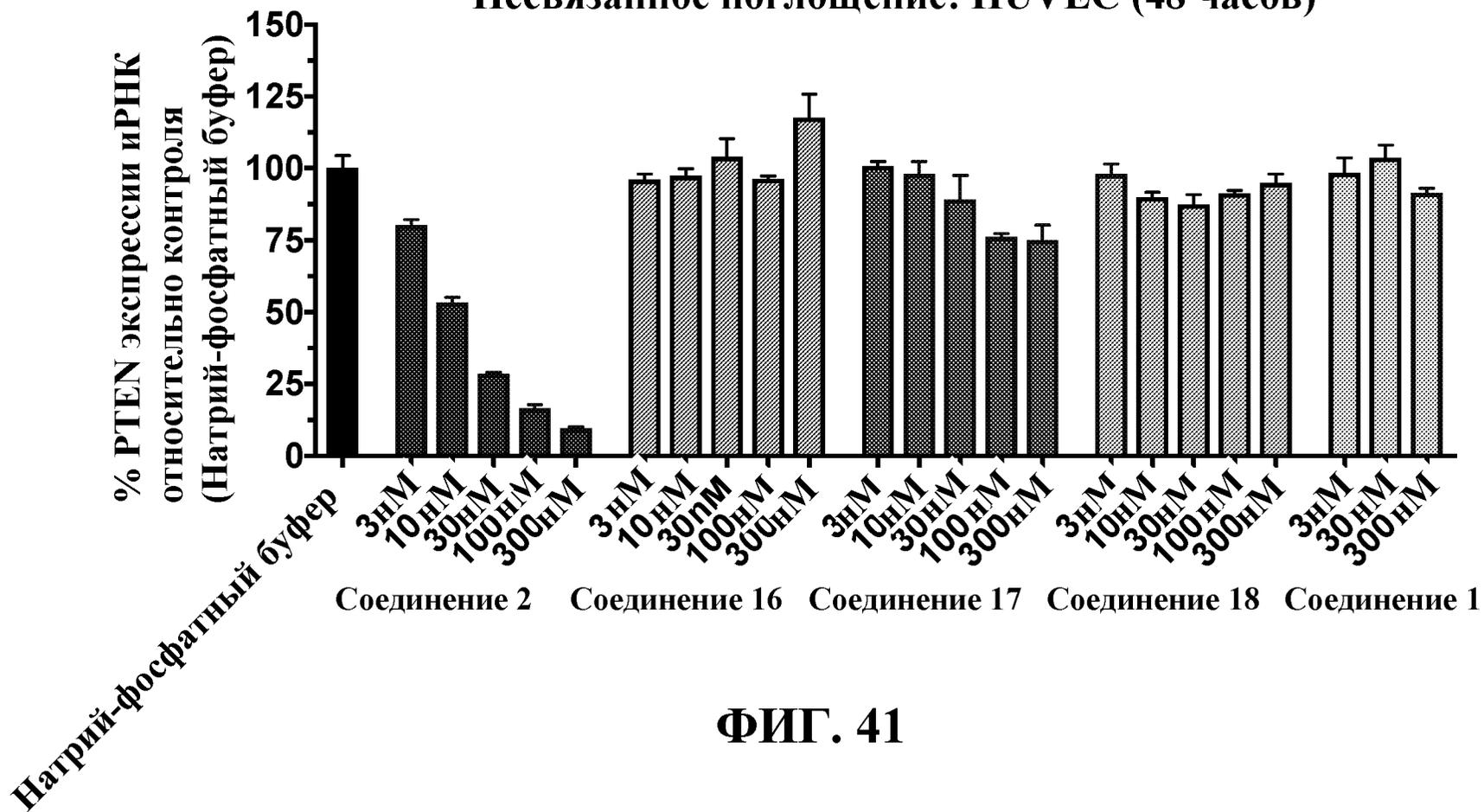
ФИГ. 39

Несвязанное поглощение: дифференцированные SH-SY5Y клетки  
(нормальные среды)

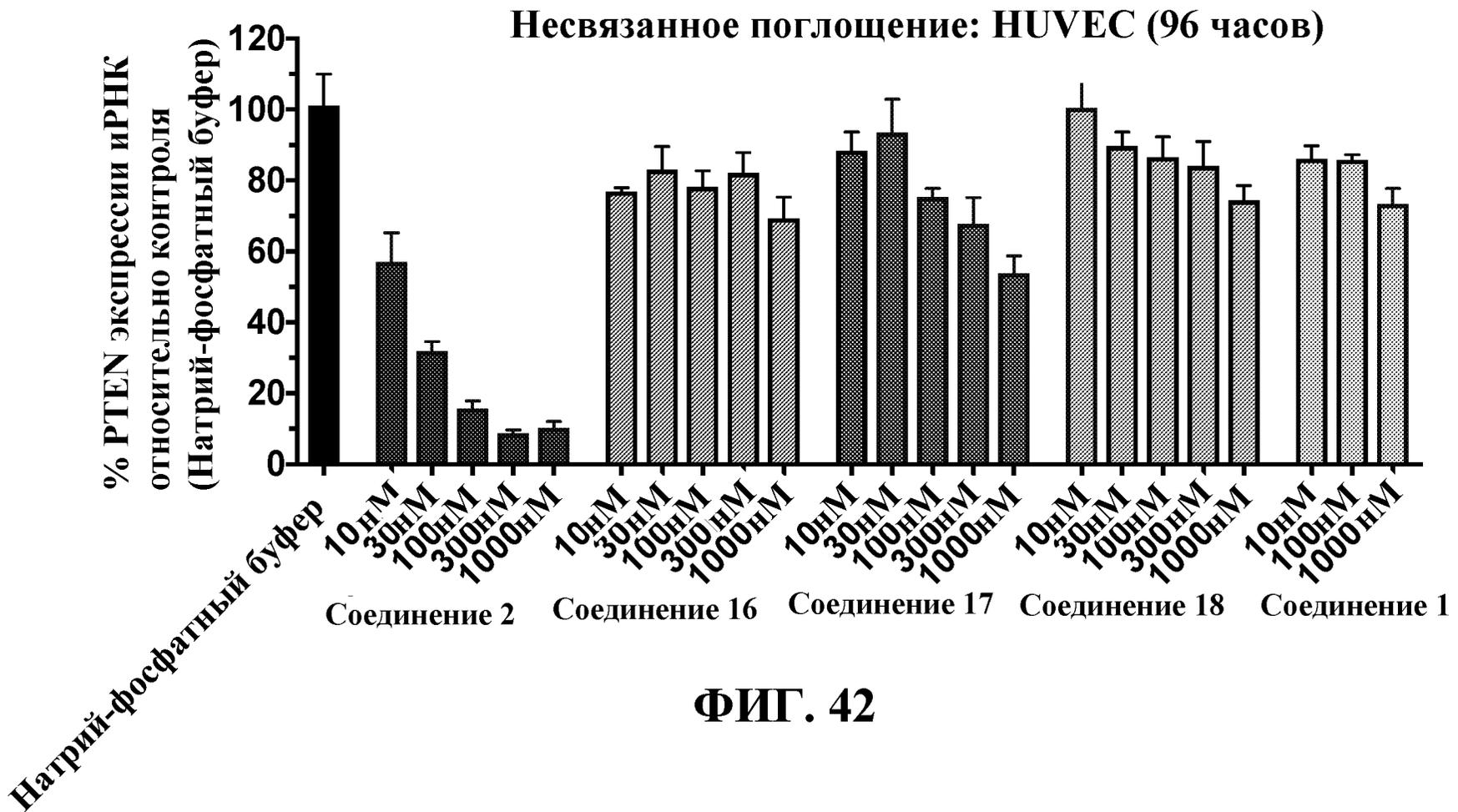


ФИГ. 40

### Несвязанное поглощение: HUVES (48 часов)

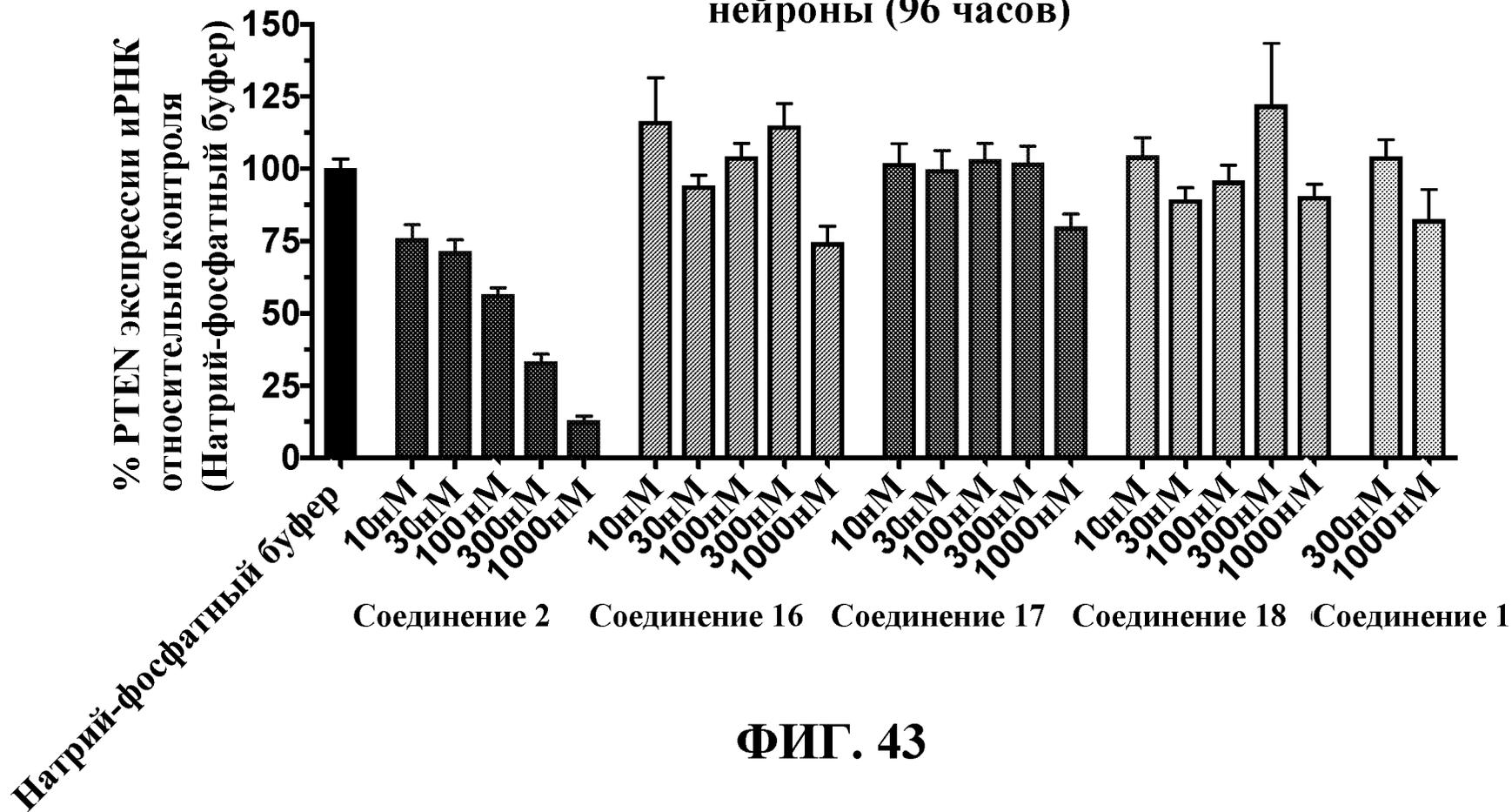


ФИГ. 41



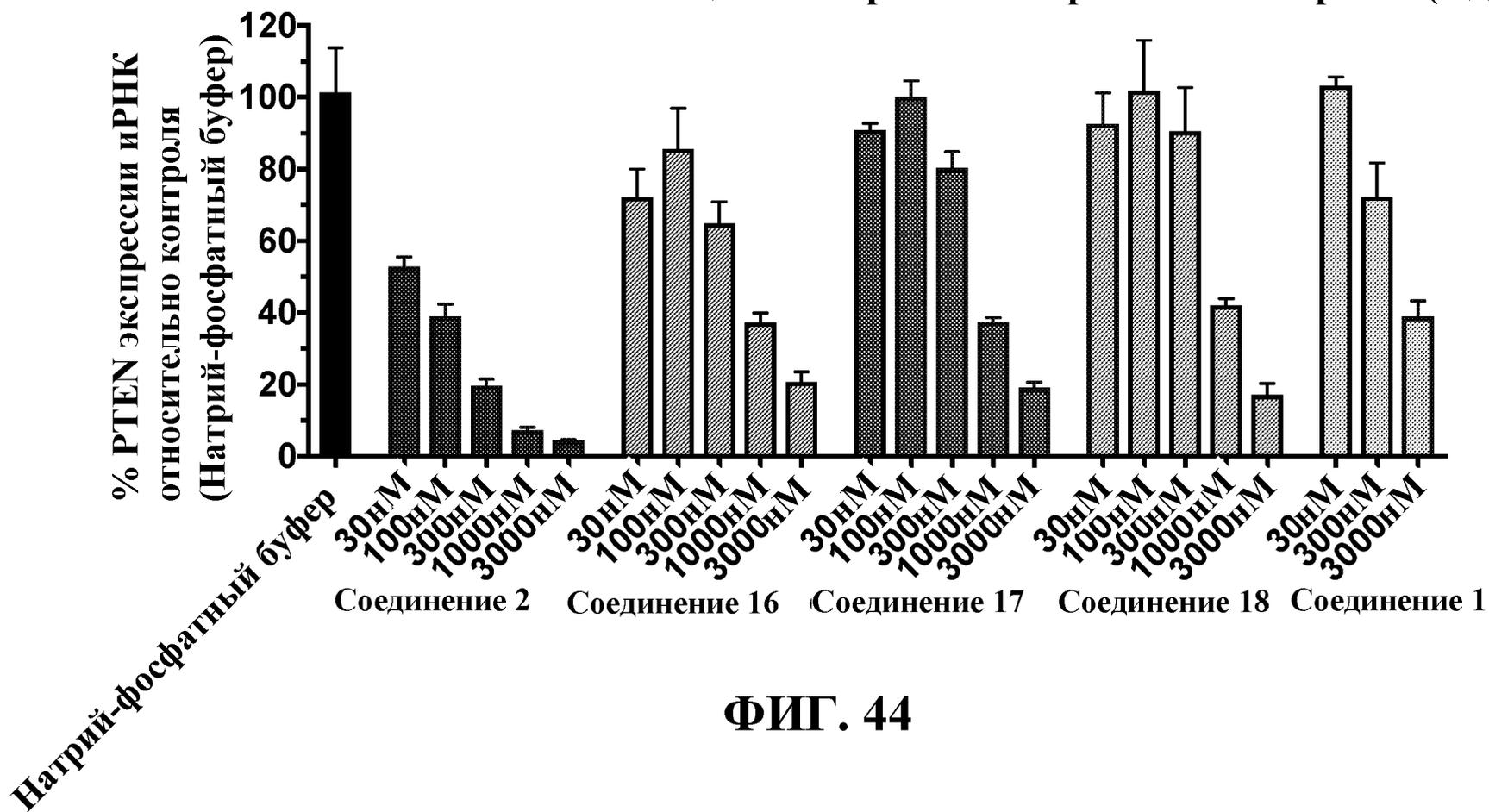
**ФИГ. 42**

Несвязанное поглощение: первичные крысиные  
нейроны (96 часов)

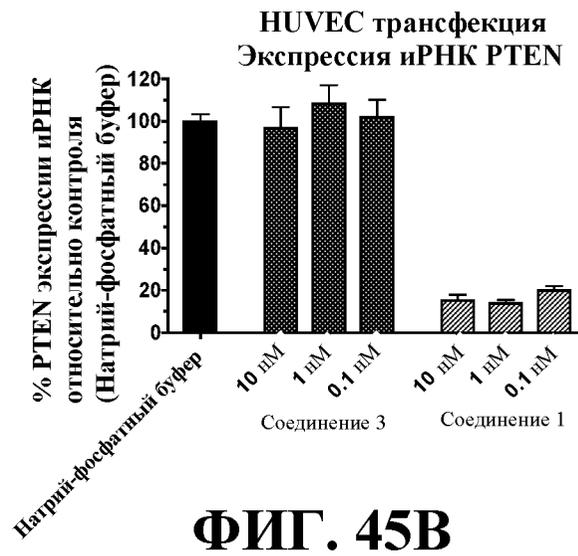
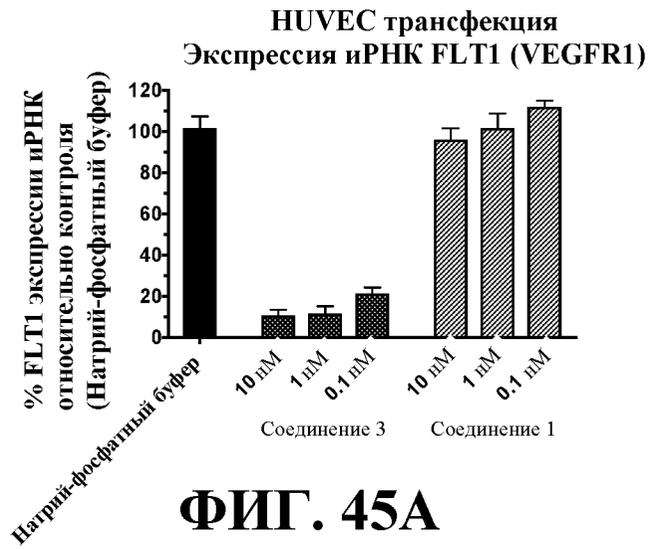


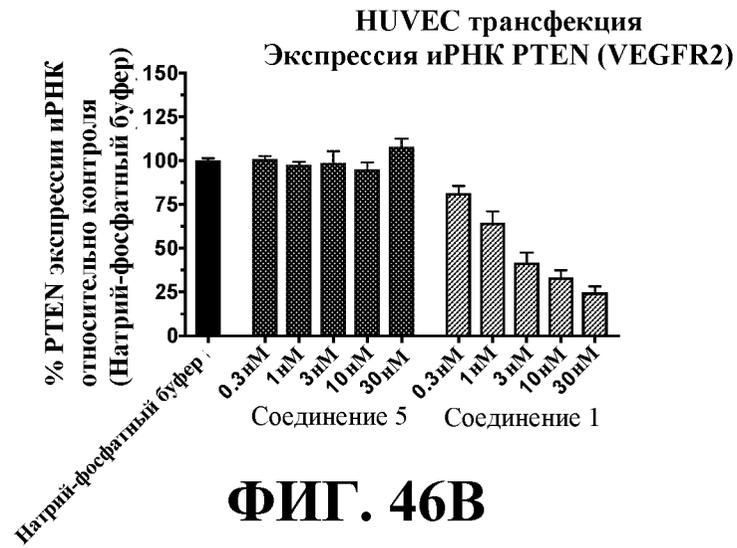
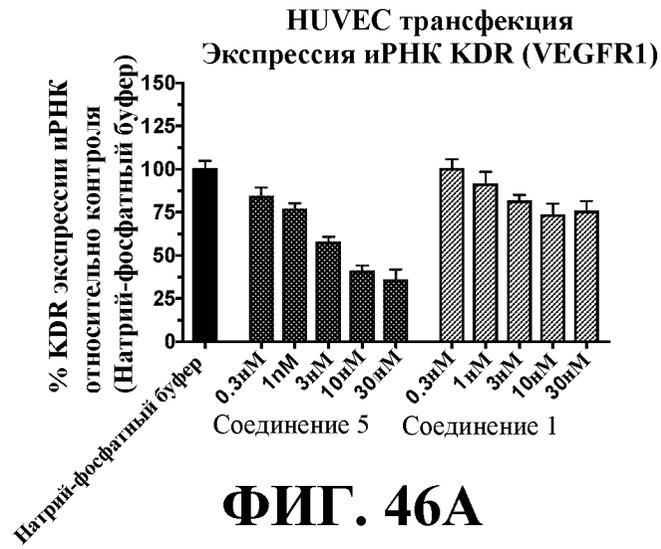
ФИГ. 43

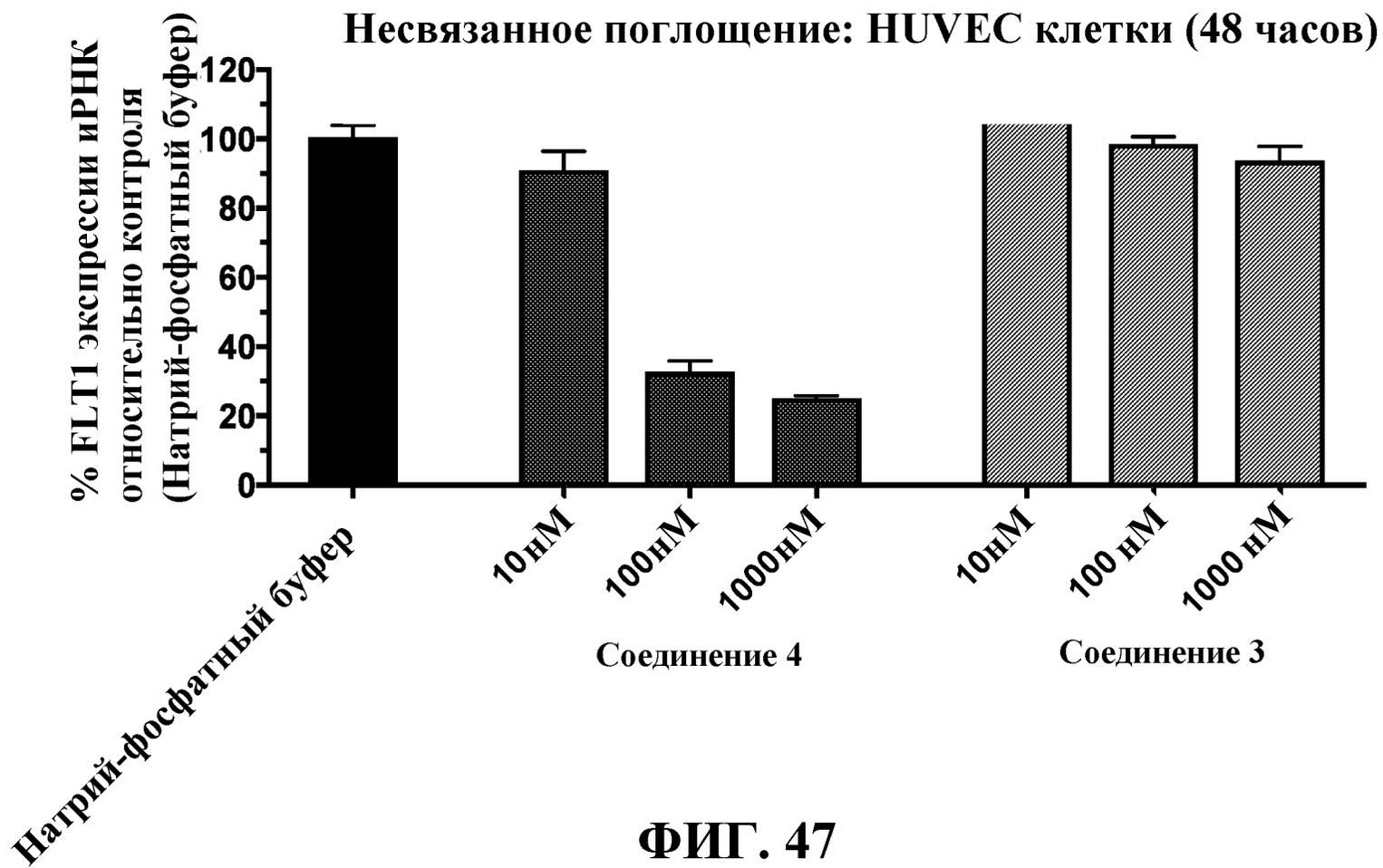
Несвязанное поглощение: первичные крысиные нейроны (7 дней)

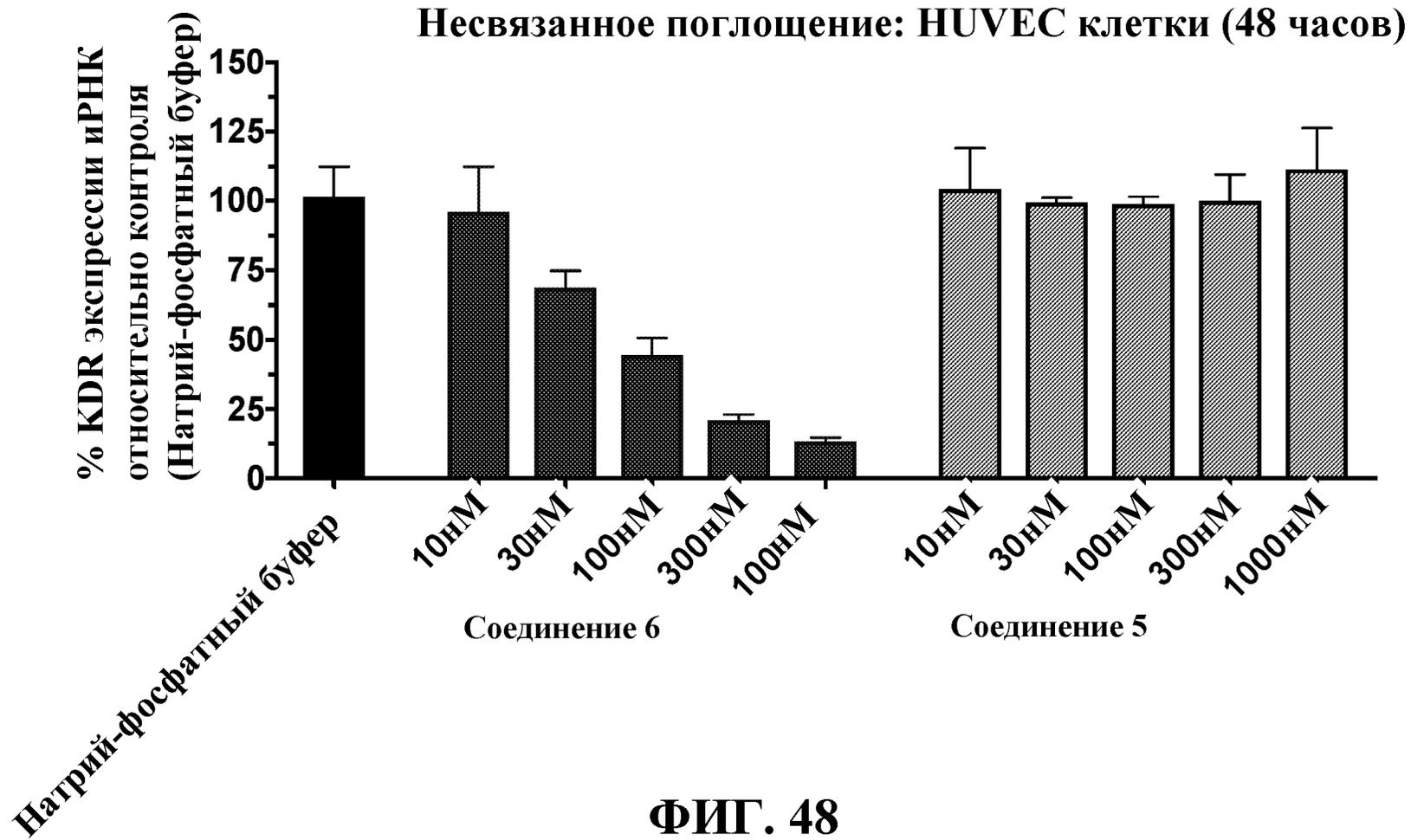


ФИГ. 44





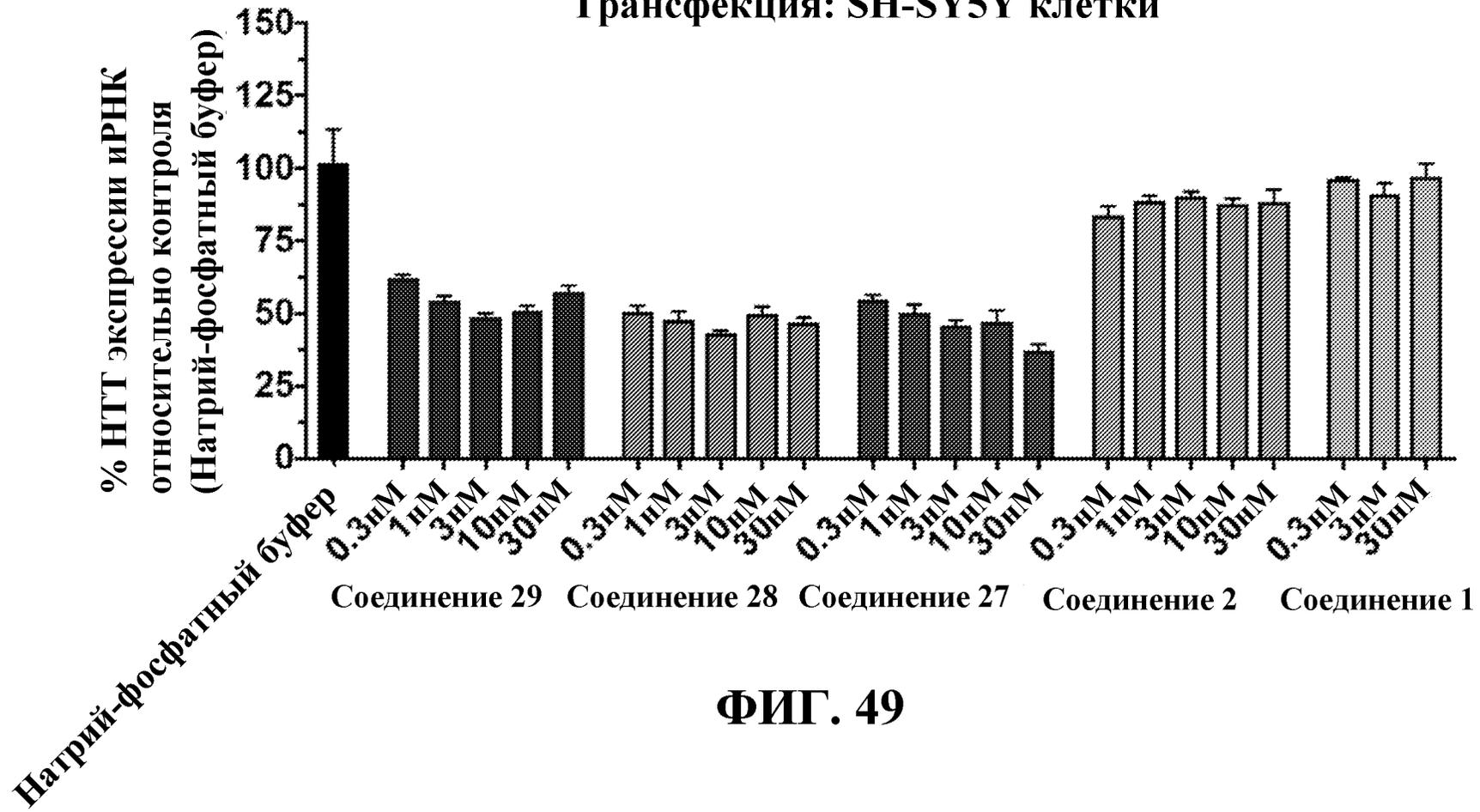




50/85

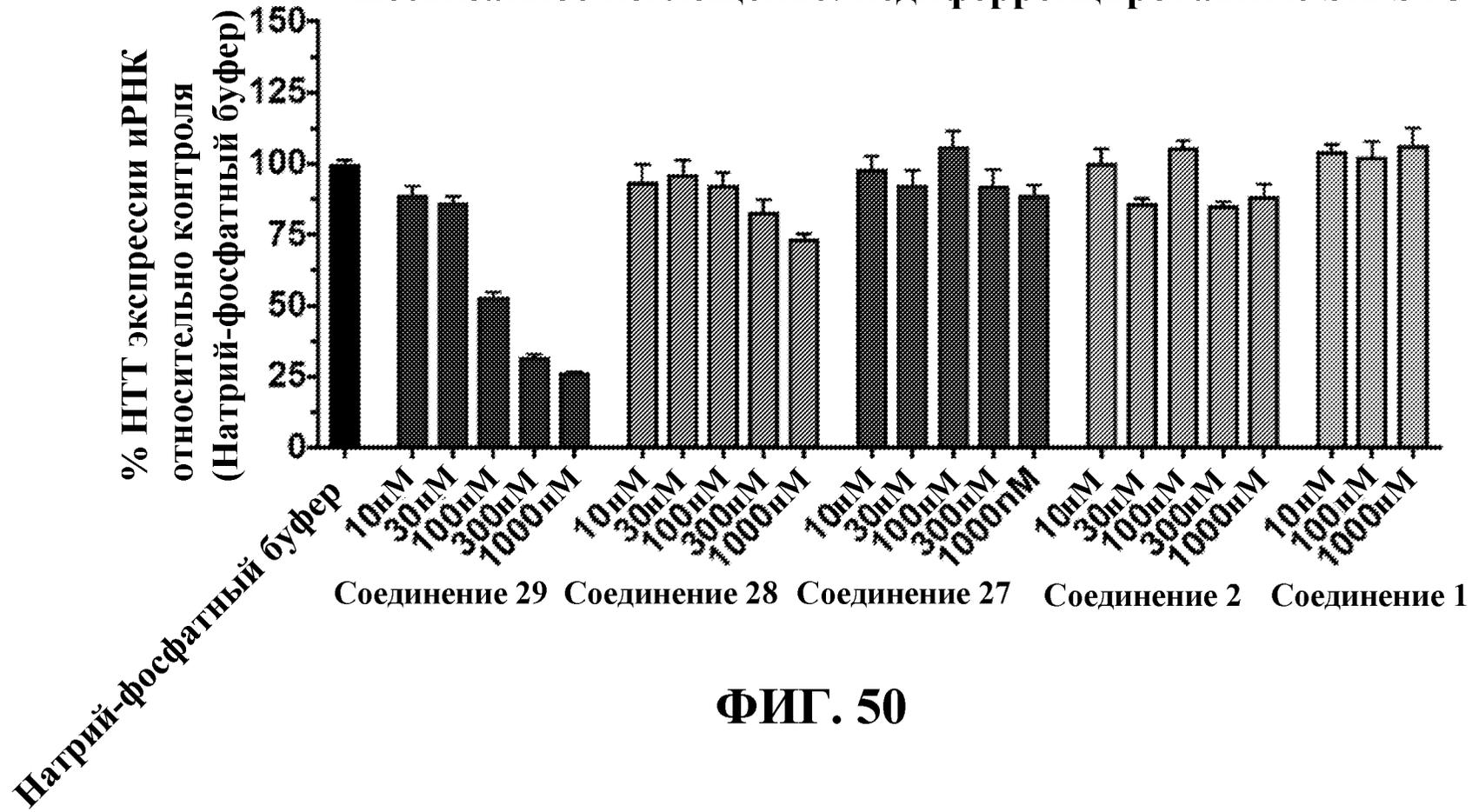
**ФИГ. 48**

### Трансфекция: SH-SY5Y клетки



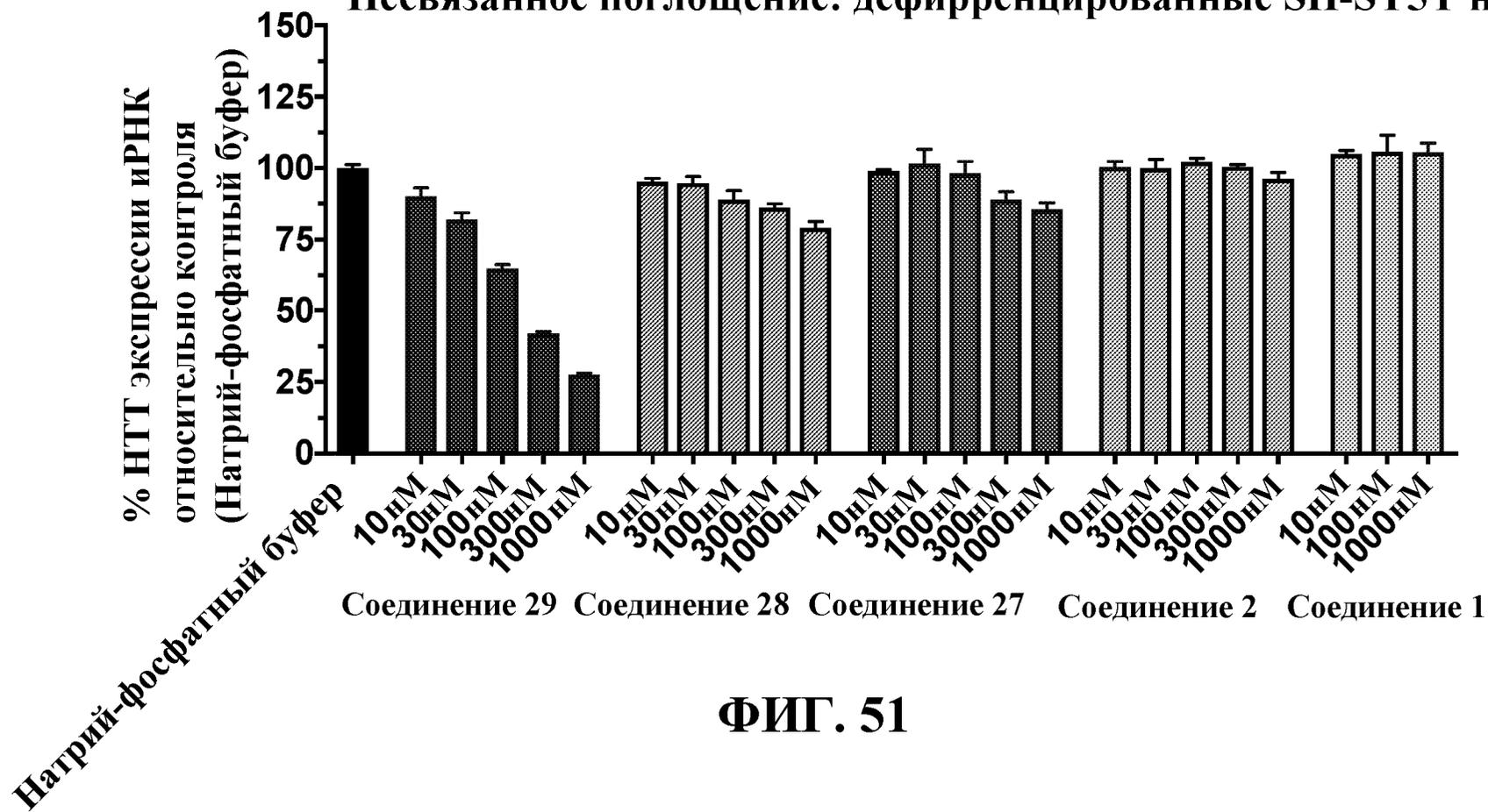
ФИГ. 49

Несвязанное поглощение: недифференцированные SH-SY5Y клетки



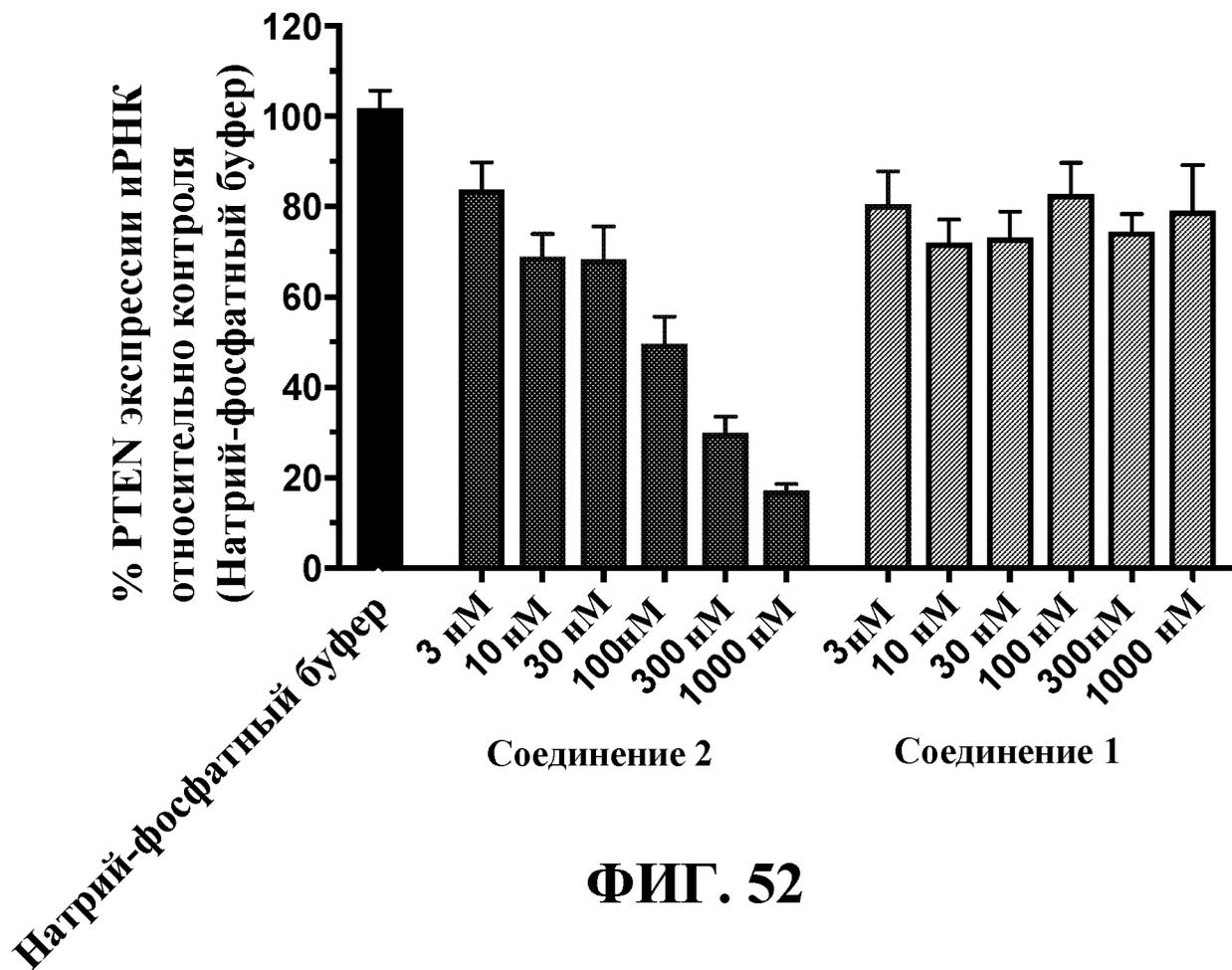
ФИГ. 50

Несвязанное поглощение: дефифренцированные SH-SY5Y нейроны

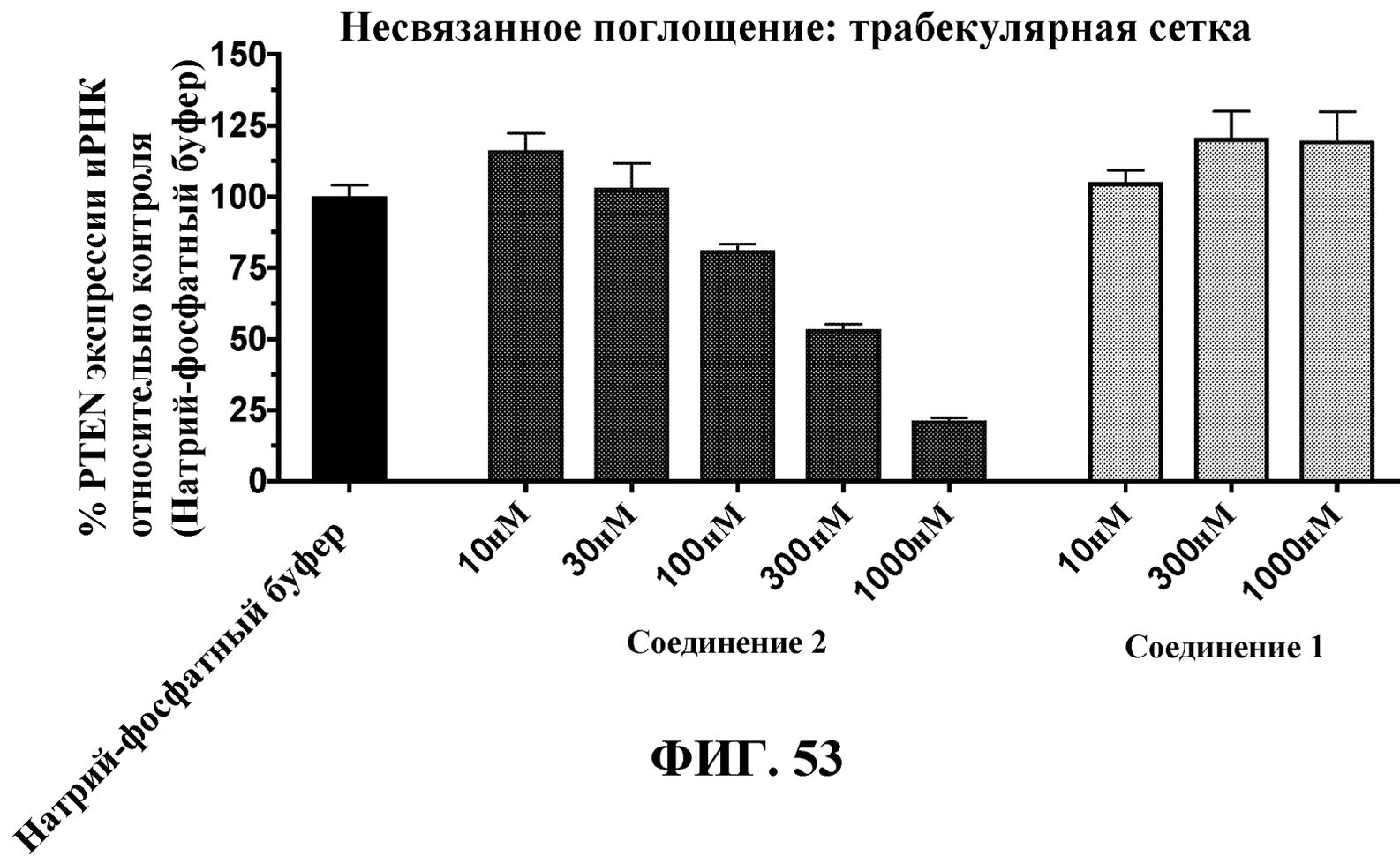


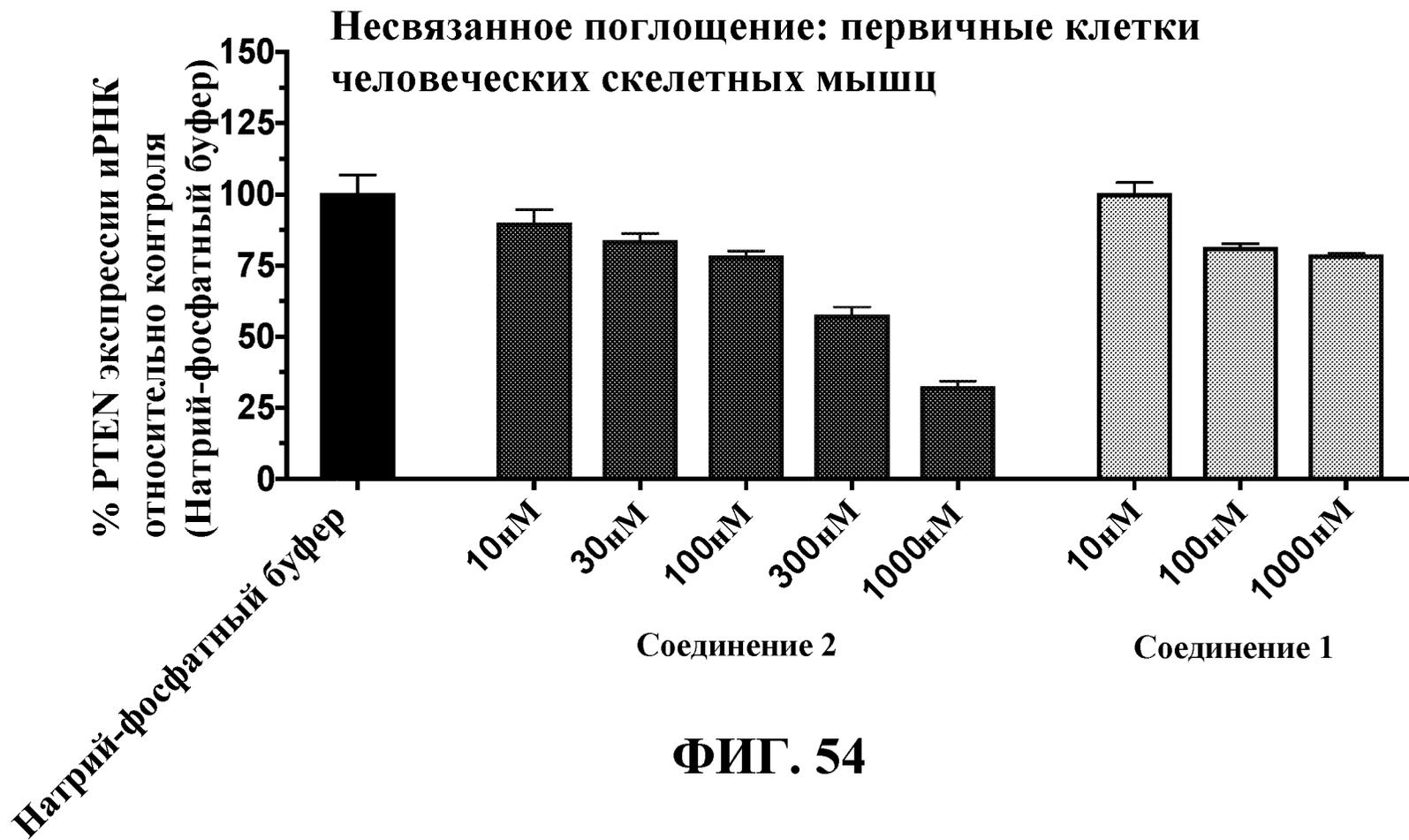
ФИГ. 51

Несвязанное поглощение: дефирренцированные 3T3L1 адипоциты

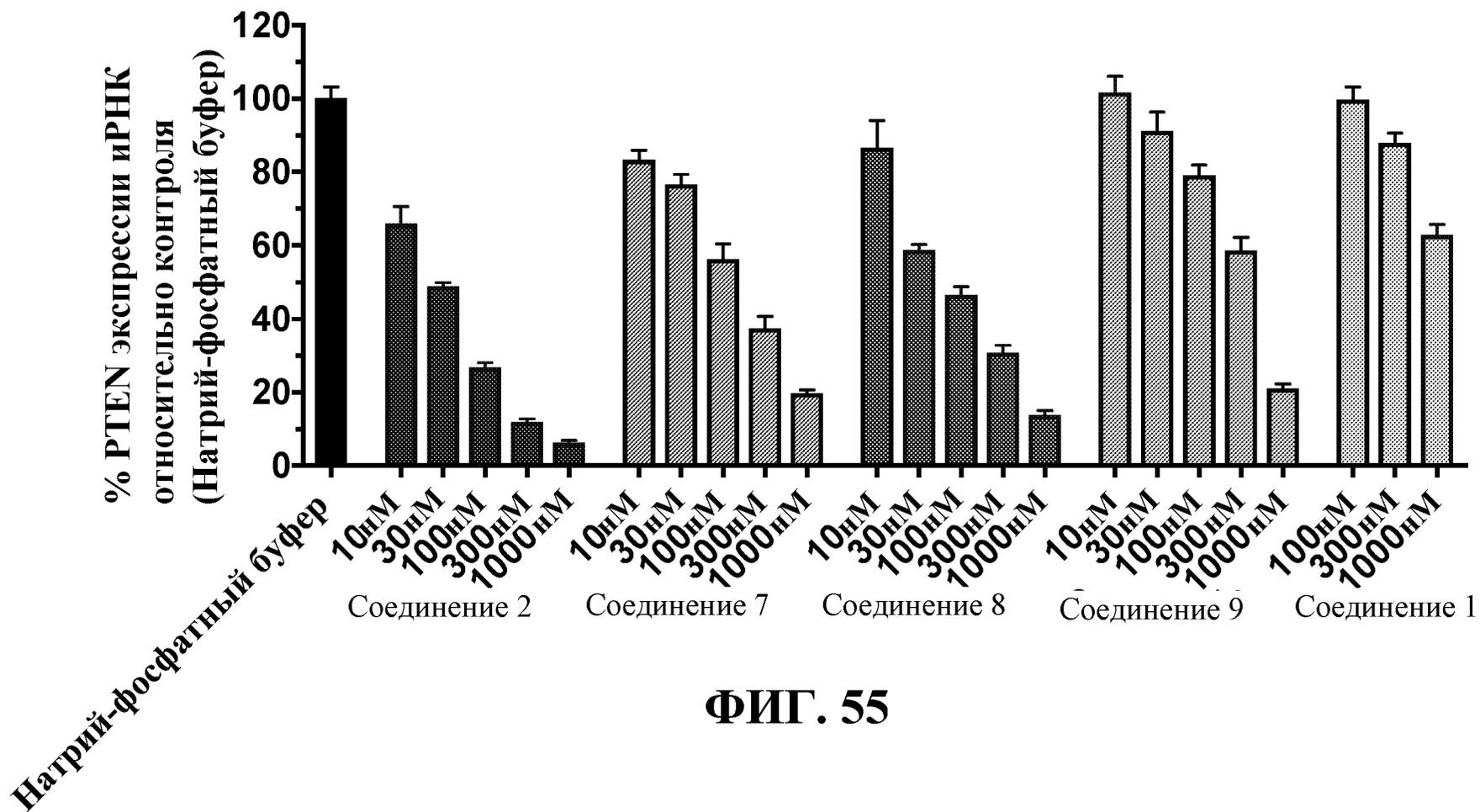


ФИГ. 52



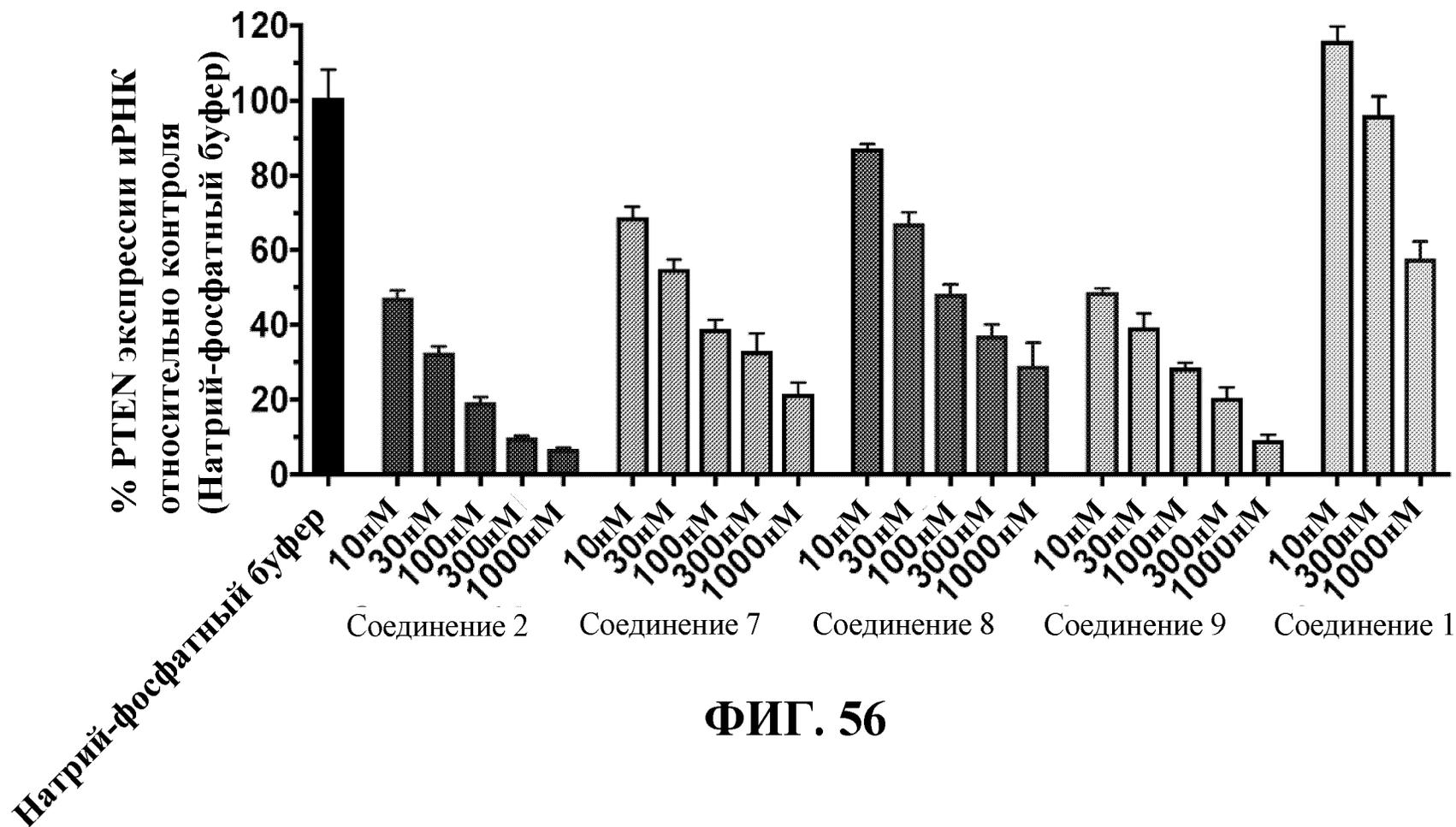


Несвязанное поглощение: первичные человеческие гепатоциты



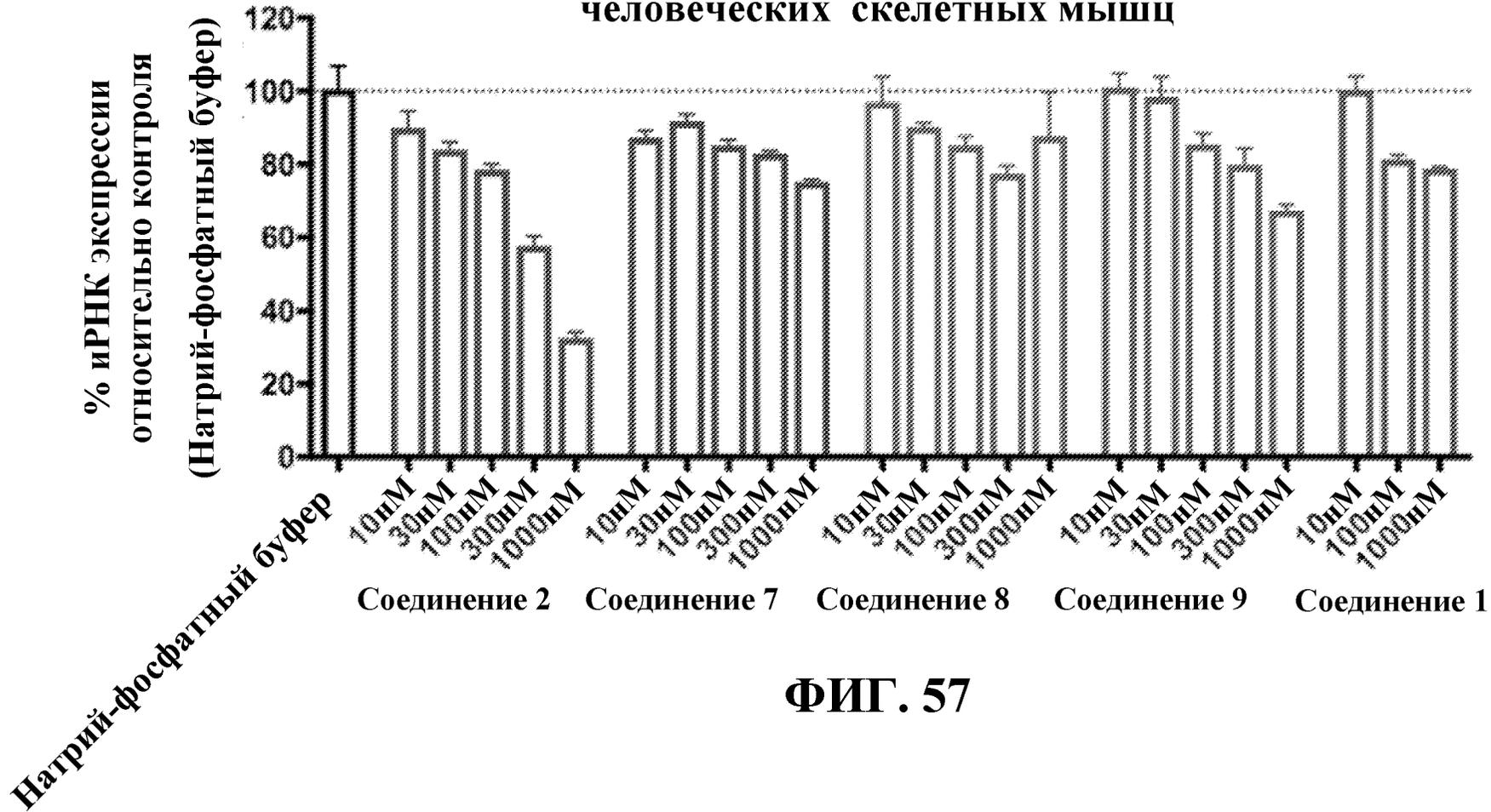
ФИГ. 55

Несвязанное поглощение: первичные человеческие адипоциты (7 дней)



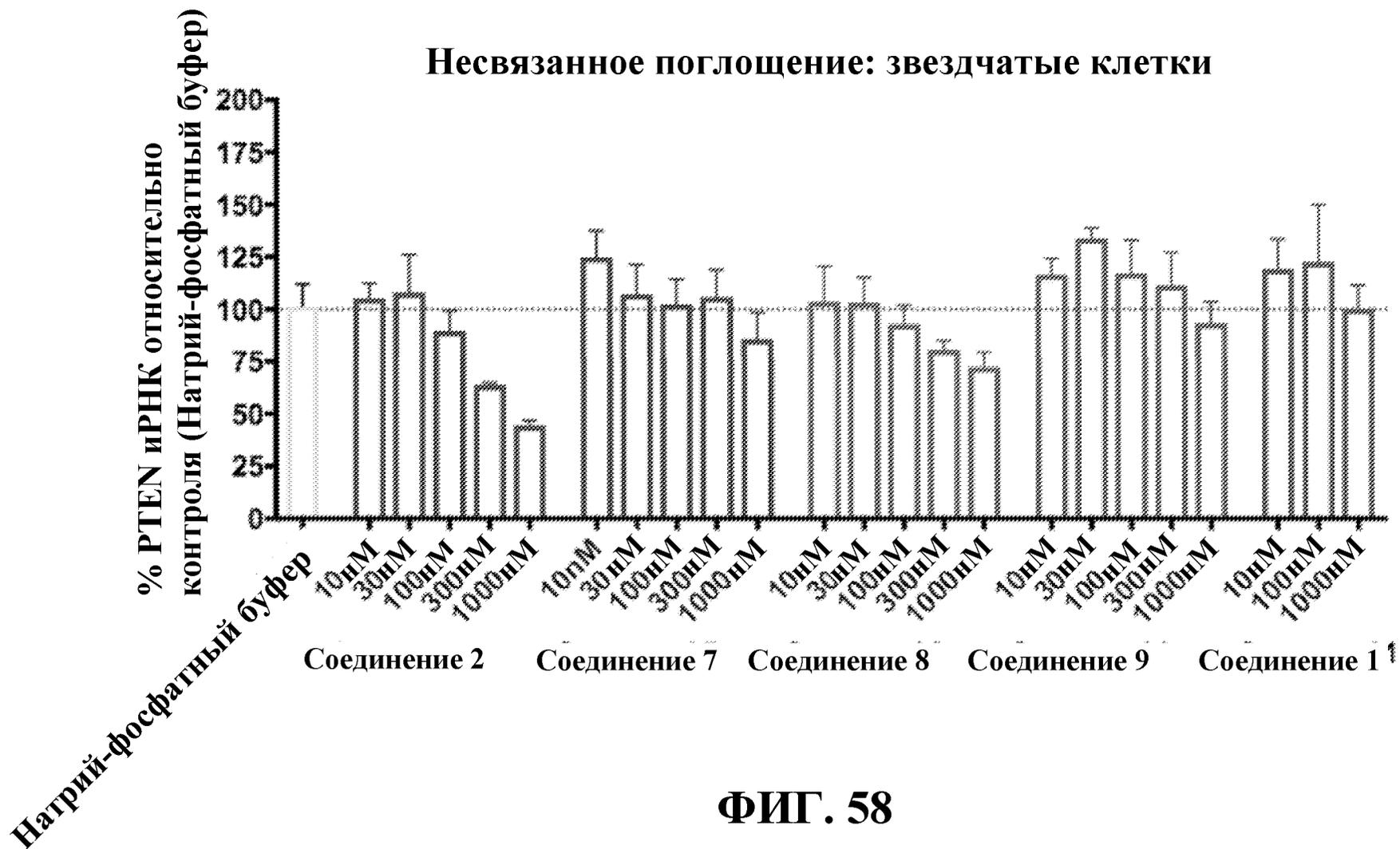
ФИГ. 56

Несвязанное поглощение: первичные клетки  
человеческих скелетных мышц

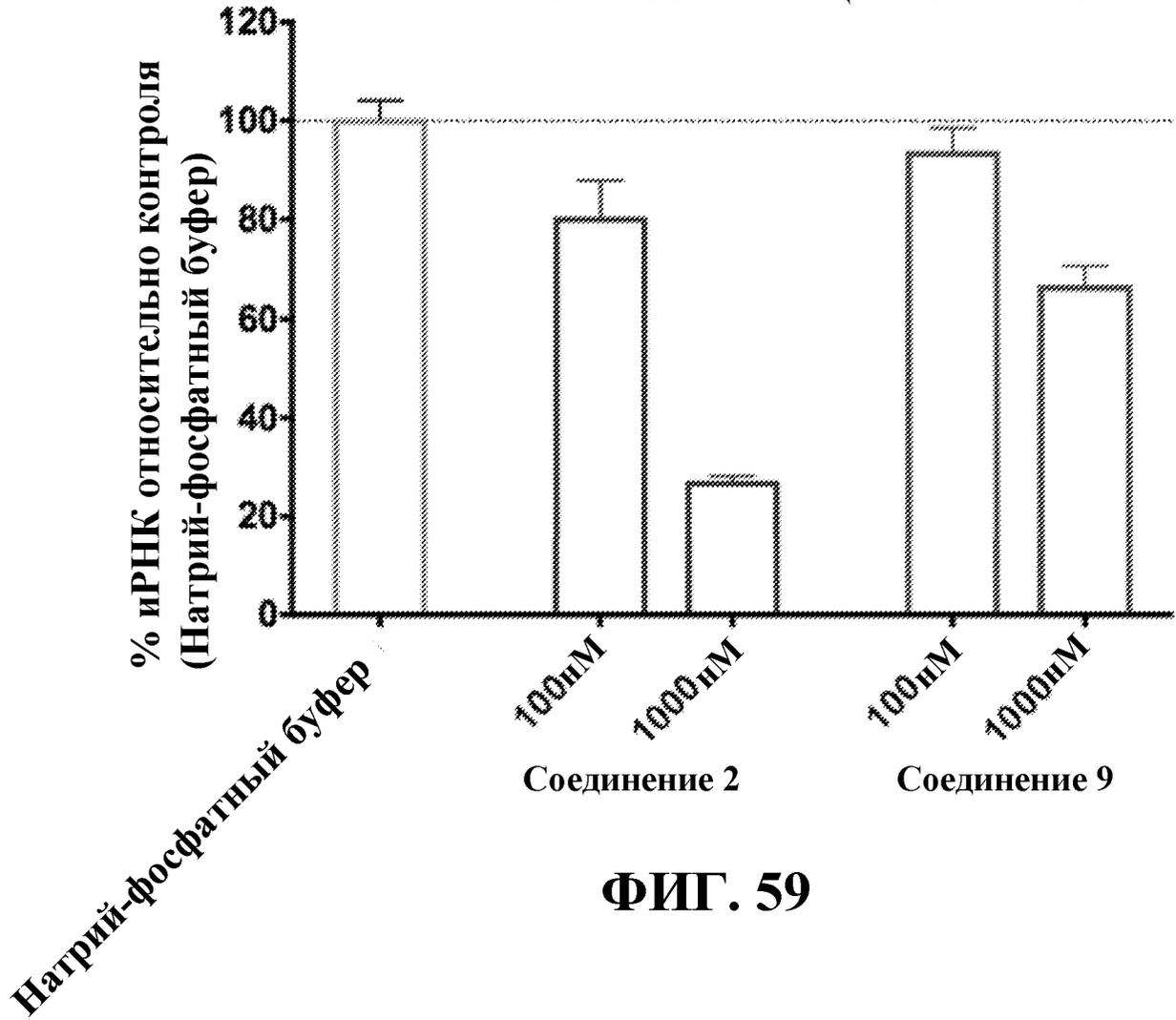


ФИГ. 57

### Несвязанное поглощение: звездчатые клетки

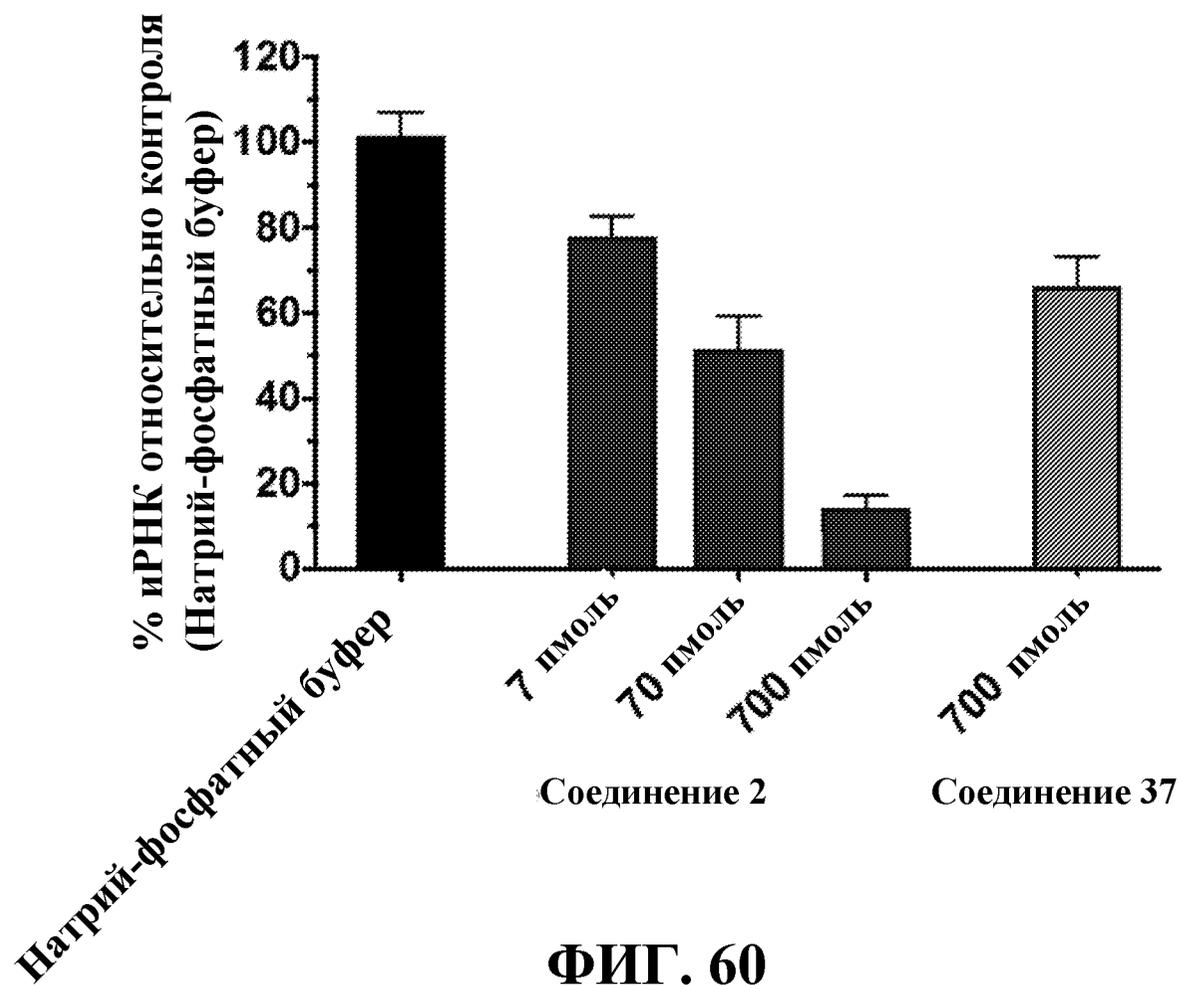


Несвязанное поглощение: Т-клетки

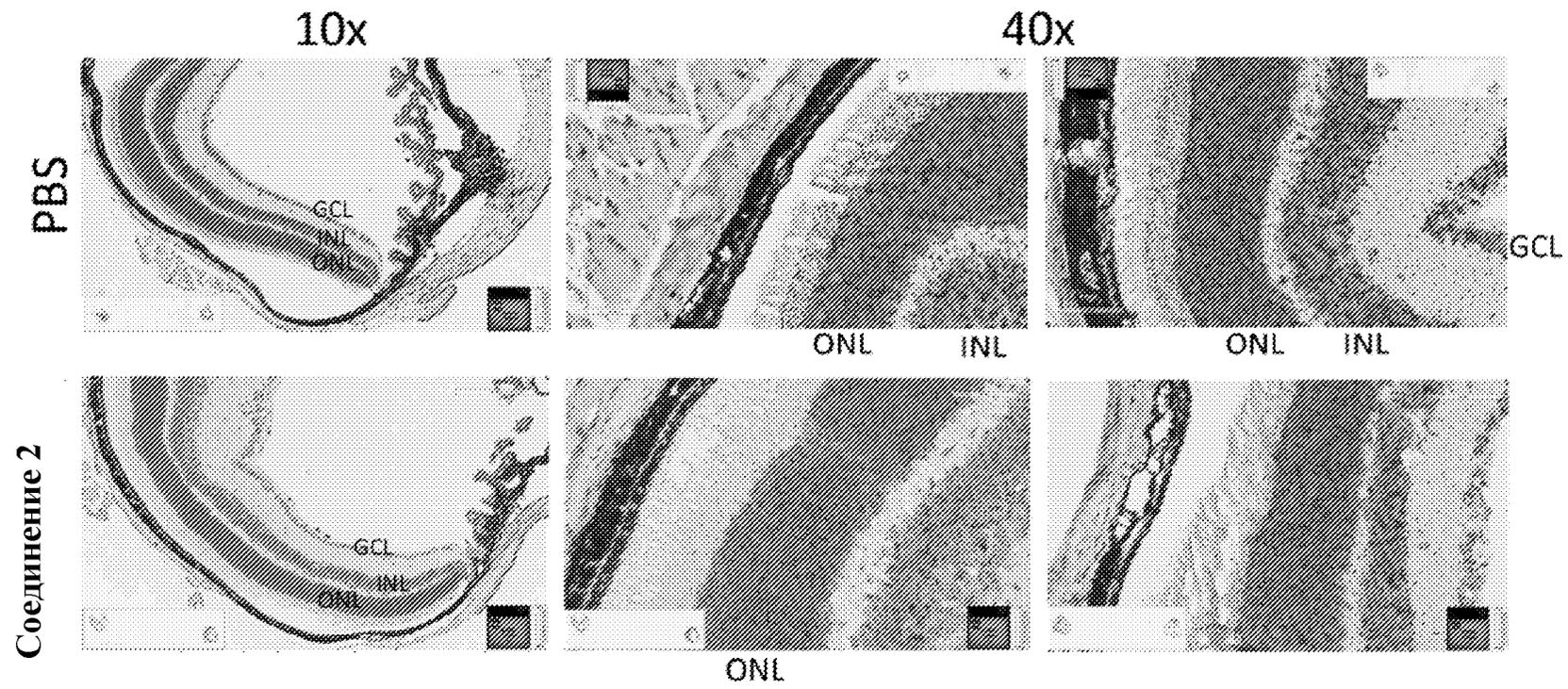


ФИГ. 59

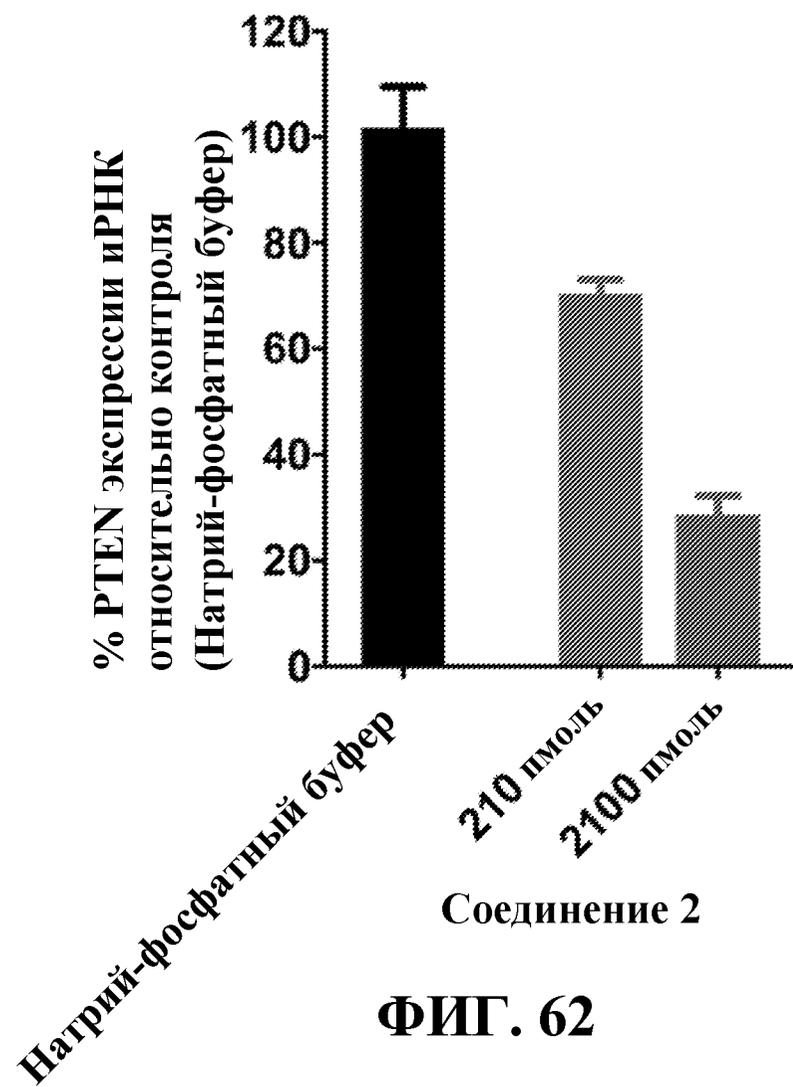
### IVT дозировка: PTEN экспрессия иРНК



ФИГ. 60

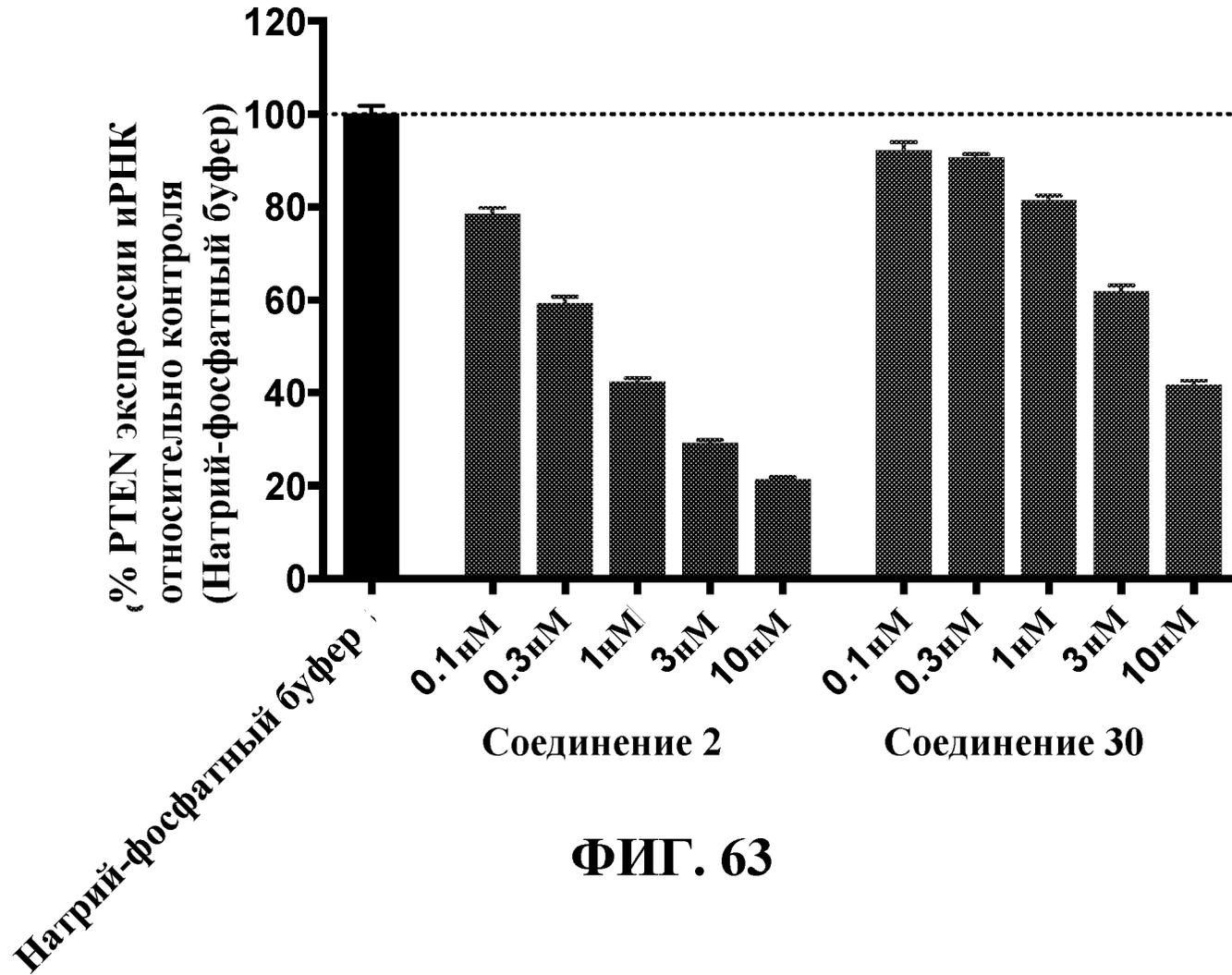


**ФИГ. 61**

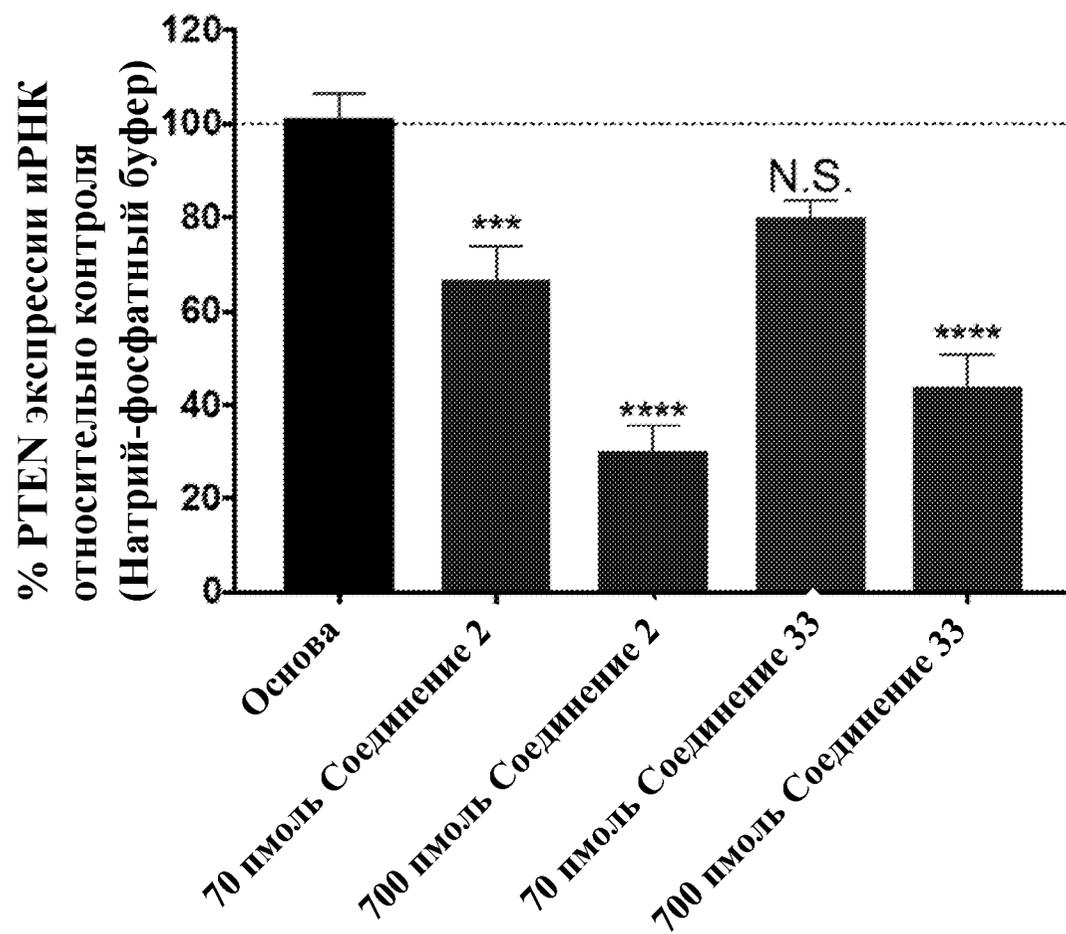


ФИГ. 62

### Трансфекция: НЕК293 клетки

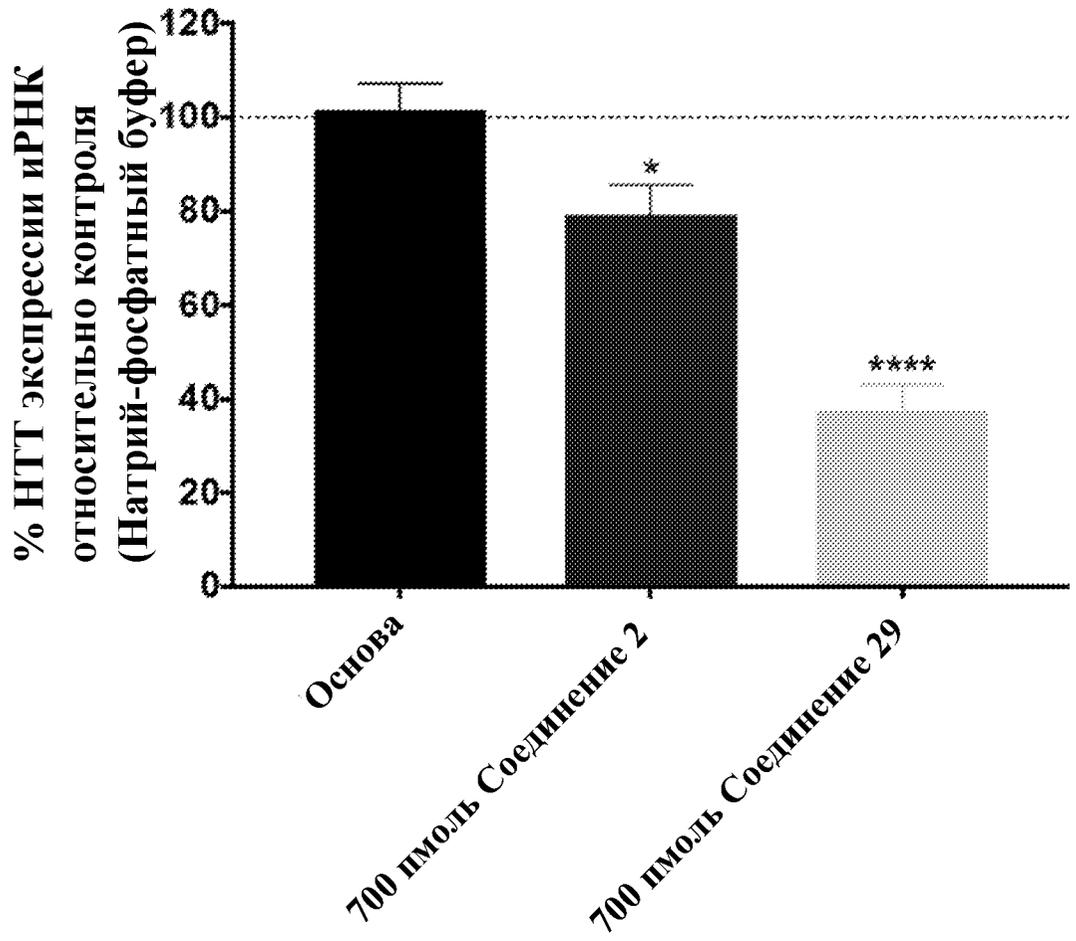


ФИГ. 63



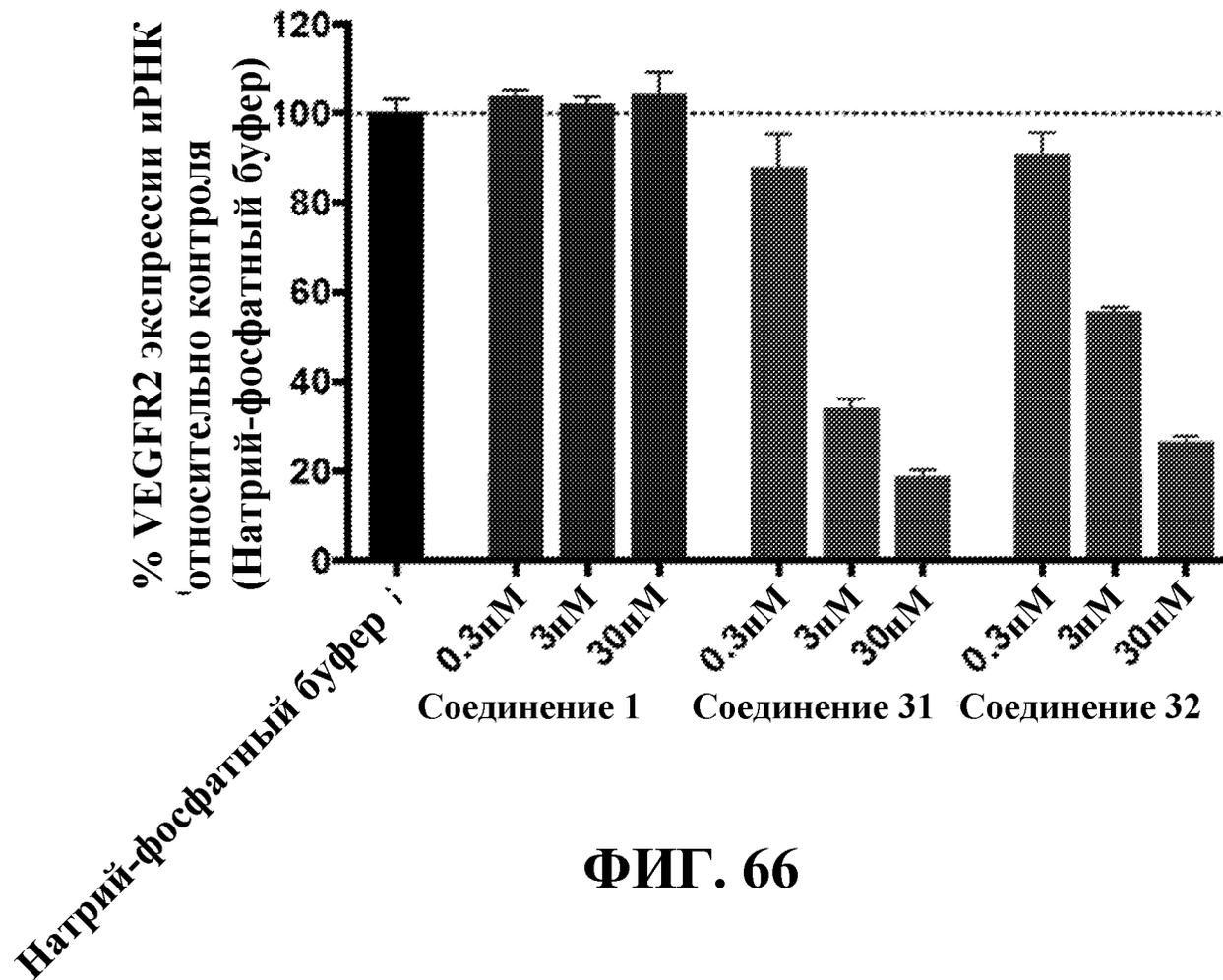
ФИГ. 64

IVT дозировка: НТТ экспрессия иРНК



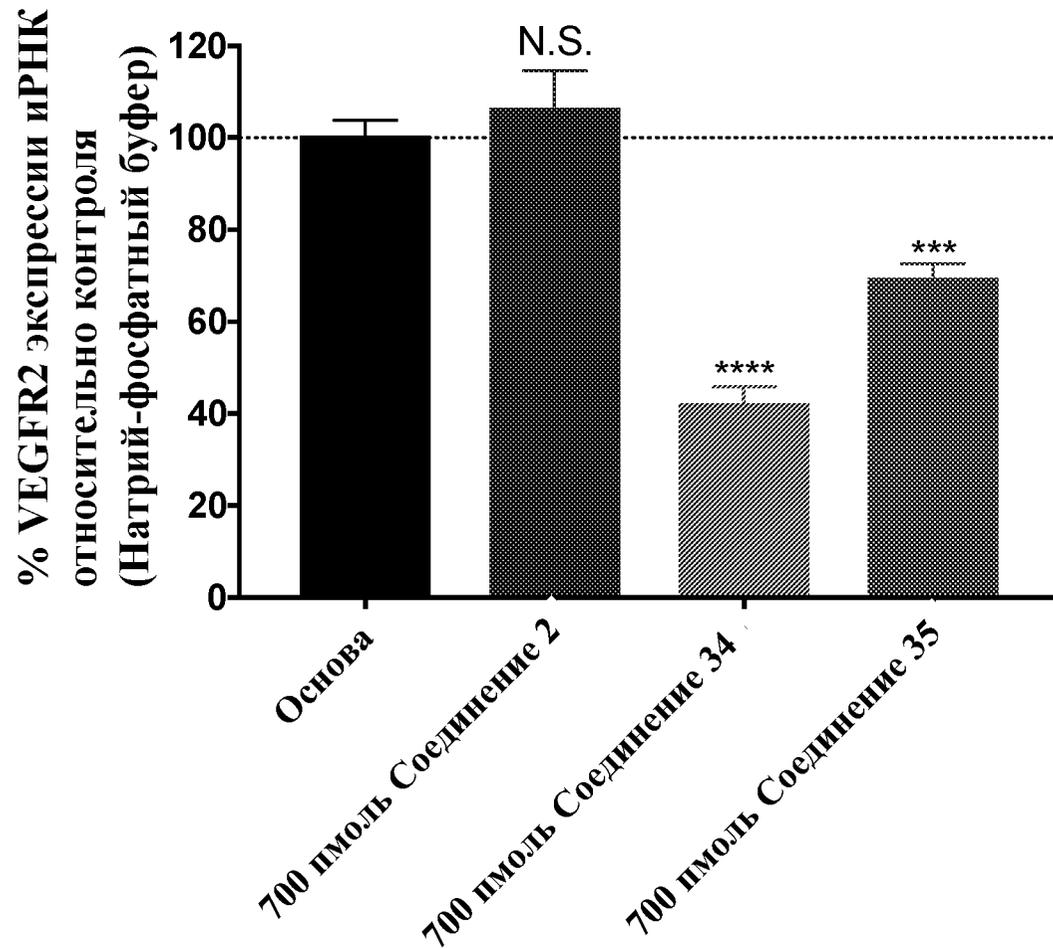
ФИГ. 65

### Трансфекция: BEND клетки



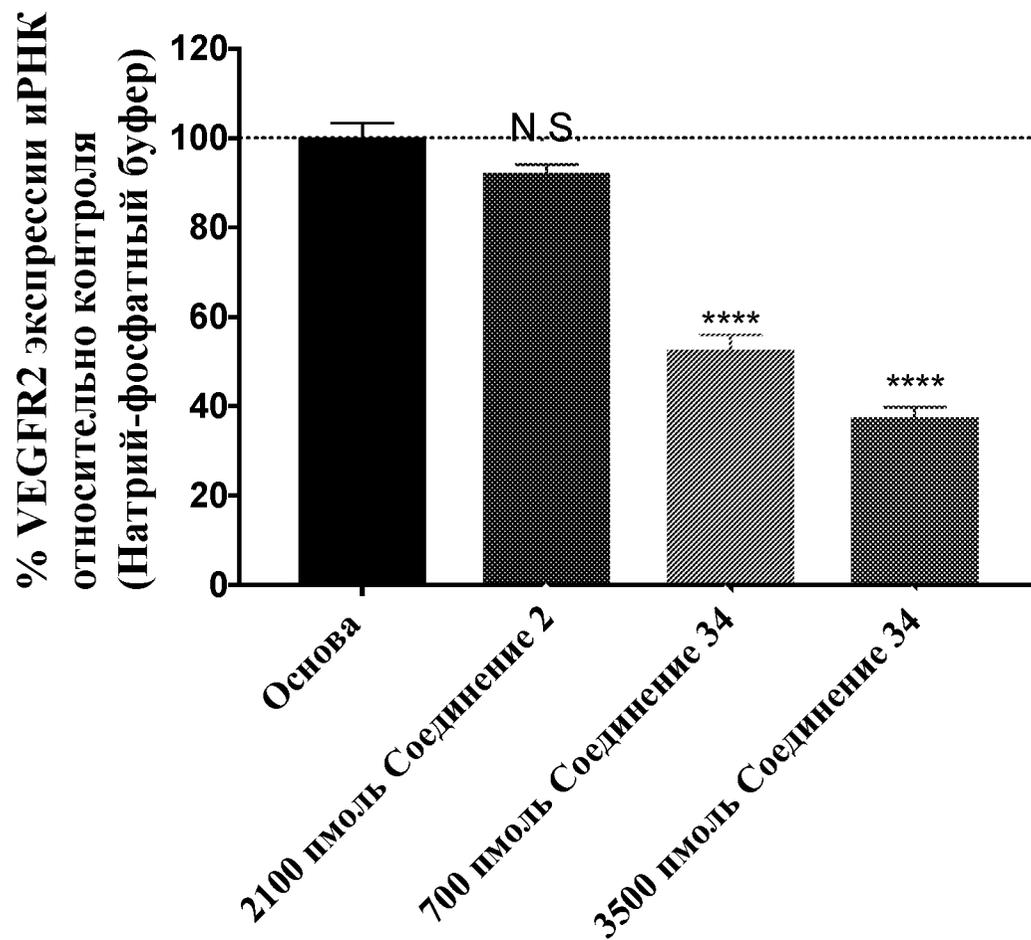
ФИГ. 66

IVT дозировка: VEGFR2 экспрессия иРНК



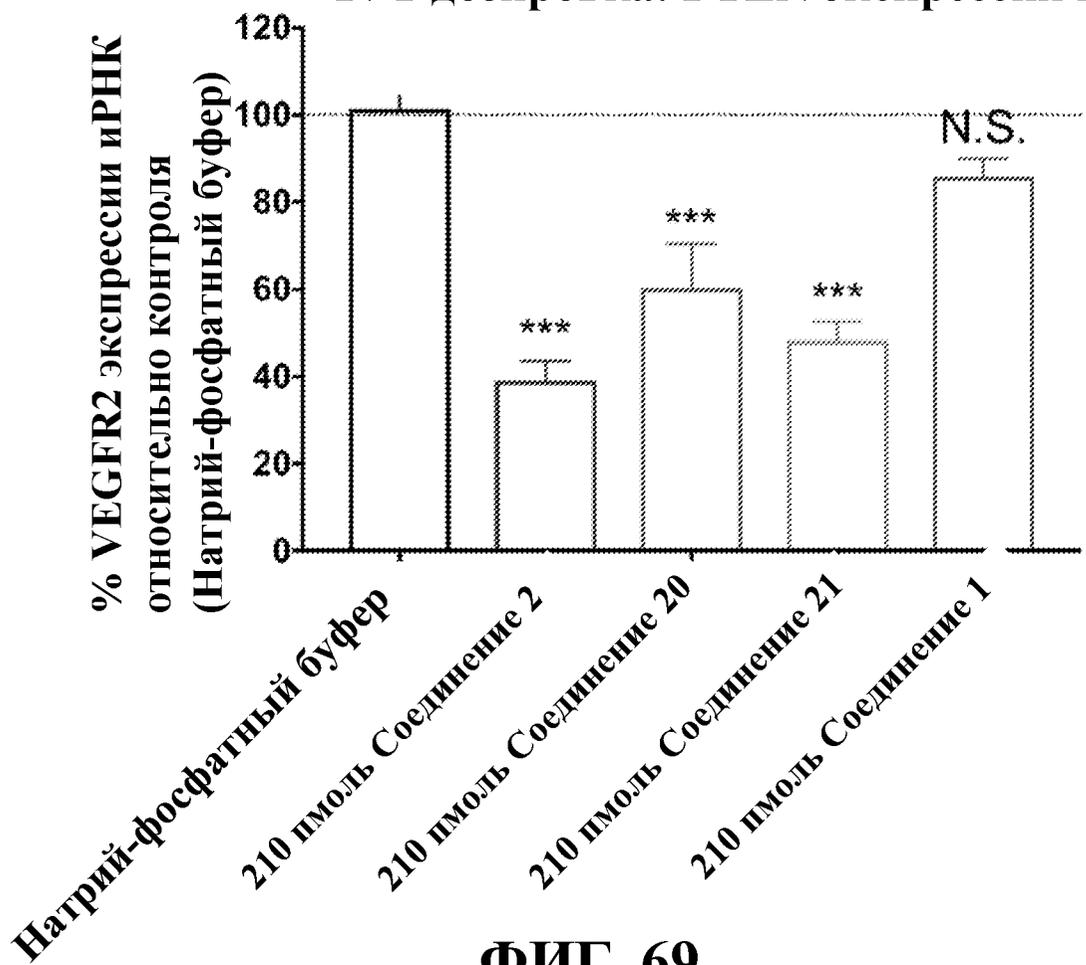
ФИГ. 67

### IVT дозировка: VEGFR2 экспрессия иРНК



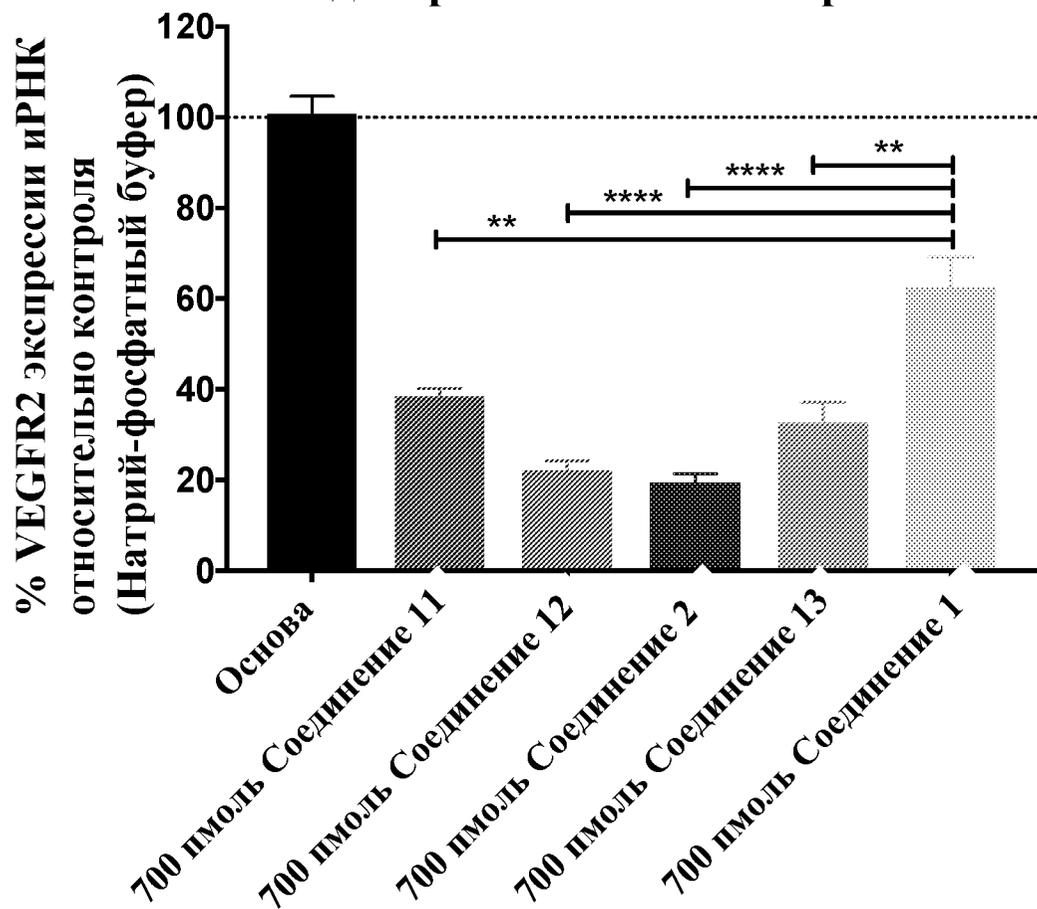
ФИГ. 68

IVT дозировка: PTEN экспрессия иРНК

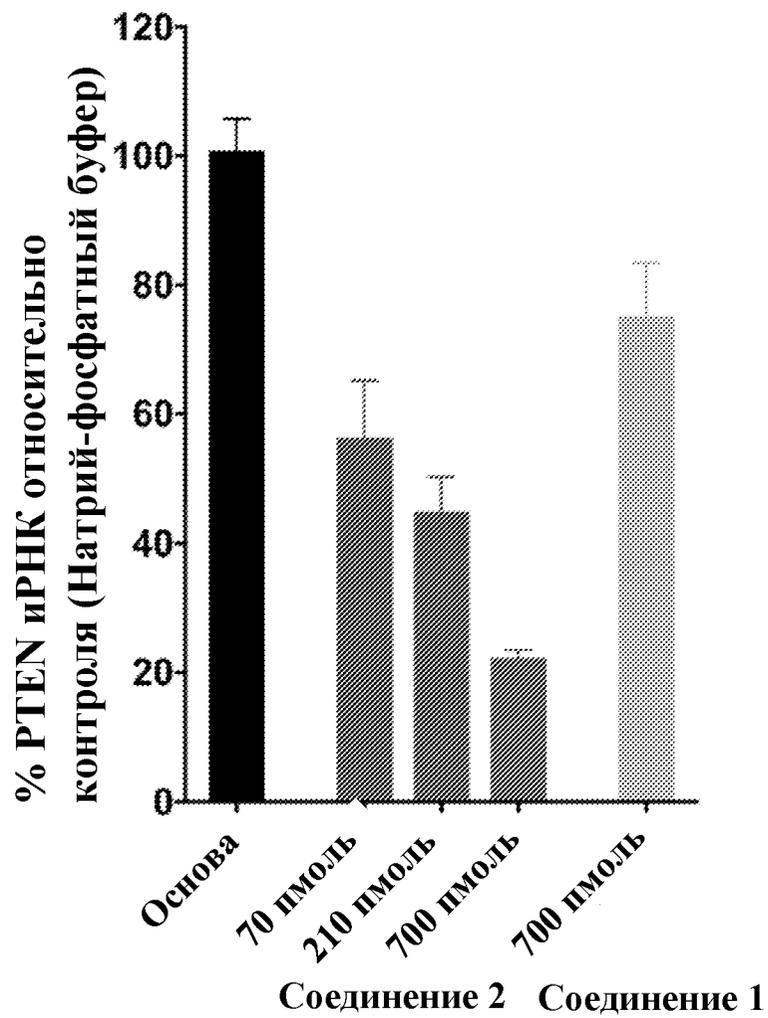


ФИГ. 69

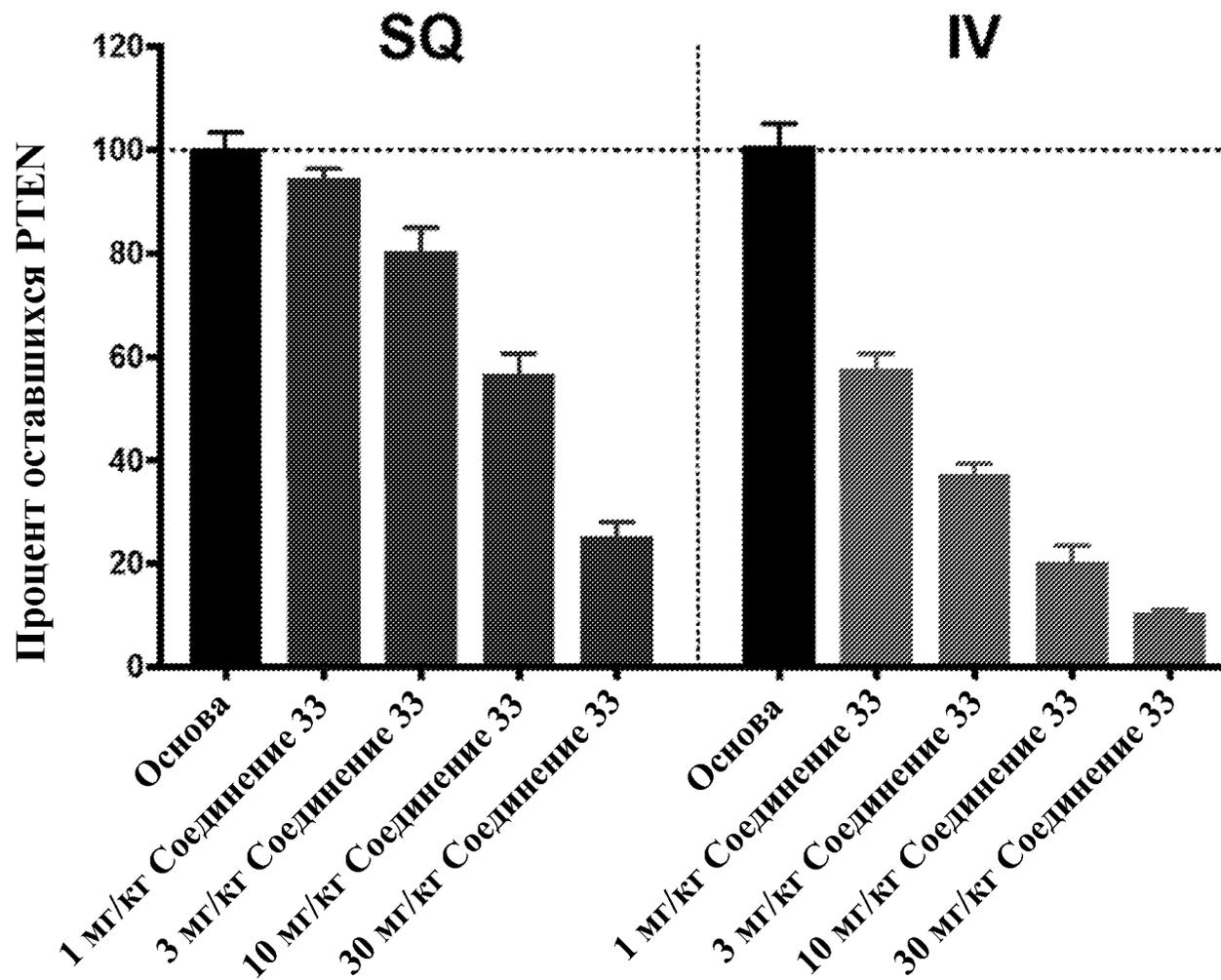
### IVT дозировка: PTEN экспрессия иРНК



ФИГ. 70

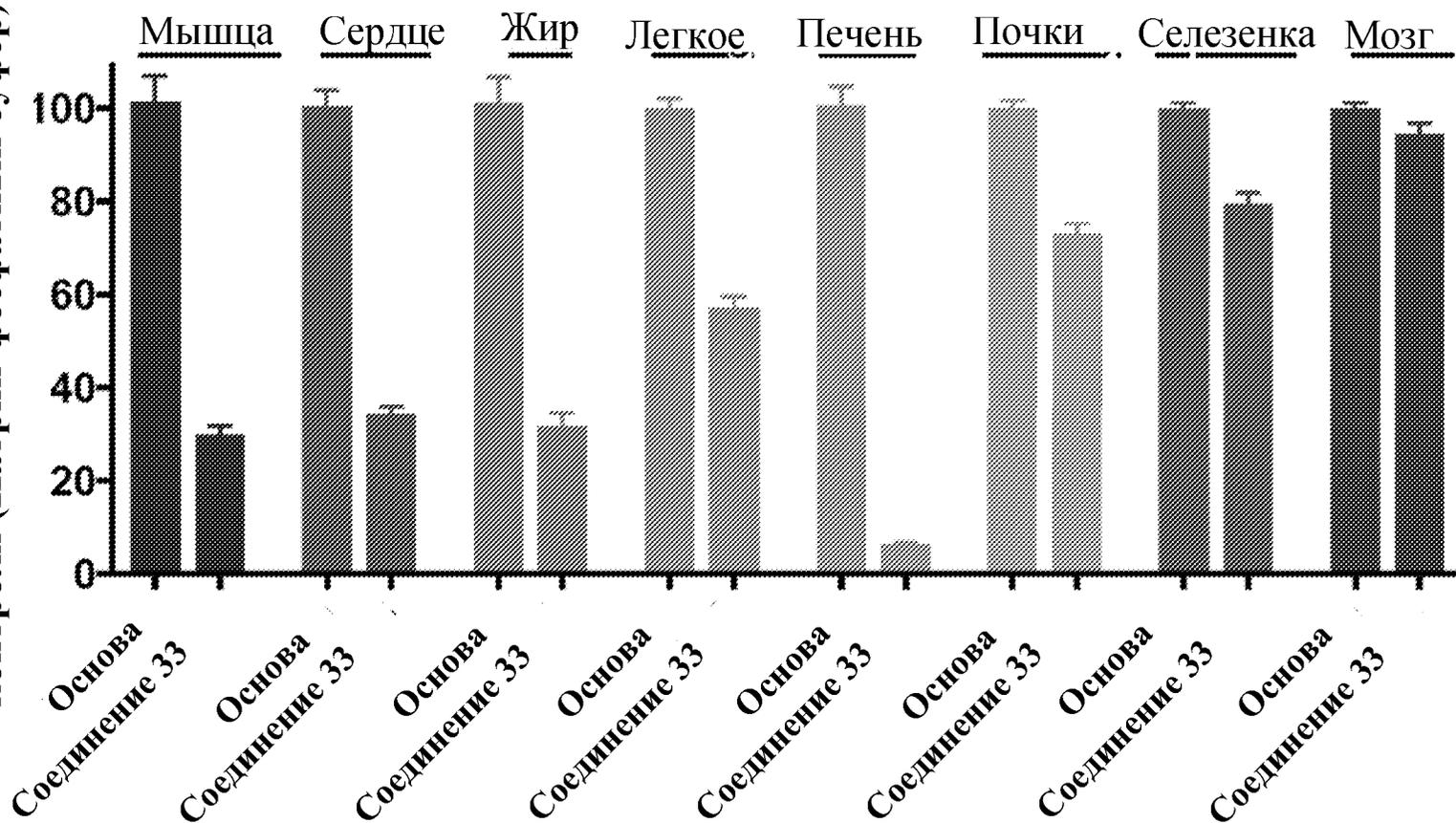


ФИГ. 71



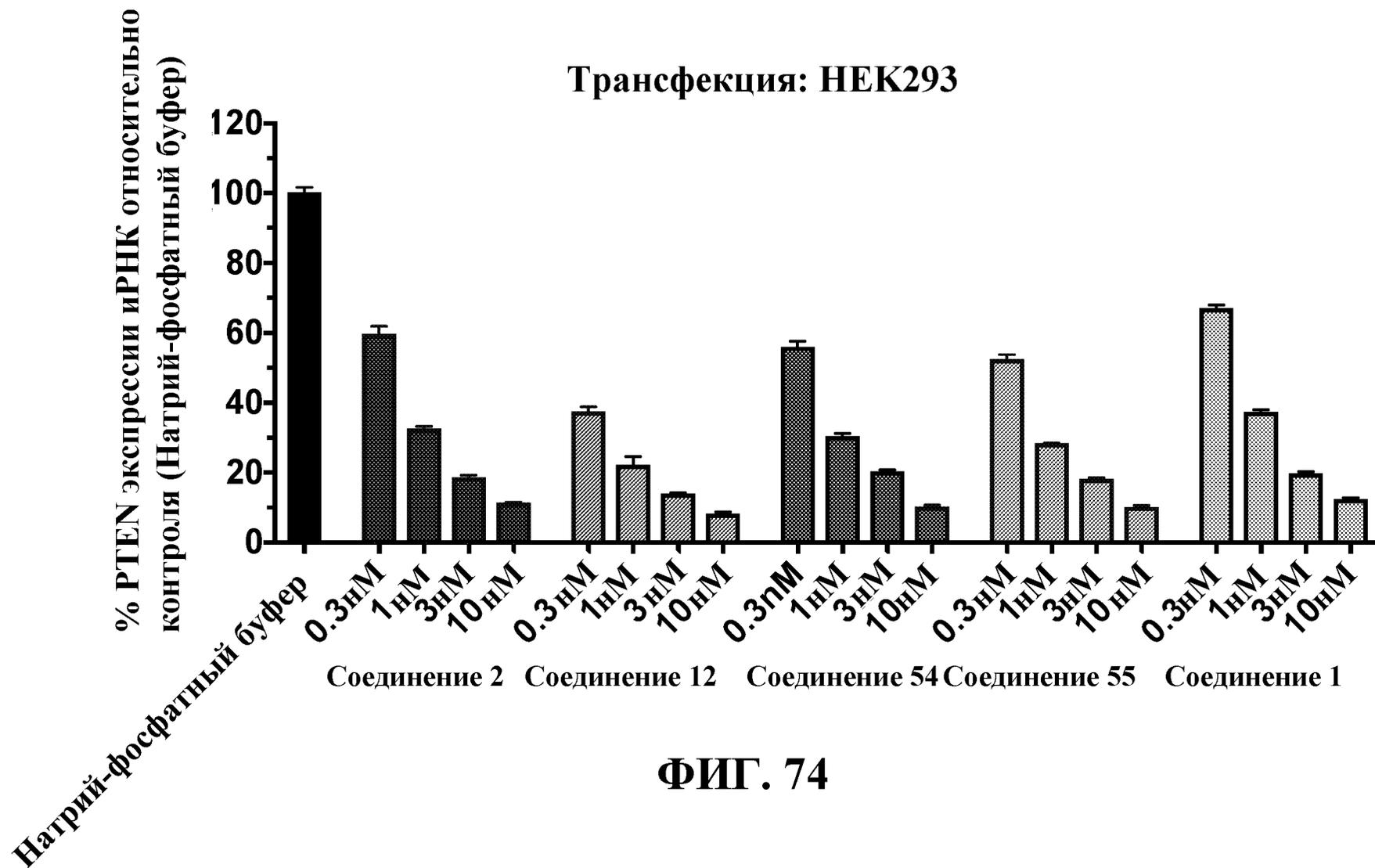
ФИГ. 72

% РТЕН экспрессии иРНК относительно  
контроля (Натрий-фосфатный буфер)



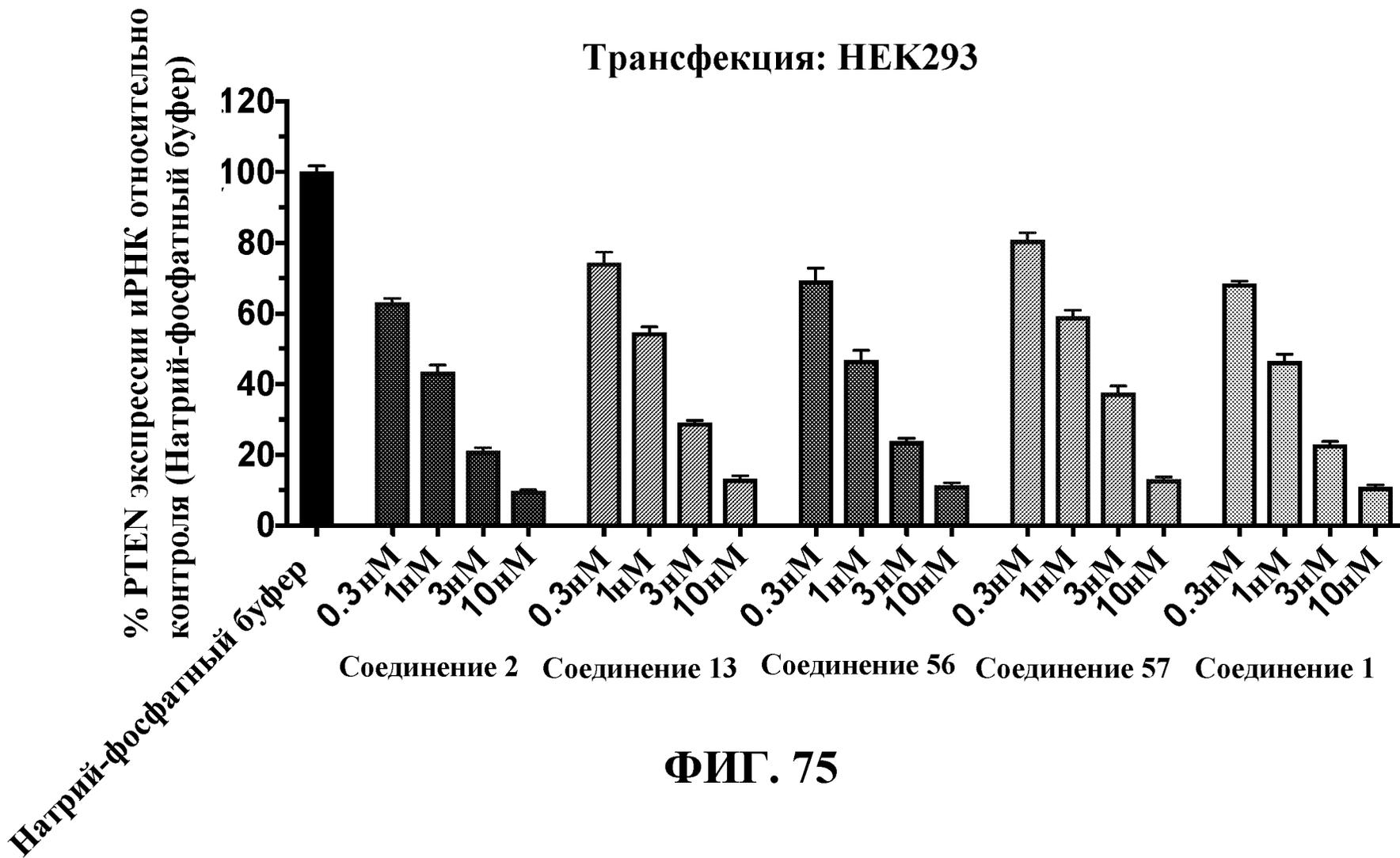
ФИГ. 73

### Трансфекция: НЕК293



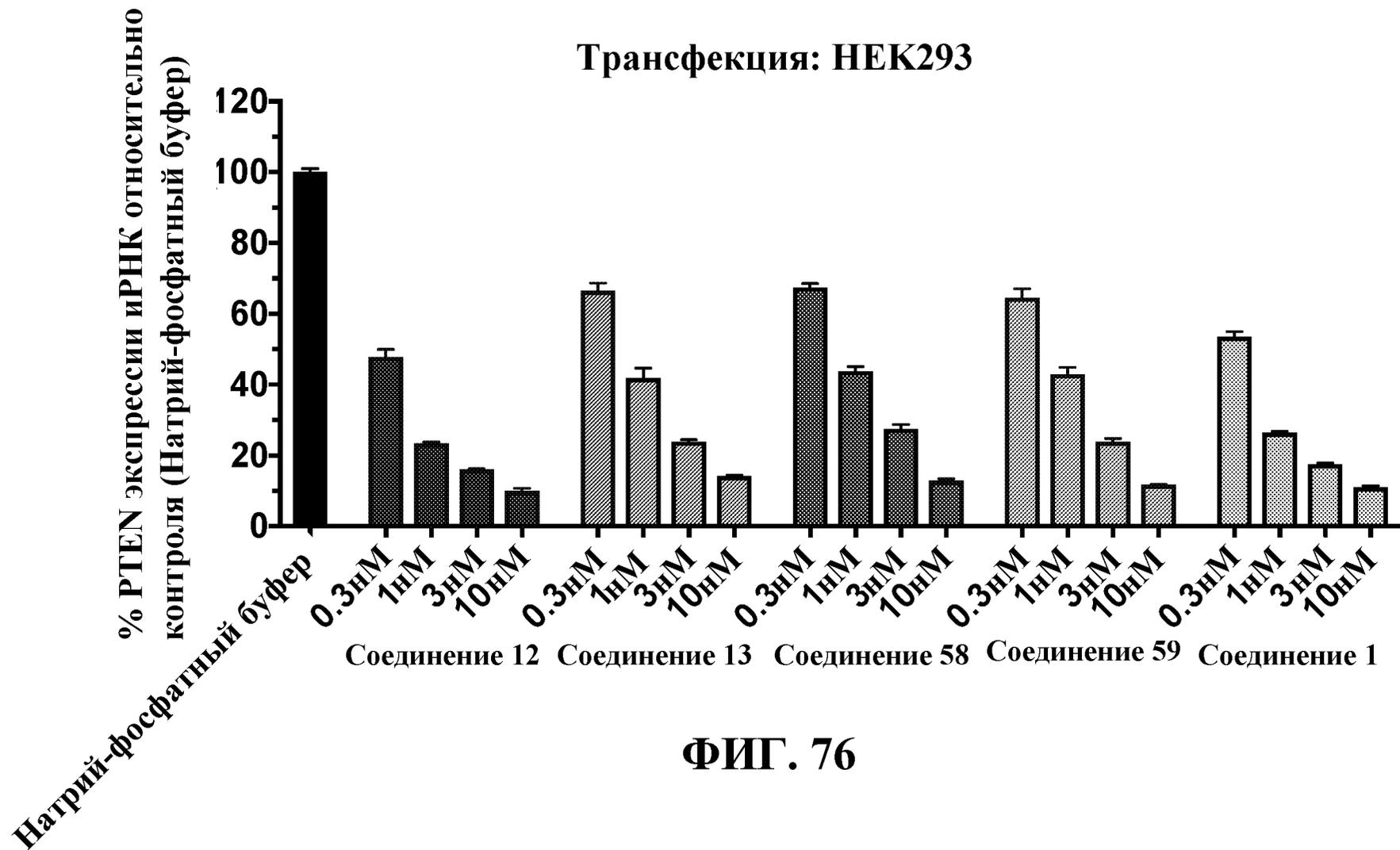
ФИГ. 74

Трансфекция: НЕК293

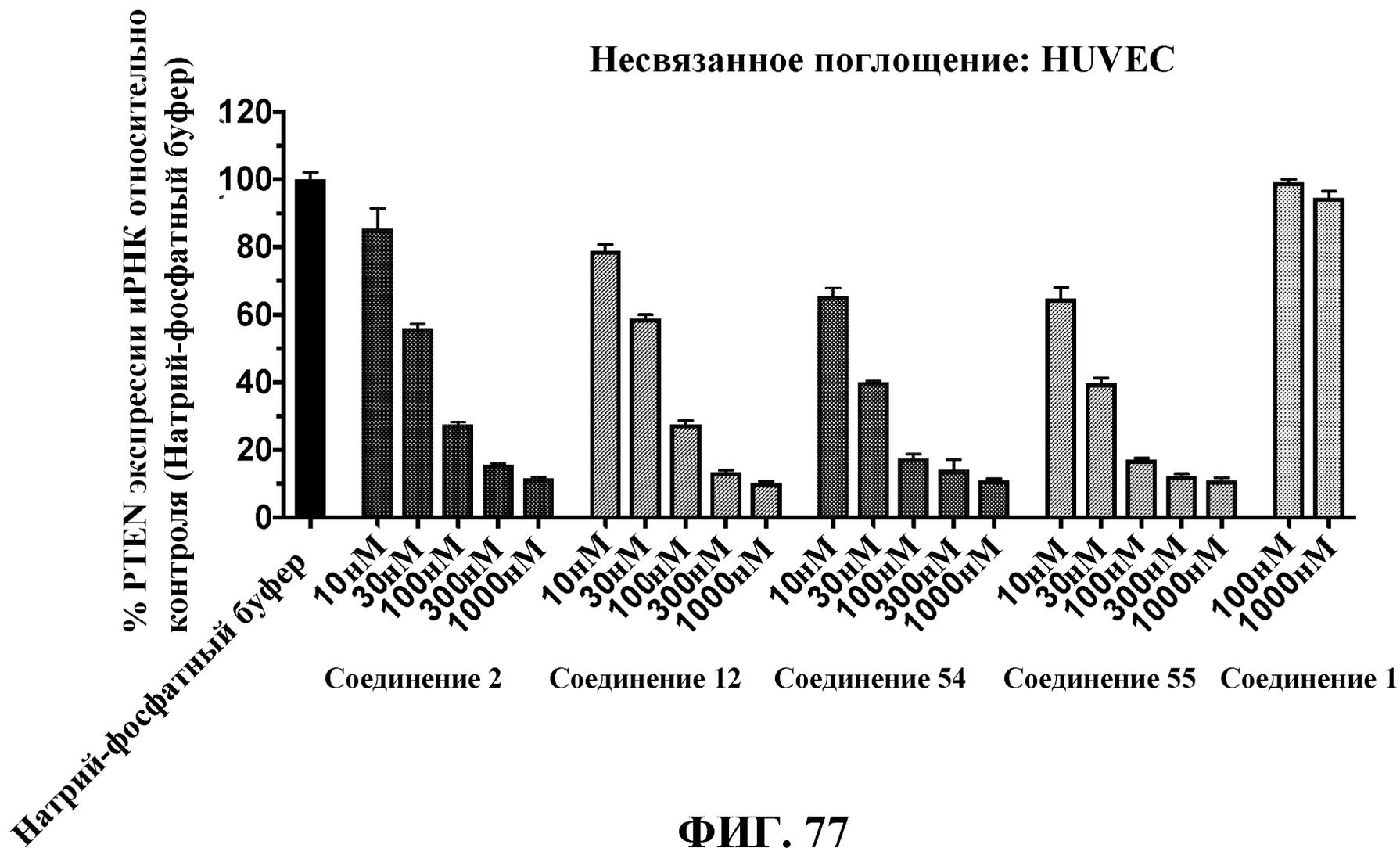


ФИГ. 75

### Трансфекция: НЕК293

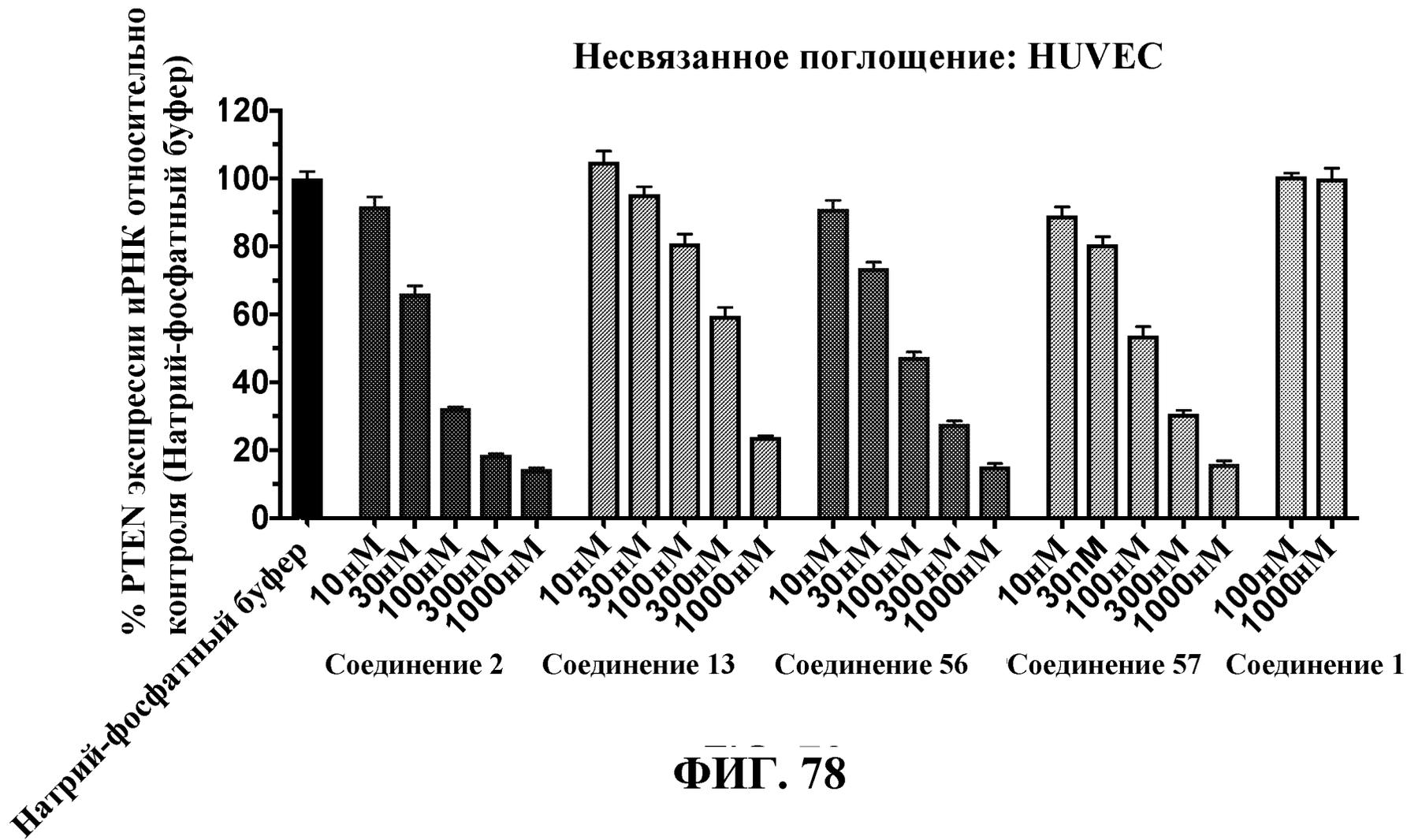


### Несвязанное поглощение: HUVEC



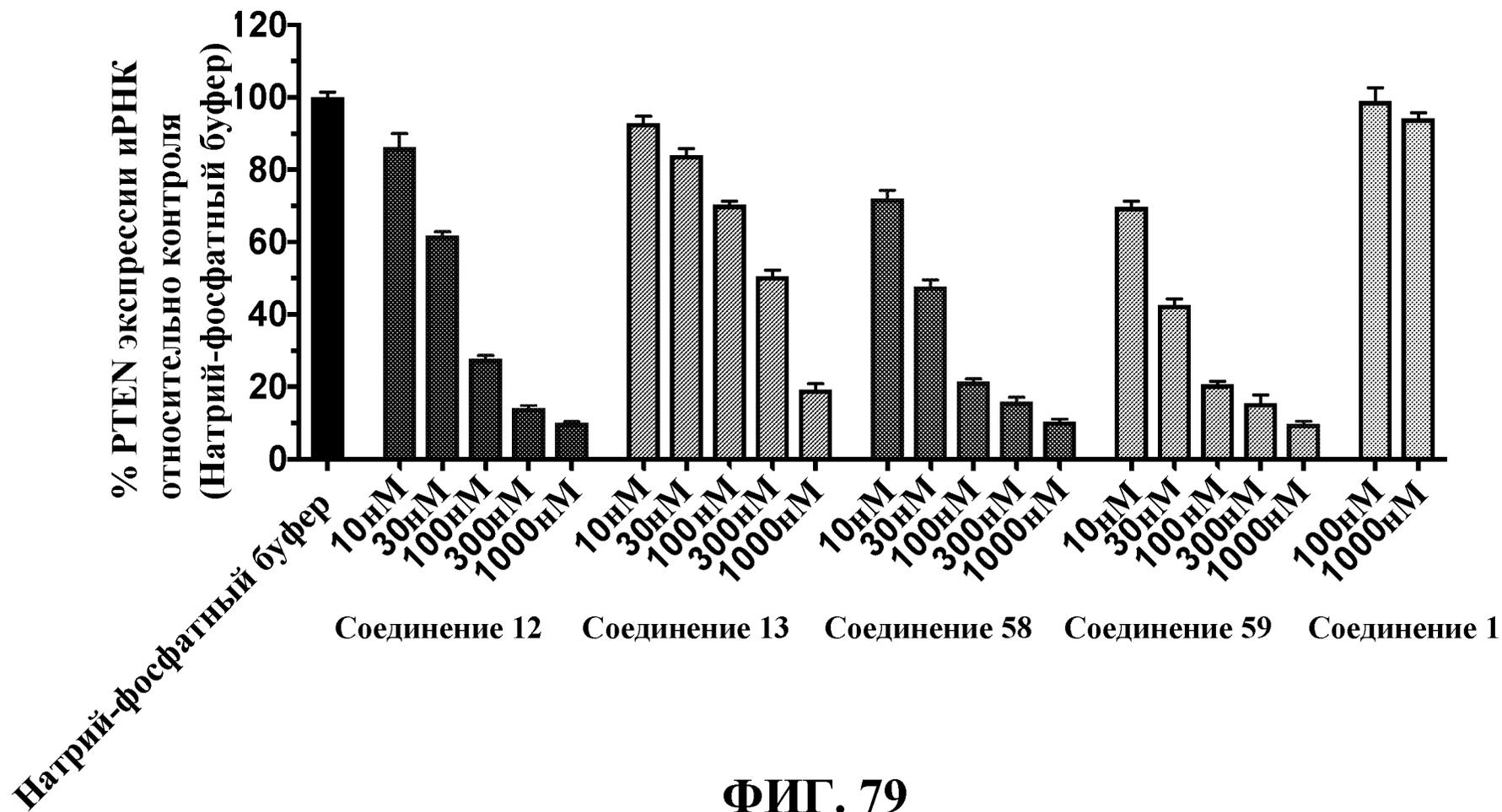
ФИГ. 77

### Несвязанное поглощение: HUVES

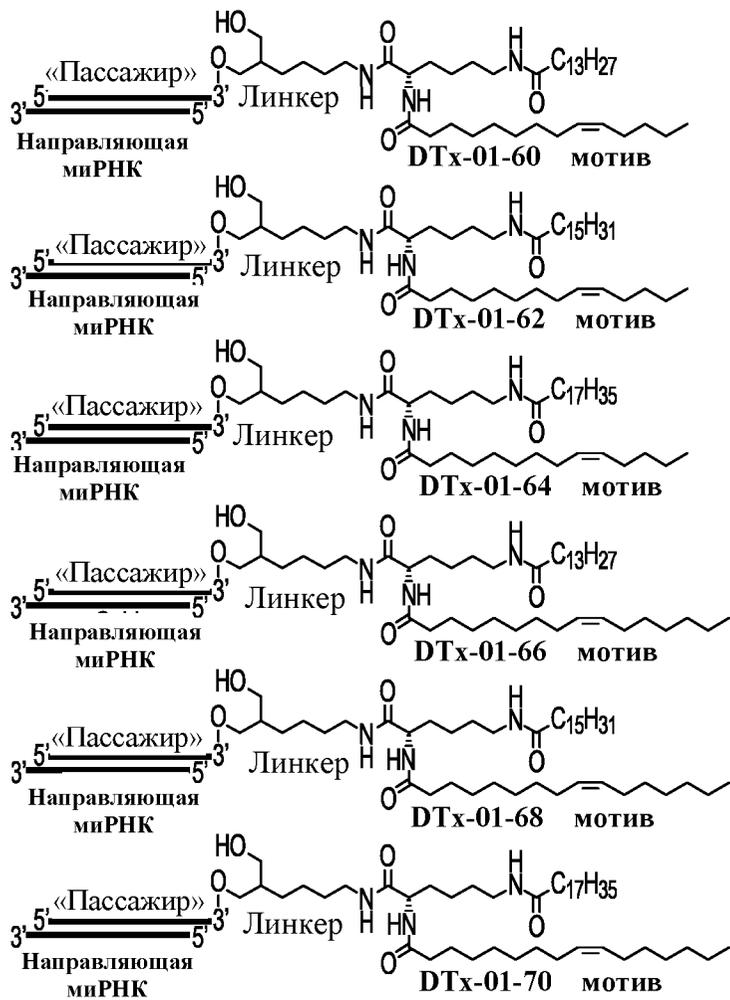


ФИГ. 78

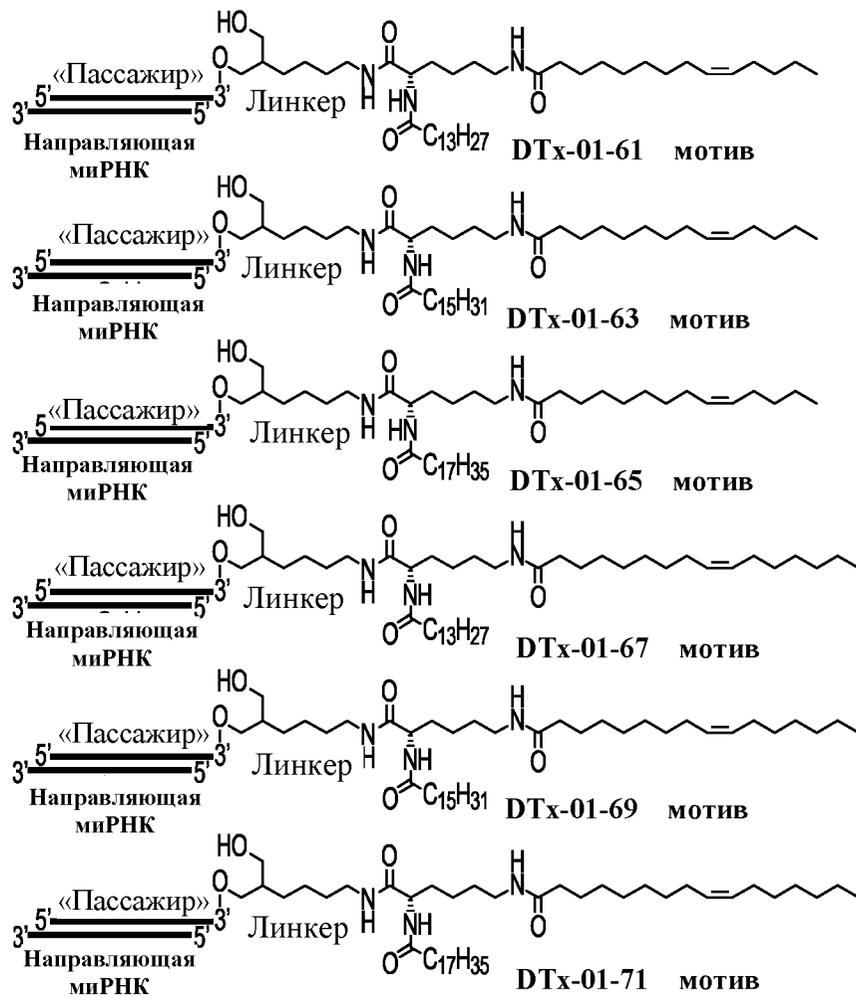
### Несвязанное поглощение: HUVES



Соединение 72 Соединение 74 Соединение 76 Соединение 78 Соединение 80 Соединение 82



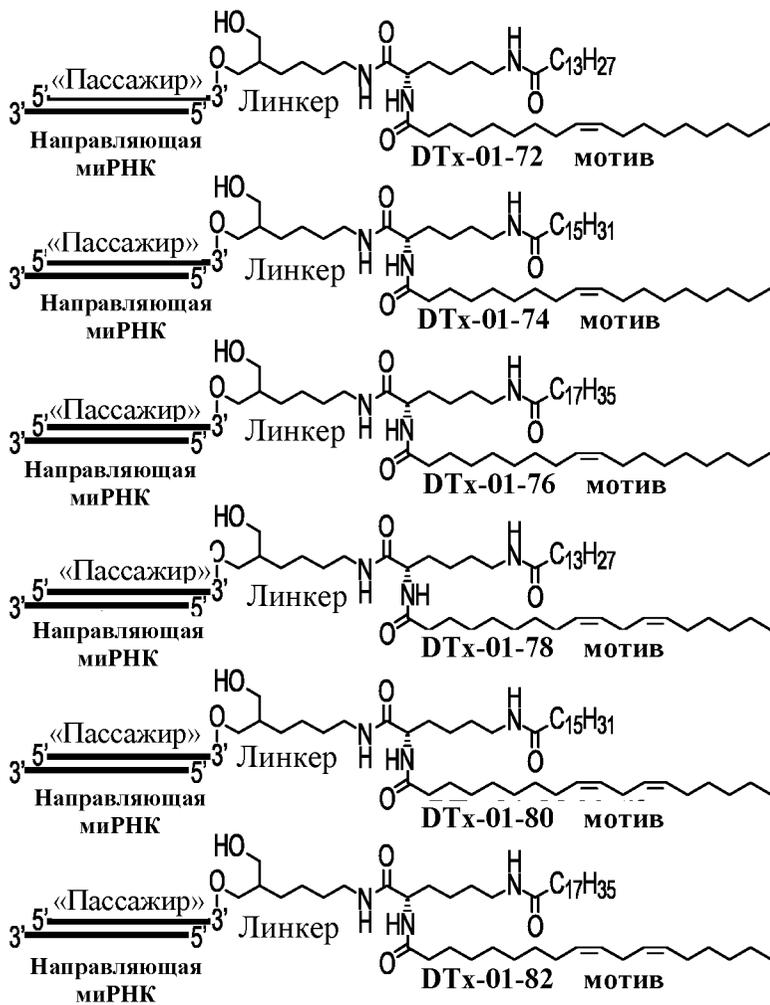
Соединение 75 Соединение 77 Соединение 79 Соединение 81 Соединение 83



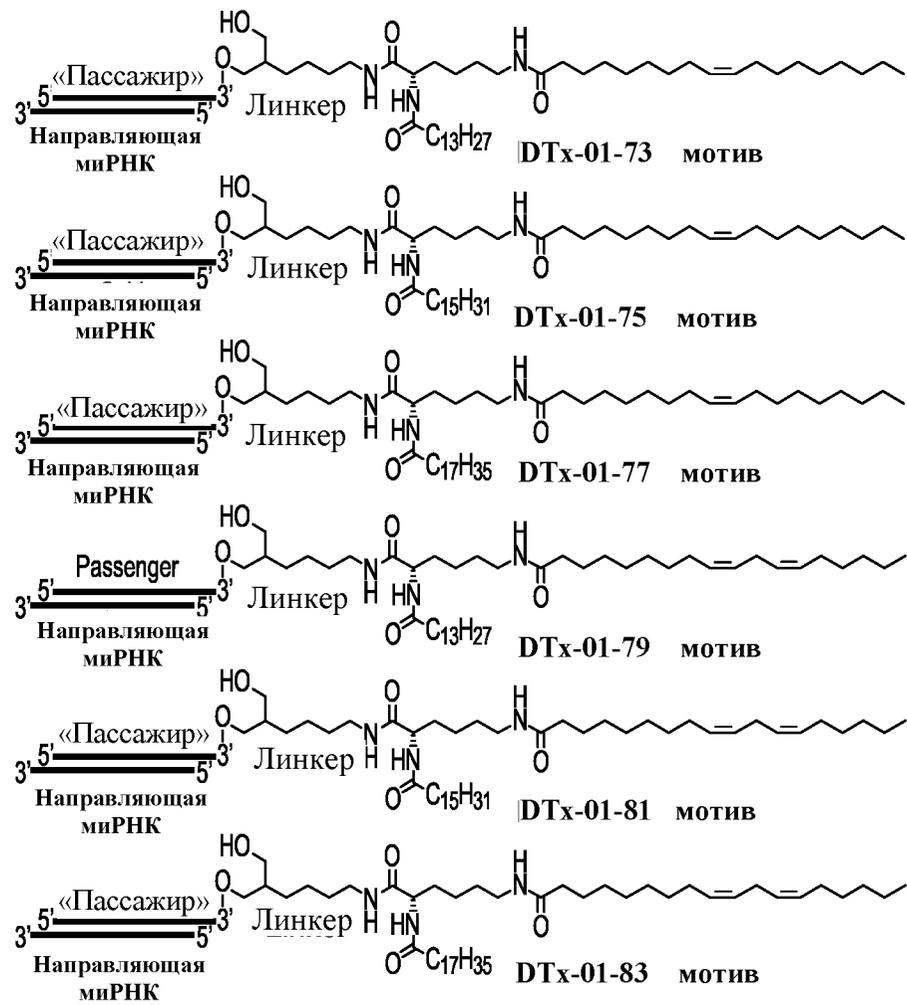
Направляющая  
миРНК

ФИГ. 80

Соединение 94 Соединение 92 Соединение 90 Соединение 88 Соединение 86 Соединение 84



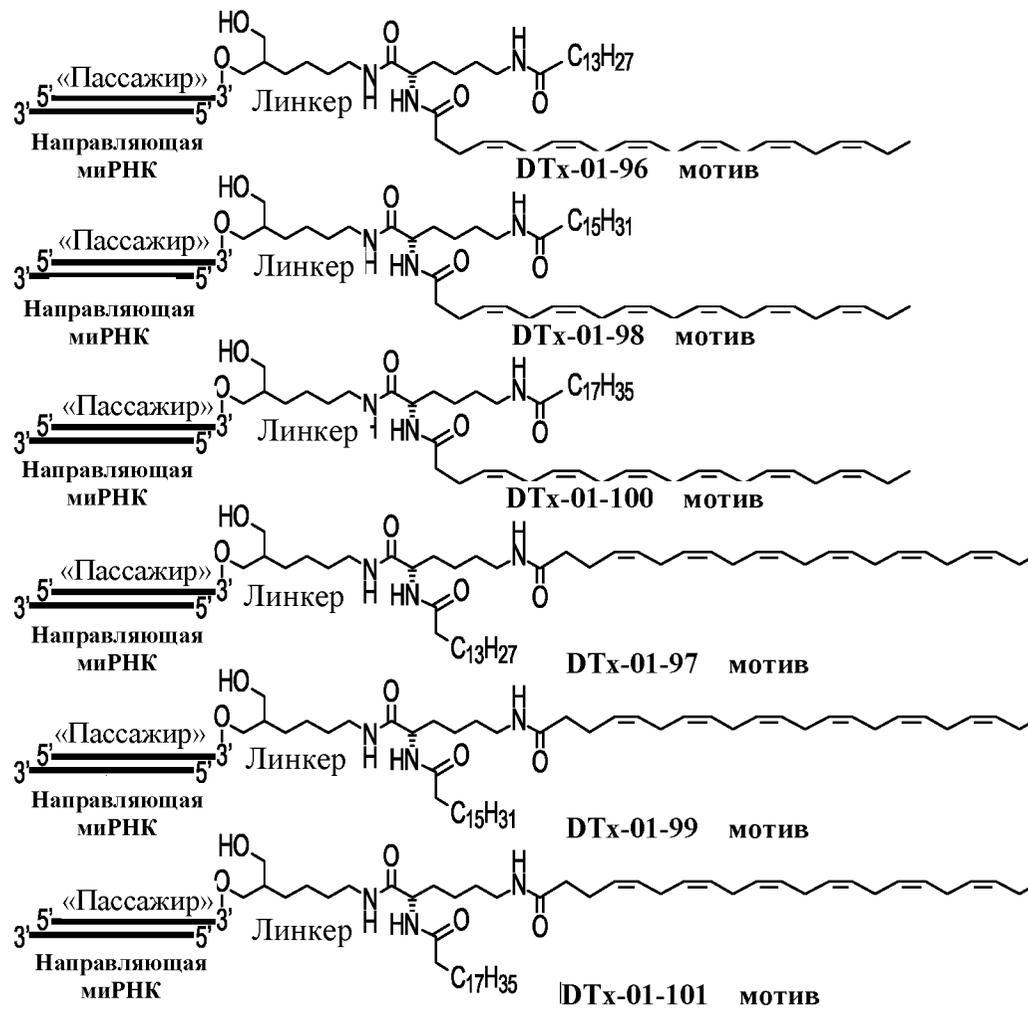
Соединение 95 Соединение 93 Соединение 91 Соединение 89 Соединение 87 Соединение 85



ФИГ. 81



Соединение 113 Соединение 111 Соединение 109 Соединение 112 Соединение 110 Соединение 108



ФИГ. 83