

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292696 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.02(51) Int. Cl. C12N 15/115 (2010.01)
C12N 15/67 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.03.24

(54) АПТАМЕРЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ АНАЛОГИ И ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАМИНА

(31) 62/994,135

(32) 2020.03.24

(33) US

(86) PCT/IB2021/000163

(87) WO 2021/191680 2021.09.30

(71) Заявитель:
МИРАДЖИТИЭКС ЮКЕЙ П
ЛИМИТЕД (GB)

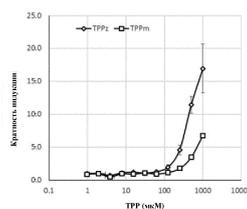
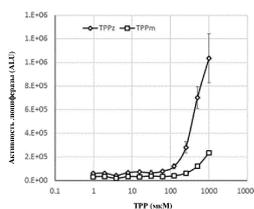
(72) Изобретатель:

Го Сюэцуй, Форбс Александрия, Лю
Кевин Г., Ким Джи-Ин (US)

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к олигонуклеотидным аптамерам, которые связываются с определенными малыми молекулами, включающими в себя аналоги и производные тиамина, и к способам получения аптамеров, которые связываются с такими малыми молекулами. В данном изобретении подразумеваются также РНК-переключатели и полинуклеотидные кассеты, содержащие описанные в данном документе аптамеры. Дополнительно предложены способы применения указанных аптамеров, РНК-переключателей и/или полинуклеотида для регуляции генов-мишеней, включая терапевтические гены. В изобретении дополнительно предложены малые молекулы, которые являются модуляторами экспрессии гена-мишени, причем ген-мишень содержит РНК-переключатель, содержащий описанный в данном документе аптамер.



A1

202292696

202292696

A1

АПТАМЕРЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ АНАЛОГИ И ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАМИНА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет по заявке США № 62/994,135, поданной 24 марта 2020 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее раскрытие относится к олигонуклеотидным аптамерам, которые связываются с определенными малыми молекулами, и к способам получения аптамеров, которые связываются с такими малыми молекулами. В данном изобретении подразумеваются также РНК-переключатели и полинуклеотидные кассеты для регуляции экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит описанный в данном документе аптамер. Дополнительно предложены малые молекулы, которые являются модуляторами экспрессии гена-мишени, причем ген-мишень содержит РНК-переключатель, содержащий описанный в данном документе аптамер.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Аптамерами являются олигонуклеотиды, которые связываются с лигандом-мишенью с высокой аффинностью и специфичностью. Эти последовательности нуклеиновых кислот доказали свою высокую терапевтическую и диагностическую ценность: недавно FDA одобрило первый аптамерный препарат, и еще несколько лекарственных препаратов находятся в клинической разработке. Благодаря высокой степени специфичности и универсальности РНК-аптамеры стали одним из основных инструментов развивающейся области РНК-нанотехнологий для борьбы с заболеваниями человека, включая рак, вирусные инфекции и другие болезни.

[0004] Кроме того, аптамеры могут использовать как часть РНК-переключателя, который оказывает определенное воздействие в присутствии или отсутствии лиганда аптамера. Например, РНК-переключатели могут применять для регулирования экспрессии генов в ответ на присутствие или отсутствие лиганда аптамера.

[0005] Тем не менее, аптамер, полученный из прокариотических источников или созданный с использованием способа отбора *in vitro*, часто не способен продемонстрировать функциональность, требующуюся для экспрессии терапевтических

генов-мишеней в эукариотических системах. По существу, имеется потребность в новых аптамерных последовательностях, способных регулировать экспрессию генов в ответ на присутствие или отсутствие низкомолекулярного лиганда.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В данном документе предложены аптамерные последовательности, которые связываются с малыми молекулами, такими как тиамин пирирофосфат (ТРР) и его аналоги или производные. В данном изобретении подразумеваются также РНК-переключатели и полинуклеотидные кассеты для регуляции экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит описанный в данном документе аптамер. Дополнительно предложены способы применения указанных аптамеров, РНК-переключателей и/или полинуклеотидных кассет для регуляции генов-мишеней, включая терапевтические гены. В изобретении дополнительно предложены малые молекулы, которые являются модуляторами экспрессии гена-мишени, причем ген-мишень содержит РНК-переключатель, содержащий описанный в данном документе аптамер.

[0007] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCCTTX₈X₉
X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:1),

где

X₁ представляет собой А или G;

X₂ представляет собой С или ненуклеотидный фрагмент;

X₃ представляет собой Т или ненуклеотидный фрагмент;

X₄ представляет собой А или G;

X₅ представляет собой любой нуклеотид;

X₆ представляет собой любой нуклеотид;

X₇ представляет собой любой нуклеотид;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой С, G или Т;

X₁₀ представляет собой любой нуклеотид;

X₁₁ представляет собой А или Т;

X₁₂ представляет собой С или Т; и

X₁₃ представляет собой С или Т.

[0008] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:2),

где

X₁ представляет собой А или G;

X₂ представляет собой С или ненуклеотидный фрагмент;

X₃ представляет собой Т или ненуклеотидный фрагмент;

X₅ представляет собой G или Т;

X₆ представляет собой С или Т;

X₇ представляет собой С или Т;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или Т;

X₁₀ представляет собой А, G или Т;

X₁₁ представляет собой А или Т;

X₁₂ представляет собой С или Т; и

X₁₃ представляет собой С или Т.

[0009] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCSTTTGAACCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:3),

где

X₁₂ представляет собой С или Т; и

X₁₃ представляет собой С или Т.

[0010] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCSTTX₈X₉X₁₀X

$_{11}\text{CCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT}$ (SEQ ID NO:4),

где

X₁ представляет собой A или G;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или T;

X₁₀ представляет собой A, G или T; и

X₁₁ представляет собой A или T.

[0011] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит

$\text{ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAX}_5\text{X}_6\text{AX}_7\text{ACCCTTTGAAC}$
 $\text{CTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT}$ (SEQ ID NO:5),

где

X₅ представляет собой G или T;

X₆ представляет собой C или T; и

X₇ представляет собой C или T.

[0012] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит

$\text{ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCX}_4\text{CCGGTGAGAX}_5\text{X}_6\text{AX}_7\text{ACCCTTX}_8\text{X}_9\text{X}_{10}$
 $\text{ACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT}$ (SEQ ID NO:6),

где

X₄ представляет собой A или G;

X₅ представляет собой любой нуклеотид;

X₆ представляет собой любой нуклеотид;

X₇ представляет собой любой нуклеотид;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой C или G; и

X₁₀ представляет собой любой нуклеотид.

[0013] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая

аптамер последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7-36 (см. таблицу 1). В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:7-36 (см. таблицу 1).

[0014] В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 9, 14-18, 21, 25, 26 и 30. В одном аспекте предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 9, 14-18, 21, 25, 26 и 30.

[0015] В предпочтительном варианте осуществления предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 14 и 26. В еще более предпочтительном варианте осуществления предложена полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, при этом кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 14 и 26.

[0016] В одном аспекте предложена последовательность, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCCTTX₈X₉
X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:1),

где

X₁ представляет собой A или G;
X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;
X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;
X₄ представляет собой A или G;
X₅ представляет собой любой нуклеотид;
X₆ представляет собой любой нуклеотид;
X₇ представляет собой любой нуклеотид;
X₈ представляет собой любой нуклеотид;
X₉ представляет собой C, G или T;
X₁₀ представляет собой любой нуклеотид;
X₁₁ представляет собой A или T;
X₁₂ представляет собой C или T; и
X₁₃ представляет собой C или T.

[0017] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является A; X₂ не является C; X₃ не является T; X₄ не является G; X₅ не является G; X₆ не является C; X₇ не является C; X₈ не является T; X₉ не является G; X₁₀ не является A; X₁₁ не является A; X₁₂ не является T; и X₁₃ не является C.

[0018] В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁ представляет собой A; X₂ представляет собой C; X₃ представляет собой T; X₄ представляет собой G; X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой C; X₇ представляет собой C; X₈ представляет собой T; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой A; X₁₁ представляет собой A; X₁₂ представляет собой T; и X₁₃ представляет собой C.

[0019] В одном аспекте предложена последовательность, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉
X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:2),

где

X₁ представляет собой A или G;
X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;
X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;
X₅ представляет собой G или T;

X₆ представляет собой С или Т;
X₇ представляет собой С или Т;
X₈ представляет собой любой нуклеотид;
X₉ представляет собой G или Т;
X₁₀ представляет собой А, G или Т;
X₁₁ представляет собой А или Т;
X₁₂ представляет собой С или Т; и
X₁₃ представляет собой С или Т.

[0020] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является А; X₂ не является С; X₃ не является Т; X₄ не является G; X₅ не является G; X₆ не является С; X₇ не является С; X₈ не является Т; X₉ не является G; X₁₀ не является А; X₁₁ не является А; X₁₂ не является Т; и X₁₃ не является С. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁ представляет собой А; X₂ представляет собой С; X₃ представляет собой Т; X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой С; X₇ представляет собой С; X₈ представляет собой Т; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой А; X₁₁ представляет собой А; X₁₂ представляет собой Т; и X₁₃ представляет собой С.

[0021] В одном аспекте предложена последовательность, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCT
GTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:3),

где

X₁₂ представляет собой С или Т; и

X₁₃ представляет собой С или Т.

[0022] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁₂ не является Т; и X₁₃ не является С. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁₂ представляет собой Т и X₁₃ представляет собой С.

[0023] В одном аспекте предложена последовательность, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCSTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT (SEQ ID NO:4),

где

X₁ представляет собой A или G;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или T;

X₁₀ представляет собой A, G или T; и

X₁₁ представляет собой A или T.

[0024] В варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является A; X₈ не является T; X₉ не является G; X₁₀ не является A; X₁₁ не является A. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁ представляет собой A; X₈ представляет собой T; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой A; X₁₁ представляет собой A; X₁₂ представляет собой T; и X₁₃ представляет собой C.

[0025] В одном аспекте предложена последовательность, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTTGAAC
CTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT (SEQ ID NO:5),

где

X₅ представляет собой G или T;

X₆ представляет собой C или T; и

X₇ представляет собой C или T.

[0026] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₅ не является G; X₆ не является C; и X₇ не является C. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой C; и X₇ представляет собой C.

[0027] В одном аспекте предложена последовательность, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит:

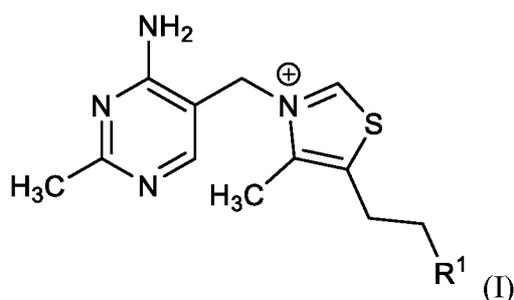
ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉X₁₀ACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT (SEQ ID NO:6),

где

- X₄ представляет собой A или G;
 X₅ представляет собой любой нуклеотид;
 X₆ представляет собой любой нуклеотид;
 X₇ представляет собой любой нуклеотид;
 X₈ представляет собой любой нуклеотид;
 X₉ представляет собой C или G; и
 X₁₀ представляет собой любой нуклеотид.

[0028] В одном аспекте предложена последовательность, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7-36 (см. таблицу 1). В некоторых вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 9, 14-18, 21, 25, 26, и 30. В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 14 и 26.

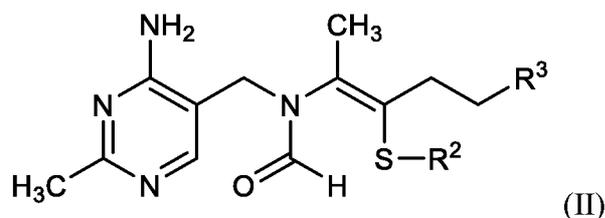
[0029] В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается или иным образом реагирует на описанную в данном документе малую молекулу, включая малые молекулы, имеющие структуру в соответствии с формулами I-VIII. В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой I:



где:

R¹ выбран из группы, состоящей из OH, amino, F, Cl, Br, фосфата, пирофосфата,
 -O-C(=O)-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-C₂-C₆ алкенила, -O-C(=O)-фенила,
 -O-C(=O)-гетероцикла, -O-C(=O)-O-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-O-C₂-C₆ алкенила,
 -O-C(=O)-O-фенила и -O-C(=O)-O-гетероцикла.

[0030] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой II:



где:

R^2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, $-(CH_2)_n-R^6$, $-C(=O)-R^4$, $-C(=O)-O-R^4$, $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$, $-S-C_1-C_6$ алкила, $-S-C_2-C_6$ алкенила, $-S$ -гетероцикла и $-S-CH_2$ -гетероцикла;

или R^2 представляет собой $-S$ -[формула II] таким образом, что данное соединение образует димер из двух молекул формулы II, соединенных посредством дисульфидной ($-S-S-$) связи;

R^3 выбран из группы, состоящей из OH, amino, F, Cl, Br, фосфата, пирофосфата, $-O-C(=O)-C_1-C_6$ алкила, $-O-C(=O)-C_1-C_6$ алкенила, $-O-C(=O)$ -фенила, $-O-C(=O)$ -гетероцикла, $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ алкила, $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ алкенила, $-O-C(=O)-O$ -фенила, $-O-C(=O)-O$ -гетероцикла.

R^4 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_9 - C_{14} трициклила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-(C_2-C_6$ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

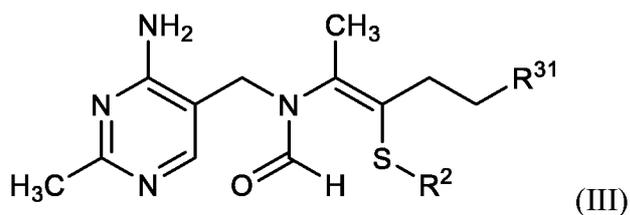
R^5 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R^6 представляет собой гидроксил, amino, амидо, C_1 - C_6 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкил, C_6 - C_{10} бициклил, арил, гетероарил и гетероциклил; и

n равно от 1 до 8;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, amino, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_1 - C_6 галогеналкила, C_1 - C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0031] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой III:



где:

R^2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, $-(CH_2)_n-R^6$, $-C(=O)-R^4$, $-C(=O)-O-R^4$, $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$, $-S-C_1-C_6$ алкила, $-S-C_2-C_6$ алкенила, $-S$ -гетероцикла и $-S-CH_2$ -гетероцикла;

R^{31} выбран из группы, состоящей из OH и фосфата;

R^4 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_9 - C_{14} трициклила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-(C_2-C_6$ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

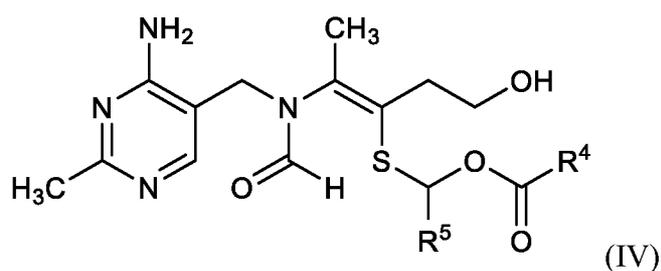
R^5 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R^6 представляет собой гидроксил, амино, амидо, C_1 - C_6 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкил, C_6 - C_{10} бициклил, арил, гетероарил и гетероциклил; и

n равно от 1 до 8;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_1 - C_6 галогеналкила, C_1 - C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0032] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой IV:



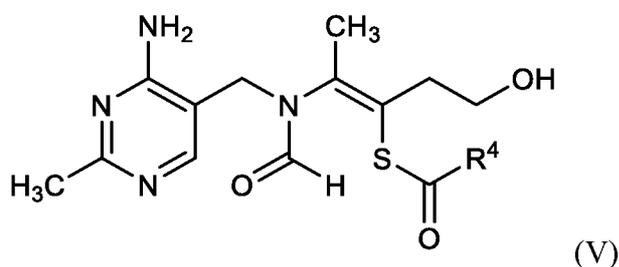
где:

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R⁵ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0033] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой V:



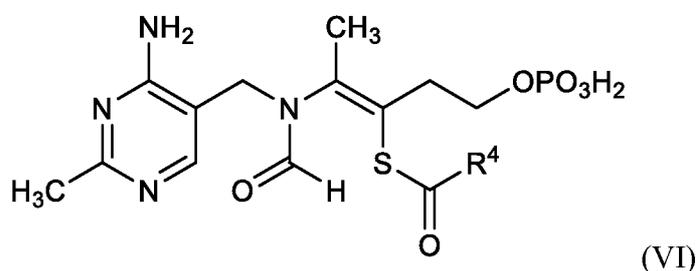
где:

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆

пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0034] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой VI:

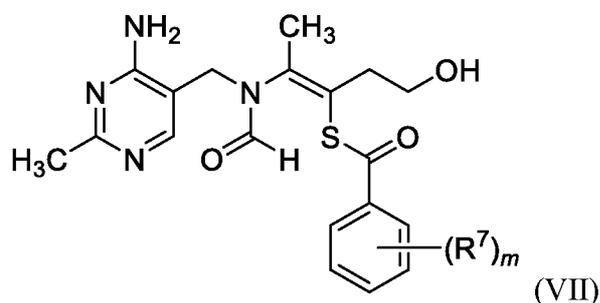


где:

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0035] В некоторых вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой VII:



где

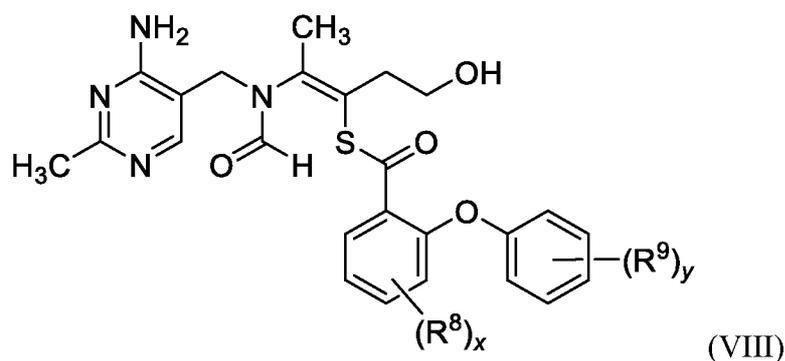
каждый R⁷ независимо выбран из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -

(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R⁷ могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила; и

m равно 0, 1, 2, 3 или 4.

[0036] В некоторых вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой VIII:



где:

каждый R⁸ независимо выбран из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R⁸ могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амино, циано,

амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

каждый R⁹ независимо выбран из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R⁹ могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

x равно 0, 1, 2 или 3; и

y равно 0, 1, 2, 3 или 4.

[0037] В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие малой молекулы, выбранной из группы, состоящей из ацефуртиамина, ацетиамина, аллотиамина, ампролиума, беклотиамина, бенфотиамина, бентиамина, бисбентиамина, цетотиамина, цикотиамина, фурсултиамина, монофосфотиамина, октотиамина, окситиамина, просултиамина, сулбутиамина, тиамин, тиамин пирогосфата и винтиамола. В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие малой молекулы, выбранной из группы, состоящей из бенфотиамина, фурсултиамина и просултиамина. В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие

бенфотиамин. В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие фурсултиамина. В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие просултиамина.

[0038] В некоторых вариантах осуществления аптамер обладает пониженным связыванием и/или показывает пониженный ответ на тиамин пиродифосфат (ТРР) по сравнению с эквимоллярными количествами фурсултиамина, бенфотиамина или просултиамина. В некоторых вариантах осуществления, в которых аптамер находится в контексте РНК-переключателя, закодированного как часть полинуклеотидной кассеты для регулирования экспрессии гена-мишени, аптамер дает пониженный ответ на ТРР по сравнению с эквимоллярными количествами фурсултиамина, бенфотиамина или просултиамина.

[0039] Предложен также РНК-переключатель для регуляции экспрессии гена-мишени в ответ на малую молекулу, причем РНК-переключатель содержит описанный в данном документе аптамер. В одном варианте осуществления кодирующая РНК-переключатель последовательность содержит последовательность SEQ ID NO:37.

[0040] Предложена также полинуклеотидная кассета для регуляции экспрессии гена-мишени в ответ на малую молекулу, полинуклеотидная кассета содержит:

- (a) РНК-переключатель; и
- (b) альтернативно сплайсируемый экзон, фланкированный 5' интроном и 3' интроном,

причем РНК-переключатель содержит (i) эффекторную область, содержащую стебель, который включает 5' последовательность сайта сплайсинга из 3' интрона, и (ii) описанный в данном документе аптамер; и

где альтернативно сплайсируемый экзон включает стоп-кодон, который находится в рамке с геном-мишенью, когда альтернативно сплайсируемый экзон сплайсируется в мРНК гена-мишени.

[0041] В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета содержит РНК-переключатель, кодирующий последовательность, содержащую последовательность SEQ ID NO:37 и дополнительно содержащую аптамер кодирующую последовательность, причем аптамерная последовательность выбрана из аптамерной последовательности, описанной в данном документе.

[0042] В одном варианте осуществления предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая аптамер, РНК-переключатель и/или полинуклеотидную кассету, описанную в данном документе. Предложена также молекула нуклеиновой кислоты включающая в себя

содержащий ген-мишень РНК-переключатель или полинуклеотидную кассету, описанную в данном документе. В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета расположена в кодирующей белок последовательности гена-мишени. В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета расположена в нетранслируемой области гена-мишени или в интроне гена мишени.

[0043] Предложен также вектор, содержащий молекулу любую нуклеиновую кислоты, описанную в данном документе. В одном аспекте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, адено-ассоциированного вирусного вектора и лентивирусного вектора.

[0044] В одном аспекте предложен способ идентификации аптамера, который модулирует экспрессию гена-мишени в ответ на представляющее интерес соединение (например, аналог или производное тиамин, такое как соединения в соответствии с формулы I-VIII), способ включает стадии:

- (i) отбора исходной аптамерной последовательности;
- (ii) получения библиотеки РНК-переключателей, включающей в себя последовательности, кодирующие весь аптамер или его часть, выбранный на стадии (i), причем кодирующие аптамеры последовательности включают в себя один или более случайным образом мутировавших нуклеотидов в одной или более неспаренных областей в аптамере, причем мутировавшие аптамерные последовательности находятся в контексте РНК-переключателя, который контролирует экспрессию гена-репортера;
- (iii) скрининга библиотеки из (ii) аптамеров, обеспечивающих повышенную регуляцию (например, более высокую кратность индукции или репрессии) экспрессии гена-мишени в ответ на воздействие представляющего интерес соединения, по сравнению исходной аптамерной последовательностью;
- (iv) необязательно повторяющиеся стадии (ii) и (iii) (для аптамера, идентифицированного на стадии (iii) вместо аптамера, отобранного на стадии (i)).

[0045] В вариантах осуществления исходная аптамерная последовательность представляет собой аптамер ТТР (включающих предполагаемый аптамер ТТР или известный аптамер ТТР). В вариантах осуществления исходная аптамерная последовательность выбрана из РНК-переключателя Rfam ТТР семейства RF00059. В вариантах осуществления одна или более неспаренных областей аптамерной последовательности являются областями соединения (J). Кроме того или дополнительно,

неспаренная область может представлять собой петлевую (L) область. В дополнительных вариантах осуществления последовательность, кодирующая аптамер с одним или более нуклеотидами в одной или более неспаренных областях, которые случайным путем мутировали, также с одним или более нуклеотидами в спаренной (P) области, мутировавшей, например по одному или более спаренным нуклеотидам, смежным с неспаренной областью.

[0046] В вариантах осуществления представляющее интерес соединение представляет собой аналог или производное тиамин. В вариантах осуществления аналогом тиамин является фурсултиамин, бенфотиамин или просултиамин. В одном варианте осуществления аптамер обладает пониженным связыванием и/или показывает пониженный ответ на тиамин пиродифосфат (TRP) по сравнению с эквимольными количествами фурсултиамин, бенфотиамин или просултиамин. В вариантах осуществления представляющее интерес соединение представляет собой соединение в соответствии с формулами I-VIII. В вариантах осуществления представляющее интерес соединение представляет собой соединение в соответствии с формулами I-III.

[0047] В аспектах в настоящем описании представлены соединения формул I-VIII. В вариантах осуществления в настоящем описании представлены соединения формул I-VIII в фармацевтической композиции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0048] На **Фиг. 1** проиллюстрировано как синтетический РНК-переключатель TRPz или TRPm, содержащий аптамер thiC и thiM TRP, соответственно, индуцирующий экспрессию в ответ на обработку тиамин пиродифосфатом (TRP) или аналогом тиамин. Клетки НЕК 293 трансфицировали конструкциями, содержащими ген люциферазы, содержащий РНК-переключатель TRPz или TRPm. Трансфицированные клетки обрабатывали TRP (**Фиг. 1A**), фурсултиамин (**Фиг. 1B**), просултиамин (**Фиг. 1C**), бисбентиамин, беклотиамин или сулбутиамин (**Фиг. 1D**) в указанных дозах или оставались необработанными. Активность люциферазы выражали в средних произвольных световых единицах (ALU) ± С.О., и кратность индукции рассчитывали как соотношение активности люциферазы, зарегистрированной для клеток, подвергшихся воздействию TRP или аналога тиамин, к активности люциферазы, зарегистрированной для клеток, не подвергшихся воздействию TRP или аналога тиамин.

[0049] На **Фиг. 2** проиллюстрирована как предполагаемая аптамерная последовательность (14G4), за вычетом из семейства аптамеров TRP (семейство RF00059

Rfam), регулирующая экспрессию люциферазы в ответ на фурсултиамин. Клетки трансфицировали с помощью конструкции люциферазы-РНК-переключателя, содержащей предполагаемый аптамер TPP, 14G4 (номер доступа AACU023654033.1/903-800 из базы Rfam RF00059). Трансфицированные клетки обрабатывали фурсултиамином в указанных дозах в клетки НЕК 293 (**Фиг. 2А**) или в другие типы клеточных линий человека и мыши (**Фиг. 2В**). Активность люциферазы рассчитывали в виде соотношения активности люциферазы, зарегистрированной для клеток, подвергшихся воздействию фурсултиамина, к активности люциферазы, зарегистрированной для клеток, не подвергшихся воздействию фурсултиамина.

[0050] На **Фиг. 3** показана прогнозируемая структура исходного аптамера 14G4 с нативным стеблем P1 (SEQ ID NO:38) (**Фиг. 3А**) и кодирующая аптамер 14G4 последовательность (SEQ ID NO:7), и из них получены библиотеки (**Фиг. 3В**). Прогнозируемую структуру аптамера 14G4, включающую положения стеблей и неспаренных областей, определена как описано в данном документе. Штриховка структуры вокруг каждого основания обозначает вероятность его спаривания с основаниями, более темная штриховка указывает на более высокую вероятность. Для неспаренных областей более темная штриховка обозначает вероятность их неспаренности. Нуклеотиды, которые случайным образом мутировали с получением аптамерных библиотек А1 (SEQ ID NO:39), А2 (SEQ ID NO:40) или А3 (SEQ ID NO:41), соответственно указаны с помощью «N» в кодирующих аптамеры последовательностях на **Фиг. 3В** и соответствуют нуклеотидам, которые являются неспаренными или смежными к неспаренным областям.

[0051] На **Фиг. 4** проиллюстрировано улучшение активности по регуляции генов, полученное посредством мутагенеза аптамеров, которые содержатся в пределах РНК-переключателей. Конструкции РНК-переключателей, содержащие случайным образом мутировавшие аптамеры (происходящие из аптамерных библиотек А1, А2 или А3), проходили скрининг на улучшение активности по регуляции генов в клетках НЕК. Трансфицированные клетки НЕК обрабатывали 50 мкМ фурсултиамином или оставляли необработанными. Примеры РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности, которые выделяли при скрининге и которые демонстрировали улучшенную активность по регуляции генов по сравнению с РНК-переключателем 14G4, показаны на **Фиг. 4А**. **Фиг. 4В**, которые иллюстрируют, что РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности, используются для дозозависимой индукции гена-мишени в различных типах клеток. Клетки

AML12, C2C12 и ARPE-19 трансфицировали реконструированными конструкциями РНК-переключателей с использованием реагента TransIT-X2. Трансфицированные клетки обрабатывали фурсултиамином в указанных дозах. На **Фиг. 4С** проиллюстрировано, что РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности, регулируют экспрессию люциферазы в ответ на различные аналоги ТРР. Клетки AML12 трансфицировали РНК-переключателями, содержащими реконструированные аптамерные последовательности, и их обрабатывали фурсултиамином, бенфотиамином или просултиамином в указанных дозах. **Фиг. 4А–4С**: кратность индукции рассчитывали как соотношение активности люциферазы, зарегистрированной для клеток, подвергшихся воздействию ТРР или аналога тиамин, к активности люциферазы, зарегистрированной для клеток, не подвергшихся воздействию ТРР или аналога тиамин.

[0052] На **Фиг. 5** показана нуклеотидная последовательность кодирующей аптамер 3Н4 последовательности (SEQ ID NO:9), которая была получена посредством мутагенезом 14G4. Нуклеотиды, которые случайным образом мутировали с получением аптамерной библиотеки А4 (SEQ ID NO:42), обозначены с помощью «N» в кодирующих аптамеры последовательностях.

[0053] На **Фиг. 6А** проиллюстрировано как мутагенез выбранных нуклеотидов аптамеров, задействованных в связывание аптамер/лиганд, может улучшать активность по регуляции генов РНК-переключателей на основе аптамеров в клетках млекопитающих. Клетки HEK 293, ARPE-19 и AML12 трансфицировали с помощью конструкций РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности, выделенные из аптамерной библиотеки А4. Трансфицированные клетки обрабатывали фурсултиамином в указанных дозах или оставляли необработанными. На **Фиг. 6В** проиллюстрирована способность РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности для индукции экспрессии люциферазы в ответ на различные производные тиамин, которые имеют сходные химические структурные признаки с тиамин. Клетки AML12 трансфицировали указанными конструкциями РНК-переключателей и обрабатывали фурсултиамином, бенфотиамином или просултиамином в указанных дозах или оставляли необработанными. Кратность индукцию рассчитывали как соотношение активности люциферазы, полученной из клеток, обработанных соединениями-аналогами тиамин, к активности люциферазы, полученной для клеток без обработки аналогами тиамин.

[0054] На **Фиг. 7** проиллюстрирована способность РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности, индуцировать экспрессию

разнообразных генов-мишеней в ответ на лиганд. На **Фиг. 7А и 7В** проиллюстрировано как РНК-переключатель, содержащий аптамер 6В4, регулирует усиленную экспрессию зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в ответ на обработку фурсултиамином. Стабильно трансфицированные клетки НЕК 293, содержащие конструкции EGFP-6В4, обрабатывали фурсултиамином в концентрации 50 мкМ (**Фиг. 7А**) или в указанных дозах (**Фиг. 7В**) в течение 24 часов или оставляли необработанными. На **Фиг. 7В и 7С** проиллюстрировано как РНК-переключатель, содержащий 3Н4 или 15D10, соответственно, регулирует экспрессию эритропоэтина мыши (mЕро) в ответ на обработку фурсултиамином. Клетки AML12 трансфицировали конструкциями Еро-3Н4 или Еро-15D10. Трансфицированные клетки обрабатывали фурсултиамином в указанных дозах или оставляли необработанными. Экспрессию mЕро выявляли и количественно определяли с использованием ELISA mЕро и выражали как среднее значение \pm С.О. (**Фиг. 7С**). Кратность индукции рассчитывали как соотношение количества mЕро, полученного из клеток, обработанных фурсултиамином, к количеству mЕро, полученному из клеток без обработки фурсултиамином (**Фиг. 7D**).

[0055] На **Фиг. 8** проиллюстрировано индуцибельную экспрессию люциферазы РНК-переключателем, содержащим реконструированную аптамерную последовательность *in vivo*. Адено-ассоциированные вирусные частицы AAV2/8 продуцировали содержащую интрон-альтернативный экзон-интрон кассету с помощью (1) нерегулируемого РНК-переключателя без аптамера (Контроль 1), (2) кассету РНК-переключателя, содержащую аптамер 3Н4 (переключатель 3Н4 или «3Н4»), или (3) кассету РНК-переключателя, содержащую аптамер 6В4 (переключатель 6В4 или «6В4»). Мышам породы Balb/c (n=5 в каждой группе) вводили инъекцией в одну хвостовую вену $1,0 \times 10^{11}$ (**Фиг. 8А, 8В и 8D**) или $2,5 \times 10^{11}$ (**Фиг. 8С и 8Е**) вирусных частиц на мышь. Через двадцать восемь дней после доставки вектора AAV мышам внутрибрюшинно вводили 50 мг/кг просултиамина. Активность люциферазы измеряли за сутки до введения дозы лекарственного средства, а также через 6 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после введения дозы лекарственного средства. После первого введения просултиамина мышей подвергали трем дополнительным циклам введения доз и циклам визуализации следующим образом: Сутки 36 (после введения AAV): 100 мг/кг; сутки 43: 200 мг/кг и сутки 51: 400 мг/кг. На **Фиг. 8А** показана экспрессия люциферазы в определенные моменты времени и для указанных доз просултиамина для мышей, трансфицированных векторами AAV, содержащими ген люциферазы с реконструированными РНК-переключателями 3Н4 или 6В4. На **Фиг. 8В и 8С** показана интенсивность флуоресценции люциферазы, наблюдаемая для различных групп за сутки до введения дозы лекарственного средства, а также через 6 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после введения

дозы. На **Фиг. 8D** и **8E** показана относительное увеличение экспрессии люциферазы при лечении просултиамином после дозирования лекарственным средством для различных его доз и различных групп. Кратность индукции экспрессии люциферазы рассчитывали как соотношение показателя фотонов/с, полученного для мышей, получивших лечение просултиамином, к значению, полученному для мышей за одни сутки до лечения просултиамином.

[0056] На **Фиг. 9** показана индукция экспрессии гена-мишени люциферазы в ответ на фурсултиамин или бенфотиамин по сравнению с дополнительными аналогами тиамин формул IV, V и VI. Ген-мишень люциферазы содержал последовательность, кодирующую РНК-переключатель, содержащий аптамер 15D10. Соединения группы IV тестировали на способность индуцировать экспрессию люциферазы в клетках НЕК 293 (**Фиг. 9A**) и AML 12 (**Фиг. 9B**). Соединения группы V и группы VI тестировали на способность индуцировать экспрессию люциферазы в клетках НЕК 293 (**Фиг. 9C**) и AML 12 (**Фиг. 9D**). Наиболее активные соединения дополнительно тестировали на способность индуцировать экспрессию люциферазы в клетках ARPE-19 (**Фиг. 9E**) и Hep G2 (**Фиг. 9F**).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0057] В данном документе предложены аптамерные последовательности, которые связываются или иным образом отвечают на малые молекулы, такие как тиамин или ТРР и его аналоги или производные тиамин или ТРР. В некоторых вариантах осуществления аптамерные последовательности, предложенные в данном документе, пригодны для регуляции экспрессии гена-мишени в ответ на аналог или производное тиамин или ТРР. В изобретении подразумеваются также РНК-переключатели, содержащие аптамерные последовательности, раскрытые в данном документе, а также полинуклеотидные кассеты для регуляции экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидные кассеты содержат последовательности, кодирующие описанные в данном документе РНК-переключатели. В данном документе предложены также способы применения указанных аптамеров, РНК-переключателей и/или полинуклеотидных кассет для регуляции генов-мишеней, включая терапевтические гены, и лечение нуждающихся в этом субъектов.

[0058] Аптамеры

[0059] Аптамеры представляют собой одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, которые нековалентно связываются со специфическими лигандами с высокой аффинностью и специфичностью путем сворачивания в трехмерную структуру. Лиганды аптамеров включают ионы, малые молекулы, белки, вирусы и клетки. Лиганды аптамеров

могут быть представлены, например, органическим соединением, аминокислотой, стероидом, углеводом или нуклеотидом. Неограничивающие примеры лигандов аптамеров в виде малых молекул включают антибиотики, терапевтические средства, красители, кофакторы, метаболиты, молекулярные маркеры, нейромедиаторы, загрязняющие вещества, токсины, пищевые добавки, канцерогены, наркотики. По существу, аптамеры используются для выявления малых молекул. Применение выявления малых молекул с помощью аптамеров включает мониторинг окружающей среды, безопасность пищевых продуктов, медицину (включая диагностику), микробиологию, аналитическую химию, криминалистику, сельское хозяйство и фундаментальные биологические исследования.

[0060] Используемый в данном документе термин «аптамер» относится к РНК-полинуклеотиду (или последовательности ДНК, кодирующей РНК-полинуклеотид), который специфически связывается с классом лигандов. Термин «лиганд» относится к молекуле, которая специфически связывается аптамером. Аптамеры содержат области связывания, которые способны образовывать комплексы с предполагаемой молекулой-мишенью (т. е. лигандом). Аптамер будет иметь длину, как правило, от около 15 до около 200 нуклеотидов. Чаще всего аптамер будет иметь длину от около 30 до около 100 нуклеотидов, например иметь длину от 70 до 90 нуклеотидов. Аптамеры обычно состоят из нескольких спаренных (P) областей, в которых аптамер образует стебель, и неспаренных областей, в которых аптамер образует область присоединения (J) или область петли (L). Спаренные области могут быть пронумерованы последовательно, начиная с 5' конца (P1) и с нумерацией последовательно каждого стебля (P2, P3 и т. д.). Петли (L1, L2 и т. д.) нумеруются в соответствии с прилегающей спаренной областью, и области присоединения нумеруются в соответствии со спаренными областями, которые они соединяют.

[0061] В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCCTTX₈X₉X₁₀X₁₁
CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:1),

где

X₁ представляет собой A или G;

X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;

X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;

X₄ представляет собой A или G;

X₅ представляет собой любой нуклеотид;

X₆ представляет собой любой нуклеотид;

X₇ представляет собой любой нуклеотид;
X₈ представляет собой любой нуклеотид;
X₉ представляет собой C, G или T;
X₁₀ представляет собой любой нуклеотид;
X₁₁ представляет собой A или T;
X₁₂ представляет собой C или T; и
X₁₃ представляет собой C или T.

[0062] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является A; X₂ не является C; X₃ не является T; X₄ не является G; X₅ не является G; X₆ не является C; X₇ не является C; X₈ не является T; X₉ не является G; X₁₀ не является A; X₁₁ не является A; X₁₂ не является T; и X₁₃ не является C. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁ представляет собой A; X₂ представляет собой C; X₃ представляет собой T; X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой C; X₇ представляет собой C; X₈ представляет собой T; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой A; X₁₁ представляет собой A; X₁₂ представляет собой T; и X₁₃ представляет собой C.

[0063] В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCCTTX₈X₉X₁₀X₁₁
CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:2),

где

X₁ представляет собой A или G;
X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;
X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;
X₅ представляет собой G или T;
X₆ представляет собой C или T;
X₇ представляет собой C или T;
X₈ представляет собой любой нуклеотид;
X₉ представляет собой G или T;
X₁₀ представляет собой A, G или T;
X₁₁ представляет собой A или T;
X₁₂ представляет собой C или T; и
X₁₃ представляет собой C или T.

[0064] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является А; X₂ не является С; X₃ не является Т; X₄ не является G; X₅ не является G; X₆ не является С; X₇ не является С; X₈ не является Т; X₉ не является G; X₁₀ не является А; X₁₁ не является А; X₁₂ не является Т; и X₁₃ не является С. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих не одновременно присутствуют в аптамерной последовательности: X₁ представляет собой А; X₂ представляет собой С; X₃ представляет собой Т; X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой С; X₇ представляет собой С; X₈ представляет собой Т; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой А; X₁₁ представляет собой А; X₁₂ представляет собой Т; и X₁₃ представляет собой С.

[0065] В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCTGTTX₁
₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:3),

где

X₁₂ представляет собой С или Т; и

X₁₃ представляет собой С или Т.

[0066] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁₂ не является Т; и X₁₃ не является С. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в аптамерной последовательности: X₁₂ представляет собой Т и X₁₃ представляет собой С.

[0067] В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCT
GTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT (SEQ ID NO:4),

где

X₁ представляет собой А или G;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или Т;

X₁₀ представляет собой А, G или Т; и

X₁₁ представляет собой А или Т.

[0068] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является А; X₈ не является Т; X₉ не является G; X₁₀ не является А; X₁₁ не является А. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в аптамерной последовательности: X₁

представляет собой А; X₈ представляет собой Т; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой А; X₁₁ представляет собой А; X₁₂ представляет собой Т; и X₁₃ представляет собой С.

[0069] В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTTGAACCTGT
TTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT (SEQ ID NO:5),

где

X₅ представляет собой G или Т;

X₆ представляет собой С или Т; и

X₇ представляет собой С или Т.

[0070] В вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₅ не является G; X₆ не является С; и X₇ не является С. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в аптамерной последовательности: X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой С; и X₇ представляет собой С.

[0071] В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит:

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉X₁₀ACCT
GTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT (SEQ ID NO:6),

где

X₄ представляет собой А или G;

X₅ представляет собой любой нуклеотид;

X₆ представляет собой любой нуклеотид;

X₇ представляет собой любой нуклеотид;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой С или G; и

X₁₀ представляет собой любой нуклеотид.

[0072] В одном варианте осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7–36 (см. таблицу 1). В некоторых вариантах осуществления кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7-36.

«Процент идентичности последовательности» по отношению к эталонной полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты определяется как процент аминокислотных остатков или нуклеотидов в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам или нуклеотидам в эталонной полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах возможностей среднего специалиста в данной области, к примеру, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, включающего программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR).

Таблица 1. Кодирующие аптамеры последовательности

SEQ ID NO:	Аптамер	Кодирующая аптамер последовательность
7	14G4 (исходная)	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
8	1D10	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTATA CCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
9	3H4	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
10	3F10	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
11	3H9	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTATGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
12	4G2	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
13	6D2	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTTGTTCCCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
14	6B4	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA

		CCCTT <u>GT</u> GACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
15	4H2	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
16	6C4	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTCGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
17	6G12	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
18	8F1	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
19	10A7	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATGATA CCCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
20	12D5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACA CCCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
21	12G7	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTATA CCCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
22	12H3	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCACA CCCTTACTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
23	13H7	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAACAGA CCCTTTGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
24	13B6	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAACACA CCCTTTGTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
25	15A5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTATA CCCTTACTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
26	15D10	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCACCGGTGAGAACATA CCCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
27	15F9	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTACA CCCTTAGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
28	16E5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCAA CCCTTGGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
29	16G8	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGTACA CCCTTCGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
30	16G6	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCACA CCCTTGGTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
31	17E2	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTACA

		CCCTTTGGACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
32	17G1	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCACA CCCTTGGAACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
33	17D3	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGGATA CCCTTCGGACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
34	17F5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGTATA CCCTTAGTACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
35	17G3	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCACCGGTGAGACAATA CCCTTGGTACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
36	18G9	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGAATA CCCTTGGTACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT

[0073] Средний специалист в данной области понимает, что описанные в данном документе аптамеры могут представлять собой молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК). В вариантах осуществления аптамеры, описанные в данном документе, являются частью более длинного РНК-полинуклеотида, включающего, например, гяРНК, мРНК, киRNA, или миРНК.

[0074] В одном аспекте предложен аптамер, содержащий последовательность:
 $ACX_1GGGGUCCGGCX_2UX_3UUCAUUUGGCX_4CCGGUGAGAX_5X_6AX_7ACCCUUX_8X_9X_{10}$
 $X_{11}CCUGUUX_{12}ACGGAUAAUGCCGCX_{13}GCAGGGAGU$ (SEQ ID NO:43),

где

X_1 представляет собой А или G;

X_2 представляет собой С или нуклеотидный фрагмент;

X_3 представляет собой U или нуклеотидный фрагмент;

X_4 представляет собой А или G;

X_5 представляет собой любой нуклеотид;

X_6 представляет собой любой нуклеотид;

X_7 представляет собой любой нуклеотид;

X_8 представляет собой любой нуклеотид;

X_9 представляет собой С, G, или U;

X_{10} представляет собой любой нуклеотид;

X_{11} представляет собой А или U;

X_{12} представляет собой С или U; и

X_{13} представляет собой С или U.

[0075] В вариантах осуществления аптамерная последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X_1 не является А; X_2 не является С; X_3 не является U; X_4 не является G; X_5 не является G; X_6 не является С; X_7 не является С; X_8 не является U; X_9 не является G; X_{10} не является А; X_{11} не является А; X_{12} не является U; и X_{13} не является С.

[0076] В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в аптамерной последовательности: X_1 представляет собой А; X_2 представляет собой С; X_3 представляет собой U; X_4 представляет собой G; X_5 представляет собой G; X_6 представляет собой С; X_7 представляет собой С; X_8 представляет собой U; X_9 представляет собой G; X_{10} представляет собой А; X_{11} представляет собой А; X_{12} представляет собой U; и X_{13} представляет собой С.

[0077] В одном аспекте предложен аптамер, содержащий последовательность:

ACX₁GGGGUCCGGCX₂UX₃UUCAUUUGGCGCCGGUGAGAX₅X₆AX₇ACCCUUX₈X₉X₁₀X₁₁CCUGUUX₁₂ACGGAUAAUGCCGCX₁₃GCAGGGAGU (SEQ ID NO:44),

где

X_1 представляет собой А или G;

X_2 представляет собой С или нуклеотидный фрагмент;

X_3 представляет собой U или нуклеотидный фрагмент;

X_5 представляет собой G или U;

X_6 представляет собой С или U;

X_7 представляет собой С или U;

X_8 представляет собой любой нуклеотид;

X_9 представляет собой G или U;

X_{10} представляет собой А, G или U;

X_{11} представляет собой А или U;

X_{12} представляет собой С или U; и

X_{13} представляет собой С или U.

[0078] В вариантах осуществления аптамерная последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X_1 не является А; X_2 не является С; X_3 не является U; X_4 не является G; X_5 не является G; X_6 не является С; X_7 не является С; X_8 не является U; X_9 не является G; X_{10} не является А; X_{11} не является А; X_{12} не является U; и X_{13} не является С. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих не одновременно присутствуют в аптамерной последовательности: X_1 представляет собой А; X_2 представляет собой С; X_3 представляет собой U; X_5 представляет собой G; X_6 представляет собой С; X_7 представляет собой С; X_8 представляет собой U; X_9 представляет собой G; X_{10} представляет собой А; X_{11}

представляет собой А; X₁₂ представляет собой U; и X₁₃ представляет собой С.

[0079] В одном аспекте предложен аптамер, содержащий последовательность:
ACAGGGGUCCGGCCUUUUCAUUUGGCGCCGGUGAGAGCACACCCUUUGAACCCUGU
UX₁₂ACGGAUAAUGCCGCX₁₃GCAGGGAGU (SEQ ID NO:45),

где

X₁₂ представляет собой С или U; и

X₁₃ представляет собой С или U.

[0080] В вариантах осуществления аптамерная последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁₂ не является U; и X₁₃ не является С. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в аптамерной последовательности: X₁₂ представляет собой U и X₁₃ представляет собой С.

[0081] В одном аспекте предложен аптамер, содержащий последовательность:
ACX₁GGGGUCCGGCCUUUUCAUUUGGCGCCGGUGAGAGCACACCCUUX₈X₉X₁₀
X₁₁CCUGUUUACGGAUAAUGCCGCCGCAGGGAGU (SEQ ID NO:46),

где

X₁ представляет собой А или G;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или U;

X₁₀ представляет собой А, G или U; и

X₁₁ представляет собой А или U.

[0082] В вариантах осуществления аптамерная последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является А; X₈ не является U; X₉ не является G; X₁₀ не является А; и X₁₁ не является А. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в аптамерной последовательности: X₁ представляет собой А; X₈ представляет собой U; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой А; X₁₁ представляет собой А; X₁₂ представляет собой U; и X₁₃ представляет собой С.

[0083] В одном аспекте предложен аптамер, содержащий последовательность:
ACAGGGGUCCGGCCUUUUCAUUUGGCGCCGGUGAGAX₅X₆AX₇ACCCUUUGAACCCU
GUUUACGGAUAAUGCCGCCGCAGGGAGU (SEQ ID NO:47),

где

X₅ представляет собой G или U;

X₆ представляет собой С или U; и

X₇ представляет собой С или U.

[0084] В вариантах осуществления аптамерная последовательность обладает одним или

более из следующих свойств: X_5 не является G; X_6 не является C; и X_7 не является C. В вариантах осуществления все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в аптамерной последовательности: X_5 представляет собой G; X_6 представляет собой C; и X_7 представляет собой C.

[0085] В одном аспекте предложен аптамер, содержащий последовательность:
ACAGGGGUCCGGCCUUUCAUUUGGCX₄CCGGUGAGAX₅X₆AX₇ACCCUUX₈X₉X₁₀AC
CUGUUCACGGAAUAUGCCGUCGAGGGAGU (SEQ ID NO:48),

где

X_4 представляет собой A или G;

X_5 представляет собой любой нуклеотид;

X_6 представляет собой любой нуклеотид;

X_7 представляет собой любой нуклеотид;

X_8 представляет собой любой нуклеотид;

X_9 представляет собой C или G; и

X_{10} представляет собой любой нуклеотид.

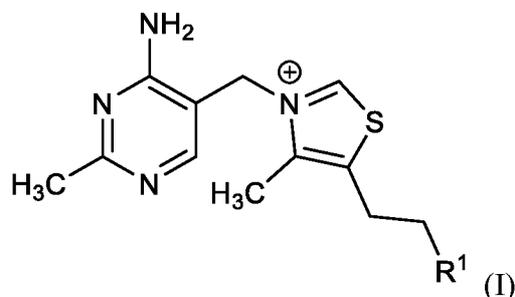
[0086] В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается с малой молекулой, причем аптамер содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:49–78. В некоторых вариантах осуществления аптамерная последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49–78. В вариантах осуществления аптамерная последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 56 и 68.

[0087] Лиганды аптамеров

[0088] В одном варианте осуществления лиганд аптамера представляет собой тиамин (витамин B1) или представляет собой аналог тиамина и/или производное тиамина. Используемый в данном документе термин «аналог тиамина» относится к молекуле, которая обладает сходными физическими, химическими, биохимическими или фармакологическими свойствами по сравнению с тиамином, и включает, например, ампролиум или цикотиамин. Аналог тиамина может быть производным тиамина. Термин «производное тиамина», используемый в данном документе, относится к соединению, происходящему из тиамина или его тиазольной формы с открытым кольцом, полученному путем модификации или замещения. Производные тиамина могут включать, например, ацефуртиамин, ацетиамин, аллителиамин, беклотиамин, бенфотиамин, бентиамин,

бисбентиамин, цетотиамин, фурсултиамин, монофосфотиамин, октотиамин, просултиамин, сулбутиамин, тиамин, тиамин пиродифосфат или винтиамол.

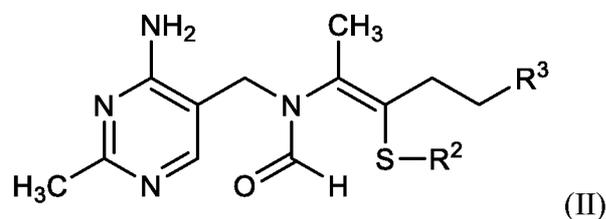
[0089] В некоторых вариантах осуществления аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие или добавление описанной в данном документе малой молекулы, включая малые молекулы, имеющие структуру в соответствии с формулами I-VIII. В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой I:



где:

R^1 выбран из группы, состоящей из OH, амина, F, Cl, Br, фосфата, пирофосфата, -O-C(=O)-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-C₂-C₆ алкенила, -O-C(=O)-фенила, -O-C(=O)-гетероцикла, -O-C(=O)-O-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-O-C₂-C₆ алкенила, -O-C(=O)-O-фенила и -O-C(=O)-O-гетероцикла.

[0090] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой II:



где:

R^2 выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, -(CH₂)_n-R⁶, -C(=O)-R⁴, -C(=O)-O-R⁴, -CHR⁵-O-C(=O)-R⁴, -S-C₁-C₆ алкила, -S-C₂-C₆ алкенила, -S-гетероцикла и -S-CH₂-гетероцикла;

или R^2 представляет собой -S-[Формула II] таким образом, что данное соединение образует димер из двух молекул формулы II, соединенных посредством дисульфидной (-S-S-) связи;

R^3 выбран из группы, состоящей из OH, амина, F, Cl, Br, фосфата, пирофосфата, -O-C(=O)-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-C₁-C₆ алкенила, -O-C(=O)-фенила, -O-C(=O)-гетероцикла, -O-C(=O)-O-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-O-C₁-C₆ алкенила, -O-C(=O)-O-фенила, -O-C(=O)-O-гетероцикла.

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

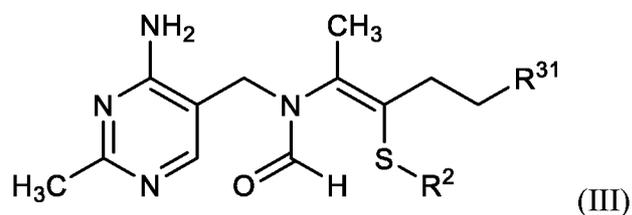
R⁵ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R⁶ представляет собой гидроксил, amino, амидо, C₁-C₆ алкокси, C₃-C₇ циклоалкил, C₆-C₁₀ бициклил, арил, гетероарил и гетероциклил; и

n равно от 1 до 8;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, amino, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0091] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой III:



где:

R² выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, -(CH₂)_{*n*}-R⁶, -C(=O)-R⁴, -C(=O)-O-R⁴, -CHR⁵-O-C(=O)-R⁴, -S-C₁-C₆ алкила, -S-C₂-C₆ алкенила, -S-гетероцикла и -S-CH₂-гетероцикла;

R³¹ выбран из группы, состоящей из OH и фосфата;

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R⁵ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

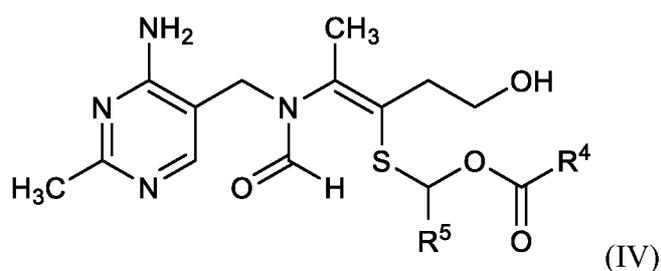
R⁶ представляет собой гидроксил, amino, амидо, C₁-C₆ алкокси, C₃-C₇ циклоалкил, C₆-C₁₀

бициклил, арил, гетероарил и гетероциклил; и

n равно от 1 до 8;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0092] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой IV:



где:

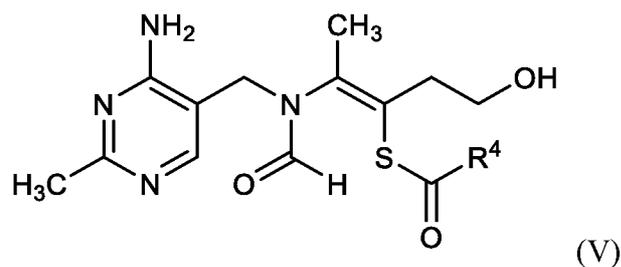
R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R⁵ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0093] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с

формулой V:

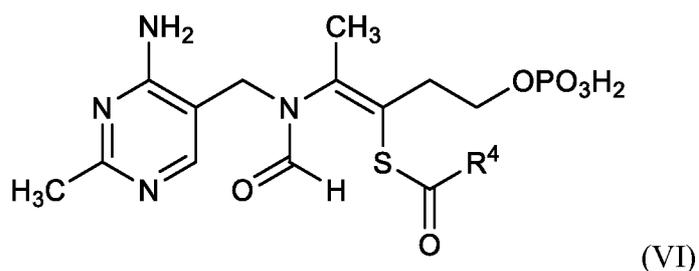


где:

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, amino, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0094] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой VI:



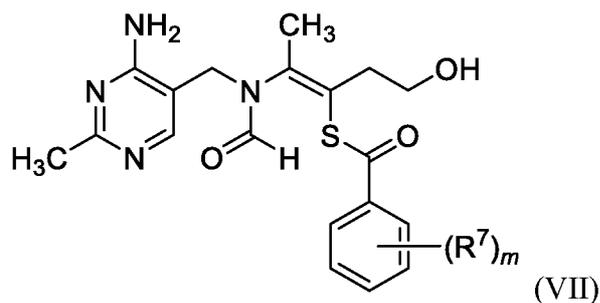
где:

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы,

состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0095] В вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой VII:



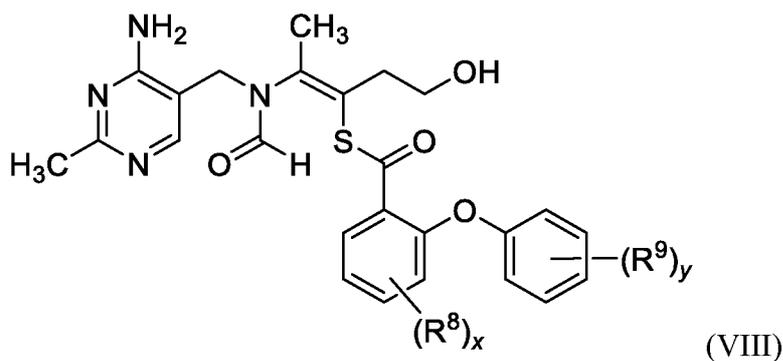
где

каждый R⁷ независимо выбран из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R⁷ могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила; и

m равно 0, 1, 2, 3 или 4.

[0096] В некоторых вариантах осуществления малая молекула имеет структуру в соответствии с формулой VIII:



где:

каждый R^8 независимо выбран из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1-C_6 алкила, C_2-C_6 алкенила, C_3-C_7 циклоалкила, C_6-C_{10} бициклила, C_1-C_6 галогеналкила, C_1-C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R^8 могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1-C_6 алкила, C_2-C_6 алкенила, C_3-C_7 циклоалкила, C_6-C_{10} бициклила, C_1-C_6 галогеналкила, C_1-C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

каждый R^9 независимо выбран из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1-C_6 алкила, C_2-C_6 алкенила, C_3-C_7 циклоалкила, C_6-C_{10} бициклила, C_1-C_6 галогеналкила, C_1-C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R^9 могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или

замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

x равно 0, 1, 2 или 3; и

y равно 0, 1, 2, 3 или 4.

[0097] Термин «алкил» относится к радикалу насыщенных алифатических групп, включая алкильные группы с неразветвленной цепью и алкильные группы с разветвленной цепью. В предпочтительных вариантах осуществления алкил с неразветвленной или разветвленной цепью имеет в остове 6 или менее атомов углерода (например, C₁-C₆ для неразветвленной цепи, C₃-C₆ для разветвленной цепи). Алкильные группы включают метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, изо-бутил, трет-бутил, пентил, изопентил, гексил и т. п.

[0098] Термин «циклоалкил» относится к насыщенным карбоциклическим группам, имеющим в кольце от 3 до 6 углеродов. Циклоалкильные группы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

[0099] Термин «бициклил» относится к насыщенным карбоциклическим группам, имеющим две соединенные кольцевые системы, которые могут быть конденсированными или мостиковыми. Бициклические группы включают бициклил[2.1.1]гексан, бицикл[2.2.1]гептан, декалин и т. п. Термин «трициклил» относится к насыщенным карбоциклическим группам, имеющим три соединенные кольцевые системы, которые могут быть конденсированными и/или мостиковыми. Трициклические группы включают адамантан и т. п.

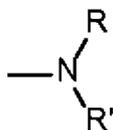
[0100] Термин «алкенил» относится к ненасыщенным алифатическим группам, включая алкенильные группы с неразветвленной цепью и алкенильные группы с разветвленной цепью, имеющие по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. В предпочтительных вариантах осуществления алкенильная группа содержит от двух до шести атомов углерода (например, C₂-C₆ алкенил).

[0101] Используемый в данном документе термин «галоген» или «гало» обозначает -F, -Cl, -Br или -I, и предпочтительно -F, -Cl или -Br.

[0102] Используемые здесь термины «алкоксил» или «алкокси» относятся к алкильной

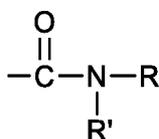
группе, как определено выше, присоединенной через кислородный радикал. Репрезентативные алкоксильные группы включают метокси, этокси, пропилокси, трет-бутокси и т. д.

[0103] Термины «амин» и «амино» относятся как к незамещенным, так и замещенным аминам, например, их фрагмент может быть представлен общей формулой:



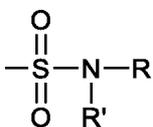
причем R и R', каждый независимо, выбран из H и C₁-C₃ алкила.

[0104] Термины «амидо» относятся как к незамещенным, так и замещенным амидным заместителям, например, их фрагмент может быть представлен общей формулой:



причем R и R', каждый независимо, выбран из H и C₁-C₃ алкила.

[0105] Термины «сульфонамид» или «сульфонамидо» относятся как к незамещенным, так и замещенным сульфонамидным заместителям, например, их фрагмент может быть представлен общей формулой:



причем R и R', каждый независимо, выбран из H и C₁-C₃ алкила.

[0106] Термин «арил», используемый в данном документе, включает 5-, 6-членные ароматические группы с одним кольцом, которые могут содержать от нуля до четырех гетероатомов, например, бензол, пирен, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, триазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин. Те арильные группы, которые содержат гетероатомы в кольцевой структуре, также могут называться «арильными гетероциклами» или «гетероарильными» группами. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических колец, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец (эти кольца являются «конденсированными кольцами»), причем по меньшей мере одно из колец является ароматическим. Соответственно, арил включает от 8- до 10-членные конденсированные бициклические ароматические группы, которые могут включать от нуля до пяти гетероатомов, в которых один или оба кольца являются ароматическими, например

нафталин, хинолон, изохинолин, бензо[b]тиофен, тетрагидронафталин и т. п. Каждая арильная группа может быть незамещенной или может быть замещенной от 1 до 5 заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила.

[0107] Термин «гетероцикл» из «гетероциклила» относится к неароматическим гетероциклам, содержащим от 1 до 3 гетероатомов в кольце. Предпочтительные гетероциклы являются 5- и 6-членными гетероциклическими группами, имеющими от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S.

[0108] Термин «гетероатом», используемый в данном документе, означает атом любого элемента, кроме углерода или водорода. Предпочтительными гетероатомами являются азот, кислород и сера.

[0109] Используемое в данном документе определение каждого выражения, например алкила, R¹, R² и т. д., возникающее в любой структуре более одного раза, является независимым от его определения той же структуры в другом месте документа.

[0110] Следует понимать, что термины «замещение» или «замещенный» включают неявное условие, что такое замещение соответствует допустимой валентности замещенного атома и заместителя, и что замещение приводит к получению стабильного соединения, например, которое не подвергается спонтанному превращению, такому как перестройка, циклизация, отщепление и т. д.

[0111] Лиганды аптамеров, описанные в данном документе, могут существовать в частности в геометрической или стереоизомерной формах, а также в виде их смесей. Такие геометрические или стереоизомерные формы включают, но не ограничиваются, цис- и транс-изомерами, R- и S-энантиомерами, диастереомерами, (D)-изомерами, (L)-изомерами, их рацемическими смесями и их другими смесями. В заместителе, таком как алкильная группа, могут присутствовать дополнительные асимметричные атомы углерода.

[0112] Соединения в соответствии с формулами от I до VIII могут содержать кислотные или основные функциональные группы и, соответственно, могут быть представлены форме соли. Предпочтительно, чтобы форма соли представляла собой фармацевтически приемлемую соль. В этом отношении термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к относительно нетоксичным солям присоединения неорганических и

органических кислот и оснований к соединениям, раскрытым в данном документе.

[0113] Соединения в соответствии с формулами от I до VIII могут содержать основную функциональную группу, такую как амино или алкиламино, и, таким образом, быть способными образовывать фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемыми кислотами. Такие соли можно получать *in situ* в носителе для введения или при производственном процессе получения лекарственной формы, или отдельным проведением в реакцию очищенного соединения, раскрытого в данном документе, в форме его свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой и выделением полученной, таким образом, соли во время последующего процесса очистки. Репрезентативные соли включают гидробромидные, гидрохлоридные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, нитратные, ацетатные, валератные, олеатные, пальмитатные, стеаратные, лауратные, бензоатные, лактатные, фосфатные, тозилатные, цитратные, малеатные, фумаратные, сукцинатные, тартратные, нафтилатные, мезилатные, глюкогептонатные, лактобионатные и лаурилсульфонатные соли и т. п. (см., например, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19).

[0114] Фармацевтически приемлемые соли рассматриваемых олигомеров включают в себя традиционные нетоксичные соли или соли четвертичного аммония данных соединений, образованные, например, из нетоксичных органических или неорганических кислот. Например, такие обычные нетоксичные соли включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная кислота и т. п.; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, пальмитиновая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изотионовая и т. п.

[0115] В других случаях соединения в соответствии с формулами от I до VIII могут содержать одну или более кислотных функциональных групп и, таким образом, быть способными к образованию фармацевтически приемлемых солей с фармацевтически приемлемыми основаниями. Такие соли аналогичным образом могут быть получены *in situ* в носителе для введения или при производственном процессе получения лекарственной формы, или отдельным приведением в реакцию очищенного соединения в форме свободной кислоты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла, аммиаком или фармацевтически

приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают в себя соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и т. п. Репрезентативные органические амины, пригодные для образования солей присоединения оснований, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т. п. (*см., например, Berge et al., выше*).

[0116] В вариантах осуществления аптамер, предложенный в данном документе связывается или иным образом реагирует с одним или более аналогами тиамин или ТРР, предложенными в данном документе, и/или связывается или иным образом реагирует с метаболитом аналога или производного тиамин или ТРР, предложенным в данном документе, включая, например, ТРР и/или тиамин.

[0117] Специфичность связывания аптамера с его лигандом могут определять в показателях сравнительных констант диссоциации (K_d) аптамера с его лигандом по сравнению с константой диссоциации аптамера для нерелевантной молекулы. Таким образом, лиганд представляет собой молекулу, которая связывается с аптамером с большей аффинностью, чем с нерелевантным веществом. Как правило, значение K_d для аптамера, применительно к его лиганду, будет составлять по меньшей мере в приблизительно 10 раз меньшее значение, чем K_d для аптамера с нерелевантной молекулой. В других вариантах осуществления значение K_d будет составлять по меньшей мере в приблизительно 20 раз меньшее, по меньшей мере в приблизительно 50 раз меньшее, по меньшей мере в приблизительно 100 раз меньшее, и по меньшей мере в приблизительно 200 раз меньшее, по меньшей мере в приблизительно 500 раз меньшее, по меньшей мере в приблизительно 1000 раз меньшее, или по меньшей мере в приблизительно 10 000 раз меньшее значение, чем K_d для аптамера с нерелевантной молекулой.

[0118] В одном варианте осуществления аптамер связывается с ТРР с аффинностью, которая по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере примерно в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 1000 раз или по меньшей мере в 10 000 раз ниже, чем аффинность указанного аптамера к соединению формулы I-VII или к ацесуртиамину, ацетиамину, аллотиамину, беклотиамину, бенфотиамину, бентиамину, бисбентиамину, цетотиамину, циклотиамину, фурсултиамину, монофосфотиамину, октотиамину, просултиамину, сулбутиамину или винтиамолу. В одном варианте осуществления аптамер связывается с тиамин с аффинностью, которая по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере примерно в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по

меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 1000 раз или по меньшей мере в 10 000 раз ниже, чем аффинность указанного аптамера к соединению формулы I-VII или к ацесуртиамину, ацетиамину, аллителиамину, беклотиамину, бенфотиамину, бентиамину, бисбентиамину, цетотиамину, цикотиамину, фурсултиамину, монофосфотиамину, октотиамину, просултиамину, сулбутиамину или винтиамолу.

[0119] Аптамеры для регуляции экспрессии генов

[0120] В некоторых вариантах осуществления в данном раскрытии подразумевается аптамер, применяемый для регуляции экспрессии генов. Регуляция экспрессии гена-мишени (например, терапевтический трансген) представляет собой преимущество в разнообразных ситуациях. В контексте терапевтической экспрессии генов, например, методы, позволяющие регулировать экспрессию трансгенов в ответ на присутствие малой молекулы, могут повышать безопасность и эффективность, позволяя регулировать уровень экспрессии гена-мишени и ее время. В исследовательских условиях регуляция экспрессии генов позволяет систематически изучать различные экспериментальные условия.

[0121] В вариантах осуществления последовательность, кодирующая аптамер, является частью кассеты генной регуляции, которая обеспечивает способность регулировать уровень экспрессии гена-мишени в ответ на присутствие или отсутствие малой молекулы, описанной в данном документе. В вариантах осуществления кассета генной регуляции дополнительно содержит ген-мишень. Используемый в данном документе «ген-мишень» относится к трансгену, который экспрессируется в ответ на присутствие или отсутствие раскрытых в данном документе лигандов малых молекул вследствие связывания малых молекул с раскрытыми в данном документе аптамерами. В вариантах осуществления ген-мишень содержит кодирующую последовательность для белка (например, терапевтического белка), миРНК или киРНК. Ген-мишень гетерологичен аптамеру, используемому для регуляции экспрессии гена-мишени, гетерологичен полинуклеотидной кассете, используемой для регуляции гена-мишени, и/или гетерологичен части полинуклеотидной кассеты, используемой для регуляции гена-мишени.

[0122] При использовании для регуляции экспрессии гена-мишени в ответ на присутствие/отсутствие лиганда, описанные в данном документе аптамеры могут быть частью полинуклеотидной кассеты, которая кодирует аптамер как часть РНК-переключателя. Термины «кассета генной регуляции», «регуляторная кассета» или «полинуклеотидная кассета» применяются в данном документе взаимозаменяемо.

[0123] В вариантах осуществления присутствие малой молекулы, связывающейся с аптамером, раскрытым в данном документе, приводит к увеличению экспрессии гена-

мишени по сравнению с экспрессией гена-мишени в отсутствие малой молекулы. В таком варианте осуществления аптамер представляет собой «переключатель». В вариантах осуществления экспрессия гена-мишени увеличивается по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или по меньшей мере в 10 000 раз в присутствии малой молекулы, связывающейся с аптамером, раскрытым в данном документе, по сравнению с отсутствием малой молекулы. В вариантах осуществления экспрессия гена-мишени увеличивается от 2 раз до 10 раз, от 5 раз до 10 раз, от 5 раз до 15 раз, от 5 раз до 20 раз, от 5 раз до 25 раз, от 5 раз до 30 раз, от 10 раз до 20 раз, от 10 раз до 30 раз, от 10 раз до 40 раз, от 10 раз до 50 раз, от 10 раз до 100 раз, в пределах 10 раз и 500 раз, в пределах 10 раз и 1000 раз, в пределах 50 раз и 100 раз, в пределах 50 раз и 500 раз, в пределах 50 раз и 100 раз, в пределах 50 раз и 1000 раз, в пределах 100 раз и 1000 раз или в пределах 100 раз и 10000 раз в присутствии малой молекулы, связывающейся с аптамером, раскрытым в данном документе, по сравнению с отсутствием малой молекулы.

[0124] В вариантах осуществления присутствие малой молекулы, связывающейся с аптамером, раскрытым в данном документе, приводит к уменьшению экспрессии гена-мишени по сравнению с экспрессией гена-мишени в отсутствие малой молекулы. В таком варианте осуществления аптамер представляет собой «выключатель». В вариантах осуществления экспрессия гена-мишени уменьшается по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или по меньшей мере в 10 000 раз в присутствии малой молекулы, связывающейся с аптамером, раскрытым в данном документе, по сравнению с отсутствием малой молекулы. В одном варианте осуществления экспрессия гена-мишени уменьшается от 2 раз до 10 раз, от 5 раз до 10 раз, от 5 раз до 15 раз, от 5 раз до 20 раз, от 5 раз до 25 раз, от 5 раз до 30 раз, от 10 раз до 20 раз, от 10 раз до 30 раз, от 10 раз до 40 раз, от 10 раз до 50 раз, от 10 раз до 100 раз, в пределах 10 раз и 500 раз, в пределах 10 раз и 1000 раз, в пределах 50 раз и 100 раз, в пределах 50 раз и 500 раз, в пределах 50 раз и 100 раз, в пределах 50 раз и 1000 раз, в пределах 100 раз и 1000 раз или в пределах 100 раз и 10 000 раз в присутствии малой молекулы, связывающейся с аптамером, раскрытым в данном документе, по сравнению с отсутствием малой молекулы.

[0125] В вариантах осуществления аптамер представляет собой часть РНК-переключателя. РНК-переключатели представляют собой регуляторные сегменты РНК-полинуклеотида, который регулирует стабильность РНК-полинуклеотида и/или регулирует продукцию белка из РНК-полинуклеотида в ответ на присутствие или отсутствие аптамер-специфических молекул-лигандов. В вариантах осуществления РНК-переключатель содержит сенсорную область (например, аптамерную область) и эффекторную область, которые совместно отвечают за распознавание наличия лиганда (например, низкомолекулярного) и вызывают воздействие, ведущее к увеличению или снижению экспрессии гена-мишени. РНК-переключатели, описанные в данном документе, являются рекомбинантными с использованием полинуклеотидов из двух или более источников. В вариантах осуществления сенсорная и эффекторная области соединены полинуклеотидным линкером. В вариантах осуществления полинуклеотидный линкер образует стебель или спаренную область РНК (т. е. область РНК-полинуклеотида, которая является двухцепочечной). В вариантах осуществления спаренная область, связывающая аптамер с эффекторной областью, включает весь или часть стебля аптамера (например, например, весь или часть стебля Р1 аптамера).

[0126] РНК-переключатели, содержащие аптамерные последовательности, могут использовать, например, для контроля образования *rho*-независимых шпилек терминации транскрипции, приводящих к преждевременной терминации транскрипции. РНК-переключатели, содержащие аптамерные последовательности, могут также индуцировать структурные изменения в РНК, приводящие к изъятию сайта связывания рибосом и ингибированию трансляции. Альтернативные структуры РНК-переключателей, содержащие раскрытые в данном документе аптамерные последовательности, могут дополнительно влиять на сплайсинг мРНК в ответ на присутствие лиганда малой молекулы.

[0127] РНК-переключатели с альтернативным сплайсингом

[0128] В одном варианте осуществления аптамеры, описанные в данном документе, кодируются в виде части кассеты генной регуляции для регуляции гена-мишени путем опосредованного аптамером/лигандом альтернативного сплайсинга получаемой РНК (например, пре-мРНК). В этом контексте кассета регуляции генов содержит РНК-переключатель, состоящий из сенсорной области (например, аптамеры, описанные в настоящем документе) и эффекторной области, которые вместе отвечают за распознавание присутствия лиганда малой молекулы и измененный сплайсинг в альтернативном экзоне. Сплайсинг относится к процессу, в ходе которого из возникающей пре-матричной РНК (пре-мРНК) удаляется интронная последовательность, и экзоны соединяются вместе,

образуя мРНК. Сайты сплайсинга — это стыки между экзонами и интронами, которые определяются различными консенсусными последовательностями на 5' и 3' концах интрона (т. е. сайты донорского сплайсинга и акцепторного сплайсинга, соответственно). Сплайсинг осуществляется большой многокомпонентной структурой, называемой сплайсосомой, которая представляет собой набор малых ядерных рибонуклеопротеинов (snRNP) и разнообразного набора вспомогательных белков. Распознавая различные цис-регуляторные последовательности, сплайсосома определяет границы между экзона/интрона, удаляет интронные последовательности и соединяет экзоны в конечную матричную молекулу (например, мРНК). В случае альтернативного сплайсинга некоторые экзоны могут быть включены или исключены для изменения конечной кодирующей матричной молекулы, тем самым изменяя получаемый экспрессированный белок.

[0129] В одном варианте осуществления регуляция экспрессии гена-мишени достигается с использованием любой из ДНК-конструкций, раскрытых в WO2016/126747, которая тем самым включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В вариантах осуществления настоящего раскрытия РНК-переключатели и полинуклеотидные кассеты, раскрытые в WO2016/126747, содержат кодирующую аптамер последовательность, описанную в данном документе, вместо аптамерной последовательности, раскрытой в WO2016/126747.

[0130] В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета содержит (a) РНК-переключатель и (b) альтернативно сплайсируемый экзон, фланкированный 5' интроном и 3' интроном, причем РНК-переключатель содержит (i) эффекторную область, включающую стебель, который содержит 5' последовательность сайта сплайсинга из 3' интрона, и (ii) аптамер, раскрытый в данном документе. В вариантах осуществления эффекторная область содержит интронную 5' последовательность сайта сплайсинга (5' ss) интрона, который находится непосредственно рядом с 3' альтернативного экзона, а также последовательность, комплементарную 5' ss последовательности из 3' интрона. Когда аптамер связывает свой лиганд, эффекторная область образует стебель и, таким образом, предотвращает сплайсинг по сайту донорского сплайсинга на 3' конце альтернативного экзона. При определенных условиях (например, когда аптамер не связан со своим лигандом) эффекторная область находится в контексте, который обеспечивает доступ к сайту донорского сплайсинга на 3' конце альтернативного экзона, что приводит к включению альтернативного экзона в мРНК гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная кассета размещена в гене-мишени для регуляции экспрессии ген-мишени в ответ на лиганд. В варианте осуществления альтернативно

сплайсируемый экзон содержит стоп-кодон, который находится в рамке с геном-мишенью, когда альтернативно сплайсируемый экзон сплайсируется в мРНК гена-мишени.

[0131] В одном варианте осуществления касета генной регуляции содержит последовательность SEQ ID NO:37, в которой -X- представляет кодирующую аптамер последовательность, раскрытую в данном документе. Строчные буквы обозначают спаренную стеблевую последовательность, связывающую аптамер с остальной частью РНК-переключателя. В одном варианте осуществления альтернативный экзон (подчеркнутый в SEQ ID NO:37, ниже) заменяется другой последовательностью альтернативного экзона.

[0132] SEQ ID NO:37 -

GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATG
TCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTT
GCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATCTTATT
TCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCC
GAGTAACGCTGTTTCTCTAACTTGTAGGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAA
AAAAAAATCTTCAGTAGAAGgtaatgt-X-

acattacGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATAT
TGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAG
GCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTAT
CTTCCCTCCCACAG.

[0133] Альтернативный экзон фланкирован 5' и 3' интронными последовательностями. Интронные последовательности 5' и 3', которые могут применяться в касетах генной регуляции, раскрытых в данном документе, могут быть любой последовательностью, которая может сплайсироваться из гена-мишени, создавая либо мРНК гена-мишени, либо ген-мишень, содержащий альтернативный экзон в мРНК, в зависимости от наличия или отсутствия лиганда, связывающего аптамер. Каждая интронная последовательность 5' и 3' содержит последовательности, необходимые для прохождения сплайсинга, т. е., донор сплайсинга, акцептор сплайсинга и последовательности точки ветвления. В одном варианте осуществления 5' и 3' интронные последовательности касеты генной регуляции получены из одного или более встречающихся в природе интронов или их частей. В одном варианте осуществления 5' и 3' интронные последовательности получены из усеченного интрона 2 бета-глобина (IVS2Δ), из интрона 2 гена 03-глобина человека, из интрона мРНК SV40 (применяемого в векторе pCMV-LacZ от Clontech Laboratories, Inc.), из интрона 6 гена

триозофосфатизомеразы (TPI) человека (Nott Ajit, et al. РНК. 2003, 9:6070617) из интрона фактора IX человека (Sumiko Kurachi, et al. J. Bio. Chem. 1995, 270(10), 5276), из своего собственного интрона гена-мишени, или из любого геномного фрагмента или синтетического интрона (Yi Lai, et al. Hum Gene Ther. 2006:17(10): 1036), которые содержат элементы, достаточные для регулируемого сплайсинга (Thomas A. Cooper, Methods 2005 (37):331).

[0134] В одном варианте осуществления альтернативный экзон и РНК-переключатель сконструированы таким образом, чтобы находиться в эндогенном интроне гена-мишени. То есть интрон (или аналогичная интронная последовательность) естественным образом встречается в этом положении гена-мишени. В этом случае интронная последовательность непосредственно перед альтернативным экзоном называется 5' интроном или 5' интронной последовательностью, а интронная последовательность непосредственно после альтернативного экзона называется 3' интроном или 3' интронной последовательностью. В этом случае эндогенный интрон модифицируется таким образом, чтобы содержать акцепторную последовательность сплайсинга и донорскую последовательность сплайсинга, фланкирующие 5' и 3' концы альтернативного экзона. В одном варианте осуществления 5' и/или 3' интрон являются экзогенными к гену-мишени.

[0135] Сайты донорского сплайсинга и акцепторного сплайсинга в каскаде генной регуляции с альтернативным сплайсингом могут быть модифицированы в направлении усиления или ослабления. То есть сайты сплайсинга могут быть модифицированы так, чтобы быть ближе к консенсусной последовательности для сплайсинга донора или акцептора с помощью стандартных способов клонирования, сайт-направленного мутагенеза и т. п. Сайты сплайсинга, которые больше похожи на консенсусную последовательность сплайсинга, способствуют сплайсингу и, таким образом, усиливают его. Сайты сплайсинга, которые меньше похожи на консенсусную последовательность сплайсинга, препятствуют сплайсингу и, таким образом, ослабляют его. Консенсусная последовательность для донора сплайсинга наиболее распространенного класса интронов (U2) представляет собой A/C A G // G T A/G A G T (где // обозначает границу экзона/интрона). Консенсусная последовательность для акцептора сплайсинга представляет собой C A G // G (где // обозначает границу экзона/интрона). Частота встречаемости определенных нуклеотидов в сайтах донора и акцептора сплайсинга описана в данной области (см., например, Zhang, M. Q., Hum Mol Genet. 1988. 7(5):919-932). Силу 5' и 3' сайтов сплайсинга могут изменять для модуляции сплайсинга альтернативного экзона.

[0136] Дополнительные модификации 5' и 3' интронов, присутствующих в каскаде

генной регуляции альтернативного сплайсинга, которые могут создавать для модуляции сплайсинга, включают модификацию, удаление и/или добавление интронных элементов-энхансеров сплайсинга, интронных элементов-супрессоров сплайсинга и или сайтов сплайсинга, и/или модификацию последовательности сайта ветвления.

[0137] В одном варианте осуществления 5' интрон модифицировали, чтобы он содержал стоп-кодон, который будет находиться в рамке с геном-мишенью. Интронные последовательности 5' и 3' также могут модифицировать для удаления скрытых сайтов сплайсинга, которые могут идентифицировать с помощью общедоступного программного обеспечения (см., например, Kapustin, Y. et al. Nucl. Acids Res. 2011. 1-8).

[0138] Длину 5' и 3' интронных последовательностей могут изменять, чтобы, например, она соответствовала требованиям к размеру для вирусных экспрессионных конструкций. В одном варианте осуществления 5' и/или 3' интронные последовательности содержат в длину от около 50 до около 300 нуклеотидов. В одном варианте осуществления 5' и/или 3' интронные последовательности содержат в длину от около 125 до около 240 нуклеотидов.

[0139] Стеблевая часть эффекторной области должна иметь достаточную длину (и содержание GC), чтобы в значительной степени предотвращать альтернативный сплайсинг альтернативного экзона при связывании лиганда с аптамером, в то же время обеспечивая доступ к сайту сплайсинга, когда лиганд не присутствует в достаточном количестве. В вариантах осуществления стеблевая часть эффекторной области содержит стеблевую последовательность в дополнение к 5' последовательности сайта сплайсинга 3' интрона и ее комплементарной последовательности — 5' последовательности сайта сплайсинга. В вариантах осуществления эта дополнительная стеблевая последовательность содержит последовательность из стебля аптамера. Длина и последовательность части стебля могут изменять с помощью известных методов с целью выявления стеблей, которые обеспечивают приемлемую фоновую экспрессию гена-мишени при отсутствии лиганда и приемлемые уровни экспрессии гена-мишени при наличии лиганда. В одном варианте осуществления стебель эффекторной области РНК-переключателя имеет в длину от около 7 до около 20 пар оснований. В одном варианте осуществления стебель эффекторной области имеет в длину от около 8 до около 11 пар оснований. В дополнение к длине стебля, содержание пар оснований GC в стебле могут изменять для модификации стабильности стебля.

[0140] В одном варианте осуществления альтернативный экзон, входящий в состав кассет генной регуляции альтернативного сплайсинга, раскрытых в данном документе, представляет собой полинуклеотидную последовательность, способную

транскрибироваться в пре-мРНК и альтернативно сплайсироваться в мРНК гена-мишени. В одном варианте осуществления альтернативный экзон содержит по меньшей мере одну последовательность, которая ингибирует трансляцию таким образом, что когда альтернативный экзон включен в мРНК гена-мишени, то экспрессия гена-мишени с этой мРНК предотвращается или снижается. В предпочтительном варианте альтернативный экзон содержит стоп-кодон (TGA, TAA, TAG), который находится в рамке с геном-мишенью, когда альтернативный экзон включен в мРНК гена-мишени путем сплайсинга. В вариантах осуществления альтернативный экзон содержит, в дополнение к стоп-кодону или в качестве альтернативы стоп-кодону, другую последовательность, которая снижает или существенно предотвращает трансляцию, когда альтернативный экзон включается путем сплайсинга в мРНК гена-мишени, включая, например, сайт связывания микроРНК, что приводит к деградации мРНК. В одном варианте осуществления альтернативный экзон включает последовательность связывания микроРНК, которая приводит к деградации мРНК. В одном варианте осуществления альтернативный экзон кодирует полипептидную последовательность, которая снижает стабильность белка, содержащего эту полипептидную последовательность. В одном варианте осуществления альтернативный экзон кодирует полипептидную последовательность, которая направляет белок, содержащий эту полипептидную последовательность на деградацию.

[0141] Базальный или фоновый уровень сплайсинга альтернативного экзона могут оптимизировать путем изменения энхансерных последовательностей сплайсинга экзона (ESE) и супрессорных последовательностей сплайсинга экзона (ESS) и/или путем введения последовательностей ESE или ESS в альтернативный экзон. Такие изменения в последовательность альтернативного экзона могут осуществляться с помощью способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь, сайт-направленным мутагенезом. Альтернативно олигонуклеотиды желаемой последовательности (например, содержащие весь альтернативный экзон или его часть) могут получать из коммерческих источников и клонировать в кассету генной регуляции. Идентификацию последовательностей ESS и ESE могут выполнять способами, известными в данной области, включая, например, использование ESEfinder 3.0 (Cartegni, L. et al. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Research*, 2003, 31(13): 3568-3571) и/или другие доступные источники.

[0142] В одном варианте осуществления альтернативный экзон представляет собой встречающийся в природе экзон. В другом варианте осуществления альтернативный экзон получен из всего или части известного экзона. В данном контексте «производный»

относится к альтернативному экзону, содержащему последовательность, которая по существу гомологична встречающемуся в природе экзону или его части, но может содержать различные мутации, например, мутации, полученные путем изменения энхансерных последовательностей сплайсинга экзона (ESE) и супрессорных последовательностей сплайсинга экзона (ESS) и/или путем введения последовательностей ESE или ESS в альтернативный экзон. «Гомология» и «гомологичный», используемые в данном документе, относятся к проценту идентичности между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидными последовательностями. Соответствие между одной и другой последовательностями могут определять способами, известными в данной области. Например, гомологию могут определять путем прямого сравнения двух полипептидных молекул путем выравнивания их последовательностей и использования легкодоступных компьютерных программ. Альтернативно гомологию могут определять путем гибридизации полинуклеотидов в условиях, способствующих образованию стабильных дуплексов между гомологичными областями, с последующим расщеплением специфической (-ими) нуклеазой (-ами), специфичной (-ыми) к одноцепочечным участкам, и определения размера расщепленных фрагментов. Две полинуклеотидные или две полипептидные последовательности являются «по существу гомологичными» друг другу, если после оптимального выравнивания с соответствующими вставками или делециями по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% и по меньшей мере около 95% нуклеотидов или аминокислот, соответственно, совпадают на определенной длине молекул, как определено с помощью вышеуказанных способов.

[0143] В одном варианте осуществления альтернативный экзон является экзонным по отношению к гену-мишени, хотя его могут получать из последовательности, происходящей из организма, в котором будет экспрессироваться этот ген-мишень. Используемый в настоящем документе «экзогенный» означает полученный из генотипически отличного элемента от остальной части элемента, с которым он сравнивается или в который он введен или инкорпорирован. Например, полинуклеотид, введенный методами генной инженерии в другой тип клеток, представляет собой гетерологичный полинуклеотид (и при экспрессии может кодировать гетерологичный полипептид). В одном варианте осуществления альтернативно сплайсируемый экзон происходит из экзона 2 гена дигидрофолат-редуктазы человека (DHFR), мутантного экзона 5 опухоли Вильмса 1 человека, экзона 16 дельта кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II мыши или экзона 6 SIRT1. В вариантах осуществления альтернативно сплайсируемый экзон представляет собой или включает в

себя модифицированные экзон 2 DHFR в SEQ ID NO:79 (GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAG). В вариантах осуществления альтернативно сплайсируемый экзон представляет собой или включает в себя модифицированные экзон 2 DHFR в SEQ ID NO:98 GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAG.

[0144] Аптамер-опосредованное расщепление посредством саморасщепляющихся рибозимов

[0145] В одном варианте осуществления опосредованная аптамером экспрессия гена-мишени регулируется посредством опосредованной аптамерами модуляции малых эндонуклеолитических рибозимов. Рибозим — это РНК-фермент, катализирующий химическую реакцию. В нуклеиновых кислотах и способах, раскрытых в данном документе, рибозим может быть любым малым эндонуклеолитическим рибозимом, который саморасщепляется в клетке-мишени, включая, но не ограничиваясь этим, рибозим в виде головки молотка, шпильки, рибозим вируса гепатита дельта, рибозим спутник Варкуда, твистер, твистер-систер, рибозим в виде пистолета или топора. Соответственно, в одном варианте осуществления представлены РНК-переключатель и кассета генной экспрессии, включающая РНК-переключатель, который содержит рибозим, связанный с раскрытым в настоящем документе аптамером. В WO2017/136608, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки, описаны такие РНК-переключатели, которые активируют саморасщепление рибозима в присутствии лиганда аптамера (выключатель), или РНК-переключатели, которые ингибируют саморасщепление рибозима в присутствии аптамера (включатель).

[0146] В сценарии «выключателя» связывание аптамера/лиганда усиливает рибонуклеазную функцию рибозима, что приводит к расщеплению РНК гена-мишени, содержащего полинуклеотидную кассету, тем самым снижая экспрессию гена-мишени. Примеры такого выключателя включают в себя полинуклеотидную кассету для регуляции экспрессии гена-мишени, содержащую РНК-переключатель, который состоит из рибозима твистер, связанного стеблем с аптамером, причем стебель, связывающий рибозим твистер с аптамером, присоединяется к рибозиму в положении стебля Р3 рибозима твистер, и при этом ген-мишень связан со стеблем Р1 рибозима твистер (см., например, Фиг. 1a, 1b или 3a из WO2017/136608 и соответствующий текст, включенный в данный документ посредством ссылки).

[0147] В сценарии «включателя» связывание аптамера/лиганда усиливает рибонуклеазную функцию рибозима, что снижает расщепление РНК гена-мишени,

содержащего полинуклеотидную кассету, тем самым увеличивая экспрессию гена-мишени в присутствии лиганда. Примеры включателя включают РНК-переключатель, который включает в себя рибозим твистер, связанный с аптамером, причем аптамер связан с 3' или 5' концом стебля Р1 рибозима твистер, причем аптамер связан с 3' концом стебля Р1 рибозима твистера, часть 3' плеча стебля Р1 рибозима твистер альтернативно является 5' плечом стебля Р1 аптамера, и при этом аптамер связан с 5' концом стебля Р1 рибозима твистер, часть 5' плеча стебля Р1 рибозима твистер альтернативно является 3' плечом стебля Р1 аптамера (см., например, Фиг. 6а–6б из WO2017/136608 и соответствующий текст, включенный в данный документ посредством ссылки).

[0148] Аптамерная модуляция полиаденилирования

[0149] В вариантах осуществления экспрессия гена-мишени регулируется посредством полиаденилирования, модулируемого аптамерами. 3' конец почти всех эукариотических мРНК состоит из хвоста поли(А) — гомополимера из 20–250 остатков аденозина. Поскольку добавление хвоста поли(А) к мРНК защищает ее от деградации, на экспрессию гена можно влиять, модулируя полиаденилирование соответствующей мРНК.

[0150] В одном варианте осуществления экспрессия гена-мишени регулируется посредством доступности сигналов полиаденилирования, модулируемой аптамерами, как описано в и WO2018/156658, которые включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. В таких вариантах осуществления РНК-переключатель содержит эффекторный стебель-петлю и аптамер, описанный в настоящем документе, причем эффекторный стебель-петля включает сигнал полиаденилирования, и при этом аптамер и эффекторный стебель-петля связаны альтернативно общим стеблевым плечом, включающим последовательность, комплементарную к необобщенному плечу аптамерного стебля и к необобщенному плечу эффекторной стеблевой петли (см., например, Фиг. 1а, 1б, 2а и 5а WO2018/156658 и соответствующий текст, включенный в настоящий документ посредством ссылки). В одном варианте осуществления эффекторный стебель-петля расположен на 3' конце аптамера таким образом, что альтернативно обобщенное плечо стебля включает всё 3' плечо аптамерного стебля или его часть и всё 5' плечо эффекторного стебля или его часть. В одном варианте осуществления эффекторный стебель-петля расположен на 5' конце аптамера таким образом, что альтернативно обобщенное плечо стебля включает всё 5' плечо аптамерного стебля или его часть и всё 3' плечо эффекторного стебля или его часть. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой ААТAAA или АТТAAA. В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования представляет последующий (даунстрим) элемент (DSE). В одном

варианте осуществления сигнал полиаденилирования представляет собой элемент предыдущей (апстрим) последовательности (USE). В одном варианте осуществления полинуклеотидная кассета включает два РНК-переключателя, причем эффекторная стволовая петля первого РНК-переключателя содержит весь сигнал полиаденилирования ААТААА или АТТААА или его часть, и эффекторная стволовая петля второго РНК-переключателя содержит весь последующий элемент (DSE) или его часть. В одном варианте осуществления каждый из двух РНК-переключателей содержит аптамеры, которые связывают один и тот же лиганд. В одном варианте осуществления два РНК-переключателя содержат различные аптамеры, которые связывают разные лиганды.

[0151] В некоторых вариантах осуществления РНК-переключатель содержит чувствительную область (например, аптамер, описанный в настоящем документе) и эффекторную область, содержащую сайт связывания для малого ядерного рибонуклеопротеина (snRNP) U1, который является частью сплайсосомы. В WO2017/136591 описаны РНК-переключатели, причем эффекторная область содержит сайт связывания snRNP U1, и она включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Когда аптамер связывает свой лиганд, эффекторная область образует стебель и блокирует сайт связывания snRNP U1 от связывания snRNP U1. При определенных условиях (например, когда аптамер не связан со своим лигандом), эффекторная область находится в контексте, который обеспечивает доступ к сайту связывания snRNP U1, позволяя snRNP U1 связывать мРНК и ингибировать полиаденилирование, что приводит к деградации матричной молекулы. Сайт связывания snRNP U1 может быть любой полинуклеотидной последовательностью, способной связывать snRNP U1, тем самым рекрутируя snRNP U1 в 3' UTR гена-мишени и подавляя полиаденилирование матричной молекулы гена-мишени. В одном варианте осуществления сайт связывания snRNP U1 представляет собой консенсусный сайт CAGGTAAGTA (SEQ ID NO:80) (CAGGUAAGUA, SEQ ID NO:81, когда находится в мРНК). В некоторых вариантах осуществления сайт связывания snRNP U1 является вариацией этой консенсусной последовательности, включая, например, последовательности, которые короче или содержат один или более измененных нуклеотидов по сравнению с консенсусной последовательностью. В одном варианте осуществления сайт связывания snRNP U1 содержит последовательность CAGGTAAG. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания кодируется последовательностью, выбранной из CAGGTAAGTA (SEQ ID NO:80), CAGGTAAGT, и CAGGTAAG. Сайт связывания snRNP U1 может быть любым 5' сайтом сплайсинга, происходящий из гена, например 5' сайтом сплайсинга из экзона 2 DHFR человека.

[0152] Опосредованная аптамерами модуляция рибонуклеазного расщепления

[0153] В одном варианте осуществления экспрессия гена-мишени регулируется посредством рибонуклеазного расщепления, модулируемого аптамером. Рибонуклеазы (РНКазы) распознают и расщепляют специфические последовательности рибонуклеазного субстрата. В данном документе предложены рекомбинантные ДНК-конструкции, которые при включении в ДНК гена-мишени обеспечивают способность регулировать экспрессию гена-мишени путем опосредованного аптамером/лигандом рибонуклеазного расщепления образующейся РНК. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность аптамера, описанная в настоящем документе, является частью конструкции, которая содержит или кодирует последовательность рибонуклеазного субстрата и РНК-переключатель, содержащий эффекторную область и аптамер таким образом, что когда аптамер связывает лиганд, происходит экспрессия гена-мишени (как описано в WO2018/161053, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). В вариантах осуществления последовательность субстрата РНКазы Р связана с РНК-переключателем, причем РНК-переключатель содержит эффекторную область и аптамер, описанный в данном документе, при этом эффекторная область содержит последовательность, комплементарную части последовательности субстрата РНКазы Р. Связывание подходящего лиганда с аптамером индуцирует структурные изменения в аптамере и эффекторной области, изменяя доступность последовательности рибонуклеазного субстрата для расщепления рибонуклеазой.

[0154] В одном варианте осуществления аптамерная последовательность расположена на 5' конце от последовательности субстрата РНКазы Р, и эффекторная область содержит всю лидерную последовательность или ее часть и всю 5' последовательность акцепторного стебля или ее часть из последовательности субстрата РНКазы Р. См., например, Фиг. 1a, 1b и 3b из WO2018/161053 и ассоциированный текст, включенные в данный документ посредством ссылки. В дальнейших вариантах осуществления акцепторный стебель субстрата РНКазы Р и эффекторная область РНК-переключателя разделены 0, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидами. В других вариантах осуществления стебель эффекторной области содержит, в дополнение к лидерной последовательности (и ее комплементарной последовательности), один или более нуклеотидов акцепторного стебля субстрата РНКазы Р и последовательность, комплементарную одному или более нуклеотидам акцепторного стебля.

[0155] В одном варианте осуществления аптамерная последовательность полинуклеотидной кассеты расположена на 3' конце от последовательности субстрата

РНКазы Р, и эффекторная область содержит всю последовательность, комплементарную всему 3' акцепторному стеблю последовательности субстрата РНКазы Р. См., например, Фиг. 3а из WO2018/161053 и ассоциированный текст, включенные в данный документ посредством ссылки. В дальнейших вариантах осуществления последовательность эффекторной области, комплементарная 3' акцепторному стеблю субстрата РНКазы Р, составляет от 1 до 7 нуклеотидов. Другими словами, стебель эффекторной области включает от 1 до 7 нуклеотидов акцепторного стебля и включает последовательность, комплементарную этим от 1 до 7 нуклеотидам акцепторного стебля. В вариантах осуществления РНК-переключатель расположен на 3' конце от субстрата РНКазы Р таким образом, что стебель эффекторной области и акцепторный стебель субстрата РНКазы Р не перекрываются. В вариантах осуществления эффекторная область и акцепторный стебель субстрата РНКазы Р находятся непосредственно рядом (т. е. не перекрываются). В других вариантах осуществления эффекторная область и акцепторный стебель субстрата РНКазы Р разделены 1, 2, 3, 4, 5 или более нуклеотидами.

[0156] Аптамеры и кассеты генной регуляции, раскрытые в настоящем документе, могут использовать для регуляции экспрессии любого гена-мишени, который может экспрессироваться в целевых клетке, ткани или организме. Термин «ген-мишень» относится к полинуклеотиду, который вводится в клетку и способен транскрибироваться в РНК и транслироваться и/или экспрессироваться в соответствующих условиях. Альтернативно ген-мишень является эндогенным для клетки-мишени, и кассету генной регуляции помещают в ген-мишень (например, в существующую нетранслируемую область или интрон эндогенного гена-мишени). Примером гена-мишени является полинуклеотид, кодирующий терапевтический полипептид. В одном варианте осуществления ген-мишень является экзогенным для клетки, в которой должна транскрибироваться рекомбинантная ДНК-конструкция. В другом варианте осуществления ген-мишень является эндогенным для клетки, в которой должна транскрибироваться рекомбинантная ДНК-конструкция. Ген-мишень может быть геном, кодирующим белок, или последовательностью, кодирующей небелковую кодирующую РНК. Ген-мишень может быть, например, геном, кодирующим структурный белок, фермент, клеточный сигнальный белок, митохондриальный белок, белок цинкового пальца, гормон, транспортный белок, фактор роста, цитокин, внутриклеточный белок, внеклеточный белок, трансмембранный белок, цитоплазматический белок, ядерный белок, рецепторную молекулу, РНК-связывающий белок, ДНК-связывающий белок, фактор транскрипции, трансляционный механизм,

канальный белок, двигательный белок, молекулу клеточной адгезии, митохондриальный белок, метаболический фермент, киназу, фосфатазу, факторы обмена, белок-шаперон и модуляторы любого из них. В вариантах осуществления ген-мишень кодирует эритропоэтин (Epo), гормон роста человека (hGH), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), человеческий инсулин, CRISPR-ассоциированный белок 9 (cas9) или иммуноглобулин (или его часть), включая, например, терапевтическое антитело.

[0157] В вариантах осуществления аптамеры и кассеты генной регуляции, раскрытые в настоящем документе, используют для регуляции экспрессии гена-мишени в эукариотических клетках, например в клетках млекопитающих и, более конкретно, в клетках человека. В вариантах осуществления аптамеры и кассеты генной регуляции, раскрытые в настоящем документе, используют для регуляции экспрессии гена-мишени в глазу (включая роговицу и сетчатку), центральной нервной системе (включая головной мозг), печени, почках, поджелудочной железе, сердце, дыхательных путях, мышцах, коже, легких, хрящах, семенниках, артериях, вилочковой железе, костном мозге или в опухолях.

[0158] В одном аспекте предложены рекомбинантные векторы и их применение для введения полинуклеотида, включающего ген-мишень и кассету генной регуляции, причем кассета генной регуляции содержит аптамер, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ДНК-конструкции включают в себя дополнительные ДНК-элементы, содержащие ДНК-сегменты, обеспечивающие репликацию ДНК в клетке-хозяине и экспрессию гена-мишени в клетках-мишенях на соответствующих уровнях. Специалист средней квалификации понимает, что последовательности контроля экспрессии (промоторы, энхансеры и т. п.) выбирают на основе их способности стимулировать экспрессию гена-мишени в клетке-мишени. «Вектор» означает рекомбинантную плазмиду, дрожжевую искусственную хромосому (YAC), мини-хромосому, мини-кольцевую ДНК или вирус (включая последовательности, полученные из вирусов), содержащие полинуклеотид, который необходимо доставлять в клетку-хозяина *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте осуществления рекомбинантный вектор представляет собой вирусный вектор или комбинацию нескольких вирусных векторов.

[0159] Вирусные векторы для экспрессии гена-мишени в целевых клетке, ткани или организме известны в данной области и включают аденовирусные (AV) векторы, векторы адено-ассоциированного вируса (AAV), ретровирусные и лентивирусные векторы и векторы вируса простого герпеса типа 1 (HSV1).

[0160] Аденовирусные векторы включают, например, векторы на основе аденовируса человека типа 2 и аденовируса человека типа 5, которые стали дефектными по репликации благодаря делециям в областях E1 и E3. Транскрипционную кассету могут вставлять в область E1, в результате чего получается рекомбинантный вектор AV с удаленными E1/E3. Аденовирусные векторы также включают хелпер-зависимые аденовирусные векторы высокой емкости (также известные как «высокоемкие», «дефектные» или «пустые» векторы), которые не содержат вирусных кодирующих последовательностей. Эти векторы содержат цис-действующие элементы, необходимые для репликации и упаковки вирусной ДНК, в основном последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) и сигнал упаковки (CY). Геномы этих хелпер-зависимых AV-векторов способны переносить от нескольких сотен пар оснований до приблизительно 36 т. н. чужеродной ДНК.

[0161] Векторы рекомбинантного адено-ассоциированного вируса «гAAV» включают в себя любой вектор, полученный из любого серотипа адено-ассоциированного вируса, включая, без ограничений, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-7 и AAV-8, AAV-9, AAV-10 и т. п. Векторы гAAV могут иметь один или более полностью или частично удаленных генов AAV дикого типа, предпочтительно генов Rep и/или Cap, но сохраняя функциональные фланкирующие последовательности ITR. Функциональные последовательности ITR сохраняются для сохранения, репликации, упаковки и потенциальной хромосомной интеграции генома AAV. ITR не обязательно должны быть нуклеотидными последовательностями дикого типа, их могут изменять (например, путем вставки, делеции или замены нуклеотидов) до тех пор, пока последовательности обеспечивают функциональное сохранение, репликацию и упаковку.

[0162] Альтернативно могут применять другие системы, такие как лентивирусные векторы. Системы на основе лентивирусов могут трансдуцировать как в неделящиеся, так и делящиеся клетки, что делает их пригодными для применений, нацеленных, например, на неделящиеся клетки ЦНС. Лентивирусные векторы pochodят из вируса иммунодефицита человека и, как и этот вирус, интегрируются в геном хозяина, обеспечивая возможность очень длительной экспрессии генов.

[0163] Полинуклеотиды, включая плазмиды, YAC, минихромосомы и миникольцевые молекулы, несущие ген-мишень, содержащий кассету генной регуляции, также могут внедрять в клетку или организм с помощью невирусных векторных систем, использующих в качестве носителей, например, катионные липиды, полимеры или и то, и другое. Конъюгированные поли-L-лизиновые (PLL) полимерные и полиэтилениминовые (PEI) полимерные системы также могут использовать для доставки вектора в клетки. Другие

способы доставки вектора в клетки включают гидродинамическую инъекцию и электропорацию, а также использование ультразвука, как для культуры клеток, так и для организмов. Для получения обзора о вирусных и невирусных системах доставки для доставки генов см. Nayerossadat, N. et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1:27), включенную в данный документ посредством ссылки.

[0164] В одном аспекте в настоящем раскрытии предлагается способ модуляции экспрессии гена-мишени (например, терапевтического гена), включающий (а) вставку полинуклеотидной кассеты, содержащей аптамер, раскрытый в данном документе, в ген-мишень, (b) введение гена-мишени, содержащего полинуклеотидную кассету, в клетку, и (c) воздействие на клетку низкомолекулярного лиганда, который специфически связывает аптамер в количестве, эффективном для индукции экспрессии гена-мишени. В некоторых аспектах экспрессия гена-мишени в клетках-мишенях придает желаемое свойство клетке, в которую он был введен, или иным образом приводит к желаемому терапевтическому результату.

[0165] В одном варианте осуществления кассету генной регуляции, содержащую аптамер, раскрытый в настоящем документе, вставляют в кодирующую белок последовательность гена-мишени (а не в 5' или 3' нетранслируемые области). В одном варианте осуществления единственную кассету генной регуляции, содержащую аптамер, раскрытый в настоящем документе, вставляют ген-мишень. В других вариантах осуществления в ген-мишень вставляют 2, 3, 4 или более кассет генной регуляции, причем одна или более кассет генной регуляции содержат аптамер, раскрытый в настоящем документе. В одном варианте осуществления в ген-мишень вставляют две кассеты генной регуляции, причем одна или более кассет генной регуляции содержат аптамер, раскрытый в настоящем документе. Когда несколько кассет генной регуляции вставлены в ген-мишень, каждая из них может содержать один и тот же аптамер, что позволяет использовать единственный лиганд для модуляции экспрессии гена-мишени. В других вариантах осуществления в ген-мишень вставляют несколько кассет генной регуляции, каждая из которых может содержать различные аптамеры, так что воздействие нескольких различных низкомолекулярных лигандов модулирует экспрессию гена-мишени.

[0166] **Способы лечения и применения фармацевтических композиций**

[0167] В одном аспекте предложен способ регулирования уровня терапевтического белка, получаемого путем генной терапии. Терапевтическая генная последовательность,

содержащая регуляторную кассету, включающую в себя аптамер, раскрытый в настоящем документе, доставляется в клетки-мишени в организме, например, с помощью вектора. Клеточная специфичность экспрессии гена-мишени может контролироваться промотором и/или другими элементами внутри вектора и/или капсида вирусного вектора. Доставка векторной конструкции, содержащей ген-мишень, и трансфекция ней тканей-мишеней, приводящая к стабильной трансфекции регулируемого гена-мишени, является первым шагом в продуцировании терапевтического белка. Однако из-за наличия аптамера внутри последовательности гена-мишени, он не экспрессируется на значительных уровнях, т. е. находится в «выключенном состоянии» в отсутствие специфического лиганда, который связывается с аптамером, содержащимся в регуляторной кассете РНК-переключателя. Только при введении лиганда, специфичного для аптамера, происходит активация экспрессии гена-мишени.

[0168] Доставка векторной конструкции, содержащей ген-мишень, и доставка активирующего лиганда обычно разделены во времени. Доставка активирующего лиганда будет контролировать момент экспрессии гена-мишени, а также уровень экспрессии белка. Лиганд могут доставлять множеством способов, включая, но не ограничиваясь ими, интравитреальный, внутриглазной, ингаляционный, подкожный, внутримышечный, внутрикожный, внутриочаговый, местный, внутрибрюшинный, внутривенный (ВВ), внутриартериальный, периваскулярный, интрацеребральный, интрацеребровентрикулярный, пероральный, сублингвальный, сублабиальный, буккальный, назальный, внутригрудный, внутрисердечный, интратекальный, эпидуральный, внутрикостный или внутрисуставный.

[0169] Время доставки лиганда будет зависеть от необходимости активации гена-мишени. Например, если терапевтический белок, кодируемый геном-мишенью, требуется постоянно, пероральный низкомолекулярный лиганд могут доставлять ежедневно или несколько раз в сутки, чтобы обеспечить постоянную активацию гена-мишени и, таким образом, постоянную экспрессию терапевтического белка. Если ген-мишень обладает длительным действием, индуцирующий лиганд можно дозировать реже, например раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц.

[0170] Описанные в данном документе аптамеры в контексте кассеты генной регуляции, содержащей РНК-переключателя, позволяют временно контролировать экспрессию терапевтического трансгена, путем определяемой временной дозировкой лиганда, специфичного для этого аптамера. Экспрессия терапевтического трансгена только при введении лиганда повышает безопасность лечения генной терапией, позволяя выключать

ген-мишень в отсутствие лиганда.

[0171] Различные аптамеры могут применять в нескольких РНК-переключателях, что позволяет различным лигандам повышать или понижать экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления каждый терапевтический ген, содержащий регуляторную кассету, будет иметь специфический аптамер внутри кассеты, который будет активироваться специфической малой молекулой. Это означает, что каждый терапевтический ген может быть активирован только лигандом, специфичным для размещенного в нем аптамера. В этих вариантах осуществления каждый лиганд будет активировать только один терапевтический ген. Это дает возможность доставки одному индивиду нескольких различных «генов-мишеней», каждый из которых будет активирован при доставке специфического лиганда для аптамера, содержащегося в регуляторной кассете, расположенной в каждом гене-мишени.

[0172] Аптамеры, раскрытые в настоящем документе в контексте РНК-переключателя, позволяют любому терапевтическому белку, ген которого может быть доставлен в организм (например, эритропоэтину (ЭПО) или терапевтическому антителу), продуцироваться организмом при доставке активирующего лиганда. Этот способ доставки терапевтических белков может заменять производство таких терапевтических белков вне организма, которые затем вводят или вливают, например, антитела, используемые при раке или для блокирования воспалительных или аутоиммунных заболеваний. Организм, содержащий регулируемый ген-мишень, становится фабрикой по производству биологических препаратов, которая включается при введении ген-специфического лиганда.

[0173] В одном варианте осуществления белок-мишень может быть нуклеазой, которая может нацеливаться и редактировать конкретную последовательность ДНК. Такие нуклеазы включают Cas9, содержащие цинковые пальцы нуклеазы или TALEN. В случае этих нуклеаз белок нуклеазы может потребоваться лишь на короткий период времени, достаточный для редактирования эндогенных генов-мишеней. Однако если в организм доставляется нерегулируемый ген нуклеазы, этот белок может присутствовать до конца жизни клетки. В случае нуклеаз риск нецелевого редактирования возрастает тем больше, чем дольше присутствует нуклеаза. Регулирование экспрессии таких белков имеет значительное преимущество с точки зрения безопасности. В этом случае вектор, содержащий ген-мишень нуклеазы, содержащий регуляторную кассету, могут доставлять в соответствующие клетки организма. В отсутствие кассетно-специфического лиганда ген-мишень находится в «выключенном» состоянии, поэтому нуклеаза не продуцируется. Только при введении активирующего лиганда нуклеаза продуцируется. По истечении

времени, достаточного для выполнения редактирования, лиганд удаляют и больше не вводят. После этого ген нуклеазы переходит в состояние «выключено», и больше нуклеаза не продуцируется, а редактирование прекращается. Этот подход могут использовать для коррекции генетических заболеваний, включая ряд наследственных ретинопатий, таких как LCA10, вызванная мутациями в CEP290, и болезнь Штаргардта, вызванная мутациями в ABCA4.

[0174] Введение регулируемого гена-мишени, кодирующего терапевтический белок, который активируется только на введение специфического лиганда, могут применять для регуляции терапевтического гена с целью лечения множества различных типов заболеваний, например ракового заболевания с помощью терапевтических антител, иммунных нарушений с помощью иммуномодуляторных белков или антител, метаболических заболеваний, редких заболеваний, таких как PNH с помощью антител против C5 или фрагментов антител в виде регулируемого гена, или окулярного ангиогенеза с помощью терапевтических антител, и сухой ВМД с помощью иммуномодуляторных белков.

[0175] Широкое разнообразие специфических генов-мишеней, обеспечивающих лечение широкого разнообразия специфических заболеваний и патологических состояний, пригодно для применения в виде гена-мишени, экспрессию которого можно регулировать с использованием описанных в данном документе аптамера/лиганда. Например, инсулин или аналог инсулина (предпочтительно человеческий инсулин или аналог человеческого инсулина) могут использоваться в качестве гена-мишени для лечения диабета I типа, диабета II типа или метаболического синдрома; гормон роста человека могут использовать в качестве гена-мишени для лечения детей с нарушениями роста или взрослых с дефицитом гормона роста; эритропоэтин (предпочтительно человеческий эритропоэтин) могут использовать в качестве гена-мишени для лечения анемии вследствие хронического заболевания почек, анемии вследствие миелодисплазии или анемии вследствие химиотерапии рака. Дополнительные гены-мишени, совместимые с аптамерами и кассетами генной экспрессии, раскрытыми в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, циклический нуклеотидом катионный канал альфа-3 (CNGA3) и управляемый циклическим нуклеотидом катионный канал бета-3 (CNGB3) для лечения ахроматопсии, ретиноидную изомерогидролазу (RPE65) для лечения пигментного ретинита или конгестивного амавроза Лебера, регулятор ГТФазы X-сцепленного пигментного ретинита (RPGR) для лечения X-сцепленного пигментного ретинита, декарбоксилазу глутаминовой кислоты (GAD), в том числе для лечения болезни Паркинсона, регулятор

нонсенс-транскриптов 1 (UPF1) для лечения бокового амиотрофического склероза и аквапорин для лечения радиационно-индуцированной ксеростомии и синдрома Шегрена. Дополнительные гены-мишени включают в себя ArchT (археродопсин из штамма TP009 *Halorubrum*), белок Jaws (круксгалородопсин, полученный из *Haloarcula* (*Halobacterium*) *salinarum* (штамм Shark)), iC1C2 (вариант химеры C1C2 между канальными родопсинами ChR1 и ChR2 из *Chlamydomonas reinhardtii*) или Rgs9-анкерный белок (R9AP), критический компонент комплекса ГТФазы, который опосредуют дезактивацию каскада фототрансдукции.

[0176] Экспрессионные конструкции, содержащие аптамер, раскрытый в настоящем документе, могут быть особенно пригодны для лечения заболеваний, вызванных дефектами одного гена, таких как муковисцидоз, гемофилия, мышечная дистрофия, талассемия или серповидно-клеточная анемия. Так, человеческий β -, γ -, δ - или ζ -глобин могут использовать в качестве гена-мишени для лечения β -талассемии или серповидно-клеточной анемии; человеческий фактор VIII или фактор IX могут использовать в качестве гена-мишени для лечения гемофилии А или гемофилии В.

[0177] Малые молекулы, описанные в данном документе, обычно объединяют с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями для формирования фармацевтических композиций, пригодных для введения пациенту. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, связующие, разбавители, разрыхлители, смазывающие вещества, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т. п., обычно применяемые в фармацевтической области. Фармацевтические композиции могут быть в форме таблеток, пилюль, капсул, пастилок и т. п. и составлены таким образом, чтобы быть совместимыми с их предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например внутривенное, интрадермальное, интраназальное, подкожное, пероральное, ингаляционное, трансдермальное (местное) и трансмукозальное введение.

[0178] Фармацевтические композиции, содержащие аналог или производное тиамин, вводят пациенту в таком режиме дозирования, чтобы доставлять пациенту количество аналога или производного тиамин, достаточное для желательной регуляции гена-мишени. Если дозированная форма представляет собой таблетку, пилюлю или т. п., предпочтительно фармацевтическая композиция содержит от 0,1 мг до 10 г аналога или производного тиамин; от 0,5 мг до 5 г аналога или производного тиамин; от 1 мг до 1 г аналога или производного тиамин; от 2 мг до 750 мг аналога или производного тиамин; от 5 мг до 500

мг аналога или производного тиамин; от 10 мг до 250 мг аналога или производного тиамин; или от 150 мг до 300 мг аналога или производного тиамин.

[0179] Фармацевтическую композицию могут дозировать раз в сутки или множество раз в сутки (например, 2, 3, 4, 5 или более раз в сутки). Альтернативно фармацевтические композиции могут дозировать реже, чем один раз в сутки, например, один раз в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней, или один раз в месяц, или один раз в несколько месяцев. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут вводить пациенту небольшое количество раз, например один, два, три раза и т. д.

[0180] В настоящем документе предложен способ лечения пациента, нуждающегося в увеличении экспрессии терапевтического белка, кодируемого геном-мишенью, способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей лиганд, с которым связывается или иным образом реагирует раскрытый в настоящем документе аптамер, причем пациенту ранее вводили рекомбинантную ДНК, содержащую ген-мишень, и при этом ген-мишень содержит раскрытую в настоящем документе каскету генной регуляции, которая обеспечивает способность регулировать экспрессию гена-мишени лигандом аптамера. В настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая лиганд, с которым связывается или иным образом реагирует раскрытый в настоящем документе аптамер, для применения в способе лечения пациента, нуждающегося в повышенной экспрессии терапевтического белка, кодируемого геном-мишенью, причем пациенту ранее вводили рекомбинантную ДНК, содержащую ген-мишень, и при этом ген-мишень содержит каскету генной регуляции, раскрытую в настоящем документе, которая обеспечивает возможность регуляции экспрессии гена-мишени лигандом аптамера.

[0181] Аптамеры для выявления и/или диагностических применений

[0182] Широкий спектр выявляющих и диагностических агентов может быть связан с аптамерами посредством химерной или физической конъюгации. Дополнительно аптамеры могут внедрять в биосенсоры, микроструйные устройства и другие платформы выявления. В некоторых вариантах осуществления аптамер конъюгирован с полиалкиленгликолевым фрагментом, включая, но не ограничиваясь этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль (ППГ), полиоксиэтилированный глицерин (ПОГ) и другие полиоксиэтилированные полиолы, поливиниловый спирт (ПВС) и другие полиалкиленоксиды, полиоксиэтилированный сорбит или полиоксиэтилированную глюкозу.

[0183] В некоторых вариантах осуществления аптамер конъюгирован с выявляемым фрагментом, включая, но не ограничиваясь ими, флуоресцентные фрагменты или метки, агенты для визуализации, радиоизотопные фрагменты, радиоконтрастные фрагменты и т. п., например выявляемые метки, такие как биотин, флуорофор, хромофоры, зонды спинового резонанса, наночастицы (включающие, но не ограничивающиеся, золотыми, магнитными и суперпарамагнитными наночастицами), квантовые точки, радиометки. Примеры флуорофоров включают флуоресцентные красители (например флуоресцеин, родамин и т. п.) и другие люминесцентные молекулы (например, люминал). Флуорофор может быть чувствительным к окружающей среде таким, что его флуоресценция меняется, если он расположен вблизи одного или более остатков в модифицированном белке, которые претерпевают структурные изменения при связывании субстрата (например, дансиловые зонды). Примеры радиометок включают в себя малые молекулы, содержащие атомы с один или более низкочувствительных ядер (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{123}I , $^{99\text{Tc}}$, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In и т. п.). В данной области известны дополнительные пригодные фрагменты.

[0184] В некоторых вариантах осуществления аптамер конъюгирован с терапевтическим фрагментом, включая, но не ограничиваясь этим, противовоспалительный агент, противораковый агент, антинейродегенеративный агент, противомикробный агент или, в целом, терапевтический агент.

[0185] Способы идентификации аптамера, который связывается с соединением

[0186] В настоящем документе раскрыты способы идентификации аптамера, который связывается с интересующим соединением (таким как малая молекула, включая аналог тиамин, аналог ТРР или их производные) или иным образом модулирует экспрессию гена-мишени в составе РНК-переключателя в ответ на добавление или воздействие интересующего соединения. В одном варианте осуществления способ включает стадии:

- (i) выбора исходной последовательности аптамера;
- (ii) получения аптамерной библиотеки, включающей в себя последовательности, кодирующие аптамер, выбранный на (i), причем один или более нуклеотидов в кодирующей аптамер последовательности являются случайным образом мутировавшими по одному или более положений, соответствующих одной или более неспаренных областей в аптамере, причем мутировавшие аптамерные последовательности находятся в контексте РНК-переключателя, который контролирует экспрессию гена-репортера;
- (iii) скрининг библиотеки из (ii) на аптамеры, обладающие увеличенной регуляцией

(например, более высокой кратностью индукции или репрессии) экспрессии гена-мишени в ответ на аналог тиамин по сравнению с исходной аптамерной последовательностью;

- (iv) необязательно повторяющиеся стадии (ii) и (iii) для аптамера, идентифицированного на стадии (iii) вместо аптамера, отобранного на стадии (i).

[0187] Исходная аптамерная последовательность может быть аптамером TPP, включая известные последовательности аптамеров TPP, или может быть предполагаемым аптамером TPP, идентифицированным путем поиска гомологичных последовательностей в доступных базах данных. Исходная аптамерная последовательность может быть последовательностью аптамера, раскрытой в настоящем документе.

[0188] Стадия выбора исходной аптамерной последовательности может включать в себя, например, (i) определение предполагаемого аптамера TPP; (ii) введение аптамера в РНК-переключатель, который модулирует экспрессию гена-мишени (например, гена-репортера); и (iii) воздействие на конструкцию РНК-переключателя/гена-мишени аналога или производного тиамин или TPP (например, соединений, описанных в настоящем документе).

[0189] Предполагаемый аптамер TPP могут идентифицировать из соответствующей базы данных последовательностей, такой как база данных Rfam, которая представляет собой набор семейств РНК, каждый представлен множественными выравниваниями последовательностей, консенсусными вторичными структурами и ковариационными моделями (СМ). В вариантах осуществления предполагаемый аптамер TPP идентифицирован из РНК-переключателя TPP Rfam семейства RF00059. В вариантах осуществления предполагаемый аптамер TPP содержит последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO:94 или SEQ ID NO:95 (соответственно, аптамера thiC или thiM со стеблями).

SEQ ID NO:94:

GUAAUGUGUCGGAGUGCCUUAAGGGAUUAUUCUUAAAGCUGAGACCGCAUUGC
GGGAUCCGUUGAACCUGAUCAGGCUAAUACCUUGCGAAGGGAACACAUUAC

SEQ ID NO:95:

GUAAUGUCUCGGGGUGCCCUUCUGCGUGAAGGCUGAGAAUACCCGUAUCACCUUG
AUCUGGAUAAUGCCAGCGUAGGGAAGACAUUAC

[0190] Предполагаемый аптамер TPP может быть вставлен в РНК-переключатель с

помощью способов, известных специалисту средней квалификации. Восприимчивость аптамера на присутствие TRP и одного или более аналогов или производных тиамин или TRP (например, соединений, описанных в данном документе) могут проверять в культуре клеток и/или в бесклеточной системе. В частности, система культуры клеток представляет собой культуру эукариотических клеток, включающую, например, культуру клеток млекопитающего, растения или насекомого.

[0191] Для идентификации аптамеров, реагирующих на аналог или производное тиамин или TRP (например, описанных в настоящем документе соединений), одно или более нуклеотидных положений последовательности, кодирующей аптамер (т. е. исходный аптамер), рандомизируют. Нуклеотидные положения для рандомизации могут выбирать на основе структуры исходной аптамерной последовательности. Предполагаемую вторичную структуру могут получать с использованием таких доступных программ, как RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) и/или сравнением с кристаллической структурой родственного аптамера (например, РНК-переключателя thiM *E. coli* из Edwards, TE & Ferré-D'Amaré, AR, Structure. 2006 Sep;14(9):1459-68). Например, могут идентифицировать неспаренные области аптамера, включая петлевые (L) области (например, L3 и/или L5) и области присоединения (J) (например, J3-2 (спаренные области присоединения P3 и P2), J2-4, и/или J4-5), и могут рандомизировать один или более нуклеотидов в одной или более неспаренных областей для создания библиотеки аптамеров. В вариантах осуществления рандомизированы один или более нуклеотидов, смежных с одной или более неспаренных областей. Кроме того, могут рандомизировать один или более нуклеотидов в спаренных (P) областях. Кроме того, могут добавлять или удалять один или более нуклеотидов в неспаренных или спаренных областях. Мутагенизированные аптамерные последовательности могут предлагать в виде библиотеки аптамерных последовательностей в контексте РНК-переключателя. В вариантах осуществления аптамерная библиотека предложена в контексте РНК-переключателя как часть кассеты генной экспрессии, описанной в данном документе.

[0192] Кодированные аптамеры последовательности содержащие одну или более мутаций могут тестировать на восприимчивость к наличию TRP или одного или более аналогов или производных тиамин или TRP, как описано выше. В вариантах осуществления аптамер, содержащий одну или более мутаций, является восприимчивым к аналогу или производному, но обладает сниженной восприимчивостью к тиамину и/или TRP, по сравнению с исходным аптамером из которого он происходит (в контексте того же РНК-переключателя/кассеты генной экспрессии).

[0193] Аптамеры, которые восприимчивы к желаемому соединению, могут дополнительно мутагенизироваться рандомизирующими нуклеотидами. Нуклеотиды в выбранном положении, например неспаренные области, могут рандомизировать и создавать библиотеки, как описано выше.

[0194] В некоторых вариантах осуществления интересующее соединение представляет собой аналог тиамин, такой как ацефуртиамин, ацетиамин, аллителиамин, ампролиум, беклотиамин, бенфотиамин, бентиамин, бисбентиамин, цетотиамин, цикотиамин, фурсултиамин, монофосфотиамин, октотиамин, окситиамин, просултиамин, сулбутиамин или винтиамол. В вариантах осуществления аналог тиамин или TPP представляет собой соединения формулы I-VIII, включающие в себя, но ограничивающиеся ими, соединения M10-M99. В вариантах осуществления аналог тиамин или TPP представляет собой один из M10, M16, M18, M19, M21, M26, M27, M28, M29, M30, M31, M32, M33 и M34.

[0195] Репортерные белки, кодируемые генами-репортерами, используемыми в способах, раскрытых в настоящем документе, представляют собой белки, которые могут анализировать путем обнаружения характеристик репортерного белка, таких как ферментативная активность или спектрофотометрические характеристики, или косвенно, например, с помощью анализов на основе антител. Примеры легко выявляемых продуктов генов-репортеров включают, но не ограничиваются ими, маркер устойчивости к пурамицину (рас), 3-галактозидазу, люциферазу, оротидин-5'-фосфат декарбоксилазу (URA3), аргинин пермеазу CAN1, галактокиназу (GAL1), бета-галактозидазу (LacZ) или хлорамфеникол ацетилтрансферазу (CAT). Другие примеры выявляемых сигналов включают в себя маркеры поверхности клеток, включающие, но ограничивающиеся, CD4. Гены-репортеры, подходящие для применения в способах идентификации аптамеров, раскрытых в настоящем документе, также включают в себя гены флуоресцентных белков (например, зеленого флуоресцентного белка (GFP) и его производных) или белков, слитых с флуоресцентной меткой. Примеры флуоресцентных меток и белков включают, но не ограничиваются ими, (3-F)Тур-EGFP, A44-KR, aacuGFP1, aacuGFP2, aceGFP, aceGFP-G222E-Y220L, aceGFP-h, AcGFP1, AdRed, AdRed-C148S, aeurGFP, afraGFP, alajGFP1, alajGFP2, alajGFP3, amCyan1, amFP486, amFP495, amFP506, amFP515, amilFP484, amilFP490, amilFP497, amilFP504, amilFP512, amilFP513, amilFP593, amilFP597, anm1GFP1, anm1GFP2, anm2CP, anobCFP1, anobCFP2, anobGFP, apulFP483, AQ14, AQ143, белок Aquamarine, asCP562, asFP499, AsRed2, asulCP, atenFP, avGFP, avGFP454, avGFP480, avGFP509, avGFP510, avGFP514, avGFP523, AzamiGreen, белок Azurite, BDFP1.6, bfloGFPa1, bfloGFPc1, BFP, BFP.A5, BFP5, bsDronpa (On), ccalGFP1, ccalGFP3, ccalOFP1,

ccalRFP1, ccalYFP1, cEGFP, cerFP505, белок Cerulean, CFP, cFP484, cfSGFP2, cgfmKate2, CGFP, cgfTagRFP, cgigGFP, cgreGFP, CheGFP1, CheGFP2, CheGFP4, белок Citrine, Citrine2, белок Clomeleon, белок Clover, cp-mKate, cpCitrine, cpT-Sapphire174-173, CyOFP1, CyPet, CyRFP1 (CyRFP1), d-RFP618, D10, d1EosFP (зеленый), d1EosFP (красный), d2EosFP (зеленый), d2EosFP (красный), deGFP1, deGFP2, deGFP3, deGFP4, dendFP (зеленый), dendFP (красный), Dendra (зеленый), Dendra (красный), Dendra2 (зеленый), Dendra2 (красный), Dendra2-M159A (зеленый), Dendra2-M159A (оранжевый), Dendra2-T69A (зеленый), Dendra2-T69A (оранжевый), dfGFP, dimer1, dimer2, dis2RFP, dis3GFP, dKeima, dKeima570, dLanYFP, DrCBD, Dreiklang (On), Dronpa (On), Dronpa-2 (On), Dronpa-3 (On), dsFP483, DspR1, DsRed, DsRed-Express, DsRed-Express2, DsRed-Max, DsRed.M1, DsRed.T3, DsRed.T4, DsRed2, DstC1, dTFP0.1, dTFP0.2, dTG, dTomato, dVFP, E2-Crimson, E2-оранжевый, E2-красный/зеленый, EaGFP, EBFP, EBFP1.2, EBFP1.5, EBFP2, ECFP, ECFPH148D, ECGFP, eechGFP1, eechGFP2, eechGFP3, eechRFP, efasCFP, efasGFP, eforCP, EGFP, eGFP203C, eGFP205C, белок Emerald, GFP с улучшенным фиолетовым излучением, EosFP (зеленый), EosFP (красный), eqFP578, eqFP611, eqFP611V124T, eqFP650, eqFP670, EYFP, EYFP-Q69K, fabdGFP, ffDronpa (On), FoldingReporterGFP, FP586, FPrfl2.3, FR-1, FusionRed, FusionRed-M, G1, G2, G3, Gamillus (On), Gamillus0.1, Gamillus0.2, Gamillus0.3, Gamillus0.4, GCaMP2, gfasGFP, GFP(S65T), GFP-151pyTyrCu, GFP-Tyr151pyz, GFPmut2, GFPmut3, GFPxm16, GFPxm161, GFPxm162, GFPxm163, GFPxm18, GFPxm181uv, GFPxm18uv, GFPxm19, GFPxm191uv, GFPxm19uv, H9, HcRed, HcRed-Tandem, HcRed7, hcriGFP, hmGFP, HriCFP, HriGFP, iFP1.4, iFP2.0, iLov, iq-EBFP2, iq-mApple, iq-mCerulean3, iq-mEmerald, iq-mKate2, iq-mVenus, iRFP670, iRFP682, iRFP702, iRFP713, iRFP720, IrisFP (зеленый), IrisFP (оранжевый), IrisFP-M159A (зеленый), Jred, Kaede (зеленый), Kaede (красный), Katushka, Katushka-9-5, Katushka2S, KCY, KCY-G4219, KCY-G4219-38L, KCY-R1, KCY-R1-158A, KCY-R1-38H, KCY-R1-38L, KFP1 (On), KikGR1 (зеленый), KikGR1 (красный), KillerOrange, KillerRed, KO, Kohinoor (On), laesGFP, laGFP, LanFP1, LanFP2, lanRFP-ΔS831, LanYFP, laRFP, LSS-mKate1, LSS-mKate2, LSSmOrange, M355NA, mAmetrine, mApple, Maroon0.1, mAzamiGreen, mBanana, mBeRFP, mBlueberry1, mBlueberry2, mc1, mc2, mc3, mc4, mc5, mc6, McaG1, McaG1ea, McaG2, mCardinal, mCarmine, mcavFP, mcavGFP, mcavRFP, mcCFP, mCerulean, mCerulean.B, mCerulean.B2, mCerulean.B24, mCerulean2, mCerulean2.D3, mCerulean2.N, mCerulean2.N(T65S), mCerulean3, mCherry, mCherry2, mCitrine, mClavGR2 (зеленый), mClavGR2 (красный), mClover3, mCyRFP1, mECFP, meffCFP, meffGFP, meffRFP, mEGFP, meleCFP, meleRFP, mEmerald, mEos2 (зеленый), mEos2 (красный), mEos2-A69T (зеленый), mEos2-A69T

(оранжевый), mEos3.1 (зеленый), mEos3.1 (Red), mEos3.2 (зеленый), mEos3.2 (красный), mEos4a (зеленый), mEos4a (красный), mEos4b (зеленый), mEos4b (красный), mEosFP (зеленый), mEosFP (красный), mEosFP-F173S (зеленый), mEosFP-F173S (красный), mEosFP-M159A (зеленый), mEYFP, MfaG1, mGarnet, mGarnet2, mGeos-C (On), mGeos-E (On), mGeos-F (On), mGeos-L (On), mGeos-M (On), mGeos-S (On), mGinger1, mGinger2, mGrape1, mGrape2, mGrape3, mHoneydew, MiCy, mIFP, miniSOG, miniSOGQ103V, miniSOG2, miRFP, miRFP670, miRFP670nano, miRFP670v1, miRFP703, miRFP709, miRFP720, mIrisFP (зеленый), mIrisFP (Red), mK-GO (Early), mK-GO (Late), mKalama1, mKate, mKateM41GS158C, mKateS158A, mKateS158C, mKate2, mKeima, mKelly1, mKelly2, mKG, mKikGR (Green), mKikGR (красный), mKillerOrange, mKO, mKO2, mKOk, mLumin, mMaple (зеленый), mMaple (красный), mMaple2 (зеленый), mMaple2 (красный), mMaple3 (зеленый), mMaple3 (красный), mMaroon1, mmGFP, mMicCy, mmilCFP, mNectarine, mNeonGreen, mNeptune, mNeptune2, mNeptune2.5, mNeptune681, mNeptune684, Montiporasp.#20-9115, mOrange, mOrange2, moxBFP, moxCerulean3, moxDendra2 (зеленый), moxDendra2 (красный), moxGFP, moxMaple3 (зеленый), moxMaple3 (красный), moxNeonGreen, moxVenus, mPapaya, mPapaya0.7, mPlum, mPlum-E16P, mRaspberry, mRed7, mRed7Q1, mRed7Q1S1, mRed7Q1S1BM, mRFP1, mRFP1-Q66C, mRFP1-Q66S, mRFP1-Q66T, mRFP1.1, mRFP1.2, mRojoA, mRojoB, mRouge, mRtms5, mRuby, mRuby2, mRuby3, mScarlet, mScarlet-H, mScarlet-I, mStable, mStrawberry, mT-Sapphire, mTagBFP2, mTangerine, mTFP0.3, mTFP0.7 (On), mTFP1, mTFP1-Y67W, mTurquoise, mTurquoise2, muGFP, mUkG, mVenus, mVenus-Q69M, mVFP, mVFP1, mWasabi, Neptune, NijiFP (зеленый), NijiFP (оранжевый), NowGFP, obeCFP, obeGFP, obeYFP, OFP, OFPxm, oxBFP, oxCerulean, oxGFP, oxVenus, P11, P4, P4-1, P4-3E, P9, PA-GFP (On), Padron (On), Padron(star) (On), Padron0.9 (On), PAmCherry1 (On), PAmCherry2 (On), PAmCherry3 (On), PAmKate (On), PATagRFP (On), PATagRFP1297 (On), PATagRFP1314 (On), pcDronpa (зеленый), pcDronpa (красный), pcDronpa2 (зеленый), pcDronpa2 (красный), PdaC1, pdae1GFP, phiYFP, phiYFPv, pHluorin,ecliptic, pHluorin,ecliptic (кислотный), pHluorin,ratiometric (кислотный), pHluorin,ratiometric (щелочной), pHluorin2 (кислотный), pHluorin2 (щелочной), pHuji, PlamGFP, pmeaGFP1, pmeaGFP2, pmimGFP1, pmimGFP2, Pp2FbFP, Pp2FbFPL30M, prluGFP1, prluGFP2, prorGFP, prorRFP, PS-CFP (фиолетовый), PS-CFP (зеленый), PS-CFP2 (фиолетовый), PS-CFP2 (зеленый), psamCFP, PSmOrange (инфракрасный), PSmOrange (оранжевый), PSmOrange2 (инфракрасный), PSmOrange2 (оранжевый), ptilGFP, R3-2+PCB, RCaMP, RDSmCherry0.1, RDSmCherry0.2, RDSmCherry0.5, RDSmCherry1, rfloGFP, rfloRFP, RFP611, RFP618, RFP630, RFP637, RFP639, roGFP1, roGFP1-R1, roGFP1-R8, roGFP2,

rrenGFP, RRvT, rsCherry (On), rsCherryRev (On), rsCherryRev1.4 (On), rsEGFP (On), rsEGFP2 (On), rsFastLime (On), rsFolder (зеленый), rsFolder2 (зеленый), rsFusionRed1 (On), rsFusionRed2 (On), rsFusionRed3 (On), rsTagRFP (ON), Sandercyanin, Sapphire, sarcGFP, SBFP1, SBFP2, SCFP1, SCFP2, SCFP3A, SCFP3B, scubGFP1, scubGFP2, scubRFP, secBFP2, SEYFP, sg11, sg12, sg25, sg42, sg50, SGFP1, SGFP2, SGFP2(206A), SGFP2(E222Q), SGFP2(T65G), SHardonnay, shBFP, shBFP-N158S/L173I, ShG24, белок Sirius, SiriusGFP, Skylan-NS (On), Skylan-S (On), smURFP, SNIFP, SOPP, SOPP2, SOPP3, SPOON (on), stylGFP, SuperfolderGFP, SuperfoldermTurquoise2, SuperfoldermTurquoise2ox, SuperNovaGreen, SuperNovaRed, SYFP2, T-Sapphire, TagBFP, TagCFP, TagGFP, TagGFP2, TagRFP, TagRFP-T, TagRFP657, TagRFP675, TagYFP, td-RFP611, td-RFP639, tdimer2(12), tdKatushka2, TDsmURFP, tdTomato, tKeima, белок Topaz, TurboGFP, TurboGFP-V197L, TurboRFP, Turquoise-GL, белок Ultramarine, UnaG, usGFP, белок Venus, VFP, vsfGFP-0, vsfGFP-9, W1C, W2, W7, WasCFP, Wi-Phy, YPet, zFP538, zoan2RFP, ZsGreen, ZsYellow1, α GFP, 10B, 22G, 5B, 6C, A1a, aacuCP, acanFP, ahyaCP, amilCP, amilCP580, amilCP586, amilCP604, apulCP584, BFPsol, Blue102, CFP4, cgigCP, CheGFP3, Clover1.5, cpasCP, Cy11.5, dClavGR1.6, dClover2, dClover2A206K, dhorGFP, dhorRFP, dPapaya0.1, Dronpa-C62S, DsRed-Timer, echFP, echiFP, EYFP-F46L, fcFP, fcomFP, Fpaagar, Fpag_frag, Fpcondchrom, Fpmann, Fpmcavgr7.7, Gamillus0.5, gdjiCP, gfasCP, GFPhal, gtenCP, hcriCP, hfriFP, KikG, LEA, mcFP497, mcFP503, mcFP506, mCherry1.5, mClavGR1, mClavGR1.1, mClavGR1.8, mClover1.5, mcRFP, meffCP, mEos2-NA, meruFP, mKate2.5, mOFP.T.12, mOFP.T.8, montFP, moxEos3.2, mPA-GFP, mPapaya0.3, mPapaya0.6, mRFP1.3, mRFP1.4, mRFP1.5, mTFP0.4, mTFP0.5, mTFP0.6, mTFP0.8, mTFP0.9, mTFP1-Y67H, mTurquoise-146G, mTurquoise-146S, mTurquoise-DR, mTurquoise-GL, mTurquoise-GV, mTurquoise-RA, mTurquoise2-G, NpR3784g, PDM1-4, psupFP, Q80R, rfloGFP2, RpBphP1, RpBphP2, RpBphP6, rrGFP, RSGFP1, RSGFP2, RSGFP3, RSGFP4, RSGFP6, RSGFP7, Rtms5, scleFP1, scleFP2, spisCP, stylCP, sympFP, TeAPC α , tPapaya0.01, Trp-lessGFP, vsGFP, Xpa, yEGFP, YFP3, zGFP и zRFP.

[0196] Способы скрининга раскрытой в данном документе библиотеки аптамеров могут включать в себя измерение активности гена-репортера под контролем аптамера и/или сравнение активности гена-репортера в присутствии аналога тиамина или TPP, используемого для скрининга, по сравнению с активностью гена-репортера в отсутствие аналога тиамина или TPP, используемого для скрининга.

[0197] Промышленные изделия и наборы

[0198] Предусмотрены также наборы или промышленные изделия для применения в способах, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах наборы содержат

композиции, описанные в данном документе (например, композиции для доставки вектора, включающего в себя ген-мишень, содержащий кассету генной регуляции) в подходящей упаковке. Подходящие упаковки для описанных в данном документе композиций (таких как глазные композиции для инъекций), известны в данной области техники и включают в себя, например, флаконы (такие как герметично закрытые флаконы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкие упаковки (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т. п. Эти изделия могут быть дополнительно стерилизованы и/или герметизированы.

[0199] Предложены также наборы, содержащие композиции, описанные в данном документе. Эти наборы могут также включать инструкцию (-и) по способам использования композиции, таким как описанные в данном документе способы. Наборы, описанные в данном документе, могут также включать в себя другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по введению композиции или выполнению любых способов, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит гAAV для экспрессии гена-мишени, содержащий кассету генной регуляции, содержащую аптамерную последовательность, описанную в данном документе, фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для инъекций, и одно или более из: буфера, разбавителя, фильтра, иглы, шприца и вкладыша в упаковку с инструкциями по выполнению инъекций. В некоторых вариантах осуществления изобретения набор пригоден для внутриглазной инъекции, внутримышечной инъекции, внутривенной инъекции и т. п.

[0200] Следует понимать и ожидать, что специалист в данной области может выполнять различные вариации раскрываемых композиций и способов, раскрытых в данном документе, и предполагается, что такие модификации должны быть включены в объем настоящего изобретения. Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но при этом они не должны толковаться как ограничивающие объем настоящего изобретения каким-либо образом.

[0201] Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки в их полном объеме. Все нуклеотидные последовательности, представленные в данном документе, находятся в ориентации от 5' до 3', если не указано иное. Перечень последовательностей прилагается к настоящему документу, содержание этого перечня полностью включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРИМЕРЫ

[0202] Пример 1. Синтетический РНК-переключатель, содержащий чувствительные к тиаминпирофосфату (ТРР) аптамеры, может регулировать экспрессию генов в ответ на ТРР и аналоги тиамина

[0203] Экспериментальные методики

[0204] Конструкции РНК-переключателей: аптамеры синтезировали в компании Integrated DNA Technologies, Inc. и применяли стратегию клонирования Golden Gate (New England Biolabs, NEB) для клонирования синтезированных аптамерных последовательностей в кассету интрон-экзон-интрон для замены гуанинового аптамера в кассете РНК-переключателя G17 (см. SEQ ID NO: 15, цитируемую в WO 2016/126747, которая включена в данный документ в полном объеме) на аптамер ТРР из гена *thiC* *Alishewanella tabrizica* (Microbiol Res. 2017 Jan; 195:71-80) или аптамер ТРР из гена *thiM* *Escherichia coli* (Structure. 2006 Sep; 14(9):1459-68), получая РНК-переключатели ТРРz и ТРРm, соответственно.

[0205] SEQ ID NO: 82 получена вставкой РНК-переключателя ТРРz в ген-репортер люциферазы. Прописными буквами обозначена кодирующая люциферазу последовательность. Строчными буквами обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер *thiC* последовательность (SEQ ID NO: 96) подчеркнута. В одном варианте осуществления предложен РНК-переключатель, содержащий SEQ ID NO: 82, причем кодирующая аптамер последовательность (SEQ ID NO: 96) в SEQ ID NO:82 заменена другой аптамерной последовательностью, раскрытой в данном документе.

[0206] SEQ ID NO: 82

[0207] ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCT
GGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGG
TTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTG
AGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAAT
ACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTG
TTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAA
CGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAA
AAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAAT
TATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGT

CACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGAT
AGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAA
GGTGTGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCT
ATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATC
ACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTT
AATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCA
AAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGA
CAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAG
GAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatggg
acccttgatgtttcttccccttctttctatggtaagtcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaaccagggt
atttgcaattgtaatttaaaaaatgctttcttcttaataactttttgttatcttatttctaataactttccctaactctttcttccagggaataatgat
acaatgtatcatgccgagtaacgctgtttcttaactgtaggaatgaattcagatattccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggta
atgtgtcggagtgcccttagggattattcccctaaagctgagaccgcattgcgggatccgttgaacctgatcaggctaataacctgcaagggga
acacattacgcaccattctaagaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaa
ctgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttatgtttatggttgggataaggctggattattctgagctc
aagctaggcccttttgcataatcatgttcatacctcttatcttctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTAC
ATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCGGTAAAG
TTGTTCCATTTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCG
TTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAA
ACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGA
GACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCT
CTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTC
CAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGT
GAACTTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAAAAGA
GATCGTGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAG
TTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAA
ATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

[0208] SEQ ID NO: 83 получена вставкой РНК-переключателя TPPm в ген-репортер люциферазы. Прописными буквами обозначена кодирующая люциферазу последовательность. Строчными буквами обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер thiM последовательность (SEQ ID NO: 97) подчеркнута. В одном варианте осуществления предложен РНК-переключатель, содержащий SEQ ID NO: 83, причем кодирующая аптамер последовательность (SEQ ID NO: 97) в SEQ ID NO:83 заменена другой аптамерной

последовательностью, раскрытой в данном документе.

[0209] SEQ ID NO:83

[0210] ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCT
GGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGG
TTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTG
AGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAAT
ACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTG
TTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAA
CGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTGCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAA
AAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAAT
TATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGT
CACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGAT
AGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAA
GGTGTGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCT
ATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATC
ACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTT
AATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCA
AAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGA
CAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAG
GAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagctatggg
acccttgatgtttcttccccttctttctatggtaagtcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgacaaatcagggt
atgttcattgtaatttaaaaaatgctttcttctttaataactttttgttatcttatttctaatactttccctaactctttcttccagggaataatgat
acaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaactgttaggaatgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggta
atgtctcggggtgcccttctgcgtgaaggctgagaaataccggtatcacctgatctggataatgccagcgtagggaagacattacgcaccat
tctaaagaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtt
catattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttatttatgggtgggataaggctggattattctgagccaagctaggccctttg
ctaatcatgttcataccttcttcttctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATT
CTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTT
TTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAG
AGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGA
AGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTT
ACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGT
ACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCA
ACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCG

CCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGAT
TACGTCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTTGT
GGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAG
ATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

[0211] Трансфекция: $3,5 \times 10^4$ эмбриональных клеток почки человека (НЕК) 293 высевали на 96-луночный плоскодонный планшет за сутки до трансфекции. В пробирку или на 96-луночный планшет с U-образным дном добавляли плазмидную ДНК (500 нг). По отдельности добавляли реагент TransIT-293 (Mirus; 1,4 мкл) к 50 мкл среды OptiMem I (Life Technologies) и давали отстояться в течение 5 минут при комнатной температуре (КТ). Затем добавляли 50 мкл разбавленного реагента для трансфекции к ДНК, смешивали и инкубировали при КТ в течение 20 мин. Наконец добавляли 7 мкл этого раствора в лунку с клетками в 96-луночном планшете. Через четыре часа после трансфекции среду, содержащую трансфекционный раствор, заменяли средой, содержащей TPP, фурсултиамин, просултиамин, бисбентиамин, беклотиамин гидрохлорид или сулбутиамин в качестве индукторов аптамеров.

[0212] Анализ люциферазы светлячка в культивированных клетках: через двадцать четыре часа после смены среды планшеты вынимали из инкубатора и уравнивали до КТ в течение нескольких минут на лабораторном столе, затем аспирировали из них среду. Добавляли буфер Glo-lysis (Promega, 100 мкл, КТ), и оставляли планшеты при КТ в течение по меньшей мере 5 минут. Затем содержимое лунок перемешивали путем ресуспендирования объемом 50 мкл, и смешивали 20 мкл каждого образца с 20 мкл реагента bright-glo (Promega), разведенного до 10% в буфере glo-lysis. На непрозрачном белом 384-луночном планшете задействовали 96 лунок. После 5-минутной инкубации при КТ измеряли люминесценцию с помощью прибора Tecan с временем считывания 500 мс. Активность люциферазы выражали в средних произвольных световых единицах (ALU) \pm С.О., и кратность индукции рассчитывали как соотношение активности люциферазы, полученной для клеток с обработкой TPP или аналогом, к активности люциферазы, полученной для клеток без обработки TPP или аналогом.

[0213] *Результаты*

[0214] Кассеты генной экспрессии, содержащие TPP-восприимчивый РНК-переключатель, получали вставкой аптамеров TPP из любого из РНК-переключателя *A. tabrizica thiC* (для РНК-переключателя TPPz) или РНК-переключателя *thiME. coli* (для РНК-переключателя TPPm), соответственно, в синтетическую кассету генной экспрессии с РНК-переключателем. В данном документе аптамерная последовательность вставлена после

интрона альтернативного экзона, содержащего стоп-кодон в рамке считывания, как описано в WO2016/126747, включенном в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Лиганд, связывающийся с аптамером, контролирует доступность 5' сайта сплайсинга из 3' интрона, тем самым обеспечивая регуляцию экспрессии гена-мишени посредством модулирования альтернативного сплайсинга.

[0215] Как показано на **Фиг. 1А**, оба синтетических РНК-переключателя TPPz и TPPm регулируют экспрессию люциферазы в ответ на TPP. TPPz индуцирует экспрессию гена-мишени даже при более низких концентрациях, чем TPPm, указывая на то, что для аптамера thiC *A. tabrizica* аффинность связывания TPP выше в клетках млекопитающих по сравнению с аптамером thiM *E. coli*.

[0216] Чтобы определить, реагируют ли синтетические РНК-переключатели TPPz и TPPm также на аналоги тиамин, исследовали группу аналогов тиамин. Как показано на **Фиг. 1В и 1С**, TPPz и TPPm индуцируют экспрессию люциферазы в ответ на обработку фурсултиамином и просултиамином, в то время как обработка бисбентиамином, беклотиамином гидрохлоридом и сулбутиамином слабо или вообще не влияет на экспрессию люциферазы (см. **Фиг. 1D**). Во всех случаях РНК-переключатель TPPz индуцировал ген-мишень экспрессии в более низкой концентрации, чем TPPm.

[0217] Эти данные указывают, что синтетические РНК-переключатели, содержащие гетерологичные аптамерные последовательности, могут эффективно индуцировать экспрессию генов-мишеней в ответ на различные молекулы, родственные с тиамин, дозозависимым образом в клетках млекопитающих.

[0218] Пример 2. Гомологичная аптамеру TPP последовательность регулирует экспрессию генов в клетках млекопитающих в ответ на аналоги тиамин.

[0219] *Экспериментальные методики:*

[0220] Конструкция РНК-переключателя: гомологичные аптамеру TPP последовательности получали из Rfam 12.0 (<https://rfam.xfam.org/>) и синтезировали (Twister Biotech). Для получения конструкций РНК-переключателя, содержащих гомологичные аптамеру TPP последовательности, синтезированные олигонуклеотиды применяли как матрицы для ПЦР и заменяли гуаниновый аптамер в конструкции РНК-переключателя G17 (WO 2016/126747) с использованием клонирования Golden Gate (NEB).

[0221] Трансфекцию и анализ на люциферазу проводили как описано в примере 1.

[0222] *Результаты:*

[0223] Для регуляции генов в терапевтических целях, например, у человека, особенно

приемлемо применение синтетических РНК-переключателей в комбинации с синтетическими соединениями, которые естественным образом не встречаются у субъекта, подлежащего лечению (например, как фурсултиамин). Это объясняется тем, что отсутствие регуляторного соединения в организме пациента позволяет строго контролировать экспрессию терапевтических генов.

[0224] Для идентификации аптамеров с увеличенной активностью регуляции генов в ответ на аналоги тиамин по сравнению с TPPz и TPPm, получали предполагаемый аптамер TPP с гомологичной последовательностью, полученной Rfam 12.0 (база данных RF00059 семейства РНК, <http://rfam.xfam.org/family/RF00059>). Этот предполагаемый аптамер TPP (номер доступа AACU023654033.1, с последовательностью, начинающейся с положения 895 и заканчивающейся в положении 815; называемой в данном документе как 14G4) вставляли кассету генной регуляции на основе альтернативного сплайсинга как описано в примере 1 для создания аптамерного РНК-переключателя 14G4.

[0225] SEQ ID NO: 84 получена вставкой РНК-переключателя 14G4 в ген-репортер люциферазы. Прописными буквами обозначена кодирующая люциферазу последовательность. Строчным регистром обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер 14G4 последовательность (SEQ ID NO:7) подчеркнута. В одном варианте осуществления предложен РНК-переключатель, содержащий SEQ ID NO: 84, причем кодирующая аптамер последовательность (SEQ ID NO: 7) в SEQ ID NO:84 заменена другой аптамерной последовательностью, раскрытой в данном документе.

[0226] SEQ ID NO:84

[0227] ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCT
GGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGG
TTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTG
AGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAAT
ACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTG
TTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAA
CGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAA
AAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAAT
TATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGT
CACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGAT
AGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCSTAAA
GGTGTGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCT

ATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATC
ACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTT
AATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCA
AAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGA
CAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAG
GAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatggg
acccttgatgttttcttccccttctttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacaggttacacataattgaccaaaccaggga
attttgcatgttaatttaaaaaatgctttcttctttaataatactttttgttatcttatttctaatactttccctaactctttctttcagggaataatgat
acaatgtatcatgccgagtaacgctgtttcttaactgttaggaatgaattcagatattccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggta
atgtacaggggtccggcctttcatttggcgggtgagagcacacccttgaacctgtttacggataatgccgccgaggagtagcattacg
caccattctaagaataacagtataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcataataatatttctgcataaattgtaactgatgtaag
aggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctaggc
ccttttgctaatcatgttcatacctcttatcttctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGC
TATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCAGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCC
ATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCA
AAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCC
GGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAG
CTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAAGTCTCTGATTA
AGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACC
CCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTC
CCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTG
GATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTT
TGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAG
AGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTA

[0228] Этот РНК-переключатель тестировали на клетках НЕК 293 на его способность регулировать экспрессию гена люциферазы. Как показано на **Фиг. 2**, экспрессия люциферазы увеличилась в 100 раз при обработке фурсултиамином дозозависимым образом. Дополнительно РНК-переключатель 14G4 регулировал экспрессию гена люциферазы в ответ на обработку фурсултиамином во многих типах клеток.

[0229] Этот эксперимент иллюстрирует успешное создание РНК-переключателей млекопитающих, содержащих аптамеры, которые способны значительно индуцировать экспрессию генов-мишеней в клетках млекопитающих в ответ на синтетические малые молекулы.

[0230] Пример 3. Создание РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности, которые обладают увеличенной чувствительностью к аналогам тиамина.

[0231] РНК-переключатель 14G4 выбирали для дальнейшего улучшения благодаря его селективности по отношению к фурсултиамину по сравнению с TPP. После сравнения предполагаемой вторичной структуры (RNAfold, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) РНК-переключателя 14G4 с помощью кристаллографической структуры РНК-переключателя thiM *E. coli*, идентифицировали три области в последовательности 14G4, которые, похоже, не вовлечены в образование спиралей, но принимают участие в образовании третичной структуры при связывании лигандов. Эти три области выбирали для рандомизации последовательности с целью получения РНК-переключателей с реконструированными аптамерными последовательностями с улучшенной активностью.

[0232] Создавали три аптамерные библиотеки A1, A2 и A3 путем рандомизации нуклеотидов в 6 положениях, соответственно, областей J4-5, J2-4 и J3-2 или рядом с ними (см. **Фиг. 3**). Отбирали отдельные бактериальные колонии, и плазмиды, содержащие конструкции РНК-переключателя, подвергали скринингу в клетках НЕК 293 на предмет улучшения активности регуляции генов в ответ на 50 мкМ фурсултиамина по сравнению с РНК-переключателем 14G4. Как показано на **Фиг. 4А**, несколько выделенных конструкций аптамеров, включая 1D10, 3Н4, 4Н2, 6В4, 6С4 и 6G12, показывают увеличение фурсултиамин-зависимой индукции по сравнению с исходной конструкцией 14G4. Эти РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности, также приводят к значительным усилениям экспрессии гена-мишени в других типах клеток, включая клетки альфа 12 печени мыши (AML12), C2C12 (линия клеток мышечных миоцитов) и линию клеток-19 пигментного эпителия сетчатки взрослого человека (ARPE-19) (см. **Фиг. 4В**). Дополнительно выбранные РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности также увеличивают экспрессию гена-мишени в ответ на обработку просултиамина и бенфотиамина (в клетках AML 12) (см. **Фиг. 4С**).

[0233] Эти данные демонстрируют, что выделенные РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности пригодны для индуцирования экспрессии генов-мишеней в различных типах клеток в ответ на различные синтетические малые молекулы.

[0234] Для дополнительного усиления активности регуляции генов выполняли второй

цикл мутагенеза с использованием библиотеки А4 (см. **Фиг. 5**). Для этой библиотеки аптамерная последовательность варианта ЗН4 конструкции РНК-переключателя рандомизировали в шести нуклеотидных позициях, а именно в трех основаниях в области J3-2 и трех основаниях в области J2-4 прогнозируемой вторичной структуры аптамера ЗН4. Отбирали отдельные бактериальные колонии, и плазмиды, содержащие конструкции РНК-переключателя, подвергали скринингу в клетках НЕК 293 на предмет улучшения активностей регуляции генов по сравнению с РНК-переключателем ЗН4, с использованием на 50 мкМ фурсултиамина.

[0235] Несколько РНК-переключателей, содержащих различные варианты аптамеров, которые были выделены из библиотеки А4, показали еще более улучшенную чувствительность к фурсултиамину по сравнению с 14G4 и ЗН4, демонстрируя, что мутагенез выбранных нуклеотидов, участвующих в связывании аптамера/лиганда, может улучшать активность регуляции генов РНК-переключателей на основе аптамеров в клетках млекопитающих (см. **Фиг. 6А**).

[0236] Далее определяли способность РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности, выделенные из библиотеки А4 аптамеров, реагировать на другие аналоги тиамин, имеющие общие с тиамин химические структурные особенности. Как показано на **Фиг. 6В**, ЗН4-производные РНК-переключатели, содержащие аптамеры 15А5 и 15D10 устойчиво регулировали экспрессию люциферазы в ответ на синтетические молекулы фурсултиамина, просултиамина и бенфотиамина, но очень слабо отвечали на ТРР природного происхождения. Кроме того, РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности 15А5 и 15D10, демонстрируют значительно улучшенные динамические диапазоны в ответ на фурсултиамин, просултиамин и бенфотиамин по сравнению с исходным РНК-переключателем ЗН4.

[0237] Этот пример иллюстрирует, что путем многократных раундов мутагенеза могут создавать улучшенные РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности, которые усиливают экспрессию генов-мишеней в ответ на лечение несколькими синтетическими аналогами тиамин.

[0238] Пример 4. Синтетические РНК-переключатели на основе аналогов тиамин могут регулировать экспрессию различных генов-мишеней в ответ на фурсултиамин

[0239] Как обсуждалось в примере 3, выделенные РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности эффективно индуцируют

экспрессию репортерного белка люциферазы в ответ на различные аналоги тиамина. Чтобы проверить способность выделенных аптамеров регулировать экспрессию других генов-мишеней, несколько РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности, вставляли в последовательность кДНК мышинового эритропоэтина (mEpo) и последовательность кДНК усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

[0240] *Экспериментальные методики:*

[0241] Конструкции РНК-переключателя: РНК-переключатели с альтернативным сплайсингом, содержащие аптамер 3H4 или 15D10, соответственно, вставляли в положение 308 в последовательность кДНК эритропоэтина мыши в конструкции Con8-Epo (SEQ ID NO:85), получая конструкции Epo-3H4 (SEQ ID NO:86) и Epo-15D10 (SEQ ID NO:87). Экспрессия гена эритропоэтина управлялась промотором цитомегаловируса (CMV). Кассету РНК-переключателя, содержащую аптамер 6B4, вставляли в положение 276 в последовательности кДНК, кодирующей усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), в вектор pEGFP-C1 с получением конструкции EGFP-6B4 (SEQ ID NO:88). Кассету интрон-экзон-интрон с аптамерной последовательностью вставляли в Con8-Epo для создания конструкции Epo-Con1 (SEQ ID NO:89), служащей как контроль для экспрессии конститутивного гена-мишени.

[0242] SEQ ID NO: 86 получена вставкой РНК-переключателя 3H4 в ген эритропоэтина. Прописными буквами обозначена кодирующая эритропоэтин последовательность (см. EQ ID NO:85). Строчными буквами обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер 3H4 последовательность (SEQ ID NO:9) подчеркнута.

[0243] SEQ ID NO:86

[0244] ATGGGGGTGCCCGAACGTCCCACCCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTACTG
ATTCTCTGGGCCTCCCAGTCCTCTGTGCTCCCCACGCCTCATCTGCGACAGTCGAG
TTCTGGAGAGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCAGAAAATGTCACGATGGGTTGT
GCAGAAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTACAGTCCCAGATACCAAAGTCAACTT
STATGCTTGGAAAAGAATGGAGGTGGAAGAACAGGCCATAGAAGTTTGGCAAGGCC
TGTCCTGCTCTCAGAAGCCATCCTGCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttcttcccctctttctatggt
taagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggtaatgttcatttgaatttaaaaaatgctttctct
ttaaataactttttgtttatcttatttctaatactttccctaactctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctct
aacttgtaggaatgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggtccggccttttcatttggcgcc
ggtgagagcacacccttgaacctgttcaggataatgccgctgcagggagtacattacgcaccattctaaagaataacagtgataattctg
ggttaaggcaatagcaataatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatcca

gctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatctctc
ccccacagCCCAGGCCCTGCTAGCCAATTCCTCCCAGCCACCAGAGACCCTTCAGCTTCA
TATAGACAAAGCCATCAGTGGTCTACGTAGCCTCACTTCACTGCTTCGGGTAAGTGGG
AGCTCAGAAGGAATTGATGTCGCCTCCAGATACCACCCACCTGCTCCACTCCGAAC
ACTCACAGTGGATACTTTCTGCAAGCTCTTCCGGGTCTACGCCAACTTCCTCCGGGG
GAAACTGAAGCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGGACAGGTGA

[0245] SEQ ID NO: 87 получена вставкой РНК-переключателя 15D10 в ген эритропоэтина. Прописными буквами обозначена кодирующая эритропоэтин последовательность (см. EQ ID NO:85). Строчными буквами обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер 15D10 последовательность (SEQ ID NO:26) подчеркнута.

[0246] SEQ ID NO:87
ATGGGGGTGCCCGAACGTCACCCCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTACTGATTCTC
TGGGCCTCCAGTCCTCTGTGCTCCCCACGCCTCATCTGCGACAGTCGAGTTCTGG
AGAGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCAGAAAATGTCACGATGGGTTGTGCAGAA
GGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTACAGTCCCAGATACCAAAGTCAACTTCTATGCT
TGAAAAGAATGGAGGTGGAAGAACAGGCCATAGAAGTTTGGAAGGCCTGTCCCT
GCTCTCAGAAGCCATCCTGCAGGgtgagtctatggacccttgatgttttctttcccctctttctatggttaagttcatgtc
ataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggttaatttgcatgttaatttaaaaaatgctttctcttttaataactttt
ttgtttatcttatttctaataactttccctaatactctttctttcagggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttcttaactgttagga
atgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggtccggccttttcatttggcaccgggtgagaacat
accctcggacctgttcacggataatccgctgcagggagtacattacgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggtaaggcaat
agcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctg
cttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttctccccacagCCC
AGGCCCTGCTAGCCAATTCCTCCCAGCCACCAGAGACCCTTCAGCTTCATATAGACA
AAGCCATCAGTGGTCTACGTAGCCTCACTTCACTGCTTCGGGTAAGTGGGAGCTCAGA
AGGAATTGATGTCGCCTCCAGATACCACCCACCTGCTCCACTCCGAACACTCACAG
TGGATACTTTCTGCAAGCTCTTCCGGGTCTACGCCAACTTCCTCCGGGGGAAACTGA
AGCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGGACAGGTGA

[0247] SEQ ID NO: 88 получена вставкой РНК-переключателя 6B4 в ген EGFP. Прописными буквами обозначена кодирующая EGFP последовательность. Строчным регистром обозначается интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер 6B4 последовательность (SEQ ID NO:14) подчеркнута.

[0248] SEQ ID NO:88

[0249] ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGT
CGAGCTGGACGGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGG
GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
CCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC
CGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGg
tgagtctatgggacccttgatgttttcttccccctctttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgac
caaatcagggtaatgttgcattgtaatttaaaaaatgctttctctttaaataactttttgtttatcttatttctaatactttccctaactctcttctttcag
ggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttcttaactgttaggaatgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaaaatcttca
gtagaaggtaatgtacaggggtccggcctttcatttggcgccgggtgagagcacacccttgacaccttttacgggataatgccgccgagggg
agfacattacgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgta
actgatgtaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtc
caagctaggcccttttgctaactcatgttcatacctcttattcttctcccacagCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCT
TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
GGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACA
AGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGT
GCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACT
CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

[0250] SEQ ID NO: 89 получена вставкой кассеты интрон-экзон-интрон без аптамерной последовательности в ген эритропоэтина. Прописными буквами обозначена кодирующая эритропоэтин последовательность (см. SEQ ID NO:85). Строчными буквами обозначена последовательность интрон/альтернативный экзон/интрон.

[0251] SEQ ID NO:89

[0252] ATGGGGGTGCCCGAACGTCCCACCCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTACTG
ATTCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTCTGTGCTCCCCACGCCTCATCTGCGACAGTCGAG
TTCTGGAGAGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCAGAAAATGTCACGATGGGTTGT
GCAGAAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTACAGTCCCAGATACCAAAGTCAACTT
CTATGCTTGGAAAAGAATGGAGGTGGAAGAACAGGCCATAGAAGTTTGGCAAGGCC
TGTCCCTGCTCTCAGAAGCCATCCTGCAGGgtgagtctatgggacccttgatgttttcttccccctctttctatggt
taagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgacaaatcagggtaatgttgcattgtaatttaaaaaatgctttctct
ttaaataactttttgtttatcttatttctaatactttccctaactctcttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaa

gaataacagtataatttctgggftaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattg
ctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttttatgggtgggataaggctggattattctgagtgccaagctaggcccttttctaatca
tggtcataccttcttctctcccacagCCCAGGCCCTGCTAGCCAATTCCTCCCAGCCACCAGAGAC
CCTTCAGCTTCATATAGACAAAGCCATCAGTGGTCTACGTAGCCTCACTTCACTGCT
TCGGGTACTGGGAGCTCAGAAGGAATTGATGTCGCCTCCAGATAACCACCCACCTGC
TCCACTCCGAACACTCACAGTGGATACTTTCTGCAAGCTCTTCCGGGTCTACGCCAA
CTTCTCCGGGGGAAACTGAAGCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGGACA
GGTGA.

[0253] Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для эритропоэтина мыши: клетки AML12 трансфицировали как описано в примере 1 с помощью реагента для трансфекции TransIT-X2 (Mirus Bio). Через четыре часа после трансфекции клетки AML12 обрабатывали фурсултиамином в указанных дозах. Супернатанты трансфицированных клеток собирали через 24 часа после обработки фурсултиамином и подвергали ELISA для обнаружения в супернатанте mEpo в соответствии с инструкцией производителя (R&D).

[0254] Получение линии клеток, экспрессирующей EGFP-6B4: стабильную линию клеток, содержащую конструкцию EGFP-6B4, получали путем электропорации клеток НЕК 293 с помощью 100 нг плазмидной ДНК с использованием Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) и с применением параметров по умолчанию для клеток НЕК 293. Через 48 часов после электропорации культуру клеток обрабатывали 800 мкг/мл антибиотика G418 в течение двух недель для отбора клеток, стабильно экспрессирующих кассету EGFP-6B4, которая несет ген устойчивости G418. Клетки трипсинизировали. Интенсивность флуоресценции EGFP в суспензии клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием прибора Guava EasyCyte 8HT. Получаемые данные анализировали с использованием GuavaSoft 3.3. Кратность индукции рассчитывали как соотношение средней интенсивности флуоресценции (СИФ), полученной из клеток, обработанных фурсултиамином, к СИФ, полученной из клеток без обработки фурсултиамином.

[0255] Анализ проточной цитометрии: $1,5 \times 10^5$ клеток НЕК 293, стабильно трансдуцированных с помощью конструкции EGFP-6B4, высевали на 24-луночный планшет за сутки до обработки фурсултиамином. Клетки обрабатывали фурсултиамином в течение 24 часов. Интенсивность флуоресценции EGFP определяли методом проточной цитометрии, как описано выше.

[0256] *Результаты:*

[0257] Клетки, экспрессирующие конструкцию EGFP-6B4, проявили низкую экспрессию репортерного белка EGFP в отсутствие обработки фурсултиамином, но

показали увеличение экспрессии EGFP в 14 раз в присутствии фурсултиамина (см. **Фиг. 7А**), иллюстрируя способность РНК-переключателя, содержащего реконструированный аптамер 6В4, индуцировать экспрессию репортерных белков, отличных от люциферазы, в ответ на синтетический лиганд фурсултиамин. Дополнительно индукция экспрессии EGFP в ответ на обработку фурсултиамином была дозозависимой (см. **Фиг. 7В**).

[0258] Далее изучали способность РНК-переключатель, содержащего аптамеры 3Н4 и 15D10, для регуляции экспрессии гена mEpo. В отсутствие фурсултиамина клетки, содержащие mEpo-3Н4 или mEpo-15D10 экспрессировали очень низкие уровни mEpo. Тем не менее, при обработке фурсултиамином экспрессия mEpo усиливалась дозозависимым образом в клетках, содержащих конструкции mEpo-3Н4 или mEpo-15D10. Как и ожидалось, контрольная конструкция mEpo-Con1 конститутивно экспрессировала mEpo, независимо от присутствия или отсутствия фурсултиамина (см. **Фиг. 7С**). В ответ на обработку 12,5 мкМ фурсултиамина экспрессия mEpo индуцировалась с увеличением примерно в 40-раз (Epo-15D10) или 9 раз (Epo-3Н4) по сравнению с экспрессии в отсутствие фурсултиамина (см. **Фиг. 7D**), уровень mEpo из mEpo-15D10 при концентрации индуктора 12,5 мкМ составлял около 61,3% от уровня конститутивной и нерегулируемой конструкции mEpo-Con1.

[0259] Эти результаты показывают, что способность РНК-переключателей, содержащих реконструированные аптамерные последовательности, индуцировать экспрессию генов в ответ на малые молекулы не ограничивается конкретными последовательностями генов-мишеней, что указывает на общую применимость этих аптамерных РНК-переключателей для регуляции экспрессии генов-мишеней.

[0260] Пример 5. Синтетические РНК-переключатели регулируют экспрессию генов у мышей *in vivo*

[0261] Для оценки способности реконструированных аптамеров индуцировать экспрессию генов *in vivo* мышей трансфицировали адено-ассоциированным вирусным вектор (AAV), несущим реконструированный РНК-переключатель, который вставлен в ген для репортерного белка люциферазы. Фурсултиамин применяли в виде лиганда аптамера для индукции экспрессии люциферазы.

[0262] *Экспериментальные методики:*

[0263] Продукция вирусных частиц AAV2.8: частицы AAV2.8, применяемые для трансфекции мышей, включали в себя вирусный геном, происходящий из AAV2, и капсид, происходящий из AAV8. Ген люциферазы, содержащий кассету интрон-экзон-интрон с (1) нерегулируемым РНК-переключателем без аптамера (luci-Con1, SEQ ID NO:90), (2) кассету

РНК-переключателя, содержащую аптамер 3Н4 (luci-3Н4, SEQ ID NO:91) или (3) кассету РНК-переключателя, содержащую аптамер 6В4 (luci-6В4, SEQ ID NO:92), соответственно, клонировали в плазмидном векторе AAV2. Экспрессию гена люциферазы контролировали промотором CASI, который содержит энхансерные элементы CMV и убиквитина С и промотором куриного β -актина. Вирусный вектор упакован в капсид AAV8 и продуцирован по следующему протоколу производителя (Vigene Biosciences).

[0264] SEQ ID NO: 90 получена вставкой кассеты интрон-экзон-интрон без аптамерной последовательности в ген-репортер люциферазы. Прописными буквами обозначена кодирующая люциферазу последовательность. Строчными буквами обозначена последовательность интрон/альтернативный экзон/интрон.

[0265]	SEQ	ID	NO:90
	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGA		
	TGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTG		
	GAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACT		
	TCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAAT		
	CACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGC		
	GCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAA		
	TTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGG		
	TTGCAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATC		
	ATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCT		
	CATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCCTTCGATAGGGAC		
	AAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTC		
	GCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTT		
	GGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTT		
	TTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTA		
	TAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGC		
	GCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATA		
	CGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTC		
	GGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgt		
	ttctttccccttctttctatgggtaagtcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggttaatttgcatttg		
	taatttataaaaatgctttctcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaatactctttctttcagggaataatgatacaatgatca		
	tgctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaac		
	tgatgtaagaggtttcatattgctaataagcagctacaatccagctaccattctgctttattttatgggtgggataaggctggattattctgagcca		
	agctaggcccttttgctaatacatgttcatacctcttatcttctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACA		

TCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGT
TGTTCCATTTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGT
TAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAA
CAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAG
ACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTC
TGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCC
AACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTG
AACTTCCCGCCGCGCTTGTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAG
ATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGT
TGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAA
TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

[0266] SEQ ID NO: 91 получена вставкой РНК-переключателя ЗН4 в ген-репортер люциферазы. Прописными буквами обозначена кодирующая люциферазу последовательность. Строчными буквами обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер ЗН4 последовательность (SEQ ID NO:9) подчеркнута.

[0267] SEQ ID NO:91
ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGA
TGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTG
GAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACT
TCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAAT
CACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGC
GCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAA
TTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGG
TTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATC
ATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCT
CATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGAC
AAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTC
GCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTT
GGCAATCAAATCATTCGGATACTGCGATTTTAAAGTGTGTTCCATTCATCACGGTT
TTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTA
TAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGC
GCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATA
CGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTC

GGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgt
 tttctttccccttctttctatgggtaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaacagggtaattttgcatttg
 taattttaaaaaatgctttctcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaatactctttctttcaggggcaataatgatacaatgatca
 tgccgagtaacgctgtttcttaactgttaggaatgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggt
ccggccttttcatttggcgccggtgagagcacaccttgaacctgttcacggataatgccgctgcaggggagtacattacgcaccattctaaa
 gaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattg
 ctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgctaatca
 tgttcatacctcttatcttctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGA
 TTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTTG
 AAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGC
 GAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAACAATCCGGAAGCG
 ACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGG
 GACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAA
 GGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATC
 TTCGACGCAGGTGTTCGAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCC
 GTTGTGTTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGT
 CGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACG
 AAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTC
 ATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

[0268] SEQ ID NO: 92 получена вставкой РНК-переключателя 6B4 в ген-репортер люциферазы. Прописными буквами обозначена кодирующая люциферазу последовательность. Строчными буквами обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер 6B4 последовательность (SEQ ID NO:14) подчеркнута.

[0269]	SEQ	ID	NO:92
	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGA		
	TGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTG		
	GAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACT		
	TCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAAT		
	CACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGC		
	GCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAA		
	TTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAGGGG		
	TTGCAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAATTTATTATC		
	ATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCT		

CATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGAC
AAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTC
GCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTT
GGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTGTGTTCCATTCCATCACGGTT
TTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTA
TAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGC
GCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATA
CGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTC
GGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgt
ttctttccccctttttctatgggtaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaacagggtaatttgacattg
taattttaaaaaatgctttctcttttaataatactttttgtttatcttatttctaactttccctaactctttttttcagggaataatgatacaatgatca
tgccgagtaacgctgtttcttaactgttaggaatgaattcagatattccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggt
ccggccttttcatttggcgccgggtgagagcacaccctgtgacctgtttacggataatgccgcccaggggagtacattacgcaccattctaaa
gaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattg
ctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgctaatca
tgttcatacctcttatcttctctccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGA
TTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTG
AAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATAACCGGGAACCGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGC
GAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCG
ACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGG
GACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAA
GGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATC
TTCGACGCAGGTGTTCGACAGGTTCTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCC
GTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGT
CGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACG
AAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTC
ATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

[0270] Исследования на животных: мыши породы Balb/c получали единственной инъекцией в хвостовую вену $1,0 \times 10^{11}$ или $2,5 \times 10^{11}$ геномных копий продуктивной вирусной частицы AAV2.8. Через двадцать восемь дней после доставки вектора AAV мышам внутрибрюшинно (В.Б.) вводили 50 мг/кг просултиамина. Активность люциферазы измеряли за сутки до введения дозы лекарственного средства, а также через 6 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после введения дозы лекарственного средства. После первого введения просултиамина мышей подвергали трем дополнительным циклам введения доз и циклам

визуализации следующим образом: день 36 (после введения AAV): 100 мг/кг; день 43: 200 мг/кг; и день 51: 400 мг/кг.

[0271] Неинвазивная биолуминесцентная визуализация живых животных: перед визуализацией мышей анестезировали 2% изофлураном и вводили инъекции люциферина по 150 мг/кг массы тела. В указанный момент времени после введения препарата получали изображения в течение от 2 до 5 минут после введения инъекции люциферина с помощью системы Btucker Xtreme. Активность люциферазы выражали в виде среднее количество фотонов/с \pm С.О. (n=5). Кратность индукции экспрессии гена люциферазы рассчитывали как соотношение показателя фотонов/с, полученного для мышей, получивших лечение просултиамином, к значению, полученному для мышей за сутки до лечения просултиамином.

[0272] *Результаты:*

[0273] Для проверки способности РНК-переключателя регулировать экспрессию генов у животных, векторы AAV, содержащие ген люциферазы с РНК-переключателем или без него, вводили мышам внутривенно. Через 4 недели после инъекции AAV мышей лечили просултиамином внутрибрюшинным (В.Б.) введением. Через шесть часов после лечения однократной дозы просултиамина (50 мг/кг) активность люциферазы значительно увеличивалась у мышей, которым вводили векторы AAV, содержащие ген люциферазы, включающий в себя РНК-переключатели 3Н4 или 6В4, но не в группе мышей, которым вводили инъекцию такой же дозой нерегулируемого контрольного вектора Con1 (см. **Фиг. 8А–8Е**). Дополнительно увеличение активности люцифераз при лечении просултиамином было дозозависимым. В группе мышей, которых лечили одной дозой 50 мг/кг или двумя дозами 50 мг/кг и 100 мг/кг просултиамина, соответственно, индуцированная активность люциферазы снижалась до уровня до лечения индуктором через 24 часа после лечения одной дозой. Однако у мышей, которых дополнительно лечили более высокими дозами индуктора просултиамина (т. е. 200 мг/кг и 400 мг/кг), индуцированная активность люциферазы сохранялась в течение 48 часов или дольше.

[0274] Эти результаты демонстрируют, что РНК-переключатели, содержащие реконструированные аптамерные последовательности, избирательно индуцируют экспрессию генов-мишеней при лечении аналогом тиамин дозозависимым образом *in vivo*.

[0275] **Примеры от 6 до 99. РНК-переключатель на основе аналога тиамин регулирует экспрессию генов в клетках млекопитающих в ответ на аналоги тиамин**

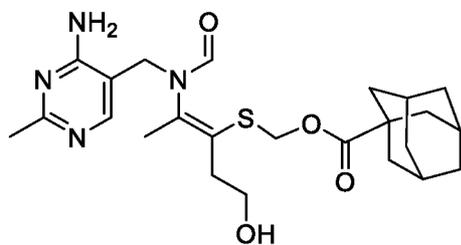
[0276] *Экспериментальные методики:*

[0277] Получение аналогов тиамина

[0278] Все растворители и реагенты получали коммерческим путем и использовали в том виде, в котором получены. Спектры ¹H ЯМР регистрировали на приборе Bruker (300 МГц или 400 МГц) в приведенных дейтерированных растворителях. Химические сдвиги приведены в м. д., а константы взаимодействия — в герцах. Все конечные соединения очищали методом флэш-хроматографии с использованием силикагеля с размером гранул 220-400 меш или обращенно-фазовой ВЭЖХ с CH₃CN/водой в качестве растворителя. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах силикагеля 60 F-254 (толщина 0,25 нм). Визуализацию осуществляли с помощью УФ-света и/или 10% фосфомолибденовой кислоты в этаноле. Номинальные масс-спектры (низкого разрешения) получали либо на масс-спектрометре Waters LCT, либо на масс-спектрометре Applied Biosystems API 3000. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) получали либо на масс-спектрометре Waters LCT, либо на Agilent TOF. Все остальные эксперименты ЖХ-МС проводили на ВЭЖХ Agilent 1100 в сочетании с одноквадрупольным масс-спектрометром Agilent. Чистоту соединений определяли с помощью ЖХ-МС с длинами волн 230 нм и 254 нм. Все конечные соединения, представленные в данном документе, имеют чистоту ≥ 95%.

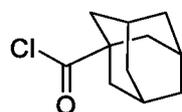
[0279] Пример 6 (M19)

[0280] (((Z)-2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метил (3г,5г,7г)-адамантан-1-карбоксилат



[0281] Стадия 1

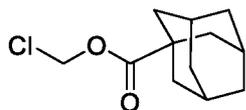
[0282] (3г,5г,7г)-Адамантан-1-карбонил хлорид



[0283] Смесь (3г,5г,7г)-адамантан-1-карбоновой кислоты (10,0 г, 55,4 ммоль) и SOCl₂ (32,8 г, 275 ммоль, 20,0 мл) перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, бромкрезоловый зеленый, R_f = 0,62) показала, что исходное вещество полностью израсходовано. Смесь концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (11,0 г, 99,7%) в виде бесцветных кристаллов, которое использовали непосредственно на следующей стадии реакции без дополнительной очистки.

[0284] Стадия 2

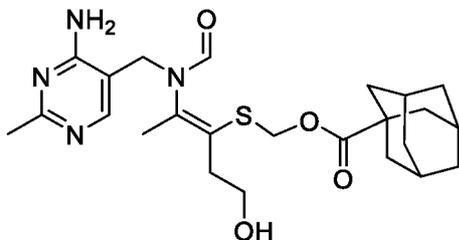
[0285] Хлорметил (3г,5г,7г)-адамантан-1-карбоксилат



[0286] К смеси (3г,5г,7г)-адамантан-1-карбоновой кислоты (15 г, 83,2 ммоль, 1 эквив.), тетрабутиламмония бромида (ТВАВ) (2,68 г, 8,32 ммоль, 0,1 эквив.) и NaHCO_3 (21,0 г, 250,0 ммоль, 3 эквив.) в DCM (150 мл) и H_2O (150 мл) по каплям добавляли хлор(хлорсульфонилокси)метан (16,5 г, 99,9 ммоль, 1,2 эквив.) при 20 °С. Смесь перемешивали при 20 °С в течение 15 часов (выделение газа). При отстаивании смесь разделялась на два слоя, и водный слой экстрагировали дихлоридом метилена (100 мл \times 2). Объединенные органические фазы сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного бесцветного масла. Неочищенный продукт разбавляли в дихлорметане (500 мл) и фильтровали через слой силикагеля. Фильтрат концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (15,5 г, 81,4%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 5,72 (с, 2H), 2,05–1,92 (м, 6H), 1,74–1,70 (м, 2H).

[0287] Стадия 3

[0288] (((Z)-2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метил (3г,5г,7г)-адамантан-1-карбоксилат

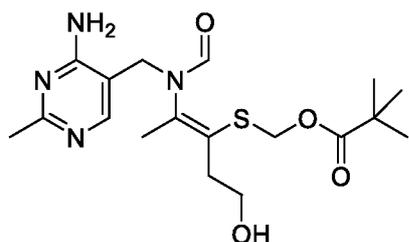


[0289] К смеси витамина В1 (10 г, 33,2 ммоль, 1 эквив.) и KI (551,0 мг, 3,32 ммоль, 0,1 эквив.) в H_2O (150 мл) и THF (150 мл) добавляли порциями NaOH (2,66 г, 66,5 ммоль, 2 эквив.), и смесь перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. Хлорметил (3г,5г,7г)-адамантан-1-карбоксилат (15,2 г, 66,5 ммоль, 2 эквив.) добавляли по каплям к смеси, и полученную смесь перемешивали при 20 °С в течение еще 12 ч. ЖХМС показала завершение реакции. Реакционную смесь разделяли на два слоя. Водный слой экстрагировали этилацетатом (200 мл \times 3). Объединенные органические фазы сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта (ТСХ: этилацетат/этанол = 10/1, R_f продукта = 0,2). Неочищенный продукт очищали методом хроматографии на силикагеле (дихлорид метилена/метанол = 10/1) с получением продукта в виде желтого твердого

вещества, которое дополнительно очищали пре-ВЭЖХ (колонка: Waters Xbridge ВЕН С18 250 × 50 мм, 10 мкм; подвижная фаза: вода-ацетонитрил с 0,05% гидроксида аммония об./об., 20 мин) с получением указанного в заголовке соединения (580,24 мг, 4%) в виде белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,93 (с, 1Н), 7,82 (с, 1Н), 6,96 (уш, 2Н), 4,95 (с, 2Н), 4,68 (т, *J* = 5,2 Гц, 1Н), 4,32 (с, 2Н), 3,52–3,48 (м, 2Н), 2,58 (м, 2Н), 2,28 (с, 3Н), 1,94 (с, 6Н), 1,80-1,78 (м, 6Н), 1,68-1,62 (м, 6Н). МС (ЭР⁺) *m/e* 475,2 (M+H)⁺.

[0290] Пример 7 (M10)

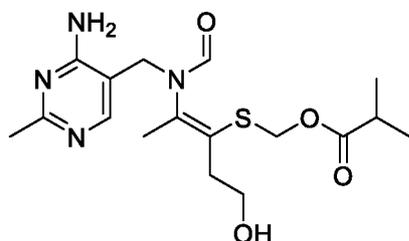
[0291] (Z)-((2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила пивалат



[0292] К раствору витамина В1 (1,00 г, 3,78 ммоль, 1,00 эквив.) в EtOH (10,0 мл) добавляли NaOEt (257 мг, 3,78 ммоль, 1,00 эквив.), хлорметил пивалат (569 мг, 3,78 ммоль, 547 мкл, 1,00 эквив.) и NaOH (45,4 мг, 1,13 ммоль, 0,30 эквив.). Смесь перемешивали при комнатной температуре 20 °С в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали преп-ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (61,0 мг, 3,4%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,93 (с, 1Н), 7,83 (с, 1Н), 6,71 (уш д, *J* = 0,9 Гц, 2Н), 4,96 (с, 2Н), 4,69 (т, *J* = 5,5 Гц, 1Н), 4,34 (уш с, 2Н), 3,60 – 3,42 (м, 2Н), 2,59 (т, *J* = 6,9 Гц, 2Н), 2,28 (с, 3Н), 1,96 (с, 3Н), 1,12 (с, 9Н). МС (ЭР⁺) *m/e* 397,3 (M+H)⁺.

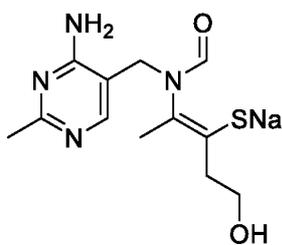
[0293] Пример 8 (M16)

[0294] (Z)-((2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила изобутират



[0295] Стадия 1

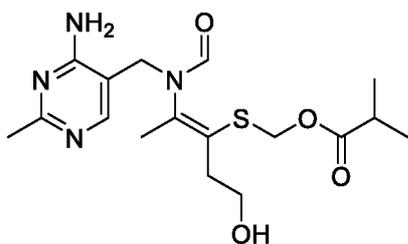
[0296] Натрия (Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-тиолат



[0297] К раствору витамина В1 (40,0 г, 132 ммоль) в EtOH (80,0 мл) добавляли NaOEt (40,0 г, 123 ммоль) в EtOH при -10 °С. Смесь перемешивали при 10 °С в течение 30 мин. Образовавшееся твердое вещество собирали фильтрацией и высушивали с получением указанного в заголовке соединения (36,0 г, 88,9%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9,51 (с, 1H), 8,05 (с, 1H), 7,18 (с, 2H), 5,41 (с, 3H), 3,65–3,62 (м, 2H), 3,01–2,95 (м, 2H), 2,48 (с, 3H), 2,34 (с, 3H).

[0298] Стадия 2

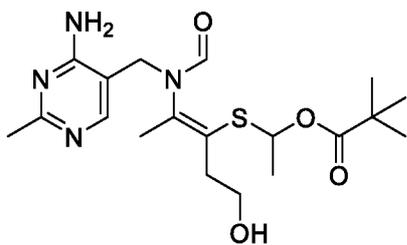
[0299] (Z)-((2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила изобутират



[0300] К смеси натрия (Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-тиолата (3,00 г, 9,86 ммоль) в EtOH (30,0 мл) при 25 °С добавляли NaOH (120 мг, 3,00 ммоль), затем хлорметилизобутират (1,35 г, 9,88 ммоль). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч и концентрировали с получением остатка. Остаток очищали преп-ВЭЖХ (основные условия) и лиофилизировали с получением 150 мг неочищенного коричневого твердого вещества, которое дополнительно очищали преп-ВЭЖХ (забуференной NH₄НСО₃) с последующей лиофилизацией с получением указанного в заголовке соединения (50,1 мг, 29%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,92 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 6,70 (уш, 2H), 4,96 (с, 2H), 4,69 (т, *J* = 5,2 Гц, 1H), 4,34 (с, 2H), 3,41–3,52 (м, 2H), 2,58 (т, *J* = 6,8 Гц, 2H), 2,50–2,40 (м, 1H), 2,28 (с, 3H), 1,95 (с, 3H), 1,08 (д, *J* = 7,2 Гц, 6H). МС (ЭР⁺) *m/e* 383,3 (M+H)⁺.

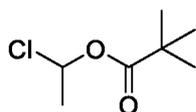
[0301] Пример 9 (M18)

[0302] (Z)-1-((2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)этила пивалат



[0303] Стадия 1

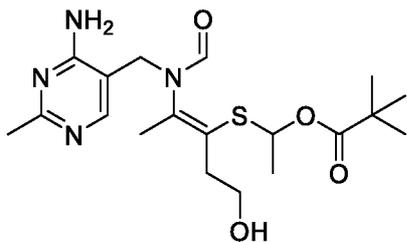
[0304] 1-Хлорэтила пивалат



[0305] К смеси пивалоилхлорида (9,80 г, 81,2 ммоль, 10,0 мл) и 2,4,6-триметил-1,3,5-триоксана (4,95 г, 37,4 ммоль, 5,00 мл) добавляли $ZnCl_2$ (1 М, 2,50 мл), и смесь перемешивали при 90 °С в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли EtOAc (100 мл). Полученный органический раствор промывали ледяным раствором $NaHCO_3$ (20,0 мл \times 3) и солевым раствором, высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением остатка. Остаток дистиллировали при 90 °С (манометрическое давление: -0,09 Мпа) с получением указанного в заголовке соединения (1,60 г) в виде бесцветного масла. 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 6,52–6,56 (м, 1H), 1,80 (д, $J = 5,6$ Гц, 3H), 1,22 (с, 9H).

[0306] Стадия 2

[0307] (Z)-1-((2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)этила пивалат

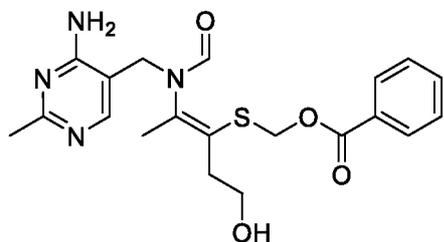


[0308] К смеси натрия (Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-тиолата (3,00 г, 9,86 ммоль) в EtOH (30,0 мл) добавляли NaOEt (3,20 г, 9,88 ммоль) в EtOH при 25 °С, затем 1-хлорэтилпивалат (1,60 г, 9,72 ммоль) и NaOH (120 мг, 3,00 ммоль). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 12 ч и концентрировали с получением остатка. Остаток очищали преп-ВЭЖХ с последующей лиофилизацией с получением указанного в заголовке соединения (60,0 мг, выход 2%) в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 7,92 (с, 1H), 7,85 (с, 1H), 6,48 (уш, 2H), 5,74–5,79 (м, 1H), 4,46 (д, $J = 15,2$ Гц, 1H), 4,37 (с, 1H), 4,28 (д, $J = 15,2$ Гц, 1H), 3,53–3,55

(м, 2H), 2,52–2,57 (м, 2H), 2,30 (с, 3H), 1,95 (с, 3H), 1,29 (д, $J = 6,4$ Гц, 3H), 1,33 (с, 9H). МС (ЭР^+) m/e 411,3 ($M+H$) $^+$.

[0309] Пример 10 (M21)

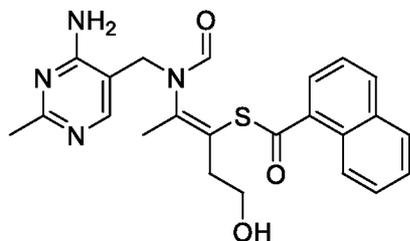
[0310] (Z)-((2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила бензоат



[0311] К смеси витамина В1 (5 г, 16,6 ммоль, 1 эквив.) и К1 (138,0 мг, 831,0 ммоль, 0,05 эквив.) в H_2O (25 мл) и добавляли порциями NaOH (1,33 г, 33,2 ммоль, 2 эквив.). Смесь перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч, затем по каплям добавляли раствор хлорметилбензоата (2,84 г, 16,6 ммоль, 1 эквив) в THF (25 мл). Реакционную смесь затем перемешивали при 20 °С еще в течение 10 ч. ЖХМС показала образование нового продукта. Смесь гасили добавлением 5 мл метанола и регулировали рН до ~7 насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Затем водный раствор экстрагировали этилацетатом (200 мл \times 2). Объединенные органические фазы высушивали безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, который растирали с этилацетатом (50 мл) с получением указанного в заголовке соединения (700 мг, 10%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,96–7,92 (м, 3H), 7,81 (с, 1H), 7,73–7,67 (м, 1H), 7,57–7,53 (м, 2H), 6,76 (уш с, 2H), 5,28 (с, 2H), 4,74–4,70 (м, 1H), 4,32 (с, 2H), 3,54–3,48 (м, 2H), 2,69–2,66 (м, 2H), 2,26 (с, 3H), 1,96 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 417,2 ($M+H$) $^+$.

[0312] Пример 11 (M34)

[0313] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) нафталин-1-карботиоат

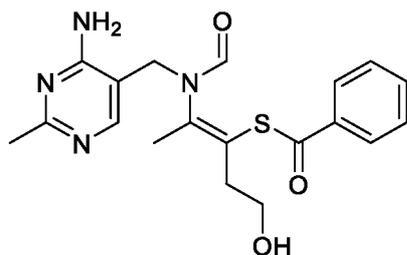


[0314] К смеси витамина В1 (9 г, 29,9 ммоль, 1 эквив.) и К1 (497,0 мг, 2,99 ммоль, 0,1 эквив.) в H_2O (150 мл) и THF (150 мл) добавляли NaOH (2,39 г, 59,8 ммоль, 2 эквив.). Смесь перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. По каплям добавляли 1-нафтоилхлорид (11,1 г,

58,0 ммоль, 8,71 мл, 1,94 эквив). Реакционную смесь перемешивали при 20 °С еще в течение 12 ч. ЖХМС показала завершение реакции. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (100 мл × 3). Водную фазу корректировали до pH 7–8 насыщенным раствором бикарбоната натрия и экстрагировали этилацетатом (100 мл × 3). Объединенные органические фазы высушивали с помощью безводного Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, который растирали с этилацетатом (10 мл) с получением указанного в заголовке соединения (420 мг, 962 мкмоль, выход 3%) в виде почти белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8,21–8,20 (м, 2H), 8,05–8,02 (м, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,92–7,91 (м, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,68–7,59 (м, 3H), 6,74 (уш с, 2H), 4,70–4,68 (м, 1H), 4,44 (с, 2H), 3,53 (м, 2H), 2,70–2,68 (м, 2H), 2,19 (с, 3H), 2,13 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 437,1 (M+H)⁺.

[0315] Пример 12 (M26)

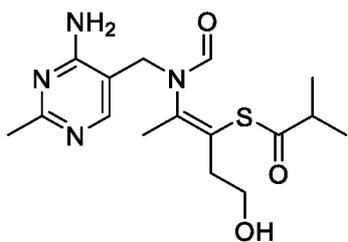
[0316] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) бензотиоат



[0317] К раствору витамина В1 (1,00 г, 3,32 ммоль, 1,00 эквив) и NaOH (133,0 мг, 3,32 ммоль, 1,00 эквив.) в H₂O (50,0 мл) и THF (5,00 мл) добавляют бензоилхлорид (935,0 мг, 6,65 ммоль, 772,0 мкл, 2,00 эквив) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что исходное вещество израсходовано, и был выявлен продукт с желаемой массой. Реакционную смесь гасили MeOH (5,00 мл), доводили до pH = 7 и экстрагировали с помощью 10:1 DCM:MeOH (25,0 мл × 2). Объединенные органические слои высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который при растирании с EtOAc/EtOH/DCM (2:2:1) давал указанное в заголовке соединение (251 мг, 18,6%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,89 (с, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,73 (д, J = 7,2 Гц, 2H), 7,68 (т, J = 7,6 Гц, 1H), 7,53 (т, J = 7,6 Гц, 2H), 6,65 (уш с, 2H), 4,64 (т, J = 4,2 Гц, 1H), 4,39 (с, 2H), 3,46 (м, 2H), 2,57 (м, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,14 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 387,0 (M+H)⁺.

[0318] Пример 13 (M27)

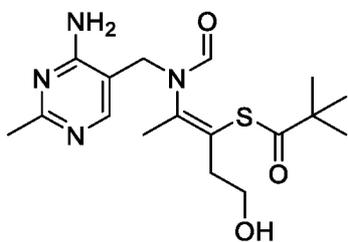
[0319] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-метилпропантиоат



[0320] К раствору витамина В1 (1,00 г, 3,32 ммоль, 1,00 эквив) и NaOH (266 мг, 6,65 ммоль, 2,00 эквив.) в H₂O (50,0 мл) и THF (5,00 мл) добавляют изобутирилхлорид (708 мг, 6,65 ммоль, 695,0 мкл, 2,00 эквив) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 0,5 ч, гасили MeOH (5,00 мл), доводили до pH = 7. Смесь экстрагировали с помощью 10:1 DCM:MeOH (25,0 мл × 2). Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растирали с EtOAc/EtOH/DCM (2:2:1) с получением указанного в заголовке соединения (224,0 мг, 19,0%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,79 (с, 1H), 7,77 (с, 1H), 6,68 (уш с, 2H), 4,61 (т, *J* = 4,2 Гц, 1H), 4,35 (с, 2H), 3,40 (к, *J* = 6,8 Гц, 2H), 2,60–2,50 (м, 1H), 2,44 (т, *J* = 7,2 Гц, 1H), 2,26 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 1,02 (с, 3H), 1,00 (с, 3H). МС (ЭР⁺) *m/e* 353,3 (M+H)⁺.

[0321] Пример 14 (M28)

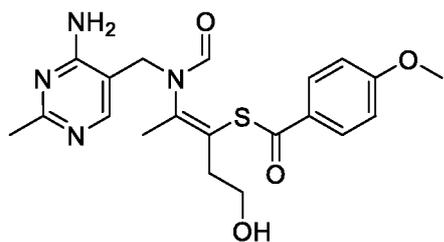
[0322] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2,2-диметилпропантиоат



[0323] К смеси натрия (Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-тиолята (0,50 г, 1,64 ммоль, 1,00 эквив.) и NaOH (65,7 мг, 1,64 ммоль, 1,00 эквив.) в H₂O (5,00 мл) добавляли пивалоилхлорид (198 мг, 1,64 ммоль, 202 мкл, 1 эквив.) при 0 °С, и полученную смесь перешивали при 0 °С в течение 1 ч. Смесь концентрировали и очищали колоночной хроматографией (SiO₂, дихлорметан: метанол = от 100:1 до 10:1, ТСХ: дихлорметан: метанол 10:1, R_f = 0,4) с получением указанного в заголовке соединения (110 мг, 18,2%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,79 (с, 1 H) 7,75 (с, 1 H) 6,70 (уш с, 2 H) 4,60 (т, *J* = 5,6 Гц, 1 H) 4,35 (уш с, 2 H) 3,39 (к, *J* = 6,8 Гц, 2 H) 2,42 (уш т, *J* = 6,8 Гц, 2 H) 2,26 (с, 3 H) 2,08 (с, 3 H) 1,07 (с, 9 H). МС (ЭР⁺) *m/e* 367,2 (M+H)⁺.

[0324] Пример 15 (M29)

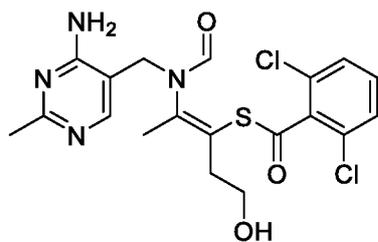
[0325] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-метоксибензоатиоат



[0326] К смеси натрия (Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-тиолята (0,50 г, 1,64 ммоль, 1,00 эквив.) и NaOH (65,7 мг, 1,64 ммоль, 1,00 эквив.) в H₂O (4 мл) добавляли соединение 4-метоксибензоилхлорид (280 мг, 1,64 ммоль, 226 мкл, 1,00 эквив.) при 0 °С, и полученную смесь перешивали при 0 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала, что исходное вещество израсходовано, и был выявлен продукт с желаемой массой. Затем смесь концентрировали, и остаток очищали колоночной хроматографией с силикагелем (от 100:0 до 20:1 дихлорметан:метанол) с получением указанного в заголовке соединения (60,0 мг, 9%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,87 (с, 1 H), 7,81 (с, 1 H), 7,72 (уш д, *J* = 8,8 Гц, 2 H), 7,05 (уш д, *J* = 8,8 Гц, 2 H), 6,64 (м, 2 H), 4,64 (уш с, 1 H), 4,37 (уш с, 2 H), 3,84 (с, 3 H), 3,46 (уш д, *J* = 4,0 Гц, 2 H), 2,58 (м, 2 H), 2,19 (с, 3 H), 2,12 (с, 3 H). МС (ЭР⁺) *m/e* 417,1 (M+H)⁺.

[0327] **Пример 16 (M30)**

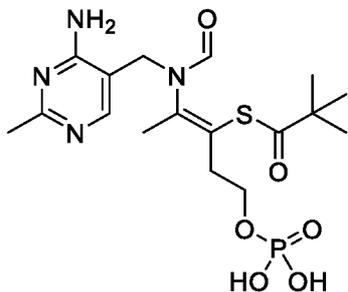
[0328] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2,6-диметилпропантиоат



[0329] К смеси натрия (Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-тиолята (0,50 г, 1,64 ммоль, 1,00 эквив.) и NaOH (65,7 мг, 1,64 ммоль, 1,00 эквив.) в H₂O (4,00 мл) добавляли 2,6-дихлорбензоилхлорид (344 мг, 1,64 ммоль, 235 мкл, 1,00 эквив.) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч, а затем концентрировали с получением остатка. Остаток очищали преп-ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (150 мг, 20,1%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,96 (с, 1 H), 7,84 (с, 1 H), 7,60 – 7,54 (м, 3 H), 6,68 (м, 2 H), 4,68 – 4,75 (м, 1 H), 4,41 (уш с, 2 H), 3,46 – 3,52 (м, 2 H), 2,62 – 2,69 (м, 2 H), 2,26 (с, 3 H), 2,14 (с, 3 H). МС (ЭР⁺) *m/e* 455,1 (M+H)⁺.

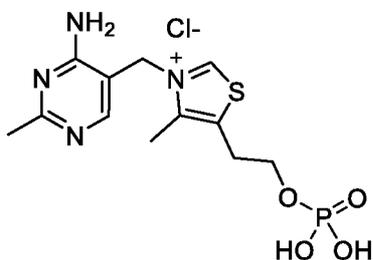
[0330] Пример 17 (М31)

[0331] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-(фосфоноокси)пент-2-ен-3-ил) 2,2-диметилпропантиоат



[0332] Стадия 1

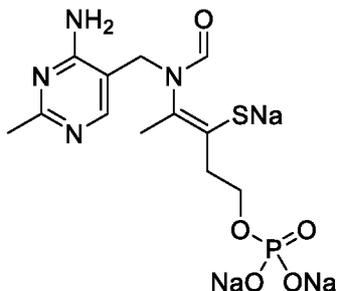
[0333] 3-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)-4-метил-5-(2-(фосфоноокси)этил)тиазол-3-ия хлорид



[0334] К раствору полифосфорной кислоты (150 г, 49,8 ммоль, 1,00 эквив) при 130 °С порциями добавляли витамин В1 (15,0 мг, 49,8 ммоль, 1,00 эквив.). Смесь перемешивали при 100–130 °С в течение 2 ч. Добавляли воду (250 мл), и смесь перемешивали при 100 °С в течение 2 ч, охлаждали до 25 °С и экстрагировали триоктиламином/МТВЕ (1:1, 250 мл × 2). Водный слой отделяли, разбавляли 400 мл EtOH и перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. Образовавшееся белое твердое вещество собирали фильтрацией, промывали EtOH (200 мл × 2) и высушивали с получением указанного в заголовке соединения (17,0 г, 98,7%).

[0335] Стадия 2

[0336] Натрия (Z)-4-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-3-сульфидопент-3-ен-1-ил фосфат

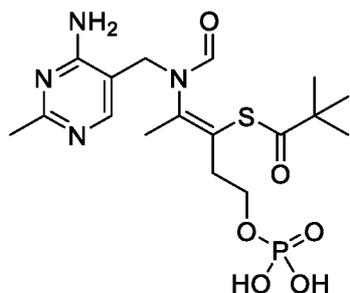


[0337] К смеси 3-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)-4-метил-5-(2-(фосфоноокси)этил)тиазол-3-ия (2,00 г, 5,79 ммоль, 1,00 эквив.) в H₂O (20 мл) медленно

добавляли NaOH (5,64 г, 42,3 ммоль, 7,30 эквив.) при 0–5 °С. Смесь перемешивали при 5–10 °С в течение 0,5 ч и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (2,40 г, 97%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии реакции без дополнительной очистки.

[0338] Стадия 3

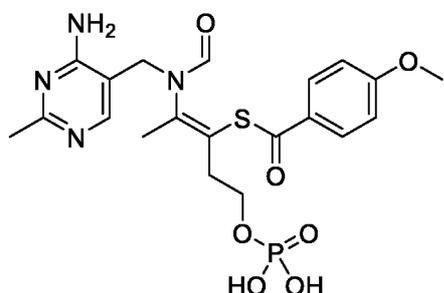
[0339] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-(фосфоноокси)пент-2-ен-3-ил) 2,2-диметилпропантиоат



[0340] К смеси натрия (Z)-4-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-3-сульфидопент-3-ен-1-ил фосфата (0,800 г, 1,87 ммоль, 1,00 эквив.) в NaOH (1 М, 3,74 мл, 2,00 эквив.) добавляли пивалоилхлорид (840 мг, 6,97 ммоль, 857 мкл, 3,73 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. ТСХ (этилацетат:дихлорметан = 2: 1) показала, что исходное вещество полностью израсходовано, и образовалось новое пятно. Реакционную смесь концентрировали и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (132 мг, 15,7%) как а белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,99 (с, 1 H), 7,79 (с, 1 H), 3,93 (уш д, J = 5,6 Гц, 2 H), 2,56 (с, 3 H), 2,25 (с, 3 H), 1,14 (с, 9 H). МС (ЭР⁺) m/e 447,1 (M+H)⁺.

[0341] Пример 18 (M32)

[0342] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-(фосфоноокси)пент-2-ен-3-ил) 4-метоксибензотиоат

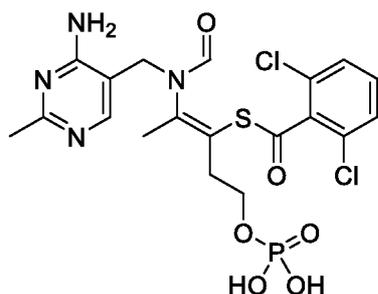


[0343] К смеси натрия (Z)-4-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-3-сульфидопент-3-ен-1-ил фосфата (0,80 г, 1,87 ммоль, 1,00 эквив.) в NaOH (1 М, 3,74 мл, 2,00 эквив.) добавляли 4-метоксибензоилхлорид (1,19 мг, 6,97 ммоль, 958 мкл, 3,73 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. ТСХ (этилацетат: дихлорметан=

2: 1) показала полностью израсходованное исходное вещество, и образовалось новое пятно. Смесь концентрировали и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (174 мг, 18,1%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8,04 (с, 1 H), 7,99 (с, 1 H), 7,75 (д, $J = 8,8$ Гц, 2 H), 7,00 (д, $J = 8,8$ Гц, 2 H), 4,74 – 4,35 (м, 2 H), 4,03 (к, $J = 5,6$ Гц, 2 H), 3,88 (с, 3 H), 2,81 (м, 2 H), 2,40 (с, 3 H), 2,30 (с, 3 H). МС (ЭР^+) m/e 497,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0344] Пример 19 (M33)

[0345] (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-(фосфоноокси)пент-2-ен-3-ил) 2,6-дихлорбензотиоат

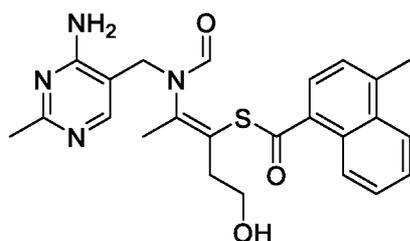


[0346] К смеси натрия (Z)-4-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-3-сульфидопент-3-ен-1-ил фосфата (0,800 г, 1,87 ммоль, 1,00 эквив.) в NaOH (1 М, 3,74 мл, 2,00 эквив.) добавляли 2,6-дихлорбензоилхлорид (391 мг, 1,87 ммоль, 268 мкл, 1,00 эквив.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. ТСХ (этилацетат: дихлорметан = 2: 1) показала, что исходное вещество полностью израсходовано, и образовалось новое пятно. Смесь концентрировали и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения (72,0 мг, 7,20%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8,06 (с, 1 H), 8,02 (с, 1 H), 7,44 (с, 3 H), 4,07 – 4,04 (м, 2 H), 2,49 (с, 3 H), 2,32 (с, 3 H). МС (ЭР^+) m/e 535,0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0347] Примеры от 20 до 59: следующие соединения синтезировали, следуя методикам получения препарата М34 (пример 11), с соответствующим исходным веществом.

[0348] Пример 20 (M37)

[0349] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-метилнафталин-1-карботиоат

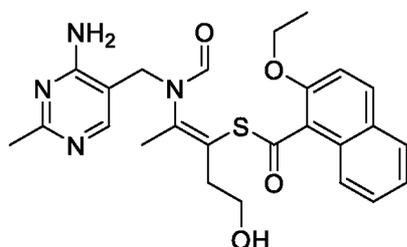


[0350] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,30 – 8,25 (м, 1H), 8,13 (дд, $J = 3,2, 6,6$ Гц, 1H),

7,98 (с, 1H), 7,88 – 7,80 (м, 2H), 7,69 – 7,64 (м, 2H), 7,47 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H), 6,71 (уш с, 2H), 4,69 (уш т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,43 (уш с, 2H), 3,55 – 3,47 (м, 2H), 2,72 (с, 3H), 2,66 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,13 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 451 (M+H)⁺.

[0351] Пример 21 (M38)

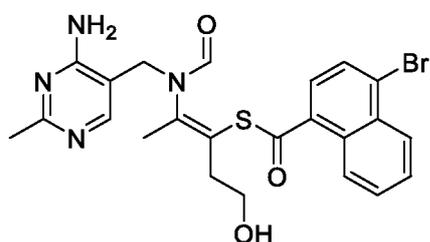
[0352] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-этоксинафталин-1-карботиоат



[0353] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,06 – 7,92 (м, 4H), 7,57 – 7,42 (м, 4H), 6,67 (уш с, 2H), 4,73 (уш т, $J = 4,8$ Гц, 1H), 4,42 (уш с, 2H), 4,23 (к, $J = 6,8$ Гц, 2H), 3,62 – 3,51 (м, 2H), 2,73 (уш с, 2H), 2,23 (с, 3H), 2,13 (с, 3H), 1,32 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 481 (M+H)⁺.

[0354] Пример 22 (M39)

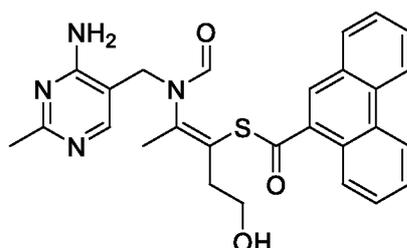
[0355] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-бромнафталин-1-карботиоат



[0356] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,27 – 8,23 (м, 2H), 8,02 – 7,98 (м, 2H), 7,86 – 7,78 (м, 4H), 6,72 (уш д, $J = 1,2$ Гц, 2H), 4,71 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,44 (уш с, 2H), 3,53 (к, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,67 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,19 (с, 3H), 2,08 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 515 (M+H)⁺.

[0357] Пример 23 (M40)

[0358] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) фенантрен-9-карботиоат

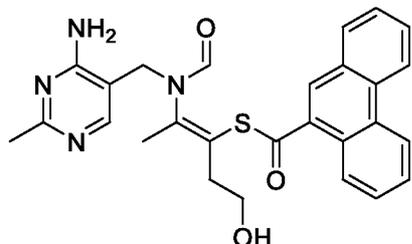


[0359] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,92 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 8,88 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 8,26–8,19 (м, 3H), 8,03 (с, 1H), 7,90 (с, 1H), 7,80–7,75 (м, 1H), 7,80–7,77 (м, 2H), 7,74–7,72 (м,

1H), 6,80 (с, 2H), 4,74 (т, $J = 4,8$ Гц, 1H), 4,47 (с, 2H), 4,11 (д, $J = 3,6$ Гц, 2H), 3,58 (к, $J = 6,0$ Гц, 2H), 3,17 (д, $J = 2,4$ Гц, 2H), 2,72 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,21 (с, 3H), 2,09 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 487 (M+H)⁺.

[0360] Пример 24 (M43)

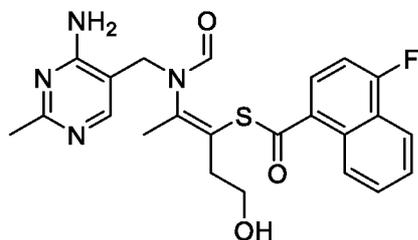
[0361] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) фенантрен-9-карботиоат



[0362] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,88 – 7,83 (м, 2H), 7,32 – 7,20 (м, 3H), 6,73 (уш д, $J = 1,2$ Гц, 2H), 4,66 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,40 (уш с, 2H), 3,47 (к, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,75 (уш с, 2H), 2,67 (уш с, 2H), 2,58 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,21 (с, 3H), 2,13 (с, 3H), 1,70 (м, 4H). МС (ЭР⁺) m/e 441 (M+H)⁺.

[0363] Пример 25 (M44)

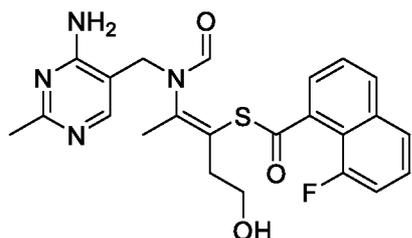
[0364] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-фторнафталин-1-карботиоат



[0365] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,33 (уш д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 8,16 (уш д, $J = 7,6$ Гц, 1H), 8,08 – 7,94 (м, 2H), 7,87 (с, 1H), 7,82 – 7,70 (м, 2H), 7,45 (дд, $J = 8,0, 10,1$ Гц, 1H), 6,71 (уш с, 2H), 4,69 (уш т, $J = 5,2$ Гц, 1H), 4,43 (уш с, 2H), 3,66 – 3,47 (м, 2H), 2,66 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,25 – 2,15 (м, 3H), 2,13 – 1,96 (м, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 455 (M+H)⁺.

[0366] Пример 26 (M45)

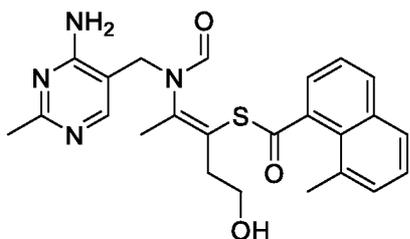
[0367] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 8-фторнафталин-1-карботиоат



[0368] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,20 (уш д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,91 – 7,83 (м, 2H), 7,73 – 7,58 (м, 2H), 7,56 – 7,29 (м, 2H), 6,81 (уш с, 2H), 4,73 (уш с, 1H), 4,46 (уш с, 2H), 3,55 (уш с, 2H), 2,69 (уш т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,18 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 455 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0369] **Пример 27** (M46)

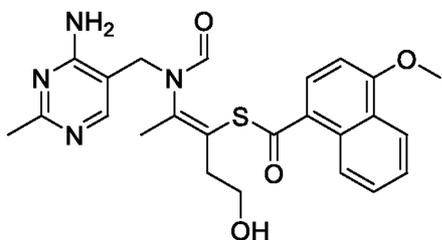
[0370] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 8-метилнафталин-1-карботиоат



[0371] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,14 (дд, $J_1 = 1,6$, $J_2 = 8,0$ Гц, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,91 – 7,86 (м, 2H), 7,59 – 7,47 (м, 4H), 6,83 (уш с, 2H), 4,75 (уш т, $J = 5,2$ Гц, 1H), 4,46 (уш с, 2H), 3,54 (к, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,70 – 2,64 (м, 2H), 2,48 (с, 3H), 2,19 (д, $J = 5,6$ Гц, 6H). МС (ЭР^+) m/e 451 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0372] **Пример 28** (M47)

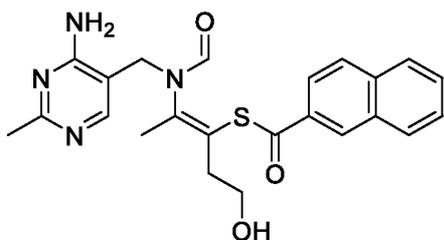
[0373] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-метоксинафталин-1-карботиоат



[0374] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,42 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 8,26 (д, $J = 0,4$ Гц, 1H), 8,05 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,68 – 7,65 (м, 1H), 7,65 – 7,61 (м, 1H), 7,08 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 6,71 (уш с, 2H), 4,69 (уш т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,43 (уш с, 2H), 4,08 (с, 3H), 3,55 – 3,50 (м, 2H), 2,66 – 2,63 (м, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,14 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 467 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0375] **Пример 29** (M49)

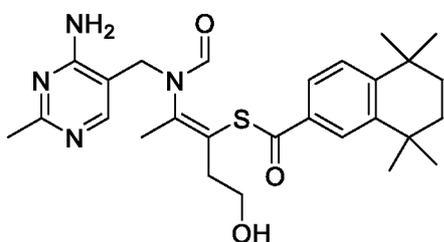
[0376] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) нафталин-2-карботиоат



[0377] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,41 (с, 1H), 8,18 (уш д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 8,06 – 8,02 (м, 2H), 7,95 (с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,76 – 7,64 (м, 3H), 6,64 (уш с, 2H), 4,67 (уш т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,41 (уш с, 2H), 3,52 (к, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,62 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,14 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 437 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0378] **Пример 30** (M50)

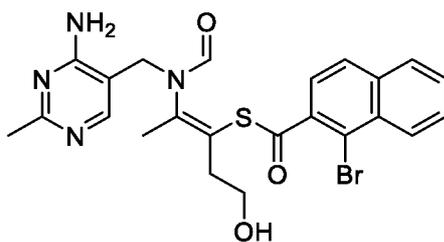
[0379] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 5,5,8,8-тетраметил-5,6,7,8-тетрагидронафталин-2-карботиоат



[0380] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,84 (д, $J = 14,4$ Гц, 2H), 7,64 (с, 1H), 7,51–7,46 (м, 2H), 6,63 (с, 2H), 4,63 (т, $J = 4,2$ Гц, 1H), 4,38 (с, 2H), 3,45 (д, $J = 5,6$ Гц, 2H), 2,56 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,20 (с, 2H), 2,13 (с, 2H), 1,65 (с, 3H), 1,25 (с, 12H). МС (ЭР^+) m/e 497 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0381] **Пример 31** (M51)

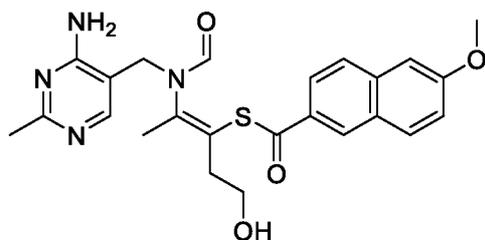
[0382] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 1-бромнафталин-2-карботиоат



[0383] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,28 (д, $J = 8,8$ Гц, 2H), 8,12–8,09 (м, 2H), 7,98 (с, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,80–7,76 (м, 1H), 7,74–7,72 (м, 1H), 7,46 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H), 6,75 (с, 2H), 4,72 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,45 (с, 2H), 3,55 (к, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,68 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,17 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 516 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0384] **Пример 32** (M52)

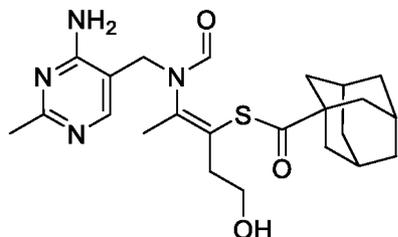
[0385] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 6-метоксинафталин-2-карботиоат



[0386] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,33 (д, $J = 1,2$ Гц, 1H), 8,08 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H), 7,94 – 7,83 (м, 3H), 7,70 (дд, $J_1 = 1,6$, $J_2 = 8,4$ Гц, 1H), 7,43 (д, $J = 2,0$ Гц, 1H), 7,28 (дд, $J_1 = 2,4$, $J_2 = 8,8$ Гц, 1H), 6,76 – 6,55 (м, 2H), 4,65 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,40 (уш с, 2H), 3,92 (с, 3H), 3,53 – 3,46 (м, 2H), 2,60 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,14 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 467 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0387] **Пример 33** (M53)

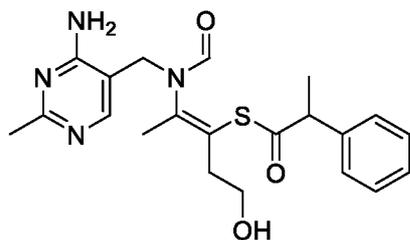
[0388] S-((Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) (3г,5г,7г)-адамантан-1-карботиоат



[0389] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,79 (с, 1H), 7,74 (с, 1H), 6,75 (уш с, 2H), 4,60 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 3,44 – 3,38 (м, 2H), 2,41 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 1,98 (уш с, 3H), 1,84 – 1,75 (м, 1H), 1,71 – 1,62 (м, 11H). МС (ЭР^+) m/e 445 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0390] **Пример 34** (M54)

[0391] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-фенилпропантиоат

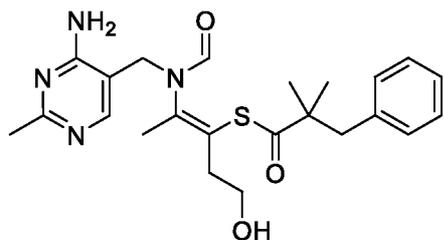


[0392] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,77 (с, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,34 – 7,24 (м, 5H), 6,64 (с, 2H), 4,55 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,40–4,24 (м, 2H), 3,82 (м, 1H), 3,29 – 3,28 (м, 2H), 2,48 – 2,39 (м, 1H), 2,32 – 2,28 (м, 1H), 2,28 (с, 3H), 1,34–1,30 (д, $J = 7,6$ Гц, 3H). МС (ЭР^+) m/e 415 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0393] **Пример 35** (M55)

[0394] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-

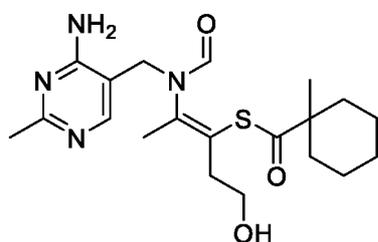
гидроксипент-2-ен-3-ил) 2,2-диметил-3-фенилпропантиоат



[0395] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,78 (с, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,27 – 7,20 (м, 3H), 7,09 (м, 2H), 6,71 (с, 1H), 4,61 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,34 (с, 1H), 3,42 – 3,36 (м, 2H), 2,73 (с, 2H), 2,43 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,25 (с, 2H), 2,07 (с, 3H), 1,02 (с, 6H). МС (ЭР $^+$) m/e 443 (M+H) $^+$.

[0396] **Пример 36** (M57)

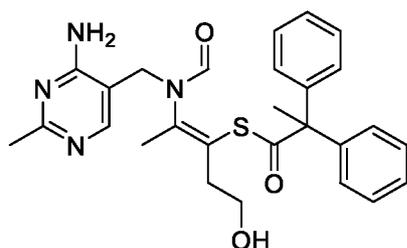
[0397] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 1-метилциклогексан-1-карботиоат



[0398] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,79 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 6,70 (с, 2H), 4,61 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,34 (с, 2H), 3,45 – 3,35 (м, 2H), 2,43 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,27 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 1,78 (дд, $J = 6,8, 9,8$ Гц, 2H), 1,49 – 1,24 (м, 8H), 1,05 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 407 (M+H) $^+$.

[0399] **Пример 37** (M58)

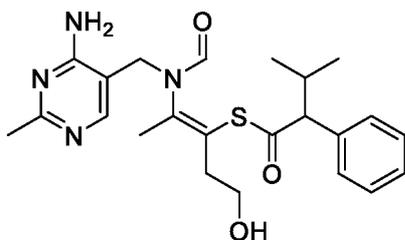
[0400] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2,2-дифенилпропантиоат



[0401] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,77 (д, $J = 3,2$ Гц, 2H), 7,35 – 7,25 (м, 6H), 7,16 – 7,08 (м, 4H), 6,73 (уш с, 2H), 4,58 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,31 (уш с, 2H), 3,32 – 3,28 (м, 2H), 2,41 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,05 (с, 3H), 1,84 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 491 (M+H) $^+$.

[0402] **Пример 38** (M59)

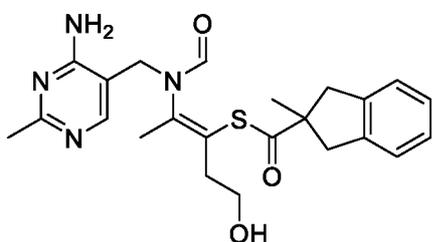
[0403] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 3-метил-2-фенилбутантиоат



[0404] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,77 (с, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,35 – 7,30 (м, 2H), 7,29 – 7,21 (м, 3H), 6,64 (с, 2H), 4,55 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,25 (с, 2H), 3,45 – 3,41 (м, 1H), 3,29 – 3,17 (м, 2H), 2,48 – 2,39 (м, 1H), 2,27–2,20 (м, 5H), 1,99 (с, 3H), 0,92 (д, $J = 6,4$ Гц, 3H), 0,61 (д, $J = 6,8$ Гц, 3H). МС (ЭР^+) m/e 443 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0405] **Пример 39** (M62)

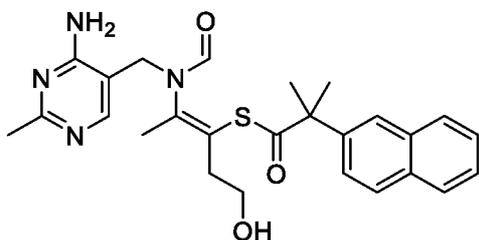
[0406] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-метил-2,3-дигидро-1H-инден-2-карботиоат



[0407] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,79 (с, 2H), 7,21 – 7,13 (м, 4H), 6,72 (с, 2H), 4,62–4,59 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,35 (с, 1H), 3,43 – 3,38 (м, 2H), 3,20 (д, $J = 16,0$ Гц, 2H), 2,73 (д, $J = 16,0$ Гц, 2H), 2,44 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,22 (с, 3H), 2,09 (с, 3H), 1,21 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 441 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0408] **Пример 40** (M63)

[0409] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-метил-2-(нафталин-2-ил)пропантиоат

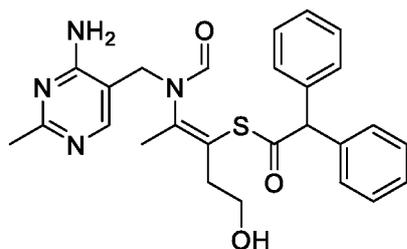


[0410] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,90–7,89 (м, 1H), 7,88–7,85 (м, 3H), 7,77 (с, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,53–7,51 (м, 2H), 7,35–7,33 (м, 1H), 6,71 (с, 2H), 4,50 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,31 (с, 2H), 3,26 (к, $J = 5,6$ Гц, 2H), 2,38 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,22 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 1,53 (с, 6H). МС (ЭР^+) m/e 479 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0411] **Пример 41** (M64)

[0412] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-

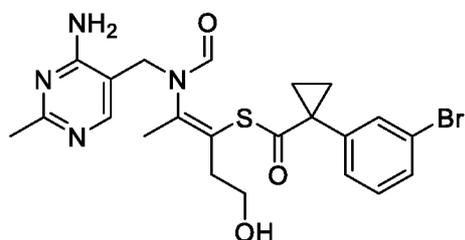
гидроксипент-2-ен-3-ил) 2,2-дифенилэтантоат



[0413] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,77 (д, $J = 3,2$ Гц, 2H), 7,39 – 7,23 (м, 12H), 6,78 – 6,57 (м, 2H), 5,29 (с, 1H), 4,63 – 4,51 (м, 1H), 4,31 (уш с, 2H), 2,21 (с, 3H), 2,02 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 477 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0414] **Пример 42** (M65)

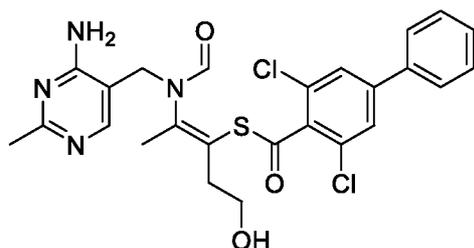
[0415] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 1-(3-бромфенил)циклопропан-1-карботиоат



[0416] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,74 (с, 1H), 7,71 (с, 1H), 7,55–7,52 (м, 2H), 7,39–7,37 (м, 2H), 6,71 (с, 2H), 4,55–4,52 (м, 1H), 4,31 (с, 2H), 3,37–3,35 (м, 1H), 2,41–2,34 (м, 2H), 2,37 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 1,40–1,37 (м, 2H), 1,22–1,19 (с, 2H). МС (ЭР^+) m/e 506 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0417] **Пример 43** (M66)

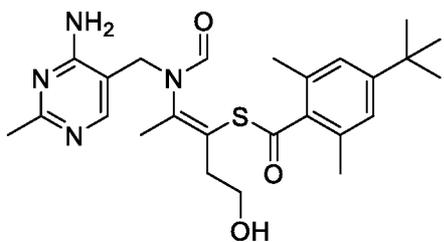
[0418] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 3,5-дихлор-[1,1'-бифенил]-4-карботиоат



[0419] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,98 (с, 1H), 7,89 (с, 3H), 7,78 (дд, $J_1 = 1,6$, $J_2 = 8,0$ Гц, 2H), 7,58 – 7,45 (м, 3H), 6,92 (м, 2H), 4,74 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,43 (уш с, 2H), 3,55 – 3,48 (м, 2H), 2,67 (уш д, $J = 1,6$ Гц, 2H), 2,22 (с, 3H), 2,15 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 532 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0420] **Пример 44** (M67)

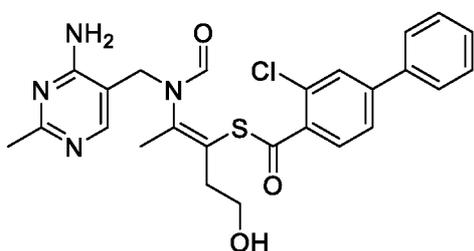
[0421] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-(трет-бутил)-2,6-диметилбензотиоат



[0422] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,95 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,13–7,08(м, 2H), 6,75 (с, 2H), 4,75–4,72 (м, 1H), 4,40 (с, 2H), 3,49–3,44 (м, 2H), 2,68 (м, 1H), 2,26 (с, 3H), 2,20 (с, 6H), 2,15 (с, 3H), 1,24 (с, 9H). МС (ЭР $^+$) m/e 471 (M+H) $^+$.

[0423] **Пример 45** (M68)

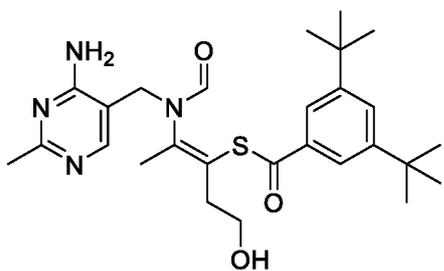
[0424] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 3-хлор-[1,1'-бифенил]-4-карботиоат



[0425] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,92 (с, 1H), 7,90 – 7,84 (м, 2H), 7,80 – 7,73 (м, 3H), 7,65 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,57 – 7,45 (м, 3H), 6,96 – 6,56 (м, 2H), 4,70 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,43 (уш с, 2H), 3,53 – 3,46 (м, 2H), 2,61 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,21 (с, 3H), 2,16 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 498 (M+H) $^+$.

[0426] **Пример 46** (M70)

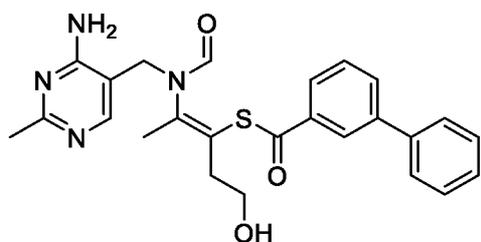
[0427] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 3,5-ди-трет-бутилбензотиоат



[0428] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,88 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,74 (т, $J = 2,0$ Гц, 1H), 7,55 (д, $J = 2,0$ Гц, 1H), 6,60 (с, 2H), 4,65 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,39 (с, 2H), 3,57 – 3,42 (м, 2H), 2,57 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,15 (с, 3H), 1,32 (с, 18H). МС (ЭР $^+$) m/e 499 (M+H) $^+$.

[0429] **Пример 47** (M72)

[0430] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) [1,1'-бифенил]-3-карботиоат



[0431] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,98 (м, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,91–7,90 (м, 1H), 7,84 (с, 1H), 7,73–7,71 (м, 3H), 7,63 (м, 1H), 7,55–7,51 (м, 2H), 7,44 (м, 1H), 6,64 (с, 2H), 4,64–4,65 (м, 2H), 4,40 (с, 2H), 3,52–3,48 (м, 2H), 2,61–2,51 (м, 2H), 2,21 (с, 3H), 2,13 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 463 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0432] **Пример 48** (M73)

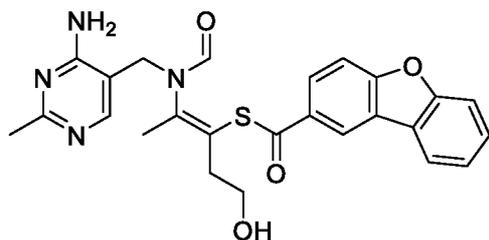
[0433] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-феноксibenзотиоат



[0434] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,87 (с, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,77 (с, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,50–7,46 (м, 2H), 7,27 (м, 1H), 7,15 (д, $J = 8$ Гц, 2H), 7,04 (д, $J = 8$ Гц, 2H), 6,64 (с, 2H), 4,64–4,61 (м, 2H), 4,38 (с, 2H), 3,48–3,43 (м, 2H), 2,58–2,52 (м, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,13 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 463 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0435] **Пример 49** (M76)

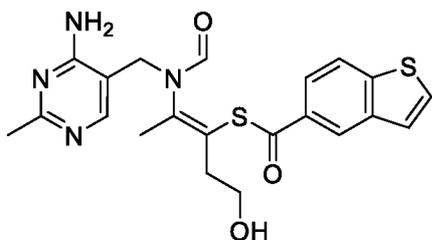
[0436] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) дибензо[b,d]фуран-2-карботиоат



[0437] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,57 (с, 1H), 8,35–8,34 (д, $J = 4$ Гц, 1H), 7,96–7,90 (м, 5H), 7,79–7,77 (м, 1H), 7,61–7,48 (м, 1H), 6,65 (м, 2H), 4,70 (м, 1H), 4,41 (с, 1H), 3,54 (м, 2H), 2,63 (м, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,16 (с, 6H). МС (ЭР^+) m/e 477 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0438] **Пример 50** (M79)

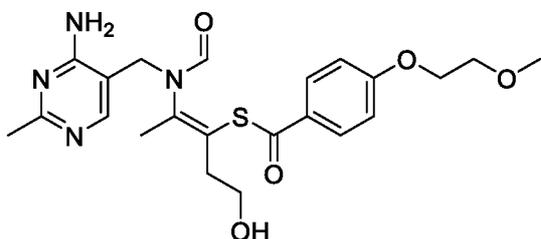
[0439] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) бензо[b]тиофен-5-карботиоат



[0440] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,31 (с, 1H), 8,15 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,94–7,93 (м, 2H), 7,84 (с, 1H), 7,67–7,65 (м, 2H), 6,63 (с, 2H), 4,67–4,64 (м, 2H), 4,40 (с, 2H), 3,51–3,47 (м, 2H), 2,67–2,58 (м, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,14 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 443 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0441] **Пример 51** (M82)

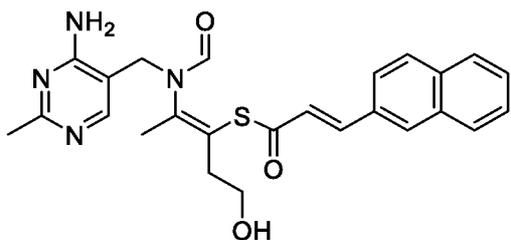
[0442] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-(2-метоксиэтокси)бензотиоат



[0443] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,88 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,73–7,69 (м, 2H), 7,08–7,04 (м, 2H), 6,64 (с, 2H), 4,66–4,63 (м, 2H), 4,38 (с, 2H), 4,21–4,18 (м, 2H), 3,69–3,68 (м, 2H), 3,47 (м, 2H), 3,34 (с, 3H), 2,56 (м, 2H), 2,25 (с, 3H), 2,20 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 461 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0444] **Пример 52** (M88)

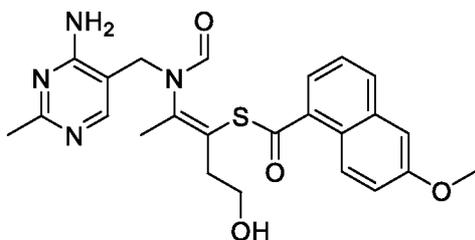
[0445] S-((Z)-2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) (E)-3-(нафталин-2-ил)проп-2-ентиоат



[0446] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,26 (с, 1H), 8,00–7,94 (м, 4H), 7,90 (с, 1H), 7,84 (с, 1H), 7,59–7,56 (м, 3H), 6,95 (д, $J = 15,6$ Гц, 1H), 6,68 (с, 2H), 4,69 (с, 1H), 4,39 (с, 2H), 3,48 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H), 2,57 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,22 (с, 3H), 2,12 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 463 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0447] **Пример 53** (M108)

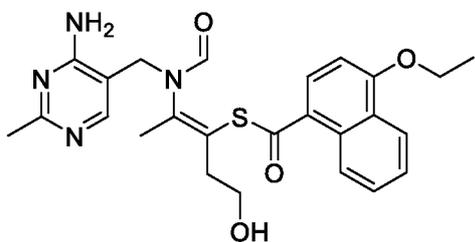
[0448] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 6-метоксинафталин-1-карботиоат



[0449] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,13 (д, $J = 9,6$ Гц, 1H), 8,09 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,74 (д, $J = 6,8$ Гц, 1H), 7,55 (т, $J = 6,8$ Гц, 1H), 7,45 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 7,29 (дд, $J_1 = 2,8$ Гц, $J_2 = 9,2$ Гц, 1H), 6,73 (с, 2H), 4,71 (с, 1H), 4,43 (с, 2H), 3,89 (с, 3H), 3,52 (с, 2H), 2,66 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,13 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 467 (M+H) $^+$.

[0450] **Пример 54** (M109)

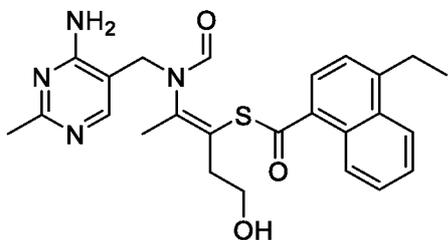
[0451] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-этоксинафталин-1-карботиоат



[0452] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,42 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 8,26 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 8,03 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,67 (т, $J = 1,2$ Гц, 1H), 7,65–7,60 (м, 1H), 7,05 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 6,70 (с, 2H), 4,68 (т, $J = 9,2$ Гц, 1H), 4,42 (с, 1H), 4,32 (к, $J = 7,2$ Гц, 2H), 3,51 (к, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,64 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,13 (с, 3H), 1,50 (т, $J = 6,8$ Гц, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 481 (M+H) $^+$.

[0453] **Пример 55** (M110)

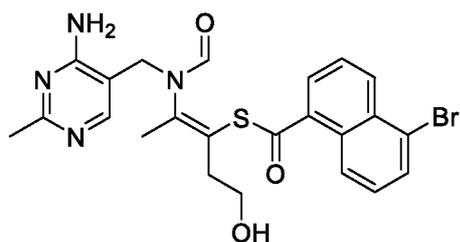
[0454] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-этилнафталин-1-карботиоат



[0455] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,28–8,26 (м, 1H), 8,19–8,18 (м, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,87–7,85 (м, 1H), 7,67–7,64 (м, 1H), 7,48 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H), 6,74 (с, 2H), 4,70 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,43 (с, 1H), 3,52 (к, $J = 6,0$ Гц, 2H), 3,14 (к, $J = 7,2$ Гц, 2H), 2,66 (т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,14 (с, 3H), 1,31 (т, $J = 7,6$ Гц, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 465 (M+H) $^+$.

[0456] **Пример 56** (M111)

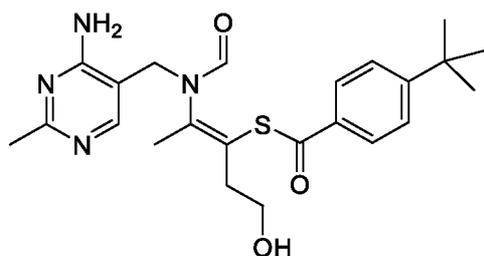
[0457] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 5-бромнафталин-1-карботиоат



[0458] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,44 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H), 8,20 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H), 8,06 – 7,95 (м, 3H), 7,88 (с, 1H), 7,79 (дд, $J_1 = 7,2$, $J_2 = 8,4$ Гц, 1H), 7,58 (дд, $J_1 = 7,6$, $J_2 = 8,4$ Гц, 1H), 6,74 (уш с, 2H), 4,70 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,45 (уш с, 2H), 3,56 – 3,49 (м, 2H), 2,68 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,21 – 2,16 (м, 3H), 2,11 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 516 (M+H)⁺.

[0459] **Пример 57** (M114)

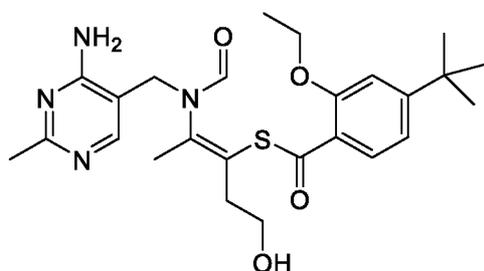
[0460] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-(трет-бутил)бензотиоат



[0461] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,90 – 7,82 (м, 2H), 7,68 (д, $J = 8,4$ Гц, 2H), 7,59 – 7,52 (м, 2H), 6,84 – 6,54 (м, 2H), 4,67 (уш с, 1H), 4,38 (уш с, 2H), 4,03 (к, $J = 7,2$ Гц, 1H), 3,45 (уш с, 2H), 2,56 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,27 – 2,07 (м, 6H), 1,30 (с, 9H). МС (ЭР⁺) m/e 443 (M+H)⁺.

[0462] **Пример 58** (M115)

[0463] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-(трет-бутил)-2-этоксibenзотиоат

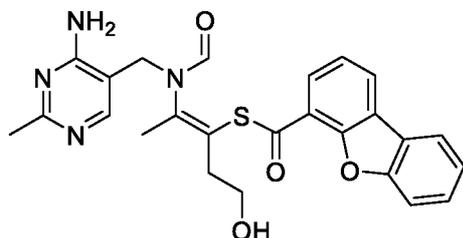


[0464] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,83–7,82 (м, 2H), 7,52 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,06–7,03 (м, 2H), 6,68 (с, 2H), 4,62 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,36 (с, 1H), 4,17 (к, $J = 7,2$ Гц, 2H), 3,44 (к, $J = 5,6$ Гц, 2H), 2,54–2,52 (м, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,10 (с, 3H), 1,32 (т, $J = 6,8$ Гц, 3H), 1,28 (с,

9H). МС (ЭР⁺) m/e 487 (M+H)⁺.

[0465] **Пример 59** (M148)

[0466] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) дибензо[b,d]фуран-4-карботиоат

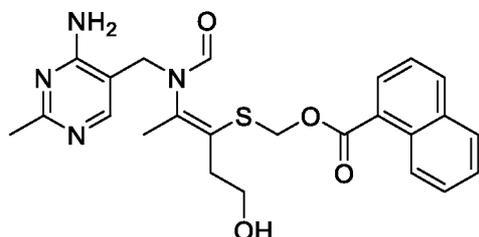


[0467] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,47 (д, J = 6,80 Гц, 1H), 8,22 (д, J = 7,60 Гц, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,90 – 7,86 (м, 3H), 7,62 (т, J = 8,00 Гц, 1H), 7,58 – 7,47 (м, 2H), 6,64 (с, 2H), 4,67 (т, J = 5,60 Гц, 1H), 4,42 (с, 2H), 3,54 – 3,48 (м, 2H), 2,65 (т, J = 6,80 Гц, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,13 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 477 (M+H)⁺.

[0468] **Примеры от 60 до 68:** следующие соединения синтезировали, следуя методикам получения препарата M19 (пример 6), с соответствующим исходным веществом.

[0469] **Пример 60** (M97)

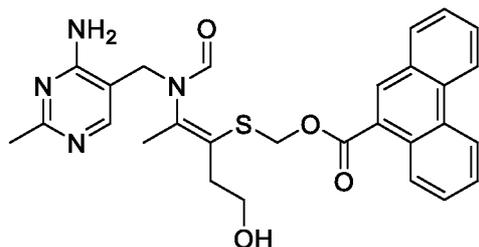
[0470] (Z)-((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила 1-нафтоат



[0471] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,75 (д, 1H), 8,29 – 8,22 (м, 1H), 8,14 – 8,12 (м, 1H), 8,12 – 8,05 (м, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,69 – 7,63 (м, 3H), 6,74 – 6,71 (м, 2H), 5,37 (с, 2H), 4,73 (т, J = 5,6 Гц, 1H), 4,34 (уш с, 2H), 3,57 – 3,52 (м, 2H), 2,73 – 2,69 (м, 2H), 2,25 (с, 3H), 1,95 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 467 (M+H)⁺.

[0472] **Пример 61** (M98)

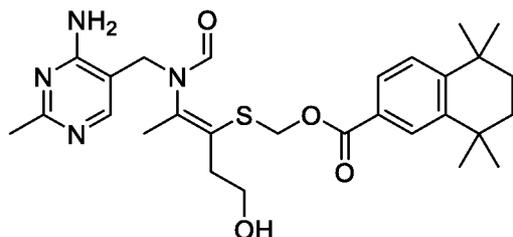
[0473] (Z)-((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила фенантрен-9-карбоксилат



[0474] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,97 – 8,87 (м, 2H), 8,77 – 8,70 (м, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,19 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,90 – 7,81 (м, 2H), 7,80 – 7,73 (м, 3H), 6,74 (уш с, 2H), 5,41 (с, 2H), 4,78 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 3,63 – 3,50 (м, 2H), 2,74 (уш т, $J = 7,2$ Гц, 2H), 2,24 (с, 3H), 1,98 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 517 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0475] **Пример 62** (M99)

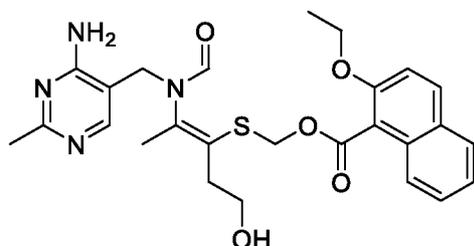
[0476] (Z)-((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила 5,5,8,8-тетраметил-5,6,7,8-тетрагидронафталин-2-карбоксилат



[0477] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,93 (с, 1H), 7,89 – 7,85 (м, 1H), 7,77 (с, 1H), 7,66 (дд, $J_1 = 2,0$, 1H), 7,51 – 7,46 (м, 1H), 6,73 (м, 2H), 5,24 (с, 2H), 4,69 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,44 – 4,18 (м, 2H), 3,57 – 3,44 (м, 2H), 2,67 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,29 – 2,24 (м, 3H), 1,94 (с, 3H), 1,66 (с, 4H), 1,25 (с, 12H). МС (ЭР^+) m/e 527 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0478] **Пример 63** (M100)

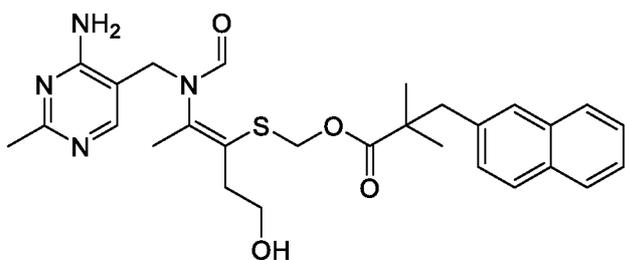
[0479] (Z)-((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила 2-этокси-1-нафтоат



[0480] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,07 (д, $J = 8,8$ Гц, 1H), 7,95 – 7,90 (м, 2H), 7,80 (с, 1H), 7,62 – 7,49 (м, 3H), 7,43 (м, 1H), 6,73 (уш с, 2H), 5,33 (с, 2H), 4,65 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 4,27 – 4,21 (м, 2H), 3,55 – 3,44 (м, 2H), 2,61 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,28 (с, 3H), 1,95 (с, 3H), 1,31 (т, $J = 7,2$ Гц, 3H). МС (ЭР^+) m/e 511 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0481] **Пример 64** (M101)

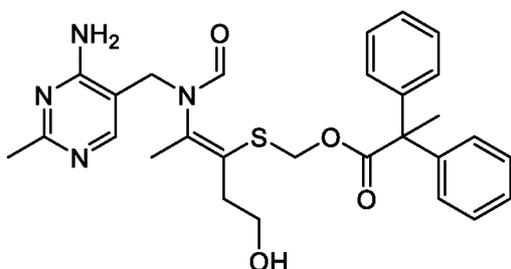
[0482] (Z)-((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила 2,2-диметил-3-(нафталин-2-ил)пропаноат



[0483] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,90 (с, 1H), 7,88 – 7,78 (м, 4H), 7,64 – 7,58 (м, 1H), 7,51 – 7,44 (м, 2H), 7,28 – 7,19 (м, 1H), 6,78 (м, 2H), 4,95 (уш с, 2H), 4,66 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,33 (уш с, 2H), 3,50 – 3,41 (м, 2H), 3,01 – 2,92 (м, 2H), 2,48 (уш с, 2H), 2,28 (м, 3H), 1,91 (с, 3H), 1,16 – 1,12 (м, 6H). МС (ЭР^+) m/e 523 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0484] **Пример 65** (M103)

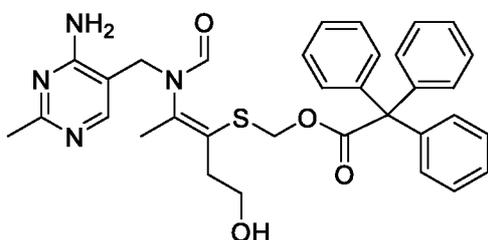
[0485] (Z)- ((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила 2,2-дифенилпропаноат



[0486] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,78 (с, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,28 – 7,34 (м, 6H), 7,12 – 7,36 (м, 4H), 6,72 – 6,70 (м, 2H), 5,04 (уш с, 2H), 4,60 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,27 (уш с, 2H), 3,28 – 3,32 (м, 2H), 2,38 – 2,35 (м, 2H), 2,27 (с, 3H), 1,88 – 1,85 (м, 6H). МС (ЭР^+) m/e 521 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0487] **Пример 66** (M105)

[0488] (Z)-((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила 2,2,2-трифенилацетат

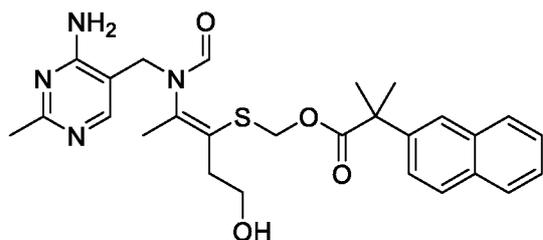


[0489] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,89 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,34 – 7,28 (м, 11H), 7,11 – 7,09 (м, 7H), 6,77 – 6,72 (м, 2H), 5,39 (уш с, 2H), 4,56 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,33 (уш с, 2H), 3,20 – 3,19 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,08 – 1,99 (м, 2H), 1,89 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 583 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0490] **Пример 67** (M107)

[0491] (Z)-((2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-

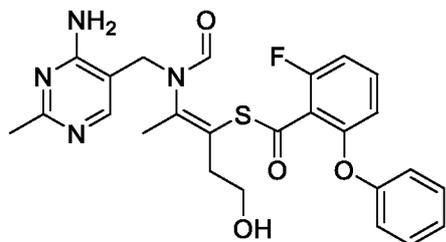
гидроксипент-2-ен-3-ил)тио)метила 2-метил-2-(нафталин-2-ил)пропаноат



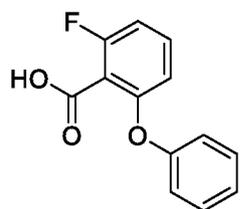
[0492] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,92 – 7,82 (м, 4H), 7,76 (с, 1H), 7,70 – 7,64 (м, 1H), 7,53 – 7,46 (м, 2H), 7,44 – 7,37 (м, 1H), 6,69 (уш д, $J = 12,4$ Гц, 2H), 4,96 (с, 2H), 4,59 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,35 – 4,12 (м, 2H), 3,32 – 3,25 (м, 2H), 2,34 (уш т, $J = 6,8$ Гц, 2H), 2,29 – 2,20 (м, 3H), 1,77 (с, 3H), 1,64 – 1,57 (м, 6H). МС (ЭР $^+$) m/e 509 (M+H) $^+$.

[0493] **Пример 68** (M126)

[0494] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-фтор-6-феноксibenзотиоат



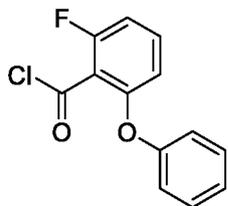
[0495] Стадия 1. 2-Фтор-6-феноксibenзойная кислота



[0496] К раствору 2-бром-6-фторбензойной кислоты (5,00 г, 22,8 ммоль, 1,00 экв.) и фенола (3,87 г, 41,1 ммоль, 3,61 мл, 1,80 экв.) в DMF (100 мл) добавляли CuI (434 мг, 2,28 ммоль, 0,10 экв.) и Cs₂CO₃ (22,3 г, 68,5 ммоль, 3,00 экв.). Смесь перемешивали при 100 °С в течение 10 ч в атмосфере N₂, охлаждали до кт, разбавляли водой (300 мл) и промывали этилацетатом (200 мл × 2). Водную фазу доводили до pH ~ 1 с помощью HCl (2 M) и экстрагировали этилацетатом (300 мл × 2). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором (100 мл × 2), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением неочищенного продукта, который очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (5% ~ 55% ацетонитрила в воде, 0,1% HCl), и концентрировали под вакуумом для удаления ацетонитрила. Остаток экстрагировали этилацетатом (300 мл × 2). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором (100 мл × 2),

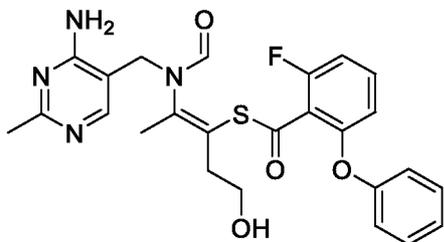
высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения (1,10 г, 4,74 ммоль, выход 21%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,47 – 7,36 (м, 3H), 7,20 – 7,16 (м, 1H), 7,13 – 7,06 (м, 1H), 7,03 (дд, $J_1 = 0,80$ Гц, $J_2 = 8,80$ Гц, 2H), 6,74 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H). МС (ЭР^+) m/e 233 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0497] Стадия 2. 2-Фтор-6-феноксibenзоилхлорид



[0498] К раствору 2-фтор-6-феноксibenзойной кислоты (500 мг, 2,15 ммоль, 1,00 экв.) в DCM (10,0 мл) и DMF (1,57 мг, 21,5 мкмоль, 1,66 мкл, 0,01 экв.) по каплям добавляли $(\text{COCl})_2$ (328 мг, 2,58 ммоль, 226 мкл, 1,20 экв.) при 25 °С. Реакционную смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 часа. Реакцию гасили безводным MeOH и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (540 мг, неочищенное) в виде желтого масла, которое непосредственно использовали на следующей стадии без очистки.

[0499] Стадия 3. (Z)-S-(2-(N-((4-Амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-фтор-6-феноксibenзотиоат

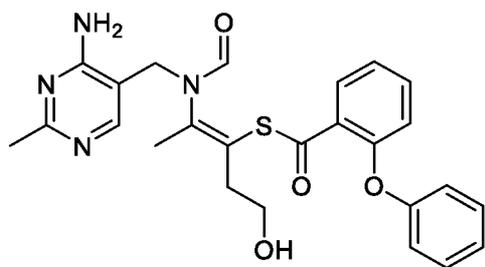


[0500] ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,93 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,58 – 7,48 (м, 1H), 7,46 – 7,39 (м, 1H), 7,24 – 7,17 (м, 1H), 7,13 – 7,02 (м, 1H), 6,78 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,42 (с, 2H), 4,47 – 4,25 (м, 1H), 3,47 (уш д, $J = 5,20$ Гц, 1H), 2,58 (уш т, $J = 6,80$ Гц, 1H), 2,29 (с, 3H), 2,05 (с, 1H). МС (ЭР^+) m/e 497 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0501] **Примеры от 69 до 99:** следующие соединения синтезировали с использованием по существу той же методики получения M126 и соответствующего исходного вещества.

[0502] **Пример 69 (M113)**

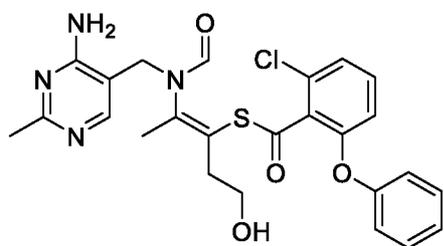
[0503] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-феноксibenзотиоат



[0504] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,83 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,66 – 7,56 (м, 2H), 7,43 – 7,36 (м, 2H), 7,27 (дт, $J_1 = 0,8$, $J_2 = 7,6$ Гц, 1H), 7,19 – 7,12 (м, 1H), 7,01 – 6,95 (м, 3H), 6,78 – 6,59 (м, 2H), 4,57 (т, $J = 5,6$ Гц, 1H), 4,34 (уш с, 2H), 3,36 (уш д, $J = 6,0$ Гц, 2H), 2,43 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,08 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 479 (M+H)⁺.

[0505] **Пример 70** (M127)

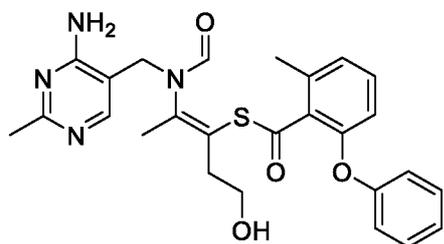
[0506] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-хлор-6-феноксibenзотиоат



[0507] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,91 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,53 – 7,45 (м, 1H), 7,44 – 7,37 (м, 2H), 7,33 (уш д, $J = 8,00$ Гц, 1H), 7,19 (уш т, $J = 8,00$ Гц, 1H), 7,08 – 6,97 (м, 2H), 6,90 (уш д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,83 – 6,58 (м, 2H), 4,62 (уш т, $J = 5,20$ Гц, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 3,41 – 3,37 (м, 2H), 2,59 – 2,54 (м, 2H), 2,27 (с, 3H), 2,07 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 514 (M+H)⁺.

[0508] **Пример 71** (M128)

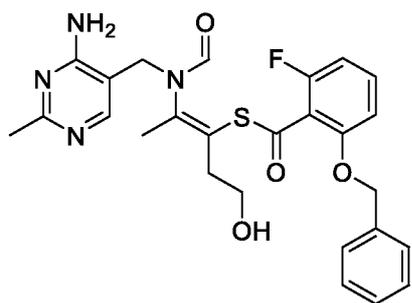
[0509] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-метил-6-феноксibenзотиоат



[0510] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,91 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,40 – 7,31 (м, 3H), 7,16 – 7,05 (м, 2H), 6,98 – 6,92 (м, 2H), 6,80 – 6,60 (м, 3H), 4,57 (т, $J = 5,20$ Гц, 1H), 4,34 (уш с, 2H), 3,37 – 3,33 (м, 2H), 2,53 – 2,51 (м, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,24 (с, 3H), 2,06 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 493 (M+H)⁺.

[0511] **Пример 72** (M129)

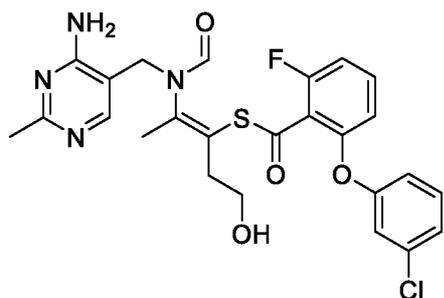
[0512] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(бензилокси)-6-фторбензотиоат



[0513] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,91 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,50 – 7,25 (м, 7H), 7,04 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,89 (т, $J = 8,80$ Гц, 1H), 6,77 – 6,52 (м, 2H), 5,21 (с, 2H), 4,63 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,33 (с, 2H), 3,43 – 3,38 (м, 2H), 2,59 – 2,55 (м, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,05 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 511 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0514] **Пример 73** (M130)

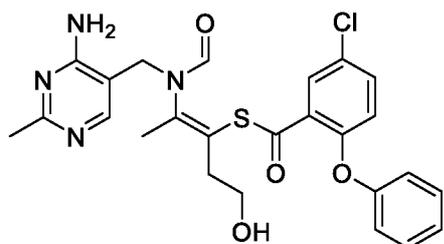
[0515] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(3-хлорфенокси)-6-фторбензотиоат



[0516] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,86 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,63 – 7,55 (м, 1H), 7,46 – 7,40 (м, 1H), 7,28 – 7,18 (м, 2H), 7,13 (т, $J = 2,00$ Гц, 1H), 6,98 (дд, $J_1 = 2,00$ Гц, $J_2 = 8,40$ Гц, 1H), 6,92 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,73 – 6,57 (м, 2H), 4,64 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,34 (с, 2H), 3,40 (уш с, 2H), 2,60 – 2,58 (м, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,06 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 532 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0517] **Пример 74** (M131)

[0518] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 5-хлор-2-феноксибензотиоат

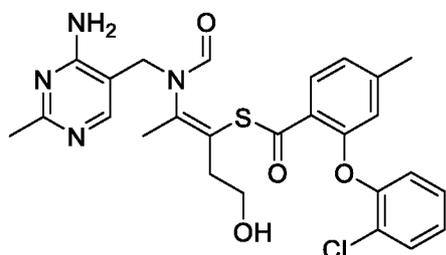


[0519] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,85 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,61 (дд, $J = 12,0$ Гц, 1H), 7,58 (д, $J = 4,00$ Гц, 1H), 7,45 – 7,39 (м, 2H), 7,22 – 7,16 (м, 1H), 7,04 (д, $J = 7,60$ Гц, 2H), 6,97

(д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 6,76 – 6,73 (м, 2H), 4,61 – 4,56 (м, 1H), 4,35 (с, 2H), 3,43 – 3,38 (м, 2H), 2,49 – 2,45 (м, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,10 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 514 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0520] Пример 75 (M133)

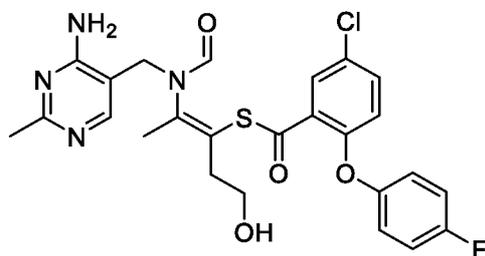
[0521] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(2-хлорфенокси)-4-метилбензотиоат



[0522] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,82 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,60 – 7,54 (м, 2H), 7,35 (дт, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 7,8$ Гц, 1H), 7,21 (дт, $J = 1,60$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,10 (д, $J = 8,00$ Гц, 1H), 6,99 (дд, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 6,70 – 6,60 (м, 3H), 4,57 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,33 (уш с, 2H), 3,43 – 3,37 (м, 2H), 2,45 – 2,41 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,16 (с, 3H), 2,06 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 528 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0523] Пример 76 (M134)

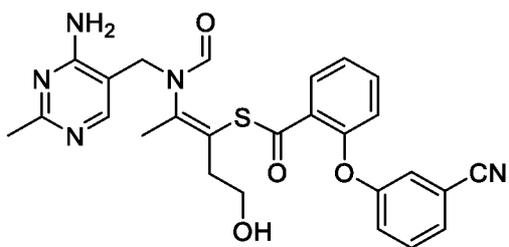
[0524] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 5-хлор-2-(4-фторфенокси)бензотиоат



[0525] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,84 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,65 – 7,63 (м, 2H), 7,29 – 7,24 (м, 2H), 7,13 – 7,11 (м, 2H), 6,66 (д, $J = 7,20$ Гц, 1H), 6,64 (уш с, 2H), 5,60 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,35 (с, 2H), 3,42 – 3,39 (м, 2H), 2,56 – 2,55 (м, 2H), 2,15 (с, 3H), 2,11 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 532 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0526] Пример 77 (M135)

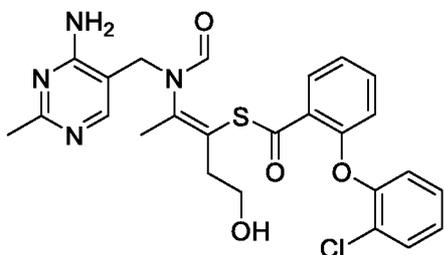
[0527] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(3-цианофенокси)бензотиоат



[0528] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,81 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,72 – 7,62 (м, 2H), 7,61 – 7,54 (м, 2H), 7,46 – 7,35 (м, 2H), 7,28 – 7,20 (м, 1H), 7,14 (д, $J = 7,60$ Гц, 1H), 6,69 (уш с, 2H), 4,58 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,34 (уш с, 2H), 3,45–3,38 (м, 2H), 2,42 – 2,35 (м, 2H), 2,15 (с, 3H), 2,08 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 504 (M+H) $^+$.

[0529] **Пример 78** (M136)

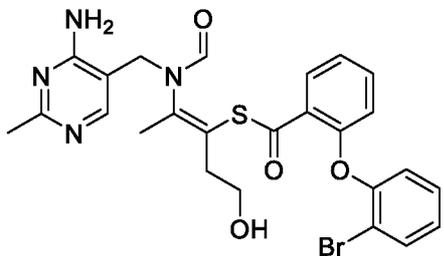
[0530] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(2-хлорфенокси)бензотиоат



[0531] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,85 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,64 (дд, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 7,60$ Гц, 1H), 7,61 – 7,55 (м, 2H), 7,40 – 7,33 (м, 1H), 7,31 – 7,25 (м, 1H), 7,24 – 7,19 (м, 1H), 7,06 – 7,00 (м, 1H), 6,86 (д, $J = 7,60$ Гц, 1H), 6,67 (уш с, 2H), 4,59 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 3,42 – 3,35 (м, 2H), 2,46 – 2,44 (м, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,08 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 514 (M+H) $^+$.

[0532] **Пример 79** (M137)

[0533] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(2-бромфенокси)бензотиоат

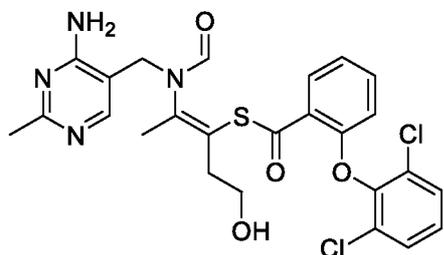


[0534] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,85 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,73 (дд, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,64 (дд, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,60 – 7,54 (м, 1H), 7,44 – 7,37 (м, 1H), 7,28 (т, $J = 7,60$ Гц, 1H), 7,18 – 7,12 (м, 1H), 7,00 (дд, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 6,84 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,75 – 6,60 (м, 2H), 4,59 (т, $J = 6,00$ Гц, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 3,40 (к, $J = 6,80$

Гц, 2H), 2,47 – 2,43 (м, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,08 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 558 (M+H)⁺.

[0535] Пример 80 (M138)

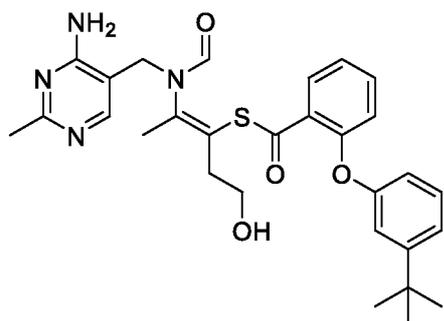
[0536] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(2,6-дихлорфенокси)бензотиоат



[0537] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,30 – 8,25 (м, 1H), 8,13 (дд, J₁ = 3,20 Гц, J₂ = 6,4 Гц, 1H), 7,98 (с, 1H), 7,88 – 7,80 (м, 2H), 7,69 – 7,64 (м, 2H), 7,47 (д, J = 7,60 Гц, 1H), 6,71 (уш с, 2H), 4,69 (уш т, J = 5,60 Гц, 1H), 4,43 (уш с, 2H), 3,55 – 3,47 (м, 2H), 2,72 (с, 3H), 2,66 (уш т, J = 6,80 Гц, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,13 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 457 (M+H)⁺.

[0538] Пример 81 (M139)

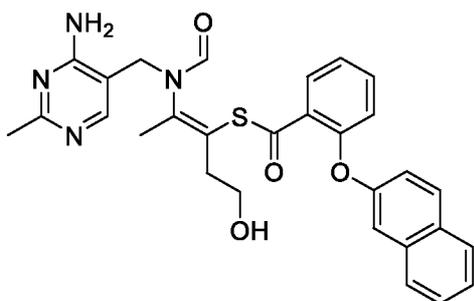
[0539] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(3-(трет-бутил)фенокси)бензотиоат



[0540] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,86 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,66 – 7,54 (м, 2H), 7,34 – 7,23 (м, 2H), 7,19 (уш д, J = 8,00 Гц, 1H), 7,05 – 6,93 (м, 2H), 6,79 – 6,56 (м, 3H), 4,58 (т, J = 5,60 Гц, 1H), 4,34 (уш с, 2H), 3,40 – 3,37 (м, 2H), 2,44 (уш т, J = 6,80 Гц, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 1,26 (с, 9H). МС (ЭР⁺) m/e 535 (M+H)⁺.

[0541] Пример 82 (M140)

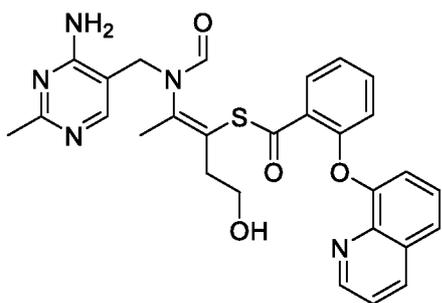
[0542] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(нафталин-2-илокси)бензотиоат



[0543] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,97 (д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 7,91 (д, $J = 7,60$ Гц, 1H), 7,86 – 7,81 (м, 2H), 7,77 (с, 1H), 7,72 – 7,65 (м, 1H), 7,65 – 7,58 (м, 1H), 7,54 – 7,41 (м, 2H), 7,37 – 7,29 (м, 2H), 7,26 (дд, $J_1 = 2,40$ Гц, $J_2 = 8,80$ Гц, 1H), 7,10 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,70 (уш с, 2H), 4,50 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,32 (уш с, 2H), 3,23 (к, $J = 6,40$ Гц, 2H), 2,35 (уш т, $J = 6,40$ Гц, 2H), 2,14 (с, 3H), 2,05 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 529 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0544] Пример 83 (M141)

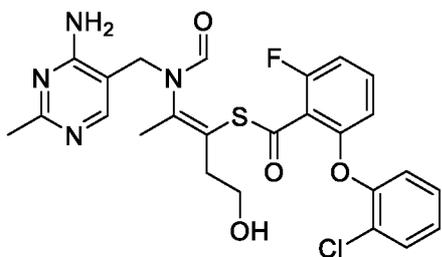
[0545] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(хинолин-8-илокси)бензотиоат



[0546] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,86 (с, 1H), 7,84 – 7,72 (м, 2H), 7,68 – 7,59 (м, 1H), 7,49 – 7,32 (м, 3H), 7,32 – 7,17 (м, 2H), 7,11 – 6,84 (м, 1H), 6,83 – 6,47 (м, 3H), 6,44 – 6,06 (м, 1H), 4,64 – 4,40 (м, 2H), 4,13 – 3,95 (м, 1H), 3,56 – 3,48 (м, 2H), 2,80 – 2,70 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 1,83 (уш с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 530 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0547] Пример 84 (M142)

[0548] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(2-хлорфенокси)-6-фторбензотиоат

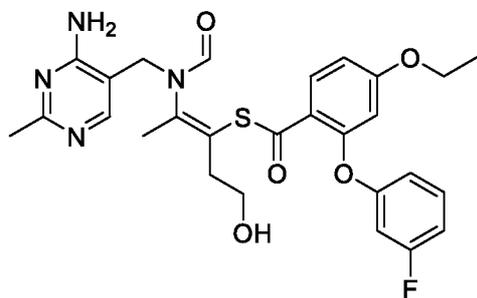


[0549] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,89 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,58 (дд, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,51 – 7,45 (м, 1H), 7,41 – 7,36 (м, 1H), 7,29 – 7,23 (м, 1H), 7,18 – 7,08 (м, 2H), 6,87 – 6,61 (м, 2H), 6,55 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 4,61 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,33 (с, 2H), 3,42 – 3,38

(м, 2H), 2,57 – 2,55 (м, 2H), 2,27 (с, 3H), 2,06 (д, $J = 1,60$ Гц, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 532 (M+H)⁺.

[0550] **Пример 85** (M143)

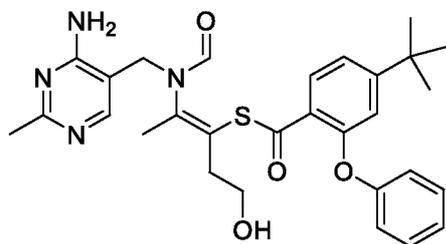
[0551] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-этокси-2-(3-фторфенокси)бензотиоат



[0552] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,79 (с, 1H), 7,77 (с, 1H), 7,69 (д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 7,44 – 7,36 (м, 1H), 6,98 (дт, $J_1 = 2,40$ Гц, $J_2 = 8,40$ Гц, 1H), 6,91 – 6,85 (м, 1H), 6,76 (дд, $J_1 = 2,00$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 6,65 (уш д, $J = 2,00$ Гц, 2H), 6,54 (д, $J = 2,40$ Гц, 1H), 4,55 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,31 (уш с, 2H), 4,06 (к, $J = 7,20$ Гц, 2H), 3,37 – 3,33 (м, 2H), 2,40 (уш т, $J = 6,80$ Гц, 1H), 2,17 (с, 3H), 2,06 (с, 3H), 1,30 (т, $J = 6,80$ Гц, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 541 (M+H)⁺.

[0553] **Пример 86** (M145)

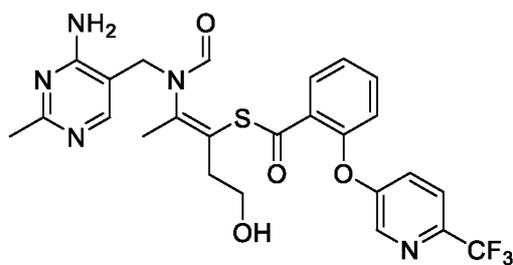
[0554] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-(трет-бутил)-2-феноксибензотиоат



[0555] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,89 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,64 (уш д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 7,40 – 7,36 (м, 2H), 7,32 (уш д, $J = 7,20$ Гц, 1H), 7,19 – 7,08 (м, 1H), 7,01 (с, 1H), 6,96 (д, $J = 8,40$ Гц, 2H), 6,30 (уш с, 2H), 4,35 (с, 2H), 4,21 – 4,06 (м, 1H), 3,50 – 3,43 (м, 2H), 2,55 (уш с, 2H), 2,25 (с, 3H), 2,06 (с, 3H), 1,26 (с, 9H). МС (ЭР⁺) m/e 535 (M+H)⁺.

[0556] **Пример 87** (M146)

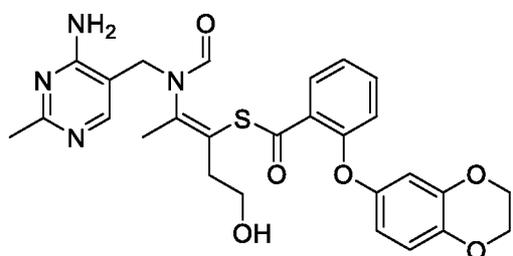
[0557] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-((6-(трифторметил)пиридин-3-ил)окси)бензотиоат



[0558] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,50 (д, $J = 2,40$ Гц, 1H), 7,89 (д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 7,85 – 7,63 (м, 4H), 7,50 – 7,40 (м, 2H), 7,39 – 7,27 (м, 1H), 6,71 (уш с, 2H), 4,59 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 2,59 (уш д, $J = 6,80$ Гц, 2H), 2,40 (уш т, $J = 6,40$ Гц, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,09 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 548 (M+H) $^+$.

[0559] **Пример 88** (M147)

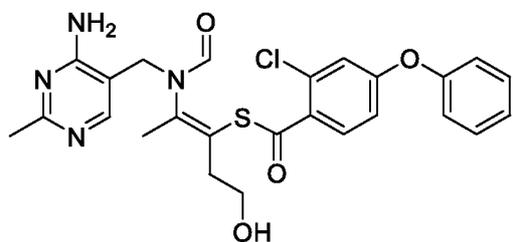
[0560] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-((2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)окси)бензотиоат



[0561] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,85 (с, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,65 – 7,51 (м, 2H), 7,22 (т, $J = 7,60$ Гц, 1H), 6,93 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,87 (д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 6,67 (уш с, 2H), 6,56 (д, $J = 2,40$ Гц, 1H), 6,48 (дд, $J_1 = 2,80$ Гц, $J_2 = 8,80$ Гц, 1H), 4,67 – 4,54 (м, 1H), 4,35 (уш с, 2H), 4,25 – 4,23 (уш д, $J = 2,40$ Гц, 4H), 3,41 (к, $J = 6,40$ Гц, 2H), 2,48 – 4,46 (м, 2H), 2,16 (с, 3H), 2,09 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 537 (M+H) $^+$.

[0562] **Пример 89** (M149)

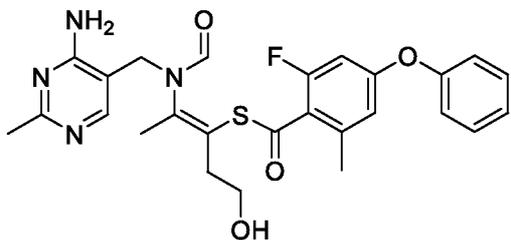
[0563] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-хлор-4-феноксibenзотиоат



[0564] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,88 (с, 1H), 7,84 (с, 1H), 7,61 (д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 7,50 (т, $J = 8,00$ Гц, 2H), 7,33 – 7,28 (м, 1H), 7,22 – 7,15 (м, 3H), 6,98 (дд, $J_1 = 2,40$ Гц, $J_2 = 8,80$ Гц, 1H), 6,79 – 6,68 (м, 2H), 4,67 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,45 – 4,41 (м, 2H), 3,49 – 3,45 (м, 2H), 2,60 – 2,58 (м, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,15 (с, 3H). МС (ЭР $^+$) m/e 514 (M+H) $^+$.

[0565] **Пример 90** (M150)

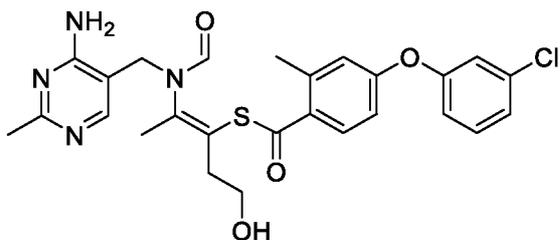
[0566] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-фтор-6-метил-4-феноксibenзоатиоат



[0567] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,91 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,49 – 7,42 (м, 2H), 7,29 – 7,22 (м, 1H), 7,14 (д, $J = 8,00$ Гц, 2H), 6,79 – 6,57 (м, 4H), 4,71 (т, $J = 5,20$ Гц, 1H), 4,39 (уш с, 2H), 3,49 – 3,43 (м, 2H), 2,60 (уш с, 2H), 2,26 (м, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,12 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 511 (M+H)⁺.

[0568] **Пример 91** (M151)

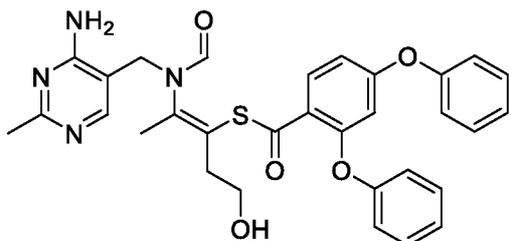
[0569] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-(3-хлорфенокси)-2-метилбензоатиоат



[0570] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,88 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,67 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 7,47 (т, $J = 8,00$ Гц, 1H), 7,30 (дд, $J_1 = 0,80$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,23 (т, $J = 2,00$ Гц, 1H), 7,09 (дд, $J_1 = 2,00$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,00 (уш д, $J = 2,00$ Гц, 1H), 6,90 (уш дд, $J = 2,40$ Гц, $J_2 = 8,80$ Гц, 1H), 6,82 – 6,59 (м, 2H), 4,65 (уш т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,40 (уш с, 2H), 3,46 (к, $J = 6,40$ Гц, 2H), 2,58 – 2,55 (м, 2H), 2,32 (с, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,14 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 528 (M+H)⁺.

[0571] **Пример 92** (M152)

[0572] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2,4-дифеноксibenзоатиоат

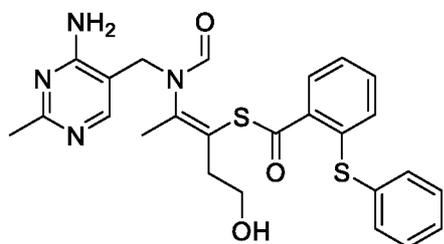


[0573] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,13 (с, 1H), 7,93 (с, 1H), 7,71 (д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 7,43 – 7,41 (м, 5H), 7,28 – 7,18 (м, 2H), 7,09 (м, 5H), 6,79 – 6,77 (м, 1H), 6,38 (д, $J = 2,40$ Гц,

1H), 4,70 (с, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,42 (т, $J = 6,00$ Гц, 2H), 2,448 – 2,44 (м, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,16 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 571 (M+H)⁺.

[0574] Пример 93 (M153)

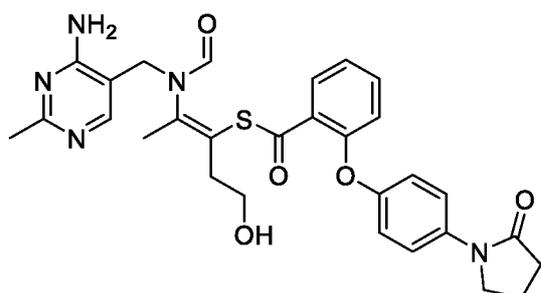
[0575] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(фенилтио)бензотиоат



[0576] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,92 (с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,69 (дд, $J_1 = 1,20$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,53 – 7,40 (м, 7H), 7,34 – 7,28 (м, 1H), 6,90 (д, $J = 8,00$ Гц, 1H), 6,86 – 6,60 (м, 2H), 4,67 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,44 – 4,33 (м, 2H), 3,49 – 3,44 (м, 2H), 2,62 – 2,55 (м, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,14 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 495 (M+H)⁺.

[0577] Пример 94 (M155)

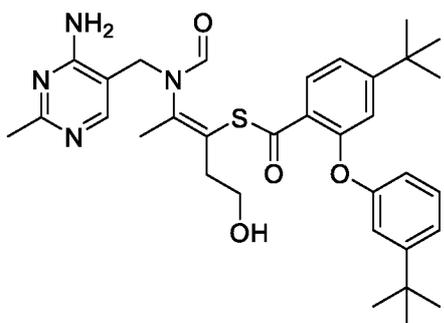
[0578] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(4-(2-оксипирролидин-1-ил)фенокси)бензотиоат



[0579] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,84 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,69 – 7,63 (м, 3H), 7,62 – 7,54 (м, 1H), 7,31 – 7,22 (м, 1H), 7,04 – 6,99 (м, 2H), 6,96 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,69 (уш с, 2H), 4,59 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,34 (уш с, 2H), 3,82 (т, $J = 7,20$ Гц, 2H), 3,42 – 3,37 (м, 2H), 2,49 – 2,44 (м, 4H), 2,17 (с, 3H), 2,11 – 2,02 (м, 5H). МС (ЭР⁺) m/e 562 (M+H)⁺.

[0580] Пример 95 (M156)

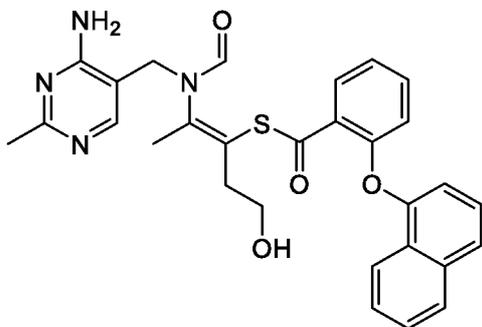
[0581] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 4-(трет-бутил)-2-(3-(трет-бутил)фенокси)бензотиоат



[0582] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,83 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,60 (д, $J = 8,00$ Гц, 1H), 7,39 – 7,30 (м, 2H), 7,16 (д, $J = 7,20$ Гц, 1H), 6,99 (с, 2H), 6,74 – 6,66 (м, 3H), 4,62 – 4,54 (м, 1H), 4,42 – 4,39 (с, 2H), 2,45 – 2,40 (м, 3H), 2,17 (с, 3H), 2,06 (с, 3H), 1,24 (с, 9H), 1,21 (с, 9H). МС (ЭР^+) m/e 591 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0583] **Пример 96** (M157)

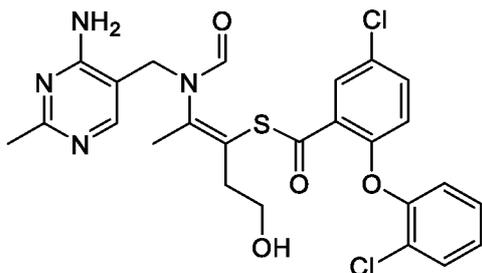
[0584] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(нафталин-1-илокси)бензотиоат



[0585] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,09 – 8,04 (м, 1H), 8,01 – 7,96 (м, 1H), 7,84 (с, 1H), 7,80 – 7,71 (м, 2H), 7,68 (дд, $J_1 = 1,60$ Гц, $J_2 = 8,00$ Гц, 1H), 7,62 – 7,52 (м, 3H), 7,47 (т, $J = 8,00$ Гц, 1H), 7,32 – 7,24 (м, 1H), 6,97 – 6,88 (м, 2H), 6,69 (уш с, 2H), 4,52 (т, $J = 5,60$ Гц, 1H), 4,33 (уш с, 2H), 3,29 – 3,26 (м, 2H), 2,39 (уш т, $J = 6,40$ Гц, 2H), 2,15 (с, 3H), 2,05 (с, 3H). МС (ЭР^+) m/e 529 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0586] **Пример 97** (M158)

[0587] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формаидо)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 5-хлор-2-(2-хлорфенокси)бензотиоат

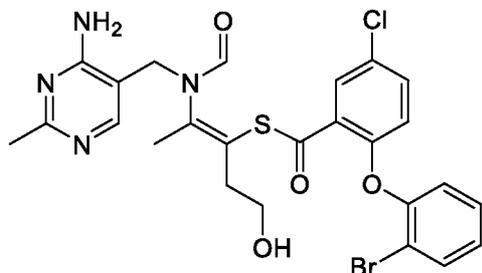


[0588] ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,87 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,64 – 7,58 (м, 3H), 7,39

(т, $J = 7,20$ Гц, 1H), 7,27 (т, $J = 7,20$ Гц, 1H), 7,14 (т, $J = 8,00$ Гц, 1H), 6,86 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,63 (с, 2H), 4,63 – 4,59 (м, 1H), 4,35 (с, 2H), 3,46 – 3,41 (м, 2H), 2,46 – 2,44 (м, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,10 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 548 (M+H)⁺.

[0589] Пример 98 (M159)

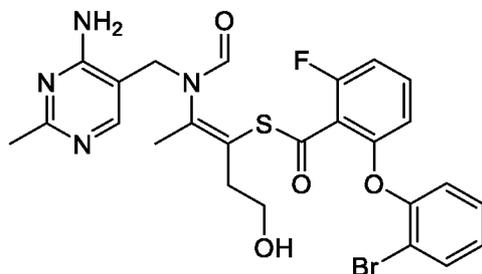
[0590] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(2-бромфенокси)-5-хлорбензотиоат



[0591] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,87 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,78 – 7,74 (м, 1H), 7,65 – 7,58 (м, 2H), 7,48 – 7,42 (м, 1H), 7,25 – 7,18 (м, 1H), 7,16 – 7,13 (м, 1H), 6,86 (д, $J = 8,40$ Гц, 1H), 6,63 (с, 2H), 4,62 – 4,58 (м, 1H), 4,35 (с, 2H), 3,45 – 3,40 (м, 2H), 2,46 – 2,42 (с, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,10 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 592 (M+H)⁺.

[0592] Пример 99 (M160)

[0593] (Z)-S-(2-(N-((4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил)формамино)-5-гидроксипент-2-ен-3-ил) 2-(2-бромфенокси)-6-фторбензотиоат



[0594] ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,89 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,75 (дд, $J_1 = 1,20$ Гц, $J_2 = 7,60$ Гц, 1H), 7,56 – 7,41 (м, 2H), 7,23 – 7,19 (м, 1H), 7,18 – 7,08 (м, 2H), 6,63 – 6,61 (м, 2H), 6,56 (д, $J = 8,80$ Гц, 1H), 4,64 – 4,61 (м, 1H), 4,35 (с, 2H), 3,47 – 3,36 (м, 2H), 2,06 (с, 3H). МС (ЭР⁺) m/e 576 (M+H)⁺.

[0595] Пример 100. Результаты

[0596] Для выявления соединений, которые являются более активными по включению таких РНК-переключателей на основе аналогов тиамин в клетках млекопитающих и/или имеют другие характеристики, такие как улучшенные фармакокинетические параметры, были получены дополнительные соединения (например, соединения формул IV–VIII) и протестированы на их активность по регулированию РНК-переключателей на основе

аналогов тиамин с использованием конструкции люциферазы, несущей РНК-переключатель 15D10 (Luci-15D10, SEQ ID NO:93).

[0597] SEQ ID NO: 93 получена вставкой РНК-переключателя 15D10 в ген-репортер люциферазы. Прописными буквами обозначена кодирующая люциферазу последовательность. Строчными буквами обозначены интрон/альтернативный экзон/интрон и последовательность РНК-переключателя. Кодирующая аптамер 15D10 последовательность (SEQ ID NO:26) подчеркнута.

[0598] SEQ ID NO:93:

[0599] ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCT
GGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGG
TTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTG
AGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAAT
ACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTG
TTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCAACGACATTTATAATGAA
CGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAA
AAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAAT
TATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGT
CACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGAT
AGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAA
GGTGTGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCT
ATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTGTTCCATTCCATC
ACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTT
AATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCA
AAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGA
CAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAG
GAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatggg
acccttgatgttttcttccccttctttctatggtaagtcatgtcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaaatcagggta
atthtgcaattgtaatttaaaaaatgctttcttcttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaactcttcttctcagggcaataatgat
acaatgtatcatgccgagtaacgctgtttcttaactgttagaatgaattcagatattccagagaatgaaaaaaatcttcagtagaaggtaat
gtacaggggtccggccttttcattggcaccgggtgagaacatacccttcggacctgttcacggataatgccgctgcaggagtagacattacgc
accattctaaagaataacagtgataattctgggtaaggcaatagcaatattctgcatataaatattctgcatataaattgtaactgatgtaaga
ggttcatattgctaataagcagctacaatccagctaccattctgctttattttatgggtgggataaggctggattattctgagccaagctaggcc
cttttgctaatcatgttcatacctcttatctctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCT
ATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCC

ATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCA
AAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAACAATCC
GGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAG
CTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTA
AGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACC
CCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTC
CCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTG
GATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTT
TGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAG
AGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTA

[0600] Соединения формулы IV сначала протестировали на клетках НЕК 293. Как показано на **Фиг. 9А**, экспрессия гена люцифераз увеличивалась при обработке соединения М10, М16, М18, М19 или М21 клеток НЕК 293 дозозависимым образом. По сравнению с активностью фурсултиамина, М19 является более активным при индуцировании экспрессии люциферазы, вызывая 168,7-кратное увеличение экспрессии люциферазы при концентрации 12,5 мкМ в клетках НЕК 293. Далее, эти новые соединения протестировали в линии клеток AML 12 — клеток печени мыши. Как показано на **Фиг. 9В**, в соответствии с наблюдениями на клетках НЕК 293 все соединения увеличивали экспрессию люциферазы из конструкции, содержащей РНК-переключатель 15D10, дозозависимым образом. По сравнению с активностью фурсултиамина на РНК-переключателе 15D10 соединения М10, М16, М19 и М21 являются более активными, чем фурсултиамин. М19 и М21 одинаково активно индуцируют экспрессию люциферазы, регулируемую РНК-переключателем 15D10, в этом типе клеток.

[0601] Соединения формул V и VI вместе с бенфотиамином в качестве контрольного соединения протестировали как на клетках НЕК 293, так и на AML 12. Как показано на **Фиг. 9С**, соединения М30, М31, М32 и М33, а также бенфотиамин не влияли на экспрессию люциферазы, тогда как М26, М27, М28, М29 и М34 увеличивали экспрессию люциферазы из конструкции Luc1-15D10, причем М34 было самым активным соединением в клетках НЕК 293. Напротив, в клетках AML 12 все соединения, кроме М30 и М33, увеличивали экспрессию люциферазы из конструкции Luc1-15D10. Закономерно, что в этих двух типах клеток М34 является самым активным индуктором среди этих двух групп соединений по включению данного РНК-переключателя (**Фиг. 9D**).

[0602] Относительно более активные соединения дополнительно протестировали на их активность в регулировании РНК-переключателя в дополнительных линиях клеток

человека. Как показано на **Фиг. 9Е** в клетках ARPE-19 человека, как бенфотиамин, так и М32 не проявляли активности в увеличении экспрессии люциферазы, регулируемой РНК-переключателем 15D10, тогда как М10, М19 и М21 обладают эквивалентной с фурсултиамином активностью в увеличении экспрессии люциферазы из конструкции Luc1-15D10. Сходным образом, бенфотиамин и М32 не обладают активностью в клетках Нер G2, тогда как М19, М21 и М10 обладают сходной активностью в концентрации 12,5 мкМ (**Фиг. 9F**).

[0603] Соединения от М34 до М123 и соединения от М126 до М160, с фурсултиамином в качестве контрольного соединения, протестировали как на клетках НЕК 293, так и на AML 12, на активность по регулированию РНК-переключателя на основе аналога тиамин с использованием конструкции люциферазы, содержащей РНК-переключатель 15D10 (Luc1-15D10, SEQ ID NO:93). Увеличение экспрессии люциферазы из конструкции Luc1-15D10 в ответ на эти соединения показано в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Кратность увеличения экспрессии люциферазы, регулируемой РНК-переключателем 15D10, для соединений от М34 до М123 при 50 мкМ (рассчитано как соотношение сигнала люциферазы, полученному от клеток, обработанных идентифицированным соединением, к сигналу люциферазы, полученному от необработанных клеток). № = номер соединения. НЕК = клетки НЕК 293. AML = клетки AML12. Контр. = фурсултиамин.

№	НЕК	AML	№	НЕК	AML	№	НЕК	AML
М19	676,3	329,5	М59	1,1	1,0	М101	88,6	128,0
М21	618,3	228,6	М62	49,0	109,9	М103	0,9	0,5
М34	163,5	290,6	М63	1,7	19,0	М105	0,2	0,2
М37	76,2	134,3	М64	2,0	3,9	М106	1,2	294,4
М38	1,2	1,0	М65	3,2	67,1	М107	26,0	40,2
М39	102,7	127,2	М66	1,1	0,4	М108	75,8	129,2
М40	83,1	206,0	М67	2,1	0,9	М109	22,6	87,3
М43	10,2	95,3	М68	303,0	209,0	М110	65,7	145,6
М44	176,8	314,1	М70	51,0	235,9	М111	180,7	174,7
М45	1,3	2,9	М72	235,9	295,1	М113	212,9	272,5
М46	1,3	6,0	М73	205,1	200,3	М114	50,1	88,8
М47	25,3	85,1	М76	60,7	134,3	М115	19,9	52,1
М49	414,0	202,3	М79	352,8	358,2	М116	1,3	0,8

M50	93,5	141,8		M82	89,2	73,9		M117	0,8	3,4
M51	392,5	188,6		M88	215,7	355,2		M118	9,3	140,3
M52	363,9	195,1		M91	13,1	150,3		M119	0,9	0,7
M53	2,4	57,0		M92	0,9	23,7		M120	0,5	30,5
M54	3,0	13,9		M97	298,9	126,2		M121	0,9	0,5
M55	2,1	9,0		M98	13,6	57,7		M122	1,3	0,5
M57	1,2	24,4		M99	0,2	0,4		M123	0,4	0,6
M58	1,1	1,5		M100	1,1	0,4		Контр.	446,2	314,6

Таблица 3. Кратность увеличения экспрессии люциферазы, регулируемой РНК-переключателем 15D10, для соединений от M126 до M160 при 50 мкМ (рассчитано как соотношение сигнала люциферазы, полученному от клеток, обработанных идентифицированным соединением, к сигналу люциферазы, полученному от необработанных клеток). № = номер соединения. HEK = клетки HEK 293. AML = клетки AML12.

№	HEK	AML		№	HEK	AML
M113	265,00	348,35		M143	138,05	299,80
M126	147,00	305,39		M145	156,06	60,62
M127	0,46	7,39		M146	53,27	96,56
M128	0,56	7,87		M147	193,36	266,56
M129	10,91	167,48		M148	152,89	288,05
M130	110,40	328,65		M149	175,93	382,94
M131	740,64	508,85		M150	12,27	11,96
M133	99,97	273,22		M151	20,51	231,00
M134	556,94	407,79		M152	68,89	36,62
M135	87,55	44,49		M153	441,91	534,59
M136	132,20	262,53		M155	7,71	117,46
M137	139,56	287,66		M156	0,06	10,13
M138	227,96	195,26		M157	117,52	315,57
M139	37,02	188,39		M158	96,94	235,31
M140	174,69	192,16		M159	85,50	205,55
M141	1,61	3,46		M160	79,51	131,03
M142	85,27	183,85				

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:1), и где:

X₁ представляет собой A или G;

X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;

X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;

X₄ представляет собой A или G;

X₅ представляет собой любой нуклеотид;

X₆ представляет собой любой нуклеотид;

X₇ представляет собой любой нуклеотид;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой C, G или T;

X₁₀ представляет собой любой нуклеотид;

X₁₁ представляет собой A или T;

X₁₂ представляет собой C или T; и

X₁₃ представляет собой C или T.

2. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:2), и где:

X₁ представляет собой A или G;

X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;

X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;

X₅ представляет собой G или T;

X₆ представляет собой C или T;

X₇ представляет собой C или T;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или T;

X₁₀ представляет собой A, G или T;

X₁₁ представляет собой A или T;

X₁₂ представляет собой C или T; и

X₁₃ представляет собой C или T.

3. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCT
GTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:3), и где:

X₁₂ представляет собой C или T; и

X₁₃ представляет собой C или T.

4. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTX₈X₉
X₁₀X₁₁CCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT (SEQ ID NO:4), и где

X₁ представляет собой A или G;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или T;

X₁₀ представляет собой A, G или T; и

X₁₁ представляет собой A или T.

5. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCCTTTGAAC
CTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT (SEQ ID NO:5), и где:

X₅ представляет собой G или T;
X₆ представляет собой C или T; и
X₇ представляет собой C или T.

6. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCCTTX₈
X₉X₁₀ACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT (SEQ ID NO:6), и где:

X₄ представляет собой A или G;
X₅ представляет собой любой нуклеотид;
X₆ представляет собой любой нуклеотид;
X₇ представляет собой любой нуклеотид;
X₈ представляет собой любой нуклеотид;
X₉ представляет собой C или G; и
X₁₀ представляет собой любой нуклеотид.

7. Полинуклеотидная кассета для регулирования экспрессии гена-мишени, причем полинуклеотидная кассета содержит последовательность, кодирующую аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–36.

8. Полинуклеотидная кассета по п. 7, в которой кодирующая аптамер последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–36.

9. Полинуклеотидная кассета по п. 8, в которой кодирующая аптамер последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 9, 14–18, 21, 25, 26 и 30.

10. Полинуклеотидная кассета по п. 9, в которой кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 9, 14 и 26.

11. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит
- ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:1), и где:
- X₁ представляет собой A или G;
- X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;
- X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;
- X₄ представляет собой A или G;
- X₅ представляет собой любой нуклеотид;
- X₆ представляет собой любой нуклеотид;
- X₇ представляет собой любой нуклеотид;
- X₈ представляет собой любой нуклеотид;
- X₉ представляет собой C, G или T;
- X₁₀ представляет собой любой нуклеотид;
- X₁₁ представляет собой A или T;
- X₁₂ представляет собой C или T; и
- X₁₃ представляет собой C или T.
12. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 11, в которой кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является A; X₂ не является C; X₃ не является T; X₄ не является G; X₅ не является G; X₆ не является C; X₇ не является C; X₈ не является T; X₉ не является G; X₁₀ не является A; X₁₁ не является A; X₁₂ не является T; и X₁₃ не является C.
13. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 11, в которой все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁ представляет собой A; X₂ представляет собой C; X₃ представляет собой T; X₄ представляет собой G; X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой C; X₇ представляет собой C; X₈ представляет собой T; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой A; X₁₁ представляет собой A; X₁₂ представляет собой T; и X₁₃ представляет собой C.

14. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:2), и где:

X₁ представляет собой A или G;

X₂ представляет собой C или нуклеотидный фрагмент;

X₃ представляет собой T или нуклеотидный фрагмент;

X₅ представляет собой G или T;

X₆ представляет собой C или T;

X₇ представляет собой C или T;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или T;

X₁₀ представляет собой A, G или T;

X₁₁ представляет собой A или T;

X₁₂ представляет собой C или T; и

X₁₃ представляет собой C или T.

15. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 14, в которой кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является A; X₂ не является C; X₃ не является T; X₄ не является G; X₅ не является G; X₆ не является C; X₇ не является C; X₈ не является T; X₉ не является G; X₁₀ не является A; X₁₁ не является A; X₁₂ не является T; и X₁₃ не является C.

16. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 14, в которой все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁ представляет собой A; X₂ представляет собой C; X₃ представляет собой T; X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой C; X₇ представляет собой C; X₈ представляет собой T; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой A; X₁₁ представляет собой A; X₁₂ представляет собой T; и X₁₃ представляет собой C.

17. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аптамер, который

связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGGGAGT (SEQ ID NO:3), и где:

X₁₂ представляет собой С или Т; и

X₁₃ представляет собой С или Т.

18. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 17, в которой кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁₂ не является Т; и X₁₃ не является С.

19. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 17, в которой все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁₂ представляет собой Т и X₁₃ представляет собой С.

20. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит

ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCSTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT (SEQ ID NO:4), и где:

X₁ представляет собой А или G;

X₈ представляет собой любой нуклеотид;

X₉ представляет собой G или Т;

X₁₀ представляет собой А, G или Т; и

X₁₁ представляет собой А или Т.

21. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 20, в которой кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₁ не является А; X₈ не является Т; X₉ не является G; X₁₀ не является А; X₁₁ не является А.

22. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 20, в которой все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₁ представляет собой А; X₈ представляет собой Т; X₉ представляет собой G; X₁₀ представляет собой А; X₁₁ представляет собой А; X₁₂

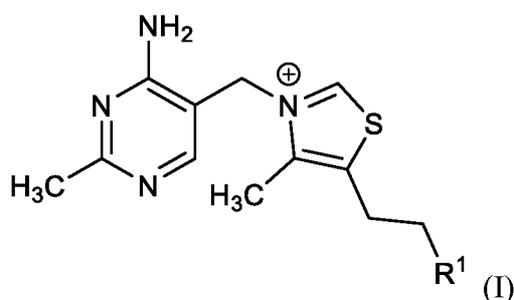
представляет собой T; и X₁₃ представляет собой C.

23. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит
- ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTTGAAC
CTGTTTACGGATAATGCCGCCGAGGGAGT (SEQ ID NO:5), и где:
- X₅ представляет собой G или T;
X₆ представляет собой C или T; и
X₇ представляет собой C или T.
24. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 23, в которой кодирующая аптамер последовательность обладает одним или более из следующих свойств: X₅ не является G; X₆ не является C; и X₇ не является C.
25. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 23, в которой все фрагменты из следующих одновременно не присутствуют в кодирующей аптамер последовательности: X₅ представляет собой G; X₆ представляет собой C; и X₇ представляет собой C.
26. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аптамер, который связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит
- ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCSTTX₈
X₉X₁₀ACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT (SEQ ID NO:6), и где:
- X₄ представляет собой A или G;
X₅ представляет собой любой нуклеотид;
X₆ представляет собой любой нуклеотид;
X₇ представляет собой любой нуклеотид;
X₈ представляет собой любой нуклеотид;
X₉ представляет собой C или G; и
X₁₀ представляет собой любой нуклеотид.
27. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аптамер, который

связывается с малой молекулой, причем кодирующая аптамер последовательность содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–36.

28. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 27, в которой кодирующая аптамер последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:7–36.
29. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 28, в которой кодирующая аптамер последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 9, 14–18, 21, 25, 26 и 30.
30. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 29, в которой кодирующая аптамер последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 14 и 26.
31. Полинуклеотидная кассета по любому из пп. 1–10 или последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 11–30, в которой аптамер связывается иным образом реагирует на присутствие малой молекулы со структурой в соответствии с любой из:

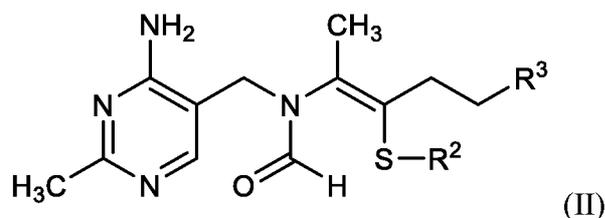
а) формулы I:



где:

R¹ выбран из группы, состоящей из OH, amino, F, Cl, Br, фосфата, пиррофосфата,
-O-C(=O)-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-C₂-C₆ алкенила, -O-C(=O)-фенила,
-O-C(=O)-гетероцикла, -O-C(=O)-O-C₁-C₆ алкила, -O-C(=O)-O-C₂-C₆ алкенила,
-O-C(=O)-O-фенила и -O-C(=O)-O-гетероцикла;

б) формулы II:



где:

R^2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, $-(CH_2)_n-R^6$, $-C(=O)-R^4$, $-C(=O)-O-R^4$, $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$, $-S-C_1-C_6$ алкила, $-S-C_2-C_6$ алкенила, $-S$ -гетероцикла и $-S-CH_2$ -гетероцикла;

или R^2 представляет собой $-S$ -[формула II] таким образом, что данное соединение образует димер из двух молекул формулы II, соединенных посредством дисульфидной ($-S-S-$) связи;

R^3 выбран из группы, состоящей из OH, amino, F, Cl, Br, фосфата, пирофосфата, $-O-C(=O)-C_1-C_6$ алкила, $-O-C(=O)-C_1-C_6$ алкенила, $-O-C(=O)$ -фенила, $-O-C(=O)$ -гетероцикла, $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ алкила, $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ алкенила, $-O-C(=O)-O$ -фенила, $-O-C(=O)-O$ -гетероцикла.

R^4 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_9 - C_{14} трициклила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-(C_2-C_6$ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

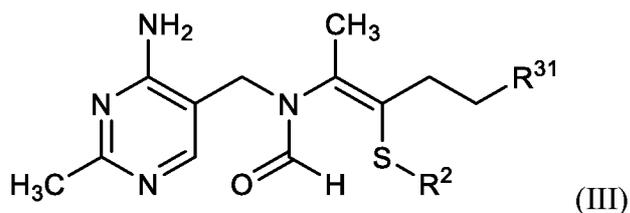
R^5 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R^6 представляет собой гидроксил, amino, амидо, C_1 - C_6 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкил, C_6 - C_{10} бициклил, арил, гетероарил и гетероциклил; и

n равно от 1 до 8;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, amino, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_1 - C_6 галогеналкила, C_1 - C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

с) формулы III:



где:

R^2 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, $-(CH_2)_n-R^6$, $-C(=O)-R^4$, $-C(=O)-O-R^4$, $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$, $-S-C_1-C_6$ алкила, $-S-C_2-C_6$ алкенила, $-S$ -гетероцикла и $-S-CH_2$ -гетероцикла;

R^{31} выбран из группы, состоящей из OH и фосфата;

R^4 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_9 - C_{14} трициклила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-(C_2-C_6$ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

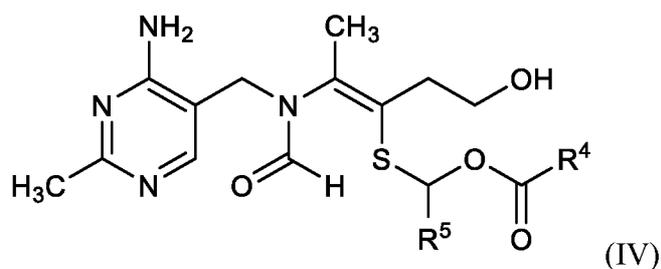
R^5 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R^6 представляет собой гидроксил, амино, амидо, C_1 - C_6 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкил, C_6 - C_{10} бициклил, арил, гетероарил и гетероциклил; и

n равно от 1 до 8;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_1 - C_6 галогеналкила, C_1 - C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

d) формулы IV:



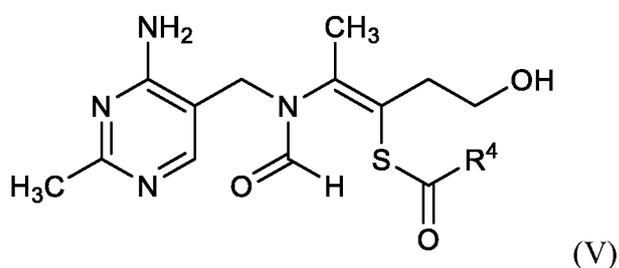
где:

R^4 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_9 - C_{14} трициклила, $-(C_1$ - C_6 алкил)-арила, $-(C_2$ - C_6 алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

R^5 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_1 - C_6 галогеналкила, C_1 - C_6 пергалогеналкила, $-O$ -(C_1 - C_6 алкила), O -(C_3 - C_7 циклоалкила), $-O$ -(C_1 - C_6 галогеналкила), $-O$ -(C_1 - C_6 пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1$ - C_6 алкил)-арила, $-O$ -(C_1 - C_6 алкил)-арила, $-S$ -(C_1 - C_6 алкила), $-S$ -(C_3 - C_7 циклоалкила), $-S$ -(C_1 - C_6 галогеналкила), $-S$ -(C_1 - C_6 пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S$ -(C_1 - C_6 алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

е) формулы V:



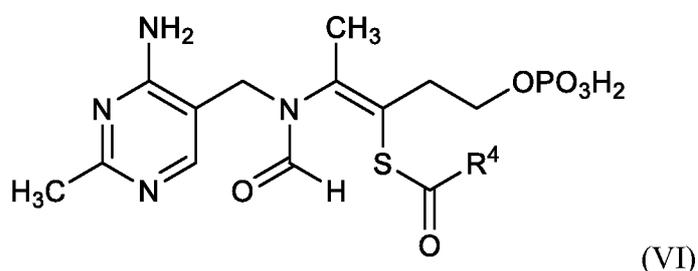
где:

R^4 выбран из группы, состоящей из H, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_9 - C_{14} трициклила, $-(C_1$ - C_6 алкил)-арила, $-(C_2$ - C_6 алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может

быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, amino, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

f) формулы VI:

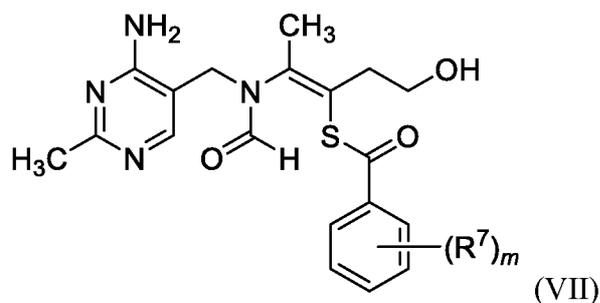


где:

R⁴ выбран из группы, состоящей из H, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₉-C₁₄ трициклила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -(C₂-C₆ алкенил)-арила, арила, гетероарила и гетероциклила;

и при этом каждая из алкильной, алкенильной, циклоалкильной, бициклильной, трициклильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной групп может быть незамещенной или замещенной от 1 до 3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила, amino, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

g) формулы VII



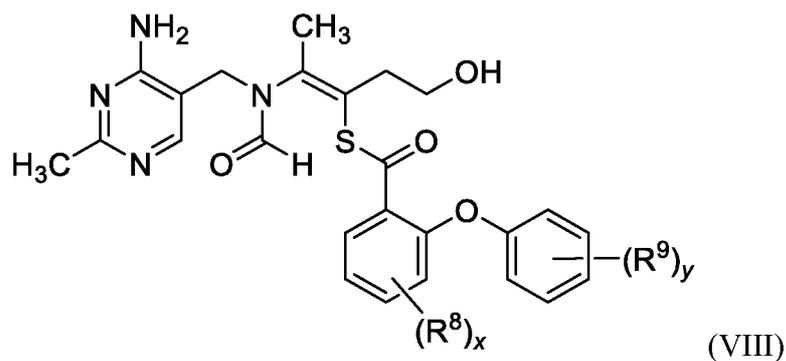
где:

каждый R^7 независимо выбран из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_1 - C_6 галогеналкила, C_1 - C_6 пергалогеналкила, -O-(C_1 - C_6 алкила), O-(C_3 - C_7 циклоалкила), -O-(C_1 - C_6 галогеналкила), -O-(C_1 - C_6 пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C_1 - C_6 алкил)-арила, -O-(C_1 - C_6 алкил)-арила, -S-(C_1 - C_6 алкила), -S-(C_3 - C_7 циклоалкила), -S-(C_1 - C_6 галогеналкила), -S-(C_1 - C_6 пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C_1 - C_6 алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R^7 могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, -SH, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_3 - C_7 циклоалкила, C_6 - C_{10} бициклила, C_1 - C_6 галогеналкила, C_1 - C_6 пергалогеналкила, -O-(C_1 - C_6 алкила), O-(C_3 - C_7 циклоалкила), -O-(C_1 - C_6 галогеналкила), -O-(C_1 - C_6 пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C_1 - C_6 алкил)-арила, -O-(C_1 - C_6 алкил)-арила, -S-(C_1 - C_6 алкила), -S-(C_3 - C_7 циклоалкила), -S-(C_1 - C_6 галогеналкила), -S-(C_1 - C_6 пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C_1 - C_6 алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила; и

m равно 0, 1, 2, 3 или 4; и

h) формулы VIII



где:

каждый R^8 независимо выбран из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1-C_6 алкила, C_2-C_6 алкенила, C_3-C_7 циклоалкила, C_6-C_{10} бициклила, C_1-C_6 галогеналкила, C_1-C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R^8 могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1-C_6 алкила, C_2-C_6 алкенила, C_3-C_7 циклоалкила, C_6-C_{10} бициклила, C_1-C_6 галогеналкила, C_1-C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

каждый R^9 независимо выбран из галогена, гидроксила, амина, циано, амидо, сульфонида, нитро, $-SH$, C_1-C_6 алкила, C_2-C_6 алкенила, C_3-C_7 циклоалкила, C_6-C_{10} бициклила, C_1-C_6 галогеналкила, C_1-C_6 пергалогеналкила, $-O-(C_1-C_6$ алкила), $O-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-O-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-O-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), арила, $-O$ -арила, $-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-O-(C_1-C_6$ алкил)-арила, $-S-(C_1-C_6$ алкила), $-S-(C_3-C_7$ циклоалкила), $-S-(C_1-C_6$ галогеналкила), $-S-(C_1-C_6$ пергалогеналкила), $-S$ -арила, $-S-(C_1-C_6$ алкил)-арила, гетероарила и

гетероциклила;

дополнительно или альтернативно, две смежные группы R⁹ могут независимо брать для получения конденсированного 5- или 6-членного ароматического или неароматического кольца, которое содержит от 0 до 2 гетероатомов в кольце и которое незамещено или замещено до четырьмя заместителями, выбранными из галогена, гидроксила, амино, циано, амидо, сульфонамида, нитро, -SH, C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₃-C₇ циклоалкила, C₆-C₁₀ бициклила, C₁-C₆ галогеналкила, C₁-C₆ пергалогеналкила, -O-(C₁-C₆ алкила), O-(C₃-C₇ циклоалкила), -O-(C₁-C₆ галогеналкила), -O-(C₁-C₆ пергалогеналкила), арила, -O-арила, -(C₁-C₆ алкил)-арила, -O-(C₁-C₆ алкил)-арила, -S-(C₁-C₆ алкила), -S-(C₃-C₇ циклоалкила), -S-(C₁-C₆ галогеналкила), -S-(C₁-C₆ пергалогеналкила), -S-арила, -S-(C₁-C₆ алкил)-арила, гетероарила и гетероциклила;

x равно 0, 1, 2 или 3; и

y равно 0, 1, 2, 3 или 4.

32. Полинуклеотидная кассета по любому из пп. 1–10 или последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 11–30, в которой аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие малой молекулы, выбранной из группы, состоящей из ацефуртиамина, ацетиамина, аллитиамина, ампролиума, беклотиамина, бенфотиамина, бентиамина, бисбентиамина, цетотиамина, циклотиамина, фурсултиамина, монофосфотиамина, октотиамина, окситиамина, просултиамина, сулбутиамина, тиамина, тиамина пирофосфата и винтиамола.
33. Полинуклеотидная кассета или последовательность нуклеиновой кислоты по п. 32, в которой аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие малой молекулы, выбранной из группы, состоящей из бенфотиамина, фурсултиамина и просултиамина.
34. Полинуклеотидная кассета или последовательность нуклеиновой кислоты по п. 33, в которой аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие бенфотиамина.
35. Полинуклеотидная кассета или последовательность нуклеиновой кислоты по п. 33,

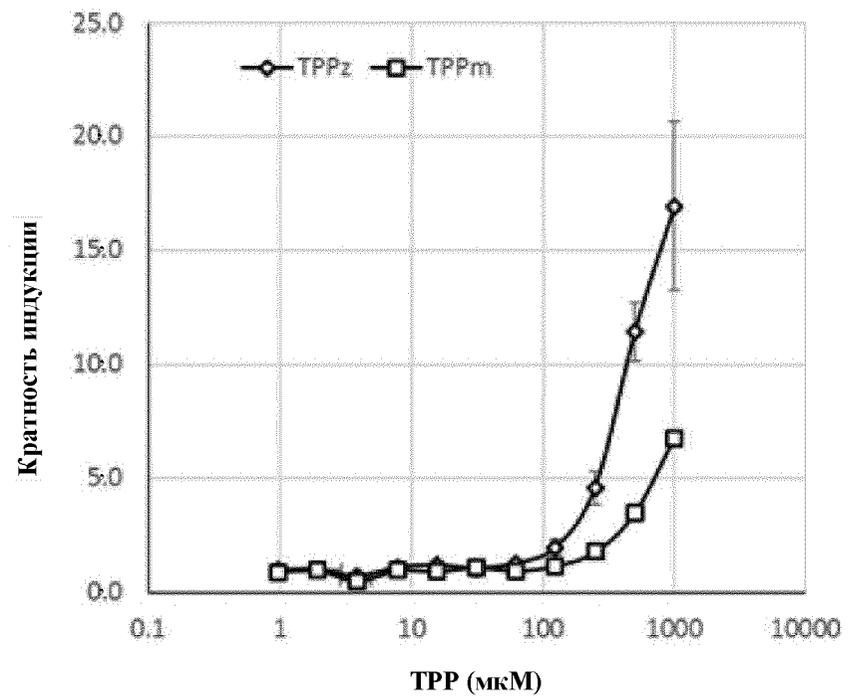
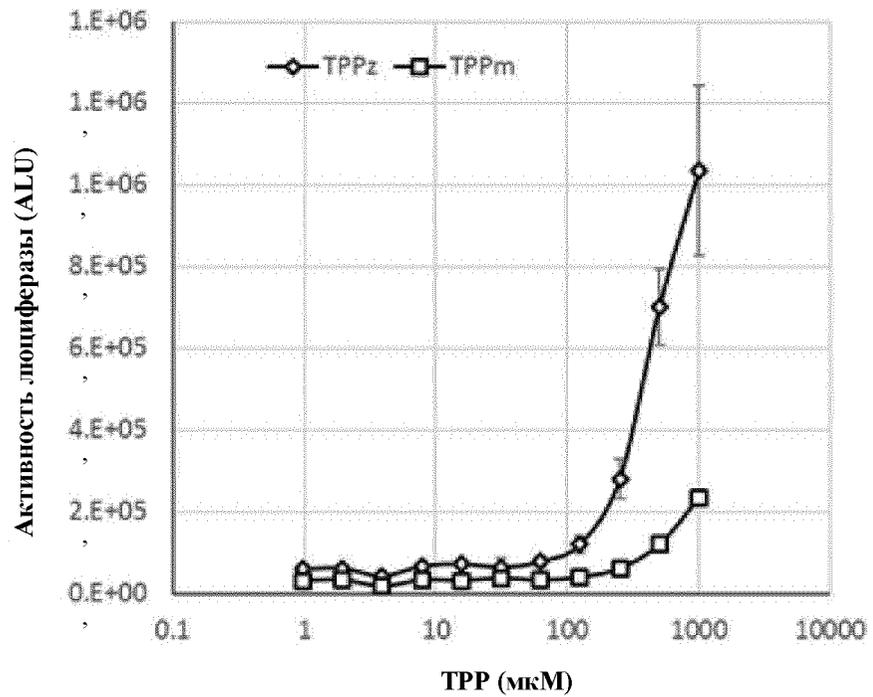
в которой аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие фурсултиамина.

36. Полинуклеотидная кассета или последовательность нуклеиновой кислоты по п. 33, в которой аптамер связывается или иным образом реагирует на присутствие просултиамина.
37. Полинуклеотидная кассета по любому из пп. 1–10 или последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 11–30, в которой аптамер обладает пониженным связыванием и/или показывает пониженный ответ на тиамин пирифосфат (ТРР) по сравнению с эквимоллярными количествами фурсултиамина, бенфотиамина или просултиамина.
38. Полинуклеотидная кассета или последовательность нуклеиновой кислоты по п. 37, в которой аптамер находится в контексте РНК-переключателя, закодированного как часть полинуклеотидной кассеты для регулирования экспрессии гена-мишени.
39. РНК-переключатель для регуляции экспрессии гена-мишени в ответ на малую молекулу, причем РНК-переключатель содержит аптамер по любому из пп. 1–38.
40. РНК-переключатель по п. 39, причем РНК-переключатель содержит последовательность SEQ ID NO:37.
41. Полинуклеотидная кассета для регуляции экспрессии гена-мишени в ответ на малую молекулу, причем полинуклеотидная кассета содержит:
 - (с) РНК-переключатель; и
 - (d) альтернативно сплайсируемый экзон, фланкированный 5' интроном и 3' интроном,причем РНК-переключатель содержит (i) эффекторную область, содержащую стебель, который включает 5' последовательность сайта сплайсинга из 3' интрона, и (ii) аптамер по любому из пп. 1–38; и где альтернативно сплайсируемый экзон включает стоп-кодон, который находится в рамке

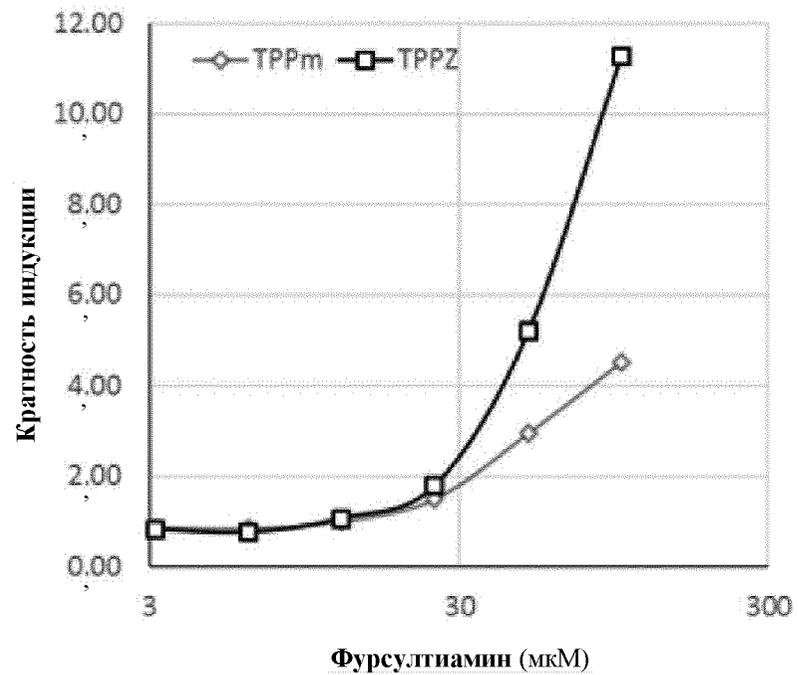
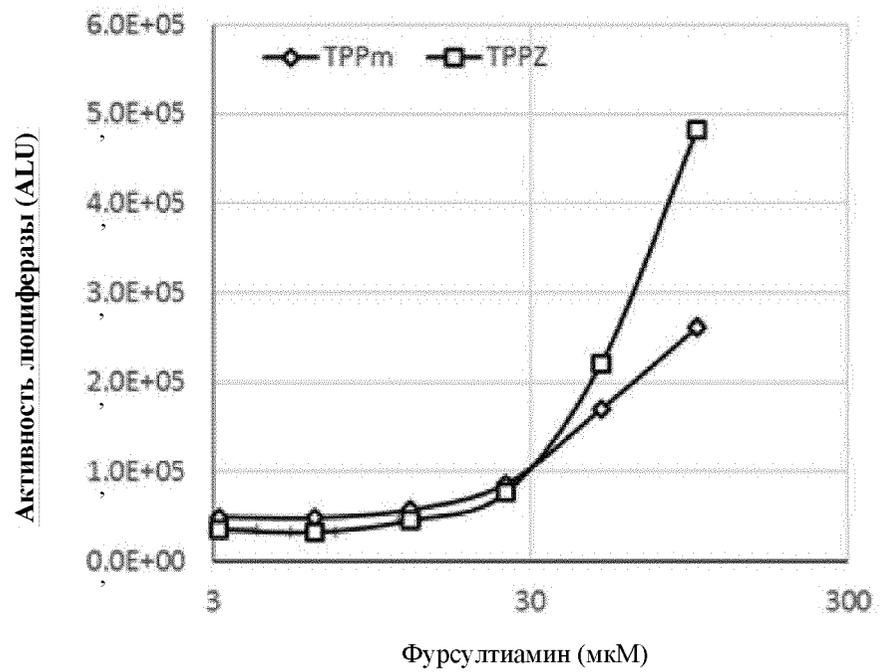
с геном-мишенью, когда альтернативно сплайсируемый экзон сплайсируется в мРНК гена-мишени.

42. Полинуклеотидная кассета по п. [0040], в которой РНК-переключатель содержит последовательность SEQ ID NO:37.
43. Полинуклеотидная кассета по п. [0040], причем полинуклеотидная кассета расположена в кодирующей белок последовательности гена-мишени.
44. Полинуклеотидная кассета по п. [0040], причем полинуклеотидная кассета расположена в нетранслируемой области гена-мишени или в интроне гена мишени.
45. Вектор, содержащий полинуклеотидную кассету по любому из пп. 1–10, 31–38 или 41–44, нуклеиновая кислота по любому из пп. 11–38 или РНК-переключатель по любому из пп. 39 или 40.
46. Вектор по п. 45, причем вектор представляет собой вирусный вектор.
47. Вектор по п. 46, причем вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, адено-ассоциированного вирусного вектора и лентивирусного вектора.
48. Способ идентификации аптамера, который модулирует экспрессию гена-мишени в ответ на представляющее интерес соединение, причем способ включает стадии:
 - (i) отбора исходного аптамера;
 - (ii) получения библиотеки РНК-переключателей, включающей в себя последовательности, кодирующие аптамер, выбранный на стадии (i), причем кодирующие аптамеры последовательности включают в себя один или более случайным образом мутировавших нуклеотидов в одной или более неспаренных областей в аптамере, причем мутировавшие аптамерные последовательности находятся в контексте РНК-переключателя, который контролирует экспрессию гена-репортера;

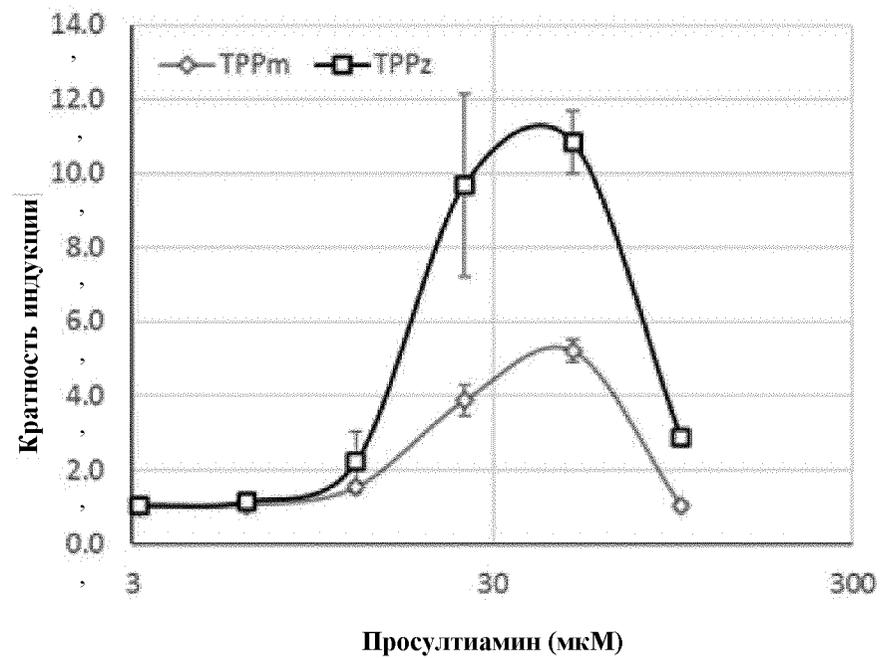
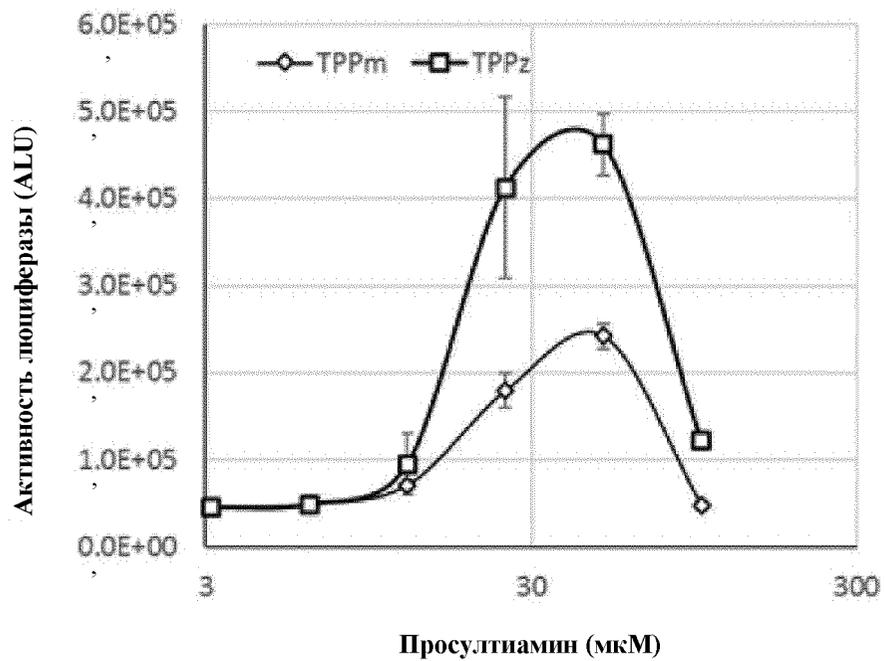
- (iii) скрининга библиотеки из (ii) на аптамеры, обладающие увеличенной регуляцией экспрессии гена-мишени в ответ на добавление соединения в соответствии с формулами I–VII по сравнению с исходной аптамерной последовательностью;
- (iv) необязательно повторяющиеся стадии (ii) и (iii) (для аптамера, идентифицированного на стадии (iii)).
49. Способ по п. 48, в котором исходный аптамер представляет собой аптамер TPP, и представляющее интерес соединение является аналогом или производным тиаминина.
50. Способ по п. 49, в котором аптамер TPP выбран из РНК-переключателя TPP Rfam семейства RF00059.
51. Способ по п. 49 или п. 50, в котором аналог или производное тиаминина выбрано из группы, состоящей из формулы I–VIII.
52. Способ по любому из пп. 48–51, в котором одна или более неспаренных областей аптамерной последовательности содержат область соединения.
53. Способ по любому из пп. 48–51, в котором неспаренная область содержит петлевую область.
54. Способ по любому из пп. 48–51, в котором кодирующие аптамеры последовательности дополнительно содержат один или более мутировавших нуклеотидов в спаренной области.
55. Способ по любому из пп. 48–51, в котором кодирующие аптамеры последовательности дополнительно содержат один или более мутировавших нуклеотидов, смежные с неспаренной областью.



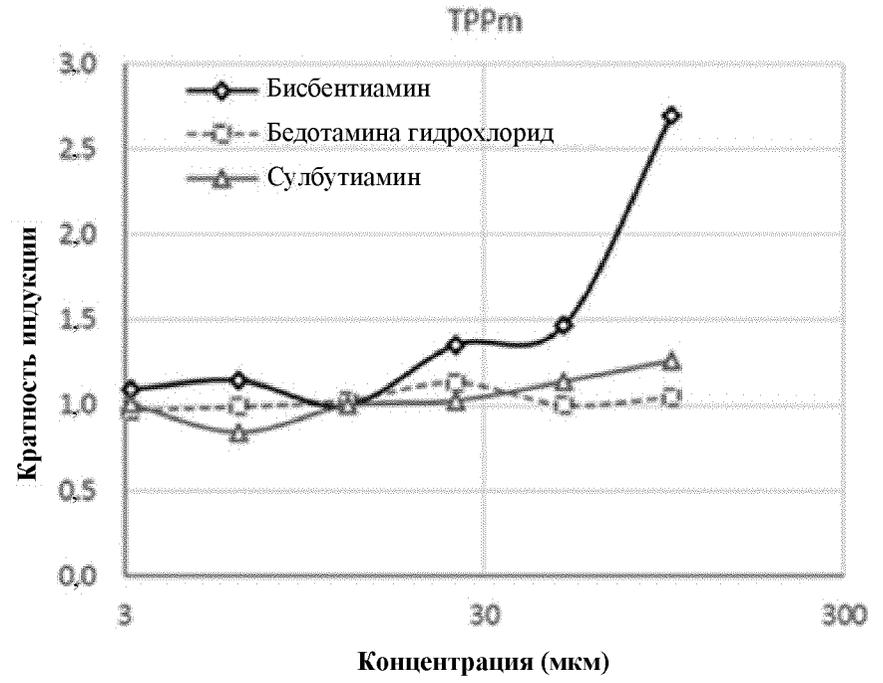
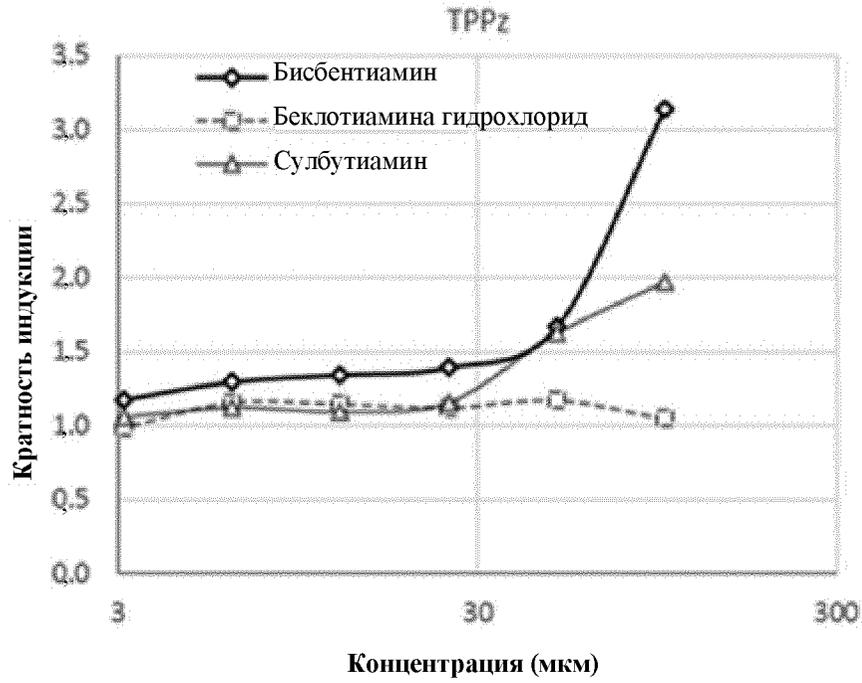
Фиг. 1А



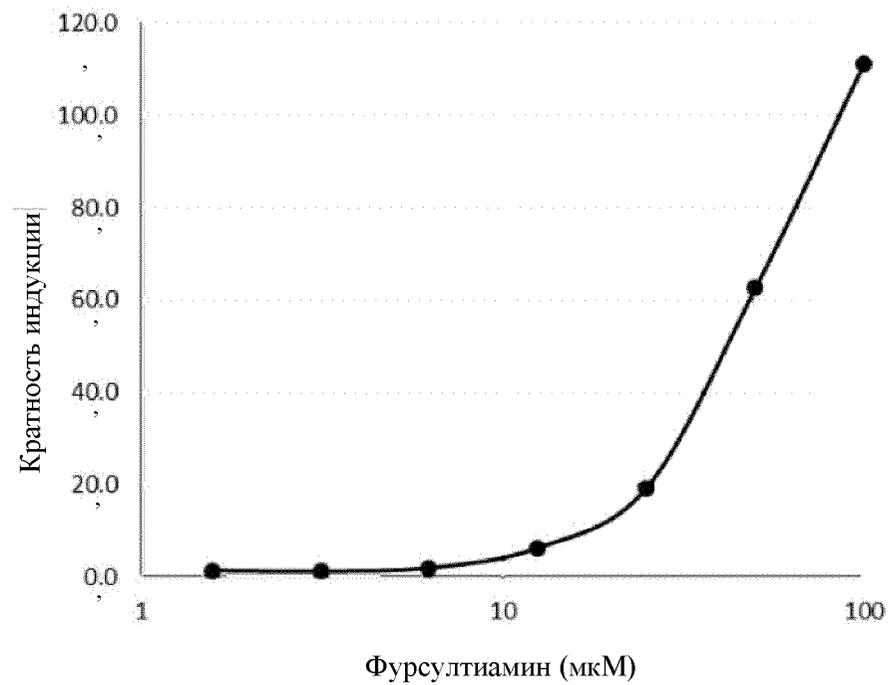
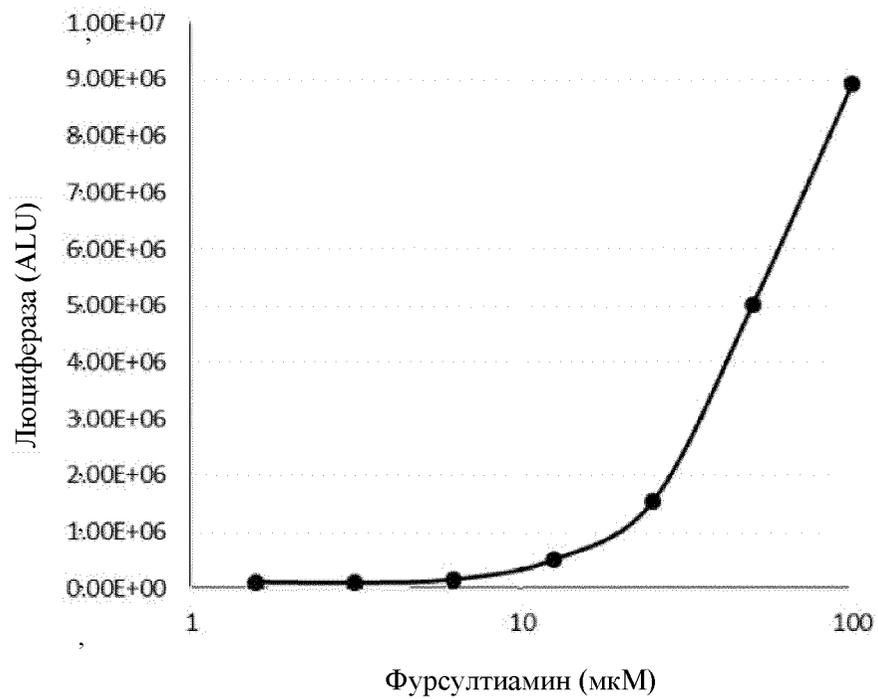
Фиг. 1В



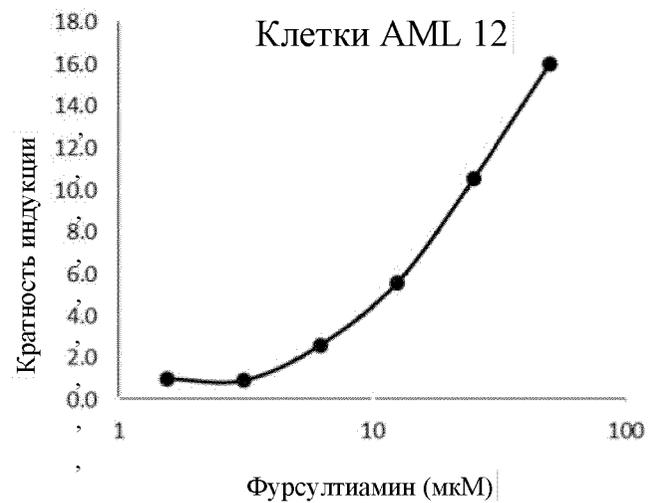
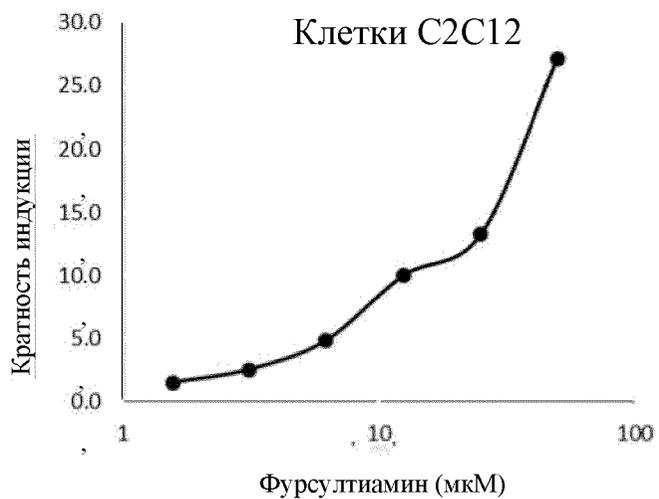
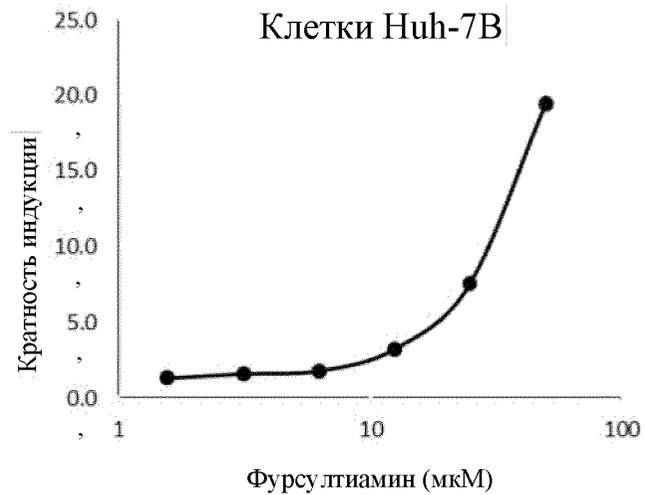
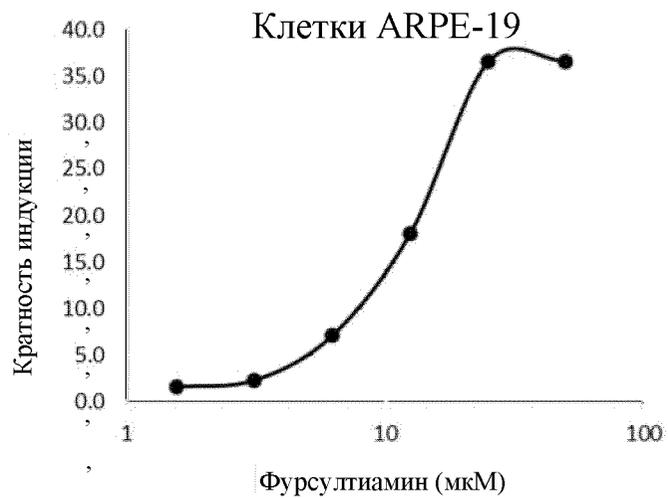
Фиг. 1С



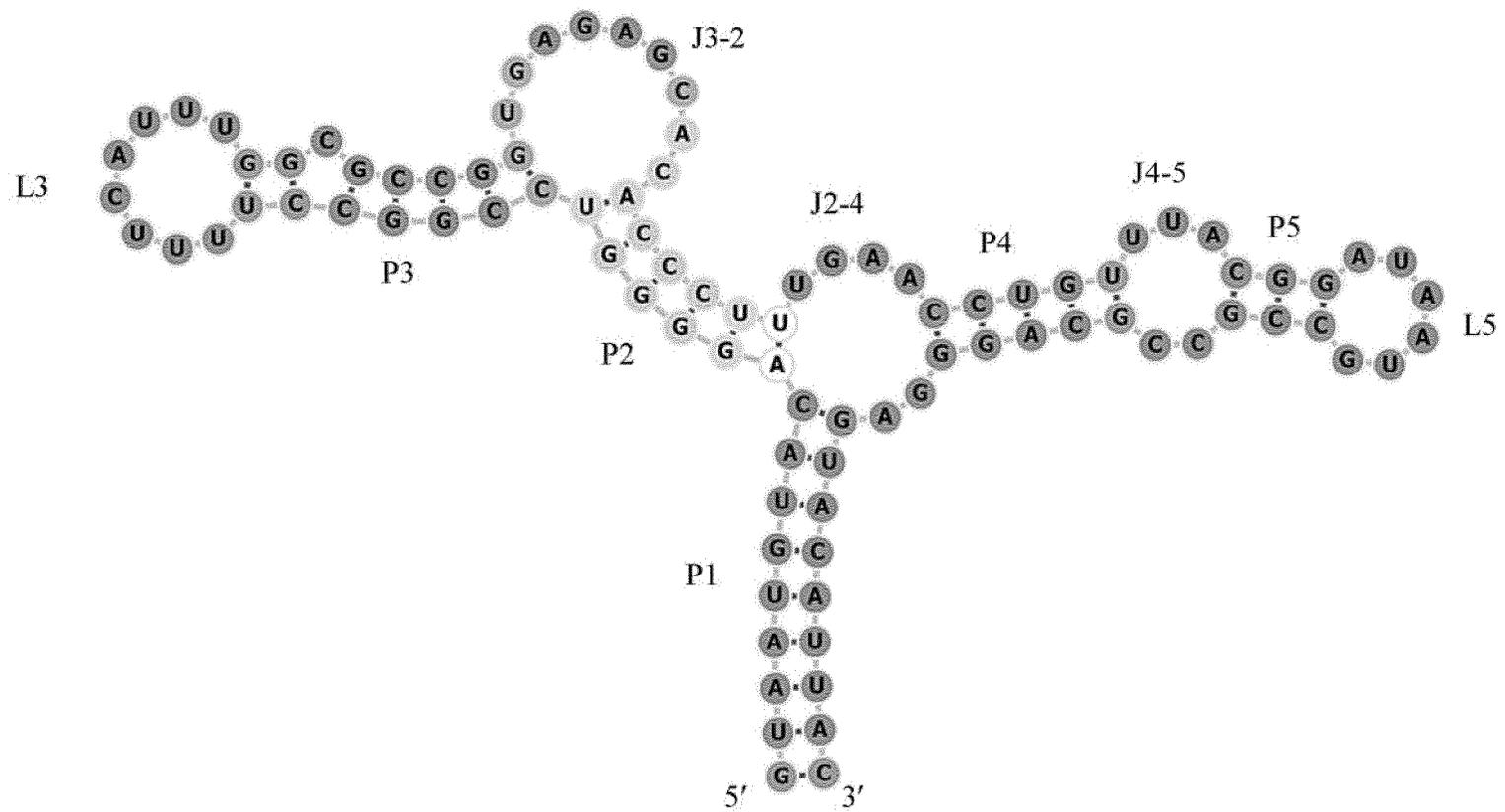
Фиг. 1D



Фиг. 2А



Фиг. 2В.



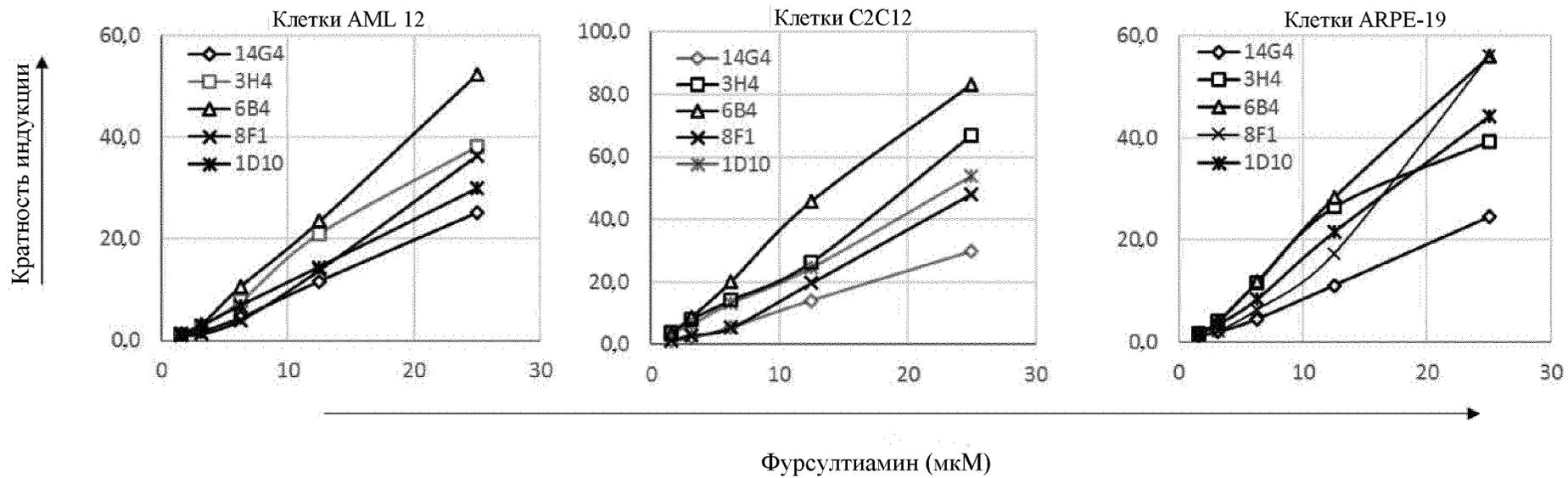
Фиг. 3А

Аптамер 14G4	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
Библиотека A1	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCTG NNNN CGGATAATGCCG NN GCAGGGAGT
Библиотека A2	AC N GGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCT NNNN CCCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
Библиотека A3	ACAGGGG N CCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAG NNNN CCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT

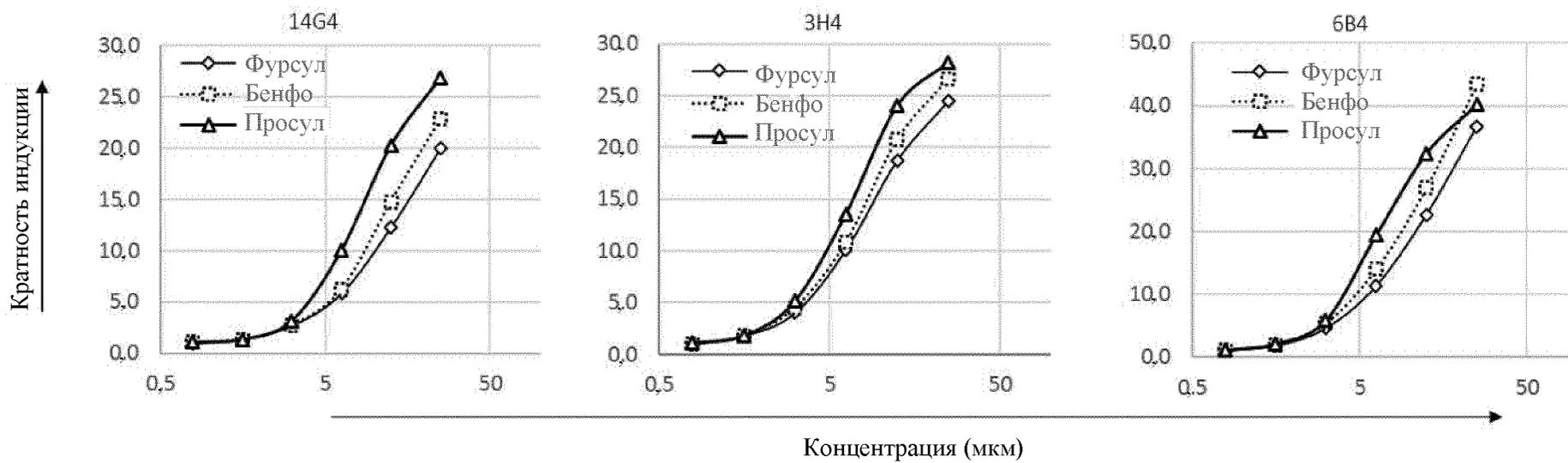
Фиг. 3В



Фиг. 4А



Фиг. 4В.



Фиг. 4С

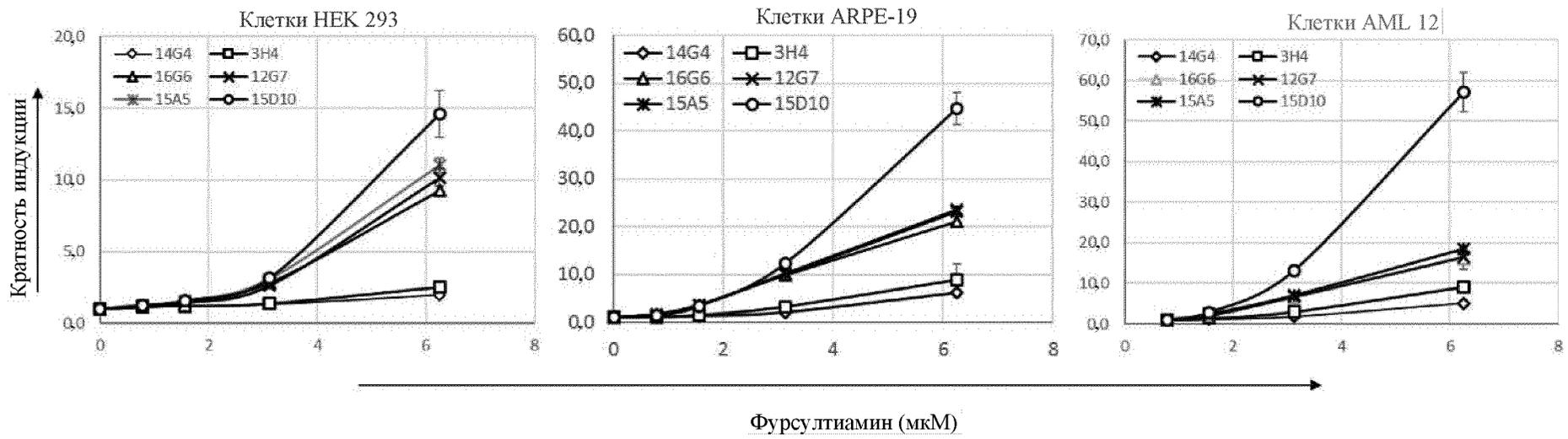
Аптамер 3Н4

Библиотека А4

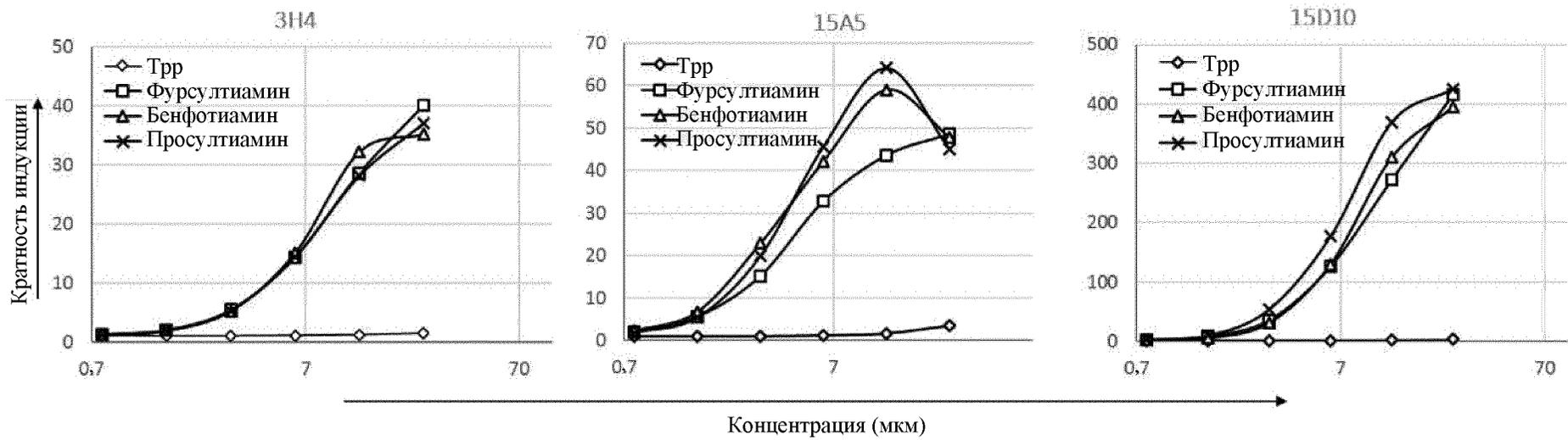
ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGANNANACCCTTNNNACCTGTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT

Фиг. 5

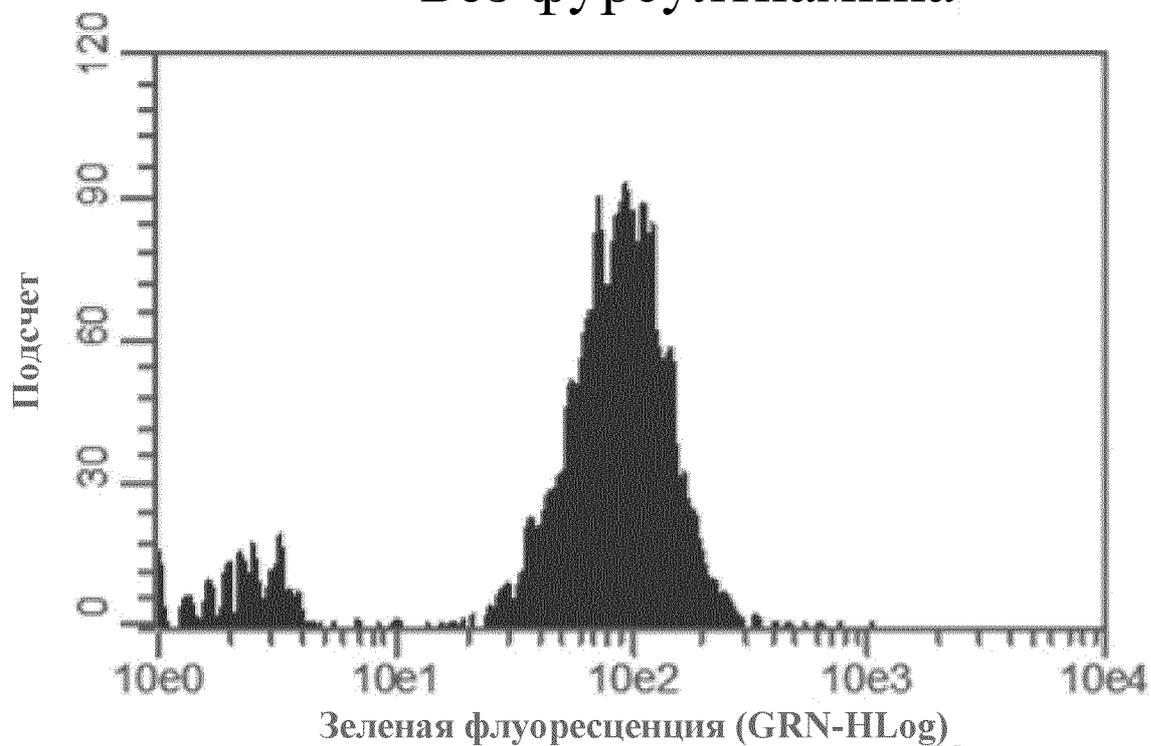


Фиг. 6А

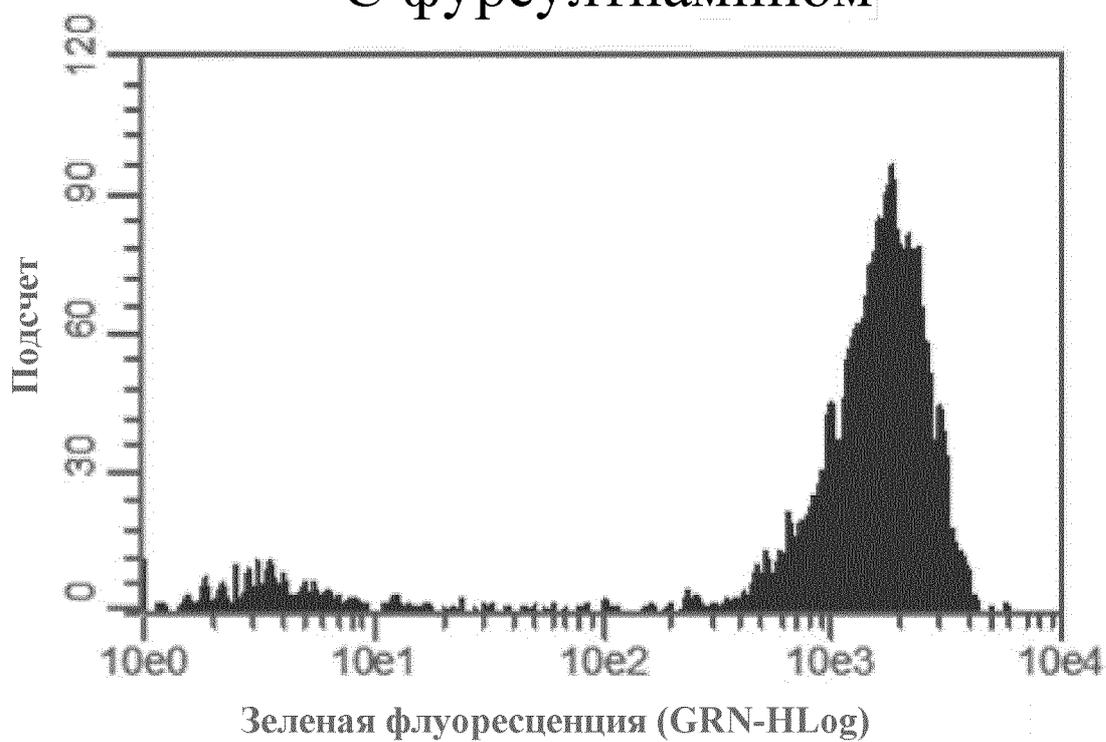


Фиг. 6В.

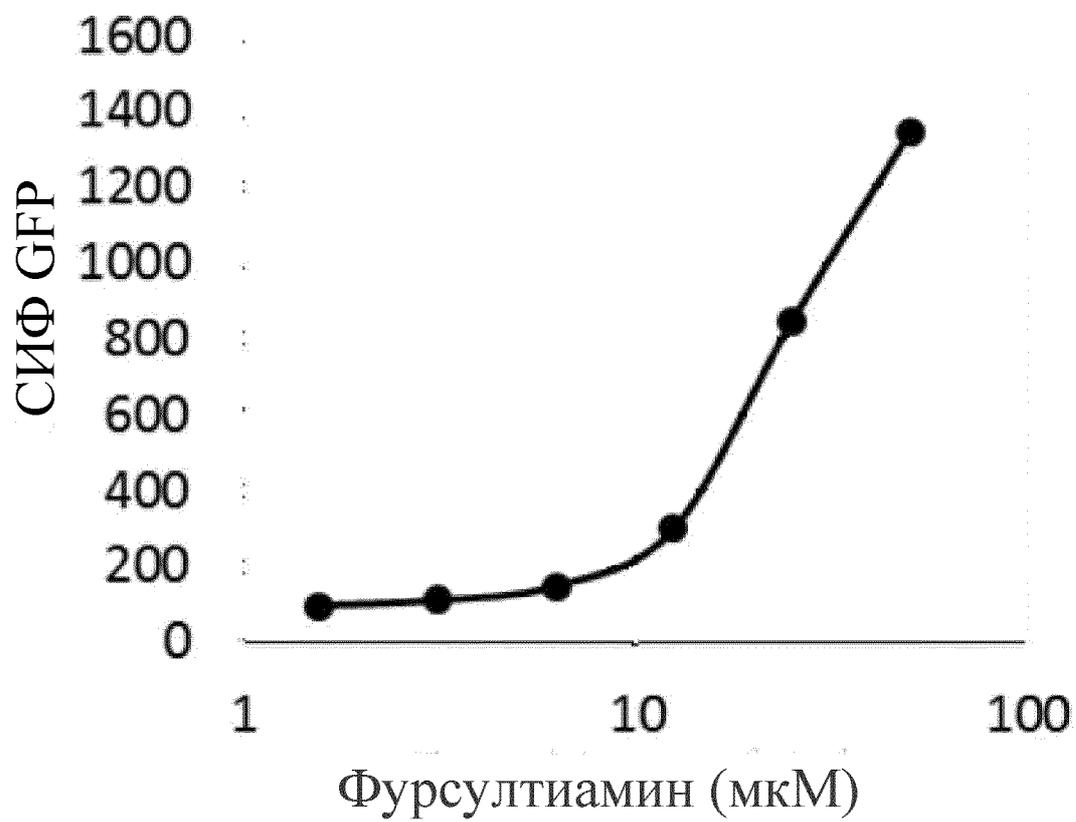
Без фурсултиамина



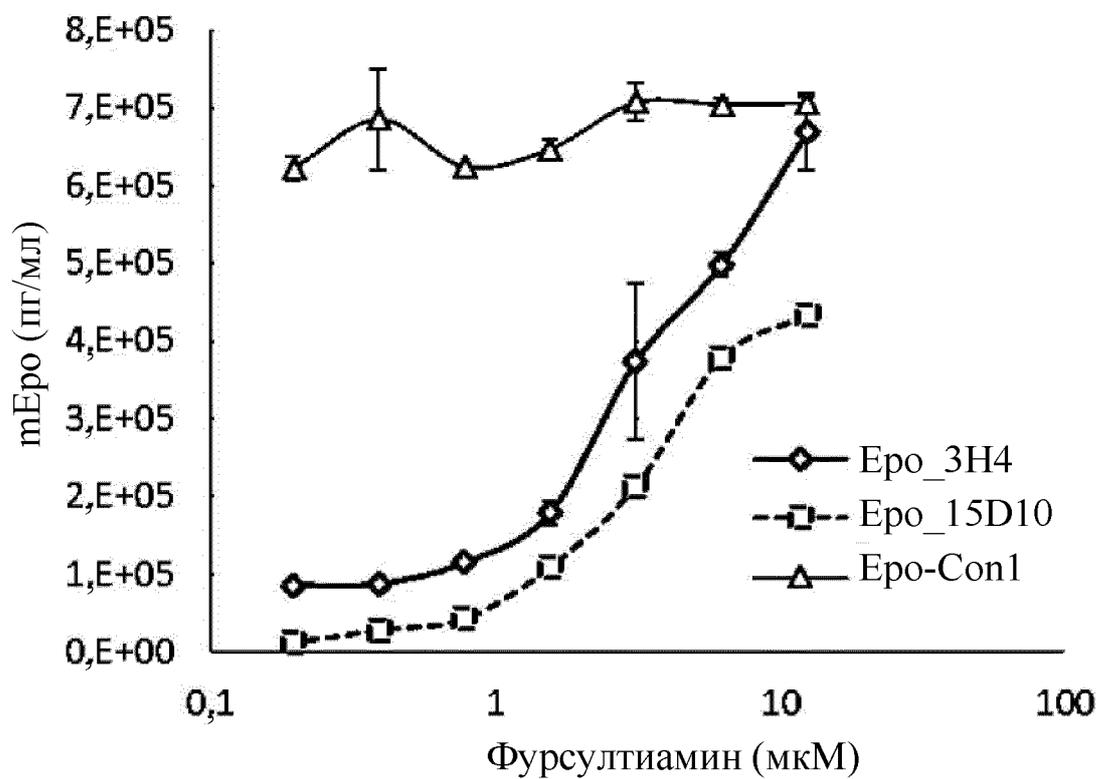
С фурсултиамином



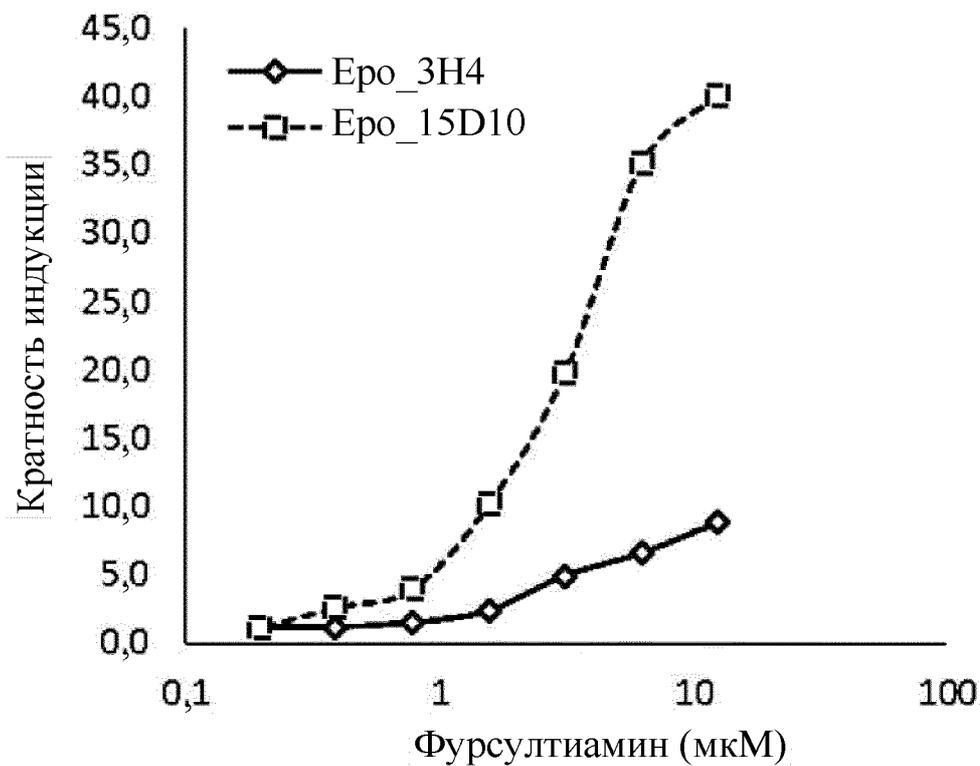
Фиг. 7А



Фиг. 7В

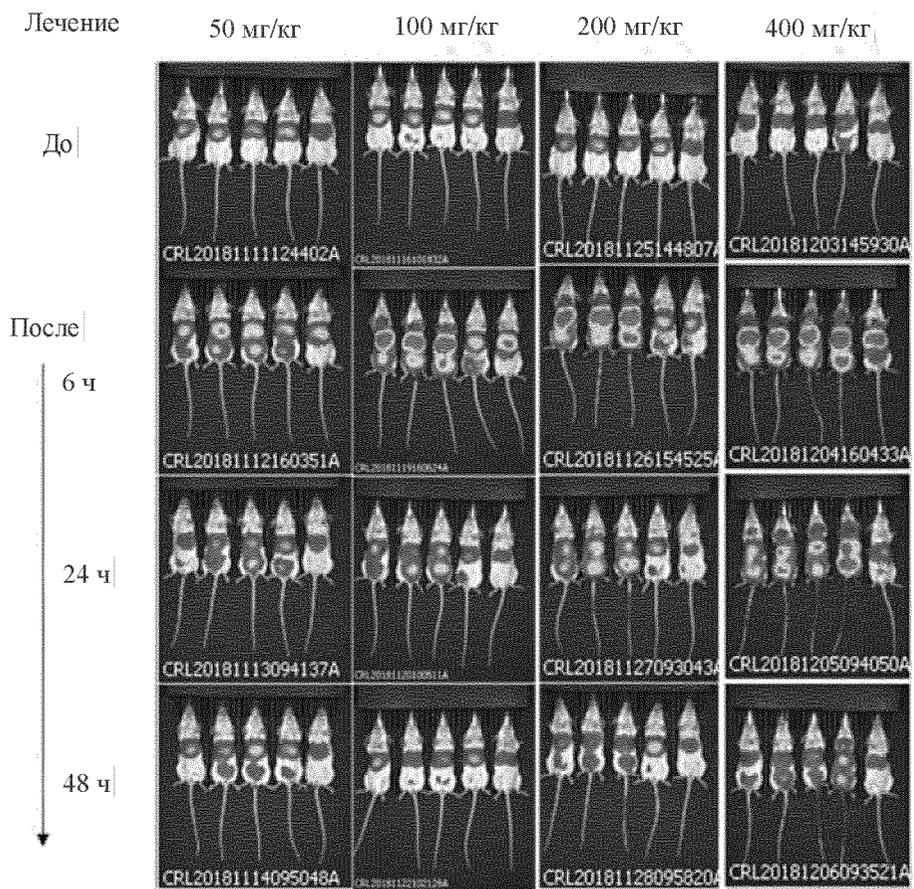


Фиг. 7С

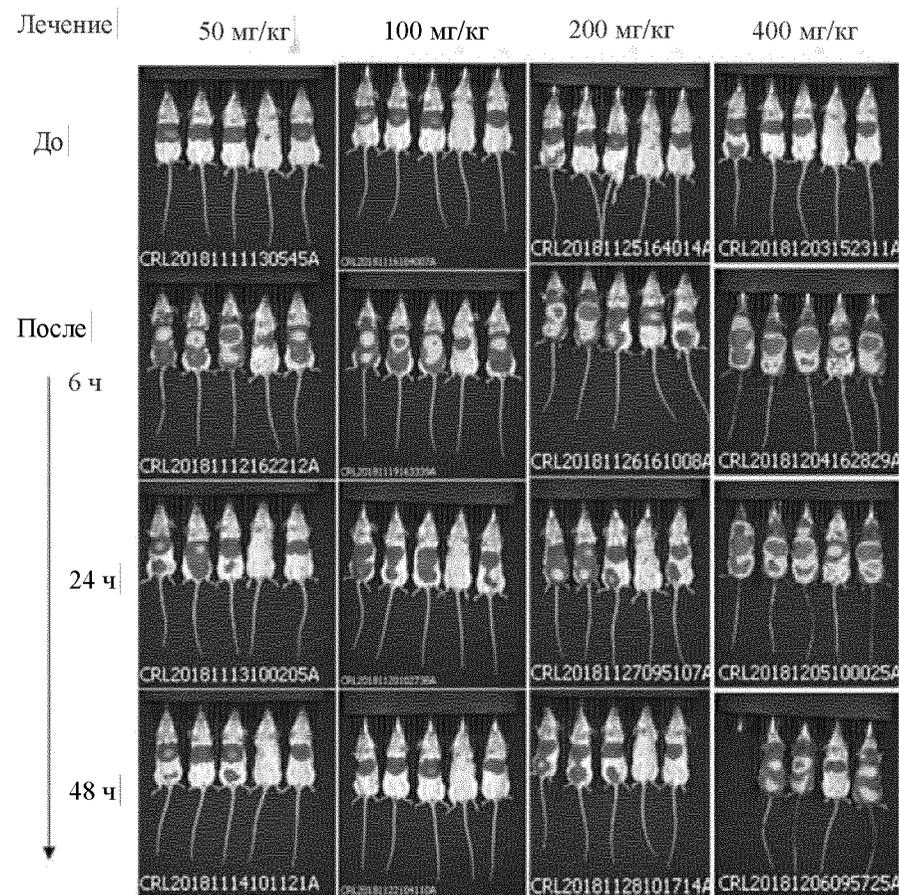


Фиг. 7D

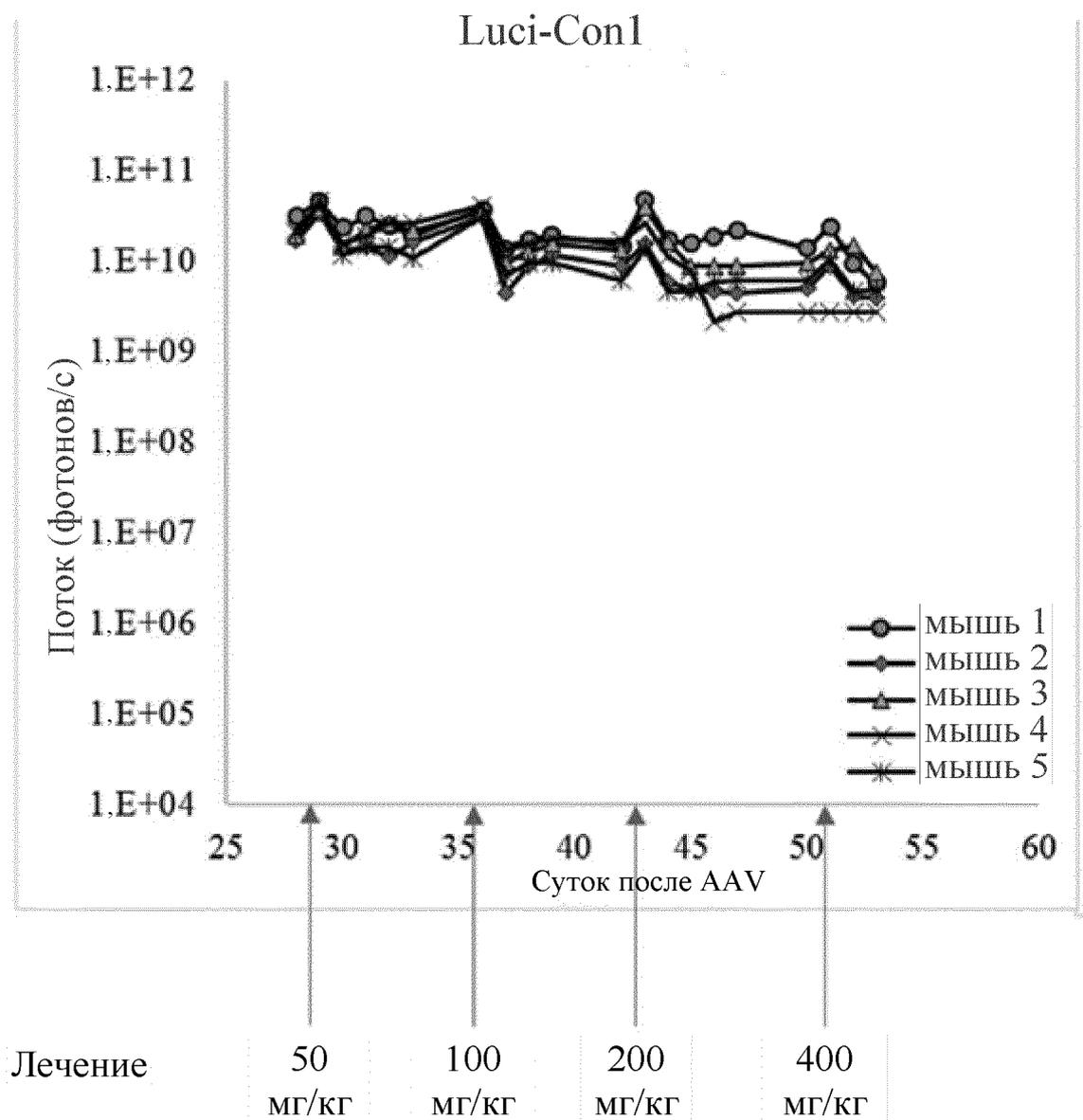
Группа 3Н4



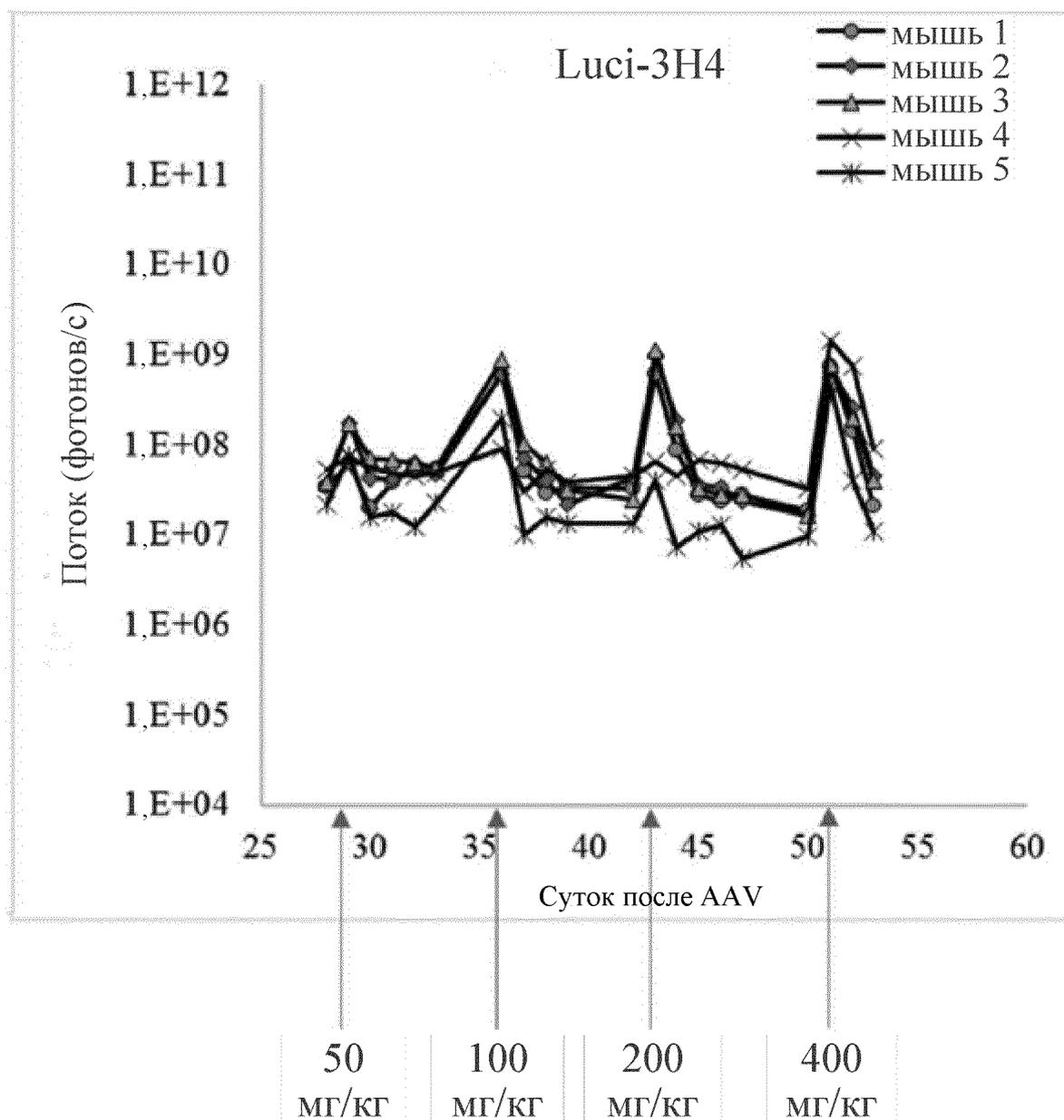
Группа 6В4



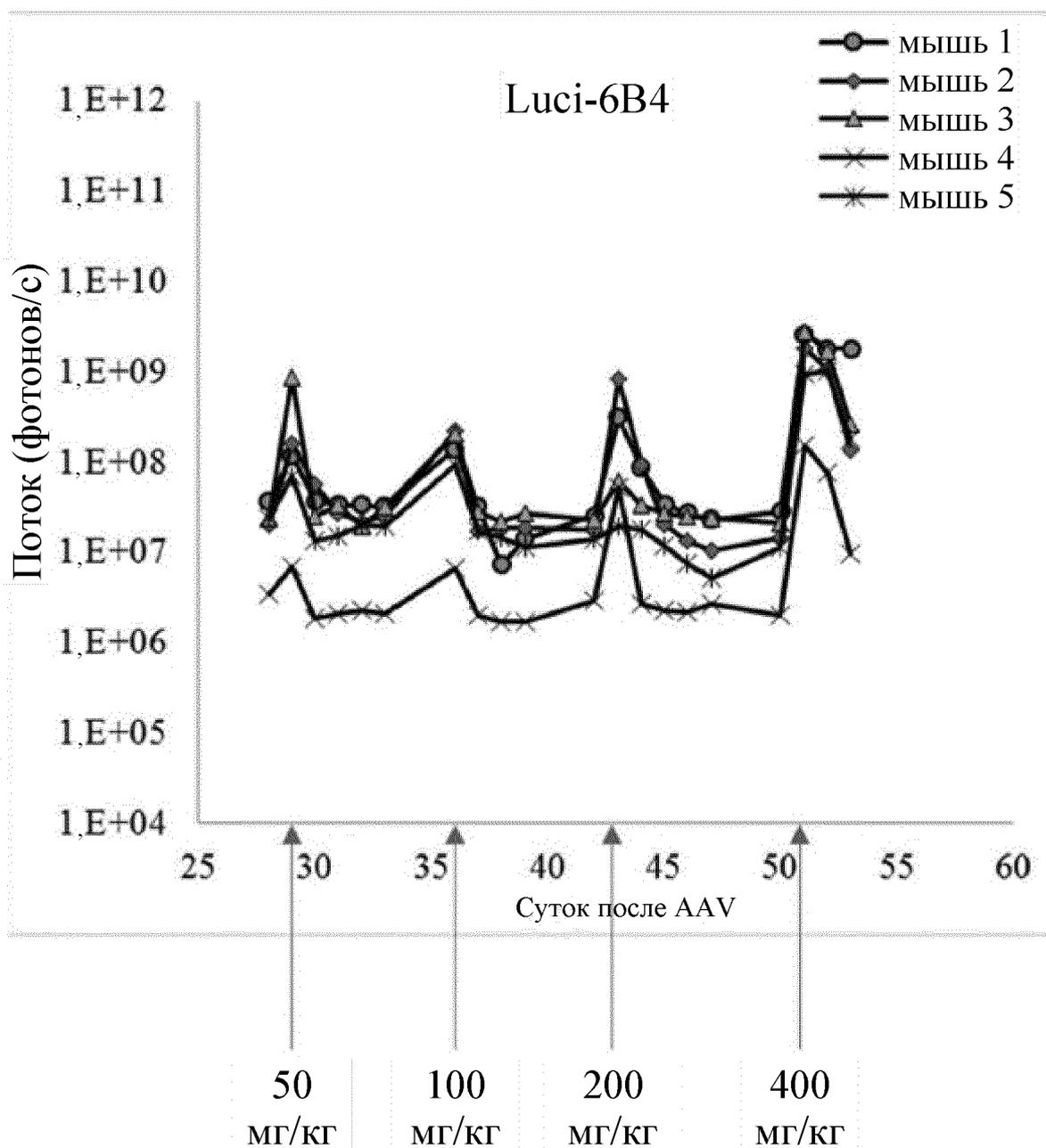
Фиг. 8А



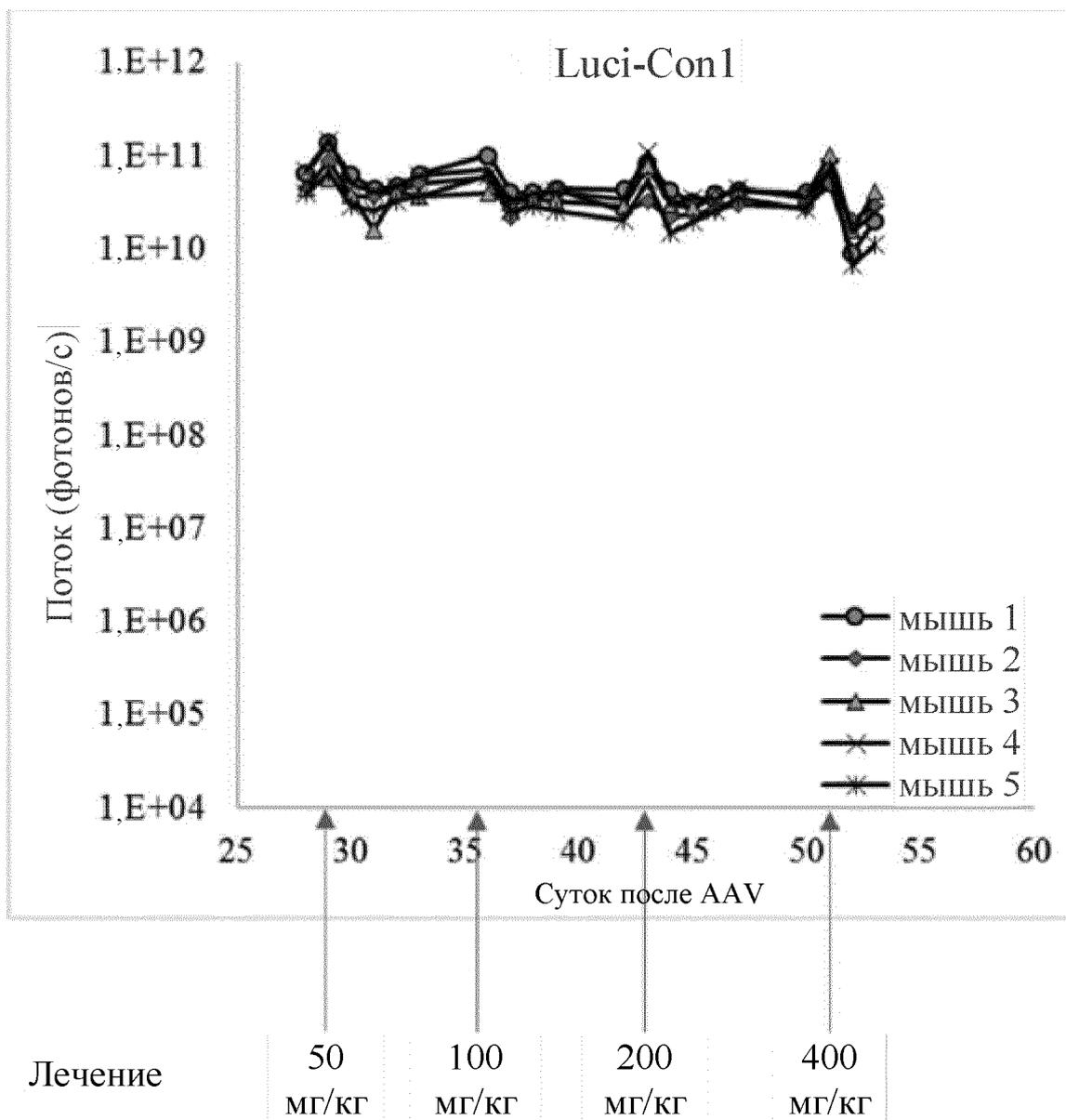
Фиг. 8В



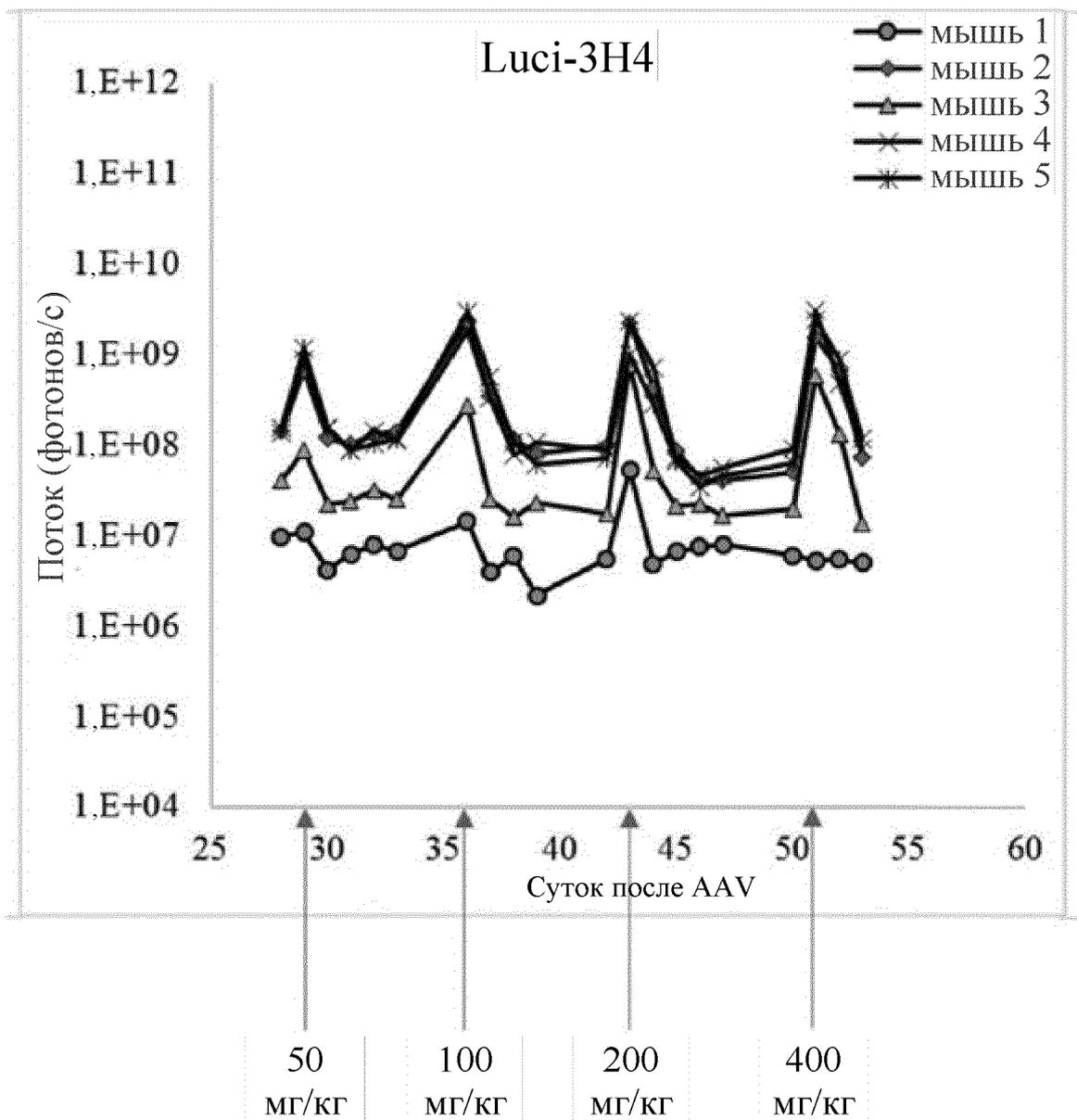
Фиг. 8В (продолж.)



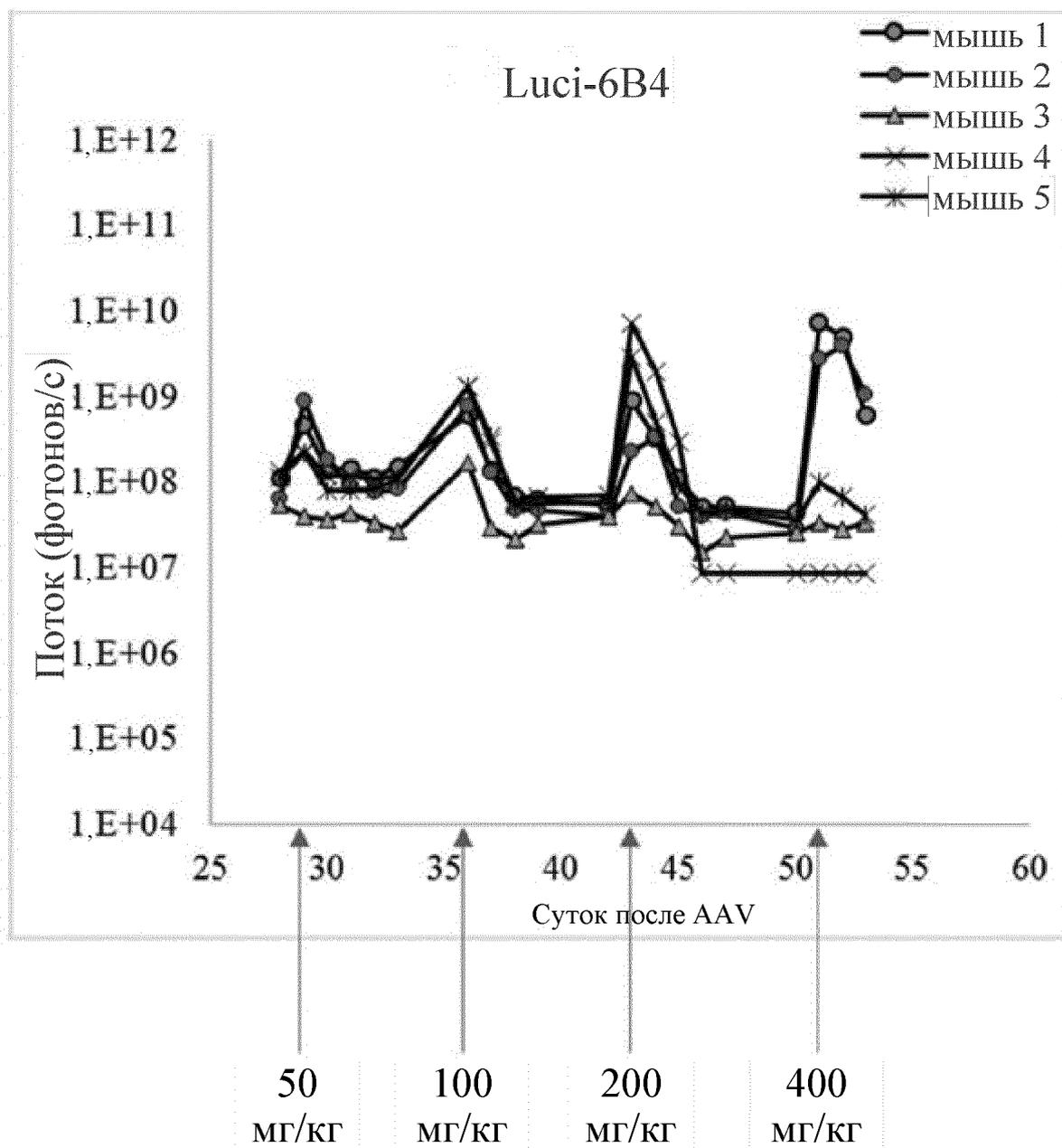
Фиг. 8В (продолж.)



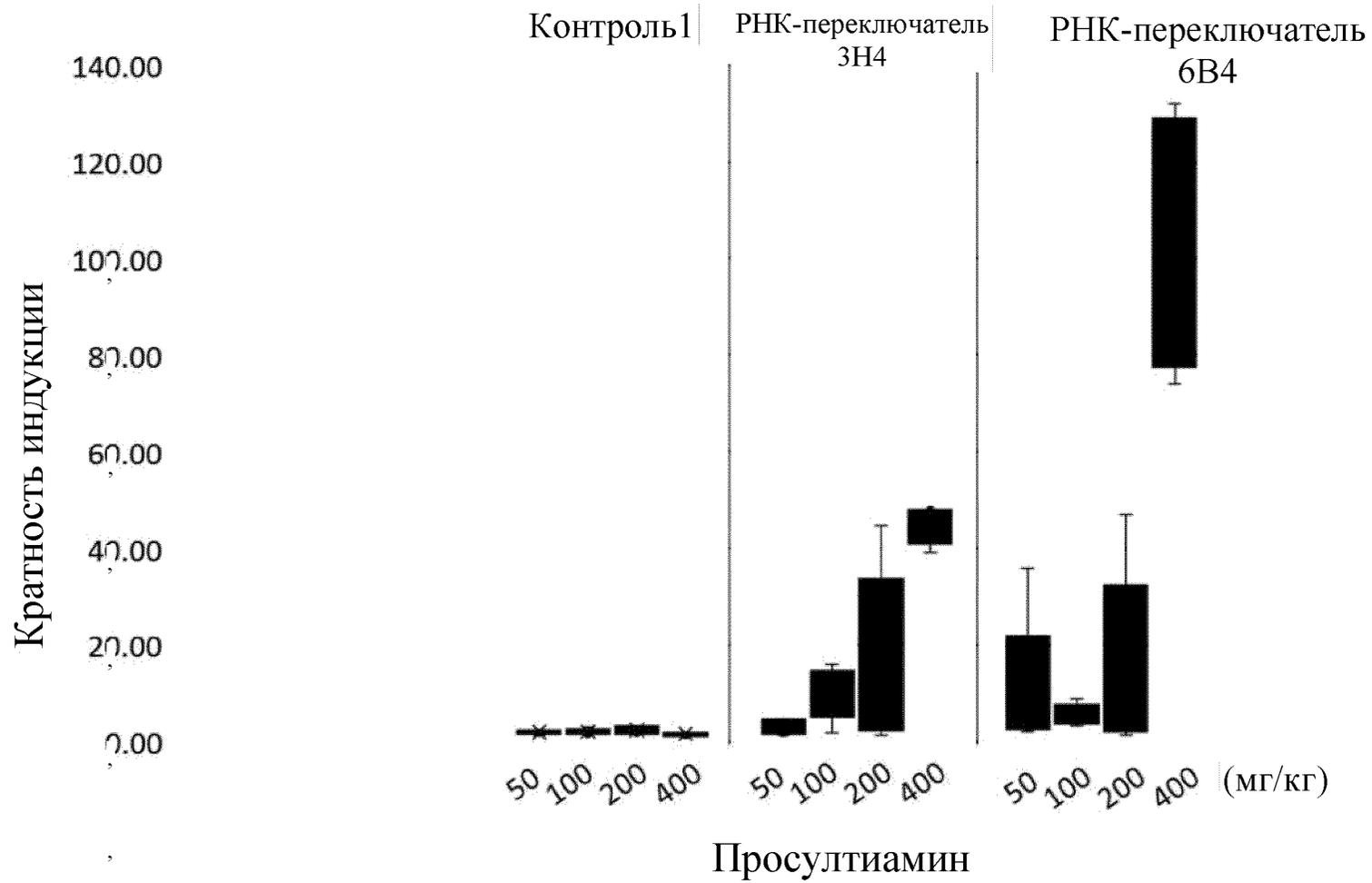
Фиг. 8С



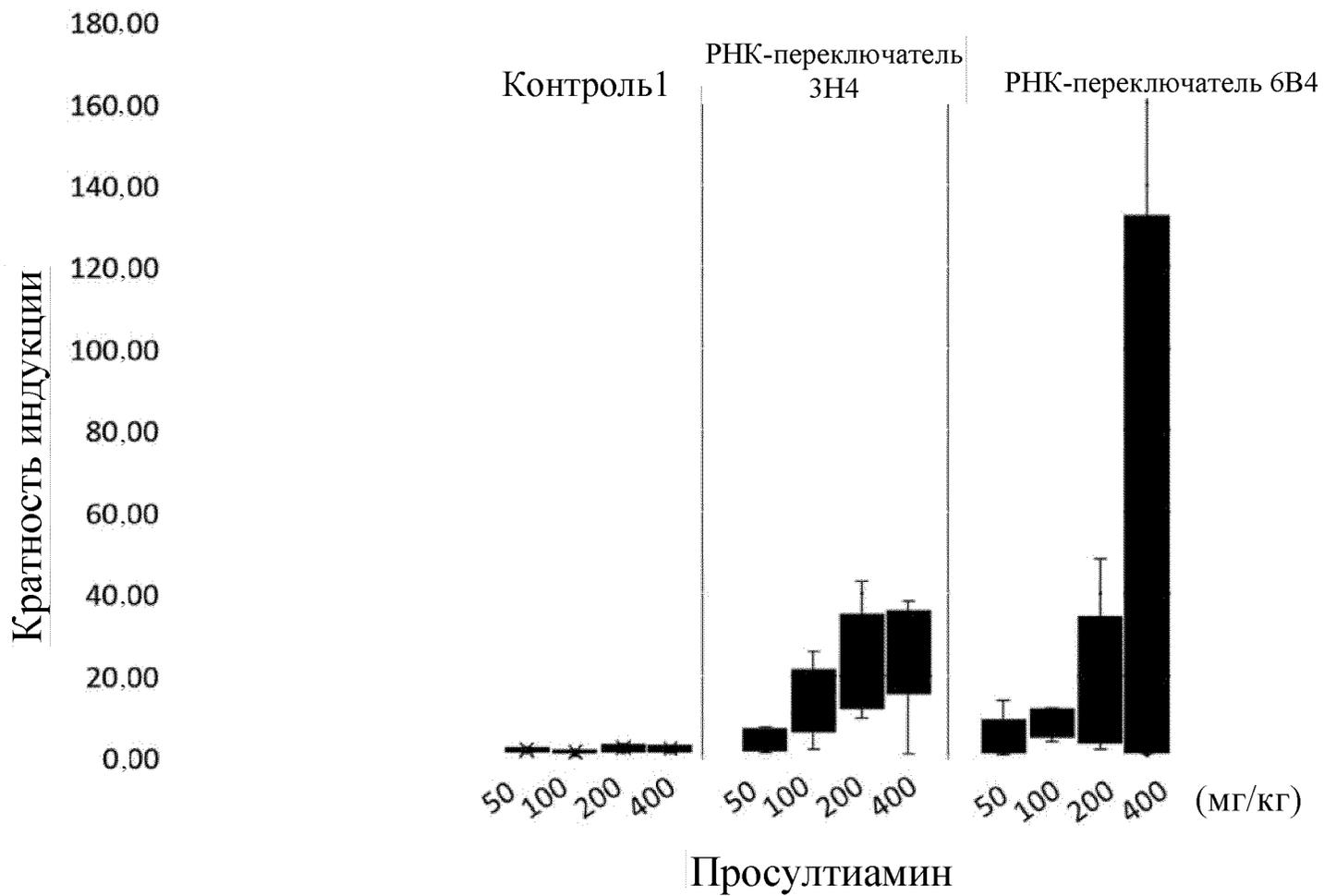
Фиг. 8С (продолж.)



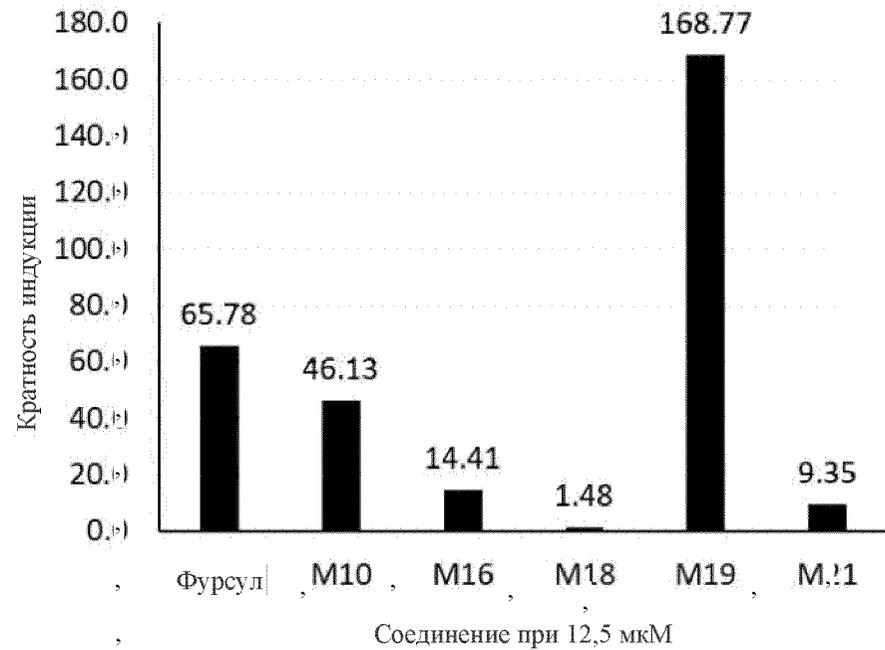
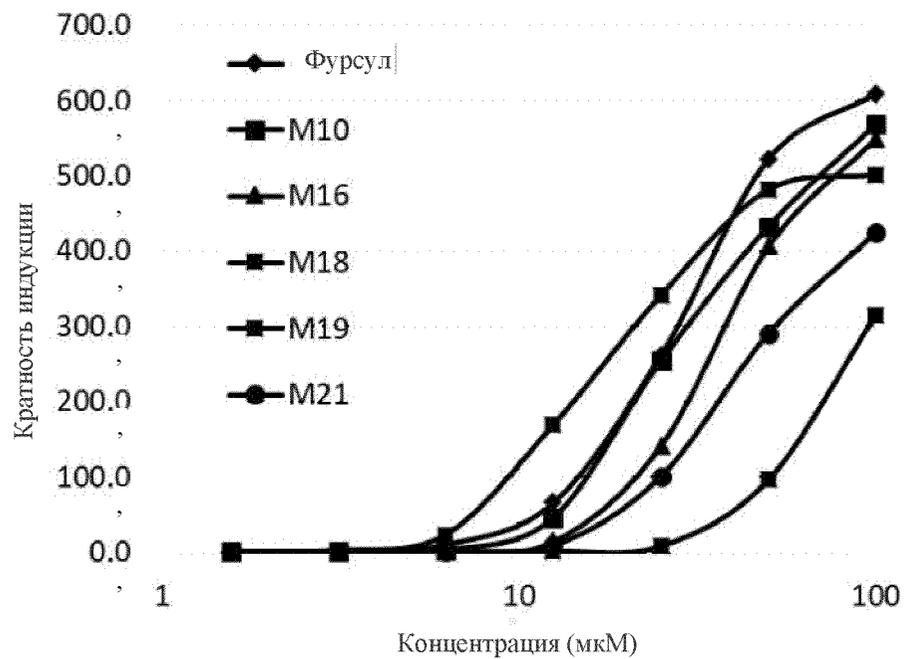
Фиг. 8С (продолж.)



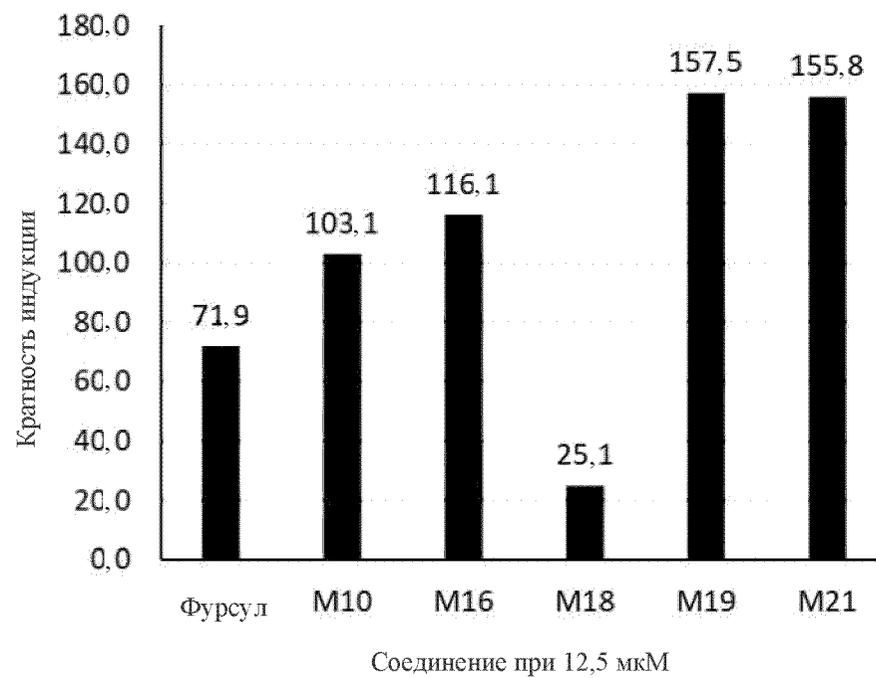
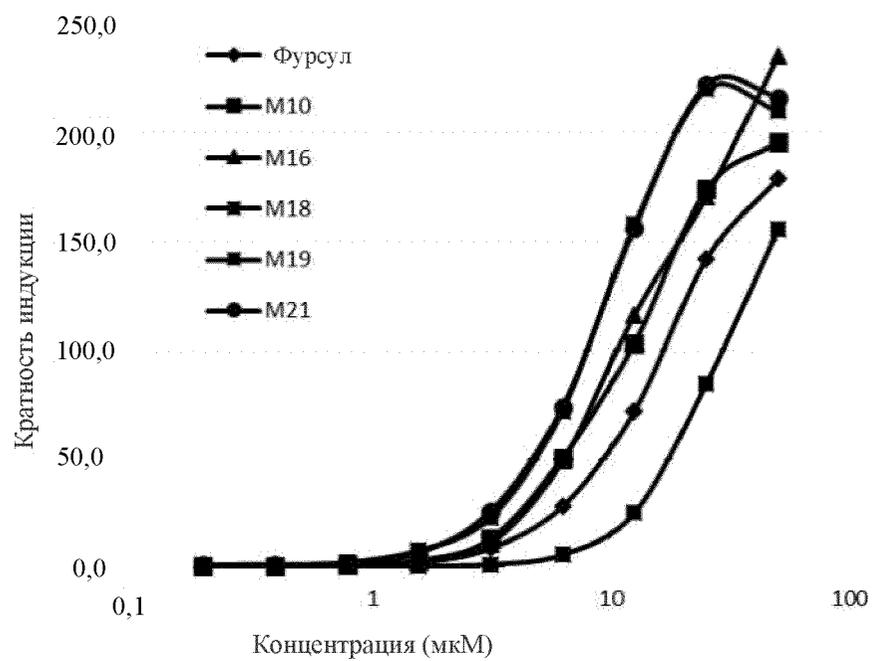
Фиг. 8D



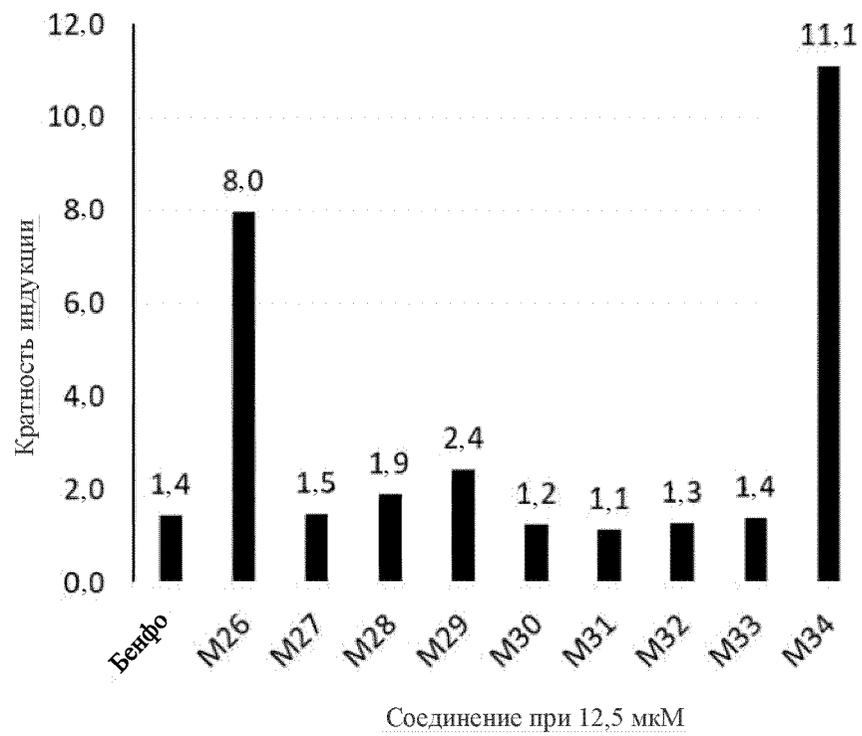
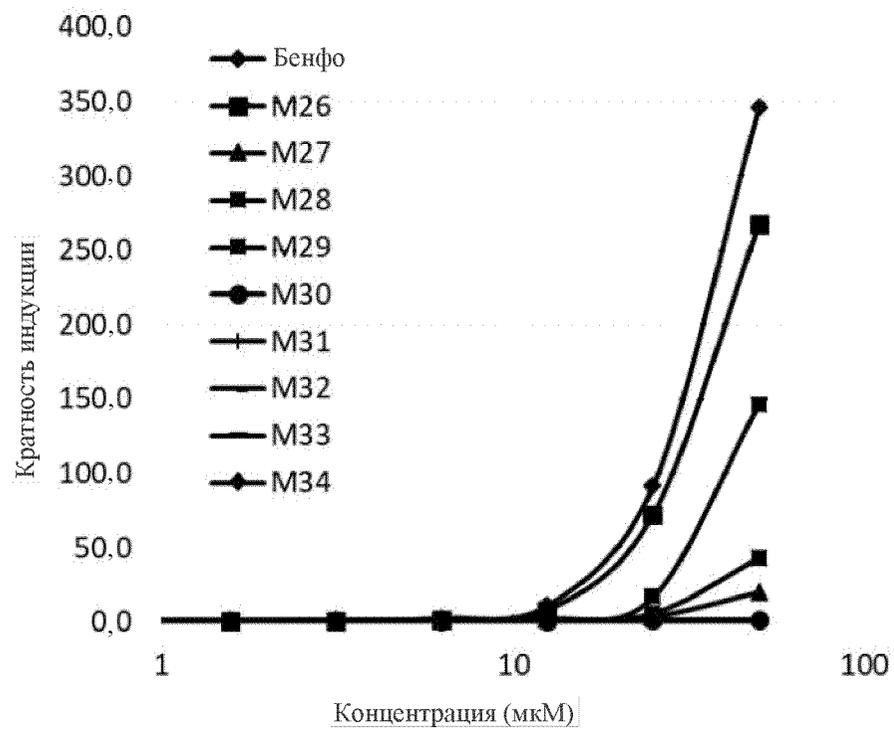
Фиг. 8Е



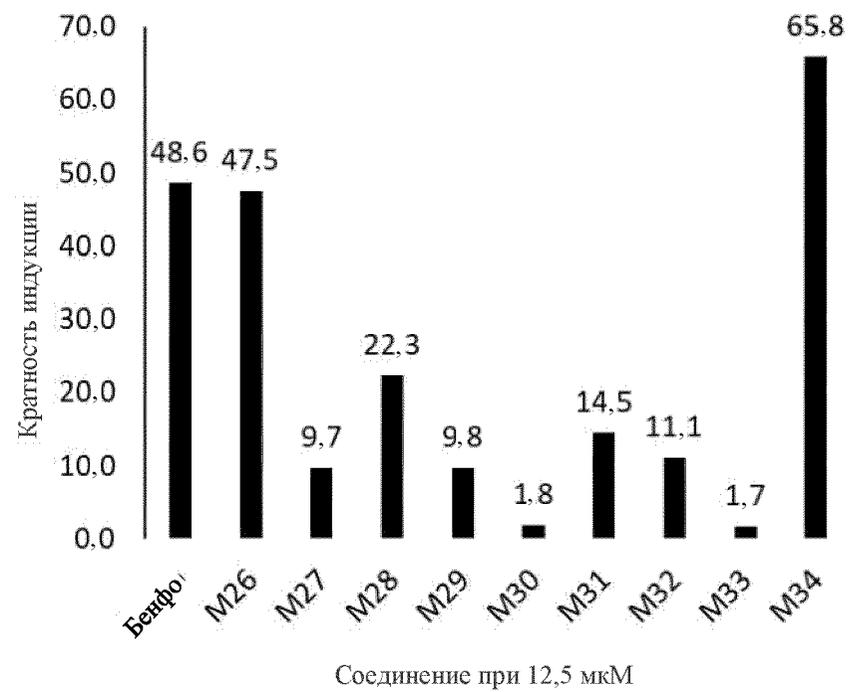
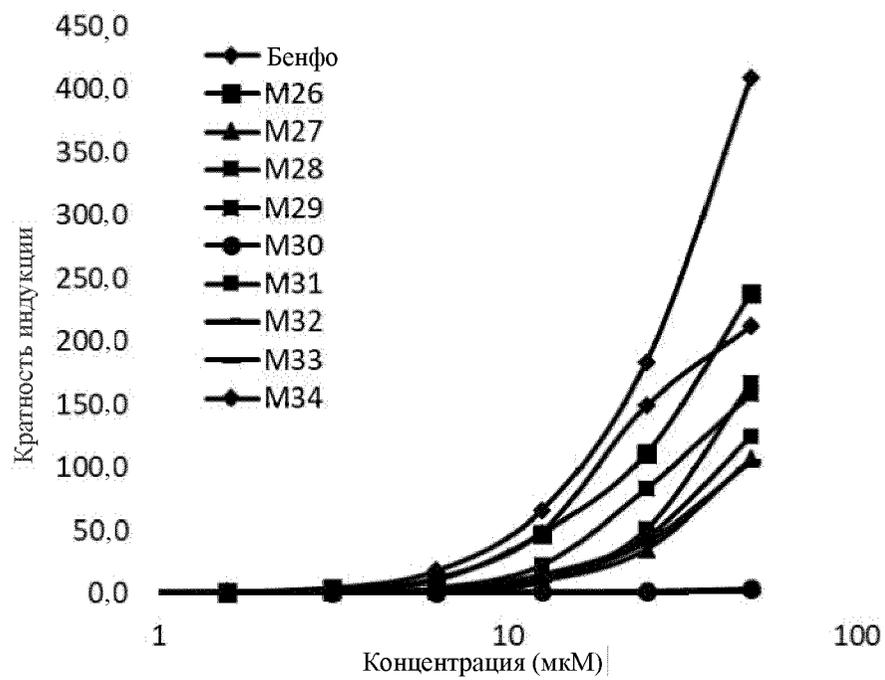
Фиг. 9А



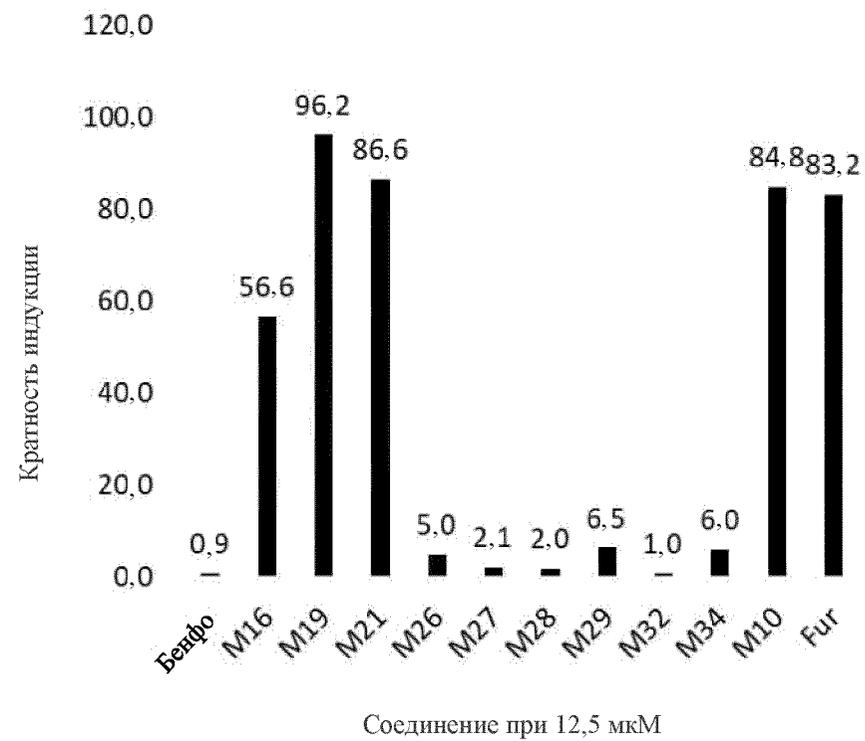
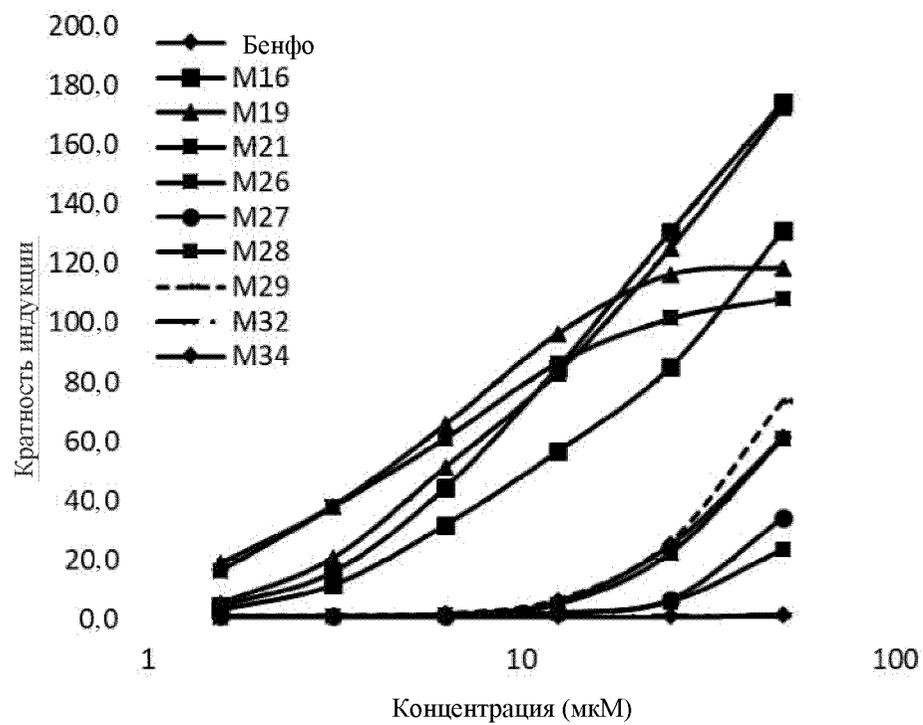
Фиг. 9В



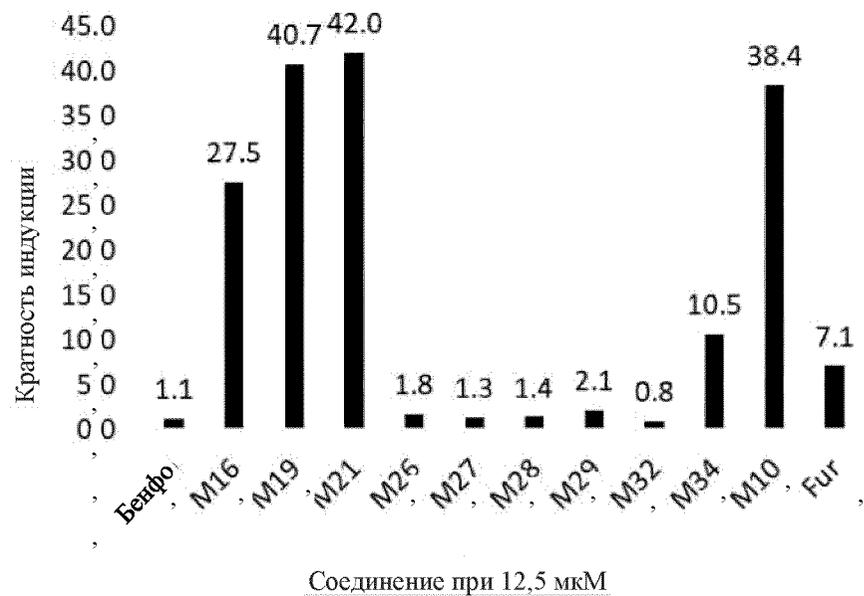
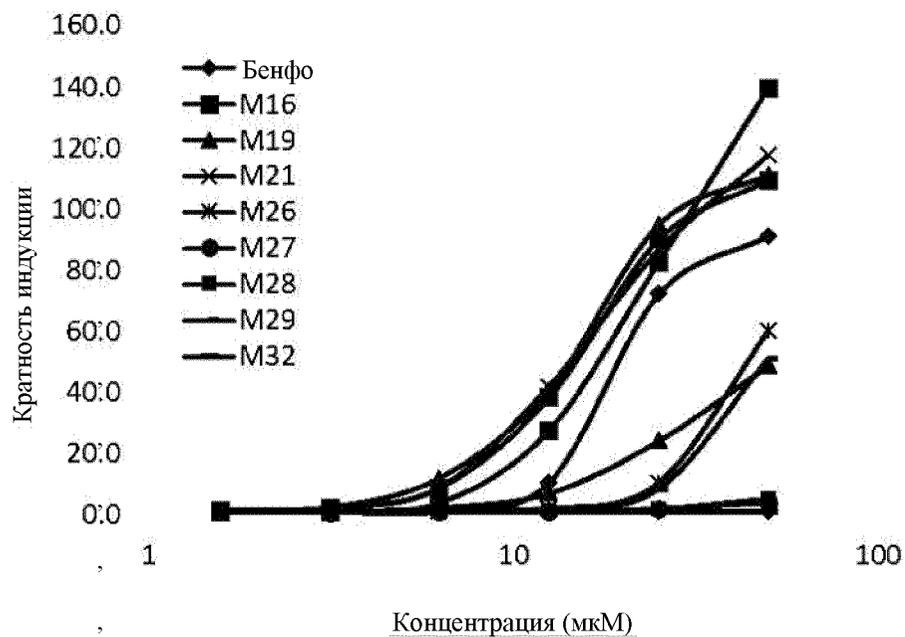
Фиг. 9С



Фиг. 9D



Фиг. 9E



Фиг. 9F