

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292593 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.01.20

(51) Int. Cl. C07C 219/12 (2006.01)  
C07C 233/62 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.07.23

(54) ЛИПИДОИДЫ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PV 2020-529

(72) Изобретатель:

(32) 2020.09.23

Циглер Петр, Грантз Саскова Клара,  
Ванек Вацлав, Крузикова Зузана,  
Седлак Франтисек (CZ)

(33) CZ

(86) PCT/CZ2021/050079

(87) WO 2022/063350 2022.03.31

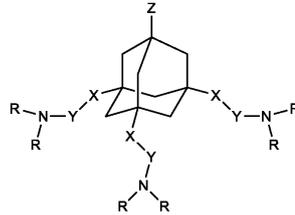
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Нагорных И.М. (RU)

УСТАВ ОРГАНИЗМЕ ХЕМИЕ А  
БИОХЕМИЕ АВ ЦР, В. В. И. (CZ)

(57) Объектом настоящего изобретения является липидоид общей формулы I



где X, Y, Z и R являются такими, как определено в формуле изобретения. Настоящий липидоид полезен в качестве трансфекционного агента. В изобретении также раскрыты трансфекционные агенты, трансфекционные частицы, содержащие настоящий липидоид, и их применение.

A1

202292593

202292593

A1

## Липидоиды для трансфекции нуклеиновой кислотой и их применение

### Область техники

Изобретение относится к новым ионизируемым липидоидам и к применению этих соединений для трансфекции и введения нуклеотидов и нуклеиновых кислот и их синтетических аналогов в клетки и ткани.

### Предшествующий уровень техники

В последние годы произошло необычайное оживление в области разработки методов лечения, основанных на применении нуклеиновых кислот. Терапия рибонуклеиновыми кислотами (РНК) в настоящее время получает все большее распространение из-за высокой эффективности и более низкого по сравнению с ранее испытанными терапевтическими дезоксирибонуклеиновыми кислотами (ДНК) риска возникновения неблагоприятных побочных эффектов. Несколько таких препаратов уже нашли применение в клинической практике, например, патисиран при наследственном транстиретиновом амилоидозе, этеплирсен при некоторых типах мышечной дистрофии Дюшенна или нусинерсен при лечении спинальной мышечной атрофии. Все эти заболевания опасны для жизни, альтернативные методы их лечения отсутствуют. Потенциальные препараты, нацеленные на рибонуклеиновую кислоту (РНК) или ее применение, можно разделить на три категории в зависимости от того, нацелены ли они на нуклеиновые кислоты или белки или кодируют белки. К первой категории относятся одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды, состоящие из 13-25 нуклеотидов (нт), блокирующие трансляцию мессенджерной РНК (мРНК) или сплайсинг РНК (нусинерсен, этеплирсен), а также малые интерферирующие РНК (миРНК, 21-23 нт), которые разрушают мРНК (патисиран). Терапевтические молекулы РНК, направленные на белки, используют тип молекул, которые известны как РНК-аптамеры. Они предназначены для изменения функции определенного белка. Примером такого лекарственного препарата является пегаптаниб, используемый для лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна, и который представляет собой первый одобренный препарат такого типа (2004 г.). Терапия с использованием мРНК в основном используется для приготовления так называемых персонализированных вакцин против рака или вакцин против инфекционных заболеваний (*напр.*, вирус Зика, SARS-CoV-2). Было показано, что при вирусных заболеваниях кандидатные профилактические вакцины на основе мРНК против бешенства и пандемического гриппа индуцируют безопасную выработку антител у здоровых добровольцев. К разработке вакцины против тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом-2 (SARS-CoV-2) — вируса, ответственного за пандемию COVID-19, были приложены большие усилия. Эти усилия привели к созданию безопасных и высокоэффективных кандидатных мРНК-вакцин,

которые в настоящее время распространяются для широкого применения. Белок-замещающая мРНК-терапия, например, для лечения гемофилии, также находится на доклинической стадии разработки.

5 В настоящее время интенсивно развиваются молекулярные технологии, позволяющие осуществлять прямое редактирование генома, особенно основанные на системе CRISPR-Cas9. Технология CRISPR является инструментом, который дает возможность изменять последовательности ДНК и изменять функцию генов. Потенциальные области применения включают в себя исправление генетических дефектов, лечение и предотвращение распространения заболеваний или улучшение сельскохозяйственных культур. Система  
10 CRISPR-Cas9 была протестирована в ряде доклинических и клинических исследований, в том числе в таких, как лечение ВИЧ, лечение гематологических злокачественных новообразований и генетических нарушений, включая серповидно-клеточную анемию и  $\beta$ -талассемию. Редактирование РНК обеспечивается системой ADAR (аденозиндезаминаза, действующая на РНК), которая на данный момент представляется наиболее безопасной с клинической точки зрения. Молекулярные технологии прямого редактирования генома могут быть доставлены к  
15 месту приложения действия в виде мРНК, кодирующей соответствующий фермент, ответственный за редактирование.

Ключевым фактором, обеспечивающим безопасное использование всех вышеперечисленных технологий (или других, основанных на нуклеиновых кислотах), является их безопасная и  
20 эффективная транспортировка к месту действия. Наиболее важный этап — проникновение отрицательно заряженных нуклеиновых кислот через фосфолипидную мембрану клетки; процесс преднамеренного введения нуклеиновых кислот в эукариотические клетки называется трансфекцией. В последние десятилетия ведется интенсивная разработка носителей (так называемых векторов) для эффективного транспорта нуклеиновых кислот через клеточную  
25 мембрану и одновременной защиты нуклеиновых кислот от деградации *in vivo* (Stewart, M. P.: *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 7409–7531).

Для трансфекции нуклеиновыми кислотами используют как вирусные, так и невирусные (физические, химические) векторы. Несмотря на то, что примерно 70 % клинических испытаний в области генной терапии до сих пор проводились с использованием вирусных  
30 векторов, этот подход связан с многочисленными рисками (канцерогенность, индукция иммунного ответа, тканевая неспецифичность, ограниченная способность включения нуклеиновых кислот и сложность производства). Физические методы (*например*, электропорация) сложно системно применять в клинической медицине.

Синтетические химические векторы, наоборот, обычно обладают более низкой  
35 иммуногенностью, способны переносить большее количество генетического материала, и, так как они состоят из четко определенных молекул, на их структуру можно влиять по мере

необходимости с целью повышения их эффективности и подавления токсичности. В качестве химических векторов используют катионные полимеры или катионные липиды, которые образуют комплекс с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. Такой комплекс способен проникать через клеточную мембрану и в то же время защищает нуклеиновые кислоты от деградации во внеклеточном пространстве.

С точки зрения структуры так называемые липидные наночастицы (ЛНЧ) в настоящее время являются наиболее перспективной и наиболее клинически исследованной формой этих комплексов. В них катионные липиды обычно изготовлены с пегилированным липидом, препятствующим агрегации, влияющим на размер частиц и эффективность трансфекции, с хелперным липидом и холестерином, которые необходимы для стабильной инкапсуляции нуклеиновой кислоты, как показано, например, в системе трансфекции миРНК (Kulkarni, J.: *Nanoscale*, **2019**, *11*, 21733–21739). ЛНЧ могут размещать молекулы нуклеиновых кислот размером от нескольких до миллионов нуклеотидов.

Синтетические катионные липиды и липидоиды (синтетические молекулы, подобные липидам и отличающиеся большим количеством гидрофобных цепей) образованы за счет катионного и гидрофобного доменов. На сегодняшний день разработано большое количество этих веществ с высокой структурной изменчивостью в обоих доменах, как путем направленной разработки, так и путем тестирования комбинаторно созданных библиотек.

Такие липиды и липидоиды, как D-Lin-MC3-DMA, C12-200, cKK-E12, SA2-SC8 и другие были специально разработаны для трансфекции миРНК (Dong, Y.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *144*, 133–147). Композиция, содержащая D-Lin-MC3-DMA была недавно (август 2018 г.) внедрена в клиническую практику под названием Онпаттро (ранее — Патисиран), что сделало ее первым зарегистрированным лекарственным препаратом на основе миРНК (Zhang, X.: *J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *60* (1), 37-49). Однако композиции, разработанные для миРНК могут быть неэффективными для мРНК, поэтому необходима направленная оптимизация (Cullis, P.: *Mol. Ther.* **2017**, *25* (7), 1467–1475).

Ионизируемые липиды и липидоиды, такие как D-Lin-MC3-DMA, C12-200, cKK-E12 и ТТЗ, используются для трансфекции мРНК (Zhong, Z.: *Nano Today* **2018**, *23*, 16–39; Kowalski, P.: *Mol. Ther.* **2019**, *27* (4), 1-19; Li, B.: *Nano Lett.* **2015**, *15*, 8099–8107). Ионизируемые липиды используются также для трансфекции ДНК. Следует подчеркнуть, что системы трансфекции, оптимизированные для трансфекции малых молекул (миРНК), не всегда подходят для трансфекции ДНК, и даже композиции, разработанные для мРНК, могут быть неэффективны для ДНК (Buck, J.: *ACS Nano* **2019**, *13*, 3754–3782).

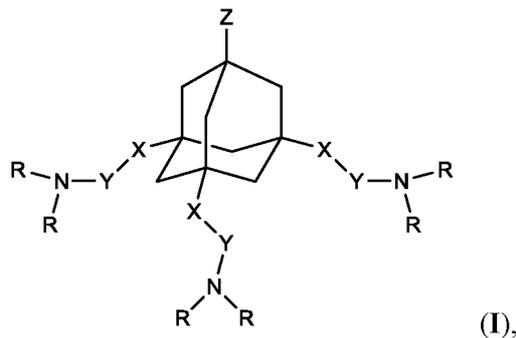
В связи с тем, что, несмотря на их большой терапевтический потенциал, до стадии клинического применения до сих пор доведено очень мало синтетических векторов на основе

ионизируемых липидов, необходима разработка новых систем с более высокой эффективностью, которые также обладали бы очень низкими показателями токсичности *in vivo*.

### Раскрытие изобретения

5 Настоящее изобретение представляет собой решение проблемы эффективности трансфекции и направленной доставки нуклеотидов и нуклеиновых кислот и их синтетических аналогов с использованием ионизируемых (катионных) липидов, а также токсичности этих липидов для целевого организма или клеток. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что при  
10 использовании адамантана в качестве центрального ядра ионизируемого липидоида эффективность трансфекции таких липидоидов существенно возросла по сравнению с ранее известными решениями, особенно эффективность трансфекции мРНК, циклических динуклеотидов, миРНК и ДНК. К тому же указанные адамантан-содержащие липидоиды имеют крайне низкую цитотоксичность в соответствующих дозах. Они не проявляют признаков токсичности у мышей после внутривенного или внутрибрюшинного введения. Специфическим  
15 свойством адамантанового ядра, используемого в качестве центрального структурного мотива новых ионизируемых липидоидов, является стерическая сложность его окружения и высокая ригидность по сравнению с ионизируемыми липидами и липидоидами, известными до настоящего времени. Еще одним преимуществом биологически активных веществ, представляющих собой структурные производные адамантана, является их общая хорошая  
20 биологическая совместимость и, как следствие, пригодность для фармацевтического использования, особенно в клинической медицине.

Настоящее изобретение относится к ионизируемым липидоидам общей формулы I



25 где X выбирают из группы, состоящей из -C(=O)NH-, -C(=O)O-, -C(=S)O-, -C(=O)S-,  
-C(=S)S-, -C(=O)NHNH-, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -OC(=O)-, -S-, -SC(=O)-, -NH-, -NHNH-, -NHC(=O)-,  
-NHNHC(=O)-, -C≡C-, -CH=CH-, пятичленного гетероцикла, содержащего по меньшей мере 2 атома азота, -CH<sub>2</sub>C(=O)NH-, -CH<sub>2</sub>C(=O)O-, -CH<sub>2</sub>C(=S)O-, -CH<sub>2</sub>C(=S)S-, -  
30 CH<sub>2</sub>C(=O)NHNH-,  
-N=CH- и -CH=N-;

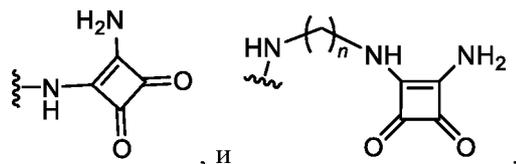
Y независимо выбирают из группы, состоящей из алкиленовых цепей C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, при этом в указанной алкиленовой цепи одна или несколько -CH<sub>2</sub>- групп могут быть необязательно заменены на один или несколько атомов O или S;

Z выбирают из группы, содержащей водород, -OH, -CH<sub>2</sub>OH, -NH<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

5 -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup> и -NHCH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C(=O)R<sup>1</sup>,

при этом R<sup>1</sup> выбирают из -NH<sub>2</sub>, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH, -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH]<sub>2</sub>, -NHCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>,

-NHCH<sub>2</sub>CH(-OH)CH<sub>2</sub>OH, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>, -N[CH<sub>2</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>,



-NHCH[C(=O)NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(=O)NH<sub>2</sub>,

где n представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 2 до 5;

10 и R одинаковы или отличаются друг от друга, причем каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из алкила C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, алкенила C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> и алкинила C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, при этом в указанном алкиле, алкениле или алкиниле одна или более -CH<sub>2</sub>- групп могут быть необязательно заменены на одну или несколько групп, выбранных из -CH(OH)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -S-S-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -O- и -S-;

15 и их фармацевтически приемлемые соли, соли присоединения и сольваты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X выбирают из группы, состоящей из -C(=O)NH-, -C(=O)O-, -C(=S)O-,

20 -C(=O)S-, -C(=S)S-, -C(=O)NHNH-, -CH<sub>2</sub>-, -O-, -S-, -NH-, -NHNH-, -NHC(=O)-, -NHNHC(=O)-, -C≡C-, -CH=CH-, пятичленного гетероцикла, содержащего по меньшей мере два атома азота,

-CH<sub>2</sub>C(=O)NH-, -CH<sub>2</sub>C(=O)O-, CH<sub>2</sub>C(=S)O-, CH<sub>2</sub>C(=S)S-, -CH<sub>2</sub>C(=O)NHNH-, -N=CH-,  
-CH=N-.

25 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Y выбирают из группы, состоящей из алкиленовых цепей C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>.

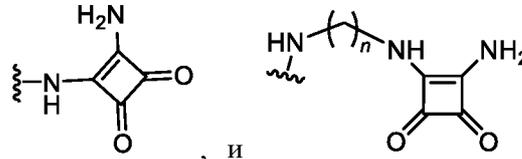
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Z выбирают из группы, состоящей из атома водорода, -OH, -NH<sub>2</sub>, -NHCH<sub>3</sub>,

30 -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup>.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Z выбирают из группы, состоящей из водорода, -OH, -CH<sub>2</sub>OH, -NH<sub>2</sub>,

$-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_3-SO_3^-$ ,  $-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-COO^-$  и  $-C(=O)R^1$ ,

при этом  $R^1$  выбирают из  $-NH_2$ ,  $-NH(CH_2)_nOH$ ,  $-N[(CH_2)_nOH]_2$ ,  $-NHCH(CH_2OH)_2$ ,  
 $-NHCH_2CH(OH)CH_2OH$ ,  $-NH(CH_2)_nC(=O)NH_2$ ,  $-N[CH_2C(=O)NH_2]_2$ ,  $-NHCH[C(=O)NH_2]_2$ ,



$-NH(CH_2)_2NHC(=O)NH_2$ , и , где  $n$  представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 2 до 5.

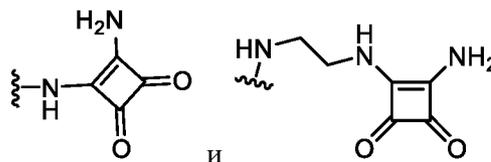
5

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения  $Z$  выбирают из группы, состоящей из водорода,  $-OH$ ,  $-CH_2OH$ ,  $-NH_2$ ,

$-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_3-SO_3^-$ ,  $-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-COO^-$  и  $-C(=O)R^1$ ,

10

при этом  $R^1$  выбирают из  $-NH_2$ ,  $-NH(CH_2)_2OH$ ,  $-N[(CH_2)_2OH]_2$ ,  $-NHCH(CH_2OH)_2$ ,  
 $-NHCH_2CH(-OH)CH_2OH$ ,  $-NH(CH_2)_2C(=O)NH_2$ ,  $-N[CH_2C(=O)NH_2]_2$ ,  $-NHCH[C(=O)NH_2]_2$ ,



$-NH(CH_2)_2NHC(=O)NH_2$ , и .

15

Термин "алкил" обозначает насыщенную углеводородную цепь, которая может быть линейной, разветвленной или циклической, или цикл-содержащей.

Термин "алкенил" обозначает углеводородную цепь, содержащую по меньшей мере одну двойную связь между атомами углерода. Углеводородная цепь может быть линейной, разветвленной или циклической, или цикл-содержащей.

20

Термин "алкинил" означает углеводородную цепь, содержащую по меньшей мере одну тройную связь между атомами углерода и необязательно дополнительно одну или более двойных связей между атомами углерода. Углеводородная цепь может быть линейной, разветвленной или циклической, или цикл-содержащей.

25

Термин "алкиленовая цепь" обозначает насыщенную углеводородную цепь, которая может быть линейной, разветвленной, циклической или цикл-содержащей, но предпочтительно линейной. Эта цепь имеет две валентности, т. е. она связывает как линкер или мостик через двойную связь.

30

Если молекула общей формулы I имеет положительный заряд, то соединение включает в себя противоион, который может быть фармацевтически приемлемым анионом органической или неорганической кислоты, с образованием фармацевтически приемлемой соли. Такой анион

может быть выбран, например, из группы, состоящей из ацетата, аспартата, бензолсульфоната, бензоата, безилата, бикарбоната, битартрата, бромиды, камсилата, карбоната, хлорида, цитрата, деканоата, эдетата, эзилата, фумарата, глюцептата, глюконата, глутамата, гликолята, гексаноата, йодида, лактата, малата, малеата, манделата, мезилата, метансульфата, напсилата, нитрата, октаноата, олеата, пальмоата, пантотената, фосфата, полигалактуроната, пропионата, салицилата, стеарата, сукцината, сульфата, тартрата и тозилата.

Когда соединение формулы I содержит хиральные центры, формула I включает чистые энантиомеры, а также смеси энантиомеров, включая рацемат.

Формула I включает соединения формулы I в свободной форме, а также в виде солей, солей присоединения (кислот или оснований) и/или сольваты, включая гидраты или спиртовые сольваты.

Линкер X в формуле I образуется в результате реакции присоединения аминных группировок молекулы к центральному алмазановому ядру. Следовательно, линкеры могут быть разные в зависимости от выбранной реакции, например, образование эфира, амида и их аналогов, клик-реакция (например, азидо-алкиновое циклоприсоединение) и т. п. Таким образом, X выбирают из группы, состоящей из C(=O)NH-, C(=O)O-, C(=S)O-, C(=O)S-, C(=S)S-, C(=O)NHNH-, CH<sub>2</sub>-, -O-, -OC(=O)-, -S-, -SC(=O)-, -NH-, -NHNH-, -NHC(=O)-, -NHNHC(=O)-, C≡C-, -CH=CH-, пятичленного гетероцикла, содержащего не менее 2 атомов азота, -CH<sub>2</sub>C(=O)NH-, -CH<sub>2</sub>C(=O)O-, -CH<sub>2</sub>C(=S)O-, -CH<sub>2</sub>C(=S)S-, -CH<sub>2</sub>C(=O)NHNH-, -N=CH- и -CH=N-. Предпочтительно X выбирают из C(=O)NH-, пятичленного гетероцикла, содержащего не менее 2 атомов азота и C(=O)O-.

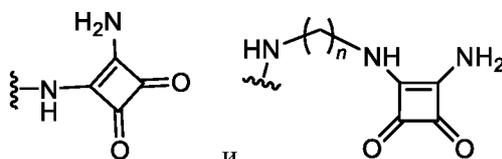
Линкер Y представляет собой алкиленовую цепь, обеспечивающую по меньшей мере минимальное расстояние между амином в составе линкера X и алмазановым ядром. Y представляет собой алкиленовую цепь C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, предпочтительно алкиленовую цепь C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, при этом в указанной алкиленовой цепи одна или две -CH<sub>2</sub>- группы могут быть необязательно заменены на один или несколько атомов O или S.

Заместитель Z может в небольшой степени дополнительно изменять свойства соединения формулы I.

Предпочтительно Z представляет собой атом водорода или -C(=O)R<sup>1</sup>. Группировка -C(=O)R<sup>1</sup> обычно образуется в результате реакции молекулы с аминными концевыми группами с

центральным адамантовым ядром, несущим карбоксильно-кислотную группу. R<sup>1</sup> выбирают из группы, состоящей из -NH<sub>2</sub>, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH, -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH]<sub>2</sub>, -NHCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>,

-NHCH<sub>2</sub>CH(-OH)CH<sub>2</sub>OH, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>, -N[CH<sub>2</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, -NHCH[C(=O)NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>,



-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(=O)NH<sub>2</sub>,

, и

, где *n* представляет собой

5 целое число, находящееся в диапазоне от 2 до 5.

Предпочтительно R<sup>1</sup> выбирают из -NH<sub>2</sub>, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, -NHCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>.

10 Цепи R могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга, предпочтительно они являются одинаковыми, или все атомы азота замещены одинаково (двумя одинаковыми R или двумя разными R) для простоты синтеза. Заместители R представляют собой жирные цепи, и их выбирают из группы, состоящей из C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкила, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкенила и C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкинила, при этом в указанном алкиле, алкениле или алкиниле одна или более -CH<sub>2</sub>- групп могут быть  
15 необязательно заменены на одну или несколько групп, выбранных из -CH(OH)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -SS-, -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -O- и -S-. Заместители R предпочтительно выбирают из группы, состоящей из C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкила, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкенила и C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкинила, при этом в указанных алкиле, алкениле или алкиниле одна или несколько -CH<sub>2</sub>- групп могут быть необязательно заменены на одну или несколько групп, выбранных из -CH(OH)-, -OC(=O)- и -C(=O)O-.

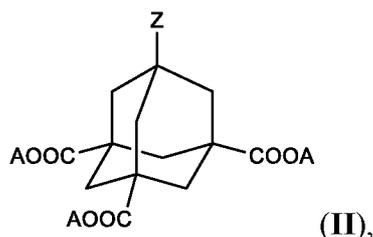
20 Предпочтительно R выбирают из C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> алкила, C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> алкила, в котором -CH<sub>2</sub>- группа заменена на -CH(OH)- или -C(=O)O-, C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> алкенила с одной или двумя или тремя двойными связями, C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> алкенила с одной или двумя или тремя двойными связями, в котором -CH<sub>2</sub>- группа заменена на -C(=O)O- или -CH(OH)-.

25 Соединения формулы I получают соответствующей реакцией предшественника адамантана, замещенного группой Z в положении 7, и групп-предшественников линкера X в положениях 1, 3, 5 с амином общей формулы X'-Y-NR<sub>2</sub>, где X представляет собой группу-предшественник линкера X. Амин может быть получен с помощью реакций и процедур, известных специалистам в данной области, и подходящие амины также коммерчески доступны.

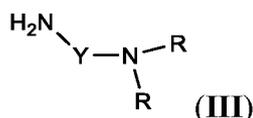
30

В более конкретном примере осуществления изобретения соединения формулы I предпочтительно получают

путем реакции соединения формулы II



где А представляет собой водород, с диамином формулы III



в присутствии конденсирующего агента и основания, или

- 5 путем реакции соединения общей формулы II, в котором А представляет собой галоген, с диамином общей формулы III в присутствии основания.

В формулах II и III Z, Y и R являются такими, как описано выше.

- Настоящее изобретение также относится к трансфекционному агенту, содержащему по  
 10 меньшей мере один липидоид общей формулы I и по меньшей мере один хелперный липид. Трансфекционный агент может быть получен путем объединения компонентов. Трансфекционный агент в виде раствора может быть получен путем растворения и смешивания компонентов. Трансфекционный агент в твердой форме (в форме частиц, предпочтительно в  
 15 форме наночастиц) может быть получен с помощью методов, используемых в традиционной технологии получения наночастиц, например, путем микрофлюидного перемешивания. Трансфекционные частицы обычно представляют собой наночастицы, под которыми в целом понимают частицы размером от 1 до 500 нм. Размеры трансфекционных наночастиц обычно  
 находятся в диапазоне от 30 до 250 нм, более предпочтительно от 40 до 150 нм.

- Предпочтительно трансфекционный агент содержит по меньшей мере один липидоид общей  
 20 формулы I в количестве от 10 до 50 мол. % и по меньшей мере один хелперный липид в количестве от 50 до 90 мол. %. Предпочтительно трансфекционный агент содержит по меньшей мере один липидоид общей формулы I в количестве от 15 до 30 мол. % и по меньшей мере один хелперный липид в количестве от 70 до 85 мол. %. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления трансфекционный агент содержит по меньшей мере один липидоид общей  
 25 формулы I в количестве от 15 до 30 мол. %, холестерин в количестве от 30 до 55 мол. % и по меньшей мере один другой хелперный липид в количестве от 20 до 50 мол. %.

- В особенно предпочтительном варианте осуществления трансфекционный агент содержит по  
 30 меньшей мере один липидоид общей формулы I в количестве от 15 до 30 мол. %, холестерин в количестве от 30 до 55 мол. %, 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин в количестве от 20

до 45 мол. % и 1,2-димиристоил-*rac*-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 в количестве от 0,5 до 5 мол. %.

Настоящее изобретение также относится к трансфекционной частице, содержащей по меньшей мере один липидоид формулы I, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту и/или ее часть и/или производное нуклеиновой кислоты и предпочтительно также по меньшей мере один хелперный липид. Трансфекционные частицы могут быть получены, например, путем смешивания раствора липидоида общей формулы I, который может необязательно содержать хелперные липиды, с раствором нуклеиновой кислоты и/или ее части и/или производного нуклеиновой кислоты. Перемешивание может быть осуществлено с помощью методов, используемых в традиционной технологии получения наночастиц, например, микрофлюидного перемешивания.

Массовое соотношение общего количества нуклеиновой кислоты и/или ее части и/или производного нуклеиновой кислоты к общему количеству липидоида общей формулы I и хелперных липидов в трансфекционной частице предпочтительно находится в диапазоне от 1:2 до 1:500, более предпочтительно от 1:5 до 1:100. В частности, в качестве иллюстративного примера: в частицах, полученных в примерах, приведенных ниже в настоящем документе, это соотношение составляло примерно 1:9 для мРНК и примерно 1:68 для миРНК.

Трансфекционные частицы обычно представляют собой наночастицы, под которыми обычно понимают частицы с размерами в диапазоне от 1 до 500 нм. Как правило, размеры трансфекционных наночастиц находятся в диапазоне от 30 до 250 нм, предпочтительно от 40 до 200 нм, более предпочтительно от 40 до 150 нм.

Структуру трансфекционных частиц наблюдали с помощью криогенной просвечивающей электронной микроскопии, и наблюдение показало, что трансфекционные частицы представляли собой компактные слоистые липидные наночастицы, содержащие в своем составе нуклеиновую кислоту (или ее часть или производное).

Хелперные липиды в реагентах для трансфекции и трансфекционных частицах в основном представляют собой нейтральные липиды, стеринны или липидные конъюгаты с гидрофильными полимерами.

Нейтральные липиды имеют суммарный нулевой заряд при физиологических значениях pH, и они могут существовать в незаряженной форме или электронейтральной цвиттерионной форме при физиологических значениях pH, такие как 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-

фосфохолин (DSPC), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DMPC) и 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-(цианин 5).

Стерины могут быть выбраны из, например, холестерина,  $\beta$ -ситостерина, стигмастана, кампестерола, фукостерола, авенастерола, фекостерола, брассикастерина, эргостерола и 9,11-дегидроэргостерола. Предпочтительно стерин представляет собой холестерин.

Липидные конъюгаты с гидрофильными полимерами состоят из липидной части и полимерной части, такой как поли(этиленгликоль), поли(2-этил-2-оксазолин), поли(2-метил-2-оксазолин), поли(глицерин), поли(*N*-(2-гидроксипропил)метакриламид), поли(саркозин) или гликольхитозан. Предпочтительно полимерная часть состоит из поли(этиленгликоля) с

молекулярной массой, которая может быть в диапазоне от примерно 500 до примерно 10000 Да, более предпочтительно от примерно 1000 до примерно 5000 Да. Липидные конъюгаты с

гидрофильными полимерами могут быть выбраны, например, из 1,2-димиристоил-*rac*-глицеро-3-метоксиполи(этиленгликоля)-2000, 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-

поли(этиленгликоля)-2000, 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-

поли(этиленгликоля)-2000, 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-

поли(этиленгликоля)-2000 и тому подобных. Липидные конъюгаты с гидрофильными полимерами могут предпочтительно представлять собой 1,2-димиристоил-*rac*-глицеро-3-метоксиполи(этиленгликоль)-2000.

Нуклеиновая кислота или ее часть представляют собой группировки, содержащие один или более нуклеотидов и/или дезоксинуклеотидов. Нуклеиновая кислота или ее часть могут представлять собой терапевтическое, диагностическое или профилактическое средство или могут обеспечивать маркировку клеток или тканей, в которые они трансфицируются. Таким образом, соединения формулы I имеют преимущественно терапевтическое или биотехнологическое применение.

Под термином "нуклеиновая кислота или ее часть" понимаются нуклеиновые кислоты или их сегменты, выбранные предпочтительно из олигонуклеотидов (1-100 нуклеотидов, например,

аптамеры), циклических динуклеотидов (например, 2',3'-cGAMP), антисмысловых

олигонуклеотидов, дезоксирибонуклеиновой кислоты (одноцепочечная ДНК, двухцепочечная ДНК, кДНК, плазмидная ДНК, кодирующая ген или гены), рибонуклеиновой кислоты, обычно

мессенджерной РНК (мРНК), транспортной РНК (тРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК), двухцепочечной РНК, микро РНК (микроРНК), пивиРНК (пиРНК), антисмысловой РНК (асРНК), гидовой РНК (гРНК) для системы CRISPR и их комбинации (обычно, например,

гРНК и мРНК, кодирующие нуклеазу Cas9, Cas13a/C2c2 и Cas13b, или аналогичные нуклеазы,

подходящие для использования в CRISPR, CRISPRi и других вариациях и последующей

модификации генома клетки-хозяина или ткани или модификации транскриптома клетки-хозяина или ткани). Кроме того, все раскрытые в настоящем документе нуклеиновые кислоты (НК) могут состоять из синтетических аналогов оснований или быть модифицированы ими, например, для повышения их стабильности в биологических системах. Синтетические аналоги нуклеиновых кислот включают, в частности, следующие заместители: фосфорилирование на 5'-и/или 3'-конце цепи, 5-метилцитидин-5'-трифосфат, N<sup>1</sup>-метилпсевдоуридин-5'-трифосфат, P<sup>1</sup>-(5'-(3'-О-метил)-7-метил-гуанозил)-P<sup>3</sup>-(5'-(гуанозил))трифосфат, P<sup>1</sup>-(гуанозил) P<sup>3</sup>-(5'-(гуанозил))трифосфат, P<sup>1</sup>-(5'-7-метил-гуанозил) P<sup>3</sup>-(5'-(гуанозил))трифосфат, P<sup>1</sup>-(5'-2,2,7-триметил-гуанозил) P<sup>3</sup>-(5'-(гуанозил))трифосфат, N<sup>6</sup>-метиладенозин-5'-трифосфат, 2-тиоуридин-5'-трифосфат, псевдоуридин-5'-трифосфат, 5-метоксиуридин-5'-трифосфат, N<sup>1</sup>-метиладенозин-5'-трифосфат, N<sup>4</sup>-ацетилцитидин-5'-трифосфат, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил, 2'-фтор, метиленовый мостик, соединяющий 2'-кислород и 4'-углерод пентозного кольца (так называемая замкнутая нуклеиновая кислота), боранофосфонаты или фосфоротиоаты.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает применение липидоидов формулы I или трансфекционных агентов или трансфекционных частиц для трансфекции клеток или тканей нуклеиновой кислотой и/или ее частью и/или производным нуклеиновой кислоты *in vitro*. Кроме того, настоящее изобретение охватывает липидоиды формулы I или трансфекционные частицы для применения при трансфекции клеток или тканей нуклеиновой кислотой и/или ее частью и/или производным нуклеиновой кислоты *in vivo* (за исключением трансфекции человеческих эмбрионов для промышленного или коммерческого использования и за исключением модификации зародышевой линии человека).

Трансфекционные частицы, содержащие липидоиды общей формулы I, полезны в ряде биологических приложений в фундаментальных исследованиях, особенно для трансфекции клеточных культур или животных для доставки активной нуклеиновой кислоты и последующего подавления экспрессии или активации хромосомного гена или генов, редактирования генома (вырезание гена, вставка гена или введение мутации) или редактирования транскриптома, или для обеспечения экспрессии данного белка, кодируемого нуклеиновой кислотой, вставленной с помощью трансфекционной частицы "*in trans*".

В ветеринарной и клинической медицине трансфекционные частицы, содержащие липидоиды общей формулы I, предпочтительно могут быть использованы в терапевтических или профилактических целях. Частицы, содержащие терапевтическую нуклеиновую кислоту, можно вводить животному или человеку для подавления или активации хромосомного(-ых) гена(-ов), подавления или активации иммуногенов, ингибирования или активации сигнальных

путей, редактирования генома (вырезание гена, вставка гена или введение мутации) или транскриптома или для обеспечения экспрессии белка(-ов), кодируемого(-ых) нуклеиновой кислотой.

- 5 В настоящем изобретении также предложены липидоиды общей формулы I или трансфекционные агенты или трансфекционные частицы для использования в качестве лекарственных средств, в частности для генной терапии. В частности, они пригодны для применения при лечении злокачественных новообразований и/или генетических нарушений.
- 10 Липидоиды общей формулы I или трансфекционные частицы могут быть изготовлены для терапевтического, косметического или биотехнологического применения в виде препаратов с фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Составы могут быть в жидкой или твердой форме, или в других формах, таких как аэрозоль. Жидкие формы включают растворы, суспензии, дисперсии, приспособленные, *например*, для инъекций или перорального введения.
- 15 Твердые лекарственные формы включают, например, капсулы, таблетки, таблетки, покрытые оболочкой, порошки, суппозитории и другие формы.
- Жидкие лекарственные формы могут быть распылены. Распыляемые суспензии можно вдыхать непосредственно из распыляющего устройства, или распыляющее устройство можно присоединять к тампонированным дыхательным маскам или к дыхательному устройству
- 20 периодического действия с положительным давлением.
- Твердые лекарственные формы также могут быть введены путем ингаляции с использованием ингаляторов сухого порошка. Лекарственные формы в виде суспензий или сухих порошков можно вводить перорально или назально из устройств, которые доставляют фармацевтическую композицию подходящим способом.
- 25 Для доставки активного вещества на кожу или слизистые оболочки трансфекционные частицы с активным веществом также могут быть составлены в виде крема, геля, мази, пасты, бальзама, жидкости. Эти формы для наружного применения могут быть применены непосредственно на месте приложения действия.
- 30 Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают растворители, агенты, регулирующие растворимость, агенты, регулирующие pH, носители, наполнители, связующие, вещества, обеспечивающие скольжение, разрыхлители, консерванты, сорбенты, агенты, регулирующие вязкость, агенты, влияющие на органолептические свойства, такие как вкус, запах или цвет лекарственной формы.

Кроме того, липидоиды общей формулы I или трансфекционные агенты или трансфекционные частицы предпочтительно могут быть использованы для целей косметической промышленности для доставки активного вещества к месту приложения действия. Трансфекционные частицы с активным веществом могут быть составлены в виде крема, геля, мази, пасты, бальзама, жидкости и т.п. и использованы в качестве макияжа, косметики для волос или средства личной гигиены.

#### Краткое описание чертежей

- Фиг. 1. Схема синтеза липидоидов **4a-g**.
- 10 Фиг. 2. Схема синтеза липидоида **9**.
- Фиг. 3. Схема синтеза липидоида **13**.
- Фиг. 4. Схема синтеза соединения **19**, предшественника липидоида **21**.
- Фиг. 5. Схема синтеза липидоида **21**.
- Фиг. 6. Схема синтеза соединения **22** и его ацилхлорида, предшественников липидоидов **23-25**.
- 15 Фиг. 7. Схема синтеза липидоидов **23-25**.
- Фиг. 8. Схема синтеза липидоидов **29a-f**
- Фиг. 9. Схема синтеза липидоидов **31a-d**.
- Фиг. 10. Проверка функциональной доставки мРНК-ЛНЧ (**B39**) в печень мыши.

#### 20 Примеры

##### Список сокращений:

экв.	эквивалент
$R_f$	фактор удерживания
25 ТСХ	тонкослойная хроматография
РВИ	роторный вакуумный испаритель
кт	комнатная температура
уш. с.	уширенный сигнал
с	синглет
30 д	дублет
м	мультиплет
дд	двойной дублет
$J$	константа взаимодействия
$\delta$	химический сдвиг
35 МСВР	масс-спектрометрия высокого разрешения
ESI	ионизация электрораспылением

	МАЛДИ	матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
	ИК	инфракрасная спектроскопия
	ЯМР	ядерный магнитный резонанс
	CE5	смесь циклогексан-этилацетат 95:5 (об/об)
5	CE20	смесь циклогексан-этилацетат 80:20 (об/об)
	CE50	смесь циклогексан-этилацетат 50:50 (об/об)
	D1	дихлорметан-метанол-NH <sub>3</sub> водный 25% 75::3 (об/об/об)
	D2	дихлорметан-метанол-NH <sub>3</sub> водный 25% 175:22:3 (об/об/об)
	D3	дихлорметан-метанол-NH <sub>3</sub> водный 25% 275:22:3 (об/об/об)
10	D4	дихлорметан-метанол-NH <sub>3</sub> водный 25% 375:22:3 (об/об/об)
	TFA	трифторуксусная кислота
	НСТU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -6-хлорбензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат
	DIPEA	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин
15	ДМФА	<i>N,N</i> -диметилформамид
	ДХМ	дихлорметан
	АСN	ацетонитрил
	TBDPSCI	<i>tert</i> -бутилдифенилхлорсилан
	DIC	диизопропилкарбодиимид
20	DMAP	4-диметиламинопиридин
	ЛНЧ	липидные наночастицы
	НК	нуклеиновая кислота
	ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
	РНК	рибонуклеиновая кислота
25	мРНК	мессенджерная РНК
	миРНК	малая интерферирующая РНК
	тРНК	транспортная РНК
	микроРНК	микро РНК
	оцДНК/РНК	одноцепочечная ДНК/РНК
30	дцДНК/РНК	двухцепочечная ДНК/РНК
	DMG-PEG <sub>2000</sub>	1,2-димиристоил- <i>rac</i> -глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000
	DOPE	1,2-диолеоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфоэтаноламин
	DOPC	1,2-диолеоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин
	DSPC	1,2-дистеароил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин
35	DOPE-Cy5	1,2-диолеоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфоэтаноламин- <i>N</i> -(цианин 5)
	Lip2000	Lipofectamine <sup>®</sup> 2000 (Invitrogen)

Пример 1

5

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Дидодецилэтан-1,2-диамин **3a****

Круглодонную колбу объемом 500 мл, снабженную хлоркальциевым колпачком и магнитной мешалкой, заполняли раствором амина **1a** (5,00 г, 31,2 ммоль) в ДХМ (100 мл) и охлаждали до 0°С на ледяной бане. При интенсивном перемешивании добавляли *n*-додециловый альдегид (20,8 мл, 93,6 ммоль, 3 экв.), после чего добавляли триацетоксиборогидрид натрия (19,8 г, 93,6 ммоль, 3 экв.) тремя порциями в течение 10 минут. Охлаждающую ванну удаляли и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Ход реакции контролировали методом ТСХ с использованием подвижной фазы гексан-этилацетат в соотношении 80:20 (об/об) на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком (детекция с помощью нингидрина). После завершения реакции добавляли водный раствор NaOH (1 М, 200 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 15 мин, затем переливали в делительную воронку и разбавляли водой (300 мл). Продукт экстрагировали с помощью ДХМ (300 мл, 2x50 мл), объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Темный маслянистый остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента этилацетат в гексане (от 10 до 30 %). Амин **2a** (5,12 г, 33,0 %) получали в виде желтоватого масла.

Добавляли трифторуксусную кислоту (10 мл) к раствору соединения **2a** (5,12 г) в ДХМ (10 мл), охлаждали до 0°С при перемешивании на ледяной бане, и оставляли реакционную смесь при 0°С на 3 ч. Затем раствор переносили в делительную колбу объемом 1 л, разбавляли 20%-ным водным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 мл) и экстрагировали продукт с помощью ДХМ (250 мл, 2 x 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (100 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента D1 в ДХМ (от 0 до 70 %). Диамин **3a** (2,55 г, 62,4 %; *R*<sub>f</sub> 0,46 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция при помощи нингидрина) получали в виде желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,895, 2,64, 2,48, 1,45, 1,28, 1,26, 1,24–1,28, 1,24, 0,87 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 54,31, 53,85, 38,33, 31,90, 29,65, 29,62, 29,61, 29,52, 29,34, 26,36, 23,88, 22,67, 14,10 м.д. ИК-спектр (пленка): ν<sub>max</sub>/см<sup>-1</sup> = 3371 сл. и 3315 сл. (ν

35

$\text{NH}_2$ ), 2801 *ср.* ( $\nu_s \text{N-CH}_2$ ), 2953 *сил.* ( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_3$ ), 2924 *vs* ( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_2$ ), 2853 *сил.* ( $\nu_s \text{CH}_2$ ), 1467 *ср.* и 1457 *ср.*, *ос.* ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{ас}} \text{CH}_3$ ), 1378 *сл.* и 1367 *сл.* ( $\delta_s \text{CH}_3$ ), 721 *ср.* ( $\beta_{\text{ас}} \text{CH}_2$ ). **МСВР** (ESI): *m/z* рассчитано для  $\text{C}_{26}\text{H}_{57}\text{N}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 397,45163; найдено 397,45093.

#### 5 $N^1, N^3, N^5$ -Трис(2-(дидодециламино)этил)-адамантан-1,3,5-трикарбоксамид **4a**

*O*-(1*H*-6-хлорбензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат (НСТU, 256 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.) и *N,N*-диизопропилэтиламин (DIPEA, 0,415 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) добавляли к раствору адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (40 мг, 0,149 ммоль) в безводном ДМФА (1,5 мл) и перемешивали раствор в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор  $N^1, N^1$ -дидодецилэтан-1,2-диамина **3a** (237 мг, 0,149 ммоль, 4 экв.) в ДХМ (1,0 мл) и перемешивали реакционную смесь в течение 12 ч. Раствор переносили в делительную колбу объемом 250 мл, разбавляли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл) и экстрагировали продукт с помощью ДХМ (50 мл, 2 x 20 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента D1 в ДХМ (от 20 до 50 %). Липидоид **4a** (71 мг, 33,9 %;  $R_f$  0,73 в D2 в подвижной фазе D2 на планшете ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла. <sup>1</sup>**H ЯМР-спектр** (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,33, 3,56, 3,32, 3,125, 3,075, 2,34, 2,01, 1,91, 1,79, 1,67, 1,36, 1,285, 1,26–1,32, 1,25, 0,88 м.д. <sup>13</sup>**C ЯМР-спектр** (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 180,48, 56,72, 53,78, 41,38, 39,04, 36,86, 36,29, 31,90, 29,64, 29,62, 29,50, 29,40, 29,35, 29,04, 27,79, 26,36, 23,88, 22,68, 14,10 м.д. **ИК-спектр** ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{см}^{-1}$  = 3440 *сл.* и 3322 *сл.* ( $\nu \text{NH}$ ), 1653 *сл.* (амид I) и 1623 *сл.* (амид I связанный), 1535 *сл.* (амид II), 2956 *ср.* ( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_3$ ), 2927 *vs* ( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_2$ ), 2855 *ср.* ( $\nu_s \text{CH}_2$ ), 1467 *сл.* и 1457 *сл.* ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{ас}} \text{CH}_3$ ), 1378 *сл.* ( $\delta_s \text{CH}_3$ ). **МСВР** (MALDI): *m/z* рассчитано для  $\text{C}_{91}\text{H}_{179}\text{N}_6\text{O}_3$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 1404,4033; найдено 1404,4012.

#### Пример 2

#### $N^1, N^1$ -Дидодецилпропан-1,3-диамин **3b**

Амин **2b** получали из амина **1b** (6,0 г, 34,43 ммоль), *n*-додецилового альдегида (22,91 мл, 103,30 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (21,89 г, 103,30 ммоль, 3 экв.) согласно методике, описанной для соединения **2a** в примере 1. Амин **2b** получали в виде желтоватого масла (7,72 г, 43,9 %).

Снятие защиты с амина **2b** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **3b** (4,26 г, 68,6 %;  $R_f$  0,28 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция при помощи нингидрина) получали в виде

желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3,07, 2,70, 2,50, 1,81, 1,46, 1,28, 1,26, 1,25-1,29, 1,24, 0,87$  м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 53,70, 53,30, 41,18, 31,90, 29,64, 29,62, 29,60, 29,58, 29,48, 29,33, 27,42, 25,71, 23,87, 22,67, 14,10$  м.д. ИК-спектр (пленка):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3361$  сл. и  $3274$  сл. ( $\nu \text{NH}_2$ ),  $2803$  ср. ( $\nu_s \text{N-CH}_2$ ),  $2954$  сил. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ),  $2924$  vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ),  $2853$  сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ),  $1467$  ср. и  $1456$  ср., ос. ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ),  $1378$  сл. и  $1364$  сл. ( $\delta_s \text{CH}_3$ ),  $720$  ср. ( $\beta_{\text{as}} \text{CH}_2$ ). МСВР (ESI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{27}\text{H}_{59}\text{N}_2$   $[\text{M} + \text{H}]^+$   $411,46728$ ; найдено  $411,46652$ .

### $N^1, N^3, N^5$ -трис(3-(дидодециламино)пропил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид **4b**

Липидоид **4b** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (20 мг, 0,075 ммоль), НСТУ (128 мг, 0,298 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,208 мл, 1,19 ммоль, 16 экв.) и диамина **3b** (123 мг, 0,298 ммоль, 4 экв.) в соответствии с методикой, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **4b** (64 мг, 59,3 %;  $R_f$  0,51 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого масла желтого цвета.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,59, 3,36, 2,99, 2,88, 2,31, 2,13, 2,00, 1,96, 1,81, 1,67, 1,31, 1,28, 1,25-1,30, 1,24, 0,87$  м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 177,39, 55,22, 50,70, 41,78, 40,38, 37,20, 35,67, 31,89, 29,60, 29,51, 29,48, 29,32, 29,19, 28,39, 26,94, 24,10, 23,68, 22,67, 14,10$  м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3466$  сл. и  $3287$  сл. ( $\nu \text{NH}$ ),  $1656$  ср. (амид I) и  $1511$  ср. (амид II),  $2814$  сл. ( $\nu_s \text{CH}_2\text{NR}_2$ ),  $2954$  сил. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ),  $2927$  vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ),  $2871$  ср. ( $\nu_s \text{CH}_3$ ),  $2855$  сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ),  $1468$  ср. и  $1456$  ср. ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ),  $1378$  сл. ( $\delta_s \text{CH}_3$ ),  $721$  сл. ( $\beta_{\text{as}} \text{CH}_2$ ). МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{94}\text{H}_{185}\text{O}_3\text{N}_6$   $[\text{M} + \text{H}]^+$   $1446,45027$ ; найдено  $1446,44896$ .

### Пример 3

#### $N^1, N^1$ -Дидодецилбутан-1,4-диамин **3c**

Амин **2c** получали из амина **1c** (5,0 г, 26,56 ммоль), *n*-додецилового альдегида (17,67 мл, 79,67 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (16,89 г, 79,67 ммоль, 3 экв.) в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1. Амин **2c** получали в виде желтоватого масла (4,15 г, 29,8 %).

Снятие защиты с амина **2c** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **3c** (2,36 г, 70,3 %;  $R_f$  0,29 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция при помощи нингидрина) получали в виде желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2,85, 2,81, 2,59, 1,725, 1,68, 1,51, 1,28, 1,265, 1,25-1,30, 1,24, 0,87$  м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 53,33, 52,74, 40,44, 31,90, 29,64, 29,60, 29,60, 29,40, 29,33, 28,65, 27,46, 24,83, 24,40, 22,67, 14,10$  м.д. ИК-спектр (пленка):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3370$  сл. и  $3274$  сл. ( $\nu \text{NH}_2$ ),  $2798$  ср. ( $\nu_s \text{N-CH}_2$ ),  $2957$  сил. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ),  $2924$  vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ),  $2853$  сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ),  $1467$  ср. и  $1456$  ср., ос. ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ),  $1378$  сл. и  $1367$  сл.

( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>), 720 ср. ( $\beta_{as}$  CH<sub>2</sub>). **МСВР** (ESI):  $m/z$  рассчитано для C<sub>28</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 425,48293; найдено 425,48227.

**N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>5</sup>-трис(4-(дидодециламино)бутил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 4с**

- 5 Липидоид **4с** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (40 мг, 0,149 ммоль), НСТУ (256 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,416 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) и диамина **3с** (253 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.) согласно методике, описанной для соединения **4а** в примере 1; липидоид **4с** (64 мг, 28,8 %;  $R_f$  0,48 в подвижной фазе D2 на планшете ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла. <sup>1</sup>H
- 10 **ЯМР-спектр** (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,27, 3,335, 3,03, 2,98, 2,28, 2,12, 2,06, 1,875, 1,81, 1,74, 1,64, 1,33, 1,28, 1,25–1,29, 1,24, 0,87 м.д. <sup>13</sup>C **ЯМР-спектр** (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 177,27, 52,78, 52,27, 41,83, 40,26, 37,36, 37,20, 31,88, 29,58, 29,49, 29,43, 29,31, 29,10, 28,37, 26,82, 26,56, 22,94, 22,66, 20,79, 14,10 м.д. **ИК-спектр** (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{max}/cm^{-1}$  = 3441 сл. и 3329 сл. ( $\nu$  NH), 1641 ср. (амид I), 1534 сл. (амид II), 2956 ср. ( $\nu_{as}$  CH<sub>3</sub>), 2927 vs ( $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>), 2855 ср. ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>), 1466 ср. и 1458 ср. ( $\beta_s$
- 15 CH<sub>2</sub> и  $\delta_{as}$  CH<sub>3</sub>), 1378 сл. ( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>). **МСВР** (MALDI):  $m/z$  рассчитано для C<sub>97</sub>H<sub>191</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1488,4972; найдено 1488,4956.

Пример 4

**N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-Дидодецилпентан-1,5-диамин 3d**

- 20 Амин **2d** получали из амина **1d** (5,0 г, 24,72 ммоль), н-додецилового альдегида (16,45 мл, 74,15 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (15,71 г, 74,15 ммоль, 3 экв.) согласно методике, описанной для соединения **2а** в примере 1. Амин **2d** получали в виде желтоватого масла (6,01 г, 45,1 %).

- Снятие защиты с амина **2d** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения
- 25 **2а** в примере 1; диамин **3d** (4,32 г, 88,3 %;  $R_f$  0,28 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция при помощи нингидрина) получали в виде желтоватого масла. <sup>1</sup>H **ЯМР-спектр** (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2,75, 2,68, 2,55, 1,565, 1,53, 1,50, 1,35, 1,28, 1,27, 1,24–1,28, 1,24, 0,87 м.д. <sup>13</sup>C **ЯМР-спектр** (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 53,61, 53,55, 41,48, 32,10, 31,89, 29,63, 29,61, 29,58, 29,45, 29,32, 27,41, 25,74, 24,90, 24,55, 22,66, 14,09 м.д.
- 30 **ИК-спектр** (пленка):  $\nu_{max}/cm^{-1}$  = 3367 сл. и 3284 сл. ( $\nu$  NH<sub>2</sub>), 2797 ср. ( $\nu_s$  N-CH<sub>2</sub>), 2956 сил. ( $\nu_{as}$  CH<sub>3</sub>), 2924 vs ( $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>), 2853 сил. ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>), 1467 ср. и 1456 ср., ос. ( $\beta_s$  CH<sub>2</sub> и  $\delta_{as}$  CH<sub>3</sub>), 1378 сл. и 1367 сл. ( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>), 720 ср. ( $\beta_{as}$  CH<sub>2</sub>). **МСВР** (ESI):  $m/z$  рассчитано для C<sub>29</sub>H<sub>63</sub>N<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 439,49858; найдено 439,49783.

- 35 **N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>5</sup>-Трис(5-(дидодециламино)пентил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 4d**

Липидоид **4d** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (40 мг, 0,149 ммоль), НСТУ (256 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,416 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) и диамина **3d** (262 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.) согласно методике, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **4d** (74 мг, 32,4 %;  $R_f$  0,49 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,91, 3,27, 2,99, 2,29, 2,09, 1,97, 1,82, 1,81, 1,76, 1,59, 1,45, 1,34, 1,28, 1,25–1,30, 1,24, 0,87 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 177,01, 52,77, 52,30, 41,82, 40,10, 38,33, 37,59, 31,88, 29,58, 29,48, 29,43, 29,30, 29,09, 28,53, 28,39, 26,84, 23,83, 23,09, 23,02, 22,66, 14,10 м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3322 сл. ( $\nu$  NH), 1640 ср. (амид I), 1535 сл. (амид II), 2956 ср. ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 2927 vs ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_2$ ), 2855 ср. ( $\nu_s$   $\text{CH}_2$ ), 1467 ср. и 1457 ср. ( $\beta_s$   $\text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 1378 сл. ( $\delta_s$   $\text{CH}_3$ ), 722 ср. ( $\beta_{\text{as}}$   $\text{CH}_2$ ). МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{100}\text{H}_{197}\text{N}_6\text{O}_3$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  1530,5442; найдено 1530,5478.

#### Пример 5

##### 15 $N^1, N^1$ -Дидодецилгексан-1,6-диамин **3e**

Амин **2e** получали из амина **1e** (5,0 г, 23,11 ммоль), *n*-додецилового альдегида (15,38 мл, 69,34 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (14,70 г, 69,34 ммоль, 3 экв.) в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1. Амин **2e** получали в виде желтоватого масла (3,67 г, 28,7 %).

20 Снятие защиты с амина **2e** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **3e** (2,17 г, 72,2 %;  $R_f$  0,31 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция при помощи нингидрина) получали в виде желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2,73, 2,65, 2,57, 1,56, 1,52, 1,51, 1,36, 1,31, 1,28, 1,25–1,29, 1,24, 0,87 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 53,51, 53,20, 41,62, 32,40, 31,89, 29,63, 29,61, 29,57, 29,44, 29,32, 27,39, 27,09, 26,53, 25,65, 25,02, 22,66, 14,10 м.д. ИК-спектр (пленка):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3374 сл. и 3294 сл. ( $\nu$   $\text{NH}_2$ ), 2797 ср. ( $\nu_s$   $\text{N-CH}_2$ ), 2956 сил. ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 2924 vs ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_2$ ), 2853 сил. ( $\nu_s$   $\text{CH}_2$ ), 1467 ср. и 1455 ср., ос. ( $\beta_s$   $\text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 1378 сл. и 1367 сл. ( $\delta_s$   $\text{CH}_3$ ), 721 ср. ( $\beta_{\text{as}}$   $\text{CH}_2$ ). МСВР (ESI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{30}\text{H}_{65}\text{N}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  453,51423; найдено 453,51340.

30

##### $N^1, N^3, N^5$ -Трис(6-(дидодециламино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид **4e**

Липидоид **4e** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (40 мг, 0,149 ммоль), НСТУ (256 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,416 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) и диамина **3e** (270 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.) согласно методике, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **4e** (91 мг, 38,8 %;  $R_f$  0,52 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла.  $^1\text{H}$

35

**ЯМР-спектр** (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7,80, 3,33, 3,03, 2,99, 2,37, 2,27, 2,02, 1,92, 1,81, 1,76, 1,62, 1,43, 1,41, 1,34, 1,285, 1,26-1,30, 1,24, 0,88$  м.д. **<sup>13</sup>C ЯМР-спектр** (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 177,87, 52,87, 52,26, 41,74, 39,31, 36,86, 31,90, 29,60, 29,50, 29,44, 29,32, 29,10, 28,26, 26,82, 25,77, 25,52, 23,44, 23,14, 22,68, 14,12$  м.д. **ИК-спектр** (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{\max}/\text{см}^{-1} = 3463$  сл. и  $3327$  сл. ( $\nu$  NH),  $1641$  ср. (амид I),  $1535$  ср. (амид II),  $2958$  сил. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>),  $2871$  сил. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>),  $1467$  ср. и  $1457$  ср. ( $\beta_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub> и  $\delta_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>),  $2927$  сил. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>),  $2855$  сил. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>),  $1378$  сл. ( $\delta_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>),  $721$  сл. ( $\beta_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>),  $2799$  сл. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>). **МСВР** (MALDI):  $m/z$  рассчитано для C<sub>103</sub>H<sub>203</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1572,5911; найдено 1572,5881.

#### 10 Пример 6

##### **N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-Дидодецилгептан-1,7-диамин 3f**

Амин **2f** получали из амина **1f** (1,0 г, 4,34 ммоль), н-додецилового альдегида (3,14 мл, 13,02 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (2,76 г, 13,02 ммоль, 3 экв.) в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1. Амин **2f** получали в виде желтоватого масла (1,74 г, 70,6 %).

Снятие защиты с амина **2f** проводили в смеси TFA (4 мл) и ДХМ (4 мл) в соответствии с методикой, описанной для **2a** в примере 1; диамин **3f** (0,842 г, 59,1 %;  $R_f$  0,38 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, обнаружение с нингидрином) получали в виде желтоватого масла. **<sup>1</sup>H ЯМР-спектр** (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 2,73, 2,69, 2,64, 1,56, 1,50, 1,30, 1,28, 1,25-1,31, 1,25, 0,87$  м.д. **<sup>13</sup>C ЯМР-спектр** (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 53,37, 53,20, 41,62, 32,22, 31,89, 27,10-29,60, 26,57, 25,14, 22,66, 14,10$  м.д. **ИК-спектр** (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{\max}/\text{см}^{-1} = 3391$  всл. ( $\nu_{\text{as}}$  NH<sub>2</sub>);  $2960$  s, ос. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>);  $2927$  vs ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>);  $2872$  s, ос. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>);  $2855$  vs ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>);  $2798$  ср. ( $\nu_{\text{s}}$  N-CH<sub>2</sub>);  $1467$  сил. и  $1458$  ср. ( $\beta_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub> и  $\delta_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>);  $1378$  сл. ( $\delta_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>);  $1302$  сл. ( $\gamma_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>);  $721$  сл. ( $\beta_{\text{as}}$  и  $\gamma_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>). **МСВР** (ESI):  $m/z$  рассчитано для C<sub>31</sub>H<sub>67</sub>N<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 467,52988; найдено 467,52974.

##### **N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>5</sup>-Трис(7-(дидодециламино)гептил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 4f**

Липидоид **4f** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (40 мг, 0,149 ммоль), НСТУ (256 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,416 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) и диамина **3f** (278 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.) согласно методике, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **4f** (199 мг, 82,6 %;  $R_f$  0,55 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла. **<sup>1</sup>H ЯМР-спектр** (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7,97, 3,22, 3,09, 2,34, 1,92, 1,83, 1,82, 1,70, 1,58, 1,52, 1,36, 1,30, 1,285, 1,28, 1,25-1,32, 1,25, 0,88$  м.д. **<sup>13</sup>C ЯМР-спектр** (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 177,27, 54,00, 53,14, 41,59, 39,48, 39,30, 36,92, 31,89, 29,60, 29,48, 29,39, 29,32, 29,06, 28,22, 26,50, 25,58, 23,63, 23,38, 22,67, 14,10$  м.д. **ИК-спектр** (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{\max}/\text{см}^{-1} = 3438$  сл. (свободный) и  $3339, 3196$

сл. (связанный) ( $\nu$  NH); 1627 ср. (амид I); 1535 ср. (амид II); 2956 с, ос. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 2873 ср., ос. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>); 1468 ср. и 1457 ср., ос. ( $\beta_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub> и  $\delta_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 2927 vs ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>); 2856 сил. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>); 1378 сл. ( $\delta_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>); 722 сл. ( $\beta_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>); 2805 сл. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>). **МСВР** (MALDI):  $m/z$  рассчитано для C<sub>106</sub>H<sub>209</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1614,6381; найдено 1614,6414.

5

### Пример 7

#### *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Дидодецилоктан-1,8-диамин **3g**

10 Амин **2g** получали из амина **1g** (1,0 г, 4,09 ммоль), *n*-додецилового альдегида (2,96 мл, 12,28 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (2,60 г, 12,28 ммоль, 3 экв.) в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1. Амин **2g** получали в виде желтоватого масла (1,98 г, 83,1 %).

15 Снятие защиты с амина **2g** проводили в смеси TFA (4 мл) и ДХМ (4 мл) в соответствии с методикой, описанной для **2a** в примере 1; диамин **3g** (0,848 г, 52,0 %;  $R_f$  0,35 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция при помощи нингидрина) получали в виде желтоватого масла. **<sup>1</sup>H ЯМР-спектр** (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2,70, 2,63, 2,53, 1,51, 1,47, 1,32, 1,28, 1,25–1,32, 1,25, 0,87 м.д. **<sup>13</sup>C ЯМР-спектр** (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 53,61, 53,20, 41,92, 33,00, 31,90, 27,30–29,60, 26,70, 25,83, 22,67, 14,10 м.д. **ИК-спектр** (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3391 всл. ( $\nu_{\text{as}}$  NH<sub>2</sub>); 2960 с, ос. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 2927 vs ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>); 2872 с, ос. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>); 2855 vs ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>); 2799 ср. ( $\nu_{\text{s}}$  N-CH<sub>2</sub>); 1467 сил. и 1458 ср. ( $\beta_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub> и  $\delta_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 1378 сл. ( $\delta_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>); 1302 сл. ( $\gamma_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub>); 721 сл. ( $\beta_{\text{as}}$  и  $\gamma_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>). **МСВР** (ESI):  $m/z$  рассчитано для C<sub>32</sub>H<sub>69</sub>N<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 481,54553; найдено 481,54507.

#### 25 *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Трис(8-(дидодециламино)октил)адамantan-1,3,5-трикарбоксамид **4g**

Липидоид **4g** получали из адамantan-1,3,5-трикарбоновой кислоты (40 мг, 0,149 ммоль), НСТU (256 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,416 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) и диамина **3g** (286 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.) согласно методике, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **4g** (211 мг, 85,4 %;  $R_f$  0,60 в подвижной фазе D2 на планшете для ТСХ, предварительно насыщенном аммиаком, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла. **<sup>1</sup>H ЯМР-спектр** (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8,03, 3,21, 3,09, 3,07, 2,35, 1,985, 1,82, 1,815, 1,71, 1,51, 1,335, 1,33, 1,29, 1,28, 1,25–1,33, 1,25, 0,88 м.д. **<sup>13</sup>C ЯМР-спектр** (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 177,22, 54,04, 53,07, 41,56, 40,01, 39,08, 36,95, 31,89, 29,60, 29,49, 29,40, 29,32, 29,06, 28,45, 28,42, 28,30, 26,53, 26,13, 26,01, 23,88, 23,45, 22,67, 14,10 м.д. **ИК-спектр** (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3439 сл. (свободный) и 3341, 3196 сл. (связанный) ( $\nu$  NH); 1635, 1627 сл. (амид I); 1533 сл. (амид II); 2954 ср., ос. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 2873 ср., ос. ( $\nu_{\text{s}}$  CH<sub>3</sub>); 1467 ср. и 1457 сл., ос. ( $\beta_{\text{s}}$  CH<sub>2</sub> и  $\delta_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 2927 vs

35

( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_2$ ); 2856 сил. ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ ); 1378 сл. ( $\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$ ); 2810 всл., ос. ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2\text{NR}_2$ ). **МСВР:**  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{109}\text{H}_{215}\text{N}_6\text{O}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  1656,6856; найдено 1656,6882.

### Пример 8

#### 5 1,2-Эпоксидодекан 6

Н-хлорсукцинимид (NCS, 3,44 г, 25,77 ммоль, 0,95 экв.) и L-пролин (0,937 г, 8,14 ммоль, 0,30 экв.) добавляли к раствору н-додецилового альдегида (6,0 мл, 27,13 ммоль) в ацетонитриле (70 мл), охлаждали до 0°C на ледяной бане и перемешивали смесь при 0°C в течение 2 ч. Затем раствор разбавляли этанолом (40 мл), добавляли  $\text{NaBH}_4$  (2,57 г, 67,82 ммоль, 2,5 экв.) и перемешивали реакционную смесь при 0°C в течение 3,5 ч. Раствор перелили в делительную колбу объемом 1000 мл, разбавляли водой (100 мл) и рассолом (100 мл) и экстрагировали продукт этилацетатом (300 мл, 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (100 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента этилацетат в циклогексане (0-20 %). Хлорспирт **5** (2,79 г, 46,6 %;  $R_f$  0,42 в подвижной фазе SE20, детекция при помощи  $\text{KMnO}_4$ ) получали в виде бесцветного масла.

Раствор  $\text{NaOH}$  (11,37 г, 0,284 ммоль, 22,5 экв.) в воде (49 мл) добавляли к раствору хлорспирта **5** (2,79 г, 12,64 ммоль) в диоксане (38 мл), смесь перемешивали в течение 30 ч при 35°C. Затем раствор переносили в делительную колбу объемом 500 мл, разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали продукт с помощью ДХМ (100 мл, 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента этилацетат в циклогексане (0-5 %). Эпоксид **6** (1,797 г, 77,2 %;  $R_f$  0,38 в подвижной фазе SE5, детекция фосфорномолибденовой кислотой/ $\text{Ce}^{4+}$ ) получали в виде бесцветного масла.  **$^1\text{H}$  ЯМР-спектр** (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0,92$  (t,  $J = 6$  Hz, 3H), 1,29-1,60 (m, 18H), 2,47-2,49 (m, 1H), 2,76-2,78 (m, 1H), 2,90-2,95 (m, 1H) м.д.  **$^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр** (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 14,11, 22,68, 25,97, 29,33, 29,45, 29,56, 29,59, 31,90, 32,50, 47,14, 52,42$  м.д. **ИК-спектр** ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{см}^{-1} =$  эпоксид: 2997 сл., ос. ( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_2$ ); 1482 сл., 1410 сл., 1130 сл. ( $\delta_{\text{s}} \text{O}-\text{CH}_2$ ); 1259 сл. ( $\nu_{\text{s}}$  скелет, респираторн.); 917 сл. ( $\delta_{\text{ас}}$  круговая); 896 всл. ( $\delta_{\text{ас}} \text{COC}$ ); алиф. цепь: 2957 сил. ( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_3$ ); 2928 vs ( $\nu_{\text{ас}} \text{CH}_2$ ); 2872 ср. ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_3$ ); 2856 сил. ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ ); 1467 ср. и 1458 ср. ( $\beta_{\text{s}} \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{ас}} \text{CH}_3$ ); 1379 сл. ( $\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$ ), **МСВР** (EI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}$   $[\text{M}]^+$  184,1827; найдено 184,1832.

35

#### $N^1, N^1$ -Бис(2-гидроксидодецил)гексан-1,6-диамин 8

Амин **1e** (0,86 г, 3,98 ммоль) и эпоксид **6** (1,76 г, 9,54 ммоль, 2,4 экв.) смешивали в стеклянном флаконе объемом 4 мл, смесь нагревали в отсутствие растворителя до 80°C в атмосфере аргона в течение 24 ч. Полученную желтоватую жидкость очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента D1 в ДХМ (0-30 %).

5 Амин **7** (1,98 г, 85,1 %;  $R_f$  0,51 в подвижной фазе D3, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла.

Снятие защиты с амина **7** проводили в смеси TFA (4 мл) и ДХМ (6 мл) согласно методике, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **8** (1,271 г, 77,4%;  $R_f$  0,20 в подвижной фазе D2, детекция при помощи нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 3,65, 3,63, 2,84, 2,82, 2,565, 2,55, 2,41, 2,325, 1,60, 1,59, 1,41, 1,38, 1,35, 1,30–1,48, 1,28, 1,25–1,29, 1,25, 0,87 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 69,39, 67,71, 62,72, 61,05, 55,78, 54,77, 40,86, 40,56, 35,22, 35,08, 31,90, 30,45, 29,6–29,9, 29,33, 25,65–26,77, 22,67, 14,10 м.д. ИК-спектр (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  = 3412 сл., вуш. ( $\nu$  OH); 1077 сл., вуш. ( $\nu$  C-OH); 1621 всл., вуш. ( $\beta_s$  NH<sub>2</sub>); 1090 сл. ( $\nu$  C-NH<sub>2</sub>); 2956 ср., ос. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 2928 vs ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>); 2871 15 ср. ( $\nu_s$  CH<sub>3</sub>); 2855 сил. ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>); 2810 сл., ос. ( $\nu_s$  N-CH<sub>2</sub>); 1467 сл. и 1457 сл. ( $\beta_s$  CH<sub>2</sub> и  $\delta_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 1378 всл. ( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>); 722 всл. ( $\beta_{\text{as}}$  и  $\gamma_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>). МСВР (ESI): m/z рассчитано для C<sub>30</sub>H<sub>65</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 485,50406; найдено 485,50461.

**N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>5</sup>-Трис(6-(бис(2-гидроксидодецил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 9**  
 20 Липидоид **9** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (40 мг, 0,149 ммоль), НСТU (256 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,416 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) и диамина **8** (289 мг, 0,596 ммоль, 4 экв.) согласно процедуре, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **9** (188 мг, 75,5 %;  $R_f$  0,43 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,97, 4,10, 4,075, 4,04, 4,00, 3,38, 3,31, 3,28, 3,24, 3,21, 3,19, 3,16, 3,11, 2,34, 2,14, 1,93, 1,87, 1,28, 1,25–1,31, 1,25, 0,88 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 177,50, 66,38, 65,92, 65,10, 64,73, 61,43, 61,23, 60,55, 59,64, 57,63, 54,48, 53,38, 41,70, 39,42, 39,23, 37,16, 31,90, 29,63, 29,56, 29,52, 29,34, 28,39, 22,68, 14,11 м.д. ИК-спектр (CCl<sub>4</sub>):  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  = 3300-3500 ср., уш. ( $\nu$  OH); 1090 сл. ( $\nu$  C-OH); 3439 сл. (свободный) и 3344 сл. (связанный) ( $\nu$  NH); 1635 ср. (амид I); 1536 ср. (амид II); 2956 ср., ос. ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>3</sub>); 2873 ср., ос. ( $\nu_s$  CH<sub>3</sub>); 2927 vs ( $\nu_{\text{as}}$  CH<sub>2</sub>); 2855 сил. ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>); 1378 сл. ( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>); 2808 сл., ос. ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>); 721 сл. ( $\beta_s$  CH<sub>2</sub>). МСВР (MALDI): m/z рассчитано для C<sub>103</sub>H<sub>203</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1668,5612; найдено 1668,5628.

#### Пример 9

35 **Линолеилальдегид 10**

Периодинан Десса-Мартина (4,45 г, 10,49 ммоль, 1,3 экв.) добавляли к раствору линолеилового спирта (2,50 мл, 8,07 ммоль) в ДХМ (120 мл), охлаждали до 0°C на ледяной бане, смесь перемешивали при 0°C в течение 4 ч. Затем реакцию гасили добавлением раствора тиосульфата натрия (20 г Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O/100 мл H<sub>2</sub>O) и насыщенного водного раствора бикарбоната натрия (50 мл), перемешивали в течение 1 ч при кт до тех пор, пока изначально мутный раствор не стал прозрачным. Раствор переносили в делительную колбу объемом 1000 мл, разбавляли водой (150 мл), продукт экстрагировали с помощью ДХМ (150 мл, 2x50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (150 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный материал очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (изократический режим, 5% этилацетат в циклогексане). Альдегид **10** (1,271 г, 59,6 %; *R<sub>f</sub>* 0,36 в подвижной фазе CE5, детекция с помощью KMnO<sub>4</sub>) получали в виде бесцветного масла.

#### 15 *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Ди((9*Z*,12*Z*)-октадека-9,12-диен-1-ил)гексан-1,6-диамин **12**

Амин **11** получали из амина **1e** (0,345 г, 1,59 ммоль), альдегида **10** (1,27 г, 4,78 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (1,01 г, 4,78 ммоль, 3 экв.) в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1. Амин **11** получали в виде желтоватого масла (1,08 г, 94,9 %; *R<sub>f</sub>* 0,18 в подвижной фазе CE20, детекция с помощью нингидрина).

20 Снятие защиты с амина **11** проводили в смеси TFA (4 мл) и ДХМ (5 мл) по методике, описанной для **2a** в примере 1; диамин **12** (0,594 г, 64,0 %; *R<sub>f</sub>* 0,13 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5,30–5,40, 2,765, 2,73, 2,67, 2,59, 2,04, 1,51, 1,385, 1,37, 1,34, 1,295, 1,29, 1,28–1,34, 1,28, 0,88 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 130,19, 130,06, 127,99, 127,89, 53,49, 53,45, 41,67, 32,52, 31,50, 29,62, 29,46, 29,20–29,48, 27,37, 27,20, 27,18, 26,52, 25,61, 22,56, 14,06 м.д. ИК-спектр (CCl<sub>4</sub>): ν<sub>max</sub>/см<sup>-1</sup> = 3011 сил. (ν<sub>as</sub> =CH); 1646-1673 ср. (ν C=C); 3455 сл. (ν<sub>as</sub> NH<sub>2</sub>); 3394 (ν<sub>s</sub> NH<sub>2</sub>); 1620 сл. (β<sub>s</sub> NH<sub>2</sub>); 1087 ср. (ν C-NH<sub>2</sub>); 2957 s, ос. (ν<sub>as</sub> CH<sub>3</sub>); 2928 vs (ν<sub>as</sub> CH<sub>2</sub>); 2873 s, ос. (ν<sub>s</sub> CH<sub>3</sub>); 2856 vs (ν<sub>s</sub> CH<sub>2</sub>); 2801 ср. (ν<sub>s</sub> N-CH<sub>2</sub>); 1467 ср. и 1457 ср., ос. (β<sub>s</sub> CH<sub>2</sub> и δ<sub>as</sub> CH<sub>3</sub>); 1378 ср. (δ<sub>s</sub> CH<sub>3</sub>); 721 ср. (β<sub>as</sub> и γ<sub>as</sub> CH<sub>2</sub>). МСВР: m/z рассчитано для C<sub>42</sub>H<sub>81</sub>N<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 613,63943; найдено 613,63899.

#### 5 *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Трис(6-(бис((9*Z*,12*Z*)-октадека-9,12-диен-1-ил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид **13**

35 Липидоид **13** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (30 мг, 0,112 ммоль), НСТУ (192 мг, 0,447 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,312 мл, 2,39 ммоль, 16 экв.) и диамина **12** (274 мг, 0,447 ммоль, 4 экв.) по методике, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **13** (154 мг,

67,1 %;  $R_f$  0,48 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,32, 5,37, 5,32, 3,23, 2,76, 2,31, 2,04, 1,90, 1,81, 1,52, 1,35, 1,305, 1,295, 1,29, 1,28–1,35, 1,28, 0,88 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 176,42, 130,21, 129,99, 128,04, 127,87, 52,94, 41,72, 39,98, 38,99, 37,77, 31,50, 29,60, 29,18, 29,08, 29,0–29,7, 28,57, 27,18, 26,26, 25,61, 22,55, 14,07 м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3011 ср. ( $\nu_{\text{as}} = \text{CH}$ ); 1661 ср. ( $\nu \text{ C}=\text{C}$ ); 3464 сл. (свободный) и 3347 сл. (связанный) ( $\nu \text{ NH}$ ); 1645 ср., ос. (амид I); 1534 сл. (амид II); 2957 ср., ос. ( $\nu_{\text{as}} \text{ CH}_3$ ); 2873 ср., ос. ( $\nu_{\text{s}} \text{ CH}_3$ ); 2929 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{ CH}_2$ ); 2856 сил. ( $\nu_{\text{s}} \text{ CH}_2$ ); 1378 и 1366 сл. ( $\delta_{\text{s}} \text{ CH}_3$ ); 1086 сл., ос. ( $\nu \text{ C-N}$ ); 722 сл. ( $\beta_{\text{as}}$  и  $\gamma_{\text{as}} \text{ CH}_2$ ). МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{139}\text{H}_{251}\text{N}_6\text{O}_3$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  2052,9667; найдено 2052,9672.

#### Пример 10

##### 8-((трет-бутилдифенилсилил)окси)октан-1-ол 14

Трет-бутилдифенилхлорсилан (17,50 мл, 68,39 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору 1,8-октандиола (10,0 г, 68,39 ммоль) и имидазола (5,59 г, 82,06 ммоль, 1,2 экв.) в ДХМ (250 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при кт. Раствор переливали в делительную колбу объемом 1000 мл, разбавляли водой (400 мл) и рассолом (100 мл) и экстрагировали продукт ДХМ (2 x 100 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (100 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента этилацетат в циклогексане (0-30 %). Спирт 14 (13,65 г, 51,9 %;  $R_f$  0,35 в подвижной фазе SE20, детекция с помощью  $\text{KMnO}_4$ ) получали в виде бесцветного масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,08 (s, 9H), 1,31-1,41 (m, 8H), 1,55-1,62 (m, 4H), 3,64-3,70 (m, 4H), 7,38-7,47 (m, 6H), 7,69-7,71 (m, 4H) м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 19,24, 25,68, 25,72, 26,89, 29,33, 29,38, 32,56, 32,79, 63,09, 63,99, 127,57, 129,48, 134,19, 135,58 м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3072 ср. (20a); 3053 ср. (20b); 2529 s, ос. (tBu,  $\nu_{\text{as}} \text{ CH}_3$ ); 2898 s, ос. (tBu,  $\nu_{\text{s}} \text{ CH}_3$ ); 1590, 1568 (8a, 8b); 1487 ср. (19a); 1463 ср., 1473 сил. (tBu,  $\delta_{\text{as}} \text{ CH}_3$ ); 1428 сил. (19b); 1390 ср., 1362 ср. (tBu,  $\delta_{\text{s}} \text{ CH}_3$ ); 1189 m; 1112 vs, 1094 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{ Si-Ph}$ ); 1030 ср. (18a); 1008 ср. ( $\delta \text{ Ph-Si}$ ); 939 ср. ( $\nu \text{ CH}_3$ ); 701 vs ( $\nu_{\text{s}} \text{ COSi}$ ); 688 ср. (4); 622 ср. (6b); 614 сил. (6a); 505 сил. (16b); 489 ср. ( $\delta \text{ Si-Ph}$ ); 2932 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{ CH}_2$ ); 2858 vs ( $\nu_{\text{s}} \text{ CH}_2$ ); 3636 ср., 3341 ср., уш. ( $\nu_{\text{s}} \text{ OH}$ ); 1057 ср. ( $\nu_{\text{s}} \text{ C-OH}$ ). МСВР (ESI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_2\text{NaSi}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  407,23768; найдено 407,23742.

##### 8-((трет-бутилдифенилсилил)окси)октановая кислота 15

Периодинан Десса-Мартина (19,54 г, 46,07 ммоль, 1,3 экв.) добавляли к раствору спирта 14 (13,63 г, 35,44 ммоль) в ДХМ (250 мл), охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  на ледяной бане и перемешивали

смесь при 0°C в течение 4 ч. Затем реакцию гасили добавлением раствора тиосульфата натрия (50 г  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/150$  мл  $\text{H}_2\text{O}$ ) и насыщенного водного раствора бикарбоната натрия (100 мл), перемешивали в течение 1 ч при кт до тех пор, пока первоначально мутный раствор не стал прозрачным. Раствор переносили в делительную колбу объемом 1000 мл, разбавляли водой (200 мл), продукт экстрагировали с помощью ДХМ (200 мл, 2x50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (200 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Получали 13,56 г бесцветного масла.

Полученный остаток растворяли в колбе объемом 2 л в смеси ацетона (450 мл) и воды (90 мл); к раствору добавляли 2-метил-2-бутен (15,02 мл, 141,8 ммоль, 4 экв.) и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (11,06 г, 70,88 ммоль, 2 экв.) и охлаждали суспензию до 0°C на ледяной бане. Затем постепенно из капельной воронки в течение 30 мин приливали раствор хлорита натрия (9,62 г, 106,32 ммоль, 3 экв.) в воде (60 мл), реакционную смесь удаляли из охлаждающей ванны и энергично перемешивали при кт в течение 12 ч. Раствор переносили в делительную колбу объемом 1000 мл, разбавляли раствором лимонной кислоты (70 г) в воде (300 мл) и экстрагировали продукт диэтиловым эфиром (300 мл, 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (300 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (изократический режим, 5% метанол в хлороформе). Кислота **15** (12,92 г, 91,5 %;  $R_f$  0,35 в подвижной фазе  $\text{MeOH}-\text{CHCl}_3$  5:95 (об./об.)), детекция при помощи  $\text{KMnO}_4$ ) получали в виде вязкого бесцветного масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,05 (s, 9H), 1,27-1,39 (m, 6H), 1,51-1,66 (m, 4H), 2,34 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 2H), 3,65 (t,  $J$  = 6,5 Hz, 2H), 7,36-7,44 (m, 6H), 7,66-7,68 (m, 4H) м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 19,23, 24,63, 25,59, 26,89, 28,97, 29,02, 32,48, 33,95, 63,91, 127,57, 129,49, 134,15, 135,58, 179,60 м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3534 сл. ( $\nu$  OH, мономер); 3100 сл., 2740 сл., 2674 сл. ( $\nu$  OH, димер); 1711 vs ( $\nu$  C=O); 1413 сл., 1289 сл. ( $\nu$  CO и  $\delta$  COH); 2561 ср., ос. (tBu,  $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ); 2898 ср., ос. (tBu,  $\nu_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ); 1590 сл.; 1487 сл. (19a); 1463 ср., 1472 ср. (tBu,  $\delta_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ); 1429 ср. (19b); 1390 сл., 1362 сл. (tBu,  $\delta_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ); 1112 s, ( $\nu_{\text{as}}$  COSi); 1093 ср. (18b); 1030 сл.; 1008 сл. ( $\delta$  Ph-Si); 940 сл. ( $\nu$   $\text{CH}_3$ ); 701 сил. (4); 688 сл. (SiOC); 622 сл. (6b); 614 ср. (6a); 505 сл. (16b); 2932 сил. ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_2$ ); 2858 ср. ( $\nu_{\text{s}}$   $\text{CH}_2$ ). МСВР (ESI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_3\text{Si}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 397,22044; найдено 397,22018.

#### (Z)-нон-2-ен-1-ил-8-гидроксиоктаноат 17

Диизопропилкарбодиимид (1,08 мл, 6,90 ммоль, 1,1 экв.) и 4-диметиламинопиридин (23,0 мг, 0,188 ммоль, 0,03 экв.) добавляли к раствору кислоты **15** (2,50 г, 6,27 ммоль) в ДХМ (100 мл), охлаждали до 0°C на ледяной бане и перемешивали смесь при 0°C в течение 30 мин. Затем

добавляли *транс*-2-нонен-1-ол (1,37 мл, 8,15 ммоль, 1,3 экв.) и перемешивали реакционную смесь в течение 12 ч при кт. Растворитель выпаривали на ротационном вакуумном испарителе, а остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (изократический режим, 5% этилацетат в циклогексане). Сложный эфир **16** (2,784 г, 84,9 %;  $R_f$  0,61 в подвижной фазе

5

SE5, детекция при помощи  $\text{KMnO}_4$ ) получали в виде бесцветного масла. Раствор моногидрата тетрабутиламмония фторида (2,95 г, 10,56 ммоль, 2 экв.) в тетрагидрофуране (10 мл) добавляли к раствору сложного эфира **16** (2,76 г, 5,28 ммоль) в тетрагидрофуране (40 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч при кт. Раствор

10

переливали в делительную колбу объемом 500 мл, разбавляли 10%-ным водным раствором хлорида аммония (150 мл), продукт экстрагировали диэтиловым эфиром (150 мл, 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (100 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на

15

ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента этилацетат в циклогексане (0-45 %). Спирт **17** (1,311 г, 87,3 %;  $R_f$  0,61 в подвижной фазе SE50, детекция с

20

помощью  $\text{KMnO}_4$ ) получали в виде слегка желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,87 (t,  $J$  = 6 Hz, 3H), 1,26-1,38 (m, 14H), 1,51-1,66 (m, 4H), 2,07-2,12 (m, 2H), 2,30 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 2H), 3,63 (t,  $J$  = 6,6 Hz, 2H), 4,61-4,62 (m, 2H), 5,48-5,55 (m, 1H), 5,60-5,67 (m, 1H) м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 14,07, 22,60, 24,88, 25,54, 27,54, 28,86, 29,02, 29,07, 29,39, 31,68, 32,68, 34,30, 60,22, 62,97, 123,34, 135,45, 173,75 м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3637 сл., 3453 сл. ( $\nu$  OH); 1056 ср. ( $\nu$  C-OH); 1736 vs ( $\nu$  C=O); 1238 ср., 1170 сил. ( $\nu$  C-O); 3025 сл. ( $\nu_{\text{as}}=\text{CH}$ ); 1659 сл. ( $\nu$  C=C); 1419 сл. ( $\rho$  =C-H); 2955 сил. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 2931 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ); 2858 сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ); 2872 s, ос. ( $\nu_s \text{CH}_3$ ); 1466 ср. и 1457 ср. ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 1378 ср. ( $\delta_s \text{CH}_3$ ); 722 ср. ( $\beta_{\text{as}}$  и  $\gamma_{\text{as}} \text{CH}_2$ ). МСВР (EI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$  284,2351; найдено 284,2355.

25

#### **(Z)-нон-2-ен-1-ил-8-оксооктаноат 18**

Периодинан Десса-Мартина (2,46 г, 5,80 ммоль, 1,3 экв.) добавляли к раствору спирта **17** (1,27 мл, 4,46 ммоль) в ДХМ (100 мл), охлаждали до 0°C на ледяной бане, смесь перемешивали при 0°C в течение 4 ч. Затем реакцию гасили добавлением раствора тиосульфата натрия (10 г

30

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/50$  мл  $\text{H}_2\text{O}$ ) и насыщенного водного раствора бикарбоната натрия (50 мл) и перемешивали в течение 1 ч при кт до тех пор, пока первоначально мутный раствор не стал

35

прозрачным. Раствор переносили в делительную колбу объемом 500 мл, разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали продукт с помощью ДХМ (100 мл, 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (150 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали

через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с

использованием линейного градиента этилацетат в циклогексане (0-30 %). Альдегид **18** (0,573 г, 45,4 %;  $R_f$  0,49 в подвижной фазе CE20, детекция с помощью  $\text{KMnO}_4$ ) получали в виде бесцветного масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0,88$  (t,  $J = 7$  Hz, 3H), 1,26-1,38 (m, 14H), 1,59-1,67 (m, 4H), 2,07-2,12 (m, 2H), 2,30 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 2,40-2,44 (m, 2H), 4,61-4,63 (m, 2H), 5,48-5,55 (m, 1H), 5,61-5,68 (m, 1H), 9,76 (t,  $J = 1,8$  Hz, 1H) м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14,07, 21,86, 22,60, 24,71, 27,54, 28,77, 28,83, 28,86, 29,39, 31,68, 34,19, 43,79, 60,25, 123,31, 135,49, 173,59, 202,62$  м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 2818$  ср., 2716 ср. (альдег.,  $\nu$  CH); 1733 vs (альдег.,  $\nu$  C=O); 1395 ср., ос. (альдег.,  $\delta$  OCH); 1733 vs ( $\nu$  C=O); 1244 ср., 1172 сил. ( $\nu$  C-O); 3026 ср. ( $\nu_{\text{as}} = \text{CH}$ ); 1659 сл. ( $\nu$  C=C); 2956 сил. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 2930 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ); 2858 сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ); 2873 s, ос. ( $\nu_s \text{CH}_3$ ); 1466 ср. а 1462 ср. ( $\beta_s \text{CH}_2$  а  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 1378 ср. а 1373 ср. ( $\delta_s \text{CH}_3$ ). МСВР (ESI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{O}_4$  [ $\text{M} - \text{H}$ ] 297,20713; найдено 297,20722.

#### $N^1, N^1$ -Бис(8-((Z)-нон-2-ен-1-ил)окси-8-оксооктил)гексан-1,6-диамин **20**

Амин **19** получали из амина **1e** (140 мг, 0,647 ммоль), альдегида **18** (0,548 г, 1,94 ммоль, 3 экв.) и триацетоксиборогидрида натрия (0,411 г, 1,94 ммоль, 3 экв.) согласно методике, описанной для **2a** в примере 1, за исключением того, что реакционную смесь выпаривали без предварительной экстракции, а остаток очищали напрямую при помощи хроматографии. Амин **19** получали в виде слегка желтоватого масла (0,446 г, 92,0%).

Снятие защиты с амина **19** проводили в смеси TFA (4 мл) и ДХМ (4 мл) по методике, описанной для **2a** в примере 1; диамин **20** (0,333 г, 86,2 %;  $R_f$  0,16 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,63, 5,50, 4,61, 3,06, 3,02, 2,99, 2,29, 2,08, 1,82, 1,74, 1,60, 1,57, 1,42, 1,34, 1,28, 1,27, 0,87$  м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173,59, 135,39, 129,29, 60,24, 52,64, 52,19, 39,50, 34,12, 31,64, 29,34, 28,84, 28,82, 28,73, 27,51, 26,60, 25,76, 25,36, 24,69, 23,11, 22,57, 14,05$  м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3446$  сл. ( $\nu_{\text{as}} \text{NH}_2$ ); 1612 сл. ( $\beta_s \text{NH}_2$ ); 2800 ср., ос. ( $\nu_s \text{N-CH}_2$ ); 1736 vs ( $\nu$  C=O); 1236 ср., 1168 сил. ( $\nu$  C-O); 3024 ср. ( $\nu_{\text{as}} = \text{CH}$ ); 1679 сл. ( $\nu$  C=C); 1419 сл. ( $\rho = \text{CH}$ ); 2957 сил. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 2931 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ); 2858 сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ); 2873 s, ос. ( $\nu_s \text{CH}_3$ ); 1467 ср. и 1457 ср. ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 1378 ср. ( $\delta_s \text{CH}_3$ ); 721 сл. ( $\beta_{\text{as}}$  и  $\gamma_{\text{as}} \text{CH}_2$ ). МСВР (ESI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{40}\text{H}_{77}\text{O}_4\text{N}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] 649,58779; найдено 649,58767.

#### $N^1, N^3, N^5$ -Трис(6-(бис(8-((Z)-нон-2-ен-1-ил)окси-8-оксооктил)амино)гексил)адамantan-1,3,5-трикарбоксамид **21**

Липидоид **21** получали из адамantan-1,3,5-трикарбоновой кислоты (30 мг, 0,112 ммоль), НСТU (192 мг, 0,447 ммоль, 4 экв.), DIPEA (0,312 мл, 1,79 ммоль, 16 экв.) и диамина **20** (290 мг, 0,447 ммоль, 4 экв.) по методике, описанной для соединения **4a** в примере 1; липидоид **21** (181 мг, 74,9 %;  $R_f$  0,29 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,54, 5,63, 5,50, 4,61, 3,29,$

3,00, 2,98, 2,34, 2,29, 2,23, 2,08, 1,98, 1,89, 1,76, 1,60, 1,585, 1,42, 1,38, 1,35, 1,28, 1,26, 0,87 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 177,29, 173,53, 135,41, 123,27, 60,25, 52,62, 52,27, 41,72, 39,57, 39,20, 37,12, 34,09, 31,64, 29,34, 28,85, 28,82, 28,74, 28,44, 28,37, 27,51, 26,63, 25,83, 25,56, 24,67, 23,11, 22,57, 14,06$  м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3321$  сл. ( $\nu$  NH); 1644 ср. (амид I); 1535 сл.-ср. (амид II); 1736 сил. ( $\nu$  C=O); 1276 сл.-ср., 1166 ср. ( $\nu$  C-O); 3025 сл. ( $\nu_{\text{as}} = \text{CH}$ ); 1419 сл. ( $\rho = \text{CH}$ ); 2956 с, ос. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 2930 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ); 2858 сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ); 2873 ср., ос. ( $\nu_s \text{CH}_3$ ); 1467 ср. и 1457 ср. ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ); 1378 сл.-ср. ( $\delta_s \text{CH}_3$ ). МСВР (MALDI): m/z рассчитано для  $\text{C}_{133}\text{H}_{239}\text{N}_6\text{O}_{15} [\text{M} + \text{H}]^+$  2160,8118; найдено 2160,8164.

10

### Пример 11

#### 3,5,7-Трис((6-(дидодециламино)гексил)карбамоил)адамantan-1-карбоновая кислота 22

Тионилхлорид (300 мкл) и ДМФА (2 мкл) добавляли к адамantan-1,3,5,7-тетракарбоновой кислоте (21 мг, 0,067 ммоль), суспензию перемешивали в течение 2 ч при 70°C в закрытом флаконе; в ходе этого суспензия превращалась в прозрачный гомогенный раствор. Избыток  $\text{SOCl}_2$  выдували струей сухого азота, остаток высушивали в вакууме (10 мин) и после охлаждения до кт растворяли в 0,5 мл безводного ДМФА с образованием прозрачного раствора. Затем раствор  $N^1, N^1$ -дидодецилгексан-1,6-диамина (76 мг, 0,168 ммоль, 2,5 экв.) и DIPEA (117 мкл, 0,672 ммоль, 10 экв.) в смеси ДХМ (1,5 мл) и ДМФА (0,5 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при кт. Затем реакционную смесь адсорбировали на диоксиде кремния (10 г) и выпаривали растворители в вакууме. Неочищенный продукт очищали методом флэш-хроматографии на диоксиде кремния (элюирование линейным градиентом D1 в ДХМ, 35-85 %) с получением целевого соединения 22 (45 мг, 41,4 %;  $R_f$  0,50 в D2/3, визуализация нингидрином) в виде густого бледно-желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,32, 3,24, 3,05-2,95, 2,16, 1,97, 1,92, 1,80-1,72, 1,55, 1,38-1,23, 0,87$  м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 176,52, 52,89, 52,20, 42,28, 39,39, 38,96, 31,89, 29,60, 29,50, 29,44, 29,32, 29,10, 28,72, 26,83, 26,23, 25,99, 23,47, 23,14, 22,66, 14,10$  м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1} = 3314$  сл., уш. ( $\nu$  NH), 1643 ср. (амид I) и 1638 сл. (амид II), 2954 сил. ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$ ), 2927 vs ( $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ), 2855 сил. ( $\nu_s \text{CH}_2$ ), 1467 ср., ос. и 1457 ср., ос. ( $\beta_s \text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ), 1378 сл. ( $\delta_s \text{CH}_3$ ); -COOH димер: 2591 сл., уш. ( $\nu$  OH), 1715 сл. ( $\nu$  C=O), 1411 всл. и 1283 сл., уш. ( $\delta$  COH и  $\nu$  CCO). МСВР (MALDI): m/z рассчитано для  $\text{C}_{104}\text{H}_{203}\text{N}_6\text{O}_5 [\text{M} + \text{H}]^+$  1616,5810; найдено 1616,58014.

#### $N^1, N^3, N^5$ -Трис(6-(дидодециламино)гексил)адамantan-1,3,5,7-тетракарбоксамид 23

ДМФА (2 мкл) и тионилхлорид (24 мкл, 0,349 ммоль, 14 экв.) добавляли к раствору кислоты 22 (27 мг, 0,017 ммоль) в ДХМ (3,5 мл), и перемешивали суспензию в течение 2 ч при кт в

5 закрытом флаконе. Затем раствор барботировали слабой струей безводного  $\text{NH}_3$  в течение 5 мин; немедленно образовывался белый осадок. Через 10 мин реакционную смесь фильтровали через целитовую подушку, фильтрат адсорбировали на диоксиде кремния (10 г), растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали методом флэш-хроматографии на диоксиде кремния (элюирование линейным градиентом D1 в ДХМ, 30-70 %) с получением целевого соединения **23** (15 мг, 55,6 %;  $R_f$  0,57 в D2/3, визуализация нингидрином) в виде густого бледно-желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,69, 6,49, 3,21, 2,67, 1,99, 1,96, 1,57, 1,51, 1,33, 1,285, 1,245, 0,87 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 178,41, 175,71, 53,42, 53,07, 42,38, 39,52, 39,40, 39,18, 31,88, 29,62, 29,60, 29,58, 29,55, 29,37, 10 29,32, 29,02, 27,24, 26,56, 26,21, 22,66, 14,09 м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3330 сл., уш. ( $\nu$  NH), 1649 ср. (амид I) и 1536 сл. (амид II), 2953 ср. ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 2927 vs ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_2$ ), 2875 ср., ос. ( $\nu_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ), 2855 сил. и 2805 всл. ( $\nu_{\text{s}}$   $\text{CH}_2$ ), 1467 ср., и 1457 сл., 1438 сл., ос. ( $\beta_{\text{s}}$   $\text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 1378 сл. ( $\delta_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ); перв. амид: 3199 сл., уш. ( $\nu$   $\text{NH}_2$  *váz.*), 1697 всл., ос. ( $\nu$   $\text{C}=\text{O}$ ), 1605 сл., ос. ( $\beta_{\text{s}}$   $\text{NH}_2$ ). МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{104}\text{H}_{204}\text{N}_7\text{O}_4$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  1615,5969; найдено 1615,5998.

15

Пример 12 **$N^1, N^3, N^5$ -Трис(6-(дидодециламино)гексил)- $N^7$ -(2-гидроксиэтил)адамантан-1,3,5,7-тетракарбоксамид **24****

ДМФА (2 мкл) и тионилхлорид (20 мкл, 0,286 ммоль, 14 экв.) добавляли к раствору кислоты **22** (33 мг, 0,020 ммоль) в ДХМ (1,5 мл) и перемешивали суспензию в течение 1 ч при кт в закрытом флаконе. Затем добавляли этаноламин (50 мкл, 0,816 ммоль, 40 экв.), сразу же образовывался белый осадок. Через 20 мин реакционную смесь фильтровали через целитовую подушку, фильтрат адсорбировали на диоксиде кремния (10 г), растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали методом флэш-хроматографии на диоксиде кремния (элюирование с линейным градиентом D1 в ДХМ, 35-85 %) с получением целевого соединения **24** (31 мг, 91,5 %;  $R_f$  0,59 в D2/3, визуализация нингидрином) в виде густого бледно-желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,39, 6,92, 3,69, 3,37, 3,22, 3,00, 2,02, 1,96, 1,76, 1,53, 1,40-1,22, 0,86 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 176,76, 176,16, 61,73, 61,38, 52,73, 52,16, 43,13, 42,55, 42,41, 39,54, 39,43, 38,74, 31,86, 29,56, 29,45, 29,40, 29,28, 29,06, 28,64, 25 26,78, 25,92, 25,64, 23,38, 23,08, 22,64, 14,07 м.д. ИК-спектр ( $\text{CCl}_4$ ):  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  = 3324 сл., уш. ( $\nu$  NH), 1646 ср. (амид I) и 1538 сл. (амид II), 2955 сил. ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 2927 vs ( $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_2$ ), 2855 сил. и 2876 ср., ос. ( $\nu_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ), 1467 ср., 1457 ср. и 1435 сл., ос. ( $\beta_{\text{s}}$   $\text{CH}_2$  и  $\delta_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ ), 1378 сл. ( $\delta_{\text{s}}$   $\text{CH}_3$ ), 1060 сл., 30  $\nu_{\text{OH}}$ , 1036 сл., уш. ( $\nu$   $\text{C}-\text{OH}$ ). МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{106}\text{H}_{208}\text{N}_7\text{O}_5$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  1659,6231; найдено 1659,62718.

35

Пример 13

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Трис(6-(дидодециламино)гексил)-*N*<sup>7</sup>-(1,3-дигидроксипропан-2-ил)адамантан-1,3,5,7-тетракарбоксамид **25****

Следуя методике, описанной для **24**, целевое соединение **25** получали из кислоты **22** (51 мг, 0,031 ммоль) и серинола (115 мг, 1,26 ммоль, 40 экв.) с получением липидоида **25** в виде густого бледно-желтого масла (19 мг, 35,6%; *R*<sub>f</sub> 0,59 в D2/3). <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,79, 7,21, 7,17, 7,08, 3,26, 3,01, 2,03, 1,92, 1,775, 1,57, 1,385, 1,33, 1,28-1,24 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 176,14, 175,04, 52,74, 52,66, 52,32, 52,17, 39,28-38,65, 31,89, 29,68, 29,59, 29,49, 29,43, 29,32, 29,09, 28,47, 26,83, 26,80, 25,98-25,40, 23,05, 22,67, 14,10 м.д. ИК-спектр (CCl<sub>4</sub>): ν<sub>max</sub>/см<sup>-1</sup> = 3324 сл., уш. (ν NH), 1646 ср. (амид I) и 1538 сл. (амид II), 2955 сил. (ν<sub>as</sub> CH<sub>3</sub>), 2927 vs (ν<sub>as</sub> CH<sub>2</sub>), 2855 сил. и 2876 ср., ос. (ν<sub>s</sub> CH<sub>3</sub>), 1467 ср., 1457 ср. и 1435 сл., ос. (β<sub>s</sub> CH<sub>2</sub> и δ<sub>as</sub> CH<sub>3</sub>), 1378 сл. (δ<sub>s</sub> CH<sub>3</sub>), 1060 сл., вуш., 1036 сл., уш. (ν C-OH). МСВР (MALDI): m/z рассчитано для C<sub>107</sub>H<sub>210</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1689,6337; найдено 1616,63235.

Пример 14

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Ди((гептилоксикарбонил)пропил)гексан-1,6-диамин **28a****

Диизопропилкарбодиимид (3,17 мл, 20,24 ммоль, 1,3 экв.) и DMAP (57,1 мг, 0,467 ммоль, 0,03 экв.) добавляли к раствору 4-броммасляной кислоты (2,60 г, 15,57 ммоль) и 1-гептанола (2,64 мл, 18,68 ммоль, 1,2 экв.) в ДХМ (60 мл), смесь перемешали при кт в течение 1 ч. Затем реакционную смесь адсорбировали на диоксиде кремния (16 г), растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали методом флэш-хроматографии на диоксиде кремния (80 г, элюирование в линейном градиенте этилацетата в циклогексане, 0-10 %) с получением целевого соединения **26a** (3,916 г, 94,8 %; *R*<sub>f</sub> 0,36 в SE5, визуализация KMnO<sub>4</sub>) в виде бесцветного масла.

Бромэфир **26a** (1,53 г, 5,78 ммоль, 2,5 экв.) и карбонат калия (3,19 г, 23,11 ммоль, 10 экв.) добавляли к раствору *N*-Вос-1,6-диаминогексана (0,50 г, 2,31 ммоль) в ACN (10 мл), и перемешивали смесь при 35 °С в течение 3 дней. Затем реакционную смесь адсорбировали на диоксиде кремния (16 г), растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали методом флэш-хроматографии на диоксиде кремния (40 г, элюирование линейным градиентом этилацетата в циклогексане, 0-100 %) с получением целевого соединения **27a** (1,093 г, 80,9 %; *R*<sub>f</sub> 0,35 в SE50 на планшете ТСХ, предварительно обработанном NH<sub>3</sub>, визуализация нингидрином) в виде бледно-желтого масла.

Снятие защиты с амина **27a** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **28a** (0,817 г, 90,2 %; *R*<sub>f</sub> 0,27 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4,05, 3,63, 3,21, 3,15, 2,91, 2,85, 2,67, 2,53-2,41, 2,32, 1,86, 1,76, 1,61, 1,46, 1,35-1,25, 0,88 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173,66, 64,58, 53,66, 52,98, 52,87, 40,78, 40,34, 31,87,

31,70, 30,10, 28,90, 28,62, 26,85, 26,45, 25,87, 22,56, 22,02, 14,04 м.д. **МСВР** (ESI):  $m/z$  calcd. for  $C_{28}H_{57}N_2O_4$   $[M + H]^+$  485,43128; найдено 485,43039.

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Трис(6-(бис((гептилоксикарбонил)пропил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-**

**5 трикарбоксамид 29a**

Тионилхлорид (300 мкл) и ДМФА (2 мкл) добавляли к адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоте (60 мг, 0,224 ммоль), суспензию перемешивали в течение 1 ч при 70°C в закрытом флаконе; в ходе этого суспензия превращалась в прозрачный гомогенный раствор. Избыток  $SOCl_2$  выдували струей сухого азота, остаток высушивали в вакууме (10 мин) и после охлаждения до кт растворяли в 0,5 мл безводного ДМФА с образованием прозрачного раствора. Затем добавляли раствор амина **28a** (434 мг, 0,895 ммоль, 4 экв.) и DIPEA (390 мкл, 2,24 ммоль, 10 экв.) в смеси ДХМ (1,5 мл) и ДМФА (0,5 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при кт. Затем реакционную смесь адсорбировали на диоксиде кремния (16 г), растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали методом флэш-хроматографии на диоксиде кремния (40 г, элюирование линейным градиентом D1 в ДХМ, 20-60 %) с получением целевого соединения **29a** (115 мг, 30,8 %;  $R_f$  0,51 в D2, визуализация нингидрином) в виде густого бледно-желтого масла. **<sup>1</sup>H ЯМР-спектр** (600 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 5,76, 4,05, 3,21, 2,42, 2,32, 2,01, 1,84, 1,80, 1,74, 1,61, 1,47, 1,41, 1,34–1,25, 0,88 м.д. **<sup>13</sup>C ЯМР-спектр** (150,9 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 176,01, 173,73, 64,53, 53,72, 53,00, 41,65, 39,77, 39,48, 37,88, 31,96, 31,70, 29,51, 28,90, 28,63, 27,02, 26,76, 25,87, 22,56, 14,05 м.д. **МСВР** (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $C_{97}H_{179}N_6O_{15}$   $[M + H]^+$  1668,3423; найдено 1668,3398.

Пример 15

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Ди((гексилоксикарбонил)бутил)гексан-1,6-диамин 28b**

25 Аналогично методике, описанной для **26a**, получали бромэфир **26b** из 5-бромпентановой кислоты (3,0 г, 16,57 ммоль), 1-гексанола (2,48 мл, 19,89 ммоль, 1,2 экв.), DIC (3,37 мл, 21,54 ммоль, 1,3 экв.) и DMAP (61 мг, 0,497 ммоль, 0,03 экв.) с получением **26b** в виде бесцветного масла (3,938 г, 89,6 %,  $R_f$  0,28 в SE5, визуализация  $KMnO_4$ ).

30 Аналогично методике, описанной для **27a**, Вос-производное **27b** получали из бромэфира **26b** (1,53 г, 5,78 ммоль, 2,5 экв.), *N*-Вос-1,6-диаминогексана (0,50 г, 2,31 ммоль) и карбоната калия (3,19 г, 23,11 ммоль, 10 экв.) с получением **27b** в виде бледно-желтого масла (1,080 г, 79,9 %,  $R_f$  0,30 в SE50 на планшете для ТСХ, предварительно обработанном  $NH_3$ , визуализация нингидрином).

35 Снятие защиты с амина **27b** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **28b** (0,788 г, 86,9 %;  $R_f$  0,13 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла. **<sup>1</sup>H ЯМР-спектр** (600 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 4,05,

3,63, 3,21, 3,15, 2,79, 2,68, 2,60, 2,51, 2,42, 2,32, 1,61, 1,50, 1,36–1,28, 0,88 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173,62, 64,52, 53,68, 53,29, 41,22, 40,26, 34,03, 31,41, 28,58, 25,75, 25,57, 22,80, 22,51, 13,98 м.д. МСВР (ESI):  $m/z$  calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  485,43128; найдено 485,43052.

5

**$N^1, N^3, N^5$ -Трис(6-(бис((гексилосикарбонил)бутил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 29b**

Аналогично методике, описанной для **29a** в примере 14, липидоид **29b** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (53 мг, 0,198 ммоль), амина **28b** (383 мг, 0,790 ммоль, 4 экв.) и DPEA (344 мкл, 1,98 ммоль, 10 экв.) с получением **29b** в виде густого бледно-желтого масла (191 мг, 57,9 %,  $R_f$  0,48 в D2, визуализация нингидрином).  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 5,72, 4,05, 3,21, 2,38, 2,35, 2,30, 2,01, 1,83, 1,80, 1,61, 1,44, 1,40, 1,35–1,27, 0,88 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 175,96, 173,77, 64,44, 53,98, 53,63, 41,64, 39,73, 39,55, 37,92, 34,27, 31,42, 29,59, 28,60, 27,22, 26,89, 26,63, 25,58, 23,01, 22,52, 13,99 м.д. МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{97}\text{H}_{179}\text{N}_6\text{O}_{15}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  1668,3428; найдено 1668,3418.

15

Пример 16

**$N^1, N^1$ -Ди((нонилоксикарбонил)пропил)гексан-1,6-диамин 28c**

Аналогично методике, описанной для **26a**, бромэфир **26c** получали из 4-броммасляной кислоты (2,60 г, 15,57 ммоль), 1-нонанола (3,26 мл, 18,68 ммоль, 1,2 экв.), DIC (3,17 мл, 20,24 ммоль, 1,3 экв.) и DMAP (57 мг, 0,467 ммоль, 0,03 экв.) с получением **26c** в виде бесцветного масла (4,025 г, 88,2 %,  $R_f$  0,32 в CE5, визуализация  $\text{KMnO}_4$ ).

20

Аналогично методике, описанной для **27a**, Вос-производное **27c** получали из бромэфира **26c** (1,25 г, 4,28 ммоль, 2,5 экв.), *N*-Вос-1,6-диаминогексана (0,370 г, 1,71 ммоль) и карбоната калия (2,36 г, 17,10 ммоль, 10 экв.) с получением **27c** в виде бледно-желтого масла (0,848 г, 77,3 %,  $R_f$  0,45 в CE50 на планшете для ТСХ, предварительно обработанном  $\text{NH}_3$ , визуализация нингидрином).

25

Снятие защиты с амина **27c** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **28c** (0,631 г, 88,2 %;  $R_f$  0,29 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4,66, 4,05, 3,16, 2,91, 2,63, 2,59, 2,53, 2,48, 2,34, 1,81, 1,70, 1,61, 1,54, 1,47, 1,42, 1,35–1,24, 0,87 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 173,39, 64,72, 64,66, 52,53, 31,84, 31,59, 29,46, 29,25, 29,22, 28,61, 28,60, 25,91, 25,90, 22,64, 14,08 м.д. МСВР (ESI):  $m/z$  calcd. for  $\text{C}_{32}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  541,49388; найдено 541,49303.

30

35

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Трис(6-(бис((нонилоксикарбонил)пропил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 29с**

Аналогично методике, описанной для **29а** в примере 14, липидоид **29с** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (42 мг, 0,157 ммоль), амина **28с** (339 мг, 0,626 ммоль, 4 экв.) и DIPEA (273 мкл, 1,57 ммоль, 10 экв.) с получением **29с** в виде густого бледно-желтого масла (134 мг, 46,6 %, *R*<sub>f</sub> 0,56 в D2, визуализация нингидрином). <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5,72, 4,05, 3,21, 2,40, 2,36, 2,31, 2,01, 1,83, 1,80, 1,72, 1,61, 1,47, 1,38, 1,33–1,24, 0,87 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 175,96, 173,84, 64,48, 53,80, 53,12, 41,65, 39,74, 39,54, 37,92, 32,06, 31,84, 29,47, 29,26, 29,22, 28,64, 25,92, 22,64, 14,09 м.д. МСВР (MALDI): *m/z* рассчитано для C<sub>109</sub>H<sub>203</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1836,5306; найдено 836,5319.

Пример 17

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Ди((октилоксикарбонил)бутил)гексан-1,6-диамин 28d**

Следуя методике, описанной для **26а**, бромэфир **26d** получали из 5-бромпентановой кислоты (3,0 г, 16,57 ммоль), 1-октанола (3,13 мл, 19,89 ммоль, 1,2 экв.), DIC (3,37 мл, 21,54 ммоль, 1,3 экв.) и DMAP (61 мг, 0,497 ммоль, 0,03 экв.) с получением **26d** в виде бесцветного масла (4,327 г, 89,0 %, *R*<sub>f</sub> 0,32 в SE5, визуализация с помощью KMnO<sub>4</sub>).

Следуя методике, описанной для **27а**, Вос-производное **27d** получали из бромэфира **26d** (1,73 г, 5,89 ммоль, 2,5 экв.), *N*-Вос-1,6-диаминогексана (0,510 г, 2,36 ммоль) и карбоната калия (3,26 г, 23,58 ммоль, 10 экв.) с получением **27d** в виде бледно-желтого масла (1,241 г, 82,1 %, *R*<sub>f</sub> 0,18 в SE50 на планшете для ТСХ, предварительно обработанном NH<sub>3</sub>, визуализация нингидрином).

Снятие защиты с амина **27d** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2а** в примере 1; диамин **28d** (1,09 г, количественный; *R*<sub>f</sub> 0,22 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,22, 4,86, 4,05, 3,04, 2,37, 1,75, 1,67, 1,61, 1,48, 1,40, 1,32–1,25, 0,88 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172,99, 64,85, 52,44, 51,90, 39,41, 33,13, 31,75, 29,18, 29,14, 28,54, 26,54, 25,86, 25,49, 24,88, 22,60, 21,83, 14,05 м.д. МСВР (ESI): *m/z* calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>65</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> 541,49388; найдено 541,49297.

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Трис(6-(бис((октилоксикарбонил)бутил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 29d**

Аналогично методике, описанной для **29а** в примере 14, липидоид **29d** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (70 мг, 0,261 ммоль), амина **28d** (565 мг, 1,04 ммоль, 4 экв.) и DIPEA (455 мкл, 2,61 ммоль, 10 экв.) с получением **29d** в виде густого бледно-желтого масла (229 мг, 47,8 %, *R*<sub>f</sub> 0,58 в D2, визуализация нингидрином). <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ

= 5,79, 4,05, 3,21, 2,44, 2,31, 2,01, 1,84, 1,80, 1,61, 1,47, 1,34–1,24, 0,88 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 176,03, 173,63, 64,50, 53,54, 41,65, 39,77, 39,45, 37,88, 34,12, 31,76, 29,48, 29,20, 29,16, 28,63, 25,91, 22,87, 22,61, 14,07$  м.д. МСВР (ESI): m/z calcd. for  $\text{C}_{109}\text{H}_{203}\text{N}_6\text{O}_{15}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  1836,53010; найдено 1836,52959.

5

### Пример 18

#### $N^1, N^1$ -Ди((гептилоксикарбонил)пентил)гексан-1,6-диамин 28e

Аналогично методике, описанной для **26a**, бромэфир **26e** получали из 6-бромгексановой кислоты (3,0 г, 15,38 ммоль), 1-гептанола (2,61 мл, 18,46 ммоль, 1,2 экв.), DIC (3,13 мл, 19,99 ммоль, 1,3 экв.) и DMAP (56 мг, 0,461 ммоль, 0,03 экв.) с получением **26e** в виде бесцветного масла (4,177 г, 92,6 %,  $R_f$  0,27 в CE5, визуализация  $\text{KMnO}_4$ ).

Аналогично методике, описанной для **27a**, Вос-производное **27e** получали из бромэфира **26e** (1,49 г, 5,08 ммоль, 2,5 экв.), *N*-Вос-1,6-диаминогексана (0,440 г, 2,03 ммоль) и карбоната калия (2,81 г, 20,34 ммоль, 10 экв.) с получением **27e** в виде бледно-желтого масла (1,076 г, 82,5 %,  $R_f$  0,15 в CE50 на планшете для ТСХ, предварительно обработанном  $\text{NH}_3$ , визуализация нингидрином).

Снятие защиты с амина **27e** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **28e** (0,895 г, 98,6 %,  $R_f$  0,17 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,40, 4,04, 3,04, 2,99, 2,31, 2,05, 1,72, 1,66, 1,61, 1,48, 1,39, 1,33-1,26, 0,88$  м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173,38, 64,64, 52,02, 33,78, 31,68, 28,88, 28,58, 26,70, 26,25, 26,13, 25,83, 25,68, 24,93, 24,20, 22,99, 22,55, 22,48, 14,03$  м.д. МСВР (ESI): m/z calcd. for  $\text{C}_{32}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  541,49388; найдено 541,49303.

#### $N^1, N^3, N^5$ -Трис(6-(бис((гептилоксикарбонил)пентил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 29e

Аналогично методике, описанной для **29a** в примере 14, липидоид **29e** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (55 мг, 0,205 ммоль), амина **28e** (444 мг, 0,820 ммоль, 4 экв.) и DIPEA (357 мкл, 2,05 ммоль, 10 экв.) с получением **29e** в виде густого бледно-желтого масла (150 мг, 39,8 %,  $R_f$  0,37 в D2, визуализация нингидрином).  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,72, 4,05, 3,21, 2,37, 2,29, 2,01, 1,83, 1,80, 1,62, 1,47, 1,42, 1,33-1,25, 0,88$  м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 175,97, 173,84, 64,42, 53,96, 41,64, 39,74, 39,53, 37,91, 34,35, 31,70, 29,59, 28,89, 28,63, 27,14, 25,87, 24,97, 22,56, 14,05$  м.д. МСВР (ESI): m/z calcd. for  $\text{C}_{109}\text{H}_{203}\text{N}_6\text{O}_{15}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  1836,53010; найдено 1836,52930.

35

### Пример 19

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-Ди(((нонан-3-ил)оксикарбонил)пропил)гексан-1,6-диамин 28f**

Аналогично методике, описанной для **26a**, бромэфир **26f** получали из 6-бромгексановой кислоты (3,2 г, 16,41 ммоль), 3-нонанола (2,60 г, 18,05 ммоль, 1,1 экв.), DIC (3,27 мл, 21,33 ммоль, 1,3 экв.) и DMAP (60 мг, 0,492 ммоль, 0,03 экв.) с получением **26f** в виде бесцветного масла (2,88 г, 54,5 %, *R*<sub>f</sub> 0,42 в SE5, визуализация KMnO<sub>4</sub>).

Следуя методике, описанной для **27a**, Вос-производное **27f** получали из бромэфира **26f** (2,82 г, 8,78 ммоль, 2,5 экв.), *N*-Вос-1,6-диаминогексана (0,760 г, 3,51 ммоль) и карбоната калия (4,86 г, 35,13 ммоль, 10 экв.) с получением **27f** в виде бледно-желтого масла (1,72 г, 70,19 %, *R*<sub>f</sub> 0,56 в SE50 на планшете для ТСХ, предварительно обработанном NH<sub>3</sub>, визуализация нингидрином).

Снятие защиты с амина **27f** проводили в соответствии с методикой, описанной для соединения **2a** в примере 1; диамин **28f** (1,84 г, количественный; *R*<sub>f</sub> 0,25 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде желтоватого масла. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,29, 4,80, 2,99, 2,305, 1,69–1,66, 1,55–1,51, 1,445, 1,38, 1,28–1,24, 0,87, 0,86 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 173,14, 75,61, 52,10, 39,27, 34,08, 33,56, 31,71, 29,15, 26,90, 26,74, 26,14, 25,69, 25,27, 24,86, 24,33, 22,97, 22,56, 22,51, 14,03, 9,57 м.д. МСВР (ESI): *m/z* calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>73</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> 597,55649; найдено 597,55631.

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-Трис(6-(бис(((нонан-3-ил)оксикарбонил)пропил)амино)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксамид 29f**

Следуя методике, описанной для **29a** в примере 14, липидоид **29f** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (50 мг, 0,186 ммоль), амина **28f** (334 мг, 746 ммоль, 4 экв.) и DIPEA (325 мкл, 1,86 ммоль, 10 экв.) с получением **29f** в виде густого бледно-желтого масла (237 мг, 63,4 %, *R*<sub>f</sub> 0,44 в D2, визуализация нингидрином). <sup>1</sup>H ЯМР-спектр (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6,385, 4,79, 3,21, 2,99, 2,305, 2,015, 1,88, 1,80, 1,73, 1,66, 1,55–1,50, 1,38–1,35, 1,27–1,24, 0,865, 0,855 м.д. <sup>13</sup>C ЯМР-спектр (150,9 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ = 176,57, 173,02, 76,58, 52,43, 51,98, 41,69, 39,89, 38,89, 37,64, 34,09, 33,55, 31,70, 29,14, 28,84, 26,90, 26,28, 26,01, 25,78, 24,39, 23,13, 22,96, 22,55, 14,04, 9,59 м.д. МСВР (MALDI): *m/z* рассчитано для C<sub>121</sub>H<sub>227</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub> [M + H]<sup>+</sup> 2004,7179; найдено 2004,7187.

30 Пример 20**6-(Ди((гептилоксикарбонил)пропил)амино)гексан-1-ол 30a**

Бромэфир **26a** (1,13 г, 4,27 ммоль, 2,5 экв.) и карбонат калия (2,36 г, 17,07 ммоль, 10 экв.) добавляли к раствору 6-аминогексан-1-ола (0,20 г, 1,71 ммоль) в ACN (10 мл), перемешивали смесь при 50 °C в течение 20 ч. Затем реакционную смесь адсорбировали на диоксиде кремния (16 г), растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали методом флэш-хроматографии на диоксиде кремния (40 г, элюирование линейным градиентом D1 в ДХМ, 0-50

%) с получением целевого соединения **30a** (0,552 г, 63,0 %;  $R_f$  0,56 в D2, визуализация  $KMnO_4$ ) в виде бледно-желтого масла.

$^1H$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 4,05, 3,63, 2,52, 2,33, 1,80, 1,61, 1,565, 1,50, 1,375, 1,32–1,27, 0,88 м.д.  $^{13}C$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 173,54, 64,63, 53,45, 52,82, 32,59, 31,78, 31,69, 28,89, 28,60, 26,95, 25,86, 25,45, 22,55, 21,78, 14,03 м.д. МСВР (ESI): m/z calcd. for  $C_{28}H_{56}NO_5$   $[M + H]^+$  486,41530; найдено 486,41467.

#### трис(6-(Ди((гептилоксикарбонил)пропил)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксилат **31a**

Тетраметилфторформамидиний гексафторфосфат (TFFH, 169 мг, 0,640 ммоль, 3,3 экв.) и DPEA (0,506 мл, 2,91 ммоль, 15 экв.) добавляли к раствору адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (52 мг, 0,194 ммоль) в безводном ДМФА (5 мл), раствор перемешивали в течение 30 мин при 0°C. Затем добавляли раствор спирта **30a** (311 мг, 0,640 ммоль, 3,3 экв.) и DMAP (7 мг, 0,058 ммоль, 0,3 экв.) в ДМФА (2,0 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при кт. Раствор переносили в делительную колбу объемом 250 мл, разбавляли насыщенным водным раствором  $NaHCO_3$  (50 мл), продукт экстрагировали диэтиловым эфиром (100 мл, 2 x 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), сушили над безводным сульфатом натрия, пропускали через фильтр-сепаратор S2 и выпаривали растворители на ротационном вакуумном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента D1 в ДХМ (от 0 до 65 %).  
Липидоид **31a** (33 мг, 10,3 %;  $R_f$  0,57 в подвижной фазе D4, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтоватого масла.  $^1H$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 4,05, 2,40, 2,05–1,94, 1,83, 1,61, 1,35–1,25, 0,886 м.д.  $^{13}C$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 176,02, 64,95, 64,45, 41,35, 39,14, 37,14, 31,67, 28,87, 28,55, 25,83, 22,54, 14,03 м.д. МСВР (MALDI): m/z рассчитано для  $C_{97}H_{176}N_3O_{18}$   $[M + H]^+$  1671,2943; найдено 1671,2973.

25

#### Пример 21

#### 6-(Ди((гексилоксикарбонил)бутил)амино)гексан-1-ол **30b**

Следуя методике, описанной для **30a**, спирт **30b** получали из 6-аминогексан-1-ола (0,20 г, 1,71 ммоль), бромэфира **26b** (1,13 г, 4,27 ммоль, 2,5 экв.) и  $K_2CO_3$  (2,36 г, 17,07 ммоль, 10 экв.) с получением **30b** в виде бледно-желтого масла (0,599 г, 72,3 %,  $R_f$  0,55 в D2, визуализация  $KMnO_4$ ).

$^1H$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 4,04, 3,63, 2,46, 2,32, 1,76, 1,60, 1,56, 1,45, 1,37–1,25, 0,87 м.д.  $^{13}C$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 173,69, 64,56, 62,79, 53,57, 52,96, 32,64, 31,90, 31,82, 29,45, 29,24, 29,21, 28,61, 27,02, 25,91, 25,51, 22,63, 14,07 м.д.

35

#### Трис(6-(ди((гексилоксикарбонил)бутил)гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксилат **31b**

Липидоид **31b** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (84 мг, 0,313 ммоль), TFFH (273 мг, 1,03 ммоль, 3,3 экв.), DIPEA (0,818 мл, 4,179 ммоль, 15 экв.), DMAP (11 мг, 0,093 ммоль, 0,3 экв.) и спирта **30b** (608 мг, 1,25 ммоль, 4 экв.) в соответствии с методикой, описанной для соединения **31a** в примере 20; липидоид **31b** (55 мг, 10,4 %;  $R_f$  0,74 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4,05, 2,96, 2,37, 2,33, 2,01, 1,94, 1,85–1,78, 1,66, 1,60, 1,38, 1,34–1,28, 0,88 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 176,01, 172,90, 64,76 – 64,34, 52,16, 47,81, 46,61, 41,35, 39,14, 37,12, 33,22, 31,38, 28,53, 25,54, 22,50, 22,09, 13,97 м.д. МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{97}\text{H}_{176}\text{N}_3\text{O}_{18}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  1671,2943; найдено 1671,2910.

### Пример 22

#### 6-(Ди((нонилоксикарбонил)пропил)амино)гексан-1-ол **30c**

Аналогично методике, описанной для **30a**, спирт **30c** получали из 6-аминогексан-1-ола (0,20 г, 1,71 ммоль), бромэфира **26c** (1,25 г, 4,27 ммоль, 2,5 экв.) и  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2,36 г, 17,07 ммоль, 10 экв.) с получением **30c** в виде бледно-желтого масла (0,651 г, 70,4 %,  $R_f$  0,59 в D2, визуализация  $\text{KMnO}_4$ ).  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4,07, 3,65, 3,09, 3,03, 2,45, 2,16, 1,89, 1,61, 1,56, 1,45, 1,34–1,25, 0,88 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 172,24, 65,25, 62,39, 52,41, 51,55, 32,11, 31,84, 30,65, 29,45, 29,22, 28,54, 26,29, 25,87, 22,65, 18,39, 14,09 м.д.

#### Трис(6-(ди((нонилоксикарбонил)пропил))гексил)адамантан-1,3,5-трикарбоксилат **31c**

Липидоид **31c** получали из адамантан-1,3,5-трикарбоновой кислоты (86 мг, 0,320 ммоль), TFFH (279 мг, 1,06 ммоль, 3,3 экв.), DIPEA (0,838 мл, 4,81 ммоль, 15 экв.), DMAP (12 мг, 0,096 ммоль, 0,3 экв.) и спирта **30c** (695 мг, 1,28 ммоль, 4 экв.) по методике, описанной для соединения **31a** в примере 20; липидоид **31c** (23 мг, 3,9 %;  $R_f$  0,91 в подвижной фазе D2, детекция с помощью нингидрина) получали в виде вязкого желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4,05, 2,37, 2,01, 1,95, 1,83, 1,61, 1,35–1,24, 0,87 м.д.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр (150,9 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 176,02, 64,70, 41,35, 39,15, 37,15, 31,82, 29,44, 29,23, 29,20, 28,58, 28,47, 25,88, 22,63, 14,07 м.д. МСВР (MALDI):  $m/z$  рассчитано для  $\text{C}_{109}\text{H}_{200}\text{N}_3\text{O}_{18}$   $[\text{M}]^+$  1839,4821; найдено 1839,4799.

### Пример 23

#### 6-(Ди((октилоксикарбонил)бутил)амино)гексан-1-ол **30d**

Следуя методике, описанной для **30a**, спирт **30d** получали из 6-аминогексан-1-ола (0,20 г, 1,71 ммоль), бромэфира **26d** (1,25 г, 4,27 ммоль, 2,5 экв.) и  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2,36 г, 17,07 ммоль, 10 экв.) с



DOPE-Cy5	$1,19 \times 10^{-3}$									
----------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

**Таблица 2.** Состав трансфекционных реагентов A11-A13.

соединение	Концентрация отдельных компонентов в трансфекционных реагентах (мМ)		
	A11	A12	A13
23	1,1	—	—
24	—	1,1	—
25	—	—	1,1
холестерин	2,18	2,18	2,18
DOPE	1,65	1,65	1,65
DMG-PEG <sub>2000</sub>	0,075	0,075	0,075

**Таблица 3.** Состав трансфекционных реагентов A14-A23.

соединение	Концентрация отдельных компонентов в трансфекционных реагентах (мМ)									
	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23
29a	1,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29b	—	1,1	—	—	—	—	—	—	—	—
29c	—	—	1,1	—	—	—	—	—	—	—
29d	—	—	—	1,1	—	—	—	—	—	—
29e	—	—	—	—	1,1	—	—	—	—	—
29f	—	—	—	—	—	1,1	—	—	—	—
31a	—	—	—	—	—	—	1,1	—	—	—
31b	—	—	—	—	—	—	—	1,1	—	—
31c	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1	—
31d	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1
холестерин	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18
DOPE	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64
DMG-PEG <sub>2000</sub>	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
DOPE-Cy5	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$

5

**Таблица 4.** Состав трансфекционных реагентов A24-A29 (A26 и A27 являются сравнительными примерами).

соединение	Концентрация отдельных компонентов в трансфекционных реагентах (мМ)					
	A24	A25	A26	A27	A28	A29
4e	1,1	1,1	—	—	1,1	—
4d	—	—	—	—	—	1,1
D-Lin-MC3-DMA	—	—	2,5	—	—	—
ТТЗ	—	—	—	1,1	—	—
холестерин	2,18	2,18	1,93	2,18	2,18	2,18
DOPE	—	—	—	1,64	1,65	1,65
DOPC	1,64	—	—	—	—	—
DSPC	—	1,64	0,49	—	—	—
DMG-PEG <sub>2000</sub>	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
DOPE-Cy5	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	—	—

Пример 25**Получение липидных наночастиц (ЛНЧ), содержащих мРНК**

ДНК, кодирующую флуоресцентный белок mKate2, амплифицировали из плазмиды pmKate2-C (Evrogen) при помощи праймеров (5'-CGCCACCATGGTGAGCGAGCTG-3' (SEQ ID NO. 1); 5'-CCTCCTCCACCTCTGTGCCCCAG-3' (SEQ ID NO. 2)) и клонировали в вектор pET24a (Invitrogen) под промоутером T7. Мессенджерную РНК (мРНК), кодирующую mKate2, транскрибировали *in vitro* с использованием набора для транскрипции Ampliscribe T7-Flash (Lucigen) согласно протоколу производителя. Аналог кэп-структуры РНК ARCA (Jena Bioscience) добавляли к реакции транскрипции *in vitro* и синтезировали поли(А) конец с использованием поли(А) полимеразы (New England Biolabs) согласно стандартному протоколу. мРНК-содержащие ЛНЧ (мРНК-ЛНЧ) получали следующим образом: 300 мкл раствора каждого из трансфекционных реагентов **A01-A27**, полученных в примере 24, смешивали с раствором 120 мкг мРНК в 300 мкл 10 mM цитратного буфера (pH 3,0) при помощи Y-образного микрофлюидного устройства с двумя входами и одним выходом для отбора проб. Липидную смесь и раствор мРНК вводили отдельно в каждое входное отверстие линейным насосом при постоянной скорости потока 300 мкл/мин. Полученный раствор наночастиц объемом 600 мкл собирали и немедленно разбавляли добавлением 600 мкл ФСБ; таким образом, из трансфекционных реагентов **A01-A27** были образованы соответствующие образцы наночастиц, обозначенные как **B01-B27**. Каждый из образцов мРНК-ЛНЧ (**B01-B27**) получали в трех повторностях. Гидродинамический диаметр свежесформированных мРНК-ЛНЧ измеряли с использованием динамического рассеяния света (NanoZS Zetasizer, Малверн, Вустершир, Великобритания) при угле рассеяния 173° и температуре 25°C. Гидродинамический диаметр мРНК-ЛНЧ варьировал от 72 до 135 нм, за исключением образца B18, диаметр которого составил 265 нм (таблица 5). В таком виде частицы использовались для последующих биологических тестов.

**Таблица 5.** Гидродинамический диаметр мРНК-ЛНЧ, включая стандартное отклонение, измеренный методом динамического рассеяния света.

ЛНЧ	Диаметр (нм)	ЛНЧ	Диаметр (нм)	ЛНЧ	Диаметр (нм)
<b>B01</b>	81,5 ± 8,0	<b>B09</b>	90,8 ± 5,5	<b>B17</b>	72,2 ± 4,0
<b>B02</b>	99,3 ± 2,7	<b>B10</b>	89,5 ± 5,0	<b>B18</b>	265,7 ± 19,9
<b>B03</b>	85,1 ± 4,1	<b>B11</b>	82,5 ± 0,2	<b>B19</b>	71,8 ± 4,2
<b>B04</b>	107,7 ± 4,2	<b>B12</b>	85,5 ± 1,1	<b>B20</b>	85,7 ± 6,4
<b>B05</b>	76,1 ± 1,9	<b>B13</b>	102,1 ± 10,7	<b>B21</b>	135,1 ± 1,1
<b>B06</b>	72,9 ± 8,6	<b>B14</b>	92,6 ± 5,1	<b>B22</b>	80,3 ± 6,7
<b>B07</b>	73,6 ± 3,9	<b>B15</b>	118,0 ± 5,5	<b>B23</b>	80,1 ± 5,4
<b>B08</b>	108,0 ± 18,3	<b>B16</b>	79,4 ± 2,7		

Пример 26**Сравнение трансфекции мРНК с использованием новых ЛНЧ in vitro с использованием различных хелперных липидов в липидной смеси**

ЛНЧ **B05**, **B24** и **B25**, содержащие мРНК, кодирующую флуоресцентный белок mKate2, полученные в трех повторностях в примере 25, исследовали на клетках клеточной линии человека HEK293. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде IMDM с добавлением 10% FBS при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-ЛНЧ (при конечной общей концентрации всех липидных компонентов 20 мкМ) и затем инкубировали в течение 24 часов. Процедуры трансфекции проводились в трех повторностях. Интенсивность флуоресценции Cy5, которая указывает на проникновение ЛНЧ в клетки, и интенсивность флуоресценции mKate2, которая указывает на трансляцию мРНК, высвобождаемой из ЛНЧ после трансфекции клеток, анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa.

Новые мРНК-ЛНЧ, липидная смесь которых содержала хелперный липид DOPE, DOPC или DSPC, были способны эффективно трансфицировать мРНК в клеточную линию HEK293, причем наиболее эффективная трансфекция была достигнута с помощью мРНК-ЛНЧ, содержащих хелперный липид DOPE (таблица 6).

**Таблица 6.** Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ, содержащих хелперные липиды DOPE (**B05**), DOPC (**B24**) или DSPC (**B25**). Указанные значения интенсивности флуоресценции Cy5 и mKate2 нормализованы к контрольному варианту трансфекции ЛНЧ, содержащими DOPE (**B05**).

ЛНЧ	Флуоресценция Cy5		Флуоресценция mKate2	
<b>B05</b>	1,00	± 0,04	1,00	± 0,19
<b>B24</b>	0,52	± 0,01	0,18	± 0,01
<b>B25</b>	0,42	± 0,03	0,12	± 0,02

Пример 27

**Сравнение трансфекции мРНК с использованием новых ЛНЧ и мРНК-ЛНЧ, образованных известными трансфекционными реагентами**

Эффективность трансфекции мРНК-ЛНЧ **B05** сравнивали с выбранными известными высокоэффективными реагентами для трансфекции, а именно D-Lin-MC3-DMA (MedChemExpress Europe) и ионизируемым липидоидом TT3 (Li, B.: *Nano Lett.* **2015**, *15*, 8099–8107), изготовленных в примере 25 как **B26-B27**, а также с реагентом Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, используется в соответствии со стандартным протоколом, предоставленным производителем, обозначается как Lip2000). Клетки клеточной линии человека HEK293T

культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% FBS при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-ЛНЧ (при конечной общей концентрации всех липидных компонентов 20 мкМ) и затем инкубировали в течение 24 часов. Процедуры трансфекции проводились в трех повторностях.

5 Интенсивность флуоресценции mKate2 и процент клеток, экспрессирующих mKate2, анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa.

Новые мРНК-ЛНЧ (обозначенные **B05**) демонстрировали значительно более высокую эффективность трансфекции, чем известные трансфекционные реагенты (таблица 7).

10 **Таблица 7.** Сравнение новых мРНК-ЛНЧ с мРНК-ЛНЧ, образованными коммерческими ионизируемыми липидами D-Lin-MC3-DMA (**B26**), TT3 (**B27**) и Lipofectamine® 2000 (Lip2000). Эффективность трансфекции выражается как процент клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2, и как интенсивность флуоресценции mKate2, нормализованная к значению контрольной трансфекции Lipofectamine® 2000.

ЛНЧ	% клеток, экспрессирующих mKate2		Флуоресценция mKate2		
<b>B05</b>	95,20	± 0,84	13,29	± 0,02	
<b>B26</b>	84,22	± 1,18	0,76	± 0,03	
<b>B27</b>	90,04	± 2,43	1,96	± 0,06	
Lip2000	40,70	± 1,13	1,00	± 0,03	

15

#### Пример 28

#### Эффективность встраивания мРНК в липидные наночастицы

Эффективность упаковки мРНК, кодирующей флуоресцентный белок mKate2, в мРНК-ЛНЧ **B01-B27**, полученные в примере 25, определяли с использованием набора для анализа Qubit 4 RNA HS Assay Kit (Life Technologies) согласно протоколу производителя. Эффективность встраивания определяли путем сравнения концентрации мРНК, свободно доступной в растворе наночастиц, и концентрации мРНК, высвобождающейся из наночастиц после их распада. мРНК-ЛНЧ растворяли с помощью буфера, содержащего Triton X-100 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, 2% Triton X-100). Была продемонстрирована эффективность упаковки мРНК в

20

25 диапазоне от 43 до 93 % (таблица 8).

**Таблица 8.** Эффективность упаковки мРНК, кодирующей флуоресцентный белок mKate2, в мРНК-ЛНЧ, включая стандартные отклонения, с использованием тройных повторностей.

ЛНЧ	Упаковка мРНК (%)		ЛНЧ	Упаковка мРНК (%)		ЛНЧ	Упаковка мРНК (%)	
<b>B01</b>	92,59	± 2,79	<b>B09</b>	67,51	± 6,27	<b>B17</b>	65,9	± 7,3
<b>B02</b>	82,30	± 2,20	<b>B10</b>	78,33	± 0,79	<b>B18</b>	65,3	± 3,8

<b>B03</b>	90,94 ± 0,55	<b>B11</b>	92,3 ± 4,4	<b>B19</b>	83,6 ± 1,8
<b>B04</b>	93,18 ± 0,77	<b>B12</b>	88,3 ± 1,0	<b>B20</b>	43,4 ± 5,8
<b>B05</b>	80,86 ± 2,31	<b>B13</b>	78,3 ± 7,0	<b>B21</b>	54,8 ± 2,8
<b>B06</b>	83,74 ± 0,24	<b>B14</b>	60,8 ± 2,8	<b>B22</b>	66,3 ± 9,8
<b>B07</b>	76,49 ± 6,16	<b>B15</b>	62,2 ± 4,2	<b>B23</b>	64,2 ± 1,7
<b>B08</b>	81,22 ± 1,33	<b>B16</b>	64,3 ± 1,4		

### Пример 29

#### **Клеточная токсичность мРНК-ЛНЧ**

Клеточную линию человека, полученную из эмбриональных клеток почки (HEK293), ту же  
 5 линию, экспрессирующую большой Т-антиген SV40 (HEK293T), клеточную линию,  
 полученную из остеосаркомы человека (U2OS), и клеточную линию карциномы гепатоцитов  
 человека (HepG2) культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл  
 питательной среды на лунку) в модифицированной среде Дульбекко (DMEM) или в среде  
 10 IMDM (модифицированная среда Дульбекко от Iscove) с добавлением 10% эмбриональной  
 бычьей сыворотки (FBS) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-  
 ЛНЧ, полученными в трех повторностях в примере 25 (конечная общая концентрация всех  
 липидных компонентов в лунке составляла 20 мкМ) или 10 мкл мРНК-ЛНЧ (конечная общая  
 концентрация всех липидных компонентов в лунке составляла 100 мкМ), и затем инкубировали  
 в течение 24 часов. Цитотоксичность ЛНЧ анализировали с помощью набора для определения  
 15 жизнеспособности клеток CellTiterGlo 2.0 (Promega, США). Жизнеспособность клеток  
 нормализовывали к нетрансфицированным клеткам (контроль). Результаты обобщены в  
 таблицах 9А,В и 10А,В.

При использовании мРНК-ЛНЧ с общей концентрацией всех липидных компонентов 20 мкМ  
 максимальная цитотоксичность, измеренная в клеточной линии HEK293, составила 16 %,   
 20 определенная для **B02** и **B03**. Для частиц **B01** и **B05-B23** не было показано существенной  
 токсичности. При 5-кратной общей концентрации всех липидных компонентов 100 мкМ  
 тенденция была аналогичной, с наибольшей токсичностью 38 % в **B03**; частицы **B04-B08** имели  
 цитотоксичность приблизительно 20 %, в **B09** и **B10** токсичность не наблюдалась. Частицы  
**B11-B23** также не проявляли токсичности. В линии HEK293T самая высокая цитотоксичность  
 25 была снова зарегистрирована в **B02** и **B03**; в других частицах токсичность была очень низкой.  
 Частицы с общей концентрацией всех липидных компонентов 20 мкМ практически не  
 проявляли токсичности на клеточной линии U2OS, при концентрации 100 мкМ максимальная  
 токсичность составляла 35 % для частиц **B10**. Частицы, образованные липидоидами **4a**, **4b**, **4d** и  
**4e**, были нетоксичными, частицы, образованные липидоидами **4f**, **4g**, **9** и **13**, были крайне  
 30 слаботоксичными (табл. 9А, табл. 10В).

**Таблица 9А.** Цитотоксичность мРНК-ЛНЧ, выраженная как жизнеспособность клеток (%) после добавления 20 мкМ трансфекционной смеси с мРНК для отдельных типов клеточных линий.

ЛНЧ	HEK293		HEK293T		U2OS	
Контроль	100,00	± 6,75	100,00	± 2,34	100,00	± 2,65
<b>B01</b>	98,15	± 1,00	95,54	± 0,29	96,51	± 0,47
<b>B02</b>	84,02	± 1,98	80,75	± 2,61	98,08	± 1,38
<b>B03</b>	84,62	± 0,32	75,04	± 2,58	90,09	± 1,64
<b>B04</b>	91,76	± 0,45	89,54	± 1,13	98,59	± 0,88
<b>B05</b>	98,98	± 1,73	93,75	± 2,51	96,45	± 2,97
<b>B06</b>	96,89	± 4,71	92,70	± 2,59	92,75	± 2,53
<b>B07</b>	96,91	± 5,64	93,45	± 0,94	92,53	± 2,70
<b>B08</b>	97,70	± 5,13	95,16	± 4,00	92,98	± 4,65
<b>B09</b>	107,46	± 6,15	84,34	± 3,78	95,89	± 1,87
<b>B10</b>	97,13	± 3,47	81,06	± 2,69	98,92	± 1,11

5 **Table 9B.** Цитотоксичность мРНК-ЛНЧ, выраженная как жизнеспособность клеток (%) после добавления 20 мкМ трансфекционной смеси с мРНК для отдельных типов клеточных линий.

ЛНЧ	HEK293T		HepG2	
<b>B11</b>	103,8	± 6,8	104,2	± 8,4
<b>B12</b>	99,3	± 6,5	105,7	± 4,5
<b>B13</b>	101,5	± 5,6	104,0	± 7,6
<b>B14</b>	102,3	± 3,7	106,6	± 4,8
<b>B15</b>	98,9	± 1,4	99,7	± 1,9
<b>B16</b>	100,7	± 1,7	107,4	± 3,3
<b>B17</b>	100,2	± 4,5	108,7	± 4,9
<b>B18</b>	100,2	± 3,8	104,2	± 1,3
<b>B19</b>	96,6	± 1,6	79,6	± 4,2
<b>B20</b>	101,7	± 1,8	106,3	± 2,4
<b>B21</b>	105,6	± 1,9	106,4	± 1,2
<b>B22</b>	104,3	± 1,6	106,6	± 3,0
<b>B23</b>	102,9	± 1,1	104,7	± 5,0

**Таблица 10А.** Цитотоксичность мРНК-ЛНЧ, выраженная как жизнеспособность клеток (%) после добавления 100 мкМ трансфекционной смеси с мРНК для отдельных типов клеточных линий.

10

ЛНЧ	HEK293		HEK293T		U2OS	
Контроль	100,00	± 6,75	100,00	± 2,34	100,00	± 2,65
<b>B01</b>	95,98	± 0,88	90,01	± 0,24	94,63	± 0,58
<b>B02</b>	70,24	± 2,90	65,65	± 2,32	91,32	± 2,40
<b>B03</b>	62,00	± 2,89	57,21	± 2,18	75,64	± 4,92
<b>B04</b>	77,44	± 1,35	78,14	± 1,30	97,02	± 0,73

ЛНЧ	HEK293			HEK293T			U2OS		
<b>B05</b>	88,00	±	4,82	88,92	±	1,39	96,51	±	1,87
<b>B06</b>	81,58	±	3,97	83,86	±	0,98	83,31	±	1,74
<b>B07</b>	87,19	±	1,71	91,09	±	1,98	85,02	±	1,37
<b>B08</b>	77,93	±	14,22	88,46	±	2,81	84,76	±	2,16
<b>B09</b>	100,44	±	12,84	82,46	±	5,08	84,88	±	5,59
<b>B10</b>	94,09	±	5,58	86,73	±	8,29	65,30	±	7,71

**Таблица 10В.** Цитотоксичность мРНК-ЛНЧ, выраженная как жизнеспособность клеток (%) после добавления 100 мкМ трансфекционной смеси с мРНК для отдельных типов клеточных линий.

ЛНЧ	HEK293T			HepG2		
<b>B11</b>	98,2	±	3,3	99,7	±	3,8
<b>B12</b>	95,9	±	3,8	101,6	±	3,1
<b>B13</b>	90,9	±	4,3	96,3	±	3,0
<b>B14</b>	98,3	±	0,7	103,8	±	4,5
<b>B15</b>	97,5	±	0,6	109,9	±	9,6
<b>B16</b>	96,8	±	3,3	108,5	±	5,1
<b>B17</b>	96,7	±	2,9	105,1	±	6,6
<b>B18</b>	101,5	±	5,9	108,2	±	4,6
<b>B19</b>	82,2	±	1,8	84,4	±	4,2
<b>B20</b>	96,9	±	4,2	104,5	±	3,8
<b>B21</b>	96,7	±	1,7	102,3	±	6,7
<b>B22</b>	96,1	±	3,1	103,1	±	4,3
<b>B23</b>	100,1	±	4,4	103,6	±	3,9

5

### Пример 30

#### Трансфекция мРНК с использованием новых ЛНЧ *in vitro*

Клеточную линию человека, полученную из эмбриональных почек (HEK293), ту же линию, экспрессирующую большой Т-антиген SV40 (HEK293T), клетки карциномы печени (HepG2, Huh7) и клеточную линию, полученную из остеосаркомы человека (U2OS), культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в модифицированной среде Дульбекко (DMEM) или в среде IMDM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-ЛНЧ **B01-B05**, полученных в примере 25 (конечная общая концентрация всех липидных компонентов в лунке составляла 20 мкМ), несущих мРНК, кодирующую флуоресцентный белок mKate2, и затем инкубировали в течение 24 часов. В качестве контрольного трансфекционного реагента использовали Lipofectamine<sup>®</sup> 2000. Процедуры трансфекции проводили в трех биологических повторностях, причем каждая биологическая повторность включала три технические повторности. Процент клеток, экспрессирующих

флуоресцентный белок mKate2, и интенсивность флуоресценции mKate2 анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa. Применительно к интенсивности флуоресценции данные нормализованы к коммерческому трансфекционному реагенту Lipofectamine® 2000.

Для линии HEK293 процент клеток, экспрессирующих белок mKate2, был более чем в 2 раза выше для всех используемых липидоидов, чем для коммерчески доступного реагента для трансфекции. Интенсивность флуоресценции была более чем в 2 раза выше для всех используемых липидоидов, при использовании частиц **B02**, образованными липидоидом **4d**, она была в 3 раза выше, чем для коммерчески доступного Lipofectamine® 2000. мРНК-ЛНЧ, образованные с использованием новых липидоидов, трансфицировали клеточную линию HepG2 во всех случаях по меньшей мере в 2,5 раза лучше, чем коммерческий реагент Lipofectamine® 2000, интенсивность флуоресценции для мРНК-ЛНЧ **B03**, образованных с использованием липидоида **4c**, была в 4,5 раза выше, чем для реагента Lipofectamine® 2000. Аналогичное улучшение трансфекции с новыми мРНК-ЛНЧ по сравнению с коммерческим реагентом Lipofectamine® 2000 было достигнуто в других клеточных линиях (табл. 11, табл. 12).

**Таблица 11.** Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ на различных клеточных линиях, выраженная как процент клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2 из мРНК, трансфицированной частицами для линий HEK293, HepG2, HEK293T, Huh7 и U2OS. Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p всегда относятся к контрольному варианту трансфекции реагентом Lip2000 в соответствующей клеточной линии; значения  $p < 0,001$  обозначены буквой "a".

ЛНЧ	HEK293	p	HepG2	p	HEK293T	p	Huh7	p	U2OS	p
<b>B01</b>	91,24 ± 4,25	a	94,57 ± 0,38	a	–		97,08 ± 0,40	a	–	
<b>B02</b>	96,39 ± 0,72	a	97,10 ± 0,70	a	93,10 ± 1,63	a	–		–	
<b>B03</b>	95,63 ± 0,79	a	96,93 ± 0,39	a	92,31 ± 1,56	a	88,23 ± 2,61	a	82,37 ± 1,68	a
<b>B04</b>	90,57 ± 1,54	a	97,56 ± 0,36	a	93,53 ± 3,58	a	90,66 ± 0,79	a	–	
<b>B05</b>	91,56 ± 3,02	a	96,42 ± 0,75	a	93,53 ± 3,58	a	96,26 ± 0,37	a	–	
Lip2000	42,63 ± 17,56	a	38,10 ± 1,54	a	46,03 ± 1,88	a	64,67 ± 1,40	a	53,93 ± 1,93	a

**Таблица 12.** Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ для различных клеточных линий, выраженная как относительная интенсивность флуоресценции mKate2 из мРНК, трансфицированной частицами для линий HEK293, HepG2, HEK293T, Huh7 и U2OS. Применительно к интенсивности флуоресценции данные нормализованы к коммерческому трансфекционному реагенту Lipofectamine® 2000. Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p всегда относятся к контрольному варианту трансфекции реагентом Lip2000 в соответствующей клеточной линии; значения  $p < 0,001$  отмечены буквой "a",  $p < 0,01$  отмечены буквой "b".

ЛНЧ	HEK293	p	HepG2	p	HEK293T	p	Huh7	p	U2OS	p
<b>B01</b>	2,33 ± 0,17	a	3,05 ± 0,22	a	–		2,04 ± 0,09	a	–	
<b>B02</b>	2,74 ± 0,37	a	2,87 ± 0,17	a	3,00 ± 0,47	a	–		–	
<b>B03</b>	2,92 ± 0,38	a	4,54 ± 0,22	a	3,93 ± 0,57	a	1,19 ± 0,08	b	2,07 ± 0,27	a
<b>B04</b>	3,08 ± 0,21	a	3,93 ± 0,24	a	3,50 ± 0,55	a	1,26 ± 0,08	a	–	
<b>B05</b>	2,61 ± 0,11	a	3,48 ± 0,32	a	2,87 ± 0,31	a	1,96 ± 0,13	a	–	
Lip2000	1,00 ± 0,30	a	1,00 ± 0,11	a	1,00 ± 0,05	a	1,00 ± 0,03	ab	1,00 ± 0,03	a

### Пример 31

#### Трансфекция мРНК с использованием новых ЛНЧ, образованных липидоидами, модифицированными в "Z"

- 5 Клеточную линию человека HepG2 культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% FBS при 37°C в 5%CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-ЛНЧ **B11-B13**, приготовленными в примере 25 (конечная общая концентрация всех липидных компонентов в лунке составляла 20 мкМ), затем инкубировали в течение 24 часов. В качестве контрольного трансфекционного реагента
- 10 использовали Lipofectamine® 2000. Процедуры трансфекции проводили в трех биологических повторностях, причем каждая биологическая повторность включала три технические повторности. Процент клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2, и интенсивность флуоресценции mKate2 анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa. Новые мРНК-ЛНЧ с Z-модифицированными заместителями липидоидов были способны
- 15 эффективно трансфицировать мРНК в клеточную линию HepG2 (табл. 13) во всех случаях лучше по сравнению с контрольным трансфекционным реагентом Lipofectamine® 2000.

**Таблица 13.** Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ, выраженная в процентах клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2 и как относительная интенсивность флуоресценции mKate2 из мРНК, трансфицированной частицами для клеточной линии HepG2. Применительно к интенсивности флуоресценции данные нормализованы к коммерческому трансфекционному реагенту Lipofectamine® 2000 (Lip2000). Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p всегда относятся к контрольному варианту трансфекции реагентом Lip2000 в соответствующей клеточной линии; значения p <0,001 обозначены буквой "a".

ЛНЧ	% клеток, экспрессирующих mKate2	p	Интенсивность флуоресценции	p
<b>B11</b>	97,92 ± 0,62	a	3,81 ± 0,51	a
<b>B12</b>	95,92 ± 2,55	a	1,62 ± 0,34	a
<b>B13</b>	95,31 ± 0,53	a	2,23 ± 0,26	a
<b>Lip2000</b>	40,70 ± 1,13	a	1,00 ± 0,03	a

Пример 32**Трансфекция мРНК с использованием новых ЛНЧ, образованных биоразлагаемыми липидоидами**

- 5 Клеточные линии человека HEK293, HEK293T и U2OS культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM или IMDM с добавлением 10% FBS при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-ЛНЧ **B05**, **B08–B10** и **B14–B23**, полученных в примере 25 (конечная общая концентрация всех липидных компонентов в лунке составляла 20 мкМ), затем инкубировали в течение 24 часов. В качестве
- 10 контрольного трансфекционного реагента использовали Lipofectamine® 2000. Процедуры трансфекции проводили в трех биологических повторностях, причем каждая биологическая повторность включала три технические повторности. Процент клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2, и интенсивность флуоресценции mKate2 анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa.
- 15 Клеточные линии были трансфицированы значительно лучше с новыми мРНК-ЛНЧ по сравнению с коммерческим реагентом Lipofectamine® 2000. Липидоиды **4e**, **9**, **13** и **21** оказывали сопоставимое влияние на процент трансфицированных клеток. Интенсивность флуоресценции транслируемой мРНК, кодирующей белок mKate2, всегда была значительно повышенной в линиях HEK293 и HEK293T по сравнению с коммерческим реагентом Lipofectamine® 2000. В
- 20 линии U2OS липидоид **13** трансфицировался аналогично липидоиду **4e** (табл. 14, табл. 15).

**Таблица 14.** Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ для различных клеточных линий, выраженная в процентах клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2 из мРНК, трансфицированной частицами. Приведены линии HEK293, HEK293T и U2OS. Статистические

25 данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p всегда относятся к контрольному варианту трансфекции реагентом Lip2000 в соответствующей клеточной линии; значения  $p < 0,001$  обозначены буквой "a".

ЛНЧ	HEK293	p	HEK293T	p	U2OS	p
<b>B08</b>	86,50 ± 0,71	a	95,63 ± 4,50	a	86,87 ± 4,72	a
<b>B09</b>	87,50 ± 2,15	a	96,03 ± 4,79	a	88,65 ± 0,93	a
<b>B10</b>	86,50 ± 0,71	a	96,83 ± 3,52	a	86,85 ± 2,32	a
<b>B14</b>			92,94 ± 0,90	a		
<b>B15</b>			87,30 ± 1,44	a		
<b>B16</b>			92,81 ± 0,95	a		
<b>B17</b>			92,94 ± 2,50	a		
<b>B18</b>			92,16 ± 2,02	a		
<b>B19</b>			99,67 ± 0,12	a		

<b>B20</b>		90,23 ± 0,38	a			
<b>B21</b>		91,68 ± 0,53	a			
<b>B05</b>	89,20 ± 0,34	a	98,57 ± 0,23	a	90,15 ± 2,10	a
Lip2000	36,73 ± 1,86	a	59,40 ± 2,78	a	38,87 ± 3,18	a

**Таблица 15.** Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ для различных клеточных линий, выраженная как относительная интенсивность флуоресценции mKate2, относящаяся к контрольному варианту трансфекции с Lip2000. Приведены линии НЕК293, НЕК293Т и U2OS.

5 Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p всегда относятся к контрольному варианту трансфекции реагентом Lip2000 в соответствующей клеточной линии; значения p <0,001 отмечены буквой "a", p <0,01 отмечены буквой "b".

ЛНЧ	НЕК293	p	НЕК293Т	p	U2OS	p
<b>B08</b>	3,11 ± 0,49	a	1,37 ± 0,08	b	1,08 ± 0,12	b
<b>B09</b>	4,31 ± 0,62	a	1,49 ± 0,13	a	1,93 ± 0,05	a
<b>B10</b>	2,96 ± 0,19	a	1,77 ± 0,26	b	1,06 ± 0,11	b
<b>B14</b>			1,41 ± 0,04	a		
<b>B15</b>			2,51 ± 0,21	a		
<b>B16</b>			1,03 ± 0,14			
<b>B17</b>			1,74 ± 0,29	b		
<b>B18</b>			1,94 ± 0,08	a		
<b>B19</b>			7,47 ± 0,90	a		
<b>B05</b>	8,54 ± 0,44	a	2,93 ± 0,15	a	2,14 ± 0,10	a
Lip2000	1,00 ± 0,09	a	1,00 ± 0,11	ab	1,00 ± 0,15	ab

### Пример 33

#### 10 Трансфекция миРНК с использованием новых ЛНЧ *in vitro*

ЛНЧ, содержащие малую интерферирующую РНК (миРНК, номер по каталогу AM4626, Ambion), вызывающую деградацию мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), получали следующим образом: 300 мкл раствора трансфекционного реагента **A28**, приготовленного в примере 24, смешивали с раствором 1,20 нмоль миРНК в 300 мкл 10 мМ цитратного буфера (рН 3,0) с использованием микрофлюидного устройства аналогично

15 примеру 25. Полученные миРНК-ЛНЧ немедленно разводили в 600 мкл ФСБ; в результате из трансфекционного реагента **A28** получали соответствующие наночастицы, обозначенные как **B28**. ЛНЧ, несущие контрольные (скремблированные; 4390843, Ambion) миРНК, которые не нацелены на эндогенно транскрибируемую в клетке мРНК (**B29**), были получены аналогичным

20 образом. Липофектамин RNAiMax (Invitrogen) использовали в качестве контрольного трансфекционного реагента специально для трансфекции миРНК в соответствии со стандартным протоколом производителя. Для нокдауна миРНК-ЛНЧ использовали клеточную

линию человека U2OS, стабильно экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл миРНК-ЛНЧ, конечная общая концентрация всех липидных компонентов в лунке составляла 20 мкМ; конечная концентрация миРНК составляла 16 нМ), затем инкубировали в течение 24 часов. Процедуры трансфекции выполняли в трех биологических повторностях. Процент клеток, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок GFP, и интенсивность флуоресценции GFP анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa.

При использовании новых миРНК-ЛНЧ (**B28**) наблюдалось снижение экспрессии GFP до 1 % GFP-экспрессирующих клеток; при использовании коммерческого реагента RNAiMax экспрессия GFP все еще детектировалась в 13,6 % клеток. Интенсивность флуоресценции GFP при использовании новых миРНК-ЛНЧ (**B28**) снизилась в 1,25 раза по сравнению с коммерческим реагентом RNAiMax (табл. 16).

**Таблица 16.** Снижение GFP-кодирующей мРНК в клеточной линии U2OS с помощью миРНК-ЛНЧ (**B28**), выраженное в процентах GFP-экспрессирующих клеток и интенсивности флуоресценции GFP по сравнению с коммерческим трансфекционным реагентом RNAiMax и миРНК-ЛНЧ, несущей контрольную миРНК (**B29**). Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p относятся к испытываемой трансфекционной смеси **B28**; значения  $p < 0,001$  обозначены буквой "a",  $p < 0,01$  обозначены буквой "b".

ЛНЧ	% клеток, экспрессирующих GFP			p	Интенсивность флуоресценции GFP			p
Контроль	82,30	±	1,60		0,86	±	0,02	
<b>B28</b>	1,00	±	0,30	a	0,26	±	0,03	ab
<b>B29</b>	83,60	±	0,90	a	0,92	±	0,06	a
RNAiMax	13,60	±	1,20	a	0,32	±	0,03	b

миРНК-ЛНЧ, содержащие малую интерферирующую РНК (миРНК, номер по каталогу 4392420, Ambion), вызывающую деградацию мРНК, кодирующей тирозил-ДНК фосфодиэстеразу 2 (TDP2), получали таким же образом, как частицы **B28** в настоящем примере. Таким образом, соответствующие наночастицы, обозначенные как **B30**, были образованы из трансфекционного реагента **A28**. ЛНЧ, несущие контрольные (скремблированные; 4390843, Ambion) миРНК, которые не нацелены на эндогенно транскрибируемую в клетке мРНК (**B29**), также использовали в качестве контроля. Липофектамин RNAiMax (Invitrogen) использовали в качестве контрольного трансфекционного реагента специально для трансфекции миРНК.

Клеточную линию человека HEK293 и две линии, полученные из множественной миеломы человека, которые очень трудно трансфицировать доступными трансфекционными реагентами, использовали для нокдауна миРНК-ЛНЧ ((Brito J.L.R., Brown N., Morgan G.J. (2010) Transfection of siRNAs in Multiple Myeloma Cell Lines. In: Min WP., Ichim T. (eds) RNA Interference. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 623. Humana Press).

Клетки культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл миРНК-ЛНЧ (с конечной общей концентрацией всех липидных компонентов 20 мкМ и конечной концентрацией миРНК 16 нМ), после чего инкубировали в течение 24 часов. Процедуры трансфекции выполняли в трех биологических повторностях. РНК выделяли с помощью набора RNAeasy Plus Micro Kit (Qiagen). кДНК получали с помощью TATAA GrandScript cDNA Supermix (TATAAbiocenter) согласно рекомендациям производителя. Количественную ОТ-ПЦР проводили в LightCycler 480 (Roche Life Science). Праймеры для амплификации мРНК, кодирующей TDP2, были следующими: 5'-CGAGAGGAGGGTCTCAAAGAG-3' (SEQ ID NO. 3) и 5'-ATTTCGGGAAGGCTGCTGTC-3' (SEQ ID NO. 4). Для нормализации данных использовали мРНК, кодирующую GAPDH (праймеры: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3' (SEQ ID NO. 5) и 5'-TGGACTCCACGACGТАCTCA-3' (SEQ ID NO. 6)).

Во всех этих случаях новые миРНК-ЛНЧ значительно снижали уровень мРНК TDP2 в клетках по сравнению с коммерческим трансфекционным реагентом RNAiMax. В клеточной линии HEK293 снижение составило 2,86 раза, в линии миеломы OPM-2 — 4,3 раза, и в линии миеломы RPMI8226 — 6,7 раза по сравнению с коммерческим реагентом для трансфекции миРНК (табл. 17).

**Таблица 17.** Снижение уровней эндогенно экспрессируемой мРНК TDP2 в клетках с помощью новых миРНК-ЛНЧ (**B30**) по сравнению с коммерческим реагентом для трансфекции RNAiMax и по сравнению с контрольными миРНК-ЛНЧ (**B29**) в клеточных линиях HEK293, OPM-2 и RPMI8226.

Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p относятся к исследуемой трансфекционной смеси **B30**; значения p < 0,001 обозначены буквой "а".

ЛНЧ	HEK293	p	OPM-2	p	RPMI8226	p
Контроль	1,00 ± 0,10		1,00 ± 0,01		1,00 ± 0,03	
<b>B30</b>	0,03 ± 0,01	а	0,14 ± 0,02	а	0,13 ± 0,00	а
<b>B29</b>	0,99 ± 0,17	а	1,09 ± 0,01	а	0,78 ± 0,01	а
RNAiMax	0,09 ± 0,01	а	0,58 ± 0,02	а	0,87 ± 0,11	а

Пример 34**Трансфекция плазмидной ДНК с использованием новых ЛНЧ *in vitro***

ЛНЧ, содержащие плазмидную ДНК размером 4706 п.н. (Evrogen, кат. № FP181), кодирующую флуоресцентный белок mKate2, получали следующим образом: 300 мкл раствора реагента для трансфекции **A28**, полученного в Примере 24, смешивали с раствором 120 мкг плазмидной ДНК в 300 мкл 10 мМ цитратного буфера (pH 3,0) с использованием микрофлюидного устройства, аналогично примеру 25. Полученные ДНК-ЛНЧ немедленно разводили в 600 мкл ФСБ; в результате из трансфекционного реагента **A28** получали соответствующие наночастицы, обозначенные как **B31**. Процедуры трансфекции проводили на клеточной линии человека НЕК293Т. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл ДНК-ЛНЧ (при конечной общей концентрации всех липидных компонентов 20 мкМ) и затем инкубировали в течение 24 часов. В качестве контрольного трансфекционного реагента использовали Lipofectamine® 2000 (Lip2000, Invitrogen). Процедуры трансфекции проводили в трех биологических повторностях, причем каждая биологическая повторность включала три технические повторности. Процент клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2, и интенсивность флуоресценции mKate2 анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa.

Процент клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate2, был в 3,8 раза выше при использовании новых ДНК-ЛНЧ по сравнению с коммерческим реагентом для трансфекции. Интенсивность флуоресценции была в 2,9 раза выше, чем при использовании коммерческого реагента (табл. 18).

**Таблица 18.** Эффективность трансфекции новых ДНК-ЛНЧ (**B31**) по сравнению с коммерческим реагентом Lipofectamine® 2000 (Lip2000) в клеточной линии НЕК293Т, выраженная в % клеток, экспрессирующих mKate2, и в интенсивности флуоресценции mKate2. Применительно к интенсивности флуоресценции данные нормализованы к коммерческому трансфекционному реагенту Lipofectamine® 2000. Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения  $p < 0,001$  обозначены буквой "а".

ЛНЧ	% клеток, экспрессирующих mKate2			р	Интенсивность флуоресценции mKate2			р
<b>B31</b>	91,16	±	0,98	а	2,93	±	0,36	а
Lip2000	24,30	±	1,00	а	1,00	±	0,07	а

30

Пример 35**Трансфекция мРНК с новыми ЛНЧ в первичные гепатоциты человека**

Ген, кодирующий биолюминесцентный белок NanoLuc, амплифицировали из плазмиды pET51b(+)\_S-Luc\_CLIP (Addgene, кат. № 113923; любезно предоставлен Каем Джонссоном (Kai Johnsson)) с использованием праймеров: (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3' (SEQ ID NO. 7); 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO. 8)). Мессенджерную РНК (мРНК) получали *in vitro* аналогично примеру 25 и упаковали в ЛНЧ следующим образом: 300 мкл образца трансфекционного реагента **A28** и 120 мкг мРНК в 300 мкл 10 мМ цитратного буфера (рН 3,0) собирали в ЛНЧ с использованием микрофлюидного устройства аналогично примеру 25. Полученные мРНК-ЛНЧ немедленно разводили в 600 мкл ФСБ; в результате из трансфекционного реагента **A28** получали соответствующие наночастицы, обозначенные как **B32**. Первичные гепатоциты выделяли из человеческого донора в соответствии с опубликованным протоколом (LeCluyse, E.L.: *Methods in Molecular Biology* 2005; 290, 207-230). Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-ЛНЧ (при конечной общей концентрации всех липидных компонентов 20 мкМ) и инкубировали в течение 24 часов. В качестве контроля использовали трансфекционный реагент Lipofectamine® 2000. Затем к клеткам добавляли субстрат из набора для анализа люциферазы Nano-Glo® (Promega) и анализировали интенсивность люминесценции с помощью микропланшетного ридера Infinite® M1000 PRO (Tecan). Новые мРНК-ЛНЧ эффективно трансфицировали первичные гепатоциты человека со значительным увеличением люминесценции в 2,0 раза по сравнению с нетрансфицированным контролем (табл. 19).

**Таблица 19.** Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ (**B32**) в первичной линии гепатоцитов человека по сравнению с коммерческим реагентом для трансфекции Lipofectamine® 2000, выраженная как интенсивность биолюминесценции, нормализованная к значению контрольной трансфекции. Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения  $p < 0,05$  обозначены буквой "с".

ЛНЧ	интенсивность биолюминесценции		р
<b>B32</b>	1,97	± 0,60	с
Lip2000	1,00	± 0,12	с

### Пример 36

#### **Трансфекция циклических динуклеотидов новыми ЛНЧ *in vitro***

Циклический динуклеотид (2',3'-cGAMP) (Sigma, кат. № SML1229-.5UMO) упаковывали в ЛНЧ следующим образом: 300 мкл образцов реагентов для трансфекции **A01-A06** и 120 нмоль cGAMP в 300 мкл 10 мМ цитратного буфера (рН 3,0) добавляли в ЛНЧ с использованием микрофлюидного устройства аналогично примеру 25. Полученные cGAMP-ЛНЧ немедленно разводили в 600 мкл ФСБ; таким образом, из соответствующих трансфекционных реагентов

**A01-A06** получали образцы наночастиц, обозначенные как **V33-V38**. Для анализа эффективности трансфекции частиц сGAMP-ЛНЧ использовали репортерный анализ, показывающий степень индукции интерферонового ответа циклическим динуклеотидом сGAMP через путь STING. Для этой цели использовали клеточную репортерную линию HEK293T, экспрессирующую общий тип белка STING, и репортерный ген люциферазы под интерферон IRF3-стимулируемым (ISRE) промотором согласно Novotná *et al.* (Novotná, B.: *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (23), 10676-10690). Клетки переносили в 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One), покрытые поли-D-лизинном (Sigma-Aldrich), при плотности  $2,5 \times 10^4$  в среде DMEM, содержащей глюкозу (содержащую L-глутамин; Biowest), с добавлением 10% FBS (Capricorn Scientific) и 1% пенициллина-стрептомицина (Biowest). После инкубации при 37°C в 5%CO<sub>2</sub> в течение ночи в клетки добавляли последовательно разведенные соединения в течение 7 часов. Одновременно с этим инкубировали клетки HEK293T только с исследуемыми соединениями в течение 30 минут, дважды промывали свежей средой, а затем культивировали в течение дополнительных 6,5 часов. Наконец, 50 мкл среды для культивирования клеток смешивали с 30 мкл реагента Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) в белых 96-луночных планшетах и измеряли люминесценцию на спектрофотометре Spark® (TECAN, Grödig). Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC<sub>50</sub>) рассчитывали с использованием GraphPad Prism (La Jolla), как описано в Novotná *et al.* (Novotná, B.: *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (23), 10676-10690) (табл. 20).

Циклический динуклеотид 2',3'-сGAMP показал значения EC<sub>50</sub> активации STING равные ± 30 мкМ. Все новые сGAMP-ЛНЧ, образованные ионизируемыми липидоидами **4a-4f**, эффективно трансфицировали клетки HEK293T и активировали STING в наномолярной области, увеличивая эффективность трансфекции примерно в 2000-15000 раз. Наибольшую эффективность показал липидоид **4d** со значением EC<sub>50</sub> равным  $2,00 \pm 0,36$  нМ.

**Таблица 20.** Значения EC<sub>50</sub> для активации STING для 2',3'-сGAMP, трансфицированного новыми сGAMP-ЛНЧ (**V33-V38**), образованными ионизируемыми липидоидами **4a-4f**.

ЛНЧ	EC <sub>50</sub> для активации STING (нМ)		
<b>V33</b>	9,00	±	1,75
<b>V34</b>	12,00	±	1,80
<b>V35</b>	10,00	±	6,42
<b>V36</b>	2,00	±	0,36
<b>V37</b>	4,00	±	1,12
<b>V38</b>	14,00	±	2,61

Пример 37

### Токсичность новых мРНК-ЛНЧ *in vivo*

Мессенджерную РНК (мРНК), кодирующую белок NanoLuc, получали и упаковали в частицы аналогично примеру 35. Полученные мРНК-ЛНЧ (**B32**) вводили внутрибрюшинно трем мышам C57B1/6 (BIOCEV, Вестец) в концентрации 0,5 мг мРНК/кг, при этом трем контрольным мышам C57B1/6 вводили внутрибрюшинно ФСБ. Другим трем мышам C57B1/6 вводили мРНК-ЛНЧ в 5-кратной концентрации (2,5 мг мРНК/кг) таким же образом. Аналогичным образом, идентичные дозы мРНК-ЛНЧ снова вводили 3 мышам C57B1/6 (0,5 мг мРНК/кг) и 3 мышам C57B1/6 (2,5 мг мРНК/кг) внутривенно, перед введением животных анестезировали (2,5 мг/мышь кетамина, 0,4 мг/мышь ксилазина, Bioveta). Затем за мышами наблюдали в течение 48 часов, и ни у одной из них не было обнаружено каких-либо признаков токсичности или фенотипических изменений по сравнению с контрольными животными.

### Пример 38

#### Биораспределение новых мРНК-ЛНЧ *in vivo*

Ген, кодирующий белок CRE-рекомбиназы, амплифицировали из плазмиды pCAG-Cre-IRES2-GFP (Addgene, кат. № 26646, предоставлен Анджен Ченн (Anjen Chenn)) с использованием праймеров: (5'- ТААТАСГАСТСАСТАТАГААТТТАСТ-3' (SEQ ID NO. 9); 5'- СТААТСГССАТСТТССАГСА-3' (SEQ ID NO. 10)). Мессенджерную РНК (мРНК) получали *in vitro* аналогично примеру 25 и упаковали в ЛНЧ следующим образом: 300 мкл образца трансфекционного реагента **A28** и 120 мкг мРНК в 300 мкл 10 мМ цитратного буфера (pH 3,0) собирали в ЛНЧ с использованием микрофлюидного устройства аналогично примеру 25. Полученные мРНК-ЛНЧ немедленно разводили в 600 мкл ФСБ; в результате из трансфекционного реагента **A28** получали соответствующие наночастицы, обозначенные как **B39**. мРНК-ЛНЧ (**B39**) вводили внутривенно в концентрации от 0,5 мг мРНК/кг до 2,5 мг мРНК/кг в каждом случае 3 мышам с глобальным двойным Cre-репортером (Mazumdar, M.D.: *Genesis* **2007**, 45:593-605) (BIOCEV, Вестец), позволяющим анализировать успешную рекомбинацию. В клетках, в которые были успешно доставлены мРНК-ЛНЧ, несущие мРНК Cre-рекомбиназы, наблюдалась хромосомная рекомбинация и последующее вырезание гена мембранного красного белка (так называемый красный помидор) и "включение" транскрипции гена мембранного зеленого белка (GFP). Мышей, включая контрольных мышей, не содержащих микрочастиц, умерщвляли через 3 дня после применения микрочастиц, и все органы подвергали гистологическому анализу в соответствии со стандартным протоколом. Гистологические изображения показывают полное распределение частиц в печени, что привело к 30-50% превращению клеток, экспрессирующих красный мембранный белок, в клетки, экспрессирующие зеленый мембранный белок, через 3 дня после применения (фиг. 7). На фиг. 7 гистологические изображения печени показывают превращение клеток, экспрессирующих

мембранный красный белок, в клетки, экспрессирующие мембранный зеленый белок, через 3 дня после применения мРНК-ЛНЧ [2,5 мг/кг мРНК], кодирующих Cre-рекомбиназу (помеченную как “3 dpi mRNA-LNP”). "ФСБ-контроль" – инъекция только ФСБ.

## 5 Пример 39

### Стабильность новых мРНК-ЛНЧ и миРНК-ЛНЧ при 4 °С

Клеточную линию человека НЕК293Т культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% FBS при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2 мкл мРНК-ЛНЧ **B05**, полученного в примере 25 (конечная общая концентрация всех липидных компонентов в лунке составляла 20 мкМ), затем инкубировали в течение 24 часов. мРНК-ЛНЧ **B05** хранили при 4°C, процедуры трансфекции аналогичным образом повторяли через одну, три и пять недель после сборки. Процедуры трансфекции проводились в трех повторностях. Интенсивность флуоресценции mKate2 анализировали на цитофлуориметре BD LSR Fortessa.

15 Эффективность трансфекции новых мРНК-ЛНЧ (помеченных **B05**) осталась неизменной в течение по меньшей мере трех недель и снизилась до 81% по сравнению с 1-м днем при хранении при 4°C (табл. 21).

20 **Таблица 21.** Эффективность трансфекции мРНК-ЛНЧ **B05** при хранении при 4 °С для клеток НЕК293, выраженная как относительная интенсивность флуоресценции mKate2. Данные, нормализованные к интенсивности флуоресценции, измеренной на 1-й день после сборки. Пять недель спустя мРНК-ЛНЧ **B05** все еще сохраняли 81% эффективности трансфекции при хранении при 4°C.

Время	Флуоресценция mKate2		
1 день	1,00	±	0,17
1 неделя	1,14	±	0,26
3 недели	1,04	±	0,16
5 недель	0,81	±	0,11

25 миРНК-ЛНЧ (помеченные **B30** и **B40**), содержащие малую интерферирующую РНК (siRNA, каталожный номер 4392420, Ambion), вызывающую деградацию мРНК, кодирующую тирозил-ДНК фосфодиэстеразу 2 (TDP2), получали таким же образом, как описано в примере 33, и хранили при 4°C. миРНК-ЛНЧ **B40** были сформированы из трансфекционного реагента A29, 30 полученного в примере 24. Клетки НЕК293Т культивировали в 96-луночных планшетах ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали 2

мкл миРНК-ЛНЧ (с конечной общей концентрацией всех липидных компонентов 20 мкМ и конечной концентрацией миРНК 16 нМ), после чего инкубировали в течение 24 часов. Процедуры трансфекции проводились в трех повторностях. Выделение РНК, получение кДНК и кПЦР-РВ проводили, как описано в примере 33. Всю процедуру повторяли через один, два и три месяца после сборки ЛНЧ.

Эффективность трансфекции новых миРНК-ЛНЧ (помеченных **В30** и **В40**), выраженная в их способности снижать уровень мРНК TDP2 в клетках, осталась практически неизменной при хранении при 4 °С в течение трех месяцев (табл. 22).

**Таблица 22.** Относительный уровень мРНК TDP2 в клетках HEK293T после трансфекции миРНК-ЛНЧ при хранении при 4°С в соответствующие моменты времени.

Время	В30		В40	
1 день	0,0380 ±	0,0107	0,0336 ±	0,0079
1 месяц	0,0700 ±	0,0036	0,0817 ±	0,0100
2 месяца	0,0423 ±	0,0026	0,0492 ±	0,0037
3 месяца	0,0387 ±	0,0067	0,0646 ±	0,0164

#### Пример 40

##### **Трансфекция миРНК предварительно образованными пустыми ЛНЧ**

Трансфекционные реагенты **A28** и **A29** из примера 24 использовали для сборки пустых наночастиц **В41** и **В42** в цитратном буфере, за исключением нуклеиновой кислоты, аналогично примеру 25, без постдилюции. Один мкл ЛНЧ смешивали с 1 пмоль миРНК, нацеленной на TDP2, за 10 минут до трансфекции, аналогично рекомендациям для реагента Lipofectamine RNAiMax, и инкубировали при комнатной температуре. Клетки HEK293T и HepG2 ( $5 \times 10^4$  клеток в 100 мкл культуральной среды на лунку) трансфицировали смесью предварительно собранных ЛНЧ и миРНК и инкубировали в течение 24 часов. Процедуры трансфекции проводились в трех повторностях. В качестве контрольного трансфекционного реагента использовали Липофектамин RNAiMax. Предварительно собранные ЛНЧ, впоследствии смешанные с 1 пмоль миРНК, были способны осуществить нокдаун экспрессии мРНК TDP2 на 90-97%, что значительно лучше коммерческого реагента для трансфекции Липофектамина RNAiMax (табл. 23).

**Таблица 23.** Снижение уровней мРНК TDP2 в клетках с помощью предварительно собранных пустых ЛНЧ, смешанных с миРНК, нацеленной на TDP2, по сравнению с коммерческим реагентом для трансфекции RNAiMax. Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p относятся к контрольной трансфекции

Липофектамина RNAiMax, значения  $p < 0,001$  обозначены буквой “a”, значения  $p < 0,01$  обозначены буквой “b”.

ЛНЧ	НЕК293Т	p	HepG2	p
Контроль	1,00 ± 0,25		1,00 ± 0,08	
<b>B41</b>	0,03 ± 0,01	a	0,10 ± 0,03	b
<b>B42</b>	0,07 ± 0,01	b	0,08 ± 0,01	a
RNAiMax	0,12 ± 0,03	ab	0,18 ± 0,01	ab

#### Пример 41

#### 5 Трансфекция мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) миРНК-ЛНЧ и оценка цитокинового ответа

Реагент для трансфекции **A28** из примера 24 использовали для образования миРНК-ЛНЧ, обозначенной как **B43**, содержащей миРНК, вызывающей деградацию мРНК, кодирующей Поли(У)-связывающий фактор сплайсинга (PUF60). миРНК-ЛНЧ получали аналогично

10 примеру 33. В качестве контрольного трансфекционного реагента использовали Липофектамин RNAiMax. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от 3 анонимных доноров крови (договор № 13/06/2012 этического комитета Института гематологии и переливания

15 крови, Прага, Чешская Республика) выделяли в градиенте фикола (Ficoll® Paque Plus, 17-1440-02, GE Healthcare) и культивировали в среде RPMI с добавлением 10% FBS и 50 ед/мл пенициллина/стрептомицина. Клетки высевали в количестве  $10^5$  клеток на 100 мкл (всего 200 мкл) в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C. Систему ON-target plus SmartPool siRNA, нацеленную на PUF60, приобрели у Dharmascon (каталожный номер: L-012505-01-0005 ; Илькирш, Франция) и повторно суспендировали в воде при 20 пмоль/мкл. Использовали

20 конечные концентрации 1 пмоль или 10 пмоль. Каждое условие выполняли в трех повторностях. Через 24 часа после трансфекции клетки собирали, включая супернатант. Общую РНК экстрагировали при помощи набора для экстракции РНК Nucleospin (Macherey Nagel) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 500 нг РНК. Количественную ОТ-ПЦР проводили в LightCycler 480 (Roche Life Science) в двух повторностях с использованием смеси SYBERGREEN.

25 Использовали следующие праймеры для амплификации PUF60: 5'-ССТТСААССГСАТСТАСГТГ-3 (SEQ ID NO. 7) и 5'-СТГГГССТТСТСГТАСТСАА-3 (SEQ ID NO. 8). Для нормализации данных использовали RPLP0 (праймеры: 5'-САССАТТГАААТССТГАТГАТГ-3 (SEQ NO. 9) и 5'-ТГАССАГСССАААГГАГААГ-3 (SEQ NO. 10)). Количества общего IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , продуцируемых PBMC после трансфекций,

30 измеряли в бесклеточных супернатантах с использованием наборов для ИФА (набор Human IFN- $\alpha$  ELISABASIC (HRP), 3425-1H-20, Mabtech и набор Human IFN- $\lambda$ 1 ELISABASIC, 3570-1H-

20, Mabtech). В качестве положительного контроля использовали 24-часовую обработку PBMC 1 мкМ CpG ODN 2216 Class A (Invivogen).

Во всех случаях миРНК-ЛНЧ снижали уровень мРНК PUF60 в клетках PBMC (табл. 24) без усиления цитокинового ответа в отличие от RNAiMax (табл. 25 и табл. 26).

5

**Таблица 24.** Снижение уровней эндогенно экспрессируемой мРНК PUF60 в PBMC новыми миРНК-ЛНЧ (**В43**) по сравнению с реагентом для трансфекции RNAiMax и по сравнению с необработанными клетками.

ЛНЧ	Донор 1	Донор 2	Донор 3
Необработанные	1,00 ± 0,23	1,00 ± 0,34	1,00 ± 0,18
<b>В43</b> [1 пмоль миРНК]	0,55 ± 0,04	0,12 ± 0,20	0,65 ± 0,32
<b>В43</b> [10 пмоль миРНК]	0,40 ± 0,14	0,50 ± 0,02	0,07 ± 0,03
RNAiMax [1 пмоль миРНК]	0,51 ± 0,08	1,15 ± 0,01	0,62 ± 0,40
RNAiMax [10 пмоль миРНК]	0,21 ± 0,20	0,29 ± 0,30	0,22 ± 0,10

10 **Таблица 25.** IFN- $\alpha$ -ответ PBMC после обработки миРНК-ЛНЧ по сравнению с RNAiMax.

ЛНЧ	Донор 1	Донор 2	Донор 3
Необработанные	2,38 ± 2,06	0,44 ± 0,56	0,00 ± 0,00
Положительный контроль	533 ± 13	661 ± 58	2265 ± 29
<b>В43</b> [1 пмоль миРНК]	0,00 ± 0,00	1,52 ± 1,54	0,00 ± 0,00
<b>В43</b> [10 пмоль миРНК]	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	16,8 ± 20,1
RNAiMax [1 пмоль миРНК]	0,00 ± 0,00	6,05 ± 8,58	0,65 ± 1,12
RNAiMax [10 пмоль миРНК]	433 ± 251	1814 ± 243	1951 ± 31

**Таблица 26.** IFN- $\lambda$ -ответ PBMC после обработки миРНК-ЛНЧ по сравнению с RNAiMax.

ЛНЧ	Донор 1	Донор 2	Донор 3
Необработанные	2,49 ± 2,34	2,99 ± 2,75	37,9 ± 7,4
Положительный контроль	713 ± 67	1765 ± 180	1000 ± 52
<b>В43</b> [1 пмоль миРНК]	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	20,4 ± 2,7
<b>В43</b> [10 пмоль миРНК]	11,7 ± 20,2	0,00 ± 0,00	40,7 ± 4,2

RNAiMax [1 пмоль миРНК]	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	44,5 ± 13,2
RNAiMax [10 пмоль миРНК]	28,7 ± 49,8	100 ± 59	706 ± 188

#### Пример 42

##### Эффективность миРНК-ЛНЧ *in vivo*

Реагент для трансфекции **A29** из примера 24 использовали для образования миРНК-ЛНЧ, обозначенных как **B44**, с миРНК, нацеленной на ген мышиноного аполипопротеина В (АроВ) — экспрессируемый гепатоцитами ген, участвующий в транспорте холестерина (АроВ) (кат. № 238055 АроВ mouse siPOOL-40 kit, siTOOLS Biotech GmbH), и альтернативно миРНК-ЛНЧ (**B45**) с контрольными ненаправленными миРНК-ЛНЧ (входят в набор 238055 АроВ mouse siPOOL-40 kit, siTOOLS Biotech GmbH), сборка которых осуществлялась, как описано в примере 33. миРНК-ЛНЧ подвергали диализу против ФСБ. Уровень эндотоксина составлял < 2 ЕЭ/мл. Мышей не кормили в течение 4 часов перед сбором плазмы с помощью ретро-орбитального кровотоечения. миРНК-ЛНЧ, нацеленные на АроВ, вводили внутривенно 5 мышам C57B1/6 (BIOCEV, Чешский центр феногеномики, Вестец) в концентрации 32 мкг миРНК и 16 мкг миРНК, соответственно, причем контрольным 5 мышам вводили 32 мкг не нацеленных миРНК-ЛНЧ, а другим 5 мышам вводили ФСБ в качестве контроля. Всех мышей умерщвляли через 2 дня после применения ЛНЧ. Уровни холестерина, триглицеридов и Х-ЛПНП в плазме крови измеряли с помощью автоматизированных систем в Чешском центре феногеномики в соответствии со стандартизированным протоколом.

Клинический биохимия маркеров в плазме крови, таких как общий холестерин, триглицериды и Х-ЛПНП, на которые повлиял нокдаун АроВ, показала их значительное снижение по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует об эффективной доставке миРНК АроВ новыми ЛНЧ в печень (табл. 27).

**Таблица 27.** Клиническая биохимия маркеров в плазме крови, указывающая на эффективный нокдаун АроВ в печени. Статистические данные оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Значения p1 всегда относятся к контрольным мышам, которым вводили ФСБ; значения p2 всегда относятся к мышам, которым вводили ЛНЧ **B45** с контрольной ненаправленной миРНК; значения p < 0,001 отмечены буквой "a", p < 0,01 отмечены буквой "b".

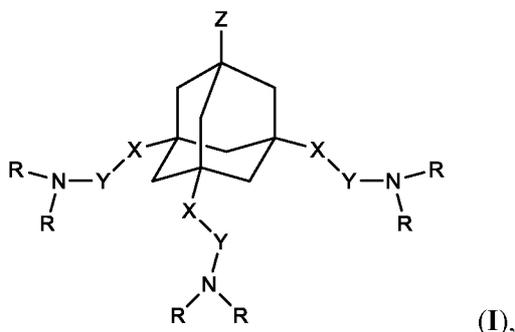
ЛНЧ	Общий холестерин		p1	p2	Триглицериды		p1	p2	Х-ЛПНП		p1	p2
Контроль	1,99 ±	0,34	a		0,46 ±	0,12	ab		0,39 ±	0,04	a	
<b>B44</b> [16 мкг]	0,43 ±	0,18	a	a	0,18 ±	0,03	a	a	0,15 ±	0,05	a	a
<b>B44</b> [32 мкг]	0,35 ±	0,13	a	a	0,19 ±	0,03	b	a	0,13 ±	0,03	a	a
<b>B45</b> [32 мкг]	2,58 ±	0,61		a	0,53 ±	0,04		a	0,84 ±	0,12		a

Пример 43**Эффективность нуклеозид-модифицированных мРНК-ЛНЧ *in vivo***

Ген, кодирующий белок CRE-рекомбиназы, амплифицировали из плазмиды pCAG-Cre-IRES2-GFP (Addgene, кат. № 26646, предоставлен Анджен Ченн (Anjen Chenn)) с использованием праймеров: (5'- ТААТАСГАСТСАСТАТАГААТТТАСТ-3' (SEQ ID NO. 9); 5'-СТААТСГССАТСТТССАГСА-3' (SEQ ID NO. 10)). Мессенджерную РНК (мРНК) получали *in vitro* аналогично примеру 25, за исключением того, что ЦТФ полностью заменяли на 5-Метил-СТР (NU-1138L, Biogen Praha s.r.o.), а УТФ полностью заменяли на N1-Метилпсевдо-УТР (NU-890L, Biogen Praha s.r.o.) и упаковывали в ЛНЧ следующим образом: 300 мкл образца трансфекционного реагента **A28** и 120 мкг мРНК в 300 мкл 10 мМ цитратного буфера (рН 3,0) собирали в ЛНЧ с использованием микрофлюидного устройства аналогично примеру 25. Полученные мРНК-ЛНЧ немедленно разводили в 600 мкл ФСБ; в результате из реагента для трансфекции **A28** были образованы соответствующие наночастицы, помеченные **B46**. мРНК-ЛНЧ (**B46**) вводили внутривенно в концентрации от 0,5 мг мРНК/кг до 2,5 мг мРНК/кг в каждом случае 3 мышам с глобальным двойным Cre-репортером (Mazumdar, M.D.: *Genesis* **2007**, 45:593-605) (BIOCEV, Вестец), позволяющий анализировать успешную рекомбинацию. В клетках, в которые были успешно доставлены мРНК-ЛНЧ, несущие мРНК Cre-рекомбиназы, наблюдали хромосомную рекомбинацию и последующее вырезание гена мембранного красного белка (так называемый красный помидор) и "включение" транскрипции гена мембранного зеленого белка (GFP). Мышей, включая контрольных мышей, не содержащих микрочастиц, умерщвляли через 3 дня после применения микрочастиц, и все органы подвергали гистологическому анализу в соответствии со стандартным протоколом. На гистологических изображениях показано полное распределение частиц в печени, что привело к 35-75% превращению клеток, экспрессирующих мембранный красный белок, в клетки, экспрессирующие мембранный зеленый белок, через 3 дня после применения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

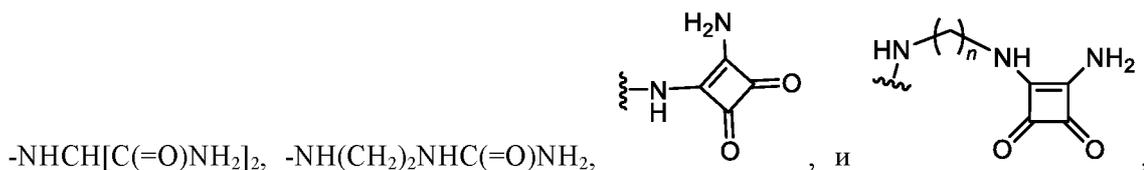
## 1. Липидоиды общей формулы I



- 5 где X выбирают из группы, состоящей из  $-C(=O)NH-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-C(=S)O-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-C(=S)S-$ ,  $-C(=O)NHNH-$ ,  $-CH_2-$ ,  $-O-$ ,  $-OC(=O)-$ ,  $-S-$ ,  $-SC(=O)-$ ,  $-NH-$ ,  $-NHNH-$ ,  $-NHC(=O)-$ ,  $-NHNHC(=O)-$ ,  $-C\equiv C-$ ,  $-CH=CH-$ , пятичленного гетероцикла, содержащего по меньшей мере 2 атома азота,  $-CH_2C(=O)NH-$ ,  $-CH_2C(=O)O-$ ,  $-CH_2C(=S)O-$ ,  $-CH_2C(=S)S-$ ,  $-CH_2C(=O)NHNH-$ ,  $-N=CH-$  и  $-CH=N-$ ;

Y независимо выбирают из группы, состоящей из алифатических цепей  $C_2-C_{10}$ , при этом в указанной алифатической цепи одна или несколько  $-CH_2-$  групп могут быть необязательно заменены на один или несколько атомов O или S;

- Z выбирают из группы, содержащей водород,  $-OH$ ,  $-CH_2OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_3-SO_3^-$ ,  $-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-COO^-$  и  $-NHCH_3$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-N^+(CH_3)_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$ ,  $-C(=O)R^1$ , при этом  $R^1$  выбирается из  $-NH_2$ ,  $-NH(CH_2)_nOH$ ,  $-N[(CH_2)_nOH]_2$ ,  $-NHCH(CH_2OH)_2$ ,  $-NHCH_2CH(OH)CH_2OH$ ,  $-NH(CH_2)_nC(=O)NH_2$ ,  $-N[CH_2C(=O)NH_2]_2$ ,



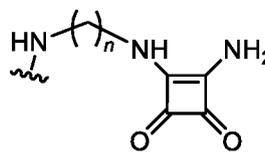
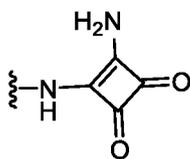
где  $n$  представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 2 до 5;

- 20 и R одинаковы или отличаются друг от друга, причем каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из алкила  $C_8-C_{20}$ , алкенила  $C_8-C_{20}$  и алкинила  $C_8-C_{20}$ , при этом в указанном алкиле, алкениле или алкиниле одна или более  $-CH_2-$  групп могут быть необязательно заменены на одну или несколько групп, выбранных из  $-CH(OH)-$ ,  $-OC(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-S-S-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NHC(=O)-$ ,  $-O-$  и  $-S-$ ;
- 25 и их фармацевтически приемлемые соли, соли присоединения и сольваты.

2. Липидоид по п.1, отличающийся тем, что Z выбирают из группы, состоящей из водорода, -OH, -CH<sub>2</sub>OH, -NH<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup> и -C(=O)R<sup>1</sup>,

при этом R<sup>1</sup> выбирают из -NH<sub>2</sub>, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH, -N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH]<sub>2</sub>, -NHCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>,

-NHCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>, -N[CH<sub>2</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, -NHCH[C(=O)NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>,



5 -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(=O)NH<sub>2</sub>, , и , где n представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 2 до 5.

3. Липидоид по пп.1 или 2, отличающийся тем, что X выбирают из -C(=O)NH-, пятичленного гетероцикла, содержащего по меньшей мере 2 атома азота, или -C(=O)O-.

10

4. Липидоид по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что R независимо выбирают из группы, состоящей из C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкила, C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкенила и C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> алкинила, при этом в указанных алкиле, алкениле или алкиниле одна или несколько -CH<sub>2</sub>- групп могут быть необязательно заменены на одну или несколько групп, выбранных из -CH(OH)-, -OC(=O)- и -C(=O)O-.

15

5. Липидоид по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что все R в молекуле одинаковы, или все атомы азота в молекуле одинаковым образом замещены двумя одинаковыми R или двумя разными R.

20

6. Трансфекционный агент, отличающийся тем, что он содержит по меньшей мере один липидоид общей формулы I по любому из пп. 1-5 в количестве от 10 до 50 мол. % и по меньшей мере один хелперный липид в общем количестве от 50 до 90 мол. %.

25 7. Трансфекционный агент по п. 6, отличающийся тем, что он содержит по меньшей мере один липидоид общей формулы I по любому из пп. 1-5 в количестве от 15 до 30 мол. %, холестерин в количестве от 30 до 55 мол. % и по меньшей мере один дополнительный хелперный липид в количестве от 20 до 50 мол. %.

30 8. Трансфекционная частица, отличающаяся тем, что она содержит по меньшей мере один липидоид общей формулы I по любому из пп. 1-5, по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту и/или ее часть и/или производное нуклеиновой кислоты и предпочтительно также по меньшей мере один хелперный липид.

9. Применение липидоида общей формулы I по любому из пп. 1-5, или трансфекционного агента по пп. 6 или 7, или трансфекционной частицы по п. 8 для трансфекции клеток или тканей *in vitro* нуклеиновой кислотой и/или ее частью и/или производной нуклеиновой кислоты.

5

10. Применение по п. 9, отличающееся тем, что оно предназначено для подавления или активации хромосомного(-ых) гена(-ов), подавления или активации иммуногенов, ингибирования или активации сигнальных путей, редактирования генома или транскриптома или обеспечения экспрессии белка(-ов), кодируемого(-ых) нуклеиновой кислотой.

10

11. Липидоид формулы I по любому из пп. 1-5, или трансфекционный агент по пп. 6 или 7, или трансфекционная частица по п. 8, для применения в трансфекции клеток или тканей нуклеиновой кислотой и/или ее частью и/или производным нуклеиновой кислоты *in vivo*, предпочтительно за исключением трансфекции человеческих эмбрионов для промышленного или коммерческого использования и за исключением модификации зародышевой линии человека.

15

12. Липидоид формулы I по любому из пп. 1-5, или трансфекционный агент по пп. 6 или 7, или трансфекционная частица по п. 8 для применения по п. 11 для подавления или активации хромосомного(-ых) гена(-ов), подавления или активации иммуногенов, ингибирования или активации сигнальных путей, редактирования генома или транскриптома или обеспечения экспрессии белка(-ов), кодируемого(-ых) нуклеиновой кислотой.

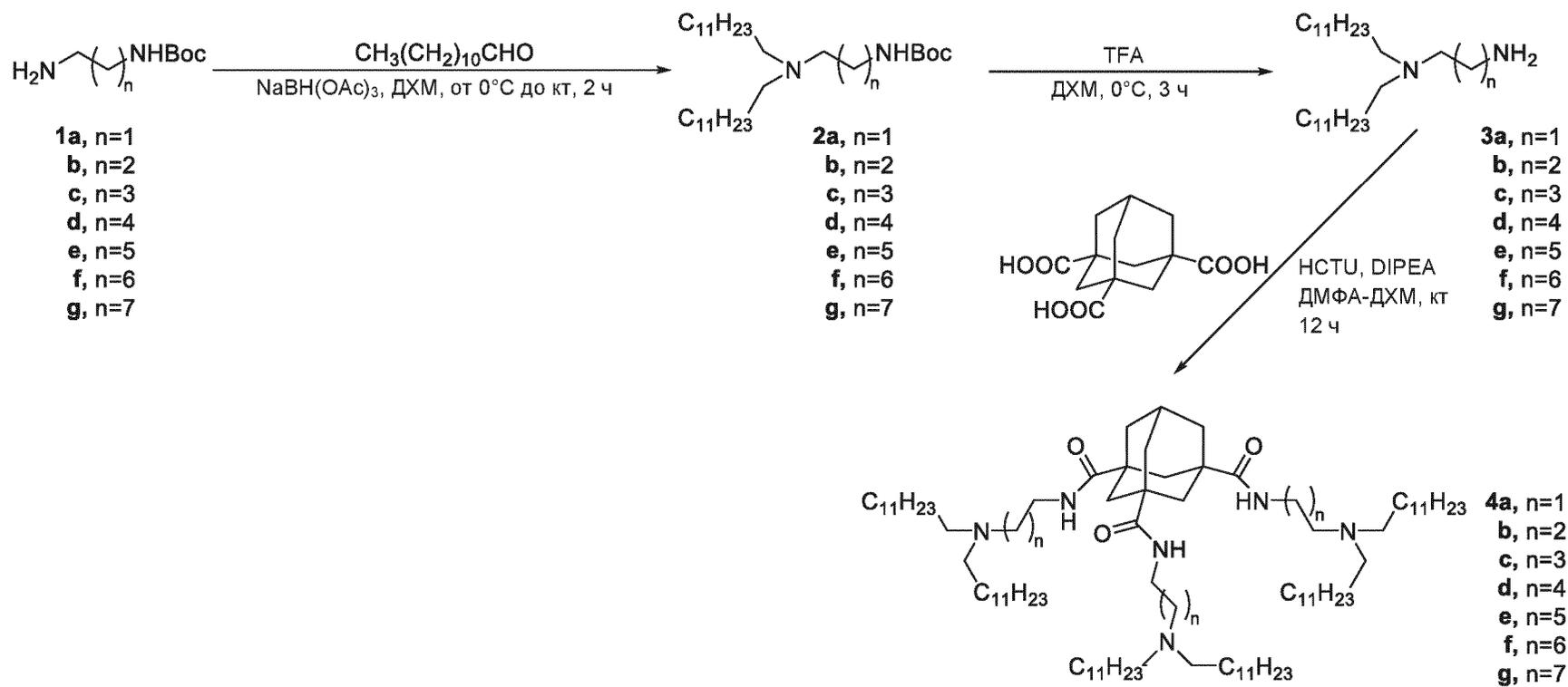
20

13. Липидоид формулы I по любому из пп. 1-5, или трансфекционного агента по пп. 6 или 7, или трансфекционной частицы по п. 8 для применения в качестве лекарственного средства, в частности для генной терапии, предпочтительно для лечения злокачественных новообразований и/или генетических нарушений.

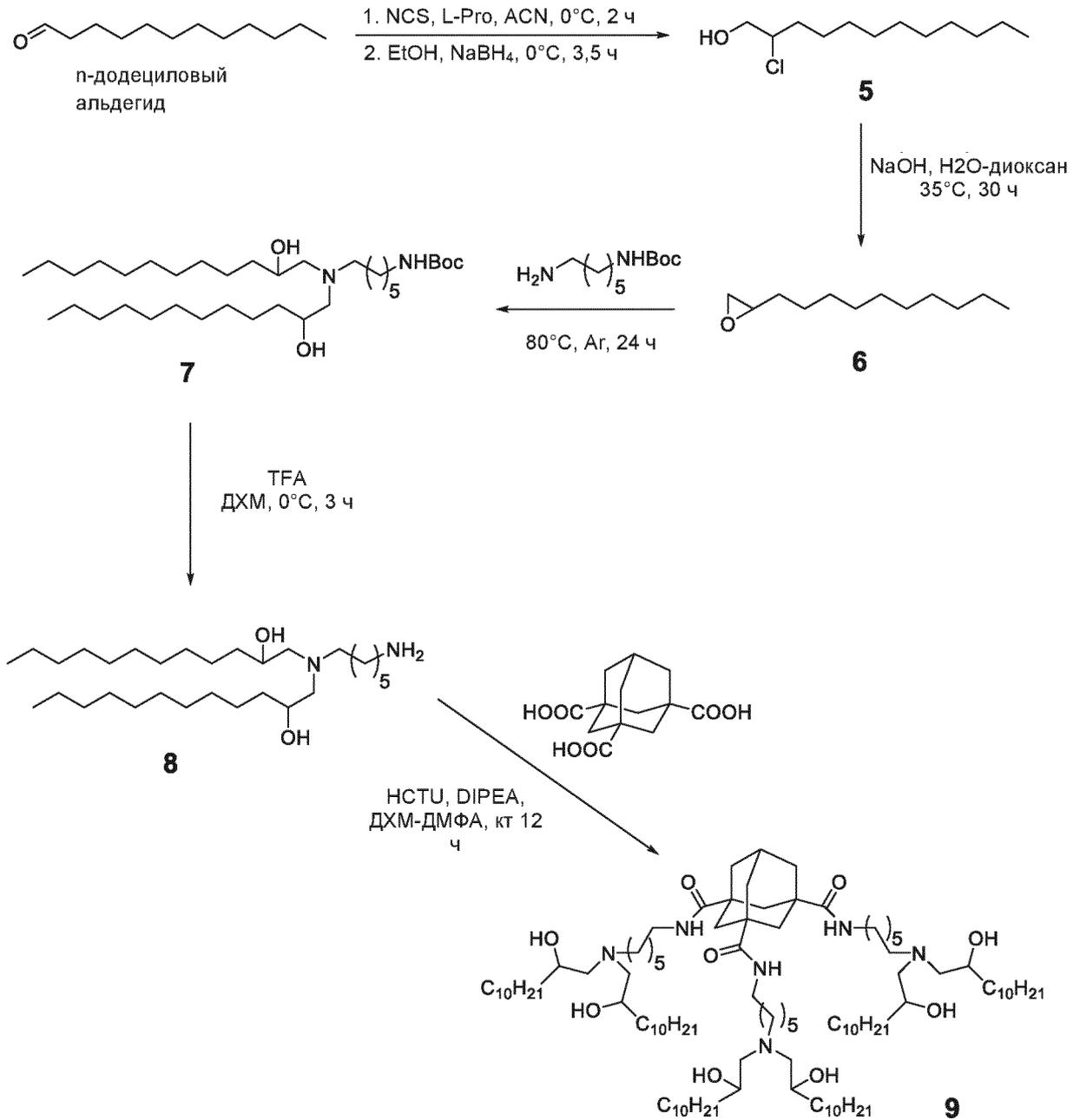
25

14. Применение липидоида общей формулы I по любому из пп. 1-5, или трансфекционного агента по пп. 6 или 7, или трансфекционной частицы по п. 8 в косметических препаратах для доставки активного ингредиента к месту приложения действия.

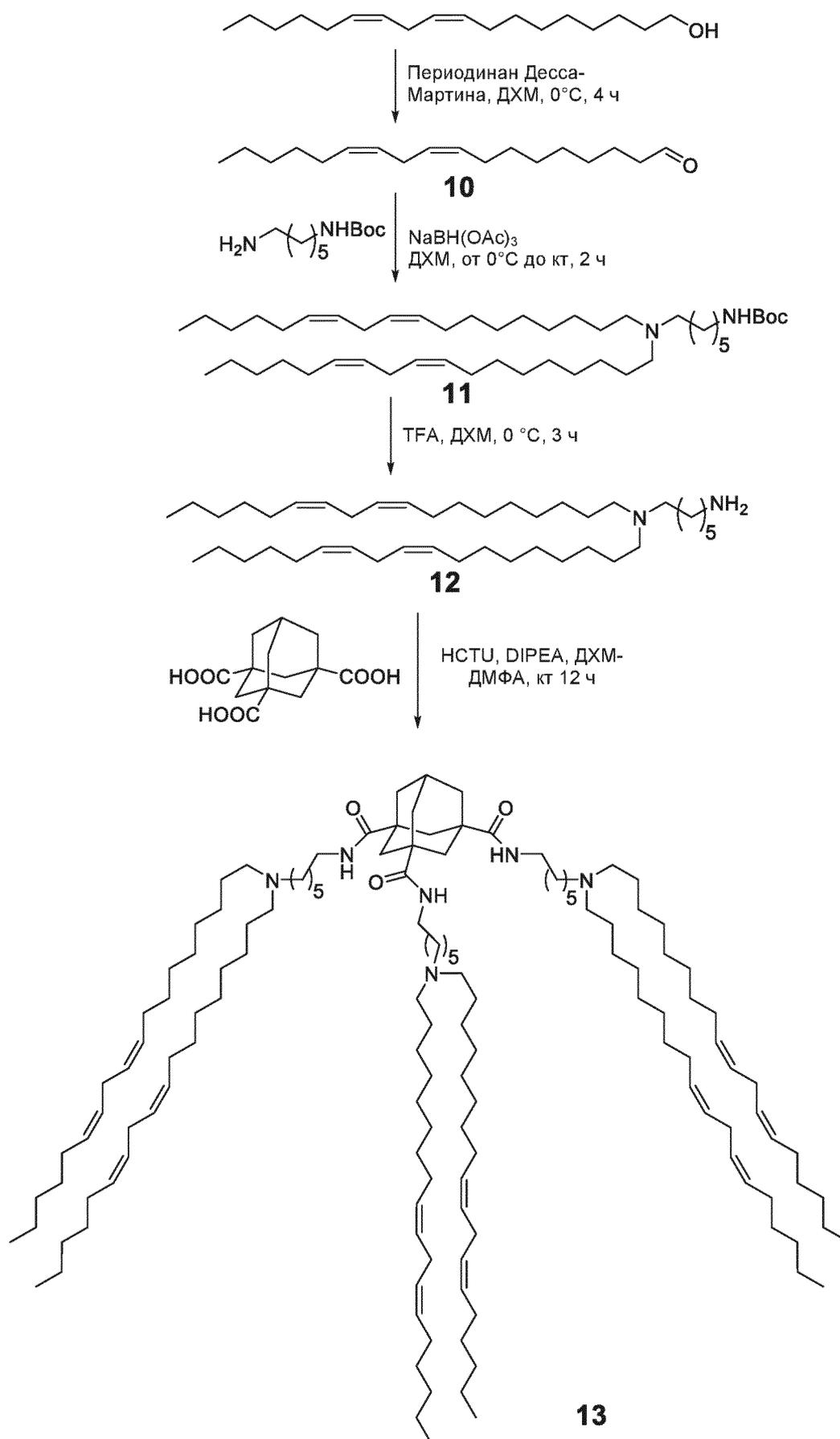
30



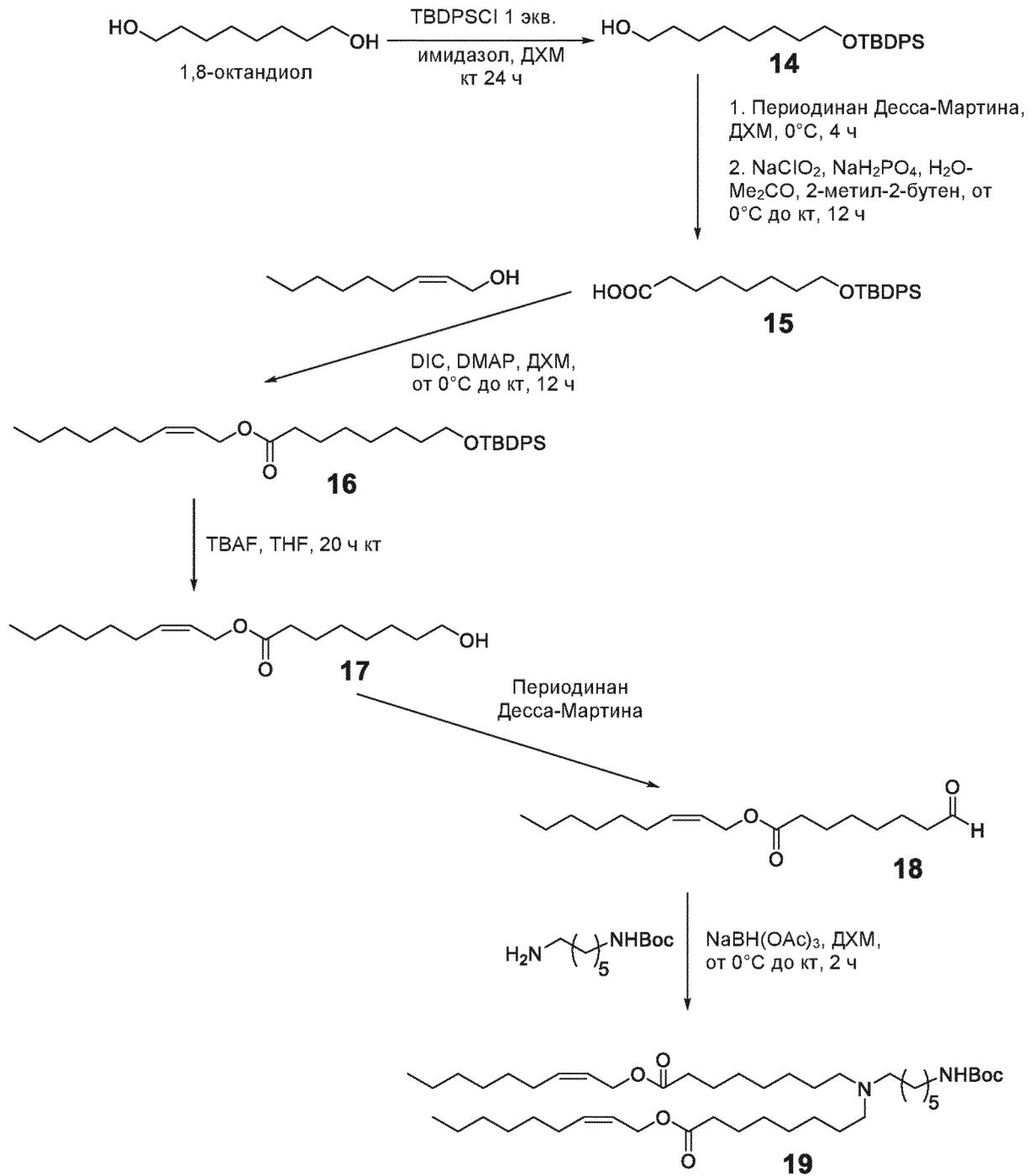
Фиг. 1



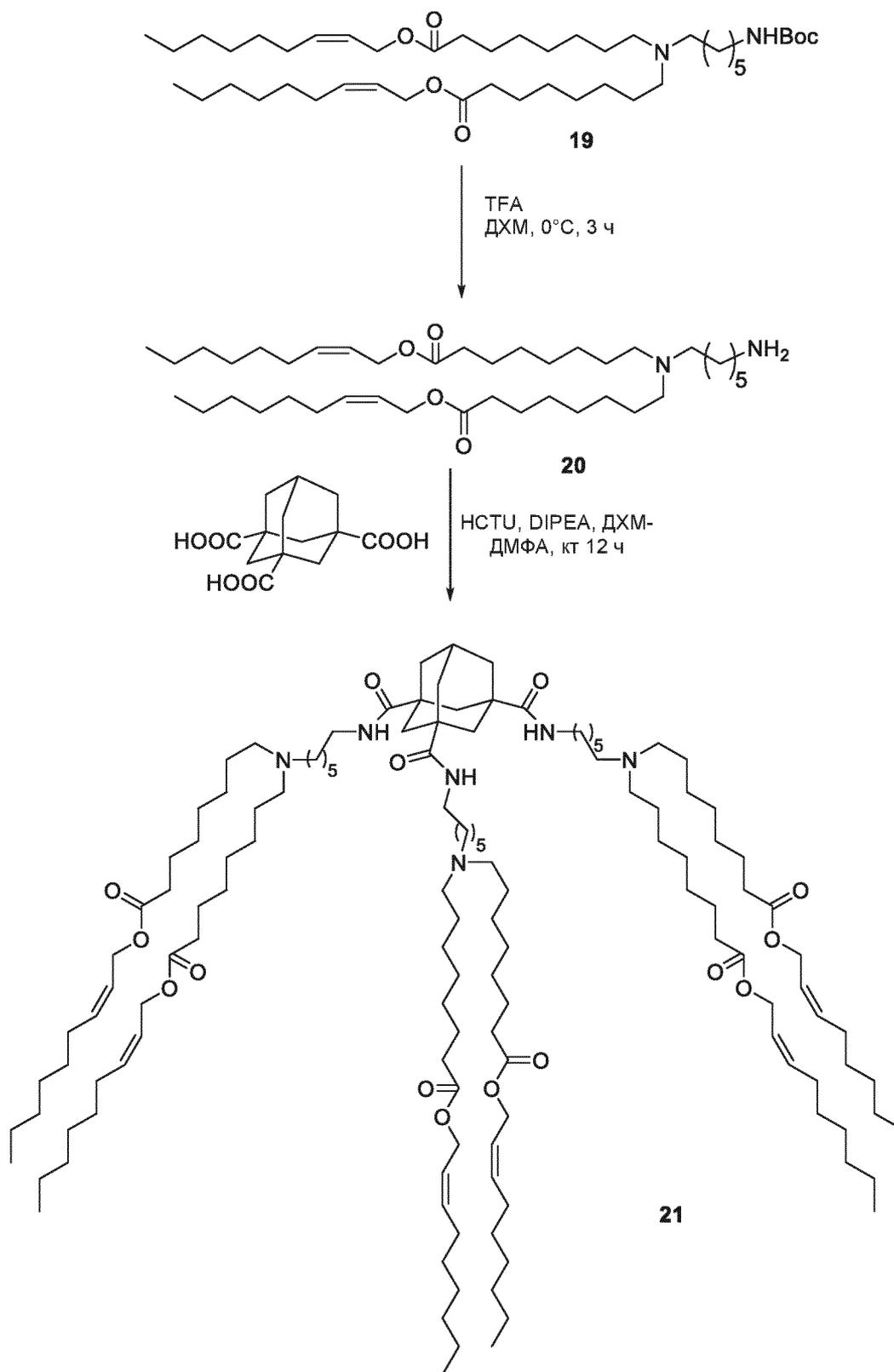
Фиг. 2



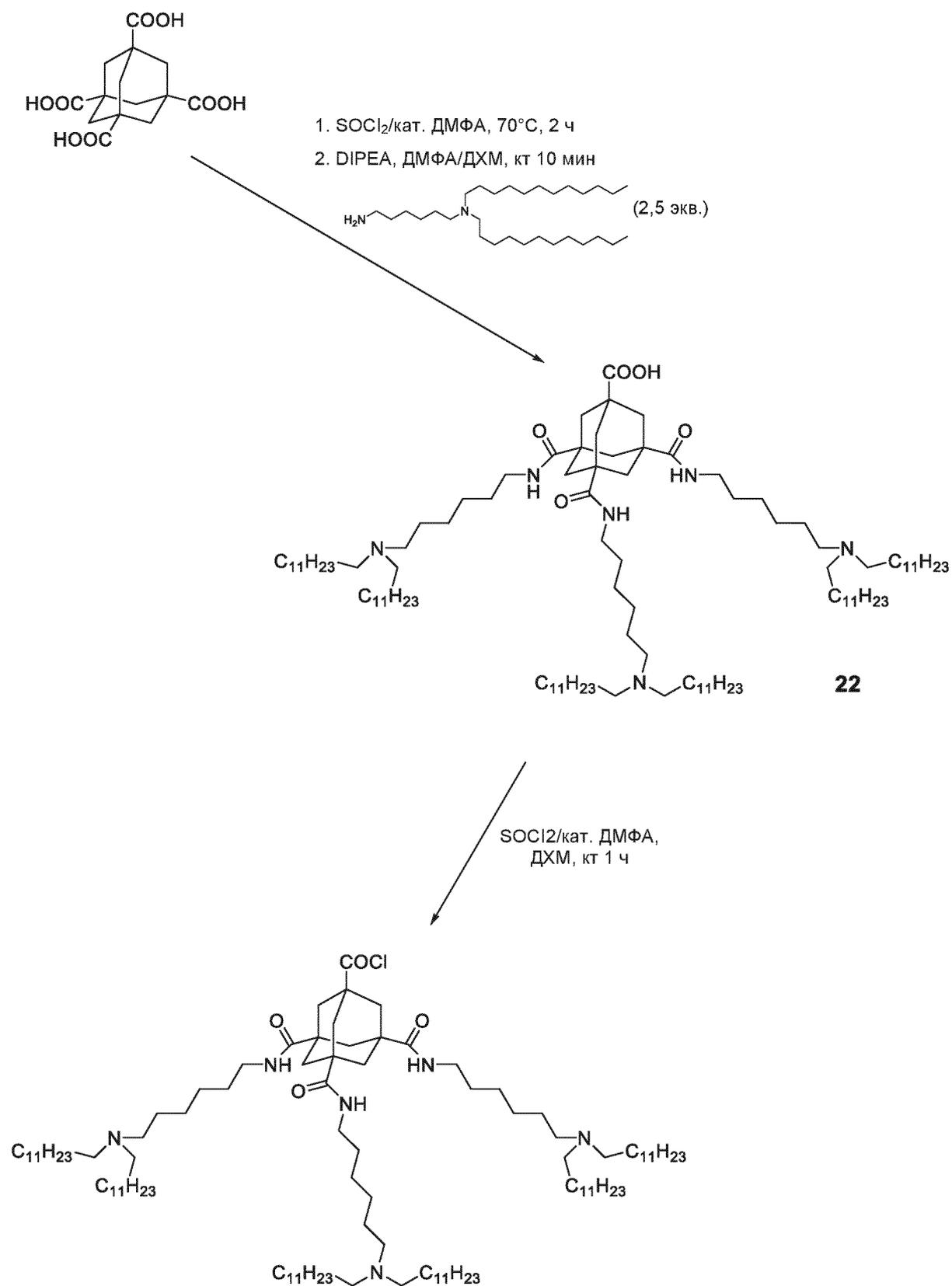
Фиг. 3



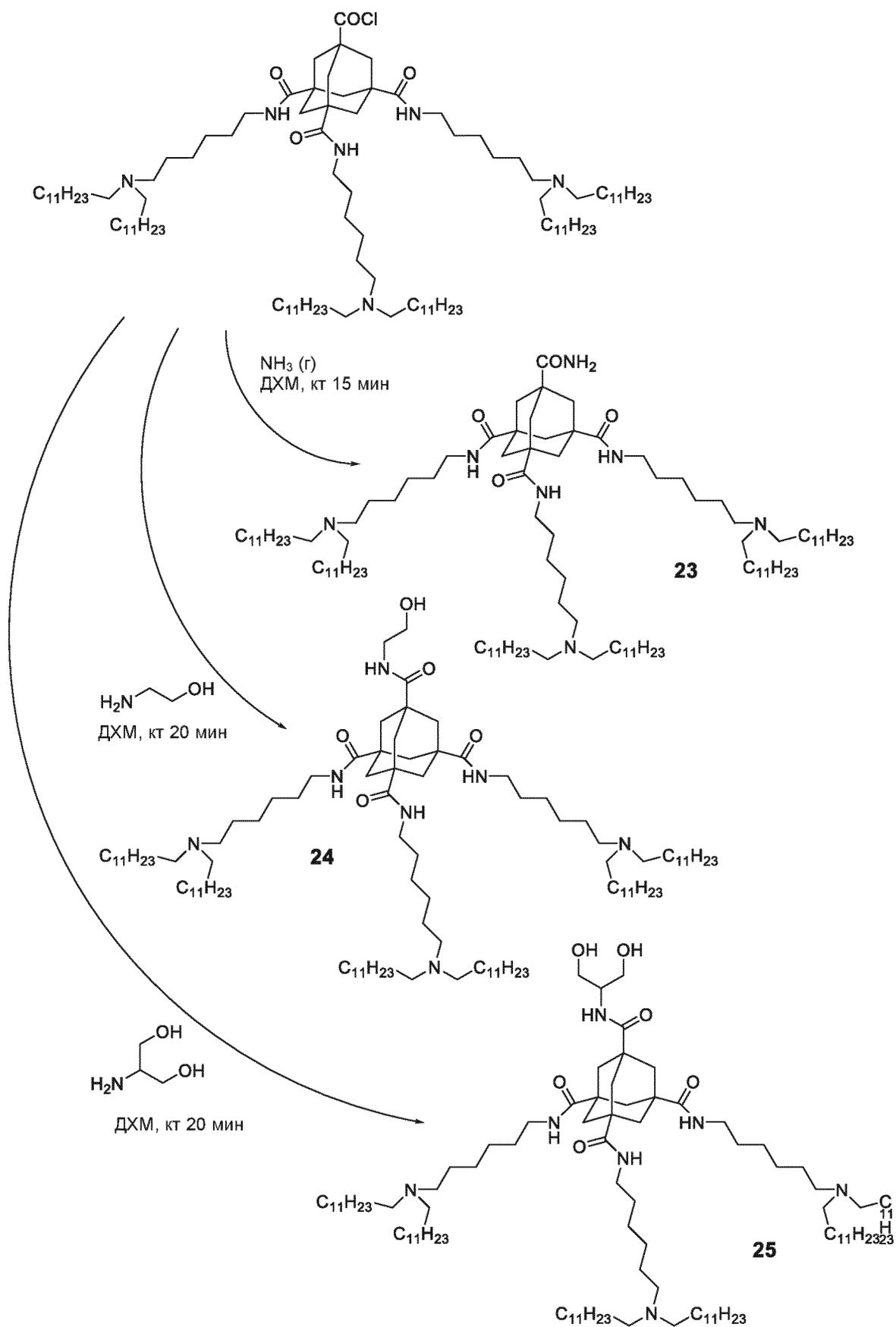
Фиг. 4



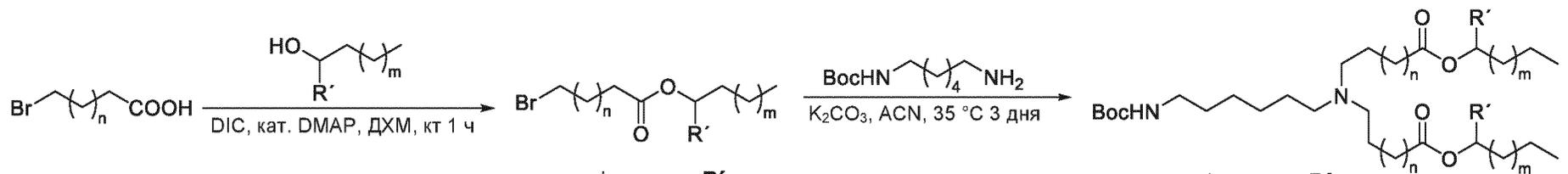
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

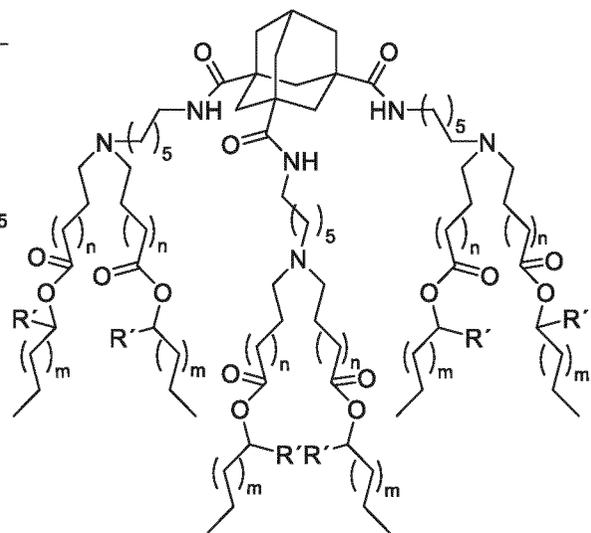


	n	m	R'
<b>26a</b>	2	4	H
<b>b</b>	3	3	H
<b>c</b>	2	6	H
<b>d</b>	3	5	H
<b>e</b>	4	4	H
<b>f</b>	3	4	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

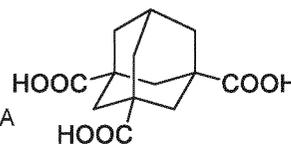
	n	m	R'
<b>27a</b>	2	4	H
<b>b</b>	3	3	H
<b>c</b>	2	6	H
<b>d</b>	3	5	H
<b>e</b>	4	4	H
<b>f</b>	3	4	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

TFA  
ДХМ, 0 °С 3 ч

	n	m	R'
<b>29a</b>	2	4	H
<b>b</b>	3	3	H
<b>c</b>	2	6	H
<b>d</b>	3	5	H
<b>e</b>	4	4	H
<b>f</b>	3	4	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>



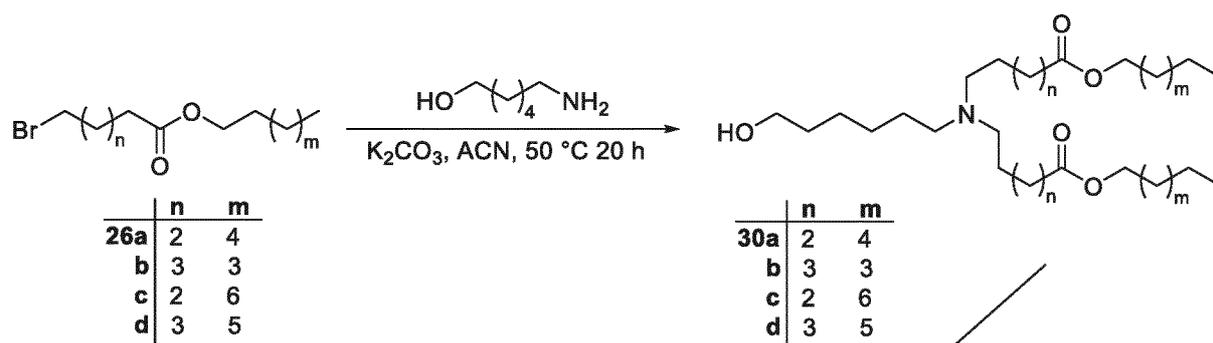
1. SOCl<sub>2</sub>/кат. ДМФА  
70 °С, 1 ч



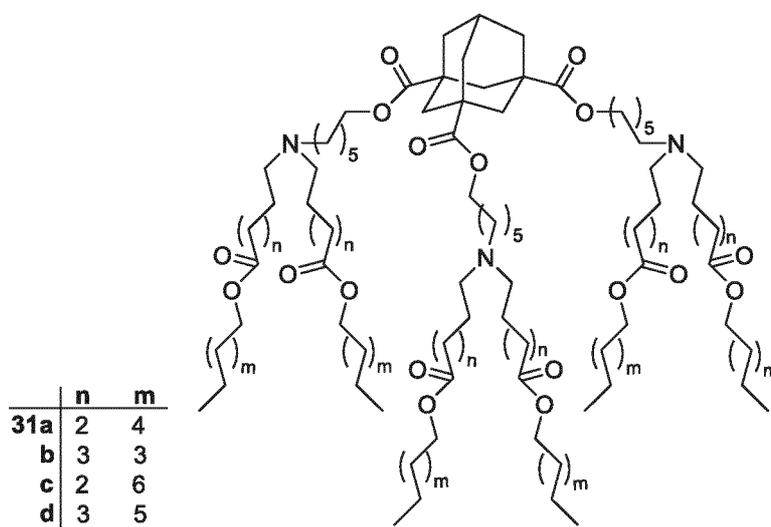
2. 28a-f, DIPEA  
ДМФА/ДХМ, кт 10 мин

	n	m	R'
<b>28a</b>	2	4	H
<b>b</b>	3	3	H
<b>c</b>	2	6	H
<b>d</b>	3	5	H
<b>e</b>	4	4	H
<b>f</b>	3	4	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

Фиг. 8

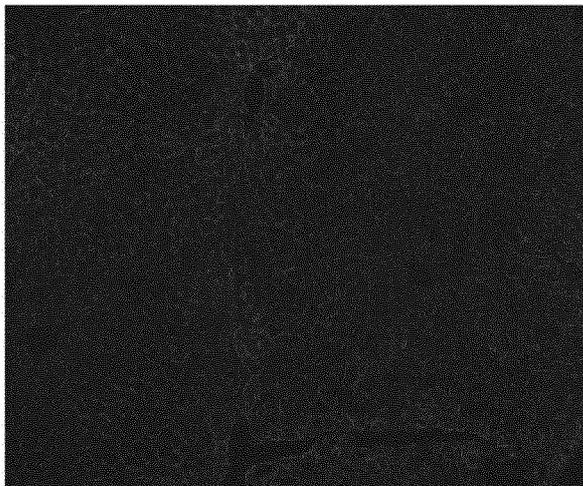


адамантан-1,3,5-трикарбоновая  
 кислота, TFFH, DIPEA, DMAP,  
 ДМФА, кт 14 ч

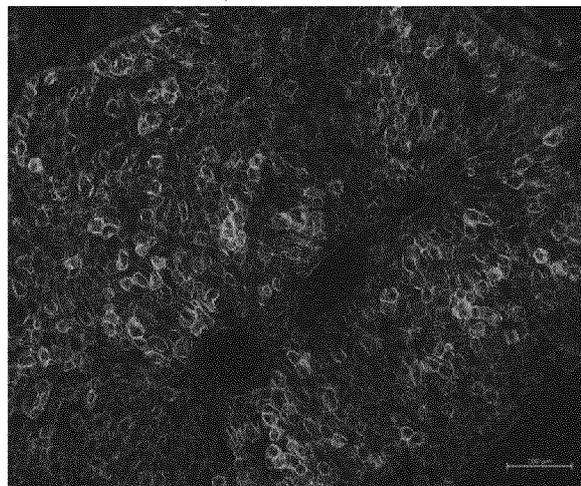


Фиг. 9

ФСБ-контроль



3 dpi мРНК-ЛНЧ



Фиг. 10